

引用格式:

张宗飞, 刘媛媛, 欧阳解秀, 李绍波, 王鑫. 水稻 *OsFRK1* 与 *OsFRK2* 基因 CRISPR 敲除突变体的构建[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2020, 46(6): 679–685.

ZHANG Z F, LIU Y Y, OUYANG J X, LI S B, WANG X. Generation of CRISPR knock-out mutants of the *OsFRK1* and *OsFRK2* in rice[J]. Journal of Hunan Agricultural University (Natural Sciences), 2020, 46(6): 679–685.

投稿网址: <http://xb.hunau.edu.cn>



## 水稻 *OsFRK1* 与 *OsFRK2* 基因 CRISPR 敲除突变体的构建

张宗飞, 刘媛媛, 欧阳解秀, 李绍波, 王鑫\*

(南昌大学生命科学学院, 江西 南昌 330031)

**摘要:** 为揭示水稻果糖激酶(*OsFRK*)家族基因的生物学功能, 采用 CRISPR/Cas9 技术, 成功创建了 2 个已鉴定了的水稻 *OsFRK* 家族基因的敲除突变体; 获得 28 株 *OsFRK1* 的  $T_0$  代转基因植株, 其转基因阳性率、突变率与纯合突变率分别为 100%、46.43%和 10.71%; 获得 14 株 *OsFRK2* 的  $T_0$  代转基因植株, 其转基因阳性率、突变率与纯合突变率分别为 92.86%、92.86%和 21.43%;  $T_0$  代敲除纯合突变体中目的蛋白质的功能结构域均发生不同程度的破坏。

**关键词:** 水稻; *OsFRK* 家族基因; CRISPR/Cas9 技术; 载体构建; 敲除突变体

中图分类号: S511; Q789

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2020)06-0679-07

### Generation of CRISPR knock-out mutants of the *OsFRK1* and *OsFRK2* in rice

ZHANG Zongfei, LIU Yuanyuan, OUYANG Jiexiu, LI Shaobo, WANG Xin\*

(College of Life Sciences, Nanchang University, Nanchang, Jiangxi 330031, China)

**Abstract:** To reveal the biological function of fructokinase (*OsFRK*) family genes in rice, two knock-out mutants for identified *OsFRK* family genes were constructed using CRISPR/Cas9 technology. The results showed that 28 *OsFRK1* and 14 *OsFRK2*  $T_0$  transgenic plants were successfully constructed. The transgenic positive rate, mutation rate and homozygous mutation rate of *OsFRK1* is 100%, 46.43% and 10.71%, while *OsFRK2* is 92.86%, 92.86% and 21.43%. In addition, the functional domains of targeted proteins of the  $T_0$  knock-out homozygous mutants were damaged in the mutants.

**Keywords:** *Oryza sativa*; *OsFRK* family genes; CRISPR/Cas9; vector construction; knock-out mutants

果糖激酶在植物的生长发育过程以及逆境适应中具有重要的功能, 属于 pfkB 碳水化合物激酶家族中的一类亚家族<sup>[1-2]</sup>。该类酶具有高度保守的 ATP 结合结构域和果糖底物结合结构域<sup>[3-4]</sup>。在植物中, 对番茄的果糖激酶基因的功能研究比较深入, KANAYAMA 等<sup>[5]</sup>从番茄中克隆到了 4 个果糖

激酶基因 *LeFRK1*、*LeFRK2*、*LeFRK3* 和 *LeFRK4*, 这 4 个同源基因位于不同的染色体上, 在番茄生长发育过程中发挥着不同的作用。*LeFRK1* 基因下调表达, 突变体的花期延迟, 说明 *LeFRK1* 基因与花期的调控有关<sup>[6]</sup>; *LeFRK4* 基因在花粉发育的后期和花粉萌发期间在花药中特异性表达, 表明这种酶可

收稿日期: 2019-12-09

修回日期: 2020-03-01

基金项目: 国家自然科学基金项目(31760080、31960422)

作者简介: 张宗飞(1993—), 男, 广东茂名市人, 硕士研究生, 主要从事水稻遗传学研究, [zzf520cn@163.com](mailto:zzf520cn@163.com); \*通信作者, 王鑫, 博士, 讲师, 主要从事植物分子遗传学研究, [wangxin@ncu.edu.cn](mailto:wangxin@ncu.edu.cn)

能是参与花粉管发育过程中所必需的碳水化合物<sup>[7]</sup>。研究发现,拟南芥 *AtFRK* 家族基因对种子油的积累与维管的发育非常重要<sup>[8]</sup>。*ZmFRK2* 基因在玉米响应短期盐胁迫过程中上调表达<sup>[9]</sup>;在甜菜(*Beta vulgaris*)的根中,检测到伤口应激反应中 FRK 活性增加<sup>[10]</sup>。说明 FRK 在维持植物正常的生长发育以及逆境适应过程中都具有重要的功能。

水稻中,目前已鉴定了 2 个 *OsFRK* 家族基因,分别为 *OsFRK1* 和 *OsFRK2*<sup>[11]</sup>。有研究结果表明,在无氧条件下,水稻幼苗中的 *OsFRK2* 基因表达上调,*OsFRK1* 基因表达下调<sup>[12]</sup>。GUGLIELMINETTI 等<sup>[13]</sup>研究发现,乙醇处理后水稻 *OsFRK2* 基因在幼苗的胚与胚芽鞘中的表达上调,*OsFRK1* 基因下调表达,这些结果暗示了 *OsFRK1* 和 *OsFRK2* 很有可能参与了水稻响应氧胁迫的作用过程,但还需要进一步证实。

本研究拟利用成熟的 CRISPR/Cas9 基因编辑技术<sup>[14]</sup>,构建水稻 *OsFRK1* 和 *OsFRK2* 的敲除表达载体,利用根癌农杆菌介导的水稻遗传转化法、靶点序列的 PCR 扩增与测序分析等方法创建 *OsFRK1* 和 *OsFRK2* 的 CRISPR 敲除表达突变体,为深入研究 *OsFRK1* 和 *OsFRK2* 的生物学功能提供基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

粳稻‘中花 11’由江西省分子生物学与基因工程重点实验室提供。主要试剂有 KOD-Plus (TOYOBO)、*Taq* 酶(TransGen)、限制性内切酶 *Bsa* I (NEB)、*T4*DNA ligase (NEB)、超薄 DNA 产物纯化试剂盒(TIANGEN)和质粒小提中量试剂盒(TIANGEN)等。

### 1.2 实验菌株与载体

大肠埃希菌 DH5 $\alpha$  和根癌农杆菌 EHA105 购于上海唯地生物技术有限公司;CRISPR/Cas9 载体构建的 pYL-CRISPR-Cas9-PubI-H(MH)及 sgRNA 表达盒构建所需的启动子载体 pYLsgRNA-OsU6a 和 pYLsgRNA-OsU6b 由华南农业大学刘耀光惠赠。

### 1.3 CRISPR/Cas9 靶点设计

在 Phytozome 网站(<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>)分别下载水稻 *OsFRK1*(LOC\_

Os01g66940)和 *OsFRK2* (LOC\_Os08g02120)基因组序列、mRNA 序列和氨基酸序列,随后在 CRISPR-P 网站(<http://crispr.hzau.edu.cn/CRISPR2/>)上,以 NGG 为 PAM 结构,分别在目的基因的第 1 个外显子上设计特异性的 pYL-CRISPR/Cas9 靶点;并利用 SMART 在线网站([http://smart.embl-heidelberg.de/smart/batch.pl?tdsourcetag=s\\_pctim\\_aiomsg](http://smart.embl-heidelberg.de/smart/batch.pl?tdsourcetag=s_pctim_aiomsg))对这 2 个 *FRK* 家族基因的蛋白保守结构域进行分析;进而在 CRISPR-GE 网站(<http://skl.scau.edu.cn/>)对已设计出的靶点进行脱靶预测分析<sup>[15]</sup>,挑选出编辑效率较高、脱靶可能性较低且位于蛋白保守结构域序列上的靶点,并根据特异性靶点的特性设计靶点接头引物。

### 1.4 CRISPR/Cas9 敲除表达载体的构建

参考 MA 等<sup>[14]</sup>的方法构建 CRISPR/Cas9 敲除表达载体。先进行靶点接头的制备,再采用 *Bsa* I 对 sgRNA 启动子载体进行酶切,其中 *OsFRK1* 选择 pYLsgRNA-OsU6b 启动子载体,*OsFRK2* 选择 pYLsgRNA-OsU6a 和 pYLsgRNA-OsU6b 2 个靶点,进行第 1 轮 PCR。各取 1  $\mu$ L 第 1 轮 PCR 产物,用 ddH<sub>2</sub>O 稀释 10 倍,作为第 2 轮 PCR 的模板。采用 30  $\mu$ L 体系进行 sgRNA 表达盒的构建,加入 0.5  $\mu$ L 第 2 轮 PCR 引物(最终浓度 0.167  $\mu$ mol/L),使用适量的 KOD-Plus 进行巢式 PCR。程序设置为 20 个循环:95  $^{\circ}$ C 预变性 3 min;95  $^{\circ}$ C 变性 10 s,58  $^{\circ}$ C 退火 15 s,68  $^{\circ}$ C 延伸 20 s。将第 1 轮与第 2 轮 PCR 产物进行电泳鉴定,成功之后再包含特异性靶点的 sgRNA 表达盒的第 2 轮 PCR 产物进行纯化回收,成功构建 sgRNA 表达盒。采用 Gold Gate cloning 方法<sup>[16]</sup>将其与 pYL-CRISPR/Cas9 骨架载体同时进行酶切-酶连;取 5  $\mu$ L 产物转化大肠埃希菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞,在含卡那霉素的 LB 培养基上长出菌落后,进行菌落 PCR 和测序验证;最后再利用质粒小提中量试剂盒提取相应的 CRISPR/Cas9 质粒。

### 1.5 水稻组织培养与遗传转化

采用冻融法<sup>[17]</sup>,将构建好的载体转化至 EHA105 感受态细胞中,挑取阳性菌加入含卡那霉素和利福平抗生素的液体 LB 培养基中进行培养。参考前人建立的水稻遗传转化体系<sup>[18]</sup>,完成敲除载

体的遗传转化。首先,利用成熟的粳稻‘中花 11’种子经诱导培养基培养,获得结构致密、呈淡黄色的愈伤组织;挑选硬实的胚性愈伤组织于预培养基中,预培养 3 d 后进行农杆菌浸染转化;将浸染处理后的愈伤组织接种到筛选培养基(9 cm 方皿)中,培养约 1 个月;将新长出的抗性愈伤组织移至分化培养基中,分化处理约 1 个月后长出幼苗;将幼苗去根后移至生根培养基中培养 10 d 左右,获得根系发达的转基因幼苗,经过练苗处理后,移至大田中正常生长。

1.6 水稻叶片基因组 DNA 的提取

采用 CTAB 法<sup>[19]</sup>提取水稻  $T_0$  代材料的叶片基因组 DNA。 $T_0$  代幼苗移栽大田后 15 d,每棵植株剪取 0.2 g 叶片于 2 mL 离心管中(加有直径 0.4 cm 的不锈钢珠),加入 800  $\mu$ L 的 CTAB 提取液(含  $\beta$ -巯基乙醇),置于 DNA-extractor (高通量组织球磨仪)上,打碎 3 min,重复 2 次;65  $^{\circ}$ C 水浴处理 30 min;采用氯仿、异戊醇(氯仿与异戊醇的体积比为 24 : 1)溶液进行抽提,随后利用无水乙醇进行 DNA 沉淀;获得 DNA 沉淀后,再用 ddH<sub>2</sub>O 溶解,最后采用超微量分光光度计(Thermo Nanodrop 2000)对 DNA 溶液进行检测。

1.7 敲除突变体材料的鉴定

因 CRISPR/Cas9 载体构建的骨架载体 MH 的 T-DNA 插入区包含有潮霉素抗性基因(HPT)序列,

通过 Addgene 质粒数据库(<http://www.addgene.org/>)获取 MH 载体的序列,再将序列导入 SnapGene 软件中自动识别出载体的 HPT 序列,针对该序列设计 PCR 引物(表 1)并验证,以确定敲除载体的 T-DNA 区是否插入到水稻基因组中。在靶点上、下游各 200 bp 区段附近设计特异性扩增引物,进行 PCR 扩增产物测序验证<sup>[20]</sup>,其中 *OsFRK2* 只需设计 1 对引物就可将双靶点序列扩增在内,对扩增产物进行测序,测序结果采用 Geneious 软件进行比对分析,以此鉴定突变体的靶点序列突变情况。采用 Geneious 软件进行突变体的氨基酸序列分析,先将突变后的 CDS 序列导入 Geneious 软件中,进行翻译,即可看到氨基酸序列的变化情况,再与粳稻‘中花 11’编码蛋白质保守结构域的序列进行对比,可知保守结构域是否遭到破坏。

2 结果与分析

2.1 *OsFRK1* 和 *OsFRK2* 敲除靶点的设计与获取

在 Phytozome 数据库中下载 *OsFRK1* 和 *OsFRK2* 的基因序列,利用 CRISPR-P 和 CRISPR-GE 在线网站设计最佳的靶点(图 1),在 *OsFRK1* 基因的第 1 个外显子上设计了 1 个敲除靶点,由 OsU6b 启动;在 *OsFRK2* 基因的第 1 个外显子上设计了 2 个敲除靶点,分别由 OsU6a 和 OsU6b 启动。最后针对以上特异性靶点设计相应的靶点接头引物(表 1)。

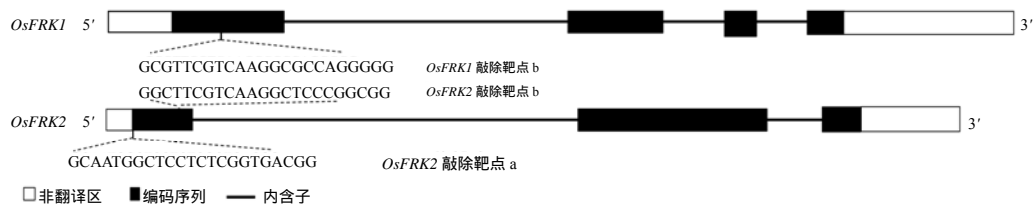


图 1 *OsFRK1* 和 *OsFRK2* 的 CRISPR/Cas9 敲除靶点序列与位置

Fig.1 The sequence and position of CRISPR/Cas9 knockout targets in *OsFRK1* and *OsFRK2*

表 1 本研究所用的引物

Table 1 Primers used in this research

名称	引物序列(5'—3')	用途
OsU6b-FRK1F	GTTGCGTTCGTCAAGGCGCCAGG	<i>OsFRK1</i> 基因敲除靶点接头引物
OsU6b-FRK1R	AAACCCTGGCGCCTTGACGAACG	
OsU6a-FRK2F	GCCGCAATGGCTCCTCTCGGTGA	<i>OsFRK2</i> 基因敲除靶点接头引物
OsU6a-FRK2R	AAACTCACCGAGAGAGCCATTG	
OsU6b-FRK2F	GTTGGCTTCGTCAAGGCTCCCGG	<i>OsFRK2</i> 基因敲除靶点接头引物

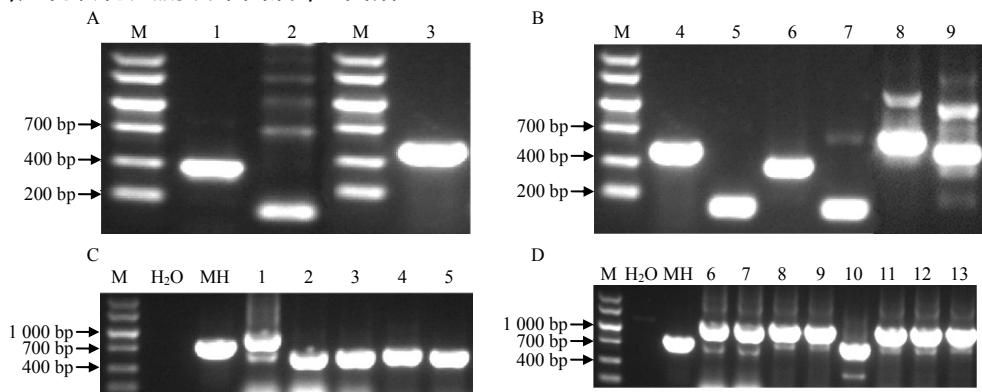
表 1(续)

名称	引物序列(5'—3')	用途
OsU6b-FRK2R	AAACCCGGGAGCCTTGACGAAGC	敲除载体构建第 1 轮 PCR
U-F	CTCCGTTTTACCTGTGGAATCG	
Gr-R	CGGAGGAAAATTCCATCCAC	
Pps-GGL	TTCAGAggtctctctcgACTAGTATGGAATCGGCAGCAAAGG	敲除载体构建第 2 轮 PCR
Pgs-GGR	AGCGTGggtctcgaccgACGCGTATCCATCCACTCCAAGCTC	
SP-L1	GCGGTGTCATCTATGTTACTAG	
SP-R	GGCTGTATCTACGTTATTGAAG	潮霉素抗性基因检测
HPT-F	CTGAACTCACC GCGACGCTCTGTC	
HPT-R	TAGCGCTCTGCTGCTCCATACA	
OsFRK1-cF	GAGCAGGGTGTTGTTGTTTG	<i>OsFRK1</i> 基因敲除靶点测序
OsFRK1-cR	GGCGAGAGGTTTCGGTTCAA	
OsFRK2-cF	TCTCGGATTAAGACTAATTACG	<i>OsFRK2</i> 基因敲除靶点测序
OsFRK2-cR	TCATTCTGCACAATTCAAC	

2.2 *OsFRK1* 和 *OsFRK2* 敲除表达载体的构建

参考 MA 等<sup>[14]</sup>的方法,首先成功构建了 sgRNA 表达盒,其 2 轮巢式 PCR 产物电泳结果(图 2-A、图 2-B)显示,第 2 轮 PCR 产物 *OsFRK1*-*OsU6b*-gRNA、*OsFRK2*-*OsU6a*-gRNA、*OsFRK2*-*OsU6b*-gRNA 电泳条带大小与预期的基本相符,分别为 485 bp、599 bp 和 485 bp,随后把纯化回收的靶标 sgRNA 表达盒与 pYLCRISPR/Cas9 骨架载体同时进行酶切-酶连反应;产物转化大肠埃希菌后,经菌落 PCR

鉴定,获得阳性单菌落(图 2-C、图 2-D),其中图 2-C 中的泳道 2~4 为 *OsFRK1* 敲除表达载体转化后的阳性单菌落,泳道 1 为假阳性;图 2-D 中除泳道 10 为假阳性单菌落外,其余的皆为 *OsFRK2* 敲除表达载体转化后的阳性单菌落。分别挑取 3 个不同的阳性单菌落进行测序和 NCBI 的 Blastn 比对分析,发现预期的特异性靶点序列已成功装载,由此确定成功构建了 *OsFRK1* 和 *OsFRK2* 的 CRISPR 敲除表达载体。



M DNA Marker; H<sub>2</sub>O 空白对照; MH pYLCRISPR/Cas9-MH 质粒。A 泳道 1、2 为 *OsFRK1*-*OsU6b* 第 1 轮扩增产物,泳道 3 为 *OsFRK1*-*OsU6b* 第 2 轮扩增产物;B 泳道 4、5 为 *OsFRK2*-*OsU6a* 第 1 轮扩增产物,泳道 6、7 为 *OsFRK2*-*OsU6b* 第 1 轮扩增产物,泳道 8、9 为 *OsFRK2*-*OsU6b* 第 2 轮扩增产物;C 泳道 1~5 为 *OsFRK1* 基因敲除单菌落;D 泳道 6~13 为 *OsFRK2* 基因敲除单菌落。

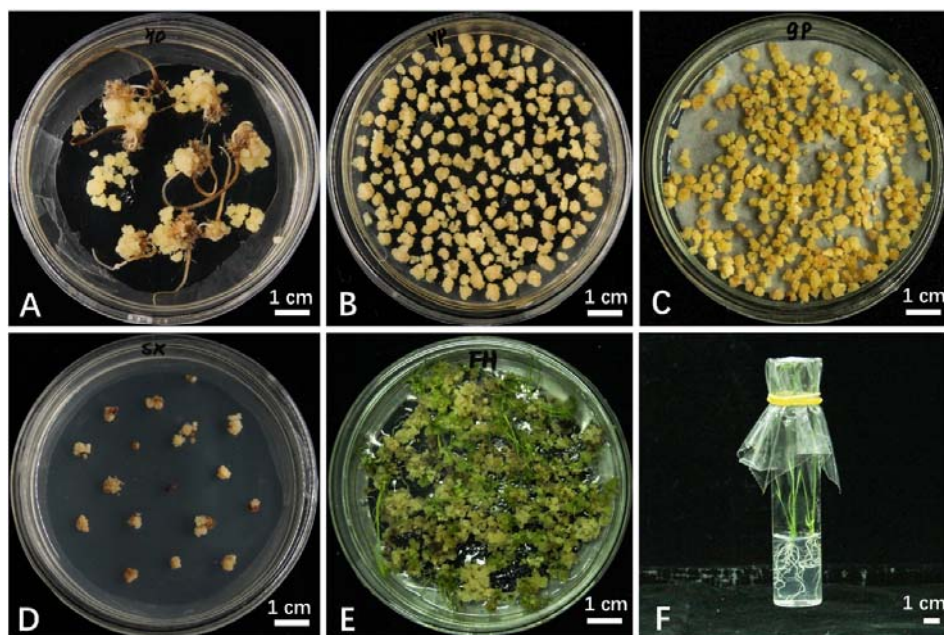
图 2 水稻 *OsFRK1* 和 *OsFRK2* 的 CRISPR 敲除表达载体构建

Fig.2 Construction of CRISPR knock-out expression vectors of *OsFRK1* and *OsFRK2* in rice

2.3 水稻遗传转化及转基因植株的获得

成功获得 CRISPR/Cas9 敲除表达载体后,利用冻融法将其转化至根癌农杆菌(EHA105)感受态细胞中,经农杆菌介导法转化水稻愈伤组织,获得 T<sub>0</sub>

代转基因水稻植株(图 3)。最终获得 28 株 *OsFRK1* 基因的 T<sub>0</sub> 代转基因植株和 14 株 *OsFRK2* 基因的 T<sub>0</sub> 代转基因植株。这些转基因植株移至大田种植后的存活率均为 100%。



A 水稻愈伤组织的诱导; B 农杆菌浸染前愈伤组织的预培养; C 浸染后的共培养; D 愈伤组织的筛选培养; E 愈伤组织的分化培养; F  $T_0$ 代组培苗的生根培养。

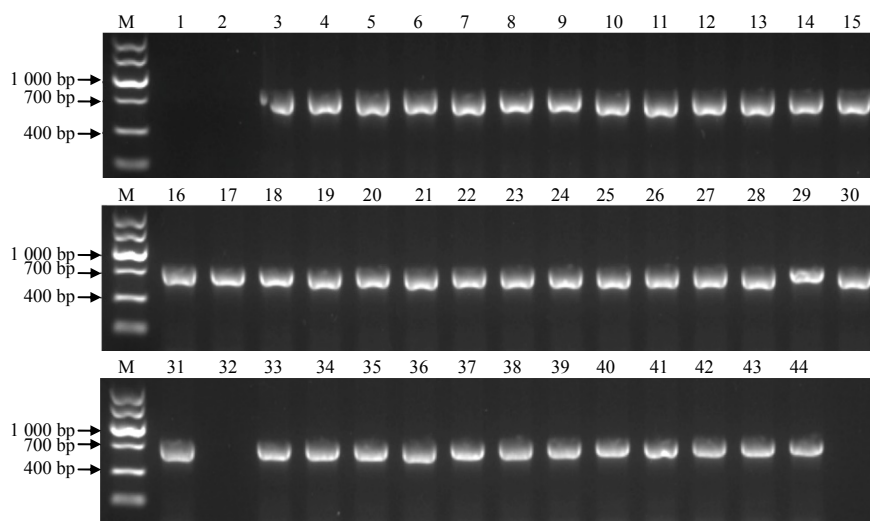
图 3 水稻 *OsFRK1* 和 *OsFRK2*  $T_0$ 代转基因植株的获得过程

Fig.3 The process of obtaining  $T_0$  transgenic plants of *OsFRK1* and *OsFRK2*

## 2.4 $T_0$ 代转基因植株的鉴定

在转基因幼苗移栽至大田 15 d 后,提取其叶片基因组 DNA,对其转基因植株的阳性率和敲除突变

情况进行鉴定。对潮霉素抗性基因(*HPT*)进行 PCR 扩增条带检测(图 4),其中 *HPT* 扩增片段大小为 733 bp;若无条带,则表明无 T-DNA 插入。



M DNA Marker 泳道 1  $H_2O$  空白对照 泳道 2 野生型‘中花 11’ 泳道 3~30 *OsFRK1* 转基因潮霉素抗性苗 泳道 31~44 *OsFRK2* 转基因幼苗。

图 4  $T_0$ 代转基因水稻植株的 PCR 检测

Fig.4 PCR detection of  $T_0$  transgenic plants

对  $T_0$ 代转基因植株进行分析,结果(表 2)显示,28 株为 *OsFRK1*  $T_0$ 代转基因阳性植株,转基因阳性率为 100%;13 株为 *OsFRK2*  $T_0$ 代转基因阳性植株,其阳性率为 92.86%。对转基因植株靶位点序列进行 PCR 扩增和扩增产物的测序分析,结果(表 2)发现,

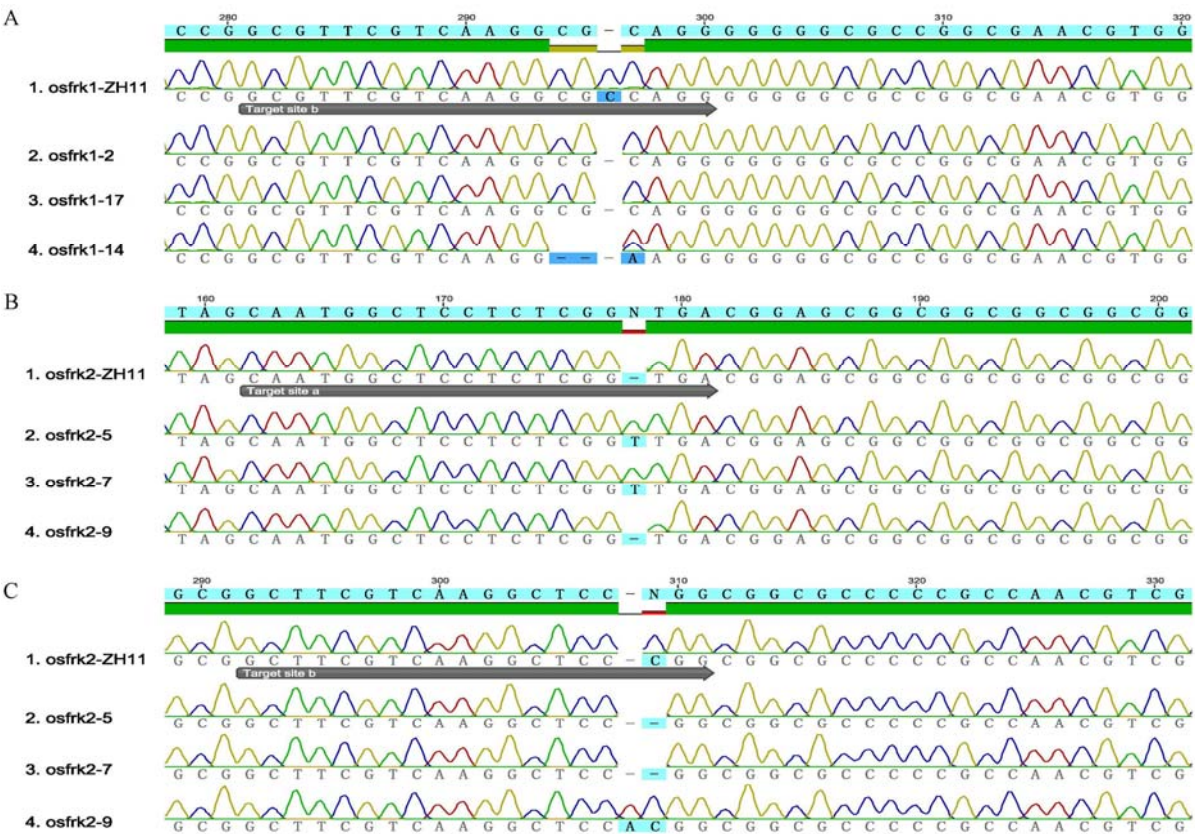
*OsFRK1* 转基因植株突变率为 46.43%,纯合突变率为 10.71%,同时获得 2 种纯合突变体材料,分别是 *osfrk1-2/17*(碱基 C 缺失)和 *osfrk1-14*(碱基 CGC 缺失且由 C 突变为 A);*OsFRK2* 转基因植株突变率为 92.86%,纯合突变率为 21.43%,也获得 2 种纯合突



表 2 *OsFRK1* 和 *OsFRK2* 的 T<sub>0</sub> 代转基因植株的敲除效率

Table 2 Knock-out efficiency analysis of T <sub>0</sub> transgenic plants of <i>OsFRK1</i> and <i>OsFRK2</i>						
敲除基因	T <sub>0</sub> 代单株数	T <sub>0</sub> 代阳性苗株数	突变株数	突变率/%	纯合突变株数	纯合突变率/%
<i>OsFRK1</i>	28	28	13	46.43	3	10.71
<i>OsFRK2</i>	14	13	13	92.86	3	21.43

变体材料,分别是 osfrk2-5/7(靶点 1 处插入碱基 T; A); 纯合突变体的测序结果没有杂峰(图 5)。靶点 2 处缺失碱基 C)和 osfrk2-9(靶点 2 处插入碱基



A、B、C 分别为 *OsFRK1b*、*OsFRK2a* 和 *OsFRK2b* 靶点序列测序结果。

图 5 *OsFRK1* 和 *OsFRK2* 的 T<sub>0</sub> 代转基因纯合植株的测序结果

Fig.5 Sequencing results of T<sub>0</sub> homozygous mutants of *OsFRK1* and *OsFRK2*

进一步对纯合突变体进行氨基酸序列预测,结果(图 6)发现:所获得的 T<sub>0</sub> 代纯合突变体材料的蛋白功能结构域都遭到不同程度的破坏,osfrk1-2/17 的靶位点序列缺失 C 碱基,导致之后的氨基酸序列

发生移码突变,翻译提前终止;osfrk2-5/7 在靶点 a 处增添 T 碱基,导致天冬氨酸(D)直接突变为终止密码子,严重破坏了目的蛋白的功能结构域。

```
osfrk1-ZH11: MAGRSELVVSFGEMLIDFVPTVAGVSLAEAPAFVKAPGGAPANVAIVARLGGGAFFVGKLGDDFGRMLAAILRDNGVDDGGVVFDAAGARTALAFVTLRADGEREFMFYRNPSADML
LTHAELNVELIKRAAVFHYGSLIAEPCRSAPHLRAEIAKEAGALLSYDPNLRALWPSREARTKILSIWDQADIVKVSEVELEFLTGTIDSVEDDVVMKLRPTMKLLLVTLGDQG
CKYYARDFRGAVPSYKVVQVDTTGAGDAFVGALLRRIVQDPSSLQDQKLEEAIFANACGAIATATKGAIPSLPTEVEVLKLMESA*
osfrk1-2/17: MAGRSELVVSFGEMLIDFVPTVAGVSLAEAPAFVKAQGGRRRTWPSRWGSAAGPRSSASWGTTSGGCSRPSATTASTTAGSCSTPGRAPRSPSSAPTGSASSCSTATPTCS
SPTPSSTSSSRGLPSSIMDQ* (-C)
osfrk1-14: MAGRSELVVSFGEMLIDFVPTVAGVSLAEAPAFVKE-GGAPANVAIVARLGGGAFFVGKLGDDFGRMLAAILRDNGVDDGGVVFDAAGARTALAFVTLRADGEREFMFYRNPSADML
LTHAELNVELIKRAAVFHYGSLIAEPCRSAPHLRAEIAKEAGALLSYDPNLRALWPSREARTKILSIWDQADIVKVSEVELEFLTGTIDSVEDDVVMKLRPTMKLLLVTLGDQG
CKYYARDFRGAVPSYKVVQVDTTGAGDAFVGALLRRIVQDPSSLQDQKLEEAIFANACGAIATATKGAIPSLPTEVEVLKLMESA* (-3bp且C→A)
osfrk2-ZH11: MAPLGDGAAAAAEEPNLVVSFGEMLIDFVDPVAGVSLAESSGFVKAPGGAPANVACAISKLGSSAFVGKFGDDEFGH...*
osfrk2-5/7: MAPLG* (+T;-C)
osfrk2-9: MAPLGDGAAAAAEEPNLVVSFGEMLIDFVDPVAGVSLAESSGFVKAPRRRPRQRRLRLHQLARWLLRLRRQVW* (WT;+A)
```

灰色部分序列为目的蛋白的功能结构域;红色序列代表突变体发生突变后的序列。

图 6 *OsFRK1* 和 *OsFRK2* 的 T<sub>0</sub> 代转基因纯合植株的氨基酸序列分析结果

Fig.6 Amino acid sequence analysis results of T<sub>0</sub> homozygous mutants of *OsFRK1* and *OsFRK2*

### 3 结论与讨论

有研究<sup>[21]</sup>表明,优化 Cas9 基因表达的启动子,可以提高基因组编辑的效率。在拟南芥中,由 PcUbi4-2 驱动 Cas9 基因时, T<sub>1</sub> 代转基因植株突变效率低至 26%<sup>[22]</sup>,而改为 YAO 启动子时,拟南芥基因组的突变率高达 88.5~90.5%<sup>[23]</sup>。MA 等<sup>[14]</sup>研究发现,在水稻中用 PZmUbi 启动 Cas9 基因,表达效果最佳, T<sub>0</sub> 代转基因植株的突变率高达 85.4%。本研究中,采用 PZmUbi 启动的 CRISPR/Cas9 技术成功创建了 *OsFRK1* 与 *OsFRK2* 的 T<sub>0</sub> 代转基因植株,它们的突变率分别为 46.43%和 92.86%,其纯合突变率分别为 10.71%和 21.43%,说明了 PZmUbi 启动的 CRISPR/Cas9 系统对水稻基因组的编辑效率较高。

前人研究结果表明,在拟南芥和番茄中,FRK 家族基因的表达变化会影响植株的生长发育<sup>[5-8]</sup>;在玉米、向日葵和甜菜等植物中,FRK 家族基因表现出对多种非生物胁迫具有显著的响应<sup>[9-10]</sup>。说明 FRK 家族基因在植物的生长发育以及逆境适应中具有重要的生物学功能。本研究中,采用 CRISPR/Cas9 技术,构建了 *OsFRK1* 与 *OsFRK2* 的敲除突变体,获得了 13 株敲除突变体 T<sub>0</sub> 代植株,并且在 2 个基因的 T<sub>0</sub> 代敲除突变体中均获得了 2 种不同突变类型的纯合突变体,为进一步探究 *OsFRK1* 和 *OsFRK2* 的生物学功能提供了遗传材料。

#### 参考文献:

- [1] PETERSEN L A , DOWNS D M . Identification and characterization of an operon in *Salmonella typhimurium* involved in thiamine biosynthesis[J] . Journal of Bacteriology , 1997 , 179(15) : 4894-4900 .
- [2] SIGRELL J A , CAMERON A D , JONES T A , et al . Structure of *Escherichia coli* ribokinase in complex with ribose and dinucleotide determined to 1.8 Å resolution : insights into a new family of kinase structures[J] . Structure , 1998 , 6(2) : 183-193 .
- [3] FENNINGTON G J , HUGHES T A . The fructokinase from *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* belongs to group I fructokinase enzymes and is encoded separately from other carbohydrate metabolism enzymes[J] . Microbiology , 1996 , 142(2) : 321-330 .
- [4] 陈毅鸿, 张积森. 植物果糖激酶基因家族演化及其功能[J] . 分子植物育种 , 2016 , 14(2) : 359-369 .
- CHEN Y H , ZHANG J S . A review for gene evolution and functional study in plant fructokinase[J] . Molecular Plant Breeding , 2016 , 14(2) : 359-369 .
- [5] KANAYAMA Y , DAI N , GRANOT D , et al . Divergent fructokinase genes are differentially expressed in tomato[J] . Plant Physiology , 1997 , 113(4) : 1379-1384 .
- [6] ODANAKA S , BENNETT A B , KANAYAMA Y . Distinct physiological roles of fructokinase isozymes revealed by gene-specific suppression of *Frk1* and *Frk2* expression in tomato[J] . Plant Physiology , 2002 , 129(3) : 1119-1126 .
- [7] GERMAN M A , DAI N , CHMELNITSKY I , et al . *LeFRK4* , a novel tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) fructokinase specifically expressed in stamens[J] . Plant Science , 2002 , 163(3) : 607-613 .
- [8] STEIN O , AVIN-WITTENBERG T , KRAHNERT I , et al . Corrigendum : *Arabidopsis* fructokinases are important for seed oil accumulation and vascular development[J] . Frontiers in Plant Science , 2017 , 8 : 2047 .
- [9] ZÖRB C , SCHMITT S , MÜHLING K H . Proteomic changes in maize roots after short-term adjustment to saline growth conditions[J] . Proteomics , 2010 , 10(24) : 4441-4449 .
- [10] KLOTZ K L , FINGER F L , ANDERSON M D . Wounding increases glycolytic but not soluble sucrolytic activities in stored sugarbeet root[J] . Postharvest Biology and Technology , 2006 , 41(1) : 48-55 .
- [11] JIANG H W , DIAN W M , LIU F Y , et al . Isolation and characterization of two fructokinase cDNA clones from rice[J] . Phytochemistry , 2003 , 62(1) : 47-52 .
- [12] GUGLIELMINETTI L , MORITA A , YAMAGUCHI J , et al . Differential expression of two fructokinases in *Oryza sativa* seedlings grown under aerobic and anaerobic conditions[J] . Journal of Plant Research , 2006 , 119(4) : 351-356 .
- [13] GUGLIELMINETTI L , VOLTERRANI M . Effect of ethanol on the expression of two fructokinases in rice seedlings[J] . Plant Production Science , 2014 , 17(4) : 305-310 .
- [14] MA X L , ZHANG Q Y , ZHU Q L , et al . A robust CRISPR/Cas9 system for convenient , high-efficiency multiplex genome editing in monocot and dicot plants[J] . Molecular Plant , 2015 , 8(8) : 1274-1284 .
- [15] XIE X R , MA X L , ZHU Q L , et al . CRISPR-GE : a convenient software toolkit for CRISPR-based genome editing[J] . Molecular Plant , 2017 , 10(9) : 1246-1249 .

- 209–212 .  
ZHENG H J , ZHU R , GE C L , et al . Bioinformatics of human interleukin-29[J] . Chinese Journal of Biologicals , 2013 , 26(2) : 209–212 .
- [23] FRANCO T , LOW P S . Erythrocyte adducin : a structural regulator of the red blood cell membrane[J] . Transfusion Clinique et Biologique , 2010 , 17(3) : 87–94 .
- [24] CHEN C L , LIN Y P , LAI Y C , et al .  $\alpha$ -adducin translocates to the nucleus upon loss of cell-cell adhesions[J] . Traffic , 2011 , 12(10) : 1327–1340 .
- [25] LIU C M , HSU W H , LIN W Y , et al . Adducin family proteins possess different nuclear export potentials[J] . Journal of Biomedical Science , 2017 , 24(1) : 30 .
- [26] 王京兰 , 钱小红 . 磷酸化蛋白质分析技术在蛋白质组研究中的应用[J] . 分析化学 , 2005 , 33(7) : 1029–1035 .  
WANG J L , QIAN X H . Analytical methods on phosphoproteins and their application in phosphoproteomics[J] . Chinese Journal of Analytical Chemistry , 2005 , 33(7) : 1029–1035 .
- [27] OHTSUBO K , MARTIN J D . Glycosylation in cellular mechanisms of health and disease[J] . Cell , 2006 , 126(5) : 855–867 .
- [28] 杨娟娟 . 肉鸡 *Ex-FABP* 和 *ADD1* 基因的遗传多态性及其组织表达谱分析[D] . 南京 : 南京农业大学 , 2011 .  
YANG J J . Genetic polymorphisms and tissue expression profile of *Ex-FABP* and *ADD1* genes in chicken[D] . Nanjing : Nanjing Agricultural University , 2011 .
- 责任编辑: 邹慧玲  
英文编辑: 柳 正
- 
- (上接第 685 页)
- [16] ENGLER C , KANDZIAR , MARILLONNET S . A one pot , one step , precision cloning method with high throughput capability[J] . PLoS One , 2008 , 3(11) : e3647 .
- [17] HOLSTERS M , WAELE D D , DEPICKER A , et al . Transfection and transformation of *Agrobacterium tumefaciens*[J] . Molecular and General Genetics , 1978 , 163(2) : 181–187 .
- [18] WANG X , ZHOU W , LU Z H , et al . A lipid transfer protein , OsLTP136 , is essential for seed development and seed quality in rice[J] . Plant Science , 2015 , 239 : 200–208 .
- [19] 张焕 , 仇忠凯 , 阎新 , 等 . 水稻种子特异表达基因 *OsEnS38* 的克隆与表达[J] . 湖南农业大学学报(自然科学版) , 2018 , 44(3) : 278–283 .  
ZHANG H , QIU Z K , YAN X , et al . Cloning and expression analysis of a seed-specific gene *OsEnS38* in rice[J] . Journal of Hunan Agricultural University (Natural Sciences) , 2018 , 44(3) : 278–283 .
- [20] 李东昊 , 姜玲 , 刘春林 , 等 . 甘蓝型油菜 *BnaSDG8* 基因 CRISPR/Cas9 敲除载体的构建及功能探究[J] . 湖南农业大学学报(自然科学版) , 2018 , 44(4) : 346–352 .  
LI D H , JIANG L , LIU C L , et al . Construction of CRISPR/Cas9 knockout vector *BnaSDG8* and its genetic transformation in *Brassica napus*[J] . Journal of Hunan Agricultural University(Natural Sciences) , 2018 , 44(4) : 346–352 .
- [21] LI J F , NORVILLE J E , 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(8) : 688–691 .
- [22] FAUSER F , SCHIML S , PUCHTA H . Both CRISPR/Cas-based nucleases and nickases can be used efficiently for genome engineering in *Arabidopsis thaliana*[J] . The Plant Journal , 2014 , 79(2) : 348–359 .
- [23] YAN L H , WEI S W , WU Y R , et al . High-efficiency genome editing in *Arabidopsis* using YAO promoter-driven CRISPR/Cas9 system[J] . Molecular Plant , 2015 , 8(12) : 1820–1823 .
- 责任编辑: 毛友纯  
英文编辑: 柳 正