

丝瓜 *LcPPO1* 基因 CRISPR/Cas9 基因编辑载体的构建

陈敏敏, 王彬, 刘建汀, 叶新如, 曾美娟, 朱海生*, 温庆放*, 康玉妹

(福建省蔬菜遗传育种重点实验室, 福建省农业科学院作物研究所, 蔬菜研究中心/福建省蔬菜工程技术研究中心, 福建福州 350013)

摘要 [目的]通过 CRISPR/Cas9 系统构建丝瓜 *LcPPO1* 基因编辑载体。[方法]根据前期已经克隆得到的 *LcPPO1* 基因序列,设计 2 个 sgRNA 靶位点序列,退火制备 sgRNA 双链,分别与线性 PCA1301-Cas9 载体连接获得 2 个重组载体,将重组载体转化 DH5 α 感受态细胞,再对其进行 PCR 鉴定及测序比对分析。[结果]2 个 sgRNA 靶位点序列已经分别准确地连入 PCA1301-Cas9 载体,插入序列无突变。[结论]成功构建了丝瓜 *LcPPO1* 基因编辑载体 PCA1301-Cas9-sgRNA1 和 PCA1301-Cas9-sgRNA2,为后续研究丝瓜 *LcPPO1* 基因功能奠定了基础。

关键词 丝瓜; *LcPPO1* 基因; CRISPR/Cas9 技术; 基因编辑

中图分类号 S188 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2021)03-0105-05

doi:10.3969/j.issn.0517-6611.2021.03.028



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Construction of CRISPR/Cas9 Gene Editing Vector of *LcPPO1* Gene in Luffa

CHEN Min-dong, WANG Bin, LIU Jian-ting et al (Fujian Key Laboratory of Vegetable Genetics and Breeding, Crops Research Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Vegetable Research Center, Fujian Engineering Research Center for Vegetables, Fuzhou, Fujian 350013)

Abstract [Objective] *LcPPO1* gene editing vector for luffa was constructed by CRISPR/Cas9 system. [Method] Based on the sequence of *LcPPO1* gene cloned in previous stage, two sgRNA target sequences were designed, and the sgRNA double strand was prepared by annealing. Then the sgRNA double strands were connected with the linear PCA1301-Cas9 vector to obtain two recombinant vectors, respectively. The recombinant vectors were transformed into *E. coli* DH5 α , and then identified by PCR and sequenced. [Result] Two sgRNA target sequences were accurately linked into the PCA1301-Cas9 vector, respectively, and the insertion sequence had no mutation. [Conclusion] Two *LcPPO1* gene editing vectors for luffa, PCA1301-Cas9-sgRNA1 and PCA1301-Cas9-sgRNA2, were successfully constructed, which laid a foundation for further study on the function of *LcPPO1* gene in luffa.

Key words Luffa; *LcPPO1* gene; CRISPR/Cas9 technique; Gene editing

丝瓜为葫芦科(Cucurbitaceae)丝瓜属(*Luffa* Mill.)一年生攀援藤本植物,起源于印度,在东亚地区被广泛种植,我国各地也均有大面积栽培,是我国重要的蔬菜品种之一^[1-2]。丝瓜主要有普通丝瓜[*Luffa cylindrica* (L.) Roem.]和有棱丝瓜[*Luffa acutangula* (L.)]两类栽培种,我国大部分地区以栽培普通丝瓜为主,仅广西、广东及海南省等华南地区种植有棱丝瓜^[3]。普通丝瓜在储藏、运输、加工和烹饪过程中果肉和果汁容易产生褐变,极大降低了贮藏加工性能,严重影响丝瓜产品的营养品质和商品价值,造成了巨大的经济损失。阐明丝瓜褐变机理并控制褐变的发生已成为丝瓜育种及其采后贮藏保鲜的研究重点^[3-6]。

研究发现,普通丝瓜的褐变属于酶促褐变,褐变的主要原因是细胞内酚类物质在多酚氧化酶(PPO)的催化下氧化形成醌,醌聚合形成黑色或褐色沉淀^[7-8]。我国台湾的几个学者对丝瓜褐变的生理机制进行了探讨,证实丝瓜的褐变主要是 PPO 酶引起的酶促褐变, PPO 酶的含量和活性与褐变

具有直接关系^[9-10]。课题组前期通过转录组测序和 RT-PCR 方法获得了 3 个丝瓜 PPO 家族基因(*LcPPO1*、*LcPPO2* 和 *LcPPO3*),分析显示 *LcPPO* 家族基因的表达与丝瓜褐变关系密切,其中 *LcPPO1*、*LcPPO2* 在普通丝瓜果肉褐变过程中发挥着重要作用^[11]。通过对丝瓜 *LcPPO* 家族基因的功能验证,探究其在果实褐变中的调控作用,可为普通丝瓜品质改良和遗传育种提供科学依据。

CRISPR/Cas9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR) (CRISPR-associated proteins 9, Cas9) 基因编辑系统是近些年来人们验证特定基因功能的一种新手段^[12]。其原理是 crRNA 与 tracrRNA 通过碱基配对结合形成 sgRNA,引导 Cas9 蛋白在与 crRNA 配对靶位点处形成双链断裂(double-stranded DNA breaks, DSBs),之后细胞可以通过非同源性末端接合(non-homologous end joining, NHEJ)修复机制实现基因组特定定位点的 DNA 插入、缺失、碱基突变或修饰,从而使基因发生移码突变^[13]。与其他基因组编辑技术相比,CRISPR/Cas9 系统的操作性更高,突变效率更高,可轻松实现对目标基因的敲除、替换和定点突变等操作,而且容易在第一代得到纯合的突变体^[14]。目前,植物 CRISPR/Cas9 系统日趋完善,已经在拟南芥^[15]、烟草^[16]、番茄^[17]和玉米^[18]等多个物种中成功实现了定点基因组编辑。然而迄今为止,CRISPR/Cas9 基因编辑技术在丝瓜基因功能研究中的应用鲜见报道。该研究根据前期已经克隆得到的丝瓜 *LcPPO1* 基因序列,设计 2 个 sgRNA 靶位点序列,构建 2 个 *LcPPO1* 基因 CRISPR/Cas9 基因编辑载体,以期接下来的

基金项目 福建省自然科学基金项目(2019J01112);福建省现代蔬菜产业技术体系岗位专家项目(2018R1026-5);福建省农业科学院科技创新团队建设项目(STIT2017-1-2);国家大宗蔬菜产业技术体系福州综合试验站项目(CARS-23-G-53);设施蔬菜种质收集及基因发掘、品种创新与产业化(2018NZ0002-3);福建省属公益类专项(2019R1031-2)。

作者简介 陈敏敏(1989—),女,福建福州人,助理研究员,硕士,从事蔬菜遗传育种研究。*通信作者:朱海生,研究员,博士,从事蔬菜生物技术与育种研究;温庆放,研究员,从事蔬菜栽培与育种研究。

收稿日期 2020-07-03;修回日期 2020-07-29

遗传转化及 *LcPPO1* 基因的功能研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒与菌株。植物 CRISPR/Cas9 基因编辑载体为 pCA1301-Cas9,由南京农业大学郭世荣课题组馈赠;所用菌株为大肠杆菌 DH-5α,购自宝生物工程(大连)有限公司。

1.1.2 主要酶及试剂。多功能 DNA 纯化回收试剂盒、*Bbs* I 和 *T₄* DNA 连接酶购自南京诺唯赞生物科技有限公司; *T₃* Super PCR Mix 购自北京擎科生物科技有限公司;DL2000 DNA Marker 购自宝生物工程(大连)有限公司。

1.2 方法

1.2.1 sgRNA 靶位点序列的设计与引物合成。使用 CRISPR Primer Designer V1.1.2 设计工具,在 *LcPPO1* 基因外显子序列寻找 Cas9 潜在的靶向位点,根据靶位点的位置及 GC 含量,筛选出 2 个合适的打靶位点,分别为 *LcPPO1*-sgRNA1 和 *LcPPO1*-sgRNA2。根据该靶点得到相应引物,并在引物上添加酶切识别序列,由铂尚生物技术(上海)有限公司合成,引物序列见表 1。

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequence

序号 No.	引物名称 Primer name	序列(5'—3') Sequence
1	<i>LcPPO1</i> -sgRNA1-F	aaaca CTTATTTCGTCCTCCACTTTTCaa
2	<i>LcPPO1</i> -sgRNA1-R	gtgattGAAAAGTGGGACGAAATAAG
3	<i>LcPPO1</i> -sgRNA2-F	aaaca CGAAGCAGAAAGTTTCTCATaa
4	<i>LcPPO1</i> -sgRNA3-R	gtgatt ATGAGAACTTTCTGCTTCG
5	M13F	GTAAACGACGGCCAGT

1.2.2 pCA1301-Cas9-sgRNA 重组载体的构建。

1.2.2.1 pCA1301-Cas9 载体的酶切及回收。使用限制性内切酶 *Bbs* I 对 pCA1301-Cas9 载体进行酶切,反应体系为 10× buffer 5 μL, *Bbs* I 酶 1 μL, pCA1301-Cas9 质粒 2 μL,加水补至 50 μL。使用金属浴 37 ℃ 酶切 4 h,酶切产物进行 1%琼脂

糖凝胶电泳,切取目的条带,经多功能 DNA 纯化回收试剂盒回收酶切产物。

1.2.2.2 sgRNA 引物退火。将 sgRNA 寡核苷酸单链以逐步降温的方法退火成双链,程序如下:95 ℃ 5 min;95 ℃ 1 min, -1 ℃/循环,40 个循环;55 ℃ 30 min;55 ℃ 1 min, -1 ℃/循环,22 个循环;4 ℃ 保持备用。

1.2.2.3 *T₄* 连接。使用 *T₄* DNA 连接酶连接酶切后的载体与退火形成双链产物,反应体系为 5×*T₄* DNA Ligase buffer 2 μL,酶切质粒 2 μL,双链产物 3 μL, *T₄* DNA Ligase 1 μL,加水补至 10 μL;37 ℃ 连接 2 h。

1.2.2.4 转化。在 10 μL 的连接产物中加入 DH5α 感受态细胞至 100 μL 轻轻混匀,冰水浴放置 30 min,42 ℃ 水浴中热激 45 s,迅速移到冰中放置 5 min,加入 600 μL LB 培养基,37 ℃ 振荡培养 2 h,取 100 μL 菌液涂到 LB(含卡那抗性)平板,倒置平板于 37 ℃ 培养 12~16 h。

1.2.2.5 重组载体的鉴定。挑取单菌落进行菌液 PCR 鉴定及测序。PCR 鉴定使用通用引物 M13F 与 sgRNA1-F 和 sgRNA2-F。反应体系为 *T₃* Super PCR Mix 10 μL,引物各 1.5 μL,菌液 1 μL,加水补至 20 μL;PCR 反应条件为 94 ℃ 预变性 3 min;94 ℃ 1 min,60 ℃ 1 min,72 ℃ 1 min,30 个循环;72 ℃ 5 min,4 ℃ 保存。对 PCR 产物进行 1%的琼脂糖凝胶电泳鉴定,取阳性的重组载体送测序公司测序。

2 结果与分析

2.1 靶向 *LcPPO1* 的 sgRNA 设计 应用 CRISPR Primer Designer V1.1.2 设计工具,在 *LcPPO1* 基因外显子序列找到 2 个合适的 sgRNA 序列,分别为 *LcPPO1*-sgRNA1:5'-CT-TATTTTCGTCCTCCACTTTTC-3'; *LcPPO1*-sgRNA2:5'-CGAAG-CAGAAAGTTTCTCAT-3'。由图 1 可知, *LcPPO1*-sgRNA1 位于 *LcPPO1* CDS 序列的 55 bp 处, *LcPPO1*-sgRNA2 位于 *LcPPO1* CDS 序列的 105 bp 处,2 个 sgRNA 序列均为 20 bp,GC 含量达 40%,并包含 PAM 标识位点。

AAAACACAAGCTTAGATCTAATAATCAAAGCTAGCCTAATGGCTTCTCTATCTCCTCCTC
CGCTTGCAACCCTTTCCTCCGCCACCGCCA^{CC}ACTTATTTCGTCCCACTTTTCCGTAAC
AACAAATACCCATCATTTCGGC^{CC}TGAAGCAGAAAGTTTCTCATCAACAAAGCTCCTC
GAGTTTTGTGCAGCGCCTCCAATGGCGACCAAAAGTTGACCGGAGAGACGTGCTCC
TTGGGCTGGGCGGTCTCTACGGAGCCTCAACTCTCGGCCCGGATTCTTCGCCCTTCGCC
AGTCCGGTGGTGACGCCGCCACTGGACAAAGTGTCACCTTAGCAACCTTGCCAGATGGC
ACAAAGGATGCTTGCTGCCCCGCCGACGGCCGTCAACATCAAAGACTTCCGGCCAACC
CCACCTAGCAAAC TGCGGGTTAGGCCGGCGGCCCATTTAATTGATGAAAAGTACATAG
AGAAATACAAGAGAGCCGTCCAGCTGATGAAGTGCTTGCCGGACAACGACCCAAGAA
ATTTTAGACAGCAAGCGAATGTTCACTGTGCCTATTGTCATGGCGGCTACGACCAAGTG

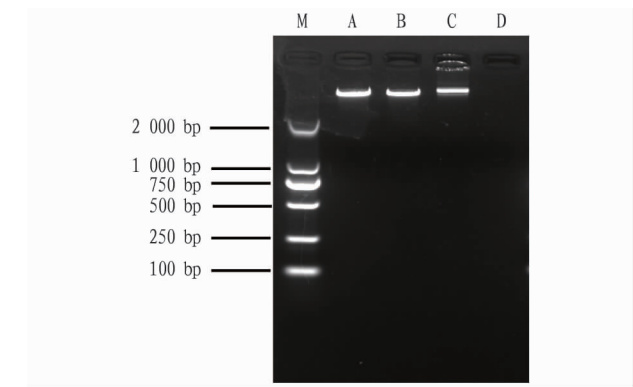
注:蓝色代表 *LcPPO1* 基因的部分编码区,下划线标记序列为 2 个 sgRNA 序列,CC(-)表示 PAM 识别位点
Note:The blue represented the partial coding region of *LcPPO1* gene,the underlined sequence was two sgRNA sequences,and CC(-)represented PAM recognition site

图 1 *LcPPO1* 基因及 sgRNA 序列
Fig. 1 *LcPPO1* gene and sgRNA sequence

2.2 载体 pCA1301-Cas9 的酶切 载体 pCA1301-Cas9 大小为 14 847 bp,用限制性内切酶 *Bbs* I 可酶切成大小为 20 和

14 827 bp 的 2 个片段,如图 2 所示,A、B 为 pCA1301-Cas9 载体;C 为 *Bbs* I 酶切后的线性载体,A、B 和 C 的片段差异很

小,D 为未加质粒的空对照,没有跑出条带,符合预期结果,表明载体 pCA1301-Cas9 酶切成功。



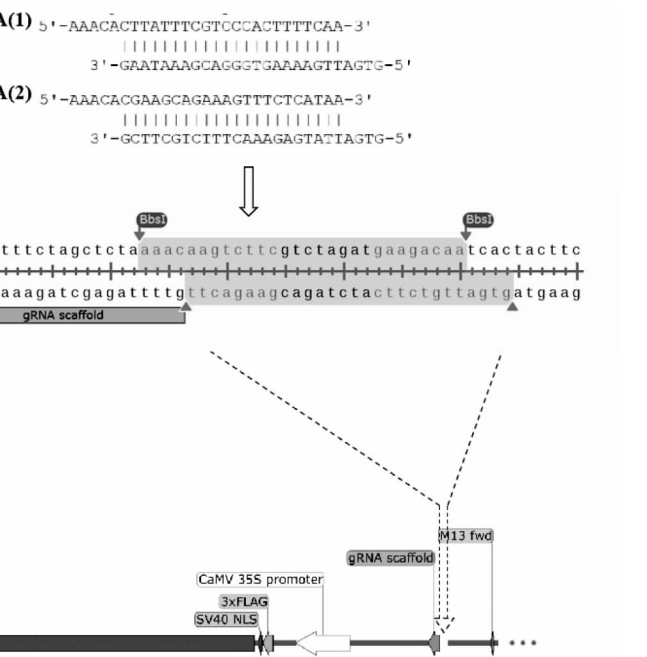
注:M 为 DL2000 DNA Marker;A、B 为 pCA1301-Cas9 载体;C 为 *Bbs* I 酶切后的线性载体;D 为空对照
Note:M was DL2000 DNA Marker;A and B were pCA1301-Cas9 vector;C was linear vector after *Bbs* I digested;D was blank control

图 2 pCA1301-Cas9 载体 *Bbs* I 酶切鉴定
Fig. 2 pCA1301-Cas9 vector digested by *Bbs* I

2.3 重组载体pCA1301-Cas9-sgRNA的构建 重组载体

pCA1301-Cas9-sgRNA 的构建流程如图 3 所示,2 个 sgRNA 寡核苷酸单链以逐步降温的方法退火形成双链[图 3A(1)和图 3A(2)],接着利用限制性内切酶 *Bbs* I 切去 pCA1301-Cas9 载体中的一小部分(图 3B 中阴影部分),从而获得线性载体,由于限制性内切酶 *Bbs* I 本身只需识别序列的一端就可以进行酶切,所以该研究利用 1 个内切酶就能完成双酶切,最后利用 *T*₄ 连接酶将 A1 和 A2 序列分别与 pCA1301-Cas9 线性载体连接,获得重组载体 pCA1301-Cas9-sgRNA1 和 pCA1301-Cas9-sgRNA2(图 3C)。

2.4 重组载体 pCA1301-Cas9-sgRNA 的 PCR 鉴定结果 以 M13F 和 sgRNA1-F 为引物对重组载体 pCA1301-Cas9-sgRNA1 进行菌液 PCR 鉴定,以 M13F 与 sgRNA2-F 为引物对重组载体 pCA1301-Cas9-sgRNA2 进行菌液 PCR 鉴定。扩增得到的目的片段(图 4)均在 250 bp 左右,与预期条带大小一致,说明 2 个 sgRNA 靶位点序列已经分别准确地连入 pCA1301-Cas9 载体,然后将阳性克隆菌液送至公司进行测序,结果显示插入片段与设计的序列匹配一致,无突变(图 5),表明 2 个靶向 *LcPPO1* 基因的 CRISPR/Cas9 基因编辑载体构建成功。



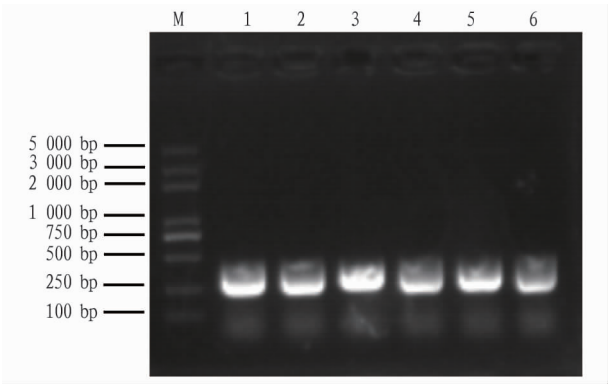
注:A1 是 sgRNA1 双链序列;A2 是 sgRNA2 双链序列;B 表示载体 pCA1301-Cas9 的酶切,阴影部分为切去的序列;C 表示重组载体 pCA1301-Cas9-sgRNA,箭头部分为插入的靶向序列
Note:A1 was sgRNA1 double stranded sequence;A2 was sgRNA2 double stranded sequence;B was enzyme digestion of vector pCA1301-Cas9,the shaded part was cut sequence;C was recombinant vector pCA1301-Cas9-sgRNA,and the arrow part was the inserted target sequence

图 3 重组载体 PCA1301-Cas9-sgRNA 的构建流程
Fig. 3 Construction process of recombinant vector PCA1301-Cas9-sgRNA

3 讨论

CRISPR/Cas 系统是一种新兴起的基因定点编辑技术,它是基于细菌获得性免疫系统原理改造而成的一种全新的人工核酸酶系统,因其操作简单、编辑高效、成本低廉,已被广泛应用于多种农作物的基因功能研究^[19]。CRISPR/Cas 系统包括 CRISPR/Cas9、CRISPR/Cpf1、CRISPR/C2c1 和

CRISPR/C2c2 等亚类型,其中应用最多的是 CRISPR/Cas9^[19]。然而在葫芦科作物中一直存在再生成苗率低、遗传转化困难等问题,所以一定程度上影响到该技术的利用。近几年,只在黄瓜和甜瓜中有 CRISPR/Cas9 技术应用的研究报道。Chandrasekaran 等^[20]通过改进 CRISPR/Cas9 技术制造出非转基因全雌性黄瓜。戚晶晶^[21]利用 CRISPR/Cas9 技术创制



注: M 为 DL2000 DNA Marker;1、2、3 为重组载体 pCA1301-Cas9-sgRNA1 的 PCR 鉴定;4、5、6 为重组载体 pCA1301-Cas9-sgRNA2 的 PCR 鉴定

Note: M was DL2000 DNA Marker;1,2 and 3 were PCR identification of recombinant vector pCA1301-Cas9-sgRNA1;4,5 and 6 were PCR identification of recombinant vector pCA1301-Cas9-sgRNA2

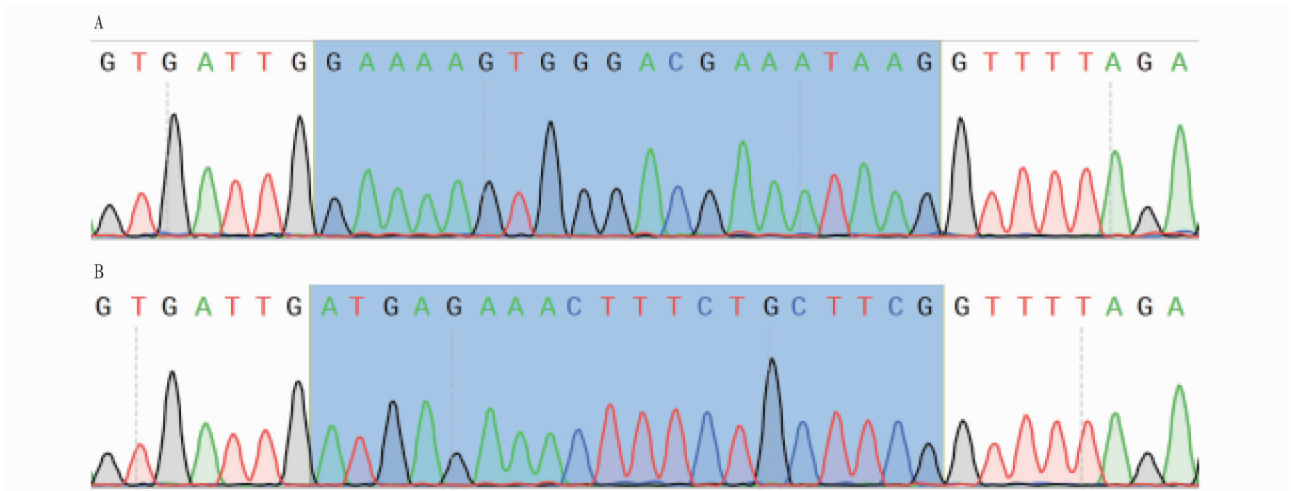
图 4 重组载体 pCA1301-Cas9-sgRNA 的 PCR 鉴定
Fig. 4 Identification of recombinant vector pCA1301-Cas9-sgRNA with PCR amplification

出矮生黄瓜株系。王丹等^[22]采用 CRISPR/Cas9 技术编辑了新疆甜瓜全缘叶基因 *PLL*。王雪等^[23]构建了甜瓜 ACC 合成酶基因 CRISPR-Cas9 表达载体。该研究以丝瓜为材料,构建了 *LcPPO1* 基因的 CRISPR/Cas9 基因编辑载体,填补了丝瓜在基因编辑研究方面的空缺,同时也为接下来的遗传转化及基因功能研究奠定了基础。

在 CRISPR/Cas9 基因编辑技术中,sgRNA 的设计至关重要,既要考虑切割效率,又要考虑特异性。靶位点的选择与切割效率密切相关,应该尽量避免靶向基因的 N 端或 C 端

以及靶向 5'和 3'非编码区。sgRNA 序列的长度决定特异性,一般应为 20 nt 左右。有研究显示,小于 20 nt 的短 sgRNA,可以在不牺牲靶基因组编辑效率的情况下,减少脱靶位点突变多达 5 000 倍或更多^[24]。该研究按照 sgRNA 的设计原则,在 *LcPPO1* 基因编码区序列找到了 2 个合适的 sgRNA 序列,2 个 sgRNA 序列均为 20 nt,GC 含量达 40%,包含 PAM 标识位点,并成功构建了 2 个靶向 *LcPPO1* 的 CRISPR/Cas9 基因编辑载体,为丝瓜其他基因靶向的 CRISPR/Cas9 基因组编辑载体的构建提供了借鉴方法。下一步的工作是通过根瘤农杆菌的介导将 CRISPR/Cas9 基因组编辑载体转入丝瓜,获得转基因植株,验证 CRISPR/Cas9 基因组编辑载体的有效性。

该研究所构建的 2 个重组载体均为单靶点 CRISPR/Cas9 基因编辑载体。通常情况下单个 sgRNA 只能靶向基因的 1 个位点,敲除率不稳定且偏低,而多个 sgRNA 靶向同一基因的不同位点,不仅能够提高基因突变的频率,还能造成较大片段的缺失突变。汪秉琨等^[25]构建了 *Wx* 基因双靶点 CRISPR/Cas9 表达载体 pGK03-*Wx*-gRNA,在 T0、T1 和 T2 代水稻株系中得到了多个位点突变的个体。胡春华等^[26]利用一套改良的 CRISPR/Cas9 多靶点载体系统,构建了针对香蕉 *MaPDS* 的 pYLCRISPR/Cas9-gRNA 基因编辑载体,成功在香蕉体内实现了对内源 *MaPDS* 的定点敲除,获得了基因定点敲除的突变体株系。在后续的研究中如有必要可以对现有载体进行改进,考虑构建多靶点基因编辑载体。另外,课题组在前期的研究中已获得与丝瓜褐变相关的基因全长序列 15 条,包括 11 条 PPO、PAL、POD、CAT 和 SOD 家族基因和 4 条 WRKY 转录因子家族基因^[11,27-34]。还可以利用 CRISPR/Cas9 技术进行多基因位点的同时编辑,从而进一步提高基因编辑的效率,获得更多的突变个体。



注: A 表示重组载体 pCA1301-Cas9-sgRNA1 部分测序结果;B 表示重组载体 pCA1301-Cas9-sgRNA2 部分测序结果;蓝色部分为插入的 *LcPPO1* 基因靶向序列

Note: A was partial sequencing results of recombinant vector pCA1301-Cas9-sgRNA1;B was partial sequencing results of recombinant vector pCA1301-Cas9-sgRNA2;The blue part was the target sequence of the inserted *LcPPO1* gene

图 5 重组载体 pCA1301-Cas9-sgRNA 部分测序结果
Fig. 5 Partial sequencing results of recombinant vector pCA1301-Cas9-sgRNA

参考文献

- [1] 李程斌,李恩,郑艳,等. 丝瓜藤和叶营养成分分析[J]. 安徽师范大学学报(自然科学版),2009,32(1):69-71.
- [2] 颜国纲,郑振佳,时新刚,等. 丝瓜的营养价值及其综合利用研究进展[J]. 中国果菜,2011,31(7):35-36.
- [3] 娄丽娜,刘哲,苏小俊. 普通丝瓜耐褐变研究进展[J]. 长江蔬菜,2015(4):1-4.
- [4] 王成,王辉,娄丽娜,等. 普通丝瓜果肉褐变的鉴定方法[J]. 江苏农业科学,2012,40(11):137-138.
- [5] QUEIROZ C, MENDES LOPES M L, FIALHO E, et al. Polyphenol oxidase: Characteristics and mechanisms of browning control[J]. Food reviews international, 2008, 24(4): 361-375.
- [6] CONSTABEL C P, BARBEHENN R. Defensive roles of polyphenol oxidase in plants[M]//SCHALLER A. Induced plant resistance to herbivory. Dordrecht: Springer N-Verlag, 2008: 253-270.
- [7] 康娟,庄尹宏,林碧英,等. 丝瓜多酚氧化酶及过氧化物酶学特性的研究[J]. 福建农业学报,2017,32(8):854-858.
- [8] 吴海霞,曹雨舟. 67.8 ku 丝瓜多酚氧化酶酶学性质的研究[J]. 食品工业科技,2014,35(4):184-188.
- [9] 苏群棋. 不同瓜品种之多元酚氧化酶、多元酚含量与褐变间关系之探讨[D]. 台北:中国文化大学,1998.
- [10] 吴佳真. 圆筒丝瓜结果特性及果肉褐变之品种差异[D]. 台北:台湾大学,2004.
- [11] 朱海生,康娟,刘建汀,等. 丝瓜多酚氧化酶 *PPO* 基因家族的克隆与表达分析[J]. 核农学报,2018,32(8):1502-1512.
- [12] 暴会会,尹竹君,王少坤,等. CRISPR-Cas9 系统在蔬菜育种上应用研究进展[J]. 江西农业学报,2019,31(7):38-44.
- [13] 时欢,林玉玲,赖钟雄,等. CRISPR/Cas9 介导的植物基因编辑技术研究进展[J]. 应用与环境生物学报,2018,24(3):640-650.
- [14] 原文霞,王柳鸣,李冬月,等. 利用 CRISPR/Cas9 技术靶向编辑水稻基因[J]. 浙江农业学报,2017,29(5):685-693.
- [15] JIANG W Z, ZHOU H B, BI H H, et al. Demonstration of CRISPR/Cas9/sgRNA-mediated targeted gene modification in Arabidopsis, tobacco, sorghum and rice[J]. Nucleic acids research, 2013, 41(20):188-200.
- [16] CHEN K L, GAO C X. Targeted genome modification technologies and their applications in crop improvements[J]. Plant cell reports, 2014, 33(4):575-583.
- [17] BROOKS C, NEKRASOV V, LIPPMAN Z B, et al. Efficient gene editing in tomato in the first generation using the clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated9 system[J]. Plant physiology, 2014, 166(3):1292-1297.
- [18] LIANG Z, ZHANG K, CHEN K L, et al. Targeted mutagenesis in *Zea mays* using TALENs and the CRISPR/Cas system[J]. Journal of genetics and genomics, 2014, 41(2):63-68.
- [19] 薛永国,刘鑫磊,唐晓飞,等. CRISPR-Cas9 技术在作物中研究进展[J]. 黑龙江农业科学,2020(2):125-130.
- [20] CHANDRASEKARAN J, BRUMIN M, WOLF D, et al. Development of broad virus resistance in non-transgenic cucumber using CRISPR/Cas9 technology[J]. Molecular plant pathology, 2016, 17(7):1140-1153.
- [21] 戚晶晶. 利用 CRISPR/Cas9 技术创制矮生黄瓜株系[D]. 南京:南京农业大学,2017:10-20.
- [22] 王丹,王旭辉,高兴旺,等. CRISPR/Cas9 技术编辑新疆甜瓜全缘叶基因[J]. 新疆农业科学,2018,55(2):238-245.
- [23] 王雪,李冠. CRISPR-Cas9 系统敲除甜瓜 ACC 合成酶基因表达载体的构建[J]. 北方园艺,2017(12):114-118.
- [24] 谢胜松,张懿,张利生,等. CRISPR/Cas9 系统中 sgRNA 设计与脱靶效应评估[J]. 遗传,2015,37(11):1125-1136.
- [25] 汪秉琨,张慧,洪汝科,等. CRISPR/Cas9 系统编辑水稻 *Wx* 基因[J]. 中国水稻科学,2018,32(1):35-42.
- [26] 胡春华,邓贵明,孙晓玄,等. 香蕉 CRISPR/Cas9 基因编辑技术体系的建立[J]. 中国农业科学,2017,50(7):1294-1301.
- [27] 朱海生,温文旭,刘建汀,等. 丝瓜苯丙氨酸解氨酶基因 *PAL* 克隆及表达分析[J]. 植物遗传资源学报,2018,19(2):268-276.
- [28] 朱海生,刘建汀,王彬,等. 丝瓜过氧化物酶基因的克隆及其在果实褐变中的表达分析[J]. 农业生物技术学报,2018,26(1):43-52.
- [29] 温庆放,刘建汀,朱海生,等. 丝瓜过氧化氢酶基因 *CAT1* 的克隆及表达分析[J]. 园艺学报,2016,43(10):2039-2048.
- [30] 刘建汀,朱海生,温庆放,等. 丝瓜过氧化氢酶 *CAT2* 基因的分离及表达分析[J]. 中国细胞生物学学报,2017,39(8):1076-1083.
- [31] 朱海生,刘建汀,陈敏氢,等. 丝瓜铜锌超氧化物歧化酶 *Cu/Zn-SOD* 基因家族的克隆与表达分析[J]. 中国农业科学,2017,50(17):3386-3399.
- [32] 刘建汀,朱海生,温庆放,等. 丝瓜 *LcWRKY21* 转录因子基因的克隆与表达分析[J]. 中国细胞生物学学报,2017,39(10):1268-1278.
- [33] 刘建汀,朱海生,温庆放,等. 丝瓜 *WRKY* 转录因子基因的分离与褐变分析[J]. 农业生物技术学报,2017,25(12):1950-1960.
- [34] ZHU H S, LIU J T, WEN Q F, et al. De novo sequencing and analysis of the transcriptome during the browning of fresh-cut *Luffa cylindrica* 'Fusi-3' fruits[J]. PLoS One, 2017, 12(11):1-20.

(上接第 104 页)

- [18] CHOU K C, SHEN H B. Plant-mPLOC: A top-down strategy to augment the power for predicting plant protein subcellular localization[J]. PLoS One, 2010, 5(6):1-11.
- [19] SONNHAMMER E L L, VON HEIJNE G, KROGH A. A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences[J]. Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol, 1998, 6:175-182.
- [20] CHANDRASEKARAN J, BRUMIN M, WOLF D, et al. Development of broad virus resistance in non-transgenic cucumber using CRISPR/Cas9 technology[J]. Molecular plant pathology, 2016, 17(7):1140-1153.
- [21] BAILEY T L, BODEN M, BUSKE F A, et al. MEME SUITE: Tools for motif discovery and searching[J]. Nucleic Acids Res, 2009, 37(S2):W202-208.
- [22] CHEN C J, XIA R, CHEN H, et al. TBtools, a Toolkit for Biologists integrating various HTS-data handling tools with a user-friendly interface [J/OL]. bioRxiv, 2018[2020-03-07]. https://doi.org/10.1101/289660.
- [23] ROMBAUTS S, DÉHAIS P, VAN MONTAGU M, et al. PlantCARE, a plant cis-acting regulatory element database[J]. Nucleic Acids Res, 1999, 27(1):295-296.
- [24] QIN L, HAN P P, CHEN L Y, et al. Genome-wide identification and expression analysis of NRAMP family genes in soybean (*Glycine max* L.) [J]. Frontiers in plant science, 2017, 8:1436-1455.
- [25] MANI A, SANKARANARAYANAN K. In silico analysis of natural resistance-associated macrophage protein (NRAMP) family of transporters in rice[J]. Protein J, 2018, 37(3):237-247.
- [26] ULLAH I, WANG Y R, EIDE D J, et al. Evolution, and functional analysis of Natural Resistance-Associated Macrophage Proteins (NRAMPs) from *Theobroma cacao* and their role in cadmium accumulation[J]. Sci Rep, 2018, 8:14412-14427.