

应用 TALENs 技术定向敲除烟草 *eIF4E-6* 基因宋琳娜^{1,2}, 杨鹏九³, 万秀清², 乔婵², 潘洪杏^{1,2}, 郭振楠², 刘侠⁴, 郭兆奎², 李若^{2*}

(1. 牡丹江师范学院, 黑龙江牡丹江 157100; 2. 牡丹江烟草科学研究所, 黑龙江牡丹江 157011; 3. 黑龙江省烟草专卖局, 黑龙江哈尔滨 150010; 4. 牡丹江医学院, 黑龙江牡丹江 157011)

摘要 [目的]利用 TALENs 技术定向敲除烟草 *eIF4E-6* 基因, 为提高优质烤烟品种 K326 的马铃薯 Y 病毒(PVY)抗性提供材料。[方法]构建特异靶向烟草 *eIF4E-6* 基因的 TALENs 载体, 并由农杆菌介导转化 K326 烟草, 用 PCR 和克隆测序方法筛选目的基因被成功编辑的 T₀ 代转基因烟株。[结果]构建了 2 个特异靶向 *eIF4E-6* 基因的 TALENs 载体 T3 和 T4。2 个载体各获得了约 40 和 50 株阳性转化的 K326 T₀ 代烟株。T3 载体获得 1 株目的基因靶位点发生大片段碱基缺失的杂合突变型 T₀ 代单株, 3 株靶位点发生碱基替换的杂合突变型 T₀ 代单株。T4 载体获得 5 株靶位点发生碱基替换的杂合突变型 T₀ 代单株。[结论]利用 TALENs 技术获得的 *eIF4E-6* 基因杂合突变型 K326 T₀ 代单株为后续获得纯合基因敲除的 K326 烟草, 并最终获得 PVY 病毒抗性改良的 K326 烟草材料奠定了基础。

关键词 烟草; PVY; K326; *eIF4E-6* 基因; TALENs

中图分类号 S188 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2017)04-0142-05

The Directional Knockout of *eIF4E-6* Gene Using TALENs TechniqueSONG Lin-na^{1,2}, YANG Peng-jiu³, WAN Xiu-qing², LI Ruo^{2*} et al (1. Mudanjiang Normal University, Mudanjiang, Heilongjiang 157100; 2. Mudanjiang Tobacco Science Research Institute, Mudanjiang, Heilongjiang 157011; 3. Heilongjiang Tobacco Monopoly Bureau, Harbin, Heilongjiang 150010)

Abstract [Objective] To knockout *eIF4E-6* gene using TALENs technique, and to provide material for improving the PVY resistance of high-class flue-cured tobacco cultivar K326. [Method] TALENs vectors that specifically targeting against *eIF4E-6* gene were constructed. TALENs vectors transformed tobacco cultivar K326 mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. The T₀ transgenic tobacco plants of which *eIF4E-6* gene were successfully edited were screened. [Result] Two TALENs vectors which specifically targeted against *eIF4E-6* gene were constructed in this study. Two vectors obtained approximately 40 and 50 positively transformed T₀ tobacco plants respectively. Vector T3 obtained 1 heterozygous mutant T₀ plant whose targeting site of *eIF4E-6* gene showed deletion of big base fragment and 3 heterozygous mutant plants whose targeting sites showed single base substitution. Vector T4 obtained 5 heterozygous mutant T₀ plants whose targeting sites showed single base substitution. [Conclusion] These heterozygous mutant T₀ K326 tobacco plants obtained by using TALENs technique laid foundation for obtaining homozygous gene knockout K326 tobacco and finally obtaining K326 tobacco with improved PVY resistance.

Key words Tobacco; PVY; K326; *eIF4E-6* gene; TALENs

马铃薯 Y 病毒(Potato Virus Y, PVY)是近年来危害烟草生产的重要病害之一, 严重影响烟草的产量和质量^[1]。培育烟草 PVY 抗病品种是解决这一病毒性病害的有效途径。前期研究中, 从普通栽培烟草中鉴定了一个真核生物翻译起始因子 4E(Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E, eIF4E)基因家族成员 *eIF4E-6* 基因, 基因功能研究结果表明其为烟草 PVY 病毒的感病基因。可见, 通过基因组编辑技术敲除烟草 PVY 感病基因 *eIF4E-6* 来培育 PVY 抗病烟草成为可能。

转录激活样效应因子核酸酶(Transcription Activator-Like Effector Nucleases, TALENs)技术是近年新兴的基因组编辑技术, 已在动植物的基因组改造、基因功能研究等各个生物技术领域得到广泛应用。TALENs 通过 DNA 识别模块靶向特异性的 DNA 位点并结合, 然后由其 *Fok I* 核酸酶切断该位点的 DNA 双链。DNA 双链断裂触发生物细胞固有的 DNA 损伤修复机制, 细胞或通过非同源末端连接(Non-Homologous End Joining, NHEJ)的方式在靶位点 DNA 引入一定数目的碱

基删除、插入以实现为目的基因的敲除, 或在提供供体模板的情况下通过同源修复(Homology-Directed Repair, HDR)的方式对靶位点 DNA 实现点突变、片段或基因的替换、敲入。由于 TAL 蛋白的 DNA 特异识别单位是间隔 32 个恒定氨基酸残基的二联氨基酸, 而二联氨基酸与 A、G、T、C 这 4 个核苷酸碱基具有一一对应关系, 因此利用模块化的串联 TAL 蛋白就可以靶向任意 DNA 序列。该研究利用 TALENs 技术对烟草 *eIF4E-6* 基因进行特异性敲除, 以期改良优质烤烟品种 K326 的 PVY 抗病性。

1 材料与方法

1.1 材料 烤烟品种 K326 种子由牡丹江烟草科学研究所提供。特异靶向普通烟草 *eIF4E-6* 基因的 TALENs 载体 pTALED-LR(分别命名为 T3 及 T4)订购自北京唯尚立德生物科技有限公司(图 1)。MS(Murashige & Skoog Medium)及 1/2 MS 植物组织培养基购自 Duchefa Biochemie 公司(荷兰)。潮霉素 B(Hygromycin B)购自 Roche 公司(瑞士)。质粒 DNA 小量纯化试剂盒(TaKaRa MiniBEST Plasmid Purification Kit Ver. 4.0)、植物基因组 DNA 提取试剂盒(TaKaRa MiniBEST Plant Genomic DNA Extraction Kit)、DNA 片段纯化试剂盒(TaKaRa MiniBEST DNA Fragment Purification Kit Ver. 4.0)、pMD18-T 载体、大肠杆菌感受态细胞(*E. coli* DH5 α Competent Cells)、农杆菌感受态细胞(*Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 Electro-Cells)、普通 *Taq* 酶(TaKaRa *Taq*TM)、Ex

基金项目 中国烟草总公司科技项目[110201301010(JY-10)、110201501015(JY-02)]; 中国烟草总公司黑龙江省公司科技项目(HN201503)。

作者简介 宋琳娜(1991—), 女, 黑龙江林口人, 硕士研究生, 研究方向: 功能基因组学。* 通讯作者, 助理研究员, 从事烟草生物技术研究。

收稿日期 2016-12-16

Taq 酶 (TaKaRa Ex *Taq*[®]) 均购自宝生物工程 (大连) 有限公司。该研究所用 PCR 引物及序列见表 1, 所有引物由上海立菲生物技术有限公司 (北京) 合成。其他试剂为化学分析纯。

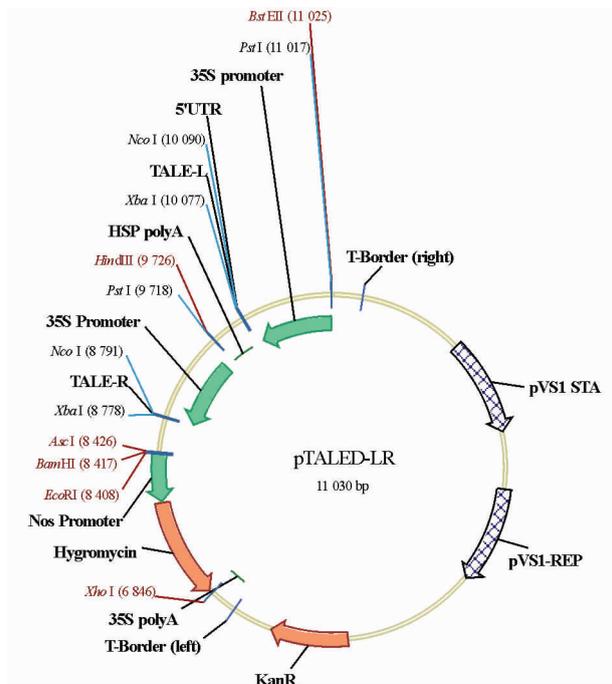


图 1 TALENs 载体

Fig. 1 TALENs vector

表 1 该研究所用 PCR 引物

Table 1 The PCR primers used in this study

引物名称 Primers name	引物序列 (5'—3') Primers sequence (5'—3')	产物大小 Length of products//bp
TEST - F	GCCGTC AACCAAGCTCTGATAG	801
TEST - R	CTGATCGAAAAGTTCGACAGCGTC	
hygromycinB - F2	CTCACCCGCGAGCTCTGTCGAG	968
hygromycinB - R2	CTATCGGCGAGTACTTCTACAC	
eIF4E6TALEN4&5 - F2	GCCAGAGGAAGCTGAGAAATTG	222
eIF4E6TALEN4&5 - R2	GTGTAAGTTCGCGAAGGGAAC	

1.2 方法

1.2.1 构建靶向 *eIF4E-6* 基因的 TALENs 载体。首先确定目的基因的靶序列。①根据 TALENs 载体靶序列选择原则, TALENs 识别臂识别碱基数量为 16~18, 识别位点第 0 个碱基为 T 或者 C, 间隔序列为 14~18 个碱基; ②根据在线 Blast 及与中国烟草基因组数据库数据比对情况, 确定 *eIF4E-6* 基因的特异靶位点 2 个, 分别命名为 T3 和 T4, 靶位点序列信息见表 2。根据靶位点序列, 由北京唯尚立德生物科技有限公司合成 TALENs 载体, 并用荧光素酶 (Luciferase) 单链退火 (Single Strand Annealing, SSA) 报告基因方法检测 TALENs 载体的体外 DNA 剪切活性。

1.2.2 TALENs 载体遗传转化 K326 烟草。首先将 TALENs 载体质粒电击转化农杆菌, 具体步骤如下: 将 1 μ g 质粒放入解冻后的农杆菌 LBA4404 感受态细胞中, 冰浴 30 min; 将混合液移入电击杯中, 2 500 V/6 ms 进行电击; 然后加入 500

μ L SOC 培养基, 28 $^{\circ}$ C、170 r/min 振荡培养 60 min; 取 150 μ L 菌液涂布在含卡那霉素的 LB 平板上, 28 $^{\circ}$ C 培养 2~3 d 至单菌落出现。挑取单菌落进行菌落 PCR 验证。菌落 PCR 反应体系为总体积 20 μ L, 其中 10 \times PCR Buffer 2 μ L, dNTPs (各 2.5 mmol/L) 1.6 μ L, 无菌水 14.1 μ L, 上下游引物 (TEST - F 和 TEST - R 各 10 μ mol/L) 各 0.5 μ L, r-*Taq* 酶 0.3 μ L, 菌液 1 μ L。PCR 扩增条件为 95 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 6 min。PCR 反应完成后进行 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测。扩增载体潮霉素 B 抗性标签的 PCR 产物大小为 801 bp。

表 2 TALENs 靶位点信息

Table 2 Information of TALENs targeting sites

TALENs 载体 TALENs vector	靶位点序列 (5'—3') Sequences of targeting sites (5'—3')
T3	<u>GCCAGAGGAAGCTGAG</u> AAATTGCGGGTAGA TGAAGTAGAAGTAGTCC
T4	<u>CCATTAGAGAATTCTTGG</u> ACTTTTTGTTTGATAAT CCTATGGCTAAATCTAG

注: 下划线标注 TALENs 识别序列, 中间为间隔序列

Note: Underlined sequences are recognition sites of TALENs, and sequences between recognition sites are spacers

其次制备 K326 烟草无菌苗, 具体步骤如下: 将 K326 烟草种子放入灭菌的 1.5 mL 离心管中, 用 0.2% 升汞消毒 5 min, 无菌水冲洗 3~5 次, 按 8 粒/瓶播种于 1/2 MS 固体培养基 (MS 大量元素减半 + 蔗糖 30 g/L + 琼脂 8 g/L, pH = 5.8) 上, 培养条件为 25 $^{\circ}$ C, 光照 16 h/d。

最后采用叶盘法转化 K326 烟草, 具体步骤如下: 待无菌苗长出 4 片叶子后, 剪成约 5 mm \times 5 mm 的小块, 用 MS 固体培养基预培养 2 d。扩繁转化成功的菌液, 离心后用 1/2 MS 液体培养基重悬菌体。用重悬的菌液侵染烟草叶盘 5 min, 然后将被侵染的烟草叶盘置于含有 2 mg/L 6-BA 和 0.1 mg/L NAA 的 MS 固体培养基中, 23 $^{\circ}$ C 暗培养 2 d。共培养后, 在培养基中添加 500 mg/L 头孢曲松钠和 10 mg/L 潮霉素 B 进行筛选, 诱导抗性愈伤组织的产生。待不定芽长到 1~2 cm 时, 切下不定芽并转移到含 250 mg/L 头孢曲松钠和 10 mg/L 潮霉素 B 的生根培养基上进行生根培养后获得 T₀ 代 K326 烟株。

1.2.3 筛选 T₀ 代阳性转基因 K326 烟株。分别取 T₀ 代 K326 烟株和非转基因对照烟株鲜嫩叶片, 用植物基因组 DNA 提取试剂盒提取烟草叶片 DNA, 以此为模板进行 PCR 检测。PCR 反应体系为 10 \times PCR Buffer 2.5 μ L, dNTPs (各 2.5 mmol/L) 2 μ L, 上下游引物 (hygromycinB - F2 和 hygromycinB - R2 各 10 μ mol/L) 各 1 μ L, 普通 *Taq* 酶 0.25 μ L, 模板 DNA 1 μ L, 加无菌水至 25 μ L。PCR 扩增条件为 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。扩增潮霉素 B 载体抗性标签, 预期 PCR 产物大小为 968 bp, 在 1% 的琼脂糖凝胶上电泳检测。

1.2.4 T₀代 K326 烟株 *eIF4E-6* 基因突变检测。以 T₀代 K326 烟株叶片 DNA 为模板,进行 PCR 反应检测突变。PCR 反应体系为 10 × Ex Taq Buffer 2.5 μL, dNTPs (各 2.5 mmol/L) 2 μL, 上下游引物 (eIF4E6TALEN4&5 - F2 和 eIF4E6TALEN4&5 - R2 各 10 μmol/L) 各 1 μL, Ex Taq 酶 0.25 μL, 无菌水 17.25 μL, 模板 DNA 1 μL。PCR 扩增条件为 95 °C 5 min; 95 °C 40 s, 58 °C 30 s, 72 °C 50 s, 35 个循环; 72 °C 延伸 7 min。PCR 反应完成后取少量 PCR 产物进行 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测。用 DNA 片段纯化试剂盒纯化剩余 PCR 产物, 然后将纯化的 PCR 产物连接到 pMD-18T 载体, 连接产物转化大肠杆菌感受态细胞, 经蓝白斑筛选每板挑取 10 个

阳性菌落, 摇菌后送上海立菲生物技术有限公司(北京)测序。用 DNAMAN6、DNASTAR7 等序列分析软件分析 T₀代 K326 烟株 *eIF4E-6* 基因在 TALENs 靶位点处产生 DNA 序列和相应氨基酸序列改变的情况。

2 结果与分析

2.1 TALENs 载体体外 DNA 剪切活性检测 采用 Luciferase-SSA 报告基因方法对构建的 2 对 TALENs 载体 T3 和 T4 进行体外 DNA 剪切活性检测, 结果如图 2 所示。相对于阴性对照, T3 及 T4 载体的相对荧光强度分别达 3.7 倍和 5.4 倍, 说明 2 个载体对相应靶位点 DNA 均具有体外剪切活性, 可以用于体内试验。

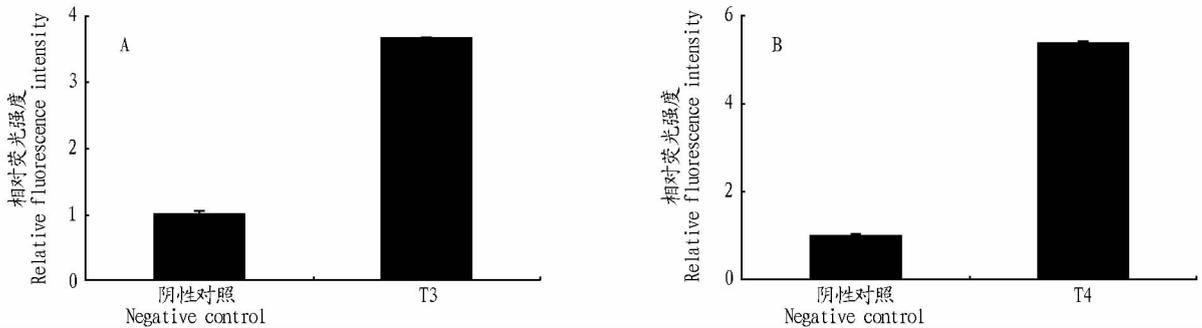
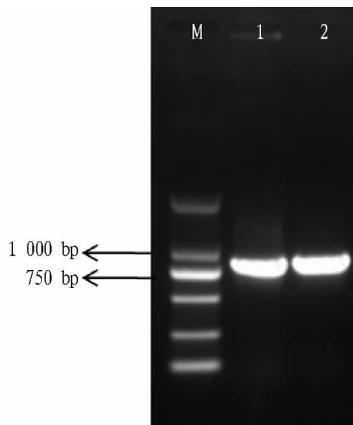


图2 TALENs 载体体外 DNA 剪切活性测试

Fig.2 Detection of DNA cleavage activity of TALENs vectors in vitro

2.2 K326 烟草的遗传转化 TALENs 载体电击转化农杆菌, 菌液 PCR 检测载体上的潮霉素 B 抗性标签, 结果如图 3 所示。2 个载体转化的菌落均扩增出约 800 bp 大小的条带, 与预期 801 bp 大小 PCR 产物相符, 说明载体已成功导入农杆菌。



注: M. Marker; 1. 载体 T3; 2. 载体 T4

Note: M. Marker; 1. vector T3; 2. vector T4

图3 载体转化农杆菌的菌落 PCR 检测

Fig.3 Colony PCR detection of TALENs - vector - transformed *Agrobacterium tumefaciens*

2.3 T₀代阳性转基因 K326 烟株的筛选 经潮霉素 B 抗性筛选, 最终 2 个 TALENs 载体各获得约 50 和 80 株 T₀代再生 K326 烟株。提取再生烟株及非转基因 K326 烟草叶片 DNA, PCR 检测潮霉素 B 抗性标签以筛选阳性转基因烟株, 代表性结果如图 4 所示。大部分 T₀代再生烟株均能扩增出约 1 kb

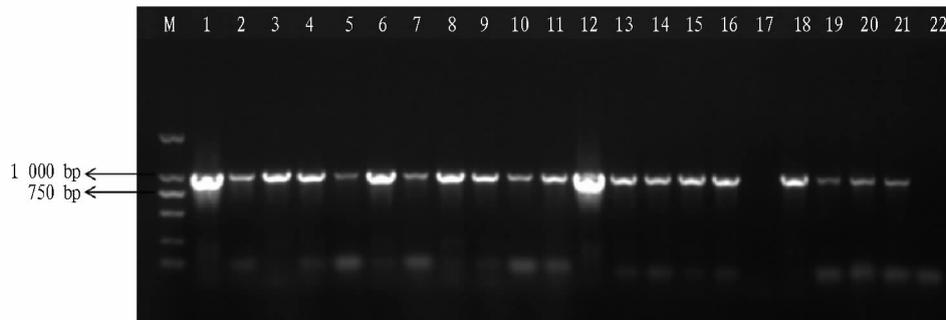
大小的特异性条带, 与预期的 PCR 产物大小 968 bp 一致, 说明这些烟株已被 TALENs 载体成功转化。最终, 2 个 TALENs 载体各获得约 40 和 50 株阳性转基因烟株。

2.4 T₀代转基因 K326 烟株 *eIF4E-6* 基因突变检测 在 *eIF4E-6* 基因 TALENs 靶位点两侧序列设计引物 (eIF4E6TALEN4&5 - F2 和 eIF4E6TALEN4&5 - R2), PCR 特异扩增 T₀代阳性转基因 K326 烟株及非转基因 K326 烟草目标基因片段, 代表性结果如图 5 所示。作为阴性对照的非转基因 K326 烟草扩增出单一的约 200 bp 大小的 PCR 产物, 与预期 PCR 产物大小 222 bp 相符。后续对该产物测序结果表明, 产物序列与 *eIF4E-6* 基因序列完全一致。这说明该对引物可用于 *eIF4E-6* 基因靶位点序列的测定。但是, 绝大部分 2 个载体转化的 T₀代阳性转基因 K326 烟株得到的该基因片段的大小与阴性对照一致。这预示着, 这些 T₀代转基因 K326 烟株的 *eIF4E-6* 基因在 TALENs 靶位点处可能未出现大片的缺失或插入。

将扩增 *eIF4E-6* 基因靶位点序列的 PCR 产物连入 T 载体, 进行克隆测序, 并与非转基因 K326 烟草该片段序列比对, 序列分析结果如图 6 所示。由图 6A 可知, T3 转基因烟株 T3-26 *eIF4E-6* 基因由靶位点处开始出现 49 bp 的 DNA 片段缺失; 单株 T3-38、45、46 则分别在 TALENs 载体 *Fok I* 核酸酶剪切位点出现单个碱基替换。由图 6B 可知, 这些核酸序列的突变导致这些单株 *eIF4E-6* 基因翻译蛋白分别出现了蛋白翻译提前终止或单氨基酸残基的替换。由图 6C、6D 可知, T₀代 T4 转基因烟株有 5 个单株 T4-14、15、21、34、44 在靶位点出现单碱基替换, 导致靶位点处单氨基酸残基的

替换。需要说明的是,这些突变均为杂合型突变,即每个单株克隆测序序列中仍有与野生型 *eIF4E-6* 基因完全一致的序列,而实际上一致的序列占多数。对部分 T_0 代单株 PCR 产物直接测序的结果也验证了这一点,产物中占多数的未发

生突变的 *eIF4E-6* 基因片段序列掩盖了占少数的突变序列。最终,这些 *eIF4E-6* 基因杂合突变的 T_0 代转基因 K326 烟株为后续基因纯合突变后代的获得提供了材料。

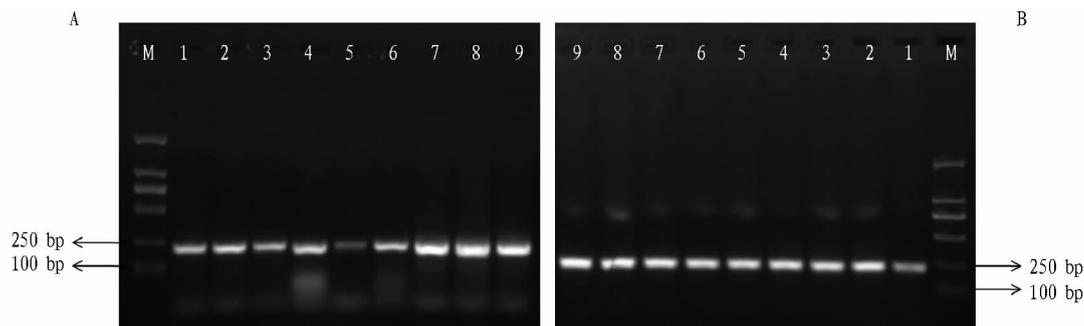


注:M 为 Marker;1 为 T3 载体质粒(阳性对照);2~11 为 T3 载体转基因烟株;12 为 T4 载体质粒(阳性对照);13~21 为 T4 载体转基因烟株;22 为非转基因 K326 烟草(阴性对照)

Note:M. Marker;1. T3 vector plasmid (positive control);2-11. T3 vector transformed tobacco plants;12. T4 vector plasmid (positive control);13-21. T4 vector transformed tobacco plants;22. non-transgenic K326 tobacco plants (negative control)

图 4 PCR 检测 T_0 代阳性转基因 K326 烟株

Fig. 4 PCR detection of T_0 positive transgenic K326 tobacco plants



注:A 为 T3 转基因烟株 *eIF4E-6* 基因突变检测,M 为 Marker,1 为非转基因 K326 烟草,2~9 为 T3 转基因烟株;B 为 T4 转基因烟株 *eIF4E-6* 基因突变检测,1 为非转基因 K326 烟草,2~9 为 T4 转基因烟株

Note:A. mutation detection of *eIF4E6* gene of T3 transgenic tobacco plants, M. Marker, 1. Non-transgenic K326 tobacco; 2-9. T3 transgenic tobacco plants; B. mutation detection of *eIF4E6* gene of T4 transgenic tobacco plants, 1. non-transgenic K326 tobacco, 2-9. T4 transgenic tobacco plants

图 5 PCR 检测 T_0 代转基因 K326 烟株 *eIF4E-6* 基因突变

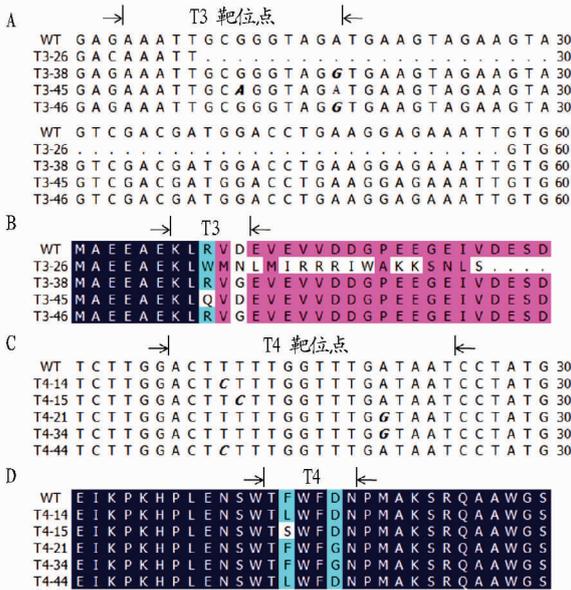
Fig. 5 PCR detection of mutation of *eIF4E6* gene of T_0 transgenic K326 tobacco plants

3 结论与讨论

PVY 病毒是危害烟叶生产的重要病害,长年对我国烟叶生产造成重大经济损失。PVY 病毒是马铃薯 Y 病毒属(*Potyvirus*)的典型成员。近年发现,*eIF4E* 蛋白是植物抗/感 *Potyvirus* 病毒的决定因子^[2]。例如辣椒中抗 PVY 和烟草蚀纹病毒(Tobacco Etch Virus, TEV)的 *pv2* 基因^[3],拟南芥中抗芜菁黄叶病毒(Turnip Mosaic Virus, TuMV)和生菜花叶病毒(Lettuce Mosaic Virus, LMV)的 *lsp1* 基因^[4,5],生菜中抗 LMV 的 *mol* 基因^[6]等,不同植物物种中的所有这些 *Potyvirus* 病毒抗性相关基因都最终被鉴定为 *eIF4E* 基因家族成员。基于此,前期在普通栽培烟草中找到 1 个 *eIF4E-6* 基因,通过基因功能研究试验鉴定其为 PVY 感病基因。目前烟草抗 PVY 育种中采用的主要抗源是 *va* 基因^[7],它是 1 个控制烟草 PVY 抗性的单隐性抗病基因。在法国,有 77.5% 的烟草栽培品种含有此抗源^[8]。2014 年 Julio 等^[9]确定普通烟草中的

eIF4E 基因家族中一成员(GenBank 序列号 KF155696),即对应 *va* 基因。经序列比对,该研究中的 *eIF4E-6* 基因与 Julio 等报道的 KF155696 序列完全一致。基于以上研究,通过目前的基因组编辑技术可以定向敲除普通烟草中 PVY 感病基因 *eIF4E-6*,从而实现对烟草栽培品种的抗性改良。

近年来,基因组编辑技术的出现及迅速发展为实现作物的精准遗传改良提供了强大技术支撑。最初的基因组编辑工具锌指核酸酶(Zinc-Finger Nucleases),因其在基因组作用靶点范围、基因编辑效率、组装技术难度、脱靶概率及突变遗传复杂性等方面的局限,而逐渐被后续出现的 TALENs 及 CRISPR-Cas9(Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat-associated Protein 9)技术取代。TALENs 技术近年来已成功应用于酵母、蛔虫、大鼠、斑马鱼、人胚胎干细胞等众多生物的靶向基因组编辑^[10],其中也包括水稻、拟南芥、烟草等多种植物物种^[11]。该研究利用这一技术通过定向敲



注:A为T3转基因烟株TALENs靶位点DNA序列(相对野生型改变的碱基用粗斜体显示,·代表碱基删除);B为T3转基因烟株TALENs靶位点翻译蛋白氨基酸序列;C为T4转基因烟株TALENs靶位点DNA序列;D为T4转基因烟株TALENs靶位点翻译蛋白氨基酸序列

Note:A. DNA sequences of TALENs targeting site of T3 transgenic tobacco plants (the mutated bases of transgenic plants compared with those of wild type are in bold italic, · indicates base deletion); B. Amino acid sequences of translated protein of TALENs targeting site of T3 transgenic tobacco plants; C. DNA sequences of TALENs targeting site of T4 transgenic tobacco plants; D. Amino acid sequences of translated protein of TALENs targeting site of T4 transgenic tobacco plants

图6 T₀代转基因K326烟株eIF4E-6基因突变分析

Fig. 6 Mutation analysis of eIF4E-6 gene of T₀ transgenic K326 tobacco plants

除烟草PVY感病基因来改良烟草的抗病性。由于该研究的目标基因eIF4E-6属于1个包含多达12个成员的基因家族,且成员间编码序列一致度高,所以最终仅选择2个靶点。依据靶点序列构建的TALENs载体在导入烟草前对其体外DNA剪切活性进行了检测,结果显示T4载体的活性高于T3。但最终T₀代转化烟草的目标基因突变检测结果表明T3

载体对目标基因的编辑效果要略优于T4。这说明,TALENs载体的体外活性可能并不能准确预测其在植物体内的基因组编辑效果。当然,由于该研究2个载体基因编辑效率较低,且获得的T₀代烟株数量不足够大,这一结果需要更大数量后代材料的验证。从2个载体获得的T₀代烟株目的基因的整体突变情况来看,突变均为杂合型且多数为单碱基替换,2个载体基因编辑效率偏低。这可能由于该研究所用的早期的(2013年)TALENs载体基因编辑效率不高^[11],也可能受到该研究目标基因与其他非靶标基因同源性的限制。

综上所述,该研究利用TALENs基因组编辑技术获得了eIF4E-6基因杂合突变型的T₀代K326烟株,为将来获得纯合基因敲除的PVY抗性改良的烟草品种提供了材料。

参考文献

- [1] 朱贤朝,王彦亭,王智发. 中国烟草病害[M]. 北京:中国农业出版社, 2002:209-216.
- [2] ROBAGLIA C, CARANTA C. Translation initiation factors: A weak link in plant RNA virus infection[J]. Trends in plant science, 2006, 11(1): 40-45.
- [3] RUFFEL S, DUSSAULT M H, PALLOIX A, et al. A natural recessive resistance gene against potato virus Y in pepper corresponds to the eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E) [J]. Plant journal, 2002, 32(6): 1067-1075.
- [4] LELLIS A D, KASSCHAU K D, WHITHAM S A, et al. Loss-of-susceptibility mutants of *Arabidopsis thaliana* reveal an essential role for eIF (iso) 4E during potyvirus infection [J]. Current biology, 2002, 12(12): 1046-1051.
- [5] DUPRAT A, CARANTA C, REVERS F, et al. The *Arabidopsis* eukaryotic initiation factor (iso) 4E is dispensable for plant growth but required for susceptibility to potyviruses [J]. Plant journal, 2002, 32(6): 927-934.
- [6] NICAISE V, GERMAN-RETANA S, SANJUÁN R, et al. The eukaryotic translation initiation factor 4E controls lettuce susceptibility to the *Potyvirus lettuce mosaic virus* [J]. Plant physiology, 2003, 132(3): 1272-1282.
- [7] GUPTON C L, BURK L G. Location of the factor for resistance to potato virus Y in tobacco [J]. Journal of heredity, 1973, 64(5): 289-290.
- [8] LACROIX C, GLAIS L, VERRIER J L, et al. Effect of passage of a *Potato virus Y* isolate on a line of tobacco containing the recessive resistance gene *va*² on the development of isolates capable of overcoming alleles 0 and 2 [J]. European journal of plant pathology, 2011, 130(2): 259-269.
- [9] JULIO E, COTUCHEAU J, DECORPS C, et al. A eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E) is responsible for the "va" tobacco recessive resistance to Potyviruses [J]. Plant molecular biology reporter, 2015, 33(3): 609-623.
- [10] GAJ T, GERSBACH C A, BARBAS C F III, et al. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering [J]. Trends in biotechnology, 2013, 31(7): 397-405.
- [11] ZHANG H, GOU F, ZHANG J S, et al. TALEN-mediated targeted mutagenesis produces a large variety of heritable mutations in rice [J]. Plant biotechnology journal, 2015, 14(1): 186-194.

(上接第94页)

参考文献

- [1] 谷英敏,柴可夫,马纲. 食材内涵古今辨析[J]. 浙江中医药大学学报, 2010, 34(3): 301-302.
- [2] 丁俊发,牟惟仲,张成海,等. 物流术语: GB/T 18354—2006[S]. 北京:中国标准出版社, 2007.
- [3] 余宣中. 案例研究: 腾兴公司的食材配送体系及运营[D]. 广州: 华南理

工大学, 2011.

- [4] VANĚEK D, KALÁB D. Logistics in agricultural production [J]. Agriculture Economics-CZECH, 2003, 49(9): 439-443.
- [5] 谭涛, 朱毅华. 农产品供应链组织模式研究 [J]. 现代经济探讨, 2004(5): 24-27.
- [6] 李红霞, 席西民. 管理激励的发展趋向: 基于信任的激励 [J]. 西南交通大学学报(社会科学版), 2003, 4(4): 22-27.