



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111676220 A

(43)申请公布日 2020.09.18

(21)申请号 202010434843.8

(22)申请日 2020.05.21

(71)申请人 扬州大学

地址 225009 江苏省扬州市大学南路88号

(72)发明人 刘思安 胥猛 祁浩然 吴玲

(74)专利代理机构 南京苏高专利商标事务所

(普通合伙) 32204

代理人 郑立发

(51)Int.Cl.

C12N 15/113(2010.01)

C12N 15/84(2006.01)

A01H 5/06(2018.01)

A01H 6/00(2018.01)

权利要求书1页 说明书7页

序列表1页 附图3页

(54)发明名称

杨树长链非编码RNA lnc11及其应用

(57)摘要

本发明公开了一条新的杨树长链非编码RNA lnc11及其应用,其核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示,还提供了所述杨树长链非编码RNA lnc11的过量表达载体、多靶点CRISPR/Cas9敲除载体以及表达载体的宿主,并提供了所述杨树长链非编码RNA lnc11在控制杨树不定根形成方面的应用。本发明通过将长链非编码RNA lnc11的敲除载体转入杨树原生质体中获得了很高的敲除效率,此方法可以广泛用于lncRNA的功能研究。此外,本发明提供的lnc11在过量表达后转基因杨树的不定根数量显著减少。这表明lnc11是调控杨树不定根形成的关键基因,通过过量表达或敲除lnc11调控杨树不定根的数量,能够按照需求培育出生根数量不同的杨树,因此在杨树分子育种过程中具有重要的应用价值。

1. 杨树长链非编码RNA lnc11,其核苷酸序列如SEQ NO.1所示。
2. 含有权利要求1所述的杨树长链非编码RNA lnc11的过量表达载体。
3. 根据权利要求2所述的过量表达载体,其特征在于:所述过量表达载体是在lnc11的5'端组装组成型强表达启动子P35S。
4. 根据权利要求2所述的载体,其特征在于:所述过量表达载体是在lnc11的3'端组装了强终止子NOS。
5. 根据权利要求2所述的载体,其特征在于:所述过量表达载体组装了NPT II 基因表达盒,作为转基因杨树的筛选标记。
6. 权利要求1所述lnc11的多靶点CRISPR/Cas9敲除载体。
7. 根据权利要求6所述的lnc11的多靶点CRISPR/Cas9敲除载体,其特征在于,所述CRISPR/Cas9敲除载体是CRISPR/Cas9-lnc11载体,含有NPTII抗性基因,具有卡那霉素抗性,Cas9蛋白由P35S启动子驱动;所述lnc11的CRISPR/Cas9的靶位点序列为TAAACGCTGGCATGGAAAAG;GTTTATGGTTGAGTAAACGC;TCTTGAAATGAATGTTGTAG。
8. 含有权利要求1所述杨树长链非编码RNA lnc11、权利要求2所述过量表达载体、或权利要求6所述lnc11的多靶点CRISPR/Cas9敲除载体的宿主细胞。
9. 权利要求1所述的长链非编码RNA lnc11在调控杨树不定根形成中的应用。

## 杨树长链非编码RNA lnc11及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于植物基因工程技术领域,具体涉及一条新的杨树长链非编码RNA lnc11 及其应用。

### 背景技术

[0002] 杨树根系主要由大量的不定根及其侧根组成,是其固着、吸收养分和水分的主要器官,决定着杨树生长、产量、抗性 & 生态效应的发挥。一般而言,杨树是适宜无性繁殖的树种,在各种无性繁殖方法中,扦插最为普遍,不仅简单易行、效高价廉,而且能保持母株的优良性状、提早开花结实。插穗的不定根发生的难易程度直接影响造林成活率,且关乎苗木的适应性和抗逆性。部分优良基因型扦插生根困难是限制其在干旱、寒冷和盐碱滩涂等困难立地推广造林的主要因素。

[0003] 不定根发生与根系响应逆境胁迫的可塑性是植物发育与进化生物学领域的前沿和热点。尽管拟南芥、水稻和玉米等草本植物的根系发育生物学研究已经取得了突破性进展,许多分子调控模式和信号传导途径被揭示。但是,多年生林木与草本植物的器官发生和抗逆适应机制存在明显不同之处。深入解析杨树不定根发生的遗传调控机制,对于揭示物种间器官发生和适应性进化机制的异同有重要的理论意义。近年来,研究人员在越来越多的树种中开展了 mRNA、miRNA 挖掘与功能验证研究。杨树功能基因组学研究领先于其它树种,杨树不定根发生过程中的一些关键 mRNA、miRNA 及其调控通路已经得到初步验证和阐释,但是长链非编码 RNA (lncRNA) 如何调控林木不定根的形成和发育鲜有报道。

[0004] lncRNA 是指长度大于 200nt,没有长的开放阅读框,不具有编码能力的非编码 RNA。不像 miRNA 已经研究的较为透彻,lncRNA 的研究起步较晚。最初,lncRNA 并没有被人们重视,一度被视为没有功能的转录“噪音”。但是自从人体中第一个 lncRNA 被 Lukiw 等人 (1992) 报道后,最近的一系列研究表明,lncRNA 在许多生命活动和发育过程中都扮演着重要角色。近几年随着高通量测序技术发展,在植物越来越多的 lncRNA 被预测,但深入开展其克隆和功能研究的报道寥寥无几。尽管植物 lncRNA 研究刚刚起步,但现有的研究发现,植物 lncRNA 的生物学功能丰富多样,广泛参与了植物生命活动的方方面面。

[0005] 在拟南芥中,lncRNA COOLAIR 是关键的花抑制基因 FLC 的天然反义转录本,而 COLDAIR 转录自 FLC 的第一个内含子,COOLAIR 通过转录干扰暂时抑制 FLC 的表达,而 COLDAIR 如前文所说的,通过参与染色质表观修饰沉默 FLC 的表达,调控拟南芥开花。张启发等通过比较野生型水稻 Nongken 58N 和水稻光敏雄性不育系 Nongken 58S,发现水稻特异的 lncRNA LDMAR 发生 C 到 G 的单碱基突变,引起启动子区甲基化,抑制了 Nongken 58S 中 LDMAR 的表达,导致其产生光敏雄性不育。玉米花粉特异表达的 lncRNA Zm401 是调控花粉发育的关键基因,缺失和过表达 Zm401 都会导致玉米雄性不育。白菜花粉特异表达的 lncRNA BcMF11 在白菜育性方面起着重要作用,如果 BcMF11 的表达发生异常,会提前降解绒毡层并造成花粉败育。相比草本植物,木本植物有关 lncRNA 的研究更是少见。

[0006] 虽然目前已经开展杨树 lncRNA 的高通量测序工作,但是很少有深入研究 lncRNA

功能的研究报道,特别是lncRNA调控杨树不定根的研究还未见到报道。

## 发明内容

[0007] 发明目的:针对现有技术中存在的不足,本发明的目的是提供一条新的长链非编码 RNA lnc11。本发明的另一目的是提供一条新的长链非编码RNA lnc11在调控杨树不定根形成过程中的应用。本发明通过克隆并探究一个新的lncRNA——lnc11的功能,不仅能填补lncRNA调控杨树不定根形成方面的空白,还能促进林木分子育种的研究进展。

[0008] 技术方案:为了实现上述发明目的,本发明采用的技术方案如下:

[0009] 本发明提供了一条新的杨树长链非编码RNA lnc11,其核苷酸序列如SEQ NO.1所示。

[0010] 本发明还提供了所述的杨树长链非编码RNA lnc11的过量表达载体。

[0011] 作为一种实施方案:

[0012] 所述过量表达载体在lnc11的5'端组装组成型强表达启动子P35S。

[0013] 所述过量表达载体在lnc11的3'端组装了强终止子NOS。

[0014] 所述过量表达载体组装了NPT II 基因表达盒,作为转基因杨树的筛选标记,可以用卡那霉素进行转基因杨树的筛选。

[0015] 所述过量表达载体组装LB和RB序列,促使组装于其间的基因表达框架和筛选标记基因NPT II 整合至杨树受体细胞染色体中。

[0016] 本发明还提供了所述lnc11的多靶点CRISPR/Cas9敲除载体。

[0017] 作为一种实施方案:

[0018] 所述CRISPR/Cas9敲除载体是CRISPR/Cas9-lnc11载体,含有NPTII抗性基因,具有卡那霉素抗性,Cas9蛋白由P35S启动子驱动;所述lnc11的CRISPR/Cas9的靶位点 序列为TAAACGCTGGCATGGAAAAG;GTTTATGGTTGAGTAAACGC;TCTTGAAA TGAATGTTGTAG。

[0019] 本发明还提供了含有所述杨树长链非编码RNA lnc11、所述过量表达载体、或所述lnc11的多靶点CRISPR/Cas9敲除载体的宿主细胞。

[0020] 本发明最后提供了所述长链非编码RNA lnc11在调控杨树不定根形成中的应用。

[0021] 本发明以南林895杨不定根为材料,克隆了lnc11基因。同时,采用Gateway克隆 技术构建其过量表达载体35S::lnc11。采用overlapping PCR和金门克隆技术构建了多靶点的敲除载体CRISPR/Cas9-lnc11,在杨树原生质体中表达获得了很高的敲除效率。将 过量表达载体35S::lnc11转入杨树中发现其调控杨树不定根的形成。

[0022] 有益效果:本发明克隆了一个新的长链非编码RNA lnc11,通过将长链非编码RNA lnc11的敲除载体转入杨树原生质体中获得了很高的敲除效率,此方法可以广泛用于lncRNA的功能研究。而过量表达lnc11的转基因杨不定根数量显著减少,表明lnc11是 调控杨树不定根形成的重要的lncRNA。通过过量表达或敲除lnc11调控杨树不定根的数量,在杨树分子育种过程中具有重要的应用价值。

## 附图说明

[0023] 图1是构建好的植物表达载体35S::lnc11的结构示意图;

[0024] 图2是lnc11的CRISPR/Cas9敲除效率检测;

- [0025] 图3是过量表达lnc11的转基因杨树分子检测；
- [0026] 图4是过量表达lnc11的转基因杨与未转基因杨的整体形态比较图；图中CK未转基因杨；
- [0027] 图5是过量表达lnc11的转基因杨与未转基因杨的不定根数量统计。

### 具体实施方式

[0028] 下面通过具体实施例对本发明所述的技术方案给予进一步详细的说明。

[0029] 实施例1克隆lnc11

[0030] (1) 基于杨树基因组和申请人前期杨树不定根的转录组数据,使用Oligo 6设计引物。

[0031] 其中,lnc11正向引物为:5' -TCACTATTTATTTCCCATCAAGAAA-3'',lnc11反向引物为:5' -TGAGATTTATCTGGGTTGTTGGT-3'';高保真PCR反应体系如下:10×LA PCR Buffer (Mg<sup>2+</sup>free) 5.0μl;2.5mM dNTP Mixture 8.0μl;25mM Mg<sup>2+</sup>5.0μl;LA Taq DNA Polymerase (5U/μl) 0.5μl;正向引物(10μM) 2μl;反向引物(10μM) 2μl;模板(895 杨cDNA) 1μl;加无菌ddH<sub>2</sub>O补足50μl。反应程序:预变性94℃ 3分钟-(94℃ 40秒-55℃ 30秒-72℃ 30秒)×35个循环-72℃ 10分钟。

[0032] (2) 纯化片段与克隆载体的连接反应

[0033] 采用TaKaRa公司的pMD19-T simple Vector克隆目的DNA分子,参考说明书,连接反应体系与程序稍有改进。

[0034] 反应体系(5μl):

	纯化回收的 PCR 产物	2.2μl
	pMD-19 Simple Vector	0.3μl
[0035]	Solution I	2.5μl
	<b>Total</b>	<b>5.0μl</b>

[0036] 反应条件:16℃30min;4℃过夜。

[0037] (3) 大肠杆菌转化

[0038] 1) 将新鲜制备或-70℃冻存的大肠杆菌TOP10感受态细胞在冰上融化;

[0039] 2) 取5μl纯化片段与克隆载体的连接产物,加入到100μl感受态细胞中,并轻轻混匀,冰浴30min左右;

[0040] 3) 42℃水浴中热击90sec,迅速置于冰上3-5min;

[0041] 4) 加入800μl LB液体培养基,37℃&100rpm摇菌1h;

[0042] 5) 4000rpm离心3min,吸掉上层800μl培养基,混匀剩余菌液;

[0043] 6) 将菌液涂抹于含有Amp的LB筛选培养板上,37℃倒置培养过夜。

[0044] (4) 阳性克隆筛选及测序分析

[0045] 从筛选培养板上挑选单菌落接种于LB液体培养基中,37℃&250rpm摇菌过夜;直接以培养过夜的菌液为模板进行重组转化子的PCR检测。

[0046] 反应体系:

	10×PCR Buffer(Mg <sup>2+</sup> free)	2.0μl	
[0047]	MgCl <sub>2</sub> (25mM)	1.5μl	
	dNTP Mixture (each 2.5 mM)	1.3μl	
	3' RACE gene specific inner primer (10μM)	1.0μl	
	3' RACE Inner Primer(10μM)	1.0μl	
[0048]	菌液	0.1μl	
	rTaq	1.0μl	
	Milli-Q Water	12.1μl	
	<b>Total volume</b>	<b>20.0μl</b>	
[0049]	反应程序:		
	94°C	3min	
	94°C	30sec	} 28cycles
[0050]	60°C	30sec	
	72°C	1min	
	72°C	7min	

[0051] 菌液PCR检测为阳性的克隆送英骏生物技术公司(上海)测序鉴定。lnc11的序列为长度为215bp,序列如SEQ NO.1所示。

[0052] 实施例2 lnc11过量表达载体构建

[0053] 利用Gateway技术构建lnc11基因的过量表达载体。使用特异PCR引物(实施例1的lnc11引物),以cDNA为模板,进行PCR扩增,将lnc11构建到入门载体。入门载体为pCR<sup>TM</sup>8/GW/TOPO<sup>TM</sup> vector (Invitrogen)。反应体系为:Fresh PCR product (purified) 10-20ng; Salt solution 1μl;pCR<sup>TM</sup>8/GW/TOPO<sup>TM</sup> vector 1μl;加无菌ddH<sub>2</sub>O补足6μl。反应程序为:室温静置30min。

[0054] 从筛选培养板上挑取阳性克隆进行PCR检测及测序验证,携带lnc11基因的入门载体与植物表达载体pBI121进行LR反应。载体质粒如图1所示。反应体系为:linearized entry clone 100ng;purified destination vector (100ng/μl) 1.5μl;LR Clonase II enzyme mix 2μl;加TE (pH 8.0) 补足10μl;反应条件:25°C 1h。经LR反应后Lnc11基因导入植物表达载体pBI121中,在lnc11基因的5'端组装组成型强表达启动子P35S,它能使lnc11基因在杨树体内高效表达;在lnc11基因的3'端组装了强终止子NOS,可有效终止lnc11基因的转录;在载体质粒上组装NPT II基因表达盒,作为转基因杨树的筛选标记,可以用卡那霉素进行转基因杨树的筛选;在载体质粒组装LB和RB序列,促使组装于其间的lnc11基因表达框架和筛选标记基因NPT II整合至杨树受体细胞染色体中。通过PCR检测及测序验证,确认过量表达载体构建成功,命名为35S::lnc11,该基因位于启动子P35S之后,在启动子P35S的驱动下,lnc11可在杨树体内高效表达。

[0055] 实施例3 lnc11的CRISPR/Cas9敲除载体构建、转化与敲除效率检测

[0056] 根据靶位点在lnc11的DNA序列中的位置以及靶位点可能的脱靶情况,从中选择了3个作为最终的靶位点,即Target 1、Target 2和Target 3,它们的序列信息见表1。进而,根据这三个靶位点的序列设计sgRNA引物(表2)。选用的CRISPR/Cas9载体含有NPTII抗

性基因,具有卡那霉素抗性,Cas9蛋白由P35S启动子驱动。3个sgRNA表达盒中间载体分别是由拟南芥AtU3d启动子驱动的pYLsgRNA-AtU3d/LacZ载体、AtU3b启动子驱动的pYLsgRNA-AtU3b载体和AtU6-1启动子驱动的pYLsgRNA-AtU6-1载体。首先利用overlapping PCR法将三个拟南芥启动子与3个sgRNA连接起来构成1个 AtU3d::Target1-AtU3b::Target2-AtU6-1::Target3表达盒。然后用金门克隆法将 AtU3d::Target1-AtU3b::Target2-AtU6-1::Target3表达盒连接到CRISPR/Cas9载体上,最终成功构建成为以1nc11为靶标的CRISPR/Cas9-1nc11敲除载体。载体构建所需引物见表2。将1nc11的CRISPR/Cas9敲除载体(CRISPR/Cas9-1nc11)转入杨树原生质体中。经过24h暗培养,进行DNA提取。在靶位点两端设计引物进行PCR扩增,然后进行测序。经过测序分析发现,靶位点1的敲除效率为5.6%,靶位点2的敲除效率为5.4%,靶位点3的敲除效率较高为71.1%(图2)。结果显示三个靶位点都成功地进行了基因编辑,并且具有较高的敲除效率,说明该CRISPR/Cas9基因编辑体系在杨树中是可行的。

[0057] 表1 1nc11的CRISPR/Cas9靶位点序列

靶位点	靶位点序列 (5'-3')
Target	Target Sequences (5'-3')
[0058] Target 1	TAAACGCTGGCATGGAAAAG
Target 2	GTTTATGGTTGAGTAAACGC
Target 3	TCTTGAAATGAATGTTGTAG

[0059] 表2 1nc11敲除载体构建和检测所需的引物

引物名称	引物序列 (5'-3')
Primer ID	Primer Sequences (5'-3')
<i>U-F</i>	CTCCGTTTTACCTGTGGAATCG
[0060] <i>gR-R</i>	CTCCGTTTTACCTGTGGAATCG
<i>Pps-R</i>	TTCAGAGTCTCTACCGACTAGTCACGCGTATGGAATCGGCAGCAAA
<i>Pgs-2</i>	AGCGTGGGTCTCGTCAGGGTCCATCCACTCCAAGCTC
<i>Pps-2</i>	TTCAGAGTCTCTCTGACACTGGAATCGGCAGCAAAGG
<i>Pgs-3</i>	AGCGTGGGTCTCGTCTTCACTCCATCCACTCCAAGCTC

引物名称	引物序列 (5'-3')
Primer ID	Primer Sequences (5'-3')
<i>Pps-3</i>	TTCAGAGGTCTCTAAGACTTTGGAATCGGCAGCAAAGG
<i>Pgs-4</i>	AGCGTGGGTCTCGAGTCCTTCCATCCACTCCAAGCTC
<i>Pps-4</i>	TTCAGAGGTCTCTGACTACATGGAATCGGCAGCAAAGG
<i>SP-L1</i>	GCGGTGTCATCTATGTTACTAG
<i>SP-L2</i>	GTCGTGCTCCACATGTTGACC
<i>SP-R</i>	TGCAATAACTTCGTATAGGCT
<i>Cas9-F</i>	CTGACGCTAACCTCGACAAG
[0061] <i>Cas9-R</i>	CCGATCTAGTAACATAGATGACACC
<i>Pgs-L</i>	AGCGTGGGTCTCGCTCGACGCGTATCCATCCACTCCAAGC
<i>lnc11</i> target 1 F	TAAACGCTGGCATGGAAAAGGTTTTAGAGCTAGAAAAT
<i>lnc11</i> target 1 R	CTTTTCCATGCCAGCGTTTATGACCAATGGTGCTTTG
<i>lnc11</i> target 2 F	GTTTATGGTTGAGTAAACGCGTTTTAGAGCTAGAAAAT
<i>lnc11</i> target 2 R	GCGTTTACTCAACCATAAACTGACCAATGTTGCTCC
<i>lnc11</i> target 3 F	TCTTGAAAATGAATGTTGTAGGTTTTAGAGCTAGAAAAT
<i>lnc11</i> target 3 R	CTACAACATTCATTTCAAGACAATCACTACTTCGTCT
<i>lnc11</i> 检测 F	TCACTATTTATTTCCCATCAAGAAA
<i>lnc11</i> 检测 R	TGAGATTTTATCTGGGTTGTTGGT

[0062] 实施例4 *lnc11*过量表达载体的遗传转化

[0063] 通过液氮冻融法将所构建的35S::*lnc11*过量表达载体转入农杆菌菌株EHA105中，通过农杆菌介导将*lnc11*基因转入杨树。具体步骤如下：

[0064] 1) 挑取阳性单菌落，接种于50mL的LB液体培养基中，28℃250rpm摇菌至 OD<sub>600</sub>值约0.5；

[0065] 2) 将菌液分装于50mL的离心管中，1400xg离心5分钟，除去上清，收集菌斑；

[0066] 3) 用等体积的MS不加蔗糖的液体培养基重悬；

[0067] 4) 取一个月左右的山新杨叶片将叶缘剪出伤口，放入菌液中，在25℃90rpm下 摇半个小时；

[0068] 5) 取出叶盘，转入不添加抗生素的分化培养基中暗培养2天；

[0069] 6) 用不含糖的MS液体培养基对叶盘清洗，然后转入不添加抗生素的分化培养基中正常光下培养1周；

[0070] 7) 1周后将叶盘放到添加抗生素的分化培养基中进行培养；

[0071] 8) 当叶盘长成小芽时，将其转入壮苗培养基中；

[0072] 9) 最后将长大的小苗转入MS培养基中。

[0073] 实施例5转基因植株的检测与表型观测

[0074] 利用实时定量PCR技术，检测外源基因在RNA水平的表达情况，发现过量表达转基因杨树中*lnc11*的表达量显著升高(图3)。利用生长一个月的*lnc11*过表达转基因杨树进行表型观察，发现*lnc11*转基因杨树的不定根明显减少(图4)。每个株系选取5株 进行不定根数目的统计，发现*lnc11*转基因杨树的不定根数量显著少于CK(图5)，这说明*lnc11*是调控杨树不定根形成的一个重要的*lncRNA*。通过过量表达或敲除*lnc11*调控杨树不定根的数



量,能够按照需求培育出生根数量不同的杨树,因此在杨树分子育种过程中具有重要的应用价值。

## 序列表

<110> 扬州大学

<120> 杨树长链非编码RNA lnc11及其应用

<160> 1

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 215

<212> DNA/RNA

<213> RNA lnc11 (RNA lnc11)

<400> 1

```
tcaactattta tttcccatca agaaatgacc acttttccat gccagcgttt actcaacct 60
aaaccaatac catgaaacaa caccatacag cctctacaac attcatttca agattcattt 120
aagctcaagc tcattcttctc ttgtaccaaa acacagccta aacattttat tagttcaaaa 180
accaatacaa aaccaacaac ccagataaaa tctca 215
```

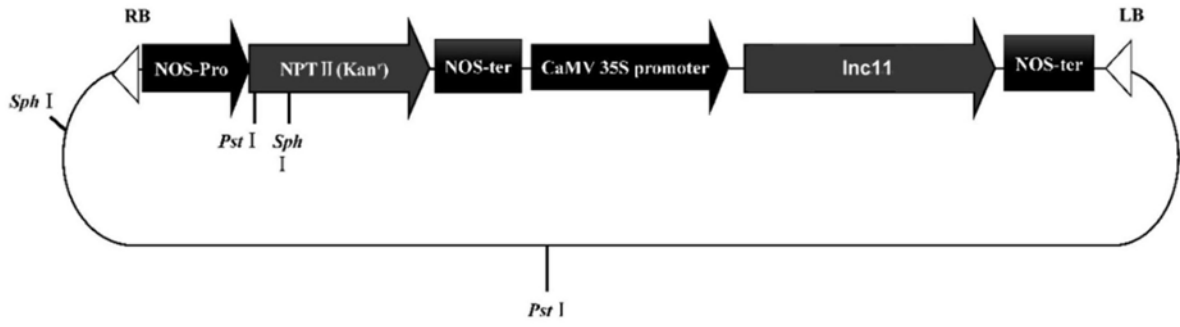


图1

		Target 1	PAM
0	94.40%	ATGGTTGAGTAAACGCTGGCATGGAA	AAGTGGTCATTTCTTGATGGGAAAT
-1	2.90%	ATGGTTGAGTAAACGCTGGCATGGA-	AAGTGGTCATTTCTTGATGGGAAAT

		Target 2	PAM
0	94.60%	TGGTATTGGTTTATGGTTGAGTAAA	CGCTGGCATGGAAAAGTGGTCATTT
-1	2.80%	TGGTATTGGTTTATGGTTGAGTAAA	-GCTGGCATGGAAAAGTGGTCATTT
+7	0.10%	TGGTATTGGTTTATGGTTGAGTAAA	NNNNNNCGCTGGCATGGAAAAGTG

		Target 3	PAM
0	28.90%	TAAATGAATCTTGAAATGAATGTTG	TAGAGGCTGTATGGTGTGTTTCAT
-3	0.30%	TAAATGAATCTTGAAATGAATG---	TAGAGGCTGTATGGTGTGTTTCAT
-5	2%	TAAATGAATCTTGAAATGAATG---	--GAGGCTGTATGGTGTGTTTCAT
-9	0.10%	TAAATGAATCTTGAAATGAATGT--	-----TGTATGGTGTGTTTCAT
-9	0.40%	TAAATGAATCTTGAAATGAA-----	-----GCTGTATGGTGTGTTTCAT
-9	65.10%	TAAATGAATCTTGAAATGAATGTTG	-----TATGGTGTGTTTCAT
-19	0.49%	TAAATGAATCTTGAAAT-----	-----TGGTGTGTTTCAT
-19	1.20%	TAAATGAATCTTGAAATG-----	-----GGTGTGTTTCAT

图2

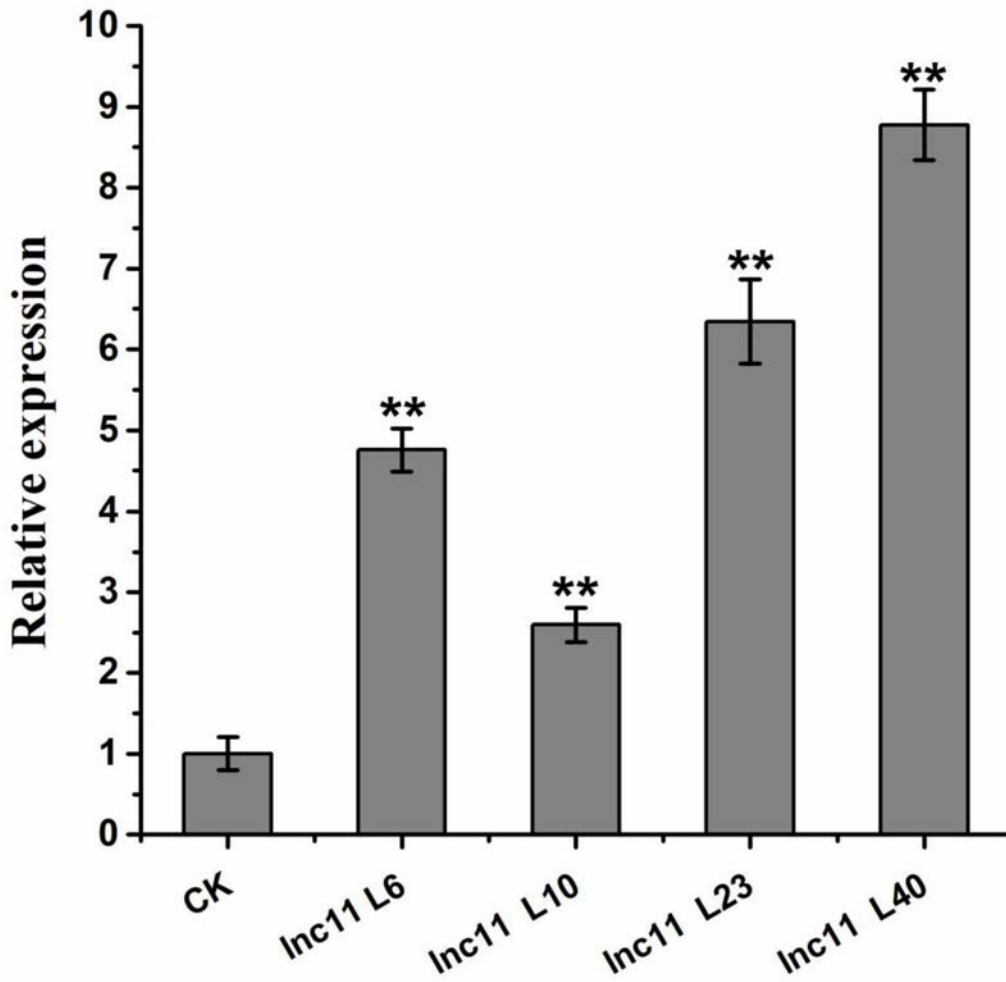


图3



图4

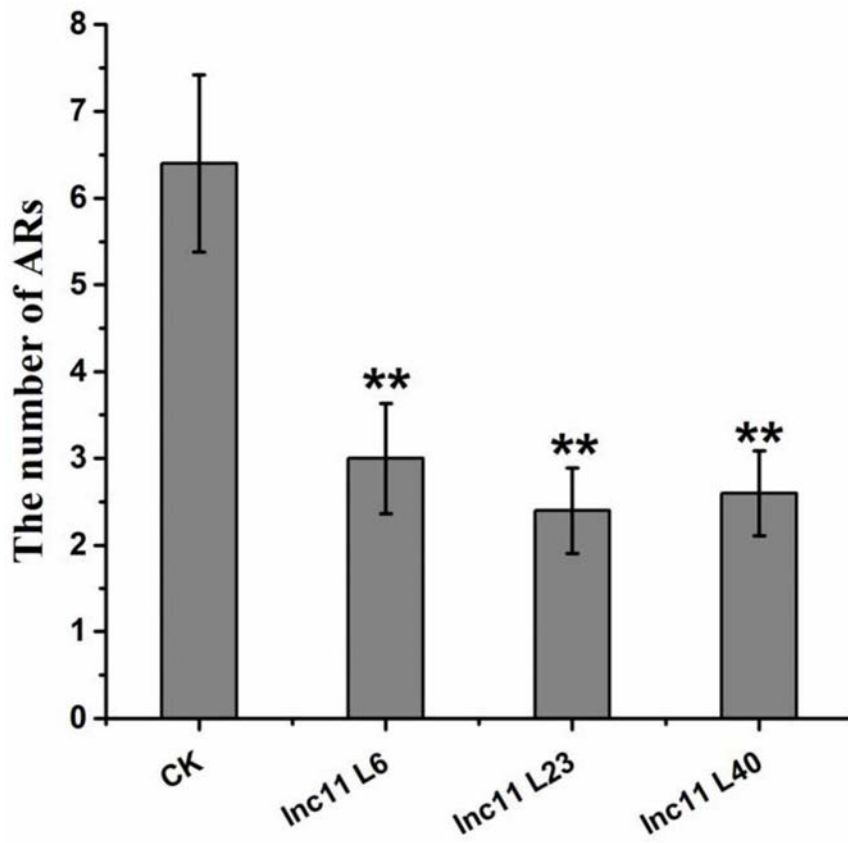


图5