



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 117802104 A

(43) 申请公布日 2024. 04. 02

(21) 申请号 202410157230.2

(22) 申请日 2024.02.04

(71) 申请人 中国科学院动物研究所

地址 100101 北京市朝阳区北辰西路1号院
5号

(72) 发明人 崔峰 赵婉

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245

专利代理师 关畅

(51) Int. Cl.

C12N 15/113 (2010.01)

C12N 15/82 (2006.01)

A01H 5/00 (2018.01)

A01H 6/46 (2018.01)

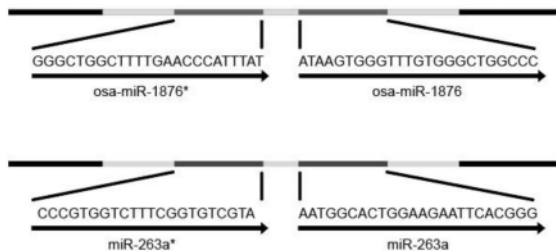
权利要求书2页 说明书14页
序列表(电子公布) 附图1页

(54) 发明名称

媒介昆虫来源的miRNA在抑制水稻条纹病毒
侵染中的应用

(57) 摘要

本发明公开了媒介昆虫来源的miRNA在抑制水稻条纹病毒侵染中的应用,属于生物技术领域。所述miRNA是如下A1)、A2)的miRNA:A1)核苷酸序列为SEQ ID No.1的单链RNA分子;A2)将SEQ ID No.1所示的核苷酸序列经过核苷酸的取代和/或缺失和/或添加得到的与A1)所示的RNA分子具有90%以上的同一性且与植物对水稻条纹病毒的抗性相关的miRNA。本发明通过实验证明,miR-263a的过表达水稻中NP的含量要显著低于野生品系中NP的含量,表明过表达miR-263a可抑制RSV病毒在植物的增殖。



1. miRNA或调控miRNA表达的物质的应用,其特征在于,所述应用为下述任一种:
 - H1) miRNA或调控miRNA表达的物质在调控植物对水稻条纹病毒的抗性中的应用;
 - H2) miRNA或调控miRNA表达的物质在制备调控植物对水稻条纹病毒的抗性的产品中的应用;
 - H3) miRNA或调控miRNA表达的物质在植物育种中的应用;所述miRNA是如下A1)、A2)的miRNA:
 - A1) 核苷酸序列为SEQ ID No.1的单链RNA分子;
 - A2) 将SEQ ID No.1所示的核苷酸序列经过核苷酸的取代和/或缺失和/或添加得到的与A1)所示的RNA分子具有90%以上的同一性且与植物对水稻条纹病毒的抗性相关的miRNA。
2. 根据权利要求1所述的应用,其特征在于,所述调控植物对水稻条纹病毒的抗性为提高植物对水稻条纹病毒的抗性。
3. 根据权利要求1所述的应用,其特征在于,所述物质为促进植物中所述miRNA表达的物质。
4. 根据权利要求1-3任一所述的应用,其特征在于,所述物质均为下述任一种:
 - B1) 产生权利要求1中所述miRNA的核酸分子或产生权利要求1中所述miRNA的前体的核酸分子;
 - B2)、含有B1)所述核酸分子的表达盒;
 - B3)、含有B1)所述核酸分子的重组载体、或含有B2)所述表达盒的重组载体;
 - B4)、含有B1)所述核酸分子的重组微生物、或含有B2)所述表达盒的重组微生物、或含有B3)所述重组载体的重组微生物;
 - B5)、含有B1)所述核酸分子的转基因植物细胞系、或含有B2)所述表达盒的转基因植物细胞系;
 - B6)、含有B1)所述核酸分子的转基因植物组织、或含有B2)所述表达盒的转基因植物组织;
 - B7)、含有B1)所述核酸分子的转基因植物器官、或含有B2)所述表达盒的转基因植物器官。
5. 根据权利要求4所述的应用,其特征在于,B1)所述核酸分子是核苷酸序列为SEQ ID No.2的DNA分子。
6. 根据权利要求1-5中任一所述的应用,其特征在于,所述植物为下述任一种:
 - G1) 单子叶植物或双子叶植物;
 - G2) 禾本目植物;
 - G3) 禾本科植物;
 - G4) 稻属;
 - G5) 水稻。
7. 一种提高植物对水稻条纹病毒的抗性的方法,包括提高目的植物中权利要求1所述miRNA基因表达量或/和所述miRNA的前体的基因表达量或/和所述miRNA的含量或/和所述miRNA的前体的含量,以提高植物对水稻条纹病毒的抗性。
8. 培育对水稻条纹病毒的抗性提高的植物的方法,包括提高目的植物中权利要求1所

述miRNA基因表达量或/和所述miRNA的前体的基因表达量或/和所述miRNA的含量或/和所述miRNA的前体的含量,得到对水稻条纹病毒的抗性提高的植物;所述对水稻条纹病毒的抗性提高的植物对水稻条纹病毒的抗性高于所述目的植物。

9.根据权利要求8所述的方法,其特征在于,所述提高目的植物中权利要求1所述miRNA的含量或/和所述miRNA的前体的含量或/和所述miRNA基因表达量或/和所述miRNA的前体的基因表达量是通过将权利要求4或5所述的核酸分子导入所述目的植物实现的。

10.权利要求1中所述的miRNA或权利要求4中所述的物质。

媒介昆虫来源的miRNA在抑制水稻条纹病毒侵染中的应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,具体涉及媒介昆虫来源的miRNA在抑制水稻条纹病毒侵染中的应用。

背景技术

[0002] 植物病毒对农作物和经济作物造成危害,约80%的植物病毒依赖昆虫作为媒介传播(Hohn,2007)。虫媒病毒病的防治非常复杂,需要控制病毒在植物和昆虫中的增殖和传播。而现有的商业化药剂多是针对虫媒的杀虫剂,或是针对作物的免疫诱抗剂,尚缺乏有效的针对病毒的特效药。面对绿色生态建设的需求,阻断病毒在虫媒源头传播成为保障粮食和经济作物产量稳定的重要需求。

[0003] RSV通过灰飞虱在水稻田间传播。病毒通过灰飞虱取食带毒水稻进入虫体,感染虫媒肠腔,然后穿过肠壁进入血淋巴,随后循环并运输到脑、唾液腺、精巢和卵巢等其他组织(Toriyama,S.(1986)Rice stripe virus:prototype of a new group of viruses that replicate in plants and insects.MicrobiolSci,3,347-51.)。当感毒灰飞虱取食健康水稻时,病毒会随着昆虫分泌的唾液,水平传播至新的水稻植株,实现新一轮的侵染。唾液腺作为连接昆虫和植物的桥梁,在病毒水平传播过程中起关键作用,其中的关键效应因子如唾液蛋白或小RNA,可参与调控病毒的传播和侵染。

[0004] RNA干扰(RNA interference, RNAi)是昆虫抗病毒的天然免疫机制(Ding,S.W.and Voinnet,O.(2007)Antiviral immunity directed by small RNAs.Cell,130,413-26., Carthew,R.W.and Sontheimer,E.J.(2009)Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs.Cell,136,642-55.)。已有研究发现,来源于昆虫的miRNA和小干扰RNA可以调控病毒在虫体的增殖(Kutter,C.and Svoboda,P.(2008)miRNA,siRNA,piRNA:Knowns of the unknown.RNA Biol,5,181-8.)。研究还发现,在可传播多种人类致病病原的蚊、蜱的唾液腺或分泌的唾液中可以检测到昆虫源小RNA的存在,表明小RNA可能通过唾液腺分泌至人类寄主(Arca,B.,Colantoni,A.,Fiorillo,C.,Severini,F.,Benes,V.,Di Luca,M.,et al.(2019)MicroRNAs from saliva of anopheline mosquitoes mimic human endogenous miRNAs and may contribute to vector-host-pathogen interactions.Sci Rep,9,2955.;Malik,M.I.,Nawaz,M.,Hassan,I.A.,Zhang,H.,Gong,H.,Cao,J.,et al.(2019)A microRNA profile of saliva and role of miR-375 in Haemaphysalis longicornis (Ixodida:Ixodidae).Parasit Vectors,12,68.)。然而,目前还不清楚虫媒的唾液小RNA是否可以进入植物,并调控植物对病毒的抗性。

发明内容

[0005] 本发明所要解决的技术问题是在水稻植株中过表达成熟体为24nt的昆虫来源的miRNA。所要解决的技术问题不限于所描述的技术主题,本领域技术人员通过以下描述可以清楚地理解本文未提及的其它技术主题。

- [0006] 为解决上述技术问题,本发明提供了以下技术方案:
- [0007] 本发明提供miRNA或调控miRNA表达的物质的应用,所述应用为下述任一种:
- [0008] H1)miRNA或调控miRNA表达的物质在调控植物对水稻条纹病毒的抗性中的应用;
- [0009] H2)miRNA或调控miRNA表达的物质在制备调控植物对水稻条纹病毒的抗性的产品中的应用;
- [0010] H3)miRNA或调控miRNA表达的物质在植物育种中的应用;
- [0011] 所述miRNA是如下A1)、A2)的miRNA:
- [0012] A1)核苷酸序列为SEQ ID No.1的单链RNA分子;
- [0013] A2)将SEQ ID No.1所示的核苷酸序列经过核苷酸的取代和/或缺失和/或添加得到的与A1)所示的RNA分子具有90%以上的同一性且与植物对水稻条纹病毒的抗性相关的miRNA。
- [0014] 上述miRNA可人工合成,也可先合成编码其前体的DNA,再进行生物表达得到。
- [0015] 本文中,同一性是指氨基酸序列或核苷酸序列的同一性。可使用国际互联网上的同源性检索站点测定氨基酸序列的同一性,如NCBI主页网站的BLAST网页。例如,可在高级BLAST2.1中,通过使用blastp作为程序,将Expect值设置为10,将所有Filter设置为OFF,使用BLOSUM62作为Matrix,将Gap existence cost,Per residue gap cost和Lambda ratio分别设置为11,1和0.85(缺省值)并进行检索以对氨基酸序列的同一性进行计算,然后即可获得同一性的值(%)。
- [0016] 本文中,所述90%以上的同一性可为至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的同一性。
- [0017] 上述调控可为上调或增强或提高植物中所述miRNA的编码基因表达或所述miRNA含量或活性,也可下调或抑制或降低植物中所述miRNA的编码基因表达或所述miRNA含量或活性。
- [0018] 上述调控植物对水稻条纹病毒的抗性可为上调或增强或提高植物对水稻条纹病毒的抗性,也可下调或抑制或降低植物对水稻条纹病毒的抗性。
- [0019] 所述植物育种可为培育对水稻条纹病毒的抗性上调或增强或提高的植物,也可对水稻条纹病毒的抗性下调或抑制或降低的植物。
- [0020] 进一步地,上述应用中,所述调控植物对水稻条纹病毒的抗性为提高植物对水稻条纹病毒的抗性。
- [0021] 进一步地,上述应用中,所述物质为促进植物中所述miRNA表达的物质。
- [0022] 进一步地,上述应用中,所述物质均为下述任一种:
- [0023] B1)产生前述miRNA的核酸分子或产生前述miRNA的前体的核酸分子;
- [0024] B2)、含有B1)所述核酸分子的表达盒;
- [0025] B3)、含有B1)所述核酸分子的重组载体、或含有B2)所述表达盒的重组载体;
- [0026] B4)、含有B1)所述核酸分子的重组微生物、或含有B2)所述表达盒的重组微生物、或含有B3)所述重组载体的重组微生物;
- [0027] B5)、含有B1)所述核酸分子的转基因植物细胞系、或含有B2)所述表达盒的转基因植物细胞系;
- [0028] B6)、含有B1)所述核酸分子的转基因植物组织、或含有B2)所述表达盒的转基因植

物组织;

[0029] B7)、含有B1)所述核酸分子的转基因植物器官、或含有B2)所述表达盒的转基因植物器官。

[0030] B1)所述核酸分子为DNA分子,所述DNA分子能够转录成所述miRNA的前体,并进而加工形成所述miRNA。

[0031] 进一步地,上述应用中,B1)所述核酸分子是核苷酸序列为SEQ ID No.2的DNA分子。

[0032] 上述生物材料中,B2)所述的含有核酸分子的表达盒,是指能够在宿主细胞中表达编码上述应用中所述miRNA前体的DNA分子,该DNA不但可包括启动编码基因表达的启动子,还可包括终止编码基因表达的终止子。进一步,所述表达盒还可包括增强子序列。可用于本发明的启动子包括但不限于:组成型启动子,组织、器官和发育特异的启动子,以及诱导型启动子。启动子的例子包括但不限于:花椰菜花叶病毒的组成型启动子35S;来自西红柿的创伤诱导型启动子,亮氨酸氨基肽酶("LAP",Chao等人(1999)Plant Physiology 120:979-992);来自烟草的化学诱导型启动子,发病机理相关1(PR1)(由水杨酸和BTH(苯并噻二唑-7-硫代羧酸S-甲酯)诱导);西红柿蛋白酶抑制剂II启动子(PIN2)或LAP启动子(均可用茉莉酮酸甲酯诱导);热休克启动子(美国专利5,187,267);四环素诱导型启动子(美国专利5,057,422);种子特异性启动子,如谷子种子特异性启动子pF128(CN101063139B(中国专利200710099169.7)),种子贮存蛋白质特异的启动子(例如,菜豆球蛋白、napin,oleosin和大豆beta conglycin的启动子(Beachy等人(1985)EMBO J.4:3047-3053))。它们可单独使用或与其它植物启动子结合使用。此处引用的所有参考文献均全文引用。合适的转录终止子包括但不限于:农杆菌胭脂碱合成酶终止子(NOS终止子)、花椰菜花叶病毒CaMV 35S终止子、tm1终止子、豌豆rbcS E9终止子和胭脂氨酸和章鱼氨酸合酶终止子(参见,例如:Ode11等人(1985)Nature 313:810;Rosenberg等人(1987)Gene,56:125;Guerineau等人(1991)Mol.Gen.Genet,262:141;Proudfoot(1991)Cell,64:671;Sanfacon等人GenesDev.,5:141;Mogen等人(1990)Plant Cell,2:1261;Munroe等人(1990)Gene,91:151;Ballad等人(1989)Nucleic Acids Res.17:7891;Joshi等人(1987)Nucleic Acid Res.,15:9627)。

[0033] 可用现有的植物表达载体构建含有所述编码基因表达盒的重组表达载体。所述植物表达载体包括双元农杆菌载体和可用于植物微弹轰击的载体等。如pAHC25、pWMB123、pBin438、pCAMBIA1302、pCAMBIA2301、pCAMBIA1301、pCAMBIA1300、pBI121、pCAMBIA1391-Xa或pCAMBIA1391-Xb(CAMBIA公司)等。所述植物表达载体还可包含外源基因的3'端非翻译区域,即包含聚腺苷酸信号和任何其它参与mRNA加工或基因表达的DNA片段。所述聚腺苷酸信号可引导聚腺苷酸加入到mRNA前体的3'端,如农杆菌冠瘿瘤诱导(Ti)质粒基因(如胭脂碱合成酶基因Nos)、植物基因(如大豆贮存蛋白基因)3'端转录的非翻译区均具有类似功能。使用本发明的基因构建植物表达载体时,还可使用增强子,包括翻译增强子或转录增强子,这些增强子区域可以是ATG起始密码子或邻接区域起始密码子等,但必需与编码序列的阅读框相同,以保证整个序列的正确翻译。所述翻译控制信号和起始密码子的来源是广泛的,可以是天然的,也可以是合成的。翻译起始区域可以来自转录起始区域或结构基因。为了便于对转基因植物细胞或植物进行鉴定及筛选,可对所用植物表达载体进行加工,如加入可在植物中表达的编码可产生颜色变化的酶或发光化合物的基因(GUS基因、萤光素酶基因

等)、抗生素的标记基因(如赋予对卡那霉素和相关抗生素抗性的nptII基因,赋予对除草剂膦丝菌素抗性的bar基因,赋予对抗生素潮霉素抗性的hph基因,和赋予对methatrexate抗性的dhfr基因,赋予对草甘磷抗性的EPSPS基因)或是抗化学试剂标记基因等(如抗除莠剂基因)、提供代谢甘露糖能力的甘露糖-6-磷酸异构酶基因。从转基因植物的安全性考虑,可不加任何选择性标记基因,直接以逆境筛选转化植株。

[0034] 上述生物材料中,所述重组微生物具体可为酵母,细菌,藻和真菌。

[0035] 进一步地,上述应用中,所述植物为下述任一种:

[0036] G1) 单子叶植物或双子叶植物;

[0037] G2) 禾本目植物;

[0038] G3) 禾本科植物;

[0039] G4) 稻属;

[0040] G5) 水稻。

[0041] 本发明提供一种提高植物对水稻条纹病毒的抗性的方法,包括提高目的植物中前述miRNA基因表达量或/和所述miRNA的前体的基因表达量或/和所述miRNA的含量或/和所述miRNA的前体的含量,以提高植物对水稻条纹病毒的抗性。

[0042] 本发明提供培育对水稻条纹病毒的抗性提高的植物的方法,包括提高目的植物中前述miRNA基因表达量或/和所述miRNA的前体的基因表达量或/和所述miRNA的含量或/和所述miRNA的前体的含量,得到对水稻条纹病毒的抗性提高的植物;所述对水稻条纹病毒的抗性提高的植物对水稻条纹病毒的抗性高于所述目的植物。

[0043] 进一步地,上述方法中,所述提高目的植物前述miRNA的含量或/和所述miRNA的前体的含量或/和所述miRNA基因表达量或/和所述miRNA的前体的基因表达量是通过将前述的核酸分子导入所述目的植物实现的。

[0044] 所述miRNA前体的编码基因可通过使用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 PlantMolecular Biology VIII,Academy Press,New York,pp.411-463;Geiserson and Corey,1998,Plant Molecular Biology(2nd Edition)。

[0045] 上述方法中,所述转基因植物理解为不仅包含第一代到第二代转基因植物,也包括其子代。对于转基因植物,可以在该物种中繁殖该基因,也可用常规育种技术将该基因转移进入相同物种的其它品种,特别包括商业品种中。所述转基因植物包括种子、愈伤组织、完整植株和细胞。

[0046] 前述的miRNA或物质也属于本发明的保护范围。

[0047] 本申请不仅提供了一种在水稻中表达外源miRNA的方法,而且提供了一种能够获得抵抗病原体植株的方法,所述方法包括:构建miR-263a的植物过表达载体,增加所述植物miR-263a的转录水平,从而增加miR-263a的表达水平。

[0048] 本发明以水稻—灰飞虱—RSV为研究对象,研究灰飞虱唾液腺中的miRNA抑制病毒在水稻中增殖的分子机制。结果发现了一个来源于灰飞虱的miRNA,miR-263a,在灰飞虱取水稻的过程中可伴随唾液传播至水稻植株中,抑制了水稻中RSV的增殖。miR-263a的成熟体长度为24nt,而现有的水稻商业化过表达载体只能表达成熟体为21nt的miRNA,不能适用miR-263a的过表达,因此制备了miR-263a过表达载体以及相应的基因编辑水稻。研究发现

该基因编辑水稻显著降低了RSV的增殖,还显著的降低了RSV在水稻中的发病率。由此可见,过表达miR-263a在植物抗病中具有较好的应用潜能。本发明的结果将加深研究者对昆虫唾液腺功能性miRNA调控植物病毒增殖和传播机制的理解,丰富关于昆虫介导病毒传播的理论研究,并为RSV的防治提供潜在的治理靶点。

附图说明

[0049] 图1为miR-263a植物过表达载体骨架构建示意图。图注:绿色表示水稻miR-1876的成熟体序列(可产生的成熟体为24nt)和其互补序列(osa-miR-1876*);红色表述miR-263a的成熟体序列和其反义链(miR-263a*)。

[0050] 图2为水稻原生质体过表达miR-263a;(A)显微镜检测水稻原生质体的活性。(B)定量检测转染过表达载体前后水稻原生质体的miR-263a的表达量以及病毒NP的表达量。数据用平均值±标准误表示。使用t-检验统计差异显著性。“*”表示 $p<0.05$,即差异显著;“**”表示 $p<0.01$,即差异极显著。

[0051] 图3为水稻中过表达miR-263a抑制病毒的积累。(A) qPCR鉴定过表达品系中miR-263a的含量。(B) Northern blotting检测过表达水稻品系中miR-263a的成熟体以及前体。(C) 接毒处理后qPCR检测RSVNP的表达量。数据用平均值±标准误表示。使用one-wayANOVA统计差异显著性,不同字母表示差异显著($p<0.05$)。

具体实施方式

[0052] 下面结合具体实施方式对本发明进行进一步的详细描述,给出的实施例仅为了阐明本发明,而不是为了限制本发明的范围。以下提供的实施例可作为本技术领域普通技术人员进行进一步改进的指南,并不以任何方式构成对本发明的限制。

[0053] 下述实施例中的实验方法,如无特殊说明,均为常规方法,按照本领域内的文献所描述的技术或条件或者按照产品说明书进行。下述实施例中所用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。

[0054] 水稻条纹病毒(RSV)和带毒灰飞虱:记载于非专利文献“Zhao,W.,Yang,P.,Kang,L.and Cui,F.(2016) Different pathogenicities of Rice stripe virus from the insect vector and from viruliferous plants. *New Phytologist*, 210, 196-207.”,感染RSV的水稻以及灰飞虱可从中国科学院动物研究所媒介昆虫与病毒基因组学研究所获得,病毒基因组的四条RNA链序列已上传于NCBI(accession numbers MF287953-MF287956)。

[0055] 实施例1、miR-263a过表达载体的构建

[0056] 基于Northern blotting,qPCR以及sanger测序,发明人证明miR-263a来自于灰飞虱,其全长序列为5'-AAUGGCACUGGAAGAAUUCACGGG-3'(对应于SEQ ID No.1:5'-AATGGCACTGGAAGAATTCACGGG-3')长度为24个核苷酸(nucleotide,nt)。植物体miRNA的长度在20-24nt,多集中在20-22nt。目前水稻中miRNA的过表达已广泛应用于商业中,但过表达载体的骨架是根据水稻中miR-528前体序列设计的,只可以产生成熟体为21nt的miRNA,不适用于其他长度miRNA的过表达,因此同样不适用于本研究中miR-263a的过表达。因此,基于文献调研与前期实验,发明人筛选了在水稻中高丰度的,且成熟体同样为24nt的miR-1876作为实验对象,以期利用其前体序列(primary miRNA,pri-miRNA)作为骨架,表达虫

源的miR-263a。具体步骤如下:

[0057] 首先从水稻的转录本里克隆到了miR-1876的部分pri-miRNA的cDNA基因序列,长度为490bp,序列如下:

[0058] miR-1876的部分pri-miRNA

[0059] CCCACAGUCUCAUAUUAAGGGGGCAGAAUAUACAGACGUUUCUCAAUUUUAGUGUUAUUAUUCUCCAC
AUGUCAUAAUUUAAAAGAUAGCCAAGCCAAGUUCUGAAGUCAAGAAGGUUUAAGUAAGAUUUUGUUUAGCAGGGAUUU
GGAAGGCACAUUGUUGGUAAUUCUAUUGGAAUGCAAGUGGGCUGGCUUUUGAACCCAUUUUAGGGCUAUUCAAGUGG
GUAACCAUAGGUUGGUGCACUUAUUUGGCCUAAUAGUGGGUUUGUGGGCUGGCCUCUUGUAUCCUGAUAGUUUAG
UAUGAUUGGUAAUAAUAGCAAUGCUACUUUUAAAUUUAAAGGUUUGUUAUGGACUAGUGAUACUGUUAUGGGAUCGA
GUACCAGUGGCACAAGAAACUACUGGCUAGUCUCGUAGCUUGCUAGGUACUCCCUUGUCCCAAAUAAACAAAGCU
AGUACGGGAUGUGGCACUCCUAGUCCUGUACUAG

[0060] miR-1876的部分pri-miRNA的cDNA基因序列

[0061] 5'-CCCACAGTCTCATATTAAGGGGGCAGAATATACAGACGTTTCTTCAATTTTAGTGTTATTATTCT
CCACATGTCATAATTTTAAAGATAGCCAAGCCAAGTTCTGAAGTCAAGAAGGTTTAGTAAGATTTTGTTCAGCAGG
GATTTGGAAGGCACATATGTTGGTATTCTATTGGAATGCAAGTGGGCTGGCTTTTGAACCCATTTATGGGCTATTC
AAGTGGGTAAACCATAGGTTGGTGCACCTAAATGGCCTATAAGTGGGTTTGTGGGCTGGCCCTCTGTATCCTGAT
AGTTTAGTATGATTGGTAATAATAGCAATGCTACTTTTAAATTTAAGGTTTGTATGGACTAGTGATAACTGTTAT
GGGATCGAGTACCAGTGGCACAAGAACTACTGGCTAGTCTCGTAGCTTGCTAGGTACTCCCTCTGTCCCAAATA
AACAAAGCTAGTACGGGGATGTGGCACTTCCTAGTCTGTACTAG-3'

[0062] 其中位于下游序列的下划线标注的是miR-1876成熟体基因序列:5'-ATAAGTGGGTTTGTGGGCTGGCCC-3',位于上游序列的下划线标注的是miR-1876成熟体的反义链序列(miR-1876*):5'-GGGCTGGCTTTTGAACCCATTTAT-3'。将克隆得到的miR-1876的部分pri-miRNA中的miR-1876的成熟体和反义链序列分别替换成miR-263a的成熟体和反义链序列(miR-263a*),得到了miR-263a在水稻中的pri-miRNA(对应于SEQ ID No.2),用于后续的转染操作中。miR-263a植物过表达载体骨架构建示意图如图1。

[0063] miR-263a在水稻中的pri-miRNA

[0064] CCCACAGUCUCAUAUUAAGGGGGCAGAAUAUACAGACGUUUCUCAAUUUUAGUGUUAUUAUUCUCCAC
AUGUCAUAAUUUAAAAGAUAGCCAAGCCAAGUUCUGAAGUCAAGAAGGUUUAAGUAAGAUUUUGUUUAGCAGGGAUUU
GGAAGGCACAUUGUUGGUAAUUCUAUUGGAAUGCAAGUCCCGUGGUCUUUCGGUGUCGUAGGGCUAUUCAAGUGGGU
AAACCAUAGGUUGGUGCACUUAUUUGGCCUAAUUGGCACUGGAAGAAUUCACGGGUCUUGUAUCCUGAUAGUUUAGUA
UGAUUGGUAAUAAUAGCAAUGCUACUUUUAAAUUUAAAGGUUUGUUAUGGACUAGUGAUACUGUUAUGGGAUCGAGU
ACCAGUGGCACAAGAAACUACUGGCUAGUCUCGUAGCUUGCUAGGUACUCCCUUGUCCCAAAUAAACAAAGCUAG
UACGGGAUGUGGCACUCCUAGUCCUGUACUAG

[0065] SEQ ID No.2:

[0066] 5'-CCCACAGTCTCATATTAAGGGGGCAGAATATACAGACGTTTCTTCAATTTTAGTGTTATTATTCT
CCACATGTCATAATTTTAAAGATAGCCAAGCCAAGTTCTGAAGTCAAGAAGGTTTAGTAAGATTTTGTTCAGCAGG
GATTTGGAAGGCACATATGTTGGTATTCTATTGGAATGCAAGTCCCGTGGTCTTTCGGTGTCTGAGGGCTATTCAA
GTGGGTAAACCATAGGTTGGTGCACCTAAATGGCCTAATGGCACTGGAAGAATTCACGGGTCTGTATCCTGATAG
TTTAGTATGATTGGTAATAATAGCAATGCTACTTTTAAATTTAAGGTTTGTATGGACTAGTGATAACTGTTATGG

GATCGAGTACCAGTGGCACAAGAACTACTGGCTAGTCTCGTAGCTTGCTAGGTACTCCCTCTGTCCCAAATAAA
CAAAGCTAGTACGGGGATGTGGCACTTCCTAGTCCTGTACTAG-3'。

[0067] 其中位于下游的下划线标注的是miR-263a成熟体基因序列:5'-AATGGCACTGGAAGAATTCACGGG-3',位于上游的下划线标注的是miR-263a成熟体的反义链序列(miR-263a*):5'-CCCGTGGTCTTTTCGGTGTCTGTA-3'。将构建好的miR-263a在水稻中的pri-miRNA序列(SEQ ID No.2序列)插入到植物表达载体pBI221(购于武汉淼灵生物科技有限公司,货号为P6700)BamHI和SmaI酶切识别位点之间,且保持pBI221的其他核苷酸序列不变得得到重组表达载体pBI221-0E263a。

[0068] 将pBI221-0E263a转化大肠杆菌DH5 α ,取1mL菌液,加入100mL具有氨苄抗性的LB液体培养基中,置于37℃的摇床中,转速200rpm,过夜摇菌。使用无内毒素质粒大提试剂盒(DP117, TIANGEN BIOTECH, Beijing, China)大量提取无内毒素的表达质粒,冻存于-20℃备用。具体步骤如下:

[0069] (1)柱平衡步骤:向吸附柱中加入2.5mL BL平衡液,8000rpm,离心2分钟,弃废液,将吸附柱重新放回收集管中。

[0070] (2)取100mL菌液加入离心管,室温8000rpm离心3分钟收集细菌,吸除上清。

[0071] (3)向离心管中加入8mL P1溶液,使用涡旋振荡器彻底悬浮细菌细胞沉淀。

[0072] (4)向离心管中加入8mL P2溶液,立即温和地上下翻转8次,使菌体充分裂解,室温放置5分钟。

[0073] (5)向离心管中加入8mL P4溶液,立即温和地上下翻转8次,充分混匀,至溶液出现白色分散絮状沉淀。然后室温放置10分钟左右。8000rpm离心30分钟,使白色沉淀至管底,将全部液小心倒入过滤器CS1中,慢慢推动推柄过滤,滤液收集在干净的50mL的管中。

[0074] (6)向滤液中加入0.3倍滤液体积的异丙醇,上下颠倒混匀后转移到吸附柱CP6中。

[0075] (7)室温下8000rpm离心2分钟,倒掉收集管中的废液,将吸附柱CP6重新放回收集管中。

[0076] (8)向吸附柱CP6中加入10mL PW漂洗液,8000rpm离心2分钟,弃掉收集管中的废液,将吸附柱重新放回收集管中。

[0077] (9)重复操作步骤8。

[0078] (10)向吸附柱CP6中加入3mL无水乙醇,室温8000rpm离心2分钟,倒掉废液。

[0079] (11)将吸附柱CP6重新放回收集管中,8000rpm离心5分钟,将吸附柱中残余的漂洗液去除。

[0080] (12)将吸附柱CP6置于一个干净的50mL收集管中,向吸附膜的中间部位悬空滴加600 μ L ddH₂O,室温放置5分钟,然后室温8000rpm离心2分钟。将50mL离心管中的洗脱液全部移入一个干净的1.5mL离心管,置于-20℃保存。

[0081] 实施例2、miR-263a过表达水稻原生质体的制备

[0082] 一、水稻原生质体的制备

[0083] 收集未接种病毒的、健康的武育粳水稻幼苗,利用水稻原生质体制备及转化试剂盒(PPT111-10T, Coolaber Bio, Beijing, China)制备水稻原生质体,具体操作如下:

[0084] 1、准备7d的无毒水稻幼苗,用锋利的刀片去除水稻的根和叶尖,尽可能保留基部的分生组织。每次切5-10株幼苗,将叶片垂直主叶脉切成0.5-1.0mm的小段。

[0085] 2、将切好的水稻小段放入新鲜配置的20mL酶液的小烧杯中,锡箔纸包裹,烧杯口留洞,抽真空30min(15Hg/50kpa/0.5)。所述酶液含16mL溶液I、0.3g Cellulose R10、0.15g Macerozyme R10、200 μ L BSA(10%)、7.14 μ L β -巯基乙醇、10 μ L Amp(100mg/mL)。

[0086] 3、避光室温40-50rpm摇床上摇动4h。收集原生质体前,轻轻摇晃小烧杯,让细胞完全释放出来。

[0087] 4、用1mL预冷的溶液II-W5solution润洗细胞筛后,弃废液。

[0088] 5、将酶解后的产物用细胞筛过滤,肉眼可见浓绿色液体滴落。用10mL预冷的溶液II-W5solution冲洗酶解器皿和未消化的叶片2-3次,将所有的液体收到50mL离心管中。

[0089] 6、选用水平转子,150g离心5min,去除上清(管中绿色沉淀即为原生质体)。

[0090] 7、用10mL预冷的溶液II-W5 solution轻轻重悬位于底部的原生质体,轻轻悬起混匀,150g离心3min,去上清。

[0091] 8、加入1mL预冷的溶液II-W5 solution,重悬原生质体,冰上避光静置30min。

[0092] 9、在离心前,可以显微镜下观察原生质体的状态和血球计数板计数。

[0093] 二、水稻原生质体的转化及感染

[0094] 利用水稻原生质体制备及转化试剂盒(PPT111-10T,CoolaberBio,Beijing,China)将前述重组表达载体pBI221-0E263a转化水稻原生质体,具体操作如下:

[0095] 1、根据前期摸索的条件,利用PBS缓冲液提取带RSV水稻幼苗的RSV病毒粗提液,具体操作方法如下:

[0096] (1)收集100只实验室饲养的带毒灰飞虱(四龄幼虫),放至1.5mL的无RNA酶的EP管中,加入100 μ L PBS缓冲液(pH 7.2),研磨充分后在冰上静置5分钟。

[0097] (2)12000rpm,4℃离心15分钟,取上清转移到干净的EP管中。

[0098] (3)重复离心4-5次,直到上清变得澄清无杂质,以此得到RSV病毒粗提液。

[0099] 2、ELISA定量RSV粗提液

[0100] (1)在PBS缓冲液(pH 7.2)中准备NP标准品。制备九个稀释浓度(0、0.0045、0.045、0.45、4.5、12.5、25、45、90ng/ml)。

[0101] (2)设置RSV原始提取物作为样品,向96孔ELISA板的每个孔中分别加入100 μ L标准品和样品,并用100 μ L 1xELISAc coating buffer(Solarbio,catalog number:C1050)混合,在4℃下孵育过夜。

[0102] (3)每个孔用200 μ L PBST洗涤三次,每次至少3分钟。

[0103] (4)向每个孔中加入200 μ L封闭液(含5%脱脂奶粉的PBST缓冲液),在室温下孵育至少30分钟。

[0104] (5)重复(3)步骤洗涤。

[0105] (6)向每个孔中加入100 μ L实验室制备的单克隆抗NP抗体稀释液(1:2000倍稀释于封闭液中),在室温下孵育1.5小时。

[0106] (7)重复(3)步骤洗涤。

[0107] (8)向每个孔中加入100 μ L稀释的羊抗小鼠IgG,HRP偶联抗体(Thermo Fisher Scientific,InvitrogenTM,catalog number:32430)(1:5000倍稀释于封闭液中),在室温下孵育1.5小时。

[0108] (9)去除上清液,并用PBST洗涤板子五次,每次1分钟。

- [0109] (10) 向每个孔中加入100 μ L TMB溶液 (Sigma-Aldrich, catalog number: T0440)。
- [0110] (11) 在室温下用Decolorizing Orbital Shaker轻轻摇动30分钟。
- [0111] 注意: 该反应应该避免光照。
- [0112] (12) 向反应中加入100 μ L 2M H_2SO_4 或1% SDS停止反应。
- [0113] 注意: 确保所有孔中颜色已经从蓝色变为黄色。
- [0114] (13) 在SpectraMax® Paradigm®多模式检测平台上在5分钟内读取波长450nm处的光密度(OD)。调整NP的最终浓度为1 μ g/mL, 用0.45 μ m的滤膜过滤除菌备用, 得到无菌的RSV粗提液。
- [0115] 3、在2ml的圆底离心管中分别加入100 μ L步骤一中得到的原生质体, 10 μ L (10-20 μ g) 纯化后且去内毒素的重组表达载体pBI221-0E263a, 10 μ L过滤除菌的RSV粗提液, 再加入120 μ L溶液IV-PEG solution轻轻混匀, 28 $^{\circ}$ C放置30min。
- [0116] 4、加入1.6mL预冷的溶液II-W5 solution, 轻柔混匀, 终止转化。常温150g离心3min, 尽可能去掉上清。
- [0117] 5、加入2mL预冷的溶液II-W5 solution悬浮原生质体, 常温150g离心3min, 去上清, 得到接种RSV的水稻原生质体。
- [0118] 三、原生质体的培养和收集
- [0119] 1、向上述接种RSV的水稻原生质体中加入1mL预冷的溶液II-W5 solution悬浮细胞。将离心管水平室温放置(避免强光照射), 孵育48h。
- [0120] 2、收集细胞时, 缓慢将离心管拿起, 用枪头轻柔的将附着在管壁上的细胞悬起, 离心管室温垂直静置几分钟后再离心, 150g离心3min, 去除大部分溶液II-W5 solution, 收集原生质体, 用于后续RNA提取以及定量实验。
- [0121] 将经过同样试剂处理, 但未接种RSV的水稻原生质体作为阴性对照。
- [0122] 四、qPCR检测原生质体的miR-263a及病毒含量
- [0123] 采用Trizol法 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 提取接种RSV前后的水稻原生质体的RNA (Zhao et al., 2016), 利用miRcute增强型miRNA cDNA第一链合成试剂盒 (Tiangen, Beijing, China) 合成miRNA的cDNA, 之后用miRcute增强型miRNA荧光定量检测试剂盒 (Tiangen) 定量检测miR-263a的含量 (检测方法参见非专利文献“Zhao, W., Yu, J., Jiang, F., Wang, W., Kang, L. and Cui, F. (2021) Coordination between terminal variation of the viral genome and insect microRNAs regulates Rice stripe virus replication in insect vectors. PLoS Pathogens, 17, e1009424.”), 以miRcute增强型miRNA荧光定量检测试剂盒 (Tiangen) 里提供的Reverse Primer以及表1中miR-263a-F为引物对扩增miR-263a的成熟体序列 (SEQ ID No.1) 的片段。内参基因为水稻的OsU6。
- [0124] 利用Promega公司的M-MLV Reverse Transcriptase以及随机引物Random primer合成水稻及病毒mRNA的cDNA, 利用Roche的SYBR Green Master检测病毒核衣壳蛋白编码基因NP的含量。检测方法参见非专利文献“Zhao, W., Yang, P., Kang, L. and Cui, F. (2016) Different pathogenicities of Rice stripe virus from the insect vector and from viruliferous plants. New Phytologist, 210, 196-207.”。内参基因为水稻的UBQ10 (表1)。
- [0125] 表1荧光定量PCR所需的引物
- [0126]

引物名称	引物序列 (5' -3')
------	---------------

miR-263a-F	AATGGCACTGGAAGAATTCACGGG
OsU6-F	TACAGATAAGATTAGCATGGCCCC
OsU6-R	GGACCATTTCTCGATTTGTACGTG
NP-F	GGAACAAATGCCAATGCTATC
NP-R	TGAGACATTTGGGAATAGCTGA
UBQ10-F	TGGTCAGTAATCAGCCAGTTTGG
UBQ10-R	GCACCACAAATACTTGACGAACAG

[0127] 表2 miRNA荧光定量PCR反应

试剂	体积
2×Mix	10μL
F引物(自备)	0.5μL
R引物(试剂盒提供)	0.5μL
cDNA	2μL(稀释10-100倍)
ddH ₂ O	7μL

[0129] qPCR程序:预变性95℃15分钟;变性94℃20秒,退火、延申60℃34秒,45个循环。溶解曲线检测过程:94℃5秒,60℃1分钟,97℃15秒,40℃10秒。

[0130] 表3常规基因荧光定量PCR反应

试剂	体积
2×SYBR Mix (Roche)	10μL
F引物	0.5μL
R引物	0.5μL
cDNA	2μL(稀释4倍)
ddH ₂ O	7μL

[0132] qPCR程序:预变性95℃15分钟;变性95℃10秒,退火58℃20秒,延申72℃20秒,三个步骤循环40次。溶解曲线检测过程:95℃5秒,65℃1分钟,40℃10秒。

[0133] 水稻原生质体提取结果如图2中A所示,用荧光素双醋酸酯染色法(FDA染色法)测定原生质体的活性,见图2中A的右图。定量结果如图2中B所示(图2中OE263a即表示转染pBI221-OE263a后的水稻原生质体),转染该载体后,水稻原生质体中可表达昆虫来源的miR-263a,且表达miR-263a后,病毒NP的表达量与未转染水稻原生质体的病毒量相比,显著下调。

[0134] 实施例3、构建过表达miR-263a(OE263a)的水稻植株

[0135] 一、制备miR-263a过表达水稻植株

[0136] 1、将SEQ ID No.2插入到pBWA(V)HS质粒(购于武汉伯远生物科技有限公司,货号#REC10-I)的35S启动子之后的BsaI和Eco31I酶切识别位点之间,得到连接产物。

[0137] 2、将步骤(1)中的连接产物转化大肠杆菌感受态,转化涂卡那霉素抗性平皿,37℃培养12小时,进行菌斑PCR鉴定。

[0138] 3、挑取10个菌斑同时进行1.5ml EP管接菌和PCR鉴定。取100μL送样测序,其余400μL菌液接种到含有5-10mL卡那抗性的LB中,试管摇菌,待测序结果出来后,对应测序正确的取一管提取质粒,命名为pBWA(V)HS-OE263a。pBWA(V)HS-OE263a是以核苷酸序列是SEQ ID

No.2的miR-1876前体基因替换pBWA(V)HS质粒的BsaI和Eco31I酶切识别位点之间的片段并保持其他核苷酸序列不变得到的重组表达载体。

[0139] 4、将重组表达载体pBWA(V)HS-OE263a转化农杆菌EHA105,利用表4中引物鉴定转化后的农杆菌EHA105是否含有重组表达载体pBWA(V)HS-OE263a,再将鉴定正确的农杆菌转入日本晴水稻胚性愈伤组织中。

[0140] 具体实验操作以及所需培养基配置方法如下:

[0141] (1) 水稻愈伤诱导:去壳的水稻种子用75%酒精消毒2分钟,冲洗3次;使用0.15%升汞(含0.1%Tween 20)浸泡15分钟,再冲洗3次;将消毒的种子接入诱导培养基,32℃光照培养5~10天。

[0142] (2) 农杆菌活化:在含50mg/L卡那霉素的LB培养基上划线,28℃培养。

[0143] (3) 侵染:将活化的农杆菌加入悬浮培养基,28℃,180rpm震荡培养3小时,调节菌液浓度至OD600=0.1;将诱导的愈伤组织放入农杆菌悬浮液中侵染1.5分钟;倒掉菌液,用滤纸吸干愈伤表面的菌液;愈伤表面覆盖滤纸,超净台吹干30分钟;将愈伤转入共培养基,20℃暗培养过夜,25℃继续暗培养2天。

[0144] (4) 清洗:将共培养完成的愈伤组织转移到空的容器中,用灭菌蒸馏水清洗7~8次,前3次快速清洗,后3~4次每次浸泡3~5分钟,在含500mg/L Cn的灭菌蒸馏水中浸泡30分钟,倒掉溶液,滤纸吸干愈伤表面水分,愈伤表面覆盖滤纸,超净台吹干1小时。

[0145] (5) 筛选:将清洗后的愈伤放在筛选培养基上,32℃光照培养14天。

[0146] (6) 分化:经过筛选14天后,将抗性愈伤转入分化培养基,28℃培养(光周期为14h光照/10h黑暗)。

[0147] (7) 生根:待抗性愈伤在分化培养基上形成3~4cm高的再生苗时,转入生根培养基,直至形成完整的植株,命名为OE263a水稻。

[0148] 诱导培养基:加ddH₂O定容至1L,调pH值至5.8,高压灭菌。

[0149] 表4诱导培养基配方

N _{6max} 存储液 (10x)	100mL
N _{6min} 存储液 (100x)	10mL
Fe ²⁺ -EDTA存储液 (100x)	10mL
Vitamin存储液 (100x)	10mL
2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (D-7299,Sigma)	2.5mL
Proline	0.6g
Casein Enzymatic Hydrolysate (N-4642,Sigma)	0.8g
Sucrose	30g
Phytigel	3g

[0151] 共培养基:加ddH₂O定容至250mL,调pH值至5.6。高压灭菌,使用前加入5mL50%的葡萄糖和250μL的Acetosringone存储液。

[0152] 表5共培养基配方

N _{6max} 存储液 (10x)	12.5mL
N _{6min} 存储液 (100x)	1.25mL
Fe ²⁺ -EDTA存储液 (100x)	1.25mL

Vitamin存储液(100x)	2.5mL
2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (D-7299, Sigma)	0.625mL
Proline	0.15g
Casein Enzymatic Hydrolysate (N-4642, Sigma)	0.2g
Sucrose	7.5g
Agar powder	2g

[0154] 筛选培养基: 加ddH₂O定容至250mL, 调pH值至6.0。高压灭菌, 使用时入250μL Hygromycin B溶液(50mg/ml)和500μL Carbenicillin(250mg/ml)。

[0155] 表6筛选培养基配方

N _{6max} 存储液(10x)	25mL
N _{6min} 存储液(100x)	2.5mL
Fe ²⁺ -EDTA存储液(100x)	2.5mL
Vitamin存储液(100x)	2.5mL
2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (D-7299, Sigma)	0.625mL
Proline	0.15g
Casein Enzymatic Hydrolysate (N-4642, Sigma)	0.2g
Sucrose	7.5g
Agar powder	2g

[0157] 分化培养基: 加ddH₂O定容至250mL, 调pH值至6.0。高压灭菌, 使用时入250μL Hn(50mg/ml)和500μL Cn(250mg/ml)。

[0158] 表7分化培养基配方

MS _{max} 存储液(10x)	100 mL
MS _{min} 存储液(100x)	10 mL
Fe ²⁺ -EDTA 存储液(100x)	10 mL
Vitamin 存储液(100x)	10 mL
Kinetin 存储液	2 mL
Naphthalene acetic acid 存储液	0.2 mL

Proline	0.6 g
Casein Enzymatic Hydrolysate (N-4642, Sigma)	0.8 g
D-sorbitol	30 g
Sucrose	30 g
Phytigel	3 g

[0161] 生根培养基: 加ddH₂O定容至1L, 调pH值至5.8。高压灭菌。

[0162] 表8生根培养基配方

MS _{max} 存储液(10x)	50mL
----------------------------	------

MS _{min} 存储液 (100x)	5mL
Fe ²⁺ -EDTA 存储液 (100x)	5mL
Vitamin 存储液 (100x)	5mL
Sucrose	20g
Phytigel	3g

[0164] 表9 PCR菌检所用引物

引物名称	引物序列 (5' - 3')
HS) 35seq, 35seq (G)	TTCATTTGGAGAGAACACGGGGGAC
NOSseq-R, Noseq (G)	CAAGACCGGCAACAGGATTCAATC

[0166] 二、验证过表达miR-263a水稻品系

[0167] 1、OE263a水稻品系的分子鉴定

[0168] 提取步骤一中得到的OE263a水稻的RNA,利用miRcute增强型miRNAcDNA第一链合成试剂盒 (Tiangen) 合成miRNA的cDNA,之后用miRcute增强型miRNA荧光定量检测试剂盒 (Tiangen) 定量检测miR-263a的含量,以此明确过表达载体是否可以应用于水稻中成功表达昆虫来源的miR-263a。以miRcute增强型miRNA荧光定量检测试剂盒 (Tiangen) 里提供的 Reverse Primer以及表1中miR-263a-F为引物对扩增含有SEQ ID No.1 (24nt) 的片段。内参基因为水稻的OsU6。

[0169] 定量时设置6-8个生物学重复,每个样品进行2个技术性重复。如果数据符合正态分布使用独立样本t检验统计分析,不符合正态分布使用Wilcoxon秩和检验方法,多重比较用单因素方差分析进行统计,并采用Tukey检验。参考 $2^{-\Delta CT}$ 法计算基因的相对表达量。实验重复三次。

[0170] 结果如图3中A所示,筛选出T2代的两株miR-263a表达量显著增加的株系进行后续试验,分别命名为OE263a-1和OE263a-2。

[0171] 2、提取WT、OE263a-1和OE263a-2的RNA,进行Northern blotting实验,根据miR-263a的成熟体反向互补序列设计两端生物素标记、且带有LNA修饰的DNA探针。水稻的rRNA作为内参。

[0172] Northern blotting具体步骤如下:

[0173] 跑胶:配饰15%的聚丙烯酰胺凝胶 (4.2g尿素,3.75mL40%丙烯酰胺-甲叉丙烯酰胺溶液,1mL 10×TBE,60μL 10%过硫酸铵,4.6μLTEMED),电泳液为1×TBE,200V预电泳15min,之后用电泳液冲洗上样孔,迅速加样 (WT、OE263a-1和OE263a-2的RNA),电压180V跑胶约45min,直到溴酚蓝到达胶的底部。将胶浸泡在0.5×TBE大约10min,用SYBR Gold (Invitrogen) 染色10-20min紫外凝胶观测RNA电泳情况,并在胶上做出标记。

[0174] 转膜:用0.5×TBE洗胶5min,将尼龙膜 (BrightStar™-Plus Positively Charged Nylon Membrane,Thermo Fisher Scientific) 和两片厚滤纸浸泡在转膜液 (0.5 x TBE) 中大约10min。然后转移至转膜液:转膜液倒入托盘中,白板朝下,按照白板-海绵-滤纸-膜-胶-滤纸-海绵-黑板的顺序排好,每加一层用滚轮拍一次气泡,安装好之后放入转膜槽,黑板对黑侧,白板对红侧,转膜槽置于冰水混合物中,300mA转膜1h。

[0175] 紫外交联:能量值1200,交联300s。膜放于烘箱或杂交炉中80℃烘烤30min。

[0176] 预杂交:杂交液 (Ultrasb-hybridization buffer,Ambion) 预热至37℃,

将膜放入杂交管中,加入5mL预热的杂交液,预杂交1h。

[0177] 杂交:含探针的杂交液(探针浓度:100ng/mL)于37℃预热,置换出预杂交液,于37℃杂交过夜。miR-263a-probe探针序列(5'-3'):BI0-CC+CGT+GAA+TTC+TTC+CAG+UGC+CATT-BI0,其中“+”表示LNA修饰。水稻总RNA作为内参,在琼脂糖凝胶电泳上检测其提取质量。

[0178] 洗涤与封闭:2×SSC+0.1%SDS,37℃洗涤30min两次;加10mL Blocking Buffer封闭15min,摇床上缓慢振荡;按照1:300的比例加入HRP Streptavidin辣根过氧化物酶标记链霉亲和素(Yeasen/翊圣35105ES60),孵育1h;1×Wash solution洗膜4次;FITC-酪胺工作液(BF06084-500T,Biodragon/博奥龙,生物素化酪胺试剂盒),按照1:50—1:200的比例用稀释液稀释,避光室温孵育20min;1×Wash solution洗膜4次。

[0179] 显色:ECL发光液(Thermo,A38556),A液和B液1:1混匀,每张膜加入400μL,照胶仪成像。

[0180] 结果如图3中B所示,OE263a-1和OE263a-2中均可表达昆虫来源的miR-263a。

[0181] 三、过表达miR-263a可抑制RSV在寄主水稻中的增殖

[0182] 无毒水稻幼苗接种RSV实验:待WT、OE263a-1和OE263a-2的水稻苗长到2.5叶龄时在水稻叶片上用微虫笼固定位点接种RSV,每个叶片接种15头感染RSV的4龄灰飞虱幼虫。带毒灰飞虱取食的叶片为接种叶,其余的水稻叶片为系统叶,接毒2d后去除带RSV的灰飞虱及微虫笼。继续培养已接种水稻7d,取接种叶进行qPCR定量检测病毒的侵染率(即检测NP基因的表达情况)。

[0183] 实验方法如下:采用Trizol法(Invitrogen,Carlsbad,CA,USA)提取上述三种接种叶的RNA,利用Promega公司的Random primer和M-MLVReverse Transcriptase合成水稻及病毒的cDNA,利用Roche的SYBR Green Master检测病毒核衣壳蛋白编码基因NP的含量。检测方法参见非专利文献“Zhao,W.,Yang,P.,Kang,L.and Cui,F.(2016) Different pathogenicities of Rice stripe virus from the insect vector and from viruliferous plants.NewPhytologist,210,196-207.”。内参基因为水稻的UBQ10(表1)。

[0184] 定量时设置10-12个生物学重复,每个样品进行2个技术性重复。如果数据符合正态分布使用独立样本t检验统计分析,不符合正态分布使用Wilcoxon秩和检验方法,多重比较用单因素方差分析进行统计,并采用Tukey检验。参考 $2^{-\Delta CT}$ 法计算基因的相对表达量。实验重复三次。

[0185] 定量结果表明miR-263a的过表达水稻品系(OE263a-1和OE263a-2)中NP基因的含量要显著低于野生品系中NP基因的含量,表明过表达miR-263a可抑制RSV病毒在植物的增殖(图3中C)。

[0186] 以上对本发明进行了详述。对于本领域技术人员来说,在不脱离本发明的宗旨和范围,以及无需进行不必要的实验情况下,可在等同参数、浓度和条件下,在较宽范围内实施本发明。虽然本发明给出了特殊的实施例,应该理解为,可以对本发明作进一步的改进。总之,按本发明的原理,本申请欲包括任何变更、用途或对本发明的改进,包括脱离了本申请中已公开范围,而用本领域已知的常规技术进行的改变。

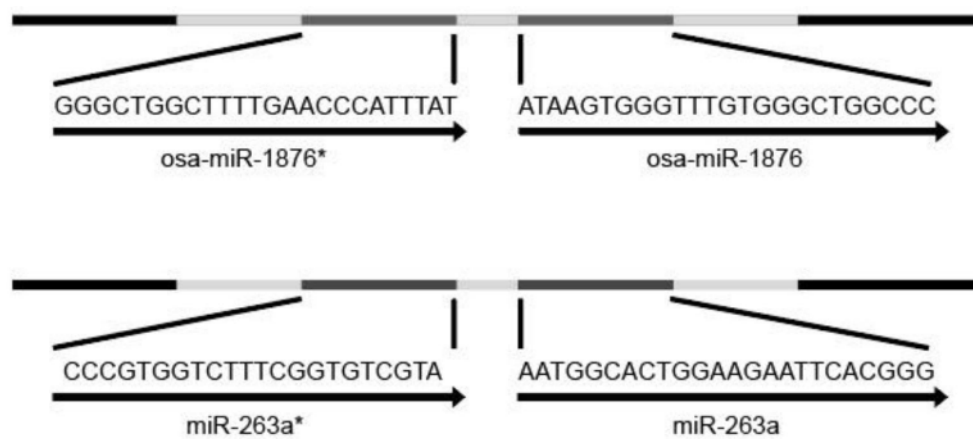


图1

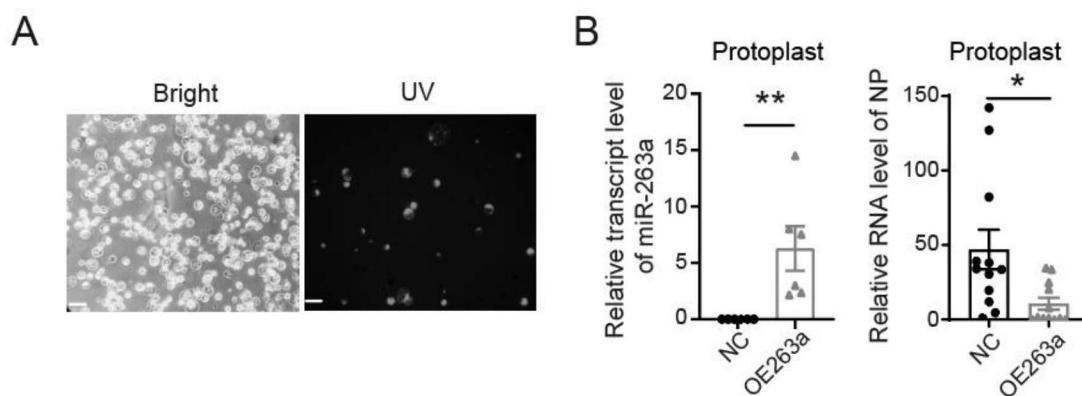


图2

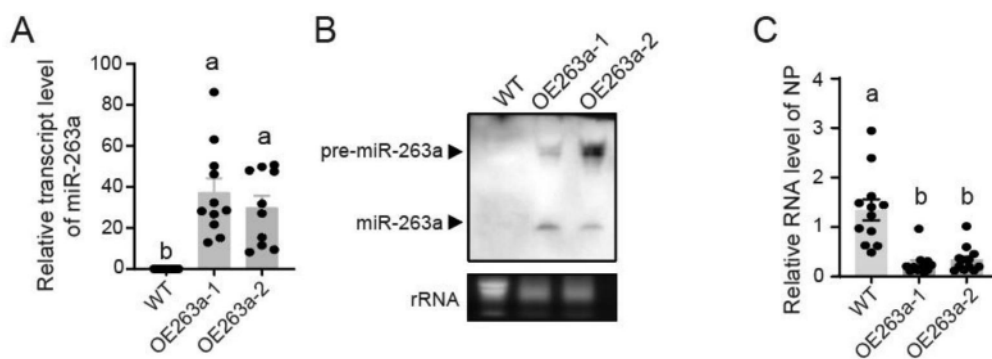


图3