

利用 CRISPR-Cas9 系统高效创制水稻品系“17318”的 OsGW2、OsGN1a 基因定向突变体

周建平¹, 吉琳艺¹, 何瑶¹, 郑雪莲¹, 罗樊², 蔡光泽^{2*}, 张勇^{1*}

(1.电子科技大学生命科学与技术学院信息生物学中心,成都 610054;2.西昌学院,四川 西昌 615013)

摘要: CRISPR-Cas9 系统在水稻功能基因的功能研究、性状改良与分子设计育种中起着重要的作用。本研究成功构建了水稻高效定向敲除 OsGW2 和 OsGN1a 的 CRISPR/Cas9 载体 pZJP049。并将该载体通过农杆菌介导转化水稻“17318”愈伤,获得水稻再生苗。PCR 扩增的方法进行转基因植株阳性检测,结果显示阳性率为 100%。PCR-RFLP 结果表明 OsGN1a 基因位点的突变效率为 77.7%。PCR-SSCP 检测结果显示 OsGW2 基因位点突变率为 100%。双基因聚合突变体(gw2gw2gn1agn1a)的种子在长度和宽度均有明显增加,与预期一致。本研究通过 CRISPR-Cas9 系统快速聚合 Gn1a, GW2 基因,实现了目标性状的精确改良。

关键词: CRISPR-Cas9; 水稻; OsGW2; OsGN1a

中图分类号: Q943.2; S511.033 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673-1891(2018)03-0001-05

Creation Mutants of OsGW2 and OsGN1a in Rice Cultivar “17318” via CRISPR/Cas9

ZHOU Jian-ping¹, JI Lin-yi¹, HE Yao¹, ZHENG Xue-lian¹, LUO Fan², CAI Guang-ze^{2*}, ZHANG Yong^{1*}

(1.Center for Informational Biology, School of Life Science and Technology, University of Electronic Science and Technology of China, Chengdu 610054, China; 2. Xichang University, Xichang, Sichuan 615013, China)

Abstract: CRISPR-Cas9 has significant influence on gene function research, agronomic traits improvement and molecular design breeding. This research successful constructed highly efficient vector pZJP049 that act as OsGW2 and OsGN1a double gene knockout. And we transformed pZJP049 into “17318” through agrobacterium mediation, obtained transformation. PCR verified positive rate in seedling is 100%. PCR-RFLP showed mutant efficiency at OsGN1a is 77.7%. PCR-SSCP showed mutant efficiency at OsGW2 is 100%. The grain size (the grain length and width) in the double mutant (gw2gw2gn1agn1a) is larger than WT. This research achieved the integration of GN1a and GW2 and precise gene editing by CRISPR-Cas9.

Keywords: CRISPR-Cas9; *Oryza sativa*; OsGW2; OsGN1a

传统创制突变体的方法主要有辐射诱变、化学诱变剂处理、转座子插入及 T-DNA 插入等^[1]。尽管这些诱变方法都能够使植株发生突变,但是其突变位点是随机产生,由此也增加了突变体的筛选难度。近几年来,基因编辑技术成为一种新兴的创制突变体的方法。其主要是运用特异的核酸酶定向使目标基因产生 DNA 双链断裂(double-strand break, DSB),断裂的 DNA 能够激活细胞内固有的非同源末端连接(Non-homologous-ending-joining,

NHEJ)或同源重组(Homologous recombination, HR)两种不同的修复机制对其进行修复^[2-3],从而实现对其基因组的定点编辑。

早期的基因编辑技术主要包括锌指核酸酶(Zinc-finger nucleases, ZFNs)和转录激活因子样效应物核酸酶(Transcription activator-like effector nucleases, TALENs),它们都是由特异性的 DNA 识别结构域和具有 DNA 剪切功能的 Fok I 核酸内切酶组成。ZFNs 的 DNA 识别结构域由 3~4 个

收稿日期:2018-02-28

基金项目:四川省国际科技合作与交流研发项目(2018HH0112);四川省青年科学基金项目(2017JQ0005);中央高校基本科研基金项目(ZYGX2016J119、ZYGX2016J122)。

作者简介:周建平(1975—),男,四川安州人,副教授,博士,研究方向:生物化学与分子生物学。*为通信作者。

Cys2-His2 锌指蛋白(zinc-fingers)串联组成,每个锌指蛋白识别并结合一个特异的三联体碱基^[4]。TALENs 的 DNA 识别结构域由一系列植物病原菌黄单胞菌(*Xanthomonas*)自然分泌的 TAL 效应子蛋白串联重复组成,每个 TAL 效应子只能识别一个碱基^[5]。近几年来,ZFNs 和 TALENs 被应用于植物基因组的编辑中^[6],这为植物突变体创制和育种提供了新的思路。但是 ZFNs 和 TALENs 这两项实验技术操作难度大,载体的构建较为复杂,耗时长,且效率低,一般实验室很难有效利用。

2013 年,多个研究组相继发表了应用 CRISPR/Cas9 (Clustered regularly interspaced short palindromic repeats)作为一种新的基因编辑工具对基因进行改造的文章^[7-12]。CRISPR/Cas 系统结构早在 1987 年就已经被发现^[13],但是直到 2007 年才被首次证明该系统与细菌免疫系统相关^[14],是细菌保护机体免受病毒或质粒 DNA 入侵的一种免疫机制。这种免疫保护主要是通过细菌体内具有的序列特异性小 RNA 沉默外来入侵的核苷酸来完成的^[15]。

CRISPR-Cas9 系统因其设计操纵简便、编辑高效与通用性广等优势而广泛应用于动物、植物、微生物基因组的定向修饰及遗传改良中^[16-21]。最近,研究者发展了新的 II 型 CRISPR-Cas 系统—CRISPR/Cpf1 系统^[22-23],它主要优点是删除片断比较大(大多为 6~13 bp),目前已经在植物中加以应用^[24-26]。

水稻籽粒大小和穗粒数是与产量直接相关的重要性状,同时与水稻的品质有密切关系。到目前为止,一些控制籽粒大小和穗粒数的基因被成功克隆并用于育种中^[27-28]。GW2 是一个控制粒宽和粒重的主效基因,GW2 编码一个环型 E3 泛素连接酶,GW2 功能缺失会加快水稻籽粒灌浆速率,导致粒宽增大、粒重和产量增加。另外,虽然增大了粒宽,但对籽粒外观品质影响很小,而且几乎没有影响到蒸煮和食味品质^[29]。GN1a 是第一个被克隆的控制穗粒数的 QTL,位于第 1 染色体的短臂,编码细胞分裂素氧化酶/脱氢酶 2,能够降解细胞分裂素。GN1a 表达量的下降或者功能缺失,使得颖花分生组织中细胞分裂素大量积累,增加二次枝梗数,引起颖花数目的增加,最终增加了每穗粒数,进而提高了产量^[28]。运用现代生物技术手段快速创制并聚合这些基因的突变体,将大大加速水稻育种的进程。

本文利用 CRISPR-Cas9 系统定向创制并获得了水稻品系“17318” OsGW2、OsGN1a 基因的突变体,不仅可以为水稻育种储备更多的遗传资源,还

可以为加速水稻育种进程提供新的方法和思路。

1 材料与方法

1.1 材料

水稻品系“17318”。

1.2 实验方法

1.2.1 载体构建

以 pZHY988 质粒作为模板,用引物 OsGW2-sgRNA1-P1F (caccgtctcAgtgtGGTGTAAGACAAAGGgttttagactagaaata) 和 General-P1R (CGCCAATATA TCCTGTCAAA)进行扩增。

以 pZHY988 质粒作为模板,用引物 General-P2F (tttgacagatatattggcgAGGATccgcGGATCATG) 和 OsGN1a-sgRNA1-P2R (CGATGGTCTC CAAACCCCTG CAGGCGGCCG AGCGACACAC AAGCGACAGC GC)进行扩增。

将上述两个 PCR 产物回收,等量混合,并以此为模板,用 OsGW2-sgRNA1-P1F, OsGN1a-sgRNA1-P2R 为引物,做融合 PCR。将融合 PCR 产物直接回收,通过 Golden Gate 反应与 pZHY988 进行连接。

连接产物转化大肠杆菌,菌落 PCR 验证,挑选阳性克隆摇菌,提质粒,测序,最后转化农杆菌。

1.2.2 农杆菌介导的遗传转化

根据文献[30]提供的方法进行。

1.2.3 再生苗转基因阳性检测

水稻苗 DNA 提取采用 CTAB 法,利用引物 TX067-ZmUbi-F: CATATGCAGCAGCTATATGTGGA; ZY295-Cas9-HP-2: TCTTCTCACCAGGGAGCTGAGCA 进行 PCR 的方法鉴定阳性植株。PCR 反应条件为:94 ℃ 5 min;94 ℃ 30 s,56 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s(35 cycles);72 ℃ 5 min;10 ℃ 10 min。

1.2.4 突变体的鉴定

对于 OsGN1a 基因位点,采用限制性片段长度多态性聚合酶链反应(Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism, PCR-RFLP) 技术进行初步鉴定。用引物 OsGN1a-PstI-F2: GCCTCCTTCCTCGACGACCT 和 OsGN1a-PstI-R3: GGTGAGGTGGAGGTAGTCTGT 进行 PCR 后,取 10 μL PCR 产物用 Pst I 酶切,后琼脂糖凝胶电泳检测扩增效果。

对于 OsGW2 基因位点,采用 PCR-SSCP 进行突变体的初步筛选,具体方法见文献[31]。首先用引物 OsGW2-SSCP-F1: CTCACA CTGCTCAGCC TACAC 和 OsGW2-SSCP-R1: GTGCTTCTATGACT

野生型的主穗长约 22 cm。双基因聚合突变体 T0 植株 4-1 所结种子在长度和宽度均有明显增加(图 6),这与预期结果一致。

a: 种子长度



b: 种子宽度



注:标尺为 1cm。

图 6 突变体植株 4-1 所结种子大小。

3 讨论

自 CRISPR/Cas9 技术在植物中开始应用以来,针对它的剪切效率报道表明其远远高于 ZFNs 和 TALENs,但却因物种、靶基因、靶位点、脱靶效应、转化方式等因素的影响,Cas9 的剪切效率也不尽相同。Li^[6]发现 Cas9 在拟南芥原生质体中的效率为 1.1%~5.6%,而在烟草原生质体中效率大大增加,为 37.7%~38.5%。Yang 等^[32]在拟南芥中应用 Cas9 敲除一个位点的效率为 50%~89%,同时敲除 2 个位点的效率为 68%~74%。相反,Cas9 在水稻原生

质体中的效率为 14.5%~38%,而稳定转化的效率却只有 7.1%~9.4%^[18]。Zhang^[33]实验室应用 Cas9 在水稻中靶向了 11 个基因,单位点敲除效率为 22.1%~66.7%,双位点敲除效率为 5.7%~33.3%。除此之外,Cas9 还被应用于其他的模式植物中,在大豆中的剪切效率为 70%^[34],番茄中的剪切效率为 75%^[35],玉米中的剪切效率为 16.4%~19.1%^[36]。从我们的实验结果中可以看出,CRISPR/Cas9 在水稻中的工作效率很高,单位点敲除效率在 OsGN1a、OsGW2 基因位点的突变效率分别为 77.7%和 100%(表 1),而双位点敲除效率为 77.7%。

近来,研究者将 CRISPR/Cas9 系统应用于水稻功能基因的功能研究、性状改良与分子设计育种之中。刘耀光课题组利用 CRISPR/Cas9 系统研究了水稻雄性不育机制^[37],高彩霞课题组利用 CRISPR-Cas9 系统获得了对草甘膦具有抗性的材料^[16],王克剑课题组利用 CRISPR/Cas9 系统定向改良不同水稻品种的 GN1a, DEP1, GS3, IPA1 等基因^[38-39]。我们利用 CRISPR/Cas9 系统在水稻品系“17318”中定向、高效创制、并快速聚合 GN1a, GW2 基因,实现了目标性状的精确改良,为水稻定向育种提供了新的高效方法。

参考文献:

- [1] TILL B J, REYNOLDS S H, GREENE E A, *et al.* Large-scale Discovery of Induced Point Mutations with High-throughput TILLING [J]. *Genome Res.*, 2003,13:524-530.
- [2] BIBIKOVA M, GOLIC M, GOLIC K G, *et al.* Targeted Chromosomal Cleavage and Mutagenesis in Drosophila Using Zinc-finger Nucleases [J]. *Genetics*, 2002,161(3):1169-1175.
- [3] SALOMON S, PUCHTA H. Capture of Genomic and T-DNA Sequences during Double-strand Break Repair in Somatic Plant Cells [J]. *The EMBO Journal*, 1998,17(20):6086-6095.
- [4] WOOD A J, LO T W, ZEITLLEL B, *et al.* Targeted Genome Editing Across Species Using ZFNs and TALENs [J]. *Science*, 2011,333(6040):307-307.
- [5] LI T, HUANG S, ZHAO X F, *et al.* Modularly Assembled Designer TAL Effector Nucleases for Targeted Gene Knockout and Gene Replacement in Eukaryotes [J]. *Nucleic Acids Res*, 2011,39(14):6315-6325.
- [6] BOGDANOVA A J, VOYTAS D F. TAL Effectors: Customizable Proteins for DNA Targeting [J]. *Science*, 2011,333(6051):1843-1846.
- [7] CHO S W, KIM S, KIM J M, *et al.* Targeted Genome Engineering in Human Cells with the Cas9 RNA-guided Endonuclease [J]. *Nature Biotechnology*, 2013,31(3):230-232.
- [8] CONG L, RAN F A, COX D, *et al.* Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems [J]. *Science*, 2013,339(6121):819-823.
- [9] HWANG W Y, FU Y F, REYOU D, *et al.* Efficient Genome Editing in Zebrafish Using a CRISPR-Cas System [J]. *Nature Biotechnology*, 2013,31(3):227-229.
- [10] JIANG W Y, BIKARD D, COX D, *et al.* RNA-guided Editing of Bacterial Genomes Using CRISPR-Cas Systems [J]. *Nature Biotechnology*, 2013,31(3):233-239.
- [11] JINEK M, EAST A, CHENG A, *et al.* RNA-programmed Genome Editing in Human Cells [J]. *Elife*, 2013(2):208-209.
- [12] MALI P, YANG L H, ESVELT K M, *et al.* RNA-Guided Human Genome Engineering via Cas9 [J]. *Science*, 2013,339(6121):823-826.

- [13] ISHINO Y, SHINAQAWA H, Makino K, *et al.* Nucleotide Sequence of the *Iap* Gene, Responsible for Alkaline Phosphatase Isozyme Conversion in *Escherichia Coli*, and Identification of the Gene Product [J]. *Journal of Bacteriology*, 1987, 169(12): 5429-5433.
- [14] BARRANGOU R, FREMAUX C, DEVEAU H, *et al.* CRISPR Provides Acquired Resistance against Viruses in Prokaryotes [J]. *Science*, 2007, 315(5819): 1709-1712.
- [15] JINEK M, CHYLINSKI K, FONFARA I, *et al.* A Programmable Dual-RNA-guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity [J]. *Science*, 2012, 337(6096): 816-821.
- [16] LI J, MENG X, ZONG Y, *et al.* Gene Replacements and Insertions in Rice by Intron Targeting Using CRISPR-Cas9 [J]. *Nat Plants*, 2016, (2): 16139.
- [17] LI J F, NORVILLE J E, AACH J, *et al.* Multiplex and Homologous Recombination-mediated Genome Editing in *Arabidopsis* and *Nicotiana Benthiana* Using Guide RNA and Cas9 [J]. *Nat Biotechnol.* 2013, 31(8): 688-691.
- [18] SHAN Q, WANG Y, Li J, *et al.* Targeted Genome Modification of Crop Plants Using a CRISPR-Cas System [J]. *Nat Biotechnol.* 2013, 31(8): 686-688.
- [19] WANG Y, CHENG X, SHAN Q, *et al.* Simultaneous Editing of Three Homoeoalleles in Hexaploid Bread Wheat Confers Heritable Resistance to Powdery Mildew [J]. *Nat Biotechnol.* 2014, 32(9): 947-951.
- [20] NIU D, WEI H J, LIN L, *et al.* Inactivation of Porcine Endogenous Retrovirus in Pigs Using CRISPR-Cas9 [J]. *Science*, 2017, 4187.
- [21] ZHOU J, DENG K, CHENG Y, *et al.* CRISPR-Cas9 Based Genome Editing Reveals New Insights into MicroRNA Function and Regulation in Rice [J]. *Front. Plant Sci.* 2017(8): 1598.
- [22] ZETSCHKE B, GOOTENBERG J S, Abudayyeh O O, *et al.* Cpf1 is a Single RNA-guided Endonuclease of a Class 2 CRISPR-Cas System [J]. *Cell*, 2015, 163: 759-771.
- [23] KIM H, KIM S T, RYU J, *et al.* CRISPR/Cpf1-mediated DNA-free Plant Genome Editing [J]. *Nat Commun.* 2017, 8: 14406.
- [24] XU R, QIN R, LI H, *et al.* Generation of Targeted Mutant Rice Using a CRISPR-Cpf1 System [J]. *Plant Biotechnol J.* 2016, 12669.
- [25] ENDO A, MASAFUMI M, KAYA H, *et al.* Efficient Targeted Mutagenesis of Rice and Tobacco Genomes Using Cpf1 from *Francisella Novicida* [J]. *Sci Rep.* 2016(6): 38169.
- [26] TANG X, LOWDER L G, ZHANG T, *et al.* A CRISPR-Cpf1 System for Efficient Genome Editing and Transcriptional Repression in Plants. *Nat Plants*, 2017(3): 17018.
- [27] HU X, WANG C, LIU Q, *et al.* Targeted Mutagenesis in Rice Using CRISPR-Cpf1 System [J]. *J Genet Genomics.* 2016.
- [28] ASHIKARI M, SAKAIBARA H, LIN S, *et al.* Cytokinin oxidase Regulates Rice Grain Production [J]. *Science*, 2005, 309: 741-745.
- [29] SONG X J, HUANG W, SHI M, *et al.* A QTL for Rice Grain Width and Weight Encodes a Previously Unknown RING-type E3 Ubiquitin Ligase [J]. *Nat Genet.* 2007, 39: 623-630.
- [30] TOKI S, HARA N, ONO K, *et al.* Early Infection of Scutellum Tissue with *Agrobacterium* Allows High-speed Transformation of Rice [J]. *The Plant Journal.* 2006, 47: 969-976.
- [31] ZHENG X, YANG S, ZHANG D, *et al.* Effective Screen of CRISPR/Cas9-induced Mutants in Rice by Single-strand Conformation Polymorphism [J]. *Plant Cell Rep.* 2016, 35(7): 1545-1554.
- [32] MAO Y F, ZHANG H, XU N F, *et al.* Application of the CRISPR-Cas System for Efficient Genome Engineering in Plants [J]. *Molecular Plant.* 2013(6): 2008-2011.
- [33] ZHANG H, ZHANG J S, WEI P L, *et al.* The CRISPR/Cas9 System Produces Specific and Homozygous Targeted Gene Editing in Rice in One Generation [J]. *Plant Biotechnology Journal.* 2014, 12(6): 797-807.
- [34] JACOBS T B, LAFAYETTE P R, Schmitz R J, *et al.* Targeted Genome Modifications in Soybean with CRISPR/Cas9 [J]. *BMC Biotechnology.* 2015, 15: 16.
- [35] BROOKS C, NEKRASOV V, LIPPMAN Z B, *et al.* Efficient Gene Editing in Tomato in The First Generation Using the Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR-associated 9 System [J]. *Plant Physiology.* 2014, 166(3): 1292-1297.
- [36] LIANG Z, ZHANG K, CHENG K, *et al.* Targeted Mutagenesis in Zea Mays Using TALENs and the CRISPR/Cas System [J]. *Journal of Genetics and Genomics.* 2014, 41(2): 63-68.
- [37] SHEN R, WANG L, LIU X, *et al.* Genomic Structural Variation-mediated Allelic Suppression Causes Hybrid Male Sterility in Rice [J]. *Nat Commun.* 2017, 8(1): 1310.
- [38] LI M, LI X, ZHOU Z, *et al.* Reassessment of the Four Yield-related Genes *Gn1a*, *DEP1*, *GS3*, and *IPA1* in Rice Using a CRISPR/Cas9 System [J]. *Front Plant Sci.* 2016(7): 377.
- [39] SHEN L, WANG C, FU Y, *et al.* QTL Editing Confers Opposing Yield Performance in Different Rice Varieties [J]. *Integr. Plant Biol.* 2016, 60(2): 89-93.