

利用 CRISPR/Cas9 敲除葡萄 *VviPDS1* 基因的研究

郭 晔, 万东艳, 柴壮壮, 王跃进, 文颖强*

(西北农林科技大学园艺学院, 农业部西北地区园艺作物生物学与种质创新重点实验室, 旱区作物逆境生物学国家重点实验室, 陕西杨凌 712100)

摘要: 选择葡萄八氢番茄红素脱氢酶 (Phytoene desaturase) 基因 *VviPDS1* 为靶标, 利用 CRISPR/Cas9 系统构建基因敲除载体, 瞬时转化葡萄叶片原生质体, 检测到不同类型的突变。通过农杆菌介导转化 ‘无核白’ 葡萄胚性愈伤组织, 筛选获得卡那霉素抗性植株 71 株。经 PCR 鉴定, 其中 53 株为阳性植株, 阳性率为 74.64%。测序结果表明, 共有 20 株在靶点发生不同类型的突变, 编辑效率为 37.74%; 其中 9 株产生了双等位基因突变。对其进行氨基酸序列预测, 在第 202 位氨基酸之后发生了不同程度的变异。利用 CRISPR/Cas9 系统敲除 *VviPDS1* 获得的突变体植株呈现整体矮化, 其叶片出现不同程度白化。表明 CRISPR/Cas9 系统可以通过细胞中的瞬时或稳定表达进行基因编辑, 可以实现在葡萄编辑植株中产生纯合敲除。

关键词: 葡萄; CRISPR/Cas9; *PDS1*; 基因编辑

中图分类号: S 663.1

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2019) 04-0623-12

Knock-out Analysis of *VviPDS1* Gene Using CRISPR/Cas9 in Grapevine

GUO Ye, WAN Dongyan, CHAI Zhuangzhuang, WANG Yuejin, and WEN Yingqiang*

(College of Horticulture, Northwest A & F University, Key Laboratory of Horticultural Plant Biology and Germplasm Innovation in Northwest China, Ministry of Agriculture, State Key Laboratory of Crop Stress Biology for Arid Areas, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: *VviPDS1*, phytoene desaturase in grapevine, was selected as the target gene. A gene knockout vector, using the CRISPR/Cas9 system, was constructed. Different types of mutations were detected in grape protoplasts by transient transformation of protoplasts from grape leaves. In addition, the vector was constructed and transformed to *Vitis vinifera* L. ‘Thompson Seedless’ through *Agrobacterium*-mediated transformation. Seventy-one kanamycin resistant lines were obtained through resistance screening. Fifty-three transgenic lines, 74.64%, were confirmed by T-DNA specific PCR. Sequencing revealed that twenty transgenic lines had different types of mutations at the target site and the editing efficiency was 37.74%. Among them, 9 lines with biallelic mutations were shown the albino phenotype. The prediction of amino acids of biallelic mutations showed them have different degrees of mutation

收稿日期: 2018-11-23; **修回日期:** 2019-04-08

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (31772264); 杨凌示范区农业科技示范推广项目 (2017-TS-24)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: wenyq@nwsuaf.edu.cn)

behind the 202th amino acids. These biallelic mutations were shown dwarf and different albino phenotypes. These indicated that the CRISPR/Cas9 system allows genome editing in the transient of grape cells or stable expression, which can produce homozygous knockout in transgenic plants of grape.

Keywords: grapevine; CRISPR/Cas9; *PDS1*; gene editing

基因编辑技术可以依赖序列特异核酸酶在目的基因位点产生双链断裂 (Double strand break, DSB), 通过生物体的内源修复机制——非同源末端连接 (Non-homologous end joining, NHEJ) 或同源重组 (Homologous recombination, HR) 进行自动修复, 易错的 NHEJ 修复机制会产生碱基缺失、插入或替换, 从而实现对目的基因的改造。第 3 代基因编辑技术——成簇的规律间隔的短回文重复序列及其相关系统 (Clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR associated, CRISPR/Cas9 system) 仅借助 Cas9 核酸酶和 sgRNA (Single guide RNA) 即可实现对目的基因位点的编辑 (Jinek et al., 2012; Cong et al., 2013), 相对于锌指核酸酶 (Zinc finger nuclease, ZFN) 技术 (Bibikova et al., 2003) 和类转录激活因子效应物核酸酶 (Transcription activator like effector nucleases, TALENs) 技术 (Christian et al., 2010; Li et al., 2011), 其操作简单、试验周期短、成本低廉, 已在动物、植物和微生物领域广泛应用。

2013 年, CRISPR/Cas9 系统首次应用于植物基因编辑研究 (Li et al., 2013; Nekrasov et al., 2013; Shan et al., 2013)。截至目前, 该系统已成功应用于多种植物基因组编辑, 如拟南芥 (Li et al., 2013; Mao et al., 2013; Nekrasov et al., 2013)、水稻 (Shan et al., 2013)、玉米 (Svitashev et al., 2015)、小麦 (Wang et al., 2014; Zhang et al., 2017)、棉花 (Li et al., 2017)、大豆 (Du et al., 2016)、番茄 (Ito et al., 2015)、西瓜 (Tian et al., 2017)、杨树 (Fan et al., 2015; Zhou et al., 2015)、苹果 (Malnoy et al., 2016; Nishitani et al., 2016)、芥蓝 (郑爱红 等, 2019)、柑橘 (邹修平等, 2019) 等。

2016 年, Wang 等 (2016) 鉴定了葡萄基因组中基于 CRISPR/Cas9 系统的基因编辑特异性靶位点, 并开发了用于编辑葡萄基因组的数据库; Ren 等 (2016) 利用 CRISPR/Cas9 系统对‘霞多丽’葡萄 *IdnDH* 基因进行编辑。2017 年和 2018 年, 有报道利用 CRISPR/Cas9 系统对葡萄内源 *PDS* 基因和 *WRKY52* 基因进行编辑 (Nakajima et al., 2017; Wang et al., 2018)。同时, Malnoy 等 (2016) 将 CRISPR/Cas9 系统转化葡萄愈伤组织原生质体, 并通过高通量测序的方法, 对目标基因靶位点编辑情况进行检测和分析。

八氢番茄红素脱氢是类胡萝卜素生物合成途径中的重要步骤, 八氢番茄红素脱氢酶 (phytoene desaturase, PDS) 是此步骤重要的限速酶。拟南芥 *PDS3* 基因突变会积累高水平的八氢番茄红素, 其在某些负反馈调控中起重要作用, 导致至少 20 种代谢途径中涉及的基因表达变化, 包括抑制类胡萝卜素、叶绿素和赤霉素生物合成途径中的许多基因。拟南芥 *pds3* 突变体植株具有明显的白化和矮化表型 (Qin et al., 2007)。因此, 自 CRISPR/Cas9 系统应用于植物基因组编辑以来, 研究者大多选择植物内源 PDS 基因作为靶基因, 验证 CRISPR/Cas9 系统是否可以在目标物种中进行编辑。目前已有多个研究团队通过 CRISPR/Cas9 系统敲除不同植物内源 PDS 基因获得具有白化和矮化表型的突变体 (Shan et al., 2013; Nishitani et al., 2016; Tian et al., 2017)。Nakajima 等 (2017) 通过 CRISPR/Cas9 系统敲除‘Neo Muscat’葡萄内源 PDS 基因, 获得的突变体植株部分叶片出现白化, 但并未出现植株矮化现象, 与报道的其他物种内源 PDS 基因突变表型差距明显。本研究中以‘无核白’葡萄八氢番茄红素脱氢酶基因 *VviPDS1* (Young et al., 2012) 为 CRISPR/Cas9 系统靶标, 重新选择不同的靶

位点, 利用葡萄叶片原生质体转化体系, 通过 PCR/RE (PCR/restriction enzyme) 方法 (Shan et al., 2014) 检测 CRISPR/Cas9 系统在目的基因靶位点的编辑情况, 进而通过农杆菌介导的遗传转化获得了编辑植株, 为利用 CRISPR/Cas9 系统在葡萄中开展更加广泛的基因功能研究提供了依据。

1 材料与方 法

1.1 植物材料、载体和菌株

供试材料为欧洲葡萄 ‘无核白’ 花药诱导保存的胚性愈伤组织 (程远 等, 2017)。

CRISPR/Cas9 基因编辑载体 pKSE401 (Xing et al., 2014) 由中国农业大学陈其军教授馈赠; pBI221 载体 (Clontech, 北京, 中国) 为葡萄原生质体瞬时转化体系中的阳性对照; pMD 19-T 克隆载体购自 TaKaRa 公司; 大肠杆菌 TOP10 购自天根生化科技有限公司; 农杆菌 GV3101 由本课题组保存。

1.2 靶位点的选择

基于八氢番茄红素脱氢酶基因 *VviPDS1* (Gene ID: 100240685, NCBI 数据库) 序列 (Young et al., 2012), 根据 CRISPR/Cas9 系统识别 PAM 序列上游约 20 nt 核苷酸序列的特点, 在 ORF 区域查找潜在的靶位点。靶位点的 GC 含量不低于 40%, 且带有限制性酶切位点。所选靶位点使用在线 (<http://cbi.hzau.edu.cn/crispr/>) 软件 CRISPR-P (Lei et al., 2014) 进行靶点特异性分析。

1.3 CRISPR/Cas9 表达载体构建

利用 NEB 公司限制性内切酶 *Bsa* I 酶切 pKSE401 载体。反应体系: *Bsa* I 1.5 μ L、10 \times CutSmart Buffer 4 μ L、pKSE401 2 μ g、加去离子水至 40 μ L, 37 $^{\circ}$ C 下酶切 2 h。根据所选择的靶位点序列合成靶点接头引物 VviPDS1t-F 和 VviPDS1t-R, 将靶点接头引物稀释至 100 μ mol \cdot L $^{-1}$, 各取 30 μ L 混合; 65 $^{\circ}$ C 退火 5 min, 25 $^{\circ}$ C 降至室温, 制成靶点接头。将酶切完成的 pKSE401 载体与制备好的靶点接头按比例加入连接体系 (3 μ L 靶点接头、2 μ L pKSE401 载体、5 μ L Solution I), 在 16 $^{\circ}$ C 下反应 30 min 完成连接 (Xing et al., 2014)。

采用热激法将连接产物导入大肠杆菌感受态 TOP10, 涂布于含有 50 mg \cdot L $^{-1}$ 卡那霉素的 LB 平板, 37 $^{\circ}$ C 培养过夜, 挑取平板上单菌落扩繁, 并用载体特异性引物 U6-26p-F 和 U6-26t-R 进行 PCR 验证, 将 PCR 阳性菌液进行测序验证; 将测序正确质粒导入农杆菌感受态 GV3101。

表 1 引物名称与序列

Table 1 The primer names and sequences

引物名称 Primer name	引物序列 (5' - 3') Primer sequence	
VviPDS1t	F: ATTGTCAAATCGGCTGAATCCCC	R: AAACGGGGAATTCAGCCGATTTGA
U6-26	p-F: TGTCACAGGATTAGAATGATTAGGC	t-R: CCCCAGAAATTGAACGCCGAAGAAC
PDS1t	F: CCCCATAATTGAATTCATATGGTTGTAG	R: CAAGGATCGATGGCATCAGTGA
PDS1t	F1: GGATGGAGACTGGTATGAGACAGG	R1: ATCGAAACTAATACAAGATGCCGTGG
PDS1t-seq	GTTGTCATGCATGGACCTGTGG	

1.4 葡萄叶片原生质体分离及转化

参考 Zhao 等 (2016) 的方法, 取 ‘无核白’ 葡萄组培苗叶片切成约 1 mm 宽的细条, 放入 10 mL

含 $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MES (pH 5.7)、 $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 甘露醇、 $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ KCl、 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ CaCl_2 、1.5% 纤维素酶 R-10 和 0.4% 离析酶 R-10 的酶解液中, 0.08 MPa 下真空处理 30 min 后, 黑暗下 $40 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 振荡酶解 8 ~ 10 h。加入等体积 W5 溶液($5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 葡萄糖, $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MES, $154 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl, $125 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ CaCl_2 和 $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ KCl) 以终止反应。通过 $75 \mu\text{m}$ 尼龙布滤掉未酶解的叶片; 将滤液转入离心管, $25 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 $200 \times g$ 离心 3 min。去上清液后加入 5 mL W5 溶液重悬原生质体, 再次 $25 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 $200 \times g$ 离心 1 min。小心去上清液后重新加入 2 倍体积 W5 溶液, 在冰上静置 30 min。去上清液, 加入适量体积的 MMG 溶液 ($4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MES, $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 甘露醇, $15 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MgCl_2) 重悬原生质体。镜检, 调整原生质体浓度至 $2 \sim 3 \times 10^5 \text{ cell} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

将 $40 \mu\text{g}$ 构建好的包含靶位点 *VviPDS1-t* 的 CRISPR/Cas9 载体质粒加至离心管, 加入 $100 \mu\text{L}$ 葡萄原生质体和 $140 \mu\text{L}$ 新鲜制备的 PEG- Ca^{2+} 溶液, 混匀, 诱导瞬时转化 10 min, 加入 $560 \mu\text{L}$ W5 溶液混匀, 以终止反应。 $25 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 $200 \times g$ 离心 1 min, 去上清液, 加入 $200 \mu\text{L}$ W5 溶液重悬原生质体, 室温暗培养 48 h。

1.5 转基因植株的获得及验证

将活化后的农杆菌菌液扩大培养, 室温下 $5 \text{ } 500 \times g$ 离心 10 min 收集菌落后加入 1/2MS (含 $150 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 乙酰丁香酮) 液体培养基重悬, $28 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 $200 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 恒温摇床上培养 1 h, 调节浓度至 $\text{OD}_{600} = 0.4 \sim 0.6$ 。加入 ‘无核白’ 葡萄胚性愈伤组织, 摇动 15 min, 通过 200 目细胞筛过滤菌液, 晾干后转移至共培养培养基 (含 $150 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 乙酰丁香酮的 1/2MS 培养基), 室温下暗培养 72 h。

共培养后的葡萄胚性愈伤组织放入无菌水中清洗 1 min, 通过 200 目细胞筛滤去无菌水, 使用含有 $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 头孢霉素和 $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 羧苄青霉素的 1/2MS 液体培养基冲洗脱菌 15 min, 再用无菌水清洗 3 次。置于延迟筛选培养基 (MS、 $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 头孢霉素和 $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 羧苄青霉素) 上室温下暗培养 3 周后, 转入筛选培养基 (MS、 $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 头孢霉素、 $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 羧苄青霉素和 $75 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的卡那霉素) 继续暗培养。每 3 ~ 4 周继代培养 1 次。长出次生胚后, 逐渐降低筛选培养基中卡那霉素的浓度, 将抗性萌发的胚放至不含任何抗生素的成苗培养基 (MS、 $15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖) 上进行成苗培养。

取筛选获得的再生植株叶片 0.1 g 提取 DNA, 使用载体特异引物 U6-26p-F 和 U6-26t-R (表 1) 进行 PCR 扩增。理论产物长度为 424 bp, 能扩增出目的片段的植株为 PCR 阳性植株。

1.6 靶位点的酶切检测

PCR/RE 检测 (Shan et al., 2014): 该检测方法的先决条件是目标基因靶位点被 CRISPR/Cas9 系统诱导的突变破坏了限制酶位点, 因此扩增含有靶位点的片段, 用识别野生型靶位点的限制酶消化扩增产物, 突变扩增产物由于发生突变无法被对应的限制酶酶切, 产生未切割的条带。然后进行琼脂糖凝胶电泳, 可通过观察是否产生未切割条带确定是否发生突变。

使用跨越靶位点的特异引物 PDS1t-F 和 PDS1t-R (表 1) 扩增含有靶位点的片段 (约 1 090 bp), 由于所选择的靶位点含有 *EcoR* I 限制性内切酶酶切位点 G/AATTC, 所以野生型的植株扩增产物可以被 *EcoR* I 识别并完全切断为两个长度分别约 710 和 380 bp 的片段, 而发生突变的植株无法完成识别和切割。

提取转化后原生质体的总 DNA, 使用特异引物 PDS1t-F 和 PDS1t-R 扩增含有靶位点的片段 (约 1 090 bp), 对 PCR 扩增产物进行限制性内切酶 *EcoR* I 处理, 以此为模板, 使用特异引物 PDS1t-F1 和 PDS1t-R1 进行第 2 轮 PCR 扩增, 扩增产物为含靶点的片段 (约 728 bp), 对第 2 轮 PCR 产物进

行富集后再进行限制性内切酶处理, 基因型为野生型的片段被 *EcoR* I 识别并完全切断为两个长度分别为 505 和 223 bp 的片段, 而突变片段的扩增产物则无法完成识别和切割。将发生突变的 PCR 片段克隆到 T/A 载体中, 对阳性克隆进行测序确认编辑类型。

1.7 测序检测 *VviPDS* 靶位点的基因型

以 PCR 阳性植株基因组 DNA 为模板, 用特异引物 PDS1t-F 和 PDS1t-R 扩增含靶位点的目的基因片段, 使用引物 PDS1t-seq 对 PCR 产物进行测序, 使用 DNAMAN 软件进行核苷酸序列比对分析确认突变植株基因型, 产生双峰的测序结果使用在线工具 DSDecodeM 进行解码 (Liu et al., 2015), 分析突变的类型。

2 结果与分析

2.1 靶位点选择及载体构建

根据葡萄 *VviPDS1* 基因序列, 设计位于 *VviPDS1* 第 5 个外显子上具有 PAM 序列的 1 个靶位点, GC 含量 50%, 所选靶位点包含一个 *EcoR* I (G/AATTC) 限制酶切位点 (图 1, a), 用于 PCR/RE 检测。

根据靶位点序列合成靶点接头引物 VviPDS1t-F 和 VviPDS1t-R (表 1), 退火形成靶点接头后克隆到 CRISPR/Cas9 载体 pKSE401 (图 1, b)。使用载体特异引物 U6-26p-F 和 U6-26p-R 进行阳性检测, 连接成功载体 PCR 扩增产物约 424 bp。将阳性载体质粒送往公司测序验证, 将测序正确的质粒转入农杆菌感受态 GV3101。

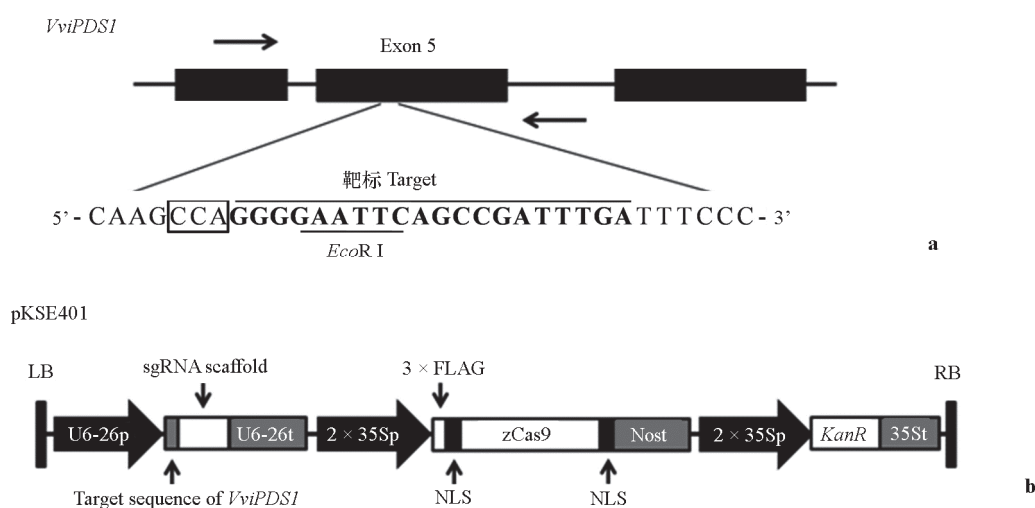


图 1 靶位点选择 (a) 和 pKSE401 T-DNA 区域 (b) 示意图

LB: T-DNA 的左边界; RB: T-DNA 的右边界; U6-26p: 拟南芥 U6 基因启动子; U6-26t: U6-26 终止子; 2 × 35Sp: 2 × 35S 启动子; 3 × FLAG: 3 × FLAG 标签蛋白; NLS: 核定位信号; zCas9: 玉米密码子优化的 Cas9; Nost: *nos* 基因终止子; KanR: 卡那霉素抗性基因; 35St: 35S 终止子。

Fig. 1 Schematic representation of *VviPDS1* with target site (a) and the T-DNA region of the pKSE401 vector (b)

LB: Left border of T-DNA; RB: Right border of T-DNA; U6-26p: *Arabidopsis* U6 gene promoter; U6-26t: U6-26 terminator; 2 × 35Sp: 2 × 35S promoter; 3 × FLAG: 3 × FLAG tag; NLS: Nuclear localization signal; zCas9: *Zea mays* codon-optimized Cas9; Nost: *nos* gene terminator; KanR: Kanamycin resistance gene; 35St: 35S terminator.

2.2 葡萄原生质体瞬时转化检测 *VviPDS1* 的突变

通过 PEG 介导的‘无核白’葡萄原生质体转染进行瞬时表达验证。如图 2, a 所示, 转化含有 GFP 报告蛋白的 pBI221 空载体质粒对照的效率达 86%, 说明转化体系正常, 可达到后续研究要求。

将构建好的包含打靶位点 *VviPDS1-t* 的 CRISPR/Cas9 载体瞬时转化葡萄原生质体, 利用 PCR/RE 方法检测靶位点的变异情况。在多次试验经过一轮 PCR/RE 后, 无法通过琼脂糖凝胶电泳反映突变是否发生。继续以第 1 轮 PCR/RE 反应产物为模板, 使用特异引物 PDS1t-F1 和 PDS1t-R1 进行第 2 轮 PCR 扩增, 使得突变片段得以富集, 再进行限制性内切酶处理, 之后通过琼脂糖凝胶电泳可观察到未被限制性内切酶消化的 DNA 片段 (图 2, b 中红色箭头标注), 即突变扩增产物。

将未消化的 PCR 片段 (图 2, b 中红色箭头标注) 克隆到 T/A 载体中, 挑选阳性克隆进行测序。结果表明, 在靶点位置发生 1~5 类型的编辑 (图 2, c), 其中缺失突变占大多数。

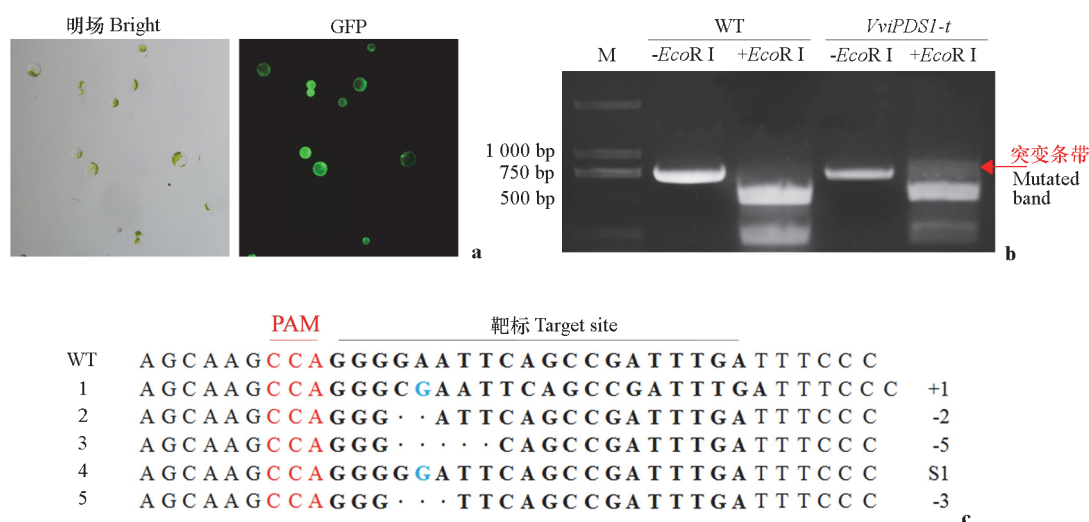


图 2 原生质体基因组编辑的突变检测

a: pBI221 载体转化葡萄叶片原生质体明场及绿色荧光照片; b: PCR/RE 检测 *VviPDS1* 突变 (M: Marker; WT: 野生型);
 c: 突变克隆 DNA 序列分析 [蓝色字母: 插入 (+) 或替换 (S); 点: 删除 (-)]。

Fig. 2 Mutation detection after genome-editing using a protoplast transformation system

a: Bright image and green fluorescence image of pBI221 vector transfected grape protoplasts; b: *VviPDS1* mutation is detected by the PCR/RE assay (M: Marker; WT: Wild type); Rad arrow: Mutated band; c: DNA sequencing results of mutated clones [WT: Wild type; Blue: Insertion (+) or substitution (S); Point: Deleted nucleotides (-)].

2.3 葡萄的遗传转化

经过叶片原生质体系统验证的 CRISPR/Cas9 表达载体, 利用农杆菌介导侵染‘无核白’葡萄的胚性愈伤组织, 在 24 °C 下共培养 3 d, 脱菌后, 延迟筛选培养 3 周 (图 3, a), 之后放在含 75 mg · L⁻¹ 卡那霉素的筛选培养基上进行抗性筛选 (图 3, b), 每 1 个月继代 1 次直至长出抗性胚 (图 3, c)。将萌发的抗性子叶胚 (图 3, d) 转移至成苗培养基 (图 3, e) 光下培养, 共获得 71 株抗性植株, 按其表型分为 3 种, 分别为全绿叶片、纯白叶片和花白叶片 (图 3, f~h)。

2.4 再生植株的分子鉴定

提取抗性植株基因组 DNA, 利用载体特异引物 U6-26p-F 和 U6-26p-R 进行 PCR 扩增 (图 4, a);

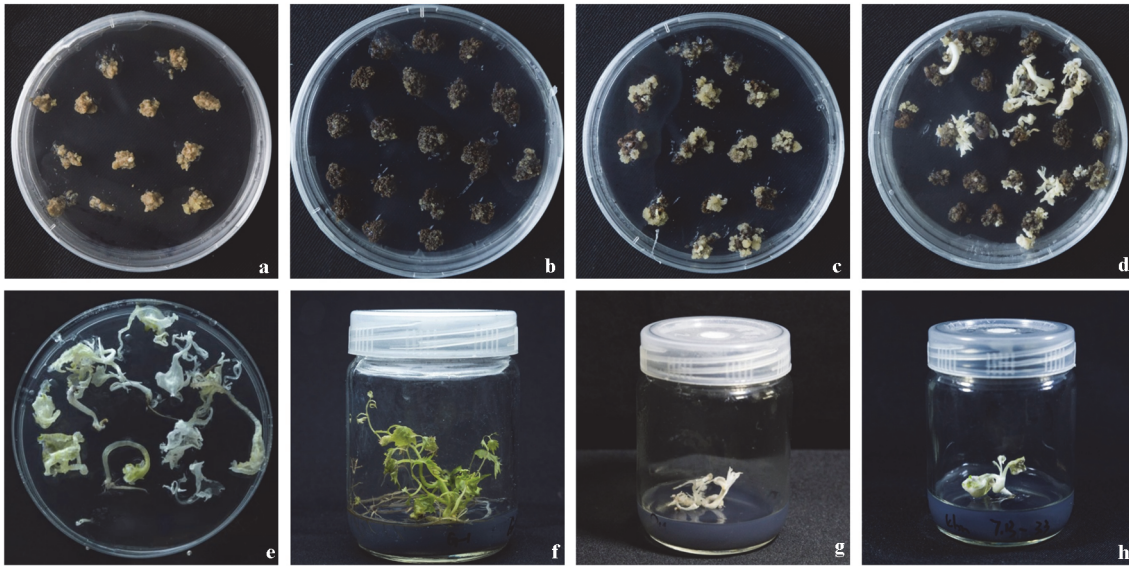


图3 农杆菌诱导的‘无核白’葡萄遗传转化及植株再生过程

a: 延迟筛选; b: 抗性筛选; c: 抗性胚; d: 抗性子叶胚; e: 抗性胚在光下培养; f: 全绿抗性植株;
g: 纯白抗性植株; h: 花白抗性植株。

Fig. 3 *Agrobacterium*-mediated transformation of Thompson Seedless grape and regeneration

a: Embryogenic calluses were cultured on the medium without kanamycine; b: Embryogenic calluses were cultured on the medium with kanamycine;
c: Positive embryos; d: Positive cotyledonary embryos; e: Positive embryo cultured under light; f: Positive plants with all green leaves;
g: Positive plants with all albino leaves; h: Positive plants with some albino leaves.

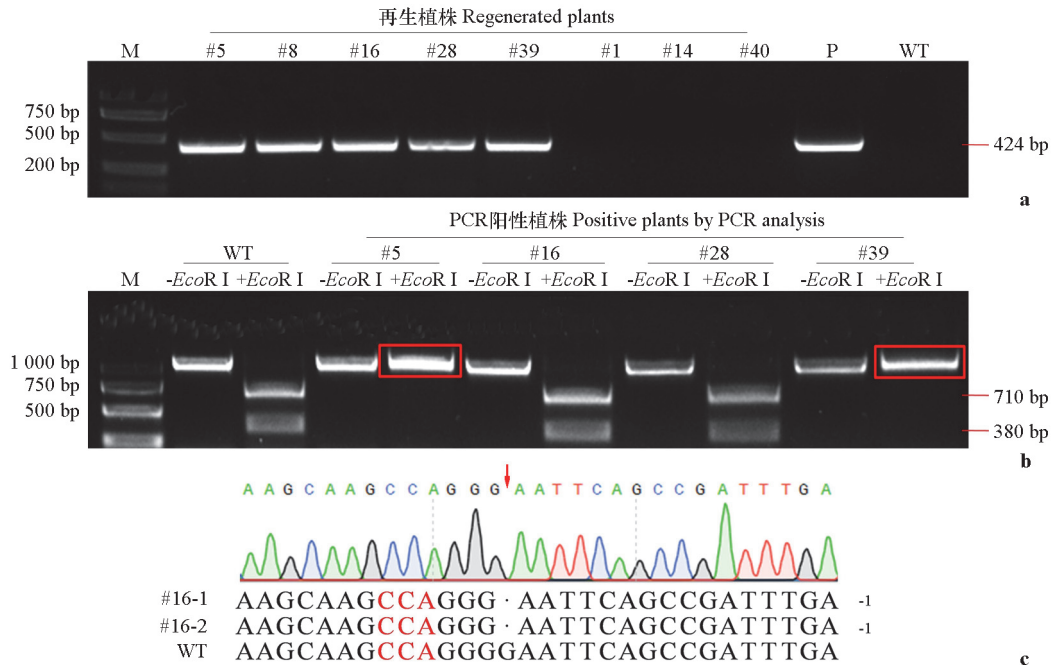


图4 再生植株的PCR鉴定(a)、靶位点PCR/RE检测(b)和#16植株靶位点测序(c)

M: Marker; WT: 野生型; P: 质粒, 阳性对照; 红色方框: 突变条带; 点: 删除 (-)。

Fig. 4 Identification of regenerated plants by PCR analysis (a), detection of mutations at the target locus by the PCR/RE assay (b) and DNA sequencing results of transgenic line #16 (c)

M: Marker; WT: Wild type; P: Plasmid used as positive control; Red pane: Mutated band; Point: Deleted nucleotides (-) .

野生型植株 (WT) 无法扩增出目的片段; 带有目标靶点的 CRISPR/Cas9 载体质粒阳性对照 (P) 可扩增出约 424 bp 的目的片段; 抗性植株中可扩增出与阳性对照大小相同片段的 (如 #5、#8、#16、#28、#39) 为 PCR 阳性植株。在 71 株抗性植株中, PCR 阳性植株有 53 株, 阳性率为 74.64%。

进一步利用 PCR/RE 方法对 53 株 PCR 阳性植株的靶位点编辑情况进行检测。使用特异引物 PDS1t-F 和 PDS1t-R 扩增 1 090 bp 的目的片段, 野生型经酶切处理后产生两个长度分别为 710 和 380 bp 的片段 (图 4, b 中 WT); 发生编辑的植株则由于酶切位点被破坏, 限制性内切酶无法完成识别切割 (图 4, b 中 #5、#39)。

按照酶切结果所示, 经 PCR 检测为阳性的 #16 和 #28 也被切割, 应是非编辑植株, 表型应为野生型, 但在试验中观察到 #16 表现部分白化表型, 所以用特异引物 PDS1t-F 和 PDS1t-R 扩增 #16 含靶位点的 1 090 bp 目的片段, 并进行测序鉴定 (图 4, c)。结果表明, #16 在靶位点 (红色箭头标注处) 发生 1 个碱基 G 的缺失。由于紧邻被缺失碱基的同为 G, 导致 *EcoR* I 限制酶切位点并未被破坏, 经酶切处理后得到长度分别约为 710 和 380 bp 的片段, 琼脂糖凝胶电泳结果与野生型相同。因此 PCR/RE 检测结果不能准确反映植株的编辑情况, 所有 PCR 阳性植株应经测序确定是否编辑以及编辑类型。

2.5 编辑效率和编辑类型

以 53 株 PCR 阳性植株和 18 株有卡那霉素抗性但 PCR 阴性植株 DNA 为模板, 使用跨越靶位点的特异引物 PDS1t-F 和 PDS1t-R 进行 PCR 扩增, 对 PCR 产物进行测序。结果表明, 在 53 株 PCR 阳性植株中, 共有 20 株在靶位点发生不同类型的突变, 编辑效率为 37.74%; 18 株 PCR 阴性植株中不存在突变。

进一步分析 20 株发生编辑的植株基因型发现, 9 株为纯合突变 (图 5, a), 占 PCR 阳性植株总数的 16.98%, 使用 DNAMAN 对基因型进行比对分析, 其中发生缺失 (-) 和插入 (+) 的各 4 株, 发生替换 (S) 的 1 株 (图 5, a)。对于剩余 11 株测序结果使用在线工具 DSDecodeM 进行解码发现, 其中 5 株发生杂合突变 (图 5, b), 占 PCR 阳性植株总数的 9.43%; 6 株因编辑情况复杂而导致解码失败, 占 PCR 阳性植株总数的 11.32%。

2.6 氨基酸序列分析

在获得的 9 株发生双等位基因突变的植株中, 按编辑结果可分为 A、B、C、D 4 组 (图 6, a)。进一步使用 DNAMAN 对这 9 株突变株 *VviPDS1* 编码的氨基酸序列进行预测分析, #5 植株由于发生 6 bp 的替换导致第 202 位氨基酸突变, 并造成 26 个氨基酸片段缺失 (图 6, a), 产生完全白化表型 (图 6, b); #16、#21、#49 发生 1 个碱基 G 的缺失, 产生移码导致其第 203 位至第 216 位共 14 个氨基酸发生突变, 随后翻译提前终止 (图 6, a), 产生部分白化表型 (图 6, b); #27、#28、#47、#54 发生 1 个碱基 T 的插入, 使其在第 203 位氨基酸突变为终止信号翻译提前终止 (图 6, a), 产生完全白化表型 (图 6, b); #39 发生 2 bp 的碱基缺失, 导致其第 203 位氨基酸突变为终止信号翻译提前终止 (图 6, a), 产生部分白化表型 (图 6, b)。这些结果表明本研究获得的编辑植株, *VviPDS1* 编码的氨基酸存在不同程度的变异。



图 5 CRISPR/Cas9 介导的编辑植株的不同编辑类型

a: 纯合突变; b: 杂合突变; WT: 野生型; 蓝色字母: 插入 (+) 或替换 (S); 点: 删除 (-)。

Fig. 5 Different types of mutations detected in the edited plant after CRISPR/Cas9-mediated gene editing

a: Same mutation in both alleles; b: Different mutation in two alleles; WT: Wild type;
 Blue: Insertion (+) or substitution (S); Point: Deleted nucleotides (-) .

A	WT	G I N D R L Q W K E H S M I F A K P S K P G E F S R F D F P E V L P A P L N G I W A I L R N N E M L T W P E K I K F A I	240
B	#5	G I N D R L Q W K E H S M I F A K P S K P I * M L T W P E K I K F A I	214
C	#16、#21、#49	G I N D R L Q W K E H S M I F A K P S K P N S A D L I S L K S F L H P *	216
D	#27、#28、#47、#54	G I N D R L Q W K E H S M I F A K P S K P G *	202
	#39	G I N D R L Q W K E H S M I F A K P S K P I Q P I *	206
	Consensus	g i n d r l q w k e h s m i f a k p s k p	

a

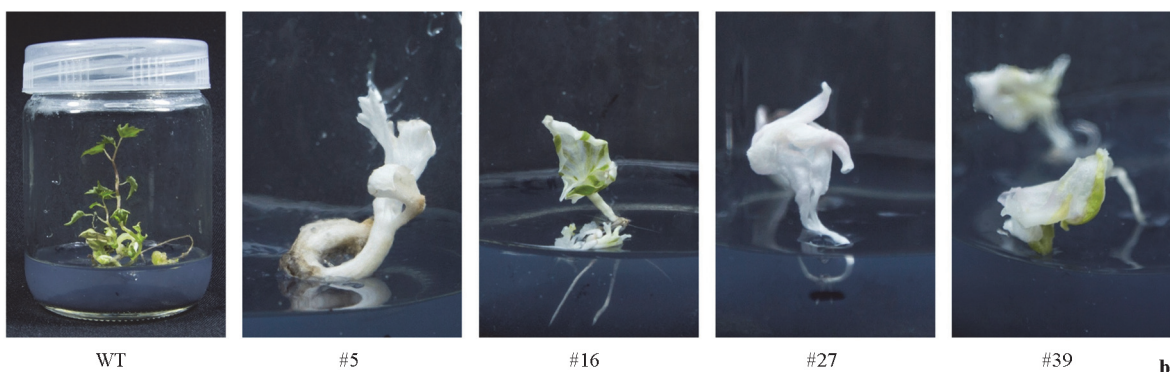


图 6 野生型和双等位基因突变植株的预测的氨基酸序列 (a) 和表型 (b)

Fig. 6 Predicted amino acids (a) and the phenotype (b) of wild type and mutants with biallelic mutants

3 讨论

突变体对于生命科学领域基因功能研究至关重要。通过传统的化学和物理措施等获得突变体的方法 (Colbert et al., 2001) 往往存在随机性, 需要构建大规模的突变体库和进行大规模筛选 (Till et al., 2003)。长期以来葡萄缺乏突变体, 主要通过超表达和 RNAi 的手段研究基因功能 (Dai et al., 2015; Pessina et al., 2016)。CRISPR/Cas9 技术的出现, 可以直接在基因组特定位置引入突变, 从而获得特定的突变体, 将促进基因功能的研究和遗传改良的应用。

本研究中通过 CRISPR/Cas9 系统敲除葡萄 *VviPDS1* 基因, 获得 20 株在目的位点发生编辑的突变体葡萄, 具有明显白化和矮化表型, 其中完全白化植株共 5 株, 占发生突变植株的 25%。研究表明, 拟南芥 *pds3* 突变体的白化和矮化表型是由 *PDS3* 基因的功能性破坏引起的 (Qin et al., 2007); 利用 CRISPR/Cas9 定向编辑技术, 在 T0 代获得了水稻 PDS 基因功能缺失的纯合突变体, 也呈现预期的白化和矮化表型, 影响植株的正常发育 (Shan et al., 2013)。另外, 在苹果和西瓜等园艺作物中, 其内源 PDS 基因通过 CRISPR/Cas9 定向编辑同样呈现完全白化和严重矮化的表型 (Nishitani et al., 2016; Tian et al., 2017)。而 Nakajima 等 (2017) 的报道中, 通过 CRISPR/Cas9 系统定向编辑葡萄内源 PDS 基因, 突变植株未能呈现矮化, 只表现部分叶片部分白化。本研究结果中获得的突变植株表型与其差异较大, 可能与所选择的靶位点有关, 或者与其未获得纯合突变的植株有关。在本研究中, 通过 CRISPR/Cas9 系统在 *VviPDS1* 上的预期位置成功产生突变, 获得 9 株纯合突变植株并产生白化和矮化表型, 这表明葡萄内源 PDS 基因的缺失会同样会导致矮化及白化, 且 CRISPR/Cas9 系统能够在葡萄基因组中进行基因组编辑。

葡萄作为木本植物, 遗传转化周期长, 遗传转化过程复杂且效率较低, 因此评估体内靶向效率对于在稳定转化的葡萄中实现成功的基因组编辑至关重要 (Lin et al., 2018)。本研究中通过 PEG 介导质粒瞬时转染葡萄叶片原生质体, 通过两次 PCR/RE 的方法验证载体功能。此前 Malnoy 等 (2016) 使用 PEG 介导转化葡萄胚性愈伤组织分离的原生质体细胞后, 通过高通量测序的方法检测到了 CRISPR/Cas9 系统可在葡萄内进行定点编辑, 但葡萄胚性愈伤组织诱导保存十分困难 (程远 等, 2017), 且高通量测序费用高昂, 因此此方法不适用于简单、快速地验证载体功能和靶向序列的工作效率。本研究中使用葡萄叶片原生质体进行转化, 并通过 PCR/RE 进行检测的方法则相对简单、快捷和成本低, 且使用叶片提取原生质体材料丰富, 可用于大量验证。但是本研究中以转染后的原生质体总 DNA 为模板, 在第 1 轮 PCR/RE 分析期间不能观察到无法被对应的限制酶消化突变扩增产物。以第 1 轮 PCR/RE 产物为模板, 再进行第 2 轮 PCR/RE 后, 使得突变扩增产物得以富集, 可通过琼脂糖凝胶电泳观察到突变条带。正因如此, 致使无法通过 Shan 等 (2014) 报道的方法, 使用凝胶图像进行编辑效率的估算。对类似葡萄等需要通过两次 PCR/RE 才能在原生质体转化中检测到编辑的物种, 可尝试通过 Lin 等 (2018) 报道的方法, 使用单个原生质体, 确认是否发生编辑并进行编辑效率估算。

综上所述, 本结果表明 CRISPR/Cas9 系统可以通过葡萄细胞中的瞬时或稳定表达进行基因组编辑。此外, CRISPR/Cas9 系统能够在再生植株中产生纯合敲除。因此, CRISPR/Cas9 系统将成为促进葡萄基因功能研究和遗传改良的有力工具。

References

Bibikova M, Beumer K, Trautman J K, Carroll D. 2003. Enhancing gene targeting with designed zinc finger nucleases. *Science*, 300 (5620):

- 764 - 764.
- Cheng Yuan, Wan Dong-yan, Zhang Bao-lin, Wang Yue-jin, Wen Ying-qiang. 2017. Induction, preservation, propagation and cytological observation of proembryonic masses of grapevine. *Journal of Fruit Science*, (8): 968 - 987. (in Chinese)
- 程 远, 万东艳, 张宝林, 王跃进, 文颖强. 2017. 葡萄原胚团的诱导、保存、扩繁及其细胞学观察. *果树学报*, (8): 968 - 987.
- Christian M, Cermak T, Doyle E L, Schmidt C, Zhang F, Hummel A, Bogdanove A J, Voytas D F. 2010. Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. *Genetics*, 186 (2): 757 - 761.
- Colbert T, Till B J, Tompa R, Reynolds S, Steine M N, Yeung A T, McCallum C M, Comai L, Henikoff S. 2001. High-throughput screening for induced point mutations. *Plant Physiol*, 126 (2): 480 - 484.
- Cong L, Ran F A, Cox D, Lin S L, Barretto R, Habib N, Hsu P D, Wu X B, Jiang W Y, Marraffini L A, Zhang F. 2013. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 339 (6121): 819 - 823.
- Dai L M, Zhou Q, Li R M, Du Y J, He J, Wang D, Cheng S Y, Zhang J X, Wang Y J. 2015. Establishment of a picloram-induced somatic embryogenesis system in *Vitis vinifera* cv. Chardonnay and genetic transformation of a stilbene synthase gene from wild-growing *Vitis* species. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 121 (2): 397 - 412.
- Du H Y, Zeng X R, Zhao M, Cui X P, Wang Q, Yang H, Cheng H, Yu D Y. 2016. Efficient targeted mutagenesis in soybean by TALENs and CRISPR/Cas9. *J Biotechnol*, 217: 90 - 97.
- Fan D, Liu T T, Li C F, Jiao B, Li S, Hou Y S, Luo K M. 2015. Efficient CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis in *Populus* in the first generation. *Sci Rep*, 5: 7.
- Ito Y, Nishizawa-Yokoi A, Endo M, Mikami M, Toki S. 2015. CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of the RIN locus that regulates tomato fruit ripening. *Biochem Biophys Res Commun*, 467 (1): 76 - 82.
- Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna J A, Charpentier E. 2012. A programmable Dual-RNA-Guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 337 (6096): 816 - 821.
- Lei Y, Lu L, Liu H Y, Li S, Xing F, Chen L L. 2014. CRISPR-P: a web tool for synthetic single-guide RNA design of CRISPR-system in plants. *Mol Plant*, 7 (9): 1494 - 1496.
- Li C, Unver T, Zhang B H. 2017. A high-efficiency CRISPR/Cas9 system for targeted mutagenesis in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Sci Rep*, 7: 10.
- Li J F, Norville J E, Aach J, McCormack M, Zhang D D, Bush J, Church G M, Sheen J. 2013. Multiplex and homologous recombination-mediated genome editing in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana* using guide RNA and Cas9. *Nature Biotechnology*, 31 (8): 688 - 691.
- Li T, Huang S, Jiang W Z, Wright D, Spalding M H, Weeks D P, Yang B. 2011. TAL nucleases (TALNs): hybrid proteins composed of TAL effectors and FokI DNA-cleavage domain. *Nucleic Acids Res*, 39 (1): 359 - 372.
- Lin C S, Hsu C T, Yang L H, Lee L Y, Fu J Y, Cheng Q W, Wu F H, Hsiao H C W, Zhang Y S, Zhang R, Chang W J, Yu C T, Wang W, Liao L J, Gelvin S B, Shih M C. 2018. Application of protoplast technology to CRISPR/Cas9 mutagenesis: from single-cell mutation detection to mutant plant regeneration. *Plant Biotechnol J*, 16 (7): 1295 - 1310.
- Liu W Z, Xie X R, Ma X L, Li J, Chen J H, Liu Y G. 2015. DSDecode: A Web-Based tool for decoding of sequencing chromatograms for genotyping of targeted mutations. *Mol Plant*, 8 (9): 1431 - 1433.
- Malnoy M, Viola R, Jung M H, Koo O J, Kim S, Kim J S, Velasco R, Kanchiswamy C N. 2016. DNA-Free genetically edited grapevine and apple protoplast using CRISPR/Cas9 Ribonucleoproteins. *Front Plant Sci*, 7: 9.
- Mao Y F, Zhang H, Xu N F, Zhang B T, Gou F, Zhu J K. 2013. Application of the CRISPR/Cas system for efficient genome engineering in plants. *Mol Plant*, 6 (6): 2008 - 2011.
- Nakajima I, Ban Y, Azuma A, Onoue N, Moriguchi T, Yamamoto T, Toki S, Endo M. 2017. CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis in grape. *PLoS ONE*, 12 (5): 16.
- Nekrasov V, Staskawicz B, Weigel D, Jones J D G, Kamoun S. 2013. Targeted mutagenesis in the model plant *Nicotiana benthamiana* using Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nature Biotechnology*, 31 (8): 691 - 693.
- Nishitani C, Hirai N, Komori S, Wada M, Okada K, Osakabe K, Yamamoto T, Osakabe Y. 2016. Efficient genome editing in apple using a

- CRISPR/Cas9 system. *Sci Rep*, 6: 8.
- Pessina S, Lenzi L, Perazzolli M, Campa M, Dalla Costa L, Urso S, Vale G, Salamini F, Velasco R, Malnoy M. 2016. Knockdown of MLO genes reduces susceptibility to powdery mildew in grapevine. *Hortic Res-England*, 3: 9.
- Qin G J, Gu H Y, Ma L G, Peng Y B, Deng X W, Chen Z L, Qu L J. 2007. Disruption of phytoene desaturase gene results in albino and dwarf phenotypes in *Arabidopsis* by impairing chlorophyll, carotenoid, and gibberellin biosynthesis. *Cell Research*, 17 (5): 471 - 482.
- Ren C, Liu X J, Zhang Z, Wang Y, Duan W, Li S H, Liang Z C. 2016. CRISPR/Cas9-mediated efficient targeted mutagenesis in Chardonnay (*Vitis vinifera* L.). *Sci Rep*, 6: 9.
- Shan Q W, Wang Y P, Li J, Gao C X. 2014. Genome editing in rice and wheat using the CRISPR/Cas system. *Nat Protoc*, 9 (10): 2395 - 2410.
- Shan Q W, Wang Y P, Li J, Zhang Y, Chen K L, Liang Z, Zhang K, Liu J X, Xi J J, Qiu J L, Gao C X. 2013. Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system. *Nature Biotechnology*, 31 (8): 686 - 688.
- Svitashev S, Young J K, Schwartz C, Gao H R, Falco S C, Cigan A M. 2015. Targeted mutagenesis, precise gene editing, and site-specific gene insertion in maize using Cas9 and guide RNA. *Plant Physiol*, 169 (2): 931 - 945.
- Tian S W, Jiang L J, Gao Q, Zhang J, Zong M, Zhang H Y, Ren Y, Guo S G, Gong G Y, Liu F, Xu Y. 2017. Efficient CRISPR/Cas9-based gene knockout in watermelon. *Plant Cell Reports*, 36 (3): 399 - 406.
- Till B J, Reynolds S H, Greene E A, Comomo C A, Enns L C, Johnson J E, Burtner C, Odden A R, Young K, Taylor N E, Henikoff J G, Comai L, Henikoff S. 2003. Large-scale discovery of induced point mutations with high-throughput TILLING. *Genome Res*, 13 (3): 524 - 530.
- Wang X H, Tu M X, Wang D J, Liu J W, Li Y J, Li Z, Wang Y J, Wang X P. 2018. CRISPR/Cas9-mediated efficient targeted mutagenesis in grape in the first generation. *Plant Biotechnol J*, 16 (4): 844 - 855.
- Wang Y, Liu X J, Ren C, Zhong G Y, Yang L, Li S H, Liang Z C. 2016. Identification of genomic sites for CRISPR/Cas9-based genome editing in the *Vitis vinifera* genome. *BMC Plant Biol*, 16: 7.
- Wang Y P, Cheng X, Shan Q W, Zhang Y, Liu J X, Gao C X, Qiu J L. 2014. Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew. *Nature Biotechnology*, 32 (9): 947 - 951.
- Xing H L, Dong L, Wang Z P, Zhang H Y, Han C Y, Liu B, Wang X C, Chen Q J. 2014. A CRISPR/Cas9 toolkit for multiplex genome editing in plants. *BMC Plant Biol*, 14: 12.
- Young P R, Lashbrooke J G, Alexandersson E, Jacobson D, Moser C, Velasco R, Vivier M A. 2012. The genes and enzymes of the carotenoid metabolic pathway in *Vitis vinifera* L. *BMC Genomics*, 13: 17.
- Zhang Y W, Bai Y, Wu G H, Zou S H, Chen Y F, Gao C X, Tang D Z. 2017. Simultaneous modification of three homoeologs of TaEDR1 by genome editing enhances powdery mildew resistance in wheat. *Plant J*, 91 (4): 714 - 724.
- Zhao F L, Li Y J, Hu Y, Gao Y R, Zang X W, Ding Q, Wang Y J, Wen Y Q. 2016. A highly efficient grapevine mesophyll protoplast system for transient gene expression and the study of disease resistance proteins. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 125 (1): 43 - 57.
- Zheng Aihong, Zhang Fen, Jiang Min, Yuan Qiao, Jiang Leiyu, Chen Qing, Tang Haoru, Sun Bo. 2019. Targeted editing of *BoaZDS* by CRISPR/Ca9 technology in Chinese kale. *Acta Horticulturae Sinica*, 46 (1): 57 - 64. (in Chinese)
- 郑爱红, 张芬, 江敏, 袁巧, 江雷雨, 陈清, 汤浩茹, 孙勃. 2019. 利用 CRISPR/Ca9 技术靶向编辑芥蓝 *BoaZDS*. *园艺学报*, 46 (1): 57 - 64.
- Zhou X H, Jacobs T B, Xue L J, Harding S A, Tsai C J. 2015. Exploiting SNPs for biallelic CRISPR mutations in the outcrossing woody perennial *Populus reevesii* 4-coumarate: CoA ligase specificity and redundancy. *New Phytol*, 208 (2): 298 - 301.
- Zou Xiuping, Fan Di, Peng Aihong, He Yongrui, Xu Lanzhen, Lei Tiangang, Yao Lixiao, Li Qiang, Luo Keming, Chen Shanchun. 2019. CRISPR/Cas9-mediated editing of multiple sites in the citrus *CsLOB1* promoter. *Acta Horticulturae Sinica*, 46 (2): 337 - 344. (in Chinese)
- 邹修平, 范迪, 彭爱红, 何永睿, 许兰珍, 雷天刚, 姚利晓, 李强, 罗克明, 陈善春. 2019. CRISPR/Cas9 介导柑橘 *CsLOB1* 基因启动子的多位点编辑. *园艺学报*, 46 (2): 337 - 344.