

利用 CRISPR/Cas9 技术定点编辑烟草中半胱氨酸转移酶 CY S 基因

包雪梅^{1,2,4} 李云³ 曹东³ 刘宝龙³ 王洪伦^{1*} 宗渊^{3*}

1 中国科学院藏药研究重点实验室, 西宁, 810001; 2 青海师范大学教育学院, 西宁, 810016;

3 中国科学院西北高原生物研究所, 青海省作物分子育种重点实验室, 西宁, 810001;

4 中国科学院大学, 北京, 100049* 共同通信作者

摘要:为研究半胱氨酸转移酶(CY S)基因对烟草生长发育及花青素合成的影响,在烟草中建立 CRISPR/ Cas9 基因编辑体系,构建双靶点 CRISPR/Cas9 基因编辑载体 p35S-H-CY S,利用农杆菌介导的遗传转化体系 获得 CY S 烟草突变体,通过碱基测序和 RT-qPCR 检验 CY S 基因敲除效果,分析靶位点序列突变类型。结果表明,3 个突变体株系在靶位点发生了基因突变,突变类型包括碱基插入、碱基替换,其中,靶位点 1 可以更 有效地与靶位点结合,靶位点 2 处产生 2 个碱基替换,均为氨基酸同义突变。RT-qPCR 结果表明,突变体株 系中 CY S 基因的相对表达量均显著低于野生型烟草($P<0.01$)。与野生型对比,CY S-1、CY S-2 和 CY S-3 突 变体株系中 CY S 基因转录水平倍数分别为 0.31、0.45 和 0.34。敲除 CY S 基因后对烟草株高、叶形等表型未见 明显影响,而突变体烟草中花青素含量均有不同程度的提高,其中,CY S-1 突变体株系中花青素含量为野生 型的 1.3 倍,显著高于野生型烟草($P<0.05$),说明 CY S 基因会抑制花青素的合成,该结果与先前转录组结果相 符。本研究通过 CRISPR/Cas9 基因编辑技术对 CY S 基因设计 2 个靶位点进行定点编辑,以烟草为转化受体,为 进一步研究 CY S 基因功能提供了重要的材料基础。

关键词:烟草; CY S; CRISPR/Cas9; 基因编辑; 突变体

Site-specific editing of the cysteine transferase (CYS) gene in tobacco using the CRISPR/Cas9 technology

Bao Xuemei 1, 2, 4, Li Yun 3, Cao Dong 3, Liu Baolong 3, Wang Honglun 1*, Zong Yuan 3*

1 Key Laboratory of Tibetan Medicine Research, Chinese Academy of Sciences, Xining 810001, China;

2 College of Education, Qinghai Normal University, Xining 810016, China;

3 Qinghai Key Laboratory of Crop Molecular Breeding, Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810001, China;

4 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China * Corresponding authors,

Abstract In order to study the effects of cysteine transferase (CYS) gene on the growth, development and anthocyanin synthesis in tobacco, we established CRISPR/Cas9 gene editing system in tobacco and constructed a double target CRISPR/Cas9 gene editing vector P35S-H-CYS. CYS tobacco mutant lines were obtained by Agrobacterium-mediated genetic system, the CYS gene knockout effect was tested by base sequencing and RT-qPCR, the mutation types of target genes were analyzed. Sequencing results showed that 3 mutant lines had gene mutations at target sites, including base insertion and base replacement. Target site 1 could bind to target

site more effectively, and target site 2 produced two bases mutations, both synonymous mutations of amino acids. RT-qPCR results showed that the relative expression level of CYS gene in mutants were significantly lower than the wild type tobacco ($P < 0.01$). Compared to wild type, the multiple of gene transcription levels were 0.31, 0.45 and 0.34. The knockout of CYS gene had no significant effect on tobacco plant height and leaf shape, but the anthocyanin content in the mutant tobacco were increased in different degrees. The content of anthocyanin in CYS-1 mutant was 1.3-fold, which was significantly higher than that of wild type ($P < 0.05$). These results indicated that CYS gene can inhibit anthocyanin synthesis, which was consistent with the previous transcriptome analysis results. In this study, CRISPR/Cas9 gene editing technology was used to design two target sites for targeted editing of CYS gene. Using tobacco as the transformation receptor provided an important material basis for further study of the function of CYS.

keyword Tobacco; CYS; CRISPR/Cas9; Gene editing; Mutant

1 引言

黑果枸杞 (*Lycium ruthenicum* Murray) 为茄科 (Solanaceae) 枸杞属 (*Lycium* L.) 多年生灌木, 是中国“药食两用”的重要特色资源。黑果枸杞在民族医药、营养食品和荒漠生态系统恢复等方面都具有重要作用 (Wang et al., 2018)。黑果枸杞富含花青素, 其中, 矮牵牛素衍生物含量最高 (Zhang et al., 2019)。黑果枸杞花青素生物合成代谢广受国内外学者关注, 转录因子 MYB、bHLH 和 WD40 通过形成 MBW 复合物调节结构基因的表达式来调控花青素的生物合成 (He et al., 2020; Wen et al., 2021)。

本研究前期从黑果枸杞中克隆了与花青素合成代谢相关的 R2R3-MYB 转录因子基因 LrA N2, 并对 LrA N2 基因进行了功能验证, LrA N2 过表达烟草呈现紫色表型, 花青素含量显著升高 (Zong et al., 2019b)。将 LrA N2 紫色转基因烟草与野生型烟草 ‘Samsun’ 进行了转录组分析 (Zong et al., 2019a), 结果表明, 半胱氨酸转移酶 (CYS) 在紫色烟草中表达量下调最显著。课题组对烟草 CYS 基因进行克隆, 并进行生物信息学分析, 为 CYS 基因的功能研究提供参考依据 (罗香怡等, 2021)。目前, 烟草中 CYS 基因的生物功能尚未深入研究, 仍需进一步补充和完善。

半胱氨酸蛋白酶对调控植物的生长发育有重要的作用, 其主要参与了植物种子贮藏蛋白的降解, 根、茎、叶等组织器官的衰老、死亡等过程 (莫黎杰等, 2021), 并参与植物对各种胁迫的反应, 如干旱、病原体感染等 (罗香怡等, 2021)。McLellan 等 (2009) 发现半胱氨酸蛋白酶的表达式在拟南芥叶片衰老过程中显著增加, 同时, 有助于拟南芥的发育和抗病。NtCP1 与其他衰老相关的半胱氨酸蛋白酶具有高度的相似性, 是 AtSAG12 的同源蛋白, 只在衰老的叶片中表达, 可以作为烟叶衰老的特异性分子标记基因 (Beyene et al., 2006)。除拟南芥和烟草等模式植物外, 在其他植物中, 也发现了参与调控叶片衰老的半胱氨酸蛋白酶, 如辣椒 CaCp (Xiao et al., 2014)、水稻 OsSAG39

(Liu et al., 2010)、甘蓝 SAG12 (Ahlawat and Liu, 2021) 等。

CRISPR/Cas9 系统是细菌和古细菌适应性免疫

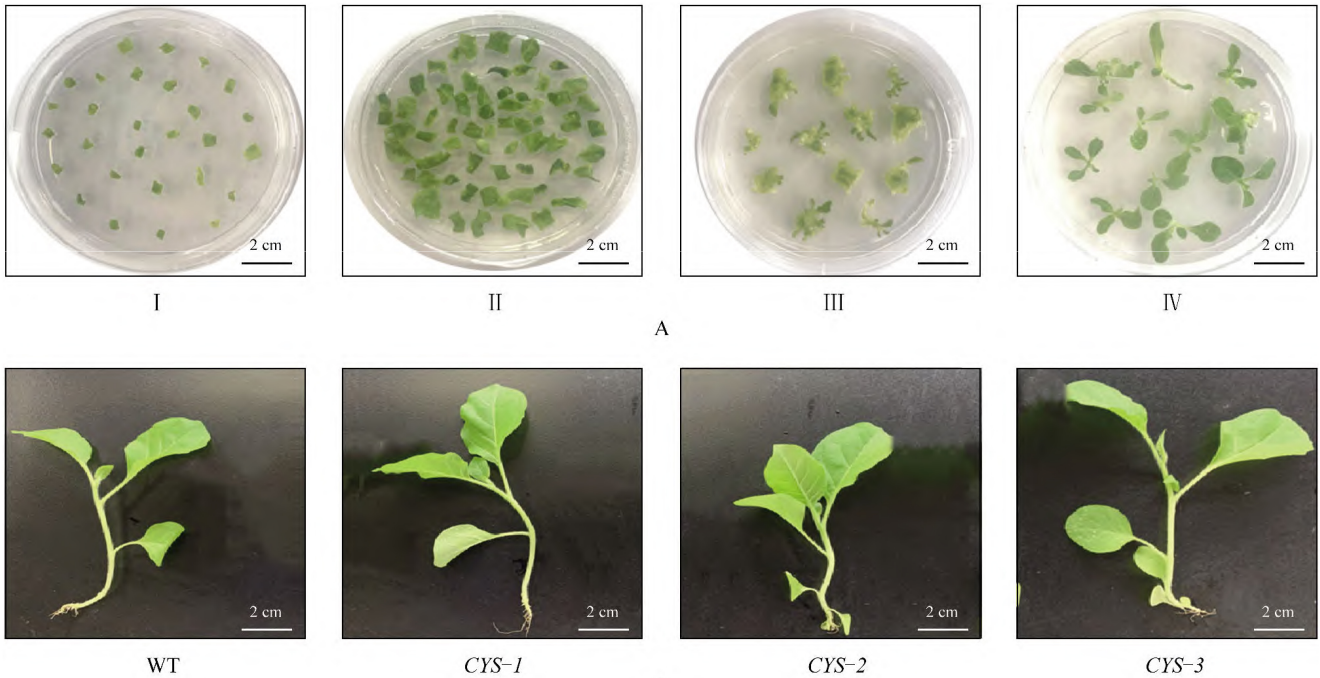
的防御系统, 保护其免受病毒等的侵入 (Bortesi and Fischer, 2015), 由成簇的规律间隔短回文序列组成 (Jinek et al., 2012)。因其具有低成本、高效率和多基因编辑等优势, 因而被广泛应用于各种作物中。烟草是一种传统的模式植物和重要的经济作物, CRISPR-Cas9 基因编辑技术在烟草基因组的定向编辑研究中也得到了广泛的应用。冯吉等 (2021) 利用 CRISPR/Cas9 基因组编辑技术定向敲除了烤烟 ‘K326’ 中控制烟碱合成和转运的 5 个基因, CRISPR/Cas9 技术能够高效定向敲除烟碱关键基因, 获得低烟碱烟草。张思琦等 (2020) 利用 CRISPR/Cas9 技术定向编辑了高香气烤烟品系 8306 中的 CPS2 基因, 获得 CPS2 突变体。此外, CRISPR/Cas9 技术在烟草中还通过定向编辑核基因 *atp2* (赵重燕等, 2020)、5-磷酸脱氧木酮糖还原异构酶 NtDXR (谢小东等, 2019)、NtPDS 和 Nt-PDR6 (Gao et al., 2015) 等多个基因进行有效突变, 为 CRISPR/Cas9 技术在烟草中的功能研究的应用奠定了基础。

本研究利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术, 对课题组前期克隆得到的半胱氨酸转移酶 (CYS) 基因, 设计 2 个靶位点进行定点编辑, 以烟草为转化受体, 获得了烟草 CYS 突变体, 为 CYS 基因在烟草中的功能探究和培育烟草新品种提供参考依据。

2 结果与讨论

2.1 NtCYS 的基因编辑载体的构建及转化

以华南农业大学刘耀光课题组提供的 pYL-CRISPR/Cas9-MH 基因编辑载体为框架, 将设计的 NtCYS 基因编辑靶点序列克隆到 sgRNA 上游, 编辑载体质粒转化大肠杆菌 DH5α 感受态细胞, 挑取单克隆进行菌落 PCR, 条带大小约为 500 bp, 符合预期大小, 选择阳性单克隆送生工测序, 获得 NtCYS 的基因编辑载体 p35S-H-CYS, 将该载体质粒转化至农杆菌 LBA4404, 菌落 PCR 鉴定阳性单克隆, 摇菌后侵染烟草。



2.2 NtCYS 基因编辑载体转化的编辑效果验证及突变体检测

利用根癌农杆菌介导法侵染烟草，共培养基暗培养 2 d (图 1A-I)，转入分化培养基培养 7 d (图 1A-II)，潮霉素抗性分化培养基培养 14 d (图 1A-III)，切幼苗转入生根培养基直至生根 (图 1A-IV)，生根后炼苗、移栽。以突变体株系 gDNA 为模板，使用引物 CYS-F、CYS-R 扩增 CYS 基因，共得到 3 株阳性苗，命名为 CYS-1、CYS-2、CYS-3，3 株阳性苗与野生型烟草相对比，株高、叶形等表型上未见明显差异 (图 1B)。

为验证 CYS 是否被成功编辑，对突变体基因序列进行扩增并进行测序分析。碱基序列对比结果显示 (图 2)，CYS-1、CYS-2、CYS-3 的两个靶点处均发生编辑，CYS-1 在靶点 1 处

插入 1 个单碱基 G，在靶点 2 处发生 2 个碱基替换 (G 替换为 C，A 替换为 G)，CYS-2、CYS-3 在靶点 1、靶点 2 处均发生了碱基替换 (G 替换为 A，G 替换为 C，A 替换为 G)。氨基酸序列对比结果显示 (图 3)，CYS-1 基因起始密码子 (ATG) 后 33 和 34 个碱基之间插入 “G”，碱基序列发生移码突变致使该蛋白在 71 个氨基酸处翻译提前终止。CYS-2、CYS-3 在靶点 1 处，因发生碱基替换 (G 替换为 A)，致使氨基酸由 V (缬氨酸) 变为 I (异亮氨酸)，在靶点 2 处，2 个碱基替换均为同义突变，此外，CYS-2 与 CYS-3 在 275bp 处有碱基突变，CYS-2 编码 C (半胱氨酸)，CYS-3 编码 S (丝氨酸)，氨基酸差异可能会导致基因功能差异。

2.3 花青素含量测定

	-----CCTGTTGGTGTCCCTCCCC-----	
CYS	ATGAGTTACTACAATCAACAACACCCCTGTTGGTGTCCCTCCCCCGCAAGGATATCCACCGGAAGGTTACCCCTAAGGACGCATACCCACCACCGGGG	100
CYS-1	ATGAGTTACTACAATCAACAACACCCCTGTTGGTGTCCCTCCCCCGCAAGGATATCCACCGGAAGGCTACCCAAAGGACGCATACCCACCACCGGGG	100
CYS-2	ATGAGTTACTACAATCAACAACACCCCTGTTGGTGTCCCTCCCCCGCAAGGATATCCACCGGAAGGCTACCCAAAGGACGCATACCCACCACCGGGG	100
CYS-3	ATGAGTTACTACAATCAACAACACCCCTGTTGGTGTCCCTCCCCCGCAAGGATATCCACCGGAAGGCTACCCAAAGGACGCATACCCACCACCGGGG	100
	靶点1 Target 1	
CYS	TACCCACAACAGGGTTACCCACCACAGGGGTACCCTCAACAAGGTTACCCTCCTCAAGGGTACCCTCCCCAGTATGGTGTCCACCCCTCAACAACAAC	200
CYS-1	TACCCACAACAGGGTTACCCACCACAGGGGTACCCTCAACAAGGTTACCCTCCTCAAGGGTACCCTCCCCAATATGGTGTCCACCCCTCAACAACAAC	200
CYS-2	TACCCACAACAGGGTTACCCACCACAGGGGTACCCTCAACAAGGTTACCCTCCTCAAGGGTACCCTCCCCAATATGGTGTCCACCCCTCAACAACAAC	200
CYS-3	TACCCACAACAGGGTTACCCACCACAGGGGTACCCTCAACAAGGTTACCCTCCTCAAGGGTACCCTCCCCAATATGGTGTCCACCCCTCAACAACAAC	200
CYS	AGCAACAATCTGGTAGCTCTGGCTTTATGGAAGGATGTTTGGCTGCACTGTGCTGTTGCTGTCTCCTAGATGCATGCTTCTGA	283
CYS-1	AGCAACAATCTGGTAGCTCTGGCTTTATGGAAGGATGTTTGGCTGCACTGTGCTGTTGCTGTCTCCTAGATGCATGCTTCTGA	283
CYS-2	AGCAACAATCTGGTAGCTCTGGCTTTATGGAAGGATGTTTGGCTGCACTGTGCTGTTGCTGTCTCCTAGATGCATGCTTCTGA	283
CYS-3	AGCAACAATCTGGTAGCTCTGGCTTTATGGAAGGATGTTTGGCTGCACTGTGCTGTTGCTGTCTCCTAGATGCATGCTTCTGA	283
	-----CCTGTTGGTGTCCACCC-----	
	靶点2 Target 2	

Figure 2 Base sequence analysis

```

CYS  MSYYNQQPFGVPPPGYPPGEGYPKDAYPPPGYPQQGYPPQGYPPQGYPP  50
CYS-1 MSYYNQQPFGVPPPGYPPGEGYPKDAYPPPGYPQQGYPPQGYPPQGYPP  50
CYS-2 MSYYNQQPFGVPPPGYPPGEGYPKDAYPPPGYPQQGYPPQGYPPQGYPP  50
CYS-3 MSYYNQQPFGVPPPGYPPGEGYPKDAYPPPGYPQQGYPPQGYPPQGYPP  50

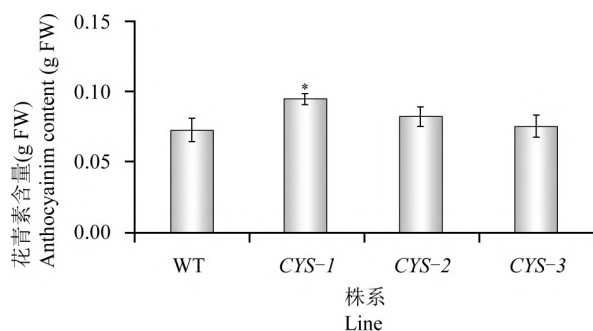
CYS  PQ--GYPQQGYGAPPPQQQQQSGSTGFMEGCLAALCCCCLLDAF  94
CYS-1 SSRVPSPIWCSTPSTTTATW-----  75
CYS-2 PQ--GYPQQGYGAPPPQQQQQSGSTGFMEGCLAALCCCCLLDAF  94
CYS-3 PQ--GYPQQGYGAPPPQQQQQSGSTGFMEGCLAALCCCCLLDAF  94
    
```

为验证 CY S 基因与花青素生物合成是否有关, 对野生型 (WT) 与突变体 (CYS-1,CYS-2,CYS-3) 烟草中的花青素含量进行了测定。结果显示, CY S-1、CY S-2 和 CY S-3 突变体株系中花青素含量均高于野生型烟草, 其中, CY S-1 花青素含量显著高于野生型 ($P<0.05$), 是野生型烟草花青素含量的 1.3 倍 (图 4)。

2.4 RT-qPCR

根据实验室前期克隆得到的 CY S 基因序列, 以 NtA ctin 为内参基因, 对野生型 (WT) 和突变体 (CY S-1, CY S-2 和 CY S-3) 烟草中 CY S 基因的相对表达量进行 RT-qPCR 检测。), 以野生型烟草为对照, CY S-1、CY S-2 和 CY S-3 突变体株系中 CY S 基因转录水平倍数分别为 0.31、0.45 和 0.34, 均显著低于野生型 (WT) ($P<0.01$)。

1.5 二级结构及其蛋白质跨膜分析将 CYS 原序列及其编辑基因 CYS-1、CYS-2 和 CYS-3 氨基酸序列导入 SOPMA 在线软件进行二级结构分析, CYS-1、CYS-2 和 CYS-3 二级结构的主要结构形式与 CYS 有较大差异, 其中, CYS-1 因移码突变导致氨基酸翻译提前终止, 致使其二级结构发生较大改变, 其主要结构形式为无规卷曲 (87.32%) 和延伸链 (12.68%)。而 CYS-2 与 CYS-3 的氨基酸突变未改变其二级结构, 主要结构形式为 α -螺旋 (20.43%)、无规卷曲 (68.82%)、延伸链 (4.3%) 以及 β -转角 (6.45%)。使用 TMHMM-2.0 在线软件分析 CYS、CYS-1、CYS-2 和 CYS-3 蛋白的跨膜区, 结果显示, 所有蛋白质的跨膜螺旋数量 (Number of predicted TMHs) 均为 0, 初步预测, 这 4 种蛋白质均在膜外进行作用, 不具有跨膜区。



3 讨论

根据 L rA N2 过表达紫色烟草与野生型烟草转录组结果中差异基因的表达, 以此了解 LrAN2 过表达烟草与野生型烟草差异基因的表达情况。以野生型烟草为参照, 在 39 个下调基因中, CL16576.Contig3_All 基因下调最为显著, log2FoldChange 为 6.02。利用 NCBI, 对 CL16576.Contig3_All 进行同源比对, CL16-576.Contig3_All (CYS) 基因为半胱氨酸蛋白酶同源序列。LrA N2 过表达紫色烟草中参与花青素合成相关的结构基因均被激活, 均为上调表达, 而 CY S 下调最显著, 因此, 本研究采用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术, 对 CY S 基因进行基因编辑, 以此判断 CY S 基因是 Molecular Plant Breeding 否对烟草的生长发育和花青素的合成有影响。近年来, CRISPR/Cas9 基因编辑技术发展迅速, 2021), 实验所用 TA 克隆载体购自北京全式金生物可更快速、高效、精准地对目的基因进行敲除。为了技术有限公司; 大肠杆菌感受态细胞 DH5 α 和农杆 3.2 sgRNA 设计及载体构建简单快速鉴定 CRISPR/Cas9 编辑体的基因型, 大多数学者选择双靶点编辑 1 个基因, 当 1 个 DNA 序列上有 2 个位置发生双链断裂后, 中间的片段可能发生丢失 (Brooks et al., 2014; Srivastava et al., 2017; 张扬等, 2020)。双靶点敲除单个基因是一种易于检测且高效的基因编辑方法 (张扬等, 2020)。Watanabe 等 (2017) 利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术对双氢黄酮醇 -4- 还原酶 -B (DFR-B) 进行靶点编辑, 以牵牛花作为受体, 结果发现 75% 的牵牛花开出白花, 花青素含量下降。CRISPR/Cas9 介导的敲除 NtMY B4a 下调了 NtPAL、NtC4H、Nt4CL、NtCHS、NtCHI、NtF3H 等结构基因的表达, 降低了烟草花青素含量, 烟草花瓣颜色变淡 (Luo et al., 2020)。因此, 本研究利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术完成了对 CY S 基因敲除, 看其是否会对烟草植株的生长和花青素的生物合成造成影响。结果表明, 本研究共获得 3 个突变体, 这 3 个突变体株系均实现了基因编辑, 第一个靶点的突变频率为 100%, 突变类型涉及碱基插入、碱基替换等, 而 CYS-1 突变体在起始密码子 (ATG) 后 33 和 34 个碱基之间插入 “G”, 碱基序列发生移码突变致使该蛋白在 71 个氨基酸处翻译提前终止。而 CY S-2、CY S-3 在靶点 1 与靶点 2 处均发生了碱基替换, 致使存在 2 个氨基酸差异。RT-qPCR 结果表明, CYS-1、CYS-2、CY S-3 突变体株系中 CY S 基因相对表达量均显著低于野生型 (WT), 这与 CRISPR/Cas9 成功敲除 CYS 基因结果相一致。综上所述, 通过设计两个靶位点, 可以实现对 1 个基因的高效敲除。同时, CY S 基因编辑后, 突变体与野生型烟草相对比, 株高、叶形等表型

上未发现明显变化, 而突变体烟草中花青素含量较野生型烟草均有所提高, 尤其是 CYS-1 突变体烟草中, 的方式, 将第二轮 PCR 胶回收产物克隆到终载体

花青素含量显著高于野生型 ($P<0.05$), 结合 LrA N2 过表达紫色烟草和野生型烟草差异基因表达情况, 初步推断, CY S

基因有可能会抑制烟草中花青素的合成代谢

CRISPR/Cas9 表达载体的构建:采用边切边连 35S-H, 反应体系:第二轮 PCR 胶回收产物 1.5 μ L。本研究的顺利开展验证了 CY S 基因对烟草花青素的生物合成代谢具有一定的抑制作用, 这为黑果枸杞 LrA N2 基因的表达调控提供更丰富的理论基础。

4 材料与方法

4.1 试验材料

本研究以‘Samsun’烟草为试验材料, CY S 基因序列由本课题组前期克隆和分离获得(罗香怡等, 菌感受态细胞 LBA4404 购自生工生物工程(上海)股份有限公司; BsaI 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、PrimeSTAR Max DNA Polymerase R045A 均购自宝生物(大连)有限公司。载体 pYLCRISPR/Cas9 由华南农业大学刘耀光课题组惠赠。

根据转录组测序数据, 结合本研究前期的研究, 选定半胱氨酸转移酶基因 CY S, 使用在线软件 CRISPR-P 2.0 (<http://crispr.hzau.edu.cn/CRISPR2/>) 设计靶点接头引物, 本研究中使用的所有引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

接头制备: 将每个靶点的正反向接头引物稀释至 10 μ mol/L, 反应体系为 1 μ L 正引物、1 μ L 反应物, 加 ddH₂O 至 10 μ L, 反应条件是 90 °C 30 s, 自然冷却, 获得双链结构的靶片段。

gRNA 表达盒制备: 采用边切边连的方式, 将两个靶点片段连入 Atu3 中间载体上, 反应体系(10 μ L): Atu3 1 μ L (20 ng), 退火后的接头引物 1 μ L, T4 DNA 连接酶 0.3 μ L, T4 DNA 连接酶 Buffer 0.3 μ L, BsaI 限制性内切酶 0.3 μ L, BsaI 限制性内切酶 Buffer 1 μ L, ddH₂O 补至 10 μ L, 反应程序: 37 °C 5 min, 20 °C 5min, 进行 5 个循环。选取边连产物(1 μ L)作为后续扩增模板, 第一轮 PCR 扩增选择上游引物(U-F)和下游引物(gRNA-R)作为 PCR 引物。将第一轮 PCR 产物稀释 10 倍, 用通用引物 B'、BL 及 B2'、BL 进行第 2 轮 PCR 扩增, 1% 琼脂糖凝胶电泳(150 V, 30 min)检测 PCR 产物, 切胶并进行回收。

载体 35S-H 质粒 0.5 μ L, BsaI 限制性内切酶 0.5 μ L, BsaI 限制性内切酶 Buffer 1.5 μ L, ddH₂O 补至 14.5 μ L, 37 °C 酶切 10 min 后, 再加 T4 DNA 连接酶 0.5 μ L, T4 DNA 连接酶 Buffer 0.8 μ L, 反应条件为 37 °C 2 min, 10 °C 3 min, 20 °C 5 min, 共 15 个循环。

转化大肠杆菌: 将连接产物通过热激法转化至大肠杆菌感受态细胞 DH5 α , 在 LB 固体抗性培养基(100 mg/L 卡那霉素)上涂板, 37 °C 培养 12~18 h, 挑取单克隆, 使用 CY S-bF、CY S-dR 引物进行菌落 PCR 鉴定, 阳性单克隆送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序, 测序正确的单克隆于 37 °C, 200 r/min 条件下摇菌 12~18 h, 使用天根 TIANprep Mini Plasmid Kit 质粒小提试剂盒(离心柱型, #DP103-02)提质粒, 备用。

4.2 利用根癌农杆菌介导法侵染烟草

将重组表达质粒 p35S-H-CY S, 采用冻融法导入根癌农杆菌感受态细胞 LBA4404, 在含有抗性(100 mg/L 卡那霉素, 100 mg/L 利福平)的 LB 固体培养基上于 28 °C 培养 48h 后挑取单克隆, 利用引物 CYS-F、CYS-R 进行菌落 PCR 鉴定, 挑取阳性单克隆在含有上述抗生素的 LB 液体培养基中于 28 °C、200 r/min 条件下摇菌 48 h 左右, OD 值为 0.8 时, 采用叶盘法进行烟草遗传转化(Horsch et al., 1985), 培养基为潮霉素(10 mg/L)抗性。采用 DNase Plant Kit 新型植物基因组 DNA 提取试剂盒(离心柱型)提取 T0 代转基因烟草叶片 DNA, 利用引物 CY S-F、CY S-R 进行 PCR 扩增筛选植株, 确定阳性植株, PCR 反应体系为 50 μ L, 其中 DNA 模板 2 μ L, 2 $\times$ santaq PCR Mix 25 μ L, 引物各 1 μ L, ddH₂O 21 μ L。PCR 反应程序: 94 °C 预变性 5min; 94 °C 变性 30s, 58 °C 退火 30s, 72 °C 延伸 1min; 72 °C 终延伸 10 min, 30 个循环。

4.3 烟草 CY S 突变体的检测

利用引物 CYS-F、CYS-R 扩增 CY S 基因序列, PCR 产物胶回收后, 连接到 pEasyBlunt 克隆载体, 转化大肠杆菌 DH5 α , 37 °C 培养 12~18 h 后, 进行菌落 PCR 鉴定, 并送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。利用 AlignX 软件对克隆序列及 CY S 参考基因序列进行比对分析, 并进行碱基差异统计。

4.4 花青素含量的测定

称取约 0.3 g 野生型、突变体烟草叶片, 加入 0.1% HCl 水溶液, 避光条件下提取 24 h, 在 530、657 nm 处测定提取溶液的吸光度值(A₅₃₀, A₆₅₇), 根据公式 $Q = (A_{530} - 0.25 \times A_{657}) / M$ (Q 表示花青素含量, M 表示称取烟)。

5 结束语

采用天根 RNApure Pure 多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒(离心柱型, Cat.#DP441)对野生型烟草(WT)和突变体(CYS-1, CYS-2 和 CYS-3)的总 RNA 进行提取, 浓度测定仪 Nanodro 用以总 RNA 浓度测定, 1.0% 琼脂糖凝胶电泳(150 V, 30 min)用以检测总 RNA 的质量。使用 PrimerScript™ RT Master Mix (Perfect Real Time) (TaKaRa, Code No.RR036A)将上述提取的总 RNA 反转录为 cDNA, 并稀释 100 倍作为模板, 选择 NtActin 作为内参基因, CYS-F、CYS-R 作为荧光定量 PCR 引物, 以野生型烟草为对照, 进行 RT-qPCR 实验。CY S 基因的相对表达量采用 2 $^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算(Jiang et al., 2020), 3 次生物学重复。

致谢本研究由青海省基础 Research 计划项目 (2021-ZJ-955Q) 资助。

参考文献：

Ahlawat Y., and Liu T., 2021, Varied expression of senescence-associated and ethylene-related genes during postharvest storage of Brassica vegetables, *Int. J. Mol. Sci.*, 22(2): 839.

Beyene G., Foyer C.H., and Kunert K.J., 2006, Two new cysteine proteinases with specific expression patterns in mature and senescent tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) leaves, *J. Exp. Bot.*, 57(6): 1431–1443.

Bortesi L., and Fischer R., 2015, The CRISPR/Cas9 system for plant genome editing and beyond, *Biotechnol. Adv.*, 33(1): 41–52.

Brooks C., Nekrasov V., Lippman Z.B., and Van Eck J., 2014, Efficient gene editing in tomato in the first generation using the clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated9 system, *Plant Physiol.*, 166 (3): 1292–1297.

Feng J., Cheng L., Cai C.C., Sun G.W., Sun J.G., Yang J.P., Li J. P., and Chen Z.G., 2021, CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis and functional analysis of nicotine-related genes in *Nicotiana tabacum*, *Zhongguo Yanco Xue* (Chinese Tobacco Science), 42(2): 84–90. (冯吉, 程玲, 蔡长春, 孙光伟, 孙敬国, 杨锦鹏, 李建平, 陈振国, 2021, 基于 CRISPR/Cas9 技术的烟草烟碱相关基因敲除及功能研究, *中国烟草科学*, 42(2): 84–90.)

Gao J.P., Wang G.H., Ma S.Y., Xie X.D., Wu X.W., Zhang X.T., Wu Y.Q., Zhao P., and Xia Q.Y., 2015, CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis in *Nicotiana tabacum*, *Plant Mol. Biol.*, 87(1–2): 99–110.

He Q., Wu J.Q., Xue Y.H., Zhao W.B., Li R., and Zhang L.G., 2020, The novel gene BrMYB2, located on chromosome A07, with a short intron 1 controls the purple-head trait of Chinese cabbage (*Brassica rapa* L.), *Hortic. Res.*, 7: 97.

Horsch R.B., Fry J.E., Hoffmann N.L., Eichholtz D.A., Rogers S.G., and Fraley R.T., 1985, A simple and general method for transferring genes into plants, *Science*, 227(4691): 1229–1231.

Jiang T., Zhang M.D., Wen C.X., Xie X.L., Tian W., Wen S.Q., Lu R.K., and Liu L.D., 2020, Integrated metabolomic and transcriptomic analysis of the anthocyanin regulatory networks in *Salvia miltiorrhiza* Bge. flowers, *BMC Plant Biol.*, 20: 349.

Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M., Doudna J.A., and Charpentier E., 2012, A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity, *Science*, 337(6096): 816–821.

Liu L., Zhou Y., Szczerba M.W., Li X.H., and Lin Y.J., 2010, Identification and application of a rice senescence-associated promoter, *Plant Physiol.*, 153(3): 1239–1249.

Luo Q., Liu R.X., Zeng L.G., Wu Y.Y., Jiang Y., Yang Q., and Nie Q., 2020, Isolation and molecular characterization of NtMYB4a, a putative transcription activation factor involved in anthocyanin synthesis in tobacco, *Gene*, 760: 144990.

Luo X.Y., Gao J.M., Liu M.H., Cao D., Zong Y., Liu B.L., and Wei L., 2021, Bioinformatics analysis of cysteine transmembrane gene CYS in transgenic tobacco, *Fenzi Zhiwu Yuzhong* (Molecular Plant Breeding), 19(15): 4873–4879. (罗香怡, 高洁铭, 刘明慧, 曹东, 宗渊, 刘宝龙, 魏乐, 2021, 转基因烟草中半胱氨酸跨膜基因 CYS 生物信息学分析, *分子植物育种*, 19(15): 4873–4879.)

McLellan H., Gilroy E.M., Yun B.W., Birch P.R.J., and Loake G. J., 2009, Functional redundancy in the Arabidopsis *Cathepsin B* gene family contributes to basal defence, the hypersensitive response and senescence, *New Phytol.*, 183(2): 408–418.

Mo L.J., Liu X.T., Li H., and Lu H., 2021, On the function of plant cysteine protease in plant growth and development, *Shengwu Jishu Tongbao* (Biotechnology Bulletin), 37 (6): 202–212. (莫黎杰, 刘夏瞳, 李慧, 陆海, 2021, 植物半胱氨酸蛋白酶在植物生长发育中的功能研究, *生物技术通报*, 37(6): 202–212.)

Srivastava V., Underwood J.L., and Zhao S., 2017, Dual-targeting by CRISPR/Cas9 for precise excision of transgenes from rice genome, *Plant Cell Tiss. Organ Cult.*, 129(1): 153–160.

Wang H.Q., Li J.N., Tao W.W., Zhang X., Gao X.J., Yong J.J., Zhao J.J., Zhang L.M., Li Y.Z., and Duan J.A., 2018, Lycium ruthenicum studies: molecular biology, phytochemistry and pharmacology, *Food Chem.*, 240: 759–766.

Watanabe K., Kobayashi A., Endo M., Sage-Ono K., Toki S., and Ono M., 2017, CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of the dihydroflavonol-4-reductase-B (DFR-B) locus in the Japanese morning glory *Ipomoea (Pharbitis) nil*, *Sci. Rep.*, 7(1): 10028.

Wen C.H., Tsao N.W., Wang S.Y., and Chu F.H., 2021, Color variation in young and senescent leaves of Formosan sweet gum (*Liquidambar formosana*) by the gene regulation of anthocyanidin biosynthesis, *Physiol. Plant*, 172(3): 1750–1763.

Xiao H.J., Yin Y.X., Chai W.G., and Gong Z.H., 2014, Silencing of the CaCP gene delays salt- and osmotic-induced leaf senescence in *Capsicum annuum* L., *Int. J. Mol. Sci.*, 15(5): 8316–8334.

Xie X.D., Gao J.P., Li Z.F., Zhang J.F., Wei P., Luo Z.P., Wang C., Wu M.Z., Zhai N., and Yang J., 2019, Application of multigene editing system mediated by CRISPR/Cas9 to *Nicotiana tabacum*, *Zhongguo Yanco Xuebao* (*Acta Tabacaria Sinica*), 25(4): 72–80. (谢小东, 高军平, 李泽锋, 张剑锋, 魏攀, 罗朝鹏, 王晨, 武明珠, 翟妮, 杨军, 2019, CRISPR/Cas9 介导烟草多基因编辑体系的应用, *中国烟草学报*, 25(4): 72–80.)

Zhang G., Chen S.S., Zhou W., Meng J., Deng K., Zhou H.N., Hu N., and Suo Y.R., 2019, Anthocyanin composition of fruit extracts from *Lycium ruthenicum* and their protective effect for gouty arthritis, *Ind. Crops Prod.*, 129: 414–423.

Zhang S.Q., He J., He L.X., Xue G., Sun J.T., Li X.H., Duan D. W., and Xu S.X., 2020, CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis and function analysis of CPS2 in *Nicotiana tabacum*, *Yanco Keji* (*Tobacco Science & Technology*), 53 (5): 17–25. (张思琦, 何佳, 贺凌霄, 薛刚, 孙聚涛, 李晓辉, 段杜薇, 徐世晓, 2020, 基于 CRISPR/Cas9 技术的烟草 CPS2 基因敲除及功能分析, *烟草科技*, 53(5): 17–25.)

Zhang Y., Huang W.F., Zhou F., and Lin Y.J., 2020, A simple, fast and efficient method of constructing dual-target CRISPR/Cas9 vector, *Huazhong Nongye Daxue Xuebao* (*Journal of Huazhong Agricultural University*), 39(3): 9–18. (张杨, 黄维峰, 周菲, 林拥军, 2020, 1 种简单快速高效的双靶点 CRISPR/Cas9 载体构建方法, *华中农业大学学报*, 39(3): 9–18.)

Zhao C.Y., Bao H.H., Wu Y.R., Du K.H., Li S.C., Yang Z.A., and Yang F., 2020, CRISPR/Cas9 vector construction of *atp2* gene and genetic transformation in tobacco, *Fenzi Zhiwu Yuzhong* (*Molecular Plant Breeding*), 18(21): 7056–7061. (赵重燕, 暴会会, 仵亚汝, 杜康华, 李顺成, 杨正安, 杨飞, 2020, 烟草 *atp2* 基因 CRISPR/Cas9 载体构建与遗传转化, *分子植物育种*, 18(21): 7056–7061.)

Zong Y., Li S.M., Xi X.Y., Cao D., Wang Z., Wang R., and Liu B.L., 2019a, Comprehensive influences of overexpression of a MYB transcription factor regulating anthocyanin biosynthesis on transcriptome and metabolome of tobacco leaves, *Int. J. Mol. Sci.*, 20(20): 5123.

Zong Y., Zhu X.B., Liu Z.G., Xi X.Y., Li G.M., Cao D., Wei L., Li J.M., and Liu B.L., 2019b, Functional MYB transcription factor encoding gene AN2 is associated with anthocyanin biosynthesis in *Lycium ruthenicum* Murray, *BMC Plant Biol.*, 19: 169.