

利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术创建水稻 *OsPUX2* 突变体高上¹, 满森森¹, 赵华², 张丽娜¹, 王加峰^{1*}

(1. 华南农业大学国家植物航天育种工程技术研究中心, 广东广州 510642; 2. 广州国家现代农业产业科技创新中心, 广东广州 510520)

摘要 [目的] U-box 蛋白是一类决定靶蛋白特异性的 E3 泛素连接酶(少部分属于泛素链聚集因子-E4), 在植物抗病、抗逆和生长发育各阶段都发挥着重要作用。为揭示 U-box 蛋白家族基因 *OsPUX2* 在水稻防御反应中的具体生物学功能, 利用 CRISPR/Cas9 编辑技术对 *OsPUX2* 基因进行编辑。[方法] 在 *OsPUX2* 第 1 个外显子设计 1 个 20 bp 的编辑靶点, 构建了 *OsPUX2* 基因敲除载体 pRGE32-*OsPUX2*-gRNA 载体, 并通过农杆菌介导的转化方法侵染水稻 Pik-H4 NIL 愈伤组织, 经潮霉素检测获得转基因阳性植株, 并对 T₀ 代转基因植株进行靶点区域序列进行 PCR 和测序分析, 分析 *ospux2* 的突变类型。[结果] 成功获得了 *ospux2* 的敲除突变体材料, 对突变类型的分析发现, 转基因编辑后代共存在 7 种突变类型, 以缺失突变为主, 其中一种纯合突变类型在 *OsPUX2* 第一个外显子的第 115 号碱基处缺失了一个 C 碱基, 导致蛋白的翻译在第 84 个氨基酸处提前终止。[结论] 该研究获得 *ospux2* 突变株系对进一步研究该基因的功能具有重要意义。

关键词 水稻; U-box; *OsPUX2*; CRISPR/Cas9; 基因编辑

中图分类号 S511 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2023)09-0073-04

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2023.09.018



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

CRISPR/Cas9 Targeted Editing of *OsPUX2* in RiceGAO Shang¹, MAN Miao-miao¹, ZHAO Hua² et al (1. National Engineering Research Center of Plant Space Breeding, South China Agricultural University, Guangzhou, Guangdong 510642; 2. National S&T Innovation Center for Modern Agricultural Industry, Guangzhou, Guangdong 510520)

Abstract [Objective] U-box proteins are a class of E3 ubiquitin ligases that determine the specificity of target proteins, play an important role in plant disease resistance, stress resistance and all stages of growth and development. In order to reveal the specific biological function of the U-box protein family gene *OsPUX2* in rice defense response, the *OsPUX2* gene was edited by CRISPR/Cas9 editing technology. [Method] A 20-bp editing target was designed in the first exon of *OsPUX2* and the pRGE32-*OsPUX2*-gRNA vector was constructed. Rice Pik-H4 NIL callus was infected by Agrobacterium-mediated transformation and tested with hygromycin. The T₀ generation transgenic plants were subjected to PCR and sequencing analysis of the target region sequence to analyze the mutation type of *ospux2*. [Result] The knockout mutant of *ospux2* was successfully obtained. There were a total of 7 mutation types in the transgenic edited progeny, which are mainly deletion mutations. One of the homozygous mutation types with a C base deletion at the +115 bp of the first exon of *OsPUX2* gene leads to termination of protein translation at 84 aa. [Conclusion] The *ospux2* mutant strain obtained in this study is of great significance to further study the function of this gene.

Key words Rice; U-box; *OsPUX2*; CRISPR/Cas9; Gene editing

泛素-蛋白酶体系统是细胞内蛋白质降解的重要途径之一, 参与生物体内绝大多数的生理活动, 通过降解靶蛋白水平调控植物的生长发育过程及其对生物胁迫和非生物胁迫的响应^[1-2]。泛素-蛋白酶体降解途径由泛素活化酶 E1、泛素结合酶 E2、泛素连接酶 E3 及 26S 蛋白酶体组成, 其中 E1 负责激活泛素, E2 直接将泛素转移到底物蛋白质, 或者同泛素一起转移给 E3 连接酶, 形成被蛋白酶体识别的底物后被降解^[3]。泛素分子对靶蛋白的特异性识别主要依赖于 E3 泛素连接酶, E3 是一个大的、多样化的蛋白群, 根据基序的不同, 可分为 4 类: HECT 结构域、U-box 结构域、RING-finger 结构域、Cullin-RING 结构域^[4-5]。其中 U-box 蛋白质广泛存在于酵母到人类的大量真核生物中^[6]。据报道, 植物中 U-box 蛋白质在抵抗生物胁迫与非生物胁迫过程中发挥重要作用^[3], 迄今为止, 大部分水稻 U-box 蛋白质的功能及其作用机制尚不清楚, 通过利用基因编辑技术对靶基因 *OsPUX2* 进行定点编辑, 为解析该类蛋白质在植物抗病抗逆

方面的功能具有重要意义。

目前已经有大量 U-box 蛋白质参与抗病抗逆过程的报道, 如在植物抗病反应中起负调控作用的 *AtSPL11*、*AtPUB12*/*AtPUB13*^[7-9] 及在植物抗病中发挥着正调控作用的 *CMGP1*、*AtPUB17* 等^[10-11]。水稻 *OsPUB44* 正调控水稻 PTI 及其对白叶枯病的抗性^[12]。*AtPUB22* 和 *AtPUB23* 能够协同负调控植物的干旱胁迫反应, 而 *AtPUB30* 蛋白能调控植物耐盐作用^[13]。此外, 水稻 *OsPUB15* 能够降低活性氧暴发, 从而正调控盐胁迫反应^[14]。*AtPUX1* 对于清除无功能的 *AtCDC48* 具有重要作用, 可介导多种细胞活动, 包括内质网和高尔基体膜的同型融合、内质网相关蛋白降解、细胞周期进程和细胞凋亡^[15]。虽然大量 U-box 蛋白参与调控植物各种生理活动被研究报道, 植物许多 U-box 蛋白的功能及其作用机制研究也取得了较大进展, 但仍缺乏系统深入研究。水稻中 *OsPUX2* 与 *AtPUX2* 亲缘关系较近, 但其具体功能尚不清楚。

CRISPR/Cas9 技术作为一种高效的基因编辑工具, 已经被广泛应用于水稻、小麦、玉米、番茄等农作物中, 实现对不同靶基因的定向编辑, 在分子育种方面也显示了巨大的应用潜力^[16-18]。CRISPR/Cas9 介导的基因编辑是由 gRNA 与 Cas9 蛋白组成复合物实现的, gRNA 负责定位与其有互补关系的 DNA 双链, Cas9 核酸酶负责切割 DNA 双链产生双链断

基金项目 2021 年省级乡村振兴战略专项经费(2021KJ382); 农业农村部华南现代生物种业重点实验室(2105-000000-20-03-457451)。

作者简介 高上(1999—), 男, 河南郑州人, 硕士研究生, 研究方向: 水稻抗性。* 通信作者, 副研究员, 博士, 从事水稻病害研究。

收稿日期 2022-06-28

裂(Double strand breaking, DSB),经非同源末端连接修复(non-homologous end-joining, NHEJ)后,产生一系列插入、缺失及碱基替换突变,从而创造出一系列的突变体,以便于进行基因功能的研究。由于CRISPR/Cas9技术操作简单,效率较高,目前已被广泛应用于各类生物基因功能研究中^[19]。笔者利用CRISPR/Cas9基因编辑技术定点编辑水稻*OsPUX2*基因,构建水稻*OsPUX2*的突变体材料,以期后续开展*OsPUX2*参与的具体调控通路的功能解析奠定重要的材料基础。

1 材料与与方法

1.1 试验材料 以粳稻Pik-H4 NIL为受体材料。Cas9-gRNA表达载体pRGE32购自Addgene。大肠杆菌(*Escherichia coli*)DH5 α 、根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)EHA105由本实验室保存。

1.2 靶点的选择及gRNA设计 利用CRISPR/Cas9靶位点在线设计平台(<http://skl.scau.edu.cn/>)^[20]设计*OsPUX2*编辑靶点,查找符合GN19NGG的序列。其中,GN19为20个碱基的靶点序列,NGG(N表示任意碱基)为识别靶序列的原初间隔序列毗邻基序(Protospacer adjacent motif, PAM)。优选靶位点位于编码序列5'端,与潜在靶位点的差异在3个碱基以上,以保证编辑的特异性。选择第1外显子设计1个20bp的编辑靶点,设计2条互补靶点引物*OsPUX2*-E1gRNAF与*OsPUX2*-E1gRNAR,其靶点引物序列分别为TGCAGATGATCCGTGGCAAGATGCCAAGGGGACTCGCCGTTTTAGAGCTAGAAATAG(5'-3')和CTATTTCTAGCTCTAAAACGGCGAGTCCCTTGGCATCTTGCCACGGATCATCTGCA(5'-3')。靶位点的特异性通过水稻全基因组BLAST分析进行比对。

1.3 CRISPR/Cas9表达载体构建 首先将Cas9蛋白表达

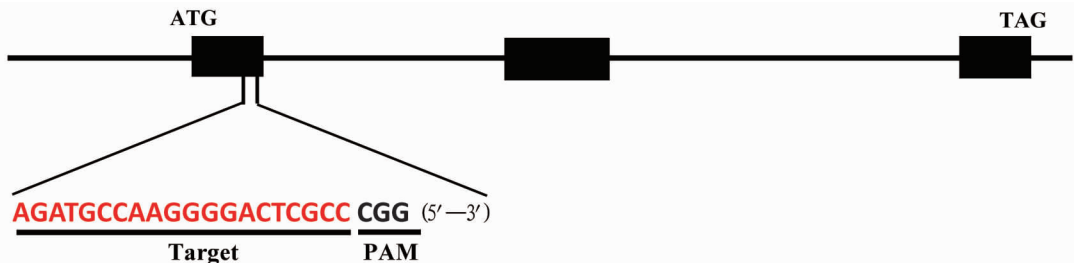


图1 *OsPUX2*基因结构和靶位点位置

Fig. 1 *OsPUX2* gene structure and target site location

2.2 *OsPUX2*基因的CRISPR/Cas9表达载体构建 首先凝胶回收BsaI酶切后的pRGE32载体片段,将2条互补靶点引物*OsPUX2*-E1gRNAF与*OsPUX2*-E1gRNAR退火后直接将其与BsaI酶切后的pRGE32载体片段利用重组酶进行重组连接反应,重组产物热激转化后,挑取单克隆用引物U3gRNA-F、UBI-R进行菌落PCR扩增,得到500bp的目的条带(图2)。对阳性菌落质粒利用U3gRNA-F进行测序,结果表明*OsPUX2*基因的1个靶点序列克隆至pRGE32载体,成功获得pRGE32-*OsPUX2*-gRNA的表达载体,可以进行后续转基因试验。

2.3 *OsPUX2*基因的CRISPR/Cas9转基因植株鉴定 pRGE32-*OsPUX2*-gRNA的表达载体转入农杆菌

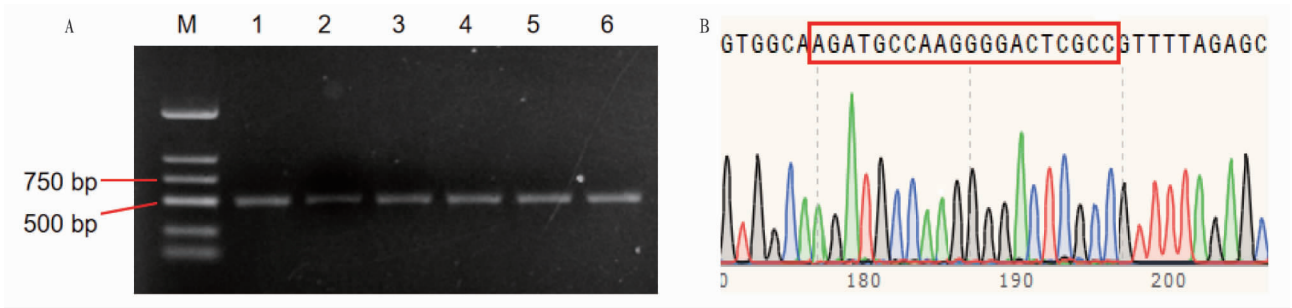
载体pRGE32用BsaI进行单酶切,凝胶回收载体片段,将2条互补靶点引物*OsPUX2*-E1gRNAF与*OsPUX2*-E1gRNAR进行退火反应,将其与凝胶回收的pRGE32载体片段利用重组酶进行重组连接反应(反应体系:4 μ L 5 \times CE II Buffer、2 μ L Exnase II、0.03 pmol pRGE32、0.06 pmol 插入片段,补ddH₂O至20 μ L;37 $^{\circ}$ C 30 min),将连接产物转化大肠杆菌DH5 α 后对靶点序列利用U3gRNA-F与UBI-R(表2)进行菌落PCR鉴定,并进行测序分析,取测序正确的重组质粒转化农杆菌EHA105感受态,并侵染转化Pik-H4 NIL愈伤组织,经潮霉素筛选获得再生T₀代植株。用CTAB法提取植株叶片基因组DNA,利用*OsPUX2*-kotest-F与*OsPUX2*-kotest-R(表2)对靶位点区域DNA片段进行PCR扩增(产物约408bp)鉴定突变类型。引物U3gRNA-F、UBI-R、*OsPUX2*-kotest-F、*OsPUX2*-kotest-R的碱基序列分别为GTTG-GAAACCACGTGATGT(5'-3')、ACTGTAATTTCTTCTGGCTGG(5'-3')、ACAACAGGCAAATCAGGAGC(5'-3')、GGAACGACAAGTACAGGAAGG(5'-3')。

2 结果与分析

2.1 gRNA靶点选择和序列设计 *OsPUX2*含有3个外显子,CDS含有615个碱基,编码205个氨基酸(aa),UBX结构域位于*OsPUX2*的C端区域(121~205aa)。为完全破坏*OsPUX2*基因的功能,利用CRISPR/Cas9靶位点在线设计平台(<http://skl.scau.edu.cn/>)在*OsPUX2*第1个外显子区域选择一个靶点(5'-AGATGCCAAGGGGACTCGCC CGG-3')进行定点编辑,靶位点位于编码区+98到+118处(图1)。将设计的靶位点序列进行BLAST比对分析,证明其具有较好的特异性。

EHA105中,利用农杆菌介导法将表达载体转入水稻材料Pik-H4 NIL愈伤组织中,经过加有潮霉素的培养基筛选后,将阳性愈伤组织转入分化培养基;进一步生根培养得到T₀代*OsPUX2*基因的CRISPR/Cas9转基因植株。最终获得20个潮霉素阳性转基因植株(图3)。

2.4 编辑突变体的突变类型分析 首先利用引物(*OsPUX2*-kotest-F与*OsPUX2*-kotest-R)对潮霉素基因检测为阳性的植株*OsPUX2*编辑靶点区域DNA片段进行扩增。电泳结果表明,所有的CRISPR/Cas9编辑突变体都能扩增出408bp左右的目的条带(图4)。对相应突变体靶位点区域的DNA片段进行测序,并以野生型序列作为参考,对*OsPUX2*转基因株系中各靶位点序列进行比较,并利用解码网站(<http://>

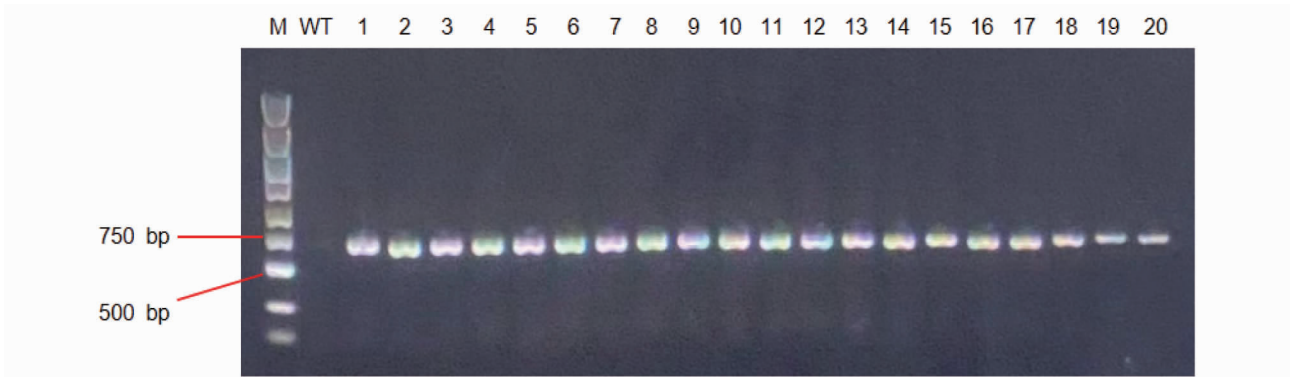


注:A.带有靶点序列的sgRNA载体的菌落PCR鉴定。1.空载体pRGE32;2~6.阳性克隆pRGE32-OsPUX2-gRNA。B.pRGE32-OsPUX2-gRNA表达载体靶点区域的测序结果。

Note:A.Colony PCR identification of sgRNA vectors with target sequences.1.Empty carrier pRGE32;2-6 was the positive clone pRGE32-ospux2-gRNA. B.Sequencing result map of pRGE32-ospux2-GRNA expression vector target region.

图2 *OsPUX2* 基因的 CRISPR/Cas9 表达载体鉴定

Fig.2 Identification of CRISPR/Cas9 expression vector of *OsPUX2* gene

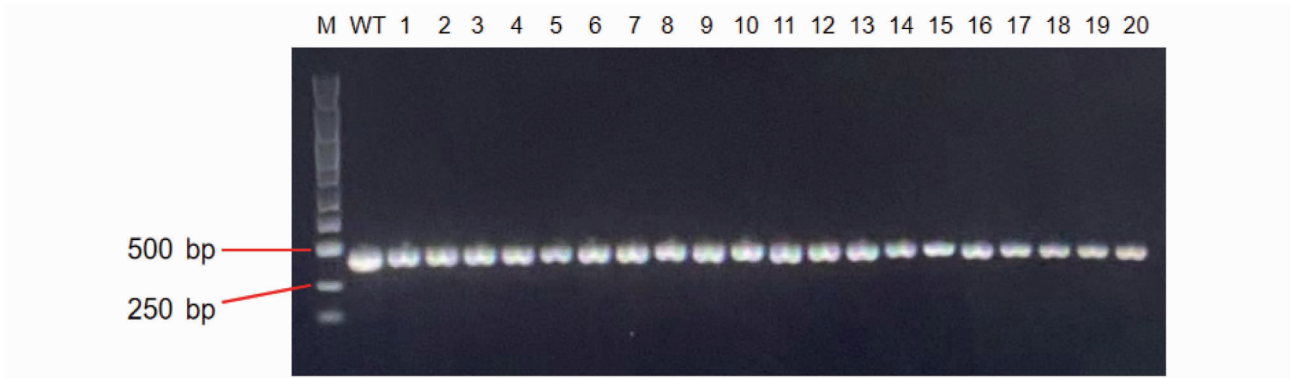


注:M.Marker;WT.野生型Pik-H4 NIL;1~20.T₀代*OsPUX2*基因CRISPR/Cas9转基因植株。

Note:M.Marker;WT.wild-type Pik-H4 NIL;1-20.CRISPR/Cas9 transgenic plants of *OsPUX2* gene of T₀ generation.

图3 转基因植株潮霉素抗性基因PCR鉴定

Fig.3 Identification of hygromycin resistance gene in transgenic plants by PCR



注:M.Marker;WT.野生型Pik-H4 NIL;1~20.T₀代*OsPUX2*基因CRISPR/Cas9转基因植株。

Note:M.Marker;WT.Wild-type Pik-H4 NIL;1-20.CRISPR/Cas9 transgenic plants of *OsPUX2* gene of T₀ generation.

图4 CRISPR/Cas9 突变体靶点区域扩增产物的电泳分析

Fig.4 Electrophoretic analysis of amplified products from CRISPR/Cas9 mutant target region

skl.scau.edu.cn/dsdecode/)对全部转基因植株进行序列分析。结果表明(图5),*ospux2*的突变频率高达85%,共存在7种突变类型,多为剪切位点处产生的碱基缺失突变,分别有-1、-2、-4、-5、-23、-23及-2/+1(缺失/插入)类型,分别占编辑类型总数的51.7%、10.3%、10.3%、13.7%、3.4%、6.9%和3.4%,其中,单碱基缺失占比最高。进一步分析发现,含

有单碱基缺失(CDS中115号碱基C缺失)的突变体有6个转基因株系均为纯合缺失突变(*ospux2-1*、*ospux2-2*、*ospux2-11*、*ospux2-19*、*ospux2-21*和*ospux2-25*),该碱基缺失导致该蛋白的翻译在第84个氨基酸处提前终止。综上所述可以发现,成功实现了对*OsPUX2*基因的定点编辑,并获得了6株含有1个碱基的纯合突变株系,而杂合突变株系需要在T₁、T₂

代继续与测序进行比较分析。

WT	GGCAGATGCCAAGGGGACTCGCCCGGATGGAGTTGGCGAACAGCAGGGG	缺失/插入	次数
1	GGCAGATGCCAAGGGGACT- GCCCGGATGGAGTTGGCGAACAGCAGGGG	-1	15
2	GGCAGATGCCAAGGGGA- ---GCCCGGATGGAGTTGGCGAACAGCAGGGG	-3	3
3	GGCAGATGCCAAGGGG---- GCCCGGATGGAGTTGGCGAACAGCAGGGG	-4	3
4	GGCAGATGCCAAGGG ------GCCCGGATGGAGTTGGCGAACAGCAGGGG	-5	4
5	GGCAGATGCCAAGGGG-----ACAGCAGGGG	-23	1
6	GGCAGATGCCAAGGGGA-----CAGCAGGGG	-23	2
7	GGCAGATGCCAAGGGGA- -CGGCCGGATGGAGTTGGCGAACAGCAGGGG	-2/+1	1

图5 CRISPR/Cas9 编辑突变体靶位点编辑类型

Fig. 5 CRISPR/Cas9 editing mutant target site editing type

3 讨论

CRISPR/Cas9 是一项比 TALEN 和 ZFN 技术优势更强的基因编辑技术,能够精确地对植物基因组的靶标部位进行编辑,具有较高的特异性和编辑效率。CRISPR/Cas9 技术的出现为植物基因工程研究提供了新工具,也极大推动了植物中复杂调控网络的解析与遗传育种研究。

U-box 蛋白质多参与植物的生长发育、生物胁迫与非生物胁迫过程的调控^[9,12-13]。前期研究发现, *OsPUX2* 基因可能参与对稻瘟病抗性的调控,经分析发现, *OsPUX2* 基因与拟南芥的 *AtPUX2* 同源性高,但具体的功能仍不清楚。为进一步研究 *OsPUX2* 基因在抗病途径中的功能,该研究利用单靶点 gRNA 对水稻的 *OsPUX2* 基因进行了定点编辑,获得了一系列不同缺失类型的 *ospux2* 突变体, *ospux2* 的突变频率高达 85%,其中, *ospux2* 单碱基缺失突变类型占 51.7%,该碱基(115 号碱基 C)缺失导致蛋白翻译提前终止,突变株系中有 6 株含有该种类型的纯合突变。其他类型的突变包括多碱基缺失及插入株系都处于杂合状态,需要在 T₁ 代或 T₂ 代予以分离出来,这些类型的突变中除 3 碱基缺失会造成整码突变外,其他多造成蛋白翻译的提前终止。以上功能缺失型突变体的获得为进一步研究 *OsPUX2* 基因的功能提供了重要的遗传材料。

参考文献

- [1] SADANANDOM A, BAILEY M, EWAN R, et al. The ubiquitin-proteasome system: Central modifier of plant signalling[J]. *New Phytol*, 2012, 196(1): 13-28.
- [2] FURNISS J J, GREY H, WANG Z S, et al. Proteasome-associated HECT-type ubiquitin ligase activity is required for plant immunity[J]. *PLoS Pathog*, 2018, 14(11): 1-22.
- [3] STONE S L. The role of ubiquitin and the 26S proteasome in plant abiotic stress signaling[J]. *Front Plant Sci*, 2014, 5: 1-10.
- [4] ARAVIND L, KOONIN E V. The U box is a modified RING finger-a common domain in ubiquitination[J]. *Curr Biol*, 2000, 10(4): R132-R134.
- [5] HATAKEYAMA S, YADA M, MATSUMOTO M, et al. U box proteins as a new family of ubiquitin-protein ligases[J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(35): 33111-33120.
- [6] ZHANG Z Y, LI J H, LIU H H, et al. Roles of ubiquitination-mediated pro-

- tein degradation in plant responses to abiotic stresses[J]. *Environ Exp Bot*, 2015, 114: 92-103.
- [7] SHIRSEKAR G S, VEGA-SANCHEZ M E, BORDEOS A, et al. Identification and characterization of suppressor mutants of spl11-mediated cell death in rice[J]. *Mol Plant Microbe Interact*, 2014, 27(6): 528-536.
- [8] LIU J L, LI W, NING Y S, et al. The U-Box E3 ligase SPL11/PUB13 is a convergence point of defense and flowering signaling in plants[J]. *Plant Physiol*, 2012, 160(1): 28-37.
- [9] LIU J L, PARK C H, HE F, et al. The RhoGAP SPIN6 associates with SPL11 and OsRac1 and negatively regulates programmed cell death and innate immunity in rice[J]. *PLoS Pathog*, 2015, 11(2): 1-23.
- [10] YANG C W, GONZÁLEZ-LAMOTHE R, EWAN R A, et al. The E3 ubiquitin ligase activity of *Arabidopsis* PLANT U-BOX17 and its functional tobacco homolog ACRE276 are required for cell death and defense[J]. *Plant Cell*, 2006, 18(4): 1084-1098.
- [11] GONZÁLEZ-LAMOTHE R, TSITSIGIANNIS D I, LUDWIG A A, et al. The U-box protein CMPG1 is required for efficient activation of defense mechanisms triggered by multiple resistance genes in tobacco and tomato[J]. *Plant Cell*, 2006, 18(4): 1067-1083.
- [12] ISHIKAWA K, YAMAGUCHI K, SAKAMOTO K, et al. Bacterial effector modulation of host E3 ligase activity suppresses PAMP-triggered immunity in rice[J]. *Nat Commun*, 2014, 5: 1-11.
- [13] SEO D H, RYU M Y, JAMMES F, et al. Roles of four *Arabidopsis* U-box E3 ubiquitin ligases in negative regulation of abscisic acid-mediated drought stress responses[J]. *Plant Physiol*, 2012, 160(1): 556-568.
- [14] PARK J J, YI J, YOON J, et al. OsPUB15, an E3 ubiquitin ligase, functions to reduce cellular oxidative stress during seedling establishment[J]. *Plant J*, 2011, 65(2): 194-205.
- [15] PARK S, RANCOUR D M, BEDNAREK S Y. Protein domain-domain interactions and requirements for the negative regulation of *Arabidopsis* CDC48/p97 by the plant ubiquitin regulatory X(UBX) domain-containing protein, PUX1[J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(8): 5217-5224.
- [16] CHILCOAT D, LIU Z B, SANDER J. Use of CRISPR/Cas9 for crop improvement in maize and soybean[J]. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 2017, 149: 27-46.
- [17] CHEN K L, WANG Y P, ZHANG R, et al. CRISPR/Cas genome editing and precision plant breeding in agriculture[J]. *Annu Rev Plant Biol*, 2019, 70: 667-697.
- [18] CAO H X, WANG W Q, LE H T, et al. The power of CRISPR-Cas9-induced genome editing to speed up plant breeding[J]. *Int J Genomics*, 2016, 2016: 1-11.
- [19] 刘耀光, 李构思, 张雅玲, 等. CRISPR/Cas 植物基因组编辑技术研究进展[J]. *华南农业大学学报*, 2019, 40(5): 38-49.
- [20] 曾栋昌, 马兴亮, 谢先荣, 等. 植物 CRISPR/Cas9 多基因编辑载体构建和突变分析的操作方法[J]. *中国科学: 生命科学*, 2018, 48(7): 783-794.