

# 应用 CRISPR/Cas9 技术在杨树中高效敲除多个靶基因

刘婷婷, 范迪, 冉玲玉, 姜渊忠, 刘瑞, 罗克明

西南大学生命科学学院, 西南大学资源植物研究所, 重庆 400715

**摘要:** CRISPR/Cas9 系统是一种广泛应用于细菌、酵母、动物和植物中的基因组定点编辑技术。本课题组在前期工作中利用该系统在毛白杨(*Populus tomentosa* Carr.)中率先实现了对内源基因—八氢番茄红素脱氢酶(Phytoene dehydrogenase, PDS)基因的定点敲除。为研究靶点的设计和选择对该系统介导的杨树内源基因敲除效率的影响, 本文分析了不同单向导 RNA(Single-guide RNA, sgRNA)结合毛白杨 PDS(*PtPDS*)靶基因 DNA 序列后对突变效率的影响。结果发现 sgRNA 与靶基因间的碱基错配会导致突变的效率降低, 甚至不能突变, 其中 3' 端的碱基配对更为重要。进一步测序分析发现, 该系统能同时敲除杨树基因组上两个同源的 PDS 编码基因(*PtPDS1* 和 *PtPDS2*), 突变率分别达 86.4% 和 50%。研究证明该系统可快速高效地敲除两个以上的内源基因, 获得多重突变体杨树株系。利用该技术, 本课题组已获得多个杨树转录因子及结构基因的敲除突变体株系, 为将来开展基因功能研究和杨树遗传改良奠定了基础。

**关键词:** CRISPR/Cas9; 杨树; 定点敲除; 多基因; 八氢番茄红素脱氢酶

## Highly efficient CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis of multiple genes in *Populus*

Tingting Liu, Di Fan, Lingyu Ran, Yuanzhong Jiang, Rui Liu, Keming Luo

Institute of Resources Botany, School of Life Sciences, Southwest University, Chongqing 400715, China

**Abstract:** The type II CRISPR/Cas9 system (Clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated 9) has been widely used in bacteria, yeast, animals and plants as a targeted genome editing technique. In previous work, we have successfully knocked out the endogenous phytoene dehydrogenase (PDS) gene in *Populus tomentosa* Carr. using this system. To study the effect of target design on the efficiency of CRISPR/Cas9-mediated gene knockout in *Populus*, we analyzed the efficiency of mutagenesis using different single-guide RNA (sgRNA) that target PDS DNA sequence. We found that mismatches between the sgRNA and the target DNA resulted in decreased efficiency of mutagenesis and even failed mutagenesis. Moreover, complementarity between the 3' end nucleotide of sgRNA and target DNA is especially crucial for efficient mutagenesis. Further sequencing analysis showed that two PDS homologs in *Populus*, *PtPDS1* and *PtPDS2*, could be knocked out simul-

收稿日期: 2015-07-03; 修回日期: 2015-07-26

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 31300990, 31171620)和中央高校基本科研业务费(编号: XDJK2014C062)资助

作者简介: 刘婷婷, 硕士研究生, 专业方向: 植物遗传与发育。E-mail: 1023417738@qq.com

范迪, 讲师, 研究方向: 植物表观遗传。E-mail: fandi\_biology@163.com

刘婷婷和范迪同为第一作者。

通讯作者: 罗克明, 博士, 教授, 研究方向: 植物分子生物学和基因工程。E-mail: kemingl@swu.edu.cn

DOI: 10.16288/j.ycz.15-303

网络出版时间: 2015/9/22 16:23:03

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20150922.1623.003.html>

taneously using this system with 86.4% and 50% efficiency, respectively. These results indicated the possibility of introducing mutations in two or more endogenous genes efficiently and obtaining multi-mutant strains of *Populus* using this system. We have indeed generated several knockout mutants of transcription factors and structural genes in *Populus*, which establishes a foundation for future studies of gene function and genetic improvement of *Populus*.

**Keywords:** CRISPR/Cas9; *Populus*; targeted mutagenesis; multiple genes; phytoene dehydrogenase (PDS)

随着锌指核酸酶(Zinc finger nuclease, ZFN)技术、转录激活样效应因子核酸酶(Transcription activator-like effector nucleases, TALEN)技术和成簇规律间隔短回文重复(Clustered regularly interspaced short palindromic repeat, CRISPR)技术为代表的基因组编辑新技术的出现,使得基因组定位修饰、定向突变和定点整合成为可能<sup>[1,2]</sup>。其中,CRISPR/Cas9 技术是基于细菌体内的获得性免疫机制改造而成,可通过一条单链的单向导 RNA(Single-guide RNA, sgRNA)来识别特定的 DNA 序列,并引导 Cas9 核酸内切酶剪切 DNA 双链<sup>[3]</sup>。相比 ZFN 和 TALEN 技术,CRISPR/Cas9 系统具有明显的优势:只需设计一段与靶位点配对的含几十个碱基的核苷酸序列,操作简单,实验周期短,花费不高。因此,该技术已被广泛应用于细菌、酵母和动物的基因组编辑中<sup>[4]</sup>。

2013 年,中国、美国和英国的 3 个研究团队同时报道了利用 CRISPR/Cas9 系统在植物中实现了对内源基因的定点突变:中国科学院遗传与发育生物学研究所高彩霞团队利用 CRISPR/Cas9 系统定点突变了水稻和小麦两个作物的 *OsPDS* 和 *TaMLO* 等 5 个基因,并通过同源重组 DNA 修复途径,利用单链寡核苷酸 DNA(Single-strand DNA, ssDNA)作为模板在基因组特定位点精确插入了 12 bp 序列<sup>[5]</sup>;哈佛大学和塞恩斯伯里实验室团队利用该技术分别在拟南芥和烟草中敲除了内源 *AtPDS* 和 *NbPDS* 等基因<sup>[6,7]</sup>。这些研究首次证实了 CRISPR/Cas9 系统能够用于植物的基因组编辑。到目前为止,人们利用该系统先后在模式植物拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、烟草(*Nicotiana benthamiana*)以及水稻(*Oryza sativa*)<sup>[8,9]</sup>、小麦(*Triticum aestivum*)<sup>[5,10]</sup>、玉米(*Zea mays*)<sup>[11]</sup>、高粱(*Sorghum bicolor*)<sup>[12]</sup>、二穗短柄草(*Brachypodium distachyon*)、番茄(*Lycopersicon esculentum*)<sup>[13]</sup>等作物中成功实现了基因组编辑,这也是目前唯一在植物中实现了广泛应用的基因组定点编辑技术<sup>[14]</sup>。然而,

多数研究都是在草本植物中展开,该技术在木本植物中的应用报道目前还比较少。

作为全球种植面积最大的速生经济林树种,杨树(*Populus*)具有重要的商业价值和生态价值。2006 年,杨树作为首个完成基因组测序的多年生木本植物<sup>[15]</sup>,其基因组信息的公布为在该物种中开展功能基因组学的研究奠定了基础。因此,近年来杨树已经发展为全世界公认的木本模式植物。然而,由于木本植物自身固有的特点,对杨树基因功能的研究存在诸多技术困难。尤其是其非常长的繁殖周期和较低的遗传转化效率,限制了遗传研究手段在杨树中的应用,导致人们迄今仅获得了极少数的杨树基因突变体<sup>[16,17]</sup>。因此,如果能通过新的技术手段实现高效的杨树基因突变,将十分有利于林木的遗传改良研究。

在前期工作中,本实验室利用一套改良的 CRISPR/Cas9 多靶点载体系统<sup>[18]</sup>,在杨树体内同时表达 Cas9 蛋白和多个针对八氢番茄红素脱氢酶(Phytoene dehydrogenase, PDS)基因的 sgRNA,在杨树体内实现了对内源基因的高效定点敲除,成功运用 CRISPR/Cas9 技术在木本植物中获得了稳定的基因定点敲除的突变体株系<sup>[19]</sup>。利用 CRISPR/Cas9 系统在 T<sub>0</sub> 代转基因杨树中可实现 50% 以上突变效率,具有快速、高效的特点,因而在杨树的功能基因研究和遗传改良中具有广泛的应用前景。2015 年,Zhou 等<sup>[20]</sup>利用 Cas9 技术在杨树中定点敲除了杨树内源的 *4CL* 基因。

为了进一步研究 CRISPR/Cas9 系统在杨树中的敲除特性,本研究设计和构建了含有不同 sgRNA 个数的一系列敲除载体,并遗传转化杨树,通过测序分析了 *PtPDS* 基因不同靶点上发生核酸序列改变的形式和效率,证明 sgRNA 内 3' 端的序列对于识别和介导靶基因突变更为重要,为杨树内源靶点的设计和选择提供了参考依据。进一步利用生物信息分析

和基因克隆,发现杨树基因组内存在两个同源的 *PDS* 编码基因,而多靶点系统能够同时识别和敲除这两个杨树内源 *PDS* 基因,导致突变体出现白化的表型,表明多靶点 CRISPR/Cas9 系统具备同时快速高效地敲除多个内源基因的优势。最后,本文利用该系统成功敲除了多个杨树内源基因,构建了杨树突变体库,为开展基因功能研究奠定了基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

毛白杨(*Populus tomentosa* Carr. clone 741)在温室中培养,温度 25℃,14 h/10 h 光照/黑暗,光照强度 4500 lx。根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)菌株 GV3101(本实验室保存)。pYLCRISPR/Cas9-DH 植物表达载体系统由华南农业大学刘耀光教授提供。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 杨树组培和遗传转化

遗传转化方法为叶盘法<sup>[21]</sup>。取杨树无菌苗幼嫩叶片,切成 0.5 cm 小块,菌液浸染 8~10 min;取出叶片,背面向下平铺在 WPM1[WPM 培养基(NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 400 mg/L、Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> · 4H<sub>2</sub>O 556 mg/L、K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 990 mg/L、CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O 96 mg/L、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 170 mg/L、Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O 0.25 mg/L、MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 370 mg/L、MnSO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O 22.4 mg/L、ZnSO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O 8.6 mg/L、CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O 0.25 mg/L、FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 27.8 mg/L、Na<sub>2</sub>-EDTA 37.3 mg/L、肌醇 100 mg/L、维生素 B1 1.0 mg/L、烟酸 0.5 mg/L、维生素 B6 0.5 mg/L、甘氨酸 2.0 mg/L、蔗糖 20 g/L、琼脂 6 g/L, pH 5.2)加萘乙酸 1.0 mg/L、乙酰丁香酮 100 μmol/L]共培养基上,暗培养 2 d;移到 WPM2(WPM 培养基加玉米素 2 mg/L、萘乙酸 1.0 mg/L、头孢霉素 400 mg/L、潮霉素 90 mg/L)选择培养基上,光照培养 3~4 周;长出愈伤后移入生芽培养基 WPM3(WPM 培养基加玉米素 2 mg/L、萘乙酸 0.1 mg/L、头孢霉素 400 mg/L、潮霉素 90 mg/L),光照培养 4~5 周;不定芽切下并转入 WPM4(WPM 培养基加萘乙酸 0.1 mg/L、头孢霉素 400 mg/L、潮霉素 90 mg/L)中生根。

#### 1.2.2 Cas9 靶点设计

基于 *PtPDS1* 基因组序列,本文利用在线工具 ZiFiT Targeter Version 4.2 (<http://zifit.partners.org/Zi->

FiT/Introduction.aspx)查找潜在的 Cas9 靶点<sup>[22]</sup>。根据靶点的位置和 GC 含量选择其中 4 个(T1/T2/T3/T4)设计 sgRNA(图 2A)。靶点的序列分别为 T1 5'-TGA-GTGCATTGAACTTGAGC-3'; T2: 5'-GTGTTATC-AAGGTCCGGTCT-3'; T3: 5'-TTCACCGTGTTATC-AAGGTC-3'; T4: 5'-CCATTAAATGTTGTCATTGC-3'。

#### 1.2.3 Cas9 植物表达载体构建

载体系统包含了双元的植物表达载体 pYLCRISPR/Cas9-DH 和针对 T1 到 T4 的 4 个 sgRNA 表达盒中间载体,前者以 35S 超表达 Cas9,后者分别以 *AtU3b*、*AtU3d*、*AtU6-1* 和 *AtU6-29* 四个启动子分别驱动 sgRNA 的表达<sup>[22]</sup>。载体构建采用 Golden Gate Cloning 方法<sup>[23]</sup>。

#### 1.2.4 基因组 DNA 提取

取恒定转化的 T<sub>0</sub> 代植株材料约 0.1 g,采用 CTAB 法提取杨树基因组 DNA。

#### 1.2.5 突变检测

以转基因植株的基因组 DNA 为模板,PCR 扩增杨树内源 *PDS* 基因 5'端部分序列。PCR 引物如下:

*PtPDS*-F: 5'-GTTGAATTTGGTTTTGGAGAAA-TG-3';

*PtPDS*-R1: 5'-CCAAGTATTTTGCAGTCGATA-AACCCG-3';

*PtPDS*-R2: 5'-CCAAATATTTTGCAGTAGATAA-ACCAG-3'。

用 *PtPDS*-F 和 *PtPDS*-R1 引物组合扩增 *PtPDS1*; 用 *PtPDS*-F 和 *PtPDS*-R2 引物组合扩增 *PtPDS2*。PCR 扩增产物经胶回收后连接到 pMD19-T Simple (宝生物工程(大连)有限公司)载体上,挑单克隆测序。利用 DNAMAN(Version 7.0)对所有测序获得的序列和 *PtPDS* 基因的参考序列进行比对分析,并进行统计。

## 2 结果与分析

### 2.1 多靶点 CRISPR/Cas9 系统敲除效率的分析

本实验室前期研究已经证明,针对杨树 1 个 *PtPDS* 基因序列上的不同靶点,用 4 个对应的 sgRNA 可高效地介导 Cas9 对杨树内源基因的敲除,在转基因 T<sub>0</sub> 代杨树即出现白化的表型<sup>[19]</sup>。然而,是不是一定需要多个 sgRNA 才能达到如此高的敲除效率?这

些 sgRNA 在导致杨树白化表型中的作用是否存在差异? 这些问题尚不清楚。因此, 本文设计了一组载体, 分别带有 4 个(*PtPDS*×4)、3 个(*PtPDS*×3)、2 个(*PtPDS*×2)和 1 个(*PtPDS*×1)针对 *PtPDS* 的 sgRNA。受该系统载体构建方法的限制, 这一组载体上携带哪些 sgRNA 是按照不同 sgRNA 表达盒连入载体的顺序, 而不是按照 sgRNA 在基因上结合位点的顺序来设计的。其中, *PtPDS*×4 含有针对杨树内源 *PDS* 座位上全部 4 个靶序列的 sgRNA; 而 *PtPDS*×3 含有结合 T1、T2、T4 的 sgRNA; *PtPDS*×2 含结合 T1、T4 的 sgRNA; *PtPDS*×1 只有一个结合 T1 位点的 sgRNA(图 1)。将上述载体和作为对照的空载体分别

转化杨树, 发现  $T_0$  代的再生植株在表型上有明显差异: *PtPDS*×4(图 1A)和 *PtPDS*×3(图 1B)转化的  $T_0$  代植株中, 有部分叶片和幼茎出现白化表型, 推测是因内源 *PDS* 缺陷导致叶绿素合成受阻所引起的。而 *PtPDS*×2(图 1C)和 *PtPDS*×1(图 1D)转化的植株中则未发现该白化的表型, 与转化空载体的对照组(表 1)一样, 均为正常的绿色。

经统计分析, 发现 *PtPDS*×4 和 *PtPDS*×3 的  $T_0$  代转化植株中分别有 51.7%(30/59)和 53.8%(21/39)出现白化表型, 两者间并无显著差异; 而 *PtPDS*×2 和 *PtPDS*×1 的相应比例为 0%(分别统计了  $T_0$  代植株 38 棵和 123 棵), 与前两者存在明显的差异(表 1)。

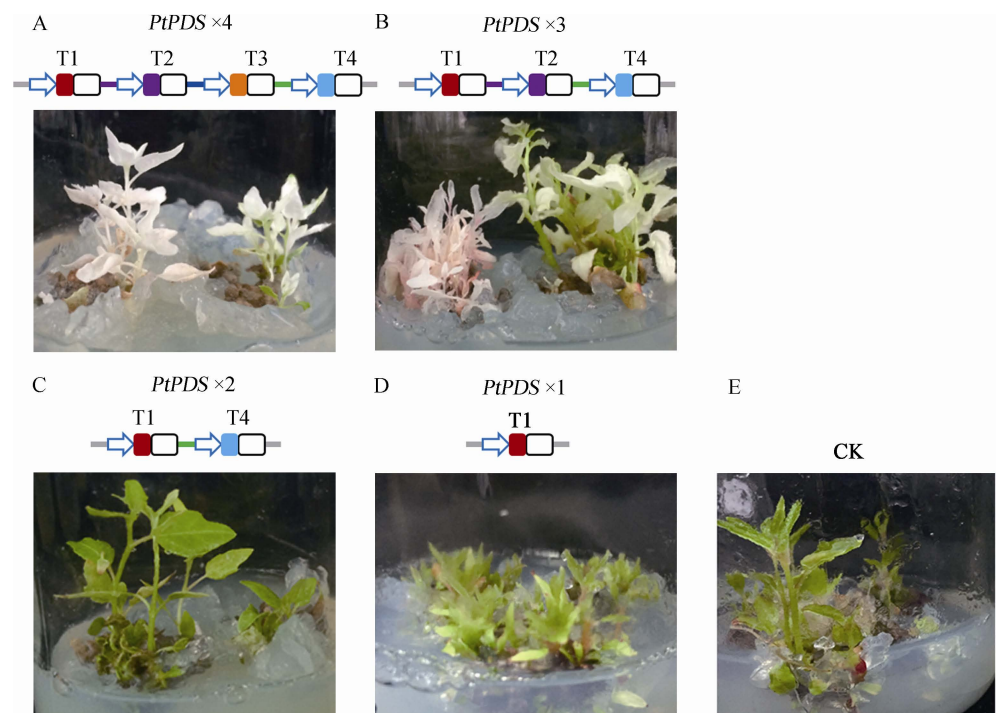


图 1 多靶点 CRISPR/Cas9 系统转化毛白杨后的  $T_0$  代表型分析  
A~D: 分别为各载体上携带 sgRNA 的情况和转化后再生苗的表型; E: 空白载体对照(CK)。

表 1  $T_0$  代 Cas9 转化杨树的表型分析

转化的质粒	转化阳性植株数	白化的植株数	突变率(%)	预期的纯合子		预期的杂合子	
				棵数	%	棵数	%
<i>PtPDS</i> ×4	59	30	51.7	28	47.5	2	3.4
<i>PtPDS</i> ×3	39	21	53.8	16	41.0	5	12.8
<i>PtPDS</i> ×2	38	0	0	ND	ND	ND	ND
<i>PtPDS</i> ×1	123	0	0	ND	ND	ND	ND
空载体(对照)	42	0	0	ND	ND	ND	ND

注: ND 表示未检测。



这一结果暗示, 结合 T3 的 sgRNA 对于导致植物白化可能无作用, 而结合 T2 的 sgRNA 对植物产生白化表型是必需的。

经统计分析, 发现 *PtPDS*×4 和 *PtPDS*×3 的  $T_0$  代转化植株中分别有 51.7%(30/59)和 53.8%(21/39) 出现白化表型, 两者间并无显著差异; 而 *PtPDS*×2 和 *PtPDS*×1 的相应比例为 0%(分别统计了  $T_0$  代植株 38 棵和 123 棵), 与前两者存在明显的差异(表 1)。这一结果暗示, 结合 T3 的 sgRNA 对于导致植物白化可能无作用, 而结合 T2 的 sgRNA 对植物产生白化表型是必需的。

## 2.2 不同 sgRNA 对杨树 *PDS* 同源基因结合能力的差异分析

从图 1 可见, 当只有针对 T1 和 T4 的 sgRNA 时 (*PtPDS*×2), 不足以导致 *PDS* 基因功能的完全缺陷而引起植物白化。而本实验室之前已经通过测序证明, 内源 *PDS* 基因的 T1 靶点能够在 Cas9 的作用下产生突变<sup>[19]</sup>。上述结果提示在杨树基因组内, 除了本文所检测的一个 *PDS* 基因外, 可能存在其他多个编码 *PDS* 的基因拷贝。利用同源序列比对, 本文在毛果杨(测序种)基因组(<http://phytozome.jgi.doe.gov>) 中找到了两个与拟南芥 *PDS3*(AT4G14210)高度同源的基因: Potri.002G235200 和 Potri.014G148700。通过设计引物, 从杨树基因组中克隆到两个 *PDS* 的编码基因(5'端部分序列), 分别命名为 *PtPDS1* 和 *PtPDS2*, 两者序列相似性达到 89.1%, 但在很多位点上仍存在核苷酸的多态性, 因此可以设计特异的引物分别扩增和检测这两个基因(图 2A)。

对两个杨树内源基因的 5'端序列分析发现, *PtPDS1* 的序列与 4 个 sgRNA 均能完全配对; 而 *PtPDS2* 的序列则与所有 sgRNA 均存在 1~2 bp 的碱基错配。其中, T1 靶序列中 1 bp 错配的碱基位于靠近 NGG 的识别序列 3'端位置。T2、T3 和 T4 内发生错配的碱基均位于离 3'端 12 bp 以上的位置(图 2B)。之前的研究发现, 靠近 3'端的错配对于 sgRNA 识别和结合靶点的影响可能较大, 反之则可能影响较小<sup>[24,25]</sup>。因此推测, 结合 T1 位点的 sgRNA 仅能结合到 *PtPDS1* 上, 而不能结合 *PtPDS2*, 故不能介导对后者的有效敲除。

## 2.3 CRISPR/Cas9 可同时敲除多个内源基因

为了证明序列的错配可能引起 sgRNA 对两个

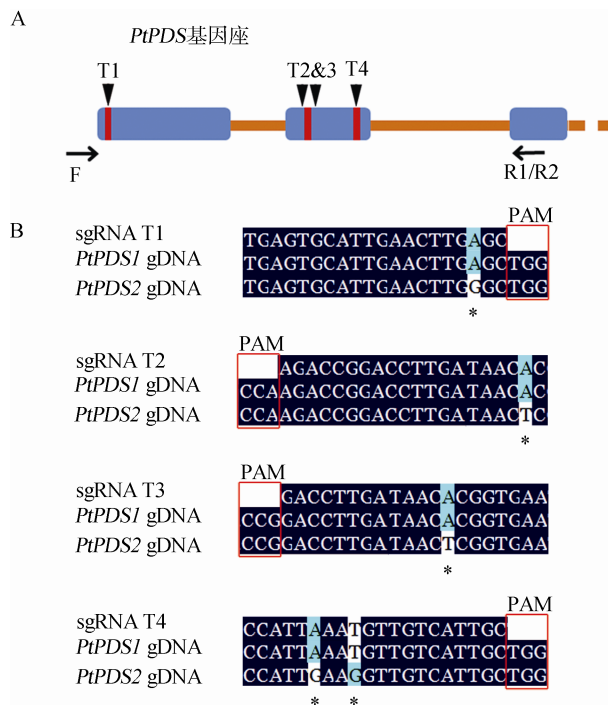


图 2 sgRNA 与杨树内源 *PDS* 基因序列结合位置和分析

A: 各靶点在 *PtPDS* 基因上的分布及克隆引物的结合位置; B: sgRNA 识别序列与 *PtPDS* 基因序列的比对。\*代表不配对的碱基位点。

内源 *PDS* 基因(*PtPDS1* 和 *PtPDS2*)结合效率的差异, 本文对 *PtPDS*×3 转基因的  $T_0$  代植株中内源 *PDS* 基因的序列进行测序分析。在随机挑选测序的 44 个 *PtPDS1* 基因克隆中, 有 21 个在 T1 靶点的位置发生了突变, 突变率为 47.7%(图 3A)。在测序的 24 个 *PtPDS2* 基因克隆中, 未检测到任何突变(图 3B)。该结果证明 sgRNA 能够介导 Cas9 对 *PtPDS1* 的剪切, 而对 *PtPDS2* 无作用。暗示可能是由于序列与 *PtPDS2* 存在碱基错配, 因而 sgRNA 不能稳定地结合并引导 Cas9 结合到 *PtPDS2* 的 T1 位置上来。在 T2 位点, *PtPDS1* 和 *PtPDS2* 均能检测到序列突变, 发生突变的概率分别为 86.4%(38/44)和 50%(23/46)(图 3)。说明 T2 的 sgRNA 可以识别两个基因, 但可能由于近 5'端序列与 *PtPDS2* 的 1 bp 错配, 影响了结合的效率进而影响了突变率。在 T4 位点, 两个基因均未检测到突变(图 3)。

由此可见, 序列上的差异确实可以导致 sgRNA 对基因结合能力的差异。其中靠近靶点 3'端 NGG 的碱基错配对结合能力的影响也比较大, 可能导致完全不能结合, 而远离 3'端的错配也会对结合的效率

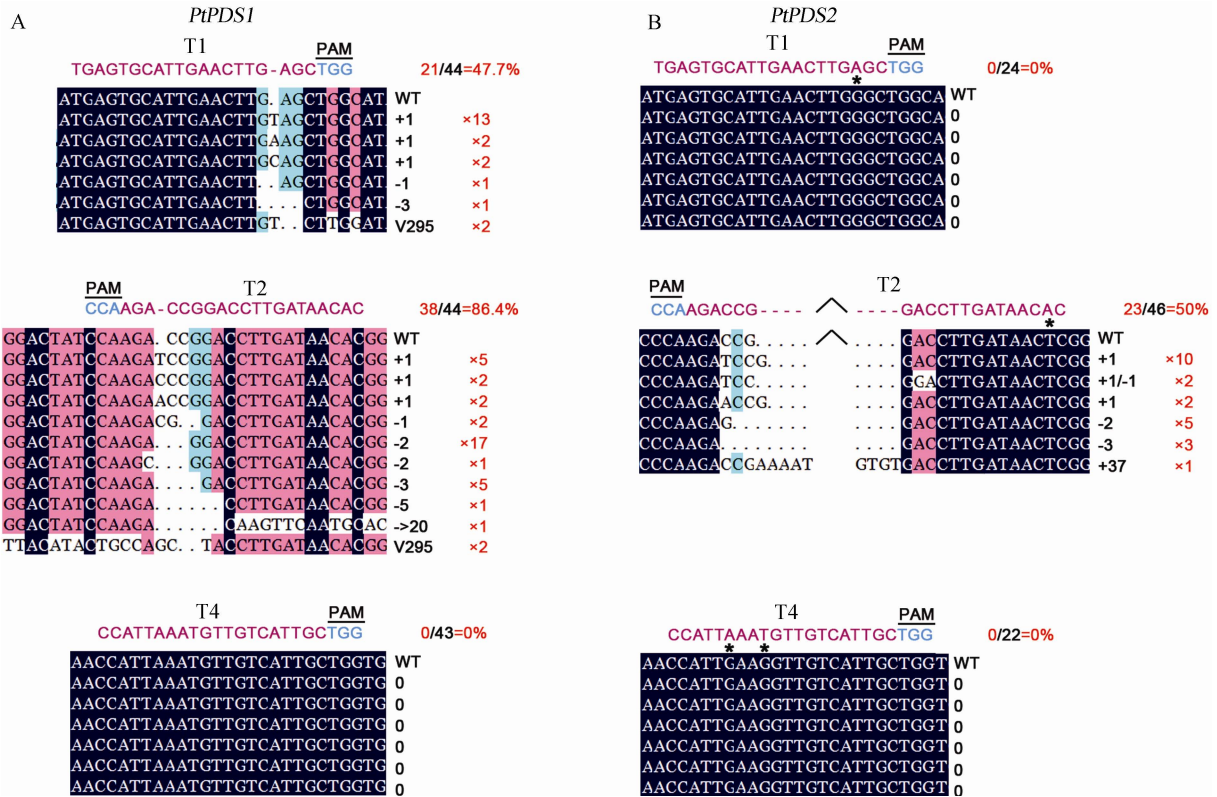


图 3 *PtPDS*×3 转基因杨树内源 *PDS* 基因突变分析

A: *PtPDS1* 基因的突变情况; B: *PtPDS2* 基因的突变情况。右侧的黑字表示突变的类型(“-”代表缺失;“+”代表插入;“V”代表倒位);红字代表特定类型突变出现的次数和比例。

产生影响。这与之前在动物和人体细胞中的研究结果相符<sup>[24]</sup>,为设计杨树的 Cas9 靶点提供了参考依据。另一方面,测序结果证明针对 T1 靶点的 sgRNA 只结合 *PtPDS1*,不结合 *PtPDS2*,针对 T4 靶点的 sgRNA 对 *PtPDS1* 和 *PtPDS2* 均不能结合。提示在 *PtPDS*×2(含针对 T1 和 T4 的 sgRNA)转基因植株中只有 *PtPDS1* 是缺陷的,而 *PtPDS2* 则维持正常功能,这就解释了植株未出现白化表型的原因(图 1C)。在 *PtPDS*×3 的 T<sub>0</sub> 转基因植株中,多靶点的 CRISPR/Cas9 能高效地将两个内源基因同时敲除掉(图 3)。证明该系统具备在杨树内实现快速、高效的对多个基因定点编辑的能力。

#### 2.4 利用 CRISPR/Cas9 技术构建杨树功能基因突变体库

通过对 *PtPDS* 基因的高效敲除,本文初步建立了杨树 CRISPR/Cas9 基因定点敲除技术。而仅仅敲除 *PDS* 不足以证明该系统在杨树中具有广泛的应用性。因此,利用该技术,本文选择多个在杨树生长

发育、新陈代谢和环境响应中具有重要作用的基因和基因家族,构建它们的突变体株系。*PtPIN1* 和 *PtPIN7* 是杨树中生长素跨膜转运因子的编码基因,与拟南芥 *AtPIN1* 的同源性最高,对生长素的极性分布具有重要作用<sup>[26,27]</sup>。本文从 *PtPIN1* 和 *PtPIN7* 的基因序列上选择 3 个靶点,通过多靶点的 Cas9 系统再次实现同时敲除两个内源基因,敲除效率率达 30% 以上(表 2)。结果再次证明该系统具备同时快速高效地敲除多个内源基因的优势。*PtWRKY18* 和 *PtMYB170* 分别属于杨树 WRKY 和 MYB 转录因子家族,分别在植物对病害的免疫防御机制和次生代谢产物合成的调控机制中扮演这重要角色<sup>[28,29]</sup>。为了进一步研究它们的功能,本文通过 CRISPR/Cas9 系统成功获得了两者各自的突变体株系(表 2),表明该 CRISPR/Cas9 系统可广泛适用于杨树内源基因的定点编辑。

此外,本课题组还构建和转化了用于敲除在植物发育中具有重要作用的 *SHOOT MERISTEMLESS* (*STM*)<sup>[30]</sup>、*WUSCHEL*(*WUS*)<sup>[31]</sup>等 10 多个转录因子和

表 2 利用 Cas9 系统构建的杨树功能基因和转录因子突变体

目标基因	基因类型	预期的基因功能	使用的 sgRNA 个数	发生突变的克隆数	测序的克隆数	突变类型
<i>PtWRKY18</i>	TF	植物免疫	3	14	14	小片段缺失和插入、倒位
<i>PtMYB170</i>	TF	木质素合成	3	8	8	大片段缺失
<i>PtPIN1&amp;7</i>	转运蛋白	生长素信号转导	3	10	32	小片段缺失和插入
<i>PtWOX5&amp;WUS</i>	TF	干细胞功能的维持	3	ND	ND	ND
<i>PtSTM</i>	TF	分生组织活性	3	ND	ND	ND

注：TF：transcriptional factor；ND：未检测。

蛋白酶基因的 CRISPR/Cas9 载体(表 2),初步开始构建了杨树重要功能基因的突变体库。为木本植物发育、代谢的分子机制研究和林木基因资源的开发利用奠定了基础。

### 3 讨 论

长期以来,因为缺乏突变体,对杨树等木本植物基因功能的研究主要采用超量表达和 RNAi 的手段。但是,由于同源或异源的基因超表达,无法准确模拟内源基因的表达水平和时空表达特异性,其结果的可靠性常受到质疑。RNAi 的方法同样有特异性差、效率不高、范围受限等缺陷。如果能够获得突变体株系,与超表达材料对照分析,将会促进林学研究和遗传改良应用。因此,在初步建立起杨树的 CRISPR/Cas9 基因定点敲除后,选择敲除杨树中具有重要功能的基因,建立杨树功能基因的突变体库,对于深入研究木本植物中基因的生物学功能及其调控机理都具有重要的意义。

本研究发现,在同一转基因杨树的同一内源基因上,不同靶点的突变率也存在显著差异:*PtPDS*×3 转基因 T<sub>0</sub> 代中,*PtPDS1* 基因的 T1、T2 和 T4 靶点的突变率分别为 47%、86%和 0%(图 3)。由于 Cas9 结合到 DNA 序列的特定位置依赖于 sgRNA 的引导,所以 sgRNA 对靶序列的结合能力会影响突变的效率<sup>[2,32]</sup>。其中,靶序列的 GC 含量、碱基的分布、以及错配碱基的位置等均对 sgRNA 与 DNA 靶序列之间的亲和性有影响,需要在选择靶点时纳入考虑<sup>[33]</sup>。此外,sgRNA 的表达水平的差异也是一个可能的原因。在多靶点系统中,不同的 sgRNA 是由多个不同的启动子来驱动的。T2 位点上较高的突变率,暗示驱动其对应 sgRNA 的 AtU6-29 启动子在杨树体内可能具有较高的活性。

测序结果表明,CRISPR/Cas9 系统在杨树体内引起的突变,主要是 1~5 bp 的小片段确缺失或者插入,偶尔也有发生较大片段的序列改变。例如,大于 20 bp 的片段插入或者删除,T1 和 T2 之间 295 bp 的片段发生倒位(图 3)。这主要是由植物体内 DNA 的修复机制所决定的,与 Cas9 无关<sup>[34]</sup>。这也提示,可以借助多靶点系统获得特定形式的突变体,如缺失某一特定结构域的基因突变体。此外,多靶点 CRISPR/Cas9 系统相比单靶点系统的一个主要优势在于大幅提高了突变的效率。在 *PtPDS*×3 转基因 T<sub>0</sub> 代中,*PtPDS1* 单基因的突变概率达到近 90%,远远高于在其他植物物种中所报道的突变率<sup>[14]</sup>。而该系统同时敲除 *PtPDS1* 和 *PtPDS2* 两个同源基因,导致 PDS 功能完全缺陷,产生白化表型的概率也高达 50% 左右。

在植物基因功能的研究中,常常需要获得两个或以上基因同时突变的材料,因为可能有多个同源基因功能冗余,或者多个不同源基因参与了平行的信号转导。对于拟南芥等模式植物,比较易于通过杂交、遗传转化等方法获得多突,然而,受制于漫长的繁殖周期和困难的二次遗传转化,以杨树为代表的木本植物很难获得多基因缺陷材料。利用多靶点的 CRISPR/Cas9,可在转基因 T<sub>0</sub> 代就高效地获得多基因同时敲除的突变体株系。在本研究中,T2-sgRNA 起着关键的作用并足以引起两个内源 *PDS* 基因序列的突变。这主要是因为两个 *PDS* 基因在 T2 位点上序列基本一致。对于后期的应用,并非所有希望同时敲除的两个或多个基因,都有具有序列高度一致的 Cas9 靶点,这种情况下,多靶点系统就为人们提供了更多选择和更大的自由度。这种高效省时的基因突变方法对于杨树的遗传研究具有重要意义。



## 参考文献

- [1] Bogdanove AJ, Voytas DF. TAL effectors: customizable proteins for DNA targeting. *Science*, 2011, 333(6051): 1843–1846. [DOI]
- [2] Doudna JA, Charpentier E. Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, 2014, 346(6213): 1258096. [DOI]
- [3] Deltcheva E, Chylinski K, Sharma CM, Gonzales K, Chao YJ, Pirzada ZA, Eckert MR, Vogel J, Charpentier E. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature*, 2011, 471(7340): 602–607. [DOI]
- [4] Wei CX, Liu JY, Yu ZS, Zhang B, Gao GJ, Jiao RJ. TALEN or Cas9-rapid, efficient and specific choices for genome modifications. *J Genet Genomics*, 2013, 40(6): 281–289. [DOI]
- [5] Shan QW, Wang YP, Li J, Zhang Y, Chen KL, Liang Z, Zhang K, Liu JX, Xi JJ, Qiu JL, Gao CX. Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(8): 686–688. [DOI]
- [6] Li JF, Norville JE, Aach J, McCormack M, Zhang DD, Bush J, Church GM, Sheen J. Multiplex and homologous recombination-mediated genome editing in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana* using guide RNA and Cas9. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(8): 688–691. [DOI]
- [7] Nekrasov V, Staskawicz B, Weigel D, Jones JDG, Kamoun S. Targeted mutagenesis in the model plant *na benthamiana* using Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(8): 691–693. [DOI]
- [8] Mao YF, Zhang H, Xu NF, Zhang BT, Gou F, Zhu JK. Application of the CRISPR-Cas system for efficient genome engineering in plants. *Mol Plant*, 2013, 6(6): 2008–2011. [DOI]
- [9] Feng ZY, Zhang BT, Ding WN, Liu XD, Yang DL, Wei PL, Cao FQ, Zhu SH, Zhang F, Mao YF, Zhu JK. Efficient genome editing in plants using a CRISPR/Cas system. *Cell Res*, 2013, 23(10): 1229–1232. [DOI]
- [10] Wang YP, Cheng X, Shan QW, Zhang Y, Liu JX, Gao CX, Qiu JL. Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew. *Nat Biotechnol*, 2014, 32(9): 947–951. [DOI]
- [11] Liang Z, Zhang K, Chen KL, Gao CX. Targeted mutagenesis in *Zea mays* using TALENs and the CRISPR/Cas system. *J Genet Genomics*, 2014, 41(2): 63–68. [DOI]
- [12] Jiang WZ, Zhou HB, Bi HH, Fromm M, Yang B, Weeks DP. Demonstration of CRISPR/Cas9/sgRNA-mediated targeted gene modification in *Arabidopsis*, tobacco, sorghum and rice. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41(20): e188. [DOI]
- [13] Brooks C, Nekrasov V, Lippman ZB, Van Eck J. Efficient gene editing in tomato in the first generation using the clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated9 system. *Plant Physiol*, 2014, 166(3): 1292–1297. [DOI]
- [14] Baltes NJ, Voytas DF. Enabling plant synthetic biology through genome engineering. *Trends Biotechnol*, 2015, 33(2): 120–131. [DOI]
- [15] Tuskan GA, DiFazio S, Jansson S, Bohlmann J, Grigoriev I, Hellsten U, Putnam N, Ralph S, Rombauts S, Salamov A, Schein J, Sterck L, Aerts A, Bhalarao RR, Bhalarao RP, Blaudez D, Boerjan W, Brun A, Brunner A, Busov V, Campbell M, Carlson J, Chalot M, Chapman J, Chen GL, Cooper D, Coutinho PM, Couturier J, Covert S, Cronk Q, Cunningham R, Davis J, Degroove S, Déjardin A, Depamphilis C, Detter J, Dirks B, Dubchak I, Duplessis S, Ehlting J, Ellis B, Gendler K, Goodstein D, Gribskov M, Grimwood J, Groover A, Gunter L, Hamberger B, Heinze B, Helariutta Y, Henrissat B, Holligan D, Holt R, Huang W, Islam-Faridi N, Jones S, Jones-Rhoades M, Jorgensen R, Joshi C, Kangasjärvi J, Karlsson J, Kelleher C, Kirkpatrick R, Kirst M, Kohler A, Kalluri U, Larimer F, Leebens-Mack J, Leplé JC, Locascio P, Lou Y, Lucas S, Martin F, Montanini B, Napoli C, Nelson DR, Nelson C, Nieminen K, Nilsson O, Pereda V, Peter G, Philippe R, Pilate G, Poliakov A, Razumovskaya J, Richardson P, Rinaldi C, Ritland K, Rouzé P, Ryaboy D, Schmutz J, Schrader J, Segerman B, Shin H, Siddiqui A, Sterky F, Terry A, Tsai CJ, Uberbacher E, Unneberg P, Vahala J, Wall K, Wessler S, Yang G, Yin T, Douglas C, Marra M, Sandberg G, Van de Peer Y, Rokhsar D. The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray). *Science*, 2006, 313(5793): 1596–1604. [DOI]
- [16] Fladung M, Polak O. Ac/Ds-transposon activation tagging in poplar: a powerful tool for gene discovery. *BMC Genomics*, 2012, 13: 61. [DOI]
- [17] Polle A, Janz D, Teichmann T, Lipka V. Poplar genetic engineering: promoting desirable wood characteristics and pest resistance. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2013, 97(13): 5669–5679. [DOI]
- [18] Ma XL, Zhang QY, Zhu QL, Liu W, Chen Y, Qiu R, Wang B, Yang ZF, Li HY, Lin YR, Xie YY, Shen RX, Chen SF, Wang Z, Chen YL, Guo JX, Chen LT, Zhao XC, Dong ZC, Liu YG. A robust CRISPR/Cas9 system for convenient, high-efficiency multiplex genome editing in monocot and



- dicot plants. *Mol Plant*, 2015, 8(8): 1274–1284. [DOI]
- [19] Fan D, Liu TT, Li CF, Jiao B, Li S, Hou YS, Luo KM. Efficient CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis in *Populus* in the first generation. *Sci Rep*, 2015, 5: 12217. [DOI]
- [20] Zhou XH, Jacobs TB, Xue LJ, Harding SA, Tsai CJ. Exploiting SNPs for biallelic CRISPR mutations in the outcrossing woody perennial *Populus* reveals 4-coumarate: CoA ligase specificity and redundancy. *New Phytol*, 2015, doi: 10.1111/nph.13470. [DOI]
- [21] Jia ZC, Sun YM, Yuan L, Tian QY, Luo KM. The chitinase gene (*Bbchit1*) from *Beauveria bassiana* enhances resistance to *Cytospora chrysosperma* in *Populus tomentosa* Carr. *Biotechnol Lett*, 2010, 32(9): 1325–1332. [DOI]
- [22] Sander JD, Maeder ML, Reyon D, Voytas DF, Joung JK, Dobbs D. ZFiT (Zinc Finger Targeter): an updated zinc finger engineering tool. *Nucleic Acids Res*, 2010, 38(Suppl 2): W462–W468. [DOI]
- [23] Engler C, Gruetznier R, Kandzia R, Marillonnet S. Golden gate shuffling: a one-pot DNA shuffling method based on type II restriction enzymes. *PLoS One*, 2009, 4(5): e5553. [DOI]
- [24] Kuscü C, Arslan S, Singh R, Thorpe J, Adli M. Genome-wide analysis reveals characteristics of off-target sites bound by the Cas9 endonuclease. *Nat Biotechnol*, 2014, 32(7): 677–683. [DOI]
- [25] Sander JD, Joung JK. CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. *Nat Biotechnol*, 2014, 32(4): 347–355. [DOI]
- [26] Carraro N, Tisdale-Orr TE, Clouse RM, Knoller AS, Spicer R. Diversification and expression of the PIN, AUX/LAX, and ABCB families of putative auxin transporters in *Populus*. *Front Plant Sci*, 2012, 3: 17. [DOI]
- [27] Liu BB, Zhang J, Wang L, Li JB, Zheng HQ, Chen J, Lu MZ. A survey of *Populus* PIN-FORMED family genes reveals their diversified expression patterns. *J Exp Bot*, 2014, 65(9): 2437–2448. [DOI]
- [28] Jiang YZ, Duan YJ, Yin J, Ye SL, Zhu JR, Zhang FQ, Lu WX, Fan D, Luo KM. Genome-wide identification and characterization of the *Populus* WRKY transcription factor family and analysis of their expression in response to biotic and abiotic stresses. *J Exp Bot*, 2014, 65(22): 6629–6644. [DOI]
- [29] Chai GH, Wang ZG, Tang XF, Yu L, Qi G, Wang D, Yan XF, Kong YZ, Zhou GK. *R2R3-MYB* gene pairs in *Populus*: evolution and contribution to secondary wall formation and flowering time. *J Exp Bot*, 2014, 65(15): 4255–4269. [DOI]
- [30] Groover AT, Mansfield SD, DiFazio SP, Dupper G, Fontana JR, Millar R, Wang Y. The *Populus* homeobox gene *ARBORKNOX1* reveals overlapping mechanisms regulating the shoot apical meristem and the vascular cambium. *Plant Mol Biol*, 2006, 61(6): 917–932. [DOI]
- [31] Liu BB, Wang L, Zhang J, Li JB, Zheng HQ, Chen J, Lu MZ. *WUSCHEL*-related *Homeobox* genes in *Populus tomentosa*: diversified expression patterns and a functional similarity in adventitious root formation. *BMC Genomics*, 2014, 15: 296. [DOI]
- [32] Kleinstiver BP, Prew MS, Tsai SQ, Topkar VV, Nguyen NT, Zheng ZL, Gonzales APW, Li ZY, Peterson RT, Yeh JJ, Aryee MJ, Joung JK. Engineered CRISPR-Cas9 nucleases with altered PAM specificities. *Nature*, 2015, 523(7561): 481–485. [DOI]
- [33] Xu H, Xiao TF, Chen CH, Li W, Meyer CA, Wu Q, Wu D, Cong L, Zhang F, Liu JS, Brown M, Liu SX. Sequence determinants of improved CRISPR sgRNA design. *Genome Res*, 2015, 25(8): 1147–1157. [DOI]
- [34] Ramalingam S, Annaluru N, Chandrasegaran S. A CRISPR way to engineer the human genome. *Genome Biol*, 2013, 14(2): 107. [DOI]

(责任编辑: 高彩霞)