北京林业大学学报
JOURNAL OF BEIJING FORESTRY UNIVERSITY

杨树U6启动子转录活性分析及其对基因编辑效率的影响

冯雨倩 冯欣燕 刁文彬 撖静宜 李慧 王馨 刘迪 陆海

Transcriptional activity analysis of U6 promoters and their effect on gene editing efficiency in poplar

Feng Yuqian, Feng Xinyan, Diao Wenbin, Han Jingyi, Li Hui, Wang Xin, Liu Di, Lu Hai

引用本文:
冯雨倩, 冯欣燕, 刁文彬, 撖静宜, 李慧, 王馨, 刘迪, 陆海. 杨树U6启动子转录活性分析及其对基因编辑效率的影响[J]. 北京林业大学学报, 2026, 48(6):41–48. doi: 10.12171/j.1000–1522.20250415
Feng Yuqian, Feng Xinyan, Diao Wenbin, Han Jingyi, Li Hui, Wang Xin, Liu Di, Lu Hai. Transcriptional activity analysis of U6 promoters and their effect on gene editing efficiency in poplar[J]. Journal of Beijing Forestry University, 2026, 48(6):41–48. doi: 10.12171/j.1000–1522.20250415

在线阅读 View online: https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20250415

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

白桦*BpSPL6*基因启动子的克隆及表达分析

Cloning and expression analysis of *BpSPL6* promoter from *Betula platyphylla*

北京林业大学学报, 2022, 44(2): 1–10. https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20200174

核桃*JrTT1–1*启动子不同长度片段响应干旱的活性分析

Activity analysis of different length fragments of walnut *JrTT1–1* promoter in response to drought stress

北京林业大学学报, 2022, 44(8): 31–38. https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20210126

杨树响应胶孢炭疽菌侵染的转录组学研究

Transcriptome analysis of poplar leaves infected with *Colletotrichum gloeosporioides*

北京林业大学学报, 2024, 46(4): 91–102. https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20210481

杨树*HSF*家族基因生物信息学与胁迫应答表达分析

Bioinformatics and stress response expression analysis of poplar *HSF* family genes

北京林业大学学报, 2021, 43(2): 34–45. https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20200159

山新杨谷胱甘肽S–转移酶编码基因*PdbGSTU*功能分析

Functional analysis of encoding gene *PdbGSTU* for glutathione S–transferase in *Populus davidiana* × *P. bolleana*

北京林业大学学报, 2024, 46(8): 68–78. https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20240020

毛果杨丝氨酸蛋白酶抑制子PtrSPI的抗虫能力分析

Analysis of insect resistance ability of the serine protease inhibitor PtrSPI from *Populus tomentosa*

北京林业大学学报, 2021, 43(9): 51–58. https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20210163

DOI:10.12171/j.1000−1522.20250415

杨树 U6 启动子转录活性分析及其对基因编辑效率的影响

冯雨倩[1,2]　冯欣燕[1,2]　刁文彬[1,2]　撖静宜[1,2]　李　慧[1,2]
王　馨[1,2]　刘　迪[1,2]　陆　海[3]
（1. 树木花卉育种生物工程国家林业和草原局重点实验室，北京 100083；2. 北京林业大学生物科学与技术学院，北京 100083；3. 新疆维吾尔自治区林业科学院，新疆 乌鲁木齐 830000）

摘要:【目的】植物 CRISPR/Cas 基因编辑的效率受到 sgRNA 转录水平的影响，内源启动子可以提高 sgRNA 的转录水平，从而提高 CRISPR/Cas 基因编辑效率。U6 启动子是双子叶植物 CRISPR/Cas 基因编辑系统中驱动 sgRNA 表达的常用元件，但目前尚缺乏关于杨树 U6 启动子的研究。本研究旨在挖掘杨树高效内源 U6 启动子，以优化杨树 CRISPR/Cas 基因编辑工具。**【方法】**从‘84K’杨中鉴定并克隆 7 条内源性 U6 启动子，构建 *proPagU6::GUS* 融合表达载体并遗传转化烟草；通过组织化学染色与 qRT-PCR 分析不同 *PagU*6 启动子对 *GUS* 转录活性的影响；选取转录活性最高的 U6 启动子驱动 sgRNA 表达，构建 CRISPR/Cas 基因编辑载体并遗传转化杨树。**【结果】**7 条杨树 *PagU*6 启动子均可驱动 *GUS* 基因表达，表现出转录活性，其中 *PagU*6-1 启动子的活性最高；由 *PagU*6-1 启动子驱动 sgRNA 表达的基因编辑载体成功编辑了杨树目标基因，编辑效率达 16.22%。**【结论】**本研究筛选鉴定出具有较高转录活性的 *PagU*6-1 启动子，可用于优化杨树 CRISPR/Cas 基因编辑工具，为提升杨树基因编辑效率提供了技术支撑。

关键词：杨树；U6 启动子；CRISPR/Cas 系统；转录活性；基因编辑
中图分类号：S791.11；Q78　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**1000−1522(2026)06−0041−08
引文格式：冯雨倩，冯欣燕，刁文彬，等. 杨树 U6 启动子转录活性分析及其对基因编辑效率的影响［J］. 北京林业大学学报，2026，48(6)：41−48. Feng Yuqian, Feng Xinyan, Diao Wenbin, et al. Transcriptional activity analysis of U6 promoters and their effect on gene editing efficiency in poplar［J］. Journal of Beijing Forestry University, 2026, 48(6): 41−48.

Transcriptional activity analysis of U6 promoters and their effect on gene editing efficiency in poplar

Feng Yuqian[1,2]　Feng Xinyan[1,2]　Diao Wenbin[1,2]　Han Jingyi[1,2]　Li Hui[1,2]
Wang Xin[1,2]　Liu Di[1,2]　Lu Hai[3]
(1. Tree and Ornamental Plant Breeding and Biotechnology Laboratory of National Forestry and Grassland Administration, Beijing 100083, China;
2. School of Biological Sciences and Technology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China;
3. Xinjiang Uygur Autonomous Region Academy of Forestry Science, Urumqi 830000, Xinjiang, China)

Abstract:［**Objective**］The efficiency of CRISPR/Cas-mediated gene editing in plants is influenced by the transcriptional level of sgRNA. Endogenous promoters can enhance sgRNA transcription and improve gene editing efficiency. The U6 promoter is commonly used to drive sgRNA expression in CRISPR/Cas gene editing in dicottyledonous plants, however, studies on the U6 promoter in poplar remain scarce. This study

收稿日期: 2025−10−24　**修回日期:** 2026−04−07
基金项目: 国家重点研发计划(2021YFD2200101)。
第一作者: 冯雨倩。主要研究方向：林木基因编辑、林木发育。Email: 13406366836@163.com　地址：100083 北京市海淀区清华东路 35 号北京林业大学生物科学与技术学院。
责任作者: 陆海，博士生导师，教授。主要研究方向：林木发育与抗逆。Email: luhai1974@bjfu.edu.cn　地址：830000 新疆维吾尔自治区林业科学院。
本刊网址: https://j.bjfu.edu.cn; https://journal.bjfu.edu.cn

aims to identify potent endogenous U6 promoters in poplar and optimize the CRISPR/Cas toolbox for this species. [**Method**] Seven endogenous U6 promoters were identified and cloned from the poplar '84K' (*Populus alba* × *P. tremula* var. *glandulosa*). Seven *proPagU6::GUS* fusion expression vectors were constructed and transformed into tobacco. The transcriptional activities of different *PagU6* promoters were analyzed using histochemical staining and qRT-PCR. A CRISPR/Cas9 vector utilizing *PagU6* to drive sgRNA was constructed and transformed into poplar. [**Result**] Histochemical staining and qRT-PCR analyses revealed that all seven *PagU6* promoters exhibited transcriptional activity, with *PagU6*-1 showing the highest activity. The gene editing vector, driven by the *PagU6*-1 promoter for sgRNA expression, successfully edited target genes in poplar, achieving a gene editing efficiency of 16.22%. [**Conclusion**] This study identified *PagU6*-1 as an ideal endogenous promoter with high transcriptional activity for optimizing CRISPR/Cas gene editing tools, providing a critical technical foundation for enhancing gene editing efficiency in poplar.

Key words: *Populus* spp.; U6 promoter; CRISPR/Cas; transcriptional activity; gene editing

CRISPR/Cas 系统作为第三代基因编辑技术，能够对基因组进行精确的定点编辑，具有高效、便捷和灵活等优势。该系统主要由 Cas 核酸酶与单引导 RNA（single guide RNA，sgRNA）组成[1]。其作用机制为：Cas 核酸酶在 sgRNA 的引导下特异性结合靶基因，形成三元复合物后切割靶基因双链 DNA，产生位点特异性断裂；随后，借助内源性细胞修复机制实现基因组编辑[2]。

U6 和 U3 启动子是植物 CRISPR/Cas 系统中驱动 sgRNA 表达的关键元件。其中，U6 启动子多用于双子叶植物，而 U3 启动子多用于单子叶植物[3]。U6 核小 RNA（small nuclear RNA，snRNA）长度约为 100 bp，是剪接体的重要组成成分，在真核生物各组织和细胞中广泛表达且表达水平相对稳定[3]。U6 启动子被 RNA 聚合酶Ⅲ识别并启动 U6 snRNA 的转录，其包含 2 个保守的核心序列元件，位于−30 bp 处 TATA-like box 元件和位于−60 bp 处的 USE 元件（5′-RTCCCACATCG-3′）。此外，U6 启动子具有明确的转录起始位点，即“G”碱基[4]。

U6 启动子通常具有物种特异性。同一物种中存在多条不同的 U6 启动子，其转录效率存在差异。因此，在针对特定物种进行基因编辑时，筛选该物种中具有高效转录活性的内源 U6 启动子以驱动 sgRNA 高表达，能够有效提高基因编辑效率。目前，多个物种的 U6 启动子已被克隆并成功应用于 CRISPR/Cas 基因编辑体系。例如，在咖啡（*Coffea canephora*）中，应用 *CcU6* 启动子驱动 sgRNA，实现了对八氢番茄红素脱氢酶（*phytoene desaturase gene* 8，*PDS*）基因的编辑并获得白化植株[5]；生菜（*Lactuca sativa*）内源性启动子 *LsU6*-10 在生菜中的编辑效率高于拟南芥（*Arabidopsis thaliana*）*AtU6*-26 启动子[6]；对葡萄（*Vitis vinifera*）叶片进行瞬时转化发现 *VvU6*-1 启动子的转录活性远超 *AtU6* 启动子，*VvU6*-1 启动子不仅能提高基因编辑效率，还能驱动多个 sgRNA 的表达以实现多重基因编辑[7]；在白桦（*Betula platyphylla*）中筛选 PolⅢ启动子，发现 *bpU6*-6 是提高白桦 CRISPR/Cas9 编辑效率的最适启动子[8]；相较于 *AtU6*-26，使用落叶松（*Larix kaempferi*）*LaU6*-12 启动子将基因编辑效率从 4.92% 提升至 14.29%[9]。这些研究结果表明，在特定物种的 CRISPR/Cas 基因编辑体系中，使用植物内源性 U6 启动子驱动 sgRNA 表达可显著提高基因编辑效率。

杨树（*Populus* spp.）是研究木本植物的模式生物之一，在经济、生态和科学研究等多个领域都具有重要地位[10]。目前，在杨树中，CRISPR/Cas 技术已经被广泛应用到新种质创制、基因功能研究等领域，但以往的研究通常利用外源启动子驱动 sgRNA 的表达。例如，Zhang 等[11]为揭示 3-羟基对香豆酸（p-coumaroyl shikimate 3′-hydroxylase，C3′H）在木质素合成中的作用，使用 *AtU6*-26、*AtU6*-1 和 *AtU3d* 启动子分别驱动 sgRNA 的 3 个靶点，构建 CRISPR/Cas9 编辑载体并对野生型毛白杨进行基因编辑，在 14 个转基因株系中获得了 2 株纯合突变体；Sulis 等[12]利用 *AtU6* 启动子驱动 sgRNA-tRNA 的表达，利用 CRISPR/Cas9 系统进行多重基因编辑，靶基因咖啡酰辅酶 O-甲基转移酶（caffeoyl-CoA O-methyltransferase，CCoAOMT2）的编辑效率为 9.3%；Yao 等[13]应用基于 Cas9 nickase（nCas9）的细胞质嘧啶碱基编辑器（CBE），利用 *AtU6* 启动子驱动 sgRNA 表达，在杂交杨“717-1B4”中编辑植物真菌病原体反应转录因子（plant AT-rich protein and zinc-binding protein，PLATZ），效率达 13% ~ 14%；An 等[14]在 CRISPR/Cas12a 系统中利用 *AtU6*-26 启动子驱动 sgRNA 表达，靶向 *PagPDS* 基因并获得白化杨树苗，

其中 LbCas12a 系统的基因编辑效率为 30%，而 PagPDS-FnCas12a 系统仅为 3.4%；Wu 等[15]利用 II 型启动子 Cestrum yellow leaf curling virus（CmYLCV）驱动 sgRNA 表达，改造 *pCAMBIAO*380 基因编辑载体，在‘84K’杨中靶向 *Golden*2-*like*（*GLK*）基因，编辑效率达 45.8%，实现了高效且无外源 DNA 残留的可视化基因编辑，该研究证实不同启动子驱动 sgRNA 表达影响基因编辑效率。随着 CRISPR/Cas 技术的广泛应用，筛选物种内源高效转录活性启动子以提高基因编辑效率成为研究热点，但关于杨树内源性 U6 启动子的研究尚未见报道。因此，本研究对杨树内源性 U6 启动子进行了克隆鉴定并分析了其转录活性，以期筛选出高效的杨树 U6 启动子并用于杨树基因编辑系统，优化杨树 CRISPR/Cas 基因编辑工具，从而为提高杨树基因编辑的效率提供技术支撑。

1　材料与方法

1.1　实验材料

本研究所用‘84K’杨（*Populus alba* × *P. tremula* var. *glandulosa*）、本氏烟草（*Nicotiana benthamiana*）和载体质粒 pBI121 由本课题组保存。大肠杆菌感受态 DH5α 和农杆菌感受态 GV3101 购于上海唯地生物技术有限公司。引物合成及 DNA 测序由擎科生物技术有限公司完成。

1.2　*PagU*6 启动子的筛选与克隆

利用拟南芥 *AtU*6-26 snRNA 基因序列在‘84K’杨树基因组数据库（https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/genome/）中进行 BLAST 序列比对，选取相似度高于 90% 的 *PagU*6 snRNA 基因作为候选基因，以其上游约 700 bp 序列作为候选启动子序列。利用 DNAMAN 软件将候选序列与 *AtU*6-26 snRNA 基因及其启动子序列进行比对分析，鉴定 U6 snRNA 高度保守的核心序列区域以及 RNA 聚合酶III转录所必需的保守元件。

利用植物基因组 DNA 提取试剂盒（艾德莱生物科技有限公司，北京）提取‘84K’杨基因组 DNA，以此为模板，利用高保真 DNA 聚合酶进行 PCR 扩增各 U6 启动子候选序列。所用引物见表 1。反应体系为 50 μL，退火温度为 58 ℃，延伸时间为 2 min。扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测，并使用胶回收试剂盒（南京诺唯赞生物科技股份有限公司，北京）进行回收与纯化。

1.3　*proPagU6::GUS* 融合表达载体的构建

用限制性内切酶 *Hind* Ⅲ与 *Bam* HⅠ对载体质粒 pBI121 进行酶切，37 ℃ 酶切 3 h。酶切产物从胶内回收后，用无缝克隆方法连接。启动子片段与酶切载体产物按 1∶4（摩尔比）混合，反应条件为 50 ℃、1 h。连接产物转化大肠杆菌感受态 DH5α，卡那霉素抗性筛选含 *ProPagU6::GUS* 质粒的菌液，经 DNA 测序确认的重组质粒转入农杆菌感受态 GV3101，用于烟草叶片瞬时转化实验。

1.4　融合表达载体侵染烟草叶片与 GUS 组织化学染色

选取 4 ~ 5 周龄生长良好的烟草作为转化受体，采用农杆菌介导法对烟草叶片进行侵染。取瞬时侵染后的烟草叶片，剪切成适宜大小，进行 GUS 组织

表 1　‘84K’杨 U6 启动子克隆的引物序列

Tab. 1　Primer sequence for cloning of U6 promoter in ‘84K’

引物名称	引物序列（5′—3′）
*PagU*6-1 F	ctatgaccatgattacgccaCAGTACAGATGATGCAATAATGC
*PagU*6-1 R	taagggactgaccacccgggAATTTTATCAGATGTCTCCGAAG
*PagU*6-2 F	ctatgaccatgattacgccaCACAACATGACTTCAAGAGTGCCATAT
*PagU*6-2 R	taagggactgaccacccgggAATTTTATCGGATGTCCCCGAAGGG
*PagU*6-3 F	ctatgaccatgattacgccaCACCACACAGTACGAATCACTA
*PagU*6-3 R	taagggactgaccacccgggAATTTTATCGGATGTCCCCGAAGGG
*PagU*6-4 F	ctatgaccatgattacgccaATGAACCACGACAGATTGCTGGA
*PagU*6-4 R	taagggactgaccacccgggAATTTTATCGGACGTCCCCGAAGG
*PagU*6-5 F	ctatgaccatgattacgccaAATATCATGTATTGCATTCCAA
*PagU*6-5 R	taagggactgaccacccgggAATTTTATCAGATGTCTCCGAAGAGA
*PagU*6-6 F	ctatgaccatgattacgccaTCATCACTACTCAACAGCAGGT
*PagU*6-6 R	taagggactgaccacccgggAATTTTATCGGATGTCCCCGAAGGG
*PagU*6-7 F	ctatgaccatgattacgccaCCTATAAGTAATGAGGAATCTCACACGG
*PagU*6-7 R	taagggactgaccacccgggAATTTTATCAGATGTCTCCGAAGAGA

注：引物序列中小写字母为载体构建所需同源序列，大写字母为启动子克隆引物序列。下同。

化学染色，随后置于无水乙醇中脱色并观察结果。

1.5 实时荧光定量 PCR（qRT-PCR）检测 *GUS* 基因表达水平

利用植物 RNA 快速提取试剂盒（康为世纪生物科技股份有限公司，北京）提取瞬时侵染的烟草叶片 RNA，并分别进行反转录。以 *L*23 基因为内参基因（*L*23-F：5′-AAGGATGCCGTGAAGAAGATGT-3′；*L*23-R：5′-GCATCGTAGTCAGGAGTCAACC-3′），以 cDNA 为模板来检测 *GUS* 基因（*GUS*-F：5′-GCATTCAGTCTGGATCGCG-3′；*GUS*-R：5′-GTAATGAGTGACCGCATCG-3′）的相对表达量。反应体系 20 μL：引物各 0.4 μL、cDNA 500 ng、SYBR Green I qPCR Mix 10 μL，用 ddH_20 补足至 20 μL。扩增程序：95 ℃ 180 s；95 ℃ 10 s，55 ℃ 10 s（40 个循环）。每个样品设置 3 个生物学重复。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算目的基因的相对表达量，并使用 GraphPadPrism 8.0 软件进行单因素方差分析。

1.6 *proPagU6-1::PagPDS* 基因编辑载体的构建

以 *PagPDS* 基因为 Cas9 的靶点，使用 Golden-Gate 克隆技术将 gRNAs-tRNA 片段与线性化的 pRGEB32 载体连接，构建对照载体 *proOsU3::PagPDS*，引物序列详细见表 2。分别以对照载体 *proOsU3::PagPDS* 及 *PagU6-1* 启动子为模板，克隆目的片段。用限制性内切酶 *Hind* Ⅲ和 *Sbf* Ⅰ对 *proOsU3::PagPDS* 载体进行双酶切，获得线性化载体。利用无缝克隆方法将扩增目的片段与线性化载体连接，得到实验载体 *proPagU6-1::PagPDS*。将 DNA 测序确认的 CRISPR/Cas9 基因编辑载体转入根癌农杆菌感受态 GV3101，用于后续杨树遗传转化实验。

1.7 农杆菌介导‘84K’杨稳定转化及转基因植株鉴定

选取 1 月龄左右生长良好的‘84K’杨树组培苗，利用农杆菌介导的叶盘法进行稳定转化，使用 2 mg/L 潮霉素筛选抗性芽。提取转基因植株基因组 DNA，使用 SpCas9 引物（SpCas9-F：5′-GCCTGACCCCCAACTTCA-3′；SpCas9-R：5′-TTGTCTTGCCGGACTGCT-3′）进行 PCR 扩增，鉴定基因编辑植株。以待测植株基因组 DNA 为模板，以 *PagPDS* 基因引物（PDS-F：5′-GAATCATATCCGCCCTCC-3′；PDS-R：5′-TCCCGCATCTGCCAAGTATT-3′）扩增并纯化覆盖靶位点的片段序列，将其连接到 pCE2-TA/Blunt-Zero 载体，通过 Sanger 测序确定靶基因编辑情况[16]。使用 DNAMAN 软件将测序结果与野生型序列进行比对，分析突变类型。

2 结果与分析

2.1 *Pag U6* 启动子的序列信息

利用拟南芥保守的 102 bp U6 snRNA 序列对‘84K’杨树基因组数据库进行 BLAST 比对，筛选出 9 条相似度高于 90% 的候选序列（表 3）。运用 DNAMAN 软件，对 *PagU6-1* 至 *PagU6-9* 上游的 DNA 序列与拟南芥 *AtU6-26* 启动子序列进行比对分析。结果显示，*PagU6-8* 和 *PagU6-9* 在转录起始位点“G”碱基处发生突变或缺失，且缺乏 TATA-like box 和 USE 元件，推测这两条序列并非功能性 U6 启动子。而 *PagU6-1* 至 *PagU6-7* 序列含有转录起始位点“G”碱基，且上游启动子区域具备 U6 启动子的典型特征，包括位于转录起始位点上游约 −30 bp 处的 TATA-like box 和−60 bp 处的 USE 元件（5′-TCCCACATCG-3′），两元件间距离相对固定（图 1A）。因此，推断这 7 个高度同源的 DNA 上游序列为‘84K’杨的 U6 启动子。

2.2 *PagU6* 启动子的克隆

以‘84K’杨基因组 DNA 为模板，克隆 7 个 U6

表 2 CRISPR/Cas9 基因编辑载体构建的引物

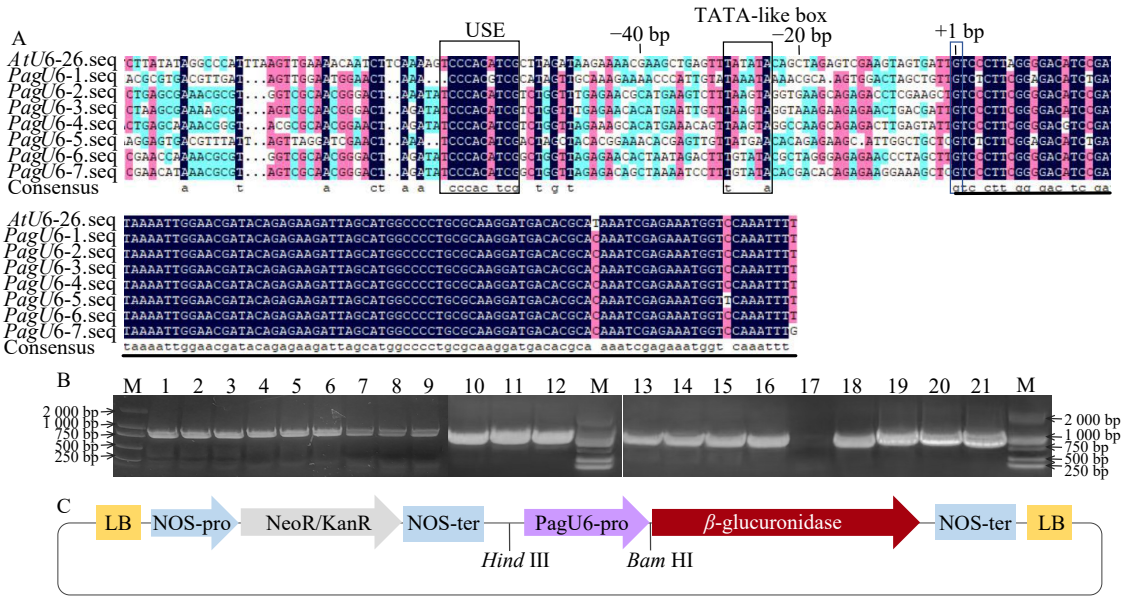
Tab. 2 Primer sequences for CRISPR/Cas9 gene editing vectors

引物名称	引物序列（5′—3′）
S5AD5-F	CGGGTCTCAGGCAGGATGGGCAGTCTGGGCA
S3AD5-R	TAGGTCTCCAAACGGATGAGCGACAGCAAAC
gR1-F	TA GGTCTCC AGACCGGACCTTGAgttttagagctagaa
gR1-R	CG GGTCTCA GTGTTATCAAtgcaccagccgggaa
gR2-F	TA GGTCTCC AAGGTCCGGTCTgttttagagctagaa
gR2-R	CG GGTCTCA CCTTGATAACACtgcaccagccgggaa
gR3-F	TA GGTCTCC AGACCGGACCgttttagagctagaa
gR3-R	CG GGTCTCA GTGTTATCAAGGTCtgcaccagccgggaa
L5AD5-F	CGGGTCTCAGGCAGGATGGGCAGTCTGGGCAACAAAGCACCAGTGGACAAAGCACCAGTGG
L3AD5-R	TAGGTCTCCAAACGGATGAGCGACAGCAAACAAAAAAAAAAGCACCGACTCG

表 3　‘84K’杨的 U6 snRNA 基因的定位

Tab. 3　Mapping of U6 snRNA chromosome in genome of ‘84K’

基因名称	染色体编号	基因组区段/bp	序列相似度
PagU6-1	3	22 281 589 ~ 22 281 690	98/102（96%）
PagU6-2	5	3 777 911 ~ 3 778 012	101/102（99%）
PagU6-3	5	3 780 995 ~ 3 781 093	101/102（99%）
PagU6-4	5	3 774 511 ~ 3 774 612	100/102（98%）
PagU6-5	9	11 684 921 ~ 11 685 022	97/102（95%）
PagU6-6	11	14 401 117 ~ 14 401 218	101/102（99%）
PagU6-7	11	14 396 075 ~ 14 396 175	100/102（98%）
PagU6-8	5	3 783 544 ~ 3 783 641	97/98（99%）
PagU6-9	9	6 500 520 ~ 6 500 613	90/94（96%）



A. 黑线表示 snRNA 基因序列，黑框中为启动子的重要元件 TATA-like box 和 USE 元件，转录起始位点 “G” 碱基由蓝框显示；B. M: 2 000 bp Marker，1 ~ 3.*PagU6*-2，4 ~ 6. *PagU6*-3，7 ~ 9. *PagU6*-7，10 ~ 12. *PagU6*-1；13 ~ 15. *PagU6*-4；16 ~ 18. *PagU6*-5；19 ~ 21. *PagU6*-6；C. *proPagU6*::*GUS* 融合表达载体的示意图。

图 1　*PagU6* 启动子序列比对分析和 *proPagU6::GUS* 融合表达载体的构建

Fig. 1　Sequence analysis of *PagU6* promoters and construction of *proPagU6::GUS* fusion expression vector

snRNA 的 5′端 27 bp 及其上游约 700 bp 序列作为 U6 启动子序列。*PagU6*-1 至 *PagU6*-7 启动子的序列长度依次为 709、724、729、711、734、740、717 bp（图 1B）。

2.3　*proPagU6::GUS* 融合表达载体的构建

用限制性内切酶 *Hind* Ⅲ和 *Bam* HⅠ对载体质粒 pBI121 进行酶切，回收线性化载体。利用无缝克隆方法将目的启动子片段连接至酶切后的 pBI121 线性载体，构建‘84K’杨 U6 启动子与 *GUS* 基因融合表达载体。测序结果与预期一致，表明 7 个 *proPagU6*::*GUS* 融合表达载体构建成功。

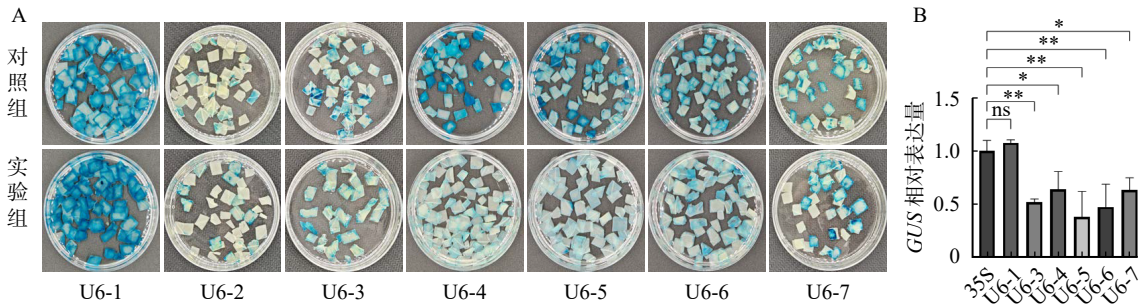
2.4　不同 *PagU6* 启动子的转录活性

将 7 个 *proPagU6*::*GUS* 融合表达载体通过农杆菌注射法在烟草叶片中瞬时表达，观察 *GUS* 染色情况。*CaMV* 35*S*::*GUS* 阳性对照和 7 个实验组均观察到蓝色信号，其中 *PagU6*-1 中 GUS 染色程度最深，其余组染色较浅（如图 2A）。结果表明，7 个 *PagU6* 启动子均能驱动组成型 *GUS* 基因表达，具有转录活性，且 *PagU6*-1 的转录活性可能相对较高。

为进一步验证 *PagU6* 启动子的活性，对瞬时侵染烟草叶片的 6 个不同 *proPagU6*::*GUS* 载体利用 qRT-PCR 比较 *GUS* 基因表达水平。结果显示，*PagU6*-1 启动子与 *CaMV* 35*S* 启动子驱动的 *GUS* 基因表达水平相当，而其余 5 个 *PagU6* 启动子驱动的 *GUS* 基因表达量相对较低（如图 2B）。这证明 *PagU6*-1 启动子活性最高，适用于 CRISPR/Cas 基因编辑载体中驱动 sgRNA 的高效表达。

2.5　基因编辑‘84K’杨及基因编辑效率

八氢番茄红素脱氢酶（phytoene desaturase，PDS）是类胡萝卜素生物合成的关键酶，催化无色八氢番

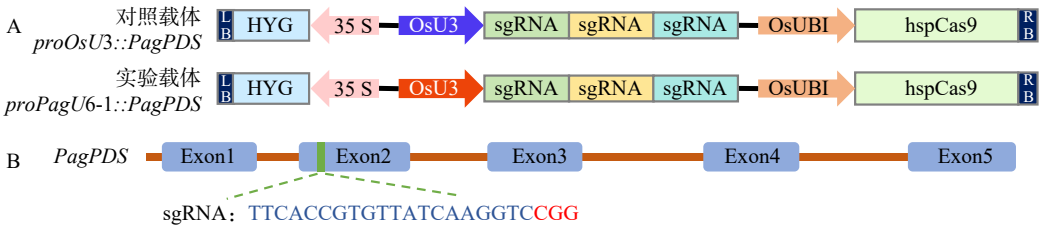


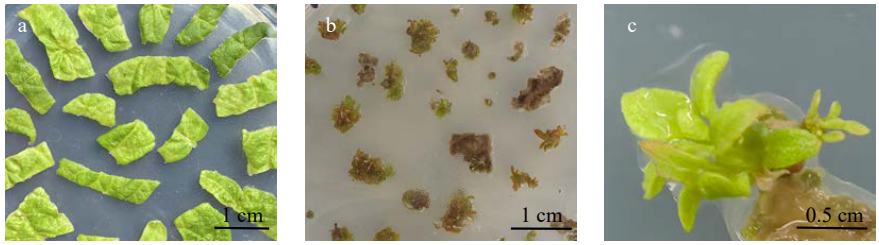
A. GUS 组织化学染色检测不同 *proPagU6*::*GUS* 在烟草叶片中的表达情况，对照组为 *CaMV* 35*S*::*GUS* 载体；实验组为 *proPagU6*::*GUS* 重组载体；B. qRT-PCR 检测不同 *proPagU6*::*GUS* 在烟草叶片中的表达情况，柱值为平均值 ± 标准差，$n = 3$。显著性分析：$*p < 0.05$，$**p < 0.01$。

图 2 不同 *PagU6* 转录活性分析

Fig. 2 Transcriptional activity analysis of different *PagU6*

茄红素转化为有色类胡萝卜素。*PDS* 基因突变会导致植物产生肉眼可见的白化表型[17]。选取 *PagPDS* 为靶基因，构建含 3 个重复 sgRNAs 的基因编辑载体。利用农杆菌介导的叶盘转化法对杨树进行遗传转化，对转基因芽鉴定并进行序列分析（图 3）。结果显示，转化实验载体（*proPagU6*-1::*PagPDS*）与对照载体（*proOsU3*::*PagPDS*）均能实现对‘84K’杨的基因编辑。其中，转化实验载体获得了 37 个转基因芽，





D

基因编辑载体	检测植株总数	转基因植株数量	转化效率/%	突变植株数量	突变效率/%
proOsU3::*sgRNA*	37	21	56.76	3	14.29
proPagU6-1::*sgRNA*	60	37	61.67	6	16.22

E

		靶点	
野生型		5′-GACTATCCAAGACCGGACCTTGATAACACGGTGAAT-3′	
proOsU3::*sgRNA*	01	GACTATCCAAGACCGGACTCTTGATAACACGGTGAAT	+1
	02	GACTATCCAAGACCGGAC-TTGATAACACGGTGAAT	−1
	03	GACTATCCAAGACCGGA-CTTGATAACACGGTGAAT	−1
proPagU6-1::*sgRNA*	01	GACTATCCAAGACCGGAC-TTGATAACACGGTGAAT	−1
	02	GACTATCCAAGACCGGACCCTTGATAACACGGTGAAT	+1
	03	GACTATCCAAGACCGGAC-TTGATAACACGGTGAAT	−1
	04	GACTATCCAAGACCGGA------TAACACGGTGAAT	−6
	05	GACTATCCAAGACCGGACACTTGATAACACGGTGAAT	+1
	06	GACTATCCAAGACCGGACACTTGATAACACGGTGAAT	+1

A. 对照载体 *proOsU3*::*PagPDS* 与实验载体 *proPagU6*-1::*PagPDS* 的载体图谱；B. *PagPDS* 基因的靶点位置，蓝色为靶基因序列，红色为 PAM 位点；C. 基因编辑植株的获得，a. 叶片预培养，b. 不定芽分化，c. 不定芽再生；D. 数据统计不同基因编辑载体的遗传转化效率和基因编辑效率；E. 不同载体介导基因编辑植株的测序结果，红色为 PAM 位点，绿色为靶基因序列，蓝色为突变碱基。

图 3 CRISPR/Cas9 基因编辑载体构建与杨树遗传转化结果

Fig. 3 Construction of CRISPR/Cas9 gene editing vector and the results of genetic transformation in poplar

6 个发生了基因编辑，编辑效率为 16.22%，较对照载体高。基因编辑植株呈绿色，突变类型主要为单碱基缺失或插入，其中 1 株为 6 个碱基缺失。

3 讨　论

CRISPR/Cas 系统作为广泛应用的基因编辑工具，编辑效率高度依赖 sgRNA 的稳定表达水平[18]。在双子叶植物中，U6 启动子是驱动 sgRNA 转录的关键序列，其物种适配性与转录活性决定了 sgRNA 的转录效率，进而影响 CRISPR/Cas 编辑效率[3]。杨树作为林木生物学和木本植物研究的重要模式生物，基因编辑研究虽已取得显著进展，但其生长周期长、基因组复杂等特性限制了编辑效率的提升[10]。目前，杨树 CRISPR/Cas 编辑体系中广泛应用拟南芥 *AtU6*、*AtU3* 等异源启动子[13−14]，其转录活性可能受物种差异影响。因此，鉴定和分析杨树自身内源性 U6 启动子，筛选合适的 U6 启动子用于杨树 CRISPR/Cas 基因编辑体系，对提升杨树基因编辑效率至关重要。

本研究通过对‘84K’杨树基因组数据库进行 BLAST 比对，鉴定出 9 条与拟南芥 *AtU6* snRNA 保守序列相似度高于 90% 的 *PagU6* 基因序列。其中，*PagU6*-8 和 *PagU6*-9 在典型的转录起始位点（通常为高度保守的“G”碱基）发生变异或缺失。snRNA 基因转录起始位点，尤其是起始“G”碱基，对于 Pol III 的精确识别与有效转录至关重要，其缺失或突变通常导致转录活性丧失[19]。因此，推测 *PagU6*-8 和 *PagU6*-9 为非功能性假基因，这与蓖麻等植物中 U6 snRNA 基因家族存在无转录活性假基因[20−22]的报道相符。

进一步分析显示，其余 7 条 *PagU6* 序列（*PagU6*-1 至 *PagU6*-7）编码区高度保守，且上游启动子区域完整包含 U6 snRNA 基因特有的两个核心调控元件：TATA-like box 和 USE 元件[3]。在木豆（*Cajanus cajan*）、苜蓿（*Medicago sativa*）、枸杞（*Lycium ruthenicum*）等多种植物中[8−9, 23−25]，Pol III 对 U6 snRNA 基因启动子的识别需这两个元件的协同作用；TATA-like box 主要参与招募转录因子 TFIIIB 复合物，而 USE 元件则增强转录起始的效率和特异性[3, 26−27]。此外，这 7 个 *PagU6* 启动子中 TATA-like box 与 USE 元件的间距与拟南芥 *AtU6*-26 启动子保持一致。这种元件组成和空间排列的高度保守性是 U6 启动子具备驱动转录活性的关键特征[4]。本研究借助 *GUS* 报告基因系统在烟草叶片中进行瞬时表达分析，证实从‘84K’杨中克隆的 7 个 *PagU6* 启动子均具备驱动转录的功能活性。

然而，杨树中不同 *PagU6* 启动子的转录效率存在显著差异，该现象与生菜[6]、玉米（*Zea mays*）[28]、咖啡[5]等物种中内源 U6 启动子的活性分化规律一致，反映出同一植物不同 U6 启动子转录活性的差异性。*PagU6*-2 启动子在重复实验及不同个体间转录水平波动显著，推测这可能是由于表观遗传调控的动态变化所导致。DNA 甲基化、组蛋白修饰等表观遗传标记在启动子区域的异质性分布，可能通过改变染色质构象或转录因子结合效率，间接影响 Pol III 的招募与转录起始过程[29]。GUS 组织化学染色和 qRT-PCR 结果一致显示，*PagU6*-1 的转录活性与 *CaMV* 35*S* 启动子相当，说明 *PagU6*-1 具有较高的转录活性。因此，*PagU6*-1 可作为 CRISPR/Cas 基因编辑载体中驱动 sgRNA 表达的候选启动子，以提升杨树中的基因编辑效率。

本研究利用内源性 *PagU6*-1 启动子驱动 sgRNA 表达，构建 CRISPR/Cas 基因编辑载体并遗传转化‘84K’杨。实验结果显示，与对照载体 *proOsU3::PagPDS* 相比，实验载体 *proPagU6*-1*::PagPDS* 提高了靶基因编辑效率，达到 16.22%。这表明，杨树 *PagU6*-1 是理想的内源启动子，能够有效引导 sgRNA 表达，进而实现对目的基因的编辑，且其编辑效率优于外源启动子 *OsU3*，可用于优化杨树 CRISPR/Cas 基因编辑工具。这与白桦、落叶松等木本植物中内源 U6 启动子活性优于外源启动子的研究结果一致[8−9]，进一步支持了物种内源性启动子在基因编辑中的应用价值。在基因编辑类型方面，基因编辑植株主要为单碱基的缺失或插入，仅有一个编辑植株发生了 5 个碱基缺失的情况。这一结果与先前研究报道一致，即 3 个 gRNAs 重复靶向同一位点会减少大片段删除突变的发生，使靶基因更容易产生单碱基突变[16]。之前的研究表明，PDS 的纯合突变或杂合突变可造成部分白化表型，并难以达到完全白化[17, 30]。此外，中国白杨基因组中存在 PDS 的另一个同源基因[17]，白化表型受基因功能冗余等复杂因素调控，因此本系统造成的单碱基突变或小片段删除未能形成彻底白化表型。然而，分子鉴定证实，本研究利用 *PagU6*-1 启动子可有效驱动 sgRNA，使 CRISPR/Cas9 基因编辑系统精准修饰靶基因。综上，本研究筛选得到杨树内源 U6 启动子，优化了杨树 CRISPR/Cas 基因编辑工具，为提高杨树基因编辑效率提供了技术支撑。

4 结　论

本研究从‘84K’杨树中筛选、鉴定并克隆了 7 条杨树内源 U6 启动子。通过 GUS 组织化学染色和 qRT-PCR 分析证明，7 条 *PagU6* 启动子均具有转录

活性，其中 *PagU*6-1 的转录活性最高。使用 *PagU*6-1 驱动 sgRNA 表达构建 CRISPR/Cas 基因编辑载体并遗传转化杨树，基因编辑效率达到 16.22%。结果表明，杨树 *PagU*6-1 是理想的内源启动子，可用于优化杨树 CRISPR/Cas 基因编辑工具，从而提高杨树基因编辑效率。

参 考 文 献

[1] Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity [J]. Science, 2012, 337: 816−21.

[2] Yin K, Gao C, Qiu J L. Progress and prospects in plant genome editing [J]. Nature Plants, 2017, 3: 17107.

[3] Kor S D, Chowdhury N, Keot A K, et al. RNA Pol III promoters-key players in precisely targeted plant genome editing [J]. Frontiers in Genetics, 2023, 13: 989199.

[4] Waibel F, Filipowicz W. U6 snRNA genes of *Arabidopsis* are transcribed by RNA polymerase III but contain the same two upstream promoter elements as RNA polymerase II-transcribed U-snRNA genes [J]. Nucleic Acids Research, 1990, 18(12): 3451−3458.

[5] Casarin T, Freitas N C, Pinto R T, et al. Multiplex CRISPR/Cas9-mediated knockout of the *phytoene desaturase* gene in *Coffea canephora* [J]. Scientific Reports, 2022, 12(1): 17270.

[6] Riu Y S, Kim G H, Chung K W, et al. Enhancement of the CRISPR/Cas9-based genome editing system in lettuce (*Lactuca sativa* L.) using the endogenous U6 promoter [J]. Plants (Basel, Switzerland), 2023, 12(4): 878.

[7] Ren C, Liu Y, Guo Y, et al. Optimizing the CRISPR/Cas9 system for genome editing in grape by using grape promoters [J]. Horticulture Research, 2021, 8(1): 52.

[8] Cheng D, Liu Y, Wang Y, et al. Establishment of high-efficiency genome editing in white birch (*Betula platyphylla* Suk.) [J]. Plant Biotechnol Journal, 2024, 22(1): 7−9.

[9] Xing J X, Luo A J, Wang X H, et al. Identification of U6 promoter and establishment of gene-editing system in *Larix kaempferi* (Lamb.) Carr [J]. Plants (Basel, Switzerland), 2024, 14(1): 45.

[10] Liu Y J, Jiang P F, Han X M, et al. Genome and CRISPR/Cas9 system of a widespread forest tree (*Populus alba*) in the world [J]. Plant Biotechnol Journal, 2025, 23(3): 857−859.

[11] Zhang S, Wang B, Li Q, et al. CRISPR/Cas9 mutated *p-coumaroyl shikimate* 3'-*hydroxylase* 3 gene in *Populus tomentosa* reveals lignin functioning on supporting tree upright [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2023, 253(3): 126762.

[12] Sulis D B, Jiang X, Yang C, et al. Multiplex CRISPR editing of wood for sustainable fiber production [J]. Science, 2023, 381: 216−221.

[13] Yao T, Yuan G, Lu H, et al. CRISPR/Cas9-based gene activation and base editing in *Populus* [J]. Horticulture Research, 2023, 10(6): uhad085.

[14] An Y, Geng Y, Yao J, et al. Efficient genome editing in *Populus* using CRISPR/Cas12a [J]. Frontiers in Plant Science, 2020, 11: 593938.

[15] Wu R, Chai Y, Li Y, et al. A visual monitoring DNA-free multi-gene editing system excised via LoxP: : FRT/FLP in poplar [J]. Plant Biotechnologu Journal, 2025, 23(9): 4017−4029.

[16] Feng Y, Sun Y, Zhang H, et al. Increased genome editing efficiency in poplar by optimizing sgRNA length and copy number [J]. Industrial Crops and Products, 2025, 226: 120664.

[17] Fan D, Liu T, Li C, et al. Efficient CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis in *Populus* in the first generation [J]. Scientific Reports, 2015, 5: 12217.

[18] Lowder L G, Zhang D, Baltes N J, et al. A CRISPR/Cas9 toolbox for multiplexed plant genome editing and transcriptional regulation [J]. Plant Physiology, 2015, 169(2): 971−985.

[19] Kunkel G R. RNA polymerase III transcription of genes that lack internal control regions [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1991, 1088(1): 1−9.

[20] Kanai M, Hikino K, Mano S. Cloning and functional verification of endogenous U6 promoters for the establishment of efficient CRISPR/Cas9-based genome editing in Castor (*Ricinus communis*) [J]. Genes (Basel), 2023, 14(7): 1327.

[21] Panchy N, Lehti-shiu M, Shiu S H. Evolution of gene duplication in plants [J]. Plant Physiology, 2016, 171(4): 2294−316.

[22] Millson A, Lewis T, Pesaran T, et al. Processed pseudogene confounding deletion/duplication assays for *SMAD4* [J]. The Journal of Molecular Diagnostics, 2015, 17(5): 576−582.

[23] Senthil K, Rathinam M, Parashar M, et al. Establishing a CRISPR/Cas9 genome editing framework in pigeonpea (*Cajanus cajan* L.) by targeting *phytoene desaturase* (*PDS*) gene disruption [J]. Journal, Genetic Engineering & Biotechnology, 2025, 23(1): 100465.

[24] Xia X, Li S, Wang N, et al. Convenient, high-efficiency multiplex genome editing in autotetraploid alfalfa using endogenous U6 promoters and visual reporters [J]. aBIOTECH, 2025, 6(1): 81−90.

[25] Sun Y, Hong Z, Wang W, et al. Establishment of an efficient and versatile genome editing platform for *L. ruthenicum* [J]. Plant Physiology, 2025, 199(2): kiaf486.

[26] K C R, Cheng R, Zhou S, et al. Evidence of RNA polymerase III recruitment and transcription at protein-coding gene promoters [J]. Molecular Cell, 2024, 84(21): 4111−4124.

[27] Shah S Z, Perry T N, Graziadei A, et al. Structural insights into distinct mechanisms of RNA polymerase II and III recruitment to snRNA promoters [J]. Nature Communications, 2025, 16(1): 141.

[28] Nagy E D, Davis I W, Song S, et al. Computationally derived RNA polymerase III promoters enable maize genome editing [J]. Frontiers in Plant Science, 2025, 16: 1540425.

[29] Park J L, Lee Y S, Kunkeaw N, et al. Epigenetic regulation of noncoding RNA transcription by mammalian RNA polymerase III [J]. Epigenomics, 2017, 9(2): 171−187.

[30] An Y, Geng Y, Yao J, et al. An improved CRISPR/Cas9 system for genome editing in *Populus* by using *mannopine synthase* (*MAS*) promoter [J]. Frontiers in Plant Science, 2021, 12: 703546.

（责任编辑 赵田芸 范 娟
责任编委 马履一）