



研究报告

Research Report

CRISPR-Cas9 植物基因编辑系统敲除拟南芥 AG 基因表达载体的构建

王晓霞[✉], 苏哲[✉], 岳彩云[✉], 樊金会[✉]

山东农业大学林学院, 泰安, 271018

✉ 通讯作者: [hj2003@sdau.edu.cn](mailto:hjf2003@sdau.edu.cn) ✉ 作者

分子植物育种, 2016 年, 第 14 卷, 第 4 篇 doi: 10.5376/mpb.cn.2016.14.0004

这是一篇采用 Creative Commons Attribution License 进行授权的开放取阅论文。只要对本原作有恰当的引用, 版权所有人允许并同意第三方无条件的使用与传播。

引用格式(中文):

王春凯等, 2016, 烤烟易烤性连锁标记的适用性验证, 分子植物育种(online), 14(4): 1024-1028 (doi: 10.5376/mpb.cn. 2016.14.0004)

引用格式(英文):

Wang et al., 2016, The Construction of Expression Vector of Knocking Out AG Gene in *Arabidopsis thaliana* by CRISPR-Cas9, Fenzi Zhiwu Yuzhong (online) (Molecular Plant Breeding), 14(4): 1024-1028 (doi: 10.5376/mpb.cn2016.14.0004)

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(double-strand break, DSB)。CRISPR-Cas 系统作为一种新兴的基因定点编辑技术逐渐成熟并在多个植物中成功得到应用, 以此技术对目的基因进行靶向的敲除或敲入。本实验以拟南芥 AG 基因为基础, 构建 CRISPR-Cas9 植物基因编辑系统敲除拟南芥 AG 基因的表达载体, 并利用农杆菌介导 CRISPR-Cas9 植物基因编辑系统敲除拟南芥 AG 基因, 以获得高效的敲除拟南芥基因的遗传转化体系。

关键词 CRISPR-Cas9; 基因敲除; 拟南芥; AG; 遗传转化

The Construction of Expression Vector of Knocking out AG Gene in *Arabidopsis thaliana* by CRISPR-Cas9

Wang Xiaoxia[✉] Su Zhe[✉] Yue Caiyun[✉] Fan Jinhui[✉]

1. College of Forestry, Shandong Agricultural University, Tai'an, 271018

✉ Corresponding author, [hj2003@sdau.edu.cn](mailto:hjf2003@sdau.edu.cn); ✉ Authors

Abstract The CRISPR-Cas system is a kind of adaptive immune system, which was gradually formed in the evolutionary process of bacteria and archaea. The CRISPR-Cas system positions to the targeted point with sgRNA, and the nucleic acid is double-strand broken by Cas enzyme. CRISPR-Cas system as a new gene fixed-point editing techniques has been successful applied in many plants. Targeted genes can be targeting knock-out and knock-in by the technology of CRISPRs. The experiment is based on the AG gene of *Arabidopsis thaliana*, and constructed a vector which knockout AG gene by CRISPR-Cas9 system, and then the high efficient genetic transformation system is obtained which can knockout *Arabidopsis thaliana* genes by using the agrobacterium-mediated genetic transformation of CRISPR-Cas9 system.

Keywords CRISPR-Cas9; Gene knockout; *Arabidopsis thaliana*; AG; Genetic transformation

研究背景

基因组编辑技术正飞速发展, CRISPR-Cas 系统作为一种新兴的基因定点编辑技术逐渐成熟并成功应用于多种动植物物种, 促进了基因功能的研究。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, 通过小片段的 RNA 介导对入侵的核酸进行靶向定位并通

过 Cas 酶对核酸进行酶切、降解可以降解入侵的病毒或质粒 DNA (Wiedenheft et al., 2012; Terns and Terns, 2011)。利用此技术能够对目的基因进行靶向的敲除或敲入。

虽然目前为止, 对 CRISPR-Cas9 系统的作用机制尚未作出完全详细的论述, 但其作用机制的整个过程已经基本明确, CRISPR-Cas9 的作用机理(基本工作原理如图 1)可分为三个阶段。第一阶段, CRISPR 的高度可变的间隔区的获得, 在噬菌体入侵的起始阶段, Cas 蛋白复合物靶向并裂解噬菌体基因组中的原型间隔序列, 间隔序列接下

收稿日期: 2016 年 02 月 29 日

接受日期: 2016 年 03 月 28 日

发表日期: 2016 年 04 月 06 日

基金项目: 感谢山东农业大学林学院和生命科学与技术学院提供实验条件与技术支持



来整合到宿主基因组的 CRISPR 位点的 5'端; 第二阶段, CRISPR 基因座的表达, 这些插入的短间隔序列被转录成 crRNA; 第三阶段, CRISPR-Cas9 系统发挥活性, 对外源遗传物质进行干扰。在 Cas 蛋白复合物的参与下, 靶向和干扰侵入的噬菌体 DNA 序列(李铁民和杜波, 2011; 方锐等, 2013)。

AG 基因是最早克隆的花发育调控基因, 与植

物花器官(心皮, 胚珠, 果实等)的发育有密切关系。由于 AG 基因与植物性别分化, 开花结果等密切相关, 因此研究 AG 的调控机制有一定的实际应用价值。本研究以拟南芥为材料, 构建 CRISPR-Cas9 敲除拟南芥 AG 基因载体, 建立稳定的敲除拟南芥基因的转化体系, 并获得基因敲除的突变体。

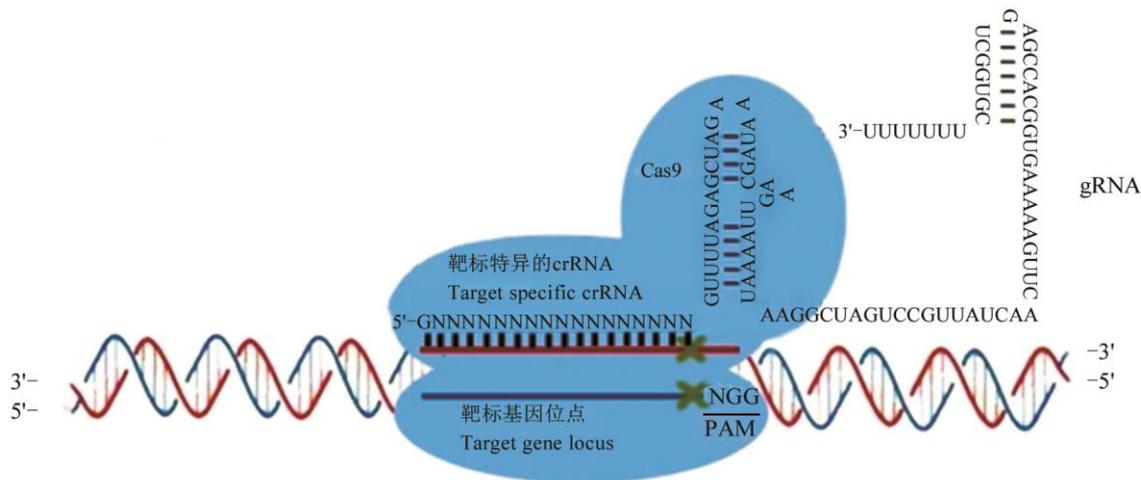


图 1 CRISPR-Cas9 工作原理示意图

Figure 1 Schematic diagram of CRISPR-Cas9

1 结果与分析

首先将靶位序列片段与克隆载体 pUC19-U3 连接, 转化大肠杆菌, 菌落 PCR 筛选阳性克隆(图 2), 提取质粒为构建好的克隆载体 pUC19-AG。中间克隆载体 pUC19-AG 利用 *EcoRI* 和 *XbaI* 双酶切回收 520 bp 左右片段(图 3), 表达载体 pCAMBIA1302-Cas9 利用 *EcoRI* 和 *NheI* 分别酶切后过滤小片段并线性化。利用 T4DNA 连接酶连接 520 bp 片段和线性化表达载体, 构建 pCAMBIA1302-AG 表达载体。

菌落 PCR 筛选引物为 AG-P: 5'-GCAAATC GTCTTCTCTAGCCGTGG-3' 和 OsU3-D:CGGCTA GAGAAGACGATTTG。

表达载体构建过程中 pCR 筛选验证的电泳图说明表达载体已构建成功, 并可以进行转入植物体内进行表达过程。

2 讨论

虽然 CRISPR 系统的发现可以追溯到 1987 年, 但是 CRISPR-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。该技术已经成功应用在多种微生物、动物细胞、动物和植物。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本生烟中取得了多个基因定点敲除、插入等基因组定点编辑的操作的成功案例, 并首次证实 CRISPR-Cas9 系统能够在植物基因组中实现定点编辑(Shan et al., 2013; Feng et al., 2013; Li et al., 2013; Nekrasov et al., 2013)。

利用 CRISPR-Cas9 系统极性基因定点编辑可以用更加灵活性的方式实现只利用载体定点编辑同一个基因的不同位点和利用一个载体同时编辑多个靶位点。由于此系统的靶位点很短, 只有 20 bp 左右, 所以可以设计几个串联在一起的 sgRNA, 来实现对同一基因多个位点的同时编辑以及多个不同基因靶位点的编辑。同时定点编辑多个基因, 可以有助于研究基因间的相互作用机制和研究同一基因家族的不同基因的功能。

CRISPR-Cas9 在各项研究领域必将有越来越有广阔的应用前景, 为基因组定向编辑领域的研究带来突破性的技术革命, 特别是在基因功能解析和加速重要农作物水稻、小麦性状改良与分子定向育种等方面(李君等, 2013)。

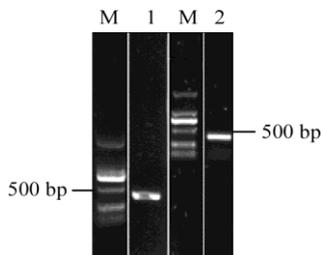


图 2 菌落 PCR 筛选

注: M: DL2000 maker; 1: pUC19-AG; 2: pCAMBIA1302-AG

Figure 2 Colony PCR screen

Note: M: DL2000 maker; 1: pUC19-AG; 2: pCAMBIA1302-AG

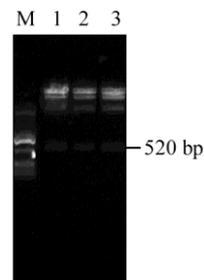


图 3 pUC19-AG 酶切电泳图

Figure 3 Enzyme electrophoresis map of pUC19-AG

拟南芥作为模式植物, 在分子研究领域有着植株小、结实多、生命周期短、基因组简单、遗传操作简便等优势, 拟南芥基因组测序的完成使得大量涉及重要生命过程的基因被发现, 对于开展遗传分析、基因克隆和功能研究意义重大。

3 材料与方法

3.1 植物材料

试验采用在实验室中培养室进行培养的拟南芥无菌苗。

3.2 菌株与质粒

CRISPR-Cas9 植物基因敲除系统包含克隆载体 pUC19-U3 和表达载体 pCAMBIA1302-Cas9; 本实验所用的大肠杆菌 (*E.coli*) 菌株为 *E.coli* DH5 α , 农杆菌菌株为 GV3101。

3.3 酶和生化试剂

Taq 酶、T4 DNA 连接酶、*Bbs* I 酶、*EcoR* I 酶、*Nhe* I 酶、DNA Maker DL 2000 等试剂及 DNA 纯化回收试剂盒等。

3.3 愈伤组织诱导

无菌环境下, 切取实验室的无菌苗叶片, 接种到 1/2 MS 基本培养基培养, 附加激素 2,4-D 和 6-BA 进行处理: 2,4-D 的浓度设 0、0.2 mg/L、0.5 mg/L、1.0 mg/L 和 2.0 mg/L 5 个梯度, 6-BA 的浓度为 0.5 mg/L。每种培养基接种 50 个样, 约 21 天后观察叶片愈伤形态, 统计愈伤组织的诱导率。

3.4 表达载体构建

3.4.1 AG 基因敲除靶位引物序列设计

(1) 在 AG 基因序列中设计一对 20 bp 的 oligo DNA 片段: 5'-3': ATCGTCTTCTCTAGCCGTGG

在基因的起始密码子 ATG 后, 找到 Cas9 的识别位点 PAM 结构, 找到 PAM 结构 AGG(下划线标出), 在 PAM 结构前找 20 bp 序列片段设定为靶位序列: ATCGTCTTCTCTAGCCGTGG。

5'-GTCGCACTC ATCGTCTTCTCTAGCCG

PAM 靶位点



TGGTCGTCTCTATG...3'

SgRNA-3'-UAGCAGAAGAGAUCGGC-5'

(2) 设计敲除靶位序列: 正义链 AG-P: 5'-GCA-AATCGTCTTCTCTAGCCGTGG-3'; 反义链 AG-D: 5'-AAACCCACGGCTAGAGAAGACGAT-3'。其中 GCAA 和 CAAA 分别为上游和下游 *Bbs*I 酶切形成的粘性末端, 以连接线性化的 pUC19-U3。引物由上海生工合成, 纯化级别为 PAGE。

3.4.2 构建克隆载体 pUC19-AG

(1) 线性化克隆载体 pUC19-U3。使用限制性内切酶 *Bbs* I 酶切克隆载体 pUC19-U3 载体, 并利用 DNA 片段纯化试剂盒过滤除去 22 bp 片段, 回收 3.2 kb 的线性化片段;

pUC19-U3 部分序列(标注下划线序列为酶切除序列):

5'-CATGAAGCCTTTCAGGACATGTATTGC
AGTATGGGCCCGGCCATTACGCAATTGGACG
ACAACAAAGACTAGTATTAGTACCACCTCGG
CTATCCACATAGATCAAAGCTGATTTAAAAGA
GTTGTGGATGATCCGTGGCAA gggtcttcgagaagac
ctGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAT
AAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTG
GCACCGAGTCGGTGCTTTTTTAGAGCTGGTT-
TGTGAACCGTCAGATCCGCTAGCGCTACCGG
ACTCAGATCTCGAGCTCAAGCTTCGAATTCT



GCAGTCGACGGTACCCGTTACATAACTTACG
 GTAAATGGCCCCGCCTGGCTAACTAGAGATCT
 AGAGCGAC-3'.

3.4.3 重组克隆载体 pUC19-AG 的构建

(1)插入片段制备。将 AG 敲除序列正负义链 (100 μmol/L)等比例混合后, 加热到 95℃, 3 min, 自然冷却至 40℃ 以下, 得到所需双链 DNA;

(2)正负义链连接反应, 连接体系(表 1)。将双链 DNA 与酶切纯化后的 pPIC.2 载体片段连接、转化大肠杆菌, 构建得到重组 pPIC.2-AG 载体;

(3)测序。对重组载体进行测序, 确认插入序列的正确性。

表 1 连接反应体系

Table 1 Ligation reaction system

| 试剂 | 用量(μL) |
|--------------------|-------------|
| Reagent | Amount (μL) |
| pUC19- AG | 20 |
| 插入片段 | 1 |
| ddH ₂ O | 9 |
| Total | 30 |

3.4.4 回收目的片段

利用 *EcoR* I、*Nhe* I 双酶切重组载体 pUC19-AG, DNA 回收试剂回收约 520bp 的 DNA 片段。

酶切反应: 用 *EcoR* I 和 *Nhe* I 限制性内切酶对 pUC19- AG 重组载体双酶切, 置于 37℃ 进行双酶切反应 3 h, 然后置于常温下反应过夜, 充分酶切, 回收。酶切反应体系(表 2)如下:

表 2 *EcoRI* 和 *NheI* 双酶切反应

Table 2 Double enzyme digestion reaction of *EcoRI* and *NheI*

| 试剂 | 用量(μL) |
|--------------------|-------------|
| Reagent | Amount (μL) |
| pUC19-AG | 20 |
| <i>EcoR</i> I | 1 |
| <i>Nhe</i> I | 1 |
| 10× Buffer | 3 |
| ddH ₂ O | 5 |
| Total | 30 |

3.4.5 重组表达载体 pCAMBIA1302- AG 载体的构建

(1)线性化表达载体 pCAMBIA1302-Cas9。用 *EcoR* I 和 *Xba* I 先后分别酶切 pCAMBIA1302-Cas9, 回收线性化片段。

酶切反应: 用 *EcoR* I 先对 pCAMBIA1302-Cas9 载体酶切, 置于 37℃ 进行双酶切反应 3 h,

然后置于常温下反应过夜, 充分酶切, 回收线性化载体。*Nhe* I 酶切回收的线性化载体, 置于 37℃ 进行双酶切反应 3 h, 然后置于常温下反应过夜, 充分酶切, 回收连接反应需要的线性化片段。连接体系(表 3)。

表 3 酶切目的片段反应体系

Table 3 Enzyme reaction system of the objective gene fragment

| 试剂 | 用量(μL) |
|------------------------------|-------------|
| Reagent | Amount (μL) |
| Plasmid | 20 |
| <i>EcoR</i> I 或 <i>Xba</i> I | 1 |
| 10× Buffer | 3 |
| ddH ₂ O | 6 |
| Total | 30 |

(2)胶回收的 520 bp DNA 片段与酶切后的 p-CAMBIA1302-Cas9 利用 T4 DNA 酶进行连接, 构建表达载体 pCAMBIA1302-AG。

连接反应: 连接体系(表 4), 将反应体系置于 16℃ 反应一周, 大片段充分链接。转化大肠杆菌, 筛选阳性克隆菌落。

表 4 表达载体连接反应体系

Table 4 Ligation reaction system for the construction of transgenic vector

| 试剂 | 用量 |
|---------------------|--------|
| Reagent | Amount |
| pCAMBIA1302-Cas9 | 1 μg |
| 520 bp DNA fragment | 1 μg |
| 10× Buffer | 5 μL |
| T4 DNA ligase | 2 μL |
| Total | 50 μL |

3.4.6 转化与重组载体(pCAMBIA1302-AG)的筛选

取 2~4 μL 连接产物转化 *E.coli* DH5α 感受态细胞。热激法转化大肠杆菌与单克隆筛选: 用 PCR 及质粒 DNA 双酶切鉴定后, 提取质粒 DNA, 备用。碱法小量提取质粒 DNA

3.5 农杆菌转化

采用冻融法转化农杆菌, 并进行菌落 PCR 验证, 然后保存菌液, 取 700 mL 菌液和 300 mL 甘油混于 1.5 mL 的 Eppendorf 管中, 于 -20℃ 保存, 用于后续拟南芥的遗传转化实验。

作者贡献

王晓霞是本研究的实验设计和实验研究的执行人; 苏哲、岳彩云完成数据分析, 负责论文



初稿的写作, 并参与研究实验及结果分析; 樊金会是项目的构思者及负责人, 指导实验设计, 数据分析, 论文写作与修改。全体作者都阅读并同意最终的文本。

致谢

感谢山东农业大学林学院和生命科学与技术学院提供实验条件与技术支持。

参考文献

- Fang R., Chang F., Sun Z.L., Li N., and Meng Q.Y., 2013, The techniques of CRISPR - Cas9 mediated fixed-point editing of the genome, *Shengwu Huaxue Yu Shengwu Wuli Jinzhan (Progress in Biochemistry and Biophysics)*, 40(8): 691-702 (方锐, 畅飞, 孙照霖, 李宁, 孟庆勇, CRISPR-Cas9 介导的基因组定点编辑技术, *生物化学与生物物理进展*, 2013, 40(8): 691-702)
- Li T.M., and Du B., 2011, CRISPR-Cas system and coevolution of bacteria and phages, *Yichuan (Hereditas)*, 33(3): 213-218(李铁民, 杜波, CRISPR-Cas 系统与细菌和噬菌体的共进化, *遗传*, 2011, 33(3): 213 - 218)
- Li J., Zhang Y., Chen K.L., Shan Q.W., Wang Y.P., Liang Z., and Gao C.X., 2013, CRISPR/Cas: a novel way of RNA-guided genome editing, *Yichuan (Hereditas)*, 40(8): 691-702(李君, 张毅, 陈坤玲, 单奇伟, 王延鹏, 梁振, 高彩霞, 2013, CRISPR/Cas 系统: RNA 靶向的基因组定向编辑新技术, *遗传*, 35(11): 1265-1273)
- Feng Z.Y., Zhang B.T., Ding W.N., Liu X.D., Yang D.L., Wei P.L., Cao F.Q., Zhu S.H., Zhang F., Mao Y.F., and Zhu J.K., 2013, Efficient genome editing in plants using a CRISPR/Cas system, *Cell Res*, 23(10): 1229-1232
<http://dx.doi.org/10.1038/cr.2013.114>
- Li D.L., Qiu Z.W., Shao Y.J., Chen Y.T., Guan Y.T., Liu M.Z., Li T.M., Gao N., Wang L.R., Lu X.L., Zhao Y.X., and Liu M.Y., 2013, Heritable gene targeting in the mouse and rat using a CRISPR-Cas system, *Nature Biotechnology*, 31(8): 681-683
<http://dx.doi.org/10.1038/nbt.2661>
- Li J.F., Norville J.E., Aach J., McCormack M., Zhang D.N., Bush J., Church G.M., and Sheen J., 2013, Multiplex and homologous recombination-mediated genome editing in Arabidopsis and Nicotiana benthamiana using guide RNA and Cas9, *Nature Biotechnology*, 31(8): 688-691
<http://dx.doi.org/10.1038/nbt.2654>
- Nekrasov V., Staskawicz B., Weigel D., Jones J.D.G., and Kamoun S., 2013, Targeted mutagenesis in the model plant Nicotiana benthamiana using Cas9 RNA-guided endonuclease, *Nat Biotechnol*, 31(8): 691-693
<http://dx.doi.org/10.1038/nbt.2655>
- Shan Q.W., Wang Y.P., Li J., Zhang Y., Chen K.L., Liang Z., Zhang K., Liu J.X., Xi J.J., Qiu J.L., and Gao C.X., 2013, Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system, *Nature Biotechnology*, 31(8): 686-688
<http://dx.doi.org/10.1038/nbt.2650>
- Terns M.P., and Terns R.M., 2011, CRISPR-based adaptive immune systems, *Curr Opin Microbiol*, 14(3): 321-327
<http://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2011.03.005>
- Wiedenheft B., Sternberg S.H., and Doudna J.A., 2012, RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea, *Nature*, 482(7385): 331-338
<http://dx.doi.org/10.1038/nature10886>