一种在生物体内产生新突变的方法及应用

优先权信息

本申请要求 2019 年 11 月 7 日提交的中国发明专利申请 201911081617.X、2020 年 8 月 15 日提交的中国发明专利申请 202010821877.2 和 2020 年 9 月 16 日提交的中国发明专利申请 202010974151.2 的权益，上述申请通过引用完全并入本文。

技术领域

本发明属于基因工程技术领域，具体而言涉及一种在无人工 DNA 模板的前提下，在生物体内创制定点突变的方法及应用。

背景技术

利用基因工程技术改造生物体基因组已在工农业生产中得到广泛应用，例如在制药、化工领域常用的转基因微生物和农业领域的抗虫抗除草剂转基因作物等。随着位点特异性核酸酶的出现，通过将靶向断裂引入到受体生物基因组并引起自发修复，已经能够实现基因组的定点编辑，对基因组进行更精确的改造。

基因编辑工具主要包括三大类型序列特异性核酸酶(SSN)：锌指核酸酶(Zinc finger nuclease，ZFN)、类转录激活因子效应物核酸酶(Transcription activator-like effector nuclease，TALEN)和成簇的规律间隔的短回文重复序列(CRISPR)–Cas 系统(Clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR associated，CRISPR/Cas system)。序列特异性核酸酶是可编程的核酸酶，能够在基因组中的特定位点产生 DNA 双链断裂（DSBs）。DNA 双链断裂激活内源性 DNA 修复途径修复细胞 DNA 损伤，修复过程中容易导致目标位点 DNA 序列的变化，从而实现在预期位点引入突变，这项技术使生物学家能够精确靶向目标基因并且加以编辑。其中 ZFN 和 TALEN 都需要针对靶点序列设计特异识别的蛋白模块，通量低，操作复杂。而 CRISPR/Cas 系统中 Cas 蛋白是通用的，针对靶点设计特异的 CRISPR-RNA (crRNA)即可单独或与反式激活 RNA（tracrRNA）配合形成引导 RNA（guide RNA，gRNA），或设计单一引导 RNA（single guide RNA，sgRNA）即可，crRNA 与 tracrRNA 共同或者 sgRNA 单独和 Cas 蛋白组装形成核糖核蛋白复合体(ribonucleoprotein, RNP)，在基因组中以原间隔序列毗邻基序(protospacer adjacent motif，PAM)为基础识别靶点序列，实现定点编辑，因其操作简便、适用范围广、通量高成为目前主流的基因编辑工具。

序列特异性核酸酶能够在基因组的特定位置产生 DNA 双链断裂，这些 DNA 双链断裂会被修复成多种不同的修复类型，其中以碱基的插入或缺失为主。如 CRISPR/Cas9 编辑事件中最为普遍的两种类型是在断口处插入一个碱基或在断口处删除一个碱基（Shen et al. 2018. Predictable and precise template-free CRISPR editing of pathogenic variants. Nature. DOI: 10.1038/s41586-018-0686-x）。编码区碱基的插入、缺失会造成移码突变，导致基因功能的丧失，因此，上述基因编辑工具最主要的用途仍然是用于基因敲除。

一直以来单独使用序列特异性核酸酶被认为无法实现碱基替换类型的突变。为此，现有技术提出了 3 种解决方案：1）加入外源 DNA 片段作为修复模板引发同源重组修复途径；2）将脱氨酶与 Cas9 融合开发先后出了 C 到 T，A 到 G 的单碱基编辑工具；3）将逆转录酶与 Cas9 融合，以 pegRNA 引导合成置换小范围的 DNA 链。但是这三种方案的编辑效率都显著低于基因敲除的效率，同时引入的外源 DNA 片段和逆转录酶也容易引起生物安全性的顾虑，单碱基编辑的脱靶效应也制约了其在细胞治疗中的应用潜力。尤其对于长周期的植物育种项目而言，如何提高目标位点的碱基替换效率同时降低监管部门对于生物安全性的顾虑是基因编辑技术应用中需要解决的问题。

综上所述，仅用序列特异性核酸酶的靶向敲除实现定点的碱基替换，不引入外源 DNA 片段，特别是通过非转基因的瞬时编辑体系高效率的完成定点的碱基替换编辑在细胞治疗和生物育种领域都有着急迫的技术需求。

发明简述

本发明提供了一种仅通过在基因组上产生双链断裂的形式，并且在不提供人工 DNA 模板的情况下，在生物体内创制定点突变的方法及其应用。

本发明采用的技术方案如下：

一种在生物体内产生新突变的方法，包括以下步骤：在生物体基因组的特定位置上按先后顺序依次产生两个以上的 DNA 断裂并分别自发修复，其中在后的 DNA 断裂以在先的 DNA 断裂修复后产生的新序列为基础产生。

在一具体实施方式中，所述的“DNA 断裂”是通过将具有靶向特性的核酸酶递送到生物体细胞内与基因组 DNA 特定位置接触实现的。

在一具体实施方式中，所述的“具有靶向特性的核酸酶”为 ZFN、TALEN 或 CRISPR/Cas 系统。

在一具体实施方式中，所述的“特定位置上按先后顺序依次产生两个以上的 DNA 断裂”是指针对由 ZFN 或 TALEN 编辑产生的在先的 DNA 断裂修复事件形成的新序列设计新的 ZFN 或 TALEN 蛋白，对该位点再次进行切割。

在另一具体实施方式中，所述的“特定位置上按先后顺序依次产生两个以上的 DNA 断裂”是指针对由 CRISPR/Cas 系统编辑产生的在先的 DNA 断裂修复事件形成的新序列设计新的靶向 RNA，对该位点再次进行切割。例如，第二次是针对由 Cas9 编辑的第一次断裂修复事件形成的新序列设计新的靶向 RNA，对该处再次进行切断。同理，可以根据再次修复事件形成的新序列设计新的靶向 RNA，对该处进行第三次切断。如图 1 所示，以此类推。

在一具体实施方式中，所述“两个以上的 DNA 断裂”是将不同的靶向核酸酶按先后顺序递送到不同代的受体细胞中产生的，以完成在先编辑的突变细胞作为受体接受在后编辑的靶向核酸酶的递送，进行二次编辑产生定点突变。这种方式优选用于 ZFN、TALEN 编辑系统。

在另一具体实施方式中，所述“两个以上的 DNA 断裂”是将不同靶向的靶向核酸酶递送到同一个受体细胞中产生的。这种方式优选用于 CRISPR/Cas 编辑系统。

在一具体实施方式中，所述“两个以上的DNA断裂”由同一种CRISPR/Cas核酸酶与不同的gRNA或sgRNA分别组成RNP复合体按先后顺序切割对应的靶点序列产生。

在另一具体实施方式中，所述“两个以上的DNA断裂”由两种以上识别不同PAM序列的CRISPR/Cas核酸酶与对应的gRNA或sgRNA分别组成RNP复合体按先后顺序切割对应的靶点序列产生。例如来自化脓链球菌(Streptococcus pyogenes)的Cas9识别的PAM序列是“NGG”或“NAG”(Jinek等，“A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity”，Science 2012，337：816-821)，金黄色葡萄球菌(Staphylococcus aureus)的Cas9识别的PAM序列是“NNGRRT”或“NNGRR(N)”，脑膜炎奈瑟球菌(Neisseria meningitidis)Cas9识别PAM序列NNNNGATT，嗜热链球菌(Streptococcus thermophilus)Cas9识别PAM序列NNAGAAW。在这种方式下，DNA分子上可编辑的窗口范围更大。

在一具体实施方式中，所述靶向核酸酶为所有能实现基因组编辑的CRISPR/Cas核酸酶。

在一具体实施方式中，所述靶向核酸酶以DNA形式存在。

在另一具体实施方式中，所述靶向核酸酶以mRNA或蛋白形式存在，而非DNA形式。优选蛋白形式。

在一具体实施方式中，将靶向核酸酶递送到细胞内的方法包括，1）PEG介导的细胞转染的方法；2）脂质体介导的细胞转染的方法；3）电击转化的方法；4）显微注射；5）基因枪轰击；6）农杆菌介导的转化方法等。

所述方法以在先的DNA断裂修复后产生的新序列为基础设计新靶点，可以在基因组的特定位置连续多次形成突变，指数级的丰富DNA断裂后修复事件的类型，实现单次基因编辑无法得到的新的碱基替换、删除及插入突变类型，适合用作创造新突变的工具，本方法可以简述为循环打靶或连续打靶的方法。

在一具体实施方式中，根据对生物体基因组特定位置在先断裂修复后预测可能产生的特定新序列设计新靶点，进行顺次编辑，可以提前设计该位置最终可能产生的突变，实现预期编辑。

在另一具体实施方式中，根据对生物体基因组特定位置在先断裂修复后预测可能产生的新序列设计新靶点，进行顺次编辑，除预期的编辑事件外，该位置最终还可能产生多种不同突变，可作为创造多种不同突变的工具。

在另一方面，本发明还提供了一种在生物体内产生新突变的方法，包括以下步骤：在生物体基因组或染色体水平上，通过在基因的特定位置上按先后顺序依次产生两个以上的DNA断裂，实现精准碱基替换、删除或插入。

在一具体实施方式中，所述的“特定位置上按先后顺序依次产生两个以上的DNA断裂”是指针对前一次断裂修复事件形成的新序列设计新的靶向RNA，对该处再次进行切断。

在一具体实施方式中，所述的“DNA断裂”是通过具有靶向特性的核酸酶来实现。

本发明还提供一种采用前述方法获得的新突变。

本发明另外提供一种具有所述新突变的蛋白或其生物活性片段。

本发明另外提供一种核酸，其包含编码所述蛋白或其生物活性片段的核酸序列或者其互

补序列。

本发明另外还提供一种核酸，其包含：

(a)编码靶向 RNA 的核苷酸序列，其中，

所述 RNA 至少包含两个，前一个 RNA 靶向 DNA 导致其断裂，后一个靶向 RNA 针对前一次断裂修复事件形成的序列再次进行切断。

在一具体实施方式中，所述核酸还包括(b)编码 Cas 多肽的核苷酸序列。

在一具体实施方式中，所述靶向 RNA 为 sgRNA 或 gRNA。

在一具体实施方式中，所述 Cas 多肽和所述靶向 RNA 为在体外细胞或离体细胞内。

本发明另外提供一种重组表达载体，其包含前述的核酸，以及与之可操作地连接的启动子。

本发明另外提供一种表达盒，其中包含前述的核酸。

本发明另外提供一种宿主细胞，其中包含有所述的表达盒。

本发明另外还提供采用所述宿主细胞再生成的生物。

本发明还提供一种裂解靶 DNA 的方法，其包括使所述靶 DNA 与复合物接触，所述复合物包含：

(a)Cas 多肽；以及

(b)至少两个靶向 RNA，前一个 RNA 靶向 DNA 导致其断裂，后一个靶向 RNA 针对前一次断裂修复事件形成的序列再次进行切断。

在一具体实施方式中，所述靶向 RNA 为 sgRNA 或 gRNA。

在一具体实施方式中，所述靶 DNA 存在于细菌细胞、真核细胞、植物细胞或动物细胞中。

在一具体实施方式中，所述靶 DNA 为染色体 DNA。

在一具体实施方式中，所述 Cas 多肽和所述靶向 RNA 为在体外细胞或离体细胞内。

在一具体实施方式中，所述接触包括将以下引入细胞：(a)所述 Cas 多肽或编码所述 Cas 多肽的多核苷酸，和(b)所述靶向 RNA 或编码所述靶向 RNA 的 DNA 多核苷酸。

本发明还提供一种组合物，其包含：

(a)Cas 多肽，或编码所述 Cas 多肽的多核苷酸；以及

(b)至少两个靶向 RNA，或编码所述靶向 RNA 的 DNA 多核苷酸，其中，前一个 RNA 靶向 DNA 导致其断裂，后一个靶向 RNA 针对前一次断裂修复事件形成的序列再次进行切断。

在一具体实施方式中，所述靶向 RNA 为 sgRNA 或 gRNA。

在一具体实施方式中，所述 Cas 多肽和所述靶向 RNA 为在体外细胞或离体细胞内。

本发明还提供所述的组合物在用于制备治疗疾病的药剂中的用途。

能够用本发明的组合物进行治疗的疾病包括，但不限于，遗传性酪氨酸血症 1 型、苯丙酮尿症、早衰症、镰状细胞病等单基因突变引起的疾病，通过向细胞内递送 Cas 蛋白和针对致病突变位点预期可修复为正常功能蛋白的 crRNA 或 sgRNA 组合物，诱导细胞自发修复产生治疗效果。

本发明还提供一种试剂盒，其包含：

(a)Cas 多肽，或包含编码所述 Cas 多肽的核苷酸序列的核酸；以及

(b)至少两个靶向 RNA，或包含编码所述靶向 RNA 的核苷酸序列的核酸，其中，前一个 RNA 靶向 DNA 导致其断裂，后一个靶向 RNA 针对前一次断裂修复事件形成的序列再次进行切断；

其中(a)和(b)是在相同或单独的容器中。

在一具体实施方式中，所述靶向 RNA 为 sgRNA 或 gRNA。

在一具体实施方式中，(b)中的靶向 RNA 是在相同或单独的容器中。

本发明还提供一种不依赖外源转基因标记筛选编辑事件的方法，包括以下步骤：

1) 在受体细胞第一目标基因的特定位置上按先后顺序依次产生两个以上的 DNA 断裂并分别自发修复，其中在后的 DNA 断裂以在先的 DNA 断裂修复后产生的新序列为基础产生；

2) 第一目标基因特定位置经顺次切割并修复后产生的某些编辑事件，能够赋予突变体细胞对某种筛选压力的抗性，产生表型可选择的性状，施加相对应的筛选压力对该性状进行选择，分离出含有该类编辑事件的细胞、组织、器官或完整的生物；

3) 可选的，在第一目标基因之外，同时使用针对至少一个第二目标基因的靶向核酸酶对其它靶点进行编辑，通过筛选第一目标基因突变产生的可选择性状同步对第二目标基因的编辑事件进行富集筛选，分离出同时含有第一目标基因与至少一个第二目标基因编辑事件的细胞、组织、器官或完整的生物。

在一具体实施方式中，所述“第一目标基因”是编码至少一种表型可选择性状的基因位点，其中所述至少一种表型可选择性状是抗性/耐受性性状或生长优势性状。

在一具体实施方式中，所述“第一目标基因的特定位置”是指所述位置处经顺次切割并修复后产生的某些突变类型能够赋予所述受体细胞对某种筛选压力的抗性，产生至少一种表型可选择的抗性/耐受性性状或生长优势性状。

在一具体实施方式中，所述“某些突变类型”包括单碱基替换、多个碱基的替换或不特定数目的碱基插入或缺失。

在一具体实施方式中，所述“某种筛选压力”可以是环境压力，如高温、低温、低氧等，也可以是添加的化合物压力，例如盐离子浓度、抗生素、细胞毒素、除草剂等。

在一具体实施方式中，所述的“DNA 断裂”是通过将具有靶向特性的核酸酶递送到生物体细胞内与基因组 DNA 特定位置接触实现的。

在一具体实施方式中，所述的“具有靶向特性的核酸酶”为所有能实现基因组编辑的 CRISPR/Cas 核酸酶。

在一具体实施方式中，所述的“特定位置上按先后顺序依次产生两个以上的 DNA 断裂”是指针对由 CRISPR/Cas 系统编辑产生的在先的 DNA 断裂修复事件形成的新序列设计新的靶向 RNA，对该位点再次进行切割。

在一具体实施方式中，所述“两个以上的 DNA 断裂”由同一种 CRISPR/Cas 核酸酶与不同的 gRNA 或 sgRNA 分别组成 RNP 复合体按先后顺序切割对应的靶点序列产生。

在另一具体实施方式中，所述“两个以上的 DNA 断裂”由两种以上识别不同 PAM 序列的 CRISPR/Cas 核酸酶与对应的 gRNA 或 sgRNA 分别组成 RNP 复合体按先后顺序切割对应的靶点序列产生。在这种方式下，DNA 分子上可编辑的窗口范围更大。

在一具体实施方式中，所述“第二目标基因”是指编码与第一目标基因不同的其它基因。

在一具体实施方式中，所述“针对至少一个第二目标基因的靶向核酸酶”与在第一目标基因特定位置上产生 DNA 断裂使用的 CRISPR/Cas 核酸酶相同。

在另一具体实施方式中，所述“针对至少一个第二目标基因的靶向核酸酶”与在第一目标基因特定位置上产生 DNA 断裂使用的 CRISPR/Cas 核酸酶不同。在这种方式下，第二目标基因上可选择的编辑位点更多。

在一具体实施方式中，所述靶向核酸酶以 DNA 形式存在。

在另一具体实施方式中，所述靶向核酸酶以 mRNA 或蛋白形式存在，而非 DNA 形式。优选蛋白形式。

在一具体实施方式中，将靶向核酸酶递送到细胞内的方法包括，1）PEG 介导的细胞转染的方法；2）脂质体介导的细胞转染的方法；3）电击转化的方法；4）显微注射；5）基因枪轰击；6）农杆菌介导的转化方法等。

本发明进一步提供了一种对生物体基因组进行非转基因瞬时编辑的方法，包括以下步骤：

1）针对受体细胞第一目标基因的特定位置设计并合成至少两条 crRNA 片段组合或至少两条 sgRNA 片段组合，所述 crRNA 组合与 tracrRNA 结合或单独使用 sgRNA 组合能够引导对应的 Cas 蛋白在受体细胞第一目标基因的特定位置上依次产生两个以上的 DNA 断裂并分别自发修复，其中在后的 DNA 断裂以在先的 DNA 断裂修复后产生的新序列为基础产生；

2）将适量 CRISPR/Cas 蛋白或其相应的 mRNA 与上述预先设计合成的能够引导第一目标基因定点编辑产生内源筛选标记的 crRNA 片段组合和 tracrRNA 片段或单独 sgRNA 片段组合混合，可选的，进一步加入至少一个靶向第二、第三或更多目标基因的人工合成的 crRNA 和 tracrRNA 片段或人工合成的 sgRNA 片段，在体外孵育形成 RNP 复合体；

3）将上述 RNP 复合体递送到受体细胞中，与基因组 DNA 特定位置接触实现基因编辑；

4）根据 RNP 复合体对第一目标基因的定点编辑产生的表型可选择的性状，施加相对应的筛选压力对该性状进行选择，分离出含有该类编辑事件的细胞、组织、器官或完整的生物，以及可选的，分离出同时含有第一目标基因与至少一个第二、第三或更多目标基因的编辑事件的细胞、组织、器官或完整的生物。

在一具体实施方式中，所述“第一目标基因”是编码至少一种表型可选择性状的基因位点，其中所述至少一种表型可选择性状是抗性/耐受性性状或生长优势性状。

在一具体实施方式中，所述“第一目标基因的特定位置”是指所述位置处经顺次切割并修复后产生的某些突变类型能够赋予所述受体细胞对某种筛选压力的抗性，产生至少一种表型可选择的抗性/耐受性性状或生长优势性状。

在一具体实施方式中，所述“某些突变类型”包括单碱基替换、多个碱基的替换或不特定

数目的碱基插入或缺失

在一具体实施方式中，所述“某种筛选压力”可以是环境压力，如高温、低温、低氧等，也可以是添加的化合物压力，例如盐离子浓度、抗生素、细胞毒素、除草剂等。

在一具体实施方式中，所述的 CRISPR/Cas 蛋白为所有能实现基因组编辑的 CRISPR/Cas 核酸酶。

在一具体实施方式中，所述的“特定位置上按先后顺序依次产生两个以上的 DNA 断裂”是指针对由 CRISPR/Cas 系统编辑产生的在先的 DNA 断裂修复事件形成的新序列设计新的靶向 RNA，对该位点再次进行切割。

在一具体实施方式中，所述“两个以上的 DNA 断裂”由同一种 CRISPR/Cas 蛋白与不同的 gRNA 或 sgRNA 分别组成 RNP 复合体按先后顺序切割对应的靶点序列产生。

在另一具体实施方式中，所述“两个以上的 DNA 断裂”由两种以上识别不同 PAM 序列的 CRISPR/Cas 蛋白与对应的 gRNA 或 sgRNA 分别组成 RNP 复合体按先后顺序切割对应的靶点序列产生。在这种方式下，DNA 分子上可编辑的窗口范围更大。

在一具体实施方式中，所述“第二、第三或更多目标基因”是指编码与第一目标基因不同的其它基因。

在一具体实施方式中，所述“至少一个靶向第二、第三或更多目标基因的人工合成的 crRNA 和 tracrRNA 片段或人工合成的 sgRNA 片段”与靶向第一目标基因的 crRNA 或 sgRNA 共用同一种 Cas 蛋白。

在另一具体实施方式中，所述所述“至少一个靶向第二、第三或更多目标基因的人工合成的 crRNA 和 tracrRNA 片段或人工合成的 sgRNA 片段”与靶向第一目标基因的 crRNA 或 sgRNA 使用识别不同 PAM 序列的 Cas 蛋白。在这种方式下，第二目标基因上可选择的编辑位点更多。

在一具体实施方式中，将所述 RNP 复合体递送到细胞内的方法包括，1）PEG 介导的细胞转染的方法；2）脂质体介导的细胞转染的方法；3）电击转化的方法；4）显微注射；5）基因枪轰击等。

本发明还提供一种对植物基因组进行非转基因瞬时编辑的方法，包括以下步骤：

1）针对受体植物细胞或组织第一目标基因的特定位置设计并合成至少两条 crRNA 片段组合或至少两条 sgRNA 片段组合，所述 crRNA 组合与 tracrRNA 结合或单独使用 sgRNA 组合能够引导对应的 Cas 蛋白在受体细胞第一目标基因的特定位置上依次产生两个以上的 DNA 断裂并分别自发修复，其中在后的 DNA 断裂以在先的 DNA 断裂修复后产生的新序列为基础产生；

2）将适量 CRISPR/Cas 蛋白或其相应的 mRNA 与上述预先设计合成的能够引导第一目标基因定点编辑产生内源筛选标记的 crRNA 片段组合和 tracrRNA 片段或单独 sgRNA 片段组合混合，可选的，进一步加入至少一个靶向第二、第三或更多目标基因的人工合成的 crRNA 和 tracrRNA 片段或人工合成的 sgRNA 片段，在体外孵育形成 RNP 复合体；

3）将上述 RNP 复合体递送到受体植物细胞或组织中，与基因组 DNA 特定位置接触实

现基因编辑；

4）根据 RNP 复合体对第一目标基因的定点编辑产生的表型可选择的性状，施加相对应的筛选压力对该性状进行选择，分离出含有该类编辑事件的细胞、组织、器官或完整的植物，以及可选的，分离出同时含有第一目标基因与至少一个第二、第三或更多目标基因的编辑事件的细胞、组织、器官或完整的植物。

在一具体实施方式中，所述“第一目标基因”是编码至少一种表型可选择性状的基因位点，其中所述至少一种表型可选择性状是抗性/耐受性性状或生长优势性状。

在一具体实施方式中，所述“第一目标基因的特定位置”是指所述位置处经顺次切割并修复后产生的某些突变类型能够赋予所述受体细胞对某种筛选压力的抗性，产生至少一种表型可选择的抗性/耐受性性状或生长优势性状。

在一具体实施方式中，所述“某些突变类型”包括单碱基替换、多个碱基的替换或不特定数目的碱基插入或缺失。

在一具体实施方式中，所述“某种筛选压力”可以是环境压力，如高温、低温、低氧等，也可以是添加的化合物压力，例如盐离子浓度、抗生素、细胞毒素、除草剂等。

在一具体实施方式中，所述“受体植物细胞或组织”为任何能作为瞬时表达受体并能经过组织培养再生为完整植株的细胞或组织。具体而言，所述细胞具体为原生质体细胞或悬浮细胞等；所述组织具体为愈伤组织、幼胚、成熟胚、叶片、茎尖、幼穗或下胚轴等。

在一具体实施方式中，所述的 CRISPR/Cas 蛋白为所有能实现基因组编辑的 CRISPR/Cas 核酸酶。

在一具体实施方式中，所述的“特定位置上按先后顺序依次产生两个以上的 DNA 断裂”是指针对由 CRISPR/Cas 系统编辑产生的在先的 DNA 断裂修复事件形成的新序列设计新的靶向 RNA，对该位点再次进行切割。

在一具体实施方式中，所述“两个以上的 DNA 断裂”由同一种 CRISPR/Cas 蛋白与不同的 gRNA 或 sgRNA 分别组成 RNP 复合体按先后顺序切割对应的靶点序列产生。

在另一具体实施方式中，所述“两个以上的 DNA 断裂”由两种以上识别不同 PAM 序列的 CRISPR/Cas 蛋白与对应的 gRNA 或 sgRNA 分别组成 RNP 复合体按先后顺序切割对应的靶点序列产生。在这种方式下，DNA 分子上可编辑的窗口范围更大。

在一具体实施方式中，所述“第二、第三或更多目标基因”是指编码与第一目标基因不同的其它基因。

在一具体实施方式中，所述“至少一个靶向第二、第三或更多目标基因的人工合成的 crRNA 和 tracrRNA 片段或人工合成的 sgRNA 片段”与靶向第一目标基因的 crRNA 或 sgRNA 共用同一种 Cas 蛋白。

在另一具体实施方式中，所述所述“至少一个靶向第二、第三或更多目标基因的人工合成的 crRNA 和 tracrRNA 片段或人工合成的 sgRNA 片段”与靶向第一目标基因的 crRNA 或 sgRNA 使用识别不同 PAM 序列的 Cas 蛋白。在这种方式下，第二目标基因上可选择的编辑位点更多。

在一具体实施方式中，将所述 RNP 复合体递送到植物细胞内的方法包括，1）PEG 介导的原生质体转化的方法； 2）显微注射；3）基因枪轰击；4）碳化硅纤维介导法；5)真空渗入法或其他任何瞬时导入方法。优选基因枪轰击。

在一具体实施方式中，所述“第一目标基因”是编码选自除草剂抗性/耐受性的至少一种表型可选择性状的至少一个内源基因，其中除草剂抗性/耐受性选自包括对 EPSPS 抑制剂(包括草甘膦)的抗性/耐受性；对谷氨酰胺合成抑制剂(包括草铵膦)的抗性/耐受性；对 ALS 或 AHAS 抑制剂(包括咪唑啉或磺酰脲)的抗性/耐受性；对 ACCase 抑制剂(包括芳氧基苯氧基丙酸(FOP))的抗性/耐受性；对类胡萝卜素生物合成抑制剂的抗性/耐受性，包括八氢番茄红素去饱和酶（PDS）步骤的类胡萝卜素生物合成抑制剂、4-羟基苯基丙酮酸双加氧酶(HPPD)抑制剂或其他类胡萝卜素生物合成靶抑制剂；对纤维素抑制剂的抗性/耐受性；对脂质合成抑制剂的抗性/耐受性；对长链脂肪酸抑制剂的抗性/耐受性；对微管组装抑制剂的抗性/耐受性；对光系统 I 电子分流剂的抗性/耐受性；对光系统 II 抑制剂(包括氨基甲酸酯、三嗪类和三嗪酮类)的抗性/耐受性；对 PPO 抑制剂的抗性/耐受性和对合成生长素(包括麦草畏、2,4-D(即 2,4-二氯苯氧乙酸))的抗性/耐受性。其中，所述第一目标基因可选自 PsbA、ALS、EPSPS、ACCase、PPO、HPPD、PDS、GS、DOXPS、TIR1、AFB5，这些除草剂靶标基因的特定位置经顺次切割并修复后产生的某些突变类型能够赋予所述受体植物细胞对相应除草剂的抗性/耐受性。

在一具体实施方式中，所述“第一目标基因”为 ALS，所述“基因的特定位置”是指拟南芥 AtALS 蛋白氨基酸序列（如 SEQ ID NO：1 所示）位点 A122、P197、R198、D204、A205、D376、R377、W574、S653、G654，以及以 AtALS 氨基酸序列为参照标准的其它植物的 ALS 蛋白相对应的上述氨基酸位点。所述 crRNA 或 sgRNA 靶向包含选自编码 AtALS 蛋白氨基酸序列位点 A122、P197、R198、D204、A205、D376、R377、W574、S653、G654 或其任意组合的序列的靶序列，以及以 AtALS 氨基酸序列为参照标准的其它植物的 ALS 蛋白相对应的上述氨基酸位点及其任意组合的序列的靶序列。优选 ALS W574 位点。所述筛选压力优选啶磺草胺或烟嘧磺隆处理。

在一具体实施方式中，所述“第一目标基因”为 ACCase，所述“基因的特定位置”是指大穗看麦娘(Alopecurus myosuroides) AmACCase 蛋白氨基酸序列（如 SEQ ID NO：3 所示，基因序列如 SEQ ID NO：4 所示）位点 I1781、E1874、N1878、W1999、W2027、I2041、D2078、C2088、G2096，以及以 AmACCase 氨基酸序列为参照标准的其它单子叶植物的 ACCase 蛋白相对应的上述氨基酸位点。所述 crRNA 或 sgRNA 靶向包含选自编码 AmACCase 基因氨基酸序列位点 I1781、E1874、N1878、W1999、W2027、I2041、D2078、C2088、G2096 或其任意组合的序列的靶序列，以及以 AmACCase 氨基酸序列为参照标准的其它单子叶植物的 ACCase 蛋白相对应的上述氨基酸位点及其任意组合的序列的靶序列。优选 ACCase W2027 位点。所述筛选压力优选精喹禾灵处理。

在一具体实施方式中，所述“第一目标基因”为 HPPD，所述“基因的特定位置”是指水稻 OsHPPD 蛋白氨基酸序列（如 SEQ ID NO：5 所示，基因组序列如 SEQ ID NO：6 所示）位点 H141、L276、P277、N338、G342、R346、D370、P386、K418、G419，以及以 OsHPPD

氨基酸序列为参照标准的其它植物的 HPPD 蛋白相对应的上述氨基酸位点。所述 crRNA 或 sgRNA 靶向包含选自编码 OsHPPD 基因氨基酸序列位点 H141、L276、P277、N338、G342、R346、D370、P386、K418、G419 或其任意组合的序列的靶序列，以及以 OsHPPD 氨基酸序列为参照标准的其它植物的 HPPD 蛋白相对应的上述氨基酸位点及其任意组合的序列的靶序列。所述筛选压力优选双唑草酮处理。

在一具体实施方式中，所述“第一目标基因”为 PPO，所述“基因的特定位置”是指水稻 OsPPO1 蛋白氨基酸序列（如 SEQ ID NO：7 所示，基因组序列如 SEQ ID NO：8 所示）位点 S128、V217、S223、V364、K373、L423、Y425、W470，以及以 OsPPO1 氨基酸序列为参照标准的其它植物的 PPO 蛋白相对应的上述氨基酸位点。所述 crRNA 或 sgRNA 靶向包含选自编码 OsPPO1 基因氨基酸序列位点 S128、V217、S223、V364、K373、L423、Y425、W470 或其任意组合的序列的靶序列，以及以 OsPPO1 氨基酸序列为参照标准的其它植物的 PPO 蛋白相对应的上述氨基酸位点及其任意组合的序列的靶序列。所述筛选压力优选苯嘧磺草胺处理。

在一具体实施方式中，所述“第一目标基因”为 TIR1，所述“基因的特定位置”是指水稻 OsTIR1 蛋白氨基酸序列（如 SEQ ID NO：9 所示，基因组序列如 SEQ ID NO：10 所示）位点 F93、F357、C413、S448，以及以 OsTIR1 氨基酸序列为参照标准的其它植物的 TIR1 蛋白相对应的上述氨基酸位点。所述 crRNA 或 sgRNA 靶向包含选自编码 OsTIR1 基因氨基酸序列位点 F93、F357、C413、S448 或其任意组合的序列的靶序列，以及以 OsTIR1 氨基酸序列为参照标准的其它植物的 TIR1 蛋白相对应的上述氨基酸位点及其任意组合的序列的靶序列。所述筛选压力优选 2,4-D 处理。

本发明还提供了采用前述方法的非转基因瞬时编辑系统。

本发明另外提供了前述非转基因瞬时编辑系统作为筛选标记的用途。

本发明另外提供了前述非转基因瞬时编辑系统在疾病治疗中的用途。

本发明另外提供了前述非转基因瞬时编辑系统在生物育种中的用途。

本发明另外提供了一种采用前述方法获得的遗传修饰植物，其基因组中包含第一目标基因的编辑事件，所述遗传修饰植物是非转基因方式获得的。

本发明另外提供了一种采用前述方法获得的遗传修饰植物，其基因组中包含第一目标基因的编辑事件，还包括至少一个第二目标基因的编辑事件，所述遗传修饰植物是非转基因方式获得的。

本发明另外提供了一种采用前述方法获得的遗传修饰植物，其基因组中包含至少一个第二靶点基因的编辑事件，所述遗传修饰植物是非转基因方式获得的，其中第一目标基因的编辑事件已经过遗传分离去除。

本发明还提供了采用前述方法获得的遗传修饰植物的基因组，所述基因组包含：1）第一目标基因的编辑事件；2）第一目标基因的编辑事件和至少一个第二目标基因的编辑事件；或 3）至少一个第二靶点基因的编辑事件，其中第一目标基因的编辑事件已经过遗传分离去除；其中所述遗传修饰植物是非转基因方式获得的。

本发明另一方面提供了一种采用前述方法获得的植物基因新突变。

本发明还提供一种在植物内产生的新突变，其包括以下类型中的一个或两个以上的组合：

对应于拟南芥 ALS376 位置处的天冬氨酸被任何其他氨基酸取代、ALS574 位置处的色氨酸被任何其他氨基酸取代、ALS653 位置处的丝氨酸被任何其他氨基酸取代、或 ALS654 位置处的丝氨酸被任何其他氨基酸取代；或者，对应于大穗看麦娘 ACCase2027 位置处的色氨酸被任何其他氨基酸取代。

在一具体实施方式中，对应于拟南芥 ALS376 位置处的天冬氨酸被谷氨酸取代（D376E）、ALS574 位置处的色氨酸被亮氨酸或甲硫氨酸取代（W574L 或 W574M）、ALS653 位置处的丝氨酸被天冬酰胺或精氨酸取代（S653N 或 S653R）、或 ALS654 位置处的甘氨酸被天冬氨酸取代（G654D），其中，氨基酸的位置以拟南芥中相应氨基酸的序列位置为参照；或者，对应于大穗看麦娘 ACCase2027 位置处的色氨酸被亮氨酸或半胱氨酸取代（W2027L 或 W2027C），其中，氨基酸的位置以大穗看麦娘 Alopecurus myosuroides 中相应氨基酸的序列位置为参照。

在另一具体实施方式中，所述突变类型为 S653R/G654D，其中，氨基酸的位置以拟南芥中相应氨基酸的序列位置为参照。

在一具体实施方式中，水稻 ALS350 位置处的天冬氨酸被任何其他氨基酸取代、水稻 ALS548 位置处的色氨酸被任何其他氨基酸取代、或马铃薯 ALS2 561 位置处的色氨酸被任何其他氨基酸取代；或者，水稻 ACCase2 2038 位置处的色氨酸被任何其他氨基酸取代。

在另一具体实施方式中，水稻 ALS350 位置处的天冬氨酸被谷氨酸取代（D350E）、水稻 ALS548 位置处的色氨酸被亮氨酸或甲硫氨酸取代（W548L 或 W548M）、或马铃薯 ALS2 561 位置处的色氨酸被亮氨酸或甲硫氨酸取代（W561L 或 W561M）；或者，水稻 ACCase2 2038 位置处的色氨酸被亮氨酸或半胱氨酸取代（W2038L 或 W2038C）。其中，水稻 ALS 蛋白氨基酸序列如 SEQ ID NO: 11 所示，马铃薯 StALS2 蛋白氨基酸序列如 SEQ ID NO: 19 所示，水稻 ACCase2 蛋白氨基酸序列如 SEQ ID NO: 13 所示。

本发明另外提供了一种具有所述新突变的蛋白或其生物活性片段。

本发明还提供了一种核酸，其包含编码所述蛋白或其生物活性片段的核酸序列或者其互补序列。

本发明另外提供了一种重组表达载体，其包含所述的核酸，以及与之可操作地连接的启动子。

本发明另外还提供了一种表达盒，其中包含所述的核酸。

本发明另外还提供了一种植物细胞，其中包含有所述的表达盒。

本发明进一步还提供了采用所述植物细胞再生成的植物。

本发明另一方面提供了一种生产对于除草剂的抗性或耐受性提高的植物的方法，其中包括所述的植物细胞再生成植物。

本发明另一方面又提供了一种控制植物栽培场所的杂草的方法，其中所述植物包括上述的植物或者通过上述方法制备的植物，所述方法包括对所述栽培场所施用控制杂草有效量的

一种或多种除草剂。

本发明另一方面还提供了所述新突变、所述的蛋白或其生物活性片段、所述的核酸、所述的重组表达载体或所述的表达盒在提高植物细胞、植物组织、植物部分或植物的除草剂抗性或耐受性上的应用。

本发明具有如下优异技术效果：

根据顺次编辑产生的新的修复事件形成的序列，设计新靶点，可以在基因组的特定位置连续多次形成突变，极大的丰富 DNA 断裂后修复事件的类型，实现单次基因编辑无法得到的新的碱基替换、删除及插入突变。即本发明采用的以在先基因编辑修复序列为在后基因编辑靶点的循环打靶方案，可以赋予 CRISPR/Cas 通过简单敲除实现单碱基编辑和定点精准删除和插入的新功能。

本发明能够实现无外源标记的基因编辑事件筛选，进一步的实现非转基因的基因编辑并能有效筛选编辑事件，能够极大减轻该方法在细胞治疗和生物育种中应用的生物安全性关切。

尤其是本发明提供的植物非转基因瞬时编辑方法，只涉及 Cas 蛋白和人工合成的小片段 gRNA 或 sgRNA，全程无外源 DNA 参与，通过连续打靶编辑第一目标基因产生内源抗性筛选标记，能够有效筛选编辑事件，实质并不涉及转基因操作，与化学诱变或辐射诱导育种等同，也不需要连续多代的分离检测外源转基因成分，能够缩短育种周期，保证生物安全性，节约监管和审批成本，在植物精准育种中有巨大的应用前景。

发明详述

在本发明中，除非另有说明，否则本文中使用的科学和技术名词具有本领域技术人员所通常理解的含义。并且，本文中所用的蛋白质和核酸化学、分子生物学、细胞和组织培养、微生物学、免疫学相关术语和实验室操作步骤均为相应领域内广泛使用的术语和常规步骤。同时，为了更好地理解本发明，下面提供相关术语的定义和解释。

本文所用术语“基因组”是指存在于生物体的每个细胞或病毒或细胞器中的遗传物质(基因和非编码序列)的全部互补物，和/或从一个亲本作为一个单位(单倍体)遗传的完整染色体组。

术语“基因编辑”是指针对活体有机体的任何遗传信息或基因组的靶向特异性修饰的策略和技术。因此，术语包括基因编码区的编辑，但也包括除基因组的基因编码区之外的区域的编辑。它还包括编辑或改造核(如果存在)以及细胞的其他遗传信息。

术语“CRISPR/Cas 核酸酶”可以是基于 CRISPR 的核酸酶或编码其的核酸序列，包括但不限于：1）Cas9，包括 SpCas9，ScCas9，SaCas9，xCas9，VRER-Cas9，EQR-Cas9，SpG-Cas9，SpRY-Cas9，SpCas9-NG，NG-Cas9，NGA-Cas9（VQR）等，2）Cas12，包括 LbCpf1，FnCpf1，AsCpf1，MAD7 等，或前述基于 CRISPR 的核酸酶的任何变体或衍生物，优选其中所述至少一个基于 CRISPR 的核酸酶与相应的野生型序列相比包含突变，使得所获得的基于 CRISPR 的核酸酶识别不同的 PAM 序列。如本文所用，“基于 CRISPR 的核酸酶”是已经在天然存在的 CRISPR 系统中鉴定的任何核酸酶，其随后从其天然背景中分离，并且其优选已被修饰或组

合成感兴趣的重组构建体，适合作为靶向基因组工程的工具。只要最初的基于野生型 CRISPR 的核酸酶提供 DNA 识别，即结合特性，任何基于 CRISPR 的核酸酶都可以使用并任选重新编程或另外突变以适合本发明的各种实施方案。

术语“CRISPR”指代依赖于成簇规律间隔短回文重复序列途径的序列特异性遗传操纵技术，其不同于 RNA 干扰在转录水平下调节基因表达。

“Cas9 核酸酶”和“Cas9”在本文中可互换使用，指的是包括 Cas9 蛋白或其片段(例如包含 Cas9 的活性 DNA 切割结构域和/或 Cas9 的 gRNA 结合结构域的蛋白)的 RNA 指导的核酸酶。Cas9 是 CRISPR/Cas(成簇的规律间隔的短回文重复序列及其相关系统)基因组编辑系统的组分，能在引导 RNA 的指导下靶向并切割 DNA 靶序列形成 DNA 双链断裂(DSB)。

“Cas 蛋白”或“Cas 多肽”是指由 Cas(CRISPR-相关的)基因编码的多肽。Cas 蛋白包括 Cas 内切核酸酶。Cas 蛋白可以是细菌或古细菌蛋白。例如，本文中的 I-III 型 CRISPR Cas 蛋白通常起源于原核生物；I 型和 III 型 Cas 蛋白可以源自于细菌或古细菌物种，而 II 型 Cas 蛋白(即 Cas9)可以源自于细菌种类。Cas 蛋白包括 Cas9 蛋白、Cpf1 蛋白、C2c1 蛋白、C2c2 蛋白、C2c3 蛋白、Cas3、Cas3-HD、Cas5、Cas7、Cas8、Cas10、Cas12a、Cas12b 或这些的组合或复合物。

“Cas9 变体”或“Cas9 内切核酸酶变体”是指亲本 Cas9 内切核酸酶的变体，其中当与 crRNA 和 tracRNA 或与 sgRNA 相缔合时，Cas9 内切核酸酶变体保留以下能力：识别、结合 DNA 靶序列的全部或部分并任选地解旋 DNA 靶序列的全部或部分、使 DNA 靶序列的全部或部分产生切口、或切割 DNA 靶序列的全部或部分。Cas9 内切核酸酶变体包括本文所述 Cas9 内切核酸酶变体，其中所述 Cas9 内切核酸酶变体不同于亲本 Cas9 内切核酸酶，其方式为：所述 Cas9 内切核酸酶变体(当与 gRNA 复合以形成能够修饰靶位点的、多核苷酸指导的内切核酸酶复合物时)与亲本 Cas9 内切核酸酶(与相同的 gRNA 复合以形成能够修饰相同靶位点的、多核苷酸指导的内切核酸酶复合物)相比时具有至少一种改善的特性，例如，但不限于，增加的转化效率、增加的 DNA 编辑效率、减少的脱靶切割、或其任意组合。

本文所述的 Cas9 内切核酸酶变体包括当与 crRNA 和 tracrRNA 或与 sgRNA 相缔合时可结合双链 DNA 靶位点并使双链 DNA 靶位点产生切口的变体，而亲本 Cas 内切核酸酶当与 crRNA 和 tracrRNA 或与 sgRNA 相缔合时可在靶位点处结合并使双链断裂(切割)。

“引导 RNA”和“gRNA”在本文中可互换使用，指代用于靶向特定基因从而采用 CRISPR 技术进行校正的引导 RNA 序列，通常由部分互补形成复合物的 crRNA 和 tracrRNA 分子构成，其中 crRNA 包含与靶序列具有足够互补性以便与该靶序列杂交并且指导 CRISPR 复合物(Cas9+crRNA+tracrRNA)与该靶序列序列特异性结合的序列。然而，本领域已知可以设计单一引导 RNA(sgRNA)，其同时包含 crRNA 和 tracrRNA 的特征。

术语“单一引导 RNA”和“sgRNA”在本文中可互换使用，并涉及两个 RNA 分子的合成融合，其中包含可变靶向结构域(与 tracrRNA 杂交的 tracr 配对序列连接)的 crRNA(CRISPRRNA)与 tracrRNA(反式激活 CRISPR RNA)融合。sgRNA 可以包含可与 II 型 Cas 核酸内切酶形成复合物的 II 型 CRISPR/Cas 系统的 crRNA 或 crRNA 片段和 tracrRNA 或 tracrRNA 片段，其中所

述引导 RNA/Cas 核酸内切酶复合物可以将 Cas 核酸内切酶引导至 DNA 靶位点，使得 Cas 核酸内切酶能够识别、任选地结合 DNA 靶位点、并任选地使 DNA 靶位点产生切口或切割(引入单链或双链断裂)DNA 靶位点。

在某些实施方式中，引导 RNA(一个或多个)和 Cas9 可以作为核糖核蛋白(RNP)复合物递送至细胞。RNP 由与 gRNA 复合的纯化的 Cas9 蛋白组成，并且在本领域中众所周知 RNP 可以被有效地递送到多种类型的细胞中，包括但不限于干细胞和免疫细胞(Addgene，Cambridge，MA、Mirus Bio LLC，Madison，WI)。

本文中的原间隔序列毗邻基序(protospacer adjacent motif，PAM) 是指与由 gRNA/Cas 内切核酸酶系统识别的(靶向的)靶序列(前间隔子)邻近的短核苷酸序列。如果靶 DNA 序列不邻近合适的 PAM 序列，则 Cas 内切核酸酶可能无法成功识别所述靶 DNA 序列。本文中的 PAM 的序列和长度可以取决于所使用的 Cas 蛋白或 Cas 蛋白复合物而不同。所述 PAM 序列可以是任何长度，但典型地是 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 或 20 个核苷酸长度。

如本文所使用的，术语“生物”或“生物体”，包括动物、植物、真菌、细菌等。

如本文所使用的，术语“宿主细胞”，包括植物细胞、动物细胞、真菌细胞、细菌细胞等。

在本发明中，“动物”包括但不限于脊椎动物，如人类、非人哺乳动物、鸟类、鱼类、爬行类、两栖类等，以及无脊椎动物，如昆虫等。

在本发明中，“植物”应理解为能够进行光合作用的任何分化的多细胞生物，特别是单子叶或双子叶植物，例如：（1）粮食作物：稻属(Oryza spp.)，例如稻(Oryza sativa)、阔叶稻(Oryza latifolia)、水稻(Oryza sativa)、光稃稻（Oryza glaberrima)；小麦属(Triticum spp.)，例如普通小麦(Triticum aestivum)、硬粒小麦(T.Turgidumssp.durum)；大麦属(Hordeum spp.)，例如大麦(Hordeum vulgare)、亚利桑那大麦（Hordeum arizonicum)；黑麦 (Secale cereale)；燕麦属(Avena spp.)，例如燕麦(Avena sativa)、野燕麦(Avena fatua)、比赞燕麦(Avena byzantina)、Avena fatua var.sativa、杂种燕麦(Avena hybrida)；稗属(Echinochloa spp.)，例如，珍珠粟(Pennisetum glaucum)、高粱(两色高粱(Sorghum bicolor)、高粱(Sorghum vulgare))、黑小麦、玉蜀黍或玉米、粟、稻(rice)、谷子、糜子、两色蜀黍(Sorghum bicolor)、黍子、荞麦属(Fagopyrum spp.)、黍(Panicum miliaceum)、小米(Setaria italica)、沼生菰(Zizania palustris)、埃塞俄比亚画眉草(Eragrostis tef)、稷(Panicum miliaceum)、龙爪稷(Eleusine coracana)；（2）豆类作物：大豆属(Glycine spp.)，例如大豆(Glycine max)、黄豆(Soja hispida)、Soja max)、野豌豆属(Vicia spp.)、豇豆属(Vigna spp.)、豌豆属(Pisum spp.)、芸豆(field bean)、羽扇豆属(Lupinus spp.)、蚕豆属(Vicia)、酸豆(Tamarindus indica)、兵豆(Lens culinaris)、山黧豆属(Lathyrus spp.)、扁豆属(Lablab)、蚕豆、绿豆、红豆、鹰嘴豆；（3）油料作物：花生(Arachis hypogaea)、落花生属(Arachis spp)、胡麻属(Sesamum spp.)、向日葵属(Helianthus spp.)(例如向日葵(Helianthus annuus))、油棕属(Elaeis)(例如油棕(Eiaeis guineensis)、美洲油棕(Elaeis oleifera))、大豆(soybean)、油菜（Brassicanapus)、芸苔、芝麻、芥菜（Brassicajuncea)、油菜籽油菜(oilseedrape)、油茶、油棕、油橄榄、

蓖麻、欧洲油菜（Brassica napus L.）、卡诺拉油菜（canola）；（4）纤维作物：剑麻(Agave sisalana)、棉属（棉花、海岛棉(Gossypium barbadense)、陆地棉(Gossypium hirsutum)）、红麻、剑麻、蕉麻、亚麻(Linum usitatissimum)、黄麻、苎麻、大麻(Cannabis sativa)、火麻；（5）水果类作物：枣属(Ziziphus spp.)、香瓜属(Cucumis spp.)、鸡蛋果(Passiflora edulis)、葡萄属(Vitis spp.)、越桔属(Vaccinium spp.)、西洋梨(Pyrus communis)、李属（Prunus spp.)、番石榴属(Psidium spp.)、石榴(Punica granatum)、苹果属(Malus spp.)、西瓜(Citrullus lanatus)、柑桔属(Citrus spp.)、无花果(Ficus carica)、金桔属（Fortunella spp.)、草莓属(Fragaria spp.)、山楂属(Crataegus spp.)、柿树属(Diospyros spp.)、红仔果(Eugenia unifora)、枇杷(Eriobotrya japonica)、龙眼(Dimocarpus longan)、番木瓜(Carica papaya)、椰子属(Cocos spp.)、阳桃（Averrhoa carambola)、猕猴桃属(Actinidia spp.)、扁桃(Prunus amygdalus)、芭蕉属(Musa spp.)（香蕉）、鳄梨属(Persea spp.)（鳄梨(Persea americana)）、番石榴(Psidium guajava)、曼密苹果(Mammea americana)、芒果(Mangifera indica)、橄榄(油橄榄(Oleaeuropaea))、番木瓜(Caricapapaya)、椰子(Cocos nucifera)、凹缘金虎尾(Malpighia emarginata)、人心果(Manilkara zapota)、菠萝(Ananas comosus)、番荔枝属(Annona spp.)、柑桔树(柑桔属物种(Citrus spp.))、波罗蜜属(Artocarpus spp.)、荔枝(Litchi chinensis)、茶藨子属(Ribes spp.)、悬钩子属(Rubus spp.)、梨、桃、杏、梅、杨梅、柠檬、金橘、榴莲、橙、草莓(straw berry)、蓝莓、哈密瓜、甜瓜、椰枣、胡桃树、樱桃树；（6）根茎类作物：木薯属(Manihot spp.)、甘薯(Ipomoea batatas)、芋（Colocasia esculenta)、榨菜、洋葱、荸荠、油莎草、山药；（7）蔬菜类作物：菠菜属(Spinacia spp.)、菜豆属(Phaseolus spp.)、莴苣(Lactuca sativa)、苦瓜属(Momordica spp)、欧芹（Petroselinum crispum)、辣椒属(Capsicum spp.)、茄属(Solanum spp.)（例如马铃薯(Solanum tuberosum)、红茄(Solanum integrifolium)或蕃茄(Solanum lycopersicum))、蕃茄属(Lycopersicon spp.)（例如西红柿(Lycopersicon esculentum)、蕃茄(Lycopersicon lycopersicum)、梨形蕃茄（Lycopersicon pyriforme))、硬皮豆属(Macrotyloma spp.)、无头甘蓝(kale)、棱角丝瓜(Luffa acutangula)、小扁豆(lentil)、秋葵（okra)、洋葱(onion)、马铃薯(potato)、洋蓟(artichoke)、芦笋(asparagus)、西兰花(broccoli)、球芽甘蓝(Brussels sprouts)、卷心菜(cabbage)、胡萝卜(carrot)、花椰菜(cauliflower)、芹菜(celery)、羽衣甘蓝(collard greens)、西葫芦（squash)、冬瓜(Benincasa hispida)、石刁柏(Asparagus officinalis)、旱芹(Apium graveolens)、苋属(Amaranthus spp.)、葱属(Allium spp.)、秋葵属(Abelmoschus spp.)、苦苣(Cichorium endivia)、南瓜属(Cucurbita spp.)、芫荽(Coriandrum sativum)、埃塞俄比亚芥（B.carinata)、萝卜(Rapbanus sativus)、芸苔属(Brassica)物种(例如例如欧洲油菜(Brassica napus)、芜菁亚种(Brassica rapa ssp.)、卡诺拉油菜(canola)、油籽油菜（oilseed rape)、芜菁油菜(turnip rape)、芥菜、甘蓝、黑芥、油菜籽油菜)、孢子甘蓝、茄科植物（茄子)、甜椒、黄瓜、丝瓜、白菜、油菜、甘蓝、葫芦、韭菜、莲、藕、生菜；（8）花卉作物：小金莲花(Tropaeolum minus)、金莲花(Tropaeolum majus)、美人蕉(Canna indica)、仙人掌属(Opuntia spp.)、万寿菊属(Tagetes spp.)、兰花、文殊兰、君子兰、朱顶红、玫瑰、月季、茉莉花、郁金香、樱花、牵牛花、

金盏花、荷花、雏菊、康乃馨、矮牵牛花、郁金香、百合、梅花、水仙、迎春、报春、瑞香、山茶、白玉兰、紫玉兰、琼花、君子兰、海棠、牡丹、芍药、丁香、杜鹃、西洋杜鹃、含笑、紫荆、棣棠、锦带花、连翘、云南黄馨、金雀花、仙客来、蝴蝶兰、石斛、风信子、鸢尾、马蹄莲、金盏菊、百枝莲、四季海棠、吊钟海棠、竹节海棠、天竺葵、绿萝；（9）药用作物：红花(Carthamus tinctorius)、薄荷属(Mentha spp.)、波叶大黄(Rheum rhabarbarum)、番红花(Crocus sativus)、枸杞、玉竹、黄精、知母、麦冬、贝母、郁金、砂仁、何首乌、大黄、甘草、黄芪、人参、三七、五加、当归、川芎、北柴胡、曼佗罗、洋金花、薄荷、益母草、藿香、黄芩、夏枯草、除虫菊、银杏、金鸡纳树、天然橡胶树、苜蓿、胡椒、板蓝根、白术；（10）原料作物：橡胶、蓖麻(Ricinus communis)、油桐、桑、忽布、桦、椴木、漆树；（11）牧草作物：冰草属(Agropyron spp.)、车轴草属(Trifolium spp.)、芒(Miscanthus sinensis)、狼尾草属(Pennisetum sp.)、鹅草(Phalaris arundinacea)、柳枝稷(Panicum virgatum)、草原草(prairiegrasses)、印度草 (Indiangrass)、大须芒草(Big bluestem grass)、梯牧草(Phleum pratense)、草皮草(turf)、莎草科（高山嵩草、脚苔草(Carex pediformis)、低苔草)、苜蓿、梯牧草、紫花苜蓿、草木犀、紫云英、柽麻、田菁、红萍、水葫芦、紫穗槐、羽扇豆、三叶草、沙打旺、水浮莲、水花生、黑麦草；（12）糖料作物：甘蔗(甘蔗属物种(Saccharum spp.))、甜菜(Beta vulgaris)；（13）饮料作物：大叶茶(Camellia sinensis)、茶(Camellia Sinensis)、茶树(tea)、咖啡(咖啡属物种(Coffea spp.))、可可树(Theobroma cacao)、蛇麻花（啤酒花)；（14）草坪植物：固沙草(Ammophila arenaria)、早熟禾属(Poa spp.)（草地早熟禾(Poa pratensis)(蓝草))、剪股颖属物种(Agrostis spp.)(剪股颖、匍匐剪股颖（Agrostis palustris）)、黑麦草属物种(Lolium spp.)(黑麦草)、羊茅属物种(Festuca spp.) (羊茅)、结缕草属物种(Zoysia spp.)(结缕草（Zoysiajaponica）)、狗牙根属物种(Cynodon spp.)(百慕大草、狗牙根)、侧钝叶草(Stenotaphrum secunda tum)(圣奥古斯丁草)、雀稗属物种(Paspalum spp.)(巴哈草)、假俭草(Eremochloa ophiuroides)(百足草)、地毯草属物种(Axonopus spp.)(地毯草)、指形垂穗草(Bouteloua dactyloides)(野牛草)、垂穗草属变种物种 (Bouteloua var.spp.)(格兰马草) 、马唐（Digitariasanguinalis)、香附子（Cyperusrotundus)、短叶水蜈蚣（Kyllingabrevifolia)、阿穆尔莎草（Cyperusamuricus)、加拿大飞蓬（Erigeroncanadensis）、天胡荽（Hydrocotylesibthorpioides）、鸡眼草（Kummerowiastriata)、地锦（Euphorbiahumifusa)、耕地堇菜（Violaarvensis)、白颖苔草、异穗苔草、草皮草（turf)；（15）树木作物：松属(Pinus spp.)、柳属(Salix sp.)、槭树属(Acer spp.)、木槿属(Hibiscus spp.)、桉属(Eucalyptus sp.)、银杏(Ginkgo biloba)、箭竹属(Bambusa sp.)、杨属(Populus spp.)、牧豆树属(Prosopis spp.)、栎属(Quercus spp.)、刺葵属(Phoenix spp.)、山毛榉属 (Fagus spp.)、吉贝(Ceiba pentandra)、樟属(Cinnamomum spp.)、黄麻属(Corchorus sp.)、南方芦苇(Phragmites australis)、酸浆属(Physalis spp.)、山蚂蝗属(Desmodium spp.)、杨、常春藤、白杨、珊瑚树、银杏、栎类、臭椿、木荷、冬青、悬铃木、女贞、大叶黄扬、落叶松、黑荆树、马尾松、思茅松，云南松、南亚松、油松、红松、黑胡桃、柠檬、悬铃木、蒲桃、珙桐、木棉、爪哇木棉、洋紫荆、羊蹄甲、雨树、

合欢、龙牙花、刺桐、广玉兰、苏铁、紫薇、针叶树、乔木、灌木；（16）坚果作物：巴西栗 (Bertholletia excelsea)、栗属(Castanea spp.)、榛属(Corylus spp.)、山核桃属 (Carya spp.)、核桃属(Juglans spp.)、阿月浑子(Pistacia vera)、腰果(Anacardium occidentale)、澳洲坚果(全缘叶澳洲坚果(Macadamia integrifolia))、碧根果、夏威夷果、开心果、巴旦木以及产生坚果的植物；（17）其他：拟南芥、臂形草、蒺藜草、大狗尾草、牛筋草、Cadaba farinosa、藻类(algae)、Carex elata、观赏植物、大果假虎刺(Carissa macrocarpa)、菜蓟属(Cynara spp.)、野胡萝卜(Daucus carota)、薯蓣属(Dioscorea spp.)、蔗茅属(Erianthus sp.)、苇状羊茅(Festuca arundinacea)、萱草 (Hemerocallis fulva)、百脉根属(Lotus spp.)、Luzula sylvatica、紫苜蓿(Medicago sativa)、草木樨属(Melilotus spp.)、黑桑(Morus nigra)、烟草属(Nicotiana spp.)、木犀榄属(Olea spp.)、鸟足豆属(Ornithopus spp.)、欧防风(Pastinaca sativa)、接骨木属(Sambucus spp.)、白芥属(Sinapis sp.)、蒲桃属 (Syzygium spp.)、鸭茅状摩擦禾(Tripsacum dactyloides)、Triticosecale rimpaui、香堇(Viola odorata)等。

在一具体实施方式中，所述植物选自水稻、玉米、小麦、大豆、向日葵、高粱、油菜、苜蓿、棉花、大麦、谷子、甘蔗、番茄、烟草、木薯、马铃薯、甘薯、白菜、甘蓝、黄瓜、月季、绿萝、西瓜、甜瓜、草莓、蓝莓、葡萄、苹果、柑橘、桃、梨、香蕉等。

如本文所使用的，术语“植物”包括整个植物和任何后代、植物的细胞、组织、或部分。术语“植物部分”包括植物的任何部分，包括，例如但不限于：种子(包括成熟种子、没有种皮的未成熟胚、和不成熟的种子)；植物插条(plant cutting)；植物细胞；植物细胞培养物；植物器官(例如，花粉、胚、花、果实、芽、叶、根、茎，和相关外植体)。植物组织或植物器官可以是种子、愈伤组织、或者任何其他被组织成结构或功能单元的植物细胞群体。植物细胞或组织培养物能够再生出具有该细胞或组织所来源的植物的生理学和形态学特征的植物，并能够再生出与该植物具有基本上相同基因型的植物。与此相反，一些植物细胞不能够再产生植物。植物细胞或组织培养物中的可再生细胞可以是胚、原生质体、分生细胞、愈伤组织、花粉、叶、花药、根、根尖、丝、花、果仁、穗、穗轴、壳、或茎。

植物部分包括可收获的部分和可用于繁殖后代植物的部分。可用于繁殖的植物部分包括，例如但不限于：种子；果实；插条；苗；块茎；和砧木。植物的可收获部分可以是植物的任何有用部分，包括，例如但不限于：花；花粉；苗；块茎；叶；茎；果实；种子；和根。

植物细胞是植物的结构和生理单元。如本文所使用的，植物细胞包括原生质体和具有部分细胞壁的原生质体。植物细胞可以是处于分离的单个细胞或细胞聚集体的形式(例如，松散愈伤组织和培养的细胞)，并且可以是更高级组织单元(例如，植物组织、植物器官、和植物)的一部分。因此，植物细胞可以是原生质体、产生配子的细胞，或者能够再生成完整植物的细胞或细胞的集合。因此，在本文的实施方案中，包含多个植物细胞并能够再生成为整株植物的种子被认为是一种“植物部分”。

如本文所使用的，术语“原生质体”是指细胞壁被完全或部分地除去、其脂双层膜裸露的植物细胞。典型地，原生质体是没有细胞壁的分离植物细胞，其具有再生成细胞培养物或整株植物的潜力。

植物“后代”包括植物的任何后续世代。

术语“细菌”意旨所有的原核生物，包括原核生物界（Kingdom Procaryotae）中的所有生物。术语“细菌”包括认为是细菌的所有微生物，包括支原体属(Mycoplasma)、衣原体属(Chlamydia)、放线菌属(Actinomyces)、链霉菌属(Streptomyce)和立克次氏体属(Rickettsia)。所有形式的细菌均包括在该定义内，包括球菌、杆菌、螺旋菌、原生质球、原生质体等。在该术语中还包括为革兰氏阴性或革兰氏阳性的原核生物。“革兰氏阴性”和“革兰氏阳性”意指使用本领域众所周知的革兰氏染色法的染色模式(例如参见 Finegold 和 Martin，Diagnostic Microbiology，6th Ed.，CV MosbySt.Louis，pp.13-15[1982])。“革兰氏阳性菌”为保留用于革兰氏染色的原染料的细菌，导致染色的细胞在显微镜下表现出深蓝色至紫色。“革兰氏阴性菌”不保留用于革兰氏染色的原染料，但被复染剂染色。因此，革兰氏阴性菌在革兰氏染色反应后呈红色。

本文所用的术语“真菌”用以指真核生物，诸如霉菌和酵母，包括双态性真菌。

“除草剂耐受性”和“除草剂抗性”两个术语可以互换使用，均指的是对除草剂的耐受性和对除草剂的抗性。“除草剂耐受性提高”和“除草剂抗性提高”是指对所述除草剂的耐受性或抗性与含有野生型基因的植物相比提高。

术语“野生型”指的是可以在自然界中被发现存在的核酸分子或蛋白质。

在本发明中，术语“场所”包括栽培本发明植物的场地例如土壤，也包括例如植物种子、植物苗以及长成的植物。术语“控制杂草有效量”指的是除草剂的量足以影响目标杂草的生长或发育，例如阻止或抑制目标杂草的生长或发育，或者杀灭所述杂草。有利地，所述控制杂草有效量不会显著影响本发明植物种子、植物苗或植物的生长和/或发育。本领域技术人员可以通过常规实验确定这样的控制杂草有效量。

如本文所使用的“靶 DNA”为包含“靶位点”或“靶序列”的 DNA 多核苷酸。

“裂解”意指 DNA 分子的共价骨架的断裂。可通过各种各样的方法来开始裂解，所述方法包括但不限于磷酸二酯键的酶水解或化学水解。单链裂解和双链裂解均是可能的，并且双链裂解可由于两个相异单链裂解事件而发生。DNA 裂解可导致平端或交错端产生。在某些实施方案中，包含靶向 DNA 的 RNA 和定点修饰多肽的复合物用于靶向的双链 DNA 裂解。

术语“基因”包括表达功能性分子(诸如但不限于，特定蛋白质)的核酸片段，包括在编码序列之前(5’非编码序列)和之后(3’非编码序列)的调节序列。

“编码”具体 RNA 的 DNA 序列为转录成 RNA 的 DNA 核酸序列。DNA 多核苷酸可编码翻译成蛋白质的 RNA(mRNA)，或 DNA 多核苷酸可编码不翻译成蛋白质的 RNA(例如 tRNA、rRNA 或靶向 DNA 的 RNA；又称为“非编码”RNA 或“ncRNA”)。

“多肽”、“肽”和“蛋白”在本发明中可互换使用，指氨基酸残基的聚合物。该术语适用于其中一个或多个氨基酸残基是相应的天然存在的氨基酸的人工化学类似物的氨基酸聚合物，以及适用于天然存在的氨基酸聚合物。术语“多肽”、“肽”、“氨基酸序列”和“蛋白”还可包括修饰形式，包括但不限于糖基化、脂质连接、硫酸盐化、谷氨酸残基的 γ 羧化、羟化和 ADP-核糖基化。

“生物活性片段”是指从蛋白质的 N 和/或 C 末端缺失一或多个氨基酸残基而仍保留其功能活性的片段。

对于说明书中所用的有关氨基酸取代的术语，第一个字母代表特定序列某一位置上天然存在的氨基酸，后面的数字代表所述对应序列中的位置，第二个字母代表取代该天然氨基酸的不同氨基酸。譬如 W574L 表示第 574 位的色氨酸被亮氨酸取代。对于双重或多重突变，各突变之间以“/”隔开。

术语“多核苷酸”和“核酸”可以互换使用，包括 DNA、RNA 或者其杂交体，可以是双链或单链的。

术语“核苷酸序列”和“核酸序列”均是指 DNA 或 RNA 中碱基的排列顺序。

如本发明所用，“表达盒”“表达载体”和“表达构建体”是指适于感兴趣的核苷酸序列在植物中表达的载体如重组载体。“表达”指功能产物的产生。例如，核苷酸序列的表达可指核苷酸序列的转录(如转录生成 mRNA 或功能 RNA)和/或 RNA 翻译成前体或成熟蛋白质。

本发明的“表达构建体”可以是线性的核酸片段、环状质粒、病毒载体，或者，在一些实施方式中，可以是能够翻译的 RNA(如 mRNA)。

本发明的“表达构建体”可包含不同来源的调控序列和感兴趣的核苷酸序列，或相同来源但以不同于通常天然存在的方式排列的调控序列和感兴趣的核苷酸序列。

术语“重组表达载体”或“DNA 构建体”在本文中可互换使用，是指包含载体和至少一个插入物的 DNA 分子。通常出于表达和/或繁殖插入物的目的或出于构建其它重组核苷酸序列而产生重组表达载体。插入物可以可操作的或可以不可操作地连接至启动子序列并且可以可操作的或可以不可操作地连接至 DNA 调节序列。

“调控序列”和“调控元件”可互换使用，指位于编码序列的上游(5'非编码序列)、中间或下游(3'非编码序列)，并且影响相关编码序列的转录、RNA 加工或稳定性或者翻译的核苷酸序列。植物表达调控元件指的是能够在植物中控制感兴趣的核苷酸序列转录、RNA 加工或稳定性或者翻译的核苷酸序列。

调控序列可包括但不限于启动子、翻译前导序列、内含子和多腺苷酸化识别序列。

“启动子”指能够控制另一核酸片段转录的核酸片段。在本发明的一些实施方案中，启动子是能够控制植物细胞中基因转录的启动子，无论其是否来源于植物细胞。启动子可以是组成型启动子或组织特异性启动子或发育调控启动子或诱导型启动子。

“组成型启动子”指一般将引起基因在多数细胞类型中在多数情况下表达的启动子。“组织特异性启动子”和“组织优选启动子”可互换使用，并且指主要但非必须专一地在一种组织或器官中表达，而且也可在一种特定细胞或细胞型中表达的启动子。“发育调控启动子”指其活性由发育事件决定的启动子。“诱导型启动子”响应内源性或外源性刺激(环境、激素、化学信号等)而选择性表达可操纵连接的 DNA 序列。

如本文中所用，术语“可操作地连接”指调控元件(例如但不限于，启动子序列、转录终止序列等)与核酸序列(例如，编码序列或开放读码框)连接，使得核苷酸序列的转录被所述转录调控元件控制和调节。用于将调控元件区域可操作地连接于核酸分子的技术为本领域已知的。

将核酸分子(例如质粒、线性核酸片段、RNA 等)或蛋白质“导入”植物是指用所述核酸或蛋白质转化植物细胞，使得所述核酸或蛋白质在植物细胞中能够发挥功能。本发明所用的“转化”包括稳定转化和瞬时转化。

“稳定转化”指将外源核苷酸序列导入植物基因组中，导致外源基因稳定遗传。一旦稳定转化，外源核酸序列稳定地整合进所述植物和其任何连续世代的基因组中。

“瞬时转化”指将核酸分子或蛋白质导入植物细胞中，执行功能而没有外源基因稳定遗传。瞬时转化中，外源核酸序列不整合进植物基因组中。

除非另外定义，否则本文使用的所有技术术语和科学术语具有与通过本发明所属领域中的普通技术人员通常理解的相同的含义。虽然还可在本发明的实践或测试中使用类似于或等同于本文所述的那些方法和材料的任何方法和材料，但现在描述优选的方法和材料。

本说明书中引用的所有出版物和专利以引用的方式并入本文如同每个单独的出版物或专利均确切地和单独地指出以引用的方式并入一样，并且以引用的方式并入本文以公开和描述与出版物所引用的相关的方法和/或材料。任何出版物的引用为其公开在申请日之前并且不应该解释为承认本发明没有资格先于现有发明的这种出版物。此外，所提供的出版日期可与实际出版日期不同，这可能需要独立证实。

除非具体说明或暗示，如本文中所用，术语“一”、“一个/一种”和“所述”表示“至少一个”。本文提到或引用的所有专利、专利申请和出版物整体引入本文作为参考，其引用程度如同单独地个别引用一样。

附图说明

图 1 为本发明所述在生物体内产生新突变的方法原理图，图中仅仅以 NGG 为 PAM 的 Cas9 为例；同理也可以应用其它具有不同 PAM（如 NG 等）的 Cas9 变体。

图 2 为拟南芥 ALS 基因 W574 位点与 S653 位点 gRNA 设计示意图。

图 3 显示了转化两个不同循环打靶载体的拟南芥 T2 代抗除草剂株系。pQY743 和 pQY745 为载体编号。抗性株系能够正常生根，野生型 Col-0 和非抗性株系不能生根。

图 4 为抗甲咪唑烟酸拟南芥 T2 代株系 ALS 基因的测序峰图，箭头所指的 T 由 G 突变而来，导致了 W574L 突变。

图 5 为拟南芥 ALS 基因 W574 位点循环打靶方案设计。T-DNA 序列表达 sgRNA1、sgRNA2、Cas9 和 HygR 四个基因。其中 sgRNA1 和 Cas9 形成复合物，切割基因组中 ALS 的 W574 密码子，预期经过细胞自发修复形成-G 的基因型，该新序列可以被 sgRNA2 和 Cas9 形成的复合物识别并切割，经过细胞自发修复形成+T 的基因型，导致 W574L。

图 6 显示甲咪唑烟酸筛选的拟南芥抗性苗和 ALS W574 位点测序结果。

图 7 为拟南芥 ALS 基因 S653 位点循环打靶方案设计。T-DNA 序列表达 sgRNA1、sgRNA2、Cas9 和 HygR 四个基因。其中 sgRNA1 和 Cas9 形成复合物，切割基因组中 ALS 的 S653 密码子。经过细胞自发修复形成-G 的基因型。该序列可以被 sgRNA2 和 Cas9 形成的复合物识别并切割。经过细胞自发修复形成+A 的基因型，导致 S653N。

图 8 显示甲咪唑烟酸筛选的拟南芥抗性苗和 ALS S653 位点测序结果。左侧为抗性苗筛选结果和抗性苗的比例，右侧显示了 S653 位点的测序峰图和突变类型。

图 9 为拟南芥 ALS 基因 W574 位点循环打靶方案设计。T-DNA 序列表达 sgRNA1、sgRNA2、Cas9 和 HygR 四个基因。其中 sgRNA1 和 Cas9 形成复合物，切割基因组中 ALS 的 W574 密码子。经过细胞自发修复形成+A 的基因型。该序列可以被 sgRNA2 和 Cas9 形成的复合物识别并切割。经过细胞自发修复形成-G 的基因型，导致 W574M。其中两次切割利用了不同的 PAM 位点。

图 10 为水稻 ACCase2 基因 W2038 位点循环打靶方案设计，该位点对应大穗看麦娘 W2027。T-DNA 序列表达 sgRNA1、sgRNA2、Cas9 和 HygR 四个基因。其中 sgRNA1 和 Cas9 形成复合物，切割基因组中 ACCase 的 W2038 密码子。经过细胞自发修复形成-G 的基因型。该序列可以被 sgRNA2 和 Cas9 形成的复合物识别并切割。经过细胞自发修复形成+T 的基因型，导致 W2038L。

图 11 显示潮霉素（50 ug/L）和精喹禾灵（50 ug/L）共筛选的抗性水稻愈伤和 W2038 位点测序结果。

图 12 为原核表达纯化的 SpCas9 和 NGA-Cas9 蛋白聚丙烯酰胺凝胶电泳图。箭头所指的条带为 Cas9 蛋白条带。

图 13 显示用琼脂糖凝胶电泳检测纯化的 Cas9 蛋白在体外对含有 OsALS W548 靶位点和 OsACCase2 W2038 靶位点 DNA 片段的切割活性，可以看到仅在同时加入 Cas9 蛋白和 sgRNA 片段的条件下，DNA 片段能够被切割为预期大小。

图 14 为 RNP 转化水稻原生质体 OsALS W548 靶点测序峰图，该位点对应拟南芥 ALS W574 位点。箭头所指处除原始的 G 碱基信号峰外，还有突变得到的 T 碱基信号峰，导致了 W548L 突变。

图 15 为 50ug/L 精喹禾灵筛选 RNP 编辑 OsACCase2 W2038 位点的水稻抗性愈伤。箭头所指为抗性愈伤。

图 16 为抗性愈伤分化出的水稻苗 OsACCase2 W2038 靶点测序峰图。箭头所指处的 T 由 G 突变而来，导致了 W2038L 突变。

图 17 为 T1 代 OsACCase2 W2038L 编辑苗对高效氟吡甲禾灵的抗性测试。图中左 1 为野生型淮稻 5 号水处理对照，左 2 至左 4 为野生型淮稻 5 号和两个 RNP 基因枪转化 T1 代 W2038L 编辑株系 QY367-7-12、QY367-7-18 使用 5 克每亩活性成分的高效氟吡甲禾灵处理的结果。可见编辑株系产生了对高效氟吡甲禾灵的抗性。

图 18 为 T1 代 OsACCase2 W2038L 编辑苗对精喹禾灵的抗性测试。图中左 1 为野生型淮稻 5 号水处理对照，左 2 至左 4 为野生型淮稻 5 号和两个 RNP 基因枪转化 T1 代 W2038L 编辑株系 QY367-5-10、QY367-5-21 使用 5 克每亩活性成分的精喹禾灵处理的结果。可见编辑株系产生了对精喹禾灵的抗性。

图 19 为 50ug/L 精喹禾灵筛选 RNP 编辑同时编辑 OsACCase2 W2038 位点和 OsBADH2 基因的水稻抗性愈伤。箭头所指为抗性愈伤。

图 20 为 T0 代双位点编辑苗 OsACCase2 W2038 靶点测序峰图。箭头所指处的 T 由 G 突变而来，导致了 W2038L 突变。

图 21 为 T0 代双位点编辑苗 OsBADH2 靶点测序峰图。箭头所指处发生了+A 的纯合突变。

图 22 为 5mg/L 啶磺草胺筛选 RNP 编辑同时编辑 OsALS W548 位点和 OsSWEET14 基因的水稻抗性愈伤。箭头所指为抗性愈伤。

图 23 为 T0 代双位点编辑苗 OsALS W548 靶点测序峰图。箭头所指处同时存在 G 碱基和 T 碱基的信号峰，导致了 W548L 突变。

图 24 为 T0 代双位点编辑苗 OsSWEET14 靶点测序峰图。箭头所指处显示发生了-C 的纯合突变。

图 25 为 T1 代 OsALS W548 位点和 OsSWEET14 双位点编辑苗对烟嘧磺隆的抗性测试。图中左 1 为野生型淮稻 5 号水处理对照，左 2 至左 3 为野生型淮稻 5 号和 RNP 基因枪转化 T1 代 W548L 编辑株系 QY360-7-11 使用 4 克每亩活性成分的烟嘧磺隆处理的结果。可见编辑株系产生了对烟嘧磺隆的抗性。

图 26 为 T1 代 OsALS W548 位点和 OsSWEET14 双位点编辑苗对氟唑磺隆的抗性测试。图中左 1 为野生型淮稻 5 号水处理对照，左 2 至左 3 为野生型淮稻 5 号和 RNP 基因枪转化 T1 代 W548L 编辑株系 QY360-7-9 使用 2 克每亩活性成分的氟唑磺隆处理的结果。可见编辑株系产生了对氟唑磺隆的抗性。

图 27 为 T1 代 OsALS W548 位点和 OsSWEET14 双位点编辑苗对甲基咪草烟的抗性测试。图中左 1 为野生型淮稻 5 号水处理对照，左 2 至左 3 为野生型淮稻 5 号和 RNP 基因枪转化 T1 代 W548L 编辑株系 QY360-7-11 使用 7 克每亩活性成分的甲基咪草烟处理的结果。可见编辑株系产生了对甲基咪草烟的抗性。

图 28 为 T1 代 OsALS W548 位点和 OsSWEET14 双位点编辑苗对啶磺草胺的抗性测试。图中左 1 为野生型淮稻 5 号水处理对照，左 2 至左 4 为野生型淮稻 5 号和 RNP 基因枪转化 T1 代 W548L 编辑株系 QY360-7-2、QY360-7-11 使用 2 克每亩活性成分的啶磺草胺处理的结果。可见编辑株系产生了对啶磺草胺的抗性。

图 29 为 293T 细胞中 HBB 基因连续打靶方案。其中，A 代表 293T 细胞中 HBB 基因连续打靶靶点设计；B 代表 293T 细胞中 HBB 基因连续打靶各编辑载体转化 48 小时后的转化效率；C 代表 293T 细胞中 HBB 基因连续打靶和单位点打靶产生的基因编辑类型的比例；WT：野生型，indel：删除或插入的基因型，C->T SNP：在切口处产生 C 到 T 的碱基替换的基因型。

序列说明

本发明所涉及的主要序列总结如下，并且在序列表中提供了相关的序列。

SEQ ID NO:	序列说明
1	拟南芥 ALS 蛋白氨基酸序列

2	拟南芥 ALS 基因 DNA 序列
3	大穗看麦娘(Alopecurus myosuroides) AmACCase 蛋白的氨基酸序列
4	大穗看麦娘 AmACCase 基因的 DNA 序列
5	水稻 OsHPPD 蛋白氨基酸序列
6	水稻 OsHPPD 蛋白基因组 DNA 序列
7	水稻 OsPPO1 蛋白氨基酸序列
8	水稻 OsPPO1 蛋白基因组 DNA 序列
9	水稻 OsTIR1 蛋白氨基酸序列
10	水稻 OsTIR1 蛋白基因组 DNA 序列
11	水稻 ALS 蛋白氨基酸序列
12	水稻 ALS 基因 DNA 序列
13	水稻 ACCase2 蛋白氨基酸序列
14	水稻 ACCase2 基因组 DNA 序列
15	SpCas9 蛋白经植物密码子优化后的 DNA 序列
16	NGA-Cas9 蛋白经植物密码子优化后的 DNA 序列
17	水稻 OsBADH2 基因组 DNA 序列
18	水稻 OsSWEET14 基因组 DNA 序列
19	马铃薯 StALS2 蛋白氨基酸序列
20	马铃薯 StALS2 基因 DNA 序列
21	人胚肾细胞 293T 中 HBB（hemoglobin subunit beta）基因 DNA 序列
22	人胚肾细胞 293T 中 HBB 基因 CDS 序列
23	人胚肾细胞 293T 中 HBB 基因氨基酸序列

具体实施方式

以下结合实例，对本发明作进一步说明。下面的说明是采用举例的方式，但是本发明的保护范围不应局限于此。下述实施例中的实验方法，如无特殊说明，均为常用分子生物学、组织培养技术和农学手册所记载的方法。例如，具体步骤可参见：《Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3rd edition)》（Sambrook，J.，Russell, David W.， 2001，Cold Spring Harbor），《Plant Propagation by Tissue Culture》(Edwin F. George, Michael A. Hall, Geert-Jan De Klerk, 2008, Springer)。下述实施例中所用的材料、试剂、仪器等，如无特殊说明，均可从商业途径得到。

实施例 1 针对拟南芥 ALS 基因 W574 及 S653 位点循环打靶设计可预期的碱基替换

A．实验材料

1. 拟南芥材料

拟南芥 Col-0 野生型为双子叶植物模式品种，原始种子由中国农业大学植物保护学院杂

草学教研室提供，本实验室按照本领域标准方法扩繁保存。

2. 载体

pCBC-dT1T2（Xing HL, Dong L, Wang ZP, Zhang HY, Han CY, Liu B, Wang XC, Chen QJ 2014. A CRISPR/Cas9 toolkit for multiplex genome editing in plants. BMC Plant Biol. Nov 29;14(1):327 具体信息见 https://www.addgene.org/50590/）、pHEE401E（具体信息见 Wang ZP, Xing HL, Dong L, Zhang HY, Han CY, Wang XC, Chen QJ Genome Biol. 2015 Jul 21;16:144. doi: 10.1186/s13059-015-0715-0. https://www.addgene.org/71287/）、pHEE401E-NG（将 Nishimasu et al. 2018 Engineered CRISPR-Cas9 nuclease with expanded targeting space. Science 361(6408):1259-1262. doi: 10.1126/science.aas9129 报道中的突变引入到 pHEE401E 中，构建成识别 NG PAM 的载体 pHEE401E-NG）载体质粒可自 Addgene 网站商购获得或由本实验室按照常规分子生物学方法构建，并由本实验室保存。

3. 主要仪器设备

移液枪、水浴锅、PCR 仪（Bio-rad T100）、电泳仪（威克斯 WIX-EP600）、凝胶成像仪、电热鼓风干燥机、离心机（Eppendorf 5424R）、高通量组织破碎仪、摇床、电子天平、pH 计等。

4. 主要试剂

高保真 DNA 聚合酶（购自 Tsingke 生物）、琼脂糖凝胶回收试剂盒与质粒提取试剂盒（购自思科捷）、BsaI 与 T4 DNA 连接酶（购自 NEB）、Trans5α 感受态细胞与 EHA105 感受态细胞（购自北京全式金），GV3101 农杆菌感受态（购自上海昂羽生物），Tris、EDTA、卡那霉素、头孢抗生素、潮霉素、琼脂糖、酵母粉、胰蛋白胨、NaCl（购自生工生物）、MS 粉末、蔗糖、Silwet-77、潮霉素（购自索莱宝公司），核酸染料（Dured）、无水乙醇（购自国药）等。

5. 主要溶液配置

1）种子消毒液：4mL 10%SDS，20mL NaClO，加水定容至 200mL。

2）SDS 提取缓冲液：40mL 1M Tris·HCl（pH 8.0），50mL 0.1M EDTA，10mL 5M NaCl，10mL 10%SDS，加水定容至 200mL。

3）侵染液：蔗糖 1.5g，Silwet-77 9μL，加入 30mL 超纯水。

4）LB 固体培养基：酵母粉 5g，胰蛋白胨 10g，NaCl 10g，琼脂 15g，加水定容至 1L，121℃灭菌 15 分钟后倒平板备用。

5）50×TAE 母液：Tris 242g，$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$ 37.2g，加入 800mL 超纯水，充分搅拌溶解，加入 57.1mL 醋酸，充分搅拌，最后用去离子水定容至 1L，室温保存。

6）MS 固体培养基：称取 4.42g MS 粉末，10g 蔗糖，加入 800mL 超纯水，调 pH 至 5.8，加水定容至 1L，加入 10g 植物凝胶，121℃灭菌 15 分钟后倒平板备用。

B．实验方法

1. CRISPR/Cas9 双靶点载体设计与构建

1.1 靶点设计

拟南芥 ALS 基因序列如 SEQ ID NO: 2 所示，以拟南芥 ALS574 位点附近 AGA 为 PAM

设计 19 个碱基的靶点序列 gRNA1: 5'-GCATGGTTATGCAATGGGA-3'，预测经过编辑后在 PAM 前 3-4 位之间会删除一个碱基 G，然后以删除后的序列设计第二个靶点序列 gRNA2: 5'-GGCATGGTTATGCAATGGA-3'，预测经过第二次编辑会插入一个碱基 T，从而实现 TGG-TTG 的转换，如图 2 所示。

同样的，以拟南芥 ALS653 位点附近 TGG 为 PAM 设计 19 个碱基的靶点序列 gRNA3: 5'-TGCCGATGATCCCGAGTGG-3'，预测经过编辑后在 PAM 前 3-4 位之间会删除一个碱基 G，然后以删除后的序列设计第二个靶点序列 gRNA4: 5'- TTGCCGATGATCCCGATGG-3'，预测经过第二次编辑会插入一个碱基 A，从而实现 AGT-AAT 的转换，如图 2 所示。

1.2 载体构建

按照 Xing HL, Dong L, Wang ZP, Zhang HY, Han CY, Liu B, Wang XC, Chen QJ 2014. A CRISPR/Cas9 toolkit for multiplex genome editing in plants. BMC Plant Biol. Nov 29;14(1):327 中所述方法进行。具体而言，以 dT1T2 质粒为模板分别扩增 ALS574 与 653 位点双靶点片段，构建 sgRNA 表达盒。BsaI 酶切 pHEE401E、pHEE401E-NG 载体骨架，切胶回收，目的片段经酶切后直接用于连接反应。采用 T4 DNA 连接酶连接载体骨架与目的片段，转化连接产物至 Trans5α 感受态细胞，挑取不同的单克隆测序，测序正确后利用思科捷高纯度质粒小量提取试剂盒抽提质粒，得到重组质粒，分别命名为 pQY743、pQY745。

2. 靶点检测引物的设计

靶点检测引物以 ALS574、ALS653 靶点为中心，上游检测引物距 ALS574 靶点约 100bp 左右，下游检测引物距 ALS653 靶点约 280bp。引物序列 574/653checking-F：5' AT-TGACGGAGATGGAAGCTT3'， 574/653checking-R：5'CCAAACTGAGCCAGTCACAA3'。

3. 拟南芥遗传转化体系的建立

3.1 农杆菌转化

将构建好的重组质粒转化农杆菌 GV3101 感受态细胞，得到重组农杆菌。

3.2 农杆菌侵染液的制备

1)挑取活化的农杆菌接种于 30ml YEP 液体培养基(含 25mg/L Rif 和 50mg/L Kan)中，28℃ 200 转/分钟振荡培养过夜至 OD600 值为 1.0-1.5 左右。

2）6000 转/分钟离心 10 分钟收集菌体，弃上清。

3）用侵染液（无须调节 pH）重新悬浮菌体至 OD600=0.8 左右备用。

3.3 拟南芥转化

1）植株转化之前注意植株是否生长良好，花序茂盛，无胁迫反应，第一次转化株高 20 厘米即可进行。若土壤干燥可适当浇一些水。转化前一天用剪刀将已长出的角果剪去。

2）将待转化植株花序浸泡于上述溶液中 30 秒-1 分钟，期间轻轻搅动，浸润后的植株上应该有一层液体膜。

3)转化完成后植株放于黑暗环境中暗培养 24 小时，然后取出放于正常光照环境下生长。

4）一周以后即可按同样的方法进行第二次转化。

3.4 种子收获

待种子成熟后即可进行收获，收获后置于37℃烘箱一周左右烘干种子。

4. 转基因植株的筛选

种子经过消毒液处理5分钟，用去离子水洗5遍后均匀铺于MS筛选培养基（含30μg/mL潮霉素、100μg/mL 头孢霉素）上，将培养基放于光照培养箱培养（温度22℃，16小时光照，8小时黑暗，光照强度100-150μmol/m^2/s，湿度75%），一周后选取阳性幼苗移栽至土壤。

5. T1突变植株的检测

5.1 基因组DNA提取

1）剪取拟南芥叶片约于2mL离心管中，加入钢珠，利用高通量组织破碎仪进行叶片研磨。

2）待研磨充分后，加入400μL SDS提取缓冲液，上下颠倒混匀，置于65℃水浴锅中孵育15分钟，期间每隔5分钟颠倒混匀一次。

3）13000转/分钟离心5分钟。

4）吸取300μL上清液转移至一新的1.5mL离心管中，向离心管中加入等体积经过-20℃预冷的异丙醇，将离心管置于-20℃ 1小时或者过夜。

5）13000转/分钟离心10分钟，去掉上清液。

6）向离心管中加入500μL 70%乙醇洗涤沉淀，离心后倒掉洗涤液（注意不要倒掉沉淀），置于室温晾干后，加入30μL超纯水溶解DNA，置于-20℃保存DNA。

5.2 PCR扩增

以提取的T1植株基因组为模板，用检测引物进行靶点片段扩增，吸取5μL扩增产物经1%琼脂糖凝胶电泳检测，并经凝胶成像仪成像，剩余产物交由测序公司直接进行测序。

6. T2突变植株的检测

单株收获T1株系的种子后，选取两个载体不同株系的种子铺于甲咪唑烟酸筛选培养基（MS培养基+0.24μg/mL 甲咪唑烟酸）上进行筛选，一周后移栽阳性幼苗至土壤并进行分子检测，方法同步骤5。

所用引物及序列：

引物名称	序列（5’-3’）
ALS574-F	ATATATGGTCTCGATTGGCATGGTTATGCAATGGGAGTTTTAGAGCTAGAAATA
ALS574-R	ATTATTGGTCTCGAAACTCCATTGCATAACCATGCCCAATCTCTTAGTCGACTC
ALS653-F	ATATATGGTCTCGATTGTGCCGATGATCCCGAGTGGGTTTTAGAGCTAGAAATA
ALS653-R	ATTATTGGTCTCGAAACCCATCGGGATCATCGGCAACAATCTCTTAGTCGACTC
ALS574/653checking-F	ATTGACGGAGATGGAAGCTT
ALS574/653checking-R	CCAAACTGAGCCAGTCACAA

C．试验结果

1. T1 植株基因型检测

T1 种子经过 MS 潮霉素抗性培养基筛选，pQY743 载体共得到 32 株阳性苗，pQY745 载体共得到 18 株阳性苗。每个载体选择 10 株幼苗提取叶片基因组 DNA 检测靶点，发现 ALS574 位点 T1 代均未发生编辑，而 ALS653 位点均有符合设计预期的编辑事件发生。检测结果如表 1 所示：

表 1 T1 植株突变类型

ALS 位点	载体编号	T1 植株编号	编辑类型
574	pQY743	1-10	WT
653	pQY745	3,4-8,10	嵌合体
		1,2,9	杂合体

2. T2 代种子筛选结果

单株收获 T2 代种子后，铺于甲咪唑烟酸抗性培养基筛选，可以看到野生型 Col-0 在抗性培养基上不能生长，突变株系阳性植株在抗性培养基上能够正常生长，如图 3 所示。

每个载体选择 10 株幼苗取叶片提取基因组 DNA 进行分子检测，发现 pQY743 载体有 6 株发生了符合预期的纯合突变，由 TGG 变为 TTG，如图 4 所示。另有 1 株为杂合突变，3 株为嵌合突变。检测结果如表 2 所示。

表 2 T2 植株突变类型

ALS 位点	载体编号	T2 植株编号	编辑类型
574	pQY743	2,3,5,6,7,9	纯合体
		4	杂合体
		1,8,10	嵌合体

以上结果表明，使用本发明顺次连续打靶的技术方案，可以实现对目标位点设计预期突变并实现，能够通过设计有先后顺序的 sgRNA 的组合仅需 Cas9 蛋白即可实现碱基替换突变。

实施例 2 针对拟南芥 ALS 基因 W574 及 S653 位点循环打靶实现多种突变类型

载体设计，构建，拟南芥转化筛选操作步骤参照实施例 1，对 AtALS W574 位点，设计载体与实施例 1 相同，载体示意图见图 5，通过在特定位置先-G 再+T，预期实现 W574L 突变。载体转化拟南芥在 T1 代未检测到编辑事件，对转基因拟南芥 T2 代使用 0.24 mg/L 甲咪唑烟酸筛选，得到大量抗除草剂植株，如图 6 左侧所示，对这些抗性植株进行分子检测，PCR 产物测序结果显示，W574 位点不仅出现了预期的 W574L 突变，也出现了另外一种抗性突变 W574M，见图 6 右侧。

对 AtALS S653 位点，设计载体与实施例 1 相同，载体示意图见图 7，通过在特定位置先-G 再+A，预期实现 S653N 突变。载体转化拟南芥在 T1 代检测到 S653N 的预期编辑事件，对转基因拟南芥 T2 代继续使用 0.24 mg/L 甲咪唑烟酸筛选，得到大量抗除草剂植株，如图 8

左侧所示，对这些抗性植株进行分子检测，PCR 产物测序结果显示，S653 位点不仅出现了预期的 S653N 突变，也出现了另外两种抗性突变 S653R、S653R/G654D，见图 8 右侧。

以上结果表明，使用本发明顺次连续打靶的技术方案，通过设计有先后顺序的 sgRNA 的组合仅需配套 Cas9 蛋白，除实现对目标位点设计的预期突变外，还能够产生多种功能突变类型，适合作为一种创制新功能突变的工具。

实施例 3 针对拟南芥 ALS 基因 W574 位点附近利用不同的 PAM 进行循环打靶产生 W574M 抗性突变

载体设计，构建，拟南芥转化筛选操作步骤参照实施例 1，与实施例 1 不同之处在于，对 AtALS W574 位点附近序列 5'CTTGGCATGGTTATGCAATGgg3'首先以更靠近 W574 位点的 GG 为 PAM，设计 sgRNA1：5'CTTGGCATGGTTATGCAATG3'带下划线为 W574 位点，斜体为 NG PAM，预测切割修复将 +A 后形成新序列 5'CTTGGCATGGTTATGCAAATGGGA*ag*3'，以 AG 为新的 PAM 位点设计 sgRNA2：5'CTTGGCATGGTTATGCAAATGGGA3'，经过细胞自发修复形成-G 的基因型，导致 W574M，即本方案中两次切割使用了不同的 PAM 位点，载体示意图见图 9。使用该载体转化拟南芥，对 T1 代转基因株系进行基因型检测，从中检测到 W574M 的预期编辑事件，植株表现对甲咪唑烟酸处理的抗性。

结果表明，使用本发明的技术方案，利用不同的 PAM 进行循环打靶编辑，能够在更宽的序列范围内进行编辑，实现氨基酸替换。

实施例 4 针对水稻 ALS 基因 D350 和 W548 位点设计可预期的碱基替换

将 Nishimasu et al. 2018 Engineered CRISPR-Cas9 nuclease with expanded targeting space. Science 361(6408):1259-1262. doi: 10.1126/science.aas9129 报道中的突变引入到 pHUE411（A CRISPR/Cas9 toolkit for multiplex genome editing in plants. Xing HL, Dong L, Wang ZP, Zhang HY, Han CY, Liu B, Wang XC, Chen QJ. BMC Plant Biol. 2014 Nov 29;14(1):327. 10.1186/s12870-014-0327-y 具体信息见 https://www.addgene.org/71287/）中，构建成识别 NG PAM 的载体 pHUE411-NG。

水稻 ALS 基因序列如 SEQ ID NO: 12 所示，以 5'GGCGTGCGGTTTGATGATCG3'（带下划线为对应拟南芥 ALS-D376 的 OsALS-D350 位点）和预测在先编辑后生成的新序列 5'GGCGTGCGGTTTGATGACG3'为靶点，按照 Xing HL, Dong L, Wang ZP, Zhang HY, Han CY, Liu B, Wang XC, Chen QJ. BMC Plant Biol. 2014 所述方法，构建双靶点载体，预期实现 GAT-GAA 的转换，产生 OsALS D350E 突变。

以 5'GGTATGGTTGTGCAATGGGA3'（带下划线为对应拟南芥 ALS-W574 的 OsALS-W548 位点）和预测在先编辑后生成的新序列 5' GGTATGGTTGTGCAATGGA 3'为靶点，构建双靶点载体，预期实现 TGG-TTG 的转换，产生 OsALS W548L 突变。

然后将这两个载体转入水稻，获得转基因植株，鉴定获得了预期替换的 D350E 和 W548L

的植株。田间抗除草剂生测实验结果表明，D350E 和 W548L 突变体获得了对 ALS 抑制剂类除草剂的抗性。

实施例 5 针对水稻 ACCase2 基因 W2038 位点设计可预期的碱基替换及筛选多种突变类型

水稻 ACCase2 基因序列如 SEQ ID NO: 14 所示，OsACCase2 W2038 位点对应大穗看麦娘 ACCase W2027 位点，以靠近该位点的 AGG 为 PAM 设计 sgRNA1: 5'TTCATCCTCGCTAAC-TGGAG3'，预测切割修复将-G 后形成新序列，继续以 AGG 为 PAM 设计 sgRNA2：5'CTTC-ATCCTCGCTAACTGAG3'，再次切割修复后形成+T 的基因型，导致 W2038L 突变，将 sgRNA1 和 sgRNA2 构建到 pHUE411 载体上形成编辑载体，载体示意图见图 10。

编辑载体转化水稻品种淮稻 5 号愈伤组织，经 50 μg/L 潮霉素和 50 μg/L 精喹禾灵共筛选 3 周后，出现了大量抗性愈伤，如图 11 左侧所示，取抗性愈伤进行基因型鉴定，发现不仅出现了预期的 W2038L 突变，也出现了 W2038C 突变，如图 11 右侧所示。

以上对水稻基因循环打靶的结果说明本发明的技术方案在单双子叶植物中均适用。

实施例 6 SpCas9 和 NGA-Cas9 蛋白的表达纯化

1. 试验仪器试剂

表 3 试验仪器

试剂	配制及使用方法
Q5 DNA 聚合酶	购买自 NEB
I5 DNA 聚合酶及 I5 反应液	购买自 Tsingke 生物
dNTP	上海生工
Ni-NTA 树脂	上海生工
Tris/NaCl/咪唑	上海生工
DTT	上海生工
β-巯基乙醇	Sigma
SDS-PAGE 预制胶	南京金斯瑞
Superdex200 柱	GE Healthcare

表 4 试验仪器

仪器	型号
PCR 仪	Bio-rad T100
恒温摇床	欧诺 HNY-200B
细胞破碎仪	宁波新芝 JY92-IIN
电泳仪	威克斯 WIX-EP600
蛋白纯化仪	GE AKTA pure

高速大容量冷冻离心机	湘智 ZX21K
高速离心机	Eppendorf 5424R
白光胶片观察仪	北京六一 WD-9406
核酸凝胶成像仪	北京赛智 ChampGel™ 5000
微量分光光度计	DS-II

2. 试验方法

2.1 pET15b-Cas9 表达载体构建

SpCas9 和 NGA-Cas9 蛋白经植物密码子优化后的 DNA 序列分别见 SEQ ID NO：15 和 SEQ ID NO：16，序列交金斯瑞合成作为模板 DNA。

将 NG-Cas9 和 NGA-Cas9 序列分别扩增后，融合（infusion）法将两个片段连接到 pET15b 表达载体上，转化 DH5a，验证后测序。

表 5 PCR 验证扩增体系及引物

反应体系 50 ul	
2× I5 反应液	25 ul
模板 DNA	1 ul
正反向引物	各 2 ul
超纯水	补足至 50 ul
引物序列：	5’-3’
pET15b-NG Cas9 -F	gtgccgcgcggcagccatatggattacaaggaccacgacg
pET15b-NG Cas9-R	tttgttagcagccggatcctcacttcttcttcttcgcctgc
pET15b-NGA Cas9 -F	tgccgcgcggcagccatatgatggattacaaggaccacgacg
pET15b-NG Cas9 -R	tttgttagcagccggatcctcacttcttcttcttggcctgtccc

2.2 蛋白表达纯化

将构建好的表达载体转入大肠杆菌 Rosetta (DE3)中，经 IPTG 诱导表达，收菌裂解后利用 Ni-NTA 柱进行纯化，具体方法如下：

a)将重组表达载体转化到 Rosetta (DE3)菌株中，挑取单克隆到 10 ml LB 培养基中，CmR+Amp（pET15b）或者 CmR+Kana（pET28a）抗性 37℃，200 rpm 培养过夜，转入含有 1 L LB 培养基的 2 L 摇瓶中，37℃，200 rpm，培养到 OD600 达到 0.6-0.8 时，降温到 18℃，0.5 mM IPTG 诱导表达过夜，4000g 离心收菌。

b)将收集好的菌体利用 Ni-buffer A：50 mM HEPES pH7.4, 500 mM NaCl, 20 mM 咪唑, 5 mM β-巯基乙醇重悬，加入终浓度为 1 mM PMSF 和 250 ul Cocktail inhibitor，混匀。

c)重悬后的菌体经超声破碎仪破碎后，40000g，4℃离心 30 分钟，取上清过 Ni-NTA 柱。

d)Ni-NTA 柱纯化，将裂解液上清与 resin 结合 20 分钟后，用含有 50 mM 咪唑的 buffer A 洗杂，最后用含 400 mM 咪唑的洗脱缓冲液洗脱。

e)SDS-PAGE 凝胶电泳检测蛋白纯化效果。

f)透析换 buffer 至 50 mM HEPES pH7.5, 150 mM KCl, 1 mM DTT, 3% 甘油。

h)最终样品经 SDS-PAGE 凝胶电泳检测蛋白纯化效果，超滤浓缩后，冻存于-80℃备用。

2.3 Cas9 融合蛋白表达纯化结果

SpCas9 和 NGA-Cas9 蛋白纯化结果如图 12 所示，箭头所指为 Cas9 蛋白条带，达到较高的纯度。

实施例 7 SpCas9 和 NGA Cas9 蛋白分别对 OsACCase2 W2038 和 OsALS W548 靶向位点的体外酶切活性检测

1. 将 OsALS 和 OsACCase2 基因 DNA 序列输入 CRISPOR 在线工具中（http://crispor.tefor.net/）针对 OsALS 对应拟南芥 ALS 蛋白第 574 位氨基酸位点的 W548（OsALS 第 548 位氨基酸，水稻 ALS 蛋白氨基酸序列如 SEQ ID NO: 11 所示）和 OsACCase2 对应大穗看麦娘第 2027 位氨基酸位点的 W2038（OsACCase2 第 2038 位氨基酸，水稻 ACCase2 蛋白氨基酸序列如 SEQ ID NO: 13 所示）分别设计 sgRNA 如下，委托金斯瑞公司合成：

>sgRNA1-548-G:

5’GGGUAUGGUUGUGCAAUGGGAguuuuagagcuagaaauagcaaguuaaaauaaggcuaguccguuaucaacuugaaaaaguggcaccgagucggugc3’

> sgRNA1-2038-G:

5’GUUCAUCCUCGCUAACUGGAGguuuuagagcuagaaauagcaaguuaaaauaaggcuaguccguuaucaacuugaaaaaguggcaccgagucggugc3’

2. 利用特异检测引物 OsALS265AA-F：5’ggtcttgcgtctggttggc3’和 OsALS-end-R：5’ccatgccaagcacatcaaacaag 3’扩增含有 OsALS W548 靶位点的片段，PCR 产物长度为 1200 bp。

利用特异检测引物 OsACC1750AA-F：5’gcgaagaagactatgctcgtattgg3’和 OsACC2196AA-R：5’cttaatcacacctttcgcagcc3’，扩增含有 OsACCase W2038 靶位点的片段，PCR 产物长度为 1500 bp。

PCR 体系如下表：

成分	体积
2 × I5 反应液	25 μL
正向引物 （10 μM ）	2 μL
反向引物 （10 μM ）	2 μL
基因组 DNA 模板	2 μL
超纯水	补到 50 μL

3. 建立 PCR 反应，反应条件为：

步骤	温度	时间
预变性	98 °C	30 s
30-35 扩增循环	98 °C	15 s
	58 °C	15 s
	72 °C	30 s

最后延伸	72 °C	3 min

4. 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物并送测序进一步验证，验证无误后切胶回收 DNA 片段，加入 30ul RNase-free 超纯水进行溶解，并测试浓度。

5. 使用以下检测体系检测 Cas9 蛋白活性，体系添加完成后，37℃条件下孵育 1h。

成分	体积
Cas9 蛋白	0.5μL (1ug)
sgRNA	0.5μL (1ug)
10×Cas9 反应缓冲液	2 μL
回收 DNA 片段	XμL (100ng)
RNase-free 超纯水	补到 20 μL

6. 反应完毕后，65℃处理 10 分钟，加入 4 ul 6×DNA 上样缓冲液，使用浓度为 2%的琼脂糖凝胶检测条带大小。

结果如图 13 所示，可见纯化的 Cas9 蛋白仅在加入 sgRNA 的条件下能够在设计的靶向位点处切割 DNA 双链。

实施例 8 利用两种不同靶向的 RNP 复合体转化水稻原生质体实现 OsALS548 位点的 W548L 突变

1. 水稻原生质体制备以及 PEG 介导的转化在已经发表的方法（Bart et al., 2006）基础上进行了部分修改，具体的制备步骤如下：

（1）首先准备原生质体用的水稻幼苗，品种为日本晴（Nipponbare）。水稻种子首先去壳，去壳种子用 75%乙醇漂洗 1 分钟，用 5%（v/v）的次氯酸钠处理 20 分钟，然后用无菌水洗涤 5 次以上，放在超净台中吹干后放在盛有 1/2 MS 的培养基的组培瓶中，每瓶放 20 粒种子。26°C，12 小时光照培养 10 天左右取出制备原生质体。

（2）选取幼苗叶鞘部分，用锋利的吉利剃须刀片切成约 1 毫米的碎片，放在 0.6 M 甘露醇和 MES 培养液（配方：0.6 M 甘露醇，0.4 M MES，pH 5.7）中备用。将全部材料切好后转入 20 mL 酶解液（配方：1.5%纤维素酶 R10/RS (YaKult Honsha)，0.5% Mecerozyme R10 (YaKult Honsha)，0.5M 甘露醇，20mM KCl，20mM MES, pH5.7，10mM $CaCl_2$，0.1% BSA，5 mM β-巯基乙醇）中，用锡箔纸包好置于 28℃摇床中，50 rpm 避光酶解约 4 小时，最后 2 分钟将转速提高至 100 rpm；

（3）酶解结束后，加入等体积的 W5 溶液（配方：154mM NaCl，125mM $CaCl_2$，5mM KCl，15mM MES），水平摇动 10 秒，释放原生质体。酶解后的细胞经 300 目的筛子过滤后，150 g 离心 5 分钟收集原生质体；

（4）用 W5 溶液漂洗细胞两次，150 g 离心 5 分钟收集原生质体；

（5）用适量的 MMG 溶液（配方：3.05g/L $MgCl_2$，1g/L MES，91.2g/L 甘露醇）重悬原生质体，原生质体浓度约为 2×10^6 个细胞/mL。

2. RNP 复合体制备：

根据 OsALS548 靶位点序列 GGGTATGGTTGTGCAATGGGA*gga*，带下划线为对应拟南芥 ALS W574 的 OsALS W548 位点，斜体小写为 Cas9 蛋白识别的 PAM 位点，选择纯化的 NGA-Cas9 蛋白制备 RNP 复合体。以 GGA 为 PAM 设计 >CrRNA1-548-G: 5'-GGGUAUGGUUGUGCAAUGGGAguuuuagagcuaugcu-3'，预测经过编辑后在 PAM 前 3-4 位之间会删除一个碱基 G，然后以删除后的序列设计第二个 >CrRNA2-548+T: 5'-UGGGUAUGGUUGUGCAAUGGAguuuuagagcuaugcu-3'，预测经过第二次编辑会插入一个碱基 T，从而实现 TGG-TTG 的转换。

将 >CrRNA1-548-G，>CrRNA1-548+T 交金斯瑞生物科技公司合成，同时还合成了 sgRNA：

>sgRNA1-548-G:

5'GGGUAUGGUUGUGCAAUGGGAguuuuagagcuagaaauagcaaguuaaaauaaggcuaguccguuaucaacuugaaaaaguggcaccgagucggugc3'

>sgRNA2-548+T:

5'UGGGUAUGGUUGUGCAAUGGAguuuuagagcuagaaauagcaaguuaaaauaaggcuaguccguuaucaacuugaaaaaguggcaccgagucggugc3'。

将合成的 crRNA 与 GenCRISPR tracrRNA（金斯瑞 SC1933）等摩尔混合，加入 crRNA&tracrRNA 退火 buffer（金斯瑞 SC1957-B）按操作说明退火制备 gRNA。tracrRNA 序列为 5'-agcauagcaaguuaaaauaaggcuaguccguuaucaacuugaaaaaguggcaccgagucggugcuuu-3'。

按下表制备 RNP 反应体系，添加完成后，25℃孵育 10 分钟。

成分	体积
NGA Cas9 蛋白	10μL (20 μg)
gRNA 或 sgRNA	10μL (20 μg)
10x×Cas9 反应缓冲液	10 μL
RNase-free 超纯水	70 μL

3. 原生质体转化

（1）取上述 200 μl MMG 重悬的原生质体加入孵育完成后的 RNP 复合体（Cas9 蛋白 20μg，sgRNA 20μg ），轻弹混匀。

（2）加入等体积的 40%（w/v）的 PEG 溶液（配方：40%（w/v）PEG，0.5M 甘露醇，100mM $CaCl_2$），轻弹混匀，28°C 避光静置 15 分钟；

（3）诱导转化结束后缓慢加 1.5 mL 的 W5 溶液，轻弹混匀细胞，150 g 离心 3 分钟收集细胞，重复此步骤一次；

（4）加入 1.5 mL W5 溶液重悬细胞，置于 28°C 培养箱中避光培养 12-16 小时，若用于提取原生质体基因组 DNA，需培养 48-60 小时。

4. 基因组靶点编辑事件检测

（1）提取原生质体 DNA，使用 CTAB 法并进行部分修改，具体方法如下：原生质体离

心后弃上清，加入 500 μL DNA 提取液，振荡混匀，置于 65°C 水浴锅中孵育 1 小时；水浴后的样品冷却后加入等体积的氯仿，颠倒混匀后 10,000 rpm 离心 10 分钟；取 400 μl 上清转移到一个新的 1.5 mL 离心管中，加入 1 mL 70%（v/v）的乙醇放入-20°C 沉淀 20 分钟；用 12,000 rpm 离心 15 分钟沉淀 DNA，待沉淀晾干后加入 50 μl 超纯水溶解，保存于-20°C 备用。

（2）使用基因特异引物，扩增含有 W548 靶位点的片段，针对靶点设计了检测引物：OsALS500AA-F：5'GGCTAACCCAGGTGTCACAG3'， OsALS-3'UTR-R：5'CCATGCCAAG-CACATCAAACAAG3'

PCR 反应体系如下表：

成分	体积
2 × I5 反应液	25 μL
正向引物 （10 μM ）	2 μL
反向引物 （10 μM ）	2 μL
基因组 DNA 模板	2 μL
超纯水	补到 50 μL

（3）建立 PCR 反应，一般反应条件是：

步骤	温度	时间
预变性	98 °C	30 s
30-35 扩增循环	98 °C	15 s
	58 °C	15 s
	72 °C	30 s
最后延伸	72 °C	3 min

（4）琼脂糖凝胶电泳检测，回收 PCR 片段测序。

5. 检测结果：

使用合成的 crRNA 和 tracrRNA 退火制备的 gRNA 或直接使用合成的 sgRNA 与纯化的 NGA-Cas9 蛋白均能形成有活性的 RNP 复合体，对 OsALS548 靶向位点测序能够检测到 TGG 到 TTG 的突变，证明 RNP 复合体配合前后顺序的 crRNA 或 sgRNA 能够在细胞内实现对目标位点的定向突变。如图 14 所示，原生质体 OsALS548 靶点测序峰图中箭头所指处除原始的 G 碱基信号峰外，还有突变得到的 T 碱基信号峰，导致了 OsALS548 位点处 W548L 突变。

实施例 9：利用两种不同靶向的 RNP 复合体轰击水稻愈伤实现 OsACCase2 W2038 位点的 W2038L 突变

1. RNP 复合体制备：

根据 OsACCase2 W2038 靶位点序列 GTTCATCCTCGCTAACTGGAG*agg*，带下划线为对应大穗看麦娘 ACCase W2027 的 OsACCase2 W2038 位点，斜体小写为 Cas9 蛋白识别的 PAM 位点，选择纯化的 SpCas9 蛋白制备 RNP 复合体。以 GGA 为 PAM 设计>CrRNA1-2038-G: 5'-GUUCAUCCUCGCUAACUGGAGguuuuagagcuaugcu-3'，预测经过编辑后在 PAM 前 3-4 位

之间会删除一个碱基 G，然后以删除后的序列设计第二个>CrRNA2-2038+T: 5'-UGUUCAUCCUCGCUAACUGAGguuuuagagcuaugcu-3'，预测经过第二次编辑会插入一个碱基 T，从而实现 TGG-TTG 的转换。

将>CrRNA1-2038-G，>CrRNA2-2038+T 交金斯瑞生物科技公司合成，同时还合成了 sgRNA：

>sgRNA1-2038-G:

5'GUUCAUCCUCGCUAACUGGAGguuuuagagcuagaaauagcaaguuaaaauaaggcuaguccguuaucaacuugaaaaaguggcaccgagucggugc 3'

>sgRNA2-2038+T:

5'UGUUCAUCCUCGCUAACUGAGguuuuagagcuagaaauagcaaguuaaaauaaggcuaguccguuaucaacuugaaaaaguggcaccgagucggugc 3'。

将合成的 crRNA 与 GenCRISPR tracrRNA（金斯瑞 SC1933）等摩尔混合，加入 crRNA&tracrRNA 退火 buffer（金斯瑞 SC1957-B）按操作说明退火制备 gRNA。

按实施例 8 同样的反应体系孵育制备 RNP 复合体，以基因枪转化 10 次轰击用量为例：Cas9 蛋白 20μg，gRNA 或 sgRNA 20 μg，10μl 10×Cas9 反应缓冲液 ，使用 RNase-free 超纯水补足，共 100 μl，25℃孵化 10 分钟，轻混匀。

2. 水稻愈伤诱导

挑选成熟饱满的水稻种子，脱壳，按以下步骤消毒处理：

（1）剥取水稻种子，水稻品种为淮稻 5 号，来自种子市场采购。

（2）无菌水清洗种子，直至洗后的水变清澈，不限次数。

（3）70%酒精消毒 1 分钟，之后 10%次氯酸钠置于水平摇床摇晃培养 25 分钟。

（4）次氯酸钠消毒后无菌水清洗 5 次。接种于愈伤诱导培养基（配方：MS 粉末（4.42g/L）+2,4-D（2mg/L）+ 蔗糖（30g/L）+ 植物凝胶（4g/L）），28℃黑暗培养诱导愈伤。

3. 基因枪 RNP 轰击：

（1）高渗培养

将胚性良好的愈伤组织转移至高渗培养基（配方：MS 粉末（4.42g/L）+2,4-D（2mg/L）+ 蔗糖（30g/L）+ D-甘露醇（0.4M）+ 植物凝胶（4g/L）），超净台无菌操作，25℃，暗培养 4-6 小时。

（2）制备金粉悬浮液：用 1.5 mL 的进口 EP 管，称取 30 mg 金粉（直径 0.6μm）；加入 1mL 70%的乙醇，充分涡旋，冰上静置 10 分钟。离心 1 分钟，弃上清；加入 1mL 无菌水，充分涡旋，离心 1 分钟，弃上清，重复操作 3 次。加入 500 μL 灭菌甘油（50%），充分涡旋，制成浓度为 60 μg/μl 的金粉悬浮液，-20℃保存。

（3）取 50μl 金粉悬浮液（60μg/ml），加入制备好的 RNP 复合体 100μL，温和混匀。

（4）取 15μl RNP 金粉混合液于 PDS-1000 台式基因枪（Bio-Rad）可裂膜中心，吹干后，按照仪器操作说明进行轰击。

轰击参数：真空度为 26-28，距离为 6 厘米，气压为 1100psi 或 1350psi。

（5）轰击完成后愈伤在高渗培养基上 25℃黑暗过夜培养 16 小时。

4. 筛选、分化和生根：

（1）轰击后的愈伤过夜培养后，转入诱导培养基，28℃恢复培养一周。

（2）恢复 1 周后，愈伤转入筛选培养基（配方：4.1g/L N6 粉末+ 0.3 g/L 水解酪蛋白+ 2.8 g/L 脯氨酸+ 2 mg/L 2,4-D + 3 %蔗糖+ 50 ug/L 精喹禾灵+ 500 mg/L Cef（头孢霉素）+0.1 g/L 肌醇+ 0.35 %植物凝胶，pH 5.8）筛选 3-4 周，对 OsACCase2 W2038 的预期编辑，使用精喹禾灵 50 ug/L 进行筛选，如图 15 所示。

（3）筛选出的生长状态良好的抗性愈伤转入分化培养基（配方：MS 粉末（4.42g/L）+KT（1mg/L）+蔗糖（30g/L）+ 植物凝胶（4.5g/L）+50 ug/L 精喹禾灵，pH 5.8），28℃光照培养诱导分化 2-4 周。

（4）将分化出的幼苗移至生根培养基（配方：1/2MS 粉末（2.3g/L）+ 蔗糖（30g/L）+ 植物凝胶（4.5g/L））进行生根培养，生根完成的幼苗进行炼苗处理后，移至装有土壤的花盆中置温室进行培养。

5. 抗性愈伤和 T0 组培苗的靶点编辑事件检测：

在筛选阶段共得到 11 个抗性愈伤，使用 CTAB 法提取 DNA，针对靶点设计检测引物为 OsACC2038test-F ： 5’CTGTAGGCATTTGAAACTGCAGTG3’ ， OsACC2038test-R ： 5’GCAATCCTGGAGTTCCT-CTGACC3’，扩增包含 OsACCase2 W2038 位点的 PCR 片段，回收测序。测序检测其中 10 个在 OsACCase2 W2038 位点存在 TGG 到 TTG 的突变，其中 3 个样品为纯合突变。

对抗性愈伤分化得到的 T0 代组培苗提取 DNA 检测编辑靶点序列，同样在 OsACCase2 W2038 位点存在 TGG 到 TTG 的纯合突变，如图 16 所示。

6. T1 代苗对 ACCase 抑制剂类除草剂的抗性测试

检测发生 W2038L 突变的 T0 株系扩繁后，对 T1 代突变幼苗使用田间浓度精喹禾灵和高效氟吡甲禾灵测试除草剂抗性，可见 OsACCase2 W2038L 突变株系对这 2 种 ACCase 抑制剂类除草剂均产生明显抗性，如图 17-18 所示。

综上，使用合成的 crRNA 和 tracrRNA 退火制备的 gRNA 或直接使用合成的 sgRNA 与纯化的 SpCas9 蛋白均能形成有活性的 RNP 复合体，能够在组培阶段使用精喹禾灵对基因枪轰击的愈伤进行筛选，对 T0 代组培苗的 OsACCase2 W2038 靶向位点测序能够检测到 TGG 到 TTG 的纯合突变，该突变能够遗传到 T1 代并表现出 ACCase 抑制剂类除草剂的抗性，进一步证明 RNP 复合体配合前后顺序的 crRNA 或 sgRNA 连续打靶能够在细胞内实现对目标位点的定向突变，并能引导产生细胞内源的筛选标记用于组培筛选，创制抗除草剂的作物。

实施例 10：利用不同靶向的 RNP 复合体编辑水稻愈伤 OsACCase2 W2038 位点同时编辑 OsBADH2 基因

RNP 复合体制备方法参照实施例 8，基因枪轰击和组培步骤同实施例 9，除针对 OsACCase2 W2038 位点的 crRNA 或 sgRNA 外，同时加入针对 OsBADH2 基因的 crRNA 或

sgRNA，与 SpCas9 蛋白孵育形成针对第二靶标基因 OsBADH2 的靶向 RNP 复合体，进行基因枪轰击，恢复培养，筛选，分化，生根，得到 T0 代组培苗，扩繁 T1 代。

水稻 OsBADH2 基因组序列如 SEQ ID NO: 17 所示，根据 CRISPOR 在线工具（http://crispor.tefor.net/）选择靶位点序列 CCAAGTACCTCCGCGCAATCG*cgg*，斜体小写为 Cas9 蛋白识别的 PAM 位点，选择纯化的 SpCas9 蛋白制备 RNP 复合体。以 CGG 为 PAM 设计>CrRNA1-OsBADH2: 5'-CCAAGUACCUCCGCGCAAUCGguuuuagagcuaugcu-3'，预测通过精喹禾灵筛选得到的抗性愈伤中能够同时检测到 OsACCase2 W2038L 的抗性突变和 OsBADH2 的敲除突变事件。

将>CrRNA1-OsBADH2 交金斯瑞生物科技公司合成，同时还合成了 sgRNA：

>OsBADH2-sgRNA:5'CCAAGUACCUCCGCGCAAUCGguuuuagagcuagaaauagcaaguuaaaauaaggcuaguccguuaucaacuugaaaaaguggcaccgagucggugc3'。

按实施例 9 中的转化步骤筛选抗性愈伤，如图 19 所示，挑选抗性愈伤分化出苗，对愈伤和 T0 代组培苗 OsACCase2 和 OsBADH2 靶点处序列进行测序，OsBADH2 靶点检测引物为：

OsBADH2-check F：5'CATCGGTACCCTCCTCTTC3'

OsBADH2-check R：5'ATCGATCGATTTGGGGCTCA3'

结果共筛选得到 13 个抗性愈伤，其中 11 个检测到 OsACCase2 W2038L 突变事件，在这 11 个愈伤样品中检测 OsBADH2 靶点序列，其中 8 个同时含有 OsBADH2 靶点处的编辑事件。在分化得到的 T0 代组培苗中，能够检测到存在 OsACCase2 W2038L 的突变和 OsBADH2 +A 的纯合突变，如图 20-21 所示。

综上所述，使用顺序打靶的 crRNA 或 sgRNA 靶向 RNP 复合体对 OsACCase2 W2038 进行定向编辑，同时加入靶向第二靶标基因 OsBADH2 的靶向 RNP 复合体，对水稻愈伤进行基因枪轰击后，能够在组培阶段使用精喹禾灵对愈伤进行筛选，抗性愈伤中 61%同时发生了 OsACCase2 W2038 突变和 OsBADH2 的靶向敲除，在 T0 代组培苗中可见检测到 OsBADH2 发生纯合突变的株系，说明顺序打靶结合 RNP 转化针对抗性基因的定点编辑可以产生内源的筛选标记，加入对应的筛选压力可以同时筛选第二靶标基因的编辑事件，实现非转基因手段的基因组定点编辑。

实施例 11：利用不同靶向的 RNP 复合体编辑水稻愈伤 OsALS548 位点同时编辑 OsSWEET14 基因

针对 OsALS548 位点的靶向 RNP 复合体制备方法参照实施例 8，crRNA 和 sgRNA 序列同实施例 8，分别为：

>CrRNA1-548-G: 5'-GGGUAUGGUUGUGCAAUGGGAguuuuagagcuaugcu-3'，

>CrRNA2-548+T: 5'-UGGGUAUGGUUGUGCAAUGGAguuuuagagcuaugcu-3'，

>sgRNA1-548-G:

5'GGGUAUGGUUGUGCAAUGGGAguuuuagagcuagaaauagcaaguuaaaauaaggcuaguccguuau

caacuugaaaaaguggcaccgagucggugc3’，

>sgRNA2-548+T:

5’UGGGUAUGGUUGUGCAAUGGAguuuuagagcuagaaauagcaaguuaaaauaaggcuaguccguuau caacuugaaaaaguggcaccgagucggugc3’。

参照实施例 8，将 gRNA 或 sgRNA 与 NGA-Cas9 孵育制备靶向 OsALS548 位点的 RNP 复合体。

除针对 OsALS548 位点的靶向 RNP 复合体外，同时加入针对 OsSWEET14 基因的 crRNA 或 sgRNA，与 SpCas9 蛋白孵育形成针对第二靶标基因 OsSWEET14 的靶向 RNP 复合体，进行基因枪轰击，恢复培养，筛选，分化，生根，得到 T0 代组培苗，扩繁 T1 代。筛选压力选用 5mg/L 啶磺草胺。

水稻 OsSWEET14 基因组序列如 SEQ ID NO: 18 所示，根据 CRISPOR 在线工具（http://crispor.tefor.net/）选择靶位点序列 GAGCTTAGCACCTGGTTGGAG*ggg*，斜体小写为 SpCas9 蛋白识别的 PAM 位点，选择纯化的 SpCas9 蛋白制备 RNP 复合体。以 GGG 为 PAM 设计：

>CrRNA1-OsSWEET14:

5’-GAGCUUAGCACCUGGUUGGAGguuuuagagcuaugcu-3’，预测通过啶磺草胺筛选得到的抗性愈伤中能够同时检测到 OsALS W548L 的抗性突变和 OsSWEET14 的敲除突变事件。

将>CrRNA1-Os SWEET14 交金斯瑞生物科技公司合成，同时还合成了 sgRNA：

>Os SWEET14-sgRNA:

5’GAGCUUAGCACCUGGUUGGAGguuuuagagcuagaaauagcaaguuaaaauaaggcuaguccguuau caacuugaaaaaguggcaccgagucggugc3’。

按实施例 9 所述基因枪轰击和组培步骤筛选抗性愈伤，如图 22 所示，挑选抗性愈伤分化出苗，其中筛选培养基配方为：4.1g/L N6 粉末+ 0.3 g/L 水解酪蛋白+ 2.8 g/L 脯氨酸+ 2 mg/L 2,4-D + 3 %蔗糖+ 5 mg/L 啶黄草胺+ 500 mg/L Cef（头孢霉素）+0.1 g/L 肌醇+ 0.35 %植物凝胶，pH 5.8。

对愈伤和 T0 代组培苗 OsALS548 位点和 OsSWEET14 靶点处序列进行测序，OsSWEET14 靶点检测引物为：

OsSWEET14-check F：5’ ATGGGTGCTGATGATTATCTTGTAT3’

OsSWEET14-check R：5’ TGAAGAGACATGCCAGCCATTG3’

结果共筛选得到 9 个抗性愈伤，其中 8 个检测到 OsALS W548L 突变事件，在这 8 个愈伤样品中检测 OsSWEET14 靶点序列，其中 5 个同时含有 OsSWEET14 靶点处的编辑事件。在分化得到的 T0 代组培苗中，能够检测到同时存在 OsALS W548L 的突变和 OsSWEET14 -C 的纯合突变，如图 23-24 所示。

检测发生 OsALS W548L 突变的 T0 株系扩繁后，对 T1 代突变幼苗株系使用田间浓度的啶磺草胺、甲基咪草烟、烟嘧磺隆和氟唑磺隆测试除草剂抗性，可见 OsALS W548L 突变株系对这 4 种 ALS 抑制剂类除草剂均产生明显抗性，如图 25-28 所示。

综上所述，使用合成的 crRNA 和 tracrRNA 退火制备的 gRNA 或直接使用合成的 sgRNA 与纯化的 NGA Cas9 蛋白均能形成有活性的 RNP 复合体，配合顺序打靶的 crRNA 或 sgRNA 能够在细胞内实现对目标位点的定向突变，能够在组培阶段使用啶磺草胺对基因枪轰击的愈伤进行筛选，对 T0 代组培苗的 OsALS548 靶向位点测序能够检测到 TGG 到 TTG 的突变，该突变能够遗传到 T1 代并表现出对 ALS 抑制剂类除草剂的抗性。

同时加入靶向第二靶标基因 OsSWEET14 的靶向 RNP 复合体，使用识别 NGG PAM 的 SpCas9 蛋白，对水稻愈伤进行基因枪轰击后，在组培阶段使用啶磺草胺对愈伤进行筛选，抗性愈伤中 55%同时发生了 OsALS W548L 突变和 OsSWEET14 的靶向敲除，在 T0 代组培苗中可检测到 OsSWEET14 发生纯合突变的株系，进一步说明顺序打靶结合 RNP 转化针对抗性基因的定点编辑可以产生内源的筛选标记，并且可以同时使用识别不同 PAM 位点的 Cas9 蛋白，加入对应的筛选压力同时筛选第二靶标基因的编辑事件，实现非转基因手段的基因组定点编辑。

实施例 12：利用两种不同靶向的 RNP 复合体轰击马铃薯外植体实现 StALS561 位点的 W561L 突变

马铃薯 StALS2 蛋白氨基酸序列如 SEQ ID NO: 19 所示，马铃薯 StALS2 基因序列如 SEQ ID NO: 20 所示。RNP 复合体制备和基因枪轰击方法参照实施例 8-9，针对马铃薯 StALS2 对应拟南芥 ALS574 位点的 StALS2W561 位点设计针对原始序列和编辑后序列的 sgRNA 如下：

>StALS561- G:

5’GGGAAUGGUGGUUCAGUGGGAguuuuagagcuagaaauagcaaguuaaaauaaggcuaguccguuaucaacuugaaaaaguggcaccgagucggugc3’

>StALS561 +T:

5’UGGGAAUGGUGGUUCAGUGGAguuuuagagcuagaaauagcaaguuaaaauaaggcuaguccguuaucaacuugaaaaaguggcaccgagucggugc3’，

按实施例 8 所述方法制备 RNP 复合体。

受体马铃薯品种为大西洋或费瑞乌它，分别使用了叶片、茎段和腋芽作为外植体，基因枪轰击和筛选分化方法如下：

（1）叶片：将整叶剪下，平铺在高渗 M6 培养基（配方：4.42g/L MS 粉末+1 ml/L B5 vitamins（Phytotechlab，G219）+ 30g/L 蔗糖+8g/L 琼脂+2mg/L 2,4-D +0.8mg/L 玉米素核苷 +0.2M 甘露醇+250mg/L Cef）中，每一枪大约 5-6 片叶。预培养 24 小时后，进行金粉轰击。轰击后继续高渗 M6 培养基暗培养 2 天，转移至 M6 培养基（4.42g/L MS 粉末+1 ml/L B5 vitamins（Phytotechlab，G219）+ 30g/L 蔗糖+8g/L 琼脂+2mg/L 2,4-D +0.8mg/L 玉米素核苷 +250mg/L Cef）中，继续培养 1 周，1 周后转移至带有筛选压力的 M6 培养基，筛选压力为 20μg/L 氯磺隆（配方：4.42g/L MS 粉末+1 ml/L B5 vitamins（Phytotechlab，G219）+ 30g/L 蔗糖+8g/L 琼脂+2mg/L 2,4-D +0.8mg/L 玉米素核苷 +250mg/L Cef+20μg/L 氯磺隆）中进行筛选抗性愈伤，4 周后转移至含有筛选压力的诱导芽培养基 R4（配方：4.42g/L MS 粉末+1 ml/L B5

vitamins（Phytotechlab，G219）+ 30g/L 蔗糖+8g/L 琼脂+2mg/L GA3 +0.8mg/L 玉米素核苷+250mg/L Cef+20μg/L 氯磺隆），直至出苗。

（2）茎段：取马铃薯茎段（不含腋芽），将茎段纵切，切口朝上，放置于 CIMI 培养基（4.42g/L MS 粉末+20g/L 蔗糖+8g/L 琼脂+0.5mg/L 玉米素核苷+2mg/L 2,4-D +250mg/L Cef+20μg/L 氯磺隆）上，随后进行基因枪轰击，轰击后暗培养 1 天，将茎段转移至新鲜的 CIMI 培养基上，继续培养 1 周，随后将茎段转移至含有筛选压力的 SIMI 培养基（配方：4.42g/L MS 粉末+20g/L 蔗糖+8g/L 琼脂+1mg/L 玉米素核苷+0.1mg/L GA3+250mg/L Cef+20μg/L 氯磺隆）上进行抗性芽的筛选，直至出苗。

（3）腋芽：取马铃薯茎段上的腋芽，进行纵切后转移至 CIMI 培养基上，切口朝上，放置于 CIMI 培养基上，随后进行基因枪轰击，轰击后暗培养 1 天，将茎段转移至新鲜的 CIMI 培养基上，继续培养 1 周，随后将茎段转移至含有筛选压力的 SIMI 培养基上进行抗性芽的筛选，直至出苗。

对 StALS2 W561 位点的检测引物为：

StALS561-Check F：5’GTGGATTAGGAGCAATGGGATTT3’

StALS561-Check R：5’ TTATTTTAGATAATACAATGCCTCG3’

经检测，经抗性筛选的 T0 代马铃薯组培苗 StALS2 W561 位点发生了 W561L 的编辑事件，说明本发明提供的非转基因瞬时基因编辑方法适用于类似马铃薯这类难以通过自交或杂交分离去除外源转基因元件的作物。

实施例 13：循环打靶方案成功地在人类 293T 细胞中进行了碱基替换

选择人胚肾细胞 293T 中 HBB（hemoglobin subunit beta）基因（其 DNA 序列如 SEQ ID NO: 21 所示，其 CDS 序列如 SEQ ID NO: 22 所示，其氨基酸序列如 SEQ ID NO: 23 所示），第一个外显子的区域设计 sgRNA 的连续打靶的靶位点，其中第一靶点 catggtgcaCctgactcctgAGG，识别此靶点的 sgRNA 命名为 sgHBB，预测此位点 sgRNA 切口处有可能产生减少一个 C 碱基。第二靶点为 ccatggtgcatctgactctgAGG，识别第一靶点打靶后产生的减少一个 C 碱基的序列，此靶点的 sgRNA 命名为 sgHBB-c。并设计在 293T 细胞中无靶位点的 sgRNA 命名为 sgNOTAR，作为实验中转染补齐质粒。

根据以上设计，分别合成互补单链 DNA 片段。经过退火后连接入 BbsI 酶酶切的 px458（addgene：48138）质粒中。并转化大肠杆菌 DH5a 感受态。获得的大肠杆菌单克隆经过测序验证正确后，用无内毒素质粒提取试剂盒（天根生物）提取纯化质粒。

用 0.05%胰蛋白酶（Gibico）消化分离生长旺盛的 293T 细胞。用 DMEM 培养基（10%胎牛血清；青霉素+链霉素双抗）稀释后接种至 24 孔培养板。置于二氧化碳培养箱中培养过夜。次日，按照连续打靶：sgHBB 和 sgHBB-c 质粒各 0.5ug；单靶点打靶：sgHBB 和 sgNOTAR 质粒各 0.5ug；无靶点对照：pEGFP-c1 质粒 1ug 分别混合。用 lipofectamine3000（Invitrogen）进行转化。每组设 3 个重复。

转化后 48 小时，用荧光显微镜拍照记录转化效率。并用核酸提取试剂盒（Omega）分

别提取各孔细胞总 DNA。

设计 Hi-tom 测序引物如下：

Hi-HBB-F：ggagtgagtacggtgtgcGCTTACATTTGCTTCTGACACAACT；

Hi-HBB-R：gagttggatgctggatggTCTATTGGTCTCCTTAAACCTGTCTTG。

并用此引物对各个 DNA 样本进行 PCR。PCR 产物用 Hi-tom 方法高通量测序（Sci China Life Sci. 2019 Jan;62(1):1-7. doi: 10.1007/s11427-018-9402-9）。

测序结果的统计数据显示在表 6 和表 7 中，这些数据表明：HBB 位点连续打靶方法产生了约 1.67%的 C 到 T 的编辑结果（导致 P6S 突变），而单靶点打靶无法产生此类碱基替换突变。

表 6 在 293T 细胞中 HBB 基因连续打靶实验不同 sgRNA 组合产生的编辑类型，以 Hi-Tom 方式测序检测到的不同基因型的读数

基因型	HBB 循环打靶重复 1	HBB 循环打靶重复 2	HBB 循环打靶重复 3	HBB 单靶点重复 1	HBB 单靶点重复 2	HBB 单靶点重复 3	GFP 转化对照重复 1	GFP 转化对照重复 2
WT	6025	6037	6003	5776	5636	5614	7564	7430
1Deletion	555	593	613	1170	1134	1120	252	288
2Deletion	594	625	410	465	509	405		
3Deletion	304	263	258		260	243		
4Deletion		222						
5Deletion			220		217			
6Deletion								
7Deletion	312	223	232	274	229	278		
Insertion				273		308		
C->T SNP	168		230					
total	7958	7963	7966	7958	7985	7968	7816	7718

表 7 合并统计在 293T 细胞中 HBB 基因连续打靶实验不同 sgRNA 组合产生的编辑类型各自所占的比例

基因型	HBB 循环打靶	HBB 单靶点打靶	GFP 转化背景	HBB 循环打靶比例	HBB 单靶点打靶比例	GFP 转化背景比例
WT	18065	17026	14994	75.63%	71.21%	96.52%
1Deletion	1761	3424	540	7.37%	14.32%	3.48%
2Deletion	1629	1379	0	6.82%	5.77%	0.00%
3Deletion	825	503	0	3.45%	2.10%	0.00%
4Deletion	222	0	0	0.93%	0.00%	0.00%
5Deletion	220	217	0	0.92%	0.91%	0.00%

6Deletion	0	0	0	0.00%	0.00%	0.00%
7Deletion	767	781	0	3.21%	3.27%	0.00%
Insertion	0	581	0	0.00%	2.43%	0.00%
C->T SNP	398	0	0	1.67%	0.00%	0.00%
total	23887	23911	15534	100.00%	100.00%	100.00%

注：WT 代表野生型；Deletion 代表删除的基因型；Insertion 代表插入的基因型；C->T SNP 代表在切口处产生 C 到 T 的碱基替换的基因型；total 代表总计。

此外，镰刀细胞贫血症（sickle cell anemia）和 β-地中海贫血（β-thalassemia）都是由于编码成人血红蛋白 β 亚基的 HBB 基因上出现突变而导致的遗传性贫血症。这些疾病的患者可能终生需要接受输血或者其它疗法的治疗。上述实验的结果表明，通过本发明提供的循环打靶的技术方案，可以对 HBB 基因的突变位点设计 crRNA 或 sgRNA 组合诱导在突变位点产生预期的修复，使细胞产生有活性的血红蛋白，恢复功能，起到治疗作用，即本发明提供的组合物具有治疗疾病的用途。

同时经过多种测试，由于这种新方法完全是建立在 Cas9 已有功能的基础之上，因此在其他 Cas9 能够很好起作用的生物体中（植物、动物、真菌或细菌等），本发明的方法将完全适用，实现碱基替换、删除和插入特定的片段的新功能。

说明书中提及的所有出版物和专利申请均通过引用并入本文，如同每篇出版物或专利申请被单独、特别地通过引用并入本文一样。

尽管为清楚理解起见，前述发明已通过举例说明和实施例的方式较为详细地进行了描述，但显而易见的是，可以在所附权利要求书的范围内实施某些改变和修改，这样的改变和修改均在本发明的范围之内。

1.一种在生物体内产生新突变的方法，其包括以下步骤：在生物体基因组的特定位置上按先后顺序依次产生两个以上的 DNA 断裂并分别自发修复，其中在后的 DNA 断裂以在先的 DNA 断裂修复后产生的新序列为基础产生。

2.根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述的“DNA 断裂”是通过将具有靶向特性的核酸酶递送到生物体细胞内与基因组 DNA 特定位置接触实现的。

3.根据权利要求 2 所述的方法，其特征在于，所述的“具有靶向特性的核酸酶”为 ZFN、TALEN 或 CRISPR/Cas 系统。

4.根据权利要求 1-3 任意一项所述的方法，其特征在于，所述的“特定位置上按先后顺序依次产生两个以上的 DNA 断裂”是指针对由 ZFN 或 TALEN 编辑产生的在先的 DNA 断裂修复事件形成的新序列设计新的 ZFN 或 TALEN 蛋白，对该位点再次进行切割。

5.根据权利要求 1-3 任意一项所述的方法，其特征在于，所述的“特定位置上按先后顺序依次产生两个以上的 DNA 断裂”是指针对由 CRISPR/Cas 系统编辑产生的在先的 DNA 断裂修复事件形成的新序列设计新的靶向 RNA，对该位点再次进行切割。

6.根据权利要求 1-4 任意一项所述的方法，其特征在于，所述“两个以上的 DNA 断裂”是将不同的靶向核酸酶按先后顺序递送到不同代的受体细胞中产生的，以完成在先编辑的突变细胞作为受体接受在后编辑的靶向核酸酶的递送，进行二次编辑产生定点突变。

7.根据权利要求 1-3、5 任意一项所述的方法，其特征在于，所述“两个以上的 DNA 断裂”是将不同靶向的靶向核酸酶递送到同一个受体细胞中产生的。

8.根据权利要求 1-3、5、7 任意一项所述的方法，其特征在于，所述“两个以上的 DNA 断裂”是由同一种 CRISPR/Cas 核酸酶与不同的 gRNA 或 sgRNA 分别组成 RNP 复合体按先后顺序切割对应的靶点序列产生。

9.根据权利要求 1-3、5、7 任意一项所述的方法，其特征在于，所述“两个以上的 DNA 断裂”是由两种以上识别不同 PAM 序列的 CRISPR/Cas 核酸酶与对应的 gRNA 或 sgRNA 分别组成 RNP 复合体按先后顺序切割对应的靶点序列产生。

10.根据权利要求 7 所述的方法，其特征在于，所述靶向核酸酶为所有能实现基因组编辑的 CRISPR/Cas 核酸酶。

11.根据权利要求 6 或 7 所述的方法，其特征在于，所述靶向核酸酶以 DNA 形式存在。

12.根据权利要求 7-9 任意一项所述的方法，其特征在于，所述靶向核酸酶以 mRNA 或蛋白形式存在，而非 DNA 形式。

13.根据权利要求 6 或 7 所述的方法，其特征在于，将靶向核酸酶递送到细胞内的方法选自 1）PEG 介导的细胞转染的方法；2）脂质体介导的细胞转染的方法；3）电击转化的方法；4）显微注射；5）基因枪轰击；或 6）农杆菌介导的转化方法。

14.一种采用权利要求 1-13 任意一项所述方法获得的新突变。

15.一种具有权利要求 14 所述新突变的蛋白或其生物活性片段。

16.一种核酸，其包含编码权利要求 15 所述蛋白或其生物活性片段的核酸序列或者其互补序列。

17.一种核酸，其包含：

(a)编码靶向 RNA 的核苷酸序列，其中，

所述 RNA 至少包含两个，前一个 RNA 靶向 DNA 导致其断裂，后一个靶向 RNA 针对前一次断裂修复事件形成的序列再次进行切断。

18.根据权利要求 17 所述的核酸，其特征在于，还包括(b)编码 Cas 多肽的核苷酸序列。

19.根据权利要求 17 或 18 所述的核酸，其特征在于，所述靶向 RNA 为 sgRNA 或 gRNA。

20.根据权利要求 17-19 任意一项所述的核酸，其特征在于，所述 Cas 多肽和所述靶向 RNA 为在体外细胞或离体细胞内。

21.一种重组表达载体，其包含权利要求 16-20 任意一项所述的核酸，以及与之可操作地连接的启动子。

22.一种表达盒，其中包含权利要求 16-20 任意一项所述的核酸。

23.一种宿主细胞，其中包含有权利要求 22 所述的表达盒。

24.采用权利要求 23 所述宿主细胞再生成的生物。

25.一种裂解靶 DNA 的方法，其包括使所述靶 DNA 与复合物接触，所述复合物包含：

(a)Cas 多肽；以及

(b)至少两个靶向 RNA，前一个 RNA 靶向 DNA 导致其断裂，后一个靶向 RNA 针对前一次断裂修复事件形成的序列再次进行切断。

26.根据权利要求 25 所述的方法，其特征在于，所述靶向 RNA 为 sgRNA 或 gRNA。

27.根据权利要求 25 或 26 所述的方法，其特征在于，所述靶 DNA 存在于细菌细胞、真核细胞、植物细胞或动物细胞中。

28.根据权利要求 25-27 任意一项所述的方法，其特征在于，所述靶 DNA 为染色体 DNA。

29.根据权利要求 25-28 任意一项所述的方法，其特征在于，所述 Cas 多肽和所述靶向 RNA 为在体外细胞或离体细胞内。

30.根据权利要求 25-29 任意一项所述的方法，其特征在于，所述接触包括将以下引入细胞：(a)所述 Cas 多肽或编码所述 Cas 多肽的多核苷酸，和(b)所述靶向 RNA 或编码所述靶向 RNA 的 DNA 多核苷酸。

31.一种组合物，其包含：

(a)Cas 多肽，或编码所述 Cas 多肽的多核苷酸；以及

(b)至少两个靶向 RNA，或编码所述靶向 RNA 的 DNA 多核苷酸，其中，前一个 RNA 靶向 DNA 导致其断裂，后一个靶向 RNA 针对前一次断裂修复事件形成的序列再次进行切断。

32.根据权利要求 31 所述的组合物，其特征在于，所述靶向 RNA 为 sgRNA 或 gRNA。

33.根据权利要求 31 或 32 所述的组合物，其特征在于，所述 Cas 多肽和所述靶向 RNA 为在体外细胞或离体细胞内。

34.如权利要求 31-33 任意一项所述的组合物在用于制备治疗疾病的药剂中的用途。

35.一种试剂盒，其包含：

(a)Cas 多肽，或包含编码所述 Cas 多肽的核苷酸序列的核酸；以及

(b)至少两个靶向 RNA，或包含编码所述靶向 RNA 的核苷酸序列的核酸，其中，前一个 RNA 靶向 DNA 导致其断裂，后一个靶向 RNA 针对前一次断裂修复事件形成的序列再次进行切断；

其中(a)和(b)是在相同或单独的容器中。

36.根据权利要求 35 所述的试剂盒，其特征在于，所述靶向 RNA 为 sgRNA 或 gRNA。

37.根据权利要求 35 或 36 所述的试剂盒，其特征在于，(b)中的靶向 RNA 是在相同或单独的容器中。

38.一种不依赖外源转基因标记筛选编辑事件的方法，包括以下步骤：

1) 在受体细胞第一目标基因的特定位置上按先后顺序依次产生两个以上的 DNA 断裂并分别自发修复，其中在后的 DNA 断裂以在先的 DNA 断裂修复后产生的新序列为基础产生；

2) 第一目标基因特定位置经顺次切割并修复后产生的某些编辑事件，能够赋予突变体细胞对某种筛选压力的抗性，产生表型可选择的性状，施加相对应的筛选压力对该性状进行选择，分离出含有该类编辑事件的细胞、组织、器官或完整的生物；

3) 可选的，在第一目标基因之外，同时使用针对至少一个第二目标基因的靶向核酸酶对其它靶点进行编辑，通过筛选第一目标基因突变产生的可选择性状同步对第二目标基因的编辑事件进行富集筛选，分离出同时含有第一目标基因与至少一个第二目标基因编辑事件的细胞、组织、器官或完整的生物。

39.根据权利要求 38 所述的方法，其特征在于，所述“第一目标基因”是编码至少一种表型可选择性状的基因位点，其中所述至少一种表型可选择性状是抗性/耐受性性状或生长优势性状。

40.根据权利要求 38 或 39 所述的方法，其特征在于，所述“第一目标基因的特定位置”是指所述位置处经顺次切割并修复后产生的某些突变类型能够赋予所述受体细胞对某种筛选压力的抗性，产生至少一种表型可选择的抗性/耐受性性状或生长优势性状。

41.根据权利要求 40 所述的方法，其特征在于，所述“某些突变类型”包括单碱基替换、多个碱基的替换或不特定数目的碱基插入或缺失。

42.根据权利要求 38-41 任意一项所述的方法，其特征在于，所述“某种筛选压力”是环境压力或添加的化合物压力；所述环境压力优选高温、低温或低氧；所述添加的化合物压力优选盐离子浓度、抗生素、细胞毒素或除草剂。

43.根据权利要求 38-42 任意一项所述的方法，其特征在于，所述的“DNA 断裂”是通过将具有靶向特性的核酸酶递送到生物体细胞内与基因组 DNA 特定位置接触实现的。

44.根据权利要求 43 所述的方法，其特征在于，所述的“具有靶向特性的核酸酶”为所有能实现基因组编辑的 CRISPR/Cas 核酸酶。

45.根据权利要求 38-44 任意一项所述的方法，其特征在于，所述的“特定位置上按先后顺序依次产生两个以上的 DNA 断裂”是指针对由 CRISPR/Cas 系统编辑产生的在先的 DNA 断裂修复事件形成的新序列设计新的靶向 RNA，对该位点再次进行切割。

46.根据权利要求 38-45 任意一项所述的方法，其特征在于，所述“两个以上的 DNA 断裂”

是由同一种 CRISPR/Cas 核酸酶与不同的 gRNA 或 sgRNA 分别组成 RNP 复合体按先后顺序切割对应的靶点序列产生。

47.根据权利要求 38-45 任意一项所述的方法，其特征在于，所述“两个以上的 DNA 断裂”是由两种以上识别不同 PAM 序列的 CRISPR/Cas 核酸酶与对应的 gRNA 或 sgRNA 分别组成 RNP 复合体按先后顺序切割对应的靶点序列产生。

48.根据权利要求 38-47 任意一项所述的方法，其特征在于，所述“第二目标基因”是指编码与第一目标基因不同的其它基因。

49.根据权利要求 38-48 任意一项所述的方法，其特征在于，所述“针对至少一个第二目标基因的靶向核酸酶”与在第一目标基因特定位置上产生 DNA 断裂使用的 CRISPR/Cas 核酸酶相同或不同。

50.根据权利要求 38-45、48-49 任意一项所述的方法，其特征在于，所述靶向核酸酶以 DNA 形式存在。

51.根据权利要求 38-49 任意一项所述的方法，其特征在于，所述靶向核酸酶以 mRNA 或蛋白形式存在，而非 DNA 形式。

52.根据权利要求 43-51 任意一项所述的方法，其特征在于，将靶向核酸酶递送到细胞内的方法选自 1）PEG 介导的细胞转染的方法；2）脂质体介导的细胞转染的方法；3）电击转化的方法；4）显微注射；5）基因枪轰击；或 6）农杆菌介导的转化方法。

53.一种对生物体基因组进行非转基因瞬时编辑的方法，包括以下步骤：

1）针对受体细胞第一目标基因的特定位置设计并合成至少两条 crRNA 片段组合或至少两条 sgRNA 片段组合，所述 crRNA 组合与 tracrRNA 结合或单独使用 sgRNA 组合能够引导对应的 Cas 蛋白在受体细胞第一目标基因的特定位置上依次产生两个以上的 DNA 断裂并分别自发修复，其中在后的 DNA 断裂以在先的 DNA 断裂修复后产生的新序列为基础产生；

2）将适量 CRISPR/Cas 蛋白或其相应的 mRNA 与上述预先设计合成的能够引导第一目标基因定点编辑产生内源筛选标记的 crRNA 片段组合和 tracrRNA 片段或单独 sgRNA 片段组合混合，可选的，进一步加入至少一个靶向第二、第三或更多目标基因的人工合成的 crRNA 和 tracrRNA 片段或人工合成的 sgRNA 片段，在体外孵育形成 RNP 复合体；

3）将上述 RNP 复合体递送到受体细胞中，与基因组 DNA 特定位置接触实现基因编辑；

4）根据 RNP 复合体对第一目标基因的定点编辑产生的表型可选择的性状，施加相对应的筛选压力对该性状进行选择，分离出含有该类编辑事件的细胞、组织、器官或完整的生物，以及可选的，分离出同时含有第一目标基因与至少一个第二、第三或更多目标基因的编辑事件的细胞、组织、器官或完整的生物。

54.根据权利要求 53 所述的方法，其特征在于，所述“第一目标基因”是编码至少一种表型可选择性状的基因位点，其中所述至少一种表型可选择性状是抗性/耐受性性状或生长优势性状。

55.根据权利要求 53 或 54 所述的方法，其特征在于，所述“第一目标基因的特定位置”是指所述位置处经顺次切割并修复后产生的某些突变类型能够赋予所述受体细胞对某种筛选

压力的抗性，产生至少一种表型可选择的抗性/耐受性性状或生长优势性状。

56.根据权利要求 55 所述的方法，其特征在于，所述“某些突变类型”包括单碱基替换、多个碱基的替换或不特定数目的碱基插入或缺失。

57.根据权利要求 55 或 56 所述的方法，其特征在于，所述“某种筛选压力”是环境压力或添加的化合物压力；所述环境压力优选高温、低温或低氧；所述添加的化合物压力优选盐离子浓度、抗生素、细胞毒素或除草剂。

58.根据权利要求 53-57 任意一项所述的方法，其特征在于，所述的 CRISPR/Cas 蛋白为所有能实现基因组编辑的 CRISPR/Cas 核酸酶。

59.根据权利要求 53-58 任意一项所述的方法，其特征在于，所述的“特定位置上按先后顺序依次产生两个以上的 DNA 断裂”是指针对由 CRISPR/Cas 系统编辑产生的在先的 DNA 断裂修复事件形成的新序列设计新的靶向 RNA，对该位点再次进行切割。

60.根据权利要求 53-59 任意一项所述的方法，其特征在于，所述“两个以上的 DNA 断裂”由同一种 CRISPR/Cas 蛋白与不同的 gRNA 或 sgRNA 分别组成 RNP 复合体按先后顺序切割对应的靶点序列产生。

61.根据权利要求 53-59 任意一项所述的方法，其特征在于，所述“两个以上的 DNA 断裂”由两种以上识别不同 PAM 序列的 CRISPR/Cas 蛋白与对应的 gRNA 或 sgRNA 分别组成 RNP 复合体按先后顺序切割对应的靶点序列产生。

62.根据权利要求 53-61 任意一项所述的方法，其特征在于，所述“第二、第三或更多目标基因”是指编码与第一目标基因不同的其它基因。

63.根据权利要求 53-62 任意一项所述的方法，其特征在于，所述“至少一个靶向第二、第三或更多目标基因的人工合成的 crRNA 和 tracrRNA 片段或人工合成的 sgRNA 片段”与靶向第一目标基因的 crRNA 或 sgRNA 共用同一种 Cas 蛋白。

64.根据权利要求 53-62 任意一项所述的方法，其特征在于，所述“至少一个靶向第二、第三或更多目标基因的人工合成的 crRNA 和 tracrRNA 片段或人工合成的 sgRNA 片段”与靶向第一目标基因的 crRNA 或 sgRNA 使用识别不同 PAM 序列的 Cas 蛋白。

65.根据权利要求 53-64 任意一项所述的方法，其特征在于，将所述 RNP 复合体递送到细胞内的方法选自 1）PEG 介导的细胞转染的方法；2）脂质体介导的细胞转染的方法；3）电击转化的方法；4）显微注射；或 5）基因枪轰击。

66.一种对植物基因组进行非转基因瞬时编辑的方法，包括以下步骤：

1）针对受体植物细胞或组织第一目标基因的特定位置设计并合成至少两条 crRNA 片段组合或至少两条 sgRNA 片段组合，所述 crRNA 组合与 tracrRNA 结合或单独使用 sgRNA 组合能够引导对应的 Cas 蛋白在受体细胞第一目标基因的特定位置上依次产生两个以上的 DNA 断裂并分别自发修复，其中在后的 DNA 断裂以在先的 DNA 断裂修复后产生的新序列为基础产生；

2）将适量 CRISPR/Cas 蛋白或其相应的 mRNA 与上述预先设计合成的能够引导第一目标基因定点编辑产生内源筛选标记的 crRNA 片段组合和 tracrRNA 片段或单独 sgRNA 片段组

合混合，可选的，进一步加入至少一个靶向第二、第三或更多目标基因的人工合成的 crRNA 和 tracrRNA 片段或人工合成的 sgRNA 片段，在体外孵育形成 RNP 复合体；

3）将上述 RNP 复合体递送到受体植物细胞或组织中，与基因组 DNA 特定位置接触实现基因编辑；

4）根据 RNP 复合体对第一目标基因的定点编辑产生的表型可选择的性状，施加相对应的筛选压力对该性状进行选择，分离出含有该类编辑事件的细胞、组织、器官或完整的植物，以及可选的，分离出同时含有第一目标基因与至少一个第二、第三或更多目标基因的编辑事件的细胞、组织、器官或完整的植物。

67.根据权利要求 66 所述的方法，其特征在于，所述“第一目标基因”是编码至少一种表型可选择性状的基因位点，其中所述至少一种表型可选择性状是抗性/耐受性性状或生长优势性状。

68.根据权利要求 66 或 67 所述的方法，其特征在于，所述“第一目标基因的特定位置”是指所述位置处经顺次切割并修复后产生的某些突变类型能够赋予所述受体细胞对某种筛选压力的抗性，产生至少一种表型可选择的抗性/耐受性性状或生长优势性状。

69.根据权利要求 68 所述的方法，其特征在于，所述“某些突变类型”包括单碱基替换、多个碱基的替换或不特定数目的碱基插入或缺失。

70.根据权利要求 68 或 69 所述的方法，其特征在于，所述“某种筛选压力”是环境压力或添加的化合物压力；所述环境压力优选高温、低温或低氧；所述添加的化合物压力优选盐离子浓度、抗生素、细胞毒素或除草剂。

71.根据权利要求 66-70 任意一项所述的方法，其特征在于，所述“受体植物细胞或组织”为任何能作为瞬时表达受体并能经过组织培养再生为完整植株的细胞或组织；所述细胞优选为原生质体细胞或悬浮细胞；所述组织优选为愈伤组织、幼胚、成熟胚、叶片、茎尖、幼穗或下胚轴。

72.根据权利要求 66-71 任意一项所述的方法，其特征在于，所述的 CRISPR/Cas 蛋白为所有能实现基因组编辑的 CRISPR/Cas 核酸酶。

73.根据权利要求 66-72 任意一项所述的方法，其特征在于，所述的“特定位置上按先后顺序依次产生两个以上的 DNA 断裂”是指针对由 CRISPR/Cas 系统编辑产生的在先的 DNA 断裂修复事件形成的新序列设计新的靶向 RNA，对该位点再次进行切割。

74.根据权利要求 66-73 任意一项所述的方法，其特征在于，所述“两个以上的 DNA 断裂”由同一种 CRISPR/Cas 蛋白与不同的 gRNA 或 sgRNA 分别组成 RNP 复合体按先后顺序切割对应的靶点序列产生。

75.根据权利要求 66-73 任意一项所述的方法，其特征在于，所述“两个以上的 DNA 断裂”由两种以上识别不同 PAM 序列的 CRISPR/Cas 蛋白与对应的 gRNA 或 sgRNA 分别组成 RNP 复合体按先后顺序切割对应的靶点序列产生。

76.根据权利要求 66-75 任意一项所述的方法，其特征在于，所述“第二、第三或更多目标基因”是指编码与第一目标基因不同的其它基因。

77.根据权利要求 66-76 任意一项所述的方法，其特征在于，所述“至少一个靶向第二、第三或更多目标基因的人工合成的 crRNA 和 tracrRNA 片段或人工合成的 sgRNA 片段”与靶向第一目标基因的 crRNA 或 sgRNA 共用同一种 Cas 蛋白。

78.根据权利要求 66-76 任意一项所述的方法，其特征在于，所述“至少一个靶向第二、第三或更多目标基因的人工合成的 crRNA 和 tracrRNA 片段或人工合成的 sgRNA 片段”与靶向第一目标基因的 crRNA 或 sgRNA 使用识别不同 PAM 序列的 Cas 蛋白。

79.根据权利要求 66-78 任意一项所述的方法，其特征在于，将所述 RNP 复合体递送到植物细胞内的方法选自 1）PEG 介导的原生质体转化的方法；2）显微注射；3）基因枪轰击；4）碳化硅纤维介导法；或 5)真空渗入法或其他任何瞬时导入方法。

80.根据权利要求 66-79 任意一项所述的方法，其特征在于，所述“第一目标基因”是编码选自除草剂抗性/耐受性的至少一种表型可选择性状的至少一个内源基因，其中除草剂抗性/耐受性选自包括对 EPSPS 抑制剂的抗性/耐受性、对谷氨酰胺合成抑制剂的抗性/耐受性、对 ALS 或 AHAS 抑制剂的抗性/耐受性、对 ACCase 抑制剂的抗性/耐受性、对类胡萝卜素生物合成抑制剂的抗性/耐受性、对纤维素抑制剂的抗性/耐受性、对脂质合成抑制剂的抗性/耐受性、对长链脂肪酸抑制剂的抗性/耐受性、对微管组装抑制剂的抗性/耐受性、对光系统 I 电子分流剂的抗性/耐受性、对光系统 II 抑制剂的抗性/耐受性或对 PPO 抑制剂的抗性/耐受性和对合成生长素的抗性/耐受性；优选地，所述“第一目标基因”选自 PsbA、ALS、EPSPS、ACCase、PPO、HPPD、PDS、GS、DOXPS、TIR1 或 AFB5。

81.根据权利要求 80 所述的方法，其特征在于，所述“第一目标基因”为 ALS，所述“基因的特定位置”是指拟南芥 AtALS 蛋白氨基酸序列位点 A122、P197、R198、D204、A205、D376、R377、W574、S653 或 G654，以及以 AtALS 氨基酸序列为参照标准的其它植物的 ALS 蛋白相对应的上述氨基酸位点；或

所述 crRNA 或 sgRNA 靶向包含选自编码 AtALS 蛋白氨基酸序列位点 A122、P197、R198、D204、A205、D376、R377、W574、S653、G654 或其任意组合的序列的靶序列，以及以 AtALS 氨基酸序列为参照标准的其它植物的 ALS 蛋白相对应的上述氨基酸位点及其任意组合的序列的靶序列。

82.根据权利要求 80 所述的方法，其特征在于，所述“第一目标基因”为 ACCase，所述“基因的特定位置”是指大穗看麦娘 AmACCase 蛋白氨基酸序列位点 I1781、E1874、N1878、W1999、W2027、I2041、D2078、C2088 或 G2096，以及以 AmACCase 氨基酸序列为参照标准的其它单子叶植物的 ACCase 蛋白相对应的上述氨基酸位点；或

所述 crRNA 或 sgRNA 靶向包含选自编码 AmACCase 基因氨基酸序列位点 I1781、E1874、N1878、W1999、W2027、I2041、D2078、C2088、G2096 或其任意组合的序列的靶序列，以及以 AmACCase 氨基酸序列为参照标准的其它单子叶植物的 ACCase 蛋白相对应的上述氨基酸位点及其任意组合的序列的靶序列。

83.根据权利要求 80 所述的方法，其特征在于，所述“第一目标基因”为 HPPD，所述“基因的特定位置”是指水稻 OsHPPD 蛋白氨基酸序列位点 H141、L276、P277、N338、G342、

R346、D370、P386、K418 或 G419，以及以 OsHPPD 氨基酸序列为参照标准的其它植物的 HPPD 蛋白相对应的上述氨基酸位点；或

所述 crRNA 或 sgRNA 靶向包含选自编码 OsHPPD 基因氨基酸序列位点 H141、L276、P277、N338、G342、R346、D370、P386、K418、G419 或其任意组合的序列的靶序列，以及以 OsHPPD 氨基酸序列为参照标准的其它植物的 HPPD 蛋白相对应的上述氨基酸位点及其任意组合的序列的靶序列。

84.根据权利要求 80 所述的方法，其特征在于，所述“第一目标基因”为 PPO，所述“基因的特定位置”是指水稻 OsPPO1 蛋白氨基酸序列位点 S128、V217、S223、V364、K373、L423、Y425 或 W470，以及以 OsPPO1 氨基酸序列为参照标准的其它植物的 PPO 蛋白相对应的上述氨基酸位点；或

所述 crRNA 或 sgRNA 靶向包含选自编码 OsPPO1 基因氨基酸序列位点 S128、V217、S223、V364、K373、L423、Y425、W470 或其任意组合的序列的靶序列，以及以 OsPPO1 氨基酸序列为参照标准的其它植物的 PPO 蛋白相对应的上述氨基酸位点及其任意组合的序列的靶序列。

85.根据权利要求 80 所述的方法，其特征在于，所述“第一目标基因”为 TIR1，所述“基因的特定位置”是指水稻 OsTIR1 蛋白氨基酸序列位点 F93、F357、C413 或 S448，以及以 OsTIR1 氨基酸序列为参照标准的其它植物的 TIR1 蛋白相对应的上述氨基酸位点；或

所述 crRNA 或 sgRNA 靶向包含选自编码 OsTIR1 基因氨基酸序列位点 F93、F357、C413、S448 或其任意组合的序列的靶序列，以及以 OsTIR1 氨基酸序列为参照标准的其它植物的 TIR1 蛋白相对应的上述氨基酸位点及其任意组合的序列的靶序列。

86.采用权利要求 53-85 任意一项所述方法的非转基因瞬时编辑系统。

87. 如权利要求 86 所述非转基因瞬时编辑系统在作为筛选标记或疾病治疗或生物育种中的用途。

88.一种采用权利要求 66-85 任意一项所述方法获得的遗传修饰植物，其基因组中包含：

1）第一目标基因的编辑事件；

2）第一目标基因的编辑事件和至少一个第二目标基因的编辑事件；或

3）至少一个第二靶点基因的编辑事件，其中第一目标基因的编辑事件已经过遗传分离去除；

其中，所述遗传修饰植物是非转基因方式获得的。

89.一种采用权利要求 66-85 任意一项所述方法获得的植物基因新突变。

90.一种在植物内产生的新突变，其包括以下类型中的一个或两个以上的组合：

对应于拟南芥 ALS376 位置处的天冬氨酸被任何其他氨基酸取代、ALS574 位置处的色氨酸被任何其他氨基酸取代、ALS653 位置处的丝氨酸被任何其他氨基酸取代、或 ALS654 位置处的丝氨酸被任何其他氨基酸取代；或者，对应于大穗看麦娘 ACCase2027 位置处的色氨酸被任何其他氨基酸取代。

91.根据权利要求 90 所述的突变，其特征在于，对应于拟南芥 ALS376 位置处的天冬氨

酸被谷氨酸取代、ALS574 位置处的色氨酸被亮氨酸或甲硫氨酸取代、ALS653 位置处的丝氨酸被天冬酰胺或精氨酸取代、或 ALS654 位置处的甘氨酸被天冬氨酸取代；或者，对应于大穗看麦娘 ACCase2027 位置处的色氨酸被亮氨酸或半胱氨酸取代。

92.根据权利要求 90 所述的突变，其特征在于，水稻 ALS350 位置处的天冬氨酸被任何其他氨基酸取代、水稻 ALS548 位置处的色氨酸被任何其他氨基酸取代、或马铃薯 ALS2 561 位置处的色氨酸被任何其他氨基酸取代；或者，水稻 ACCase2 2038 位置处的色氨酸被任何其他氨基酸取代。

93.根据权利要求 90-92 任意一项所述的突变，其特征在于，水稻 ALS350 位置处的天冬氨酸被谷氨酸取代、水稻 ALS548 位置处的色氨酸被亮氨酸或甲硫氨酸取代、或马铃薯 ALS2 561 位置处的色氨酸被亮氨酸或甲硫氨酸取代；或者，水稻 ACCase2 2038 位置处的色氨酸被亮氨酸或半胱氨酸取代。

94.一种具有权利要求 89-93 任意一项所述新突变的蛋白或其生物活性片段。

95.一种核酸，其包含编码权利要求 94 所述蛋白或其生物活性片段的核酸序列或者其互补序列。

96.一种重组表达载体，其包含权利要求 95 所述的核酸，以及与之可操作地连接的启动子。

97.一种表达盒，其中包含权利要求 95 所述的核酸。

98.一种植物细胞，其中包含有权利要求 97 所述的表达盒。

99.采用权利要求 98 所述植物细胞再生成的植物。

100.一种生产对于除草剂的抗性或耐受性提高的植物的方法，其中包括用权利要求 96 所述的重组表达载体或权利要求 97 所述的表达盒转化或转染植物细胞，并将经转化或转染的植物细胞再生成植物。

101.一种控制植物栽培场所的杂草的方法，其中所述植物包括权利要求 88 或 99 所述的植物或者通过权利要求 100 所述方法制备的植物，所述方法包括对所述栽培场所施用控制杂草有效量的一种或多种除草剂。

102. 权利要求 89-93 任意一项所述新突变、权利要求 94 所述的蛋白或其生物活性片段、权利要求 95 所述的核酸、权利要求 96 所述的重组表达载体或权利要求 97 所述的表达盒在提高植物细胞、植物组织、植物部分或植物的除草剂抗性或耐受性上的应用。