

李星坤,潘慧,李攀,等. 基于 CRISPR/Cas9 系统的拟南芥 *ugt84a1/ugt84a2* 双突变体制作及突变位点分析[J]. 江苏农业科学,2020,48(20):49-55.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.20.008

基于 CRISPR/Cas9 系统的拟南芥 *ugt84a1/ugt84a2* 双突变体制作及突变位点分析

李星坤¹,潘慧¹,李攀²,王振¹,刘林¹,张桂芝¹

(1. 临沂大学药学院,山东临沂 276000; 2. 聊城大学药学院,山东聊城 252000)

摘要:CRISPR/Cas9 基因编辑技术相对于锌指核酸酶(ZFNs)和转录激活因子效应物核酸酶(TALENs)而言,具有操作简便、突变效率高等优点,已经被广泛应用于医学、动物科学、植物科学等领域。拟南芥糖基转移酶 UGT84A1、UGT84A2 参与植物次生代谢及外源毒物反应,并且为同工酶。本研究以拟南芥糖基转移酶同工酶基因 *UGT84A1* 和 *UGT84A2* 为靶向基因,构建 CRISPR/Cas9 双突变体表达载体,并转化到农杆菌浸染拟南芥,从而同时定向敲除靶向基因。根据拟南芥转基因后代的测序结果,对获得的 42 株阳性转化植株进行突变位点分析,结果表明,有 2 株阳性植株发生双突变,由此成功构建了 *ugt84a1/ugt84a2* 双突变体。试验结果可为加快 *ugt84a1/ugt84a2* 功能基因资源的开发利用提供有力的理论与方法支持。

关键词:拟南芥;双突变体;CRISPR/Cas9;基因敲除;位点分析

中图分类号:S184 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2020)20-0049-07

植物体内小分子的糖基化修饰是一种普遍存在的生理现象,并且是植物细胞维持体内代谢平衡的主要机制之一^[1-2]。研究表明,糖基化修饰参与调节植物生长发育的各个方面。植物中最早被鉴定的糖基转移酶基因是诺贝尔奖获得者 McClintoc 于 1997 年发现的控制玉米种子黑色素沉积的 *Bronze1* 基因,后证实该基因编码产生黄酮糖苷的糖基转移酶。Fraissinet-Tachet 等研究番茄的防御机制时发现,糖基转移酶基因 *Twil* 的表达能够使植株对病原菌感染做出快速应答^[3]。Jackson 等通过对拟南芥中糖基转移酶 UGT84B1 的研究,发现其对生长素吲哚乙酸有活性,过表达后植物莲座叶数目增加^[4]。Tognetti 等鉴定了拟南芥生长素糖基转移酶 UGT74E2,研究其过表达体表型发现 UGT74E2 参与调节植物的形态建成和干旱、盐胁迫的应答^[5]。Wang 等研究表明,UGT87A2 参与调控拟南芥开花

途径进而影响开花时间^[6],这些研究表明,糖基化修饰参与植物生长发育的诸多方面。

而针对同一小分子的糖基化修饰,往往需要几个不同的糖基转移酶基因。例如,在拟南芥糖基化修饰研究中,Hou 等通过离体生物化学分析发现,拟南芥细胞分裂素糖基转移酶是由 5 个不同的成员组成,包括催化细胞分裂素 *N*-糖基化的糖基转移酶 UGT76C1 和 UGT76C2,以及催化细胞分裂素 *O*-糖基化的糖基转移酶 UGT85A1、UGT73C5 和 UGT73C1^[7]。Poppenberger 等在拟南芥中发现,UGT73C5 可以催化油菜素内酯形成 23-*O*-油菜素内酯糖苷物^[8],随后他们又发现 UGT73C6 同样能够糖基化修饰油菜素内酯^[9]。此外,拟南芥中已证明的生长素 IAA 的糖基转移酶包括 UGT84B1 和 UGT74D1 这 2 个成员^[10-11],而水杨酸糖基转移酶包括 UGT74F1 和 UGT74F2 这 2 个成员^[12]。在玉米糖基化修饰研究中,同样发现针对同一激素存在多个糖基化修饰的同工酶。例如,玉米中细胞分裂素包括 *cis*-ZOG1 和 *cis*-ZOGT2 这 2 个成员^[13-14]。在水稻中,细胞分裂素糖基转移酶则包括 *c*ZOGT1、*c*ZOGT2、*c*ZOGT3 这 3 个成员^[15]。这些同工酶的存在也导致了基因的功能冗余,单单敲除某个基因往往不会使植株出现明显表型。

收稿日期:2020-06-18

基金项目:国家自然科学基金(编号:31700238);山东省自然科学基金(编号:ZR2017PC007)。

作者简介:李星坤(1996—),男,山东潍坊人,主要研究方向为植物小分子糖基化修饰。E-mail:sdwflxk111@163.com。

通信作者:张桂芝,博士,教授,主要从事植物分子遗传学研究。E-mail:guizhizhang11@163.com。

体外试验表明,拟南芥糖基转移酶 UGT84A1、UGT84A2 都能够作用于外源毒物 2,4,5-三氯苯酚^[16],Meißner 等通过体外试验证明拟南芥糖基转移酶 UGT84A1、UGT84A2 同时对羟基肉桂酸具有活性^[17],表明拟南芥糖基转移酶 UGT84A1、UGT84A2 与植物脱毒反应及植物的次生代谢有关,并且为同工酶。目前对拟南芥糖基转移酶 *ugt84a1*、*ugt84a2* 仅仅停留在单突变体植株的研究,但是随着基因编辑技术的飞速发展以及生物信息学的广泛应用,对拟南芥糖基转移酶 *ugt84a1/ugt84a2* 双突变体的构建已经成为今后科研工作者所必须的工作。锌指核酸酶(zinc-finger nucleases,ZFN)技术^[18]、类转录激活因子效应核酸(transcription activator-like effector nucleases,TALEN)技术^[19]以及全新的人工核酸酶 CRISPR/Cas9(clustered regulatory interspaced short plindromic repeat/Cas9)系统^[20]是目前被广泛应用的三大基因编辑技术。其中 CRISPR/Cas9 系统由于制作成本低、操作简便,只需合成目标基因的 sgRNA 靶向序列就能实现对基因特定位点进行特异性编辑,因此更广泛地运用于分子生物学试验中,这一技术短短几年就广泛应用于世界各地各个领域的分子实验。

本研究是利用最新的 CRISPR/Cas9 基因编辑技术,同时对拟南芥糖基转移酶 *ugt84a1/ugt84a2* 进行双位点的定向敲除,使糖基转移酶的同工基因同时突变,从而获得 *ugt84a1/ugt84a2* 双位点突变体植株,并详细分析了其突变位点,为验证该糖基转移酶在体内发挥的功能奠定基础,为加快 *ugt84a1/ugt84a2* 功能基因资源的开发利用提供有力的理论与方法支持。

1 材料与方法

1.1 试验材料

野生型拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)及突变体株系种植于临沂大学药学院药用植物实验室植物培养室,温度(22±2)℃,光照度 100 μmol/(m²·s)。CPISPR/Cas9 载体,购于百格基因科技(江苏)有限公司,大肠杆菌 *E. coli* DH5α 感受态细胞、农杆菌 GV3101 感受态细胞、T₄ DNA Ligase 试剂盒、DNA 回收试剂盒、质粒提取试剂盒、Taq 酶、DNA Maker、PCR 耗材等材料与试剂为笔者所在实验室现有保存。gRNA 引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,基因序列由铂尚生物技术(上海)有限公司

测定,试验开展时间为 2018 年 9 月至 2020 年 1 月。

1.2 gRNA 引物设计

从拟南芥信息资源网站(The Arabidopsis Information Resource,TAIR)查找到已公布的拟南芥 *ugt84a1* 和 *ugt84a2* 的基因组序列号分别为 AT4G15480 和 AT3G21560。利用 sgRNA 设计软件分别设计拟南芥 *ugt84a1* 和 *ugt84a2* 的 sgRNA 靶点序列:2 个都按照正向引物 5'-TGATT+正向靶点序列进行序列的合成,按照反向引物 5'-AAAC+反向靶点序列进行序列的合成。

1.3 CPRSPR/Cas9 载体的构建

首先根据 *ugt84a1*、*ugt84a2* 靶点序列制备 Oligo 二聚体(表 1)。加入 Anneal Buffer 18 μL、SG6977-UP(10 μmol/L)1 μL、SG6977-LW(10 μmol/L)1 μL,先在 95℃ 条件下变性 3 min,然后以约 0.2℃/s 缓慢降至 20℃ 进行退火。另一个 Oligo 二聚体同法可得。

将 Oligo 二聚体与 CRISPR/Cas 载体连接。加入 Vector-016B(线性化载体)2 μL、Enzyme Mix 1 μL、Oligo 二聚体 1 μL、ddH₂O 6 μL,在 25℃ 条件下反应 1 h。取 5 μL 上述反应液,加入 20 μL DH5α 感受态细胞,通过 42℃ 热激法转入到 DH5α。转化子通过引物 PUV4-R 和 PUV3-F(表 1)进行菌落 PCR 验证,验证正确的阳性转化子再进行摇菌,提取质粒后送铂尚生物技术(上海)有限公司进行测序。将验证 100% 正确的阳性转化子放于 -80℃ 保存。取 10 μL 验证正确的质粒转入农杆菌 GV3101 感受态细胞中,涂布于含有 50 μg/mL 利福平和 50 μg/mL 卡那霉素的 LB 平板上,28℃ 倒置暗培养 2 d 后备用。

1.4 农杆菌转化拟南芥

挑取含有目的基因质粒的单克隆阳性农杆菌菌体置于离心管中培养。取培养后的菌液 10 μL 接种于 10 mL 含有利福平和卡那霉素的新鲜 LB 液体培养基中,28℃、160 r/min 条件下培养 2~4 d,直到其 $D_{600\text{nm}}$ 值达到 0.8 左右。取该菌液 1 mL 放于离心管中,离心后保留沉淀,用 5% 蔗糖溶液和 Sitwet-77(万分之二加入)的混合液重新悬浮。随后用悬浮液浸染未开放的花序,浸染后的拟南芥用黑色塑料袋覆盖,暗培养 24 h 后移入正常光照下继续培养。为了增加浸染的成功率,每隔 20 min 浸染 1 次,共浸染 3 次,并且 1 周后再次浸染。收集拟南芥成熟种子,先用 70% 乙醇消毒 2 min,迅速用

0.1% 的 HgCl_2 清洗种子 90 s, 最后用无菌水对种子润洗 3 次。处理后的种子用琼脂水溶液均匀铺在含有潮霉素 (HYR) 的 LB 平板上, 4 °C 暗处理 2~3 d 后移入正常光照下继续培养, 将长成绿苗的拟南芥移入浇过营养液的土壤中继续生长, 用于筛选阳性苗。

1.5 拟南芥双突变体的检测

将得到的 42 株 T_1 代植株进行编码, 分别记为 T_{1-1} 、 T_{1-2} 、 T_{1-3} 、 \dots 、 T_{1-40} 、 T_{1-41} 、 T_{1-42} 。剪取拟南芥 T_1 代幼苗叶片 2~3 张, 提取其基因组 DNA, 利用引物 84a1 - F 和 84a1 - R (表 1) 进行 PCR 扩增目的基因, PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶进行初步检测, 初步检测正确后送公司进行测序验证。以野生型拟南芥序列作为对照, 分析该基因片段靶序列是否突变。

将验证好的 84a1 发生突变的拟南芥继续用潮

霉素筛选获得 T_2 代, 提取阳性绿苗基因组 DNA, 首先利用引物 84a1 - F 和 84a1 - R 进行 PCR 扩增, 与 T_1 代的检测结果进行比对, 检测其突变是否已经纯合。将这些 84a1 突变体纯合体再利用引物 84a2 - F 和 84a2 - R (表 1) 进行 PCR 扩增, 用 1% 琼脂糖凝胶进行初步检测后送铂尚生物技术 (上海) 有限公司进行测序验证, 以野生型拟南芥作为对照, 通过序列比对确定其突变基因类型。

将突变的 84a2 但未纯合的拟南芥 T_2 代继续用潮霉素筛选获得 T_3 代, 同上提取其基因组 DNA, 利用 84a1 - F 和 84a1 - R 进行 PCR 扩增获得 *ugt84a1* 目标序列, 利用 84a2 - F 和 84a2 - R 进行 PCR 扩增获得 *ugt84a2* 目标序列, 将 2 种扩增产物送公司进行测序, *ugt84a1*、*ugt84a2* 同时发生突变的株系则为 *ugt84a1/ugt84a2* 双突变体。

表 1 引物

| 引物名称 | 引物序列(5'→3') | 引物说明 |
|-------------|---------------------------|---------------------|
| SG6977 - UP | TGATTGCTCGTTACCTTCGTTACAA | <i>ugt84a1</i> 靶点序列 |
| SG6977 - LW | AAACTTGTAACGAAGTAACGAGCA | |
| SG6978 - UP | TGATTGACGAAGAAGTGGATTAACG | <i>ugt84a2</i> 靶点序列 |
| SG6978 - LW | AAACCGTTAATCCACTTCTTCGTCA | |
| PUV4 - R | TCCCAGTCACGACCTTGATA | CRISPR/Cas 载体鉴定序列 |
| PUV3 - F | AGCTGGCAGCACAGGTTTCCCGACT | |
| 84a1 - F | CTCTTCTCGTCTCGGCAAG | |
| 84a1 - R | GTCGAAAACCCGTGAACCTAG | 84a1 突变体植株鉴定序列 |
| 84a2 - F | ATGGAGCTAGAATCTTCTCC | 84a2 突变体植株鉴定序列 |
| 84a2 - R | AATAGTAATAAGCAGCTAAGC | |

2 结果与分析

2.1 sgRNA 靶点序列的选择

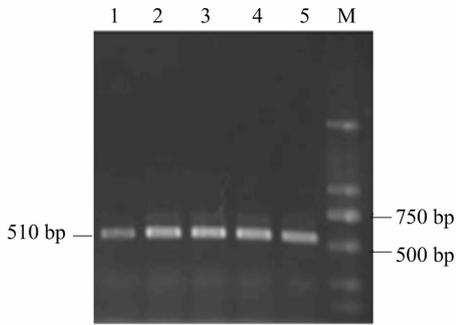
从 TAIR 数据库查找到已公布的拟南芥 *ugt84a1* 和 *ugt84a2* 的基因组序列 (分别为 AT4G15480 和 AT3G21560)。利用 sgRNA 设计软件搜索到可能的拟南芥 sgRNA 序列, 通过进一步筛选最终选定 2 条 sgRNA 序列, 分别为 GCTCGTTACCTTCGTTACAA 和 GACGAAGAAGTGGATTAACG。利用该靶点序列设计引物, 其中拟南芥 *ugt84a1* 靶点序列的引物为 Oligo (5'→3') UP (TGATTGCTCGTTACCTTCGTTACAA) 和 Oligo LW (AAACTTGTAACGAAGTAACGAGCA); 拟南芥 *ugt84a2* 靶点序列的引物为 Oligo UP (TGATTGACGAAGAAGTGGATTAACG) 和 Oligo LW (AAACCGTTAATCCACTTCTTCGTCA)。

2.2 载体的构建及其验证

先将 sgRNA 靶点序列的引物 Oligo 二聚体在 95 °C 条件下变性 3 min, 然后以约 0.2 °C/s 缓慢降至 20 °C 进行退火配对连接。然后与线性化的 CRISPR/Cas 载体在 25 °C 反应 1 h 进行连接。反应结束后首先进行 PCR 验证, *ugt84a1* 阳性转化子的 PCR 条带大小为 510 bp (图 1), *ugt84a2* 阳性转化子的 PCR 条带大小为 470 bp (图 2)。验证条带大小正确的转化子, 提取其质粒进一步送铂尚生物技术 (上海) 有限公司测序验证, 选取测序序列 100% 正确的重组载体转入农杆菌并浸染拟南芥。

2.3 拟南芥双突变体的筛选与检测

2.3.1 *ugt84a1* 突变体植株嵌合体序列分析 携带有重组双突变体载体的农杆菌浸染拟南芥获得 T_0 代植株, 通过潮霉素筛选拟南芥 T_0 代得到 20 株 T_1



M—DL2000 DNA marker; 1~5—PCR 扩增产物。图 2 同
图 1 CRISPR/Cas9-ugt84a1 菌落 PCR 筛选

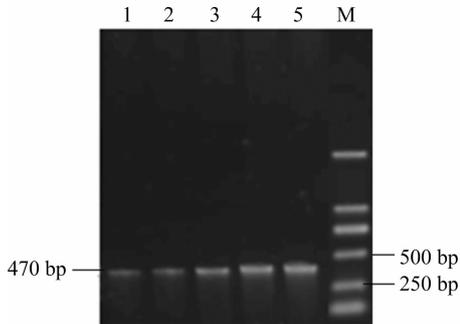
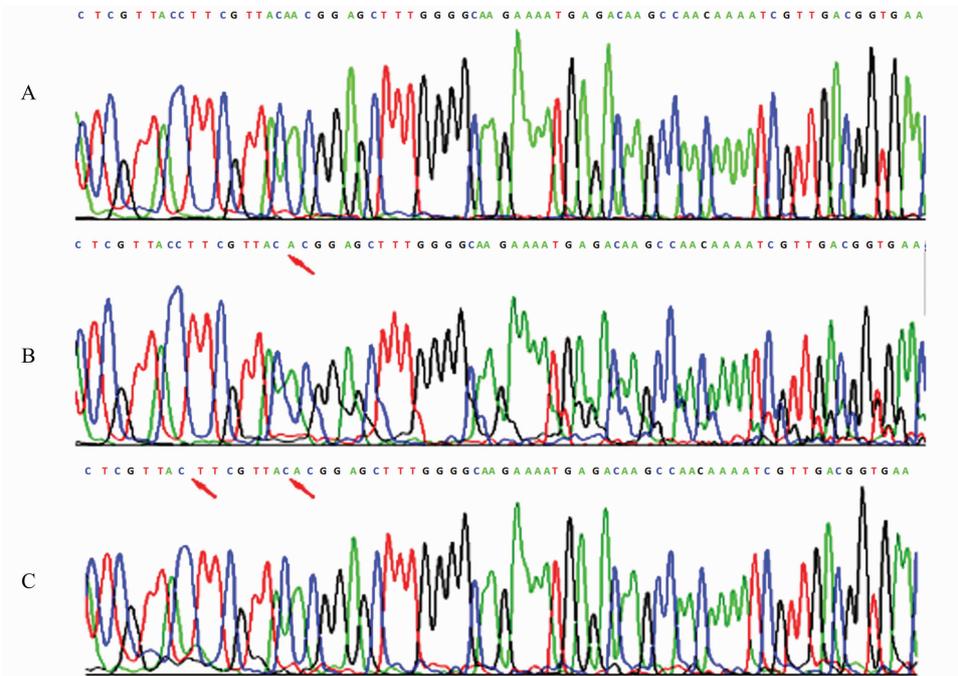


图 2 CRISPR/Cas9-ugt84a2 菌落 PCR 筛选

代阳性苗,分别编号为 T_{1-1} 、 T_{1-2} 、 T_{1-3} 、 \dots 、 T_{1-18} 、 T_{1-19} 、 T_{1-20} 。提取 T_1 代 20 株幼苗基因组 DNA,并利用引物 84a1 - F 和 84a1 - R(表 1)进行 PCR 扩增,扩增产物送铂尚生物技术(上海)有限公司进行测序分析。将测序序列与野生型拟南芥植株序列进行比对,在 20 株阳性转基因植株中有 12 株缺失 A 碱基,引起基因的移码突变;3 株缺失 A、C 2 个碱基,引起基因的移码突变;5 株未发生突变。其中,缺失 A 碱基的 12 株拟南芥突变基因类型相同,缺失 A、C 2 个碱基的 3 株拟南芥突变基因类型相同(图 3),从而得到 *ugt84a1* 突变体植株(表 2),从图 3 可以看出,测序序列中有嵌合峰,表明 T_1 代突变植株为嵌合体。

2.3.2 *ugt84a1* 突变体纯合体筛选 选取 T_1 代已经验证好的 *ugt84a1* 突变体 T_{1-2} 、 T_{1-16} 继续经潮霉素筛选得到 T_2 代植株,每个号选取 8 株,分别编号为 T_{2-2-1} 、 T_{2-2-2} 、 \dots 、 T_{2-2-7} 、 T_{2-2-8} ; T_{2-16-1} 、 T_{2-16-2} 、 \dots 、 T_{2-16-7} 、 T_{2-16-8} 。对这些 T_2 代植株进行基因组 DNA 提取,利用引物 84a1 - F 和 84a1 - R 进行 PCR 扩增,扩增产物送铂尚生物技术(上海)有限



A—野生型测序峰图; B—缺 A 碱基转基因植株的测序峰图; C—缺 A、C 碱基转基因植株的测序峰图

图 3 拟南芥 *ugt84a1* 突变体检测

表 2 *ugt84a1* 突变体植株

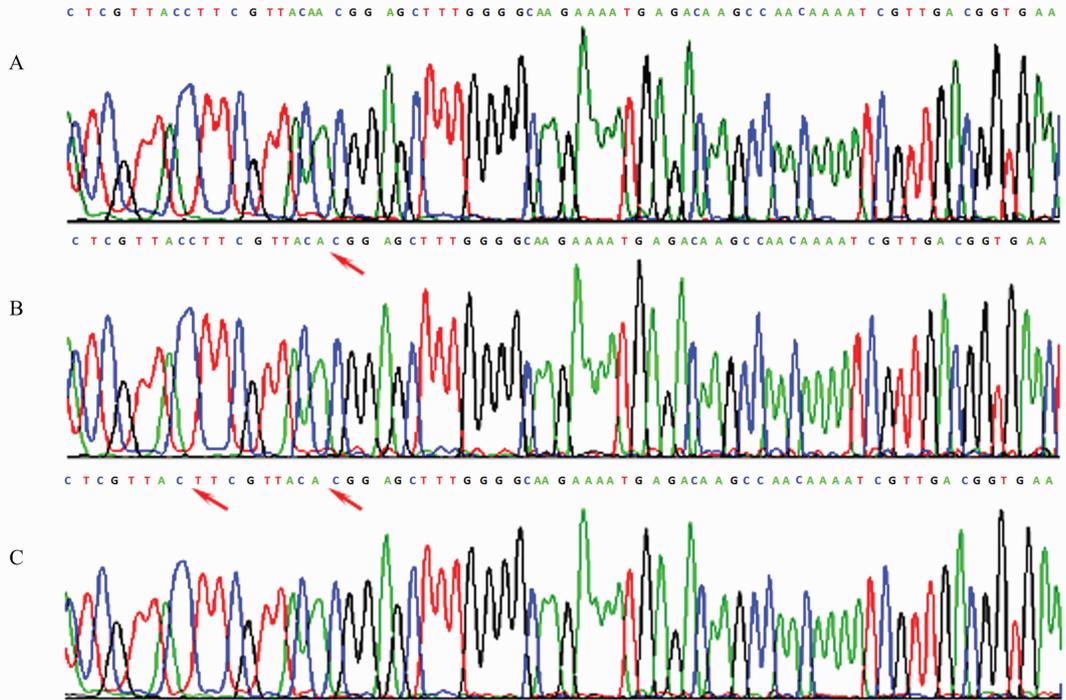
| 拟南芥基因类型 | 基因突变位点 | 对应的植株号 |
|--------------|----------------------------|--|
| 未突变/野生型 | CTCGTTACCTTCGTTACAACGG | T_{1-3} 、 T_{1-17} 、 T_{1-18} 、 T_{1-19} 、 T_{1-20} |
| 缺 A 碱基突变类型 | CTCGTTACCTTCGTTACA * CGG | T_{1-1} 、 T_{1-2} 、 T_{1-4} 、 T_{1-6} 、 T_{1-7} 、 T_{1-8} 、 T_{1-9} 、 T_{1-10} 、 T_{1-11} 、 T_{1-12} 、 T_{1-13} 、 T_{1-14} |
| 缺 A、C 碱基突变类型 | CTCGTTAC * TTCGTTACA * CGG | T_{1-5} 、 T_{1-15} 、 T_{1-16} |

公司进行测序分析。观察并分析测序结果,与 T_1 代 $ugt84a1$ 突变体植株的突变位点进行对比,其中 T_{2-2-1} 、 T_{2-2-5} 、 T_{2-2-6} 的 T_2 代与 T_1 代突变位点一致,缺少 A 碱基; T_{2-16-4} 的 T_2 代与 T_1 代突变位点一

致,缺少 A、C 碱基(表 3),并且为纯合突变体(图 4)。经过 T_1 代与 T_2 代的验证,得到了 $ugt84a1$ 纯合体植株。

表 3 $ugt84a1$ 纯合突变体植株

| 拟南芥基因类型 | 基因突变位点 | 对应的植株号 |
|--------------|----------------------------|---|
| 未突变/野生型 | CTCGTTACCTTCGTTACAACGG | WT |
| 缺 A 碱基突变类型 | CTCGTTACCTTCGTTACA * CGG | T_{2-2-1} 、 T_{2-2-5} 、 T_{2-2-6} |
| 缺 C、A 碱基突变类型 | CTCGTTAC * TTCGTTACA * CGG | T_{2-16-4} |



A—野生型测序峰图; B—缺失 A 碱基阳性转基因植株的测序峰图; C—缺失 C、A 碱基阳性转基因植株的测序峰图

图 4 拟南芥 $ugt84a1$ 纯合突变体检测

2.3.3 $ugt84a1/ugt84a2$ 双突变体筛选 将检测的 $ugt84a1$ 纯合体 T_{2-2-1} 、 T_{2-2-5} 、 T_{2-2-6} 和 T_{2-16-4} 进行 $ugt84a2$ 基因突变检测(图 5)。首先进行基因组 DNA 提取,利用引物 84a2-F 和 84a2-R 进行 PCR 扩增,扩增产物送铂尚生物技术(上海)有限公司进行测序分析。分析测序结果,与野生型植株的 84a2 相应基因位点进行对比,检测结果发现, T_{2-2-1} 、 T_{2-2-5} 、 T_{2-2-6} 缺失 A 碱基, T_{2-16-4} 的 A 碱基突变为 T 碱基,插入 1 个 T 碱基(表 4),由此得到了 2 种不

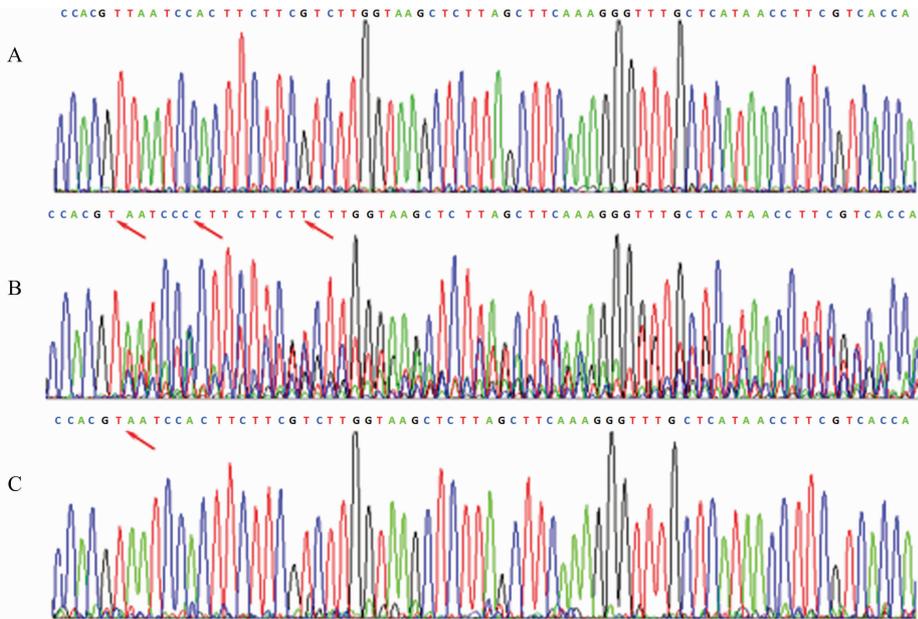
同类型的 $ugt84a1/ugt84a2$ 双突变体,分别为 $ugt84a1/ugt84a2$ T_{2-2-1} ($ugt84a1$ 缺失 A, $ugt84a2$ 缺失 T)、 $ugt84a1/ugt84a2$ T_{2-16-4} ($ugt84a1$ 缺失 C、A, $ugt84a2$ 缺失 T、A 突变为 C、G 突变为 T)。

3 讨论与结论

CRISPR/Cas9 是一种能够对基因组的特定位点进行精确编辑的技术,其原理是核酸内切酶 Cas9 蛋白通过导向性 RNA 识别特定基因组位点并对双链

表 4 $ugt84a2$ 突变体植株

| 拟南芥基因类型 | 基因突变位点 | 对应的植株号 |
|---------------------------|---------------------------|---|
| 未突变/野生型 | CCACGTTAATCCACTTCTTCGTC | WT |
| 缺失 T 碱基突变类型 | CCACGT * AATCCACTTCTTCGTC | T_{2-2-1} 、 T_{2-2-5} 、 T_{2-2-6} |
| 缺失 T、A 突变为 C、G 突变为 T 突变类型 | CCACGT * ATTCCCTTCTTCTTC | T_{2-16-4} |



A—野生型测序峰图；B—缺失T碱基、A突变为C、G突变为T转基因植株的测序峰图；C—缺T碱基转基因植株的测序峰图

图5 拟南芥 *ugt84a2* 突变体检测

DNA 进行切割,细胞随之利用非同源末端连接或者同源重组方式对切割位点进行修复,实现 DNA 水平基因敲除或精确编辑^[22-24]。CRISPR/Cas9 基因编辑技术比起 ZFNs 和 TALENs 基因编辑技术而言,有着无法比拟的优点^[25]。CRISPR/Cas9 系统操作较为简便,只需设计 sgRNA 靶向序列便可对基因进行编辑^[21],由于其独特的优势,CRISPR/Cas9 基因编辑技术已经在医学、动物科学、植物科学等领域广泛应用^[26-28]。

植物体内含有大量的小分子化合物,这些小分子物质的糖基化在植物体内普遍存在^[29-30]。糖基化修饰是植物小分子代谢修饰的一种重要形式,通常会引引起小分子化合物的失活,从而调节细胞内小分子稳态,影响植物生长发育的诸多方面^[31-32]。研究表明,拟南芥糖基转移酶 UGT84A1、UGT84A2 都能够糖基化外源毒性物质 2,4,5-三氯苯酚^[16]以及植物内源物质对羟基肉桂酸^[17],表明 *UGT84A1* 和 *UGT84A2* 为同工基因。目前这 2 个基因的功能研究都停留在单基因突变体研究,目前的研究结果对于解析同源基因的功能和互相作用还缺少有力的证据。虽然拟南芥糖基转移酶 *UGT84A1* 和 *UGT84A2* 基因早已被发现并克隆,但由于体内代谢平衡调控是一个复杂的过程,其中涉及的相关基因的有序时空表达与基因之间的相互作用还没有具体研究透彻。基于以上原因,本研究利用 CRISPR/Cas9 系统成功获得了拟南芥 *ugt84a1/ugt84a2* 双突

变体,此研究为 *UGT84A1* 和 *UGT84A2* 基因功能研究提供了试验材料,为其他物种中 *UGT84A1* 和 *UGT84A2* 同源基因的功能研究提供了借鉴。

快速高效筛选双突变体材料对于科学研究是必要的。本研究中,将 *UGT84A1* 与 *UGT84A2* 靶序列同时构建到 CRISPR/Cas9 双突变体载体,从而同时敲除同源基因 *ugt84a1/ugt84a2*,通过分析突变体突变位点时发现,针对单一基因突变体往往会筛选到 2~3 种不同位点突变,其中多数突变的碱基是一致的,说明构建的 CRISPR/Cas9 载体系统工作稳定性很高。在筛选双突变体过程中,由于 2 个基因同时突变的概率很低,所以首先筛选 *ugt84a1* 单突变体,找到其突变体纯合体后,再筛选另一个基因 *ugt84a2* 是否同时突变,这样不仅工作效率高,需要测序的样品数也大大减少,从而提高了突变体筛选效率。综上,本研究的开展对于加快 *ugt84a1/ugt84a2* 功能基因资源的开发利用提供有力的理论与方法支持。

参考文献:

- [1] Weis M, Lim E K, Bruce N C, et al. Engineering and kinetic characterisation of two glucosyltransferases from *Arabidopsis thaliana* [J]. *Biochimie*, 2008, 90(5): 830-834.
- [2] Lim E K, Ashford D A, Hou B K, et al. *Arabidopsis* glucosyltransferases as biocatalysts in fermentation for regioselective synthesis of diverse quercetin glucosides [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2004, 87(5): 623-631.

- [3] Fraissinet - Tachet L, Baltz R, Chong J L, et al. Two tobacco genes induced by infection, elicitor and salicylic acid encode glucosyltransferases acting on phenylpropanoids and benzoic acid derivatives, including salicylic acid [J]. FEBS Letters, 1998, 437 (3): 319 - 323.
- [4] Jackson R G, Kowalczyk M, Li Y, et al. Over - expression of an *Arabidopsis* gene encoding a glucosyltransferase of indole - 3 - acetic acid: phenotypic characterisation of transgenic lines [J]. Plant Journal, 2002, 32(4): 573 - 583.
- [5] Togenetti V B, van Aken O, Morreel K, et al. Perturbation of indole - 3 - butyric acid homeostasis by the UDP - glucosyltransferase UGT74E2 modulates *Arabidopsis* architecture and water stress tolerance [J]. Plant Cell, 2010, 22(8): 2660 - 2679.
- [6] Wang B, Jin S H, Hu H Q, et al. UGT87A2, an *Arabidopsis* glycosyltransferase, regulates flowering time via FLOWERING LOCUS C [J]. New Phytologist, 2012, 194(3): 666 - 675.
- [7] Hou B K, Lim E K, Higgins G S, et al. *N* - glucosylation of cytokinins by glycosyltransferases of *Arabidopsis thaliana* [J]. Journal of Biological Chemistry, 2004, 279(46): 47822 - 47832.
- [8] Poppenberger B, Fujioka S, Soeno K, et al. The UGT73C5 of *Arabidopsis thaliana* glucosylates brassinosteroids [J]. PNAS, 2005, 102(42): 15253 - 15258.
- [9] Husar S, Berthiller F, Fujioka S, et al. Overexpression of the UGT73C6 alters brassinosteroid glucoside formation in *Arabidopsis thaliana* [J]. BMC Plant Biology, 2011, 11(1): 51.
- [10] Jackson R G, Lim E K, Li Y, et al. Identification and biochemical characterization of an *Arabidopsis* indole - 3 - acetic acid glucosyltransferase [J]. Journal of Biological Chemistry, 2001, 276(6): 4350 - 4356.
- [11] Jin S H, Ma X M, Han P, et al. Correction: UGT74D1 is a novel auxin glycosyltransferase from *Arabidopsis thaliana* [J]. PLoS One, 2013, 8(4): e61705.
- [12] Lim E K, Doucet C J, Li Y, et al. The activity of *Arabidopsis* glycosyltransferases toward salicylic acid, 4 - hydroxybenzoic acid, and other benzoates [J]. Journal of Biological Chemistry, 2002, 277(1): 586 - 592.
- [13] Martin R C, Mok M C, Habben J E, et al. A maize cytokinin gene encoding an *O* - glucosyltransferase specific to cis - zeatin [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2001, 98(10): 5922 - 5926.
- [14] Veach Y K, Martin R C, Mok D W S, et al. *O* - glucosylation of cis - zeatin in maize. Characterization of genes, enzymes, and endogenous cytokinins [J]. Plant Physiology, 2003, 131(3): 1374 - 1380.
- [15] Kudo T, Makita N, Kojima M, et al. Cytokinin activity of cis - zeatin and phenotypic alterations induced by overexpression of putative cis - Zeatin - *O* - glucosyltransferase in rice [J]. Plant Physiology, 2012, 160(1): 319 - 331.
- [16] Jones P, Messner B, Nakajima J I, et al. UGT73C6 and UGT78D1, glycosyltransferases involved in flavonol glycoside biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* [J]. Journal of Biological Chemistry, 2003, 278(45): 43910 - 43918.
- [17] Meißner D, Albert A, Böttcher C, et al. The role of UDP - glucose: hydroxycinnamate glucosyltransferases in phenylpropanoid metabolism and the response to UV - B radiation in *Arabidopsis thaliana* [J]. Planta, 2008, 22: 663.
- [18] Fauser F, Roth N, Pacher M, et al. In planta gene targeting [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012, 109(19): 7535 - 7540.
- [19] Li T, Liu B, Spalding M H, et al. High - efficiency TALEN - based gene editing produces disease - resistant rice [J]. Nature Biotechnology, 2012, 30(5): 390 - 392.
- [20] Shan Q W, Wang Y P, Li J, et al. Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR - Cas system [J]. Nature Biotechnology, 2013, 31(8): 686 - 688.
- [21] Li J F, Norville J E, Aach J, et al. Multiplex and homologous recombination - mediated genome editing in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana* using guide RNA and Cas9 [J]. Nature Biotechnology, 2013, 31(8): 688 - 691.
- [22] Razzaq A, Saleem F, Kanwal M, et al. Modern trends in plant genome editing: an inclusive review of the CRISPR/Cas9 toolbox [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20(16): 4045.
- [23] Xu X J, Wan T, Xin H H, et al. Delivery of CRISPR/Cas9 for therapeutic genome editing [J]. Journal of Gene Medicine, 2019, 21(7): e3107.
- [24] 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.
- [25] Bannikov A V, Lavrov A V. CRISPR/CAS9, the king of genome editing tools [J]. Molekuliarnaia Biologiya, 2017, 51(4): 582 - 594.
- [26] Zhang J F, Chen L, Zhang J, et al. Drug inducible CRISPR/Cas systems [J]. Computational and Structural Biotechnology Journal, 2019, 17: 1171 - 1177.
- [27] Ziegler H, Nellen W. CRISPR - Cas experiments for schools and the public [J]. Methods, 2019, 172: 86 - 94.
- [28] Bradford J, Perrin D. A benchmark of computational CRISPR - Cas9 guide design methods: datasets [J]. PLoS Computational Biology, 2019, 15(8): e1007274.
- [29] Wang J, Hou B K. Glycosyltransferases: key players involved in the modification of plant secondary metabolites [J]. Frontiers in Biology in China, 2009, 4(1): 39 - 46.
- [30] Bowles D, Isayenkova J, Lim E K, et al. Glycosyltransferases: managers of small molecules [J]. Current Opinion in Plant Biology, 2005, 8(3): 254 - 263.
- [31] Lim E K, Bowles D J. A class of plant glycosyltransferases involved in cellular homeostasis [J]. EMBO Journal, 2004, 23(15): 2915 - 2922.
- [32] Sieber P, Schorderet M, Ryser U, et al. Transgenic *Arabidopsis* plants expressing a fungal cutinase show alterations in the structure and properties of the cuticle and postgenital organ fusions [J]. Plant Cell, 2000, 12(5): 721 - 738.