



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107299102 A

(43)申请公布日 2017. 10. 27

(21)申请号 201710596891.5

(22)申请日 2017.07.20

(71)申请人 中国科学院东北地理与农业生态研究所

地址 150081 黑龙江省哈尔滨市南岗区哈平路138号

(72)发明人 卜庆云 田晓杰 李秀峰 王臻昱

(74)专利代理机构 哈尔滨市松花江专利商标事务所 23109

代理人 侯静

(51)Int. Cl.

C12N 15/29(2006.01)

C07K 14/415(2006.01)

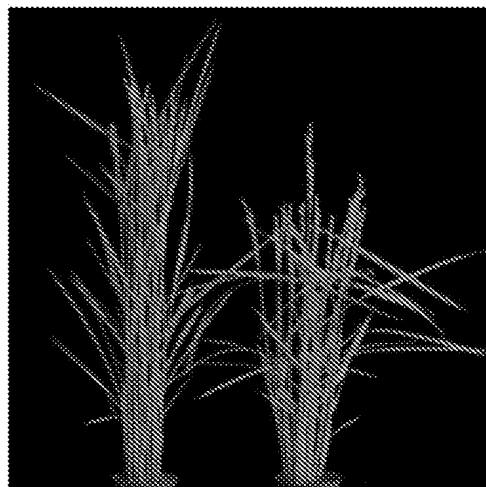
权利要求书1页 说明书9页
序列表9页 附图8页

(54)发明名称

水稻BR信号正调控因子OsWRKY53基因及其编码蛋白

(57)摘要

水稻BR信号正调控因子OsWRKY53基因及其编码蛋白,它涉及一种水稻BR信号正调控因子OsWRKY53基因及其编码蛋白。其目的是提供水稻BR信号正调控因子OsWRKY53基因及其编码蛋白。水稻BR信号正调控因子OsWRKY53基因的核苷酸序列如序列表中SEQ ID NO:1所示。编码水稻BR信号正调控因子OsWRKY53基因的蛋白的氨基酸序列如序列表中SEQ ID NO:2所示。OsWRKY53基因能够正向调控BR信号及水稻株型,丰富和完善了水稻BR信号转导通路,对改造水稻株型,进而提高作物产量提供重要理论依据。本发明应用于水稻分子育种领域。



WT OsWRKY53-OE

1. 水稻BR信号正调控因子OsWRKY53基因,其特征在于该基因的核苷酸序列如序列表中SEQ ID NO:1所示。

2. 编码权利要求1所述的水稻BR信号正调控因子OsWRKY53基因的蛋白,其特征在于该蛋白的氨基酸序列如序列表中SEQ ID NO:2所示。

水稻BR信号正调控因子OsWRKY53基因及其编码蛋白

技术领域

[0001] 本发明涉及水稻BR信号正调控因子OsWRKY53基因及其编码蛋白。

背景技术

[0002] 水稻是一种重要的粮食作物,世界上一半以上的人口以其为主食,提高水稻作物产量对提高粮食安全和稳定经济发展具有重要意义。而水稻株型是影响水稻作物产量的一个重要因素,水稻叶夹角又是水稻株型的一个重要组成部分。叶夹角增大,更加利于叶片捕获光,进而提高光合速率,在一定程度上提高作物产量;而叶夹角小,叶片处于直立状态,可以在一定程度上提高种植密度,进而也能够提高作物产量。所以,系统的研究水稻的叶夹角对塑造水稻株型和提高作物产量具有重要的理论和应用价值。在短期内实现林木性状改良的需求,通过转基因手段对其进行遗传改良具有很大意义。

发明内容

[0003] 本发明提供一种白桦基因及其编码蛋白和应用。

[0004] 本发明水稻BR信号正调控因子OsWRKY53基因的核苷酸序列如序列表中SEQ IDNO:1所示。

[0005] 本发明编码水稻BR信号正调控因子OsWRKY53基因的蛋白的氨基酸序列如序列表中SEQ ID NO:2所示。

[0006] BR,即油菜素内酯,是一种重要的甾醇类植物激素,参与对植物叶夹角的调控,水稻BR缺陷型突变体如d61-2、d11、BZR1-RNAi、OsGSK2-OE等,叶夹角显著变小;而BR功能获得性突变体如M107、bzl1-D、OsGSK2-RNAi等,叶夹角显著增大,充分表明BR与植物叶夹角调控之间存在着直接的关系。

[0007] 本发明公开了水稻BR信号正调控因子OsWRKY53基因及其编码蛋白,本发明利用PCR方法从水稻中克隆出水稻转录因子OsWRKY53基因。本发明获得的OsWRKY53基因编码区全长序列与Rice Genome Annotation Project中公布的LOC_Os05g27730.1相对应。本发明通过遗传转化手段,将OsWRKY53基因在水稻中过量表达,并且发现OsWRKY53基因过表达转基因水稻叶夹角显著增大、种子增大,表现出BR信号增强的表型;通过CRISPR/Cas9敲除技术获得OsWRKY53基因敲除突变体,oswrky53突变体表现出叶夹角变小、种子变小、株高变矮等一系列BR信号缺陷的表型。BR生物合成基因检测、外源BR对叶夹角敏感性分析实验以及OsWRKY53对外源BR处理的响应实验,都充分表明OsWRKY53能够正向调控BR信号。

[0008] 本发明首次发现水稻转录因子OsWRKY53基因能够正向调控BR信号及水稻株型。水稻转录因子OsWRKY53作为BR信号正调控因子的发现,在一定程度上丰富和完善了水稻BR信号转导通路,对改造水稻株型,进而提高作物产量提供重要理论依据,具有广阔的应用前景。

附图说明

- [0009] 图1为OsWRKY53基因过表达转基因水稻总体形态图;其中WT为野生型水稻,OsWRKY53-OE为OsWRKY53基因过表达转基因水稻;
- [0010] 图2为OsWRKY53基因过表达转基因水稻叶夹角形态图;其中WT为野生型水稻,OsWRKY53-OE为OsWRKY53基因过表达转基因水稻;
- [0011] 图3为OsWRKY53基因过表达转基因水稻叶夹角大小统计结果;其中WT为野生型水稻,OsWRKY53-OE为OsWRKY53基因过表达转基因水稻;
- [0012] 图4为OsWRKY53基因过表达转基因水稻种子形态图;其中WT为野生型水稻,OsWRKY53-OE-1、OsWRKY53-OE-2、OsWRKY53-OE-3均为OsWRKY53基因过表达转基因水稻;
- [0013] 图5为OsWRKY53基因过表达转基因水稻种子粒长统计结果图;其中WT为野生型水稻,1、2和3均为OsWRKY53基因过表达转基因水稻;
- [0014] 图6为OsWRKY53基因过表达转基因水稻种子粒宽统计结果图;其中WT为野生型水稻,1、2和3均为OsWRKY53基因过表达转基因水稻;
- [0015] 图7为3个BR生物合成基因D2、OsDWF4、D11在OsWRKY53基因过表达转基因水稻及野生型的表达量检测结果;其中a为野生型水稻,b、c和d均为OsWRKY53基因过表达转基因水稻;
- [0016] 图8为oswrky53突变体敲除类型;其中WT为野生型水稻,OsWRKY53-1、OsWRKY53-2均为OsWRKY53基因敲除突变体;
- [0017] 图9为oswrky53突变体总体形态图;其中WT为野生型水稻,OsWRKY53-1、OsWRKY53-2均为OsWRKY53基因敲除突变体;
- [0018] 图10为oswrky53突变体叶夹角形态图;其中WT为野生型水稻,OsWRKY53-1为OsWRKY53基因敲除突变体;
- [0019] 图11为oswrky53突变体叶夹角大小统计结果;其中a为野生型水稻,b为OsWRKY53基因敲除突变体;
- [0020] 图12为oswrky53突变体种子形态图;其中WT为野生型水稻,OsWRKY53-1、OsWRKY53-2均为OsWRKY53基因敲除突变体;
- [0021] 图13为oswrky53突变体种子粒长统计结果;其中WT为野生型水稻,1和2为OsWRKY53基因敲除突变体;
- [0022] 图14为oswrky53突变体种子粒宽统计结果;其中WT为野生型水稻,1和2为OsWRKY53基因敲除突变体;
- [0023] 图15为oswrky53突变体株高统计结果;其中WT为野生型水稻,1和2为OsWRKY53基因敲除突变体;
- [0024] 图16为外源BR对OsWRKY53基因过表达转基因水稻叶夹角的敏感性分析实验的图片;其中WT为野生型水稻,OsWRKY53-OE为OsWRKY53-OE基因过表达转基因水稻;
- [0025] 图17为外源BR对OsWRKY53基因过表达转基因水稻叶夹角的敏感性分析实验的统计结果;其中a为野生型水稻,b为OsWRKY53-OE基因过表达转基因水稻;
- [0026] 图18为外源的BR对oswrky53突变体叶夹角敏感性分析实验的图片;其中WT为野生型水稻,OsWRKY53为OsWRKY53基因敲除突变体;
- [0027] 图19为外源的BR对oswrky53突变体叶夹角的敏感性分析实验的统计结果;其中a为野生型水稻,b为OsWRKY53基因敲除突变体;

[0028] 图20为转录水平上,OsWRKY53基因对BR响应的表达特征分析;其中b为OsWRKY53基因,c为OsDWF4基因;

[0029] 图21为蛋白水平上,OsWRKY53对BR响应的表达特征分析。

具体实施方式

[0030] 具体实施方式一:本实施方式水稻BR信号正调控因子OsWRKY53基因的核苷酸序列如序列表中SEQ ID NO:1所示。

[0031] 本实施方式公开了水稻BR信号正调控因子OsWRKY53基因及其编码蛋白,本实施方式利用PCR方法从水稻中克隆出水稻转录因子OsWRKY53基因。本实施方式获得的OsWRKY53基因编码区全长序列与Rice Genome Annotation Project中公布的LOC_0s05g27730.1相对应。本实施方式通过遗传转化手段,将OsWRKY53基因在水稻中过量表达,并且发现OsWRKY53基因过表达转基因水稻叶夹角显著增大、种子增大,表现出BR信号增强的表型;通过CRISPR/Cas9敲除技术获得OsWRKY53基因敲除突变体,oswrky53突变体表现出叶夹角变小、种子变小、株高变矮等一系列BR信号缺陷的表型。BR生物合成基因检测、外源BR对叶夹角敏感性分析实验以及OsWRKY53对外源BR处理的响应实验,都充分表明OsWRKY53能够正向调控BR信号。

[0032] 本实施方式首次发现水稻转录因子OsWRKY53基因能够正向调控BR信号及水稻株型。水稻转录因子OsWRKY53作为BR信号正调控因子的发现,在一定程度上丰富和完善了水稻BR信号转导通路,对改造水稻株型,进而提高作物产量提供重要理论依据,具有广阔的应用前景。

[0033] 具体实施方式二:本实施方式编码水稻BR信号正调控因子OsWRKY53基因的蛋白的氨基酸序列如序列表中SEQ ID NO:2所示。

[0034] 通过以下实验验证本发明的效果:

[0035] 实施例1、

[0036] 1、水稻BR信号正调控因子OsWRKY53基因的克隆及测序:

[0037] 一、以野生水稻品种日本晴为实验材料,按照Invitrogen公司的TRIzol试剂盒的操作手册,提取叶片总RNA;

[0038] 二、采用DNase I处理步骤一所提取的总RNA;

[0039] 三、取1 μ g步骤二处理后的总RNA用于cDNA的合成,cDNA的合成操作按照购买自BD Biosciences Clontech公司的BD SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit试剂盒的使用手册进行,获得cDNA;

[0040] 四、以上述获得的cDNA为模板,参照TaKaRa公司的PrimeSTAR[®] HS DNAPolymerase操作说明书,用正向引物F1与反向引物R1扩增OsWRKY53基因。PCR反应条件如下:95 $^{\circ}$ C预变性5min;95 $^{\circ}$ C变性30s,58 $^{\circ}$ C退火30s,72 $^{\circ}$ C延伸90s,共38循环;72 $^{\circ}$ C终延伸10min。最后,将PCR产物在ABI3130测序仪(ABI公司)上进行测序,测序结果表明,水稻BR信号正调控因子OsWRKY53基因由1464个碱基组成,其核苷酸序列如序列表中的SEQ ID No:1所示。编码具有序列表中SEQ ID NO:2的氨基酸序列的蛋白质。

[0041] 正向引物F1:5'-ATGGCGTCCTCGACGGGG-3'

[0042] 反向引物R1:5'-CTAGCAGAGGAGCGACTCGACG-3'

[0043] 2、OsWRKY53基因过表达转基因水稻的获得

[0044] 一、载体构建：以日本晴cDNA为模板，参照TaKaRa公司的PrimeSTAR®HS DNA Polymerase操作说明书，以正向引物F2与反向引物R2为扩增引物，扩增OsWRKY53基因的编码区，并将扩增片段克隆进入植物过表达载体PC1390U，形成一个Ubiquitin启动子驱动的OsWRKY53基因过表达载体。

[0045] 正向引物F2：5'-GTTACTTCTGCACTAGGTACCATGGCGTCCTCGACGGGG-3'

[0046] 反向引物R2：5'-TCTTAGAATTCCTCGGGGATCCCTAGCAGAGGAGCGACTCGACG-3'

[0047] 二、目的载体转化农杆菌EHA105：将EHA105感受态从-80℃冰箱取出，置于冰上融化；将500ng~1μg的目的质粒加入100ul EHA105感受态中，冰上放置30min；迅速置于液氮中5min；从液氮中取出，迅速置于37℃水浴锅中水浴5min；冰上2min；加入800ul液体LB培养基，置于全温振荡器（购自MKN公司）中，28℃，120rpm孵育4~5h；离心，弃大部分上清，将剩余菌液涂抹于含有卡那霉素（50ug/ml）（购自Amresco）和利福平（50ug/ml）（购自Amresco）的LB固体培养基上，28℃培养3天左右。

[0048] 三、待长出菌落后，进行菌落PCR鉴定，鉴定出阳性克隆；挑取阳性克隆至加有相应抗生素和利福平的液体LB培养基中，28℃，180rpm培养16h左右，此时的菌液可以用30%的甘油按1:1的体积比进行保存，存至-80℃冰箱，侵染愈伤组织时，从-80℃取出进行活化即可。

[0049] 四、农杆菌侵染水稻愈伤组织：从-80℃冰箱取出目的存菌，按1:100的比例加入含有卡那霉素（50ug/ml）和利福平（50ug/ml）的液体LB培养基中，180rpm，28℃培养过夜；将菌液培养至肉眼看上去像橙汁一样的颜色（OD=1.0左右），方可从培养箱中取出；取500ul左右菌液至1.5ml离心管中，5000rpm，28℃，离心3min，弃上清，可以看到管底有白色的菌团；用300ul含有20ug/ml的乙酰丁香酮（购自Aldrich）的液体共培培养基轻轻吹打管底菌团，使其均匀的悬浮在液体培养基中；挑选生长状态良好的愈伤组织至50ml离心管中，大约至离心管刻度5ml左右；加入20ml含有20ug/ml的乙酰丁香酮的液体共培培养基，然后将上述悬浮好的300ul菌液全部加入到50ml离心管中；持续轻柔混匀2~3min，以进行侵染。将液体共培培养基倒掉，然后将侵染好的愈伤组织转移至铺有滤纸的培养皿中，吸附多余的培养基，这一过程大约需要1min左右；在固体共培培养基上铺一层滤纸，使滤纸浸透，然后将上述侵染好的愈伤组织转移至此固体培养基上；28℃暗培养2~3天。

[0050] 五、被侵染水稻愈伤组织的恢复培养：被侵染的愈伤暗培养2~3天后，将愈伤颗粒转移至50ml离心管中；用含有400ug/ml羧苄青霉素（购自Amresco）的无菌水清洗愈伤组织4~5遍，每次持续1min左右，进行除菌；再用无菌水清洗愈伤组织2~3遍，转移至铺有滤纸的培养皿上，吸干多余水分；将上述愈伤组织转移至含有400ug/ml羧苄青霉素的恢复培养基上，28℃人工气候培养箱（24h光培养）恢复培养4~5天。

[0051] 六、被侵染水稻愈伤组织的筛选培养：恢复培养4~5天后，将恢复培养基上的愈伤组织转移至含有400ug/ml羧苄青霉素和50ug/ml潮霉素（购自Roche）的筛选培养基上；将其转移至28℃人工气候培养箱（24h光培养）中培养30天左右。

[0052] 七、抗性水稻愈伤组织的分化培养：将筛选培养基上的抗性愈伤转移至分化培养基上，每瓶移至一簇愈伤；将其置于28℃人工气候培养箱（24h光培养）中培养30天左右，即可分化出转基因苗。

[0053] 八、转基因苗的鉴定:待分化出转基因苗后,需对其进行鉴定,排除假阳性。首先进行水稻DNA的粗提;用以上粗提的DNA为模板,按照全式金公司的EasyTaq DNAPolymerase说明书,用潮霉素引物(F3和R3)进行扩增。

[0054] 正向引物F3:5'-TGCGCCCAAGCTGCATCAT-3'

[0055] 反向引物R3:5'-TGA ACTCACC GCGACGTCTGT-3'

[0056] 如图1所示,是OsWRKY53基因过表达转基因水稻的总体形态图,可以看到过表达转基因水稻呈现出BR信号增强的表型;其叶夹角显著增大,其剑叶的叶夹角超过100°,而野生型的叶夹角仅为30°左右(如图2、3所示);并且过表达转基因水稻的种子显著增大,测量其粒长粒宽发现,与野生型相比两者都显著变长(如图4、5和6所示),OsWRKY53基因极有可能正向调控BR信号。

[0057] 3、BR生物合成基因的表达量检测

[0058] 一、以OsWRKY53基因过表达转基因水稻及其对照为实验材料,培养至两周大小,取相同部位的叶片,参照购买自Invitrogen公司的TRIzol试剂盒的操作手册提取叶片总RNA;

[0059] 二、采用DNase I处理步骤一提取的总RNA;

[0060] 三、取1 μ g步骤二处理后的总RNA用于cDNA的合成,cDNA的合成操作按照购买自BD Biosciences Clontech公司的BD SMART™ RACE cDNA Amplification Kit试剂盒的使用手册进行;

[0061] 四、以获得的cDNA为模板通过3个BR生物合成基因引物:D2基因(正向引物F4与反向引物R4)、OsDWF4基因(正向引物F5与反向引物R5)和D11基因(正向引物F6与反向引物R6),水稻内参actin(正向引物F7与反向引物R7),采用SYBR Green PCRmaster mix (TransStart)进行Quantitative real-time PCR;数据从Bio-Rad chromo 4real-time PCR detector上获得;用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法分析倍数变化。

[0062] 正向引物F4:5'-TCGCTGACGGAGCTGATG-3'

[0063] 反向引物R4:5'-ACTTGAGGTGGGAGGACTTG-3'

[0064] 正向引物F5:5'-CTCCACCTTCTCCGCTCAG-3'

[0065] 反向引物R5:5'-GCCGCTCCGTCTCTCC-3'

[0066] 正向引物F6:5'-TGGCGACATTGAGAAGATTGC-3'

[0067] 反向引物R6:5'-CAGAAGGCGATGACATTGACC-3'

[0068] 正向引物F7:5'-AGACCTTCAACACCCCTGCTATG-3'

[0069] 反向引物R7:5'-TCACGCCAGCAAGGTCG-3'

[0070] 如图7所示,是3个BR生物合成基因D2、OsDWF4、D11在OsWRKY53基因过表达转基因水稻及其对照中的表达特征。结果显示,与对照野生型相比,过表达转基因水稻中3个BR生物合成基因的表达量均显著降低,说明在过表达转基因水稻中其内源的BR信号是增强的,初步说明OsWRKY53基因能够正向调控BR信号。

[0071] 4、oswrky53突变体的获得

[0072] 一、将OsWRKY53基因的CDS序列输入CRISPR Primer Designer软件,设计2对靶位点引物(F8和R8;F9和R9),用于后续敲除载体的构建。

[0073] 正向引物F8:5'-GGCATTCCAGTCGTACCTCTGAGC-3'

[0074] 反向引物R8:5'-AAACGCTCAGAGGTACGACTGGAA-3'

- [0075] 正向引物F9:5'-GCCGAGCTGGAGGACGGGTACAAC-3'
- [0076] 反向引物R9:5'-AAACGTTGTACCCGTCCTCCAGCT-3'
- [0077] 二、将100 μ M上下游引物各取1 μ l加入到98 μ l的0.5 \times TE溶液中,90 $^{\circ}$ C热激30s,形成打靶接头,移至室温冷却完成退火。
- [0078] 三、将这2个打靶接头分别连接到各gRNA表达盒上。
- | | | |
|--------|--|-------------|
| | pYL-U3/U6a-gRNA 载体 (10ng/ μ l) | 1.0 μ l |
| | 打靶接头 (0.1 μ M) | 1.0 μ l |
| | 10 \times T ₄ DNA ligase buffer (NEB) | 1.0 μ l |
| [0079] | T ₄ DNA 连接酶 (NEB) | 0.5 μ l |
| | Bsa I 限制性内切酶 (NEB) | 0.1 μ l |
| | ddH ₂ O | 补至 10ul |
- [0080] PCR程序为:37 $^{\circ}$ C5min,20 $^{\circ}$ C5min,5个循环。
- [0081] 四、通过巢式PCR的方法扩增gRNA表达盒
- [0082] 第一轮PCR扩增
- | | | |
|--------|--|--------------|
| | 模板 (步骤三连接产物) | 2 μ l |
| | U-F (10 μ M) | 0.3 μ l |
| | gRNA-R (10 μ M) | 0.3 μ l |
| [0083] | 5 \times PrimerSTAR GXL Buffer (NEB) | 3 μ l |
| | PrimerSTAR GXL DNA Polymerase (NEB) | 0.15 μ l |
| | dNTP(2.5mM) | 0.8 μ l |
| | ddH ₂ O | 补至 15ul |
- [0084] PCR程序:98 $^{\circ}$ C2min;98 $^{\circ}$ C10s,60 $^{\circ}$ C10s,72 $^{\circ}$ C20s,共25个循环;72 $^{\circ}$ C5min。第二轮PCR扩增:
- | | | |
|--------|--|---------------|
| | 模板 (上述步骤四第一轮 PCR 产物稀释 10 倍) | 1 μ l |
| | B _n '引物 (10 μ M) | 0.3 μ l |
| | B _{n+1} 引物 (10 μ M) | 0.3 μ l |
| [0085] | 5 \times PrimerSTAR GXL Buffer (NEB) | 4 μ l |
| | PrimerSTAR GXL DNA Polymerase (NEB) | 0.2 μ l |
| | dNTP (2.5mM) | 1 μ l |
| | ddH ₂ O | 补至 18 μ l |
- [0086] PCR程序:98 $^{\circ}$ C2min;98 $^{\circ}$ C10s,60 $^{\circ}$ C10s,72 $^{\circ}$ C30s,25个循环;72 $^{\circ}$ C5min。
- [0087] 本步骤操作所涉及到的通用引物序列为:
- [0088] U-F:5'-CTCCGTTTACCTGTGGAATCG-3'

- [0089] gRNA-R:5'-CGGAGGAAAATTCCATCCAC-3'
- [0090] B1':5'-TTCAGAGGTCTCTCTCGCACTGGAATCGGCAGCAAAGG-3'
- [0091] B2:5'-AGCGTGGGTCTCGTCAGGGTCCATCCACTCCAAGCTC-3'
- [0092] B2':5'-TTCAGAGGTCTCTCTGACACTGGAATCGGCAGCAAAGG-3'
- [0093] BL:5'-AGCGTGGGTCTCGACCGGGTCCATCCACTCCAAGCTC-3'
- [0094] 五、将上述巢式PCR获得的片段,连接入pYLCRSPR/Cas9-MT载体骨架上,即完成敲除载体的构建。

pYLCRISPR/Cas9-MT 质粒 (100ng/μL) 1 μL

各回收 PCR 产物 20~40ng

[0095] BsaI (NEB) 1μL

10×Cutsmart Buffer (NEB) 1.5 μL

ddH₂O 补足 15 μL

[0096] 程序:37℃,15min;随后,在上述体系基础上加入连接酶,连接体系为:

[0097] T₄DNA酶 (NEB) 0.1μL

[0098] 10x DNA ligase buffer (NEB) 1.5μL

[0099] PCR程序:37℃5min,10℃5min,20℃5min,共15个循环。

[0100] 六、连接产物的转化、阳性克隆的鉴定、测序、质粒的提取;

[0101] 七、目的载体转化农杆菌EHA105;

[0102] 八、采用农杆菌介导的遗传转化方法获得OsWRKY53基因敲除突变体。

[0103] 如图8所示,是两种OsWRKY53基因敲除突变体oswrky53-1和oswrky53-2的测序结果,WT的序列为:5'-ATCCCGGCT CAGAGGTACGACTGGAAG-3',oswrky53-1(-CAGAGGT)的序列为:5'-ATCCCGGCT-----ACGACTGGAAG-3',oswrky53-2(+A)的序列为:5'-ATCCCGGCT ACAGAGGTACGACTGGAAG-3',分别是缺失7bp和插入1bp,均造成后续移码突变,使表达出的氨基酸发生改变,OsWRKY53蛋白功能丧失。如图9所示,是oswrky53突变体的总体形态图,从图中可以看到突变体呈现出一系列BR信号缺失的表型;首先,oswrky53突变体叶夹角变小,其剑叶的叶夹角仅为18°左右,而对照的叶夹角为38°左右(如图10、11所示);其次,oswrky53突变体的种子显著变小,测量其粒长粒宽发现,与野生型相比两者都显著变短(如图12、13和14所示);再次,oswrky53突变体株高变矮(如图15所示)。oswrky53突变体的表现再次说明,OsWRKY53能够正向调控BR信号。

[0104] 5、外源BR对叶夹角的敏感性分析

[0105] 一、种子消毒:选用OsWRKY53基因过表达转基因水稻及其对照为实验材料,种子剥皮,用70%乙醇浸泡1min;然后用30%的次氯酸浸泡两次,每次15min;最后用无菌水清洗5~7遍;

[0106] 二、将消毒种子转移至1/2MS固体培养基(1%蔗糖,4%phytagel,pH5.8)上,30℃暗培养8天左右;

[0107] 三、选取第二个叶的叶夹角(包含叶片、叶鞘各1cm),用不同浓度24-epiBL(Sigma, E1641)在30℃培养箱中暗培养48h;

[0108] 四、观察结果,并用ImageJ软件进行叶夹角的测量。

[0109] 如图16所示,是OsWRKY53基因过表达转基因水稻及其对照在不同浓度24-epiBL (Sigma, E1641) 中处理48h后的照片,图17是不同浓度24-epiBL处理过程中叶夹角角度统计结果。结果显示,用10nM 24-epiBL处理后,过表达转基因水稻的叶夹角达到130°左右,而对照仅为60°左右;并且,随着24-epiBL处理浓度的提高,叶夹角增大的表型更加明显,用1μM 24-epiBL处理后,过表达转基因水稻的叶夹角甚至达到230°左右,说明OsWRKY53过表达转基因水稻叶夹角对外源的BR处理超敏感。相反的,oswrky53突变体叶夹角对外源的24-epiBL处理不敏感(如图18、19所示),即使用1μM 24-epiBL处理后,oswrky53突变体的叶夹角仅达到50°左右,而对照达到140°左右。进一步为OsWRKY53基因正向调控BR信号提供实验证据。

[0110] 6、转录水平上,OsWRKY53基因对BR响应的表达特征分析:

[0111] 一、选用野生水稻品种龙粳11为实验材料,浸种催芽后,将萌发的种子播种在剪了底的96孔PCR板中,然后浸在1/2MS液体培养基中,28℃光照培养箱(光培养14h;暗培养10h)中培养2周;

[0112] 二、挑选生长状态一致的水稻幼苗,用1μM 24-epiBL分别处理0h、1h、3h、6h;

[0113] 三、取相同部位的叶片,参照购买自Invitrogen公司的TRIzol试剂盒的操作手册,提取叶片总RNA;

[0114] 四、采用DNase I处理步骤三提取的总RNA;

[0115] 五、取1μg步骤四处理后的总RNA用于cDNA的合成,cDNA的合成操作按照购买自BD Biosciences Clontech公司的BD SMART™ RACE cDNA Amplification Kit试剂盒的使用手册进行,获得cDNA;

[0116] 六、以获得的cDNA为模板,正向引物F10与反向引物R10为检测引物,检测OsWRKY53基因的表达水平。

[0117] 正向引物F10:5'-AGACCTTCAACACCCCTGCTATG-3'

[0118] 反向引物R10:5'-TCACGCCAGCAAGGTCG-3'

[0119] 如图20所示,是OsWRKY53基因转录水平上对BR响应的表达特征,结果显示BR能够抑制OsWRKY53转录水平上的表达,并且BR处理时间越长,抑制程度越明显。

[0120] 7、蛋白水平上,OsWRKY53对BR响应的表达特征分析

[0121] 一、选用纯合的带有MYC标签的OsWRKY53基因过表达转基因水稻为实验材料,浸种催芽后,将萌发的种子播种在剪了底的96孔PCR板中,然后浸在1/2MS液体培养基中,在28℃培养箱(光培养14h;暗培养10h)中培养2周;

[0122] 二、挑选生长状态一致的水稻幼苗,用1μM 24-epiBL和DMSO分别处理30min;

[0123] 三、取相同部位的叶片,参照碧云天公司的SDS裂解液说明书提取叶片总蛋白;

[0124] 四、加入1×loading buffer,煮沸5min,高速离心10min;

[0125] 五、上样,进行SDS-PAGE电泳;

[0126] 六、电泳结束后,进行转膜,将胶上的蛋白转移至PVDF膜(Bio-Rad)上;

[0127] 七、待转膜结束后,用MYC抗体(Abmart:M20002L)进行后续western杂交。

[0128] 如图21所示,是蛋白水平上,OsWRKY53对BR响应的表达特征。结果显示,BR能够诱导OsWRKY53蛋白水平上的表达。作为BR信号正调控因子,其蛋白水平上的积累越多,BR信号

输出越强,但植物体又存在着自我负反馈平衡调节机制,当植物体内BR信号强到一定程度后,植物体又能够抑制这些BR信号正调控因子转录水平上的表达,以维持植物体内BR信号的平衡。

[0129] 综上所述,本实施例通过遗传转化手段,将OsWRKY53基因在水稻中过量表达,并且发现OsWRKY53基因过表达转基因水稻叶夹角显著增大、种子增大,表现出BR信号增强的表型;通过CRISPR/Cas9敲除技术获得OsWRKY53基因敲除突变体,oswrky53突变体表现出叶夹角变小、种子变小、株高变矮等一系列BR信号缺陷的表型。BR生物合成基因检测、外源BR对叶夹角敏感性分析实验以及OsWRKY53对外源BR处理的响应实验,都充分表明OsWRKY53能够正向调控BR信号。

序列表

<110> 中国科学院东北地理与农业生态研究所

<120>水稻BR信号正调控因子OsWRKY53基因及其编码蛋白

<160> 28

<210> 1

<211> 1464

<212> DNA

<213>水稻

<400> 1

```

atggcgctect cgacggggggg gttggaccac gggttcacgt tcacgccgcc gccgttcatc 60
acgtcgttca ccgagctgct gtcgggggggc ggtggggacc tgctcggcgc cggcggtgag 120
gagcgcctcgc cgaggggggtt ctccagaggc ggagcgaggg tggcgggcgg ggtgcccagg 180
ttcaagtccg cgcagccgcc gagectgccg ctctcggcgc cggcggtgtc gccgtcgtcc 240
tacttcgcca tcccgccggg gctcagcccc accgagctgc tcgactcccc cgtcctctc 300
agctcctccc atatcttggc gtecccgacc accggtgcaa tcccggtca gaggtacgac 360
tggaaggcca gcgccgatct catcgtttct cagcaagatg acagccgcgg cgacttctcc 420
ttccacacca actccgacgc catggccgcg caaccggcct ctttccttc cttcaaggag 480
caagagcagc aagtggtcga gtcgagcaag aacggcgccg ccgccgcgtc gagcaacaag 540
agcggcgggc gcgggaacaa caagctggag gacgggtaca actggaggaa gtacgggcag 600
aagcaggtga aggggagcga gaaccgcagg agctactaca agtgcaccta caacggctgc 660
tccatgaaga agaaggtgga gcgctcgtc gccgacggcc gcacaccca gatcgtctac 720
aaggcgcac acaaccaccc caagccgctc tccaccgcc gcaacgcctc ctctcgcgc 780
accgccgcc cctgcgccga cgacctcgcg gcgccggcg cggcgcgga ccagtactcc 840
gccgcgacgc ccgagaactc ctccgtcacg ttcggcgacg acgaggccga caacgcatcg 900
caccgcagcg agggcgacga gcccgaagcc aagcgtgga aggaggatgc tgacaacgag 960
ggcagctccg gcggcatggg cggcgccgcc ggcggcaagc cggtgcgca gccgaggctt 1020
gtggtgcaga cgctgagcga catcgacatc ctcgacgacg gcttccggtg gaggaagtac 1080
ggccagaagg tcgtcaaggg caaccaccaac ccaaggagct actacaagtg cacgacggtg 1140
ggctgcccgg tgcggaagca cgtggagcgg gcgtcgcacg acacgcgcgc cgtgateacc 1200
acctacgagg gcaagcacia ccacgacgtc ccggtcggcc gcggcgggcg cggcggacgc 1260
gccccggcgc cggcgccgcc gacgtcgggg gcgatccggc cgtcggccgt cgccgccgcc 1320
cagcaggggc cctacacct cgagatgctc cccaaccccg ccggcctcta cggcggttac 1380
ggcgccggcg ccggcgggcg cgcgttcccg cgcaccaagg acgagcggcg ggacgacctg 1440
ttcgtcagat cgctcctctg ctag 1464

```

<210> 2

<211> 487

<212> PRT

<213>水稻

<400> 2

Met Ala Ser Ser Thr Gly Gly Leu Asp His Gly Phe Thr Phe Thr		
1	5	10 15
Pro Pro Pro Phe Ile Thr Ser Phe Thr Glu Leu Leu Ser Gly Gly		
	20	25 30
Gly Gly Asp Leu Leu Gly Ala Gly Gly Glu Glu Arg Ser Pro Arg		
	35	40 45
Gly Phe Ser Arg Gly Gly Ala Arg Val Gly Gly Gly Val Pro Lys		
	50	55 60
Phe Lys Ser Ala Gln Pro Pro Ser Leu Pro Leu Ser Pro Pro Pro		
	65	70 75
Val Ser Pro Ser Ser Tyr Phe Ala Ile Pro Pro Gly Leu Ser Pro		
	80	85 90
Thr Glu Leu Leu Asp Ser Pro Val Leu Leu Ser Ser Ser His Ile		
	95	100 105
Leu Ala Ser Pro Thr Thr Gly Ala Ile Pro Ala Gln Arg Tyr Asp		
	110	115 120
Trp Lys Ala Ser Ala Asp Leu Ile Ala Ser Gln Gln Asp Asp Ser		
	125	130 135
Arg Gly Asp Phe Ser Phe His Thr Asn Ser Asp Ala Met Ala Ala		
	140	145 150
Gln Pro Ala Ser Phe Pro Ser Phe Lys Glu Gln Glu Gln Gln Val		
	155	160 165
Val Glu Ser Ser Lys Asn Gly Ala Ala Ala Ala Ser Ser Asn Lys		
	170	175 180
Ser Gly Gly Gly Gly Asn Asn Lys Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Trp		
	185	190 195
Arg Lys Tyr Gly Gln Lys Gln Val Lys Gly Ser Glu Asn Pro Arg		
	200	205 210
Ser Tyr Tyr Lys Cys Thr Tyr Asn Gly Cys Ser Met Lys Lys Lys		
	215	220 225
Val Glu Arg Ser Leu Ala Asp Gly Arg Ile Thr Gln Ile Val Tyr		
	230	235 240
Lys Gly Ala His Asn His Pro Lys Pro Leu Ser Thr Arg Arg Asn		
	245	250 255
Ala Ser Ser Cys Ala Thr Ala Ala Ala Cys Ala Asp Asp Leu Ala		
	260	265 270
Ala Pro Gly Ala Gly Ala Asp Gln Tyr Ser Ala Ala Thr Pro Glu		
	275	280 285

Asn Ser Ser Val Thr Phe Gly Asp Asp Glu Ala Asp Asn Ala Ser		
	290	300
His Arg Ser Glu Gly Asp Glu Pro Glu Ala Lys Arg Trp Lys Glu		
	305	315
Asp Ala Asp Asn Glu Gly Ser Ser Gly Gly Met Gly Gly Gly Ala		
	320	330
Gly Gly Lys Pro Val Arg Glu Pro Arg Leu Val Val Gln Thr Leu		
	335	345
Ser Asp Ile Asp Ile Leu Asp Asp Gly Phe Arg Trp Arg Lys Tyr		
	350	360
Gly Gln Lys Val Val Lys Gly Asn Pro Asn Pro Arg Ser Tyr Tyr		
	365	375
Lys Cys Thr Thr Val Gly Cys Pro Val Arg Lys His Val Glu Arg		
	380	390
Ala Ser His Asp Thr Arg Ala Val Ile Thr Thr Tyr Glu Gly Lys		
	395	405
His Asn His Asp Val Pro Val Gly Arg Gly Gly Gly Gly Gly Arg		
	410	420
Ala Pro Ala Pro Ala Pro Pro Thr Ser Gly Ala Ile Arg Pro Ser		
	425	435
Ala Val Ala Ala Ala Gln Gln Gly Pro Tyr Thr Leu Glu Met Leu		
	440	450
Pro Asn Pro Ala Gly Leu Tyr Gly Gly Tyr Gly Ala Gly Ala Gly		
	455	465
Gly Ala Ala Phe Pro Arg Thr Lys Asp Glu Arg Arg Asp Asp Leu		
	470	780
Phe Val Glu Ser Leu Leu Cys		
	485	487

<210> 3

<211> 18

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223>PCR引物F1的核苷酸序列。

<400> 3

ATGGCGTCCT CGACGGGG 18

<210> 4

<211> 22

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223>PCR引物R1核苷酸序列。

<400> 4

CTAGCAGAGG AGCGACTCGA CG 22

<210> 5

<211> 39

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223> PCR引物F2的核苷酸序列。

<400> 5

GTTACTTCTG CACTAGGTAC CATGGCGTCC TCGACGGGG 39

<210> 6

<211> 43

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223> PCR引物P2的核苷酸序列。

<400> 6

TCTTAGAATT CCCGGGATC CCTAGCAGAG GAGCGACTCG ACG 43

<210> 7

<211> 19

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223> PCR引物F3的核苷酸序列。

<400> 7

TGCGCCCAAG CTGCATCAT 19

<210> 8

<211> 21

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223> PCR引物R3的核苷酸序列。

<400> 8

TGAACTCACC GCGACGTCTG T 21

<210> 9

<211> 18

<212> DNA
<213>人工序列
<220>
<223> PCR引物F4的核苷酸序列。
<400> 9
TCGCTGACGG AGCTGATG 18
<210> 10
<211> 20
<212> DNA
<213>人工序列
<220>
<223> PCR引物R4的核苷酸序列。
<400> 10
ACTTGAGGTG GGAGGACTTG 20
<210> 11
<211> 19
<212> DNA
<213>人工序列
<220>
<223> PCR引物F5的核苷酸序列。
<400> 11
CTCCACCTTC TCCGCTCAG 19
<210> 12
<211> 17
<212> DNA
<213>人工序列
<220>
<223> PCR引物R5的核苷酸序列。
<400> 12
GCCGCTCCGT CTCTTCC 17
<210> 13
<211> 21
<212> DNA
<213>人工序列
<220>
<223> PCR引物F6的核苷酸序列。
<400> 13
TGGCGACATT GAGAAGATTG C 21
<210> 14

<211> 21
<212> DNA
<213>人工序列
<220>
<223> PCR引物R6的核苷酸序列。
<400> 14
CAGAAGGCGA TGACATTGAC C 21
<210> 15
<211> 23
<212> DNA
<213>人工序列
<220>
<223> PCR引物F7的核苷酸序列。
<400> 15
AGACCTTCAA CACCCCTGCT ATG 23
<210> 16
<211> 18
<212> DNA
<213>人工序列
<220>
<223> PCR引物R7的核苷酸序列。
<400> 16
TCACGCCAG CAAGGTCG 18
<210> 17
<211> 24
<212> DNA
<213>人工序列
<220>
<223> PCR引物F8的核苷酸序列。
<400> 17
GGCATTCCAG TCGTACCTCT GAGC 24
<210> 18
<211> 24
<212> DNA
<213>人工序列
<220>
<223> PCR引物R8的核苷酸序列。
<400> 18
AAACGCTCAG AGGTACGACT GGAA 24

<210> 19
<211> 24
<212> DNA
<213>人工序列
<220>
<223> PCR引物F9的核苷酸序列。
<400> 19
GCCGAGCTGG AGGACGGGTA CAAC 24
<210> 20
<211> 24
<212> DNA
<213>人工序列
<220>
<223> PCR引物R9的核苷酸序列。
<400> 20
AAACGTTGTA CCCGTCCTCC AGCT 24
<210> 21
<211> 23
<212> DNA
<213>人工序列
<220>
<223> PCR引物F10的核苷酸序列。
<400> 21
AGACCTCAA CACCCCTGCT ATG 23
<210> 22
<211> 18
<212> DNA
<213>人工序列
<220>
<223> PCR引物R10的核苷酸序列。
<400> 22
TCACGCCAG CAAGGTCG 18
<210> 23
<211> 22
<212> DNA
<213>人工序列
<220>
<223> PCR引物U-F的核苷酸序列。
<400> 23

CTCCGTTTTA CCTGTGGAAT CG 22

<210> 24

<211> 20

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223> PCR引物gRNA-R的核苷酸序列。

<400> 24

CGGAGGAAAA TTCCATCCAC 20

<210> 25

<211> 38

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223> PCR引物B1'的核苷酸序列。

<400> 25

TTCAGAGGTC TCTCTCGCAC TGGAAATCGGC AGCAAAGG 38

<210> 26

<211> 37

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223> PCR引物B2的核苷酸序列。

<400> 26

AGCGTGGGTC TCGTCAGGGT CCATCCACTC CAAGCTC 37

<210> 27

<211> 38

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223> PCR引物B2'的核苷酸序列。

<400> 27

TTCAGAGGTC TCTCTGACAC TGGAAATCGGC AGCAAAGG 38

<210> 28

<211> 37

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223> PCR引物BL的核苷酸序列。

<400> 28

AGCGTGGGTC TCGACCGGGT CCATCCACTC CAAGCTC 37

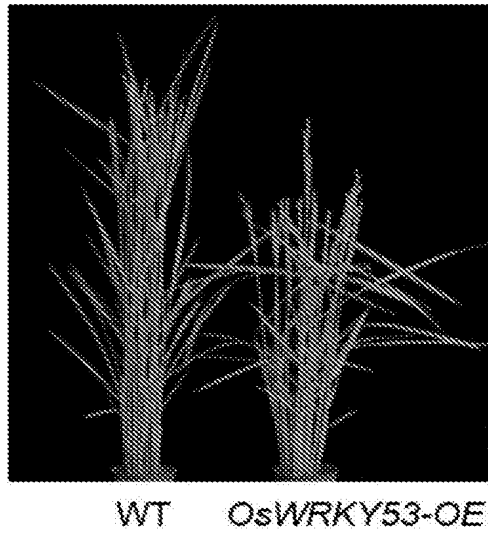


图1

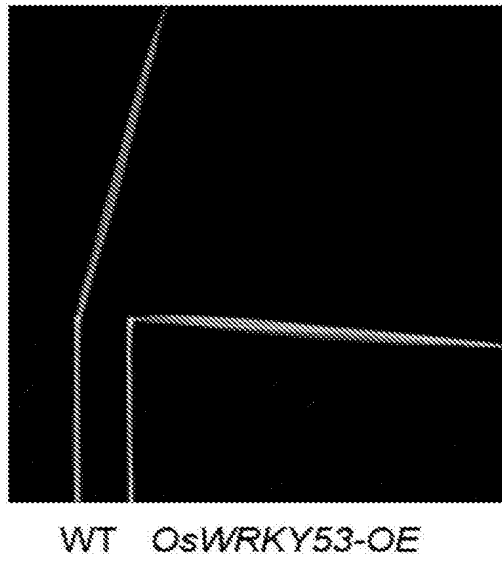


图2

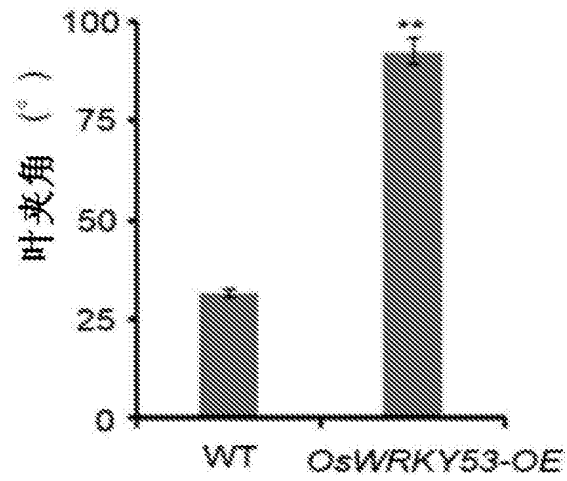


图3

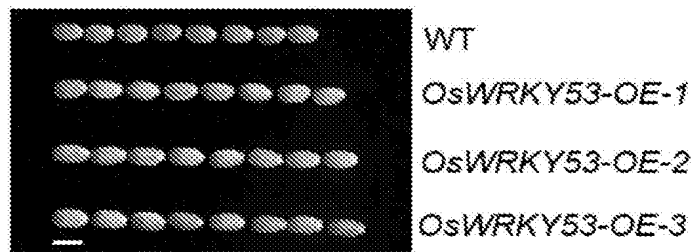


图4

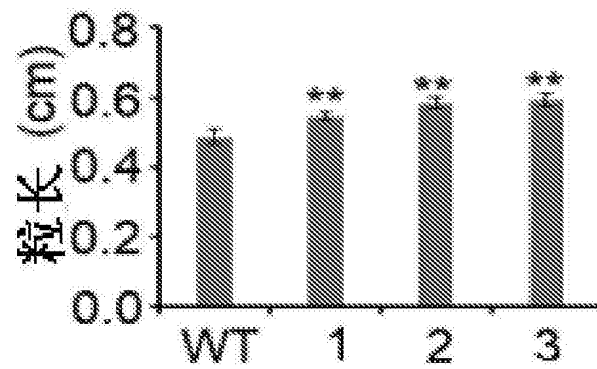


图5

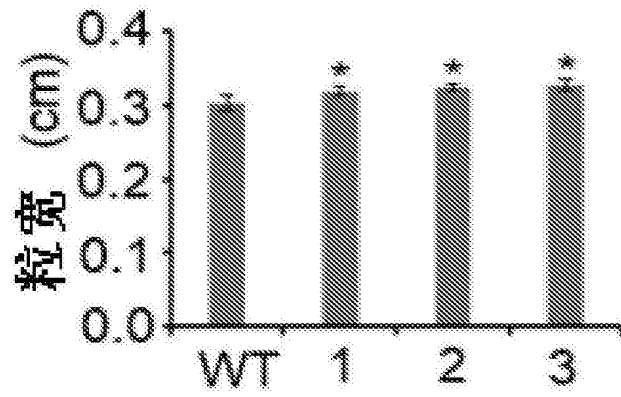


图6

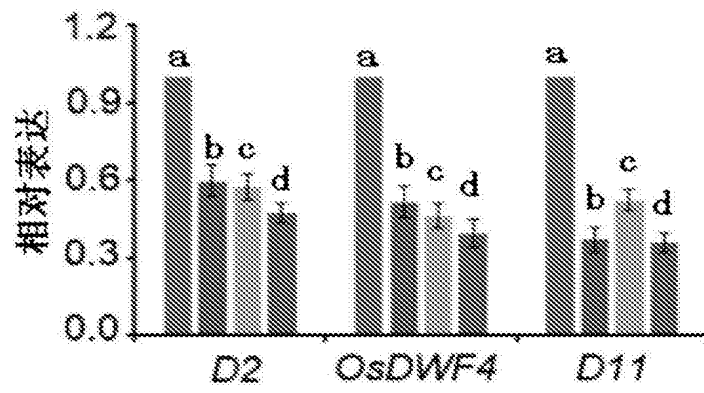


图7

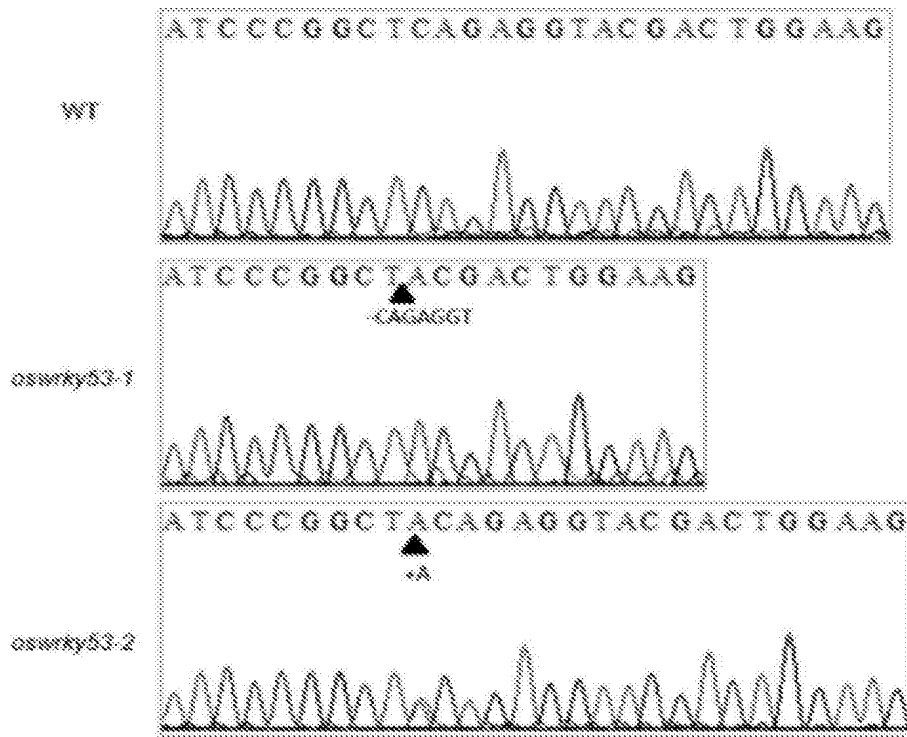


图8

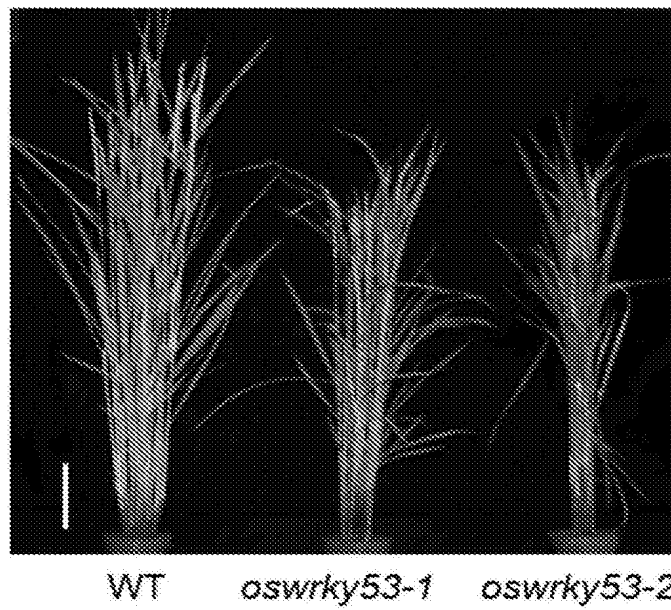


图9

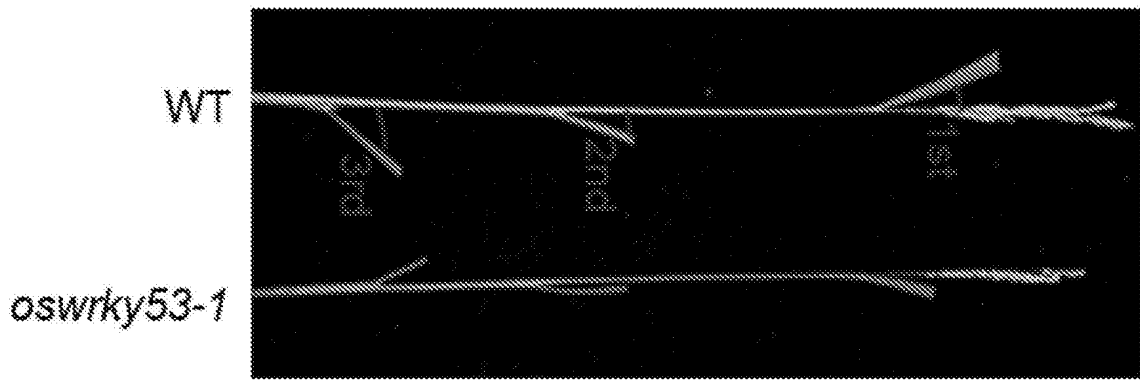


图10

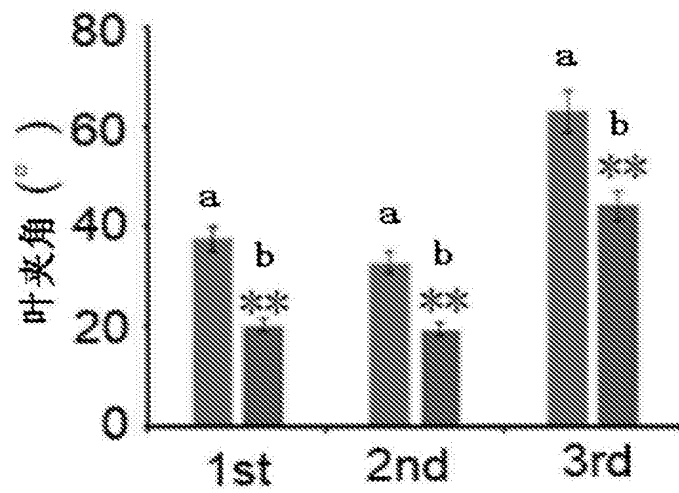


图11

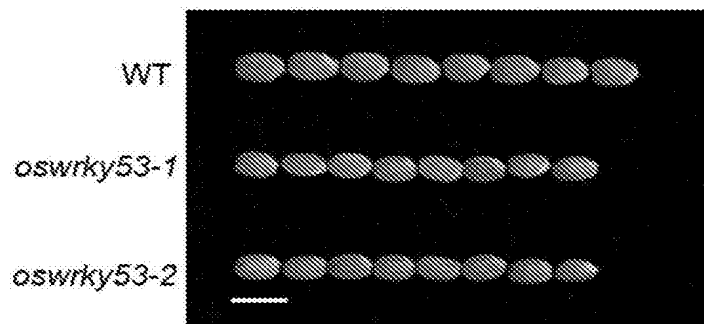


图12

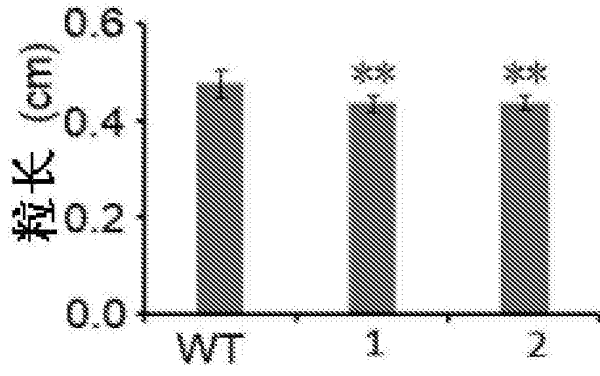


图13

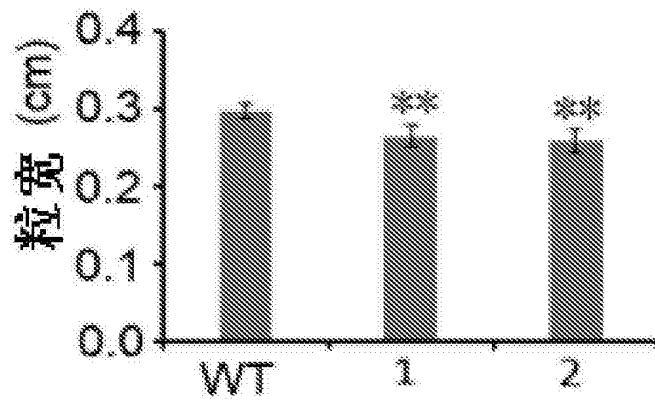


图14

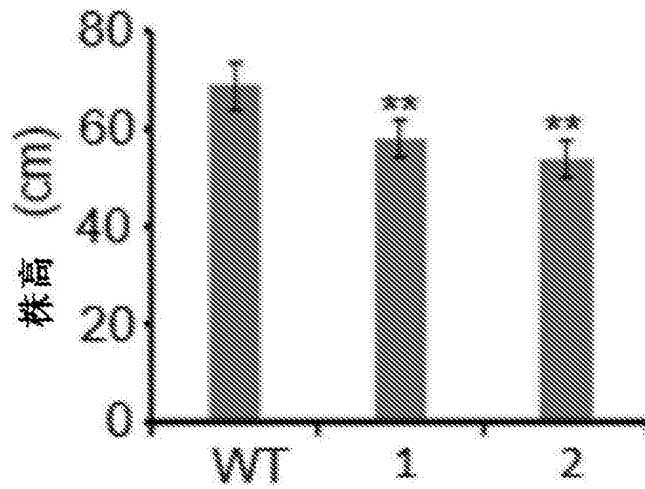


图15

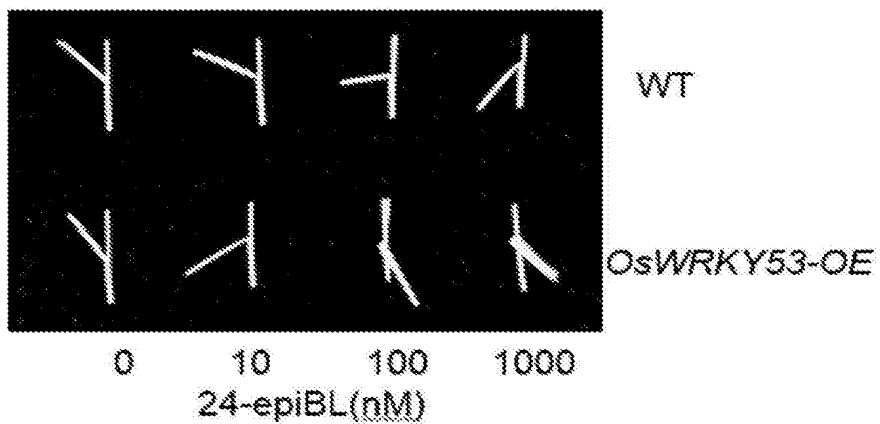


图16

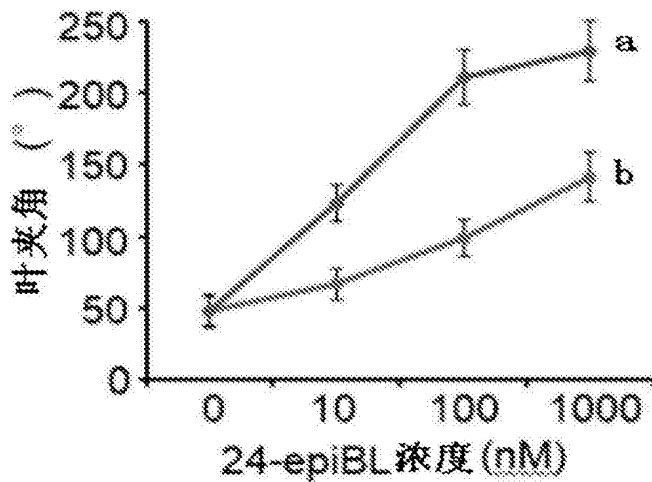


图17

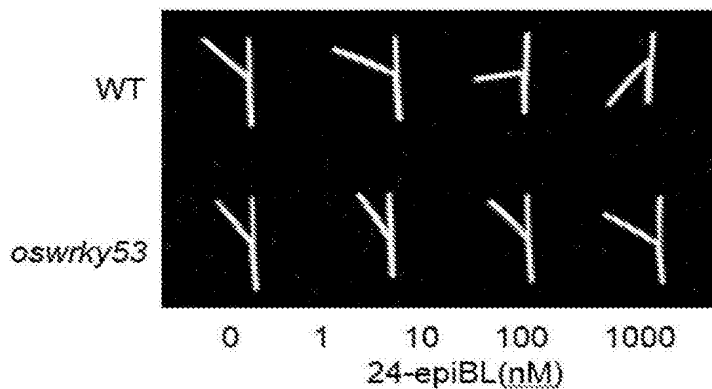


图18

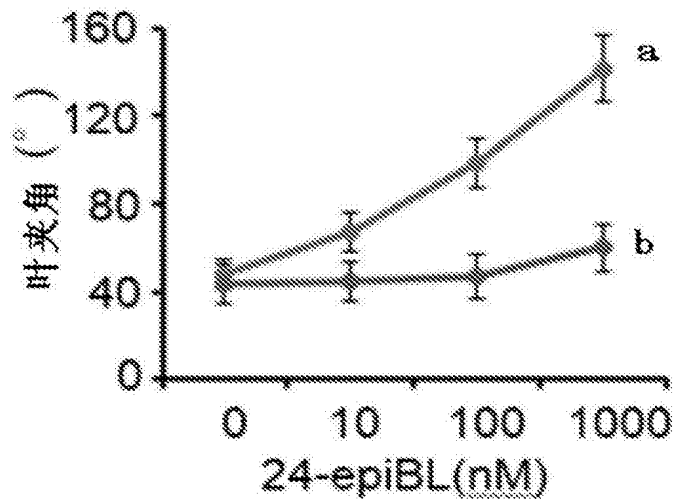


图19

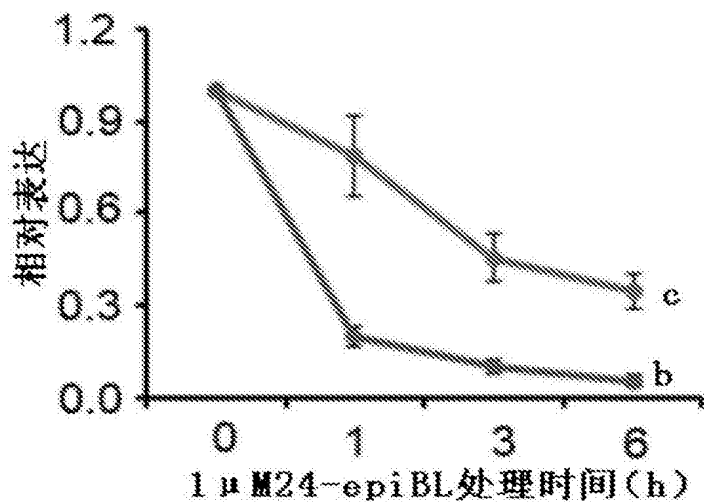


图20

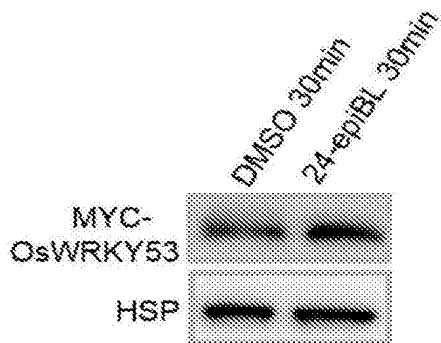


图21