(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 108103092 B
(45)授权公告日 2021.02.12

(21)申请号 201810010146.2
(22)申请日 2018.01.05
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 108103092 A
(43)申请公布日 2018.06.01
(73)专利权人 中国农业科学院作物科学研究所
地址 100081 北京市海淀区中关村南大街12号科海福林大厦对面小2楼109
(72)发明人 隋毅 孙尧 阴涛 吴传银 张皓珊 程子祥
(74)专利代理机构 北京天奇智新知识产权代理有限公司 11340
代理人 龙涛
(51)Int.Cl.
C12N 15/82(2006.01)
C12N 15/29(2006.01)
C12N 15/113(2010.01)
A01H 5/00(2018.01)
A01H 5/04(2018.01)
A01H 6/46(2018.01)

(56)对比文件
CN 105647962 A,2016.06.08
CN 104395469 A,2015.03.04
CN 106676130 A,2017.05.17
张笑寒.CRISPR/Cas9 定点编辑OsGA20ox2基因降低水稻株高研究.《中国优秀硕士学位论文全文数据库 农业科技辑》.2017,(第3期),
佚名.登录号:XM_015772235.1.《Genbank》.2016,
胡雪娇等.利用CRISPR/Cas9系统定向编辑水稻SD1基因.《中国水稻科学》.2018,第32卷(第3期),
Yue Han等.Generation of semi-dwarf rice (Oryza sativa L.) lines by CRISPR/Cas9-directed mutagenesis of OsGA20ox2 and proteomic analysis of unveiled changes caused by mutations.《Biotech》.2019,第9卷(第387期),

审查员 马晓霞

权利要求书1页 说明书6页
序列表1页 附图5页

(54)发明名称

利用CRISPR-Cas系统修饰OsHPH基因获得矮化水稻的系统及其应用

(57)摘要

本发明提供了一种水稻株高相关基因OsHPH,以及在调控水稻株高的应用。通过CRISPR-cas系统对该基因进行编辑后可以不同程度的降低水稻株高,T0代经过后代分离后,可以选育出不含有转基因成分的植株。这些植株可以作为杂交亲本进行生产应用,解决农业生产中杂交F1代株高过高容易倒伏的不良现象。

CN 108103092 B

1.一种基于CRISPR/Cas9技术对水稻OsGA20ox2进行定点编辑从而降低株高的方法,其中gRNA靶点1序列为5′-CTCTGGCATTGCCGCCCCGG-3′;其中水稻品种为东粳。

2.一种减小植株株高的转基因方法,具体是以5′-CTCTGGCATTGCCGCCCCGG-3′为靶点,利用CRISPR/Cas9基因编辑技术进行敲除从而得到转基因植物,所述转基因植物的株高相比于对照野生型植株变小,所述植物为水稻品种东粳。

利用CRISPR-Cas系统修饰OsHPH基因获得矮化水稻的系统及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于作物分子育种相关领域,具体的,本发明涉及利用CRISPR/Cas9技术对进行植物基因的编码编辑与应用,特别涉及与植物株高发育相关的基因及其编码基因与应用。

背景技术

[0002] 水稻(Oryza sativa L.)作为我国乃至世界最重要的粮食作物之一,其产量的提高对解决未来全球粮食问题具有十分重要的战略意义。株高是水稻最重要的农艺性状之一。世界范围内的“绿色革命”就是以作物矮化育种为标志。然而,自20世纪60年代至今,育种上可利用优秀矮源并不多,过度应用有限的矮源可能会导致水稻品种遗传背景单一,从而导致品种抗病虫能力下降。特别是,随着杂交育种技术的突破和发展,杂种优势的充分利用也带来了株高的偏高的问题。

[0003] 一般说来,高杆的水稻倒伏现象比较严重,矮杆水稻的抗倒伏能力比较强,因此培育矮杆水稻能够减少水稻的倒伏率、增加产量、提高品质,是现代水稻育种中的热点问题之一。随着科学技术的进步,分子生物学在水稻育种方面发挥着越来越重要的作用。

[0004] 在现有技术中,已知的CN 102559653 A,提供了一种利用水稻中Dicer蛋白OsDCL3b培育矮杆水稻的方法,该方法是利用转基因抑制水稻细胞中OsDCL3b基因的表达,具体地是利用RNA干扰技术抑制水稻中OsDCL3b基因的表达从而获得矮杆的水稻。CN 1101645 C公开了一种水稻显性半矮秆材料的选育方法及应用,以综合农艺性状优良的水稻品种配制杂交组合,从后代群体中,选择矮秆突变单株,混系繁殖,育成矮秆性状稳定的矮秆突变材料。利用该矮秆材料与已知矮秆基因来源为sd-1等矮源杂交,得知该水稻矮秆性状受一对主基团控制,且矮秆性状为显性。利用该半矮秆材料与植株明显偏高的材料或其它常规材料及不育系杂交,可育得正常株高的水稻品种。

[0005] 随着近年来CRISPR/Cas9技术的研究,我们可以利用该技术对目标基因进行精确的编辑,从而产生我们需要的突变类型。CRISPR/Cas9可以在DNA靶位点产生DNA双链断裂(Double strand breaks,DSBs),对基因组定点编辑是通过控制DNA的修复途径实现的,DNA损伤后产生的DSBs激活细胞内固有的非同源末端连接(Non-homologous ending-joining,NHEJ)或同源重组(Homologous recombination,HR)两种不同的修复机制对损伤的DNA进行修复,从而实现对基因组的定点编辑。

[0006] 本研究利用CRISPR/Cas9技术对目标基因不同的靶点进行定点编辑,得到了不同程度降低株高的后代植株,这对于常规育种与杂种优势的充分利用都起到了十分明显的降低株高的作用。

发明内容

[0007] 本发明的目的在于解决现有技术中存在的问题,利用CRISPR/Cas9可以对目的基

因进行定点编辑造成双链断裂(DSBs),DNA损伤后产生的DSBs激活细胞内固有的非同源末端连接(Non-homologous ending-joining,NHEJ)或同源重组(Homologous recombination,HR)两种不同的修复机制对损伤的DNA进行修复,从而实现对基因组的定点编辑。在不同的突变类型对水稻HPH基因进行定点编辑,得到不同程度矮化的植株。

[0008] 本发明所要解决的技术问题是利用CRISPR/Cas9技术,精确编辑目的基因,提供一种调控水稻株高的方法。

[0009] 为解决上述技术问题,本发明首先提供了水稻株高相关基因OsHPH在调控水稻株高的应用。

[0010] 本发明所选择对目的基因OsHPH进行定点的编辑,所述基因OsHPH的序列与编辑位点属于本发明保护的范围。OsHPH基因编码的OsHPH蛋白是调控水稻株高的关键蛋白之一,定点编辑OsHPH基因后,导致不能翻译出有正常功能的OsHPH蛋白,从而达到降低株高的目的。

[0011] 其中gRNA靶点1序列的选择:序列为5′-CTCTGGCATTGCCGCCCCGG-3′(SEQ ID No.1)。

[0012] 本发明另外提供gRNA靶点2序列的选择:序列为5′-TCGGCCACACGAATGGCTCC-3′(SEQ ID No.2)。

[0013] 本发明另外提供一种减小植株株高的转基因方法,具体是将OsHPH编码基因利用CRISPR/Cas9基因编辑技术进行敲除从而得到转基因植物,所述转基因植物的株高相比于对照野生型植株变小。

[0014] 本发明另外一个方面,提供水稻控制株高相关蛋白OsHPH的编码基因OsHPH的CRISPR/Cas9的载体构建方法,(1)、OsHPH基因的获得

[0015] 以水稻Kitaake(Oryza sativa var.Kitaake)的基因组DNA为模板,用如下引物primer1和primer2进行PCR扩增获得目的基因。其中的下划线部分为In-Fusion酶连接用接头;

[0016] Primer1:5’-ATCCTCTAGAGTCGACATGGTGGCCGAGCACCCCACGC-3’;

[0017] primer2:5’-ATCCTCTAGAGTCGACTCAGCTGGCCGCCTCGAC-3’;

[0018] 将PCR产物回收纯化后连接入B-zero测序载体,转化DH5α感受态细胞,挑选阳性克隆后,进行测序;

[0019] 测序结果表明,扩增得到的PCR产物的长度为1.1Kb,序列如SEQ ID No.3所示的核苷酸序列,命名为OsHPH基因;OsHPH基因编码的蛋白质的氨基酸序列如SEQ ID No.4所示,将该蛋白命名为OsHPH;

[0020] (2)、OsHPH基因gRNA位点CRISPR/Cas9载体构建

[0021] 1)以AarI酶切CRPSPR/Cas9载体,回收线性化15kb大小的片段,命名为CRISPR/Cas9AarI。

[0022] 2)人工合成引物

[0023] gRNA1-F:5’-AGATGATCCGTGGCACTCTGGCATTGCCGCCCCGGGTTTTAGAGCTATGC-3’其中下划线部分是In-Fusion酶接头;反向重复得到序列

[0024] gRNA1-R:5’-GCATAGCTCTAAAACCCGGGGCGGCAATGCCAGAGTGCCACGGATCATCT-3’

[0025] 3)将gRNA1-F与gRNA1-R稀释到10pmol,于PCR管中各加入1ul,后加入8ul得到H_2O;

94℃10min,0.1℃/s退火至15℃,15℃保持10min,完成退火;

[0026] 4)取步骤3)得到的样品1ul,与CRISPR/Cas9AarI进行infusion,转入DH5α,涂于SPEC固体培养基上;

[0027] 5)挑取单克隆用引物Seq-gRNA:CGACAATCTGATCCAAGCTCA进行测序,与得到正确的单克隆;以同样的方法得到gRNA2位点的CRISPR/Cas9载体。

[0028] 另外,OsHPH基因编辑的转基因水稻植株的制备方法,具体包括如下步骤:将CRISPR/Cas9-gRNA1或CRISPR/Cas9-gRNA2通过根癌农杆菌EHA105介导转化Kitaake粳稻,具体方法如下:

[0029] (1)、将重组载体CRISPR/Cas9-gRNA1或CRISPR/Cas9-gRNA2用热激法导入根癌农杆菌EHA105中得到含有重组载体CRISPR/Cas9-gRNA1或CRISPR/Cas9-gRNA2的重组根癌农杆菌EHA105。将含有重组载体CRISPR/Cas9-gRNA1或CRISPR/Cas9-gRNA2的重组根癌农杆菌EHA105在28℃培养16h,收集菌体。采用含有浓度为100μM乙酰丁香酮的N6液体培养基将菌体进行稀释,得到稀释菌液,稀释菌液的OD600≈0.5;

[0030] (2)、将培养至一个月的水稻成熟胚胚性愈伤组织与步骤1的稀释菌液混合侵染30min,采用滤纸吸干菌液后转入N6固体共培养培养基中,在24℃共培养3d,得到共培养处理后的愈伤组织;

[0031] (3)、将步骤2的共培养处理后的愈伤组织接种在含有质量浓度为150mg/L潮霉素的N6固体筛选培养基,向N6固体培养基中加入潮霉素得到N6固体筛选培养基,N6固体筛选培养基中潮霉素的质量浓度为150mg/L,上进行第一次筛选;

[0032] (4)、在第一次筛选开始的第16天挑取健康愈伤组织转入含有质量浓度为200mg/L潮霉素的N6固体筛选培养基上进行第二次筛选,每15天继代一次,共继代1次;

[0033] (5)、挑取抗性愈伤组织转入含有质量浓度为150mg/L潮霉素的分化培养基上,分化培养基:6-BA 2mg,NAA 0.2mg,N6 4g,水解酪蛋白1g,肌醇0.1g,蔗糖25g,山梨醇2.4g,琼脂粉7g,去离子水1L,进行分化,在24℃培养45d,此时植株地上部分高度约为15cm,打开瓶口炼苗3天,然后移栽至温室栽培,即为转CRISPR/Cas9-gRNA1或CRISPR/Cas9-gRNA2的植株T0代。

[0034] 最后,其中水稻为Kitaake(Kit)、Nipponbare(Nip)、中作1022(1022)、中作9017(9017)、东粳(DJ)、中花11(ZH11)或滇粳优(DJY)任一所示。

[0035] 有益效果

[0036] 通过编辑后可以不同程度的降低水稻株高,T0代经过后代分离后,可以选育出不含有转基因成分的植株。这些植株可以作为杂交亲本进行生产应用,解决农业生产中杂交F1代株高过高容易倒伏的不良现象。

附图说明

[0037] 图1.靶点示意图

[0038] 图2.Kitaake WT与编辑后的Kitaake

[0039] 图3.Nipponbare WT与编辑后的Nipponbare

[0040] 图4.中作1022WT与编辑后的中作1022

[0041] 图5.中作9017WT与编辑后的中作9017

[0042] 图6.东粳WT与编辑后的东粳

[0043] 图7.中花11WT与编辑后不同高度的中花11

[0044] 图8.滇粳优WT与编辑后不同高度的滇粳优

[0045] 图9.二个gRNA靶点基因编辑对比图

6、具体实施方式

[0046] 举例说明本发明的具体实施过程,使本领域技术人员按照其不需要创造性劳动就能完成该发明即可。

[0047] 下面结合具体实施方式对本发明进行进一步的详细描述,给出的实施例仅为了阐明本发明,而不是为了限制本发明的范围。

[0048] 下述实施例中的实验方法,如无特殊说明,均为常规方法。

[0049] 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。

[0050] 下述实施例中的水稻Kitaake(也称为野生型水稻,简称WT)记载在如下文献中,Gao H,Zheng XM,Fei G,Chen J,Jin M,Ren Y,Wu W,Zhou K,Sheng P,Zhou F,Jiang L,Wang J,Zhang X,Guo X,Wang JL,Cheng Z,Wu C,Wang H,Wan JM.(2013)Ehd4encodes a novel and Oryza-genus-specific regulator of photoperiodic flowering in rice.PLOS GENET.9:e1003281)公众可从中国农业科学院作物科学研究所获得,该生物材料只为重复本发明的相关实验所用,不可作为其它用途使用。

[0051] 下述实施例中所用表达载体是一种CRISPR/Cas9载体。公众可从中国农业科学院作物科学研究所获得该生物材料,该生物材料只为重复本发明的相关实验所用,不可作为其它用途使用。

[0052] 下述实施例中的农杆菌为根癌农杆菌EHA105(Agrobacterium tumefaciens EHA105)(New Agrobacterium helper plasmids for gene transfer to plants.Hood,Elizabeth E;Gelvin,Stanton B;Melchers,LeoS;Hoekema,Andre.Transgenic research,2(4):p.208-218(1993))公众可从中国农业科学院作物科学研究所获得,该生物材料只为重复本发明的相关实验所用,不可作为其它用途使用。

[0053] 实施例1、水稻控制株高相关蛋白OsHPH的编码基因OsHPH的CRISPR/Cas9的载体构建

[0054] 1、OsHPH基因的获得

[0055] 以水稻Kitaake(Oryza sativa var.Kitaake)的基因组DNA为模板,用如下引物primer1和primer2进行PCR扩增获得目的基因。其中的下划线部分为In-Fusion酶连接用接头。

[0056] Primer1:5'-ATCCTCTAGAGTCGACATGGTGGCCGAGCACCCCACGC-3';

[0057] primer2:5'-ATCCTCTAGAGTCGACTCAGCTGGCCGCCTCGAC-3'。

[0058] 将PCR产物回收纯化后连接入B-zero(购买自北京全式金公司)测序载体,转化DH5α感受态细胞,挑选阳性克隆后,进行测序。

[0059] 测序结果表明,扩增得到的PCR产物的长度为1.1Kb,序列如SEQ ID No.3所示的核苷酸序列,命名为OsHPH基因。OsHPH基因编码的蛋白质的氨基酸序列如SEQ ID No.4所示,将该蛋白命名为OsHPH。

[0060] 2、OsHPH基因gRNA位点CRISPR/Cas9载体构建

[0061] 1)以AarI(购自赛默飞公司)酶切CRPSPR/Cas9载体,回收线性化15kb大小的片段,命名为CRISPR/Cas9(AarI)。

[0062] 2)以设计的gRNA1位点为例,人工合成引物

[0063] gRNA1-F:5'-AGATGATCCGTGGCACTCTGGCATTGCCGCCCCGGGTTTTAGAGCTATGC-3'其中下划线部分是In-Fusion酶接头。

[0064] gRNA1-R:5'-GCATAGCTCTAAAACCCGGGGCGGCAATGCCAGAGTGCCACGGATCATCT-3'

[0065] 3)将gRNA1-F与gRNA1-R稀释到10pmol,于PCR管中各加入1ul,后加入8ul得到H_2O。94℃10min,0.1℃/s退火至15℃,15℃保持10min,完成退火;

[0066] 4)取步骤3)得到的样品1ul,与CRISPR/Cas9(AarI)进行infusion,转入DH5α,涂于SPEC固体培养基上。

[0067] 5)挑取单克隆用引物Seq-gRNA:CGACAATCTGATCCAAGCTCA进行测序,与得到正确的单克隆。以同样的方法得到gRNA2位点的CRISPR/Cas9载体。

[0068] 实施例2、培育OsHPH基因被编辑的转基因植株Kitaake及其鉴定

[0069] 一、培育OsHPH基因被编辑的转基因植株

[0070] 将CRISPR/Cas9-gRNA1通过根癌农杆菌EHA105介导转化Kitaake粳稻,具体方法如下:

[0071] 1、将实施例1得到的重组载体CRISPR/Cas9-gRNA1用热激法导入根癌农杆菌EHA105中得到含有重组载体CRISPR/Cas9-gRNA1的重组根癌农杆菌EHA105。将含有重组载体CRISPR/Cas9-gRNA1的重组根癌农杆菌EHA105在28℃培养16h,收集菌体。采用含有浓度为100μM乙酰丁香酮的N6液体培养基(Sigma,产品目录号为C1416)将菌体进行稀释,得到稀释菌液,稀释菌液的OD_{600}≈0.5。

[0072] 2、将培养至一个月的水稻成熟胚胚性愈伤组织与步骤1的稀释菌液混合侵染30min,采用滤纸吸干菌液后转入N6固体共培养培养基中,在24℃共培养3d,得到共培养处理后的愈伤组织。

[0073] 3、将步骤2的共培养处理后的愈伤组织接种在含有质量浓度为150mg/L潮霉素的N6固体筛选培养基(向N6固体培养基中加入潮霉素得到N6固体筛选培养基,N6固体筛选培养基中潮霉素的质量浓度为150mg/L)上进行第一次筛选。

[0074] 4、在第一次筛选开始的第16天挑取健康愈伤组织转入含有质量浓度为200mg/L潮霉素的N6固体筛选培养基上进行第二次筛选,每15天继代一次,共继代1次。

[0075] 5、挑取抗性愈伤组织转入含有质量浓度为150mg/L潮霉素的分化培养基上(分化培养基:6-BA 2mg,NAA 0.2mg,N6 4g,水解酪蛋白1g,肌醇0.1g,蔗糖25g,山梨醇2.4g,琼脂粉7g,去离子水1L)进行分化,在24℃培养45d(此时植株地上部分高度约为15cm),打开瓶口炼苗3天,然后移栽至温室栽培,即为转CRISPR/Cas9-gRNA1植株(T_0代)。

[0076] 二、OsHPH基因被编辑的转基因植株的PCR鉴定

[0077] 提取步骤一获得的转CRISPR/Cas9-gRNA1植株的T0代幼苗和受体亲本水稻Kitaake植株的幼苗(简称为WT)的基因组DNA,并采用引物HPH-F(5'-ATCATGTCTGTCCAGTGGCA-3')和引物HPH-R(5'-AGCATAATCTCGGTCGGTGT-3')进行PCR。得到829bp片段,回收该片段,利用引物Seq-F:ACAAATACCCCACCCTCCTG进行测序。将WT的测序结

果作为参照，与T_0幼苗的测序结果进行比对，发现序列出现差异，导致该基因的表达失活(参见图9所示)，具体的序列差异参考SEQ ID NO:5-10。同理，根据同样的方法与引物鉴定CRISPR/Cas9-gRNA2的转基因植株，结果相同导致该基因的表达失活(参见图9所示)，具体的序列差异参考SEQ ID NO:11-16。

[0078] 四、OsHPH基因被编辑的转基因植株的表型鉴定

[0079] 分别将步骤二得到的CRISPR/Cas9-gRNA1植株和受体亲本水稻Kitaake植株(简称为WT)种植在中国农业科学院作物科学研究所顺义实验基地，观察整个生长期内CRISPR/Cas9-gRNA1植株和受体亲本水稻Kitaake植株(简称为WT)的表型差异。观察结果如图2，与受体亲本水稻Kitaake植株相比，CRISPR/Cas9-gRNA1植株出现了株高降低的表型。从而证明了OsHPH基因参与控制水稻的株高。并且，采用gRNA2的导入植株也取得类似的结果，在此不一一赘述。从图2的结果可以看出，本发明设计的gRNA具有较好的编辑效率以及编辑效果。

[0080] 实施例3、培育OsHPH基因被编辑的转基因植株Nipponbare(Nip)、中作1022(1022)、中作9017(9017)、东粳(DJ)、中花11(ZH11)、滇粳优(DJY)

[0081] 采用实施例2相同的方法，分别制备OsHPH基因被编辑的转基因植株Nipponbare(Nip)、中作1022(1022)、中作9017(9017)、东粳(DJ)、中花11(ZH11)、滇粳优(DJY)结果参见图2-8所示，在这些品种中同样可以实现株高降低的表型，这也充分的说明OsHPH是调节水稻株高的基因。

[0082] 对于本领域技术人员而言，显然本发明不限于上述示范性实施例的细节，而且在不背离本发明的精神或基本特征的情况下，能够以其他的具体形式实现本发明。因此，无论从哪一点来看，均应将实施例看作是示范性的，而且是非限制性的，本发明的范围由所附权利要求而不是上述说明限定，因此旨在将落在权利要求的等同要件的含义和范围内的所有变化囊括在本发明内。

[0083] 此外，应当理解，虽然本说明书按照实施方式加以描述，但并非每个实施方式仅包含一个独立的技术方案，说明书的这种叙述方式仅仅是为清楚起见，本领域技术人员应当将说明书作为一个整体，各实施例中的技术方案也可以经适当组合，形成本领域技术人员可以理解的其他实施方式。

[0001] 序列表

[0002] <110> 中国农业科学院作物科学研究所

[0003] <120> 利用CRISPR-Cas系统修饰OsHPH 基因获得矮化水稻的系统及其应用

[0004] <141> 2018-01-05

[0005] <160> 0

[0006] <170> SIPOSequenceListing 1.0

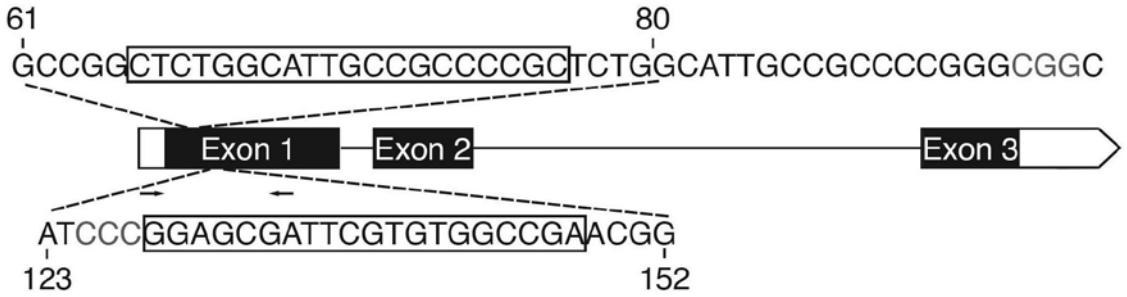
61
80
GCCGGCTCTGGCATTGCCGCCCCGCTCTGGCATTGCCGCCCCGGGCGGC
Exon 1
Exon 2
Exon 3
ATCCCGGAGCGATTCGTGTGGCCGAACGG
123
152

图1

图2

图3

图4

图5

图6

图7

图8

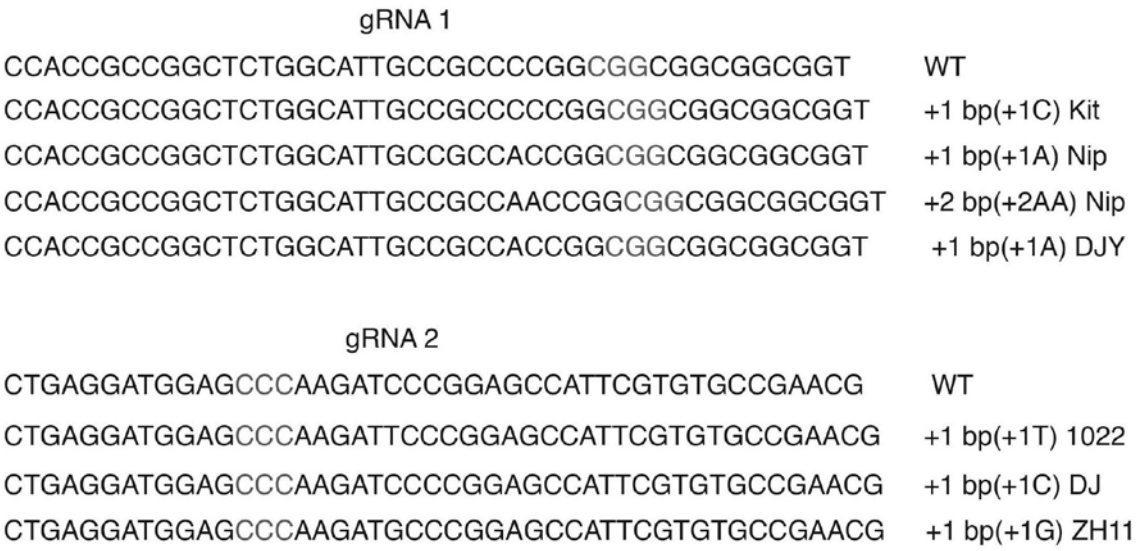
gRNA 1
CCACCGCCGGCTCTGGCATTGCCGCCCCGGCGGCGGCGGCGGT WT
CCACCGCCGGCTCTGGCATTGCCGCCCCCGGCGGCGGCGGCGGT +1 bp(+1C) Kit
CCACCGCCGGCTCTGGCATTGCCGCCACCGGCGGCGGCGGCGGT +1 bp(+1A) Nip
CCACCGCCGGCTCTGGCATTGCCGCCAACCGGCGGCGGCGGCGGT +2 bp(+2AA) Nip
CCACCGCCGGCTCTGGCATTGCCGCCACCGGCGGCGGCGGCGGT +1 bp(+1A) DJY
gRNA 2
CTGAGGATGGAGCCCAAGATCCCGGAGCCATTCGTGTGCCGAACG WT
CTGAGGATGGAGCCCAAGATTCCCGGAGCCATTCGTGTGCCGAACG +1 bp(+1T) 1022
CTGAGGATGGAGCCCAAGATCCCCGGAGCCATTCGTGTGCCGAACG +1 bp(+1C) DJ
CTGAGGATGGAGCCCAAGATGCCCGGAGCCATTCGTGTGCCGAACG +1 bp(+1G) ZH11

图9