



# (12)发明专利

(10)授权公告号 CN 110157709 B

(45)授权公告日 2020.08.28

(21)申请号 201910466630.0

C12N 15/82(2006.01)

(22)申请日 2019.05.31

C12N 15/10(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 110157709 A

(43)申请公布日 2019.08.23

(73)专利权人 中国热带农业科学院橡胶研究所

地址 571101 海南省海口市龙华区学院路4号

(72)发明人 辛士超 杨先锋 范月婷 戴雪梅  
华玉伟 黄华孙 王春 王克剑

(74)专利代理机构 北京兴智翔达知识产权代理有限公司 11768

代理人 蒋常雪

(51)Int.Cl.

C12N 15/113(2010.01)

(56)对比文件

CN 103153044 A, 2013.06.12

朱家红等.《巴西橡胶树HbSIP1基因启动子的克隆和序列分析》.《中国农学通报》.2013,第29卷(第4期),第5-9页.

曲龙等.《巴西橡胶HbWRKY55启动子的克隆及功能初步分析》.《分子植物育种》.2018,第16卷(第9期),第2827-2833页.

审查员 王斯奇

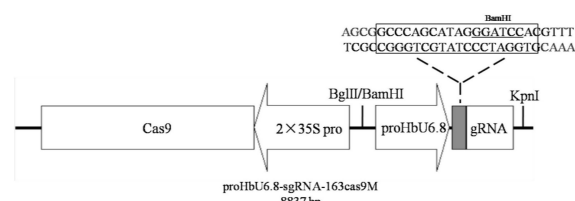
权利要求书2页 说明书7页  
序列表1页 附图3页

(54)发明名称

一种橡胶树U6基因启动子proHbU6.8及其克隆与应用

(57)摘要

本发明属于基因工程技术领域,具体涉及一种橡胶树RNA聚合酶III型启动子,更具体涉及一种橡胶树U6基因启动子proHbU6.8,并进一步公开其克隆方法与应用。本发明首次在巴西橡胶树中克隆获得橡胶树RNA聚合酶III型启动子--橡胶树内源U6启动子proHbU6.8,该启动子为橡胶树内源RNA聚合酶III型启动子,该启动子具有高效转录活性,可驱动下游sgRNA的表达,并通过瞬时转化橡胶树原生质体验证了该启动子的活性及其应用于橡胶树CRISPR/Cas9基因编辑系统的可行性,并实现了CRISPR/Cas9介导的橡胶树基因组靶向编辑。



1. 一种橡胶树U6基因启动子proHbU6.8,其特征在于,所述启动子proHbU6.8的DNA核苷酸序列如SEQ ID No:1所示。

2. 一种橡胶树瞬时转化编辑载体,其特征在于,含有权利要求1所述的橡胶树U6基因启动子proHbU6.8。

3. 根据权利要求2所述的橡胶树瞬时转化编辑载体,其特征在于,所述瞬时转化编辑载体为重组质粒proHbU6.8-sgRNA-163Cas9M。

4. 一种克隆权利要求1所述的橡胶树U6基因启动子proHbU6.8的方法,其特征在于,包括如下步骤:

(1) 以巴西橡胶树热研7-33-97叶片基因组DNA为模板,设计如下特异引物:

proHbU6.8-F:CTAGTCACATGCCTGTAATG;

proHbU6.8-R:CGCTCGAGGGTAGTCCGTTC;

(2) 使用KOD FX酶在20 $\mu$ l反应体系中进行PCR扩增;

(3) 将扩增产物TA克隆到pMD19-T载体上,转化大肠杆菌Dh5 $\alpha$ 中并挑重组单克隆测序,即得754bp橡胶树U6基因启动子DNA片段proHbU6.8。

5. 根据权利要求4所述的克隆所述的橡胶树U6基因启动子proHbU6.8的方法,其特征在于,所述步骤(2)中,所述PCR扩增步骤的反应程序为:95 $^{\circ}$ C预变性2min,98 $^{\circ}$ C变性10s,59 $^{\circ}$ C退火30s,72 $^{\circ}$ C延伸1min,35个循环,72 $^{\circ}$ C终延伸5min。

6. 一种构建权利要求2或3所述的橡胶树瞬时转化编辑载体的方法,其特征在于,包括如下步骤:

(a) 将克隆的启动子proHbU6.8构建到中间载体SK-5G上

用SalI和XhoI双酶切SK-5G载体,回收2913bp载体骨架片段,设计如下引物分别在proHbU6.8序列和载体gRNA序列两端引入同源序列,将proHbU6.8和gRNA组装到SK-5G载体上得到proHbU6.8-SK-5G:

proHbU6.8-1F:

GCGGCCGCAGATCTGCTAGCGTCGACCTAGTCACATGCCTGTAATG;

proHbU6.8-1R:

GGTGTGTGTTCACCTGCGAGCCGCTCGAGGGTAGTCCGTTC;

gRNA-sF:GCTCGAGGTGAACACAACACC;

gRNA-sR:TTGGGTACCGAGGATCCTCTAGA;

(b) 将靶位点构建到proHbU6.8-SK-5G载体上

在橡胶树HbTFL1-3基因上选择如下靶位点:

GCCCAGCATAGGGATCCAC,用AarI酶切proHbU6.8-SK-5G载体后两端形成3'-TCGC和5'-GTTT两个粘性末端;

合成靶位点序列,并引入5'-AGCG和3'-CAAA两个粘性末端:

正向:AGCGCCCAGCATAGGGATCCAC;

反向:AAACGTGGATCCCTATGCTGGGC;

将上述正向和反向靶点序列DNA混匀,100 $^{\circ}$ C处理后进行室温退火,形成带有与proHbU6.8-SK-5G载体互补粘性末端的双链DNA,然后使用T4 DNA连接酶将该片段连接到载体proHbU6.8启动子下游位置得到完整sgRNA表达框;

(c) sgRNA表达框构建到瞬时转化编辑载体163Cas9M上  
用KpnI和BglII双酶切proHbU6.8-sgRNA-SK-5G载体,回收918bp的小片段sgRNA表达框;

用KpnI和BamHI双酶切163Cas9M载体,回收7919bp大片段;

使用T4 DNA连接酶将小片段sgRNA表达框构建到163Cas9M载体上得到橡胶树瞬时转化编辑载体proHbU6.8-sgRNA-163Cas9M,即得。

7. 一种对橡胶树进行基因组编辑的方法,其特征在于,包括将权利要求2或3所述的橡胶树瞬时转化编辑载体导入橡胶树原生质体的步骤。

8. 权利要求1所述的橡胶树U6基因启动子proHbU6.8在橡胶树分子育种技术领域中的应用。

9. 权利要求2或3所述的橡胶树瞬时转化编辑载体在橡胶树分子育种技术领域中的应用。

## 一种橡胶树U6基因启动子proHbU6.8及其克隆与应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于基因工程技术领域,具体涉及一种橡胶树RNA聚合酶III型启动子,更具体涉及一种橡胶树U6基因启动子proHbU6.8,并进一步公开其克隆方法与应用。

### 背景技术

[0002] 天然橡胶一直是我国重要的战略物资和储备资源,目前,我国橡胶树新品种的选育仍然是以传统的杂交育种为主。由于橡胶树生长缓慢,导致了常规育种存在效率低、周期长的问题,这严重地阻碍了橡胶树育种的进程。随着生物技术的发展,分子育种技术在橡胶树中的应用加快了橡胶树新品种的培育,通过农杆菌或基因枪导入外源基因成为橡胶树遗传改良的重要方式。然而,在上述外源基因片段导入的过程中,基因片段是随机地插入橡胶树基因组的,不仅插入位点不受控制,同时还存在位置效益等问题(Yutaka等,2018, *Chromosoma*, doi:10.1007/s00412-018-0677-6.)。

[0003] CRISPR/Cas9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated nuclease 9) 基因组编辑技术的出现为基因组的精确修饰提供了新的途径(Yongwei等,2016, *Front Plant Sci*, 7:1928; Collonnier等,2017, *Methods*, 121-122:103-117; Yutaka等,2018, *Chromosoma*, doi:10.1007/s00412-018-0677-6), 其介导基因编辑的基本原理是依靠单链向导RNA (single guide RNA, sgRNA) 引导下,利用核酸酶Cas9定点结合和切割基因组特异性位点(PAM)上游特定靶位点,产生DNA双链断裂(DSBs),进而引起靶位点的突变。同时,通过同源重组修复(HR)或非同源末端连接(NHEJ)生物内源修复机制,也可将外源供体DNA插入到sgRNA靶位点,从而实现对基因组上特定位点的突变以及特定DNA片段的敲除、插入及替换等(Lee等,2017, *Elife*, 6:e25312.; Smirnikhina等,2018, *Hum Genet*, 138(1):1-19.),并由此实现目标基因的精准化品种改良。目前,在拟南芥(Miki D等,2018, *Nat Commun*. 9(1):1967.)、水稻(Li J等,2016, *Nat Plants*, 2(10):16139.)及玉米(Gil-Humanes J等,2017, *Plant J*, 89(6):1251-1262.)等植物中已经利用基于质粒CRISPR/Cas9基因组编辑技术实现了外源基因的导入。此外,在玉米、小麦、水稻中也已经通过CRISPR/Cas9-sgRNA RNP瞬时转化也实现了外源基因的导入(Svitashev S等,2015, *Plant Physiol*, 169(2):931-945.; Liang Z等,2017, *Nat Commun*, 8:14261.; Sun Y W等,2016, *Mol Plant*, 9(4):628-631); 另外,Liang等(2018, *Nature Protocols*, 13(3):413-430.)也利用基因枪将Cas9和sgRNA表达载体质粒,通过瞬时转化受体细胞实现基因编辑。

[0004] 研究显示,在CRISPR/Cas9基因编辑体系中,受体细胞中sgRNA的含量水平是影响编辑效率的重要因素之一,因此,可精确启动sgRNA体内转录的聚合酶III型启动子得到了广泛的关注(Jinek等,2016, *science* 337:816-821; Mali等,2013, *science* 339:823-826; Cong等,2013, *Science* 339:819-823)。U6RNA是一种参与mRNA前体剪接的非编码RNA,其对应的U6启动子是一类RNA聚合酶III型启动子,并已经在许多物种的CRISPR/Cas9系统中得到了大量的应用(Kim和Nam, 2013, *plant mol. Bio. Rep.* 31:581-593; Li等,2007,

J.integrate plant biol..49:222-229;H.Jia等,2014,pone,9(4):e93806.)。

[0005] 虽然CRISPR/Cas9基因组编辑技术目前已在多个物种中得到广泛地应用,但是针对橡胶树的基因编辑技术尚且未见报道。这主要是由于虽然在许多物种中U6启动子已有大量的报道,但外源的U6启动子通常并不适用(X.Sun等,2015,Sci.Rep.,5p.10342)。可见,缺少适用的U6启动子已成为目前橡胶树CRISPR/Cas9基因编辑体系的限制因子,也限制了CRISPR/Cas9基因组编辑技术在橡胶树育种中的应用。因此,筛选出在橡胶树中有功能活性的U6启动子对于橡胶树的基因育种技术发展具有积极的意义。

## 发明内容

[0006] 为此,本发明所要解决的技术问题在于提供一种橡胶树U6基因启动子proHbU6.8,并进一步公开其克隆方法及应用。

[0007] 为解决上述技术问题,本发明所述的一种橡胶树U6基因启动子proHbU6.8,所述启动子proHbU6.8包括如SEQ ID No:1所示的DNA核苷酸序列。上述橡胶树U6基因启动子proHbU6.8属于橡胶树U6snRNA基因的RNA聚合酶III型启动子,来源于巴西橡胶树(Heveabrasiliensis)。

[0008] 具体的,所述启动子proHbU6.8的DNA核苷酸序列如SEQ ID No:1所示。

[0009] 本发明还公开了一种橡胶树瞬时转化编辑载体,即含有所述的橡胶树U6基因启动子proHbU6.8。

[0010] 具体的,所述瞬时转化编辑载体为重组质粒proHbU6.8-sgRNA-163Cas9M。

[0011] 本发明还公开了一种克隆所述的橡胶树U6基因启动子proHbU6.8的方法,包括如下步骤:

[0012] (1) 以巴西橡胶树热研7-33-97叶片基因组DNA为模板,设计如下特异引物:

[0013] proHbU6.8-F:CTAGTCACATGCCTGTAATG;

[0014] proHbU6.8-R:CGCTCGAGGGTAGTCCGTTC;

[0015] (2) 使用KOD FX酶在20μl反应体系中进行PCR扩增;

[0016] (3) 将扩增产物TA克隆到pMD19-T载体上,转化大肠杆菌Dh5α中并挑重组载体单克隆测序,即得754bp橡胶树U6基因启动子DNA片段proHbU6.8。

[0017] 具体的,所述步骤(2)中,所述PCR扩增步骤的反应程序为:95℃预变性2min,98℃变性10s,59℃退火30s,72℃延伸1min,35个循环,72℃终延伸5min。

[0018] 本发明还公开了一种构建所述的橡胶树瞬时转化编辑载体的方法,包括如下步骤:

[0019] (a) 将克隆的启动子proHbU6.8构建到中间载体SK-5G上

[0020] 用SalI和XhoI双酶切SK-5G载体,回收2913bp载体骨架片段,设计如下引物分别在proHbU6.8序列和载体gRNA序列两端引入同源序列,将proHbU6.8和gRNA组装到SK-5G载体上得到proHbU6.8-SK-5G:

[0021] proHbU6.8-1F:

[0022] GCGGCCGCAGATCTGCTAGCGTCGACCTAGTCACATGCCTGTAATG;

[0023] proHbU6.8-1R:

[0024] GGTGTGTGTTCACCTGCGAGCCGCTCGAGGGTAGTCCGTTC;

- [0025] gRNA-sF:GCTCGCAGGTGAACACAACACC;
- [0026] gRNA-sR:TTGGGTACCGAGGATCCTCTAGA;
- [0027] (b) 将靶位点构建到proHbU6.8-SK-5G载体上
- [0028] 在橡胶树HbTFL1-3基因上选择如下靶位点:
- [0029] GCCCAGCATAGGGATCCAC,用AarI酶切proHbU6.8-SK-5G载体后两端形成3'-TCGC和5'-GTTT两个粘性末端;
- [0030] 合成靶位点序列,并引入5'-AGCG和3'-CAAA两个粘性末端(图3):
- [0031] 正向:AGCGGCCCAGCATAGGGATCCAC;
- [0032] 反向:AAACGTGGATCCCTATGCTGGGC;
- [0033] 将上述正向和反向靶点序列DNA混匀,100℃处理后进行室温退火,形成带有与proHbU6.8-SK-5G载体互补粘性末端的双链DNA,然后使用T4DNA连接酶将该片段连接到载体proHbU6.8启动子下游位置得到完整sgRNA表达框;
- [0034] (c) sgRNA表达框构建到瞬时转化编辑载体163Cas9M上
- [0035] 用KpnI和BglIII双酶切proHbU6.8-sgRNA-SK-5G载体,回收918bp的小片段sgRNA表达框;
- [0036] 用KpnI和BamHI双酶切163Cas9M载体,回收7919bp大片段;
- [0037] 使用T4DNA连接酶将小片段sgRNA表达框构建到163Cas9M载体上得到橡胶树瞬时转化编辑载体proHbU6.8-sgRNA-163Cas9M,即得。
- [0038] 本发明还公开了一种对橡胶树进行基因组编辑的方法,即包括将所述的橡胶树瞬时转化编辑载体导入橡胶树原生质体的步骤。
- [0039] 本发明还公开了所述的橡胶树U6基因启动子proHbU6.8在橡胶树分子育种技术领域中的应用。
- [0040] 本发明还公开了所述的橡胶树瞬时转化编辑载体在橡胶树分子育种技术领域中的应用。
- [0041] 本发明首次在巴西橡胶树中克隆获得橡胶树RNA聚合酶III型启动子--橡胶树内源U6启动子proHbU6.8,该启动子为橡胶树内源RNA聚合酶III型启动子,该启动子具有高效转录活性,可驱动下游sgRNA的表达,并经过筛选橡胶树内源开花调控基因HbTFL1-3的靶点序列后,将其构建到编辑载体中proHbU6.8启动子下游,通过PEG介导橡胶树叶片原生质瞬时转化将编辑载体导入橡胶树细胞内实现了对HbTFL1-3基因靶位点的编辑,验证了proHbU6.8启动子的活性,也首次在橡胶树中建立了有效的CRISPR/Cas9基因编辑技术体系。
- [0042] 本发明首次将克隆的橡胶树内源RNA聚合酶III型启动子,通过瞬时转化橡胶树原生质体验证了该启动子的活性及其应用于橡胶树CRISPR/Cas9基因编辑系统的可行性,并首次实现了CRISPR/Cas9介导的橡胶树基因组靶向编辑。经验证,编辑后靶基因片段重组克隆测序结果发现突变类型多为单碱基的缺失,其中,也出现了多碱基的缺失和小片段的插入。因此,本发明克隆的启动子proHbU6.8可应用于橡胶树CRISPR/Cas9基因编辑体系,从而实现对橡胶树高效精准的品种改良。

## 附图说明

[0043] 为了使本发明的内容更容易被清楚的理解,下面根据本发明的具体实施例并结合附图,对本发明作进一步详细的说明,其中,

[0044] 图1为橡胶树HbU6.8基因与拟南芥和棉花U6基因序列比对,其中,框线位置为U6snRNA转录的关键元件USE (upstream sequence element) 及TATA box,箭头位置处为转录起始位点;

[0045] 图2为橡胶树HbU6.8基因启动子的克隆电泳图,可见经PCR扩增得到了754bp的HbU6.8基因启动子片段;

[0046] 图3为橡胶树瞬时转化编辑载体proHbU6.8-sgRNA-163Cas9M结构简图,其中,框线内为靶点序列,下划线序列为BamHI识别酶切位点,其两端为与载体互补的粘性末端;

[0047] 图4为橡胶树原生质体基因组靶基因片段PCR产物再酶切(PCR/RE)鉴定结果;其中,1:橡胶树原生质体DNA靶基因片段PCR产物;2:转化对照163Cas9M载体的原生质体DNA靶基因片段PCR产物再BamHI酶切;3:转proHbU6.8-sgRNA-163Cas9M载体的原生质体DNA靶基因片段PCR产物再BamHI酶切;未被编辑的靶基因片段被BamHI酶切为500bp和331bp小片段,基因编辑突变后的靶基因片段为箭头处不能被酶切的条带;

[0048] 图5为部分TA克隆后重组克隆中靶基因片段的酶切验证结果图,可筛选得到靶位点突变而不能被BamHI酶切的靶基因片段重组载体单克隆;

[0049] 图6为靶位点编辑结果序列比对分析;可见,被编辑后的靶位点测序后与野生型比对发现主要的突变类型为单碱基的缺失,也存在多碱基的缺失和小片段的插入。

## 具体实施方式

[0050] 本发明下述实施例中,如无特别说明,均为常规方法。下述实施例中的载体SK-5G和瞬时转化载体163Cas9M由中国水稻所王克剑课题组惠赠(王克剑,王春,沈兰等,植物多基因敲除载体的构建及应用),该生物材料只为重复本发明的相关实验所用,不可作为其他用途使用。

[0051] 实施例1巴西橡胶树U6基因启动子proHbU6.8的获得

[0052] 以拟南芥AtU6-26基因(Genebank登录号:X52528.1)和棉花GhU6-9基因(Genebank登录号:XR\_001680717.1)的DNA序列为参考,搜索我们建立的橡胶树基因组数据库(hevea.catas.cn),通过同源比对的方式找到一个橡胶树HbU6基因(Genebank登录号:XR\_002491643.1),获得此基因上游参考序列。

[0053] 以巴西橡胶树热研7-33-97(中国热带农业科学院橡胶研究所培育)叶片基因组DNA为模板,设计如下proHbU6.8-F和proHbU6.8-R特异引物,以克隆该启动子区754bp DNA片段:

[0054] proHbU6.8-F:CTAGTCACATGCCTGTAATG;

[0055] proHbU6.8-R:CGCTCGAGGGTAGTCCGTTT;

[0056] 使用KOD FX酶(TOYOBO)在20μl反应体系中进行PCR扩增,具体反应程序为:95℃预变性2min,98℃变性10s,59℃退火30s,72℃延伸1min,35个循环,72℃终延伸5min。

[0057] 将扩增产物TA克隆到pMD19-T载体上,转化大肠杆菌Dh5α中并挑取重组载体单克隆PCR电泳验证后测序,电泳结果如图2所示。最后,获得754bp如SEQ ID No:1所示的橡胶树

U6基因启动子DNA片段proHbU6.8。

[0058] 使用Vector NTI align X(Invitrogen)将该启动子序列与拟南芥AtU6-26和棉花GhU6-9及其启动子的碱基序列比对分析,发现该启动子序列同样含有U6snRNA转录的关键位点TATA box及USE(upstream sequence element)元件(如图1所示),并且这两个元件相对于转录起始位点的位置也与AtU6-26和棉花GhU6-9的启动子序列基本一致,这对于几何对称的RNA聚合酶的结合具有重要作用(Kim and Nam, (2013) plant mol.Bio.Rep.

[0059] 31:581-593)。

[0060] 实施例2橡胶树基因编辑载体的构建

[0061] (1) proHbU6.8构建到中间载体SK-5G载体上

[0062] 用SalI和XhoI双酶切SK-5G载体和下游gRNA片段,去掉该载体上的水稻U3启动子,回收2913bp载体骨架片段,设计引物:

[0063] proHbU6.8-1F:

[0064] GCGGCCGAGATCTGCTAGCGTCGACCTAGTCACATGCCTGTAATG;

[0065] proHbU6.8-1R:

[0066] GGTGTGTGTTACCTGCGAGCCGCTCGAGGGTAGTCCGTTC;

[0067] (下划线所示为与SK-5G载体同源序列)。

[0068] 以橡胶树基因组DNA为模板,使用KOD FX酶(TOYOBO)在20μl反应体系中95℃预变性2min,98℃变性10s,60℃退火30s,72℃延伸1min,35个循环,72℃终延伸5min扩增得到proHbU6.8启动子片段,并在其两端引入了SK-5G载体同源序列。

[0069] 设计引物:

[0070] gRNA-sF:GCTCGCAGGTGAACACAACACC;

[0071] gRNA-sR:TTGGGTACCGAGGATCCTCTAGA;

[0072] 以SK-5G载体质粒为模板,使用KOD FX酶(TOYOBO)在20μl反应体系中95℃预变性2min,98℃变性10s,60℃退火30s,72℃延伸1min,35个循环,72℃终延伸5min扩增得到gRNA片段。

[0073] 使用Gibson assembly Cloning Kit(NEB),参照说明书,将得到的同源序列proHbU6.8启动子片段和gRNA片段组装到SK-5G载体上得到proHbU6.8-SK-5G。

[0074] (2) 靶位点构建到proHbU6.8-SK-5G载体上

[0075] 为了验证proHbU6.8启动子的功能活性,选择橡胶树开花调控基因HbTFL1-3作为CRISPR/Cas9编辑的目标基因,在该基因上选择合适靶位点GCCCAGCATAGGGATCCAC,该位点在PAM位点AGG上游2个碱基位置包含BamHI识别位点GGATCC(下划线部分),可用于靶位点被编辑之后的酶切鉴定。

[0076] 合成靶位点序列如下:

[0077] 正向:AGCGGCCGAGCATAGGGATCCAC;

[0078] 反向:AAACGTGGATCCCTATGCTGGGC,下划线所示为5'-AGCG和3'-CAAA两个粘性末端。

[0079] 用AarI酶切proHbU6.8-SK-5G载体后在proHbU6.8启动子下游形成3'-TCGC和5'-GTTT两个粘性末端。同时,分别取10μl浓度为100μM的正向和反向靶点序列混匀,于100℃处理5min后室温退火形成带有与proHbU6.8-SK-5G载体互补粘性末端的靶位点双链DNA片段。



然后使用T4DNA连接酶(NEB)将该片段连接到proHbU6.8-SK-5G载体proHbU6.8启动子下游位置得到完整sgRNA表达框(结果如图3所示)。

[0080] (3) sgRNA表达框构建到瞬时转化CRISPR/Cas9基因编辑载体163Cas9M上

[0081] 用KpnI和BglIII双酶切proHbU6.8-sgRNA-SK-5G载体,回收918bp的小片段proHbU6.8-sgRNA表达框;

[0082] 用KpnI和BamHI双酶切163Cas9M载体,回收7919bp大片段;

[0083] 根据BamHI和BglIII酶切后产生相同粘性末端的特点,使用T4DNA连接酶(NEB)将小片段sgRNA表达框构建到163Cas9M载体上得到橡胶树瞬时转化编辑载体proHbU6.8-sgRNA-163Cas9M(构建结果如图3所示)。

[0084] 实施例3橡胶树原生质体转化

[0085] 本实施例以PEG介导编辑载体proHbU6.8-sgRNA-163Cas9M转化橡胶树原生质体,并以不含sgRNA表达框的163Cas9M载体作为对照。

[0086] 将培育一个月的橡胶树热研7-33-97组培苗转到26-28℃黑暗条件下培养5-7天,取2g变色期叶片立即于0.6M甘露醇溶液中浸泡10min后用于制备原生质体。原生质体的制备和的转化过程参照(Yoo,S.D.等,2007,Nature Protocols,2:1565-1575.)。转化后的原生质体于26-28℃黑暗条件下培养48个小时后用于靶位点突变的检测。

[0087] 实施例4橡胶树HbTFL1-3靶序列突变位点的检测

[0088] 使用植物基因组DNA提取试剂盒(Tiagen)提取橡胶树原生质体基因组DNA,采用基因组DNA PCR产物进行再酶切(PCR/Restriction Enzymedigestion,PCR/RE)的方法检测HbTFL1-3基因靶位点序列上的突变(Henao-Mejia J等,2016,Cold Spring Harbor Protocols,2016(2):pdb.prot090704.)。

[0089] 设计所述靶基因片段PCR扩增引物:

[0090] HbTFL1-3-F:CACCTAGGGCATAACTTCTAC,

[0091] HbTFL1-3-R:ACGGGATCTTAGTTGGATGG,

[0092] 以橡胶树原生质体基因组DNA为模板,反应程序为:95℃预变性2min,98℃变性10s,59℃退火30s,72℃延伸1min,35个循环,72℃终延伸5min,PCR扩增得到包含编辑位点在内的831bpHbTFL1-3靶基因片段。

[0093] 因为靶基因编辑位点包含一个BamHI限制性内切酶识别位点,通过对回收的HbTFL1-3基因片段进行BamHI酶切来检测靶位点的编辑。结果如图4所示,部分靶基因片段因为BamHI识别位点发生突变而不再被BamHI识别并酶切,这初步表明靶基因已成功被编辑,而未被编辑的靶基因片段则被酶切为500bp和331bp的两个小片段。为排除酶切不彻底而残留的部分未编辑靶基因片段的影响,回收PCR产物中不能被酶切的片段,将其TA克隆到pMD-19T(TAKARA)载体上,转化大肠杆菌Dh5α后,再次对重组载体单克隆上靶基因片段进行BamHI酶切验证,结果如图5所示;取不能被酶切的单克隆进行DNA测序,通过序列比对分析橡胶树HbTFL1-3靶位点序列的突变,证实了在橡胶树原生质体细胞内的编辑结果。结果如图6所示。

[0094] 可见,本发明在巴西橡胶树中获得橡胶树RNA聚合酶III型启动子proHbU6.8启动子具有转录活性,可驱动下游sgRNA的表达,并首次实现了CRISPR/Cas9介导的橡胶树基因组靶向编辑;而编辑后靶位点克隆测序结果发现突变类型多为单碱基的缺失,其中,也出现

了多碱基的缺失和小片段的插入。因此,本发明所述启动子可应用于橡胶树CRISPR/Cas9基因编辑体系,从而实现对橡胶树高效精准的品种改良。

[0095] 显然,上述实施例仅仅是为清楚地说明所作的举例,而并非对实施方式的限定。对于所属领域的普通技术人员来说,在上述说明的基础上还可以做出其它不同形式的变化或变动。这里无需也无法对所有的实施方式予以穷举。而由此所引伸出的显而易见的变化或变动仍处于本发明创造的保护范围之内。

[0001]	序列表
[0002]	<110>
[0003]	<120> 一种橡胶树U6基因启动子proHbU6.8及其克隆与应用
[0004]	<160> 1
[0005]	<170> SIP0SequenceListing 1.0
[0006]	<210> 1
[0007]	<211> 754
[0008]	<212> DNA
[0009]	<213> proHbU6.8
[0010]	<400> 1
[0011]	ctagtcacat gcctgtaatg ataagattca ctctaggtgg gaagataaaa gatagaacac 60
[0012]	aagataagat acctagagtg tcaaggacca aatcattcat ggcacagccc atcaaacaag 120
[0013]	gaaccgtagc tgagttgaaa attaaaccaa aagagaaaat tacattgttg ctcttttctc 180
[0014]	agttttctgta gcagacatgg cttgttaaatt aaggatagcc ctatgggtctg tcacggttcg 240
[0015]	gttttgatcc aagggctaga agaccaaatt tatattgaag gtccctttga ttttgatttt 300
[0016]	gattttgatt ttgattttga ttttgatttt aattaaattt aatattttatt tattttttta 360
[0017]	ttttattttt taaaagaaat tttgatttta acatgaaacc ggactgatca attgtggtcc 420
[0018]	aattcaaata caattttatt caatataaac ttaatcaatt ttaatttgat tttattttta 480
[0019]	aattgaacta atctaatttc aatgtccaat tgcactgttc tgcaacattg ttctgtacaa 540
[0020]	ggctaaatgt tgccagaatt tgggcctcat gatctaaaac acagacggcc tgtagcctgt 600
[0021]	ggagagtcta aaacttgctt ggtgcggcct tgtaagtgag ctgacgtgtt taaaatgaat 660
[0022]	gctgacggct atagttagaa cagaactaaa tcccacatcg tttagttaac ccattcgctt 720
[0023]	gactttattt tgatgaacgg actaccctcg agcg 754

AtU6-26 ..CATTTAAG.....TTGAAAACAATCTTCAAAA....  
 GhU6-9 ..CTTCGGGGACATAC.TTCAGGGCCATGGTCAAAA....  
 HbU6.8 CGTGTTTAAAATGAATGCTGACGGCTATAGTTAGAACAGA  
 Consensus t t a c a t t a a a

**USE**

AtU6-26 G.....TCCCACATCGCTTAGATAAGAAAACGAAGCTGAG  
 GhU6-9 ACTA...TCCCACATTGCTAAGGAACCATAAGGAAGAAGCA  
 HbU6.8 ACTAAATCCCACATCGTTTAGTTAACCCATTCGC.TTGAC  
 Consensus tcccacat g t a a a g

**TATA BOX**

AtU6-26 TTTATATACAGCTAGAGTCGAAGTA.GTGATTGTCCCTTC  
 GhU6-9 TTTATATA.AGCGAAAGAAGCAGCACATAACTGTCCCTTC  
 HbU6.8 TTTATTTT.GATGAACGGACTACCC.TCGAGCGTCCCTTC  
 Consensus tttat t a g a a gtccc tc

AtU6-26 GGGGACATCCGATAAAATTGGAACGATACAGAGAAGATTA  
 GhU6-9 GGGGACATCCGATAAAATTGGAACGATACAGAGAAGATTA  
 HbU6.8 GGGGACATCCGATAAAATTGGAACGATACAGAGAAGATTA  
 Consensus ggggacatccgataaaaattggaacgatacagagaagatta

AtU6-26 GCATGGCCCCCTGCGCAAGGATGACACGCATAAATCGAGAA  
 GhU6-9 GCATGGCCCCCTGCGCAAGGATGACACGCACAAATCGAGAA  
 HbU6.8 GCATGGCCCCCTGCGCAAGGATGACACGCACAAATCGAGAA  
 Consensus gcatggccccctgcgcaaggatgacacgca aaatcgagaa

AtU6-26 ATGGTCCAAATTTTTTTT  
 GhU6-9 ATGGTCCAAATTTTTTTT  
 HbU6.8 ATGGTCCAAATTTTTTTT  
 Consensus atggtccaaatTTTTTTT

图1

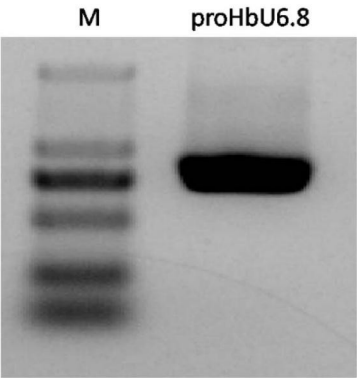


图2

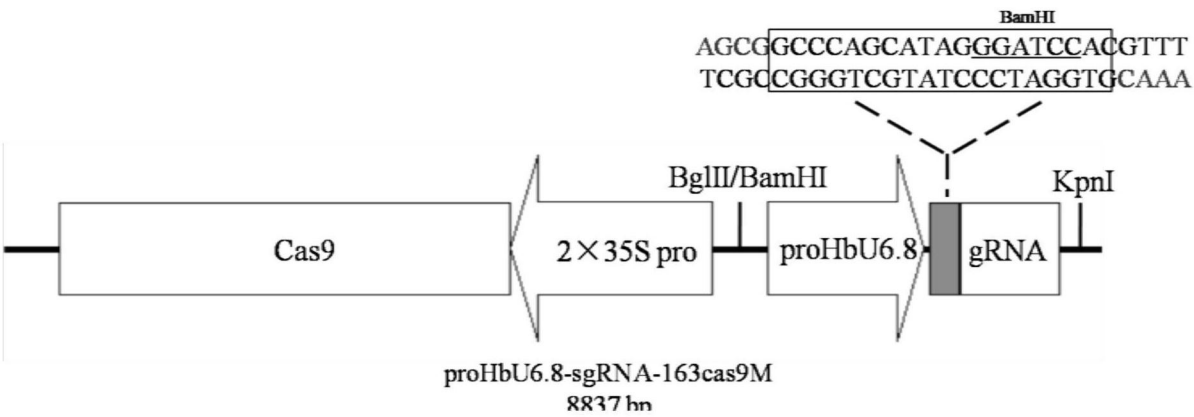


图3

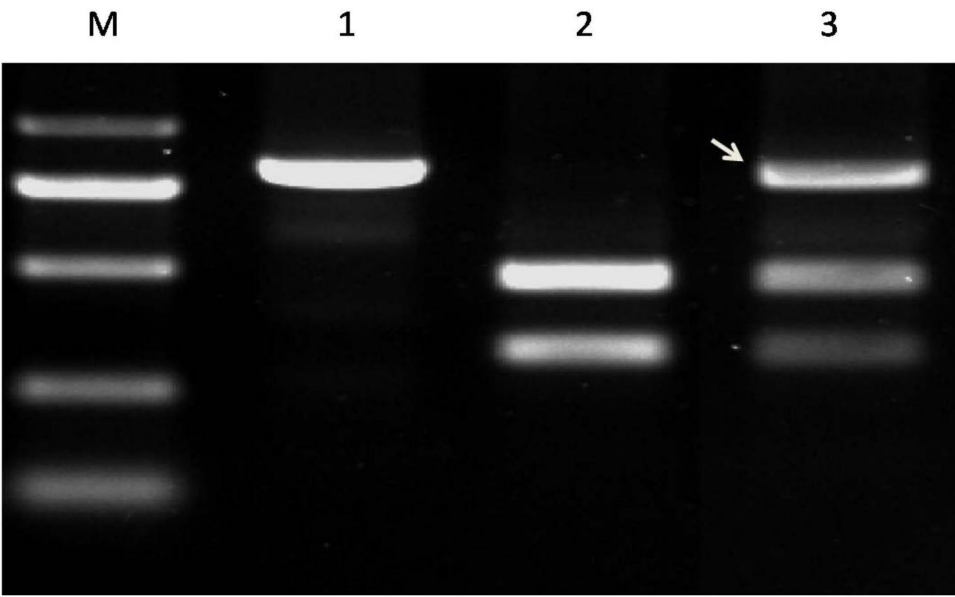


图4

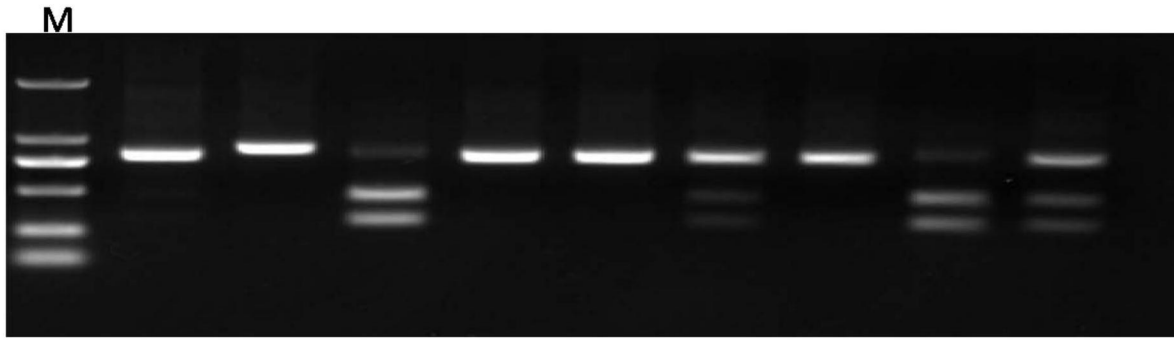


图5

	BamHI										PAM																			
WT	G	C	C	C	A	G	C	A	T	A	G	G	G	A	T	C	C	A	C	A	G	G	T	T	T	G	T	G		
1	G	C	C	C	A	A	C	A	T	A	G	G	G	A	T	-	C	A	C	A	G	G	T	T	T	G	T	G	-1	(×13)
2	G	C	C	C	A	G	C	A	T	A	G	G	G	-	-	-	C	A	C	A	G	G	T	T	T	G	T	G	-3	(×3)
3	G	C	C	C	A	A	C	A	T	A	G	G	-	-	-	-	C	A	C	A	G	G	T	T	T	G	T	G	-4	(×2)
4	G	C	C	C	A	A	C	A	T	A	-	-	-	-	-	-	C	A	C	A	G	G	T	T	T	G	T	G	-6	(×4)
5	G	C	C	C	A	G	C	A	T	A	G	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-10	(×1)
6	G	C	C	C	A	A	C	A	T	A	G	G	G	A	T	+	C	A	C	A	G	G	T	T	T	G	T	G	+24	(×1)
7	G	C	C	C	A	G	C	A	T	A	G	G	G	A	T	+	C	A	C	A	G	G	T	T	T	G	T	G	+115	(×1)

图6