

1、一种在生物体内创制新基因的方法，其特征在于，包括以下步骤：

在生物体基因组中至少两个不同的特定位置上同时产生 DNA 断裂，其中所述特定位置是能够分割不同基因元件或不同蛋白结构域的基因组位点，所述 DNA 断裂通过非同源末端连接（NHEJ）或同源修复的方式互相连接，产生所述不同基因元件或不同蛋白结构域之间不同于原始基因组序列的新组合，形成新基因。

2、根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述的“至少两个不同的特定位置”可以位于同一条染色体上，也可以位于不同染色体上。

3、根据权利要求 1 或 2 所述的方法，其特征在于，所述的“至少两个不同的特定位置”可以在至少两个不同基因上的特定位置，也可以在同一基因上的至少两个不同的特定位置。

4、根据权利要求 3 所述的方法，其特征在于，所述的“至少两个不同基因”的转录方向可以相同，也可以不同。

5、根据权利要求 1-4 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。

6、根据权利要求 5 所述的方法，其特征在于，所述的“具有靶向特性的核酸酶”为 Meganuclease、Zinc finger nuclease、TALEN 或 CRISPR/Cas 系统。

7、根据权利要求 5 或 6 所述的方法，其特征在于，所述“具有靶向特性的核酸酶”以 DNA 形式存在。

8、根据权利要求 5 或 6 所述的方法，其特征在于，所述“具有靶向特性的核酸酶”以 mRNA 或蛋白形式存在，而非 DNA 形式。

9、根据权利要求 5-8 任意一项所述的方法，其特征在于，将具有靶向特性的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。

10、根据权利要求 1-9 任意一项所述的方法，其特征在于，所述“基因元件”包括基因的启动子、5'非编码区、编码区或非编码 RNA 区、3'非编码区和终止子。

11、根据权利要求 1-10 任意一项所述的方法，其特征在于，所述不同基因元件的组合为两个具有不同表达模式的基因其中之一的启动子和另一基因的编码区或非编码 RNA 区的组合。

12、根据权利要求 11 所述的方法，其特征在于，所述不同基因元件的组合中一个为生物内源强启动子，另外一个为 HPPD、EPSPS、PPO 或 GH1 基因编码区。

13、根据权利要求 1-10 任意一项所述的方法，其特征在于，所述不同基因元件的组合为两个具有不同表达模式的基因其中之一的启动子至 5'非编码区和另一基因的编码区或非编码 RNA 区的组合。

14、根据权利要求 11 或 13 所述的方法，其特征在于，所述“不同表达模式”为基因表达水平强弱的差异。

15、根据权利要求 11 或 13 所述的方法，其特征在于，所述“不同表达模式”为基因表达组织特异性的差异。

16、根据权利要求 11 或 13 所述的方法，其特征在于，所述“不同表达模式”为基因表达

发育时期特异性的差异。

17、根据权利要求 1-10 任意一项所述的方法，其特征在于，所述不同基因元件的组合为同一基因内相邻基因元件的组合。

18、根据权利要求 1-17 任意一项所述的方法，其特征在于，所述“蛋白结构域”是指对应于蛋白质特定功能结构域的 DNA 片段；优选地，包括核定位信号、叶绿体导肽、线粒体导肽、磷酸化位点、甲基化位点、跨膜结构域、DNA 结合结构域、转录激活结构域、受体激活结构域或酶催化中心。

19、根据权利要求 1-18 任意一项所述的方法，其特征在于，所述不同蛋白结构域的组合为两个具有不同亚细胞定位的蛋白编码基因其中之一的定位信号区域和另一基因的成熟蛋白编码区域的组合。

20、根据权利要求 19 所述的方法，其特征在于，所述“不同亚细胞定位”包括核定位、胞质定位、细胞膜定位、叶绿体定位、线粒体定位或内质网膜定位。

21、根据权利要求 1-18 任意一项所述的方法，其特征在于，所述不同蛋白结构域的组合为两种不同生物学功能的蛋白结构域的组合。

22、根据权利要求 21 所述的方法，其特征在于，所述“不同生物学功能”包括识别特异 DNA 或 RNA 保守序列、激活基因表达、结合蛋白配体、结合小分子信号、离子结合或特异的酶促反应。

23、根据权利要求 1-18 任意一项所述的方法，其特征在于，所述不同蛋白结构域的组合为同一基因内相邻蛋白结构域的组合。

24、根据权利要求 1-10 和 18 任意一项所述的方法，其特征在于，所述基因元件和蛋白结构域的组合为同一基因内蛋白结构域与相邻的启动子、5'非编码区、3'非编码区或终止子的组合。

25、根据权利要求 1-24 任意一项所述的方法，其特征在于，所述的生物体是动物、植物或真菌。

26、一种采用权利要求 1-25 任意一项所述方法获得的新基因。

27、根据权利要求 26 所述的新基因，其特征在于，所述的新基因与原基因相比，或具有不同启动子并因此具有了不同时空或不同强度或不同发育时期的表达特性，或具有了新的氨基酸序列；优选地，所述的“新的氨基酸序列”，即可以是两个以上基因编码区的整体融合，也可以是编码区的部分融合或同一基因部分蛋白编码区的加倍。

28、根据权利要求 26 或 27 所述的新基因，其特征在于，所述新基因为高表达生物内源 HPPD、EPSPS、PPO 或 GH1 基因。

29、一种包含权利要求 26-28 任意一项所述基因的 DNA。

30、一种利用包含权利要求 26-28 任意一项所述基因编码的蛋白或其生物活性片段。

31、一种重组表达载体，其包含权利要求 26-28 任意一项所述的基因，以及与之可操作地连接的启动子。

32、一种包含权利要求 26-28 任意一项所述基因的表达盒。

33、一种宿主细胞，其中包含有权利要求 32 所述的表达盒；优选地，所述宿主细胞是植

物细胞、动物细胞或真菌细胞。

34、采用权利要求 33 所述宿主细胞再生的生物。

35、一种如权利要求 26-28 任意一项所述的基因在赋予或提高生物体抗性/耐受性性状或生长优势性状上的应用。

36、一种组合物，其包含：

(a)两个具有不同表达模式的基因其中之一的启动子和另一基因的编码区或非编码 RNA 区；

(b)两个具有不同表达模式的基因其中之一的启动子至 5'非编码区和另一基因的编码区或非编码 RNA 区；

(c)同一基因内相邻基因元件；

(d)两个具有不同亚细胞定位的蛋白编码基因其中之一的定位信号区域和另一基因的成熟蛋白编码区域；

(e)两种不同生物学功能的蛋白结构域；

(f)同一基因内相邻蛋白结构域；或者，

(g)同一基因内蛋白结构域与相邻的启动子、5'非编码区、3'非编码区或终止子。

37、根据权利要求 36 所述的方法，其特征在于，所述“不同表达模式”为基因表达水平强弱的差异。

38、根据权利要求 36 所述的方法，其特征在于，所述“不同表达模式”为基因表达组织特异性的差异。

39、根据权利要求 36 所述的方法，其特征在于，所述“不同表达模式”为基因表达发育时期特异性的差异。

40、根据权利要求 36-39 任意一项所述的方法，其特征在于，所述“不同亚细胞定位”包括核定位、胞质定位、细胞膜定位、叶绿体定位、线粒体定位或内质网膜定位。

41、根据权利要求 36-40 任意一项所述的方法，其特征在于，所述“不同生物学功能”包括识别特异 DNA 或 RNA 保守序列、激活基因表达、结合蛋白配体、结合小分子信号、离子结合或特异的酶促反应。

42、根据权利要求 36-41 任意一项所述的组合物，其在体内融合。

43、一种不依赖于外源 DNA 供体片段，在生物体中提高目标内源基因表达水平的编辑方法，包括以下步骤：

分别在所述目标内源基因与可选的内源高表达基因的启动子和编码区之间选择特定位置同时产生 DNA 断裂，所述 DNA 断裂通过非同源末端连接（NHEJ）或同源修复的方式互相连接，产生目标内源基因编码区与可选的内源强启动子的体内融合，形成新的高表达内源基因。

44、根据权利要求 43 所述的编辑方法，其特征在于，所述目标内源基因与可选的内源高表达基因位于同一染色体上。

45、根据权利要求 43 所述的编辑方法，其特征在于，所述目标内源基因与可选的内源高表达基因位于不同染色体上。

46、一种在植物中敲高内源 HPPD 基因表达的编辑方法，其特征在于，将 HPPD 基因编码区与植物内源强启动子体内融合，形成新的高表达植物内源 HPPD 基因。

47、根据权利要求 46 所述的编辑方法，其特征在于，具体包括以下步骤：分别在 HPPD 基因与可选的内源高表达基因的启动子和编码区之间选择特定位置同时产生 DNA 断裂，所述 DNA 断裂通过细胞内修复途径互相连接，产生 HPPD 基因编码区与可选的内源强启动子的体内融合，形成新的高表达 HPPD 基因。

48、根据权利要求 46 或 47 所述的编辑方法，其特征在于，所述植物为水稻，优选地，强启动子为 ubiquitin2 基因的启动子。

49、一种采用权利要求 46-48 任意一项所述编辑方法获得的高表达植物内源 HPPD 基因。

50、一种高表达水稻内源 HPPD 基因，其具有选自下述的序列：

(1) 如 SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 18 或 SEQ ID NO: 19 所示的核酸序列或其部分序列或其互补序列；

(2) 与 (1) 限定的任一序列具有至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 98%或至少 99%以上同一性；或

(3) 在严谨条件下与 (1) 或 (2) 所示序列杂交的核酸序列。

51、一种在植物中敲高内源 EPSPS 基因表达的编辑方法，其特征在于，将 EPSPS 基因编码区与植物内源强启动子体内融合，形成新的高表达植物内源 EPSPS 基因。

52、根据权利要求 51 所述的编辑方法，其特征在于，具体包括以下步骤：分别在 EPSPS 基因与可选的内源高表达基因的启动子和编码区之间选择特定位置同时产生 DNA 断裂，所述 DNA 断裂通过细胞内修复途径互相连接，产生 EPSPS 基因编码区与可选的内源强启动子的体内融合，形成新的高表达 EPSPS 基因。

53、根据权利要求 51 或 52 所述的编辑方法，其特征在于，所述植物为水稻，优选地，强启动子为 TKT 基因的启动子。

54、一种采用权利要求 51-53 任意一项所述编辑方法获得的高表达植物内源 EPSPS 基因。

55、一种高表达水稻内源 EPSPS 基因，其具有选自下述的序列：

(1) 如 SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 13 或 SEQ ID NO: 14 所示的核酸序列或其部分序列或其互补序列；

(2) 与 (1) 限定的任一序列具有至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 98%或至少 99%以上同一性；或

(3) 在严谨条件下与 (1) 或 (2) 所示序列杂交的核酸序列。

56、一种在植物中敲高内源 PPO 基因表达的编辑方法，其特征在于，将 PPO 基因编码区与植物内源强启动子体内融合，形成新的高表达植物内源 PPO 基因。

57、根据权利要求 56 所述的编辑方法，其特征在于，具体包括以下步骤：分别在 PPO 基因与可选的内源高表达基因的启动子和编码区之间选择特定位置同时产生 DNA 断裂，所述 DNA 断裂通过细胞内修复途径互相连接，产生 PPO 基因编码区与可选的内源强启动子的体内融合，形成新的高表达 PPO 基因。

58、根据权利要求 56 或 57 所述的编辑方法，其特征在于，所述植物为水稻或拟南芥，

优选地，在水稻中，强启动子为 CP12 基因的启动子；在拟南芥中，强启动子为 ubiquitin10 基因的启动子。

59、一种采用权利要求 56-58 任意一项所述编辑方法获得的高表达植物内源 PPO 基因。

60、一种高表达水稻内源 PPO 基因，其具有选自下述的序列：

(1) 如 SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 20、SEQ ID NO: 21、SEQ ID NO: 22、SEQ ID NO: 23、SEQ ID NO: 24、SEQ ID NO: 25 或 SEQ ID NO: 26 所示的核酸序列或其部分序列或其互补序列；

(2) 与 (1) 限定的任一序列具有至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 98% 或至少 99% 以上同一性；或

(3) 在严谨条件下与 (1) 或 (2) 所示序列杂交的核酸序列。

61、一种包含权利要求 49、50、54、55、59 或 60 所述基因的 DNA。

62、一种利用包含权利要求 49、50、54、55、59 或 60 所述基因编码的蛋白或其生物活性片段。

63、一种重组表达载体，其包含权利要求 49、50、54、55、59 或 60 所述的基因，以及与之可操作地连接的启动子。

64、一种包含权利要求 49、50、54、55、59 或 60 所述基因的表达盒。

65、一种宿主植物细胞，其中包含有权利要求 64 所述的表达盒。

66、采用权利要求 65 所述宿主植物细胞再生成的植物。

67、一种生产对于除草剂的抗性或耐受性提高的植物的方法，其中包括将权利要求 65 所述的宿主植物细胞再生成植物及其衍生后代。

68、根据权利要求 67 所述的方法，其特征在于，所述对于除草剂的抗性或耐受性提高的植物是将宿主植物细胞再生成的植物与野生型杂交通过遗传分离去除外源转基因成分的非转基因株系。

69、一种抗除草剂水稻，其包含权利要求 50 所述高表达水稻内源 HPPD 基因、权利要求 55 所述高表达水稻内源 EPSPS 基因和权利要求 60 所述高表达水稻内源 PPO 基因中的一种或两种以上组合。

70、根据权利要求 69 所述的水稻，其是非转基因的。

71、如权利要求 49、50、54、55、59 或 60 所述基因在提高植物细胞、植物组织、植物部分或植物的相应抑制性除草剂抗性或耐受性上的应用。

72、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 66 所述的植物、通过权利要求 67 或 68 的方法制备的植物或者权利要求 69 或 70 所述的水稻，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 HPPD、EPSPS 或 PPO 抑制性除草剂。