

学校编码: 10384

分类号\_\_\_\_\_密级\_\_\_\_\_

学号: 21620130154103

UDC \_\_\_\_\_

廈門大學

博 士 学 位 论 文

**CRISPR/Cas9 基因编辑技术在拟南芥中获得可  
遗传突变新策略研究**

**A New Strategy for Reliably Isolating Heritable Mutations  
Generated by CRISPR/Cas9-mediated Genome Editing**

陈继林

指导教师姓名: 陈 亮 教授

赵云德 教授

专 业 名 称: 细胞生物学

论文提交日期: 2017 年 5 月

论文答辩时间: 2017 年 5 月 18 日

学位授予日期:

答辩委员会主席: \_\_\_\_\_

评 阅 人: \_\_\_\_\_

2017 年 5 月

# 厦门大学学位论文原创性声明

兹提交的学位论文，是本人在导师指导下独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考的其他个人或集体的研究成果，均在文中以明确方式标明。本人依法享有和承担由此论文而产生的权利和责任。

声明人（签名）：

年 月 日

---

# 厦门大学学位论文著作权使用声明

本人完全了解厦门大学有关保留、使用学位论文的规定。厦门大学有权保留并向国家主管部门或其指定机构送交论文的纸质版和电子版，有权将学位论文用于非赢利目的的少量复制并允许论文进入学校图书馆被查阅，有权将学位论文的内容编入有关数据库进行检索，有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

本学位论文属于

- 1、保密（ ），在      年解密后适用本授权书。
- 2、不保密（ ）

（请在以上相应括号内打“√”）

作者签名：                      日期：      年    月    日

导师签名：                      日期：      年    月    日

## 目录

摘要 .....	I
ABSTRACT .....	III
<b>第一章 前言 .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 基因编辑的兴起 .....</b>	<b>1</b>
1.1.1 基因编辑的发展历史 .....	2
1.1.2 基因编辑的突破 .....	3
1.1.3 基因编辑核酸酶分类 .....	6
1.1.4 最新核酸酶的发现 .....	8
<b>1.2 CRISPR/Cas 系统 .....</b>	<b>9</b>
1.2.1 细菌获得性免疫 CRISPR/Cas 系统 .....	9
1.2.2 CRISPR/Cas 系统的分类 .....	10
1.2.3 II 类 CRISPR/Cas9 系统的作用过程 .....	12
1.2.4 CRISPR/Cas9 的结构剖析 .....	13
<b>1.3 CRISPR/Cas9 在植物基因组编辑中的应用 .....</b>	<b>15</b>
1.3.1 单基因的基因敲除 .....	15
1.3.2 多基因的基因敲除 .....	17
1.3.3 基因的大片段敲除 .....	18
1.3.4 基因的定点插入与定点突变 .....	18
1.3.5 基因编辑效率的提升 .....	19
<b>1.4 CRISPR/Cas9 系统的脱靶效应 .....</b>	<b>20</b>
<b>1.5 CRISPR/Cas9 其他方面的应用 .....</b>	<b>21</b>
<b>1.6 RGR (Ribozyme-gRNA-Ribozyme) 表达 gRNA .....</b>	<b>23</b>
1.6.1 表达 gRNA 的 RGR 元件 .....	23
1.6.2 RGR 表达元件的设计 .....	24
1.6.3 RGR 表达元件的使用案例 .....	25
<b>1.7 ABPI 研究概况 .....</b>	<b>25</b>

1.8 本研究的目的意义 .....	26
<b>第二章 材料与方法 .....</b>	<b>28</b>
<b>2.1 材料 .....</b>	<b>28</b>
2.1.1 拟南芥材料 .....	28
2.1.2 质粒和菌株 .....	28
2.1.3 实验药品 .....	28
2.1.4 主要实验仪器 .....	29
<b>2.2 方法 .....</b>	<b>30</b>
2.2.1 相关试剂的配制 .....	30
2.2.2 Taq DNA 聚合酶的提取 (PFU/PHusion DNA 聚合酶相同) .....	34
2.2.3 DH5a 感受态制备 .....	35
2.2.4 GV3101 电转感受态制备 .....	36
2.2.5 DNA 聚合酶链反应 .....	36
2.2.6 PCR 产物回收 .....	37
2.2.7 质粒 DNA 小量提取 .....	38
2.2.8 酶切 .....	38
2.2.9 RGR 元件的克隆与重组 .....	39
2.2.10 U6 元件的克隆与重组 .....	42
2.2.11 Gibson assembly 反应 .....	44
2.2.12 热击法转化 DH5a .....	45
2.2.13 单克隆 PCR 鉴定 .....	45
2.2.14 电击法转化农杆菌 .....	45
2.2.15 农杆菌介导的遗传转化 .....	45
2.2.16 拟南芥植株的种植 .....	46
2.2.17 转基因种子的荧光筛选 .....	46
2.2.18 Cas9-Free 荧光筛选 .....	46
2.2.19 基因组 DNA 的提取 .....	47
2.2.20 CRISPR/Cas9 系统编辑植株的鉴定 .....	47
2.2.21 拟南芥杂交实验 .....	47

2.2.22 可遗传株系后代分离比分析 .....	47
<b>第三章 结果与分析 .....</b>	<b>48</b>
3.1 <i>ABPI</i> 目标靶序列的选择 .....	48
3.2 构建载体引物的设计 .....	50
3.2.1 RGR 元件相关引物 .....	50
3.2.2 U6 元件相关引物 .....	51
3.2.3 构建载体引物列表 .....	52
3.3 pHDE-35S-Cas9-mCherry 载体的构建与鉴定 .....	53
3.4 pHDE-35S-Cas9-mCherry-UBQ10- <i>ABPI</i> -CRP2/CRP3 载体的构建与鉴定 .....	54
3.4.1 pHDE-35S-Cas9-mCherry-UBQ10 载体的构建与鉴定 .....	54
3.4.2 pHDE-35S-Cas9-mCherry-UBQ10- <i>ABPI</i> -CRP2/CRP3 载体的构建与鉴定 .....	56
3.5 pHDE-35S-Cas9-mCherry-UBQ10- <i>ABPI</i> -CRP2/CRP3-RGR 载体的构建与鉴定 .....	59
3.6 转基因植株以及无 Cas9 基因植株的种子可视化筛选 .....	62
3.7 利用 CRISPR/Cas9 系统获得 <i>ABPI</i> 突变体 .....	63
3.8 T2 代中可遗传植株的获得 .....	66
3.9 利用两个 gRNA 进行大片段敲除 .....	68
3.10 <i>ABPI</i> 突变体表型 .....	71
<b>第四章 讨论 .....</b>	<b>73</b>
4.1 在拟南芥中获得可遗传突变的新方法 .....	73
4.2 获得突变体遗传分离比解析 .....	76
4.3 CRISPR/Cas9 获得基因编辑突变体的检测方法 .....	77
4.4 如何提高筛选获得可遗传突变体的概率 .....	79
4.5 如何简化构建载体步骤 .....	80
4.6 <i>ABPI</i> 突变体表型分析 .....	81
4.7 CRISPR/Cas9 的脱靶效应 .....	84

<b>第五章 结论与展望</b> .....	<b>85</b>
<b>5.1 结论</b> .....	<b>85</b>
<b>5.2 创新</b> .....	<b>85</b>
<b>5.3 展望</b> .....	<b>86</b>
5.3.1 mCherry 与高效基因编辑载体的融合 .....	86
5.3.2 RGR 元件与高效基因编辑载体的融合 .....	86
5.3.3 通过同源重组修复进行定点突变和插入 .....	86
<b>参考文献</b> .....	<b>87</b>
<b>附录</b> .....	<b>100</b>
<b>I、<i>abp1-c2</i> 和 <i>abp1-c3</i> 序列分析</b> .....	<b>100</b>
<b>II、缩略词</b> .....	<b>102</b>
<b>III、鉴定 CRISPR/Cas9 编辑事件的引物</b> .....	<b>103</b>
<b>IV、含有 U6-gRNA 表达元件和 RGR 表达元件的 pHDE-35S-Cas9-mCherry-UBQ10 载体序列</b> .....	<b>104</b>
<b>致谢</b> .....	<b>112</b>

**CONTENTS**

<b>Abstract (in chinese)</b> .....	<b>I</b>
<b>Abstract (in english)</b> .....	<b>III</b>
<b>Chapter one introduction</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 The rise of gene editing</b> .....	<b>1</b>
1.1.1 The history of gene editing .....	2
1.1.2 The breakthrough of gene editing .....	3
1.1.3 Classification of nuclease in gene editing.....	6
1.1.4 Discovery of new nuclease .....	8
<b>1.2 CRISPR/Cas system</b> .....	<b>9</b>
1.2.1 CRISPR/Cas system in bacteria acquire immune system.....	9
1.2.2 The classification of CRISPR/Cas9 system.....	10
1.2.3 The processing of type II CRISPR/Cas9 system .....	12
1.2.4 Structure analysis of CRISPR/Cas9 system.....	13
<b>1.3 Application of CRISPR/Cas9 system in plant gene editing</b> .....	<b>15</b>
1.3.1 Single gene editing in plant .....	15
1.3.2 Multi-gene editing in plant .....	17
1.3.3 Large deletion in plant genome.....	18
1.3.4 Site-specific mutagenesis and insertion in plant genome .....	18
1.3.5 Improvement in gene editing efficiency .....	19
<b>1.4 Off-targets in CRISPR/Cas9 system</b> .....	<b>20</b>
<b>1.5 Application of CRISPR/Cas9 system in other field</b> .....	<b>21</b>
<b>1.6 RGR for gRNA expression</b> .....	<b>23</b>
1.6.1 RGR unit .....	23
1.6.2 Design of RGR.....	24
1.6.3 Application of RGR .....	25
<b>1.7 Summary of <i>ABPI</i></b> .....	<b>25</b>



---

<b>1.8 The purpose and significant of the research.....</b>	<b>26</b>
<b>Chapter two materials and methodes . . . . .</b>	<b>28</b>
<b>2.1 Materials .....</b>	<b>28</b>
2.1.1 Arabidopsis material .....	28
2.1.2 Strains and vectors .....	28
2.1.3 Reagents and drugs .....	28
2.1.4 Equipments .....	29
<b>2.2 Methodes .....</b>	<b>30</b>
2.2.1 Preparation of reagents .....	30
2.2.2 Extraction of Taq/PFU/PHusion DNA polymerase .....	34
2.2.3 Preparation of DH5a competent cell.....	35
2.2.4 Preparation of electric GV3101 competent cell.....	36
2.2.5 DNA polymerase chain reaction.....	36
2.2.6 Purification of PCR.....	37
2.2.7 Plasmid extraction.....	38
2.2.8 Enzyme digestion.....	38
2.2.9 Cloning and recombination of RGR unit.....	39
2.2.10 Cloning and recombination of U6 unit .....	42
2.2.11 Reaction of Gibson assembly.....	44
2.2.12 Heat shock transformation of DH5a .....	45
2.2.13 Identification of colony PCR .....	45
2.2.14 Electric shock transformation of agrobacterium.....	45
2.2.15 Plant transformation via agrobacterium.....	45
2.2.16 Plant growth.....	46
2.2.17 Screen of transgenic seeds .....	46
2.2.18 Screen of Cas9-free seeds .....	46
2.2.19 Extraction of plant genomic DNA .....	47
2.2.20 Identification of mutations by CRISPR/Cas9 system.....	47
2.2.21 Hybrid experiment in arabidopsis.....	47

---

2.2.22 Segregation analysis of T2 generation.....	47
<b>Chapter three results and analysis .....</b>	<b>48</b>
<b>3.1 The choose of target sites for <i>ABP1</i> .....</b>	<b>48</b>
<b>3.2 Primers design for constructions .....</b>	<b>50</b>
3.2.1 Primers for RGR unit.....	50
3.2.2 Primers for U6 unit .....	51
3.2.3 Table of primers for construction.....	52
<b>3.3 Construction and identification of pHDE-35S-Cas9-mcherry .....</b>	<b>53</b>
<b>3.4 Construction and identification of pHDE-35S-Cas9-mcherry-<i>ABP1</i>-CRP2/ CRP3 .....</b>	<b>54</b>
3.4.1 Construction and identification of pHDE-35S-Cas9-mcherry-UBQ10.....	54
3.4.2 Construction and identification of pHDE-35S-Cas9-mcherry-UBQ10- <i>ABP1</i> -CRP2/CRP3.....	56
<b>3.5 Construction and identification of pHDE-35S-Cas9-mcherry-UBQ10- <i>ABP1</i>-CRP2/CRP3-RGR.....</b>	<b>59</b>
<b>3.6 Visible screen for transgenic and Cas9-free seeds.....</b>	<b>62</b>
<b>3.7 Generation of mutations in the <i>ABP1</i> locus by CRISPR/Cas9 .....</b>	<b>63</b>
<b>3.8 Generation of reliable and heritable plants in T2 generation.....</b>	<b>66</b>
<b>3.9 generation of large deletions using two gRNAs.....</b>	<b>68</b>
<b>3.10 Phenotype of <i>ABP1</i> mutant .....</b>	<b>71</b>
<b>Chapter four discussion.....</b>	<b>73</b>
<b>4.1 New strategy to generate reliable and heritable mutations in Arabidopsis</b>	<b>73</b>
<b>4.2 Segregation analysis in generations.....</b>	<b>76</b>
<b>4.3 Methodes to detect mutations by CRISPR/Cas9 .....</b>	<b>77</b>
<b>4.4 How to increase the ratio of screening mutations .....</b>	<b>79</b>
<b>4.5 How to simplify the steps for constructing .....</b>	<b>80</b>
<b>4.6 The phenotype of <i>ABP1</i> mutant.....</b>	<b>81</b>
<b>4.7 Off targets of CRISPR/Cas9 .....</b>	<b>84</b>

---

<b>Chapter five conclusion and prospect</b> .....	<b>85</b>
<b>5.1 Conclusion</b> .....	<b>85</b>
<b>5.2 Innovation</b> .....	<b>85</b>
<b>5.3 Prospect</b> .....	<b>86</b>
5.3.1 Fuse mCherry with highly efficiency gene-editing vectors .....	86
5.3.2 Fuse RGR with highly efficiency gene-editing vectors .....	86
5.3.3 Site-specific mutagenic and insertion by recombination .....	86
<b>References</b> .....	<b>87</b>
<b>Appendix</b> .....	<b>100</b>
<b>I、 Sequence analysis of <i>abp1-c2</i> and <i>abp1-c3</i></b> .....	<b>100</b>
<b>II、 Abbreviation</b> .....	<b>102</b>
<b>III、 Primers for gene-editing detection</b> .....	<b>103</b>
<b>IV、 The sequence of pHDE-35S-Cas9-mCherry-UBQ10</b> .....	<b>104</b>
<b>Acknowledgement</b> .....	<b>112</b>

## 摘要

基因编辑作为研究基因功能的重要研究手段在近年来得到突飞猛进的发展。从二十世纪 50 年代开始，科学家便不断探索基因编辑的新方法。直到 2013 年，基因编辑的方法取得了突破，CRISPR/Cas9 系统因操作简单、效率高而被迅速应用到各种生物的基因编辑当中。将细菌免疫系统中的 CRISPR/Cas9 系统应用到植物体当中，需要面临很多应用上的问题。其中最关键的两个问题是 CRISPR/Cas9 系统在植物体中的表达以及产生突变后如何尽快筛选到可遗传的突变体。目前在拟南芥中，研究者通过改变 CRISPR/Cas9 系统中的相关启动子，在获得突变体的效率上取得了一定的进展，但由于获得拟南芥转基因植株采用的是花序侵染法，其突变体可能含有大量嵌合体，而嵌合体后代不能够稳定的遗传。如何能够快速有效的在突变体后代中获得可稳定遗传的突变体，仍没能有所突破。本研究利用模式生物拟南芥作为研究材料，对 CRISPR/Cas9 系统的载体进行改造，期望在拟南芥中找到一种简单高效的方法获得可稳定遗传的突变体，这方面的突破对于后续研究具有重要意义。

本研究以生长素结合蛋白 *ABP1* 作为 CRISPR/Cas9 系统的靶基因，它作为一个膜结合的生长素受体自发现以来便受到了研究者的热捧，它在植物的生长发育以及生长素信号通路中被认为起到非常重要的作用。但是它对植物的重要性目前却受到了挑战。本实验主要研究结果如下：

将种皮特异性表达启动子驱动的 mCherry 红色荧光标记蛋白与 CRISPR/Cas9 系统载体相结合，利用可视化荧光筛选成功地在 T1 代获得了带有 Cas9 的 *ABP1* 突变体，并在 T2 代获得了不带有 Cas9 的 *ABP1* 稳定遗传突变体。结果表明 CRISPR/Cas9 系统与 mCherry 可以同时表达，相互独立，互不影响。并且利用这套筛选方法不仅能够大大缩减获得突变体的时间，同时也提高了可靠性，改造过后的载体既可以用来筛选稳定遗传突变体，也有利于节约大量的人力物力。

为了进一步简化筛选突变体的复杂程度，通过对 *ABP1* 设计两个 Cas9 目标靶序列，使对突变体的检测简化为一步 PCR 法。使用 PCR 检测法对 *ABP1* 大片段切除进行检测，分别成功获得了 1141bp 和 711bp 大片段敲除突变体。大片段突变体的成功获得表明利用双元 gRNA 可以大大降低对人力物力的投入。

通过上述方法获得的 *ABP1* 突变体不具备其他研究者所报道的缺陷性表型和

功能。实验室早期利用普通筛选方法获得的突变体表明 *ABPI* 在胚的形成、根的发育以及生长素信号通路中并没有之前所报道的功能, 利用新的筛选方法获得多个 *ABPI* 突变体的获得进一步验证了实验室早期的结果。推翻了之前 *ABPI* 研究的很多重要结论, 不但使 *ABPI* 的功能得到了重新审视, 还增强了不断追求真理的研究者们的信心。

本研究详细阐述了 CRISPR/Cas9 载体的改进方法, 目标靶序列的选择等。首次将种子的荧光筛选与 CRISPR/Cas9 系统引起基因靶序列的突变相结合, 在拟南芥中建立起快速筛选出稳定遗传突变体的简单流程。这些研究结果使得 CRISPR/Cas9 系统在拟南芥中的应用更加成熟可靠, 为获得可靠稳定的突变体奠定了坚实的基础。

关键词: CRISPR/Cas9; 引导 RNA; 核酸酶-引导 RNA-核酸酶人工复合体; mCherry 荧光; 突变体

## ABSTRACT

Gene-editing, an important technique in studies of gene functions, has developed rapidly in recent years. Scientists had been exploring new ways to edit genes since 1950s. In 2013, CRISPR/Cas9, with its high efficiency and simplified operation, was applied into gene-editing. It is a breakthrough in gene-editing. But in practice, scientists have encountered new problems using CRISPR/Cas9, a part of bacteria immune system, in plant gene editing. There are two significant problems when we use CRISPR/Cas9 for site-specific mutagenesis. First one is how to induce the gRNA expression in plant, the other problem is how to obtain reliable and heritable mutations. Now, our researchers have some research progress in generating mutagenesis by changing the promoter of CRISPR/Cas9 system. However, the conventional way to get transgenic plants is inflorescence infection mediated by agrobacteria in *Arabidopsis*, and the mutants are mosaic in first generation. So it is hard for us to get breakthrough in obtaining reliable and heritable mutagenesis. Herein, we use *Arabidopsis* as a model to improve CRISPR/Cas9 system. It is important for us to develop an easy, reliable and efficient strategies to solve these problems.

To demonstrate in principle, we targeted *Auxin Binding Protein 1 (ABP1)* gene, whose function is thought to be very important to plant development and auxin signal pathway as a membrane-associated auxin receptor has been challenged recently. The main results are showed as following:

The vector combined red fluorescence protein mCherry, which is expressed by seed coat specific promoter AT2S3, with CRISPR/Cas9 system. By using this simple screen method, we successfully obtained *ABP1* mutants with Cas9 in T1 and without Cas9 in T2 generated by CRISPR/Cas9-mediated gene-editing. It indicated that mCherry and CRISPR/Cas9 system can be expressed separately. This method can highly reduce the screen time and improve the reliability, not only for it is heritable mutants obtaining, but also for it is time saving.

To further simplify the screening procedure, we simultaneously targeted two sites in *ABP1* to generate large deletions, which can be easily identified by a PCR reaction.

We successfully generated two *ABPI* alleles, which contained 1141 bp and 711 bp deletions in *ABPI* gene, respectively. It demonstrated that it is time and labor saving by using CRISPR/Cas9-mediated gene-editing with two gRNA.

There is no defected phenotype of *ABPI* mutants as reported. The mutants from general screen method showed that *ABPI* has no significant function in embryo development, root development, and auxin signal pathway. The new mutants, obtained from new screen method, verified our early results. And it overthrewed many conclusions we made. It is not only the time to rethink the function of *ABPI*, but also enhanced the pursuit of truth in the research.

Collectively, this study elaborated how to improve CRISPR/Cas9 vector and how to choose targets. We use a simple screening method to establish a simple and quick process to obtain the heritable mutagenesis in *Arabidopsis* by using CRISPR/Cas9-mediated gene-editing. These results make CRISPR/Cas9-mediated gene-editing easier and more reliable, and set a solid foundation in obtaining mutagenesis in *Arabidopsis*.

Key words: CRISPR/Cas9; gRNA; RGR; mCherry fluorescence; mutants

## 第一章 前言

### 1.1 基因编辑的兴起

遗传物质在生物体整个生命过程中扮演着重要的角色，但是直到二十世纪五十年代，Watson 和 Crick 发现核酸分子会通过磷酸键首尾相连形成双螺旋结构(1, 2)，人类才开启了分子生物学的新时代，对生命的认知也开始深入到了分子水平。

DNA (Deoxyribonucleic Acid) 是一种非常不稳定的分子，即使在没有任何外在因素的影响下也会以每天超过 10000 个碱基被分解(3, 4)。造成 DNA 发生双链断裂的原因主要包括内生外生损害（碱基不稳定、内源代谢、紫外线、电离辐射等）和细胞进程损害（核酸内切酶、染色体重组、细胞复制等）(5)。DNA 发生断裂后，细胞会启动自身的内源修复机制：包括同源重组修复（HDR）和非同源末端结合修复（NHEJ）(6-8)。

同源重组修复（HDR）和非同源末端结合修复（NHEJ）（图1.1）必须经历双链DNA的断裂。在同源重组修复中，Rad51蛋白(9)在HDR修复起始后，可能会结合在断裂链的两端，结合后Rad51会募集辅助因子，辅助因子用于引导断裂片

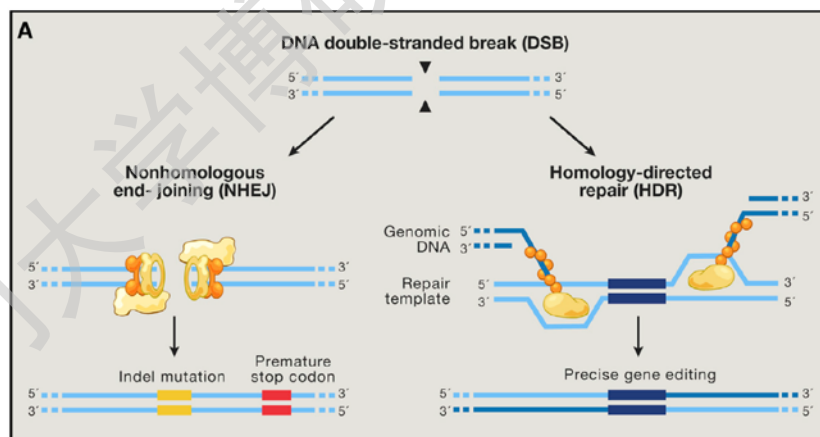


图1.1 DNA双链断裂典型的修复方式(10)

Figure 1.1 Typical repaired pathways of DNA double-strand breaks (DSBs)(10)

段同外源修复模板同源臂的结合。最后，在姐妹染色单体的协助下对基因进行准确的修复。在非同源末端修复中，Ku蛋白(11)的异源二聚体结合在断裂链的两端，它为相应的修复蛋白起到了支架作用，当互补的双链末端遭受切除或者有相似同源片段导致错配，将会造成插入或缺失，最终引起移码突变或基因敲除，插入与



Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库