

DOI: 10.16861/j.cnki.zggc.202423.0786

发根农杆菌介导的甜瓜 CRISPR/Cas9 系统靶位点的检测

朱 蕾

(黑龙江省农业科学院大庆分院 黑龙江大庆 163711)

摘要: 选取甜瓜栽培材料龙庆八号作为受体材料, 构建 *CmCURTIA* 基因 CRISPR/Cas9 基因编辑载体, 经发根农杆菌介导检测靶位点的编辑情况, 为后续甜瓜遗传转化试验提供载体基础。以甜瓜 *CmCURTIA* 基因 (ID: MELO3C006053.2) 为靶基因构建双靶位点敲除载体, 经发根农杆菌 K599 介导的简单遗传转化技术使甜瓜组织长出不定根, 经 PCR 测序发现在不定根中分别存在 65 bp、72 bp 不同碱基片段的缺失。该方法成功进行了甜瓜 CRISPR/Cas9 载体靶位点敲除情况的检测, 简单高效, 实现了在甜瓜中基因编辑靶点的快速鉴定, 为研究甜瓜基因功能和遗传改良奠定基础。

关键词: 甜瓜; CRISPR/Cas9; 发根农杆菌; 基因敲除

中图分类号: S652

文献标志码: A

文章编号: 1673-2871(2024)08-015-09

Detection of target sites of CRISPR/Cas9 system in melon by *Agrobacterium rhizogenes* system

ZHU Lei

(Daqing Branch of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Daqing 163711, Heilongjiang, China)

Abstract: The cultivation melon Long Qing No. 8 was used as the receptor material to construct the CRISPR/Cas9 editing vector of *CmCURTIA* gene. The target site was detected through *Agrobacterium rhizogenes*, which provided the vector basis for subsequent genetic transformation experiment of melon. A double target knockout vector was constructed using the *CmCURTIA* gene (ID: MELO3C006053.2) as the target gene. Through a simple genetic transformation technique mediated by *Agrobacterium rhizome* K599, adventitious roots were grown. PCR sequencing revealed that different base fragments of 65 bp and 72 bp were absent in the adventitious roots. The method was simple and efficient for the detection of CRISPR/Cas9 vector target site knockout in melon, realizing rapid identification of gene editing targets, and laying a foundation for studying the gene function and genetic improvement in melon.

Key words: Melon; CRISPR/Cas9 system; *Agrobacterium rhizogenes*; Gene knockout

甜瓜为葫芦科甜瓜属作物, 其含有丰富的可溶性固形物和维生素等营养物质, 同时也是典型的喜光、耐热植物, 是我国重要的水果型经济作物。叶片是甜瓜进行光合作用的主要场所, 叶片中的叶绿体吸收光能转为化学能, 进而积累有机物供给植物生长发育。类囊体是叶绿体细胞器中重要的片层结构, 类囊体的结构、数量、大小都可能会影响叶绿体的结构, 进而影响植物的光合作用^[1-2]。随着甜瓜全基因组测序工程的完成, 有关甜瓜叶绿体发育相关基因的研究正在稳步进行, 甜瓜叶绿体基因组中约有 115 个基因, 且有高度保守性^[3]。这些基因主

要分为三大类: 光合作用相关基因, 叶绿体转录、翻译、表达相关基因, 其他蛋白质编码基因等^[4]。研究发现, 在盐胁迫下, *CmCURTIA* 基因的表达显著下调, 且叶绿体超微结构显示类囊体排列不均匀、不清晰且数量减少^[5]。因此, 深入研究甜瓜叶绿体相关基因 *CmCURTIA*, 为促进甜瓜有机物的生成和产量的提高奠定了研究基础。

近年来, 利用基因工程和细胞工程等技术改良园艺作物品质已取得重大进展。基因编辑技术实现了精准地对靶标基因进行定向修饰, 使 DNA 双链断裂, 并利用 DNA 自身的修复特性对靶标基因

收稿日期: 2023-12-19; 修回日期: 2024-02-26

基金项目: 黑龙江省农业科技创新跨越工程优青项目 (CX22YQ32); 黑龙江省农业科技创新跨越工程农业特色产业项目 (CX23TS11)

作者简介: 朱 蕾, 女, 副研究员, 研究方向为蔬菜栽培生理与品质调控。E-mail: 583692793@qq.com

进行敲除、替换、插入、突变等人工修饰^[6]。CRISPR/Cas9 系统因具有简单、高效、精准等优点成为当前广泛应用到拟南芥^[7]、水稻^[8]、玉米^[9]、大豆^[10]、棉花^[11]、番茄^[12]等重要作物中的基因编辑系统^[13]。CRISPR/Cas9 系统在寻找靶位点时,可能会受到基因组中其他高度相似序列的干扰,导致在非目标位置发生切割,即脱靶效应^[14-15]。

CRISPR/Cas9 基因编辑系统在研究甜瓜基因功能方面非常重要,因此高效、准确地实现靶位点的切割是进行甜瓜基因功能分析的重要基础。由于甜瓜的遗传转化周期较长、过程复杂繁琐、转化效率偏低等,利用发根农杆菌(*Agrobacterium rhizogenes*)^[16]介导的遗传转化技术促使甜瓜产生不定根进行靶位点检测是当前可以快速获得甜瓜靶位点切割情况的方式。发根农杆菌的工作原理是利用其能力诱导植物伤口形成不定根,并通过携带 T-DNA 的 Ri 质粒侵入细胞,将 T-DNA 插入植物基因组中^[17]。发根农杆菌介导的植物遗传转化技术已经广泛应用于大豆、黄瓜、西瓜、甜瓜等植物中^[18-21]。

甜瓜遗传转化过程复杂,周期较长,且 CRISPR/Cas9 基因编辑系统存在一定的脱靶风险。2016 年,Chandrasekaran 等^[22]报道了利用 pKSE402 基因编辑载体在黄瓜中成功敲除 *eIF4E* 单个核苷酸,但转化率不足 1%;Feng 等^[23]利用添加了 *GRF/GIF* 生长因子基因的 CRISPR/Cas9 载体使得西瓜材料 TC 的基因编辑效率达到 47.02%;2022 年,Xin 等^[24]对甜瓜基因型、侵染时间和条件等进行优化,通过观察 GFP 荧光信号的强弱获得最优的遗传转化体系。因此,为了快速检测靶位点的敲除情况,便于后续甜瓜遗传转化试验的顺利进行,笔者构建了甜瓜 *CmCUTRIA* 基因双靶点基因敲除载体,并利用发根农杆菌介导甜瓜外植体产生不定根,通过不定根中 GFP 荧光信号的强弱进行筛选并测序,为实现甜瓜基因组编辑及基因功能的验证奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

试验选取的甜瓜栽培材料龙庆八号为黑龙江省农业科学院大庆分院自主选育的薄皮甜瓜品种,其具备可溶性固形物含量高、抗逆性强等优良性状,且再生能力较强,种质资源保存在黑龙江省农业科学院大庆分院。

1.2 田间试验设计与时间安排

2023 年 3 月,挑选甜瓜栽培材料龙庆八号饱满种子进行催芽、育苗,于黑龙江省安达市育种基地育苗温室内进行。

2023 年 4—5 月,选取长势一致、健壮幼苗 20 株,定植于黑龙江省安达市育种基地,设置随机区组,株行距 30 cm×50 cm,常规肥水管理,使用地膜覆盖,田间管理采用多蔓整枝,严格控制人工自交授粉,后期进行疏花疏果,每株留 1~2 个瓜为宜。

2023 年 7 月,果实成熟后采收,将采收的种子淘洗、晾干后,挑选成熟、饱满的籽粒装袋,注明品种与采收日期,以备后续试验使用。

1.3 分子试验设计

1.3.1 植物材料 分子试验材料为甜瓜栽培材料龙庆八号幼嫩叶片组织总 RNA 和龙庆八号成熟饱满种子。

1.3.2 菌株材料 基因克隆所使用的载体为 pMD-18T, CRISPR-Cas9 基因编辑载体为 pKSE402-PCBC-DT1T2,载体由黑龙江省八一农垦大学园艺学院提供。大肠杆菌(*E. coli*)DH5 α 菌株和发根农杆菌 K599 菌株分别购自上海唯地生物技术有限公司。

1.3.3 试验设计 2023 年 5 月提取幼嫩叶片总 RNA,反转录为 cDNA,设计特异性引物,采用 TA 克隆进行 *CmCUTRIA* 基因克隆并分析序列差异;2023 年 7—8 月构建甜瓜 CRISPR/Cas9 敲除载体,并进行发根农杆菌介导的甜瓜遗传转化试验。

1.4 植物总 RNA 的提取与 cDNA 的反转录

取甜瓜幼嫩叶片于 2 mL 离心管中,在液氮中速冻、研磨,迅速加入裂解液,后续操作按照植物总 RNA 快速抽提试剂盒(上海生工)说明书进行,利用高速微型离心机进行低温、高速离心。

cDNA 的反转录利用 HiScript II Q Select RT SuperMix for qPCR(+gDNA wiper)进行,反转录后的 cDNA 置于-20 °C 保存,避免反复冻融。

1.5 *CmCUTRIA* 基因的克隆及序列差异分析

参考葫芦科基因组数据库 CuGenDB(Cucurbit Genomics Database)获得 *CmCUTRIA* 基因参考序列,利用 Primer Premier 5.0 设计基因扩增引物。上游引物 clone-F: ATGGCAGCCACGGCCTCCCCT,下游引物 clone-R: TTATTCGGTCCAG-CAATCTTC。

在无 RNA 酶的 200 μ L 离心管中添加:稀释 5 倍的 cDNA 2 μ L、10 μ mol·L⁻¹ clone-F/R 各 1 μ L、2 × Rapid Taq Master Mix 12.5 μ L、ddH₂O 8.5 μ L,用

瞬时离心机进行混匀。PCR 扩增程序:95 °C 预变性 3 min;95 °C 变性 15 s,56 °C 退火 15 s,72 °C 延伸 20 s,35 个循环数;72 °C 延伸 5 min。反应后用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测目的基因条带,并利用 DNA 纯化试剂盒 FastPure Gel DNA Extraction Mini Kit 进行切胶回收。

将目的基因与 pMD-18T 载体按照载体说明书进行连接,然后将反应液转化入大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中。接着,在含有 50 mg·L⁻¹ 氨苄青霉素的 LB 固体平板上倒置过夜培养于 37 °C。第 2 天,挑取白色饱满的单菌落,利用预先设计的引物和 PCR 扩增程序进行 PCR 检测,随后将阳性菌液送至上海生工进行测序。最后,利用 DNAMAN 进行序列差异比对分析。

1.6 双靶位点的选择

本研究所选取的敲除基因为甜瓜类囊体结构蛋白关键基因 *CmCUTR1A* (Gene ID: *ME-LO3C006053.2*),在使用在线靶位点设计软件 CRISPR-P2.0 (<http://crispr.hzau.edu.cn/CRISPR2/>) 进行靶位点设计时,需要根据 CRISPR/Cas9 系统的特点来识别目标序列中含有 PAM 序列的区域。通常情况下,为确保编辑效果,在选择靶位点时会考虑其 GC 含量不低于 40%。同时,为避免试验中出现脱靶现象,会对所选的靶位点进行特异性分析。为了提高编辑效率,选择 2 个靶位点进行编辑。

1.7 CRISPR/Cas9 敲除载体的构建

(1) 本试验所用的 CRISPR/Cas9 载体为 pKSE402 载体(以 pHSE401 载体为骨架改造优化),以稀释 100 倍的 pCBC-DT1T2 为模板进行 4 引物 PCR 扩增,引物序列见表 1。DT1-BsF/DT2-BsR 引物稀释至 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$;DT1-F0/DT2-R0 引物稀释至 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

(2) 纯化回收上述 PCR 产物,建立如下酶切连接体系:PCR 产物 50 ng、10 \times ligase buffer 1 μL 、T₄ DNA ligase 0.5 μL 、*Bsa*I-HF 0.5 μL 、ddH₂O 补足至 10 μL 体系。PCR 扩增程序设置:37 °C 酶切 2 min,

16 °C 连接 5 min,50 个循环数;80 °C 酶失活 5 min。

(3) 将 5 μL 上述连接产物转化入 DH5 α 感受态细胞后,涂布于含有 50 mg·L⁻¹ 卡那霉素的 LB 固体平板上,然后在 37 °C 下倒置过夜进行培养。第 2 天,挑选白色饱满的单菌落,利用特异性引物 U626-IDF 和 U629-IDR 进行菌液 PCR 检测。阳性菌液送往上海生工进行测序(测序引物选用特异性引物 U626-IDF 和 U629-IDR)。

(4) 从测序正确的菌液中提取重组质粒,取 1 μg 重组质粒利用转化法导入 100 μL 发根农杆菌 K599 感受态中,依次进行冰浴 5 min、液氮 5 min、37 °C 水浴 5 min、冰浴 5 min,加入 700 μL 无抗生素的 TY 液体培养基;28 °C,200 r·min⁻¹ 振荡 2~3 h。涂布于含有 50 mg·L⁻¹ 卡那霉素和 50 mg·L⁻¹ 链霉素的 TY 固体平板上,28 °C 倒置培养 2~3 d。挑取白色饱满单菌落,利用特异性引物 U626-IDF 和 U629-IDR 进行 PCR 检测阳性菌液。

1.8 发根农杆菌介导的甜瓜遗传转化

(1) 从成熟甜瓜种子中,选取籽粒饱满、大小均匀、平整的龙庆八号甜瓜种子进行试验,将其浸泡在 55 °C 温水中处理 2 h,去除种皮。接下来,在 HDL 洁净工作台(北京东联哈尔仪器制造有限公司)中进行以下操作:用 75% 酒精消毒 30 s,然后用无菌水冲洗 3 次,随后用 10% NaClO 消毒 10 min,最后再用无菌水冲洗 5 次。将处理后的种子放置于含有 8% 琼脂的培养基中,每个培养皿 30~40 粒种子。将培养皿置于 28 °C 连续黑暗条件下培养 2 d,直至甜瓜种子萌发。

(2) 选取萌发饱满的甜瓜种子,将下胚轴切掉并刮去生长点子叶一分为二,切去上半部分,便于发根农杆菌的侵染。

(3) 将 PCR 检验正确的菌液接种于 50 mL 离心管中继续培养(10 mL TY 液体+50 mg·L⁻¹ 卡那霉素和 50 mg·L⁻¹ 链霉素),待菌液浓度达到 OD₆₀₀ 约 0.6 时,4000 r·min⁻¹ 离心,用灭菌的 MS 液体重悬菌体,调节重悬液浓度 OD₆₀₀ 约 0.2。将切好的甜瓜子

表 1 CRISPR/Cas9 载体构建所有引物

Table 1 All primers of CRISPR/Cas9 vector construction

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence(5'-3')
DT1-BsF	ATATATGGTCTCGATTGCCCGCCTCCGTAGAGAAGGTT
DT1-F0	TGCCCCGCCTCCGTAGAGAAGGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
DT2-R0	AACCTCACGTAGATCGTCTCTGCAATCTCTTAGTCGACTCTAC
DT2-BsR	ATTATTGGTCTCGAAACCTCACGTAGATCGTCTCTGCAA
U626-IDF	TGTCCCAGGATTAGAATGATTAGGC
U629-IDR	AGCCCTCTCTTTTCGATCCATCAAC

叶节置于 20 mL 注射器中,吸取 10 mL 菌液抽真空 2 min 后,取出晾干,平铺于覆有一层滤纸的 MS 固体培养基(MS+3.0%蔗糖+NAA α -萘乙酸 0.5 mg·L⁻¹)中,25 °C暗培养 2 d。

(4)2 d 后将暗培养的子叶节取出,用无菌水冲洗干净并晾干后,置于 MS 固体培养基(MS+3.0%蔗糖+NAA α -萘乙酸 0.5 mg·L⁻¹+特美汀 200 mg·L⁻¹)上,26 °C、光 16 h/暗 8 h 培养,约 2 周左右观察生根情况。

1.9 甜瓜不定根靶位点的检测

利用 CTAB 法提取不定根组织的 DNA^[25],根据靶位点的位置及理论敲除长度在靶点前后设计特异性引物 *CmCUTRIA-F* 和 *CmCUTRIA-R*,并进行 PCR 扩增验证。对 1%琼脂糖凝胶电泳目的片段条带正确的 PCR 产物进行胶回收,并送往生工生物工程有限公司测序,检测分析靶位点的编辑情况。

2 结果与分析

2.1 *CmCUTRIA* 基因序列差异分析

取龙庆八号甜瓜栽培材料幼嫩叶片,提取叶片的总 RNA,后反转录为 cDNA。以 *CmCUTRIA* 基因的特异性引物(表 2)进行 PCR 扩增,1%琼脂糖凝胶电泳显示该目的基因片段长度为 494 bp(图 1-A),将 PCR 扩增产物进行胶回收后连接克隆载体并转入大肠杆菌感受态细胞,进行菌液 PCR 鉴定,条带约为 494 bp(图 1-B),将阳性菌液进行测序,测序结果经 DNAMAN 进行序列比对,发

表 2 甜瓜不定根 PCR 检测引物

Table 2 PCR primers for sequencing of melon adventitious roots

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence(5'-3')
<i>CmCUTRIA-F</i>	AGGTAAACGTTCACTGGGCAC
<i>CmCUTRIA-R</i>	CCGATCAGTGAATGTGGACGAT

现龙庆八号与葫芦科甜瓜参考基因组数据库中 *MELO3C006053.2* 基因相比无突变产生(图 2),故可以用龙庆八号甜瓜品种进行发根农杆菌的侵染及后续试验。

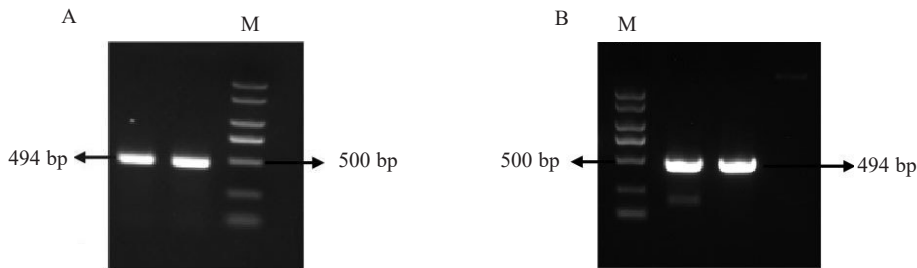
2.2 双靶位点载体的构建

根据 CRISPR-P2.0 在线工具设计了双靶位点,分别位于第 2 外显子和第 3 外显子上。以 PCBC-DT1T2 载体为中间模板进行四引物扩增,扩增双靶点基因敲除所需要的作用元件 sgRNA 与两个靶位点 gRNA1、gRNA2,利用 CRISPR/Cas9 系统重组载体构建示意图(图 3)。

PCR 扩增得到的中间产物,利用 T₄连接酶连接到 pKSE402 载体上,并转入大肠杆菌感受态细胞中以特异性引物 U626-IDF 和 U629-IDR 进行菌液 PCR 以验证阳性菌液,PCR 检测特异性条带大小在 1%琼脂糖凝胶检测下应为 726 bp(图 4-A),测序结果显示所添加的作用元件 sgRNA 和 2 个靶位点的序列均正确无误(图 5)。以上结果表明,CRISPR/Cas9 敲除载体已经构建成功。提取测序成功菌液中的重组质粒并转入发根农杆菌 K599 感受态细胞中,轻挑取白色单克隆菌落并进行阳性菌液 PCR 检测,经 1%琼脂糖凝胶电泳检测片段长为 726 bp(图 4-B),证明该重组质粒已成功转入发根农杆菌中,可以用于后续侵染试验。

2.3 发根农杆菌介导的甜瓜转化技术检测靶位点的可行性

通过发根农杆菌 K599 介导的甜瓜转化体系对 CRISPR/Cas9 表达载体靶位点的可行性进行验证,龙庆八号种子萌发后(图 6-A),将切好的甜瓜子叶节放入 20 mL 无菌注射器中添加 10 mL 菌液并进行抽真空 5 min,25 °C暗培养 3 d(图 6-B),用无菌水脱菌后,将子叶节表面晾干后放置于生根筛选的 MS 培养基上进行光照培养。在含有 NAA 的 MS



注:A. *CmCUTRIA* 目的基因的扩增;B. 大肠杆菌 DH5 α 菌液 PCR;M. D2000 Marker.
Note: A. Amplification of *CmCUTRIA* gene; B. PCR identification of *E. coli* DH5 α ; M. D2000 Marker.

图 1 *CmCUTRIA* 基因的 PCR 扩增

Fig. 1 PCR amplification of *CmCUTRIA* gene

DHL92.txt	ATGGCAGCCACGGCCTCCCCTACAGCGGCCACGCGGTT	40
Long_Qing-8.txt	ATGGCAGCCACGGCCTCCCCTACAGCGGCCACGCGGTT	40
Consensus	atggcagccacggcctccccctacagcggccacgcggtt	
DHL92.txt	TGAGACCTTCTCTGGCTGCTTCTCAACCCACTCGCCGCT	80
Long_Qing-8.txt	TGAGACCTTCTCTGGCTGCTTCTCAACCCACTCGCCGCT	80
Consensus	tgagaccttctctggctgcttctcaaccactcgccgctc	
DHL92.txt	CGTTTTGCCGCTCCTTCCCCCTCGAGTCGGCTCCCCTCT	120
Long_Qing-8.txt	CGTTTTGCCGCTCCTTCCCCCTCGAGTCGGCTCCCCTCT	120
Consensus	cgttttgccgctccttccccctcgagtcggctccccctct	
DHL92.txt	TCCTTCTCCACCTCCCTCAAATTATCCTTAGACTCACGTA	160
Long_Qing-8.txt	TCCTTCTCCACCTCCCTCAAATTATCCTTAGACTCACGTA	160
Consensus	tccttctccacctccctcaaattatccttagactcacgta	
DHL92.txt	GATCGTCTCTGCTTCAAACCCGAGCCTCATCTTCAGAAGA	200
Long_Qing-8.txt	GATCGTCTCTGCTTCAAACCCGAGCCTCATCTTCAGAAGA	200
Consensus	gatcgtctctgcttcaaaccgagcctcatcttcagaaga	
DHL92.txt	ATCATCTGCTGCTGATGCATCTGAGCTTTCACAGACTTG	240
Long_Qing-8.txt	ATCATCTGCTGCTGATGCATCTGAGCTTTCACAGACTTG	240
Consensus	atcatctgctgctgatgcactctgagctttcacagacttg	
DHL92.txt	AAAGAAAAGTGGGATGCCCTTGAGAACAATCCACAGTAC	280
Long_Qing-8.txt	AAAGAAAAGTGGGATGCCCTTGAGAACAATCCACAGTAC	280
Consensus	aaagaaaagtgggatgcccttgagaacaatccacagtac	
DHL92.txt	TTCTCTACGAGGCGGGCAATTGTTGCGGTTTGGCTTTC	320
Long_Qing-8.txt	TTCTCTACGAGGCGGGCAATTGTTGCGGTTTGGCTTTC	320
Consensus	ttctctacgaggcgggcaattgttgcggtttggctttc	
DHL92.txt	TTCAATTCTTGGTGGTCAACTCAGTTCCTTTGCTT	360
Long_Qing-8.txt	TTCAATTCTTGGTGGTCAACTCAGTTCCTTTGCTT	360
Consensus	ttcaattcttgggtgggcaactcagttcctttgctt	
DHL92.txt	CCGAAGATACTGGAGTTGGTAGGGCTTGGATATACAGGGT	400
Long_Qing-8.txt	CCGAAGATACTGGAGTTGGTAGGGCTTGGATATACAGGGT	400
Consensus	cpgaagatactggagttggtagggcttggatatacaggg	
DHL92.txt	GGTTTGTGTACCGATATCTACTCTTCAAGTCAAGCAGAAA	440
Long_Qing-8.txt	GGTTTGTGTACCGATATCTACTCTTCAAGTCAAGCAGAAA	440
Consensus	ggtttgtgtaccgatatctactcttcaagtcaagcagaaa	
DHL92.txt	GGAAGTACTGATGACATTGAAGCATTGAAGAAGAAGATT	480
Long_Qing-8.txt	GGAAGTACTGATGACATTGAAGCATTGAAGAAGAAGATT	480
Consensus	ggaagtactgatgacattgaagcattgaagaagaagatt	
DHL92.txt	GCTGGAACCGAATA	494
Long_Qing-8.txt	GCTGGAACCGAATA	494
Consensus	gctggaaccgaata	

图 2 龙庆八号和甜瓜参考基因组 *CmCUTR1A* 基因的序列比对
 Fig. 2 Sequence alignment of the *CmCUTR1A* gene from two different accessions melon

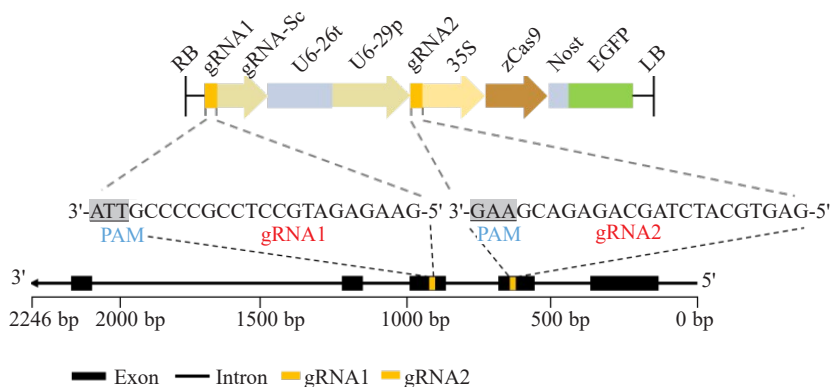


图 3 CRISPR/Cas9 表达载体构建
 Fig. 3 CRISPR/Cas9 vector construction

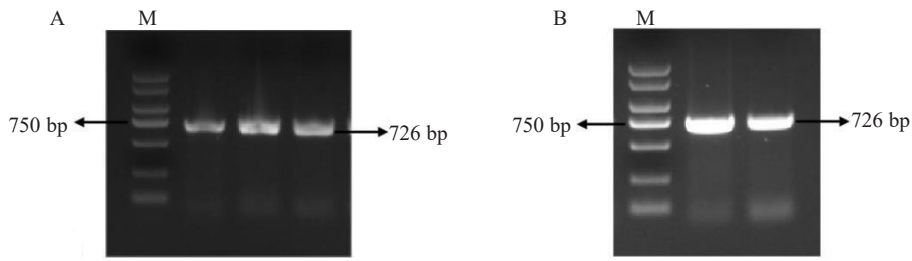


图4 CRISPR/Cas9 重组载体大肠杆菌菌液 PCR 检测(A)和发根农杆菌菌液 PCR 检测(B)

Fig. 4 *E. coli* bacterial liquid PCR of recombinant plasmid (A) and K599 bacterial liquid PCR (B)

CmCUTR1A.txt	CCAAACCGCAACAATTGCCCCGCCTCCGTAGAGAAGTACTGTGGATTGTCTCAAGGGC	240
gRNA1.txtGCCCCGCCTCCGTAGAGAAG.....	20
gRNA2.txt	0
CmCUTR1A.txt	ATCCCACTTTTCTTTCAAGTCTGTGAAGAGCTCAGATGCATCAGCAGCAGATGATTCTTC	300
gRNA1.txt	20
gRNA2.txt	0
CmCUTR1A.txt	TGAAGATGAGGCTCGGGTTTGAAGCAGAGACGATCTACGTGAGTCTAAGGATAATTTGAG	360
gRNA1.txt	20
gRNA2.txtGCAGAGACGATCTACGTGAG.....	20

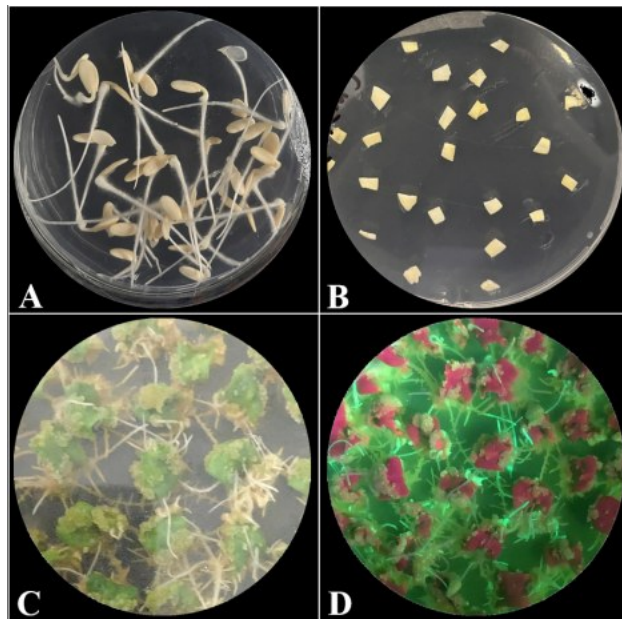
图5 CRISPR/Cas9 重组载体双靶位点序列比对

Fig. 5 Sequence alignment of double target sites in CRISPR/Cas9 system

培养基上进行不定根的培养约 7 d 后能观察到不定根的伸长(图 6-C),利用路阳 365L 荧光检测灯能观察到明显的绿色荧光信号(图 6-D)。

待培养至 20 d 后提取甜瓜不定根组织的 DNA,根据双靶位点在 *CmCUTR1A* 基因上的位置,

在双靶位点附近设计了特异性引物 *CmCUTR1A-F* 和 *CmCUTR1A-R*,利用该引物对 DNA 进行 PCR 扩增,采用 1%琼脂糖凝胶电泳对目的片段进行检验,结果发现未经敲除的 WT 条带大小约 300 bp,编辑后的不定根产生的条带经电泳后大小约 220 bp



注:A. 甜瓜种子萌发;B. 外植体的侵染及培养;C. 生根培养;D. 甜瓜不定根荧光情况。

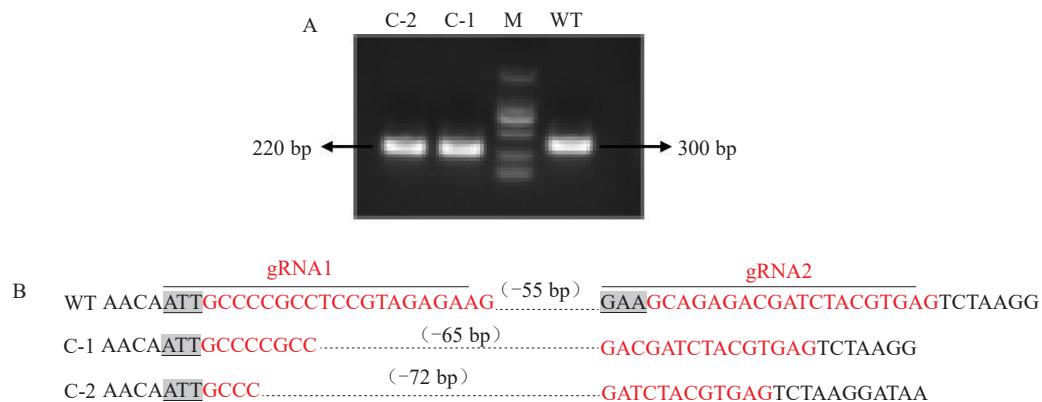
Note: A. Seed germination; B. Infection and culture of explants; C. Rooting culture; D. Fluorescence of melon adventitious roots.

图6 发根农杆菌介导的甜瓜转化后外植体的生根过程

Fig. 6 K599 mediated the rooting process of melon explants after transformation

(图 7-A),将目的片段进行回收纯化并送往上海生工生物工程有限公司进行测序。利用 GFP 荧光信号筛选不定根,共进行 PCR 测序检测产生不定根的外植体 16 个,测序结果显示,经基因敲除后的不定根组织的 DNA 中存在两种独立的碱基的缺失,在 C-1、C-2 的测序结果中显示均从第 1 个 PAM 序列进行识别,并敲除至第 2 个 PAM 序列产生,但 DNA 在双链断裂的过程中会产生碱基互补配对进而进行 DNA 的修复。由于重新修复补充上的碱基数量不等,导致敲除片段

存在长度上的差异。C-1 的测序结果显示缺失 65 bp,C-2 显示缺失 72 bp(图 7-B)。经计算,产生 GFP 荧光信号的外植体 16 个,测序获得的独立编辑事件为 2 个,初步估算本研究中以 pKSE402 载体和甜瓜栽培品种龙庆八号为受体材料的基因编辑效率为 12.5%。结果表明,该方法成功实现了在甜瓜不定根中的基因编辑,发生了碱基的缺失,说明该基因编辑载体具有基因编辑的功能,可用于甜瓜材料龙庆八号的稳定遗传转化试验。



注: A. 琼脂糖凝胶电泳条带(WT:野生型,C-1、C-2:突变体,M:D2000 Marker);B. PCR 产物测序结果。

Note: A. Electrophoretic map (WT: Wild type, C-1, C-2: mutant, M: D2000 Marker); B. PCR sequencing result.

图 7 发根农杆菌基因组编辑的突变检测

Fig. 7 Detection of mutations in genome editing of *Agrobacterium rhizogenes*

3 讨论与结论

甜瓜的光合作用是通过叶绿体进行的,而叶绿体中的类囊体结构可能直接或间接地影响甜瓜叶片光合速率。笔者之前在甜瓜的研究中发现了一个基因 *CmCUTR1A*^[5],该基因可能控制着甜瓜中类囊体的结构。基于这一发现进行了后续试验以进一步探究其基因结构与功能。

由于甜瓜基因型的不同会导致甜瓜在遗传转化过程中所用激素浓度不同^[26],笔者选择了具有较强再生能力的龙庆八号甜瓜材料作为研究对象。随着基因编辑技术的广泛应用,提高植物基因编辑效率并实现精准靶向基因敲除位点越来越受到重视。传统育种方法中的物理和化学诱变产生新突变体具有随机性^[27],需要进行大规模操作,从而导致巨大的工作量。然而,CRISPR/Cas9 系统的引入解决了这一生产技术上的难题,通过构建确定的双靶位点等载体,CRISPR/Cas9 系统能够高效、精准靶

向编辑相关基因,实现基因的精准定点突变,这一技术为基因功能的研究及新品种选育提供了新的策略。

CRISPR/Cas9 系统在甜瓜上的应用已经逐渐扩大。从 2019 年至今,通过基因编辑技术已经获得了大多数甜瓜基因的功能信息如 *CmPDS*^[28]、*CmROSI*^[29]、*CmeIF4E*^[30]等。与此同时,甜瓜遗传转化体系也在逐步优化^[24],使得甜瓜品种的基因优化改良不再成为困难。然而,甜瓜的基因编辑进程仍然较为缓慢,并且常常存在一定程度的脱靶风险。为了解决这个问题,一种利用发根农杆菌介导的方法被提出来检测靶位点编辑情况。通过评估载体的可利用性,可以有效地进行后续的基因功能验证工作。通过构建双靶位点 CRISPR/Cas9 基因敲除系统,并利用发根农杆菌 K599 诱导甜瓜不定根的生成,笔者成功地获得了敲除突变体,这一方法已被证明是有效的。此外,一些研究表明,在烟草、蒲公英等植物中,利用发根农杆菌诱导产生的不定

根^[31-32],可以经过脱分化和再分化的过程培育成完整的转基因植株。在南瓜中也成功地通过诱导不定根形成了愈伤组织^[33],为培育出完整的转基因植株提供了新途径。这些研究结果为甜瓜不定根的脱分化和再生提供了新的方向。

本研究结果表明,经基因克隆比对,龙庆八号甜瓜栽培材料中类囊体结构蛋白 *CmCUTRIA* 基因与甜瓜参考基因组该基因序列无突变差异;构建了 *CmCUTRIA* 基因双靶点 CRISPR/Cas9 载体,并经发根农杆菌介导使甜瓜子叶节产生不定根,且经检测不定根中存在多种片段缺失,证明此 CRISPR/Cas9 载体具有一定的基因敲除功能,为后续进行甜瓜遗传转化试验奠定了基础。

参考文献

- [1] 徐振彪,宋林霞.叶绿体的遗传工程应用研究[J].安徽农业科学,2007,35(23):7085-7087.
- [2] 周云龙.载色体与叶绿体的区别和联系[J].生物学教学,2014,39(6):39-40.
- [3] RODRIGUEZ-MORENO L, GONZALEZ V M, BENJAK A, et al. Determination of the melon chloroplast and mitochondrial genome sequences reveals that the largest reported mitochondrial genome in plants contains a significant amount of DNA having a nuclear origin[J]. BMC Genomics, 2011, 12: 424.
- [4] 朱强龙,朱子成,王鹏飞,等.葫芦科作物线粒体和叶绿体基因组研究进展[J].中国瓜菜,2016,29(8):1-8.
- [5] LIU T, AMANULLAH S, XU H C, et al. RNA-Seq identified putative genes conferring photosynthesis and root development of melon under salt stress[J]. Genes, 2023, 14(9): 1728.
- [6] 方锐,畅飞,孙照霖,等. CRISPR/Cas9 介导的基因组定点编辑技术[J].生物化学与生物物理进展,2013,40(8):691-702.
- [7] 瞿礼嘉,郭冬姝,张金喆,等. CRISPR/Cas 系统在植物基因组编辑中的应用[J].生命科学,2015,27(1):64-70.
- [8] WANG F J, WANG C L, LIU P Q, et al. Enhanced rice blast resistance by CRISPR/Cas9-targeted mutagenesis of the ERF transcription factor gene OsERF922[J]. PLOS ONE, 2016, 11(4): e0154027.
- [9] FENG C, YUAN J, WANG R, et al. Efficient targeted genome modification in maize using CRISPR/Cas9 system[J]. Journal of Genetics and Genomics, 2016, 43(1): 37-43.
- [10] CAI Y P, CHEN L, LIU X J, et al. CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis of *GmFT2a* delays flowering time in soya bean[J]. Plant Biotechnology Journal, 2018, 16(1): 176-185.
- [11] WANG P C, ZHANG J, SUN L, et al. High efficient multisites genome editing in allotetraploid cotton (*Gossypium hirsutum*) using CRISPR/Cas9 system[J]. Plant Biotechnology Journal, 2018, 16(1): 137-150.
- [12] BEMER M, KARLOVA R, BALLESTER A R, et al. The tomato FRUITFULL homologs TDR4/FUL1 and MBP7/FUL2 regulate ethylene-independent aspects of fruit ripening[J]. Plant Cell, 2012, 24(11): 4437-4451.
- [13] BHATTA B P, MALLA S. Improving horticultural crops via CRISPR/Cas9: current successes and prospects[J]. Plants-Basel, 2020, 9(10): 1360.
- [14] TSAI S Q, ZHENG Z, NGUYEN N T, et al. GUIDE-seq enables genome-wide profiling of off-target cleavage by CRISPR-Cas nucleases[J]. Nature Biotechnology, 2015, 33(2): 187-197.
- [15] GANTZ V M, BIER E. The mutagenic chain reaction: A method for converting heterozygous to homozygous mutations[J]. Science, 2015, 348(6233): 442-444.
- [16] SMITH E F, TOWNSEND C O. A plant-tumor of bacterial origin[J]. Science, 1907, 25(643): 671-673.
- [17] CHILTON M D, DRUMMOND M H, MERIO D J, et al. Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells: The molecular basis of crown gall tumorigenesis[J]. Cell, 1977, 11(2): 263-271.
- [18] JACOBS T B, LAFAYETTE P R, SCHMITZ R J, et al. Targeted genome modifications in soybean with CRISPR/Cas9[J]. BMC Biotechnology, 2015, 15: 16.
- [19] WANG X T, JIN B Y, YAN W J, et al. Cucumber abscisic acid 8'-hydroxylase Csyf2 regulates yellow flesh by modulating carotenoid biosynthesis[J]. Plant Physiology, 2023, 193(2): 1001-1015.
- [20] 张月乔,葛洁,田树娟,等.利用发根农杆菌体系检测西瓜 CRISPR/Cas9 系统的靶位点[J].中国瓜菜,2020,33(4):7-11.
- [21] 王平勇,徐永阳,赵光伟,等.发根农杆菌介导甜瓜转基因过表达体系的建立[J].中国瓜菜,2019,32(12):15-18.
- [22] CHANDRASEKARAN J, BRUMIN M, WOLF D, et al. Development of broad virus resistance in nontransgenic cucumber using CRISPR/Cas9 technology[J]. Molecular Plant Pathology, 2016, 17(7): 1140-1153.
- [23] FENG Q, XIAO L, HE Y, et al. Highly efficient genotype-independent transformation and gene editing in watermelon (*Citrullus lanatus*) using a chimeric *CIGRF4-GIF1* gene[J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2021, 63(12): 2038-2042.
- [24] XIN T, TIAN H, MA Y, et al. Targeted creating new mutants with compact plant architecture using CRISPR/Cas9 genome editing by an optimized genetic transformation procedure in cucurbit plants[J]. Horticulture Research, 2022, 9: uhab086. DOI: 10.1093/hr/uhab086.
- [25] 王怀松,贺超兴,张志斌,等.甜瓜白粉病抗性 AFLP 连锁标记的初步研究[J].中国瓜菜,2009,22(2):4-6.
- [26] 祁宏英,徐洪国,王秀文,等.甜瓜再生体系的建立[J].中国瓜菜,2021,34(5):105-108.
- [27] COLBERT T, TILL B J, TOMPA R. High-throughput screening for induced point mutations[J]. Plant Physiology, 2001, 126(2): 480-484.
- [28] HOOGHVORST I, LOPEZ C, NOGUES S. Efficient knockout of phytoene desaturase gene using CRISPR/Cas9 in melon[J]. Scientific Reports, 2019, 9: 17077.
- [29] GIORDANO A, SANTO D M, QUADRANA L, et al. CRISPR/

- Cas9 gene editing uncovers the roles of constitutive triple response 1 and repressor of silencing 1 in melon fruit ripening and epigenetic regulation[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2022, 73(12):4022-4033.
- [30] PARSA H S, SABET M S, MOIENI A, et al. CRISPR/Cas9-mediated cytosine base editing using an improved transformation procedure in melon (*Cucumis melo* L.)[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(13):11189.
- [31] ALTAMURA M M, ARCHILLETTI T, CAPONE I, et al. Histological analysis of the expression of *Agrobacterium rhizogenes* *rolB*-GUS gene fusions in transgenic tobacco[J]. *New Phytologist*, 1991, 118(1):69-78.
- [32] LEE M H, YOON E S, JEONG J H, et al. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of *Taraxacum platycarpum* and changes of morphological characters[J]. *Plant Cell Reports*, 2004, 22(11):822-827.
- [33] BALEN B, LELJAK-LEVANIC D, MIHAIJEVIĆ S, et al. Formation of embryogenic callus in hairy roots of pumpkin (*Cucurbita pepo* L.)[J]. *In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant*, 2004, 40(2):182-187.