



一种 CRISPR-Cas9 介导的拟南芥高效基因编辑系统的构建与应用

张成, 何明亮, 汪威, 徐芳森

(华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室, 武汉 430070)

摘要:【背景】近些年兴起的 CRISPR-Cas9 基因编辑技术在多种植物中实现了高效的基因打靶, 为基因功能研究提供了一种高效快速的方法, 但一些 CRISPR-Cas9 载体编辑效率很低。【目的】通过构建一种由 *RIBOSOMAL PROTEIN S5A (RPS5A)* 启动子启动 Cas9 并带有红色荧光蛋白筛选标记的 CRISPR-Cas9 载体, 提高拟南芥 CRISPR-Cas9 编辑效率, 并利用这套系统对拟南芥木葡聚糖内糖基转移/水解酶基因 *TOUCH4 (TCH4)* 进行编辑。【方法】在 pKSE401 载体的基础上, 以从胚胎发育早期就表现出高转录活性的 *RPS5A* 启动子替换 35S 启动子、以 *DsRed2* 替换潮霉素抗性基因, 构建拟南芥中使用的 CRISPR 载体 pRSE-WH; 以 *AtTCH4* 为靶基因, 使用 CRISPR-P 2.0 (<http://crispr.hzau.edu.cn>) 设计靶位点, 将所设计的靶点序列在拟南芥参考基因组中比对分析以排除非特异性靶位点, 最终筛选出 2 个靶位点 target 1 和 target 2。化学合成带有接头的靶位点寡核苷酸序列, 退火后分别与 pRSE-WH 载体连接, 构建 TCR1 和 TCR2 表达载体, 采用农杆菌介导的沾花法侵染野生型拟南芥 Col-0, 以红色荧光蛋白为标记筛选获得 T₁ 代转基因阳性植株。通过靶位点扩增测序法判断 T₁ 代转基因植株在预期靶位点是否发生编辑, 根据测序结果的峰图对编辑情况进行解码, 进一步分析突变类型及基因型。【结果】构建了一个在拟南芥中高效编辑的 CRISPR 载体 pRSE-WH。TCR1 和 TCR2 成功地实现了对 *TCH4* 的定点编辑, 靶点一的编辑效率为 80%, 靶点二的编辑效率为 100%, 总编辑效率为 86%。根据测序结果的峰图解码了 T₁ 代植株的突变结果, 纯合编辑、杂合编辑、双等位编辑均有出现。对不同的编辑类型进行统计发现, 59 株 T₁ 代阳性植株中, 无编辑 8 株, 占比 13.56%, 纯合编辑 9 株, 占比 15.25%, 双等位编辑 40 株, 占比 67.80%, 杂合编辑 2 株, 占比 3.39%。在 T₁ 代发生纯合编辑以及双等位编辑的株系中选择了无红光种子进行繁殖, 并对 T₂ 代植株编辑情况进行测序检测, 结果发现 T₁ 代中的突变成功遗传到了 T₂ 代无 Cas9 株系中。【结论】pRSE-WH 在拟南芥中展现了极高的编辑效率, 并且通过对种子进行红色荧光筛选, 能够简便地获得无 Cas9 且稳定遗传的 T₃ 代突变体。

关键词: 拟南芥; CRISPR/Cas9; 基因编辑; 解码; *TCH4*

Development of an Efficient Editing System in *Arabidopsis* by CRISPR-Cas9

ZHANG Cheng, HE MingLiang, WANG Wei, XU FangSen

(National Key Laboratory of Crop Genetic Improvement, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070)

Abstract: 【Background】 In recent years, the CRISPR-Cas9 system has been developed to an efficient site-directed gene-editing technology in a variety of plants. It can provide a rapid method for studying gene function. However, the editing efficiency of some CRISPR-Cas9 vectors is very low. 【Objective】 In this study, an efficient CRISPR-Cas9 system, with a red fluorescent protein

收稿日期: 2019-10-09; 接受日期: 2019-12-08

基金项目: 国家自然科学基金 (31972483, 31772380)

联系方式: 张成, E-mail: zcheng93@webmail.hzau.edu.cn. 通信作者徐芳森, E-mail: fangsenxu@mail.hzau.edu.cn

screening marker and a *RIBOSOMAL PROTEIN S5 A (RPS5A)* promoter, was constructed to edit the xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase *TOUCH4 (TCH4)* gene in *Arabidopsis thaliana*. 【Method】 The CRISPR vector pRSE-WH was constructed from the pKSE401 vector by replacing the 35S promoter with a *RPS5A* promoter, which maintains high constitutive expression at all developmental stages from the egg cell, and the hygromycin resistance gene with *DsRed2*. The sgRNA of *TCH4* was designed using CRISPR-P 2.0 (<http://crispr.hzau.edu.cn>). After excluding non-specific target sites by sequence comparisons with the *Arabidopsis thaliana* genome database, two target sites were selected. The sgRNA oligonucleotides with junctions were chemically synthesized. After annealing, two expression vectors (TCR1 and TCR2, corresponding to the two target sites) were constructed by linking the sgRNA with junctions to the plasmid pRSE-WH respectively. The vectors of TCR1 and TCR2 were transferred into wild-type Col-0 by *Agrobacterium*-mediated floral-dip transformation. In the T₁ generation, the positive transgenic plants were identified using red fluorescent protein as a marker, and the target sites were detected using PCR combined with Sanger-sequencing to confirm whether it was mutated as expected. The mutations were determined from the peak map of the sequencing results, and the mutation pattern and genotypes were further analyzed. 【Result】 A high efficiency CRISPR vector pRSE-WH for gene editing in *Arabidopsis* was constructed. The TCR1 and TCR2 expression vectors successfully enabled gene-specific editing of *TCH4*. In the editing of the *TCH4* gene, the mutation ratios using TCR1 and TCR2 were 80%, 100% respectively, and the total editing efficiency was 86%. The mutations in T₁ plants were decoded according to the sequencing results and included homozygous, heterozygous and biallelic mutations. Among 59 mutated T₁ plants, 8 plants (13.56%) were not edited, 9 plants (15.25%) were homozygous, 40 plants (67.80%) were biallelic and 2 plants (3.39%) were heterozygous. The homozygous and biallelic seeds without red fluorescence of T₁ generation were selected for breeding, and sequenced the plants of T₂ generation. The results showed that mutations of the T₁ generation were successfully inherited to T₂ generation, which were *Cas9*-free. 【Conclusion】 PRSE-WH demonstrated high-efficiency gene editing in *Arabidopsis thaliana*. It was very easy to obtain *Cas9*-free and stably inherited mutants in the T₃ generation by screening seeds with red fluorescence marker.

Key words: *Arabidopsis thaliana*; CRISPR/Cas9; gene editing; decode; *TCH4*

0 引言

【研究意义】通过基因编辑手段获得基因敲除材料, 对于研究基因在植物中的生物学功能具有重要的意义。而获得高编辑效率的 CRISPR-Cas9 系统能加速获得基因敲除材料的进程。【前人研究进展】在植物基因功能研究中, 靶向基因编辑技术有着十分重要的作用, 特别是在目标基因与其同源基因同源性较高的情况下很难通过其他途径获得想要的突变体。近些年, 基于细菌免疫系统中 CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats) -Cas (CRISPR associated) 的靶向基因编辑技术席卷了整个生物基因组研究领域^[1-2]。常用的 CRISPR-Cas9 系统由两部分组成: 带有核定位信号的 *Cas9* 和由 21 bp 靶序列 (tracrRNA) 的 CRISPR (crRNA) 构成的 sgRNA (synthetic guide RNA)。其中, 由 sgRNA 转录而成的非编码 RNA 与带有核定位信号的 *Cas9* 蛋白结合形成复合体, 在 PAM (protospacer-adjacent motif, *Cas9* 系统中为 NGG) 位点上游 3 bp 位置切割 DNA 产生 DNA 双链切割 (double-stranded breaks, DSBs), 继而发生同源重组修复 (homology-directed repair, HDR) 或非同源重组修复 (nonhomologous end joining, NHEJ),

而容易出错的 NHRJ 修复方式导致在切割位点附近发生核苷酸的随机缺失, 插入或者替换^[1,3]。目前, CRISPR-Cas9 系统已经成功在多种植物中得以应用, 包括拟南芥、水稻、玉米、番茄、小麦、油菜和烟草等^[4-11]。目前, 在拟南芥中主要是利用农杆菌蘸花的方法, 通过 T-DNA 插入到拟南芥卵细胞或者胚胎干细胞中的基因组获得拟南芥转基因植株。在之前的拟南芥 CRISPR-Cas9 研究中, 主要是利用花椰菜花叶病毒 (cauliflower mosaic virus, CaMV) 35s 启动子启动 *Cas9* 的表达, 但发现拟南芥中的编辑效率较水稻下降很多, 且发生基因编辑的 T₁ 代大部分为嵌合体。这主要由于 35s 启动子在植物的胚胎形成过程中表达量不高, 而是在营养器官中高表达量的原因^[8,11]。因此, 为了提高拟南芥中基因编辑的效率以及遗传稳定性, 选用合适的启动子启动 *Cas9* 的表达显得尤为重要。目前已经有一些研究人员使用了在拟南芥卵细胞中表达水平高的启动子来启动 *Cas9* 的表达, 比如 *EC1.1/EC1.2* 启动子^[12]、*DD45* 和 *SPL* 启动子^[13]、*YAO* 启动子^[14]、*INCURVATA2* 启动子^[15]、*APETALA1* 启动子^[16]以及 *RPS5A* 和 *WOX2* 启动子^[17]。【本研究切入点】拟南芥 CRISPR 载体的编辑效率大多较低, 且从 T₁ 代编辑株系的鉴定到 T₃ 代纯合突变且无 *Cas9* 材料的

获得过程耗时费力,造成严重的时间、人力和资源的浪费。创建拟南芥高效的 CRISPR 编辑系统有利于加速基因敲除材料的获得,且节省时间和成本。【拟解决的关键问题】本研究通过构建一个高效 CRISPR-Cas9 系统用于拟南芥的基因编辑,并用拟南芥木葡聚糖内糖基转移/水解酶基因 *TOUCH 4 (TCH4)* 对该基因编辑系统进行验证。采用 DsRed2 红色荧光筛选标记筛选阳性植株及无 *Cas9* 植株。通过对测序峰图的分析对编辑结果进行解码,以便降低获得稳定遗传的无 *Cas9* 突变体材料的时间、人力和财务成本。

1 材料与方法

1.1 材料

拟南芥为 Columbia-0 (Col-0) 生态型,生长条件为长日照 (16 h 光照/8 h 黑暗),环境温度为 22℃。

1.2 拟南芥 CRISPR-Cas9 载体改造

拟南芥 *RPS5A* 编码一个核糖体蛋白,从胚胎发育早期到后期所有的生长发育阶段都表现为持续的高效表达^[18-19]。使用的原始载体为 pKSE401 (由陈其军教授课题组提供),为了构建 pRSE-WH 载体,首先使用引物 pKSE-F: 5'-GCGGGACTCTGGGGTTCG-3'和 pKSE-R: 5'-GCGGGACTCTGGGGTTCG-3',用宝生物公司的 primer STAR MAX 高保真酶扩增不包含 35S 启动子和潮霉素抗性的 pKSE 载体片段,同时以 pBinGlyRed3 的质粒为模板,用引物 RED-F: 5'-GCCAACATGGTGGAGGAGGAGTCCACCATGGT AGATCTG-3'和 RED-R: 5'-ACCCCAGAGTCCCGCT CAGGGTACCAGGAACAGGTG-3'扩增红光蛋白片段,利用 Infusion (TaKaRa) 将 2 个片段连接,转化后得到 pRSE401 载体。以 pRSE401 载体为模板,使用引物 pRSE-F: 5'-CTCGACCTCAACACAACATATAC-3'和 pRSE-R: 5'-GACCTGCAGGCATGCAAGC-3',扩增得到不包含 35S 启动子的 pRSE401 载体片段。利用拟南芥基因组 DNA 为模板,使用引物 AtRPS5A-F: 5'-GCATGCCTGCAGGTCCTCAACTTTTGATTCGCT ATTTGC-3'和 AtRPS5A-R: 5'-TGTGTTGAGGTCGAG GGCTGTGGTGAGAGAAACAG-3'扩增得到 *AtRPS5A* 启动子片段,使用 Infusion 连接 pRSE401 载体片段和 *AtRPS5A* 启动子片段,得到 pRSE-WH 载体。

1.3 *TCH4* 的 CRISPR 载体构建

拟南芥 *TCH4* (AT3G11940, XTH22) 属于木葡聚糖内糖基转移/水解酶 (xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase, XTH) 家族中的一员^[20],具有 2 种催化活

性: 1) 内切木葡聚糖; 2) 将内切产生的木葡聚糖还原端连接到另一个木葡聚糖的非还原端。XTH 一方面可以剪切细胞壁中的木葡聚糖交联网络引起细胞壁的松弛,一方面可以参与细胞壁新组分的组装,通过对细胞壁结构的调节参与对植物生长发育的调节^[21-26]。利用 CRISPR-P 2.0 (<http://crispr.hzau.edu.cn>) 对拟南芥 *TCH4* 设计 2 个靶点,靶点一序列为: 5'-CCTTTCACTGCTTCTTACCG-3',靶点二序列为: 5'-GGATTGGAATCCAGAACCAG-3'。在引物的上游添加接头: 5'-ATTG-3',在引物的下游添加接头: 5'-AAAC-3'。用于基因编辑第一个靶点的引物为: F: 5'-ATTGCCTTTCACTGCTTCTTACCG-3', R: 5'-AAACCCGTAAGAAGCAGTGAAAGG-3'。用于基因编辑第二个靶点的引物为: F: 5'-ATTGGGATTGGAATCCAGAACAG-3'; R: 5'-AAACCTGGTCTGGATTCCAA TCC-3'。采用 25 μL 退火体系 (5 μL 10 mmol·L⁻¹ 的上游引物, 5 μL 10 mmol·L⁻¹ 的下游引物, 15 μL 去离子水),退火程序为 95℃ 3 min, 95℃—16℃ 每 20 s 下降 1℃, 16℃ 保存,得到带有黏性末端的靶序列二聚体。酶切连接体系为靶序列二聚体 2 μL、pRSE-WH 2 μL、10×NEB T4 buffer 1.5 μL、*Bsa* I (NEB) 1 μL、10×BSA 1.5 μL、T4 连接酶 (NEB, 高浓度) 1 μL,去离子水补充至 15 μL。反应程序为 37℃ 5 h, 50℃ 5 min, 80℃ 10 min。将连接产物转化大肠杆菌,送公司测序鉴定正确后,提取质粒转化农杆菌。

1.4 拟南芥转化以及阳性植株获得和筛选

采用沾花法转化拟南芥^[27],收获 T₁ 代种子之后,筛选标记为红色荧光蛋白 DsRed2,在绿色激发光下发射光为红色,使用体式荧光显微镜筛选阳性植株。

1.5 编辑鉴定

采用 CTAB 法^[28]提取 T₁ 代阳性植株的叶片基因组 DNA,使用引物: TCR-F: 5'-ATGGCGATCACTTAC TTGCTTC-3'和 TCR-R: 5'-TACTCTCTCTATGCAGCT AAGCAC-3'进行 PCR 扩增,测序检测 T₁ 代植株编辑情况。

2 结果

2.1 拟南芥高效 CRISPR-Cas9 载体改造

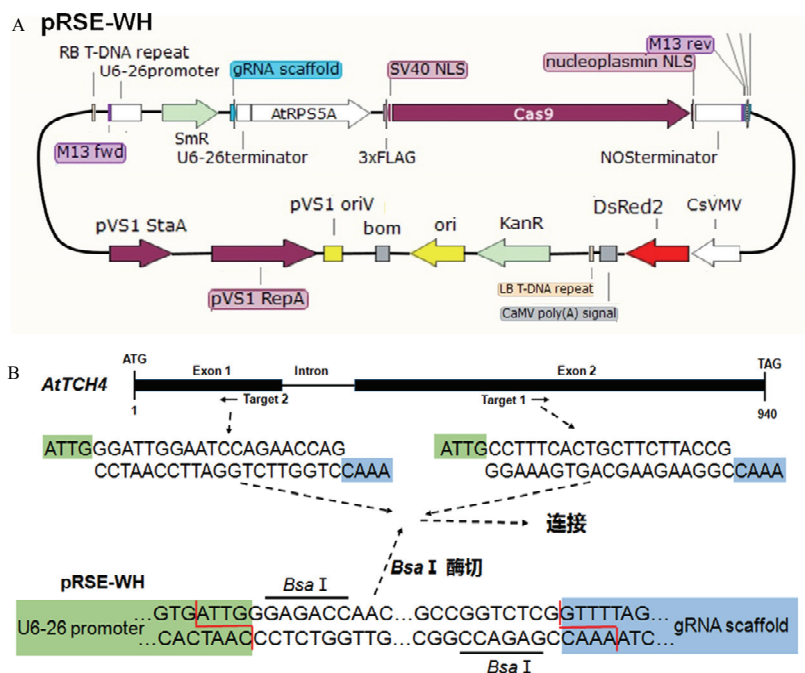
首先,用 DsRed2 红色荧光蛋白替换了原始的潮霉素抗性基因 (图 1-A)。然后,利用拟南芥中 *RPS5A* 的启动子替换 pKSE401 载体中的 CaMV35s 启动子,从而达到在拟南芥胚胎发育早期进行基因编辑的目的。从拟南芥 Col-0 基因组 DNA 中扩增得到长度为

1 659 bp 的 *RPS5A* 的启动子, 将其整合到 pRSE-WH 载体中(图 1-A)。在 pRSE-WH 中, sgRNA 由 AtU6-26 启动子启动, 而在 sgRNA 和 U6-26 启动子中间包含 2 个 *Bsa* I 酶切位点, 可直接一步将 20 bp 的靶序列连入载体。替换后的红色荧光蛋白可直接用于阳性植株的筛选以及后期无 *Cas9* 植株的筛选。

2.2 *TCH4* 的 CRISPR 载体构建

TCH4 的 CDS 全长为 855 bp, 基因结构包括 2 个外显子和 1 个内含子。使用 CRISPR-P 2.0(<http://crispr.hzau.edu.cn>)

对拟南芥 *TCH4* 设计 2 个靶点。第一个靶点位于第二个外显子上, 第二个靶点位于第一个外显子上(图 1-B)。在 20 bp 靶序列正向序列及反向互补序列的 5'端添加接头序列, 通过变性-复性形成带有黏性末端的二聚体, 而 pRSE-WH 载体经过 *Bsa* I 酶切形成带有粘性末端的线性化载体片段, 利用 T4 连接酶连接即可将靶序列整合到 pRSE-WH 载体中。将带有靶点的 2 个载体分别命名为 TCR1 和 TCR2。



A: 改造后的 CRISPR/Cas9 载体 pRSE-WH; B: 2 个靶位点在 *TCH4* 中的位置
A: Reconstructed CRISPR/Cas9 vector pRSE-WH; B: Position of two targets in *TCH4* gene locus

图 1 CRISPR/Cas9 载体图谱和 *TCH4* 的靶点示意图

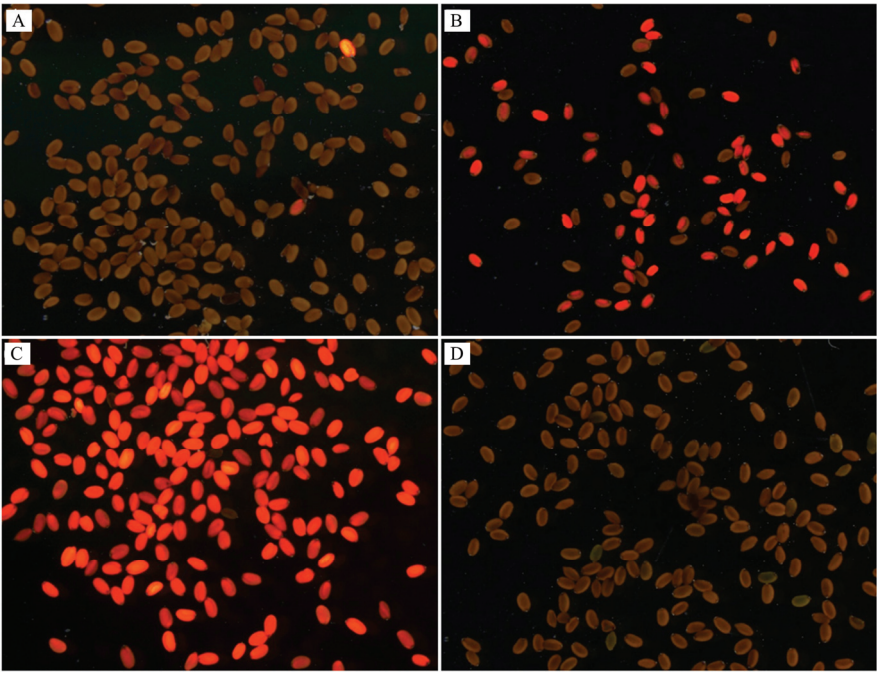
Fig. 1 CRISPR/Cas9 vectors and target mapping of *TCH4* gene

2.3 红光筛选

使用 DsRed2 作为筛选标记, 用于阳性筛选。组成型表达的 DsRed2 蛋白, 使得拟南芥种皮在绿光激发下发出红光, 区别于其他阴性种子(图 2)。将 T_1 代红色的阳性种子播种(图 2-A), 收获得到 T_2 代种子, 大部分的 T_2 代种子中, 红光种子与非红光种子的比例近似 3:1 (红光种子与非红光种子分别为 65 和 28 颗, 图 2-B), 符合分离定律。 T_2 代挑选红色种子繁殖得到 T_3 代不同植株种子中, 三分之一的几率得到纯合红色种子(图 2-C)。而 T_2 代非红光种子后代全部为非红光种子(图 2-D)。

2.4 编辑检测

从 T_1 代植株中挑选 40 株 TCR1 和 19 株 TCR2, 提取植株叶片 DNA, 对 *TCH4* 基因组片段进行 PCR 扩增, 测序检测编辑结果。根据测序峰图手动解码编辑结果, 结果发现, 编辑类型可以分为 4 种: 无编辑、纯合编辑、杂合编辑以及双等位编辑(图 3)。在 40 株 TCR1 植株中, 发生编辑的有 32 株, 编辑效率达到 80%, 19 株 TCR2 植株中, 全部发生编辑, 100% 编辑效率。通过对不同的编辑类型进行统计, 发现 59 株 T_1 代阳性植株中, 无编辑 8 株(13.56%)、纯合编辑 9 株(15.25%)、双等位编辑 40 株(67.80%)和杂合编



A: T₁ 代种子; B: T₂ 代种子; C: T₃ 代红光种子; D: T₃ 代无红光种子
A: T₁ seeds; B: T₂ seeds; C: T₃ seeds with red fluorescence; D: T₃ seeds without red fluorescence

图 2 阳性植株的筛选

Fig. 2 Screening of positive plants

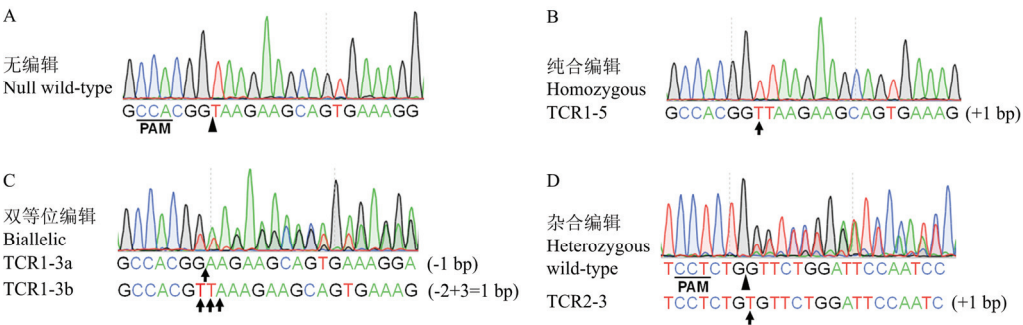


图 3 T₁ 代植株的编辑类型

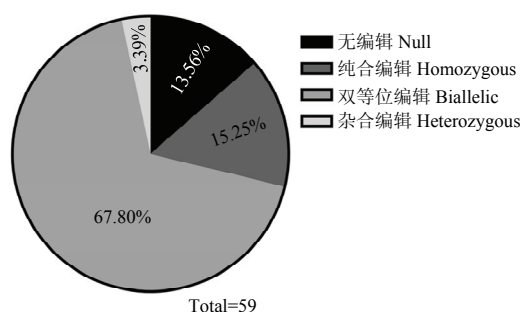
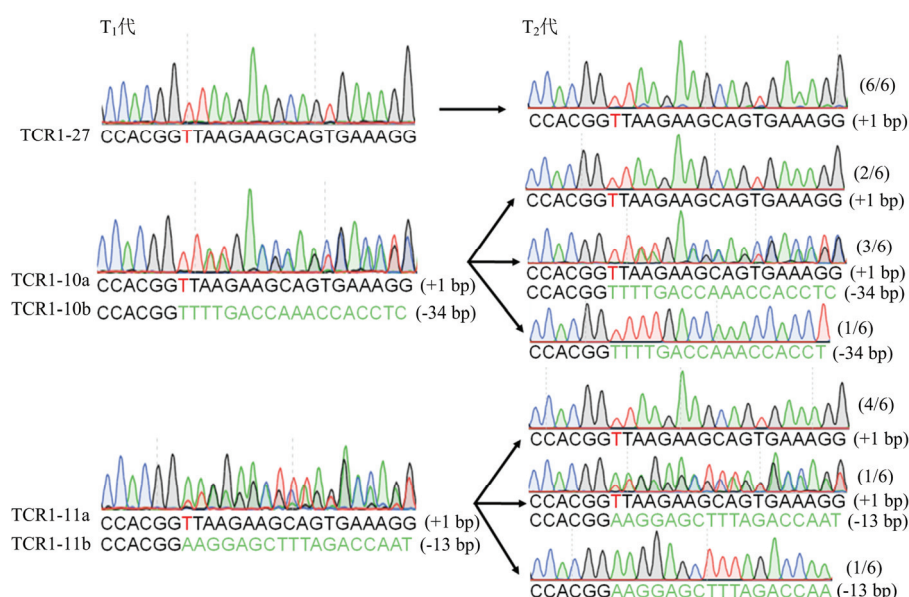
Fig. 3 Genotypes of the edited T₁ plants

辑 2 株 (3.39%) (图 4)。将每条染色体的编辑事件单独分析, 118 次编辑事件中, 18 次没有编辑, 占比 15.25%; 45 次单碱基插入, 占比 38.14%; 1 次多碱基插入, 占比 0.85%; 11 次单碱基缺失, 占比 9.32%; 43 次多碱基缺失, 占比 36.44% (表 1)。其中多碱基缺失中, 从几 bp 到几十 bp 均有发生, 甚至几百 bp 缺失。在单碱基插入事件中, TCR1 中只存在 2 种事件, 4 次 A 碱基插入和 28 次 T 碱基插入, 而 TCR2

中 4 种碱基插入均有发生, 5 次 A 碱基插入, 2 次 T 碱基插入, 1 次 C 碱基插入和 5 次 G 碱基插入。

2.5 T₂ 代编辑分析

在 T₁ 代发生纯合编辑以及双等位编辑的株系中选择了无红光种子进行繁种, 并对 T₂ 代植株编辑情况进行测序检测。结果显示, TCR1-27 株系 T₁ 代检测结果为 T 碱基插入的纯合编辑, 所测序的 6 个 T₂ 代单株均为纯合的 T 碱基插入。同样, TCR1-10 和 TCR1-11

图 4 T₁ 代植株各编辑类型所占比例Fig. 4 Proportion of editing types in T₁ plants图 5 T₁ 和 T₂ 代株系间的突变遗传Fig. 5 Mutation inheritance in T₁ and T₂ generation

实际操作中存在的两个问题，一编辑效率低；二从 T₁ 代阳性植株筛选到 T₃ 代稳定遗传株系的获得，工作量大，成本高。而前者是主要的问题，因为一个高效的编辑系统能够很大的降低后期的工作量和成本。植物营养遗传实验室前期的工作中使用载体 pKSE401 进行甘蓝型油菜和拟南芥的编辑，其编辑效率较低，造成严重的时间、人力、资源的浪费。于是尝试了对实验室原有的 CRISPR 载体进行改造，试图提高编辑效率。与一些植物采用外植体侵染-再生转化植物不同的是，拟南芥遗传转化采用的是沾花法，农杆菌侵染的是雌性生殖器官中的胚囊。常用的 35S 启动子在胚囊中或者在整个胚胎发育过程中表达量并不高，而这很

的 T₁ 代均为双等位编辑，所测序的 6 个 T₂ 代单株均显示 2 条染色体中的突变都成功地遗传到后代中（图 5）。

3 讨论

以 CRISPR 为代表的基因编辑技术已广泛应用于农作物基因功能验证和农作物遗传改良。目前，已研发多种 CRISPR 载体运用于单子叶和双子叶植物的基因编辑^[11-14,17,29]。植物营养遗传实验室尝试了使用载体 pKSE401 在拟南芥和油菜中运用 CRISPR 技术对拟研究的候选基因进行基因编辑。但是发现在 CRISPR

有可能导致了拟南芥中编辑效率的下降。因此，本研究采用了一个在胚胎发育过程中持续高表达的 *RPS5A* 启动子替换 35S 启动子。

对 *TCH4* 的编辑结果显示，*RPS5A* 启动子启动 *Cas9* 的系统确实有着很高的效率，测序的 59 株转基因阳性植株中编辑效率达到 86%。而不同的靶点序列的编辑效率也有一定的差异，其中靶点一的编辑效率为 80%，而靶点二的则是 100% 编辑。目前，CRISPR 在水稻中的运用较好，编辑效率可以超过 81%^[11]，在拟南芥中的编辑效率大多不超过 40%^[7,11,16]。而本研究改造的 CRISPR 编辑效率可高达 86%。高的编辑效率可以很容易得到各种不同的突变类型，发生最多的是

表 1 *TCH4* CRISPR T_1 代植株的编辑类型及比例

Table 1 Mutation patterns and proportions *TCH4* edited T_1 plants

T_1 代植株染色体的编辑类型	发生次数	突变比例
Mutation patterns of chromosome in T_1 plants	No. of edited lines	Mutation rate (%)
无 None	18	15.25
+1	45	38.14
+32	1	0.85
-1	11	9.32
-2	4	3.39
-4	1	0.85
-5	2	1.69
-6	2	1.69
-7	4	3.39
-10	4	3.39
-11	1	0.85
-12	1	0.85
-13	3	2.54
-14	1	0.85
-16	1	0.85
-17	1	0.85
-19	1	0.85
-20	6	5.08
-22	1	0.85
-23	1	0.85
-31	1	0.85
-34	2	1.69
-49	1	0.85
-55	1	0.85
-218	1	0.85
-313	1	0.85
-503	1	0.85
-577	1	0.85
合计 Total	118	100.00

单碱基插入，占 38.14%；其次是多碱基缺失，占 36.44%；再次是单碱基缺失，占 9.32%；而多碱基插入发生概率较低，118 次编辑事件中只发生了一次。在这些不同的突变类型中，发现不同的靶点序列似乎对不同的突变类型有一定的偏好性。在 *TCR1* 的单碱基插入中，只发现了 A/T 插入，而且 T 插入占 88%。但是 *TCR2* 的单碱基插入则 4 种碱基插入均有发现。导致这样的结果可能与产生 DNA 双链切割位点的碱基类型有关。*TCR1* 的 DNA 双链切割位点碱基为 G-T，而 *TCR2* 的 DNA 双链切割位点碱基为 G-G。

DsRed 最早是从香菇珊瑚 (*Discosoma striata*) 中分离得到的一种红色荧光蛋白^[30]。*DsRed* 的发射光谱峰值为 583 nm，激发光谱峰值为 558 nm。*DsRed* 在应用过程中被发现存在一些问题，包括成熟缓慢，易形成四聚体，有一定毒性。第二代 *DsRed2* 的氨基末端进行了一些突变改造，使得其组织蛋白凝集和毒性下降，荧光基团成熟时间变短。*DsRed2* 不仅可以像 GFP 一样进行活体检测和连续观察，而且能消除植物本身的背景干扰，甚至在白光条件下也能检测到红光，因此，*DsRed2* 可以作为一种可视标记应用于植物遗传转

化^[30-31]。在 pRSE-WH 中, 采用 DsRed2 这种可视筛选标记。如果 *Cas9* 一直在植物中表达, 它一方面可能会继续对靶位点进行切割、编辑; 另一方面脱靶的可能性也一直存在。因此, 最终希望得到无 *Cas9* 且稳定遗传的突变体。而 *Cas9* 基本上是与 *DsRed2* 连锁的, 所以通过筛选无红光种子就能得到无 *Cas9* 的株系。在拟南芥 CRISPR 系统中, 常用的抗生素筛选标记不适用于 T_2 代无 *Cas9* 株系的筛选, 而只能对 T_2 代植株提取 DNA, 通过 PCR 扩增进行鉴定, 理论上这会增加很大的工作量。而使用 DsRed2 可以很轻易的从 T_2 代种子中筛选得到无 *Cas9* 的种子, 并且能够保证 T_3 代种子中无 *Cas9* 的稳定遗传。所以, 在拟南芥 CRISPR 系统中 DsRed2 要明显优于常用的抗生素筛选。此外, 常用的解码编辑结果的方法为对 PCR 产物进行克隆测序, 并增加测序的单克隆数量获得编辑的结果, 这无疑是最可靠的方式之一, 但这会增加大量的时间、人力和物力的消耗。本研究在了解解码的机制后进行手动解码: 对目标基因的基因组片段进行 PCR 扩增, 测序检测编辑结果会出现 2 种峰型: 单峰和套峰。其中, 单峰表明扩增的 PCR 片段是单一的, 可以很容易得到其中的 DNA 序列信息, 而这种单峰的结果包括没有发生编辑和纯合编辑; 套峰意味着 PCR 产物存在 2 个或者多个不同的 DNA 片段, 会导致没有那么容易获得其中不同的 DNA 序列信息。可以通过以下几点去解码套峰中包含的信息: 1) PCR 过程中会导致不同 DNA 片段含量不一致, 进而测序中表现出不同强度的信号值, 可以通过这种信号强度的差异将不同的信息区分开; 2) 由于 CRISPR-Cas9 是基于 DNA 双链切割进而发生 DNA 修复产生的编辑, 所以它的特点是编辑会发生在切割位点附近或者向外扩散, 而未编辑的位点则应该与参考序列一致, 因此, 即使在套峰中 2 个信号强度相近的 DNA 片段, 依旧可以通过碱基间的序列信息推断出其序列, 解码出其中一条信息之后, 套峰的信息减去其中已知的信息, 就能得到另一条的序列信息。基于以上两点, 对 T_1 代阳性植株的测序信息进行解码, 选择理想的编辑株系进行繁种, 并在 T_2 代中进行测序验证, 其结果等同于在 T_1 代中进行克隆测序, 且节省了大量的时间、精力和成本。

4 结论

构建了一个适用于拟南芥中基因编辑的高效 CRISPR 载体 pRSE-WH, 能够简便地获得无 *Cas9* 且稳定遗传的 T_3 代突变体。

致谢: 中国农业大学陈其军教授提供了原始 pKSE401 载体; 华中农业大学杨光圣教授课题组提供了体式荧光显微镜; 华中农业大学汪社亮博士和英国 The James Hutton Institute 的 Philip John White 教授对文章的修改, 在此表示感谢。

References

- [1] CONG L, RAN F A, COX D, LIN S, BARRETTO R, HABIB N, HSU P D, WU X, JIANG W, MARRAFFINI L A, ZHANG F. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 2015, 339(11): 197.
- [2] JINEK M, CHYLINSKI K, FONFARA I, HAUER M, DOUDNA J A, CHARPENTIER E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 2012, 337(6096): 816-821.
- [3] MALI P, YANG L, ESVELT K M, AACH J, GUELL M, DICARLO J E, NORVILLE J E, CHURCH G M. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*, 2013, 339(6121): 823-826.
- [4] FENG Z, MAO Y, XU N, ZHANG B, WEI P, YANG D L, WANG Z, ZHANG Z, ZHENG R, YANG L, ZENG L, LIU X, ZHU J K. Multigeneration analysis reveals the inheritance, specificity, and patterns of CRISPR/Cas-induced gene modifications in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 2014, 111(12): 4632-4637.
- [5] MIAO J, GUO D, ZHANG J, HUANG Q, QIN G, ZHANG X, WAN J, GU H, QU L J. Targeted mutagenesis in rice using CRISPR-Cas system. *Cell Research*, 2013, 23(10): 1233-1236.
- [6] MIKAMI M, TOKI S, ENDO M. Comparison of CRISPR/Cas9 expression constructs for efficient targeted mutagenesis in rice. *Plant Molecular Biology*, 2015, 88(6): 561-572.
- [7] LI J F, NORVILLE J E, AACH J, MCCORMACK M, ZHANG D, BUSH J, CHURCH G M, SHEEN J. Multiplex and homologous recombination-mediated genome editing in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana* using guide RNA and Cas9. *Nature Biotechnology*, 2013, 31(8): 688-691.
- [8] FENG Z, ZHANG B, DING W, LIU X, YANG D L, WEI P, CAO F, ZHU S, ZHANG F, MAO Y, ZHU J K. Efficient genome editing in plants using a CRISPR/Cas system. *Cell Research*, 2013, 23(10): 1229-1232.
- [9] MAO, Y, ZHANG H, XU N, ZHANG B, GOU F, ZHU J K. Application of the CRISPR-Cas system for efficient genome engineering in plants. *Molecular Plant*, 2013, 6(6): 2008-2011.
- [10] XIE K, ZHANG J, YANG Y. Genome-wide prediction of highly

- specific guide RNA spacers for CRISPR-Cas9-mediated genome editing in model plants and major crops. *Molecular Plant*, 2014, 7(5): 923-926.
- [11] MA X, ZHANG Q, ZHU Q, LIU W, CHEN Y, QIU R, WANG B, YANG Z, LI H, LIN Y, XIE Y, SHEN R, CHEN S, WANG Z, CHEN Y, GUO J, CHEN L, ZHAO X, DONG Z, LIU Y G. A Robust CRISPR/Cas9 system for convenient, high-efficiency multiplex genome editing in monocot and dicot plants. *Molecular Plant*, 2015, 8: 1274-1284.
- [12] WANG Z P, XING H L, DONG L, ZHANG H Y, HAN C Y, WANG X C, CHEN Q J. Egg cell-specific promoter-controlled CRISPR/Cas9 efficiently generates homozygous mutants for multiple target genes in *Arabidopsis* in a single generation. *Genome Biology*, 2015, 16: 144.
- [13] MAO Y, ZHANG Z, FENG Z, WEI P, ZHANG H, BOTELLA J R, ZHU J K. Development of germ-line-specific CRISPR-Cas9 systems to improve the production of heritable gene modifications in *Arabidopsis*. *Plant Biotechnology Journal*, 2016, 14(2): 519-532.
- [14] YAN L, WEI S, WU Y, HU R, LI H, YANG W, XIE Q. High-efficiency genome editing in *Arabidopsis* using yao promoter-driven CRISPR/Cas9 system. *Molecular Plant*, 2015, 8(12): 1820-1823.
- [15] HYUN Y, KIM J, CHO S W, CHOI Y, KIM J S, COUPLAND G. Site-directed mutagenesis in *Arabidopsis thaliana* using dividing tissue-targeted RGEN of the CRISPR/Cas system to generate heritable null alleles. *Planta*, 2015, 241(1): 271-284.
- [16] GAO X, CHEN J, DAI X, ZHANG D, ZHAO Y. An effective strategy for reliably isolating heritable and Cas9-free *Arabidopsis* mutants generated by CRISPR/Cas9-mediated genome editing. *Plant Physiology*, 2016, 171(3): 1794-1800.
- [17] TSUTSUI H, HIGASHIYAMA T. pKAMA-ITACHI vectors for highly efficient CRISPR/Cas9-mediated gene knockout in *Arabidopsis thaliana*. *Plant & Cell Physiology*, 2017, 58(1): 46-56.
- [18] WEIJERS D, FRANKE-VAN DIJK M, VENCKEN R J, QUINT A, HOOYKAAS P, OFFRINGA R. An *Arabidopsis* Minute-like phenotype caused by a semi-dominant mutation in a RIBOSOMAL PROTEIN S5 gene. *Development*, 2001, 128(21): 4289-4299.
- [19] MARUYAMA D, HAMAMURA Y, TAKEUCHI H, SUSAKI D, NISHIMAKI M, KURIHARA D, KASAHARA R D, HIGASHIYAMA T. Independent control by each female gamete prevents the attraction of multiple pollen tubes. *Developmental Cell*, 2013, 25(3): 317-323.
- [20] ROSE J K C, BRAAM J, FRY S C, NISHITANI K. The XTH family of enzymes involved in xyloglucan endotransglucosylation and endohydrolysis: Current perspectives and a new unifying nomenclature. *Plant and Cell Physiology*, 2002, 43(12): 1421-1435.
- [21] FANUTTI C, GIDLEY M J, REID J S G. Action of a pure xyloglucan endo-transglycosylase (formerly called xyloglucan-specific endo-1,4-D-glucanase) from the cotyledons of germinated nasturtium seeds. *The Plant Journal*, 1993, 3(5): 691-700.
- [22] FARKAS V, SULOVA Z, STRATILOVA E, HANNA R, MACLACHLAN G. Cleavage of xyloglucan by nasturtium seed xyloglucanase and transglycosylation to xyloglucan subunit oligosaccharides. *Archives of Biochemistry & Biophysics*, 1992, 298(2): 365-370.
- [23] FRY S C, SMITH R C, RENWICK K F, MARTIN D J, HODGE S K, MATTHEWS K J. Xyloglucan endotransglycosylase, a new wall-loosening enzyme activity from plants. *Biochemical Journal*, 1992, 282(3): 821-828.
- [24] NISHITANI K, TOMINAGA R. Endo-xyloglucan transferase, a novel class of glycosyltransferase that catalyzes transfer of a segment of xyloglucan molecule to another xyloglucan molecule. *Journal of Biological Chemistry*, 1992, 267(29): 21058-21064.
- [25] NISHITANI K. Endo-xyloglucan transferase, a new class of transferase involved in cell wall construction. *Journal of Plant Research*, 1995, 108(1): 137-148.
- [26] SMITH R C, FRY S C. Endotransglycosylation of xyloglucans in plant cell suspension cultures. *Biochemical Journal*, 1991, 279(2): 529-535.
- [27] CLOUGH S J, BENT A F. Floral dip: A simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 1998, 16(6): 735-743.
- [28] 王慧娜, 初志战, 马兴亮, 李日清, 刘耀光. 高通量PCR 模板植物基因组 DNA 制备方法. *作物学报*, 2013, 39(7): 1200-1205.
- WANG H N, CHU Z Z, MA X L, LI R Q, LIU Y G. A high through-put protocol of plant genomic DNA preparation for PCR. *Acta Agronomica Sinica*, 2013, 39: 1200-1205. (in Chinese)
- [29] HUA K, TAO X, HAN P, WANG R, ZHU J K. Genome engineering in rice using cas9 variants that recognize ng pam sequences. *Molecular Plant*, 2019, 12(7): 1003-1014.
- [30] BAIRD G S, ZACHARIAS D A, TSIEN R Y. Biochemistry, mutagenesis, and oligomerization of DsRed, a red fluorescent protein from coral. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 2000, 97(22): 11984-11989.
- [31] BEVIS B J, GLICK B S. Rapidly maturing variants of the Discosoma red fluorescent protein (DsRed). *Nature Biotechnology*, 2002, 20(1): 83-87.

(责任编辑 李莉)