



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109486830 A

(43)申请公布日 2019.03.19

(21)申请号 201811509555.3

(22)申请日 2018.12.11

(71)申请人 上海市农业生物基因中心

地址 201106 上海市闵行区北翟路2901号

(72)发明人 余舜武 马孝松 张余 李天菲

徐凯 吴金红 刘鸿艳 罗利军

(74)专利代理机构 上海智力专利商标事务所

(普通合伙) 31105

代理人 周涛

(51)Int.Cl.

C12N 15/29(2006.01)

C12N 15/82(2006.01)

C07K 14/415(2006.01)

A01H 5/10(2018.01)

A01H 6/46(2018.01)

权利要求书2页 说明书10页

序列表12页 附图4页

(54)发明名称

水稻SNB基因及应用、调控籽粒大小的方法

(57)摘要

本发明涉及到一种利用和改造水稻SNB基因来调控种子大小,其中,SNB基因的核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示,其应用点在于通过改变或改造SNB基因的表达来调控种子大小,具体为:超表达全长SNB基因如SEQ ID NO.1,突变SNBm2基因如SEQ ID NO.5,达到显著减小种子大小;通过CRISP/CAS9技术手段在第一外显子(EXON1)序列的5'端400bp-500bp区内插入缺失造成基因提前终止如SEQ ID NO.7,或过量表达突变SNBm1基因如SEQ ID NO.3,达到显著增加种子大小,从而表明SNB编码的蛋白质在调控水稻种子大小的重要作用,同时也提供了一种新的提高水稻产量遗传改良的方法。



1. 一种水稻种子的SNB基因的应用,其特征在于:所述SNB基因的核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示。

2. 根据权利要求1所述的SNB基因,其特征在于,所述的SNB基因EAR位点进行人工突变形成SNBm1基因,所述SNBm1基因的核苷酸序列如SEQ ID NO.3所示。

3. 根据权利要求2所述的SNB基因,其特征在于,所述SNB基因EAR位点人工突变的SNBm1基因的应用是以引物SNBm1F和SNBR组合,利用SNB基因编码区cDNA为模板进行PCR扩增,并回收该PCR产物,其中:

SNBm1F: ATGGTGATGGATATCAATGTGGAGTCGCC;

SNBR: TCAGGCGGTCGGGGGAAGTAG。

4. 根据权利要求1所述的SNB基因,其特征在于,SNBm2基因全长编码cDNA为截取SNB基因3'端1071bp长度的突变基因,其核苷酸序列如SEQ ID NO.5所示。

5. 根据权利要求4所述的SNB基因,其特征在于,所述截取SNB基因3'端的人工突变的SNBm2基因的应用是以引物SNBm2F和SNBR组合,利用SNB基因编码区cDNA为模板进行PCR扩增,并回收该PCR产物,其中:

SNBm2F: ATGCCGATGCCGCGGCGGCTGGG

SNBR: TCAGGCGGTCGGGGGAAGTAG。

6. 根据权利要求1所述的SNB基因,其特征在于,所述SNB基因第一外显子序列第400-500bp区域插入或缺失,该突变使基因翻译提前终止,形成SNB基因的突变体knSNB基因,所述的knSNB基因的第一外显子核苷酸序列如SEQ ID NO.7所示。

7. 根据权利要求5所述的SNB基因的应用,其特征在于,所述水稻SNB基因引导RNA靶点序列引物在编辑水稻基因组中的应用是以OsSNB基因诱导RNA的核苷酸序列为SNB-sgRNA: GCTCTTCCCTTCGCCGTCTGCGG。

8. 根据权利要求5所述的SNB基因的应用,其特征在于,所述应用包括添加接头利用PCR扩增的方法构建权利要求4所述的引导RNA靶点序列的sgRNA表达盒;

将sgRNA表达盒装载到CRISPR/Cas9载体上,得到含靶点序列的CRISPR/Cas9-sgRNA载体;

将靶点CRISPR/Cas9-sgRNA载体转化水稻愈伤组织,得到水稻SNB基因突变体knSNB植株。

9. 一种包含权利要求1-8任一所述SNB基因的应用,其特征在于,所述应用可用于调节水稻种子的大小。

10. 一种水稻种子的OsSNB基因,其特征在于,所述OsSNB基因用于调控水稻种子的大小。

11. 一种权利要求10所述的OsSNB基因突变体编码的蛋白质,其特征在于,所述OsSNB基因突变体编码的蛋白质可调控水稻种子得大小。

12. 一种生产水稻种子大小改变的转基因植物的方法,其特征在于:

该方法包括以下步骤:

1) 将权利要求1、2、4和6中任一所述的SNB基因、突变基因及其基因编辑可操作地连接于植物表达调控序列,形成植物表达载体;

2) 将步骤1)所得的植物表达载体转入植物细胞;

3) 经筛选获得的转化细胞,再生为植物及其后代,所述的植物包括植物细胞、植物组织或植物种子。

水稻SNB基因及应用、调控籽粒大小的方法

技术领域

[0001] 本发明属于植物基因工程技术领域,具体涉及水稻SNB基因在调控种子大小的应用。

背景技术

[0002] 水稻是世界上重要的粮食作物之一,全球有122个国家种植水稻,供养着全球超过23%人口。我国是一个农业大国和人口大国,不仅稻谷是我国的主粮,稻谷的生产也是我国的主要农业活动,因此提高水稻的产量对保障我国粮食安全具有重要意义。

[0003] 粒重、穗粒数和有效穗数是水稻产量三要素。谷粒重量作为产量的三要素之一,是一个重要的产量性状,它是谷粒长、粒宽与粒厚的综合指标,一般以千粒重表示。粒重与谷粒大小紧密相关,是一个极为重要的品质性状。谷粒重量或谷粒大小在禾谷类作物进化上也具有重要的意义,由于小粒种子生活力较低、机械收获难度大。在水稻的驯化过程中人们趋向于选择大粒的品种进行栽培,逐步形成了栽培种比它们的野生亲缘种籽粒偏大的状况。同时菲律宾国际水稻研究所也认为,提高粒重可以增产30%以上(马丽莲等,水稻大粒种质资源和遗传分析,植物学通报,2006, 23 (4): 395-401),培育大粒水稻品种也是当前水稻育种的一个重要方向。

[0004] 水稻粒型大小性状是复杂的数量性状,对粒型数量性状进行QTL遗传剖析的努力持续超过30年,随着近代分子技术的进步,在调控水稻粒型主效基因的克隆和功能分析取得了较大进展。影响粒型的基因大致分为3类,第一类表型基本是籽粒变短,植株变矮,叶倾角变小,如D1、D2、D11等;第二类表型为小而圆的粒型,植株变矮,主要分布与粳稻,如SRS1、SRS2、SRS5等;第三类为主要在穗部表达,如GS3、GW2、GW5等(Huang et al. Genetic bases of rice grain shape: so many genes, so little known. Trends in plant science, 2013, 18(4):218-226)。前两类对植株生长发育影响较大,在生产中利用价值受到影响,第三类由于对整个植株的生长发育影响小,主要影响种子大小和性状,被认为育种应用潜力较大。

[0005] 将种子性状进一步分解,可分解为谷粒长、粒宽与粒厚3个指标,其中粒厚遗传影响很小,粒形主要受粒长和粒宽控制。分解后发现GS3、qGL3/g13.1、TGW6、PGL1/2均是调控粒长的主效基因,而GW2、GW5/qSW5、GW8、GS5、GS6、HGW为调控粒宽的主效基因,也发现同时影响粒长和粒宽的主效基因,如SMG1、GL7/GW7和GS2/GL2(朱业宝等,水稻粒形调控基因的互作及其驯化研究进展.福建农业学报,2016,31(1):95-101)。这些基因编码蛋白既有转录因子,也有激酶、磷酸酶、E3泛素连接酶和其他活性酶等,这些基因之间也存在着复杂的相互调控关系,表明水稻的粒型调控涉及多个基因调控,是典型的复杂性状。尽管在粒型研究上取得了这些研究进展,但认为对粒型的研究仍存在许多未知因子待了解,同时有利于株型改良提高产量的新基因仍有待发掘。

[0006] 水稻单株产量的影响因素中还包括穗粒数和有效穗数。Supernumerary Bract (SNB) 基因发现在水稻穗发育中扮演重要作用(Lee et al, The rice heterochronic

gene SUPERNUMERARY BRACT regulates the transition from spikelet meristem to floral meristem. The Plant Journal, 2006, 49(1): 64-78), 控制着花分生组织建立和花序结构(Lee et al, Two AP2 family genes, SUPERNUMERARY BRACT (SNB) and OsINDETERMINATE SPIKELET 1 (OsIDS1), synergistically control inflorescence architecture and floral meristem establishment in rice. The Plant Journal, 2011, 69(3): 445-461)。同时, SNB的调控机制也被发现, 该基因是microRNA172的靶基因, 如果将结合位点突变, 能显著降低株高, 增加穗粒数, 该特点在申请专利(一种利用水稻SNB基因来增加穗粒数和降低株高的方法, 专利申请号: 201510786256.4)得到详细描述, 但如果将SNB基因敲除或抑制, 常造成花发育不良性状(Wang et al, Coordinated regulation of vegetative and reproductive branching in rice. Proc Natl Acad Sci U S A. 2015, 112(50): 15504-15509)。我们通过水稻种质资源的研究发现, SNB基因也可影响水稻种子大小, 并通过基因编辑和改造, 增加或缩小种子大小, 可以用于水稻籽粒精准育种, 为水稻的高产打下基础。

发明内容

[0007] 本发明是基于一部分来源于水稻的OsSNB基因调控水稻籽粒发育的发现。本发明的目的在于提供一种SNB基因改变水稻种子大小的应用。

[0008] 为此, 本发明提供了一种通过超表达SNB基因来减少水稻种子大小的方法。同时本发明还提供了一种通过超表达人工突变SNB基因来增加水稻种子大小的方法。

[0009] 同时本发明还提供了一种通过人工编辑水稻基因组使产生提前终止密码来增加水稻种子大小的方法。本发明也包括采用其它的方法改造编码区5'端序列而得到的SNB基因的等位基因或衍生物。本发明提过改造SNB基因形成突变等位基因或过表达人工突变基因, 显著增加水稻种子大小, 这些结果表明SNB基因在水稻产量育种中具有重要的应用价值。通过精确改良SNB基因, 构建适当的植物表达载体, 可以拓展当前植物生物技术中可应用于改变水稻产量的基因, 为改良水稻的重要农艺性状提供精准育种手段。

[0010] 本发明提供的SNB基因的核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示, 所述的SNB基因EAR位点进行人工突变形成SNBm1基因, 所述SNBm1基因的核苷酸序列如SEQ ID NO.3所示。

[0011] 本发明的优选实施方案是, 所述SNB基因EAR位点人工突变的SNBm1基因的应用是以引物SNBm1F和SNBR组合, 利用SNB基因编码区cDNA为模板进行PCR扩增, 并回收该PCR产物, 其中:

SNBm1F: ATGGTGATGGATATCAATGTGGAGTCGCC;

SNBR: TCAGGCGGTCGGGGGAAGTAG。

[0012] 本发明的优选实施方案是, SNBm2基因全长编码cDNA为截取SNB基因3'端1071bp长度的突变基因, 其核苷酸序列如SEQ ID NO.5所示。

[0013] 本发明的优选实施方案是, 所述截取SNB基因3'端的人工突变的SNBm2基因的应用是以引物SNBm2F和SNBR组合, 利用SNB基因编码区cDNA为模板进行PCR扩增, 并回收该PCR产物, 其中:

SNBm2F: ATGCCGATGCCGGCGGCGGCTGGG

SNBR: TCAGGCGGTCGGGGGAAGTAG。

[0014] 本发明的优选实施方案是,所述SNB基因第一外显子序列第400-500bp区域插入或缺失,该突变使基因翻译提前终止,形成SNB基因的突变体knSNB基因,所述的knSNB基因的第一外显子核苷酸序列如SEQ ID NO.7所示。

[0015] 另一方面,所述水稻SNB基因引导RNA靶点序列引物在编辑水稻基因组中的应用是以*O_sSNB*基因诱导RNA的核苷酸序列为SNB-sgRNA: GCTCTTCCCTTCGCCGTCTGCGG。

[0016] 另一方面,所述应用包括添加接头利用PCR扩增的方法构建上述的引导RNA靶点序列的sgRNA表达盒;

将sgRNA表达盒装载到CRISPR/Cas9载体上,得到含靶点序列的CRISPR/Cas9-sgRNA载体;

将靶点CRISPR/Cas9-sgRNA载体转化水稻愈伤组织,得到水稻SNB基因突变体knSNB植株。

[0017] 本发明公开了一种含有编码核酸的多核苷酸的分离的DNA分子在制备转基因水稻品种中的用途,分离水稻*O_sSNB*基因编码区cDNA,其所述的核苷酸序列如SEQ ID NO.2所示。

[0018] 另一方面,本发明公开了人工改造突变SNBm1基因的方法,以上述的cDNA为模板,通过PCR扩增得到EAR位点突变的SNBm1基因,其所述的核苷酸序列如SEQ ID NO.3所示。

[0019] 另一方面,本发明公开了人工改造突变SNBm2基因的方法,以上述的cDNA为模板,通过PCR扩增得到截取*O_sSNB*基因全长编码cDNA的3'端1071bp片段,其核苷酸序列如SEQ ID NO.5所示。

[0020] 另一方面,本发明公开了一种通过基因编辑的方式获得的水稻基因组中SNB基因等位基因knSNB基因的方法,其特征在于构建含有SNB-sgRNA表达盒的CRISP/CAS9载体,利用水稻遗传转化在所述SNB基因第一外显子序列第400-500bp区域产生插入或缺失的水稻突变体,其第一外显子核苷酸序列如SEQ ID NO.7所示。

[0021] 另一方面,本发明公开了所分离的DNA序列连接至组成性启动子驱动的植物表达载体,利用水稻遗传转化方法获得能超表达*O_sSNB*基因、突变SNBm1基因和突变SNBm2基因的水稻转基因植株。

[0022] 本发明还公开了一种水稻种子的*O_sSNB*基因,其中,所述*O_sSNB*基因用于调控水稻种子的大小。

[0023] 本发明还公开了一种*O_sSNB*基因突变体编码的蛋白质,其中,所述*O_sSNB*基因突变体编码的蛋白质可调控水稻种子得大小。

[0024] 本发明还提供了一种生产水稻种子大小改变的转基因植物的方法,其特征在于:

该方法包括以下步骤:

1)将上述的SNB基因、突变基因及其基因编辑可操作地连接于植物表达调控序列,形成植物表达载体;

2)将步骤1)所得的植物表达载体转入植物细胞;

3)经筛选获得的转化细胞,再生为植物及其后代,所述的植物包括植物细胞、植物组织或植物种子。

[0025] 与现有技术相比,本发明的优点如下:

1.本发明克隆的SNB基因和SNB基因突变体具有增加或减少水稻种子大小。

[0026] 2.本发明将超表达SNB突变基因的蛋白编码区导入水稻,实现了增加水稻种子大

小。

[0027] 3.本发明建立了四种利用SNB基因来对水稻种子大小进行遗传改良的方法。

附图说明

[0028] 图1 OsSNB蛋白结构图

采用NCBI中BLAST软件(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>)对SEQ ID NO.2蛋白序列分析,以及相关发表文献绘制OsSNB蛋白结构图。ATG为翻译起始位点,TGA为终止密码子,EAR位点为amphiphilic repression (EAR) motif,核定位表示核定位信号位点,miR172位点表示microRNA172结合位点。箭头m1表示SNBm1基因突变位点,箭头m2表示SNBm2基因开始翻译起始位点,箭头kn表示knSNB基因中插入缺失突变位点。

[0029] 图2 SNBm1基因突变位点图

SNBm1基因在SNB基因5'端EAR位点突变,突变核苷酸及其相应的突变氨基酸加大加粗显示。

[0030] 图3 表达载体pCBH04-OsSNB的构建示意图;

图4 表达载体pCBH04-SNBm1的构建示意图;

图5 表达载体pCBH04-SNBm2的构建示意图;

图6 CRISP/Cas9植物转化载体构建示意图

图7 超表达转基因植株相对表达量示意图

OE表示超表达株系,日本晴表示非转基因受体亲本植株。采用定量PCR方法 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算相对表达量,参照为非转基因受体亲本日本晴。

[0031] 图8 CRISP/Cas9敲除后转化植物的测序验证结果

OsSNB表示日本晴部分片段序列,knSNB表示敲除株系部分片段序列。

[0032] 图9 超表达和敲除转基因植株的种子大小统计

WT表示亲本日本晴,***表示t-test分析 $p<0.001$ 。

[0033] 图10 超表达SNBm1和SNBm2转基因植株的种子大小统计

WT表示亲本日本晴,**表示t-test分析 $p<0.01$,*表示 $p<0.05$ 。

具体实施方式

[0034] 在本文,术语“分离的”、“纯化的”DNA是指,该DNA或片段已从天然状态下位于其两侧的序列中分离出来,还指该DNA或片段已经与天然状态下伴随核酸的组分分开,而且已经与在细胞中伴随其蛋白质分开。

[0035] 通过本领域已知的方法可以分离和纯化多核苷酸(DNA或RNA)、载体、转化体和生物体。

[0036] 用于本发明的载体可以是如噬菌体、质粒、粘粒、微型染色体、病毒或逆转录病毒载体。可用于克隆和/或表达本发明的多核苷酸的载体是能在需复制和/或表达多核苷酸的宿主细胞中复制和/或表达多核苷酸的载体。一般说来,携带本发明的核酸序列的重组表达载体可以使用Ti质粒、植物病毒载体,直接DNA转化、微注射、电穿孔等常规生物技术方法导入植物细胞(Weissbach, 1998, Method for Plant Molecular Biology VIII, Academy Press, New York, pp. 411-463; Geiserson and Corey, 1998, Plant Molecular

Biology (2nd Edition)。

[0037] 已开发出多种方法用于经由互补的粘性末端使多核苷酸与载体可操作相连。例如,可在欲插入载体 DNA 内的 DNA 区段添加互补的同聚体序列片段。然后通过互补同聚体尾之间的氢键连接载体和 DNA 区段以形成重组 DNA 分子。

[0038] 含有一或多种限制性位点的合成接头提供了另一种连接 DNA 区段与载体的方法。用噬菌体 T4 DNA 聚合酶或大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 处理通过内切核酸酶限制性消化产生的 DNA 区段,所述的两种聚合酶用其 3',5'-核酸外切活性除去突出的 γ -单链末端,并用其聚合活性补平 3'-凹端。因此,这些活性的联合产生了平端 DNA 区段,然后在能催化平端 DNA 分子连接的酶,如噬菌体 T4 DNA 连接酶的存在下将平端区段与摩尔过量的接头分子一起保温。因此,反应产物是末端携有聚合接头序列的 DNA 区段,然后用适当的限制性酶裂解这些 DNA 区段,并连接至已用酶裂解的表达载体中,所述酶能产生与所述 DNA 区段相容的末端。从多个商家可以买到含有多个限制性内切核酸酶位点的合成接头。

[0039] 其它新发展的技术利用同源重组方法,将携带有特定序列接头或同源序列接头的多核苷酸与载体进行同源重组,将欲插入载体 DNA 内的 DNA 区段与同样携带有特定序列或同源序列的载体通过重组酶的作用形成重组DNA分子。

[0040] 多核苷酸插入物应该可操作地连接于同表达多核苷酸的宿主细胞相容的适当启动子上,启动子可以是强启动子和/或诱导型启动子。列举的一些启动子的例子包括噬菌体 PL 启动子、大肠杆菌 lac、trP、phoA、tac 启动子、SV40 早期和晚期启动子以及逆转录病毒 LTR 启动子;其它适当启动子是本领域技术人员已知的。表达重组载体进一步含有转录起始、终止位点,并在转录区含有用于翻译的核糖体结合位点。重组载体表达的转录物的编码部分可包括位于起点处的翻译起始密码子和适当地位于被翻译多肽的末端的终止密码子(UAA, UGA或UAG)。

[0041] 如上所述,表达载体可包括至少一个选择标记。所述标记包括编码抗生素的抗性基因,例如:新霉素磷酸转移酶(Neomycin phosphotransferase)基因npt II、潮霉素磷酸转移酶(Hygromycin phosphotransferase)基因hpt 和二氢叶酸还原酶(Dihydrofolate reductase)基因dhfr;另一类是编码除草剂抗性基因,例如,草丁膦乙酰转移酶(Phosphinothricin acetyltransferase)基因bar、5-烯醇丙酮酰草酸-3-磷酸合成酶(5-Enolpyruvate shikimatr-3-phosphate)基因epsps。适当宿主的代表性例子包括但不限于:原生质体细胞和植物细胞。上述宿主细胞的适当培养基和培养条件是本领域已知的。

[0042] 目的基因或目的多核苷酸的转化方法:一类是载体介导的转化方法,即将目的基因插入到农杆菌的质粒或病毒的DNA 等载体分子上,随着载体DNA的转移而将目的基因导入到植物基因组中;农杆菌介导和病毒介导法就属于这种方法。第二类为基因直接导入法,是指通过物理或化学的方法直接将外源目的基因导入植物的基因组中。物理方法包括基因枪转化法、电激转化法、超声波法、显微注射法和激光微束法等;化学方法有PEG介导转化方法和脂质体法等。第三类为种质系统法,这包括花粉管通道法、生殖细胞浸染法、胚囊和子房注射法等。

[0043] 本发明中,使用的术语“转化体”(transformant),即带有异源DNA分子的宿主细胞或生物体。

[0044] 本发明还包括含有本发明的核苷酸序列的宿主细胞,所述核苷酸序列经本领域已

知的技术与一或多种异源控制区(如启动子和/或增强子)可操作相连。可以选择能调节插入的基因序列的表达,或能按照所需的特殊方式修饰和加工基因产物的宿主菌株。在某些诱导物的存在下,某些启动子启动的表达会升高。

[0045] 通过众所周知的技术可以鉴定出被成功转化的细胞,即含有本发明所述核苷酸序列的重组载体的细胞或生物体。

[0046] 以下结合具体实施例,进一步阐明本发明。应理解,这些实施例仅用于说明本发明而并不用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件,或按照制造厂商所建议的条件。

[0047] 实施例1:分离克隆*OsSNB*基因

1.1 *OsSNB*基因克隆

剪取水稻叶片,采用TRIzol试剂(GIBCO BRL, USA)抽提总RNA。利用反转录酶MLV(Tiangen, China)将其反转录成cDNA。用引物SNBRF(5'-ATGGTGCTGGATCTCAATGTGG-3')和引物SNBR(5'-TCAGGCGGTCGGGGGAAGTAG-3'),扩增出基因的全长编码cDNA。PCR反应条件为:94℃预变性3min;94℃30sec,60℃30sec,72℃60sec共35个循环;72℃延伸5min。将扩增获得的PCR产物连入pGEM-T载体(Promega, USA),筛选阳性克隆并测序,获得*OsSNB*基因的cDNA序列(SEQ ID NO. 1)。*OsSNB*推测的蛋白序列进行同源基因的比对分析,发现该基因编码蛋白为包含2个AP2 domain的转录因子(见图1)。进一步分析该基因核苷酸序列和蛋白质序列特征,该基因3'端包含一个microRNA172结合位点,在蛋白质N端和中间分别包含一个EAR基序(见图1)。

[0048] 1.2 *OsSNB*突变基因克隆

SNBm1突变基因克隆,以*OsSNB*基因序列为模板,分别用引物SNBM1F(5'-ATGGTGATGGATATCAATGTGGAGTCGCC-3')和SNBR(5'-TCAGGCGGTCGGGGGAAGTAG-3'),扩增突变基因SNBm1,PCR条件同上1.1所述。该突变基因将位于蛋白质N端EAR基序中2个氨基酸进行了突变,将LDLN改变为MDIN,具体的突变位点见图2。

[0049] SNBm2突变基因克隆,以*OsSNB*基因序列为模板,分别用引物SNBM2F(5'-ATGCCGATGCCGCGGCGGCTGGG-3')和SNBR(5'-TCAGGCGGTCGGGGGAAGTAG-3'),扩增突变基因SNBm2,PCR条件同上1.1所述。该突变基因将蛋白质N端80氨基酸序列截除,具体的序列长度见图1,即从m2箭头位置开始到TGA位置终止。

[0050] 实施例2:*OsSNB*基因相关表达载体的构建

2.1 含目的基因超表达载体的构建:

根据*OsSNB*基因的全长序列(SEQ ID NO. 1),设计扩增出完整编码阅读框的引物,并在上游引物和下游引物上分别添加接头引物,以便构建表达载体。以实施例1中获得的扩增产物为模板,经高保真Taq酶pfu酶(Tiangen, China)进行PCR扩增后,将*OsSNB*基因cDNA克隆至中间载体(如pDONR207),进一步转化大肠杆菌DH5α,在保证阅读框架正确的前提下鉴定中间载体,然后抽提质粒,然后使用LR Clonase重组酶与包含启动子和终止子蛋白植物表达载体载体pCBH04进行重组反应,构成了一个完整的表达单元(见图3),转化农杆菌EHA105,最后进行水稻愈伤组织转化实验。其所获得的过表达转基因植株命名为*OsSNB*。

[0051] 同上述载体构建方法,分别将SNBm1和SNBm2突变基因装入植物表达载体pCBH04中,载体示意图见图4和图5,转化农杆菌EHA105,最后进行水稻愈伤组织转化实验。其所获

得的转基因植株命名为SNBm1和SNBm2。

[0052] 植物转化载体构建

2.2.1、引导RNA靶点序列选择与引物设计

根据控制水稻基因OsSNB的基因组序列(LOC_0s07g13170),设计基因OsSNB的sgRNA。20nt的核苷酸sgRNA靶点序列按照5'-N20-NGG-3'序列进行设计,同时设计靶点序列引物gRT+和OsU6aT-,其3'端有15-17 nt分别与sgRNA和U6a启动子配对。具体靶点核苷酸序列如下,见图1。

[0053] SNB-sgRNA: GCTCTTCCCTTCGCCGTCTGCGG

gRT+: 5'-GCTCTTCCCTTCGCCGTCTGgttttagagctagaaat-3'

OsU6aT-:5'-CAGACGGCGAAGGGAAGAGCggcagccaagccagca-3'

2.2.2、靶点序列sgRNA表达盒的构建

参考Ma等人的方法(Ma et al., 2015, Molecular Plant, 8 (8) :1274-1284),取2-5 ng pYLgRNA-OsU6a/LacZ质粒(1ul)为模板,在两个反应体系中分别进行PCR扩增:U-F和OsU6aT-用于扩增OsU6a-靶点片段,gR-R和gRT+用于扩增sgRNA-靶点片段。一般使用KOD plus聚合酶(TOYOBO),反应体系为1ul质粒模板,2.5 uL 10×Buffer,0.5 uL KOD plus聚合酶,1ul 25mM的MgSO₄,2.5 uL 2mM的dNTPs,10 uM的前后引物各0.5 uL,补充dd H₂O至25 uL;PCR扩增程序为:95℃ 2min,98℃ 10s,58℃ 15s,68℃ 20s 25个循环。电泳检测PCR产物,OsU6a-靶点片段为700bp左右,gRNA-靶点片段为131bp左右。取第一轮两个PCR产物各1μl为模板,用引物U-GAL和Pgs-GAR按以上步骤进行第二轮PCR,30循环。产物大小为830bp左右。凝胶电泳检测,切胶回收,此产物即为基因OsSNB靶点序列-sgRNA表达盒。

[0054] 所述的Gibson assembly的引物为:

U-F: 5'-ctccgttttacctgtggaatcg-3'

gR-R: 5'-cggaggaaaattccatccac-3'

U-GAL: 5'-accggtaaggcgcgccgtagtgtcgactagtagtgaatcggcagcaaagg-3'

Pgs-GAR: 5'-tagctcgagaggcgcgcccaatgataccgacgcgtatccatccactccaagctcttg-3'

2.2.3、靶点CRISPR/Cas9-sgRNA载体构建

组装靶点序列sgRNA表达盒到pYLCRISPR/Cas9Pubi-H载体,以南京诺唯赞生物科技有限公司的ClonExpress快速克隆重组酶为例:4 μl 5 × CE II Buffer,200 ng线性化pYLCRISPR/Cas9Pubi-H质粒,上面回收的含OsSNB靶点序列-sgRNA的PCR产物200 ng,2 μl ExnaseTM II,最后加水到20 μl,37℃ 温浴30min,将5μl反应混合物转化大肠杆菌,涂布含卡那霉素的LB平板筛选阳性克隆,次日挑取阳性单克隆进行测序验证并抽提质粒保存。质粒所示载体示意图见图6,转化农杆菌EHA105,最后进行水稻愈伤组织转化实验。其所获得的转基因植株命名为knSNB。

[0055] 实施例3:水稻遗传转化

3.1种子消毒

成熟的日本晴水稻种子去壳后放入无菌三角瓶中,用75%酒精浸泡1-2 min,无菌水冲洗2次;再用30% NaClO消毒30 min,其间需经常摇动,再用无菌水洗3-4次,用无菌滤纸吸干多余的水分,将种子接种到愈伤组织诱导培养基(MS + 2,4-D 2.0 mg/L)上,每皿约30粒,于28℃暗培养。

[0056] 继代培养

经过近1月的诱导,水稻长出黄色膨大的愈伤组织,去其盾片,将愈伤转至新鲜的愈伤组织诱导培养基(MS + 2,4-D 2.0 mg/L)上进行继代。每2周继代一次,继代2-4次即可获得适合转基因的嫩黄色、颗粒状的胚性愈伤组织。在继代培养2周后,挑选胚性颗粒用于遗传转化。

[0057] 农杆菌的培养

在转化平板上挑取单菌落在1ml农杆菌培养基中培养。在50ml农杆菌培养基(含相应抗生素)中加入1ml上述培养物,200rpm,28℃培养5-6hr至OD600为0.6-1.0,培养结束前2hr加入乙酰丁香酮(AS,终浓度100uM)。取上述菌液在室温下,4000rpm,10min,弃上清,加入MS液体培养基(含AS 100uM)重悬菌体,在与上相同的条件下培养2hr,使菌液的OD600=0.5-1,此时可用来转化愈伤组织。AS=acetosringone。

[0058] 共培养

将水稻胚性愈伤组织浸入农杆菌菌液20-30min,再用无菌吸水纸吸干水分,将侵染的愈伤组织置于共培养培养基(MS + 2,4-D 2.0 mg/L + AS 100 uM)上,28℃暗培养三天。

[0059] 洗菌

共培养的愈伤组织先用无菌水冲洗3遍,再浸泡在含Cef/CN 400 mg/L的MS液体培养基中20-30min后,将愈伤组织转入无菌滤纸上吸干。

[0060] 选择培养

将吸干水分的愈伤组织接种于选择培养基(MS + 2,4-D 2.0 mg/L + Hyg 30 mg/L + Cef 400 mg/L)上。3周后,挑选新长出的愈伤接种于选择培养基(MS + 2,4-D 2.0 mg/L + Hyg 50 mg/L + Cef 250 mg/L)上,再选择2周。

[0061] 分化培养

将经过2次选择得到的抗性愈伤组织转入到预分化培养基(N6 + KT 2.0 mg/L + NAA 0.2 mg/L + 6-BA 2.0 mg/L + Hyg 30 mg/L + Cef 200 mg/L + 琼脂 9g/L + 蔗糖45g/L)上暗培养10天左右,再转到分化培养基(N6 + KT 2.0 mg/L + NAA 0.2 mg/L + 6-BA 2.0 mg/L + Hyg 30 mg/L + 琼脂 4.5g/L + 蔗糖30 g/L)上光照培养。

[0062] 生根培养

约1-2个月,将2cm左右高的幼苗转到生根培养基(1/2MS + Hyg 15 mg/L + 琼脂 4.5g/L + 蔗糖20g/L)上诱导不定根的发生。

[0063] 转基因苗的移栽

当幼苗长至10cm高时,将幼苗取出,用无菌水洗净附着的固体培养基,移入泥土中,刚开始用玻璃罩罩几天,待植株健壮后再取下玻璃罩,温室中培养。

[0064] 实施例4:OsSNB基因在转基因植株中的表达分析

4.1材料准备

转基因T1代水稻种子发芽后,移植于液体培养基(自来水配制成1/5MS大量元素)。幼苗生长15 d后,剪取叶片快速投入液氮保存,用于RNA的抽提。

[0065] 无DNA的总RNA制备

按上海全式金生物技术有限公司提供的植物叶RNA小量抽提试剂盒使用说明书抽提。使用Beckman Coulter™ DU® 640紫外分光光度计测定RNA浓度。为除去残留在RNA中的DNA,

每个总RNA样品取5 μg ,加入1 μL DNAase I (美国Invitrogen公司) 和1 μL 10 $\times$ 反应缓冲液,补足体积至10 μL ,常温反应30 min,然后每管加入1 μL 2 mmol L⁻¹ EDTA终止反应,最后在70 $^{\circ}\text{C}$ 加热10 min使DNAase I失活。

[0066] 第一链cDNA的合成

将上述RNA样品各取2 μL ,按美国Promega公司反转录试剂盒提供的试剂依次添加4 μL 25 mmol L⁻¹ MgCl₂,2 μL 10 $\times$ RT 缓冲液,2 μL dNTP混和液和1 μL oligo(dT) 15,加水补足体积到18.5 μL ,在70 $^{\circ}\text{C}$ 加热变性10 min,快速在冰上冷却。然后加0.5 μL RNase inhibitor 和1 μL AMVRTase,在42 $^{\circ}\text{C}$ 水浴60 min,70 $^{\circ}\text{C}$ 下加热10 min终止反应。

[0067] 定量PCR

根据基因*OsSNB*的序列设计特异性引物QF: 5' - ctttgtgaacctcaggaagtag -3',QR: 5' - tcaggcgggtcgggggaagtag -3' 用于荧光定量PCR,根据水稻*Actin*基因(GenBank accession No. AY212324)的cDNA序列设计特异性引物AF: 5' -cttctctcatgccatcctgc-3',AR: 5' -gcaagcttctccttgatgtcc-3' 用于参照基因的荧光定量PCR。PCR使用美国ABI PRISM[®] 7000定量PCR仪,每一个PCR设置一次重复。反应体系包含SYBR Premix Ex Taq[™] (2 $\times$) 10 μL ,正反向引物各0.5 μL ,各种处理的cDNA模板1 μL ,加水补足体积至25 μL 。反应程序为:95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,然后在95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s,61 $^{\circ}\text{C}$ 34 s下循环40次,设定在每个循环中60 $^{\circ}\text{C}$ 34 s时读取荧光值,同时进行ROX值校正,最后添加荧光PCR产物融解曲线分析,其他操作详见仪器使用说明书。为了检测RNA样品中是否存在DNA的污染,随机选取3个样品,各取1 μL RNA作为模板进行PCR,方法同上。

[0068] 分析方法

Ct是通过7000 system SDS Version1.2.3软件在PCR的荧光域值通过手工确定为0.2后产生的,将数据输入到EXCEL进行计算分析。数据分析采用方法为 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$,然后利用EXCEL表作表达差异柱状图。

[0069] 分析结果

以空白非转基因日本晴品种为参照,分别检测了6个独立的转基因株系T1-T6,发现转基因株系均有较强的增强表达,其增强表达倍数在15-45倍以上(见图7),说明该基因导入到水稻后在叶片中得到明显的超表达,可应用于进一步的转基因水稻研究。

[0070] 实施例5:knSNB植株鉴定

将CRISPR/Cas9-sgRNA载体转化水稻所获得的转基因植株移栽,剪切20mg叶片,按照快捷型植物基因组DNA提取系统(Tiangen,China)提供的说明方法,提取叶片DNA,取1-2 μL DNA为模板,CasF:5' -gggagagcggttggttagta-3', CasR:5' -agaaataggagctcaccagg-3',经Taq酶(Tiangen,China)进行PCR扩增后,回收纯化PCR片段,提交公司测序,寻找位点纯合突变的单株。通过序列分析,发现在*OsSNB*基因翻译密码起始位点下游178的位置缺失序列tcgccgtctgcgg (见图8),该序列缺失导致蛋白翻译提前终止,使该基因功能缺失,形成功能敲除缺失突变植株knSNB。

[0071] 实施例6:*OsSNB*基因过表达转基因、突变植株和突变基因转基因植株种子大小分析

分别将所获得的转基因T1代植株*OsSNB*、knSNB、SNBm1和SNBm2在大田种植,到植株生长成熟时收获转基因T2代植株种子,对种子大小进行观察测量。

[0072] 将野生型水稻、超表达SNB和敲除knSNB种子放在一起进行拍照和统计,我们发现超表达SNB后使水稻种子明显变小,粒长和粒宽都明显变短,而敲除knSNB种子呈明显变大,尤其是粒长发生了显著变化(见图9)。

[0073] 将野生型水稻、超表达SNB和敲除knSNB种子放在一起进行拍照和统计,我们发现超表达SNBm1使种子变大,其主要贡献是粒长变长,但超表达SNBm2使种子变小(见图10)。

[0074] 综上所述,超表达野生型SNB基因和突变型SNBm2基因,使水稻种子变小,而敲除knSNB和超表达突变型SNBm1基因,使水稻种子变大。

[0075] 本发明的范围不受所述具体实施方案的限制,所述实施方案只作为阐明本发明各个方面的单个例子,本发明范围内还包括功能等同的方法和组分。实际上,除了本文所述的内容外,本领域技术人员参照上文的描述和附图可以容易地掌握对本发明的多种改进。所述改进也落入所附权利要求书的范围之内。上文提及的每篇参考文献皆全文列入本文作为参考。

序列表

<110> 上海市农业生物基因中心

<120> 水稻SNB基因及应用、调控籽粒大小的方法

<130> 2

<150> 201510786256.4

<151> 2015-11-16

<160> 7

<170> SIP0SequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 1311

<212> DNA

<213> Oryza sativa

<220>

<221> CDS

<222> (1) .. (1311)

<400> 1

```

atg gtg ctg gat ctc aat gtg gag tcg ccg ggt ggg tcg gcg gcg acg 48
Met Val Leu Asp Leu Asn Val Glu Ser Pro Gly Gly Ser Ala Ala Thr
1          5          10          15
tcg agc tcg tcc acg ccg ccg ccg ccg ccc gac ggt ggc ggc ggg ggg 96
Ser Ser Ser Ser Thr Pro Pro Pro Pro Pro Asp Gly Gly Gly Gly Gly
          20          25          30
tac ttc cgg ttc gac ctg ctc ggc ggg agc ccc gac gag gac ggg tgc 144
Tyr Phe Arg Phe Asp Leu Leu Gly Gly Ser Pro Asp Glu Asp Gly Cys
          35          40          45
tcc tcg cct gtc atg acg cgc cag ctc ttc cct tcg ccg tct gcg gtg 192
Ser Ser Pro Val Met Thr Arg Gln Leu Phe Pro Ser Pro Ser Ala Val
          50          55          60
gtg gcg ctg gcg ggg gac ggg tcg tcg acg cca ccg ctg acg atg ccg 240
Val Ala Leu Ala Gly Asp Gly Ser Ser Thr Pro Pro Leu Thr Met Pro
65          70          75          80
atg ccg gcg gcg gct ggg gag ggg ccg tgg ccg cgc cgc gcg gcg gat 288
Met Pro Ala Ala Ala Gly Glu Gly Pro Trp Pro Arg Arg Ala Ala Asp
          85          90          95
ctc ggg gtg gcg cag agc cag agg tcc ccc gcc ggc ggg aag aag agc 336
Leu Gly Val Ala Gln Ser Gln Arg Ser Pro Ala Gly Gly Lys Lys Ser
          100          105          110
cgc cgc ggc ccg agg tct cgg agc tcc cag tac agg ggc gtc acc ttc 384

```

Arg	Arg	Gly	Pro	Arg	Ser	Arg	Ser	Ser	Gln	Tyr	Arg	Gly	Val	Thr	Phe	
115							120					125				
tac	agg	agg	acc	ggg	cga	tgg	gag	tcg	cac	atc	tgg	gac	tgc	ggg	aag	432
Tyr	Arg	Arg	Thr	Gly	Arg	Trp	Glu	Ser	His	Ile	Trp	Asp	Cys	Gly	Lys	
130							135					140				
cag	gtg	tac	ctg	ggt	ggt	ttc	gat	aca	gct	cat	gcc	gca	gcg	agg	gcc	480
Gln	Val	Tyr	Leu	Gly	Gly	Phe	Asp	Thr	Ala	His	Ala	Ala	Ala	Arg	Ala	
145						150					155				160	
tat	gat	cgc	gcg	gcg	atc	aag	ttc	aga	ggc	ctc	gac	gcg	gat	atc	aac	528
Tyr	Asp	Arg	Ala	Ala	Ile	Lys	Phe	Arg	Gly	Leu	Asp	Ala	Asp	Ile	Asn	
				165					170					175		
ttt	aat	ctg	aat	gac	tat	gag	gac	gac	ttg	aag	cag	atg	cgc	aat	tgg	576
Phe	Asn	Leu	Asn	Asp	Tyr	Glu	Asp	Asp	Leu	Lys	Gln	Met	Arg	Asn	Trp	
				180					185					190		
acc	aag	gag	gag	ttt	gtg	cac	ata	ctt	cgg	cgc	caa	agc	aca	gga	ttt	624
Thr	Lys	Glu	Glu	Phe	Val	His	Ile	Leu	Arg	Arg	Gln	Ser	Thr	Gly	Phe	
				195					200					205		
gca	agg	ggg	agc	tca	aag	tac	cgg	ggt	gtg	aca	ctg	cac	aag	tgt	ggc	672
Ala	Arg	Gly	Ser	Ser	Lys	Tyr	Arg	Gly	Val	Thr	Leu	His	Lys	Cys	Gly	
				210					215					220		
cgg	tgg	gaa	gct	cgg	atg	ggc	cag	ctg	ctc	ggc	aag	aag	tac	atc	tat	720
Arg	Trp	Glu	Ala	Arg	Met	Gly	Gln	Leu	Leu	Gly	Lys	Lys	Tyr	Ile	Tyr	
225					230						235				240	
cta	gga	ttg	ttt	gac	agt	gaa	att	gag	gct	gca	aga	gca	tat	gac	cgg	768
Leu	Gly	Leu	Phe	Asp	Ser	Glu	Ile	Glu	Ala	Ala	Arg	Ala	Tyr	Asp	Arg	
				245							250				255	
gca	gct	atc	cgc	ttc	aat	gga	agg	gaa	gct	gtt	act	aat	ttt	gat	cct	816
Ala	Ala	Ile	Arg	Phe	Asn	Gly	Arg	Glu	Ala	Val	Thr	Asn	Phe	Asp	Pro	
				260							265				270	
agt	tct	tat	gat	gga	gat	gtt	cta	cct	gaa	acc	gac	aat	gaa	gtg	gtt	864
Ser	Ser	Tyr	Asp	Gly	Asp	Val	Leu	Pro	Glu	Thr	Asp	Asn	Glu	Val	Val	
				275							280				285	
gat	gga	gac	atc	att	gac	tta	aat	ctg	aga	att	tca	cag	cct	aac	gtt	912
Asp	Gly	Asp	Ile	Ile	Asp	Leu	Asn	Leu	Arg	Ile	Ser	Gln	Pro	Asn	Val	
				290										300		
cat	gag	ctg	aaa	agt	gat	ggt	acc	cta	act	ggg	ttc	cag	ttg	aat	tgt	960
His	Glu	Leu	Lys	Ser	Asp	Gly	Thr	Leu	Thr	Gly	Phe	Gln	Leu	Asn	Cys	
305						310					315				320	
gat	tct	cct	gaa	gct	tca	agt	tct	gtt	gtt	act	cag	cca	ata	agt	cct	1008

```

Asp Ser Pro Glu Ala Ser Ser Ser Val Val Thr Gln Pro Ile Ser Pro
      325                      330                      335
cag tgg cct gtg ctt cct cag ggc aca tcg atg tcc cag cat cca cat 1056
Gln Trp Pro Val Leu Pro Gln Gly Thr Ser Met Ser Gln His Pro His
      340                      345                      350
tta tat gca tct cct tgt ccg ggc ttc ttt gtg aac ctc agg gaa gta 1104
Leu Tyr Ala Ser Pro Cys Pro Gly Phe Phe Val Asn Leu Arg Glu Val
      355                      360                      365
cct atg gag aaa aga cct gag ttg ggt ccc cag tcg ttc cct act tcg 1152
Pro Met Glu Lys Arg Pro Glu Leu Gly Pro Gln Ser Phe Pro Thr Ser
      370                      375                      380
tgg tca tgg caa atg cag ggc tcc cct ttg cca tta ctc cct act gca 1200
Trp Ser Trp Gln Met Gln Gly Ser Pro Leu Pro Leu Leu Pro Thr Ala
      385                      390                      395                      400
gca tca tca gga ttc tct acg ggc acc gtc gcc gac gcc gcc cgc tcg 1248
Ala Ser Ser Gly Phe Ser Thr Gly Thr Val Ala Asp Ala Ala Arg Ser
      405                      410                      415
cct tcc tcc cgc ccc cat cca ttt ccc ggc cac cac cag ttc tac ttc 1296
Pro Ser Ser Arg Pro His Pro Phe Pro Gly His His Gln Phe Tyr Phe
      420                      425                      430
ccc ccg acc gcc tga
Pro Pro Thr Ala
      435
<210> 2
<211> 436
<212> PRT
<213> Oryza sativa
<400> 2
Met Val Leu Asp Leu Asn Val Glu Ser Pro Gly Gly Ser Ala Ala Thr
1          5          10          15
Ser Ser Ser Ser Thr Pro Pro Pro Pro Pro Asp Gly Gly Gly Gly Gly
      20          25          30
Tyr Phe Arg Phe Asp Leu Leu Gly Gly Ser Pro Asp Glu Asp Gly Cys
      35          40          45
Ser Ser Pro Val Met Thr Arg Gln Leu Phe Pro Ser Pro Ser Ala Val
      50          55          60
Val Ala Leu Ala Gly Asp Gly Ser Ser Thr Pro Pro Leu Thr Met Pro
65          70          75          80
Met Pro Ala Ala Ala Gly Glu Gly Pro Trp Pro Arg Arg Ala Ala Asp

```

			85					90					95				
Leu	Gly	Val	Ala	Gln	Ser	Gln	Arg	Ser	Pro	Ala	Gly	Gly	Lys	Lys	Ser		
			100					105					110				
Arg	Arg	Gly	Pro	Arg	Ser	Arg	Ser	Ser	Gln	Tyr	Arg	Gly	Val	Thr	Phe		
			115					120					125				
Tyr	Arg	Arg	Thr	Gly	Arg	Trp	Glu	Ser	His	Ile	Trp	Asp	Cys	Gly	Lys		
			130					135					140				
Gln	Val	Tyr	Leu	Gly	Gly	Phe	Asp	Thr	Ala	His	Ala	Ala	Ala	Arg	Ala		
145			150					155					160				
Tyr	Asp	Arg	Ala	Ala	Ile	Lys	Phe	Arg	Gly	Leu	Asp	Ala	Asp	Ile	Asn		
			165					170					175				
Phe	Asn	Leu	Asn	Asp	Tyr	Glu	Asp	Asp	Leu	Lys	Gln	Met	Arg	Asn	Trp		
			180					185					190				
Thr	Lys	Glu	Glu	Phe	Val	His	Ile	Leu	Arg	Arg	Gln	Ser	Thr	Gly	Phe		
			195					200					205				
Ala	Arg	Gly	Ser	Ser	Lys	Tyr	Arg	Gly	Val	Thr	Leu	His	Lys	Cys	Gly		
210			215					220									
Arg	Trp	Glu	Ala	Arg	Met	Gly	Gln	Leu	Leu	Gly	Lys	Lys	Tyr	Ile	Tyr		
225			230					235					240				
Leu	Gly	Leu	Phe	Asp	Ser	Glu	Ile	Glu	Ala	Ala	Arg	Ala	Tyr	Asp	Arg		
			245					250					255				
Ala	Ala	Ile	Arg	Phe	Asn	Gly	Arg	Glu	Ala	Val	Thr	Asn	Phe	Asp	Pro		
			260					265					270				
Ser	Ser	Tyr	Asp	Gly	Asp	Val	Leu	Pro	Glu	Thr	Asp	Asn	Glu	Val	Val		
			275					280					285				
Asp	Gly	Asp	Ile	Ile	Asp	Leu	Asn	Leu	Arg	Ile	Ser	Gln	Pro	Asn	Val		
290			295					300									
His	Glu	Leu	Lys	Ser	Asp	Gly	Thr	Leu	Thr	Gly	Phe	Gln	Leu	Asn	Cys		
305			310					315					320				
Asp	Ser	Pro	Glu	Ala	Ser	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Gln	Pro	Ile	Ser	Pro		
			325					330					335				
Gln	Trp	Pro	Val	Leu	Pro	Gln	Gly	Thr	Ser	Met	Ser	Gln	His	Pro	His		
			340					345					350				
Leu	Tyr	Ala	Ser	Pro	Cys	Pro	Gly	Phe	Phe	Val	Asn	Leu	Arg	Glu	Val		
355			360					365									
Pro	Met	Glu	Lys	Arg	Pro	Glu	Leu	Gly	Pro	Gln	Ser	Phe	Pro	Thr	Ser		
370			375					380									
Trp	Ser	Trp	Gln	Met	Gln	Gly	Ser	Pro	Leu	Pro	Leu	Leu	Pro	Thr	Ala		
385			390					395					400				

Ala Ser Ser Gly Phe Ser Thr Gly Thr Val Ala Asp Ala Ala Arg Ser
 405 410 415
 Pro Ser Ser Arg Pro His Pro Phe Pro Gly His His Gln Phe Tyr Phe
 420 425 430
 Pro Pro Thr Ala
 435
 <210> 3
 <211> 1311
 <212> DNA
 <213> Oryza sativa
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (1311)
 <400> 3
 atg gtg atg gat atc aat gtg gag tcg ccg ggt ggg tcg gcg gcg acg 48
 Met Val Met Asp Ile Asn Val Glu Ser Pro Gly Gly Ser Ala Ala Thr
 1 5 10 15
 tcg agc tcg tcc acg ccg ccg ccg ccg ccc gac ggt ggc ggc ggg ggg 96
 Ser Ser Ser Ser Thr Pro Pro Pro Pro Pro Asp Gly Gly Gly Gly Gly
 20 25 30
 tac ttc cgg ttc gac ctg ctc ggc ggg agc ccc gac gag gac ggg tgc 144
 Tyr Phe Arg Phe Asp Leu Leu Gly Gly Ser Pro Asp Glu Asp Gly Cys
 35 40 45
 tcc tcg cct gtc atg acg cgc cag ctc ttc cct tcg ccg tct gcg gtg 192
 Ser Ser Pro Val Met Thr Arg Gln Leu Phe Pro Ser Pro Ser Ala Val
 50 55 60
 gtg gcg ctg gcg ggg gac ggg tcg tcg acg cca ccg ctg acg atg ccg 240
 Val Ala Leu Ala Gly Asp Gly Ser Ser Thr Pro Pro Leu Thr Met Pro
 65 70 75 80
 atg ccg gcg gcg gct ggg gag ggg ccg tgg ccg cgc cgc gcg gcg gat 288
 Met Pro Ala Ala Ala Gly Glu Gly Pro Trp Pro Arg Arg Ala Ala Asp
 85 90 95
 ctc ggg gtg gcg cag agc cag agg tcc ccc gcc ggc ggg aag aag agc 336
 Leu Gly Val Ala Gln Ser Gln Arg Ser Pro Ala Gly Gly Lys Lys Ser
 100 105 110
 cgc cgc ggc ccg agg tct cgg agc tcc cag tac agg ggc gtc acc ttc 384
 Arg Arg Gly Pro Arg Ser Arg Ser Ser Gln Tyr Arg Gly Val Thr Phe
 115 120 125
 tac agg agg acc ggg cga tgg gag tcg cac atc tgg gac tgc ggg aag 432

Tyr Arg Arg Thr Gly Arg Trp Glu Ser His Ile Trp Asp Cys Gly Lys	
130	135 140
cag gtg tac ctg ggt ggt ttc gat aca gct cat gcc gca gcg agg gcc	480
Gln Val Tyr Leu Gly Gly Phe Asp Thr Ala His Ala Ala Ala Arg Ala	
145	150 155 160
tat gat cgc gcg gcg atc aag ttc aga ggc ctc gac gcg gat atc aac	528
Tyr Asp Arg Ala Ala Ile Lys Phe Arg Gly Leu Asp Ala Asp Ile Asn	
165	170 175
ttt aat ctg aat gac tat gag gac gac ttg aag cag atg cgc aat tgg	576
Phe Asn Leu Asn Asp Tyr Glu Asp Asp Leu Lys Gln Met Arg Asn Trp	
180	185 190
acc aag gag gag ttt gtg cac ata ctt cgg cgc caa agc aca gga ttt	624
Thr Lys Glu Glu Phe Val His Ile Leu Arg Arg Gln Ser Thr Gly Phe	
195	200 205
gca agg ggg agc tca aag tac cgg ggt gtg aca ctg cac aag tgt ggc	672
Ala Arg Gly Ser Ser Lys Tyr Arg Gly Val Thr Leu His Lys Cys Gly	
210	215 220
cgg tgg gaa gct cgg atg ggc cag ctg ctc ggc aag aag tac atc tat	720
Arg Trp Glu Ala Arg Met Gly Gln Leu Leu Gly Lys Lys Tyr Ile Tyr	
225	230 235 240
cta gga ttg ttt gac agt gaa att gag gct gca aga gca tat gac cgg	768
Leu Gly Leu Phe Asp Ser Glu Ile Glu Ala Ala Arg Ala Tyr Asp Arg	
245	250 255
gca gct atc cgc ttc aat gga agg gaa gct gtt act aat ttt gat cct	816
Ala Ala Ile Arg Phe Asn Gly Arg Glu Ala Val Thr Asn Phe Asp Pro	
260	265 270
agt tct tat gat gga gat gtt cta cct gaa acc gac aat gaa gtg gtt	864
Ser Ser Tyr Asp Gly Asp Val Leu Pro Glu Thr Asp Asn Glu Val Val	
275	280 285
gat gga gac atc att gac tta aat ctg aga att tca cag cct aac gtt	912
Asp Gly Asp Ile Ile Asp Leu Asn Leu Arg Ile Ser Gln Pro Asn Val	
290	295 300
cat gag ctg aaa agt gat ggt acc cta act ggg ttc cag ttg aat tgt	960
His Glu Leu Lys Ser Asp Gly Thr Leu Thr Gly Phe Gln Leu Asn Cys	
305	310 315 320
gat tct cct gaa gct tca agt tct gtt gtt act cag cca ata agt cct	1008
Asp Ser Pro Glu Ala Ser Ser Ser Val Val Thr Gln Pro Ile Ser Pro	
325	330 335
cag tgg cct gtg ctt cct cag ggc aca tcg atg tcc cag cat cca cat	1056

Gln Trp Pro Val Leu Pro Gln Gly Thr Ser Met Ser Gln His Pro His	
340	345 350
tta tat gca tct cct tgt ccg ggc ttc ttt gtg aac ctc agg gaa gta	1104
Leu Tyr Ala Ser Pro Cys Pro Gly Phe Phe Val Asn Leu Arg Glu Val	
355	360 365
cct atg gag aaa aga cct gag ttg ggt ccc cag tcg ttc cct act tcg	1152
Pro Met Glu Lys Arg Pro Glu Leu Gly Pro Gln Ser Phe Pro Thr Ser	
370	375 380
tgg tca tgg caa atg cag ggc tcc cct ttg cca tta ctc cct act gca	1200
Trp Ser Trp Gln Met Gln Gly Ser Pro Leu Pro Leu Leu Pro Thr Ala	
385	390 395 400
gca tca tca gga ttc tct acg ggc acc gtc gcc gac gcc gcc cgc tcg	1248
Ala Ser Ser Gly Phe Ser Thr Gly Thr Val Ala Asp Ala Ala Arg Ser	
405	410 415
cct tcc tcc cgc ccc cat cca ttt ccc ggc cac cac cag ttc tac ttc	1296
Pro Ser Ser Arg Pro His Pro Phe Pro Gly His His Gln Phe Tyr Phe	
420	425 430
ccc ccg acc gcc tga	1311
Pro Pro Thr Ala	
435	
<210> 4	
<211> 436	
<212> PRT	
<213> Oryza sativa	
<400> 4	
Met Val Met Asp Ile Asn Val Glu Ser Pro Gly Gly Ser Ala Ala Thr	
1	5 10 15
Ser Ser Ser Ser Thr Pro Pro Pro Pro Pro Asp Gly Gly Gly Gly Gly	
20	25 30
Tyr Phe Arg Phe Asp Leu Leu Gly Gly Ser Pro Asp Glu Asp Gly Cys	
35	40 45
Ser Ser Pro Val Met Thr Arg Gln Leu Phe Pro Ser Pro Ser Ala Val	
50	55 60
Val Ala Leu Ala Gly Asp Gly Ser Ser Thr Pro Pro Leu Thr Met Pro	
65	70 75 80
Met Pro Ala Ala Ala Gly Glu Gly Pro Trp Pro Arg Arg Ala Ala Asp	
85	90 95
Leu Gly Val Ala Gln Ser Gln Arg Ser Pro Ala Gly Gly Lys Lys Ser	
100	105 110

Arg	Arg	Gly	Pro	Arg	Ser	Arg	Ser	Ser	Gln	Tyr	Arg	Gly	Val	Thr	Phe
115				120				125							
Tyr	Arg	Arg	Thr	Gly	Arg	Trp	Glu	Ser	His	Ile	Trp	Asp	Cys	Gly	Lys
130				135				140							
Gln	Val	Tyr	Leu	Gly	Gly	Phe	Asp	Thr	Ala	His	Ala	Ala	Ala	Arg	Ala
145				150				155				160			
Tyr	Asp	Arg	Ala	Ala	Ile	Lys	Phe	Arg	Gly	Leu	Asp	Ala	Asp	Ile	Asn
				165				170				175			
Phe	Asn	Leu	Asn	Asp	Tyr	Glu	Asp	Asp	Leu	Lys	Gln	Met	Arg	Asn	Trp
				180				185				190			
Thr	Lys	Glu	Glu	Phe	Val	His	Ile	Leu	Arg	Arg	Gln	Ser	Thr	Gly	Phe
				195				200				205			
Ala	Arg	Gly	Ser	Ser	Lys	Tyr	Arg	Gly	Val	Thr	Leu	His	Lys	Cys	Gly
210				215				220							
Arg	Trp	Glu	Ala	Arg	Met	Gly	Gln	Leu	Leu	Gly	Lys	Lys	Tyr	Ile	Tyr
225				230				235				240			
Leu	Gly	Leu	Phe	Asp	Ser	Glu	Ile	Glu	Ala	Ala	Arg	Ala	Tyr	Asp	Arg
				245				250				255			
Ala	Ala	Ile	Arg	Phe	Asn	Gly	Arg	Glu	Ala	Val	Thr	Asn	Phe	Asp	Pro
				260				265				270			
Ser	Ser	Tyr	Asp	Gly	Asp	Val	Leu	Pro	Glu	Thr	Asp	Asn	Glu	Val	Val
275				280				285							
Asp	Gly	Asp	Ile	Ile	Asp	Leu	Asn	Leu	Arg	Ile	Ser	Gln	Pro	Asn	Val
290				295				300							
His	Glu	Leu	Lys	Ser	Asp	Gly	Thr	Leu	Thr	Gly	Phe	Gln	Leu	Asn	Cys
305				310				315				320			
Asp	Ser	Pro	Glu	Ala	Ser	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Gln	Pro	Ile	Ser	Pro
				325				330				335			
Gln	Trp	Pro	Val	Leu	Pro	Gln	Gly	Thr	Ser	Met	Ser	Gln	His	Pro	His
340				345				350							
Leu	Tyr	Ala	Ser	Pro	Cys	Pro	Gly	Phe	Phe	Val	Asn	Leu	Arg	Glu	Val
355				360				365							
Pro	Met	Glu	Lys	Arg	Pro	Glu	Leu	Gly	Pro	Gln	Ser	Phe	Pro	Thr	Ser
370				375				380							
Trp	Ser	Trp	Gln	Met	Gln	Gly	Ser	Pro	Leu	Pro	Leu	Leu	Pro	Thr	Ala
385				390				395				400			
Ala	Ser	Ser	Gly	Phe	Ser	Thr	Gly	Thr	Val	Ala	Asp	Ala	Ala	Arg	Ser
				405				410				415			
Pro	Ser	Ser	Arg	Pro	His	Pro	Phe	Pro	Gly	His	His	Gln	Phe	Tyr	Phe

420	425	430
Pro Pro Thr Ala		
435		
<210> 5		
<211> 1077		
<212> DNA		
<213> Oryza sativa		
<220>		
<221> CDS		
<222> (1) .. (1077)		
<400> 5		
atg ccg atg ccg gcg gcg gct ggg gag ggg ccg tgg ccg cgc cgc gcg	48	
Met Pro Met Pro Ala Ala Ala Gly Glu Gly Pro Trp Pro Arg Arg Ala		
1 5 10 15		
gcg gat ctc ggg gtg gcg cag agc cag agg tcc ccc gcc ggc ggg aag	96	
Ala Asp Leu Gly Val Ala Gln Ser Gln Arg Ser Pro Ala Gly Gly Lys		
20 25 30		
aag agc cgc cgc ggc ccg agg tct cgg agc tcc cag tac agg ggc gtc	144	
Lys Ser Arg Arg Gly Pro Arg Ser Arg Ser Ser Gln Tyr Arg Gly Val		
35 40 45		
acc ttc tac agg agg acc ggg cga tgg gag tcg cac atc tgg gac tgc	192	
Thr Phe Tyr Arg Arg Thr Gly Arg Trp Glu Ser His Ile Trp Asp Cys		
50 55 60		
ggg aag cag gtg tac ctg ggt ggt ttc gat aca gct cat gcc gca gcg	240	
Gly Lys Gln Val Tyr Leu Gly Gly Phe Asp Thr Ala His Ala Ala Ala		
65 70 75 80		
agg gcc tat gat cgc gcg gcg atc aag ttc aga ggc ctc gac gcg gat	288	
Arg Ala Tyr Asp Arg Ala Ala Ile Lys Phe Arg Gly Leu Asp Ala Asp		
85 90 95		
atc aac ttt aat ctg aat gac tat gag gac gac ttg aag cag atg cgc	336	
Ile Asn Phe Asn Leu Asn Asp Tyr Glu Asp Asp Leu Lys Gln Met Arg		
100 105 110		
aat tgg acc aag gag gag ttt gtg cac ata ctt cgg cgc caa agc aca	384	
Asn Trp Thr Lys Glu Glu Phe Val His Ile Leu Arg Arg Gln Ser Thr		
115 120 125		
gga ttt gca agg ggg agc tca aag tac cgg ggt gtg aca ctg cac aag	432	
Gly Phe Ala Arg Gly Ser Ser Lys Tyr Arg Gly Val Thr Leu His Lys		
130 135 140		
tgt ggc cgg tgg gaa gct cgg atg ggc cag ctg ctc ggc aag aag tac	480	

Cys Gly Arg Trp Glu Ala Arg Met Gly Gln Leu Leu Gly Lys Lys Tyr	
145	150 155 160
atc tat cta gga ttg ttt gac agt gaa att gag gct gca aga gca tat	528
Ile Tyr Leu Gly Leu Phe Asp Ser Glu Ile Glu Ala Ala Arg Ala Tyr	
165	170 175
gac cgg gca gct atc cgc ttc aat gga agg gaa gct gtt act aat ttt	576
Asp Arg Ala Ala Ile Arg Phe Asn Gly Arg Glu Ala Val Thr Asn Phe	
180	185 190
gat cct agt tct tat gat gga gat gtt cta cct gaa acc gac aat gaa	624
Asp Pro Ser Ser Tyr Asp Gly Asp Val Leu Pro Glu Thr Asp Asn Glu	
195	200 205
gtg gtt gat gga gac atc att gac tta aat ctg aga att tca cag cct	672
Val Val Asp Gly Asp Ile Ile Asp Leu Asn Leu Arg Ile Ser Gln Pro	
210	215 220
aac gtt cat gag ctg aaa agt gat ggt acc cta act ggg ttc cag ttg	720
Asn Val His Glu Leu Lys Ser Asp Gly Thr Leu Thr Gly Phe Gln Leu	
225	230 235 240
aat tgt gat tct cct gaa gct tca agt tct gtt gtt act cag cca ata	768
Asn Cys Asp Ser Pro Glu Ala Ser Ser Ser Val Val Thr Gln Pro Ile	
245	250 255
agt cct cag tgg cct gtg ctt cct cag ggc aca tcg atg tcc cag cat	816
Ser Pro Gln Trp Pro Val Leu Pro Gln Gly Thr Ser Met Ser Gln His	
260	265 270
cca cat tta tat gca tct cct tgt ccg ggc ttc ttt gtg aac ctc agg	864
Pro His Leu Tyr Ala Ser Pro Cys Pro Gly Phe Phe Val Asn Leu Arg	
275	280 285
gaa gta cct atg gag aaa aga cct gag ttg ggt ccc cag tcg ttc cct	912
Glu Val Pro Met Glu Lys Arg Pro Glu Leu Gly Pro Gln Ser Phe Pro	
290	295 300
act tcg tgg tca tgg caa atg cag ggc tcc cct ttg cca tta ctc cct	960
Thr Ser Trp Ser Trp Gln Met Gln Gly Ser Pro Leu Pro Leu Leu Pro	
305	310 315 320
act gca gca tca tca gga ttc tct acg ggc acc gtc gcc gac gcc gcc	1008
Thr Ala Ala Ser Ser Gly Phe Ser Thr Gly Thr Val Ala Asp Ala Ala	
325	330 335
cgc tcg cct tcc tcc cgc ccc cat cca ttt ccc ggc cac cac cag ttc	1056
Arg Ser Pro Ser Ser Arg Pro His Pro Phe Pro Gly His His Gln Phe	
340	345 350
tac ttc ccc ccg acc gcc tga	1077

Tyr Phe Pro Pro Thr Ala

355

<210> 6

<211> 358

<212> PRT

<213> Oryza sativa

<400> 6

Met Pro Met Pro Ala Ala Ala Gly Glu Gly Pro Trp Pro Arg Arg Ala

1 5 10 15

Ala Asp Leu Gly Val Ala Gln Ser Gln Arg Ser Pro Ala Gly Gly Lys

20 25 30

Lys Ser Arg Arg Gly Pro Arg Ser Arg Ser Ser Gln Tyr Arg Gly Val

35 40 45

Thr Phe Tyr Arg Arg Thr Gly Arg Trp Glu Ser His Ile Trp Asp Cys

50 55 60

Gly Lys Gln Val Tyr Leu Gly Gly Phe Asp Thr Ala His Ala Ala Ala

65 70 75 80

Arg Ala Tyr Asp Arg Ala Ala Ile Lys Phe Arg Gly Leu Asp Ala Asp

85 90 95

Ile Asn Phe Asn Leu Asn Asp Tyr Glu Asp Asp Leu Lys Gln Met Arg

100 105 110

Asn Trp Thr Lys Glu Glu Phe Val His Ile Leu Arg Arg Gln Ser Thr

115 120 125

Gly Phe Ala Arg Gly Ser Ser Lys Tyr Arg Gly Val Thr Leu His Lys

130 135 140

Cys Gly Arg Trp Glu Ala Arg Met Gly Gln Leu Leu Gly Lys Lys Tyr

145 150 155 160

Ile Tyr Leu Gly Leu Phe Asp Ser Glu Ile Glu Ala Ala Arg Ala Tyr

165 170 175

Asp Arg Ala Ala Ile Arg Phe Asn Gly Arg Glu Ala Val Thr Asn Phe

180 185 190

Asp Pro Ser Ser Tyr Asp Gly Asp Val Leu Pro Glu Thr Asp Asn Glu

195 200 205

Val Val Asp Gly Asp Ile Ile Asp Leu Asn Leu Arg Ile Ser Gln Pro

210 215 220

Asn Val His Glu Leu Lys Ser Asp Gly Thr Leu Thr Gly Phe Gln Leu

225 230 235 240

Asn Cys Asp Ser Pro Glu Ala Ser Ser Ser Val Val Thr Gln Pro Ile

245 250 255

Ser Pro Gln Trp Pro Val Leu Pro Gln Gly Thr Ser Met Ser Gln His
 260 265 270
 Pro His Leu Tyr Ala Ser Pro Cys Pro Gly Phe Phe Val Asn Leu Arg
 275 280 285
 Glu Val Pro Met Glu Lys Arg Pro Glu Leu Gly Pro Gln Ser Phe Pro
 290 295 300
 Thr Ser Trp Ser Trp Gln Met Gln Gly Ser Pro Leu Pro Leu Leu Pro
 305 310 315 320
 Thr Ala Ala Ser Ser Gly Phe Ser Thr Gly Thr Val Ala Asp Ala Ala
 325 330 335
 Arg Ser Pro Ser Ser Arg Pro His Pro Phe Pro Gly His His Gln Phe
 340 345 350
 Tyr Phe Pro Pro Thr Ala
 355

<210> 7

<211> 406

<212> DNA

<213> Oryza sativa

<220>

<221> mutation

<222> (1) .. (406)

<400> 7

atgggtgctgg atctcaatgt ggagtcgccg ggtgggtcgg cggcgacgtc gagctcgtcc 60
 acgccgccgc cgccgcccga cgggtggcggc ggggggtact tccggttcga cctgctcggc 120
 gggagccccg acgaggacgg gtgctcctcg cctgtcatga cgcgccagct cttcccttgg 180
 tggcgctggc gggggacggg tcgtcgacgc caccgctgac gatgccgatg ccggcggcgg 240
 ctggggaggg gccgtggccg cgccgcgcgg cggatctcgg ggtggcgcag agccagaggt 300
 cccccgccgg cgggaagaag agccgccgcg gcccaggtc tcggagctcc cagtacaggg 360
 gcgtcacctt ctacaggagg accgggcgat gggagtcgca catctg 406



图1

OsSNB ATGGTG**C**TGGAT**C**TCAATGTGGAGTCG
 M V L D L N V E S
 SNBm1 ATGGTG**A**TGGAT**A**TCAATGTGGAGTCG
 M V M D I N V E S

图2

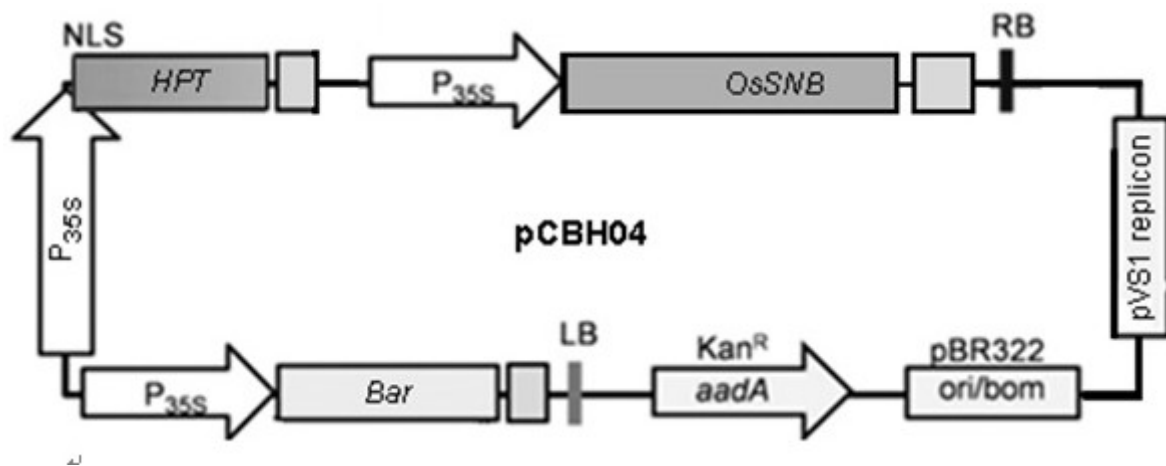


图3

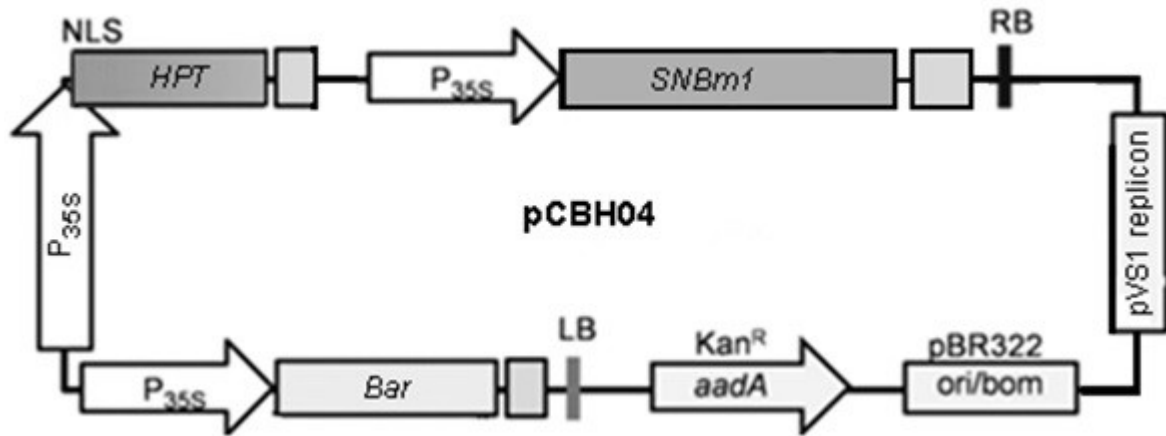


图4

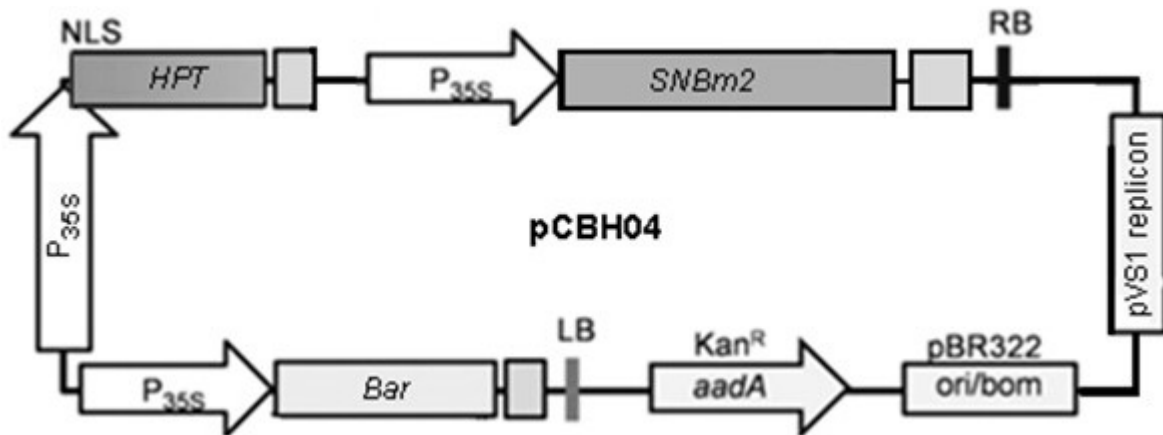


图5

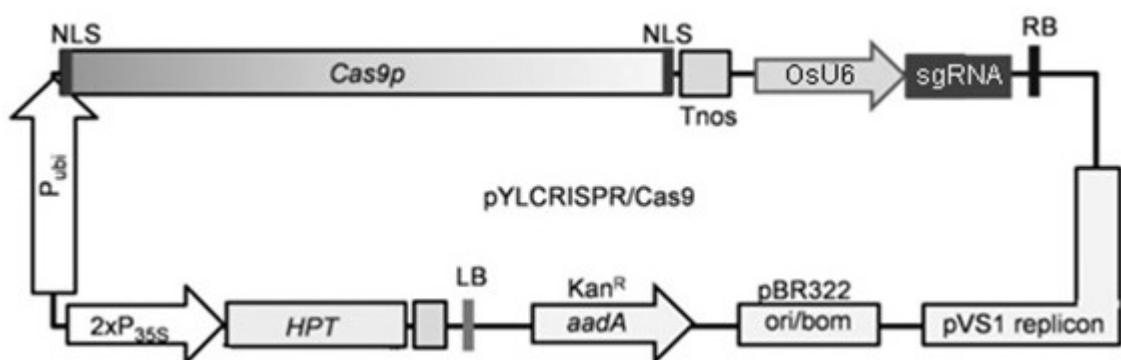


图6

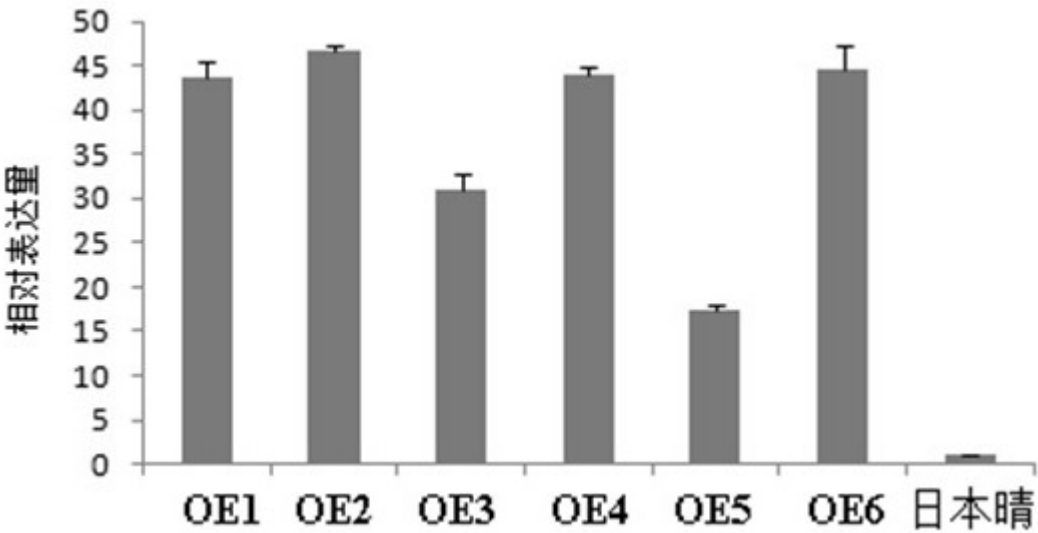


图7

+

	2417	2420	2430	2440	2450	2460	2470	2480
OsSNB	2417	GCCTGTCATGACGCGCCAGCTCTTCCCTTCGCCGTCTGCGGTGGTGGCGCTGGCGGGGGACGGGTCGTCGA						
knSNB	150	GCCTGTCATGACGCGCCAGCTCTTCCCT-----TGGTGGCGCTGGCGGGGGACGGGTCGTCGA						

图8

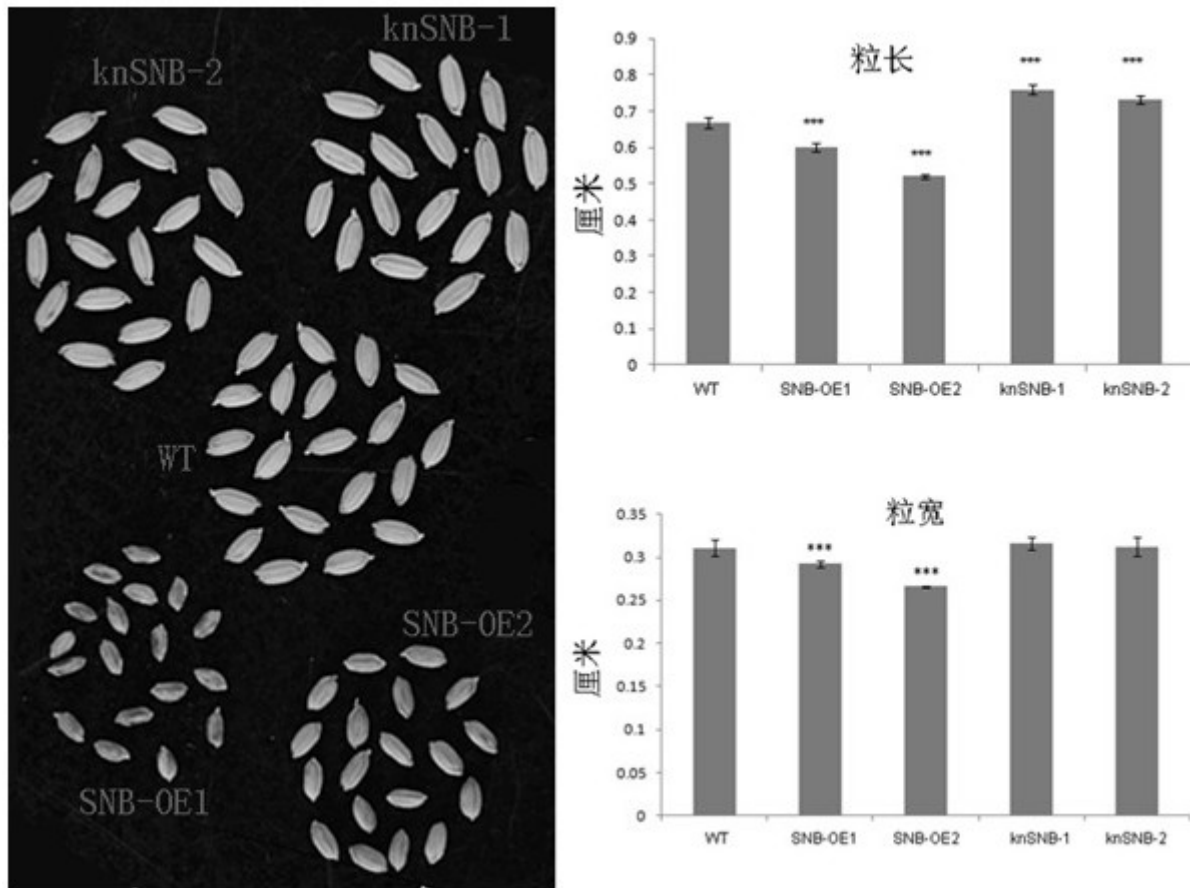


图9

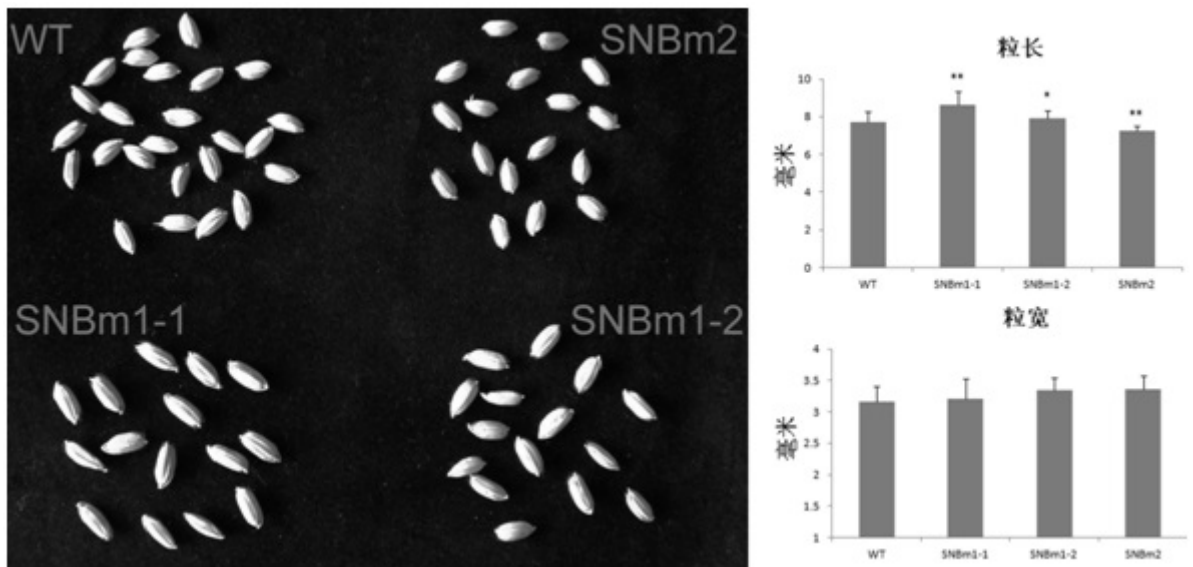


图10