DOI: 10.3724/SP.J.1006.2020.94169

研究简报

大豆生物钟基因 *GmLNK1/2*、*GmRVE4/8* 和 *GmTOC1* CRISPR/Cas9 组织表达分析及敲除靶点的鉴定

甘卓然 石文茜 黎永力 侯智红 李海洋 程 群 董利东
刘宝辉 芦思佳*

广州大学生命科学学院, 广东广州 510006

摘 要: 生物钟基因能够参与调控植物的整个生命进程, 对提高作物产量具有重要的作用。*LNK1* (*NIGHT LIGHT-INDUCIBLE AND CLOCK-REGULATED 1*)、*LNK2*、*RVE4* (*REVEILLE 4*)、*RVE8* (*REVEILLE 8*) 和 *TOC1* (*TIMING OF CAB EXPRESSION 1*) 是植物中重要的生物钟基因。本研究利用 BLAST 同源比对和进化树分析的方法分别鉴定 *AtLNK1*、*AtLNK2*、*AtRVE4*、*AtRVE8* 和 *AtTOC1* 在大豆中的同源基因, 通过 qRT-PCR 实验证明这些生物钟基因在大豆根、茎、叶等组织中均有表达。成功构建这些基因的 CRISPR/Cas9 敲除载体, 并利用大豆根毛转化体系成功鉴定出 13 个基因的 CRISPR/CAS9 有效靶点。为进一步获得稳定的大豆突变体材料及研究其生物钟基因的功能提供了理论基础。

关键词: 大豆; 基因敲除; 生物钟基因; CRISPR/Cas9

Identification of CRISPR/Cas9 knockout targets and tissue expression analysis of circadian clock genes *GmLNK1/2*, *GmRVE4/8*, and *GmTOC1* in soybean

GAN Zhuo-Ran, SHI Wen-Qian, LI Yong-Li, HOU Zhi-Hong, LI Hai-Yang, CHENG Qun, DONG Li-Dong, LIU Bao-Hui, and LU Si-Jia*

School of Life Sciences, Guangzhou University, Guangzhou 510006, Guangdong, China

Abstract: Circadian clock genes play an important role in improving crop yield. *LNK1*, *LNK2*, *RVE4*, *RVE8*, and *TOC1* are important circadian clock genes in plants. Homologous genes of *AtLNK1*, *AtLNK2*, *AtRVE4*, *AtRVE8*, and *AtTOC1* in soybean were found by evolutionary tree analysis. These genes were expressed in soybean roots, stems and leaves. The knockout vectors of these genes were successfully constructed by using CRISPR/Cas9 gene editing technology. Transformation system of soybean root hair and RT-PCR were used to identify 13 genes targets effectively. The results of this study provide important target informations for further obtaining soybean mutant materials, and a foundation for further studying the function of circadian clock genes.

Keywords: soybean; gene knockout; clock gene; CRISPR/Cas9

单产低是我国大豆面临的最大问题, 因此提高大豆单产是首要任务^[1]。影响大豆产量的因素可归为两大类, 一是外部因素, 如耕作技术、气候、土壤和自然灾害等; 二是内部因素, 即基因, 两方面的因素相互影响、协调, 共同调控大豆的产量^[2-3]。大豆作为固着生物, 必须准确地感知环境信号, 如光和温度, 以适应其生长发育的周围环境^[4]。实际上, 大多数生物并不是简单地对外部环境做出

反应, 而是对外部环境的变化做出预测, 并根据自己的生物习性进行调整^[5]。这种内源性生物节律就是生物钟。生物钟使生物体能够预测和准备应对周围环境中的变化^[4]。生物钟基因在控制植物开花、产量、生物胁迫和非生物胁迫中都扮演重要的角色。我们前期的研究发现, 大豆长童期性状关键位点 *J* 是拟南芥生物钟关键基因 *ELF3* (*EARLY FLOWERING 3*) 的一个同源基因, 并证明在短日照下 *J* 的

本研究由国家自然科学基金项目(31771815, 31701445)和作物遗传与种质创新国家重点实验室开放课题(ZW201901)资助。

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (31771815, 31701445) and the State Key Laboratory of Crop Genetics & Germplasm Enhancement (ZW201901).

* 通信作者(Corresponding authors): 芦思佳, E-mail: lusijia@gzhu.edu.cn

第一作者联系方式: E-mail: gggzr@126.com

Received (收稿日期): 2019-11-07; Accepted (接受日期): 2020-03-24; Published online (网络出版日期): 2020-04-07.

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1809.S.20200404.0851.002.html>

等位变异能够延迟大豆开花,使大豆产量提高 30%以上^[6]。植物生物钟由许多基因共同调控,如 *LHY* (*LATE ELONGATED HYPOCOTYL*)、*CCA1* (*CIRCADIAN CLOCK-ASSOCIATED*)、*TOC1* (*TIMING OF CAB EXPRESSION1*)、*PRR* (*PSEUDO-RESPONSE REGULATOR*)、*LUX* (*LUX ARRHYTHMO*)、*ELF3* (*EARLY FLOWERING 3*)、*ELF4* (*EARLY FLOWERING 4*)、*RVE* (*REVEILLE*)、*LNK* (*NIGHT LIGHT-INDUCIBLE AND CLOCK-REGULATED*)等^[7]。在拟南芥中,*LHY/CCA1* 与 *TOC1* 是植物生物钟的核心元件,并且形成反馈调节回路^[8-9]。*RVE4*、*RVE6* 和 *RVE8* 是与 *LHY/CCA1* 同源的生物钟基因,作为生物钟激活因子调控下游基因的表达^[9-10]。*LNK1* 与 *LNK2* 作为转录共激活因子,能够与 *RVE4* 及 *RVE8* 相互作用,共同调控 *TOC1* 基因的表达^[11]。番茄 *LNK2* 基因的突变可导致番茄生物钟周期延迟^[12]。这些生物钟基因在不同植物中引起其他性状的变化也开始被解析。*RVE* 功能研究中发现,拟南芥 *RVE4/RVE6/RVE8* 三突变体中,光敏色素互作因子 *PIF4* (*PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 4*) 和 *PIF5* (*PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 5*) 表达量提高,从而导致其叶片面积显著大于野生型拟南芥植株^[10]。*LNK2* 功能研究中发现,番茄 *LNK2* 基因突变可导致番茄生物钟周期延后,叶绿素含量明显增加,有效防止番茄晒伤,该研究指出昼夜节律中的这种条件变化可能对各物种(包括植物和动物)的纬度适应性至关重要^[12-13]。尽管这些重要的生物钟基因在拟南芥、番茄等植物中的功能相继被解析,但在大豆中仍不清楚。

CRISPR/Cas9 技术能够精准快速地进行基因编辑,因此被广泛应用在动物和植物中^[14-17]。近些年在大豆中利用 CRISPR/Cas9 技术已经成功对多个大豆基因进行定点编辑。例如 *GmFT2a*、*GmFT5a*、*GmSPL9*、*GmFAD2-1a*、*GmFAD2-1b* 等,为更加深入研究这些基因的功能,提供了良好的遗传材料^[18-20]。大豆的基因组复杂,生长周期长,转化效率低,所以我们在利用 CRISPR/Cas9 技术进行大豆稳定转化前,确定目的基因靶点(gRNA)的有效性是十分重要的。本研究首先利用蛋白同源比对和进化树分析的

方法成功鉴定出与拟南芥同源的大豆生物钟基因 *GmLNK1*、*GmLNK2*、*GmTOC1*、*GmRVE4* 和 *GmRVE8*。并利用 qRT-PCR 技术,检测这些基因在大豆植株的各个组织中的表达情况。随后,利用 CRISPR/Cas9 技术,构建了大豆 *GmLNK1a/b/c/d*、*GmLNK2a/b/c/d*、*GmTOC1a/b/c/d*、*GmRVE4/8a/b/c/d* 基因的敲除载体,并利用大豆发根体系成功检测出大部分基因的有效编辑靶点。为利用 CRISPR/Cas9 技术创造这些生物钟基因的稳定大豆突变体和进一步研究这些生物钟基因的功能提供了理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

大豆发根转化材料为大豆品种 Williams 82 (W82),大肠杆菌菌株 DH5 α 、发根农杆菌菌株 K599 均由本实验室保存,载体构建质粒 AtU3d、AtU3b、AtU6-1、AtU6-29、Cas9 载体由华南农业大学刘耀光院士提供。

1.2 植物材料处理及 RNA 提取

将大豆品种 W82 种子播于钵中(草炭土 蛭石=2 1),每钵 6 粒,在温度 25℃、光照 16 h/8 h (光照/黑暗)的温室培养。大约 14 d 后,大豆幼苗长到 V1 期,取大豆的根、茎、子叶、下胚轴、初生叶、三出复叶和生长点于液氮中速冻。大豆生长到 R1 期(约 48 d),取大豆的花于液氮中速冻。参照 RNA 提取试剂盒说明书(RNA pure Plant Kit, China)提取 RNA。qRT-PCR 实验分别进行 3 次生物重复。

1.3 大豆生物钟基因的鉴定和进化树分析

分别利用拟南芥生物钟基因 *AtLNK1*、*AtLNK2*、*AtTOC1*、*AtRVE4*、*AtRVE8* 的蛋白序列,在 Phytozome 12 数据库进行 BLAST 分析,分别鉴定与拟南芥同源的大豆生物钟基因。根据同源性由高到低,分别将每个拟南芥生物钟基因在大豆中 4 个同源基因命名为 a、b、c 和 d。利用 DANMAN 软件进行同源比对分析。

1.4 靶点设计

利用 CRISPR direct 在线网站(<http://crispr.dbcls.jp/>)进行靶点设计,载体构建所用基因靶点引物信息,如表 1 所示。

表 1 基因靶点引物列表

Table 1 List of gene target primers

靶点引物 Target primer	引物序列 Primer sequence (5'-3')	靶点对应基因 Target of gene
LNK1T1F	gtcaGGAGACAAGTGTGTGGTGG	<i>GmLNK1a</i> , <i>GmLNK1b</i>
LNK1T1R	aaacCCACCACACACTTGTCTCC	<i>GmLNK1a</i> , <i>GmLNK1b</i>
LNK1T2F	gtcaAGAGGAGTTCTGCTGGCTC	<i>GmLNK1a</i> , <i>GmLNK1b</i>
LNK1T2R	aaacGAGCCAGCAGAACTCTCT	<i>GmLNK1a</i> , <i>GmLNK1b</i>
LNK1T3F	attgCTTGGGAGACAAGTGTGTGG	<i>GmLNK1c</i> , <i>GmLNK1d</i>
LNK1T3R	aaacCCACACACTTGTCTCCCAAG	<i>GmLNK1c</i> , <i>GmLNK1d</i>
LNK1T4F	attgAGACTTTGAAGAIGTTGAC	<i>GmLNK1c</i> , <i>GmLNK1d</i>
LNK1T4R	aaacGTCAACATCTTCAAAGTCT	<i>GmLNK1c</i> , <i>GmLNK1d</i>

(续表 1)

靶点引物 Target primer	引物序列 Primer sequence (5'-3')	靶点对应基因 Target of gene
LNK2T1F	gtcaACATAATATGGGGTGAAGG	<i>GmLNK2a</i> , <i>GmLNK2b</i>
LNK2T1R	aaacCCTTCACCCCATATTATGT	<i>GmLNK2a</i> , <i>GmLNK2b</i>
LNK2T2F	gtcaAAACTGATCAGGGTTCCT	<i>GmLNK2c</i> , <i>GmLNK2d</i>
LNK2T2R	aaacAGGGAACCTGATCAGTTT	<i>GmLNK2c</i> , <i>GmLNK2d</i>
LNK2T3F	attgTTTGATTGGAACGACGAAG	<i>GmLNK2a</i> , <i>2b</i> , <i>2c</i> , <i>2d</i>
LNK2T3R	aaacCTTCGTCGTTCCAATCAA	<i>GmLNK2a</i> , <i>2b</i> , <i>2c</i> , <i>2d</i>
LNK2T4F	attgTCATATTGTGCCTTATCCGG	<i>GmLNK2c</i> , <i>GmLNK2d</i>
LNK2T4R	aaacCCGGATAAGGCACAATATGA	<i>GmLNK2c</i> , <i>GmLNK2d</i>
RVE48T1F	gtcaCTTCCCTGCTGATGAATGC	<i>GmRVE4/8b</i> , <i>GmRVE4/8c</i>
RVE48T1R	aaacGCATTCATCAGCAGGGAAG	<i>GmRVE4/8b</i> , <i>GmRVE4/8c</i>
RVE48T2F	gtcaTCATCCCATGTGACATACCC	<i>GmRVE4/8a</i> , <i>GmRVE4/8d</i>
RVE48T2R	aaacGGGTATGTCACATGGGATGA	<i>GmRVE4/8a</i> , <i>GmRVE4/8d</i>
RVE48T3F	attgCAGCTTTGCGCTTTGGACG	<i>GmRVE4/8b</i> , <i>GmRVE4/8c</i>
RVE48T3R	aaacCGTCCAAAGCGCAAAGCTG	<i>GmRVE4/8b</i> , <i>GmRVE4/8c</i>
RVE48T4F	attgAAGCTTTGCGCTTAGGCCG	<i>GmRVE4/8a</i> , <i>GmRVE4/8d</i>
RVE48T4R	aaacCGGCCTAAGCGCAAAGCTT	<i>GmRVE4/8a</i> , <i>GmRVE4/8d</i>
TOC1T1F	gtcaCGATTCCAAGATTCTCAAG	<i>GmTOC1a</i> , <i>GmTOC1b</i>
TOC1T1R	aaacCTTGAGAACTCTTGGAATCG	<i>GmTOC1a</i> , <i>GmTOC1b</i>
TOC1T2F	gtcaGTGATGTCCGCACAAGATG	<i>GmTOC1a</i> , <i>GmTOC1b</i>
TOC1T2R	aaacCATCTTGTCGCGACATCAC	<i>GmTOC1a</i> , <i>GmTOC1b</i>
TOC1T3F	attgGTGGGAATAATAGTAAGAG	<i>GmTOC1c</i> , <i>GmTOC1d</i>
TOC1T3R	aaacCTCTTACTATTATTTCCAC	<i>GmTOC1c</i> , <i>GmTOC1d</i>
TOC1T4F	attgTTGTAAAGTGCTTGAGGCT	<i>GmTOC1c</i> , <i>GmTOC1d</i>
TOC1T4R	aaacAGCCTCAAGCACTTTACAA	<i>GmTOC1c</i> , <i>GmTOC1d</i>

1.5 CRISPR/Cas9 载体构建

参照曾林昌等^[21]、侯智红等^[22]研究方法进行载体构建。实验步骤如下: (1)靶点引物退火。(2)已退火的靶点与小载体 AtU3d、AtU3b、AtU6-1 和 AtU6-29 一一对应连接, 并进行第一次边切边连。(3)使用第一次边切边连产物进行第一次 PCR 扩增。(4)以第一次 PCR 产物为模板, 进行第二次 PCR 扩增。(5)回收第二次 PCR 的产物, 进行第二次边切边连, 连接 Cas9 载体。(6)第二次边切边连产物转化大肠杆菌 DH5 α 。(7)挑取阳性单菌落, 摇菌, 提取质粒, 转化农杆菌 K599。

1.6 大豆根毛转化

参照表 2 配制萌发及根诱导培养基, 并参照 Cheng 等^[23]方法进行根毛转化。步骤如下: (1)将大豆种子灭菌, 取饱满没有病斑的籽粒置干燥器中, 在干燥器中放一个 200 mL 烧杯, 盛 96 mL 次氯酸钠和 4 mL 浓盐酸, 灭菌 12~16 h。(2)根据表 2 配制大豆萌发培养基, 在无菌操作台中将已灭菌的大豆种子均匀摆放到萌发培养基。(3)大豆种子萌发 5 d 左右, 根据表 2 配制发根培养基, 在无菌操作台中利用手术刀在大豆的子叶上面切一个小洞。然后将处理的大豆子叶均匀放置到发根培养基上, 取 20 μ L 含有目的载体的农杆菌 K599 放到大豆子叶的小洞中。(4)将培养基放在大豆无菌

培养室中, 培养 15 d 左右, 从大豆子叶的侵染部位会有根毛长出, 分别收集大豆的根毛于液氮中速冻。

1.7 基因靶点编辑有效性检测

大豆生物钟基因靶点编辑有效性检测步骤如下: (1)用 1.6 中收集的大豆根毛提取 DNA。(2)利用 CRISPR/Cas9 载体通用引物 SP1 和 SP3 (表 3)检测大豆根毛是否为转基因

表 2 萌发培养基与根诱导培养基
Table 2 Germination medium and root medium

培养基类型 Medium type	药品名称 Name of the medicine	药品用量 Medicine dosage
萌发培养基 Germination medium	B5 盐 B5 salt mixture	1 $\times$
	蔗糖 Sucrose (g L ⁻¹)	20
	琼脂 Agar (g L ⁻¹)	8
发根培养基 Rooting medium	MS 合成盐 MS salt mixture	1 $\times$
	蔗糖 Sucrose (g L ⁻¹)	30
	2-(4-吗啉)乙磺酸 MES	0.6
	琼脂 Agar (g L ⁻¹)	8
	头孢霉素 Cef (mg L ⁻¹)	250
	羧苄青霉素 Car (mg L ⁻¹)	250

MES: 2-Morpholinoethanesulfonic acid.

因根毛(目的片段的长度约为 2000 bp 左右), 检测每个载体 20 个转基因事件以检测靶点编辑效率。(3)根据每个基因的 DNA 序列, 分别设计扩增目的基因的靶点检测特异引物。利用每个基因的靶点特异引物(表 3)进行 PCR 扩增目的片段, 将 PCR 产物送广州天一辉远测序服务公司测序。(4)分析测序结果的峰图, 如果在靶点附近发生套峰, 证明目的基因的靶点是有效的。

2 结果与分析

2.1 进化树与同源性比对分析

在 Phytozome 12 数据库中, 搜索并下载与拟南芥生物钟基因 *AtLNK1* (*AT5G64170.2*)、*AtLNK2* (*AT3G54500.3*)、*AtTOC1* (*AT5G61380.1*)、*AtRVE4* (*AT5G02840.1*)、*AtRVE8* (*AT3G09600.1*)同源的大豆基因序列, 发现大豆中分别含有 4 个 *AtLNK1* 同源拷贝, 命名为 *GmLNK1a* (*Glyma.05G118300.1*)、*GmLNK1b* (*Glyma.08G073300.1*)、*GmLNK1c* (*Glyma.08G179400.1*)、*GmLNK1d* (*Glyma.15G053000.1*); 大豆中分别含有 4 个 *AtLNK2* 同源拷贝, 命名为 *GmLNK2a* (*Glyma.04G141400.1*)、*GmLNK2b* (*Glyma.11G154700.1*)、

GmLNK2c (*Glyma.13G199300.1*)、*GmLNK2d* (*Glyma.15G237600.1*); 大豆中分别含有 4 个 *AtTOC1* 同源拷贝, 命名为 *GmTOC1a* (*Glyma.04G166300.1*)、*GmTOC1b* (*Glyma.06G196200.1*)、*GmTOC1c* (*Glyma.05G025000.1*)、*GmTOC1d* (*Glyma.17G102200.1*); 大豆中分别含有 4 个 *AtRVE4* 与 *AtRVE8* 同源拷贝, 命名为 *GmRVE4/8a* (*Glyma.03G177300.1*)、*GmRVE4/8b* (*Glyma.10G048500.1*)、*GmRVE4/8c* (*Glyma.13G136300.1*)、*GmRVE4/8d* (*Glyma.19G178000.1*)。

利用 DNAMAN 软件, 分别与 *AtLNK1*、*AtLNK2*、*AtTOC1*、*AtRVE4*、*AtRVE8* 进行同源性比对。表明, *GmLNK1a/b/c/d* 在第 503~618 位氨基酸比较保守, 保守率约为 63.38% (图 1-A)。 *GmLNK2a/b/c/d* 在第 176~224、438~471 和 511~620 位氨基酸比较保守, 保守率约为 68.81% (图 1-B)。 *GmTOC1a/b/c/d* 在第 27~205、553~622 位氨基酸比较保守, 保守率约为 72.07% (图 1-C)。 *GmRVE4/8a/b/c/d* 在第 35~124、226~282 位氨基酸比较保守, 与 *AtRVE4* 比对, 保守率约为 73.37%, 与 *AtRVE8* 比对, 则保守率约为 76.66% (图 1-D)。

表 3 靶点检测引物

Table 3 Target primer

靶点检测引物 Target primer	引物序列 Primer sequence (5'-3')	靶点检测引物 Target primer	引物序列 Primer sequence (5'-3')
SP3	GTCGTGCTCCACATGTTGACCGG	LNK2cT4&2R	TCCTGAGGTTAGTAGTTCTCCACT
SP1	GAAGTTATTGCATCTATGTCGGG	LNK2dT3F	CTCTCCGTCGCCGTTATAGCA
LNK1aF	TGACGCCAGGGTATCTTAAA	LNK2dT3R	ACCAAACGAAGCACGAACA
LNK1aR	TCTCCATGTGTGTGTTTGGTA	LNK2dT4&2F	GGTGGTGGAGGGAGAAGATGAG
LNK1bF	CTCAGGGTAGGGAGGACTTG	LNK2dT4&2R	AGACACTTATTGCCGCTACAACCTG
LNK1bR	CGGTAAAGTTGAGCCTTGGT	RVE4/8aF	ACAGCTCTTCAGCTAGGTGTT
LNK1cF	TCATATAGTGCCCCATGCCA	RVE4/8aR	GAGGAGAGGGGGTATGGGTT
LNK1cR	AGTTCTATAGCAGCTCATGACA	RVE4/8bF	AGCGAAGAACTCTGCAATCCA
LNK1dF	GCCCGATCATTGCTTCAAGAG	RVE4/8bR	CTACCACCTTGGGCCGAAAT
LNK1dR	AGTTCTATAGCAGCTCGTGGC	RVE4/8cF	TTCGAAGCCATGCTCAGAAG
LNK2aT3F	GAATTCGGCGATGTGTGAGC	RVE4/8cR	CCAGCAACAAGGTTCTGTAAGT
LNK2aT3R	ACAGCTACACAAAGACACACA	RVE4/8dF	TTCGTTGGTCATCTTGCTGGT
LNK2aT1F	CCGTCCAAGGAGATTGTCACTGA	RVE4/8dR	CTGGACATGGCCTTCTGTGT
LNK2aT1R	TCCTGAGGTAGGTAGTTCTCCACT	TOC1aF	TCCCTCAACGATGCTG
LNK2bT3F	TGATGGAGTGCCTTCTCTG	TOC1aR	GCCTCCGTCTCCACAT
LNK2bT3R	CCCTGATTTTCCTGGCGTAA	TOC1bF	TTGAGCAAGTCCAGGGTT
LNK2bT1F	CCGTCCAAGGAGATTGTCACTGA	TOC1bR	ATGGCTGTGATGGTAACTCG
LNK2bT1R	TCCTGAGGTAGGTAGTTCTCCACT	TOC1cF	CTCTAACTAACTATCCAGACCCTA
LNK2cT3F	TTCTCCGTCGATCAGTGAAGTG	TOC1cR	ATGGCTGGTGGGTTGA
LNK2cT3R	GCTAAGAGTCACGCCTCCTTG	TOC1dF	TACGCCCTCCCTCTTT
LNK2cT4&2F	CGTGATGCCAAATTAGTTGGGTAT	TOC1dR	GGGACTTGGGAAATACA

[illegible]

图 1 同源性比对

Fig. 1 Homology comparison

A: AtLNK1 与 GmLNK1a、GmLNK1b、GmLNK1c、GmLNK1d 氨基酸序列对比; B: AtLNK2 与 GmLNK2a、GmLNK2b、GmLNK2c、GmLNK2d 氨基酸序列对比; C: AtTOC1 与 GmTOC1a、GmTOC1b、GmTOC1c、GmTOC1d 氨基酸序列对比; D: AtRVE4、AtRVE8 与 GmRVE4/8a、GmRVE4/8b、GmRVE4/8c、GmRVE4/8d 氨基酸序列对比。

A: amino acid sequences comparison of AtLNK1, GmLNK1a, GmLNK1b, GmLNK1c, and GmLNK1d; B: amino acid sequences comparison of AtLNK2, GmLNK2a, GmLNK2b, GmLNK2c, and GmLNK2d; C: amino acid sequences comparison of AtTOC1, GmTOC1a, GmTOC1b, GmTOC1c, and GmTOC1d; D: amino acid sequences comparison of AtRVE4, AtRVE8, GmRVE4/8a, GmRVE4/8b, GmRVE4/8c, and GmRVE4/8d.

2.2 组织特异性表达分析

生物钟基因在整个植物生命进程及应答环境胁迫过程中扮演至关重要的角色, 因此检测生物钟基因在植物中的表达部位非常重要。通过 qRT-PCR 技术检测显示,

GmLNK1a、*GmLNK1b* 和 *GmLNK1c*、*GmLNK1d* 在大豆各个组织中均有表达, 但 *GmLNK1a/b/c* 表达量较低, 而 *GmLNK1d* 在下胚轴、子叶、茎、生长点中表达较高(图 2-A); *GmLNK2a/b/c/d* 在大豆各个组织中均有表达, 且在初生叶

图 2 4 个生物钟基因组织特异表达

Fig. 2 Expression of four clock genes in soybean tissues

A: *GmLNK1a/b/c/d* 在 W82 中的组织特异表达; B: *GmLNK2a/b/c/d* 在 W82 中的组织特异表达; C: *GmTOC1a/b/c/d* 在 W82 中的组织特异表达; D: *GmRVE4/8a/b/c/d* 在 W82 中的组织特异表达。

A: the expression of *GmLNK1a/b/c/d* in soybean W82 tissues; B: the expression of *GmLNK2a/b/c/d* in soybean W82 tissues; C: the expression of *GmTOC1a/b/c/d* in soybean W82 tissues; D: the expression of *GmRVE4/8a/b/c/d* in soybean W82 tissues.

中表达最高(图 2-B); *GmTOC1* 家族中 4 个 *GmTOC1* 的表达情况与 *GmLNK1* 家族相似, *GmTOC1a*、*GmTOC1b* 和 *GmTOC1c* 的表达量都很低, *GmTOC1d* 在下胚轴的表达量最高(图 2-C); *GmRVE4/8* 家族则没有明显的规律, *GmRVE4/8a* 在三出复叶处的表达量最高, *GmRVE4/8b* 在花处的表达量最高, *GmRVE4/8c* 在生长点处的表达量最高, *GmRVE4/8d* 在花处的表达量最高(图 2-D)。

2.3 CRISPR/Cas9 载体构建

为了鉴定这些基因有效的基因编辑靶点, 分别将 *GmLNK1a/b/c/d*、*GmLNK2a/b/c/d*、*GmTOC1a/b/c/d*、*GmRVE4/8a/b/c/d* 16 个基因的 16 个靶点构建到 4 个 CRISPR/Cas9 载体上, 每个基因包含 2~3 个靶点, 各基因所对应靶点如表 1 所示。载体结构如图 3 所示, *GmLNK1*、*GmLNK2*、*GmTOC1* 和 *GmRVE4/8* 基因的 T1 靶点连接拟南芥的 *AtU3d* 启动子, T2 靶点连接拟南芥的 *AtU3b* 启动子, T3 靶点连接拟南芥的 *AtU6-1* 启动子, T4 靶点连接拟南芥的 *AtU6-29* 启动子。

2.4 *GmLNK1*、*GmLNK2*、*GmTOC1* 和 *GmRVE4/8* 基因的靶点有效性检测

从图 4-A 可以看出, *GmLNK1* 基因的 T1 靶点测序峰图在靶点附近发生套峰, 说明这个靶点是有效的。根据测序发现的 16 个基因中, 有 13 个被成功编辑, *GmLNK1a* 的 LNK1T1 靶点、*GmLNK1b* 的 LNK1T2 靶点、*GmLNK1c* 和 *GmLNK1d* 的 LNK1T4 靶点可被有效编辑(图 4-A); *GmLNK2a* 和 *GmLNK2b* 的靶点 LNK2T1 靶点, *GmLNK2c* 和 *GmLNK2d* 的 LNK2T4 可被有效编辑(图 4-B); *GmRVE4/8b* 的 RVE48T1 靶点和 *GmRVE4/8d* 的 RVE48T4 靶点可被有效编辑(图 4-C), *GmTOC1b* 的 TOC1T2 靶点, 以及 *GmTOC1c* 和 *GmTOC1d* 的 TOC1T4 可被有效编辑(图 4-D)。

3 讨论

基因组定点编辑是将外源的 DNA 导入受体细胞染色体的特定位点上, 特异地改造基因组, 是目前研究基因功能的重要方法之一^[24]。2013 年, 科学家发现了一个突破性的基因编辑技术 CRISPR/Cas 系统, 这个系统作为防御

系统存在于部分古生菌和细菌的基因组中^[24-27]。在植物中, CRISPR/Cas9 系统已成功应用于包括拟南芥、烟草、水稻、烟草、高粱、小麦、玉米、柑橘和苔类植物在内的多种植物中^[28-35]。CRISPR/Cas9 系统较传统基因编辑技术更加便捷高效, 应用广泛^[36]。

大豆是古四倍体植物, 约 75% 的基因重复^[37]。在大豆中一个基因往往存在 2~4 个拷贝, 而且这些基因大多是功能冗余的, 随机突变一个基因往往不会产生表型^[38]。随着对 CRISPR/Cas9 系统的不断完善, 现已成功应用到大豆中, 实现对目标基因的定点编辑^[18-19, 39]。但由于大豆的转化效率低, 基因组复杂, 生长周期长等特点, CRISPR/Cas9 技术在大豆中的应用仍然会出现靶点无效的问题。生物钟基因在植物的生长发育、生物胁迫和非生物胁迫中都扮演着重要的角色。但大部分生物钟基因在大豆中的功能都没有被解析。本试验通过蛋白序列比对和进化树分析鉴定了大豆中的 *GmLNK1*、*GmLNK2*、*GmTOC1*、*GmRVE4/8* 同源基因, 初步分析了它们在大豆植株不同组织中的表达情况, 为进一步预测这些基因在大豆的不同组织中是否具有功能提供了理论基础。例如, *GmRVE4/8a* 在三出复叶中的表达量最高, 推测 *GmRVE4/8a* 在大豆的叶片中具有重要功能; *GmRVE4/8b* 和 *GmRVE4/8d* 在大豆的花中表达量最高, 这 2 个基因可能对大豆花的发育具有重要作用; 而 *GmRVE4/8c* 在生长点处的表达量最高, *GmRVE4/8c* 可能与大豆的开花和生长习性有关。

CRISPR/Cas9 系统在应用于大豆的过程中靶点的编辑效率存在相对低的问题。本研究利用 CRISPR/Cas9 系统成功构建多个用于诱导大豆 *GmLNK1*、*GmLNK2*、*GmTOC1*、*GmRVE4/8* 突变的 CRISPR/Cas9 载体。共设计了 16 个靶点, 其中 9 个能有效编辑目的基因, 同时也发现 9 个有效的靶点能够有效敲除 13 个基因。本研究设计大豆多个拷贝的同源基因 CRISPR/Cas9 基因敲除靶点的策略尽可能设计一个能够同时敲除 2 个或 2 个以上基因的靶点, 在构建一个多基因敲除载体时保证每个基因含有 2 个或 2 个以上的靶点。本研究中, 构建的 CRISPR/Cas9 载体能够同时敲除 *GmLNK1* 的 4 个同源基因和 *GmLNK2* 的 4 个同源基因证明 CRISPR/Cas9 靶点设计策略是有效的。

图 3 Cas9 载体结构图

Fig. 3 Schematic diagram of the Cas9 vector construction

a: 靶点 LNK1T1、LNK2T1、TOC1T1 和 RVE4/8T1; b: 靶点 LNK1T2、LNK2T2、TOC1T2 和 RVE4/8T2; c: 靶点 LNK1T3、LNK2T3、TOC1T3 和 RVE4/8T3; d: 靶点 LNK1T4、LNK2T4、TOC1T4 和 RVE4/8T4。
a: target of LNK1T1, LNK2T1, TOC1T1, and RVE4/8T1; b: target of LNK1T2, LNK2T2, TOC1T2, and RVE4/8T2; c: target of LNK1T3, LNK2T3, TOC1T3, and RVE4/8T3; d: target LNK1T4, LNK2T4, TOC1T4, and RVE4/8T4.

图 4 发生编辑靶点的测序峰图

Fig. 4 Detailed sequence of the targets site in the transgenic soybean hairy roots

A: *GmLNK1a* 的靶点 LNK1T1、*GmLNK1b* 的靶点 LNK1T2、*GmLNK1c* 的靶点 LNK1T4 和 *GmLNK1d* 的靶点 LNK1T4 突变情况; B: *GmLNK2a* 的靶点 LNK2T1、*GmLNK2b* 的靶点 LNK2T1、*GmLNK2c* 的靶点 LNK2T4 和 *GmLNK2d* 的靶点 LNK2T4 突变情况; C: *GmTOC1b* 的靶点 TOC1T2、*GmTOC1c* 的靶点 TOC1T4 和 *GmTOC1d* 的靶点 TOC1T4 突变情况; D: *GmRVE4/8b* 的靶点 RVE4/8T1 和 *GmRVE4/8d* 的靶点 RVE4/8T4 突变情况。

A: mutations were found in target LNK1T1 of *GmLNK1a*, target LNK1T2 of *GmLNK1b*, target LNK1T4 of *GmLNK1c* and target LNK1T4 of *GmLNK1d*; B: mutations were found in target LNK2T1 of *GmLNK2a*, target LNK2T1 of *GmLNK2b*, target LNK2T4 of *GmLNK2c* and target LNK2T4 of *GmLNK2d*; C: mutations were found in target TOC1T2 of *GmTOC1b*, target TOC1T4 of *GmTOC1c* and target TOC1T4 of *GmTOC1d*; D: mutations were found in target RVE4/8T1 of *GmRVE4/8b* and target RVE4/8T4 of *GmRVE4/8d*.

本研究提供了一个简单高效的大豆多拷贝同源基因 CRISPR/Cas9 靶点设计策略, 保证每个基因设计 2 个或 2 个以上靶点, 同时利用大豆发根转化体系快速检测靶点的编辑效率, 为更加快速创造大豆关键基因的突变体提供了理论基础。

References

- [1] 田志喜, 刘宝辉, 杨艳萍, 李明, 姚远, 任小波, 薛勇彪. 大豆分子设计育种成果与展望. 中国科学院院刊, 2018, 33: 915-922.
Tian Z X, Liu B H, Yang Y P, Li M, Yao Y, Ren X B, Xue Y B. Update and prospect of soybean molecular module-based designer breeding in China. *Bull Chin Acad Sci*, 2018, 33: 915-922 (in Chinese with English abstract).
- [2] Li M W, Xin D, Gao Y, Li K P, Fan K, Muñoz N B, Yung W S, Lam H M. Using genomic information to improve soybean adaptability to climate change. *J Exp Bot*, 2017, 68: 1823-1834.
- [3] Raju S K K, Shao M R, Sanchez R, Xu Y Z, Sandhu A, Graef G, Mackenzie S. An epigenetic breeding system in soybean for increased yield and stability. *Plant Biotechnol J*, 2018, 16: 1836-1847.
- [4] Inoue K, Araki T, Endo M. Circadian clock during plant development. *J Plant Res*, 2018, 131: 59-66.
- [5] McClung C R. Plant circadian rhythms. *Plant Cell*, 2006, 18: 792-803.
- [6] Lu S, Zhao X, Hu Y, Liu S, Nan H, Li X, Fang C, Cao D, Shi X, Kong L, Su T, Zhang F, Li S, Wang Z, Yuan X, Cober E R, Weller J L, Liu B, Hou X, Tian Z, Kong F. Natural variation at the soybean *J* locus improves adaptation to the tropics and

- enhances yield. *Nat Genet*, 2017, 49: 773–779.
- [7] Inoue K, Araki T, Endo M. Circadian clock during plant development. *J Plant Res*, 2018, 131: 59–66.
 - [8] Green R M, Tobin E M. Loss of the circadian clock-associated protein 1 in *Arabidopsis* results in altered clock-regulated gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 4176–4179.
 - [9] Bendix C, Marshall C M, Harmon F G. Circadian clock genes universally control key agricultural traits. *Mol Plant*, 2015, 8: 1135–1152.
 - [10] Gray J A, Shalit-Kaneh A, Chu D N, Hsu P Y, Harmer S L. The REVEILLE clock genes inhibit growth of juvenile and adult plants by control of cell size. *Plant Physiol*, 2017, 173: 2308–2322.
 - [11] Xie Q, Wang P, Liu X, Yuan L, Wang L, Zhang C, Li Y, Xing H, Zhi L, Yue Z, Zhao C, McClung C R, Xu X. LNK1 and LNK2 are transcriptional coactivators in the *Arabidopsis* circadian oscillator. *Plant Cell*, 2014, 26: 2843–2857.
 - [12] Müller N A, Zhang L, Koornneef M, Jiménez-Gómez J M. Mutations in *EID1* and *LNK2* caused light-conditional clock deceleration during tomato domestication. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 115: 7135–7140.
 - [13] Müller N A, Wijnen C L, Srinivasan A, Ryngajlo M, Ofner I, Lin T, Ranjan A, West D, Maloof J N, Sinha N R, Huang S, Zamir D, Jiménez-Gómez J M. Domestication selected for deceleration of the circadian clock in cultivated tomato. *Nat Genet*, 2016, 48: 89–93.
 - [14] 高耀辉, 马斌, 肖凤洁, 魏光普. CRISPR/Cas9 系统在园林植物中的研究展望. *北方园艺*, 2019, (15): 133–140.
Gao Y H, Ma B, Xiao F J, Wei G P. Prospect of research on CRISPR/Cas9 system in garden plants. *Nor Hort*, 2019, (15): 133–140 (in Chinese with English abstract).
 - [15] 暴会会, 尹竹君, 王少坤, 马瑞红, 谢俊俊, 张杰, 杨正安. CRISPR-Cas9 系统在蔬菜育种上应用研究进展. *江西农业学报*, 2019, 31(7): 38–44.
Bao H H, Yin Z J, Wang S K, Ma R H, Xie J J, Zhang J, Yang Z A. Research advances in application of CRISPR/Cas9 system in vegetable breeding. *Acta Agric Jiangxi*, 2019, 31(7): 38–44 (in Chinese with English abstract).
 - [16] Zhang J, Zhu Z, Yue W, Li J, Chen Q, Yan Y, Lei A, Hua J. Establishment of CRISPR/Cas9 mediated knock-in system for porcine cells with high efficiency. *Appl Biochem Biotechnol*, 2019, 189: 26–36.
 - [17] Lin C Y, Su Y H. Genome editing in sea urchin embryos by using a CRISPR/Cas9 system. *Dev Biol*, 2016, 409: 420–428.
 - [18] Cai Y, Wang L, Chen L, Wu T, Liu L, Sun S, Wu C, Yao W, Jiang B, Yuan S, Han T, Hou W. Mutagenesis of *GmFT2a* and *GmFT5a* mediated by CRISPR/Cas9 contributes for expanding the regional adaptability of soybean. *Plant Biotechnol J*, 2020, 18: 298–309.
 - [19] Bao A, Chen H, Chen L, Chen S, Hao Q, Guo W, Qiu D, Shan Z, Yang Z, Yuan S, Zhang C, Zhang X, Liu B, Kong F, Li X, Zhou X, Tran L P, Cao D. CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis of *GmSPL9* genes alters plant architecture in soybean. *BMC Plant Biol*, 2019, 19: 131.
 - [20] Do P T, Nguyen C X, Bui H T, Tran L T N, Stacey G, Gillman J D, Zhang Z J, Stacey M G. Demonstration of highly efficient dual gRNA CRISPR/Cas9 editing of the homeologous *GmFAD2-1A* and *GmFAD2-1B* genes to yield a high oleic, low linoleic and α -linolenic acid phenotype in soybean. *BMC Plant Biol*, 2019, 19: 311.
 - [21] 曾栋昌, 马兴亮, 谢先荣, 祝钦波, 刘耀光. 植物 CRISPR/Cas9 多基因编辑载体构建和突变分析的操作方法. *中国科学: 生命科学*, 2018, 48: 783–794.
Zeng D C, Ma X L, Xie X R, Zhu Q L, Liu Y G. A protocol for CRISPR/Cas9-based multi-gene editing and sequence decoding of mutant sites in plants. *Sci Sin Vitae*, 2018, 48: 783–794 (in Chinese with English abstract).
 - [22] 侯智红, 吴艳, 程群, 董利东, 芦思佳, 南海洋, 甘卓然, 刘宝辉. 利用 CRISPR/Cas9 技术创制大豆高油酸突变系. *作物学报*, 2019, 45: 839–847.
Hou Z H, Wu Y, Cheng Q, Dong L D, Lu S J, Nan H Y, Gan Z R, Liu B H. Creation of high oleic acid soybean mutation plants by CRISPR/Cas9. *Acta Agron Sin*, 2019, 45: 839–847 (in Chinese with English abstract).
 - [23] Cheng Q, Dong L D, Gao T J, Liu T F, Li N H, Wang L, Chang X, Wu J J, Xu P F, Zhang S Z. The bHLH transcription factor *GmPIB1* facilitates resistance to *Phytophthora sojae* in *Glycine max*. *J Exp Bot*, 2018, 69: 2527–2541.
 - [24] 解莉楠, 宋凤艳, 张旸. CRISPR/Cas9 系统在植物基因组定点编辑中的研究进展. *中国农业科学*, 2015, 48: 1669–1677.
Xie L N, Song F Y, Zhang Y. Progress in research of CRISPR/Cas9 system in genome targeted editing in plants. *Sci Agric Sin*, 2015, 48: 1669–1677 (in Chinese with English abstract).
 - [25] Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna J A, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 2012, 337: 816–821.
 - [26] Bhaya D, Davison M, Barrangou R. CRISPR-Cas systems in bacteria and archaea: versatile small RNAs for adaptive defense and regulation. *Annu Rev Genet*, 2011, 45: 273–297.
 - [27] Wiedenheft B, Sternberg S H, Doudna J A. RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea. *Nature*, 2012, 482: 331–338.
 - [28] Nekrasov V, Staskawicz B, Weigel D, Jones J D, Kamoun S. Targeted mutagenesis in the model plant *Nicotiana benthamiana* using Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nat Biotechnol*, 2013, 31: 691–693.
 - [29] Shan Q, Wang Y, Li J, Zhang Y, Chen K, Liang Z, Zhang K, Liu J, Xi J J, Qiu J L, Gao C. Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system. *Nat Biotechnol*, 2013, 31: 686–688.
 - [30] Li J F, Norville J E, Aach J, McCormack M, Zhang D, Bush J, Church G M, Sheen J. Multiplex and homologous recombination-mediated genome editing in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana* using guide RNA and Cas9. *Nat Biotechnol*, 2013, 31: 688–691.
 - [31] Feng Z Y, Zhang B T, Ding W, Liu X D, Yang D L, Wei P L, Cao F Q, Zhu S H, Zhang F, Mao Y F, Zhu J K. Efficient genome editing in plants using a CRISPR/Cas system. *Cell Res*, 2013, 23: 1229–1232.
 - [32] Miao J, Guo D, Zhang J, Huang Q, Qin G, Zhang X, Wan J,

- Gu H, Qu L J. Targeted mutagenesis in rice using CRISPR-Cas system. *Cell Res*, 2013, 23: 1233–1236.
- [33] 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. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41: e188.
- [34] Jia H, Wang N. Targeted genome editing of sweet orange using Cas9/sgrNA. *PLoS One*, 2014, 9: e93806.
- [35] Fauser F, Schiml S, Puchta H. Both CRISPR/Cas-based nucleases and nickases can be used efficiently for genome engineering in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 2014, 79: 348–359.
- [36] 梁丹, 吴宇轩, 李劲松. CRISPR-Cas9 技术在干细胞中的应用. *生命科学*, 2015, 27(1): 93–98.
- Liang D, Wu Y X, Li J S. Progress of CRISPR-Cas9 in stem cell research. *Chin Bull Life Sci*, 2015, 27(1): 93–98 (in Chinese with English abstract).
- [37] Chen K, Gao C. Targeted genome modification technologies and their applications in crop improvements. *Plant Cell Rep*, 2014, 33: 575–583.
- [38] Curtin S J, Zhang F, Sander J D, Haun W J, Starker C, Baltes N J, Reyon D, Dahlborg E J, Goodwin M J, Coffman A P, Dobbs D, Joung J K, Voytas D F, Stupar R M. Targeted mutagenesis of duplicated genes in soybean with zinc-finger nucleases. *Plant Physiol*, 2011, 156: 466–473.
- [39] Cai Y, Chen L, Liu X, Sun S, Wu C, Jiang B, Han T, Hou W. CRISPR/Cas9-Mediated genome editing in soybean hairy roots. *PLoS One*, 2015, 10: e0136064.