

Cas9 蛋白变体 VQR 高效识别水稻 NGAC 前间区序列邻近基序

辛高伟^{1,2}, 胡熙璟², 王克剑², 王兴春¹

1. 山西农业大学生命科技学院, 太谷 030801

2. 中国农业科学院, 中国水稻研究所, 水稻生物学国家重点实验室, 杭州 310006

摘要: 成簇的规律间隔短回文重复序列及 CRISPR 相关蛋白(clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated 9, CRISPR/Cas9)系统是近年来发展起来并被广泛应用的第三代基因组编辑工具。但是, 该系统的酿脓链球菌 Cas9(*Streptococcus pyogenes*, SpCas9)仅能识别 NGG 前间区序列邻近基序(proto-spacer adjacent motif, PAM), 极大地限制了基因组编辑的范围。SpCas9 变体 VQR(D1135V/R1335Q/T1337R)在水稻中可识别 NGAA、NGAG 和 NGAT PAM, 但尚不清楚是否能识别 NGAC PAM。本研究利用改进后的 CRISPR/VQR 系统对水稻中 3 个相对低效的 VQR 靶位点 NAL1-Q1、NAL1-Q2 和 LPA1-Q 进行了编辑, 结果表明改进后的 CRISPR/VQR 系统可以高效编辑这 3 个靶位点, 编辑效率分别为 9.75%、43.90%和 29.26%。为了明确改进后的 CRISPR/VQR 系统对 NGAC PAM 的识别情况, 本研究选择水稻叶片宽度调控基因 *NARROW LEAF 1 (NAL1)* 中的 NAL-C 位点和蜡质合成基因 *GLOSSY1 (GL1)* 中的 GL1-C 位点进行基因编辑, 并获得 57 株转基因水稻。靶位点 PCR 扩增及测序结果表明, NAL1-C 和 GL1-C 靶标位点突变的植株分别为 27 株和 44 株, 突变率分别为 47.36%和 77.19%; 其中 NAL1-C/GL1-C 双突变植株为 26 株, 双突变率为 45.61%。进一步分析表明, CRISPR/VQR 系统造成的突变有 4 种类型, 分别为杂合突变、双等位突变、嵌合体突变和纯合突变, 其中以杂合突变和双等位突变为主。这些结果表明, 改进的 CRISPR/VQR 系统可以高效编辑水稻 NGAC PAM 位点, 并产生丰富的突变类型。本研究为水稻及其他植物相关基因 NGAC PAM 位点的编辑提供了理论依据。

关键词: 基因编辑; CRISPR/Cas9; VQR; NGAC 前间区序列邻近基序; 水稻

收稿日期: 2018-05-10; 修回日期: 2018-06-20

基金项目: 中国农业科学院科技创新工程和国家自然科学基金项目(编号: 31600289)资助[Supported by the Innovation Project of Chinese Academy of Agricultural Sciences and the National Natural Science Foundation of China (No. 31600289)]

作者简介: 辛高伟, 硕士研究生, 专业方向: 生物化学与分子生物学。E-mail: 592950985@qq.com

通讯作者: 王兴春, 博士, 教授, 研究方向: 植物重要功能基因的发掘和应用。E-mail: wxingchun@163.com

王克剑, 博士, 研究员, 研究方向: 新基因发掘与遗传效应分析。E-mail: wangkejian@caas.cn

DOI: 10.16288/j.yczs.18-126

网络出版时间: 2018/9/26 7:23:19

URI: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20180926.0723.004.html>

Cas9 protein variant VQR recognizes NGAC protospacer adjacent motif in rice

Gaowei Xin^{1,2}, Xixun Hu², Kejian Wang², Xingchun Wang¹

1. College of Life Sciences, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, China

2. State Key Laboratory of Rice Biology, China National Rice Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310006, China

Abstract: Clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated protein 9 (CRISPR/Cas9) system is the third-generation genome editing tools that was developed and widely used in recent years. However, *Streptococcus pyogenes* Cas9 (SpCas9) in this system could only recognize NGG PAM (protospacer adjacent motif), which largely restricts the range of genome editing. The VQR (D1135V/R1335Q/T1337R) variant of SpCas9 could recognize NGAA, NGAG and NGAT PAMs in rice. However, whether VQR variant could recognize NGAC PAM remains unclear. In this study, three low editing efficiency sites of the VQR variant, NAL1-Q1, NAL1-Q2 and LPA1-Q, were selected for genome editing using the improved CRISPR/VQR system. The improved CRISPR/VQR system effectively edited these target sites, and the gene editing efficiency was 9.75%, 43.90% and 29.26% respectively. To ensure the recognition of NGAC PAM by the improved CRISPR/VQR system, two NGAC PAM containing sites (NAL-C and GL1-C) in the *NARROW LEAF 1* (*NALI*) for leaf length and *GLOSSY1* (*GLI*) genes for wax biosynthesis were selected for genome editing in rice in this study, and 57 transgenic plants were obtained. The PCR amplification and sequencing results showed that 27 plants (47.36%) had mutation in the NAL1-C site, 44 plants (77.19%) had mutation in the GL1 gene, and 26 plants (45.61%) had mutation in the NAL-C and GL1-C sites. Further analysis revealed that there were four types of mutations caused by the CRISPR/VQR system, respectively for the hybrid mutation, biallelic mutation, chimeric mutation and homozygous mutations. Among them, heterozygous mutation and biallelic mutation were dominant changes. These results indicated that the improved CRISPR/VQR system could efficiently edit the NGAC PAM sites of the rice and produce abundant mutant types. This study provides a theoretical basis for NGAC PAM editing in rice and other related plants.

Keywords: gene editing; CRISPR/Cas9; VQR; NGAC PAM; rice

基因组编辑技术是一种在基因组水平上对目标基因序列进行碱基删除、插入或替换的操作技术。该技术的原理是利用人工构建序列特异性核酸酶(sequence-specific nucleases, SSNs)在特定的基因组位置切断 DNA, 切断的 DNA 在细胞内 DNA 修复系统修复过程中产生突变, 从而实现定点改造基因组的目的^[1]。目前, 常用的 SSNs 主要包括锌指核酸酶(zinc-finger nucleases, ZFNs)技术^[2]、类转录激活因子效应物核酸酶(Transcription activator-like effector nucleases, TALENs)技术^[3]和成簇的规律间隔的短回

文重复序列/相关蛋白(clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated 9, CRISPR/Cas9)技术^[4]。与 ZFN 和 TALEN 技术相比, CRISPR/Cas9 技术具有载体构建简单、基因编辑效率高、成本低等特点^[5,6], 目前被广泛应用于基因功能研究和动植物精准分子育种等领域^[7~11]。

2013 年, 在细菌天然免疫系统中发现的 CRISPR/Cas9 系统作为第三代基因组编辑技术迅猛发展起来^[12,13]。该基因编辑系统通过单链向导 RNA (single guide RNA, sgRNA)与基因组上的靶位点进行碱基

互补配对完成识别过程,进而与核酸酶 Cas9 形成的 sgRNA-Cas9 复合体在特定靶位点造成 DNA 双链断裂,并借助于生物体内的同源或非同源重组修复途径完成基因组编辑。其中,靶位点的选择需符合不同系统的 PAM 要求^[14]。目前,广泛使用的酿脓链球菌(*Streptococcus pyogenes*) SpCas9 在植物中所识别的 PAM 主要是 NGG^[4],极大地限制了 SpCas9 的基因组编辑范围。为了扩展 CRISPR/Cas9 在基因组中的编辑范围,人们从不同微生物中鉴定了识别不同 PAM 的同源蛋白,比如嗜热性链球菌(*Streptococcus thermophiles*) CRISPR3 Cas9 识别 NGGNG PAM^[15],嗜热性链球菌(*Streptococcus thermophiles*) CRISPR1 Cas9 识别 NNAGAAW PAM^[16],脑膜炎奈瑟菌(*Neisseria meningitidis*) NmeCas9 识别 NNNNGATT PAM^[17]。此外,通过改造 SpCas9 的方法也可以改变其识别的靶位点。SpCas9 变体 VQR (D1135V/R1335Q/T1337R) 和 VRER (D1135V/G1218R/R1335E/T1337R) 分别可以识别 NGA PAM 和 NGCG PAM^[18]; 而变体 xCas9 可以识别 NG、GAA 和 GAT 3 种 PAM^[19]。类似地,本课题组对 VQR 和 VRER 变体在水稻中的研究表明, VQR 和 VRER 在水稻中也分别识别 NGA PAM 和 NGCG PAM^[20]。生物信息学分析表明,水稻基因组中 VQR、VRER 和 SpCas9 可编辑位点数目分别为 45176043、7972298 和 38923028^[20]。在水稻中 VQR 的基因编辑范围大于 VRER 和 SpCas9,其中 NGAG、NGAC、NGAT 和 NGAA 4 种类型 PAM 靶位点的个数分别为 9784476、9784158、12807613 和 12799796, NGAC 所占比例为 22%^[20]。然而, VQR 变体能够高效识别 NGAA、NGAT 和 NGAG 3 种 PAM, NGAC 是否能够被编辑仍然未知^[20,21]。

虽然 VQR 变体大大扩展了 CRISPR/Cas9 的应用范围,但其编辑效率低于原 CRISPR/Cas9 系统,这极大地限制了该系统在水稻中的推广应用^[20]。在哺乳动物细胞中,将 sgRNA 中连续 4 个胸腺嘧啶(T) 中的一个碱基 T 突变为胞嘧啶(C),同时将 sgRNA 双链特异性延长 5 bp 可以提高 CRISPR/Cas9 系统的基因编辑效率^[22]。最近,本课题组通过优化 sgRNA 的结构以及使用水稻内源性强启动子来驱动 VQR 变体的表达,成功地将 CRISPR/Cas9-VQR 系统的编辑效率提高到了原有系统的 3~7 倍^[21]。

为了验证改进后的 VQR 变体是否可以高效编辑 NGAC 靶位点,本文在水稻中使用改进后的 CRISPR/VQR 系统,即改造后的 sgRNA 和 *Actin1* 启动子表达 VQR 来编辑 PAM 为 NGAC 的两个靶位点。在获得的 57 株转基因水稻中,两个靶位点附近分别有 27 株和 44 株发生移码突变。进一步分析表明,改进后的 VQR 系统编辑效率显著高于未改进的 VQR 系统。这表明改进后的 VQR 系统可以高效识别 NGAC PAM,为今后利用改进后的 VQR 变体编辑 NGAC 靶位点提供了理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

水稻品种为日本晴(*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*),所有材料均种植于浙江省杭州市富阳区中国水稻研究所实验基地,正季常规水肥管理。

载体分别为 SK-gRNA、pC1300-ACT1-Cas9 和 pC1300-ACT1-VQR,载体详细信息参见文献^[21]。

1.2 基因编辑载体的构建

在正向靶序列 5'端加上 GGCA,合成引物 g++; 在反向互补靶序列的 5'端加上 AAAC,合成引物 g—。g++和 g—等量混合,100 5 min,室温复性成双链 DNA,并与 *Aar* I (Thermo Scientific,美国)线性化的 SK-gRNA 载体进行连接。靶标位点序列及其所对应的引物 g++和 g—序列详见表 1。

基因编辑的构建采用同尾酶连接策略:首先将 5 个靶位点 NAL1-Q1、NAL1-Q2、LPA1-Q、GL1-C 和 NAL1-C 序列分别组装至中间载体 SK-gRNA,所得载体分别命名为 SK-gRNA-NAL1-Q1、SK-gRNA-NAL1-Q2、SK-gRNA-LPA1-Q、SK-gRNA-GL1-C 和 SK-gRNA-NAL1-C。然后将 SK-gRNA-NAL1-Q1 (*Kpn* I/*Sal* I)、SK-gRNA-NAL1-Q2 (*Xho* I/*Bgl* II) 和 SK-gRNA-LPA1-Q (*Bam*H I/*Nhe* I) 同时组装至 pC1300-ACT-VQR (*Kpn* I/*Xba* I); 将 SK-gRNA-GL1C (*Kpn* I/*Sal* I) 和 SK-gRNA-NAL1C (*Xho* I/*Nhe* I) 同时组装至 pC1300-ACT-VQR (*Kpn* I/*Xba* I); 将 SK-gRNA-GL1C (*Kpn* I/*Sal* I) 和 SK-gRNA-NAL1C

表 1 靶位点及构建基因编辑载体的引物

Table 1 Target sites and primers for construction of the gene editing vectors

靶位点	靶位点序列(5'→3')	引物名称	引物序列(5'→3')
NAL1-Q1	GCGTTTATCTTGGAGCTGTTGAA	NAL1-Q1-g++	GGCAGCGTTTATCTTGGAGCTGT
		NAL1-Q1-g—	AAACACAGCTCCAAGATAAACGC
NAL1-Q2	GCTATTGAGCGGACACTGCAGAT	NAL1-Q2-g++	GGCAGCTATTGAGCGGACACTGC
		NAL1-Q2-g—	AAACGCAGTGTCCGCTCAATAGC
LPA1-Q	CAGCGGGAGCAGAACCTGCAGAT	LPA1-Q-g++	GGCACAGCGGGAGCAGAACCTGC
		LPA1-Q-g—	AAACGCAGGTTCTGCTCCCGCTG
NAL1-C	ACCCCATATAATTCCAATTGGAC	NAL1-C-g++	GGCAACCCCATATAATTCCAATT
		NAL1-C-g—	AAACAATTGGAATTATATGGGGT
GL1-C	CCGCCATGCGCCTCCCAAGGAC	GL1-C-g++	GGCACCGCCATGCGCCTCCCAAA
		GL1-C-g—	AAACTTGGGGAGGCGCATGGCGG

下划线序列为 PAM 位点。

(*Xho* I /*Nhe* I)同时组装至 pC1300-ACT-Cas9 (*Kpn* I /*Xba* I)。

1.3 农杆菌介导的水稻遗传转化

水稻遗传转化采用 Hiei 等^[23]农杆菌介导法进行,所用的农杆菌菌株为 EHA105。

1.4 靶位点片段的扩增和测序

采用十六烷基三甲基溴化铵(hexadecyl trimethyl ammonium bromide, CTAB)方法提取水稻愈伤组织及植株基因组 DNA。利用 KOD FX Polymerase (TOYOBO, 日本)扩增靶标位点片段,引物序列详见表 2。PCR 产物通过 Sanger 测序,峰图使用 DSD (degenerate sequence decoding)方法进行解读^[24]。

2 结果与分析

2.1 改进的 CRISPR/VQR 系统可以高效编辑 *NAL1* 和 *LPA1* 基因

前期研究发现,在 *NAL1* 和 *LPA1*(*LOOSE PLANT ARCHITECTURE 1*)基因外显子上存在 3 个相对低效的 VQR 靶位点 NAL1-Q1、NAL1-Q2 和 LPA1-Q,其 PAM 分别为 NGAA、NGAT、NGAG^[20]。在未改

表 2 靶位点片段扩增所用引物

Table 2 The primers for target fragment amplification

引物名称	引物序列(5'→3')
NAL1-Q1	F:TGTCCAGATTTGCTGTGACC
	R:GGGCGGCATATATGTTTGG
NAL1-Q2	F:TCATATTAATGCCGATTGC
	R:CAAGTTCAGACGGTCGAG
LPA1-Q	F:TCCTTGCAAGTTATGGCACTG
	R:TTGAGGTGGGCCTTGTAATC
NAL1-C	F:AGCTCTGGTCACACAAGTGG
	R:CCCAACAGCTGAGGTAACG
GL1-C	F:GTCGCTGTTGCTGAGACGTA
	R:CCAGCGAGTACTGCACAAGA

进的 VQR 系统下,这 3 个位点的基因编辑效率分别为 0%、13.30%和 2.10%^[20]。为了进一步研究改进后 VQR 系统的编辑效率,本研究构建了同时靶向这 3 个位点的基因编辑载体(图 1A),并利用农杆菌介导法将其转入水稻,获得 41 株转基因水稻。

经 Sanger 测序检测,NAL1-Q1、NAL1-Q2 和 LPA1-Q 靶位点的基因突变率分别为 9.75%、43.90%和 29.26% (图 1B),表明改进后的 VQR 系统可以大幅提高这 3 个位点的编辑效率。值得一提的是,在原系统无法编辑的 NAL1-Q1 位点上,改进后的 VQR 系统也造成了一定水平的突变(图 1C)。

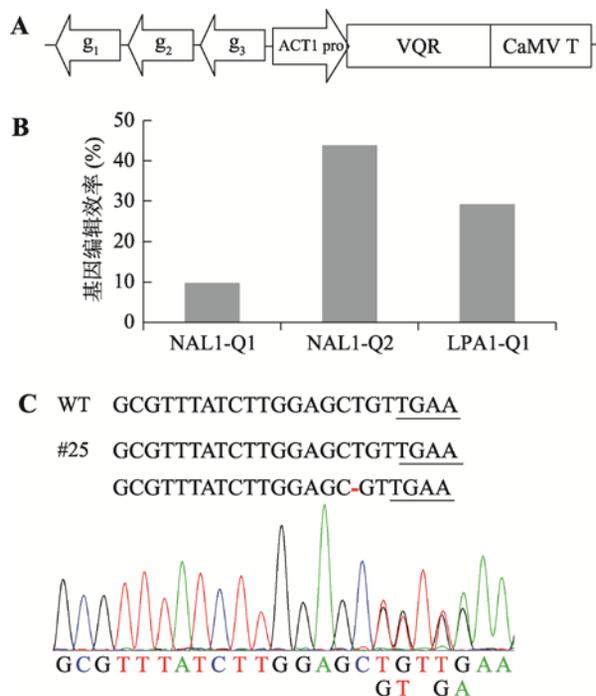


图 1 NAL1-Q1、NAL1-Q2 和 LPA1-Q 位点基因编辑
Fig. 1 Gene editing of NAL1-Q1, NAL1-Q2 and LPA1-Q
 A: NAL1-Q1、NAL1-Q2 和 LPA1-Q 靶位点基因编辑载体示意图。
 g_1 、 g_2 和 g_3 分别表示 gRNA-NAL1-Q1、gRNA-NAL1-Q2 和
 gRNA-LPA1-Q, ACT1 pro 表示 *Actin1* 启动子, CaMV T 表示
 CaMV 终止子。B: NAL1-Q1、NAL1-Q2 和 LPA1-Q 位点基因编
 辑效率。C: #25 转基因植株靶位点 NAL1-Q1 的测序结果。红色
 短线表示碱基缺失, 下划线的序列为 PAM。

2.2 改进的 CRISPR/VQR 系统高效识别 NGAC PAM 序列

在水稻中, *NAL1* 通过影响细胞分裂调控叶片宽度, 该基因的突变导致叶片变窄^[25]; *GLI* 是蜡质合成中的一个基因, *GLI* 突变破坏叶表皮蜡质形成叶片高度亲水表型^[26]。为了进一步研究改进后的 CRISPR/VQR 系统能否对 NGAC PAM 靶位点进行识别和编辑, 本研究选择水稻中 *GLI* 和 *NAL1* 基因的靶位点 GL1-C 和 NAL1-C 进行基因编辑(图 2A)。利用同尾酶连接策略, 构建了 GL1-C 和 NAL1-C 共敲除载体(图 2B), 然后通过农杆菌转染法将其转入水稻中, 最终获得 57 株转基因水稻。靶位点 PCR 扩增及测序结果显示, NAL1-C 和 GL1-C 靶位点的基因突变植株分别为 27 株和 44 株, 突变率分别为 47.36% 和 77.19%; NAL1-C 和 GL1-C 靶位点的

双基因突变植株为 26 株, 突变率为 45.61% (图 2C)。此外, 也检测出基因功能缺失型突变体(双等位突变及纯合突变)。为了验证改进 VQR 系统的编辑效果, 本研究进一步分析了基因编辑水稻的表型。如图 2D 所示, 野生型水稻叶片较宽, 疏水性较强, 水滴呈球形; 而双基因纯合突变叶片较窄, 亲水性较强, 水滴扩散开。这些结果表明在改进后的系统中, VQR 可以高效地识别 NGAC PAM 序列。

2.3 突变类型分析

本研究进一步对 CRISPR/VQR 系统造成的突变进行分类, 发现共有 4 种突变类型, 分别为杂合突变、双等位突变、嵌合体突变和纯合突变。其中, 以杂合突变和双等位突变为主, 其次是嵌合体突变和纯合突变(表 3)。双等位突变多数情况意味着基因功能丧失, 而转基因 T_1 代则能产生一半的纯合突变体, 在研究中具备重要的价值。

2.4 SpCas9 低效识别 NGAC PAM

前人研究表明 SpCas9 可以切割 NGA PAM 类型的靶位点^[18], 但切割效率尚不清楚。为此, 本研究检测了 SpCas9 对 NAL1-C 和 GL1-C 靶位点的切割能力。结果表明, NAL1-C 和 GL1-C 靶位点在 SpCas9 切割下, 转基因愈伤组织的基因突变率分别为 10.42% 和 12.50% (表 4)。与转基因植株测序结果相比, 通常愈伤组织中敲除效率要略高一些。然而, SpCas9 在 NAL1-C 和 GL1-C 位点的表现却远逊于 VQR 在转基因苗中的结果(图 2C), 这表明 VQR 对 NGAC PAM 的编辑能力要高于 SpCas9。

3 讨论

目前, 广泛应用的 CRISPR/Cas9 基因编辑系统仅能识别 NGG PAM, 极大地限制了其靶位点的选择范围。SpCas9 的变体 VQR 能够高效识别 NGAA、NGAT 和 NGAG3 种 PAM, 对于 CRISPR/Cas9 系统是一个强大补充。研究表明, 在水稻中利用改进后的 CRISPR/VQR 也可以高效编辑 NGAC PAM, 并产生丰富的突变类型, 从而为水稻 NGAC PAM 位点的编辑提供了理论依据。

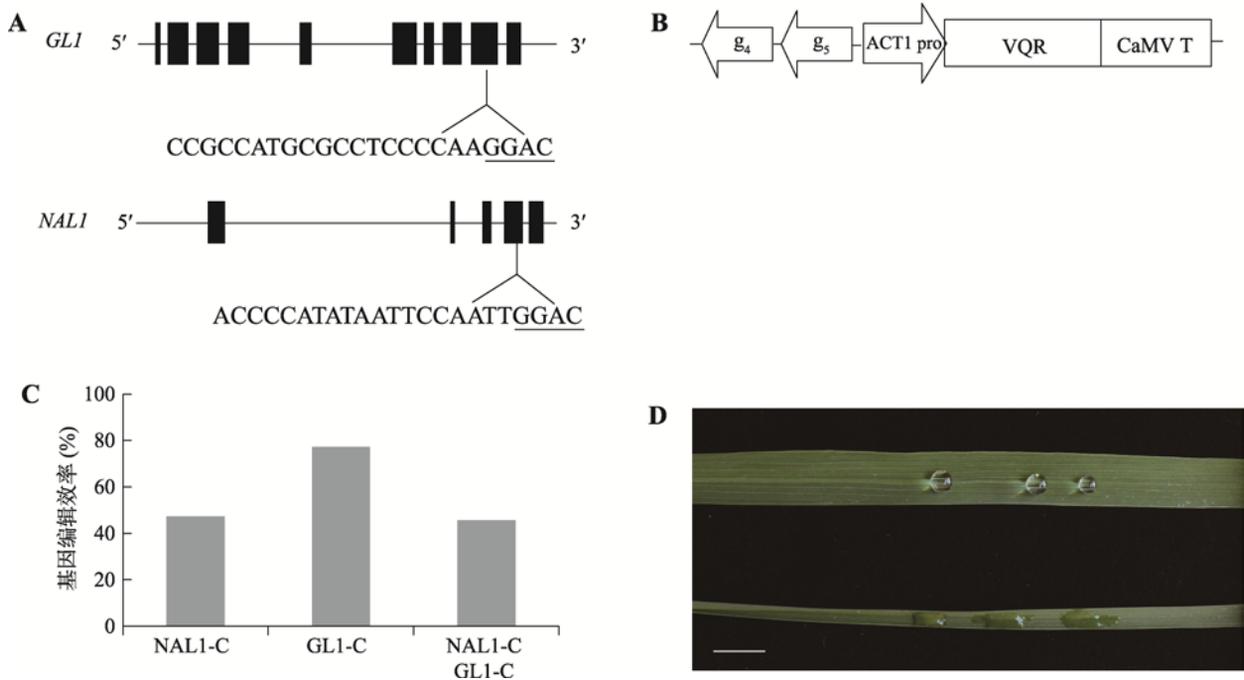


图 2 GL1-C 和 NAL1-C 位点基因编辑

Fig. 2 Gene editing of GL1-C and NAL1-C

A: *GL1* 和 *NAL1* 基因编辑靶位点示意图。下划线序列表示 PAM。B: *GL1-C* 和 *NAL1-C* 靶位点基因编辑载体示意图。 g_4 和 g_5 分别表示 gRNA-*GL1-C* 和 gRNA-*NAL1-C*, *ACT1 pro* 表示 *Actin1* 启动子, *CaMV T* 表示 *CaMV* 终止子。C: *NAL1-C* 靶位点和 *GL1-C* 靶位点及 *NAL1-C/GL1-C* 双靶位点的基因编辑效率。D: *GL1* 和 *NAL1* 基因共敲除水稻叶片。上面为野生型, 下面为基因编辑的突变体, 标尺为 1 cm。

表 3 靶位点突变类型

Table 3 Mutation type of target sites

靶位点	突变率(%)	杂合突变		双等位突变		嵌合体		纯合突变	
		植株数	所占比例(%)	植株数	所占比例(%)	植株数	所占比例(%)	植株数	所占比例(%)
NAL1-Q1	9.75	3	75.00	0	0	1	25.00	0	0
NAL1-Q2	43.90	15	83.33	3	16.66	0	0	0	0
LPA1-Q	29.26	6	50.00	5	41.66	1	8.33	0	0
NAL1-C	47.36	19	70.37	6	22.22	1	3.70	1	3.70
GL1-C	77.19	19	43.18	12	27.27	11	25.00	2	4.54

在人类细胞中, 基于增强型绿色荧光蛋白 (enhanced green fluorescent protein, EGFP) 报告基因破坏实验的结果表明, VQR 对包含 NGAN PAM 位点的切割效率为: NGAG>NGAT=NGAA>NGAC, 这表明 VQR 对包含 NGAC PAM 的位点有切割能力^[18]。在水稻中, 由于 NGAC 的位点尚未被验证, 22% 的 NGA 位点是否能够被 VQR 编辑仍然不清楚^[20,21]。在原始的 CRISPR/VQR 系统中, VQR 无法切割 NGAC PAM 位点^[20]。在改进的 CRISPR/VQR

系统中, sgRNA 特异性延长 5 bp, 增强了 sgRNA 的稳定性; 将多聚胸腺嘧啶 (poly T) 的第 4 个碱基 T 突变为 C, 消除了转录终止信号, 从而使 sgRNA 转录水平得到提高; 强内源启动子表达 VQR 使其蛋白表达水平得到提高, 因此基因编辑效率得到显著提高^[22]。本研究利用改进后的 CRISPR/VQR 系统也高效地编辑了水稻中 NAL1-Q1、NAL1-Q2 和 LPA1-Q 等 3 个位点 (图 1), 而原始 CRISPR/VQR 系统对这 3 个位点的编辑效率极低甚至无法编辑。在此基础上, 本研

表 4 SpCas9 对 NAL1-C 和 GL1-C 靶位点的编辑效率
Table 4 Editing ability of wild Cas9 to NAL1-C, GL1-C target sites

靶点名称	检测愈伤组织总数	突变愈伤组织个数	突变率(%)
NAL1-C	48	5	10.42
GL1-C	48	6	12.50

究进一步验证了改进后的 CRISPR/VQR 系统对 NGAC PAM 识别和编辑的情况。结果表明,改进后的 CRISPR/VQR 系统可以高效识别并编辑 *NAL1* 和 *GLI* 基因的 NGAC PAM (图 2),从而为水稻中含有 NGAC PAM 位点基因的编辑提供了理论依据。此外,我们推测原始的 CRISPR/VQR 系统也应该能够识别 NGAC PAM 位点,但由于编辑效率极低,在转基因株系较少的情况可能无法获得基因编辑植株。对于相同靶位点 NAL1-C 和 GL1-C, SpCas9 的基因编辑效率远低于 VQR (图 2, 表 4),因此 VQR 在实际应用中仍具有不可被 SpCas9 替代的优势。从突变类型来看, VQR 主要产生杂合突变和双等位突变(表 3)。其中双等位突变与纯合体一样,同为基因功能缺失型突变,并且其自交一代理论上可以产生出约 1/2 的纯合体,在育种或基因研究方面均具备巨大应用价值。

CRISPR/Cas9 基因编辑系统的脱靶问题会引起基因组非靶向位点的突变,导致研究结果的不确定性。本课题组前期的研究表明,在利用改进后的 CRISPR/VQR 编辑 NGAG 和 NGAT PAM 位点时也存在一定的脱靶效率^[21]。由于脱靶效率主要与错配碱基距离 PAM 位点的远近有关,因此在利用改进后的 CRISPR/VQR 系统编辑 NGAC 位点时也存在类似的脱靶问题。

综上所述,本文利用改进的 CRISPR/VQR 基因编辑系统成功地编辑了水稻 NGAC PAM 序列,并产生丰富的突变型,为水稻及其他植物含有 NGAC PAM 基因的编辑提供了借鉴。

参考文献(References):

- [1] Shan QW, Gao CX. Research progress of genome editing and derivative technologies in plants. *Hereditas (Beijing)*, 2015, 37(10): 953–973.
- [2] Kim YG, Cha J, Chandrasegaran S. Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(3): 1156–1160. [DOI]
- [3] Boch J, Scholze H, Schornack S, Landgraf A, Hahn S, Kay S, Lahaye T, Nickstadt A, Bonas U. Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type effectors. *Science*, 2009, 326(5959): 1509–1512. [DOI]
- [4] Hsu PD, Lander ES, Zhang F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell*, 2014, 157(6): 1262–1278. [DOI]
- [5] Wan HF, Feng CJ, Teng F, Yang SH, Hu BY, Niu YY, Xiang AP, Fang WZ, Ji WZ, Li W, Zhao XY, Zhou Q. One-step generation of *p53* gene biallelic mutant *Cynomolgus* monkey via the CRISPR/Cas system. *Cell Res*, 2015, 25(2): 258–261. [DOI]
- [6] Yang H, Wang H, Shivalila CS, Cheng AW, Shi L, Jaenisch R. One-step generation of mice carrying reporter and conditional alleles by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell*, 2013, 154(6): 1370–1379. [DOI]
- [7] Voytas DF. Plant genome engineering with sequence-specific nucleases. *Annu Rev Plant Biol*, 2013, 64(64): 327–350. [DOI]
- [8] 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]
- [9] Shen L, Hua YF, Fu YP, Li J, Liu Q, Jiao XZ, Xin GW, Wang JJ, Wang XC, Yan CJ, Wang KJ. Rapid generation of genetic diversity by multiplex CRISPR/Cas9 genome editing in rice. *Sci China Life Sci*, 2017, 60(5): 506–515. [DOI]
- [10] Li S, Yang YY, Qiu Y, Chen YH, Xu LW, Ding QR. Applications of genome editing tools in precision medicine research. *Hereditas (Beijing)*, 2017, 39(3): 177–188. 李爽, 杨圆圆, 邱艳, 陈彦好, 徐璐薇, 丁秋蓉. 基因组编辑技术在精准医学中的应用. *遗传*, 2017, 39(3): 177–188. [DOI]
- [11] Zhou XC, Xing YZ. The application of genome editing in identification of plant gene function and crop breeding. *Hereditas (Beijing)*, 2016, 38(3): 227–242. 周想春, 邢永忠. 基因组编辑技术在植物基因功能鉴定及作物育种中的应用. *遗传*, 2016, 38(3): 227–242. [DOI]

- [12] 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]
- [13] 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: 1229–1232. [DOI]
- [14] Jiang F, Doudna JA. CRISPR-Cas9 structures and mechanisms. *Annu Rev Biophys*, 2017, 46: 505–529. [DOI]
- [15] Horvath P, Romero DA, Coûtémonvoisin AC, Richards M, Deveau H, Moineau S, Boyaval P, Fremaux C, Barrangou R. Diversity, activity, and evolution of CRISPR loci in *Streptococcus thermophilus*. *J Bacteriol*, 2008, 190(4): 1401–1412. [DOI]
- [16] Deveau H, Barrangou R, Garneau JE, Labonté J, Fremaux C, Boyaval P, Romero DA, Horvath P, Moineau S. Phage response to CRISPR-encoded resistance in *Streptococcus thermophilus*. *J Bacteriol*, 2008, 190(4): 1390–1400. [DOI]
- [17] Zhang Y, Heidrich N, Ampattu BJ, Gunderson C, Seifert HS, Schoen C, Vogel J, Sontheimer E. Processing-independent CRISPR RNAs limit natural transformation in *Neisseria meningitidis*. *Mol Cell*, 2013, 50(4): 488–503. [DOI]
- [18] Kleinstiver BP, Prew MS, Tsai SQ, Ved T, Nguyen NT, Zheng Z, Gonzales APW, Li ZY, Peterson RT, Joanna JR. Engineered CRISPR-Cas9 nucleases with altered PAM specificities. *Nature*, 2015, 523(7561): 481–485. [DOI]
- [19] Hu JH, Miller SM, Geurts MH, Tang W, Chen L, Sun N, Zeina CM, Gao X, Rees HA, Lin Z, Liu DR. Evolved Cas9 variants with broad PAM compatibility and high DNA specificity. *Nature*, 2018, 556(7699): 57–63. [DOI]
- [20] Hu X, Wang C, Fu YP, Liu Q, Jiao XZ, Wang KJ. Expanding the range of CRISPR/Cas9 genome editing in rice. *Mol Plant*, 2016, 9(6): 943–945. [DOI]
- [21] Hu XX, Meng XB, Liu Q, Li JY, Wang KJ. Increasing the efficiency of CRISPR-Cas9-VQR precise genome editing in rice. *Plant Biotechnol J*, 2018, 16(1): 292–297. [DOI]
- [22] Dang Y, Jia GX, Choi J, Ma HM, Anaya E, Ye CT, Shankar P, Wu HQ. Optimizing sgRNA structure to improve CRISPR-Cas9 knockout efficiency. *Genome Biol*, 2015, 16: 280. [DOI]
- [23] Hiei Y, Ohta S, Komari T, Kumashiro T. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *Plant J*, 1994, 6(2): 271–282. [DOI]
- [24] 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]
- [25] Jiang D, Fang JJ, Lou LM, Zhao JF, Yuan SJ, Yin L, Sun W, Peng LX, Guo BT, Li XY. Characterization of a null allelic mutant of the rice *NALI* gene reveals its role in regulating cell division. *PLoS One*, 2015, 10(2): e0118169. [DOI]
- [26] Qin BX, Tang D, Huang J, Li M, Wu XR, Lu LL, Wang KJ, Yu HX, Chen JM, Gu MH, Cheng ZK. Rice *OsGLI-1* is involved in leaf cuticular wax and cuticle membrane. *Mol Plant*, 4(6): 985–995. [DOI]

(责任编辑: 高彩霞)