

# CRISPR/Cas9 技术编辑 *OsRhoGDI2* 基因导致水稻半矮化

王凯婕, 安文静, 刘亚菲, 刘迪, 冯连杰, 王俊杰, 黄俊骏, 刘肖飞, 梁卫红

河南师范大学 生命科学学院, 河南 新乡 453007

王凯婕, 安文静, 刘亚菲, 等. CRISPR/Cas9 技术编辑 *OsRhoGDI2* 基因导致水稻半矮化. 生物工程学报, 2020, 36(4): 707–715.  
Wang KJ, An WJ, Liu YF, et al. Disruption of *OsRhoGDI2* by CRISPR/Cas9 technology leads to semi-dwarf in rice. Chin J Biotech, 2020, 36(4): 707–715.

**摘要:** *OsRhoGDI2* 是通过酵母双杂交从水稻幼穗中分离的一个与 Rho 蛋白家族成员 *OsRacD* 相互作用蛋白的编码基因, 但功能尚不明确。本研究利用 CRISPR/Cas9 技术创制水稻 *OsRhoGDI2* 基因敲除突变体。检测结果表明, 转基因水稻 T<sub>0</sub> 代获得 2 种纯合突变体, T<sub>1</sub> 代获得 8 种纯合突变体。序列分析显示, 在敲除水稻中, 该基因的编辑靶点附近发生了碱基的替换或缺失, 预期生成丧失 RhoGDI 保守结构域的截短蛋白。表型比对分析发现, 敲除水稻与对照相比, 株高显著降低, 统计学分析结果显示, 敲除水稻株高降低源于第 II 和第 III 茎节的缩短, 提示 *OsRhoGDI2* 基因可能与水稻株高控制相关。

**关键词:** CRISPR/Cas9 技术, 水稻, *OsRhoGDI2*, 株高

## Disruption of *OsRhoGDI2* by CRISPR/Cas9 technology leads to semi-dwarf in rice

Kaijie Wang, Wenjing An, Yafei Liu, Di Liu, Lianjie Feng, Junjie Wang, Junjun Huang, Xiaofei Liu, and Weihong Liang

College of Life Sciences, Henan Normal University, Xinxiang 453007, Henan, China

**Abstract:** *OsRhoGDI2* was isolated as a putative partner of Rho protein family member *OsRacD* from rice panicles by yeast two-hybrid, but its function remains unknown. In order to identify the function of *OsRhoGDI2*, *OsRhoGDI2* knockout mutants were created by CRISPR/Cas9 technology. The results showed that two different homozygous mutants were obtained in T<sub>0</sub> generation, and eight kinds homozygous mutants were identified in T<sub>1</sub> generation. Sequence analysis revealed that the base substitution or base deletion occurred near the editing targets of the gene in knockout rice, and it could be expected that the truncated *OsRhoGDI2* proteins lacking the RhoGDI conserved domain would be generated. Phenotype analysis showed that

**Received:** July 24, 2019; **Accepted:** September 11, 2019

**Supported by:** National Natural Science Foundation of China (Nos. U1704101, 31701070, 31701508), Program for Innovative Research Team (in Science and Technology) in University of Henan Province (No. 15IRTSTHN020).

**Corresponding author:** Weihong Liang. Tel: +86-373-3326340; E-mail: liangwh@htu.cn

国家自然科学基金 (Nos. U1704101, 31701070, 31701508), 河南省高校科技创新团队支持计划 (No. 15IRTSTHN020) 资助。

网络出版时间: 2019-10-10

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.q.20191010.1048.006.html>

the *OsRhoGDI2* knockout rice plants were significantly lower than the control plants. Statistical analysis confirmed that the significant decrease of plant height was due to the shortening of the second and third internodes, suggesting that *OsRhoGDI2* gene may be related with rice height control.

**Keywords:** CRISPR/Cas9 technology, rice, *OsRhoGDI2*, plant height

CRISPR/Cas9 技术是近些年发展起来的一种简捷高效的基因编辑技术<sup>[1]</sup>。该技术通过 sgRNA 与基因组靶序列结合, 引导 Cas9 内切酶对靶序列进行切割产生 DSB, 在 DSB 修复过程中可能产生碱基的插入、缺失等<sup>[2]</sup>, 从而实现基因的编辑。近年来, CRISPR/Cas9 技术因其操作简单、成本低、效率高, 迅速发展并广泛应用于动物、植物、微生物等研究中<sup>[3-6]</sup>。例如高彩霞课题组率先利用该技术实现了水稻基因组编辑<sup>[7]</sup>; 邵高能等利用 CRISPR/Cas9 技术成功编辑了水稻 *Badh2* 香味基因, 加速香稻品种的选育进程<sup>[8]</sup>; 朱健康课题组相关研究表明, CRISPR/Cas9 系统可高效编辑水稻特异基因, 并且基因突变能够稳定遗传<sup>[9]</sup>。

植物 Rho/Rop 蛋白, 属于小 G 蛋白家族, 在信号转导中起“分子开关”的作用。已明确, 植物 RhoGDIs 是一类与 Rho/Rop 相互作用的互作蛋白。RhoGDIs 已知的功能涉及调节根毛<sup>[10]</sup>、花粉管生长、维持花粉管细胞稳态<sup>[11]</sup>、幼苗发育以及叶片细胞形态发生<sup>[12]</sup>等过程。*OsRhoGDI2* 是水稻 Rho 蛋白 OsRacD 互作蛋白的编码基因<sup>[13]</sup>。*OsRhoGDI2* 启动子功能鉴定以及表达模式分析发现, *OsRhoGDI2* 基因在叶鞘与节中高效表达<sup>[14]</sup>; *OsRhoGDI2* 蛋白亚细胞定位分析表明, 该蛋白主要分布在细胞膜、细胞质与细胞核<sup>[15]</sup>。目前, *OsRhoGDI2* 基因的功能尚不明确。为此, 本研究利用 CRISPR/Cas9 技术对水稻 *OsRhoGDI2* 进行编辑, 旨在筛选纯合敲除植株, 通过表型分析, 确定该基因可能涉及的生物学过程, 为后续以敲除水稻为材料开展 *OsRhoGDI2* 的功能研究奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 植物材料

本研究所用实验材料为粳稻栽培品种日本晴

(*Oryza sativa* L. *Japonica* cv. Nipponbare)。

### 1.2 菌株与载体

大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  与根癌农杆菌 *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 由本实验室保存, 载体 pw-A-cas9 与 pw-B 由武汉伯远公司提供。

### 1.3 主要试剂及试剂盒

限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒均购自大连 TaKaRa 公司。卡那霉素、潮霉素、酵母浸膏等试剂均购自北京鼎国生物技术有限公司。

### 1.4 引物

本文所用引物均采用 Primer Premier 5 软件设计, 委托英潍捷基 (上海) 贸易有限公司合成 (表 1)。

### 1.5 *OsRhoGDI2* 编辑靶位点的选择

将 *OsRhoGDI2* (AY364312) 提交至 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 进行检索, 找到全基因序列, 获得外显子信息。根据 gRNA 设计原则, 在 1 号外显子上设计 2 个 gRNA 靶位点, 并将其与水稻基因组 blast 比对分析验证, 确认靶序列的特异性。

### 1.6 中间载体的构建

通过 P1/P2 引物退火, 制备 gRNA1 片段, 反应体系如下: P1/P2 各 5  $\mu$ L, H<sub>2</sub>O 40  $\mu$ L; 反应条件如下: 95  $^{\circ}$ C 变性 10 min、55  $^{\circ}$ C 退火 10 min。gRNA2 片段通过 P3/P4 引物退火制备, 体系同上。

将制备的 2 个 gRNA 片段分别与载体 pw-A-cas9 和 pw-B 连接, 酶切连接体系如下: gRNA 片段 2  $\mu$ L, 载体 1.5  $\mu$ L, *Bsa* I 0.5  $\mu$ L, T4 DNA 连接酶 0.5  $\mu$ L, T4 缓冲液 1  $\mu$ L, H<sub>2</sub>O 4.5  $\mu$ L, 混匀后于 37  $^{\circ}$ C 反应 2 h。

表 1 本研究所用的引物

Table 1 Primers used in this study

Primer name	Primer sequence (5'-3')	Usage
P1	CAGT <u>GGTCTC</u> AGGCACGATGACGAGGAAGATGAG	Synthesis of sgRNA1
P2	CAGT <u>GGTCTC</u> AAAACCTCATCTTCTCGTCATCG	
P3	CAGT <u>GGTCTC</u> AGGCACCCCTCCGTGAGCTTCTCG	Synthesis of sgRNA2
P4	CAGT <u>GGTCTC</u> AAAACCGAGAAGCTCACGGAGGGG	
P5	ACGGTGTCTGCCATCACAGTTTGCC	Amplification of <i>Hyg</i> gene
P6	TTCGGAAGTGCTTGACATTGGGGA	
P7	CCACCTATTCTTCTCGCACATTC	Amplification of <i>OsRhoGDI2</i> editing target region
P8	AGGCTCTCATCCTCCTTCCAAGT	
off-1-F	CCTATGCCCTGGACCTGAAT	Amplification of off-target
off-1-R	GGGACCAAGAAAAGGAAAGAGT	
off-2-F	CATTTGAGCCTGCCTATCTG	
off-2-R	CCTATCCCGACCTTAAACCAA	
off-3-F	GCAAACAACAACCTAAGTACCCG	
off-3-R	CAAAGCCCAGCCGAATAAAC	
off-4-F	AATCTGAACGCCCAAATGC	
off-4-R	GGATGAACTGAACAGGTACAAGC	
off-5-F	GGCTCCCCTGGACTGTAAA	
off-5-R	ATCTCGCTCCCTGATGACC	

Note: *Bsa* I restriction site is underlined.

以热激法分别将上述 2 个连接产物转化 DH5 $\alpha$  感受态细胞, 经阳性转化子的筛选、检测, 将测序验证后的重组中间载体分别命名为 GDI2-A 与 GDI2-B。

### 1.7 植物表达载体 pW-T-*OsRhoGDI2* 的构建

取适量的 GDI2-A 与 GDI2-B 质粒, 按照以下体系进行酶切连接反应。体系如下: GDI2-A 1  $\mu$ L, GDI2-B 1.5  $\mu$ L, *Lgu* I 0.5  $\mu$ L, T4 DNA 连接酶 0.5  $\mu$ L, T4 缓冲液 1  $\mu$ L, 加 ddH<sub>2</sub>O 至 10  $\mu$ L, 混匀后于 37  $^{\circ}$ C 反应 2 h。以热激法进行连接产物的转化, 进行阳性转化子的筛选、检测并测序, 确认后的载体命名为 pW-T-*OsRhoGDI2*。

### 1.8 水稻的遗传转化及筛选

以农杆菌介导法将 pW-T-*OsRhoGDI2* 载体转化日本晴水稻愈伤组织, 常规方法筛选。待再生水稻 (T<sub>0</sub> 代) 长至四叶期时, 提取叶片基因组 DNA, 以 P5/P6 引物组合进行基因组 DNA 的 PCR 检测, 扩增体系为 10  $\mu$ L: 2 $\times$ Es *Taq* Master Mix 5  $\mu$ L, P5/P6 各 0.4  $\mu$ L, DNA 0.4  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 3.8  $\mu$ L; 扩增条件为: 94  $^{\circ}$ C 预变性 2 min; 94  $^{\circ}$ C 30 s, 57  $^{\circ}$ C

30 s, 72  $^{\circ}$ C 20 s, 进行 34 个循环; 72  $^{\circ}$ C 终延伸 2 min, 1% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增结果。采用相同体系, 以 P7/P8 引物组合扩增包含编辑靶点序列, 并对 PCR 产物胶回收测序, 测序结果采用 Primer Premier、DNAMAN 与 Chromas 软件分析。

转基因水稻 T<sub>1</sub> 代筛选方法同上。

### 1.9 *OsRhoGDI2* 编辑水稻的表型分析

选择 3 株 T<sub>1</sub> 代纯合的 *OsRhoGDI2* 编辑水稻植株, 观察其与野生型水稻日本晴的差异。待生长至成熟期时, 测量其株高、穗与茎节的长度, 获得的数据用 Microsoft Excel 2018 进行统计学分析, 并用 DPS 软件进行数据差异性分析, 用 Origin85 软件作图。

## 2 结果与分析

### 2.1 *OsRhoGDI2* 编辑靶位点的选择及载体构建

*OsRhoGDI2* 序列检索显示, 该基因由 5 个外显子和 4 个内含子构成。根据编辑靶点设计原则, 在 1 号外显子选择两个靶位点 (图 1)。其中, 靶位点 1 (Target 1) 位于 1 号外显子第 230–252 bp 处; 靶位点 2 (Target 2) 位于 1 号外显子第 153–175 bp

处的互补链上,且两个靶位点相隔 54 bp。

通过引物退火制备 gRNA1 与 gRNA2,它们分别与载体 pw-A-cas9 和 pw-B 连接,制备中间载体 GDI2-A 与 GDI2-B。通过 2 个中间载体酶切连接,最终构建植物表达载体 pW-T-*OsRhoGDI2* (图 2),该载体中的 *Hyg* 基因和 *Cas9* 基因均由 CaMV35S 启动子驱动,gRNA1 与 gRNA2 均由 *OsU3* 启动子

驱动,以 NOS 终止子终止。

## 2.2 *OsRhoGDI2* 敲除水稻的筛选与鉴定

经农杆菌介导的水稻愈伤转化及筛选,在  $T_0$  代共获得 11 株独立的再生植株。潮霉素基因引物扩增结果显示,11 株均为转基因水稻。编辑靶点序列的扩增结果显示,均扩增出与预期 598 bp 大小相符的目的片段 (图 3)。

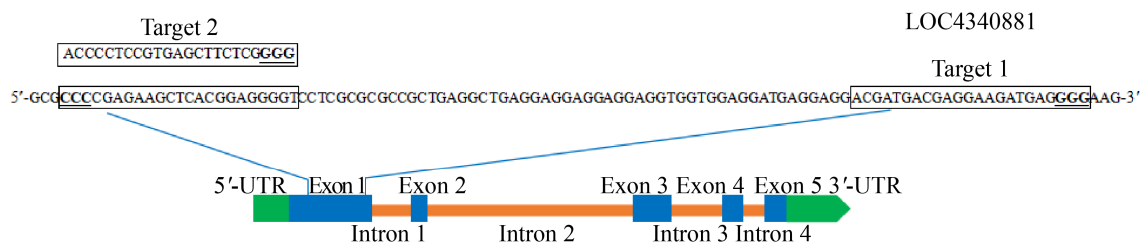


图 1 *OsRhoGDI2* 基因结构及编辑靶点的位置

Fig. 1 Schematic diagram of *OsRhoGDI2* gene structure and the sites of target sequences. PAM sequences are underlined.

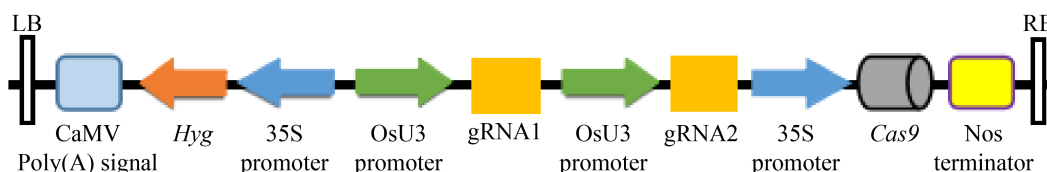


图 2 pW-T-*OsRhoGDI2* 表达载体的构建

Fig. 2 Construction of pW-T-*OsRhoGDI2* vector. LB: vector left border; RB: vector right border; *Hyg*: the resistance gene of hygromycin; *OsU3* promoter: rice *U3* promoter; 35S promoter: Cauliflower mosaic virus (CaMV) 35S promoter; *Nos* terminator: *Agrobacterium tumefaciens* nopaline synthase gene (*Nos*) terminator; gRNA1 and gRNA2: guide RNA; *Cas9*: the gene of *Cas9*.

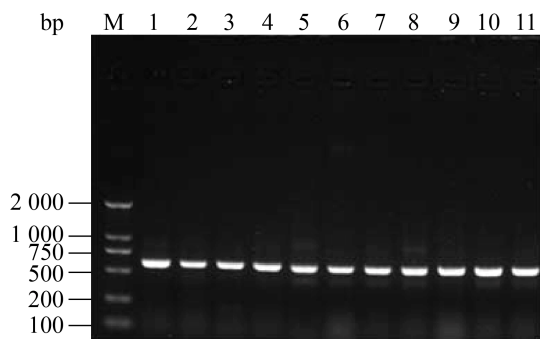


图 3 编辑靶点序列扩增产物的琼脂糖凝胶电泳

Fig. 3 Agarose gel electrophoresis of the editing target sequences amplification products. M: DL2000 marker; 1-11:  $T_0$  transgenic lines.

将上述 PCR 产物测序,并进行序列分析。结果显示 (表 2), $T_0$  代获得杂合株系 6 个 (占 54.5%)、双等位突变株系 2 个 (占 18.2%)、纯合株系 2 个 (占 18.2%)、未被编辑株系 1 个 (占 9.1%)。 $T_0$  代 11 个株系与野生型进行编辑靶点序列比对,发现 6 个杂合株系中有 2 个 (#1、#5) 在靶位点 2 处发生突变,4 个 (#2、#3、#8、#11) 在靶位点 1 处发生突变;2 个双等位突变株系 (#7、#9) 均在靶位点 1 处发生突变;2 个纯合株系 (#6、#10) 均在靶位点 1 处发生突变 (图 4)。

对 153 株 (来自  $T_0$  代的杂合与双等位突变种子

表 2 T<sub>0</sub> 与 T<sub>1</sub> 代转基因水稻突变类型比较Table 2 Comparison of mutation type between T<sub>0</sub> and T<sub>1</sub> transgenic lines

Mutation type	T <sub>0</sub> generation (n=11)	T <sub>1</sub> generation (n=153) (from T <sub>0</sub> Heterozygous and Bi-allelic lines)	T <sub>1</sub> generation (n=24) (from T <sub>0</sub> Homozygous lines)
Heterozygous mutation	6 (54.5%)	65 (42.5%)	0
Bi-allelic mutation	2 (18.2%)	6 (3.9%)	0
Homozygous mutation	2 (18.2%)	45 (29.4%)	24 (100%)
No mutation	1 (9.1%)	37 (24.2%)	0

A

Line	Sequence Target 2	Type
#1	Allele1: CCGCCGCCGCGCGCCCCGAGAAGCTCACGGAGGGGTCTCGCGCGCCG	WT
	Allele2: CCGCCGCCGCGCGCCCCGA -AGCTCACGGAGGGGTCTCGCGCGCCG	d2
#5	Allele1: CCGCCGCCGCGCGCCCCGAGAAGCTCACGGAGGGGTCTCGCGCGCCG	WT
	Allele2: CCGCCGCCGCGCGCCCCGAGGGAA ----- G	m4/d22
	Ref: CCGCCGCCGCGCGCCCCGAGAAGCTCACGGAGGGGTCTCGCGCGCCG	

Line	Sequence Target 1	Type
#2	Allele1: GAGGAGGACGATGACGAGGAAGATGAGGGGAAGGT	WT
	Allele2: GAGGAGGACGATGACGAG ----- AGGGGAAGGT	d7
#3	Allele1: GAGGAGGACGATGACGAGGAAGATGAGGGGAAGGT	WT
	Allele2: GAGGAGGACGATGACGAGGAGAGGGGAAGGGGG	m9
#8	Allele1: GAGGAGGACGATGACGAGGAAGATGAGGGGAAGGT	WT
	Allele2: GAGGAGGACGATGACGAGGACGAGGATGGGCTCGG	m7
#11	Allele1: GAGGAGGACGATGACGAGGAAGATGAGGGGAAGGT	WT
	Allele2: GAGGAGGACGATGACGAGGAA - TGAGGGGAAGGT	d2
#7	Allele1: GAGGAGGACGATGACGAGG ----- AGGGGAAGGT	d6
	Allele2: GAGGAGGACGATGACGAGG ----- GGAAGGT	d9
#9	Allele1: GAGGAGGACGATGACGAGGA ---- GAGGGGAAGGT	d4
	Allele2: GAGGAGGACGATGACGAGGAA - - GAGGGGAAGGT	d3
#6	Allele1/2: GAGGAGGACGATGACGAGGAAGA - - GGGGAAGGT	d3
#10	Allele1/2: GAGGAGGACGATGACGAGGA ---- GAGGGGAAGGT	d4
	Ref: GAGGAGGACGATGACGAGGAAGATGAGGGGAAGGT	

B

Line	Sequence Target 2	Target 1	Type
WT	<u>CCCGAGAAGCTCACGGAGGGGTCTCT</u> ... <u>ACGATGACGAGGAAGATGAGGGGAAG</u>		WT
#1-1	CCCCGA - - AGCTCACGGAGGGGTCTCT... ACGATGACGAGGA - - - - - GGGGAAG		d8
#5-1	CCCCGAGGGAA ----- ... ACGATGACGAGGAAGATGAGGGGAAG		m4/d22
#5-2	CCCCGAGAAGCTCACGGAGGGGTCTCT... ACGATGACGAGGA - - - GAGGGGAAG		d4
#9-1	CCCCGAGAAGCTCACGGAGGGGTCTCT... ACGATGACGAGGA - - - GAGGGGAAG		d4
#7-1	CCCCGAGAAGCTCACGGAGGGGTCTCT... ACGATGACGAGGA - - - - - GGGGAAG		d6
#7-2	CCCCGAGAAGCTCACGGAGGGGTCTCT... ACGATGACGAGG - - - - - GGAAG		d9
#8-1	CCCCGAGAAGCTCACGGAGGGGTCTCT... ACGATGACGAGGACAAGGATCAG-----		m6/d21
#8-2	CCCCGAGAAGCTCACGGAGGGGTCTCT... ACGATGACGAGGAAG - - - - - GGGGAAG		d5
#11-1	CCCCGAGAAGCTCACGGAGGGGTCTCT... ACGATGACGAGGAA - - TGAGGGGAAG		d2
#10-1	CCCCGAGAAGCTCACGGAGGGGTCTCT... ACGATGACGAGGA - - - GAGGGGAAG		d4

图 4 T<sub>0</sub> 代与 T<sub>1</sub> 代转基因植株编辑靶点序列比对

Fig. 4 Comparison of the editing target sequences between T<sub>0</sub> and T<sub>1</sub> transgenic plants. (A) Comparison of the editing target sequences between T<sub>0</sub> transgenic lines and WT. (B) Comparison of the editing target sequences between T<sub>1</sub> homozygous transgenic lines and WT. The targeted sequences are highlighted with underline and PAM sequences in shadow. The deleted sequences are shown by black hyphens, and red fonts are mutated bases. m: mutation; d: deletion; WT: wild type; #1 to #11: T<sub>0</sub> transgenic lines; #1-1 to #11-1: T<sub>1</sub> homozygous transgenic lines.

#1、#2、#3、#5、#7、#8、#9、#11) T<sub>1</sub>代水稻筛选,结果显示(表2)有65个杂合株系(占42.5%)、6个双等位突变株系(占3.9%)、45个纯合株系(占29.4%)、37个未被编辑株系(占24.2%)。T<sub>1</sub>代纯合株系与野生型进行编辑靶点序列比对,发现靶位点2处发生突变的有1种(#5-1);靶位点1处发生突变的有6种(#5-2与#9-1、#7-1、#7-2、#8-1、#8-2、#11-1);靶位点1与靶位点2均发生突变的有1种(#1-1)(图4)。

对24株(来自T<sub>0</sub>代的纯合突变种子#10) T<sub>1</sub>代水稻筛选,结果显示,24株(#10-1)均为靶位点1处缺失4个碱基“AGAT”,突变位点与T<sub>0</sub>代#10一致。序列分析证明,T<sub>1</sub>代产生移码突变的株系共有6种(#1-1、#5-1、#5-2与#9-1与#10-1、#8-1、

#8-2、#11-1),另外,在对编辑靶点扩增和测序的分析中发现,后代没有出现大片段删除事件。

选取3个产生移码突变的T<sub>1</sub>代纯合株系与野生型进行预期OsRhoGDI2蛋白的氨基酸序列比对(图5)。由于3个纯合敲除株系靶位点发生碱基缺失,导致该基因产生移码突变与无义突变,翻译提前终止,生成的截短蛋白中保守的RhoGDI结构域丢失,因此转基因水稻中将无法产生正常的OsRhoGDI2蛋白。

为评估2个靶位点的脱靶效应,本研究选取T<sub>1</sub>代的3株纯合突变体(#1-1、#5-1、#5-2)进行评估。对5个潜在的脱靶位点进行PCR扩增,测序比对发现,所有被检测植株的潜在脱靶位点均未出现突变(表3)。

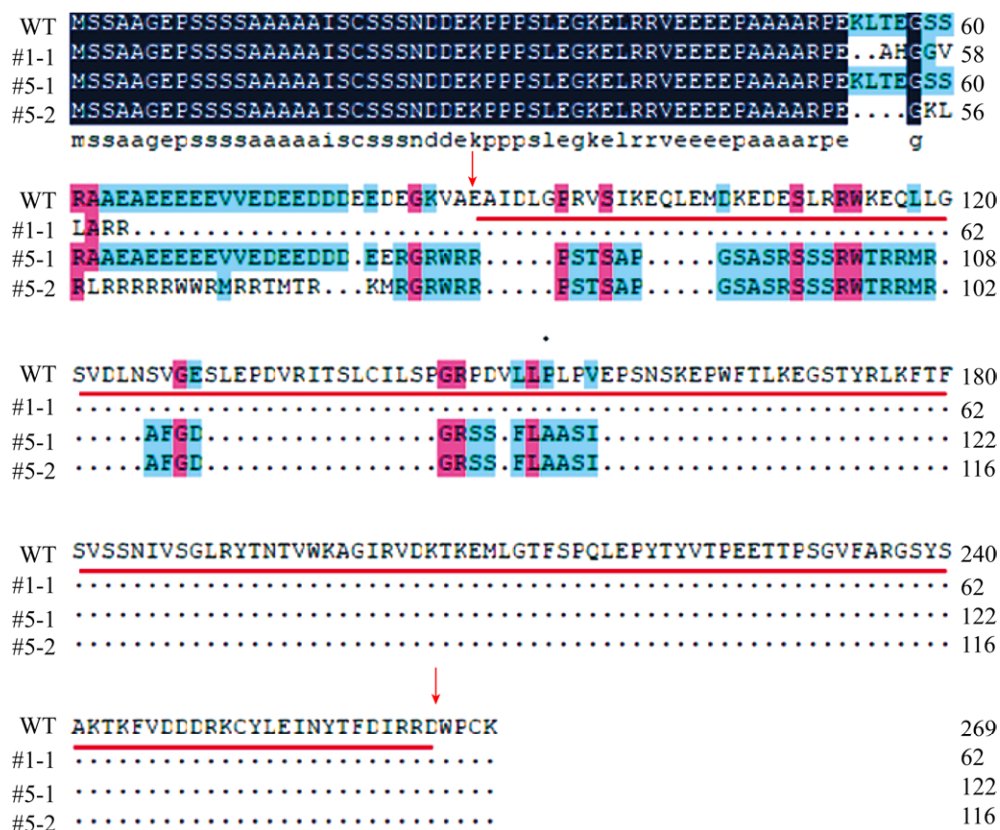


图5 野生型与T<sub>1</sub>代纯合敲除株系内源OsRhoGDI2氨基酸序列的对比

Fig. 5 Comparison of amino acid sequences of endogenous OsRhoGDI2 between wild type and T<sub>1</sub> homozygous knockout lines. The conserved domain of RhoGDI is underlined. WT: wild type; #1-1, #5-1, #5-2: T<sub>1</sub> homozygous transgenic lines.

### 2.3 *OsRhoGDI2* 敲除水稻表型分析

对大田种植的 *OsRhoGDI2* 敲除水稻和野生型水稻进行观察。在成熟期，3 个敲除水稻株系株高相比野生型明显降低，统计学分析显示，3 个敲除株系株高平均下降 9.3%，且差异达到极显著水平

(图 6A, C)。对成熟期水稻茎节与穗长度进行测量，结果显示，3 个敲除株系第 II 茎节与第 III 茎节长度相比野生型平均降低 19.0% 与 27.0%，在统计学上，差异均达到极显著水平(图 6B, 6D)。但是 3 个敲除株系的穗长与野生型相比无统计学上的差异。

表 3 潜在脱靶位点的分析

Table 3 Analysis of putative off-target sites

Putative off-target	Putative off-target locus	Sequence of putative off-target site	Mismatching bases No.	Detected plant No.	Mutation plant No.
Target1-off-1	Chr1:15308-15330	<u>GCGAGC</u> ACGAGGAAGATGAGGGG	3	3	0
Target1-off-2	Chr11:114855-114877	A <u>ACGGAT</u> CGAGGAAGATGAGGGG	6	3	0
Target1-off-3	Chr12:45131-45109	<u>GAAGGGG</u> CGAGGAAGATGAGGGG	6	3	0
Target2-off-4	Chr2:87871-87893	<u>CCATCTCCT</u> TGAGCTTCTCGGG	4	3	0
Target2-off-5	Chr8:47065-47087	<u>CCTCCTCCG</u> CAGCTCCTCGGG	4	3	0

Note: mismatching bases are in red fonts; PAM sequences are underlined.

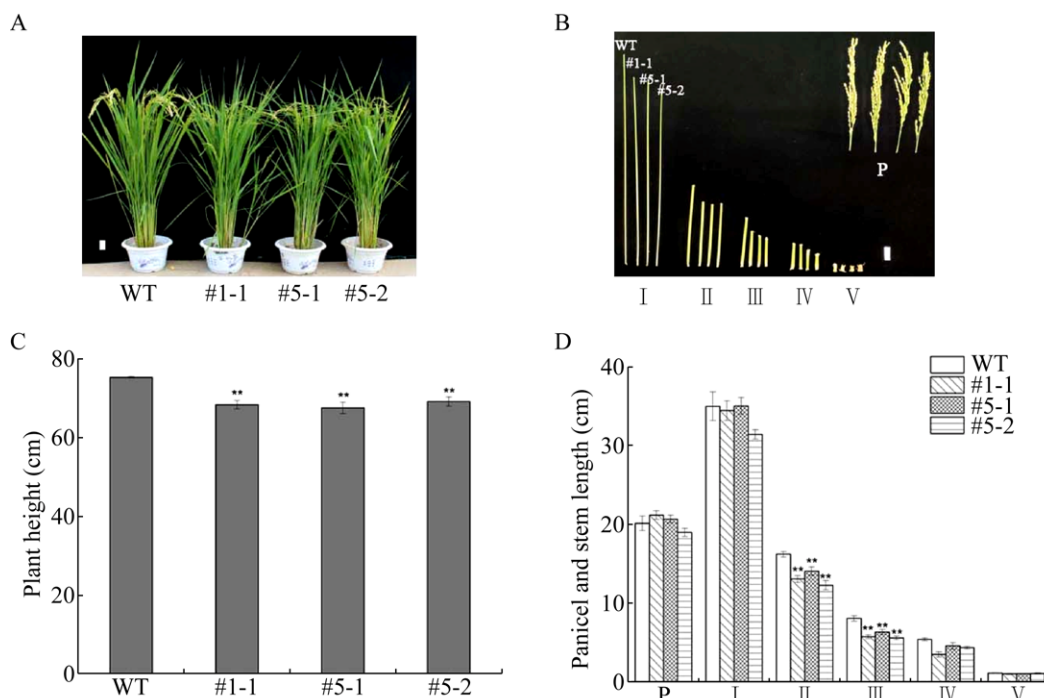


图 6 野生型与  $T_1$  代转基因株系表型比较

Fig. 6 Phenotypes of wild type and  $T_1$  homozygous transgenic lines. (A) Morphologies in the mature stage. (B) Morphologies of panicles and internodes. There are WT, #1-1, #5-1 and #5-2 lines from left to right. (C) Height of plants in the mature stage. (D) Length of panicles and the first to fourth internodes. Bar=5 cm; \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ,  $n=10$ ; I: first internode; II: second internode; III: third internode; IV: fourth internode; V: fifth internode; P: panicle; #1-1, #5-1, #5-2:  $T_1$  homozygous transgenic lines; WT: wild type.

### 3 讨论

有报道显示,利用 CRISPR/Cas9 技术编辑水稻,当碱基插入或缺失引起移码突变或蛋白结构改变时,靶基因的功能就会被破坏<sup>[16-17]</sup>。本研究利用双靶点 CRISPR/Cas9 表达载体对水稻 *OsRhoGDI2* 基因进行定点编辑,实现了 *OsRhoGDI2* 基因的敲除。

有研究显示,利用 CRISPR/Cas9 技术编辑水稻产生的突变可以稳定遗传到后代植株<sup>[18-19]</sup>。本研究在 T<sub>0</sub> 代获得 2 种纯合敲除水稻,分别为缺失 3 个碱基株系 (#6) 与 4 个碱基株系 (#10)。由于缺失 3 或 3 倍数的碱基突变不会造成移码突变,株系 #6 是无效的,因此需要在 T<sub>1</sub> 代继续进行纯合株系的筛选,获得足够的突变材料。对 T<sub>1</sub> 代水稻 (24 株来自 T<sub>0</sub> 代纯合种子 #10, 153 株来自 T<sub>0</sub> 代杂合突变与双等位突变种子 #1、#2、#3、#5、#7、#8、#9、#11) 继续筛选,共获得 8 种纯合敲除水稻。对 T<sub>1</sub> 代纯合敲除水稻编辑靶点的分析发现,在 T<sub>0</sub> 代纯合的 #10 株系其后代均保持与 T<sub>0</sub> 代相同的突变类型,说明 T<sub>0</sub> 代获得的纯合株系在 T<sub>1</sub> 代可以稳定遗传,也说明采用 CRISPR/Cas9 技术在 T<sub>0</sub> 代便有可能筛选到纯合敲除水稻,这与王美娜等<sup>[20]</sup>的研究结果一致,证明 CRISPR/Cas9 技术具有高效性与稳定性。

利用 T<sub>1</sub> 代纯合敲除株系进行初步的表型分析,发现最显著的差异体现在株高这一性状上。株高是直接影响水稻品种抗倒性能与产量的重要农艺学性状<sup>[21]</sup>,研究株高对于更好地了解植物的生长发育规律以及植物分子育种具有重要意义<sup>[22]</sup>。但是,株高的调控是一个复杂的过程。Liang 等将达到正常植株高度 50% 与 50%–100% 的植株分别定义为矮化和半矮化植株<sup>[23]</sup>,本研究所分析的 3 种 *OsRhoGDI2* 基因 T<sub>1</sub> 代纯合敲除水稻株系相比野生型,株高均处于野生型株高 50%–100% 之间,属于半矮化类型。半矮化植株在第一次“绿色革命”时被用来培育抗倒伏作物新品种,从而大幅度

提高了粮食产量<sup>[24]</sup>。已知水稻节间数目与节间长度影响株高<sup>[25]</sup>。Takahashi 与 Takeda 等根据水稻各茎节的长短,将水稻矮化突变体分为 *dn*、*dm*、*sh*、*d6* 与 *nl* 5 种类型,本文获得的突变体均出现第 II 和第 III 茎节显著缩短的现象,属于 *dm* 类。目前,植物 RhoGDI 与株高相关研究尚未见报道,而 *OsRhoGDI2* 敲除水稻的株高相比野生型均有极显著降低,提示 *OsRhoGDI2* 基因与株高控制关系密切,值得深入研究其作用机制。

### REFERENCES

- [1] Arazoe T, Miyoshi K, Yamato T, et al. Tailor-made CRISPR/Cas system for highly efficient targeted gene replacement in the rice blast fungus. *Biotechnol Bioeng*, 2015, 112(12): 2543–2549.
- [2] Shen B, Zhang J, Wu HY, et al. Generation of gene-modified mice via Cas9/RNA-mediated gene targeting. *Cell Res*, 2013, 23(5): 720–723.
- [3] Wang T, Wei JJ, Sabatini DM, et al. Genetic screens in human cells using the CRISPR-Cas9 system. *Science*, 2014, 343(6166): 80–84.
- [4] Wang Y, Geng LZ, Yuan ML, et al. Deletion of a target gene in *Indica* rice via CRISPR/Cas9. *Plant Cell Rep*, 2017, 36(8): 1333–1343.
- [5] Zong Y, Wang YP, Li C, et al. Precise base editing in rice, wheat and maize with a Cas9-cytidine deaminase fusion. *Nat Biotechnol*, 2017, 35(5): 438–440.
- [6] Jakočiūnas T, Bonde I, Herrgård M, et al. Multiplex metabolic pathway engineering using CRISPR/Cas9 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Metab Eng*, 2015, 28: 213–222.
- [7] Shan QW, Wang YP, Li J, et al. Genome editing in rice and wheat using the CRISPR/Cas system. *Nat Protoc*, 2014, 9(10): 2395–2410.
- [8] Shao GN, Xie LH, Jiao GA, et al. CRISPR/CAS9-mediated editing of the fragrant gene *Badh2* in rice. *Chin J Rice Sci*, 2017, 31(2): 216–222 (in Chinese).  
邵高能, 谢黎虹, 焦桂爱, 等. 利用 CRISPR/CAS9 技术编辑水稻香味基因 *Badh2*. *中国水稻科学*, 2017, 31(2): 216–222.
- [9] Zhang H, Zhang JS, Wei PL, 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.
- [10] Carol RJ, Takeda S, Linstead P, et al. A RhoGDP dissociation inhibitor spatially regulates growth in root hair cells. *Nature*, 2005, 438(7070): 1013–1016.
- [11] Feng QN, Kang H, Song SJ, et al. Arabidopsis RhoGDIs are critical for cellular homeostasis of pollen tubes. *Plant Physiol*, 2016, 170(2): 841–856.
- [12] Wu YX, Zhao SJ, Tian H, et al. CPK3-phosphorylated RhoGDI1 is essential in the development of *Arabidopsis* seedlings and leaf epidermal cells. *J Exp Bot*, 2013, 64(11): 3327–3338.
- [13] Liang WH, Tang CR, Wu NH. Isolation and characterization of two GDP dissociation inhibitor genes from *Oryza sativa* L. *Chin J Biochem Mol Biol*, 2004, 20(6): 785–791 (in Chinese).  
梁卫红, 唐朝荣, 吴乃虎. 两种水稻GDP解离抑制蛋白基因的分离及特征分析. *中国生物化学与分子生物学报*, 2004, 20(6): 785–791.
- [14] Huang JJ, Zhang J, Hao YF, et al. Distinct expression patterns of the GDP dissociation inhibitor protein gene (*OsRhoGDI2*) from *Oryza sativa* during development and abiotic stresses. *Biologia*, 2016, 71(11): 1230–1239.
- [15] Peng WF, Liang WH. Bioinformatics analysis and subcellular localization study on rice *OsRhoGDI2* gene. *Biotechnol Bull*, 2010(5): 82–86, 92 (in Chinese).  
彭威风, 梁卫红. 水稻OsRhoGDI2蛋白生物信息学分析及亚细胞定位研究. *生物技术通报*, 2010(5): 82–86, 92.
- [16] Cong L, Ran FA, Cox D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 2013, 339(6121): 819–823.
- [17] Zhou HB, Liu B, Weeks DP, et al. Large chromosomal deletions and heritable small genetic changes induced by CRISPR/Cas9 in rice. *Nucleic Acids Res*, 2014, 42(17): 10903–10914.
- [18] Feng ZY, Mao YF, Xu NF, et al. Multigeneration analysis reveals the inheritance, specificity, and patterns of CRISPR/Cas-induced gene modifications in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111(12): 4632–4637.
- [19] Minkenberg B, Xie KB, Yang YN. Discovery of rice essential genes by characterizing a CRISPR-edited mutation of closely related rice MAP kinase genes. *Plant J*, 2017, 89(3): 636–648.
- [20] Wang MN, Peng JJ, Wang KJ, et al. Editing *ROP* gene *OsRac5* of rice by CRISPR/Cas9 technique. *Chin J Biochem Mol Biol*, 2018, 34(12): 1350–1357 (in Chinese).  
王美娜, 彭静静, 王凯婕, 等. 利用 CRISPR/Cas9 技术编辑水稻 *ROP* 基因 *OsRac5*. *中国生物化学与分子生物学报*, 2018, 34(12): 1350–1357.
- [21] Wang YH, Li JY. Molecular basis of plant architecture. *Annu Rev Plant Biol*, 2008, 59: 253–279.
- [22] Wang YJ, Zhao J, Lu WJ, et al. Gibberellin in plant height control: old player, new story. *Plant Cell Rep*, 2017, 36(3): 391–398.
- [23] Liang F, Xin XY, Hu ZJ, et al. Genetic analysis and fine mapping of a novel semidominant dwarfing gene *LB4D* in rice. *J Integr Plant Biol*, 2011, 53(4): 312–323.
- [24] Hedden P. The genes of the green revolution. *Trends Genet*, 2003, 19(1): 5–9.
- [25] Yang XC, Hwa CM. Genetic modification of plant architecture and variety improvement in rice. *Heredity (Edinb)*, 2008, 101(5): 396–404.

(本文责编 陈宏宇)