



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112048490 A

(43) 申请公布日 2020.12.08

(21) 申请号 202010985865.3

(22) 申请日 2020.09.18

(71) 申请人 中国农业大学

地址 100193 北京市海淀区圆明园西路2号

(72) 发明人 李召虎 李芳军 周琳 田晓莉

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245

代理人 关畅

(51) Int. Cl.

C12N 9/12 (2006.01)

C12N 15/54 (2006.01)

C12N 15/82 (2006.01)

A01H 5/00 (2018.01)

A01H 6/60 (2018.01)

A01H 6/20 (2018.01)

权利要求书2页 说明书12页
序列表2页 附图5页

(54) 发明名称

棉花丝/苏氨酸蛋白磷酸酶GhTOPP6及其编码基因和应用

(57) 摘要

本发明公开了棉花丝/苏氨酸蛋白磷酸酶GhTOPP6及其编码基因和应用。本发明首先公开了如下任一所示的蛋白质在调控植物抗逆性中的应用:A1) 氨基酸序列为SEQ ID No.1的蛋白质;A2) 在SEQ ID No.1所示的氨基酸序列的N端或/和C端连接标签得到的融合蛋白;A3) 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/或添加得到的与A1) 所示的蛋白质具有90%以上的同一性且功能相同的蛋白质。本发明进一步公开了培育抗逆性增强的转基因植物的方法。本发明棉花GhTOPP6基因可以提高植物的抗逆性,为有效提高植物的耐盐性、抗旱性和ABA胁迫抗性奠定良好的分子基础。

1. 如下任一所示的蛋白质在调控植物抗逆性中的应用:

A1) 氨基酸序列为SEQ ID No.1的蛋白质;

A2) 在SEQ ID No.1所示的氨基酸序列的N端或/和C端连接标签得到的融合蛋白;

A3) 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/或添加得到的与A1)所示的蛋白质具有90%以上的同一性且功能相同的蛋白质。

2. 与权利要求1所述蛋白质相关的生物材料在调控植物抗逆性中的应用,所述生物材料为如下任一所述的应用:

C1) 编码权利要求1中所述蛋白质的核酸分子;

C2) 含有C1)所述核酸分子的表达盒;

C3) 含有C1)所述核酸分子的重组载体、或含有C2)所述表达盒的重组载体;

C4) 含有C1)所述核酸分子的重组微生物、或含有C2)所述表达盒的重组微生物、或含有C3)所述重组载体的重组微生物;

C5) 含有C1)所述核酸分子的转基因植物细胞系、或含有C2)所述表达盒的转基因植物细胞系、或含有C3)所述重组载体的转基因植物细胞系;

C6) 含有C1)所述核酸分子的转基因植物组织、或含有C2)所述表达盒的转基因植物组织、或含有C3)所述重组载体的转基因植物组织;

C7) 含有C1)所述核酸分子的转基因植物器官、或含有C2)所述表达盒的转基因植物器官、或含有C3)所述重组载体的转基因植物器官;

C8) 含有C1)所述核酸分子的转基因植株、或含有C2)所述表达盒的转基因植株、或含有C3)所述重组载体的转基因植株;

C9) 由C8)所述转基因植株的可再生细胞产生的组织培养物;

C10) 由C9)所述组织培养物产生的原生质体;

C11) 抑制权利要求1中所述的蛋白质的基因的表达量和/或抑制所述蛋白质的活性和/或降低所述蛋白质的含量的重组载体或重组微生物。

3. 根据权利要求2所述的应用,其特征在于:C1)所述核酸分子为如下任一所示:

B1) SEQ ID No.2所示的DNA分子;

B2) 编码序列是SEQ ID No.2所示的DNA分子;

B3) 在严格条件下与B1)或B2)限定的DNA分子杂交,且编码权利要求1中所述的蛋白质的DNA分子。

4. 权利要求1中所述蛋白质或权利要求2中所述生物材料在如下任一中的应用:

D1) 在培育抗逆性增强的转基因植物中的应用;

D2) 在制备培育抗逆性增强的转基因植物产品中的应用;

D3) 在培育抗逆性降低的基因沉默植物中的应用;

D4) 在制备培育抗逆性降低的基因沉默植物产品中的应用;

D5) 在植物育种中的应用。

5. 一种培育抗逆性增强的转基因植物的方法,其特征在於:所述方法包括提高目的植物中权利要求1中所述蛋白质的基因的表达量和/或权利要求1中所述蛋白质的活性和/或权利要求1中所述蛋白质的含量,得到转基因植物;与所述目的植物相比,所述转基因植物的抗逆性增强。

6. 根据权利要求5所述的方法,其特征在于:所述提高目的植物中权利要求1中所述蛋白质的基因的表达量和/或权利要求1中所述蛋白质的活性和/或权利要求1中所述蛋白质的含量为在目的植物中过表达权利要求1中所述蛋白质。

7. 一种培育抗逆性降低的基因沉默植物的方法,其特征在于:所述方法为如下任一种:

1) 抑制目的植物中权利要求1中所述蛋白质的基因的表达量和/或权利要求1中所述蛋白质的活性和/或权利要求1中所述蛋白质的含量,得到基因沉默植物;与所述目的植物相比,所述基因沉默植物的抗逆性降低;

2) 在目的植物中导入抑制目的植物中权利要求1中所述蛋白质的基因表达的载体和辅助载体;具体的,所述抑制目的植物中权利要求1中所述蛋白质的基因表达的载体为含有 SEQ ID No.2第1-311位所示的DNA分子的pYL156载体;所述辅助载体为pTRV-RNA1载体。

8. 根据权利要求1-4任一所述的应用,或,权利要求5-7任一所述的方法,其特征在于:所述抗逆性是指耐盐性和/或抗旱性和/或ABA胁迫抗性。

9. 根据权利要求1-4任一所述的应用,或,权利要求5-7任一所述的方法,其特征在于:所述植物为M1) 或M2) 或M3) 或M4) 或M5):

M1) 单子叶植物或双子叶植物;

M2) 十字花科;

M3) 拟南芥;

M4) 棉属植物;

M5) 棉花。

10. 权利要求1中所述的蛋白质或权利要求2或3中所述的生物材料。

棉花丝/苏氨酸蛋白磷酸酶GhTOPP6及其编码基因和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及植物基因工程领域。具体涉及棉花丝/苏氨酸蛋白磷酸酶GhTOPP6及其编码基因和应用。

背景技术

[0002] 盐碱地分布在世界各大洲干旱和沿海地区,全球约20%的耕地受到盐害威胁,棉花是盐碱地种植的先锋作物,随着耕地面积的减少,棉花种植逐渐向盐碱地集中,但棉花并非盐生植物,其耐盐程度有限,随土壤盐度增加,棉花也会受到盐胁迫危害,盐碱棉田棉花产量、品质问题不容忽视。随着分子生物学的不断发展,利用生物技术手段,培育抗旱、耐盐棉花品种正成为可能。当前棉花的基因克隆工作虽然已经取得了一定的成果,但棉花的基因克隆工作远远落后于水稻、玉米、小麦等粮食作物,尤其是对棉花耐盐机理的研究特别是在分子水平上的研究还不是很多。病毒诱导的基因沉默(Virus-induced gene silencing, VIGS)作为一种有效的反向遗传学技术广泛的用于植物基因组功能的鉴定,病毒诱导的基因沉默可以在植株的不同部位成功沉默内源基因,为研究不同生长时期的基因功能提供了切实可行的手段。

[0003] 真核生物中,可逆的磷酸化和去磷酸化是蛋白翻译后修饰的主要形式,真核生物细胞活动的所有方面,包括新陈代谢、细胞周期、离子通道、发育阶段的控制和逆境响应等几乎都需要可逆磷酸化的调节。依据底物特异性的不同,蛋白磷酸酶可以分为丝氨酸/苏氨酸蛋白磷酸酶、酪氨酸蛋白磷酸酶以及双特异性蛋白磷酸酶。丝氨酸/苏氨酸蛋白磷酸酶家族又可分为PP1,PP2A,PP2B(即钙调蛋白磷酸酶),PP4,PP5,PP6,PP7和kelch磷酸酶。该家族蛋白磷酸酶的数量不多且催化亚单位也很保守,但该家族磷酸酶的调节亚单位的数量众多,所以能调控上千种磷酸化蛋白底物的去磷酸过程。PP1是PPP蛋白磷酸酶家族中重要的一类磷酸酶,在拟南芥中,PP1有9个成员,在棉花中尚未有PP1成员的研究报道。

发明内容

[0004] 本发明所要解决的技术问题为如何调控棉花的抗逆性。

[0005] 为解决上述技术问题,本发明首先提供了一种蛋白质,所述蛋白质命名为丝/苏氨酸蛋白磷酸酶GhTOPP6,简称为蛋白GhTOPP6,来源于棉花(*Gossypium hirsutum*),是如下任一所示的蛋白质:

[0006] A1) 氨基酸序列为SEQ ID No.1的蛋白质;

[0007] A2) 在SEQ ID No.1所示的氨基酸序列的N端或/和C端连接标签得到的融合蛋白;

[0008] A3) 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/或添加得到的与A1)所示的蛋白质具有90%以上的同一性且功能相同的蛋白质。

[0009] 其中,SEQ ID No.1由323个氨基酸残基组成。

[0010] 上述蛋白质可人工合成,也可先合成其编码基因,再进行生物表达得到。

[0011] 上述蛋白质中,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。

[0012] 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(%)。

[0013] 上述蛋白质中,所述90%以上的同一性可为至少91%、92%、95%、96%、98%、99%或100%的同一性。

[0014] 本发明还提供上述蛋白GhTOPP6在调控植物抗逆性中的应用。

[0015] 与上述蛋白GhTOPP6相关的生物材料也属于本发明的保护范围,本发明还提供了与蛋白GhTOPP6相关的生物材料的新用途。

[0016] 本发明与蛋白GhTOPP6相关的生物材料在调控植物抗逆性中的应用,所述生物材料为如下任一所示:

[0017] C1) 编码蛋白GhTOPP6的核酸分子;

[0018] C2) 含有C1)所述核酸分子的表达盒;

[0019] C3) 含有C1)所述核酸分子的重组载体、或含有C2)所述表达盒的重组载体;

[0020] C4) 含有C1)所述核酸分子的重组微生物、或含有C2)所述表达盒的重组微生物、或含有C3)所述重组载体的重组微生物;

[0021] C5) 含有C1)所述核酸分子的转基因植物细胞系、或含有C2)所述表达盒的转基因植物细胞系、或含有C3)所述重组载体的转基因植物细胞系;

[0022] C6) 含有C1)所述核酸分子的转基因植物组织、或含有C2)所述表达盒的转基因植物组织、或含有C3)所述重组载体的转基因植物组织;

[0023] C7) 含有C1)所述核酸分子的转基因植物器官、或含有C2)所述表达盒的转基因植物器官、或含有C3)所述重组载体的转基因植物器官;

[0024] C8) 含有C1)所述核酸分子的转基因植株、或含有C2)所述表达盒的转基因植株、或含有C3)所述重组载体的转基因植株;

[0025] C9) 由C8)所述转基因植株的可再生细胞产生的组织培养物;

[0026] C10) 由C9)所述组织培养物产生的原生质体;

[0027] C11) 抑制上述蛋白GhTOPP6的基因的表达量和/或抑制上述蛋白GhTOPP6的活性和/或降低上述蛋白GhTOPP6的含量的重组载体或重组微生物。

[0028] 其中,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或hnRNA等。

[0029] 上述生物材料中,C1)所述核酸分子为如下任一所示:

[0030] B1) SEQ ID No.2所示的DNA分子;

[0031] B2) 编码序列是SEQ ID No.2所示的DNA分子;

[0032] B3) 在严格条件下与B1)或B2)限定的DNA分子杂交,且编码蛋白GhTOPP6的DNA分子。

[0033] 其中,SEQ ID No.2由972个核苷酸组成,编码SEQ ID No.1所示的蛋白质。

[0034] 所述严格条件是在 $2\times$ SSC,0.1%SDS的溶液中,在68℃下杂交并洗膜2次,每次5min,又于 $0.5\times$ SSC,0.1%SDS的溶液中,在68℃下杂交并洗膜2次,每次15min。

[0035] 上述生物材料中,C2)所述的表达盒是指能够在宿主细胞中表达蛋白GhTOPP6的DNA,该DNA不但可包括启动GhTOPP6基因转录的启动子,还可包括终止GhTOPP6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:GhTOPP6基因自身的启动子,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: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 Physiol* 120:979-992);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-硫代羧酸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200710099169.7)),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:GhTOPP6基因自身的终止子、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(I^{985}) *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)。

[0036] 上述生物材料中,C3)所述重组载体可含有SEQ ID No.2所示的用于编码蛋白GhTOPP6的DNA分子。

[0037] 可用现有的植物表达载体构建含有所述蛋白GhTOPP6的基因或所述蛋白GhTOPP6的基因表达盒的重组载体。所述植物表达载体可为Gateway系统载体或双元表达载体等,如super1300、pGWB411、pGWB412、pGWB405、pBin438、pCAMBIA1302、pCAMBIA2300、pCAMBIA2301、pCAMBIA1301、pCAMBIA1300、pBI121、pCAMBIA1391-Xa或pCAMBIA1391-Xb。使用GhTOPP6构建重组载体时,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、泛生素基因Ubiquitin启动子(pUbi)等,它们可单独使用或与其它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。

[0038] 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(如抗除莠剂基因)等。

[0039] 在本发明具体的实施方式中,C3)所述重组载体为35S::GhTOPP6-GFP重组载体,所述35S::GhTOPP6-GFP重组载体将super1300的SmaI和KpnI酶切位点间的DNA片段替换为SEQ ID No.2的GhTOPP6基因后,且保持super1300的其他序列不变得到的载体。

[0040] 上述生物材料中,C11)所述重组载体为重组表达载体pYL156-GhTOPP6,所述pYL156-GhTOPP6为在pYL156载体的EcoRI和BamHI酶切位点间的DNA片段替换为SEQ ID No.2第1-311位所示的DNA分子,且保持pYL156载体的其它序列不变得到的重组载体。

[0041] 上述生物材料中,所述重组微生物具体可为酵母、细菌、藻和真菌;如所述细菌可以为农杆菌GV3101。

[0042] 上述生物材料中,所述转基因植物器官可为转基因植物的根、茎、叶、花、果实和种子。

[0043] 上述生物材料中,所述组织培养物可来源于根、茎、叶、花、果实、种子、花粉、胚和花药。

[0044] 上述生物材料中,所述转基因植物细胞系、转基因植物组织和转基因植物器官均不包括繁殖材料。

[0045] 本发明进一步提供了调控植物抗逆性的产品,含有上述蛋白GhTOPP6或与其相关的生物材料。

[0046] 上述蛋白GhTOPP6或与其相关的生物材料在如下任一中的应用也在本发明的保护范围之内:

[0047] D1) 在培育抗逆性增强的转基因植物中的应用;

[0048] D2) 在制备培育抗逆性增强的转基因植物产品中的应用;

[0049] D3) 在培育抗逆性降低的基因沉默植物中的应用;

[0050] D4) 在制备培育抗逆性降低的基因沉默植物产品中的应用;

[0051] D5) 在植物育种中的应用。

[0052] 上述应用中,植物育种中的应用具体可为将含有蛋白GhTOPP6或与其相关的生物材料(例如蛋白GhTOPP6的编码基因GhTOPP6)的植物与其它植物进行杂交以进行植物育种。

[0053] 本发明还提供了培育抗逆性增强的转基因植物的方法。

[0054] 本发明培育抗逆性增强的转基因植物的方法,包括提高目的植物中蛋白GhTOPP6的基因的表达量和/或蛋白GhTOPP6的活性和/或蛋白GhTOPP6的含量,得到转基因植物;与所述目的植物相比,所述转基因植物的抗逆性增强。

[0055] 上述方法中,所述提高目的植物中蛋白GhTOPP6的基因的表达量和/或蛋白GhTOPP6的活性和/或蛋白GhTOPP6的含量为在目的植物中过表达蛋白质GhTOPP6。

[0056] 所述过表达的方法为将蛋白GhTOPP6的基因导入目的植物;具体的,所述蛋白GhTOPP6的基因的核苷酸序列是SEQ ID No.2所示的DNA分子。

[0057] 上述将蛋白质GhTOPP6的基因导入目的植物可通过携带有本发明基因GhTOPP6的植物表达载体导入目的植物中。携带有本发明基因GhTOPP6的植物表达载体可通过使用Ti质粒、Ri质粒、植物病毒载体、直接DNA转化、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,并将转化的植物细胞或组织培育成植株。

[0058] 携带有本发明基因GhTOPP6的植物表达载体可为35S::GhTOPP6-GFP。具体的载体

构建方法为将Super1300载体的SmaI和KpnI酶切位点间的DNA片段替换为SEQ ID No.2所示的DNA分子,且保持Super1300载体的其它序列不变得到的重组载体。

[0059] 本发明还提供了培育抗逆性降低的基因沉默植物的方法,包括抑制目的植物中蛋白质GhTOPP6的基因的表达量和/或蛋白质GhTOPP6的活性和/或蛋白质GhTOPP6的含量,得到基因沉默植物;与所述目的植物相比,所述基因沉默植物的抗逆性降低。

[0060] 上述方法中,所述抑制目的植物中蛋白GhTOPP6的基因的表达量和/或蛋白GhTOPP6的活性和/或蛋白GhTOPP6的含量为在目的植物中导入抑制目的植物中GhTOPP6的基因表达的载体和辅助载体。

[0061] 具体的,所述抑制目的植物中GhTOPP6的基因表达的载体为含有SEQ ID No.2第1-311位所示的DNA分子的pYL156载体;所述辅助载体为pTRV-RNA1载体。

[0062] 在本发明具体的实施方式中,所述抑制目的植物中GhTOPP6的基因表达的载体可为pYL156-GhTOPP6。所述pYL156-GhTOPP6的具体的构建方法为将pYL156载体的EcoRI和BamHI酶切位点间的DNA片段替换为SEQ ID No.2第1-311位所示的DNA分子,且保持pYL156载体的其它序列不变得到的重组载体。

[0063] 本发明中,所述抗逆性是指耐盐性和/或抗旱性和/或ABA胁迫抗性。

[0064] 本发明中,所述植物为M1) 或M2) 或M3) 或M4) 或M5) :

[0065] M1) 单子叶植物或双子叶植物;

[0066] M2) 十字花科;

[0067] M3) 拟南芥;

[0068] M4) 棉属植物;

[0069] M5) 棉花。

[0070] 本发明克隆了棉花GhTOPP6基因,并利用转基因技术构建了GhTOPP6过表达的转基因拟南芥植物和利用VIGS技术构建了GhTOPP6沉默植株,对GhTOPP6进行了功能验证,明确了GhTOPP6可以提高植物的抗逆性,尤其是提高了植物的抗旱性、耐盐性和ABA胁迫抗性,有利于更深入的研究植物对盐、旱等非生物胁迫信号的响应机制,为有效提高植物耐盐抗旱性奠定良好的分子基础,对探究植物在逆境下的信号调控网络具有重大价值。

附图说明

[0071] 图1为GhTOPP6基因扩增产物琼脂糖凝胶电泳图。

[0072] 图2为棉花GhTOPP6基因组织特异性表达分析图。

[0073] 图3为35S::GhTOPP6-GFP重组载体的结构示意简图。

[0074] 图4为GhTOPP6亚细胞定位图;A为GhTOPP6转基因拟南芥的根部细胞荧光定位图;B为棉花GhTOPP6基因在拟南芥原生质体中的亚细胞定位图。图5为GhTOPP6基因第1-311位扩增产物琼脂糖凝胶电泳图。

[0075] 图6为棉花GhTOPP6基因沉默效率鉴定及GhTOPP6基因沉默植株抗逆性验证;A为棉花GhTOPP6基因沉默效率鉴定;B为GhTOPP6基因沉默植株抗盐表型;C为GhTOPP6基因沉默植株离体植株失水率。

[0076] 图7为棉花GhTOPP6基因在非生物胁迫条件下的表达量变化。

[0077] 图8为过表达转基因拟南芥纯合株系获取及过表达株系在不同胁迫条件下的萌发

率比较;A为过表达转基因拟南芥株系Western Blot鉴定图;B为过表达转基因拟南芥纯合株系OE1、OE2和OE3在不同胁迫条件下的萌发率比较。

具体实施方式

[0078] 以下的实施例便于更好地理解本发明,但并不限定本发明。下述实施例中所使用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、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。

[0079] 实施例1、GhTOPP6蛋白及其编码基因的发现、克隆及定位

[0080] 一、GhTOPP6蛋白及其编码基因的发现

[0081] 对VIGS cDNA文库盐相关基因进行筛选(利用VIGS技术研究棉花抗逆基因功能,李芳军,《中国农业大学》,2014),利用棉花数据库进行检索从棉花品种“国欣3号”(国欣3号抗虫棉栽培技术,冯素莲,《河北农业》,2011,06)中获得一个新的蛋白,将其命名为GhTOPP6蛋白,所述GhTOPP6蛋白的氨基酸序列如SEQ ID No.1所示,由323个氨基酸残基组成;将编码GhTOPP6蛋白的基因命名为GhTOPP6基因,所述GhTOPP6基因的开放阅读框如SEQ ID No.2所示,由972个核苷酸组成。

[0082] 二、GhTOPP6基因的克隆

[0083] 使用艾德莱试剂盒抽提棉花叶片和根系RNA(试剂盒购自北京久康源生物科技有限公司,抽提按照提供的说明书操作),用M-MLV反转录试剂盒(购自Promega公司,按照试剂盒说明书操作)合成第一链cDNA,所得的第一链cDNA作为模板用于扩增GhTOPP6基因全长。根据GhTOPP6基因序列,设计两条特异性引物(上游引物:ATGGAACTAGGGTTCTTGAT和下游引物:ATTTATGTATACCTTGATTC)进行PCR扩增,获得PCR产物,其中,20 μ L PCR反应体系包括模板10xBuffer 2 μ L、10mmol/L dNTPs 2 μ L、MgSO₄ 1.4 μ L、cDNA 1.2 μ L、KOD-Plus酶0.4 μ L、上游引物(10 μ M) 0.3 μ L、下游引物(10 μ M) 0.3 μ L、ddH₂O 12.4 μ L;PCR扩增程序为:94 $^{\circ}$ C,2min;30个循环的程序为94 $^{\circ}$ C,15s;56 $^{\circ}$ C,30s;68 $^{\circ}$ C,3min;最后68 $^{\circ}$ C延伸10min。取PCR产物在1%琼脂糖凝胶上电泳(图1)。电泳完毕在紫外灯下切下目的条带,用琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒(购自天根生化科技有限公司,操作步骤参照该试剂盒的使用说明书)回收,纯化,得到纯化后的片段末端加A,其中,10 μ L反应体系为:10xBuffer 1 μ L、dATP1 μ L、Taq酶0.5 μ L、纯化后的片段7.5 μ L,72 $^{\circ}$ C反应半小时。加A后的片段与PMD18-T载体(购自TaKaRa公司,操作按照TaKaRa公司的说明书进行)连接,得到连接产物,其中,10 μ L反应体系为:加A的片段4.5 μ L、PMD18-T 0.5 μ L、Solution I 5 μ L,于16 $^{\circ}$ C连接过夜。取5 μ L连接产物,采用热击法(参照J.萨姆布鲁克,等著,黄培堂等译,分子克隆实验指南(第三版),科学出版社,2002版)转化大肠杆菌DH5 α ,在含有50mg/L氨苄霉素的LB固体平板中筛选阳性克隆,挑取5个克隆测序(测序工作由上海invitrogen公司完成),获得所需的全长基因cDNA,即获得了GhTOPP6基因。测序结果表明,该基因的序列全长972bp、编码323个氨基酸的完整的ORF阅读框。

[0084] 三、GhTOPP6基因的组织特异性定位

[0085] 通过荧光实时定量PCR对棉花品种“国欣3号”中GhTOPP6基因的表达部位进行分析:

[0086] 荧光实时定量PCR所用的仪器为ABI 7500Fast (Applied Biosystem),所用的引物对为5'-CGGATTCTACGACGAGTGTA-3'和5'-CGGATTCTGGGACATCAGT-3',用于检测组织特异性

表达的样本为正常营养水平下三叶期棉花不同组织(即叶、根和茎)的总RNA反转录得到的cDNA,PCR程序:94℃变性30s;94℃变性5s,60℃退火35s、40个循环;以棉花Actin9基因作为对照(用于鉴定棉花Actin9基因的引物对为:5'-GCCTTGACTATGAGCAGGA-3'和5'-AAGAGATGGCTGGAAGAGGA-3'),相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算。

[0087] 结果显示,正常营养水平下三叶期棉花各部位GhTOPP6基因的相对表达量见图2,GhTOPP6基因在棉花不同组织中均有一定的表达量,而在叶和根中的表达量相对较高。

[0088] 四、GhTOPP6基因的亚细胞定位

[0089] 利用稳定遗传转化的转基因拟南芥根部来研究GhTOPP6蛋白的亚细胞定位。根据植物二元转化载体super1300-GFP(连接GFP基因的重组载体,该载体记载于博士学位论文“菟丝子离体生长过程中的代谢特征及其基因组中农杆菌mis基因的研究,张月霞,《中国农业大学》,2020”中,公众经作者同意后,可从中国农业大学李召虎课题组获得,以重复本实验,不可作为其它用途使用,以下称为“super1300”)的多克隆位点和GhTOPP6基因的编码区序列设计出扩增GhTOPP6基因整个编码区的正向引物和反向引物,得到35S::GhTOPP6-GFP重组载体,具体方法为以GhTOPP6基因为模板,利用正向引物和反向引物进行PCR扩增,获得包含GhTOPP6基因的产物;利用SmaI和KpnI分别酶切包含GhTOPP6基因的产物和super1300,分别得到酶切产物和载体框架并回收;将酶切产物和载体框架连接得到的35S::GhTOPP6-GFP重组载体(结构示意图如图3所示),即将super1300的SmaI和KpnI酶切位点间的DNA片段替换为SEQ ID No.2的GhTOPP6基因后,且保持super1300的其他序列不变得到的载体。

[0090] 其中,所述引物如下:

[0091] 正向引物:5'-TCCCCGGGATGGAACTAGGGTTCTTGAT-3'(下划线为SmaI的酶切位点);

[0092] 反向引物:5'-GGGGTACCTACCATGGCTCCAAGAAATG-3'(下划线为KpnI的酶切位点)。

[0093] 将35S::GhTOPP6-GFP转入农杆菌GV3101,获得重组菌并侵染拟南芥,筛选出稳定遗传转化的转基因植株。

[0094] 用Leica SimulatorSP8型显微镜观察稳定遗传转化的转基因拟南芥根部细胞的报告基因,结果显示,转基因拟南芥的根部细胞荧光定位在细胞质或者细胞核上(图4中A所示)。为了排除GhTOPP6-GFP在细胞膜上表达的可能性,将35S::GhTOPP6-GFP重组载体转入到拟南芥原生质体中并表达,结果显示,荧光信号仍定位在细胞质或者细胞核(图4中B所示),拟南芥原生质体分离与转化方法如下:

[0095] 拟南芥原生质体提取(Cellulase R10及Macerozyme R10购自Onozuka,其他试剂购自Sigma-Aldrich)

[0096] 酶解液(10mL):1%Cellulase R10,0.2%Macerozyme R10,0.4M mannitol,20mM KCl,20mM MES pH 5.7,10mM CaCl₂。

[0097] WI溶液:20mM KCl,0.5M mannitol,4mM MES pH5.7。

[0098] W5溶液:125mM CaCl₂,154mM NaCl,5mM KCl,2mM MES pH5.7。

[0099] MMg溶液:0.4M mannitol,15mM MgCl₂,4mM MES pH 5.7。

[0100] 40%(w/v)PEG转化液:0.2M mannitol,CaCl₂100 mM,4g PEG 4000。

[0101] 用刀片将四周龄拟南芥幼嫩的莲座叶切成宽1mm,长约1cm的长条,将切好的条状叶片迅速转入并浸没在酶解液中,避光抽真空30min,避光静置酶解2-3h;加入与酶解液等

体积的W5溶液,用200目尼龙膜过滤酶解溶液以除去未酶解的残渣,过滤液即为拟南芥的原生质体;90g离心2min,弃去上清液。用W5溶液重悬原生质体并90g离心2min,弃去上清液,加入W5溶液重悬原生质体,置于冰上30min;吸去W5溶液,并加入MMg溶液重悬原生质体,调整原生质体终浓度约为 2×10^5 个/mL用于转化。

[0102] 吸取100 μ L的原生质体于2mL圆底离心管中,并加入10 μ L 35S::GhTOPP6-GFP重组质粒DNA,轻弹使二者混匀,向离心管中加入110 μ L 40%PEG溶液,迅速轻弹离心管使其混匀,室温下静置5min;向离心管中加入800 μ L的W5溶液终止反应。90g离心2min,弃上清,用WI溶液重悬原生质体;将原生质体转移至培养板中,室温弱光培养10-12h。90g离心2min,吸去WI溶液,向其中加入110 μ L WI溶液,轻弹混匀。

[0103] 用剪去尖部的枪头吸取少量原生质体滴加在载玻片上,于激光共聚焦显微镜下观察GFP的表达情况。

[0104] 实施例2、VIGS沉默植株胁迫表型

[0105] 一、VIGS-GhTOPP6沉默载体的构建

[0106] 1、提取棉花品种“国欣3号”叶片的总RNA并反转录为cDNA。

[0107] 2、以步骤1得到的cDNA为模板,用F1和R1组成的引物对进行PCR扩增,得到PCR扩增产物(图5)。

[0108] F1:5' -GGAATTCATGGAACTAGGGTTCTT-3' (下划线为EcoRI的酶切位点)

[0109] R1:5' -CGGGATCCAGGAGAAGACATATGGTT-3' (下划线为BamHI的酶切位点)

[0110] 3、用限制性内切酶EcoRI和BamHI双酶切步骤2得到的PCR扩增产物,回收酶切产物。

[0111] 4、用限制性内切酶EcoRI和BamHI双酶切pYL156 (pTRV2:RNA2) 载体(记载于非专利文献“Gao X,2013,Functional genomic analysis of cotton genes with agrobacterium-mediated virus-induced gene silencing.”中),回收载体骨架。

[0112] 5、将步骤3的酶切产物和步骤4的载体骨架连接,得到重组质粒pYL156-GhTOPP6。

[0113] 对重组质粒pYL156-GhTOPP6进行测序验证,结果表明:重组质粒pYL156-GhTOPP6为将pYL156载体的EcoRI和BamHI酶切位点间的DNA片段替换为SEQ ID No.2第1-311位所示的部分GhTOPP6基因片段后,且保持pYL156载体的其他序列不变得到的载体。

[0114] 二、VIGS-GhTOPP6沉默植株的获得

[0115] 1、将pYL156-GhTOPP6、pYL156-GFP、pTRV-RNA1和pYL156-GhCLA1 (pYL156-GFP、pTRV1 (pTRV-RNA1) 和pYL156-GhCLA1记载于非专利文献“Gao X,2013,Functional genomic analysis of cotton genes with agrobacterium-mediated virus-induced gene silencing.”中) 分别电击转化农杆菌GV3101,得到重组菌pYL156-GhTOPP6/GV3101、重组菌pYL156-GFP/GV3101、重组菌pTRV1/GV3101和重组菌pYL156-GhCLA1/GV3101,分别于28 $^{\circ}$ C在LB液体培养基(50 μ g/mL卡那霉素,25 μ g/mL庆大霉素,10mM MES pH5.6-5.7,20 μ M乙酰丁香酮,溶剂为水)中摇培12-14h收集重组菌pYL156-GhTOPP6/GV3101、重组菌pYL156-GFP/GV3101、重组菌pTRV1/GV3101和重组菌pYL156-GhCLA1/GV3101;

[0116] 2、重组菌pYL156-GhTOPP6/GV3101、重组菌pYL156-GFP/GV3101、重组菌pTRV1/GV3101和重组菌pYL156-GhCLA1/GV3101用VIGS溶液(10mM MES pH5.6,10mM MgCl₂,200 μ M乙酰丁香酮,溶剂为水)分别重悬菌体并将菌液浓度调整到OD₆₀₀=1.5,将重组菌pYL156-

GhTOPP6/GV3101、pYL156-GFP/GV3101和pYL156-GhCLA1/GV3101分别与重组菌pTRV1/GV3101的菌液按照1:1的比例混合,得到混合液1、混合液2和混合液3;

[0117] 3、用1ml无针头注射器将混合液1打满不同的棉花“国欣3号”子叶的下表面,以获得VIGS-GhTOPP6沉默植株;

[0118] 用1ml无针头注射器将混合液2打满不同的棉花“国欣3号”子叶的下表面,以获得VIGS-GFP对照植株;

[0119] 用1ml无针头注射器将混合液3打满不同的棉花“国欣3号”子叶的下表面,培养两周后分别获得VIGS-GhCLA1指示植株;

[0120] 待注射混合液3的植株出现白化表型约两周后,对注射混合液1和混合液2的植株分别提取叶片部位RNA(使用艾德莱试剂盒抽提棉花RNA,抽提按照提供的说明书操作),并反转录cDNA(M-MLV反转录试剂盒,购自Promega公司,按照试剂盒说明书操作),通过荧光实时定量PCR进行基因沉默效率分析:所用的引物对为5'-CCAACAGGCAACTCGTAAC-3'和5'-TGTGAATGTCCCAAACCC-3',PCR程序:94℃变性30s;94℃变性5s、60℃退火35s、40个循环;以棉花Actin9基因作为对照(用于鉴定棉花Actin9基因的引物对为:5'-GCCTTGACTATGAGCAGGA-3'和5'-AAGAGATGGCTGGAAGAGGA-3'),相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算。

[0121] 结果显示,注射混合液1(含有pYL156-GhTOPP6/GV3101和pTRV1/GV3101菌液)的植株的GhTOPP6基因表达量显著低于注射混合液2(含有pYL156-GFP/GV3101和pTRV1/GV3101菌液)的植株(图6中A所示),即通过上述方法获得了沉默GhTOPP6基因的VIGS-GhTOPP6沉默植株(注射混合液1的植株)以及VIGS-GFP对照植株(注射混合液2的植株)。

[0122] 三、VIGS-GhTOPP6沉默植株的抗盐表型

[0123] 通过对步骤二得到的沉默GhTOPP6基因的VIGS-GhTOPP6沉默植株和VIGS-GFP对照植株进行200mM NaCl胁迫处理,在盐胁迫下,VIGS-GhTOPP6沉默植株与VIGS-GFP对照植株相比,植株生长量抑制更加明显,叶片更小,且叶缘处萎蔫卷曲等盐害特征更显著,对盐胁迫更为敏感;在未经NaCl处理的对照组中,VIGS-GhTOPP6沉默植株和VIGS-GFP对照植株生长特征并无差异(图6中B所示)。

[0124] 四、VIGS-GhTOPP6沉默植株的失水率测定

[0125] 通过对步骤二得到的沉默GhTOPP6基因的VIGS-GhTOPP6沉默植株和VIGS-GFP对照植株进行离体干旱处理,取植株地上部,置于正常棉花植株生长条件下,在不同时间点称取植株鲜重,检测失水率变化(图6中C所示),VIGS-GhTOPP6沉默植株相较于VIGS-GFP对照植株,失水速率更快。

[0126] 四、GhTOPP6基因在非生物胁迫条件下的表达量变化

[0127] 将正常生长条件下的三叶期的棉花品种“国欣3号”植株分为三组,每组10株,分别进行200mM NaCl,100μM ABA和5%PEG处理,分别提取不同时间点(0h、3h、6h、9h、12h、24h、48h、72h)的叶和根的RNA并反转录为cDNA,通过荧光实时定量PCR检测GhTOPP6基因表达量,所用的引物对为5'-CCAACAGGCAACTCGTAAC-3'和5'-TGTGAATGTCCCAAACCC-3',PCR程序:94℃变性30s;94℃变性5s、60℃退火35s、40个循环;以棉花Actin9基因作为对照(用于鉴定棉花Actin9基因的引物对为:5'-GCCTTGACTATGAGCAGGA-3'和5'-AAGAGATGGCTGGAAGAGGA-3'),相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算。结果显示各胁迫条件(200mM NaCl,100μM ABA和5%

PEG处理)均能诱导GhTOPP6的表达(图7)。

[0128] 综合图6、图7中的试验结果,在棉花中利用VIGS基因沉默技术使GhTOPP6基因表达量显著降低,基因沉默效率达到73.9%;与VIGS-GFP对照植株相比,VIGS-GhTOPP6沉默植株在盐胁迫处理下生长量抑制更加明显,且盐害特征更显著,对盐胁迫更为敏感;植株离体模拟干旱处理,VIGS-GhTOPP6沉默植株失水速率更快;而正常生长的棉花植株受到NaCl(图7中A所示)、ABA(图7中B所示)、PEG(图7中C所示)处理模拟的盐、干旱等非生物胁迫均能诱导GhTOPP6基因表达量上调,表明GhTOPP6基因可能在棉花盐胁迫等非生物逆境中起到正调控作用。

[0129] 实施例3、转基因植物的获得

[0130] 1、将实施例1步骤四获得的35S::GhTOPP6-GFP重组载体导入农杆菌菌株GV3101,得到重组农杆菌。

[0131] 2、将步骤1得到的重组农杆菌于28℃在LB液体培养基(50μg/mL卡那霉素,25μg/mL庆大霉素)中摇培24h,4000rpm离心10min收集重组农杆菌并重悬(重悬液:50mM MES pH5.6,5%蔗糖,溶剂为水),将重悬菌液浓度调整到OD₆₀₀=0.8,加入silwetL-77(500μl/L,将菌悬液蘸湿拟南芥未露白的花序,然后将拟南芥用黑色塑料袋包住以保持湿度,平放,20℃暗培养24h后去掉塑料袋,恢复光照、按常规方法培养植株至结实,收获成熟T₀代种子。

[0132] 3、采用含有50mg/L潮霉素的1/2MS培养基培养T₀代种子并从中挑选阳性植株(阳性植株表现为:真叶健康呈深绿色,根伸长至培养基中)。

[0133] 4、将步骤4获得的阳性植株自交获得T₁代种子。

[0134] 5、采用含有25mg/L潮霉素的1/2MS培养基培养T₁代种子并从中挑选阳性植株(筛选标准为阳性植株比例大于3:1)。

[0135] 6、将步骤6所获阳性植株自交获得T₂代种子。

[0136] 7、采用含有25mg/L潮霉素的1/2MS培养基培养T₂代种子并从中挑选阳性植株(筛选标准为该株系全部为阳性植株)。

[0137] 8、将步骤8所获阳性植株自交获得T₃代种子。培育T₃代种子,获得T₃代转GhTOPP6拟南芥植株。

[0138] 9、对T₃代转GhTOPP6拟南芥植株提取总蛋白,用Western Blot进行分子鉴定(图8中A),得到GhTOPP6过表达转基因纯合株系。

[0139] 具体步骤如下:

[0140] 在植株生长至第四周时用打孔器取叶片样品,液氮磨碎叶片组织,加入SDS植物总蛋白提取液(250mM Tris-HCl pH 6.8,4%SDS,40%甘油,0.1%溴酚蓝,4%β-巯基乙醇),混匀后95度以上变性10分钟,离心取上清即为变性后的总蛋白进行SDS-PAGE检测;

[0141] 用10%SDS-PAGE凝胶安好电泳装置,倒入电泳液,加入蛋白样品和预染marker,设置电压为90-120V进行恒压电泳分离(SDS-PAGE凝胶购自BIO-RAD,所用仪器来自于Bio-Rad Mini-PROTEAN^R Tetra System,预制marker购自Thermo Fisher,10×Tris-甘氨酸电泳缓冲液:30.3g/L Tris base,144g/L甘氨酸,10g/L SDS,用前用蒸馏水稀释至1×使用),待染料线距离凝胶底部1-2cm时停止电泳;

[0142] 取下SDS-PAGE胶浸泡于转膜缓冲液(2.9g/L甘氨酸,5.8g/L Tris base,0.37g/L SDS,20%甲醇)平衡10min,将PVDF膜剪裁至合适大小,在甲醇中浸湿10-15s之后转移至转

膜缓冲液中平衡20~30min,转膜用滤纸同样在转膜缓冲液中充分浸湿,从正极到负极按照滤纸、PVDF膜、SDS-PAGE胶、滤纸的顺序放置于转膜仪上(BIO-RAD TRANS-BLOT SD SEMI-DRY TRANSFER CELL),60mA恒流转膜1hr;

[0143] 转膜完成后将PVDF膜置于2% (m/v) BSA或3%-5%脱脂奶粉的TBST溶液(10×TBS溶液:80g/L NaCl,30g/L Tris-base,2g/L KCL,调节PH至7.5,使用时用蒸馏水稀释至1×,并按照1:500-1:1000加入Tween 20,即为TBST溶液)中封闭1-2h;

[0144] 按照1:1500的比例在封闭液中加入抗体anti-GFP(购自Sigma-Aldrich),4℃杂过夜,用TBST溶液洗膜3次,每次10min,加入二抗anti-mouse(购自Sigma-Aldrich,使用时按照1:10000稀释在2% (m/v) BSA或3%-5%脱脂奶粉的TBST溶液),室温孵育2h,用TBST溶液洗膜3次,用TBS溶液洗膜一次后进行显影(显影液BIO-RAD Clarity™ Western ECL Substrate,成像系统为BIO-RAD ChemiDoc™ XRS+)。

[0145] 显影后将PVDF膜浸没在丽春红染色液中(丽春红溶液:0.2% (w/v) 丽春红,3% (v/v) 乙酸),摇动2-5min或更长后取出,用蒸馏水漂洗2-3次,出现清晰条带后记录结果。

[0146] 最终,选取GhTOPP6过表达转基因纯合株系OE1、OE2、OE3进行抗逆性分析。

[0147] 实施例4不同转基因株系抗逆性分析

[0148] 对拟南芥GhTOPP6过表达转基因纯合株系逆境胁迫下萌发率分析:将GhTOPP6过表达转基因纯合株系OE1、GhTOPP6过表达转基因纯合株系OE2、GhTOPP6过表达转基因纯合株系OE3和野生型拟南芥(WT)种子,拟南芥同源基因突变体株系SLAK-066057C,SALK-093747C(购自ABRC)种在正常1/2MS培养基和含有100mM NaCl和0.2μM ABA的培养基中,4℃春化72小时后,移入20℃温室中,16h光/8h暗,光强为60μmol/m²/s,湿度60%~70%的培养室培养10天,于第8天、第9天和第10天分别检测各株系的萌发率,结果如图8中B所示:在1/2MS培养基上,野生型拟南芥(WT)和GhTOPP6过表达转基因纯合株系OE1、GhTOPP6过表达转基因纯合株系OE2、GhTOPP6过表达转基因纯合株系OE3、突变体株系SLAK-066057C,SALK-093747C的萌发率分别为:第8天94%,100%,100%,100%,100%,94%;第9天98%,100%,100%,100%,100%,94%;第10天98%,100%,100%,100%,100%,94%,在100mM NaCl条件胁迫下,野生型拟南芥(WT)和GhTOPP6过表达转基因纯合株系OE1、GhTOPP6过表达转基因纯合株系OE2、GhTOPP6过表达转基因纯合株系OE3、突变体株系SLAK-066057C,SALK-093747C的萌发率分别为:第8天4.3%,44.4%,31.1%,17%,0,0;第9天8.7%,60%,42.2%,25.5%,0,4%;第10天13%,71.1%,48.9%,42.6%,0,12%,在0.2μM ABA条件胁迫下,野生型拟南芥(WT)和GhTOPP6过表达转基因纯合株系OE1、GhTOPP6过表达转基因纯合株系OE2、GhTOPP6过表达转基因纯合株系OE3、突变体株系SLAK-066057C,SALK-093747C的萌发率分别为:第8天0,9.1%,8.5%,9.2%,0,0;第9天2.1%,43.2%,29.8%,60.4%,0,7.5%;第10天38.3%,86.4%,57.4%,72.9%,18.2%,17.5%。因此,在100mM NaCl和0.2μM ABA条件胁迫下,GhTOPP6过表达转基因纯合株系OE1、GhTOPP6过表达转基因纯合株系OE2、GhTOPP6过表达转基因纯合株系OE3的萌发率均高于野生型拟南芥和突变体株系。

[0149] 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。

SEQUENCE LISTING

<110> 中国农业大学
<120> 棉花丝/苏氨酸蛋白磷酸酶GhTOPP6及其编码基因和应用
<130> GNCFY201031
<160> 2
<170> PatentIn version 3.5
<210> 1
<211> 323
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<400> 1
Met Glu Thr Arg Val Leu Asp Gly Ile Ile Asn Arg Leu Leu Glu Val
1 5 10 15
Arg Gly Lys Pro Gly Lys Gln Ile Gln Leu Ser Glu Pro Glu Ile Arg
 20 25 30
Gln Leu Cys Leu Val Ser Lys Asp Ile Phe Leu Met Gln Pro Ile Leu
 35 40 45
Leu Glu Leu Glu Ala Pro Ile Lys Ile Cys Gly Asp Ile His Gly Gln
 50 55 60
Tyr Ser Asp Leu Leu Arg Leu Phe Glu Asn Gly Gly Phe Pro Pro Arg
65 70 75 80
Ala Asn Tyr Leu Phe Leu Gly Asp Tyr Val Asp Arg Gly Lys Gln Ser
 85 90 95
Leu Glu Thr Ile Cys Leu Leu Leu Ala Tyr Lys Ile Lys Tyr Pro Glu
 100 105 110
Asn Phe Phe Leu Leu Arg Gly Asn His Glu Cys Ala Ser Val Asn Arg
 115 120 125
Ile Tyr Gly Phe Tyr Asp Glu Cys Lys Arg Arg Phe Asn Val Arg Leu
 130 135 140
Trp Lys Ala Phe Thr Asp Ser Phe Asn Cys Leu Pro Val Ala Ala Leu
145 150 155 160
Ile Glu Glu Lys Ile Phe Cys Met His Gly Gly Leu Ser Pro Glu Leu
 165 170 175
Arg Asn Leu Asp Gln Ile Arg Asn Leu Lys Arg Pro Thr Asp Val Pro
 180 185 190
Glu Ser Gly Leu Leu Cys Asp Leu Leu Trp Ser Asp Pro Ser Lys Asp
 195 200 205
Ile Gln Gly Trp Gly Pro Asn Asp Arg Gly Val Ser Tyr Ile Phe Gly

210	215	220	
Ala Asp Arg Val Leu Asp Cys Leu Lys Lys Leu Asp Leu Asp Leu Ile			
225	230	235	240
Cys Arg Ala His Gln Val Val Glu Asp Gly Tyr Glu Phe Phe Ala Asn			
	245	250	255
Arg Gln Leu Val Thr Ile Phe Ser Ala Pro Asn Tyr Cys Gly Glu Phe			
	260	265	270
Asp Asn Ala Ala Ala Met Met Ser Val Asp Glu Thr Leu Ile Cys Ser			
	275	280	285
Phe Gln Ile Leu Lys Pro Ala Ala Lys Lys Pro Lys Phe Gly Phe Gly			
	290	295	300
Thr Phe Thr Ser Thr Lys Ser Pro Thr Pro Pro Ser Arg Ile Lys Val			
305	310	315	320
Tyr Ile Asn			
<210>	2		
<211>	972		
<212>	DNA		
<213>	人工序列 (Artificial Sequence)		
<400>	2		
atggaaacta gggttcttga tggataatc aataggttgc ttgaagttag aggaaaacca			60
gggaagcaaa tccaactttc tgagcctgaa ataagacagc tttgtcttgt ttctaaagac			120
atcttcttga tgcagcccat tttgtagag ctggaagcac ctattaagat ctgtggagac			180
atacatggcc agtattcgga tctgtaagg ctgttcgaaa atggcggctt ccctcctcgt			240
gccaattact tattcttagg agactatgta gatcgtggca agcaaagcct gaaaccata			300
tgtcttctcc ttgcatacaa gatcaaatac cctgaaaact tcttccttct aaggggcaac			360
cacgagtgcg cgtccgtgaa ccgcatctac ggattctacg acgagtgtaa acgaaggttc			420
aatgtccggc tctgaaaagc attcaccgat tctttcaact gccttcccgt cgcggccctg			480
atcgaagaaa agatattctg catgcacggt ggactgtccc cagagcttcg caatttagac			540
cagattcgaa acttgaaacg gctactgat gtcccagaat ccggcttact atgtgatctc			600
ctatggctctg atcctagtaa agatatacaa ggctgggggc ctaatgatag ggggtgtttca			660
tacatatattg gtgctgatag ggtgcttgat tgtctaaaaa aacttgatct tgatctaata			720
tgccgtgcac accaggtcgt cgaagacgga tacgagttct tcgccaacag gcaactcgta			780
accatatattt cagcaccaaa ttattgcgga gatttcgaca atgctgccgc catgatgagt			840
gtagatgaaa cattgattg ttctttccaa atattaaagc ctgcagctaa gaaaccgaaa			900
ttcgggtttg ggacattcac atcaactaag tctcctacac ctccatctag aatcaaggta			960
tacataaatt aa			972

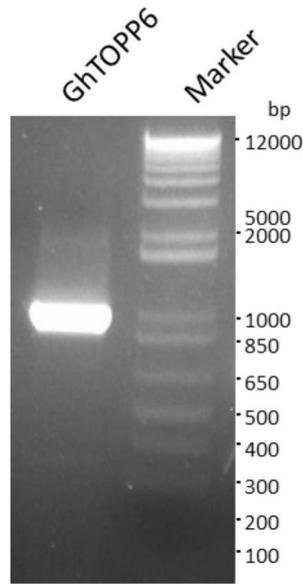


图1

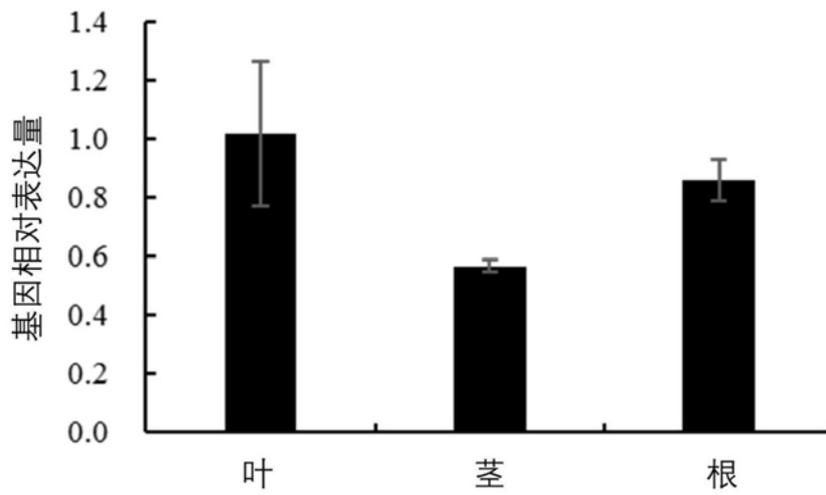


图2

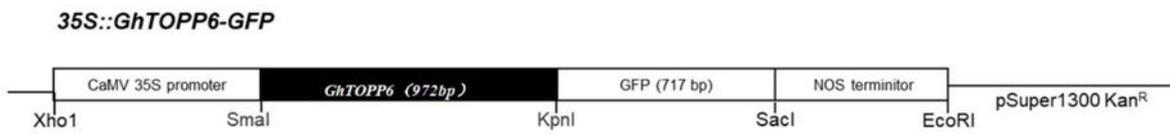
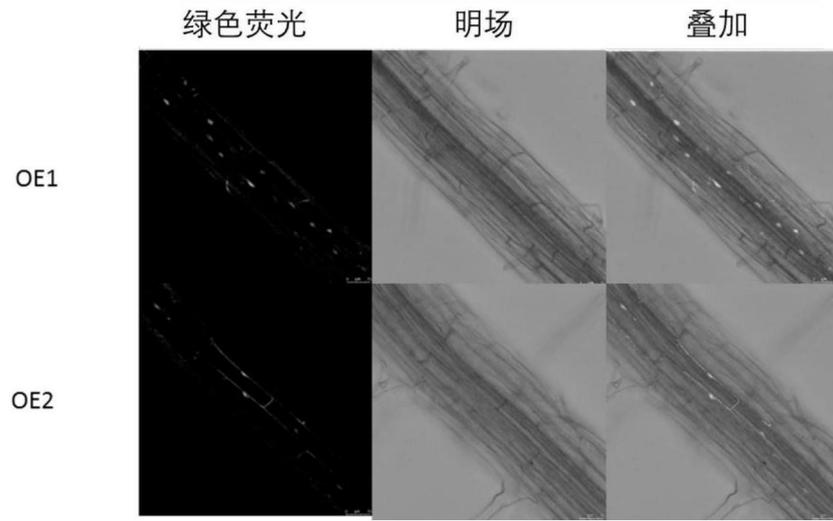
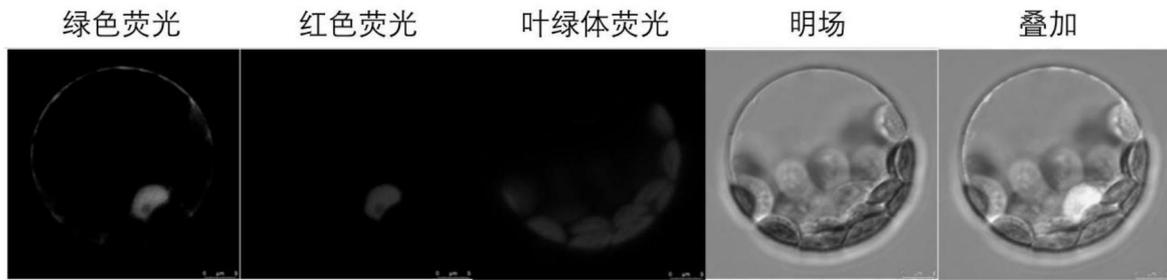


图3



A



B

图4

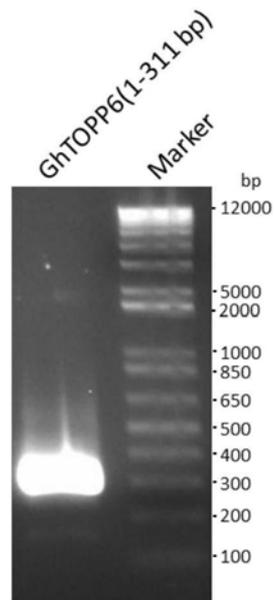


图5

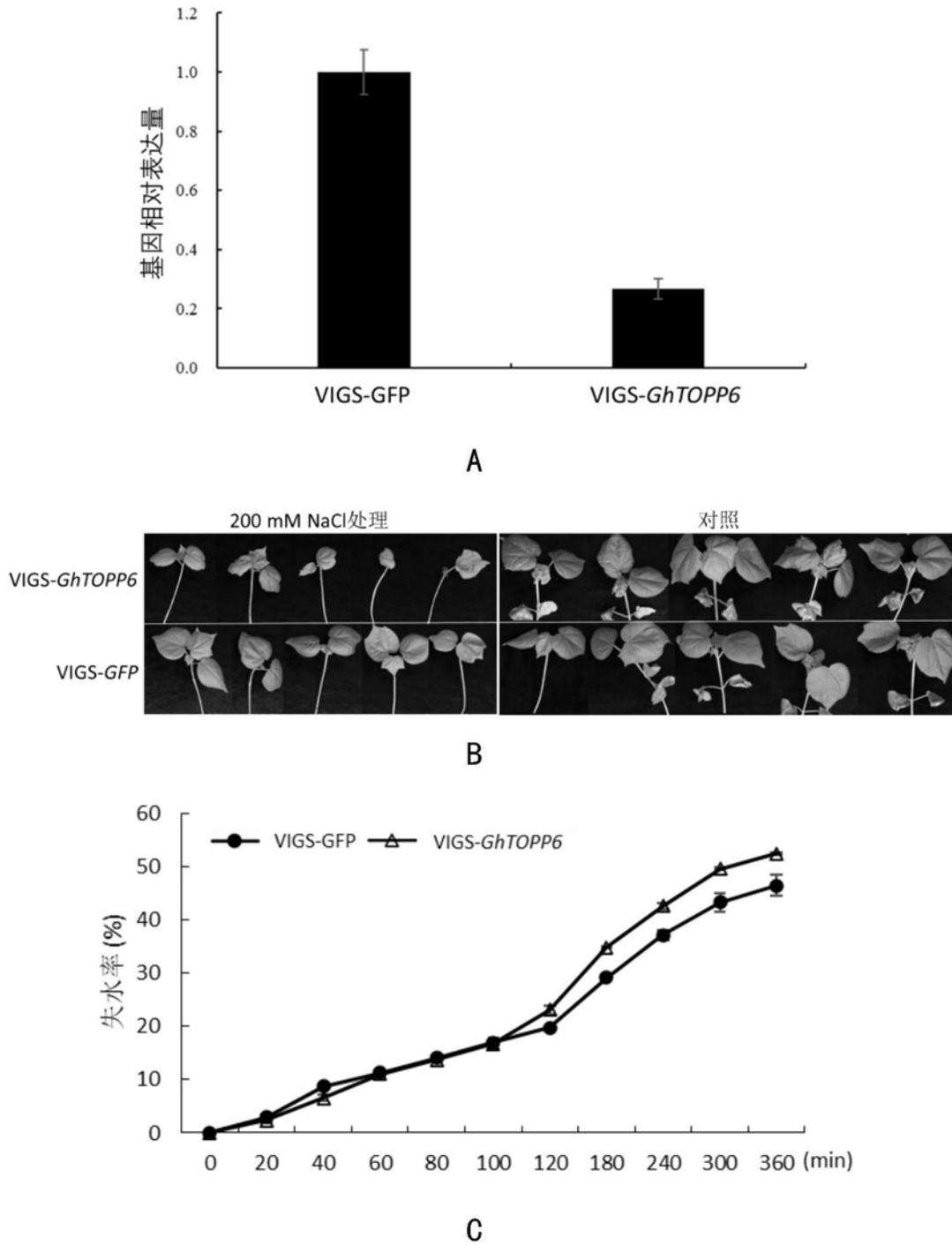


图6

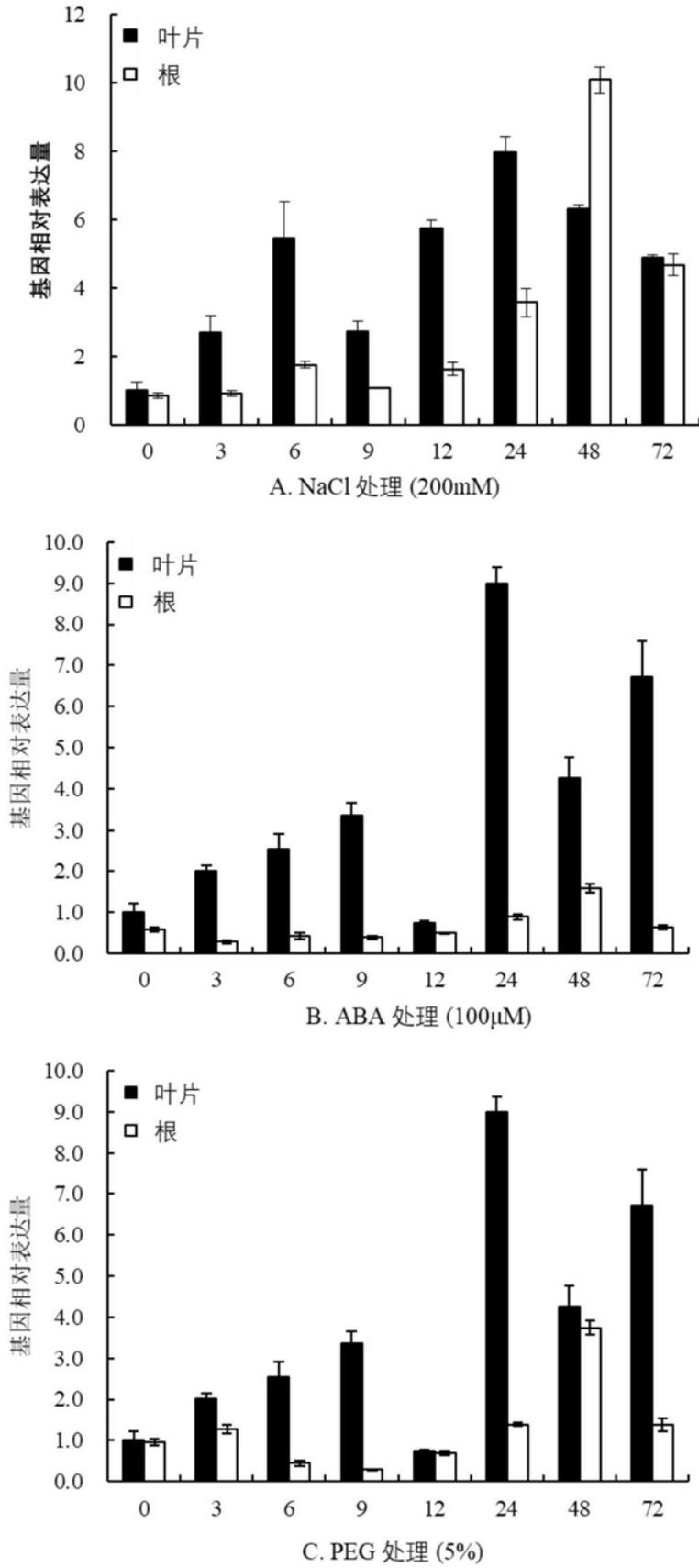
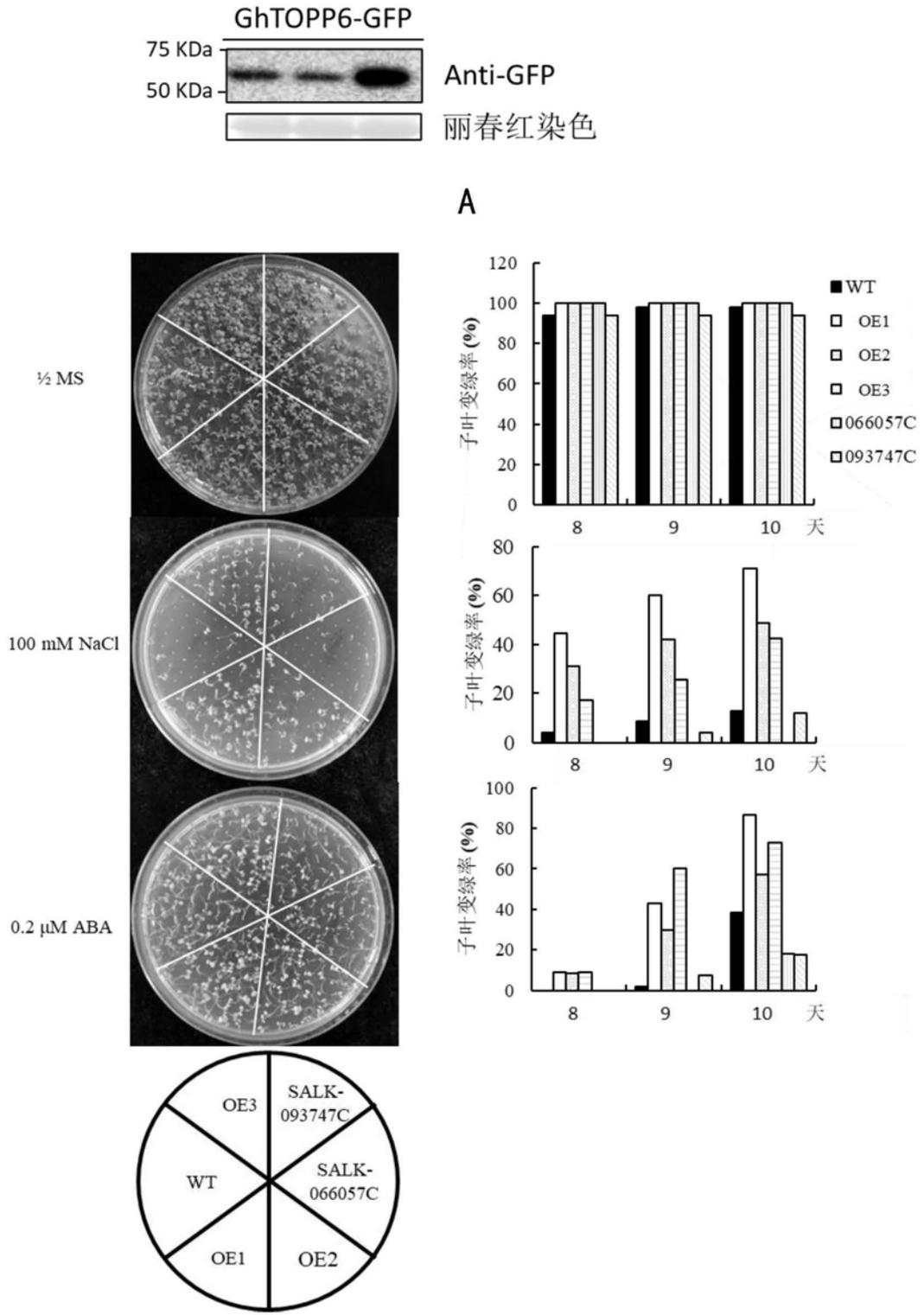


图7



B

图8