

李莉梅, 欧阳乐军, 尹爱国, 等. 1 种大片段敲除巨桉细胞分裂素氧化酶基因的 CRISPR 载体构建[J]. 江苏农业科学, 2018, 46(12): 19–22.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.12.004

1 种大片段敲除巨桉细胞分裂素氧化酶基因的 CRISPR 载体构建

李莉梅, 欧阳乐军, 尹爱国, 韩寒冰, 陈凯钊, 布良灏, 孙同川

(广东石油化工学院, 广东茂名 525000)

摘要: CRISPR–Cas 系统是细菌和古细菌在进化过程中逐渐形成的一种适应性免疫系统, 通过 sgRNA 介导对靶位点进行定位并利用 Cas 酶对核酸实现双链断裂。CRISPR–Cas9 系统以其操作简单、效率高等优点被迅速应用到对原核生物和真核生物的基因编辑当中。以巨桉 *CKX* 基因为目的基因, 构建 CRISPR–35S–Cas9 植物基因编辑系统大片段敲除巨桉 *CKX* 基因的表达载体, 重组质粒的 PCR 鉴定及测序结果表明, 含 2 个 Target 的重组载体构建成功。研究结果为 CRISPR/Cas9 系统在桉树功能基因研究及育种中的应用奠定基础。

关键词: CRISPR/Cas9; 基因敲除; 桉树; *CKX* 基因; 载体构建

中图分类号: S188 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002–1302(2018)12–0019–04

CRISPR/Cas9 基因组定向编辑技术是近几年发展起来的对基因组进行定向精确修饰的一种技术。通过将外源 DNA 导入受体细胞染色体的特定位点上, 从而特异地改造基因组, 研究基因的功能。该技术可以对基因组中的靶位点进行缺失、敲入、核苷酸修正等操作。2013 年, 科学家首次将 CRISPR/Cas9 应用到人类和小鼠细胞系中对基因进行敲除^[1], 随后人们在模式植物和其他农作物中也成功获得了应用, 经过改造的 CRISPR/Cas9 系统也迅速地被应用到拟南芥、烟草、高粱、水稻、小麦、玉米等不同植物基因组的定向编辑研究中, 并且获得较高的诱导突变率和可稳定遗传的基因组编辑植株^[2–3]。相对于转基因技术, CRISPR/Cas9 系统具有操作简单、快捷、不需要巨大的资金投入、在遗传编辑之后

不留下转基因的痕迹等优点, 无需引用外源基因, 因而生物安全性高, 不具有转基因争议。

目前, CRISPR/Cas9 系统在植物中的应用存在表达活性不高以及单位点基因编辑后代的酶切检测繁琐等问题^[4]。要想设计高效率的 CRISPR/Cas9 系统, 要考虑到该系统表达的时间、空间以及效率等几个方面。目前多数 CRISPR 载体都只有 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 能够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, 也利于突变后代的 PCR 方法筛选检测。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。本研究以细胞分裂素氧化/脱氢酶基因 (cytokinin oxidase/dehydrogenase, *CKX*) 为目标基因, 以 PHDE–35S–Cas9 为基础载体, 通过 3 轮 PCR 反应, 建立将 2 个 sgRNA 串联到同一个 CRISPR 载体中的方法体系, 可同时连接 2 个 target 片段, 突变效率高, 突变后代鉴定简单, 无须进行酶切鉴定。

1 材料与方法

1.1 试验材料与仪器

细菌培养基 (LB) 的制备: 酵母提取粉 5 g, 蛋白胨 10 g,

化学杂志, 2016(5): 428–433.

[60] 王 馨, 严 磊, 苗加伟, 等. 表没食子儿茶素没食子酸酯对脂多糖诱导原代胶质细胞炎症反应的保护作用[J]. 中国医院药学杂志, 2015, 35(10): 917–920.

[61] 陈 华, 苗加伟, 李 晶, 等. 表没食子儿茶素没食子酸酯对脂多糖诱导胶质细胞炎症的保护作用[J]. 中国老年学, 2016, 36(16): 3913–3914.

[62] 刘 华, 曹第勇, 杨尚君, 等. 表没食子儿茶素没食子酸酯对 IL–1 β 诱导 MIN6 细胞凋亡的保护作用[J]. 重庆医学, 2015(23): 3183–3186.

收稿日期: 2017–08–03

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 31470677); 广东省自然科学基金 (编号: 2015A030313560, 2017A030307017); 广东省“扬帆计划”高层次人才项目 (编号: 201434023); 广东省科技计划 (编号: 2017A030303087); 广东省大学生攀登计划 (编号: pdjhb0343, pdjhb0338)。

作者简介: 李莉梅 (1980—), 河南沈丘人, 硕士, 实验师, 研究方向为植物分生物学。E–mail: lilimeinh@163.com。

通信作者: 欧阳乐军, 博士, 副教授, 研究方向为植物基因工程。E–mail: ouyanglejun@163.com。

[56] 杨 哲, 刘 平, 王嘉翔, 等. EGCG 对 H₂O₂ 诱导 HLE 细胞氧化损伤的保护作用[J]. 现代生物医学进展, 2016, 16(28): 5410–5427.

[57] 李小娜, 范 芹, 黄伟琨, 等. 茶多酚对脂多糖介导下人牙周膜成纤维细胞 MMP–1、MMP–2 表达的影响[J]. 实用口腔医学杂志, 2014(6): 774–777.

[58] 王 珏, 欧 龙, 罗 芸, 等. 茶多酚对脂多糖诱导人牙周膜成纤维细胞凋亡及炎症因子的影响[J]. 中华老年口腔医学杂志, 2015(2): 80–84.

[59] 袁发许, 冯金梅, 刘 锴, 等. EGCG 对日本血吸虫感染小鼠 TIMP–1 及 α –SMA 表达和肝纤维化的影响[J]. 中国病原体

氯化钠 10 g,加 30 g 琼脂,用蒸馏水定容至 1 000 mL。CRISPR/Cas9 表达载体 PHDE-35S-Cas9 由加州大学圣地亚哥分校 Professor Zhao 提供;大肠杆菌 DH5 α 以及农杆菌 GV3101 菌株由笔者所在实验室保存;普通琼脂糖凝胶 DNA 纯化回收试剂盒、PCR 产物回收试剂盒、质粒小提试剂盒均购自天根生化科技(北京)有限公司;DNA 聚合酶、*MFE* I 内切酶、Pfu DNA Polymerase、T₄ DNA Ligase 均购自鼎国生物(广州)有限公司;DNA 分子量 Mark III 购自广州东盛生物科技有限公司;引物合成及基因测序在上海生物工程有限公司完成。PCR 仪购自德国 Biometra 公司;离心机购自德国 Eppendorf 公司;电泳仪购自北京市六一仪器公司;凝胶成像系统购自美国 Bio-Rad 公司;金属振荡培养箱购自哈尔滨东联电子技术开发有限公司;超净工作台购自江苏苏州安泰空气技术有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 sgRNA 靶位点的选择与设计 使用 CRISPR 在线设计工具(<http://crispr.dbcls.jp/>),以 *CKX* 基因为靶基因,选择靠近 5'端得分最高的 G-N19-NGG 23 bp 序列,其中一个 G 是小 RNA 转录的起始信号位点,NGG 是 *Cas9* 基因定位的 PAM 序列,需要插入 gRNA 载体的是 G-N19 共 20 bp 序列。靶序列的选择原则:尽可能选择 2 个 target 的目的片段长度大于 1 000 bp,以增加目标基因敲除效果;靶序列必须在全基因组中比对且唯一,否则会形成错误切割,影响试验结果;选择高 G+C 含量的靶位点,增加向导 sgRNA 和 DNA 结合稳定性,从而提高切割效率,减少脱靶效应的发生^[5]。

1.2.2 含 target 片段的 PCR 扩增 以 PHDE-U6-26-29 质粒为模板,第 1 轮 PCR 分别扩增 26 端与 29 端的全长,再以 26 端与 29 端 PCR 回收产物为模板扩增 26+29 的全长,其中 26 端与 29 端分别含有 1 个与目标基因匹配的 target 序列,PCR 扩增反应体系如下:PHDE-U6-26-29 1 μ L(模板);Pfu 酶 2.5 μ L;ddH₂O 74.5 μ L;dNTP 10 μ L;Buffer 10 μ L;Primer F 1 μ L(正向引物);Primer R 1 μ L(反向引物)。PCR 反应程序:94 $^{\circ}$ C 4 min;94 $^{\circ}$ C 30 s,59 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 1 min,40 个循环;72 $^{\circ}$ C 2 min。PCR 产物的回收纯化参照天根生化科技(北京)有限公司的 DNA 回收纯化试剂盒进行。

PCR 所需引物序列如下:
U6-29P5: GCACTTCCGATGAGATAAACCAATACGTTCTTAATCCAACTACTGCAGC;
U6-29-F: GGTGAGGCCTCTGTCGACTTGTTTAGAGC-TAGAAATAGCAAGTTA;
U6-29P3: AGACCAAGCTTCACTTCATCCTTGGCATAT-AAATGTCCCATGAG;
U6-29-R: AAGTCGACAGAGGCCTCACCAATCTCTTA-GTCGACTCTACC;
U6-26P5: GGCTGCAGGTCGACGCGTCCGACTTGCCT-TCCGCACAATAC;
U6-26-F: GATCAGCAATGTCTACGAAAGTTTATAGAGC-TAGAAATAGCAAGTTA;
U6-26P3: GCTGCAGTAGTTTGGATTAAGAACGTATTGG-TTTATCTCATCGGAAGTGC;
U6-26-R: TTCGTAGACATTGCTGATCAATCACTACT-

TCGACTCTAG。
1.2.3 含 target 片段的 PCR 产物与载体连接 将上述“1.2.1”节扩增的 26-29 最终 PCR 产物与经 *MFE* I 酶切 PHDE-EC2-Cas9 载体在 PCR 仪中 50 $^{\circ}$ C 连接 1 h,经同源重组将含 2 个 target 的 26-29 unity 目的片段与载体相连。连接体系如表 1 所示。

表 1 表达载体连接反应体系

试剂	用量(μ L)
PHDE-35S-Cas9 载体	0.3
重组混合酶(含 DNA 外切酶、连接酶、聚合酶)	3.0
26-29 unity 的 PCR 产物	0.7
总计	4.0

1.2.4 转化与重组载体鉴定 将上述“1.2.2”节的连接产物转化 *Escherichia coli* DH5 α 感受态细胞。热激法转化大肠杆菌与单克隆筛选,经菌液 PCR 鉴定后,提取质粒 DNA 备用。碱法小量提取质粒 DNA,送样测序鉴定与分析。

2 结果与分析

2.1 靶位点的选择

针对 *CKX* 基因序列,遵循以 NGG 的 PAM 序列上游 20 bp 为靶序列的原则,在目标基因的不同区域寻找 2 个靶位点,2 个靶点分别位于 *CKX* 基因不同外显子上,2 个靶序列间隔大约在 1 000 bp,target Sequence(5'→3')的具体信息如下:

target1:GGTGAGGCCTCTGTCGACTTTGG;
target2:GATCAGCAATGTCTACGAAATGG。

下划线是 PAM 序列。

2.2 含 target 的插入片段 PCR 扩增

2.2.1 26 和 29 的 3'与 5'片段扩增 质粒 PHDE-U6-26-29 为模板,用 U6-26-5(3)P 和 U6-26-5(3)R 为正向和反向引物,扩增得到 300 bp 左右的 26-3'与 5'端,同时,以 PHDE-U6-26-29 为模板,用 U6-29-5(3)P 和 U6-29-5(3)R 为正向和反向引物,扩增得到 29-3'与 5'端(图 1、图 2)。

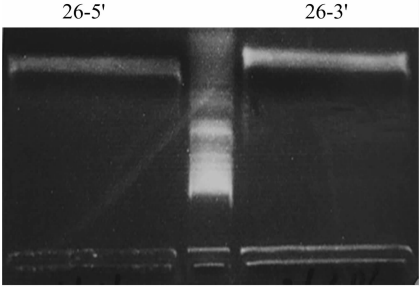


图1 26-3'与 26-5'PCR 扩增条带

2.2.2 26 unity 与 29 unity 全长片段的扩增 用“2.2.1”节中 26(29)的 3'与 5'PCR 回收产物为模板,以 U6-26(29)-5P 与 U6-26(29)-3p 为正向与反向引物,扩增得到 600 bp 左右的 26 unity 和 29 unity 全长片段(图 3)。

2.2.3 26+29 的全长 unity 片段扩增 用“2.2.2”节中 26 unity 和 29 unity 全长片段,以 U6-26-5P 与 U6-29-3p 为正向与反向引物,扩增得到 26+29 全长 unity 片段(图 4)。

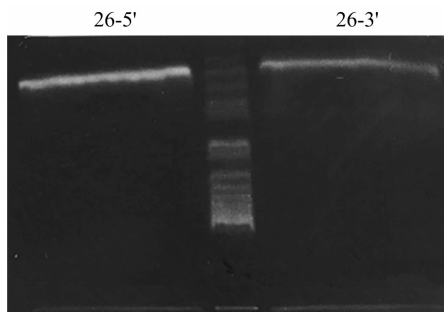


图2 29-3'与29-5'PCR扩增条带

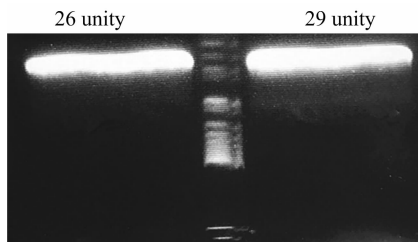


图3 26和29全长PCR扩增条带

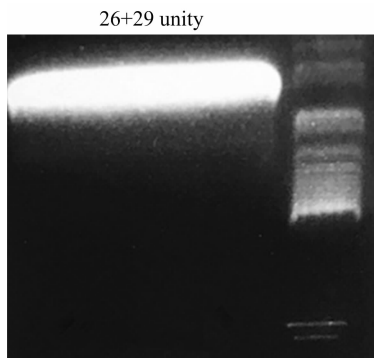


图4 26+29 unit PCR 扩增条带

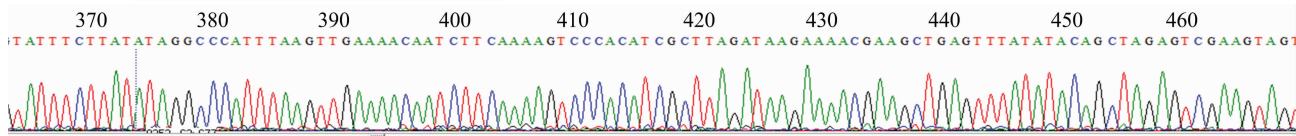


图6 重组质粒测序峰图



图7 载体结构示意图

Cas9 这种技术的应用研究还处于初始阶段,是近几年才逐渐发展起来的^[6]。CRISPR/Cas9 系统作为一种有效的基因编辑工具,具有操作简单、高效性、特异性等其他基因编辑工具所不具备的优势,近年来迅速被世界各大实验室运用。该技术已经成功应用在多种微生物、动物和植物^[7]。2013 年《Nature Biotechnology》同时报道了在重要作物水稻、小麦以及模式植物拟南芥和烟草中取得了多个基因定点敲除、插入等基因组定点编辑操作的成功案例,并首次证实 CRISPR/Cas9 系统能够在植物基因组中实现定点编辑^[8]。

对于靶位点的选择,主要参考在线工具 CRISPR Design 或 E-Crispr^[9],以 NGG 为 PAM 序列原则,在目标基因序列

2.3 重组载体构建连接

将上述“2.2.2”节的最终 26 + 29 unit PCR 产物与经 MFE I 酶切 PHDE-EC2-Cas9 载体在 PCR 仪中 50 ℃ 连接 1 h,经同源重组将含 2 个 target 的 26-29 unit 目的片段与载体相连。将连接产物用热激法转化 *Escherichia coli* DH5α 感受态细胞,再将转化后的细胞涂布在含卡那霉素的平板上培养,挑选部分单菌落进行培养,4 h 后进行菌液 PCR 鉴定,鉴定结果如图 5 所示,转化阳性率达到 100%。

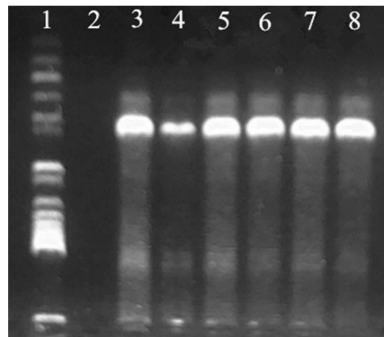


图5 重组质粒 PCR 鉴定结果

2.4 序列测定

提取菌液 PCR 扩增为阳性质粒,以 U6-F 为引物测序,经送样测序结果比对,证实 26 + 29 的全长片段扩增并组装到 PHDE-35S-Cas9 成功(图 6),该插入片段含 2 个 target 序列,与预期设计完全一致(图 7)。

3 结论与讨论

CRISPR 系统的发现可以追溯到 1987 年,但是 CRISPR -

中选择含 20 个碱基的靶点,并在全基因组中扫描潜在的脱靶位点和脱靶效率,经过综合评价,将靶点按照得分高低排列,选择最合适的靶点。CRISPR Design 网站提供脱靶位点相关信息,而 E-Crispr 网站不提供具体的脱靶数据。通常 1 个目标基因至少选择 2 个不同靶点。本研究以巨桉细胞分裂素氧化酶基因 *CKY* 基因为目标基因,分别选择 2 个不同靶点,可实现 1 个基因 2 个位点的大片段敲除。Gao 等创造性地将 2 个 gRNA 对同一个基因进行大片段切除,使得对基因编辑事件的检测只需要进行简单的 PCR 分析^[10],极大地减少了工作量,提高了效率。

这种同一基因选取 2 个目标位点经 Cas9 酶切,造成突变后可得到大片段缺失突变,在后续突变后代检测时,在突变基因 2 个 target 位点上、下游设计 2 条引物进行 PCR 扩增,野生型是得到 1 条大带,目的基因没有缺失;纯合突变的电泳结果是只有 1 条小带,目的基因因中间有大片段缺失,以此为模板扩增得到的片段比野生型要小;对于二倍体生物,如果 2 条同

源染色体中的 1 对等位基因只有 1 条被 Cas9 酶成功切割,另外一条没有发生切割,则会出现 2 条带,说明 2 个等位基因只有 1 个突变成功,用该基因组作为模板可扩增得到 2 条大小不同的条带。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^[11]。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^[12-15]。

桉树是南方重要的工业用材林树种,具有良好的经济及生态社会效益。近些年,随着桉树再生及转化体系的高效建立以及基因工程技术的成功应用,为定向改良基因组成、研究相关基因功能奠定了基础^[16-18]。应用高效的基因组定向编辑的 CRISPR/Cas9 技术体系,不用引入外源基因,不存在转基因争议,生物安全性高,为桉树材质改良、抗性育种提供了一种具有广阔应用前景的技术体系^[19-20]。本研究基于已测序的巨桉基因转录组数据分析,以巨桉分裂素氧化酶基因 CKX 为研究对象,借助基因编辑工具 CRISPR/Cas9 系统,成功构建了重组敲除载体 PHDE-CKX-35S-cas9,为首次开展 CRISPR/Cas9 编辑系统对桉树基因组定向编辑奠定基础。与其他构建多重 sgRNA 载体的方法相比,采用同源重组的方法直接将 PCR 扩增到的插入片段与载体相连,且 PCR 产物也无须经专门的回收试剂盒进行回收,只需将切胶回收的条带放入 -20 ℃ 冰箱冷冻 20 min 左右,15 000 r/min 离心 10 min 后可直接取上清液与载体连接,整个过程只需连接 1 h,一次构建成功的概率达到 100%,因此,本研究这种构建大片段敲除目标基因的 CRISPR/Cas9 载体构建方法具有快速、高效等优点。

参考文献:

- [1] Cong L, Ran F A, Cox D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems[J]. Science, 2013, 339(6121): 819-823.
- [2] Feng Z, Mao Y, Xu N, et al. Multigeneration analysis reveals the inheritance, specificity, and patterns of CRISPR/Cas-induced gene modifications in *Arabidopsis* [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2014, 111(12): 4357-4358.
- [3] Zong Y, Wang Y, Li C, et al. Precise base editing in rice, wheat and maize with a Cas9-cytidine deaminase fusion [J]. Nature Biotechnology, 2017, 35(5): 438-440.
- [4] Mao Y F, Botella J R, Zhu J K. Heritability of targeted gene modifications induced by plant-optimized CRISPR systems [J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2017, 74(6): 1075-1093.
- [5] Moreno-Mateos M A, Vejnar C E, Beaudoin J D, et al. CRISPRscan: designing highly efficient sgRNAs for CRISPR-Cas9 targeting *in vivo* [J]. Nature Methods, 2015, 12(10): 982-988.
- [6] Laughery M F, Hunter T, Brown A, et al. New vectors for simple and streamlined CRISPR-Cas9 genome editing in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Yeast, 2015, 32(12): 711-720.
- [7] Feng Z, Zhang B, Ding W, et al. Efficient genome editing in plants using a CRISPR/Cas system [J]. Cell Research, 2013, 23(10): 1229-1232.
- [8] 刘丁源, 邱婷, 丁晓辉, 等. 快速构建多重 sgRNA 载体利用 CRISPR/Cas9 技术敲除拟南芥 *IAA2* 基因 [J]. 遗传, 2016, 38(8): 756-764.
- [9] Wang H Y, Yang H, Shivalila C S, et al. One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering [J]. Cell, 2013, 153(4): 910-918.
- [10] Gao X, Chen J, Dai X, et al. An effective strategy for reliably isolating heritable and Cas9-free *Arabidopsis* mutants generated by CRISPR/Cas9-mediated genome editing [J]. Plant Physiology, 2016, 171(3): 1794-1800.
- [11] Xing H L, Dong L, Wang Z P, et al. A CRISPR/Cas9 toolkit for multiplex genome editing in plants [J]. BMC Plant Biology, 2014, 14: 327.
- [12] Zhang Z J, Mao Y F, Ha S, et al. A multiplex CRISPR/Cas9 platform for fast and efficient editing of multiple genes in *Arabidopsis* [J]. Plant Cell Reports, 2016, 35(7): 1519-1533.
- [13] Doudna J A, Charpentier E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9 [J]. Science, 2014, 346(6213): 1258-1296.
- [14] Zhang C, Meng X H, Wei X L, et al. Highly efficient CRISPR mutagenesis by microhomology-mediated end joining in *Aspergillus fumigatus* [J]. Fungal Genetics and Biology, 2016, 86: 47-57.
- [15] Doudna J A, Charpentier E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9 [J]. Science, 2014, 346(6213): 1258096.
- [16] Ouyang L J, Li L M. Effects of an inducible *aiiA* gene on disease resistance in *Eucalyptus urophylla* × *Eucalyptus grandis* [J]. Transgenic Research, 2016, 25(4): 441-452.
- [17] 沙月娥, 欧阳乐军, 彭舒, 等. 桉树胚状体再生与遗传转化的研究进展 [J]. 植物生理学报, 2012, 48(4): 325-332.
- [18] 杨民胜, 吴志华, 张维耀. 我国环北部湾地区发展桉树的思考 [J]. 世界林业研究, 2016, 29(6): 64-69.
- [19] Gaj T, Gersbach C A, Barbas C F. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering [J]. Trends in Biotechnology, 2013, 31(7): 397-405.
- [20] Barrangou R. Cas9 targeting and the CRISPR revolution [J]. Science, 2014, 344(6185): 707-708.