

АНАЛИЗ ЭФФЕКТИВНОСТИ CRISPR/CAS9-РЕДАКТИРОВАНИЯ РИБОНУКЛЕОПРОТЕИДНЫМИ КОМПЛЕКСАМИ ГЕНА *GEX2* В ПРОТОПЛАСТАХ КУКУРУЗЫ

© 2024 г. Е. М. Моисеева¹, В. В. Фадеев^{1,2}, Ю. В. Фадеева^{1,2}, Ю. С. Гусев^{1,2}, М. И. Чумаков^{1,*}

¹Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов, Федеральный исследовательский центр

“Саратовский научный центр Российской академии наук”, Саратов, 410049 Россия

²Саратовский национальный исследовательский государственный университет

им. Н.Г. Чернышевского, Саратов, 410012 Россия

*e-mail: chumakov_m@ibppm.ru

Поступила в редакцию 24.11.2023 г.

После доработки 28.12.2023 г.

Принята к публикации 29.12.2023 г.

Белок GEX2 экспрессируется в мембранах гамет кукурузы и необходим при оплодотворении на этапе контакта (адгезии) мембран гамет. Нокаутирование этого гена, предположительно, может привести к нарушению оплодотворения и, как следствие, образованию матроклиных гаплоидных зародышей кукурузы. Целью исследования является анализ эффективности редактирования гена *GEX2* после ПЭГ-опосредованной трансфекции протопластов кукурузы рибонуклеопротеидными (РНП) комплексами с разными гидРНК. Впервые созданы конструкции для CRISPR/Cas9-редактирования гена *GEX2* кукурузы, эффективность которых доказана на протопластах и достигает 10,7%, в зависимости от подобранной гидРНК, соотношения и количества компонентов в РНП-комплексах.

Ключевые слова: *Zea mays*, гаметы, протопласты, CRISPR-Cas9-редактирование, гидРНК.

DOI: 10.31857/S0016675824060114 **EDN:** BXNSRT

Кукуруза (*Zea mays* L.) — одна из наиболее распространенных сельскохозяйственных культур, производство которой в мире во втором десятилетии XXI века выросло более чем в полтора раза по сравнению с 2010 г., а в России с 1985 по 2018 гг. сбор зерна увеличился в девять раз [1]. Исследование явления гиногенеза у кукурузы представляет научный и практический интерес в связи с разработкой эффективных методов получения гаплоидов, необходимых в частности для ускоренного создания гомозиготных линий. У современных сортов кукурузы гиногенез встречается крайне редко (0.01–0.1%) [2, 3]. Обычно для селекции гомозиготных линий кукурузы, необходимо около шести–восьми поколений, для более быстрого их получения используют в качестве опылителей так называемые линии-гаплоиндукторы, при опылении пылью которых в потомстве возникают гаплоидные растения в десятки, сотни раз чаще, по сравнению с нормой.

При двойном оплодотворении у покрытосеменных растений из оплодотворенной яйцеклетки развивается диплоидный зародыш. Центральная клетка с двумя полярными ядрами (2n) в результате

слияния со вторым спермием (1n) образует триплоидный эндосперм (3n). При нарушении оплодотворения яйцеклетки у покрытосеменных растений может формироваться гаплоидный зародыш (1n). Одним из механизмов его образования является гиногенез, при котором после проникновения спермия в яйцеклетку их ядра не сливаются, и в последующем развитии участвует только ядро яйцеклетки [4].

За последние 5–7 лет были открыты несколько генов кукурузы, экспрессия которых приводит к развитию в потомстве матроклиных гаплоидов [4]. В 2016 г. был описан ген *CENH3*, влияющий на расхождение хромосом [5]. Нарушения расхождения хромосом в анафазе митоза могут приводить к полной элиминации хромосом отцовского родителя и образованию гаплоидных зародышей. В 2017 г. тремя независимыми научными группами у линии кукурузы Stock 6 был открыт ген гиногенеза, получивший разные названия — *MATRILINEAL* (*MTL*) [6], *NOT LIKE DAD* (*NLD*) [7], *PLA1* [8]. Мы предположили [9], что мутация по гену кукурузы *MTL/NLD/PLA1*, кодирующему фермент фосфолипазу, может привести к изменениям в составе

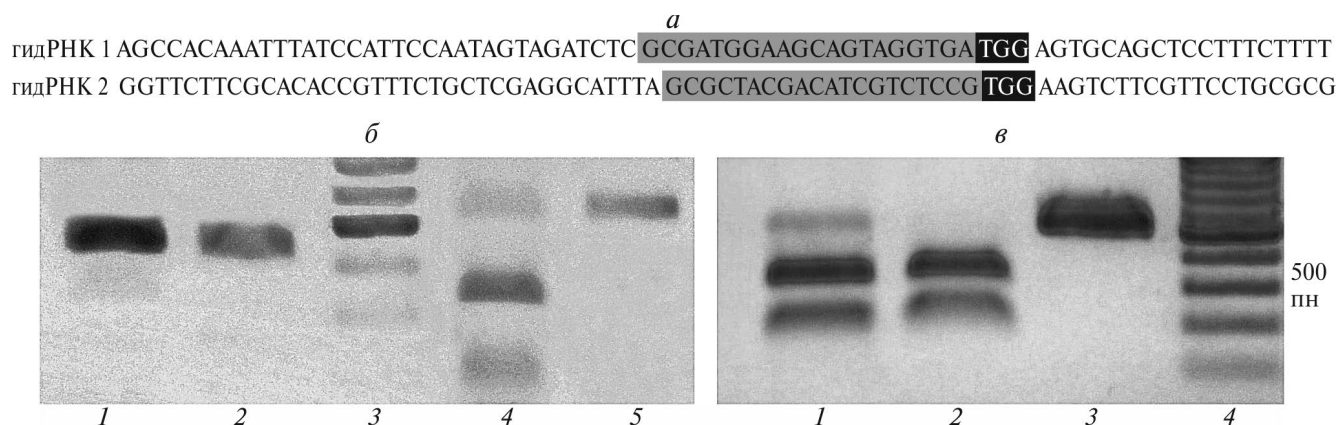


Рис. 1. Оценка эффективности работы РНП-комплексов *in vitro* и в протопластах кукурузы. *a* — нуклеотидные последовательности участков гена *GEX2*, содержащие протоспейсеры для гидРНК 1, 2; целевые сайты для гидРНК выделены серым цветом, РАМ-последовательности — черным. *б* — электрофорез ПЦР-продуктов с фрагмента гена *GEX2* после обработки РНП-комплексами *in vitro*; дорожки: 1 — ПЦР-продукт с целевым локусом для гидРНК 1 после инкубации с РНП-комплексом; 2 — ПЦР-продукт с целевым локусом для гидРНК 1 (без обработки); 3 — маркер молекулярного веса ДНК; 4 — ПЦР-продукт с целевым локусом для гидРНК 2 после инкубации с РНП-комплексом; 5 — ПЦР-продукт с целевым локусом для гидРНК 2 (без обработки). *в* — электрофорез ПЦР-продуктов с целевым локусом для гидРНК 2. Дорожки: 1 — ПЦР-продукт с фрагмента гена *GEX2*, полученный с ДНК протопластов кукурузы после трансформации с РНП-комплексами (45 мг нуклеазы/15 мг гидРНК) и обработанный рестриктазой *BstMAI* (ожидаемые размеры полос после гидролиза — 324 и 183 пн); 2 — ПЦР-продукт с фрагмента гена *GEX2*, полученный с ДНК листа кукурузы и обработанный *BstMAI*; 3 — ПЦР-продукт с фрагмента гена *GEX2* без обработки *BstMAI* (507 пн, контроль); 4 — маркер молекулярного веса ДНК, шаг 100 пн.

липидов мембран и, как следствие — к нарушению способности мембраны спермия к взаимодействию и слиянию с мембраной яйцеклетки. Следуя этой логике, мутации, приводящие к нарушению взаимодействия и слияния мембраны спермия с мембраной яйцеклетки, могут привести к нарушению оплодотворения.

При взаимодействии гамет у растений на этапе контакта (адгезии) мембран необходим белок *GEX2* (GAMETE EXPRESSED 2) [10, 11], а на этапе слияния мембран — белок *HAP2/GCS1* [12]. В 2019 г. доказано, что ген *DMP9*, специфически экспрессирующийся в мембранах женской и мужской гамет растений и регулирующий их контакт [13], контролирует также гаплоиндукцию у кукурузы [14].

Эффективный перенос CRISPR-конструкций в клетки растения с целью редактирования генома, их сохранность и экспрессия являются актуальными проблемами современной биологии, в частности, в отношении доставки целевых конструкций. Для эффективного редактирования генома растений применяются различные методы доставки, такие как агробактериальная трансформация, библистическая трансформация, метод погружения цветочных почек, ПЭГ-опосредованная трансформация протопластов, электропорация [15–17]. Существенные трудности возникают при трансформации однодольных растений с низкой регенерационной способностью.

Редактирование геномов растений с введением чужеродной ДНК в клетки вызывает проблемы, связанные с законодательным запретом коммерческого выращивания генетически модифицированных растений в России [18]. Важным преимуществом доставки компонентов CRISPR-системы в клетки в виде комплекса рибонуклеопротеидов (РНП) является возможность редактирования генов без интеграции в геном чужеродной информации [19–22]. РНП-комплексы действуют быстрее, чем генетические конструкции на основе векторов, поскольку комплекс сразу активен в клетке, не требуя внутриклеточной транскрипции и трансляции. Также необходимо отметить, что при использовании РНП-комплексов мутации вне зоны мишени либо вообще отсутствуют [23], либо их частота оказывается существенно ниже [19, 21].

Существуют различные методы доставки комплексов белков с нуклеиновыми кислотами в растительный геном с эффективностью, позволяющей регулировать различные клеточные процессы [24]. Основным препятствием на пути доставки генетического материала в растительные клетки является клеточная стенка, поэтому введение ДНК в клетки растений, лишенные клеточной стенки (протопласты), значительно повышает эффективность трансформации. Показано, что протопласты кукурузы остаются жизнеспособными через несколько суток после трансфекции, что делает возможным дальнейшее культивирование растительных тканей

[25]. Трансформация с использованием ПЭГ представляет собой наиболее часто используемый метод трансформации протопластов, применимый к клеткам различных растений.

Цель исследования — анализ эффективности редактирования гена *GEX2* после ПЭГ-опосредованной трансфекции протопластов кукурузы РНП-комплексами с разными гидРНК.

Материалом для исследования служили листья кукурузы линии Коричневый маркер (КМ), созданной С. Чейзом [26]. Протопласты выделяли из клеток мезофилла листа кукурузы в два этапа по методике, описанной в работе [27], с модификациями [28]. Подсчет количества протопластов проводили в камере Горяева при увеличении объектива 20× на микроскопе Leica DM 2500 (США).

Последовательности протоспейсеров для направляющей (гид) РНК к гену *GEX2* (GenBank accession no. MW195549.1, KMLine), определенные с помощью ресурса E-CRISP (<http://www.e-crisp.org/E-CRISP/index.html>) или CHOP-CHOP (<https://chopchop.cbu.uib.no/>), приведены на рис. 1, а. ГидРНК синтезировали в двух вариантах: двухкомпонентную гидРНК, состоящую из CRISPR РНК (crRNA) и транскрипционной РНК (tracrRNA), и единую направляющую РНК (singleguideRNA, sgRNA).

ГидРНК 1 со спейсером GCGATGGAAGCAGTAGGTGA (Chr2: 187666031–187666050) была синтезирована компанией «Синтол» (Россия) в составе РНК-олигонуклеотидов crRNA – GCGAUGGAAGCAGUAGGUGAGUUU UAGAGCUAUGCUGUUUUUG и tracrRNA – GGAACCAUUCAAAACAGCAUAGCAAGUUAUAAAUAA GGCUAGUCCGUUAUACAACUUGAAAAAGUGG CACCGAGUCGGUGCUUUUUUUU. Последовательности РНК-олигонуклеотидов были определены как описано в работе [29].

ГидРНК 2 со спейсером GCGCTACGACATCGTCTCCG, 2:188130318) была получена в виде единой направляющей РНК (GC GCUACGACAUCGUCUCCGGUUUUAGAGCUA GAAAUAGCAAGUUAUAAAUAAAGGCUAGUCCGU UAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGG UGCUUUUU) с использованием набора для проведения T7-транскрипции *in vitro* (Биолабмикс, Россия). ДНК-матрицу для гидРНК 2 получали ПЦР-амплификацией синтезированных олигонуклеотидов (Синтол, Россия) с использованием высокоточной полимеразы Tersus (Евроген, Россия). Последовательности ДНК-олигонуклеотидов определяли с использованием ресурса (<https://sgrna.neb.com/#!/sgrna>).

Для проверки специфической активности (целевого расщепления) *in vitro* 10 мкл реакционной смеси, содержащей 200 нг ПЦР-амплифицированного целевого фрагмента гена *GEX2* кукурузы, 400

нМ специфической гидРНК и 400 нМ Cas9-NLS (Биолабмикс, Россия) инкубировали в стандартном буфере для проведения реакции в течение 1 ч. при 37°C. Комплекс Cas9/гидРНК 1 должен расщеплять продукт ПЦР (407 пн) с образованием двух фрагментов — 300 и 107 пн, Cas9/гидРНК 2 должен расщеплять продукт ПЦР (507 пн) с образованием фрагментов — 324 и 183 пн. В экспериментах *in vitro* РНП-комплекс с гидРНК 1 продемонстрировал очень низкую активность (рис. 1, б, дорожка 1), тогда как РНП-комплекс с гидРНК 2 оказался способен к расщеплению ПЦР-продукта, содержащего целевой локус (рис. 1, б).

Для приготовления 50 мкл РНП-комплексов для трансфекции протопластов использовали 7,5–15 мкг гидРНК и 22,5–45 мкг нуклеазы Cas9 (Биолабмикс, Россия). После 15-минутной инкубации при комнатной температуре РНП-комплексы смешивали с 50 мкл суспензии протопластов кукурузы (1–6 × 10⁵ кл/мл), а затем добавляли 220 мкл 40% раствора ПЭГ (40% ПЭГ-4000, 0,6 М маннит, 0,1 М CaCl₂) и инкубировали смесь 40 мин. при 25°C в темноте [30]. Далее к раствору добавляли 850 мкл раствора W5 [31], центрифугировали при 100 g 2 мин. ресуспендировали осадок в 500 мкл раствора W1 [31] и инкубировали при 25°C в темноте. Через сутки протопласты собирали центрифугированием при 100 g 2 мин, выделяли ДНК набором «ДНК-экстран-3» («Синтол», Россия) или с использованием додецилсульфата натрия [32]. Редактирование определяли по гидролизу специфическими эндонуклеазами рестрикции ПЦР-фрагментов целевых районов гена *GEX2* кукурузы [33]. Сайты узнавания рестриктаз *Asu*HP1 или *Bst*MAI (СибЭнзайм, Россия) находились в области 17–18 нуклеотидов подобранной мишени (3 пн от РАМ-последовательности) для гидРНК 1 и 2. Целевой участок гена *GEX2*, содержащий протоспейсер, амплифицировали при помощи ПЦР. ПЦР-продукты получали с использованием праймеров *Gex2*-RNA1-F (TCGTTTCCCGTCCTACTCCT)/*Gex2*-RNA1-R (ACGAGTGCACAGTGTGGAA), *Gex2*-RNA2-F (GGACTTCTTCCCTGCGATTGA)/*Gex2*-RNA2-R (GGCAAGGACCTGGTGTACA) и высокоточной полимеразы Tersus (Евроген, Россия). Предварительно очищенные (набор для очистки ДНК CleanUpMini (Евроген, Россия)) продукты ПЦР (60 нг) инкубировали 4 ч с эндонуклеазой рестрикции *Asu*HP1 (гидРНК 1) или *Bst*MAI (гидРНК 2). Электрофорез продуктов рестрикции проводили в 2%-ном агарозном геле, анализ плотности свечения полос ДНК проводили с помощью программы ImageJ [34], используя формулу для расчета процента эффективности трансформации и редактирования на основе процентного отношения остаточных нерасщепленных фрагментов ПЦР к общему количеству продуктов ПЦР [35].

Нам не удалось зафиксировать редактирование гена *GEX2* в протопластах кукурузы в экспериментах с комплексами Cas9/гидРНК 1. В экспериментах с комплексами Cas9/гидРНК 2 эффективное редактирование было достигнуто только при использовании 45 мкг нуклеазы и 15 мкг гидРНК 2 (рис. 1, в), при соотношении 22,5 мкг нуклеазы и 7,5 мкг гидРНК редактирование не было зарегистрировано (данные не показаны).

Как видно из рис. 1, в часть ПЦР-продукта фрагмента гена *GEX2* осталась негидролизованной специфической эндонуклеазой рестрикции BstMAI (дорожка 1, верхняя полоса 507 пн), в отличие от полностью гидролизованного ПЦР-продукта в контроле (дорожка 2). Ампликоны с мутантными последовательностями устойчивы к расщеплению BstMAI, поскольку включают сайт узнавания рестрикционного фермента, который нарушен мутацией, индуцированной CRISPR/Cas9. Оценка плотности свечения полос с помощью программы ImageJ в двух независимых экспериментах показала, что на долю свечения верхней полосы (507 пн) приходится 6,5 и 10,7% всего свечения ПЦР-продукта. То есть в двух независимых экспериментах, с использованием 45 мкг нуклеазы Cas9 и 15 мкг гидРНК 2 эффективность редактирования гена *GEX2* составила 6,5 и 10,7%. Анализ литературных данных показал, что CRISPR-Cas9-редактирование протопластов кукурузы с подобранными гидРНК к гену инозитолфосфаткиназе дает эффективность от 0,85 до 5,85% [35]. В наших экспериментах эффективность трансформации и редактирования протопластов зависела от используемой гидРНК, соотношения и количества компонентов в РНП-комплексе.

Таким образом, можно количественно оценивать эффективности CRISPR/Cas9-редактирования генома протопластов кукурузы РНП-комплексами с разными гидРНК.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Президента РФ (МК-4527.2022.1.4) и Программы фундаментальных исследований Государственных академий наук на 2021–2023 годы (№ 121031700141–7).

Авторы признательны О.В. Гуторовой за предоставленные семена кукурузы. Авторы признательны рецензентам за конструктивные замечания, улучшившие качество статьи.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием в качестве объекта животных.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием в качестве объекта людей.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Чумаков М.И., Гусев Ю.С., Богатырева Н.В., Соколов А.Ю. Оценка рисков распространения генетически модифицированной кукурузы с пылью при выращивании с нетрансформированными сортами (обзор) // С-хоз. биология. 2019. Т. 54. № 3. С. 426–445.
<https://doi.org/10.15389/agrobiology.2019.3.426rus>
2. Chase S.S. Monoploid frequencies in a commercial double cross hybrid maize, and its component single cross hybrids and inbred lines // Genetics. 1949. V. 34. № 4. P. 384–392.
<https://doi.org/10.1134/S1022795422040044>
3. Coe E.H. A line of maize with high haploid frequency // Am. Naturalist. 1959. V. 93. № 873. P. 381–382.
<https://doi.org/10.1086/282098>
4. Чумаков М.И., Мазиллов С.И. Генетический контроль гиногенеза у кукурузы (обзор) // Генетика. 2022. Т. 58. № 4. С. 388–397.
<https://doi.org/10.1134/S1022795422040044>
5. Kelliher T., Starr D., Wang W. et al. Maternal haploids are preferentially induced by CENH3-tailswap transgenic complementation in maize // Front. Plant Sci. 2016. V. 7. P. 414.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00414>
6. Kelliher T., Starr D., Richbourg L. et al. MATRILINEAL, a sperm-specific phospholipase, triggers maize haploid induction // Nature. 2017. V. 542. P. 105–109.
<https://doi.org/10.1038/nature20827>
7. Gilles L.M., Khaled A., Laffaire J.B. et al. Loss of pollen-specific phospholipase NOT LIKE DAD triggers gynogenesis in maize // EMBO J. 2017.
<https://doi.org/10.15252/embj.201796603>
8. Liu C., Li X., Meng D. et al. A 4-bp insertion at Zm-PLA1 encoding a putative phospholipase a gene rates haploid induction in maize // Mol. Plant. 2017. V. 10. P. 520–522.
<https://doi.org/10.1016/j.molp.2017.01.011>
9. Чумаков М.И. Матроклинная гаплоидия и взаимодействие гамет у кукурузы (обзор) // Генетика. 2018. Т. 54 № 10. С. 1120–1124.
<https://doi.org/10.1134/S1022795418100058>
10. Mori H., Kuroiwa T., Kranz E., Scholten S. GENERATIVE CELL SPECIFIC 1 is essential for angiosperm fertilization // Nat. Cell Biol. 2006. V. 8. P. 64–71.
<https://doi.org/10.1038/ncb1345>
11. Besser V.K., Frank A.C., Johnson M.A., Preuss D. Arabidopsis HAP2(GCS1) is a sperm-specific gene required for pollen tube guidance and fertilization // Development. 2006. V. 133. P. 4761–4769.
<https://doi.org/10.1242/dev.02683>
12. Mori T., Igawa T., Tamiya G. et al. Gamete attachment requires GEX2 for successful fertilization in Arabidopsis // Curr. Biol. 2014. V. 24. P. 170–175.
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.11.030>

13. *Takahashi T., Mori T., Ueda K. et al.* The male gamete membrane protein DMP9/DAU2 is required for double fertilization in flowering plants // *Development*. 2018. V. 45. dev170076. doi:10.1242/dev.170076
14. *Zhong Y., Liu C., Qi X. et al.* Mutation of ZmDMP enhances haploid induction in maize // *Nat. Plants*. 2019. V. 5. P. 575–580. <https://doi.org/10.1038/s41477-019-0443-7>
15. *Paszkowski J., Baur M., Bogucki A., Potrykus I.* Gene targeting in plants // *The EMBO J.* 1988. V. 7. № 13. P. 4021–4026. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1988.tb03295.x>
16. *Banakar R., Eggenberger A.L., Lee K. et al.* High-frequency random DNA insertions upon co-delivery of CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein and selectable marker plasmid in rice // *Sci. Rep.* 2019. V. 9. № 1. P. 19902. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-55681-y>
17. *Sandhya D., Jogam P., Allini V.R. et al.* The present and potential future methods for delivering CRISPR/Cas9 components in plant // *J. Genet. Eng. Biotechnol.* 2020. V. 18. P. 25. <https://doi.org/10.1186/s43141-020-00036-8>
18. *Богатырева Н.В., Соколов А.Ю., Мусеева Е.М. и др.* Правовое положение растений, полученных с использованием технологии редактирования генома: перспективы для России // *Экологическая генетика*. 2021. Т. 19. № 1. С. 89–101. <https://doi.org/10.17816/ecogen42532>
19. *Cho S.W., Lee J., Carroll D. et al.* Heritable gene knockout in *Caenorhabditis elegans* by direct injection of Cas9–sgRNA ribonucleoproteins // *Genetics*. 2013. V. 195. P. 1177–1180. <https://doi.org/10.1534/genetics.113.155853>
20. *Woo J.W., Kim J., Kwon S. et al.* DNA-free genome editing in plants with preassembled CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins // *Nat. Biotechnology*. 2015. V. 33. № 11. P. 1162–1164. <https://doi.org/10.1038/nbt.3389>
21. *Liang Z., Chen K., Li T. et al.* Efficient DNA-free genome editing of bread wheat using CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein complexes // *Nat. Com.* 2017. V. 8. P. 14261. <https://doi.org/10.1038/ncomms14261>
22. *De Witt M.A., Corn J.E., Carroll D.* Genome editing via delivery of Cas9 ribonucleoprotein // *Methods*. 2017. V. 121–122. P. 9–15. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2017.04.003>
23. *Svitashev S., Schwartz C., Lenderts B. et al.* Genome editing in maize directed by CRISPR–Cas9 ribonucleoprotein complexes // *Nat. Com.* 2016. V. 7. P. 13274. <https://doi.org/10.1038/ncomms14261>
24. *Кулуев Б.Р., Гумерова Г.Р., Михайлова Е.В. и др.* Доставка CRISPR/CAS-компонентов в клетки высших растений для редактирования их геномов // *Физиол. растений*. 2019. Т. 66. № 5. С. 339–353. <https://doi.org/10.1134/S0015330319050117>
25. *Kanchiswamy C.N.* DNA-free genome editing methods for targeted crop improvement // *Plant Cell Rep.* 2016. V. 35. P. 1469–1474. <https://doi.org/10.1007/s00299-016-1982-2>
26. *Chase S.S.* Monoploids and monoploid-derivatives of maize (*Zea mays* L.) // *The Bot. Review*. 1969. V. 35. № 2. P. 117–168. <https://doi.org/10.1007/BF02858912>
27. *Wolter F., Edelmann S., Kadri A., Scholten S.* Characterization of paired Cas9 nickases induced mutations in maize mesophyll protoplasts // *Maydica*. 2018. V. 62. № 2. P. 1–11.
28. *Красова Ю.В., Фадеев В.В., Мусеева Е.М. и др.* Оптимизация методики получения протопластов кукурузы и их нативность после электропорации // *Изв. Саратовского у-та. Серия: Химия. Биология. Экология*. 2022. Т. 22. Вып. 4. С. 445–454. <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2022-22-4-445-454>
29. *Mekler V., Minakhin L., Semenova E. et al.* Kinetics of the CRISPR-Cas9 effector complex assembly and the role of 3'-terminal segment of guide RNA // *Nucl. Ac. Res.* 2016. V. 44. № 6. P. 2837–2845. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw138>
30. *Sant'Ana R.R.A., Caprestano C.A., Nodari R.O., Agapito-Tenfen S.Z.* PEG-delivered CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins system for gene-editing screening of maize protoplasts // *Genes*. 2020. V. 11. P. 1029–1043. <https://doi.org/10.3390/genes11091029>
31. *Yoo S.D., Cho Y.H., Sheen J.* Arabidopsis mesophyll protoplasts: A versatile cell system for transient gene expression analysis // *Nature Protocols*. 2007. V. 2. № 7. P. 1565–1572. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.199>
32. *Дрейнер Дж., Скотт Р., Армидж Ф. и др.* Генная инженерия растений. Лабораторное руководство. М.: Мир, 1991. 408 с.
33. *Shan Q., Wang Y., Li J. et al.* Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system // *Nat. Biotechnol.* 2013. V. 31. № 8. P. 686–688. <https://doi.org/10.1038/nbt.2650>
34. *Schneider C.A., Rasband W.S., Eliceiri K.W.* NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis // *Nat. Methods*. 2012. V. 9. P. 671–675. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>
35. *Sentmanat M.F., Peters S.T., Florian C.P. et al.* A survey of validation strategies for CRISPR-Cas9 editing // *Sci. Reports*. 2018. V. 8. P. 888–895. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19441-8>

Analysis of the Effectiveness of Crispr-Editing of the *GEX2* Gene by Ribonucleoprotein Complexes in Maize Protoplasts

E. M. Moiseeva¹, V. V. Fadeev^{1, 2}, Y. V. Fadeeva^{1, 2}, Y. S. Gusev^{1, 2}, M. I. Chumakov^{1, *}

¹*Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms – Subdivision of the Federal Research Center,*

²*Saratov Scientific Centre of the Russian Academy of Sciences, Saratov, 410049 Russia*

³*Chernyshevsky Saratov National Research State University, Saratov, 410012 Russia*

**e-mail: chumakov_m@ibppm.ru*

The GEX2 protein is expressed in the maize gamete membranes and necessary for gamete membranes contact (adhesion). Knockout of *GEX2* gene, presumably, can lead to impaired fertilization and, as a result, to the haploid embryo formation. The aim of the study is to analyze the efficiency of CRISPR/Cas9 editing of the *GEX2* gene after PEG-mediated transfection of maize protoplasts by ribonucleoprotein (RNP) complexes with different sgRNA. For the first time, the RNP complexes with different sgRNA to the *GEX2* gene have been created. The effectiveness of CRISPR/Cas9 editing of the *GEX2* gene have been proven on protoplasts and reaches 10.7%, depending on the sgRNA, level and the sgRNA:Cas9 ratio in the RNP complex.

Keywords: *Zea mays*, gametes, protoplasts, CRISPR/Cas9 editing, sgRNA.