



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 121204113 A

(43) 申请公布日 2025. 12. 26

(21) 申请号 202511370226.5

A01H 5/06 (2018.01)

(22) 申请日 2025.09.24

A01H 6/46 (2018.01)

(66) 本国优先权数据

202510325429.6 2025.03.19 CN

(71) 申请人 上海市农业生物基因中心

地址 201106 上海市闵行区北翟路2901号

(72) 发明人 徐凯 王迪 陈亮 陈守俊

李铁梅 程华想 罗利军

(74) 专利代理机构 北京首捷专利代理有限公司

11873

专利代理师 舒畅

(51) Int.Cl.

C12N 15/82 (2006.01)

C12N 9/00 (2006.01)

C12N 15/52 (2006.01)

权利要求书1页 说明书11页

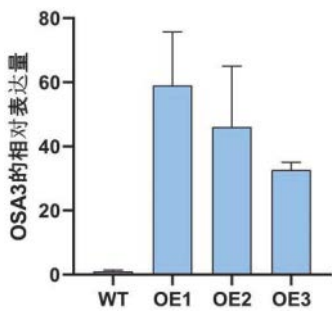
序列表(电子公布) 附图4页

(54) 发明名称

OSA3基因的应用

(57) 摘要

本发明公开了OSA3基因的应用,涉及基因工程技术领域,所述OSA3基因的核苷酸序列如SEQ ID NO.3所示。本发明研究证明OSA3基因具有调控水稻深根比的能力,利用这一能力,可以针对干旱地区开发抗旱型转基因水稻。同时本发明构建的OSA3基因敲除突变体osa3-1/osa3-2,浅根系数量增加,可以针对土壤贫瘠地区开发抗贫瘠型转基因水稻,增强水稻种质对环境的适应能力。



1. OSA3基因的应用,其特征在于,所述应用为调控水稻深根比和/或水稻根系数目,且所述OSA3基因的核苷酸序列如SEQ ID NO.3所示。

2. 根据权利要求1所述OSA3基因的应用,其特征在于,增加OSA3基因的表达量,提高水稻深根比和/或深根数量,提高抗旱能力;

敲除OSA3基因,降低水稻深根比和/或提高浅根数量,提高抗营养贫瘠能力。

3. 一种生物材料,其特征在于,所述生物材料为以下任意一种:

A: 能够使核苷酸序列如SEQ ID NO:3所示的OSA3基因过表达或敲除的表达盒;

B: 含有A所述表达盒的重组载体;

C: 含有A所述表达盒或B所述重组载体的重组微生物。

4. 权利要求3所述生物材料的应用,其特征在于,所述应用为调控水稻深根比和/或水稻根系数目。

5. 一种提高水稻深根比的方法,其特征在于,利用转基因手段,提高OSA3基因的表达量;其中,所述OSA3基因的核苷酸序列如SEQ ID NO.3所示。

6. 一种提高水稻抗旱能力的方法,其特征在于,利用转基因手段,提高OSA3基因的表达量;其中,所述OSA3基因的核苷酸序列如SEQ ID NO.3所示。

7. 一种提高水稻抗营养贫瘠能力的方法,其特征在于,利用基因编辑手段,敲除OSA3基因;其中,所述OSA3基因的核苷酸序列如SEQ ID NO.3所示。

8. 一种OSA3基因的突变基因,其特征在于,所述突变基因为核苷酸序列SEQ ID NO.3的第881-882位之间插入C,或在核苷酸序列SEQ ID NO.3的第880-885位之间缺失CAACAG。

9. 一种含有权利要求8所述突变基因的生物材料,其特征在于,所述生物材料为表达盒、重组载体和/或重组微生物。

10. 权利要求8所述突变基因或权利要求9所述的生物材料的应用,其特征在于,所述应用为提高水稻浅根数目,和/或提高根系磷肥吸收量,和/或构建水稻深根比降低模型。

OSA3基因的应用

技术领域

[0001] 本发明涉及基因工程技术领域,更具体的说是涉及OSA3基因的应用。

背景技术

[0002] 干旱缺水是造成全球粮食减产的重要因素之一。干旱胁迫严重影响植物生长和发育,甚至造成植物死亡。水稻是重要的粮食作物之一,水稻需水占农业灌溉用水的65%,利用现代生物学技术研究植物抗旱的生理生化反应,克隆重要的抗旱基因,进而转入植物中培育抗逆性增强的作物新品种,特别是培育节水抗旱的水稻新品种是缓解全球干旱缺水、人口增长带来的粮食生产压力的有效途径。

[0003] 植物在长期的进化过程中形成了一系列的适应机制来应对干旱等逆境胁迫。干旱胁迫下,植物一方面通过调节气孔关闭来减少水分蒸腾,同时通过促进根系生长来增加水分吸收,从而有效避免干旱胁迫对植物的伤害。其中根系生长调控对于水稻抗旱性具有至关重要的作用。当地表缺水的时候,植物可通过促进根系向下生长来吸收深层土壤中的水分进而增强自身应对干旱胁迫的能力。在禾本科作物的研究中,将向下生长的根的数量(与水平夹角 50° - 90°)与向侧面生长的根的数量(与水平夹角 0° - 50°)的比值称为深根比,一般深根比越大的植物,吸收深层水的能力更强,因而抗旱能力更强(CN118460554A、CN118291487A)。

[0004] 深根系可以提升植物耐旱能力,而浅根则能提高对土壤浅层磷肥的吸收能力(Journal of Experimental Botany, 2020, 71, 5752-5763),而目前这些调控基因研究还比较匮乏,因此,挖掘更多控制根系形态的功能基因是本领域技术人员亟需解决的问题。

发明内容

[0005] 有鉴于此,本发明提供了OSA3基因的应用。

[0006] 为了实现上述目的,本发明采用如下技术方案:

[0007] OSA3基因的应用,所述应用为调控水稻深根比和/或水稻根系数目,且所述OSA3基因的核苷酸序列如SEQ ID NO.3所示。

[0008] 作为优选的技术方案,所述应用,增加OSA3基因的表达量,提高水稻深根比和/或深根数量,提高抗旱能力;

[0009] 敲除OSA3基因,降低水稻深根比和/或提高浅根数量,提高抗营养贫瘠能力。

[0010] 本发明的又一目的是,提供一种生物材料,所述生物材料为以下任意一种:

[0011] A:能够使核苷酸序列如SEQ ID NO:3所示的OSA3基因过表达或敲除的表达盒;

[0012] B:含有A所述表达盒的重组载体;

[0013] C:含有A所述表达盒或B所述重组载体的重组微生物。

[0014] 本发明的又一目的是,提供上述生物材料的应用,所述应用为调控水稻深根比和/或水稻根系数目。

[0015] 本发明的又一目的是,提供一种提高水稻深根比的方法,利用转基因手段,提高

OSA3基因的表达式;其中,所述OSA3基因的核苷酸序列如SEQ ID NO.3所示。

[0016] 本发明的又一目的是,提供一种提高水稻抗旱能力的方法,利用转基因手段,提高OSA3基因的表达式;其中,所述OSA3基因的核苷酸序列如SEQ ID NO.3所示。

[0017] 本发明的又一目的是,提供一种提高水稻抗营养贫瘠的方法,利用基因编辑手段,敲除OSA3基因的表达式;其中,所述OSA3基因的核苷酸序列如SEQ ID NO.3所示。

[0018] 本发明的又一目的是,提供一种OSA3基因的突变基因,所述突变基因为核苷酸序列SEQ ID NO.3的第881-882位之间插入C,或在核苷酸序列SEQ ID NO.3的第880-885位之间缺失CAACAG。

[0019] 本发明的又一目的是,提供一种含有上述突变基因的生物材料,所述生物材料为表达盒、重组载体和/或重组微生物。

[0020] 本发明的又一目的是,提供上述突变基因或上述的生物材料的应用,所述应用为提高水稻浅根数目,和/或提高根系磷肥吸收量,和/或构建水稻深根比降低模型。

[0021] 有益效果:本发明研究证明OSA3基因具有调控水稻深根比的能力,过表达该基因能够增加深根数目和深根比,利用这一能力,可以针对干旱地区开发抗旱型转基因水稻。同时本发明构建的OSA3基因敲除突变体*osa3-1/osa3-2*,浅根系数量增加,可以针对土壤贫瘠地区开发抗贫瘠型转基因水稻,增强水稻种质对环境的适应能力。

附图说明

[0022] 为了更清楚地说明本发明实施例或现有技术中的技术方案,下面将对实施例或现有技术描述中所需要使用的附图作简单地介绍,显而易见地,下面描述中的附图仅仅是本发明的实施例,对于本领域普通技术人员来讲,在不付出创造性劳动的前提下,还可以根据提供的附图获得其他的附图。

[0023] 图1为本发明利用MEGA7软件将OSA3蛋白与部分水稻OSAs成员蛋白序列进行保守结构域比对的结果;

[0024] 图2为本发明的OSA3基因在水稻各组织中的表达水平;

[0025] 图3为本发明的OSA3基因CRISPR/Cas9基因编辑载体转化水稻植株中OSA3基因序列的检测;ZH11:野生型水稻(中花11),*osa3-1*和*osa3-2*为基因敲除转基因水稻;

[0026] 图4为本发明的过表达OSA3基因转基因水稻中目的基因的表达式;

[0027] 图5为本发明的OSA3基因CRISPR/Cas9基因编辑载体转化水稻与野生型水稻根系变化结果,ZH11:野生型水稻(中花11),*osa3-1*和*osa3-2*为基因敲除转基因水稻。

[0028] 图6为本发明的过表达OSA3基因转基因水稻与野生型水稻根系变化结果,ZH11:野生型水稻(中花11),OE1、OE2和OE3为过表达OSA3基因转基因水稻。

具体实施方式

[0029] 为了便于理解本发明,下面将参照实施例对本发明进行更全面的描述,以下给出了本发明的较佳实施例。但是,本发明可以以许多不同的形式来实现,并不限于本文所描述的实施例。提供这些实施例的目的是使对本发明的公开内容的理解更加透彻全面。应理解,下述实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件,例如Sambrook等分子克隆:实验室手册(New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)中所述的条件,或

按照制造厂商所建议的条件。实施例中所用到的各种常用试剂,均为市售产品。

[0030] 除非另有定义,本文所使用的所有的技术和科学术语与属于本发明的技术领域的技术人员通常理解的含义相同。在本发明的说明书中所使用的术语只是为了描述具体的实施例的目的,不是旨在限制本发明。本文所使用的术语“和/或”包括一个或多个相关的所列项目的任意的和所有的组合。

[0031] 本发明术语“表达盒”是指,能够在宿主细胞中表达目的基因的DNA,该DNA不但可包括启动蛋白编码基因转录的启动子,还可包括终止蛋白编码基因转录的终止子。较佳地,所述表达盒还可包括增强子序列。

[0032] 本发明术语“载体”是指,选用本领域已知的各种载体,如市售的载体,包括质粒,粘粒等。

[0033] 实施例1

[0034] 水稻OSA3基因的克隆

[0035] 通过对水稻基因组及全长基因数据库进行搜索,获得水稻OSA3基因LOC_Os12g44150的预测的编码区cDNA序列。根据预测信息设计上下游引物:

[0036] OSA3F(5'-ATGGCTGAGAAGGAGGGCAA-3',SEQ ID NO.1)和

[0037] OSA3R(5'-TCACACGGTGTAAGACTGCT-3',SEQ ID NO.2),

[0038] 从cDNA中直接克隆获得了OSA3基因,凝胶回收,连接到pEASY-Blunt载体上,鉴定后进行序列测定,测序结果经BLAST比对确认。结果显示本发明中的水稻OSA3编码区cDNA的长度为2871bp,详细序列见SEQ ID NO.3。

[0039] ATGGCTGAGAAGGAGGGCAACCTCGACGCCGTCCTCAAGGAGGCCGTCGACTTGGAGAATATTCCTCGAGGAAGTGTGTTGAGAACCTGAGATGCAGCCGCGAGGGTCTCACAACCTCAGCAGGCCGAGCAGCGCCTCGAAATCTTTGGCCCCAACAAAGCTTGAGGAGAAGGAGGAGAGCAAGTTCCTCAAGTTTTTGGGGTTCATGTGGAATCCACTCTCATGGGTCATGGAAGCTGCAGCTATCATGGCCATTGCGCTGGCGAATGGAGGGGGGAAGCCACCGGATTGGCAGGACTTTGTTGGTATCATAACTCTTCTTGTTATCAACTCGACAATCAGTTTCATTGAGGAAAACAATGCTGGCAATGCTGCTGCTGCACTCATGGCCCGTCTTGCACCAAAGGCCAAGGTGCTTCGTGATGGCCGATGGACTGAGGAAGAGGCGGCCATCCTTGTACCAGGGGATATCGTAAGTATTAACTTGGAGACATTATACCTGCAGATGCGCGTCTCCTTGAGGGAGATCCTTTGAAGATCGATCAGTCTGCCCTGACTGGAGAATCATTGCCTGTCACCAAAGTCCCTGGTGATGGTGCTATTCTGGTTTCGACTGTCAAGCAAGGTGAGATCGAAGCCATAGTGATTGCTACTGGTGTTACACTTTCTTCGGAAAGCAGCACACCTTGTTGACTCAACTAACCAAGTTGGTCATTTCCAGAAGGTCCTGACGGCTATTGGGAATTTCTGCATTTGCTCAATTGCTGTGGGAATGTTTGTTGAGATCATTGTAATGTACCCTATCCAGCACAGGGCATAACCGCCCCGGGATTGACAACCTCCTTGTCCTTCTCATTGGAGGCATTCCCATAGCCATGCCAACAGTCTTATCTGTGACTATGGCAATTGGGTACACCGCTGTCTCAACAGGGAGCGATCACAAGAGAATGACTGCAATTGAGGAGATGGCGGGCATGGATGTTCTTTGCAGTGATAAACTGGAACCTTGACCTTGAATAAGCTCACCGTGGACAAGAACCTCATTGATGCTTTTGAAAGAGGAATCACTCAGGACCAAGTGATTCTCATGGCTGCTAGAGCATCACGAACAGAAAACCAGGATGCTATTGATACTGCAATAGTTGGGATGCTAGCTGATCCAAAAGAGGCCCGTGCTGGTATTCAAGAAGTTCATTTCTGCCATTCAATCCTACTGACAAAAGAACAGCATTGACATACATTGATGGTGATGGCAAAATGTATCGTGTTAGTAAGGGTGCACCTGAGCAGATTCTCCACCTGCTCATAACAAACCGGAGATAGAGCGGAGGGTCCATGCTGTGATTGACAAATTGACAGAACGTGGACTTAGATCGCTTGCTGTAGCATACCAGGAAGTACCAGAGGGGACGAAAGAAAGCCCTGGTGGCCCATGGCATTGTTGTTGGTCTCATGCCACTTTTTGATCCTCCAAGGCACGACAGTGCTGAAACAATTCGGCGGGCA

CTTAATCTTGGTGTCAATGTCAAGATGATCACAGGTGATCAGCTGGCAATTGGAAAAGAAACAGGGCGTCGCCTGG
GAATGGGTACAAACATGTACCCTTCATCCGCTTTGCTGGGACAGAACAAGGATGAGTCCATTGCCGCTTTACCAGT
TGATGATCTCATTGAGAAAGCTGATGGCTTTGCTGGTGTATTCCCAGAGCACAAAGTATGAGATTGTGAAACGTCTG
CAAGCAAGAAAGCACATATGTGGAATGACTGGTGTGTTGATGCTCCAGCCCCTAAAGAAAGCTGACATTG
GTATTGCTGTTGCTGATGCAACTGATGCAGCCAGGAGTGCTTCAGATATTGTGCTCACAGAACCTGGTCTTAGTGT
GATCATCAGTGCTGTGCTTACAAGTCGTGCAATTTTCCAGCGTATGAAGAACTACACTATCTATGCTGTCTCAATC
ACCATTTCGTATAGTGCTTGGATTTATGCTACTTGCCTCATCTGGAAATTCGATTTCCCCCTTTTATGGTCTCTAA
TCATAGCAATTCTAAATGATGGTACCATCATGACTATATCAAAGGATCGGGTAAAACCATCTCCACTACCTGACAG
CTGGAAGCTGGCTGAGATTTTTACAACCTGGAGTTGTCTCGGTGGATACTTGGCAATGATGACAGTAATCTTCTTC
TGGGCTGCATATAAGACAGACTTTTTCCCGAGAATATTTTCATGTTGAAAGCCTTGAGAAGACAGCTCAAGATGATT
TCCAAAACTTGCCTCTGCTGTTTACCTCCAAGTTAGCACCATCAGCCAAGCTCTCATCTTTGTCACAAGGTCCCG
CAGCTGGTCATTTGTTGAGCGCCCTGGATTTCTGCTGGTCTTTGCTTTCTTGGTTGCACAGCTGATTGCTACACTG
ATTGCTGTGTATGCTGACTGGGCGTTCACCTCAATCAAAGGCATTGGGTGGGGTTGGGCTGGTATTGTGTGGCTCT
ACAATCTAATCTTCTACTTCCCACTCGACATTATCAAGTTCCTCATCAGATATGCTTTGAGTGGGAAAGCATGGGA
TCTTGTTCATTGAGCAAAGGATCGCTTTCACAAGGAAGAAGGACTTTGGTAAGGAGGAGAGGGAGCTCAAGTGGGCA
CATGCTCAGAGGACCCTCCATGGACTGCAGCCGCCTGATGCCAAGATGTTCTCGGAGAAGGCTGGCTACAATGAGC
TCAATCAGATGGCTGAAGAGGCGAAGAGGAGGGCGGAGATTGCCAGGCTTAGGGAGCTCCATACGCTCAAGGGGCA
TGTAGAATCGGTTGTGAAGCTCAAAGGCCTCGACATTGAGACCATCCAGCAGTCTTACACCGTGTGA, SEQ ID
NO.3。

[0040] 实施例2

[0041] 水稻OSA3蛋白序列信息与同源性分析

[0042] 根据本发明水稻OSA3基因的ORF推导出水稻OSA3的氨基酸序列,共956个氨基酸 (SEQ ID NO.4),分子量为105.44kDa道尔顿。通过NCBI网站的BLASTP程序比对得出 (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>),OSA3编码蛋白具有定位于细胞质膜 (Plasma membrane, PM) 的H⁺-ATPase特有的结构域,属于PM H⁺-ATPase家族。通过对OSA3与水稻中的部分PM H⁺-ATPase编码蛋白进行保守结构域的序列比对 (参见附图1),我们发现,该蛋白与其家族蛋白具有较高的同源性,都含有保守的跨膜结构域TM1-TM10,以及C末端的自抑制结构域。

[0043] MAEKEGNLDAVLKEAVDLENIPLEEVENLRCSREGLTTQQAQQRLIFGPNKLEEKEESKFLKFLGF
MWNPLSWVMEAAAIMAIALANGGGKPPDWQDFVGIIITLLVINSTISFIEENNAGNAAAALMARLAPKAKVLRDGRW
TEEEAAILVPGDIVSIKLGDIIPADARLLEGDPLKIDQSALTGESLPVTKGPGDGVYSGSTVKQGEIEAIVIATGV
HTFFGKAAHLVDSTNQVGHFQKVLTAIGNFCICSIAGVMFVEIIVMYPPIQHRAIRPGIDNLLVLLIGGIPIAMPTV
LSVTMAIGSHRLSQQGAITKRMTAIEEMAGMDVLCSDKTGTLTLNKLTVDKNLIDVFERGITQDQVILMAARASRT
ENQDAIDTAIVGMLADPKEARAGIQEVHFLPFNPTDKRTALTYIDGDGKMYRVSKGAPEQILHLAHNKPEIERRVH
AVIDKFAERGLRSLAVAYQEVPEGTKESPGGPWHFVGLMPLFDPPRHDSAETIRRALNLGVNVKMITGDQLAIGKE
TGRRLGMGTNMYPSSALLGQNKDEIAALPVDDLIEKADGFAGVFPEHKYEIVKRLQARKHICGMTGDGVNDAPAL
KKADIGIAVADATDAARSASDIVLTEPGLSVIISAVLTSRAIFQRMKNYTIYAVSITIRIVLGFMLLALIWKDFDP
PFMVLIIAILNDGTIMTISKDRVKPSPLPDSWKLAEIFTTGVVLGGYLAMMTVIFFWAAYKTDFPRIFHVESLEK
TAQDDFQKLASAVYLQVSTISQALIFVTRSRWSFVERPGFLLVFAFLVAQLIATLIAVYADWAFTSIKIGIGWGA

GIVWLYNLIFYFPLDIIKFLIRYALSGKAWDLVIEQRIAFTRKKDFGKEERELKWAHAQRTLHGLQPPDAKMFSEK
AGYNELNQMAEEAKRRAEIARLRELHTLKGHVESVVKLKGLDIETIQQSYTV*, SEQ ID NO.4。

[0044] 实施例3

[0045] 水稻OSA3基因在各组织器官的表达分析

[0046] 1. 幼苗培育

[0047] 苗期:选取饱满的粳稻中花11种子,2.5%NaClO消毒20分钟后清洗干净,置于30℃催芽,种子露白后放在发芽盒内水培生长,三叶期后施加营养液(国际水稻所标准营养液),待四叶期后取新叶和根,准备抽取RNA。

[0048] 成株期:待粳稻中花11四叶期后,移栽至水田中,孕穗期取植株的叶片、叶鞘、根、分蘖芽和小穗,准备抽取RNA。

[0049] 2. RNA提取

[0050] RNA的提取:所取样品在研钵中用液氮冷冻后研磨成粉状,加入盛有1mL TRNzol-A+试剂(天根生化科技有限公司)的2mL EP管,充分振荡后,室温放置5min,之后加0.2mL氯仿,剧烈震荡15s后,室温放置3min;后于4℃,12000rpm离心10min,将上清液移至新的2mL EP管中,加等体积异丙醇沉淀RNA,加100μLRNase-free ddH₂O溶解。电泳鉴定总RNA质量,然后在分光光度计上测定RNA含量。

[0051] 3. 第一链cDNA合成

[0052] (1) 反转录之前需用DNaseI消化所提取RNA样品,反应体系如表1:

[0053] 表1

	试剂名称	使用量
[0054]	Total RNA	2 μg
	Anchored Oligo (dT)18 primer	0.5 μL
	2×ES Reaction Mix	10 μL
	EasyScript RT/RI Enzyme Mix	1 μL
	gDNA Remover	1 μL
	RNase-free Water	Up to 20 μL

[0055] (2) 将上反应体系于42℃温育30min;然后85℃加热5min,使反转录酶失活并阻止其与DNA结合;4℃或冰上放置5min。制备好的cDNA可以立即使用或存放于-20℃备用。

[0056] 4. 定量PCR分析

[0057] (1) 以反转录结果获得的cDNA为模板,对基因实施的定量体系如表2:

[0058] 表2

	试剂名称	使用量
[0059]	2 × SYBR Premix Ex Taq	10 μg
	Forward primer (SEQ ID NO.5)	0.4 μL
	Reverse primer (SEQ ID NO.6)	0.4 μL
	cDNA 模版	0.5 μL
	Nuclease-free Water	Up to 20 μL

[0060] Forward primer: AATTCGGCGGGCACTTAATC, SEQ ID NO.5, Reverse primer:

TTGTTCTGTCCCAGCAAAGC,SEQ ID NO.6。

[0061] (2) 利用Bio-Rad CFX96 Real-Time PCR仪,反应程序:94℃30s;94℃5s,55℃15s,72℃10s,40cycles;72℃1min;溶解曲线设置从95.0℃to 65.0℃,5s,间隔0.5℃。每个反应设置3个重复。以水稻OsUbi5基因作为内参基因,数据分析采用 $2^{-\Delta Ct}$ 法或者 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法。

[0062] 定量分析结果显示(参见附图2) OSA3基因主要在叶中表达,其中叶片和叶鞘表达量较高,此外,在节和分蘖芽中也有表达。

[0063] 实施例4

[0064] 水稻OSA3基因CRISPR/Cas9敲除载体和过表达载体的构建及转化水稻

[0065] 1. 构建利用CRISPR/Cas9系统进行OSA3基因编辑的载体:

[0066] 根据OSA3的基因组信息,结合华中农业大学CRISPR-P 2.0 (Molecular Plant.2017,10(3):530-532)设计靶点,在预测的sgRNA中选择脱靶效率低、特异性好且位于外显子区的片段,最终将sgRNA:5'-CCATGCCAACAGTCTTATCTGTG-3'(SEQ ID NO.7)作为靶点,然后利用华南农业大学刘耀光老师提供的CRISPR/Cas9基因编辑系统的载体,其中pYLsgRNA-OsU6A/LacZ载体主要用于扩增U6启动子和sgRNA表达盒,以pYLgRNA-OsU6a/LacZ质粒为模版,分别在两个体系中进行PCR扩增,gR-R和OSA3-U6a(CACAGATAAGACTGTTGGCATGGCGGCAGCCAAGCCAGCA,SEQ ID NO.8)扩增U6a-靶点片段,U-F和OSA3-gRT(CCATGCCAACAGTCTTATCTGTGTTTTAGAGCTAGAAAT,SEQ ID NO.9)扩增gRNA-靶点片段,通过U-GAL和Pgs-GAR进行进行第二轮overlapping PCR将U6启动子和sgRNA盒融合在一起,得到OSA3-sgRNA表达盒。利用BsaI酶切载体pYLCRISPR/Cas9-MH,得到的线性化载体与融合后的sgRNA表达盒进行重组,将Ub和sgRNA表达盒整合到含有Cas9蛋白的pYLCRISPR/Cas9-MH编辑载体中,该载体用于在植物中表达。

[0067] 2. 构建过表达OSA3基因的植物表达载体

[0068] 以实施例1中已获得含有OSA3基因的pEASY-Blunt载体为模板,用前引物osa3f:5'-GAGAACACGGGGGACTCTAGAATGGCTGAG AAGGAGGGCAA-3'(SEQ ID NO.10),后引物osa3r:5'-GCCCT TGCTCACCATTTCGAACACGGTGTAAGACTGCT-3'(SEQ ID NO.11)进行PCR扩增。扩增产物经回收纯化后,通过重组反应,将扩增产物片段克隆到植物超量表达载体p35S2(以商业化质粒pCAM BIA1300为底盘,化学合成过表达元件CaMV35S启动子-GFP标签蛋白-NOSR终止子,利用重组的方法,将此片段重组到pCAMBIA1300载体上,筛选阳性克隆后测序确认,即获得由CaMV启动子驱动的带GFP标签的植物表达载体,命名为p35S2),筛选阳性克隆。具体过程如下:

[0069] (1)PCR扩增

[0070] 50μL反应体系如下:

[0071] 表3

	各反应成分	用量 (μL)
[0072]	ddH ₂ O	21
	引物 F	1.5
	引物 R	1.5
	质粒	1
	KOD-One	25

[0073] 扩增程序: 98℃预变性2min, 98℃10s, 60℃5s, 68℃20s, 30个循环。

[0074] 采用普通琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒(北京全式金生物技术有限公司)对PCR产物进行纯化回收。

[0075] (2) 重组反应

[0076] 重组反应的目的在于将含有与载体酶切位点两端序列相同的接头的PCR产物重组到p35S2载体上, 以产生CaMV35S启动子驱动的超表达载体。重组反应可在室温配制混匀, 0.5mL的离心管中进行。反应体系如下:

[0077] 表4

	试剂	用量
[0078]	线性化的 p35S2 (50-150ng)	1 μL
	回收 PCR 产物 (150 ng/ μL)	3 μL
	H ₂ O	3 μL
	5×CE buffer	2 μL
	重组酶	1 μL
	总体积	10 μL

[0079] 35℃温浴30min左右, 然后将反应液转化大肠杆菌感受态细胞。转化完成的大肠杆菌液涂布在含有卡那霉素的平板上生长。接着挑取单菌落, 进行PCR验证, 然后送测序, 测序结果与该基因cDNA序列比对以确认序列正确与否, 最后提取质粒, 即可转化农杆菌EHA105。

[0080] 3. 农杆菌转化

[0081] (1) 根癌农杆菌(EHA105)感受态细胞的制备:

[0082] 根癌农杆菌菌液于28℃培养至OD₆₀₀=0.5时, 4℃离心收集菌体, 用500 μL 、0.1mol/L冰浴CaCl₂重悬, 冰浴30min后离心, 去上清, 用100 μL 、0.1mol/L冰CaCl₂重悬后, 于4℃保存。

[0083] (2) 农杆菌转化, 采取冻融法:

[0084] 向农杆菌感受态细胞(100 μL)中加入5 μL 植物表达载体质粒DNA, 轻轻混匀, 冰水浴30min后, 于液氮中速冻冷激2min; 加入400-800 μL YEP培养液(含卡那霉素, Kan); 28℃, 200r/min振荡培养3-5h; 室温离心(5000r/min, 5min), 保留100 μL 上清重悬菌体, 涂布于LB固体培养基(含Kan)上, 28℃倒置培养2天直至长出合适大小的菌落, 挑取单克隆进行PCR检测, 得到阳性菌株。

[0085] 4. 愈伤诱导: 种子用无菌水漂洗15-20min, 再用75%的乙醇消毒1min, 然后用1.5%有效浓度次氯酸钠溶液振荡消毒20min。最后再用无菌水冲洗5遍。将洗好的种子用吸水纸吸干接种在诱导愈伤培养基中, 25℃暗培养2周。

[0086] 愈伤诱导培养基:采用表5的诱导培养基,加入0.3g脯氨酸、0.6g水解酪蛋白酶、30g蔗糖和2.5mL 2,4-D (浓度1mg/mL),配成1L溶液,调pH至5.9,加入7g琼脂粉,高温高压灭菌。

[0087] 5.继代培养:把胚性愈伤组织切下,接入继代培养基中,25℃暗培养2周。

[0088] 继代培养基:采用表5的继代培养基,加入0.5g脯氨酸、0.6g水解酪蛋白酶、30g蔗糖和2mL 2,4-D (浓度1mg/mL),配成1L溶液,调pH至5.9,加入7g琼脂粉,高温高压灭菌。

[0089] 6.农杆菌浸染和愈伤组织共培养:培养农杆菌,挑取阳性单菌落,在1mL农杆菌培养液(含抗生素)中,28℃培养过夜;取以上培养物,加入50mL农杆菌培养液(含抗生素)中,28℃培养至 $OD_{600}=0.6-1.0$ 。将获得的农杆菌菌液离心,将收集到的菌体加入悬浮培养液中,震荡培养30min至 $OD_{600}=0.6-1.0$ 。然后将愈伤组织放入含有农杆菌菌液的悬浮培养液中,振荡培养20min左右。将愈伤组织在灭菌滤纸上晾干,转入共培养培养基中,25℃暗培养5d。

[0090] 悬浮培养液:采用表5的悬浮培养液,加入0.08g水解酪蛋白酶、2g蔗糖和0.2mL 2,4-D (浓度1mg/mL),配成100mL溶液,调pH至5.4,分成两瓶(每瓶50mL),高温高压灭菌。使用之前加入1mL50%的葡萄糖和100 μ L AS(100mM)。

[0091] 共培养培养基:采用表5的共培养培养基,加入0.8g水解酪蛋白酶、20g蔗糖和3.0mL 2,4-D (浓度1mg/mL),配成1L溶液,调pH至5.6,加入7g琼脂粉,高温高压灭菌。使用之前加入20mL50%的葡萄糖和1mL AS(100mM)。

[0092] 7.筛选培养:共培养3d后,选取好的愈伤组织,转入筛选培养基中,25℃暗培养2周,筛选两次。

[0093] 筛选培养基:采用表6的筛选培养基,加入0.6g水解酪蛋白酶、30g蔗糖和2.5mL 2,4-D (浓度1mg/mL),配成1L溶液,调pH至6.0,加入7g琼脂粉,高温高压灭菌。使用之前加入1mL Hn和1mL Cn(100ppm)。

[0094] 8.分化培养:挑取胚性愈伤组织接入分化培养基,24℃,16h/8h光暗培养诱导分化芽(4-6周)。

[0095] 分化培养基:采用表6的分化培养基,加入2.0mg/L 6-BA、2.0mg/L KT、0.2mg/L NAA、0.2mg/L IAA、1.0g水解酪蛋白酶和30g蔗糖,配成1L溶液,调pH至6.0,加入7g琼脂粉,高温高压灭菌。

[0096] 9.生根培养:待芽长至2cm左右时,将幼芽切下,插入生根培养基中,25℃左右,16h/8h光暗培养,诱导生根。

[0097] 生根培养基:采用表6的生根培养基,加入30g蔗糖,配成1L溶液,调pH至5.8,加入7g琼脂粉,高温高压灭菌。

[0098] 10.转化植株培养:待根系发达后,打开试管口,加入无菌水炼苗2-3d后,将植株取出,用无菌水洗净附着的固体培养基,移入土壤中,刚开始遮荫避风,待植株健壮后进行常规田间或温室管理培养。

[0099] 表5基本培养基成分1

	成分	诱导、继代培养	悬浮、共培养培
		基 (mg/L)	养基 (mg/L)
[0100]	大量元素		
	KNO ₃	2830	1415
	KH ₂ PO ₄	200	200
	(NH ₄) ₂ SO ₄	463	231.5
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	185	62.5
	CaCl ₂ ·2H ₂ O	166	83
	微量元素		
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	1.5	0.75
	MnSO ₄ ·4H ₂ O	4.4	2.2
	H ₃ BO ₃	1.6	0.8
	KI	0.8	0.4
	Fe ²⁺ -EDTA (铁盐)		
	FeSO ₄ ·7H ₂ O	27.8	27.8
	Na ₂ EDTA·2H ₂ O	37.3	37.3
	Vitamin (有机成分)		
	Glycine	2	2
	Thiamine HCL(VB1)	1	1
	Pyridoxine	1	1
	HCL(VB6)		
	Nicotinic acid	1	1
	Inositol	100	100

[0101] 表6基本培养基成分2

	成分	筛选, 分化培养基	生根培养
		(mg/L)	基 (mg/L)
[0102]	大量元素		
	KNO ₃	1900	950
	NH ₄ NO ₃	1650	825
	KH ₂ PO ₄	170	85
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	370	185
	CaCl ₂ ·2H ₂ O	440	220
	微量元素		
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	1.5	0.75
	MnSO ₄ ·4H ₂ O	22.3	11.15
	H ₃ BO ₃	6.2	3.1
	KI	0.83	0.415
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025	0.0125
	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.25	0.125
	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025	0.0125
	Fe ²⁺ -EDTA (铁盐)		
	FeSO ₄ ·7H ₂ O	27.8	27.8
	Na ₂ EDTA·2H ₂ O	37.3	37.3
	Vitamin (有机成分)		
	Glycine	2	2
	Thiamine HCL(VB1)	1	1
	Pyridoxine		
	HCL(VB6)	1	1
	Nicotinic acid	1	1
	Inositol	100	100

[0103] 11. CRISPR敲除阳性植株中靶位点序列检测及突变类型鉴定

[0104] 提取转基因T2代植物叶片DNA, 在sgRNA靶点上下游约500bp设计引物 (CGGCTATTGGGAATTTCTGC, SEQ ID NO.12; TGAGGTTCTGTCCACGGTG, SEQ ID NO.13), 进行PCR扩增, 对扩增片段进行一代测序, 确定了2种纯合的突变类型, 分别为插入1bp (在SEQ ID NO.3第881-882位之间插入C) 以及缺失6bp (在SEQ ID NO.3第880-885位之间缺失CAACAG), 翻译成氨基酸序列后, 分别造成OSA3翻译的提前终止以及编码区缺失2个氨基酸 (参见附图3)。

[0105] 12. 过表达OSA3基因转基因水稻中目的基因的表达量检测

[0106] 提取转基因T2代植物叶片RNA, 采用实施例3中的定量PCR法检测了OSA3过表达植株中目的基因的表达水平。结果如附图4所示, 在检测的3个转基因株系中, OSA3的表达量都明显高于野生型植株, 增加了32~59倍。

[0107] 实施例5

[0108] 转基因水稻表型测定

[0109] 将已鉴定的osa3敲除突变体种子消毒(2.5%NaClO消毒20分钟)后清洗干净,置于30℃催芽,种子露白后放在发芽盒内水培生长,待生长至三叶一心期后移栽到含有土壤的篮子中,放入水池中进行种植。生长45天后,将篮子从水池中取出,数篮子侧边的根的数量作为浅根数量,数篮子底部的根的数量作为深根数量,计算总根数,用深根数占总根数的百分比作为深根比(参见附图5)。

[0110] 实验结果可以看出,osa3敲除突变体的深根比相较于野生型植株显著降低,浅根数增加。

[0111] 将过表达OSA3转基因家系种子去壳消毒(75%酒精处理1min,1.5%NaClO处理20min,无菌水清洗5次),在含有50mg/L潮霉素的1/2MS培养基上发芽,野生型对照在不含潮霉素的1/2MS培养基上。待发芽2~3天后挑选发芽好且长势一致的种子,分别转移到含有土壤的篮子中放入装满营养液的水池中进行种植。生长50天左右,将篮子取出,测定主根的根长,数篮子侧边和底部的根的数量,计算总根数和深根比。

[0112] 实验结果可以看出,OSA3转基因水稻的浅根数和野生型水稻类似,但其根长、深根数和深根比均显著高于野生型水稻(图6);该结果表明过表达OSA3提高了水稻的深根性。

[0113] 以上结果表明OSA3基因正调控植株的深根比,将其进行过表达能提高植株的深根比,应用于开发抗旱型转基因水稻;敲除该基因的突变株的浅根数增多,表明该基因敲除突变株具有潜在的更强的对浅层土壤中营养吸收(磷肥)能力。

[0114] 本说明书中各个实施例采用递进的方式描述,每个实施例重点说明的都是与其他实施例的不同之处,各个实施例之间相同相似部分互相参见即可。

[0115] 对所公开的实施例的上述说明,使本领域专业技术人员能够实现或使用本发明。对这些实施例的多种修改对本领域的专业技术人员来说将是显而易见的,本文中所定义的一般原理可以在不脱离本发明的精神或范围的情况下,在其它实施例中实现。因此,本发明将不会被限制于本文所示的这些实施例,而是要符合与本文所公开的原理和新颖特点相一致的最宽的范围。

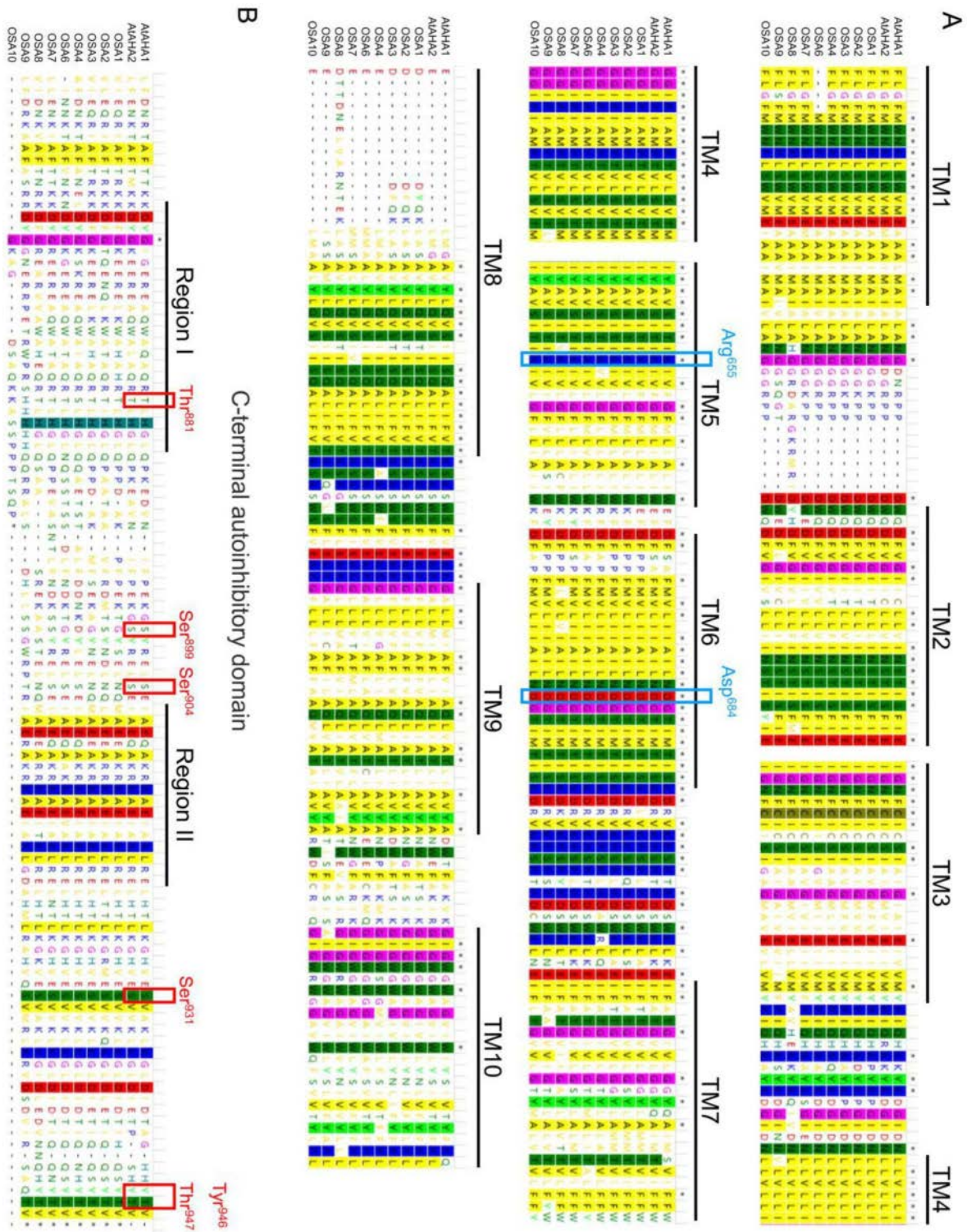


图1

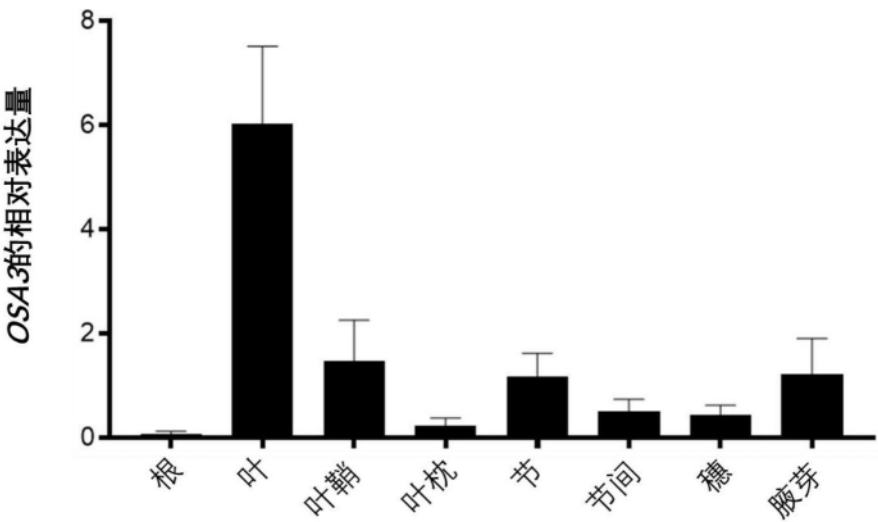


图2

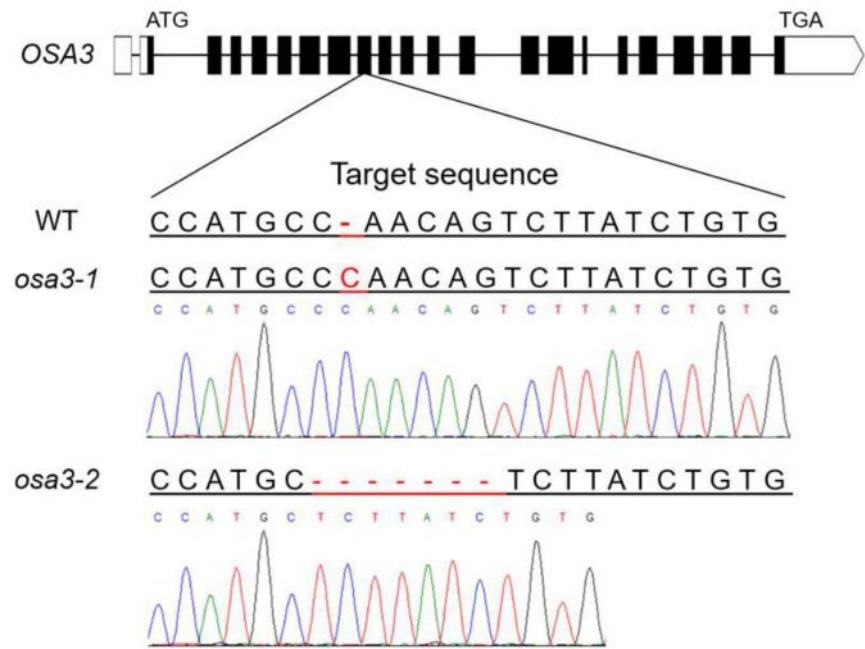


图3

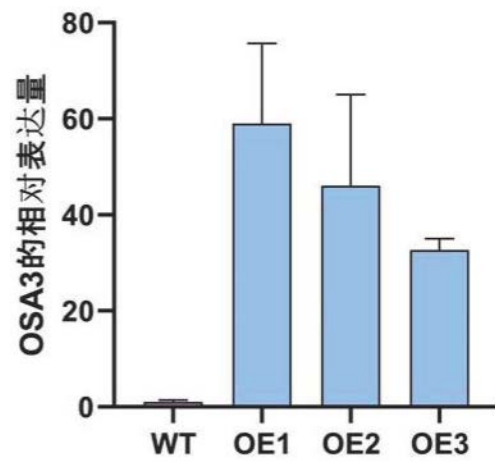


图4

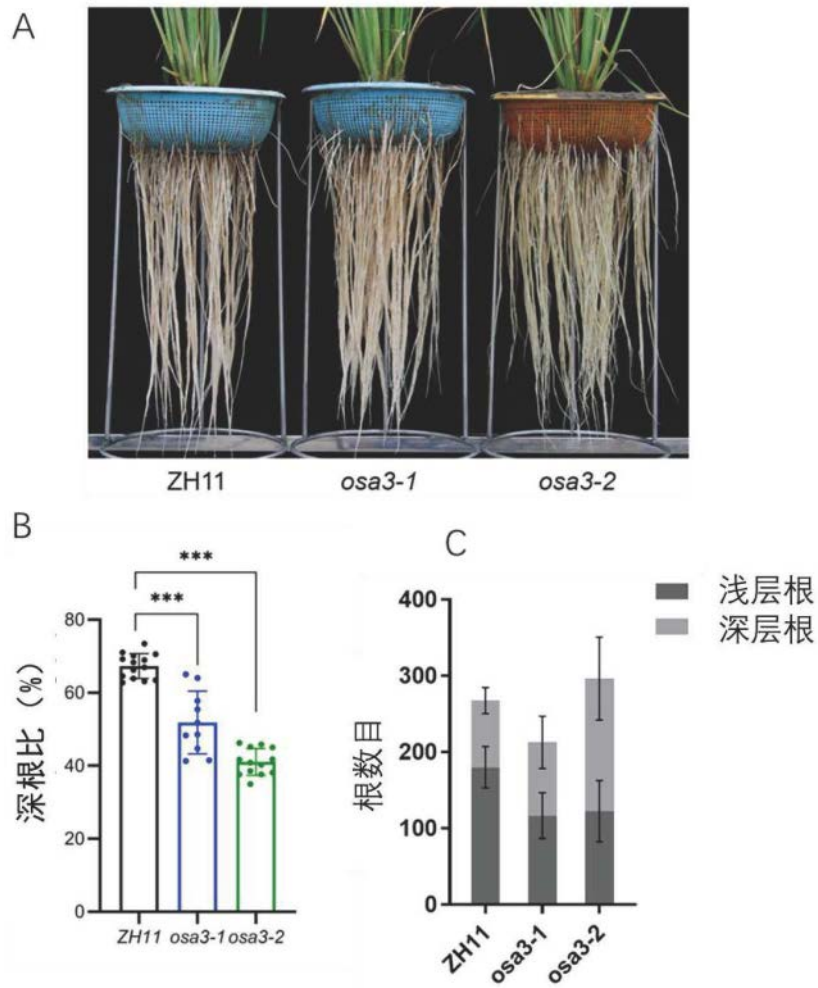


图5

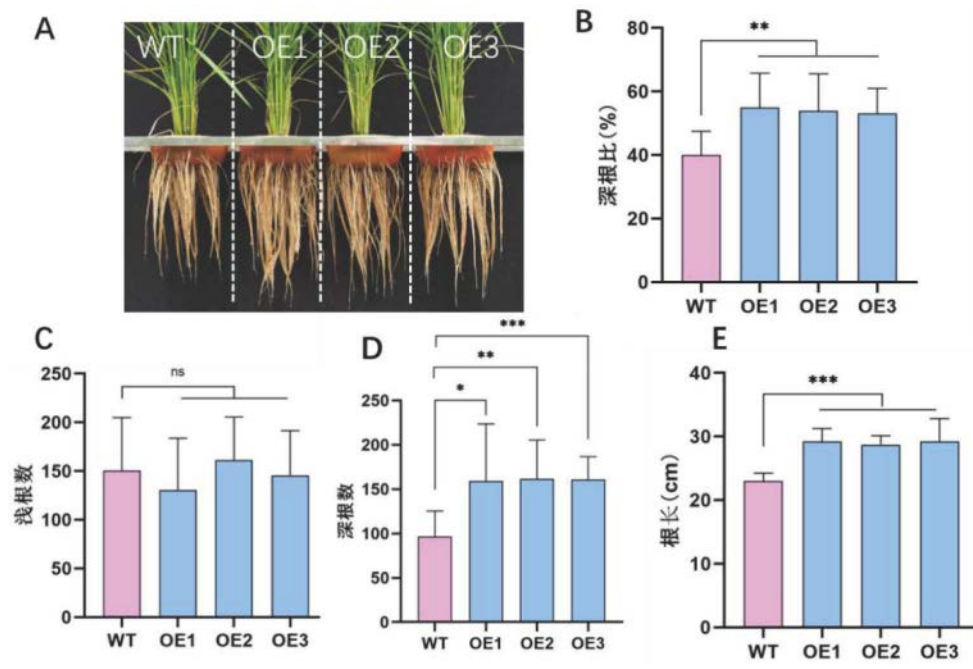


图6