



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 111549041 B

(45) 授权公告日 2022. 07. 08

(21) 申请号 202010321272.7

A01H 5/06 (2018.01)

(22) 申请日 2020.04.22

A01H 6/20 (2018.01)

C12Q 1/6895 (2018.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 111549041 A

(56) 对比文件

WO 2010101884 A1, 2010.09.10

CN 104093842 A, 2014.10.08

CN 103173463 A, 2013.06.26

CN 1488642 A, 2004.04.14

CN 110753703 A, 2020.02.04

Totoki, Y. 等. 登录号AK227159.1:

Arabidopsis thaliana mRNA for anthranilate N-benzoyltransferase - like protein, complete cds, clone: RAFL09-86-017.《GenBank数据库》.2006,

(43) 申请公布日 2020.08.18

(73) 专利权人 青岛农业大学

地址 266000 山东省青岛市城阳区长城路700号

审查员 邢云龙

(72) 发明人 马倩 金尚卉

(74) 专利代理机构 青岛合创知识产权代理事务

所(普通合伙) 37264

专利代理师 王晓晓

权利要求书1页 说明书9页

序列表3页 附图14页

(51) Int. Cl.

C12N 15/54 (2006.01)

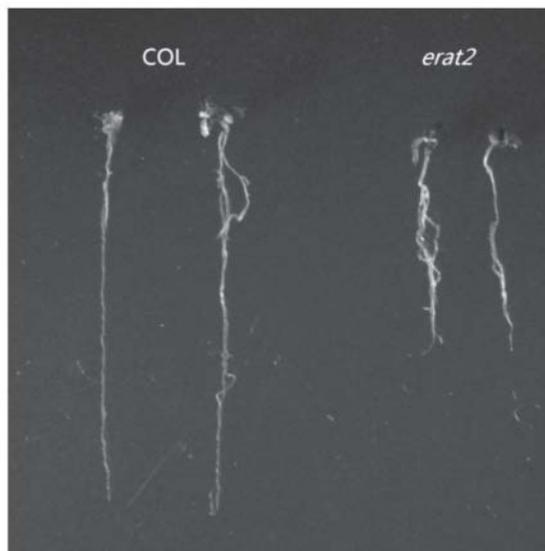
C12N 15/82 (2006.01)

(54) 发明名称

一种乙烯诱导BAHD酰基转移酶ERAT2基因及其应用

(57) 摘要

本发明提供了一种乙烯诱导的BAHD酰基转移酶ERAT2基因及其应用。所述乙烯诱导的BAHD酰基转移酶ERAT2基因的核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示。本发明构建了ERAT2基因的CRISPR-Cas9基因敲除载体,并获得了ERAT2基因的CRISPR-Cas9基因敲除株系,该株系在干旱胁迫和盐胁迫的条件下,野生型株系相比种子的发芽率降低,幼苗的根长变短;并且ERAT2基因的RNAi基因敲除株系能够参与合成多种脂质类物质溶血磷脂酰胆碱,本发明的技术方案为植物中对溶血磷脂酰胆碱的生物合成和抗渗透胁迫育种提供了理论依据和实验基础。



1. 乙烯诱导BAHD酰基转移酶ERAT2基因在参与植物渗透胁迫响应中的应用,其特征在于,所述ERAT2基因的核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示;所述ERAT2基因的表达受乙烯的诱导调控;所述植物渗透胁迫是盐胁迫和干旱胁迫。

2. 乙烯诱导BAHD酰基转移酶ERAT2基因在参与植物溶血磷脂酰胆碱的生物合成中的应用,其特征在于,所述ERAT2基因的核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示,所述植物为拟南芥。

3. 根据权利要求2所述的应用,其特征在于,所述ERAT2基因的CRISPR-Cas9基因敲除株系能够合成脂质类物质溶血磷脂酰胆碱。

一种乙烯诱导BAHD酰基转移酶ERAT2基因及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物基因工程领域,具体涉及一种乙烯诱导BAHD酰基转移酶ERAT2基因及其应用。

背景技术

[0002] 乙烯是一种气态的植物激素,广泛参与植物的种子萌发、器官衰老、果实成熟、叶片脱落及对逆境和病原菌侵染的反应等过程。拟南芥是植物激素分子生物学的模式作物,很多植物激素的信号转导途径都是通过对拟南芥的研究来阐明的,这其中也包括乙烯信号转导途径。在拟南芥的乙烯信号转导途径中,植物体内合成的乙烯首先与位于内质网和高尔基体上的乙烯受体结合,正常情况下,乙烯受体与CTR1蛋白结合,协同负调控下游的乙烯反应,从而抑制下游的信号转导和相应基因的表达。当乙烯与其受体结合后,乙烯受体的蛋白质构象发生改变,乙烯受体与CTR1的结合受到抑制后,乙烯受体与下游的正调控因子EIN2结合,从而激活EIN2蛋白。激活后的EIN2蛋白在S645位点发生去磷酸化后,其C端被剪切下来,进入细胞核并且激活下游的EIN3/EILs转录因子,进而导致AP2/ERFs等一系列生长和抗逆等相关基因的表达。尽管目前针对乙烯的信号转导途径的研究较多,但却没有任何有关于乙烯参与酰基转移酶基因表达及调控功能的报道被公开。

发明内容

[0003] 本发明提供了一种乙烯诱导的BAHD酰基转移酶ERAT2基因及其应用。本发明通过多种实验的综合分析获得一种能够编码BAHD酰基转移酶的新基因ERAT2(基因编号为AT5G01210),并通过实验验证了其参与对植物溶血磷脂酰胆碱物质的生物合成和渗透胁迫响应的功能。

[0004] 为达到解决上述生产问题的目的,本发明采用以下技术方案予以实现:

[0005] 本发明提供了一种乙烯诱导BAHD酰基转移酶ERAT2基因,所述ERAT2基因的核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示。

[0006] 进一步的,所述ERAT2基因的表达受乙烯的诱导调控,并且位于乙烯信号通路的下游。

[0007] 进一步的,所述ERAT2基因在多种组织器官中发挥功能,不存在组织特异性。

[0008] 进一步的,所述ERAT2基因具有参与植物渗透胁迫响应的功能。

[0009] 进一步的,所述ERAT2基因具有参与植物溶血磷脂酰胆碱物质的生物合成的功能。

[0010] 进一步的,所述ERAT2基因的表达能够受到干旱胁迫和盐胁迫的影响。

[0011] 进一步的,所述ERAT2基因的表达能够影响植株幼苗对逆境的敏感度。

[0012] 本发明还提供了一种ERAT2基因的基因敲除载体,所述基因敲除载体为CRISPR-Cas9,其中含有如SEQ ID NO.1所示的ERAT2基因。

[0013] 本发明还提供了一种erat2突变体,所述erat2突变体含有如SEQ ID NO.1所示的ERAT2基因。

[0014] 本发明还提供了乙烯诱导BAHD酰基转移酶ERAT2基因在参与植物渗透胁迫中响应的应用。

[0015] 进一步的,在渗透胁迫条件下,ERAT2基因的CRISPR-Cas9基因敲除株系与野生型株系相比种子发芽率降低。

[0016] 进一步的,在渗透胁迫条件下,ERAT2基因的CRISPR-Cas9基因敲除株系的幼苗与野生型株系相比根长变短。

[0017] 进一步的,所述ERAT2基因的RNAi基因敲除株系的幼苗比成苗更敏感。

[0018] 进一步的,所述植物渗透胁迫包括盐胁迫和干旱胁迫。

[0019] 本发明还提供了乙烯诱导BAHD酰基转移酶ERAT2基因在参与植物溶血磷脂酰胆碱的生物合成中的应用。

[0020] 进一步的,所述ERAT2基因的CRISPR-Cas9基因敲除株系能够合成脂质类物质溶血磷脂酰胆碱。

[0021] 与现有技术相比,本发明的优点和有益技术效果是:

[0022] 1、本发明通过对乙烯突变体ctr1-8的转录组测序、乙烯信号通路中EIN3转录因子的ChIP-Seq和ACC处理拟南芥根系的基因芯片分析结果的综合分析,获得并首次确定并公开了一种能够编码乙烯诱导的BAHD酰基转移酶的新基因ERAT2(基因编号为AT5G01210)。

[0023] 2、本发明利用现有的植物基因工程技术,获得了ERAT2基因拟南芥了DNA插入突变体erat2和CRISPR-Cas9基因敲除载体及其株系,并通过各项实验证实,erat2突变体和CRISPR-Cas9基因敲除株系的幼苗对逆境比成苗更为敏感,干旱和盐胁迫都会影响两种株系幼苗根系的生长,延缓了幼苗根的生长速度且降低植株的发芽率,通过分析erat2突变体和CRISPR-Cas9基因敲除株系渗透胁迫相关基因,从而确定ERAT2基因具有参与植物渗透胁迫响应的功能。本发明还通过实验证实了erat2突变体和CRISPR-Cas9基因敲除株系参与了植物溶血磷脂酰胆碱的生成,进而证实ERAT2基因参与了植物溶血磷脂酰胆碱的生物合成。

[0024] 3、本发明的技术方案为植物中对溶血磷脂酰胆碱的生物合成和抗渗透胁迫育种提供了理论依据和实验基础。

附图说明

[0025] 图1是本发明中综合分析乙烯突变体ctr1-8的转录组测序、乙烯信号通路中EIN3转录因子的ChIP-Seq和ACC处理拟南芥根系的基因芯片分析数据的结果。

[0026] 图2是本发明中乙烯生物合成前体ACC处理后ERAT2在野生型拟南芥中表达量的变化。

[0027] 图3是本发明中乙烯生物合成前体ACC处理后ERAT2在乙烯不敏感拟南芥突变体中表达量的变化。

[0028] 图4是本发明中乙烯生物合成前体ACC处理后ERAT2在乙烯超敏感拟南芥突变体中表达量的变化。

[0029] 图5是本发明中ERAT2在拟南芥不同组织器官中的相对表达量。

[0030] 图6是本发明中ERAT2在干旱胁迫下的相对表达量。

[0031] 图7是本发明中ERAT2在盐胁迫下的相对表达量。

[0032] 图8是本发明中ERAT2在冷胁迫下的相对表达量。

- [0033] 图9是本发明中ERAT2在突变体中的相对表达量。
- [0034] 图10是本发明中erat2突变体的生长状况,其中A为直接播种在土壤中,萌发后不再生长的突变体幼苗;B为1/2MS培养基上培养三周后,移栽入土壤中正常生长的突变体幼苗。
- [0035] 图11是本发明中野生型拟南芥和erat2突变体在无甘露醇处理时的发芽率。
- [0036] 图12是本发明中野生型拟南芥和erat2突变体在400mM甘露醇处理时的发芽率。
- [0037] 图13是本发明中野生型拟南芥和erat2突变体在400mM甘露醇处理10天时的根长比较。
- [0038] 图14是本发明中野生型拟南芥和erat2突变体在不同浓度甘露醇处理10天时的根长比较。
- [0039] 图15是本发明中野生型拟南芥和erat2突变体在无NaCl处理时的发芽率。
- [0040] 图16是本发明中野生型拟南芥和erat2突变体在100mM NaCl处理时的发芽率。
- [0041] 图17是本发明中野生型拟南芥和erat2突变体在150mM NaCl处理6天时的根长比较。
- [0042] 图18是本发明中野生型拟南芥和erat2突变体在不同浓度NaCl处理6天时的根长比较。
- [0043] 图19是本发明中erat2突变体经甘露醇模拟干旱处理后HK1基因的表达量变化。
- [0044] 图20是本发明中erat2突变体经盐处理后ERD4基因的表达量变化。
- [0045] 图21是本发明中erat2突变体经盐处理后ERF11基因的表达量变化。
- [0046] 图22是本发明中erat2突变体经盐处理后ERF4基因的表达量变化。
- [0047] 图23是本发明中erat2突变体经盐处理后ERF105基因的表达量变化。
- [0048] 图24是本发明中erat2突变体经盐处理后ERF1基因的表达量变化。
- [0049] 图25是本发明中野生型拟南芥和ERAT2的CRISPR-Cas9基因敲除株系在100mM甘露醇处理时的发芽率,其中L1和L2分别是所筛选的2个独立的纯合的敲除株系。
- [0050] 图26本发明中野生型拟南芥和ERAT2的CRISPR-Cas9基因敲除株系在不同浓度甘露醇处理时的根长结果。
- [0051] 图27是本发明中野生型拟南芥和ERAT2的CRISPR-Cas9基因敲除株系在200mM NaCl处理时的发芽率。
- [0052] 图28是本发明中野生型拟南芥和ERAT2的CRISPR-Cas9基因敲除株系在不同浓度NaCl处理时的根长结果。
- [0053] 图29是本发明中ERAT2的CRISPR-Cas9基因敲除株系经甘露醇模拟干旱处理后HK1基因的表达量变化。
- [0054] 图30是本发明中ERAT2的CRISPR-Cas9基因敲除株系经盐处理后ERF105基因的表达量变化。
- [0055] 其中,a、b、c和d均表示不同字母标注下的个体间差异达到0.05的显著水平。

具体实施方式

- [0056] 以下结合附图、附表和具体实施例对本发明的技术方案做进一步详细的说明。
- [0057] 下述实施例中的实验方法,如无特殊说明,均为常规方法。下述实施例中所用的材

料、试剂、仪器等,如无特殊说明,均为市售商品。以下实施例中的定量试验,均设置三次重复实验,结果取平均值。

[0058] 实施例1:乙烯诱导BAHD酰基转移酶ERAT2的表达

[0059] 1、独立实验的综合分析

[0060] (1)对乙烯通路突变体ctr1-8的转录组测序结果分析时发现1702个基因的表达量受CTR1的调控。

[0061] (2)下载NCBI上数据号为SRA063695,针对EIN3转录因子的ChIP-Seq的原始数据;

[0062] (3)下载ArrayExpress上数据号为E-MEXP-362,对ACC处理3小时的拟南芥根系进行基因芯片分析时的原始数据;

[0063] (4)综合分析上述三次独立实验的数据,结果如图1所示,发现有25个基因是完全重叠的;

[0064] (5)对上述25个重叠基因进行更进一步的分析发现,存在一个编码BAHD酰基转移酶的未知新基因AT5G01210在这三次独立实验中均受到显著影响。本发明将AT5G01210命名为ERAT2(Ethylene Regulated BAHD AcylTransferase 2),其核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示。根据上述结果,推测BAHD酰基转移酶ERAT2受乙烯的诱导,并位于乙烯通路EIN3转录因子的下游。

[0065] 2、生物信息学的方法分析ERAT2的启动子序列

[0066] (1)通过拟南芥数据库(<http://www.arabidopsis.org>)和NCBI数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide>),查找BAHD酰基转移酶ERAT2起始密码子ATG上游2000bp的序列。

[0067] (2)使用网络启动子分析网站PlantCARE,分析ERAT2的启动子序列,启动子序列的核苷酸序列如SEQ ID NO.2所示,ERAT2的启动子序列中含有乙烯响应元件(-ATTTCAA-),推测ERAT2的表达受乙烯的调控。

[0068] 3、qRT-PCR证明ERAT2的表达受乙烯的调控

[0069] (1)选择野生型拟南芥Col,乙烯不敏感突变体etr1-1和ein2,和乙烯超敏感突变体rte1-3和rte5作为实验材料。

[0070] (2)将野生型拟南芥Col以及乙烯通路突变体etr1-1、rte1-3、ein2和rte5种子在1/2MS培养基上培养2周之后,转入加有100 μ M ACC的1/2MS液体培养基上,密封光照培养6小时。

[0071] (3)qRT-PCR检测各个样品中ERAT2在乙烯处理前后的相对表达量的变化,其中检测ERAT2基因所用的qRT-PCR引物序列为:

[0072] AtERAT2-FP:5' -CGTCTCCGATCTCCGTCTCT-3' (SEQ ID NO.3);

[0073] AtERAT2-RP:5' -GTCGTCGAAGGAGAAGGAAGG-3' (SEQ ID NO.4)。

[0074] 实验结果显示,在野生型拟南芥中,ERAT2的表达量因乙烯的处理而显著增加(图2);在乙烯不敏感突变体etr1-1和ein2中,ERAT2的表达量在乙烯处理前后无显著变化(图3);而在乙烯超敏感突变体rte1-3和rte5中,ERAT2的表达量在乙烯处理后的增加程度甚至超过了野生型拟南芥对照(图4)。综上所述说明BAHD酰基转移酶ERAT2的表达受乙烯的调控,并且位于乙烯信号通路的下游,由此可以进一步的证明乙烯诱导BAHD酰基转移酶ERAT2基因的表达。

[0075] 实施例2:ERAT2突变体对渗透胁迫和溶血磷脂酰胆碱的生物合成的影响

[0076] 1、ERAT2基因的组织表达模式和渗透胁迫诱导表达模式

[0077] (1) 收集野生型拟南芥Col的根、叶、茎、花和果荚,液氮研磨,提取RNA,并反转录成cDNA;qRT-PCR检测ERAT2在这几个组织器官中的相对表达。结果如图5所示,ERAT2在这几个器官中均有表达,说明ERAT2在多种组织器官中发挥功能,不存在组织特异性。

[0078] (2) 将野生型拟南芥Col种子在MS培养基上培养2周之后,转入加有200mM甘露醇(模拟干旱)或200mM NaCl的MS液体培养基上,密封光照培养0h、3h、6h、9h、12h和24h,取样。

[0079] qRT-PCR检测干旱和盐胁迫处理不同时间后,ERAT2表达量的变化趋势。结果显示,ERAT2经甘露醇模拟干旱处理后,表达量不断增加,到6h时达到最高峰,之后短暂下降,但从9h开始出现第二次上升(图6)。而ERAT2经盐处理后,表达量不断增加(图7)。

[0080] (3) 将培养2周的幼苗转入MS液体培养基上。密封后,将表面皿置于冰水混合物中,进行0℃冷处理0h、3h、6h、9h、12h和24h,取样。

[0081] qRT-PCR检测冷胁迫处理不同时间后,ERAT2表达量的变化趋势。结果显示,ERAT2经冷处理后,在12h内几乎无明显表达量的变化(图8)。

[0082] 综上所述说明ERAT2参与渗透胁迫(干旱和盐)的响应。

[0083] 2、ERAT2 T-DNA插入突变体的获得

[0084] (1) 从tair网站购买了BAHD酰基转移酶ERAT2的拟南芥T-DNA插入突变体,突变体SALK号为:SALKseq_129231。

[0085] (2) RT-PCR单株检测突变体的纯合性。只存在2-LP和2-RP扩增条带的个体是野生型的;只存在Lba和2-RP扩增条带的个体是该基因T-DNA插入突变体的纯合个体;既存在2-LP和2-RP扩增条带,也存在Lba和2-RP扩增条带的个体是野生型和T-DNA插入突变体的杂合个体。检测结构显示,所购买的突变体全部是该基因T-DNA插入突变体的纯合个体,符合网站上的标注。

[0086] 其中,检测erat2 T-DNA插入突变体纯合性所用的PCR引物序列为:

[0087] 2-LP:5'-AAACCTGGTTTGAACCTTGGC-3'(SEQ ID NO.5);

[0088] 2-RP:5'-AGTTACACAGGAACGTGGTGG-3'(SEQ ID NO.6);

[0089] Lba:5'-TGGTTCACGTAGTGGGCCATCG-3'(SEQ ID NO.7)。

[0090] (3) qRT-PCR检测突变体中ERAT2的相对表达量。提取野生型和erat2T-DNA插入突变体的RNA,反转录成cDNA;qRT-PCR检测突变体中ERAT2的相对表达量。结果如图9显示突变体中ERAT2的表达量相对于野生型明显降低,说明购买的突变体合格,可以在后续实验中使用。

[0091] 3、erat2突变体幼苗对逆境敏感

[0092] (1) 将突变体种子播种到营养土中,发现erat2突变体在土壤中萌发后,便不再生长,最终死亡(图10A)。

[0093] (2) 将突变体种子播种在较厚的1/2MS培养基上培养三周后,再转移入土壤中,发现可以正常生长(图10B)。

[0094] 上述结果说明突变体erat2幼苗对逆境比成苗更为敏感。

[0095] 4、erat2突变体对于干旱胁迫敏感

[0096] (1) 将erat2突变体的种子撒入甘露醇终浓度分别为0和400mM的1/2MS培养基上。

将种子4℃冷处理3天后,光照培养,每天记录发芽率。结果如图11和12所示,相比于野生型拟南芥Col,erat2突变体种子在甘露醇模拟干旱胁迫下,发芽率明显降低。

[0097] (2) 将erat2突变体的种子撒入1/2MS培养基上,4℃冷处理3天。取出,转入甘露醇终浓度分别为0、100、200、300和400mM的1/2MS培养基上,光照培养3天,观察并测量根长的变化。结果如图13-14所示,经过含不同浓度甘露醇的培养基上培养10天后,erat2突变体幼苗的根明显比野生型拟南芥的短,说明干旱胁迫影响了erat2突变体幼苗根系的生长,也说明ERAT2的突变体对于干旱胁迫敏感。

[0098] 5、erat2突变体对盐胁迫敏感

[0099] (1) 将erat2突变体的种子撒入NaCl终浓度为0和100mM的1/2MS培养基上。将种子4℃冷处理3天后,光照培养,每天记录发芽率。结果如图15-16所示,相比于野生型拟南芥Col,erat2突变体种子在不同浓度的盐胁迫下,发芽率都明显降低。

[0100] (2) 将erat2突变体的种子撒入1/2MS培养基上,4℃冷处理3天。取出,光照培养3天后,转入含NaCl终浓度为0、50、100、150和200mM的1/2MS培养基上,光照培养6天,观察并根长的变化。结果如图17-18所示,经过含不同浓度盐的培养基上培养6天后,erat2突变体幼苗的根明显比野生型拟南芥的短,说明盐胁迫影响了erat2突变体幼苗根系的生长,也说明ERAT2的突变体对盐胁迫敏感。

[0101] 6、qRT-PCR检测突变体中渗透胁迫相关基因的相对表达量变化

[0102] 将培养2周的拟南芥野生型和erat2突变体幼苗转入MS液体培养基上。之后加入200mM甘露醇或者200mM NaCl溶液处理0h、3h、6h、9h、12h、24h、48h和72h,取样提RNA,反转录成cDNA;qRT-PCR检测渗透胁迫相关基因的表达量变化趋势。结果如图19-24显示,跟野生型拟南芥COL相比,erat2突变体不论是甘露醇模拟干旱处理后还是NaCl处理后,HK1、ERD4、ERF1、ERF4、ERF11和ERF105渗透胁迫相关基因的表达量都呈下降趋势。

[0103] 综上所述说明ERAT2基因在植物对渗透胁迫响应中起作用。

[0104] 7、erat2突变体对溶血磷脂酰胆碱的生物合成的影响

[0105] 本发明考虑到突变体erat2幼苗对逆境比成苗更为敏感,选择了培养基上的两周龄幼苗作为实验材料,来检测ERAT2在植物次生代谢中的功能。

[0106] (1) 以野生型拟南芥Col为对照,将两周龄的突变体erat2幼苗液氮冷冻,置于干冰中,送样至武汉迈特维尔生物科技有限公司对样品进行了广泛靶向代谢组学分析。结果如表1显示,BAHD酰基转移酶ERAT2主要涉及脂质类物质溶血磷脂酰胆碱的生成,说明ERAT2基因在植物对脂质类物质溶血磷脂酰胆碱的生物合成中起作用。

[0107] 表1 BAHD酰基转移酶ERAT2参与脂质类物质溶血磷脂酰胆碱的生成

编号	物质	物质类别
pmb0165	溶血磷脂酰胆碱 16:1	脂质
pmb0848	溶血磷脂酰胆碱 16:1(2n 异构)	脂质
pmb0852	溶血磷脂酰胆碱 18:2	脂质
pmb0859	溶血磷脂酰胆碱 18:1(2n 异构)	脂质
pmb0863	溶血磷脂酰胆碱 16:2	脂质
pmb0865	溶血磷脂酰胆碱 18:3(2n 异构)	脂质
[0108] pmb0873	溶血磷脂酰胆碱 18:3(2n 异构)	脂质
pmb0882	溶血磷脂酰胆碱 18:2(2n 异构)	脂质
pmb2228	溶血磷脂酰胆碱 18:1	脂质
pmb2388	溶血磷脂酰胆碱 19:0	脂质
pmc0960	溶血磷脂酰胆碱 18:0(2n 异构)	脂质
pmd0144	溶血磷脂酰胆碱 20:4	脂质
pmd0145	溶血磷脂酰胆碱 20:1(2n 异构)	脂质
	溶血磷脂酰胆碱 20:1	脂质

[0109] 实施例3:ERAT2的CRISPR-Cas9基因敲除株系对渗透胁迫和溶血磷脂酰胆碱的生物合成的影响

[0110] 1、获得了ERAT2的CRISPR-Cas9基因敲除株系

[0111] (1) 利用百格CRISPR-Cas9载体构建试剂盒,设计并生成ERAT2的gRNA靶点序列(<http://www.biogle.cn/index/excrispr>)。在ERAT2的CDS序列上寻找PAM序列CGG。在ERAT2的CDS序列的前、中、后端各选择一个CGG位点。

[0112] (2) 将每个CGG位点前端19bp的序列,输入网站www.biogle.cn,设计引物,制备Oligo二聚体,并将Oligo二聚体构建至CRISPR-Cas9载体BGK01上。

[0113] (3) 将构建的CRISPR-Cas9载体转化大肠杆菌;

[0114] (4) PCR验证后,提取阳性菌株质粒,转入农杆菌菌株GV3101中。

[0115] (5) 利用蘸花法转化拟南芥。PCR鉴定之后,测序确定转化株系。

[0116] 检测ERAT2的CRISPR-Cas9基因敲除株系所用的PCR引物序列为:

[0117] ERAT2CRI-Ff:5'-ATAACTCCTACTCATCACCAATAC-3'(SEQ ID NO.8);

[0118] ERAT2CRI-Rf:5'-TCGTTGCAGACAATGGAAAT-3'(SEQ ID NO.9);

[0119] ERAT2CRI-Fm:5'-CGTTAGTTACAACGGTCATC-3'(SEQ ID NO.10);

[0120] ERAT2CRI-Rm:5'-CTGAGAGATTGGAACGATGA-3'(SEQ ID NO.11)。

[0121] (6) 不断自交获得了2个独立的纯合的ERAT2的CRISPR-Cas9基因敲除株系L1和L2作为实验材料。

[0122] 2、ERAT2的CRISPR-Cas9基因敲除株系对逆境敏感

[0123] (1) 将ERAT2的CRISPR-Cas9基因敲除株系种子直接播种到营养土中,发现其种子

在土壤中萌发后,便不再生长,最终死亡。

[0124] (2) 将ERAT2的CRISPR-Cas9基因敲除株系种子播种在较厚的1/2MS培养基上培养三周后,再转移入土壤中,发现可以正常生长,说明L1和L2的幼苗对逆境比成苗更为敏感。

[0125] 3、ERAT2的CRISPR-Cas9基因敲除株系对于干旱胁迫敏感

[0126] (1) 将ERAT2 CRISPR-Cas9基因敲除株系的种子撒入甘露醇终浓度分别为100mM的1/2MS培养基上。将种子4℃冷处理3天后,光照培养,每天记录发芽率。结果如图25所示,相比于野生型拟南芥Col,CRISPR-Cas9基因敲除株系种子在甘露醇模拟干旱胁迫下,发芽率明显降低。

[0127] (2) 将CRISPR-Cas9基因敲除株系的种子撒入1/2MS培养基上,4℃冷处理3天。取出,转入甘露醇终浓度分别为0、100、200、300和400mM的1/2MS培养基上,光照培养3天,观察并测量根长的变化。结果如图26显示,经过含不同浓度甘露醇的培养基上培养10天后,CRISPR-Cas9基因敲除株系幼苗的根明显比野生型拟南芥的短,说明干旱胁迫影响了CRISPR-Cas9基因敲除株系幼苗根系的生长,也说明ERAT2的CRISPR-Cas9基因敲除株系对于干旱胁迫敏感。

[0128] 4、CRISPR-Cas9基因敲除株系对盐胁迫敏感

[0129] (1) 将CRISPR-Cas9基因敲除株系的种子撒入NaCl终浓度为200mM的1/2MS培养基上。将种子4℃冷处理3天后,光照培养,每天记录发芽率。结果如图27所示,相比于野生型拟南芥Col,CRISPR-Cas9基因敲除株系种子在不同浓度的盐胁迫下,发芽率都明显降低。

[0130] (2) 将CRISPR-Cas9基因敲除株系的种子撒入1/2MS培养基上,4℃冷处理3天。取出,光照培养3天。转入含NaCl终浓度为0、100、200和400mM的1/2MS培养基上,光照培养6天,观察并根长的变化。结果如图28显示,经过含不同浓度盐的培养基上培养6天后,CRISPR-Cas9基因敲除株系幼苗的根明显比野生型拟南芥的短,说明盐胁迫影响了CRISPR-Cas9基因敲除株系幼苗根系的生长,也说明ERAT2的CRISPR-Cas9基因敲除株系对盐胁迫敏感。

[0131] 5、qRT-PCR检测突变体中渗透胁迫相关基因的相对表达量变化

[0132] 将培养2周的拟南芥野生型和CRISPR-Cas9基因敲除株系幼苗转入MS液体培养基上。之后加入200mM甘露醇或者200mM NaCl溶液处理0h、3h、6h、9h、12h、24h、48h和72h,取样提RNA,反转录成cDNA。qRT-PCR检测渗透胁迫相关基因的表达量变化趋势。结果如图29-30显示,跟野生型拟南芥COL相比,CRISPR-Cas9基因敲除株系L-1和L-2不论是甘露醇模拟干旱处理后还是NaCl处理后,HK1和ERF105渗透胁迫相关基因的表达量都呈下降趋势。

[0133] 综上说明ERAT2基因在植物对渗透胁迫响应中起作用。

[0134] 6、ERAT2对溶血磷脂酰胆碱的生物合成影响

[0135] 考虑到CRISPR-Cas9基因敲除株系幼苗对逆境比成苗更为敏感,本发明选择了培养基上的两周龄幼苗作为实验材料,来检测ERAT2在植物次生代谢中的功能。

[0136] (1) 以野生型拟南芥Col为对照,将两周龄的CRISPR-Cas9基因敲除株系幼苗液氮冷冻,置于-80℃冰箱,备用。

[0137] (2) 利用LC-MS检测CRISPR-Cas9基因敲除株系中脂质类物质溶血磷脂酰胆碱的差异。结果如表2所示,验证了BAHD酰基转移酶ERAT2涉及脂质类物质溶血磷脂酰胆碱的生成,说明BAHD酰基转移酶ERAT2在植物溶血磷脂酰胆碱的生物合成起作用。

[0138] 表2 BAHD酰基转移酶ERAT2参与脂质类物质溶血磷脂酰胆碱的生成

	编号	物质	变化倍数	变化趋势
[0139]	pmb0165	溶血磷脂酰胆碱 16:1	3.6237	上升
	pmb0848	溶血磷脂酰胆碱 16:1(2n 异构)	2.3701	上升
	pmb0852	溶血磷脂酰胆碱 18:2	2.8410	上升
	pmb0859	溶血磷脂酰胆碱 18:1(2n 异构)	3.3641	上升
	pmb0863	溶血磷脂酰胆碱 16:2	3.4617	上升
[0140]	pmb0865	溶血磷脂酰胆碱 18:3(2n 异构)	3.5404	上升
	pmb0873	溶血磷脂酰胆碱 18:2(2n 异构)	2.7105	上升
	pmb0882	溶血磷脂酰胆碱 18:1	3.2115	上升
	pmb2228	溶血磷脂酰胆碱 19:0	2.6541	上升
	pmb2388	溶血磷脂酰胆碱 18:0(2n 异构)	3.2577	上升
	pmc0960	溶血磷脂酰胆碱 20:4	3.1629	上升
	pmd0144	溶血磷脂酰胆碱 20:1(2n 异构)	2.7062	上升
	pmd0145	溶血磷脂酰胆碱 20:1	2.8017	上升

[0141] 以上实施例仅用以说明本发明的技术方案,而非对其进行限制;尽管参照前述实施例对本发明进行了详细的说明,对于本领域的普通技术人员来说,依然可以对前述实施例所记载的技术方案进行修改,或者对其中部分技术特征进行等同替换;而这些修改或替换,并不使相应技术方案的本质脱离本发明所要求保护的技术方案的精神和范围。

[0001]	序列表	
[0002]	<110>	青岛农业大学
[0003]	<120>	一种乙烯诱导BAHD酰基转移酶ERAT2基因及其应用
[0004]	<160>	11
[0005]	<170>	SIP0SequenceListing 1.0
[0006]	<210>	1
[0007]	<211>	1428
[0008]	<212>	DNA
[0009]	<213>	拟南芥(<i>Arabidopsis thaliana</i>)
[0010]	<400>	1
[0011]	atgccttctt	gttcggtaac tgaatttca aaatgtatcg tctatccgga gaagaagtcc 60
[0012]	accgtctccg	atctccgtct ctccgtctcc gacctcceta tgctctcatg tcattacatt 120
[0013]	caaaaaggcg	tctctctcac cagccctcct ctttcttct ctttcgacga cttgtctctc 180
[0014]	tctctccgcc	gttctctctc ctccactctt tccctcttcc ctgcttttagc cggccgtttc 240
[0015]	tccaccactc	ccgccggtca catttccatt gtctgcaacg acgccggagt tgatttctgc 300
[0016]	gccgttccg	ctaaacacgt caaactctct gatgttctct taccaggtga agacgttctc 360
[0017]	ctgcttttcc	gtgagttttt cgtcttcgag cgtctctgta gttacaacgg tcatcataag 420
[0018]	cctctcgccg	ccgttcaagt gacggagctc cacgacggtg tcttcatcgg atgtaccgtg 480
[0019]	aatcattccg	ttactgacgg aacttcttct tggcacttct tcaacacctt tgctgacgtc 540
[0020]	actagcggtg	cttctaagat caaacacctt ccagatttct cccgccacac cgtcttcgat 600
[0021]	tctccggctg	ttcttccagt ccttccgggt ggtccacgtg tcactttcga cgccgacca 660
[0022]	cctctacggg	agagaatfff tcatttcagc agagaggcga ttaccaaact gaaacagagg 720
[0023]	acgaataaca	gagttaacgg aattgagact gccgttaacg atggaaggaa atgtaacgga 780
[0024]	gagattaacg	gaaaaataac aaccgttttg gatagttttt tgaataataa gaagagttat 840
[0025]	gatcggacgg	ctgagatttc atcgttccaa tctctcagcg ctcagctatg gcgatccgtt 900
[0026]	acacgagcga	ggaatctcga tccgagcaag acgacgacgt ttcgaatgce ggtaatttgc 960
[0027]	cggcaccggc	ttgagccgaa gatggatccg tactacttctg gaaacgcgat acagagcata 1020
[0028]	ccgacgttgg	cgtctcgccg agatctgcta agcaaagatc tcaggtggtc cgccgaacag 1080
[0029]	ttacacagga	acgtggtggc gcacgacgac gcgacggtcc gccgtggaat cgccgcttgg 1140
[0030]	gaaagcgate	cgaggetgtt tctctctcga aatccagatg gagcttcgat cacgatgggg 1200
[0031]	agctcgccga	gattcccaat gtacgacaat gatttccgat ggggaaaacc gttagctgtg 1260
[0032]	agaagcggcg	gagcgaataa attcgacggg aagatctcgg cgtttcccgg tagagaagga 1320
[0033]	aacggaagcg	tggatctgga agtagttctg gcgccggaga ctatgactgg gattgagaac 1380
[0034]	gatgetgagt	ttatgcaata cgtatcagaa gtcacttacg attgttga 1428
[0035]	<210>	2
[0036]	<211>	699
[0037]	<212>	DNA
[0038]	<213>	拟南芥(<i>Arabidopsis thaliana</i>)
[0039]	<400>	2
[0040]	gaatctatta	tattactact attacttaga catatatata tttctatatg caaacagag 60
[0041]	gatactcaaa	tttctcatt tgtcaaaaat gctggcagat gttatccact acaataatt 120

[0042]	acacattagg tcattgtaac ttactgattt tgtcatgttt gtctgttata taaatcgact	180
[0043]	aactgtatat atagtttgat ctaaaccgaa taatcgaacc aaaacagaat caaatcaat	240
[0044]	caaggaagca agcaaacaaa aaaacaaaa catttcacac ataaaagtcc gaaattgggt	300
[0045]	tctttctgat tttgatttga aatttcaaag aaaaaaacac caaacacact tttacttate	360
[0046]	ctaaacaaa acattttgct cgtgaaagtg atgttaacac ttgctataaa tattcateta	420
[0047]	gaatttgcac ggtgagatat gataactaatt gaggcaagaa tgtgcgtttg atataatttt	480
[0048]	ttctttagta acaaattaac aatataaata tcaccgggat tttcatatag ttttattata	540
[0049]	caaacctatt gtgattatag gtttcatagc taaagaaaa gaaaaaata tgaatatag	600
[0050]	aaaacaacta aaataaaaag acaagaatag taacaactca agttcatgaa tccaaccatt	660
[0051]	gatccgacca ctatataaac ccctatcccc cccccccc	699
[0052]	<210> 3	
[0053]	<211> 20	
[0054]	<212> DNA	
[0055]	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
[0056]	<400> 3	
[0057]	cgtctccgat ctccgtctct	20
[0058]	<210> 4	
[0059]	<211> 21	
[0060]	<212> DNA	
[0061]	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
[0062]	<400> 4	
[0063]	gtcgtcgaag gagaaggaag g	21
[0064]	<210> 5	
[0065]	<211> 21	
[0066]	<212> DNA	
[0067]	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
[0068]	<400> 5	
[0069]	aaacctggtt tgaactttgg c	21
[0070]	<210> 6	
[0071]	<211> 21	
[0072]	<212> DNA	
[0073]	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
[0074]	<400> 6	
[0075]	agttacacag gaacgtggtg g	21
[0076]	<210> 7	
[0077]	<211> 22	
[0078]	<212> DNA	
[0079]	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
[0080]	<400> 7	
[0081]	tggttcacgt agtgggcat cg	22
[0082]	<210> 8	
[0083]	<211> 24	

[0084]	<212> DNA	
[0085]	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
[0086]	<400> 8	
[0087]	ataactccta ctcacacca atac	24
[0088]	<210> 9	
[0089]	<211> 20	
[0090]	<212> DNA	
[0091]	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
[0092]	<400> 9	
[0093]	tcgttcaga caatgaaat	20
[0094]	<210> 10	
[0095]	<211> 20	
[0096]	<212> DNA	
[0097]	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
[0098]	<400> 10	
[0099]	cgtagttac aacggcatc	20
[0100]	<210> 11	
[0101]	<211> 20	
[0102]	<212> DNA	
[0103]	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
[0104]	<400> 11	
[0105]	ctgagagatt ggaacgatga	20

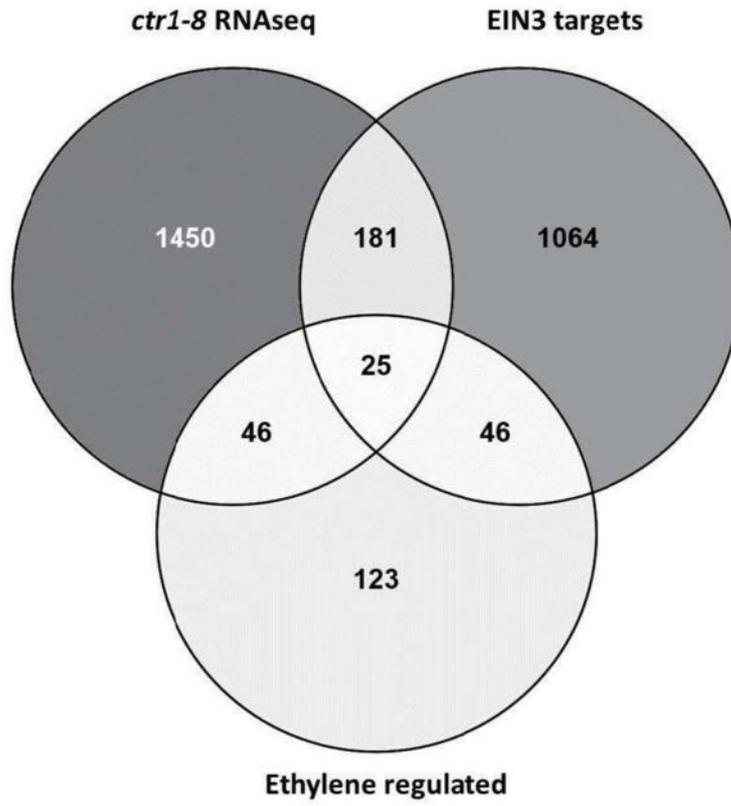


图1

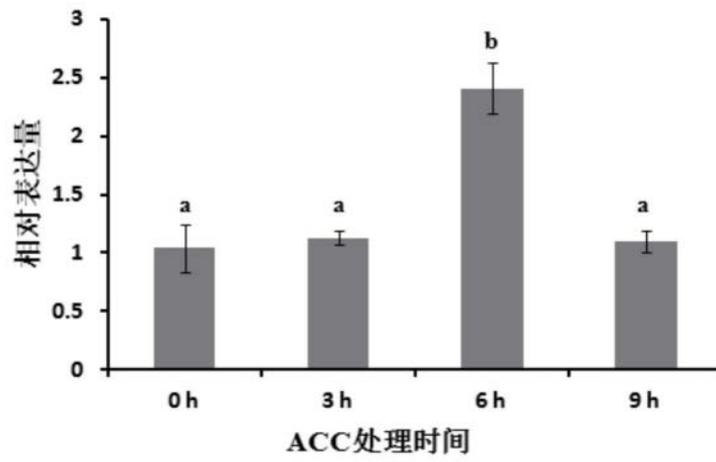


图2

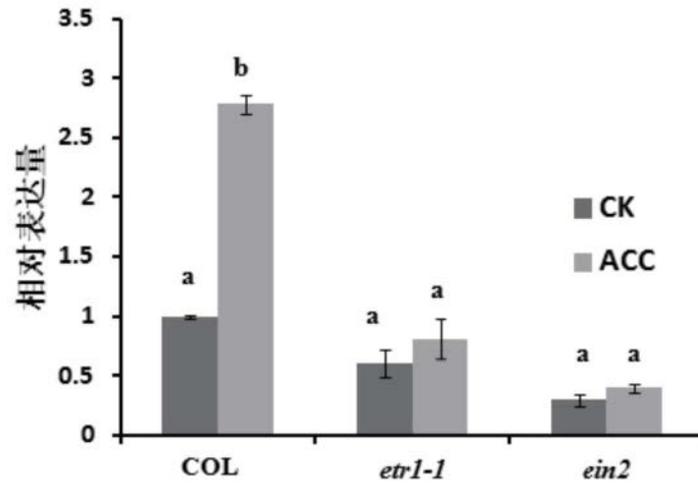


图3

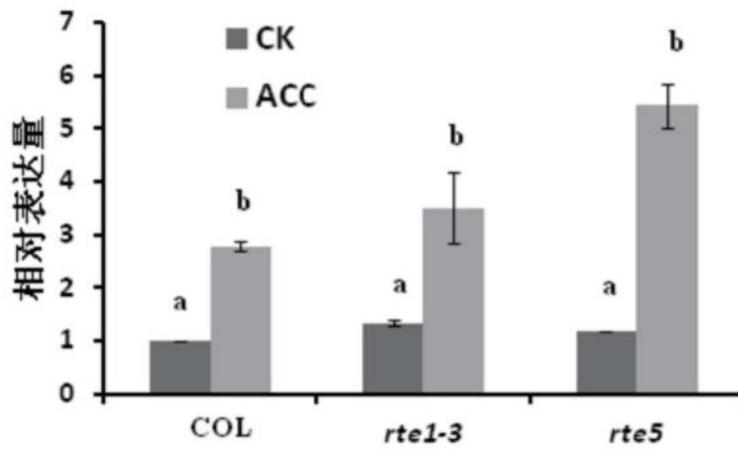


图4

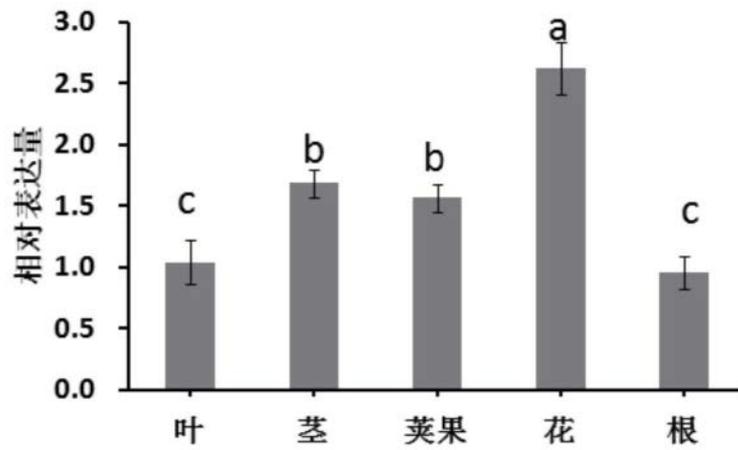


图5

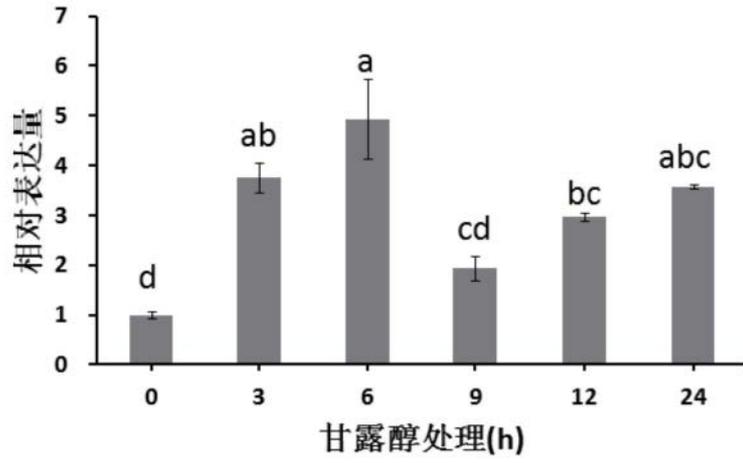


图6

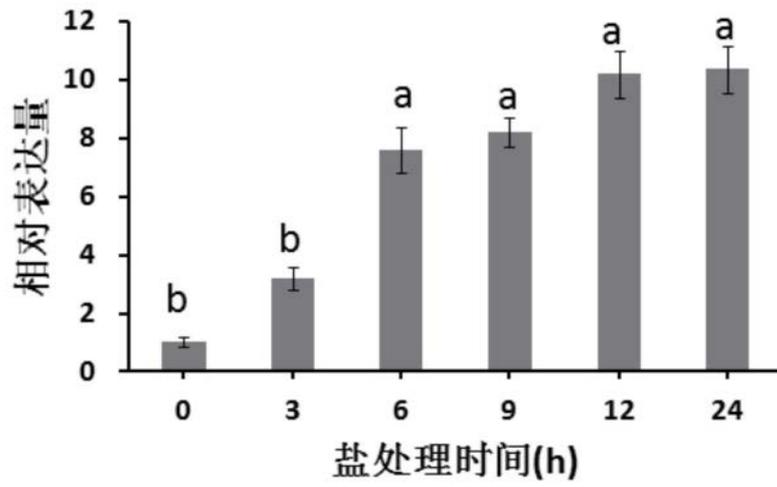


图7

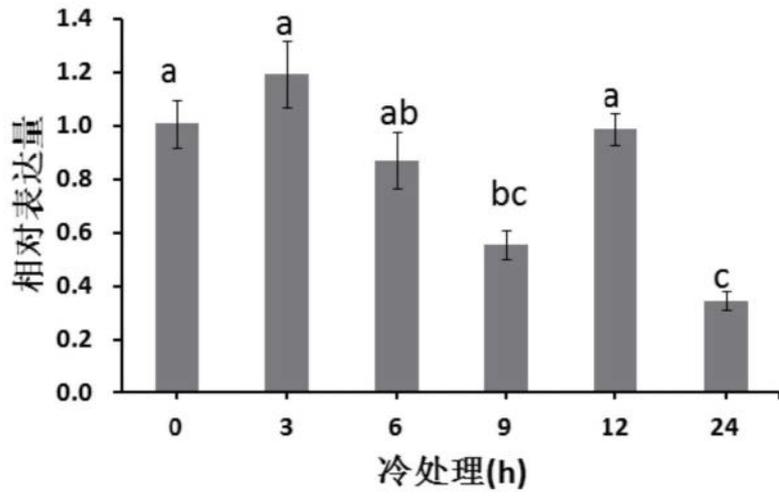


图8

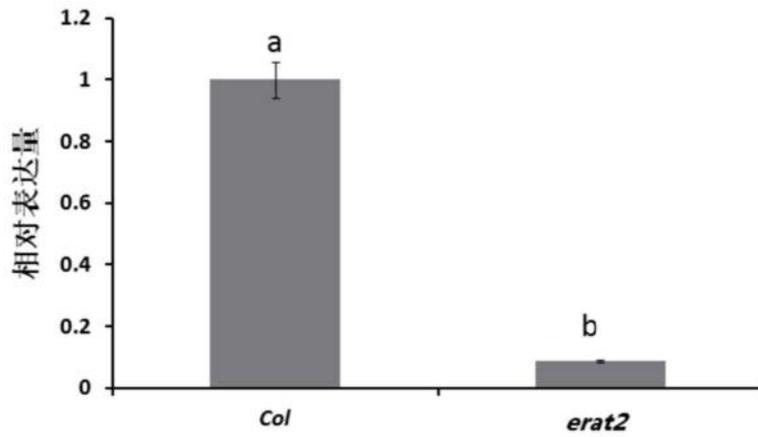


图9

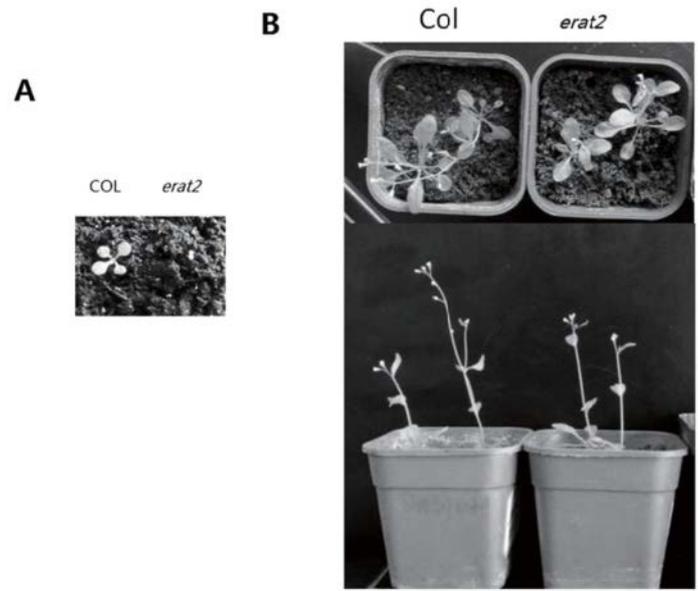


图10

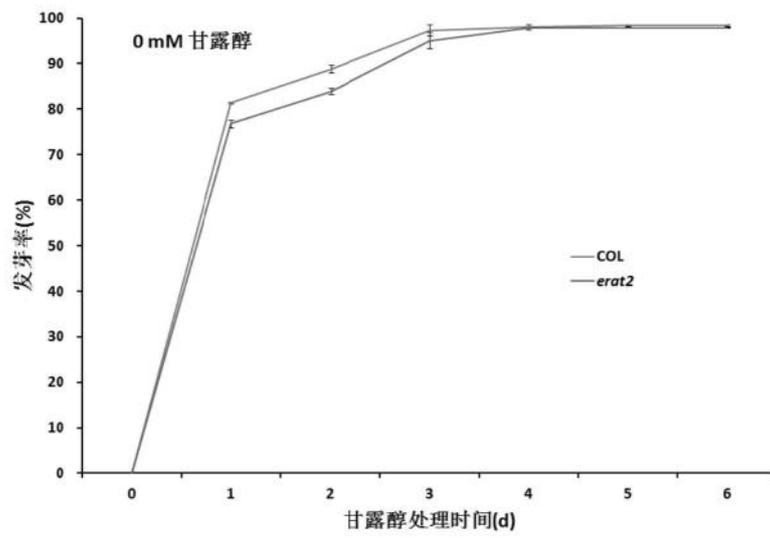


图11

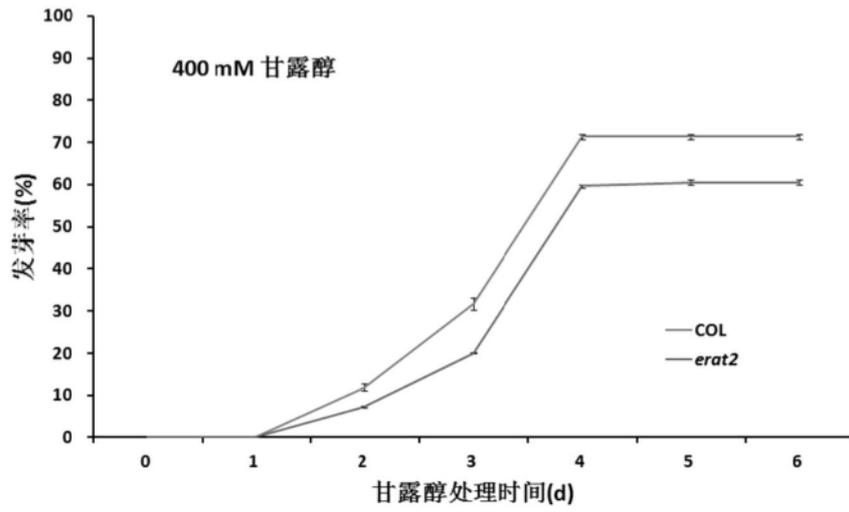


图12

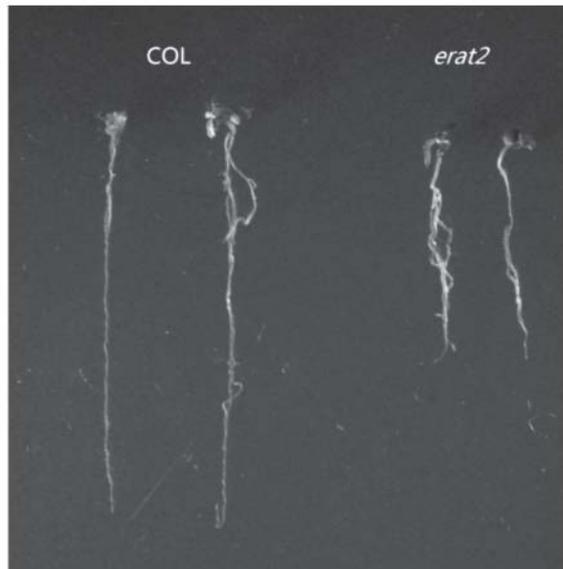


图13

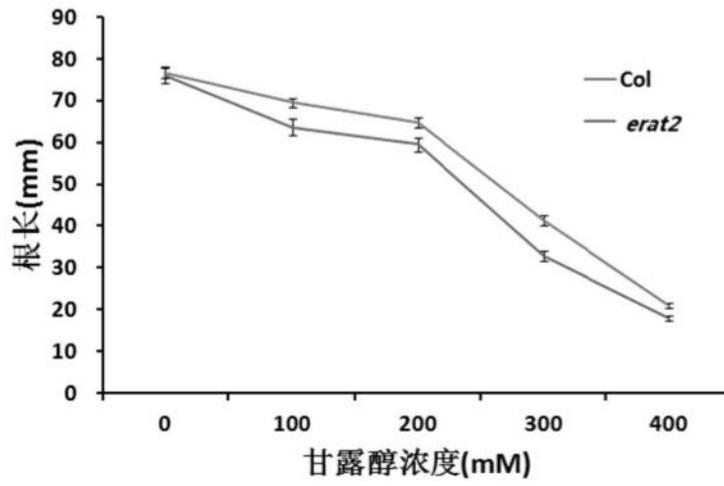


图14

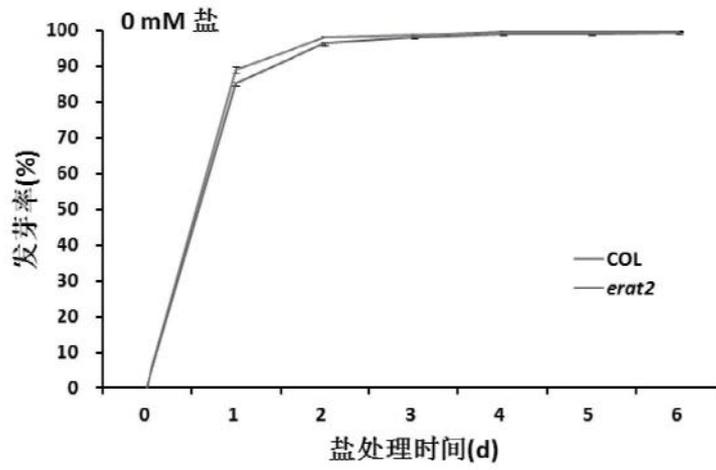


图15

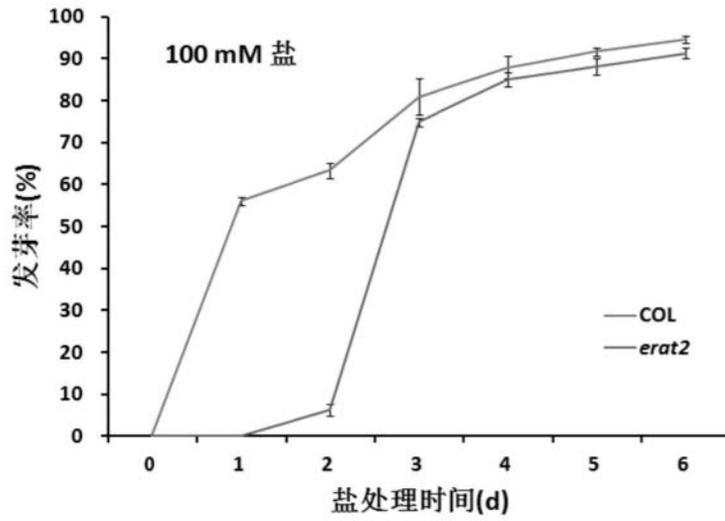


图16

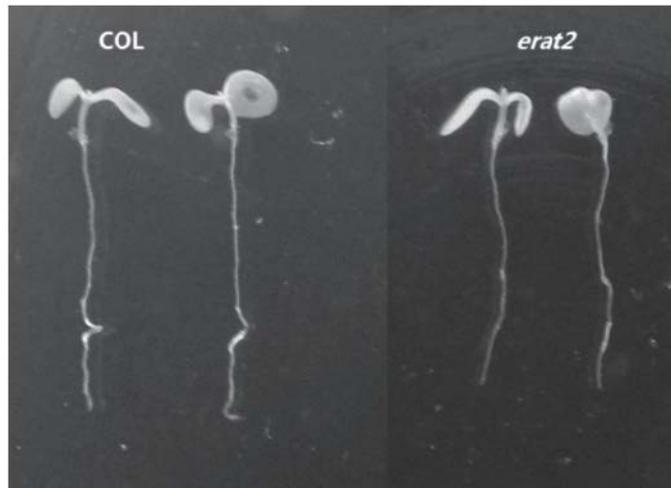


图17

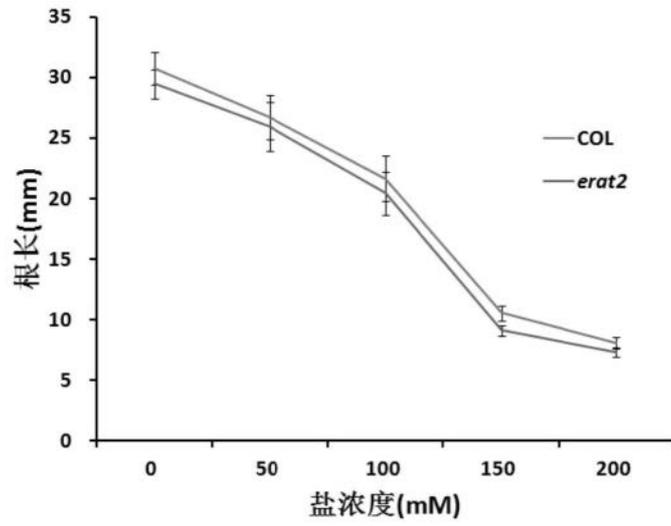


图18

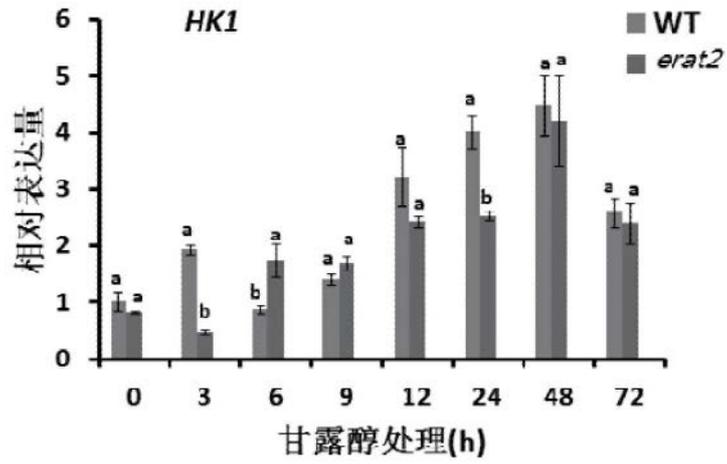


图19

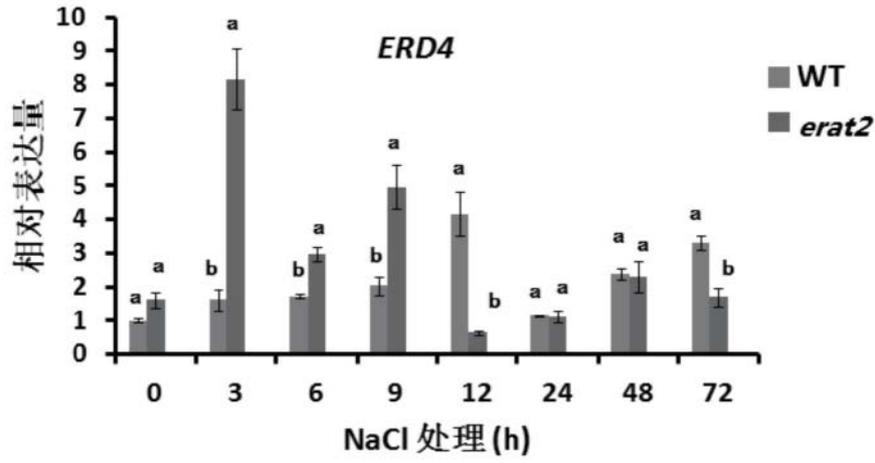


图20

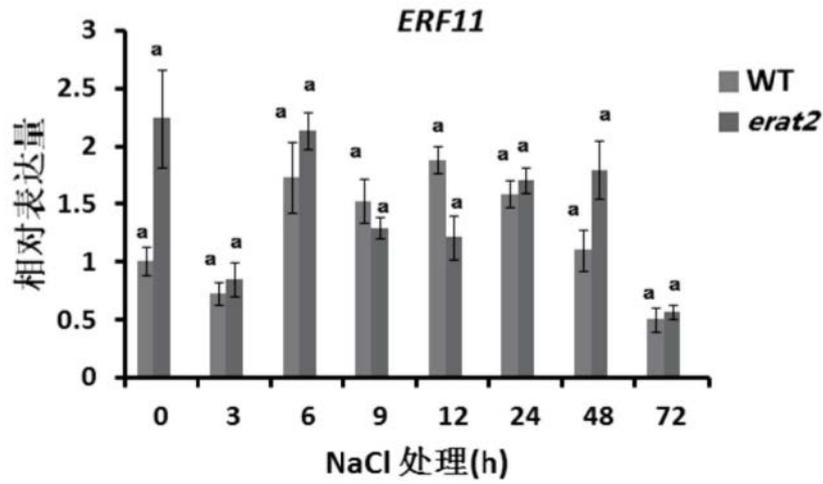


图21

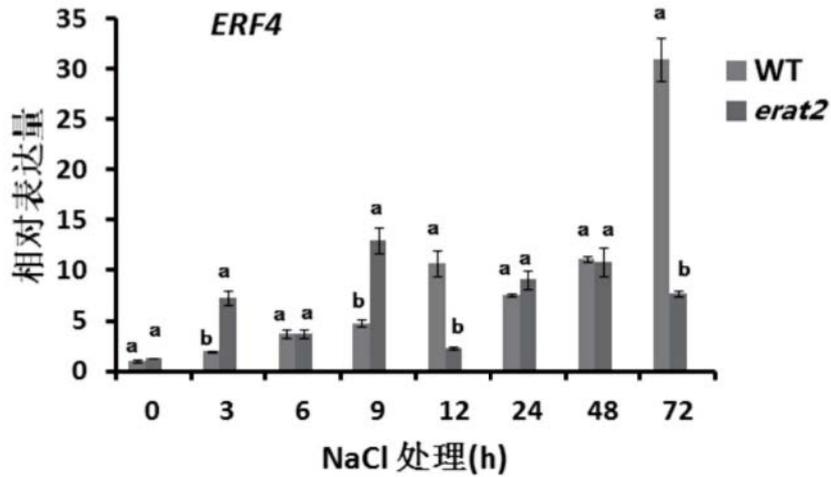


图22

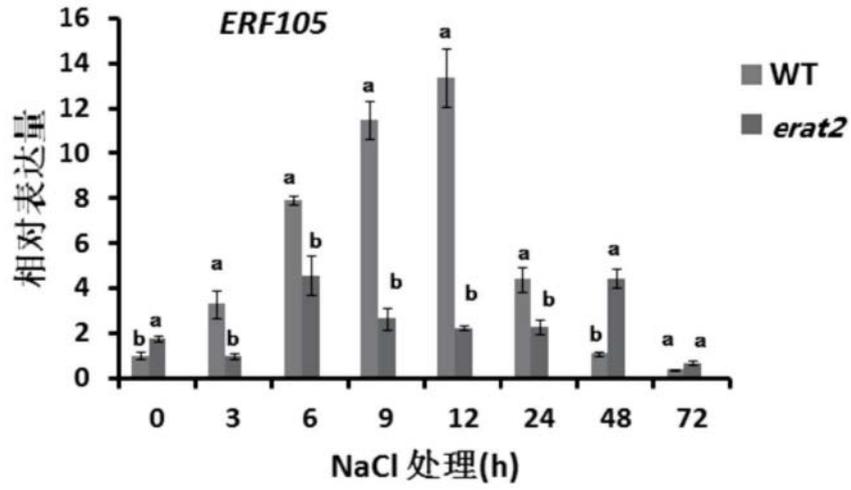


图23

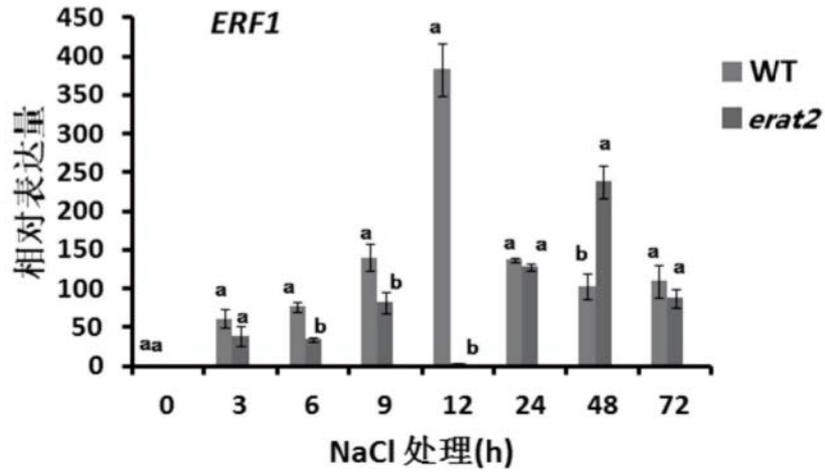


图24

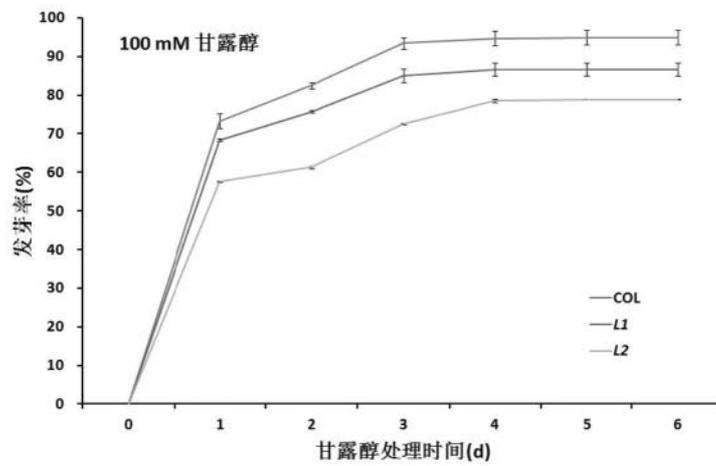


图25

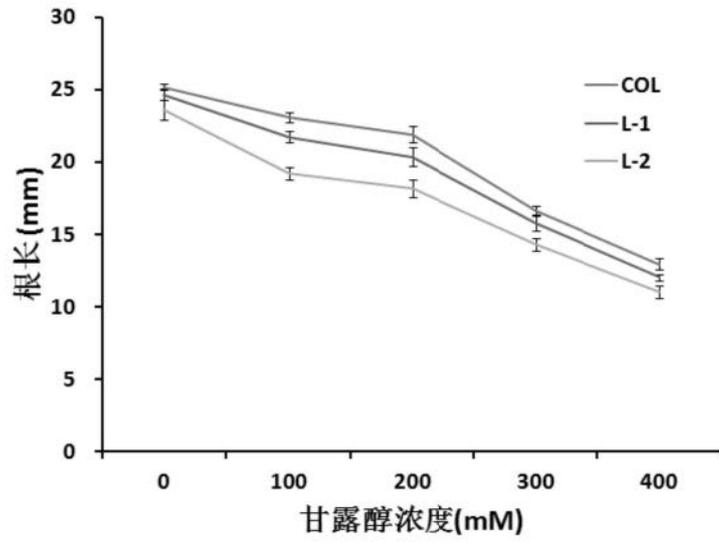


图26

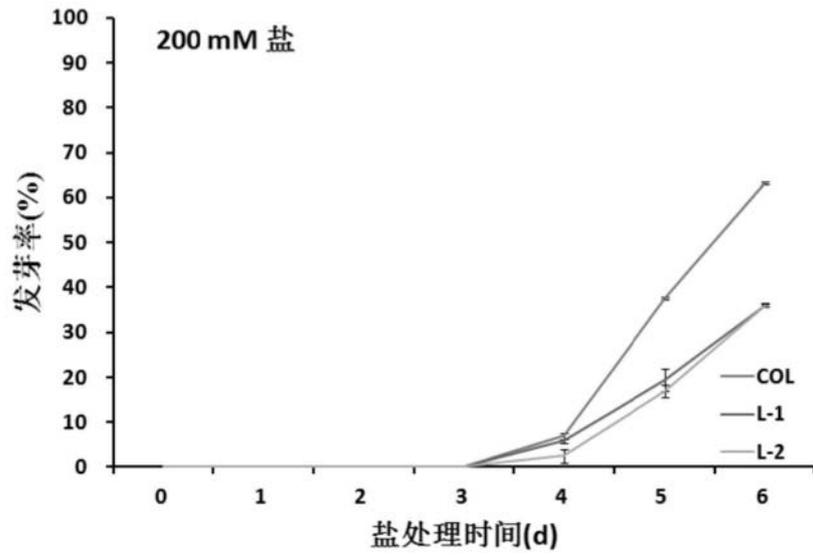


图27

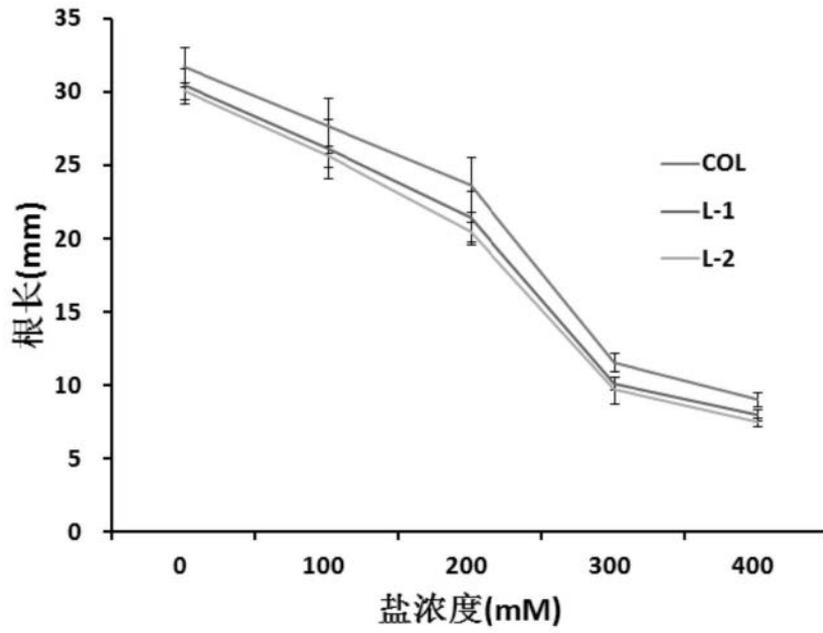


图28

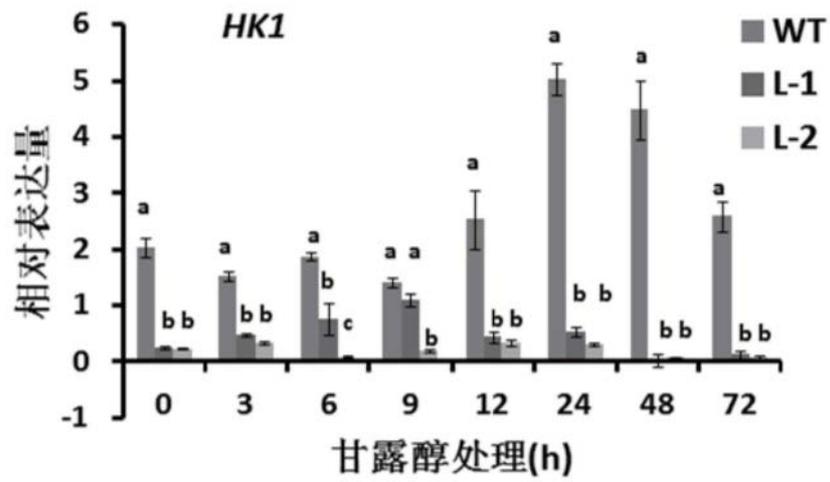


图29

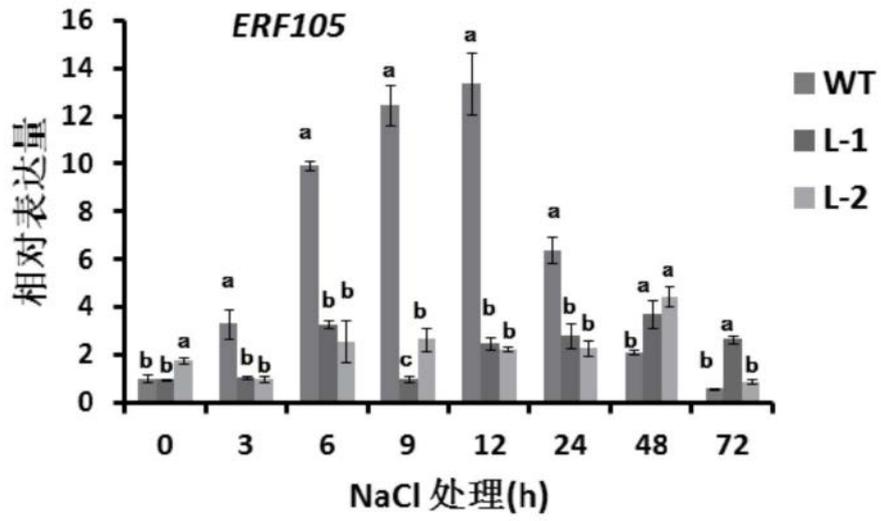


图30