



您当前所在的位置：首页 > 科学研究 > 科研动态

我所基因编辑团队在水稻基因组中精确插入蛋白标签方面取得新进展

发布日期：2023-03-20 作者：李娟 来源：水稻所 阅读：652 次

A⁺ A⁻

高效准确标记蛋白质，是解析植物蛋白质生化功能和生理过程的重要技术，但在植物活体细胞中准确标记蛋白质，仍然存在较大困难。常用的蛋白标签有HIS、FLAG、GST、Myc等，利用同源重组技术、Cre-LoxP和FLP-FRT等位点特异性重组酶系统等方法，均可在植物内实现基因或片段的定点插入。但较低的插入效率，需要预先在基因组中整合重组位点等繁琐操作，限制了这些方法的广泛应用。

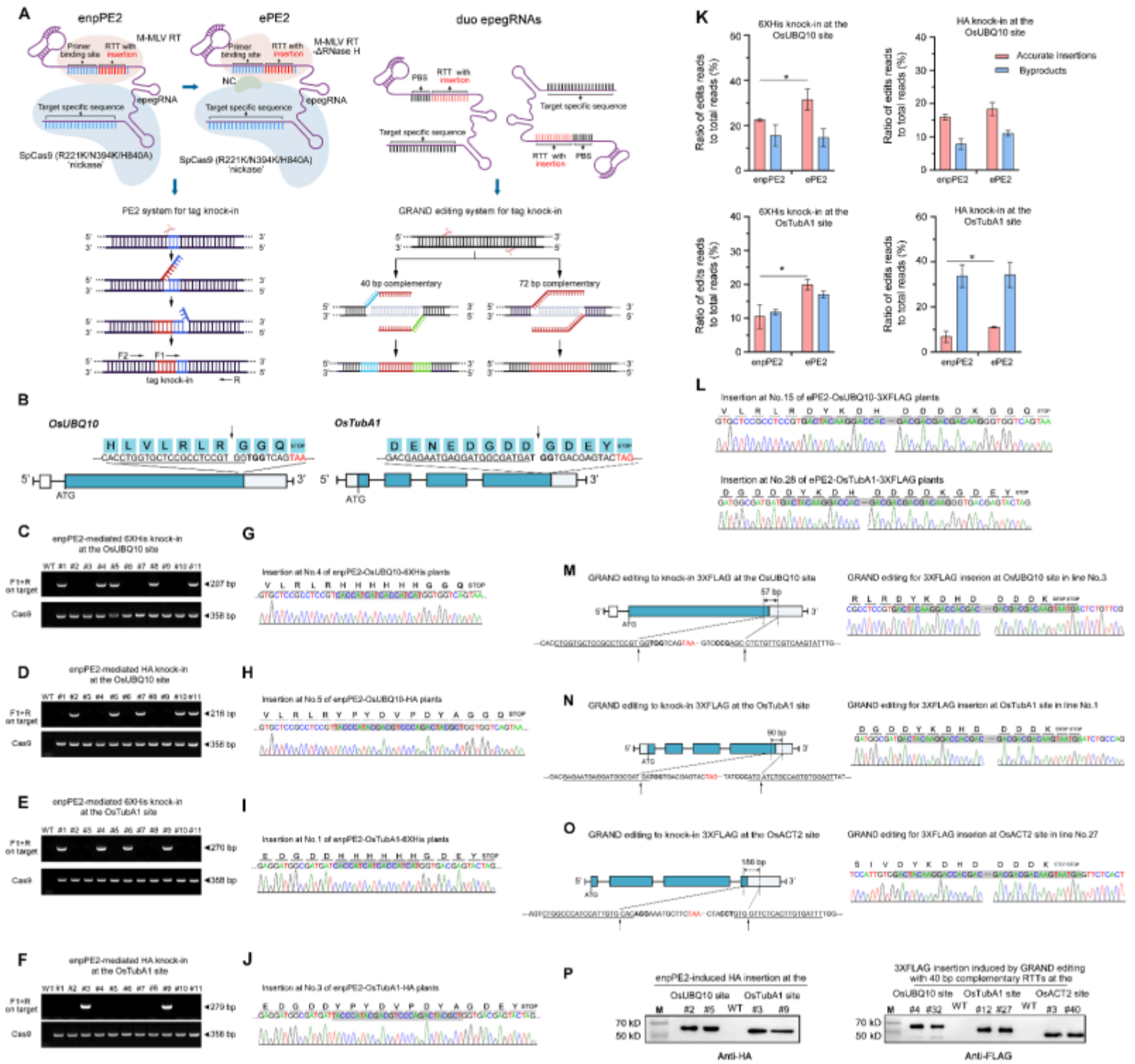
近日，水稻所基因编辑团队和安徽农业大学农学院魏鹏程课题组在植物科学知名期刊《Plant Communications》（影响因子8.625）上，在线发表了题为“Prime editing-mediated precise knock-in of protein tag sequences in the rice genome”的研究论文。该工作通过升级引导编辑器、采用GRAND editing等策略，在水稻基因组中有效地插入了HIS、HA和FLAG等蛋白标签序列，开发了简单高效的活体植物细胞蛋白标记方法。

引导编辑技术（Prime editing）是一种基于CRISPR/Cas系统的精确基因组编辑技术，由nSpCas9(H840A)、MLV RT 逆转录酶、pegRNA构建而成，可灵活地在作物中实现单碱基和多碱基替换等多种精确突变，但其在片段插入、缺失上的效率仍比较低。为测试PE系统是否可以实现在水稻基因组中插入蛋白标签，该工作首先利用课题组前期开发的引导编辑工具enpPE2进行了测试，在基因OsUBQ10和OsTubA1终止密码子上游9 bp位点和12 bp位点分别插入了6×His和HA序列标签，在10.42% ~ 43.75%的转基因植株中实现了标签插入，但纯合插入效率很低。为此在enpPE2的基础上，将引导编辑系统中逆转录酶M-MLV RT的RNA核酸酶H（RNase H）结构域去除，同时在M-MLV RT的N端融合病毒核衣壳蛋白，获得新的引导编辑工具ePE2。与enpPE2相比，在原生质中ePE2在标签插入效率上提高了1.90倍。稳定转化株系的编辑效率比enpPE2提高了1.14-1.8倍，其中纯合插入蛋白标签的效率为15.63%(6×His)和5.21%(HA)，这表明ePE2是植物中非常高效的蛋白标签插入工具。

虽然ePE2可以精确在水稻基因上插入短序列标签，但在水稻基因组中插入较长的3×FLAG序列(66 bp)时，活性仍然不足。为了提高长片段靶向插入的效率，本研究采用了基于双pegRNA的GRAND编辑策略。结果表明，在OsUBQ10、OsTubA1和OsACT2三个基因位点的稳定转化株系的插入效率为8.33%~25.00%，并且定点插入的标签可被Western印记稳定检测。

该研究报道了简单可靠的水稻标签敲入基因标记系统，为植物研究提供了简单易用的蛋白质标记方法。水稻所基因编辑团队李娟副研究员为该论文的（共同）第一作者，安徽农业大学农学院魏鹏程教授为（共同）通讯作者，研究得到了国家重点研发计划、国家自然科学基金、安徽省科技重大专项等项目的资助。

Figure 1



原文链接: <https://doi.org/10.1016/j.xplc.2023.100572>



打印 关闭