



毛竹不同截短U3启动子的克隆及表达分析

凡惠金^{1,2}, 金康鸣¹, 卓仁英¹, 乔桂荣^{1*}

¹中国林业科学研究院亚热带林业研究所, 杭州 311400; ²南京林业大学, 南京 210037

摘要 具有明确转录起始位点的U3和U6启动子是CRISPR/Cas9技术中驱动sgRNA转录的重要元件。从毛竹(*Phyllostachys edulis*)中克隆了2个PeU3启动子, 均进行了3个不同长度的截短, 长度分别为550、397和149 bp及561、392和152 bp; 并分别构建6个启动子驱动的GUS及LUC植物表达载体, 再利用农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)介导法分别转化麻竹(*Dendrocalamus latiflorus*)愈伤组织和烟草(*Nicotiana benthamiana*)叶片。结果显示, 这些PeU3启动子总体都具有转录活性, 不同PeU3启动子以及同一PeU3启动子不同截短时其转录活性不同, 其中长度为397 bp的PeU3-1-2pro启动子活性最强, 可为构建竹子CRISPR/Cas9基因组编辑体系提供更多理想的内源启动子。

关键词 基因组编辑, LUC活性, PeU3启动子, 毛竹

凡惠金, 金康鸣, 卓仁英, 乔桂荣 (2020). 毛竹不同截短U3启动子的克隆及表达分析. 植物学报 55, 299–307.

竹子是重要的森林资源之一, 具有分布广、生长快、用途多、生态和经济价值高等特点。毛竹(*Phyllostachys edulis*)基因组测序的完成极大地推动了竹类植物分子生物学的发展(Peng et al., 2013; Zhao et al., 2018)。近年来, 研究人员先后在竹子鞭芽发育、快速生长、开花及抗逆等方面开展了相关研究(Chen et al., 2015; Ge et al., 2017; Li et al., 2018; Sandhu et al., 2018; 孙建飞等, 2018); 但由于竹子分子生物学的许多研究技术体系还不够成熟, 大量与竹子重要经济性状相关的基因资源还未得到充分研究和利用。基因组编辑技术是一种新近发展起来的对基因组进行定向精确修饰的技术, 主要包括人工核酸酶介导的锌指核酸酶(zinc-finger nucleases, ZFN)、转录激活样效应因子核酸酶(transcription activator-like effector nucleases, TALEN)及RNA引导的CRISPR/Cas核酸酶(clustered regularly interspaced short palindromic repeat, CRISPR)技术(Bibikova et al., 2003; Bedell et al., 2012; Cong et al., 2013)。基因组编辑技术在基础研究和作物遗传改良等方面展示出巨大的潜力, 其中第3代基因组编辑技术(如CRISPR/Cas9)拥有其它基因组编辑技术无可比拟的

优势, 与导向RNA (single guide RNA)结合的Cas9蛋白不仅能发挥识别的作用, 还可以行使切割功能, 靶向特定位点, 操作简单高效, 还可针对多个靶点同时进行编辑(Garneau et al., 2010; Jinek et al., 2012; Cong et al., 2013; Ma et al., 2015)。目前, CRISPR/Cas9系统作为一种高效的基因定点编辑技术, 已成功应用于拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、水稻(*Oryza sativa*)、玉米(*Zea mays*)、小麦(*Triticum aestivum*)、烟草(*Nicotiana benthamiana*)以及杨树(*Populus simonii*)等植物(Liang et al., 2017; Lee et al., 2018; Zhang et al., 2018; Bruegmann and Fladung, 2019; Papikian et al., 2019; Ren et al., 2019); 在竹子中也首次实现了对麻竹(*Dendrocalamus latiflorus*)八氢番茄红素合酶(phytoene synthase)基因PSY1的成功编辑(Ye et al., 2020)。

具有明确转录起始位点的U3和U6启动子是CRISPR/Cas9技术中驱动sgRNA转录的重要元件; 其转录起始位点分别为A和G, 且转录活性较高。选择具有明确起始位点的U3或U6启动子, 能精确引导sgRNA的转录从而减少无关DNA转录带来的脱靶效应(Li et al., 2007; Belhaj et al., 2013; Cong et al.,

收稿日期: 2019-11-07; 接受日期: 2020-03-24

基金项目: 中国林业科学研究院中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(No.CAFYBB2020ZB004)和浙江省基础公益研究计划(No.LGN18C160007)

* 通讯作者。E-mail: gr_q1982@163.com

2013)。虽然U3和U6启动子已在多个物种基因组编辑系统中得到应用,但相同的U3或U6启动子在同源关系较远的物种间并不一定适用(Wang et al., 2008; Sugano et al., 2014)。而且同一物种基因中往往存在多个U3和U6启动子,其转录效率也不相同,有些多位点基因编辑载体的构建需要多种U3和U6启动子。因此,克隆出更多的植物内源U3/U6启动子,有利于CRISPR/Cas9基因组编辑系统的完善。Ye等(2020)利用麻竹原生质体系统比较了3个水稻U6启动子(*OsU6a/OsU6b/OsU6c*)之间的编辑效率,发现*OsU6*的编辑效率更高,那么利用竹子内源U3/U6启动子是否会带来更精准且高效的编辑?鉴于此,本研究从毛竹中克隆了2种U3启动子,并将其进行不同长度的截短,构建相应的*GUS*及*LUC*表达载体,利用农杆菌介导转化法侵染麻竹愈伤组织及烟草叶片,通过*GUS*染色、活体成像及*LUC*活性测定,验证不同截短U3启动子的转录活性,以期构建竹子CRISPR/

Cas9基因组编辑体系提供更多理想的内源启动子。

1 材料与方法

1.1 实验材料

毛竹(*Phyllostachys edulis* (Carr.) Mitford)叶片来自本实验室培养的实生苗,麻竹(*Dendrocalamus latiflorus* Munro)愈伤组织和本氏烟(*Nicotiana benthamiana* L.)均由本实验室培养。大肠杆菌(*Escherichia coli*)感受态细胞TOP10、根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*) EHA105、植物表达载体pCambia1301及pGreenII0800-LUC均由本实验室保存。

1.2 毛竹PeU3启动子的克隆

利用毛竹基因组在NCBI网站进行blast,获得多个U3 *snRNA*序列,并对其启动子元件分析,然后设计并合成引物(表1)。以毛竹叶片基因组DNA为模板,扩

表1 本研究中所使用的引物序列

Table 1 Primer sequences used in this study

| Primer name | Sequences (5'-3') |
|-----------------|--|
| PeU3-1 | F: ATCCGCCCTGGTTGCTCTA R: CAAGCCGTTAATCACGCTCTGG |
| PeU3-2 | F: TCAGCGTTGACCTCCTCTTG R: TGGCACGAAATGGGATGAAG |
| 1301-PeU3-1-1-F | F: GACCTGCAGGCATGCAAGCTTTCAGCGTTGACCTCCTCTT R: TTTACCCTCAGATCTACCATTGCTGAGTAGCGCAGGGCTC |
| 1301-PeU3-1-2-F | F: GACCTGCAGGCATGCAAGCTCAGGTCATAAGATGGAAGCT R: TTTACCCTCAGATCTACCATTGCTGAGTAGCGCAGGGCTC |
| 1301-PeU3-1-3-F | F: GACCTGCAGGCATGCAAGCTCAGCCCATACGAAAGTGATT R: TTTACCCTCAGATCTACCATTGCTGAGTAGCGCAGGGCTC |
| 1301-PeU3-2-1-F | F: GACCTGCAGGCATGCAAGCTCCCTAGTGATGCCTTAAAGC R: TTTACCCTCAGATCTACCATTGCATCAATGCTCCAAAGCT |
| 1301-PeU3-2-2-F | F: GACCTGCAGGCATGCAAGCTATGGTATTCTGTTGCGGACT R: TTTACCCTCAGATCTACCATTGCATCAATGCTCCAAAGCT |
| 1301-PeU3-2-3-F | F: GACCTGCAGGCATGCAAGCTTGGCCTTTTTCATGGAGCCG R: TTTACCCTCAGATCTACCATTGCATCAATGCTCCAAAGCT |
| LUC-PeU3-1-1-F | F: TCGACGGTATCGATAAGCTTTTCAGCGTTGACCTCCTCTT R: GCTCTAGAACTAGTGGATCCTGCTGAGTAGCGCAGGGCTC |
| LUC-PeU3-1-2-F | F: TCGACGGTATCGATAAGCTTCAGGTCATAAGATGGAAGCT R: GCTCTAGAACTAGTGGATCCTGCTGAGTAGCGCAGGGCTC |
| LUC-PeU3-1-3-F | F: TCGACGGTATCGATAAGCTTCAGCCCATACGAAAGTGATT R: GCTCTAGAACTAGTGGATCCTGCTGAGTAGCGCAGGGCTC |
| LUC-PeU3-2-1-F | F: TCGACGGTATCGATAAGCTTATCCGCCCTGTTGCTCTA R: GCTCTAGAACTAGTGGATCCTGCATCAATGCTCCAAAGCT |
| LUC-PeU3-2-2-F | F: TCGACGGTATCGATAAGCTTATGGTATTCTGTTGCGGACT R: GCTCTAGAACTAGTGGATCCTGCATCAATGCTCCAAAGCT |
| LUC-PeU3-2-3-F | F: TCGACGGTATCGATAAGCTTTGGCCTTTTTCATGGAGCCG R: GCTCTAGAACTAGTGGATCCTGCATCAATGCTCCAAAGCT |

下划线部分为载体接头序列。Underlined sequences are the parts of carrier connectors.

增*PeU3-1*和*PeU3-2*启动子全长。扩增体系及反应程序参照Phanta EVO HS Super-Fidelity DNA Polymerase (Cat No.P504)说明书。扩增产物经凝胶电泳检测后回收、纯化目的片段, 然后进行连接, 转化大肠杆菌感受态细胞。利用载体通用引物M13F/R进行菌液PCR和测序。

1.3 植物表达载体的构建

根据*PeU3*启动子序列(经测序验证正确), 各设计3对截短引物(表1), 并以此为模板, 用EVO酶扩增含有不同截短长度的*PeU3*启动子片段。同时, 用HindIII和NcoI双酶切植物表达载体pCAMBIA1301, 用HindIII和BamHI双酶切载体pGreenII0800-LUC。分别回收目的片段, 经同源重组连接。重组质粒经菌液PCR和测序后, 得到不同截短的*PeU3pro::GUS*和*PeU3pro::LUC*表达载体(图1)。通过电击法将载体转入农杆菌EHA105, 用于后续侵染麻竹愈伤组织和烟草叶片。

1.4 农杆菌介导法侵染烟草叶片和麻竹愈伤组织

利用农杆菌将不同截短长度启动子载体*PeU3-pro::GUS*和阳性对照*35Spro::GUS*导入烟草叶片,

培养2天后将叶片剪下, 加入适量的GUS染色剂, 抽真空10分钟后暗培养。具体操作参照GUS染色液(即用型)(北京雷根, Cat No.DP0013)说明书。

通过农杆菌介导法用上述载体侵染麻竹愈伤组织, 共培养3天后转入含有潮霉素的筛选培养基上。继续培养2个月后获得抗性愈伤组织, 以未转化愈伤组织为阴性对照进行GUS染色。

1.5 不同截短*PeU3pro::LUC*在烟草叶片中的瞬时表达

利用农杆菌转化法将不同截短长度启动子载体*PeU3-pro::LUC*导入烟草叶片, 然后分别通过植物活体分子成像系统和荧光发光检测仪测定荧光强度和荧光值。具体方法参考陈香嵩等(2018)的外源蛋白在烟草叶片瞬时表达以及双荧光素酶系统实验操作步骤。

2 结果与讨论

2.1 *PeU3*启动子扩增产物的鉴定

从毛竹中成功扩增出*PeU3-1*和*PeU3-2*启动子, 长度分别为675和688 bp, 经PCR检测与预期的目的片段大小相符, 测序比对后证实扩增序列为预期的启动子

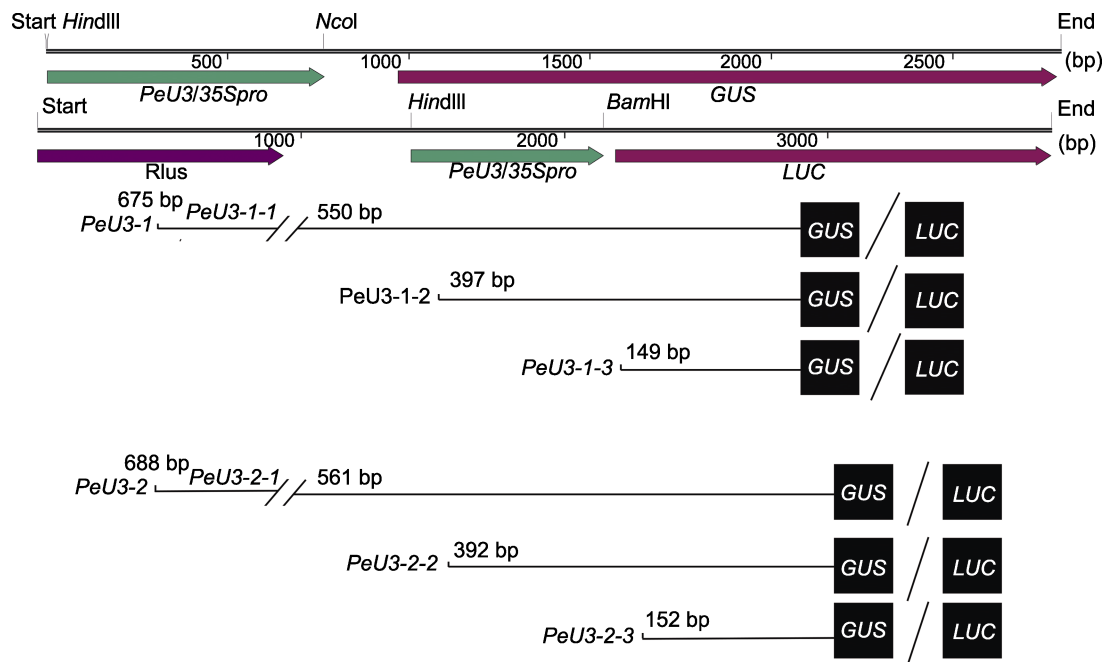


图1 不同截短*PeU3*启动子驱动报告基因*GUS/LUC*的表达载体构建

Figure 1 Construction of expression vectors with *GUS/LUC* reporter gene driven by different truncated *PeU3* promoters

序列。

以测序正确的*PeU3-1*和*PeU3-2*启动子质粒为模板,成功扩增出6个不同截短的启动子片段(图2),分别为*PeU3-1-1pro* (550 bp)、*PeU3-1-2pro* (397 bp)、*PeU3-1-3pro* (149 bp)、*PeU3-2-1pro* (561 bp)、*PeU3-2-2pro* (392 bp)和*PeU3-2-3pro* (152 bp)。经PCR检测后与预期的目的片段大小相符,测序证实为预期的启动子序列。

2.2 *PeU3*启动子序列分析

将本研究已克隆的2个*PeU3*启动子与水稻*OsU3*启

动子序列进行比对,发现毛竹*PeU3*启动子区域也包含RNA聚合酶III转录所需要的USE元件和TATA框,二者分别位于-60 bp、-30 bp, TSS为*PeU3 snRNA*转录起始位点(图3)。

2.3 不同截短*PeU3pro::GUS*和*PeU3pro::LUC*表达载体的构建

将不同截短*PeU3*启动子序列分别与植物表达载体pCambia1301及pGreenII0800-LUC进行同源重组,经PCR检测后与预期的目的片段大小相符,则表明不同截短的*PeU3*启动子与表达载体pCambia1301

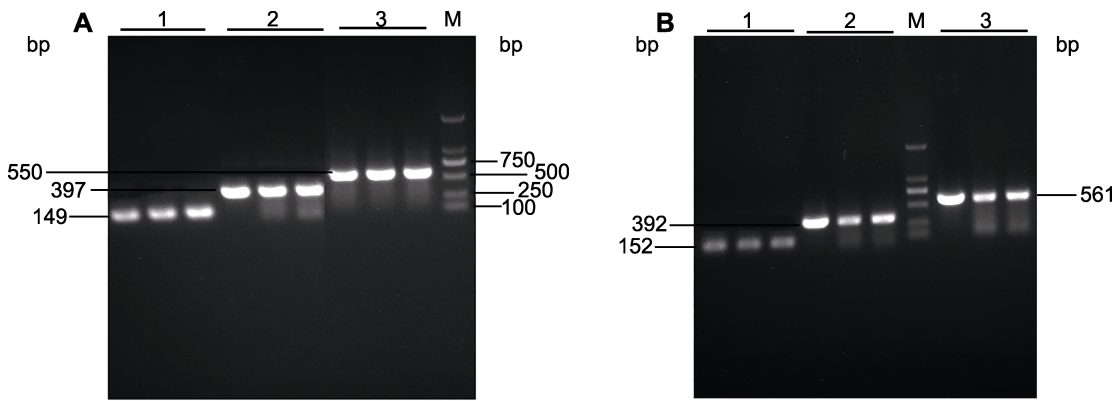


图2 6个不同截短*PeU3*启动子片段的扩增产物电泳检测 (A) 以*PeU3-1*启动子质粒为模板进行扩增(1: *PeU3-1-3pro*; 2: *PeU3-1-2pro*; 3: *PeU3-1-1pro*); (B) 以*PeU3-2*启动子质粒为模板进行扩增(1: *PeU3-2-3pro*; 2: *PeU3-2-2pro*; 3: *PeU3-2-1pro*). M: 2 kb DNA marker

Figure 2 PCR analysis of six truncated *PeU3* promoters (A) Amplification using *PeU3-1* promoter plasmid as template (1: *PeU3-1-3pro*; 2: *PeU3-1-2pro*; 3: *PeU3-1-1pro*); (B) Amplification using *PeU3-2* promoter plasmid as template (1: *PeU3-2-3pro*; 2: *PeU3-2-2pro*; 3: *PeU3-2-1pro*). M: 2 kb DNA marker

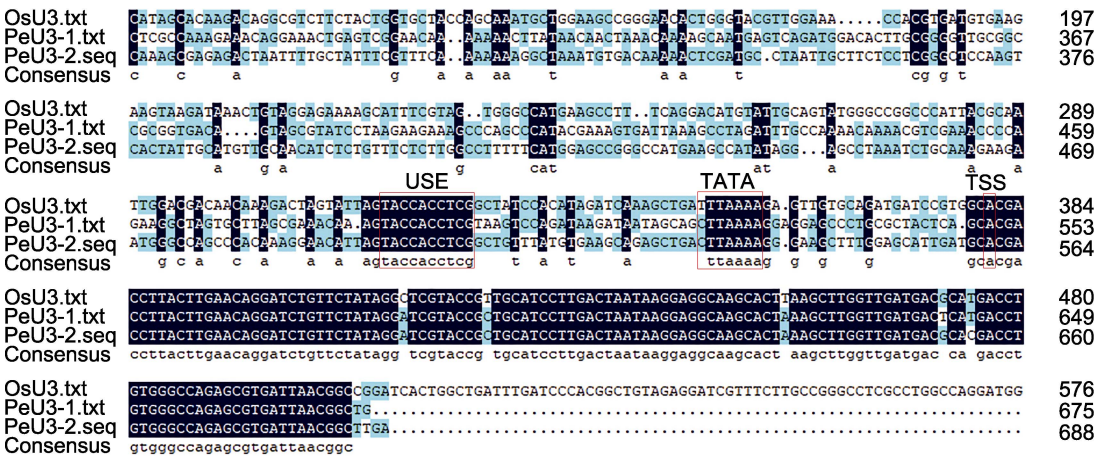


图3 *PeU3*启动子序列分析
Figure 3 Sequence analysis of *PeU3* promoters

及pGreenII0800-LUC构建成功。

2.4 不同截短 *PeU3-1*和*PeU3-2*启动子活性分析

将不同截短 *PeU3-1*和*PeU3-2*启动子进行GUS活性分析。结果表明, 在所有处理中, 除阴性对照未被染色外, 其余叶片和愈伤组织均被染成浅蓝色(图4A, B), 说明6个不同截短的*PeU3-1*和*PeU3-2*启动子均能驱动 *GUS* 基因的表达。其中, 阳性对照 35Sp-

*ro::GUS*染色最深, 不同启动子及其不同截短序列之间相比, 染色深浅程度无法明显辨别。

2.5 不同截短 *PeU3pro::LUC*的瞬时表达分析

经活体成像(图5A, B)和LUC活性(图5C)测定后发现, 35S*pro::LUC*活性最强, 其次是*PeU3-1-2pro::LUC*、*PeU3-1-3pro::LUC*、*PeU3-2-3pro::LUC*、*PeU3-1-1pro::LUC*、*PeU3-2-2pro::LUC*和*PeU3-2-1pro::LUC*,

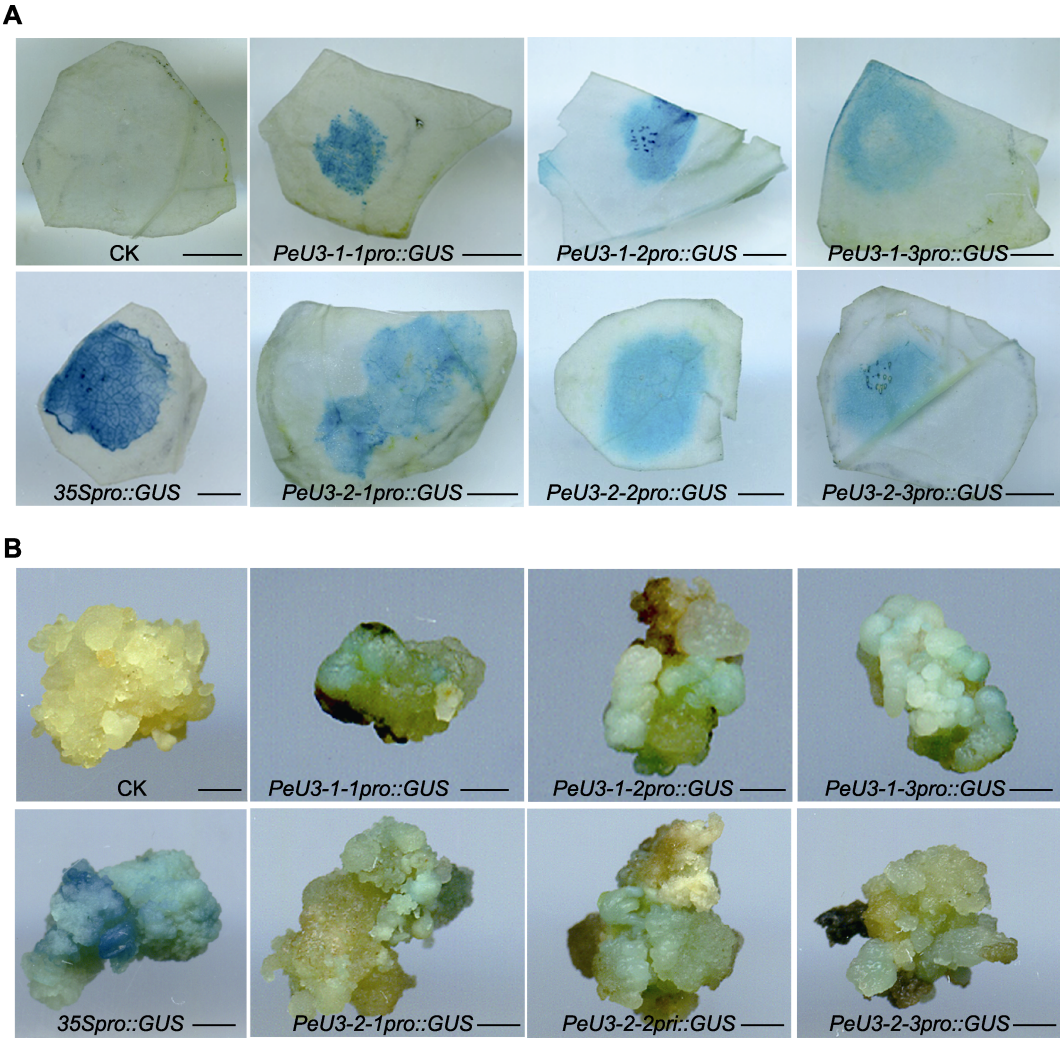


图4 不同截短 *PeU3*启动子驱动*GUS*表达
(A) 不同截短 *PeU3*启动子驱动*GUS*在烟草叶片中的瞬时表达(Bars=5 mm); (B) 不同截短 *PeU3*启动子驱动*GUS*在麻竹愈伤组织中的表达(Bars=5 mm)。CK: 阴性对照

Figure 4 *GUS* expression driven by different truncated *PeU3* promoters
(A) Transient expression of *GUS* gene driven by different truncated *PeU3* promoters in the leaves of *Nicotiana benthamiana* (Bars=5 mm); (B) Expression of *GUS* gene driven by different truncated *PeU3* promoters in the callus of *Dendrocalamus latiflorus* (Bars=5 mm). CK: Negative control

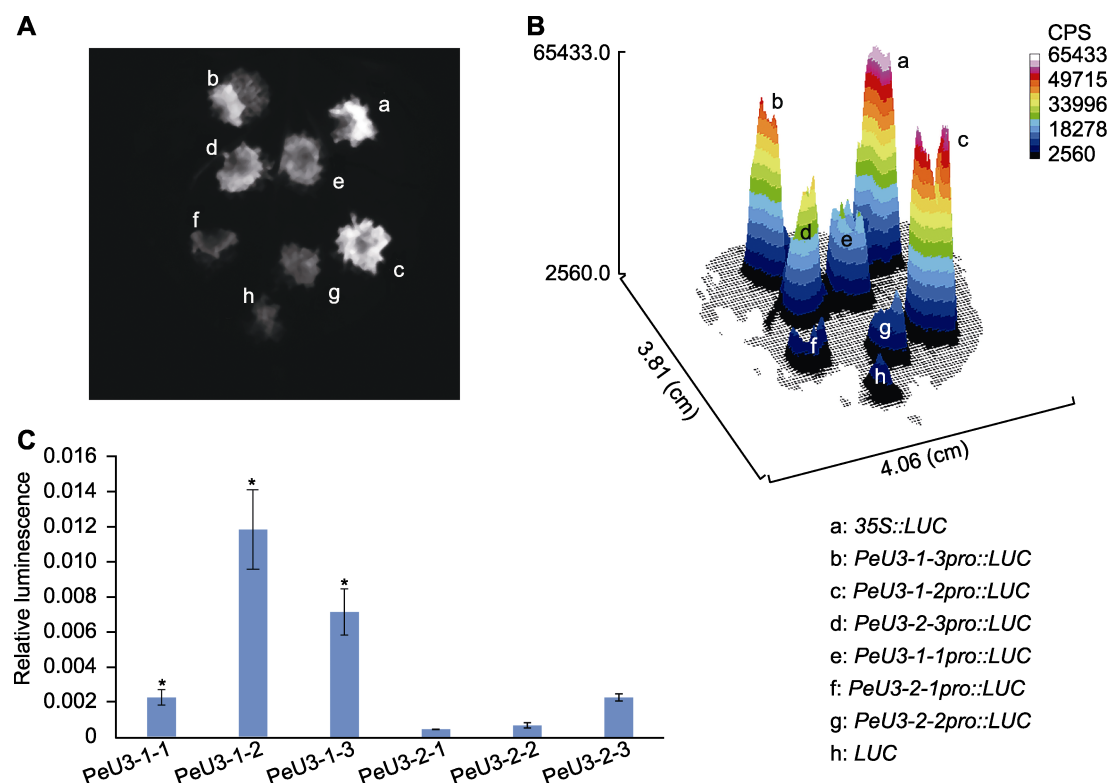


图5 不同截短*PeU3*启动子驱动*LUC*在烟草叶片中的瞬时表达

(A), (B) *PeU3*启动子在烟草叶片中的瞬时表达*LUC*荧光图; (C) *PeU3*启动子在烟草叶片中的瞬时表达*LUC*相对活性(每个实验均设4个生物学重复。* 表示Duncan法检测时在 $P<0.05$ 水平差异显著); CPS: 荧光强度

Figure 5 *LUC* expression driven by different truncated *PeU3* promoters in the leaves of *Nicotiana benthamiana*

(A), (B) Transient expression *LUC* assays illustrating the activation of *PeU3* promoter in leaves of *N. benthamiana*; (C) The quantification of the relative luminescence intensities (In each experiment, four biological replications were performed with quantification. Asterisk above the bars denote significant differences determined by the Duncan's test, $P<0.05$); CPS: Luminescence intensity

阴性对照*LUC*活性最弱。

2.6 讨论

CRISPR/Cas9系统最初在细菌中发现,该系统对靶DNA进行切割时仅需1个Cas蛋白和2个RNA元件即可实现(Jinek et al., 2012)。该技术因操作简单、突变率高、成本低等优势而快速发展,为基因功能研究及作物遗传改良做出了巨大贡献。利用U3或U6启动子建立CRISPR/Cas9的基因组编辑系统已应用于多种植物(Charrier et al., 2019; Doll, 2019; Nandy et al., 2019; Zhang et al., 2019)。虽然Ye等(2020)利用水稻U6启动子建立了麻竹基因组编辑体系,但目前关于竹子内源U3/U6启动子的研究还未见报道。因此,本研究从毛竹中克隆了2种*PeU3*启动子,分析发现其

含有比较保守的USE元件和TATA框,与水稻的*OsU3*启动子类似。在玉米、番茄(*Lycopersicon esculentum*)及小麦的U3启动子中也发现了这2个保守元件(Marshallsay et al., 1992; 李丽莉等, 2005; Liang et al., 2014),这表明本研究克隆出的2个毛竹*PeU3*启动子可能具有转录活性。

利用CRISPR/Cas9基因组编辑载体系统时,由于酶切位点的选择限制,在保证启动子具有高转录活性的基础上,长度较短的U3/U6启动子更有利于载体构建,因此克隆有效截短的毛竹U3启动子非常必要。雷建峰等(2016b)将不同截短的*GbU3*启动子驱动的*GUS*基因转化棉花(*Gossypium barbadense*)愈伤组织,结果表明同一*GbU3*启动子不同截短后其转录活性相同;但是在验证*GbU6*启动子的转录活性时,结

果显示更短的U6启动子转录活性更高(雷建峰等, 2016a)。李继洋等(2018)利用雷建峰等(2016a)已验证具有活性的2个U6启动子建立了棉花CRISPR/Cas9基因编辑技术体系, 在新海16胚性愈伤组织中成功实现基因的靶向编辑; 藏旭阳等(2019)利用上述棉花内源U3-2P和U6-7P启动子均能有效驱动 $sgRNA$ 的转录, 实现CRISPR/Cas9介导的棉花基因组靶向编辑。本研究对已克隆的2个 $PeU3$ 启动子进行有效截短, 首先在烟草中进行预实验, 通过烟草瞬时表达系统证实毛竹U3启动子也能够启动 GUS 基因的表达; 而后经农杆菌介导法侵染麻竹愈伤组织, GUS 染色结果显示不同截短的 $PeU3$ 启动子均能驱动 GUS 基因的表达, 说明这2种启动子都具有转录活性, 但同一启动子截短后其染色深浅差异是否显著无法辨别。因此, 我们进一步通过农杆菌注射烟草叶片, 然后测定LUC相对活性来比较不同长度启动子的瞬时转录活性; 结果表明, 克隆的2种U3启动子不同截短序列均能够启动报告基因 LUC 的表达, 总体上 $PeU3-1$ 启动子比 $PeU3-2$ 启动子活性更强, 长度为397 bp的 $PeU3-1-2pro$ 活性最强, 而 $PeU3-2$ 启动子长度越短活性越强。蒲艳等(2019)在番茄中验证启动子转录活性时, 克隆的U3启动子长度在250 bp以内仍具有转录活性, Nekrasov等(2013)在基因组编辑技术研究中使用的U6启动子长度为79 bp, 这均暗示U3启动子或许也可以进一步截短。为了多位点基因编辑载体的构建, 是否仅保留U3启动子的USE元件和TATA框就可以达到理想的转录活性还有待深入研究。

本研究克隆了6个毛竹不同截短且具有转录活性的 $PeU3$ 启动子, 经 GUS 染色、植物活体分子成像及LUC相对荧光值测定, 发现不同 $PeU3$ 启动子以及同一 $PeU3$ 启动子不同截短时其转录活性并不相同, 其中长度为397 bp的 $PeU3-1-2pro$ 启动子活性最强。研究结果可为竹子基因组编辑技术提供更多理想的内源启动子。

参考文献

- 陈香嵩, 李甜甜, 周少立, 赵毓 (2018). 外源蛋白在烟草叶片瞬时表达. *BioProtoc* doi: 10.21769/BioProtoc.1010127.
- 雷建峰, 李月, 徐新霞, 阿尔祖古丽·塔什, 蒲艳, 张巨松, 刘晓东 (2016a). 棉花不同GbU6启动子截短克隆及功能鉴定. *作物学报* **42**, 675–683.
- 雷建峰, 徐新霞, 代培红, 李继洋, 张巨松, 刘晓东 (2016b). 不同截短U3启动子在棉花中的功能分析. *棉花学报* **28**, 307–314.
- 李继洋, 雷建峰, 代培红, 姚瑞, 曲延英, 陈全家, 李月, 刘晓东 (2018). 基于棉花U6启动子的海岛棉CRISPR/Cas9基因组编辑体系的建立. *作物学报* **44**, 227–235.
- 李丽莉, 扈廷茂, 扈会平, 刘明秋, 苏慧敏 (2005). 利用番茄 $U3snRNA$ 基因上游启动子构建植物表达载体及对烟草的转化. *内蒙古大学学报(自然科学版)* **36**, 63–67.
- 蒲艳, 刘晓东, 阿尔祖古丽·塔什, 魏倩, 刘超 (2019). 番茄不同截短U3启动子的克隆及功能分析. *华北农学报* **34**, 33–39.
- 孙建飞, 翟建云, 马元丹, 傅卢成, 卜柯丽, 王柯杨, 高岩, 张汝民 (2018). 毛竹快速生长期茎秆不同节间光合色素和光合酶活性的差异. *植物学报* **53**, 773–781.
- 藏旭阳, 代培红, 李继洋, 蒲艳, 顾爱星, 刘晓东 (2019). 棉花U3和U6启动子在CRISPR/Cas9基因组编辑体系中的功能鉴定. *棉花学报* **31**, 31–39.
- Bedell VM, Wang Y, Campbell JM, Poshusta TL, Starker CG, Krug II RG, Tan WF, Penheiter SG, Ma AC, Leung AYH, Fahrenkrug SC, Carlson DF, Voytas DF, Clark KJ, Essner JJ, Ekker SC (2012). *In vivo* genome editing using a high-efficiency TALEN system. *Nature* **491**, 114–118.
- Belhaj K, Chaparro-Garcia A, Kamoun S, Nekrasov V (2013). Plant genome editing made easy: targeted mutagenesis in model and crop plants using the CRISPR/Cas system. *Plant Methods* **9**, 39.
- Bibikova M, Beumer K, Trautman JK, Carroll D (2003). Enhancing gene targeting with designed zinc finger nucleases. *Science* **300**, 764–764.
- Brueggemann T, Fladung M (2019). Overexpression of both flowering time genes $AtSOC1$ and $SaFUL$ revealed huge influence onto plant habitus in poplar. *Tree Genet Genomes* **15**, 20.
- Charrier A, Vergen E, Dousset N, Richer A, Petiteau A, Chevreau E (2019). Efficient targeted mutagenesis in apple and first time edition of pear using the CRISPR-Cas9 system. *Front Plant Sci* **10**, 40.
- Chen JR, Shafi M, Li S, Wang J, Wu JS, Ye ZQ, Peng DL, Yan WB, Liu D (2015). Copper induced oxidative stresses, antioxidant responses and phytoremediation potential of Moso bamboo (*Phyllostachys pubescens*). *Sci Rep* **5**, 13554.
- Cong L, Ran FA, Cox D, Lin SL, Barretto R, Habib N, Hsu PD, Wu XB, Jiang WY, Marraffini LA, Zhang F (2013).

- Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* **339**, 819–823.
- Doll NM, Gilles LM, Gérentes MF, Richard C, Just J, Fierle J, Borrelli VMG, Gendrot G, Ingram GC, Rogowsky PM, Widiez T** (2019). Single and multiple gene knockouts by CRISPR-Cas9 in maize. *Plant Cell Rep* **38**, 487–501.
- Garneau JE, Dupuis MÈ, Villion M, Romero DA, Barrangou R, Boyaval P, Fremaux C, Horvath P, Magadán AH, Moineau S** (2010). The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature* **468**, 67–71.
- Ge W, Zhang Y, Cheng ZC, Hou D, Li XP, Gao J** (2017). Main regulatory pathways, key genes and microRNAs involved in flower formation and development of Moso bamboo (*Phyllostachys edulis*). *Plant Biotechnol J* **15**, 82–96.
- Jinek M, Chylinski K, Fonfara L, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E** (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* **337**, 816–821.
- Lee K, Zhang YX, Kleinstiver BP, Guo JA, Aryee MJ, Miller J, Malzahn A, Zarecor S, Lawrence-Dill CJ, Joung JK, Qi YP, Wang K** (2019). Activities and specificities of CRISPR/Cas9 and Cas12a nucleases for targeted mutagenesis in maize. *Plant Biotechnol J* **17**, 362–372.
- Li L, Cheng ZC, Ma YJ, Bai QS, Li XY, Cao ZH, Wu ZN, Gao J** (2018). The association of hormone signaling genes, transcription and changes in shoot anatomy during Moso bamboo growth. *Plant Biotechnol J* **16**, 72–85.
- Li X, Jiang DH, Yong KL, Zhang DB** (2007). Varied transcriptional efficiencies of multiple *Arabidopsis* U6 small nuclear RNA genes. *J Integr Plant Biol* **49**, 222–229.
- Liang Z, Chen KL, Li TD, Zhang Y, Wang YP, Zhao Q, Liu JX, Zhang HW, Liu CM, Ran YD, Gao CX** (2017). Efficient DNA-free genome editing of bread wheat using CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein complexes. *Nat Commun* **8**, 14261.
- Liang Z, Zhang K, Chen KL, Gao CX** (2014). Targeted mutagenesis in *Zea mays* using TALENs and the CRISPR/Cas system. *J Genet Genomics* **41**, 63–68.
- Ma XL, Zhang QY, Zhu QL, Liu W, Chen Y, Qiu R, Wang B, Yang ZF, Li HY, Lin YR, Xie YY, Shen RX, Chen SF, Wang Z, Chen YL, Guo JX, Chen LT, Zhao XC, Dong ZC, Liu YG** (2015). A robust CRISPR/Cas9 system for convenient, high-efficiency multiplex genome editing in monocot and dicot plants. *Mol Plant* **8**, 1274–1284.
- Marshallsay C, Connelly S, Filipowicz W** (1992). Characterization of the U3 and U6 snRNA genes from wheat: U3 snRNA genes in monocot plants are transcribed by RNA polymerase III. *Plant Mol Biol* **19**, 973–983.
- Nandy S, Pathak B, Zhao S, Srivastava V** (2019). Heat-shock-inducible CRISPR/Cas9 system generates heritable mutations in rice. *Plant Direct* **3**, e00145.
- Nekrasov V, Staskawicz B, Weigel D, Jones JDG, Kamoun S** (2013). Targeted mutagenesis in the model plant *Nicotiana benthamiana* using Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nat Biotechnol* **31**, 691–693.
- Papikian A, Liu WL, Gallego-Bartolomé J, Jacobsen SE** (2019). Site-specific manipulation of *Arabidopsis* loci using CRISPR-Cas9 SunTag systems. *Nat Commun* **10**, 729.
- Peng ZH, Lu Y, Li LB, Zhao Q, Feng Q, Gao ZM, Lu HY, Hu T, Yao N, Liu KY, Li Y, Fan DL, Guo YL, Li WJ, Lu YQ, Weng QJ, Zhou CC, Zhang L, Huang T, Zhao Y, Zhu CR, Liu XG, Yang XW, Wang T, Miao K, Zhuang CY, Cao XL, Tang WL, Liu GS, Liu YL, Chen J, Liu ZJ, Yuan LC, Liu ZH, Huang XH, Lu TT, Fei BH, Ning ZM, Han B, Jiang ZH** (2013). The draft genome of the fast-growing non-timber forest species Moso bamboo (*Phyllostachys heterocycla*). *Nat Genet* **45**, 456–461.
- Ren C, Guo YC, Gathunga EK, Duan W, Li SH, Liang ZC** (2019). Recovery of the non-functional *EGFP*-assisted identification of mutants generated by CRISPR/Cas9. *Plant Cell Rep* **38**, 1541–1549.
- Sandhu M, Wani SH, Jiménez VM** (2018). *In vitro* propagation of bamboo species through axillary shoot proliferation: a review. *Plant Cell Tissue Organ Cult* **132**, 27–53.
- Sugano SS, Shirakawa M, Takagi J, Matsuda Y, Shimada T, Hara-Nishimura I, Kohchi T** (2014). CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis in the liverwort *Marchantia polymorpha* L. *Plant Cell Physiol* **55**, 475–481.
- Wang MB, Helliwell CA, Wu LM, Waterhouse PM, Peacock WJ, Dennis ES** (2008). Hairpin RNAs derived from RNA polymerase II and polymerase III promoter-directed transgenes are processed differently in plants. *RNA* **14**, 903–913.
- Ye SW, Chen G, Kohnen MV, Wang WJ, Cai CY, Ding WS, Wu C, Gu LF, Zheng YS, Ma XQ, Lin CT, Zhu Q** (2020). Robust CRISPR/Cas9 mediated genome editing and its application in manipulating plant height in the first generation of hexaploid Ma bamboo (*Dendrocalamus latiflorus* Munro). *Plant Biotechnol J* doi: 10.1111/pbi.13320.
- Zhang JS, Zhang H, Botella JR, Zhu JK** (2018). Genera-

tion of new glutinous rice by CRISPR/Cas9-targeted mutagenesis of the *Waxy* gene in elite rice varieties. *J Integr Plant Biol* **60**, 369–375.

Zhang ZZ, Hua L, Gupta A, Tricoli D, Edwards KJ, Yang B, Li WL (2019). Development of an *Agrobacterium*-delivered CRISPR/Cas9 system for wheat genome editing. *Plant Biotechnol J* **17**, 1623–1635.

Zhao HS, Gao ZM, Wang L, Wang JL, Wang SB, Fei BH, Chen CH, Shi CC, Liu XC, Zhang HL, Lou YF, Chen LF, Sun HY, Zhou XQ, Wang SN, Zhang C, Xu H, Li LC, Yang YH, Wei YL, Yang W, Gao Q, Yang HM, Zhao SC, Jiang ZH (2018). Chromosome-level reference genome and alternative splicing atlas of Moso bamboo (*Phyllostachys edulis*). *Gigascience* **7**, giy115.

Cloning and Expression Analysis of Different Truncated U3 Promoters in *Phyllostachys edulis*

Huijin Fan^{1,2}, Kangming Jin¹, Renying Zhuo¹, Guirong Qiao^{1*}

¹The Research Institute of Subtropical Forestry, Chinese Academy of Forestry, Hangzhou 311400, China

²Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China

Abstract The U3 and U6 promoters with well-defined transcription initiation sites are important elements driving *sgRNA* transcription in the CRISPR/Cas9 genome editing system. According to the two sequences of *PeU3* promoter cloned from *Phyllostachys edulis*, six different truncated U3 promoters were successfully cloned and were 550 bp, 397 bp, 149 bp, and 561 bp, 392 bp, 152 bp, respectively in length. *GUS* and *LUC* expression vectors were constructed by corresponding truncated promoter and transformed into the callus of *Dendrocalamus latiflorus* and tobacco leaf by the *Agrobacterium*-mediated method, respectively. Our results indicate that, all of these U3 promoters have different transcriptional activity, and the *Peu3-1-2pro* promoter with a length of 397 bp has the strongest activity. It provides more ideal endogenous promoters for constructing CRISPR/Cas9 genome editing system of *P. edulis*.

Key words genome editing, *LUC* activity, *PeU3* promoter, *Phyllostachys edulis*

Fan HJ, Jin KM, Zhuo RY, Qiao GR (2020). Cloning and expression analysis of different truncated U3 promoters in *Phyllostachys edulis*. *Chin Bull Bot* **55**, 299–307.

* Author for correspondence. E-mail: gr_q1982@163.com

(责任编辑: 朱亚娜)