



# (12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 118421663 B

(45) 授权公告日 2025. 02. 18

(21) 申请号 202410657115.1

C12N 15/82 (2006.01)

(22) 申请日 2024.05.25

C12N 1/21 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

C12Q 1/18 (2006.01)

申请公布号 CN 118421663 A

C12N 15/62 (2006.01)

(43) 申请公布日 2024.08.02

A01H 6/82 (2018.01)

(73) 专利权人 沈阳农业大学

A01H 5/00 (2018.01)

地址 110866 辽宁省沈阳市沈河区东陵路  
120号

C12R 1/01 (2006.01)

(72) 发明人 王志平 骆佳欣 王新蕊 赵彬

曹可心 孙思雨

### (56) 对比文件

Ahmed Mahas等.CRISPR-Cas13d mediates robust RNA virus interference in plants.Genome Biology.2019,第3页左栏第2段至右栏第1段,第5页右栏第2段,图1-3,.

(74) 专利代理机构 北京睿智保诚专利代理事务所(普通合伙) 11732

白亚琳等.基于CRISPR-CasRx 的RNA 病毒编辑体系构建”,白亚琳等,分子植物育种,第1-13页.分子植物育种.2024,摘要,1 结果与分析部分,图1-2.

专利代理师 张宁

审查员 陈佩

(51) Int. Cl.

C12N 15/55 (2006.01)

C12N 9/22 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

权利要求书1页 说明书19页

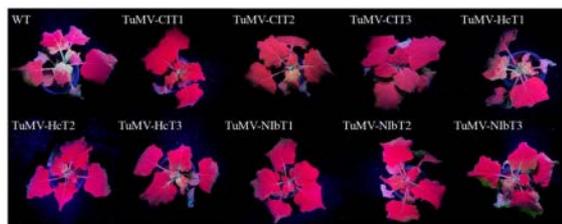
序列表(电子公布) 附图4页

### (54) 发明名称

一种干扰植物病毒的CasRx及其制备方法、重组表达载体、重组菌

### (57) 摘要

本发明涉及植物抗病毒育种技术领域,尤其涉及一种干扰植物病毒的CasRx及其制备方法、重组表达载体、重组菌。本发明提供了一种干扰植物病毒的CasRx,编辑所述CasRx的核苷酸序列如SEQ ID NO:1所示;其是将修饰后的zmCasRx序列和修饰后的ntCasRx序列通过连接肽融合得到的;本发明还提供了一种基于CasRx的植物抗病毒crRNA高效靶点序列的筛选方法,这种依赖于CasRx转基因本生烟的供试靶点瞬时表达评估过程,大大降低了因靶点无效或低效导致的育种风险,加快了植物抗病毒育种进程。



1. 一种基于CasRx的植物抗病毒crRNA的靶点序列的筛选方法,其特征在于,包括如下步骤:

(1) 将检测靶点的表达序列整合入crRNA表达载体中,得到靶点载体;

(2) 将所述的靶点载体转化至宿主菌,收集OD值为0.4~0.6的菌液,得到待接种液;

(3) 将所述的待接种液注射至转基因烟中,得到含有靶点的转基因烟;

(4) 在所述含有靶点的转基因烟中接种目标病毒,观察接种目标病毒的转基因烟的病毒病症状的强弱和测定病毒含量,筛选对目标病毒干扰效率高的靶点作为靶点序列;

所述转基因烟的构建方法,包括如下步骤:将重组菌转化到本生烟中,筛选阳性株,得到转基因烟;

所述重组菌包括编辑CasRx的核苷酸序列以及空载菌;

所述空载菌为农杆菌;

所述编辑CasRx的核苷酸序列如SEQ ID NO:1所示;

所述CasRx的制备方法包括如下步骤:将修饰后的zmCasRx序列和修饰后的ntCasRx序列通过连接肽融合得到的;

所述zmCasRx序列的修饰方法为:在zmCasRx序列两端融合定位肽,N端融合标签蛋白,得到修饰后的zmCasRx序列;

所述zmCasRx序列如SEQ ID NO:2所示;

所述定位肽为NLS;所述标签为Flag标签;

所述定位肽NLS的序列如SEQ ID NO:3所示;所述标签Flag的序列如SEQ ID NO:4所示;

所述ntCasRx序列的修饰方法为:在ntCasRx序列两端融合定位肽,C端融合标签蛋白,得到修饰后的ntCasRx序列;

所述ntCasRx序列如SEQ ID NO:5所示;

所述定位肽为NES;所述标签为HA标签;

所述定位肽NES的序列如SEQ ID NO:6所示;所述标签HA的序列如SEQ ID NO:7所示;

所述连接肽为2A连接肽。

2. 根据权利要求1所述的筛选方法,其特征在于,所述检测靶点的表达序列包括spacer序列和检测靶点的反向互补序列;

所述spacer序列如SEQ ID NO:8所示;

所述检测靶点为病毒外壳蛋白基因或病毒功能基因区域内5'端富含U的22~30nt的序列,U的连续数量 $\geq 4$ ;

所述crRNA表达载体的构建方法如下:以基因编辑载体为骨架,删除基因编辑载体上的Cas9表达盒和sgRNA表达盒中的sgRNA-scaffold,保留AtU6-26启动子和AtU6-29终止子,得到crRNA表达载体。

3. 权利要求1或2所述的筛选方法在筛选植物抗病毒crRNA的靶点中的应用。

## 一种干扰植物病毒的CasRx及其制备方法、重组表达载体、重组菌

### 技术领域

[0001] 本发明涉及植物抗病毒育种技术领域,尤其涉及一种干扰植物病毒的CasRx及其制备方法、重组表达载体、重组菌。

### 背景技术

[0002] 植物病毒利用宿主细胞器进行复制和传播,因其种类多、繁殖快、传播途径广,加上缺少有效的防治药剂和措施,素有“植物癌症”之称。尽管在与病原物的长期互作过程中,植物进化出了固有免疫和适应性免疫机制来进行防御,但是,大多数病毒仍可以消减或逃避宿主的防御机制,对宿主细胞造成不可逆的损害。相比于动、植物等真核生物,细菌和古细菌在对噬菌体等病毒的防御上却拥有更为“先进”的武器,如经典的“限制-修饰(restriction-modification)”系统和“成簇的规律间隔短回文序列(clustered regularly-interspaced short palindromic repeat, CRISPR)及相关蛋白(CRISPR associated proteins, Cas)”系统。而后者CRISPR/Cas系统是一种更为精巧、特异的获得性免疫系统。细菌利用Cas核酸酶和CRISPR序列簇迅速检测到入侵的外来核酸并进行特异性地靶向切割。其特异性就在于这些原核生物能够捕获噬菌体基因组上的短基序,再以间隔序列的形式整合进自身的CRISPR序列簇中作为对外来入侵者的遗传记忆,从而对曾经感染过的噬菌体等外源核酸形成获得性免疫。因此,若将细菌的这种精妙的病毒免疫机制“移植”到植物中,将很大程度上提升植物的病毒抗性,从而以较低成本减小病毒对农作物造成的经济损失。利用原核生物的病毒防御机制开发真核生物抗病毒免疫系统也是目前许多研究者着力突破的方向。

[0003] 目前已有一些研究利用该策略进行了针对特定病毒的育种改良尝试。在具体操作上需要RNA靶向的CRISPR/Cas13系统稳定转化作物,获得转基因植株来保证在作物的整个生长周期内随时抵御入侵的病毒。而稳定的遗传转化往往需要大量的人力、物力和时间成本来实现,因此高效的病毒靶点对于作物的抗病毒育种成败就变得至关重要。靶点的高效与否与靶点自身的属性(如二级结构特征等)相关,也与病毒基因组结构、所选的致病基因等因素有关。近几年,已有利用RNA靶向的Cas13家族核酸酶在动、植物体内进行抗病毒干扰的研究报道,但这些工作在具体的crRNA靶点选取上,大多存在一定的随机性。高效的靶点对于特定病毒的有效防御至关重要,尤其利用Cas13对于植物进行抗病毒育种改良时,依赖于转基因技术将CRISPR/Cas13系统稳定地整合进植物基因组,这样就要求在靶点选择上务必谨慎,否则将会浪费大量的人工和时间成本。因此建立一套快速评估靶点效能的筛选系统是非常亟需和必要的。

### 发明内容

[0004] 本发明的目的在于提供一种干扰植物病毒的CasRx及其制备方法、重组表达载体、重组菌,还提供了一种基于CasRx的植物抗病毒crRNA高效靶点序列的筛选方法,这种依赖

于CasRx转基因本生烟的供试靶点瞬时表达评估过程,大大降低了因靶点无效或低效导致的育种风险,加快了植物抗病毒育种进程。

[0005] 为了实现上述发明目的,本发明提供以下技术方案:

[0006] 本发明提供了一种干扰植物病毒的CasRx,编辑所述CasRx的核苷酸序列如SEQ ID NO:1所示。

[0007] 本发明还提供了所述的CasRx的制备方法,包括如下步骤:将修饰后的zmCasRx序列和修饰后的ntCasRx序列通过连接肽融合得到的;

[0008] 所述zmCasRx序列的修饰方法为:在zmCasRx序列两端融合定位肽,N端融合标签蛋白,得到修饰后的zmCasRx序列;

[0009] 所述zmCasRx序列如SEQ ID NO:2所示;

[0010] 所述定位肽为NLS;所述标签为Flag标签;

[0011] 所述定位肽NLS的序列如SEQ ID NO:3所示;所述标签Flag的序列如SEQ ID NO:4所示;

[0012] 所述ntCasRx序列的修饰方法为:在ntCasRx序列两端融合定位肽,C端融合标签蛋白,得到修饰后的ntCasRx序列;

[0013] 所述ntCasRx序列如SEQ ID NO:5所示;

[0014] 所述定位肽为NES;所述标签为HA标签;

[0015] 所述定位肽NES的序列如SEQ ID NO:6所示;所述标签HA的序列如SEQ ID NO:7所示;

[0016] 所述连接肽为2A连接肽。

[0017] 本发明还提供了一种重组表达载体,包括编辑所述的CasRx的核苷酸序列以及空载体;

[0018] 所述空载体为pSuper1300。

[0019] 本发明还提供了一种重组菌,包括编辑所述的CasRx的核苷酸序列以及空载菌;

[0020] 所述空载菌为农杆菌。

[0021] 在本发明中,所述农杆菌为农杆菌LBA4404。

[0022] 本发明还提供了所述的CasRx、所述的重组表达载体或所述的重组菌在构建用于筛选植物抗病毒crRNA高效靶点的转基因本生烟中的应用。

[0023] 本发明还提供了一种用于筛选植物抗病毒crRNA高效靶点的转基因本生烟的构建方法,包括如下步骤:将所述的CasRx、所述的重组表达载体或所述的重组菌转化到本生烟中,筛选阳性株,得到转基因本生烟。

[0024] 本发明还提供了所述构建方法构建得到的转基因本生烟在筛选植物抗病毒crRNA高效靶点中的应用。

[0025] 本发明还提供了一种基于CasRx的植物抗病毒crRNA高效靶点序列的筛选方法,包括如下步骤:

[0026] (1) 将检测靶点的表达序列整合入crRNA表达载体中,得到靶点载体;

[0027] (2) 将所述的靶点载体转化至宿主菌,收集OD值为0.4~0.6的菌液,得到待接种液;

[0028] (3) 将所述的待接种液注射至转基因本生烟中,得到含有靶点的转基因烟;

[0029] (4) 在所述含有靶点的转基因本生烟中接种目标病毒,观察接种目标病毒的转基因本生烟的病毒病症状的强弱和测定病毒含量,筛选对目标病毒干扰效率高的靶点作为靶点序列;

[0030] 步骤(3)中,所述转基因本生烟为所述构建方法构建得到的转基因本生烟。

[0031] 作为优选,所述检测靶点的表达序列包括spacer序列和检测靶点的反向互补序列;

[0032] 所述spacer序列如SEQ ID NO:8所示;

[0033] 所述检测靶点为病毒外壳蛋白基因或病毒功能基因区域内5'端富含U的22或30nt的序列,U的连续数量 $\geq 4$ ;

[0034] 所述crRNA表达载体的构建方法如下:以基因编辑载体为骨架,删除基因编辑载体上的Cas9表达盒和sgRNA表达盒中的sgRNA-scaffold,保留AtU6-26启动子和AtU6-29终止子,得到pAtU6-crRNA表达载体,所述pAtU6-crRNA表达载体的序列SEQ ID NO:9所示。

[0035] 本发明还提供了所述的筛选方法在筛选植物抗病毒crRNA的靶点中的应用。

[0036] 本发明的有益效果:

[0037] 本发明构建了的适用植物病毒的靶点筛选方法,即通过创制不同亚细胞定位的CasRx转基因本生烟、合成供试靶点序列、构建靶点载体、对CasRx转基因本生烟注射靶点载体、接种目标病毒、系统发病后症状和病毒粒子含量比较等一系列环节,即可在短时间内获得高效靶点信息。这种依赖于CasRx转基因本生烟的供试靶点瞬时表达评估过程,大大降低了因靶点无效或低效导致的育种风险,加快了植物抗病毒育种进程。

## 附图说明

[0038] 图1为植物病毒的靶点筛选方法,其中A为修饰后的zmCasRx序列,B为修饰后的ntCasRx序列,C为biCasRx序列,D为pAtU6-crRNA表达载体,E为携带BsaI酶切位点的残余碱基的正反引物退火后得到的crRNADNA双链表达序列,F为待接种液和病毒侵染性克隆的注射范围,a为待接种液的注射范围,b为病毒侵染性克隆的注射范围;

[0039] 图2为二元表达载体pSuper-biCasRx的质粒图谱;

[0040] 图3为实施例2中9个靶点病毒干扰效率的系统发病症状比较;

[0041] 图4为实施例2中9个靶点对TuMV的干扰效率比较的qRT-PCR病毒含量检测结果;

[0042] 图5为实施例2中9个靶点对TuMV的干扰效率比较的病毒含量Western-blot检测结果;

[0043] 图6为实施例3中4个靶点对PVY的干扰效率比较的qRT-PCR病毒含量检测结果;

[0044] 图7为实施例3中4靶点对PVY病毒干扰效率比较的系统发病症状比较。

## 具体实施方式

[0045] 本发明提供了一种干扰植物病毒的CasRx,编辑所述CasRx的核苷酸序列如SEQ ID NO:1:ATGGATTACAAGGACCACGACGGGGATTACAAGGACCACGACATTGATTACAAGGATGATGATGACAAGCGGCCGCTCCCAAGAAGAAGAGAAAGGTGATAGAAAAAAGAAGAGCTTCGCTAAGGGGATGGGGTTAAGTCGACGCTAGTTAGCGGCTCCAAGGTGTACATGACCACCTTTGCTGAGGGCAGTGATGCGAGGCTGGAGAAGATCGTGGAAGGAGATAGTATCCGTTCTGTTAATGAAGGAGAGGCATTCTCTGCTGAGATGGCCGATAAAAACGCGGGGTATAAAAT

AGGTAATGCCAAATTTTCTCATCCAAAGGGATATGCCGTGGTCGCGAACAACCCCTTGTACACGGGGCCTGTACAA  
CAGGACATGCTCGGGCTTAAAGAGACATTGGAGAAGAGGTACTTCGGGGAATCAGCAGACGGAAATGATAACATCT  
GCATTCAGGTTATCCATAATATCTTGATATAGAAAAATCTTAGCCGAATATATCACCAATGCCCGTATGCTGT  
TAACAATATCAGCGGGCTTGATAAGGATATTATCGGTTTTGGTAAATTCAGCACGGTGTACACCTATGACGAGTTC  
AAAGATCCAGAGCACCACCGGGCGGCTTCAACAACAATGACAACTGATCAATGCCATTAAGGCCAATACGACG  
AATTCGACAACCTTCTCGACAATCCACGGCTAGGGTATTTTGGACAGGCGTCTTCTCAAAAAGAGGGGAGGAATTA  
TATAATAAACTATGGTAATGAGTGCTACGACATTCTAGCTCTTCTGTCCGGTCTGCGACACTGGGTGGTGCACAAC  
AACGAGGAGGAAAAGTCGCATCTCACGGACGTGGCTCTACAATCTGGATAAGAACTTAGACAACGAATATATCTCCA  
CACTCAACTACTTATATGACAGAATTACCAACGAGCTGACAAATTCCTTTTCGAAAAATAGTGCTGCCAACGTCAA  
CTACATCGCCGAGACTCTTGGGATCAACCCTGCAGAATTCGCGGAGCAGTACTTTCGCTTTTCCATTATGAAGGAA  
CAAAAAGAACTTGGGTTTCAATATTACTAAGCTGAGGGAGGTGATGCTGGACCGCAAGGATATGTCCGAGATCAGGA  
AGAACCACAAGGTATTTGATTCTATTAGAACCAAAGTCTACACAATGATGGATTTTCGTGATCTACAGGTATTATAT  
TGAAGAGGATGCCAAGGTGGCAGCAGCAACAAGTCCCTGCCGACAATGAAAAGTCGCTCTCGGAGAAGGACATC  
TTCGTGATCAATCTTCGCGGCAGCTTTAACGACGATCAGAAAGATGCTTTGTATTATGATGAAGCAAATAGAATTT  
GGAGAAAGTTAGAGAACATTATGCATAACATAAAAAGAATTCGGTGGCAACAAAACCAGGGAGTACAAAAAAGGA  
CGCGCCGCGCTTACCGAGAATCCTACCGGCAGGCAGAGACGTCTCTGCTTTTTCTAAACTCATGTACGCGCTGACC  
ATGTTCTTGACGGCAAGGAGATAAATGACCTGCTCACAACCTCTGATTAACAAGTTTGATAATATTCAAAGTTTCC  
TGAAGGTCATGCCTCTGATTGGAGTGAATGCCAAATTTGTTGAAGAATACGCCTTCTTAAAGACTCCGCGAAGAT  
TGCTGATGAGTTGCGTCTCATAAAGAGCTTGCACGAATGGGGGAGCCATAGCTGACGCCGACGAGCCATGTAT  
ATTGACGCCATAAGGATCCTAGGTACGAACCTCTCTATGATGAGCTTAAGGCCCTCGCCGACACGTTTCAGCCTCG  
ATGAAAATGGTAACAAGCTCAAGAAGGGAAAGCATGGAATGCGGAACTTCATCATAATAATGTTATATCAAATAA  
GCGCTTCCATTACTTGATCCGCTACGGCGATCCAGCGCACTTGCATGAAATTGCTAAAAATGAAGCGGTCGTGAAG  
TTTGTGCTCGGCAGGATCGCTGACATCCAGAAGAAGCAGGGCCAGAACGGCAAGAATCAAATCGATAGATACTACG  
AAACATGTATTGGCAAAGACAAAGGTAAGAGCGTATCAGAAAAAGTCGATGCGCTGACCAAAATCATCACTGGCAT  
GAATTACGACCAGTTCGACAAGAAGCGAAGCGTCATCGAGGACACCGGCCGCGAAAACGCTGAAAGGGAGAAGTTC  
AAGAAGATTATTTGCTTTATCTGACTGTAATCTACCATATACTCAAGAATATCGTCAATATAAATGCGCGTTACG  
TCATTGGTTTCCACTGTGTAGAGAGGGATGCGCAGCTCTACAAGGAGAAGGGTTACGATATCAATCTCAAGAACT  
TGAGGAGAAAGGCTTCTCATCCGTCACTAAGCTCTGCGCCGGCATTGACGAGACTGCACCTGATAAAAGAAAGGAT  
GTTGAAAAGGAAATGGCGGAGCGCGCAAGGAGAGTATAGACTCATTGGAATCTGCCAACCCAAAACCTATATGCAA  
ATTATATCAAGTACTCAGATGAGAAGAAAGCAGAGGAGTTTACGAGGCAAATAAACCGTGAGAAGGCAAAAACAGC  
TTTGAATGCATATCTTCGGAATACGAAGTGAACGTTATTATCCGGGAAGACCTACTTCGCATTGATAATAAGACA  
TGCCTCTCTTCAGGAACAAGGCTGTCCATCTTGAGGTTGCCCGCTATGTTACGCCTACATTAACGATATAGCCG  
AGGTCAACTCCTACTTCCAGCTGTACCACTACATCATGCAGAGAATAATAATGAACGAGAGATATGAAAAAGCTC  
TGAAAAGGTGTCCGAGTACTTCGATGCTGTGAATGATGAGAAGAAATACAACGACCGATTGTTGAAGCTGCTGTGT  
GTGCCCTTTGGCTACTGCATCCCGCGTTCAAAAATTTATCTATTGAGGCCCTCTTGACAGGAACGAAGCTGCAA  
AATTCGACAAGGAGAAGAAAAAGGTTAGCGGCAACTCTCCTAAGAAAAAGAGGAAGGTGGGCTCCGGCGCCACCAA  
CTTCTCCCTCCTGAAGCAGGCCGGCGACGTCGAGGAGAACCCCGGCCCGGGCCGTAATGCTGTATCCTGAGCGG  
CTGCGGGGATCCTGACCATTGAGAAGAAGAAATCTTTTGCTAAAGGGATGGGAGTAAAATCAACATTGGTAAGCG  
GAAGTAAGGTATACATGACAACCTTTGACAGAGGTTCTGATGCTCGTCTCGAAAAAATTGTGGAGGGAGATAGCAT

TAGGTCAGTTAACGAGGGCGAGGCATTTAGTGCGGAAATGGCTGATAAGAATGCTGGGTACAAAATCGGTAATGCT  
AAGTTTAGTCATCCTAAGGGCTATGCTGTTGTGGCTAATAATCCTTTATACACTGGACCTGTTCAACAAGACATGT  
TGGGCTTGAAAAGACGCTGGAAAAGAGATACTTCGGGGAAAGTGCTGATGGTAACGATAATATTTGTATCCAAGT  
TATTCACAATATTCTTGATATTGAAAAGATATTAGCAGAGTACATTACCAATGCAGCATATGCAGTCAATAATATT  
TCGGGATTGGATAAAGACATTATTGGCTTTGGTAAATTTTCAACTGTTTACACATATGATGAATTTAAAGATCCAG  
AACATCATAGAGCAGCTTTTAAACAATAATGACAACTTATTAATGCCATCAAGGCTCAATATGATGAGTTCGACAA  
TTTCTTAGATAATCCTAGACTGGGCTATTTTGGTCAAGCATTCTTTTCCAAGGAAGGTGCAAATTACATTATAAAT  
TATGGAAACGAATGTTATGATATATTGGCCCTTCTTTCTGGACTTAGGCATTGGGTTGTTTACAACAACGAAGAGG  
AAAGTCGAATCTCCCGAAGTGGCTTTACAATCTGGATAAAAAATTTGGACAACGAATATATTTCTACGCTTAATTA  
CTTATATGATCGTATCACAAATGAACTAACTAACTCATTAGCAAAAAATTTCTGCTGCCAATGTCAACTATATAGCT  
GAAACCTTGGGTATAAATCCTGCTGAATTCGCGGAGCAGTATTTTCCATTATGAAAGAACAAAAGAATT  
TGGGTTTTAATATTACCAAACCTACGGGAGGTTATGTTGGACAGAAAAGATATGTCTGAAATTAGAAAAATCATAA  
AGTTTTTCGATTCTATTTCGAACAAAAGTTTATACAATGATGGATTTTGTATTATAGATACTACATTGAAGAGGAT  
GCCAAAGTGGCAGCTGCAAAACAAAAGTCTACCTGATAACGAAAAGAGTCTGTCTGAAAAGGACATTTTTGTCTTA  
ATCTTAGGGGAAGTTTTAATGATGATCAAAAAGATGCATTGTACTACGACGAAGCTAATAGGATATGGAGAAAGCT  
AGAGAACATAATGCACAATATTAAGAATTCCGCGGAATAAGACTCGGGAATACAAGAAGAAGGATGCACCCAGA  
CTTCCACGGATTTTGCCTGCGGGACGTGATGTTTTCAGCTTTCTCAAAATTGATGTACGCCCTACTATGTTTCTTG  
ATGAAAAGAGATCAATGATTTACTGACTACTCTCATCAACAAATTTGACAACATCCAATCATTCTTGAAGGTGAT  
GCCACTTATAGGAGTGAATGCCAAATTTGTGGAAGAGTATGCTTTCTTCAAAGACAGCGCTAAGATTGCAGATGAG  
CTTCGTTTAAATTAATCGTTTGCTAGAATGGGAGAACCCATAGCCGATGCACGCAGGGCAATGTATATCGATGCTA  
TTCGGATACTCGGAACCAACCTCAGTTATGACGAGTTAAAGGCCCTTTCGCGACACCTTTTTCATTAGATGAAAATGG  
TAATAAACTTAAAAAAGGGAAGCATGGAATGAGAAATTTTATAATAAATAATGTGATCTCAAACAAGAGATTCCAC  
TATCTGATTCGCTATGGTGATCCGGCACATCTCCATGAAATTGCAAAGAACGAAGCCGTAGTGAAGTTCGTCCTGG  
GGAGAATTGCAGACATCCAGAAAAGCAAGGGCAGAATGGAAAAATCAAATTGATCGATATTATGAAACATGCAT  
TGGTAAAGATAAAGGAAAAATCCGTATCAGAGAAGGTTGATGCCTTGACCAAGATCATTACGGGTATGAACTACGAT  
CAGTTTGACAAGAAGCGTTCTGTTATTGAAGACACTGGTAGGGAGAATGCTGAGAGAGAAAAATTCAGAAAAATAA  
TTTCTCTCTACTTGACAGTCATTTATCACATATTGAAGAACATAGTGAATATTAATGCAAGATATGTGATTGGATT  
TCATTGTGTTGAGAGGGATGCTCAGCTATACAAGGAGAAAGGTTATGACATAAACTTAAAAAACTTGAAGAAAA  
GGCTTCTCTCTGTAACGAACTATGCGCTGGGATAGATGAACTGCTCCAGATAAGAGGAAGGATGTTGAAAAGG  
AGATGGCAGAGAGAGCTAAAGAGTCAATAGATTCTTTGGAATCTGCTAACCCGAAGTTGTATGCAAACCTACATCAA  
ATATTCTGATGAGAAAAAGGCAGAAGAATTTACTAGGCAGATTAACCGAGAGAAGGCAAAAACAGCTTTAAATGCT  
TATCTGAGAAATACAAAAGTGAATGTAATTATACGGGAAGATCTTCTTAGAATTGACAACAAGACATGTACTTTGT  
TTAGGAACAAAGCGGTCCACTTAGAAGTTGCCAGGTATGTTTCATGCTTATATCAACGATATCGCTGAGGTAAATTC  
ATACTTTCAATTATATCATTATATAATGCAGAGAATAATTATGAATGAAAAGATATGAAAAGTCTTCCGGGAAAGTA  
TCGGAGTACTTCGATGCTGTTAATGATGAGAAAAAGTATAATGATAGGCTGCTTAACTTCTTTGTGTGCCATTTG  
GATATTGCATTCCACGATTTAAGAACCTCTCAATAGAAGCACTTTTTGATAGAAATGAGGCTGCAAAATTTGACAA  
AGAGAAGAAAAAGTCAGTGGTAATAGCCTTTATCCAGAGAGGCTGAGACGCATCCTCACCTACCCATATGATGTT  
CCTGATTATGCCTACCCGTACGACGTGCCGGACTACAGCCATGCGCACCCAGTCCCCGACCATACATGA所示。

[0046] 本发明还提供了所述的CasRx的制备方法,包括如下步骤:将修饰后的zmCasRx序

列和修饰后的ntCasRx序列通过连接肽融合得到的；

[0047] 所述zmCasRx序列的修饰方法为：在zmCasRx序列两端融合定位肽，N端融合标签蛋白，得到修饰后的zmCasRx序列；

[0048] 所述zmCasRx序列如SEQ ID NO:2:ATGGATTACAAGGACCACGACGGGGATTACAAGGACCACGACATTGATTACAAGGATGATGATGACAAGGCGGCCCTCCCAAGAAGAAGAGAAAAGGTGATAGAAAAAAGAAGAGCTTCGCTAAGGGGATGGGGTTAAGTCGACGCTAGTTAGCGGCTCCAAGGTGTACATGACCACCTTTGCTGAGGGCAGTGATGCGAGGCTGGAGAAGATCGTGGAAAGGAGATAGTATCCGTTCTGTTAATGAAGGAGAGGCATTCTCTGCTGAGATGGCCGATAAAAAACGCGGGGTATAAAATAGGTAATGCCAAATTTTCTCATCCAAAGGGATATGCCGTGGTCCGACAAACCCCTTGACACGGGGCCTGTACAACAGGACATGCTCGGGCTTAAAGAGACATTGGAGAAGAGGTACTTCGGGAATCAGCAGACGGAAATGATAACATCTGCATTACAGGTTATCCATAATATCTTGGATATAGAAAAATCTTAGCCGAATATATACCAATGCCGCGTATGCTGTTAACAATATCAGCGGGCTTGATAAGGATATTATCGGTTTTGGTA AATTCAGCACGGTGTACACCTATGACGAGTTCAAAGATCCAGAGCACCACGGGCGGCGTTCAACAACAATGACAA ACTGATCAATGCCATTAAGGCCAATACGACGAATTCGACAACCTTCTCGACAATCCACGGCTAGGGTATTTTGGACAGGCGTTCTTCTCAAAAAGAGGGGAGGAATTATATAATAAACTATGGTAATGAGTGCTACGACATTCTAGCTCTTC TGTCCGGTCTGCGACACTGGGTGGTGACAACAACGAGGAGGAAAGTCGCATCTCACGGACGTGGCTCTACAATCT GGATAAGAACTTAGACAACGAATATATCTCCACACTCACTACTTATATGACAGAATTACCAACGAGCTGACAAAT TCCTTTTCGAAAAATAGTGCTGCCAACGTCACTACATCGCCGAGACTCTTGGGATCAACCCTGCAGAATTCGCGG AGCAGTACTTTTCGCTTTTCCATTATGAAGGAACAAAAGAAGCTTGGGTTTCAATATTACTAAGCTGAGGGAGGTGAT GCTGGACCGCAAGGATATGTCCGAGATCAGGAAGAACCACAAGGTATTTGATTCTATTAGAACCAAAGTCTACACA ATGATGGATTTTCGTGATCTACAGGTATTATATTGAAGAGGATGCCAAGGTGGCAGCAGCAAACAAGTCCCTGCCCG ACAATGAAAAGTCGCTCTCGGAGAAGGACATCTTCGTGATCAATCTTCGCGGACGCTTAAACGACGATCAGAAAAGATGCTTTGTATTATGATGAAGCAAATAGAATTTGGAGAAAAGTTAGAGAACATTATGCATAACATAAAAAGAATTCCGT GGCAACAAAACCAGGGAGTACAAAAAAAAGGACGCGCCGCGCTTACCGAGAATCCTACCGGCAGGCAGAGACGCTCT CTGCTTTTTCTAAACTCATGTACGCGCTGACCATGTTCTTGGACGGCAAGGAGATAAATGACCTGCTCACAACCTCT GATTAACAAGTTTGATAATATTCAAAGTTTCTGAAGGTCATGCCTCTGATTGGAGTGAATGCCAAATTTGTTGAA GAATACGCCTTCTTTAAAGACTCCGCGAAGATTGCTGATGAGTTGCGTCTCATAAAGAGCTTTGCACGAATGGGGG AGCCCATAGCTGACGCCCGACGAGCCATGTATATTGACGCCATAAGGATCCTAGGTACGAACCTCTCCTATGATGA GCTTAAGGCCCTCGCCGACACGTTCCAGCCTCGATGAAAATGGTAACAAGCTCAAGAAGGGAAAGCATGGAATGCGG AACTTCATCATTAAATAATGTTATATCAAATAAGCGCTTCCATTACTTGATCCGCTACGGCGATCCAGCGCACTTGC ATGAAATTGCTAAAAATGAAGCGGTGCTGAAGTTTGTGCTCGGCAGGATCGCTGACATCCAGAAGAAGCAGGGCCA GAACGGCAAGAATCAAAATCGATAGATACTACGAAACATGTATTGGCAAAGACAAAAGGTAAGAGCGTATCAGAAAAA GTCGATGCGCTGACCAAAAATCATCACTGGCATGAATTACGACCAGTTCGACAAGAAGCGAAGCGTCATCGAGGACA CCGGCCGCGAAAACGCTGAAAGGGAGAAGTTCAAGAAGATTATTTTCGCTTTATCTGACTGTAATCTACCATATACT CAAGAATATCGTCAATATAAATGCGCGTTACGTCATTGGTTTTCCACTGTGTAGAGAGGGATGCGCAGCTCTACAAG GAGAAGGGTTACGATATCAATCTCAAGAACTTGAGGAGAAAGGCTTCTCATCCGTCCTAAGCTCTGCGCCGGCA TTGACGAGACTGCACCTGATAAAAGAAAGGATGTTGAAAAGGAAATGGCGGAGCGCGGAAGGAGAGTATAGACTC ATTGGAATCTGCCAACCCAAAACCTATATGCAAATTATATCAAGTACTCAGATGAGAAGAAAGCAGAGGAGTTTACG AGGCAAATAAACCGTGAGAAGGCAAAAACAGCTTTGAATGCATATCTTCGGAATACGAAGTGAACGTTATTATCC GGGAAAGACCTACTTCGCATTGATAATAAGACATGCACTCTCTTCAGGAACAAGGCTGTCCATCTTGAGGTTGCCCG

CTATGTTACGCCTACATTAACGATATAGCCGAGGTCAACTCCTACTTCCAGCTGTACCACTACATCATGCAGAGA  
ATAATAATGAACGAGAGATATGAAAAAGCTCTGGAAAGGTGTCCGAGTACTTCGATGCTGTGAATGATGAGAAGA  
AATACAACGACCGATTGTTGAAGCTGCTGTGTGTGCCCTTTGGCTACTGCATCCCGCGGTTCAAAAATTTATCTAT  
TGAGGCCCTCTTTGACAGGAACGAAGCTGCAAAATTCGACAAGGAGAAGAAAAAGGTTAGCGGCAACTCTCCTAAG  
AAAAAGAGGAAGGTG所示;

[0049] 所述定位肽为NLS;所述标签为Flag标签;

[0050] 所述定位肽NLS的序列如SEQ ID NO:3:CCCAAGAAGAAGAGAAAGGTG所示;所述标签  
Flag的序列如SEQ ID NO:4:ATGGATTACAAGGACCACGACGGGGATTACAAGGACCACGACATTGATTACA  
AGGATGATGAT GACAAG所示;

[0051] 所述ntCasRx序列的修饰方法为:在ntCasRx序列两端融合定位肽,C端融合标签蛋  
白,得到修饰后的ntCasRx序列;

[0052] 所述ntCasRx序列如SEQ ID NO:5:ATGCTGTATCCTGAGCGGCTGCGGCGGATCCTGACCATT  
GAGAAGAAGAAATCTTTGCTAAAGGGATGGGAGTAAAATCAACATTGGTAAGCGGAAGTAAGGTATACATGACAA  
CTTTTGCAGAGGGTCTGATGCTCGTCTCGAAAAATTGTGGAGGGAGATAGCATTAGGTCAGTTAACGAGGGCGA  
GGCATTTAGTGCGAAATGGCTGATAAGAATGCTGGGTACAAAATCGGTAATGCTAAGTTTAGTCATCCTAAGGGC  
TATGCTGTTGTGGCTAATAATCCTTTATACACTGGACCTGTTCAACAAGACATGTTGGGCTTGAAAGAGACGCTGG  
AAAAGAGATACTTCGGGGAAAGTGCTGATGGTAACGATAATATTTGTATCCAAGTTATTCACAATATTCTTGATAT  
TGAAAAGATATTAGCAGAGTACATTACCAATGCAGCATATGCAGTCAATAATATTTCCGGATTGGATAAAGACATT  
ATTGGCTTTGGTAAATTTTCAACTGTTTACACATATGATGAATTTAAAGATCCAGAACATCATAGAGCAGCTTTTA  
ACAATAATGACAACTTATTAATGCCATCAAGGCTCAATATGATGAGTTCGACAATTTCTTAGATAATCCTAGACT  
GGGCTATTTTGGTCAAGCATTCTTTTCCAAGGAAGGTGCAAAATTACATTATAAATTATGGAAACGAATGTTATGAT  
ATATTGGCCCTTCTTTCTGGACTTAGGCATTGGGTTGTTTACAACAACGAAGAGGAAAGTCAATCTCCCGAACTT  
GGCTTTACAATCTGGATAAAAAATTTGGACAACGAATATATTTCTACGCTTAATTAATTATATGATCGTATCACAAA  
TGAACATAACTAATCATTACAGCAAAAATTCTGCTGCCAATGTCAACTATATAGCTGAAACCTTGGGTATAAATCCT  
GCTGAATTCGCGGAGCAGTATTTTCCATTATGAAAGAACAAAAGAATTTGGGTTTTAATATTACCAAAC  
TACGGGAGGTTATGTTGGACAGAAAAGATATGTCTGAAATTAGAAAAAATCATAAAGTTTTCGATTCTATTGAAAC  
AAAAGTTTATACAATGATGGATTTTGTATTTATAGATACTACATTGAAGAGGATGCCAAAGTGGCAGCTGCAAAC  
AAAAGTCTACCTGATAACGAAAAGAGTCTGTCTGAAAAGGACATTTTGTCAATTAATCTTAGGGGAAGTTTTAATG  
ATGATCAAAAAGATGCATTGTACTACGACGAAGCTAATAGGATATGGAGAAAAGCTAGAGAACATAATGCACAATAT  
TAAAGAATTCGCGGGAATAAGACTCGGGAATACAAGAAGAAGGATGCACCCAGACTTCCACGGATTTTGCCTGCG  
GGACGTGATGTTTTCAGCTTTCTCAAAATTGATGTACGCCCTCACTATGTTTCTTGATGGAAAAGAGATCAATGATT  
TACTGACTACTCTCATCAACAAATTTGACAACATCCAATCATTCTTGAAGGTGATGCCACTTATAGGAGTGAATGC  
CAAATTTGTGGAAGAGTATGCTTTCTTCAAAGACAGCGCTAAGATTGCAGATGAGCTTCGTTTAATTAATCGTTT  
GCTAGAATGGGAGAACCATAGCCGATGCACGCAGGGCAATGTATATCGATGCTATTCGGATACTCGGAACCAACC  
TCAGTTATGACGAGTTAAAGGCCCTTGCAGACACCTTTTCATTAGATGAAAAATGGTAATAAACTTAAAAAGGGAA  
GCATGGAATGAGAAATTTTATAATAAATAATGTGATCTCAAACAAGAGATTCCACTATCTGATTTCGCTATGGTGTAT  
CCGGCACATCTCCATGAAAATTGCAAAGAACGAAGCCGTAGTGAAGTTTCGTCTGGGGAGAATTGCAGACATCCAGA  
AAAAGCAAGGGCAGAATGGAAAAAATCAAATTGATCGATATTATGAAACATGCATTGGTAAAGATAAAGGAAAATC  
CGTATCAGAGAAGGTTGATGCCTTGACCAAGATCATTACGGGTATGAACTACGATCAGTTTGACAAGAAGCGTTCT

GTTATTGAAGACACTGGTAGGGAGAATGCTGAGAGAGAAAAATTCAAGAAAATAATTTCTCTCTACTTGACAGTCA  
TTTATCACATATTGAAGAACATAGTGAATATTAATGCAAGATATGTGATTGGATTCATTGTGTTGAGAGGGATGC  
TCAGCTATACAAGGAGAAAGTTATGACATAAACTTAAAAAACTTGAAGAAAAAGGCTTCTCCTCTGTAACGAAA  
CTATGCGCTGGGATAGATGAAACTGCTCCAGATAAGAGGAAGGATGTTGAAAAGGAGATGGCAGAGAGAGCTAAAG  
AGTCAATAGATTCTTTGGAATCTGCTAACCCGAAGTTGTATGCAAACTACATCAAATATTCTGATGAGAAAAAGGC  
AGAAGAATTTACTAGGCAGATTAACCGAGAGAAGGCAAAAACAGCTTTAAATGCTTATCTGAGAAATACAAAGTGG  
AATGTAATTATACGGGAAGATCTTCTTAGAATTGACAACAAGACATGTACTTTGTTTAGGAACAAAGCGGTCCACT  
TAGAAGTTGCCAGGTATGTTTCATGCTTATATCAACGATATCGCTGAGGTAAATTCATACTTTCAATTATATCATT  
TATAATGCAGAGAATAATTATGAATGAAAGATATGAAAAGTCTTCCGGGAAAAGTATCGGAGTACTTCGATGCTGTT  
AATGATGAGAAAAAGTATAATGATAGGCTGCTTAACTTCTTTGTGTGCCATTTGGATATTGCATTCCACGATTTA  
AGAACCTCTCAATAGAAGCACTTTTTGATAGAAATGAGGCTGCAAAATTTGACAAAAGAGAAGAAAAAAGTCAGTGG  
TAATAGCCTTTATCCAGAGAGGCTGAGACGCATCCTCACC所示;

[0053] 所述定位肽为NES;所述标签为HA标签;

[0054] 所述定位肽NES的序列如SEQ ID NO:6:CTGTATCCTGAGCGGCTGCGGCGGATCCTGACC所  
示;所述标签HA的序列如SEQ ID NO:7:TACCCATATGATGTTCTGATTATGCCTACCCGTACGACGTGC  
CGGACTACAGCCATGCGCACC ACGTCCCCGACCATACA所示;

[0055] 所述连接肽为2A连接肽。

[0056] 在本发明中,zmCasRx序列是黄色瘤胃球菌(*Ruminococcus flavefaciens* XPD3002)菌株的CasRx序列(NCBI Reference Sequence:NZ\_FPJT01000005.1,Cas13d gene 4911~7814)进行玉米密码子优化得到的。

[0057] ntCasRx序列是黄色瘤胃球菌(*Ruminococcus flavefaciens* XPD3002)菌株的CasRx序列(NCBI Reference Sequence:NZ\_FPJT01000005.1,Cas13d gene 4911~7814)进行烟草密码子优化得到的。

[0058] 本发明还提供了一种重组表达载体,包括编辑所述的CasRx的核苷酸序列以及空载体;

[0059] 所述空载体为pSuper1300。

[0060] 本发明还提供了一种重组菌,包括编辑所述的CasRx的核苷酸序列以及空载菌;

[0061] 所述空载菌为农杆菌。

[0062] 本发明还提供了所述的CasRx、所述的重组表达载体或所述的重组菌在构建用于筛选植物抗病毒crRNA高效靶点的转基因烟中的应用。

[0063] 本发明还提供了一种用于筛选植物抗病毒crRNA高效靶点的转基因烟的构建方法,包括如下步骤:将所述的CasRx、所述的重组表达载体或所述的重组菌转化到本生烟中,筛选阳性株,得到转基因烟。

[0064] 本发明还提供了所述构建方法构建得到的转基因烟在筛选植物抗病毒crRNA高效靶点中的应用。

[0065] 本发明还提供了一种基于CasRx的植物抗病毒crRNA的靶点序列的筛选方法,包括如下步骤:

[0066] (1) 将检测靶点的表达序列整合入crRNA表达载体中,得到靶点载体;

[0067] (2) 将所述的靶点载体转化至宿主菌,收集OD值为0.4~0.6的菌液,得到待接种



aagtgtaaagcctgggggtgcctaataagtgagtgagctaactcacattaattgcggttgcgctcactgcccgtttccagt  
cgggaaacctgtcgtgccagctgcattaatgaatcgccaacgcgcggggagaggcggtttgcgtattggctagag  
cagcttgccaacatgggtggagcacgacactctcgtctactccaagaatatcaaagatacagtctcagaagacccaaa  
gggctattgagacttttcaacaaagggtaatatcgggaaacctcctcggattccattgcccagctatctgtcactt  
catcaaaaggacagtagaaaaggaagggtggcacctacaaatgccatcattgcgataaaggaaaggctatcgttcaa  
gatgcctctgcccagcagtggtcccaaagatggacccccaccacgaggagcatcgtggaaaaagaagacgttccaa  
ccacgtcttcaaagcaagtggattgatgtgataacatgggtggagcacgacactctcgtctactccaagaatatcaa  
agatacagtctcagaagaccaaagggtattgagacttttcaacaaagggtaatatcgggaaacctcctcggattc  
cattgcccagctatctgtcacttcatcaaaaggacagtagaaaaggaagggtggcacctacaaatgccatcattgcg  
ataaaggaaaggctatcgttcaagatgcctctgcccagcagtggtcccaaagatggacccccaccacgaggagcat  
cgtggaaaaagaagacgttccaaccacgtcttcaaagcaagtggattgatgtgatactcactgacgtaagggat  
gacgcacaatcccactatccttcgcaagaccttctctatataaggaagttcatttcatttggagaggacacgctg  
aaatcaccagctctctctacaaatctatctctctcagacttttcgagatcccggggggcaatgagatatgaaaa  
gcctgaactcaccgcgacgtctgtcgagaagtttctgatcgaaaagttcgacagcgtctccgacctgatgcagctc  
tcggaggggcgaagaatctcgtgctttcagcttcgatgtagggggcgtggatattcctcgggtaaatagctgcg  
ccgatggtttctacaaagatcgttatgtttatcggcactttgcatcggccgcgctcccattccggaagtgttga  
cattggggagtttagcgagagcctgacctattgcatctcccgcctgcacagggtgtcacgttgaagacctgctt  
gaaaccgaactgcccgtgttctacaaccggtcgcggaggctatggatgcgatcgtcggccgatcttagccaga  
cgagcgggttcggccattcggaccgaaggaatcgggtcaatacactacatggcgtgatttcatatgcgcgattgc  
tgatccccatgtgtatcactggcaactgtgatggacgacaccgtcagtgctccgtcgcgaggctctcgatgag  
ctgatgctttggggccgaggactgccccgaagtccggcacctcgtgcacgcggatttcggctccaacaatgtcctga  
cggacaatggccgcataacagcggctattgactggagcagggcagatgttcggggattccaatacagaggtcgccaa  
catcttctctggaggccgtggttggcttgatggagcagcagacgcgctacttcgagcggaggcatccggagctt  
gcaggatcgccacgactccgggcgtatatgctccgcattggctttgaccaactctatcagagcttggttgacggca  
atctcgatgatgcagcttgggcgcagggtcagatgcgacgcaatcgtccgatccggagccgggactgtcgggcgtac  
acaaatcggccgcagaagcgcggccgtctggaccgatggctgtgtagaagtaactcggcagatgtgaaaccgacgc  
cccagcactcgtccgagggcaagaaatagagtagatgccgaccgatctgtcgatcgacaagctcagagtttctcc  
ataataatgtgtgagtagtcccagataaggaattagggttctatagggttctcgtcatgtttgagcatataa  
gaaaccttagtatgtatttgtatttgtaaaatacttctatcaataaaaatttctaattctaaaacccaaaatccag  
tactaaaatccagatccccgaattaattcggcgtaattcagtacattaaaaacgtccgcaatgtgttattaagt  
tgtctaagegtcaatttgtttacaccacaatatatcctgccaccagccagccaacagctccccgaccggcagctcg  
gcacaaaatcaccactcgatacaggcagcccatcagtcgggacggcgtcagcgggagagccgttgaaggcggca  
gactttgctcatgttaccgatgtattcggagaacggcaactaagctgccgggttgaacacggatgatctcgc  
ggagggtagcatgttgattgtaacgatgacagagcgttgcctgtgatcaccgcggttcaaaatcggctcctg  
cgatactatgttatacgccaactttgaaaacaactttgaaaaagctgttttctggattttaaggttttagaatgca  
aggaacagtgaaattggagtctgtttgttataattagcttcttggggatctttaaatactgtagaaaagaggaag  
gaaataataaatggctaaaatgagaatatcaccggaattgaaaaaactgatcgaataaccgctgcgtaaaagat  
acggaaggaatgtctcctgctaaggtatataagctgggtgggagaaaatgaaaacctatatttaaaaatgacggaca  
gccggtataaagggaccacctatgatgtggaacgggaaaaggacatgatgctatggctggaaggaaagctgcctgt

tccaaaggtcctgcactttgaacggcatgatggctggagcaatctgctcatgagtgaggccgatggcgtcctttgc  
tcggaagagtatgaagatgaacaaagccctgaaaagattatcgagctgtatgicggagtgcacaggctctttcact  
ccatcgacatatcgattgtccctatacgaatagcttagacagccgcttagccgaattggattacttactgaataa  
cgatctggccgatgtggattgcgaaaactgggaagaagacactccatttaaagatccgcgcgagctgtatgatttt  
ttaaagacggaaaagcccgaagaggaacttgtcttttccacggcgacctgggagacagcaacatctttgtgaaag  
atggcaaagtaagtggctttattgatcttgggagaagcggcagggcggacaagtggatgacattgccttctgcgt  
ccggtcgatcaggaggatatacggggaagaacagtatgtcagactatttttgacttactggggatcaagcctgat  
tgggagaaaataaaatattatattttactggatgaattgttttagtacctagaatgcatgacccaaaatccctaac  
gtgagttttcgttccactgagcgtcagaccccgtagaaaagatcaaaggatcttcttgagatccttttttctgcg  
cgtaatctgctgcttgcaaacaaaaaaccaccgctaccagcgggtggtttgtttgccggatcaagagctaccaact  
ctttttccgaaggtaactggcttcagcagagcgcagataccaaatactgtccttctagtgtagccgtagttagcc  
accacttcaagaactctgtagcaccgctacatacctcgtctgtctaatcctgttaccagtggctgctgccagtgg  
cgataagtcgtgtcttaccgggttgactcaagacgatagttaccggataaggcgcagcggctcgggctgaacgggg  
ggttcgtgcacacagcccagcttggagcgaacgacctacaccgaactgagataacctacagcgtgagctatgagaaa  
gcgccacgcttcccgaagggagaaaggcggacaggtatccggtaagcggcagggctcggaacaggagagcgcacgag  
ggagcttccagggggaaacgcttggtatctttatagtcctgtcgggtttccaccctctgacttgagcgtcgattt  
ttgtgatgctcgtcagggggcggagcctatggaaaaacgccagcaacgcggcctttttacggttctctggcctttt  
gctggccttttctcacatgttcttctcgttattcccctgattctgtggataaccgtattaccgcttttgagtg  
agctgataaccgctcggcagccgaacgaccgagcgcagcagctcagtgagcaggaagcggaaagagcgcctgatg  
cggtattttctccttacgcatctgtcgggtatttcacaccgcatatggcgcactctcagtacaatctgctctgatg  
ccgcatagttaagccagtatacactccgctatcgctacgtgactgggtcatggctgcgccccgacaccgcccaaca  
cccgctgacgcgccctgacgggcttgtctgctcccggcatccgcttacagacaagctgtgaccgtctccgggagct  
gcatgtgtcagaggttttaccgctatcaccgaaacgcgcgagggcaggggtgccttgatgtgggcgcccggcggctga  
gtggcgacggcgcggcttgtccgcgccctggtagattgcctggccgtaggcccagccatttttgagcggccagcggc  
cgcgataggccgacgcgaagcggcggggcgtagggagcgcagcagccgaagggtaggcgtttttgacgctcttgc  
gctgtgcgctggccagacagttatgcacaggccaggcgggttttaagagttttaataagttttaagagttttagg  
cggaaaaatcgcttttttctttttatcagtcacttacatgtgtgaccgggtcccaatgtacggctttgggtt  
cccaatgtacgggttccggttcccaatgtacggctttgggttcccaatgtacgtgctatccacaggaaacagacct  
tttcgaccttttcccctgctagggcaatttgccctagcatctgctccgtacattaggaaccggcggatgcttcgc  
cctcgatcaggttgcggtagcgcactagtagcggccagcctgccccgcctcctccttcaaatcgtactccgg  
caggtcatttgaccgatcagcttgcgcaggtgaaacagaacttcttgaactctccggcgtgcccactgcttgc  
tagatcgtcttgaacaaccatctggcttctgccttgcctgcggcgcggcgtgccaggcggtagagaaaacggccga  
tgccgggatcgatcaaaaagtaatcgggggtgaaccgtcagcacgtccgggttcttgccttctgtgatctcgcggta  
catccaatcagctagctcgatctcgatgtactccggcgcgccgggtttcgtctttacgatctttagcggctaate  
aaggcttcaccctcgataaccgtcaccaggcggccgttcttggccttcttctgtacgtgcatggcaacgtgcgtgg  
tgttttaaccgaatgcaggtttctaccaggtcgtctttctgctttccgccatcggtcgcggcagaacttgagta  
gtccgcaacgtgtggacggaaacgcggccgggttgtctcccttcccttcccggatcggttcatggattcggtt  
agatgggaaaccgccatcagtagcaggtcgtaatcccacacactggccatgccggcggccctgcggaaacctcta  
cgtgcccgtctggaagctcgtagcggatcacctcggcagctcgtcggctcacgcttcgacagacggaaaacggccac

gtccatgatgctgcgactatcgcgggtgccacgtcatagagcatcggaacgaaaaatctggttgctcgtcgccc  
ttggggcggttccaatcgacggcgcaccggctgccggcggttgccgggattccttgcggattegatcagcggccg  
cttgccacgattcaccggggcgtgcttctgcctcgatgcggttgccgctgggcggcctgcgcggccttcaacttctc  
caccaggtcatcaccagcgcgcgccgatttgtaccgggcccggatggtttgcgaccgctcagccgattcctcgg  
gcttgggggttccagtgccattgcagggccggcagacaaccagccgcttacgcctggccaaccgcccgttctcc  
acacatggggcattccacggcgtcggtgccctggttgttcttgattttccatgccgctcctttagccgctaaaatt  
catctactcatttattcatttgcctacttactctggtagctgcgcgatgtattcagatagcagctcggtaatggtc  
ttgccttggcgtaccgcgtacatcttcagcttgggtgtgatcctccgccggcaactgaaagttgaccgcttcatgg  
ctggcgtgtctgccaggctggccaacgttcagccttgctgctgcgtgcgctcggacggccggcacttagcgtggt  
tgtgcttttgctcattttctctttacctcattaactcaaatgagttttgatttaatttcagcggccagcgcctgga  
cctcgcgggcagcgtcgccctcgggttctgattcaagaacggttgtgccggcggcggcagtgctgggtagctcac  
gcgctgcgtgatacgggactcaagaatgggcagctcgtaccggccagcgcctcggcaacctaccgcccgatgcgc  
gtgcttttgatcgcccgacacgacaaaggccgctttagccttccatccgtgacctcaatgcgctgcttaacca  
gctccaccaggtcggcggtggcccatatgtcgttaaggccttggtgcaccggaatcagcacgaagtcggctgcctt  
gatcgcggacacagccaagtcgccgctggggcgtcctcgtcgatcactacgaagtcgcgccggccgatggccttc  
acgtcgcggtcaatcgtcggcggtcgatgccgacaacggttagcggttgatcttccgcacggccgccaatcgc  
gggcaactgcccgggatcggaatcgactaacagaacatcgccccggcgagttgcagggcgcgggctagatgggt  
tgcgatggctcgtcttgctgaccgcttctggttaagtacagcgataacctcatgcttccccttgcgatatt  
gtttatttactcatcgcacatatacgcagcgaccgcatgacgcaagctgttttactcaaatacacatcaccttt  
tagacggcggcgcctcggttcttcagcggccaagctggccggccaggccgccagcttggcatcagacaaaccggcc  
aggatttcatgcagccgcacggttgagacgtgcgcggggcggtcgaacacgtaccggcccgatcatctccgct  
cgatctcttcggtaatgaaaaacggttcgtcctggccgctcctggtgcggttcatgcttgttctcttgcggttca  
ttctcggcggccgcccaggcgtcggcctcggctcaatgcgtcctcacggaaggcaccgcgccgctggcctcgggtg  
gcgtcacttctcgtcgcgtcaagtgcgcggtacagggtcgagcgatgcacgccaagcagtcagccgctcttt  
cacggtgcggccttctggtcgatcagctcgcggcgtgcgcgatctgtgccggggtgagggtaggcgggggcca  
aacttcacgcctcgggccttggcggcctcgcgcccgtcgggtgcggtcgatgattaggaacgctcgaactcgg  
caatgccggcgaacacgggtcaacacatgcggccggccggcgtggtggtgcggccacggctctgccaggctacg  
caggcccgcgccgctcctggatgcgtcggcaatgtccagtaggtcgcgggtgctgcgggcccaggcggcttagc  
ctggtcactgtcacaacgtcgccaggcgttaggtggtcaagcatcctggccagctcggggcggtcgcgcctggtgc  
cggtgatcttctcggaaaacagcttgggtgcagccggccgcgtgcagttcgcccgttgggtggtcaagtctggtc  
gtcgggtgctgacgcgggcatagcccagcaggccagcggcggcgtccttgttcatggcgtaatgtctccggttctag  
tcgcaagtattctactttatgcgactaaaacacgcgacaagaaaacgccaggaaaaggcaggggcggcagcctgtc  
gcgtaacttaggacttgtgcgacatgtcgttttcagaagacggctgcactgaacgtcagaagccgactgcactata  
gcagcggagggggttgatcaaatgactttgatcccagggggaacctgtggttggcatgcacatacaaatggacga  
acggataaaccttttcacgcccttttaaatatccgttattctaa。

[0076] 所述基因编辑载体为pHSE401。

[0077] 在本发明中,在本发明中,步骤(1)中,所述整合入crRNA表达载体前,需要将表达序列合成DNA双链片段,合成方法如下:以表达序列为模板设计正、反引物,将正、反引物混合后置于90°C金属浴10min,冷却至25°C合成DNA双链片段;

[0078] 所述表达序列在合成DNA双链片段时,为了可以插入至crRNA表达载体中,需要在序列两端添加BsaI酶切位点的残余碱基。

[0079] 在本发明中,步骤(1)中,所述的检测靶点或所述的表达序列是通过启动子和终止子之间的两个BsaI酶切位点整合入crRNA表达载体中。

[0080] 在本发明中,步骤(2)中,所述宿主菌为农杆菌LBA4404;

[0081] 所述待接种液需要静置4~6h,优选为5h;静置的温度为20~30℃,优选为25℃。

[0082] 在本发明中,步骤(4)中,所述接种目标病毒的方法为侵染性克隆或摩擦接毒;

[0083] 若目标病毒有侵染性克隆,优选采用侵染性克隆注射接毒;若目标病毒无侵染性克隆,优选采用摩擦接毒进行接种;

[0084] 所述接种病毒的位置为待接种液注射的范围内;待接种液注射的位置为转基因烟的叶背。

[0085] 本发明还提供了所述的筛选方法在筛选植物抗病毒crRNA的靶点中的应用

[0086] 下面结合实施例对本发明提供的技术方案进行详细的说明,但是不能把它们理解为对本发明保护范围的限定。

[0087] 实施例1

[0088] (1)将来自黄色瘤胃球菌(*Ruminococcus flavefaciens* XPD3002)菌株的CasRx序列(NCBI Reference Sequence:NZ\_FPJT01000005.1,Cas13d gene 4911~7814)进行玉米密码子优化,得到zmCasRx序列;在zmCasRx两端融合核定位信号肽NLS,并在N端融合3×Flag标签,得到优化后的zmCasRx序列,如图1A所示;

[0089] (2)将来自黄色瘤胃球菌(*Ruminococcus flavefaciens* XPD3002)菌株的CasRx序列(NCBI Reference Sequence:NZ\_FPJT01000005.1,Cas13d gene 4911~7814)进行烟草密码子优化,得到ntCasRx序列;在ntCasRx两端融合核定位信号肽NES,在C端融合HA标签,得到优化后的ntCasRx序列,如图1B所示;

[0090] (3)将修饰后的zmCasRx序列和修饰后的ntCasRx序列通过2A连接肽融合得到的一种干扰植物病毒的CasRx,命名为biCasRx,如图1C所示;

[0091] (2)将编辑biCasRx的核苷酸序列构建至载体pUC57-simple质粒(购买自金斯瑞生物科技股份有限公司)上,得到重组质粒;将重组质粒通过自身携带的限制性内切酶位点XbaI、SacI插入至pSuper1300(来自中国农业大学)表达载体的多克隆位点处,构建得到用于植物转化的双元表达载体pSuper-biCasRx,即重组表达载体如图2所示;

[0092] (3)将重组表达载体(双元表达载体pSuper-biCasRx)转化至转化农杆菌LBA4404中,再利用农杆菌介导的遗传转化技术转化至本生烟(*Nicotiana benthamiana*)中,通过抗性筛选和转基因阳性鉴定获得转化阳性株,得到pSuper-biCasRx转基因本生烟。

[0093] 实施例2针对芜菁花叶病毒(TuMV)的高效靶点筛选

[0094] 芜菁花叶病毒(Turnip Mosaic Virus, TuMV)为正义单链病毒,马铃薯Y病毒属,与其他病毒相比, TuMV具有广泛的宿主范围,在人工接种下,除十字花科外,至少有318种双子叶植物,隶属于43科156属,其中包括菊科,茄科、藜科、苋科、豆科和石竹科等。在自然条件下,主要寄主有大白菜、油菜、蔬菜、芥菜、卷心菜、花椰菜、芥菜、花青素、胡萝卜等十字花科植物。

[0095] (1)检测靶点序列选择和表达序列的合成

[0096] 在芜菁花叶病毒 (NCBI Reference Sequence:NC\_002509.2) 的Hc-pro (mat\_peptide 1217..2590,protein\_id="NP\_734214.1")、CI (mat\_peptide 3812..5743,protein id="NP\_734217.1")、Nib (mat\_peptide7208..8758,protein\_id="NP\_734221.1") 三个蛋白编码基因中选取5' 端富含U的22nt序列作为检测靶点序列,每个基因分别选取了3个检测靶点,共计9个检测靶点,如表1所示:

[0097] 将上述9个检测靶点序列反向互补后添加上spacer序列,得到表达序列,即表达序列为:AACCCCTACCAACTGGTCGGGGTTTGAAAC+22nt检测靶点反向互补序列;在表达序列后添加BsaI的残余碱基,以表达序列为模板设计正反引物,正反向引物序列如表1和图1E所示。

[0098] 表1TuMV的检测靶点序列以及正反向引物序列

基因名	检测靶点序列	正反向引物序列
TuMV-Hc-T1	SEQ ID NO: 10: aagggaacagatgaaa ggcgaa	F (SEQ ID NO: 19) : ATTGAACCCCTACCAACTGGTCGGGGTTTGAAACTTCGCCTTCA TCTGTTCCCTT
		R (SEQ ID NO: 20) : AAACaagggaacagatgaaggcgaaGTTTCAAACCCCGACCAGTTGGTAG GGGTT
TuMV-Hc-T2	SEQ ID NO: 11: acatcaatatcttctagc cat	F (SEQ ID NO: 21) : ATTGAACCCCTACCAACTGGTCGGGGTTTGAAACATGGCTAGGA AGATATTGATGT
		R (SEQ ID NO: 22) : AAACacatcaatatcttctagccatGTTTCAAACCCCGACCAGTTGGTAGGG GTT
TuMV-Hc-T3	SEQ ID NO: 12: accagacgttgctaac gccga	F (SEQ ID NO: 23) : ATTGAACCCCTACCAACTGGTCGGGGTTTGAAACTCGGCCTTAG CAACGTCCTGGGT
		R (SEQ ID NO: 24) :

[0100]

		AAACaccagacgttgctaacgccgaGTTTCAAACCCCGACCAGTTGGTAGG GGTT
TuMV- NIb-T1	SEQ ID NO. 13: ggtgggatcgcttgttg gagt	F (SEQ ID NO. 25): ATTGAACCCCTACCAACTGGTCGGGGTTTGAACACTCCAACAA GCGATCCCAACC
		R (SEQ ID NO. 26): AAACggtgggatcgcttgttgagtGTTTCAAACCCCGACCAGTTGGTAGGG GTT
TuMV- NIb-T2	SEQ ID NO. 14: acaccagatggtacact cgta	F (SEQ ID NO. 27): ATTGAACCCCTACCAACTGGTCGGGGTTTGAACACTGACGAGTGT ACCATCTGGTGT
		R (SEQ ID NO. 28): AAACacaccagatggtacactcgtaGTTTCAAACCCCGACCAGTTGGTAGG GGTT
TuMV- NIb-T3	SEQ ID NO. 15: cgcaccaggggcacaa aagaga	F (SEQ ID NO. 29): ATTGAACCCCTACCAACTGGTCGGGGTTTGAACACTCTCTTTGTG CCCCTGGTGCG
		R (SEQ ID NO. 30): AAACcgcaccaggggcacaaaagagaGTTTCAAACCCCGACCAGTTGGTAG GGGTT
TuMV-C I-T1	SEQ ID NO: 16: gtgaacgcacagggtg gtggaa	F (SEQ ID NO: 31): ATTGAACCCCTACCAACTGGTCGGGGTTTGAACACTTCCACTACC CTGTGCGTTCAC
		R (SEQ ID NO: 32): AAACgtgaacgcacagggtagtggaaGTTTCAAACCCCGACCAGTTGGTAGG GGTT
TuMV-C I-T2	SEQ ID NO: 17: gaataaattagccatacc tcac	F (SEQ ID NO: 33): ATTGAACCCCTACCAACTGGTCGGGGTTTGAACCGTGAGGTATG GCTAATTTATTC
		R (SEQ ID NO: 34): AAACgaataaattagccatacctcacGTTTCAAACCCCGACCAGTTGGTAGGG GTT
TuMV-C I-T3	SEQ ID NO: 18: atgtgctcgacatccc agaaa	F (SEQ ID NO: 35): ATTGAACCCCTACCAACTGGTCGGGGTTTGAACACTTTCTGGGAT GTCGCGACACAT
		R (SEQ ID NO: 36): AAACatgtgctcgacatcccagaaaGTTTCAAACCCCGACCAGTTGGTAGG GGTT

[0101] 将上述9对正反向引物序列分别退火得到9个DNA双链片段,具体步骤如下:将溶解成100 $\mu$ M的TuMV-Hc-T1F和TuMV-Hc-T1R分别取10 $\mu$ L混合,置于95 $^{\circ}$ C金属浴10min后,关闭金属浴,使其自然降温至25 $^{\circ}$ C,得到DNA双链片段TuMV-Hc-T1,按照上述方法依次获取其它的DNA双链片段:TuMV-Hc-T2、TuMV-Hc-T3、TuMV-NIb-T1、TuMV-NIb-T2、TuMV-NIb-T3、TuMV-CI-T1、TuMV-CI-T2、TuMV-CI-T3。

[0102] (2) 靶点载体的构建

[0103] 以基因编辑载体pHSE401(来自中国农业大学)为骨架,删除基因编辑载体上的Cas9表达盒和sgRNA表达盒中的sgRNA-scaffold,保留AtU6-26启动子和AtU6-29终止子,得

到pAtU6-crRNA表达载体,如图1D所示;

[0104] 将crRNA表达载体进行BsaI酶切,得到酶切产物,将酶切产物进行电泳检测,符合预期;将酶切产物置于65°C金属浴20min使BsaI内酶切失活,得到失活后的酶切产物;取1μL失活后的酶切产物分别与步骤(1)中9个表达载体的DNA双链片段进行连接,得到连接产物pAT-TuMV-Hc-T1、pAt-TuMV-Hc-T2、pAt-TuMV-Hc-T3、pAt-TuMV-NIb-T1、pAt-TuMV-NIb-T2、pAt-TuMV-NIb-T3、pAt-TuMV-CI-T1、pAt-TuMV-CI-T2、pAt-TuMV-CI-T3;将9个酶切产物分别经过含100mg/L卡那霉素的LB固体培养平板筛选、菌落PCR鉴定和质粒测序确认获得构建成功的9个靶点载体;

[0105] 其中菌落PCR的体系和程序如下:

[0106] 体系:10μM正反向混合引物1μL,Taq mix 10μL,ddH<sub>2</sub>O 19μL,枪头尖部蘸取微量菌落溶解于反应体系中作为模板;

[0107] 程序:95°C,10min-(95°C,15s-60°C,15s-72°C,30s)×30round-72°C,5min-16°C,forever。

[0108] (3) 供试转基因烟苗准备

[0109] 以T2代实施例1所述的pSuper-biCasRx转基因本生烟为试材;提前播种好供试的本生烟苗,烟苗在25°C、16h/8h光周期、光强20000Lux、相对湿度60%的光照培养箱内(避免蚜虫等传毒干扰)培养至6叶期。

[0110] (4) 靶点载体注射

[0111] 将步骤(2)中构建成功的9个靶点载体分别转化到农杆菌LBA4404中,通过对菌落进行PCR鉴定筛选阳性克隆菌;将取50mL阳性克隆菌进行28°C振荡培养过夜,菌液OD<sub>600</sub>=1,将菌液5000rpm离心10min,弃上清后用农杆菌侵染缓冲液(10mM MES,10mM MgCl<sub>2</sub>,150μM乙酰丁香酮)重悬菌体,调整至菌液的OD<sub>600</sub>为0.5,得到待接种液;将待接种液静置6h后,用去除针头的1mL一次性无菌注射器将400μL待接种液注射至pSuper-biCasRx转基因本生烟的叶背上,得到含有靶点的转基因烟,其中每个靶点注射5株转基因烟苗,每株注射一片叶子。同时注意设置野生型本氏烟对照,也按上述方法进行靶点注射。

[0112] (5) 病毒接种

[0113] 在靶点载体注射2d后,将侵染性克隆载体(TuMV-GFP,侵染性克隆载体在Hc-pro融合端融合了GFP蛋白,因此可以通过绿色荧光蛋白分布指示病毒粒子的系统侵染情况)转化到农杆菌中,将50μL转化了侵染性克隆载体的农杆菌进行28°C振荡培养过夜,菌液OD<sub>600</sub>=1,将菌液5000rpm离心10min,弃上清后用农杆菌侵染缓冲液(10mM MES,10mM MgCl<sub>2</sub>,150μM乙酰丁香酮)重悬菌体,调整至菌液的OD<sub>600</sub>为0.25,静置6h,得到TuMV病毒侵染性克隆悬液;将TuMV病毒侵染性克隆悬液注射到靶点载体注射的叶片上,注射范围在靶点载体注射的范围内,注射量为200μL,如图1F所示;野生型本生烟苗作对照,接种相同剂量的病毒侵染性克隆菌液。

[0114] (6) 系统发病症状观察和病毒含量检测

[0115] 将接种病毒后的转基因烟苗和野生型本生烟苗继续在25°C、16h/8h光周期、光强20000Lux、相对湿度60%的光照培养箱内培养,观察植株的系统发病情况;

[0116] 培养5d后,野生型出现病毒病症状,采用实时荧光定量PCR和western-blot对所有靶点注射后的转基因烟取顶端系统叶进行病毒粒子含量检测,检测结果如图3~5所示,其

中图3是9个靶点病毒干扰效率的系统发病症状比较,图4是9个靶点对TuMV的干扰效率比较的qRT-PCR病毒含量检测结果,图5是9个靶点对TuMV的干扰效率比较的病毒含量Western-blot检测结果。

[0117] 从图3~5中可以看出,9个靶点中TuMV-CI-T3、TuMV-NIb-T2、TuMV-NIb-T1表现出更高的干扰效率,其中以TuMV-CI-T3靶点的病毒干扰效率最高。综上,通过上述过程,成功筛选出最佳的病毒crRNA靶点TuMV-CI-T3,为后续进行稳定转基因创制特异性抗TuMV病毒的作物品种奠定实践基础。

[0118] 实施例3对马铃薯Y病毒(PVY)的高效靶点筛选

[0119] (1) 检测靶点序列选择和表达序列的合成

[0120] 在马铃薯Y病毒(NCBI GenBank:NC\_001616.1)的序列中选取5'端富含U的30nt序列作为检测靶点序列,选取4个检测靶点,如表2所示;

[0121] 将上述4个检测靶点序列反向互补后添加上spacer序列,得到表达序列,即表达序列为:AACCCCTACCAACTGGTCGGGGTTGAAAC+30nt检测靶点反向互补序列;在表达序列后添加BsaI的残余碱基,以表达序列为模板设计正反引物,正反引物序列如表2所示。

[0122] 表2PVY的检测靶点序列以及正反引物序列

基因名	靶点序列	正反引物序列
PVY-T1	SEQ ID NO. 37: GGAAGGGTCT GGACGGTAAT TGGGCACGAA	F (SEQ ID NO.41): ATTGAACCCCTACCAACTGGTCGGGGTTGAAACTTCGTGCCCA ATTACCGTCCAGACCCTTCC
		R (SEQ ID NO.42): AAACGGAAGGGTCTGGACGGTAATTGGGCACGAAGTTTCAAAC CCCGACCAGTTGGTAGGGGTT
PVY-T2	SEQ ID NO. 38: GAACTTGCGGT AAGATTGTGG ATTAATGAG	F (SEQ ID NO.43): ATTGAACCCCTACCAACTGGTCGGGGTTGAAACCTCATTAAATC CACAATCTTACCGCAAGTTC
		R (SEQ ID NO.44): AAACGAACTTGCGGTAAGATTGTGGATTAATGAGGTTTCAAACC CCGACCAGTTGGTAGGGGTT
PVY-T3	SEQ ID NO. 39: AGTAAGGGGA GCTGTTGGGTC TGGAAAGTC	F (SEQ ID NO. 45): ATTGAACCCCTACCAACTGGTCGGGGTTGAAACGACTTTCCAG ACCCAACAGCTCCCCTTACT
		R (SEQ ID NO. 46): AAACAGTAAGGGGAGCTGTTGGGTCTGGAAAGTCGTTTCAAACC CCGACCAGTTGGTAGGGGTT
PVY-T4	SEQ ID NO. 40: AGGAGTTACA ATGGTTCCATG GAGGTGCGA	F (SEQ ID NO. 47): ATTGAACCCCTACCAACTGGTCGGGGTTGAAACTCGCACCTCC ATGGAACCATTGTAACTCCT
		R (SEQ ID NO. 48): AAACAGGAGTTACAATGGTTCCATGGAGGTGCGAGTTTCAAACC CCGACCAGTTGGTAGGGGTT

[0124] 将上述4对正反引物序列分别退火得到4个DNA双链片段,具体步骤如下:将溶解成100 $\mu$ M的PVY-T1F和PVY-T1R分别取10 $\mu$ L混合,置于95 $^{\circ}$ C金属浴10min后,关闭金属浴,使其自然降温至25 $^{\circ}$ C,得到DNA双链片段PVY-T1,按照上述方法依次获取其它的DNA双链片段:

PVY-T2、PVY-T3、PVY-T4；

[0125] (2) 靶点载体的构建

[0126] 以基因编辑载体pHSE401(来自中国农业大学)为骨架,删除基因编辑载体上的Cas9表达盒和sgRNA表达盒中的sgRNA-scaffold,保留AtU6-26启动子和AtU6-29终止子,得到pAtU6-crRNA表达载体；

[0127] 将crRNA表达载体进行BsaI酶切,得到酶切产物,将酶切产物进行电泳检测,符合预期；将酶切产物置于65°C金属浴20min使BsaI内酶切失活,得到失活后的酶切产物；取1μL失活后的酶切产物分别与步骤(1)中4个表达载体的DNA双链片段进行连接,得到连接产物pAT-PVY-T1、pAt-PVY-T2、pAt-PVY-T3、pAt-PVY-T4；将4个酶切产物分别经过含100mg/L卡那霉素的LB固体培养平板筛选、菌落PCR鉴定和质粒测序确认获得构建成功的4个靶点载体；

[0128] 其中菌落PCR的体系和程序如下：

[0129] 体系：10μM正反向混合引物1μL, Taq mix 10μL, ddH<sub>2</sub>O 19μL, 枪头尖部蘸取微量菌落溶解于反应体系中作为模板；

[0130] 程序：95°C, 10min- (95°C, 15s-60°C, 15s-72°C, 30s) × 30round-72°C, 5min-16°C, forever。

[0131] (3) 供试转基因烟苗准备

[0132] 以T2代实施例1所述的pSuper-biCasRx转基因本生烟为试材；提前播种好供试的本生烟苗,烟苗在25°C、16h/8h光周期、光强20000Lux、相对湿度60%的光照培养箱内(避免蚜虫等传毒干扰)培养至6叶期。

[0133] (4) 靶点载体注射

[0134] 将步骤(2)中构建成功的4个靶点载体分别转化到农杆菌LBA4404中,通过对菌落进行PCR鉴定筛选阳性克隆菌；将取50mL阳性克隆菌进行28°C振荡培养过夜,菌液OD<sub>600</sub>=1,将菌液5000rpm离心10min,弃上清后用农杆菌侵染缓冲液(10mM MES, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 150μM乙酰丁香酮)重悬菌体,调整至菌液的OD<sub>600</sub>为0.5,得到待接种液；将待接种液静置6h后,用去除针头的1mL一次性无菌注射器将400μL待接种液注射至pSuper-biCasRx转基因本生烟苗的叶背上,得到含有靶点的转基因烟,其中每个靶点注射5株转基因烟苗,每株注射一片叶子。同时注意设置野生型本氏烟对照(WT),也按上述方法进行靶点注射。

[0135] (5) 病毒接种

[0136] PVY病毒采取摩擦接种的方式接种。本例中利用改造后的PVY病毒PVY-Ros1(在侵染植物后病毒粒子会在系统叶积累表现为玫红色斑点)作为靶标病毒。

[0137] 在靶点载体注射2d后,制备PVY-Ros1毒源的摩擦侵染液。取1g被PVY-Ros1侵染发病的普通烟叶片,置于灭过菌的研钵中加入30mL PBS缓冲液(pH 6.8)研磨成浆,再用纱布过滤以去除组织碎片获得用于摩擦接种的滤液；在pSuper-biCasRx转基因本氏烟草注射叶正面撒上少量金刚砂,之后用移液枪吸取100μL滤液滴在靶点crRNA载体注射过的叶片正面,并用食指指肚以相同力度轻轻涂抹固定次数(5次),注意摩擦的范围在靶点载体注射范围以内。

[0138] (6) 系统发病症状观察和病毒含量检测

[0139] 将接种病毒后的转基因烟苗和野生型本生烟苗继续在25°C、16h/8h光周期、光强

20000Lux、相对湿度60%的光照培养箱内培养；

[0140] 培养14d后,采用实时荧光定量PCR对所有靶点注射后的转基因烟苗取顶端系统叶进行病毒粒子含量检测,每个靶点随机检测三株转基因烟苗,检测结果如图6所示;培养21d后,观察植株的系统发病情况,如图7所示;

[0141] 从图6~7中可以看出,在接种PVY-Ros121天后,野生型本氏烟系统叶发生了较强的卷曲,新生叶中心生长点附近有病毒积累并出现指示性红斑,而注射靶点crRNA载体后的pSuper-biCasRx转基因本氏烟仅表现为系统叶轻微卷曲,无明显红斑;靶点PVY-T1、PVY-T2、PVY-T3、PVY-T4均表现出较高的干扰效率,尤其以靶点PVY-T1、PVY-T2、PVY-T3最佳;因此,成功筛选出最佳的病毒crRNA靶点为PVY-T1、PVY-T2、PVY-T3,为后续进行稳定转基因创制特异性抗PVY病毒的作物品种奠定实践基础。

[0142] 由以上实施例可知,本发明提供一种干扰植物病毒的CasRx及其制备方法、重组表达载体、重组菌,还提供了一种基于CasRx的植物抗病毒crRNA高效靶点序列的筛选方法,这种依赖于CasRx转基因本生烟的供试靶点瞬时表达评估过程,大大降低了因靶点无效或低效导致的育种风险,加快了植物抗病毒育种进程。

[0143] 以上所述仅是本发明的优选实施方式,应当指出,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提下,还可以做出若干改进和润饰,这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

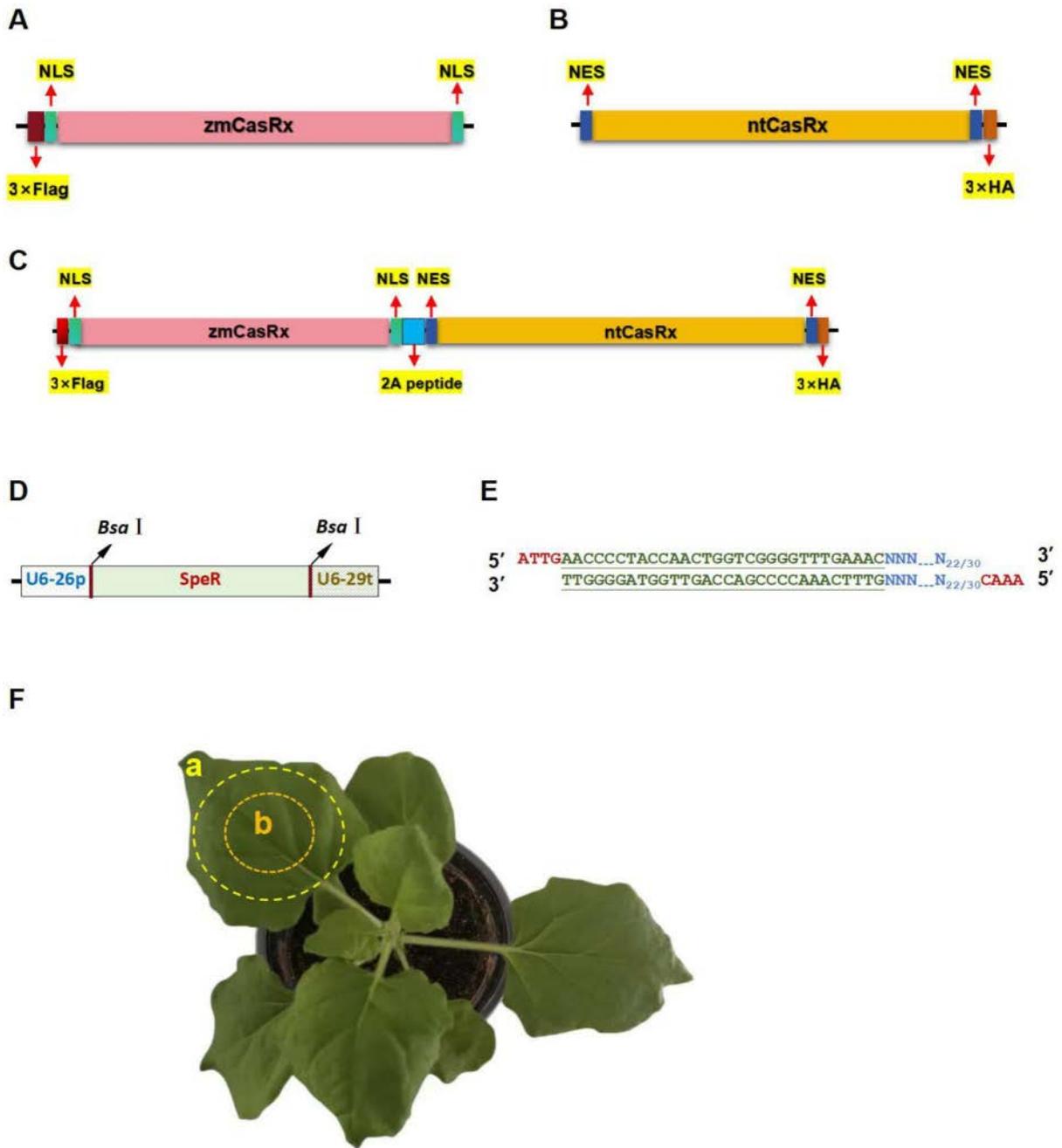


图1

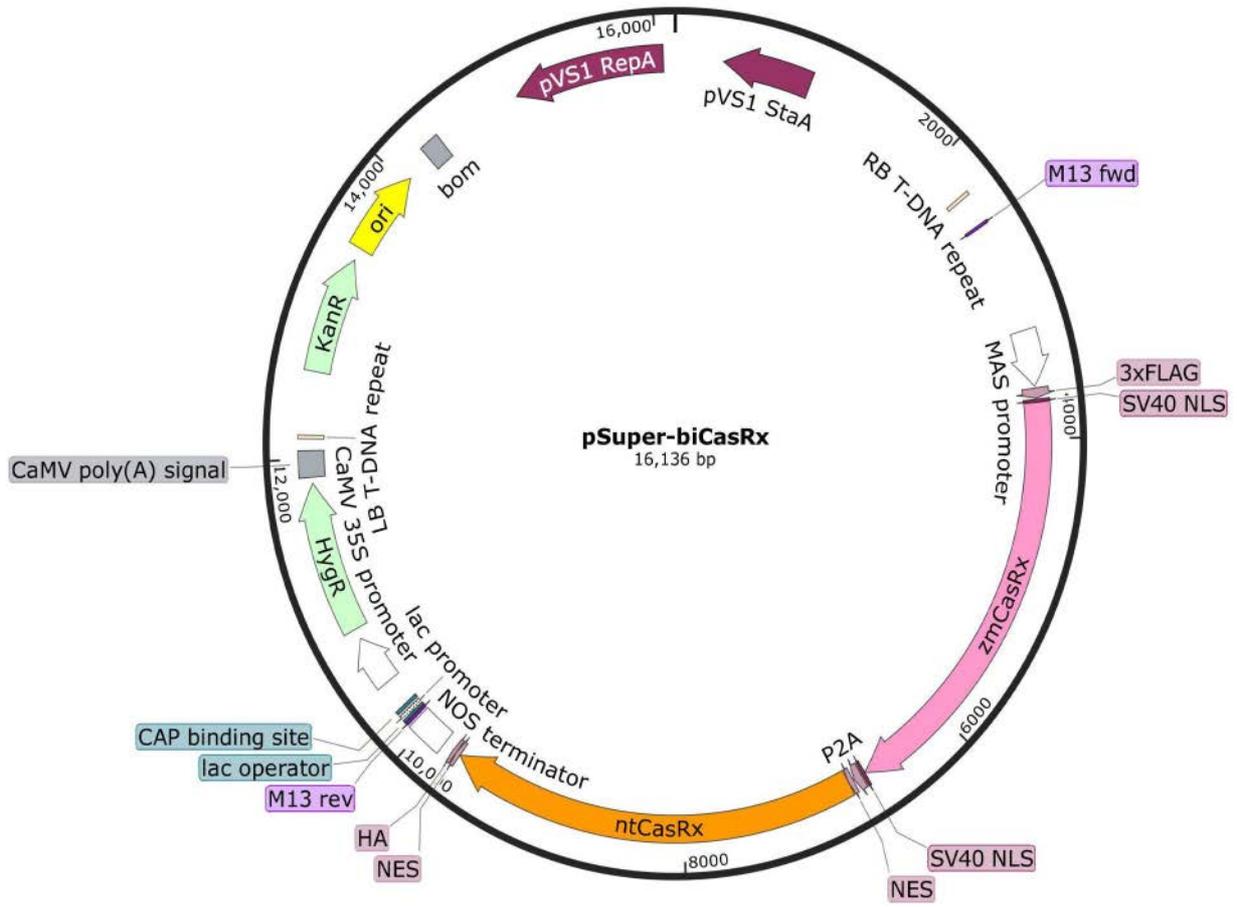


图2

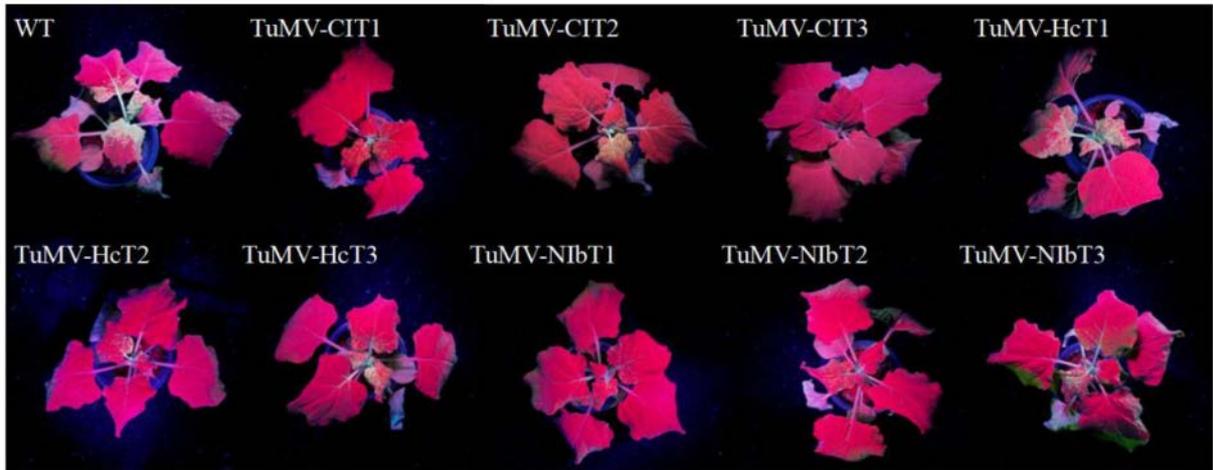


图3

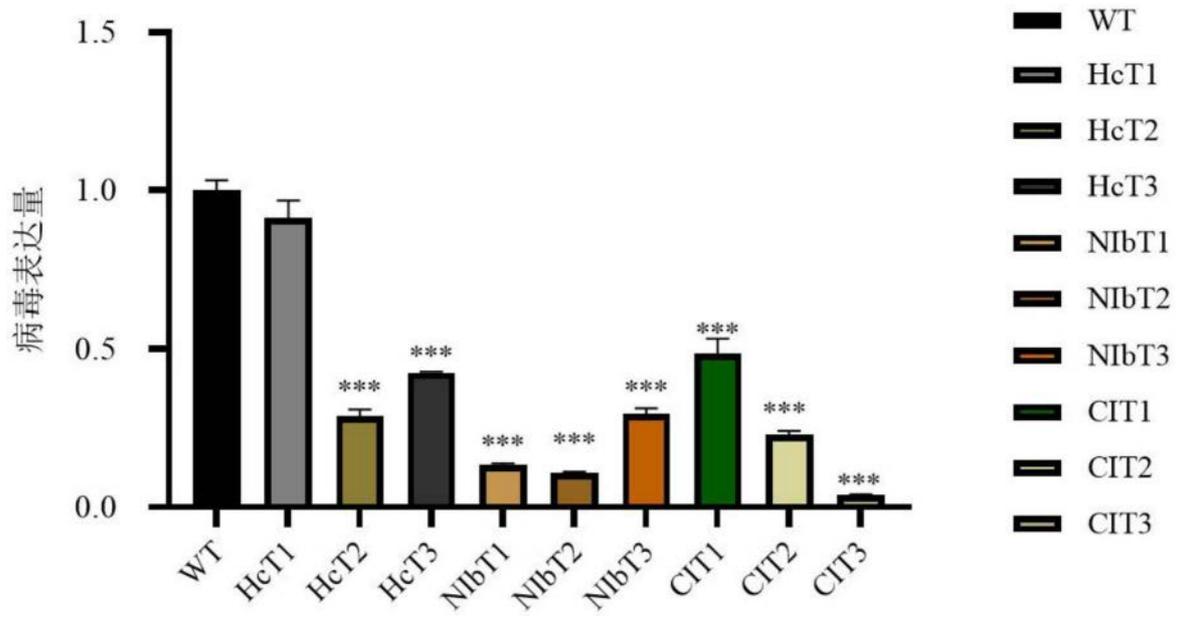


图4

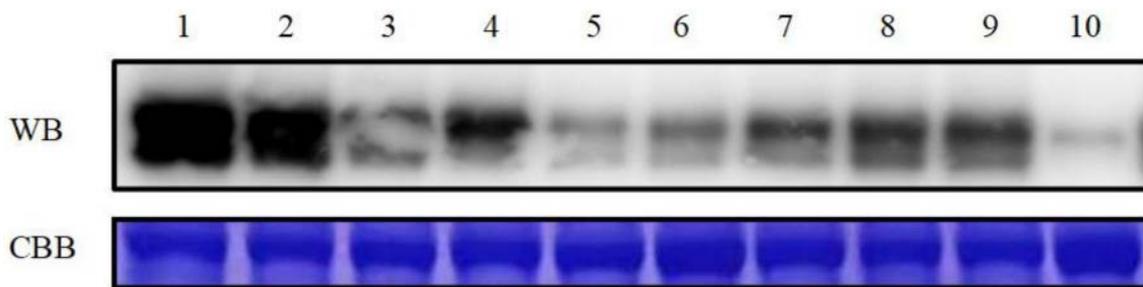


图5

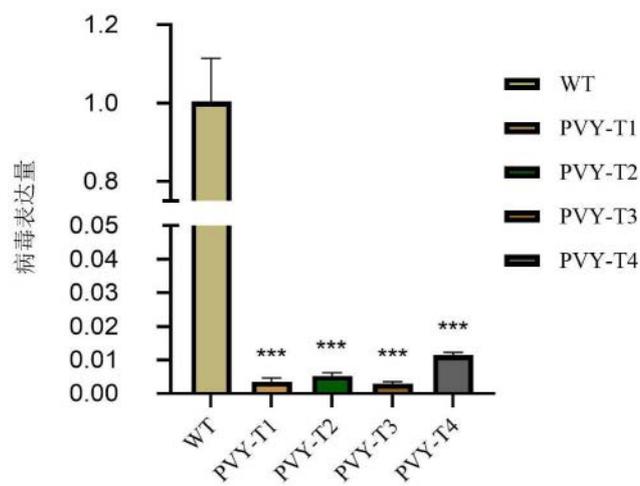


图6

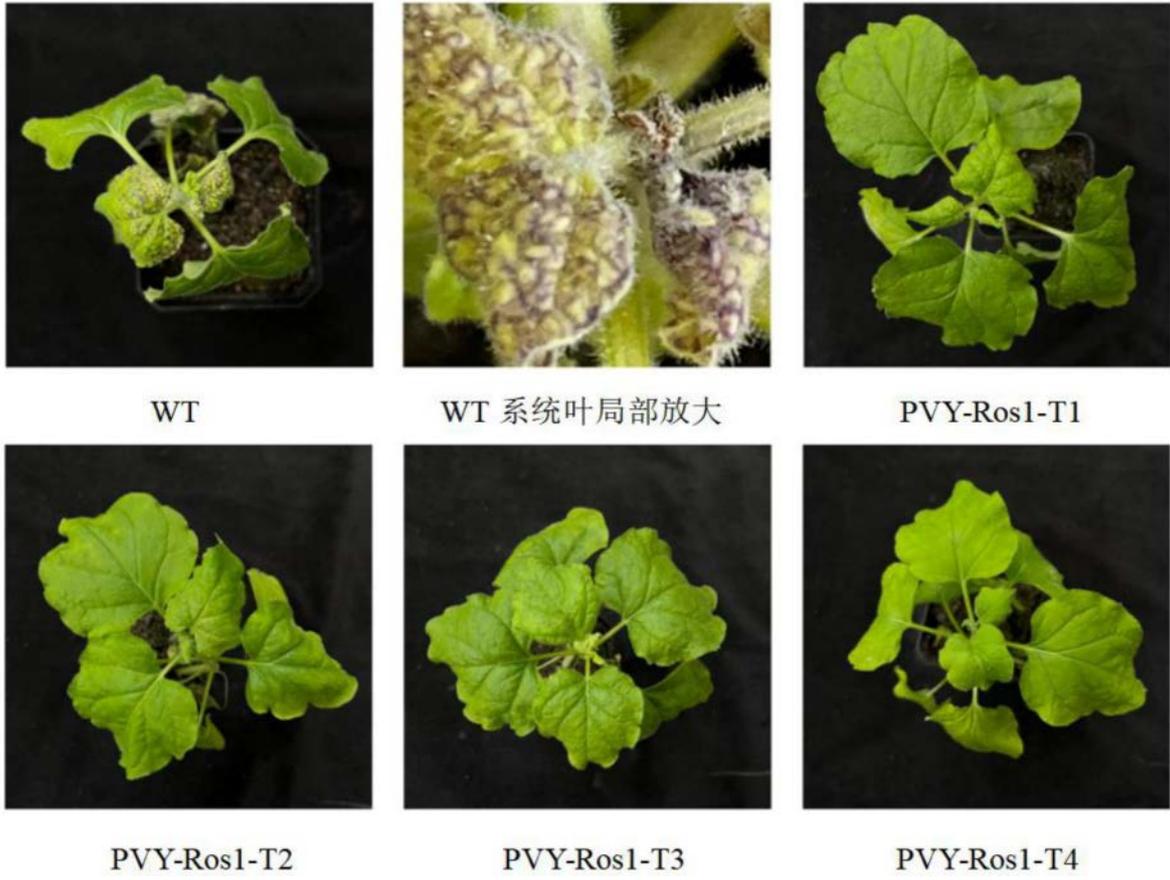


图7