

曹兴林,恽君雯,陈丽,等. 基于 CRISPR/Cas9 系统的 MDCK 细胞 *IFN-β1* 编码序列的敲除[J]. 江苏农业科学,2020,48(7):59-65.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.07.010

基于 CRISPR/Cas9 系统的 MDCK 细胞 *IFN-β1* 编码序列的敲除

曹兴林^{1,2,3}, 恽君雯^{3,4}, 陈丽^{3,4}, 宋伟^{1,3}, 侯继波³, 冯磊^{3,4}, 徐业芬²

(1. 西藏农牧学院动物科学学院,西藏林芝 860000; 2. 西藏农牧学院西藏高原动物疫病研究自治区高校重点实验室,西藏林芝 860000;

3. 江苏省农业科学院动物免疫工程研究所/国家兽用生物制品工程技术研究中心,江苏南京 210014;

4. 江苏省动物重要疫病与人兽共患病防控协同创新中心,江苏扬州 225009)

摘要:为了建立高品质的犬肾(MDCK)单克隆细胞系,使用 CRISPR/Cas9 技术实现 MDCK 细胞 *IFN-β1* 基因的敲除,构建细胞培养禽流感病毒(AIV)增殖体系。首先,根据 CRISPR/Cas9 系统的技术要求构建了 Cas9 表达载体和 sgRNA 载体;然后,用 3 种载体共转染 MDCK 细胞,通过 GFP 阳性特征分选单细胞克隆,单细胞克隆培养在 96 孔板中。通过 PCR 扩增和对 *IFN-β1* 靶序列进行测序,确定了阳性 MDCK 单细胞克隆中 *IFN-β1* 的敲除。结果成功构建了具有 *IFN-β1* 敲除的 MDCK 单细胞克隆细胞系,与原始细胞相比,该细胞系的病毒增殖能力提高。

关键词:CRISPR/Cas9;犬肾(MDCK)细胞;*IFN-β1*;禽流感病毒(AIV);增毒能力

中图分类号:S852.65⁺7 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2020)07-0059-06

禽流感(AI)是由禽流感病毒(AIV)引起的禽类烈性传染病,由于其血清型多,易发生变异^[1-3],给国际养禽业造成了巨大的经济损失,而且在人类公共卫生上也造成重大影响^[4-7],从而引起了研究人员的高度关注。犬肾(MDCK)细胞是目前用于禽流感病毒增殖主要的宿主细胞^[8-9]。有研究表明,当禽流感病毒在 MDCK 细胞中的连续传代时,其增殖效率呈现出逐渐下降的趋势。甚至在连续增殖到某一代次时,禽流感病毒的增殖效率会出现断崖式下降。造成这一情况的原因目前尚不明确,但与子代病毒粒子中缺陷型病毒粒子占比的逐渐增加有关。而这种缺陷型病毒粒子的生成又与宿主细胞 I 型干扰素介导的宿主细胞天然免疫拮抗病毒增殖有关。有关文献表明,*IFN-β1* 在禽流感病毒感染 MDCK 细胞的过程中可以诱发细胞产生天然

免疫拮抗病毒增殖的信号通路,在病毒吸附、转运、逆转录、复制以及芽殖等多个过程对病毒的增殖进行干扰。同时释放到胞外的 *IFN-β1* 可通过细胞膜上的干扰素识别受体^[10-11],激活未被禽流感病毒感染正常细胞的天然免疫系统,使得禽流感病毒在细胞间的传播受到抑制。

CRISPR 是细菌和古细菌用来对抗入侵病毒及外源 DNA 的免疫防御系统。因其机构为成簇规律性间隔短回文重复序列,被命名为 CRISPR^[12]。目前 CRISPR/Cas9 已经成为第三代基因编辑手段,较传统基因编辑工具锌指核酸酶(ZFNs)和转录激活因子样效应核酸酶(TALENs)而言,CRISPR/Cas9 操作简便、突变率高^[13-15]。CRISPR/Cas9 基因编辑技术已成功应用于各种体外和体内基因敲除模型的建立,成为重要的基因工程技术手段^[16-18]。

综上所述,通过基因工程手段敲除 MDCK 细胞的干扰素 *IFN-β1* 基因编码片段,去除细胞的主要天然免疫信号传递分子,为提高禽流感病毒在 MDCK 细胞中的增殖效率提供新思路和新种质资源。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验材料 MDCK 细胞购自 ATCC - CCL34、AIV-H9 亚型病毒: A/chicken/Jiangsu/02/

收稿日期:2019-07-04

基金项目:国家重点研发计划(编号:2017YFD0500706);江苏省自然科学基金面上项目(编号:BK20151360)。

作者简介:曹兴林(1993—),女,山西天镇人,硕士研究生,从事动物用生物制品及工程技术的研究。E-mail:1260564181@qq.com。

通信作者:冯磊,博士,副研究员,主要从事兽用生物制品工程技术研究,E-mail:fenglei@jaas.ac.cn;徐业芬,教授,主要从事西藏高原动物免疫遗传和生理学研究,E-mail:xzlxxyf@163.com;E-mail:xzlxxyf@163.com。

09(简称 JS02),由国家兽用生物制品工程技术研究中心分离、保藏;pCMV-MCS-IRES-eGFP、pUC-sgRNA-cloning 载体由国家兽用生物制品工程技术研究中心实验室构建提供。

1.1.2 试剂 DNA 连接酶 Solution I、*Nhe* I、*Xho* I 购于 Takara Bio 有限公司;限制性内切酶 *Bbs* I-HF 购于 NEB Labs;质粒 DNA 提试剂盒,转染试剂购于 QIAGEN 公司;FBS 血清购于 Thermo scientific;DMEM 培养基来自本研究所;琼脂粉 Ager 购于 Biofroxx 公司;氨苄,薄型琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒购于 RENERAY Biochnology。

1.1.3 仪器梯度 PCR 仪,Biometra 公司;核酸电泳仪,全自动凝胶成像分析系统,上海天能公司;微量紫外分光光度计,Nano Drop one;CO₂ 细胞培养箱 Thermo scientific;水浴锅,低速离心机离心机,北京鼎昊源科技有限公司;高速离心机,Eppendorf 公司。

1.2 方法

1.2.1 sgRNA 引物的设计及构建分析 犬 *IFN-β1* 的基因序列(Gene ID:481558),根据 Cas9 蛋白识别序列要求,并考虑序列的特异性以及可能的编辑脱靶效率,选取 GCTCATGGCAAGAGCCATGGTGG 为靶序列 1,GATAATCTGTAAGTATATTAAGG 为靶序列 2。针对这 2 条靶序列,设计 2 对 DNA oligo 引物用于 sgRNA 表达载体的构建,序列如下:sgRNA-1-F:5'-CACCGGCTCATGGCAAGAGCCATGG-3';sgRNA-1-R:5'-AAACGCCATGGCTCTTGCCATGAGC-3';sgRNA-2-F:5'-CACCGGATAATCTGTAAGTATATTA-3';sgRNA-2-R:5'-AAACGTAATATACTTACAGATTATC-3'。2 对靶序列引物分别经退火处理,连接至经 *Bbs* I(购自 NEB)处理的 pUC-sgRNA-cloning 载体,获得 pUC-sgRNA1 和 pUC-sgRNA2,用于后续转染试验。

1.2.2 pCas9-IRES-eGFP 载体的构建 根据犬的蛋白质翻译密码子偏好性,优化 Cas9 蛋白编码序列,并在该序列 2 端各加入 1 条 SV40 病毒的 NLS 序列。化学合成该序列(南京金斯瑞生物科技有限公司),用于载体构建。PCR 扩增 Cas9 片段(引物-F:5'-GGGCTAGCATGGCCCCAAAGAAGAAG-3';引物-R:5'-GGCTCGAGCCCCAACCCCG-3'),产物经 *Nhe* I 和 *Xho* I 处理。

1.2.3 细胞的转染和分选 根据转染试剂(Qiagen)的配制及使用说明,配制含有 1.0 μg

pCas9-IRES-GFP,各 0.5 μg pUC-sgRNA1 和 pUC-sgRNA2 的转染复合物,经转染 MDCK 细胞后 24 h,于荧光显微镜下观察转染情况,对照细胞无绿色荧光,转染细胞若转染成功,即呈现绿色。转染后 48 h 内对转染阳性细胞进行 FACS 细胞分选,将阳性细胞单克隆分选至含有 10% FBS 血清的 MDCK 细胞培养基中,设置每孔单个细胞克隆。置于正常培养环境下继续培养 1 周待用。

1.2.4 单克隆细胞鉴定 待单细胞克隆恢复生长,制作细胞克隆复板,用于细胞克隆的继续培养以及细胞克隆的基因组 DNA 的提取鉴定。针对犬 *IFN-β1* 基因序列合成 PCR 扩增引物 F:5'-ATGA AAGGAGAACTGAAAGTGGG-3'和 R:5'-GTCAA GCATCGTCCATTCCGAGAG-3'。经 PCR 扩增(98 ℃,30 s;98 ℃ 15 s,60 ℃ 30 s,72 ℃ 20 s,35 个循环;72 ℃ 10 min)。鉴定单克隆 MDCK 细胞的扩增片段,经 PCR 产物测序结果,确定基因敲除的细胞克隆。

1.2.5 H9 亚型禽流感病毒的增殖及血凝效价的测定

1.2.5.1 H9 亚型禽流感病毒的增殖 MDCK 母细胞、细胞克隆接种于 6 孔板中,待汇合度达到 95%,以 1% 的接毒量加入 H9 亚型禽流感病毒 JS02 株,同时添加 8 μg/mL 的 TPCK 处理的胰蛋白酶用于病毒增殖,接毒 3 d 后反复冻融培养物,测定子代病毒 HA 效价。并按照上述接毒操作进行病毒的连续传代,分别于不同代次测定病毒 HA 效价。

1.2.5.2 H9 亚型病毒 HA 效价的检测 采新鲜 SPF 公鸡血,经抗凝处理,以 PBS 清洗血球 3 次,配制成 1% 鸡血球 PBS 液。在 HA 检测 96 孔板上用定量稀释器于每排各孔中加 PBS 25 μL。以稀释器吸取 25 μL 待测样品于第一孔中,连续对倍稀释该样品至第 11 孔,弃去 25 μL,第 12 孔不加样品作为对照。每孔中补加 25 μL PBS,然后每孔分别加入 25 μL 1% 鸡血球 PBS 液,在振板器上振动 20 s,室温下作用 30~40 min。作用结束后依据血球凝集程度判定反应结果,以出现完全凝集的最大稀释度为该样品的血球凝集效价,以 log₂/25 μL 来表示。

2 结果与分析

2.1 pCas9-IRES-eGFP 载体构建

Cas9 编码序列的 PCR 产物核酸电泳结果如图 1-A 所示,pCas9-IRES-eGFP 载体经 *Nhe* I 和

Xho I 双酶切处理,产生 4 227 bp 和 5 714 bp 的 2 条片段,电泳结果如图 1 - B 所示,结果正确,pCas9 -

IRES - eGFP 载体用于转染试验。

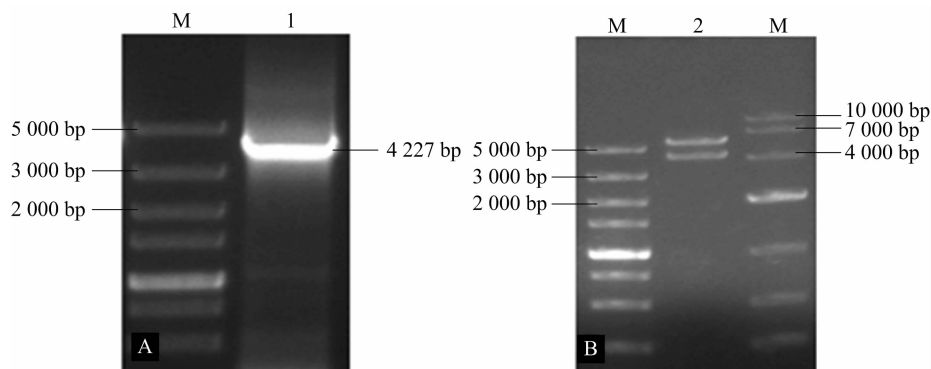
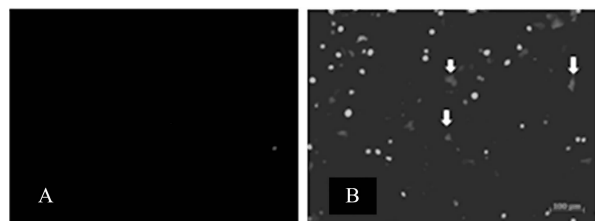


图1 Cas9 编码序列 PCR 扩增产物及 pCas9-IRES-Egfp 载体酶切产物电泳

2.2 细胞转染结果

瞬时转染 CRISPR/Cas9 系统的 3 质粒进入 MDCK 细胞 24 h 后,于荧光显微镜下观察转染结果(图 2)。结果显示,阴性对照 MDCK 细胞无绿色荧光,转染后 MDCK 细胞呈现绿色荧光,图 2 - B 箭头所指荧光代表转染成功的 MDCK 细胞。



A.对照组

B.试验组

图2 荧光显微镜下细胞图像

2.3 细胞流式分选

转染 48 h 内,以 BD FACSDiva 8.0.1 流式细胞仪进行细胞分选(图 3),绿色荧光表达强度最高(Top 1% ~ 2%)的阳性 MDCK 细胞被分选至 96 孔

板,形成单细胞克隆。

2.4 目标序列的 PCR 扩增及产物测序比对

待 96 孔板中单细胞克隆生长恢复,达到 85% 的生长汇合度,进行细胞复板操作。将复板后细胞克隆分别进行基因组 DNA 抽提及目标片段的 PCR 扩增,结果如图 4 所示。对照细胞的扩增片段大小为 767 bp,备选克隆的扩增片段如图 4 中 1 ~ 19 号泳道所示。根据备选克隆的 PCR 扩增产物的条带大小,将克隆 1 的 250 bp 左右条带、克隆 3 的 250 bp 左右条带、克隆 8 的 1 000 bp 左右条带、克隆 10 的 250 bp 左右条带、克隆 13 的 250 bp 左右条带、克隆 14 的 250 bp 左右条带、克隆 15 的 1 000 bp 左右条带、克隆 16 的 250 bp 左右条带进行切胶回收并做 PCR 产物测序,与对照细胞的犬 *IFN-β1* 基因的编码序列进行比对分析。DNA 测序及比对结果如图 5 所示,可见备选克隆中的 *IFN-β1* 基因编码序列在 2 个靶向切割位点处出现了大片段的缺失或者大片段的随机插入,说明对 MDCK 细胞进行 *IFN-β1* 基因序列的编辑改造是有效的。

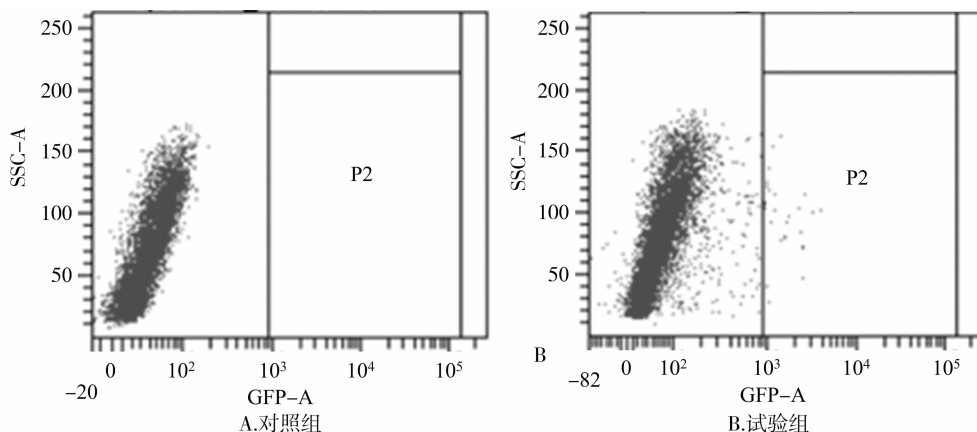


图3 流式细胞分选转染

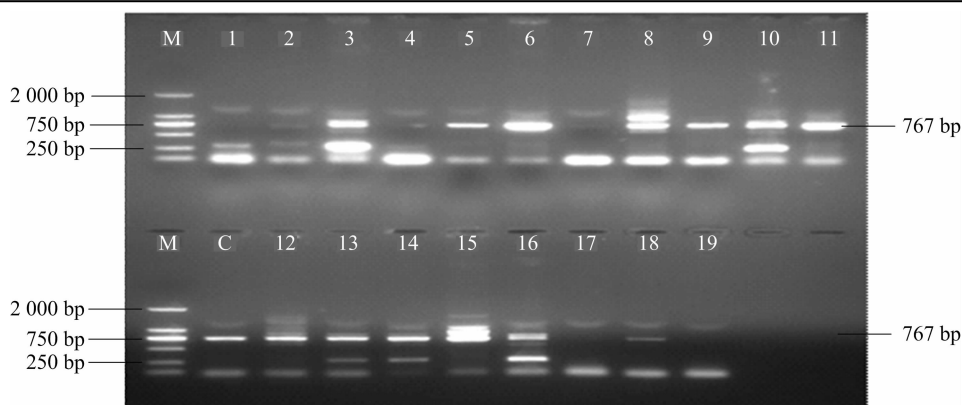


图4 备选阳性克隆的 PCR 产物电泳分析

2.5 *IFN-β1* 编码序列敲除阳性细胞克隆的生长能力比较

对备选阳性细胞克隆进行了生长能力比较,结果(表1)显示,经过 CRISPR/Cas9 系统操作之后的细胞克隆,生长能力有所差异,表现为生长速率减慢,最大细胞密度降低等。细胞克隆1、克隆3、克隆10、克隆14、克隆16的细胞生长速率相对较快,以这5株细胞克隆进行禽流感病毒的增殖比较试验。

2.6 *IFN-β1* 编码序列敲除阳性细胞克隆的病毒增殖能力比较

对细胞克隆1、克隆3、克隆10、克隆14、克隆16以及 MDCK 原始细胞的病毒增殖能力进行比较,结果(表2)表明,细胞克隆1表现出最好的病毒增殖效果,H9 亚型禽流感病毒 JS02 株在该细胞克隆中获得连续增殖的能力,HA 效价逐步升高并维持在最高的水平。

3 结论与讨论

先天免疫反应是抵御病毒感染的第一道防线。宿主细胞内的模式识别受体 (PRR) 感知病原体相关的分子模式,在触发一系列信号级联反应后,宿主的防御机制被激活^[19]。在病毒感染后,引起干扰素 (IFN) 的产生和分泌,这对先天免疫是至关重要的并且对适应性免疫也具有深远影响。干扰素信号传导会诱导 IFN 刺激基因 (*ISG*) 的转录,其进一步加强机体对病毒感染的免疫应答^[20]。I 型干扰素的主要有抗病毒、抗寄生虫、抗菌、抗肿瘤等功能,其中抗病毒是 IFN - I 最重要的功能之一。*IFN-β* 的表达增加并且延长了 *ISG* 的表达,*IFN-β* 再作用于邻近细胞,并通过正反馈机制增强 I 型 IFN 的诱导表达^[21]。对基于体外培养细胞作为增毒基质的系统而言,获得 *IFN-β* 基因敲除的细胞

克隆,进而对培养群体产生均质化,提高禽流感病毒的增殖能力和连续传代效果,为解决当前禽流感细胞疫苗的生产瓶颈问题提供了一条新思路。

CRISPR/Cas 系统是一种适应性免疫系统,可保护细菌和古细菌免受噬菌体和质粒的入侵^[15],是由 sgRNA 引导的 CRISPR/Cas 核酸酶系统,CRISPR/Cas9 针对含有三核苷酸原间隔序列 (PAM) 并与 sgRNA 互补的基因组序列进行基因切割,从而实现基因编辑。在 Cas9 对靶位点进行切割后,产生的双链断裂 (DSBs) 可通过非同源末端连接 (NHEJ) 或同源重组定向修复 (HDR) 进行修复^[22]。与 ZFN7^[23] 和 TALENs^[23-24] 技术相比,CRISPR/Cas9 敲除位点的设计更容易、特异性高、高效且非常适合高通量和多重化的系统;与 RNAi 相比,CRISPR/Cas 敲除等位基因通常会导致更明显的表型、更高的信噪比和更低的假阳性^[25]。CRISPR/Cas9 系统的简便性、方便性和有效性使其被运用在包括基因组编辑、基因功能调查以及在动物细胞和人体细胞的基因治疗等多个方面^[26]。在原核生物 CRISPR - Cas 适应性免疫系统中通过设计 gRNA 序列几乎可以编辑任何类型细胞中的任一基因,从而实现敲除突变。

本试验利用 CRISPR/Cas9 系统成功构建敲除了 *IFN-β1* 编码序列的 MDCK 单细胞克隆。该克隆生长旺盛、病毒增殖能力维持较高水平,为禽流感病毒抗原的规模增殖及相关机理研究奠定了试验基础。根据 CRISPR/Cas9 系统进行基因编辑的优势,我们接下来将利用成功构建的 CRISPR/Cas9 系统进行更多细胞基因上的改造。通过将 CRISPR/Cas9 技术与单细胞分析技术的进步相结合,在研究病毒感染细胞后的先天性免疫反应,分析细胞免疫应答时病毒与细胞关键免疫基因之间的相互依赖性,期望能对病毒与其宿主之间的关系提供新的见解。

图5 备选克隆 PCR 产物与犬 *IFN-β1* 基因的编码序列比对结果

表 1 不同细胞克隆的生长效率比较

时间 (d)	活细胞密度(×10 ⁵ cells/mL)							
	克隆 1	克隆 3	克隆 8	克隆 10	克隆 13	克隆 14	克隆 15	克隆 16
0	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00
1	5.88	6.21	3.12	6.87	4.87	6.12	3.11	5.43
2	11.20	12.11	6.38	14.21	5.51	13.12	3.87	11.21
3	18.80	20.13	10.19	26.31	6.98	24.27	4.87	19.82
4	29.88	30.11	9.11	31.35	7.75	21.11	6.89	23.89

表 2 不同细胞克隆对 H9 亚型禽流感病毒 JS02 株的连续增殖比较

MDC 细胞	H9 亚型禽流感病毒 JS02 株 HA 效价(log ₂ /25 μL)					
	第 1 代	第 5 代	第 10 代	第 15 代	第 20 代	第 30 代
母细胞	6	7	8	7	5	4
克隆 1	8	10	10	10	11	11
克隆 3	8	8	8	9	10	10
克隆 10	8	9	9	9	10	10
克隆 14	7	8	8	9	9	9
克隆 16	8	8	8	9	9	9

参考文献:

[1] Fouchier R A M, Munster V, Wallensten A, et al. Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black - headed gulls [J]. Journal of Virology, 2005, 79 (5) : 2814 - 2822.

[2] Zhu X, Yu W, McBride R, et al. Hemagglutinin homologue from H17N10 bat influenza virus exhibits divergent receptor - binding and pH - dependent fusion activities [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2013, 110(4) : 1458 - 1463.

[3] Butt K M, Smith G J D, Chen H, et al. Human Infection with an avian H9N2 Influenza A virus in Hong Kong in 2003 [J]. Journal of Clinical Microbiology, 2005, 43(11) : 5760 - 5767.

[4] Thompson C I, Barclay, W S, Zambon M C, et al. Infection of human airway epithelium by human and avian strains of influenza A virus. [J]. Journal of Virology, 2006, 80: 8060 - 8068.

[5] Naguib M M, Verhagen J H, Samy A, et al. Avian influenza viruses at the wild - domestic bird interface in Egypt [J]. Infection Ecology & Epidemiology, 2019, 9(1) : 1575687.

[6] Boon A C, Debeauchamp J, Hollmann A, et al. Host genetic variation affects resistance to infection with a highly pathogenic H5N1 influenza A virus in mice [J]. Journal of Virology, 2009, 83 (20) : 10417 - 10426.

[7] Gao Y, Zhang Y, ShinyaK, et al. Identification of amino acids in HA and PB2 critical for the transmission of H5N1 avian influenza viruses in a mammalian host [J]. PLoS Pathogens, 2009, 5(12) : e1000709.

[8] Hegde N R . Cell culture - based influenza vaccines: A necessary and indispensable investment for the future [J]. Human vaccines & immunotherapeutics, 2015, 11(5) : 1223 - 1234.

[9] Audsley J M, Tannock G A . The role of cell culture vaccines in the control of the next influenza pandemic [J]. Expert Opinion on

Biological Therapy, 2004, 4(5) : 709 - 717.

[10] Brierley M M, Fish E N . Review: IFN - alpha/beta receptor interactions to biologic outcomes; understanding the circuitry. [J]. Journal of Interferon & Cytokine Research, 2002, 22 (8) : 835 - 845.

[11] Zhou H, Chen S, Wang M, et al. Interferons and their receptors in birds: A comparison of gene structure, phylogenetic analysis, and Cross Modulation [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2014, 15(11) : 21045 - 21068.

[12] McDougall W M, Perreira J M, Reynolds E C, et al. CRISPR genetic screens to discover host - virus interactions [J]. Current Opinion in Virology, 2018, 29: 87 - 100.

[13] Hart T, Chandrashekhar M, Aregger M, et al. High - Resolution CRISPR screens reveal fitness genes and genotype - specific cancer liabilities [J]. Cell, 2015, 163(6) : 1515 - 1526.

[14] Dominguez A A, Lim W A, Qi L S, et al . Beyond editing: repurposing CRISPR - Cas9 for precision genome regulation and interrogation [J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2016, 17 (1) : 5 - 15.

[15] Puschnik A S, Majzoub K, Ooi Y S, et al. A CRISPR toolbox to study virus - host interactions. [J]. Nature Reviews Microbiology, 2017, 15: 351 - 364.

[16] Hou P, Chen S, Wang S, et al. Genome editing of CXCR4 by CRISPR/cas9 confers cells resistant to HIV - 1 infection [J]. Scientific Reports, 2015, 5: 15577.

[17] Tschaharganeh D F, Lowe S W, Garippa R J, et al. Using CRISPR/ Cas to study gene function and model disease *in vivo* [J]. The FEBS Journal, 2016, 2016, 283(17) : 3194 - 3203.

[18] Konermann S, Brigham M D, Trevino A E, et al. Genome - scale transcriptional activation by an engineered CRISPR - Cas9 complex [J]. Nature, 2014, 517(7536) : 583 - 588.

[19] Thompson M R, Kaminski J J, Kurt - Jones E A, et al. Pattern recognition receptors and the innate immune response to viral infection [J]. Viruses, 2011, 3(6) : 920 - 940.

[20] Wilson E B, Brooks D G . Decoding the complexity of type I interferon to treat persistent viral infections [J]. Trends in Microbiology, 2013, 21(12) : 634 - 640.

[21] Cheon H J, Holvey - Bates E G, Schoggins J W, et al. IFNβ - dependent increases in STAT1, STAT2, and IRF9 mediate resistance to viruses and DNA damage [J]. The EMBO Journal, 2013, 32 (20) : 2751 - 2763.

[22] Jinek M, Chylinski K., Fonfara I, et al. A programmable dual -

卢霞,邓志军,刘梦华,等. 辣椒基因组 SSR 引物的开发及品种纯度分子鉴定[J]. 江苏农业科学,2020,48(7):65-68.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.07.011

辣椒基因组 SSR 引物的开发及品种纯度分子鉴定

卢霞,邓志军,刘梦华,赵玉虎,司龙亭,李文虎,阿 门

(江苏绿港现代农业发展有限公司,江苏宿迁 223800)

摘要:辣椒是世界上重要的蔬菜作物之一,基因组简单重复序列(simple sequence repeats,简称 SSR)标记的开发对于辣椒分子育种和杂交种子纯度检测具有重要意义。为了检测辣椒品种绿院 3 号杂交种子的纯度,基于辣椒全基因组序列开发了 75 对 SSR 标记。结果表明,只有 SSR 标记 p50 对父母本的扩增结果表现为带型清晰、共显性,且具有高多态性,可进一步用于杂交种的纯度检测。为了确保标记 p50 的准确性和可靠性,对其 PCR 产物进行了进一步测序。测序结果表明,在父母本中分别扩增出了 251、293 bp 的序列。用标记 p50 对绿院 3 号辣椒进行纯度检测,结果显示,种子纯度为 100%,鉴定结果与田间纯度一致。新 SSR 分子标记的开发,为辣椒杂交种子纯度的鉴定提供了参考,也为辣椒种质资源遗传多样性分析及分子育种研究奠定了基础。

关键词:辣椒;SSR;分子标记;种子纯度鉴定

中图分类号: S641.303 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2020)07-0065-04

辣椒 (*Capsicum annuum* L.) 属于茄科 (Solanaceae) 辣椒属 (*Capsicum*), 是我国的主要蔬菜作物之一, 既可鲜食, 又是重要的调料。辣椒品种的好坏对其产量及品质均有直接而明显的影响, 因而辣椒新品种的选育至关重要。利用杂种优势选育优质高产的杂交种, 是辣椒育种中行之有效的途径。目前, 我国辣椒生产已经广泛使用杂交种, 但是在实际制种过程中, 由于人工去雄不及时、外来花粉干扰、母本自交、机械混杂等均影响了种子纯度, 因此, 为了保证辣椒种子的质量, 纯度鉴定是种子销售中不可或缺的重要步骤^[1]。在传统的形态

学角度, 辣椒种子的纯度鉴定主要依赖于果型、株型、绒毛等田间表型, 其检测周期长、用地多, 不仅费时费工, 而且易受环境因素的影响, 难以满足当年的生产需求。

近年来, 分子生物学的发展使种子纯度鉴定进入基因水平。用分子标记鉴定种子纯度采用电泳方法检测基因组 DNA 的结构与组成, 通过分析 DNA 水平上的差异来检验品种纯度与真实性, 其遗传性稳定、多态性高, 不受发育阶段、取材部位等环境因素的制约, 目前 DNA 分子标记技术已经被广泛用于辣椒、番茄、茄子、黄瓜、西葫芦、西瓜等主要蔬菜作物的鉴定与纯度检测中^[2-8]。目前, 在利用 DNA 分子标记检测辣椒种子纯度方面已有部分研究, 刘子记等对辣椒杂交种简单重复序列 (simple sequence repeats, 简称 SSR) 分子标记鉴定结果及表型鉴定结果进行比较分析, 结果表明, 筛选出的 SSR 分子标记可用于热辣 3 号杂交种纯度的快速鉴定^[9]; 张曼用筛选出的标记 CA885 分别对 2 份辣椒品种 F₁ 代杂交种的 96 株单株进行纯度检测, 检测

收稿日期:2019-03-22

基金项目:江苏省现代农业(蔬菜)产业技术体系(编号:JATS[2018]188);2017 年江苏省“双创人才”项目[编号:(2017)1388 号]。

作者简介:卢霞(1991—),女,甘肃天水人,硕士,主要从事分子标记辅助育种与种子纯度鉴定工作。E-mail:1344963751@qq.com。

通信作者:阿门,博士,中级农艺师,主要从事作物遗传育种研究。E-mail:2582259972@qq.com。

RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. [J]. Science, 2012, 337: 816-821.

[23] Sander J D, Dahlborg E J, Goodwin M J, et al. Selection-free zinc-finger nuclease engineering by context-dependent assembly (CoDA) [J]. Nature Methods, 2011, 8(1): 67-69.

[24] Wood A J, Lo T W, Zeitler B, et al. Targeted genome editing across species using ZFNs and TALENs [J]. Science, 2011, 333(6040):

307-307.

[25] Rowena D J, Moretti F, McAllister G, et al. Functional CRISPR screening identifies the ufm1ylation pathway as a regulator of SQSTM1/p62 [J]. Elife, 2016, 5: e17290.

[26] Liang P, Xu Y, Zhang X, Ding C, et al. CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human triploid zygotes [J]. Protein & Cell, 2015, 6(5): 363-372.