

李 鹏. 利用 CRISPR/Cas9 系统编辑拟南芥 *ILR3* 基因及功能验证[J]. 江苏农业科学, 2020, 48(14): 78–82.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.14.012

利用 CRISPR/Cas9 系统编辑拟南芥 *ILR3* 基因及功能验证

李 鹏

(上海辰山植物园/中国科学院上海辰山植物科学研究中心, 上海 201602)

摘要:拟南芥转录因子 *ILR3* (IAA – Leucine Resistant 3) 在铁稳态的调节、葡萄糖异硫氰酸盐 (glucosinolate, 简称 GLS) 的生物合成和病原体响应方面起到重要作用。为更深入探索该转录因子在植物体内的更多功能, 利用 *YAO* 基因启动子驱动 *Cas9* 在拟南芥中表达, 成功获得 *ILR3* 基因编辑突变体。测序结果及序列分析结果表明, 在 *ILR3* 编辑拟南芥中, 该基因编码区发生了碱基缺失或插入, 导致蛋白 *ILR3* 保守结构域丢失。并且, 这些基因编辑突变体 T2 代幼苗与 T – DNA 插入突变体 *ilr3-2* 在缺铁环境下表现出相同的性状, 进一步验证 *ILR3* 转录因子在植物对铁的吸收及体内平衡的作用, 也为深入研究其更多生物学功能奠定了工作基础。

关键词:拟南芥; *AtILR3*; *YAO* 启动子; CRISPR/Cas9; 基因编辑

中图分类号: Q784 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2020)14-0078-05

CRISPR/Cas9 (clustered regularly interspersed short palindromic repeats / CRISPR – associated protein 9) 系统已被用于基因组编辑, 具有很高的准确性, 并能高效完成真核基因组中基因敲除 (knockout/knockin) 和点突变^[1], 在人类细胞^[2-3]、植物^[4]、动物^[5]、微生物^[6] 中均得到了很好的应用, 并取得了举世瞩目的成果。*YAO* 参与拟南芥的胚胎发生及配子发育, 主要表达于分裂能力强的组织中^[7]; 中科院遗传与发育生物学研究所谢旗研究组通过 *YAO* 基因启动子驱动 *Cas9*, 极大地提高 CRISPR/Cas9 编辑拟南芥基因组的效率^[8]。

AtbHLH105/AtILR3 (IAA – Leucine Resistant 3) 基因属于拟南芥 bHLH 家族 IV c 亚家族^[9], 所编码的蛋白可与其他诸多蛋白协同作用, 共同参与植物铁稳态的调节^[10-11]。

笔者所在课题组在长期的研究中发现, *ILR3* 在植物生长发育过程中发挥更多的生物学功能。因此, 本研究首次利用 *YAO* 基因启动子驱动的 *Cas9* 编辑拟南芥 *ILR3* 基因, 所获得的基因编辑株系发生碱基插入和缺失, 与 T – DNA 插入突变体 *ilr3-2* 在缺铁处理时具有相同的表型, 与文献报道结果一致, 为研究

ILR3 在生物体中的更多功能, 奠定工作基础。

1 材料与方法

1.1 材料

本试验所用拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 野生型为 *Col-0*, 突变体 *ilr3-2* (Salk_004997C) 购买自网站 <https://www.arabidopsis.org/>, 二元表达载体 pYAO – Cas9 – SK 由中国科学院遗传与发育生物学研究所谢旗研究组馈赠, 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 和根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) EHA105 由笔者所在实验室保存。限制性内切酶 *Bam*H I 购自 NEB (北京) 公司, 质粒提取和胶回收试剂盒购自天根生化科技 (北京) 有限公司, T 载体、DNA 连接试剂盒、Taq DNA 聚合酶购自宝日生物技术 (北京) 有限公司, 其他生化试剂及引物购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司。

1.2 拟南芥 *AtILR3* 编辑靶位点的确定

将拟南芥 *AtILR3* 基因 (At5g54680) 提交 NCBI 检索, 获得其基因序列及外显子序列信息, 在外显子区域寻找 PAM (protospacer adjacent motif) 位点为 “NGG” 的 23 bp 序列, 且该序列最好带有酶切位点, 并通过拟南芥 bHLH 家族各成员同源序列比对验证该靶位点的特异性。针对筛选到的靶位点, 在序列 5' 端添加 *Bsa* I 限制性内切酶的黏性末端接头 TGATT 和 AAAC, 分别设计引物 P1 – F 和 P1 – R (表 1)。

收稿日期: 2019-08-01

基金项目: 上海市青年科技英才扬帆计划 (编号: 19YF1414800)。

作者简介: 李 鹏 (1983—), 男, 安徽濉溪人, 硕士, 工程师, 主要从事植物抗逆性研究。E-mail: penglee98@163.com。

表 1 引物名称及序列

引物名称	序列(5'→3')
P1 - F	GATTGAGAACCTGGATCCAAAAG
P1 - R	AAACCTTTTGGATCCAGGTTCTC
P2 - F	TGTTACTTGATTCGGGAATTG
P2 - R	CGCTGCTTCTCTCTACATGC
HygR - F	CTATTTCTTTGCCCTCGGACGAGTG
HygR - R	ATGAAAAAGCCTGAACTACCGCGA
LP	GAATTCAGTAAATGCCCCTGA
RP	TGCTAAGGTCAAACCATCCACT
LbB1.3	GATTTTGCCGATTTTCGGAACC

1.3 gRNA 的合成及与载体的连接

将 10 $\mu\text{mol/L}$ 的 P1 - F 和 P1 - R 各取 1 μL , 加入到 8 μL 退火缓冲液 (TE + 50 mmol/L NaCl) 中, 混匀后在 PCR 仪中退火: 从 95 $^{\circ}\text{C}$ 缓慢降温至 16 $^{\circ}\text{C}$, 速率为 0.1 $^{\circ}\text{C/s}$; 取 1 μL 退火产物, 与用 *Bsa* I 酶切过的载体 pYAO - Cas9 - SK 进行连接, 体系如下: 1 μL 退火产物, 1 μL 载体, 1 μL 10 \times T₄ 缓冲液, 0.5 μL T₄ 连接酶, 加 ddH₂O 至 10 μL , 连接条件为 25 $^{\circ}\text{C}$ 反应 2 h。采用热激法转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 经筛选鉴定后测序。将测序正确质粒导入农杆菌感受态 EHA105。

1.4 拟南芥遗传转化及基因编辑植株的获得

采用浸花法对拟南芥进行转化^[12], 收集转化后的 T0 代种子, 干燥后, 75% 乙醇消毒 1 min, 10% 次氯酸钠消毒 10 min, 无菌水漂洗 5 次, 均与播种于含潮霉素 25 mg/L 的 1/2MS 表面进行抗性筛选, 培养条件为 22 $^{\circ}\text{C}$, 16 h 光照, 8 h 黑暗。

2 周后, 选取有潮霉素抗性的拟南芥幼苗, 移栽至土壤基质中生长, 同时摘取 1 张叶片, 采用改良的 CTAB 法提取基因组 DNA, 并以此 DNA 为模板, 以潮霉素抗性基因序列设计引物 HygR - F、HygR - R (表 1), 进行 PCR 鉴定。PCR 体系: 在 20 μL 反应体系中, *Taq* DNA 聚合酶 1.0 U, dNTP 各 0.25 $\mu\text{mol/L}$, 引物 0.5 $\mu\text{mol/L}$, 100 ng 模板 DNA。PCR 反应程序: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1.5 min, 循环 30 次; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。1% 琼脂糖凝胶电泳后检测, 能完整扩增出潮霉素抗性基因的个体为转基因拟南芥阳性植株。T1、T2 代拟南芥阳性植株采用相同方法鉴定。

根据基因 *AtILR3* 序列, 在靶位点上下游 200 ~ 300 bp 处设计引物 P2 - F、P2 - R (表 1、图 1), 以 T2

代转基因拟南芥阳性植株的基因组 DNA 为模板, 再次进行 PCR, 反应体系与程序与上述相同, 扩增产物为含靶位点的 562 bp 的片段。电泳后, 回收目的片段, 取其中一部分进行限制性内切酶处理。将未被切开的 PCR 片段克隆到 T 载体, 转化至大肠杆菌中, 并对插入片段进行菌落 PCR, 阳性克隆进行质粒提取并测序。

1.5 *AtILR3* 编辑拟南芥的表型分析

将拟南芥野生型、*ilr3* - 2 突变体及获得的 4 个株系的 *ILR3* 编辑拟南芥 T1 代幼苗, 播种于 1/2MS、1/2MS - Fe 和 1/2MS - Fe + 50 $\mu\text{mol/L}$ 菲洛嗪 (ferrozine, Frz) 培养基, 2 周后, 拍照并统计最长根长度。

采用三引物法^[13]对 *ilr3* - 2 突变体进行鉴定, 引物 LP、RP 和 LbB1.3 位点及序列见图 1 和表 1。

2 结果与分析

2.1 *AtILR3* 编辑靶位点的筛选及载体构建

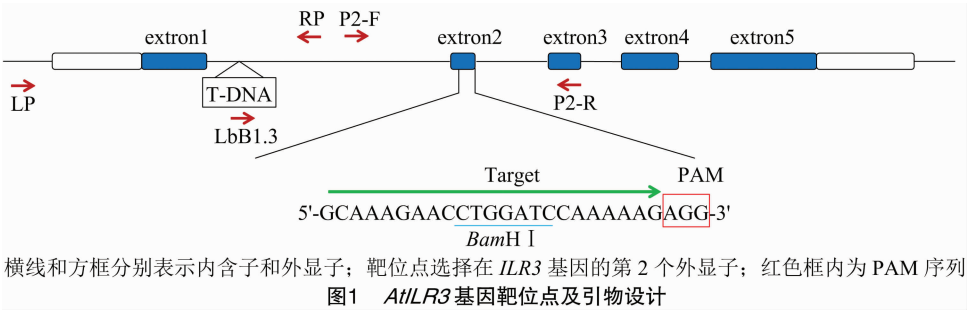
序列分析结果表明, *AtILR3* 基因包 5 个外显子, 4 个内含子, 编码区全长 705 bp, 根据 CRISPR/Cas9 设计原理, 选择其第 2 个外显子上的特异序列为编辑靶序列 (图 1), 并且该靶位点 PAM 序列前 6 bp 包含 1 个 *Bam*H I 限制性内切酶位点 (GGATCC), 方便检测。

根据靶位点序列合成靶点接头引物 P1 - F 和 P1 - R, 退火形成靶点接头后克隆到 CRISPR/Cas9 载体 pYAO - Cas9 - SK^[8], 测序后将正确质粒导入农杆菌感受态 EHA105。

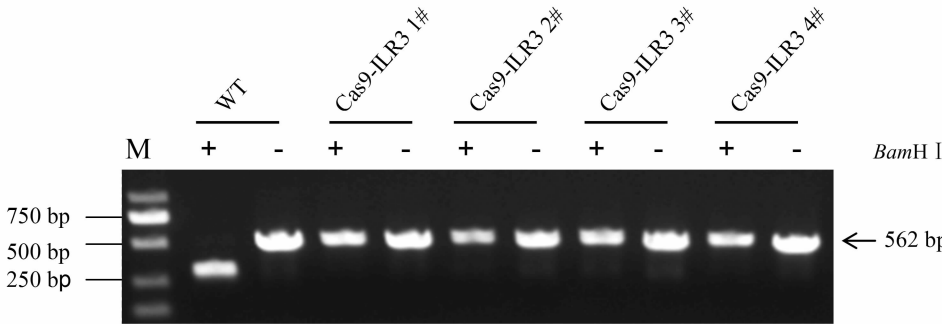
2.2 拟南芥基因编辑植株的获得及鉴定

利用引物 HygR - F、HygR - R 做 PCR 鉴定得到转基因阳性苗; 利用 P2 - F、P2 - R 为引物, 阳性苗基因组 DNA 为模板, 扩增出含靶位点的 DNA 片段; 回收此片段, 用 *Bam*H I 酶切鉴定电泳后, 获得 4 株 *ILR3* 基因编辑拟南芥幼苗。如图 2 - A 所示, 野生型的片段被 *Bam*H I 识别, 并完全切断为 2 个长度分别为 276、286 bp 的片段 (由于 2 个片段大小过于接近, 电泳结果只看到 1 条带), 而突变片段的扩增产物则无法被识别和切割。

将未消化的 PCR 片段克隆到 T 载体中, 转化大肠杆菌, 并将插入片段进行菌落 PCR, 阳性单菌落培养过夜后提取质粒进行测序。结果表明, 在靶点位置发生不同类型的编辑, 在 PAM 序列前 3 ~ 7 bp 分别产生了插入和缺失突变, 其中缺失突变占多数



(A)



(B)

	WT	GCAAAGAACCTGGATC-CAAAAAGAGG	
Cas9-ILR3 1#	GCAAAGAACCTGG	----- AAGAGG	-7
Cas9-ILR3 2#	GCAAAGAACCTGGAT	--- AAAAAGAGG	-2
Cas9-ILR3 3#	GCAAAGAACC	----- AAGAGG	-11
Cas9-ILR3 4#	GCAAAGAACCTGGATCTCAAAAAGAGG		+1

A—PCR/RE 检测*AtILR3* 突变, 箭头指示为突变条带, 562 bp, PCR 产物使用 *Bam*H I 酶切(+)或不进行酶切(-); B—突变序列 DNA 测序, 第1行为野生型, 红色框表示 PAM 序列, 红色表示插入, “-”表示删除

图2 T2 代植物基因组编辑的突变检测

(图 2 - B)。

2.3 *AtILR3* 编辑拟南芥的表型

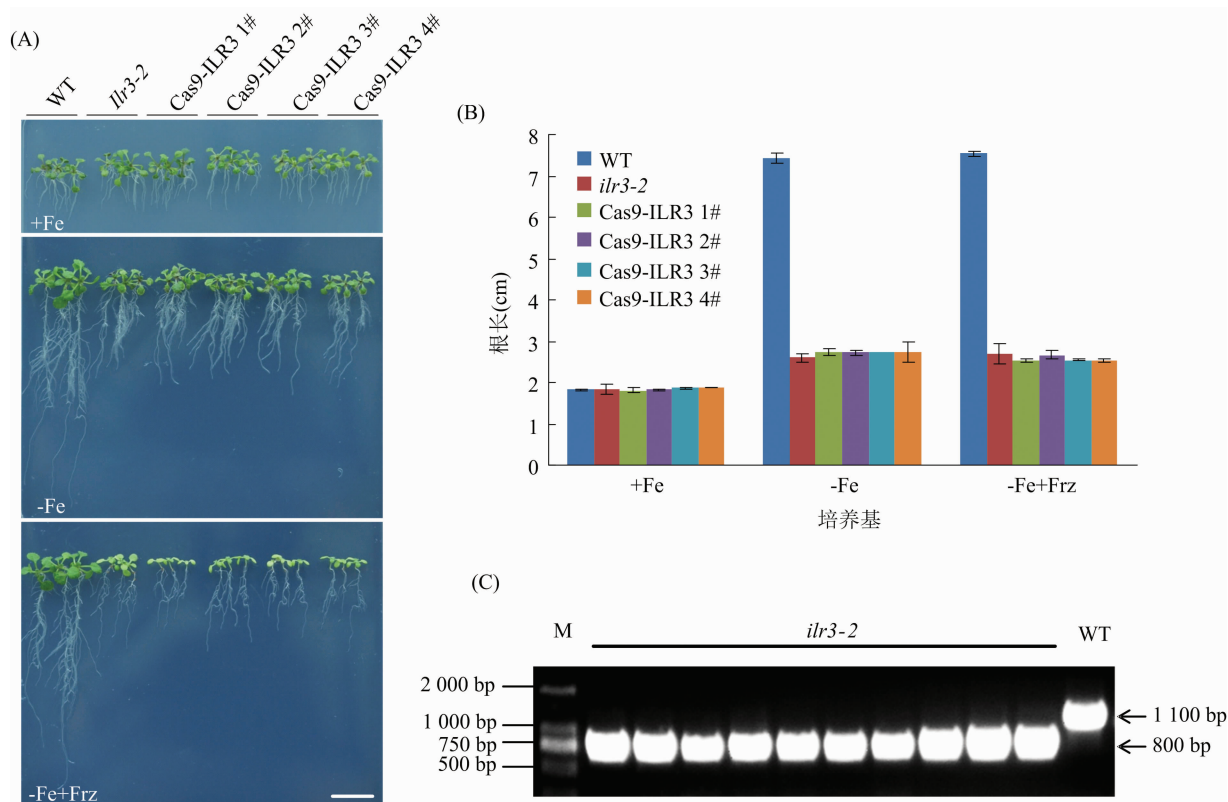
拟南芥 ILR3 蛋白在铁动态平衡的调控过程中发挥着重要作用, 突变体在缺铁环境中出现黄化、发育不良等表型^[10-11]。将野生型、*ilr3-2* 纯合突变体及筛选得到的 4 个基因编辑 T1 代幼苗播种于 1/2MS、1/2MS - Fe 和 1/2MS - Fe + 50 μmol/L Frz 培养基, 2 周后发现, 4 个基因编辑株系的幼苗与 *ilr3-2* 突变体出现相同的表型, 均弱于野生型 (图 3 - A)。数据显示, 在含有铁元素的 1/2 MS 上, 6 个株系的拟南芥生长状况基本无差异; 在缺铁培养基上, 野生型根系明显增长, 由约 1.8 cm 增长到约 7.4 cm, 而突变体 *ilr3-2* 和 4 个基因编辑株系仅增长到约 2.7 cm; Frz 可以螯合培养基中琼脂中的微量铁元素^[14], 在 1/2MS - Fe + 50 μmol/L Frz

的培养基上, 虽然 *ilr3-2* 和基因编辑株系最长根长度影响不大, 但侧根减少, 长势更弱, 而野生型影响较小 (图 3 - B)。

为鉴定 T-DNA 插入突变体 *ilr3-2* 是否为纯合子, 采用三引物法对 10 棵突变体单株和野生型进行 PCR 鉴定。电泳结果 (图 3 - C) 表明, 可以证明所用突变体 *ilr3-2* 为纯合子, 以上表型数据可信。

3 讨论

CRISPR/Cas9 是一种高效且简便的基因定点编辑技术, 该技术具有合成简单、周期短、操作灵活、效率高等优点, 给基因工程带来技术性革命, 在众多植物基因编辑中已经得到了成功应用, 如拟南芥^[15]、水稻^[16]、玉米^[17]、小麦^[18]、大豆^[19]、矮牵牛^[20]、巨桉^[21]等。将这一技术应用于拟南芥的遗



A—野生型、突变体 *ilr3-2* 和基因编辑株系 1#~4# 在含铁 (+Fe)、缺铁 (-Fe) 及缺铁并含 Frz (-Fe+Frz) 的培养基上生长 2 周的表现; Bar=1 cm; B—A 图中植物最长根长度统计, *表示突变体与野生型的根长在 0.05 水平上有显著差异 ($P \leq 0.05$); C—三引物法鉴定突变体 *ilr3-2*, 野生型和纯合子突变体仅能扩增出 1 条带

图3 基因编辑株系表型分析

传转化过程中,多采用农杆菌介导的浸花法来进行,因而囊胚是 T-DNA 的主要靶点^[22]。35S 和泛素启动子常用于驱动 *Cas9* 基因在拟南芥中表达,前者应用得更多。而已有的研究表明,CaMV 35S 启动子在生殖细胞中活性极低,用 CaMV 35S 驱动的 *Cas9* 对拟南芥基因组的编辑效率明显低于水稻,并且绝大多数 T1 植株只是体细胞突变,并不能遗传到 T2^[23-24]。YAO 是一个在细胞分裂旺盛组织优先表达的基因,尤其在胚、胚囊、胚乳以及花粉中有很高的表达量^[7];谢旗研究组用该基因的启动子 *pYAO* 代替 35S 启动子来启动 *Cas9* 的表达,提高了编辑效率并获得生殖系突变,且编辑形式更多^[8]。因此,本研究也利用启动子 *pYAO* 来驱动 *Cas9* 的表达,T0 共获得 4 株基因编辑拟南芥株系。为简化突变检测过程,本研究选择在 PAM 上游存在 *BamH* I 限制性内切酶位点的序列作为靶位点。利用 *BamH* I 进行突变检测和测序的结果显示,4 个株系中有 3 个为缺失突变,1 个为插入突变,突变位点位于 PAM 上游 3~7 bp 处。由于本试验中只有不被 *BamH* I 消化的 PCR 产物才会被收集鉴定,因

此,存在虽然发生突变,但突变位点不在 *BamH* I 内切酶位点的可能,这样的突变将不会被检测到。因此本试验所检测到的各突变类型的比例可能比真实的突变类型偏小,试验设计还有待进一步完善。

拟南芥 *bHLH* 家族 IV c 亚家族成员 *bHLH34/104/105/115* 是铁稳态调节的主要因子,其中 *bHLH105* (ILR3) 可与 *PYE*^[25]、*BTS*^[25-27]、*bHLH34*^[28]、*bHLH104*^[10]、*bHLH115*^[29] 等蛋白协同作用,调控铁吸收、转运相关下游基因 *FIT*、*ZIF1*、*NAS4*、*FRO2/IRT1*、*bHLH38/39/100/101*、*MYB10/72*^[28] 的表达;ILR3 还和 *PYE* 共同参与植物缺铁胁迫下葡萄糖异硫氰酸盐 (glucosinolate, 简称 GLS) 积累的调控网络^[11]。由此可知,ILR3 基因在植物生长发育、抵御胁迫过程中发挥着重要作用。ILR3 的 T-DNA 插入突变体 *ilr3-2* 已广泛应用在该基因功能的研究中。本研究发现,ILR3 在生长发育过程中具有新的功能,所以利用 CRISPR/Cas9 技术对 ILR3 基因进行编辑。为确保突变后的基因完全失去功能,靶位点一般选择在编码区,尤其是靠近 5' 端或处于编码蛋白功能区之前的序列^[30]。因此,本

研究选择对 *ILR3* 基因第 2 个外显子进行编辑,共获得 4 个突变株系,且这些株系在缺铁情况下与 *ilr3-2* 表现出相同的生长状态,与文献报道结果一致,进一步验证了 *ILR3* 在植物生长发育过程中及抗逆性方面所起的重要作用。

参考文献:

- [1] Wu W, Yang Y, Lei H. Progress in the application of CRISPR: from gene to base editing[J]. Medicinal Research Reviews, 2019, 39(2): 665–683.
- [2] Strecker J, Jones S, Koopal B, et al. Engineering of CRISPR – Cas12b for human genome editing[J]. Nature Communications, 2019, 10(1): 212.
- [3] Li T, Zhu L, Xiao B, et al. CRISPR – Cpf1 – mediated genome editing and gene regulation in human cells[J]. Biotechnology Advances, 2019, 37(1): 21–27.
- [4] Das A, Sharma N, Prasad M. CRISPR/Cas9: a novel weapon in the arsenal to combat plant diseases[J]. Frontiers in Plant Science, 2018, 9: 2008.
- [5] Chao T, Liu Z, Zhang Y, et al. Precise and rapid validation of candidate gene by allele specific knockout with CRISPR/Cas9 in wild mice[J]. Frontiers in Genetics, 2019, 10: 124.
- [6] Hidalgo – Cantabrana C, Goh Y J, Barrangou R. Characterization and repurposing of type I and type II CRISPR – Cas systems in bacteria[J]. Journal of Molecular Biology, 2019, 431(1): 21–33.
- [7] Li H J, Liu N Y, Shi D Q, et al. YAO is a nucleolar WD40 – repeat protein critical for embryogenesis and gametogenesis in *Arabidopsis* [J]. BMC Plant Biology, 2010, 10(1): 169.
- [8] Yan L, Wei S, Wu Y, et al. High – efficiency genome editing in *Arabidopsis* using YAO promoter – driven CRISPR/Cas9 system[J]. Molecular Plant, 2015, 8(12): 1820–1823.
- [9] Rampey R A, Woodward A W, Hobbs B N, et al. An *Arabidopsis* basic helix – loop – helix leucine zipper protein modulates metal homeostasis and auxin conjugate responsiveness[J]. Genetics, 2006, 174(4): 1841–1857.
- [10] Zhang J, Liu B, Li M, et al. The bHLH transcription factor bHLH104 interacts with IAA – LEUCINE RESISTANT3 and modulates iron homeostasis in *Arabidopsis* [J]. Plant Cell, 2015, 27(3): 787–805.
- [11] Samira R, Li B, Kliebenstein D, et al. The bHLH transcription factor ILR3 modulates multiple stress responses in *Arabidopsis* [J]. Plant Molecular Biology, 2018, 97(4/5): 297–309.
- [12] Davis A M, Hall A, Millar A J, et al. Protocol: streamlined sub – protocols for floral – dip transformation and selection of transformants in *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant Methods, 2009, 5: 3.
- [13] 李 敏, 杨 双, 阮燕晔, 等. 拟南芥 T – DNA 插入突变体 *atsuo3* 的 PCR 鉴定[J]. 植物生理学通讯, 2006, 42(1): 91–94.
- [14] Berker K I, Ozyurt D, Demirata B, et al. Solid – phase extraction spectrophotometric determination of total antioxidant capacity in antioxidant – poor samples by using the ferric – ferrozine method [J]. Analytical Sciences, 2017, 33(6): 683–689.
- [15] Yu Z, Chen Q, Chen W, et al. Multigene editing via CRISPR/Cas9 guided by a single – sgRNA seed in *Arabidopsis* [J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2018, 60(5): 376–381.
- [16] Toda E, Koiso N, Takebayashi A, et al. An efficient DNA – and selectable – marker – free genome – editing system using zygotes in rice[J]. Nature Plants, 2019, 5(4): 363–368.
- [17] Wang B, Zhu L, Zhao B, et al. Development of a haploid – inducer mediated genome editing system for accelerating maize breeding [J]. Molecular Plant, 2019, 12(4): 597–602.
- [18] Liang Z, Chen K, Li T, et al. Efficient DNA – free genome editing of bread wheat using CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein complexes[J]. Nature Communications, 2017, 8: 14261.
- [19] Li C, Nguyen V, Liu J, et al. Mutagenesis of seed storage protein genes in soybean using CRISPR/Cas9[J]. BMC Research Notes, 2019, 12(1): 176.
- [20] Sun L, Williams J S, Li S, et al. S – locus F – box proteins are solely responsible for S – RNase – based self – incompatibility of *Petunia pollen* [J]. Plant Cell, 2018, 30(12): 2959–2972.
- [21] 李莉梅, 欧阳乐军, 尹爱国, 等. 1 种大片段敲除巨核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.
- [22] Ye G N, Stone D, Pang S Z, et al. *Arabidopsis* ovule is the target for *Agrobacterium* in planta vacuum infiltration transformation [J]. Plant Journal, 1999, 19(3): 249–257.
- [23] 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.
- [24] Ma X, Zhang Q, Zhu Q, et al. A robust CRISPR/Cas9 system for convenient, high – efficiency multiplex genome editing in monocot and dicot plants[J]. Molecular Plant, 2015, 8(8): 1274–1284.
- [25] Long T A, Tsukagoshi H, Busch W, et al. The bHLH transcription factor POPEYE regulates response to iron deficiency in *Arabidopsis* roots[J]. Plant Cell, 2010, 22(7): 2219–2236.
- [26] Selote D, Samira R, Matthiadis A, et al. Iron – binding E3 ligase mediates iron response in plants by targeting basic helix – loop – helix transcription factors [J]. Plant Physiology, 2015, 167(1): 273–286.
- [27] Hindt M N, Akmakjian G Z, Pivarski K L, et al. *BRUTUS* and its paralogs, *BTS LIKE1* and *BTS LIKE2*, encode important negative regulators of the iron deficiency response in *Arabidopsis thaliana* [J]. Metallomics, 2017, 9(7): 876–890.
- [28] Li X, Zhang H, Ai Q, et al. Two bHLH transcription factors, bHLH34 and bHLH104, regulate iron homeostasis in *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant Physiology, 2016, 170(4): 2478–2493.
- [29] Liang G, Zhang H, Li X, et al. bHLH transcription factor bHLH115 regulates iron homeostasis in *Arabidopsis thaliana* [J]. Journal of Experimental Botany, 2017, 68(7): 1743–1755.
- [30] 孙勤富, 刘东晓, 林 俐, 等. 甘蓝型油菜和甘蓝 CRISPR/Cas9 编辑效果的快速检测[J]. 中国油料作物学报, 2018, 40(6): 737–744.