水稻靶标基因单碱基定向替换技术的建立

任斌^{1,2†}, 严芳^{1†}, 旷永洁¹, 李娜¹, 张大伟², 林宏辉^{2*}, 周焕斌^{1*}

1. 中国农业科学院植物保护研究所, 植物病虫害生物学国家重点实验室, 北京 100193;

2. 四川大学生命科学院, 生物资源与生态环境教育部重点实验室, 成都 610065

† 同等贡献

* 联系人, E-mail: hlin@scu.edu.cn; hbzhou@ippcaas.cn

收稿日期: 2017-03-21; 接受日期: 2017-03-28; 网络版发表日期: 2017-06-12

中国农业科学院科技创新工程和植物病虫害国家重点实验室开放基金资助

摘要 目前CRISPR/Cas9技术作为一种基因组定点编辑技术已经被广泛应用于不同植物中, 但是对于实现特定碱基替换仍具有很大难度. 本研究将APOBEC1和UGI与Cas9n融合, 开发了一种包含rBE3和rBE4的高效技术, 并通过该技术对*OsSERK1*, *OsSERK2*, *ipa1*, *pi-ta*和*OsBR1*等基因的靶位点碱基进行编辑. 在T₀代转基因植物中rBE3/sgRNA将胞嘧啶碱基转换为所有其他核苷酸碱基中效率高达38.9%; 利用rBE4还获得了抗稻瘟基因*pi-ta*的隐性等位基因靶位点胞嘧啶碱基替换为胸腺嘧啶碱基, 编辑效率达18.2%. 此外, 在所检测的材料中, 并未检测到由Cas9n切口酶引起的InDel事件. 这些结果表明, rBE3和rBE4技术的开发, 在未来植物基础研究和农业应用中具有广阔的前景.

关键词 碱基编辑器, 大鼠胞苷脱氨酶, CRISPR/Cas9, 功能获得性突变体

近年来, 基因组定点编辑技术作为一种重要技术手段在植物学研究和作物品种改良中得到了广泛应用. 然而, 相对于常见的基因功能缺失突变体, 基因功能获得性突变体的创制还比较困难. 利用植物细胞内基因组DNA修复途径的同源重组(homologous recombination, HR)或非同源末端连接(non-homologous end joining, NHEJ)机制, 研究人员已经成功地在水稻(*Oryza sativa*)和大豆(*Glycine max* (Linn.) Merr.)中实现了靶基因的定点插入和基因矫正^[1]. 然而, 较低的基因编辑效率限制了其广泛使用. 因此, 对植物基因组特定位点进行DNA定向改造以得到基因功能获得性突变体仍然具有一定的挑战性. 最近, 在哺乳动物细胞中开发

出的靶标基因单碱基编辑技术为研究人员提供了全新的思路^[2]. 其使用的碱基编辑器(base editor)由Cas9n切口酶、胞嘧啶脱氨酶(人胞苷脱氨酶(activation-induced cytidine deaminase, AID)、大鼠(*Rattus norvegicus*)胞苷脱氨酶(apolipoprotein B mRNA-editing enzyme catalytic polypeptide-like protein, APOBEC1)或七鳃鳗胞苷脱氨酶(cytidine deaminase 1, CDA1))和尿嘧啶DNA糖基化酶抑制剂(uracil glycosylase inhibitor, UGI)组成的融合蛋白发挥功能. 其原理在于sgRNA引导Cas9n结合到基因组靶位点, 胞嘧啶脱氨酶对活性窗口内的胞嘧啶碱基(C)进行修饰, DNA双螺旋重新复制后, 修饰的碱基向鸟嘌呤碱基(G)、腺嘌呤碱基(A)或胸腺嘧啶碱基

引用格式: 任斌, 严芳, 旷永洁, 等. 水稻靶标基因单碱基定向替换技术的建立. 中国科学: 生命科学, 2017, 47: 1177–1185, doi: [10.1360/N052017-00061](https://doi.org/10.1360/N052017-00061)
英文版见: Ren B, Yan F, Kuang Y J, et al. A CRISPR/Cas9 toolkit for efficient targeted base editing to induce genetic variations in rice. *Sci China Life Sci*, 2017, 60: 516–519, doi: [10.1007/s11427-016-0406-x](https://doi.org/10.1007/s11427-016-0406-x)

(T)转换,由此在基因组DNA靶位点处引入氨基酸点突变。值得注意的是,当UGI存在时,胞嘧啶碱基对向胸腺嘧啶转换具有一定的偏好性^[2]。本研究开发了包含rBE3和rBE4(rice base editor)的水稻碱基编辑器工具箱,并成功地在水稻中对特定靶标基因进行了单碱基定向替换,人工创造基因新功能种质材料。

1 材料与方法

1.1 植物材料

本研究所用的水稻品种为kitaake。野生型和转基因植物在75%湿度、30℃/12 h光照和25℃/12 h黑暗条件下培养。对于原生质体分离所用幼苗,脱壳的水稻种子用50%(体积比)的商业化消毒液表面消毒25 min,灭菌水清洗3次后将种子放置于1/2 MS培养基上培养8~10天,培养条件为25℃~30℃、12 h光照、75%湿度。

1.2 rBE3和rBE4 载体构建

本实验中用于载体构建的PCR扩增均使用high-fidelity DNA polymerase Phusion (NEB, 美国)扩增,并通过测序验证序列的正确性。所用引物见表1。

为了构建 *APOBEC1-XTEN-Cas9n(D10A)-UGI-NLS*, 首先小鼠 (*Mus musculus*) 的 *APOBEC1*^[3] 和枯草芽孢杆菌的噬菌体PBS1的 *UGI* 基因^[4] 按照水稻密码子的偏好性进行密码子优化后在公司合成 (图1C和D)。 *APOBEC1* 通过 *XTEN* 与 *Cas9n(D10A)*^[5] 连接, *Cas9n(D10A)* 蛋白的N端连接有UGI和NLS。分别用引物对rAPO-F1/R1和rUGI-F1/R1扩增得到 *APOBEC1* 和 *UGI* 基因, 利用引物对rCas9-fg1-F1/R1和rCas9-fg2-F1/R1分别扩增pUC57-rCas9-fg1和pUC57-rCas9-fg2, 得到PCR产物pUC57-rCas9-fg1和pUC57-rCas9-fg2片段。这两个PCR片段分别连接得到载体pUC57-APOBEC1-XTEN-Cas9n-fg1和pUC57-Cas9-fg2-UGI-NLS。将得到的这两个载体用 *Bam*H I / *Sph* I 和 *Sph* I / *Spe* I 酶切后与 *Bam*H I / *Spe* I 酶切后的pUC19-Cas9载体^[6] 连接, 得到载体pUC19-rBE3。在该载体中, *APOBEC1-XTEN-Cas9n(D10A)-UGI-NLS* 由CaMV35S启动子驱动表达, 并含有一个NOS基因终止子。用于水稻转化系统的pUbi-rBE3双元载体的构建方法与上述方法类似。用 *APOBEC1-XTEN-Cas9n(D10A)-UGI-NLS*

片段替换pUbi-Cas9双元载体^[7]的 *Cas9* 基因。在pUbi-rBE3载体中, 使用玉米 (*Zea mays*) 的泛素蛋白启动子驱动其表达, 并含有用于sgRNA插入的Gateway重组酶所需的attR1-ccdB-attR2序列。

为了构建 *APOBEC1-XTEN-Cas9n(D10A/D1135V/R1335Q/T1337R)-UGI-NLS*, 利用引物对VQR-F1/R1和VQR-F2/R2分别扩增点突变的 *Cas9* (VQR) 和pUC57-rCas9-fg2, 得到的两个片段连接形成载体pUC57-Cas9(VQR)-fg2。pUbi-rBE4双元载体的构建方法与pUbi-rBE3类似。

sgRNAs的构建参考已发表文献^[7]。互补的引物对(表1)在磷酸化后通过热处理退火反应的方式结合成双链, 然后插入 *Bsa* I 酶切后的pENTR-sgRNA载体。在水稻原生质体中, sgRNA表达框与pUC-rBE3共同完成瞬时表达, 而在水稻转化体系中, sgRNA与pUbi-rBE3或rBE4共同表达完成对水稻基因组的靶基因编辑。

1.3 水稻原生质体中rBE3的瞬时表达

水稻原生质体的分离和PEG介导的转化参考已发表文献^[6]。按照摩尔比1:1混合的pUC19-rBE3和pENTR-sgRNA质粒(总含量约20 μg)用于原生质体转化。转化后的原生质体转移至6孔细胞培养板中, 28℃、避光培养48 h。

1.4 农杆菌介导的水稻遗传转化

利用电转化的方法将pUbi-rBE3或pUbi-rBE4相关质粒转入农杆菌EHA105。通过稳定的农杆菌转化体系转化水稻未成熟胚诱导的愈伤组织形成转基因植株^[8]。

1.5 rBE3和rBE4诱导的基因碱基编辑效率检测

根据溴化十六烷三甲基铵(cetyltrimethyl ammonium bromide, CTAB)的方法提取原生质体的基因组DNA^[9], 将提取的基因组DNA利用 *Bam*H I 酶解6 h。以酶解产物为模板, 利用引物对OsCERK1-F3/R3, 使用high-fidelity DNA polymerase Phusion进行PCR扩增。PCR产物在 *Bam*H I 酶解3 h利用琼脂糖凝胶电泳除去靶位点未被成功编辑的PCR产物, 利用AxyPrep凝胶回收试剂盒回收成功替换靶位点碱基的片段, 连接pGEM-T载体和Sanger测序。

为了检测rBE3/sgRNA和rBE4/sgRNA诱导水稻转基因愈伤和植株突变的效率, 通过CTAB法提取基因组

表 1 文中所用到的引物及其序列

引物名称	引物序列(5'→3')	用途
rAPO-F1	AAGCTTGGATCCATGAGTAG	将APOREC1融合到Cas9n的N端
rAPO-R1	AGCAAGTCCGATTGAATACT	
rCas9-Fg1-F1	ATTGGGACAACTCTGTGG	
rCas9-Fg1-R1	ATCTAGATGCATCGCGAGT	
UGI-F1	TCCGGCGGAAGTACAAAC	将UGI融合到Cas9n的C端
UGI-R1	GAATTCAGTTCAGACCTT	
rCas9-Fg2-F1	TGCAGAGGCTGCAGCATG	
rCas9-Fg2-R1	GTCACCGCCCAACTGCGA	
VQR-F1	AGGATTCGTCTCCCCACAGT	创制Cas9的VQR版本
VQR-R1	CTTTGTCGATCTATACTGCTTTCTG	
VQR-F2	CAGAAAGCAGTATAGATCGACAAAG	
VQR-R2	ACTGTGGGGGAGACGAATCCT	
gOsCERK1-F3	GTGTGGATCCCAAGGAAGGCCTT	靶向内源的 <i>OsCERK1</i> 基因
gOsCERK1-R3	AAACAAGGCCTTCCTTGGGATCC	
OsCERK1-F3	GACGCTACGCCTTTGGTGT	<i>OsCERK1</i> 基因核苷酸变化检测
OsCERK1-R3	GTCAGCTGCAAAATGCAATG	
gOsSERK1-F3	GTGTGCATCACGATGGATAATCTT	靶向内源的 <i>OsSERK1</i> 基因
gOsSERK1-R3	AAACAAGATTATCCATCGTGATGC	
OsSERK1-F2	CATCGGAACCTCCACTTGAT	<i>OsSERK1</i> 基因核苷酸变化检测
OsSERK1-R2	GCAATATGCCCAATTGTTCC	
gOsSERK2-F3	GTGTGACATCACGATGAATGATCT	靶向内源的 <i>OsSERK2</i> 基因
gOsSERK2-R3	AAACAGATCATTCATCGTGATGTC	
OsSERK2-F3	GGCAAACAAGAACTCGGATT	<i>OsSERK2</i> 基因核苷酸变化检测
OsSERK2-R3	GAGGACTTCCCAGTAGAGAGG	
gpita-F1	TGTTGCTTCTATGCATCTTCAACC	靶向内源的 <i>pi-ta</i> 基因
gpita-R1	AAACGGTTGAAGATGCATAGAAGC	
pita-F1	CTGCAATTCGCAAGCATC	<i>pi-ta</i> 基因核苷酸变化检测
pita-R1	CACCTTTCGTTCTTTGATCC	
gipa1-F1	GTGTGTCTTCTGTCAACCCAGCCA	靶向内源的 <i>ipa1</i> 基因
gipa1-R1	AAACTGGCTGGGTTGACAGAAGAC	
ipa1-F1	CCAAATCTCCCTCCAGGTG	<i>ipa1</i> 基因核苷酸变化检测
ipa1-R1	AGACTTCATGTGGTAGCTGGTG	

DNA, 利用基因特异性的引物(表1)PCR扩增目的片段(含有sgRNA靶位点), Sanger测序检测突变形式和突变效率。

2 结果与讨论

2.1 水稻原生质体中瞬时表达rBE3以检测其编辑活性

为了验证CRISPR/Cas9n引导的胞嘧啶脱氨酶在

水稻细胞中的活性, 按照水稻密码子使用的偏好性, 分别优化了来源于大鼠的APOBEC1基因和来源于枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)噬菌体PBS1的UGI基因, 各自3'端带有XTEN衔接序列或核定位信号肽(nuclear localization signal, NLS)序列, 最后分别连接到Cas9n基因的两端, 使之编码融合蛋白APOBEC1-XTEN-Cas9n-UGI-NLS(命名为rBE3)(图1B)。将在CaMV 35S启动子驱动的rBE3和水稻U6启动子驱动转录的打靶*OsCERK1*基因的sgRNA在水稻叶鞘原生质体中进行共表达^[7]。转

图1 水稻基因碱基编辑器的模型及序列(网络版彩图)

A: rBE3体系介导的特异性的碱基C定向转化为碱基U示意图; B: rBE3和rBE4水稻转化体系的基因结构图; C: 水稻密码子优化的*APOBEC1*基因序列(5'→3'); D: 水稻密码子优化的*UGI*基因序列(5'→3')

染2天后收集原生质体,提取基因组DNA,并通过限制性内切酶*Bam*H I 消解去除未发生编辑的靶位点,富集携带有成功碱基替换的靶位点区域片段(图2B),最后对基因组DNA靶位点区域进行PCR扩增和Sanger法测序。结果表明,在31个阳性克隆中,*OsCERK1*具有两种不同的突变类型,其中28个发生了CCC>TTT替换(图2A和C),3个为CC>TT替换;与哺乳动物细胞中的报道相类似,rBE3所诱发的C>T替换发生在PAM(protospacer adjacent motif)序列上游-19~-13 bp的7 bp活性位点框内^[2]。值得注意的是,在PCR扩增产物中,未检测到Cas9n切口酶可能引起的核苷酸插入或缺失事件(insertion-deletion, InDel)发生,可能与其活性较低有关(数据未显示)。综上所述,在UGI蛋白存在的情况下,Cas9n引导的APOBEC1在水稻细胞中偏好将C诱导转换为T,具有生物活性。

2.2 rBE3诱导的基因碱基编辑

为了探索rBE3蛋白在水稻植株细胞内是否能成功

诱导C向T(或G向A)转换。将pUbi-Cas9载体中的*Cas9*基因替换为*rBE3*基因^[7],构建了基于Gateway系统的二元载体pUbi-rBE3,用于农杆菌介导的水稻转化。其中,*rBE3*转录由玉米泛素蛋白启动子(Ubi-p)驱动,“Gateway att”位点能够接受1~4条基因打靶sgRNA,进行单位点和多位点的编辑。*OsSERK1*是拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)基础型抗性途径关键基因*BAK1*在水稻中的同源基因,编码着类受体激酶,理论上其428处的保守氨基酸天冬氨酸突变为天冬酰胺可导致其激酶活性的丧失。为了创制*OsSERK1*(D428N)水稻突变体,设计了*OsSERK1*基因的打靶sgRNA(图3A),对水稻品种Ki-taake进行遗传转化。对获得的41个T₀转基因独立株系进行Sanger测序分析,共获得7个独立突变体株系(突变率为17.07%),且均为杂合体(图3C)。其中,5个株系为预期突变体,在基因打靶位置-16上发生G>A(D428N)单核苷酸替换(图3D);1个株系携带G>C替换,编码突变体蛋白*OsSERK1*(D428Y)(图3E);1个株系在基因打靶位置-14和-16处具有两个核苷酸突变(图3B)。前人

图 2 瞬时表达rBE3对水稻原生质体中*OsCERK1*的靶位点碱基编辑

A: rBE3体系介导水稻原生质体中*OsCERK1*胞嘧啶被替换; B: 在水稻原生质体中对*OSCERK1*进行碱基编辑的PCR/RE检测; M: DNA marker; 1: rBE3和sgRNA共处理的水稻原生质体; 2: rBE3处理的水稻原生质体; C: Sanger测序结果显示rBE3介导的*OsCERK1*基因靶位点处的3个胞嘧啶被替换; PAM序列用绿色标记, 编辑活性窗中假定靶位点碱基用红色标记, 检测到发生替换的碱基用蓝色或下划线(测序峰图)标记

图 3 利用rBE3对在水稻T₀代植株中的*OsSERK1*进行靶位点碱基编辑

A: rBE3介导的碱基编辑将水稻中的*OsSERK1*激酶失活; B: rBE3介导*OsCERK1*基因靶位点处两个G被A替换; C: 分析T₀代植株检测结果, 发现rBE3介导*OsSERK1*碱基编辑效率为17.0%, 且未检测到碱基插入或缺失; D: Sanger测序结果显示*OsSERK1*靶位点处-16 G>A(D428N); E: Sanger测序结果显示*OsSERK1*靶位点处-16 G>C(D428Y). PAM序列用绿色标记, 编辑活性窗中假定靶位点碱基用红色标记, 检测到发生替换的碱基用蓝色或下划线(测序峰图)标记

研究靶碱基C前面的核苷酸碱基对碱基替换效率具有一定影响, 其编辑效率遵从TC>CC>AC>GC法则^[2]. 因此, AC-14的替换可能太少而不易被检测到. 值得一提的是, 没有检测到任何由Cas9n切口酶引起的InDel(数据未显示).

为了进一步检测rBE3蛋白在水稻植株中的靶标碱基替换效率, 同时选择了*OsSERK2*和*ipa1*两个基因进行打靶实验. *OsSERK2*是拟南芥*BAK1*在水稻中的另一个同源基因, 也试图利用该技术创制其激酶失活突变体植株*OsSERK2(D433N)*(图4A). *ipa1*编码OsSPL14蛋白, 其转录后翻译受OsmiR156调控. 在*ipa1*基因内OsmiR156靶位点处引入点突变理论上可破坏其调控作用, 从而导致水稻植株形成理想株型^[10], 通过使用rBE3破坏*ipa1*中的OsmiR156切割位点而不改变OsSPL14的氨基酸序列是通过分子育种手段创造水稻理想株型的完美策略(图5A). 如图4B和C中所示, 在19个*OsSERK2*转基因独立株系中, 2株为杂合体, 均携带预期的G₋₁₅A向A₋₁₅A替换, 为*OsSERK2(D433N)*水稻突变体. 而位于编辑活性窗口内的G₋₁₈T和G₋₁₃T位置未检测到任何碱基替换发生(图4C). 对于*ipa1*, 从36个独立株系中筛选出14个突变体株系(编辑效率为38.9%). 其中, 8个株系在-15位发生了C>T转换, 其破坏miRNA识别序列而不改变所在位置亮氨酸的翻译(图5C和D). 意外的是, 在另外6个株系中发现了C被G取代(图5B和D). 目前还不清楚为何在UGI蛋白结构域存在的情况下会

发生如此高频率的非预期核苷酸转换, 有可能是由于染色质标记或miRNA的干扰作用导致的. 对于TC₋₁₈, 未检测到核苷酸的变化. 此外, 在*OsSERK2(D433N)*和*ipa1*打靶区域中均未检测到可能由Cas9n切口酶引起的InDel(数据未显示). 综述所述, 利用rBE3蛋白在水稻植株中进行靶标基因碱基定向替换是切实可行的, 且与基于CRISPR/Cas9系统介导的基因置换相比, 前者在编辑效率和转化方法的成本方面更具竞争力.

2.3 rBE4诱导的基因碱基编辑

根据CRISPR/Cas9的工作原理, rBE3蛋白由Cas9n引导至基因组靶标位点需要完成对PAM序列的识别以及sgRNA与靶位点的结合. 根据Cas9晶体结构人工引入氨基酸点突变, 改造Cas9蛋白, 可赋予其对不同PAM序列识别的属性. 因此, 为了扩大碱基编辑器在水稻中的应用, 将Cas9n突变为Cas9n(VQR), 构建了*APOBEC1-XTEN-Cas9n(VQR)-UGI-NLS*融合基因的双元载体pUbi-rBE4, 用于水稻遗传转化, rBE4在水稻中识别的PAM序列为NGA, AGTG和AGCG等.

*Pi-ta*是水稻中已克隆的单拷贝稻瘟病抗性基因, *Pi-ta*与其隐性等位基因*pi-ta*的序列和功能研究表明, 其编码蛋白氨基酸序列中唯一的区别在于第918位氨基酸, 所在位置丙氨酸被丝氨酸的替代会造成蛋白功能的丧失^[11]. 该位点区域没有可供rBE3识别的PAM

图4 利用rBE3对在水稻中的*OsSERK2*进行靶位点碱基编辑

A: rBE3介导的碱基编辑将水稻中的*OsSERK2*激酶失活; B: rBE3介导*OsSERK2*基因靶位点处G被替换为A; C: 分析T₀代植株检测结果, 发现rBE3介导*OsSERK2*碱基编辑效率为10.5%, 且未检测到碱基插入或缺失. PAM序列用绿色标记, 编辑活性窗口中假定靶位点碱基用红色标记, 检测到发生替换的碱基用蓝色或下划线(测序峰图)标记

序列, 而存在rBE4的识别序列(图6A). 因此, 为了测试rBE4的效率, 对Kitaake基因组中*pi-ta*基因靶位点处设计了sgRNA, 以期创造*pi-ta*(S918F)材料. 在获得的11个转基因独立株系中, 鉴定出2株突变体发生了预期的TC₋₁₆至TT₋₁₆替换(效率为18.2%)(图6B和C). 与上述发现相似, 除了T-16之外没有检测到其他核苷酸的变化(数据未显示). 由此可见, 识别不同PAM序列的rBE4在水稻细胞中也具有功能活性, 在水稻应用中是rBE3

强有力的补充.

综上所述, rBE3和rBE4对PAM序列上游-19和-13位置之间的7碱基活性窗口内的胞嘧啶碱基具有修饰功能, 经基因组DNA重新复制后引导其突变为其他核苷酸碱基, 在UGI的作用下偏好向胸腺嘧啶碱基转换. 另外, 胞嘧啶碱基的转换效率受前一位核苷酸碱基影响. 对于APOBEC1, TC效率较高, AC和CC次之, 但GC效率最低(表2).

图5 利用rBE3对在水稻中的*ipa1*进行靶位点碱基编辑

A: 在农杆菌介导的遗传转化下, rBE3通过破坏*ipa1*中的miRNA156结合位点而使*ipa1*突变为*IPA1*; B: rBE3介导*OsCERK1*基因靶位点处呈C>G替换; C: rBE3介导*OsCERK1*基因靶位点处呈C>T替换; D: 分析T₀代植株检测结果, 发现rBE3介导*ipa1*碱基编辑效率为38.9%, 且未检测到碱基插入或缺失. PAM序列用绿色标记, 编辑活性窗口中假定靶位点碱基用红色标记, 检测到发生替换的碱基用蓝色或下划线(测序峰图)标记

表2 rBE3和rBE4系统对T₀代水稻植株靶位点碱基编辑的效率统计^{a)}

靶标基因	碱基编辑器	T ₀ 植株	编辑效率			
			AC	TC	CC	GC
<i>OsCERK1</i>	rBE3	—	—	√	√	—
<i>OsSERK1</i>	rBE3	43	2.4%	14.6%	—	—
<i>OsSERK2</i>	rBE3	16	0.0%	10.5%	—	—
<i>ipa1</i>	rBE3	36	—	38.9%	—	—
<i>Pi-ta</i>	rBE4	11	—	18.2%	—	—
<i>OsBR11</i>	rBE3	34	—	—	—	0.0%

a) —: 靶位点区不存在相应类型的编辑; √: 此类编辑发生在原生质体中

图 6 利用 rBE4 对在水稻中的 *pi-ta* 进行靶位点碱基编辑

A: rBE4 使 918 位的丙氨酸被突变为丝氨酸的工作示意图; B: rBE4 介导 *pi-ta* 基因靶位点处呈 C>T 替换; C: 分析 T₀ 代植株检测结果, 发现 rBE3 介导 *pi-ta* 碱基编辑效率为 18.2%, 且未检测到碱基插入或缺失。PAM 序列用绿色标记, 编辑活性窗中假定靶位点碱基用红色标记, 检测到发生替换的碱基用蓝色或下划线(测序峰图)标记

3 结论

本研究组开发了一个全新 CRISPR/Cas9 基因编辑工具箱, 其能广泛地应用于水稻基因组中靶标基因单碱基定向突变, 以此创制基因功能获得性突变体材料。多个打靶 sgRNA 可轻松地通过酶切, 插入到克隆载体中, 并通过 gateway 反应整合至二元载体用于水稻遗传

转化, 进行多位点打靶。此基因编辑器在植物中的应用比通过 HR 的基因替换或通过 NHEJ 的基因插入更加有效和经济; 通过农杆菌介导的植物转化也容易分离到携带有预期遗传变异的植物材料。rBE 系统的成功开发, 为植物研究领域科研人员提供一个重要的基因功能研究工具, 并在分子育种方向上为培育水稻新品种提供了新的策略。

参考文献

- 1 Ma X, Zhu Q, Chen Y, et al. CRISPR/Cas9 platforms for genome editing in plants: developments and applications. *Mol Plant*, 2016, 9: 961–974
- 2 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
- 3 Saraconi G, Severi F, Sala C, et al. The RNA editing enzyme APOBEC1 induces somatic mutations and a compatible mutational signature is present in esophageal adenocarcinomas. *Genome Biol*, 2014, 15: 417
- 4 Kunz C, Saito Y, Schär P. DNA repair in mammalian cells. *Cell Mol Life Sci*, 2009, 66: 1021–1038
- 5 Ran F A, Hsu P D, Lin C Y, et al. Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell*, 2013, 154: 1380–1389
- 6 Jiang W, Zhou H, Bi H, et al. Demonstration of CRISPR/Cas9/sgRNA-mediated targeted gene modification in *Arabidopsis*, tobacco, sorghum and rice. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41: e188–e188
- 7 Zhou H, Liu B, Weeks D P, et al. Large chromosomal deletions and heritable small genetic changes induced by CRISPR/Cas9 in rice. *Nucleic Acids Res*, 2014, 42: 10903–10914
- 8 Hiei Y, Ohta S, Komari T, et al. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *Plant J*, 1994, 6: 271–282
- 9 Porebski S, Bailey L G, Baum B R. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. *Plant Mol Biol Rep*, 1997, 15: 8–15

- 10 Jiao Y, Wang Y, Xue D, et al. Regulation of *OsSPL14* by OsmiR156 defines ideal plant architecture in rice. [Nat Genet](#), 2010, 42: 541–544
- 11 Bryan G T, Wu K S, Farrall L, et al. tA single amino acid difference distinguishes resistant and susceptible alleles of the rice blast resistance gene Pi-ta. [Plant Cell](#), 2000, 12: 2033