



2024年第25期总377期

## 农业生物技术专题

### 本期导读

#### ▶ 学术文献

1. 博德研究所与明尼苏达大学实现超大片段基因插入哺乳动物细胞
2. 南京农大构建梨T2T基因组和泛基因组图谱
3. 布鲁克海文实验室通过CRISPR打造超级油料作物
4. 密苏里大学哥伦比亚分校利用单细胞测序分析大豆
5. 以色列魏茨曼研究所通过基因组学等揭示致幻剂梅斯卡灵合成途径

中国农业科学院农业信息研究所

联系人：周诚昊；顾亮亮

联系电话：010-82109850

邮箱：[agri@ckcest.cn](mailto:agri@ckcest.cn)

2024年6月17日

更多资讯 尽在农业专业知识服务系统：<http://agri.nais.net.cn/>

## 学术文献

### 1. 博德研究所与明尼苏达大学实现超大片段基因插入哺乳动物细胞

**简介:** 2024年6月10日, Nature Biomedical Engineering在线发表了博德研究所David R. Liu和明尼苏达大学医学院Mark J. Osborn团队合作的最新研究进展: ‘Efficient site-specific integration of large genes in mammalian cells via continuously evolved recombinases and prime editing’, 本文通过进化的重组酶结合Prime Editor在哺乳动物细胞中实现大片段基因的高效位点特异性整合。称之为PASSIGE (prime-editing-assisted site-specific integrase gene editing) 技术, 其可精确整合大于10kb的DNA片段。通过噬菌体辅助连续进化 (PACE) 和非连续进化 (PANCE) 方法, 研究团队对Bxb1重组酶进行了进化和改造, 生成了具有更高整合效率的变体evoBxb1和eeBxb1。它们能够在人类细胞系中显著提高供体DNA的整合效率, 高达60%, 远高于野生型Bxb1的整合效率。这些变体在预安装了重组酶着陆位点的人类细胞系中表现出显著的整合效率提升。在单次转染实验中, 使用eeBxb1的PASSIGE在安全港和治疗相关位点实现了平均23%的靶向基因整合效率, 比野生型Bxb1高出4.2倍。在原代人类成纤维细胞中, 整合效率在多个位点超过了30%。PASSIGE技术在多种基因整合位点上的表现均优于PASTE (programmable addition via site-specific targeting elements) 技术。evoBxb1和eeBxb1变体的PASSIGE分别比PASTE高出9.1倍和16倍。通过连续进化和工程改造, Bxb1重组酶引入了多个突变位点, 从而显著提升了其在哺乳动物细胞中进行大基因整合的效率。evoBxb1: 引入突变点为V74A, 在Bxb1重组酶的N端结构域 (NTD) 中引入的单一突变。eeBxb1: V74A, 同样在NTD中引入的突变; E229K, 在C端结构域-a (CTD-a) 中引入的突变; V375I, 在C端结构域-b (CTD-b) 中引入的突变。这些突变的组合 (特别是V74A、E229K和V375I) 在eeBxb1中共同作用, 显著提高了重组酶的整合效率。研究表明, 这些突变可能通过优化活性位点构象或提高蛋白质稳定性来增强重组酶的活性。对比评估PASSIGE, evoPASSIGE, eePASSIGE和PASTE介导的定点插入能力。测试的基因位点包括与多种遗传疾病相关的基因, 如CFTR (囊性纤维化)、GBA1 (高雪氏病和帕金森病)、COL7A1 (营养不良性大疱性表皮松解症) 等。在HEK293T和N2a细胞中, 利用PASSIGE、evoPASSIGE、eePASSIGE和PASTE技术, 整合一个5.6 kb的DNA供体到上述治疗相关位点。结果显示, evoPASSIGE和eePASSIGE在所有测试的八个治疗相关位点上均表现出显著的整合效率提升。在这些位点上, eePASSIGE的平均整合效率达到22%, evoPASSIGE达到17%, 而传统的PASSIGE仅为7.8%, PASTE为3.8%。在某些位点 (如AAVS1、ACTB和FANCA), eePASSIGE的整合效率超过30%。其他位点 (如B2M、GBA1、COL7A1、CFTR、Snn1、CCR5和ALB) 的整合效率也超过20%。平均而言, evoPASSIGE和eePASSIGE相较于PASSIGE分别提高了2.7倍和4.2倍的整合效率。相较于PASTE, PASSIGE、evoPASSIGE和eePASSIGE分别提高了3.3倍、9.1倍和16.2倍的整合效率。(图2) 通过高通量测序 (HTS) 评估整合后的基因组结果, 发现evoPASSIGE和eePASSIGE的重组效率分别为59%和73%, 显著高于PASSIGE的19%。这些结果表明, evoPASSIGE和eePASSIGE在多种治疗相关位点上均表现出高效的基因整合能力。这些改进后的PASSIGE变体在治疗相关基因位点上的高效整合, 为未来的基因治疗应用提供了强有力的工具。本文通过优化和发展PASSIGE技术, 突破了哺乳动物细胞基因组大片段定点整合效率的瓶颈, 显著提升了大基因片段在哺乳动物细胞中的整合效率和精确度, 为基因编辑、基因治疗和生物技术的应用提供了重要的技术支持和实验依据。

来源: Nature Biomedical Engineering

发布日期:2024-06-10

全文链接:

<http://agri.nais.net.cn/file1/M00/03/6F/Csgk0WZrot6ARpnUADDbE9SoK1A693.pdf>

## 2. 南京农大构建梨T2T基因组和泛基因组图谱

**简介:** 2024年6月10日, Plant Communications在线发表了南京农业大学张绍铃院士团队题为“Haplotype-resolved T2T genome assemblies and pangenome graph of pear reveal diverse patterns of allele-specific expression and genomic basis of fruit quality traits”的研究论文。该研究基于亲本的遗传信息组装了两个杂交选育的梨品种‘玉露香梨’(YLX)和‘红香酥’(HXS)的单倍型T2T基因组,并构建了首个梨泛基因组图谱,揭示了等位基因特异性表达对杂种优势和果实品质性状形成的贡献。首先,该研究基于亲本遗传信息将上述两个品种的二倍体基因组准确分型,首次组装出两套与亲本对应的梨单倍型T2T基因组。研究团队基于单倍型基因组鉴定了全基因组水平的等位基因,进一步将不同组织和果实,不同发育阶段的RNA-seq数据进行分型和定量,在两个杂交种中分别鉴定出大约6000个差异表达的等位基因(ASE),这些基因在不同组织和果实发育阶段显示出不同的表达模式,表现为ASE基因的编码区和启动子区序列差异显著高于非ASE基因,ASE基因的启动子区域比非ASE基因富集了更多的转座子序列,这表明转座子可能通过改变基因表达调控网络,影响等位基因的特异性表达。接着,利用新组装的分型基因组和已发表的梨基因组,研究团队构建了梨的泛基因组图。该图谱揭示了在梨种群中的结构变异(SV)热点区域,并为高分辨率的等位基因发现和基于泛基因组的全基因组关联分析提供了可能,发现了更多先前研究并未揭示的驯化选择区域。最后,研究团队发现梨Ma1等位基因在群体中的PAV变异与果实有机酸含量变化密切相关。该基因在两个杂交品种(YLX和HXS)的父本单倍体中缺失,导致其表现出单亲表达(SPE)的现象。进一步结合泛基因组图谱和群体信息,发现Ma1等位基因完全缺失的栽培品种有机酸含量显著低于只有一个Ma1等位基因缺失的品种有机酸含量,而Ma1等位基因部分缺失的品种有机酸含量显著低于Ma1等位基因全部都存在的品种的有机酸含量。该研究为解析梨杂种优势和优异品质形成机制提供了重要参考。同时,该研究构建的梨泛基因组为结构变异挖掘和全基因组关联分析提供了宝贵数据资源。

来源: Plant Communications

发布日期:2024-06-10

全文链接:

<http://agri.nais.net.cn/file1/M00/10/41/Csgk0GZrnnOAKBJKAMtK5dgYoAM619.pdf>

## 3. 布鲁克海文实验室通过CRISPR打造超级油料作物

**简介:** 2024年6月10日, Plant Biotechnology Journal (IF: 13.8)在线发表了布鲁克海文实验室John Shanklin、Xiao-Hong Yu团队的最新研究成果:‘Creating yellow seed *Camelina sativa* with enhanced oil accumulation by CRISPR-mediated disruption of Transparent Testa 8’,本文通过CRISPR/Cas9技术改造亚麻荠,旨在创建具有增强油脂积累的黄色种子品种。作者确定了亚麻荠基因组中的三个TT8同源基因,其是一个参与调控类黄酮合成和种子颜色形成的转录因子编码基因。通过CRISPR介导的基因编辑方法在这些基因上引入了移码突变。TT8基因的破坏导致种子颜色从棕色转变为黄色,这与类黄酮含量减少

更多资讯 尽在农业专业知识服务系统:<http://agri.nais.net.cn/>

高达44%以及种子外皮粘液层结构改变有关。这一发现表明，TT8基因的功能丧失不仅影响了色素沉积，还影响了种子的物理特性。转录组分析显示，与脂肪酸合成相关的转录因子LEC1、LEC2、FUS3和WRI1及其下游目标的表达显著增加。这些变化导致代谢重构，增加了脂肪酸合成率，并相应地增加了总脂肪酸(TFA)积累，从32.4%增加到高达38.0%的种子重量，并且三酰甘油(TAG)产量增加了21%以上，与亲本系相比，淀粉或蛋白质水平没有显著变化。通过CRISPR/Cas9技术敲除CsTT8基因，不仅增加了亚麻荠种子中的总脂肪酸和三酰甘油含量，还改变了脂肪酸的组成，特别是增加了单不饱和脂肪酸的比例。基因编辑前后亚麻荠种子中总脂肪酸(TFA)的含量变化。图1 a可以看到，在野生型(WT)种子中，TFA含量为32.4%。而在CsTT8基因敲除后的种子中，TFA含量显著增加，三个不同的突变系分别增加到37.5%，38.0%，和36.1%。基因编辑对种子中三酰甘油(TAG)含量的影响。图1 b可以看到，在野生型种子中，TAG含量为28.5%。敲除CsTT8基因后，TAG含量增加至最高34.6%，表明基因编辑显著提高了种子的油脂含量。编辑CsTT8基因后，观察到18:1(油酸)和18:2(亚油酸)脂肪酸含量显著增加，而18:3(亚麻酸)含量相应减少。这种脂肪酸组成的改变可能对油脂的营养价值和工业应用有重要影响。本研究证明了通过CRISPR/Cas9技术可以有效地创造具有高油含量的亚麻荠新品种。这些突变系可能直接有助于未来的净零碳能源生产，或与其他性状结合以高产量生产所需的脂质衍生生物产品。

来源: Plant Biotechnology Journal

发布日期:2024-06-10

全文链接:

<http://agri.nais.net.cn/file1/M00/03/6F/Csgk0WZrnOWAOWi1ADmw6TOxAsw653.pdf>

#### 4. 密苏里大学哥伦比亚分校利用单细胞测序分析大豆

**简介:** 2024年6月6日，Plant Communications 在线发表了密苏里大学哥伦比亚分校Marc Libault实验室题为Single-cell transcriptome atlases of soybean root and mature nodule reveal new regulatory programs controlling the nodulation process的研究论文，作者利用单细胞测序和Molecular Cartography™技术，精确描述了大豆根系和成熟根瘤细胞的单细胞转录组特征，揭示了成熟大豆根瘤被重氮双歧杆菌 (*B. diazoefficiens*) 侵染后不同细胞亚群的共存模式，此外作者借助根瘤单细胞转录组图谱和相关基因共表达网络分析证实了已知结瘤相关基因在大豆结瘤中的作用，还鉴定到控制结瘤过程的新基因GmFWL3，并解析其功能。作者分别构建了大豆根系和被根瘤菌侵染28天后的 (28-dpi) 根瘤的单细胞转录组图谱，利用UMPA方法，分别将之分成16和11个细胞簇。结合前人已发表的根瘤菌侵染12天、14天和21天后的根瘤单细胞转录组数据，作者将根瘤发育过程中4个时间节点的单细胞转录组数据整合到一个UMAP中，随后借助28-dpi根瘤中的51个标记基因对这一UMAP进行功能注释，得到17个细胞簇。作者利用主成分分析评估了根瘤发育过程中不同细胞簇转录组水平的保守性，发现不同细胞簇的转录水平差异既被根瘤发育过程驱动，又被细胞簇驱动。利用多维缩放图 (MDS) 分析，作者发现 28-dpi 根瘤的大多数细胞簇在转录水平上与根系细胞簇不同，MDS 分析还表明细胞簇F和G有最独特的转录组特征，它们在转录水平上与细胞簇H不同。进一步通过比较转录组学分析，作者发现，细胞簇H参与了活性固氮过程，而细胞簇F和细胞簇G的转录组特征表明它们可能负责控制宿主范围限制和植物防御。通过比较大豆根瘤和蒺藜苜蓿根瘤的单细胞转录组特征，作者发现表明大豆根瘤细胞簇F&G和细胞簇H与蒺藜苜蓿的感染区II (簇4-5) 和

更多资讯 尽在农业专业知识服务系统:<http://agri.nais.net.cn/>



固氮区III具有相似的生物学功能。综上，作者认为大豆成熟根瘤的感染区至少有两个不同的细胞群：受感染但非固氮细胞的细胞簇F和G，以及受感染且具有固氮能力的细胞簇H。进一步评估构成根瘤感染区的细胞簇之间的分子异质性，并阐明控制这些细胞生物学的主要调控途径，作者对细胞簇F&G和H进行了基因调控网络分析（gene regulatory networks, GRN），结果表明根瘤感染区不同细胞簇间存在生化异质性。此外作者还发现了调控根瘤菌侵染过程的新基因GmFWL3，通过验证其生理功能，作者发现，植物质膜的微结构域能够调控根瘤菌对根瘤细胞侵染过程。

来源：Plant Communications

发布日期:2024-06-06

全文链接:

<http://agri.nais.net.cn/file1/M00/03/6F/Csgk0WZroTiACfuCAKC6JJ9vCfw827.pdf>

## 5. 以色列魏茨曼研究所通过基因组学等揭示致幻剂梅斯卡灵合成途径

**简介:** 2024年6月3日，以色列魏茨曼研究所Asaph Aharoni团队在Molecular Plant 上发表题为“The biosynthetic pathway of the hallucinogen mescaline and its heterologous reconstruction”的研究论文。该研究通过基因组学，转录组学，体外反应等技术，揭示了仙人掌科植物合成梅斯卡林的生物合成途径。在本论文中，作者通过代谢测定发现很多进化距离远的仙人掌科植物，均可以合成梅斯卡林化合物，暗示这一个合成途径在仙人掌植物中具有保守性。作者以合成梅斯卡林的仙人掌佩奥特（Lophophora williamsii）为研究对象，首先利用Pacbio HiFi从头组装了基因组（基因组大小 3.2G），并对它的不同组织进行了转录组测序分析。基于这个高质量基因组和转录组表达数据，进行进一步的关键基因功能鉴定。基于梅斯卡林的化学结构含有苯环，甲基和氨基，研究人员主要集中在四个酶家族，分别是酪氨酸脱羧酶（L-tyrosine/LDOPA, TyDC），细胞色素P450氧化酶（CYP），多酚氧化酶（polyphenol oxidase, PPO），和甲基转移酶（methyltransferases, MTs）。在仙人掌佩奥特基因组中，共含有5个TyDC, 270个CYP, 3个PPO和350个MT蛋白。根据梅斯卡林合成的组织，挑选了在表皮和叶肉中高表达，而在根部低表达的基因。结合已知同源基因的功能，研究人员首先发现一个LwTyDC2负责L-tyrosine和L-DOPA的脱羧反应。接着，根据类似的策略，又发现一个CYP76AD家族成员LwCYP76AD131负责tyramine的羟化反应。最后，发现了两类的O-甲基化酶（OMT）通过2步甲基化修饰，生成梅斯卡林。本研究通过化学谱图分析、酶学分析、分子建模和代谢工程相结合，确定了控制梅斯卡林生物合成的六步合成酶和催化反应。简单来说，底物L-Tyrosine通过LwTyDC2脱羧酶生成Tyramine。然后P450加氧酶LwCYP76AD131催化Tyramine生成Dopamine，接着Dopamine被LwOMT1（或者LwOMT5）催化生成3-Methoxy-tyramine，并被LwCYP76AD131进一步加氧生成3,4-Dihydroxy-5-methoxy-phenethylamine。最后，在LwOMT1（或者LwOMT5）和LwOMT10（或LwOMT11）的依次O-甲基化下，最终生成梅斯卡林。值得一提的是，作者还发现了LwNMT1还能对梅斯卡林的甲基化修饰。该酶可能用于调节仙人掌植物中的梅斯卡林水平。综上，本研究通过植物基因组从头组装，转录组分析和关键酶鉴定，系统解析了仙人掌植物中致幻化合物梅斯卡林的生物合成途径，为将来应用这一天然致幻剂治疗精神疾病如抑郁症提供了可能。本研究鉴定的4类催化酶也为通过合成生物学手段合成类似重要化合物提供了元件。

来源：Molecular Plant

更多资讯 尽在农业专业知识服务系统:<http://agri.nais.net.cn/>

发布日期:2024-06-03

全文链接:

<http://agri.nais.net.cn/file1/M00/10/41/Csgk0GZroiOAcIx9AIVIJYoWdx0534.pdf>