

罗汉果 *SgARF9* 基因克隆及其 CRISPR/Cas9 基因编辑载体构建辛佳佳¹, 周琼^{1*}, 裴艳艳¹, 李刚^{2*}

(1. 广西大学农学院, 广西南宁 530004; 2. 广西药用植物园, 广西药用资源保护与遗传改良重点实验室, 广西南宁 530023)

摘要 [目的]研究 *SgARF9* 基因与罗汉果果实发育的关系。[方法]在转录组 Unigene 序列基础上,对罗汉果 *SgARF9* 基因进行克隆,并结合 CRISPR/Cas9 基因编辑技术,构建以 *SgARF9* 为靶基因的 CRISPR/Cas9 基因编辑载体。[结果]克隆得到 *SgARF9* 基因序列,且成功构建包含 *SgARF9* 基因靶点的编辑载体。[结论]该研究为揭示 *SgARF9* 基因分子生物学功能,明确其在罗汉果果实起始发育中的遗传调控机制提供了基础。

关键词 罗汉果;基因编辑;*SgARF9* 基因;克隆

中图分类号 S188+.1 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2020)02-0119-05

doi:10.3969/j.issn.0517-6611.2020.02.032

开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Cloning of *SgARF9* Gene of *Siraitia grosvenorii* and Construction of CRISPR/Cas9 Gene Editing Vector

XIN Jia-jia, ZHOU Qiong, PEI Yan-yan et al (College of Agriculture, Guangxi University, Nanning, Guangxi 530004)

Abstract [Objective] To study the relationship between *SgARF9* gene and fruit development of *Siraitia grosvenorii*. [Method] The *SgARF9* gene of *S. grosvenorii* was cloned on the basis of transcriptome Unigene sequences, and the CRISPR/Cas9 gene editing vector which used *SgARF9* as target gene was constructed by combining with CRISPR/Cas9 gene editing technology. [Result] The sequence of *SgARF9* gene was cloned, and the gene editing vector which contained targets of *SgARF9* gene was successfully constructed. [Conclusion] This study laid a foundation for revealing molecular biological function of *SgARF9* gene and clarifying its genetic regulation mechanism during fruit initial development of *S. grosvenorii*.

Key words *Siraitia grosvenorii*; Gene editing; *SgARF9* gene; Cloning

罗汉果(*Siraitia grosvenorii*)是我国特色的药食两用藤本植物,因具有雌雄异株发育生物学特性,必须人工授粉才能保证结实率,存在工作量大、成本高、产量低等问题,严重限制了罗汉果规模化种植与产业化发展,其重要成分甜甙V在果囊和果皮中含量较高,种子中含量较少^[1]。种子硬度高,难以粉碎,会影响甜甙提取。培育无需人工授粉且果实无籽罗汉果品系具有重要的现实意义。

研究表明,通过生长素类似物 2,4-D 诱导可获得单性结实果实^[2],但生长素类似物诱导可能存在畸形果、安全隐患等弊端,目前未能得到推广,从基因水平研究单性结实具有稳定遗传、品质优良、无畸形果等优点,是单性结实品种获得的可行性途径^[3]。已有的研究表明,生长素响应因子 *ARFs* 基因对植物果实发育过程具有调控作用,番茄 *SlARF7* 基因对其果实发育具有调控作用^[4]。番茄、拟南芥和茄子中 *ARF8* 基因与果实单性结实具有相关性^[5-6],黄瓜 *CsARF09* 基因在不同时期果实中有表达^[7]。通过对罗汉果 *SgARF9* 基因克隆及功能验证,探究其在果实发育中的调控作用,可为研究罗汉果单性结实提供基础。

利用传统的转基因技术实现品种遗传改良,会引入外来基因,风险性未知。而 CRISPR/Cas9 基因编辑技术具有操作简单、效率高等优越性^[8]。借助新型 CRISPR/Cas9 基因编辑技术,可对植物自身基因的编辑,从而进行品种遗传改良。

利用 CRISPR/Cas9 技术对番茄 *SMAA9* 基因和 *SlAGL6* 基因进行编辑,得知其分别与产生单性结实具有相关性^[9-10]。通过对罗汉果 *SgARF9* 基因定点编辑,进行基因功能验证,可明确其对罗汉果单性结实过程是否具有调控作用。

1 材料与方法

1.1 材料 于盛花期采取种植于广西大学农学院试验田的罗汉果果实,提取总 RNA,反转录得到克隆模板 cDNA。载体构建所用 pYLCRISPR/Cas9Pubi-B、pYLsgRNA-AtU3b 和 pYLsgRNA-AtU6-1 载体均为华南农业大学刘耀光教授惠赠。

1.2 仪器、试剂 电泳设备(DYY-10C 型,北京六一);PCR 仪(Long Gene, A300 Fast Thermal Cycler);4 °C 冷冻离心机(卢湘仪, TGL-16 M);2×Es *Taq* MasterMix(康为世纪);*TransStart FastPfu* DNA Polymerase(全式金);*Trans Taq* DNA Polymerase(HiFi)(全式金);*BsaI*-HF 内切酶(NEB);*T₄* DNA 连接酶(TaKaRa)。

1.3 引物序列 引物序列如表 1 所示,其中通用引物来自文献引用,SP-L1 为测序引物^[11-12]。

1.4 研究方法

1.4.1 *SgARF9* 基因克隆及序列分析。以罗汉果果实总 RNA 反转录得到的 cDNA 为模板,以同科其他物种的 *ARF9* 基因序列为参考,设计引物对 *ARF9*-5F/*ARF9*-5R,扩增 *SgARF9* 基因 cDNA 的 5'端序列,并与已有的 Unigene 片段进行序列拼接,接着设计引物对 *ARF9*HF/*ARF9*HR,对拼接序列进行扩增验证,基因 5'端扩增参考 2×Es *Taq* MasterMix(康为世纪)说明书进行,基因扩增验证参考 *TransTaq* DNA Polymerase(HiFi)(全式金)说明书进行,并利用 MEGA7 和 GENE-DOC 软件对序列进行比对分析、作图。

基金项目 国家自然科学基金项目(31260359);广西大学博士启动项目(XBZ110586)。

作者简介 辛佳佳(1991—),女,河南周口人,硕士研究生,研究方向:植物发育与逆境生物学。*通信作者,李刚,副研究员,博士,从事药用植物遗传育种研究;周琼,高级实验师,博士,从事植物发育生物学研究。

收稿日期 2019-05-07;修回日期 2019-08-21

表1 引物序列

Table 1 Primer sequences

序号 No.	引物名称 Primer name	序列信息(5'—3') Sequence information(5'—3')
1	ARF9-1F	GTCACAGTCCTGATCCTTGCATCC
2	ARF9-1R	AAACGGATGCAAGGATCAGGACTG
3	ARF9-2F	ATTGTGCTACTGCATCTCATGCCG
4	ARF9-2R	AAACCGGCATGAGATGCAGTAGCA
5	B1'	TTCAGAGGTCTCTCTCGACTAGTATG- GAATCGGCAGCAAAGG
6	B2	AGCGTGGGTCTCTGTCAGGGTCCATC- CACTCCAAGCTC
7	B2'	TTCAGAGGTCTCTCTGACACTGGAATCG- GCAGCAAAGG
8	BL	AGCGTGGGTCTCTGACCCACGCCTATC- CATCCACTCCAAGCTC
9	UF	CTCCGTTTTACTCTGTGGAATCG
10	gR	CGGAGGAAAATCCATCCAC
11	SP-L1	GCGGTGTCATCTATGTTACTAG
12	ARF9HF	ATGTAGTTGATGTTCCGGCTGCT
13	ARF9HR	CCGAGGTTATTACCCGCCGT
14	ARF9-5F	ATGGCTAATCGGGGT/AGGA/GG
15	ARF9-5R	GAGTT/CGGGGTCTGC/TTGGGTC

1.4.2 CRISPR/Cas9 基因编辑载体的构建。

1.4.2.1 靶点接头的选择。载体构建过程参考文献[12]略有改动,在 *SgARF9* 基因不同区域选择2个合适的靶点序列,分别为 *ARF9-1*: CAGTCCTGATCCTTGCATCC; *ARF9-2*: TGCTACTGCATCTCATGCCG,并在线软件 RNA Folding Form (<http://mfold.rna.albany.edu/?q=mfold/RNA-Folding-Form2.3>)分析,设计靶点正反向接头引物。

1.4.2.2 靶点接头制备及酶切-连接反应。各取 10 μL 的 10 $\mu\text{mol/L}$ 正反向接头引物,加入到 80 μL 0.5 \times TE 溶液中混合均匀,将上述混合液置于 PCR 仪器中,90 $^{\circ}\text{C}$ 保温 30 s,25 $^{\circ}\text{C}$ 孵化 5 min 左右,完成退火。将制备的靶点接头 *SgARF9-1*、*SgARF9-2* 分别与表达盒载体 pYLgRNA-AtU3b 和 pYLgRNA-AtU6-1 进行酶切连接,连接产物分别命名为 *SgARF9-2-AtU6-1-gRNA*、*SgARF9-1-AtU3b-gRNA*。反应体系和程序如下:靶点接头,0.5 μL ;1 \times *BsaI*-HF Buffer,9 μL ;10 mmol/L ATP,1 μL ;20 ng/ μL 的 pYLgRNA-AtU3b 或 pYLgRNA-AtU6-1 质粒,1 μL ; *BsaI*-HF,0.25 μL ;35 U/ μL T_4 连接酶0.5 μL ;37 $^{\circ}\text{C}$ 5 min,20 $^{\circ}\text{C}$ 5 min,5 个循环^[8,12]。连接产物于-20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。

1.4.2.3 两轮 PCR 扩增。以上述酶切-连接产物作为第一轮巢式 PCR 扩增的模板,第一个反应利用启动子上游引物 UF 和靶点反向特异引物 ARF9-1R、ARF9-2R 扩增;第二个反应利用靶点正向特异引物 ARF9-1F、ARF9-2F 和 sgRNA 下游引物 gR 扩增,两步 PCR 扩增反应体系如表 2 所示^[8,12]。PCR 反应程序:95 $^{\circ}\text{C}$ 2 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 20 s,(T_m-5) $^{\circ}\text{C}$ 20 s,72 $^{\circ}\text{C}$ (时间据片

段大小定),30 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$,5 min,4 $^{\circ}\text{C}$, ∞ 。

表2 第一轮 PCR 反应体系

Table 2 The first round PCR reaction system

反应 Reaction	成分 Components	体积 Volume// μL
1	上述连接产物	0.5
	UF/接头反向引物	各 3
	5 \times TransStart [®] FastPfu Buffer	3
	2.5 mmol/L dNTPS	1.2
2	TransStart [®] FastPfu	0.3
	RNAase-free H ₂ O	4
	上述连接产物	0.5
	接头正向引物/gR	各 3
	5 \times TransStart [®] FastPfu Buffer	3
	2.5 mmol/L dNTPS	1.2
	TransStart [®] FastPfu	0.3
	RNAase-free H ₂ O	4

在第二轮扩增中选取 2 组通用引物对,扩增上述 PCR 产物片段,扩增产物可以连接到双元表达载体 pYLcrispr/Cas9Pubi-B 中。以第一轮 PCR 扩增产物为模板,按照表 3 所示反应体系,利用通用引物对 B1'/B2 和 B2'/BL 进行 PCR 扩增;分别以 *SgARF9-1-AtU3b-gRNA* 的两步扩增产物混合样为模板,用引物对 B1'/B2 进行第二轮 PCR 扩增;分别以 *SgARF9-2-AtU6-1-gRNA* 的两步扩增产物混合样为模板,用引物对 B2'/BL 进行第二轮 PCR 扩增^[8,12]。PCR 反应程序:95 $^{\circ}\text{C}$ 2 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 20 s,(T_m-5) $^{\circ}\text{C}$ 20 s,72 $^{\circ}\text{C}$ (时间据片段大小定),30 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min 4 $^{\circ}\text{C}$, ∞ 。

表3 第二轮 PCR 反应体系

Table 3 The second round PCR reaction system

反应 Reaction	成分 Components	体积 Volume// μL
1	第一轮扩增产物	各 1
	通用引物 B1'/B2(1 $\mu\text{mol/L}$)	各 4.5
	5 \times TransStart [®] FastPfu Buffer	6
	2.5 mmol/ dNTPs	2.4
	TransStart [®] FastPfu	0.6
	RNAase-free H ₂ O	10
2	第一轮扩增产物	各 1
	通用引物 B2'/BL(1 $\mu\text{mol/L}$)	各 4.5
	5 \times TransStart [®] FastPfu Buffer	6
	2.5 mmol/ dNTPs	2.4
	TransStart [®] FastPfu	0.6
	RNAase-free H ₂ O	10

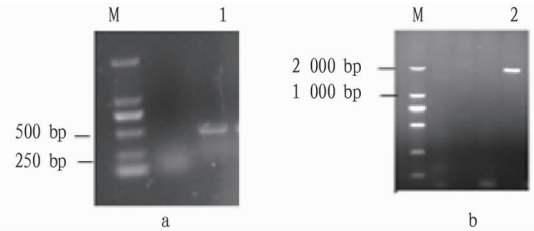
1.4.2.4 扩增产物的酶切连接及转化。将上述 PCR 扩增产物纯化回收,与 pYLcrispr/Cas9Pubi-B 表达载体酶切连接,反应体系如下:10 \times Cut Smart Buffer 1.5 μL ;10 mmol/L ATP,1.5 μL ;pYLcrispr/Cas9Pubi-B 载体质粒 60~80 ng/ μL ,1 μL ;第二轮 PCR 回收表达盒扩增产物(10~15 ng/表达盒)

1 μ L; *Bsa*I-HF 内切酶 0.25 μ L; T_4 -DNA 连接酶 35 U/ μ L, 1 μ L; 加 RNAase-free H_2O 至 15 μ L。PCR 反应程序: 37 $^{\circ}C$ 5 min, 10 $^{\circ}C$ 5 min, 20 $^{\circ}C$ 5 min, 15 个循环; 37 $^{\circ}C$ 5 min^[8,12]。连接产物命名为 *SgARF9/9-Atu3/6-sgRNA-CRISPR-B*。根据大肠杆菌感受态 DH5a(全式金)说明书进行载体转化, 并送公司测序确认。

2 结果与分析

2.1 基因克隆

在罗汉果转录组测序基础上, 克隆得到 *SgARF9* 基因的 cDNA 序列片段(图 1)。对拼接序列扩增验证测序后, 在测序结果中选取序列, 并进行氨基酸比对分析后得知, 罗汉果 *SgARF9* 序列与同科其他物种的 ARF9 序列相似性较高, 靶点所在区域对应蛋白序列与其他 ARF9 序列的比对分析结果如图 2 所示, 并分别在序列相似度较高和较低的区域对应的基因序列中选择 2 个靶点(图 3)。



注: M 为 2 000 bp Marker; 泳道 1 为 5' 端序列扩增结果; 泳道 2 为基因扩增验证结果

Note: M was 2 000 bp Marker; the lane 1 was the amplification result of 5' end sequence; the lane 2 was the amplification verification result of *SgARF9* gene

图 1 *SgARF9* 基因克隆片段电泳结果

Fig.1 Electrophoretic results of cloning fragments of *SgARF9* gene

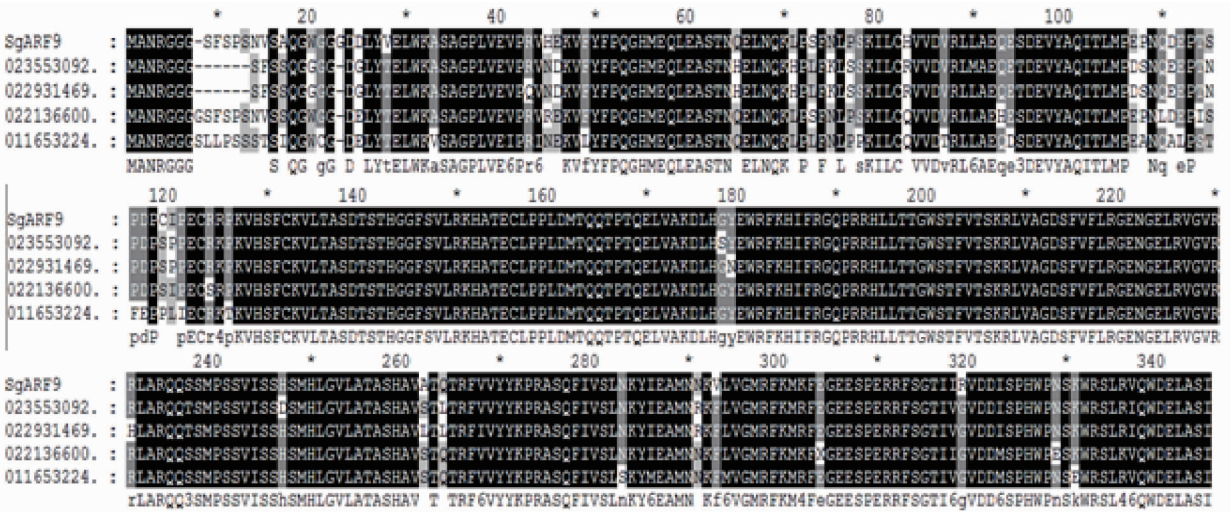


图 2 序列比对分析结果

Fig.2 Comparison and analysis result of sequences

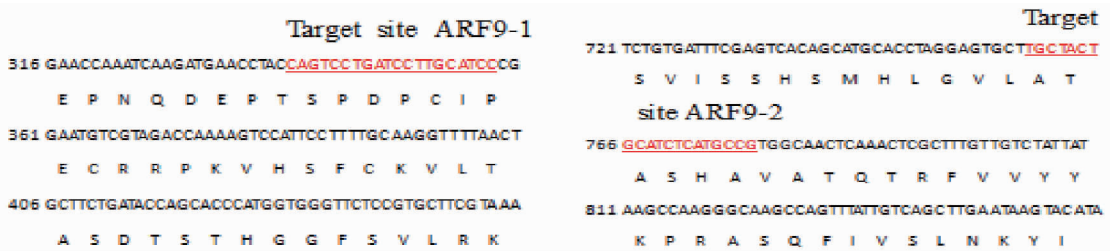


图 3 靶点序列的选取结果

Fig.3 Selection result of target sequences

2.2 靶点接头二级结构

由图 4 中 a、b 可知, 靶点 ARF9-1、ARF9-2 与 sgRNA 均不存在连续 6 bp 以上的匹配区, 可用作打靶位点构建打靶载体。

2.3 巢式 PCR 扩增

通过两轮 PCR 扩增, 得到特异性扩增产物。扩增结果如图 5 所示, 泳道 1、2、3、4 为第一轮 PCR 扩增结果, 引物对 UF/ARF9-1R、UF/ARF9-2R 扩增结果分别为泳道 1 和 4 所示, 引物对 ARF9-1F/gR、ARF9-2F/gR 扩增结果分别为泳道 2 和 3 所示, 泳道 5 和 6 分别为第二轮 PCR 中引物对 B1'/B2 和 B2'/BL 扩增结果。

2.4 测序验证

将重组载体质粒转化到大肠杆菌 DH5a 后,

构建成功的双元植物表达载体 *SgARF9/9-AtU3/6-sgRNA-CRISPR-B* 测序结果如图 6 所示, 载体包含 2 个靶点序列, 且序列正确, 确认 2 个表达盒已经与双元载体连接, 基因打靶载体构建成功。

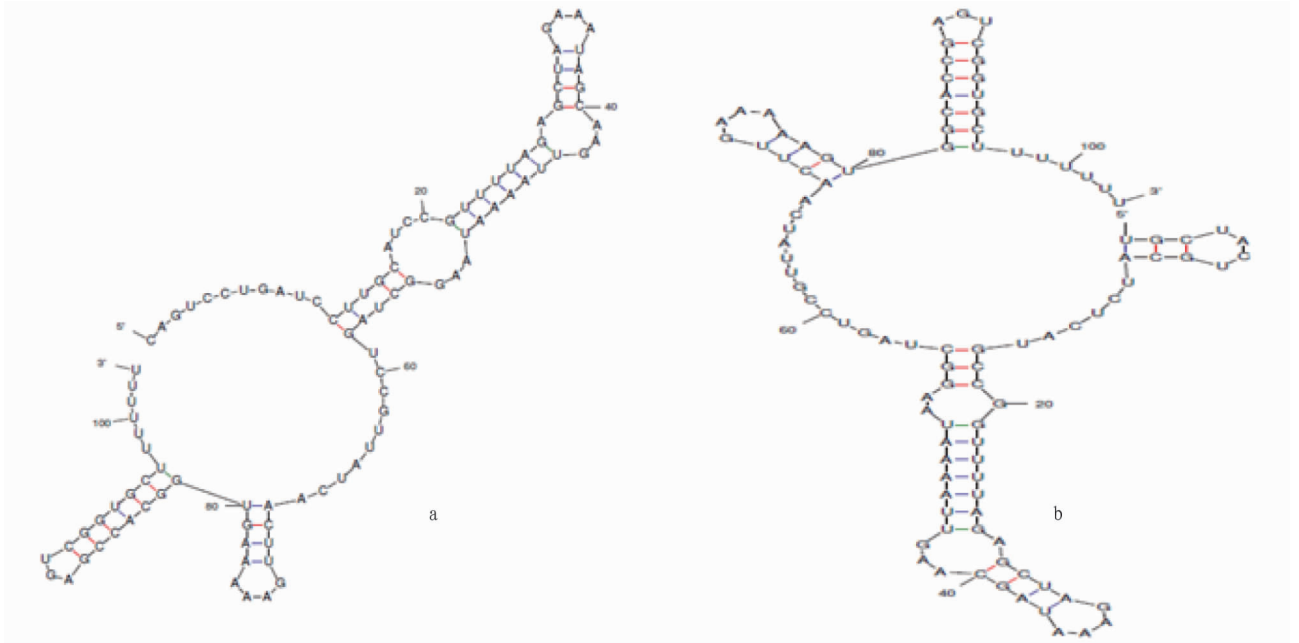
3 结论与讨论

序列比对分析结果显示, 罗汉果 *SgARF9* 与同科植物的 ARF9 蛋白序列相似性较高, 表明克隆得到的序列属于 ARF9 基因, 蛋白序列相似性较高, 预测其在功能方面可能也存在一定的相似性。此外, 序列比对分析中存在相似性较高和较低的区域, 可能保守性不同, 所以分别在 2 种区域内各设计

一个靶点序列。

所构建的 CRISPR/Cas9 基因编辑载体中,基因表达需要启动子驱动,选择合适的启动子可以驱动基因高效表达^[8-13]。已有研究证实,在双子叶植物中,与 P_{35S} 组成型启动子相比,玉米泛素启动子 *Pubi* 驱动 *Cas9* 表达的载体编辑效

率较高^[8]。该研究以罗汉果 *SgARF9* 为靶基因,分别在其编码区设计 2 个 20 bp 靶点序列,利用玉米泛素启动子 *Pubi* 驱动 *Cas9*,并以拟南芥 *AtU3b/AtU6-1* 启动子驱动 *sgRNA*,有望实现有效编辑。

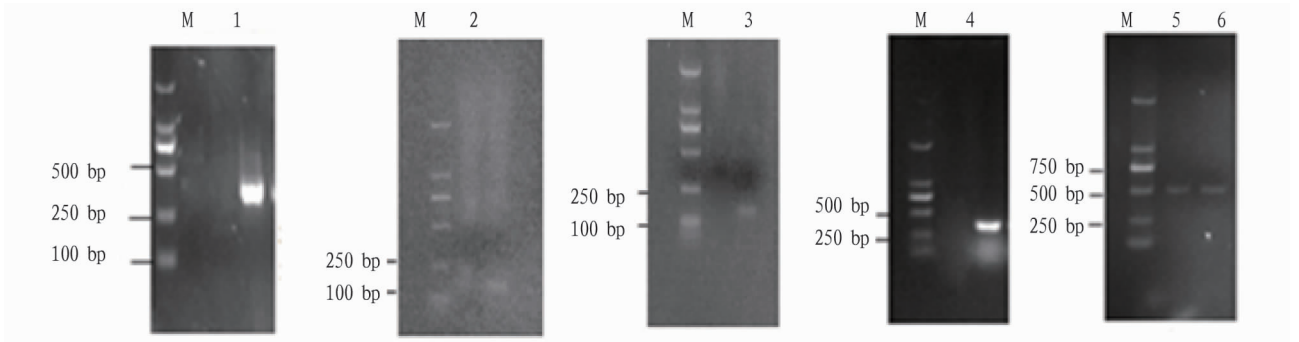


注:图 a、b 为靶点 ARF9-1、ARF9-2 二级结构

Note: Figure a and b were secondary structure of ARF9-1、ARF9-2, respectively

图 4 靶点二级结构

Fig.4 Secondary structure of targets



注:M 为 2000 bp Marker;泳道 1、2、3、4 为第一轮 PCR 扩增结果;泳道 5、6 为第二轮 PCR 扩增结果

Note:M was 2000 bp Marker;the lanes 1,2,3 and 4 were the amplification results of the first round PCR;the lanes 5 and 6 were the amplification results of the second round PCR

图 5 巢式 PCR 扩增结果

Fig.5 Nested PCR amplification results

在 CRISPR/Cas9 载体构建过程中,同时装载 2 个或者多个 *sgRNA* 靶点表达盒,可能会避免单个靶点脱靶导致的无效编辑,提高打靶效率^[14-15]。该研究在 *pYLCRIS PR/Cas9Pubi-B* 双元表达载体中装载 2 个靶点序列,对构建成功的载体通过测序验证,确保所构建载体包含打靶位点,且未发生变化,可避免靶点序列缺失或突变导致的编辑无效。利用 CRISPR/Cas9 系统对双子叶植物拟南芥 *AtARF8* 基因和番茄

SLAGL6 基因进行编辑,证实其基因与单性结实现果实发育具有相关性^[5,10]。在双子叶植物罗汉果 *SgARF9* 基因不同位置设计了打靶位点,通过边酶切边连接反应,一步反应就得到连接产物,并通过 2 轮 PCR,得到特异性扩增片段,最终将目的片段与载体正确组装,利用上述方法进行载体构建,操作简单且得到了正确组装的表达载体^[8,12]。可通过基因编辑,进一步验证基因与单性结实及果实发育是否具有相关性。

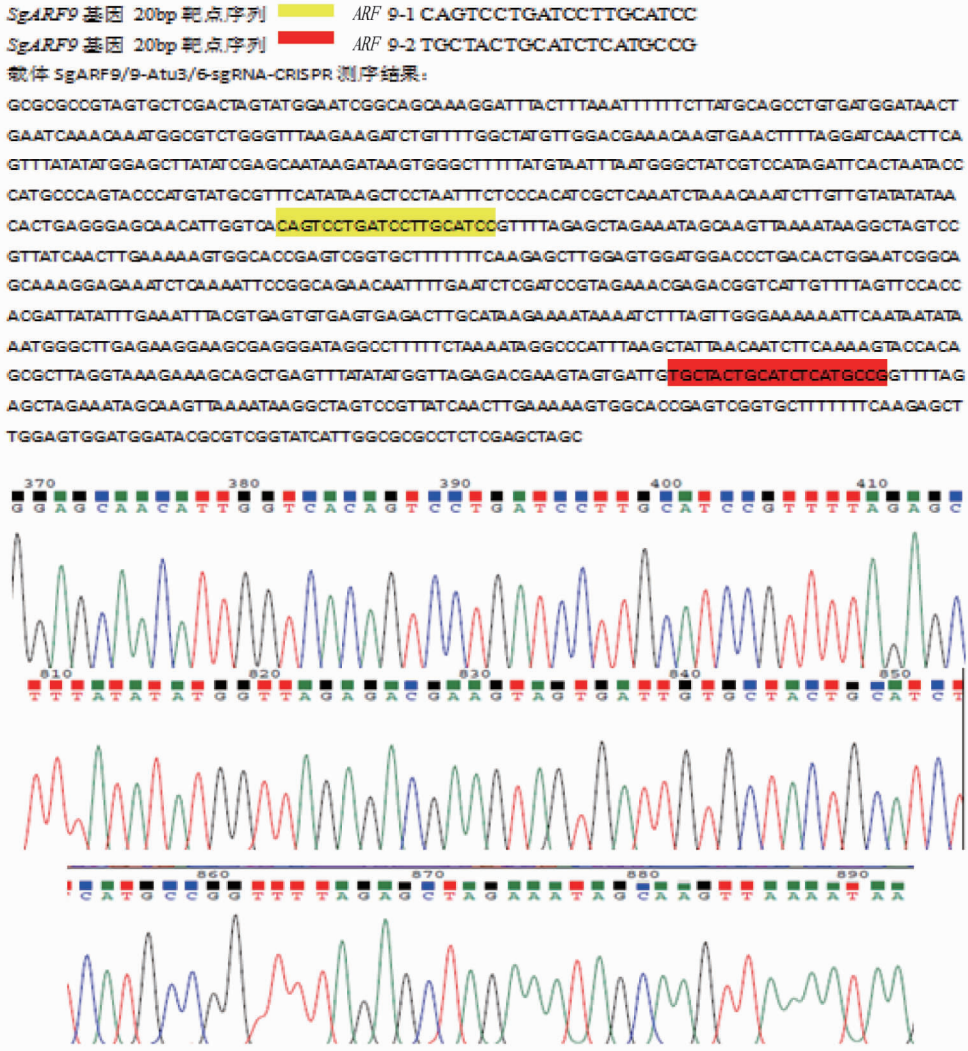


图 6 载体测序结果

Fig.6 Sequencing results of vectors

参考文献

- [1] 苏小建, 刘国雄, 聂晓, 等. 罗汉果甜甙 V 在各部位的含量分布[J]. 食品科技, 2007(5): 76-78.
- [2] 李珍贞, 郭辉平. 2,4-D 与罗汉果单性结实[J]. 植物杂志, 1988(3): 2.
- [3] 涂冬萍, 马小军, 莫长明, 等. 单性结实的分子研究进展[J]. 中草药, 2014, 45(20): 3034-3038.
- [4] DE JONG M, WOLTERS-ARTS M, FERON R, et al. The *Solanum lycopersicum* auxin response factor 7 (SlARF7) regulates auxin signaling during tomato fruit set and development[J]. The plant journal, 2009, 57(1): 160-170.
- [5] GOETZ M, HOOPER L C, JOHNSON S D, et al. Expression of aberrant forms of *AUXIN RESPONSE FACTOR8* stimulates parthenocarpy in *Arabidopsis* and tomato[J]. Plant physiology, 2007, 145: 351-366.
- [6] DU L M, BAO C L, HU T H, et al. *SmARF8*, a transcription factor involved in parthenocarpy in eggplant[J]. Molecular genetics and genomics, 2016, 291(1): 93-105.
- [7] WU J, LIU S Y, GUAN X Y, et al. Genome-wide identification and transcriptional profiling analysis of auxin response-related gene families in cucumber[J]. BMC Research Notes, 2014, 7: 1-13.
- [8] 曾栋昌, 马兴亮, 谢先荣, 等. 植物 CRISPR/Cas9 多基因编辑载体构建和突变分析的操作方法[J]. 中国科学: 生命科学, 2018, 48(7): 783-794.
- [9] UETA R, ABE C, WATANABE T, et al. Rapid breeding of parthenocarpic tomato plants using CRISPR/Cas9[J]. Scientific reports, 2017, 7: 1-8.
- [10] KLAP C, YESHAYAHOU E, BOLGER A M, et al. Tomato facultative parthenocarpy results from *SLAGAMOUS-LIKE 6* loss of function[J]. Plant biotechnology journal, 2017, 15(5): 634-647.
- [11] 史奇奇, 李增强, 韦范, 等. 红麻 miR394 基因的克隆及 CRISPR/Cas9 载体构建[J]. 中国农业大学学报, 2019, 24(1): 14-21.
- [12] MA X L, LIU Y G. CRISPR/cas9-based multiplex genome editing in monocot and dicot plants[M]//AUSUBEL F M. Current protocols in molecular biology. New York: Greene Publishing Associates, 1988.
- [13] 赵慧, 郑文岭, 崔东, 等. 泛素启动子的研究进展[J]. 广东医学, 2003, 24(12): 1376-1377.
- [14] SCHIML S, FAUSER F, PUCHTA H. The CRISPR/Cas system can be used as nuclease for *in planta* gene targeting and as paired nickases for directed mutagenesis in *Arabidopsis* resulting in heritable progeny[J]. The plant journal, 2014, 80(6): 1139-1150.
- [15] 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]. Nature biotechnology, 2013, 31(8): 688-691.