

生菜CRISPR/Cas9基因编辑体系的建立

禹明森¹, 李翔¹, 高马也², 杨蕾², 倪迪安^{2*}, 王应祥^{1*}

¹复旦大学生命科学学院, 植物科学研究所, 上海200433; ²上海应用技术大学生态技术与工程学院, 上海201418

摘要: CRISPR/Cas9基因编辑技术已经成功应用于多种植物基因组的编辑, 但是在生菜中鲜有报道。本研究拟在生菜(*Lactuca sativa* L.)中建立CRISPR/Cas9基因编辑体系。首先根据生菜FANCM基因序列设计靶位点, 构建Lsfancm-CRISPR/Cas9载体。然后以生菜子叶作为外植体, 通过农杆菌侵染、共培养、愈伤组织诱导、芽再生及生根培养等过程, 对生菜进行农杆菌介导的遗传转化, 共获得24株T₀代转基因阳性植株。进一步对靶位点序列进行PCR并测序分析, 发现4株转基因生菜的靶位点发生基因编辑, 产生fancm杂合突变体, 并且在T₁代植株中鉴定到纯合突变体。以上结果表明, 本研究已成功将CRISPR/Cas9基因编辑体系有效地运用于生菜中, 该体系的建立可为将来生菜的基因功能研究及分子育种提供重要的技术参考。

关键词: 生菜; 农杆菌介导遗传转化; 基因编辑; CRISPR/Cas9

近年来, CRISPR/Cas9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeat/CRISPR associated nuclease 9)系统作为基因编辑技术广泛应用于植物基因组的编辑从而推动基因功能的研究(Ding等2016), 并且在植物的遗传育种、性状改良、对逆境胁迫的响应等方面取得了一定的成果(Xie和Yang 2013; Zhang等2014; Bortesi和Fischer 2015; Rani等2016)。CRISPR/Cas9来源于细菌和古细菌, 是自然界中原核生物的一种防卫系统, 通过激活适应性免疫应答来抵抗噬菌体等入侵(Barrangou等2007)。CRISPR/Cas9系统主要包含gRNA (guide RNA)和Cas9核酸内切酶, gRNA通过和靶序列的碱基配对结合到DNA上, 同时gRNA可以招募Cas9蛋白。Cas9蛋白与gRNA结合并识别靶序列下游的PAM (protospacer adjacent motifs)位点, 在PAM上游约3 bp处切割DNA双链, 形成DNA双链断裂(double strand break, DSB), 继而引发生物体内源性的DSB修复。在DSB修复的过程中会在双链断裂的位置引起若干碱基的插入或者缺失从而造成DNA靶位点基因编辑(Cong等2013)。目前CRISPR/Cas9系统主要有两种方式应用于植物基因组的编辑, 一种是构建Cas9及gRNA表达载体, 通过遗传转化在植物体内表达Cas9蛋白和gRNA从而对植物基因组进行编辑。另外一种是将体外表达的Cas9蛋白和gRNA预先组装成核糖核蛋白复合体并导入受体细胞进行基因编辑, 然后将基因组被编辑的受体细胞诱导再生为完整的植株(Woo等2015; Liang等2017)。本研究应用第一种方法, 即构建相关表达载体, 对生菜进行遗传转

化, 利用重组的Cas9蛋白及gRNA对生菜进行基因组编辑。

生菜(*Lactuca sativa* L.) (2n=18)属于菊科莴苣属植物, 是一年或者两年生草本植物, 原产地中海沿岸, 是全世界广泛种植的叶用类蔬菜, 具有较高的营养和经济价值(左晓峰等2001; 范亚丽等2012)。Michelmore等在1987年已经成功报道生菜的遗传转化体系(Michelmore等1987)。到目前为止, 该遗传转化体系已经相当完善和成熟(Curtis等1999; 邓小莉等2007; 付雅丽等2007; 付雪晴等2012)。本研究以生菜FANCM基因作为CRISPR/Cas9系统的靶基因。FANCM蛋白在拟南芥中参与减数分裂过程, 限制减数分裂交叉(crossovers, COs)的形成, 拟南芥fancm突变体相比于野生型, CO数目提高, 重组频率增加(Crismani等2012; Knoll等2012)。本研究希望通过对于生菜FANCM的基因编辑提高生菜减数分裂的重组频率, 从而加快生菜的育种进程。

本研究构建Lsfancm-CRISPR/Cas9载体, 以生菜子叶为外植体, 通过农杆菌介导的方式对生菜进行遗传转化, 分析T₀代和T₁代转基因植株基因编辑状况, 最终建立有效的可遗传的生菜CRISPR/Cas9基因编辑体系。

收稿 2017-03-13 修定 2017-04-12

资助 国家自然科学基金(31370347和31570314)、上海市绿化和市容管理局年度科技项目(G179910)和荷兰Rijk Zwaan种业有限公司。

* 共同通讯作者(E-mail: yx_wang@fudan.edu.cn; dani@sibs.ac.cn)。

材料与方法

1 材料

1.1 植物材料

本研究所用的生菜(*Lactuca sativa* L.)品种‘日本结球’购自津沽园艺公司。还有‘沙丽生菜’、‘玻璃生菜’、‘香港玻璃生菜’、‘四季玻璃生菜’、‘散叶生菜大速生’、‘红霞生菜’、‘新育奶油生菜’、‘香港软尾生菜’、‘意大利全年耐抽苔生菜’9种生菜品种购自怡田种业有限公司。

1.2 菌株和质粒

大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 感受态和根

癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*) GV3101感受态购于第二实验室公司。

本研究所用的CRISPR/Cas9系统由中国农业大学生物学院陈其军老师馈赠(Xing等2014)。该系统包含3个载体,其中pCBC-DT1T2载体为氯霉素抗性,含有gRNA表达盒。pHSN401载体在细菌体内为卡那霉素(kanamycin, kan)和壮观霉素(spec-tinomycin, spec)抗性,在植物体内为潮霉素(hygromycin, hyg)抗性,用于转化根癌农杆菌GV3101感受态从而进行生菜遗传转化(图1)。pSoup载体为四环素抗性,主要作为协助载体,帮助pHSN401载体在根癌农杆菌GV3101中复制。

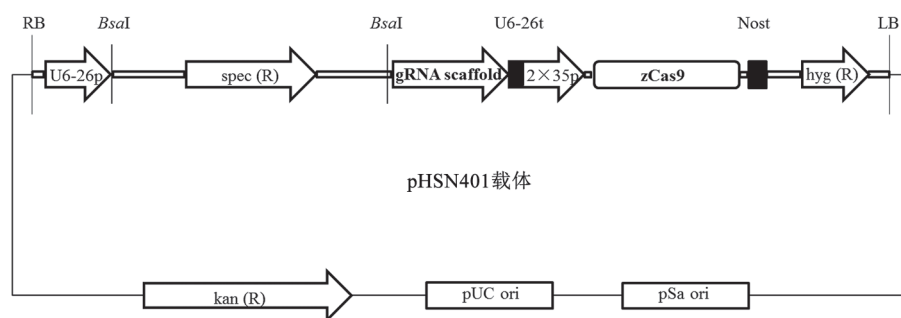


图1 pHSN401载体结构示意图

Fig.1 The structural diagram of pHSN401 vector

U6-26p: 拟南芥U6启动子; U6-26t: 拟南芥U6终止子; 2x35p: 2个串联的花椰菜病毒35S启动子; Nost: 胭脂碱合成酶Nos终止子; zCas9: 玉米密码子优化Cas9酶; spec (R): 壮观霉素抗性基因; hyg (R): 潮霉素抗性基因; kan (R): 卡那霉素抗性基因; LB/RB: T-DNA插入左/右边界; pUC ori: 大肠杆菌复制起始位点; pSa ori: 农杆菌复制起始位点。

2 方法

2.1 构建Lsfancm-CRISPR/Cas9载体以及转化农杆菌

2.1.1 基因靶位点设计

*FANCM*基因信息来自于合作单位荷兰Rijk Zwaan种业有限公司。根据CRISPR/Cas9系统的特异性切割原则(Mali等2013),即PAM (NGG或者CCN)位点切割原则(图2),设计靶位点并且命名为CRISPR/Cas9-T。

2.1.2 Lsfancm-CRISPR/Cas9载体构建

以pCBC-DT1T2载体为模板,根据靶位点设计特异性引物:Lsfancm-CRISPR-DT1T2-T-F (*BsaI*-T-F)和Lsfancm-CRISPR-DT1T2-T-R (*BsaI*-T-R)(表1)。用该引物对通过PCR扩增得到含有gRNA-scaffold和靶位点序列的DNA片段。然后用*BsaI*限制性内切酶,酶切pHSN401载体和PCR扩增后的DNA片

段。接下来通过T₄连接酶进行连接反应,将连接产物转化大肠杆菌。然后通过特异性鉴定引物U626-FD(表1)测序验证,挑选单克隆在含有50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 卡那霉素的LB培养基中摇菌培养(220 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$, 37°C),然后抽提质粒(图3),将构建好的CRISPR/Cas9载体命名为Lsfancm-CRISPR/Cas9载体。

2.2 农杆菌介导的生菜遗传转化体系

本研究采用农杆菌介导生菜的遗传转化,相关的转化方法在前人的研究基础上加以优化(Michelmore等1987; Curtis等1999; 邓小莉等2007; 付雅丽等2007; 付雪晴等2012),具有再生效率高、转化率高特点。

2.2.1 生菜种子表面消毒

首先将饱满的生菜种子用无菌水浸泡并且摇床摇晃2 h (150 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$, 25°C)。然后用70%乙醇浸泡90 s,接下来用10% NaClO浸泡15 min,无菌水清

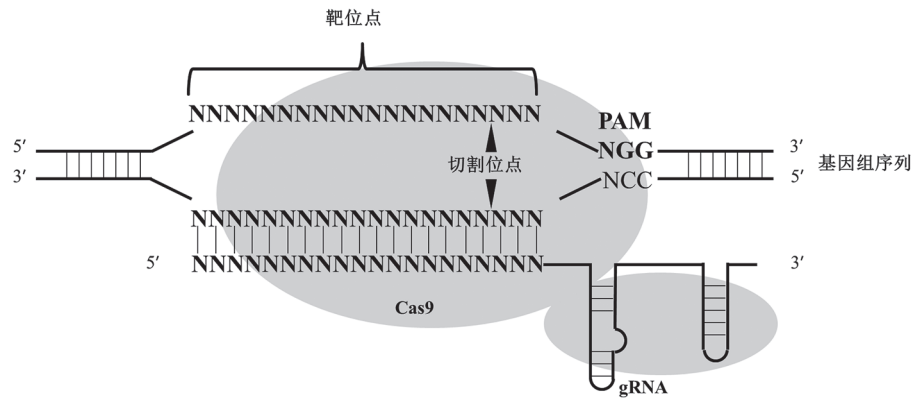


图2 CRISPR/Cas9系统基因组编辑原理图

Fig.2 The schematic diagram of genome editing using CRISPR/Cas9 system

表1 实验中所用引物

Table 1 Sequences of primers used in this study

类型	名称	序列(5'→3')
CRISPR载体构建特异性引物	Lsfancm-CRISPR-DT1T2-T-F (<i>BsaI</i> -T-F)	GAATGGTCTCTATTGTTTCAGCTCATGGTATA- CAAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTT
	Lsfancm-CRISPR-DT1T2-T-R (<i>BsaI</i> -T-R)	ATTATTGGTCTCTAAACTTGTATACCATGAGC- TGAACAATCTCTTAGTCGACTCTACCA
CRISPR载体测序引物	U626-FD	TGTCCCAGGATTAGAATGATTAGGC
潮霉素抗性基因特异性引物	HptII-F	CTACACAGCCATCGGTCCAGAC
	HptII-R	GGGAGTTTTAGCGAGAGCCTGAC
转基因植株特异性鉴定引物	Lsfancm-CRISPRseq-T-F	ACGTCCATATGTTTCAAGGCTTTC
	Lsfancm-CRISPRseq-T-R	GCTTTCCAAAGTTCTTCTTTCGTG

洗3次,最后转移到1/2MS (MS盐 $2.37 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ +蔗糖 $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ +琼脂 $7.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 5.8)培养基,培养温度为 $22\sim 24^\circ\text{C}$,16 h光照,光照强度约 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 。

2.2.2 外植体准备

种子萌发5~6 d后,将长度约5~7 mm的子叶外植体从幼苗上切下。

2.2.3 农杆菌侵染

将pSoup质粒转化根癌农杆菌GV3101感受态,然后将Lsfancm-CRISPR/Cas9载体转化GV3101/pSoup感受态,以*BsaI*-T-F和*BsaI*-T-R为引物(表1)进行菌落PCR,挑选阳性单克隆菌落,接种在含有 $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 卡那霉素、 $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 利福平、 $25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 庆大霉素、 $5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 四环素的LB液体培养基中,摇菌培养($220 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, 28°C)约12 h至 $\text{OD}_{600}=0.6\sim 0.8$ 。从上述菌液中取 $200 \mu\text{L}$ 稀释于20 mL添加相同抗生素的LB液体培养基中,在 $220 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, 28°C 条件下摇菌10~12 h至 $\text{OD}_{600}=0.6\sim 0.8$ 。将菌液在 $1\ 600\times\text{g}$,

7°C 条件下离心5 min,用MS0 (MS $4.74 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ +蔗糖 $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 5.8)重悬浮菌体,调整 $\text{OD}_{600}=0.6\sim 0.8$ 。最后将外植体在菌液中浸泡10 min。

2.2.4 共培养

将在农杆菌中浸泡过的外植体转移至MS1 [MS盐 $4.74 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ +蔗糖 $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ +琼脂 $7.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ +激动素(kinetin, KT) $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +吲哚乙酸(indoleacetic acid, IAA) $0.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 5.8]培养基,使其背部接触培养基。将外植体在黑暗条件下 25°C 共培养2 d。

2.2.5 愈伤组织诱导及芽再生

经过2 d的共培养,将外植体转移至MS2 (MS1培养基+hyg $17.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +特美汀 $300 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 5.8)培养基,使其背部接触到培养基,在 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 的光照强度, 25°C 条件下培养。每隔20 d将外植体转移至新的MS2培养基进行继代培养,继代培养2~4次。

2.2.6 生根培养

当分化再生得到的hyg抗性幼苗生长至1 cm

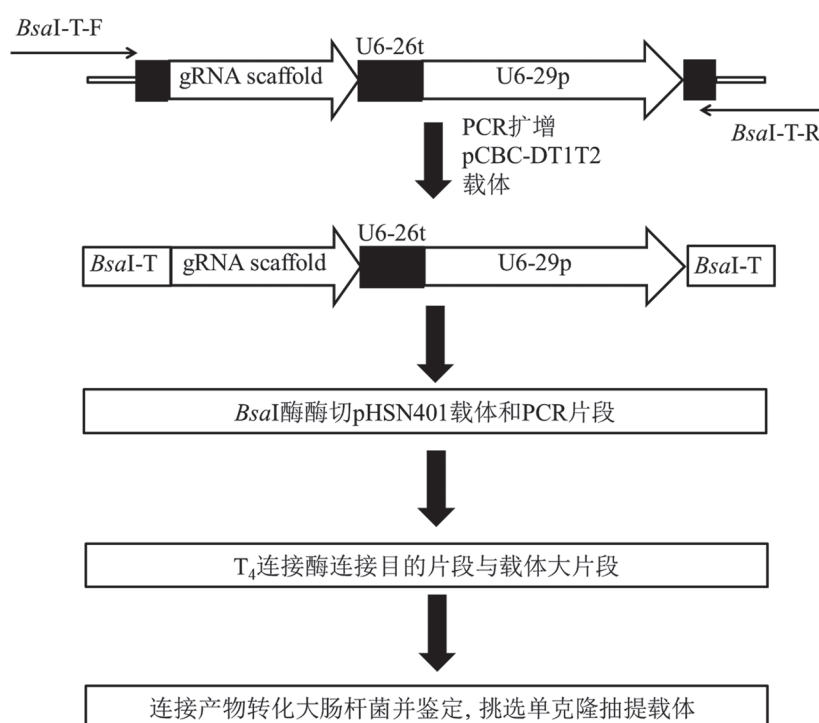


图3 Lsfancm-CRISPR/Cas9载体构建流程图

Fig.3 The flowchart of Lsfancm-CRISPR/Cas9 vector construction

U6-26t: 拟南芥U6终止子; U6-29p: 拟南芥U6启动子; BsaI-T-F/R: 靶位点正/反向引物; BsaI-T: 融合BsaI酶切位点的靶序列。

时, 将它小心切下转移至MS3 (1/2MS培养基+IAA $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 5.8)培养基上诱导生根。

2.2.7 驯化和移栽

将幼苗移栽到营养土上(蛭石:营养土:珍珠岩=9:3:1), 置于育苗盒内保湿培养, 光照培养并且逐步减低湿度至室内正常湿度(培养温度 $22 \sim 24^\circ\text{C}$, 光照时间12 h, 光照强度约 $200 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)。等到幼苗驯化2~3周后, 放置在光照培养箱中培养生长。在幼苗以及生长期, 设定光照培养箱的条件为光照时间8 h, 温度 20°C ; 黑暗时间16 h, 温度 15°C 。诱导开花时期, 设定光照培养箱的条件为光照时间14 h, 温度 30°C ; 黑暗时间10 h, 温度 25°C 。

2.3 转基因植株鉴定

2.3.1 转基因植株潮霉素抗性基因PCR鉴定

本研究采用TaKaRa MiniBEST Plant Genomic DNA Extraction Kit试剂盒提取生菜的基因组DNA, 然后以潮霉素抗性基因引物HptII-F和HptII-R为鉴定引物(表1)对转基因植株DNA进行PCR扩增: 94°C 预变性5 min; 94°C 变性30 s, 60°C 退火30 s, 72°C 延伸50 s, 35个循环后; 72°C 再延伸10 min。

2.3.2 转基因阳性植株测序

以引物Lsfancm-CRISPRseq-T-F和Lsfancm-CRISPRseq-T-R作为测序鉴定引物(表1)对转基因阳性植株进行PCR扩增(94°C 预变性3 min; 94°C 变性15 s, 55°C 退火15 s, 72°C 延伸1 min, 35个循环后; 72°C 再延伸10 min)并且测序。

本研究的引物合成以及测序服务由上海睿迪生物技术有限公司完成。

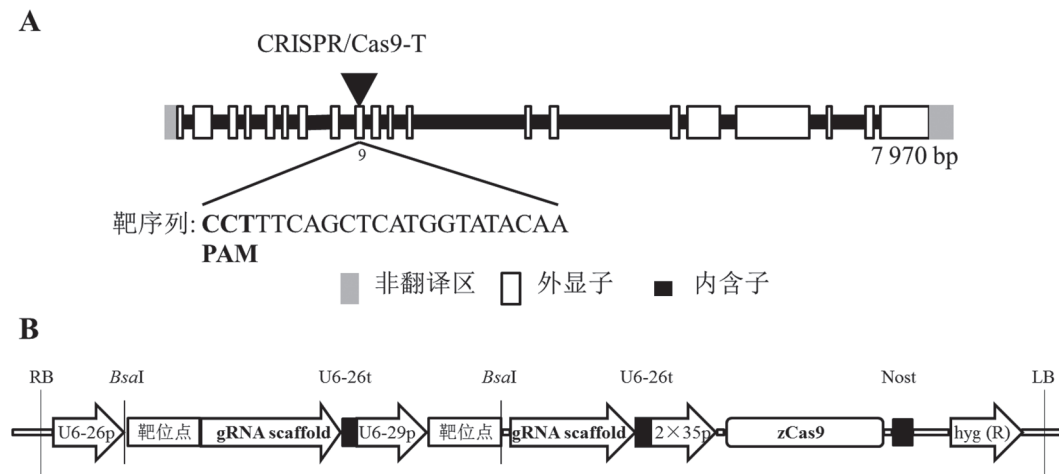
2.3.3 生菜基因靶位点序列分析

根据测序的峰型图以及碱基序列来确定生菜的基因靶位点是否发生编辑。根据PCR产物测序峰型图, 如果在靶位点附近出现多峰, 则其纯化后的PCR产物用TIANGEN公司的pEASY-Blunt Cloning kit试剂盒进行载体连接, 然后将连接产物转化大肠杆菌DH5 α 感受态, 挑选多个单克隆菌落, 摇菌培养进行单克隆测序, 根据单克隆测序结果确定基因编辑方式。

实验结果

1 Lsfancm-CRISPR/Cas9载体构建

如图4-A所示, 生菜FANCM基因全长为7 970 bp,

图4 生菜*FANCM*基因结构及Lsfancm-CRISPR/Cas9载体示意图Fig.4 The structural diagram of lettuce *FANCM* gene and Lsfancm-CRISPR/Cas9 vectorA: 生菜*FANCM*基因结构以及CRISPR/Cas9靶位点; B: Lsfancm-CRISPR/Cas9载体。

总共含有20个外显子和19个内含子。根据CRISPR/Cas9系统的特异性切割原则(Mali等2013),在*FANCM*基因的第9个外显子设计靶位点CRISPR/Cas9-T: TTCAGCTCATGGTATACAA(图4-A),按照图3所示流程图构建Lsfancm-CRISPR/Cas9载体。如图4-B所示,Lsfancm-CRISPR/Cas9表达载体携带有2个串联重复的gRNA表达盒和Cas9酶。gRNA表达盒含有拟南芥U6启动子和终止子,能够表达融合靶位点序列的gRNA,用于识别和结合生菜*FANCM*基因靶位点CRISPR/Cas9-T。Cas9酶识别CRISPR/Cas9-T的PAM(CCT)位点并且切割PAM下游的DNA双链,经过内源性DNA双链断裂修复产生基因编辑。

2 生菜的遗传转化

2.1 转基因生菜品种的确

本研究收集了‘日本结球’、‘沙丽生菜’、‘玻璃生菜’、‘香港玻璃生菜’、‘四季玻璃生菜’、‘散叶生菜大速生’、‘红霞生菜’、‘新育奶油生菜’、‘香港软尾生菜’、‘意大利全年耐抽苔生菜’10种生菜品种,参考Vanjildorj等(2005)的研究,对这些品种的再生频率进行比较,发现其中再生频率最高的是‘日本结球生菜’(78%),其次是‘玻璃生菜’(56.2%),其他生菜品种的再生频率均不足30%。因此本研究以‘日本结球生菜’作为转化材料。

2.2 生菜再生过程激素种类及比例的确定

以MS培养基为基础,研究不同激素的种类及比例对‘日本结球生菜’再生频率的影响。结果如

表2所示,使用萘乙酸(naphthylacetic acid, NAA)和6-苄基腺嘌呤(6-benzylaminopurine, 6-BA)组合,当NAA浓度为 $0.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 6-BA为 $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时再生频率最高,为82.5%。使用NAA和KT组合,当NAA浓度为 $0.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、KT为 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时再生频率最高,为87.5%。当将生长素由 $0.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的NAA替换成 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的IAA,并且分别与 $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的6-BA和 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的KT组合时(表3),再生频率分别是90.0%和96.5%。可见对于‘日本结球生菜’再生

表2 不同激素配比对‘日本结球生菜’再生频率的影响

Table 2 The effect of different hormone proportions on the frequency of lettuce regeneration

激素名称*	浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	再生频率/%
6-BA	1.0	78.0±5.0
	1.5	82.5±5.4
	4.0	73.5±6.2
KT	0.5	78.0±6.8
	1.0	87.5±5.0
	2.0	68.8±6.3

*培养基中添加 $0.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 生长素(NAA)。

表3 不同激素配比对‘日本结球生菜’再生频率的影响

Table 3 The effect of different hormone proportions on the frequency of lettuce regeneration

激素名称*	浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	再生频率/%
6-BA	1.5	90.0±2.9
KT	1.0	96.5±1.3

*培养基中添加 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 生长素(IAA)。

的诱导, KT要优于6-BA, IAA要优于NAA。因此选择 $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的KT、 $0.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的IAA的激素配比应用于后续的实验。

2.3 转基因生菜潮霉素筛选压的确定

本研究以MS培养基为基础培养基, 在 $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的KT、 $0.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的IAA激素配比下, 研究不同浓度的潮霉素对野生型‘日本结球生菜’再生频率的影响。如表4所示, 随着潮霉素浓度的升高, ‘日本结球生菜’的再生频率迅速的降低。当潮霉素的浓度达到 $17.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, ‘日本结球生菜’已经完全不能再生。因此本研究以 $17.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 作为转基因生菜的潮霉素筛选压。

表4 ‘日本结球生菜’再生时对潮霉素敏感性

Table 4 Hygromycin sensitivity of lettuce regeneration

潮霉素浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	再生频率/%
0.0	96.5±1.3
5.0	32.0±0.8
12.5	3.8±1.0
17.0	0.0±0.0

2.4 潮霉素抗性生菜植株的获得

如图5所示, 以生菜的子叶作为外植体, 经过种子萌发、农杆菌浸染、共培养、愈伤组织诱导、芽再生及生根培养等过程对生菜进行遗传转化。周期4个月左右, 得到30棵潮霉素抗性的生菜植株。

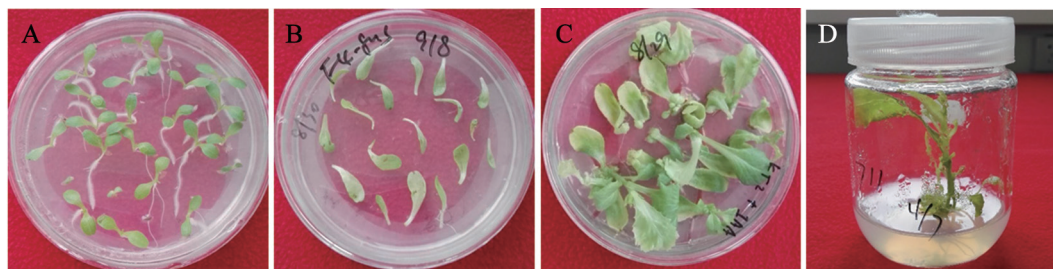


图5 生菜遗传转化过程

Fig.5 The process of lettuce genetic transformation

A: 种子萌发; B: 共培养; C: 愈伤组织诱导及芽再生; D: 生根培养。

3 T_0 代转基因植株的分子鉴定

使用潮霉素抗性基因序列特异性引物HptII-F和HptII-R (表1)对上述得到的30株潮霉素抗性植株进行PCR检测, 其中24株扩增出676 bp特异性条带(图6), Lsfancm-CRISPR/Cas9表达载体对生菜的遗传转化率为80.0%。

4 T_0 代基因编辑植株的鉴定

为检测 T_0 代植株中FANCM基因的基因编辑状

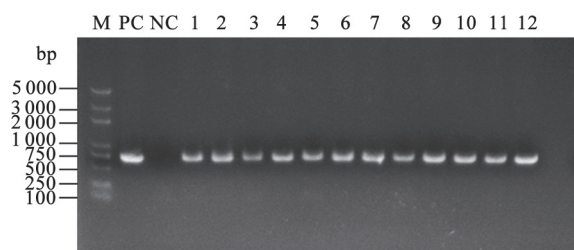


图6 部分转基因生菜植株的PCR检测结果

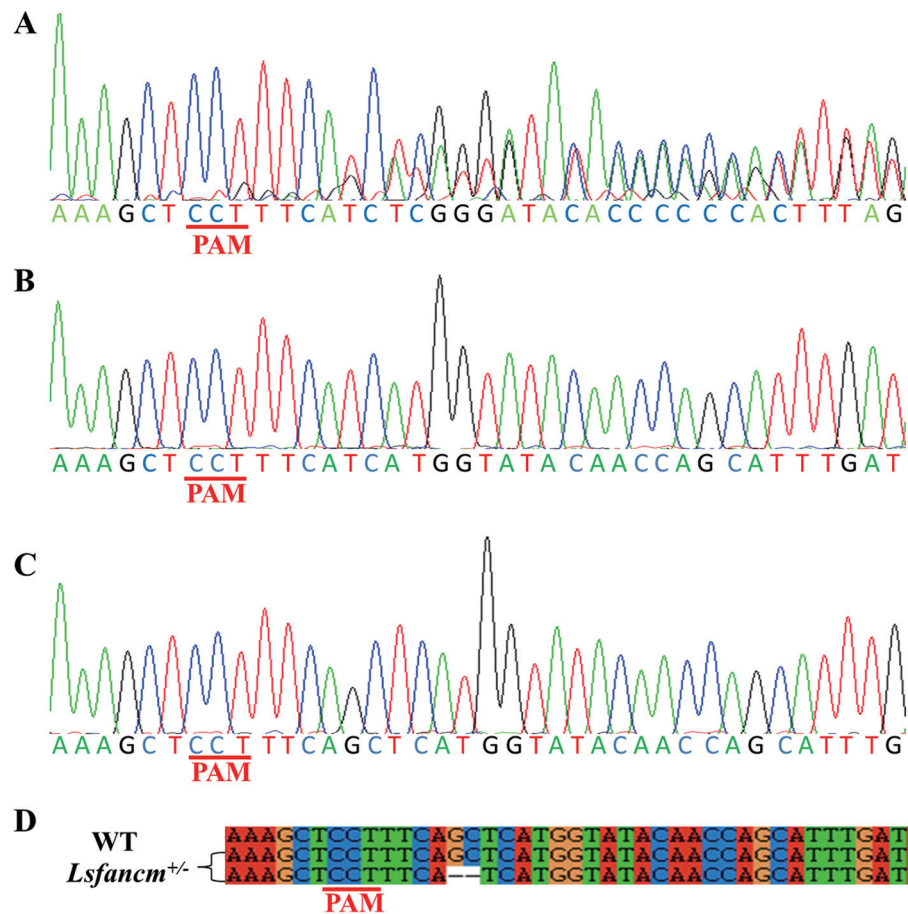
Fig.6 PCR analysis of some transgenic plants

M: DNA Marker; PC: 阳性质粒对照; NC: 未转化植株对照; 1~12: 转基因生菜植株。

况, 本研究在靶位点CRISPR/Cas9-T上下游设计特异性引物: Lsfancm-CRISPRseq-T-F和Lsfancm-CRISPRseq-T-R (表1)。以上述得到的24株转基因阳性植株的基因组DNA为模板, 进行PCR扩增及测序分析, 结果表明4株转基因生菜发生基因编辑(图7和8), 基因编辑效率为16.67%。这4株植株中产生两种基因编辑形式, 其中1株植物在PAM位点(CCT)下游4 bp处产生2 bp (GC)碱基缺失(图7), 另外3株植株在PAM位点(CCT)下游2 bp处产生13 bp (CAGCTCATGGTAT)碱基缺失(图8)。PCR产物测序结果显示, 其测序峰图出现双峰, 并且PCR产物连接载体后单克隆菌落测序得到靶位点被编辑和未编辑的两种形式, 以上结果表明4株植株均为杂合突变体(图7和8)。

5 T_1 代转基因植株的基因型分析

上述获得的4株 T_0 代基因编辑植株中, 只有1株GC碱基缺失杂合突变体自交得到10株 T_1 代植株。以上述的Lsfancm-CRISPRseq-T-F和Lsfancm-CRISPRseq-T-R作为特异性鉴定引物(表1), 对得到

图7 T₀代GC碱基缺失杂合突变体基因型分析Fig.7 Genotyping of GC base deletion in heterozygous mutant from T₀ generation

A: PCR产物测序峰图; B: GC碱基缺失的PCR产物连接载体后单克隆菌落测序峰图; C: 未编辑的PCR产物连接载体后单克隆菌落测序峰图; D: PCR产物连接载体后单克隆菌落测序序列比对; WT: 野生型生菜; *Lsfancm*^{+/-}: T₀代GC碱基缺失杂合突变体。

的10株T₁代植株的靶位点进行PCR扩增。PCR产物以及PCR产物连接载体后单克隆菌落测序结果表明, 其中5株植株是GC碱基缺失杂合突变体(图9), 2株植株是GC碱基缺失纯合突变体(图10), 剩下3株在靶位点处未检测到基因编辑。

讨 论

生菜作为一种叶用类蔬菜, 按照叶片的生长形态可以分为散叶生菜和结球生菜。按照叶片的颜色可以分为绿生菜和紫生菜。较高的再生频率是获得大量的转化植株的基础, 基因型是影响生菜再生频率的主要内在因素(Lim等2011)。本研究检测的10个生菜品种中, 绿色‘日本结球生菜’的再生频率最高。此外, 植物生长调节剂是诱导植物离体器官再生必不可少的因素, 生菜再生过程中

所使用的植物生长调节剂主要有细胞分裂素类和生长素类。一般细胞分裂素类比例增高有利于芽的再生, 而生长素类比例的升高有利于愈伤组织的形成或者根的再生(张小红等2002)。不同的生菜再生体系需要不同的激素组合(朱路英等2002; 朱春燕等2008), 这种差异主要是由于所用的生菜品种不同引起。本研究中‘日本结球生菜’再生体系的最佳激素组合为1.0 mg·L⁻¹的KT, 0.2 mg·L⁻¹的IAA。遗传转化过程中抗生素的使用是为了抑制或杀死未转化的细胞或者组织, 恰当的抗生素浓度既能够将未转化的细胞充分的杀死, 又不影响转化细胞的正常生长。本研究以潮霉素作为筛选转基因植株的抗生素, 确认潮霉素筛选压是17.0 mg·L⁻¹, 与Lim等(2011)的所用的20 mg·L⁻¹潮霉素筛选压相近。

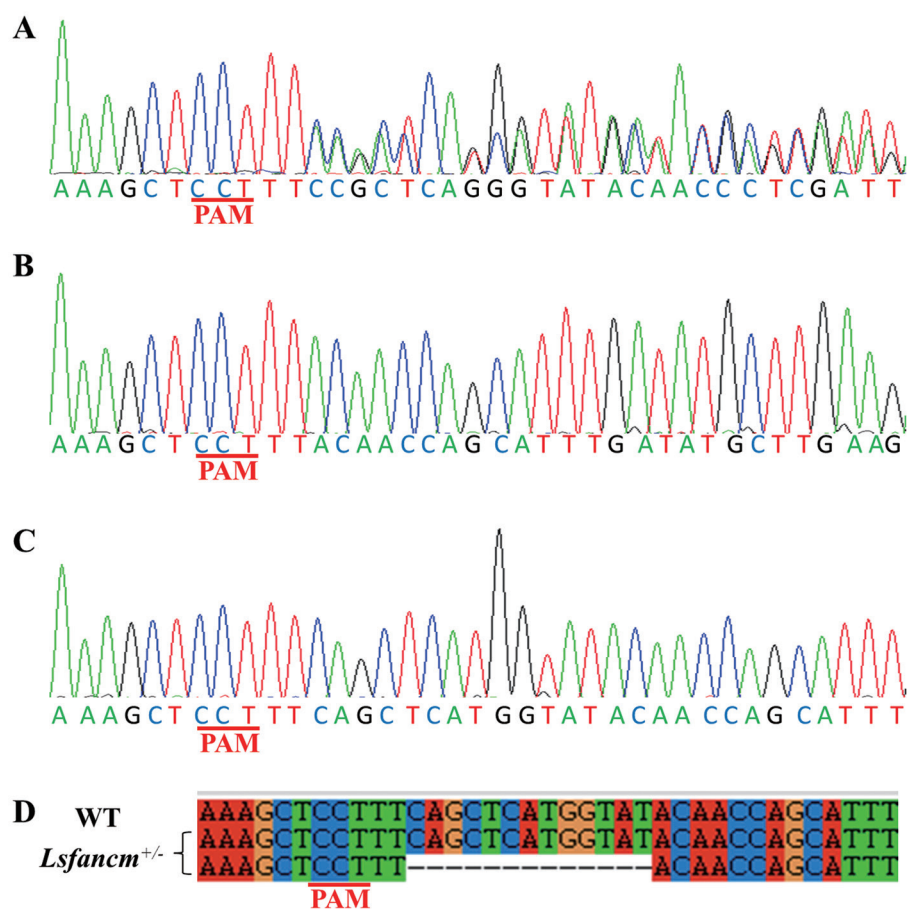


图8 T₀代CAGCTCATGGTAT碱基缺失杂合突变体基因型分析

Fig.8 Genotyping of CAGCTCATGGTAT base deletion in heterozygous mutant from T₀ generation

A: PCR产物测序峰图; B: CAGCTCATGGTAT碱基缺失的PCR产物连接载体后单克隆菌落测序峰图; C: 未编辑的PCR产物连接载体后单克隆菌落测序峰图; D: PCR产物连接载体后单克隆菌落测序序列比对; WT: 野生型生菜; *Lsfancm*^{+/-}: T₀代CAGCTCATGGTAT碱基缺失杂合突变体。

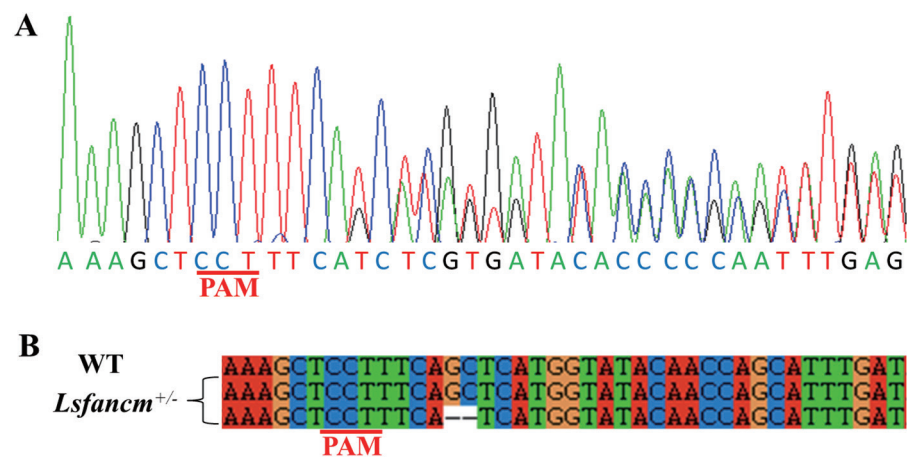


图9 T₁代GC碱基缺失杂合突变体基因型分析

Fig.9 Genotyping of GC base deletion in heterozygous mutant from T₁ generation

A: PCR产物测序峰图; B: PCR产物连接载体后单克隆菌落测序序列比对; WT: 野生型生菜; *Lsfancm*^{+/-}: T₁代GC碱基缺失杂合突变体。

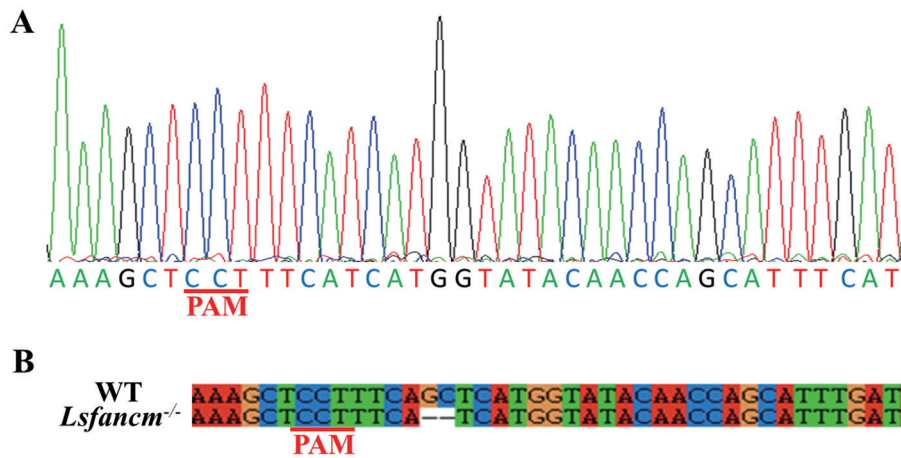


图10 T₁代GC碱基缺失纯合突变体基因型分析

Fig.10 Genotyping of GC base deletion in homozygous mutant from T₁ generation

A: PCR产物测序峰图; B: PCR产物连接载体后单克隆菌落测序序列比对; WT: 野生型生菜; *Lsfancm*^{-/-}: T₁代GC碱基缺失纯合突变体。

CRISPR/Cas9系统作为一种新兴的基因编辑技术在拟南芥(Mao等2013; Feng等2013)、水稻(Shan等2014; Li等2016)、小麦(Wang等2014; Liang等2017)等植物的基因组编辑研究中取得巨大的发展,但是在生菜中的应用还较少。目前仅有研究报道利用体外表达的Cas9蛋白和gRNA预先组装成CRISPR/Cas9核糖核蛋白复合体并导入生菜原生质体,对生菜基因组进行基因编辑(Woo等2015)。本研究首次通过传统的遗传转化方式,即构建重组的CRISPR/Cas9植物表达载体、通过农杆菌介导的遗传转化,在生菜体内表达CRISPR/Cas9系统进而对靶基因进行编辑。在T₀代总共获得24株转基因阳性植株,但是得到的转基因植株大多长势较弱,莲座叶少,易抽薹。生菜对于热比较敏感,高温条件下容易抽薹开花(Mulabagal等2010),希望在以后的研究中通过对温度的改善来调整植株的状态,促进营养生长,推迟抽薹。此外,对T₀代的24株转基因阳性植株进行靶位点序列分析,其中4株发生基因编辑,基因编辑效率为16.67%。而Woo等(2015)用预组装的CRISPR/Cas9核糖核蛋白复合体对生菜BIN2基因进行基因编辑,基因编辑效率为46%(Woo等2015)。Woo等(2015)利用体外表达的Cas9蛋白和gRNA预先组装成核糖核蛋白复合体进行CRISPR/Cas9系统构建,这种构建方式确保转化植株体内均具有CRISPR/Cas9核糖核蛋白复合体。而本研究通过构建Cas9及gRNA表达

载体转化生菜,得到的转基因植株体内只含有Cas9及gRNA基因,其能否表达Cas9蛋白和gRNA以及Cas9蛋白和gRNA的表达量在每株转基因植株中是不同的,这可能是本研究基因编辑效率偏低的原因。但是相比较于Woo等(2015)方法,本研究建立的生菜CRISPR/Cas9基因编辑体具有操作简单,周期短,易于广泛应用等特点。此外,将T₀代获得的GC碱基缺失*fancm*杂合突变体自交,我们在T₁代获得2株GC碱基缺失纯合突变体,5株植株GC碱基缺失杂合突变体,说明被编辑的基因能够在后代中稳定遗传,具有遗传稳定性。生菜*fancm*基因纯合突变体的获得,为进一步研究该基因的功能,验证其能否提高生菜减数分裂的重组频率提供了基础。

本研究建立的生菜CRISPR/Cas9基因编辑体系对于生菜的基因功能研究具有重要的意义。同时通过CRISPR/Cas9系统编辑生菜基因组,开展生菜遗传改良,加快生菜育种进程,以期培育出具有优势性状的生菜新品种。

参考文献

- Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, Boyaval P, Moineau S, Romero D, Horvath P (2007). CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*, 315 (5819): 1709–1712
- Bortesi L, Fischer R (2015). The CRISPR/Cas9 system for plant genome editing and beyond. *Biotechnol Adv*, 33 (1): 41–52
- Cong L, Ran F, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, Hsu P, Wu X, Ji

- ang W, Marraffini L, et al (2013). Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 339 (6121): 819–822
- Crismani W, Girard C, Froger N, Pradillo M, Santos JL, Chelysheva L, Copenhaver GP, Horlow C, Mercier R (2012). FANCM limits meiotic crossovers. *Science*, 336 (6088): 1588–1590
- Curtis IS, Power JB, Laats AMM, Caboche M, Davey MR (1999). Expression of a chimeric nitrate reductase gene in transgenic lettuce reduces nitrate in leaves. *Plant Cell Rep*, 18 (11): 889–896
- Deng XL, Zhou Y, Chang JL (2007). Establishment of genetic transformation system and transgenic studies in lettuce (*Lactuca sativa* var. *capatata*). *Acta Bot Yunnan*, 29 (1): 98–102 (in Chinese with English abstract) [邓小莉, 周岩, 常景玲(2007). 生菜遗传转化体系的建立及转基因研究. *云南植物研究*, 29 (1): 98–102]
- Ding Y, Li H, Chen LL, Xie K (2016). Recent advances in genome editing using CRISPR/Cas9. *Front Plant Sci*, 7: 703
- Fan YL, Li J, Ruan Y, Liu CL (2012). Study on introduction of avian influenza antigen gene *NA* into lettuce. *Hunan Agric Sci*, (5): 13–16 (in Chinese with English abstract) [范亚丽, 李进, 阮颖, 刘春林(2012). 禽流感抗原基因 NA 导入生菜的研究. *湖南农业科学*, (5): 13–16]
- Feng Z, Zhang B, Ding W, Liu X, Yang DL, Wei P, Cao F, Zhu S, Zhang F, Mao Y, et al (2013). Efficient genome editing in plants using a CRISPR/Cas system. *Cell Res*, 23 (10): 1229–1232
- Fu XQ, Guo XB, You LJ, Tang YL, Cheng HQ, Wang GF, Tang KX (2012). Co-transformation of *Atp5y* and *folE* genes elevated carotenoids and folic acid contents in romaine lettuce. *J Shanghai Jiaotong Univ (Agric Sci)*, 30 (6): 22–31 (in Chinese with English abstract) [付雪晴, 郭新波, 尤丽佳, 唐岳立, 程海祺, 王国丰, 唐克轩(2012). 共转化 $Atp5y$ 和 $folE$ 基因提高生菜类胡萝卜素和叶酸含量. *上海交通大学学报(农业科学版)*, 30 (6): 22–31]
- Fu YL, Niu RS, Fang JY, Zhao X, Wang H, Liu TZ (2007). Research advance of biotechnology breeding of lettuce. *Acta Agric Jiangxi*, 19 (10): 94–95 (in Chinese with English abstract) [付雅丽, 牛瑞生, 樊建英, 赵璇, 王虎, 刘铁铮(2007). 生菜生物技术育种研究进展. *江西农业学报*, 19 (10): 94–95]
- Knoll A, Higgins JD, Seeliger K, Reha SJ, Dangel NJ, Bauknecht M, Schröpfer S, Franklin FCH, Puchta H (2012). The Fanconi anemia ortholog FANCM ensures ordered homologous recombination in both somatic and meiotic cells in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 24 (4): 1448–1464
- Li M, Li X, Zhou Z, Wu P, Fang M, Pan X, Lin Q, Luo W, Wu G, Li H (2016). Reassessment of the four yield-related genes *Gn1a*, *DEP1*, *GS3*, and *IPA1* in rice using a CRISPR/Cas9 system. *Front Plant Sci*, 7: 377
- Liang Z, Chen K, Li T, Zhang Y, Wang Y, Zhao Q, Liu J, Zhang H, Liu C, Ran Y, et al (2017). Efficient DNA-free genome editing of bread wheat using CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein complexes. *Nat Commun*, 8: 14261
- Lim W, Park J, Park S (2011). Re-evaluation of the effects of growth regulators on callus induction and shoot regeneration in *Agrobacterium*-mediated transformation of lettuce. *Acta Physiol Plant*, 33 (5): 1631–1637
- Mali P, Aach J, Stranges PB, Esvelt KM, Moosburner M, Kosuri S, Yang L, Church GM (2013). CAS9 transcriptional activators for target specificity screening and paired nickases for cooperative genome engineering. *Nat Biotechnol*, 31 (9): 833–838
- Mao Y, Zhang H, Xu N, Zhang B, Gou F, Zhu JK (2013). Application of the CRISPR–Cas system for efficient genome engineering in plants. *Mol Plant*, 6 (6): 2008–2011
- Michelmore R, Marsh E, Seely S, Landry B (1987). Transformation of lettuce (*Lactuca sativa*) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Rep*, 6 (6): 439–442
- Mulabagal V, Ngouajio M, Nair A, Zhang Y, Gottumukkala AL, Nair MG (2010). *In vitro* evaluation of red and green lettuce (*Lactuca sativa*) for functional food properties. *Food Chem*, 118 (2): 300–306
- Rani R, Yadav P, Barbadikar KM, Baliyan N, Malhotra EV, Singh BK, Kumar A, Singh D (2016). CRISPR/Cas9: a promising way to exploit genetic variation in plants. *Biotechnol Lett*, 38 (12): 1991–2006
- Shan Q, Wang Y, Li J, Gao C (2014). Genome editing in rice and wheat using the CRISPR/Cas system. *Nat Protoc*, 9 (10): 2395–2410
- Vanjildorj E, Bae TW, Riu KZ, Kim SY, Lee HY (2005). Overexpression of *Arabidopsis ABF3* gene enhances tolerance to drought and cold in transgenic lettuce (*Lactuca sativa*). *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 83 (1): 41–50
- Wang Y, Cheng X, Shan Q, Zhang Y, Liu J, Gao C, Qiu JL (2014). Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew. *Nat Biotechnol*, 32 (9): 947–951
- Woo JW, Kim J, Kwon SI, Corvalán C, Cho SW, Kim H, Kim SG, Kim ST, Choe S, Kim JS (2015). DNA-free genome editing in plants with preassembled CRISPR–Cas9 ribonucleoproteins. *Nat Biotechnol*, 33 (11): 1162–1164
- Xie K, Yang Y (2013). RNA-Guided genome editing in plants using a CRISPR–Cas system. *Mol Plant*, 6 (6): 1975–1983
- Xing HL, Dong L, Wang ZP, Zhang HY, Han CY, Liu B, Wang XC, Chen QJ (2014). A CRISPR/Cas9 toolkit for multiplex genome editing in plants. *BMC Plant Biol*, 14: 327
- Zhang F, Wen Y, Guo X (2014). CRISPR/Cas9 for genome editing: progress, implications and challenges. *Hum Mol Genet*, 23 (1): 40–46
- Zhang XH, Zhang HY, Wu J, Min DH, Kang B (2002). Effect of TDZ on callus inducement and shoot growth in tissue culture of *Toona sinensis*. *J Northwest Sci-tech Univ Agric For (Nat Sci Ed)*, 30 (5): 35–39 (in Chinese with English abstract) [张小红, 张红燕, 武军, 闵东红, 康冰(2002). TDZ对香椿愈伤组织诱导及芽增殖生长等的影响. *西北农林科技大学(自然科学版)*, 30 (5): 35–39]
- Zhu CY, Lei JJ, Zhou H, Wu M, Chen Q, Chen YZ, Yang SH, Yu SY (2008). Optimization of the regeneration system *in vitro* culture of lettuce (*Lactuca sativa* var. *crispa* L.) using orthogonal experiment. *J Trop Med*, 8 (4): 313–316 (in Chinese with English abstract) [朱春燕, 雷建军, 周浩, 吴敏, 陈清, 陈燕珍, 杨素华, 俞守义(2008). 正交设计优化皱叶生菜离体再生体系. *热带医*

- 学杂志, 8 (4): 313–316]
- Zhu LY, Liu L, Meng XD, Zhang ZX (2002). *In vitro* shoot differentiation from cotyledon explants of lettuce. *Acta Horti Sin*, 29 (2): 181–182 (in Chinese with English abstract) [朱路英, 刘玲, 孟祥栋, 张振贤(2002). 叶用莴苣离体培养和植株再生. *园艺学报*, 29 (2): 181–182]
- Zuo XF, Zhang XY, Shan L, Xiao CY, He DX, Ru BG (2001). Expression of human intestinal trefoil factor (hITF) gene in lettuce. *Chin Bull Bot*, 43 (10): 1047–1051 (in Chinese with English abstract) [左晓峰, 张晓钰, 单龙, 肖传英, 何笃修, 茹炳根(2001). 人小肠三叶因子(hITF)基因在生菜中的整合与表达. *植物学报*, 43 (10): 1047–1051]

Establishment of CRISPR/Cas9-mediated genome editing system in lettuce (*Lactuca sativa* L.)

YU Ming-Sen¹, LI Xiang¹, GAO Ma-Ye², YANG Lei², NI Di-An^{2*}, WANG Ying-Xiang^{1*}

¹Institute of Plant Biology, School of Life Sciences, Fudan University, Shanghai 200433, China; ²School of Ecological Technology and Engineering, Shanghai Institute of Technology, Shanghai 201418, China

Abstract: CRISPR/Cas9 system has been widely applied to genome editing in many plant species, but was rarely reported in lettuce. The present study was aimed to establish the CRISPR/Cas9-mediated genome editing system in lettuce (*Lactuca sativa* L.). The lettuce *FANCM* gene was used for testing the system. According to the *FANCM* gene sequence, we designed the target site and successfully constructed the Lsfancm-CRISPR/Cas9 vector. Then we introduced the constructed Lsfancm-CRISPR/Cas9 plasmid into lettuce through *Agrobacterium tumefaciens* mediating genetic transformation approach with seedling cotyledons as explants and inoculating agrobacterium strain, co-cultivating, calli-inducing, shooting, and rooting as transformation steps. In total, 24 transgenic positive plants were obtained in T₀ generation by PCR verification. Further PCR detection and sequence analysis on target site demonstrated that 4 plants were genetically edited resulting in heterozygous *fancm* mutants. Furthermore, the homozygous mutants in T₁ generation were obtained. The effective heritable genome editing system CRISPR/Cas9 established in this study will provide important resources not only for functional gene studies but also for genetic manipulation of lettuce breeding.

Key words: *Lactuca sativa* L.; *Agrobacterium*-mediated genetic transformation; gene editing; CRISPR/Cas9

Received 2017-03-13 Accepted 2017-04-12

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant Nos. 31370347 and 31570314), the Annual Science & Technology Program of Shanghai Landscaping & City Appearance Bureau (Grant No. G179910) and Rijk Zwaan.

*Co-corresponding authors (E-mail: yx_wang@fudan.edu.cn; dani@sibs.ac.cn).