

DOI:10.11937/bfyy.201712027

CRISPR-Cas9 系统敲除甜瓜 ACC 合成酶 基因表达载体的构建

王 雪, 李 冠

(新疆大学 生命科学与技术学院, 新疆 乌鲁木齐 830046)

摘 要:以甜瓜品种“老汉瓜”为试材,采用 CRISPR-Cas9 基因组编辑技术,研究了构建 CRISPR-Cas9 系统敲除甜瓜 ACC 合成酶基因表达载体的方法,以期获得高效的敲除甜瓜基因的基因组编辑技术。结果表明:以甜瓜 ACC 合成酶的基因设计出引物后,将其构建到 pPIC4 载体上,用热激法将连接产物转化到大肠杆菌中,筛选的阳性克隆测序验证为最终载体。

关键词:CRISPR-Cas9;基因敲除;ACC 合成酶

中图分类号:S 336 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2017)12-0114-05

随着转基因技术的发展,出现了多种对基因组进行定点编辑的新技术,特别是最近发现的 CRISPR/Cas 系统因其简易和有效性被广泛应用于包括植物在内的多种生物的基因组编辑中。

第一作者简介:王雪(1992-),女,硕士研究生,研究方向为植物学。E-mail:870432310@qq.com.

责任作者:李冠(1949-),男,教授,博士生导师,现主要从事植物生理生化与分子生物学教学等工作。E-mail:guanli@xju.edu.cn.

收稿日期:2017-02-15

CRISPR/Cas 系统仅需要短 RNA 和核酸酶就可以对特定的靶标基因进行突变。CRISPR-Cas 系统是细菌和古细菌在进化过程中逐渐形成的一种适应性免疫系统,通过小片段的 RNA 介导对入侵的核酸进行靶向定位并通过 Cas 酶对核酸进行酶切、降解可以降解入侵的病毒或质粒 DNA^[1-2]。利用此技术能够对目的基因进行靶向的敲除或敲入。

2007 年,BARRANGOU 等^[3]首次利用试验证明了嗜热链球菌的 CRISPR 系统直接参与细菌对噬菌体的适应性免疫反应。CRISPR 介导的获得性免

Development of EST-SSR Markers and Optimization of SSR System in *Cerasus tianschanica*

QIN Xue¹, CHEN Shuying², TIAN Jia¹, LI Peng¹, SHENG Fang¹, LI Jiang¹

(1. College of Forestry and Horticulture, Xinjiang Agricultural University, Urumqi, Xinjiang 830052; 2. Academy of Forestry in Ili of Xinjiang, Yining, Xinjiang 835000)

Abstract: Leaves of *Cerasus tianschanica* were used as materials. The EST sequences of *Cerasus tianschanica* were obtained from NCBI, SSR motifs were screened by using SSRHunter 1.3 software from these sequences, and specific primers were designed with the software Primer 6.0. Besides, the SSR-PCR reaction system of *Cerasus tianschanica* was optimized by orthogonal test and single factor experiment to verify the developed primers in order to lay the foundation for genetic diversity and construction of genetic map. The results showed that 21 pairs of primers could amplify specific bands, and the effective amplification rate was 70%. Moreover, the 20 μ L reaction system contained 0.2 mmol \cdot L⁻¹ dNTPs, 0.4 μ mol \cdot L⁻¹ primer, 0.75 U *Taq* polymerase and 60 ng template DNA.

Keywords: *Cerasus tianschanica*; primer development; EST-SSR; system optimization

疫反应主要分为 3 个步骤(基本工作原理如图 1)。首先,侵入细菌和古细菌的外源核酸的短片段被整合到 CRISPR 位点引导序列的近端,同时重复序列也复制一次,这些被整合的 30 nt 左右的短核苷酸序列被称为 spacer;其次,在下次相似的外源核酸侵入

后,CRISPR 位点被转录成 pre-crRNA (precursor CRISPR RNA),在 Cas 蛋白的作用下,pre-crRNA 被加工成包含 spacer 序列的 crRNA(CRISPR-derived RNA);最后,crRNA 与相应的 Cas 蛋白形成复合体,切割与 spacer 互补的外源核酸^[4]。

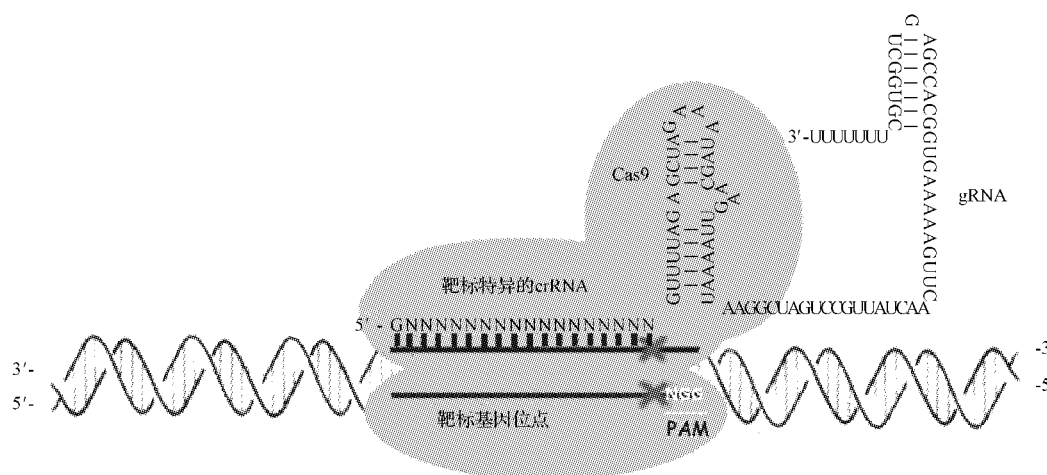


图 1 CRISPR-Cas9 工作原理

Fig. 1 Schematic of CRISPR-Cas9

“老汉瓜”维吾尔语称之为“比歇克吉”，学名为歇克甜瓜，是新疆特产，以南疆为佳，是上等瓜品之一。具有柔软可口、水分多、糖度高等特点，受到广大消费者欢迎。但是“老汉瓜”成熟后，软化速度很快，难以储藏和运输，造成很大的经济损失。乙烯是促进果实成熟的激素。它通过信号传递系统协调与成熟相关基因的表达，使果实的色、香、味和质地发生改变直至成熟。1979年，YU等^[5]阐明了乙烯的生物合成途径，ACC(1-氨基环丙烷-1-羧酸)合成酶催化SAM(S-腺苷甲硫氨酸)向ACC转化，是乙烯生物合成的限速酶。当ACC合成酶基因的表达受到抑制时，乙烯生成量下降，果实成熟受阻，使贮藏期延长。该试验以甜瓜ACC合成酶基因为基础，构建利用CRISPR-Cas9植物基因编辑系统敲除甜瓜ACC合成酶基因的表达载体。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为新疆甜瓜品种“老汉瓜”。

菌株与质粒:CRISPR-Cas9 植物基因敲除载体为适用于双子叶植物的载体 pP1C.4;该试验所用的大肠杆菌为 Trans1-T1 Page Resistant 感受态细胞。

酶和生化试剂:高保真 DNA 聚合酶、DNA 重组酶、Xba I 酶、EcoR I 酶、DNA Maker DL 2000 等试剂

及 DNA 纯化回收试剂盒等。

1.2 试验方法

1.2.1 愈伤组织诱导 无菌环境下,切取实验室的无菌苗叶片,切掉叶尖和叶柄,将叶片背面朝下,接种到 1/2MS 基本培养基培养,附加激素 6-BA 进行处理;6-BA 的浓度设计 0、0.5、1.0、1.5、2.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 5 个梯度。每种培养基接种 50 个样。培养条件为 26 $^{\circ}\text{C}$ 下,光照时间为 16 h 光照/8 h 黑暗,光照强度为 2 000 lx 的光照培养箱进行培养,约 21 d 后观察叶片愈伤形态,统计愈伤组织的诱导率。

1.2.2 引物设计 ACC 合成酶基因敲除靶位引物序列设计:1)在 ACS 基因序列中设计一对 20 bp 的 oligo DNA 片段。需要注意靶点序列要相对特异,避免出现重复序列以及多联 A,多联 T;选择靶点时应包含 3'端 NGG,构建载体引物时,不应包含 3'端 NGG;靶点序列应在基因组数据库中进行比对,避免脱靶。2)设计敲除靶位序列。A. 正向通用引物序列:U6p.4 - F 为 5' _ CAGGAAACAGCTATGAC-CATATTCATTCGGAGTTTTTGTATC_3';B. 反向引物设计方法,若设计的靶序列(长度 20 bp),第一个碱基为 G,则反向引物 Oligo - R 为 5' _ GC-TATTTCTAGCTCTAAAC -(20 bp 靶序列反向)-AATCACTACTTCGACTCT_3'。引物由北京华大基因合成,纯化级别为 PAGE。

1.2.3 sgRNA 克隆框的获得 使用高保真 DNA 聚合酶,以载体为模板,将上述合成的引物(pPIC.4 载体使用 U6p.4-F 和对应的 Oligo-R)用 PCR 扩增获得 sgRNA 克隆框。反应体系参照相应的高保真 DNA 聚合酶使用方法(表 1)。扩增后,将 PCR 产物进行凝胶电泳,回收目的片段。反应条件:起始变性,94 ℃,30~120 s;然后以下列反应条件进行 25~30 个循环,变性,94 ℃,15~30 s;复性,55 ℃,15~30 s;延伸,68 ℃,1 min · kb⁻¹。

表 1 高保真 DNA 聚合酶反应体系

Table 1 Reaction of high fidelity DNA polymerase

组分 Component	体积 Volume/ μ L	终浓度 Final concentration
10×高保真 PCR 缓冲液	5	1×
10 mmol · L ⁻¹ dNTP 混合液	1	0.2 mmol · L ⁻¹
50 mmol · L ⁻¹ MgSO ₄	2	2 mmol · L ⁻¹
引物 U6p.4-F	1~2	0.2~0.4 μ mol · L ⁻¹
引物 Oligo-R	1~2	0.2~0.4 μ mol · L ⁻¹
模板 pPIC.4 载体	≥1	按需要
高保真 DNA 聚合酶	0.2	3%
灭菌蒸馏水	至 50	N/A

1.2.4 线性化载体制备 使用 EcoR I、Xba I 双酶切 pPIC.4 载体,酶切反应体系见表 2;酶切反应条件:置于 37 ℃进行双酶切反应 5~10 min,然后置于常温下反应过夜,充分酶切,回收。

1.2.5 重组酶整合 使用 DNA 重组酶将步骤 1.2.4 中的线性化载体和步骤 1.2.3 中回收得到的扩增片段重组,构建重组载体。配置反应体系见表 3;反应条件:37 ℃,30 min;孵育结束后迅速置于冰上 15 min。

表 2 EcoR I 和 Xba I 双酶切反应体系

Table 2 Double enzyme digestion reaction of EcoR I and Xba I

试剂 Reagent	用量 Amount/ μ L
pPIC.4	20
EcoR I	1
Xba I	1
10×Buffer	3
dd H ₂ O	5
总计 Total	30

表 3 DNA 重组酶反应体系

Table 3 Reaction of DNA recombinant enzyme

试剂 Reagent	用量 Amount
5×G-force Buffer	2 μ L
G-force Enzyme	1 μ L
线性化 pPIC 载体	100 ng
扩增片段产物	5~10 ng
ddH ₂ O	至 10 μ L

1.2.6 转化与重组载体(pPIC.4-ACS)的筛选及测序 取 2~4 μ L 连接产物转化 Trans1-T1 Page Resistant 感受态细胞。采用热激法转化大肠杆菌与单克隆筛选,筛选阳性克隆分为 2 步:首先使用上游引物(pPIC.4 载体使用 U6p.4-F)和下游通用引物 gRNA-R (gRNA-R:5'-AGCACCAGCTCGGTGC CAC-3')进行 PCR 检测,回收目的片段(pPIC.4 载体回收片段大小为 400 bp 左右)。然后对回收的产物用 Xba I 内切酶酶切检测,未被切开的则为阳性克隆,检测阳性即为最终载体。将阳性 pPIC.4-ACS 质粒送北京华大生物工程有限公司进行测序。测序引物为 U6P.4-F: CAG-GAAACAGCTATGACCATATTCAT-TCGGAGTTTTTGTATC。

2 结果与分析

2.1 愈伤组织诱导

由表 4 可知,培养基中添加不同浓度的 6-BA,对愈伤组织的诱导产生一定的影响。加入 1.0 mg · L⁻¹ 6-BA 的培养基愈伤组织诱导率最高,为 100%。而不添加 6-BA 的培养基中外植体轻微的膨大,无愈伤组织形成。添加 2.0 mg · L⁻¹ 6-BA 的培养基中外植体玻璃化现象严重,愈伤组织较密集且质地软疏松。

表 4 不同浓度 6-BA 对甜瓜子叶愈伤组织诱导的影响

Table 4 Effect of 6-BA of different concentrations on inducing callus of melon

6-BA /(mg · L ⁻¹)	外植体数 Number of explants/个	愈伤组织数 Number of callus/个	愈伤组织诱导率 Rate of inducing callus/%
0.0	50	0	0
0.5	50	40	80
1.0	50	50	100
1.5	50	49	98
2.0	50	45	90

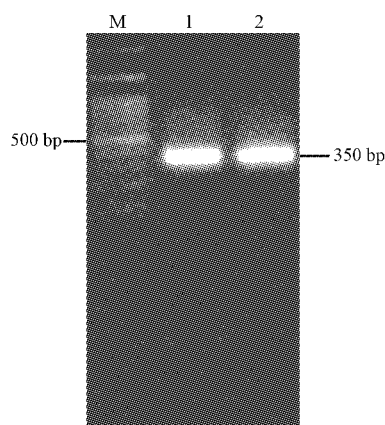
2.2 引物设计

在 ACS 基因序列中设计的一对 20 bp 的 oligo DNA 片段为:5'-3': GATGAGACTTCTAATCCCAA。设计的敲除靶位序列,A. 正向通用引物序列为:U6p.4-F: 5'-CAGGAAACAGCTATGACCATATTCATTTCGGAGTTTTTGTATC-3';B. 反向引物序列为:Oligo-R:5'-GCTATTTCTAGCTCTAAAAC-TTGGGATTAGAAGTCTCATC-AATCACTACT-TCGACTCT-3'。

2.3 片段扩增,获得 sgRNA 克隆框

首先使用高保真 DNA 聚合酶,以载体为模板,将靶位序列片段(pPIC.4 载体使用 U6p.4-F 和其

应的 Oligo-R), 用 PCR 扩增获得 sgRNA 克隆框, 扩增后, 将 PCR 产物进行凝胶电泳, 回收目的片段, pP1C. 4 载体回收约 350 bp(图 2)。PCR 的目的条带要单一明亮无弥散, 回收产物 OD_{260}/OD_{280} 为 1.8~2.0。



注: M, 标准分子量 DL 2 000; 1~2. PCR 扩增产物。

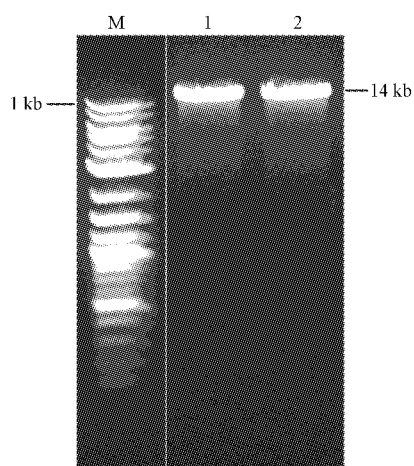
Note: M, DNA molecular Marker DL 2 000; 1-2. PCR product.

图 2 引物片断扩增

Fig. 2 Schematic diagram of CRISPR-Cas9

2.4 线性化载体制备

用 EcoR I 和 Xba I 双酶切载体 pP1C. 4, 把酶切产物进行凝胶电泳后, 割胶回收了 14 kb 左右片段(图 3)。回收产物 OD_{260}/OD_{280} 为 1.8~2.0。



注: M, 标准分子量 DL 1 000; 1~2. EcoR I 和 Xba I 双酶切载体 pP1C. 4。

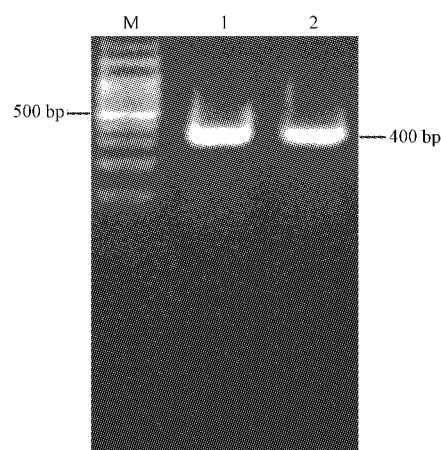
Note: M, DNA molecular Marker DL 1 000; 1-2. pP1C. 4 vector digested with EcoR I and Xba I.

图 3 EcoR I 和 Xba I 双酶切电泳图

Fig. 3 EcoR I and Xba I double enzyme electrophoresis map

2.5 重组酶整合与重组载体(pP1C. 4-ACS)的筛选

使用 DNA 重组酶将线性化载体和回收得到的扩增片段重组, 构建重组载体 pP1C. 4-ACS。将重组产物转化大肠杆菌感受态细胞, 使用上游引物 (pP1C. 4 载体使用 U6p. 4-F) 和下游通用引物 gRNA-R (gRNA-R; 5'-AGCACCGACTCGGTG CCAC-3') 进行 PCR 检测, 回收 pP1C. 4 载体片段约为 400 bp (图 4)。然后, 对回收的产物用 Xba I 内切酶酶切检测, 未被切开的为阳性克隆。



注: M, 标准分子量 DL 2 000; 1~2. PCR 产物。

Note: M, DNA molecular Marker DL 2 000; 1-2. PCR product.

图 4 菌落 PCR 筛选

Fig. 4 Colony PCR screening

2.6 重组载体(pP1C. 4-ACS)的测序结果

由图 5 可知, 测序结果与 pP1C. 4-ACS 载体的部分序列相一致, 表明敲除载体构建成功。

序列 0	CAGGAACAGCTATGACCATATTCATCGGAGTTTTGTATCTGTTCATAGTTTGTC
序列 1	-----AGTTTGTC-----
序列 0	CAGGATFAGAATGATTAGCCATCGAACCTCAAGAAATTCATGAATAAACAATCTTCAT
序列 1	CAGGATFAGAATGATTAGCCATCGAACCTCAAGAAATTCATGAATAAACAATCTTCAT
序列 0	TCTTAAGATATGAAGATAATCTTCAAAAGGCCCTGGGAATCTGAAAGAAGAGAGCAGG
序列 1	TCTTAAGATATGAAGATAATCTTCAAAAGGCCCTGGGAATCTGAAAGAAGAGAGCAGG
序列 0	CCCATTTATATGGGAAGAACAATAGTATTTCTTATATAGGCCCATTTAAGTTGAAACA
序列 1	CCCATTTATATGGGAAGAACAATAGTATTTCTTATATAGGCCCATTTAAGTTGAAACA
序列 0	ATCTTCAAAAGTCCACATCGCTTAGATAAGAAACGAAGCTGAGTTTATATACAGCTAG
序列 1	ATCTTCAAAAGTCCACATCGCTTAGATAAGAAACGAAGCTGAGTTTATATACAGCTAG

注: 序列 0. 理论上序列; 序列 1. 测序结果; *, 碱基相同。

Note: Sequence 0. theoretical sequence; Sequence 1. sequencing results; *, the same base.

图 5 pP1C. 4-ACS 载体测序结果

Fig. 5 Sequencing results of pP1C. 4-ACS vector

3 讨论

2013 年 *Nature Biotechnology* 同时报道了在重

要作物水稻、小麦以及模式植物拟南芥和本生烟中取得了多个基因定点敲除、插入等基因组定点编辑的成功案例,并首次证明 CRISPR-Cas9 系统能够在植物基因组中实现定点编辑^[6-9]。CRISPR-Cas 系统仅需要短 RNA 和核酸酶就可以对特定的靶标基因进行突变。目前 CRISPR/Cas 系统已成功在拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)^[10]、烟草 (*Nicotiana benthamiana*)^[10-11]、甜橙 (*Citrus sinensis*)^[12]、水稻 (*Oryza sativa*)^[13]、小麦 (*Triticum aestivum*)^[14]、高粱 (*Sorghum bicolor*)^[15]、玉米 (*Zea mays*)^[16] 以及苔藓植物地钱 (*Marchantia polymorpha*)^[17] 等植物中实现了定点基因组编辑。

CRISPR-Cas9 在各项研究领域必将有广阔的应用前景,为基因组定向编辑领域的研究带来突破性的技术革命,特别是在基因功能解析和加速重要农作物水稻、小麦性状改良与分子定向育种等方面^[6]。

“老汉瓜”成熟后,软化速度很快,难以储藏和运输,造成很大的经济损失。研究敲除甜瓜中的 ACC 合成酶基因后对甜瓜储藏的影响,为采用植物基因组进行定点编辑的新技术培育甜瓜的耐贮保鲜品种打下基础。

参考文献

- [1] TERNS M P, TERNS R M. CRISPR-based adaptive immune systems[J]. Curr Opin Microbiol, 2011, 14(3): 321-327.
- [2] WIEDENHEFT B, STERNBERG S H, DOUDNA J A. RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea[J]. Nature, 2012, 482(7385): 331-338.
- [3] BARRANGOU R, FREMAUX C, DEVEAU H, et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes[J]. Science, 2007, 315(5819): 1709-1712.
- [4] WIEDENHEFT B, STERNBERG S H, DOUDNA J A. RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea[J]. Nature, 2012, 482(7385): 331-338.

- [5] YU Y B, ADAMS D O, YANG S F. 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase: A key enzyme in ethylene biosynthesis [J]. Arch Biochem Biophys, 1979, 198: 280-286.
- [6] LI J, ZHANG Y, CHEN K L, et al. CRISPR/Cas: A novel way of RNA-guided genome editing[J]. Hereditas, 2013, 40(8): 691-702.
- [7] FENG Z Y, ZHANG B T, DING W N, et al. Efficient genome editing in plants using a CRISPR/Cas system[J]. Cell Res, 2013, 23(10): 1229-1232.
- [8] LI D L, QIU Z W, SHAO Y J, et al. Heritable gene targeting in the mouse and rat using a CRISPR-Cas system[J]. Nature Biotechnology, 2013, 31(8): 681-683.
- [9] NEKRASOV V, STASKAWICZ B, WEIGEL D, et al. Targeted mutagenesis in the model plant *Nicotiana benthamiana* using Cas9 RNA-guided endonuclease[J]. Nat Biotechnol, 2013, 31(8): 691-693.
- [10] LI J F, NORVILLE J E, AACH J, et al. Multiplex and homologous recombination-mediated genome editing in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana* using guide RNA and Cas9[J]. Nat Biotechnol, 2013, 31(8): 688-691.
- [11] NEKRASOV V, STASKAWICZ B, WEIGEL D, et al. Targeted mutagenesis in the model plant *Nicotiana benthamiana* using Cas9 RNA-guided endonuclease[J]. Nat Biotechnol, 2013, 31(8): 691-693.
- [12] JIA H, WANG N. Targeted genome editing of sweet orange using Cas9/sgRNA[J]. PLoS One, 2014, 9(4): e93806.
- [13] MIAO J, GUO D, ZHANG J, et al. Targeted mutagenesis in rice using CRISPR-Cas system[J]. Cell Res, 2013, 23(10): 1233-1236.
- [14] SHAN Q, WANG Y, LI J, et al. Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system[J]. Nat Biotechnol, 2013, 31(8): 686-688.
- [15] 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(20): e188.
- [16] LIANG Z, ZHANG K, CHEN K, et al. Targeted mutagenesis in *Zea mays* using TALENs and the CRISPR/Cas system[J]. J Genet Genomics, 2014, 41(2): 63-68.
- [17] SUGANO S S, SHIRAKAWA M, TAKAGI J, et al. CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis in the liverwort *Marchantia polymorpha* L. [J]. Plant Cell Physiol, 2014, 55(3): 475-481.

Construction of Expression Vector Knocking Out ACC Synthase Gene in Melon by CRISPR-Cas9 System

WANG Xue, LI Guan

(College of Life Science and Technology, Xinjiang University, Urumqi, Xinjiang 830046)

Abstract: The CRISPR-Cas9 genome editing techniques of melon, was constructed a vector which knockout ACC synthase gene by CRISPR-Cas9 system, and then the high efficient genome editing technique was obtained which could knockout melon genes. The results showed that based on the ACC synthase gene of melon to designed primers, and then they were builded to the pPIC. 4 vector. The connect product was transformed into *escherichia coli* by heat shock method. Finally, a few positive clones were selected, they were final vector.

Keywords: CRISPR-Cas9; gene knockout; ACC synthase gene