



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105063061 B

(45)授权公告日 2018. 10. 30

(21)申请号 201510450316.5

(22)申请日 2015.07.28

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 105063061 A

(43)申请公布日 2015.11.18

(73)专利权人 华南农业大学
地址 510642 广东省广州市天河区五山路
483号

(72)发明人 王加峰 黄翠红 郭涛 罗文龙
陈志强 王慧

(74)专利代理机构 广州市华学知识产权代理有
限公司 44245
代理人 苏运贞

(51) Int. Cl.
C12N 15/29(2006.01)
C07K 14/415(2006.01)
C12N 15/82(2006.01)

(56)对比文件

CN 104293827 A, 2015.01.21,
Rong-Fang Xu等.Generation of
inheritable and 'transgene clean' targeted
genome-modified rice in later generations
using the CRISPR/Cas9 system.《Scientific
Reports》.2015,摘要,第2页第1-5段,第4页1-3
段,第7页表5,第8页图1,第9页“材料与方法”.

Ken Ishimaru 等.Loss of function of
the IAA-glucose hydrolase gene TGW6
enhances rice grain weight and increases
yield.《NATURE GENETICS》.2013,第45卷(第6
期),摘要,第707页左栏最后一段至709页左栏第
一段.

王军 等.水稻千粒重基因TGW6功能标记的
开发与利用.《中国水稻科学》.2014,第28卷(第5
期),第473-478页.

审查员 李捷

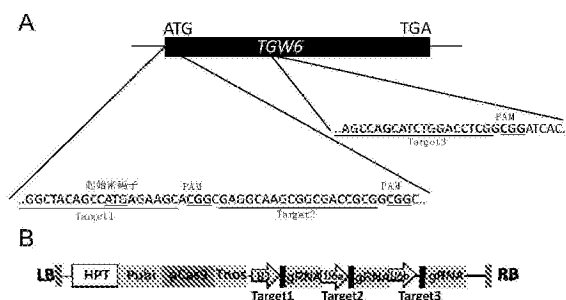
权利要求书3页 说明书9页
序列表8页 附图1页

(54)发明名称

一种水稻千粒重基因tgw6突变体及其制备
方法与应用

(57)摘要

本发明属于植物生物技术领域,具体涉及一
种水稻千粒重基因tgw6突变体及其制备方法与
应用。本发明通过设计特定的TGW6位点,利用
CRISPR/Cas9技术定点编辑了调控水稻千粒重的
TGW6基因,获得了一套具有重要应用价值的水稻
tgw6缺失突变体新种质,分别为Cas-tgw6^a、
Cas-tgw6^b或Cas-tgw6^c,该类突变体显著影响水
稻的千粒重,提高水稻千粒重5%以上。可以用于
水稻的高产、稳产育种。



1. 一种水稻千粒重基因 $tgw6$ 突变体在水稻种植领域中的应用,其特征在于:
所述的水稻千粒重基因 $tgw6$ 突变体分别为 $Cas-tgw6^a$ 、 $Cas-tgw6^b$ 或 $Cas-tgw6^c$;
所述的 $Cas-tgw6^a$ 中,千粒重基因 $tgw6$ 的氨基酸序列为:

MRNYKTGNLYIADAYMGLMRVGPKEGGEATVLAMKADGVPLRFTNGVDIDQVTGDVYFTDSSMNYQRSQHEQVT
ATKDSTGRLMKYDPRTNQVTVLQSNITYPNGVAMSADRTHLIVALTGPCCKLMRHWIRGPKTKGSEPFVDLPGYPDNV
RPDGKGGYWIALHREKYELPFGPDSHLVAMRVSAGGKLVQQMRGPKSLRPTEVMERKDGKIYMGVELPYVGVVVKSS
;

所述的 $Cas-tgw6^b$ 中,千粒重基因 $tgw6$ 的氨基酸序列为:

MGRITGRPGERRVRRQRPRPVQRRLRRPHHEVERRGRWLEHLHVQPQLHEKQVRGIDSPHGPDREQMRPPVPR
TVSLQNRQPVHRRRLHGIDASWSKRRGGNRASHEG;

所述的 $Cas-tgw6^c$ 中,千粒重基因 $tgw6$ 的氨基酸序列为:

MRMFKTIDARRSQHLDLGGSLVGPEVAFDGGKGRGPYSGVSDGRIMRWNGEAAAGWSTYTYSPSYTKNKCAAST
LPTVQTESKCGRPLGLRFHYKTGNLYIADAYMGLMRVGPKEGGEATVLAMKADGVPLRFTNGVDIDQVTGDVYFTDSS
MNYQRSQHEQVTATKDSTGRLMKYDPRTNQVTVLQSNITYPNGVAMSADRTHLIVALTGPCCKLMRHWIRGPKTKGSE
PFVDLPGYPDNVPRPDGKGGYWIALHREKYELPFGPDSHLVAMRVSAGGKLVQQMRGPKSLRPTEVMERKDGKIYMG
VELPYVGVVVKSS。

2. 根据权利要求1所述的水稻千粒重基因 $tgw6$ 突变体在水稻种植领域中的应用,其特征
在于:

所述的 $Cas-tgw6^a$ 中,千粒重基因 $tgw6$ 的核苷酸序列为:

ATGAGAACTACAAAACCGCAACCTGTACATCGCCGACGCCTACATGGGATTGATGCGAGTTGGTCCAAAAG
GCGGGGAGGCAACCGTGCTAGCCATGAAGGCTGATGGCGTGCCACTTCGCTTCACCAATGGGGTGGACATTGATCAG
GTTACCGGAGATGTTTATTTACCGACAGCAGCATGAACTACCAACGATCTCAGCAGGCAAGTCACGGCGACCAA
GGATTCGACCGGACGGCTCATGAAGTATGACCCACGAACTAACCAAGTCACCGTTCTTCAATCCAACATAACCTACC
CGAACGGTGTGCCATGAGCGCTGACCGAACACATCTGATCGTTGCATTGACCGGGCCATGTAAGTTGATGAGGCAT
TGGATCCGAGGCCCCAAGACTGGCAAACTGAACCATTTGTTGACCTGCCAGGCTATCCTGATAATGTGAGGCCTGA
TGGAAAAGGTGGTTATTGGATAGCGCTTCATCGCGAGAAGTATGAGCTTCCCTTTGGTCCGGATAGTCACTTGGTTG
CTATGAGGGTTAGTGCTGGTGGGAAGCTGGTTCAACAGATGAGAGGACCAAAGAGCTTGAGGCCAACCGAAGTGATG
GAGAGGAAGGATGGCAAAATATACATGGGAAATGTTGAATTGCCGTATGTCCGAGTCGTCAAAAAGCAGCTAG。

3. 根据权利要求1所述的水稻千粒重基因 $tgw6$ 突变体在水稻种植领域中的应用,其特征
在于:

所述的 $Cas-tgw6^b$ 中,千粒重基因 $tgw6$ 的核苷酸序列为:

ATGGGGCGGATCACTGGTCCGCCCCGAGAGCGTCGCGTTCGACGGCAAAGGCCGCGCCCCGTACAGCGGCGTC
TCCGACGGCCGCATCATGAGGTGGAACGGCGAGGCCGCTGGCTGGAGCACCTACACGTACAGCCCCAGCTACACGAA
AAACAAGTGCAGCGCATCGACTCTCCCCACGGTCCAGACCGAGAGCAAATGCGGCCGCCGTTAGGCCTACGTTTC
ACTACAAAACCGGCAACCTGTACATCGCCGACGCTACATGGGATTGATGCGAGTTGGTCCAAAAGCGGGGAGGCA
ACCGTGCTAGCCATGAAGGCTGATGGCGTGCCACTTCGCTTCACCAATGGGGTGGACATTGATCAGGTTACCGGAGA
TGTTTATTTACCGACAGCAGCATGAACTACCAACGATCTCAGCAGGCAAGTCACGGCGACCAAGGATTGACCGG
GACGGCTCATGAAGTATGACCCACGAACTAACCAAGTCACCGTTCTTCAATCCAACATAACCTACCCGAACGGTGT
GCCATGAGCGCTGACCGAACACATCTGATCGTTGCATTGACCGGGCCATGTAAGTTGATGAGGCATTGGATCCGAGG

CCCGAAGACTGGCAAATCTGAACCATTTGTTGACCTGCCAGGCTATCCTGATAATGTGAGGCCTGATGGAAAAGGTG
GTTATTGGATAGCGCTTCATCGCGAGAAGTATGAGCTTCCCTTTGGTCCGGATAGTCACTTGGTTGCTATGAGGGTT
AGTGCTGGTGGGAAGCTGGTTCAACAGATGAGAGGACCAAAGAGCTTGAGGCCAACCGAAGTGATGGAGAGGAAGGA
TGGCAAAATATACATGGGAAATGTTGAATTGCCGTATGTCGGAGTCGTCAAAAAGCAGCTAG。

4. 根据权利要求1所述的水稻千粒重基因 $tgw6$ 突变体在水稻种植领域中的应用,其特征
在于:

所述的Cas- $tgw6^c$ 中,千粒重基因 $tgw6$ 的核苷酸序列为:

ATGAGAATGTTCAAGACCATTGACGCCCGGCGGAGCCAGCATCTGGACCTCGGCGGATCACTGGTCCGCCCCG
AGAGCGTCGCGTTCGACGGCAAAGGCCGCGGCCGTACAGCGCGTCTCCGACGGCCGCATCATGAGGTGGAACGGC
GAGGCCGCTGGCTGGAGCACCTACACGTACAGCCCCAGCTACACGAAAAACAAGTGCAGCGGCATCGACTCTCCCCAC
GGTCCAGACCGAGAGCAAATGCGGCCGCCGTTAGGCCTACGGTTTCACTACAAAACCGGCAACCTGTACATCGCCG
ACGCCTACATGGGATTGATGCGAGTTGGTCCAAAAGCGGGGAGGCAACCGTGCTAGCCATGAAGGCTGATGGCGTG
CCACTTCGTTTACCAATGGGGTGGACATTGATCAGGTTACCGGAGATGTTTATTTACCGACAGCAGCATGAACTA
CCAACGATCTCAGCACGAGCAAGTCACGGCGACCAAGGATTCGACCGGACGGCTCATGAAGTATGACCCACGAACTA
ACCAAGTCACCGTTCTTCAATCCAACATAACCTACCCGAACGGTGTGCCATGAGCGCTGACCGAACACATCTGATC
GTTGCATTGACCGGGCCATGTAAGTTGATGAGGCATTGGATCCGAGGCCGAAGACTGGCAAATCTGAACCATTTGT
TGACCTGCCAGGCTATCCTGATAATGTGAGGCCTGATGGAAAAGGTGGTTATTGGATAGCGCTTCATCGCGAGAAGT
ATGAGCTTCCCTTTGGTCCGGATAGTCACTTGGTTGCTATGAGGGTTAGTGCTGGTGGGAAGCTGGTTCAACAGATG
AGAGGACCAAAGAGCTTGAGGCCAACCGAAGTGATGGAGAGGAAGGATGGCAAAATATACATGGGAAATGTTGAATT
GCCGTATGTCGGAGTCGTCAAAAAGCAGCTAG。

5. 权利要求1~4任一项所述的水稻千粒重基因 $tgw6$ 突变体的制备方法,其特征
在于包含如下步骤:

(1) 引导RNA靶点序列设计与选择

根据调控水稻粒长及千粒重基因 $TGW6$ 的基因组序列,设计、选择并合成3个 $TGW6$ 引导
RNA靶点序列;

(2) 三靶点CRISPR/Cas9-gRNA载体的构建

将步骤(1)中合成的引导RNA靶点序列的寡核苷酸链退火形成双链,然后分别与BsaI酶
切后的pYL-U3-gRNA、pYL-U6a-gRNA和pYL-U6b-gRNA连接,得到三个gRNA表达盒;然后通过
Golden gate cloning的方法将gRNA表达盒依次装载到CRISPR/Cas9载体上,得到三靶点
CRISPR/Cas9-gRNA载体;

(3) 农杆菌介导水稻愈伤遗传转化

将步骤(2)构建好的三靶点CRISPR/Cas9-gRNA载体转化到水稻中,分别获得不含
CRISPR元件T-DNA成分的纯合 $tgw6$ 突变体Cas- $tgw6^a$ 、Cas- $tgw6^b$ 或Cas- $tgw6^c$ 。

6. 根据权利要求5所述的水稻千粒重基因 $tgw6$ 突变体的制备方法,其特征
在于:

步骤(1)中所述的3个 $TGW6$ 引导RNA靶点序列的寡核苷酸序列分别为:

TGW6U3-T1-F: 5' -GGCAGCCAGCATCTGGACCTCGG-3' ;

TGW6U3-T1-R: 5' -AAACCCGAGGTCCAGATGCTGGC-3' ;

TGW6U6a-T2-F: 5' -GCCGGCTACAGCCATGAGAAGCA-3' ;

TGW6U6a-T2-R: 5' -AAACTGCTTCTCATGGCTGTAGC-3' ;

TGW6U6b-T3-F:5' -GTTGAGGCAAGCGGCGACCCGCG-3' ;

TGW6U6b-T3-R:5' -AAACCCGCGGTCGCCGCTTGCCT-3' 。

7. 根据权利要求5所述的水稻千粒重基因tgw6突变体的制备方法,其特征在于:
步骤(2)中所述的Golden gate cloning的引物为:

U3-T1-F:5' -TTCAGAGGTCTCTCTCGCACTGGAATCGGCAGCAAAGG-3' ;

U3-T1-R:5' -AGCGTGGGTCTCGTCAGGGTCCATCCACTCCAAGCTC-3' ;

U6a-T2-F:5' -TTCAGAGGTCTCTCTGACACTGGAATCGGCAGCAAAGG-3' ;

U6a-T2-R:5' -AGCGTGGGTCTCGTCTTGGTCCATCCACTCCAAGCTC-3' ;

U6b-T3-F:5' -TTCAGAGGTCTCTAAGACTGGAATCGGCAGCAAAGG-3' ;

U6b-T3-R:5' -AGCGTGGGTCTCGACCGGTCCATCCACTCCAAGCTC-3' 。

8. 根据权利要求5所述的水稻千粒重基因tgw6突变体的制备方法,其特征在于:
步骤(2)中所述的CRISPR/Cas9载体为pYLCRISPR/Cas9P_{ubi}-H。

9. 根据权利要求5所述的水稻千粒重基因tgw6突变体的制备方法,其特征在于:
步骤(3)中所述的水稻的品系为H447;

所述的H447为R819/玉香占//R819BC₂F₇代稳定品系。

一种水稻千粒重基因tgw6突变体及其制备方法与应用

技术领域

[0001] 本发明属于植物生物技术领域,具体涉及一种水稻千粒重基因tgw6突变体及其制备方法与应用。

背景技术

[0002] 水稻(*Oryza sativa* L.)是世界上重要的粮食作物之一,养活着全球半数以上的人口,也是我国近一半人口的主要食物来源。随着人口的不断增长,人们对粮食的需求也越来越大。杂种优势的有效利用对水稻产量的提高起了重要的推动作用,然而,单位面积的水稻产量一直没有太大提升,而且随着耕地面积的减少,水稻的种植面积一直在下降,迫切需要借助新的遗传改良策略来大力提高水稻的产量。近几年,随着几个控制谷粒大小的基因(GS3、SW5和GW8)、粒宽粒重(GW2、GW5)、粒长粒宽的基因(qGL1、qGW1、GS7和qSS7)及千粒重基因(TGW6)等与产量相关基因相继被克隆,部分产量相关基因已经被广泛用于水稻高产品种的培育中。这些产量性状相关基因中,以调控粒长粒重的千粒重基因(Thousand-grain Weight 6, TGW6)的遗传力最大, Ishimaru等(2013)的研究发现, Kasalath的tgw6基因能使日本晴在抽穗前的籽粒碳水化合物的积累增加,从而使日本晴产量增加15%却不影响稻米品质;进一步研究发现, Kasalath的tgw6基因在313bp处发生单碱基缺失造成移码突变而使得翻译提前终止不能形成成熟蛋白,从而通过对源器官的多效影响增加千粒重从而使水稻增产。TGW6基因编码吡啶乙酸-葡糖糖水解酶,其功能缺失突变会引起胚乳中吡啶乙酸含量下降,进而使细胞数量增加,粒长变长、粒重增加。

[0003] 一直以来,科学家都未发现准确、便捷、高效率的植物基因组编辑的方法。最近发现的CRISPR/Cas9系统因其简易和有效性已被广泛应用于包括植物在内的多种生物的基因组编辑中,该系统仅需要短引导RNA和核酸酶就可以对特定生物的靶基因进行定点突变,为生物定点诱变技术发展注入了新的活力。目前CRISPR/Cas9系统已成功在拟南芥、烟草、甜橙、水稻、小麦、高粱、玉米以及苔藓植物地钱等植物中实现了定点基因组编辑,但对水稻育种中有重要价值的产量、品质、育性等关键基因的定向编辑的研究鲜有报道,更缺乏对相关突变体的育种价值评价。

发明内容

[0004] 为了克服现有技术的缺点和不足,本发明的首要目的在于提供一种水稻千粒重基因tgw6突变体,该突变体为缺失突变体。

[0005] 本发明的另一目的在于提供上述水稻千粒重基因tgw6突变体的制备方法。

[0006] 本发明的再一目的在于提供上述水稻千粒重基因tgw6突变体的应用。

[0007] 一种水稻千粒重基因tgw6突变体,分别为Cas-tgw6^a、Cas-tgw6^b或Cas-tgw6^c;

[0008] 所述的Cas-tgw6^a中,千粒重基因tgw6的氨基酸序列为:

[0009]

MRNYKTGNLYIADAYMGLMRVGPKGGEATVLAMKADGVPLRFTNGVDIDQVTGDVYFTDSSMNYQRSQHEQVTATKD

STGRLMKYDPRTNQVTVLQSNITYPNGVAMSADRTHLIVALTGPCCKLMRHWIRGPKTKSEPFVDLPGYPDNRPDG
KGGYWIALHREKYELPFGPDSHLVAMRVSAGGKLVQQMRGPKSLRPTEVMERKDGKIYMGVVELPYVGVVVKSS;

[0010] 所述的Cas-tgw^b中,千粒重基因tgw6的氨基酸序列为:

[0011]

MGRITGRPGERRVRRQRPRPVQRRLRRPHHEVERRGRWLEHLHVQPQLHEKQVRGIDSPHGPDREQMRPPVRPTVSL
QNRQPVHRRRLHGIDASWSKRRGGNRASHEG;

[0012] 所述的Cas-tgw^c中,千粒重基因tgw6的氨基酸序列为:

[0013]

MRMFKTIDARRSQHLDLGGSLVGPESVAFDVGKGRGPYSGVSDGRIMRWNGEAAGWSTYTYSPSYTKNKCAASTLPTV
QTESKCGRPLGLRFHYKTGNLYIADAYMGLMRVGPKGGEATVLAMKADGVPLRFTNGVDIDQVTGDVYFTDSSMNYQ
RSQHEQVTATKDSSTGRLMKYDPRTNQVTVLQSNITYPNGVAMSADRTHLIVALTGPCCKLMRHWIRGPKTKSEPFVD
LPGYPDNRPDGKGGYWIALHREKYELPFGPDSHLVAMRVSAGGKLVQQMRGPKSLRPTEVMERKDGKIYMGVVELP
YVGVVVKSS;

[0014] 所述的Cas-tgw^a中,千粒重基因tgw6的核苷酸序列为:

[0015]

ATGAGAACTACAAAACCGCAACCTGTACATCGCCGACGCCTACATGGGATTGATGCGAGTTGGTCCAAAAGGCGG
GGAGGCAACCGTGCTAGCCATGAAGGCTGATGGCGTGCCACTTCGCTCACCAATGGGGTGGACATTGATCAGGTTA
CCGAGATGTTTATTTACCGACAGCAGCATGAACTACCAACGATCTCAGCACGAGCAAGTCACGGCGACCAAGGAT
TCGACCGGACGGCTCATGAAGTATGACCCACGAACTAACCAAGTCACCGTTCTTCAATCCAACATAACCTACCCGAA
CGGTGTCGCATGAGCGCTGACCGAACACATCTGATCGTTGCATTGACCGGGCCATGTAAGTTGATGAGGCATTGGA
TCCGAGGCCGAAGACTGGCAAATCTGAACCATTTGTTGACCTGCCAGGCTATCCTGATAATGTGAGGCCTGATGGA
AAAGGTGGTTATTGGATAGCGCTTCATCGCGAGAAGTATGAGCTTCCCTTTGGTCCGGATAGTCACTTGGTTGCTAT
GAGGGTTAGTGCTGGTGGGAAGCTGGTTCAACAGATGAGAGGACCAAAGAGCTTGAGGCCAACCGAAGTGATGGAGA
GGAAGGATGGCAAATATACATGGGAAATGTTGAATTGCCGTATGTCGGAGTCGTCAAAAAGCAGCTAG;

[0016] 所述的Cas-tgw^b中,千粒重基因tgw6的核苷酸序列为:

[0017]

ATGGGGCGGATCACTGGTCGGCCCGGAGAGCGTCGCGTTCGACGGCAAAGGCCGCGGCCGTACAGCGCGTCTCCG
ACGGCCGCATCATGAGGTGGAACGGCGAGGCCGCTGGCTGGAGCACCTACACGTACAGCCCCAGCTACACGAAAAAC
AAGTGC GCGGCATCGACTCTCCCCACGGTCCAGACCGAGAGCAAATGCGGCCGCCGTTAGGCCTACGGTTTCACTA
CAAAACCGGCAACCTGTACATCGCCGACGCCTACATGGGATTGATGCGAGTTGGTCCAAAAGGCGGGGAGGCAACCG
TGCTAGCCATGAAGGCTGATGGCGTGCCACTTCGCTTCACCAATGGGGTGGACATTGATCAGGTTACCGGAGATGTT
TATTTACCGACAGCAGCATGAACTACCAACGATCTCAGCACGAGCAAGTCACGGCGACCAAGGATTCGACCGGACG
GCTCATGAAGTATGACCCACGAACTAACCAAGTCACCGTTCTTCAATCCAACATAACCTACCCGAACGGTGTGCCA
TGAGCGCTGACCGAACACATCTGATCGTTGCATTGACCGGGCCATGTAAGTTGATGAGGCATTGGATCCGAGGCCCG
AAGACTGGCAAATCTGAACCATTTGTTGACCTGCCAGGCTATCCTGATAATGTGAGGCCTGATGGAAAAGGTGGTTA
TTGGATAGCGCTTCATCGCGAGAAGTATGAGCTTCCCTTTGGTCCGGATAGTCACTTGGTTGCTATGAGGGTTAGTG
CTGGTGGGAAGCTGGTTCAACAGATGAGAGGACCAAAGAGCTTGAGGCCAACCGAAGTGATGGAGAGGAAGGATGGC
AAAATATACATGGGAAATGTTGAATTGCCGTATGTCGGAGTCGTCAAAAAGCAGCTAG;

[0018] 所述的Cas-tgw^c中,千粒重基因tgw6的核苷酸序列为:

[0019]

ATGAGAATGTTCAAGACCATTGACGCCCGGCGGAGCCAGCATCTGGACCTCGGCGGATCACTGGTCCGCCCCGGAGAG
CGTCGCGTTTCGACGGCAAAGGCCGCGGCCGTACAGCGGCGTCTCCGACGGCCGCATCATGAGGTGGAACGGCGAGG
CCGCTGGCTGGAGCACCTACACGTACAGCCCCAGCTACACGAAAAACAAGTGC GCGGCATCGACTCTCCCCACGGTC
CAGACCGAGAGCAAATGCGGCCGCCGTTAGGCCTACGGTTTCACTACAAAACCGGCAACCTGTACATCGCCGACGC
CTACATGGGATTGATGCGAGTTGGTCCAAAAGCGGGGAGGCAACCGTGCTAGCCATGAAGGCTGATGGCGTGCCAC
TTCGTTTACCAATGGGGTGGACATTGATCAGGTTACCGGAGATGTTTATTTACCGACAGCAGCATGAACTACCAA
CGATCTCAGCACGAGCAAGTCACGGCGACCAAGGATTCGACCGGACGGCTCATGAAGTATGACCCACGAACTAACCA
AGTCACCGTTCTTCAATCCAACATAACCTACCCGAACGGTGTCCGATGAGCGCTGACCGAACACATCTGATCGTTG
CATTGACCGGGCCATGTAAGTTGATGAGGCATTGGATCCGAGGCCGAAGACTGGCAAATCTGAACATTTGTTGAC
CTGCCAGGCTATCCTGATAATGTGAGGCCTGATGGAAAAGTGGTTATTGGATAGCGCTTCATCGCGAGAAGTATGA
GCTTCCCTTTGGTCCGGATAGTCACTTGGTTGCTATGAGGGTTAGTGCTGGTGGGAAGCTGGTTCAACAGATGAGAG
GACCAAAGAGCTTGAGGCCAACCGAAGTGATGGAGAGGAAGGATGGCAAATATACATGGGAAATGTTGAATTGCCG
TATGTCGGAGTCGTCAAAGCAGCTAG;

[0020] 所述的水稻千粒重基因 $tgw6$ 突变体的制备方法,包含如下步骤:

[0021] (1) 引导RNA (guide RNA, gRNA) 靶点序列设计与选择

[0022] 根据调控水稻粒长及千粒重基因 $TGW6$ 的基因组序列,设计、选择并合成3个 $TGW6$ 引导RNA靶点序列;

[0023] (2) 三靶点CRISPR/Cas9-gRNA载体的构建

[0024] 将步骤(1)中合成的引导RNA靶点序列的寡核苷酸链退火形成双链,然后分别与 $BsaI$ 酶切后的pYL-U3-gRNA、pYL-U6a-gRNA和pYL-U6b-gRNA连接,得到三个gRNA表达盒;然后通过Golden gate cloning的方法将gRNA表达盒依次装载到CRISPR/Cas9载体上,得到三靶点CRISPR/Cas9-gRNA载体;

[0025] (3) 农杆菌介导水稻愈伤遗传转化

[0026] 将步骤(2)构建好的三靶点CRISPR/Cas9-gRNA载体转化到水稻中,分别获得不含CRISPR元件T-DNA成分的纯合 $tgw6$ 突变体 $Cas-tgw6^a$ 、 $Cas-tgw6^b$ 或 $Cas-tgw6^c$;

[0027] 步骤(1)中所述的3个 $TGW6$ 引导RNA靶点序列的寡核苷酸序列分别为:

[0028] $TGW6U3-T1-F$: 5' -GGCAGCCAGCATCTGGACCTCGG-3' ;

[0029] $TGW6U3-T1-R$: 5' -AAACCCGAGGTCCAGATGCTGGC-3' ;

[0030] $TGW6U6a-T2-F$: 5' -GCCGGCTACAGCCATGAGAAGCA-3' ;

[0031] $TGW6U6a-T2-R$: 5' -AAACTGCTTCTCATGGCTGTAGC-3' ;

[0032] $TGW6U6b-T3-F$: 5' -GTTGAGGCAAGCGGCGACCGCGG-3' ;

[0033] $TGW6U6b-T3-R$: 5' -AAACCCGCGGTCGCCGCTTGCCT-3' ;

[0034] 步骤(2)中所述的Golden gate cloning的引物优选为:

[0035] $U3-T1-F$: 5' -TTCAGAGGTCTCTCTCGCACTGGAATCGGCAGCAAAGG-3' ;

[0036] $U3-T1-R$: 5' -AGCGTGGGTCTCGTCAGGGTCCATCCACTCCAAGCTC-3' ;

[0037] $U6a-T2-F$: 5' -TTCAGAGGTCTCTCTGACACTGGAATCGGCAGCAAAGG-3' ;

[0038] $U6a-T2-R$: 5' -AGCGTGGGTCTCGTCTTGGTCCATCCACTCCAAGCTC-3' ;

[0039] $U6b-T3-F$: 5' -TTCAGAGGTCTCTAAGACACTGGAATCGGCAGCAAAGG-3' ;

- [0040] U6b-T3-R: 5'-AGCGTGGGTCTCGACCGGGTCCATCCACTCCAAGCTC-3';
- [0041] 步骤(2)中所述的CRISPR/Cas9载体优选为pYLCRISPR/Cas9P_{ubi}-H;
- [0042] 步骤(3)中所述的水稻的品系为H447;
- [0043] 所述的H447为R819/玉香占//R819BC₂F₇代稳定品系,即为先将R819与玉香占杂交,再将杂交后代与R819回交两次后再自交7代后所得的稳定品系;
- [0044] 所述的水稻千粒重基因tgw6突变体在水稻种植领域中的应用。
- [0045] 本发明相对于现有技术具有如下的优点及效果:
- [0046] (1) 本发明通过设计特定的tgw6位点,利用CRISPR/Cas9技术定点编辑了调控水稻千粒重的TGW6基因,获得了一套具有重要应用价值的水稻tgw6缺失突变体新种质,这些突变体可以用于水稻的高产、稳产育种。
- [0047] (2) 本发明基于CRISPR/Cas9技术的千粒重基因tgw6突变体创建的成功实施,为快速创建稻米品质(fgr、Chalk5)等生产上有重要应用价值的水稻优异新种质提供了重要参考,并有望为水稻种质资源创新提供了安全、高效的新途径,具有重要的理论和实践意义。

附图说明

- [0048] 图1是TGW6基因靶点序列引物设计及靶点组装示意图,其中,A:3个靶点在TGW6基因上的位置;B:各gRNA表达盒在载体pYLCRISPR/Cas9P_{ubi}-H中的组装方式,黑色方框代表靶点序列引物所在位置。
- [0049] 图2是利用TGW6基因靶位点附近的特异引物对突变体的检测结果,其中,M:1kb DNA ladder;1:水稻材料H447(野生型);2~22:tgw6突变体。
- [0050] 图3是部分tgw6纯合缺失突变体的突变点的测序分析图,其中“...”示为省略序列,“----”示为缺失序列;WT为水稻材料H447,4、18及8分别为tgw6缺失突变体Cas-tgw6^a、Cas-tgw6^b及Cas-tgw6^c。

具体实施方式

- [0051] 下面结合实施例及附图对本发明作进一步详细的描述,但本发明的实施方式不限于此。
- [0052] 载体pYL-U3-gRNA、pYL-U6a-gRNA和pYL-U6b-gRNA以及载体pYLCRISPR/Cas9P_{ubi}-H均由华南农业大学生命科学学院提供(Ma X,Zhang Q,Zhu Q,Liu W,Chen Y,Qiu R,Wang B,Yang Z.2015.A robust CRISPR/Cas9system for convenient,high-efficiency multiplex genome editing in monocot and dicot plants.Mol Plant.doi:10.1016/j.molp.2015.04.007);
- [0053] 水稻品系H447为R819/玉香占//R819BC₂F₇代稳定品系,即为先将R819与玉香占杂交,再将杂交后代与R819回交两次后再自交7代后所得的稳定品系;
- [0054] 实施例1基于CRISPR/Cas9技术的水稻千粒重基因tgw6缺失突变体的创建
- [0055] (1) 引导RNA(guide RNA,gRNA)靶点序列的设计根据调控水稻粒长及千粒重基因TGW6的基因组序列(GenBank:AB513135.1),设计3个靶向千粒重基因TGW6的gRNA。20nt的寡核苷酸gRNA靶点序列按A/G(N)20NGG序列进行设计,同时将设计好的gRNA靶点序列进行水稻基因组数据库比对以排除非特异性的靶切位点,具体寡核苷酸序列见表1和图1。

[0056] 表1 gRNA靶点的寡核苷酸序列

	gRNA 靶点序列	寡核苷酸序列 (5'-3')
	TGW6U3-T1-F	GGCAGCCAGCATCTGGACCTCGG
	TGW6U3-T1-R	AAACCCGAGGTCCAGATGCTGGC
[0057]	TGW6U6a-T2-F	GCCGGCTACAGCCATGAGAAGCA
	TGW6U6a-T2-R	AAACTGCTTCTCATGGCTGTAGC
	TGW6U6b-T3-F	GTTGAGGCAAGCGGCGACCGCGG
	TGW6U6b-T3-R	AAACCCGCGGTCGCCGCTTGCCT

[0058] (2) 三靶点CRISPR/Cas9-gRNA载体的构建

[0059] 参照Ma等人 (Ma X,Zhang Q,Zhu Q,Liu W,Chen Y,Qiu R,Wang B,Yang Z.2015.A robust CRISPR/Cas9system for convenient,high-efficiency multiplex genome editing in monocot and dicotplants.Mol Plant.doi:10.1016/j.molp.2015.04.007) 的方法,取等量的上游与下游gRNA寡核苷酸链(步骤(1))混合(终浓度1 μ M),90 $^{\circ}$ C30sec,移至室温冷却完成退火形成双链接头;取pYL-U3-gRNA、pYL-U6a-gRNA及pYL-U6b-gRNA质粒各1 μ g,在20 μ L反应体系中用10U BsaI (NEB公司)酶切20min,然后将酶切过的pYL-U3/U6a/U6b-gRNA载体与各自所对应的双链接头利用T4DNA ligase 22 $^{\circ}$ C连接30min后,得到3个gRNA表达盒(U3、U6a、U6b),其中,具体连接体系为:

	10 \times T4 DNA ligase buffer	1 μ L;
	酶切后的pYL-U3/U6a/U6b-gRNA载体	0.5 μ L;
[0060]	接头	1.0 μ L;
	T4 DNA ligase	35 U;
	ddH ₂ O	至10 μ L;

[0061] 然后分别用表2中所列各对引物对各个gRNA表达盒(U3、U6a、U6b)进行扩增:

[0062] 表2 扩增各靶点gRNA表达盒的引物

[0063]

名称	寡核苷酸序列 (5'-3')
U3-T1-F	TTCAGAGGTCTCTCTCGCACTGGAATCGGCAGCAAAGG
U3-T1-R	AGCGTGGGTCTCGTCAGGGTCCATCCACTCCAAGCTC
U6a-T2-F	TTCAGAGGTCTCTCTGCACTGGAATCGGCAGCAAAGG
U6a-T2-R	AGCGTGGGTCTCGTCTTGGTCCATCCACTCCAAGCTC
U6b-T3-F	TTCAGAGGTCTCTAAGACACTGGAATCGGCAGCAAAGG
U6b-T3-R	AGCGTGGGTCTCGACCGGGTCCATCCACTCCAAGCTC

[0064] 具体的扩增体系为:

	10×Buffer for KOD-Plus	2.5 μL;
	KOD plus聚合酶 (5 U/μL)	0.5 μL;
[0065]	25 mM MgSO ₄	1 μL;
	2 mM dNTPs	2.5 μL;
	上下游引物 (10 μM)	各0.5 μL;
	连接产物模板DNA	2 μL

[0066] ddH₂O 补至25 μL;

[0067] 然后进行以下反应:95°C1min;95°C15sec、55°C15sec、68°C20sec10循环;95°C15sec、60°C15sec 68°C20sec 17~20循环。

[0068] 将这三个靶点gDNA PCR产物混合后进行PCR产物的纯化,纯化产物经20UBsaI 37°C酶切30min并纯化后,将其与经BsaI酶切的pYLCRISPR/Cas9P_{ubi}-H片段利用T4DNA连接酶20°C连接约2h,具体连接体系为:

	10×T4 DNA ligase buffer	1 μL;
	<i>Bsa</i> I酶切后的pYLCRISPR/Cas9P _{ubi} -H载体	4 μL;
[0069]	gDNA PCR产物	3 μL;
	T4 DNA ligase	1 μL;
	ddH ₂ O	至10 μL;

[0070] 最后转化DH5α感受态细胞并挑取阳性单克隆(三个片段的连接顺序是U3-U6a-U6b)后进行测序验证(由Invitrogen公司完成),得到三靶点CRISPR/Cas9-gRNA载体。

[0071] 实施例2

[0072] (1) 农杆菌介导水稻愈伤遗传转化

[0073] 将实施例1组装好的CRISPR/Cas9-gRNA载体通过电击转化到农杆菌EHA105中。PCR检测(引物为:hpt F:5'-TCCGGAGCCTCCGCTCGAAGTAG-3'、hpt R:5'-CTGAACTCACCGCGACGTCTGTC-3')为阳性的克隆用于侵染水稻材料H447(R819/玉针香//R819的BC₂F₇)的愈伤组织,侵染方法参照Hiei等(1994)的方法进行,获得转基因水稻植株。

[0074] (2) 水稻基因组DNA提取及突变体的PCR检测及测序分析

[0075] 采用CTAB法提取步骤(1)中获得的水稻植株的基因组DNA,对潮霉素基因检测为阳性的植株利用引物Cas9-TGW6testF和Cas9-TGW6testR对tgw6突变位点进行PCR检测,其中鉴定引物为:

[0076] Cas9-TGW6-test-F:5'-CAACCAAACCAAAGCCTGC-3';

[0077] Cas9-TGW6-test-R:5'-CCAATGCCTCAT CAACTTAC-3';

[0078] PCR扩增体系为:

	10×Buffer for KOD-Plus	2.5 μL;
[0079]	KOD plus聚合酶 (5 U/μL)	0.5 μL;
	25 mM MgSO ₄	1 μL;

	2 mM dNTPs	2.5 μ L;
[0080]	上、下游引物 (10 μ M)	各0.5 μ L;
	模板DNA	0.5 μ L;
	ddH ₂ O	补至25 μ L;

[0081] 反应条件为:94 $^{\circ}$ C预变性3min;94 $^{\circ}$ C变性30sec,55 $^{\circ}$ C退火30sec,68 $^{\circ}$ C延伸60sec,32个循环;68 $^{\circ}$ C延伸5min;

[0082] 扩增产物经1%琼脂糖凝胶电泳(电泳缓冲液1 \times TAE),BIORAD凝胶成像系统观察、照相。结果表明,扩增产物中多为片段缺失纯合体,也有部分双等位杂合突变体存在(图2)。对PCR产物进行的测序结果分析表明,tgw6突变频率在90%以上,其中50%多为片段缺失纯合体,有40%左右是双等位杂合突变体(图3)。

[0083] (4)无转基因成分tgw6突变体的获得及相关性状调查

[0084] 将T₀代转基因植株播种成苗,苗期检测潮霉素基因的有无,将不含潮霉素基因而且tgw6基因位点有缺失的纯合个体(编号为18、8的缺失纯合体,分别命名为Cas-tgw6^b、Cas-tgw6^c)种植至收获T₁代种子,并对T₁代种子进行千粒重调查:Cas-tgw6^b、Cas-tgw6^c显著影响了水稻的千粒重,提高了千粒重5%以上。

[0085] 对于tgw6基因位点双等位杂合个体(编号为4),需自交后去除潮霉素基因影响,得到纯合缺失突变体,命名为Cas-tgw6^a,然后计算其千粒重,同样的,Cas-tgw6^a显著影响了水稻的千粒重,提高了千粒重5%以上。

[0086] 利用引物Cas9-TGW6testF和Cas9-TGW6testR对突变体Cas-tgw6^a、Cas-tgw6^b和Cas-tgw6^c的tgw6突变位点进行PCR检测并测序(图3);

[0087] 其中,突变体Cas-tgw6^a中,千粒重基因tgw6的核苷酸序列为:

[0088]

```
ATGAGAAACTACAAAACCGCAACCTGTACATCGCCGACGCCTACATGGGATTGATGCGAGTTGGTCCAAAAGGCGG
GGAGGCAACCGTGCTAGCCATGAAGGCTGATGGCGTGCCACTTCGCTTCACCAATGGGGTGGACATTGATCAGGTTA
CCGAGATGTTTATTTACCGACAGCAGCATGAACTACCAACGATCTCAGCACGAGCAAGTCACGGCGACCAAGGAT
TCGACCGGACGGCTCATGAAGTATGACCCACGAACTAACCAAGTCACCGTTCTTCAATCCAACATAACCTACCCGAA
CGGTGTCGCCATGAGCGCTGACCGAACACATCTGATCGTTGCATTGACCGGGCCATGTAAGTTGATGAGGCATTGGA
TCCGAGGCCCGAAGACTGGCAAATCTGAACCATTTGTTGACCTGCCAGGCTATCCTGATAATGTGAGGCCTGATGGA
AAAGGTGGTTATTGGATAGCGCTTCATCGCGAGAAGTATGAGCTTCCCTTTGGTCCGGATAGTCACTTGGTTGCTAT
GAGGGTTAGTGCTGGTGGGAAGCTGGTTCAACAGATGAGAGGACCAAAGAGCTTGAGGCCAACCGAAGTGATGGAGA
GGAAGGATGGCAAAATATACATGGGAAATGTTGAATTGCCGTATGTCGGAGTCGTCAAAAAGCAGCTAG;
```

[0089] 突变体Cas-tgw6^a,千粒重基因tgw6的氨基酸序列为:

[0090]

```
MRNYKTGNLYIADAYMGLMRVGPKGGEATVLAMKADGVPLRFTNGVDIDQVTGDVYFTDSSMNYQRSQHEQVTATKD
STGRMLKYDPRTNQVTVLQSNITYPNGVAMSADRTHLIVALTGPKLMRHWIRGPKTGKSEPFVDLPGYPDNVRPDG
KGGYWIALHREKYELPFGPDSHLVAMRVSAGGKLVQQMRGPKSLRPTEVMERKDGKIYMGVNELPYVG VVKSS;
```

[0091] 突变体Cas-tgw6^b中,千粒重基因tgw6的核苷酸序列为:

[0092]

ATGGGGCGGATCACTGGTCGGCCCGGAGAGCGTCGCGTTCGACGGCAAAGGCCGCGGCCCGTACAGCGGCGTCTCCG
ACGGCCGCATCATGAGGTGGAACGGCGAGGCCGCTGGCTGGAGCACCTACACGTACAGCCCCAGCTACACGAAAAAC
AAGTGC GCGGCATCGACTCTCCCCACGGTCCAGACCGAGAGCAAATGCGGCCGCCCGTTAGGCCTACGGTTTCACTA
CAAAACCGGCAACCTGTACATCGCCGACGCTACATGGGATTGATGCGAGTTGGTCCAAAAGGCGGGGAGGCAACCG
TGCTAGCCATGAAGGCTGATGGCGTGCCACTTCGCTTACCAATGGGGTGGACATTGATCAGGTTACCGGAGATGTT
TATTTACCCGACAGCAGCATGAACTACCAACGATCTCAGCACGAGCAAGTCACGGCGACCAAGGATTGACCGGACG
GCTCATGAAGTATGACCCACGAACTAACCAAGTCACCGTTCTTCAATCCAACATAACCTACCCGAACGGTGTGCGCA
TGAGCGCTGACCGAACACATCTGATCGTTGCATTGACCGGGCCATGTAAGTTGATGAGGCATTGGATCCGAGGCCCG
AAGACTGGCAAATCTGAACCATTTGTTGACCTGCCAGGCTATCCTGATAATGTGAGGCCTGATGGAAAAGGTGGTTA
TTGGATAGCGCTTCATCGCGAGAAGTATGAGCTTCCCTTTGGTCCGGATAGTCACTTGGTTGCTATGAGGGTTAGTG
CTGGTGGGAAGCTGGTTCAACAGATGAGAGGACCAAAGAGCTTGAGGCCAACCGAAGTATGGAGAGGAAGGATGGC
AAAATATACATGGGAAATGTTGAATTGCCGTATGTCGGAGTCGTCAAAAAGCAGCTAG;

[0093] 突变体 $Cas-tgw6^b$ 中, 千粒重基因 $tgw6$ 的氨基酸序列为:
MGRI TGRPGERRVRRQRPRPVQRRLRRPHHEVERRGRWLEHLHVQPQLHEKQVRGIDSPHGPDRQMRPPVRPTVSL
QNRQPVHRRRLHGIDASWSKRRRGNRASHEG;

[0094] 突变体 $Cas-tgw6^c$ 中, 千粒重基因 $tgw6$ 的核苷酸序列为:

[0095]

ATGAGAATGTTCAAGACCATTGACGCCCCGGGAGCCAGCATCTGGACCTCGGCGGATCACTGGTCGGCCCGGAGAG
CGTCGCGTTCGACGGCAAAGGCCGCGGCCGTACAGCGGCGTCTCCGACGGCCGCATCATGAGGTGGAACGGCGAGG
CCGCTGGCTGGAGCACCTACACGTACAGCCCCAGCTACACGAAAAACAAGTGC GCGGCATCGACTCTCCCCACGGTC
CAGACCGAGAGCAAATGCGGCCGCCCGTTAGGCCTACGGTTTCACTACAAAACCGGCAACCTGTACATCGCCGACGC
CTACATGGGATTGATGCGAGTTGGTCCAAAAGGCGGGGAGGCAACCGTGCTAGCCATGAAGGCTGATGGCGTGCCAC
TTCGCTTACCAATGGGGTGGACATTGATCAGGTTACCGGAGATGTTTATTTACCCGACAGCAGCATGAACTACCA
CGATCTCAGCACGAGCAAGTCACGGCGACCAAGGATTCGACCGGACGGCTCATGAAGTATGACCCACGAACTAACCA
AGTCACCGTTCTTCAATCCAACATAACCTACCCGAACGGTGTGCGCATGAGCGCTGACCGAACACATCTGATCGTTG
CATTGACCGGGCCATGTAAGTTGATGAGGCATTGGATCCGAGGCCCGAAGACTGGCAAATCTGAACCATTTGTTGAC
CTGCCAGGCTATCCTGATAATGTGAGGCCTGATGGAAAAGGTGGTTATTGGATAGCGCTTCATCGCGAGAAGTATGA
GCTTCCCTTTGGTCCGGATAGTCACTTGGTTGCTATGAGGGTTAGTGCTGGTGGGAAGCTGGTTCAACAGATGAGAG
GACCAAAGAGCTTGAGGCCAACCGAAGTATGGAGAGGAAGGATGGCAAATATACATGGGAAATGTTGAATTGCCG
TATGTCGGAGTCGTCAAAAAGCAGCTAG;

[0096] 突变体 $Cas-tgw6^c$ 中, 千粒重基因 $tgw6$ 的氨基酸序列为:

[0097]

MRFKTIIDARRSQHLDLGGSLVGPESVAFDVGKGRGPYSGVSDGRIMRWNGEAAAGWSTYTYSPSYTKNKCAASTLPTV
QTESKCGRPLGLRFHYKTGNLYIADAYMGLMRVGPKGGEATVLAMKADGVPLRFTNGVDIDQVTGDVYFTDSSMNYQ
RSQHEQVTATKDSTGRMLKYDPRTNQVTVLQSNITYPNGVAMSADRTHLIVALTGPCCKLMRHWRIRPKTGKSEPFVD
LPGYPDNVRPDGKGGYWI ALHREKYELPFGPDSHLVAMRVSAGGKLVQQMRGPKSLRPTEVMERKDGKIYMGNVLEP
YVG VVKSS。

[0098] 上述实施例为本发明较佳的实施方式, 但本发明的实施方式并不受上述实施例的

限制,其他的任何未背离本发明的精神实质与原理下所作的改变、修饰、替代、组合、简化,均应为等效的置换方式,都包含在本发明的保护范围之内。

SEQUENCE LISTING

<110> 华南农业大学
 <120> 一种水稻千粒重基因 *tgw6* 突变体及其制备方法与应用
 <130> 1
 <160> 22
 <170> PatentIn version 3.5

<210> 1
 <211> 227
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> 突变体 Cas-*tgw6a* 千粒重基因 *tgw6* 的氨基酸序列
 <400> 1

[0001]

```

Met Arg Asn Tyr Lys Thr Gly Asn Leu Tyr Ile Ala Asp Ala Tyr Met
1           5           10           15
Gly Leu Met Arg Val Gly Pro Lys Gly Gly Glu Ala Thr Val Leu Ala
           20           25           30
Met Lys Ala Asp Gly Val Pro Leu Arg Phe Thr Asn Gly Val Asp Ile
           35           40           45
Asp Gln Val Thr Gly Asp Val Tyr Phe Thr Asp Ser Ser Met Asn Tyr
           50           55           60
Gln Arg Ser Gln His Glu Gln Val Thr Ala Thr Lys Asp Ser Thr Gly
65           70           75           80
Arg Leu Met Lys Tyr Asp Pro Arg Thr Asn Gln Val Thr Val Leu Gln
           85           90           95
Ser Asn Ile Thr Tyr Pro Asn Gly Val Ala Met Ser Ala Asp Arg Thr
           100          105          110
His Leu Ile Val Ala Leu Thr Gly Pro Cys Lys Leu Met Arg His Trp
           115          120          125
Ile Arg Gly Pro Lys Thr Gly Lys Ser Glu Pro Phe Val Asp Leu Pro
           130          135          140
Gly Tyr Pro Asp Asn Val Arg Pro Asp Gly Lys Gly Gly Tyr Trp Ile
145          150          155          160
Ala Leu His Arg Glu Lys Tyr Glu Leu Pro Phe Gly Pro Asp Ser His
           165          170          175
Leu Val Ala Met Arg Val Ser Ala Gly Gly Lys Leu Val Gln Gln Met
           180          185          190
Arg Gly Pro Lys Ser Leu Arg Pro Thr Glu Val Met Glu Arg Lys Asp
           195          200          205
Gly Lys Ile Tyr Met Gly Asn Val Glu Leu Pro Tyr Val Gly Val Val
  
```

210
 Lys Ser Ser
 225
 <210> 2
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> 突变体 Cas-tgw6b 千粒重基因 tgw6 的氨基酸序列
 <400> 2
 Met Gly Arg Ile Thr Gly Arg Pro Gly Glu Arg Arg Val Arg Arg Gln
 1 5 10 15
 Arg Pro Arg Pro Val Gln Arg Arg Leu Arg Arg Pro His His Glu Val
 20 25 30
 Glu Arg Arg Gly Arg Trp Leu Glu His Leu His Val Gln Pro Gln Leu
 35 40 45
 His Glu Lys Gln Val Arg Gly Ile Asp Ser Pro His Gly Pro Asp Arg
 50 55 60
 Glu Gln Met Arg Pro Pro Val Arg Pro Thr Val Ser Leu Gln Asn Arg
 65 70 75 80
 Gln Pro Val His Arg Arg Arg Leu His Gly Ile Asp Ala Ser Trp Ser
 85 90 95
 [0002] Lys Arg Arg Gly Gly Asn Arg Ala Ser His Glu Gly
 100 105
 <210> 3
 <211> 316
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> 突变体 Cas-tgw6c 千粒重基因 tgw6 的氨基酸序列
 <400> 3
 Met Arg Met Phe Lys Thr Ile Asp Ala Arg Arg Ser Gln His Leu Asp
 1 5 10 15
 Leu Gly Gly Ser Leu Val Gly Pro Glu Ser Val Ala Phe Asp Gly Lys
 20 25 30
 Gly Arg Gly Pro Tyr Ser Gly Val Ser Asp Gly Arg Ile Met Arg Trp
 35 40 45
 Asn Gly Glu Ala Ala Gly Trp Ser Thr Tyr Thr Tyr Ser Pro Ser Tyr
 50 55 60
 Thr Lys Asn Lys Cys Ala Ala Ser Thr Leu Pro Thr Val Gln Thr Glu
 65 70 75 80
 Ser Lys Cys Gly Arg Pro Leu Gly Leu Arg Phe His Tyr Lys Thr Gly
 85 90 95
 Asn Leu Tyr Ile Ala Asp Ala Tyr Met Gly Leu Met Arg Val Gly Pro

[0003]

	100		105		110
Lys Gly Gly Glu Ala Thr Val	Leu Ala Met Lys Ala Asp Gly Val Pro				
	115		120		125
Leu Arg Phe Thr Asn Gly Val Asp Ile Asp Gln Val Thr Gly Asp Val					
	130		135		140
Tyr Phe Thr Asp Ser Ser Met Asn Tyr Gln Arg Ser Gln His Glu Gln					
145	150		155		160
Val Thr Ala Thr Lys Asp Ser Thr Gly Arg Leu Met Lys Tyr Asp Pro					
	165		170		175
Arg Thr Asn Gln Val Thr Val Leu Gln Ser Asn Ile Thr Tyr Pro Asn					
	180		185		190
Gly Val Ala Met Ser Ala Asp Arg Thr His Leu Ile Val Ala Leu Thr					
	195		200		205
Gly Pro Cys Lys Leu Met Arg His Trp Ile Arg Gly Pro Lys Thr Gly					
	210		215		220
Lys Ser Glu Pro Phe Val Asp Leu Pro Gly Tyr Pro Asp Asn Val Arg					
225	230		235		240
Pro Asp Gly Lys Gly Gly Tyr Trp Ile Ala Leu His Arg Glu Lys Tyr					
	245		250		255
Glu Leu Pro Phe Gly Pro Asp Ser His Leu Val Ala Met Arg Val Ser					
	260		265		270
Ala Gly Gly Lys Leu Val Gln Gln Met Arg Gly Pro Lys Ser Leu Arg					
	275		280		285
Pro Thr Glu Val Met Glu Arg Lys Asp Gly Lys Ile Tyr Met Gly Asn					
	290		295		300
Val Glu Leu Pro Tyr Val Gly Val Val Lys Ser Ser					
305	310		315		

- <210> 4
- <211> 684
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220>
- <223> 突变体 Cas-tgw6a 千粒重基因 tgw6 的核苷酸序列
- <400> 4

```

atgagaaaact acaaaaccgg caacctgtac ategccgacg ectacatggg attgatgcga      60
gttgggtccaa aaggcgggga ggcaaccgtg ctagccatga aggctgatgg cgtgccactt      120
cgcttcacca atgggggtgga cattgatcag gttaccggag atgtttatnt caccgacagc      180
agcatgaact accaacgate tcagcaccgag caagtcacgg cgaccaagga ttcgaccgga      240
cggctcatga agtatgacce acgaactaac caagtcacgg ttcttcaate caacataacc      300
taccggaacg gtgtgcceat gagegetgac egaacacate tgatcgttgc attgaccggg      360
ccatgtaagt tgatgaggca ttgatccga ggcccgaaga ctggcaaatc tgaaccatnt      420
gttgacctge caggetatcc tgataatgtg aggectgatg gaaaagggtg ttattggata      480
gcgcttcate gcgagaagta tgagcttccc tttggctcgg atagtcactt gtttgcctatg      540
agggttagtg ctggtgggaa gctggttcaa cagatgagag gaccaaagag cttgaggcca      600
    
```


[0004]

accgaagtga tggagaggaa ggatggcaaa atatacatgg gaaatggtga attgccgtat 660
gtcggagtcg tcaaaagcag ctag 684

<210> 5

<211> 904

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 突变体 Cas-tgw6b 千粒重基因 tgw6 的核苷酸序列

<400> 5

atggggcgga tcaactggtcg gcccgagag cgtcgcgttc gacggcaaag gccgcggccc 60
gtacacggcg gtctccgaag gccgcaatc gaggtggaac ggcgagccg ctggctggag 120
cacctacacg tacagcccga gctacacgaa aaacaagtgc gcggcaatga ctctcccac 180
ggtccagacc gagagcaaat gcggccgcc gttaggccta cggtttcaat acaaaaaccg 240
caacctgtac atcgcgacg cctacatggg attgatgca gttgggtcaa aaggcgggga 300
ggcaaccgtg ctagccatga aggetgatgg cgtgccactt cgttcacca atggggtgga 360
cattgatecag gttaccggag atgtttattt caccgacagc agcatgaact accaacgatc 420
tcagcacgag caagtcacgg cgaccaagga ttcgaccgga cggetcatga agtatgacce 480
acgaactaac caagtcaccg ttcttcaatc caacataacc taccogaacg gtgtcgccat 540
gagcgctgac cgaacacatc tgatcgttgc attgaccggg ccatgtaagt tgatgaggca 600
ttggatccga ggcccgaaga ctggcaaatc tgaaccattt gttgaectgc caggctatec 660
tgataatgtg aggctgatg gaaaagggtg ttattggata gcgcttcacg gcgagaagta 720
tgagcttccc ttggtecgg atagtcactt ggttgcctat agggttagtg ctggtgggaa 780
gctggttcaa cagatgagag gaccaaagag cttgaggcca accgaagtga tggagaggaa 840
ggatggcaaa atatacatgg gaaatggtga attgccgtat gtcggagtcg tcaaaagcag 900
ctag 904

<210> 6

<211> 951

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 突变体 Cas-tgw6c 千粒重基因 tgw6 的核苷酸序列

<400> 6

atgagaatgt tcaagaccat tgacgcccgg eggagccage atctggacct cggcggatec 60
ctggteggcc eggagagcgt cgcgttcgac ggcaaaggcc gggcccgta cagcggcgtc 120
tcgcacggcc gcacatgag gtggaacggc gaggcgcgtg gctggagcac ctacacgtac 180
agccccagct acacgaaaaa caagtgcgcg gcacgcactc tccccacggt ccagaccgag 240
agcaaatgag gccgcccgtt aggetacgg tttcactaca aaaccggcaa cctgtacatc 300
gccgacgcct acatgggatt gatgcgagtt ggtccaaaag gcggggaggc aaccgtgcta 360
gccatgaagg ctgatggcgt gccacttcgc tteaccaatg ggggtgacat tgateaggtt 420
accggagatg tttatttcac cgacagcagc atgaactacc aacgatctca gcacgagcaa 480
gtcacggcga ccaaggattc gaccgacgg ctcatgaagt atgacccaag aactaaccaa 540
gtcaccgctt ttaaatcaa cataacctac ccgaacggtg tcgcatgag cgtgaccgca 600
acacatctga tegttgcatt gaccgggcca tgtaagttga tgaggcattg gatccgagcc 660

	ccgaagactg gcaaatctga accatttggt gacctgccag gctatcctga taatgtgagg	720
	cctgatggaa aagggtggtt ttggatageg cttcatcgeg agaagtatga gettcccttt	780
	ggtccggata gtcacttggg tgctatgagg gttagtgcctg gtgggaagct ggtteaacag	840
	atgagaggac caaagagctt gaggccaacc gaagtgatgg agaggaagga tggcaaaata	900
	tacatgggaa atgttgaatt gccgtatgtc ggagtcgtca aaagcagcta g	951
	<210> 7	
	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<223> 引物 TGW6U3-T1-F	
	<400> 7	
	ggcagccagc atctggacct cgg	23
	<210> 8	
	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<223> 引物 TGW6U3-T1-R	
	<400> 8	
[0005]	aaacccgagg tccagatgct ggc	23
	<210> 9	
	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<223> 引物 TGW6U6a-T2-F	
	<400> 9	
	gccggctaca gccatgagaa gca	23
	<210> 10	
	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<223> 引物 TGW6U6a-T2-R	
	<400> 10	
	aaactgettc tcatggctgt agc	23
	<210> 11	
	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	

	<220>		
	<223>	引物 TGW6U6b-T3-F	
	<400>	11	
		gttgaggcaa geggcgaccg egg	23
	<210>	12	
	<211>	23	
	<212>	DNA	
	<213>	Artificial Sequence	
	<220>		
	<223>	引物 TGW6U6b-T3-R	
	<400>	12	
		aaaccgcgg tegccgcttg cct	23
	<210>	13	
	<211>	38	
	<212>	DNA	
	<213>	Artificial Sequence	
	<220>		
	<223>	引物 U3-T1-F	
	<400>	13	
		ttcagaggtc tctctcgcac tggaatcggc agcaaagg	38
[0006]	<210>	14	
	<211>	37	
	<212>	DNA	
	<213>	Artificial Sequence	
	<220>		
	<223>	引物 U3-T1-R	
	<400>	14	
		agcgtgggtc tcgtcagggt ccatecactc caagctc	37
	<210>	15	
	<211>	38	
	<212>	DNA	
	<213>	Artificial Sequence	
	<220>		
	<223>	引物 U6a-T2-F	
	<400>	15	
		ttcagaggtc tctctgacac tggaatcggc agcaaagg	38
	<210>	16	
	<211>	37	
	<212>	DNA	
	<213>	Artificial Sequence	

	<220>		
	<223>	引物 U6a-T2-R	
	<400>	16	
		agcgtgggctc tcgtcttggc ccatccaactc caagctc	37
	<210>	17	
	<211>	38	
	<212>	DNA	
	<213>	Artificial Sequence	
	<220>		
	<223>	引物 U6b-T3-F	
	<400>	17	
		ttcagaggctc tctaagacac tggatcggc agcaaagg	38
	<210>	18	
	<211>	37	
	<212>	DNA	
	<213>	Artificial Sequence	
	<220>		
	<223>	引物 U6b-T3-R	
	<400>	18	
		agcgtgggctc tcgaccgggt ccatccaactc caagctc	37
[0007]	<210>	19	
	<211>	23	
	<212>	DNA	
	<213>	Artificial Sequence	
	<220>		
	<223>	引物 hpt F	
	<400>	19	
		tccggagcct ccgctcgaag tag	23
	<210>	20	
	<211>	23	
	<212>	DNA	
	<213>	Artificial Sequence	
	<220>		
	<223>	引物 hpt R	
	<400>	20	
		ctgaactcac cggacgtct gtc	23
	<210>	21	
	<211>	19	
	<212>	DNA	
	<213>	Artificial Sequence	

[0008]

<220>

<223> 引物 Cas9-TGW6-test-F

<400> 21

caaccaaacc aaagcctgc

19

<210> 22

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 引物 Cas9-TGW6-test-R

<400> 22

ccaatgcctc atcaacttac

20

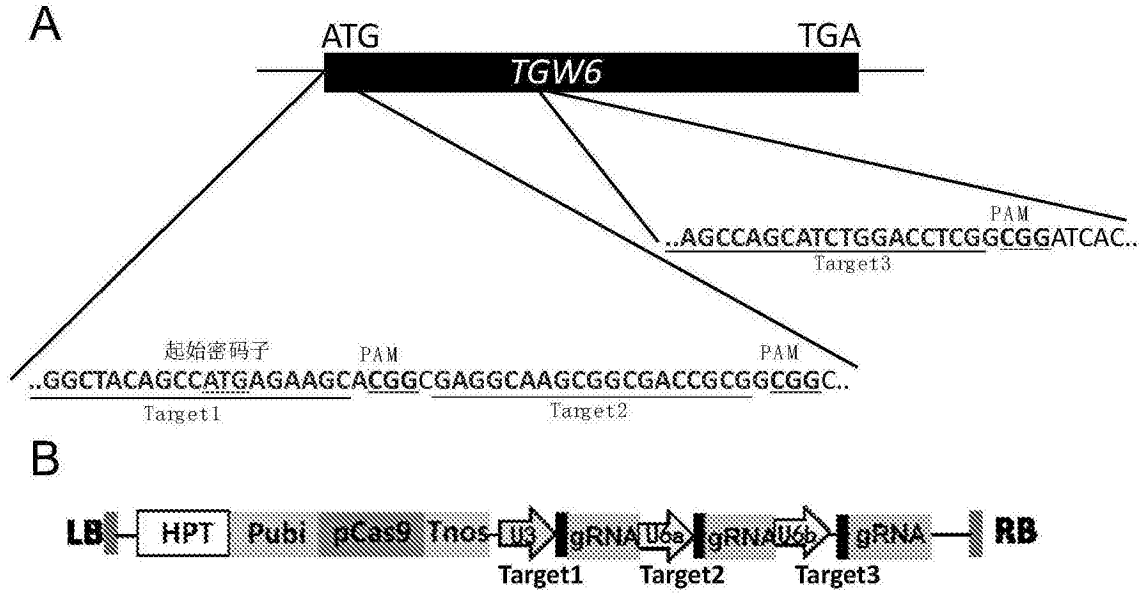


图1

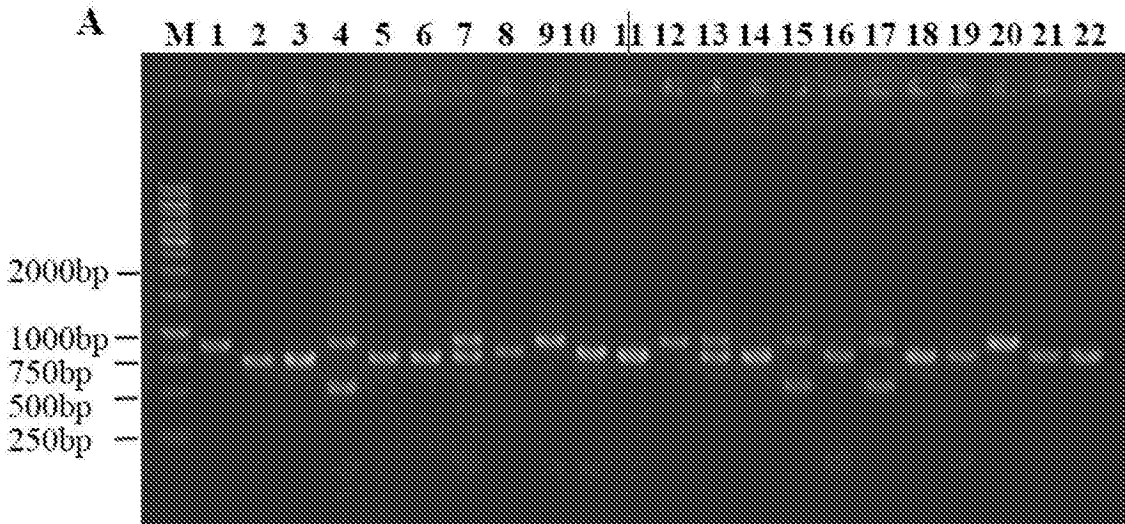


图2

WT	GCCATGAGAAGC.....CCTGGACCTCGGCG....ACTACA	缺失/插入 次数
8	GCCATG-----AGAAT..CCTGGACC-CGGCG...ACTACA	-102/-1 1
18..	GCCATG-----GGCG..ACTACA	-149 6
4..	GCCATG-----ACTACA	-369 2

图3