

DOI: 10.3724/SP.J.1006.2021.04178

## 棉花 CRISPR/Cas9 基因编辑有效 sgRNA 高效筛选体系的研究

周冠彤 雷建峰 代培红 刘超 李月 刘晓东\*

新疆农业大学农学院 / 棉花教育部工程研究中心, 新疆乌鲁木齐 830052

**摘要:** 单向导 RNA (sgRNA) 是 CRISPR/Cas9 基因组编辑技术体系的重要元件之一。然而研究显示, 很多 sgRNA 不能有效工作, 因此需要对多个设计的候选 sgRNA 进行筛选, 以验证它们的有效性。早期对 sgRNA 有效性的验证采用的是完整编辑载体瞬时转化原生质体或者叶片的方法。这些方法费时费力, 成功率不高, 尤其是对于原生质体制备效率比较低的棉花。本研究针对 *GhMAPKKK2* 和 *GhAE* 基因分别设计靶序列, 构建了只转录 sgRNA 的载体: *GhU6-5P::MAPKKK2-sgRNA-1300* 和 *GhU6-5P::AE-sgRNA-1300*, 并通过农杆菌注射 YZ-1 Cas9 转基因棉花植株叶片; 与此同时, 构建了对应完整的 CRISPR/Cas9 基因组编辑载体: *GhU6-5P::MAPKKK2-sgRNA-Cas9* 和 *GhU6-5P::AE-sgRNA-Cas9*, 并通过农杆菌注射 YZ-1 野生型棉花植株的叶片。另外, 针对 *GhPDS*、*GhCLA1*、*GhMAPKKK2* 和 *GhAE* 基因分别设计靶序列并构建了 *GhU6-5P-2::PDS-sgRNA-CLCrVA*、*GhU6-5P-2::CLA1-sgRNA-CLCrVA*、*GhU6-5P-2::MAPKKK2-sgRNA-CLCrVA* 和 *GhU6-5P-2::AE-sgRNA-CLCrVA* 病毒投送载体, 通过农杆菌注射 YZ-1 Cas9 转基因棉花植株叶片。以上试验均以转化对应空载体的植株为对照。对转化后的棉花叶片基因组 DNA 进行 PCR 扩增后酶切, 并对未完全消化的 PCR 产物进行克隆测序, 结果显示, 转化 *GhU6-5P::AE-sgRNA-1300*、*GhU6-5P::MAPKKK2-sgRNA-Cas9*、*GhU6-5P::AE-sgRNA-Cas9* 载体的棉花植株均未检测到靶基因突变, 而转化 *GhU6-5P::MAPKKK2-sgRNA-1300*、*GhU6-5P-2::PDS-sgRNA-CLCrVA*、*GhU6-5P-2::CLA1-sgRNA-CLCrVA*、*GhU6-5P-2::MAPKKK2-sgRNA-CLCrVA* 和 *GhU6-5P-2::AE-sgRNA-CLCrVA* 载体的 Cas9 转基因阳性植株基因序列发生了改变, 突变类型包括碱基替换、碱基缺失和碱基插入。表明以 Cas9 转基因阳性植株为转化受体的策略可以高效真实地验证 sgRNA 的有效性, 排除了因转化效率低而带来的假阴性的结果, 且病毒载体投送 sgRNA 的策略更高效、更准确。该 sgRNA 高效验证体系的建立, 为棉花功能基因组学研究提供了重要的技术基础。

**关键词:** 棉花; 瞬时转化; CRISPR/Cas9; 基因组编辑

## Efficient screening system of effective sgRNA for cotton CRISPR/Cas9 gene editing

ZHOU Guan-Tong, LEI Jian-Feng, DAI Pei-Hong, LIU Chao, LI Yue, and LIU Xiao-Dong\*

College of Agriculture, Xinjiang Agricultural University, Engineering Research Centre of Cotton of Ministry of Education, Urumqi 830052, Xinjiang, China

**Abstract:** Single guide RNA (sgRNA) is one of the important elements of the CRISPR/Cas9 genome editing technology system. However, studies have shown that many sgRNAs cannot work effectively. It is worth screening to verify the effectiveness of multiple design candidate sgRNAs. Instantaneous transformation of protoplasts or leaves with complete editing vectors were used to verification of the effectiveness of sgRNA in the early stage. These methods are time-consuming and laborious, and the success rate is not high, especially for cotton with low efficiency of the protoplasmic system. In this study, target sequences were designed for *GhMAPKKK2* and *GhAE* genes, and two vectors of *GhU6-5P::MAPKKK2-sgRNA-1300*, *GhU6-5P::AE-sgRNA-1300* which

本研究由国家自然科学基金项目(31660433)和新疆农业大学研究生科研创新项目(XJAUGRI2017003)资助。

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (31660433) and the Xinjiang Agricultural University Postgraduate Research and Innovation Project (XJAUGRI2017003).

\* 通信作者(Corresponding author): 刘晓东, E-mail: xiaodongliu75@aliyun.com

第一作者联系方式: E-mail: 601930485@qq.com

Received (收稿日期): 2020-08-05; Accepted (接受日期): 2020-10-14; Published online (网络出版日期): 2020-10-28.

URL: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1809.S.20201028.1426.008.html>

transcribed only sgRNA were constructed and injected YZ-1 Cas9 transgenic cotton plant leaves through *Agrobacterium*; meanwhile, two corresponding complete CRISPR/Cas9 genome editing vectors of *GhU6-5P::MAPKKK2*-sgRNA-Cas9 and *GhU6-5P::AE*-sgRNA-Cas9 were constructed and injected YZ-1 wild-type cotton leaves with *Agrobacterium*. In addition, target sequences were designed for *GhPDS*, *GhCLA1*, *GhMAPKKK2*, and *GhAE* genes, respectively, and *GhU6-5P-2::PDS*-sgRNA-CLCrVA, *GhU6-5P-2::CLA1*-sgRNA-CLCrVA, *GhU6-5P-2::MAPKKK2*-sgRNA-CLCrVA and *GhU6-5P-2::AE*-sgRNA-CLCrVA virus delivery vectors were constructed and injected YZ-1 Cas9 transgenic cotton plant leaves through *Agrobacterium*. In the above experiments, the plants transformed with the empty vector were used as controls. The genomic DNA of the transformed cotton leaves was subjected to PCR and enzyme digestion, and the PCR products which were not completely digested were cloned and sequenced. The results showed that no mutation in target gene was detected in the cotton plants transformed with the *GhU6-5P::AE*-sgRNA-1300, *GhU6-5P::MAPKKK2*-sgRNA-Cas9 and *GhU6-5P::AE*-sgRNA-Cas9, and the target genes mutation in the Cas9 transgenic plants transformed with *GhU6-5P::MAPKKK2*-sgRNA-1300, *GhU6-5P-2::PDS*-sgRNA-CLCrVA, *GhU6-5P-2::CLA1*-sgRNA-CLCrVA, *GhU6-5P-2::MAPKKK2*-sgRNA-CLCrVA and *GhU6-5P-2::AE*-sgRNA-CLCrVA vector was uncovered. The types of mutations included base substitution, base deletion and base insertion. The results indicated that the strategy of using Cas9 transgenic plants as transformation recipients can efficiently and truly verify the effectiveness of sgRNA, which eliminated false negative results due to low transformation efficiency, and the strategy of using virus as vectors to deliver sgRNA was more efficient and accurate. The establishment of this sgRNA high-efficiency verification system provides an important technical basis for cotton functional genomics research.

**Keywords:** cotton; transient transformation; CRISPR/Cas9; genome editing

棉花是我国重要的经济作物和天然纤维来源。而棉花生产面临各种生物、非生物胁迫因子的危害,同时生产的棉花纤维品质不高,生产成本日益增加<sup>[1-2]</sup>。为了从根本上解决上述棉花种植中的问题,需要棉花功能基因组学来解析各种农艺性状形成的基因调控网络<sup>[3-5]</sup>,并以此为理论基础,培育出优质高产抗病抗逆的棉花新品种。目前栽培棉花的全基因组测序已经完成,然而对每个基因的功能解析才刚刚开始。要研究棉花基因的功能,解析农艺性状形成的基因调控网络,获得相应基因突变的棉花遗传材料是关键前提。CRISPR/Cas9 基因组编辑技术在棉花上的成功建立为棉花功能基因组学研究提供了强大的技术支持<sup>[6]</sup>。

基因编辑技术是一种可以针对基因组进行定向靶向修饰的技术<sup>[7]</sup>,目前主要有 3 种基因编辑技术,分别为人工核酸酶介导的锌指核酸酶(zinc-finger nucleases, ZFN)技术、类转录激活效应物核酸酶(transcription activator-like effector nucleases, TALEN)技术和 RNA 引导的 CRISPR/Cas (clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR associated nuclease, Cas)技术<sup>[8]</sup>。CRISPR/Cas9 基因组编辑技术起源于细菌长期进化过程中自身产生的一套免疫机制<sup>[9]</sup>,包括小片段单链向导 RNA (single guide RNA, sgRNA)和具有靶向识别 sgRNA 的核酸酶 Cas9 2 个部分。通过带有靶向序列的 sgRNA 引导 Cas9 核酸酶在基因组特异性位点(PAM)附近进行切割,最终由细胞启动基因组同源重组修复(HR)或非同源重组末端连接(NHEJ)导致基因组序列发生可逆

或不可逆突变<sup>[10-11]</sup>。由于靶向序列可以根据基因组不同位点单独设计并且 Cas9 核酸酶无特异性,因此与 ZFNs 和 TALENs 等基因组编辑技术相比,CRISPR/Cas9 基因组编辑技术操作更加简便,成本更低,编辑效率更高,靶向更加精准,脱靶效应更低<sup>[12-14]</sup>,目前已在多种植物中成功应用<sup>[15-19]</sup>,在棉花功能基因组学研究中也展现出巨大的应用前景<sup>[20-21]</sup>。

sgRNA 是 CRISPR/Cas9 基因编辑技术体系的重要元件之一。然而前人研究显示很多 sgRNA 并不能有效工作<sup>[22]</sup>。因此在正式运用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术进行稳定转化受体植物前,一般都需要使用瞬时转化的方法快速验证和筛选出有效的 sgRNA,而原生质体转化法和农杆菌介导注射完整的编辑载体转化植株叶片是 2 种最常见验证 sgRNA 活性的方法<sup>[23-24]</sup>。但由于农杆菌瞬时转化效率不高和 Cas9 基因太大(大于 4000 bp),导致瞬时转化效率低,对试验操作者技术要求较高,基因编辑事件不容易被检测到。

最近的研究表明,可以利用植物病毒传递 sgRNA 用于植物基因的靶向编辑,称为病毒诱导的基因编辑(VIGE)<sup>[25-26]</sup>。相比传统的转化完整编辑载体的方式,利用植物病毒导入 sgRNA 具有如下优势:首先,sgRNA 能够伴随着病毒的侵染和复制快速积累,在更多细胞里产生更多的 sgRNA,大幅提高基因编辑的检出率;其次,VIGE 可以将多个 sgRNAs 组装到同一个病毒基因组上实现多基因编辑。一些植物 RNA 病毒,如烟草脆裂病毒(TRV)、豌豆早枯病毒(PEBV)、烟草花叶病毒(TMV)和甜菜坏死黄脉病毒(BNYVV)等被相继应用于模式植物拟南芥和烟

草的靶向编辑<sup>[27-30]</sup>。Hu 等<sup>[25]</sup>利用大麦条纹花叶病毒(BSMV)介导的 VIGE 系统, 针对六倍体小麦进行基因编辑的应用, 表明了植物 RNA 病毒介导的 VIGE 可以有效地用于农作物的基因编辑。随后, 植物 DNA 病毒介导的 VIGE 相继被开发利用<sup>[26]</sup>。然而棉花的 VIGE 系统还未见报道。

CLCrV 是一种双组份 DNA 病毒由 CLCrV-A 和 CLCrV-B 两个基因组组成。已有研究表明, CLCrV 作为病毒诱导的基因沉默(VIGS)载体, 可用于沉默棉花内源基因的表达<sup>[31]</sup>。为消除 Cas9 基因过大对基因编辑检出效率的影响, 本研究用 Cas9 阳性转基因棉花为受体材料, 分别用农杆菌 Ti 质粒和 CLCrV 病毒载体投送 sgRNA。结果表明, 这 2 种方法均能够更加高效快捷完成棉花内源基因编辑的有效 sgRNA 的筛选工作。为后续创制棉花新种质资源和进行棉花功能基因组学研究奠定了重要的技术基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

载体 *GhU6-5P::GUS-sgRNA*<sup>[32]</sup>和 *GhU6-5P-2::GUS-sgRNA* 由本实验室保存; Cas9 基因由中国农业科学院孟志刚惠赠; 用于农杆菌注射的受体材料为上述 Cas9 转基因阳性棉花植株, 其遗传背景是 YZ-1, 带有 GFP-Cas9 基因和 *GhALARP-sgRNA*, 但该 sgRNA 与本文中的 sgRNA 碱基差异很大, 不会与本文试验投送的 sgRNA 发生竞争, 从而影响实验的正确性, 由石河子大学孙杰课题组惠赠<sup>[33]</sup>。载体 pClCrVA 和 pClCrVB 由浙江大学周雪平教授惠赠, 限制性内切酶和 DNA 聚合酶均为 NEB 和 Thermo 公司产品, 其余试剂及药品均由国内生物公司代销, 引物合成及测序由上海杰李生物科技有限公司完成。

### 1.2 载体构建

以 YZ-1 基因组 DNA 为模板, 克隆 *GhMAPKKK2* (*Gh\_D10G0119*)、*GhAE* (*Gh\_D09:3656310..3658852*)、*GhPDS* (*Gh\_D07G1160*)、*GhCLA1* (*Gh\_D10G1640*) 基因部分序列用于寻找合适的靶序列, 靶序列的设计基于以下原则, 一是在四倍体棉花 YZ-1 中, A 组和 D 组的基因组序列完全一致; 二是 GC 含量在 40%~60%之间; 三是有合适的限制性内切酶位点。将靶序列单链 DNA 经过 DNA 复性反应后连接于以 *Bbs* I 酶切获得的 *GhU6-5P::GUS-sgRNA* 和 *GhU6-5P-2::GUS-sgRNA* 线性化载体。退火反应体系为 10  $\mu\text{mol L}^{-1}$  的上下游靶序列各 10  $\mu\text{L}$  (表 1), 复性程序为: 95℃ 每 5 s 降低 0.5℃ 至 20℃。经测序验证获得上述 *GhU6-5P::MAPKKK2-sgRNA*、*GhU6-5P::AE-sgRNA* 质粒后, 再将上述 2 种质粒以酶切连接的方式分别连接在以 *Kpn* I、*Xba* I 酶切获得的 pCambia1300 表达载体和和 Cas9 基因表达载体上, 分别命名为 *GhU6-5P::MAPKKK2-sgRNA-1300*、*GhU6-5P::AE-sgRNA-1300* 和 *GhU6-5P::MAPKKK2-sgRNA-Cas9*、*GhU6-5P::AE-sgRNA-Cas9*。经测序验证获得上述 *GhU6-5P-2::PDS-sgRNA*、*GhU6-5P-2::CLA1-sgRNA*、*GhU6-5P-2::MAPKKK2-sgRNA* 和 *GhU6-5P-2::AE-sgRNA* 质粒后, 再将其以酶切连接方式连接在以 *Pac* I、*Spe* I 酶切获得 pClCrVA 病毒载体上, 命名为 *GhU6-5P-2::PDS-sgRNA-ClCrVA*、*GhU6-5P-2::CLA1-sgRNA-ClCrVA*、*GhU6-5P-2::MAPKKK2-sgRNA-ClCrVA* 和 *GhU6-5P-2::AE-sgRNA-ClCrVA*。上述重组质粒酶切检测正确后均转化农杆菌 GV3101, 命名同表达载体名称。

表 1 本研究中使用的引物序列

Table 1 Primer sequences used in this study

引物名称 Primer name	上游引物序列 Forward sequence (5'-3')	下游引物序列 Reverse sequence (5'-3')
<i>GhU6-5P-MAPKKK2-sg</i>	AAGGGTTCCAGCTGACATA	TATGTCAGCTGGGAACCCCTT
<i>GhU6-5P-AE-sg</i>	GAGTTTGGAGGGCTTACAAT	ATTGTAAGCCCTCCAAACTC
<i>GhU6-5P-2-PDS-sg</i>	GAAGCGAGAGATGTTCTAGG	CCTAGAACATCTCTCGCTTC
<i>GhU6-5P-2-CLA1-sg</i>	TATGCTCGCGAATGATCAG	CTGATCATTCCGCGAGCATA
Test <i>MAPKKK2-sg</i>	CCATGTCGTAGCTTATAAAGG	TCATTTACCTTCTCTTCCCAG
Test <i>AE-sg</i>	AGACTTGTTTCAATGGACTC	AATAAGCTGACAGCAGTTGG
Test <i>PDS-sg</i>	TGCATGATCCATCACTCAAGTTT	GAACGAAAGGCCCTTTCTTTC
Test <i>CLA1-sg</i>	GGATCTGAAAGGTGAAAGGAATC	TACCGTGATACTTGTCAGCAGCT

### 1.3 棉花叶片的瞬时转化

将棉花种子在去离子水中浸泡过夜后 28℃ 黑暗发芽 24 h。发芽后移入土壤中 12 h 光照/12 h 黑暗条件下培养。当棉花长出子叶或两三片真叶时, 准备进行瞬时转化试验。接种前 3 d, 在含有 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  卡那霉素和 25  $\mu\text{g mL}^{-1}$  利福平的 LB 琼脂平板上用已转化的农杆菌的甘油储液画线, 28℃ 孵育 24 h。第 2 天从上述平板中挑取每个载体的单个菌落, 并将其接种到 2 mL 含有 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  卡那霉素和 25  $\mu\text{g mL}^{-1}$  利福平的 LB 培养基中, 28℃, 180  $\text{min}^{-1}$  的速度过夜培养。将上述培养物以 1:100 的比例接种至 30 mL 含有 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  卡那霉素、25  $\mu\text{g mL}^{-1}$  利福平、10  $\text{mmol L}^{-1}$  MES 和 20  $\mu\text{mol L}^{-1}$  乙酰丁香酮的 LB 培养基的三角瓶中 28℃, 180  $\text{min}^{-1}$  过夜培养。将农杆菌细胞 4000 $\times$ g 离心 10 min 后重悬于含有 10  $\text{mmol L}^{-1}$   $\text{MgCl}_2$ , 10  $\text{mmol L}^{-1}$  MES 和 200  $\mu\text{mol L}^{-1}$  乙酰丁香酮的悬浮液中。将悬浮液的 OD<sub>600</sub> 调节至 1.5 后室温下黑暗放置 3 h。用针尖刺破棉花真叶的下表皮, 使用 1 mL 无针头注射器将 *GhU6-5P::MAPKKK2-sgRNA-1300*、*GhU6-5P::AE-sgRNA-1300* 农杆菌注射 *Cas9* 转基因阳性植株真叶, *GhU6-5P::MAPKKK2-sgRNA-Cas9*、*GhU6-5P::AE-sgRNA-Cas9* 农杆菌悬浮液注射野生型对照 YZ-1 棉花真叶。将 pClCrVA 农杆菌分别与等量的 *GhU6-5P-2::PDS-sgRNA-CiCrVA* 农杆菌、*GhU6-5P-2::CLAI-sgRNA-CiCrVA* 农杆菌、*GhU6-5P-2::MAPKKK2-sgRNA-CiCrVA* 农杆菌和 *GhU6-5P-2::AE-sgRNA-CiCrVA* 农杆菌悬浮液混匀后注射棉花子叶中。棉花转化后黑暗放置 24 h, 12 h 光照/12 h 黑暗条件下生长 1 周。

### 1.4 编辑效应的检测

对于 pClCrVA 病毒载体, 取上部非注射的棉花叶片, 对于其他载体取注射处的棉花叶片, 参照 Trans Easypure plant Genomic DNA Kit 操作要求提取基因组 DNA, 将提取的 DNA 经过浓度检测后, 取等质量提取的 DNA, 采用检测引物进行 PCR 扩增(表 1), PCR 反应体系参照 NEB 公司 Phusion 超保真 DNA 聚合酶推荐反应体系。将扩增产物采用靶序列上选择的检测用限制性内切酶(*GhMAPKKK2* 采用 *Nde* I 酶切、*GhAE* 采用 *Mfe* I 酶切、*GhPDS* 采用 *Bfa* I 酶切、*GhCLA1* 采用 *Bcl* I)进行酶切处理, 结果进行琼脂糖凝胶电泳分析。采用 EasyPure Quick Gel Extraction Kit (北京全式金生物)回收上述 PCR 扩增

产物, 方法参照试剂盒说明书, 取 4  $\mu\text{L}$  产物与 pEASY-Blunt Zero Cloning (北京全式金生物技术有限公司)载体连接, 连接体系为 25℃, 5 min, 连接产物转化大肠杆菌感受态 Trans T1, 37℃ 过夜培养, 挑取单克隆进行菌落 PCR 鉴定, 采用靶序列上选择的检测用限制性内切酶(*GhMAPKKK2* 采用 *Nde* I 酶切、*GhAE* 采用 *Mfe* I 酶切、*GhPDS* 采用 *Bfa* I 酶切、*GhCLA1* 采用 *Bcl* I)对菌落 PCR 产物酶切处理, 挑取 PCR 产物未被切开的阳性单克隆接种到含有 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  氨苄霉素 LB 培养基过夜培养后提取质粒用于测序, 测序序列采用 DNASTAR 软件进行比对分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 编辑载体构建

用酶切方式检测上述构建的载体, 酶切结果符合预期设计, 证明 *GhU6-5P::MAPKKK2-sgRNA-1300*、*GhU6-5P::AE-sgRNA-1300*、*GhU6-5P::MAPKKK2-sgRNA-Cas9*、*GhU6-5P::AE-sgRNA-Cas9* 编辑载体和 *GhU6-5P-2::PDS-sgRNA-CiCrVA*、*GhU6-5P-2::CLAI-sgRNA-CiCrVA*、*GhU6-5P-2::MAPKKK2-sgRNA-CiCrVA*、*GhU6-5P-2::AE-sgRNA-CiCrVA* 病毒载体均构建成功(图 1)。14,632 bp 条带为 *Cas9* 骨架载体大小, 8959 bp 条带为 p1300 骨架载体大小, 14,129 bp 为 pClCrVA 骨架载体大小, 822 bp 为 *GhU6-5P::MAPKKK2-sgRNA* 和 *GhU6-5P::AE-sgRNA* 片段大小, 514 bp 为 *GhU6-5P-2::PDS-sgRNA*、*GhU6-5P-2::CLAI-sgRNA*、*GhU6-5P-2::MAPKKK2-sgRNA* 和 *GhU6-5P-2::AE-sgRNA* 大小。

### 2.2 CRISPR/Cas9 基因组编辑效应检测

*GhU6-5P::MAPKKK2-sgRNA-Cas9* 编辑载体转化 4 株 YZ-1 野生型植株, 转化空载体的 YZ-1 野生型植株作为对照。*GhU6-5P::MAPKKK2-sgRNA-1300* 编辑载体转化 4 株 YZ-1 *Cas9* 转基因阳性植株, 转化空载体的 YZ-1 *Cas9* 转基因阳性植株作为对照。对以上转化获得的棉花叶片基因组 DNA 进行先 PCR 扩增后酶切的处理。对于 *GhMAPKKK2* 基因, 在转化空载体情况下, 会得到 1 条完整的条带(636 bp), 用 *Nde* I 消化扩增产物产生 375 bp 和 261 bp 的 2 个片段, 而转化 *GhU6-5P::MAPKKK2-sgRNA-Cas9* 编辑载体的 4 株样品中也无完整的未被切开的条带(图 2-A), 表明转化 *GhU6-5P::MAPKKK2-sgRNA-Cas9* 编辑载体的植株未检测到基因编辑事件, 目标基因靶序列酶切位点处未检测到突变, 琼脂糖凝胶电泳

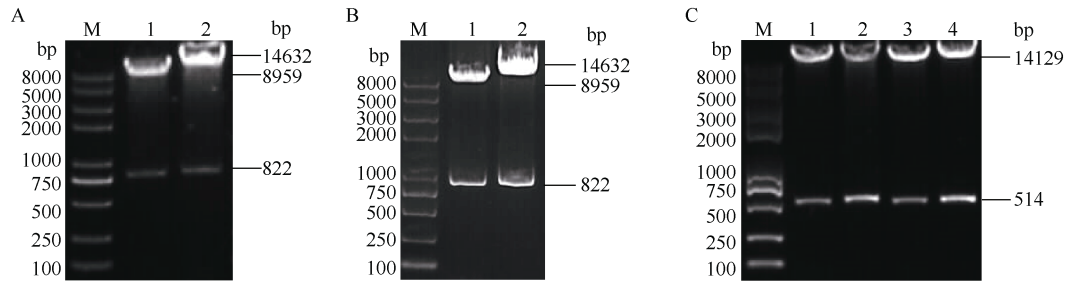


图 1 基因编辑载体的酶切鉴定

Fig. 1 Identification of gene editing vector by restriction enzyme digestion

A: 1、2 分别为 *GhU6-5P::MAPKKK2-sgRNA-1300* 和 *GhU6-5P::MAPKKK2-sgRNA-Cas9*. B: 1、2 分别为 *GhU6-5P::AE-sgRNA-1300* 和 *GhU6-5P::AE-sgRNA-Cas9*. C: 1~4 分别为 *GhU6-5P-2::PDS-sgRNA-CiCrVA*、*GhU6-5P-2::CLA1-sgRNA-CiCrVA*、*GhU6-5P-2::MAPKKK2-sgRNA-CiCrVA* 和 *GhU6-5P-2::AE-sgRNA-CiCrVA*. M: 2K plus II DNA marker.

A: 1, 2 are *GhU6-5P::MAPKKK2-sgRNA-1300* and *GhU6-5P::MAPKKK2-sgRNA-Cas9*. B: 1, 2 are *GhU6-5P::AE-sgRNA-1300* and *GhU6-5P::AE-sgRNA-Cas9*. C: 1~4 are *GhU6-5P-2::PDS-sgRNA-CiCrVA*, *GhU6-5P-2::CLA1-sgRNA-CiCrVA*, *GhU6-5P-2::MAPKKK2-sgRNA-CiCrVA* and *GhU6-5P-2::AE-sgRNA-CiCrVA*. M: 2K plus II DNA marker.

也显示 2 条条带。然而与此同时转化 *GhU6-5P::MAPKKK2-sgRNA-1300* 载体的样品中却出现完整的未被切开的条带(图 2-B), 表明转化 *GhU6-5P::MAPKKK2-sgRNA-1300* 编辑载体的叶片内发生了编辑事件, 目标基因靶序列酶切位点处出现突变, 导致限制性内切酶不能完全切割 PCR 的产物, 琼脂糖凝胶电泳出现 3 条带, 636 bp 条带明亮, 表明

*MAPKKK2-sgRNA* 编辑效率较高。混合回收转化 *GhU6-5P::MAPKKK2-sgRNA-1300* 载体的样品残留的 636bp 条带并克隆测序发现, 在 *GhMAPKKK* 靶位点处位于 PAM 位点上游限制性内切酶位点区域碱基 AD 组均出现不同类型的突变, 其中包括碱基替换和碱基缺失现象(图 2-C 和 D), 表明该策略可用于验证 sgRNA 是否有效。

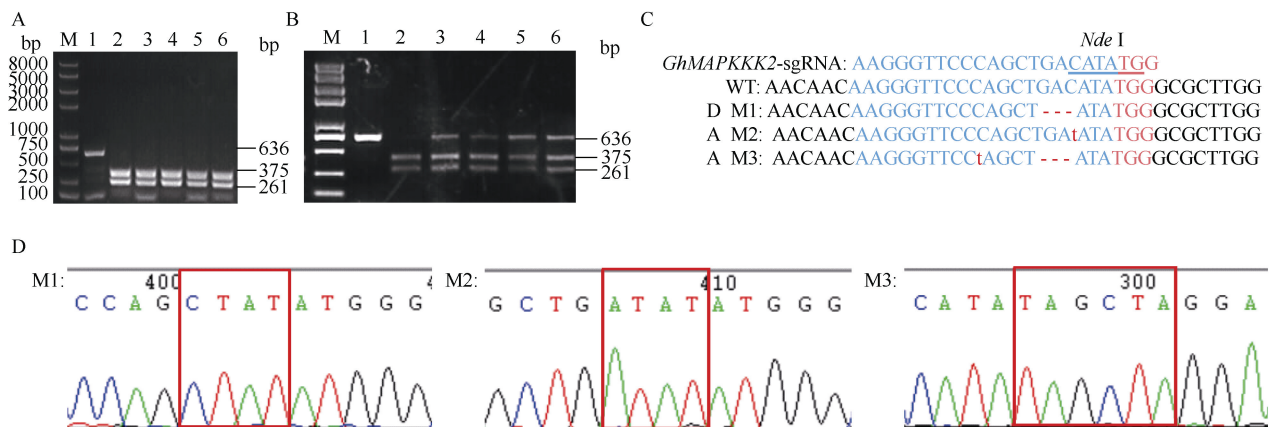


图 2 *GhU6-5P::MAPKKK2-sgRNA* 靶向突变的检测

Fig. 2 *GhU6-5P::MAPKKK2-sgRNA* targeted mutations

A: M: 2K plus II DNA marker; 1、2 分别为对照载体基因组 PCR 扩增产物酶切前后结果; 3~6 为转化 *GhU6-5P::MAPKKK2-sgRNA-Cas9* 单株样品基因组 PCR 扩增产物酶切后结果. B: M: 2K plus II DNA marker; 1、2 分别为对照载体基因组 PCR 扩增产物酶切前后结果; 3~6 为转化 *GhU6-5P::MAPKKK2-sgRNA-1300* 单株样品基因组 PCR 扩增产物酶切后结果. C: *GhMAPKKK2-sgRNA* 靶序列及突变 PCR 产物的测序. M1 发生在 D 亚组的 *GhMAPKKK2*, M2、M3 发生在 A 亚组 *GhMAPKKK2*. D: 突变 PCR 产物克隆的测序峰图, 红色方框指示碱基相比对照发生突变区域. PCR/RE 表示 PCR 扩增产物酶切分析。

A: M: 2K plus II DNA marker; 1, 2: PCR/RE assay of negative control genome before and after the enzyme digestion; 3~6: PCR/RE assay of *GhU6-5P::MAPKKK2-sgRNA-Cas9* genome of single plant sample after enzyme digestion. B: M: 2K plus II DNA marker; 1, 2: PCR/RE assay of negative control genome before and of single plant sample after the enzyme digestion; 3~6: PCR/RE assay of *GhU6-5P::MAPKKK2-sgRNA-1300* genome after enzyme digestion. C: sequencing of *GhMAPKKK2-sgRNA* target sequence and mutant PCR products. M1 occurred at *GhMAPKKK2* from D subgenome, M2, M3 occurred at *GhMAPKKK2* from A subgenome. D: sequencing peak diagram of the mutant PCR product clone, the red box indicates that the base has a mutation region compared to the control. PCR/RE indicates PCR/restriction enzyme assays.



同样采用上述策略验证 *AE*-sgRNA 的有效性。*GhU6-5P::AE*-sgRNA-Cas9 编辑载体转化 10 株 YZ-1 野生型植株, 转化空载体的 YZ-1 野生型植株作为对照。*GhU6-5P::AE*-sgRNA-1300 编辑载体转化 10 株 YZ-1 Cas9 转基因阳性植株, 转化空载体的 YZ-1 Cas9 转基因阳性植株作为对照。对以上转化获得的棉花叶片基因组 DNA 进行先 PCR 扩增后酶切的处理, 转化空载体的试验, 得到了 1 条完整的条带

(659 bp), 用 *Mfe* I 消化扩增产物产生 436 bp 和 223 bp 的 2 个片段(图 3-A), 而转化 *GhU6-5P::AE*-sgRNA-1300 和 *GhU6-5P::AE*-sgRNA-Cas9 编辑载体的样品中均无完整的未被切开的条带(图 3)。结果显示, 转化 *GhU6-5P::AE*-sgRNA-Cas9、和 *GhU6-5P::AE*-sgRNA-1300 编辑载体的植株均未检测到基因编辑事件, 表明 *AE*-sgRNA 可能无效或非常低效。那么 *AE*-sgRNA 是否确实不能用于下一步实验?

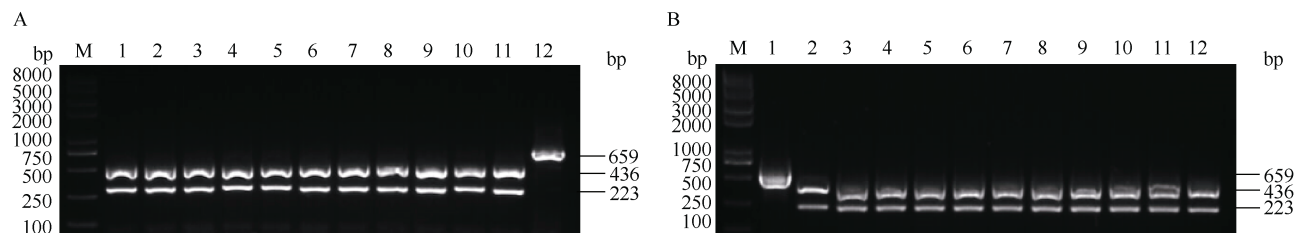


图 3 *GhU6-5P::AE*-sgRNA 靶向突变的检测

Fig. 3 *GhU6-5P::AE*-sgRNA targeted mutations

A: M: 2K plus II DNA marker; 12, 11 分别为对照载体基因组 PCR 扩增产物酶切前后结果; 3~12 为转化 *GhU6-5P::AE*-sgRNA-Cas9 单株样品基因组 PCR 扩增产物酶切后结果。B: M: 2K plus II DNA marker; 1, 2 分别为对照载体基因组 PCR 扩增产物酶切前后结果; 3~12 为转化 *GhU6-5P::AE*-sgRNA-1300 单株样品基因组 PCR 扩增产物酶切后结果。PCR/RE 表示 PCR 扩增产物酶切分析。

A: M: 2K plus II DNA marker; 12, 11: PCR/RE assay of negative control genome before and after the enzyme digestion; 3~12: PCR/RE assay of *GhU6-5P::AE*-sgRNA-Cas9 of single plant sample after enzyme digestion. B: M: 2K plus II DNA marker; 1, 2: PCR/RE assay of negative control genome before and after the enzyme digestion; 3~12: PCR/RE assay of *GhU6-5P::AE*-sgRNA-1300 of single plant sample genome after enzyme digestion. PCR/RE indicates PCR/restriction enzyme assays.

近几年利用植物病毒投送 sgRNA 用于植物基因靶向编辑的 VIGE 策略, 已展示出更高效的基因编辑效率。为此我们在棉花上采用该策略测试了上述 *AE*-sgRNA 是否确实非常低效或无效。构建的 *GhU6-5P-2::MAPKKK2*-sgRNA-CLCrVA 病毒载体转化 4 株 YZ-1 Cas9 转基因阳性植株的子叶, 构建的 *GhU6-5P-2::AE*-sgRNA-CLCrVA 病毒载体转化 5 株 YZ-1 Cas9 转基因阳性植株的子叶取新生长的真叶叶片作检测, 转化空载体的 YZ-1 Cas9 转基因阳性植株作为对照。对以上转化获得的棉花叶片基因组 DNA 进行先 PCR 扩增后酶切的处理, 对于 *GhMAPKKK2* 基因, 转化 *GhU6-5P::MAPKKK2*-sgRNA-CLCrV 载体的样品中有残留的未被切开的条带(636 bp)(图 4-B), 将残留条带混合回收后克隆, 挑取单克隆以 Test *MAPKKK2*-sgF 和 Test *MAPKKK2*-sgR 为引物进行菌液 PCR 后用 *Nde* I 酶切其产物, 菌液 PCR 产物被切开说明该单克隆为野生型, 未被切开说明该单克隆为样品基因组靶序列处发生了基因编辑事件导致基因突变(图 4-C)。对于 *GhAE* 基因, 转化 *GhU6-5P::AE*-sgRNA-CLCrV 载体的样品也有残留的未被切开的条带(659 bp)(图 5-B), 但残留条带相对较弱。将残留条带混合回收后克隆,

挑取单克隆以 M13F 和 M13R 为引物进行菌液 PCR 后用 *Mfe* I 酶切其产物, 菌液 PCR 产物被切开说明该单克隆为野生型, 未被切开说明该单克隆为样品基因组靶序列处发生了基因编辑事件导致基因突变(图 5-C)。结果显示利用病毒载体投送 sgRNA 策略, 转化 *GhU6-5P-2::MAPKKK2*-sgRNA-CLCrVA 和 *GhU6-5P-2::AE*-sgRNA-CLCrVA 病毒载体的样品均发生了基因编辑事件, 证明 *GhU6-5P::MAPKKK2*-sgRNA 和 *GhU6-5P::AE*-sgRNA 均是有效的。与投送 *GhU6-5P::AE*-sgRNA-1300 载体但并未检测到突变的结果相比, *GhU6-5P-2::AE*-sgRNA-CLCrVA 能够明显检测到基因编辑的事件, 只是效率并不高。说明病毒载体投送 sgRNA 的验证策略更高效、更可靠。

为进一步验证基于棉花叶皱缩病毒(CLCrV)的 VIGE 系统验证 sgRNA 的可靠性, 本研究选择了前人已报道过的棉花 *PDS* 和 *CLA1* 这两个基因的有效 sgRNA, 来验证该系统的可靠性<sup>[33]</sup>。*GhU6-5P-2::PDS*-sgRNA-CLCrVA 病毒载体转化 8 株 YZ-1 Cas9 转基因阳性植株的子叶, *GhU6-5P-2::PDS*-sgRNA-CLCrVA 和 *GhU6-5P-2::CLA1*-sgRNA-CLCrVA 病毒载体转化 3 株 YZ-1 Cas9 转基因阳性植株的子叶, 取新生长的真叶叶片作检测, 转化空载体的 YZ-1

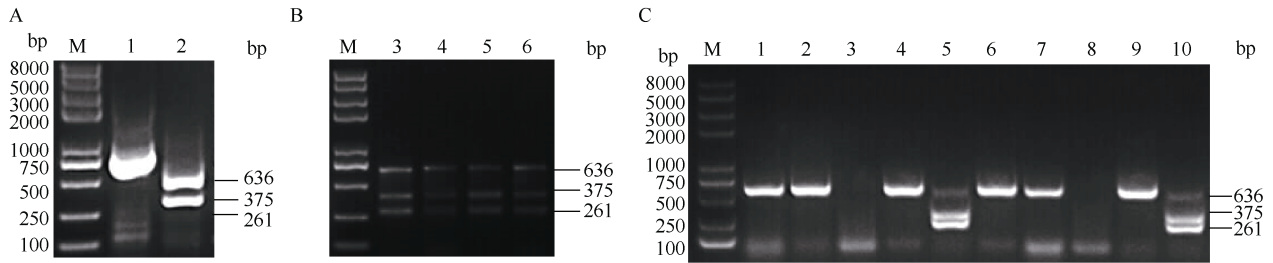


图 4 *GhU6-5P-2::MAPKKK2-sgRNA-CLCrVA* 部分编辑效应测序检测结果

Fig. 4 Results of *GhU6-5P-2::MAPKKK2-sgRNA-CLCrVA* partial editing effect sequencing

A: M: 2K plus II DNA marker; 1, 2 分别为对照载体基因组 PCR 扩增产物酶切前后结果。B: M: 2K plus II DNA marker; 3~6 为转化 *GhU6-5P-2::MAPKKK2-sgRNA-CLCrVA* 单株样品基因组 PCR 扩增产物酶切后结果。C: M: 2K plus II DNA marker; 1~10 为单克隆菌液 PCR 产物酶切后结果。PCR/RE 表示 PCR 扩增产物酶切分析。

A: M: 2K plus II DNA marker; 1, 2: PCR/RE assay of negative control genome before and after the enzyme digestion. B: M: 2K plus II DNA marker; 3~6: PCR/RE assay of *GhU6-5P-2::MAPKKK2-sgRNA-CLCrVA* genome of single plant sample after enzyme digestion. C: M: 2K plus II DNA marker; 1~10: clony PCR product after enzyme digestion. PCR/RE indicates PCR/restriction enzyme assays.

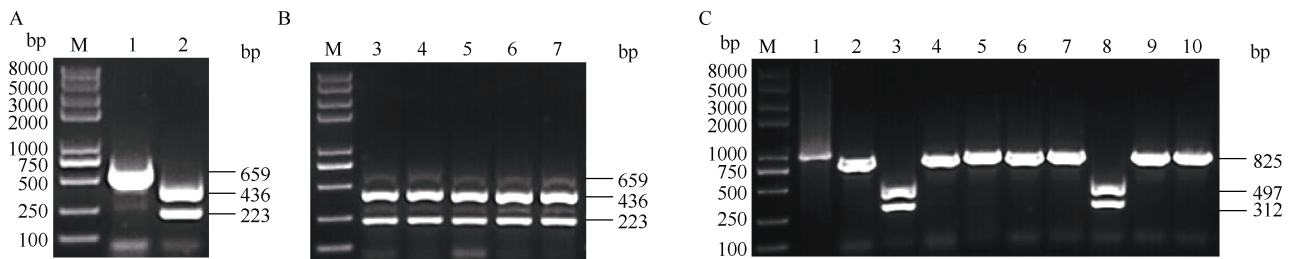


图 5 *GhU6-5P-2::AE-sgRNA-CLCrVA* 部分编辑效应测序检测结果

Fig. 5 *GhU6-5P-2::AE-sgRNA-CLCrVA* partial editing effect sequencing results

A: M: 2K plus II DNA marker; 1, 2 分别为对照载体基因组 PCR 扩增产物酶切前后结果。B: M: 2K plus II DNA marker; 3~7 为转化 *GhU6-5P-2::AE-sgRNA-CLCrVA* 单株样品基因组 PCR 扩增产物酶切后结果。C: M: 2K plus II DNA marker; 1~10 为单克隆菌液 PCR 产物酶切后结果。PCR/RE 表示 PCR 扩增产物酶切分析。

A: M: 2K plus II DNA marker; 1, 2: PCR/RE assay of negative control genome before and after the enzyme digestion. B: M: 2K plus II DNA marker; 3~7: PCR/RE assay of *GhU6-5P-2::AE-sgRNA-CLCrVA* genome of single plant sample after enzyme digestion. C: M: 2K plus II DNA marker; 1~10: clony PCR product after enzyme digestion. PCR/RE indicates PCR/restriction enzyme assays.

Cas9 转基因阳性植株作为对照。对以上转化获得的棉花叶片基因组 DNA 进行先 PCR 扩增后酶切的处理, 对于 *GhPDS* 基因, 转化空载体, 得到了 1 条完整的条带(486 bp), 用 *Bfa* I 消化扩增产物产生了 340 bp 和 146 bp 的 2 个片段(图 6-A), 转化 *GhU6-5P-2::PDS-sgRNA-CICrVA* 病毒载体的样品中有完整的未被切开的条带(图 6-B)。对于 *GhCLAI* 基因, 转化空载体得到了 1 条完整的条带(621 bp), 用 *Bcl* I 消化扩增产物产生 417 bp 和 204 bp 的 2 个片段(图 7-A), 转化 *GhU6-5P-2::CLAI-sgRNA-CICrVA* 病毒载体的样品中有完整的未被切开的条带(图 7-B)。表明转化 *GhU6-5P-2::PDS-sgRNA-CICrVA* 和 *GhU6-5P-2::CLAI-sgRNA-CICrVA* 病毒载体的叶片内发生了基因编辑事件, 目标基因靶序列酶切位点处出现突变, 导致限制性内切酶不能切割 PCR 的产物, 琼脂糖凝胶电泳显示 3 条带。转化 *GhU6-5P-2::PDS-sgRNA-CICrVA* 载体的 486 bp 条带较亮(图 6-B), 表明 *GhU6-5P-2::*

*PDS-sgRNA* 编辑效率较高, 而转化 *GhU6-5P-2::CLAI-sgRNA-CICrVA* 载体的 621 bp 条带较弱(图 7-B), 表明 *CLAI-sgRNA* 在基因编辑事件中可以工作但效率可能较低。混合回收转化 *GhU6-5P-2::PDS-sgRNA-CICrVA* 和 *GhU6-5P-2::CLAI-sgRNA-CICrVA* 载体的样品残留的 486 bp 和 621 bp 条带并克隆测序发现, 在 *GhPDS* 和 *GhCLAI* 靶位点处位于 PAM 位点上游限制性内切酶位点区域的碱基组成 AD 组均出现不同类型的突变, 其中包括碱基替换、碱基插入和碱基缺失现象(图 6-C, D; 图 7-C, D), 结果表明该策略有效并且可以在非注射部位检测到突变。采用带有 sgRNA 的 Cas9 载体和 p1300 载体的 *GhAE-sgRNA* 在 Cas9 载体和 p1300 载体中未能检测到突变, 而采用带有 sgRNA 的 pCLCrV 载体的策略在非注射的叶片中也能高效检测到该 sgRNA 发生了基因编辑的事件, 说明该策略更为高效和准确。表明用病毒载体投送 sgRNA 可以更加稳定、可靠地鉴定 sgRNA 的有效性。

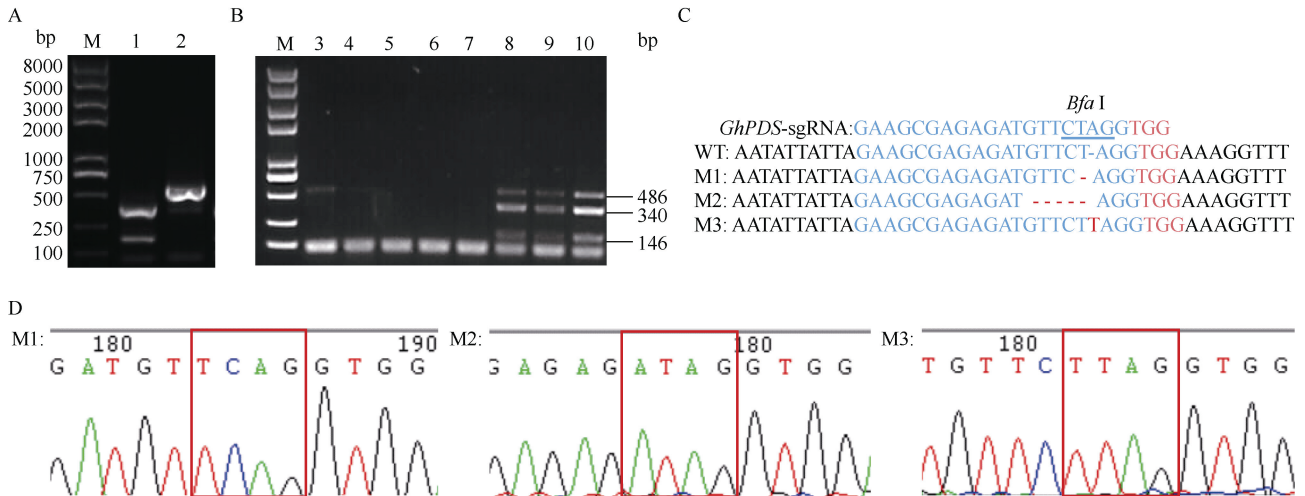


图 6 *GhU6-5P-2::PDS*-sgRNA-CLCrVA 部分编辑效应测序检测结果

Fig. 6 Results of *GhU6-5P-2::PDS*-sgRNA-CLCrVA partial editing effect sequencing

A: M: 2K plus II DNA marker; 1, 2 分别为对照载体基因组 PCR 扩增产物酶切后和酶切前结果。B: M: 2K plus II DNA marker; 3~5 为转化 *GhU6-5P-2::PDS*-sgRNA-CLCrVA 单株样品基因组 PCR 扩增产物酶切后结果。C: *GhPDS*-sgRNA 靶序列及突变 PCR 产物的测序。M1、M2 发生在 A 亚组的 *GhPDS*, M3 发生在 D 亚组的 *GhPDS*。D: 突变 PCR 产物的测序峰图, 红色方框指示碱基相比对照发生突变区域。PCR/RE 表示 PCR 扩增产物酶切分析。

A: M: 2K plus II DNA marker; 1, 2: PCR/RE assay of negative control genome after and before the enzyme digestion. B: M: 2K plus II DNA marker; 3~5: PCR/RE assay of *GhU6-5P-2::PDS*-sgRNA-CLCrVA of single plant sample genome after enzyme digestion. C: sequencing of *GhPDS*-sgRNA target sequence and mutant PCR products. M1, M2 occurred at *GhPDS* from A subgenome; M3 occurred at *GhPDS* from D subgenome. D: sequencing peak diagram of the mutant PCR product; the red box indicates that the base has a mutation region compared to the control. PCR/RE indicates PCR/restriction enzyme assays.

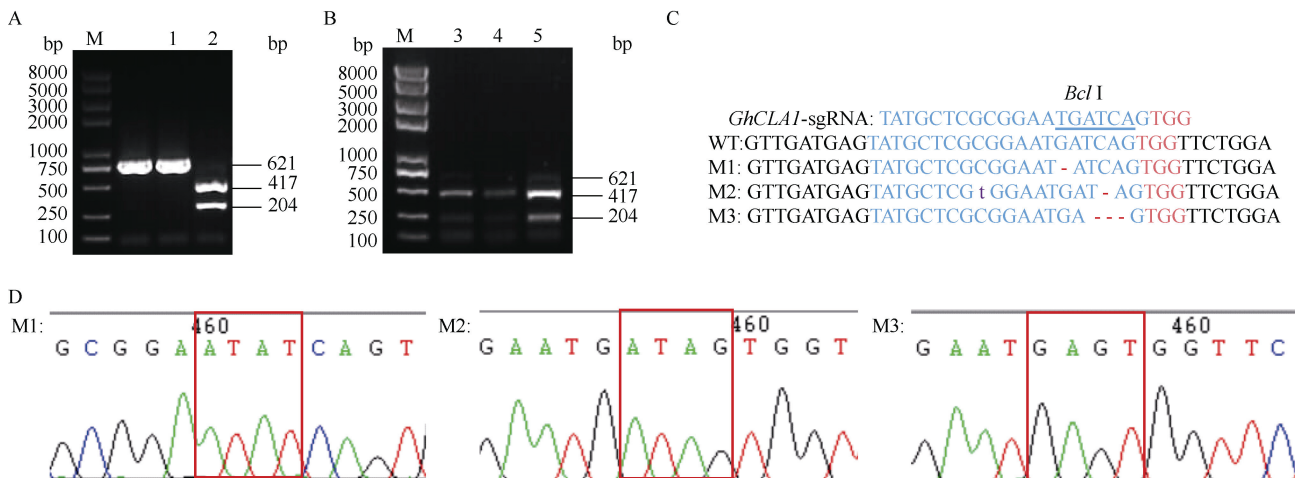


图 7 *GhU6-5P-2::CLA1*-sgRNA-CLCrVA 部分编辑效应测序检测结果

Fig. 7 Results of *GhU6-5P-2::CLA1*-sgRNA-CLCrVA partial editing effect sequencing

A: M: 2K plus II DNA marker; 1, 2 分别为对照载体基因组 PCR 扩增产物酶切前后结果。B: M: 2K plus II DNA marker; 3~5 为转化 *GhU6-5P-2::CLA1*-sgRNA-CLCrVA 单株样品基因组 PCR 扩增产物酶切后结果。C: *GhCLA1*-sgRNA 靶序列及突变 PCR 产物的测序。M1、M3 发生在 D 亚组的 *GhCLA1*, M2 发生在 A 亚组的 *GhCLA1*。D: 突变 PCR 产物的测序峰图, 红色方框指示碱基相比对照发生突变区域。PCR/RE 表示 PCR 扩增产物酶切分析。

A: M: 2K plus II DNA marker; 1, 2: PCR/RE assay of negative control genome before and after the enzyme digestion. B: M: 2K plus II DNA marker; 3~5: PCR/RE assay of *GhU6-5P-2::CLA1*-sgRNA-CLCrVA genome of single plant sample after enzyme digestion. C: sequencing of *GhCLA1*-sgRNA target sequence and mutant PCR products. M1, M3 occurred at *GhCLA1* from D subgenome; M2 occurred at *GhCLA1* from A subgenome. D: sequencing peak diagram of the mutant PCR product; the red box indicates that the base has a mutation region compared to the control. PCR/RE indicates PCR/restriction enzyme assays.

在设计靶序列前为了避免植株个体差异和排除 PCR 扩增导致上述的碱基突变, 我们在 YZ-1 野生

型植株对 *GhMAPKKK2*、*GhCBP*、*GhAE*、*GhPDS*、*GhCLA1* 基因进行同样的 PCR 扩增, 并对其扩增产



物进行克隆测序。在 20 个阳性克隆测序结果中, 靶序列区域碱基组成无任何变化(结果略)。表明靶序列区碱基的突变确实是 CRISPR/Cas9 系统基因编辑的结果。

### 3 讨论

#### 3.1 棉花 sgRNA 有效性的验证体系的研究现状

CRISPR/Cas9 介导的基因组编辑技术在植物中研究已逐渐趋于成熟, 目前棉花的 CRISPR/Cas9 基因组编辑载体在陆地棉中的稳定转化过程存在体细胞胚胎发生困难、效率低、转化周期长等问题。由于 sgRNA 时常存在无效或者低效的现象因此在正式进行 CRISPR/Cas9 基因组编辑载体转化棉花前, 采用瞬时转化法来快速验证设计的 sgRNA 的有效性就显得尤为重要。早期对 sgRNA 有效性的验证采用的是把完整的 CRISPR/Cas9 基因组编辑载体瞬时转化原生质体或者叶片中<sup>[23-24]</sup>。原生质体转化法, 转化效率较高, 但实验过程费时费力费钱, 对试验操作者的试验技能要求较高, 尤其是对于原生质体制备效率比较低的棉花等材料来说更是如此<sup>[34-35]</sup>。农杆菌介导的注射叶片法, 操作简单, 省时、省力和省钱, 但转化效率低, 很难准确验证 sgRNA 的有效性。本研究在前期实验的基础上, 先进行了原生质体转化, 尝试以陆地棉多种组织作为供试材料, 虽获得符合要求的原生质体, 但所有 sgRNA 并未检测到突变。后尝试农杆菌注射法, 将完整的带 sgRNA 和 Cas9 的载体转化农杆菌注射棉花叶片, 依然是大多数 sgRNA 没有检测到基因编辑事件。

#### 3.2 有效 sgRNA 高效验证体系的优化

采用传统方法验证 sgRNA 的有效性成功率较低, 不能有效检测到基因编辑事件, 但不能由此判定 sgRNA 是无效的或者是低效的, 未检测到突变可能的另外一个原因是完整编辑载体的瞬时转化效率低。而这个原因与 Cas9 基因太大(大于 4000 bp)密切相关。Cas9 基因作为 CRISPR/Cas9 基因组编辑体系的重要组成部分, 由于其基因片段很大, 会导致 DNA 转化效率低, 同时即使转入棉花细胞, 可能也会因为基因巨大, 进而导致瞬时表达量过低, 也会导致编辑效率低下。因此 Cas9 基因是解决上述问题的核心关键。基于 CRISPR/Cas9 基因组编辑系统的原理: 无论靶向编辑哪个基因, Cas9 基因都是不用更换的。因此我们选择采用先得到 Cas9 转基因阳性植株,

然后以此为受体材料再转化编码 sgRNA 载体的策略。该策略的优势在于测试的受体材料已经稳定表达了 Cas9 蛋白, 所需转化的载体无需 Cas9 基因, 只需构建编码 sgRNA 的投送载体即可。不仅载体小, 而且构建载体更快捷, 更省时更省事。

本研究采用了 2 种投送 sgRNA 的策略发现, 对于 *GhMAPKKK2*, 用带有 sgRNA 的 p1300 载体转化 Cas9 转基因阳性植株可以高效检测到突变, 而对应完整的 CRISPR/Cas9 基因组编辑载体转化的野生型植株没有检测到; 对于 *GhAE* 基因的 sgRNA, 即使单独转化 sgRNA 的策略也未能检测到编辑事件。但采用病毒载体投送 *GhAE* 基因的 sgRNA, 可以检测到基因突变, 只是基因编辑的效率较低, 是一个不建议优先使用的 sgRNA。试验结果显示与转化完整基因组编辑载体的对照相比, 采用的 2 种投送 sgRNA 的策略都能有效提高基因编辑的检出率。这 2 个策略都能有效消除 DNA 转化效率低的原因, 能更准确地完成对 sgRNA 有效性的验证。相比较第 1 种策略, 本研究的第 2 种策略是用病毒载体去投送 sgRNA。pCLCrV 载体是病毒的侵染性克隆载体<sup>[31]</sup>, 转化农杆菌, 注射棉花叶片后, 编码 sgRNA 的基因可以伴随病毒在棉花叶片中大量扩散, 大量累积, 且可以随着棉花生长扩散到新的组织中, 因此该策略可以在非注射的叶片中也能高效检测到基因编辑的事件。本研究结果显示, *GhU6-5P-2::AE-sgRNA-ClCrVA* 病毒载体的样品能检测到基因编辑事件, 而转化 *GhU6-5P-2::AE-sgRNA-1300* 编辑载体的样品中未检测到基因突变, 表明病毒载体投送 sgRNA 的策略可以更准确的验证 sgRNA 的有效性。

### 4 结论

采用带有 sgRNA 的 pCLCrV 载体和 p1300 载体转化 Cas9 转基因阳性棉花的 CRISPR/Cas9 基因组编辑技术体系的策略, 可以有效消除转化效率低的因素, 从而高效检测到内源基因的突变, 带有 sgRNA 的 pCLCrV 载体的策略在非注射的叶片中也能高效检测到基因编辑的事件, 且更为高效和准确。证明了该策略在棉花中用于筛选有效 sgRNA 的快速和高效性, 为棉花功能基因组学研究提供了重要的技术基础。证明了该策略在棉花中用于筛选有效 sgRNA 的快速和高效性, 为棉花功能基因组学研究提供了重要的技术基础。

## References

- [1] 许宗弘. 棉花枯萎病研究现状及展望. 知识经济, 2010, 16: 132.  
Xu Z H. Research status and prospect of cotton *Fusarium* Wilt. *Knowledge Econ*, 2010, 16: 132 (in Chinese with English abstract).
- [2] 任爱霞. 棉花枯萎病抗性遗传及生化机理研究. 浙江大学硕士学位论文, 浙江杭州, 2002.  
Ren A X. Study on Inheritance and Biochemical Mechanism of Cotton *Fusarium* Wilt Resistance. MS Thesis of Zhejiang University, Hangzhou, Zhejiang, China, 2002 (in Chinese with English abstract).
- [3] 徐立华. 我国棉花高产、高效栽培技术研究现状与发展思路. 中国棉花, 2001, (3): 5–8.  
Xu L H. Research status and development ideas of cotton high-yield and high-efficiency cultivation technology in my country. *China Cotton*, 2001, (3): 5–8 (in Chinese with English abstract).
- [4] 孙学振, 施培, 周治国. 我国棉花高产栽培技术理论研究与展望. 中国棉花, 1999, (4): 2–7.  
Sun X Z, Shi P, Zhou Z G. Current status and prospects of the theoretical research on cotton high-yield cultivation techniques in my country. *China Cotton*, 1999, (4): 2–7 (in Chinese with English abstract).
- [5] Sun Y, Li J, Xia L. Precise genome modification via sequence specific nucleases-mediated gene targeting for crop improvement. *Front Plant Sci*, 2016, 7: 1928.
- [6] 刘蓓, 尉玮, 王丽华. 基因编辑新技术研究进展. 亚热带农业研究, 2013, 9(4): 262–269.  
Liu B, Wei W, Wang L H. Research progress of new technology of gene editing. *Subtrop Agric Res*, 2013, 9(4): 262–269 (in Chinese with English abstract).
- [7] Cao H X, Wang W, Le H T, Vu G T. The power of CRISPR-Cas9-induced genome editing to speed up plant breeding. *Int J Genomics*, 2016, 2016: 5078796.
- [8] Gilbert L A, Larson M H, Morsut L, Liu Z, Brar G A, Torres S E, Stern-Ginossar N, Brandman O, Whitehead E H, Doudna J A, Lim W A, Weissman J S, Qi L S. CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes. *Cell*, 2013, 154: 442–451.
- [9] Hsu P D, Lander E S, Zhang F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell*, 2014, 157: 1262–1278.
- [10] Bassett A R, Tibbit C, Ponting C P, Liu J L. Highly efficient targeted mutagenesis of drosophila with the CRISPR/Cas9 system. *Cell Rep*, 2014, 6: 1178–1179.
- [11] Barrangou R, Marraffini L A. CRISPR-Cas systems: prokaryotes upgrade to adaptive immunity. *Mol Cell*, 2014, 54: 234–244.
- [12] Mao Y F, Zhang Z J, Feng Z Y, Wei P L, Zhang H, Botella J R, Zhu J K. Development of germline specific CRISPR/Cas9 systems to improve the production of heritable gene modifications in *Arabidopsis*. *Plant Biotechnol J*, 2016, 14: 519–532.
- [13] Kim H, Kim S T, Ryu J, Choi M K, Kweon J, Kang B C, Ahn H M, Bae S, Kim J, Kim J S, Kim S G. A simple, flexible and high-throughput cloning system for plant genome editing via CRISPR/Cas system. *J Integr Plant Biol*, 2016, 58: 705–712.
- [14] Gao S L, Tong Y Y, Wen Z Q, Zhu L, Ge M, Chen D J, Jiang Y, Yang S. Multiplex gene editing of the *Yarrowia lipolytica* genome using the CRISPR/Cas9 system. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2016, 43: 1085–1093.
- [15] Zhang F, Maeder M L, Unger-Wallace E, Hoshaw J P, Reyon D, Christian M, Li X H, Pierick C J, Dobbs D, Peterson T, Joung J K, Voytas D F. High frequency targeted mutagenesis in *Arabidopsis thaliana* using zinc finger nucleases. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107: 12028–12033.
- [16] Shukla V K, Doyon Y, Miller J C, DeKaveler R C, Moehle E A, Worden S E, Mitchell J C, Arnold N L, Gopalan S, Meng X D, Choi V M, Rock J M, Wu Y Y, Katibah G E, Gao Z F, McCaskill D, Simpson M A, Blakeslee B, Greenwalt S A, Butler H J, Hinkley S J, Zhang L, Rebar E J, Gregory P D, Urnov F D. Precise genome modification in the crop species *Zea mays* using zinc-finger nucleases. *Nature*, 2009, 459: 437–441.
- [17] Townsend J A, Wright D A, Winfrey R J, Fu F L, Maeder M L, Joung J K, Voytas D F. High-frequency modification of plant genes using engineered zinc-finger nucleases. *Nature*, 2009, 459: 442–445.
- [18] 谢小东, 高军平, 李泽锋, 张剑锋, 魏攀, 罗朝鹏, 王晨, 武明珠, 翟娟, 杨军. CRISPR/Cas9 介导烟草多基因编辑体系的应用. 中国烟草学报, 2019, 25(4): 72–80.  
Xie X D, Gao J P, Li Z F, Zhang J F, Wei P, Luo Z P, Wang C, Wu M Z, Zhai N, Yang J. Application of CRISPR/Cas9 mediated tobacco multi-gene editing system. *Acta Tab Sin*, 2019, 25(4): 72–80 (in Chinese with English abstract).
- [19] 王海明, 张立强, 李娜, 刘建丰, 马崇烈. 利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术敲除水稻 NRR 基因促进根系生长的研究. 杂交水稻, 2019, 34(5): 39–45.  
Wang H M, Zhang L Q, Li N, Liu J F, Ma C L. Using CRISPR/Cas9 gene editing technology to knock out rice NRR gene to promote root growth. *Hybrid Rice*, 2019, 34(5): 39–45 (in Chinese with English abstract).
- [20] 陈修贵. CRISPR/Cas9 系统介导的棉花 *GhCLA1* 和 *GhVP* 基因编辑的研究. 华中农业大学博士学位论文, 湖北武汉, 2017.  
Chen X G. Study on Cotton *GhCLA1* and *GhVP* Gene Editing Mediated by CRISPR/Cas9 System. PhD Dissertation of Huazhong Agricultural University, Wuhan, Hubei, China, 2017 (in Chinese with English abstract).
- [21] 王艳玲, 孟志刚, 李妍妍, 孟钊红, 王远, 孙国清, 朱涛, 梁成真, 蔡永萍, 郭三堆, 张锐, 林毅. CRISPR/Cas9 编辑棉花精氨酸酶基因促进侧根形成和发育. 中国科学: 生命科学, 2017, 47: 1200–1203.  
Wang Y L, Meng Z G, Li Y Y, Meng Z H, Wang Y, Sun G Q, Zhu T, Liang C Z, Cai Y P, Guo S D, Zhang R, Lin Y. CRISPR/Cas9 editing cotton arginase gene promotes lateral root formation and development. *Sci Sin (Vitae)*, 2017, 47: 1200–1203 (in Chinese with English abstract).
- [22] Farboud B, Meyer B J. Dramatic enhancement of genome editing by CRISPR/Cas9 through improved guide RNA design. *Genetics*, 2015, 199: 959–971.
- [23] Chen X G, Lu X K, Shu N, Wang S, Wang J J, Wang D L, Guo L X, Ye W W. Targeted mutagenesis in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) using the CRISPR/Cas9 system. *Sci Rep*, 2017, 7: 44304.

- [24] Gao W, Long L, Tian X Q, Xu F C, Liu J, Prashant K S, Jose R B, Song C P. Genome editing in cotton with the CRISPR/Cas9 system. *Front Plant Sci*, 2017, 8: 1364.
- [25] Hu J C, Li S, Li Z L, Li H Y, Song W B, Zhao H M, Lai J S, Xia L Q, Li D W, Zhang Y L. A barley stripe mosaic virus-based guide RNA delivery system for targeted mutagenesis in wheat and maize. *Mol Plant Pathol*, 2019, 20: 1463–1474.
- [26] Yin K Q, Han T, Liu G, Chen T Y, Wang Y, Yu A Y L, Liu Y L. A geminivirus-based guide RNA delivery system for CRISPR/Cas9 mediated plant genome editing. *Sci Rep*, 2015, 5: 14926.
- [27] Ali Z, Abul-Faraj A, Li L X, Ghosh N, Piatek M, Mahjoub A, Aouida M, Piatek A, Baltes N J, Voytas D F, Dinesh-Kumar S, Mahfouz M M. Efficient virus-mediated genome editing in plants using the CRISPR/Cas9 system. *Mol Plant*, 2015, 8: 1288–1291.
- [28] Ali Z, Eid A, Ali S, Mahfouz M M. Pea early-browning virus-mediated genome editing via the CRISPR/Cas9 system in *Nicotiana benthamiana* and *Arabidopsis*. *Virus Res*, 2018, 244: 333–337.
- [29] Cody W B, Scholthof H B, Mirkov T E. Multiplexed gene editing and protein overexpression using a *Tobacco mosaic virus* viral vector. *Plant Physiol*, 2017, 175: 23–35.
- [30] Jiang N, Zhang C, Liu J Y, Guo Z H, Zhang Z Y, Han C G, Wang Y. Development of Beet necrotic yellow vein virus-based vectors for multiple-gene expression and guide RNA delivery in plant genome editing. *Plant Biotechnol J*, 2019, 17: 1302–1315.
- [31] Gu Z H, Huang C J, Li F F, Zhou X P. A versatile system for functional analysis of genes and microRNAs in cotton. *Plant Biotechnol J*, 2014, 12: 638–649.
- [32] 雷建峰, 伍娟, 陈晓俊, 於添平, 倪志勇, 李月, 张巨松, 刘晓东. 棉花花粉中高效转录 U6 启动子的克隆及功能分析. *中国农业科学*, 2015, 48: 3794–3802.
- Lei J F, Wu J, Chen X J, Yu T P, Ni Z Y, Li Y, Zhang J S, Liu X D. Cloning and functional analysis of the highly efficient transcription U6 promoter in cotton pollen. *Sci Agric Sin*, 2015, 48: 3794–3802 (in Chinese with English abstract).
- [33] Zhu S H, Yu X L, Li Y J, Sun Y Q, Zhu Q H, Sun J. Highly efficient targeted gene editing in upland cotton using the CRISPR/Cas9 system. *Int J Mol Sci*, 2018, 19: 3000.
- [34] Gao W, Long L, Tian X Q, Xu F C, Liu J, Prashant K S, Jose R B, Song C P. Genome editing in cotton with the CRISPR/Cas9 system. *Front Plant Sci*, 2017, 8: 1364.
- [35] 李妮娜, 丁林云, 张志远, 郭旺珍. 棉花叶肉原生质体分离及目标基因瞬时表达体系的建立. *作物学报*, 2014, 40: 231–239.
- Li N N, Ding L Y, Zhang Z Y, Guo W Z. Isolation of mesophyll protoplast and establishment of gene transient expression system in cotton. *Acta Agron Sin*, 2014, 40: 231–239 (in Chinese with English abstract).