

基于 CRISPR/Cas9 系统制作拟南芥糖基转移酶 *ugt79b2/79b3* 双突变体纯合株系

滕霄¹, 郭伟岳¹, 李茹¹, 李攀¹, 张雨飞¹, 冀芦沙²

(1. 聊城大学 生命科学学院, 山东 聊城 252059; 2. 聊城大学 药学院, 山东 聊城 252059)

摘要 CRISPR/Cas9 系统在植物遗传改良及功能基因研究中有着非常重要的作用。本研究中, 根据拟南芥糖基转移酶家族中同工酶 UGT79B2/79B3 的前体序列, 设计针对靶基因 UGT79B2/79B3 的特异的 sgRNA 引导序列, 构建 *ugt79b2/79b3-Cas9* 双突变植物表达载体, 并转化到根癌农杆菌 GV3101 中。将含有目标载体的 GV3101 活化后, 花浸染法浸染拟南芥。以后代阳性株系 DNA 作为模板, 送公司测序。99 株阳性转基因株系中分子鉴定发现有 24 株发生突变, 其中只有 1 株发生 *ugt79b2/79b3* 双突变。该研究结果为拟南芥糖基转移酶 *ugt79b2/79b3* 突变体的功能开发提供了基础研究与方法支持。

关键词 拟南芥; 糖基转移酶; CRISPR/Cas9 系统; *ugt79b2/79b3*

中图分类号 Q933

文献标识码 A

开放科学(资源服务)标识码(OSID)



Production of *Arabidopsis* Glycosyltransferase *ugt79b2/79b3* Double Mutant Pure and Strain Based on CRISPR/Cas9 System

TENG Xiao¹, GUO Weiyue¹, LI Ru¹, LI Pan¹, ZHANG Yufei¹, JI Lusha²

(1. School of Life Science, Liaocheng University, Liaocheng 252059, China; 2. School of Pharmacy, Liaocheng University, Liaocheng 252059, China)

Abstract The CRISPR/Cas9 system plays a very important role in plant genetic improvement and functional gene research. In this study, based on the precursor sequence of the isoenzyme UGT79B2/79B3 in the *Arabidopsis* glycosyltransferase family, a specific sgRNA guide sequence for the target gene UGT79B2/79B3 was designed to construct a *ugt79b2/79b3-Cas9* double mutant plant expression vector, and transformed into *Agrobacterium tumefaciens* GV3101. After activating GV3101 containing the target vector, *Arabidopsis thaliana* wild-type plants were transformed by the flower dip method. The DNA of the subsequent generations of positive strains was used as a template and sent to the company for sequencing. Molecular identification of 99 positive transgenic strains revealed that 24 strains had mutations, of which only one strain had *ugt79b2/79b3* double mutation. The results of this study provide basic research and method support for the functional development of *Arabidopsis* glycosyltransferase *ugt79b2/79b3* mutants.

收稿日期: 2021-09-08

基金项目: 国家重点研发项目(SQ2020YFF0422322); 山东省自然科学基金面上项目(ZR202102180037)资助

通讯作者: 冀芦沙, 女, 汉族, 博士, 教授, 硕士生导师, 研究方向: 植物抗逆方向, E-mail: liyanjie@sdu.edu.cn.

Key words *Arabidopsis*; glycosyltransferase; CRISPR/Cas9 system; *ugt79b2/79b3*

CRISPR 体系是在细菌中发现的一种获得性免疫系统,能抵抗外源 DNA 侵袭^[1]。研究发现,约 90% 古细菌和 40% 细菌中含有 CRISPR 系统^[2]。CRISPR 体系是由短的高度保守的重复序列(repeats, R, 20~50 bp)及间区序列(spacers, S, 36 bp)间隔成簇排列,其 5'端有前导序列(leader, L, 550 bp)和 Cas 蛋白基因(4~10 个)^[3]。研究表明,新的 RS 序列往往会插入到 L 序列及其临近的重复序列之间^[4]。

Makarova 等将 CRISPR 系统分为 3 种类型:I 型系统由 Cas1、Cas2 及 Cas3 蛋白共同发挥基因编辑作用^[5]; II 型系统仅由 Cas9 蛋白就可以进行基因编辑^[3]; III 型系统中 Cas6 在长链 pre-crRNA 加工及加工后传递发挥重要作用^[6]。

近年来,越来越多的科研人员将 CRISPR/Cas9 技术投入到动植物研究中。研究发现,CRISPR/Cas9 体系可以使得动植物中 DNA 双链发生断裂,如果修复不及时,还会使得细胞致死^[7]。真核生物中存在同源重组(homology recombination, HR)及非同源末端连接修复(non-homology end joining, NHEJ)两种模式,其中 NHEJ 模式是主要修复途径^[8]。在 NHEJ 修复中,断裂碱基序列末端可以随机发生连接,进而容易产生缺失、插入及突变等错误修复,若这些修复发生在基因编码区,则会引起基因编码框序列发生改变,导致原有基因功能缺失^[9]。从功能基因研究角度来看,当某基因功能出现缺失时,反而对该基因功能的研究有利。因此,本研究中,我们利用 CRISPR/Cas9 技术制作拟南芥糖基转移酶 *ugt79b2/79b3* 双突变体纯合株系,为拟南芥糖基转移酶 *ugt79b2/79b3* 突变体的功能开发提供了基础研究与方法支持。

1 材料与方法

1.1 材料

植物材料:拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)为哥伦比亚野生型(Columbia wild-type),保存于聊城大学药学院植物培养室。

菌株与载体:大肠杆菌 *E. coli* DH5 α 、农杆菌 GV3101 均由本实验保存;克隆载体 pEASY-T1 Cloning Kit、pEASY-Blunt Cloning Kit 均购买于北京全式金生物技术有限公司;gRNA 引物、基因序列均由上海生工生物工程有限公司合成、测序;

仪器:组织研磨仪(Tissuelyser-192)购买于上海净信生物仪器公司;

试剂与耗材:CRISPR/Cas9 试剂盒购买于江苏百格生物技术有限公司;TaqDNA 聚合酶、限制性内切酶、T4 DNA Ligase 试剂盒、质粒提取试剂盒、DNA 回收试剂盒及 DNA Maker 等均分子生物学耗材均购买于大连宝生物(TaKaRa)生物技术有限公司;DNA 提取缓冲液购买于美国赛默飞公司;甲醇、乙醇等有机试剂均购买于北京国药集团。

1.2 gRNA 引物设计

根据拟南芥信息资源数据库(The *Arabidopsis* Information Resource, TAIR)查找拟南芥 *ugt79b2* 和 *ugt79b3* 的基因组序列号,分别为 AT4G27560 和 AT4G27570,下载 *ugt79b2* 和 *ugt79b3* 全长基因序列,分别设计 *ugt79b2* 和 *ugt79b3* 的 sgRNA 靶点序列,见表 1。

表 1 引物序列

引物名称	引物序列
<i>cas-ugt79b2</i> -F	CAGAAATGGGTGGTTTGAAGTTTC
<i>cas-ugt79b2</i> -R	AAGACTTGTAGTGACTCTTTCCAAT
<i>cas-ugt79b3</i> -F	CAGAAATGGGTGGTTTGAAGTTTC
<i>cas-ugt79b3</i> -R	GTTTCCTTCGATTTCTCTGGCTG

1.3 大肠杆菌 DH5 α 感受态制备

挑取新鲜活化的大肠杆菌 DH5 α 单菌落,将其接种到 LB 液体培养基中(5 mL),37 °C,220 r/min 过夜摇菌制备种子液;将种子液按照 1:100 的比例接种到新的 LB 液体培养基中(50 mL),37 °C,220 r/min 振荡培养。培养 4~6 h 后,紫外分光光度计测量菌液浓度,当 OD₆₀₀ 达到 0.6~0.8 时,停止振荡培养;将大肠杆菌培养液冰浴冷却 30 min 后,4 °C,4500 r/min 离心 20 min,收集菌体;将细菌细胞于冰浴冷却的去离子水中

重悬,4℃,4500 r/min 离心 20 min,重悬 3 次后,将细菌细胞悬于冰浴冷却的甘油中(10%,V/V);精确量取 100 μ L 细菌细胞液于 1.5 mL 无菌离心管中,于-80℃超低温冰箱中保存备用。

1.4 农杆菌 GV3101 感受态制备

挑取新鲜活化的农杆菌 GV3101 单菌落,将其接种到 LB 液体培养基中(5 mL),28℃,200 r/min 过夜摇菌制备种子液;将种子液按照 1:100 的比例接种到新的 LB 液体培养基中(50 mL),28℃,200 r/min 振荡培养。培养 8~10 h 后,紫外分光光度计测量菌液浓度,当 OD₆₀₀ 达到 0.4~0.6 时,停止振荡培养;将农杆菌培养液冰浴冷却 30 min 后,4℃,4500 r/min 离心 20 min,收集菌体;将细菌细胞于冰浴冷却的去离子水中重悬,4℃,4500 r/min 离心 20 min,重悬 3 次后,将细菌细胞悬于冰浴冷却的甘油中(10%,V/V);精确量取 100 μ L 细菌细胞液于 1.5 mL 无菌离心管中,于-80℃超低温冰箱中保存备用。

1.5 *ugt79b2/79b3-Cas9* 载体构建

按照表 1 制备 *ugt79b2*, *ugt79b3* Oligo 二聚体,20 μ L 反应体系中加入 18 μ L Anneal Buffer,1 μ L cas-*ugt79b2*-F (10 μ mol/L)、1 μ L cas-*ugt79b2*-R(10 μ mol/L)或 18 μ L Anneal Buffer,1 μ L cas-*ugt79b3*-F (10 μ mol/L)、1 μ L cas-*ugt79b3*-R(10 μ mol/L)。接着 95℃变性 5 min,然后以 0.2℃/s 缓慢降低温度进行退火,直到 20℃。将上述制备成功的 Oligo 二聚体与 CRISPR/Cas-9 载体进行连接,具体连接体系如表 2 所示,25℃反应 1 h。

反应结束后,取 5.0 μ L 上述连接体系反应液,加入 20 μ L 大肠杆菌感受态细胞,通过电击转化法将连接体系转化到大肠杆菌中。转化液涂布到 LB 平板中,37℃倒置培养 1 d,用表 1 中 cas9 引物进行菌落 PCR 验证。若菌落 PCR 呈阳性,则摇菌扩大培养,并取部分菌液送生物公司测序。将 100%测序正确阳性菌落,一部分置于-80℃超低温冰箱保存,另一部分提取质粒,并转入农杆菌 GV3101 感受态细胞中。将农杆菌转化液涂布到含有利福平(50 μ g/L)和卡那霉素(50 μ g/L)的 LB 平板中,28℃倒置培养 2 d,用表 1 中 cas9 引物进行菌落 PCR 验证。若菌落 PCR 呈阳性,则摇菌扩大培养,一部分置于-80℃超低温冰箱保存,另一部分用于后续拟南芥花侵染。

表 2 Oligo 二聚体与 CRISPR/Cas-9 载体连接体系

名称	体系/ μ L
Vector-016B 载体	2.0
Oligo 二聚体	1.0
Enzyme Mix	1.0
ddH ₂ O	6.0

表 3 PCR 反应体系

名称	体系/ μ L
模板基因组 DNA	2.0
引物 F (10 μ mol/L)	0.5
引物 R (10 μ mol/L)	0.5
DNA 聚合酶	0.5
10 \times PCR buffer	2.0
ddH ₂ O	14.5

1.6 PCR 扩增

PCR 反应体系如表 3 所示。

PCR 程序:(1) 预热:96℃预变性 5min;(2) PCR 循环(35~40 次):96℃变性 50 s,50~60℃退火 50 s,72℃延伸 30 s~2 min;(3) 延伸:72℃延伸 10 min;(4) 4℃保存。

1.7 拟南芥花侵染与 *ugt79b2/79b3-Cas9* 突变阳性株系筛选

将 *ugt79b2/79b3-Cas9* GV3101 菌液活化后,采用农杆菌蘸花法侵染野生型拟南芥的花序(抽薹约 1 cm),侵染后,过夜黑暗处理,每隔 1 周侵染 1 次,反复侵染 3 次。一段时间后,收集农杆菌侵染后的拟南芥种子,并置于卡那霉素(50 μ g/L)的 MS 平板中筛选,长势良好株系为阳性植株,移栽到土壤中继续培养。三代筛选后,获得阳性纯合株系。提取阳性纯合株系 DNA,PCR 鉴定阳性株系后,进一步送生物公司测序,确定是否突变。

1.8 植物基因组 DNA 提取

用小剪刀剪取拟南芥幼嫩叶片(1 cm³)一片,置于 1.5 mL EP 管中;加入直径 2.0 mm 的氧化锆珠和 100 μ L DNA 提取缓冲液;混合均匀后,置于组织研磨仪上震荡破碎 10~60 s;4200 r/min 离心 2 min,将上清液转移到新的 1.5 mL EP 管中,4℃保存,用于后续 PCR 扩增模板。

1.9 数据统计与分析

本研究中所有数据均通过 Excel 表格和 SPSS18.0 软件分析,以均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较 *t* 检验,当 $P < 0.05$ 时,差异显著;当 $P < 0.01$ 时,差异极其显著。

2 结果与分析

2.1 sgRNA 靶点序列选择

从拟南芥信息资源库 TAIR 中下载 *ugt79b2* 和 *ugt79b3* 全长基因组序列,二者同源性高达 99%,根据 sgRNA 软件设计 *ugt79b2* 和 *ugt79b3* 的 sgRNA 靶点序列,多次筛选,最终确定 UGT79B2/79B3 共同保守靶点序列 sgRNA(图 1):GCCAACAAATTGGCTGAGAAAGG;利用该靶点序列设计引物,其中拟南芥 *ugt79b2* 靶点序列引物 Oligo (5'-3'): *cas-ugt79b2-F* 为 CAGAAATGGGTGGTTTGAAGTTTC, *cas-ugt79b2-R* 为 AAGACTTGTAGTGA CTCTTT

CCAAT;拟南芥 *ugt79b3* 靶点序列引物 Oligo (5'-3') *cas-ugt79b3-F* 为 CAGAAATGGGTGGTTTGAAGTTTC, *cas-ugt79b3-R* 为 GTTTCCTTCGATTTCTCTGGCTG。

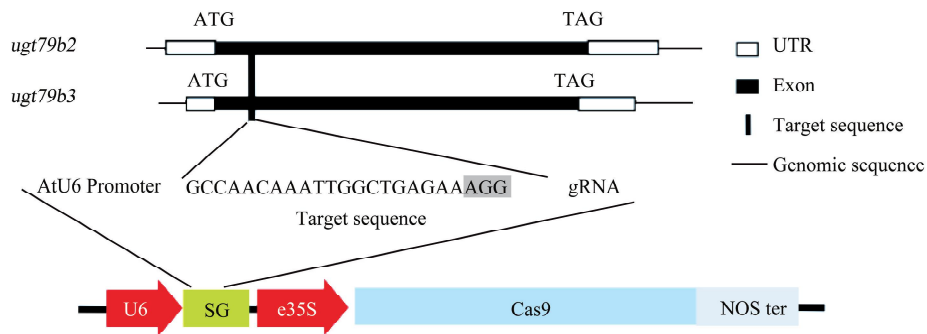
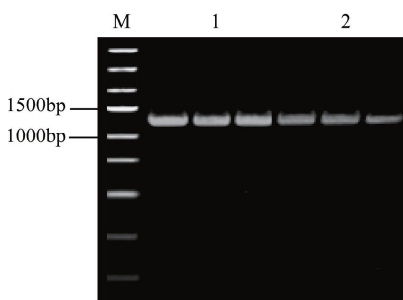


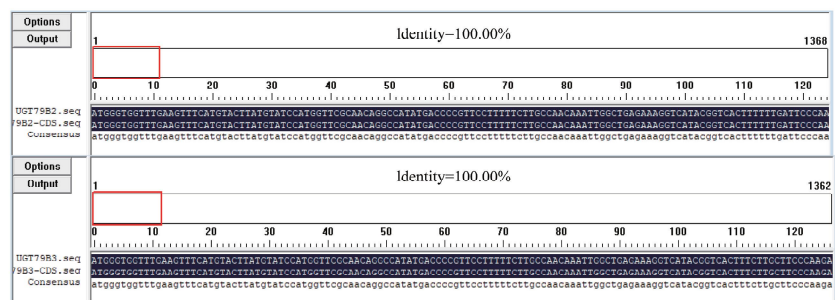
图 1 *ugt79b2*、*ugt79b3* sgRNA 序列确定

2.2 *ugt79b2/79b3-Cas9* 载体构建

按照上述方法构建 *ugt79b2/79b3-Cas9* 载体后,PCR 扩增验证 *ugt79b2/79b3-Cas9* 阳性转化子,结果发现, *ugt79b2* 阳性转化子的 PCR 条带大小为 1368 bp 如图 2(a)所示, *ugt79b3* 阳性转化子的 PCR 条带大小为 1362 bp 如图 2(a)所示。将验证成功的阳性转化子菌液送生物公司测序,结果如图 2(b)所示,测序结果与 TAIR 公布序列一致,100%正确,该结果表明 *ugt79b2/79b3-Cas9* 载体构建成功。



(a)



(b)

注:(a)CRISPR/*ugt79b2/79b3-Cas9* 菌落 PCR 验证(M:Marker;1:UGT79B2 引物验证;2:UGT79B3 引物验证);(b):CRISPR/*ugt79b2/79b3-Cas9* 菌落基因测序结果比对。

图 2 *ugt79b2/79b3-Cas9* 载体构建

2.3 *ugt79b2-cas9* 嵌合体筛选

将上述构建成功的 *ugt79b2/79b3-Cas9* GV3101 侵染拟南芥,获得 T₀ 代种子,潮霉素筛选后,获得阳性株系 99 株,分别命名 T₁₋₁,T₁₋₂,...,T₁₋₉₉。提取 99 株幼苗 DNA,以 *cas9-ugt79b2* 为引物,送公司测序,结果如表 4 所示,*ugt79b2-cas9* 嵌合体筛选获得,缺 A 碱基 7 株,A 碱基替换为 G 或 C 碱基 12 株,A 碱基插入 3 株,缺 A、G 碱基 2 株。

表 4 *ugt79b2-cas9* 突变体植株

拟南芥基因类型	基因突变位点	对应株系
未突变/野生型	GCCAACAAATTGGCTGAGAA AGG	T ₁₋₁ ...T ₁₋₈ , T ₁₋₁₀ ...T ₁₋₁₃ , T ₁₋₁₅ , T ₁₋₁₆ , T ₁₋₁₇ , T ₁₋₁₉ , T ₁₋₂₁ , T ₁₋₂₂ , T ₁₋₂₃ , T ₁₋₂₅ , T ₁₋₂₆ , T ₁₋₂₈ , T ₁₋₃₀ ...T ₁₋₃₄ , T ₁₋₃₆ , T ₁₋₃₇ , T ₁₋₄₀ , T ₁₋₄₂ ...T ₁₋₄₅ , T ₁₋₄₇ ...T ₁₋₅₁ , T ₁₋₅₃ ... T ₁₋₅₆ , T ₁₋₅₈ , T ₁₋₆₀ , T ₁₋₆₁ , T ₁₋₆₂ , T ₁₋₆₄ ... T ₁₋₆₇ , T ₁₋₆₉ ...T ₁₋₇₃ , T ₁₋₇₆ ...T ₁₋₈₂ , T ₁₋₈₄ , T ₁₋₈₆ ...T ₁₋₉₀ , T ₁₋₉₂ , T ₁₋₉₃ , T ₁₋₉₄ , T ₁₋₉₆ , T ₁₋₉₇ , T ₁₋₉₈
缺 A 碱基突变	GCCAACAAATTGGCTG * GAA AGG	T ₁₋₉ , T ₁₋₂₀ , T ₁₋₃₈ , T ₁₋₄₆ , T ₁₋₅₉ , T ₁₋₇₄ , T ₁₋₈₃
A 碱基替换突变	GCCAACAAATTGGCTG G/C GAA AGG	T ₁₋₁₈ , T ₁₋₂₄ , T ₁₋₂₇ , T ₁₋₂₉ , T ₁₋₃₅ , T ₁₋₄₁ , T ₁₋₅₇ , T ₁₋₆₃ , T ₁₋₇₅ , T ₁₋₈₅ , T ₁₋₉₁ , T ₁₋₉₅
A 碱基插入突变	GCCAACAAATTGGCTG A AGAA AGG	T ₁₋₁₄ , T ₁₋₅₂ , T ₁₋₉₉
缺 A、G 碱基突变	GCCAACAAATTGGCTG * * AA AGG	T ₁₋₃₉ , T ₁₋₆₈

2.4 *ugt79b2-Cas9* 单突变纯合体筛选

选取 T1 代突变株系,继续培养,获得 T2 代种子,潮霉素筛选后,获得阳性株系 24 株,分别命名 T₂₋₁₋₁, T₂₋₁₋₂...T₂₋₂₋₁, T₂₋₂₋₂...T₂₋₂₄₋₁, T₂₋₂₄₋₂...。提取 X 株幼苗 DNA,以 *cas9-ugt79b2* 为引物,送公司测序,结果如表 5 所示,*ugt79b2-cas9* 纯合突变体选获得,缺 A 碱基 2 株,A 碱基替换为 G 或 C 碱基 3 株,A 碱基插入 1 株,缺 A、G 碱基 1 株。

表 5 *ugt79b2-cas9* 突变纯合体植株

拟南芥基因类型	基因突变位点	对应株系
未突变/野生型	GCCAACAAATTGGCTGAGAA AGG	WT 及其它
缺 A 碱基突变	GCCAACAAATTGGCTG * GAA AGG	T ₂₋₉₋₃ , T ₂₋₁₈₋₁
A 碱基替换突变	GCCAACAAATTGGCTG G/C GAA AGG	T ₂₋₁₁₋₂ , T ₂₋₁₅₋₂ , T ₂₋₂₁₋₂
A 碱基插入突变	GCCAACAAATTGGCTG A AGAA AGG	T ₂₋₂₄₋₂
缺 A、G 碱基突变	GCCAACAAATTGGCTG * * AA AGG	T ₂₋₅₋₂

2.5 *ugt79b2/ugt79b3-Cas9* 双突变纯合体筛选

提取 *ugt79b2-Cas9* 单突变纯合体幼苗基因组 DNA,以 *cas9-ugt79b3* 为引物,送公司测序,结果如图 3 所示,*ugt79b2/ugt79b3-Cas9* 双突变纯合体筛选获得 1 株 A 碱基插入突变,用于后续 *ugt79b2*、*ugt79b3* 功能验证研究。

ugt79b2/b3-Cas9 GCCAACAAATTGGCTG**A**AGAA**AGG**
 Wild type GCCAACAAATTGGCTG -AGAA**AGG**
 GCCAACAA**A**ATTGGCTG**A**AGAA**AGG**

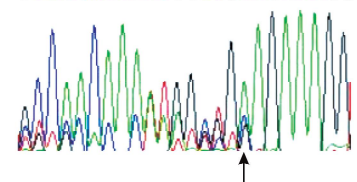


图 3 *ugt79b2/ugt79b3-Cas9* 双突变纯合体筛选

3 讨论

植物糖基转移酶是植物体内能够将各种糖基转移到小分子化合物上,如多肽类、激素类以及次级代谢产物等,改变小分子化合物特性,进而影响植物生长发育的酶类^[10]。研究发现,糖基转移酶参与非生物胁迫、调节激素平衡、参与次级代谢响应、参与生物胁迫、参与解毒反应、参与信号转导等^[11-16]。根据报道,糖基转移酶 UGT79B2/79B3 能够糖基化次级代谢物花青素类化合物,超表达拟南芥表现出抗冷、抗盐、抗旱等表型^[17]。虽然拟南芥糖基转移酶 UGT79B2/79B3 的基因功能早已被研究,但是植物体内代谢平衡是一个非常复杂的过程,通过 CRISPR/Cas9 技术获得 *ugt79b2/ugt79b3-Cas9* 双突变纯合体为其他物种中 *ugt79b2/ugt79b3* 同源基因双突变体筛选提供技术支持。

CRISPR/Cas9 是目前唯一优先应用于基因编辑的 II 型系统。与 I 型和 III 型系统不同,II 型系统仅需要 2 个 RNA 元件和 1 个 Cas 蛋白即可实现对 DNA 靶序列的切割^[18]。为了进一步精简 CRISPR/Cas9 系统,科研人员将必需元件 crRNA 与 tracrRNA 的核心序列合并为一个 sgRNA,体外实验发现,在 sgRNA 引导

下,Cas9 蛋白能够切割双链 DNA^[19]。随着 CRISPR/Cas9 试剂盒的研发,使得 CRISPR/Cas9 系统广泛的用于真核生物内源基因编辑,如水稻、棉花、拟南芥、小鼠、斑马鱼、果蝇等^[20-25]。

CRISPR/Cas9 基因编辑技术由两大核心技术组成:(1)构建 sgRNA-Cas9 表达载体,并将载体转化到受体细胞中发挥基因编辑作用;(2)将合成的 sgRNA 序列与表达纯化的 Cas9 蛋白导入到受体细胞中发挥切割作用^[26]。链球菌(*Streptococcus pyogenes*)中 SpCas9 蛋白最先被用于基因编辑研究,该蛋白由一个 HNH 核酸酶结构域和一个 RuvC-like 结构域组成^[27]。这两个结构域分别在靶 DNA 的 PAM 序列(NGG)上游 3 个碱基处对 DNA 双链进行切割,形成平末端。真核系统中,还需要在 Cas9 蛋白中添加一段核定位信号,以保证该蛋白能够顺利进入细胞核发挥功能。sgRNA 是单链 RNA,约 20 个碱基,可以与靶 DNA 序列互补配对,进而引导 sgRNA-Cas9 复合物在特定位点上发生切割^[26]。因此,构建 sgRNA-Cas9 表达载体时,仅仅需要改变 sgRNA 中特异位点的识别序列。本研究中,根据拟南芥信息资源库 TAIR 中下载 *ugt79b2* 和 *ugt79b3* 全长基因组序列,二者同源性高达 99%,sgRNA 软件设计 *ugt79b2* 和 *ugt79b3* 的 sgRNA 靶点序列,多次筛选,最终确定 1 条 sgRNA 序列:GCCAACAAATTGGCTGAGAAAGG;利用该靶点序列设计引物,其中拟南芥 *ugt79b2* 靶点序列引物 Oligo(5'-3'):cas-*ugt79b2*-F 为 CAGAAATGGGTG-GTTTGAAGTTTC,cas-*ugt79b2*-R 为 AAGACTTGTAGTGACTCTTTCCAAT;拟南芥 *ugt79b3* 靶点序列引物 Oligo(5'-3'):cas-*ugt79b3*-F 为 CAGAAATGGGTGGTTTGAAGTTTC,cas-*ugt79b3*-R 为 GTTTC-CTTCGATTTCTCTGGCTG。

CRISPR/Cas9 系统在植物基因组编辑应用过程中具有成本低、操作简单,且突变效率高等特点,还能够实现多个基因同时编辑,在遗传育种与基因功能研究等领域取得了高速发展。对于 CRISPR/Cas9 系统突变株系,科研工作者通过 3 种靶点分析技术对其进行分析。第 1 种,基于 Sanger 测定的靶点分析技术^[28]。研究表明,基于 Sanger 测序的靶点分析技术比较适应于简单突变的样品。第 2 种,基于高通量测序的靶点分析技术^[29]。当植株突变类型同时涉及简单突变、嵌合突变或者一次需要测量大量靶点突变、解析多倍体物种时,往往采用基于高通量二代测序的靶点分析技术。目前该类技术包括 Cas-analyzer、CRISPR-GA、AGEseq、Hi-TOM 和 CRISPResso 等。第 3 种,基于非测序手段的靶点分析技术。与上述两种方法相比,基于非测序手段的靶点分析技术可以在无法获知具体碱基变异序列时,就能够非常简单地判断该基因是否编辑成功,包括 T7E1(T7 endonuclease 1)法^[30]、PCR-RE(PCR/restriction enzyme)法^[31]和 HRM(High-resolution melting assay)法^[32]等。本研究中,我们采用基于 Sanger 测序的靶点分析技术就能分析 *ugt79b2-cas9* 嵌合体、*ugt79b2-Cas9* 单突变纯合体、*ugt79b2/ugt79b3-Cas9* 双突变纯合体,测序结果显示,*ugt79b2-cas9* 嵌合体筛选获得,缺 A 碱基 7 株,A 碱基替换为 G 或 C 碱基 12 株,A 碱基插入 3 株,缺 A、G 碱基 2 株;*ugt79b2-cas9* 纯合突变体选获得,缺 A 碱基 2 株,A 碱基替换为 G 或 C 碱基 3 株,A 碱基插入 1 株,缺 A、G 碱基 1 株;*ugt79b2/ugt79b3-Cas9* 双突变纯合体筛选获得 1 株 A 碱基插入突变,用于后续 *ugt79b2*、*ugt79b3* 功能验证研究。

参 考 文 献

- [1] GARNEAU J E, DUPUIS M È, VILLION M, et al. The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA [J]. *Nature*, 2010, 468(7320): 67-71.
- [2] MARRAFFINI L A, SONTHEIMER E J. Self versus non-self discrimination during CRISPR RNA-directed immunity[J]. *Nature*, 2010, 463(7280): 568-571.
- [3] MAKAROVA K S, HAFT D H, BARRANGOU R, et al. Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2011, 9(6): 467-477.
- [4] ALTENBUCHNER J. Editing of the bacillus subtilis genome by the CRISPR-Cas9 system[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2016, 82(17): 5421-5427.
- [5] MAKAROVA K S, KOONIN E V. Annotation and classification of CRISPR-Cas systems[J]. *Methods Mol Biol*, 2015, 1311: 47-75.
- [6] SHMAKOV S A, UTKINA I, Wolf Y I, et al. CRISPR arrays away from cas genes[J]. *CRISPR J*, 2020, 3(6): 535-549.
- [7] JIANG F, DOUDNA J A. CRISPR-Cas9 structures and mechanisms[J]. *Annu Rev Biophys*, 2017, 46: 505-529.

- [8] WEN Y H, LIAO G, PRITCHARD T, et al. A stable but reversible integrated surrogate reporter for assaying CRISPR/Cas9-stimulated homology-directed repair[J]. *J Biol Chem*, 2017, 292(15): 6148-6162.
- [9] LI P, ZHANG L, LI Z, et al. Cas12a mediates efficient and precise endogenous gene tagging via MITI: microhomology-dependent targeted integrations[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2020, 77(19): 3875-3884.
- [10] HE J B, ZHAO P, HU Z M, et al. Molecular and structural characterization of a promiscuous C-glycosyltransferase from *Trillium chinensis*[J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2019, 58(33): 11513-11520.
- [11] DONG N Q, SUN Y, GUO T, et al. UDP-glycosyltransferase regulates grain size and abiotic stress tolerance associated with metabolic flux redirection in rice[J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 2629-2634.
- [12] MOHNIKE L, REKHTER D, HUANG W, et al. The glycosyltransferase UGT76B1 modulates N-hydroxy-pipecolic acid homeostasis and plant immunity[J]. *Plant Cell*, 2021, 33(3): 735-749.
- [13] SIMON C, LANGLOIS-MEURINNE M, DIDIERLAURENT L, et al. The secondary metabolism glycosyltransferases UGT73B3 and UGT73B5 are components of redox status in resistance of *Arabidopsis* to *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*[J]. *Plant Cell Environ*, 2014, 37(5): 1114-1129.
- [14] SUN M, ZHU Z, CHEN J, et al. Putative trehalose biosynthesis proteins function as differential floridoside-6-phosphate synthases to participate in the abiotic stress response in the red alga *Pyropia haitanensis*[J]. *BMC Plant Biol*, 2019, 19(1): 325.
- [15] SIMON N M L, SAWKINS E, DODD A N. Involvement of the SnRK1 subunit KIN10 in sucrose-induced hypocotyl elongation[J]. *Plant Signal Behav*, 2018, 13(6): e1457913.
- [16] KE S, LIU S, LUAN X, et al. Mutation in a putative glycosyltransferase-like gene causes programmed cell death and early leaf senescence in rice[J]. *Rice (N Y)*, 2019, 12(1): 7-14.
- [17] LI P, LI Y J, ZHANG F J, et al. The *Arabidopsis* UDP-glycosyltransferases UGT79B2 and UGT79B3, contribute to cold, salt and drought stress tolerance via modulating anthocyanin accumulation[J]. *Plant J*, 2017, 89(1): 85-103.
- [18] GUPTA D, BHATTACHARJEE O, MANDAL D, et al. CRISPR-Cas9 system: a new-fangled dawn in gene editing[J]. *Life Sci*, 2019, 232: 116636.
- [19] ČERMÁK T, CURTIN S J. Design and assembly of CRISPR/Cas9 reagents for gene knockout, targeted insertion, and replacement in wheat[J]. *Methods Mol Biol*, 2017, 1679: 187-212.
- [20] FIAZ S, AHMAD S, NOOR M A, et al. Applications of the CRISPR/Cas9 system for rice grain quality improvement: perspectives and opportunities[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(4): 888.
- [21] LI C, ZHANG B. Genome editing in cotton using CRISPR/Cas9 system[J]. *Methods Mol Biol*, 2019, 1902: 95-104.
- [22] MIKI D, ZHANG W, ZENG W, et al. CRISPR/Cas9-mediated gene targeting in *Arabidopsis* using sequential transformation[J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 1967.
- [23] BANAN M. Recent advances in CRISPR/Cas9-mediated knock-ins in mammalian cells[J]. *J Biotechnol*, 2020, 308: 1-9.
- [24] LIU C X, LI C Y, HU C C, et al. CRISPR/Cas9-induced shank3b mutant zebrafish display autism-like behaviors[J]. *Mol Autism*, 2018, 9: 23.
- [25] KINA H, YOSHITANI T, HANYU-NAKAMURA K, et al. Rapid and efficient generation of GFP-knocked-in *Drosophila* by the CRISPR-Cas9-mediated genome editing[J]. *Dev Growth Differ*, 2019, 61(4): 265-275.
- [26] GUPTA D, BHATTACHARJEE O, MANDAL D, et al. CRISPR-Cas9 system: a new-fangled dawn in gene editing[J]. *Life Sci*, 2019, 232: 116636.
- [27] KLEINSTIVER B P, PATTANAYAK V, PREW M S, et al. High-fidelity CRISPR-Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects[J]. *Nature*, 2016, 529(7587): 490-495.
- [28] LEE M C S, LINDNER S E, LOPEZ-RUBIO J J, et al. Cutting back malaria: CRISPR/Cas9 genome editing of *Plasmodium*[J]. *Brief Funct Genomics*, 2019, 18(5): 281-289.
- [29] SHALEM O, SANJANA N E, ZHANG F. High-throughput functional genomics using CRISPR-Cas9[J]. *Nat Rev Genet*, 2015, 16(5): 299-311.
- [30] REEM N T, VAN ECK J. Application of CRISPR/Cas9-mediated gene editing in tomato[J]. *Methods Mol Biol*, 2019, 1917: 171-182.
- [31] WU S, ZHU H, LIU J, et al. Establishment of a PEG-mediated protoplast transformation system based on DNA and CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein complexes for banana[J]. *BMC Plant Biol*, 2020, 20(1): 425-431.
- [32] LIU X, QIU S, MEI L, et al. A high-resolution melting analysis with an unlabeled probe for CRISPR/Cas9-induced ZBED6 knockout pigs detection[J]. *J AOAC Int*, 2021, 104(3): 541-545.