CRISPR/Cas9单碱基编辑技术创制抗除草剂拟南芥种质

陈易雨^{1†}, 王志平^{2†}, 倪汉文¹, 许勇³, 陈其军^{2*}, 姜临建^{1*}

1. 中国农业大学植物保护学院植物病理学系, 农业部作物有害生物监测与绿色防控重点实验室, 北京 100193;

2. 中国农业大学生物学院, 植物生理与生化国家重点实验室, 北京 100193;

3. 国家蔬菜工程技术研究中心, 北京市农林科学院蔬菜研究中心, 农业部园艺作物生物学与种质创制重点实验室(华北), 北京 100097

† 同等贡献

* 联系人, E-mail: qjchen@cau.edu.cn; jianglinjian@cau.edu.cn

收稿日期: 2017-03-10; 接受日期: 2017-03-20; 网络版发表日期: 2017-05-10

国家重点研发计划(批准号: 2016YFD0101804)、国家自然科学基金(批准号: 31471785, 31670371)和公益性行业(农业)科研专项(批准号: 201303022)资助

CRISPR/Cas9基因编辑系统因其高效、廉价、简单、通用等特点, 引发了基因编辑领域的革命。但是, 在植物基因组上进行定点突变, 依然困难重重。目前的技术路线是, 将含有突变的DNA模板通过修复Cas9产生的DNA双链断裂的方式整合到植物基因组中, 从而实现目标区域中的点突变。整合机制包括同源末端修复^[1]或非同源末端修复^[2]的两种方式。但是, DNA模板整合到目标区域的效率极低, 这是在植物基因组中产生定点突变的最大技术障碍。

近期, Komor等人^[3]将胞嘧啶脱氨酶(cytidine deaminase, CD)和糖苷酶抑制剂(uracil glycosidase inhibitors, UGI)分别融合到Cas9n(D10A)的N端和C端, 在哺乳动物基因组上实现了定点突变。其机理是, Cas9n在sgRNA的引导下与靶标序列结合, 释放出互补链的胞嘧啶碱基(C), 作为融合在Cas9n上的胞嘧啶脱氨酶的底物, 被变成尿嘧啶(U)。Cas9n在sgRNA互补链上产生缺口, 使得随后的DNA修复过程更多的以对侧互补链为修复模板, 将U-G碱基对改变为U-A碱基对。U-A碱基对随后被修复成T-A, 从而实现了C到T的单碱基替换。

单碱基突变能够改良包括抗除草剂在内的许多重大农艺质量性状。值得指出的是, 非转基因抗咪唑啉酮除草剂作物, 如水稻(*Oryza sativa*)、小麦(*Triticum aestivum*)、油菜(*Brassica campestris* L.)、向日葵(*Helianthus annuus*)和玉米(*Zea mays*)等的遗传基础就是其乙酰乳酸合成酶基因(acetolactate synthase, ALS)的单碱基突变。本研究的目标是建立针对植物基因组的单碱基编辑技术体系, 并通过对比拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)的ALS基因进行单碱基编辑来创制抗除草剂新种质。

为此, 本课题组首先合成了经过玉米密码子优化的CD-Cas9n-UGI(BE3)基因, 然后用BE3替换了pHEE401E载体^[4]上的zCas9基因, 构建了植物单碱基编辑载体pHEE901(图1A)。巧合的是, 拟南芥ALS基因上编码第197位脯氨酸的密码子是“CCT”, 正好位于该单碱基编辑系统的“编辑窗口”, 且C变为T后, 有望赋予拟南芥除草剂抗性, 如抗苯磺隆除草剂。因此, 本研究选择此区域作为测试单碱基编辑系统的靶标位点(图1B), 并按照图1A中所示方法将其克隆到pHEE901

引用格式: 陈易雨, 王志平, 倪汉文, 等. CRISPR/Cas9单碱基编辑技术创制抗除草剂拟南芥种质. 中国科学: 生命科学, 2017, 47: 1196–1199, doi: 10.1360/N052017-00064

英文版见: Chen Y Y, Wang Z P, Ni H W, et al. CRISPR/Cas9-mediated base-editing system efficiently generates gain-of-function mutations in *Arabidopsis*. Sci China Life Sci, in press, doi: 10.1007/s11427-017-9021-5

图1 单碱基编辑技术创制抗除草剂拟南芥种质

A: pHEE901载体的T-DNA区域以及靶点的克隆方法示意图。EC1.2en-EC1.1p(EC1fp)卵母细胞特异性融合启动子，启动经过玉米密码子优化的BE3，Pol-III启动子U6-26p启动sgRNA基因。RB/LB: T-DNA右/左边界；E9t: rbcS E9终止子；Hyg: 潮霉素抗性基因；B: sgRNA及其靶标基因的序列对比。图中注明了预期的C到T突变后编码的氨基酸。红色箭头标注了Cas9n在非编辑链(sgRNA的互补链)产生缺口的位点。HR: 除草剂抗性；C: 4个含有C到T突变的T₁代单株在“编辑窗口”的测序峰图。峰图下方是PCR克隆测序所揭示的等位基因序列及编码的氨基酸。红色字体表示突变的碱基和氨基酸；D: 基因编辑的T₁植株的T₂后代表现出明显的除草剂抗性。图片只选取了有代表性的#3-T₂代株系；E: 具有纯合G202D突变植株(表2中#1-7)的测序峰图，显示出了PAM区序列TGG被编辑为TGA，很可能是单碱基编辑系统的新靶点；F: 未编辑的T₁株系，在T₂代出现抗除草剂植株。播种8天后喷施13.5 g ai hm⁻²苯磺隆，并于除草剂处理10天后拍照；G: 作物中Pro197的保守序列；H: 作物ALS基因上“Pro197”密码子中C到T突变预期产生抗除草剂的氨基酸突变

载体上。构建好的载体转入农杆菌GV3101后，用蘸花法转化拟南芥。收获的种子在含有25 mg/L潮霉素的MS培养基上筛选后，将幼苗移栽到营养土中，随后提取单株DNA，并通过PCR扩增含有靶点的片段(所用引物见表1)，来检测单碱基编辑情况。

测序结果表明，在240株T₁代植株中，有4株(#1~4)发生C到T的定点突变，均位于“编辑窗口”中(图1C)，

因此T₁代植株C到T的突变率约为1.7%。测序峰图表明，这4株的编辑类型是杂合、嵌合或双等位基因突变(图1C)。为了确定具体的突变类型，对PCR产物进行了克隆测序(图1C)。结果显示，株系#1只有一个等位基因被编辑，且没有改变编码的氨基酸。株系#2是嵌合突变体，由两种类型的突变(P197L和P197F)以及野生型组成。株系#3是含有一个编辑过的等位基因(P197F)

表 1 本研究中所用引物

名称	序列(5'→3')
BE3-IDF	catacctcccagaacacaaataagc
BE3-IDR	actgaaggccaatagtgagaatgt
oALS-T1F	attgaagtcctcgtcgatgat
oALS-T1R	aaacatcatagcagaggagactt
U626-IDF	tgcccaggattagaatgattagc
tE9-IDR2	ttcccaatgccataataactcaactcag
tE9-IDR	cattagaggccacgatttgacacat
ALS-F	ccttaacccgctctctctca
ALS-R	ccccgtaagctcaacaacc

和野生型的杂合体。株系#4的两个等位基因都发生了编辑,但是只有其中一个编码了不同的氨基酸(P197S)。总之,通过一次转化,即获得了所有可能的3种氨基酸突变类型:其中P197S和P197L是已知的抗除草剂突变,而P197F突变能否带来除草剂抗性,文献未有报道^[5]。

为了明确这些点突变能否有效的遗传给下一代,以及是否具有预期的除草剂抗性,用含有5 mg/L苯磺隆但不含潮霉素的MS板对4个编辑过的T₁株系的T₂代种子进行筛选。株系#2, #3, #4的T₂代抗除草剂个体的

比例分别为91.3%(46株中有42株), 85.1%(94株中有80株)和75.8%(124株中有94株)(图1D)。T₁代中株系#4被编辑的两个等位基因中只有一个有除草剂抗性,由于靶标序列的改变,导致这两个编辑过的位点很难在T₂代中再次被编辑。因此, #4株系的T₂代中理论上有75%的个体具有除草剂抗性。结果(75.8%)与预期相符,表明T₁代的点突变是能够通过生殖细胞正常传递到下一代。#2和#3株系在T₁代都含有未编辑的等位基因,因此T₂代时能够被再次编辑而产生除草剂抗性。这在很大程度上导致了这两个株系T₂代的抗性植株比例(#2和#3分别是91.3%和85.1%)明显高于#4株系。为了进一步证明T₁代突变能够有效传代,本研究组进一步鉴定了部分T₂代抗除草剂植株的基因型(图1D)。结果表明, #2, #3和#4株系的T₂代均含有T₁代的点突变。其中, #2株系的19株T₂代抗除草剂植株中有10株, #3株系的20株抗性植株中有7株是含P197F纯合突变(表2),表明P197F是一种新的抗除草剂突变。此外,在64株T₂代抗性植株中鉴定出了6株非转基因植株,具有纯合(P197F)或两个等位基因突变(表2)。这些结果证明,单碱基编辑产生的除草剂抗性突变能够高效地遗传给下一代。

表 2 T₁代及其T₂代抗除草剂单株的基因型^{a)}

株系		基因型
野生型		GTCCCT(N ₁₁)TGG
T ₁	#1	GTCCCT(N ₁₁)TGG
T ₂	#1-1, -5, -6	GTYYYY(N ₁₁)TGR
	#1-2, -3	GTTYCT(N ₁₁)TGR
	#1-4	GTYYCT(N ₁₁)TGR
	#1-7	GTTCCT(N ₁₁)TGA
T ₁	#2	GTYYYY(N ₁₁)TGG
T ₂	#2-1, -2, -3, -6, -14, -16, -17	GTYYYY(N ₁₁)TGG
	#2-4, -5*, -8, -9, -10*, -11*, -13, -12, -15, -18	GTTTTT(N ₁₁)TGG
	#2-7	GTTYCT(N ₁₁)TGG
T ₁	#3	GTYYYY(N ₁₁)TGG
T ₂	#3-1, -2, -7, -8, -9, -15, -16, -17, -18, -20	GTYYYY(N ₁₁)TGG
	#3-3, -6, -10, -11, -12, -13, -14	GTTTTT(N ₁₁)TGG
	#3-4	GTYYCT(N ₁₁)TGR
	#3-5	GTYYYY(N ₁₁)TGR
	#3-19	GTCCCT(N ₁₁)TGR
T ₁	#4	GTTYCT(N ₁₁)TGG
T ₂	#4-1, -4, -11,	GTTTCT(N ₁₁)TGG
	#4-2, -7, -15, -16, -18	GTTYCT(N ₁₁)TGR
	#4-3, -5, -6*, -8*, -9, -10, -12, -13, -14, -17, -19*	GTTYCT(N ₁₁)TGG

a) *: PCR鉴定出的非转基因单株; R: G和A的混合信号; Y: C和T的混合信号; N₁₁: “脱氨酶编辑窗口”和PAM之间的11个碱基

虽然#1株系在T₁代没有抗除草剂突变,但是其7.6%的T₂代植株表现出了除草剂抗性,表明在T₁代未被编辑的等位基因很可能在T₂代时被编辑成抗性突变类型. PCR产物测序结果显示,多数T₂代抗性植株的确实含有预期的抗除草剂突变(表2). 但是,64株T₂代植株中有15株的PAM序列“TGG”被编辑成了“TGA”(表2),造成G202D突变. 并且,在T₂代抗性植株中发现了一株G202D纯合植株(图1E). 虽然该植株(表2中#1-7)在“编辑窗口”有C到T突变,但未改变表达的氨基酸,因此,G202D很可能是单碱基编辑技术产生的又一新的抗性突变类型. PAM序列“TGG”被编辑成了“TGA”的现象,在哺乳动物细胞^[3]或T₀水稻中均未发现^[6-8].

用类似的单碱基编辑系统编辑水稻, T₀代具有2.7%~40%的效率^[6-8], 本研究中T₁代的编辑效率(1.7%)相对偏低. 根据CRISPOR^[9]和CRISPRscan程序^[10]的预测,所选靶点的打靶效率很低,这可能是导致本研究中编辑效率低的原因之一. 此外,本研究使用的是卵母细胞特异性启动子,其瞬时表达的特性可能是导致效率偏低的另一原因. 但是,卵母细胞特异性启动子

提高了突变的传代效率,极大地抵消了T₁代的突变效率低的问题. 另外,筛选抗除草剂突变个体的通量高且成本低,所以除草剂处理后在未被编辑T₁株系的T₂后代中出现了大量(约6%)的抗性植株(图1F).

最后,由于本研究中的ALS基因靶点区域在许多植物中高度保守(图1G和H),因此可以直接对作物中的对应位点进行单碱基编辑. 值得指出的是,国外广泛种植的非转基因抗除草剂大豆(*Glycine max* (Linn.) Merr.), 就是其ALS基因上的P178S突变^[11],即本研究中拟南芥ALS基因的P197S突变. 此外,第一个基因编辑作物——抗除草剂油菜,已经被监管部门认定为非转基因作物,并于2015年在美国推广种植^[12]. 本课题组已将原先在单子叶、双子叶植物中的高效基因编辑载体(pHSE401E, pBSE401, pKSE401, pHUE411, pBUE411^[13])中的Cas9替换为BE3,分别构建了名为pHSE901, pBSE901, pKSE901, pHUE911, pBUE911的单碱基编辑载体. 这些单碱基编辑载体为在单双子叶作物中实现定点突变,包括定点抗除草剂突变,提供了高效工具.

参考文献

- 1 Sun Y, Zhang X, Wu C, et al. Engineering herbicide-resistant rice plants through CRISPR/Cas9-mediated homologous recombination of acetolactate synthase. *Mol Plant*, 2016, 9: 628–631
- 2 Li J, Meng X, Zong Y, et al. Gene replacements and insertions in rice by intron targeting using CRISPR-Cas9. *Nat Plants*, 2016, 2: 16139
- 3 Komor A C, Kim Y B, Packer M S, et al. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature*, 2016, 533: 420–424
- 4 Wang Z P, Xing H L, Dong L, et al. Egg cell-specific promoter-controlled CRISPR/Cas9 efficiently generates homozygous mutants for multiple target genes in *Arabidopsis* in a single generation. *Genome Biol*, 2015, 16: 144
- 5 Heap I. The international survey of herbicide resistant weeds. 2017, Available from: www.weedscience.org
- 6 Li J, Sun Y, Du J, et al. Generation of targeted point mutations in rice by a modified CRISPR/Cas9 system. *Mol Plant*, 2017, 10: 526–529
- 7 Lu Y, Zhu J K. Precise editing of a target base in the rice genome using a modified CRISPR/Cas9 system. *Mol Plant*, 2017, 10: 523–525
- 8 Ren B, Yan F, Kuang Y, et al. A CRISPR/Cas9 toolkit for efficient targeted base editing to induce genetic variations in rice. *Sci China Life Sci*, 2017, in press, doi: 10.1007/s11427-016-0406-x
- 9 Haeussler M, Schöning K, Eckert H, et al. Evaluation of off-target and on-target scoring algorithms and integration into the guide RNA selection tool CRISPOR. *Genome Biol*, 2016, 17: 148
- 10 Moreno-Mateos M A, Vejnar C E, Beaudoin J D, et al. CRISPRscan: designing highly efficient sgRNAs for CRISPR-Cas9 targeting *in vivo*. *Nat Meth*, 2015, 12: 982–988
- 11 Walter K L, Strachan S D, Ferry N M, et al. Molecular and phenotypic characterization of *Als1* and *Als2* mutations conferring tolerance to acetolactate synthase herbicides in soybean. *Pest Manag Sci*, 2014, 70: 1831–1839
- 12 James C. Global status of commercialized biotech/GM crops: 2015. ISAAA Brief No. 51, 2015
- 13 Xing H L, Dong L, Wang Z P, et al. A CRISPR/Cas9 toolkit for multiplex genome editing in plants. *BMC Plant Biol*, 2014, 14: 327