
遗传发育所建立新型可预测多核苷酸删除基因组编辑系统

作者：writer 来源：中国科学院

本文原地址：<https://www.iikx.com/news/progress/10184.html>

本文仅供学习交流之用，版权归原作者所有，请勿用于商业用途！

植物基因组中有多种多样的调控元件、功能基序以及非编码DNA，例如启动子顺式作用元件、mRNA编码序列、具有调控功能的基因间区。这些DNA序列在调控基因表达、转录翻译等方面发挥重要作用，也是目前基因功能研究与遗传改良的重点目标区域。基于CRISPR/Cas9的基因组编辑技术已经被广泛用于功能基因研究和作物遗传改良。由sgRNA引导的Cas9核酸酶可以在基因组靶位点处产生DNA双链断裂（DSB），细胞通过非同源末端连接（NHEJ）修复，往往容易形成1~3个核苷酸的插入或缺失突变。然而，这种插入/缺失突变很难有效地破坏调控DNA的功能，因此经典的CRISPR/Cas9不能有效对上述重要DNA功能元件进行操纵。基于此，开发新型、精准、可预测的多核苷酸删除基因组编辑系统对调控DNA序列的功能解析及应用具有重要意义。

中国科学院遗传与发育生物学研究所高彩霞研究组长期致力于植物基因组编辑新技术的研究和开发。最近，该研究组基于胞嘧啶脱氨以及碱基切除修复（BER）原理，首次将野生型SpCas9与胞嘧啶脱氨酶APOBEC、尿嘧啶糖基化酶（UDG）以及无嘌呤嘧啶位点裂合酶（AP lyase）组合，建立了新型的多核苷酸靶向删除系统（AFIDs），并成功在水稻和小麦基因组中实现了精准、可预测的多核苷酸删除。考虑植物细胞本身存在BER体系，该研究组首先利用高脱氨活性的APOBEC3A脱氨酶构建出3种形式的AFID系统（AFID-1~3），并在水稻和小麦细胞中对多个内源DNA靶点进行测试，结果显示AFID-3介导的删除效率高达33.1%，且产生从不同的5'-胞嘧啶到Cas9切割位点间的多核苷酸删除，可预测的删除比例高达30%以上。研究人员进一步对不同胞嘧啶脱氨酶进行筛选，发现截断的APOBEC3B脱氨酶（A3Bctd）不仅具有较高的脱氨活性，同时还具有一个更窄的脱氨窗口。研究人员将A3Bctd替换AFID-3系统中的A3A，从而开发出eAFID-3系统。eAFID-3更高效地介导从偏好TC基序的脱氨位点到Cas9切割位点之间的可预测删除，效率是AFID-3的1.5倍。此外，研究组利用AFID-3系统靶向水稻OsSWEET14基因启动子上的效应子结合元件，获得了多核苷酸删除的突变体植株。经白叶枯病接种试验发现，相较于1~2 bp的插入缺失，该系统产生的多核苷酸删除水稻突变体对白叶枯病菌的抗性更强。

AFID系统具有高效、精准、可预测等优势，因此该系统的建立可为植物基因组调控DNA的功能研究及设计育种提供了一个强有力的基因组编辑工具。该研究成果于6月29日在线发表于Nature Biotechnology

上（DOI:10.1038/s41587-020-0566-4）。高彩霞研究组博士后王升星、博士后宗媛、博士生林秋鹏和副研究员张华伟为该论文的共同第一作者，高彩霞为该论文通讯作者。中科院微生物研究所邱金龙研究组也参与了研究工作。该研究得到中科院战略性先导科技专项、国家转基因重大科技专项、国家自然科学基金委项目的资助。

