

生物技术

谢小东, 高军平, 李泽锋, 等. CRISPR/Cas9 介导烟草多基因编辑体系的应用 [J]. 中国烟草学报, 2019, 25 (4). XIE Xiaodong, GAO Junping, LI Zefeng, et al. Application of multigene editing system mediated by CRISPR/Cas9 to *Nicotiana tabacum* [J]. Acta Tabacaria Sinica, 2019, 25(4). doi: 10.16472/j.chinatobacco.2019.065

CRISPR/Cas9 介导烟草多基因编辑体系的应用

谢小东¹, 高军平², 李泽锋¹, 张剑锋¹, 魏攀¹, 罗朝鹏¹,
王晨¹, 武明珠¹, 翟妞¹, 杨军¹

1 中国烟草总公司郑州烟草研究院, 国家烟草基因研究中心, 郑州高新技术产业开发区枫杨街2号 450001;

2 湖南中烟工业有限责任公司技术研发中心, 长沙市劳动中路386号 410008

摘要: CRISPR/Cas9 是一种新型的基因组定向编辑技术, 近年来在烟草基因组的定向编辑中得到了广泛应用。CRISPR/Cas9 介导的多基因编辑技术在许多物种中表现出很大的潜力, 为了探索 CRISPR/Cas9 介导烟草多基因编辑的技术体系, 本文针对烟草 *PCSI*、*HMA2*、*eIF4E*、*TOM3*、*TOM1* 5 个不同性状相关的基因构建了多靶点敲除的 CRISPR/Cas9 系统, 并借助农杆菌介导的遗传转化技术转化烟草品种 K326。对阳性植株的筛选、靶位点基因组的 PCR 扩增与测序分析表明, 构建的 CRISPR/Cas9 多基因编辑系统成功转化到烟草中, 能够同时靶向突变 5 个基因。5 个基因同时突变的检出率为 53.8%, 单基因的突变检出率在 76.9% 与 92.3% 之间。进一步的脱靶检测分析显示, 在所预测脱靶的候选位点上均未发生脱靶现象。本文构建的 CRISPR/Cas9 多基因编辑系统可将多个基因进行有效突变, 为烟草基因功能研究和基于 CRISPR/Cas9 技术的多性状改良奠定了基础。

关键词: 烟草; CRISPR/Cas9; 多基因; 突变

基因编辑技术可以精准地对基因组中的靶位点进行缺失、敲入以及核苷酸修正等操作。CRISPR/Cas9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated nuclease 9, Cas9) 基因组编辑技术问世以来, 弥补了第一代的锌指核酸酶 (zinc finger nucleases, ZFN) 和第二代的转录激活效应子核酸酶 (transcription activator-like effector nucleases, TALEN) 基因编辑技术的诸多不足。因 CRISPR/Cas9 系统靶向编辑基因的高效性、特异性和设计的便捷性, 已成为当前最主流、最热门的基因组编辑技术, 在大量物种中得到了广泛应用。

CRISPR/Cas9 是细菌和古细菌在长期演化过程中形成的一种适应性免疫防御系统, 可抵抗病毒或外源性 DNA 的侵染。CRISPR/Cas9 编辑技术是利用导向 RNA 识别靶位点, 并引导 Cas9 蛋白切割靶

序列^[1-2]。CRISPR/Cas 系统有 3 种类型 (Type I、Type II 和 Type III)。现在广泛用于基因编辑技术的 CRISPR/Cas 系统是根据 Type II 型系统改造而来的。Type II 型系统由 Cas9 核酸酶、pre-crRNA 和反式激活 crRNA 组成。在前导序列的调控下, CRISPR 的间隔序列被转录成为 pre-crRNA。借助 tracrRNA, RNase III 再将 pre-crRNA 加工为成熟的 crRNA, 并形成具有切割活性的 tracrRNA-crRNA-Cas9 复合体。随着对 CRISPR/Cas9 技术的不断优化, crRNA 和 tracrRNA 被融合成为一条单链引导 RNA (single-guide RNA, sgRNA)。sgRNA 的表达通常用 III 型 RNA 聚合酶启动子转录, PAM (protospacer adjacent motif) 序列决定 CRISPR/Cas9 系统切割的位点^[3]。随着基因编辑技术的迅速发展, 科学家开发了不同 CRISPR/Cas9 系统, 不断在提升 CRISPR/Cas9 基因

基金项目: 郑州烟草研究院院长科技发展基金项目“烟草多基因 CRISPR/Cas9 编辑体系构建及应用研究” (902017CA0210)、国家烟草专卖局资助项目“烟草基因功能元件全景图构建及关键基因挖掘与调控节点研究” (110201601033 (JY-07))

作者简介: 谢小东 (1984—), 博士, 工程师, 主要研究方向: 烟草分子生物学, Tel: 0371-67672081, Email: xiexd@cqu.edu.cn

通讯作者: 杨军 (1973—), Tel: 0371-67672319, Email: yangjun@ztri.com.cn

收稿日期: 2019-02-13; **网络出版日期:** 2019-08-27

编辑技术应用价值。

2013 年,科学家首次利用 CRISPR/Cas9 系统实现了对拟南芥^[4]、水稻和小麦基因组的定点编辑^[5],证明了该技术在植物生物学研究领域具有极高的应用价值。随后 CRISPR/Cas9 系统被广泛应用于高粱^[6]、玉米^[7]、甜橙^[8]、番茄^[9,10]、大豆^[11]、大麦^[12]、甘蓝^[12]、棉花^[13]、甘蔗^[14]等作物中,在性状改良、基因调控、抗性育种以及高通量突变体文库创制等方面得到了广泛应用^[15]。高军平等利用 CRISPR/Cas9 系统分别对烟草 *NtPDS* 和 *NtPDR6* 基因实现了定点突变^[16],首次在普通烟草中建立了 CRISPR/Cas9 技术体系。本课题组利用 CRISPR/Cas9 技术在烟草中鉴定了一个腋芽生长相关基因 *NtPIN4*,将基因突变后烟草腋芽数目比野生型明显增多,且突变类型和表型均能够稳定遗传至下一代^[17]。潘洪杏等利用 CRISPR/Cas9 技术对烟草马铃薯 Y 病毒 (*Potato Y virus, PVY*) 基因 *eIF4E* 进行了定向编辑^[18]。姚恒等利用 CRISPR/Cas9 技术对烟草茉莉酸信号关键转录因子基因 *NtabMYC2* 进行了编辑,获得了不同敲除类型的突变体^[19]。

随着基因编辑技术的快速发展,在许多物种中同时编辑多个基因的技术逐步成熟。在杨树毛白杨中,通过构建多靶点编辑载体系统,实现了同时敲除杨树基因组上两个同源的 *PDS* 编码基因 (*PtPDS1* 和 *PtPDS2*)^[20]。在水稻和拟南芥中,构建的多基因敲除体系能够成功突变拟南芥和水稻基因家族的多个基因、以及单个基因的多个靶点,在转化体第一代就获得有表型的突变体^[21]。利用 CRISPR/Cas9 系统在水稻育种中间材料中同时编辑 *TMS5*、*Pi21* 和 *Xa13* 基因,成功将具有优良性状的育种中间材料快速开发成优质多抗的两系不育系^[22]。通过构建多基因敲除体系,同时对编码拟南芥核糖体大亚基 *AtRPL10* 亚家族的三个同源基因 *AtRPL10A*, *AtRPL10B* 及 *AtRPL10C* 进行了编辑,转基因植株的三个同源基因均存在基因突变^[23]。

烟草是异源四倍体农作物,多基因编辑体系的建立与应用,对加快烟草基因功能的研究和遗传改良的有着重要的意义。在烟草中,针对多个基因、尤其是不同性状相关基因的同时编辑的研究尚未有报道。为此,基于烟草中已有的 CRISPR/Cas9 系统,本文选取以下 5 个靶基因开展 CRISPR/Cas9 介导多基因编辑研究。*eIF4E* 是转录起始因子 (eukaryotic translation initiation factors 4E),PVY 病毒通过自身的基因组连接蛋白 (viral genome-linked protein, VPg) 与植物的特定 *eIF4E* 基因家族成员相互作用,

从而启动病毒在植物体内的翻译与增殖。*eIF4E* 基因突变会导致其表达的蛋白结构改变或缺失,使病毒无法利用 *eIF4E* 蛋白侵入植株^[24]。本生烟、辣椒以及普通烟草中突变或者下调 *eIF4E* 基因,均能使植株对 PVY 产生一定的抗性^[25,26]。*TOM1* 和 *TOM3* 是烟草花叶病毒 (*Tobacco mosaic virus, TMV*) 的抗性相关基因,研究发现 *TOM3* 蛋白与 TMV 病毒特异的结合,进而将病毒复制复合体整合到质膜之上,保证病毒的复制^[27]。Sunil Kumar 等通过构建 *TOM1* 和 *TOM3* 的干扰载体,进而下调烟草中的这两个基因,发现转基因植株对 TMV 的抗性明显增强^[28]。在本氏烟中克隆了拟南芥同源基因 *NbTOM1*,分析证明病毒诱导 *NbTOM1* 沉默后,几乎完全遏制了本氏烟中 TMV 的复制,同时干扰沙姆逊烟草的 *TOM1* 和 *TOM3* 基因后,发现转基因烟草能够有效地抑制 TMV 的生长和扩散^[29]。课题组前期克隆了烟草植物螯合肽基因 *NtPCSI*,利用 RNAi 技术降低 *NtPCSI* 基因的表达量之后,烟草叶片中的镉含量显著降低。利用 TILLING 技术将镉转运基因 *NtHMA2* 的突变后,在镉胁迫下,与对照相比突变体烟叶中的镉含量降低 36.84%^[30]。本文通过对上述 5 个烟草不同性状的基因开展 CRISPR/Cas9 多基因编辑的探索研究,旨在为烟草多个 (性状) 基因的功能研究和遗传改良提供技术依据。

1 材料与方法:

1.1 材料

普通栽培烟草 K326 无菌苗培养于国家烟草基因研究中心的人工气候室:将 K326 种子放入 1.5 mL 离心管中,加入 1 mL 15% 次氯酸钠溶液消毒 15 min,无菌水清洗 5~6 次,用牙签播种于 MS 固体培养基中。MS 固体培养基成分为:4.4 g/L MS (Murashige&Skoog Basal Medium) 培养基、30 g/L 蔗糖、2.5 g/L 植物凝胶。培养条件为相对湿度 60%,光照 16 h/28 °C,黑暗 8 h/25 °C。

CRISPR/Cas9 载体 pORE-Cas9/gRNA 由西南大学提供;Taq 酶、植物 DNA 提取试剂盒、凝胶回收试剂盒、大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞、和 TOPO-TA PCR 克隆试剂盒均购自北京艾德莱生物科技有限公司;DNA Marker 和 T4 连接酶购自宝生物工程 (大连) 有限公司;引物合成和质粒提取试剂盒由生工生物工程 (上海) 股份有限公司;胶回收试剂盒购自郑州安赛生物科技有限公司;限制性内切酶 *Bsa* I 购自 NEB (北京) 公司;植物凝胶和 Murashige&Skoog

Basal Medium MS 培养基购于美国 Sigma 公司; 蔗糖、6-BA 和 NAA 购于生工生物工程(上海)股份有限公司。Hi-TOM 编辑位点检测试剂盒购自北京诺禾致源生物信息科技有限公司。PCR 仪 Applied Biosystems Veriti® 96-well Fast Thermal Cycler (德国 Eppendorf 公司); 凝胶自动成像仪和凝胶电泳仪(美国 BIO-RAD 公司); 超微量分光光度计 Nanodrop 2000 (美国 Thermo 公司)。

1.2 方法

1.2.1 sgRNA 设计及载体构建

利用烟草基因组序列信息, 通过在线工具 CRISPR MultiTargeter (<http://www.multicrispr.net/index.html>), 设计了如下的编辑位点(表 1)。将各靶位点序列分别接上 U26 启动子和终止后依次串联, 并在串联的 5' 端和 3' 引入酶切 Bsa I 位点后合成序列, 然后利用 Bsa I 酶切, 并与预先用 Bsa I 酶切过的 CRISPR/Cas9 载体连接。连接体系: 酶切载体 3 μ L, 退火产物 2 μ L, Solution I 5 μ L。16 $^{\circ}$ C 连接 30 min, 取连接产物转化 DH5 α 感受态细胞, 37 $^{\circ}$ C 培养 12~16 h。用 U26-JC F: 5'-TTAGGTTTACCCGCCAATA-3' 和各靶序列下游引物对菌斑进行阳性克隆的 PCR 扩增、克隆和测序筛选。

1.2.2 烟草 *PCSI*、*eIF4E*、*TOM3*、*TOM1* 和 *HMA2* 基因敲除靶位点的 cDNA 克隆

以中国烟草基因组数据库中 *PCSI*、*eIF4E*、*TOM3*、*TOM1* 和 *HMA2* 基因的 cDNA 序列, 设计可扩增 *PCSI*、*eIF4E*、*TOM3*、*TOM1* 和 *HMA2* sgRNA 序列的 cDNA 片段引物。PCSI-cl F: 5'-GAAGACTCCAAGACTACCGGG-3', PCSI-cl R: 5'-GCCAATTCGCAACTAATTCA-3', eIF4E-cl F: 5'-GTAGTCGACGATGGACCTGAA-3', eIF4E-cl R: 5'-CATGAAATATGAAGCCAATCG-3', TOM3-cl F: 5'-GGATGGGCTTAGACCTAGTTT-3', TOM3-cl R: 5'-TTAGCGAATAGGGTGGTACTG-3', TOM1-cl F: 5'-TGTTGTAAATGGAGTTTCGTGC-3', TOM1-cl R: 5'-CTCTTTTGGAGGCAATTTTC-3', HAM-cl F: 5'-GCATTAGCAACAGCTGACATT-3', HAM-cl R: 5'-GCGATGAGAATGAAAACCAC-3', 以 K326 品种的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增反应。PCR 反应体系(25 μ L): 基因上、下游引物(10 μ M)各 1 μ L、DNA 样品(100 ng/ μ L) 1 μ L、Taq 酶 12.5 μ L, 加 ddH₂O 补足至 25 μ L。PCR 反应程序: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 58 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 40 s,

30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 4 $^{\circ}$ C 保温。待 PCR 结束后进行琼脂糖凝胶电泳, 回收纯化 PCR 产物。用 TOPO-TA PCR 克隆试剂盒进行 TA 克隆, 转化 DH5 α 感受态细胞, 37 $^{\circ}$ C 培养 12~16 h, 菌落 PCR 阳性单克隆送测序。

1.2.3 敲除载体转化农杆菌及烟草遗传转化

将测序成功的单菌落扩大培养, 提取质粒, 利用电转法将重组编辑载体转入农杆菌 GV3101。具体的遗传转化方法见王姗姗等^[33]。

1.2.4 遗传转化株的获得及突变位点检测

待再生植株的根系生长良好后, 移出组培瓶于基质中, 置于培养条件为相对湿度 60%, 光照 16 h/28 $^{\circ}$ C、黑暗 8 h/25 $^{\circ}$ C 人工气候培养箱中培养。采集适量烟株叶片, 提取基因组 DNA。具体步骤参照 GeneAnswer GenePure 新型植物基因组 DNA 快速提取试剂盒说明书。设计 Cas9 蛋白基因检测引物, Cas9-JC F: 5'-CTCAACACAACATATACAAAACAAA-3', Cas9-JC R: 5'-CTTTGGCCATCTCGTTTGA-3', 以各植株 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 确认外源 DNA 片段是否已经插入到植物基因组中。PCR 反应体系和程序同 1.2.2。

设计扩增包含靶位点的 150bp-180bp DNA 片段的引物, 以检测目的基因是否成功被编辑。PCSI-JC F: 5'-ATTGCCAGCAGTAACTTTGATGTT-3', PCSI-JC R: 5'-GCCTAGTCCTAATTTTTTACTTGCC-3', eIF4E-JC F: 5'-ATTGGACAATGAGCTTTAGTAAGGG-3', eIF4E-JC R: 5'-TTCATTGTCAGCATTCTTGGTC-3', TOM3-JC F: 5'-ATGAAAGGTGGAGTAAT ACTTGCT-3', TOM3-JC R: 5'-TCAATCAT ATCCAGGTAAGAAAAGT-3', TOM1-JC F: 5'-CTGTTCATTGGGAATTCGTAT TOM1-JC R: 5'-GGGAGGAGAATGTAGTGAGGAA, HMA2-JC F: 5'-AGCAGGTTATCCATTGGTTTG-3', HMA2-JC R: 5'-TGACATCTTGGAAACACACACC-3'。分别在以上各正向引物的 5' 端前加 ggagtgtgtgtgtgtgtgc, 反向引物 5' 前加 gagttgtgtgtgtgtgtgtgc。以 Cas9 阳性烟株 DNA 为模板, 进行 PCR 扩增。PCR 反应体系和程序同 1.2.2。待 PCR 结束后进行琼脂糖凝胶电泳, 备用进行第二轮扩增。第二轮 PCR 反应体系(20 μ L): ddH₂O 9.0 μ L、Hi-TOM Mix 1.0 μ L、第一轮 PCR 产物 1.0 μ L。94 $^{\circ}$ C, 预变性 2 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 58 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 kb/min, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。PCR 结束后取 3-5 μ L 产物进行琼脂糖凝胶电泳检测。将扩增完毕的第二轮 PCR 产物混合, 取混合

后的 PCR 产物 200 μ L, 进行琼脂糖凝胶电泳, 切胶回收纯化。送北京诺禾致源生物信息科技有限公司进行高通量测序。

1.2.4 脱靶分析

以各基因靶位点序列为种子序列, 分别在烟草基因组中数据库进行 Blast 比对, 在全基因范围内寻找可能存在的脱靶位点。在候选脱靶位点序列位点上、下游设计引物扩增, 通过测序的方法进行验证。

2 结果与分析

2.1 多基因敲除靶位点的 sgRNA 设计

利用中国烟草基因组数据库中 *PCSI*、*eIF4E*、*TOM3*、*TOM1* 和 *HMA2* 基因的 cDNA 序列, 通过 CRISPR MultiTargeter 在线软件对 *PCSI*、*eIF4E*、*TOM3*、*TOM1* 和 *HMA2* 设计了 CRISPR/Cas9 敲除的 sgRNA 寡聚核苷酸序列, 再将设计的各 sgRNA 序列与基因组 DNA 进行了联配分析, 筛选出高特异性 sgRNA, 并排除 sgRNA 序列夸两个外显子的可能性, 获得如表 1 所示的候选的 sgRNA。

表 1 多基因敲除的 sgRNA 寡聚核苷酸序列

Tab. 1 The sgRNA oligonucleotide sequences of multiple genes

序列名称	sgRNA 序列 (5' $\rightarrow$ 3')	PAM 区	GC 含量
PCSI	TCACCAGCAAAATTTCTGGA	TGG	40%
eIF4E	AGTTAGCGTCCGAAATAAGG	GGG	45%
TOM3	GGAAGTTGCCTCCAAAGCGA	GGG	55%
TOM1	GCTTTCCTATTGAATCTAAA	GGG	30%
HMA2	AACAGCATGCTACTTCTACG	AGG	45%

2.2 烟草 *PCSI*、*eIF4E*、*TOM3*、*TOM1* 和 *HMA2* 基因的 sgRNA 区域验证

为了排除基因组测序过程中造成的碱基误差, 确保敲除靶位点序列的特异性和准确性, 进一步对含有靶位点 sgRNA 序列的 cDNA 片段进行了测序验证。通过设计特异性扩增引物, 以 K326 品种的 cDNA 为模板, 分别扩增了 *PCSI*、*eIF4E*、*TOM3*、*TOM1* 和 *HMA2* 含有靶位点序列的 cDNA 片段, 如图 1 所示, 从 K326 中均扩增到预期大小的 cDNA 片段, 并进行了纯化与克隆。测序分析显示, *PCSI*、*eIF4E*、*TOM3*、*TOM1* 和 *HMA2* cDNA 片段中的 sgRNA 序列和 PAM 区与表 1 中所设计的 sgRNA 序列及 PAM 区完全一致, 可以作为 Cas9 对相应基因敲除的 sgRNA。

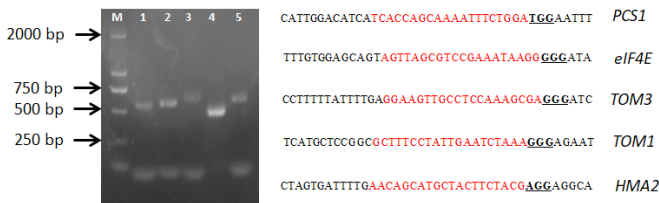
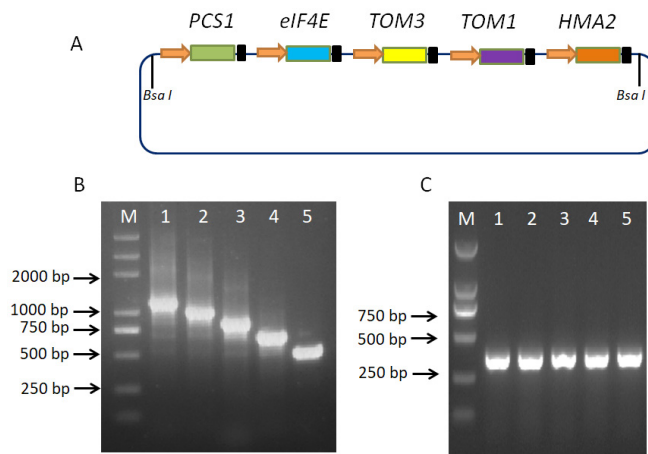


图 1 烟草 *PCSI*、*eIF4E*、*TOM3*、*TOM1* 和 *HMA2* cDNA 片段电泳检测与测序

Fig. 1 Electrophoresis detection and sequencing of partial cDNA sequence of tobacco *PCSI*, *eIF4E*, *TOM3*, *TOM1* and *HMA2*

2.3 CRISPR/Cas9 介导多基因敲除的 sgRNA 设计与构建

在每个 sgRNA 上下游分别引入拟南芥 U-26 启动子和终止序列, 用于独立启动和终止 sgRNA 表达, 再将各独立的 sgRNA 表达元件依次串联后, 在 5' 端和 3' 引入酶切 *Bsa* I 位点, 获得如图 2A 所示的串联 sgRNA 片段。利用 *Bsa* I 酶切的方法将该串联片段连接至 pORE-Cas9 植物表达载体上。分别以 U26-JC F 和 *PCSI*、*eIF4E*、*TOM3*、*TOM1* 和 *HMA2* sgRNA 的反向引物进行 PCR 扩增, 通过凝胶电泳检测显示, 5 个 sgRNA 以及载体片段均被扩增到, 并呈现出按序排列清晰条带 (图 2B), 符合预期目标。这表明已经成功构建了针对 *PCSI*、*eIF4E*、*TOM3*、*TOM1* 和 *HMA2* 基因敲除的 CRISPR/Cas9 表达载体。



A. *PCSI*、*eIF4E*、*TOM3*、*TOM1* 和 *HMA2* 基因 sgRNA 的串联示意图; B. M, DL 5000 Marker, 1-5. *PCSI*、*eIF4E*、*TOM3*、*TOM1* 和 *HMA2* sgRNA-载体片段 PCR 电泳图; C. M. DL 2000 Marker, 1-5. 重组 Crispr/Cas9 载体农杆菌 PCR 产物

A. Tandem sgRNA diagram of *PCSI*, *eIF4E*, *TOM3*, *TOM1* and *HMA2*; B. M, DL 5000 Marker, 1-5, PCR electrophoretogram of sgRNA-vector fragments of *PCSI*, *eIF4E*, *TOM3*, *TOM1* and *HMA2*. C. M, DL 2000 Marker, 1-5. PCR product of recombinant Crispr/Cas9 vector in *Agrobacterium tumefaciens*.

图 2 多基因敲除的 Crispr/Cas9 载体构建

Fig. 2 Construction of Crispr/Cas9 vector for multi-gene knockout

提取重组 CRISPR/Cas9 载体质粒, 采用电击法转入农杆菌 GV3101, 对经过卡那霉素和利福平筛选的单菌落进行菌落 PCR 验证, 所用引物为 U26-JC F 和 *PCSI*、*eIF4E*、*TOM3*、*TOM1* 和 *HMA2* sgRNA 的反向序列。如图 2C 所示, 得到预期 300 bp 左右大小的目的条带, 表明重组 CRISPR/Cas9 载体质粒已经成功转入农杆菌 GV3101 菌株内。

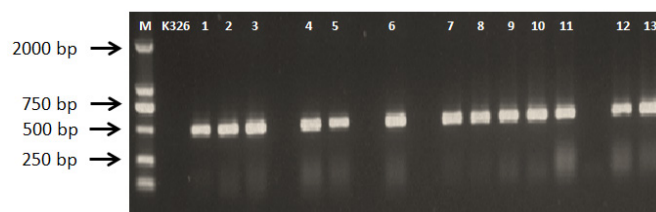
2.4 T0 代遗传转化植株的检测

利用农杆菌介导的叶盘法将重组 CRISPR/Cas9 载体质粒转化烟草 K326, 经过卡那霉素筛选, 获得了 17 株 T0 代遗传转化阳性苗。待幼苗长至 4~6 片叶时, 提取叶片基因组 DNA, 以检测编码 Cas9 蛋白基因的 Cas9-JC F 和 Cas9-JC R 引物进行 PCR 扩增。琼脂糖凝胶电泳结果显示, 从 13 株烟草中扩增出预期 500 bp 左右的 *Cas9* 基因片段 (图 3), 表明构建的重组 CRISPR/Cas9 基因敲除质粒已成功转入 K326 植株中。

2.5 烟草 *PCSI*、*eIF4E*、*TOM3*、*TOM1* 和 *HMA2* 突变靶位点的扩增与突变分析

设计特异性引物, 以各阳性植株 DNA 为模板, 扩增包含突变靶位点在内的 150 bp-180 pb 的 PCR 产物。第二轮 PCR 扩增以第一轮 PCR 产物为模板, 利用 Hi-Tom 试剂盒进行扩增与加测序接头的 PCR 反应, 其产物比第一轮长 100 bp 左右。第一轮和第二轮 PCR 扩增产物片段大小如图 4 所示, 纯化回收后进行建库测序。

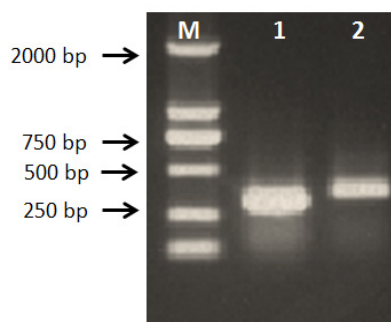
测序结果分析显示, *PCSI* 基因在靶位点处发生了多种形式的突变, 包括在不同位点处的 1 个、2 个、4 个、5 个和 10 个碱基的删除和 1 个碱基的插入 (图 5 A), 大多数突变发生在 PAM 区域附近。Cas9 对 *TOM3* 基因同样进行了成功编辑, 分析显示在 *TOM3*-sgRNA 序列处主要发生了 1 个碱基和 2 个碱基的删除 (图 5 B)。另外, 在 *TOM3*-sgRNA 位点处分别发现了 1 个碱基的替换和 1 个碱基的插入突变。在 *TOM1*-sgRNA 序列处有 4 个不同位点 1 个碱基的删除、一个位点 2 个碱基的删除以及 2 个不同位点 T → C 的碱基替换 (图 5 C)。在 *eIF4E*-sgRNA 位点主要以碱基删除为主, 包括 4 个不同位点 1 个碱基的删除、1 个位点 4 个碱基和 1 个位点 2 个碱基的删除 (图 5 D), 这三种形式的删除突变均可导致 *eIF4E* 基因在烟草中的功能丧失。对 *HMA2* 基因的测序结果分析显示, *HMA2*-sgRNA 位点处不仅有 1 个碱基的删除, 还存在 3 个、6 个和 8 个碱基的删除 (图 5 E)。根据靶位点中碱基突变的 reads 与总测序 reads 的比值, 评估了 Cas9 对靶位点处编辑效率。Cas9 对 *PCSI*、*TOM3*、*TOM1*、*eIF4E*、*HMA2* 靶位点处的编辑效率



M, DL 2000 Marker; K326, 野生型 K326 植株; 1~13, 转基因植株

图 3 T0 代植株中 *Cas9* 基因片段 PCR 电泳图

Fig. 3 PCR electrophoretogram of the sequence fragments of the *Cas9* gene, DL 2000 Marker K326; Wild -type plant of K326; 1~13, Transgenic plants



M, DL 2000 Marker 1, 第一轮 PCR 产物; 2, 第二轮 PCR 产物
M, DL 2000 Marker, 1, PCR product in the first round, 2, PCR product in the second round

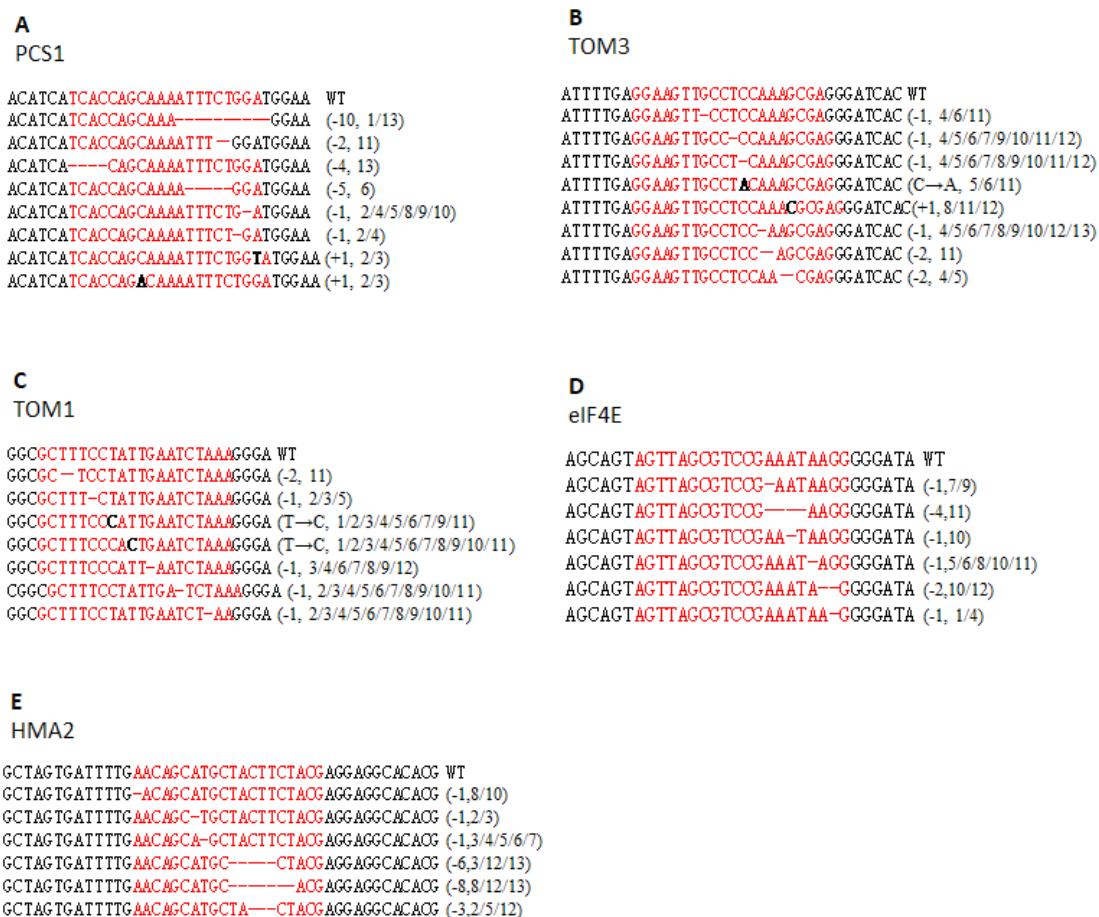
图 4 靶位点序列的 PCR 电泳图

Fig. 4 PCR electrophoretogram of target sequence

分别约为 13.1%、15.1%、6.1%、19.8% 和 16.8%。

上述分析结果表明, Cas9 对以上 5 个基因均实现了成功编辑, 获得了不同突变类型的 T0 代植株, 碱基突变类型主要以 1 个碱基的删除为主, 约占总突变类型的 50% 以上, 其次是 2 个碱基的删除以及多个碱基的删除, 1 个碱基的插入也是导致基因突变的重要因素。在各植株中仍然存在野生型基因序列, 因此, T0 代突变株为嵌合体。

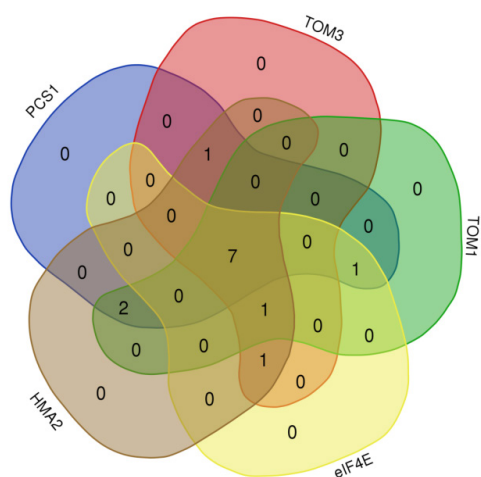
对 *PCSI*、*eIF4E*、*TOM3*、*TOM1* 和 *HMA2* 基因在 13 棵 T0 代植株中的突变分布做了维恩分析, 如图 6 所示, *PCSI*、*eIF4E*、*TOM3*、*TOM1* 和 *HMA2* 5 个基因同时在 7 棵 T0 代植株中得到成功突变, 这 7 棵 T0 代植株分别为 T0-4, T0-5, T0-6, T0-8, T0-9, T0-10 和 T0-11。5 个基因在同一株烟草同时突变的检出率为 53.8%。其余植株中均有不同基因突变的组合, 且突变基因数目均在 3 个或 3 个以上, 而单个基因突变的检出率在 76.9% 与 92.3% 之间, 表明多基因敲除系统具有较高的编辑效率。

图 5 Cas9 介导烟草 *PCSI*、*eIF4E*、*TOM3*、*TOM1* 和 *HMA2* 基因突变

注：红色为 sgRNA 序列，括号中分别标注了突变的碱基与对应的植株编号；WT：野生型

Fig. 5 Cas9-mediated targeted mutations of *PCSI*, *eIF4E*, *TOM3*, *TOM1* and *HMA2* in tobacco.

Note: sgRNA sequence is marked in red, and the mutated bases and the corresponding plant number are marked in parentheses. WT: Wild Type

图 6 *PCSI*、*eIF4E*、*TOM3*、*TOM1* 和 *HMA2* 基因在 T0 代植株中的突变分布Fig. 6 Mutation distribution of *PCSI*, *eIF4E*, *TOM3*, *TOM1* and *HMA2* in T0 Generation plants

2.6 脱靶位点预测与检测分析

由于与靶序列的相似，Cas9 可能出现非特异性切割而发生脱靶现象。为了分析本文所构建的 CRISPR/Cas9 多基因编辑系统是否存在脱靶现象，我们将 *PCSI*、*eIF4E*、*TOM3*、*TOM1* 和 *HMA2* 基因的靶位点序列与烟草基因组数据进行了对比分析，根据 (N)12NGG 的原则和 PAM 区上游序列 (12 bp) 决定靶位点特异性的原则^[31, 32]，分别在烟草全基因组范围内各筛选了一个最有可能脱靶的候选位点，如表 2 所示，各基因靶位点从第 8-10 位点开始到 PAM 序列，完全与脱靶候选位点序列匹配。通过设计特异性引物，在 5 个基因都有突变的 7 株阳性植株中扩增候选脱靶位点的 DNA 片段，测序结果表明并未发现突变序列，这表明本实验所构建的 CRISPR/Cas9 系统具有较高的特异性。

表 2 CRISPR/Cas9 系统脱靶位点分析与检测
Table 2 Analysis and examination of mutations in the putative off-target sites of CRISPR/Cas9 system.

靶基因	候选脱靶位点	未匹配碱基数	测序植株数量	突变数
PCS1	AACAAAGAAAATTTCTGGATGG	7	7	0
eIF4E	TAATGTTATCCGAAATAAGGGGG	7	7	0
TOM3	AAGCCTTATTTCCAAAGCGAGGG	8	7	0
TOM1	GCCACAGATTGAATCTAAAGGG	6	7	0
HMA2	CTGCCCAACTACTTCTACGAGG	8	7	0

3 讨论

CRISPR/Cas9 基因编辑系统自出现以来,已在各植物中得到非常广泛应用。烟草是最早建立 CRISPR/Cas9 系统的作物之一, Gao 等人最早在烟草中利用 CRISPR/Cas9 系统成功突变 *NtPDS* 和 *NtPDR6* 基因。随后,该系统在烟草腋芽、次生代谢、抗逆性等生物学性状的单基因功能研究方面发挥了重要作用^[16-17, 33-34]。本文基于烟草中已有 CRISPR/Cas9 基础表达系统,首次在烟草中针对不同生物学性状的多个基因开展了编辑研究。

构建了镉积累相关基因 *PCS1* 和 *HMA2*、PVY 抗性相关基因 *eIF4E*、TMV 抗性相关基因 *TOM3* 和 *TOM1* 5 个靶基因同时敲除的 CRISPR/Cas9 系统,并转化至烟草中。通过对阳性植株靶位点的基因序列分析表明,5 个靶基因在烟草中均得到了成功编辑,5 个基因同时突变的检出率为 53.8%,该比例与水稻中对四个靶位点同时敲除的比例相当(44% 和 67%)^[35],而单基因突变的检出率在 76.9% 与 92.3% 之间,这与烟草单基因突变的阳性植株检测率相当^[16, 17]。这表明本文构建的多靶点 CRISPR/Cas9 系统能够针对不同性状的不同基因进行编辑,为烟草不同优良性状的种质改良提供重要的技术依据。另外,由于普通烟草是由二倍体的绒毛状烟草和林烟草杂合而来的异源四倍体,在其基因组中有两套不同二倍体野生烟草基因组类型,因而存在同源基因数量多、基因功能冗余的现象。本文中构建的多靶点的 CRISPR/Cas9 系统,可有效应用于多个烟草基因的突变,提高烟草功能基因研究效率。

测序结果表明,CRISPR/Cas9 系统在烟草中引起的突变,主要是 1 至 10 个碱基的删除,其中 1 个碱基删除的突变类型最多,这与前期在烟草和其他植物中所得出的结果一致,这种突变形式很大程度上与植

物内在的修复机制相关。另外,由于普通烟草是由二倍体的绒毛状烟草和林烟草杂合而来的异源四倍体,基因组结构复杂且较大,在 T0 获得纯合突变的概率不高,多个基因的纯合突变筛选需更多的种植代数。CRISPR/Cas9 系统引导核酸酶定向剪切活性存在一定程度的容错概率,会在目标位点序列相似的基因组区域存在非特异剪切活性(脱靶效应)。基因编辑靶位点预测方法较多,全基因组测序是目前被认为最有效的方法。对拟南芥、水稻、棉花中 Cas9 或 Cpf1 的脱靶效应研究发现,造成脱靶效应的最主要因素是 gRNA 特异性,sgRNA 严谨性设计将有效消除脱靶效应的潜在影响^[36-38]。本研究在 5 个基因同时发生突变的植株中,根据 sgRNA 特异性识别靶点原则预测和分析了可能的脱靶点,结果表明未发生脱靶现象,与前期在烟草中对 CRISPR/Cas9 脱靶检测结果一致^[16]。这可能与目标基因的 sgRNA 均采用严谨标准有关,所设计靶序列均是全基因范围错误匹配最低以及 GC 含量合理的 sgRNA。更全面的脱靶评估有待于后续进一步对纯合体突变体的全基因组测序分析研究。

4 结论

本研究针对烟草不同性状的基因构建了多靶点敲除的 CRISPR/Cas9 系统,获得了镉积累相关基因 *NtPCS1*、*HMA2*、PVY 抗性相关基因 *eIF4E* 以及 TMV 抗性相关基因 *TOM3*、*TOM1* 同时突变烟草遗传材料,5 个基因同时突变的检出率为 53.8%。脱靶效应评估分析显示,在所预测脱靶的候选位点上均未发生脱靶现象。本文构建的多基因编辑的 CRISPR/Cas9 系统可将烟草多个基因进行有效突变,为烟草基因功能的研究和基于 CRISPR/Cas9 技术的多性状改良奠定了基础。

参考文献

- [1] Bhaya D, Davison M, and Barrangou R. CRISPR-Cas systems in bacteria and archaea: versatile small RNAs for adaptive defense and regulation[J]. Annual review of genetics, 2011: 45: 273-297.
- [2] Wiedenheft B, Sternberg S H, and Doudna J A. RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea[J]. Nature, 2012, 482: 331-338.
- [3] Deveau H, Barrangou R, Garneau J E, et al. Phage response to CRISPR-encoded resistance in *Streptococcus thermophilus*[J]. Journal of bacteriology, 2008, 190: 1390-1400.
- [4] Li JF, 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: 688-691.

- [5] Shan Q, Wang Y, Li J, et al. Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system[J]. *Nature biotechnology*, 2013, 31: 686-688.
- [6] Jiang W, Zhou H, Bi H, Fromm M, Yang B, Weeks D P. Demonstration of CRISPR/Cas9/sgRNA-mediated targeted gene modification in Arabidopsis, tobacco, sorghum and rice[J]. *Nucleic Acids Research*, 2013, 41 (20): e188.
- [7] Liang Z, Zhang K, Chen K, Gao C. Targeted mutagenesis in *Zea mays* using TALENs and the CRISPR/Cas system[J]. *Journal of Genetics and Genomics*, 2014, 41(2): 63-68.
- [8] Jia H, Wang N. Targeted genome editing of sweet orange using Cas9/sgRNA[J]. *PLoS One*, 2014, 9(4): e93806.
- [9] Ito Y, Nishizawa-Yokoi A, Endo M, et al. CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of the RIN locus that regulates tomato fruit ripening[J]. *Biochemical and biophysical research communications*, 2015, 467: 76-82.
- [10] Brooks C, Nekrasov V, Lippman Z B, et al. Efficient gene editing in tomato in the first generation using the clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated9 system[J]. *Plant physiology*, 2014, 166, 1292-1297.
- [11] Cai Y P, Li C, Liu X J, et al. CRISPR/Cas9-mediated genome editing in soybean hairy roots[J]. *PLoS One*, 2015, 10 (8): 1-13.
- [12] Lawrenson T, Shorinola O, Stacey N, et al. Induction of targeted, heritable mutations in barley and Brassica oleracea using RNA-guided Cas9 nuclease[J]. *Genome Biology*, 2015, 16 (1): 258-270.
- [13] Iqbal Z, Sattar M N, Shafiq M. CRISPR/Cas9: A tool to circumscribe cotton leaf curl disease[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 7(231): 475.
- [14] Mohan C. Genome editing in sugarcane: Challenges ahead[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 7(7): 1542-1546.
- [15] Chen K, Wang Y, Zhang R, et al. CRISPR/Cas Genome Editing and Precision Plant Breeding in Agriculture. *Annu Rev Plant Biol*[J], 2019, doi: 10.1146/annurev-arplant-050718-100049.
- [16] Gao J, Wang G, Ma S, et al. CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis in *Nicotiana tabacum*[J]. *Plant molecular biology*, 2015, 87: 99-110.
- [17] Xie X, Qin G, Si P, et al. Analysis of *Nicotiana tabacum* PIN genes identifies NtPIN4 as a key regulator of axillary bud growth[J]. *Physiol Plant*, 2017, 160(2): 222-239.
- [18] 潘洪杏, 刘侠, 万秀清, 等. 利用 CRISPR-Cas9 基因组编辑技术定向敲除烟草 eIF4E-6 基因 [J]. *分子植物育种*, 2017, 15(2): 538-544.
- PAN Hongxing, LIU Xia, WANG Xiuqing et al. Directional Knockout of eIF4E-6 Gene Using CRISPR-Cas9 Genome Editing Technique[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2017, 15(2): 538-544.
- [19] 姚恒, 白戈, 谢贺, 等. 利用 CRISPR-Cas9 技术创制烟草 NtabMYC2 基因的定点突变 [J]. *分子植物育种*, 2017, 15(6): 2328-2334.
- YAO Hen, BAI Ge, XIE He, et al. Targeted Mutagenesis NtabMYC2 in *Nicotiana tabacum* using the CRISPR/Cas9 Technology [J]. *Molecular Plant Breeding*, 2017, 15(6): 2328-2334.
- [20] 刘婷婷, 范迪, 冉玲玉, 等. 应用 CRISPR/Cas9 技术在杨树中高效敲除多个靶基因 [J]. *遗传*, 2015, 37(10): 953-73.
- LIU Tingting, FAN Diran, JIANG Lingyu, et al. Highly efficient CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis of multiple genes in *Populus*[J]. *Hereditas*, 2015, 37(10): 953-973.
- [21] 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]. *Mol Plant*, 2015, 8(8): 1274-84.
- [22] Li S, Shen L, Hu P, et al. Developing disease-resistant thermosensitive male sterile rice by multiplex gene editing[J]. *J Integr Plant Biol*, 2019, doi: 10.1111/jipb.12774.
- [23] Yu Z, Chen Q, Chen W, et al. Multigene editing via CRISPR/Cas9 guided by a single-sgRNA seed in Arabidopsis[J]. *J Integr Plant Biol*, 2018, (5): 376-381.
- [24] Ruffel S, Dussault M H, Palloix A, et al. A natural recessive resistance gene against potato virus Y in pepper corresponds to the eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E) [J]. *Plant J*, 2002, 32(6):1067-75.
- [25] Han Y, Luo Y, Qin S, et al. Induction of systemic resistance against tobacco mosaic virus by Ningnanmycin in tobacco[J]. *Pesticide biochemistry and physiology*, 2014, 111: 14-8.
- [26] 刘勇, 王丙武, 宋中邦, 等. 烟草隐性抗 PVY 基因 eIF4E-1 及其应用: CN201310687774.1[P].
- [27] Yamanaka T, Ohta T, Takahashi M, et al. TOM1, an Arabidopsis gene required for efficient multiplication of a tobamovirus, encodes a putative transmembrane protein[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000, 97: 10107-12.
- [28] Kumar S, Dubey AK, Karmakar R, et al. Inhibition of TMV multiplication by siRNA constructs against TOM1 and TOM3 genes of *Capsicum annuum*[J]. *Journal of virological methods*, 2012, 186: 78-85.
- [29] Asano M, Satoh R, Mochizuki A, et al. Tobamovirus-resistant tobacco generated by RNA interference directed against host genes[J]. *FEBS letters*, 2005, 579: 4479-84.
- [30] 高玉龙, 王丙武, 李文正, 等. 烟草镉转运基因突变体的鉴定和功能分析 [J]. *烟草科技*, 2017, 50(9): 1-6.
- GAO Yulong, WANG Bingwu, LI Wenzheng, et al. Identification and functional analysis of a tobacco cadmium transporter gene mutant[J]. *Tobacco Science & Technology*, 2017, 50(9): 1-6
- [31] Cong L, Ran F A, Cox D, et al. Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems[J]. *Science*, 339(6121): 819-823.
- [32] Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, et al. A programmable dual RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity[J]. *Science*, 2012, 337(6096): 816-21.
- [33] 王姗姗, 杨军, 王中, 等. 利用 CRISPR/Cas9 技术的烟草 NtLS 基因敲除分析 [J]. *烟草科技*, 2018, 51(2): 1-8.
- WANG Shanshan, YANG Jun, WANG Zhong, et al. Targeted mutagenesis of NtLS gene using CRISPR/Cas9 system[J]. *Tobacco Science & Technology*, 2018, 51(2): 1-8.
- [34] 聂梦云, 高军平, 罗培, 等. 基于 CRISPR/Cas9 技术的烟草 NtDXR 基因敲除及功能分析 [J]. *烟草科技*, 2016, 49(6): 1-7.
- NIE Mengyun, GAO Junping, LUO Pei, et al. CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis and function analysis of DXR in *Nicotiana tabacum*[J]. *Tobacco Science & Technology*, 2016, 49(6): 1-7.
- [35] Wang M, Mao Y, Lu Y, et al. Multiplex gene editing in rice using the CRISPR-Cpf1 system[J]. *Mol. Plant*, 2017, 10: 1011-13.
- [36] 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): 84.
- [37] Feng Z, Mao Y, Xu N, et al. Multigeneration analysis reveals the inheritance, specificity, and patterns of CRISPR/Cas-induced gene modifications in Arabidopsis[J]. *PNAS*, 2014, 111: 4632-37
- [38] Li J, Manghwar H, Sun L, et al. Whole genome sequencing reveals rare off-target mutations and considerable inherent genetic or/and somaclonal variations in CRISPR/Cas9-edited cotton plants[J]. *Plant Biotechnol. J*, 2018, doi: 10.1111/pbi.13020.

Application of multigene editing system mediated by CRISPR/Cas9 to *Nicotiana tabacum*

XIE Xiaodong¹, GAO Junping², LI Zefeng¹, ZHANG Jianfeng, WEI Pan, LUO Zhaopeng,
WANG Chen, WU Mingzhu, ZHAI Niu, YANG Jun¹

¹ China Tobacco Gene Research Center, Zhengzhou Tobacco Research Institute of CNTC, Zhengzhou 450001, China

² Technology Center, China Tobacco Hunan Industrial Co., Ltd., Changsha 410008, China

Abstract: CRISPR/Cas9 is a new type of directional genome editing technology, which has been widely used in targeted editing of tobacco genome in recent years. CRISPR/Cas9-mediated multi-gene editing techniques have shown great potential in gene functional research and genetic improvement on many species. In order to explore the technical system of CRISPR/Cas9-mediated multi-gene editing in tobacco, a multi-target CRISPR/Cas9 system was constructed for five genes (PCS1, HMA2, eIF4E, TOM3 and TOM1) associated with different traits, and then transformed into *Nicotiana tabacum* variety K326 by using agrobacterium-mediated genetic transformation technology. Through screening of the positive plants, PCR amplification and sequencing analysis of genome DNA of target sites, it is shown that the established multi-target CRISPR/Cas9 system can be transformed into tobacco, allowing simultaneous mutation of 5 target genes. The positive rate of simultaneous mutation of 5 genes was 53.8%. The detection rate of a single gene mutation was between 76.9% and 92.3%. Further evaluation and analysis of the off-targets showed that no off-targets occurred at the predicted candidate sites. This indicated that the multi-gene CRISPR/Cas9 editing system constructed in this paper could effectively mutate multiple genes, which laid a foundation for the study of tobacco gene function and the improvement of multi-traits based on CRISPR/Cas9 technology.

Keywords: *Nicotiana tabacum*; multi-gene; CRISPR/Cas9; mutation

*Corresponding author. Email: yangjun@ztri.com.cn

《烟草科技》2019 年第 8 期目次

· 烟草农学

- 硅对胁迫下烟草叶片 PS II 叶绿素荧光特性的影响
.....罗丽娟, 唐莉娜, 陈星峰, 等
外源葡萄糖对高温强光下旺长期烤烟光合特性及碳氮代谢关键酶活性的影响.....张艾改, 刘国顺, 云 菲, 等
基于四川凉山烟区大田试验的腐熟农家肥矿化规律分析
.....陈 宇, 凌爱芬, 李少鹏, 等
湖南不同母质植烟土壤磷形态的研究
.....刘建国, 罗建新, 田 飞, 等
氮用量对蛟河晒红烟碳氮代谢关键酶活性及品质的影响
.....凡 聪, 赵兵飞, 符云鹏, 等

· 烟草化学

- 基于聚邻苯三酚修饰的甲霜灵分子印迹传感器制备与应用
.....王春琼, 彭丽娟, 李籽萱, 等
GC-MS/MS 法结合多元统计过程控制应用于烟用香精的质量监控.....蒋成勇, 杜国荣, 王丽达, 等
滤嘴通风对卷烟主流烟气主要氮杂环类碱性香味成分释放量的影响.....朱先约, 崔 迟, 谢玉龙, 等
滤嘴参数对细支烟主要理化指标的影响
.....楚文娟, 孟祥士, 许旭, 等

· 烟草工艺

- 基于非负矩阵分解的卷烟配方维护方法
.....王 楠, 雒兴刚, 张 忠, 等
再造烟叶基加香涂布技术在卷烟包装中的应用
.....王佳琪, 文 俊, 曾 健, 等

· 设备与仪器

- 可调节气流方向的闭式循环热泵烤房的设计应用
.....任 杰, 曹亚凡, 卢晓华, 等
YJ17 卷烟机供丝系统的优化改进
.....高 迪, 郭继文, 孙 超, 等
YB65A 型硬条包装机小盒烟包翻转装置的设计
.....陆宇楨, 马 立, 吕小波, 等
GDX1 包装机烟包输出转盘变速系统的改进
.....李正伟, 李功勋, 关宏量

· 信息技术

- 基于互联网数据的斗烟市场偏好性分析
.....苏 凯, 付 博, 杨永锋, 等