



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 113461794 B

(45) 授权公告日 2022. 05. 03

(21) 申请号 202110954087.6

C12N 15/82 (2006.01)

(22) 申请日 2021.08.19

A01H 5/00 (2018.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

A01H 5/10 (2018.01)

申请公布号 CN 113461794 A

A01H 6/82 (2018.01)

(43) 申请公布日 2021.10.01

(56) 对比文件

(73) 专利权人 云南省烟草农业科学研究院

Lu Zhao 等. "R2R3-MYB Transcription Factor NtMYB330 Regulates

地址 650021 云南省昆明市圆通街33号

Proanthocyanidin Biosynthesis and Seed

(72) 发明人 赵璐 宋中邦 王丙武 高玉龙

Germination in Tobacco (Nicotiana tabacum L.)". 《Front Plant Sci》.2022, 第12

陈学军 隋学艺 张谊寒 李永平

卷

(74) 专利代理机构 北京海虹嘉诚知识产权代理

审查员 蒲恒

有限公司 11129

代理人 向群

(51) Int. Cl.

C07K 14/415 (2006.01)

权利要求书3页 说明书13页

C12N 15/29 (2006.01)

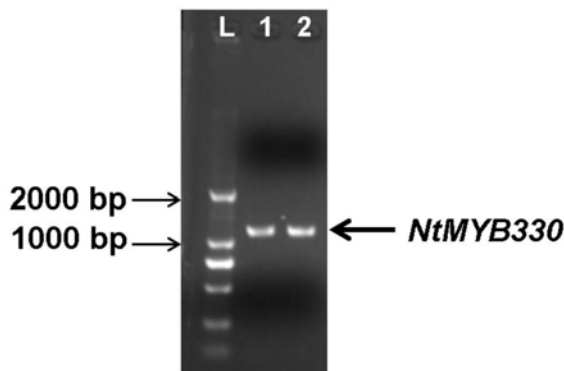
序列表5页 附图3页

(54) 发明名称

一种调控种子萌发的试剂盒、方法及其应用

(57) 摘要

本发明“一种调控种子萌发的试剂盒、方法及其应用”属于遗传工程技术领域。所述一种调控种子萌发的试剂盒包括：原花青素物质调控因子NtMYB330基因的敲除载体；一种调控种子萌发的方法的特征是对种子中的原花青素物质调控因子NtMYB330基因进行敲除。所述原花青素物质调控因子NtMYB330的氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示。采用本发明的试剂盒或方法获得的NtMYB330基因敲除突变体种子的萌发率平均提高87.95%。说明烟草NtMYB330基因突变在提高烟草种子萌发率方面具有较大的应用前景。



1. 一种调控种子萌发的试剂盒,其特征在于,通过所述试剂盒对烟草种子原花青素物质和种子萌发调控因子NtMYB330进行基因敲除,所述烟草种子原花青素物质和种子萌发调控因子的氨基酸序列中包含:R2R3重复序列、[D/E]<sub>Lx<sub>2</sub></sub>[R/K]<sub>x<sub>3</sub></sub>Lx<sub>6</sub>Lx<sub>3</sub>R结构域、VI[R/P]TKAx<sub>1</sub>RC[S/T]结构域;所述烟草种子原花青素物质和种子萌发调控因子NtMYB330的氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示;所述种子为烟草*Nicotiana tabacum* L.种子。

2. 根据权利要求1所述的一种调控种子萌发的试剂盒,其特征在于,所述基因敲除指,在烟草种子原花青素物质和种子萌发调控因子NtMYB330的基因NtMYB330的核苷酸序列第38位引入点突变。

3. 根据权利要求1所述的一种调控种子萌发的试剂盒,其特征在于,所述烟草种子原花青素物质和种子萌发调控因子NtMYB330的基因的核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示。

4. 根据权利要求1或2所述的一种调控种子萌发的试剂盒,其特征在于,所述基因敲除的靶位点如SEQ ID NO.7所示。

5. 根据权利要求4所述的一种调控种子萌发的试剂盒,其特征在于,所述基因敲除的靶位点引物包括:

P1: 5' -ATTGTTGTTTAATCCTTCTTTAGA-3' ,

P2: 5' -AAACTCTAAAGAAGGATTAACAA-3' 。

6. 根据权利要求1-3任一所述的一种调控种子萌发的试剂盒,其特征在于,还包括:PCR常用试剂、酶切常用试剂、连接转化常用试剂;

所述PCR常用试剂包括:PCR反应缓冲液、dNTP、DNA聚合酶;酶切常用试剂包括限制性内切酶、酶切缓冲液;连接转化常用试剂包括:连接酶、连接缓冲液、感受态细胞、培养基。

7. 根据权利要求6所述的一种调控种子萌发的试剂盒,其特征在于,所述DNA聚合酶和PCR反应缓冲液为同时包含DNA聚合酶和PCR反应缓冲液的Annealing buffer。

8. 根据权利要求7所述的一种调控种子萌发的试剂盒,其特征在于,所述DNA聚合酶为Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase,所述PCR反应缓冲液为Phusion HF反应缓冲液。

9. 根据权利要求6所述的一种调控种子萌发的试剂盒,其特征在于,限制性内切酶为Bsa I酶;连接酶为T4 DNA连接酶,连接缓冲液为T4 DNA buffer,感受态细胞为大肠杆菌感受态细胞;培养基为LB培养基。

10. 根据权利要求1-3、7-9任一所述的一种调控种子萌发的试剂盒,其特征在于,还包括:CRISPR/Cas9表达系统。

11. 根据权利要求10所述的一种调控种子萌发的试剂盒,其特征在于,所述CRISPR/Cas9表达系统为pHSE401载体。

12. 一种调控种子萌发的方法,其特征在于,对烟草种子原花青素物质和种子萌发调控因子NtMYB330的基因NtMYB330进行基因敲除;所述烟草种子原花青素物质和种子萌发调控因子NtMYB330的氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示;所述种子为烟草*Nicotiana tabacum* L.种子。

13. 根据权利要求12所述的一种调控种子萌发的方法,其特征在于,利用CRISPR/Cas9基因编辑系统进行所述基因敲除;所述烟草种子原花青素物质和种子萌发调控因子NtMYB330的基因的核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示。

14. 根据权利要求13所述的一种调控种子萌发的方法,其特征在于,所述基因敲除的靶位点引物包括:

P1: 5' -ATTGTTGTTTAATCCTTCTTTAGA-3' ,

P2: 5' -AAACTCTAAAGAAGGATTAACAA-3' 。

15. 根据权利要求14所述的一种调控种子萌发的方法,其特征在于,用所述靶位点引物进行退火反应形成互补DNA oligo;将互补DNA oligo与CRISPR/Cas9表达系统连接并转化农杆菌感受态细胞得到基因敲除农杆菌克隆,将基因敲除农杆菌克隆侵染植物得到基因敲除株系。

16. 根据权利要求15所述的一种调控种子萌发的方法,其特征在于,所述退火反应的体系包括:0.4 $\mu$ L/ $\mu$ L P1,0.4 $\mu$ L/ $\mu$ L P2,0.1 $\mu$ L/ $\mu$ L 10 $\times$ Annealing buffer,其余为水;所述Annealing buffer包含DNA聚合酶和PCR反应缓冲液。

17. 根据权利要求15所述的一种调控种子萌发的方法,其特征在于,退火反应的程序为:95 $^{\circ}$ C,5 min;90 $^{\circ}$ C,1 min;80 $^{\circ}$ C,1 min;70 $^{\circ}$ C,1 min;60 $^{\circ}$ C,1 min;50 $^{\circ}$ C,1 min;40 $^{\circ}$ C,1 min;30 $^{\circ}$ C,1 min;20 $^{\circ}$ C,1 min;10 $^{\circ}$ C,1 min。

18. 根据权利要求15所述的一种调控种子萌发的方法,其特征在于,所述连接的反应体系包括:0.15 $\mu$ L/ $\mu$ L CRISPR/Cas9表达系统的酶切产物,0.5 $\mu$ L/ $\mu$ L互补DNA oligo,0.1 $\mu$ L/ $\mu$ L T4 DNA buffer,0.05 $\mu$ L/ $\mu$ L T4 DNA 连接酶,其余为水。

19. 根据权利要求18所述的一种调控种子萌发的方法,其特征在于,所述连接指16 $^{\circ}$ C过夜连接。

20. 根据权利要求18所述的一种调控种子萌发的方法,其特征在于,所述酶切的体系为:0.1 $\mu$ L/ $\mu$ L CRISPR/Cas9表达系统,0.1 $\mu$ L/ $\mu$ L 10 $\times$ buffer,0.04 $\mu$ L/ $\mu$ L限制性内切酶BsaI,其余为水。

21. 根据权利要求20所述的一种调控种子萌发的方法,其特征在于,所述酶切指37 $^{\circ}$ C酶切1h。

22. 根据权利要求18或20所述的一种调控种子萌发的方法,其特征在于,所述CRISPR/Cas9表达系统为pHSE401载体。

23. 根据权利要求15所述的一种调控种子萌发的方法,其特征在于,所述转化指将连接了互补DNA oligo的pHSE401载体转化至农杆菌感受态细胞中。

24. 根据权利要求23所述的一种调控种子萌发的方法,其特征在于,所述转化指,液氮速冻1分钟,转入37 $^{\circ}$ C水浴5分钟,再冰浴2分钟。

25. 根据权利要求23或24所述的一种调控种子萌发的方法,其特征在于,转化完毕加入LB培养基对农杆菌进行培养。

26. 根据权利要求15所述的一种调控种子萌发的方法,其特征在于,所述侵染指将转化有连接了互补DNA oligo的pHSE401载体的农杆菌克隆侵染植物叶片后进行分化培养长出愈伤组织、分化出芽得到烟草种子原花青素物质和种子萌发调控因子NtMYB330基因敲除株系;所述植物为烟草*Nicotiana tabacum* L.;

所述调控种子萌发指,烟草种子原花青素物质和种子萌发调控因子NtMYB330基因敲除株系的种子萌发率提高87.95%以上。

27. 烟草种子原花青素物质和种子萌发调控因子NtMYB330在调控植物种子原花青素物

质合成、和/或,调控植物种子萌发方面的应用;所述植物为烟草*Nicotiana tabacum* L.。

28.根据权利要求27所述的烟草种子原花青素物质和种子萌发调控因子NtMYB330在调控植物种子原花青素物质合成、和/或,调控植物种子萌发方面的应用,其特征在于,表达所述烟草种子原花青素物质和种子萌发调控因子NtMYB330调控植物种子原花青素物质合成指正向调控原花青素物质合成;

表达所述烟草种子原花青素物质和种子萌发调控因子NtMYB330调控植物种子萌发指负向调控植物种子的萌发率。

29.根据权利要求27或28所述的烟草种子原花青素物质和种子萌发调控因子NtMYB330在调控植物种子原花青素物质合成、和/或,调控植物种子萌发方面的应用,其特征在于,所述原花青素物质为种皮中的原花青素物质。

## 一种调控种子萌发的试剂盒、方法及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于遗传工程技术领域,具体涉及一种调控种子萌发的试剂盒、方法及其应用。

### 背景技术

[0002] 烟草(学名:*Nicotiana tabacum* L.)是茄科烟草属植物,一年生草本。原产于南美洲。中国南北各省区广为栽培。该植物可作烟草工业的原料;全株也可作农药杀虫剂;亦可药用,作麻醉、发汗、镇静和催吐剂。

[0003] 植物种子中的原花青素物质在内皮中积累,保护种子胚芽和胚乳,并在种子成熟的脱水时期氧化变褐,与细胞壁物质交联,储存在成熟的种皮细胞壁中。原花青素物质的合成积累是抑制种子萌发的重要因素,拟南芥种皮中的原花青素物质通过脱落酸(ABA)信号途径诱导ABA合成来抑制种子的萌发。过表达*SIAN11*基因的番茄种子可大量积累原花青素物质,其种子萌发率显著低于野生型对照。

[0004] 国内外对拟南芥、番茄、葡萄等高等植物中原花青素途径的转录调控已有广泛研究,但是在烟草的相关报道较为罕见,尤其本领域有关烟草中原花青素物质调控因子基因敲除及其带来的相关表型调控更是一片空白。

### 发明内容

[0005] 基于本领域现有技术的上述空白,本发明基于对烟草种子中原花青素合成正向调控基因*NtMYB330*进行敲除,提供一种可正向调控种子萌发率且负向调控烟草种皮原花青素物质合成的试剂盒与方法。。

[0006] 本发明的技术方案如下:

[0007] 一种调控种子萌发的试剂盒,其特征在于,包括烟草种子原花青素物质和种子萌发调控因子*NtMYB330*,其氨基酸序列中包含:R2R3重复序列、 $[D/E]Lx_2[R/K]x_3Lx_6Lx_3R$ 结构域、 $VI[R/P]TKAx_1RC[S/T]$ 结构域。所述烟草种子原花青素物质和种子萌发调控因子*NtMYB330*的氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示。

[0008]  $[D/E]Lx_2[R/K]x_3Lx_6Lx_3R$ 结构域记载于“A single amino acid substitution in the R3 domain of GLABRA1 leads to inhibition of trichome formation in Arabidopsis without affecting its interaction with GLABRA3”一文中;

[0009]  $VI[R/P]TKAx_1RC[S/T]$ 结构域记载于“The Arabidopsis *TT2* gene encodes an R2R3 MYB domain protein that acts as a key determinant for proanthocyanidin accumulation in developing seed”一文中;

[0010] R2R3重复序列记载于“Ectopic expression of the coleus R2R3 MYB-Type proanthocyanidin regulator gene *SsMYB3* alters the flower color in transgenic tobacco”一文中。

[0011] 所述的一种调控种子萌发的试剂盒还包括:烟草种子原花青素物质和种子萌发调

控因子NtMYB330的突变基因；

[0012] 所述烟草种子原花青素物质和种子萌发调控因子NtMYB330的突变基因指：对烟草种子原花青素物质和种子萌发调控因子NtMYB330的基因NtMYB330进行基因敲除得到的突变基因；

[0013] 所述基因敲除指，在烟草种子原花青素物质和种子萌发调控因子NtMYB330的基因NtMYB330的核苷酸序列第38位引入点突变；

[0014] 优选地，所述烟草种子原花青素物质和种子萌发调控因子NtMYB330的基因的核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示。

[0015] 所述基因敲除的靶位点为烟草种子原花青素物质和种子萌发调控因子NtMYB330的基因NtMYB330的第1642-1661位；

[0016] 优选地，所述烟草种子原花青素合成和种子萌发的调控因子NtMYB330基因敲除的靶位点引物包括：

[0017] P1: 5' -ATTGTTGTTTAATCCTTCTTTAGA-3'，

[0018] P2: 5' -AAACTCTAAAGAAGGATTAAACAA-3'。

[0019] 所述的一种调控种子萌发的试剂盒还包括：PCR常用试剂、酶切常用试剂、连接转化常用试剂；

[0020] 所述PCR常用试剂包括：PCR反应缓冲液、dNTP、DNA聚合酶；酶切常用试剂包括限制性内切酶、酶切缓冲液；连接转化常用试剂包括：连接酶、连接缓冲液、感受态细胞、培养基；

[0021] 在一些实施例中，所述DNA聚合酶和PCR反应缓冲液优选同时包含DNA聚合酶和PCR反应缓冲液的Annealing buffer；

[0022] 在另一些实施例中，所述DNA聚合酶优选Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase，所述PCR反应缓冲液优选Phusion HF反应缓冲液；

[0023] 限制性内切酶优选Bsa I酶；酶切缓冲液为本领域公知的缓冲液，也可采用商购获得的10×buffer；连接酶优选T4 DNA连接酶，连接缓冲液优选T4 DNA buffer，感受态细胞优选大肠杆菌感受态细胞；培养基优选LB培养基；

[0024] 优选地，所述一种调控种子萌发的试剂盒还包括：CRISPR/Cas9表达系统；所述CRISPR/Cas9表达系统优选pHSE401载体；

[0025] 优选地，所述种子为烟草*Nicotiana tabacum* L.种子。

[0026] 一种调控种子萌发的方法，其特征在于，对烟草种子原花青素物质和种子萌发调控因子NtMYB330的基因NtMYB330进行基因敲除；所述烟草种子原花青素物质和种子萌发调控因子NtMYB330的氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示。

[0027] 利用CRISPR/Cas9基因编辑系统进行所述基因敲除。

[0028] 所述基因敲除的靶位点引物包括：

[0029] P1: 5' -ATTGTTGTTTAATCCTTCTTTAGA-3'，

[0030] P2: 5' -AAACTCTAAAGAAGGATTAAACAA-3'。

[0031] 根据基因敲除靶位点合成靶位点引物，并进行退火反应形成互补DNA oligo；将互补DNA oligo与CRISPR/Cas9表达系统连接并转化农杆菌感受态细胞得到基因敲除农杆菌克隆，将基因敲除农杆菌克隆侵染植物得到基因敲除株系。

[0032] 所述退火反应的体系包括：0.4μL/μL P1, 0.4μL/μL P2, 0.1μL/μL 10×Annealing

buffer,其余为水;

[0033] 退火反应的程序优选为:95°C,5 min;90°C,1 min;80°C,1 min;70°C,1 min;60°C,1 min;50°C,1 min;40°C,1 min;30°C,1 min;20°C,1 min;10°C,1 min;

[0034] 优选地,所述连接的反应体系包括:0.15μL/μL CRISPR/Cas9表达系统优选pHSE401载体的酶切产物,0.5μL/μL互补DNA oligo,0.1μL/μL T4 DNA buffer,0.05μL/μL T4 DNA 连接酶,其余为水;优选地,所述连接指16°C过夜连接;

[0035] 优选地,所述酶切的体系为:0.1μL/μL CRISPR/Cas9表达系统优选pHSE401载体,0.1μL/μL 10×buffer,0.04μL/μL限制性内切酶优选BsaI,其余为水;优选地,所述酶切指37°C酶切1h;

[0036] 优选地,所述转化指将连接了互补DNA oligo的pHSE401载体转化至感受态细胞优选农杆菌感受态细胞中;优选地,所述转化指,液氮速冻1分钟,转入37°C水浴5分钟,再冰浴2分钟;优选地,转化完毕加入LB培养基对农杆菌进行培养;

[0037] 优选地,所述侵染指将转化有连接了互补DNA oligo的pHSE401载体的农杆菌克隆侵染植物叶片后进行分化培养长出愈伤组织、分化出芽得到烟草种子原花青素物质和种子萌发调控因子NtMYB330基因敲除株系;

[0038] 所述植物优选烟草*Nicotiana tabacum* L.;

[0039] 所述对原花青素合成的调控为正调控;

[0040] 所述调控种子萌发指,烟草种子原花青素物质和种子萌发调控因子NtMYB330基因敲除株系的种子萌发率提高87.95%以上。

[0041] 烟草种子原花青素物质和种子萌发调控因子NtMYB330在调控植物种子原花青素物质合成、和/或,调控植物种子萌发方面的应用;

[0042] 优选地,所述烟草种子原花青素物质和种子萌发调控因子NtMYB330调控植物原花青素物质合成指正向调控原花青素物质合成;

[0043] 所述烟草种子原花青素物质和种子萌发调控因子NtMYB330调控植物种子萌发指负向调控植物种子的萌发率;

[0044] 优选地,所述植物为烟草*Nicotiana tabacum* L.;所述原花青素物质为种皮中的原花青素物质。

[0045] 本发明还提供一种正向调控烟草种皮原花青素物质合成并负向影响种子萌发的基因NtMYB330,其特征在于所述的正向调控烟草种皮原花青素物质合成并负向影响种子萌发的基因NtMYB330的核苷酸序列如SEQ ID NO:1所示。

[0046] 就NtMYB330基因本身来说,是正向调控原花青素合成,并负向抑制种子萌发。当敲除NtMYB330时,种皮原花青素含量降低,种子萌发率提高,即“NtMYB330基因敲除试剂盒”整体是正向调控种子萌发并负向调控原花青素合成。

[0047] 正向调控烟草种皮原花青素物质合成并负向影响种子萌发的基因NtMYB330编码的氨基酸序列如SEQ ID NO:2所示。

[0048] 所述的正向调控烟草种皮原花青素物质合成并负向影响种子萌发的基因NtMYB330的克隆方法,其特征在于包括以下步骤:

[0049] A、提取烟草种子RNA,反转录得到第一链cDNA;

[0050] B、根据NtMYB330基因序列设计合成特异性引物,以反转录得到的第一链cDNA作为

模板,进行PCR扩增,回收和纯化PCR产物;

[0051] C、纯化扩增产物与TOPO载体连接,连接体系与过程如下: 4  $\mu$ L纯化产物、1  $\mu$ L salt solution、1 $\mu$ L PCR<sup>®</sup>-Blunt II -TOPO混匀,25 $^{\circ}$ C,水浴30 min;将连好的载体通过热激转化进入大肠杆菌DH5 $\alpha$ ,加液体培养基振荡培养后涂布至含100 mg/L 卡那霉素的LB平板上过夜培养,挑取菌落进行菌液培养,质粒提取和PCR检测。筛选阳性克隆,对阳性克隆进行测序。

[0052] B步骤中所述的引物为:

[0053] 正向引物NtMYB330-BamH I: 5' -GGATCCATGGGAAGAAAGCCTTGTGTC-3' ;

[0054] 反向引物NtMYB330-Xho I:5' -CTCGAGTCAAGAGGAGAACCCATTAATCC-3' 。

[0055] B步骤中PCR扩增的反应体系是选用Phusion高保真扩增酶反应体系,体系总体积50  $\mu$ L,包括:200 ng cDNA,5 $\times$ Phusion HF反应缓冲液10  $\mu$ L,10 mM dNTP 1  $\mu$ L,2U的Phusion<sup>®</sup> High-Fidelity DNA Polymerase,10  $\mu$ M的正反向引物各1  $\mu$ L,补水至50  $\mu$ L。

[0056] B步骤中PCR扩增的反应条件是在Mastercycler<sup>®</sup> pro扩增仪上进行,反应程序为:98 $^{\circ}$ C,30秒;98 $^{\circ}$ C,7秒;62 $^{\circ}$ C,30秒;72 $^{\circ}$ C,45秒;35个循环;72 $^{\circ}$ C延伸7分钟。

[0057] 所述的正向调控烟草种皮原花青素物质合成并负向影响种子萌发的基因NtMYB330的应用,其特征在于所述原花青素正向调控基因NtMYB330在获得调控烟草种皮原花青素含量并负向影响种子萌发的基因编辑烟草植株中的应用。

[0058] 本发明的第一目的是这样实现的,所述的正向调控烟草种皮原花青素物质合成并负向影响种子萌发的基因NtMYB330的核苷酸序列如序列SEQ ID NO:1所示。

[0059] 本发明的第二目的是这样实现的,包括以下步骤:

[0060] A、提取烟草种子RNA,反转录得到第一链cDNA;

[0061] B、根据NtMYB330基因序列设计合成特异性引物,以反转录得到的第一链cDNA作为模板,进行PCR扩增,回收和纯化PCR产物;

[0062] C、纯化扩增产物通过试剂盒反应与TOPO载体连接,连接体系与过程如下: 4  $\mu$ L纯化产物、1  $\mu$ L salt solution、1 $\mu$ L PCR<sup>®</sup>-Blunt II -TOPO混匀,25 $^{\circ}$ C,水浴30 min;将连好的载体通过热激转化进入大肠杆菌DH5 $\alpha$ ,加液体培养基振荡培养后涂布至含100 mg/L 卡那霉素的LB平板上过夜培养,挑取菌落进行菌液培养,质粒提取和PCR检测。筛选阳性克隆,对阳性克隆进行测序。

[0063] 本发明的第三目的是这样实现的,所述的正向调控烟草种皮原花青素物质合成并负向影响种子萌发的基因NtMYB330在获得烟草种皮中原花青素物质积累显著降低并且萌发率显著提高的NtMYB330基因敲除植株中的应用;即通过CRISPR/Cas9编辑技术敲除所述的烟草种子中原花青素物质合成正向调控基因NtMYB330用于提高烟草种子萌发率。

[0064] 本发明还提供了一种利用CRISPR/Cas9编辑技术对烟草NtMYB330基因进行基因敲除的方法,具体包括以下步骤:

[0065] (1) 构建CRISPR/Cas9载体

[0066] A、根据NtMYB330 基因组序列设计CRISPR/Cas9靶位点(PAM),即TTGTTAATCCTTCTTTAGA。

[0067] B、靶位点引物设计。根据A设计的靶位点合成靶位点引物:P1: 5' -ATTGTTGTTAATCCTTCTTTAGA-3' , P2: 5' -AAACTCTAAAGAAGGATTAAACAA-3' 。



[0068] C、在靶位点两侧设计编辑材料的检测引物,NtMYB330-SF: 5' - CAACTAGTTACAGAT TGAGGAG-3' ; NtMYB330-SR: 5' - CATCCACAGCTAGTCACTAC-3'

[0069] D、制备dsDNA。将步骤B中设计合成的引物通过退火形成互补DNA oligo,具体步骤如下:反应体系50 $\mu$ L,包括P1 20 $\mu$ L,P2 20 $\mu$ L,10 $\times$ Annealing buffer 5 $\mu$ L,灭菌双蒸水5 $\mu$ L。退火程序为:95 $^{\circ}$ C,5min;90 $^{\circ}$ C,1 min;80 $^{\circ}$ C,1min;70 $^{\circ}$ C,1min;60 $^{\circ}$ C,1 min;50 $^{\circ}$ C,1min;40 $^{\circ}$ C,1 min;30 $^{\circ}$ C,1 min;20 $^{\circ}$ C,1 min;10 $^{\circ}$ C,1 min。

[0070] E、酶切pHSE401载体,并与步骤D所制备dsDNA进行连接。利用BsaI酶对pHSE401载体进行酶切,酶切体系50 $\mu$ L,包括:质粒 5 $\mu$ L,10 $\times$ buffer 5 $\mu$ L,BsaI 2 $\mu$ L,灭菌双蒸水38 $\mu$ L。37 $^{\circ}$ C酶切1h。酶切后对酶切产物进行电泳检测分析,可见1200bp 和 11520bp两个条带,回收11520bp的酶切产物备用;利用T4 DNA连接酶将所回收的大片段酶切产物与步骤D所制备dsDNA进行连接,连接体系20  $\mu$ L:所回收载体酶切产物 3  $\mu$ L,退火所形成dsDNA产物 10  $\mu$  L,T4 DNA buffer 2  $\mu$ L,T4 DNA 连接酶 1  $\mu$ L,灭菌双蒸水 4  $\mu$ L,16 $^{\circ}$ C过夜连接。

[0071] F、测序验证。将步骤E中连接产物转化大肠杆菌,筛选阳性克隆(pHSE401载体抗性为kan)并进行菌落PCR检测。菌落PCR检测时,所用引物设计为: U6-26p F:5' - TGTCCCAGGATTAGAATGATTAGGC -3' ;P2:5' - AAACTCTAAAGAAGGATTAACAA -3' ;对菌落PCR检测验证正确的阳性克隆菌株培养扩增后进一步进行测序分析,测序时所用的引物为U6-26p-F: 5' - TGTCCCAGGATTAGAATGATTAGGC -3' 。对测序结果进行分析,选择构建正确的克隆(pHSE401-NtMYB330)保存备用。

[0072] (2)农杆菌转化

[0073] 从-80 $^{\circ}$ C冰箱中取出农杆菌感受态细胞(C58C1),放置冰上溶解后加入载体pHSE401-NtMYB330 4 $\mu$ L;液氮速冻1分钟,转入37 $^{\circ}$ C水浴5分钟,再冰浴2分钟,向混合物中加入1mL LB液体培养基,28 $^{\circ}$ C、220rpm培养3~4小时;培养物涂布于含有卡那霉素100mg/L和利福平25mg/L的LB固体培养基上,28 $^{\circ}$ C倒置培养2~3天,可见含有目标载体的农杆菌克隆。

[0074] (3)烟草转化

[0075] A、挑取含有目标载体的农杆菌克隆,在含有卡那霉素和利福平的LB平板上划线,28 $^{\circ}$ C培养2~3天;刮取划线菌斑接菌于含有卡那霉素和利福平的LB培养基中,28 $^{\circ}$ C,220 rpm 震荡培养,菌液浓度达到OD=0.5~0.8时进行侵染;

[0076] B、将烟草叶片置于500mL广口瓶中,加入适量75%乙醇,漂洗1min;弃乙醇,加入0.1%的HgCl<sub>2</sub>溶液,置摇床上室温振荡15~30分钟;弃溶液,用无菌水冲洗6遍;

[0077] C、将叶片取出,用无菌吸水纸洗去表面液体,取无菌叶片用剪刀切成1cm $\times$ 1cm的小片,将切成小片的烟草叶片放入含目标载体的无菌LB液体培养基悬浮菌液中,静置15~20min;取出烟草叶片,用无菌滤纸吸去多余菌液,于含有6-BA (0.02mg/L)、NAA (2mg/L)的MS培养基中25 $^{\circ}$ C暗培养两天;将烟草叶片转入分化培养基中,切口接触培养基,分化培养基为含有6-BA (0.5mg/L)、NAA (0.1mg/L)、潮霉素(20mg/L)、头孢霉素(500mg/L)的MS培养基,每2~3周继代一次,切口处逐渐形成愈伤组织,最后分化出芽;

[0078] D、将长至3~5cm的芽切下,转入MS培养基诱导生根,生根后的基因编辑植株由生根培养基中取出,用自来水洗净培养基,移植于灭菌的营养土中。

[0079] (4)测序筛选编辑材料

[0080] T0代转化烟苗生长1周左右,选取20株烟苗取叶片并利用DNeasy Plant Mini Kit

(QIAGEN)提取DNA,利用步骤(1)C中设计的引物SF/SR进行扩增,扩增产物纯化后利用正向引物测序。对测序结果分析,获得一株*NtMYB330*基因插入1个碱基A的编辑材料(图3)。种植该编辑材料T1代植株,通过测序筛选双基因纯合突变单株并收种获得T2代种子。

[0081] (5)编辑材料种皮中原花青素物质的检测

[0082] 在自交授粉后的第18天,收获T2代植株的未成熟种子,用特异性染色原花青素物质的4-二甲基氨基肉桂醛(DMACA)染色30 min。染色后,用70%乙醇洗去染色液,并用蒸馏水润洗3次。待种子自然晾干后,在显微镜下观察种皮染色情况。结果见图5,编辑材料种皮中的原花青素物质含量比野生型对照显著降低,表明*NtMYB330*基因敲除后影响了原花青素物质在种皮中的累积。

[0083] (6)编辑材料种子萌发率的检测

[0084] 将*NtMYB330*基因敲除植株和野生型对照的成熟种子,置于1/2 MS培养基上,常温下培养7天,并记录每天的种子萌发率。结果见图6,编辑材料种子的萌发率在播种后的第三天显著高于野生型对照,表明*NtMYB330*基因敲除后显著提高了突变体种子在正常条件下的萌发率。

[0085] 本发明通过转录组测序获得与类黄酮物质合成途径结构基因共表达的若干MYB转录因子,其中*NtMYB330*基因编码的蛋白质序列分析表明其可能参与调控烟草种子原花青素的合成。利用CRISPR/Cas9编辑技术对*NtMYB330*进行功能验证,结果表明*NtMYB330*基因具有调控原花青素物质在烟草种皮中累积并影响种子萌发的功能,为调控烟草种皮原花青素物质积累及种子萌发率提供了靶标基因。

[0086] 转录因子复合体,包括负责结合DNA的R2R3型MYB转录因子,以及bHLH转录因子和WD40调节蛋白,是调控原花青素物质合成的主要机制。通过转录组测序获得与类黄酮物质合成途径结构基因共表达的若干MYB转录因子,其中*NtMYB330*基因编码的蛋白质序列,除在氨基端含有R2R3重复序列以及和bHLH蛋白结合的高度保守的[D/E]Lx2[R/K]x3Lx6Lx3R结构域外,其羧基端序列中存在VI[R/P]TKAx1RC[S/T]结构域,而含有该结构域的R2R3-MYB型转录因子属于原花青素调控因子进化分支二。将*NtMYB330*的蛋白质序列与其他已知调控功能的植物R2R3-MYB转录因子的蛋白序列进行同源性分析,发现*NtMYB330*属于原花青素调控因子进化分支二。据此,本发明的烟草*NtMYB330*可能为烟草种子中调控原花青素物质合成的R2R3-MYB型转录因子,并且影响种子萌发。相关应用实践结果表明,与野生型对照相比,敲除*NtMYB330*基因能够显著降低烟草种皮中的原花青素物质积累,并显著提高烟草种子在正常条件下的萌发率。此结果为利用植物基因工程技术提高烟草种子萌发率提供了靶标基因。结果所创制出的不能积累原花青素物质的烟草突变体种子,为在烟草中开展其它同源基因的功能鉴定验证提供了理想的试验材料。

[0087] 本发明公开了一种调控种子原花青素合成和种子萌发的试剂盒、方法及应用,正向调控种皮原花青素物质合成并负向影响种子萌发的基因*NtMYB330*核苷酸序列如SEQ ID: No.1所示,编码的氨基酸序列如SEQ ID: No.2所示。本发明公开的正向调控烟草种皮原花青素物质合成并负向影响种子萌发的基因*NtMYB330*的克隆方法,具体步骤包括:A、确定*NtMYB330*基因序列;B、提取烟草种子RNA,反转录得到第一链cDNA;C、根据*NtMYB330*基因序列设计合成特异性引物,以cDNA作为模板,进行PCR扩增;D、回收和纯化PCR产物,并测序;应用为所述烟草R2R3-MYB型转录因子基因*NtMYB330*在调控烟草种皮原花青素物质含量及种

子萌发中的应用。本发明利用CRISPR/Cas9技术对烟草*NtMYB330*基因进行了基因敲除。相较于野生型对照,获得的*NtMYB330*基因敲除突变体种子的萌发率平均提高87.95%,说明烟草*NtMYB330*基因突变在提高烟草种子萌发率方面具有较大的应用前景。

### 附图说明

[0088] 图1为本发明的实验例1中*NtMYB330*基因PCR扩增产物琼脂糖凝胶电泳图,*NtMYB330*大小为1164 bp,M: DL 5000 DNA Marker;

[0089] 图2为本发明的实验例2中*NtMYB330*基因在不同发育时期的烟草种子中的表达分析结果,授粉后18天的种子(18 DAP),授粉后30天的种子(30 DAP),授粉后40天的种子(40 DAP);

[0090] 图3为本发明的实验例3中CRISPR/Cas9编辑*NtMYB330*基因材料编辑靶位点测序结果,其中,*NtMYB330*为野生型序列,*ntmyb330*为编辑材料序列;

[0091] 图4为本发明的实验例3中T<sub>2</sub>代*NtMYB330*基因敲除植株成熟时期的种子中原花青素物质生物合成途径基因的表达水平分析;WT为野生型对照,M1和M2为*NtMYB330*基因敲除株系,A为*NtDFR1*,B为*NtANS1*,C为*NtLAR1*,D为*NtANR1*。“\*”和“\*\*”分别表示与野生型对照WT在0.05和0.01水平上差异显著;

[0092] 图5为本发明的实验例3中T<sub>2</sub>代*NtMYB330*基因敲除株系(M)和野生型对照(WT)种子的DMACA染色;

[0093] 图6为本发明的实验例3中T<sub>2</sub>代*NtMYB330*基因敲除株系(M)和野生型对照(WT)种子在1/2 MS培养基上的7天种子萌发率。WT为野生型对照,M为*NtMYB330*基因敲除株系,不同小写字母表示第三天的*NtMYB330*基因敲除突变体(M)种子萌发率与野生型对照WT在0.05水平上的差异显著。

### 具体实施方式

[0094] 下面结合实施例和附图对本发明作进一步的说明,但不以任何方式对本发明加以限制,基于本发明教导所作的任何变换或替换,均属于本发明的保护范围。

[0095] 生物材料的来源:

[0096] 烟草植株来自烟草品种云烟87,为申请人实验室自有烟草品种,也可商购获得。

[0097] 农杆菌感受态细胞为商购获得。

[0098] 第1组实施例、本发明的调控种子萌发的试剂盒

[0099] 本组实施例提供一种调控种子萌发的试剂盒。所述试剂盒包括:原花青素物质正向调控因子*NtMYB330*的基因敲除载体;所述原花青素物质调控因子*NtMYB330*的氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示。

[0100] 本领域技术人员可根据本发明的教导,以原花青素物质调控因子*NtMYB330*及其对应的基因序列为目标基因序列,采用常规的基因敲除或基因编辑技术,例如,miRNA、CRISPR/Cas9等,基于目标基因序列设计相关的基因敲除引物。在知晓目标基因序列的前提下,针对已知序列设计敲除靶位点并合成靶位点引物是本领域技术人员可通过本领域惯用技术手段(例如,CRISPR/Cas9靶位点预测工具、引物设计软件)或常规的技术经验,可以常规调整并选择获得。因此,除本发明一些实施例提供的P1和P2引物对以外,基于本发明原花

青素物质调控因子NtMYB330及其对应的基因序列设计的其它引物也落入本发明的保护范围。

[0101] 在一些实施例中,所述原花青素物质调控因子NtMYB330基因的核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示。

[0102] 在另一些实施例中,所述原花青素物质调控因子NtMYB330基因敲除的靶位点在原花青素物质调控因子NtMYB330基因的第1642-1661位;

[0103] 优选地,所述原花青素物质调控因子NtMYB330基因敲除的靶位点引物包括:

[0104] P1: 5' -ATTGTTGTTTAATCCTTCTTTAGA-3' ,

[0105] P2: 5' -AAACTCTAAAGAAGGATTAACAA-3' .

[0106] 在进一步的实施例中,所述的一种调控种子萌发的试剂盒还包括:PCR常用试剂、酶切常用试剂、连接转化常用试剂;

[0107] 所述PCR常用试剂包括:PCR反应缓冲液、dNTP、DNA聚合酶;酶切常用试剂包括限制性内切酶、酶切缓冲液;连接转化常用试剂包括:连接酶、连接缓冲液、感受态细胞、培养基;

[0108] 在一些实施例中,所述DNA聚合酶和PCR反应缓冲液优选同时包含DNA聚合酶和PCR反应缓冲液的Annealing buffer;

[0109] 在另一些实施例中,所述DNA聚合酶优选Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase,所述PCR反应缓冲液优选Phusion HF反应缓冲液;

[0110] 限制性内切酶优选Bsa I酶;酶切缓冲液为本领域公知的缓冲液,也可采用商购获得的10×buffer;连接酶优选T4 DNA连接酶,连接缓冲液优选T4 DNA buffer,感受态细胞优选大肠杆菌感受态细胞;培养基优选LB培养基;

[0111] 优选地,所述一种调控种子萌发率的试剂盒还包括:CRISPR/Cas9表达系统;所述CRISPR/Cas9表达系统优选pHSE401载体;

[0112] 优选地,所述种子为烟草*Nicotiana tabacum* L.种子。

[0113] 第2组实施例、本发明调控种子萌发的方法

[0114] 本组实施例提供一种调控种子萌发的方法。本组所有的实施例都具备如下共同特征:所述调控种子萌发的方法包括:对种子中的原花青素物质调控因子NtMYB330基因进行敲除;所述原花青素物质调控因子NtMYB330的氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示。

[0115] 在一些实施例中,利用靶位点引物和CRISPR/Cas9表达系统进行所述基因敲除;所述原花青素物质调控因子NtMYB330基因的核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示。

[0116] 在具体的实施例中,所述靶位点引物包括:

[0117] P1: 5' -ATTGTTGTTTAATCCTTCTTTAGA-3' ,

[0118] P2: 5' -AAACTCTAAAGAAGGATTAACAA-3' .

[0119] 在另一些实施例中,根据基因敲除靶位点合成靶位点引物,并进行退火反应形成互补DNA oligo;将互补DNA oligo与CRISPR/Cas9表达系统连接并转化农杆菌感受态细胞得到基因敲除农杆菌克隆,将基因敲除农杆菌克隆侵染植物得到基因敲除株系。

[0120] 在具体的实施例中,所述退火反应的体系包括:0.4μL/μL P1,0.4μL/μL P2,0.1μL/μL 10×Annealing buffer,其余为水;

[0121] 退火反应的程序优选为:95°C,5 min;90°C,1 min;80°C,1 min;70°C,1 min;60°C,1 min;50°C,1 min;40°C,1 min;30°C,1 min;20°C,1 min;10°C,1 min;

[0122] 优选地,所述连接的反应体系包括:0.15 $\mu$ L/ $\mu$ L CRISPR/Cas9表达系统优选pHSE401载体的酶切产物,0.5 $\mu$ L/ $\mu$ L互补DNA oligo,0.1 $\mu$ L/ $\mu$ L T4 DNA buffer,0.05 $\mu$ L/ $\mu$ L T4 DNA 连接酶,其余为水;优选地,所述连接指16 $^{\circ}$ C过夜连接;

[0123] 优选地,所述酶切的体系为:0.1 $\mu$ L/ $\mu$ L CRISPR/Cas9表达系统优选pHSE401载体,0.1 $\mu$ L/ $\mu$ L 10 $\times$ buffer,0.04 $\mu$ L/ $\mu$ L限制性内切酶优选BsaI,其余为水;优选地,所述酶切指37 $^{\circ}$ C酶切1h;

[0124] 优选地,所述转化指将连接了互补DNA oligo的pHSE401载体转化至感受态细胞优选农杆菌感受态细胞中;优选地,所述转化指,液氮速冻1分钟,转入37 $^{\circ}$ C水浴5分钟,再冰浴2分钟;优选地,转化完毕加入LB培养基对农杆菌进行培养;

[0125] 优选地,所述侵染指将转化有连接了互补DNA oligo的pHSE401载体的农杆菌克隆侵染植物叶片后进行分化培养长出愈伤组织、分化出芽得到原花青素物质调控因子NtMYB330基因敲除株系;

[0126] 所述植物优选烟草*Nicotiana tabacum* L.;

[0127] 所述对原花青素合成的调控为正调控;

[0128] 所述调控种子萌发指,原花青素物质调控因子NtMYB330基因敲除株系的种子萌发率提高87.95%以上。

[0129] 第3组实施例、本发明的原花青素物质调控因子NtMYB330的新用途

[0130] 本组实施例提供原花青素物质调控因子NtMYB330在调控植物原花青素物质合成、和/或,调控植物种子萌发方面的应用。

[0131] 优选地,所述调控植物原花青素物质合成指正向调控原花青素物质合成;

[0132] 所述调控植物种子萌发指反向调控植物种子的萌发率;

[0133] 优选地,所述植物为烟草*Nicotiana tabacum* L.;所述原花青素物质为种皮中的原花青素物质。

[0134] 本领域技术人员可根据本发明的教导,结合实际需要,利用本发明披露的原花青素物质调控因子NtMYB330对除烟草以外的其它植物进行基因编辑操作,或者采用本发明第1组实施例提供的试剂盒,或第2组实施例提供的方法尝试对其它植物进行原花青素物质调控因子NtMYB330基因敲除操作,以达到其调控原花青素物质合成、和/或,调控植物种子萌发的目的。任何利用本发明披露的原花青素物质调控因子NtMYB330对除烟草以外的其它植物进行基因编辑操作,或者采用本发明第1组实施例提供的试剂盒,或第2组实施例提供的方法尝试对其它植物进行原花青素物质调控因子NtMYB330基因敲除操作的行为,或者生产、使用、销售、许诺销售本发明第1组实施例提供的试剂盒的行为均落入本发明的保护范围。

[0135] 本发明最具体的实施例如下:

[0136] 本发明所述的正向调控烟草种皮原花青素物质合成并负向影响种子萌发的基因NtMYB330的核苷酸序列如序列表SEQ ID NO:1所示。

[0137] 所述的正向调控烟草种皮原花青素物质合成并负向影响种子萌发的基因NtMYB330编码的氨基酸序列如SEQ ID NO:2所示。

[0138] 本发明所述的正向调控烟草种皮原花青素物质合成并负向影响种子萌发的基因NtMYB330的克隆方法,其特征在于包括以下步骤:

[0139] A、提取烟草种子RNA,反转录得到第一链cDNA;

[0140] B、根据*NtMYB330*基因序列设计合成特异性引物,以反转录得到的第一链cDNA作为模板,进行PCR扩增,回收和纯化PCR产物;

[0141] C、纯化扩增产物与载体连接,具体过程如下:4  $\mu$ L 纯化产物、1  $\mu$ L salt solution、1  $\mu$ L PCR<sup>®</sup>-Blunt II-TOPO(Invitrogen)混匀,25 $^{\circ}$ C,水浴30min;将连接好的载体通过热激转化大肠杆菌DH5 $\alpha$ ,加液体培养基振荡培养后涂布至含100mg/L 卡那霉素的LB平板上过夜培养,挑取菌落进行菌液培养,质粒提取和PCR检测,筛选阳性克隆,对阳性克隆进行测序。

[0142] B步骤中所述的引物为:

[0143] 正向引物*NtMYB330-BamH* I:: 5' -GGATCCATGGGAAGAAAGCCTTGTTGTTTC-3' ;

[0144] 负向引物*NtMYB330-Xho* I: 5' -CTCGAGTCAAGAGGAGAACCCATTAATCC-3' 。

[0145] B步骤中PCR扩增的反应体系是选用Phusion高保真扩增酶反应体系,体系总体积50  $\mu$ L,包括:200 ng cDNA,5 $\times$ Phusion HF反应缓冲液10  $\mu$ L,10 mM dNTP 1  $\mu$ L,2U的Phusion<sup>®</sup> High-Fidelity DNA Polymerase,10  $\mu$ M的正反向引物各1  $\mu$ L,补水至50  $\mu$ L。

[0146] B步骤中PCR扩增的反应条件是在Mastercycler<sup>®</sup> pro扩增仪上进行,反应程序为:98 $^{\circ}$ C,30秒;98 $^{\circ}$ C,7秒;62 $^{\circ}$ C,30秒;72 $^{\circ}$ C,45秒;35个循环;72 $^{\circ}$ C延伸7分钟。

[0147] 本发明所述的正向调控烟草种皮原花青素物质合成并负向影响种子萌发的基因*NtMYB330*的应用为所述的正向调控烟草种皮原花青素物质合成并负向影响种子萌发的基因*NtMYB330*在用于获得烟草种子萌发率显著提高的*NtMYB330*基因敲除植株中的应用。

[0148] 下面以具体实验例对本发明做进一步说明:

[0149] 实验例1

[0150] 烟草原花青素物质调控基因*NtMYB330*的克隆

[0151] A、根据烟草*NtMYB330*基因的核苷酸序列,设计基因克隆引物:

[0152] *NtMYB330-F*: 5' -GGATCCATGGGAAGAAAGCCTTGTTGTTTC-3' (SEQ ID NO.3);

[0153] *NtMYB330-R*: 5' -CTCGAGTCAAGAGGAGAACCCATTAATCC-3' (SEQ ID NO.4)。

[0154] B、提取烟草种子RNA,反转录得到第一链cDNA;

[0155] C、以反转录得到的第一链cDNA作为模板,用引物*NtMYB330-F/R*进行PCR扩增,PCR产物经琼脂糖凝胶电泳分离后回收并纯化(图1);

[0156] D、纯化产物与载体连接,连接体系与过程如下:4 $\mu$ L 纯化产物、1 $\mu$ L salt solution、1 $\mu$ L PCR<sup>®</sup>-Blunt II-TOPO(Invitrogen)混匀,25 $^{\circ}$ C,水浴30min;将连接好的载体通过热激转化大肠杆菌DH5 $\alpha$ ,加液体培养基振荡培养后涂布至含100mg/L 卡那霉素的LB平板上过夜培养,挑取菌落进行菌液培养,质粒提取和PCR检测,筛选阳性克隆,对阳性克隆进行测序。

[0157] C步骤中PCR扩增的反应体系是选用Phusion高保真扩增酶反应体系,体系总体积50 $\mu$ L,包括:200ng cDNA,5 $\times$ Phusion HF反应缓冲液10 $\mu$ L,10mM dNTP 1 $\mu$ L,2U的Phusion<sup>®</sup> High-Fidelity DNA Polymerase,10 $\mu$ M的正反向引物各1 $\mu$ L,补水至50 $\mu$ L。

[0158] C步骤中PCR扩增的反应条件是在Mastercycler<sup>®</sup> pro扩增仪上进行,反应程序为:98 $^{\circ}$ C,30秒;98 $^{\circ}$ C,7秒;62 $^{\circ}$ C,30秒;72 $^{\circ}$ C,45秒,35个循环;72 $^{\circ}$ C延伸7分钟。

[0159] 实验例2

[0160] 烟草*NtMYB330*基因组织特异性表达分析

[0161] A、在自交授粉后的第18天、30天和40天,取野生型烟株的种子,提取种子RNA,反转录得到第一链cDNA。

[0162] B、根据*NtMYB330*基因序列设计qRT-PCR引物:

[0163] *NtMYB330*-F: 5'-GGATCCATGGGAAGAAAGCCTTGTTGTTTC-3' (SEQ ID NO.3);

[0164] *NtMYB330*-R: 5'-CTCGAGTCAAGAGGAGAACCCATTAATCC-3' (SEQ ID NO.4)。

[0165] 以烟草*Actin*基因作为内参,*Actin*-F:CTGAGGTCCTTTTCCAACCA (SEQ ID NO.5) 和 *Actin*-R:TACCCGGGAACATGGTAGAG (SEQ ID NO.6)。以种子cDNA为模板进行荧光定量PCR,反应在Roche LightCycler 480上利用LightCycler 480 SYBR Green I master进行,20  $\mu$ L体系含有10  $\mu$ L LightCycler 480 SYBR Green I master(2 $\times$ ),正反引物各1  $\mu$ L(10  $\mu$ mol/L),cDNA 1  $\mu$ L(反转录产物稀释4倍),7  $\mu$ L 灭菌蒸馏水。反应程序如下:98 $^{\circ}$ C预变性30 s;98 $^{\circ}$ C变性7 s,62 $^{\circ}$ C退火30 s,72 $^{\circ}$ C延伸45 s;35个循环。荧光定量PCR结果采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算*NtMYB330*基因的相对表达量。每个处理设3个生物学重复,由Excel软件绘制柱状图(图2)。结果表明,*NtMYB330*基因在自交授粉后第18天取样的未成熟种子中的表达量最高。

[0166] 实验例3

[0167] 利用CRISPR/Cas9编辑技术对烟草*NtMYB330*基因进行敲除。

[0168] (1)构建CRISPR/Cas9载体

[0169] A、根据*NtMYB330*基因组序列设计CRISPR/Cas9靶位点(PAM),即TTGTTTAATCCTTCTTAGA (SEQ ID NO.7)。CRISPR/Cas9靶位点(PAM)优选设计在相关基因的外显子序列范围内。

[0170] B、靶位点引物设计。根据A设计的靶位点合成靶位点引物:

[0171] P1: 5'-ATTGTTGTTTAATCCTTCTTAGA-3' (SEQ ID NO.8),

[0172] P2: 5'-AAACTCTAAAGAAGGATTAACAA-3' (SEQ ID NO.9)。

[0173] 插入碱基A的突变是通过CRISPR/Cas9体系的切割加上同源重组修复(NHEJ)实现的,引物只是为了合成dsDNA进一步完成敲除载体的构建,dsDNA的序列信息就是Cas9酶要进行切割和修复的目标位点/靶位点。引物的作用并不是引入突变,而是把Cas9酶指引到需要编辑的位置,然后由Cas9酶进行切割,并通过同源重组进行修复后,随机引入突变(引入的突变类型不固定,本发明是引入A碱基插入的突变)。

[0174] C、在靶位点两侧设计编辑材料的检测引物:

[0175] *NtMYB330*-SF: 5'-CAACTAGTTACAGATTGAGGAG-3' (SEQ ID NO.10);

[0176] *NtMYB330*-SR: 5'-CATCCACAGCTAGTCACTAC-3' (SEQ ID NO.11)。

[0177] D、制备dsDNA。将步骤B中设计合成的引物通过退火形成互补DNA oligo,具体步骤如下:反应体系50  $\mu$ L,包括0.4 $\mu$ L/ $\mu$ L P1,0.4 $\mu$ L/ $\mu$ L P2,0.1 $\mu$ L/ $\mu$ L10 $\times$ Annealing buffer,灭菌双蒸水5  $\mu$ L。退火程序为:95 $^{\circ}$ C,5 min;90 $^{\circ}$ C,1 min;80 $^{\circ}$ C,1 min;70 $^{\circ}$ C,1 min;60 $^{\circ}$ C,1 min;50 $^{\circ}$ C,1 min;40 $^{\circ}$ C,1 min;30 $^{\circ}$ C,1 min;20 $^{\circ}$ C,1 min;10 $^{\circ}$ C,1 min。

[0178] E、酶切pHSE401载体,并与步骤D所制备dsDNA进行连接。利用*Bsa*I酶对pHSE401载体进行酶切,酶切体系50 $\mu$ L,包括:质粒 5 $\mu$ L,10 $\times$ buffer 5 $\mu$ L,*Bsa*I 2 $\mu$ L,灭菌双蒸水38 $\mu$ L。37 $^{\circ}$ C酶切1h。酶切后对酶切产物进行电泳检测分析,可见1200bp 和 11520bp两个条带,回收11520bp的酶切产物备用;利用T4 DNA连接酶将所回收的大片段酶切产物与步骤D所制备dsDNA进行连接,连接体系20  $\mu$ L:所回收载体酶切产物 3  $\mu$ L,退火所形成dsDNA产物 10  $\mu$

L, T4 DNA buffer 2  $\mu$ L, T4 DNA 连接酶 1  $\mu$ L, 灭菌双蒸水 4  $\mu$ L, 16 $^{\circ}$ C 过夜连接。

[0179] F、测序验证。将步骤E中连接产物转化大肠杆菌, 筛选阳性克隆 (pHSE401载体抗性为kan) 并进行菌落PCR检测。菌落PCR检测时, 所用引物设计为:

[0180] U6-26p F: 5' - TGTCCCAGGATTAGAATGATTAGGC -3' (SEQ ID NO.12);

[0181] P2: 5' - AAACCTCTAAAGAAGGATTAAACAA -3' (SEQ ID NO.9);

[0182] 对菌落PCR检测验证正确的阳性克隆菌株培养扩增后进一步进行测序分析, 测序时所用的引物为U6-26p-F: 5' - TGTCCCAGGATTAGAATGATTAGGC -3' (SEQ ID NO.12)。对测序结果进行分析, 选择构建正确的克隆 (pHSE401-NtMYB330) 保存备用。

[0183] (2) 农杆菌转化

[0184] 从-80 $^{\circ}$ C冰箱中取出农杆菌感受态细胞 (C58C1), 放置冰上溶解后加入载体 pHSE401-NtMYB330 4 $\mu$ L; 液氮速冻1分钟, 转入37 $^{\circ}$ C水浴5分钟, 再冰浴2分钟, 向混合物中加入1mL LB液体培养基, 28 $^{\circ}$ C、220rpm培养3~4小时; 培养物涂布于含有卡那霉素100mg/L和利福平25mg/L的LB固体培养基上, 28 $^{\circ}$ C倒置培养2~3天, 可见含有目标载体的农杆菌克隆。

[0185] (3) 烟草转化

[0186] A、挑取含有目标载体的农杆菌克隆, 在含有卡那霉素和利福平的LB平板上划线, 28 $^{\circ}$ C培养2~3天; 刮取划线菌斑接菌于含有卡那霉素和利福平的LB培养基中, 28 $^{\circ}$ C, 220 rpm 震荡培养, 菌液浓度达到OD=0.5~0.8时进行侵染;

[0187] B、将烟草叶片置于500mL广口瓶中, 加入适量75%乙醇, 漂洗1min; 弃乙醇, 加入0.1%的HgCl<sub>2</sub>溶液, 置摇床上室温振荡15~30分钟; 弃溶液, 用无菌水冲洗6遍;

[0188] C、C、将叶片取出, 用无菌吸水纸洗去表面液体, 取无菌叶片用剪刀切成1 cm $\times$ 1 cm的小片, 将切成小片的烟草叶片放入含目标载体的无菌LB液体培养基悬浮菌液中, 静置15~20min; 取出烟草叶片, 用无菌滤纸吸去多余菌液, 于含有6-BA (0.02 mg/L)、NAA (2 mg/L)的MS培养基中25 $^{\circ}$ C暗培养两天; 将烟草叶片转入分化培养基中, 切口接触培养基, 分化培养基为含有6-BA (0.5 mg/L)、NAA (0.1 mg/L)、潮霉素 (20 mg/L)、头孢霉素 (500 mg/L)的MS培养基, 每2~3周继代一次, 切口处逐渐形成愈伤组织, 最后分化出芽;

[0189] D、将长至3~5cm的芽切下, 转入MS培养基诱导生根, 生根后的基因编辑植株由生根培养基中取出, 用自来水洗净培养基, 移植于灭菌的营养土中。

[0190] (4) 测序筛选编辑材料

[0191] T<sub>0</sub>代转化烟苗生长1周左右, 选取20株烟苗取叶片并利用DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) 提取DNA, 利用步骤(1)C中设计的引物SF/SR进行扩增, 扩增产物纯化后利用正向引物测序。对测序结果分析, 获得一株NtMYB330基因插入1个碱基A的编辑材料(图3)。种植该编辑材料T<sub>1</sub>代植株, 通过测序筛选双基因纯合突变单株并收种获得T<sub>2</sub>代种子。

[0192] (5) 基因敲除株系中原花青素物质生物合成途径基因的表达水平分析

[0193] T<sub>2</sub>代转化株系提取种子总RNA, 利用TaKaRa公司PrimeScript<sup>TM</sup> RT reagent Kit反转录试剂盒合成cDNA作为模板, 对原花青素物质生物合成途径基因进行实时荧光定量PCR分析, 对获得的NtMYB330基因敲除 (M1、M2) 株系, 进行表型分析。分析结果如图4所示, 可以看出, 基因敲除株系中原花青素物质生物合成途径基因NtDFR1, NtANS1, NtLAR1, NtANR1的表达水平相比野生株系而言显著降低。

[0194] (6) 编辑材料种皮中原花青素物质的检测



[0195] 在自交授粉后的第18天,收获T2代植株的未成熟种子,用特异性染色原花青素物质的4-二甲基氨基肉桂醛(DMACA)染色30 min。染色后,用70%乙醇洗去染色液,并用蒸馏水润洗3次。待种子自然晾干后,在显微镜下观察种皮染色情况。结果见图5,编辑材料种皮中的原花青素物质含量比野生型对照显著降低,表明*NtMYB330*基因敲除后影响了原花青素物质在种皮中的累积。

[0196] (7)编辑材料种子萌发率的检测

[0197] 将*NtMYB330*基因敲除植株和野生型对照的成熟种子,置于1/2 MS培养基上,常温下培养7天,并记录每天的种子萌发率。结果见图6,编辑材料种子的萌发率在播种后的第三天显著高于野生型对照,表明*NtMYB330*基因敲除后显著提高了突变体种子在正常条件下的萌发率。

- [0001] SEQUENCE LISTING
- [0002] <110> 云南省烟草农业科学研究院
- [0003] <120> 一种调控种子萌发的试剂盒、方法及其应用
- [0004] <130> P210404/YCN
- [0005] <160> 12
- [0006] <170> PatentIn version 3.5
- [0007] <210> 1
- [0008] <211> 1164
- [0009] <212> DNA
- [0010] <213> Artificial Sequence
- [0011] <220>
- [0012] <223> 烟草*Nicotiana tabacum* L.种子原花青素物质和种子萌发调控因子NtMYB330的基因
- [0013] <400> 1
- [0014] atggaagaa agccttgttg ttctaaagaa ggattaaaca aaggggcatg gactcctatg 60
- [0015] gaggataaaa ttctaataga ttatatcaaa gtaaatgggtg aagggaaatg gagaaatctt 120
- [0016] cccaaaagag ctggtcttaa aagatgtgga aagagttgca gactaagggtg gctgaattat 180
- [0017] ctaaggccag acattaagag gggaaatata actccagatg aagaagatct cattatcaga 240
- [0018] cttcataaac ttcttgaaa tagatggctt ctgatagctg gaaggttacc agaacgaaca 300
- [0019] gacaatgaaa tcaagaatta ttggaacaca aacatcgga aaaaactaca acaaggagtt 360
- [0020] gctcctggtc agccaaaccg cataatatct tccattaatc gtcagcgcgc tcgttctagt 420
- [0021] catgccaat cttccaagtc cgaccagtt acccaacca acaaaaataa tcaagaacac 480
- [0022] acagttccta atcaggatc acagtatttg ctaacagacg ttggattcgg aggatcatcg 540
- [0023] tcttctcat ccccggtttt ggttatccgc acaaaggcaa ttaggtgcac taaagttttt 600
- [0024] attactctc ctctactag tagttcggtt gctgagccac agaatggtga tcagtctcac 660
- [0025] aatgagattg ctcaaaggc tagtaattct cactcagtct tcccacctg caccaggaat 720
- [0026] cccgttgagt tcttacgctt tcatgttgac aactcaatc ttgataatga taacgatgac 780
- [0027] aagtaatgg cggaggattt gacaatagaa aatgcaaata ctattgtagc atcgtcctca 840
- [0028] tcatcgtcat cattatcagt gtcattttg tccgagcagc aacaaccaat atcaggatca 900
- [0029] acaccaactt tctctggaga attggaaaat tataacttta attttatggt tggttttgat 960
- [0030] atggacgatc cttttcttctc tgagcttcta aatgcacctg atatatgtga aaacttgag 1020
- [0031] aatacaacta ctggttgaga tagttgcagc aaaaacgaaa aggaaaggag ctatttcctt 1080
- [0032] tcgaattata gtcaacaac attgttcgca gaagatacgc aacacaacga tttggaactt 1140
- [0033] tggattaatg ggttctcctc ttga 1164
- [0034] <210> 2
- [0035] <211> 387
- [0036] <212> PRT
- [0037] <213> Artificial Sequence
- [0038] <220>
- [0039] <223> 烟草*Nicotiana tabacum* L.种子原花青素物质和种子萌发调控因子NtMYB330
- [0040] <400> 2



[0083]	Glu Asn Leu Glu Asn Thr Thr Thr Val Gly Asp Ser Cys Ser Lys Asn	
[0084]	340	345 350
[0085]	Glu Lys Glu Arg Ser Tyr Phe Pro Ser Asn Tyr Ser Gln Thr Thr Leu	
[0086]	355	360 365
[0087]	Phe Ala Glu Asp Thr Gln His Asn Asp Leu Glu Leu Trp Ile Asn Gly	
[0088]	370	375 380
[0089]	Phe Ser Ser	
[0090]	385	
[0091]	<210> 3	
[0092]	<211> 29	
[0093]	<212> DNA	
[0094]	<213> Artificial Sequence	
[0095]	<220>	
[0096]	<223> 引物NtMYB330-F	
[0097]	<400> 3	
[0098]	ggatccatgg gaagaaagcc ttgttgctc	29
[0099]	<210> 4	
[0100]	<211> 29	
[0101]	<212> DNA	
[0102]	<213> Artificial Sequence	
[0103]	<220>	
[0104]	<223> 引物NtMYB330-R	
[0105]	<400> 4	
[0106]	ctcgagtcaa gaggagaacc cattaatcc	29
[0107]	<210> 5	
[0108]	<211> 20	
[0109]	<212> DNA	
[0110]	<213> Artificial Sequence	
[0111]	<220>	
[0112]	<223> 引物Actin-F	
[0113]	<400> 5	
[0114]	ctgaggtcct tttccaacca	20
[0115]	<210> 6	
[0116]	<211> 20	
[0117]	<212> DNA	
[0118]	<213> Artificial Sequence	
[0119]	<220>	
[0120]	<223> 引物Actin-R	
[0121]	<400> 6	
[0122]	taccgggaa catggtagag	20
[0123]	<210> 7	
[0124]	<211> 20	

[0125]	<212> DNA	
[0126]	<213> Artificial Sequence	
[0127]	<220>	
[0128]	<223> CRISPR/Cas9靶位点(PAM)	
[0129]	<400> 7	
[0130]	ttgtttaatc cttctttaga	20
[0131]	<210> 8	
[0132]	<211> 24	
[0133]	<212> DNA	
[0134]	<213> Artificial Sequence	
[0135]	<220>	
[0136]	<223> 引物P1	
[0137]	<400> 8	
[0138]	attgttggtt aatccttctt taga	24
[0139]	<210> 9	
[0140]	<211> 24	
[0141]	<212> DNA	
[0142]	<213> Artificial Sequence	
[0143]	<220>	
[0144]	<223> 引物P2	
[0145]	<400> 9	
[0146]	aaactctaaa gaaggattaa acaa	24
[0147]	<210> 10	
[0148]	<211> 22	
[0149]	<212> DNA	
[0150]	<213> Artificial Sequence	
[0151]	<220>	
[0152]	<223> NtMYB330-SF	
[0153]	<400> 10	
[0154]	caactagtta cagattgagg ag	22
[0155]	<210> 11	
[0156]	<211> 20	
[0157]	<212> DNA	
[0158]	<213> Artificial Sequence	
[0159]	<220>	
[0160]	<223> NtMYB330-SR	
[0161]	<400> 11	
[0162]	catccacagc tagtcactac	20
[0163]	<210> 12	
[0164]	<211> 25	
[0165]	<212> DNA	
[0166]	<213> Artificial Sequence	

---

[0167]	<220>	
[0168]	<223>	引物U6-26p F
[0169]	<400>	12
[0170]	tgtcccagga ttagaatgat taggc	25

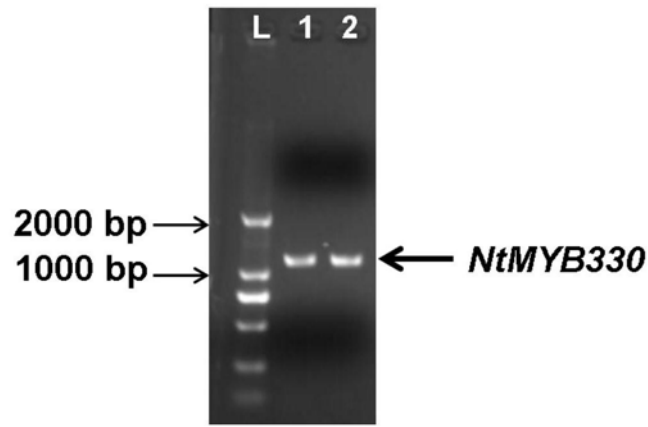


图1

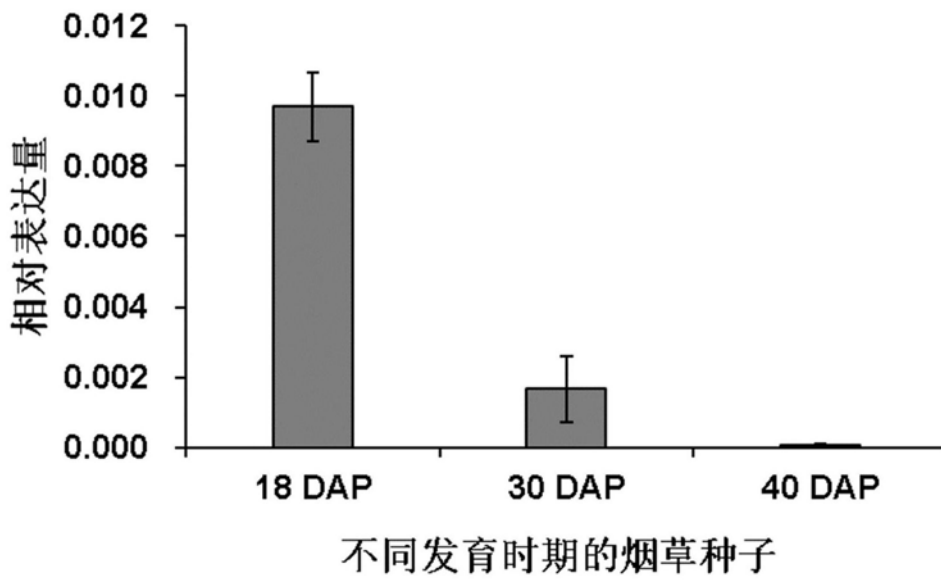


图2

*NtMYB330*     AAAGCCTTGTTGTTCTAAAGAAGGATTAAA-CAAAGGGGCATGGACTCCTATGG  
*ntmyb330*     AAAGCCTTGTTGTTCTAAAGAAGGATTAAA<sup>A</sup>CAAAGGGGCATGGACTCCTATGG

*NtMYB330* 突变基因型

图3

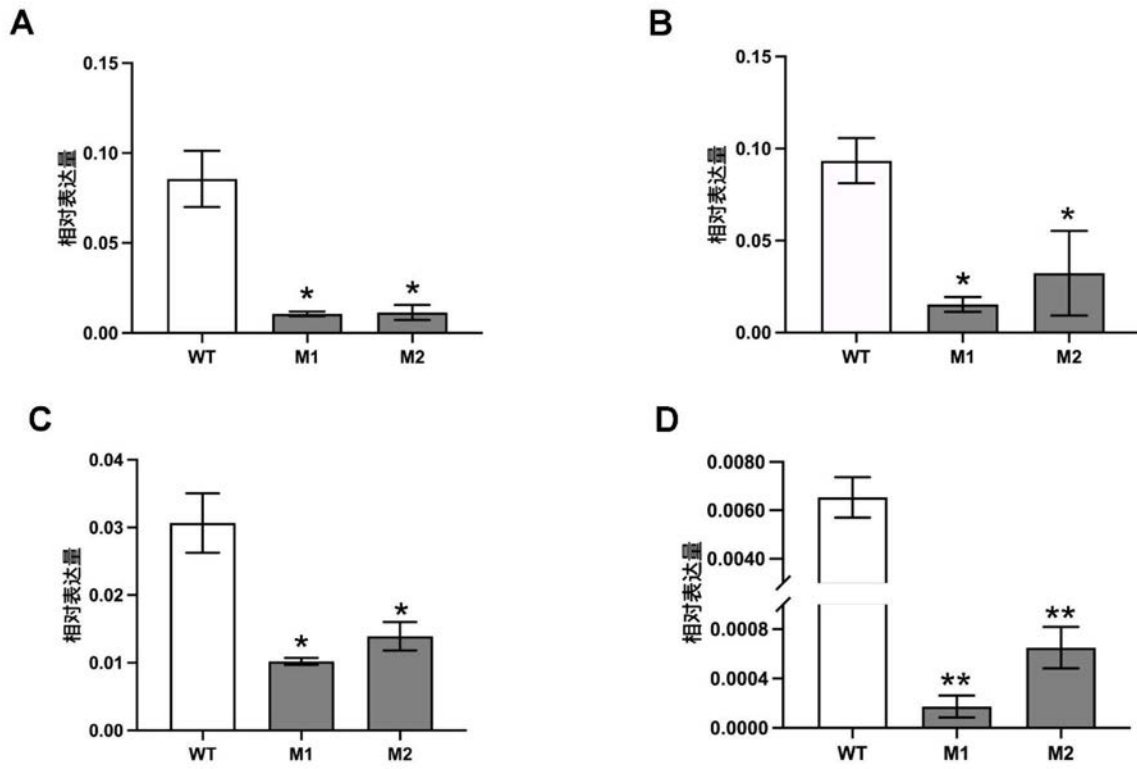


图4



WT



M

图5



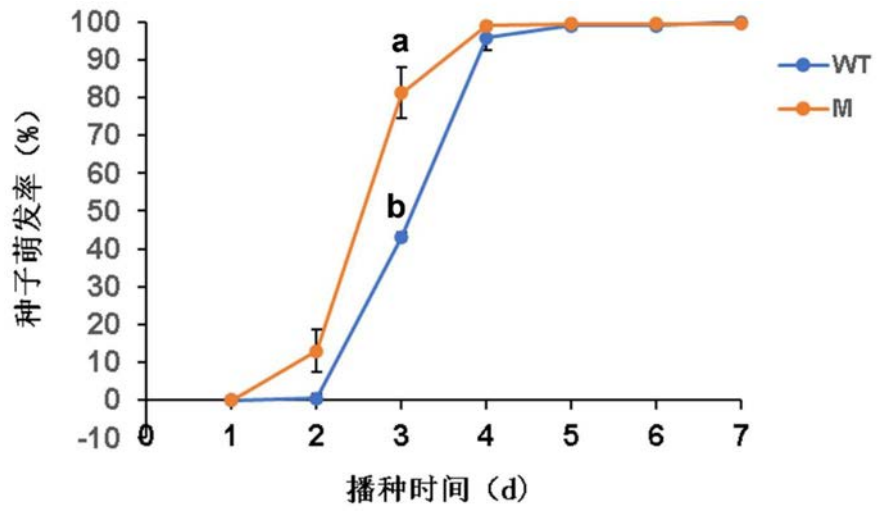


图6