



ISSN 0513-353X

CN11-1924/S

CODEN YUHPAA

ACTA HORTICULTURAE SINICA

园艺学报

第46卷

第2期

Vol. 46

No. 2

2019

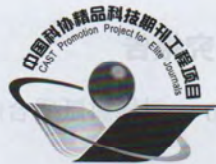
中国园艺学会 中国农业科学院蔬菜花卉研究所 主办

Sponsored by the Chinese Society for Horticultural Science and
Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences



园艺学报

YUANYI XUEBAO



2019年2月 第46卷 第2期

目次

研究论文

- 205 葡萄叶片衰老过程中不同光质对其光合和叶绿体超微结构的影响 王海波 王 帅 王孝娣 史祥宾 王志强 刘凤之
- 215 甜橙 CsKT1 的钾转运功能鉴定及其互作蛋白分析 吴娟娟 苑 平 李卫东 李先信 孔佑涵
- 227 土霉素处理对 Valencia 夏橙中淀粉及相关基因表达的影响 姚廷山 周 彦 Diann Achor 周常勇
- 237 福建地方梨资源果实性状多样性分析及其数量分类研究 曾少敏 陈小明 黄新忠
- 252 番木瓜 ERF 家族与果实成熟相关成员的分析 陈永萍 高 峰 申艳红 赵湾湾 陈桂信 王 平
- 265 笃斯越橘响应低温和短光周期的蛋白质组分析 乌凤章 王贺新
- 280 基于蛋白质组学研究光质对番茄果实挥发性物质的影响机理 董 飞 王传增 孙秀东 张 庆 董玉惠 王立霞 刘世琦
- 295 茄子紫外光受体蛋白基因 *SmUVR8* 的克隆及功能分析 张君豪 何永军 周 露 刘 杨 陈火英
- 307 大白菜抗 TuMV 显性位点 F_2 的 QTL-seq 分析 李国亮 张淑江 钱 伟 李 菲 章时蕃 张 慧 方智远 孙日飞
- 317 一个矮牵牛花器官发育突变体 *aps* 的表型鉴定及遗传分析 周 琴 鲁 瑞 张书婷 包满珠 刘国锋

研究报告

- | | | |
|-----|--|---|
| 330 | 柑橘胼胝质合成酶基因家族的表达分析 | 彭 蕊 范海芳 雷天刚 何永睿 陈善春 姚利晓 |
| 337 | CRISPR/Cas9 介导柑橘 <i>CsLOB1</i> 基因启动子的多位点编辑 | 邹修平 范 迪 彭爱红 何永睿 许兰珍 雷天刚 姚利晓 李 强 罗克明 陈善春 |
| 345 | 结球甘蓝自交系 YL-1 的高效遗传转化体系的建立及应用 | 崔慧琳 李志远 方智远 杨丽梅 庄 木 吕红奎 刘玉梅 宋江华 张扬勇 |
| 356 | 双孢蘑菇担子与担孢子形态发育显微观测 | 赵建霞 冯伟林 金群力 沈颖越 宋婷婷 蔡为明 |
| 365 | 牡丹休眠相关基因 <i>PsGRASs</i> 筛选、克隆和表达特性分析 | 吴 红 刘春英 付祥梅 盖树鹏 张玉喜 |
| 375 | 玫瑰不同品种花瓣挥发性成分分析 | 姚晨阳 葛 红 吴 华 贾瑞冬 赵 鑫 吕英民 杨树华 |
| 385 | 茶树 <i>CsAIL</i> 的克隆及在不同休眠阶段的表达分析 | 张书富 刘 莹 孙冷雪 王 璐 曾建明 杨亚军 王新超 韦朝领 郝心愿 |

新品种

- | | | |
|-----|---------------|---------------------------------|
| 397 | 黄瓜新品种‘粤丰’ | 梁雪均 陈敏敏 王 瑞 黄河勋 吴廷全 江 彪 刘文豪 彭庆务 |
| 399 | 桂花新品种‘藏花阁’ | 陈和建 任 娟 梅 花 王微琼 杨大连 |
| 401 | 紫薇新品种‘紫金’ | 陈少明 王 鹏 王淑安 李林芳 高露璐 李 王 |
| 403 | 圆齿野鸦椿新品种‘红宝石’ | 张虎平 陈泽明 梁文贤 邹小兴 胡亚林 陈成金 |

CRISPR/Cas9 介导柑橘 *CsLOB1* 基因启动子的多位点编辑

邹修平¹, 范迪², 彭爱红¹, 何永睿¹, 许兰珍¹, 雷天刚¹, 姚利晓¹,
李强¹, 罗克明^{2,*}, 陈善春^{1,*}

(¹西南大学柑桔研究所, 重庆 400712; ²西南大学生命科学学院, 重庆 400715)

摘要: 为了获得 *CsLOB1* 启动子较大片段删除的突变体, 利用 CRISPR/Cas9 技术对 *CsLOB1* 启动子进行多位点编辑。通过在 *CsLOB1* 启动子的 EBE_{PthA4} 区域及其上、下游设计不同的靶标位点, 构建了 2 个植物表达载体 pCas9CsLOB1:2sites 和 pCas9CsLOB1:3sites, 分别对 *CsLOB1* 启动子同时进行 2 个位点和 3 个位点的编辑。测序结果表明 pCas9CsLOB1:2sites 和 pCas9CsLOB1:3sites 的基因编辑效率分别为 64.7% 和 80.0%, 突变体植株在 2 个 sgRNA 之间发生了 DNA 片段的删除。进一步的分析发现, 不同的 sgRNA 具有不同的突变效率, 其差异是由于不同的 sgRNA 对 *CsLOB1* 识别和结合能力的差异造成的。本结果表明对 *CsLOB1* 启动子进行多位点编辑可以获得删除较大 DNA 片段的突变体。

关键词: 柑橘; CRISPR/Cas9 系统; *CsLOB1*; 多位点; 基因编辑

中图分类号: S 666

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2019) 02-0337-08

CRISPR/Cas9-mediated Editing of Multiple Sites in the Citrus *CsLOB1* Promoter

ZOU Xiuping¹, FAN Di², PENG Aihong¹, HE Yongrui¹, XU Lanzhen¹, LEI Tiangang¹, YAO Lixiao¹,
LI Qiang¹, LUO Keming^{2,*}, and CHEN Shanchun^{1,*}

(¹Citrus Research Institute, Southwest University, Chongqing 400712, China; ²School of Life Sciences, Southwest University, Chongqing 400715, China)

Abstract: To obtain mutants with large fragment deletions in the *CsLOB1* promoter, in this study, we edited multiple sites of the *CsLOB1* promoter using the CRISPR/Cas9 system. Two plant expression vectors, pCas9CsLOB1:2sites and pCas9CsLOB1:3sites, which were designed for the simultaneous targeting of two and three sites in the *CsLOB1* promoter, respectively, were constructed to edit the EBE_{PthA4} region. Sequencing data revealed that the editing efficiency in pCas9CsLOB1:2sites and pCas9CsLOB1:3sites transgenic lines was 64.7% and 80.0%, respectively, and fragment deletions between two sgRNA target sites occurred in the transgenic citrus plants. Further analyses indicated the mutation efficiency differed among the sgRNAs. The differences were likely due to variability in the

收稿日期: 2018 - 07 - 09; **修回日期:** 2019 - 01 - 10

基金项目: 南方山地园艺学教育部重点实验室开放课题项目; 国家现代农业产业技术体系建设专项资金项目 (CARS-26); 重庆市自然科学基金项目 (cstc2017jcyjBX0020)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: chenshanchun@cric.cn, kemingl@swu.edu.cn)

binding ability of sgRNAs to the targeted *CsLOB1* sequence. These results showed that mutants with the deletion of large DNA fragment can be obtained through editing multiple sites within the *CsLOB1* promoter.

Keywords: citrus; CRISPR/Cas9 system; *CsLOB1*; multiple sites; gene editing

人工核酸酶介导的基因组编辑技术是通过特异性识别靶位点造成DNA双链断裂,引起细胞内源性的修复机制实现靶基因的修饰,其中包括第一代锌指核酸酶(Zinc finger nuclease, ZFN)技术、第二代转录激活样效应因子核酸酶(Transcription activator-like effector nucleases, TALEN)技术以及第三代成簇规律间隔短回文重复(Clustered regularly interspaced short palindromic repeat, CRISPR)技术(Wang et al., 2018)。CRISPR是一种来自细菌降解入侵的病毒DNA或其他外源DNA的免疫机制。CRISPR发挥作用时需要CRISPR相关蛋白(Cas蛋白)的协同,首先,Cas蛋白与crRNA及tracrRNA结合成复合物,然后通过PAM序列结合并侵入DNA,形成RNA-DNA复合结构,进而对目的DNA双链进行切割,使DNA双链断裂。目前,来自酿脓链球菌(*Streptococcus pyogenes*)的CRISPR/Cas9系统应用最为广泛。为了将CRISPR/Cas9技术发展为高效的基因打靶工具,科研工作者将crRNA和tracrRNA融合为一条RNA。通过这种简化,CRISPR/Cas9系统现仅包括两个元素:Cas9蛋白和single guide RNA (sgRNA)。CRISPR/Cas9技术由于设计简单,操作方便,基因编辑效率高,在动物、植物、微生物的基因组编辑中获得了广泛的应用(Jiang et al., 2013; Miao et al., 2013; Pennisi, 2013; Shan et al., 2013)。区别于动物和微生物,植物利用CRISPR/Cas9技术进行基因组编辑通常依赖于稳定的遗传转化。尽管Cas9和sgRNA表达框可以共同组装在一个T-DNA区域,然而目前植物利用CRISPR/Cas9系统进行基因组编辑时大部分仅设计一个sgRNA,编辑基因组中一个基因的某个特定位点(Zhang et al., 2014; Jia et al., 2016; Peng et al., 2017),而针对一个基因的多位点编辑或同时编辑多个基因的研究主要集中在拟南芥、水稻(Ma et al., 2015)以及组织再生相对容易的杨树(Fan et al., 2015),对再生和转化相对困难的木本植物(柑橘等)进行多基因编辑或针对某个基因多位点编辑的报道还较少。

多位点编辑由于一次能突变多个基因或者对一个基因造成大片段的染色质缺失,更有利于研究基因的功能或植物的遗传改良。早期的多位点编辑是利用共转化方法将2个或2个以上的sgRNA转入植物中(Li et al., 2013; Mao et al., 2013),由于多个质粒的共转化效率低,从而限制了利用CRISPR/Cas9进行基因组的多基因编辑。因而将多个sgRNA表达框与一个Cas9表达框共同组装入一个质粒的T-DNA区域,实现仅一个质粒的转化,可同时编辑多个基因(Ma et al., 2015)或一个基因的多个位点(Fan et al., 2015; Ma et al., 2015),从而加速了CRISPR/Cas9系统在基因的功能研究和植物遗传改良上的应用。

柑橘溃疡病是柑橘产业中的检疫性病害,造成巨大的经济损失,严重影响着柑橘产业健康稳定的发展。研究表明柑橘溃疡病病原菌的效应因子PthA4进入柑橘基因组后,特异识别并结合在*CsLOB1*基因启动子上,调控寄主内*CsLOB1*的表达,引起柑橘对溃疡病的感病反应(Hu et al., 2014; Li et al., 2014)。近几年,利用CRISPR/Cas9技术编辑*CsLOB1*启动子已成为柑橘抗溃疡病研究的热点。Jia等(2016)、Peng等(2017)利用CRISPR/Cas9技术编辑*CsLOB1*启动子上PthA4的结合位点(EBE_{PthA4}),获得了一些抗溃疡病能力显著增强的突变体植株。然而,上述研究只针对*CsLOB1*启动子的一个位点即 EBE_{PthA4} 区域或其临近区域进行编辑,设计区域大部分突变发生的是1 bp的删除、插入或替换。柑橘溃疡病的代表性株系有5个,它们在*CsLOB1*启动子上的结合位点或与 EBE_{PthA4}

相同, 或位于 EBE_{PthA4} 区域上游 6 bp 处 (Hu et al., 2014), 因而在 EBE_{PthA4} 附近创造更大片段的删除更有利于提高突变体植株抗所有柑橘溃疡病株系的能力。为了在 *CsLOB1* 启动子上获得较大片段的删除, 本研究中对 *CsLOB1* 启动子进行多位点编辑, 以期获得 sgRNA 区段之间发生删除的突变体植株。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试材料 ‘晚锦橙’ (*Citrus sinensis* Osbeck) 的种子来源于中国农业科学院柑桔研究所国家柑橘品种改良中心。种子于 2016 年 7 月采集, 经 0.1% HgCl 消毒 10 min, 剥去种皮, 接种在 MS 固体培养基上。28 °C 暗培养 14 d, 然后在 28 °C、16 h 光照/8 h 黑暗的光周期下培养 7 d 备用。

1.2 载体构建

CRISPR/Cas9 载体来自华南农业大学刘耀光教授团队。该载体系统包含了一个双元的植物表达载体 pYL-CRISPR/Cas9-DH 和 3 个 sgRNA 表达盒中间载体 (Ma et al., 2015)。载体构建采用两步 Golden Gate Cloning 方法 (Engler et al., 2009)。首先将所设计的 3 个不同的靶点识别序列插入 sgRNA 表达盒中间载体上, 分别与 3 个启动子 AtU3b、AtU6-29 和 AtU6-1 和 sgRNA 不变区骨架形成不同 sgRNA 的表达盒; 然后将上述表达盒从中间载体上转移到携带 35S 启动子驱动的 Cas9 编码基因的植物表达载体骨架上, 得到最终载体 pCas9CsLOB1:2sites 和 pCas9CsLOB1:3sites。

1.3 柑橘遗传转化

在无菌条件下取出经见光培养 7 d 的 ‘晚锦橙’ 种子实生苗, 将上胚轴切成 1 cm 左右的茎段, 参照 Peng 等 (2015) 的方法进行遗传转化。待外植体伤口上卡那霉素抗性芽茎的长度大于 0.5 cm 时, 在无菌条件下将其嫁接在 ‘晚锦橙’ 实生苗上。待嫁接苗长至一定大小时取其叶片, 提取 DNA, PCR 检测 Cas9 基因。检测引物 Cas9LYG-semiF: 5'-AGAAGGACCTCATCATCAAGC-3' 和 Cas9LYG-semiR: 5'-GATGAGAGTAGCGTCGAGAACC-3'。扩增片段的长度为 470 bp。PCR 检测结果呈阳性的植株移至室外炼苗 7 d, 再次嫁接在温室中的枳砧木上。

1.4 基因编辑分析

利用引物 LOBP-F: 5'-AAGCTTCACATATTTGAAAGTACATCCATAACCC-3' 和 LOBP-R: 5'-ATGGATCCTTTTGTAGAGAAGAAAAGTGT-3' 对转基因植株的 *CsLOB1* 启动子区域扩增, 对每个株系所有的扩增片段进行胶回收, 回收片段 T - 克隆测序。每个样品测序 40 个单克隆, 测序结果利用 DNAMAN 软件进行分析。编辑效率 (%) = 已发生基因编辑的转基因株系/总转基因株系 × 100。突变频率 (%) = 发生了突变的克隆数/总克隆数 × 100。

2 结果与分析

2.1 靶标位点设计与转基因植株筛选

‘晚锦橙’ 基因组中 *CsLOB1* 启动子含有两种类型 $CsLOB1^G$ 和 $CsLOB1^-$ 。根据 $CsLOB1^G$ 启动

子序列(图1)设计3个sgRNA,构建了2个植物表达载体 pCas9CsLOB1:2sites 和 pCas9CsLOB1:3sites (图2)。pCas9CsLOB1:2sites 包含 sgRNA1 和 sgRNA3, 其靶向识别位点分别位于 EBE_{PthA4} 位点的 5'端和 EBE_{PthA4} 位点;植物表达载体 pCas9CsLOB1:3sites 包含3个sgRNA,在上述 sgRNA1、sgRNA3 存在的情况下,在 EBE_{PthA4} 位点的 3'端还设计了一个 sgRNA2 靶标位点。

TTTAACCTTTTTTTTGGTTCAAACGAAGAAATGTTCCGTCATTCAATTAA
 AATTAATGACATCATCTAGTGGCTCGGTGACATACGCTTAGATAACAATTGTC
 ATTCTTGCCCTTTTCCTTCTCTATATAAACCCTTTTGGCTTGAACCTTTGTTT
 CAACTAAAGCAGCTCCTCCTCATCCCTTACTGTCTTTGCTTTCTCACTAATA
 CTACAACCCAACAGTTTCTTCTCTCAAAA

图1 ‘晚锦橙’中 *CsLOB1*^G 启动子序列

红色字体代表 EBE_{PthA4}; 绿色字体代表 *CsLOB1* 基因的起始密码子; 加粗的字体代表 PAM 序列;
 下划线上的碱基序列分别代表 sgRNA1、sgRNA2、sgRNA3 序列; 箭头方向代表 Cas9 核酸酶切割的方向。

Fig. 1 The sequence of *CsLOB1*^G promoter in ‘Wanjincheng’ orange

Red indicates the EBE of PthA4 effector; Green indicates the initiation code of *CsLOB1* gene; Bold indicates the PAM sequence;
 The base sequences on the underline represent sgRNA1, sgRNA2, and sgRNA3 sequence, respectively;
 The direction of arrows indicates the cutting directions of Cas9 nuclease.

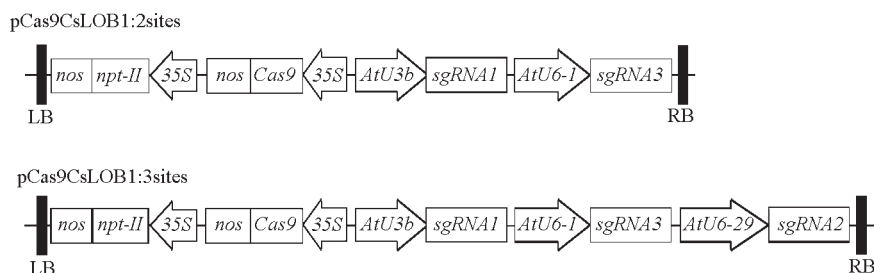


图2 pCas9CsLOB1:2sites 和 pCas9CsLOB1:3sites 载体结构图

LB: 左边界; RB: 右边界; nos: nos 终止子; npt-II: 新霉素磷酸转移酶基因; 35S: 花椰菜花叶病毒 *CaMV* 35S 启动子;
 Cas9: *SpCas9* 基因; AtU3b、AtU6-1 和 AtU6-29: 拟南芥 U3b、U6-1 和 U6-29 启动子。

Fig. 2 Schematic diagram of pCas9CsLOB1:2sites and pCas9CsLOB1:3sites vectors

LB: Left border; RB: Right border; nos: nos terminator; npt-II: Neomycin phosphotransferase gene;
 35S: *Cauliflower mosaic virus* 35S promoter; Cas9: *SpCas9* gene;
 AtU3b, AtU6-1 and AtU6-29: U3b, U6-1 and U6-29 promoter from *Arabidopsis*.

将上述2个植物表达载体 pCas9CsLOB1:2sites 和 pCas9CsLOB1:3sites 分别转入‘晚锦橙’上胚轴,外植体端口萌发卡那霉素抗性(Kan^r)芽(图3)。通过对不定芽进行试管内微嫁接,获得了350株 pCas9CsLOB1:2sites 和278株 pCas9CsLOB1:3sites Kan^r植株。用PCR技术检测Cas9基因,17个 pCas9CsLOB1:2sites、15个 pCas9CsLOB1:3sites Kan^r植株扩增出了一条470 bp的条带;表明Cas9基因已转入‘晚锦橙’中。所有的PCR阳性植株二次嫁接在田间枳砧木上。为了排除试管内PCR检测的叶片受到质粒的污染,待接穗二次嫁接成活后,取其叶片再次用上述引物进行PCR检测,17个 pCas9CsLOB1:2site、15个 pCas9CsLOB1:3sites 转基因接穗都扩增出了目的带(图4示部分转基因样品),再次表明上述接穗转基因成功。

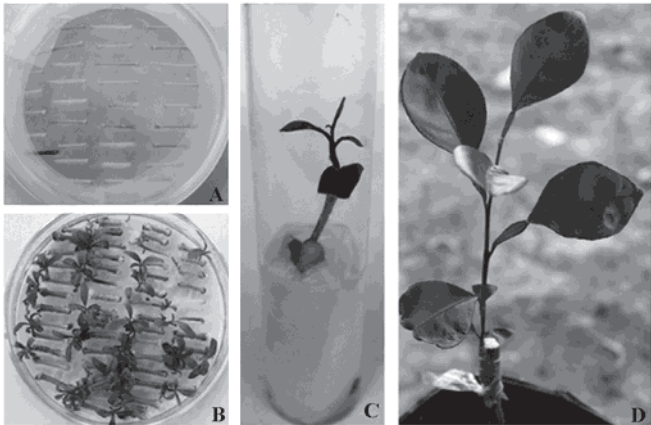


图 3 pCas9CsLOB1:2sites 和 pCas9CsLOB1:3sites 载体在‘晚锦橙’中的遗传转化
A: ‘晚锦橙’上胚轴茎段; B: 外植体端口上的卡那霉素抗性芽; C: 卡那霉素抗性芽的微嫁接; D: PCR 阳性芽田间嫁接。
Fig. 3 Transformation of pCas9CsLOB1:2sites and pCas9CsLOB1:3sites vectors, respectively, into ‘Wanjincheng’ orange
A: Epicotyls of ‘Wanjincheng’ orange; B: Kanamycin resistant (Kan^r) shoots from the cut end of explants;
C: *in vitro* grafting of Kan^r shoot; D: The field grafting of PCR positive shoot.

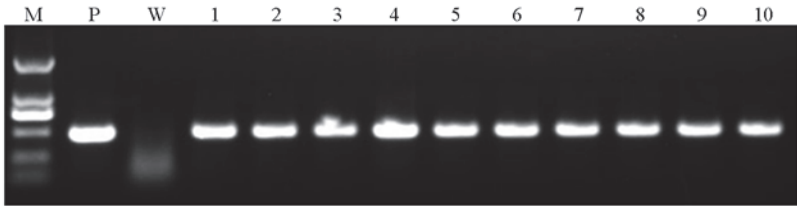


图 4 Cas9 基因的 PCR 检测
M: Marker; P: 质粒; W: 野生型; 1 ~ 5: pCas9CsLOB1:2sites 样品; 6 ~ 10: pCas9CsLOB1:3sites 样品。
Fig. 4 The identification of Cas9 gene in kanamycin resistant shoots
M: Marker; P: Plasmid; W: Wild type; 1 - 5: pCas9CsLOB1:2sites samples; 6 - 10: pCas9CsLOB1:3sites samples.

2.2 转基因植株的基因编辑分析

为了分析转基因植株的编辑效率和突变类型, 对获得的所有转基因株系进行 T - 克隆测序。测序结果表明, 17 个 pCas9CsLOB1:2sites 转基因株系中, 有 11 个转基因株系在靶标位点发生了基因编辑, 基因编辑效率为 64.7%; 15 个 pCas9CsLOB1:3sites 转基因株系中有 12 个在靶标位点发生了基因编辑, 基因编辑效率为 80.0%。11 个发生了基因编辑的 pCas9CsLOB1:2sites 株系(突变体)所发生的突变或者发生在 *CsLOB1*^G 链, 或者/和 *CsLOB1* 链。突变体 C2-12 中靶标位点的突变频率为 100%, 所有的 *CsLOB1* 链发生了相同的突变, 而 *CsLOB1*^G 的突变则含有 3 种类型, 因而 C2-12 突变体为杂合体(表 1, 图 5); 而剩余的 10 个突变体中靶标位点的突变频率小于 100%, 因而这 10 个突变体为嵌合体(表 1)。每个发生了基因编辑的 pCas9CsLOB1:3sites 突变体(共 12 个)的突变频率都小于 100%, 因而所有的 pCas9CsLOB1:3sites 突变体都是嵌合体(表 1)。

表 1 转基因‘晚锦橙’编辑效率分析
Table 1 Editing efficiency of transgenic ‘Wanjincheng’ orange plants

转基因植株	转基因株系数量	杂合体数量	嵌合体数量	编辑效率/%
Transgenic plant	Number of transgenic line	Number of heterozygote	Number of chimera	Editing efficiency
pCas9CsLOB1:2sites	17	1	10	64.7
pCas9CsLOB1:3sites	15	0	12	80.0

在突变类型分析中, pCas9CsLOB1:2sites 突变体以删除为主, 而 pCas9CsLOB1:3sites 突变体以替换为主(表 2)。两种类型的突变体发生的突变大部分是 1 bp 的插入、删除或替换。pCas9CsLOB1:2sites 突变体 sgRNA1 和 sgRNA3 之间发生了 67、70 bp 的删除, 删除的效率为 5.0%; 而 pCas9CsLOB1:3 sites 突变体 sgRNA2 和 sgRNA3 之间发生了 37 bp 和 38 bp 的删除, 删除的效率为 2.3%。pCas9CsLOB1:2sites 突变体 C2-11 和 C2-12 分别为嵌合体 and 杂合体, 其 *CsLOB1* 启动子分别有 50.0% 和 18.0% 在 sgRNA1 和 sgRNA3 位点之间删除。pCas9CsLOB1:3sites 突变体 C3-1 中分别有 17.5% *CsLOB1* 启动子在 sgRNA2 和 sgRNA3 之间发生了 37 bp 和 38 bp 的删除(图 5)。上述结果表明, CRISPR/Cas9 可以介导 *CsLOB1* 启动子上两个 sgRNA 之间 DNA 片段的删除。

表 2 转基因‘晚锦橙’的突变类型分析

Table 2 Indel types in transgenic ‘Wanjincheng’ orange plants			
突变类型	碱基数/bp	pCas9CsLOB1:2 sites (%)	pCas9CsLOB1:3 sites (%)
Indel types	No. of base		
删除	1	92 (13.5)	56 (9.3)
Deletion	2 ~ 5	15 (2.2)	8 (1.3)
	6 ~ 14	7 (1.0)	8 (1.3)
	15 ~ 40	23 (3.4)	14 (2.3)
	60 ~ 70	34 (5.0)	
插入 Insertion	1	51 (7.5)	14 (2.3)
替换	1	82 (12.1)	111 (18.5)
Replacement	4		14 (2.3)

注: pCas9CsLOB1:2sites 和 pCas9CsLOB1:3sites 转基因株系测序的总克隆数分别为 680 和 600。

Note: There were 680 and 600 clones in the pCas9CsLOB1: 2 sites and pCas9CsLOB1:3 sites transgenic lines, respectively.

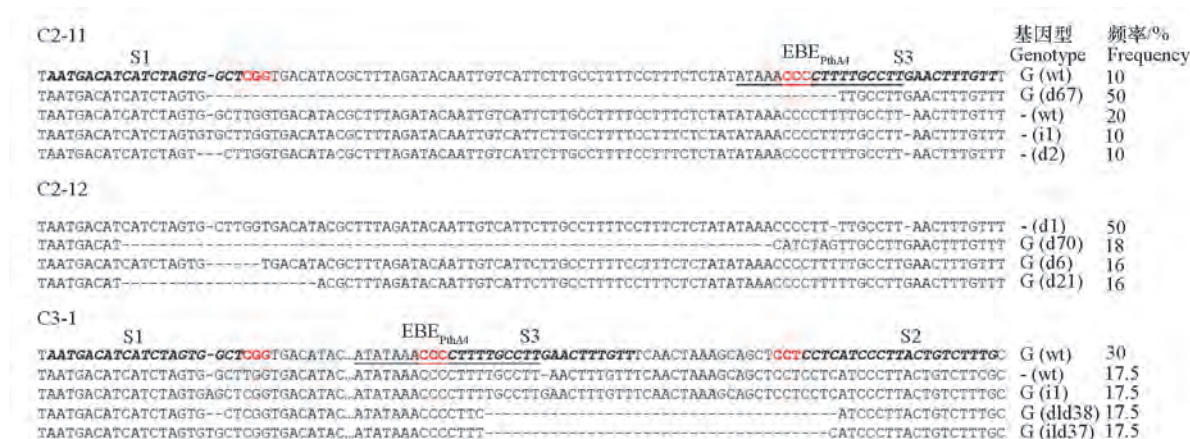


图 5 突变体 C2-11、C2-12、C3-1 的基因编辑分析

S1: sgRNA1; S2: sgRNA2; S3: sgRNA3; 下划线上的核苷酸序列表示 EBE_{PstI}; 黑色斜体表示 sgRNAs 序列; 红色表示 PAM 序列; G 和 - 分别表示 *CsLOB1*^G 和 *CsLOB1*^I; wt、i 和 d 分别表示野生型、插入和删除, i、d 后面的数字表示插入或删除的碱基数。

Fig. 5 Gene editing in C2-11, C2-12, C3-1 mutants

S1: sgRNA1; S2: sgRNA2; S3: sgRNA3. The sequence with underline is EBE_{PstI}. The black bold italics are the sequence of sgRNAs. Red represents the sequence of PAM. G and - represent *CsLOB1*^G and *CsLOB1*^I, respectively. wt, i and d represent wild type, insertion and deletion respectively, the number behind i and d represents the number of base.

2.3 不同 sgRNA 对 *CsLOB1*^G 和 *CsLOB1*^I 结合效率的差异分析

‘晚锦橙’基因组中 *CsLOB1* 启动子含有两种类型 *CsLOB1*^G 和 *CsLOB1*^I。为了分析 sgRNA1、sgRNA2 和 sgRNA3 对两种类型启动子结合能力的差异, 对 17 个 pCas9CsLOB1:2sites 和 15 个 pCas9CsLOB1:3sites 转基因株系进行 *CsLOB1*^G 和 *CsLOB1*^I 突变率的统计。在 680 个 pCas9CsLOB1:2sites 转基因株系的单克隆中, 有 172 个克隆发生 sgRNA1 位点突变 (25.3%), 其中 135 个为 *CsLOB1*^G 突变 (19.9%), 37 个为 *CsLOB1*^I 突变 (5.4%); 有 125 个克隆发生了 sgRNA3 位点突变 (18.4%), 突变都发生在 *CsLOB1*^G 启动子上(表 3)。这些结果说明 sgRNA1 可以识别 *CsLOB1*^G

和 *CsLOB1⁻*, 由于 ‘晚锦橙’ 基因组中 *CsLOB1^G* 与 *CsLOB1⁻* 的比例大概为 3 : 1 (Peng et al., 2017), 因而 sgRNA1 对 *CsLOB1^G* 与 *CsLOB1⁻* 的结合效率差异不大。sgRNA3 仅能识别和结合 *CsLOB1^G*, 而不能识别和结合 *CsLOB1⁻*。pCas9*CsLOB1*:3sites 含有 sgRNA1、sgRNA2 和 sgRNA3。对 600 个单克隆测序结果进行分析, 有 85 个克隆发生了 sgRNA1 靶位点突变 (14.2%), 其中 71 个 *CsLOB1^G* 突变 (11.8%), 14 个 *CsLOB1⁻* 突变 (2.4%); 有 77 个 sgRNA2 位点突变 (12.8%), 其中 *CsLOB1^G* 突变率为 11.7%, *CsLOB1⁻* 突变率为 1.1%; 有 57 个克隆发生 sgRNA3 位点突变 (9.5%), 都为 *CsLOB1^G* 突变 (表 3)。这些结果说明 sgRNA1、sgRNA2 具有识别 *CsLOB1^G* 与 *CsLOB1⁻* 的能力, 但 sgRNA1, sgRNA2 对 *CsLOB1* 结合能力存在差异。在 pCas9*CsLOB1*:3sites 转基因植株中, sgRNA3 也仅能识别和结合 *CsLOB1^G* 启动子。

表 3 不同 sgRNAs 对 *CsLOB1^G* 和 *CsLOB1⁻* 结合能力分析
Table 3 Ability of sgRNAs to bind to the *CsLOB1^G* and *CsLOB1⁻* promoters

类型 Type	pCas9 <i>CsLOB1</i> :2sites		pCas9 <i>CsLOB1</i> :3sites		
	sgRNA1 (%)	sgRNA3 (%)	sgRNA1 (%)	sgRNA2 (%)	sgRNA3 (%)
<i>CsLOB1^G</i>	135 (19.9)	125 (18.4)	71 (11.8)	70 (11.7)	57 (9.5)
<i>CsLOB1⁻</i>	37 (5.4)	0	14 (2.4)	7 (1.1)	0
合计 Total	172 (25.3)	125 (18.4)	85 (14.2)	77 (12.8)	57 (9.5)

3 讨论

Jia 等 (2017) 利用 SaCas9/sgRNA 系统实现了 ‘卡里佐’ 枳橙中 *Cs7g03360* 基因 2 个位点的编辑, 但突变只发生在单个 sgRNA 设计的靶标位点, 而两个 sgRNA 之间并没有发生 DNA 片段的删除。在本研究中, 利用 CRISPR/Cas9 系统传递 Cas9 核酸酶和 2 个或 3 个 sgRNA 进入 ‘晚锦橙’ 基因组, 部分突变体植株实现了 2 个 sgRNA 靶标位点之间 DNA 片段的删除。本研究结果表明通过设计合理的 sgRNA, 实现柑橘基因组中某基因的多位点编辑是可能的。

研究表明, CRISPR/Cas9 系统在柑橘体内引起的突变, 其碱基数的变化大多数为 1 bp (Jia et al., 2016; Peng et al., 2017)。本研究中的测序结果表明, 单个 sgRNA 靶标位点发生的突变主要以 1 bp 为主, 而发生在两个 sgRNA 靶标位点之间的较大片段的删除较少。2 个靶标位点之间大片段的删除, 需要 Cas9 核酸酶同时切割 2 个靶标位点。Cas9 核酸酶在 DNA 序列上的结合需要 sgRNA 的引导, 因而 sgRNA 对靶标位点的结合能力直接影响着突变效率 (Doudna & Charpentier, 2014)。在本研究中, 由于不同的 sgRNA 对靶标位点识别和结合效率不同, 导致 Cas9 核酸酶同时切割 2 个或 3 个 sgRNA 的效率较低。

不同的 sgRNA 具有不同的突变效率, 本研究中这种突变效率的差异主要是由于不同的 sgRNA 对 *CsLOB1* 识别和结合能力的差异所引起的。在 ‘晚锦橙’ 内 *CsLOB1* 启动子有两种类型 *CsLOB1^G* 和 *CsLOB1⁻*, 比例大约为 3 : 1 (Peng et al., 2017)。尽管 *CsLOB1^G* 和 *CsLOB1⁻* 中 EBE_{PthA4} 区域是相同的, 但在其他的区域存在着单核苷酸多态性, 其中最为突出的为 *CsLOB1^G* 的 EBE_{PthA4} 后含有碱基 G, 而 *CsLOB1⁻* 则缺失了这一碱基 (Peng et al., 2017)。sgRNA3 的靶标序列设计在 EBE_{PthA4} 上。sgRNA3 序列与 *CsLOB1^G* 完全匹配, 而与 *CsLOB1⁻* 发生错配, 导致在本研究中 sgRNA3 不能识别 *CsLOB1⁻*。因而对于编辑 *CsLOB1* 的启动子来说, 在 EBE_{PthA4} 上直接设计靶标位点不是最理想的选择。sgRNA1 和 sgRNA2 都具有识别和结合 *CsLOB1^G* 和 *CsLOB1⁻* 的能力。sgRNA1 在 pCas9*CsLOB1*:2sites 转基因植株中结合 *CsLOB1^G* 和 *CsLOB1⁻* 的比例大约为 3 : 1, 在 pCas9*CsLOB1*:3sites 转基因植株中大约为 5 : 1; 但 sgRNA2 结合 *CsLOB1^G* 和 *CsLOB1⁻* 的比例大约为 10 : 1, 与 *CsLOB1^G* 和 *CsLOB1⁻* 在 ‘晚锦

橙’基因组中大约为 3 : 1 的比例严重不符,表明 sgRNA1 的设计比较理想,而 sgRNA2 结合 *CsLOB1* 的能力较低,不是理想的靶标位点。因而筛选 EBE_{PthA4} 下游理想的 sgRNA 位点,利用 CRISPR/Cas9 系统对 *CsLOB1* 启动子进行多位点的编辑,对于获得 *CsLOB1* 启动子上 EBE_{PthA4} 区域及其附近大片段删除的突变体具有十分重要的意义。

References

- Doudna J A, Charpentier E. 2014. Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, 346 (6213): 1258096.
- Engler C, Gruetzner R, Kandzia R, Marillonnet S. 2009. Golden gate shuffling: a one-pot DNA shuffling method based on type II restriction enzymes. *PLoS ONE*, 4 (5): e5553.
- Fan D, Liu T, Li C, Jiao Bo, Li S, Hou Y, Luo K. 2015. Efficient CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis in *Populus* in the first generation. *Scientific Reports*, 5: 12217.
- Hu Y, Zhang J L, Jia H G, Sosso D, Li T, Frommer W B, Yang B, White F F, Wang N, Jones J B. 2014. *Lateral organ boundaries 1* is a disease susceptibility gene for citrus bacterial canker disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111: E521 - E529.
- Jia H, Orbovic V, Jones J B, Wang N. 2016. Modification of the PthA4 effector binding elements in type I *CsLOB1* promoter using Cas9/sgRNA to produce transgenic Duncan grapefruit alleviating XccΔPthA4::dCsLOB1.3 infection. *Plant Biotechnol J*, 14: 1291 - 1301.
- Jia H, Xu J, Orbovic V, Zhang Y, Wang N. 2017. Editing citrus genome via SaCas9/sgRNA system. *Frontiers in Plant Science*, 8: 2135.
- Jiang W, Zhou H, Bi H, Fromm M, Yang B, Weeks D P. 2013. Demonstration of CRISPR/Cas9/sgRNA-mediated targeted gene modification in *Arabidopsis*, tobacco, sorghum and rice. *Nucleic Acids Research*, 41: e188.
- Li J, Norville JE, Aach J, McCormack M, Zhang D. 2013. Multiplex and homologous recombination-mediated genome editing in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana* using guide RNA and Cas9. *Nature Biotechnology*, 31: 688 - 691.
- Li Z, Zou L, Ye G, Xiong L, Ji Z, Zakria M, Hong N, Wang G, Chen G. 2014. A potential disease susceptibility gene *CsLOB* of citrus is targeted by a major virulence effector PthA of *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. *Molecular Plant*, 7: 912 - 915.
- Ma X, Zhang Q, Zhu Q, Liu W, Chen Y, Qiu R, Wang B, Yang Z, Li H, Lin Y, Xie Y, Shen R, Chen S, Wang Z, Chen Y, Guo J, Chen L, Zhao X, Dong Z, Liu Y G. 2015. A robust CRISPR/Cas9 system for convenient, high-efficiency multiplex genome editing in monocot and dicot plants. *Molecular Plant*, 8: 1274 - 1284.
- Mao Y, Zhang H, Xu N, Zhang B, Gou F, Zhu J. 2013. Application of the CRISPR-Cas system for efficient genome engineering in plants. *Molecular Plant*, 6: 2008 - 2011.
- Miao J, Guo D, Zhang J, Huang Q, Qin G, Zhang X, Wan J, Gu H, Qu L J. 2013. Targeted mutagenesis in rice using CRISPR-Cas system. *Cell Research*, 23: 1233 - 1236.
- Peng A, Chen S, Lei T, Xu L, He Y, Wu L, Yao L, Zou X. 2017. Engineering canker-resistant plants through CRISPR/Cas9-targeted editing of the susceptibility gene *CsLOB1* promoter in citrus. *Plant Biotechnology Journal*, 15: 1509 - 1519.
- Peng A, Xu L, He Y, Lei T, Yao L, Chen S, Zou X. 2015. Efficient production of marker-free transgenic ‘Tarocco’ blood orange (*Citrus sinensis* Osbeck) with enhanced resistance to citrus canker using a Cre/loxP site-recombination system. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 123: 1 - 13.
- Pennisi E. 2013. The CRISPR craze. *Science*, 341: 833 - 836.
- Shan Q, Wang Y, Li J, Zhang Y, Chen K, Liang Z, Zhang K, Liu J, Xi J J, Qiu J L, Gao C. 2013. Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system. *Nature Biotechnology*, 31: 686 - 688.
- Srivastava V, Underwood J L, Zhao S. 2017. Dual-targeting by CRISPR/Cas9 for precise excision of transgenes from rice genome. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 129: 153 - 160.
- Wang Yuqing, Zhang Yaxian, Gao Zhipeng, Yang Wencai. 2018. Breeding for resistance to tomato bacterial diseases in China: challenges and prospects. *Horticultural Plant Journal*, 4 (5): 193 - 207.
- Zhang H, Zhang J, Wei P, Zhang B, Gou Feng, Feng Z, Mao Y, Yang L, Zhang H, Xu N, Zhu J. 2014. The CRISPR/Cas9 system produces specific and homozygous targeted gene editing in rice in one generation. *Plant Biotechnology Journal*, 12: 797 - 807.