

# 以甜瓜原生質體短暫性表現轉殖系統快速評估基因編輯效果

游舜期<sup>1\*</sup> 王怡雯<sup>2</sup> 林思妤<sup>1</sup> 黃慶儀<sup>3</sup> 林大鈞<sup>4\*</sup>

## 摘要

游舜期、王怡雯、林思妤、黃慶儀、林大鈞。2021。以甜瓜原生質體短暫性表現轉殖系統快速評估基因編輯效果。台灣農業研究 70(3):206–216。

常間回文重複序列叢集/Cas9 蛋白質系統 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats/Cas9; CRISPR/Cas9) 為近年來興起之基因組編輯技術，亦是目前基因功能研究及精準育種課題的重要新興核心工具。對比現行農桿菌法媒介轉形過程所需時間冗長，本研究旨建立基因組編輯系統的快速導入平台，以利進行基因編輯試驗的先期評估。首先，本研究選用葫蘆科之甜瓜 (*Cucumis melo* L.) 作為主要材料，建立葉片原生質體短暫性表現系統平台，其轉殖效率約可達 20%。同時，利用甜瓜真核轉譯起始因子 4E (*eukaryotic translation initiation factors 4E*; *Cm-eIF4E*) 作為標的基因，輔以葉片原生質體短暫性表現系統，進行甜瓜細胞之基因組編輯效應評估。結果顯示，藉由原生質體短暫性表現系統導入可同時表現 2 個不同嚮導 RNA (guide RNA; gRNA) 之基因編輯載體，並針對 *Cm-eIF4E* 基因編輯區域進行 polymerase chain reaction (PCR) 擴增及膠體電泳分析，即可快速區分基因組編輯造成之 135 bp 片段缺失的編輯效果。相較導入單一嚮導 RNA 進行基因組編輯所產生之少數幾個鹼基之缺失或插入，需要 TA 選殖及定序以進行基因組編輯分析，可大幅減少實驗所需人力、時間及經費。本研究所建立之甜瓜原生質體短暫性表現轉殖系統，除了可快速分析嚮導 RNA 對甜瓜目標基因之影響效果，亦可作為後續建立甜瓜原生質體轉殖再生平台的重要基礎，進而可作為日後甜瓜精準育種之應用。

**關鍵詞：**原生質體、基因組編輯、嚮導 RNA、甜瓜真核轉譯起始因子 4E。

## 前言

近年來氣候變遷造成之環境劇變，耐生物及非生物逆境之作物需求逐年攀升，為因應此種狀況，可精準、快速及創新育種是目前重要的研究方向及課題。常間回文重複序列叢集/Cas9 蛋白質系統 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats/Cas9; CRISPR/Cas9) 基因組編輯技術是近年來討論度最高、可精準調控基因功能，且相較以往生物技術之操作簡易及便宜，甚至無需引種即可創造新種質，對於快速氣候變遷及極端氣候因應來說，無疑是現行新世代育種技術中最佳利器之一。

CRISPR/Cas9 主要由嚮導 RNA (guide RNA; gRNA，或稱單一嚮導 RNA，single guide RNA; sgRNA) 及 Cas9 蛋白質所組成。CRISPR 序列最早由 Ishino *et al.* (1987) 在大腸桿菌中發現 (Ishino *et al.* 1987)，真正作用機制及應用則是近 10 年才逐漸明瞭。目前已知 CRISPR 基因座在細菌中扮演抵禦噬菌體之角色，其基因座包含 CRISPR 序列及 Cas 蛋白基因，分別轉錄 crRNA 前驅物 (preCRISPR RNA)、trans-activating RNA (tracrRNA) 及轉譯 (translation) 出 Cas 蛋白質。成熟型 crRNA 會與 tracrRNA 及 Cas 蛋白質形成具有功能的 crRNA-tracrRNA-

投稿日期：2021 年 3 月 22 日；接受日期：2021 年 6 月 2 日。

\* 通訊作者：yousc\_l@tari.gov.tw; dagin@tari.gov.tw

<sup>1</sup> 農委會農業試驗所生物技術組助理研究員。台灣 台中市。

<sup>2</sup> 農委會農業試驗所生物技術組聘用助理研究員。台灣 台中市。

<sup>3</sup> 農委會農業試驗所生物技術組計畫助理。台灣 台中市。

<sup>4</sup> 農委會農業試驗所生物技術組聘用副研究員。台灣 台中市。

Cas 複合體，當噬菌體侵入至細胞內，則會藉由特定 crRNA 辨識噬菌體 DNA，並引導活化態 Cas 核酸酶造成噬菌體 DNA 斷裂，而達到防禦效果。為了簡化原核生物 crRNA 及 tracrRNA 功能後續應用，Jinek *et al.* (2012) 發表利用連接環 (linker loop) 將 crRNA 及 tracrRNA 連結在一起形成 gRNA，並證實其功能與 crRNA-tracrRNA 相同，也因此簡化 CRISPR/Cas9 基因編輯工具。而真正可利用 CRISPR/Cas9 系統在真核生物上則是在 2013 年由美國 3 個團隊發表的文獻中證實 (Cong *et al.* 2013; Jinek *et al.* 2013; Mali *et al.* 2013)。

現行操作上，gRNA 設計方式和目標序列挑選結果，將影響後續基因組編輯精準度及脫靶 (off-target) 程度，更甚者影響最終外表型之分析。前人研究報告指出導入單一 gRNA 進行基因編輯可獲得不同多種突變結果，舉如：鹼基插入 (insertion)、缺失 (deletion)、置換 (replacement) 或複合 (combined) 型式；此 4 種形式結果以單一鹼基改變占有極大比率 (在阿拉伯芥、油菜及番茄分別占比為 65.9、51.0 及 40.9%)，超出 10 個鹼基改變相對較低，大片段缺失 (100 以上鹼基缺失) 出現機率更低 (Feng *et al.* 2014; Yang *et al.* 2017; Zhang *et al.* 2020)。單一鹼基之插入或缺失會造成終止密碼子提早出現 (premature termination/stop codon) 或框移突變 (frameshift mutation) 進而使胺基酸轉錄及轉譯發生錯誤，致使原先多肽或蛋白質無法正常表現而達到基因剔除 (knock out) 效果。然而，單一 gRNA 之基因編輯仍有一定機率會以 3 的倍數改變鹼基或鹼基置換，產生意義錯誤密碼 (missense codon) 或同義突變 (synonymous mutation)，此狀況仍可能產生單一胺基酸變異或轉譯出具正常功能的多肽或蛋白質，故極有可能導致基因組編輯失敗。現行技術獲得基因組編輯穩定轉殖植物，需經過農桿菌或基因槍轉殖及再生過程，其所需時間、人力及經費甚鉅。倘若能建立一基因組編輯系統的快速導入平台，將可有效先期評估基因組編輯系統。此外，農桿菌媒介轉形導入基因編輯系統，較難在  $T_0$  及  $T_1$  世代之篩選出同質突變體 (homogeneous mutation)，需要經過

自交或回交至較高世代，方有機會選拔出所需的穩定基因編輯轉殖系，以進行基因功能的研究。利用原生質體短暫性表現轉殖系統快速進行基因編輯評估，在短時間將可有效地進行不同 gRNA 之基因編輯評估，且無需建立無菌組織培養系統，此平台對於前期試驗評估將有莫大幫助 (Lin *et al.* 2018; Meng *et al.* 2020; Wu *et al.* 2020)。爰此，本研究針對單一外顯子同時導入 2 個不同 gRNA 可精準造成 135 鹼基對缺失，並利用單一原生質體 (single protoplast) 細胞搭配巢式 PCR (nested polymerase chain reaction) 分析快速評估轉殖效率，可有效地快速評估並分析基因編輯結果。

## 材料與方法

### 試驗材料

本試驗選用葫蘆科 (*Cucurbitaceae*) 之甜瓜 (*Cucumis melo*) 作為材料，試驗品種為 IRAN-H。作物之栽培係將種子播種於含泥炭土之 3 寸育苗盆中，種子播種後 1–2 d 可觀察到胚根突出。播種約 1–2 wk 後，植株生長至本葉 2–3 枚時，即可定植於栽培盆。

### 原生質體分離

甜瓜葉片以刀片切成約 0.5–1.0 mm 絲狀，置入新鮮配置之酵素溶液 (20 mM MES + 0.4 M mannitol + 20 mM KCl + 1% cellulase R10 + 0.25% macerozyme R10 + 10 mM  $\text{CaCl}_2$  + 0.1% BSA) 中，於 25°C、水平震盪 40 rpm，反應 12–16 h。經過酵素分解之殘體經過 100 目網篩過濾後，溶液以 100× g 離心 3 min，去除上清液後，沉澱物加入 wash solution (WS) 緩衝液 (4.405 g L<sup>-1</sup> MS + 0.4 M D-mannitol + 0.1 M glycine + 0.51 mM MES) 清洗 2 次。加入 floating solution (FS) 溶液 (4.405 g L<sup>-1</sup> MS + 0.6 M sucrose + 0.1 M glycine + 0.51 mM MES) 均勻混合後，以 65× g 離心 10 min，緩慢吸取最上層之分層至新離心管。加入兩倍體積之 0.5 M sorbitol 溶液，均勻混合，再以 100× g 離心 3 min，去除上清液後，混合新的 0.5 M sorbitol 後，以血球計數器 (0650030, Marienfeld, Lauda-Königshofen, Germany) 推算原生質體數量。

## 原生質體短暫性轉殖

計數原生質體數量後，調整濃度為  $2-5 \times 10^5 \mu\text{L}^{-1}$  個原生質體，調整後之 0.4 mL 原生質體溶液與一定量之 DNA ( $1 \mu\text{g} \mu\text{L}^{-1}$ ) 和 0.3 mL polyethylene glycol (PEG) 溶液 (40% PEG 6,000 + 0.25 M glucose + 0.1 M glycine + 0.1 M  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) 均勻混合。於室溫反應 15 min 後，緩慢地與 3 mL mW5 溶液 (2 mM MES + 154 mM NaCl + 125 mM  $\text{CaCl}_2$  + 5 mM KCl + 5 mM glucose) 均勻混合，再以  $100\times$  g 離心 1 min。去除上清液後，加入新的 mW5 溶液均勻混合，即可移至 24 well 培養盤，經過 24–48 h 後進行轉殖效率評估。

## 基因表現載體系統之構築

綠色螢光基因表現載體 pCAMBIA-Ubi-ZsGFP 由農業試驗所生物技術組分子遺傳實驗室所提供。基因編輯載體為利用 CRISPR-direct (<https://crispr.dbcls.jp>) 網站評估 *Cm-eIF4E* 基因序列 (MELO3C002698.2)，並從中挑選兩個目標序列 dual gRNA (+)<sub>195–217</sub> (5'-TTTCATGAAAGCTACATCGG-3') 及 dual gRNA (-)<sub>341–363</sub> (5'-TAGTGCATCAGCCTCAC-CCT-3')。以此設計構築引子 F1\_BsaI + tRNA (5'-taGGTCTCAGGCAACAAGCAC-CAGTG-3')、R1\_tRNA + gRNA1 (5'-taGGTCTCAGCTTTCATCGAATGCACCAG-CCGGG-3')、F2\_gRNA1 + scaffold (5'-taGGTCTCCAAGCTACATCGGGTTTGA-GAGCTAGAA-3') 及 R2\_BsaI + gRNA2 + tRNA (5'-taGGTCTCCAAGCTAGTGCATCAGCCT-CACCCTTGACCAGCCGGG-3')，再利用合成之 pre-tRNA 序列 (5'-AACAAAGCAC-CAGTGGTCTAGTGGTGGGAATAGTACCCT-GCCACGGTACAGACCCGGGTTTCGATTC-CCGGCTGGTGCA-3') 為模板股，以  $98^\circ\text{C}$  2.5 min,  $98^\circ\text{C}$  10 s、 $55^\circ\text{C}$  20 s、 $72^\circ\text{C}$  15 s 循環 30 次， $72^\circ\text{C}$  7 min，擴增出 P1 及 P2 片段。P1 及 P2 之 PCR 產物藉由 QIAquick Gel Extraction Kit (28706, Qiagen, Hilden, Germany) 進行去鹽純化，純化所得片段則利用 Golden Gate Assembly (E1601, NEB, Ipswich, MA, USA) 套組構築至 pRGEB32

(#63142, Addgene, Watertown, MA, USA) 載體 (Xie *et al.* 2015)，並定序確認構築序列無誤後，命名此載體為 pRGEB32 [Cm-eIF4E] [dual gRNA]。

## 綠色螢光基因表現分析

利用原生質體短暫性轉殖系統轉染 pCAMBIA-Ubi-ZsGFP 綠色螢光基因表現載體至原生質體，並培養 24 h 後。原生質體溶液以 100 體溶液離心 1 min，移除上清液，加入新的 50  $\mu\text{L}$  mW5 溶液混勻，取 20  $\mu\text{L}$  至玻片，並以正立螢光顯微鏡 (Axioskop 2 plus, Zeiss, Oberkochen, Germany) 觀察及估算綠色螢光基因表現情形。

## 單一原生質體分離及目標序列編輯結果分析

單一原生質體分離及基因編輯結果分析方法參考 Lin *et al.* (2018) 發表之文獻加以調整。原生質體短暫性轉殖且培養 48 h 後，利用血球計數器推估數量後，利用 mW5 溶液調整濃度為  $1 \text{ cell} \mu\text{L}^{-1}$ 。取 1  $\mu\text{L}$  調整後之原生質體溶液 (以顯微鏡確認溶液中含有 1 個原生質體細胞) 加入至 PCR 溶液中進行巢式 PCR，第一次片段擴增反應引子為 Cm-eIF4E (Chr.12)\_E1\_F2 (5'-TGTACCACAAAAGGCCGACT-3') 及 Cm-eIF4E (Chr.12)\_E1\_R2 (5'-ACATTCAAGACCACGACAAGA-3') 引子，第二次引子為 Cm-eIF4E (Chr.12)\_E1\_F1 (5'-CTCTCCATTCCA-CAAAGCAC-3') 及 Cm-eIF4E (Chr.12)\_E1\_R1 (5'-GCCCTCACATTCATAATCCC-3') 引子，兩次 PCR 條件以  $98^\circ\text{C}$ 、2 min,  $98^\circ\text{C}$ 、10 s,  $55^\circ\text{C}$ 、30 s,  $72^\circ\text{C}$ 、1 min 循環 30 次， $72^\circ\text{C}$ 、10 min 進行目標片段擴增，PCR 產物以 6% 聚丙烯醯胺凝膠 (polyacrylamide gel) 在  $0.5\times$  tris-borate-edta (TBE) 溶液 100 V、70 min 條件下進行膠體電泳。核酸電泳後，經 ethidium bromide (EtBr) 染色，再藉由 ultraviolet (UV) 燈箱及膠體照相系統擷取影像。

## 原生質體基因組 DNA 萃取及基因編輯產物分析

原生質體短暫性轉殖經過 48 h 培養後，以

100× g 離心 2 min，去除上清液後，利用植物基因組萃取套組 (FAPGK001, Favorgen, Ping-Tung, Taiwan) 萃取基因組 DNA。萃取之基因組 DNA，利用 Cm-eIF4E (Chr.12)\_E1\_F1 和 Cm-eIF4E (Chr.12)\_E1\_R1 引子及 Ex Taq 聚合酶鏈式反應套組 (RR001A, TaKaRa, Shiga, Japan) 擴增目標片段後，以 1.5% agarose 膠片分析。膠體電泳分離之目標片段條帶，以膠體回收套組 (28706, Qiagen, Hilden, Germany) 進行 PCR 目標產物純化，並以 TA 選殖套組 (45-0030, Invitrogen, Waltham, MA, USA) 將純化之 PCR 產物選殖入 TOPO 載體，再進行核酸定序及多重序列比對分析 (multiple sequence alignment) 結果。

## 統計分析

本研究之試驗所得資料經 SAS Enterprise Guide 7.1 套裝統計分析軟體進行變異數分析 (analysis of variance)，倘若處理間具有顯著性差異 ( $P < 0.05$ )，則利用最小顯著差異性測驗 (least significant difference test; LSD) 進行各處理間之平均值差異性比較。

## 結果

### 原生質體製備最佳化及外源 DNA 含量對短暫原生質體轉殖效率影響

為利用原生質體短暫性轉殖表現系統 (圖 1) 進行 CRISPR/Cas9 基因編輯結果評估，原生質體轉殖效率將影響後續評估結果。在低轉殖率情況下，轉殖成功之原生質體數量低，可取得之轉殖成功樣本數不僅低，亦難以代表整體基因編輯結果。所以，為評估甜瓜原生質體短暫性表現及基因編輯效果，本實驗利用研究室先前所構築之兔海葵 (*Zoanthus* sp.) 綠色螢光報導基因載體 pCAMBIA-Ubi-ZsGFP (圖 2A) 進行轉殖效率評估，並構築可同時表現兩個不同 gRNA 之 pRGE32 [Cm-eIF4E] [dual gRNA] 載體 (圖 2B) 以進行後續基因編輯評估。

前人研究報告指出，PEG 轉殖過程控制原生質體在  $2-5 \times 10^5$  個數量，有較佳之轉殖效率 (Huang *et al.* 2013; Burriss *et al.* 2016)。為評估單次轉殖可取得最佳原生質體濃度所需之

鮮葉重，不同鮮葉重取得純化後之原生質體溶液，經血球計數器估算結果顯示，單次轉殖所需之原生質體數概估需要 0.2 g 新鮮葉片重 (圖 3A)，後續原生質體轉殖實驗亦以此條件獲取所需之鮮葉重。在控制特定原生質體濃度下，PEG 轉殖效率隨著加入之載體 DNA 含量提升，轉殖率從 5% 提升至 20%，並以添加 20–30  $\mu\text{g}$  載體量具有較佳之表現效率 (圖 3B)；利用倒立螢光顯微鏡觀察原生質體外觀，多數呈現圓形之正常型態，且觀察到螢光反應表現 (圖 4)。然而，當添加之載體 DNA 含量提高至 40  $\mu\text{g}$ ，轉殖效果反而降低，顯示過高 DNA 含量對原生質體轉殖有不利影響，故在基因編輯評估實驗將以 20–25  $\mu\text{g}$  作為加入外源載體之含量基準。

### 同時導入兩個不同 gRNA 至原生質體針對 Cm-eIF4E 基因編輯結果評估

本研究之 gRNA 選擇為透過 CRISPRdirect 網站針對 Cm-eIF4E 基因序列 (MELO3C002698.2) 進行評估，選擇之目標序列皆位於 Cm-eIF4E 基因第一個外顯子區段 (exon 1)，第一個目標序列位於起始位置起算第 15–37 個鹼基對 [含 protospacer adjacent motif (PAM) 序列] 之正股 (plus/sense strand)，第二個則是第 161–183 個鹼基對 (含 PAM 序列) 之負股 (minus/antisense strand)，預期同時導入兩個不同位點之 gRNA 可造成目標序列 135 bp 缺失。為快速分析同時導入兩個不同 gRNA 造成之染色體片段缺失，針對 Cm-eIF4E 基因第一個外顯子區段設計兩組引子 Cm-eIF4E (Chr.12)\_E1\_F2/Cm-eIF4E (Chr.12)\_E1\_R2 及 Cm-eIF4E (Chr.12)\_E1\_F1/Cm-eIF4E (Chr.12)\_E1\_R1，擴增片段之 PCR 產物分別預期可獲得 732 bp 及 564 bp 條帶；若發生基因編輯產生之 135 bp 缺失，則第二組引子擴增之 PCR 產物將可觀察到 429 bp 條帶 (圖 5A)。為確認本試驗預期結果，利用混合之轉殖原生質體經基因組 DNA 萃取後，以 Cm-eIF4E (Chr.12)\_E1\_F1 及 Cm-eIF4E (Chr.12)\_E1\_R1 引子擴增目標片段，並經膠體電泳分析後，觀察到 2 個條帶；無轉殖之葉片及空載體轉殖之原生質體，以相同引子擴增目標片段，則僅觀察到 1 個條帶 (圖 5B)。

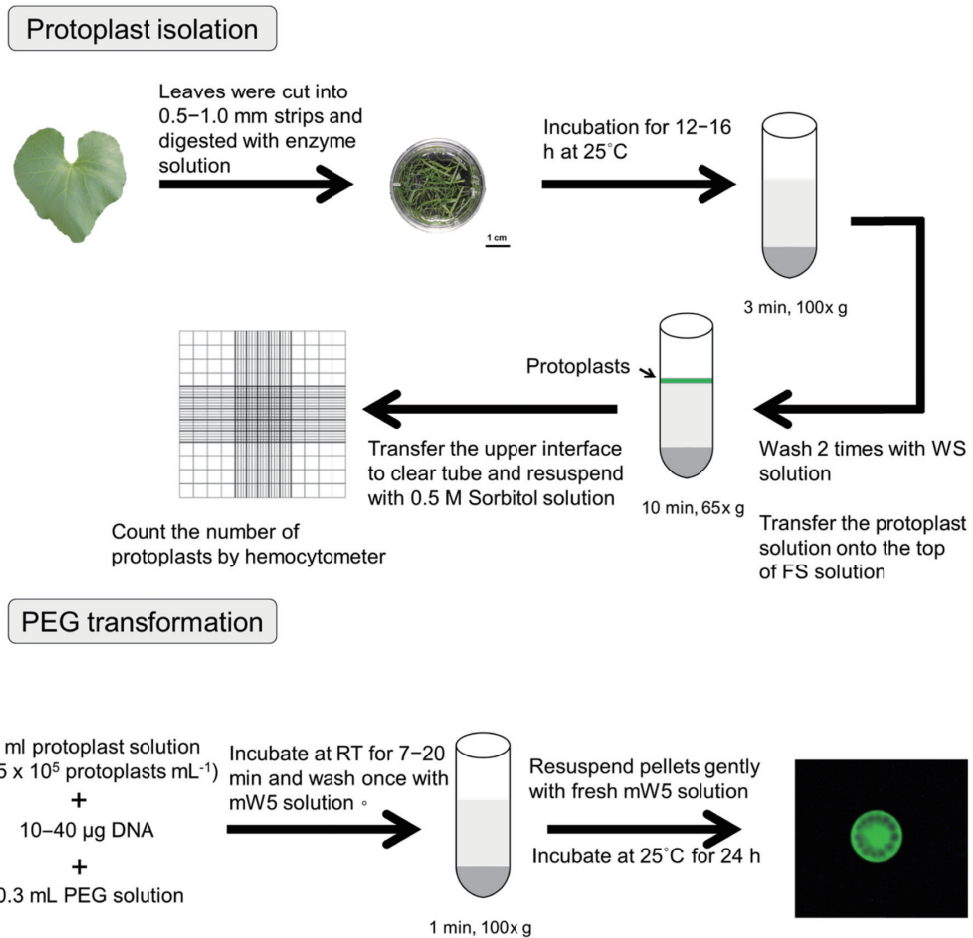


圖 1. 原生質體短暫性表現轉殖流程示意圖。

**Fig. 1.** Flowchart illustrating steps of transient transfection in melon protoplasts. WS: wash buffer; PEG: polyethylene glycol.

此外，為進一步檢測單一原生質體細胞同時導入兩個不同 gRNA，可對目標基因造成片段缺失及評估基因編輯效率，藉由單一原生質體分離方法及上述兩組引子進行巢式 PCR 分析。結果顯示 20 個原生質體樣本中，11 個樣本能擴增到目標片段，其中僅 1 個樣本 PCR 產物位於 429 bp 附近 (圖 5C)，以此推估本原生質體轉殖系統可獲得 135 bp 片段缺失約 9.1%。為進一步分析本系統原生質體基因編輯結果，將圖 5B 中轉殖原生質體經 PCR 擴增取得 564 bp 及 429 bp 位置之 2 個條帶，分別經過膠體回收、純化及 TA 選殖後，進行核酸定序。定序結果顯示 564 bp 位置之條帶，隨機挑選 8 個

樣本中，1 個樣本觀察到 1 個核苷酸插入；429 bp 位置之條帶，隨機挑選 21 個樣本，皆觀察到 135 核苷酸缺失現象，且缺失之位置皆自起始位置起算第 32 到第 166 個核苷酸 (圖 5D)。

## 討論

植物真核轉譯起始因子 4F 蛋白複合體主導真核生物傳訊 RNA (mRNA) 轉譯起始過程，其複合體含括 eIF4E、eIF4G、eIF4A (DEAD-box RNA helicase)、PARP [poly (A)-binding protein] 和 eIF3 蛋白質 (Jackson *et al.* 2010)。在植物抗病毒基因中，針對病毒脅持宿主本身

轉譯資源進行突變或剔除而獲得之抗病毒機制，稱為易感性喪失 (loss-of-susceptibility)，其中 *eIF4E* 和 *eIF4G* 基因對於病毒 RNA 轉譯

及複製為主要的關鍵因子，亦是植物病毒主要寄持宿主資源的對象 (Truniger & Aranda 2009; Wang & Krishnaswamy 2012)。在自然種原中，

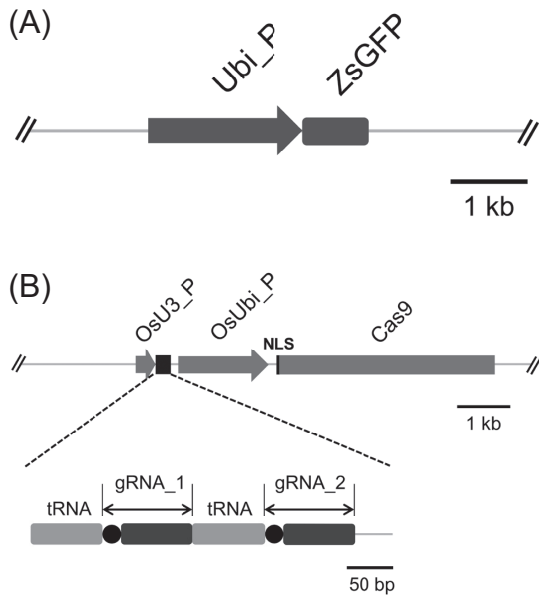


圖 2. 應用於短暫性表現轉殖系統之轉殖載體示意圖。(A) 綠色螢光基因表現載體 pCAMBIA-Ubi-ZsGFP；(B) *Cm-eIF4E* 基因編輯載體 pRGEB32 [*Cm-eIF4E*] [dual gRNA]。

**Fig. 2.** Schematic diagram of the transient expression vectors in this study. (A) *Zoanthus* sp. green fluorescent protein (ZsGFP) expression vector: pCAMBIA-Ubi-ZsGFP; (B) genomic editing vector for *Cm-eIF4E* gene: pRGEB32 [*Cm-eIF4E*] [dual gRNA]. Ubi\_P: maize ubiquitin promoter; OsU3\_P: *Oryza sativa* U3 snoRNA promoter; NLS: nuclear localization sequence; OsUbi\_P: *Oryza sativa* ubiquitin promoter.

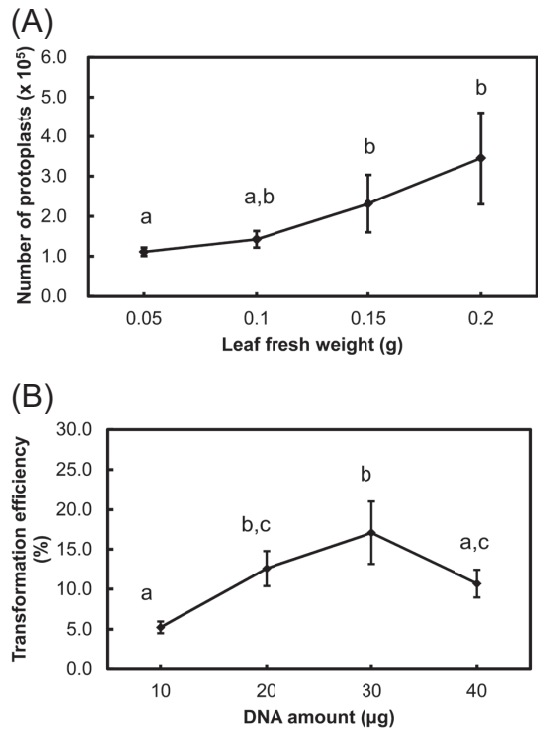


圖 3. 原生質體之分離及短暫表現轉殖效率評估。(A) 不同葉片鮮種可分離原生質體數量 ( $n = 4$ )；(B) 加入不同載體 DNA 含量對轉殖效率之影響 ( $n = 4$ )。

**Fig. 3.** Melon protoplast isolation and transient transfection efficiency. (A) Protoplast yields isolated from different leaf fresh weights; (B) effect of DNA concentration on transient transfection efficiency.

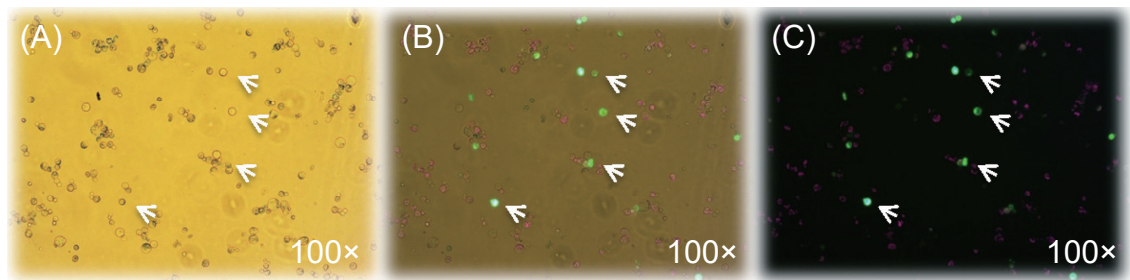
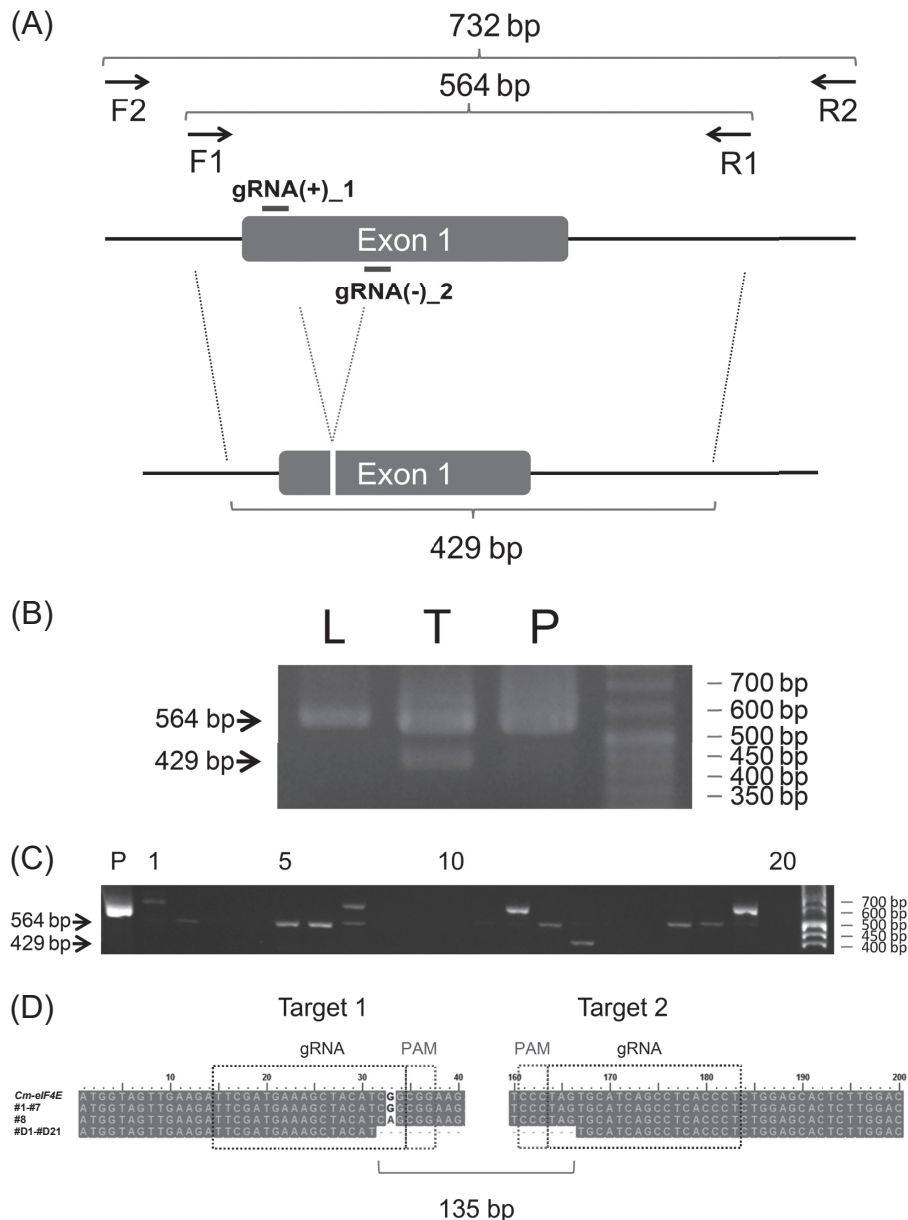


圖 4. 利用螢光顯微鏡觀察甜瓜原生質體轉殖後之外觀形態及螢光蛋白質表現情形。(A) 明視野；(B) 明視野與螢光影象；(C) 螢光影象。

**Fig. 4.** Morphology and green fluorescent images of protoplast transient transfection. (A) Bright field image; (B) bright field with fluorescent image; and (C) fluorescent image.



**圖 5.** 藉由導入兩個鄰近 gRNA，移除特定基因組序列片段。(A) *Cm-eIF4E* 第一個外顯子、gRNA 及引子設計位置簡圖。(B) 導入兩個 gRNA 造成特定片段缺失之結果；L 代表擴增來源為無轉殖之葉片 DNA；T 代表擴增來源為短暫性轉殖表現之原生質體整體表現；P 代表擴增來源為短暫性轉殖空載體 pRGE32 之原生質體整體表現。(C) 原生質體轉殖後，利用巢式 PCR 擴增單一原生質體 PCR 片段結果圖；P 代表無經過轉殖之原生質體；編號 1-20 代表經過短暫性轉殖表現之單一原生質體結果。(D) 目標片段藉由膠體純化、TA 選殖及定序後以多重序列比對分析結果。

**Fig. 5.** 135 bp fragment deletion on the *Cm-eIF4E* gene by introducing the dual gRNA vector into protoplasts. (A) Schematic diagram of designed dual gRNA and primers on *Cm-eIF4E* exon 1; (B) target fragment were amplified from wild type leaves (L), transfected (T) and non-transfected (P) protoplasts by using polymerase chain reaction (PCR) assay; (C) DNA from several single protoplasts was amplified by using nested PCR after transfection. P, non-transfected protoplasts; and (D) alignment of sequences of mutated alleles identified from cloned PCR fragments.

*eIF4E* 基因點突變 (point mutation) 造成編碼序列 (coding sequence) 改變且不影響原本蛋白質功能下，獲得抗病毒功能的種原已在多個作物中被發現，例如：番椒、番茄、萵苣、豌豆及甜瓜 (Ruffel *et al.* 2002; Nicaise *et al.* 2003; Gao *et al.* 2004; Ruffel *et al.* 2005; Nieto *et al.* 2006)；藉由人為導入基因編輯技術，精準地將 *eIF4E* 或同功型 *eIF* (iso) 4E 起始因子剔除，可在不影響植物外表型狀況下，獲得抗病毒能力，例如：阿拉伯芥、胡瓜及樹薯 (Chandrasekaran *et al.* 2016; Pyott *et al.* 2016; Gomez *et al.* 2019)。爰此，利用基因編輯技術改造 *eIF4E* 基因功能，在植物抗病毒研究及應用是極有其價值。

然而，現行植物基因編輯技術，需要利用基因轉殖方式將外源片段 CRISPR/Cas9 序列，以農桿菌轉殖或基因槍轉殖導入植物細胞才能進行作用，但由於此兩種方法需要誘導植株再生後，方能分析基因編輯的情形，所需時間短則 3 mo，長則可能需半年以上。對於前期評估基因編輯之試驗目的而言，無法有效快速獲得分析結果。特別在多數無參考序列或解序不完全之非模式植物中，更需要快速且有效的進行前期基因編輯效果及脫靶率評估，以調整目標序列或 gRNA 設計與規劃。

本試驗利用甜瓜葉片為分離原生質體之材料，分離後之原生質體以 PEG 轉殖法導入綠色螢光基因或基因編輯載體，以進行轉殖效率和 *eIF4E* 基因編輯評估。前人研究指出原生質體分離與酵素溶液成分、處理時間及物種材料等有關聯，過與不及將影響原生質體產量及存活率 (Gajdová *et al.* 2007; Huang *et al.* 2013; Burris *et al.* 2016)；本篇原生質體分離處理條件下，每 1.0 g 新鮮葉片重約可獲取  $1.7 \times 10^6$  個原生質體細胞 (圖 3A)，單次轉殖所需之原生質體數約需要 0.2 g 新鮮葉片。利用 PEG 轉殖平台添加不同含量外源 DNA，對原生質體轉殖效果有不同影響，本試驗結果顯示以添加 20–30  $\mu\text{g}$  載體量具有較佳之表現效率，但當添加濃度過高時，轉殖效率則逐漸降低 (圖 3B)，在柳枝稷、葡萄及野草莓等植物亦發現有相似狀況 (Burris *et al.* 2016; Zhao *et al.* 2016; Gou *et al.* 2020)。

CRISPR/Cas9 影響目標基因組如前言所述，可能會有鹼基插入、缺失、置換或複合型式，且以單一鹼基改變出現機率較高；單一鹼基的改變在後續篩檢分析上，可以使用 T7 核酸內切酶 (T7 endonuclease I; T7EI)、高解析度熔離分析 (high-resolution melting analysis; HRMA)、sanger 定序或次世代定序等方法進行篩檢 (Germini *et al.* 2018; Manghwar *et al.* 2019)，但這些篩檢方法所需經費及人力不低。因此，本研究同時導入兩個不同 gRNA 可精準造成 135 鹼基對缺失，再利用 PCR 擴增目標區域及膠體電泳分析，即可快速進行篩選，且利用單一原生質體細胞搭配巢式 PCR 和膠體電泳，即可快速估算 135 鹼基對缺失在原生質體中所占比例，將可大幅縮減篩檢所需經費。此外，在本研究中使用之 Cas9 蛋白及 gRNA 之表現分別由水稻 *UBI* 及 *U3* 啟動子 (promoter) 所控制，顯示單子葉水稻之 RNA 聚合酶 III 及 RNA 聚合酶 II 啟動子可正常於雙子葉甜瓜細胞中表現且具有功能，推測單、雙子葉啟動子間有一定序列相似度且部分功能可通用 (Jang *et al.* 2002; Khurana *et al.* 2013; Kumari & Ware 2013; Lin *et al.* 2018)，但為求實驗之精準性，不同植物間啟動子之效用仍建議先行評估。因此，在經費、時間及資源有限之下，利用原生質體短暫性轉殖表現系統，快速進行基因編輯效能之前期研究評估是不可或缺，後續亦可搭配原生質體再生系統獲得轉殖系植株進行外表性狀分析。冀本研究提供後續研究專家學者可於前期快速進行基因編輯評估、後續原生質體再生應用及抗病毒基因研究。

## 引用文獻

- Burris, K. P., E. M. Dlugosz, A. G. Collins, C. N. Stewart, Jr., and S. C. Lenaghan. 2016. Development of a rapid, low-cost protoplast transfection system for switchgrass (*Panicum virgatum* L.). *Plant Cell Rep.* 35:693–704. doi:10.1007/s00299-015-1913-7
- Chandrasekaran, J., M. Brumin, D. Wolf, D. Leibman, C. Klap, M. Pearlsman, A. Sherman, T. Arazi, and A. Gal-On. 2016. Development of broad virus resistance in non-transgenic cucumber using CRISPR/Cas9 technology. *Mol. Plant Pathol.* 17:1140–1153. doi:10.1111/mpp.12375

- Cong, L., F. A. Ran, D. Cox, S. Lin, R. Barretto, N. Habib, P. D. Hsu, X. Wu, W. Jiang, L. A. Marraffini, and F. Zhang. 2013. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* 339:819–823. doi:10.1126/science.1231143
- Feng, Z., Y. Mao, N. Xu, B. Zhang, P. Wei, D. L. Yang, Z. Wang, Z. Zhang, R. Zheng, L. Yang, L. Zeng, X. Liu, and J. K. Zhu. 2014. Multigeneration analysis reveals the inheritance, specificity, and patterns of CRISPR/Cas-induced gene modifications in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111:4632–4637. doi:10.1073/pnas.1400822111
- Gajdová, J., B. Navrátilová, J. Smolná, and A. Lebeda. 2007. Factors affecting protoplast isolation and cultivation of *Cucumis* spp. *J. Appl. Bot. Food Qual.* 81:1–6.
- Gao, Z., E. Johansen, S. Evers, C. L. Thomas, T. H. Noel Ellis, and A. J. Maule. 2004. The potyvirus recessive resistance gene, *sbm1*, identifies a novel role for translation initiation factor eIF4E in cell-to-cell trafficking. *Plant J.* 40:376–385. doi:10.1111/j.1365-3113X.2004.02215.x
- Germini, D., T. Tsfasman, V. V. Zakharova, N. Sjakste, M. Lipinski, and Y. Vassetzky. 2018. A comparison of techniques to evaluate the effectiveness of genome editing. *Trends Biotechnol.* 36:147–159. doi:10.1016/j.tibtech.2017.10.008
- Gomez, M. A., Z. D. Lin, T. Moll, R. D. Chauhan, L. Hayden, K. Renninger, G. Beyene, N. J. Taylor, J. C. Carrington, B. J. Staskawicz, and R. S. Bart. 2019. Simultaneous CRISPR/Cas9-mediated editing of cassava eIF4E isoforms nCBP-1 and nCBP-2 reduces cassava brown streak disease symptom severity and incidence. *Plant Biotechnol. J.* 17:421–434. doi:10.1111/pbi.12987
- Gou, Y. J., Y. L. Li, P. P. Bi, D. J. Wang, Y. Y. Ma, Y. Hu, H. C. Zhou, Y. Q. Wen, and J. Y. Feng. 2020. Optimization of the protoplast transient expression system for gene functional studies in strawberry (*Fragaria vesca*). *Plant Cell, Tissue Organ Cult.* 141:41–53. doi:10.1007/s11240-020-01765-x
- Huang, H. Y., Z. Y. Wang, J. T. Cheng, W. C. Zhao, X. Li, H. Y. Wang, Z. X. Zhang, and X. L. Sui. 2013. An efficient cucumber (*Cucumis sativus* L.) protoplast isolation and transient expression system. *Sci. Hortic.* 150:206–212. doi:10.1016/j.scienta.2012.11.011
- Ishino, Y., H. Shinagawa, K. Makino, M. Amemura, and A. Nakata. 1987. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J. Bacteriol.* 169:5429–5433. doi:10.1128/jb.169.12.5429-5433.1987
- Jackson, R. J., C. U. T. Hellen, and T. V. Pestova. 2010. The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11:113–127. doi:10.1038/nrm2838
- Jang, I. C., W. B. Choi, K. H. Lee, S. I. Song, B. H. Nahm, and J. K. Kim. 2002. High-level and ubiquitous expression of the rice cytochrome *c* gene *OsCc1* and its promoter activity in transgenic plants provides a useful promoter for transgenesis of monocots. *Plant Physiol.* 129:1473–1481. doi:10.1104/pp.002261
- Jinek, M., K. Chylinski, I. Fonfara, M. Hauer, J. A. Doudna, and E. Charpentier. 2012. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 337:816–821. doi:10.1126/science.1225829
- Jinek, M., A. East, A. Cheng, S. Lin, E. Ma, and J. Doudna. 2013. RNA-programmed genome editing in human cells. *Elife* 2:e00471. doi:10.7554/eLife.00471
- Khurana, N., H. Chauhan, and P. Khurana. 2013. Wheat chloroplast targeted sHSP26 promoter confers heat and abiotic stress inducible expression in transgenic *Arabidopsis* plants. *Plos One* 8:e54418. doi:10.1371/journal.pone.0054418
- Kumari, S. and D. Ware. 2013. Genome-wide computational prediction and analysis of core promoter elements across plant monocots and dicots. *Plos One* 8:e79011. doi:10.1371/journal.pone.0079011
- Lin, C. S., C. T. Hsu, L. H. Yang, L. Y. Lee, J. Y. Fu, Q. W. Cheng, F. H. Wu, H. C. W. Hsiao, Y. Zhang, R. Zhang, W. J. Chang, C. T. Yu, W. Wang, L. J. Liao, S. B. Gelvin, and M. C. Shih. 2018. Application of protoplast technology to CRISPR/Cas9 mutagenesis: From single-cell mutation detection to mutant plant regeneration. *Plant Biotechnol. J.* 16:1295–1310. doi:10.1111/pbi.12870
- Mali, P., L. Yang, K. M. Esvelt, J. Aach, M. Guell, J. E. DiCarlo, J. E. Norville, and G. M. Church. 2013. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science* 339:823–826. doi:10.1126/science.1232033
- Manghwar, H., K. Lindsey, X. Zhang, and S. Jin. 2019. CRISPR/Cas system: Recent advances and future prospects for genome editing. *Trends Plant Sci.* 24:1102–1125. doi:10.1016/j.tplants.2019.09.006
- Meng, R., C. Wang, L. Wang, Y. Liu, Q. Zhan, J. Zheng, and J. Li. 2020. An efficient sorghum protoplast assay for transient gene expression and gene editing by CRISPR/Cas9. *PeerJ* 8:e10077. doi:10.7717/peerj.10077
- Nicaise, V., S. German-Retana, R. Sanjuán, M. P. Dubrana, M. Mazier, B. Maisonneuve, T. Candresse, C. Caranta, and O. LeGall. 2003. The eukaryotic translation initiation factor 4E controls lettuce susceptibility to the Potyvirus Lettuce mosaic vi-

- rus. *Plant Physiol.* 132:1272–1282. doi:10.1104/pp.102.017855
- Nieto, C., M. Morales, G. Orjeda, C. Clepet, A. Monfort, B. Sturbois, P. Puigdomènech, M. Pitrat, M. Caboche, C. Dogimont, J. Garcia-Mas, M. A. Aranda, and A. Bendahmane. 2006. An *eIF4E* allele confers resistance to an uncapped and non-polyadenylated RNA virus in melon. *Plant J.* 48:452–462. doi:10.1111/j.1365-313X.2006.02885.x
- Pyott, D. E., E. Sheehan, and A. Molnar. 2016. Engineering of CRISPR/Cas9-mediated potyvirus resistance in transgene-free *Arabidopsis* plants. *Mol. Plant Pathol.* 17:1276–1288. doi:10.1111/mpp.12417
- Ruffel, S., M. H. Dussault, A. Palloix, B. Moury, A. Bendahmane, C. Robaglia, and C. Caranta. 2002. A natural recessive resistance gene against potato virus Y in pepper corresponds to the eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E). *Plant J.* 32:1067–1075. doi:10.1046/j.1365-313x.2002.01499.x
- Ruffel, S., J. L. Gallois, M. L. Lesage, and C. Caranta. 2005. The recessive potyvirus resistance gene *pot1* is the tomato orthologue of the pepper *pvr2-eIF4E* gene. *Mol. Genet. Genomics* 274:346–353. doi:10.1007/s00438-005-0003-x
- Truniger, V. and M. A. Aranda. 2009. Recessive resistance to plant viruses. *Adv. Virus Res.* 75:119–159. doi:10.1016/S0065-3527(09)07504-6
- Wang, A. and S. Krishnaswamy. 2012. Eukaryotic translation initiation factor 4E-mediated recessive resistance to plant viruses and its utility in crop improvement. *Mol. Plant Pathol.* 13:795–803. doi:10.1111/j.1364-3703.2012.00791.x
- Wu, S., H. Zhu, J. Liu, Q. Yang, X. Shao, F. Bi, C. Hu, H. Huo, K. Chen, and G. Yi. 2020. Establishment of a PEG-mediated protoplast transformation system based on DNA and CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein complexes for banana. *BMC Plant Biol.* 20:425. doi:10.1186/s12870-020-02609-8
- Xie, K., B. Minkenberg, and Y. Yang. 2015. Boosting CRISPR/Cas9 multiplex editing capability with the endogenous tRNA-processing system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112:3570–3575. doi:10.1073/pnas.1420294112
- Yang, H., J. J. Wu, T. Tang, K. D. Liu, and C. Dai. 2017. CRISPR/Cas9-mediated genome editing efficiently creates specific mutations at multiple loci using one sgRNA in *Brassica napus*. *Sci. Rep.* 7:7489. doi:10.1038/s41598-017-07871-9
- Zhang, N., H. M. Roberts, J. Van Eck, and G. B. Martin. 2020. Generation and molecular characterization of CRISPR/Cas9-induced mutations in 63 immunity-associated genes in tomato reveals specificity and a range of gene modifications. *Front. Plant Sci.* 11:10. doi:10.3389/fpls.2020.00010
- Zhao, F. L., Y. J. Li, Y. Hu, Y. R. Gao, X. W. Zang, Q. Ding, Y. J. Wang, and Y. Q. Wen. 2016. A highly efficient grapevine mesophyll protoplast system for transient gene expression and the study of disease resistance proteins. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 125:43–57. doi:10.1007/s11240-015-0928-7

# Using Transient Expression and Transfection System of Melon Protoplasts for Rapid Evaluation of Genome Editing

Shuen-Chi You<sup>1\*</sup>, Yi-Wen Wang<sup>2</sup>, Ssu-Yu Lin<sup>1</sup>, Ching-Yi Huang<sup>3</sup>, and Da-Gin Lin<sup>4\*</sup>

## Abstract

You, S. C., Y. W. Wang, S. Y. Lin, C. Y. Huang, and D. G. Lin. 2021. Using transient expression and transfection system of melon protoplasts for rapid evaluation of genome editing. *J. Taiwan Agric. Res.* 70(3):206–216.

The clustered regularly interspaced short palindromic repeats/Cas9 (CRISPR/Cas9) system is the most popular strategy for genomic editing technology in recent years, and has been a powerful tool for gene function verification and precision plant breeding. To replace the current time-consuming *Agrobacterium*-mediated method, this study aims to establish a rapid transient expression platform for the preliminary evaluation of genomic editing system. First of all, leaf protoplasts of *Cucumis melo* L. were used to establish the transient gene expression system, and the best transformation efficiency reached approximately 20%. Simultaneously, the melon *eukaryotic translation initiation factors 4E* (*eIF4E*) was used as a target gene to evaluate the genome editing efficiency in the transient expression system. Our results have demonstrated that the dual guide RNA (gRNA) CRISPR/Cas9 system could be introduced to mediate deletion of the genomic DNA fragment (135 bp) on the first exon of *Cm-eIF4E* in the transient expression system. Besides, this deletion could be rapidly detected by using the nested polymerase chain reaction (PCR) and PCR. These methods can significantly reduce the required staffing, time and costly processes in contrast to TA cloning and sequencing analysis for detecting the point mutation induced by using single gRNA CRISPR/Cas9 system. Furthermore, the system established in this study provides a foundation for further progress of the precise new-generation crop breeding platform.

**Key words:** Protoplast, Genomic editing, Dual gRNA, *Cm-eIF4E*.

---

Received: March 22, 2021; Accepted: June 2, 2021.

\* Corresponding author, e-mail: yousc\_1@tari.gov.tw; dagin@tari.gov.tw

<sup>1</sup> Assistant Research Fellows, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.

<sup>2</sup> Contract Assistant Research Fellow, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.

<sup>3</sup> Project Assistant, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.

<sup>4</sup> Contract Associate Research Fellow, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.