



一种基于PCR扩增鉴定无Cas9突变体的快速方法

李倩, 刘庆, 王远江, 韦存虚, 王娟*

扬州大学生物科学与技术学院, 江苏扬州225009

*通信作者(juanwang@yzu.edu.cn)

摘要: CRISPR/Cas9基因编辑技术已广泛应用于多个物种中。含Cas9的突变体存在脱靶风险, 并含有潜在的转基因安全问题。当前, 虽然研究者们已开发视觉辅助系统用于筛选无Cas9的植株, 但基于PCR扩增的检测方法仍必不可少。然而, 此过程中还普遍存在一些问题, 如快速DNA提取方法引起的扩增不稳定性、Cas9和潮霉素B磷酸转移酶编码基因(*Hyg*)扩增的假阳性等。本研究旨在建立一种快速可靠的基于PCR扩增Cas9和*Hyg*方法检测无Cas9突变体。本研究首先对3种快速DNA提取方法进行评估。其中, 改良蔗糖法在扩增这两个基因时的表现最佳。其次, 本研究排查PCR扩增时存在的假阳性因素。结果表明DNA提取和存储温度、PCR体系配制的环境、PCR循环数等对这两个基因的扩增均有影响。基于以上结果, 本研究建立了一种可靠、高效的筛选转基因株系的方法, 并验证了该方法在大规模筛选中的可操作性。除此之外, 本方法也适用于以*Hyg*作为选择性标记的其他类型转基因株系的鉴定。

关键词: 无Cas9突变体; PCR; *Hyg*; 快速DNA提取; 假阳性

A fast method for identification of Cas9-free mutants through PCR amplification

LI Qian, LIU Qing, WANG Yuanjiang, WEI Cunxu, WANG Juan*

College of Bioscience and Biotechnology, Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu 225009, China

*Corresponding author (juanwang@yzu.edu.cn)

Abstract: CRISPR/Cas9 genome-editing technology has been widely used in many species. However, the prolonged presence of Cas9 nuclease in cells may increase off-target risks and raise concerns about transgenic safety. Although a visual-assisted system has been developed to screen transgene-free lines, PCR-based detection remains indispensable. However, there are still some common issues in this process, such as amplification instability caused by rapid DNA extraction methods and false positives in the amplification of Cas9 and hygromycin B phosphotransferase-coding gene (*Hyg*). This study aims to establish a rapid and reliable PCR-based method for detecting Cas9-free mutants by amplifying Cas9 and *Hyg*. This study first evaluated three rapid DNA extraction methods. Among them, the modified sucrose method demonstrated the best performance in amplifying these two genes. Secondly, the study investigated potential factors contributing to false positives during PCR amplification. Results showed that the amplification of these two genes was affected by DNA extraction and storage temperature, the environment of PCR preparation, number of PCR cycles, and other factors. Based on these findings, this study established a re-

收稿 2025-01-02 修定 2025-05-14

资助 扬州市科技计划项目(YZ2024052)。

liable and efficient method for screening transgenic lines and verified its operability in large-scale screening. In addition, this method is also applicable to the identification of other types of transgenic lines using *Hyg* as a selective marker.

Key words: *Cas9*-free mutant; PCR; *Hyg*; fast DNA extraction; false positives

成簇规则间隔短回文重复(CRISPR)/CRISPR相关蛋白9 (*Cas9*)基因编辑技术已广泛应用于多个物种中(Nishida等2016; Gaudelli等2017; Adikusuma等2018)。在植物中, 基因编辑技术一方面为科学研究提供遗传学材料, 另一方面其通过精确调控基因改良作物, 提升农产品的产量、品质和抗逆性。然而, 含有*Cas9*的转基因植物带来诸多问题。首先, *Cas9*基因的存在会显著增加脱靶的风险(Zhang等2014; Gao等2016)。其次, 对于育种而言, 含有*Cas9*基因的作物、蔬菜和水果会引起转基因安全性问题。除此之外, 无*Cas9*植株等于剔除了选择性标记基因, 如潮霉素B磷酸转移酶基因(*Hyg*)等, 这有利于在此突变体背景下再次创建转基因材料, 从而进一步为科学研究提供丰富的遗传材料。

目前, 研究者们已经创建了两种可视化的辅助系统来消除CRISPR载体。其中, 荧光辅助筛选(fluorescence-assisted screening)较为广泛, 此系统包括由种子特异性或组成型启动子驱动的荧光蛋白编码基因, 如*GFP*或者*mCHERRY*等, 在种子或者其他组织中若无荧光信号呈现, 此植株即为无*Cas9*的株系(Gao等2016; Tang等2018; Aliaga-Franco等2019)。自杀式转基因法(suicide transgenes)是从植物基因组中移除CRISPR载体的另一种方法。此方法是在CRISPR载体中引入2个毒蛋白编码基因, 并限制其在生殖细胞中表达, 从而破坏了含*Cas9*的花粉或种子, 仅保留不含*Cas9*的种子。

尽管荧光和育性辅助筛选系统省时省力, 但基于PCR检测的方法在无*Cas9*株系的鉴定中仍然不可或缺。首先, 这两种可视化筛选系统的应用场景较为局限。例如, 自杀式转基因法不适用于生殖器官功能相关靶基因的编辑, 因为育性相关基因的突变可能会导致植株不育或部分育性, 这种表型效应会与自杀效应产生叠加, 影响实验结果的判定(Chen和Liu 2014; Abbas等2021)。在荧光辅助系统中, 荧光信号的缺失可能源于基因沉默现象, 这

也可能被误判为无*Cas9*的株系(Andrews等2014; Hendrix等2021)。其次, 这两种可视化系统在作物、蔬菜和水果等领域的应用尚未普及。对于尚未建立可视化筛选系统的物种, 载体特异性片段的PCR扩增是检测无CRISPR片段的唯一有效方法。除此之外, 通过可视化筛选系统筛选出的无*Cas9*植株仍需通过PCR扩增再次确认, 并且PCR扩增也是鉴定转基因第一代中阳性转化体的必要方法。

*Cas9*和*Hyg*是位于植物CRISPR载体中的2个常规基因, 它们的扩增产物被广泛用于检测转基因植株中CRISPR载体的有无。然而, 在实际应用中, 这两个基因的扩增常出现假阳性现象, 这一问题长期干扰着研究工作的准确性。此外, 在DNA提取过程中, 尽管传统的CTAB法能够获得高质量的DNA, 但其操作流程较为繁琐, 因此逐渐被更为简便快捷的DNA快速提取法所替代。然而, 快速提取法获得的DNA通常未被纯化, 这严重影响了PCR的扩增效率。本研究旨在评估一种有效且快速的DNA提取方法, 并优化稳定的PCR反应体系, 通过特异性扩增*Cas9*和*Hyg*筛选标记基因, 为获得无*Cas9*的突变体提供可靠的技术支持。本研究评估了3种快速DNA提取方法, 研究可能引起*Hyg*和*Cas9*扩增假阳性的因素, 旨在建立一种筛选无*Cas9*植株的方法, 此方法对于大规模的基因型鉴定或筛选也有效。

1 材料与方法

1.1 植物材料

本研究以水稻(*Oryza sativa* L.)野生型品种‘中花11’(ZH11)为背景材料, 通过CRISPR/*Cas9*基因编辑技术(由百格基因科技有限公司完成)构建了*osnac20/26b*双突变体(图1-A和B)。T₀植株是指第一代转基因植物。本研究中所使用的DNA是从T₀和T₁植株幼叶中提取。ZH11和*osnac20/26b*分别作为有无T-DNA插入的阴性和阳性对照(图1-A和B)。

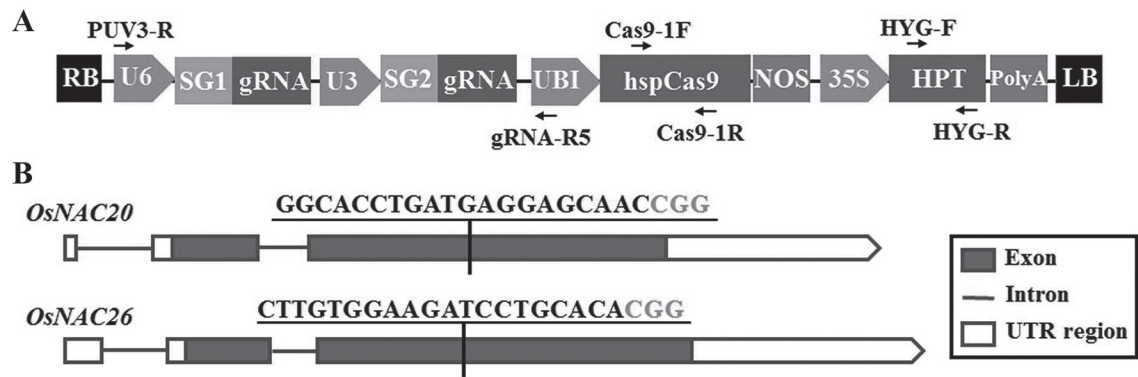


图1 CRISPR载体和突变靶点示意图
Fig. 1 Schematic diagram showing CRISPR vector and mutation target

1.2 DNA的提取

CTAB法分离基因组DNA的方法参考Murray和Thompson (1980)。10 mg叶片通过液氮研磨后, 加入400 μL 提前预热好的CTAB溶液[2% CTAB、5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA、0.84 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl、50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl (pH 8.0)], 涡旋振荡后, 65 $^{\circ}\text{C}$ 孵育10 min。向混合物中加入氯仿:异戊醇(24:1), 轻轻混匀后, 12 000 $\times g$ 离心5~10 min, 转移200 μL 上清至新管, 再加入200 μL 预冷的乙醇。-20 $^{\circ}\text{C}$ 放置后, 12 000 $\times g$ 离心10 min, 将沉淀溶解于50 μL 灭菌水中。

SDS法采用Kasajima等(2004)的方法。提取缓冲液母液[200 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl (pH 7.5)、250 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl、25 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA 和 0.5% SDS] 提取前用TE缓冲液[10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl (pH 8.0)、1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA] 稀释10倍。3~5 mg叶片加入200 μL 稀释后的提取缓冲液并研磨, 溶液中可能残留部分组织碎片。在离心或不离心的情况下直接取1~2 μL 溶液直接用于PCR反应。

蔗糖制备法(蔗糖法)参考Berendzen等(2005)的方法。将10 mg叶片置于250 μL 提取缓冲液[50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl (pH 7.5)、300 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl和300 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖] 中并研磨, 而后在99~100 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育10 min。离心后, 取1或2 μL 上清液直接用于PCR反应。

改良蔗糖法的步骤参考徐超男(2014)的方法, 在蔗糖法的基础上增加了稀释的步骤, 即在离心后将上清转移到新管(最多50 μL), 用水稀释10倍

后, 取1~2 μL 溶液直接用于PCR反应。

1.3 PCR扩增

为获得最佳的PCR扩增效率, 在20 μL 的PCR体系中分别加入1或2 μL 的DNA粗提液。引物干粉用灭菌水进行稀释。2 $\times$ Taq Master Mix (近岸蛋白) 预混液用于基因的扩增。PCR反应程序: 94 $^{\circ}\text{C}$ 、2 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s; 57 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s; 72 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s; 72 $^{\circ}\text{C}$ 、5 min; 共30个循环。引物分别为: Hyg-F (5'-CGA-GAGCCTGACCTATTGCAT-3'), Hyg-R (5'-CT-GCTCCATACAAGCCAACCAC-3'), Cas9-R (5'-CGAAGTTGCTCTTGAAGTTG-3'), Actin-F (5'-CCAAGGCCAATCGTGAGAAGA-3'), Actin-R (5'-AATCAGTGAGATCACGCCAG-3'), PUV3-R (5'-CTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAA-3'), gRNA-R5 (5'-ACGACCGGGTTCACGCTGCACCT-3')。

在温度存储的实验中, 将DNA粗提液分成三等份, 并置于室温(RT)、4 $^{\circ}\text{C}$ 和-20 $^{\circ}\text{C}$ 相应时间(d), 而后PCR扩增Actin基因, 检测不同存储温度对DNA粗提液的影响。使用单因素变量法排查可能引起Hyg和Cas9扩增假阳性的因素。其中, Fresh DNA表示常规条件下提取的DNA, 提取液现配现用, DNA现提现用。Old DNA表示Fresh DNA在4 $^{\circ}\text{C}$ 下保存数天, 而后用于PCR反应。Primer^{open}和PCR mix^{open}表示经常在开放环境中而非超净工作台使用的引物和PCR预混液。Unsterilized tube表示未经高压灭菌的PCR管。35 cycles表示PCR反应

的循环数。Low flow environment表示是在低流动环境中配制的PCR体系。低流动环境是指门窗关闭, 空气流动相对较低的环境。在大规模筛选无*Cas9*的*osnac20/26*突变体时, 参考本研究总结的方法进行。

2 实验结果

2.1 DNA快速提取法的比较

本研究对SDS法、蔗糖法和改良的蔗糖法这三种DNA提取的方法进行评估, 以筛选出适用于*Hyg*、*Cas9*和*Actin*基因扩增的方法。结果显示, 与CTAB法提取的DNA相比, SDS法和蔗糖法提取的DNA浓度较高, 但DNA质量较低(表1), 这可能会影响PCR扩增效率。在后续的实验中, 本研究主要考虑DNA的体积对PCR扩增的影响。

本研究以CTAB法提取的DNA作为对照, 在此对照组中, *Cas9*、*Hyg*和*Actin*这三个基因的扩增效果较好(图2-A)。SDS法根据其实验步骤, 也可称为一步法。SDS法中的植物组织加入提取液破碎后, 此匀浆液可在离心或不离心的情况下用于PCR反应。如图2-B~D所示, 未离心组的PCR效果较离心组的效果好。这可能主要是由于SDS法中的细胞核裂解不充分所致。未离心溶液中悬浮的细胞核较多, DNA模板量较多; 而离心后细胞核沉淀到底部, 导致模板量减少。在离心组中, 不管是1 μL 还是2 μL 的DNA溶液均抑制*Cas9*和*Hyg*的扩增(图2-B和C)。因此, 在SDS法中, 离心的粗提液虽然去除了较大的组织碎片, 但也沉淀了较多的细胞核, 导致模板量降低。相较于离心的溶液, SDS法未离心的溶液更适用于PCR反应。

在蔗糖法中, 1 μL 的DNA模板能够有效扩增*Cas9*和*Atin*基因, 但2 μL 的DNA模板抑制它们的扩增(图2-E和F)。相反, 2 μL 的DNA模板显著提高*Hyg*的扩增效率, 但抑制*Cas9*和*Actin*的扩增(图2-E和F)。前人的研究表明, PCR反应体系中所含的快速法提取的DNA溶液越多, PCR反应的效率越低。然而, 本研究的结果表明, 快速法提取的DNA的量越多, 并不总是抑制基因的扩增, 而是随着引物的不同, DNA溶液的量对PCR反应的影响不同。对于改良的蔗糖法而言, 在20 μL 的PCR体系中, 1或2

表1 DNA质量检测
Table 1 Detection of DNA quality

编号	CTAB法			SDS法(离心)			SDS法(非离心)			蔗糖法			改良蔗糖法*		
	浓度/ $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}	浓度/ $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}	浓度/ $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}	浓度/ $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}	浓度/ $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}
1	153.1	2.02	2.01	1 026.9	1.30	0.59	1 052.3	1.35	0.52	514.5	1.51	0.93	40.9	1.45	0.80
2	234.5	2.03	2.08	1 018.7	1.30	0.63	879.7	1.29	0.42	173.4	1.55	0.86	43.0	1.42	0.75
3	122.3	1.97	2.04	907.3	1.35	0.61	975.1	1.40	0.55	238.7	1.21	0.60	26.3	1.13	0.57
4	212.2	2.03	2.01	917.2	1.31	0.69	856.6	1.34	0.64	295.6	1.40	0.72	21.4	1.15	0.59
5	173.7	2.02	2.07	932.6	1.31	0.72	815.7	1.33	0.67	164.1	1.33	0.57	24.9	1.16	0.57
6	141.9	1.95	1.88	908.9	1.29	0.70	936.4	1.32	0.65	402.0	1.44	0.66	21.9	1.16	0.58

*稀释10倍的工作液用以浓度的测定。1~3表示阴性对照(ZH11)的3个生物学重复, 4~6表示阳性对照(*osnac20/26*双突变体)的3个生物学重复。

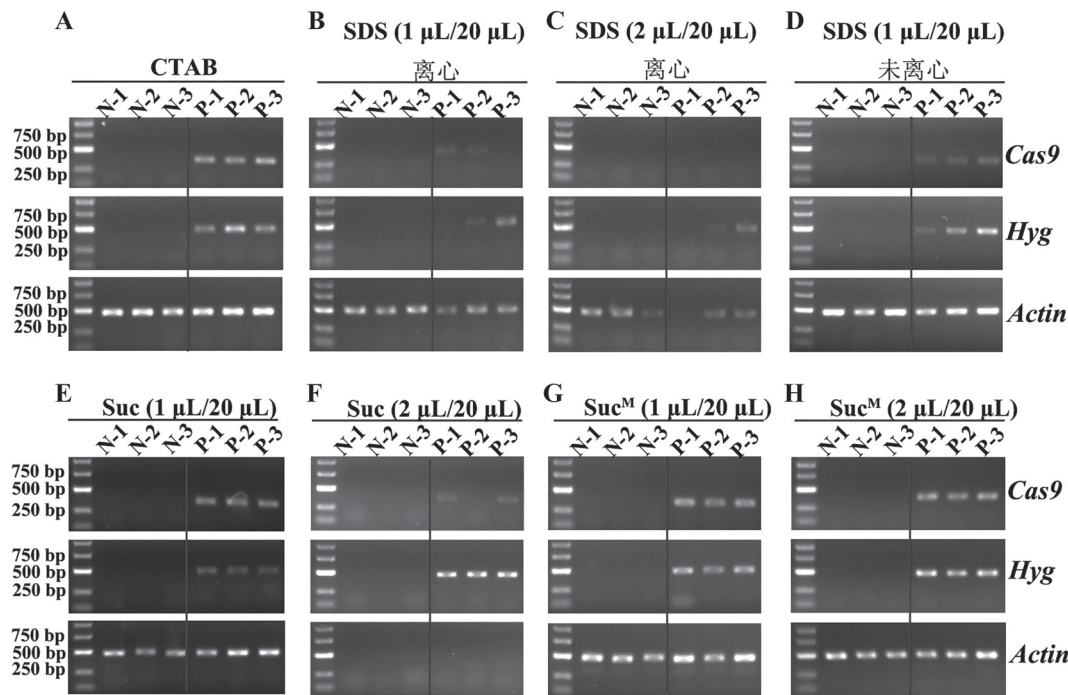


图2 三种快速DNA提取法的PCR扩增效率对比

Fig. 2 Comparison of PCR amplification efficiency of the three fast DNA extraction methods

A~H: SDS、Suc和Suc^M分别代表SDS法、蔗糖法和改良蔗糖法, N和P分别代表阴性对照(ZH11)和阳性对照(*osnac20/26*双突变体)。每个对照实施3个生物学重复实验。括号内的内容代表PCR体系中的DNA体积/总体积。

μL的DNA模板均可有效地扩增这三个基因(图2-G和H), 而在缩减的体系中(1 μL/10 μL), 这三个基因的扩增效率则较低(结果未呈现)。

简而言之, SDS法是最简单的DNA提取方法, 但此方法对*Cas9*和*Hyg*这两个基因的扩增效率较低(图2-D)。与之相比, 蔗糖法提取的DNA对这两个基因的扩增效果较高(图2-E和F)。此外, 改良蔗糖法是在蔗糖法的基础上增加了稀释的步骤, 这使得植物组织中抑制PCR扩增的因子减弱, 从而获得了最佳的扩增效果(图2-H)。因此, 在本研究的后续研究中, 改良蔗糖法是首选方法。

本研究将改良蔗糖法所得的DNA溶液分别置于室温(RT)、4°C和-20°C, 探究储存温度对PCR扩增效率的影响。结果如图3所示, DNA置于RT下1 d后, 扩增效率明显下降; 在4°C下放置28 d, 扩增效率略有下降。然而, 当DNA处于-20°C时, 至少可以保持75 d的稳定状态。

2.2 *Hyg*和*Cas9*扩增假阳性的因素排除

*Hyg*基因从大肠杆菌中克隆, *Cas9*从金黄色葡萄球菌和化脓性链球菌中克隆(Gritz和Davies 1983; Kleinstiver等2016; Slaymaker等2016)。这些细菌广泛存在于环境中, 包括气溶胶、物体表面、水、溶液甚至手上以及呼吸的气体中。当在开放的环境中配制PCR体系时, 这些细菌很容易被带入PCR系统中, 从而在扩增*Hyg*和*Cas9*时产生假阳性风险。因此, 消除这两个基因扩增时的假阳性就等于消除或减少这些细菌的引入。通常, 在PCR反应过程中, 严格的无菌操作加上灭菌的PCR成分, 可以确保结果的可靠性。然而, 这些都增加了工作量。为了增加实验的可操作性, 我们分析了可能引起*Hyg*和*Cas9*扩增的假阳性因素。在PCR过程中, DNA溶液、PCR预混液和引物在PCR管中发生反应。因此, PCR各种成分、PCR管和PCR反应条件如循环数和实验环境等可能对PCR结果有显著影响。

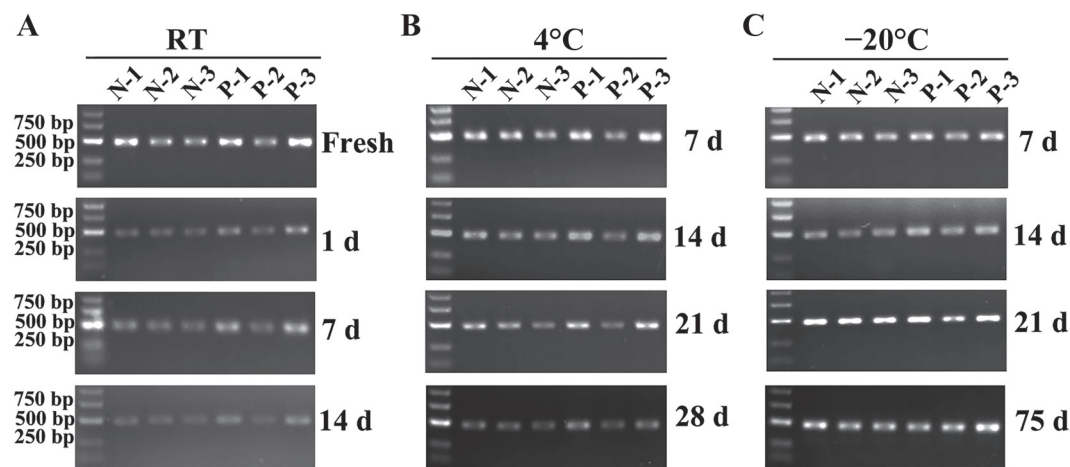


图3 不同DNA储存温度对PCR扩增效率的影响

Fig. 3 Effect of different DNA-storage temperature on PCR amplification efficiency

A~C: 室温、4°C和-20°C下扩增*Actin*基因的结果。N和P分别代表阴性对照(ZH11)和阳性对照(*osnac20/26*双突变体)。

DNA的提取和储存可能是造成假阳性的风险之一。本研究对改良蔗糖法所提取的DNA进行了检测,以分析可能的影响因素。有趣的是,当常规条件下提取的DNA立即进行*Cas9*或*Hyg*扩增时,没有出现假阳性结果(图4-B),但当该DNA置于4°C储

存几天后,基因的扩增出现了假阳性(图4-C)。这可能是由于常规条件下的DNA提取是在开放的环境中进行的,提取液现用现配(未灭菌),此时DNA溶液中的细菌量较少,在合适的PCR反应条件下,可以确保结果的可靠性。然而,当DNA粗提液置

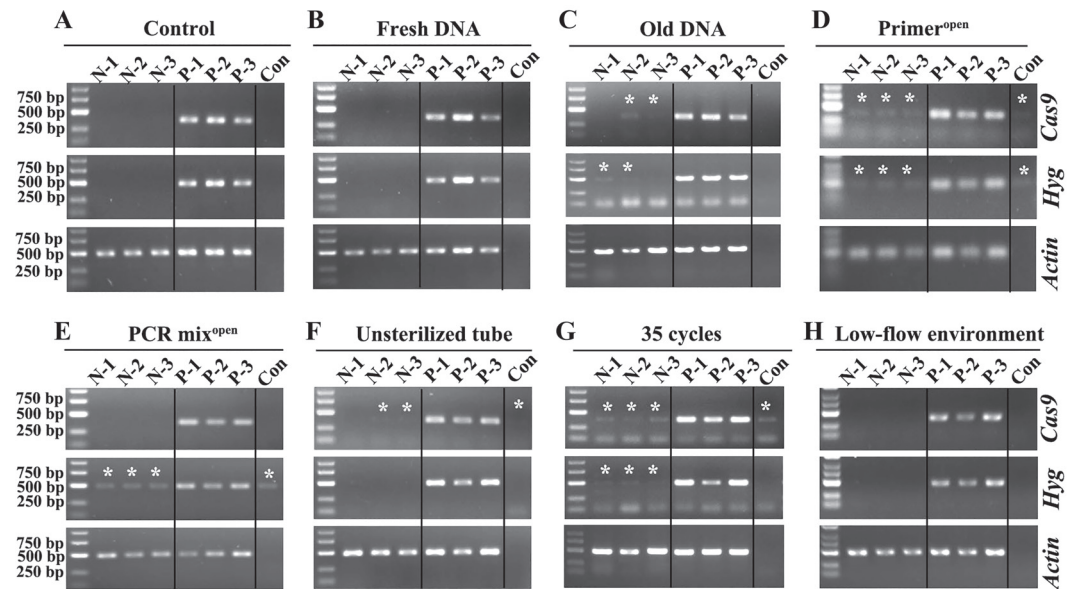


图4 *Cas9*和*Hyg*扩增的假阳性因素的分析

Fig. 4 Exclusion of false positive risk for *Cas9* and *Hyg* amplification

A: 对照组(Control)是指在无菌条件下提取的DNA和PCR反应; B~G: *Cas9*和*Hyg*扩增假阳性的因素分析。N和P分别代表阴性对照ZH11和阳性对照*osnac20/26*双突变体。Con表示未添加DNA的对照组。星号表示假阳性。

于4°C保存时,有利于细菌的生长和繁殖。因此,在扩增*Cas9*和*Hyg*时,增加了细菌的模板量,导致假阳性的产生。综上所述,在扩增*Cas9*或*Hyg*这两个基因时,只要尽快将新鲜提取的DNA粗提液用于PCR反应,DNA提取过程对结果的影响不大。

PCR反应液的配制环境对*Hyg*和*Cas9*的扩增也存在一定的影响。例如,在超净工作台中配制PCR预混液和引物不会产生假阳性结果(图4-A),而经常在开放环境中使用的预混液和引物则会产生假阳性结果(图4-D和E),这主要是由于在超净台中的操作限制了细菌的引入,而开放环境则增加了细菌引入的风险。除了主要的PCR成分外,PCR管和循环数对结果也至关重要。如图4-F所示,在未灭菌的PCR管中进行的PCR反应,*Cas9*扩增产生了假阳性的条带,而在灭菌后的PCR管中进行PCR反应则无假阳性条带产生(图4-A)。35个循环的PCR反应导致*Cas9*和*Hyg*的扩增产生了假阳性(图4-G),而30个循环的PCR反应无假阳性产生(图4-A)。这可能是由于过多的循环数增加了细菌模板的扩增,因为我们无法保证完全无菌的条件。值得注意的是,当两个或多个因素结合时,如非现提取的DNA与开放环境中使用的引物共同用于*Cas9*和*Hyg*的扩增,会显著增加假阳性的风险。

通常,PCR反应体系的配制是在超净工作台进行的,但本研究发现在低流动的环境(窗关闭,空气流动相对较低的封闭环境)下准备时,PCR结果仍可保持较高的可靠性(图4-H)。这表明当扩增*Hyg*和*Cas9*时,低流动的环境可以代替超净工作台进行PCR体系的配制。相较于超净台,在低流动的环境配制PCR反应体系更加灵活方便,尤其是在大规模筛选时,极大地节省了时间。综上所述,在*Cas9*和*Hyg*扩增过程中,保持PCR成分处于相对无菌状态,并在清洁的环境下进行实验是保证结果可靠的关键因素。基于此,本研究总结出快速高效的鉴定无*Cas9*突变体的操作方法,如表2所示。

2.3 大规模筛选无*Cas9*的突变体

为了进一步检验该操作方法是否适用于大规模的筛选,我们扩大样本进行测试。测试的目的为检测*T₁*植株中无*Cas9*的*osnac20/26b*突变体。先前的研究已证实*T₀*植株中,*OsNAC20*和*OsNAC26* 2

个基因均发生突变。在本研究中,首先扩增*Cas9*基因以初步筛选无*Cas9*的植株,而后扩增*Hyg*以再次确认转基因植株中T-DNA插入片段的有无。实验结果如图5-A所示,分别从*osnac20/26b-7*、*osnac20/26b-18*和*osnac20/26b-24* 3个独立的转基因株系中鉴定到15株无*Cas9*的植株。在这15个株系中,*Hyg*扩增也呈阴性,这进一步证实了这些株系中无T-DNA插入(图5-B)。为了进一步证实结果的可靠性,我们通过引物PUV3-R和gRNA-R5扩增载体上的另一个特异性片段(图1; Lu等2017),结果也无阳性条带呈现,这说明*Hyg*和*Cas9*基因扩增的真实性(图5-B)。DNA测序结果显示,这些无*Cas9*的植株中*OsNAC20*和*OsNAC26*均发生了突变。表型分析显示这些双纯合突变体为粉质胚乳表型(图6),这与*osnac20/26b*的表型一致(Wang等2020)。以上结果表明,本研究总结的操作方法适用于大规模的无*Cas9*的突变体植株的筛选。

3 讨论

基于PCR扩增鉴定无*Cas9*株系的方法中,DNA提取方法的筛选是关键之一。CTAB法提取DNA的效果虽好,但由于步骤多、耗时长,而往往被快速DNA提取法所取代。目前,已有多种快速DNA提取的方法,如ROSE法(Steiner等1995)、蔗糖法(Berendzen等2005)、SDS法(Kasajima等2004)和NaOH法(Wang等1993)等。然而,这些方法通常会导致PCR扩增不稳定。这可能与多种因素有关,如提取的DNA质量、引物特异性、PCR反应程序等。通常,研究人员在排除哪种因素导致的扩增不稳定性问题时耗时耗力。因此,快速且稳定的DNA提取方法有利于大规模的基因型鉴定和表型分析。在本研究中,我们发现改良蔗糖法步骤简单、省时省力,而且适用于*Cas9*、*Hyg*和*Actin*基因的扩增。

在基于PCR反应的基因型鉴定或者突变体筛选过程中,为了避免植物组织和/或快速提取缓冲液中PCR抑制因子的影响,多种增强型的DNA聚合酶,如Phire Hot Start II DNA聚合酶或KAPA3G DNA聚合酶应运而生。先前已有报道将快速DNA提取法与这两种工程酶结合进行PCR反应(Lapin等2019; Dhatt等2021; Paul等2020),从而取得较好

表2 快速有效的筛选无*Cas9*株系的方法

Table 2 The guideline for fast and effective screening *Cas9*-free lines

过程	步骤编号	具体操作	注意事项
DNA的提取	1	取10 mg叶片置于装有2个钢珠的2 mL离心管或96孔板中。	此步骤为常规步骤。新鲜配制的提取液(未灭菌)可用于提取DNA, 但提取液建议现配现用, DNA粗提液现提现用。高压灭菌之后的提取液可以长时间的保存。
	2	加入250 μ L改良的蔗糖提取液, 破碎样品。	
	3	沸水浴10 min。	
	4	离心以去除组织碎片。	
	5	将20 μ L上清液转移到新的管或96孔板中, 用无菌水稀释10倍。	
PCR体系的配制	6	在超净工作台上配制PCR体系。	当所需要筛选的样品数较少时, 建议在超净工作台进行操作。
	7	戴上口罩和手套在低流动环境下配制PCR体系, 此外在工作台周围喷施70%酒精, 并用次氯酸盐擦拭工作台。	当所需要筛选的样品数较多时, 建议在低流动环境中进行, 以更方便操作, 此外用酒精喷雾和次氯酸盐喷雾来减少气溶胶的污染。
	8	用无菌水溶解 <i>Hyg</i> 和 <i>Cas9</i> 引物干粉, 先分别配制一个总的PCR反应体系, 再分装至PCR管中。	如果选择在低流动的环境下配制PCR体系, 应该提前将引物分装, 防止剩余的引物被污染, 其他PCR组分也是如此。此外, PCR管或PCR板需灭菌。
	9	在每个PCR管中加入2 μ L的DNA溶液, 尽快盖上盖子, 并置于PCR仪反应。	PCR反应条件是根据研究者选择的PCR预混液和引物设置的, PCR反应不应超过30个循环。

本研究中使用的引物可用于筛选不含*Cas9*的突变体。对于其他引物而言, 在大规模实验之前应先进行预实验以找到合适的退火温度和循环数。

的PCR扩增效果。然而, 这些酶或相关试剂盒价格较为昂贵, 增加了普通实验室的经济负担。在本研究中, 改良蔗糖法提取的DNA只需与常规的DNA聚合酶或者PCR预混液结合即能取得较好的扩增效果, 这显著降低了成本。此外, 组织与提取液混匀后只需要操作3道工序, 也节省了时间。尽管在本研究中未对其他物种进行实验, 但改良蔗糖方法已应用于甘蓝型油菜的分子标记辅助筛选(徐超男2014; 付蓉2019; 李旭2019), 这也意味着此方法可能在多种植物中有潜在的应用前景。

除DNA的提取方法外, *Cas9*和*Hyg*扩增时产生的假阳性也往往困扰研究人员。含有*Cas9*和*Hyg*基因的细菌大量存在于我们的环境中, 这是导致假阳性产生的重要原因。在本研究中, 我们发现新鲜配制的提取液, 即使不灭菌, 只要现配现用, 也可避免假阳性的产生。在配制PCR反应液时, 相对

无菌的引物和PCR预混液、灭菌的PCR管、合适的PCR循环数均是保证结果可靠性的关键。对于操作环境而言, 低流动的实验环境可替代超净台。此外, 合理地设置对照对于实验的准确性也至关重要。在本研究中, 我们设置了阳性对照, 即以含有插入片段的转基因植株DNA为模版进行扩增。在此注意的是, 阳性样品扩增效率高, 应严格控制, 避免其成为潜在的污染源。阴性对照是以转基因的背景材料为模版进行扩增, 用于证明扩增过程中无假阳性现象。空白对照也必不可少。以纯水作为模板进行扩增, 用于证明扩增过程中的引物, 预混液和PCR管等无污染。

总之, 在本研究中, 我们通过扩增*Cas9*和*Hyg*基因, 建立了一种可靠、高效的筛选无*Cas9*转基因株系的方法。本方法也适用于以*Hyg*作为筛选标记基因的其他类型的转基因植物的鉴定。

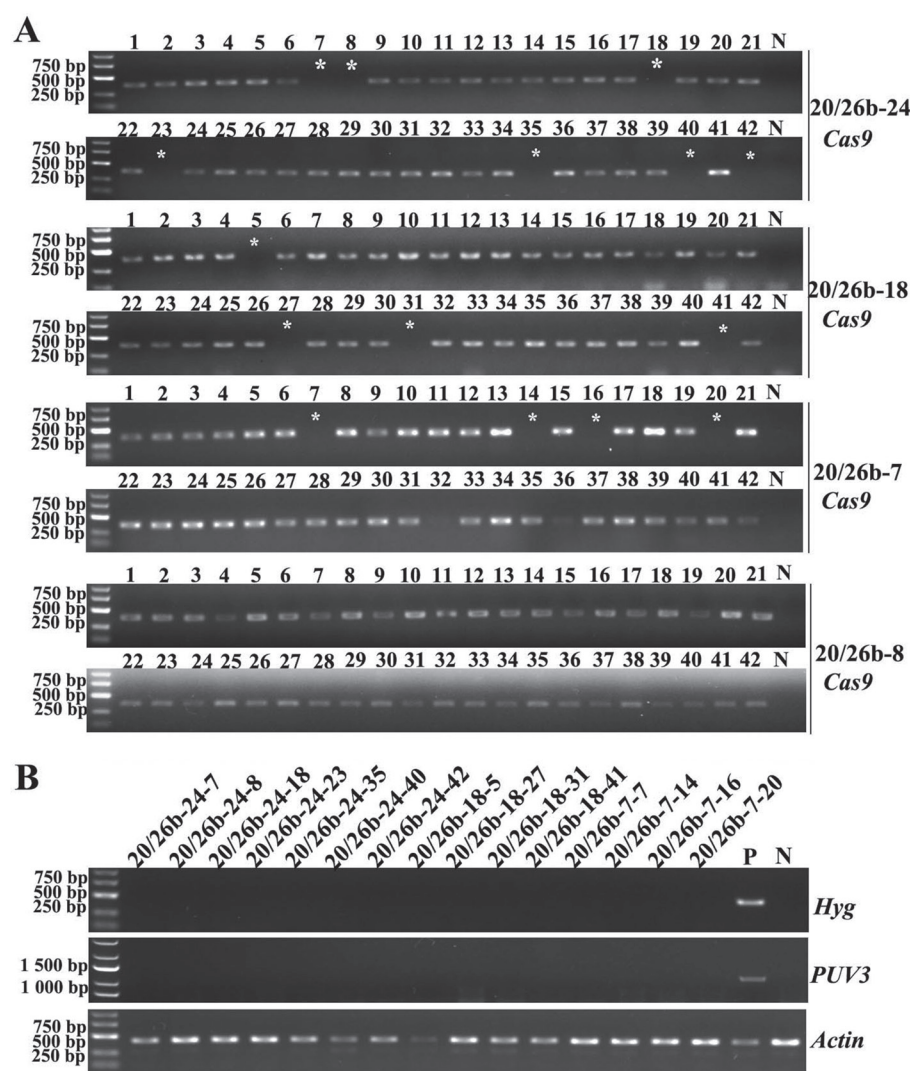


图5 无Cas9的osnac20/26b突变体植株的鉴定
Fig. 5 Identification of Cas9-free plants in osnac20/26b mutants

A: Cas9扩增初步筛选无Cas9的植株; B: Hyg和载体特异性引物的扩增确认无T-DNA插入。所有株系的DNA均从T₁植株中提取。N为阴性对照; P为阳性对照, 阳性对照的模版为CRISPR载体。

参考文献(References)

Abbas A, Yu P, Sun L, et al (2021). Exploiting genic male sterility in rice: from molecular dissection to breeding applications. *Front Plant Sci*, 12: 629314

Adikusuma F, Piltz S, Corbett M A, et al (2018). Large deletions induced by Cas9 cleavage. *Nature*, 560: E8–E9

Aliaga-Franco N, Zhang C, Presa S, et al (2019). Identification of transgene-free CRISPR-edited plants of rice, tomato, and *Arabidopsis* by monitoring DsRED fluorescence in dry seeds. *Front Plant Sci*, 10: 1150

Andrews OE, Cha DJ, Wei C, et al (2014). RNAi-mediated gene silencing in zebrafish triggered by convergent transcription. *Sci Rep*, 4: 5222

Berendzen K, Searle I, Ravenscroft D, et al (2005). A rapid and versatile combined DNA/RNA extraction protocol and its application to the analysis of a novel DNA marker set polymorphic between *Arabidopsis thaliana* ecotypes Col-0 and Landsberg *erecta*. *Plant Methods*, 1: 4

Chen L, Liu YG (2014). Male sterility and fertility restoration in crops. *Annu Rev Plant Biol*, 65: 579–606

Dhatt BK, Paul P, Sandhu J, et al (2021). Allelic variation in

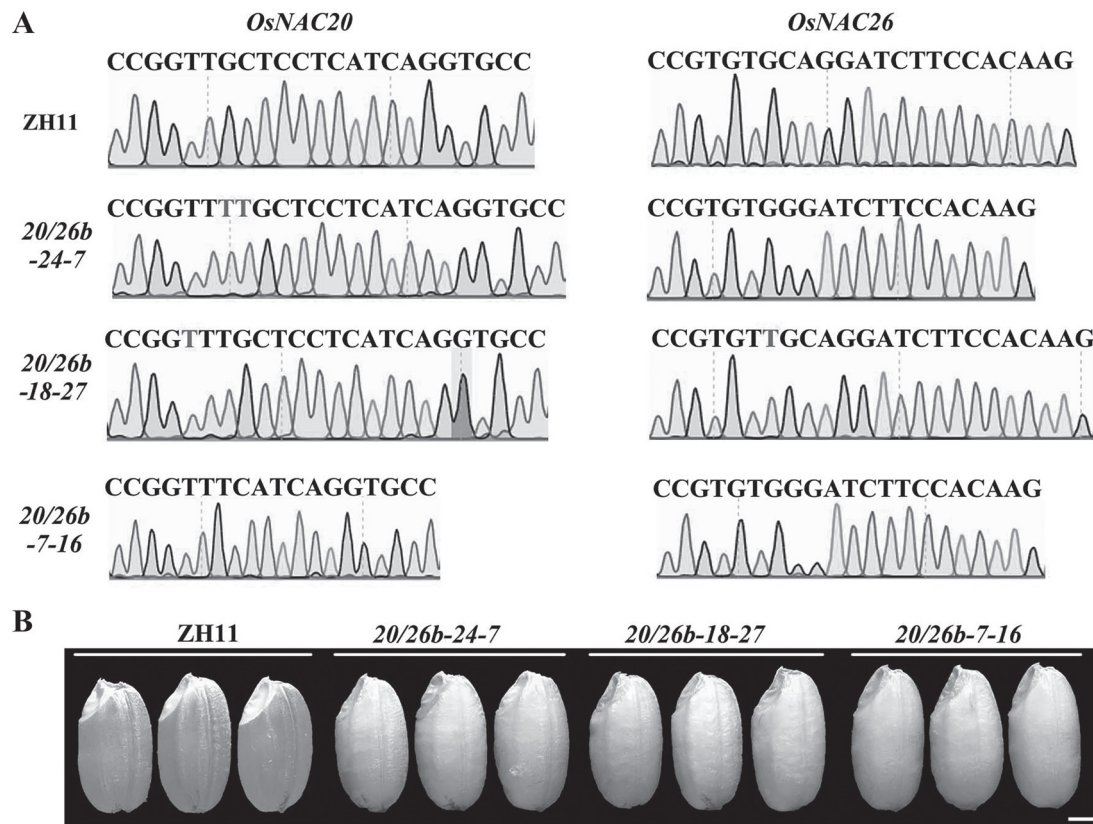


图6 无Cas9的osnac20/26b突变体的突变类型和表型观察

Fig. 6 Mutation type and phenotype observation of Cas9-free osnac20/26b mutants

rice *Fertilization Independent Endosperm 1* contributes to grain width under high night temperature stress. *New Phytol*, 229: 335–350

- Fu R (2019). Application of molecular marker-assisted selection in clubroot resistance and high oleic acid breeding in *Brassica napus* (dissertation). Wuhan: Huazhong Agricultural University (in Chinese with English abstract) [付蓉(2019). 分子标记辅助选择在油菜抗根肿病和高油酸育种中的应用(学位论文). 武汉: 华中农业大学]
- Gao X, Chen J, Dai X, et al (2016). An effective strategy for reliably isolating heritable and Cas9-free *Arabidopsis* mutants generated by CRISPR/Cas9-mediated genome editing. *Plant Physiol*, 171: 1794–1800
- Gaudelli NM, Komor AC, Rees HA, et al (2017). Programmable base editing of A•T to G•C in genomic DNA without DNA cleavage. *Nature*, 551: 464–471
- Gritz L, Davies J (1983). Plasmid-encoded hygromycin B resistance: the sequence of hygromycin B phosphotransferase gene and its expression in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, 25: 179–188
- Hendrix B, Hoffer P, Sanders R, et al (2021). Systemic *GFP*

silencing is associated with high transgene expression in *Nicotiana benthamiana*. *PLOS One*, 16: e0245422

- Kasajima I, Ide Y, Ohkama-Ohtsu N, et al (2004). A protocol for rapid DNA extraction from *Arabidopsis thaliana* for PCR analysis. *Plant Mol Biol Rep*, 22: 49–52
- Kleinstiver BP, Pattanayak V, Prew MS, et al (2016). High-fidelity CRISPR-Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects. *Nature*, 529: 490–495
- Lapin D, Kovacova V, Sun X, et al (2019). A coevolved EDS1-SAG101-NRG1 module mediates cell death signaling by TIR-domain immune receptors. *Plant Cell*, 31: 2430–2455
- Li X (2019). Improvement of male sterile line in *Brassica napus* L. by marker-assisted selection (dissertation). Wuhan: Huazhong Agricultural University (in Chinese with English abstract) [李旭(2019). 分子标记辅助选择改良油菜核不育系(学位论文). 武汉: 华中农业大学]
- Lu Y, Ye X, Guo R, et al (2017). Genome-wide targeted mutagenesis in rice using the CRISPR/Cas9 system. *Mol Plant*, 10: 1242–1245
- Murray MG, Thompson WF (1980). Rapid isolation of high

- molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res*, 8: 4321–4325
- Nishida K, Arazoe T, Yachie N, et al (2016). Targeted nucleotide editing using hybrid prokaryotic and vertebrate adaptive immune systems. *Science*, 353: aaf8729
- Paul P, Dhatt BK, Miller M, et al (2020). *MADS78* and *MADS79* are essential regulators of early seed development in rice. *Plant Physiol*, 182: 933–948
- Slaymaker IM, Gao L, Zetsche B, et al (2016). Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity. *Science*, 351: 84–88
- Steiner JJ, Polemba CJ, Fjellstrom RG, et al (1995). A rapid one-tube genomic DNA extraction process for PCR and RAPD analyses. *Nucleic Acids Res*, 23: 2569–2570
- Tang T, Yu X, Yang H, et al (2018). Development and validation of an effective CRISPR/Cas9 vector for efficiently isolating positive transformants and transgene-free mutants in a wide range of plant species. *Front Plant Sci*, 9: 1533
- Wang H, Qi M, Cutler AJ, et al (1993). A simple method of preparing plant samples for PCR. *Nucleic Acids Res*, 21: 4153–4154
- Wang J, Chen Z, Zhang Q, et al (2020). The NAC transcription factors OsNAC20 and OsNAC26 regulate starch and storage protein synthesis. *Plant Physiol*, 184: 1775–1791
- Xu CN (2014). Molecular marker-assisted selection and development of allele-specific markers for high oleic and low linolenic acid contents in the seed of *Brassica napus* (dissertation). Wuhan: Huazhong Agricultural University (in Chinese with English abstract) [徐超男(2014). 甘蓝型油菜种子高油酸和低亚麻酸等位基因特异性标记的开发及分子标记辅助选择(学位论文). 武汉: 华中农业大学]
- Zhang H, Zhang J, Wei P, et al (2014). The CRISPR/Cas9 system produces specific and homozygous targeted gene editing in rice in one generation. *Plant Biotechnol J*, 12: 797–807