



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116947988 A

(43) 申请公布日 2023. 10. 27

(21) 申请号 202211434185.8

(22) 申请日 2022.11.16

(71) 申请人 中国农业科学院生物技术研究所
地址 100081 北京市海淀区中关村南大街
12号中国农业科学院生物技术研究所

(72) 发明人 宗娜 赵军

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245
专利代理师 张立娜

(51) Int. Cl.

C07K 14/415 (2006.01)

C12N 15/29 (2006.01)

A01H 5/10 (2018.01)

A01H 6/46 (2018.01)

权利要求书3页 说明书7页
序列表(电子公布) 附图3页

(54) 发明名称

ZmECT2蛋白及其编码基因在调控玉米籽粒品质中的应用

(57) 摘要

本发明公开了ZmECT2蛋白及其编码基因在调控玉米籽粒品质中的应用。本发明提供了ZmECT2蛋白或其相关生物材料(表达ZmECT2蛋白的核酸分子或含所述核酸分子的表达盒、重组载体、重组微生物或转基因细胞系)的下述应用:调控植物籽粒品质、调控植物籽粒蛋白含量和/或淀粉含量;所述ZmECT2蛋白为SEQ ID No.1或其经过一个或几个氨基酸的取代、缺失和/或添加或与其相比具80%以上同一性且源于水稻具相同功能的蛋白或在其N端和/或C端连接标签后所得融合蛋白。本发明ZmECT2可以调控植物籽粒品质,包括调控籽粒蛋白含量和淀粉含量。本发明对于通过遗传育种和基因工程方法利用该基因资源有效地调控植物籽粒品质具有重要的应用价值。

1. ZmECT2蛋白或其相关生物材料的下述任一应用;

P1、调控植物籽粒品质;

P2、调控植物籽粒蛋白含量;

P3、调控植物籽粒淀粉含量;

所述ZmECT2蛋白为如下任一:

(A1)氨基酸序列为SEQ ID No.1的蛋白质;

(A2)将SEQ ID No.1所示的氨基酸序列经过一个或几个氨基酸残基的取代和/或缺失和/或添加且来源于水稻具有相同功能的蛋白质;

(A3)与(A1) - (A2)中任一所限定的氨基酸序列具有99%以上、95%以上、90%以上、85%以上或者80%以上同一性且来源于水稻具有相同功能的蛋白质;

(A4)在(A1) - (A3)中任一所限定的蛋白质的N端和/或C端连接蛋白标签后得到的融合蛋白;

所述相关生物材料为能够表达所述ZmECT2蛋白的核酸分子,或含有所述核酸分子的表达盒、重组载体、重组微生物或转基因细胞系。

2.根据权利要求1所述的应用,其特征在于:在所述植物中,所述ZmECT2蛋白的表达量和/或活性降低,所述植物籽粒蛋白含量升高和/或所述植物籽粒淀粉含量降低;和/或

在所述植物中,所述ZmECT2蛋白的表达量和/或活性提高,所述植物籽粒蛋白含量降低和/或所述植物籽粒淀粉含量升高。

3.能够使植物中ZmECT2蛋白的表达量和/或活性降低的物质在(a1)和/或(a2)中的应用:

(a1)提高所述植物籽粒蛋白含量;

(a2)降低所述植物籽粒淀粉含量;

所述ZmECT2蛋白为如下任一:

(A1)氨基酸序列为SEQ ID No.1的蛋白质;

(A2)将SEQ ID No.1所示的氨基酸序列经过一个或几个氨基酸残基的取代和/或缺失和/或添加且来源于水稻具有相同功能的蛋白质;

(A3)与(A1) - (A2)中任一所限定的氨基酸序列具有99%以上、95%以上、90%以上、85%以上或者80%以上同一性且来源于水稻具有相同功能的蛋白质;

(A4)在(A1) - (A3)中任一所限定的蛋白质的N端和/或C端连接蛋白标签后得到的融合蛋白。

4.能够使植物中ZmECT2蛋白的表达量和/或活性提高的物质在(b1)和/或(b2)中的应用:

(b1)降低所述植物籽粒蛋白含量;

(b2)提高所述植物籽粒淀粉含量;

所述ZmECT2蛋白为如下任一:

(A1)氨基酸序列为SEQ ID No.1的蛋白质;

(A2)将SEQ ID No.1所示的氨基酸序列经过一个或几个氨基酸残基的取代和/或缺失和/或添加且来源于水稻具有相同功能的蛋白质;

(A3)与(A1) - (A2)中任一所限定的氨基酸序列具有99%以上、95%以上、90%以上、

85%以上或者80%以上同一性且来源于水稻具有相同功能的蛋白质；

(A4) 在(A1) - (A3)中任一所限定的蛋白质的N端和/或C端连接蛋白标签后得到的融合蛋白。

5. 一种植物培育方法,为如下方法I或方法II:

方法I:一种培育籽粒蛋白含量升高和/或籽粒淀粉含量降低的植物的方法,包括使受体植物中ZmECT2蛋白的表达量和/或活性降低的步骤;

方法II:一种培育籽粒蛋白含量降低和/或籽粒淀粉含量升高的植物的方法,包括使受体植物中ZmECT2蛋白的表达量和/或活性升高的步骤;

所述ZmECT2蛋白为如下任一:

(A1) 氨基酸序列为SEQ ID No.1的蛋白质;

(A2) 将SEQ ID No.1所示的氨基酸序列经过一个或几个氨基酸残基的取代和/或缺失和/或添加且来源于水稻具有相同功能的蛋白质;

(A3) 与(A1) - (A2)中任一所限定的氨基酸序列具有99%以上、95%以上、90%以上、85%以上或者80%以上同一性且来源于水稻具有相同功能的蛋白质;

(A4) 在(A1) - (A3)中任一所限定的蛋白质的N端和/或C端连接蛋白标签后得到的融合蛋白。

6. 一种培育转基因植物的方法,为如下方法III或方法IV:

方法III:一种培育籽粒蛋白含量升高和/或籽粒淀粉含量降低的转基因植物的方法,包括如下步骤:对受体植物中能够表达ZmECT2蛋白的核酸分子进行抑制表达,得到转基因植物;所述转基因植物与所述受体植物相比籽粒蛋白含量升高和/或籽粒淀粉含量降低;

方法IV:一种培育籽粒蛋白含量降低和/或籽粒淀粉含量升高的转基因植物的方法,可包括如下步骤:向受体植物中导入能够表达ZmECT2蛋白的核酸分子,得到转基因植物;所述转基因植物与所述受体植物相比籽粒蛋白含量降低和/或籽粒淀粉含量升高;

所述ZmECT2蛋白为如下任一:

(A1) 氨基酸序列为SEQ ID No.1的蛋白质;

(A2) 将SEQ ID No.1所示的氨基酸序列经过一个或几个氨基酸残基的取代和/或缺失和/或添加且来源于水稻具有相同功能的蛋白质;

(A3) 与(A1) - (A2)中任一所限定的氨基酸序列具有99%以上、95%以上、90%以上、85%以上或者80%以上同一性且来源于水稻具有相同功能的蛋白质;

(A4) 在(A1) - (A3)中任一所限定的蛋白质的N端和/或C端连接蛋白标签后得到的融合蛋白。

7. 根据权利要求6所述的方法,其特征在于:在方法III中,对所述受体植物中能够表达所述ZmECT2蛋白的核酸分子进行抑制表达是通过基因编辑技术实现的;

进一步地,所述基因编辑技术为CRISPR-Cas9,采用的sgRNA序列如SEQ ID No.3所示;

和/或

在方法IV中,能够表达所述ZmECT2蛋白的核酸分子是以重组载体的形式导入所述受体植物中的;

进一步地,所述重组载体中启动所述核酸分子转录的启动子为pUbi启动子。

8. 根据权利要求1-7中任一所述的应用或方法,其特征在于:能够表达所述ZmECT2蛋白

的核酸分子为如下任一：

(B1) SEQ ID No.2所示的DNA分子；

(B2) 在严格条件下与(B1)限定的DNA分子杂交且编码所述ZmECT2蛋白的DNA分子；

(B3) 与(B1) - (B2)中任一限定的DNA序列具有99%以上、95%以上、90%以上、85%以上或者80%以上同源性且编码所述ZmECT2蛋白的DNA分子。

9. 权利要求4-8中任一所述的方法在植物育种中的应用。

10. 根据权利要求1-9中任一所述的应用或方法,其特征在于:所述植物为单子叶植物或双子叶植物;

进一步地,所述单子叶植物为禾本科植物;

更进一步地,所述禾本科植物为玉蜀黍属植物;

更加具体地,所述玉蜀黍属植物为玉米。

ZmECT2蛋白及其编码基因在调控玉米籽粒品质中的应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,具体涉及ZmECT2蛋白及其编码基因在调控玉米籽粒品质中的应用。

背景技术

[0002] 玉米是我国第一大粮食作物,广泛用作粮食、饲料和工业原料,在我国经济和社会发展中发挥重要的粮食安全保障作用。

[0003] 尽管近年来我国研究人员在提高玉米产量上做出了重要的贡献,我国玉米总产获得了很大提高,但对改善玉米品质方面的研究相对较少。比如,玉米质量不优、专用率低,表现在必需氨基酸含量低、营养价值差等,这些品质严重阻碍了饲料业和加工业对国内玉米的需求。

[0004] 因此,提高玉米的品质是保障我国粮食安全的重大需求。

发明内容

[0005] 本发明的目的是提供ZmECT2蛋白及其编码基因在调控玉米籽粒品质中的应用。

[0006] 第一方面,本发明要求保护ZmECT2蛋白或其相关生物材料的下述任一应用;

[0007] P1、调控植物籽粒品质;

[0008] P2、调控植物籽粒蛋白含量;

[0009] P3、调控植物籽粒淀粉含量。

[0010] 其中,所述相关生物材料可为能够表达所述ZmECT2蛋白的核酸分子,或含有所述核酸分子的表达盒、重组载体、重组微生物或转基因细胞系。

[0011] 所述表达盒是指能够在宿主细胞中表达ZmECT2的DNA,该DNA不但可包括启动ZmECT2基因转录的启动子,还可包括终止ZmECT2转录的终止子。进一步,所述表达盒还可包括增强子序列。可用于本发明的启动子包括但不限于:组成型启动子,组织、器官和发育特异的启动子,和诱导型启动子。启动子的例子包括但不限于:泛生素基因Ubiquitin启动子(pUbi);花椰菜花叶病毒的组成型启动子35S;来自西红柿的创伤诱导型启动子,亮氨酸氨基肽酶("LAP",Chao等人(1999)Plant Physiol120:979-992);来自烟草的化学诱导型启动子,发病机理相关1(PR1)(由水杨酸和BTH(苯并噻二唑-7-硫代羟酸S-甲酯)诱导);西红柿蛋白酶抑制剂II启动子(PIN2)或LAP启动子(均可用茉莉酮酸甲酯诱导);热休克启动子(美国专利5,187,267);四环素诱导型启动子(美国专利5,057,422);种子特异性启动子,如谷子种子特异性启动子pF128(CN101063139B(中国专利2007 1 0099169.7)),种子贮存蛋白质特异的启动子(例如,菜豆球蛋白、napin,oleosin和大豆beta conglycin的启动子(Beachy等人(1985)EMBO J.4:3047-3053))。它们可单独使用或与其它的植物启动子结合使用。此处引用的所有参考文献均全文引用。合适的转录终止子包括但不限于:农杆菌胭脂碱合成酶终止子(NOS终止子)、花椰菜花叶病毒CaMV 35S终止子、tml终止子、豌豆rbcS E9终止子和胭脂氨酸和章鱼氨酸合酶终止子(参见,例如:Ode11等人(I985)Nature 313:810;

Rosenberg等人(1987)Gene,56:125;Guerineau等人(1991)Mol.Gen.Genet,262:141; Proudfoot(1991)Cell,64:671;Sanfacon等人Genes Dev.,5:141;Mogen等人(1990)Plant Cell,2:1261;Munroe等人(1990)Gene,91:151;Ballad等人(1989)Nucleic Acids Res.17:7891;Joshi等人(1987)Nucleic Acid Res.,15:9627)。

[0012] 构建含有所述ZmECT2基因表达盒的重组表达载体。所利用的植物表达载体可为二元农杆菌载体或Gateway系统载体等,如pBin438、pCAMBIA1302、pCAMBIA2301、pCAMBIA1301、pCAMBIA1300、pBI121、pGWB411、pGWB412、pGWB405、pCAMBIA1391-Xa或pCAMBIA1391-Xb。使用ZmECT2构建重组表达载体时,在其转录起始核苷酸前可加上任何一种增强型、组成型、组织特异型或诱导型启动子,如花椰菜花叶病毒(CAMV)35S启动子、泛素基因Ubiquitin启动子(pUbi)等,它们可单独使用或与其它的植物启动子结合使用;此外,使用本发明的基因构建植物表达载体时,还可使用增强子,包括翻译增强子或转录增强子,这些增强子区域可以是ATG起始密码子或邻接区域起始密码子等,但必需与编码序列的阅读框相同,以保证整个序列的正确翻译。所述翻译控制信号和起始密码子的来源是广泛的,可以是天然的,也可以是合成的。翻译起始区域可以来自转录起始区域或结构基因。

[0013] 为了便于对转基因植物细胞或植物进行鉴定及筛选,可对所用植物表达载体进行加工,如加入可在植物中表达的编码可产生颜色变化的酶或发光化合物的基因(GUS基因、萤光素酶基因等)、具有抗性的抗生素标记物(庆大霉素标记物、卡那霉素标记物等)或是抗化学试剂标记基因(如抗除草剂基因)等。

[0014] 上述应用中,所述载体可为质粒、黏粒、噬菌体或病毒载体。

[0015] 上述应用中,所述微生物可为酵母、细菌、藻或真菌。其中细菌可来自埃希氏菌属(Escherichia),欧文氏菌(Erwinia),根癌农杆菌属(Agrobacterium)(如根癌农杆菌EHA105),黄杆菌属(Flavobacterium),产碱菌属(Alcaligenes),假单胞菌属(Pseudomonas),芽胞杆菌属(Bacillus)等。

[0016] 所述ZmECT2蛋白可为如下任一:

[0017] (A1)氨基酸序列为SEQ ID No.1的蛋白质;

[0018] (A2)将SEQ ID No.1所示的氨基酸序列经过一个或几个氨基酸残基的取代和/或缺失和/或添加且来源于水稻具有相同功能的蛋白质;

[0019] (A3)与(A1)-(A2)中任一所限定的氨基酸序列具有99%以上、95%以上、90%以上、85%以上或者80%以上同一性且来源于水稻具有相同功能的蛋白质;

[0020] (A4)在(A1)-(A3)中任一所限定的蛋白质的N端和/或C端连接蛋白标签后得到的融合蛋白。

[0021] 上述蛋白质中,所述蛋白标签(protein-tag)是指利用DNA体外重组技术,与目的蛋白一起融合表达的一种多肽或者蛋白,以便于目的蛋白的表达、检测、示踪和/或纯化。所述蛋白标签可为Flag标签、His标签、MBP标签、HA标签、myc标签、GST标签和/或SUMO标签等。

[0022] 上述蛋白质中,同一性是指氨基酸序列的同一性。可使用国际互联网上的同源性检索站点测定氨基酸序列的同一性,如NCBI主页网站的BLAST网页。例如,可在高级BLAST2.1中,通过使用blastp作为程序,将Expect值设置为10,将所有Filter设置为OFF,使用BLOSUM62作为Matrix,将Gap existence cost,Per residue gap cost和Lambda ratio分别设置为11,1和0.85(缺省值)并进行检索一对氨基酸序列的同一性进行计算,然后即可

获得同一性的值(%)。

[0023] 上述蛋白质中,所述95%以上的同源性可为至少96%、97%、98%的同一性。所述90%以上的同源性可为至少91%、92%、93%、94%的同一性。所述85%以上的同源性可为至少86%、87%、88%、89%的同一性。所述80%以上的同源性可为至少81%、82%、83%、84%的同一性。

[0024] 在所述植物中,所述ZmECT2蛋白的表达量和/或活性降低,所述植物籽粒蛋白含量升高和/或所述植物籽粒淀粉含量降低。所述ZmECT2蛋白的表达量和/或活性提高,所述植物籽粒蛋白含量降低和/或所述植物籽粒淀粉含量升高。

[0025] 第二方面,本发明要求保护能够使植物中ZmECT2蛋白的表达量和/或活性降低的物质在(a1)和/或(a2)中的应用:

[0026] (a1)提高所述植物籽粒蛋白含量;

[0027] (a2)降低所述植物籽粒淀粉含量。

[0028] 所述ZmECT2蛋白可为前文(A1) - (A4)中任一所示蛋白质。

[0029] 第三方面,本发明要求保护能够使植物中ZmECT2蛋白的表达量和/或活性提高的物质在(b1)和/或(b2)中的应用:

[0030] (b1)降低所述植物籽粒蛋白含量;

[0031] (b2)提高所述植物籽粒淀粉含量。

[0032] 所述ZmECT2蛋白可为前文(A1) - (A4)中任一所示蛋白质。

[0033] 第四方面,本发明要求保护一种植物培育方法。

[0034] 本发明要求保护的植物培育方法,为如下方法I或方法II:

[0035] 方法I:一种培育籽粒蛋白含量升高和/或籽粒淀粉含量降低的植物的方法(或者称为“一种提高植物籽粒蛋白含量和/或降低植物籽粒淀粉含量的方法”),可包括使受体植物中ZmECT2蛋白的表达量和/或活性降低的步骤。

[0036] 方法II:一种培育籽粒蛋白含量降低和/或籽粒淀粉含量升高的植物的方法(或者称为“一种降低植物籽粒蛋白含量和/或提高植物籽粒淀粉含量的方法”),可包括使受体植物中ZmECT2蛋白的表达量和/或活性升高的步骤。

[0037] 所述ZmECT2蛋白可为前文(A1) - (A4)中任一所示蛋白质。

[0038] 所述方法可以通过杂交手段实现,也可以通过转基因手段实现。

[0039] 第五方面,本发明要求保护一种培育转基因植物的方法。

[0040] 本发明要求保护的培育转基因植物的方法,可为如下方法III或方法IV:

[0041] 方法III:一种培育籽粒蛋白含量升高和/或籽粒淀粉含量降低的转基因植物的方法,可包括如下步骤:对受体植物中能够表达ZmECT2蛋白的核酸分子进行抑制表达,得到转基因植物;所述转基因植物与所述受体植物相比籽粒蛋白含量升高和/或籽粒淀粉含量降低。

[0042] 方法IV:一种培育籽粒蛋白含量降低和/或籽粒淀粉含量升高的转基因植物的方法,可包括如下步骤:向受体植物中导入能够表达ZmECT2蛋白的核酸分子,得到转基因植物;所述转基因植物与所述受体植物相比籽粒蛋白含量降低和/或籽粒淀粉含量升高。

[0043] 所述ZmECT2蛋白可为前文(A1) - (A4)中任一所示蛋白质。

[0044] 进一步地,方法III中,对所述受体植物中能够表达所述ZmECT2蛋白的核酸分子进

行抑制表达可通过任何能够实现这一目的的技术手段实现。如通过基因编辑技术实现,如CRISPR-cas9等。

[0045] 在本发明具体实施方式中,是通过CRISPR-cas9技术实现的,具体采用的sgRNA序列如SEQ ID No.3所示。

[0046] 进一步地,方法IV中,能够表达所述ZmECT2蛋白的核酸分子可以重组载体的形式导入所述受体植物中。

[0047] 在本发明的具体实施方式中,所述重组载体中启动所述核酸分子转录的启动子为pUbi启动子。所述重组载体具体为pCAMBIA3301-UBI-ZmECT2。原始骨架载体为pCAMBIA3301,包含目的基因长度为1914bp的ZmECT2 CDS序列,启动子为玉米Ubi启动子,终止子为胭脂碱合成酶基因NOS终止子,载体中还包含来源于吸水链霉菌的膦丝菌素乙酰转移酶基因bar,能够赋予植物草铵膦抗性,其启动子为35s启动子,终止子为35S终止子。

[0048] 在上述方法中,将基于CRISPR-cas9的编辑载体或者用于过表达的所述重组载体导入所述受体植物,具体可为:通过使用Ti质粒、Ri质粒、植物病毒载体、直接DNA转化、显微注射、电导、农杆菌介导等常规生物学方法转化植物细胞或组织,并将转化的植物组织培育成植株。

[0049] 上述方法中,所述转基因植物理解为不仅包含第一代到第二代转基因植物,也包括其子代。对于转基因植物,可以在该物种中繁殖该基因,也可用常规育种技术将该基因转移进入相同物种的其它品种,特别包括商业品种中。所述转基因植物包括种子、愈伤组织、完整植株和细胞。

[0050] 在上述各方面中,所述核酸分子可以是DNA,如cDNA、基因组DNA或重组DNA;所述核酸分子也可以是RNA,如mRNA等。

[0051] 进一步地,能够表达所述ZmECT2蛋白的核酸分子可为如下任一:

[0052] (B1) SEQ ID No.2所示的DNA分子;

[0053] (B2) 在严格条件下与(B1)限定的DNA分子杂交且编码所述ZmECT2蛋白的DNA分子;

[0054] (B3) 与(B1) - (B2)中任一限定的DNA序列具有99%以上、95%以上、90%以上、85%以上或者80%以上同源性且编码所述ZmECT2蛋白的DNA分子。

[0055] 上述核酸分子中,所述严格条件可为如下:50℃,在7%十二烷基硫酸钠(SDS)、0.5M Na₃PO₄和1mM EDTA的混合溶液中杂交,在50℃,2×SSC,0.1% SDS中漂洗;还可为:50℃,在7%SDS、0.5M Na₃PO₄和1mM EDTA的混合溶液中杂交,在50℃,1×SSC,0.1% SDS中漂洗;还可为:50℃,在7%SDS、0.5M Na₃PO₄和1mM EDTA的混合溶液中杂交,在50℃,0.5×SSC,0.1% SDS中漂洗;还可为:50℃,在7%SDS、0.5MNa₃PO₄和1mM EDTA的混合溶液中杂交,在50℃,0.1×SSC,0.1% SDS中漂洗;还可为:50℃,在7%SDS、0.5M Na₃PO₄和1mM EDTA的混合溶液中杂交,在65℃,0.1×SSC,0.1% SDS中漂洗;也可为:在6×SSC,0.5% SDS的溶液中,在65℃下杂交,然后用2×SSC,0.1% SDS和1×SSC,0.1% SDS各洗膜一次。

[0056] 上述核酸分子中,同源性是指核苷酸序列的同一性。可使用国际互联网上的同源性检索站点测定核苷酸序列的同一性,如NCBI主页网站的BLAST网页。例如,可在高级BLAST2.1中,通过使用blastp作为程序,将Expect值设置为10,将所有Filter设置为OFF,使用BLOSUM62作为Matrix,将Gap existence cost,Per residue gap cost和Lambda ratio分别设置为11,1和0.85(缺省值)并进行检索一对核苷酸序列的同一性进行计算,然后即可

获得同一性的值(%)。

[0057] 上述核酸分子中,所述95%以上的同源性可为至少96%、97%、98%的同一性。所述90%以上的同源性可为至少91%、92%、93%、94%的同一性。所述85%以上的同源性可为至少86%、87%、88%、89%的同一性。所述80%以上的同源性可为至少81%、82%、83%、84%的同一性。

[0058] 第五方面,本发明要求保护前文第三或第四方面中所述的方法在植物育种中的应用。

[0059] 在上述各方面中,所述植物为单子叶植物或双子叶植物。

[0060] 进一步地,所述植物为禾本科植物。

[0061] 更进一步地,所述植物为玉蜀黍属植物,如玉米。

[0062] 在本发明的具体实施方式中,所述植物具体为玉米自交系C01或玉米自交系KN5585。

[0063] 实验证明,本发明的株型相关蛋白ZmECT2及其编码基因可以调控植物籽粒品质,包括调控籽粒蛋白含量和淀粉含量。抑制ZmECT2编码基因的表达可以显著提高植物籽粒蛋白含量,并且降低籽粒淀粉含量;过表达ZmECT2可以显著降低植物籽粒蛋白含量,并且提高籽粒淀粉含量。证明ZmECT2蛋白及其编码基因在调控植物籽粒品质中发挥重要作用。本发明为提高植物籽粒品质方面的育种提供新的基因资源和育种资源。本发明对于通过遗传育种和基因工程方法利用该基因资源有效地调控植物籽粒品质具有重要的应用价值。

附图说明

[0064] 图1为ZmECT2基因编辑载体图谱和过表达载体图谱。A为ZmECT2基因编辑载体图谱;B为ZmECT2基因过表达载体图谱。

[0065] 图2为ZmECT2基因编辑突变体玉米的鉴定。A为ZmECT2编辑前后核苷酸序列比对。B为ZmECT2编辑前后氨基酸序列比对。

[0066] 图3为ZmECT2基因编辑材料及过表达材料的蛋白质和淀粉含量的比较结果。其中,ZmECT2-1和ZmECT2-2为ZmECT2基因编辑突变体的两个重复;过表达1表示ZmECT2过表达转基因材料1;过表达2表示ZmECT2过表达转基因材料2。图中,*表示差异显著($P<0.01$);**表示差异显著($P<0.001$)。

具体实施方式

[0067] 下面结合具体实施方式对本发明进行进一步的详细描述,给出的实施例仅为了阐明本发明,而不是为了限制本发明的范围。以下提供的实施例可作为本技术领域普通技术人员进行进一步改进的指南,并不以任何方式构成对本发明的限制。

[0068] 下述实施例中的实验方法,如无特殊说明,均为常规方法,按照本领域内的文献所描述的技术或条件或者按照产品说明书进行。下述实施例中所用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。

[0069] 实施例1、ZmECT2蛋白在调控玉米籽粒品质中的应用

[0070] 一、ZmECT2蛋白及其编码基因的克隆

[0071] 从玉米自交系B73的cDNA中扩增得到ZmECT2的编码区序列,如SEQ ID No.2所示。

SEQ ID No.2编码SEQ ID No.1所示蛋白质。

[0072] 二、ZmECT2敲除突变体玉米的构建以及籽粒品质鉴定

[0073] 本发明通过CRISPR-cas9方法构建了以玉米自交系C01为背景的ZmECT2基因的突变体玉米材料,并对籽粒蛋白含量和淀粉含量进行鉴定。

[0074] 1、ZmECT2基因敲除载体的构建

[0075] 根据ZmECT2基因序列,设计sgRNA如下:5'-GGATGTATCTACTATTGGTG-3'(SEQ ID No.3)。

[0076] 然后,按照如下构建ZmECT2基因敲除载体:

[0077] 首先,从玉米基因组中扩增U6启动子,以玉米自交系B73基因组DNA为模板,以:MU61-3F:5'-TGCACTGCACAAGCTGCTGTTTTTGTAGCCCCATCG-3'和MU61-1R:5'-AATTCGGTGCTTGCGGTC-3'为引物扩增U6启动子。接着,以CPB载体(记载于“Li C,Liu C,Qi X,Wu Y,Fei X,Mao L,Cheng B,Li X,Xie C.RNA-guided Cas9 as an in vivo desired-target mutator in maize.Plant Biotechnol J.2017Dec;15(12):1566-1576.doi:10.1111/pbi.12739.Epub 2017May 12.PMID:28379609;PMCID:PMC5698053.”一文公众可从申请人处获得,仅可用于重复本发明实验使用,不得他用)DNA为模板,以MUsgR-ZmECT1F:5'-GAGCCGCAAGCACCGAATTGGATGTATCTACTATTGGTGGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTT-3'和MUsgR-2R:5'-GGCCAGTGCCAAGCTTAAAAAGCACCGACTCG-3'为引物扩增sgRNA。将扩增的U6启动子和sgRNA产物作为模版,用MU61-3F和MUsgR-2R为引物扩增,将U6启动子和sgRNA通过overlap PCR融合在一起,融合片段命名为U6 promoter-sgRNA.pCAMBIA3301(<http://www.cambia.org>)用HindIII酶切回收,然后用infusion酶将U6 promoter-sgRNA连接到载体上,并进行测序验证,将经测序验证正确的重组质粒命名为CPB-ZmECT2。

[0078] 最终经测序验证正确后得到的ZmECT2基因敲除载体CPB-ZmECT2的图谱如图1中A所示,该载体大小为16.973Kb。外源基因包括Cas9基因和sgRNA,载体骨架上带有ZmU6启动子和UBI启动子,终止子是Nos。标记基因为bar,无报告基因。

[0079] 2、ZmECT2敲除突变体玉米的构建

[0080] 通过农杆菌介导转化愈伤组织法,将步骤1构建的ZmECT2基因敲除载体转化玉米自交系C01。获得一个基因编辑突变体,靶基因ZmECT2编辑后的全长编码区核苷酸序列如SEQ ID No.4所示,ZmECT2编辑后导致翻译提前终止,产生的氨基酸序列如SEQ ID No.5所示,ZmECT2编辑前后核苷酸序列比对,编辑后插入一个A(如图2中A所示)。ZmECT2编辑前后氨基酸序列比对,编辑后将第177、178和179位的甘氨酸、缬氨酸、天冬氨酸和谷氨酸分别突变为谷氨酸、半胱氨酸、甘氨酸和终止密码子(如图2中B所示),ZmECT2提前终止。

[0081] 实验同时设置了向玉米自交系C01中导入CPB载体的空载对照。

[0082] 3、测定ZmECT2敲除突变体玉米的籽粒蛋白质和淀粉含量

[0083] 玉米籽粒的蛋白质和淀粉含量采用FUSS近红外光谱仪(InfratecTM1241 GrainAnalyzer)测定。将仪器主菜单中的玉米测量模式打开,将100-200粒玉米籽粒盛于样品池中,设定为每次测量扫描十次,同时为消除样品粒度大小,均匀性不一致等因素对光谱的影响,每个样品均重复测量三次,结果取平均值。蛋白质并用凯氏定氮方法验证蛋白质含量。

[0084] 结果如图3所示,与未转基因的对照C01相比,ZmECT2敲除突变体玉米籽粒的蛋白

质含量显著提高,淀粉含量显著降低(*代表 $P<0.01$,**代表 $P<0.001$)。另外,空载对照的结果与C01相比基本一致,无统计学差异。

[0085] 三、ZmECT2过表达玉米的构建以及籽粒品质鉴定

[0086] 1、过表达载体的构建

[0087] 从玉米籽粒cDNA中用引物Fragment.FOR:5'-tgatgataaaggatcGATGGCGGCTGTAGG-3'和Fragment.REV:5'-caccgagctcaagctTTAACAGCCATTTAGACCCGC-3'扩增ZmECT2编码区,回收扩增片段,用BamHI和HindIII酶切pCAMBIA3301-ubi(该载体为将pCAMBIA3301载体中的35S启动子替换为UBI启动子后得到的重组载体,pCAMBIA3301载体记载于Li JT,YuG,Sun XH,Jia CG,Du Q,Li QY,Pan HY.Modification of vectors for functional genomic analysis in plants.Genet Mol Res.2014Sep 26;13(3):7815-25.doi:10.4238/2014.September.26.20.PMID:25299096.),回收大片段,然后将回收的PCR产物和pCAMBIA3301-ubi的酶切产物用infusion酶连接。连接产物转化大肠杆菌,PCR鉴定阳性菌落,测序验证,经测序验证正确的重组质粒即为ZmECT2过表达载体,命名为pCAMBIA3301-UBI-ZmECT2(质粒图谱见图1中B)。pCAMBIA3301-UBI-ZmECT2的结构描述为:将SEQ ID No.2所示DNA片段克隆入pCAMBIA3301-ubi载体的酶切位点BamHI和HindIII之间后得到的重组质粒。

[0088] 2、ZmECT2过表达玉米的构建

[0089] 玉米转化方法采用农杆菌介导的幼胚转化方法,参考Ishida Y et al.,1996Nat Biotechnol.14(6):745-750。将步骤1构建得到的ZmECT2过表达载体pCAMBIA3301-UBI-ZmECT2导入玉米自交系KN5585。

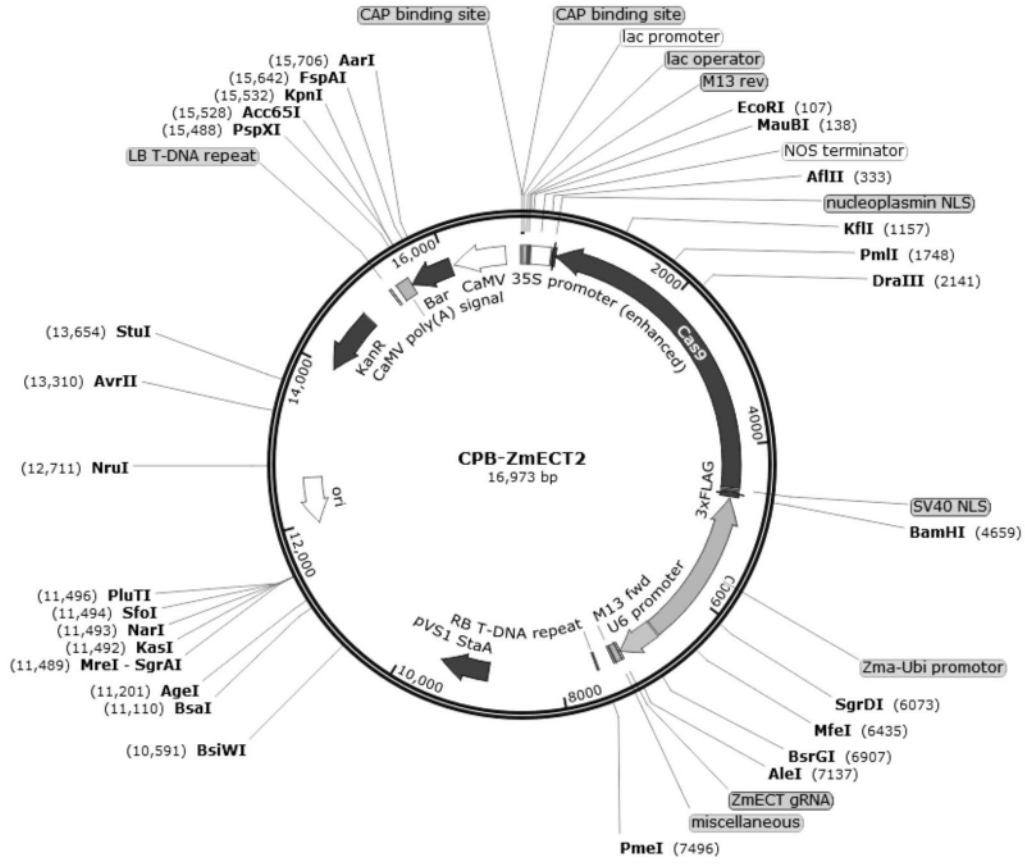
[0090] 实验同时设置了向玉米自交系KN5588中导入pCAMBIA3301-ubi的空载对照。

[0091] 3、测定ZmECT2过表达玉米的籽粒蛋白质和淀粉含量

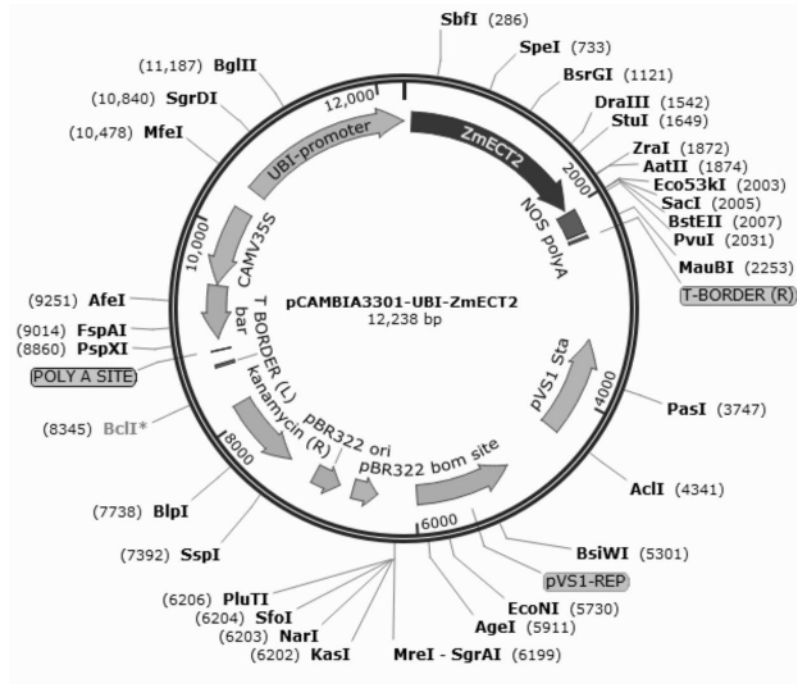
[0092] 玉米籽粒的蛋白质和淀粉含量采用FUSS近红外光谱仪(InfratecTM1241 Grain Analyzer)测定。将仪器主菜单中的玉米测量模式打开,将100-200粒玉米籽粒盛于样品池中,设定为每次测量扫描十次,同时为消除样品粒度大小,均匀性不一致等因素对光谱的影响,每个样品均重复测量三次,结果取平均值。

[0093] 结果显示:与玉米自交系KN5585相比,ZmECT2过表达的转基因玉米材料的籽粒淀粉含量升高,而蛋白质含量降低(*代表 $P<0.01$,**代表 $P<0.001$,T-test)。结果如图3所示。另外,空载对照的结果与KN5585相比基本一致,无统计学差异。

[0094] 以上对本发明进行了详述。对于本领域技术人员来说,在不脱离本发明的宗旨和范围,以及无需进行不必要的实验情况下,可在等同参数、浓度和条件下,在较宽范围内实施本发明。虽然本发明给出了特殊的实施例,应该理解为,可以对本发明作进一步的改进。总之,按本发明的原理,本申请欲包括任何变更、用途或对本发明的改进,包括脱离了本申请中已公开范围,而用本领域已知的常规技术进行的改变。按以下附带的权利要求的范围,可以进行一些基本特征的应用。



A



B

图1



A

编辑后	121	APYGVATMGHDGQIYGSQNYQYPSTYTKQQNSTAKLSSNGISEKLTAPQTDVSTI	ECG*	180
编辑前	121	APYGVATMGHDGQIYGSQNYQYPSTYTKQQNSTAKLSSNGISEKLTAPQTDVSTI	GVDE	180

B

图2

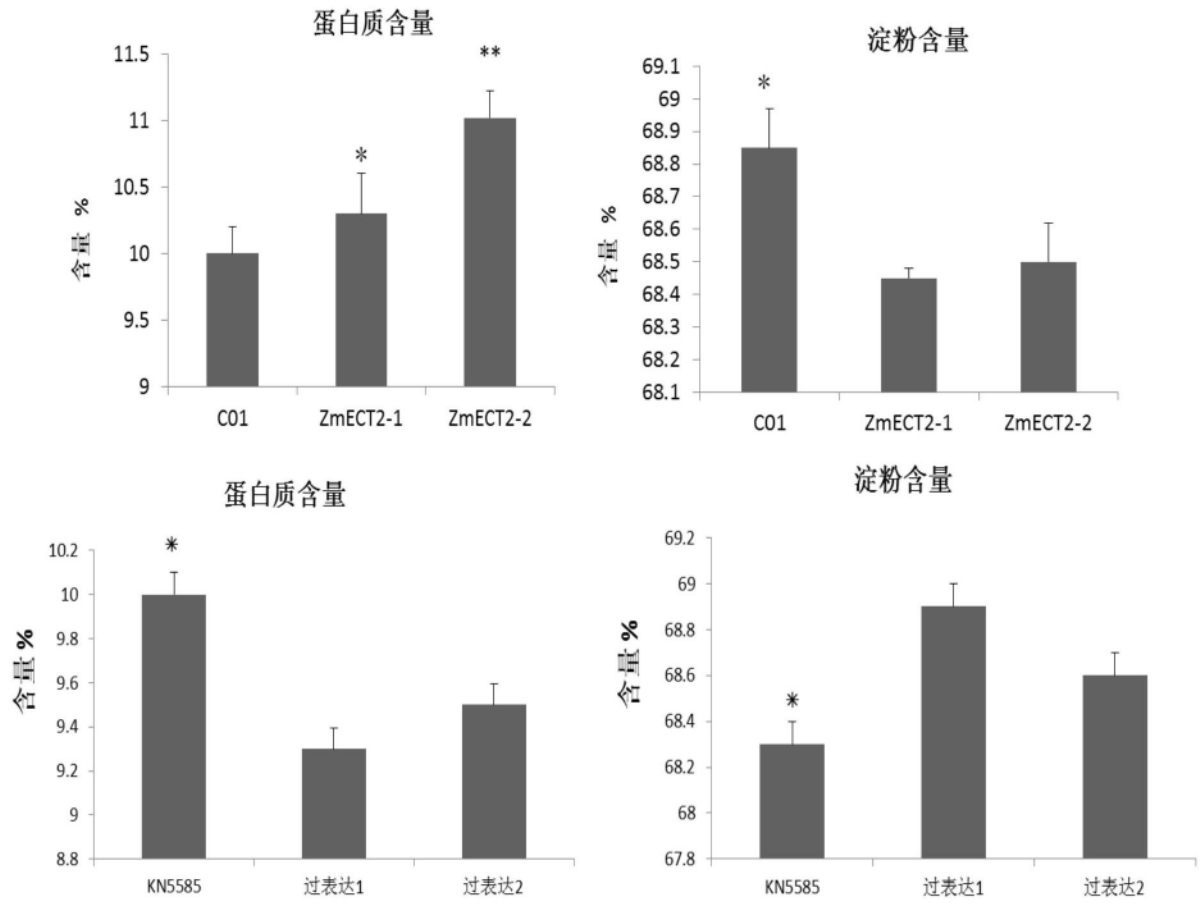


图3