

宋立晓,侯忠乐,任一鸣,等. 利用 PEI-SWNT 介导的瞬时转化检测青花菜基因编辑效率[J]. 江苏农业科学,2021,49(13):56-59.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2021.13.010

利用 PEI-SWNT 介导的瞬时转化检测 青花菜基因编辑效率

宋立晓¹, 侯忠乐², 任一鸣², 严继勇¹, 曾爱松¹, 许园园¹, 张昌伟²

(1. 江苏省农业科学院蔬菜研究所/江苏省高效园艺作物遗传改良重点实验室, 江苏南京 210014;

2. 南京农业大学园艺学院, 江苏南京 210095)

摘要:CRISPR/Cas9 基因编辑系统是作物分子设计育种的重要手段,sgRNA 设计对于提高基因编辑效率具有重要作用。为了提高 sgRNA 设计的准确度,构建了聚乙烯亚胺修饰的单壁碳纳米管(PEI-SWNT)介导的瞬时转化体系,并用于检测青花菜 CRISPR/Cas9 基因编辑效率。结果表明,CRISPR/Cas9 编辑体系可以诱导青花菜特定基因位点发生突变,编辑效率为 8.3%。研究结果为利用 CRISPR/Cas9 基因编辑系统创制青花菜新种质提供了基础。

关键词:青花菜;基因编辑;单壁碳纳米管;瞬时转化

中图分类号:S635.301 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2021)13-0056-03

青花菜(*Brassica oleracea* L. var. *italica* Planch)又名西兰花,是十字花科芸薹属甘蓝种中以绿色花球为产品的一、二年生草本植物。营养价值较高,含有丰富的维生素,并含抗癌物质,受到消费者的青睐。青花菜栽培历史较短,但发展很快,在我国已成为一些地区出口创汇的重要优质蔬菜种类之一。通过现代育种技术,提高青花菜种质资源的抗性和品质,对于青花菜品种选育工作非常重要。

近年来 CRISPR/Cas9 基因编辑系统作为一种新型生物学研究手段被开发利用,该系统凭借其技术优越性被广泛应用于拟南芥、烟草、玉米等多种作物的基因组定点编辑^[1-3]。CRISPR/Cas9 系统的编辑效率受多种因素影响,Cas9 核酸酶启动子、sgRNA 启动子的类型、sgRNA 与目标位点的结合效率,目标靶点的数目、载体的类型、转化的方式以及宿主植株的同源重组修复能力等;优化 Cas9 基因的密码子可以提高编辑效率^[4-5]。熊兴鹏对甘蓝型油菜的研究结果表明,利用不同的 sgRNA,其编辑效率从 20% 到 56% 不等^[6-7]。

不同的 sgRNA 序列对于目标基因的结合效率具有很大的差异,在依靠特定软件对 sgRNA 序列进行设计时,各个软件会依据 sgRNA 序列的碱基种类对其编辑效率进行估算,不同软件的算法差异以及作物种类的影响会造成估算结果常与实际的编辑效率有较大的差异^[8],为了排除干扰因素的影响,通过瞬时表达对 CRISPR/Cas9 转化载体的编辑效率进行检测就尤为重要。

青花菜的再生体系建立比较困难,转化的效率也较低,在实际的操作中往往是经过复杂的步骤实现了遗传转化却由于基因编辑载体的效率较低而无法实现基因编辑,为了避免这种情况,有必要在遗传转化前对基因编辑载体的编辑效率进行检测。

近年来纳米材料渐渐应用到植物的遗传转化中^[9]。碳纳米管和聚乙烯亚胺复合体介导的遗传转化是利用聚乙烯亚胺带正电的特性吸附带负电的质粒载体,利用碳纳米管长径比很大的特性,刺破植物细胞壁,将外源载体导入到植物细胞内^[10]。利用聚乙烯亚胺修饰的碳纳米管介导的瞬时转化在烟草、小麦、棉花上都已成功实现,在青花菜上还未有先例,本研究参照烟草试验方法,探索该体系在检测青花菜基因编辑效率上应用的可行性。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本试验所用青花菜品种是苏青 3 号,由江苏省

收稿日期:2021-04-27

基金项目:江苏省农业科技自主创新资金[编号:CX(18)3068]。

作者简介:宋立晓(1982—),女,山东聊城人,博士,副研究员,主要从事甘蓝类作物遗传育种研究和生物技术研究。E-mail:56785633@qq.com。

通信作者:张昌伟,博士,副教授,主要从事蔬菜遗传育种与分子生物学研究。E-mail:changweizh@njau.edu.cn。

农业科学院蔬菜研究所选育而成,由笔者所在课题组保存;碳纳米管购自于先丰纳米材料科技有限公司,聚乙烯亚胺购自于 Sigma - Aldrich。相关试验于 2019 年 10—12 月在江苏省高效园艺作物遗传改良重点实验室进行。

1.2 sgRNA 的设计与基因编辑载体的构建

用 CRISPR - p2.0 (<http://crispr.hzau.edu.cn>) 在线软件对青花菜紫色相关基因 *BEE1* (*Bol030777*) 基因序列进行靶位点分析,选择位于外显子上、GC 含量不低于 50%、靠近基因编码区 5 端的序列作为靶位点^[11];将候选的 sgRNA 与青花菜的基因组序列进行比对,淘汰脱靶率较高的 sgRNA,设计的 sgRNA 序列如表 1 所示,并将人工合成的 sgRNA 序列连接到北京唯尚立德公司 VK005 - 14 质粒载体上^[12]。选择测序结果一致的质粒进行摇菌扩繁,质粒提取步骤按照天根生化科技(北京)有限公司质粒提取试剂盒说明书进行,提取的质粒浓度需达到 1 000 ng/μL,浓度不够则利用浓缩仪进行浓缩。

表 1 青花菜 *BEE1* 基因编辑位点 sgRNA 序列

| 编号 | sgRNA 序列(5'→3') |
|----|-------------------------|
| B1 | GTCTCTACAAAATCAAGTCGAGG |
| B2 | CCACAGCTTAGCAGAGAGGGTAA |
| B3 | CCTTTGTCTTCATCGGAGAACAG |

注:斜体标记的是 PAM。

1.3 PEI - SWNT 的制备

按照文献[13 - 14]的方法制备 PEI - SWNT。将 1.3 mg 干燥 COOH - SWNTs 加入 50 mL 锥形底离心管中,加入 30 mL 蒸馏水,超声波浴处理获得 COOH - SWNT 悬浊液,PEI 与 COOH - SWNTs 共反

表 2 鉴定青花菜编辑位点的引物序列

| 编号 | 正向引物(5'→3') | 反向引物(5'→3') |
|----|-----------------------------|-----------------------------|
| B1 | GATCGTCTCTACAAAATCAAGTCGAGG | TCGACCTCGACTTGATTTTGTAGAGAC |
| B2 | GATCCCACAGCTTAGCAGAGAGGGTAA | TGGATTACCTCTCTGCTAAGCTGTGG |
| B3 | GATCCCTTGTCTTCATCGGAGAACAG | TCGACTGTCTCCGATGAAGACAAAGG |

2 结果与分析

2.1 SWNT 水分散液浓度和 PEI - SWNT 分散液浓度分析

通过对 SWNT 和 PEI - SWNT 浓度的测量表明 SWNT 水悬浊液的浓度为 90.11 mg/L(建议浓度在 100 mg/L 左右),PEI - SWNT 的浓度可以达到 41.72 mg/L(表 3),回收效率为 46.3%。PEI - SWNT 的浓度达到试验要求。

应获得 PEI - SWNT 复合体。PEI 与 COOH - SWNTs 按照 1 : 20 的比例共反应获得 PEI - SWNT 复合体,将 PEI - SWNT 复合体转移到 100000 - MWCO 过滤器中。用无核酸酶的水洗涤 PEI - SWNT 溶液 6 次,将过量的 PEI 洗去。

1.4 基因编辑载体瞬时转化青花菜叶片

准备 MES 输送缓冲液(pH 值 = 4.5 ~ 5.0)用于稀释 PEI - SWNT,以 PEI - SWNT : DNA (3 : 1) 的质量比将 500 ng PEI - SWNTs 与 167 ng 质粒 DNA 复合在一起,室温下孵育 30 min 以形成 DNA - PEI - SWNT 复合物。将 DNA - PEI - SWNT 溶液吸入 1 mL 的无针注射器。在青花菜叶子背面用针尖刺穿,将注射器缓慢注射到青花菜的叶片中。在叶片上轻轻地标记入渗区域,1 d 后质粒 DNA 转录为 mRNA,2 ~ 3 d 将 mRNA 翻译为蛋白。

1.5 青花菜子叶中瞬时表达荧光蛋白检测

将注射后的植株转移到光培箱(光周期为白天 16 h,27 °C;夜晚 8 h,22 °C)进行培养。于注射后第 3 天(72 h)在激光共聚焦显微镜下观察叶片是否有 GFP 荧光蛋白表达。

1.6 候选 sgRNA 基因编辑效率检测

取青花菜叶片有 GFP 荧光表达部位的叶片,用 CTAB 法提取叶片的基因组 DNA,根据编辑的基因序列设计包含编辑位点的引物进行 PCR 扩增(表 2)。纯化回收扩增后的 PCR 片段,连接 T 载体后进行大肠杆菌转化,每个样品挑取 8 个单克隆摇菌后 PCR 扩增测序。将测序结果与青花菜的基因序列进行比较,检测基因位点是否被编辑,并计算编辑效率。

表 3 SWNT 水分散液浓度 PEI - SWNT 分散液浓度

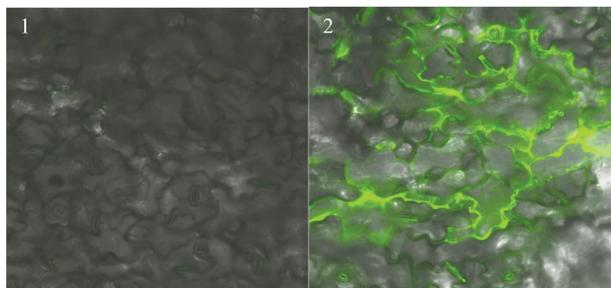
| 样品 | 吸光度 | 浓度(mg/L) |
|------------|-------|----------|
| SWNT | 0.182 | 90.11 |
| PEI - SWNT | 0.084 | 41.72 |

注:样品稀释倍数为 10。

2.2 青花菜叶片 GFP 荧光表达分析

利用荧光共聚焦显微镜观察荧光标签的表达情况,由图 1 可见,注射碳纳米管和质粒的复合体的青花菜叶片可在共聚焦显微镜下观察到绿色的荧

光,说明 GFP 蛋白在注射后第 3 天已经在叶片表达,通过此方法可以将外源基因导入到青花菜的叶面细胞中并完成外源基因的表达。本试验成功注射 32 个叶片中有 7 个可以在荧光共聚焦下观察到绿色荧光,占注射总数的 21.9%。



1—阴性对照; 2—PEI-SWNT 与质粒复合体注射的植株叶片

图1 青花菜叶片 GFP 荧光蛋白表达

2.3 青花菜 CRISPR/Cas9 系统候选 sgRNA 基因编辑结果

提取有 GFP 荧光蛋白表达的叶片 DNA,用表 2 的引物扩增检测有 GFP 荧光表达的青花菜基因组的序列,胶回收 PCR 产物,然后连接到 T 载体上并转化到大肠杆菌,将挑取的 24 个单克隆样品摇菌后进行测序。测序的结果中有 2 个编号样品的序列在基因编辑位点附近发生了基因突变,第 5 号样品在 B1 编辑位点 PAM 附近检测到 3 个碱基的缺失,第 10 号样品检测到 B1 编辑位点单碱基的突变(图 2),B2 和 B3 编辑位点没有检测到基因突变。sgRNA 在青花菜中的编辑效率为 8.3%。

| | |
|--------------|---------------------------------------|
| BEE1 基因组.seq | IGTCCAGTCTCTACAAAATCAAAGTCGAGGTTACTAA |
| 4-05.seq | IGTCCAGTCTCTACAAAATCAAAGTCGAG...ACTAA |
| 4-10.seq | IGTCCAGTCTCTACAAAATCAAAGTCGAGGTTACTAA |
| sgRNA 序列.seq |GTCTCTACAAAATCAAAGTCG..... |
| Consensus | gtctctacaaaatcaa tcg |

图2 BEE1 基因编辑位点序列对比

3 讨论

基因编辑技术已经被广泛应用于各类蔬菜的种质资源创新中,sgRNA 的编辑效率是影响基因编辑技术成败的关键因素之一^[15],通过常规遗传转化方法对 sgRNA 有效性进行验证比较耗时,且成本较高^[12]。瞬时表达体系作为一种简便高效的方法可用于快速验证 sgRNA 的编辑效率,徐璇等利用柑橘的原生质体成功实现了柑橘的瞬时转化^[16],郑天慧等利用原生质体转化的方法在拟南芥上实现了基因编辑并筛选出高效率的 sgRNA 序列。但通过原生质体实现瞬时转化的方法存在许多局限性,如试

验过程中材料容易被污染,对编辑效率的检测难度大等。已有研究表明,PEI-SWNT 介导的瞬时转化方法具有操作简便、检测周期短等优点,能够被用于验证 sgRNA 的编辑效率。本研究探索了在青花菜上建立切实可行的瞬时转化方法,该方法操作简便、快速,可以方便快捷地验证 sgRNA 的编辑效率。

本研究在已有研究的基础上优化了试验步骤,较大幅度提高了碳纳米管分散液的浓度,利用 PEI-SWNT 介导的瞬时转化系统在青花菜上实现了更加高效的瞬时转化。试验结果表明,SWNT 水悬浊液的浓度可以达到 90 mg/L 以上,PEI-SWNT 溶液的浓度可以达到 41.72 mg/L,SWNT 结合 PEI 后的回收率为 46.3%,可以满足试验的需求;PEI-SWNT 介导的瞬时转化体系可以将外源载体通过叶面注射的方法导入到青花菜的叶面细胞中。提取青花菜瞬时转化部位叶片的基因组 DNA,对编辑位点进行测序后发现有多碱基的突变和缺失,说明构建的 CRISPR/Cas9 系统在青花菜上具有编辑能力。本试验结果显示由 PEI-SWNT 介导的瞬时转化体系可以完成对青花菜更加高效的瞬时转化,本方法相较于其他瞬时转化方法更简单高效,且单次转化成本可以降低到 3 美元。该方法为利用基因编辑技术创新青花菜的新种质奠定了良好的基础。

参考文献:

- [1] Liu W, Zhu X, Lei M, et al. A detailed procedure for CRISPR/Cas9-mediated gene editing in *Arabidopsis thaliana* [J]. Science Bulletin, 2015, 60(15): 1332-1347.
- [2] Liang Z, Zhang K, Chen K, 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.
- [3] Gao J, Wang G, Ma S, et al. CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis in *Nicotiana tabacum* [J]. Plant Molecular Biology, 2015, 87(1): 99-110.
- [4] 张玉苗, 李蓉, 鲁瑶, 等. 基于提高 CRISPR/Cas 基因编辑效率的研究进展 [J]. 热带作物学报, 2019, 40(10): 2006-2015.
- [5] 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.
- [6] Xiong X, Liu W, Jiang J, et al. Efficient genome editing of *Brassica campestris* based on the CRISPR/Cas9 system [J]. Mol Genet Genomics, 2019, 294(5): 1251-1261.
- [7] 陈凯. CRISPR 技术的优化及 Cas9 酶 PAM 识别位点的改造 [D]. 中国农业科学院, 2017: 43.
- [8] Zhu Q, Liu Y G, Ma X, et al. A protocol for CRISPR/Cas9-based multi-gene editing and sequence decoding of mutant sites in plants [J]. Scientia Sinica Vitae, 2018, 48(7): 783-794.

蒋 玥,衣服德,许 华,等. 4种血清型沙门氏菌多重PCR检测方法建立及应用[J]. 江苏农业科学,2021,49(13):59-63.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2021.13.011

4种血清型沙门氏菌多重PCR检测方法建立及应用

蒋 玥^{1,2},衣服德³,许 华⁴,李贵阳⁴,卜仕金^{1,2}

(1.扬州大学兽医学院,江苏扬州 225009; 2.江苏高校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;
3.青岛市畜牧兽医研究所,山东青岛 266000; 4.中国水产科学研究院黄海水产研究所,山东青岛 266000)

摘要:为检测鉴别鸡白痢、肠炎、鼠伤寒、伤寒4种养禽业中常见的沙门氏菌血清型,利用每种血清型的特异基因位点,建立多重PCR(polymerase chain reaction)检测方法,并通过试验对多重PCR法的特异性、灵敏度进行验证。结果显示,所建立的检测方法特异性强,与非沙门氏菌无交叉反应,灵敏度高。鸡白痢沙门氏菌的最低检测限度13.1 pg/mL,肠炎沙门氏菌最低检测限度达12.5 pg/mL,鼠伤寒沙门氏菌、伤寒沙门氏菌的最低检测限度13.7 pg/mL,伤寒沙门氏菌最低检测限度12.3 pg/mL。结果表明,此方法准确可靠、特异性强、灵敏度高,有望成为以后检测沙门氏菌的有效工具。

关键词:鸡白痢沙门氏菌;肠炎沙门氏菌;鼠伤寒沙门氏菌;伤寒沙门氏菌;多重PCR

中图分类号:S852.61 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2021)13-0059-05

目前,已发现的沙门氏菌血清型有2 000多种^[1]。其中,鸡白痢沙门氏菌、肠炎沙门氏菌、鼠伤寒沙门氏菌、伤寒沙门氏菌这几种血清型的沙门氏菌在我国部分地区感染率较高^[2]。有资料显示这几种血清型的沙门氏菌基因组相近^[3],想要检测鉴别这几种沙门氏菌血清型,可通过培养为前提的传统检测方法和分子生物学检测方法^[4]。传统检测方法包括平板上鉴别培养^[5],生化检测以及血清分

型等^[3]。这些方法虽然结果清晰、准确,但是存在检测时间长^[5]、特异性差、操作过程繁琐等缺点,不适用于大批量的临床样本检测^[6]。分子生物学检测技术包括聚合酶链反应技术PCR(polymerase chain reaction)、恒温核酸扩增技术、脉冲场凝胶电泳、基因探针技术等,本试验用到的检测技术是聚合酶反应技术PCR中的多重PCR检测技术^[6]。

多重PCR检测技术可以同时扩增多个目的片段,实现高通量的目的基因检测。本研究用多重PCR检测技术检测鉴别鸡白痢沙门氏菌、肠炎沙门氏菌、鼠伤寒沙门氏菌、伤寒沙门氏菌4种养禽业中常见的沙门氏菌血清型。这个技术相比沙门氏菌传统的检测方法既快速、高效,也简单易操作^[3-7],并适用于规模化养殖中大量的样本检测。因此这个方法的建立能及时发现生产养殖中出现的沙门氏菌感染,为沙门氏菌的防控奠定基础。

收稿日期:2021-01-12

基金项目:现代农业产业技术体系建设专项(编号:CARS-41);江苏高校优势学科建设工程资助项目(编号:PAPD);青岛英赛特生物科技有限公司企业创新项目。

作者简介:蒋 玥(1994—),女,江苏盐城人,硕士研究生,研究方向为兽医药理学及毒理学。E-mail:1148260634@qq.com。

通信作者:李贵阳,研究员,主要从事微生物与生物信息学研究,E-mail:liguiyang410@126.com;卜仕金,教授,主要从事兽医药理学与毒理学研究,E-mail:pushijin@aliyun.com。

[9]孔倩倩,李志辉,王 琼,等. 纳米基因载体在植物遗传转化中的应用[J]. 生物技术通报,2010,6:6-12.

[10]袁刚强. 单壁碳纳米管材料(SWCNTs)对水稻的植物毒性效应的研究[D]. 湖南大学,2015:50-51.

[11]王玮玮,刘瑞琪,吴勇延,等. CRISPR/Cas9基因编辑系统研究进展及其在动物基因编辑研究中的应用[J]. 畜牧兽医学报,2019,7:1299-1305.

[12] Demirer G S, Zhang H, Matos J L, et al. High aspect ratio nanomaterials enable delivery of functional genetic material without DNA integration in mature plants [J]. Nat Nanotechnol,2019,14(5):456-464.

[13] Demirer G S, Zhang H, Goh N S, et al. Carbon nanotube-mediated DNA delivery without transgene integration in intact plants [J]. Nature Protocol,2019,14(10):1-24.

[14]丁莉萍,张杰伟,马 艳,等. CRISPR/Cas 基因组编辑技术研究进展及其在植物中的应用[J]. 植物生理学报,2019,55(4):411-424.

[15]马兴亮,刘耀光. 植物 CRISPR/Cas9 基因组编辑系统与突变分析[J]. 遗传,2016,38(2):118-125.

[16]徐 旋. 柑橘原生质体瞬时转化体系优化及利用 CRISPR/Cas9 技术定点突变山金柑基因[D]. 武汉:华中农业大学,2018:43-46.