

# 快速构建多重 sgRNA 载体利用 CRISPR/Cas9 技术敲除拟南芥 *IAA2* 基因

刘丁源, 邱婷, 丁晓辉, 李苗苗, 朱睦元, 王君晖

浙江大学生命科学学院, 杭州 310058

**摘要:** *IAA2*(*Indole Acetic Acid 2*)是拟南芥 *Aux/IAA* 生长素响应基因大家族中的一员, 目前还没有它的突变体的报道, 阻碍了对其功能和作用机制的深入研究。在 CRISPR/Cas9 基因组编辑技术中, 1 个 sgRNA 只能靶向基因的 1 个位点, 有时基因敲除的效率并不高。为了提高敲除效率, 本文在 Golden-Gate 克隆技术的基础上, 通过两轮 PCR 扩增, 将每 3 个 sgRNA 串联到同 1 个入门载体中, 再将入门载体与含 Cas9 表达框的目标载体 LR 反应, 获得最终的表达载体。结果表明, 设计的 6 个 sgRNA 有 4 个发挥了作用, 产生了碱基插入突变和大片段缺失突变等多种可遗传的突变。与单个 sgRNA 相比, 多重 sgRNA 的基因敲除效率高、种系突变多; 与其他构建多重 sgRNA 载体的方法相比, 本方法具有快速、高效等优点。本文所得到的 5 个突变体为后续的 *IAA2* 功能研究提供了良好的材料。

**关键词:** CRISPR/Cas9; 多重 sgRNA 串联; 基因组编辑; *IAA2* 基因

## Rapid construction of multiple sgRNA vectors and knockout of the *Arabidopsis IAA2* gene using the CRISPR/Cas9 genomic editing technology

Dingyuan Liu, Ting Qiu, Xiaohui Ding, Miaomiao Li, Muyuan Zhu, Junhui Wang

College of Life Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China

**Abstract:** *IAA2* is a member of the *Aux/IAA* auxin responsive gene family in *Arabidopsis thaliana*. No *iaa2* mutant has been reported until now, thus hindering its further mechanistic investigations. The normal genomic editing technology of CRISPR/Cas9 (Clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated protein 9) uses only a single guide RNA (sgRNA) to target one site in a specific gene, and the gene knockout efficiency is not high. Instead, multiple sgRNAs can target multiple sites; therefore, the efficiency may be improved. In the present investigation, we used the golden-gate cloning strategy and two rounds of PCR reactions to combine three sgRNAs in the same entry vector. The final expression vector was obtained by LR reactions with the destination vector containing the Cas9 expression cassette. Four out of the six sgRNAs were effective, and we also obtained a lot of insertion and deletion mutations. Compared with one sgRNA approach, multiple sgRNAs displayed higher gene-knockout efficiency and produced more germ-line mutants. Thus,

收稿日期: 2016-01-04; 修回日期: 2016-02-16

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 31170211)和浙江省科技计划项目(编号: 2012C12902)资助[Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 31170211) and Science and Technology Research Projects of Zhejiang Province(No. 2012C12902)]

作者简介: 刘丁源, 硕士研究生, 专业方向: 遗传学。E-mail: dingyuan0726@126.com

通讯作者: 王君晖, 副教授, 研究方向: 遗传学。E-mail: junhuiwang@zju.edu.cn

DOI: 10.16288/j.yczs.16-002

网络出版时间: 2016/5/12 10:40:47

URI: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20160512.1040.002.html>

we established a more rapid and efficient method and generated five mutants for further studies of IAA2 functions.

**Keywords:** CRISPR/Cas9; multiple sgRNAs; genome editing; IAA2

生长素(Auxin)调节植物生长发育的诸多方面,主要包括细胞伸长和细胞分裂、向地性和向光性反应、维管组织形成和花的发育等<sup>[1]</sup>。生长素调控基因表达主要与三类蛋白有关:生长素受体 TIR1/AFB 家族,响应生长素转录因子 ARF 家族,以及转录抑制蛋白 Aux/IAA 家族<sup>[2]</sup>。拟南芥中有 29 个 *Aux/IAA* 基因, *IAA2* 是其中一员<sup>[3]</sup>。目前,该基因的失去功能型(Loss-of-function)突变体还没有报道,阻碍了其功能和作用机制的研究。

基因组编辑技术(Genome editing)是通过基因工程表达的序列特异的核酸酶对基因组进行切割,实现基因定点敲除、敲入等修饰,在基础生物学领域的反向遗传学研究、农业领域的种质改良和医学领域的基因治疗等方面有重要的应用价值<sup>[4-8]</sup>。目前,基因组编辑技术主要包括锌指核酸酶(Zinc-finger nucleases, ZFN)<sup>[6]</sup>、转录激活样效应器核酸酶(Transcription activator-like effector nucleases, TALEN)<sup>[9]</sup>和最新发展的成簇规律间隔短回文重复序列相关核酸酶(Clustered regularly interspaced short palindromic repeats associated nuclease, CRISPR/Cas)<sup>[10]</sup>。

CRISPR/Cas 是细菌和古生菌抵抗病毒或外源质粒入侵的获得性免疫系统<sup>[11]</sup>,主要有 3 种类型: I 型、II 型和 III 型,其中 II 型系统被广泛应用于基因组编辑技术。嗜热性链球菌(*Streptococcus thermophilus*)具有典型的 II 型 CRISPR/Cas 系统,该系统编码 tracrRNA(Trans-activating crRNA),能指导 RNaseIII 和 Cas9 完成前体 crRNA 的成熟;随后, tracrRNA 与成熟的 crRNA 的互补序列配对形成 RNA 二聚体,作为向导 RNA(Guide RNA, gRNA),引导 Cas9 蛋白识别和降解入侵的外源 DNA<sup>[12]</sup>。通过人工设计,研究者将 tracrRNA/crRNA 二聚体改造成单一向导 RNA(Single guide RNA, sgRNA),极大方便了基因组编辑技术的研究。

Cas9 蛋白是一种核酸内切酶,含有两个核酸酶结构域: RuvC-like 结构域和 HNH 核酸酶结构域。HNH 结构域切割与 crRNA 互补的模板 DNA 链,切割位点位于原型间隔序列毗邻基序(Protospacer ad-

jacent motif, PAM)上游 3nt 处;而 RuvC-like 结构域对另一条 DNA 链进行切割,切割位点位于 PAM 上游 3~8nt 处<sup>[13]</sup>。在基因组编辑技术中,sgRNA 指导 Cas9 蛋白在目的基因的 PAM(保守碱基序列为 NGG)上游切割,产生 DNA 双链断裂(Double strands break, DSB)。DSB 产生以后,细胞主要通过两种方式进行修复:同源重组(Homologous recombination, HR)和非同源末端连接(Nonhomologous end joining, NHEJ)<sup>[14]</sup>。多细胞真核生物主要通过 NHEJ 的方式修复 DSB<sup>[15]</sup>。由于 NHEJ 只是将断裂的 DNA 片段进行简单的加工之后连接起来,常常会在断裂位点产生碱基的缺失或插入,造成基因突变。

1 个 sgRNA 只能靶向基因的 1 个位点,有时基因突变的效率并不高,这是因为预测 sgRNA 效率的体系和方法还不是很完善。多个 sgRNA 能靶向同一基因的不同位点,提高基因突变的频率;也能造成较大片段的缺失突变,适用于 miRNA 基因的基因组编辑和某些疾病模型的建立。另外,多个 sgRNA 也能靶向不同的基因,特别是同一信号通路、同一代谢途径或同一基因家族的基因,在基础生命科学研究中具有重要的应用价值。本文在 Golden-gate 克隆技术的基础上,通过两轮 PCR 反应,建立了将每 3 个 sgRNA 串联到同一个入门载体中的方法体系。Golden-gate 克隆技术的核心是用 IIs 型限制性核酸内切酶,该类酶的切割序列位于识别序列之外,从而能产生多种粘性末端,有利于多个 DNA 片段按照指定的意向连接。本文获得了拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)*IAA2* 基因的碱基插入突变和大片段缺失突变,整个实验体系具有快速、高效等优点。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

所有转基因实验都以拟南芥 Col-0 生态型为背景,引自 ABRC(*Arabidopsis* Biological Resource Center, Ohio State University, USA)。

菌株是大肠杆菌(*Escherichia coli*) TOP10 和农杆

菌(*Agrobacterium tumefaciens*) GV3101。

原始载体为 pRGEB31, 该载体包含 2×35S 启动子驱动的 Cas9 表达框, 细菌中的选择抗性是卡那霉素(Kanamycine), 植物中的选择抗性是潮霉素(Hygromycin)<sup>[16]</sup>。本文在该载体的 *Hind*Ⅲ和 *Spe* I 之间加入了 *ccdB* 片段, 命名为 pRGEB31-*ccdB*。

## 1.2 方法

### 1.2.1 sgRNA 靶位点的选择

sgRNA 的靶位点是符合(N)<sub>20</sub>NGG 的序列, 通过 <http://zifit.partners.org/ZiFiT/ChoiceMenu.aspx> 网站设计。为方便后期鉴定, 设计相邻的靶位点距离相隔大于 100 bp。本文针对拟南芥 *IAA2* 基因选择了 6 个靶位点。

### 1.2.2 单个 sgRNA 表达框的扩增

将 sgRNA 对应的 DNA 序列置于 U6 启动子下, 转录后就能产生 sgRNA。本文合成了 pGH-U6-26-sgRNA, 作为模板质粒。为了使 U6 启动子与相应的 DNA 序列相连, 用 1 对 U6-26 启动子通用引物(表 1) 扩增拟南芥的 U6-26 启动子片段; 用各个 sgRNA 特异的上游引物(它们的区别仅在于 20nt 的靶序列不同) 和 1 个通用的下游引物分别扩增各个 *IAA2*-sgRNA 片段。U6-26 启动子片段的下游引物和每个 *IAA2*-sgRNA 片段的上游引物都含有 *Bsa* I 酶切位点(表 1)。将 U6-26 启动子片段与每个 *IAA2*-sgRNA 片段分别用 *Bsa* I 酶切, 再用 T4 DNA 连接酶连接, 获得含有 U6-26 启动子的 *IAA2*-sgRNA 片段, 分别命名为 U6-*IAA2*-sgRNA1、U6-*IAA2*-sgRNA2、U6-*IAA2*-sgRNA3、U6-*IAA2*-sgRNA4、U6-*IAA2*-sgRNA5、U6-*IAA2*-sgRNA6。

### 1.2.3 3 个 sgRNA 表达框的扩增和克隆

为了使每 3 种 U6-sgRNA 的表达框串联, 并且串联后的片段能够连接到入门载体(entry vector)中, 本文设计了 3 对通用引物, 分别为 U6-sgRNA1、U6-sgRNA2 和 U6-sgRNA3(表 1)。每对引物的上游和下游都含有 *Bsa* I 识别序列, 并且保证 *Bsa* I 酶切后产生的粘性末端相互匹配。用 U6-*IAA2*-sgRNA1、U6-*IAA2*-sgRNA2、U6-*IAA2*-sgRNA3 做为模板, 分别用上述 3 对引物进行扩增, 将得到的 PCR 产物与入门

载体 pEntry-*ccdB* 进行切连反应, 反应体系中含 *Bsa* I 1 μL, T4 DNA 连接酶 1 μL, 10×T4 Ligation Buffer 2 μL, ddH<sub>2</sub>O 8 μL, 总体积 20 μL。将切连产物转化至 TOP10 感受态, 涂板于含卡那霉素(Kanamycine, 50 mg/L)的 LB 培养基上倒置培养过夜, 挑取单克隆摇菌, 提质粒, 进行酶切和测序验证。正确的克隆命名为 pEntry-3sgRNA-1。利用相同的方法, 本文将 U6-*IAA2*-sgRNA4、U6-*IAA2*-sgRNA5、U6-*IAA2*-sgRNA6 三个表达框也串联到 pEntry-*ccdB* 载体中, 正确的克隆命名为 pEntry-3sgRNA-2。

### 1.2.4 表达载体的构建及转基因拟南芥的获得

将入门载体 pEntry-3sgRNA-1 和 pEntry-3sgRNA-2 分别与靶向载体 pRGEB31-*ccdB* 进行 GATEWAY 系统的 LR 重组反应, 转化 TOP10 感受态细胞, 挑取单克隆摇菌, 提取质粒进行酶切验证; 正确的质粒分别命名为 *IAA2*-3sgRNA-1 和 *IAA2*-3sgRNA-2。将它们分别电转至农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)GV3101 感受态, 经菌落 PCR 验证。用真空浸润法分别转化盛花期的拟南芥, 所结种子(T<sub>0</sub>代)在含潮霉素(Hygromycin)的 B5 培养基上进行筛选, 1 周后将抗性苗移入土中培养。

### 1.2.5 突变体的筛选与鉴定

从 2~3 周苗龄的抗性苗叶片提取基因组 DNA, PCR 扩增 *IAA2* 基因; 将 PCR 产物进行变性复性, 使突变序列和野生型序列形成错配双链。采取两种方法检出突变: 一是用 T7 核酸内切酶(T7EI)酶切变性复性后的 PCR 产物 1 h, 然后用 2% 的琼脂糖凝胶电泳 0.5 h; 二是直接用 14% 聚丙烯酰胺凝胶(PAGE)电泳 2 h。将含突变的拟南芥植株继续培养至结种子(T<sub>1</sub>代), 种子发芽后在幼苗叶片中再度检测突变, 方法同上, 直到 T<sub>2</sub>代获得可遗传的种系突变为止。最后, 将纯合突变体的 PCR 产物进行测序, 所得序列与野生型序列用 BLAST 比对, 得到突变位置的具体信息。

### 1.2.6 表型观察

将纯合突变体种子在 B5 培养基上发芽, 观察表型。按照文献<sup>[17]</sup>中的方法检测突变体和野生型幼苗的主根向地性反应。

表 1 本文所用的 PCR 引物序列

Table 1 Primer sequences used in the present study

引物名称	上游引物(5'→3')	下游引物(5'→3')
U6-26 启动子	CACCCTTTTTTCTTCTTCTCGTTCATACAG	CTCGGTCTCTAATCACTACTTCGACTCT
IAA2-sgRNA1	<u>GGTCTCTGATTGAGCTATGCTTGGATTACCG</u> TTTTAGAGC TAGAAATAGC	CTTCCCCTTAGGATCCAAAT
IAA2-sgRNA2	<u>GGTCTCTGATTGGTGAATATTGTGAGAGAGAG</u> TTTTAGAG CTAGAAATAGC	CTTCCCCTTAGGATCCAAAT
IAA2-sgRNA3	<u>GGTCTCTGATTGATGGTACTGGATGTTGGT</u> TTTTAGAG CTAGAAATAGC	CTTCCCCTTAGGATCCAAAT
IAA2-sgRNA4	<u>GGTCTCTATTGTGATATTGATCCAAAAGCAAG</u> TTTTAGAGC TAGAAATAGC	CTTCCCCTTAGGATCCAAAT
IAA2-sgRNA5	<u>GGTCTCTATTGTAAACAACAAGCGTCTATTG</u> GTTTTAGAGC TAGAAATAGC	CTTCCCCTTAGGATCCAAAT
IAA2-sgRNA6	<u>GGTCTCTATTGCCAAAACTCAAATCGTTGGT</u> GTTTTAGAGC TAGAAATAGC	CTTCCCCTTAGGATCCAAAT
U6-sgRNA1(U6-sgRNA4)	<u>CTGGTCTCTCACCCTTTTTTCTTCTTCTCGTTC</u> ATAC	CGGGTCTCTCTGGAAAAAAGCACC GACTCGGT
U6-sgRNA2(U6-sgRNA5)	<u>CTGGTCTCACCAAGCTTTTTTCTTCTTCTCGTTC</u> ATAC	CGGGTCTCTCATGAAAAAAGCACCG ACTCGGT
U6-sgRNA3(U6-sgRNA6)	<u>CTGGTCTCACATGCTTTTTTCTTCTTCTCGTTC</u> ATAC	CGGGTCTCTCTTAAAAAAGCACCG ACTCGGT
突变体鉴定引物	CTCATCAACCAGCTCACCAAGAACAA	CATAAGGAAGAGTCTAGAGCAGGAG

注: 下划线部分为 *Bsa* I 识别序列, 加粗斜体部分为靶位点序列。

## 2 结果与分析

### 2.1 两轮 PCR 法构建 3 重 sgRNA 载体

Golden-gate 克隆技术因为能够将多个 DNA 片段按指定的顺序连接起来, 被广泛应用于 ZFN、TALEN 和 CRISPR/Cas 等基因组编辑技术的载体构建中。为了将 3 个 sgRNA 表达框串联在一起, 本文利用两轮 PCR 法(图 1A), 与传统的两轮克隆法(图 1B)有所不同。在本方法中, 第一轮 PCR 产生 U6 启动子区和 sgRNA 对应区, 将两者连接起来, 作为第二轮 PCR 的模板; 第二轮 PCR 分别产生 3 个 sgRNA 表达框, 将它们和克隆载体进行切连反应就可以得到入门载体(图 1A)。如果第 1 d 上午开始进行 PCR, 当天就可以转化感受态细胞; 经培养过夜, 第 2 d 就可以得到单克隆; 再培养过夜, 第 3 d 就可以提取质粒进行验证。而在两轮克隆法中, 第一轮是用 3 个质粒分别克隆 3 个靶位点, 第二轮是将 3 个正确的质粒和入门载体克隆质粒进行切连反应(图 1B)。如果第 1 d 上午进行第一轮克隆, 当天转化感受态, 培养过夜, 第 2 d 得到单克隆; 再培养过夜, 第 3 d 提质粒验证, 若正确, 马上进行第二轮克隆, 转化感

受态, 培养过夜, 第 4 d 得到单克隆; 再培养过夜, 第 5 d 提质粒验证。

两种方法的比较见表 2。两轮 PCR 法不仅省时, 而且只需要 1 管感受态细胞, 涉及 1 种 II<sub>s</sub> 型核酸内切酶; 而两轮克隆法需要 4 管感受态细胞, 涉及 2 种 II<sub>s</sub> 型核酸内切酶, 还要前期有 3 种第一阶段的克隆载体。

### 2.2 拟南芥 IAA2 突变体的鉴定

将两种各包含 3 个 sgRNA 表达框的入门载体分别与含 Cas9 表达框的目标载体 LR 反应, 获得两种最终的表达载体(图 2A)。用农杆菌介导法转化野生型拟南芥, 得到 36 株 IAA2-3sgRNA-1 的 T<sub>0</sub> 代转基因植株和 20 株 IAA2-3sgRNA-2 的 T<sub>0</sub> 代转基因植株。分别提取叶片基因组 DNA, 对 IAA2 基因进行 PCR 扩增。将 PCR 产物进行变性和复性, 使突变序列和野生型序列形成错配双链, 错配双链在 PAGE 电泳时迁移率变慢, 在 T7E1 核酸酶酶切时能被切成片段。

在 T<sub>1</sub> 代植株中, 本文也用 PAGE 电泳和 T7E1 酶切区分突变杂合体和突变纯合体。待检样品的 PCR 产物在变性复性后, 直接进行 PAGE 凝胶电泳, 若有两个或多个条带, 说明是杂合突变, 若只有一

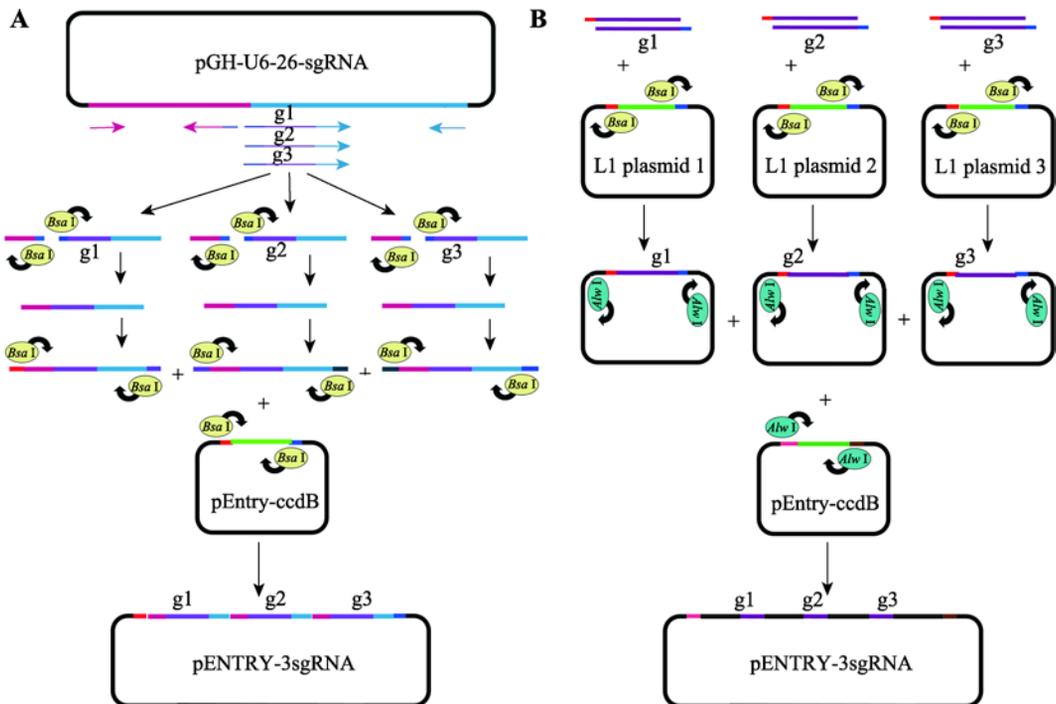


图 1 构建 3 重 sgRNA 串联载体的两种方法

Fig. 1 Two construction methods for entry vectors containing three sgRNA expression cassettes

A: 两轮 PCR 法; B: 两轮克隆法。

表 2 两种构建多重 sgRNA 载体的方法比较

Table 2 Differences between the two-round PCR and two-round cloning method in construction of vectors containing multiple sgRNA expression cassettes

	两轮 PCR 法	两轮克隆法
所需 II <sub>s</sub> 型核酸内切酶种类	1	2
感受态管数	1	4
转化次数	1	4
所需时间(d)	3	5

个条带,说明是纯合突变或没有突变(图 2B,图 3B);将只有一个条带的样品的 PCR 产物和野生型植株的 PCR 产物混合,变性复性后 PAGE 电泳,如果此时有两个条带,说明是突变纯合体(图 2C)。同理,待检样品的 PCR 产物在变性复性后,直接用 T7E1 酶切,若有切开的条带,说明是杂合突变,若只有一个条带,说明没有突变或是突变纯合体(图 2D,图 3C);将只有一个条带的样品的 PCR 产物和野生型植株的 PCR 产物混合,变性复性后用 T7E1 酶切,如果此时有切开的条带,说明是突变纯合体(图 2E,图 3D)。其中有些样品的 PCR 产物在琼脂糖凝胶电泳时就能

发现比野生型 PCR 产物条带偏小,推测这些样品可能是纯合的大片段缺失突变(图 3A)。

本文选择 2 个 *IAA2*-3sgRNA-1 和 3 个 *IAA2*-3sgRNA-2 共 5 种纯合突变体样品的 PCR 产物进行测序,将测序结果与野生型拟南芥 *IAA2* 基因组序列进行比对(图 4)。结果表明,*IAA2*-3sgRNA-1 的 2 个样品中,突变体 a 在靶位点 1 处没有突变,在靶位点 2 和靶位点 3 所对应的 PAM 前 3 个碱基处分别插入了 1 个 G 和 1 个 A;突变体 b 在靶位点 1 处发生了 140 bp 的大片段缺失(图 4B)。*IAA2*-3sgRNA-2 的 3 个样品中,靶位点 6 处没有突变,靶位点 4 和 5 之间发生了缺失突变。突变体 c 缺失了 44 bp,突变体 d 缺失了 4 bp,突变体 e 缺失了 131 bp(图 4C)。

### 2.3 根向地性表型观察与分析

本文将突变体和 Col-0 野生型在普通 B5 培养基上培养 5 d,没有发现肉眼可见的明显表型差异。由于生长素与根的向地性有关,本文将竖直放置的培养皿旋转 90°培养,每隔 1 h 观察突变体和野生型主根偏转的角度,结果发现,相同时间内突变体比野

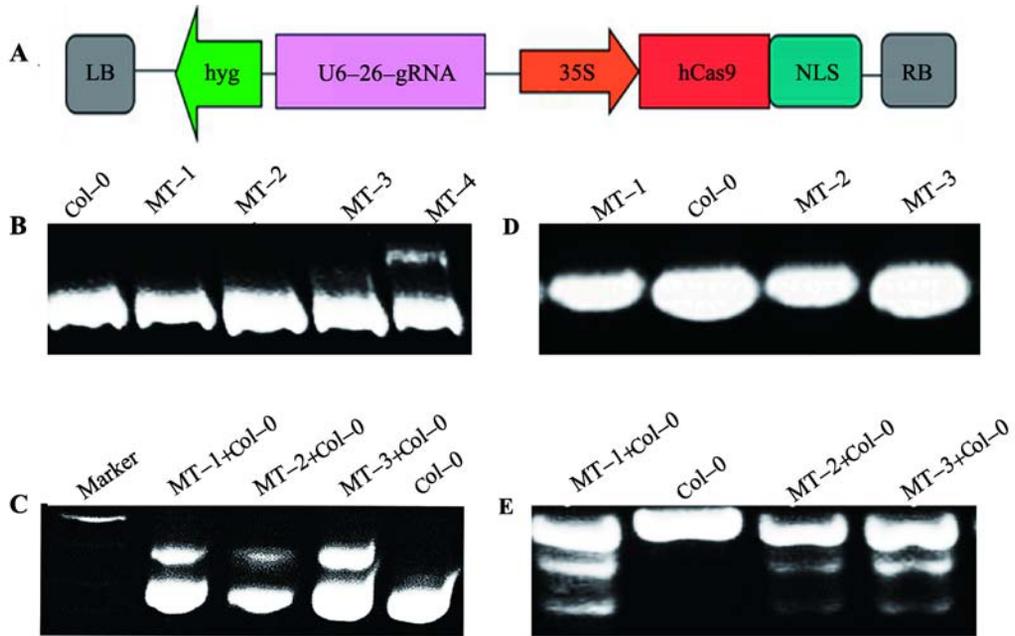


图 2 *IAA2*-3sgRNA-1 T<sub>1</sub> 代转基因株系的突变体鉴定

Fig. 2 Mutant detection in transgenic lines of *IAA2*-3sgRNA-1

A: 表达载体示意图 ;B: T<sub>1</sub> 代样品的 PCR 产物的 PAGE 电泳图 ;C: 样品 PCR 产物与野生型(Col-0)PCR 产物混合后的 PAGE 电泳图 ; D: 样品 PCR 产物经 T7E1 酶切后的琼脂糖凝胶电泳 E: 样品 PCR 产物与野生型 PCR 产物混合后经 T7E1 酶切的琼脂糖凝胶电泳图。

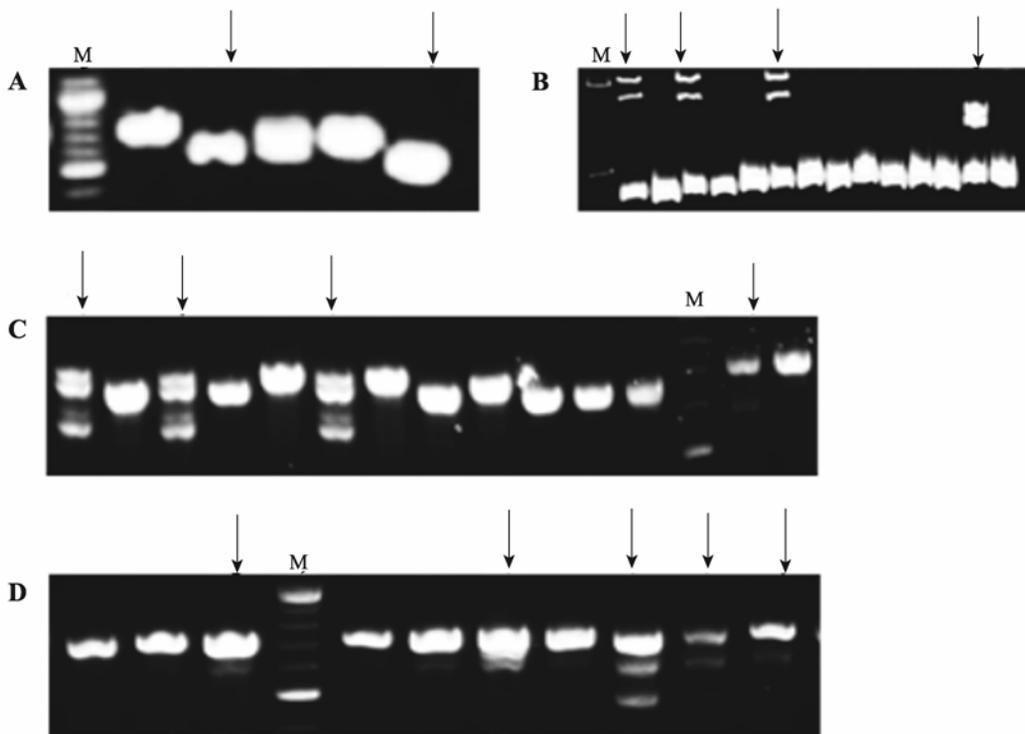


图 3 *IAA2*-3sgRNA-2 T<sub>1</sub> 代转基因株系的突变体鉴定

Fig. 3 Mutant detection in transgenic lines of *IAA2*-3sgRNA-2

A: T<sub>1</sub> 代样品的 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳图 ;B: T<sub>1</sub> 代样品 PCR 产物的 PAGE 电泳图 ;C: B 图中 PCR 产物经 T7E1 酶切的琼脂糖凝胶电泳图 ;D: C 图中未切开样品与野生型 PCR 产物混合后经 T7E1 酶切的琼脂糖凝胶电泳图。M: Marker ;箭头所指的是有突变的样品。

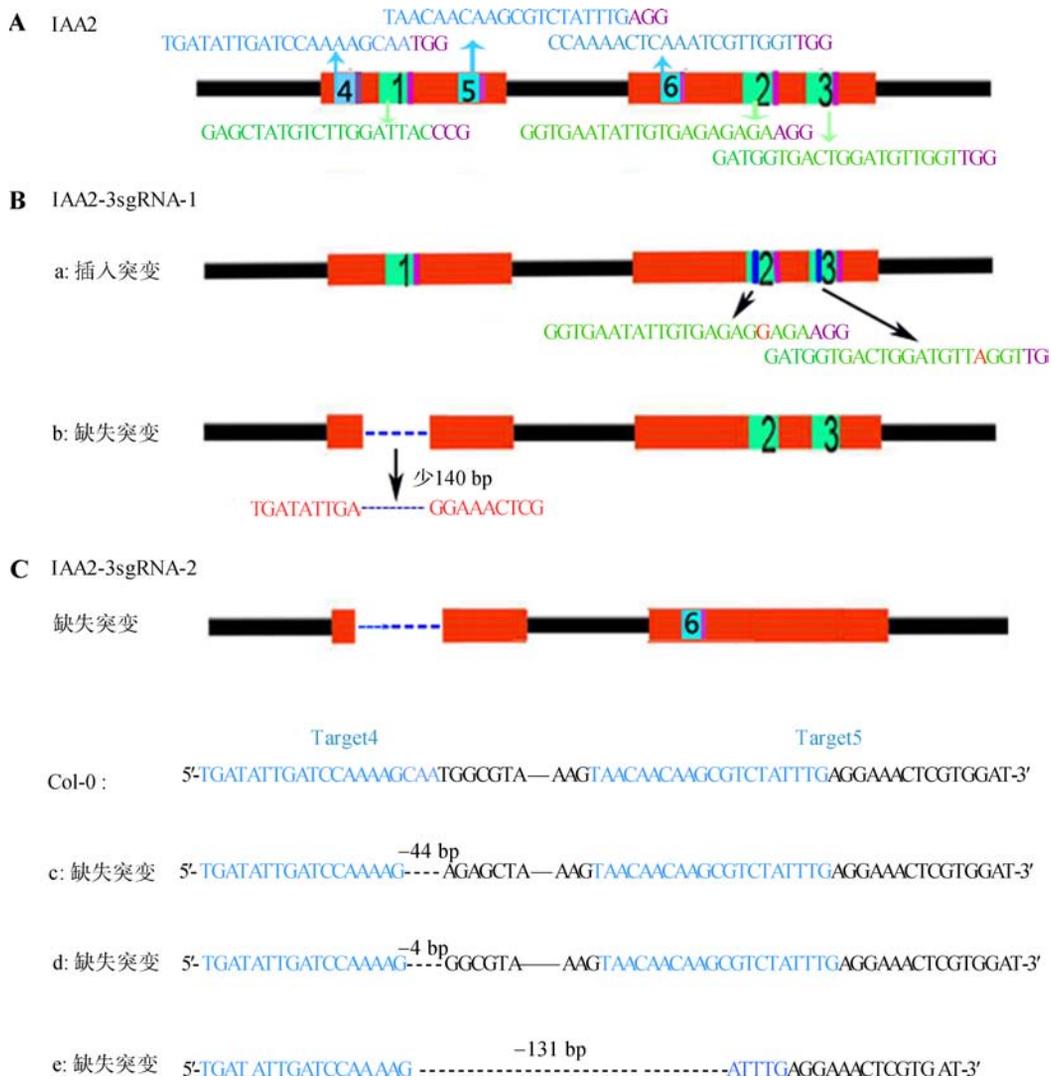


图 4 *IAA2* 基因 5 种突变体的突变位置和形式

Fig. 4 Mutation locations and forms of five *IAA2* mutants

A: *IAA2* 基因组示意图。黑色代表内含子或非翻译区, 红色代表外显子, 绿色和蓝色数字区域分别代表 *IAA2*-3sgRNA-1 和 *IAA2*-3sgRNA-2 载体中 sgRNA 靶位点位置; B: *IAA2*-3sgRNA-1 转基因株系中 2 种可遗传的突变; C: *IAA2*-3sgRNA-2 转基因材料中 3 种可遗传的突变。

生型偏转的速度快, 主根偏转至  $90^\circ$  所用的时间短, 说明 *IAA2* 基因突变提高了根的向地性(图 5)。其他方面的表型分析还包括外源生长素处理、外源生长素运输抑制剂处理等, 我们将在后续研究中开展。

### 3 讨论

在基因组编辑实验的载体构建中, 研究者大多采用 Golden-gate 克隆技术或连接酶非依赖的克隆 (Ligation-independent cloning, LIC) 技术<sup>[18]</sup>。Golden-gate 克隆技术的具体步骤可以有所变化, 本文采用

了两轮 PCR 法, 而文献中往往用两轮克隆法。本文的结果表明, 两轮 PCR 法与传统的两轮克隆法相比, 既节省了感受态细胞又节省了时间, 而且少使用一种 II<sub>s</sub> 型核酸内切酶, 不需要 3 个第一阶段的克隆载体。因此两轮 PCR 法具有快速、高效等优点。同时, 由于使用了高保真酶, PCR 片段都不长, 并且最终的表达框是测序验证的, 因此, 两轮 PCR 扩增中可能产生突变的这个潜在缺点是可以避免的。另外, 如果只构建一种表达载体, 可以在表达载体上设计 Golden-gate 位点, 直接将两轮 PCR 产物与表达载体

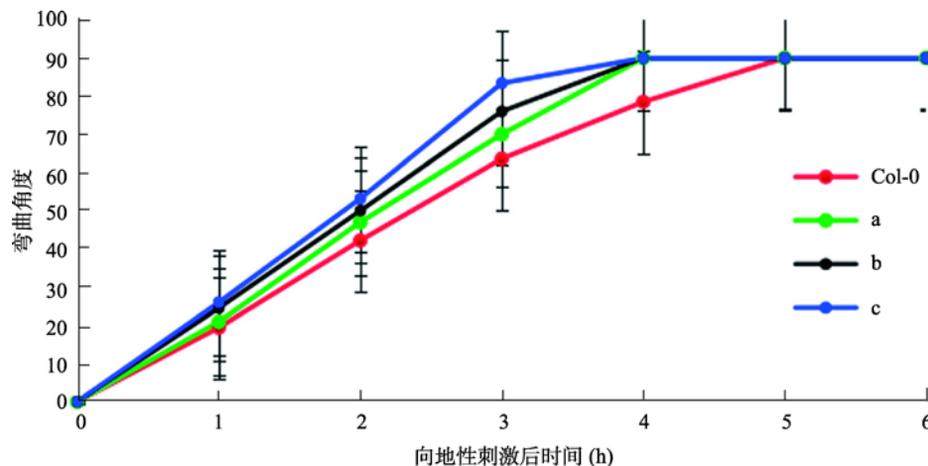


图 5 *IAA2* 突变体和野生型 *Col-0* 的向地性比较

Fig. 5 Comparison of gravitropic responses between *IAA2* mutants and wild-type *Col-0*

图中 a、b 和 c 代表 3 种不同的突变体。

进行连接反应,快速获得最终的载体。但如果要构建多种表达载体,如不同启动子驱动的 Cas9 载体,或不同抗生素筛选标记的载体等,用 Gateway 的思路,先构建入门载体再进行 LR 反应,是更加高效的。

我们在前期研究中只构建了含单个 sgRNA 的载体,结果突变效率总体不高,不同的基因突变效率不一,在 *IAA2* 基因上没有得到突变体。本文用两轮 PCR 法构建了 2 个三重串联的 sgRNA 载体,最终结果表明,所设计的 6 个 sgRNA 有 4 个发挥了作用,产生了碱基插入突变和大片段缺失突变等多种可遗传的突变。与单个 sgRNA 相比,多重 sgRNA 的基因敲除效率高、种系突变多;与其他构建多重 sgRNA 载体的方法相比,本文的方法具有快速、高效等优点。实验中得到 5 种可遗传的突变体为后续的 *IAA2* 功能研究提供了良好的材料。目前,CRISPR/Cas9 技术在基因组编辑中的应用越来越广泛,为人们定点改造动植物甚至人类基因组提供了可能。串联多个 sgRNA 表达框是进一步提高 CRISPR/Cas9 技术效率的重要途径<sup>[19]</sup>。另外,目前已经出现了一些靶位点设计和活性检测的方法,科学选择靶位点也能增强 sgRNA 的稳定性和活性,提高 CRISPR/Cas9 技术的基因组编辑效率<sup>[20]</sup>。

#### 参考文献(References):

- [1] Davies PJ. The plant hormones: their nature, occurrence, and functions. In: Davies PJ, ed. *Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*. Netherlands: Springer, 2010: 1–15. [DOI]
- [2] Theologis A, Huynh TV, Davis RW. Rapid induction of specific mRNAs by auxin in pea epicotyl tissue. *J Mol Bio*, 1985, 183(1): 53–68. [DOI]
- [3] Abel S, Nguyen MD, Theologis A. The PS-*IAA4/5*-like family of early auxin-inducible mRNAs in *Arabidopsis thaliana*. *J Mol Bio*, 1995, 251(4): 533–549. [DOI]
- [4] Shan QW, Gao CX. Research progress of genome editing and derivative technologies in plants. *Hereditas (Beijing)*, 2015, 37(10): 953–973. 单奇伟, 高彩霞. 植物基因组编辑及衍生技术最新研究进展. *遗传*, 2015, 37(10): 953–973. [DOI]
- [5] Li JH, Shou J, Wu Q. DNA fragment editing of genomes by CRISPR/Cas9. *Hereditas (Beijing)*, 2015, 37(10): 992–1002. 李金环, 寿佳, 吴强. CRISPR/Cas9 系统在基因组 DNA 片段编辑中的应用. *遗传*, 2015, 37(10): 992–1002. [DOI]
- [6] Urnov FD, Rebar EJ, Holmes MC, Zhang HS, Gregory PD. Genome editing with engineered zinc finger nucleases. *Nat Rev Genet*, 2010, 11(9): 636–646. [DOI]
- [7] Doudna JA, Charpentier E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, 2014, 346(6213): 1258096. [DOI]
- [8] Hsu PD, Lander ES, Zhang F. Development and application of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell*, 2015, 157(6): 1262–1278. [DOI]
- [9] Mahfouz MM, Li LX, Shamimuzzaman M, Wibowo A, Fang XY, Zhu JK. De novo-engineered transcription acti-

- vator-like effector (TALE) hybrid nuclease with novel DNA binding specificity creates double-strand breaks. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(6): 2623–2628. [DOI]
- [10] 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]
- [11] Makarova KS, Haft DH, Barrangou R, Brouns SJJ, Charpentier E, Horvath P, Moineau S, Mojica FJM, Wolf YI, Yakunin AF, van der Oost J, Koonin EV. Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol*, 2011, 9(6): 467–477. [DOI]
- [12] Horvath P, Barrangou R. CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. *Science*, 2010, 327(5962): 167–170. [DOI]
- [13] Ran FA, Hsu PD, Lin CY, Gootenberg JS, Konermann S, Trevino AE, Scott DA, Inoue A, Matoba S, Zhang Y, Zhang, F. Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell*, 2013, 154(6): 1380–1389. [DOI]
- [14] Haber JE. Partners and pathways: repairing a double-strand break. *Trends Genet*, 2000, 16(6): 259–264. [DOI]
- [15] Sonoda E, Hohegger H, Saberi A, Taniguchi Y, Takeda S. Differential usage of non-homologous end-joining and homologous recombination in double strand break repair. *DNA Repair*, 2006, 5(9–10): 1021–1029. [DOI]
- [16] Xie KB, Yang YN. RNA-guided genome editing in plants using a CRISPR-Cas system. *Mol Plant*, 6(6): 1975–1983. [DOI]
- [17] Kong YY, Zhu YB, Gao C, She WJ, Lin WQ, Chen Y, Han N, Bian HW, Zhu MY, Wang JH. Tissue-specific expression of *SMALL AUXIN UP RNA41* differentially regulates cell expansion and root meristem patterning in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol*, 54(4): 609–621. [DOI]
- [18] Schmid-Burgk JL, Schmid T, Kaiser V, Höning K, Hornung V. A ligation-independent cloning technique for high-throughput assembly of transcription activator-like effector genes. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(1): 76–81. [DOI]
- [19] Wang HY, Yang H, Shivalila CS, Dawlaty MM, Cheng AW, Zhang F, Jaenisch R. One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell*, 2013, 153(4): 910–918. [DOI]
- [20] Moreno-Mateos MA, Vejnar CE, Beaudoin JD, Fernandez JP, Mis EK, Khokha MK, Giraldez AJ. CRISPRscan: designing highly efficient sgRNAs for CRISPR-Cas9 targeting *in vivo*. *Nat Methods*, 2015, 12(10): 982–988. [DOI]

(责任编辑: 邢永忠)