

CRISPR/Cas9 在豆科植物毛根转化中的应用 及共生基因的编辑

谭茜 王龙祥 张先鹏 余海翔 张忠明

农业微生物学国家重点实验室/华中农业大学生命科学技术学院, 武汉 430070

摘要 将 CRISPR/Cas9 系统与毛根转化相结合, 在豆科植物百脉根和大豆中对结瘤因子受体激酶基因 *NFR1* 进行多靶点敲除, 旨在快速、便捷获得目的基因突变体。结果表明: 在百脉根和大豆中均获得了目的基因敲除的突变体; 其中, 百脉根 *LjNFR1* 基因中靶位点 1 处的敲除效率为 58.3%, 在靶位点 2 处的敲除效率为 0; 大豆 *GmNFR1* 靶位点 1 处的敲除效率为 33.3%, 靶位点 2 处的敲除效率为 41.7%。进一步测序分析发现, CRISPR/Cas9 系统可同时敲除大豆基因组上编码 *NFR1* 的 2 个同源基因(*GmNFR1* 和 *GmNFR1b*), 为研究植物体内基因的功能冗余提供了技术支持。同时, CRISPR/Cas9 系统在毛根转化中的运用进一步地缩短了获得突变体的周期。

关键词 CRISPR/Cas9; 基因组编辑技术; 定点编辑; 结瘤因子受体激酶 1; 豆科植物

中图分类号 S 188⁺.1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2017)05-0045-07

基因组编辑技术(genome editing technology)是人们解读和改造基因功能的重要反向遗传学研究手段之一^[1]。近年来, 以序列特异性核酸酶(sequence-specific nucleases, SSNs)为工具的基因组编辑技术大幅度地提高了植物基因组的编辑效率^[2-3]。与转座子插入、化学诱变、电离辐射诱变等在基因组随机产生突变相比, SSNs 通过识别和切割基因组上特定位置, 产生 DNA 双链断裂(double strand break, DSB), 从而激活植物体内易错修复系统, 以非同源末端连接(nonhomologous end joining, NHEJ)的方式在 DSB 处进行不精确修复, 形成几个碱基的插入或缺失突变^[4], 如锌指核酸酶(Zinc finger nuclease, ZFN)和类转录激活因子效应物核酸酶(transcription activator-like effector nuclease, TALEN)等^[5-6]。

CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeat, CRISPR) 技术是继 ZFN 和 TALENs 之后迅速崛起的第三代 SSNs 基因组编辑技术^[7]。它由单导向 RNA (single guide RNA, sgRNA) 和受 sgRNA 引导并切割 DNA 双链的

Cas9 核酸酶两部分组成^[8]。其中, sgRNA 5' 端的 20 个碱基与基因组上靶位点互补配对, 引导 Cas9 核酸酶在靶位点内切割基因组造成 DSB。这种以 RNA-DNA 互补配对来识别基因组特定位置的机制与 TALENs 等依赖多种蛋白质-DNA 互作的识别机制相比显得更为简单、高效^[9]。有研究者将 sgRNA 表达单元改造成多个 tRNA-sgRNA 串联的 PTG (polycistronic tRNA-gRNA, PTG) 模式, 发现可以大幅度提高编辑效率^[10]。因此, 越来越多的报道表明 CRISPR/Cas9 系统能对多种植物如拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、水稻(*Oryza sativa*)、玉米(*Zea mays*)、烟草(*Nicotiana benthamiana*)、高粱(*Sorghum bicolor*)等进行基因组定点编辑。这也是目前为止在植物基因组编辑中运用最多的技术^[11-12]。

豆科植物与根瘤菌相互作用形成根瘤, 根瘤是共生固氮的场所, 将大气中的氮气(N_2)还原成氨(NH_3)供植物生长和发育^[13]。同时, 豆科植物也是研究高等植物与微生物相互作用机制的模式材料。目前, 在豆科植物中分离和鉴定出许多参与共生固

收稿日期: 2016-05-19

基金项目: 国家重点研发计划项目(2016YFD0100702); 国家自然科学基金面上项目(31370278); 农业微生物学国家重点实验室项目(AMLKF200804)

谭茜, 硕士研究生, 研究方向: 固氮微生物学. E-mail: 1198835129@qq.com

通信作者: 张忠明, 教授, 研究方向: 共生固氮分子生物学. E-mail: zmzhang@mail.hzau.edu.cn

氮网络调控的基因^[14-17],其中包括作用于共生信号通路早期参与识别和结合结瘤因子(Nod factor)的结瘤因子受体激酶 NFR1,该基因突变会使植株对结瘤因子不敏感,最终形成不结瘤表型^[18]。为了丰富共生相关基因的突变体库,解析豆科植物共生信号调控网络,本研究利用 CRISPR/Cas9 系统和豆科植物特有的毛根转化技术,以百脉根(*Lotus japonicus*)和大豆(*Glycine max*)的结瘤因子受体激酶 NFR1 为靶基因,尝试在豆科植物根系中敲除共生信号转导相关的基因,旨在为建立共生相关基因的突变体库提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料

发根农杆菌 *Agrobacterium rhizogenes* LBA1334、百脉根野生型根瘤菌 *Mesorhizobium loti* MAFF303099 和大豆野生型根瘤菌 *Sinorhizobium fredii* USD205 由华中农业大学农业微生物学国家重点实验室保藏。含百脉根 U6 启动子(*LjU6*)的中间载体 pBluescript-*LjU6* 和含 Cas9 表达单位的植物双元转化载体 pCambia1300-sGFP-Cas9 由笔者所在实验室改造并保藏。多个串联的 tRNA-sgRNA 单元组成的 PTG (polycistronic tRNA-gRNA, PTG)模板由华中农业大学植物科学技术学院谢卡斌教授实验室惠赠。平末端连接载体试剂盒 pEASY-Blunt Zero Cloning kit 为金生物有限公司产品。KOD-plus DNA 聚合酶为 Toyobo 公司产品,各类限制性内切酶为 Fermentase 公司产品, Gibson 等温一步法酶连体系相关试剂为 TaKaRa 公司产品。PCR 引物的合成及测序工作由武汉擎科创新生物科技有限公司完成。

1.2 百脉根、大豆基因组靶位点 sgRNA 的设计

基于百脉根、大豆基因组序列,利用在线分析软件 CRISPR-P (<http://cbi.hzau.edu.cn/cgi-bin/CRISPR>)^[19],查找出潜在的靶位点。根据靶点位置和 GC 含量分别在百脉根和大豆中选择其中 2 个靶位点,设计 sgRNA 序列:

*LjNFR1*gRNA1:

5'-CCATTTCCATGTGACTGTATTGG-3';

*LjNFR1*gRNA2:

5'-CAGTGTATCCCCAGGCCTAATGG-3';

*GmNFR1*gRNA1:

5'-CCTATGATTTCGATTGCGAAAGTG-3';

*GmNFR1*gRNA2:

5'-CCTGGTGTCAATTTTCAGCAAAGA-3'。

1.3 CRISPR/Cas9 载体的构建

以 PTG 为模板,使用特异性引物扩增,在百脉根和大豆中分别获得 2 个 gRNA 的 PTG 序列。通过 Gibson 等温一步连接法连入经 *Bbs* I 线性化的中间载体 pBluescript-*LjU6* 中, *Kpn* I 和 *Xba* I 双酶切后得到“*LjU6* 启动子-PTG”形式的 sgRNA 表达单元。含有 Cas9 表达单元的载体 pCAMBIA1300-sGFP 经 *Kpn* I 和 *Xba* I 线性化后与 sgRNA 表达单元酶连整合,最终获得 CRISPR/Cas9 在豆科植物中的表达载体。

1.4 发根农杆菌介导的百脉根、大豆毛根转化试验

毛根转化方法主要参考文献[20-21],并略作修改。将萌发 5 d 的无菌幼苗从距离子叶 2~3 mm 处的下胚轴基部剪断,用携带相应目的质粒的发根农杆菌 *A. rhizogenes* LBA1334 菌液侵染幼苗下胚轴 30~60 min,用灭菌滤纸将幼苗表面菌液吸干,转移至含 2% 蔗糖的 MS 固体培养基中。暗培养 1 周后,待幼苗切口处有明显膨大时将百脉根与大豆外植体分别转移至含 300 mg/L 特美汀的 HRE 生根培养基和水培袋中,约 10 d 左右毛根从下胚轴切口处长出。在体式荧光显微镜下观察,保留带绿色荧光的阳性根,剪去无荧光的非阳性根。种植到蛭石/珍珠岩(体积比为 2:1)混合基质土中,饥饿培养 6 d 后,接种百脉根根瘤菌(*M. loti* MAFF303099)和大豆根瘤菌(*S. fredii* USD205),3 周后统计结瘤数。

1.5 基因组 DNA 的提取及目的基因靶位点的突变检测

剪取一部分百脉根或大豆新鲜根组织于 1.5 mL EP 管中,采用 CTAB 法抽提百脉根基因组 DNA。以阳性根基因组 DNA 为模板,扩增 *NFR1* 基因靶位点区域序列。PCR 引物如下:

LjNFR1-F:

5'-GCTGGGGCATGTTTGTTCATGTG-3';

LjNFR1-R:

5'-CATACATCTTCAGGAATGAAAGCTATCCCAC-3';

GmNFR1-F:

5'-CTCAATAT-TCCATTCCCCTGTG-3';

GmNFR1-R:

5'-CCAAATCCGATTAGAGAACAACATC-3';

GmNFR1b-F:

5'-GGTGAGTTTCTGGGGCATGTGTTTG-3';

GmNFR1b-R:
5'-GTTATTTTGGTGTACTCATCAATGTAT-3'。

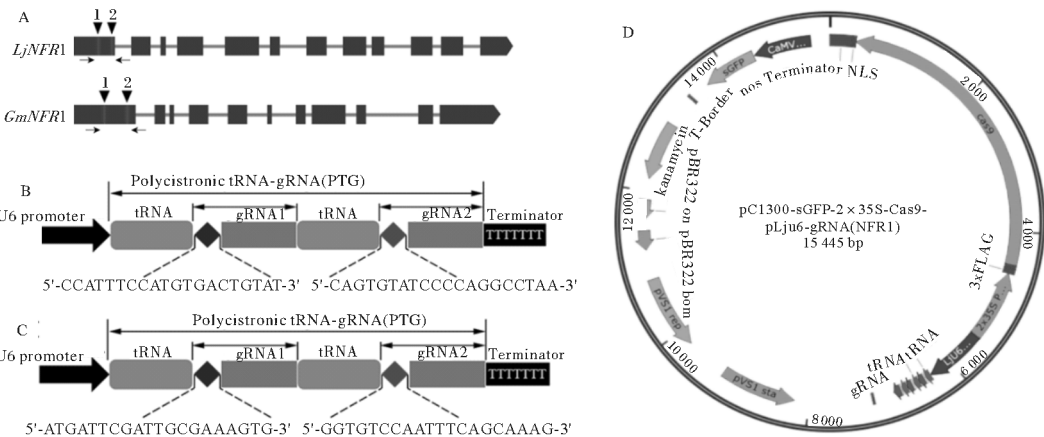
扩增产物回收后,连入 pEASY-Blunt 平末端载体上,转化后挑取单克隆测序。利用 DNAMAN 序列比对软件将测序结果与百脉根、大豆 *NFR1* 基因公布序列进行比对,对结果进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 sgRNA 的设计与打靶克隆的构建

CRISPR/Cas9 系统中 sgRNA 5'端的 20 个碱基与基因组上含有 PAM 序列(NGG)的靶位点互补配对,引导 Cas9 核酸内切酶在靶位点内切割基因组形成双链缺口。为了研究 CRISPR/Cas9 系统对豆

科植物靶基因的敲除效率,选取豆科植物百脉根、大豆结瘤因子受体激酶基因 *NFR1* 为打靶基因。依据文献[19]中 PTG 结构的设计方法,针对百脉根、大豆中 *NFR1* 基因序列,分别在二者的第 1 个外显子内筛选并设计出由 *LjU6* 启动子启动的含有 2 个靶位点的 sgRNA 表达单元(图 1A、B、C),与装载有 Cas9 表达单元的载体 pCAMBIA1300-sGFP 通过酶切酶连整合成完整的 CRISPR/Cas9 系统(图 1D)。其中 pCAMBIA1300-sGFP 由笔者所在实验室经原始 pCAMBIA1300 载体改造而来,即将原始载体上 *Hygromycin-resistance* 基因替换为 Cas9 蛋白表达单元和作为报告基因的绿色荧光蛋白(sGFP)表达单元。



A:各靶点在百脉根、大豆 *NFR1* 基因上的分布。方块代表外显子,线段代表内含子,红标和黑色三角形代表打靶位点,箭头所指区域分别为 PCR 扩增引物的结合位点;B、C:百脉根、大豆 *NFR1* 基因的 sgRNA 表达单元,每个 gRNA 包含不同的打靶序列(多色菱形表示)和保守骨架序列(绿色矩形表示);D:CRISPR/Cas9 系统瞬时转化载体图谱。A:Schematic illustrating the two sgRNA (red lines) targeting the *NFR1* gene of *Lotus japonicus* and *Glycine max* respectively.The boxes indicate exons,lines indicate introns.The areas pointed out by arrows represent the binding sites of the primers used for PCR amplification; B,C:Schematic depiction of the method for constructing the expressing cassettes of sgRNAs in *Lotus japonicus* and *Glycine max*,each gRNA contains conserved scaffold (labeled as green square) and a target-specific spacer (labeled as a diamond with different color); D:Diagram of CRISPR/Cas9 transient expression system vector.

图 1 CRISPR/Cas9 介导的基因打靶示意图

Fig.1 Schematic diagram of CRISPR/Cas9-mediated gene targeting

2.2 CRISPR/Cas9 系统介导豆科植物毛根转化中 *NFR1* 基因的突变

用携带对应基因的 CRISPR/Cas9 表达系统质粒和空载体 pCAMBIA1300-sGFP 质粒的发根农杆菌 *A. rhizogenes* LBA1334 侵染百脉根和大豆幼苗的下胚轴部位,获得转基因毛根。观察接种根瘤菌 3 周后的结瘤表型。结果显示,在百脉根与大豆中,与转化空载体的对照组相比,含 CRISPR/Cas9 系统的转基因根系中结瘤数显著减少(图 2A、B、C、

D)。在百脉根中,结瘤减少或不结瘤的突变植株占总数的 37.5%,而大豆中占 54.5%(表 1)。作为豆科植物共生信号途径中的结瘤因子受体激酶,*NFR1* 与另一结瘤因子受体激酶 *NFR5*(Nod factor receptor 5,*NFR5*)形成异源二聚体共同感知并结合结瘤因子,从而激活下游结瘤相关基因的表达,最终导致根瘤器官的形成,本研究中转基因毛根出现的不结瘤或结瘤减少的表型均与 *NFR1* 基因功能的缺失有关。这表明,CRISPR/Cas9 系统可定向编辑

豆科植物相关基因,并且通过毛根转化技术可快速地观察到目的基因的敲除表型。

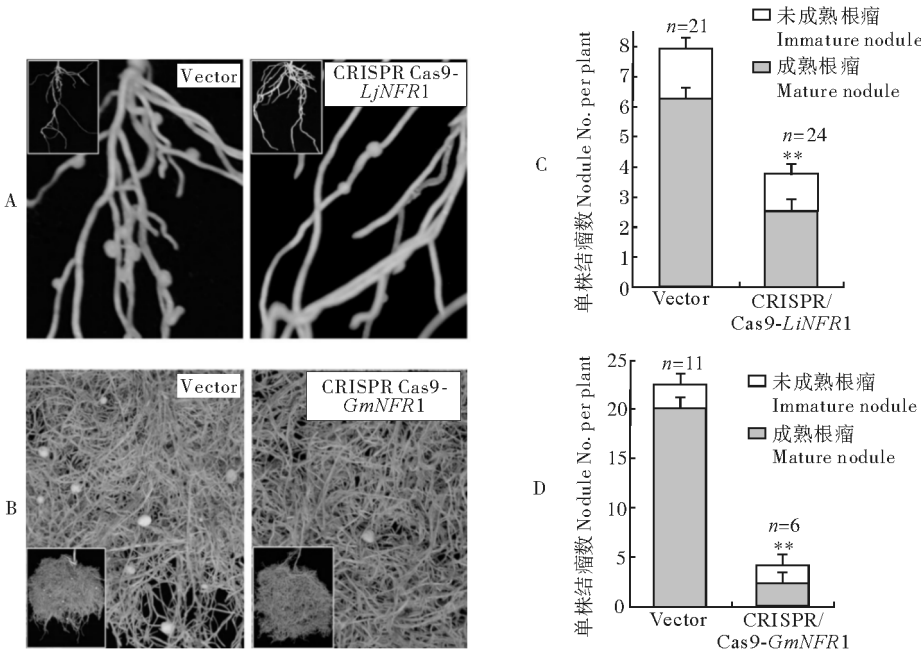
2.3 CRISPR/Cas9 系统对豆科植物 *NFR1* 基因靶位点的编辑

为了进一步探究不结瘤或结瘤减少的表型是否

与 CRISPR/Cas9 系统对 *NFR1* 基因的敲除有关,本研究随机挑选 8 株百脉根、6 株大豆转基因根系中无瘤或少瘤植株中的单条阳性毛根提取基因组 DNA。利用特异性引物扩增靶位点所在区域片段,片段大小约为 700 bp(图 1 A)。PCR 扩增产物清洁

表 1 转基因毛根的突变率

Table 1 Determinatin of mutant rate in transgenic hairy roots based on phenotype				
物种 Species	靶基因 Target gene	转基因植株数 Transgenic plant	突变植株数 Mutant plants	突变率/% Mutant rate
百脉根 <i>Lotus japonicus</i>	<i>LjNFR1</i>	64	24	37.5
百脉根 <i>Lotus japonicus</i>	CK	52	0	0.0
大豆 <i>Glycine max</i>	<i>GmNFR1</i>	11	6	54.5
大豆 <i>Glycine max</i>	CK	8	0	0.0



A,B:百脉根与大豆中对照植株与 CRISPR/Cas9 转基因植株的结瘤表型; C:百脉根中对照和 CRISPR/Cas9-*LjNFR1* 转基因植株的结瘤数比较; D:大豆中对照和 CRISPR/Cas9-*GmNFR1* 转基因植株的结瘤数比较, * * 表示在 $P<0.01$ 水平差异显著。A,B:Nodulation phenotypes of control and CRISPR/Cas9 transgenic hairy roots in *Lotus japonicus* and *Glycine max*, respectively; C:The nodule numbers per plant on control and CRISPR/Cas9-*LjNFR1* transgenic hairy roots; D:The nodule numbers per plant on control and CRISPR/Cas9-*GmNFR1* transgenic hairy roots. * * indicate statistically significant differences at $P<0.01$ between treatments and controls.

图 2 CRISPR/Cas9 系统对 *NFR1* 基因的编辑影响植株结瘤

Fig.2 CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of *NFR1* effects nodule formation

回收后连入 pEASY-Blunt 平末端载体上,转化后各随机挑选 12 个单克隆进行测序分析。发现在百脉根随机挑选的 12 个克隆中,有 7 个在 *LjNFR1* 靶位点 1 处发生基因突变,突变形式为小片段的插入或者缺失,编辑效率为 58.3%(7/12)。但未能在靶位点 2 处检测出突变(图 3A)。该结果表明百脉根中 sgRNA1 能引导 Cas9 蛋白在靶位点进行剪切,

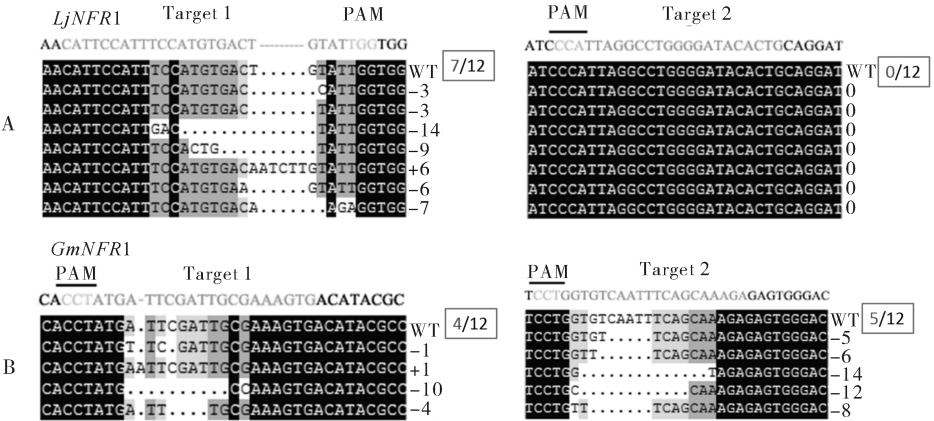
然而 sgRNA2 却无法介导 CRISPR 的编辑。这可能是由于 sgRNA2 所含的 20 bp 识别序列与基因组非靶位点发生部分配对,使得 sgRNA2 脱靶,从而无法引导 Cas9 蛋白结合到 *LjNFR1* 的靶位点 2 处。大豆 *GmNFR1* 基因的靶位点 1 和 2 均检测到小片段插入或缺失类型的突变,编辑效率分别为 33.3%(4/12)和 41.7%(5/12)(图 3B)。说明大豆

中这 2 个 sgRNA 均能识别基因组上各自的靶位点并且编辑效率相近。

2.4 CRISPR/Cas9 系统介导多个内源基因的编辑

大豆基因组中存在与 *GmNFR1* 同源的另一基因 *GmNFR1b*。为了证明 CRISPR/Cas9 系统能敲除多个内源基因,本研究中大豆 *NFR1* 基因的 2 个

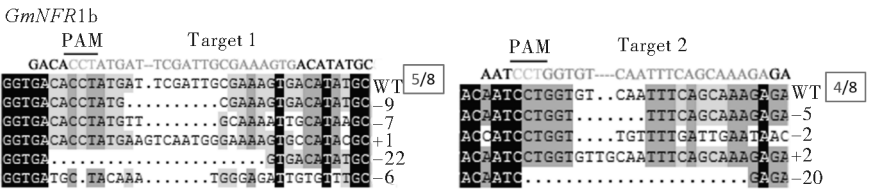
靶位点均选取在 *GmNFR1* 和 *GmNFR1b* 基因的同源区域内。利用特异性引物扩增 *GmNFR1b* 靶位点区域片段,依照上述方法随机挑选 8 个单克隆测序分析,发现其中有 5 个克隆在 *GmNFR1b* 靶位点 1 处均出现突变,有 4 个在靶位点 2 处出现突变。突变效率分别为 62.5%(5/8)和 50%(4/8),突变率



A:百脉根 *LjNFR1* 基因靶位点突变的测序检测; B:大豆 *GmNFR1* 基因靶位点突变的测序检测;右侧的黑字表示突变的类型(“-”代表缺失;“+”代表插入),数字代表突变出现的次数和比例。A:Detection of targeted mutation (deletion or insertion) of *LjNFR1* gene based on DNA sequencing; B:Detection of targeted mutation (deletion or insertion) of *GmNFR1* gene based on DNA sequencing. Black number in right side means the type of mutation (“-” indicates DNA deletions; “+” indicates DNA insertions).The No.of mutant clones and the mutant rate are at right boxes.

图 3 CRISPR/Cas9 介导的百脉根、大豆 *NFR1* 的基因编辑

Fig.3 CRISPR/Cas9-mediated gene editing of *NFR1* in *Lotus japonicus* and *Glycine max*



大豆结瘤因子受体激酶 *GmNFR1b* 基因突变的测序检测;右侧的黑字表示突变的类型(“-”代表缺失;“+”代表插入);数字代表突变出现的次数和比例。Detection of targeted mutation (deletion or insertion) of *GmNFR1b* gene based on DNA sequencing.The black number in right side means the type of mutation (“-” indicates DNA deletions; “+” indicates DNA insertions).The No.of mutant clones and the mutant rate are shown at right boxes..

图 4 CRISPR/Cas9 系统对 *GmNFR1* 同源基因 *GmNFR1b* 的编辑

Fig.4 CRISPR/Cas9-mediated gene editing in homologous gene of *GmNFR1*

与 *GmNFR1* 基因内的突变率相近(图 4)。由此可推测,通过对同源基因结构的分析和 sgRNA 设计的优化,CRISPR/Cas9 系统可用于多个内源基因的敲除,这对于研究高等植物中多个同源基因的功能冗余具有重大意义。

3 讨论

突变体对于研究植物功能基因组学具有重要意义。通过物理、化学诱变和转座子插入等方式获得

的突变体会随机地在基因组上多个位点产生突变,从而对目的基因的研究造成干扰。共生信号转导途径中存在多个基因共同调控某一生理过程的现象,故获得多个目的基因共同敲除的突变体对于研究共生固氮网络十分关键。CRISPR/Cas9 系统可同时在基因组多个靶位点处造成双链缺口,随后激发植物体内的非同源末端修复机制在各个缺口处形成几个碱基的插入或者缺失型突变,造成目的基因移码,从而实现多个目的基因的敲除。而已有的 RNA 干

扰技术只能将单个目的基因沉默而非基因敲除。

CRISPR/Cas9 系统在植物学研究中主要通过根癌农杆菌介导的稳定转化来对目的基因进行定点敲除,并可在自交产生的后代中分离得到目的基因纯合突变体。本研究将 CRISPR/Cas9 定点编辑系统应用于豆科植物毛根转化中,在百脉根和大豆中初步建立了对目的基因进行快速定点敲除的体系。采用毛根转化,一方面可大幅度地缩短试验周期;另一方面也为 CRISPR/Cas9 系统在较难实现转基因的农作物(如大豆)中的应用拓宽了范围。本研究中 CRISPR/Cas9 系统采用多个 sgRNA 串联表达的 PTG 模式,实现了对百脉根、大豆结瘤因子受体激酶 *NFR1* 基因的多靶点编辑,CRISPR 系统在百脉根、大豆 *NFR1* 基因内的编辑类型主要是小片段插入或缺失(图 3、4),并且在百脉根中靶位点 1 处突变率为 58.3%,而靶位点 2 处突变效率为 0%。这说明不同的 sgRNA 引导 Cas9 蛋白进行靶向切割的能力不同,sgRNA 的碱基分布及 GC 含量对于其与靶位点的亲和性很关键,这一亲和性直接决定 Cas9 蛋白对靶位点的编辑效率。与此同时,在 *Gm-NFR1* 和 *GmNFR1b* 二者的同源区域选取靶位点并设计 sgRNA 可同时敲除这 2 个同源基因,突变率高达 54.5%(图 4)。由于高等植物中存在多个基因功能冗余现象,它们参与组成复杂的基因网络来精确地调控植物体内各项生命活动^[22],因此,多靶点 CRISPR/Cas9 基因编辑系统对于研究这类功能冗余的基因群具有重要意义。

此外,本研究还发现 CRISPR/Cas9 转基因毛根中存在一部分有结瘤表型的阳性根(图 2A、C)。这可能是由于毛根转化过程中,不同的转基因毛根起源于不同的转化事件,它们各自的转化效率不同。即在阳性毛根上可能同时存在着未能转入 CRISPR/Cas9 表达系统的细胞,包含这种细胞的区域在接种根瘤菌后便会出现结瘤表型,导致这一类阳性根最终表现出敲除不明显的嵌合体表型。与此同时,CRISPR/Cas9 表达系统插入染色体位置的不同也可能造成其敲除效率的不同,即存在某些细胞的基因组上虽然整合了 CRISPR/Cas9 表达系统,然而目的基因并没有发生突变,所以这些细胞的基因型也会与野生型无异。

将 CRISPR/Cas9 系统运用于豆科植物毛根转化过程中,虽然缩短了试验周期,但是部分转基因毛根中存在的嵌合体形式会在一定程度上制约着对于

某些基因表型的研究。因此,CRISPR/Cas9 系统的毛根转化更加适用于突变体表型的快速检测。若要进一步分析某个或某些基因的表型,可通过稳定转化经过后代筛选获得敲除完全的突变体。

参 考 文 献

- [1] XIE K,ZHANG J,YANG Y.Genome-wide prediction of highly specific guide RNA spacers for CRISPR-Cas9-mediated genome editing in model plants and major crops[J].Molecular plant, 2014,7:923-926.
- [2] VOYTAS D.Plant genome engineering with sequence-specific nucleases[J].Annual review of plant biology, 2013, 64: 327-350.
- [3] BELHAJ K,CHAPARRO A,KAMOUN S,et al.Plant genome editing made easy: targeted mutagenesis in model and crop plants using the CRISPR/Cas system[J].Plant methods,2013, 9(1):1-10.
- [4] MLADENOV E,ILIAKIS G.Induction and repair of DNA double strand breaks:the increasing spectrum of non-homologous end joining pathways[J].Mutation research,2011,711:61-72.
- [5] SYMINGTON L,GAUTIER J.Double-strand break end resection and repair pathway choice[J].Annual review of genetics, 2011,45:247-271.
- [6] MALI P,ESVELT K,CHURCH G M,Cas9 as a versatile tool for engineering biology[J].Nature methods,2013,10:957-963.
- [7] CONG L,RAN F,COX D,et al.Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems[J].Science,2013,339:819-823.
- [8] FENG Z,ZHANG B,DING W,et al.Efficient genome editing in plants using a CRISPR/Cas system[J].Cell research,2013, 23(10):1229-1232.
- [9] MAO Y,ZHANG H,XU N,et al.Application of the CRISPR-Cas system for efficient genome engineering in plants[J].Molecular plant,2013,6:2008-2011.
- [10] XIE K,MINKENBERG B,YANG Y.Boosting CRISPR/Cas9 multiplex editing capability with the endogenous tRNA-processing system[J].Proceedings of the national academy of sciences,2015,112(11):3570-3575.
- [11] JIANG W,ZHOU H,BI H,et al.Demonstration of CRISPR/Cas9/sgRNA-mediated targeted gene modification in *Arabidopsis*, tobacco, sorghum and rice[J].Nucleic acids research, 2013,41:e188.
- [12] LI J,NORVILLE J,AACH J,et al.Multiplex and homologous recombination-mediated genome editing in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana* using guide RNA and Cas9[J].Nature biotechnology,2013,31:688-691.
- [13] HIRSCH A,LUM M,DOWNIE J A.What makes the rhizobia-legume symbiosis so special? [J].Plant physiology,2001,127 (4):1484-1492.
- [14] OLDROYD G E.Speak, friend, and enter: signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants[J].Na-

ture reviews microbiology,2013,11(4):252-263.

[15] 张晓媛,王建云,魏丰,等.紫云英根瘤中特异表达 CCPs 基因的同源分析及表达定位[J].华中农业大学学报,2016,35(2):48-55.

[16] 路达,彭杰丽,谢福莉,等.华癸中慢生根瘤菌 7653R MCHK_8182 基因的共生固氮功能[J].华中农业大学学报,2016,35(4):56-61.

[17] 李振鹏,马春草,谢福莉,等.华癸中慢生根瘤菌 7653R SraGsRNA 的共生固氮功能[J].华中农业大学学报,2016,35(5):51-57.

[18] RADUTOIU S,MADSEN L H,MADSEN E B,et al.Plant recognition of symbiotic bacteria requires two LysM receptor-like kinases[J].Nature,2003,425:585-592.

[19] LEI Y,LU L,LIU HY,et al.CRISPR-P:a web tool for synthetic single-guide RNA design of CRISPR-system in plants[J].Molecular plant,2014,7:1494-1496.

[20] KUMAGAI H,KOUCHI H.Gene silencing by expression of hairpin RNA in*Lotus japonicus* roots and root nodules[J].Molecular plant-microbe interactions,2003,16(8):663-668.

[21] KERESZT A,LI D,INDRASUMUNAR A,et al.*Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of soybean to study root biology[J].Nature protocols,2007,2:948-952.

[22] XIE K,YANG Y.RNA-guided genome editing in plants using a CRISPR-Cas system[J].Molecular plant,2013,6:1975-1983.

CRISPR/Cas9-mediated symbiotic genes mutagenesis in legumes by hairy root transformation

TAN Qian WANG Longxiang ZHANG Xianpeng YU Haixiang ZHANG Zhongming
State Key Laboratory of Agricultural Microbiology/College of Life Science & Technology,
Huazhong Agricultural University,Wuhan 430070,China

Abstract Combined with hairy root transformation,CRISPR/Cas9 is used to edit multiple sites in Nod factor receptor 1(NFR1) of *Lotus japonicus* and *Glycine max*, to quickly obtain the target mutants.The results showed that target gene mutants were generated in both of them. Editing efficiency of target 1 in *LjNFR1* was 58.3%.No mutation was detected on target 2.The efficiency of target 1 and target 2 in *Glycine max* was 33.3% and 41.7%,respectively.Further sequencing analysis demonstrated that the CRISPR/Cas9 system is capable to simultaneously knockout multiple homologous genes in *Glycine max*,implying that the CRISPR/Cas9 can functionally manipulate redundant genes in plants.Exertion of the CRISPR/Cas9 system in transgenic hairy roots shortened the experimental cycle of obtaining the desired mutants.

Keywords CRISPR/Cas9; genome editing technology; site-specific editing; Nod factor receptor 1; legumes

(责任编辑:张志钰)