

利用 CRISPR/Cas9 双基因敲除系统初步解析大豆 *GmSnRK1.1* 和 *GmSnRK1.2* 对 ABA 及碱胁迫的响应

李慧卿, 陈超, 陈冉冉, 宋雪薇, 李倩娜, 朱廷明, 丁晓东

东北农业大学农业生物功能基因重点实验室, 哈尔滨 150030

摘要: 蔗糖非发酵相关激酶(sucrose non-fermenting related protein kinases, SnRKs)是广泛存在于植物中的一类 Ser/Thr 蛋白激酶, 在植物的生长、发育、代谢和抗逆等方面具有重要调节作用。大豆(*Glycine max* L.)基因组中含有 4 个 *SnRK1* 同源基因, 其中 *GmSnRK1.1* 和 *GmSnRK1.2* 为两个主要表达基因, 可能参与大豆多种抗逆途径。为解析大豆 *GmSnRK1.1* 和 *GmSnRK1.2* 对 ABA 及碱胁迫的响应, 本研究构建了双靶点 CRISPR 载体定向敲除 *GmSnRK1.1* 和 *GmSnRK1.2* 基因, 利用发根农杆菌(*Agrobacterium rhizogenes*)介导大豆遗传转化, 获得双基因敲除突变体毛状根, 经测序鉴定双基因突变率为 48.6%; 同时, 利用实验室前期构建的植物超量表达载体获得超量表达 *GmSnRK1* 基因大豆毛状根。经 25 $\mu\text{mol/L}$ ABA 处理 15 d, 对照组和超量表达毛状根的生长受到明显抑制, 其根长与根鲜重均显著低于双基因敲除突变体毛状根; 经 50 mmol/L NaHCO_3 处理 15 d, 对照组和双基因敲除突变体毛状根的生长受到明显抑制, 其根长与根鲜重均显著低于超量表达毛状根。本研究建立的 CRISPR/Cas9 系统能够有效地对大豆进行 *GmSnRK1.1* 和 *GmSnRK1.2* 双基因敲除, 基因敲除突变降低了植物对 ABA 的敏感性及对碱胁迫的耐性, 研究结果初步说明 SnRK1 激酶在植物响应非生物胁迫中具有重要作用。

关键词: 大豆; CRISPR/Cas9; *GmSnRK1.1*; *GmSnRK1.2*; ABA 信号; 碱胁迫

Preliminary analysis of the role of *GmSnRK1.1* and *GmSnRK1.2* in the ABA and alkaline stress response of the soybean using the CRISPR/Cas9-based gene double-knockout system

Huiqing Li, Chao Chen, Ranran Chen, Xuwei Song, Jina Li, Yanming Zhu, Xiaodong Ding

Key Laboratory of Agricultural Biological Functional Genes, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China

Abstract: Sucrose non-fermenting related protein kinases (SnRKs) are a ubiquitous Ser/Thr protein kinase in the plant

收稿日期: 2017-12-27; 修回日期: 2018-05-16

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 31670272), 黑龙江省自然科学基金项目(编号: C2017014)和东北农业大学人才项目资助[Supported by the National Natural Science Foundation of China(No. 31670272), Heilongjiang Province Natural Science Foundation(No. C2017014) and the Northeast Agricultural University Talent Project]

作者简介: 李慧卿, 硕士研究生, 专业方向: 植物基因工程与分子生物学。E-mail: 632651739@qq.com

通讯作者: 朱廷明, 教授, 博士生导师, 研究方向: 植物基因工程与分子生物学。E-mail: ymzhu2001@yahoo.com.cn

丁晓东, 教授, 博士生导师, 研究方向: 植物基因工程与分子生物学。E-mail: xiaodong.ding@neau.edu.cn

DOI: 10.16288/j.ycz.17-424

网络出版时间: 2018/5/21 13:57:30

URI: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20180521.1356.004.html>

kingdom. These kinases play important roles in plant growth, development, metabolism and resistance to environmental stresses. The soybean (*Glycine max* L.) genome has four *SnRK1* genes, of which *GmSnRK1.1* and *GmSnRK1.2* are predominant and participate in multiple stress response pathways. To dissect the mechanism of the role of *GmSnRK1.1* and *GmSnRK1.2* proteins in response to ABA and alkaline stresses, we constructed a dual-gRNA CRISPR vector to specifically knock out *GmSnRK1.1* and *GmSnRK1.2*. The resultant constructs were transformed into soybean cotyledon nodes to induce hairy roots by agrobacteria (*Agrobacterium rhizogenes*). The soybean hairy roots obtained were genotyped, and the results showed that *GmSnRK1.1* and *GmSnRK1.2* were efficiently doubly knocked out in 48.6% hairy roots. We also generated control hairy roots that over-expressed *GmSnRK1*. The materials were treated with 25 $\mu\text{mol/L}$ ABA for 15 days and the results showed that the growths of wild-type and *GmSnRK1* over-expressed roots were significantly inhibited than *GmSnRK1.1 GmSnRK1.2* double-knockout roots, as the controls displayed less root lengths and fresh weights. However, after treating with 50 mmol/L NaHCO_3 for 15 days, we found that the growths of *GmSnRK1.1 GmSnRK1.2* double-knockout roots were significantly inhibited than the wild-type and *GmSnRK1* over-expressed control roots, as the knockout groups contained less root lengths and fresh weights. These results implied that the *GmSnRK1.1 GmSnRK1.2* double knockout mitigated hairy root sensitivity to ABA and resistance to alkaline stress. Taken together, we established the CRISPR/Cas9 system to perform gene double knockout in the soybean and by using this technique, we determined the roles of *GmSnRK1.1* and *GmSnRK1.2* in response of abiotic stresses.

Keywords: soybean; CRISPR/Cas9; *GmSnRK1.1*; *GmSnRK1.2*; ABA signal; alkaline resistance

蔗糖非发酵相关蛋白激酶(sucrose non-fermenting related protein kinases, SnRKs)是广泛存在于植物中的一类 Ser/Thr 蛋白激酶,能直接参与植物生长、发育、代谢和抗逆等途径^[1]。根据序列和功能,SnRKs 分为 SnRK1、SnRK2 和 SnRK3 家族,其中 SnRK2 和 SnRK3 亚家族成员已被广泛研究。据报道,SnRK2 具有参与 ABA 调控的生理功能,包括气孔的开关、种子和根系的发育、抗盐、抗寒、抗旱等^[2]。Zhu 等^[3]证明野生大豆(*Glycine soja*)GsAPK 属于 SnRK2 家族激酶,能够提高植物对 ABA 和高盐胁迫的耐受性。SnRK3 在植物抗盐的信号转导途径 SOS3-SOS2-SOS1 中扮演重要角色,被激活的 SOS2 (SnRK3 激酶)磷酸化并开启位于细胞膜上的 Na^+/H^+ 泵,将盐逆向泵出细胞从而保护细胞不受盐份伤害^[4]。此外,SnRK3 在调控气孔开关、植物激素以及病原免疫等方面的功能也有报道^[1]。相比于 SnRK2 和 SnRK3,SnRK1 可能具有更多的功能。在水稻(*Oryza sativa* L.)和野生大豆(*Glycine soja*)中,SnRK1 比 SnRK2 和 SnRK3 拥有更多种类的互作蛋白,可能广泛参与基因转录调控,并且在多种植物激素信号转导途径中扮演关键角色^[5,6]。植物中 SnRK1 激酶在进

化和功能上与酵母(*Saccharomyces*)SNF1 激酶最为相似,并能互补酵母的 *snf1* 突变功能^[7]。Liu 等^[8]在苹果(*Malus domestica*)中沉默 *MtSnRK1.1* 基因,导致转基因苹果的愈伤组织对 ABA 敏感性降低。相比于 *SnRK2* 和 *SnRK3*,*SnRK1* 的同源基因数量较少,如在栽培大豆中只含有 4 个同源基因,遗传相对简单。目前,大豆 *GmSnRK1* 在响应 ABA 及碱胁迫应答中的功能却鲜有报道,阻碍了其作用机制的研究。

由于大豆基因组高度重复且十分复杂^[9,10],使用传统技术沉默靶基因所产生的非特异性随机突变制约着植物基因功能验证及其分子机理的研究。近年来,CRISPR/Cas9 基因组定点编辑技术能够精准、高效、快速地编辑特定单个或多个基因,已成为具有广阔应用前景的基因组编辑操作系统。CRISPR/Cas9 系统属于 II 型 CRISPR 系统,核酸内切酶 Cas9 通过合成的向导 RNA(gRNA)引导,识别靶序列并对靶位点进行切割,造成 DNA 双链断裂,从而激活细胞的同源定向修复或非同源末端连接自我修复机制^[11]。当碱基插入或缺失(InDels)引发移码突变或蛋白结构被改变时,靶基因的功能就会被破坏^[11,12]。目前,CRISPR/Cas9 系统已经应用到许多重要农作

物中,如水稻^[13~16]、番茄(*Solanum lycopersicum* L.)^[17]、小麦(*Triticum aestivum* L.)^[18]和玉米(*Zea mays* L.)^[19]等。2015 年, Jacobs 等^[20]首次利用 CRISPR/Cas9 技术在大豆中实现定点编辑;同年, Cai 等^[21]在大豆中快速检测 CRISPR/Cas9 系统介导定点编辑效率的方法,证明 CRISPR/Cas9 技术可对外源导入基因和内源基因进行定点敲除;2016 年 Du 等^[22]以 *GmPDS11* 和 *GmPDS18* 为靶基因,比较 TALENs 和 CRISPR/Cas9 技术在大豆中的编辑效率,结果表明 CRISPR/Cas9 系统更适用于同时编辑多个大豆同源基因。2017 年, Cai 等^[23]利用 CRISPR/Cas9 技术定点敲除大豆开花调控关键基因 *GmFT2a*, 成功创制出无外源基因并稳定遗传的大豆晚花突变体材料。通过该系统可获得靶基因功能完全丧失的突变体,为开展大豆基因功能研究奠定了理论基础。

为解析大豆 SnRK1 激酶在响应 ABA 和碱胁迫中的功能,本研究构建了 CRISPR/Cas9 载体用于靶向敲除 *GmSnRK1.1* 和 *GmSnRK1.2* 双基因,并利用实验室前期构建的超量表达 *GmSnRK1* 基因载体,通过发根农杆菌 K599 介导大豆子叶节遗传转化,从基因敲除突变和超量表达两个方向,分析转基因毛状根在非生物胁迫下的表型,最终阐明植物 SnRK1 在非生物胁迫信号传导通路中的作用和功能。

1 材料和方法

1.1 材料

大豆栽培品种 *Williams 82* 由中国农业科学院韩天富研究员提供。发根农杆菌 K599、35S 强启动子诱导的 *GmSnRK1* 超量表达载体 pCambia2300-*SnRK1* 由东北农业大学植物生物工程实验室制备并保存。pTC217 载体由美国明尼苏达大学惠赠^[17]。

1.2 *GmSnRK1* 基因表达模式分析

选取 *Williams 82* 幼苗期根、茎、叶组织,分别提取各组织总 RNA,使用 GoldScript cDNA 试剂盒 (Invitrogen, 美国) 反转录成 cDNA。利用 Primer Premier5.0 设计基因特异性引物(表 1),通过 qRT-PCR 分析 *GmSnRK1* 的 4 个同源基因在大豆不同组

织中的表达量。将生长 21 d 长势一致的大豆幼苗分别置于 25 $\mu\text{mol/L}$ ABA 和 50 mmol/L NaHCO_3 条件下处理 0 h、1 h、3 h、6 h、12 h、24 h 后迅速切取幼嫩根尖部位,分别提取总 RNA,并反转录成 cDNA,利用 qRT-PCR 分析 *GmSnRK1.1* 和 *GmSnRK1.2* 在 ABA 处理和碱胁迫下的表达特性。PCR 扩增体系为: 5 μL 2 \times SYBR Mix (ABI Applied Biosystems, 美国), 1.5 μL cDNA 模板,上下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各 0.5 μL ,用灭菌水补足至 10 μL 。PCR 扩增条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 2 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 40 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min; 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。以 *GmGAPDH* 为内参基因,数据处理采用比较 CT 法($2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$)定量分析基因相对表达量。实验设置 3 次生物学重复和 3 次技术重复进行数据标准化处理^[24]。

1.3 基于大豆 *GmSnRK1.1* 和 *GmSnRK1.2* 基因靶点设计

为提高 CRISPR/Cas9 系统对豆科植物双靶基因的敲除效率,分别从 *GmSnRK1.1* 和 *GmSnRK1.2* 基因第 1 个外显子处、起始密码子下游 300 bp 以内,利用 CRISPR-P (<http://cbi.hzau.edu.cn/crispr/>)^[25]在线设计软件,获得正向链和反向链中紧邻 5'-NGG (PAM) 的所有潜在 gRNA 靶标序列(20 bp),通过对比大豆基因组数据库选择特异性高的序列作为 gRNA (表 2)。

表 1 qRT-PCR 引物序列

Table 1 The sequences of qRT-PCR primers used in this study

引物名称	引物序列(5'→3')
Q-GmSnRK1.1	F:CCAGTTCAATTGCCGTAGAAA
	R:GCTTCGAGGAATTAAGCTAAGC
Q-GmSnRK1.2	F:CAAGACACAGAACTCCCATTTG
	R:AAAGGTGAAAAGCAGCCTTAAG
Q-GmSnRK1.3	F:CAGTCATCTATCTCCCAATGCT
	R:CTCAGGTATGGTCATTCTCCTC
Q-GmSnRK1.4	F:TCACTCTTCTTGCCATCTATC
	R:CTCAGGTATGGTCATCCTCTTC
Q-GmGAPDH	F:GTCACAAGCCGTAGGAATCA
	R:GCGGAAGTTGGTGAGAGATAG

表 2 合成 gRNA 的引物序列

Table 2 The sequences of oligos for synthesizing gRNAs

引物名称	引物序列(5'→3')
GmSnRK1.1-gRNA1	F:gattgCAAGATTAAGAACATGGAAA R:aaaacTTTCCATGTTCTTAATCTTG
GmSnRK1.2-gRNA1	F:gattgACATGTGTTGACTGGCCATA R:aaaacTATGGCCAGTCAACACATGT

小写字母表示与载体骨架互补的粘性末端。

1.4 CRISPR/Cas9 植物表达载体的构建

以 pTC217 载体为模板, 利用高保真 DNA 聚合酶 PrimeSTAR[®] HS (TaKaRa, 北京) 特异扩增出两段分别含有 *BsmB* I 和 *Bsa* I 酶切位点的 gRNA 表达框, 用 T4 连接酶 (TaKaRa, 北京) 将经 PNK 磷酸化 (NEB, 美国) 的 gRNA 表达框依次与线性化的骨架载体 pTC217 连接, 获得含两个 gRNA 表达框的载体 pPBELp-CRISPR/Cas9。将酶切位点 *BsmB* I 突变的 *Bar* 基因经 PNK 磷酸化后, 与经限制性内切酶 *Pml* I (NEB, 美国) 线性化并去磷酸化 (CIP) (NEB, 美国) 的载体 pPBELp-CRISPR/cas9 酶连整合, 获得 pPBELp-CRISPR/Cas9-*Bar* 载体。将 5 μL gRNA 寡核苷酸链的正反向引物 (10 μmol/L) 与 5 μL 10×T4 ligase Buffer (TaKaRa, 北京) 混合, 用灭菌水补足至 50 μL, 沸水浴处理 5 min, 缓慢冷却至室温完成退火获得双链 gRNA (使用前稀释 20 倍); 将载体 pPBELp-CRISPR/Cas9-*Bar* 经 *BsmB* I 限制性内切酶 (NEB, 美国) 线性化后与 *GmSnRK1.1*-gRNA1 双链接头进行酶连整合, 获得重组载体后经 *Bsa* I 限制性内切酶 (NEB, 美国) 线性化后与 *GmSnRK1.2*-gRNA1 双链接头进行酶连整合, 最终获得可表达 Cas9 蛋白、双靶点 gRNA 和 *Bar* 筛选标记基因的 pPBELp-CRISPR/Cas9- I 植物表达载体 (图 1)。

连接产物均通过转化大肠杆菌 Trans1-T1 感受

态 (全式金, 北京) 细胞、37 °C 倒置培养过夜、挑取单菌落、菌落 PCR 鉴定阳性质粒后摇菌, 使用质粒提取试剂盒 (全式金, 北京) 抽提质粒, 测序 (金维智, 苏州) 鉴定正确的载体进行下一步操作。将植物表达载体利用冻融法转入发根农杆菌 K599 中, 经过 PCR 鉴定正确的单菌落用于大豆毛状根诱导。

1.5 大豆毛状根诱导

选择饱满的 Williams 82 大豆种子, 用氯气进行表面灭菌 (16~20 h), 置于萌发培养基 (B5 盐, 20 g/L 蔗糖, 8 g/L 琼脂, pH 5.8) 中, 在 25 °C (16 h 光照/8 h 黑暗) 萌发 5 d。将含有载体的发根农杆菌进行二次活化, 直至 OD_{600} 为 0.6~0.9。使用保留约 3 mm 下胚轴的子叶作为外植体, 剥掉种皮去除幼芽, 用解剖刀在子叶与下胚轴交接处轻划数痕, 放到二次活化后的菌液中浸泡 30 min, 期间轻轻摇晃几次。侵染后倒掉菌液, 将外植体切面朝下置于铺有灭菌滤纸的共培养培养基 (1/10 MS 盐, 30 g/L 蔗糖, 3.9 g/L MES, 7 g/L 琼脂, 150 mg/L DTT, 200 mmol/L 乙酰丁香酮, pH 5.4) 上, 23 °C 暗培养 4 d, 促进 T-DNA 从质粒转移到植物细胞中。将共培养后的子叶利用液体除菌培养基 (1/2 MS 盐, 30 g/L 蔗糖, 0.6 g/L MES, 100 mg/L 阿莫西林克拉维酸钾, 0.5 mg/L 草甘膦, pH 5.8) 冲洗 4~5 次, 用灭菌滤纸吸净残留液体, 并将子叶倾斜式插入到毛状根诱导培养基 (1/2 MS 盐, 30 g/L 蔗糖, 0.6 g/L MES, 100 mg/L 阿莫西林克拉维酸钾, 0.5 mg/L 草甘膦, 8 g/L 琼脂, pH 5.8) 上, 25 °C (16 h 光照/8 h 黑暗) 培养 7 d 左右即可见毛状根。

1.6 转基因毛状根 PCR 检测与突变体目的基因靶位点鉴定

利用植物基因组 DNA 提取试剂盒 (全式金, 北京) 提取大豆新鲜毛状根的基因组 DNA。利用 *Bar*



图 1 CRISPR/Cas9 介导的双基因敲除载体示意图

Fig. 1 Schematic diagram of the CRISPR/Cas9 vector mediating gene double-knockout

基因特异引物(表 3)进行转基因毛状根 PCR 检测,初步确定转基因根系;以转基因阳性根的基因组 DNA 为模板,利用靶位点特异引物(表 3)扩增目的基因靶位点区域序列,进行靶位点基因型鉴定,PCR 产物长度约为 500 bp。PCR 扩增体系:10 μL Φ PrimeSTAR Buffer (Mg^{2+} Plus), 4 μL dNTP Mixture (2.5 mmol/L), 上下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各 1 μL , 1 μL 模板 DNA, 0.5 μL PrimeSTAR HS DNA Polymerase (2.5 U/ μL)灭菌水补足至 50 μL 。PCR 扩增条件:98 $^{\circ}\text{C}$ 8 min; 98 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 30 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。扩增产物回收后连入 pEASY-Blunt3 (全式金, 北京)平末端载体,转化大肠杆菌 Trans1-T1 后随机挑取单克隆测序。利用序列比对分析软件 Sequencher 4.7 对 Sanger 测序结果进行分析。

1.7 表型观察

将诱导生长 10 d 左右、长势一致的毛状根继代培养在分别含有 25 $\mu\text{mol/L}$ ABA 和 50 mmol/L NaHCO_3 培养基上,在 25 $^{\circ}\text{C}$ 、16 h 光照/8 h 黑暗光周期下培养 15 d 后观察毛状根生长情况并记录根长与根鲜重。所有表型分析均设置 3 次重复,利用 SPSS20.0 检验显著性。

2 结果与分析

2.1 靶基因的确定

2.1.1 *GmSnRK1* 基因组织表达模式分析

通过 qRT-PCR 对大豆 *GmSnRK1* 的 4 个同源基因(*GmSnRK1.1*、*GmSnRK1.2*、*GmSnRK1.3*、*GmSnRK1.4*)进行组织表达模式分析(图 2)。结果表明,*GmSnRK1* 的 4 个同源基因在根、茎、叶中均有表达,但不同组织中的表达量存在明显差异。其中 *GmSnRK1.1* 和 *GmSnRK1.2* 在各组织中的表达量均明显高于其他同源基因,并且在根中 *GmSnRK1.1* 和 *GmSnRK1.2* 的相对表达量占总相对表达量的 45.15%和 36.95%为主导表达基因,而 *GmSnRK1.3* 和 *GmSnRK1.4* 的相对表达量很低。因此,本研究选择 *GmSnRK1.1* 和 *GmSnRK1.2* 作为靶基因。

表 3 PCR 引物序列

Table 3 The sequences of PCR primers used in this study

引物名称	引物序列(5'→3')
GmSnRK1.1	F:AACACTCGGCATTGGGTCCT R:GGATGACCGCAATTAAGGCA
GmSnRK1.2	F:TATTTCGCTGAACCCCTCTCT R:AGACTGAGCAGGAGGTAACAT
GmSnRK1.3	F:GAGGTGGTGCTGGACTGGACA R:ATGAACAAGACTGAGCACGAG
GmSnRK1.4	F:AAACTCTTGGCATTGGATCC R:TGTTGTCACTCCATCTCTTTC
Bar	F:CCTTATCTGGGAAGTACTCACAC R:CACCATCGTCAACCACTACAT

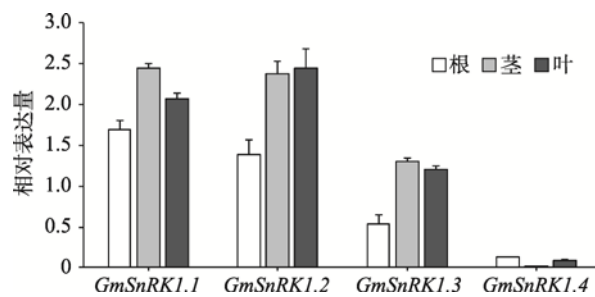


图 2 大豆 *GmSnRK1* 亚家族基因成员在根、茎、叶中的表达

Fig. 2 Spatial expression profiles of *GmSnRK1* members in roots, stems and leaves of the soybean

2.1.2 ABA 及碱胁迫处理下 *GmSnRK1.1* 和 *GmSnRK1.2* 的表达模式分析

为选择响应 ABA 及碱胁迫的靶基因,利用 qRT-PCR 分析 *GmSnRK1.1* 和 *GmSnRK1.2* 基因在 ABA 及碱胁迫处理下不同时间点转录水平上动态表达量的变化。结果表明,在 25 $\mu\text{mol/L}$ ABA 处理后,两个基因均受 ABA 诱导表达(图 3A),其中 *GmSnRK1.1* 和 *GmSnRK1.2* 均在 ABA 处理后 3 h 时表达量最高;在 50 mmol/L NaHCO_3 胁迫处理后,两个基因均受碱胁迫上调表达(图 3B),其中 *GmSnRK1.1* 在碱胁迫诱导后 6 h 时表达量最高,而 *GmSnRK1.2* 在 1 h 时表达量最高。

以上结果说明,*GmSnRK1.1* 和 *GmSnRK1.2* 在根

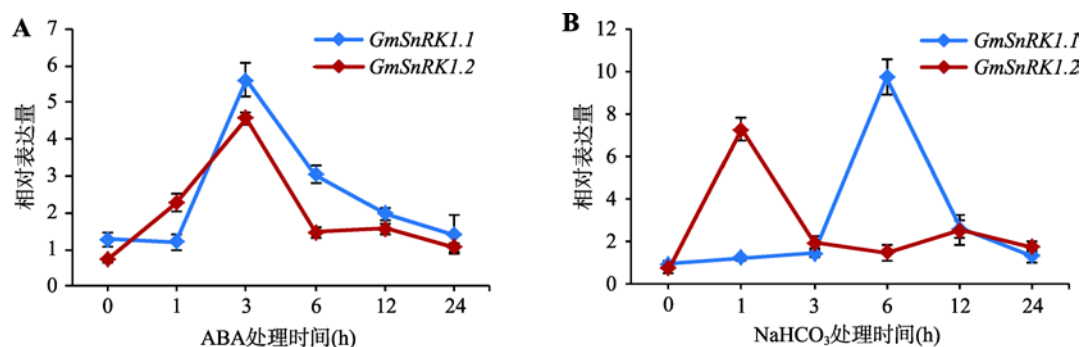


图 3 ABA 及碱胁迫处理下 *GmSnRK1.1* 和 *GmSnRK1.2* 基因表达特性

Fig. 3 Temporal expression profiles of *GmSnRK1.1* and *GmSnRK1.2* under ABA and alkaline treatments

A: ABA 处理下基因表达特性; B: NaHCO₃ 处理下基因表达特性。

中为两个主导表达基因,其表达受 ABA 和碱胁迫诱导,因此可作为基因敲除靶基因,并推测 *GmSnRK1.1* 和 *GmSnRK1.2* 可能参与大豆响应 ABA 和碱胁迫信号转导通路。

2.2 pPBELp-CRISPR/Cas9- I 载体获得及抗性毛状根分子生物学鉴定

为敲除双靶基因 *GmSnRK1.1* 和 *GmSnRK1.2*,在 *BsmB I* 和 *Bsa I* 位点上分别引入 2 个靶点 gRNA,测序结果表明与设计序列一致(图 4),表明包含双靶点 gRNA 的 pPBELp- CRISPR/Cas9- I 载体构建成功。

采用发根农杆菌介导的子叶节侵染法对大豆进行遗传转化。将不含 gRNA 的空载体 pPBELp-CRISPR/Cas9-Bar (对照组)、超量表达载体 pCambia2300-*SnRK1* 以及双基因敲除载体 pPBELp-CRISPR/Cas9- I 利用冻融法分别转入发根农杆菌 K599 中,鉴定出的阳性菌落用于侵染大豆子叶节。携带植物表达载体的发根农杆菌平均从每个大豆子叶节点处诱导 4 条抗性毛状根,通过 PCR 对抗性毛状根进行 *Bar* 基因检测。以含 *Bar* 基因的重组载体作为阳性对照,非转基因毛状根 DNA 作为阴性对照,

部分凝胶电泳结果如图 5 所示。阳性对照和大部分抗性毛状根均扩增出预计大小条带,而阴性对照无扩增条带,初步说明 T-DNA 已整合到大豆基因组中。经 PCR 检测,对照组、超量表达型以及基因敲除型抗性毛状根阳性率分别为 87.5% (70/80)、92.5% (74/80)、90% (72/80)。

2.3 CRISPR/Cas9 系统介导的大豆毛状根在 ABA 及碱胁迫下的表型分析

非生物胁迫会影响植株的生长发育,导致植物产生一系列的生理应答。为初步解析 *GmSnRK1.1* 和 *GmSnRK1.2* 对 ABA 及碱胁迫的响应,本研究将诱导生长 10 d 且长势一致的转基因毛状根转入分别含有 25 μmol/L ABA 和 50 mmol/L NaHCO₃ 的培养基中继续培养,15 d 后观察毛状根生长情况。结果表明,在正常培养基上,基因敲除毛状根与其他毛状根根系相比生长状态正常,无明显差异。在含 25 μmol/L ABA 培养基中,基因敲除毛状根长势良好受影响较轻、仍能维持正常生长,而对照组和超量表达 *GmSnRK1* 毛状根生长发育受到明显抑制(图 6A),基因敲除毛状根根长和根鲜重均显著高于其他毛状根

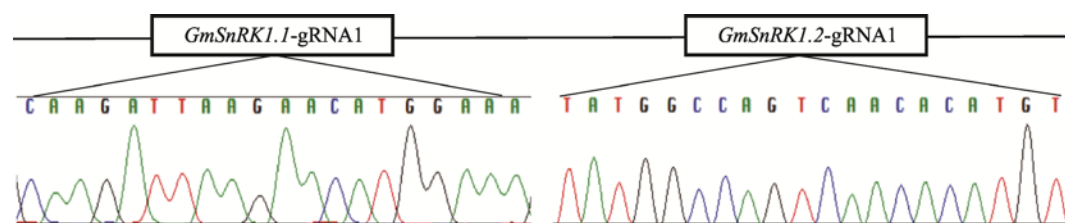


图 4 pPBELp-CRISPR/Cas9- I 载体靶点测序结果

Fig. 4 pPBELp-CRISPR/Cas9- I vector sequencing results at vector targets

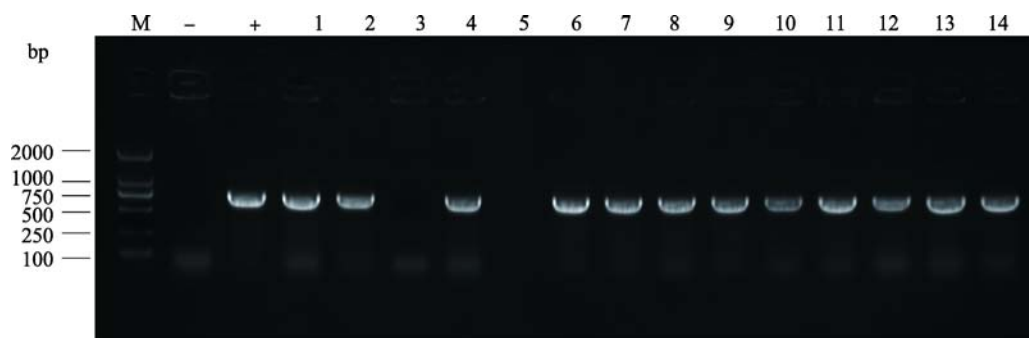


图 5 转基因抗性毛状根 PCR 检测

Fig. 5 The PCR identification of resistant hairy roots

M: DL2000; -: 阴性对照; +: 阳性对照; 1~14: 转基因毛状根 PCR 扩增产物。

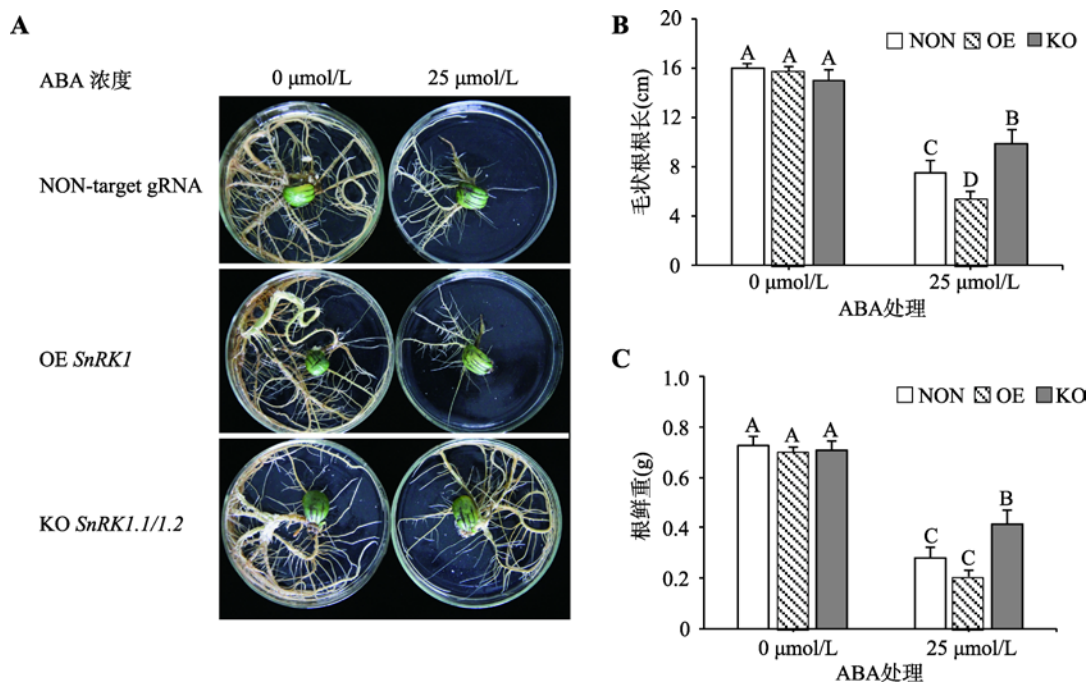


图 6 不同基因型毛状根在 ABA 处理下的表型分析

Fig. 6 Phenotypic analysis of different genotypic hairy roots under ABA treatment

A: 大豆毛状根在 ABA 处理下的表型; B: ABA 处理对大豆毛状根根长的影响; C: ABA 处理对大豆毛状根根鲜重的影响。柱型图上方的大写字母表示在 $P < 0.01$ 水平上差异显著; NON 表示无靶点对照组; OE 表示超量表达; KO 表示基因敲除。

根系 ($P < 0.01$) (图 6: B 和 C)。

在含 50 mmol/L NaHCO_3 培养基中, 超量表达 *GmSnRK1* 毛状根长势受影响最轻, 而对照组和基因敲除毛状根生长受到明显抑制(图 7A), 其根长和根鲜重显著低于超量表达毛状根 ($P < 0.01$) (图 7: B 和 C), 基因敲除毛状根表现出对碱胁迫高度敏感。以上结果说明, 基因敲除毛状根在非生物胁迫下的表型可能与 *GmSnRK1.1/1.2* 基因突变, 引发 *GmSnRK1* 功能丧失有关, 而 *GmSnRK1* 基因的超量表达可以增

强大豆耐碱能力; 同时, 利用本研究建立的 CRISPR/Cas9 系统可以有效地将 *GmSnRK1.1* 和 *GmSnRK1.2* 进行基因敲除, 所得的突变体材料初步解析了 SnRK1 激酶在 ABA 和碱胁迫中的功能。

2.4 *GmSnRK1.1* 及 *GmSnRK1.2* 靶位点基因型鉴定

本研究随机选取 35 条经 PCR 鉴定 *Bar* 基因阳性的抗性毛状根, 分别提取每条毛状根的基因组

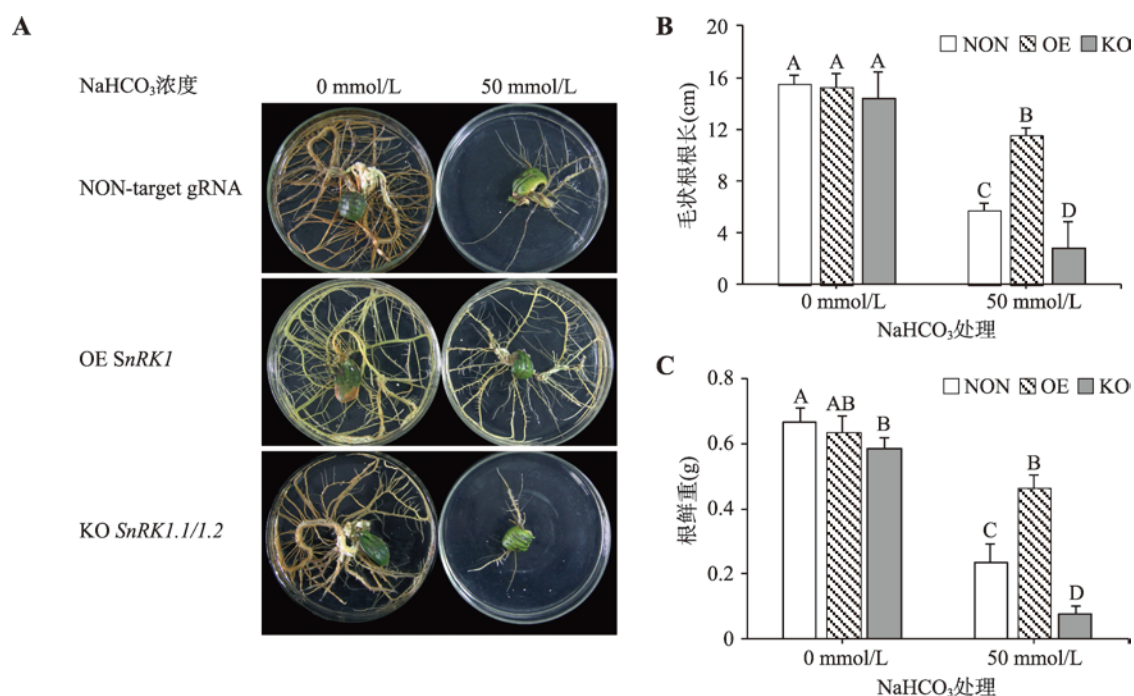


图 7 不同基因型毛状根在 NaHCO_3 胁迫下的表型分析

Fig. 7 Phenotypic analysis of different genotypic hairy roots under NaHCO_3 treatment

A: 大豆毛状根在 NaHCO_3 胁迫下的表型; B: NaHCO_3 胁迫对大豆毛状根根长的影响; C: NaHCO_3 胁迫对大豆毛状根根鲜重的影响。柱型图上方的大写字母表示在 $P < 0.01$ 水平上差异显著; NON 表示无靶点对照组; OE 表示过量表达; KO 表示基因敲除。

DNA, 对靶位点区域进行 PCR 克隆测序鉴定其基因型。测序结果表明, *GmSnRK1.1* 在 27 条毛状根中存在基因突变(图 8A), 其中 25 条为有效突变(缺失或增加碱基数不是 3 的倍数), 在 *GmSnRK1.1* 靶位点处发生了由碱基插入和碱基缺失引起的移码突变(图 9: A 和 B); *GmSnRK1.2* 在 24 条毛状根中存在基因突变(图 8B), 其中 21 条为有效突变, 在 *GmSnRK1.2* 靶位点处均发生由碱基缺失引起的移码突变(图 9C); 真正有效的双基因突变有 17 条, 均是由碱基缺失引起的移码突变(图 9: D 和 E)。统计结果见表 4。以上结果说明, 测序结果与靶基因对 ABA 及碱胁迫的响应结果相一致, 本研究成功获得了 *GmSnRK1.1* 及 *GmSnRK1.2* 双基因突变毛状根。

3 讨论

3.1 CRISPR/Cas9 技术对双靶基因的编辑效率

在研究植物基因功能时, 由于存在多个同源基因功能, 或者多个不同源基因参与平行的信号传导^[26],

往往需要得到多个基因同时突变的材料, 多靶点基因编辑系统则为基因功能研究提供更方便准确的选择。有研究表明, 利用两个以上的靶点进行基因组定点编辑时, 能够提高获得纯和突变体的概率^[27]。本研究构建了 CRISPR/Cas9 系统介导的双靶点基因敲除体系, 对大豆内源基因 *GmSnRK1.1* 和 *GmSnRK1.2* 进行定点敲除, 获得了双基因突变的大豆毛状根根系。通过 Sanger 测序对靶位点编辑效率进行分析, 结果表明不同靶点的突变率存在一定差异, *GmSnRK1.1* 靶位点突变率为 77.1%, *GmSnRK1.2* 靶位点突变率为 68.6%, 双靶点同时发生突变的效率为 48.6%。这可能是由于不同 gRNA 对靶序列的亲合能力不同, 导致 Cas9 核酸内切酶与特定位置 DNA 序列的结合效率不同, 从而影响突变率^[28,29]。另外, 在选择靶位点时, 靶序列的碱基分布、GC 含量等都对 gRNA 和靶标序列间的亲和力有影响^[30]。

3.2 CRISPR/Cas9 技术中的脱靶现象

随着基因编辑技术的快速发展, 已有研究发现 CRISPR/Cas9 系统存在一定的脱靶现象^[31]。张锋等^[32]

A	AGATCCTTAACCGCCA	CAAGATTAAAAACATGGAAA	TGGAAGAAAAAGGTCTGAATCAT	WT	
	AGATCCTTAACCGCCA	CAAGATTAAAAACATGGAA	-TGGAAGAAAAAGGTCTGAATCAT	-1	
	AGATCCTTAACCGCCA	CAAGATTAAAAA	--TGGAAA	TGGAAGAAAAAGGTCTGAATCAT	-2
	AGATCCTTAACCGCCA	CAAGATTAAAAACATGGA	--TGGAAGAAAAAGGTCTGAATCAT	-2	
	AGATCCTTAACCGCCA	CAAGATTAAAAACATGG	--ATGGAAGAAAAAGGTCTGAATCAT	-2	
	AGATCCTTAACCGCCA	CAAGATTAAAAA	--GGAAA	TGGAAGAAAAAGGTCTGAATCAT	-3
	AGATCCTTAACCGCCA	CAAGATTAAAAACAT	---ATGGAAGAAAAAGGTCTGAATCAT	-4	
	AGATCCTTAACCGCCA	CAAGATTAAAAACA	---ATTGGAAAGAAAAAGGTCTGAATCAT	-4	
	AGATCCTTAACCGCCA	CAAGATTAAAAACAT	---TGGAAGAAAAAGGTCTGAATCAT	-5	
	AGATCCTTAACCGCCA	CAAGATTAAAAACATGG	---GAAGAAAAAGGTCTGAATCAT	-5	
	AGATCCTTAACCGCCA	CAAGATT	---CATGGAAA	TGGAAGAAAAAGGTCTGAATCAT	-5
	AGATCCTTAACCGCCA	CAAGATTAA	---GAAA	TGGAAGAAAAAGGTCTGAATCAT	-6
	AGATCCTTAACCGCCA	CAAGATTAAAAA	---ATGGAAGAAAAAGGTCTGAATCAT	-7	
	AGATCCTTAACCGCCA	CAAGATTAAAAAC	---TGGAAGAAAAAGGTCTGAATCAT	-7	
	AGATCCTTAACCGCCA	CAAGATTAAAAACA	---GGAAGAAAAAGGTCTGAATCAT	-7	
	AGATCCTTAACCGCCA	CAAGATTAAAAAC	---TGGAAGAAAAAGGTCTGAATCAT	-7	
	AGATCCTTAACCGCCA	CAAGATTAAAAAC	---GGAAGAAAAAGGTCTGAATCAT	-8	
	AGATCCTTAACCGCCA	CAAGATTAAAAACA	---GAAGAAAAAGGTCTGAATCAT	-8	
	AGATCCTTAACCGCCA	CAAGATTAAA	---TGGAAGAAAAAGGTCTGAATCAT	-10	
	AGATCCTTAACCGCCA	CAAGATT	---AT	TGGAAGAAAAAGGTCTGAATCAT	-11
	AGATCCTTAACCGCCA	CAAGATTAA	---GGAAGAAAAAGGTCTGAATCAT	-11	
	AGATCCTTAACCGCCCAA	---	GAAA	TGGAAGAAAAAGGTCTGAATCAT	-13
	AGATCCTTAACCGCCACAAGAT	---	ATGGAAGAAAAAGGTCTGAATCAT	-13	
	AGATCCTTAACCGCCACAAGATT	---	GGAAGAAAAAGGTCTGAATCAT	-14	
	AGATCCTTAACCGCCCAA	---	ATGGAAGAAAAAGGTCTGAATCAT	-16	
	AGATCCTTAACCGCCACAAGATT	---	GTCTGAATCAT	-25	
	AGATCCTTAACCGCCACAAGcATTAAAAACATGGAAA	TGGAAGAAAAAGGTCTGAATCAT	+1		
	AGATCCTTAACCGCCACAAGgATTAAAAACATGGAAA	TGGAAGAAAAAGGTCTGAATCAT	+1		
	B	AGGTGAAAAATTGCAGAACATGTGTTGACTGGCCATA	AGGT	TGCGATCAAGATCCTTAA	WT
		AGGTGAAAAATTGCAGAACATGTGTTGACTGGCCAT	-AGGT	TGCGATCAAGATCCTTAA	-1
		AGGTGAAAAATTGCAGAACATGTGTTGACTGGCCA	-AGGT	TGCGATCAAGATCCTTAA	-1
		AGGTGAAAAATTGCAGAACATGTGTTGACTGGCCA	-AGGT	TGCGATCAAGATCCTTAA	-2
AGGTGAAAAATTGCAGAACATGTGTTGACTGGCCAT		-GGT	TGCGATCAAGATCCTTAA	-2	
AGGTGAAAAATTGCAGAACATGTGTTGACTGGCCA		-AGGT	TGCGATCAAGATCCTTAA	-2	
AGGTGAAAAATTGCAGAACATGTGTTGACTGGCC		-AGGT	TGCGATCAAGATCCTTAA	-2	
AGGTGAAAAATTGCAGAACATGTGTTGACTGGC		-AGGT	TGCGATCAAGATCCTTAA	-3	
AGGTGAAAAATTGCAGAACATGTGTTGACTG		-CCATA	AGGT	TGCGATCAAGATCCTTAA	-3
AGGTGAAAAATTGCAGAACATGTGTTGACTG		-TA	AGGT	TGCGATCAAGATCCTTAA	-4
AGGTGAAAAATTGCAGAACATGTGTTGACTGGC		-AGGT	TGCGATCAAGATCCTTAA	-4	
AGGTGAAAAATTGCAGAACATGTGTTGACTGG		-AGGT	TGCGATCAAGATCCTTAA	-5	
AGGTGAAAAATTGCAGAACATGTGTTGACTG		-ATA	AGGT	TGCGATCAAGATCCTTAA	-5
AGGTGAAAAATTGCAGAACATGTGTTGACTG		-ATA	AGGT	TGCGATCAAGATCCTTAA	-6
AGGTGAAAAATTGCAGAACATGTG		-GCCATA	AGGT	TGCGATCAAGATCCTTAA	-7
AGGTGAAAAATTGCAGAACATGTGTTGACTG		-GGT	TGCGATCAAGATCCTTAA	-7	
AGGTGAAAAATTGCAGAACATGTGTTGACTG		-AGGT	TGCGATCAAGATCCTTAA	-8	
AGGTGAAAAATTGCAGAACATGTGTTG		-AGGT	TGCGATCAAGATCCTTAA	-10	
AGGTGAAAAATTGCAGAACATGTGTTGACTG		-GTT	TGCGATCAAGATCCTTAA	-10	
AGGTGAAAAATTGCAGAACATGTGTT		-AGGT	TGCGATCAAGATCCTTAA	-11	
AGGTGAAAAATTGCAGAACATGTGT		-GGT	TGCGATCAAGATCCTTAA	-13	
AGGTGAAAAATTGCAGAACATGTGTTG		-T	TGCGATCAAGATCCTTAA	-13	
AGGTGAAAAATTGCAGAACATGTG		-GGT	TGCGATCAAGATCCTTAA	-14	
AGGTGAAAAATT		-CTGGCCATA	AGGT	TGCGATCAAGATCCTTAA	-16
AGGTGAAAAATTGCA		-ATA	AGGT	TGCGATCAAGATCCTTAA	-19

图 8 CRISPR/Cas9 介导的大豆 *GmSnRK1.1* 和 *GmSnRK1.2* 双突变基因型多态性

Fig. 8 Polymorphic mutant genotypes of soybean *GmSnRK1.1* and *GmSnRK1.2* genes mediated by the CRISPR/Cas9 system

A: *GmSnRK1.1* 突变基因型多态性; B: *GmSnRK1.2* 突变基因型多态性。红色虚线表示缺失碱基; 红色字体表示增加碱基; 下划线表示 gRNA 靶位点; 加粗表示 PAM 序列。

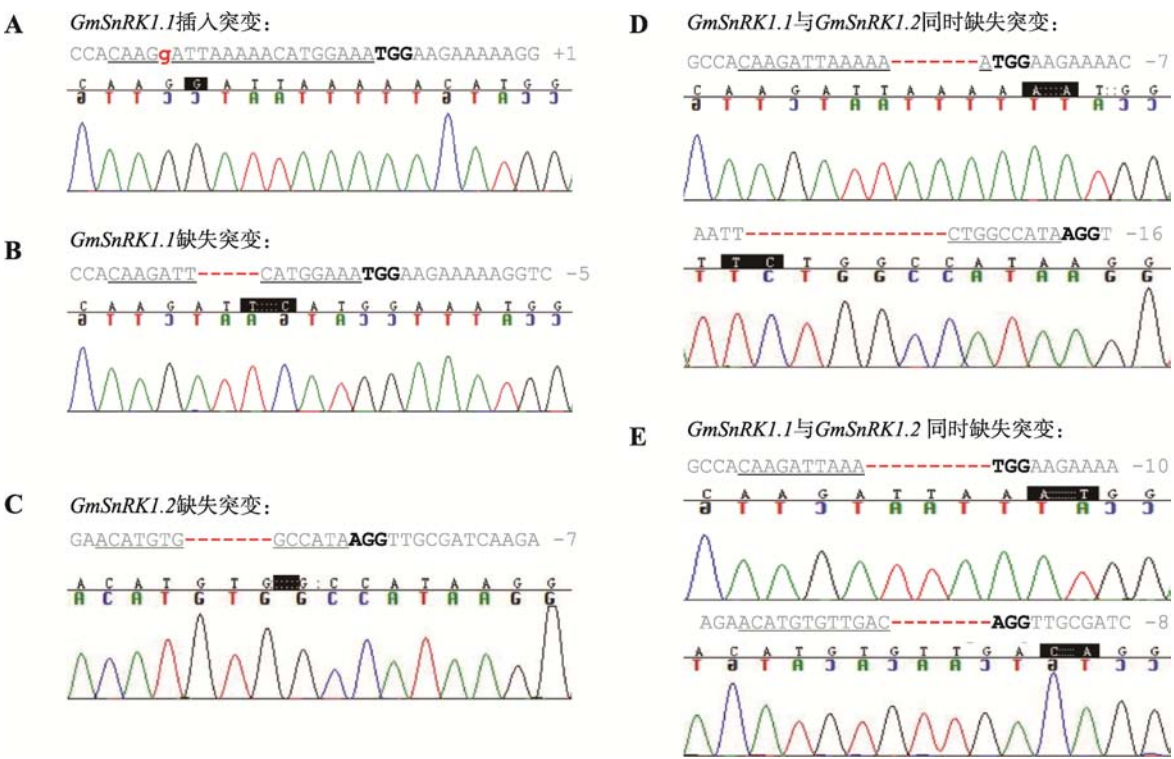


图 9 靶位点突变类型及其测序色谱分析
Fig. 9 Analyses of sequencing chromatogram data of the target mutant sites
A, B: *GmSnRK1.1* 单基因突变; C: *GmSnRK1.2* 单基因突变; D, E: 单条毛状根中双基因突变。红色虚线表示缺失碱基; 红色字体表示增加碱基; 下划线表示 gRNA 靶位点; 加粗表示 PAM 序列; 黑色框内表示突变位点。

表 4 转基因毛状根突变率
Table 4 Determination of mutation rates in transgenic hairy roots

靶基因	转基因毛状根数	基因突变毛状根数	突变率(%)	双基因突变毛状根数	双基因突变率(%)
<i>GmSnRK1.1</i>	35	27	77.1	17	48.6
<i>GmSnRK1.2</i>	35	24	68.6		

突变率(%) = (突变毛状根数/转基因毛状根数) × 100%。

通过改变化脓性链球菌 Cas9 蛋白氨基酸序列中的 3 个氨基酸, 显著降低了脱靶效应。Lee 等^[33]将 *Sth* Cas9 替换成 *Spy* Cas9 蛋白用来识别较短的 PAM 序列, 从而提高打靶效率。目前, 已有多款软件针对 CRISPR/Cas9 技术的脱靶效应来辅助设计 gRNA^[34]。本研究通过 CRISPR-GE (<http://skl.scau.edu.cn/>)^[35]在线预测潜在脱靶位点, 结果表明可能发生脱靶事件的位点位于靶基因的同源基因 *GmSnRK1.3* 和 *GmSnRK1.4* 上, 利用特异性引物(表 3)对预测位点进行 PCR 扩增, 经 Sanger 测序分析, 结果显示没有发生基因突变, 说明本研究使用的 gRNA 具有一定特

异性。CRISPR/Cas9 技术中导致脱靶事件发生的因素有很多, 如何降低脱靶风险还需要进行更加深入的研究探讨。

3.3 大豆 *GmSnRK1* 基因功能

SnRK1 是一类广泛参与胁迫抗性等途径的激酶。Ding 等^[5]利用水稻 *SnRK1a* 和 *SnRK1b* 作为诱饵对水稻 cDNA 文库进行酵母二元杂交筛选, 获得 SnRK1 复合体中的 β 、 $\beta\gamma$ 亚单元、WRKY、AP2/ EREBP、B-box 锌指蛋白等转录因子、植物衰老相关蛋白等, 说明 SnRK1 广泛参与基因的转录调控。水稻中

SnRK1 直接参与植物的水化合物代谢并能提高植物对非生物胁迫的抗性^[36]。本研究利用 CRISPR/Cas9 双基因敲除系统获得了较为精准的功能基因敲除突变体,从突变体和超量表达角度初步探究 *Gm-SnRK1.1* 和 *GmSnRK1.2* 对 ABA 及碱胁迫的响应。研究发现,在含 25 $\mu\text{mol/L}$ ABA 的培养基中基因敲除型毛状根对 ABA 敏感性很低,可维持正常生长,而超表达型毛状根生长受到明显抑制,说明 SnRK1 可能直接参与了 ABA 信号传导途径;在含 50 mmol/L NaHCO_3 的培养基中基因敲除型毛状根长势受到明显抑制,而超表达型毛状根能够提高植物对碱胁迫的抗性,这与酵母 SNF1 能够提高酵母耐碱性相似^[7],说明该类蛋白激酶在功能上的保守性。本研究初步确定 *GmSnRK1.1* 和 *GmSnRK1.2* 在 ABA 信号转导和大豆耐碱机制中发挥着重要作用,而具体分子机制还需进一步研究。

参考文献(References):

- [1] Coello P, Hey SJ, Halford NG. The sucrose non-fermenting-1-related (SnRK) family of protein kinases: potential for manipulation to improve stress tolerance and increase yield. *J Exp Bot*, 2010, 62(3): 883–893. [DOI]
- [2] Halford NG, Hey SJ. Snf1-related protein kinases (SnRKs) act within an intricate network that links metabolic and stress signaling in plants. *Biochem J*, 2009, 419(2): 247–59. [DOI]
- [3] Yang L, Ji W, Gao P, Li Y, Cai H, Bai X, Chen Q, Zhu YM. *GsAPK*, an ABA-activated and calcium-independent SnRK2-type kinase from *G. soja*, mediates the regulation of plant tolerance to salinity and ABA stress. *PLoS One*, 2012, 7(3): e33838. [DOI]
- [4] Qiu QS, Guo Y, Dietrich MA, Schumaker KS, Zhu JK. Regulation of SOS1, a plasma membrane Na^+/H^+ exchanger in *Arabidopsis thaliana*, by SOS2 and SOS3. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(12): 8436–8441. [DOI]
- [5] Ding X, Richter T, Chen M, Fujii H, Seo YS, Xie M, Zheng X, Kanrar S, Stevenson RA, Dardick C, Li Y, Jiang H, Zhang Y, Yu F, Bartley LE, Chern M, Bart R, Chen X, Zhu L, Farmerie WG, Gribskov M, Zhu JK, Fromm ME, Ronald PC, Song WY. A rice kinase-protein interaction map. *Plant Physiol*, 2008, 149(3): 1478–1492. [DOI]
- [6] Song Y, Zhang H, You HG, Liu YM, Chen C, Feng X, Yu XY, Wu SY, Wang LB, Zhong SH, Li Q, Zhu YM, Ding XD. Identification of novel interactors and potential phosphorylation substrates of GsSnRK1 from wild soybean (*Glycine soja*). *Plant Cell Envir*, 2018, doi: 10.1111/pce.13217. [DOI]
- [7] Hong SP, Carlson M. Regulation of Snf1 protein kinase in response to environmental stress. *J Biol Chem*, 2007, 282(23): 16838–16845. [DOI]
- [8] Liu XJ, Liu X, An XH, Han PL, You CX, Hao YJ. An apple protein kinase MdSnRK1.1 interacts with MdCAIP1 to regulate ABA sensitivity. *Plant Cell Physiol*, 2017, 58(10): 1631–1641. [DOI]
- [9] Schlueter JA, Lin JY, Schlueter SD, Vasylenko-Sanders IF, Deshpande S, Yi J, O'Brien M, Roe BA, Nelson RT, Scheffler BE, Jackson SA, Shoemaker RC. Gene duplication and paleopolyploidy in soybean and the implications for whole genome sequencing. *BMC Genomics*, 2007, 8: 330. [DOI]
- [10] Nakano M, Yamada T, Masuda Y, Sato Y, Kobayashi H, Ueda H, Morita R, Nishimura M, Kitamura K, Kusaba M. A green-cotyledon/stay-green mutant exemplifies the ancient whole-genome duplications in soybean. *Plant Cell Physiol*, 2014, 55(10): 1763–1771. [DOI]
- [11] Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, Hsu PD, Wu X, Jiang W, Marraffini LA, Zhang F. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 2013, 339(6121): 819–823. [DOI]
- [12] Zhou HB, Liu B, Weeks DP, Spalding MH, Yang B. Large chromosomal deletions and heritable small genetic changes induced by CRISPR/Cas9 in rice. *Nucleic Acids Res*, 2014, 42(17): 10903–10914. [DOI]
- [13] Shan Q, Wang Y, Li J, Zhang Y, Chen K, Liang Z, Zhang K, Liu J, Jeff Xi J, Qiu J, Gao C. Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(8): 686–688. [DOI]
- [14] Xu R, Li H, Qin R, Wang L, Li L, Wei P, Yang J. Gene targeting using the *Agrobacterium tumefaciens*-mediated CRISPR-Cas system in rice. *Rice*, 2014, 7(1): 5. [DOI]
- [15] Jiang W, Zhou H, Bi H, 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]
- [16] Wang JF, Zhang CM, Liu W, Luo WL, Wang H, Chen ZQ, Guo T. Construction of *tgw6* mutants in rice based on CRISPR/Cas9 technology. *Acta Agron Sin*, 2016, 42(8): 1160–1167.

王加峰, 郑才敏, 刘维, 罗文龙, 王慧, 陈志强, 郭涛. 基于 CRISPR/Cas9 技术的水稻千粒重基因 *tgw6* 突变体的创建. 作物学报, 2016, 42(8): 1160–1167. [DOI]

- [17] Čermák T, Baltes NJ, Čegan R, Zhang Y, Voytas DF. High-frequency, precise modification of the tomato genome. *Genome Biol*, 2015, 16(1): 232. [DOI]
- [18] Upadhyay SK, Kumar J, Alok A, Tuli R. RNA-Guided genome editing for target gene mutations in wheat. *G3 (Bethesda, Md.)*, 2013, 3(12): 2233–2238. [DOI]
- [19] Liang Z, Zhang K, Chen K, Gao C. Targeted mutagenesis in *Zea mays* using TALENs and the CRISPR/Cas system. *J Genet Genomics*, 2014, 41(2): 63–68. [DOI]
- [20] Jacobs TB, LaFayette PR, Schmitz RJ, Parrott WA. Targeted genome modifications in soybean with CRISPR/Cas9. *BMC Biotechnol*, 2015, 15: 16. [DOI]
- [21] Cai Y, Chen L, Liu X, Sun S, Wu C, Jiang B, Han T, Hou W. CRISPR/Cas9-mediated genome editing in soybean hairy roots. *PLoS One*, 2015, 10(8): e0136064. [DOI]
- [22] Du H, Zeng X, Zhao M, Cui X, Wang Q, Yang H, Cheng H, Yu D. Efficient targeted mutagenesis in soybean by TALENs and CRISPR/Cas9. *J Biotechnol*, 2015, 217: 90–97. [DOI]
- [23] Cai YP, Chen L, Liu XJ, Chen G, Sun S, Wu CX, Jiang BJ, Han TF, Hou WS. CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis of *GmFT2a* delays flowering time in soya bean. *Plant Biotechnol J*, 2018, 16(1): 176–185. [DOI]
- [24] Nour-Eldin HH, Hansen BG, Nørholm MH, Jensen JK, Halkier BA. Advancing uracil-excision based cloning towards an ideal technique for cloning PCR fragments. *Nucleic Acids Res*, 2006, 34(18): e122. [DOI]
- [25] Lei Y, Lu L, Liu HY, Li S, Xing F, Chen LL. CRISPR-P: A web tool for synthetic single-guide RNA design of CRISPR-system in plants. *Mol Plant*, 2014, 7(9): 1494–1496. [DOI]
- [26] 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]
- [27] 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]
- [28] Doudna JA, Charpentier E. Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, 2014, 346(6213): 1258096. [DOI]
- [29] 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]
- [30] 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]
- [31] 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]
- [32] Slaymaker IM, Gao L, Zetsche B, Scott DA, Yan WX, Zhang F. Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity. *Science*, 2016, 351(6268): 84–88. [DOI]
- [33] Lee CM, Cradick TJ, Bao G. The Neisseria meningitidis CRISPR-Cas9 system enables specific genome editing in mammalian cells. *Mol Ther*, 2016, 24(3): 645–654. [DOI]
- [34] Sheng XS, Zhang Y, Zhang LS, Li GL, Zhao CZ, Ni P, Zhao SH. SgRNA design for the CRISPR/Cas9 system and evaluation of its off-target effects. *Hereditas (Beijing)*, 2015, 37(11): 1125–1136.
谢胜松, 张懿, 张利生, 李广磊, 赵长志, 倪攀, 赵书红. CRISPR/Cas9 系统中 sgRNA 设计与脱靶效应评估. *遗传*, 2015, 37(11): 1125–1136. [DOI]
- [35] Liu W, Xie X, Ma X, Li J, Chen J, Liu YG. DSDecode: A web-based tool for decoding of sequencing chromatograms for genotyping of targeted mutations. *Mol Plant*, 2015, 8(9): 1431–1433. [DOI]
- [36] Lin CR, Lee KW, Chen CY, Hong YF, Chen JL, Lu CA, Chen KT, Ho TH, Yu SM. SnRK1A-interacting negative regulators modulate the nutrient starvation signaling sensor SnRK1 in source-sink communication in cereal seedlings under abiotic stress. *Plant Cell*, 2014, 26(2): 808–827. [DOI]

(责任编辑: 高彩霞)