

## 基因编辑技术在植物启动子编辑中的研究进展

盖思宇<sup>1§</sup>, 陈子奇<sup>2§</sup>, 夏涵超<sup>1</sup>, 赵仁贵<sup>1\*</sup>, 刘相国<sup>2\*</sup>

1.吉林农业大学农学院, 长春 130118;

2.吉林省农业科学院, 长春 130119

**摘要:** 植物基因的表达决定了植物的表型特征,而基因的表达受启动子的直接调控。启动子作为基因的一个组成部分,控制着基因表达(转录)的起始时间和表达程度。利用基因编辑技术对启动子进行定向编辑之后,会因为基因序列特有的重组排列、顺式表达等因素使得植物中的某个或某些基因的表达模式发生改变,进而影响基因功能。这些改变最终直接或间接地改变了植物的外在表型特征,而一些正向改变会对植物的品质起到优化和改良作用。综合近几年基因编辑技术对启动子的研究,主要从启动子的构成与分类、基因编辑技术和启动子编辑的研究进展这3个方面对启动子的编辑在植物中的应用进行了概述和总结,以期对启动子编辑技术应用于植物改良提供参考。

**关键词:** 基因编辑技术;启动子编辑;植物品质改良

**DOI:** 10.19586/j.2095-2341.2023.0001

中图分类号:Q37

文献标志码:A

## Research Progress of CRISPR/Cas9 Technology in Plant Promoter Editing

GAI Siyu<sup>1§</sup>, CHEN Ziqi<sup>2§</sup>, XIA Hanchao<sup>1</sup>, ZHAO Rengui<sup>1\*</sup>, LIU Xiangguo<sup>2\*</sup>

1.Faculty of Agronomy, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China;

2.Jilin Academy of Agricultural Sciences, Changchun 130119, China

**Abstract:** Plant gene expression determines plant phenotypic characteristics, and gene expression is directly regulated by promoters. As a component of genes, promoters control the initiation time and expression degree of gene expression (transcription). After directed editing of promoters by gene editing technology, the expression pattern of one or some genes in plants would be changed due to the unique recombination and arrangement of gene sequences, cis-expression and other factors, thus affecting the function of genes. These changes ultimately directly or indirectly change the external phenotypic characteristics of plants, and positive changes would help to optimize and improve plant quality. In this paper, the application of promoter editing in plants was summarized from three aspects: the structure and classification of promoters, gene editing technology and the research progress of promoter editing, which was expected to provide reference for plant improving by promoter editing.

**Key words:** gene editing technology; promoter editing; plant quality improvement

2019年,一种突破基因编辑瓶颈、优化传统基因编辑的新策略——启动子靶向编辑<sup>[1]</sup>,给研究者提供了一个新的研究思路。在此之前,基因编辑研究大多围绕在对目标基因本身进行定位编辑或者删除,虽然达到了预期效果,但是也会额外产生许多其他的mRNA或蛋白质,这对于后续实

验结果有一定影响,而靶向启动子编辑能够避免这一问题。靶向启动子编辑旨在对目标基因的启动子片段进行编辑,利用基因自身的同源重组和顺式表达来对目标基因进行微调和改良,对基因整体结构没有太多改变。由于启动子区域属于非编码区,所以无论是插入还是缺失都不会在基因

收稿日期:2023-01-06;接受日期:2023-02-22

基金项目:吉林省自然科学基金项目(20220101330JC);吉林省预算内基本建设资金(创新能力建设)项目(2022C037-3);长春市现代农业发展科技支撑计划项目(21ZY13)。

联系方式:§盖思宇和陈子奇为本文共同第一作者。盖思宇E-mail:1459365568@qq.com;陈子奇E-mail:549177102@qq.com;

\*通信作者 赵仁贵E-mail:zhaorengui@sina.com;刘相国E-mail:lxgyj@cjaas.com

编辑产品中产生新的蛋白质或 mRNA。其次,启动子上有许多作用元件,这些元件都和基因表达息息相关,它们可以控制基因表达量的上升、下降,有的甚至会使基因沉默,因此可以通过编辑这些元件,使目标基因表达水平升高或降低甚至删除某些转录因子的结合位点,使这些因子无法激活,从而实现间接调控基因表达的目的。

## 1 启动子的构成与分类

启动子是指位于转录起始位点上游,能使特定 RNA 转录本进行转录的 DNA 非转录序列<sup>[1]</sup>,通常大小为 2 000~2 500 bp 左右。启动子序列中包含大量的顺式作用元件,它们都在基因转录中起到非常重要的作用,并且为 RNA 聚合酶和转录因子提供了一个稳定的结合位点。启动子的这种结构影响了它与 RNA 聚合酶的结合,从而间接影响了基因的转录水平。

### 1.1 启动子的结构

在启动子序列中存在的顺式作用元件大致分为 4 类:核心启动子、上游启动子成分、远上游元件和特殊启动子成分。核心启动子是指保证 RNA 聚合酶 II 转录正常起始所必需的、最少的 DNA 序列,包括转录起始位点及转录起始位点上游的 TATA 区。常见的多为 TATA-BOX。TATA-BOX 上游的保守序列称为上游启动子元件或上游激活序列,如 CAAT-BOX、GC-BOX 等。远离上游元件区域又叫远端调控区,比较常见的有增强子、沉默子、绝缘子等,这些元件通过与不同的转录因子及蛋白质识别和结合来调节基因的转录。

### 1.2 启动子的类型

启动子的类型有很多种,包括组成型启动子、组织特异性启动子、诱导型启动子。

**1.2.1 组成型启动子** 组成型启动子又叫非特异性启动子,它能在植物大多数组织中高效地启动基因表达,且不同组织之间表达水平没有明显差异,并且不受时空和外界因素的影响,具有很高的活性。例如玉米的泛素启动子已被证实在各种幼嫩组织中获得了稳定的表达<sup>[2]</sup>。

**1.2.2 组织特异性启动子** 组织特异性启动子又称为器官特异性启动子,只在特定的植物组织中表达,且呈现发育调节的特性。目前已在植物的花粉、种子、胚乳等组织中发现特异性启动子的存

在,并且还存在着与特异性启动子关联的、区别于其他组织的特异性序列,这两部分共同调控着基因在不同组织中的特异性表达<sup>[2-3]</sup>。有研究发现,*PDULL1* 启动子的核心区序列(-343~-1 个碱基对)介导 *GUS* 基因只在胚乳中表达,因此其被认定为是一个胚乳特异性启动子<sup>[4]</sup>。*ZmSTK2\_USP* 启动子含有顺式元件基序和两种花药/花粉特异的启动子元件(GTGA 和 AGAAA),2017 年,Wang 等<sup>[5]</sup>构建了 *ZmSTK2\_USP* 启动子驱动 *GUS* 基因,并且只在花粉管中检测到 *GUS* 基因活性,说明它是花粉特异性启动子。

**1.2.3 诱导型启动子** 诱导型启动子又称诱导型增强启动子,是指在收到外界物理或化学因素信号的刺激下,启动子驱动的目的基因的转录水平会升高。诱导型启动子可以通过使用不同的诱导信号调控目的基因在特定情况下表达,从而快速有效地调控转录基因的转录速率<sup>[6-9]</sup>。*ZmWRKY106* 的启动子区域包括 C-重复/脱水反应元件(dehydration reaction element, DRE)、低温反应元件(low temperature reaction element, LTR)、MBS 元件和 TCA 元件,并且通过实验也证实 *ZmWRKY106* 能够积极响应干旱、高温等多种非生物胁迫反应途径<sup>[10]</sup>。从玉米中鉴定出的立枯丝核菌诱导启动子 pGRMZM2G174449,对其进行缺失分析发现,-574~-455 片段是 PGRMZM2G174449 对纹枯病菌的应答所必需的,从生物信息学角度可分析出该片段含有未知的病原菌诱导顺式作用元件,并对立枯丝核菌的响应起着重要作用<sup>[8]</sup>。

**1.2.4 双向启动子** 双向启动子指的是位于两个相邻且方向相反的基因之间的一段 DNA 序列,它可以调节两个相邻的基因,并且可以从两个方向开始转录<sup>[11-12]</sup>。

## 2 基因组编辑技术在植物中的应用

截至目前,已经广泛应用的基因组编辑技术有工程内切酶/巨核酸酶(meganuclease, EMNs)、锌指核酸酶(zinc finger nuclease, ZFNs)、转录激活因子样效应物核酸酶(transcription activator-like effector nuclease, TALENs)和规则间隔短回文重复序列(clustered regularly interspaced short palindromic repeat, CRISPR),它们都是重要的植物基因组编辑研究工具<sup>[13]</sup>。

## 2.1 工程内切酶/巨核酸酶

巨核酸酶(EMNs)也被称为归巢内切酶,它的特征是存在一个大约12~40 bp的广泛识别位点。由于其特殊的性质和较长的识别位点,这些酶被认为是最精确的限制性内切酶<sup>[12]</sup>。然而,实验证明EMN与其他基因组靶向技术一起改造巨核酸酶是困难的,不仅需要在对植物进行基因编辑时掺入修饰的巨核酸酶,例如拟南芥和烟草<sup>[14-15]</sup>,还因为DNA结合域通常与巨核酸酶的催化域混合在一起,不能彼此分离,导致操作困难<sup>[16]</sup>。

## 2.2 锌指核酸酶

锌指核酸酶(ZFNs)是通过靶向双链断裂(double strand break, DSB)进行基因组编辑最有效的工具之一<sup>[16]</sup>,是基于ZFNs的第一代基因组编辑技术使用嵌合工程核酸酶开发的<sup>[17]</sup>。目前ZFNs已经成功应用于烟草<sup>[17]</sup>、玉米<sup>[18]</sup>、拟南芥<sup>[19-20]</sup>、大豆<sup>[21]</sup>等植物的基因编辑研究中。ZFN的结构组成涉及2个结构域:① DNA结合域,由300~600个锌指重复序列组成<sup>[22]</sup>,每个锌指重复序列可以监测和读取9~18个碱基对;② DNA裂解结构域,它被称为II型限制性内切酶FokI的非特异性裂解结构域,在ZFN中充当DNA裂解结构域<sup>[23]</sup>。

## 2.3 转录激活因子样效应物核酸酶

转录激活因子样效应物核酸酶(TALENs)系统通常用于精确基因组编辑,内切核酸酶FokI与可以特异性识别DNA序列的TALE进行偶联形成内切酶TALEN。与ZFN一样,TALEN也能够促进靶向DSB,帮助启动负责修复和修饰DNA的通路<sup>[17]</sup>。TALEN系统中涉及的蛋白质包括一个负责与DNA结合的中心结构域和一个核定位序列<sup>[24]</sup>。一般来说,TALE蛋白可以通过结合DNA重复序列来调节。已有研究表明,DNA序列的核苷酸在TALE蛋白的帮助下被固定在50端胸苷碱基(50T)处。而在没有50T的情况下,TALL转录因子(TALL-TF)和TALL重组酶(TALL-R)的活性降低<sup>[25]</sup>。也有相关实验证明相比于ZFN,TALEN的调制更简单、成本效益更高、脱靶率更低<sup>[26-27]</sup>,因此也更受欢迎。目前,利用TALEN技术已经成功应用于水稻<sup>[28]</sup>、玉米<sup>[29]</sup>、大麦<sup>[30]</sup>等植物的基因组编辑中。

## 2.4 基因编辑系统

基因编辑系统(CRISPR/Cas)是在原核生物中的一种获得性免疫系统,用于抵抗存在于噬菌体或质粒的外源遗传元件的入侵。它由2个核心

成分组成——CRISPR序列和Cas酶(一种核酸内切酶),不同的编辑系统所使用的内切酶的种类也不相同,其中Cas9内切酶是研究最多且应用最广泛的一个。CRISPR/Cas9是一个高度保守的系统,起源于化脓性链球菌<sup>[31-32]</sup>,并且依赖于RNA引导的核酸酶的活性及其作用方式,因其多功能性、有效性、充分性和简单性而受到广泛关注<sup>[33]</sup>。目前,CRISPR/Cas9已经应用到生物技术、基因工程、基础生物学和应用生物学等多个研究领域<sup>[33]</sup>。随着植物基因组编辑系统的扩展,CRISPR/Cas9的表达盒被转化到细胞中,并入核基因组并表达,随后切割其目标DNA序列,在转化和组织培养过程中采用抗生素和除草剂进行筛选或阻断,从而产生CRISPR/Cas9系统介导且可以功能性表达的细胞再生植物。该技术已经成功应用于玉米<sup>[34]</sup>、水稻<sup>[35]</sup>、大豆<sup>[36]</sup>等作用中,为农作物的深入研究起到很大的帮助。

除了CRISPR/Cas9之外,这种基因组编辑系统拥有两大类和六个亚型。其中CRISPR第二类是一种名为Cpf1的V型效应器,可以使用高度特异的CRISPR RNA来切割相应的DNA序列<sup>[37-38]</sup>。其形成交错末端的特殊构型使得Cpf1成为一种非常有用的核酸酶<sup>[39-41]</sup>。Cpf1具有各种不同的特征,例如靶向富集T基序的能力,不需要反式激活crRNA,诱导交错双链断裂的功能,以及加工RNA和DNA核酸酶活性的潜力。目前,Cpf1可以视为是Cas9<sup>[42]</sup>的替代品,并且可以弥补Cas9相关的不足,已经成功应用于水稻<sup>[43]</sup>、棉花<sup>[44]</sup>、烟草<sup>[45]</sup>、柑橘<sup>[46]</sup>等植物。

## 3 植物启动子编辑的研究进展

至今,基因编辑技术已经成为研究人员不可或缺的研究手段,并且已经成功应用于各种常见作物的品种改良中。近年来人们又发现针对启动子区域的精准编辑是一种更好的选择,它不仅可以避免在编辑基因中产生多余的蛋白或其他杂质,还可为可能发生的脱靶现象降低风险。针对启动子区域的研究除了直接靶向启动子进行编辑外,还可以对启动子上的元件进行分析预测和干预,从而达到改良的目的。也就是说既可以在启动子中设计靶位点进行编辑,在得到的突变材料中进行筛选后获取需要的性状或表型,也可以直

接在启动子区域预测出与目标性状或表型相关的元件,并对其进行突变。下文概括了近几年在不同作物中比较典型的启动子编辑的应用进展。

### 3.1 利用启动子编辑抗病品种

靶向启动子编辑可以用来针对作物病害进行品种改良。综合近年的研究来看,这项技术目前在改善水稻白叶枯病研究方面应用广泛。

水稻白叶枯病是众多水稻病害之一,对产量影响较大,一般减产达20%~30%,严重的可达50%~60%,甚至颗粒无收。引起水稻白叶枯病的病菌 *Xoo* (*Xanthomonas oryzae* *oryzicola*) 通过激活易感基因 (*OsSWEET* 家族), 利用其源转录激活物样效应器来侵染宿主。为了解决这一危害, 2019年 Li 等<sup>[1]</sup> 从启动子上的作用元件入手, 利用 CRISPR/Cas9 技术, 敲除了 *Xa13* 基因启动子中的 31 个碱基病原体诱导元件<sup>[47-48]</sup>, 发现启动子中这段序列的缺失会导致 *Xa13* 基因失去其被白叶枯病诱导的能力, 进而使水稻对白叶枯病表现出抗性。Zafa 等<sup>[49]</sup> 针对白叶枯病菌的易感基因 *OsSWEET* 家族中 *OsSWEET14* 启动子上存在的 4 个与病菌相对应的结合元件 (EBE), 建立了 CRISPR-Cas9 介导的 Super Basmati 水稻的基因组编辑系统。在获得的突变体中, 只有一个效应器 *AvrXa7* 对应的 EBE 缺失突变株系对 *Xoo* 病菌表现出抗性。Xu 等<sup>[50]</sup> 同样也从 *OsSWEET13* 启动子上与病菌对应的结合元件着手, 对 3 000 个水稻品种基因组中的 EBE 变异进行了分析, 鉴定出 10 个类 *Xa25* 的单倍型, 还发现 *Xoo* 病菌至少编码 5 种类型的 PthXo2 样效应器, 其中 Tal5LN18 和 Tal7PXO6 是相互兼容的 *Xoo* 菌株 LN18 和 PXO61 的主要毒力因子, 并且这两个效应器在 *OsSWEET13* 启动子上结合了序列略有不同的 EBE 来激活其表达。Yu 等<sup>[51]</sup> 利用 CRISPR/Cas12a 技术对 *Xa13* 基因启动子上的类转录激活因子 (UPT) 效应器的核心核苷酸进行定点突变, 对效应器与病菌的结合以及致病基因的激活进行阻碍。该实验筛选出了具有缺失 UPT 盒中核心核苷酸的水稻突变株系, 该株系对 PXO99 菌株表现出明显的抗性。这说明 UPT 盒中核心核苷酸的缺失使 *Xa13* 基因无法被 PXO99 诱导, 同时这些突变株系并不具有负面的农艺性状。

除了对水稻白叶枯病的研究外, 启动子编辑技术在抵抗柑橘溃疡病害的诱导上也发挥了巨大

作用。Peng 等<sup>[52]</sup> 对柑橘中易感基因 *CsLOB1* 的启动子进行靶向修饰后, 获得了 38 个突变体并从中筛选出了 16 个在易感病毒的效应器元件 EBEPthA4 上有修饰痕迹的株系。经过分析后发现, 正是对 *CsLOB1* 启动子进行的靶向编辑干扰了其易被柑橘溃疡病侵染诱导的特性, 且这个效应器的改变使新获得的株系对柑橘溃烂病表现出更强的抗性。

### 3.2 利用启动子编辑改进产量相关性状

产量是作物育种中最重要的性状。在基因编辑领域, 早先的研究通过对一些基因的编辑来改变产量或跟产量相关的性状, 下文将介绍一些通过靶向启动子的编辑技术来改变产量和提高产量性状的研究进展。

Huang 等<sup>[53]</sup> 利用 CRISPR/Cas9 技术对水稻 *Wxb* 启动子 TATA 框附近区域进行编辑, 产生了 6 个新的 *Wx* 等位基因, 并且这 6 个等位基因都发现了 *Wx* 基因表达量的下调, 以及直链淀粉含量的下降。实验还发现在启动子上设计的 7 个位点中, S7 位点处发生的突变表现出了高度保守, 该突变材料在不同经纬度地点的测定中都体现出了稳定的基因表达量下调和淀粉含量的下降。除了淀粉含量, 水稻中蛋白质含量和碳水化合物含量之间存在的一种协调关系也跟启动子中的某些基序相关。Li 等<sup>[54]</sup> 研究发现了 *NF-YC4* 基因的异位表达会牺牲碳水化合物来增加叶子和种子的蛋白质含量。随后, 他们对水稻和大豆中 *NF-YC4* 基因的启动子进行分析, 发现其中存在着几个可能与抑制器结合的基序, 使用 CRISPR/Cas9 技术对这些基序进行靶向删除后, *NF-YC4* 基因的表达量增加, 蛋白质含量增加, 碳水化合物含量减少。将这些数据与未发生删除的株系进行对比后发现, 发生删除的株系叶蛋白含量比之前提高了 48%, 种子蛋白也提高了 15%。

在番茄中有 3 个主要生产性状: 果实大小、花序分支和植株结构。为了保证在突变后每一代都可以稳定遗传, Rodríguez-Leal 等<sup>[55]</sup> 根据之前的 CLAVATA-WUSCHEL (CLV-WUS) 通路研究结果<sup>[56]</sup>, 利用 CRISPR/Cas9 转基因在“敏化”的 F<sub>1</sub> 群体中携带多个 gRNA 的遗传力, 快速评估大量启动子变异对上述 3 个性状的影响。实验成功分离出了稳定遗传的启动子等位基因, 这些等位基因都可以为这 3 个性状提供连续的变异。Wang 等<sup>[57]</sup> 在两

个与番茄果实大小相关的基因中设计了60多个启动子等位基因,并对他们的启动子区域进行靶向突变。突变结果表明,干细胞增殖抑制基因 *SLCLV3* 启动子序列较为保守,其中的靶向突变对番茄果室数量的影响很小,并且还发现 *SLCLV3* 启动子内部有着更高级别的顺式调控互作。而在这其中, *SLWUS* 是一种被 *SLCLV3* 抑制的干细胞增殖的正调控因子,更高的保守性使得它对启动子干扰有着更强的耐受性。

芥菜型油菜通常具有双眼的植株外观,在每一眼中都包含丰富的油菜种子,但是有研究证明这种芥菜型油菜的三眼突变体中,每一眼中所包含的油菜种子数量都远远高于正常的双眼植株。Wang等<sup>[58]</sup>对芥菜和拟南芥中影响形成眼室数量的 *mc2* 基因结构和功能进行了分析,发现 *mc2* 是 *CLV1* 的直系同源基因。对 *mc2* 基因的启动子靶向编辑后发现,在 *mc2* 启动子顺式调控区发生缺失会影响 *mc2* 基因在心皮边缘分生组织中的表达,最终形成三眼果油菜,从而增加油菜籽的产量。

玉米花序分生组织的建成和维系是玉米花序正常发育的基础,从理论上讲提升玉米花序分生组织活性可以增加玉米籽粒数目,提高产量。而在植物中,分生组织的大小受到 *CLAVATA-WUSCHEL* 途径中 *CLE* 多肽信号的调控。Liu等<sup>[59]</sup>利用 *CRISPR/Cas9* 基因组编辑技术,针对 *ZmCLE7* 和 *ZmFCP1* 启动子区域靶向编辑,获得了一系列影响其表达量的弱突变等位基因。在这些等位基因中,一些启动子区域缺失的等位基因可以在一定程度上增加花序分生组织的大小,进而使相对应植株的果穗变粗,增加穗行数和穗粒数,最终提高产量。

### 3.3 利用启动子编辑分析启动子与转录因子及作用元件的关系

启动子上包含许多作用元件和转录因子及与其他物质结合的效应器,通过分析启动子序列上所包含的作用元件种类,并了解这些元件的功能,有利于了解所研究的启动子的详细信息,为研究者们提供便利和思路。

Jin等<sup>[60]</sup>利用PCR技术获得了 *Zmap* 启动子区域部分缺失的一系列衍生物,再用农杆菌介导法转入烟草叶片中,对每个缺失的结构进行了研究与分析。结果表明,在启动子区域含有 MYB 结合位点、Box-II、TGACG 元件、CGTCA 元件和低温反应元件,通过 GUS 染色实验发现 *Zmap* 启动子上

-1 694~-1 394 bp之间的序列可能含有使 *GUS* 基因表达上调的顺式元件;而在-1 694~-1 394 bp之间可能存在抑制 *Zmap* 基因表达的元件,在4℃时 *Zmap* 基因表达下调。通过在烟草中的干旱对比实验猜测 MYB 结合位点(-757)可能是一个干旱的负调控反应元件。

已知玉米籽粒灌浆受时空同步转录因子的调控,为了探究协调其表达的转录因子,Yang等<sup>[61]</sup>鉴定出一个含有 B3 结构域的转录因子——*ZmABI19*,它可以直接与 *Opaque2(O2)* 启动子结合反式激活关键因子的表达来调节种子发育和籽粒灌浆,并且可以直接调节生长素反应基因以促进种子的生长和发育。当 *ZmABI19* 失活时,胚乳和胚的发育都会受到严重影响,所以 *ZmABI19* 在协调胚胎和胚乳发育中起关键作用,且作为籽粒灌浆的启动子发挥作用。

玉米作为我国主要的粮食作物之一,约有40%的玉米产出来自北方春播玉米区,经常面临气温骤降造成减产甚至颗粒无收的情况,因此提高玉米耐冷性的研究非常必要。Li等<sup>[62]</sup>对玉米的转录组分析后发现 *BZIP68* 抑制冷诱导的 *DREB1* 转录因子的表达,并且 *BZIP68* 的稳定性和转录活性受其在冷胁迫下保守的 Ser250 残基上的磷酸化控制。同时,当 *BZIP68* 玉米启动子中插入 358 bp 的 *Indel-972* 后增强了 *BZIP68* 的表达。对启动子序列进行分析后发现,这个 358 bp 的插入中鉴定了多个保守的顺式元件,包括 CCAAT-box、W-box (TTGACT/C)、GAATC (MYB) 和 AAATT (AT-Hook) 元件,可能是 *BZIP68* 转录上调的原因。

WRKY 转录因子是一类重要的植物次生代谢调节因子。Yang等<sup>[63]</sup>证明了 CrWRKY1 可以调节观赏和药用植物长春花中萜类吲哚生物碱的生物合成,并且可以驱动 *GUS* 基因在原生植物和异源植物中的表达。他们还对序列上的缺失及突变进行了分析,结果发现位于-140~-93 bp和-3~+113 bp之间的序列对于启动子的活性至关重要,并且两个重叠的 AS-1 元件和一个 *Crtrich* 基序对启动子活性有显著影响。

从这些启动子编辑的研究中,我们不难看出靶向启动子编辑之后无论是在基因表达还是实验材料最终体现出来的表型和性状,不仅有和预期相符合的结果,还包含其他的正向效果,例如增加抗性、更加稳定的遗传等。这可能是越来越多的

研究者选择靶向启动子进行基因编辑的原因,它不仅改变了启动子上的碱基序列,还会使后面的基因序列由于自身的顺式表达产生微小的突变,从而产生其他的正向效果,这也正是研究者们需要去深入研究和探讨的问题。

#### 4 展望

在最初进行的基因改良中使用的传统突变技术主要以基因本身作为靶点,进行编辑、插入、敲除等行为,对基因自身的序列改变较大,这样不仅可能损坏原本的基因表达序列,还有可能在编辑目标基因的同时,使目标基因的非靶向位置也受到影响“被突变”,最终导致实验结果不符合预期;或者在进行下一代遗传时,基因自身的修复能力使得编辑好的结果序列发生二次突变,这些都是研究者需要考虑的问题。而本文所讲的靶向启动子编辑技术首先不会对目标基因结构造成破坏,并且由于作用靶点在基因序列的上游启动子区域,更加保证了基因序列的安全性。其次,启动子序列更加保守和稳定,在后代材料的遗传中,也可以表现为稳定的性状或表型遗传。

然而,无论是早期使用的传统突变技术,还是靶向启动子编辑技术都会面临的一个最大问题就是可能出现脱靶现象,即脱离原设计靶位进行编辑的现象。加拿大生物技术行动网络(Canadian Biotechnology Action Network, CBAN)在2020年的一份新报告中指出,在基因附近脱靶可能会产生新的蛋白,或者由于脱靶造成了非预期的基因缺失,从而导致目标基因的沉默或者植株致死。但是在启动子编辑中,脱靶之后可能会出现两种情况:①脱靶后编辑的其他位置上含有类似的作用元件,这个元件的缺失导致顺式表达后的基因出现预期外的变化;②脱靶后编辑在非功能区域,这种脱靶不仅目的基因序列不会受到影响,其他基因也不会出现意外的变化。

直接靶向基因进行编辑的材料有可能会产生其他多余的蛋白质,对检测结果不利。而靶向启动子编辑的优点之一就是不会产生这类杂质,并且不仅得到了利于农业生产的优良性状,也通过实验证明了这种方法改良的性状可以稳定遗传。因此,靶向启动子编辑是一个有利于未来农业发展和加速作物物质创新的长远策略。

#### 参 考 文 献

- [1] LI C, LI W, ZHOU Z, *et al.*. A new rice breeding method: CRISPR/Cas9 system editing of the Xa13 promoter to cultivate transgene-free bacterial blight-resistant rice[J/OL]. *Plant Biotechnol. J.*, 2020, 18(2): 313[2023-02-10]. <https://doi.org/10.1111/pbi.13217>.
- [2] PORTO M S, PINHEIRO M P N, BATISTA V G L, *et al.*. Plant promoters: an approach of structure and function[J]. *Mol. Biotechnol.*, 2014, 56: 38-49.
- [3] TSUDA K, SUZUKI T, MIMURA M, *et al.*. Comparison of constitutive promoter activities and development of maize ubiquitin promoter-and gateway-based binary vectors for rice[J]. *Plant Biotechnol.*, 2022, 39(2): 139-146.
- [4] FUJIWARA T, BEACHY R N. Tissue-specific and temporal regulation of a  $\beta$ -conglycinin gene: roles of the RY repeat and other cis-acting elements[J]. *Plant Mol. Biol.*, 1994, 24: 261-272.
- [5] 武健东, 姜翠萍, 江海洋, 等. 玉米蔗糖合酶基因启动子的克隆及功能分析[J]. *安徽农业大学学报*, 2015, 42(3): 327-332.
- [6] 董浩, 赵轶君, 李红民. 生菜 *rbcS* 基因启动子序列的克隆与分析[J]. *华北农学报*, 2013, 28(1): 88-92.
- [7] 王志新, 赵琳, 李文滨. 植物诱导型启动子的研究进展[J]. *大豆科技*, 2011(3): 5-9.
- [8] 王旭静, 李为民, 唐巧玲, 等. 中棉(*Gossypium arboreum*)光诱导基因 Gacab 启动子在转基因烟草中的功能缺失分析[J]. *作物学报*, 2009, 35(6): 1006-1012.
- [9] 魏桂民, 张金文, 王蒂, 等. 马铃薯 *Sgt1* 基因启动子的结构及功能分析[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2013, 29(10): 969-977.
- [10] WANG C T, RU J N, LIU Y W, *et al.*. Maize WRKY transcription factor ZmWRKY106 confers drought and heat tolerance in transgenic plants[J/OL]. *Int. J. Mol. Sci.*, 2018, 19(10): 3046 [2023-02-10]. <https://doi.org/10.3390/ijms19103046>.
- [11] MURPHY D J. A seed-specific *Brassica napus* oleosin promoter interacts with a G-box-specific protein and may be bi-directional[J]. *Plant Mol. Biol.*, 1994, 24: 327-340.
- [12] DHADI S R, DESHPANDE A, DRISCOLL K, *et al.* Major cis-regulatory elements for rice bidirectional promoter activity reside in the 5'-untranslated regions[J]. *Gene*, 2013, 526(2): 400-410.
- [13] AHMAR S, SAEED S, KHAN M H U, *et al.*. A revolution toward gene-editing technology and its application to crop improvement[J/OL]. *Int. J. Mol. Sci.*, 2020, 21(16): 5665 [2023-02-10]. <https://doi.org/10.3390/ijms21165665>.
- [14] TOWNSEND J A, WRIGHT D A, WINFREY R J, *et al.*. High-frequency modification of plant genes using engineered zinc-finger nucleases[J]. *Nature*, 2009, 459(7245): 442-445.
- [15] ZHANG F, MAEDER M L, UNGER-WALLACE E, *et al.*. High frequency targeted mutagenesis in *Arabidopsis thaliana* using zinc finger nucleases[J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2010, 107(26): 12028-12033.
- [16] PUCHTA H. The repair of double-strand breaks in plants: mechanisms and consequences for genome evolution[J]. *J. Exp. Bot.*, 2005, 56(409): 1-14.
- [17] GAJ T, GERSBACH C A, BARBAS C F. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering[J]. *Trends*

- Biotechnol., 2013, 31(7): 397-405.
- [18] SHUKLA V K, DOYON Y, MILLER J C, *et al.* Precise genome modification in the crop species *Zea mays* using zinc-finger nucleases[J]. Nature, 2009, 459(7245): 437-441.
- [19] ZHANG F, MAEDER M L, UNGER-WALLACE E, *et al.* High frequency targeted mutagenesis in *Arabidopsis thaliana* using zinc finger nucleases[J]. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2010, 107(26): 12028-12033.
- [20] OSAKABE K, OSAKABE Y, TOKI S. Site-directed mutagenesis in *Arabidopsis* using custom-designed zinc finger nucleases[J]. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2010, 107(26): 12034-12039.
- [21] CURTIN S J, ZHANG F, SANDER J D, *et al.* Targeted mutagenesis of duplicated genes in soybean with zinc-finger nucleases[J]. Plant Physiol., 2011, 156(2): 466-473.
- [22] CARLSON D F, FAHRENKRUG S C, HACKETT P B. Targeting DNA with fingers and TALENs[J/OL]. Mol. Ther. Nucl. Acids, 2012, 1(1): e3[2012-01-24]. <https://doi.org/10.1038/mtna.2011.5>.
- [23] CARROLL D, MORTON J J, BEUMER K J, *et al.* Design, construction and in vitro testing of zinc finger nucleases[J]. Nature Prot., 2006, 1(3): 1329-1341.
- [24] SCHORNACK S, MEYER A, RÖMER P, *et al.* Gene-for-gene-mediated recognition of nuclear-targeted AvrBs3-like bacterial effector proteins[J]. J. Plant Physiol., 2006, 163(3): 256-272.
- [25] LAMB B M, MERCER A C, BARBAS III C F. Directed evolution of the TALE N-terminal domain for recognition of all 5' bases[J]. Nucl. Acids Res., 2013, 41(21): 9779-9785.
- [26] SAUER N J, MOZORUK J, MILLER R B, *et al.* Oligonucleotide-directed mutagenesis for precision gene editing[J]. Plant Biotechnol. J., 2016, 14(2): 496-502.
- [27] KUMAR V, JAIN M. The CRISPR-Cas system for plant genome editing: advances and opportunities[J]. J. Exp. Bot., 2015, 66(1): 47-57.
- [28] LI T, LIU B, SPALDING M H, *et al.* High-efficiency TALEN-based gene editing produces disease-resistant rice[J]. Nat. Biotechnol., 2012, 30(5): 390-392.
- [29] LIANG Z, ZHANG K, CHEN K, *et al.* Targeted mutagenesis in *Zea mays* using TALENs and the CRISPR/Cas system[J]. J. Genet. Genom., 2014, 41(2): 63-68.
- [30] WENDT T, HOLM P B, STARKER C G, *et al.* TAL effector nucleases induce mutations at a pre-selected location in the genome of primary barley transformants[J]. Plant Mol. Biol., 2013, 83: 279-285.
- [31] CHYLINSKI K, MAKAROVA K S, CHARPENTIER E, *et al.* Classification and evolution of type II CRISPR-Cas systems [J]. Nucl. Acids Res., 2014, 42(10): 6091-6105.
- [32] SMIRNOV A V, YUNUSOVA A M, LUKYANCHIKOVA V A, *et al.* CRISPR/Cas9, a universal tool for genomic engineering[J]. Vavilov J. Genet. Breed., 2016, 20(4): 493-510.
- [33] GASIUNAS G, BARRANGOU R, HORVATH P, *et al.* Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria[J]. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2012, 109(39): 2579-2586.
- [34] LIANG Z, ZHANG K, CHEN K, *et al.* Targeted mutagenesis in *Zea mays* using TALENs and the CRISPR/Cas system[J]. J. Genet. Genom., 2014, 41(2): 63-68.
- [35] TANG X, LIU G, ZHOU J, *et al.* A large-scale whole-genome sequencing analysis reveals highly specific genome editing by both Cas9 and Cpf1 (Cas12a) nucleases in rice[J]. Genome Biol., 2018, 19(1): 1-13.
- [36] CAI Y, CHEN L, LIU X, *et al.* CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis of GmFT2a delays flowering time in soya bean[J]. Plant Biotechnol. J., 2018, 16(1): 176-185.
- [37] MA X, CHEN X, JIN Y, *et al.* Small molecules promote CRISPR-Cpf1-mediated genome editing in human pluripotent stem cells[J/OL]. Nat. Commun., 2018, 9(1): 1303[2023-02-10]. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03760-5>.
- [38] RIESENBERG S, MARICIC T. Targeting repair pathways with small molecules increases precise genome editing in pluripotent stem cells[J/OL]. Nat. Commun., 2018, 9(1): 2164[2023-02-10]. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04609-7>.
- [39] BERNABÉ-ORTS J M, CASAS-RODRIGO I, MINGUET E G, *et al.* Assessment of Cas12a-mediated gene editing efficiency in plants[J]. Plant Biotechnol. J., 2019, 17(10): 1971-1984.
- [40] BAYAT H, MODARRESSI M H, RAHIMPOUR A. The conspicuity of CRISPR-Cpf1 system as a significant breakthrough in genome editing[J]. Curr. Microbiol., 2018, 75: 107-115.
- [41] MALZAHN A A, TANG X, LEE K, *et al.* Application of CRISPR-Cas12a temperature sensitivity for improved genome editing in rice, maize, and *Arabidopsis*[J]. BMC Biol., 2019, 17(1): 1-14.
- [42] SAFARI F, ZARE K, NEGAHDARIPOUR M, *et al.* CRISPR Cpf1 proteins: structure, function and implications for genome editing[J]. Cell Biosci., 2019, 9: 1-21.
- [43] YIN X, ANAND A, QUICK P, *et al.* Editing a stomatal developmental gene in rice with CRISPR/Cpf1[M// Plant Genome Editing with CRISPR Systems: Methods and Protocols, 2019: 257-268.
- [44] LI B, RUI H, LI Y, *et al.* Robust CRISPR/Cpf1 (Cas12a)-mediated genome editing in allotetraploid cotton (*Gossypium hirsutum*)[J]. Plant Biotechnol. J., 2019, 17(10): 1862-1864.
- [45] ENDO A, MASAFUMI M, KAYA H, *et al.* Efficient targeted mutagenesis of rice and tobacco genomes using Cpf1 from *Francisella novicida*[J/OL]. Sci. Rep., 2016, 6(1): 38169[2023-02-10]. <https://doi.org/10.1038/srep38169>.
- [46] JIA H, ORBOVIĆ V, WANG N. CRISPR-LbCas12a-mediated modification of citrus[J]. Plant Biotechnol. J., 2019, 17(10): 1928-1937.
- [47] RÖMER P, RECHT S, STRAUß T, *et al.* Promoter elements of rice susceptibility genes are bound and activated by specific TAL effectors from the bacterial blight pathogen, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*[J]. New Phytol., 2010, 187(4): 1048-1057.
- [48] YUAN T, LI X, XIAO J, *et al.* Characterization of *Xanthomonas oryzae*-responsive cis-acting element in the promoter of rice race-specific susceptibility gene *Xa13*[J]. Mol. Plant, 2011, 4(2): 300-309.
- [49] ZAFAR K, KHAN M Z, AMIN I, *et al.* Precise CRISPR-Cas9 mediated genome editing in super basmati rice for resistance against bacterial blight by targeting the major susceptibility gene [J/OL]. Front. Plant Sci., 2020, 11: 575[2023-02-10]. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00575>.
- [50] XU Z, XU X, GONG Q, *et al.* Engineering broad-spectrum

- bacterial blight resistance by simultaneously disrupting variable TALE-binding elements of multiple susceptibility genes in rice[J]. *Mol. Plant*, 2019, 12(11): 1434-1446.
- [51] YU K, LIU Z, GUI H, *et al.*. Highly efficient generation of bacterial leaf blight-resistant and transgene-free rice using a genome editing and multiplexed selection system[J]. *BMC Plant Biol.*, 2021, 21(1): 1-10.
- [52] PENG A, CHEN S, LEI T, *et al.*. Engineering canker-resistant plants through CRISPR/Cas9-targeted editing of the susceptibility gene Cs LOB 1 promoter in citrus[J]. *Plant Biotechnol. J.*, 2017, 15(12): 1509-1519.
- [53] HUANG L, LI Q, ZHANG C, *et al.*. Creating novel Wx alleles with fine-tuned amylose levels and improved grain quality in rice by promoter editing using CRISPR/Cas9 system[J/OL]. *Plant Biotechnol. J.*, 2020, 18(11): 2164[2023-02-10]. <https://doi.org/10.1111/pbi.13391>.
- [54] ULMASOV T. CRISPR/Cas9-based editing of OsNF-YC4/GmNF-YC4 promoter yields high-protein crops[J]. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 2022, 99: 44-45.
- [55] RODRÍGUEZ-LEAL D, LEMMON Z H, MAN J, *et al.*. Engineering quantitative trait variation for crop improvement by genome editing[J]. *Cell*, 2017, 171(2): 470-480.
- [56] SOMSSICH M, JE B I, SIMON R, *et al.*. CLAVATA-WUSCHEL signaling in the shoot meristem[J]. *Development*, 2016, 143(18): 3238-3248.
- [57] WANG X, AGUIRRE L, RODRÍGUEZ-LEAL D, *et al.*. Dissecting cis-regulatory control of quantitative trait variation in a plant stem cell circuit[J]. *Nat. Plants*, 2021, 7(4): 419-427.
- [58] WANG G, ZHANG X, HUANG W, *et al.*. Increased seed number per silique in *Brassica juncea* by deleting cis-regulatory region affecting BjCLV1 expression in carpel margin meristem[J]. *Plant Biotechnol. J.*, 2021, 19(11): 2333-2348.
- [59] LIU L, GALLAGHER J, AREVALO E D, *et al.*. Enhancing grain-yield-related traits by CRISPR-Cas9 promoter editing of maize *CLE* genes[J]. *Nat. Plants*, 2021, 7(3): 287-294.
- [60] JIN B, SHENG Z, MUHAMMAD I, *et al.*. Cloning and functional analysis of the promoter of a stress-inducible gene (*Zmap*) in maize[J/OL]. *PLoS ONE*, 2019, 14(2): e0211941[2023-02-10]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0211941>.
- [61] YANG T, GUO L, JI C, *et al.*. The B3 domain-containing transcription factor ZmABI19 coordinates expression of key factors required for maize seed development and grain filling[J]. *Plant Cell*, 2021, 33(1): 104-128.
- [62] LI Z, FU D, WANG X, *et al.*. The transcription factor bZIP68 negatively regulates cold tolerance in maize[J]. *Plant Cell*, 2022, 34(8): 2833-2851.
- [63] YANG Z, PATRA B, LI R, *et al.*. Promoter analysis reveals cis-regulatory motifs associated with the expression of the WRKY transcription factor CrWRKY1 in *Catharanthus roseus*[J]. *Planta*, 2013, 238: 1039-1049.