

Knockout Vector Construction of Tobacco Vacuolar pH-Related *NtPH1* Gene by Plant CRISPR/Cas9 System

Jiamin Li, Min Wang, Kun Ma, Xiaoyu Hong, Chaojun Cui, Junyu Chen, Qinlong Zhu

College of Life Sciences, South China Agricultural University, Key Laboratory of Plant Functional Genomics and Biotechnology of Guangdong Province, Guangzhou Guangdong
Email: zhuql@scau.edu.cn

Received: Jul. 1st, 2016; accepted: Jul. 19th, 2016; published: Jul. 25th, 2016

Copyright © 2016 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

Abstract

The alkaline pH level of plant vacuoles is an important factor for coloration of blue flowers. Tobacco *NtPH1* gene is an orthologous gene of *PhPH1* that controls the vacuolar pH in petunia petals. To study the function of *NtPH1* gene, we constructed a knockout vector with two target sites of *NtPH1* gene using plant CRISPR/Cas9 System. The two target sequences in *NtPH1* genomic DNA are a 60 bp apart. PCR amplified the small nuclear RNA promoters (AtU6-26 and AtU6-29) and two sgRNAs, respectively. For each sgRNA cassette, the overlapping sequence between promoter and sgRNA was the target sequence of 20 bp. The overlapping PCR was completed to *in vitro* splice the two sgRNA cassettes. Then the two sgRNA cassettes were cloned into pYLCRISPR/Cas9Pubi-H vector by Golden Gate cloning. After positive colony PCR, restriction enzyme digestion and further sequencing, the knockout vector, pCas9-PH1T1T2, was successfully constructed. This work laid a foundation for further study on the function of *NtPH1* gene, and future application of this gene in genetic engineering of blue flowers.

Keywords

Tobacco, Vacuolar pH, *NtPH1*, CRISPR/Cas9 System, Vector Construction

烟草液泡pH相关基因*NtPH1*的CRISPR/Cas9敲除载体的构建

李嘉敏, 汪敏, 马坤, 洪晓喻, 崔超军, 陈君宇, 祝钦泷

文章引用: 李嘉敏, 汪敏, 马坤, 洪晓喻, 崔超军, 陈君宇, 祝钦泷. 烟草液泡 pH 相关基因 *NtPH1* 的 CRISPR/Cas9 敲除载体的构建[J]. 植物学研究, 2016, 5(4): 132-138. <http://dx.doi.org/10.12677/br.2016.54018>

华南农业大学生命科学学院, 广东省植物功能基因组与生物技术重点实验室, 广东 广州
Email: zhuql@scau.edu.cn

收稿日期: 2016年7月1日; 录用日期: 2016年7月19日; 发布日期: 2016年7月25日

摘要

植物液泡pH的碱性程度是蓝色花形成的一个重要因素。烟草*NtPH1*是矮牵牛蓝色花形成相关的控制液泡pH的*PhPH1*基因的直系同源基因。为了研究其功能,本研究利用植物CRISPR/Cas9系统构建*NtPH1*的双靶点敲除载体。通过对*NtPH1*基因片段的序列分析,选择两个PAM序列相距60 bp的位点作为靶序列,通过重叠PCR直接把两个靶位点分别拼接到AtU6-29和AtU6-26两个启动子驱动的sgRNA表达盒上,再利用Golden Gate克隆的方法把其连入pYLCRISPR/Cas9Pubi-H载体,重组克隆经菌落PCR筛选、质粒DNA酶切鉴定与测序,获得了*NtPH1*基因的双靶点敲除载体pCas9-PH1T1T2。这为进一步开展*NtPH1*基因的功能研究与蓝色花的基因工程应用奠定了基础。

关键词

烟草, 液泡pH, *NtPH1*, CRISPR/Cas9系统, 载体构建

1. 引言

观赏植物的花色是其最重要的商品性状之一。花的呈色除花青素苷本身的性质与种类外,还受到花瓣液泡的pH值、助色素的含量以及金属离子的络合作用等因素共同影响[1]。尽管自然界的花卉色彩丰富,但却普遍缺少蓝色系的花,蓝色花的基因工程研究一直是近年来的研究热点。蓝色花的产生,首先需要蓝色基因F3'5'H(类黄酮-3',5'-羟基化酶)的存在,其直接催化产生蓝色花的主要呈色物质——飞燕草素苷(delphinin)及其衍生物[2]。其次,随着液泡pH逐渐升高可使花青素苷呈色由红向蓝转变,偏碱性的液泡pH是蓝色呈现所必需的[3],如花瓣中含有飞燕草素苷的天竺葵(*Pelargonium hortorum*)和凤仙花(*Impatiens balsamina*),由于液泡pH偏酸而无法显现蓝色[3]。

目前关于蓝色基因F3'5'H的克隆和功能研究已有很多报道[4],而关于液泡pH的调控研究却很少。矮牵牛*PhPH5*编码P_{3A}-ATPase的质子泵,其突变直接导致花瓣液泡酸化程度降低,从而使花朵变为蓝色[5]。矮牵牛*PhPH1*编码P_{3B}-ATPase,其自身无H⁺转运的活性,通过与PH5形成复合体共同作用调控矮牵牛花瓣液泡酸化,最终决定花朵呈色,其突变导致该复合体不能正常工作,而使花瓣显示蓝色[6]。

CRISPR/Cas9系统是通过sgRNA介导对靶位点进行定位并利用Cas核酸酶对核酸实现双链断裂(double-strand break, DSB)来实现基因组定点编辑,作为一种新兴的技术已比较成熟,被广泛用于植物功能基因组研究中[7]。本实验室的Ma等已成功开发了一套简单、高效和能实现多靶点编辑的植物CRISPR/Cas9载体系统[8],该系统利用重叠PCR方法在体外直接拼接不同靶位点sgRNA的表达盒,然后再用Golden Gate克隆[9]或Gibson克隆[10]的方法把多个sgRNA表达盒一步组装到含Cas9表达盒的植物双元载体中。利用该系统已经成功在水稻、拟南芥、杨树等中实现了准确的基因组编辑[8][11]。

烟草*NtPH1*是同为茄科的矮牵牛*PhPH1*基因的直系同源基因,两者具有高度的序列一致性,推测具有与*PhPH1*相似的功能。本研究利用植物CRISPR/Cas9系统成功构建了*NtPH1*的双靶点敲除载体pCas9-PH1T1T2,为进一步开展*NtPH1*基因的功能研究,以及利用其进行蓝色花的基因工程操作奠定了基础。

2. 材料与方法

2.1. 材料、菌株与试剂

含 Cas9 表达盒的双元表达载体 pYLCRISPR/Cas9Pubi-H, 含 sgRNA 表达盒载体质粒 pYLsgRNA-AtU6-26 和 pYLsgRNA-AtU6-29, 均由本实验室构建和保存。大肠杆菌菌株 *E. coli* DH10B 由实验室保存。

高保真 DNA 聚合酶 KOD FX 购于 TOYOBO; T4 DNA 连接酶、限制性内切酶均购于 NEB; DNA 胶回收试剂盒购于 TAKARA; 其它试剂均为国产和分析纯。

2.2. 靶位点选择

选择 *NtPH1* 第 7 外显子正义或反义链设计两个 20 bp 碱基靶序列, 两个靶序列 PAM 序列(NGG)间间隔约 60 bp, GC% 含量 50%~60%, G/C 分布均匀。

2.3. 靶位点 sgRNA 表达盒的体外拼接

以质粒 pYLsgRNA-AtU6-26 为模板, 通用引物 UF(5'-CTCCGTTTTACCTGTGGAATCG-3')与特异引物 R-T1 (5'-ctggatgacgcgattatggcaatcactactcgactctagc-3', 下划线为靶序列 T1), 扩增约 470 bp 左右的 AtU6-26 启动子, 引物 F-T1(5'-ccataatcgcgtcatccagGTTTTAGAGCTAGAAATAGC-3', 下划线为靶序列 T1) 与通用引物 gR-R(5'-CGGAGGAAAATCCATCCAC-3')扩增约 136 bp 的 gRNA 序列, 上述 PCR 产物各取 0.2 μ L 和 0.1 μ L 混合后, 用 *Bsa* I 位点的通用引物 Pps-R (5'-TTCAGAggtctcTACCGACTAGTATGGAATCGGCAGCAAAGG-3', 下划线为 *Bsa* I 位点)和 Pgs-2 (5'-AGCGTGggtctcGtcaggTCCATCCACTCCAAGCTC-3', 下划线为 *Bsa* I 位点)进行重叠 PCR 扩增, 获得靶点 T1 的 sgRNA 表达盒。

以质粒 pYLsgRNA-AtU6-29 为模板, 通用引物 UF 与特异引物 R-T2 (5'-cttcgaggcttaaactgtcaatcactactcgactctagc-3', 下划线为靶序列 T2), 扩增约 400 bp 左右的 AtU6-29 启动子, 引物 F-T2 (5'-acaagttaagccctcgaagGTTTTAGAGCTAGAAATAGC-3', 下划线为靶序列 T2)与通用引物 gR-R 扩增约 136 bp 的 gRNA 序列, 上述 PCR 产物各取 0.2 μ L 和 0.1 μ L 混合后, 用 *Bsa* I 位点的通用引物 Pps-2 和 Pgs-L 进行重叠 PCR 扩增, 获得靶点 T2 的 sgRNA 表达盒。PCR 扩增体系和条件按照 KOD FX 推荐进行。

2.4. 双元载体上两个靶位点 sgRNA 表达盒的 Golden Gate 法组装

由于 *Bsa* I 位点切开后, 再连上形成的新位点已不能被 *Bsa* I 切割, 因此直接把双元载体质粒 pYLCRISPR/Cas9Pubi-H 与 T1 和 T2 的 sgRNA 表达盒, 直接混合后, 加入 *Bsa* I 内切酶和 T4 DNA 连接酶, 同时进行酶切连接。15 μ L 反应体系为: 1 μ L 10 x CutSmart buffer, 80 ng pYLCRISPR/Cas9Pubi-H 质粒, ATP (终浓度 1.0 mM), T1, T2 sgRNA 表达盒各 30 ng, 10 U *Bsa* I 内切酶, 40 U T4 DNA 连接酶, 不足的用水补足。反应条件: 在可调温度的热板或 PCR 仪上, 先 3 个循环(37 $^{\circ}$ C 10 min, 10 $^{\circ}$ C 5 min, 20 $^{\circ}$ C 5 min), 再进行 10 个循环(37 $^{\circ}$ C 3 min, 10 $^{\circ}$ C 5 min, 20 $^{\circ}$ C 5 min)。反应产物透析后直接电击 DH10B, 用靶点特异引物 T1 (5'-ccataatcgcgtcatccag-3')和 T2 (5'-cttcgaggcttaaactgt-3')筛选阳性克隆, 最后提质粒用 *Spe* I 酶切检测, 测序最终确定。整个载体构建的流程如图 1。

3. 结果与分析

3.1. 靶位点序列的确定

根据 *NtPH1* 第 7 外显子序列, 分别搜索 PAM 序列 NGG, 或其互补链的 CCN, 并且靶位点 GC% 含量在 45%~60% 之间, 最终确定两个靶位点序列 T1 和 T2 (图 2), 其中 T1 是 CCN 的互补链, 距离 T2 位点的 PAM 约有 60 bp 左右。

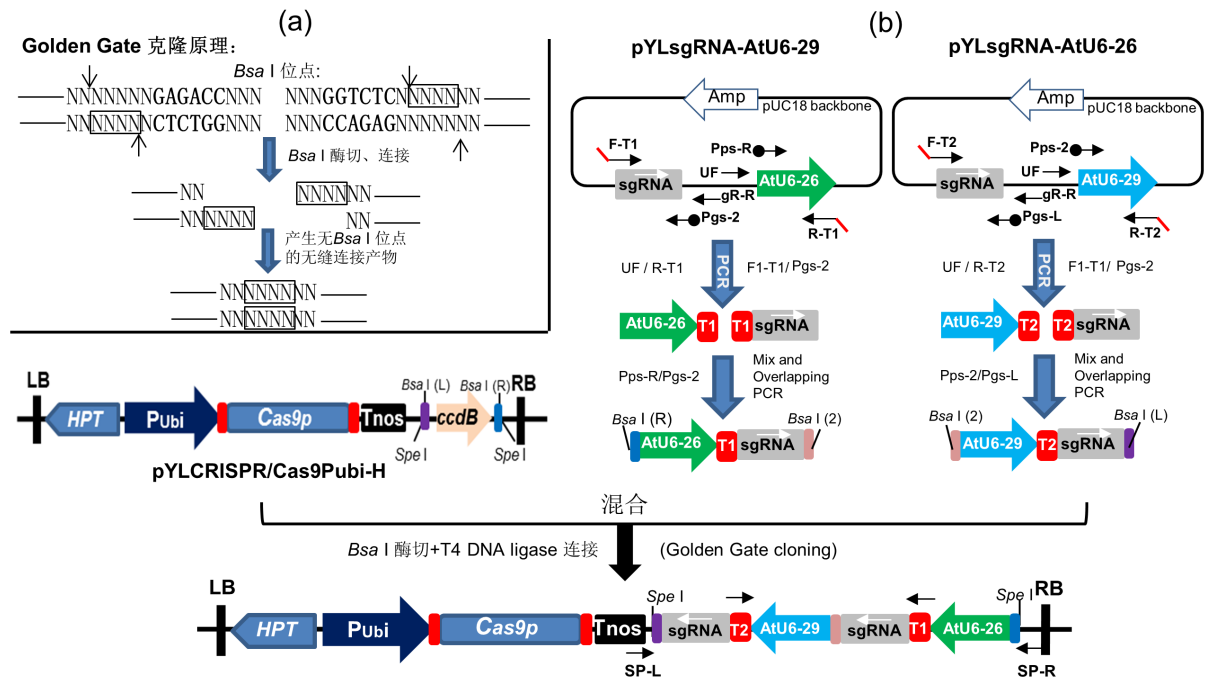


Figure 1. Schematic diagram for construction of plant CRISPR/Cas9 vector system: (a) Golden Gate cloning using IIS class *Bsa* I; (b) *in vitro* splicing of different sgRNAs and one-step Golden Gate cloning
图 1. 植物 CRISPR/Cas9 双靶点敲除载体构建示意图: (a) 利用 IIS 型限制性内切酶 *Bsa* I 的 Golden Gate 克隆原理; (b) 不同 sgRNA 表达盒的体外拼接和利用 Golden Gate 克隆方法一步连入双元表达载体中

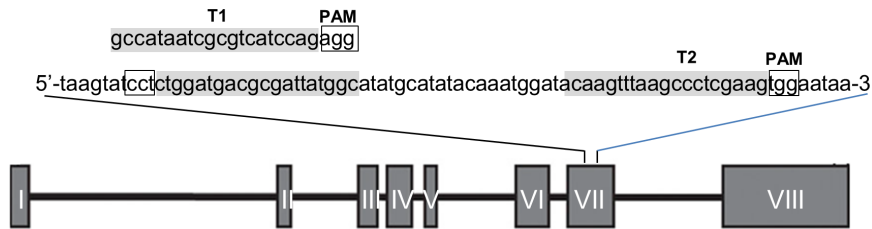


Figure 2. The location and characterization of two target sequences
图 2. 靶序列位置与特征

3.2. sgRNA 表达盒直接拼接

用通用引物 UF 与特异引物 R-T1, 扩增 pYLsgRNA-AtU6-26 质粒, 获得预期约 470 bp 左右的 AtU6-26 启动子, 引物 F-T1 与通用引物 gR-R 扩增获得预期约 136 bp 的 gRNA 序列(图 3(a))。上述 PCR 产物混合后, 通用引物 Pps-R 和 Pgs-2 进行重叠 PCR 扩增, 获得预期 600 bp 左右的 T1 sgRNA 表达盒(图 3(b))。

用通用引物 UF 与特异引物 R-T2, 扩增 pYLsgRNA-AtU6-29 质粒, 获得预期约 400 bp 左右的 AtU6-29 启动子, 引物 F-T2 与通用引物 gR-R 扩增获得预期约 136 bp 的 gRNA 序列(图 3(a))。上述 PCR 产物混合后, 通用引物 Pps-2 和 Pgs-L 进行重叠 PCR 扩增, 获得预期 530 bp 左右 T2 sgRNA 表达盒(图 3(b))。

3.3. *NtPH1* 基因的双靶点敲除载体 pCas9-PH1T1T2 构建

Golden Gate 克隆法就是利用限制性内切酶 IIS 这类酶, 如 *Bsa* I, 其识别位点与切割位点是分离的, 并且能产生 4 个任意碱基的突出末端, 其酶切连接产物能够实现无缝连接, 和产生新的不被 *Bsa* I 识别的位点, 是一种广泛使用的方法。把 pYLCRISPR/Cas9Pubi-H 与 T1 和 T2 的 sgRNA 表达盒纯化产物混合后,

边切边连，产物转化大肠杆菌 DH10B 后，随机挑选 12 个重组克隆，用靶点特异引物 T1/T2 进行 PCR 筛选，结果显示，12 个克隆都能扩出预期大小的带(图 4)，说明这种方法具有较高的连接效率。

进一步提取 PCR 阳性克隆的质粒，用 *Spe* I 酶切后，产生预期 1.2 kb 大小的两个 sgRNA 表达盒的连接带(图 5)，最后测序确定，表明 *NtPH1* 基因的双靶点敲除载体 pCas9-PH1T1T2 已被成功构建。

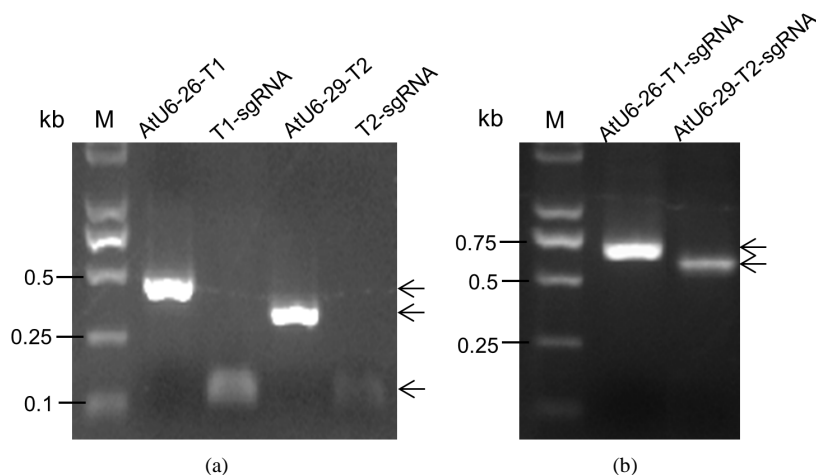


Figure 3. *In vitro* splicing of sgRNA cassette: (a) PCR amplifying promoters and sgRNAs; (b) Overlapping PCR products of sgRNA cassettes

图 3. sgRNA 表达盒体外重叠 PCR 拼接: (a) 含靶序列重叠区的启动子和 sgRNA PCR 产物; (b) sgRNA 表达盒拼接 PCR

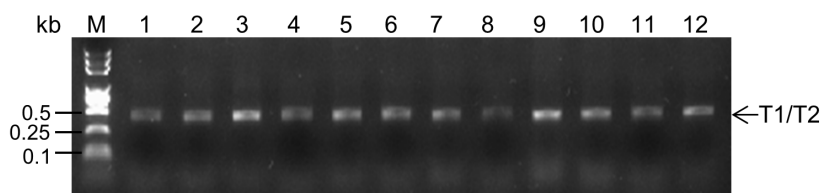


Figure 4. The colony-screening PCR of pCas9-PH1T1T2 vector

图 4. pCas9-PH1T1T2 载体的菌落 PCR 筛选

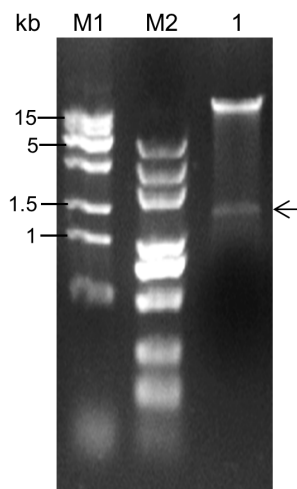


Figure 5. Restriction enzyme analysis of pCas9-PH1T1T2 vector

图 5. pCas9-PH1T1T2 载体的酶切鉴定

4. 讨论

植物基因功能研究, 采用的方法主要是超量表达和 RNAi 干涉的方法。其中, 由于 RNAi 是转录后水平的调控, 其对目标基因转录的抑制作用差异较大、特异性较差, 效果也不理想[8]。而 CRISPR/Cas9 系统能够实现以往难以做到的基因组定点编辑, 能够实现基因组水平上的目标基因的准确敲出, 直接获得突变体。作为一种新兴的基因组定点编辑技术, CRISPR/Cas9 系统已广泛应用于植物基因功能的研究中[7]。

本研究所使用的植物 CRISPR/Cas9 基因编辑载体系统, 与目前的一些植物编辑载体系统相比, 具有更大的优势和特点。如与 Zhou 等的系[12]统相比, 我们的这套载体系统具有更加简单、快速高效的特点, 不同靶位点的 sgRNA 表达盒, 是体外拼接的, 无需进行一次体内转化, 多个 sgRNA 表达盒能够通过 Golden Gate 克隆或 Gibson 克隆的方法, 一步组装到双元载体上, 只需要一次转化大肠杆菌感受态, 就能实现多基因多靶点的载体构建。由于 sgRNA 对靶位点的结合能力会影响编辑效率, 所以在选择靶位点时要尽量提高靶序列的 GC 含量(一般 50%~60%), 避免与 sgRNA 形成二级结构[8]。靶位点的选择, 除了正义链上的 NGG 外, 还可以考虑正义链上 CCN (对应反义链上的 NGG), 并且双靶点之间如果间隔几十个碱基, 则这两个靶位点间的序列被删除突变的几率更大。

蓝色花的形成除了需要蓝色基因 F3'5'H 外, 花瓣液泡 pH 的偏碱性也是一个重要的条件[3] [5] [6]。烟草 *NtPH1* 基因是同为茄科的矮牵牛 *PhPH1* 基因[6]的直系同源基因, 可能具有相似的对液泡 pH 的调控作用, 对于其功能的研究也尚未报道。本研究已成功构建了 *NtPH1* 基因的双靶点敲除载体 pCas9-PH1T1T2, 下一步将利用农杆菌介导的叶盘转化法, 转化入烟草中, 研究其对液泡 pH 的调控作用, 为蓝色花基因工程研究打下基础。

5. 结论

利用本实验室开发的高效 CRISPR/Cas9 系统, 成功构建了烟草 *NtPH1* 基因的双靶点基因组敲除载体, 为进一步研究其功能奠定了基础。

基因项目

国家级大学生创新创业训练计划项目(201610564006); 广东省公益研究与能力建设项目(2016A020210084)。

参考文献 (References)

- [1] Yoshida, K., Mori, M. and Kondo, T. (2009) Blue Flower Color Development by Anthocyanins: From Chemical Structure to Cell Physiology. *Natural Product Reports*, **26**, 884-915. <http://dx.doi.org/10.1039/b800165k>
- [2] Tanaka, Y. and Brugliera, F. (2013) Flower Colour and Cytochromes P450. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, **368**, Article ID: 20120432. <http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2012.0432>
- [3] Tanaka, Y., Brugliera, F., Kalc, G., et al. (2010) Flower Color Modification by Engineering of the Flavonoid Biosynthetic Pathway: Practical Perspectives. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **74**, 1760-1769. <http://dx.doi.org/10.1271/bbb.100358>
- [4] 戴思兰, 洪艳. 基于花青素苷合成和呈色机理的观赏植物花色改良分子育种[J]. 中国农业科学, 2016, 49(3): 529-542.
- [5] Verweij, W., Spelt, C., Di Sansebastiano, G.-P., et al. (2008) A Novel Type of Tonoplast Localized H⁺-ATPase Is Required for Vacuolar Acidification and Coloration of Flowers and Seeds. *Nature Cell Biology*, **10**, 1456-1462. <http://dx.doi.org/10.1038/ncb1805>
- [6] Faraco, M., Spelt, C., Blied, M., et al. (2014) Hyperacidification of Vacuoles by the Combined Action of Two Different P-ATPases in the Tonoplast Determines Flower Color. *Cell Reports*, **6**, 32-43. <http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2013.12.009>

- [7] 马兴亮, 刘耀光. 植物 CRISPR/Cas9 基因组编辑系统与突变分析[J]. 遗传, 2016, 38(2): 118-125.
- [8] Ma, X., Zhang, Q., Zhu, Q., *et al.* (2015) A Robust CRISPR/Cas9 System for Convenient High-Efficiency Multiplex Genome Editing in Monocot and Dicot Plants. *Molecular Plant*, **8**, 1274-1284. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molp.2015.04.007>
- [9] Engler, C., Kandzia, R., and Marillonnet, S. (2008) A One Pot, One Step, Precision Cloning Method with High Throughput Capability. *PLoS One*, **3**, e3647. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0003647>
- [10] Gibson, D.G, Young, L., Chuang, R.Y., *et al.* (2009) Enzymatic Assembly of DNA Molecules up to Several Hundred Kilobases. *Nature Methods*, **6**, 343-345. <http://dx.doi.org/10.1038/nmeth.1318>
- [11] Fan, D., Liu, T., Li, C., *et al.* (2015) Efficient CRISPR/Cas9-Mediated Targeted Mutagenesis in Populus in the First Generation. *Scientific Reports*, **5**, 12217. <http://dx.doi.org/10.1038/srep12217>
- [12] Zhou, H.B., Liu, B., Donald, P., *et al.* (2014) Large Chromosomal Deletions and Heritable Small Genetic Changes Induced by CRISPR/Cas9 in Rice. *Nucleic Acids Research*, **42**, 10903-10914. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gku806>

期刊投稿者将享受如下服务:

1. 投稿前咨询服务 (QQ、微信、邮箱皆可)
2. 为您匹配最合适的期刊
3. 24 小时以内解答您的所有疑问
4. 友好的在线投稿界面
5. 专业的同行评审
6. 知网检索
7. 全网络覆盖式推广您的研究

投稿请点击: <http://www.hanspub.org/Submission.aspx>