

在生物体内创制新基因的方法及应用

技术领域

本发明涉及基因工程和生物信息学技术领域，具体而言，涉及一种在无人工 DNA 模板的前提下，在生物体内创制新基因的方法及应用。

背景技术

一般来讲，生物体内一个完整的基因表达盒包括启动子、5'非编码区（5'UTR）、编码区（CDS）或非编码 RNA 区（Non-coding RNA）、3'非编码区（3'UTR）、终止子等多个元件。非编码 RNA 在 RNA 水平上就能行使其生物学功能，包括 rRNA、tRNA、snRNA、snoRNA 和 microRNA。CDS 区域包含外显子和内含子，转录出来的 RNA 翻译成蛋白之后，不同区段的氨基酸通常会形成不同的结构域（domain），特异的结构域决定了蛋白的细胞内定位和功能（如核定位信号、叶绿体导肽、线粒体导肽、DNA 结合结构域、转录激活结构域、酶催化中心等）。对于非编码 RNA 来讲，不同的区段也具有不同的功能。当基因的一个或几个元件发生变化，就会形成一个新的基因，可能产生新的功能。例如蟠桃中的 PpOFP1 基因上游发生一个 1.7Mb 的染色体片段倒位事件，形成新的启动子，在果实发育 S2 期，扁桃果实中 PpOFP1 表达量显著高于圆桃，可以抑制桃子果实的纵向发育，从而形成蟠桃扁平的表型（Zhou et al. 2018. A 1.7-Mb chromosomal inversion downstream of a PpOFP1 gene is responsible for flat fruit shape in peach. *Plant Biotechnol. J.* DOI: 10.1111/pbi.13455）。

生物基因组中自然产生新基因需要漫长的进化过程，根据研究，新基因产生的分子机制包括外显子重排、基因复制、逆转座、可移动元件（转座子、反转座子）的整合、基因水平转移、基因融合分裂、从头起源等多种机制，通过新基因起源和功能进化在自然选择作用下在物种中得以保留。已在果蝇、拟南芥、灵长类动物中鉴定出的比较年轻的新基因经计算距今也已有数十万到数百万年历史（Long et al. 2012. The origin and evolution of new genes. *Methods Mol Biol.* DOI: 10.1007/978-1-61779-585-5_7）。因此在基因工程和生物育种领域，以植物为例，如果希望在植物中引入新的基因（即便是该新基因的所有基因元件均是来自于该物种自身的不同基因），目前只能通过转基因技术来实现。即在体外将来自不同基因的元件组装在一起，形成新的基因，再将其通过转基因技术转入植物。其特征是新基因的组装需要在体外进行，产生的是转基因作物。

以 CRISPR/Cas9 等为代表的基因编辑工具，能够高效且精准地在生物体基因组的特定位置产生双链断裂（DSB），随后通过细胞自身的非同源末端修复或同源重组的机制修复双链断裂，产生定点突变。基因编辑目前的应用主要集中在针对单个基因内部元件的编辑，其中对 CDS 外显子区域的编辑最为普遍，在外显子上编辑的结果通常会造成基因的移码突变，导致该基因功能的丧失，为此，CRISPR/Cas9 等基因编辑工具，也被称为基因敲除（即破坏基因）工具。除了针对 CDS 区域，对启动子、5'UTR 等区域也可以通过敲除的方式，影响该基因的表达量。这些方法都是对现有基因进行突变，没有产生新的基因，因此难以满足一些生产上的需求，例如对多数基因而言，现有的基因编辑技术很难实现基因表达量的上调，也很难定向改变蛋白的亚细胞定位或改变蛋白的功能结构域。也有文献报道在现有基因的上游定点插入一段启动子或增强子的序列能够改变基因的表达模式从而产生新的性状（Lu et al. 2020. Targeted, efficient sequence insertion and replacement in rice. *Nat Biotechnol.* DOI:

10.1038/s41587-020-0581-5),但这种方法需要提供外源 DNA 模板,可能受到类似转基因作物的严格监管程序,限制了其应用。

发明简述

为解决现有技术中存在的上述问题,本发明提供了一种仅通过在生物体基因组特定位置的组合上同时产生两个以上 DNA 双链断裂的形式,并且在不提供人工 DNA 模板的情况下,在生物体内创制新基因的方法和应用。

本发明一方面提供了一种在生物体内创制新基因的方法,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。

在一具体实施方式中,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。当位于同一条染色体上时,两个特定位置处同时发生 DNA 断裂后产生的染色体片段经修复后可能发生该片段的删除、倒置或复制加倍等事件;当位于不同染色体上时,两个特定位置处产生的 DNA 断裂经修复后可能相互连接产生染色体臂的交换事件。这些事件可以通过设计特异的引物进行 PCR 测序鉴定筛选。

在一具体实施方式中,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。

在一具体实施方式中,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(相反或相对)。

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。此种 DNA 断裂与通过传统技术手段(如辐射或化学诱变)产生的 DNA 断裂无本质差异。

在一具体实施方式中,所述的“具有靶向特性的核酸酶”包括 Meganuclease、Zinc finger nuclease (ZFN)、TALEN、CRISPR/Cas 系统。

其中,CRISPR/Cas 系统可通过两个以上靶向不同序列的引导 RNA 在基因组不同的位置上,同时产生两处以上 DNA 双链断裂;Zinc finger nuclease、TALEN 系统可以通过针对两个以上特定位置序列分别设计 ZFN 蛋白或 TALEN 蛋白,同时产生两处以上 DNA 双链断裂。当两个断裂位于同一条染色体上时,可能会发生删除、倒置、加倍等修复结果;当两个断裂位于两条不同的染色体上时,则有可能出现染色体臂的交换。两个 DNA 断裂处染色体片段的删除、倒置、加倍、交换等能够对不同的基因元件或蛋白结构域重新组合产生新的功能基因。

在一具体实施方式中,所述“具有靶向特性的核酸酶”以 DNA 形式存在。

在另一具体实施方式中,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。

在一具体实施方式中,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。

所述“基因元件”，包括基因的启动子、5'非编码区（5'UTR）、编码区（CDS）或非编码RNA区（Non-coding RNA）、3'非编码区（3'UTR）和终止子。

在一具体实施方式中，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CDS或非编码RNA区的组合。

在一具体实施方式中，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GHI基因编码区。

在另一具体实施方式中，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'UTR区域和另一基因的CDS或非编码RNA区的组合。

在一具体实施方式中，所述“不同表达模式”为基因表达水平强弱的差异。

在另一具体实施方式中，所述“不同表达模式”为基因表达组织特异性的差异。

在另一具体实施方式中，所述“不同表达模式”为基因表达发育时期特异性的差异。

在另一具体实施方式中，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。

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；其包括但不限于核定位信号、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、酶催化中心等。

在一具体实施方式中，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。

在一具体实施方式中，所述“不同亚细胞定位”包括但不限于核定位、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。

在另一具体实施方式中，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。

在一具体实施方式中，所述“不同生物学功能”包括但不限于识别特异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。

在另一具体实施方式中，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。

在另一具体实施方式中，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'UTR、3'UTR或终止子的组合。

具体而言，可通过染色体片段倒置实现不同基因启动子的互换：当位于同一条染色体的两个基因的方向不同时，分别在两个基因的启动子和CDS之间选择特定位置产生DNA断裂，断口之间的区域发生倒置，即可实现这两个基因启动子的互换，在倒置染色体片段两端产生了两个新的基因。两个基因的方向不同，分为两种情形，一是5'端在内侧，即基因方向相反，二是5'端在外侧，即基因方向相对。基因方向相反的情况下，倒置的是基因的启动子，如图2方案1所示；基因方向相对的情况下，倒置的是基因的CDS区，如图4方案1所示。倒置的区域可以很短，长度小于10kb，之间没有其它基因；倒置的区域也可以很长，达到300kb-3Mb，包含上百个基因。

也可以通过染色体片段加倍创制新的基因：当位于同一条染色体的两个基因的方向相同时，分别在两个基因的启动子和CDS之间选择特定位置产生DNA断裂，断口之间的区域发生复制加倍，会在加倍片段的连接处形成由下游基因启动子和上游基因CDS区融合而成的新

基因，如图1方案1和图3所示。加倍区域的长度在500bp-5Mb范围内，可以很短，之间没有其它基因，也可以很长，包含上百个基因。这种方法虽然会给原来的两个基因的启动子和CDS区域间造成点突变，但是这种小范围的点突变一般对基因表达特性影响不大，而启动子替换创造出来的新基因则具有新的表达特性。或者在位于同一基因的蛋白结构域两侧选择特定位置产生DNA断裂，断口之间的区域发生复制加倍，会形成特异功能结构域加倍的新基因。

本发明另一方面提供了一种在生物体内创制新基因的方法，包括以下步骤：

通过在生物体基因组或染色体水平上，至少两个不同的基因上特定位置的DNA产生断裂，实现DNA的转移、加倍、倒置或删除，其中，特定的一个内源基因的元件和另外一个特定基因元件，通过非同源末端（NHEJ）或同源修复的方式连接在一起，形成新基因。

本发明还提供一种采用所述方法获得的新基因。

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组织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。

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。

在一具体实施方式中，所述新基因为高表达生物内源HPPD、EPSPS、PPO或GH1基因。

本发明另外提供一种包含所述基因的DNA。

本发明另外提供一种利用包含所述基因编码的蛋白或其生物活性片段。

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

本发明另外提供一种包含所述基因的表达盒。

本发明另外提供一种宿主细胞，其中包含有所述的表达盒。优选地，所述宿主细胞是植物细胞、动物细胞或真菌细胞。

本发明另外提供采用所述宿主细胞再生成的生物。

本发明另外提供一种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。

本发明另外提供一种组合物，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。

在一具体实施方式中，所述“不同表达模式”为基因表达水平强弱的差异。

在一另具体实施方式中，所述“不同表达模式”为基因表达组织特异性的差异。

在另一具体实施方式中，所述“不同表达模式”为基因表达发育时期特异性的差异。

在一具体实施方式中，所述“不同亚细胞定位”包括但不限于核定位、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。

在一具体实施方式中，所述“不同生物学功能”包括但不限于识别特异 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。

在一具体实施方式中，所述的组合物在体内融合。

特别的，本发明还提供了一种不依赖于外源 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 CDS 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。此种方法命名为敲高内源基因的编辑方法。

在一具体实施方式中，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。

在另一具体实施方式中，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。

本发明另一方面提供了一种在植物中敲高内源 HPPD 基因表达的编辑方法，其是将 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。即分别在 HPPD 基因与可选的内源高表达基因的启动子和 CDS 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。在水稻中，强启动子优选 ubiquitin2 基因的启动子。

本发明还提供了一种采用所述编辑方法获得的高表达植物内源 HPPD 基因。

本发明还提供了一种高表达水稻内源 HPPD 基因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。

本发明另一方面提供了一种在植物中敲高内源 EPSPS 基因表达的编辑方法，其是将 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。即分别在 EPSPS 基因与可选的内源高表达基因的启动子和 CDS 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。在水稻中，强启动子优选 TKT 基因的启动子。

本发明还提供了一种采用所述编辑方法获得的高表达植物内源 EPSPS 基因。

本发明还提供了一种高表达水稻内源 EPSPS 基因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。

本发明另一方面提供了一种在植物中敲高内源 PPO (PPOX) 基因表达的编辑方法，其是将 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。即分别在 PPO 基因与可选的内源高表达基因的启动子和 CDS 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。在水稻中，强启动子优选 CP12 基因的启动子。在拟南芥中，强启动子优选 ubiquitin10 基因的启动子。

本发明还提供了一种采用所述编辑方法获得的高表达植物内源 PPO 基因。

本发明还提供了一种高表达水稻内源 PPO 基因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。

本发明另外提供一种包含所述 HPPD、EPSPS 或 PPO 基因的 DNA。

本发明另外提供一种利用包含所述 HPPD、EPSPS 或 PPO 基因编码的蛋白或其生物活性片段。

本发明另外提供一种重组表达载体，其包含所述 HPPD、EPSPS 或 PPO 基因，以及与之可操作地连接的启动子。

本发明另外提供一种包含所述 HPPD、EPSPS 或 PPO 基因的表达盒。

本发明另外提供一种宿主植物细胞，其中包含有所述的表达盒。

本发明另外提供采用所述宿主植物细胞再生成的植物。

本发明另外提供一种生产对于除草剂的抗性或耐受性提高的植物的方法，其中包括将所述的宿主植物细胞再生成植物和/或其衍生后代。

在一具体实施方式中，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。

本发明还提供了一种抗除草剂水稻，其中包含上述高表达水稻内源 HPPD 基因、高表达水稻内源 EPSPS 基因、高表达水稻内源 PPO 基因其中之一或其任意组合。

在一具体实施方式中，所述抗除草剂水稻是非转基因的。

本发明另外提供所述高表达植物内源 HPPD、EPSPS 或 PPO 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。

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 HPPD、EPSPS 或 PPO 抑制性除草剂。

发明人在研究工作中发现，同时进行双靶点或多靶点基因编辑的细胞中，不同靶点处的 DNA 双链断裂末端有一定的比例产生自发的相互连接，从而产生同一染色体上靶点间片段的

删除、倒位或复制加倍事件，和/或不同染色体靶点之间的染色体片段交换。有文献报道，这种现象在动植物中普遍存在（Puchta et al. 2020. Changing local recombination patterns in Arabidopsis by CRISPR/Cas mediated chromosome engineering. Nat Commun. DOI: 10.1038/s41467-020-18277-z; Li et al. 2015. Efficient inversions and duplications of mammalian regulatory DNA elements and gene clusters by CRISPR/Cas9. J Mol Cell Biol. DOI: 10.1093/jmcb/mjv016）。

本发明人出乎意料地发现，通过在目标基因的特定元件附近设计基因编辑靶点组合，引起 DNA 双链断裂与自发的修复连接，不需要提供外源 DNA 模板即可在基因组水平上实现不同基因元件的定向组合，从中可能产生有功能的新基因，从而极大加速新基因的产生，在动植物育种和基因功能研究中都有极大的应用潜力。

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。例如，本发明中使用的标准重组 DNA 和分子克隆技术为本领域技术人员熟知，并且在如下文献中有更全面的描述：Sambrook, J., Fritsch, E.F.和 Maniatis, T., Molecular Cloning: A Laboratory Manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, 1989。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,能在向导 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 tracrRNA 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(CRISPR RNA)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”, 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, “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*)、光稈稻(*Oryza glaberrima*); 小麦属(*Triticum* spp.), 例如普通小麦(*Triticum aestivum*)、硬粒小麦(*T. Turgidum*ssp.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(*Elaeis guineensis*)、美洲油棕(*Elaeis oleifera*))、大豆(soybean)、油菜(*Brassicajuncea*)、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、苧麻、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 uniflora*)、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(*Olea europaea*))、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、曼陀罗、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、桤木、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.)、藨草(*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、桤麻、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 (*Zoysia japonica*))、狗牙根属物种(*Cynodon spp.*)(百慕大草、狗牙根)、侧钝叶草(*Stenotaphrum secundatum*)(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 (*Digitaria sanguinalis*)、香附子 (*Cyperus rotundus*)、短叶水蜈蚣 (*Kyllingia brevifolia*)、阿穆尔莎草 (*Cyperus amuricus*)、加拿大飞蓬 (*Erigeron canadensis*)、天胡荽 (*Hydrocotyle sibthorpioides*)、鸡眼草 (*Kummerowia striata*)、地锦 (*Euphorbia humifusa*)、耕地堇菜 (*Viola arvensis*)、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*)、簕竹属(*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、大叶黄杨、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 excelsa*)、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。一些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、和完整植物)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。

“抑制性除草剂耐受性”和“抑制性除草剂抗性”两个术语可以互换使用，均指的是对抑制性除草剂的耐受性和对抑制性除草剂的抗性。“抑制性除草剂耐受性提高”和“抑制性除草剂抗性提高”是指对所述抑制性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。

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。

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。

本领域普通技术人员可以很容易地采用已知的方法，例如定向进化和点突变的方法，对本发明的 SEQ ID No. 9 ~ SEQ ID No. 17 所示的 DNA 片段进行突变。那些经过人工修饰的，具有与本发明的前述任一序列所示的 DNA 片段至少 75% 同一性的核苷酸，且具有相同功能，均是衍生于本发明的核苷酸序列并且等同于本发明的序列。

术语“同一性”指与天然核酸序列的序列相似性。同一性可以用肉眼或计算机软件进行评价。使用计算机序列比对软件，两个或多个序列之间的同一性可以用百分比(%)表示，其可以用来评价相关序列之间的同一性。“部分序列”意味着给定序列的至少 5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90% 或 95%。

所述严谨条件可为如下：50℃，在 7% 十二烷基硫酸钠(SDS)、0.5M NaPO₄ 和 1mM EDTA 的混合溶液中杂交，在 50℃，2×SSC，0.1% SDS 中漂洗；还可为：50℃，在 7% SDS、0.5M NaPO₄ 和 1mM EDTA 的混合溶液中杂交，在 50℃，1×SSC，0.1% SDS 中漂洗；还可为：50℃，在 7% SDS、0.5M NaPO₄ 和 1mM EDTA 的混合溶液中杂交，在 50℃，0.5×SSC，0.1% SDS 中漂洗；还可为：50℃，在 7% SDS、0.5M NaPO₄ 和 1mM EDTA 的混合溶液中杂交，在 50℃，0.1×SSC，0.1% SDS 中漂洗；还可为：50℃，在 7% SDS、0.5M NaPO₄ 和 1mM EDTA 的混合溶液中杂交，在 65℃，0.1×SSC，0.1% SDS 中漂洗；也可为：在 6×SSC，0.5% SDS 的溶液中，在 65℃ 下杂交，然后用 2×SSC，0.1% SDS 和 1×SSC，0.1% SDS 各洗膜一次；也可为：2×SSC，0.1% SDS 的溶液中，在 68℃ 下杂交并洗膜 2 次，每次 5min，又于 0.5×SSC，0.1% SDS 的溶液中，在 68℃ 下杂交并洗膜 2 次，每次 15min；也可为：0.1×SSPE(或 0.1×SSC)、0.1% SDS 的溶液中，65℃ 条件下杂交并洗膜。

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。

本发明的“高表达基因”是指在特定的组织中表达量高于普通基因的基因。

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。

术语“强启动子”是本领域众所周知的并广泛使用的术语，许多强启动子是本领域已知的，或者可以通过常规实验来鉴定。所述启动子的活性高于与野生型生物中待过量表达的核酸分子有效连接的启动子的活性，例如活性比内源基因的启动子更高的启动子。优选地，强启动子的活性比与野生型生物中待过量表达的核酸分子有效连接的启动子的活性高约 2%、5%、8%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、150%、200%、250%、300%、350%、400%、450%、500%、600%、700%、800%、900%、1000%或超过 1000%。本领域技术人员知晓如何测定启动子活性，并比较不同的启动子的活性。

“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。

改变生物体内源基因的表达包括了强度和时空特性两个方面。强度包括调高(即敲高)、调低(即敲低)和/或调零(即敲除)；时空特异性包括了时间(生育时期)特异性和空间(组织)特异性两种，也包括了诱导性。此外，改变蛋白的靶向性，例如是将定位在细胞质中的蛋白改成叶绿体定位或细胞核定位。

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。

本发明具有如下优异技术效果：

本发明综合运用了以下两个不同专业领域的信息，开发了在生物体内直接创制新基因的方法，完全改变了原先基因编辑工具的常规用途（即敲除基因），实现了创制新基因的新用途，特别的，实现了通过基因编辑技术提高目标基因表达量的敲高内源基因的编辑方法。一是基因编辑领域的信息，即当两个以上不同的靶点与 Cas9 同时靶向生物基因组时，可以出现删除、倒置、加倍或倒置加倍组合等不同情况。二是基因组学领域的信息，即基因组上不同基因的位置，距离，以及基因内不同元件（启动子、5'UTR、编码区（CDS）、不同的结构域区域、终止子等）的具体位置、方向、功能，不同基因的表达特异性信息等。结合这两个不同领域的信息，在两个以上不同基因的特定位置或单个基因内的两个以上特定位置（具体位置由基因组学领域提供）进行切割，通过删除、倒置、加倍、倒置加倍组合或染色体臂的交换等（具体情形由基因编辑领域提供），形成不同基因元件或功能结构域的新组合，特异地在生物体内创制新基因。

本发明创制的这些新基因是在生物体内自发的 DNA 修复机制作用下，由两个以上基因的不同元件进行融合或重组从而改变原基因的表达强度、时空特异性、特殊功能结构域等形成的，并不含有外源转基因或者人工合成的基因元件。由于新的基因融合了两种以上不同基因的元件，这极大拓展了基因变异的自由度，会产生更为丰富多样的功能，具有广泛的应用前景。同时，这些新基因与基因编辑载体是不连锁的，通过遗传分离去除载体元件后，即可得到含有新基因的非转基因生物材料用于动植物育种。或者也可以通过 mRNA 或核糖核酸蛋白复合体（RNP）的递送方式进行非整合的瞬时编辑，创制含有新基因的非转基因生物材料。这个过程是非转基因的，最终得到的编辑材料也不含转基因。在理论和事实上，这些新基因也可以通过传统育种技术（如辐射或化学诱变等）获得，所不同的是，用传统技术进行筛选需要创制数量巨大的随机突变体库并耗费大量时间和成本从中筛选新的功能基因，而本发明能够通过生物信息学分析结合基因编辑技术定向创制新功能基因，大大缩短了育种周期。按照现行的基因编辑生物审批流程，本发明提供的方法在很多国家不受监管。

另外，本发明的新基因创制技术能够用于改变生物体的生长、发育、抗性、产量等多种性状，具有重大应用价值。创制出的新基因或具有新的调控元件（如启动子）从而改变了原基因的表达强度、时空特性等，或具有新的氨基酸序列从而具有了新功能。以农作物为例，改变特定基因的表达可以提高作物对病虫害等有害生物及干旱、水涝、盐碱等非生物胁迫的抗性，也可提高产量，改善品质。以鱼类为例，改变生长激素的表达特性，能够显著改变其生长发育的速度。

附图说明

图 1 为在水稻中创制新的 HPPD 基因原理图。

图 2 为在水稻中创制新的 EPSPS 基因原理图。

图 3 为在拟南芥中创制新的 PPOX 基因原理图。

图 4 为在水稻中创制新的 PPOX 基因原理图。

图 5 为水稻原生质体测试 HPPD-duplication 方案测序结果。

图 6 为水稻农杆菌转化载体 pQY2091 载体图谱。

图 7 为 pQY2091 转化水稻潮霉素抗性愈伤检测新基因片段 PCR 电泳结果。箭头所指为 UBI2 基因启动子和 HPPD 编码区融合的新基因 PCR 条带。数字为不同愈伤样品的编号。M 代表 DNA Marker, 条带大小依次为 100bp, 250bp, 500bp, 750bp, 1000bp, 2000bp, 2500bp, 5000bp, 7500bp。

图 8 为 pQY2091 转化水稻 T0 代幼苗检测新基因片段 PCR 电泳结果。箭头所指为 UBI2 基因启动子和 HPPD 编码区融合的新基因 PCR 条带。数字为不同 T0 苗的编号。M 代表 DNA Marker, 条带大小依次为 100bp, 250bp, 500bp, 750bp, 1000bp, 2000bp, 2500bp, 5000bp, 7500bp。

图 9 为 QY2091 T0 代 HPPD 基因加倍株系双唑草酮抗性测试结果。同一花盆中左侧为野生型金粳 818, 右侧为 HPPD 加倍株系。

图 10 为 QY2091 T0 代 HPPD 基因加倍株系 HPPD 和 UBI2 基因相对表达量。818CK1, 818CK3 为两个野生型金粳 818 对照植株; 13M, 20M 代表 QY2091-13, QY2091-20 T0 植株的主分蘖叶片样品; 13L, 20L 代表 QY2091-13, QY2091-20 T0 植株用于除草剂抗性测试的次级分蘖叶片样品。

图 11 为 QY2091 T1 代可能的基因型及分子检测引物的结合位点示意图。

图 12 为 QY2091-13、QY2091-20 检测 HPPD 加倍测序结果与预测加倍序列比对。

图 13 为对 QY2091 HPPD 加倍株系的 T1 代进行苗期的除草剂抗性检测结果。

图 14 为水稻 PPO1 基因染色体片段倒位可能的编辑事件类型及分子检测引物的结合位点示意图。

图 15 为 EPSPS-inversion 检测测序结果。

图 16 为水稻农杆菌转化载体 pQY2234 载体图谱。

图 17 为 pQY2234 转化水稻潮霉素抗性愈伤检测新基因片段 PCR 电泳结果。箭头所指为 CP12 基因启动子和 PPO1 编码区融合的新基因 PCR 条带。数字为不同愈伤样品的编号。M 代表 DNA Marker, 条带大小依次为 100bp, 250bp, 500bp, 750bp, 1000bp, 2000bp, 2500bp, 5000bp, 7500bp。

图 18 为 QY2234 T0 代 PPO1 基因倒位株系 2081 抗性测试结果。同一处理剂量下左侧花盆为野生型淮稻 5 号对照, 右侧为 PPO1 倒位株系。

图 19 为 QY2234 T0 代 PPO1 倒位株系 PPO1 和 CP12 基因相对表达量。H5CK1, H5CK2 为两个野生型淮稻 5 号对照植株; 252M、304M、329M 代表 QY2234-252, QY2234-304, QY2234-329 T0 植株的主分蘖叶片样品; 252L、304L、329L 代表次级分蘖叶片样品。

图 20 为淮稻 5 号背景的 PPO1 倒位测序结果与预测倒位序列比对。

图 21 为金粳 818 背景的 PPO1 倒位测序结果与预测倒位序列比对。

图 22 为对 QY2234 PPO1 倒位株系的 T1 代进行苗期的除草剂抗性检测结果。

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。

实施例 1 在植物中通过诱导染色体片段加倍敲高内源 HPPD 基因表达的编辑方法-水稻原生质体测试

HPPD 是植物合成叶绿素通路中的关键酶，抑制 HPPD 酶的活性最终导致植物白化失绿而死亡。许多除草剂如硝磺草酮、苯唑草酮等是以 HPPD 为靶标蛋白的抑制剂，提高植物内源 HPPD 基因的表达水平应该有助于提升植株对该类除草剂的耐受性。水稻 HPPD 基因（如 SEQ ID NO: 6 所示，其中 1-1067bp 为启动子，其余为表达区）位于水稻 2 号染色体上。通过生物信息学分析发现 HPPD 基因下游约 338kb 处为水稻 Ubiquitin2（以下简称为 UBI2）基因（如 SEQ ID NO: 5 所示，其中 1-2107bp 为启动子，其余为表达区），UBI2 基因与 HPPD 基因在染色体上的方向相同。根据国际水稻基因组测序计划（International Rice Genome Sequencing Project）提供的水稻基因表达谱数据（<http://rice.plantbiology.msu.edu/index.shtml>）分析，在水稻叶片中 UBI2 基因表达强度是 HPPD 基因的 3-10 倍，UBI2 基因启动子是一个组成型表达的强启动子。

如图 1 所示，方案 1 通过同时在 HPPD 和 UBI2 基因各自的启动子和 CDS 区之间的位置产生双链断裂，经过筛选鉴定可以获得两个断口之间的区域加倍的事件，UBI2 的启动子和 HPPD 的编码区可融合在一起形成新基因。此外，按照如图 1 所示的方案 2，通过连续两次倒置也可以形成 UBI2 的启动子和 HPPD 编码区融合的新基因。首先对图 1 所示方案在水稻原生质体系统中进行如下测试：

1. 首先将水稻 HPPD 和 UBI2 基因组 DNA 序列输入 CRISPOR 在线工具（<http://crispor.tefor.net/>）寻找可用的编辑靶点，经在线评分在 HPPD 和 UBI2 基因各自的启动子和 CDS 区之间选择如下靶点进行测试：

OsHPPD-guide RNA1	GTGCTGGTTGCCTTGGCTGC
OsHPPD-guide RNA2	CACAAATTCACCAGCAGCCA
OsHPPD-guide RNA3	TAAGAACTAGCACAAAGATTA
OsHPPD-guide RNA4	GAAATAATCACCAAACAGAT

其中 guide RNA1 和 guide RNA2 位于 HPPD 基因启动子与 CDS 区之间，靠近 HPPD 蛋白起始密码子，guide RNA3 和 guide RNA4 位于 UBI2 基因启动子与 CDS 区之间，靠近 UBI2 蛋白起始密码子。

以 pHUE411 载体（<https://www.addgene.org/62203/>）为骨架，按照“Xing HL, Dong L, Wang ZP, Zhang HY, Han CY, Liu B, Wang XC, Chen QJ. A CRISPR/Cas9 toolkit for multiplex genome editing in plants. BMC Plant Biol. 2014 Nov 29;14(1):327”所述方法，针对上述靶点设计以下引物，进行载体构建。

引物编号	DNA 序列（5' to 3'）
OsHPPD-sgRNA1-F	ATATGGTCTCGGGCGGTGCTGGTTGCCTTGGCTGCGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG
OsHPPD-sgRNA2-F	ATATGGTCTCGGGCGCACAAATTCACCAGCAGCCAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG
OsHPPD-sgRNA3-R	TATTGGTCTCTAAACTAATCTTGTGCTAGTTCTTAGCTTCTTGGTGCCGCGC
OsHPPD-sgRNA4-R	TATTGGTCTCTAAACATCTGTTTGGTGATTATTCGCTTCTTGGTGCCGCGC

按上述文献提供的方法，构建如下双靶点组合的基因编辑载体。具体而言，以 pCBC-MT1T2 质粒(<https://www.addgene.org/50593/>)为模板分别扩增 sgRNA1+3、sgRNA1+4、

sgRNA2+3、sgRNA2+4 双靶点片段，构建 sgRNA 表达盒。BsaI 酶切 pHUE411 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 Trans5 α 感受态细胞，挑取不同的单克隆测序，测序正确后利用思科提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 pQY002065、pQY002066、pQY002067、pQY002068，如下所示：

pQY002065	pHUE411-HPPD-sgRNA1+3	含 OsHPPD-guide RNA1, guide RNA3 组合
pQY002066	pHUE411-HPPD-sgRNA1+4	含 OsHPPD-guide RNA1, guide RNA4 组合
pQY002067	pHUE411-HPPD-sgRNA2+3	含 OsHPPD-guide RNA2, guide RNA3 组合
pQY002068	pHUE411-HPPD-sgRNA2+4	含 OsHPPD-guide RNA2, guide RNA4 组合

2. 按照如下方法，对上述 pQY002065-002068 载体制备高纯度、高浓度质粒：

使用 Promega 中量质粒提取试剂盒（Midipreps DNA Purification System, Promega, A7640），按操作说明提取质粒。具体步骤为：

（1）向含有卡那霉素的 300 毫升液体 LB 培养基中加 5 毫升大肠杆菌，200 rpm，37 °C 摇菌 12 – 16 小时。

（2）将上述菌液置于 500 毫升离心管中，5,000 g 离心菌液 10 分钟，弃上清。

（3）加 3 毫升细胞重悬液(Cell Resuspension Solution, CRS)重悬细胞沉淀，涡旋混匀。

（4）加 3 毫升细胞溶解液(Cell Lysis Solution, CLS)，缓慢颠倒混匀时间不宜超过 5 分钟。

（5）加 3 毫升中和液（Neutralization Solution），颠倒混匀，至颜色变清澈透明。

（6）14,000g 离心 15 分钟，如未形成紧实沉淀可再次离心 15 分钟。

（7）转移上清液至新的 50 毫升离心管中，避免吸入白色沉淀至离心管中。

（8）加 10 毫升 DNA 净化树脂（Purification Resin，用前剧烈摇匀），混匀。

（9）将 Resin /DNA 混合液倒入过滤柱中，真空泵负压法（0.05 MPa）。

（10）加 15 毫升洗柱液（Column Wash Solution, CWS）到过滤柱中，抽真空。

（11）加 15 毫升 CWS，重复抽真空一次；溶液全部通过过滤柱后延长抽 30 s。

（12）切断过滤柱，将其转移至 1.5 毫升离心管中，12,000g 离心 2 分钟，移除残留液体，将过滤柱转移至新的 1.5 毫升离心管中。

（13）加 200 μ L 预热至 70 °C 的灭菌水，静置 2 分钟。

（14）12,000 g 离心 2 分钟，洗脱质粒 DNA；浓度一般在 1 μ g/ μ L 左右。

3. 制备水稻原生质体并进行 PEG 介导转化：

首先准备原生质体用的水稻幼苗，使用的品种为日本晴（Nipponbare），种子由中国农业大学植物保护学院杂草教研室提供，本实验室扩繁。水稻种子首先去壳，去壳的种子用 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，在超净台中吹干后放在盛有 1/2 MS 培养基的组培瓶中，每瓶可放 20 粒种子。26°C，12 h 光照培养 10 d 左右，就可以进行原生质体的制备。

水稻原生质体制备以及 PEG 介导的转化方法参照“Lin et al., 2018 Application of protoplast technology to CRISPR/Cas9 mutagenesis: from single - cell mutation detection to mutant plant regeneration. Plant Biotechnology Journal <https://doi.org/10.1111/pbi.12870>”。具体的步骤如下：

(1) 选取幼苗叶鞘部分, 用锋利的吉利剃须刀片切成约 1 mm 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 毫升酶解液 (配方: 1.5% Cellulase R10/RS (YaKult Honsha), 0.5% Mecerozyme R10 (YaKult Honsha), 0.5M 甘露醇, 20mM KCl, 20mM MES, pH 5.7, 10mM CaCl₂, 0.1% BSA, 5 mM β -巯基乙醇) 中, 用锡箔纸包好置于 28°C 摇床中, 50 rpm 避光酶解约 4 个小时, 最后 2 分钟将转速提高至 100 rpm;

(2) 酶解结束后, 加入等体积的 W5 溶液 (配方: 154mM NaCl, 125mM CaCl₂, 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;

(3) 再用 W5 溶液漂洗细胞两次, 150 g 离心 5 分钟收集原生质体;

(4) 用适量的 MMG 溶液 (配方: 3.05g/L MgCl₂, 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 cell/mL。

按照如下方法进行原生质体的转化:

(1) 取上述 200 μ L MMG 重悬的原生质体加入制备好的无内毒素的高质量质粒 DNA (10-20 μ g), 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 CaCl₂), 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 毫升的 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 毫升 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. 进行基因组打靶和新基因产生情况检测:

(1) 首先需要提取原生质体 DNA。使用 CTAB 法并进行部分修改, 具体的方法如下: 原生质体离心后弃上清, 加入 500 μ L DNA 提取液 (配方: CTAB 20g/L, NaCl 81.82g/L, 100mM Tris-HCl (pH 8.0), 20 mM EDTA, 0.2% β 巯基乙醇), 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 500 μ L 氯仿, 颠倒混匀后 10,000 rpm 离心 10 分钟; 取 400 μ L 上清转移到一个新的 1.5 毫升离心管中, 加入 1 毫升 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 μ L 超纯水溶解, 保存于 -20°C 备用。

(2) 使用下表中的检测引物, 扩增含有两侧靶位点的片段或预测的 UBI2 的启动子和 HPPD 编码区融合产生的片段, PCR 产物长度为 300-1000 bp 之间, 其中 primer8-F+ primer6-R 组合用于检测染色体片段加倍后中间接头处的融合片段, 预期产物长度为 630bp。

引物	序列 (5' to 3')
OsHPPDduplicated-primer1-F	CACTACCATCCATCCATTTGC
OsHPPDduplicated-primer6-R	GAGTTCCTCCGTGGAGAGGT
OsHPPDduplicated-primer3-F	TCCATTACTACTCTCCCCGATT
OsHPPDduplicated-primer7-R	GTGTGGGGGAGTGGATGAC
OsHPPDduplicated-primer5-F	TGTAGCTTGTGCGTTTCGAT
OsHPPDduplicated-primer2-R	GGGATGCCCTCTTTGTCC

OsHPPDduplicated-primer8-F

TCTGTGTGAAGATTATTGCCACT

OsHPPDduplicated-primer4-R

GGGATGCCCTCCTTATCTTG

PCR 反应体系如下:

成分	体积
2 × I5 缓冲液	5 μL
正向引物 (10 μM)	2 μL
反向引物 (10 μM)	2 μL
模板 DNA	2 μL
超纯水	补到 50 μL

(3) 进行 PCR 反应，一般反应条件是:

步骤	温度	时间
变性	98 °C	30 秒
30-35 循环扩增	98 °C	15 秒
	58 °C	15 秒
	72 °C	30 秒
最终延伸	72 °C	3 分钟
完成	16 °C	5 分钟

(4)对 PCR 反应产物进行 1%琼脂糖凝胶电泳检测,结果显示 pQY002066 和 pQY002068 转化样品中能够检测到预测的 UBI2 的启动子和 HPPD 编码区融合片段 630 bp 阳性条带。

5.将 UBI2 的启动子和 HPPD 编码区融合片段阳性样品测序验证，使用 OsHPPDduplicated-primer8-F 和 OsHPPDduplicated-primer6-R 引物两端测序,结果如图 5 所示,显示 UBI2 基因启动子与 HPPD 基因表达区能够直接连接,结果表明在 pQY002066 和 pQY002068 质粒转化的水稻原生质体基因组 DNA 中能够检测到水稻 UBI2 基因启动子与 HPPD 基因表达区融合的编辑事件,说明通过染色体片段加倍形成新 HPPD 基因的方案可行,能够创制出强启动子驱动表达的 HPPD 新基因,定义为 HPPD 加倍事件。pQY002066 载体转化原生质体检测 HPPD 加倍事件测序结果如 SEQ ID NO: 9 所示; pQY002068 载体转化原生质体检测 HPPD 加倍事件测序结果如 SEQ ID NO: 10 所示。

实施例 2 通过农杆菌介导转化创制染色体片段加倍敲高内源 HPPD 基因表达的抗除草剂水稻

1、敲高编辑载体的构建：根据实施例 1 中原生质体测试的结果，选择编辑效率高的 OsHPPD-guide RNA1：5’GTGCTGGTTGCCTTGGCTGC3’和 OsHPPD-guide RNA4: 5’GAAATAATCACCAAACAGAT3’双靶点组合,参照实施例 1 构建农杆菌转化载体 pQY2091,载体骨架采用 pHUE411 并进行水稻密码子优化,载体图谱如图 6 所示。

2、农杆菌转化水稻愈伤:

1) 农杆菌转化：取水稻敲高编辑载体 pQY2091 质粒 1μg 加入到 10 μl 农杆菌 EHA105 热击感受态细胞（昂羽生物，货号 G6040），冰上放置 5 分钟，浸入液氮中速冻 5 分钟，取出置于 37℃热击 5 分钟，最后放置在冰上 5 分钟。加入 500μl YEB 液体培养基(配方：酵母浸膏 1g/L，蛋白胨 5g/L，牛肉膏 5g/L，蔗糖 5g/L，硫酸镁 0.5g/L)，置于 28℃、200 rpm 摇床中培养 2~3 小时；3500 rpm 离心 30 秒收集菌体，将收集的菌体涂布于 YEB（卡那霉素 50 mg/L+

利福平 25mg/L) 平板上, 28℃培养箱培养 2 天; 挑取单克隆至液体培养基培养, -80℃保菌。

2) 农杆菌的培养: 在 YEB 平板上挑取转化的农杆菌单克隆, 加入 20 毫升 YEB 液体培养基 (卡那霉素 50 mg/L + 利福平 25mg/L), 28℃振荡培养至 OD600 为 0.5, 5000rpm 离心 10 分钟收集菌落, 加入 20-40 毫升 AAM (Solarbio, 货号 LA8580) 液体培养基重悬至 OD600 为 0.2-0.3, 再加入乙酰丁香酮 (Solarbio, 货号 A8110) 至终浓度 200μM, 浸染愈伤组织。

3) 水稻愈伤组织诱导: 转化受体水稻品种为淮稻 5 号和金粳 818, 来自江苏淮安市种子市场采购, 本实验室扩繁。取 800-2000 粒干净的水稻种子脱壳, 然后用无菌水清洗, 直至洗后的水变清澈, 再用 70%酒精消毒 30 秒, 之后加入 30 毫升 5%次氯酸钠置于水平摇床 50 rpm 振荡 20 分钟, 再用无菌水清洗 5 次, 置于无菌吸水纸, 风干种子表面水分, 接种于诱导培养基上在 28℃下培养愈伤。

诱导培养基配方: 4.1g/L N6 粉末 + 0.3 g/L 水解酪蛋白 + 2.878 g/L 脯氨酸 + 2 mg/L 2,4-D + 3 %蔗糖 + 0.1g/L 肌醇 + 0.5g 谷氨酰胺 + 0.45 % 植物凝胶, pH 5.8。

4) 农杆菌侵染水稻愈伤: 选取继代培养 10 天, 直径为 3 毫米的淮稻 5 号或金粳 818 愈伤组织, 将愈伤组织收集至 50 毫升的离心管中; 将已调至 OD600 为 0.2-0.3 的农杆菌 AAM 重悬液倒入含有愈伤组织的离心管中, 置于 28℃、200 转/分摇床中侵染 20 分钟; 侵染完毕, 倒掉菌液, 将愈伤组织放置于无菌滤纸上风干 20 分钟左右, 置于共同培养基平板上共培养, 平板上铺有一张含 100μM 乙酰丁香酮的 AAM 液体培养基浸湿的无菌滤纸; 共培养 3 天后, 清洗去除农杆菌 (先用无菌水洗 5 遍, 再用 500mg/L 的头孢抗生素清洗 20 分钟), 置于 50mg/L 潮霉素筛选培养基上筛选培养。

共同培养基配方: 4.1g/L N6 粉末 + 0.3 g/L 水解酪蛋白 + 0.5 g/L 脯氨酸 + 2 mg/L 2,4-D + 200 μM AS + 10 g/L 葡萄糖 + 3 %蔗糖 + 0.45 %植物凝胶, pH 5.5。

3、潮霉素抗性愈伤的分子鉴定和分化出苗:

与常规水稻转化的筛选过程有所不同的是, 本发明利用染色体片段加倍后产生的融合片段的特异性引物, 在愈伤筛选培养阶段就可以对潮霉素抗性愈伤进行分子鉴定, 确定加倍阳性事件, 选择含有融合不同基因元件的新基因的愈伤进行分化培养, 诱导出苗。具体操作步骤如下:

1) 将共培养后的愈伤组织移至筛选培养基进行第一轮筛选 (2 周)。筛选培养基配方: 4.1g/L N6 粉末 + 0.3 g/L 水解酪蛋白 + 2.878 g/L 脯氨酸 + 2 mg/L 2,4-D + 3 %蔗糖 + 0.5g 谷氨酰胺 + 30 mg/L 潮霉素 (HYG) + 500 mg/L 头孢霉素 (cef) + 0.1 g/L 肌醇 + 0.45 %植物凝胶, pH 5.8。

2) 第一轮筛选完毕后将新长出的愈伤移至新的筛选培养基进行第二轮筛选 (2 周), 在此阶段对新长出的直径大于 3 毫米的愈伤用镊子夹取少量样品, 用实施例 1 所述 CTAB 法提取 DNA 进行第一轮分子鉴定, 本实施例对 pQY2091 载体转化的愈伤, 选择 OsHPPDduplicated-primer8-F (8F) 和 OsHPPDduplicated-primer6-R (6R) 引物对进行 PCR 鉴定, 反应体系与反应条件参照实施例 1, 共鉴定 350 个愈伤, 在淮稻 5 号愈伤中未检测到阳性样品, 在金粳 818 愈伤中检出 28 个阳性样品, 其中部分愈伤 PCR 检测结果如图 7 所示。

3) PCR 鉴定阳性的愈伤移至新的筛选培养基进行第三轮筛选扩大培养; 待愈伤直径大于 5 毫米之后, 对扩大培养的愈伤使用 8F+6R 引物对进行第二轮分子鉴定, 挑取二轮鉴定阳性

的生长状态良好的黄白色愈伤组织转入分化培养基进行分化, 3~4 周后可以获得 1 厘米左右的幼苗; 将分化出的幼苗移至生根培养基进行生根培养; 将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。分化培养基配方: 4.42g/L MS 粉末 + 0.5 g/L 水解酪蛋白+ 0.2 mg/L NAA + 2 mg/L KT + 3 %蔗糖+ 3 %山梨醇+30 mg/L 潮霉素 +0.1 g/L 肌醇+ 0.45 %植物凝胶, pH 5.8。生根培养基配方: 2.3g/L MS 粉末+ 3 %蔗糖+0.45 %植物凝胶。

4、HPPD 加倍苗 (T0 代) 的分子检测:

29 个加倍事件阳性愈伤经二轮分子鉴定后共分化得到 403 株 T0 代幼苗, 对这 403 株幼苗继续使用 8F+6R 引物对进行第三轮分子鉴定, 其中 56 株有阳性条带, 阳性苗移入温室培养, 其中部分 T0 苗 PCR 检测结果如图 8 所示。

5、HPPD 加倍苗 (T0 代) HPPD 抑制剂类除草剂抗性测试:

T0 代鉴定加倍事件阳性转化苗移栽到温室的大塑料桶里培育以扩繁 T1 代种子。在幼苗开始分蘖之后, 从生长旺盛的株系中掰取分蘖, 分别与野生型对照品种的同期分蘖栽种到同一花盆中, 待植株高度达到 20 厘米左右后, 进行除草剂抗性测试。所用除草剂为本公司生产的双唑草酮 (CAS 号: 1622908-18-2), 其田间剂量通常是每亩 4 克有效成分 (4 g a.i./mu)。本次实验双唑草酮的剂量设置为 2g, 4g, 8g, 32g 四个梯度, 采用步入式喷雾塔施药。

抗性检测结果如图 9 所示, 施药后 5 天-7 天, 野生型对照水稻苗开始显现白化症状, 而 HPPD 加倍事件各株系都保持正常绿色。施药 4 周之后, 野生型水稻苗接近死亡, 加倍事件各株系都继续保持绿色, 生长正常。测试结果说明 HPPD 基因加倍株系对双唑草酮的耐受性明显提高。

6、HPPD 加倍苗 (T0 代) HPPD 基因相对表达量定量检测:

推测 HPPD 基因加倍株系对双唑草酮的抗性提升是由于 UBI2 的强启动子与 HPPD 基因 CDS 融合提高了 HPPD 表达量引起的, 因此选择 T0 代株系 QY2091-13, QY2091-20, 分别对主分蘖和用于除草剂抗性测试的次级分蘖取样检测 HPPD 和 UBI2 基因的表达水平, 以野生型金粳 818 为对照。具体步骤如下:

1) 总 RNA 的提取 (Trizol 法):

取新鲜叶片 0.1-0.3g, 液氮研磨至粉末状, 每 50-100mg 组织加入 1 毫升 Trizol 试剂对组织进行裂解; 将上述组织的 Trizol 裂解液转入 1.5 毫升离心管中, 在室温 (15-30℃) 下放置 5 分钟; 按照每 1 毫升 Trizol 后加 0.2 毫升氯仿的量加入氯仿, 盖上离心管盖, 在手中用力震荡 15 秒, 在室温下 (15-30℃) 放置 2-3 分钟后, 12000g (4℃) 离心 15 分钟; 去上层水相置于新离心管中, 按照每 1 毫升 Trizol 加 0.5 毫升异丙醇的量加入异丙醇, 在室温下 (15-30℃) 放置 10 分钟后, 12000g (2-8℃) 离心 10 分钟; 弃上清, 按照每 1 毫升 Trizol 加 1 毫升 75% 乙醇进行洗涤, 涡旋混合, 7500g (2-8℃) 离心 5 分钟, 弃上清; 让沉淀的 RNA 在室温下自然干燥 30 分钟; 加入 50 µl RNase-free 水溶解 RNA 沉淀, 通过电泳分析及浓度测定后放于-80℃冰箱保存。

2) RNA 电泳分析:

制备浓度为 1%的琼脂糖凝胶, 然后吸取 1 µl RNA 与 1 µl 2X Loading Buffer (上样缓冲液) 混合后上样, 电压设置为 180V, 电泳时间 12 分钟, 电泳完成后, 取出琼脂糖凝胶, 在紫外凝胶成像系统中观察片段位置及亮度。

3) RNA 纯度检验:

用微量蛋白核酸分析仪测定 RNA 浓度, 较好的 RNA OD260/OD280 在 1.8-2.1 之间, 低于 1.8 说明蛋白质污染严重, 高于 2.1 说明 RNA 降解严重。

4) 实时荧光定量 PCR

通过专用反转录试剂盒, 将提取的总 RNA 反转录得到 cDNA。主要流程为: 先测定提取的总 RNA 浓度, 取 1-4 μ g RNA 的量用于反转录酶合成 cDNA。cDNA 于 -20 $^{\circ}$ C 保存。

①按照下表, 在冰上配制 RNA 模板溶液, 置于 PCR 仪进行变性、退火反应。此过程利于模板 RNA 的变性以及引物和模板特异性退火, 可以提高反转录效率。

表 1 反转录变性退火反应体系

组分	用量(μ l)
Oligo dT 引物 (50 μ M)	1 μ l
dNTP 混合物 (10mM each)	1 μ l
模板 RNA	1-4 μ g
RNase free 水	补足至 10 μ L
变性、退火反应条件:	
65 $^{\circ}$ C	5 分钟
4 $^{\circ}$ C	5 分钟

②按表 2 配制反转录反应体系, 合成 cDNA:

表 2 反转录反应体系

组分	用量(μ l)
上述变性、退火后反应液	10 μ l
5X RTase Plus Reaction Buffer	4 μ l
RNase Inhibitor	0.5 μ l
Evo M-MLV Plus RTase (200 U/ μ l)	1 μ l
RNase free 水	补足至 20 μ L
合成 cDNA 反应条件:	
42 $^{\circ}$ C	60 分钟
95 $^{\circ}$ C	5 分钟

③选用水稻的 UBQ5 基因作为内参基因, 以合成的 cDNA 为模板进行荧光定量 PCR。使用表 3 所列引物, 按表 4 配制反应液。

表 3 荧光定量引物序列 5'-3'

UBQ5-F	ACCACTTCGACCGCCACTACT
UBQ5-R	ACGCCTAAGCCTGCTGGTT
RT-OsHPPD-F	CAGATCTTCACCAAGCCAGTAG
RT-OsHPPD-R	GAGAAGTTGCCCTTCCCAA
RT-OsUbi2-F	CCTCCGTGGTGGTCAGTAAT

RT-OsUbi2-R GAACAGAGGCTCGGGACG

表 4 实时定量 PCR (Real Time PCR)反应液

混合物成分	用量(μl)
SYBR Premix ExTaq II	5 μl
正向引物(10μM)	0.2 μl
反向引物(10μM)	0.2 μl
cDNA	1 μl
Rox II	0.2μl
超纯水	3.4 μl
总计	10 μl

④按表 5 实时定量 PCR 反应步骤进行程序反应，反应程序为 40 个循环

表 5 实时定量 PCR 反应步骤

温度(°C)	时间
50°C	2 分钟
95°C	10 分钟
95°C	15 秒
60°C	20 秒
95°C	15 秒
60°C	20 秒
95°C	15 秒

5) 数据处理及实验结果

如表 6 所示，以 UBQ5 作为内参，目的基因的 Ct 值减去 UBQ5 的 Ct 值为 ΔCt ，之后计算 $2^{-\Delta Ct}$ ，代表目的基因的相对表达水平，818CK1，818CK3 为两个野生型金粳 818 对照植株；13M,20M 代表 QY2091-13,QY2091-20 T0 植株的主分蘖叶片样品；13L,20L 代表 QY2091-13, QY2091-20 T0 植株用于除草剂抗性测试的次级分蘖叶片样品。

表 6 不同基因 Ct 值及相对表达倍数

	UBQ5	平均值	UBI2	ΔCt	$2^{-\Delta Ct}$	平均值	HPPD	ΔCt	$2^{-\Delta Ct}$	平均值
	23.27		17.56	-5.88	58.95		20.81	-2.63	6.20	
	23.55		17.71	-5.73	53.09		21.01	-2.43	5.40	
818CK1	23.51	23.44	17.66	-5.78	55.06	55.70	20.98	-2.47	5.52	5.71
	23.45		17.88	-5.50	45.20		20.93	-2.44	5.43	
	23.19		17.94	-5.44	43.41		21.13	-2.24	4.74	
818CK3	23.49	23.37	17.72	-5.65	50.26	46.29	21.14	-2.24	4.72	4.96
	24.61		19.56	-4.92	30.32		20.23	-4.25	19.07	
	24.27		19.52	-4.96	31.05		20.29	-4.19	18.28	
13M	24.56	24.48	19.16	-5.32	39.97	33.78	20.48	-4.00	15.99	17.78
	23.98		18.76	-5.20	36.70		19.02	-4.94	30.64	
	23.89		18.52	-5.43	43.19		19.07	-4.89	29.56	

13L	24.00	23.96	18.81	-5.14	35.34	38.41	19.07	-4.88	29.45	29.88
	24.34		19.01	-5.40	42.30		19.37	-5.04	32.98	
	24.41		19.07	-5.34	40.64		19.33	-5.09	34.05	
20M	24.49	24.41	19.29	-5.13	35.00	39.32	19.26	-5.16	35.65	34.22
	24.63		19.46	-5.11	34.52		19.88	-4.69	25.83	
	24.67		19.38	-5.19	36.48		19.91	-4.66	25.31	
20L	24.41	24.57	19.42	-5.15	35.61	35.54	19.86	-4.71	26.16	25.77

结果如图 10 所示，以水稻 UBI2 为内参基因，对 OsHPPD 和 UBI2 基因的相对表达量进行测定，结果显示，HPPD 加倍株系与野生型相比 HPPD 表达量明显上升，说明融合的 UBI2 强启动子确实提高了 HPPD 的表达水平，形成了一个高表达的 HPPD 新基因，起到了敲高 HPPD 基因的作用。UBI2 的表达量略有下降，可能是由于在启动子区域的编辑产生的小范围突变对基因表达造成一定影响，我们也确实检测到 UBI2 靶点处的碱基插入、缺失或小片段删除。与野生型相比 UBI2 和 HPPD 表达量明显趋于一致，符合理论预期；其中 20M 样品的 HPPD 表达量较野生型 CK3 组最高提高 6 倍左右。

以上结果证明，根据原生质体中测试有效的染色体片段加倍方案，通过在农杆菌转化和组培过程中引入多轮分子鉴定，我们能够筛选出发生加倍事件的愈伤和转化苗，并且转化苗中产生的新 HPPD 基因融合的 UBI2 强启动子确实提高了 HPPD 基因的表达水平，能够使植株产生对 HPPD 抑制剂类除草剂双唑草酮的抗性，最高能达到大田剂量的 8 倍，创制出了敲高内源 HPPD 基因的抗除草剂水稻。以此为例，采用实施例 1，实施例 2 的染色体片段加倍技术方案也可对其它需要改变基因表达模式的内源基因引入所需的启动子加以融合创造新基因，在植物中可以通过农杆菌介导转化创制具有所需基因表达模式的新品种。

实施例 3 染色体片段加倍敲高内源 HPPD 基因表达抗除草剂水稻株系 T1 代的分子检测和除草剂抗性测试

野生型水稻基因组中 HPPD 基因与 UBI2 基因物理距离为 338kb，如图 1 方案 1 所示，两者间的染色体片段复制加倍后染色体长度增加了 338kb 在复制片段的接头处产生了 UBI2 启动子驱动 HPPD CDS 区的高表达 HPPD 新基因。为了确认新基因能否稳定遗传以及染色体片段加倍后对遗传稳定性的影响，我们对 HPPD 加倍株系的 T1 代进行了分子检测和除草剂抗性测试。

首先我们观察到加倍事件对 T0 代植株的育性没有明显影响，所有阳性 T0 株系都能正常结实。继续选择 QY2091-13，QY2091-20 株系进行 T1 代苗种植检测。

1、样品准备：

QY2091-13，共种植 36 株 T1 代苗，其中 27 株生长正常，9 株白化。取 32 株提 DNA 进行检测，编号 1-24 为正常苗，编号 25-32 为白化苗。

QY2091-20，共种植 44 株 T1 代苗。其中 33 株生长正常，11 株白化。取 40 株提 DNA 进行检测，编号 1-32 正常苗，编号 33-40 白化苗。

观察到 T1 代植株中出现白化苗，推测由于 HPPD 是植物合成叶绿素通路中的关键酶，双靶点编辑的 T0 代植株中可能存在染色体片段加倍，删除，倒位，编辑靶点处的小片段突变等多种基因型的嵌合，如果 HPPD 基因被破坏例如 HPPD CDS 区被删除，则植株会产生白化表型，设计不同的引物对进行 PCR 检测可能的基因型。

2、PCR 分子鉴定：

1) 检测引物序列：序列 5'-3'

Primer 8F: TCTGTGTGAAGATTATTGCCACTAGTTC

Primer 6R: GAGTTCCCCGTGGAGAGGT

Test 141-F: CCCCTTCCCTCTAAAAATCAGAACAG

Primer 4R: GGGATGCCCTCCTTATCTTGGATC

Primer 3F: CCTCCATTACTACTCTCCCCGATTC

Primer 7R: GTGTGGGGGAGTGGATGACAG

pg-Hyg-R1: TCGTCCATCACAGTTTGCCA

pg-35S-F: TGACGTAAGGGATGACGCAC

2) 上述引物结合位点见图 11，其中 Primer 8F+ Primer 6R 用于检测染色体片段加倍后 UBI2 启动子与 HPPD CDS 的融合片段，产物长度 630 bp；Test 141-F + Primer 4R 用于检测染色体片段删除事件，产物长度 222bp。pg-Hyg-R1+ pg-35S-F 用于检测编辑载体 T-DNA 片段，产物长度 660bp。

3) PCR 反应体系，反应程序和凝胶电泳检测参照实施例 1。

3、分子检测结果：

加倍和删除事件的检测结果如表 7 所示，可见 T1 代植株中染色体片段加倍事件和删除事件均有分布，不同株系之间比例有差异，QY2091-13 中加倍事件的比例 29/32 高于 QY2091-20 的 21/40，应该是由 T0 代植株中嵌合比例不同引起的，检测结果说明加倍产生的融合基因是可遗传的。

表 7 加倍和删除事件的检测结果

QY2091-20	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
加倍	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-
删除	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
加倍	-	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
删除	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+

QY2091-13	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
加倍	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
删除	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32								
加倍	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+								
删除	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+								

对上述 T1 苗使用 pg-Hyg-R1+ pg-35S-F 引物检测编辑载体 T-DNA 片段，QY2091-20-17 和 QY2091-13-7 PCR 电泳结果为 T-DNA 片段阴性，纯合加倍，可见加倍事件 T1 代中能够分离出加倍纯合的非转基因株系。

4、编辑事件测序检测：

对 QY2091-20，选择纯合加倍阳性 T1 代样品 1、5、7、11、18、19，对 QY2091-13，选择纯合加倍阳性 T1 代样品 1、3、7、9、10、12，测序加倍融合片段，同时扩增左侧 HPPD 靶点，右侧 UBI2 样品，送测序检测靶点处的编辑事件。其中 Primer 3F + Primer 7R 用于检

测左侧 HPPD 靶点编辑事件,野生型对照产物长度 481bp; Primer 8F+Primer 4R 用于检测右侧 UBI2 靶点编辑事件,野生型对照产物长度 329bp。

1) 加倍事件的基因型:

QY2091-13 检测 HPPD 加倍测序结果见 SEQ ID NO: 18, QY2091-20 检测 HPPD 加倍测序结果见 SEQ ID NO: 19, 如图 12 所示,与预测的加倍接头序列比对可见, QY2091-13 在接头处插入了一个 T 碱基, QY2091-20 在接头处删除了 19 个碱基,插入和删除都发生在 UBI2 的启动子区域,对 HPPD 蛋白编码区无影响。根据实施例 2 中的 HPPD 基因表达量检测结果,这些 UBI2 启动子融合 HPPD CDS 区的新 HPPD 基因表达量明显提高。

2) 两侧原始 HPPD 和 UBI2 靶点处的编辑事件:

两侧靶点处的编辑事件类型更多样,两个株系的 HPPD 启动子区存在单个碱基的插入, 17 个碱基的删除, 16 个碱基的删除三种编辑类型, UBI2 启动子区存在 7 个碱基的插入, 3 个碱基的删除两种编辑类型。用于检测取样的 T1 植株均为绿苗,生长正常,说明这些启动子区域的小范围突变对基因功能无明显影响,可以从后代中选育出抗除草剂的水稻品种。

5、T1 代幼苗的除草剂抗性测试:

对 QY2091 HPPD 加倍株系的 T1 代进行苗期的除草剂抗性测试,将 T1 代种子进行表面消毒后,在加入 1.2 μ M 双唑草酮的 1/2 MS 培养基上萌发,28 $^{\circ}$ C, 16 小时光照, 8 小时黑暗培养,以野生型金粳 818 为对照。

抗性检测结果如图 13 所示,光照培养 10 天后,野生型对照水稻苗显现白化症状,基本全部白化,而 HPPD 加倍事件株系 QY2091-7, 13, 20, 22 有黄化苗与绿苗的表型分离。根据前述分子检测结果, T1 代中存在基因型分离,不加除草剂处理就有白化苗出现,而绿苗在添加 1.2 μ M 双唑草酮之后,继续保持绿色,生长正常。该测试结果说明 HPPD 基因加倍株系对双唑草酮的高抗性能够稳定遗传到 T1 代。

实施例 4 通过诱导染色体片段倒位敲高内源 PPO 基因表达的编辑方法-水稻原生质体测试

水稻 PPO1 (也称 PPOX1) 基因 (如 SEQ ID NO: 7 所示,其中 1-1065bp 为启动子,其余为表达区) 位于 1 号染色体上,其下游 911kb 处为 calvin cycle protein CP12 基因 (如 SEQ ID NO: 8 所示,其中 1-2088bp 为启动子,其余为表达区),其方向与 PPO1 基因相对。根据国际水稻基因组测序计划 (International Rice Genome Sequencing Project) 提供的水稻基因表达谱数据 (<http://rice.plantbiology.msu.edu/index.shtml>) 分析,在水稻叶片中 CP12 基因表达强度是 PPO1 基因的 50 倍, CP12 基因启动子是一个在叶片中高表达的强启动子。

如图 4 所示方案 1,通过在两个基因各自的启动子和 CDS 区域之间同时造成双链断裂,经过筛选,可以获得两个断口之间区域倒置,将 PPO1 基因的启动子换成了 CP12 基因的启动子,提升 PPO1 基因的表达量,进而获得对 PPO 抑制剂类除草剂的抗性,选育抗除草剂品种。此外按照图 4 所示方案 2,先倒置再加倍,也可以创制由 CP12 基因的启动子驱动 PPO1 的新基因。

1、首先将水稻 PPO1 和 CP12 基因组 DNA 序列输入 CRISPOR 在线工具 (<http://crispor.tefor.net/>) 寻找可用的编辑靶点,经在线评分在 PPO1 和 CP12 基因各自的启动子和 CDS 区之间选择如下靶点进行测试:

靶点 sgRNA 名称	序列 (5' to 3')
OsPPO-guide RNA1	CCATGTCCGTCGCTGACGAG
OsPPO-guide RNA2	CCGCTCGTCAGCGACGGACA
OsPPO-guide RNA3	GCCATGGCTGGCTGTTGATG
OsPPO-guide RNA4	CGGATTTCTGCGTGTGATGT

其中 guide RNA1 和 guide RNA2 位于 PPO1 基因启动子与 CDS 区之间, 靠近 PPO1 蛋白起始密码子, guide RNA3 和 guide RNA4 位于 CP12 基因启动子与 CDS 区之间, 靠近 CP12 蛋白起始密码子。

参照实施例 1, 以 pHUE411 为骨架, 针对上述靶点设计引物构建双靶点载体:

引物编号	DNA 序列 (5' to 3')
OsPPO1-sgRNA1-F	ATATGGTCTCGGGCGCCATGTCCGTCGCTGACGAGGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG
OsPPO1-sgRNA2-F	ATATGGTCTCGGGCGCCGCTCGTCAGCGACGGACAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG
OsPPO1-sgRNA3-R	TATTGGTCTCTAAACCATCAACAGCCAGCCATGGCGCTTCTTGGTGCCGCGCCTC
OsPPO1-sgRNA4-R	TATTGGTCTCTAAACACATCACACGCAGAAATCCGGCTTCTTGGTGCCGCGCCTC

具体而言, 以 pCBC-MT1T2 质粒 (<https://www.addgene.org/50593/>) 为模板分别扩增 sgRNA1+3、sgRNA1+4、sgRNA2+3、sgRNA2+4 双靶点片段, 构建 sgRNA 表达盒。BsaI 酶切 pHUE411 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 pQY002095、pQY002096、pQY002097、pQY002098, 如下所示:

pQY002095	pHUE411-PPO-sgRNA1+3	含 OsPPO-guide RNA1, guide RNA3 组合
pQY002096	pHUE411-PPO-sgRNA2+3	含 OsPPO-guide RNA2, guide RNA3 组合
pQY002097	pHUE411-PPO-sgRNA1+4	含 OsPPO-guide RNA1, guide RNA4 组合
pQY002098	pHUE411-PPO-sgRNA2+4	含 OsPPO-guide RNA2, guide RNA4 组合

2、对上述 pQY002095-002098 载体制备高纯度、高浓度质粒, 具体操作参照实施例 1 步骤 2。

3、制备水稻原生质体并对上述载体进行 PEG 介导转化, 具体操作参照实施例 1 步骤 3。

4、进行基因组打靶和新基因产生情况检测, 使用下表中的检测引物进行 PCR 检测, 具体操作参照实施例 1 步骤 4。

引物	序列 (5' to 3')
OsPPOinversion-checkF1 (PPO-F1)	GCTATGCCGTCGCTCTTTCTC
OsPPOinversion-checkF2 (PPO-F2)	CGGACTTATTCCCACCAGAA
OsPPOinversion-checkR1 (PPO-R1)	GAGAAGGGGAGCAAGAAGACGT
OsPPOinversion-checkR2 (PPO-R2)	AAGGCTGGAAGCTGTTGGG
OsCPinversion-checkF1 (CP-F1)	CATTCCACCAAACCTCCCCTCTG
OsCPinversion-checkF2 (CP-F2)	AGGTCTCCTTGAGCTTGTCG
OsCPinversion-checkR1 (CP-R1)	GTCATCTGCTCATGTTTTACGGTC
OsCPinversion-checkR2 (CP-R2)	CTGAGGAGGCGATAAGAAACGA

其中 PPO-R2 和 CP-R2 组合用于扩增染色体片段倒位后右侧产生的 CP12 启动子驱动

PPO1 CDS 新基因片段, PPO-F2 和 CP-F2 组合用于扩增倒位后左侧产生的 PPO1 启动子驱动 CP12 CDS 新基因片段。双靶点编辑可能产生的基因型及分子检测引物的结合位点如图 14 所示。

5、PCR 和测序结果显示, 水稻原生质体转化获得了预期的 CP12 启动子驱动 PPO1 表达的新基因, 转化的水稻原生质体基因组 DNA 中能够检测到水稻 CP12 基因启动子与 PPO1 基因表达区融合的编辑事件, 说明通过染色体片段倒位形成新 PPO 基因的方案可行, 能够创制出强启动子驱动表达的 PPO 新基因, 定义为 PPO1 倒位事件。其中 pQY002095 载体转化原生质体检测染色体片段倒置测序结果如 SEQ ID NO: 15 所示; pQY002095 载体转化原生质体检测染色体片段删除测序结果如 SEQ ID NO: 16 所示; pQY002098 载体转化原生质体检测染色体片段倒置测序结果如 SEQ ID NO: 17 所示。

实施例 5 通过农杆菌介导转化创制染色体片段倒位敲高内源 PPO 基因表达的抗除草剂水稻

1、敲高编辑载体的构建: 根据原生质体测试的结果, 选择编辑效率高的 OsPPO-guide RNA1: 5'CCATGTCCGTCGCTGACGAG3'和 OsPPO-guide RNA4: 5'CGGATTCTGCGTGTGATGT3'双靶点组合, 构建农杆菌转化载体 pQY2234, 载体骨架采用 pHUE411 并进行水稻密码子优化, 载体图谱如图 16 所示。

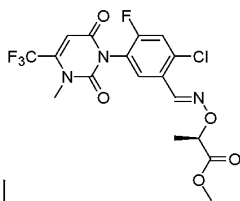
2、农杆菌转化水稻愈伤与二轮分子鉴定:

取 pQY2234 质粒按实施例 2 步骤 2 所述方法转化水稻愈伤, 受体品种为淮稻 5 号和金粳 818。在愈伤筛选阶段对潮霉素抗性愈伤进行二轮分子鉴定, 选择倒位事件阳性愈伤进行分化。在愈伤分子检测阶段, 我们用 PPO-R2 和 CP-R2 组合扩增染色体片段倒位后右侧产生的 CP12 启动子驱动 PPO1 CDS 新基因片段作为倒位事件阳性标准, 对倒位后左侧的 CP12 新基因在愈伤分化出苗后再予以考虑。共鉴定淮稻 5 号愈伤 734 个, 其中倒位事件阳性 24 个, 金粳 818 愈伤 259 个, 其中倒位事件阳性 29 个。图 17 显示了金粳 818 编号 192-259 愈伤的 PCR 检测结果。

3、共 53 个倒位事件阳性愈伤经二轮分子鉴定后共分化得到 9 个加倍事件阳性愈伤经二轮分子鉴定后共分化得到 1875 株 T0 代幼苗, 其中淮稻 5 号背景 768 株, 金粳 818 背景 1107 株, 对这 1875 株幼苗继续使用 PPO-R2 和 CP-R2 引物对进行第三轮分子鉴定, 其中淮稻 5 号背景有 184 株有倒位阳性条带, 金粳 818 背景有 350 株有倒位阳性条带, 阳性苗移入温室培养。

4、PPO1 倒位苗 (T0 代) PPO 抑制剂类除草剂抗性测试:

QY2234 T0 代鉴定倒位事件阳性转化苗移栽到温室的大塑料桶里培育以扩繁 T1 代种子。阳性苗数量较多, 所以选择部分 T0 苗与生长期、状态相近的野生型对照品种, 待植株高度达到 20 厘米左右后, 直接进行除草剂抗性测试。所用除草剂为本公司生产的高效 PPO 抑制



剂类除草剂

(代号 2081, 参见专利 CN202010281666.4), 本次实验其剂量

设置为 0.18, 0.4, 0.6 g a.i./mu 三个梯度, 采用步入式喷雾塔施药。

抗性检测结果如图 18 所示, 施药后 3-5 天, 野生型对照水稻苗从叶尖开始干枯, 叶片上出现坏死斑, 植株逐渐枯死, 而 PPO1 倒位事件多数株系保持正常生长, 叶片未见明显药害。另有部分株系出现药害, 可能是由于 T0 代株系编辑事件的多基因型嵌合, PPO1 表达量不高引起的。施药 2 周之后, 野生型水稻苗死亡, 倒位事件多数株系继续保持绿色, 生长正常。测试结果说明 PPO1 倒位株系能够明显提升植株对 2081 的耐受性。

5、PPO1 倒位苗 (T0 代) PPO1 基因相对表达量定量检测:

推测 PPO1 基因倒位株系对 2081 的抗性提升是由于 CP12 的强启动子与 PPO1 基因 CDS 融合提高了 PPO1 表达量引起的, 因此选择淮稻 5 号背景的 T0 代株系 QY2234-252, QY2234-304, QY2234-329 分别取主分蘖和次级分蘖取样检测 PPO1 和 CP12 基因的表达水平, 以野生型淮稻 5 号为对照。具体操作步骤参照实施例 2 步骤 6, 选用水稻 UBQ5 基因作为内参基因, 荧光定量引物如下: 5'-3'

UBQ5-F	ACCACTTCGACCGCCACTACT
UBQ5-R	ACGCCTAAGCCTGCTGGTT
RT-OsPPO1-F	GCAGCAGATGCTCTGTCAATA
RT-OsPPO1-R	CTGGAGCTCTCCGTCAATTAAG
RT-OsCP12-F1	CCGGACATCTCGGACAA
RT-OsCP12-R1	CTCAGCTCCTCCACCTC

以 UBQ5 作为内参, 目的基因的 Ct 值减去 UBQ5 的 Ct 值为 ΔCt , 之后计算 $2^{-\Delta Ct}$, 代表目的基因相对表达水平, H5CK1、H5CK2 为两个野生型淮稻 5 号对照植株, 252M、304M、329M 代表 QY2234-252, QY2234-304、QY2234-329 T0 植株的主分蘖叶片样品, 252L、304L、329L 代表次级分蘖叶片样品。结果见下表 8:

表 8 不同基因 Ct 值及相对表达倍数

	UBQ5	平均值	PPO1	ΔCt	$2^{-\Delta Ct}$	平均值	CP12	ΔCt	$2^{-\Delta Ct}$	平均值
	28.18		25.83	-2.43	5.39		22.28	-3.98	15.77	
	28.37		25.98	-2.28	4.85		22.06	-4.20	18.44	
H5CK1	28.23	28.26	25.93	-2.33	5.03	5.09	22.11	-4.15	17.76	17.32
	28.23		25.73	-2.36	5.15		21.63	-6.47	88.58	
	27.98		26.02	-2.07	4.20		21.53	-6.57	94.87	
H5CK2	28.07	28.09	25.92	-2.18	4.52	4.62	21.54	-6.55	93.83	92.43
	25.51		25.17	-0.54	1.45		22.26	-3.45	10.95	
	25.82		25.22	-0.49	1.41		22.36	-3.36	10.23	
252M	25.80	25.71	25.22	-0.49	1.41	1.42	22.43	-3.29	9.76	10.31
	26.41		23.36	-3.14	8.84		22.30	-4.21	18.49	
	26.64		23.41	-3.10	8.56		21.95	-4.56	23.55	
252L	26.47	26.51	23.46	-3.05	8.28	8.56	21.78	-4.73	26.47	22.84
	25.74		24.55	-1.29	2.44		22.51	-3.32	10.02	
	25.99		24.53	-1.31	2.48		22.45	-3.39	10.47	
304M	25.78	25.84	24.48	-1.36	2.57	2.50	22.56	-3.28	9.71	10.07
	25.97		23.63	-2.36	5.14		21.60	-4.39	20.97	
	26.00		23.75	-2.25	4.74		21.43	-4.56	23.55	

304L	26.00	25.99	23.56	-2.43	5.39	5.09	22.32	-3.68	12.78	19.10
	26.94		23.11	-3.89	14.84		22.23	-4.76	27.16	
	26.99		23.25	-3.75	13.42		21.85	-5.15	35.39	
329M	27.07	27.00	23.22	-3.78	13.71	13.99	21.82	-5.18	36.29	32.95
	26.50		23.64	-2.63	6.19		22.00	-4.27	19.30	
	26.52		23.74	-2.53	5.79		21.97	-4.30	19.71	
329L	25.79	26.27	23.77	-2.50	5.65	5.87	22.15	-4.12	17.42	18.81

不同株系 PPO1 和 CP12 的相对表达量如图 19 所示, 结果显示, 与实施例 2 中的加倍事件不同的是, 倒位事件各个株系间的基因表达水平有明显差异。两个淮稻 5 号 CK 组之间 CP12 的表达量差异很大, 可能是苗期生长阶段或不同导致的表达量差异。实验组与 H5CK2 对照组相比 CP12 的表达量都有下降趋势, 其中 252L、329M 的 PPO1 的表达水平明显上升, 304L、329L PPO1 的表达水平有所提高, 而 252M、304M PPO1 的表达量下降。与染色体片段加倍主要提高基因表达水平不同, 染色体片段倒位在左右两侧都产生了新基因, 在两侧靶点处可能有发生多种编辑事件, 同时转录方向的改变可能对基因表达量也有影响, 所以 T0 代植株是复杂的嵌合体, 同一植株的主分蘖和次级分蘖之间的基因表达量可能也有明显差异, 从定量 PCR 的结果来看, PPO1 倒位事件有较高比率上调 PPO1 基因的表达, 对倒位事件进行抗除草剂筛选能够从中筛选出高表达 PPO1 抗除草剂的株系。

以上结果证明, 根据原生质体中测试有效的染色体片段倒位方案, 通过在农杆菌转化和组培过程中引入多轮分子鉴定, 我们能够筛选出发生倒位事件的愈伤和转化苗, 并且转化苗中产生的新 PPO1 基因融合的 CP12 强启动子确实可以提高 PPO1 基因的表达水平, 能够使植株产生对 PPO 抑制剂类除草剂 2081 的抗性, 创制出了敲高内源 PPO 基因的抗除草剂水稻。以此为例, 采用实施例 4, 实施例 5 的染色体片段倒位技术方案也可对其它需要改变基因表达模式的内源基因引入所需的启动子加以融合创造新基因, 在植物中可以通过农杆菌介导转化创制具有所需基因表达模式的新品种。

实施例 6 染色体片段倒位敲高内源 PPO1 基因表达抗除草剂水稻株系 T1 代的分子检测和除草剂抗性测试

野生型水稻基因组 PPO1 基因与 CP12 基因物理距离为 911kb, 如图 14 所示, 两者间的染色体片段倒位后在右侧产生了 CP12 启动子驱动 PPO1 CDS 区的高表达 PPO1 新基因, 也有可能发生染色体片段的删除。为了确认新基因能否稳定遗传以及染色体片段倒位后对遗传稳定性的影响, 我们对 PPO1 倒位株系的 T1 代进行了分子检测和除草剂抗性测试。

首先我们观察到倒位事件对 T0 代植株的育性没有明显影响, 所有阳性 T0 株系都能正常结实。选择淮稻 5 号背景的 QY2234/H5-851 株系 T1 代进行检测。

1、样品准备:

QY2234/H5-851, 共种植 48 株 T1 代苗, 均生长正常。

2、PCR 分子鉴定:

1) 检测引物序列: 5'-3'

PPO-R2: AAGGCTGGAAGCTGTTGGG

CP-R2: CTGAGGAGGCGATAAGAAACGA

PPO-F2: CGGACTTATTTCCCACCAGAA

CP-F2: AGGTCTCCTTGAGCTTGTCG

pg-Hyg-R1: TCGTCCATCACAGTTTGCCA

pg-35S-F: TGACGTAAGGGATGACGCAC

2)上述引物结合位点见图 14,其中 PPO-R2+ CP-R2 用于检测染色体片段倒位后右侧 CP12 启动子与 PPO1 编码区融合片段,产物长度 507bp; PPO-F2+ CP-F2 用于检测染色体片段倒位后左侧 PPO1 启动子与 CP12 编码区融合片段,产物长度 560bp; PPO-F2+ PPO-R2 用于检测倒位前左侧 PPO 靶点,野生型对照产物长度 586bp; CP-F2+ CP-R2 用于检测倒位前右侧 CP12 靶点,野生型对照产物长度 481bp。pg-Hyg-R1+ pg-35S-F 用于检测编辑载体 T-DNA 片段,产物长度 660bp。

3) PCR 反应体系及反应条件:

反应体系 (10 μ L 体系) :

2*KOD buffer	5μL
2mM dNTPs	2μL
KOD 酶	0.2μL
Primer F	0.2μL
Primer R	0.2μL
水	2.1μL
样品	0.3μL

反应条件:

94℃	2 分钟	
98℃	20 秒	} 40 个循环
60℃	20 秒	
68℃	20 秒	
68℃	2 分钟	
12℃	5 分钟	

PCR 产物 1%琼脂糖凝胶电泳, 电压 180V, 10 分钟。

3、分子检测结果:

检测结果如表 9 所示，共检测 48 株，其中纯合倒位 12 株（2/7/11/16/26/36/37/40/41/44/46/47），杂合倒位 21 株（1/3/4/5/6/8/9/15/17/20/22/23/24/27/30/31/33/34/39/42/43），纯合非倒位植株 15 株（10/12/13/14/18/19/21/25/28/29/32/35/38/45/48）。纯合倒位：杂合倒位：纯合非倒位比例 1 : 1.75 : 1.25，约合 1:2:1，检测结果符合孟德尔遗传定律，说明倒位产生的 PPO1 新基因是可遗传的。

表 9 分子检测结果

[illegible]

倒位左侧	+	+	+	+	-	+	+	-
PPO WT	-	+	+	-	+	-	-	+
CP12 WT	-	+	+	-	+	-	-	+

对上述 T1 苗使用 pg-Hyg-R1+ pg-35S-F 引物检测编辑载体 T-DNA 片段，其中 16、41 电泳结果为 T-DNA 片段阴性，纯合倒位，可见倒位事件 T1 代中能够分离出倒位纯合的非转基因株系。

4、编辑事件测序检测：

对倒位事件基因型的检测重点关注右侧新 PPO 基因的编辑事件，保留 PPO1 基因蛋白编码框完整的突变类型，对左侧 CP12 位点编辑事件通过温室和田间表型观察不影响植株正常生长即可保留，以下列出了在倒位事件阳性株系中检测到的编辑事件基因型，无缝代表与预测的倒位后融合片段序列完全一致，淮稻 5 号为背景的 QY2234 倒位成功基因型如下：

编号	基因型	编号	基因型
2234/H5-295	右侧-1bp；左侧-32bp	2234/H5-650	右侧无缝；左侧+1bp（G）
2234/H5-381	右侧+18bp	2234/H5-263	右侧无缝；左侧无缝
2234/H5-410	右侧-1bp；左侧+1bp	2234/H5-555	右侧-23bp
2234/H5-159	右侧-16bp	2234/H5-645	右侧-5bp，+20bp，
2234/H5-232	右侧-4bp		

其中部分测序峰图与序列比对结果见图 20。

金粳 818 为背景的 QY2234 倒位成功基因型如下：

编号	右侧 PPO 基因型	编号	右侧 PPO 基因型
2234/818-5	右侧无缝	2234/818-144	右侧+1bp
2234/818-42	右侧-16bp	2234/818-151	右侧+2bp，-26bp，纯峰
2234/818-108	右侧-15bp	2234/818-257	右侧+1bp
2234/818-134	右侧+5bp，-15bp		

其中部分测序峰图与序列比对结果见图 21。

以上不同新 PPO1 基因 CP12 启动子与 PPO1 编码区融合片段测序结果见 SEQ ID NO: 20，SEQ ID NO: 21，SEQ ID NO: 22，SEQ ID NO: 23，SEQ ID NO: 24，SEQ ID NO: 25，SEQ ID NO: 26。

5、T1 代幼苗的除草剂抗性测试：

对 QY2234/H5-851 PPO1 倒位株系的 T1 代进行苗期的除草剂抗性测试，以野生型淮稻 5 号为对照，与倒位株系 T1 代种子同时种植，幼苗株高达到 15 厘米后，喷施 2081 处理，药物浓度设置 0.3，0.6，0.9，1.2 g a.i./mu 四个梯度，培养条件 28℃，16 小时光照，8 小时黑暗。

抗性检测结果如图 22 所示，施药 5 天后，野生型对照水稻苗在 0.3 g a.i./mu 剂量下即表现明显药害，从叶尖开始干枯，叶片上出现坏死斑，在 0.6 g a.i./mu 剂量下植株很快枯死。而 QY2234/H5-851 T1 苗在 0.3 g a.i./mu 剂量下能保持正常生长，叶片未见明显药害，在 0.6 和 0.9 g a.i./mu 剂量下，部分 T1 苗出现叶尖干枯的药害表现，但多数 T1 苗能保持绿色继续生长，而对照基本枯死。在 1.2 g a.i./mu 剂量下，对照已完全死亡，T1 苗还有部分能保持绿色继续生长。该测试结果说明 PPO1 基因倒位株系对 2081 的抗性能够稳定遗传到 T1 代。

实施例 7 在植物中敲高内源 EPSPS 基因表达的编辑方法

EPSPS 是植物中芳香族氨基酸合成通路中的关键酶，是灭生性除草剂草甘膦的靶点。高表达 EPSPS 基因可以赋予植物对草甘膦的抗性。EPSPS 基因（如 SEQ ID NO: 4 所示，其中 1-1897bp 为启动子，其余为表达区）位于水稻 6 号染色体上，其上游基因为转酮醇酶 transketolase（TKT，如 SEQ ID NO: 3 所示，其中 1-2091bp 为启动子，其余为表达区），方向与 EPSPS 基因相反。TKT 基因在叶片中的表达强度是 EPSPS 基因的 20-50 倍。如图 2 所示，通过在两个基因各自的启动子和 CDS 区域之间同时造成双链断裂，经过筛选，可以获得两个断口之间区域倒置（方案 1），或倒置加倍（方案 2）的情形。这两种情形均会将 EPSPS 基因的启动子换成 TKT 基因的启动子，提升 EPSPS 基因的表达量，进而获得对草甘膦的抗性。此外，图 2 中所示的方案 3, 4, 5 也可以分别创制出 TKT 基因启动子驱动 EPSPS 的新基因。EPSPS 与 TKT 相邻且方向相对的基因结构在单子叶植物中保守（表 10），在双子叶植物二者也是相邻，方向相同；因此该方法在植物中具有通用性。

表 10 不同植物中 EPSPS 基因与相邻的 TKT 基因的距离

物种	位置（染色体）	CD 区起始位置距离（kb）	方向
水稻	6	4	反向<TKT-EPSPS>
小麦	7A	35	反向<TKT-EPSPS>
	7D	15	反向<TKT-EPSPS>
	4A?	50	反向<TKT-EPSPS>
玉米	9	22	反向<TKT-EPSPS>
二穗短柄草	1	5	反向<TKT-EPSPS>
高粱	10	15	反向<TKT-EPSPS>
谷子	4	5	反向<TKT-EPSPS>
大豆	3	6	顺向 TKT>EPSPS>
番茄	5	6	顺向 TKT>EPSPS>
花生	2	6	顺向 TKT>EPSPS>
	12	5	顺向 TKT>EPSPS>
棉花	9	22	顺向 TKT>EPSPS>
苜蓿	4	8	顺向 TKT>EPSPS>
拟南芥	2	5	顺向 TKT>EPSPS>
葡萄	15	17	顺向 TKT>EPSPS>

为此，以 pHUE411 为骨架，以如下靶点为目标：

靶点 sgRNA 名称	序列（5' to 3'）
OsEPSPS-guide RNA1	CCACACCACTCCTCTCGCCA
OsEPSPS-guide RNA2	CCATGGCGAGAGGAGTGGTG
OsEPSPS-guide RNA3	ATGGTCGCCGCCATTGCCGG
OsEPSPS-guide RNA4	GACCTCCACGCCGCCGGCAA
OsEPSPS-guide RNA5	TAGTCATGTGACCATCCCTG
OsEPSPS-guide RNA6	TTGACTCTTTGGTTCATGCT

构建了多个不同的双靶点载体：

pQY002061	pHUE411-EPSPS-sgRNA1+3
pQY002062	pHUE411-EPSPS-sgRNA2+3
pQY002063	pHUE411-EPSPS-sgRNA1+4
pQY002064	pHUE411-EPSPS-sgRNA2+4
pQY002093	pHUE411-EPSPS-sgRNA2+5
pQY002094	pHUE411-EPSPS-sgRNA2+6

（2）使用下表中的相关检测引物，扩增含有两侧靶位点的片段或预测的 UBI2 的启动子和 HPPD 编码区融合产生的片段，产物长度为 300-1000 bp 之间。

引物	序列（5' to 3'）
EPSPS _{inversion} checkF1	ATCCAAGTTACCCCCTCTGC
EPSPS _{inversion} checkR1	CACAAACACAGCCACCTCAC
EPSPS _{inversion} check-nestF2	ATGTCCACGTCCACACCATA
EPSPS _{inversion} check-nestR2	AATGGAATTCACGCAAGAGG
EPSPS _{inversion} checkF3	GTAGGGGTTCTTGGGGTTGT
EPSPS _{inversion} checkR3	CGCATGCTAACTTGAGACGA
EPSPS _{inversion} check-nestF4	GGATCGTGTTACCGACTTC
EPSPS _{inversion} check-nestR4	CCGGTACAACGCACGAGTAT
EPSPS _{inversion} checkF5	GGCGTCATTCCATGGTTGATTGT
EPSPS _{inversion} checknestF6	GATAGACCCAGATGGGCATAGAATC
EPSPS _{inversion} checkR5	TGCATGCATTGATGGTTGGTGC
EPSPS _{inversion} checknestR6	CCGGCCCTTAGAATAAAGGTAGTAG

经过原生质转化，测试结果表明获得了预期倒置的事件，如图 15 所示，pQY002062 载体转化原生质体检测倒置测序结果如 SEQ ID NO: 11 所示；pQY002062 载体转化原生质体检测删除测序结果如 SEQ ID NO: 12 所示；pQY002093 载体转化原生质体检测倒置测序结果如 SEQ ID NO: 13 所示；pQY002093 载体转化原生质体检测删除测序结果如 SEQ ID NO: 14 所示。

将这些载体转至农杆菌中，转化水稻愈伤，获得了含有新 EPSPS 基因的植株，除草剂生测表明该植株对草甘膦除草剂具有明显的抗性。

实施例 8 在拟南芥中敲高内源 PPO 基因表达的编辑方法

原卟啉原氧化酶（PPO）是除草剂的主要靶点之一。高表达植物内源 PPO，即可显著提升对 PPO 抑制剂类除草剂的抗性。拟南芥 PPO 基因（如 SEQ ID NO: 1 所示，其中 1-2058bp 为启动子，其余为表达区）位于 4 号染色体上，其下游 1.9M 处是 ubiquitin10 基因（如 SEQ ID NO: 2 所示，其中 1-2078bp 为启动子，其余为表达区），并且与 PPO 基因的方向相同。

如图 3 所示方案，通过同时在 PPO 和 ubiquitin10 基因的启动子和 CDS 区之间的位置产生双链断裂，经过筛选可以获得两个断口之间区域加倍的事件，即 ubiquitin10 的启动子和 PPO 的编码区融合在一起的新基因。此外，按照图 1 中所示的方案 2，也可以创制出 ubiquitin10 的启动子和 PPO 的编码区融合在一起的新基因。

为此，以 pHEE401E 为骨架（<https://www.addgene.org/71287/>），针对如下靶点：

靶点 sgRNA 名称	序列 (5' to 3')
AtPPO-guide RNA1	CAAACCAAAGAAAAAGTATA
AtPPO-guide RNA2	GGTAATCTTCTTCAGAAGAA
AtPPO-guide RNA3	ATCATCTTAATTCTCGATTA
AtPPO-guide RNA4	TTGTGATTTCTATCTAGATC

按照“Wang ZP, Xing HL, Dong L, Zhang HY, Han CY, Wang XC, Chen QJ. Egg cell-specific promoter-controlled CRISPR/Cas9 efficiently generates homozygous mutants for multiple target genes in Arabidopsis in a single generation. *Genome Biol.* 2015 Jul 21;16:144.”所述方法, 构建双靶点载体:

pQY002076	pHEE401E-AtPPO-sgRNA1+3
pQY002077	pHEE401E-AtPPO-sgRNA1+4
pQY002078	pHEE401E-AtPPO-sgRNA2+3
pQY002079	pHEE401E-AtPPO-sgRNA2+4

按照如下方法转化拟南芥:

(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。

(2) 农杆菌侵染液的制备

1) 挑取活化的农杆菌接种于 30 毫升 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) 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 20cm 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减去。

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。

(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。

(5) 转基因植株的筛选

种子经过消毒液处理 5 分钟, 用 ddH₂O 洗 5 遍后均匀铺于 MS 筛选培养基(含 30μg/毫升 Hyg、100μg/毫升 Cef)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/m²/s, 湿度 75%), 一周后选取阳性幼苗移栽至土壤。

(6) T1 突变植株的检测

(6.1) 基因组 DNA 提取

1) 剪取拟南芥叶片约 200mg 于 2 毫升离心管中, 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 400 μ L SDS 提取缓冲液, 上下颠倒混匀, 置于 65 $^{\circ}$ C 水浴锅中孵育 15 分钟, 期间每隔 5 分钟颠倒混匀一次。

3) 13000rpm 离心 5 分钟。

4) 吸取 300 μ L 上清液转移至一新的 1.5 毫升离心管中, 向离心管中加入等体积经过 -20 $^{\circ}$ C 预冷的异丙醇, 将离心管置于 -20 $^{\circ}$ C 1 小时或者过夜。

5) 13000rpm 离心 10 分钟, 去掉上清液。

6) 向离心管中加入 500 μ L 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 30 μ L ddH₂O 溶解 DNA, 置于 -20 $^{\circ}$ C 保存 DNA。

(6.2) 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 5 μ L 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。

测序结果表明, 在拟南芥中成功实现了 AtPPO1 基因加倍, 除草剂抗性测试表明加倍的植株具有对 PPO 除草剂的抗性。

实施例 9 在斑马鱼中创制具有新表达特性的 GH1 基因

鱼类中生长激素(growth hormone; GH)基因, 控制其生长发育速度。目前通过转基因技术在大西洋三文鱼中高表达 GH 基因能够将其生长速度显著提升, 具有极大的应用价值, 但是经过了数十年才通过审批上市。GH1 基因是斑马鱼中的生长激素基因。本发明将斑马鱼中合适的启动子(持续表达、强度适宜、组织特异性适宜)在体内通过删除、倒置、加倍、倒置加倍、染色体转移等方式融合在一起, 创造出一个生长迅速的鱼类品种。

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。