

基于基因组编辑技术的水稻靶向突变特征及遗传分析

唐丽^{1,2}, 李曜魁^{1,2}, 张丹², 毛毕刚², 吕启明², 胡远艺², 韶也², 彭彦², 赵炳然², 夏石头¹

1. 湖南农业大学生物科学技术学院, 植物激素与生长发育湖南省重点实验室, 长沙 410128;
2. 湖南杂交水稻研究中心, 杂交水稻国家重点实验室, 长沙 410125

摘要: TALEN(Transcription activator-like effector nucleases)系统和 CRISPR/Cas9(Clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated protein 9)系统是当前广泛应用的两大基因组编辑技术。本文比较分析了水稻(*Oryza sativa* L.)中这两大系统诱导突变的突变率、突变类型、突变位置、突变时间和遗传模式,发现 TALEN 系统和 CRISPR/Cas9 系统均可在 T₀ 代水稻中有效诱发位点特异性突变,且 CRISPR/Cas9 的突变率更高。两大系统都以诱发 10 bp 以内的 InDel 突变为主,TALEN 系统易诱导 10 bp 以内的缺失突变,而 CRISPR/Cas9 系统易诱导 1 bp 的插入突变,且 CRISPR/Cas9 系统诱发的 DNA 双链断裂(Double-strand breaks, DSBs)位置更加精确。此外,DSBs 在修复过程中能以低频同源重组(Homologous recombination, HR)途径修复,产生 DNA 片段重复突变。对于相邻双靶点 CRISPR/Cas9 系统而言,双靶点间的 DNA 片段可发生缺失或倒位,这种双靶点间 DNA 片段突变的发生频率与双靶点各自的突变率无正相关性。两大系统诱导的突变最早发生在已转化的愈伤组织中,少量发生在水稻的体细胞中,导致了纯合突变、杂合突变、双等位突变和嵌合突变 4 种遗传模式,其中双等位突变比例最高,嵌合突变比例最低。除嵌合突变外,纯合突变、杂合突变、双等位突变的突变序列均可稳定遗传给下一代。

关键词: TALEN; CRISPR/Cas9; 水稻; 靶向突变; 遗传特性

Characteristic and inheritance analysis of targeted mutagenesis mediated by genome editing in rice

Li Tang^{1,2}, Yaokui Li^{1,2}, Dan Zhang², Bigang Mao², Qiming Lv², Yuanyi Hu², Ye Shao², Yan Peng², Binran Zhao², Shitou Xia¹

1. Hunan Provincial Key Laboratory of Phytohormones and Growth Development, College of Bioscience and Biotechnology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China;
2. State Key Laboratory of Hybrid Rice, Hunan Hybrid Rice Research Center, Changsha 410125, China

Abstract: The transcription activator-like effector nucleases (TALEN) and clustered regularly interspaced short

收稿日期: 2016-02-03; 修回日期: 2016-06-29

基金项目: 湖南省自然科学基金项目(编号: 14JJ7084)和湖南省重大科研项目(编号: 湘财农指[2014]180)资助[Supported by the Natural Science Foundation of Hunan Province (No. 14JJ7084) and the Major Scientific Research Project of Hunan Province (No.XCNZ[2014]180)]

作者简介: 唐丽, 在读博士研究生, 研究方向: 生物物理学。E-mail: tangli@hhrc.ac.cn

通讯作者: 赵炳然, 博士, 研究员, 研究方向: 水稻遗传育种。E-mail: brzhao652@hhrc.ac.cn

夏石头, 博士, 教授, 研究方向: 植物学。E-mail: xstone0505@hunau.net

DOI: 10.16288/j.ycz.16-052

网络出版时间: 2016/7/12 9:40:34

URI: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20160712.0940.002.html>

palindromic repeats/CRISPR-associated protein 9 (CRISPR/Cas9) systems are two current genome editing technologies. Here, we compare and analyze the characteristics of the targeted mutations mediated by these two systems, such as efficiency, type, position, time, and genetic patterns. Both the TALEN and CRISPR/Cas9 systems can induce site-specific mutations in T_0 rice plants effectively, but CRISPR/Cas9 is more effective. The major mutation type in both systems is the short insertion/deletion(InDel) mutation within 10 base pairs: deletions ranging from 1 to 10 bps are more often in TALEN, and 1bp insertions are more often in CRISPR/Cas9. Moreover, double-strand breaks (DSBs) generated by CRISPR/Cas9 are more precise than TALEN. In addition, DSBs could be repaired by the homologous recombination at a low frequency, causing DNA fragment duplication mutations. In some cases, the DNA fragments between the two close targets are deleted or inverted, and the mutation efficiency does not positively correlate with the mutation efficiency of each target. Mutagenesis mediated by the TALEN or CRISPR/Cas9 system can occur as early as in transformed callus cells, and less frequently in somatic cells. Consequently, four different mutation types are formed, including homozygous, heterozygous, bi-allelic and chimeric mutations, with bi-allelic mutations having the highest rate and chimeric mutations having the lowest rate. All, except chimeric mutations, can descend stably into the next generation.

Keywords: TALEN; CRISPR/Cas9; rice; site-targeted mutagenesis; inheritance character

近年兴起的基因组编辑技术以其能精确修饰DNA的特性,成为当前最受瞩目、最有影响力的生物技术之一,在基因组功能研究、作物遗传改良、基因治疗等方面得到广泛应用。基因组编辑技术以锌指核酸酶(Zinc finger nucleases, ZFN)、类转录激活因子效应物核酸酶(Transcription activator-like effector nucleases, TALEN)、成簇规律间隔的短回文重复序列及其相关蛋白(Clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated 9, CRISPR/Cas9)为代表,已在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)^[1-3]、烟草(*Nicotiana tabacum*)^[4,5]、水稻(*Oryza sativa*)^[1,6-8]、小麦(*Triticum aestivum*)^[7,9]、玉米(*Zea mays*)^[10-11]、杨树(*Populus*)^[12]等多种高等植物中成功实现了基因的定点敲除、敲入、替换等修饰。其中,TALEN、CRISPR/Cas9 分别被 *Science* 杂志评为 2012 年度、2013 年度十大科技进展之一。在作物性状改良方面,二者均展现出很好的应用前景。Li 等^[6]利用 2 对 TALEN 蛋白定点突变水稻白叶枯感病基因 *Os11N3* 的启动子,在 T_2 代获得了抗白叶枯病的纯合突变植株。Ma 等^[13]利用 3 对 TALEN 蛋白在水稻脂氧合酶基因 *LOX3* 的第 3 外显子和第 4 外显子引入突变,在 T_1 代获得了种子耐储藏性显著改良且种子萌发及综合农艺性状不受影响的突变植株。Xu 等^[14]利用 CRISPR/Cas9 系统对水稻苯达松敏感致死基因 *BEL* 的第 1 外显子和第 2 外显子引入定点突变,获得对苯达松敏感的双等位突变体,如果用该方法敲除杂

交水稻两系不育系的 *BEL* 基因,可通过苗期喷施苯达松消除杂交制种过程中不育系自交带来的制种污染。Wang 等^[9]利用 TALEN 和 CRISPR/Cas9 技术分别对六倍体小麦 3 个 *TaMLO* 同源等位基因的第 2 外显子保守区进行定点突变,在 TALEN 诱导的突变体自交后代中,获得 3 个拷贝 *TaMLO* 基因均突变的纯合突变体,该突变体表现出对白粉菌显著的广谱抗性。

水稻是重要的单子叶模式植物,也是主要的禾本科粮食作物。研究 TALEN、CRISPR/Cas9 在水稻中诱发的突变特征及遗传稳定性,对这两种技术应用于水稻基础研究和育种实践具有重要意义。目前,已报道的研究多聚焦于靶标性状的获得和靶向突变的效率分析,仅少数报道统计了这两种系统在水稻单个靶位点引入的突变基因型、并分析了遗传模式及脱靶效应^[15-18]。本研究比较分析了 TALEN 和 CRISPR/Cas9 两大系统靶向诱变水稻的突变率、突变类型、突变位置、突变时间和遗传规律,解析了双靶点 CRISPR/Cas9 系统的突变特征,以期为这两种技术更好的应用于水稻功能基因组研究和分子植物育种提供理论参考。

1 材料和方法

1.1 材料

籼稻品种 Kasalath 和根癌农杆菌菌株 EHA105 均由本实验室保存。CRISPR/Cas9 骨架载体(pYLCR-

ISPR/Cas9-MT)由华南农业大学刘耀光教授提供,大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞购自北京全式金生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 靶点设计、潜在脱靶位点选择和表达载体构建

以天然抗性相关巨噬细胞蛋白基因 *OsNramp5* (LOC_Os07g15370)、低亲和性阳离子转运蛋白基因 *OsLCT1* (LOC_Os06g38120) 和低镉基因 *OsLCD* (LOC_Os01g72670) 为靶标基因, 对供试材料的这 3 个基因的 CDS 进行测序。基于测序结果, 分别参考在线软件 TAL Effector Nucleotide Targeter 2.0(<https://tale-nt.cac.cornell.edu/node/add/talen>)和 E-CRISP(<http://www.e-crisp.org/E-CRISP/designcrispr.html>)查找 TALEN 和 CRISPR/Cas9 候选靶标序列。运用 Gramene(<http://www.gramene.org>)的 BLAST 在线工具, 将候选靶标序列与水稻全基因组序列比对, 尽量选择 PAM 区 (Protospacer adjacent motif, 即 NGG 序列) 上游 12 bp 序列特异的候选靶标序列作为靶点。同时选取与靶标序列错配碱基在 6 bp 以内且具有 NGG 的序列作为潜在脱靶序列, 评估脱靶效应。参照上海斯丹赛生物技术有限公司的 TALEN 试剂盒说明书构建 TALEN 载体, 利用 CRISPR/Cas9 骨架载体 (pYLCRISPR/Cas9-MT), 参照 Ma 等^[18] 方法构建双靶点 CRISPR/Cas9 载体。本研究共筛选出 2 对 TALEN 靶标序列和 6 条 CRISPR/Cas9 靶标序列, 构建了 2 个 TALEN 载体和 3 个双靶点 CRISPR/Cas9 载体 (表 1)。

1.2.2 遗传转化与材料培养

采用热激转化法将 TALEN 载体和双靶点 CRISPR/Cas9 载体导入农杆菌种 EHA105, 参考 Lin 和 Zhang^[19] 农杆菌介导法转化水稻成熟种子胚诱导的愈伤组织。T₀ 代转基因苗于人工气候室培养, 培养温度为 28℃ 相对湿度为 65%, 光照时间为 16 h/d, 培养 15 d 后, 移栽至转基因试验基地。T₁ 代、T₂ 代转基因株系, 经浸种、催芽后, 直接播种于转基因实验基地, 每个株系种植 50 株, 常规水肥管理。

1.2.3 基因型检测

在水稻成熟期, 每个单株采集至少 5 个分蘖的叶片制成混合样本, 检测植株基因型; 愈伤组织则于分化阶段选取独立遗传转化系的部分愈伤组织检测基因型。采用 CTAB 法提取 DNA, 用 Primer premier 5 软件设计引物, 扩增含靶位点或潜在脱靶位点的 400~750 bpDNA 片段, 由北京六合华大基因科技有限公司合成引物。用高保真酶 KOD-FX (TOYOBO 公司) PCR 扩增含靶位点或潜在脱靶位点的 DNA 片段, PCR 产物电泳, 纯化, 由铂尚生物技术科技有限公司测序。如果测序图在靶位点处为单峰, 用 DNAMAN 6.0 直接与野生型序列比对, 分析基因型。如果 T₀ 代的测序图在靶位点处开始出现叠峰, 用 TA 克隆试剂盒 (TARget ClonePlus, TOYOBO 公司) 对 PCR 产物进行 TA 克隆, 每个样品随机挑取 10 个单克隆测序, 与野生型序列比对, 鉴定样品基因型。对于第一轮测序图出现叠峰的 T₁ 代、T₂ 代植

表 1 用于基因组编辑的靶序列

Table 1 Target sequences used for genome editing

靶标基因	靶位点	对应载体	靶标序列 (5' 3')
<i>OsNramp5</i>	<i>OsNramp5</i> -L1R1	pTALEN-L1R1	CCGGCACCGCCTGCTCC TccgcaacctctccaagaggACGCCGA-CAAGTGC GCC
	<i>OsNramp5</i> -PS1	pCas-PS1/2	CACCTCCTCCTTCCTTCTCAAGG
	<i>OsNramp5</i> -PS2	pCas-PS1/2	GGTCTCTCCTGTACGAGAGCGGG
<i>OsLCT1</i>	<i>OsLCT1</i> -L2R2	pTALEN-L2R2	ATACATCGACATCTCGATgttcctcgcccttcATCTTTCGTCTGT-GGCTGT
	<i>OsLCT1</i> -PS3	pCas-PS3/4	CCGTGGTCTCTGGGGATAGTCAT
	<i>OsLCT1</i> -PS4	pCas-PS3/4	CCGCGTCGTTTGGGATCCTCAGG
<i>OsLCD</i>	<i>OsLCD</i> -PS5	pCas-PS5/6	CTTATGATTCTACTAACTGAAGG
	<i>OsLCD</i> -PS6	pCas-PS5/6	CCAAGGCCTCATGACTTGGTGTA

注: 标注下划线字母为 PAM 区序列。小写字母为 TALEN 靶序列之间的 Spacer 区。

株, 参照 DSD 法^[20], 用在线工具 DSDdecode(<http://dsdecode.scgene.com>)直接解码样品基因型。

2 结果与分析

2.1 TALEN 和 CRISPR/Cas9 系统靶向诱变水稻的突变率和脱靶率

以农杆菌介导法转化水稻, 共获得 72 株 T_0 代 TALEN 转基因阳性植株和 112 株 T_0 代 CRISPR/Cas9 转基因阳性植株。经靶位点 PCR 扩增、测序、比对分析发现, 转 TALEN 系统导致的 T_0 代突变率为 18.5%~40%, 转双靶点 CRISPR/Cas9 系统导致的 T_0 代突变率为 61.4%~100%(表 2)。这表明只要在水稻中选择合适的靶位点, TALEN 系统和 CRISPR/Cas9 系统均可有效诱发突变, 且 CRISPR/Cas9 诱发的突变率高于 TALEN。此外, GC 含量为 30%~60%的靶序列均能诱发 60% 以上的 T_0 代植株发生突变(表 2)。

进一步检测转双靶点 CRISPR/Cas9 系统的 T_0 代植株基因型, 发现部分 T_0 代植株双靶点间的 DNA 片段缺失(图 1D), 导致突变株含靶位点的 DNA 片段较野生型片段(CK)变短(图 1: A, B)。尽管靶位点 PS5、PS6 的突变率(68.9%、68.9%)和 PS1、PS2 的突变率(61.4%、65.9%)相差不大, 但是靶位点 PS5、PS6 间 DNA 片段缺失、倒位的总突变率(26.7%)比 PS1、PS2(2.3%)高一个数量级(表 2), 表明相邻双靶位点间 DNA 片段缺失、倒位的总突变率和各靶位点的突变率没有正相关性。

选取水稻参考序列中与 sgRNA 错配碱基数少于或等于 6 bp 的 5 个潜在脱靶序列评估脱靶效应,

每个序列分别检测 T_0 代、 T_1 代转基因阳性植株 47~52 株。测序比对分析发现, 所有被检测植株的潜在脱靶位点均没有发生突变(表 3)。其中, PS1-OS5 与 *OsNramp5*-PS1 的 PAM 区上游 14 bp 序列完全相同, 但由于二者靶序列 5'端存在 5 个错配碱基, 脱靶也得以控制。

2.2 TALEN 和 CRISPR/Cas9 系统靶向诱变水稻的突变类型和突变位置

统计 TALEN 系统和 CRISPR/Cas9 系统引入的单靶点突变类型及其比例发现, 单碱基替换都不足 5%。在 TALEN 诱发的突变中, 1~10 bp 缺失突变最多, 占 54.7%, 其次是 10~100 bp 缺失突变, 占 30.9%, 插入突变概率仅占 4.8%, 且均为 1 bp 的插入突变; 而在 CRISPR/Cas9 诱发的突变中, 发生最多的为 1 bp 的插入突变, 占 40.7%, 其次是 1~10 bp 的缺失突变, 占 38.1%, 10~100 bp 的缺失突变仅占 13.8%(图 1: C~F; 图 2: A, B)。这表明两大系统都以诱发 10 bp 以内的 InDel 突变为主, TALEN 系统易诱导 10 bp 以内的缺失突变, 插入突变发生率低, 而 CRISPR/Cas9 系统易诱导 1 bp 插入突变。此外, 在 CRISPR/Cas9 系统介导的靶向突变中, 有 1 处靶序列的周边序列在靶位点处发生了重复和缺失突变(图 2F), 这表明基因组编辑技术能引发 DNA 双链断裂(Double-strand breaks, DSBs)的周边序列以低频率的同源重组(Homologous recombination, HR)途径修复 DSBs, 造成 DNA 片段重复突变。在 DNA 片段发生重复的同时, 伴随缺失突变, 表明非同源末端

表 2 T_0 代转基因植株的靶向突变率

Table 2 The targeted mutation rates of T_0 transgenic plants

靶位点名	靶序列 GC 含量(%)	T_0 代转基因阳性植株数	T_0 代突变植株数	T_0 代突变率 (%)	双靶点间 DNA 片段突变数	双靶点间 DNA 片段突变率(%)
<i>OsNramp5</i> -L1R1	/	27	5	18.5	/	/
<i>OsLCT1</i> -L2R2	/	45	18	40.0	/	/
<i>OsNramp5</i> -PS1	55	44	27	61.4	1	2.3
<i>OsNramp5</i> -PS2	55	44	29	65.9	1	2.3
<i>OsLCT1</i> -PS3	50	23	23	100.0	21	91.3
<i>OsLCT1</i> -PS4	60	23	23	100.0	21	91.3
<i>OsLCD</i> -PS5	30	45	31	68.9	12	26.7
<i>OsLCD</i> -PS6	50	45	31	68.9	12	26.7

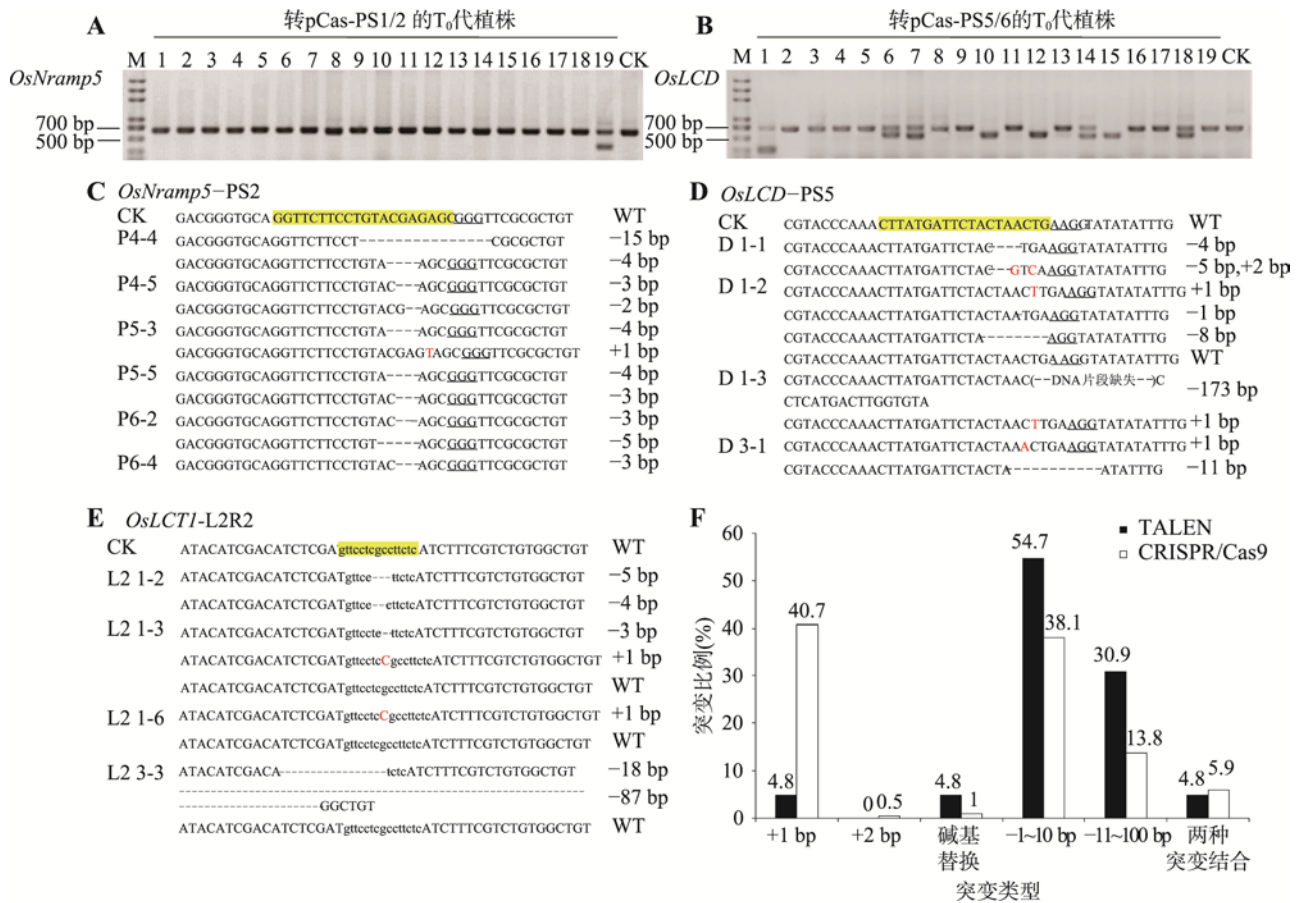


图 1 TALEN 和 CRISPR/Cas9 介导的水稻靶向突变分析

Fig. 1 Analysis of targeted mutagenesis mediated by the TALEN and CRISPR/Cas9 systems in rice

A: 转 pCas-PS1/2 植株含 *OsNramp5*-PS1、*OsNramp5*-PS2 的 DNA 片段 PCR 检测; B: 转 pCas-PS5/6 植株含 *OsLCD*-PS5、*OsLCD*-PS6 的 DNA 片段 PCR 检测; C: 转 pCas-PS1/2 植株的靶位点 *OsNramp5*-PS2 测序结果; D: 转 pCas-PS5/6 植株的靶位点 *OsLCD*-PS5 测序结果; E: 转 pTALEN-L2R2 植株的靶位点 *OsLCT1*-L2R2 测序结果; F: TALEN 和 CRISPR/Cas9 诱变的突变类型比例。M: DL2000 marker; CK: 对照; WT: 野生型序列; 标记黄色阴影的字母为 CRISPR/Cas9 靶序列或 TALEN 靶序列之间的 Spacer 区; 标注下划线的字母为 PAM 区序列; 红色字母表示插入的碱基; “-”表示碱基对缺失; “+”表示碱基对插入。

表 3 CRISPR/Cas9 潜在脱靶位点的突变检测

Table 3 Mutation detections in the putative CRISPR/Cas9 off-target sites

潜在脱靶位点	潜在脱靶位点的位置	潜在脱靶序列	错配碱基数	T ₀ 、T ₁ 代测序植株数	突变数
PS4-OS1	Chr.2: 29342306-29342328	CCGCGTCGTT CGGGATCCAGAGG	3	47	0
PS4-OS2	Chr.2: 35194511-35194533	CCGCGTCGTTTGGG GAAGACAGA	6	47	0
PS5-OS3	Chr.6: 10425641-10425663	CGATTGTCGCT ACTAAGG GAAGG	6	47	0
PS6-OS4	Chr.10: 8404002-8404024	CCAAGCCCCATGACTTGGAGAA	4	47	0
PS1-OS5	Chr.3: 8446954-8446976	TTTTTCTCCTTCCTTCTCAAGG	5	52	0

注: 红色字母为错配碱基, 标注下划线字母为 PAM 区序列。

连接(Nonhomologous end joining, NHEJ)和 HR 两种修复途径可作用于同一靶位点修复 DSBs。

对突变位置进行分析发现, TALEN 引发的突变位置集中在 Spacer 区中部(图 1E)。而在 CRISPR/Cas9

导致的单靶点突变序列中, 除了 4 条(2.1%)*OsLCD*-PS5 靶序列在 PAM 区上游 4~5 bp 之间发生 1 bp 插入突变(图 1D 株系 D3-1), 其他靶序列均在 PAM 区上游 4 bp 处发生突变(图 1C 株系 P4-5~株系 P6-4)。

可见, 一般情况下 CRISPR/Cas9 诱发 DSBs 的位置更加精确。

CRISPR/Cas9 系统介导的双靶点突变中, 除了靶位点各自发生以上类型的突变外, 还有一个显著特征就是靶点间 DNA 片段发生缺失(图 2D)或倒位(图 2E), DNA 片段缺失、倒位的突变率从 2.3% 到 91.3% 不等(表 2)。统计 54 个双靶点间 DNA 片段突变的基因型发现, DNA 片段缺失占 88.9%, DNA 片段倒位占 11.1%。以上结果表明, 同时引入 2 个 sgRNA 作用于同一染色体上的 2 条靶序列时, 这 2 条靶序列可同时发生 DSBs, 进而引发 DSBs 之间的 DNA 片段缺失、倒位。DNA 片段缺失突变率远高于 DNA 片段倒位突变率。

2.3 TALEN 和 CRISPR/Cas9 系统靶向诱变水稻的突变时间和遗传模式

分析 T_0 代突变植株的靶位点基因型发现, TALEN 和 CRISPR/Cas9 系统引发的突变均有纯合突变(位于同源染色体上的 2 条靶序列发生相同突变)、杂合突变(仅 1 条同源染色体上的靶序列发生突变)、双等位突变(位于同源染色体上的 2 条靶序列发生不同突变)、嵌合突变(不同体细胞的靶序列发生不同突变)4 种遗传模式。其中, 双等位突变的突变率相对较高, 分别为 12.5%、45.0%; 仅约 5% 的 T_0 代 TALEN 植株和 CRISPR/Cas9 植株发生嵌合突变(图 3)。提示 T_0 代绝大多数突变可能发生在胚性愈伤组织细胞或早期茎端分生组织细胞中, 体细胞突变率低。为了验证愈伤组织阶段是否存在高频率突变, 随机检测分化培养阶段的愈伤组织, 包括 23 块独立转化 pTALEN-L2R2 的愈伤组织、18 块独立转化 pCAS-PS1/2 的愈伤组织、22 块独立转化 pCAS-PS3/4 的愈伤组织、21 块独立转化 pCAS-PS5/6 的愈伤组织。经测序发现, 52.2% 转 pTALEN-L2R2 的愈伤组织、77.8% 转 pCas-PS1/2 的愈伤组织、100% 转 pCas-PS3/4 的愈伤组织及 81.8% 转 pCas-PS5/6 的愈伤组织在靶位点处出现开始叠峰(图 2C), 表明靶位点有两种或两种以上序列, 提示靶位点发生了突变。TALEN 和 CRISPR/Cas9 系统均可有效诱发愈伤组织发生靶向突变, 这对于获得可稳定遗传的 T_0 代突变体非常关键。

对 TALEN 敲除株系、CRISPR/Cas9 敲除株系的

靶位点进行遗传分析发现(表 4~表 6): (1)纯合突变体、杂合突变体和双等位突变体的突变序列均能稳定遗传到下一代; (2)双等位突变体的靶位点遗传符合孟德尔单基因遗传分离定律(1:2:1); (3)嵌合突变体的突变序列有的能遗传, 有的不能遗传(表 4 中株系 L2 10-2、L2 1-3), 后代基因型难以预测; (4)TALEN 敲除株系的 WT 序列在繁殖加代的过程中极少发生突变, 仅发现 T_0 代杂合突变体(表 4 中株系 L2 1-6)的 WT 序列在繁殖到 T_2 代时有 1 株发生了 2 bp 的缺失(表 5 中株系 L2 1-6-2), 而 CRISPR/Cas9 敲除株系的 WT 序列在 T_1 代继续发生高频突变(表 6 中株系 P 7-3)。

3 讨 论

近年来, 基因组编辑技术在功能基因组学及分子育种中的应用方兴未艾。在功能基因组研究领域, 已经成为新的反向遗传学研究手段, 在分子育种研究领域, 有望成为继转基因育种、分子标记辅助育种之后, 定向改良作物性状的强大工具。已有研究表明, 靶序列的 GC% 影响突变率。Wang 等^[21] 研究认为 GC 含量在 20% 以下及 80% 以上的靶序列突变率相对较低, Ma 等^[18] 报道指出 GC 含量高于 50% 的靶序列突变率相对较高, 本研究显示 GC 含量在 30%~60% 的靶序列均可诱发 60% 以上的突变率。双靶点间还可能发生 DNA 片段缺失^[18,22-24]、倒位^[23], 本研究发现 DNA 片段倒位的发生率显著低于 DNA 片段缺失, 且这种双靶点间 DNA 片段突变的发生频率与双靶点各自的突变率无正相关性, DNA 片段突变的影响因素及分子机理还有待研究。

本研究发现, 就单靶点突变类型而言, TALEN 系统和 CRISPR/Cas9 系统都以诱发 10 bp 以内的 InDel 突变为主, 单碱基替换发生率均很低。相比而言, CRISPR/Cas9 系统诱导的 1 bp 插入突变的明显多于 TALEN 系统, 这与 Zhang 等^[15,16] 的报道一致, 同时本研究发现 TALEN 系统诱导的突变以 10 bp 以内的缺失突变居多。这两大系统诱变的突变类型比例差异可能与它们形成的 DSBs 特点不同有关。据报道, CRISPR/Cas9 系统主要在 PAM 上游 3 bp 处切割 DNA 双链, 易形成平末端^[25,26]; 而 TALEN 系统则是由一对 FokI 蛋白各自切割 Spacer 区的 DNA 单链, 易形成带有单链突出的粘性末端^[16]。

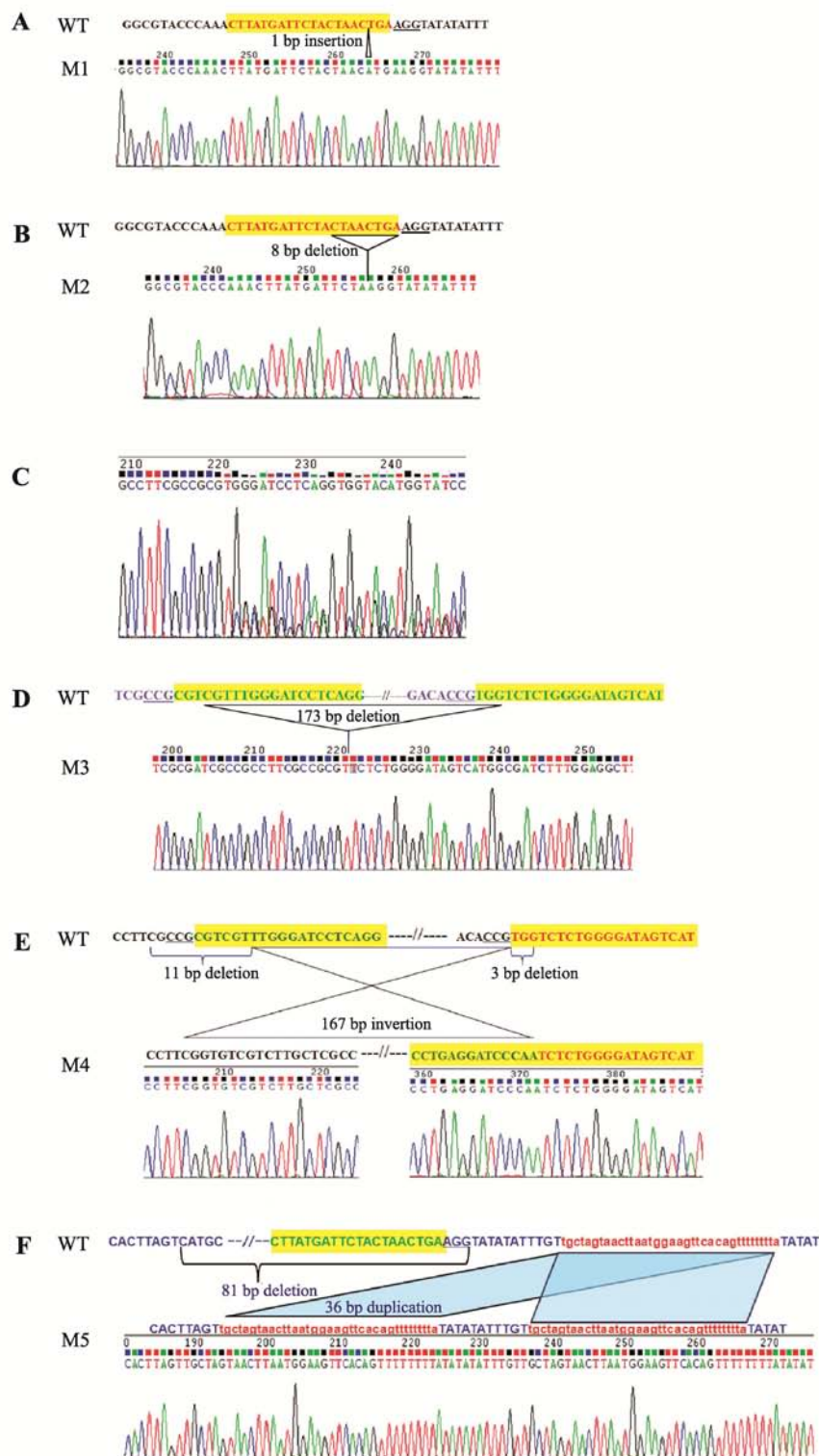


图 2 CRISPR/Cas9 系统导入的突变特点

Fig. 2 Characterization of mutations introduced by the CRISPR/Cas9 system

A: 单靶点插入突变; B: 单靶点缺失突变; C: 愈伤组织靶位点测序图; D: 双靶点间 DNA 片段缺失突变; E: 双靶点间 DNA 片段倒位及缺失突变; F: 单靶点 DNA 片段重复及缺失突变。标注黄色阴影的字母为 CRISPR/Cas9 靶序列; 标注下划线的字母为 PAM 区序列; “---”表示省略的碱基; WT: 野生型序列; M1~M5: 突变序列。

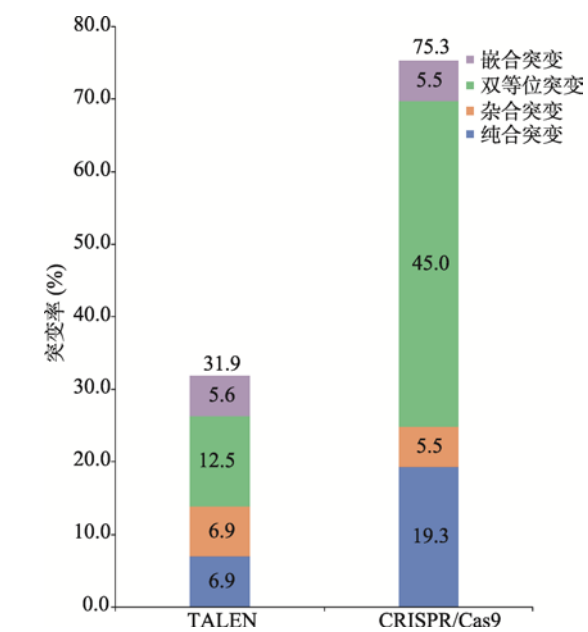


图 3 各种遗传模式靶向突变的突变率
Fig. 3 The rates of targeted mutations with various genetic patterns

就突变位置而言,本研究显示 TALEN 系统引发的突变位置集中发生在 Spacer 区的中部,与 Zhang 等^[16]的结果相符。而 CRISPR/Cas9 系统诱发绝大部分靶序列在 PAM 区上游 4 bp 发生突变,这与 Jinek 等^[25]、Gaines 等^[27]指出 CRISPR/Cas9 系统在 PAM 区上游 3 bp 处形成 DSBs 相吻合。同时,本研究发现 4 条(2.1%)*OslCD-PS5* 靶序列仅在 PAM 区上游 4~5 bp 之间发生 1 bp 插入突变。Zhang 等^[15]、Ma 等^[18]的统计中也出现了少数靶序列突变位点偏离预期 DSBs 的现象,Zhang 等^[15]发现 1 条靶序列仅在 PAM 上游第 5 个碱基处发生缺失突变,而分析 Ma 等^[18]统计结果发现,4 条靶序列仅在 PAM 上游第 5 个碱基处发生缺失突变,5 条靶序列仅在 PAM 区上游 4~5 bp 之间发生 1 bp 插入突变。少数突变位置偏离预期 DSBs 位置的现象,可能与 DSBs 修复过程中 PAM 区上游第 4 个碱基被正确修复有关,而水稻中 CRISPR/Cas9 诱导的 DSBs 是否有极小概率偏离 PAM

表 4 T₀-T₁ 代 TALEN 敲除株系靶向突变的遗传模式分析
Table 4 Genetic pattern analysis of targeted mutations in T₀ and T₁ knockout lines induced by TALEN

T ₀ 代株系	T ₀ 代基因型	T ₁ 代基因型(植株数)	χ ² (1:2:1)	T ₀ 代遗传模式
L2 11-1	-23	-23(20)	ND	纯合突变体
L2 2-5	-2	-2(20)	ND	纯合突变体
L2 1-6	+1/WT	+1(3), +1/WT(19), WT(8)	4.08(P>0.05)	杂合突变体
L2 11-3	-23/WT	-23(8), -23/WT(15), WT(4)	1.52(P>0.05)	杂合突变体
L2 7-7	-3/-29	-3(10), -3/-29(16), -29(4)	2.53(P>0.05)	双等位突变体
L2 4-4	-5/-8	-5(4), -5/-8(18), -8(8)	2.53(P>0.05)	双等位突变体
L2 10-2	-7/-23/WT	-23(8), -23/WT(17), WT(5)	1.40(P>0.05)	嵌合突变体
L2 1-3	+1/-3/WT	WT(30)	ND	嵌合突变体

注:“-”表示碱基对缺失;“+”表示碱基对插入;“/”用于区分同一植株不同的等位基因序列类型;ND表示未检测。

表 5 T₁-T₂ 代 TALEN 敲除株系靶向突变的遗传模式分析
Table 5 Genetic pattern analysis of targeted mutations in T₁ and T₂ knockout lines induced by TALEN

T ₁ 代株系	T ₁ 代基因型	T ₂ 代基因型(植株数)	χ ² (1:2:1)	T ₁ 代遗传模式
L2 2-5-20	-2	-2(16)	ND	纯合突变体
L2 1-6-23	+1	+1(17)	ND	纯合突变体
L2 1-6-4	+1/WT	+1(6), +1/WT(25), WT(9)	2.95(P>0.05)	杂合突变体
L2 11-3-27	-23/WT	-23(8), -23/WT(23), WT(6)	2.41(P>0.05)	杂合突变体
L2 7-7-8	-3/-29	-3(8), -3/-29(25), 29(6)	3.31(P>0.05)	双等位突变体
L2 4-4-2	-5/-8	-5(11), -5/-8(17), -8(6)	1.47(P>0.05)	双等位突变体
L2 1-6-2	WT	-2(1), WT(19)	ND	纯合野生型

注:基因型简写含义同表 4。ND 表示未检测。

表 6 T_0 - T_1 代 CRISPR/Cas9 敲除株系靶向突变的遗传模式分析Table 6 Genetic pattern analysis of targeted mutations in T_0 and T_1 knockout lines induced by CRISPR/Cas9

T_0 代株系	靶位点	T_0 代基因型	T_1 代基因型(植株数)	$\chi^2(1:2:1)$	T_0 代遗传模式
P 7-5	<i>OsNramp5</i> -PS1	+1	+1(17)	ND	纯合突变体
P 7-5	<i>OsNramp5</i> -PS2	-10	-10(17)	ND	纯合突变体
P 7-3	<i>OsNramp5</i> -PS1	-3/WT	-3(8), WT(4), +1a(2), +1b(1) -3/WT(9), -3/+1a(7), -3/+1b(4)	ND	ND
P 7-3	<i>OsNramp5</i> -PS2	-4/-5	-4(7), -4/-5(20), -5(8)	0.77($P>0.05$)	双等位突变体
D 3-1	<i>OsLCD</i> -PS5	+1/-11	+1(7), +1/-11(25), -11(6)	3.84($P>0.05$)	双等位突变体
D 3-1	<i>OsLCD</i> -PS6	+1a/+1b	+1a(7), +1a/+1b(25), +1b(6)	3.84($P>0.05$)	双等位突变体

注：基因型简写含义同表 4。+1a,+1b 表示同一靶位点发生了不同碱基的插入突变。ND 表示未检测。

区上游 3 bp 位置尚需新的方法验证。

一个理想的基因组编辑技术应具有以下特点：

(1)靶向突变活性高,转基因低世代有较高的突变率；(2)突变位点特异,脱靶率低；(3)突变类型多样,易于找到符合要求的突变体；(4)有一定比例能稳定遗传的突变体；(5)对于应用研究而言,在转基因低世代(如 T_1 代)易彻底分离所有的转基因成分。本研究发现,用农杆菌介导 TALEN 系统和 CRISPR/Cas9 系统转化水稻最早可在愈伤组织发生突变,在 T_0 代能有效或高效地获得可稳定遗传的各种突变体,通过选择特异性高的 CRISPR/Cas9 靶序列,可以有效控制脱靶效应。此外,我们的研究(未发表数据)表明,在 T_1 代转基因分离群体中可以筛选到不含转基因成分的纯合突变体和双等位突变体。相比 TALEN 系统而言,CRISPR/Cas9 具有不少优势:靶序列更广泛、载体构建更简单、突变更高效,不受 DNA 甲基化影响^[28],可同时敲除多达 8~10 个靶位点^[18,22,23],易形成靶点间 DNA 片段缺失等突变。因此,总体而言 CRISPR/Cas9 是更为理想的基因组编辑工具,但对于玉米等只有一小部分基因组转录本能找到 CRISPR/Cas9 特异靶位点^[29]的物种而言,TALEN 系统则提供了一个相对特异的基因组编辑方式。

参考文献(References):

- [1] 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]
- [2] Wang ZP, Xing HL, Dong L, Zhang HY, Han CY, Wang XC, Chen QJ. 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. [DOI]
- [3] Hyun Y, Kim J, Cho SW, Choi Y, Kim JS, 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. [DOI]
- [4] Townsend JA, Wright DA, Winfrey RJ, Fu FL, Maeder ML, Joung JK, Voytas DF. High-frequency modification of plant genes using engineered zinc-finger nucleases. *Nature*, 2009, 459(7245): 442–445. [DOI]
- [5] Nekrasov V, Staskawicz B, Weigel D, Jones JDG, Kamoun S. Targeted mutagenesis in the model plant *Nicotiana benthamiana* using Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(8): 691–693. [DOI]
- [6] Li T, Liu B, Spalding MH, Weeks DP, Yang B. High-efficiency TALEN-based gene editing produces disease-resistant rice. *Nat Biotechnol*, 2012, 30(5): 390–392. [DOI]
- [7] Shan QW, Wang YP, Li J, Zhang Y, Chen KL, Liang Z, Zhang K, Liu JX, Xi JZJ, Qiu JL, Gao CX. Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(8): 686–688. [DOI]
- [8] Miao J, Guo DS, Zhang JZ, Huang QP, Qin GJ, Zhang X, Wan JM, Gu HY, Qu LJ. Targeted mutagenesis in rice using CRISPR-Cas system. *Cell Res*, 2013, 23(10): 1233–1236. [DOI]
- [9] 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]
- [10] ShuklaVK, DoyonY, MillerJC, DeKolverRC, MoehleEA,

- Worden SE, Mitchell JC, Arnold NL, Gopalan S, Meng XD, Choi VM, Rock JM, Wu YY, Katibah GE, Gao ZF, McCaskill D, Simpson MA, Blakeslee B, Greenwalt SA, Butler HJ, Hinkley SJ, Zhang L, Rebar EJ, Gregory PD, Urnov FD. Precise genome modification in the crop species *Zea mays* using zinc-finger nucleases. *Nature*, 2009, 459(7245): 437–441. [DOI]
- [11] Svitashv S, Young JK, Schwartz C, Gao HR, Falco SC, Cigan AM. Targeted mutagenesis, precise gene editing, and site-specific gene insertion in maize using Cas9 and guide RNA. *Plant Physiol*, 2015, 169(2): 931–945. [DOI]
- [12] Liu TT, Fan D, Ran LY, Jiang YZ, Liu R, Luo KM. Highly efficient CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis of multiple genes in *Populus*. *Hereditas (Beijing)*, 2015, 37(10): 1044–1052.
刘婷婷, 范迪, 冉玲玉, 姜渊忠, 刘瑞, 罗克明. 应用 CRISPR/Cas9 技术在杨树中高效敲除多个靶基因. 遗传, 2015, 37(10): 1044–1052. [DOI]
- [13] Ma L, Zhu FG, Li ZW, Zhang JF, Li X, Dong JL, Wang T. TALEN-based mutagenesis of lipoxygenase LOX3 enhances the storage tolerance of rice (*Oryza sativa*) seeds. *PLoS One*, 2015, 10(12): e0143877. [DOI]
- [14] Xu RF, Li H, Qin RY, Wang L, Li L, Wei PC, Yang JB. Gene targeting using the *Agrobacterium tumefaciens*-mediated CRISPR-Cas system in rice. *Rice*, 2014, 7: 5. [DOI]
- [15] Zhang H, Zhang JS, Wei PL, Zhang BT, Gou F, Feng ZY, Mao YF, Yang L, Zhang H, Xu NF, Zhu JK. The CRISPR/Cas9 system produces specific and homozygous targeted gene editing in rice in one generation. *Plant Biotechnol J*, 2014, 12(6): 797–807. [DOI]
- [16] Zhang H, Gou F, Zhang JS, Liu WS, Li QQ, Mao YF, Botella JR, Zhu JK. TALEN-mediated targeted mutagenesis produces a large variety of heritable mutations in rice. *Plant Biotechnol J*, 2016, 14(1): 186–194. [DOI]
- [17] Xu RF, Li H, Qin RY, Li J, Qiu CH, Yang YC, Ma H, Li L, Wei PC, Yang JB. Generation of inheritable and “transgene clean” targeted genome-modified rice in later generations using the CRISPR/Cas9 system. *Sci Rep*, 2015, 5: 11491. [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] Lin YJ, Zhang QF. Optimising the tissue culture conditions for high efficiency transformation of indica rice. *Plant Cell Rep*, 2005, 23(8): 540–547. [DOI]
- [20] Ma XL, Chen LT, Zhu QL, Chen YL, Liu YG. Rapid decoding of sequence-specific nuclease-induced heterozygous and biallelic mutations by direct sequencing of PCR products. *Mol Plant*, 2015, 8(8): 1285–1287. [DOI]
- [21] Wang T, Wei JJ, Sabatini DM, Lander ES. Genetic screens in human cells using the CRISPR-Cas9 system. *Science*, 2014, 343(6166): 80–84. [DOI]
- [22] Xie KB, Minkenberg B, Yang YN. Boosting CRISPR/Cas9 multiplex editing capability with the endogenous tRNA-processing system. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112(11): 3570–3575. [DOI]
- [23] Liang G, Zhang HM, Lou DJ, Yu DQ. Selection of highly efficient sgRNAs for CRISPR/Cas9-based plant genome editing. *Sci Rep*, 2016, 6: 21451. [DOI]
- [24] 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]
- [25] Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 2012, 337(6096): 816–821. [DOI]
- [26] Hsu PD, Lander ES, Zhang F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell*, 2014, 157(6): 1262–1278. [DOI]
- [27] Gasiunas G, Barrangou R, Horvath P, Siksnys V. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(39): E2579–E2586. [DOI]
- [28] Hsu PD, Scott DA, Weinstein JA, Ran FA, Konermann S, Agarwala V, Li YQ, Fine EJ, Wu XB, Shalem O, Cradick TJ, Marraffini LA, Bao G, Zhang F. DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(9): 827–832. [DOI]
- [29] Xie KB, Zhang JW, Yang YN. Genome-wide prediction of highly specific guide RNA spacers for CRISPR-Cas9-mediated genome editing in model plants and major crops. *Mol Plant*, 2014, 7(5): 923–926. [DOI]