

研究论文

基于CRISPR/Cas9技术的大白菜内源
硫化氢生成酶LCD基因突变体构建马晓丽^{1,2#} 景巧丽^{1#} 裴雁曦^{1*}⁽¹山西大学生命科学学院, 太原 030006; ²晋中学院生物科学与技术学院, 晋中 030600)

摘要 硫化氢(hydrogen sulfide, H₂S)是植物细胞内源信号分子, 对植物的生长、发育和抗逆性具有重要的调节作用。L-半胱氨酸脱巯基酶(L-cysteine desulfhydrase, LCD)是合成内源H₂S的关键酶。大白菜(*Brassica campestris*)是我国北方主要的蔬菜。为研究H₂S信号在大白菜中的生理作用, 并为育种工作提供新材料, 该研究采用CRISPR/Cas9基因编辑技术对白菜LCD基因进行了敲除。利用农杆菌(LBA4404)介导的遗传转化法将基因编辑载体pYAO-LCD成功转化大白菜“中白60”, 获得基因编辑的遗传转化植株4株。DNA测序表明, 基因编辑后植株在靶标位点的碱基发生了相应的基因编辑。基因编辑植株中内源H₂S含量有不同程度的降低。

关键词 大白菜; 硫化氢信号; L-半胱氨酸脱巯基酶; CRISPR/Cas9技术; 遗传转化

Construction of Hydrogen Sulfide Producing Enzyme LCD Mutants in
Chinese Cabbage Based on CRISPR/Cas9 TechnologyMa Xiaoli^{1,2#}, Jing Qiaoli^{1#}, Pei Yanxi^{1*}⁽¹School of Life Science, Shanxi University, Taiyuan 030006, China;²College of Biological Science and Technology, Jinzhong University, Jinzhong 030600, China)

Abstract Hydrogen sulfide (H₂S) is an important gasotransmitter in plant cells and plays an important role in regulating plant growth, development and stress resistance. L-cysteine desulfhydrase (LCD) is the key enzyme to produce endogenous H₂S. Chinese cabbage (*Brassica campestris*) is one of the main vegetable crops in northern China. In order to study the physiological function of H₂S signal in Chinese cabbage and provide new materials for breeding, the CRISPR/Cas9 gene editing technique was used to knock out the LCD gene. Gene editing vector pYAO-LCD was transformed into ‘Zhongbai 60’ by genetic transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens* (LBA4404), and 4 plants of genetic transformation were obtained by gene editing. DNA sequencing showed that the target site was correspondingly edited. The endogenous H₂S content in different editors decreased to varying degrees.

Keywords Chinese cabbage; hydrogen sulfide signal; L-cysteine desulhydrases; CRISPR/Cas9; genetic transformation

收稿日期: 2018-08-10 接受日期: 2018-09-21

国家自然科学基金(批准号: 31372085)资助的课题

#共同第一作者

*通讯作者。Tel: 0351-7010599, E-mail: peiyanxi@sxu.edu.cn

Received: August 10, 2018 Accepted: September 21, 2018

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31372085)

#These authors contributed equally to this work

*Corresponding author. Tel: +86-351-7010599, E-mail: peiyanxi@sxu.edu.cn

网络出版时间: 2018-10-26 11:09:39 URL: http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20181026.1109.010.html

硫化氢(hydrogen sulfide, H_2S)是一种水溶性的小分子气体, 由于它的内源性、细胞膜高通过性和和多方面的生理功能特征, 被确认是继NO和CO之后第三种气体信号分子。

植物中的 H_2S 不仅参与调节整个生长、发育、成熟和衰老的过程, 还可参与应答各种非生物和生物胁迫^[1-4]。L-半胱氨酸脱巯基酶(L-cysteine desulhydrases, LCD)以L-半胱氨酸为底物催化生成内源 H_2S , 是拟南芥中明确的内源 H_2S 生成的主要途径^[5]。另外, 半胱氨酸脱巯基酶DCD1(D-cysteine desulhydrases 1, 编码基因编号At1g48420)和DCD2(D-cysteine desulhydrases 2, 编码基因编号At3g26115)则是以D型半胱氨酸为底物生成 H_2S 。由于细胞中D型半胱氨酸含量微乎其微, 故这两种脱巯基酶的生理作用仍有诸多疑问。因此, LCD被认为是植物细胞质中产生内源 H_2S 的关键酶。

近年来, 作为一种新型基因编辑工具, CRISPR/Cas9技术取得了迅猛发展, 2012年开始在动物研究中得到应用, 目前也已成功应用于多种植物研究^[6]。之前, CRISPR/Cas9在植物中的应用普遍采用CaMV 35S和ubiquitin启动子^[7-8]。但是由于植物的种类不同而编辑效率各有不同。本研究采用在拟南芥中基因编辑效率很高的YAO基因启动子控制的Cas9表达和AtU6-26驱动sgRNA的CRISPR/Cas9编辑载体系统^[9], 以期在同为十字花科植物的大白菜中获得好的基因编辑效率。在大白菜中, 这一技术的应用尚

未见报道。

本实验以大白菜为材料, 采用CRISPR/Cas9技术对内源 H_2S 合成代谢途径关键酶编码基因LCD进行基因编辑并获得突变植株, 研究内源 H_2S 信号的生理功能以及获得大白菜育种的新种质。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验材料 大白菜(*Brassica campestris*)“中白60”由山西省农业科学院蔬菜研究所提供。

1.1.2 质粒 大肠杆菌DH5 α 由本实验室保存; 质粒AtU6-26-sgRNA-SK和pCambia1300-pYAO:Cas9由中国科学院遗传与发育生物学研究所谢旗研究员惠赠, 载体图谱见图1。其中, 图1A中连接入sgRNA片段后成为最终的转化载体, 图1B是sgRNA片段的过渡载体。

1.2 方法

1.2.1 sgRNA的设计和寡核苷酸链的合成 白菜半胱氨酸脱巯基酶编码基因LCD序列来自于中国农业科学院蔬菜花卉研究所的白菜基因组数据库BRAD(<http://brassicadb.org/brad/index.php>), 基因编号为Bra003488。在白菜LCD序列上设计20 bp的Oligo片段: 从起始密码子之后, 寻找Cas9识别的PAM特征区域, 以此为基础向前搜索20 bp, 经过与白菜cDNA基因数据库序列比对确定其特异性, 作为编辑的靶标序列。针对sgRNA识别位点, 我们设

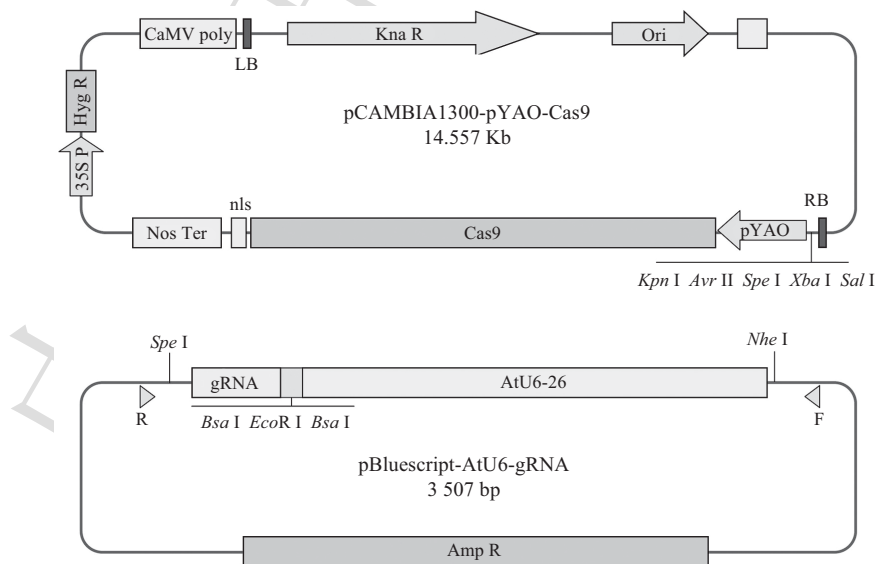


图1 载体AtU6-gRNA和载体pYAO-Cas9

Fig.1 AtU6-gRNA and pYAO-Cas9 vector

计了sgRNA序列引物, PFsg: 5'-ATT GCT TAC GTG TCA CGT GTT GG-3'; PRsg: 5'-AAA CCC AAC ACG TGA CAC GTA AG-3'; 并设计鉴定引物PF: 5'-CTC ACT ATA GGG CGA ATT GG-3', PR: 5'-AAA CCC AAC ACG TGA CAC GTA AG-3'。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.2.2 实验试剂 常规生物化学试剂购于生工生物工程(上海)股份有限公司。DNA限制性内切酶购于NEB公司。T4DNA连接酶购于北京全式金生物技术有限公司。

1.2.3 载体的构建 用TE(pH8.0)将靶点退火引物PFsg和PRsg稀释至1 μ mol/L, 加热沸腾30 s后自然冷却至室温, -20 $^{\circ}$ C保存备用。用限制性内切酶Bsa I线性化AtU6-sgRNA质粒DNA, 切胶回收。将酶切回收产物与靶点退火引物PFsg和PRsg经T4连接酶进行连接。连接产物转化DH5 α 感受态细胞, LB(Amp^r)平板筛选, 挑取单克隆以PF和PR引物进行PCR鉴定。PCR程序如下: 94 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 35个循环。

用限制性内切酶Spe I和Nhe I对测序鉴定正确的质粒进行双酶切, 回收642 bp酶切释放片段(即sgRNA cassette), 与经Spe I酶切线性化的pYAO质粒DNA连接, 转化大肠杆菌DH5 α 感受态细胞。用多克隆位点Sal I和Kpn I对其进行双酶切鉴定, 鉴定正确后, 将重组质粒pYAO-LCD转化农杆菌LBA4404, 并进行菌液PCR鉴定。将鉴定好的菌液保存于-80 $^{\circ}$ C, 用于后续的遗传转化实验。载体构建操作方法按照试剂说明书和实验室已有体系进行^[10]。

1.2.4 大白菜遗传转化和LCD编辑植株的筛选鉴定 本实验以5.0 mg/L和7.5 mg/L潮霉素作为不定根、不定芽筛选浓度, 侵染时间5 min。对带柄子叶外植体侵染后竖直插入到共培养基中培养2天后接种到分化培养基继续培养21天; 将长至2~3 mm的再生芽转至生根培养基, 待再生植株根系发达后, 炼苗移栽。转化过程按照本实验室已经建立的大白菜遗传转化体系进行^[10-11]。

共培养基培养基配方为: MS+3%蔗糖+0.8%琼脂+2 mg/L 6-BA+0.3 mg/L NAA+7 mg/L AgNO₃。分化培养基配方为: MS+3%蔗糖+0.8%琼脂+2 mg/L 6-BA+0.3 mg/L NAA+7 mg/L AgNO₃+7.5 mg/L Hyg+200 mg/L Amp。生根培养基配方为: 1/2 MS+3%蔗糖+0.7%琼脂+0.2 mg/L NAA+5 mg/L Hyg+200 mg/L Amp。

白菜植株内源H₂S含量的测定采用本实验室已有的亚甲基蓝法^[12]测定。

1.3 数据统计

采用SPSS 17.0软件进行数据统计分析。所有数据来自3次独立实验, 用平均值 $\pm$ 标准差(mean $\pm$ S.D.)。用Tukey检测分析样品间的差异显著性, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 重组载体AtU6-26-sgRNA的构建

限制性内切酶Bsa I酶切后载体AtU6-26-sgRNA与靶点退火引物进行连接, 连接产物转化DH5 α 后菌落PCR鉴定, 阳性克隆扩增出499 bp特异性片段(图2A)。对鉴定正确的菌液进行少量提取质粒, 并测序结果正确, 证明重组载体AtU6-26-sgRNA构建成功。

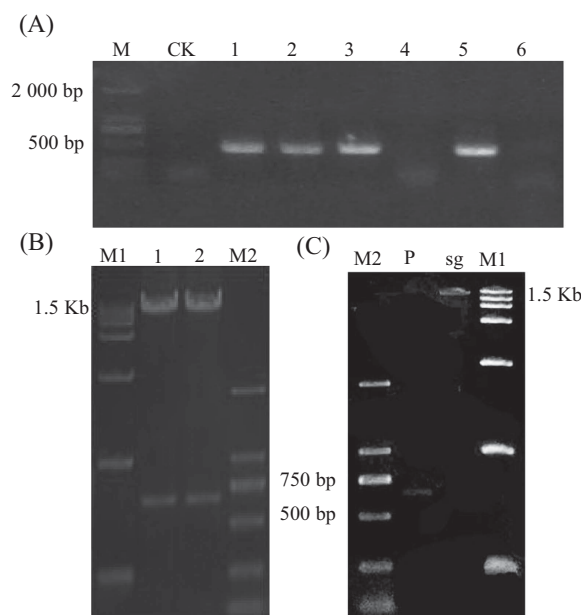
2.2 重组载体pYAO-LCD-SgRNA的构建

回收AtU6-26-sgRNA的Nhe I和Spe I双酶切释放的642 bp片段(sgRNA片段)与pYAO载体的Spe I单酶切产物进行连接(回收片段见图2B), 连接产物转化大肠杆菌DH5 α , 平板筛选后进行菌液PCR鉴定。阳性克隆用Sal I和Kpn I进行双酶切鉴定, 重组质粒释放出670 bp的DNA片段(图2C)。

2.3 LCD编辑突变植株的获得和检测

取生长5天的带柄子叶为外植体材料, 在 $D_{600}=0.2$ 的农杆菌液中匀速震荡5 min, 取出后用无菌滤纸吸干外植体表面的菌液, 接种于共培养基上(图3A)。2天后转移到分化培养基上培养21天, 然后将长到2~3 cm的芽体(图3B)转接于生根培养基中。待发芽后将已长有健壮根(图3C)的再生植株于三角瓶中炼苗7天左右, 然后移至装有已灭菌基质的培养钵中, 用塑料膜覆盖3天左右后揭膜正常光照培养。

对带柄子叶外植体40个(中间有少量污染去除)进行基因转化, 共获得8株潮霉素抗性植株。经PCR鉴定, 引物为F: 5'-CTC ACT ATA GGG CGA ATT GG-3', R: 5'-AAA CCC AAC ACG TGA CAC GTA AG-3'。编号#2、#4、#7、#8转化植株PCR产物中出现750 bp大小的条带, 转化率为13.3%, 结果如图4B。为进一步确认转化植株的突变位点的序列编辑情况, 将上述PCR回收产物送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序。测序结果显示, 与CK组植株相比, 抗性植株#2、#4、#7、#8基因组

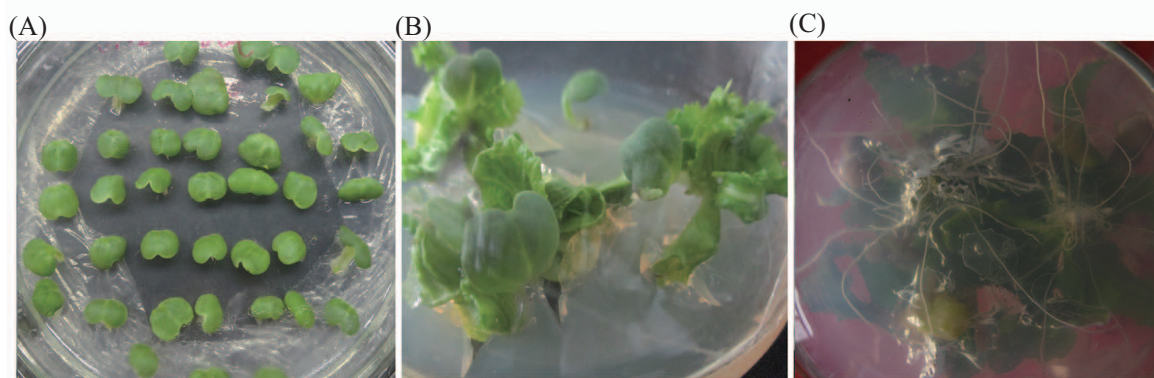


A: 重组质粒AtU6-26-sgRNA的DH5 α 菌液PCR鉴定。M: DL2000 marker; CK: ddH₂O PCR产物; 1~6: AtU6-26-sgRNA1-SK菌液PCR产物。B: 酶切鉴定重组质粒pYAO-LCD。M1: DL1.5 Kb marker; M2: DL2000 marker; 1、2: *Sal* I-HF和*Kpn* I-HF酶切。C: sgRNA回收片段和pYAO酶切产物的纯化。M1: DL1.5 Kb marker; M2: DL2000 marker; P: 酶切产物pYAO; sg: 酶切产物sgRNA片段。

A: identification of *E. coli* DH5 α with plasmid AtU6-26-sgRNA. M: DL2000 marker; CK: products of ddH₂O with PCR; 1-6: products of bacterium suspension with PCR. B: digested identification of recombinant plasmid pYAO-LCD. M1: DL1.5 Kb marker; M2: DL2000 marker; 1,2: digested products with *Sal* I-HF and *Kpn* I-HF. C: the purification of digested products of plasmid AtU6-26-sgRNA-SK and pYAO. M1: DL1.5 Kb marker; M2: DL2000 marker; P: the digested products of pYAO; sg: the digested products of sgRNA cassette.

图2 重组载体AtU6-26-sgRNA和pYAO-LCD-SgRNA的构建及鉴定

Fig.2 Construction and identification of recombinant plasmid AtU6-26-sgRNA and pYAO-LCD-SgRNA



A: 带柄子叶外植体; B: 再生植株; C: 不定根。

A: cotyledon; B: regenerated plants; C: adventitious roots.

图3 转基因植株发育的不同时期

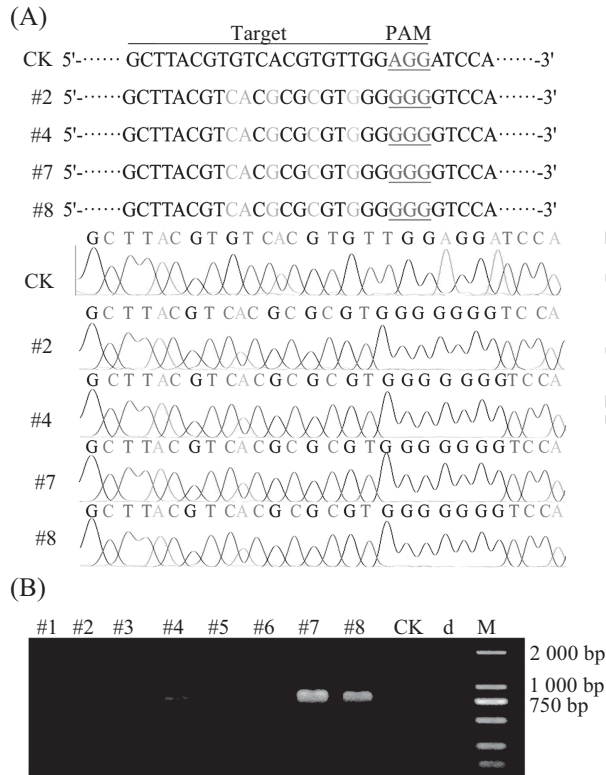
Fig.3 The different stages of transgenic plants

DNA序列发生了碱基编辑(图4A)。

理论上, *LCD*基因编辑后可影响LCD蛋白的表达, 继而会影响植株中内源H₂S含量。为了检测转化植株中内源H₂S变化, 我们测定了阳性植株内源H₂S含量(图5)。由图5可见, 转化大白菜中H₂S含量与对照相比, 均表现出了不同程度的降低, 其中7号植株中H₂S含量较对照组差异显著。

3 讨论

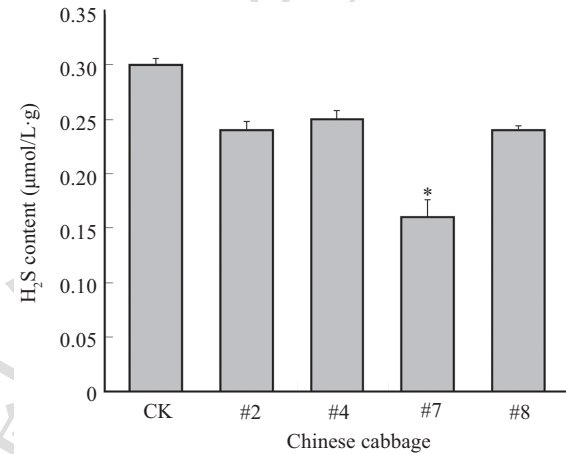
对于植物分子生物学研究领域, 制备突变体是非常重要的研究手段。但是突变体的获得过程往往非常困难。随着分子生物学技术的发展, 人们先后开发出一系列的突变体获得策略, 比如化学诱变、辐射诱变、T-DNA插入突变、转座子诱变、RNAi等, 但是这些方法都不同程度地存在各种缺陷, 尤其是



A: 编辑突变植株LCD序列测序图; B: LCD编辑突变植株的PCR鉴定, d: ddH₂O(阴性对照)。
A: sequences of LCD gene of edited mutants; B: the PCR test on the LCD in edited mutants, d: ddH₂O (negative control).

图4 编辑突变植株LCD的检测

Fig.4 The test on the LCD edited mutant plants



**P*<0.05, 与CK组比较。
**P*<0.05 vs CK group.

图5 LCD编辑突变植株中H₂S含量
Fig.5 The H₂S content of edited mutants

试验周期长、操作困难,限制了在研究中的应用。

CRISPR/Cas9是生物科学领域的颠覆性技术,被称作基因魔剪刀。CRISPR/Cas9是细菌在长期演化过程中形成的一种适应性免疫防御,可用来对抗入侵的病毒及外源DNA。CRISPR/Cas9系统通过将入侵病毒DNA片段整合到CRISPR中,并利用相

应的CRISPR RNAs(crRNAs)来指导同源序列的降解,从而提供免疫性^[13-14]。已剪切的DNA通过非同源末端连接进行修复时会产生缺失突变,可达到基因敲除的目的。CRISPR/Cas9于2012年开始在动物研究中得到应用,目前也已成功应用于多种植物研究。在之前的CRISPR/Cas9植物应用中, CaMV 35S

和ubiquitin启动子被用来启动Cas9的表达, 其中35S使用更为普遍^[7-8]。虽然CRISPR/Cas9基因编辑技术能对基因组序列进行成功的编辑, 但是, 同一载体应用于不同植物时, 基因的突变方式和突变频率不同; 不同载体应用于同一植物时, 突变方式和频率也不尽相同。编辑突变体植株中基因打靶效率存在差异, 这可能由于sgRNA的设计或是因为农杆菌侵染过程中T-DNA在基因组的插入位点影响了Cas9的表达活性, 使得Cas9核酸酶发生无用剪切进一步影响了打靶效果, 也可能与Cas9基因的启动子有关^[6,15-16]。但是和水稻中CRISPR/Cas9技术的使用相比, 拟南芥中的基因编辑效率非常低下, 且获得的突变常常是体细胞突变体。这可能和Cas9使用的启动子有很大的关系。中国科学院遗传发育研究所谢旗课题组开发了以YAO基因启动子控制的Cas9表达, AtU6-26驱动sgRNA的CRISPR/Cas9编辑载体系统获得了非常好的拟南芥编辑效果。YAO基因启动子更倾向于在细胞分裂组织中表达, 比如茎尖和根的分生组织, 并且在胚囊、胚乳和花粉中有高的表达。AtU6-26是拟南芥U6-26小核RNA(small nuclear RNA)启动子^[9]。在本研究中我们采用了这一研究系统, 期望在与拟南芥同属十字花科的大白菜材料中获得好的编辑效率。

在本实验中, 我们以大白菜为材料通过农杆菌介导获得了13.3%的基因编辑效率, 最终得到4株独立来源的阳性苗。序列测定表明, 4株阳性苗的靶标序列均发生了编辑; 被编辑序列GCT TAC GTG TCA CGT GTT GGA GG编辑后变成GTC ACG CGC GTC GGA GG(下划线为发生编辑的碱基); 氨基酸序列由原来的AYVSRVGG变成AYVTRVGG(下划线为发生过编辑的氨基酸)。虽然目标序列共发生了5个碱基的编辑改变, 但是大部分的碱基编辑行为没有改变原来的氨基酸序列(同义突变), 仅有一个氨基酸由原来的S(丝氨酸)变为T(苏氨酸)。该基因也并未改变原来的开放阅读框架。对基因编辑植株的内源H₂S含量进行测定, 结果表明, 仅有一个突变植株H₂S含量与对照组相比显著下降, 其余突变植株则无显著差异, 这可能是由于大白菜内还存在其他H₂S合成酶, 虽然LCD基因被编辑产生敲除效果, 其他产生H₂S的酶仍然在发挥作用, 从而使得大白菜体内H₂S含量维持在生理水平。另外4个独立来源的编辑植株的测序结果表明, 它们在同一

位点发生了编辑行为, 这可能是由于基因编辑的强烈的位点偏好性决定的。但是相同位点的编辑行为, 其突变体的H₂S产量有一定差异, 也是一个有趣的问题。这可能是组培原因造成的, 也可能与编辑过程的脱靶效应有关, 目前还不得而知。这些现象的具体机制还有待探究。

随着CRISPR/Cas9技术的不断完善, 其在诸多植物中的应用已经被报道。已有报道的植物种类有水稻、拟南芥、烟草、番茄、玉米、马铃薯、甜菜、杨树、甜橙、大麦、高粱等^[6]。目前尚未见到大白菜材料中关于CRISPR/Cas9技术使用的报道。本实验以大白菜为材料, 采用CRISPR/Cas9技术对内源H₂S合成代谢途径关键酶编码基因LCD进行编辑。一方面, 希望快速获得大白菜LCD敲除突变体, 为气体信号分子H₂S生理功能研究提供遗传学分析基础材料; 另一方面, 也作为CRISPR/Cas9技术在大白菜中应用的尝试, 为这一领域的基础研究和育种工作提供经验, 也期望获得大白菜育种的新种质。

参考文献 (References)

- 1 Jin ZP, Shen JJ, Qiao ZJ, Yang GD, Wang R, Pei YX. Hydrogen sulfide improves drought resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Biochem Biophys Res Comm* 2011; 414(3): 481-6.
- 2 Wang R. Physiological implications of hydrogen sulfide: a whiff exploration that blossomed. *Physiol Rev* 2012; 92(2): 791-896.
- 3 Zhang LP, Pei YX, Wang HJ, Jin ZP, Liu ZQ, Qiao ZJ, et al. Hydrogen sulfide alleviates cadmium-induced cell death through restraining ROS accumulation in roots of *Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*. *Oxi Med Cell Longev* 2015; 2015: 804603.
- 4 Qiao ZJ, Jing T, Jin ZP, Zhang LP, Jin ZP, Liu DM, et al. CDPKs enhance Cd tolerance through intensifying H₂S signal in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Soil* 2016; 398(1): 99-110.
- 5 裴雁曦. 植物中的气体信号分子硫化氢: 无香而立, 其臭如兰. *中国生物化学与分子生物学报*(Pei Yanxi. *Gastransmitter hydrgen sulfide in plant: stinking to high heaven, but refreshing to fine life*. *Chin J Biochem Mol Biol*) 2016; 32(7): 721-33.
- 6 马兴亮, 刘耀光. 植物CRISPR/Cas9基因组编辑系统与突变分析. *遗传*(Ma Xingliang, Liu Yaoguang. *CRISPR/Cas9-based genome editing systems and the analysis of targeted genome mutations in plants*. *Hereditas*) 2016; 38(2): 118-25.
- 7 Feng ZY, Zhang BT, Ding WN, Liu XD, Yang DL, Wei P L, et al. Efficient genome editing in plants using a CRISPR/Cas system. *Cell Res* 2013; 23(10): 1229-32.
- 8 Ma XL, Zhang QY, Zhu QL, Liu W, Chen Y, Qiu R, et al. A Robust CRISPR/Cas9 system for convenient, high-efficiency multiplex genome editing in monocot and dicot plants. *Mol Plant* 2015; 8(8): 1274-84.
- 9 Yan LH, Wei SW, Wu YR, Liu HR, Li HJ, Yang WC, et al. High-

- efficiency genome editing in *Arabidopsis* using YAO promoter-driven CRISPR/Cas9 system. *Mol Plant* 2015; 8(12): 1820-3.
- 10 Ma XL, Zhu Z, Li YN, Yang GD, Pei YX. Expressing a modified cowpea trypsin inhibitor gene to increase insect tolerance against *Pieris rapae* in Chinese Cabbage. *Hortic Environ Biotechnol* 2017; 58(2): 195-202.
- 11 吴玲玲, 王一娟, 董刚, 陈竹君, 裴雁曦. 大白菜再生体系的正交设计优化. *山西大学学报(自然科学版)*(Wu Lingling, Wang Yijuan, Dong Gang, Chen Zhujun, Pei Yanxi. Establishment of regeneration system of Chinese Cabbage with orthogonal design. *Shanxi University J*) 2012; 2012(4): 712-6.
- 12 Fang HH, Liu ZQ, Long YP, Liang YL, Jin ZP, Zhang LP, *et al.* The Ca^{2+} /calmodulin2-binding transcription factor TGA3 elevates LCD expression and H_2S production to bolster Cr^{6+} tolerance in *Arabidopsis*. *Plant J* 2017; 91(6): 1038-50.
- 13 Wolfs JM, Hamilton TA, Lant JT, Laforet MC, Zhang J, Salemi LM, *et al.* Biasing genome editing event toward precise length deletions with an RNA guided Tev Cas9 dual nuclease. *Proc Natl Acad Sci USA* 2016; 113(52): 14988-93.
- 14 Ghosh SJ, Tibbit CL, Liu JL. Effective knockdown of *Drosophila* long non-coding RNAs by CRISPR interference. *Nucleic Acids Res* 2016; 44(9): 84.
- 15 Zhang H, Zhang JS, Wei PL, Zhang BT, Gou F, Feng ZY, *et al.* The CRISPR/Cas9 system produces specific and homozygous targeted gene editing in rice in one generation. *Plant Biotechnol J* 2014; 12(6): 797-807.
- 16 Wang ZP, Xing HL, Dong L, Zhang HY, Han CY, Wang XC, *et al.* Egg cell-specific promoter-controlled CRISPR/Cas9 efficiently generates homozygous-mutants for multiple target genes in *Arabidopsis* in a single generation. *Genome Biol* 2015; 16(1): 144-55.