

忍冬 U6 启动子的克隆及功能验证

许小涵¹, 李小丽¹, 唐志强¹, 刘 谦^{1,2}, 李 佳^{1,2}, 刘振华^{1,2},
张永清^{1,2}, 蒲高斌^{1,2*}

(1. 山东中医药大学, 山东 济南 250355; 2. 山东省中药质量控制与全产业链建设协同创新中心,
山东 济南 250355)

摘要: 以忍冬基因组 DNA 为模板, 克隆并筛选出具有较高转录活性的忍冬 U6 启动子。采用 PCR 方法, 从忍冬基因组中克隆到 4 个 LjU6 启动子, 长度分别为 336、708、359、602 bp, PlantCARE 分析发现 4 个启动子中均含有 TATA 框以及 CAAT 框等典型的启动子顺式元件, 且包含与光响应、胁迫响应等相关的调控元件; 克隆产物经测序正确后, 将 LjU6 启动子连接至携带 β -葡萄糖苷酸酶 (GUS) 基因的 pBI121 载体, 成功构建 4 个 LjU6-pBI121 融合表达载体, 通过农杆菌瞬时转化法转化烟草叶片, 并对叶片进行 GUS 组织化学染色, 染色结果显示 LjU61-F1 转录活性最高, 本研究初步筛选出转录活性较高的忍冬 U6 启动子, 为忍冬 CRISPR/Cas9 基因组编辑技术的建立奠定了基础。

关键词: 忍冬; U6 启动子; 瞬时表达; β -葡萄糖苷酸酶染色; 基因编辑

中图分类号: R931 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2022)04-1187-06

Cloning and functional verification of a U6 promoter with high transcriptional activity in *Lonicera japonica*

XU Xiao-han¹, LI Xiao-li¹, TANG Zhi-qiang¹, LIU Qian^{1,2}, LI Jia^{1,2}, LIU Zhen-hua^{1,2},
ZHANG Yong-qing^{1,2}, PU Gao-bin^{1,2*}

(1. Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China; 2. Shandong Provincial Collaborative Innovation Center for Quality Control and Construction of the Whole Industrial Chain of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China)

Abstract: Using *Lonicera japonica* genomic DNA as a template, we cloned *Lonicera japonica* U6 promoters. Four LjU6 promoters, 336, 708, 359 and 602 bp in length, were cloned by PCR from *Lonicera japonica* genomic DNA. PlantCARE analysis found that the four promoters contained typical promoter *cis*-elements, such as a TATA box and CAAT box, and contained regulatory elements related to light response and stress response. After the cloning products were sequenced, the LjU6 promoter was ligated to the pBI121 vector carrying the β -glucuronidase (GUS) gene to construct four LjU6-pBI121 fusion expression vectors. *Nicotiana tabacum* leaves were transformed by the *Agrobacterium* transient transformation method and GUS histochemical staining was performed on the leaves. The staining results showed that LjU61-F1 had the highest transcriptional activity. This study thus identified a U6 promoter with high transcriptional activity, providing a basis for the establishment of CRISPR/Cas9 genome editing technology in *Lonicera japonica*.

Key words: *Lonicera japonica*; U6 promoter; transient expression; β -glucuronidase staining; gene editing

收稿日期: 2021-10-08; 修回日期: 2021-11-01.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81872963); 中央本级重大增减支项目“名贵中药资源可持续利用能力建设” (2060302); 山东省高等学校优秀青年创新团队支持计划 (2019 KJE004); 山东省重大科技创新工程 (2019JZZY011020).

*通讯作者 E-mail: gbpu@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2021-1454

近年来, CRISPR/Cas9 技术因其操作简便、实验周期短、效率高、脱靶率低等特点成为最常用的基因编辑技术,在作物遗传育种、植物基因改造及农作物品种改良方面展现巨大的潜力^[1-3]。CRISPR/Cas9 基因编辑系统包括能够作为核酸酶切割双链 DNA 的 Cas9 蛋白以及一个人工融合的单向导 RNA (single guide RNA, sgRNA), sgRNA 决定靶序列的特异性^[4,5],在 CRISPR/Cas9 基因编辑系统起着重要作用。前人研究表明,CRISPR/Cas9 技术编辑效率依赖于 Cas9 和 sgRNA 的高表达^[6,7],强组成型 RNA 聚合酶 II 启动子如花椰菜花叶病毒 35S (CaMV35S),通常用于驱动 Cas9 表达,而 sgRNA 通常由 U6 启动子驱动。U6 启动子是一种 RNA 聚合酶 III 启动子,具有明确的转录起始位点,能识别从 G 开始的高度保守的起始位点,已被频繁用于驱动植物小 RNA 的高表达水平^[8,9],并已成为驱动 CRISPR/Cas9 载体中 sgRNA 表达的首选。

研究表明,同一物种基因组中存在多个不同表达的 U6 基因,并非所有的 U6 启动子都能驱动基因表达且不同启动子转录效率并不相同^[10,11],U6 启动子的高度保守性使其在不同的物种之间仍具有转录活性,但在同源关系较远的不同物种之间中转录活性存在一定差异^[12],有文献报道内源性 U6 启动子可使 sgRNA 表达增加,从而提高编辑效率^[13,14],在大豆中,使用大豆内源性 U6 启动子 GmU6-10 构建 pCas9-GmU6-sgRNA 载体突变率远高于使用拟南芥 AtU6-26 构建的 pCas9-AtU6-sgRNA 载体的突变率^[15]。Long 等^[16]使用棉花内源性 GhU6.3 启动子驱动 sgRNA 发现其表达量是拟南芥 AtU6-29 启动子的 6~7 倍,编辑的突变效率提高了 4~6 倍。目前,已在拟南芥^[17]、水稻^[18]、小麦^[19]、大豆^[20]、玉米^[21]、棉花^[22]、番茄^[23]等多种植物中利用植物自身的 U6 启动子建立 CRISPR/Cas9 基因组编辑系统,实现目的基因的高效编辑。

金银花为忍冬科植物忍冬 (*Lonicera japonica* Thunb.) 的干燥花蕾或带初开的花,具有清热解毒、疏散风热的功效,主要活性成分为黄酮类、有机酸、挥发油、三萜皂苷等,开发利用前景广阔,需求量逐年增加^[24,25]。然而,关于忍冬 U6 启动子的研究尚未见报道,严重制约了忍冬基因编辑技术的开展。本文通过 PCR 及农杆菌侵染烟草叶片瞬时转化方法克隆并筛选高转录活性的忍冬 U6 启动子,对于构建忍冬 CRISPR/Cas9 基因编辑系统,实现忍冬的分子育种具有重要意义。

材料与方 法

材料 忍冬、烟草植株栽培于山东中医药大学,经山东中医药大学蒲高斌教授鉴定为忍冬 *Lonicera*

japonica Thunb.、烟草 *Nicotiana tabacum*。pBI121 双元表达载体由山东中医药大学药学院实验室保存。植物 DNA 提取试剂盒和 5 minTM TA/Blunt-Zero Cloning Kit (南京诺唯赞生物科技股份有限公司);通用型 DNA 纯化回收试剂盒、质粒小提试剂盒和 DNA 分子量 Marker DL2000 (天根生化科技(北京)有限公司);T4 DNA 连接酶 (NEB 北京有限公司);Trans 5 α Chemically Competent Cell (全式金生物公司);限制性内切酶 *Hind*III 和 *Bam*HI (赛默飞世尔科技公司);LBA4404 Chemically Competent Cell (上海唯地生物技术有限公司);纤维素酶 R-10、离析酶 R-10、X-Gluc、10 \times PBS 缓冲液 (北京索莱宝科技有限公司);引物由铂尚生物技术(上海)有限公司负责合成。

忍冬 U6 启动子的克隆 取忍冬叶片,采用植物基因组 DNA 提取试剂盒提取忍冬的 DNA,用保守的 U6 RNA 序列在忍冬基因组中搜索候选 U6 RNA 对应的 U6 启动子序列,并设计 PCR 扩增引物(表 1),进行 PCR 扩增。PCR 反应程序为① 95 $^{\circ}$ C 3 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 32 个循环; 72 $^{\circ}$ C 5 min; 4 $^{\circ}$ C 保存。② 95 $^{\circ}$ C 3 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 52 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 32 个循环; 72 $^{\circ}$ C 5 min; 4 $^{\circ}$ C 保存。反应体系为 ddH₂O 11 μ L、2 \times M5 Hiper plus Taq HiFi 10 μ L、DNA 模板 1 μ L、上下游引物各 0.5 μ L,共 20 μ L 体系;1% 琼脂糖凝胶电泳进行检测,切胶回收获得目的 DNA 片段,根据序列不同及长短差异将启动子分别命名为 LjU61-F1、LjU61-F2、LjU62-F1、LjU62-F2。将启动子片段与 pCE2 TA/Blunt-Zero 载体连接并转化到 Trans 5 α 感受态细胞中,涂板并挑单克隆,37 $^{\circ}$ C、200 r \cdot min⁻¹ 摇菌,将一次活化菌液送至铂尚生物技术有限公司测序,随后用 DNAMAN 软件对测序结果进行序列比对分析,正确的质粒分别命名为 T-LjU61-F1、T-LjU61-F2、T-LjU62-F1、T-LjU62-F2。

Table 1 Primer sequences used in this study

Primer name	Primer sequence (5' to 3')	Annealing temperature / $^{\circ}$ C
LjU61-F1	AAGCTTAGCAATGTCATACTCTAAC	58.32
LjU61-R	GGATCCTGTCTTCATCTCACTCATC	59.58
LjU61-F2	AAGCTTGTCTCGTTGTCAGTTG	57.67
LjU61-R	GGATCCTGTCTTCATCTCACTCATC	59.58
LjU62-F1	AAGCTTAAATTTTGATTGTGATCAGTG	55.22
LjU62-R	GGATCCACGTTTCTTTTGAAGTAGTTC	58.09
LjU62-F2	AAGCTTTTAGCACATTGAATTTGGC	54.66
LjU62-R	GGATCCACGTTTCTTTTGAAGTAGTTC	58.09

启动子顺式作用元件分析 将测序结果提交启动子元件在线分析网站 PlantCARE,对忍冬 U6 启动子中的顺式作用元件进行分析。

融合表达载体的构建 分别用 *Hind*III 和 *Bam*HI 对 T-LjU61-F1、T-LjU61-F2、T-LjU62-F1、T-LjU62-F2 质粒及植物表达载体 pBI121 进行双酶切, 切胶回收目的片段, 将克隆得到的 LjU6 启动子取代 pBI121 载体中的 CaMV35S 启动子, 并与 GUS 基因连接, 从而构建 pBI121 融合表达载体。将融合表达载体转化 *Trans* 5 α 感受态细胞, 其一次活化菌液经 PCR 验证正确后, 二次活化菌液并提取质粒。质粒转入 LBA4404 农杆菌感受态细胞中, 28 °C 倒置培养 2 d, 挑取单克隆于 LB 液体培养基 [卡那霉素 (Kan) 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 利福平 (Rif) 20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$] 中进行一次活化, 对一次活化菌液进行 PCR 验证, 验证成功后, 保存一次活化菌液于 -80 °C 备用。

不同启动子在烟草叶片中的瞬时表达分析 参考蒲艳等^[23]的方法, 以 LBA4404 农杆菌感受态细胞作为阴性对照, CaMV35S-pBI121 作为阳性对照。将构建的 4 个 LjU6-pBI121 融合表达载体以及阳性对照、阴性对照的一次活化农杆菌菌液划线培养, 挑取单克隆于 LB 液体培养基中 (Kan 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, Rif 20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 活化, 28 °C、200 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 摇菌至菌液 A_{600} 值在 0.6~0.8 左右; 分别吸取不同体积的活化菌液接种到 5 mL LB 液体培养基 (含 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Kan 和 20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Rif) 中, 使每个农杆菌起始菌液 A 值相同, 再次 28 °C、200 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 摇菌至所有菌液的 A_{600} 值为 1.2 时, 12 000 $\times g$ 离心 5 min 收集菌体, 弃上清液, 重悬于缓冲液 (50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ MgCl₂、200 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 吗啉乙磺酸、20 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 乙酰丁香酮) 至 1 mL, 室温放置 3 h 后分别注射到生长 2~3 周的烟草叶片中, 注射完成后做好标记, 进行过夜暗培养。用剪刀分别剪下暗培养过夜后的烟草叶片, 浸泡在 100 μL β -葡萄糖苷酸酶 (GUS) 染液中 (20 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ X-Gluc, 50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ PBS 缓冲液), 抽真空 30 min。每种农杆菌转化进行技术重复 3 次, 生物学重复 3 次。

将抽完真空后的烟草叶片置于 37 °C、180 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 振荡染色 6~7 h, 吸尽 GUS 染液。最后加入 300 μL 95% 乙醇进行脱色处理, 脱色时, 每 3~4 h 更换一次脱色液, 直至叶片绿色褪去, 观察脱色后的叶片并拍照, 根据染色情况筛选出高效转录的 U6 启动子。

结果与分析

1 忍冬启动子片段鉴定

从忍冬基因组 DNA 中成功克隆出 LjU61-F1、LjU61-F2、LjU62-F1、LjU62-F2 共 4 个 LjU6 启动子片段, 长度分别为 336、708、359、602 bp, 测序结果显示 4 个 LjU6 启动子片段序列正确。

2 启动子序列分析

通过序列分析 (表 2、3), 可以发现 4 个启动子中均含有 TATA 框以及 CAAT 框等典型的启动子顺式元件, LjU61 中还存在 AT 富集区、脱落酸反应顺式作用元件 ABRE (ACGTG)、防御和应激反应顺式作用元件 TC-rich repeats (ATTCTCTAAC)、生长素反应元件 AuxRE (TGTCTCAATAAG) 等^[26], 此外还含有多个光反应或光反应相关的元件 ACE (GACACGTATG)、G-box (TACGTG)、Box II (TGGAATAA)、GT1-motif (GGTTAA) 等, 与 LjU61 相比, LjU62 中含有顺式作用元件种类较少, 主要为光反应或光反应相关的元件 4cl-CMA1b (ATTCCGATAAACT)、Box4 (ATTAAT) 及 GA-motif (ATAGATAA) 等, 此外还含有参与逆境反应元件 CCAAT-box。

3 融合表达载体的构建

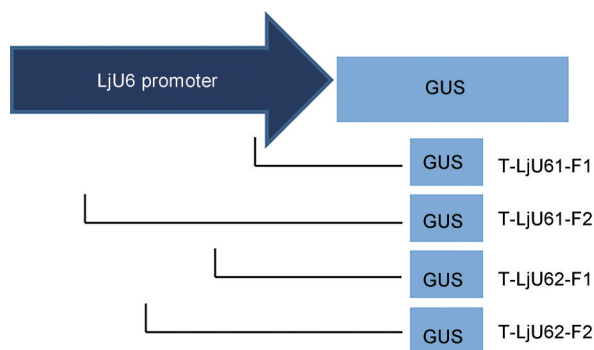
忍冬不同启动子驱动 GUS 基因的融合表达载体示意图如图 1。*Hind*III 和 *Bam*HI 双酶切 T-LjU61-F1、T-LjU61-F2、T-LjU62-F1、T-LjU62-F2 质粒和植物表达载体 pBI121, 1% 琼脂糖凝胶电泳得到目的片段, 其大小与预测片段大小相符 (图 2); 切胶回收不同 LjU6 片

Table 2 Analysis of the *cis*-acting elements of LjU61 promoter

<i>cis</i> -Acting element	Location	Function
ABRE	+687	<i>cis</i> -Acting element involved in the abscisic acid responsiveness
ACE	-684	<i>cis</i> -Acting element involved in light responsiveness
AT-rich element	-625	Binding site of AT-rich DNA binding protein (ATBP-1)
AuxRE	+573	Part of an auxin-responsive element
Box II	-588	Part of a light responsive element
CAAT-box	+99, +167, +178, +257, +417, +442, +465, +519, +549, +578, +662, +670, -22, -42, -140, -145, -151, -260, -432	Common <i>cis</i> -acting element in promoter and enhancer regions
G-box	+686	<i>cis</i> -Acting regulatory element involved in light responsiveness
GT1-motif	+707	Light responsive element
MBS	-119	MYB binding site involved in drought-inducibility
TATA-box	+125, +136, +376, +653, +601, -126, -447, -461, -583, -602, -656, -680	Core promoter element around -30 of transcription start
TC-rich repeats	+490	<i>cis</i> -Acting element involved in defense and stress responsiveness
TCT-motif	+319	Part of a light responsive element

Table 3 Analysis of the *cis*-acting elements of LjU62 promoter

<i>cis</i> -Acting element	Location	Function
4cI-CMA1b	-354	Light responsive element
Box 4	+148, -500, -522	Part of a conserved DNA module involved in light responsiveness
CAAT-box	+104, +114, +167, +315, +539, -39, -74, -116, -169, -194, -199, -256, -276, -438	Common <i>cis</i> -acting element in promoter and enhancer regions
CCAAT-box	-388	Participating in various adverse reactions
GA-motif	+32	Part of a light responsive element
TATA-box	+248, +250, -249, -479, -563, -565, -582, -585	Determining the starting point of RNA synthesis

**Figure 1** Construction of GUS reporter gene fusion expression vector driven by LjU6 promoter

段及切除 CaMV35S 启动子后 pBI121 载体大片段, 将目的片段用 T4 连接酶连接后转化 *Trans 5α* 感受态细胞, 利用其一次活化菌液进行 PCR 鉴定, 1% 琼脂糖凝胶电泳显示可扩增出启动子条带且大小与预期相符 (图 3), 表明融合表达载体构建成功, 可进行下一步实验; 菌液二次活化后提取质粒, 将融合表达载体质粒转化 LBA4404 农杆菌感受态细胞, 对其一次活化菌液进行 PCR 鉴定, 1% 琼脂糖凝胶电泳显示可扩增出目的条带且大小与预期相符 (图 4), 表明转化成功。

4 不同启动子转录活性分析

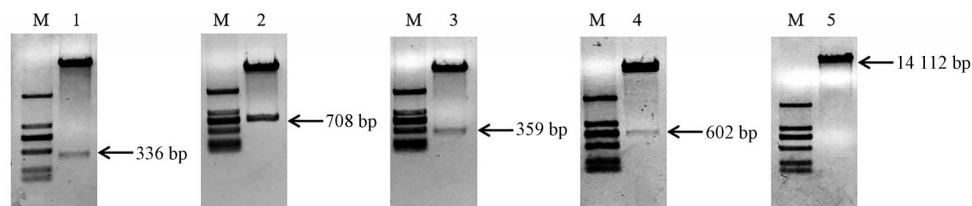
将各 LjU6-pBI121 融合表达载体通过农杆菌注射法瞬时转化烟草叶片, 并以 CaMV35S-pBI121 为阳性对照、LBA4404 农杆菌为阴性对照, 通过 GUS 组织化学染色脱色后可发现, 阴性对照及 LjU62-F1 启动子处理叶片未观察到蓝色, CaMV35S、LjU61-F1、LjU61-F2、LjU62-F2 启动子处理的烟草叶片可观察到蓝色, 说明克隆的 4 个 LjU6 启动子中有 3 个能驱动报告基因 GUS

的表达, 且转录活性并不相同 (图 5)。

讨论

本研究首次克隆得到忍冬 LjU6 启动子, 并对其进行了顺式作用元件分析, 前人研究表明启动子的结构包括顺式作用元件的排列位置及距离影响其与 RNA 聚合酶的识别、结合, 从而影响基因表达水平^[27]; 同时, 顺式作用元件 CAAT 框对于基因的转录具有较强的激活作用, 在 TATA 框上游含有 CAAT 框将使基因的表达量大幅度增加^[28]。在本研究中发现相较于 LjU62, LjU61 中含有更多的 CAAT 框, 这可能是其转录活性高于 LjU62 的一个原因。

本研究利用 GUS 作为报告基因, 通过瞬时转化烟草叶片后染色颜色深浅判断启动子活性, GUS 组织化学染色结果显示, 克隆的 4 个 U6 启动子在烟草叶片中的转录效率并不相同。已有研究表明, 在保证 U6 启动子具有高转录活性的基础上, 较短的 U6 启动子更有利于构建 CRISPR/Cas9 基因编辑载体^[29]。本实验结果也表明相对于序列较长的 LjU61-F2, 截短的 LjU61-F1 的转录活性更高。Lei 等^[29]测定棉花 6 个不同长度 U6 启动子转录活性也发现启动子的序列越短, 其转录活性越高, 猜测其原因一方面可能是顺式作用元件的数目与位置影响其转录活性, 另一方面有可能是启动子序列过长, 在其上存在一些抑制因子, 使较长的 U6 启动子的转录活性下降^[30], 此问题有待深入研究。LjU62-F1 在 GUS 染色中未显蓝色, 观察序列发现 LjU62-F1 中除少数 TATA 以及光响应序列无其他结构, 其是否因为缺少某些元件而丧失了转录活性仍有待进一步研究。

**Figure 2** Identification of different truncated T-LjU6 expression vectors by restriction enzyme digestion. M: 2 kb Plus DNA marker; 1: T-LjU61-F1; 2: T-LjU61-F2; 3: T-LjU62-F1; 4: T-LjU62-F2; 5: 35S-pBI121 enzyme section

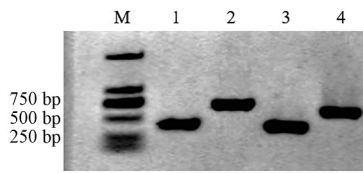


Figure 3 PCR detection of LjU6-pBI121 expression vector in Trans 5 α competent cells. M: 2 kb Plus DNA marker; 1: LjU61-F1-pBI121 (336 bp); 2: LjU61-F2-pBI121 (708 bp); 3: LjU62-F1-pBI121 (359 bp); 4: LjU62-F2-pBI121 (602 bp)

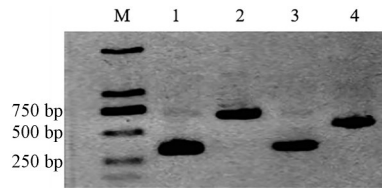


Figure 4 PCR detection of LjU6-pBI121 expression vector in LBA4404 competent cells. M: 2 kb Plus DNA marker; 1: LjU61-F1-pBI121 (336 bp); 2: LjU61-F2-pBI121 (708 bp); 3: LjU62-F1-pBI121 (359 bp); 4: LjU62-F2-pBI121 (602 bp)

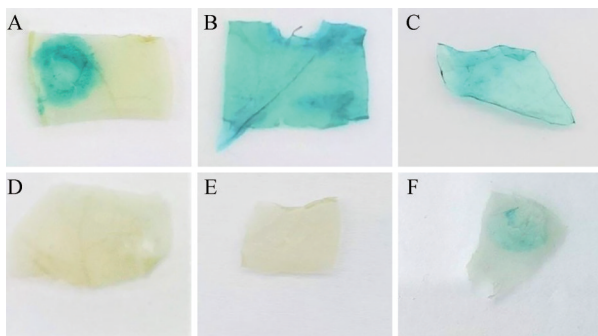


Figure 5 Expression of GUS driven by different LjU6 promoters in *Nicotiana tabacum* leaves. A: CaMV35S-pBI121 positive control; B: LjU61-F1:GUS; C: LjU61-F2:GUS; D: *Agrobacterium* negative control; E: LjU62-F1:GUS; F: LjU62-F2:GUS

作者贡献: 第一作者许小涵负责 DNA 提取、启动子克隆、烟草转化及论文撰写, 李小丽、唐志强和刘谦构建融合表达载体; 李佳、刘振华和张永清参与实验材料的准备及数据分析, 通讯作者蒲高斌指导选题及方案实施, 并对论文进行了修改。

利益冲突: 本文所有作者声明不存在利益冲突。

References

- [1] Cao HX, Wang W, Le HT, et al. The power of CRISPR-Cas9-induced genome editing to speed up plant breeding [J]. *Int J Genomics*, 2016, 2016: 5078796.
- [2] Wang Y, Huang G, Yang H, et al. Advances on nonviral vectors of CRISPR/Cas9 system for genome editing [J]. *Acta Pharm Sin (药理学学报)*, 2020, 55: 2606-2617.
- [3] Nie LZ, Fang YY. Research progress of genome editing technology CRISPR/Cas9 and CRISPR/Cpf1 in crop [J]. *J North Agric (北方农业学报)*, 2019, 47: 27-32.
- [4] Shan QW, Gao CX. Research progress of genome editing and derivative technologies in plants [J]. *Hereditas (遗传)*, 2015, 37: 953-973.
- [5] Su YK, Qiu JR, Zhang H, et al. Advances in technology improvement and innovation of CRISPR/Cas9 system in plant genome editing [J]. *Chin Bull Bot (植物学报)*, 2019, 54: 385-395.
- [6] Ng H, Dean N. Dramatic improvement of CRISPR/Cas9 editing in *Candida albicans* by increased single guide RNA expression [J]. *mSphere*, 2017, 2: e00385-16.
- [7] Jiang W, Zhou H, Bi H, et al. Demonstration of CRISPR/Cas9/sgRNA-mediated targeted gene modification in *Arabidopsis*, tobacco, sorghum and rice [J]. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41: e188.
- [8] Preece R, Georgiadis C, Gkazi SA, et al. 'Mini' U6 Pol III promoter exhibits nucleosome redundancy and supports multiplexed coupling of CRISPR/Cas9 effects [J]. *Gene Ther*, 2020, 27: 451-458.
- [9] Miyagishi M, Taira K. U6 promoter-driven siRNAs with four uridine 3' overhangs efficiently suppress targeted gene expression in mammalian cells [J]. *Nat Biotechnol*, 2002, 20: 497-500.
- [10] Ren C, Liu Y, Guo Y, et al. Optimizing the CRISPR/Cas9 system for genome editing in grape by using grape promoters [J]. *Hort Res*, 2021, 8: 52.
- [11] Wang MB, Helliwell CA, Wu LM, et al. Hairpin RNAs derived from RNA polymerase II and polymerase III promoter-directed transgenes are processed differently in plants [J]. *RNA*, 2008, 14: 903-913.
- [12] Bian SX, Han XL, Yuan GP, et al. Cloning and functional analysis of U6 promoter in apple [J]. *Sci Agric Sin (中国农业科学)*, 2019, 52: 4364-4373.
- [13] Wang C, Rollins JA. Efficient genome editing using endogenous U6 snRNA promoter-driven CRISPR/Cas9 sgRNA in *Sclerotinia sclerotiorum* [J]. *Fungal Genet Biol*, 2021, 154: 103598.
- [14] Ni XY, Lu WJ, Qiao X, et al. Genome editing efficiency of four *Drosophila suzukii* endogenous U6 promoters [J]. *Insect Mol Biol*, 2021, 30: 420-426.
- [15] Sun X, Hu Z, Chen R, et al. Targeted mutagenesis in soybean using the CRISPR-Cas9 system [J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 10342.
- [16] Long L, Guo DD, Gao W, et al. Optimization of CRISPR/Cas9 genome editing in cotton by improved sgRNA expression [J]. *Plant Methods*, 2018, 14: 85.
- [17] Wu GF, Cheng HB, Wu YJ, et al. Identification of knockout of BRI1 mutant in *Arabidopsis* mediated by CRISPR/Cas9 [J]. *Bull Bot Res (植物研究)*, 2021, 41: 362-371.
- [18] Yi Y, Zheng R, Yang B, et al. CRISPR/Cas9 mutants construction of rice zinc finger protein gene and mutation analysis [J]. *J South Agric (南方农业学报)*, 2020, 51: 2607-2613.
- [19] Sanchez-Leon S, Gil-Humanes J, Ozuna CV, et al. Low-gluten,

- nontransgenic wheat engineered with CRISPR/Cas9 [J]. Plant Biotechnol J, 2018, 16: 902-910.
- [20] Di YH, Sun XJ, Hu Z, et al. Enhancing the CRISPR/Cas9 system based on multiple GmU6 promoters in soybean [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2019, 519: 819-823.
- [21] Zhang X, Shi YX, Lu BS, et al. Creation of new maize variety with fragrant rice like flavor by editing BADH2-1 and BADH2-2 using CRISPR/Cas9 [J]. Sci Agric Sin (中国农业科学), 2021, 54: 2064-2075.
- [22] Zang XY, Dai PH, Li JY, et al. Functional identification of cotton U6 promoters in the CRISPR/Cas9 genome editing system [J]. J Xinjiang Agric Univ (新疆农业大学学报), 2018, 41: 31-35.
- [23] Pu Y, Liu C, Li JY, et al. Different SIU6 promoters cloning and establishment of CRISPR/Cas9 mediated gene editing system in tomato [J]. Sci Agric Sin (中国农业科学), 2018, 51: 315-326.
- [24] Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of People's Republic of China (中华人民共和国药典) [S]. Beijing: China Medical Science Press, 2020: 52, 230.
- [25] Qi LJ, Yuan Y, Wu C, et al. Bioinformatics analysis of DNA demethylase genes in *Lonicera japonica* Thunb [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2015, 50: 367-371.
- [26] Xie DJ, Ye YJ, Yang DM, et al. Cloning and analysis of the DXR gene and its promoter in *Morinda officinalis* [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2020, 55: 335-344.
- [27] Tang F, Tu HZ. Research progress of eukaryotic promoter [J]. China Forest Sci Technol (林业科技开发), 2015, 29: 7-12.
- [28] Li T, Sun JK, Liu JT. Research advances on plant promote [J]. Biotechnol Bull (生物技术通报), 2015, 31: 18-25.
- [29] Lei JF, Li Y, Xu XX, et al. Cloning and functional analysis of different truncated GbU6 promoters in cotton [J]. Acta Agron Sin (作物学报), 2016, 42: 675-683.
- [30] Domitrovich AM, Kunkel GR. Multiple, dispersed human U6 small nuclear RNA genes with varied transcriptional efficiencies [J]. Nucleic Acids Res, 2003, 31: 2344-2352.