

## (12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织  
国际局

(43) 国际公布日  
2018年6月7日 (07.06.2018)



(10) 国际公布号  
**WO 2018/099256 A1**

(51) 国际专利分类号:  
*CI2N 15/82* (2006.01) *A01H 5/00* (2018.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2017/110349

(22) 国际申请日: 2017年11月10日 (10.11.2017)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:  
201611091107.7 2016年12月1日 (01.12.2016) CN

(71) 申请人: 中国农业科学院作物科学研究所 (INSTITUTE OF CROP SCIENCES, CHINESE ACADEMY OF AGRICULTURAL SCIENCES) [CN/CN]; 中国北京市海淀区中关村南大街12号中国农业科学院作物科学研究所, Beijing 100081 (CN)。

(72) 发明人: 夏兰琴 (XIA, Lanqin); 中国北京市海淀区中关村南大街12号中国农业科学院作物科学研究所, Beijing 100081 (CN)。 李晶莹 (LI, Jingying); 中国北京市海淀区中关村南大街12号中国农业科学院作物科学研究所, Beijing 100081 (CN)。 赵云德 (ZHAO, Yunde); 中国北京市海淀区中关村南大街12号中国农业科学院作物科学研究所, Beijing 100081 (CN)。 孙永伟 (SUN, Yongwei); 中国北京市海淀区中关村南大街12号中国农业科学院作物科学研究所, Beijing 100081 (CN)。

(74) 代理人: 北京纪凯知识产权代理有限公司 (JEEKAI&PARTNERS); 中国北京市丰台区广安路9号5号楼15A层, Beijing 100055 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

- 包括国际检索报告 (条约第21条 (3))。
- 包括说明书序列表部分 (细则5.2(a))。

(54) Title: APPLICATION OF CRISPR/NCAS9 MEDIATED SITE-DIRECTED BASE SUBSTITUTION IN PLANTS

(54) 发明名称: 一种CRISPR/nCas9介导的定点碱基替换在植物中的应用

(57) Abstract: A CRISPR/nCas9 mediated site-directed base substitution applied to plants. The site-directed base substitution is achieved by a system of site-directed editing plant genomes, and the system comprises a BE3 plant expression vector expressing a fusion protein composed of nCas9 (D10A), deaminase, and a uracil DNA glycosylase inhibitory protein, and the system was verified by using rice OsPDS and OsSBEIIb as target genes. The results showed that among three selected target sites, expected site-directed mutant plants were all obtained, accurate site mutation of the base in rice was achieved, and the highest efficiency reached about 20%, thus providing a feasible and effective method of base substitution for crop breeding. The method has strong potential for application in agricultural breeding and provides a basis for rapidly improving important agronomic traits of crops.

(57) 摘要: 一种CRISPR/nCas9介导的定点碱基替换在植物中的应用。所述定点碱基替换通过定点编辑植物基因组的系统实现, 该系统包括BE3植物表达载体, BE3植物表达载体表达由nCas9(D10A)、脱氨酶和尿嘧啶DNA糖基化酶抑制蛋白组成的融合蛋白, 并以水稻OsPDS和OsSBEIIb为靶基因对该系统进行验证。结果表明, 在所选的3个靶点中, 均获得预期定点突变植株, 在水稻中实现了碱基的精确的点突变, 且效率最高达到20%左右, 为农作物育种提供了一种可行的有效的碱基替换方法, 在农业育种方面具有强大的应用潜力, 为快速改良农作物重要农艺性状提供了基础。

WO 2018/099256 A1

## 一种 CRISPR/nCas9 介导的定点碱基替换在植物中的应用

### 技术领域

本发明涉及生物技术领域，具体涉及一种 CRISPR/nCas9 介导的定点  
5 碱基替换在植物中的应用。

### 背景技术

CRISPR/Cas9介导的基因组编辑技术已经成为分子生物学中最强大的  
工具之一。首次在细菌中发现，由sgRNA和Cas9两部分组成（Jinek et al.,  
2012）。CRISPR/Cas9是通过自身的核酸内切酶活性引起靶位点DNA序列双  
10 链断裂（double-strand breaks, DSBs），然后通过非同源末端连接  
（non-homologous end joining, NHEJ）或同源重组介导的修复  
（homology-directed repair, HDR）两种方式引入突变。NHEJ途径诱导  
产生的突变大部分为核苷酸的插入或缺失，造成移码突变，而HDR则由同  
源供体DNA介导片段插入或核苷酸修正（Jinek et al., 2012）。CRISPR/Cas9  
15 系统对靶位点的识别依赖于核酸之间碱基互补配对，可对任何紧随PAM  
（NGG）的20bp的靶点序列进行编辑，且其靶点在基因组中的分布频率很  
高，因此对于需要定点编辑的靶基因，更容易找到合适的靶位点。另外  
CRISPR/Cas9系统可同时对同一基因的不同位点或多个基因的位点进行定  
向编辑，使其运用更加灵活。此外，CRISPR/Cas9系统操作简单快捷，每  
20 次打靶只需替换原有载体上20-30 bp的核苷酸序列，更适宜规模化，高通  
量操作（Cong et al., 2013; Feng et al., 2014; Gao and Zhao, 2014;  
Zhou et al., 2014; Lawrenson et al., 2015; Liu et al., 2015; Ma et  
al., 2015; Wang et al., 2015; Xie et al., 2015; Paul III and Qi,  
2016）。随着CRISPR/Cas9 技术在人类与动物细胞系中建立并应用，经过  
25 改造的CRISPR/Cas9系统也迅速地被应用到拟南芥、烟草、高粱、水稻、  
小麦、玉米等不同植物基因组的定向编辑研究中，并且获得较高的诱导突  
变率和可稳定遗传的基因组编辑植株（Shan et al., 2013; Puchta and  
Fauser, 2014; Voytas and Gao, 2014; Li et al., 2015; Ma et al., 2015;  
Svitashev et al., 2015; Endo et al., 2016; Gao et al., 2016; Sun  
30 et al., 2016）。

尽管CRISPR/Cas9作为一种新的靶向基因修饰技术，展现了广阔的发展潜力和应用前景，并在农作物改良中得到广泛应用，但目前主要局限于基因随机突变和敲除。农作物中含有大量农艺性状是由单碱基的突变导致，传统CRISPR/Cas9技术引入DSB后，与非同源末端连接的随机过程相比，HDR总是以相当低的频率发生，只有少数报道表明CRISPR/Cas9介导的HDR在作物中可行（Li et al., 2015; Svitashv et al., 2015; Endo et al., 2016; Shi et al., 2016; Sun et al., 2016），使得大量农艺性状无法得到快速的改良。

Nishida et al. (2016) 将dCas9或nicked-Cas9 (nCas9, D10A) 与来自七鳃鳗 (sea lamprey) 免疫系统的激活诱导性胞苷脱氨酶 (activation-induced cytidine deaminase, AID) 融合在一起。在正常情况下，这种AID酶在免疫球蛋白和抗体基因中产生突变从而让免疫系统具有多样性。AID作用在单链DNA上，将胞嘧啶 (C) 替换为尿嘧啶 (U)，随后在一轮DNA复制中，这种尿嘧啶 (U) 被转化为胸腺嘧啶 (T)。研究表明当在向导RNA (gRNA) 的引导下，这种蛋白复合物靶向作用于CAN1基因，而且相对于非靶向的选择性标志物，CAN1基因发生突变的频率增加了1000倍。利用全基因组测序，研究人员发现很少的脱靶突变，只比背景突变率略有增加。Komor et al. (2016) 将nCas9 (D10A) 与胞苷脱氨酶融合，在gRNA的指导下，nCas9 (D10A) 到达指定位点，可作为“单碱基编辑器”将在非目标链的第4-8位目标胞嘧啶定点替换。通过DNA复制或修复后，胞嘧啶被转化成胸腺嘧啶，最终由C突变成T，或者G突变成A。

### 发明公开

本发明的一个目的是提供如下 (1) - (7) 中任一种所述的应用：

(1) CRISPR/Cas9 系统、胞苷脱氨酶和植物基因表达启动子在定点编辑植物或农作物基因中的应用；

所述植物基因表达启动子启动 CRISPR/Cas9 系统中 Cas9 核酸酶和胞苷脱氨酶的表达；

(2) CRISPR/Cas9 系统和胞苷脱氨酶在定点编辑植物或农作物基因中的应用；

(3) 由 Cas9 核酸酶和胞苷脱氨酶组成的融合蛋白、待编辑基因的

sgRNA 和植物基因表达启动子在定点编辑植物或农作物基因中的应用；

所述植物基因表达启动子驱动由所述 Cas9 核酸酶和所述胞苷脱氨酶组成的融合蛋白基因的表达；

(4) CRISPR/Cas9 系统、胞苷脱氨酶、尿嘧啶 DNA 糖基化酶抑制蛋白  
5 和植物基因表达启动子在定点编辑植物或农作物基因中的应用；

所述植物基因表达启动子启动 CRISPR/Cas9 系统中 Cas9 核酸酶、胞苷脱氨酶和尿嘧啶 DNA 糖基化酶抑制蛋白的表达；

(5) CRISPR/Cas9 系统、胞苷脱氨酶和尿嘧啶 DNA 糖基化酶抑制蛋白在定点编辑植物或农作物基因中的应用；

(6) 由 Cas9 核酸酶、胞苷脱氨酶和尿嘧啶 DNA 糖基化酶抑制蛋白组成的融合蛋白、待编辑基因的 sgRNA 和植物基因表达启动子在定点编辑植物或农作物基因中的应用；

所述植物基因表达启动子驱动由所述 Cas9 核酸酶、所述胞苷脱氨酶和所述尿嘧啶 DNA 糖基化酶抑制蛋白组成的融合蛋白的编码基因的表达；

(7) 由 Cas9 核酸酶、胞苷脱氨酶、连接所述 Cas9 核酸酶与所述胞苷脱氨酶的连接肽和尿嘧啶 DNA 糖基化酶抑制蛋白组成的融合蛋白、待编辑基因的 sgRNA 和植物基因表达启动子在定点编辑植物或农作物基因中的应用；

所述植物基因表达启动子驱动由所述 Cas9 核酸酶、所述胞苷脱氨酶、所述连接肽和所述尿嘧啶 DNA 糖基化酶抑制蛋白组成的融合蛋白的编码基因  
20 的表达。

上述应用中，所述胞苷脱氨酶为 APOBEC1，其编码基因序列为序列 1 第 4838-5524 位。

上述应用中，所述尿嘧啶 DNA 糖基化酶抑制蛋白为 Uracil DNA glycosylase inhibitor，其编码基因序列为序列 1 第 429-688 位。

上述应用中，所述植物基因表达启动子为玉米 Ubiquitin 启动子，其核苷酸序列为序列 1 第 5545-7535 位。

上述应用中，所述 Cas9 核酸酶为 nCas9 (D10A)，其编码基因序列为序列 1 第 689-4789 位。

上述应用中，所述连接肽的编码基因序列为序列 1 第 4790-4837 位；  
30 所述融合蛋白的编码基因序列为序列 1 第 392-5524 位；

所述待编辑基因为 *OsSBE11b* 和 *OsPDS*;

所述 sgRNA 的核苷酸序列为序列 1 第 7785-8268 位或序列 2 第 7785-8268 位或序列 3 第 7785-8268 位。

本发明的另一个目的是提供一种定点编辑植物或农作物基因的方法  
5 或一种定点编辑植物或农作物核酸分子的方法。

本发明提供的方法为如下 (1) 或 (2) :

(1) 所述方法包括如下步骤: 将 Cas9 核酸酶编码基因、胞苷脱氨酶  
编码基因、待编辑基因的 sgRNA 的编码基因和植物基因启动子导入出发植  
物, 实现出发植物中靶基因的定点编辑;

10 (2) 所述方法包括如下步骤: 将 Cas9 核酸酶编码基因、胞苷脱氨酶  
编码基因、连接所述 Cas9 核酸酶与所述胞苷脱氨酶的连接肽的编码基因、  
尿嘧啶 DNA 糖基化酶抑制蛋白的编码基因、待编辑基因的 sgRNA 的编码基  
因和植物基因启动子导入出发植物, 实现出发植物中靶基因的定点编辑。

上述方法中,

15 (1) 中, 所述 Cas9 核酸酶编码基因、所述胞苷脱氨酶编码基因、所  
述待编辑基因的 sgRNA 的编码基因和所述植物基因启动子通过重组质粒导  
入出发植物中;

所述重组质粒包括由 Cas9 核酸酶和胞苷脱氨酶组成融合蛋白的编码  
基因、所述待编辑基因的 sgRNA 的编码基因和植物基因启动子;

20 所述植物基因启动子驱动由所述 Cas9 核酸酶和所述胞苷脱氨酶组成  
的融合蛋白基因的表达;

(2) 中, 所述 Cas9 核酸酶编码基因、所述胞苷脱氨酶编码基因、所  
述连接所述 Cas9 核酸酶与所述胞苷脱氨酶的连接肽的编码基因、所述尿  
嘧啶 DNA 糖基化酶抑制蛋白基因、所述待编辑基因的 sgRNA 的编码基因和  
25 所述植物基因启动子通过重组质粒导入出发植物中;

所述重组质粒包括由 Cas9 核酸酶、胞苷脱氨酶、连接所述 Cas9 核酸  
酶与所述胞苷脱氨酶的连接肽和尿嘧啶 DNA 糖基化酶抑制蛋白组成的融  
合蛋白的编码基因、所述待编辑基因的 sgRNA 的编码基因和植物基因启动子;

30 所述植物基因启动子驱动由所述 Cas9 核酸酶、所述胞苷脱氨酶、所  
述连接所述 Cas9 核酸酶与所述胞苷脱氨酶的连接肽和所述尿嘧啶 DNA 糖

基化酶抑制蛋白组成的融合蛋白的编码基因的表达。

上述方法中，所述胞苷脱氨酶为 APOBEC1，其编码基因序列为序列 1 第 4838-5524 位。

上述方法中，所述尿嘧啶 DNA 糖基化酶抑制蛋白为 Uracil DNA glycosylase inhibitor，其编码基因序列为序列 1 第 429-688 位。

上述方法中，所述植物基因表达启动子为玉米 Ubiquitin 启动子，其核苷酸序列为序列 1 第 5545-7535 位。

上述方法中，所述 Cas9 核酸酶为 nCas9 (D10A)，其编码基因序列为序列 1 第 689-4789 位。

10 上述方法中，所述连接肽的编码基因序列为序列 1 第 4790-4837 位；  
所述融合蛋白的编码基因序列为序列 1 第 392-5524 位；

所述待编辑基因为 *OsSBE11b* 和 *OsPDS*；

所述 sgRNA 的核苷酸序列为序列 1 第 7785-8268 位或序列 2 第 7785-8268 位或序列 3 第 7785-8268 位。

15 上述方法中，所述重组质粒的核苷酸序列为序列 1、序列 2 或序列 3。

上述方法中，所述植物为单子叶植物或双子叶植物；所述单子叶植物具体可为水稻；所述水稻品种具体可为 Kitaake (*Oryza sativa* L. subsp. japonica)。

上述重组质粒也属于本发明的保护范围。

20 本发明还有一个目的是提供一种定点编辑植物基因组的系统或一种定点编辑植物核酸分子的系统。

本发明提供的系统包括上述重组质粒。

本发明的最后一个目的是提供上述重组质粒或上述系统的新用途。

25 本发明提供了上述重组质粒或上述系统在定点编辑植物或农作物基因中的应用。

上述应用或方法中，所述定点编辑为定点碱基替换；所述替换为由 C 突变成 T，或者 G 突变成 A。

上述应用或方法中，所述 CRISPR/Cas9 系统为 CRISPR/nCas9 系统，所述 CRISPR/nCas9 系统具体为 CRISPR/nCas9 (D10A) 系统。

30 附图说明

图 1 为 pCXUN-BE3 载体框架图。

图 2 为转基因植株的鉴定。注：A 为载体 T-DNA 结构图及引物所在位置。B, C 和 D 分别为 P2, S3 和 S5 转基因植株的 *Cas9* (*D10A*), *gRNA* 及 *hptII* 基因的检测。

5 图 3 为 *OsSBE11b* 基因 S5 靶点的转基因植株及序列的鉴定。注：A 为 BE3 定点突变系统原理图。B 为 *OsSBE11b* 基因结构图及 S5 靶点所在位置，PCR 产物酶切鉴定图。“+”表示 PCR 产物经过酶切，“-”表示 PCR 产物没经过酶切。C 为所有植株 PCR 产物的克隆测序结果。D 为 S5-17 和 S5-26 两个株系基因型测序峰图。PAM 由蓝色表示，预期突变成成的碱基由红色表示，非预期的突变碱基由绿色表示。

10 图 4 为 *OsSBE11b* 基因 S3 靶点的转基因植株及序列的鉴定。注：A 为 *OsSBE11b* 基因结构图及 S3 靶点所在位置，PCR 产物电泳图。B 为所有植株 PCR 产物的克隆测序结果。C 为 S3-1 和 S3-18 两个株系基因型测序峰图。PAM 由蓝色表示，预期突变成成的碱基由红色表示，非预期的突变碱基由绿色表示。

15 图 5 为 *OsSBE11b* 基因 P2 靶点的转基因植株及序列的鉴定。注：A 为 *OsSBE11b* 基因结构图及 P2 靶点所在位置，PCR 产物酶切鉴定图。“+”表示 PCR 产物经过酶切，“-”表示 PCR 产物没经过酶切。C 为所有植株 PCR 产物的克隆测序结果。D 为 P2-21 和 P2-79 两个株系基因型测序峰图。PAM 由蓝色表示，预期突变成成的碱基由红色表示，非预期的突变碱基由绿色表示。

### 实施发明的最佳方式

下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明，均为常规方法。

下述实施例中所用的材料、试剂等，如无特殊说明，均可从商业途径得到。

25 下述实施例中的定量试验，均设置三次重复实验，结果取平均值。

下述实施例中的用于水稻转化的水稻材料为 Kitaake (*Oryza sativa* L. subsp. japonica)，由中国农业科学院作物科学研究所获得。

30 下述实施例中的 pCMV-BE3 载体在文献“Komor AC, Kim YB, Packer MS, Zuris JA, Liu DR. 2016. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. Nature.”中公开过，公众可

以从中国农业科学院作物科学研究所获得。

下述实施例中所用的内切酶、试剂盒和 PCR 酶均购自试剂公司，其他试剂均为国产分析纯。

下述实施例中的引物和 DNA 合成及测序均在华大公司完成。

5 下述实施例中的 AAM 培养基 (pH 5.2) 是将 MS salts & vitamins 盐、蔗糖、MES、葡萄糖、酪蛋白氨基酸、乙酰丁香酮和 100 ml 10 x AA amino acids 混匀得到的培养基，其中各溶质在 AAM 培养基中的浓度分别为 4.3 g/L MS salts & vitamins 盐、68.5 g/L 蔗糖、0.5 g/L MES、36 g/L 葡萄糖、500 mg/L 酪蛋白氨基酸、40 mg/L 乙酰丁香酮。上述 10 x AA amino acids 溶液为将 L-谷氨酰胺、L-天(门)冬氨酸、L-精氨酸、甘氨酸和水混匀得到的溶液，其中各溶质在 10 x AA amino acids 溶液中的浓度分别为：8.76 g/L L-谷氨酰胺、2.66 g/L L-天(门)冬氨酸、1.74 g/L L-精氨酸 和 75 mg/L 甘氨酸。

15 下述实施例中的 R1 培养基 (pH 5.8) 是将 MS& Vitamins 盐、蔗糖、MES、酪蛋白氨基酸、L-脯氨酸、2, 4-D、植物凝胶和水混匀得到的培养基，其中各溶质在 R1 培养基中的浓度分别为：4.3 g/L MS& Vitamins 盐、30 g/L 蔗糖、0.5 g/L MES、300 mg/L 酪蛋白氨基酸、2.8 g/L L-脯氨酸、2 mg/L 2, 4-D、4 g/L 植物凝胶。

20 下述实施例中的 R2 培养基 (pH 5.2) 是将 MS& Vitamins 盐、蔗糖、MES、酪蛋白氨基酸、2, 4-D、植物凝胶、乙酰丁香酮和水混匀得到的培养基，其中各溶质在 R2 培养基中的浓度分别为：4.3 g/L MS& Vitamins 盐、30 g/L 蔗糖、0.5 g/L MES、300 mg/L 酪蛋白氨基酸、2 mg/L 2, 4-D、4 g/L 植物凝胶、20 mg/ml 乙酰丁香酮。

25 下述实施例中的 R1 筛选培养基 (pH 5.8) 是将 MS& Vitamins 盐、蔗糖、MES、酪蛋白氨基酸、L-脯氨酸、2, 4-D、植物凝胶和水混匀得到的培养基，其中各溶质在 R1 筛选培养基中的浓度为：4.3 g/L MS& Vitamins 盐、30 g/L 蔗糖、0.5 g/L MES、300 mg/L 酪蛋白氨基酸、2.8 g/L L-脯氨酸、2 mg/L 2, 4-D、4 g/L 植物凝胶。

30 下述实施例中的 R4 分化培养基 (pH 5.8) 是将 MS& Vitamins 盐、蔗糖、MES、酪蛋白氨基酸、山梨醇、激动素、NAA、植物凝胶和水混匀得

到的培养基，其中各溶质在 R4 分化培养基中的浓度分别为：4.3 g/L MS& Vitamins 盐、30 g/L 蔗糖、0.5 g/L MES、2 g/L 酪蛋白氨基酸、30 g/L 山梨醇、2 mg/L 激动素、1 mg/L NAA、4 g/L 植物凝胶。

下述实施例中的 R5 培养基 (pH 5.8) 是将 MS& Vitamins 盐、蔗糖、MES、植物凝胶和水混匀得到的培养基，其中各溶质在 R5 培养基中的浓度分别为：2.15 g/L MS& Vitamins 盐、15 g/L 蔗糖、0.5 g/L MES、2 g/L 植物凝胶。

下述实施例中所用的引物如表 1 所示：

表 1、引物序列

引物	引物序列 (5' To 3' )	用途
BE F	TGTTACTTCTGCAGCCCGGGGATCCCAATACTA TGAGCTCAGAGACTGGCC	构建 pCXUN BE3
BE R	GAACGATCGGGGAAATTCGGATCCCAATACTTTA GACTTTCCTCTTCTTCTTGGG	
hrpme u3F	GTCGTTTCCCGCCTTCAGTTTGCATGCCTGCAGGTCGACGAT	构建 gRNA
hrpme u3R	CCTGTCAAACACTGATAGTTTGGATCCTCTAGAGATTATGTGG	
P2 F	ACTGAATTCTCCTGGCTTGTGTGTTTTAGAGCTAGA AATAGCAAGTTA	构建 P2 gRNA
P2 R	AACAAGCCAGGAGAATTCAGTGCCACGGATCAT CTGCACAACCTC	
S3 F	ACCTGTTCAAGATGGTGGGGTGTGTTTTAGAGCTA GAAATAGCAAGTTA	构建 S3 gRNA
S3 R	ACCCACCATCTTGAACAGGTGCCACGGATCAT CTGCACAACCTC	
S5 F	AGGCACCTGGACACGAGACGCGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTA	构建 S5 gRNA
S5 R	GCGTCTCGTGTCCAGGTGCCTGCCACGGATCAT CTGCACAACCTC	
P2testF	TCCTCCTGTTTCATACATAGTC	检测 P2 靶点序列
P2testR	GATCTATCATTAAACGTTGCTAG	

S3testF	CGCATAGAACTGTCCACC	检测 S3 靶点序列
S3testR	CCAATTAACCTCAGAAGAG	
S5testF	AGGTGGCGTGCCGTGTC	检测 S5 靶点序列
S5testR	GCACTGCACAAGAACATGTCTCC	
U3 F	AAGGAATCTTTAAACATACGAACAGATC	检测 U3 序列
U3 R	TTTGGATCCTCTAGAGATTATGTGG	
BE3 F	ATAACTACCACCATGCGCACG	检测 BE3 序列
BE3 R	GGACAGAATAGGCAACTGTAGGG	
HPTII F	GAGGGCGTGGATATGTCCTG	检测 <i>hptII</i> 基因序列
HPTII R	ATTGACCGATTCTTGC GGT	

下述实施例中靶点位置及序列如表 2 所示。

表 2、靶点位置及序列

靶标基因	靶点名称	靶点序列	靶点位置	PCR/RE 所用限制性内切酶
<i>OsPDS</i>	P2	<u>CCAAACAAGCCAG</u> <b>G<sub>10</sub>AG<sub>8</sub>AA</b> TTCAG	5 <sup>th</sup> exon	<i>Eco</i> RI
<i>OsSBE11b</i>	S3	<b>G<sub>1</sub>G<sub>2</sub>TGTTG<sub>7</sub>AAGATGGTGGG</b> GTTGG	15 <sup>th</sup> exon	<i>Bcc</i> I
	S5	<u>CCTGCGTCTCGTGTCCAG</u> <b>G<sub>6</sub>G<sub>5</sub></b> TGCC	2 <sup>nd</sup> exon	<i>Bst</i> nI

注：PAM 位点由波浪线表示，脱氨酶靶点由加粗黑体表示，G<sub>n</sub> 和 C<sub>n</sub>，# 代表碱基所在位置，远离 PAM 位点的起始位点为第一个碱基。酶切位点由下划线表示。

5

实施例 1、一种 CRISPR/nCas9 介导的定点碱基替换在植物中的应用

一、表达载体的构建

1、pCXUN-BE3 载体的构建

(1) 用限制性内切酶 *Bam*HI 酶切 pCXUN-Cas9 载体，得到线性化的载体；

(2) 以BE-F/R为引物, pCMV-BE3载体为模板进行PCR扩增, 得到PCR产物, 该PCR产物的5' 和 3' 最末端的序列分别和线性化载体两末端序列完全一致;

(3) 采用全式金公司的pEASY-Uni Seamless Cloning and Assembly Kit将步骤(1)获得的线性化的载体、步骤(2)获得的PCR产物通过同源重组进行连接, 获得载体pCXUN-BE3(图1), 从图1中可以看出: pCXUN-BE3载体包括表达盒甲, 该表达盒甲依次包括玉米Ubiquitin启动子(Ubi启动子)、胞苷脱氨酶(APOBEC1)的编码基因、连接nCas9(D10A)核酸酶和脱氨酶的连接肽(XTEN Linker)、nCas9(D10A)核酸酶的编码基因和尿嘧啶DNA糖基化酶抑制蛋白(UGI)的编码基因。

2、利用重叠PCR方法构建P2、S3及S5的gRNA表达盒pCXUN-BE3-P2、pCXUN-BE3-S3和pCXUN-BE3-S5载体

(1) S5的gRNA表达盒pCXUN-BE3-S5的构建

A、用限制性内切酶 *Pme* I 酶切 pCXUN-BE3 载体, 得到线性化的载体;  
B、以 p0sU3-sgRNA 质粒为模板, 分别利用引物 S5-F/hrpme-u3R 和 hrpme-u3F/S5-R 进行 PCR 扩增, 并将扩增产物 1:1 混合后做为模板, 用引物 hrpme-u3F/hrpme-u3R 进行扩增, 回收 PCR 产物;

C、采用全式金公司的 pEASY-Uni Seamless Cloning and Assembly Kit 将步骤 A 获得的线性化的载体、步骤 B 获得的 PCR 产物通过同源重组进行连接, 鉴定阳性克隆并测序验证, 得到 S5 的 gRNA 表达盒 pCXUN-BE3-S5。

经过测序验证: S5 的 gRNA 表达盒 pCXUN-BE3-S5 的核苷酸序列为序列 1, 其中序列 1 的第 392-5524 位为由 nCas9(D10A)核酸酶、脱氨酶(APOBEC1)、连接 nCas9(D10A)核酸酶和脱氨酶的连接肽(XTEN Linker)、尿嘧啶 DNA 糖基化酶抑制蛋白(UGI)组成的融合蛋白 BE3 的编码基因序列、第 5545-7535 位为植物基因表达启动子 Ubi 的核苷酸序列, 第 7785-8268 位为 sgRNA 序列。

(2) S3的gRNA表达盒pCXUN-BE3-S3的构建

A、用限制性内切酶 *Pme* I 酶切 pCXUN-BE3 载体, 得到线性化的载体;  
B、以 p0sU3-sgRNA 质粒为模板, 分别利用引物 S3-F/hrpme-u3R 和 hrpme-u3F/S3-R 进行 PCR 扩增, 并将扩增产物 1:1 混合后做为模板, 用引

物 hrpme-u3F/hrpme-u3R 进行扩增，回收 PCR 产物；

C、采用全式金公司的 pEASY-Uni Seamless Cloning and Assembly Kit 将步骤 A 获得的线性化的载体、步骤 B 获得的 PCR 产物通过同源重组进行连接，鉴定阳性克隆并测序验证，得到 S3 的 gRNA 表达盒 pCXUN-BE3-S3。

5 经过测序验证：S3 的 gRNA 表达盒 pCXUN-BE3-S3 的核苷酸序列为序列 2，其中序列 2 的第 392-5524 位为由 nCas9 (D10A) 核酸酶、脱氨酶 (APOBEC1)、连接 nCas9 (D10A) 核酸酶和胞苷脱氨酶的连接肽 (XTEN Linker)、尿嘧啶 DNA 糖基化酶抑制蛋白 (UGI) 组成的融合蛋白 BE3 的编码基因序列、第 5545-7535 位为植物基因表达启动子 Ubi 的核苷酸序列，  
10 第 7785-8268 位为 sgRNA 序列。

(3) P2 的 gRNA 表达盒 pCXUN-BE3-P2 的构建

A、用限制性内切酶 *Pme* I 酶切 pCXUN-BE3 载体，得到线性化的载体；

B、以 p0sU3-sgRNA 质粒为模板，分别利用引物 P2-F/hrpme-u3R 和 hrpme-u3F/P2-R 进行 PCR 扩增，并将扩增产物 1:1 混合后做为模板，用引物  
15 物 hrpme-u3F/hrpme-u3R 进行扩增，回收 PCR 产物；

C、采用全式金公司的 pEASY-Uni Seamless Cloning and Assembly Kit 将步骤 A 获得的线性化的载体、步骤 B 获得的 PCR 产物通过同源重组进行连接，鉴定阳性克隆并测序验证，得到 P2 的 gRNA 表达盒 pCXUN-BE3-P2。

20 经过测序验证：P2 的 gRNA 表达盒 pCXUN-BE3-P2 的核苷酸序列为序列 3，其中序列 3 的第 392-5524 位为由 nCas9 (D10A) 核酸酶、脱氨酶 (APOBEC1)、连接 nCas9 (D10A) 核酸酶和胞苷脱氨酶的连接肽 (XTEN Linker)、尿嘧啶 DNA 糖基化酶抑制蛋白 (UGI) 组成的融合蛋白 BE3 的编码基因序列、第 5545-7535 位为植物基因表达启动子 Ubi 的核苷酸序列，  
第 7785-8268 位为 sgRNA 序列。

25 二、重组菌的构建

分别将步骤一获得的重组质粒 pCXUN-BE3-S5、pCXUN-BE3-S3 和 pCXUN-BE3-P2 导入农杆菌 EHA105，分别得到重组农杆菌 pCXUN-BE3-S5/EHA105、pCXUN-BE3-S3/EHA105 和 pCXUN-BE3-P2/EHA105。

三、转基因水稻的获得

30 1、分别将重组农杆菌 pCXUN-BE3-S5/EHA105、pCXUN-BE3-S3/EHA105

及 pCXUN-BE3-P2/EHA105 在 LB 培养基上培养两天后, 收集农杆菌, 并用 AAM 培养基重悬, OD600 调到 0.3-0.5, 分别得到 OD600 为 0.3-0.5 的菌液。

2、选取饱满的 kitaake 水稻种子, 剥去种皮, 灭菌洗涤后, 均匀的点入 R1 培养基中, 28°C 持续光照 2-3 周诱导愈伤组织的形成。将形成的愈伤组织转移到新的 R1 培养基上培养 3-5 天, 然后分别转移到上述 OD600 为 0.3-0.5 的菌液中侵染 5 分钟, 侵染后用滤纸吸干表面菌液并转移到 R2 培养基上在 25°C 下培养三天, 再转移至含有浓度为 50mg/L 潮霉素的 R1 筛选培养基上, 在 28°C 条件下持续光照 2 周后转移至新的含有浓度为 50mg/L 潮霉素的 R1 筛选培养基, 在 28°C 条件下持续光照 2 周。选取生长良好呈嫩黄色的阳性愈伤组织, 用无菌镊子移至含有浓度为 50mg/L 潮霉素的 R4 分化培养基中, 在 28°C 条件下持续光照培养。待分化出来的幼苗长至 2-5mm 时, 将幼苗转入不含激素和抗生素的 R5 培养基中, 在 28°C 条件下持续光照培养 2-3 周, 之后移入土中置于温室中生长 (培养条件为: 温度 28-30°C, 光照为 16h 光照/8h 黑暗), 分别得到 T<sub>0</sub>代转 P2 水稻植株、T<sub>0</sub>代转 S3 水稻植株和 T<sub>0</sub>代转 S5 水稻植株。

### 3、转基因水稻植株的鉴定

根据载体序列分别设计检测 *BE3*、*gRNA* 和 *hptII* 基因引物 BE3-F/R, U3-F/R 和 HPTII-F/R (表 2), 对获得的所有 T<sub>0</sub>代转 S5 水稻植株、T<sub>0</sub>代转 S3 水稻植株和 T<sub>0</sub>代转 P2 水稻植株进行 PCR 鉴定并统计结果。

转基因水稻植株的 PCR 鉴定结果如图 2 所示。结果表明: 共获得 52 颗阳性 T<sub>0</sub>代转 S5 水稻植株、38 颗阳性 T<sub>0</sub>代转 S3 水稻植株及 88 颗阳性 T<sub>0</sub>代转 P2 水稻植株。

### 四、定点编辑的检测

#### 1、定点编辑 *OsSBE11b* 的 S5 靶点的基因型鉴定

利用引物 S5testF/R 对步骤三获得的 52 颗阳性 T<sub>0</sub>代转 S5 水稻植株的基因组 DNA 进行扩增, 得到 PCR 产物, 用 *Bst*NI 酶切 PCR 产物, 如果转 S5 水稻植株中的靶点序列发生所期待的突变, 则该转 S5 水稻植株对应的 PCR 产物将无法被相对应的限制性内切酶 *Bst*NI 酶切。

酶切鉴定结果表明: 52 颗阳性 T<sub>0</sub>代转 S5 水稻植株中共有 23 颗阳性 T<sub>0</sub>代转 S5 水稻植株的 PCR 产物完全不能或者部分不能被 *Bst*NI 切开, 说明

在该酶切位点处发生突变，将上述 23 颗植株记作定点突变的植株，并对其进行测序。

测序结果如图 3 所示。根据测序结果可以将 23 颗定点突变的植株分成如下三类：第一类共有 10 颗植株，为第五位和第六位碱基由 G 突变成 A（G<sub>5</sub>突变成 A<sub>5</sub>和 G<sub>6</sub>突变成 A<sub>6</sub>），其中，3 颗植株为纯合类型（两条同源染色体的第五位和第六位碱基均由 G 突变成 A，S5-17、S5-36、和 S5-46）、6 颗为杂合类型（S5-1、S5-8、S5-21、S5-33、S5-42 和 S5-43），1 颗为双等位突变类型（S5-34），第一类（期待突变类型）占有所有突变类型的 43%（10/23），相对于所有转基因植株而言，效率达到 20%（10/52）；第二类共有 8 颗植株，为同时包含第五位和/或第六位碱基由 G 突变成 A 及 G 突变成 C 或者 T，其中，一颗为纯合类型（S5-26），另外 7 颗为杂合类型（S5-10、S5-25、S5-44、S5-45、S5-48、S5-50 和 S5-52）；第三类共有 5 颗植株，这一类型突变均为非期待类型，主要是位点的插入和缺失，3 颗为双等位突变（S5-18、S5-31 和 S4-47），2 颗为杂合类型（S5-16 和 S5-23）。在 S5 靶点内同样含有其他的 G，但都没有发生相应的突变。

## 2、定点编辑 *OsSBE11b* 的 S3 靶点的基因型鉴定

利用引物 S3<sub>test</sub>F/R 对步骤三获得的 38 颗阳性 T<sub>0</sub>代转 S3 水稻植株的基因组 DNA 进行扩增，得到 PCR 产物，并对 PCR 扩增产物直接测序。

测序结果如图 4 所示。测序结果表明，38 颗阳性 T<sub>0</sub>代转 S3 水稻植株中共有 11 颗定点突变的植株，根据测序结果可以将 11 颗定点突变的植株分成如下三类：第一类共包含 4 颗植株，为只含有所期待的突变类型（C 突变成 T），分别为 S3-1，S3-4，S3-26 和 S3-29，其中，S3-1，S3-4 和 S3-29 为纯合植株，S3-26 为杂合型植株，杂合型植株 S3-26 的一条同源染色体上的三个靶位点均发生突变（第一，第二和第七位碱基均由 C 突变为 T），另外一条同源染色体的三个靶位点均为野生型；第二类只有一颗植株，为 S3-6，S3-6 的一条同源染色体的第七位碱基由 C 突变为 T，另外一条同源染色体的第七位碱基由 C 突变为 G；第三类共有 6 颗植株，均为非期待的类型，其中，4 颗为纯合类型，为第七位碱基均由 C 突变为 G，另外 2 颗植株为一条链在第一位碱基和第七位碱基均由 C 突变成 G，另外一条链仅第七位碱基由 C 突变成 G。

### 3、定点编辑 *OsPDS* 的 P2 靶点的基因型鉴定

利用引物 P2testF/R 对获得 88 颗阳性 T<sub>0</sub> 代转 P2 水稻植株的基因组 DNA 进行扩增，得到 PCR 产物，用 *EcoRI* 酶切 PCR 产物，如果转 P2 水稻植株中的靶点序列发生所期待的突变，则该转 P2 水稻植株对应的 PCR 产物将无法被相对应的限制性内切酶 *BstNI* 酶切。

利用 *EcoRI* 酶切 T<sub>0</sub> 代转 P2 水稻植株的 PCR 产物，结果表明有 2 颗 T<sub>0</sub> 代转 P2 水稻植株（P2-21 和 P2-79）的 PCR 产物为部分切开，说明在该酶切位点处发生突变，将上述 2 颗植株记作定点突变的植株，并对其进行测序。

10 测序结果如图5所示。结果表明，P2-21和P2-79均为杂合类型，P2-21的一条同源染色体在靶点序列的第八位和第十位碱基均由G突变成A，另外一条同源染色体为野生型。P2-79的一条同源染色体在靶点序列的第八位碱基由G突变成C，第十位碱基没有发生变化，另外一条同源染色体为野生型。

### 15 工业应用

本发明提供了一种定点编辑植物基因组的系统，该系统包括 BE3 植物表达载体，BE3 植物表达载体表达由 nCas9（D10A）、脱氨酶（APOBEC1）和尿嘧啶 DNA 糖基化酶抑制蛋白（UGI）组成的融合蛋白，并以水稻 *OsPDS* 和 *OsSBE11b* 为靶基因对该系统进行验证。结果表明，在所选的 3 个靶点中，均获得预期定点突变植株，既在靶点序列的 4-8 位置的 C 突变成 T（或 G 突变成 A），在水稻中实现了碱基的精确的点突变，且效率最高达到 20% 左右，而且该方法操作简单、可行，与构建 CRISPR/Cas9 并无明显差别，为农作物育种提供了一种可行的有效的碱基替换方法，在农业育种方面具有强大的应用潜力，为快速改良农作物重要农艺性状提供了基础。

## 权利要求

1、如下 (1) - (7) 中任一种所述的应用：

5 (1) CRISPR/Cas9 系统、脱氨酶和植物基因表达启动子在定点编辑植物或农作物基因中的应用；

所述植物基因表达启动子启动 CRISPR/Cas9 系统中 Cas9 核酸酶和脱氨酶的表达；

(2) CRISPR/Cas9 系统和脱氨酶在定点编辑植物或农作物基因中的应用；

10 (3) 由 Cas9 核酸酶和脱氨酶组成的融合蛋白、待编辑基因的 sgRNA 和植物基因表达启动子在定点编辑植物或农作物基因中的应用；

所述植物基因表达启动子驱动由所述 Cas9 核酸酶和所述脱氨酶组成的融合蛋白基因的表达；

15 (4) CRISPR/Cas9 系统、脱氨酶、尿嘧啶 DNA 糖基化酶抑制蛋白和植物基因表达启动子在定点编辑植物或农作物基因中的应用；

所述植物基因表达启动子启动 CRISPR/Cas9 系统中 Cas9 核酸酶、脱氨酶和尿嘧啶 DNA 糖基化酶抑制蛋白的表达；

(5) CRISPR/Cas9 系统、脱氨酶和尿嘧啶 DNA 糖基化酶抑制蛋白在定点编辑植物或农作物基因中的应用；

20 (6) 由 Cas9 核酸酶、脱氨酶和尿嘧啶 DNA 糖基化酶抑制蛋白组成的融合蛋白、待编辑基因的 sgRNA 和植物基因表达启动子在定点编辑植物或农作物基因中的应用；

所述植物基因表达启动子驱动由所述 Cas9 核酸酶、所述脱氨酶和所述尿嘧啶 DNA 糖基化酶抑制蛋白组成的融合蛋白的编码基因的表达；

25 (7) 由 Cas9 核酸酶、脱氨酶、连接所述 Cas9 核酸酶与所述脱氨酶的连接肽和尿嘧啶 DNA 糖基化酶抑制蛋白组成的融合蛋白、待编辑基因的 sgRNA 和植物基因表达启动子在定点编辑植物或农作物基因中的应用；

30 所述植物基因表达启动子驱动由所述 Cas9 核酸酶、所述脱氨酶、所述连接肽和所述尿嘧啶 DNA 糖基化酶抑制蛋白组成的融合蛋白的编码基因的表达。

- 2、根据权利要求 1 所述的应用，其特征在于：  
所述脱氨酶为 APOBEC1。
- 3、根据权利要求 2 所述的应用，其特征在于：  
所述 APOBEC1 的编码基因序列为序列 1 第 4838-5524 位。
- 5 4、根据权利要求 1 所述的应用，其特征在于：  
所述尿嘧啶 DNA 糖基化酶抑制蛋白为 Uracil DNA glycosylase inhibitor。
- 5、根据权利要求 4 所述的应用，其特征在于：  
所述 Uracil DNA glycosylase inhibitor 的编码基因序列为序列 1  
10 第 429-688 位。
- 6、根据权利要求 1 所述的应用，其特征在于：  
所述 Cas9 核酸酶为 nCas9。
- 7、根据权利要求 6 所述的应用，其特征在于：  
所述 nCas9 的编码基因序列为序列 1 第 689-4789 位。
- 15 8、根据权利要求 1 所述的应用，其特征在于：  
所述植物基因表达启动子为玉米 Ubiquitin 启动子。
- 9、根据权利要求 8 所述的应用，其特征在于：  
所述玉米 Ubiquitin 启动子的核苷酸序列为序列 1 第 5545-7535 位。
- 10、根据权利要求 1-9 中任一所述的应用，其特征在于：  
20 所述连接肽的编码基因序列为序列 1 第 4790-4837 位；  
所述融合蛋白的编码基因序列为序列 1 第 392-5524 位。
- 11、根据权利要求 1-9 中任一所述的应用，其特征在于：  
所述待编辑基因为 *OsSBEIIb* 和 *OsPDS*；  
所述 sgRNA 的核苷酸序列为序列 1 第 7785-8268 位或序列 2 第  
25 7785-8268 位或序列 3 第 7785-8268 位。
- 12、一种定点编辑植物或农作物基因的方法，为如下（1）或（2）：  
（1）所述方法包括如下步骤：将 Cas9 核酸酶编码基因、脱氨酶编码  
基因、待编辑基因的 sgRNA 的编码基因和植物基因启动子导入出发植物，  
实现出发植物中靶基因的定点编辑；  
30 （2）所述方法包括如下步骤：将 Cas9 核酸酶编码基因、脱氨酶编码

基因、连接所述 Cas9 核酸酶与所述脱氨酶的连接肽的编码基因、尿嘧啶 DNA 糖基化酶抑制蛋白的编码基因、待编辑基因的 sgRNA 的编码基因和植物基因启动子导入出发植物，实现出发植物中靶基因的定点编辑。

13、根据权利要求 12 所述的方法，其特征在于：

5 (1) 中，所述 Cas9 核酸酶编码基因、所述脱氨酶编码基因、所述待编辑基因的 sgRNA 的编码基因和所述植物基因启动子通过重组质粒导入出发植物中；

所述重组质粒包括由 Cas9 核酸酶和脱氨酶组成融合蛋白的编码基因、所述待编辑基因的 sgRNA 的编码基因和植物基因启动子；

10 所述植物基因启动子驱动由所述 Cas9 核酸酶和所述脱氨酶组成的融合蛋白基因的表达；

(2) 中，所述 Cas9 核酸酶编码基因、所述脱氨酶编码基因、所述连接所述 Cas9 核酸酶与所述脱氨酶的连接肽的编码基因、所述尿嘧啶 DNA 糖基化酶抑制蛋白基因、所述待编辑基因的 sgRNA 的编码基因和所述植物  
15 基因启动子通过重组质粒导入出发植物中；

所述重组质粒包括由 Cas9 核酸酶、脱氨酶、连接所述 Cas9 核酸酶与  
所述脱氨酶的连接肽和尿嘧啶 DNA 糖基化酶抑制蛋白组成的融合蛋白的编  
码基因、所述待编辑基因的 sgRNA 的编码基因和植物基因启动子；

20 所述植物基因启动子驱动由所述 Cas9 核酸酶、所述脱氨酶、所述连  
接所述 Cas9 核酸酶与所述脱氨酶的连接肽和所述尿嘧啶 DNA 糖基化酶抑  
制蛋白组成的融合蛋白的编码基因的表达。

14、根据权利要求 13 所述的方法，其特征在于：

所述脱氨酶为 APOBEC1。

15、根据权利要求 14 所述的方法，其特征在于：

25 所述 APOBEC1 的编码基因序列为序列 1 第 4838-5524 位。

16、根据权利要求 13 所述的方法，其特征在于：

所述尿嘧啶 DNA 糖基化酶抑制蛋白为 Uracil DNA glycosylase  
inhibitor。

17、根据权利要求 16 所述的方法，其特征在于：

30 所述 Uracil DNA glycosylase inhibitor 的编码基因序列为序列 1

第 429-688 位。

18、根据权利要求 13 所述的方法，其特征在于：

所述 Cas9 核酸酶为 nCas9。

19、根据权利要求 18 所述的方法，其特征在于：

5 所述 nCas9 的编码基因序列为序列 1 第 689-4789 位。

20、根据权利要求 13 所述的方法，其特征在于：

所述植物基因表达启动子为玉米 Ubiquitin 启动子。

21、根据权利要求 20 所述的方法，其特征在于：

所述玉米 Ubiquitin 启动子的核苷酸序列为序列 1 第 5545-7535 位。

10 22、根据权利要求 13 所述的方法，其特征在于：

所述连接肽的编码基因序列为序列 1 第 4790-4837 位；

所述融合蛋白的编码基因序列为序列 1 第 392-5524 位。

23、根据权利要求 13 所述的方法，其特征在于：

所述待编辑基因为 *OsSBE11b* 和 *OsPDS*；

15 所述 sgRNA 的核苷酸序列为序列 1 第 7785-8268 位或序列 2 第 7785-8268 位或序列 3 第 7785-8268 位。

24、根据权利要求 13 所述的方法，其特征在于：

所述重组质粒的核苷酸序列为序列 1、序列 2 或序列 3。

25、根据权利要求 12-24 中任一所述的方法，其特征在于：

20 所述植物为单子叶植物或双子叶植物。

26、根据权利要求 25 所述的方法，其特征在于：

所述单子叶植物为水稻。

27、权利要求 13 中所述的重组质粒。

25 28、一种定点编辑植物基因组的系统，包括权利要求 13 中所述的重组质粒。

29、权利要求 27 所述的重组质粒或权利要求 28 所述的系统在定点编辑植物或农作物基因中的应用。

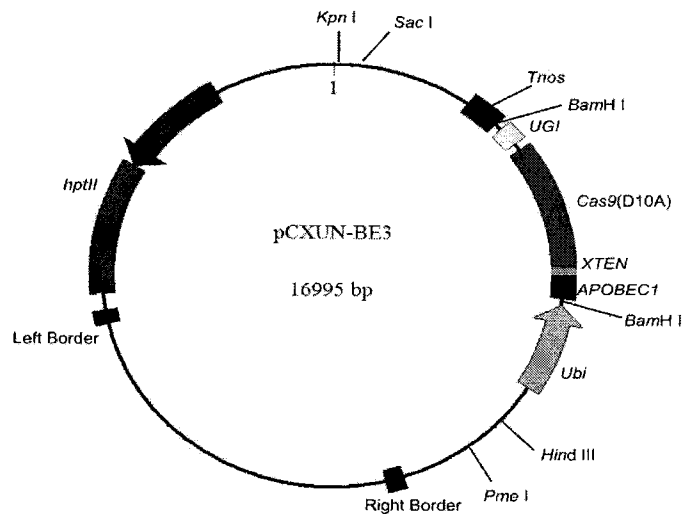


图 1

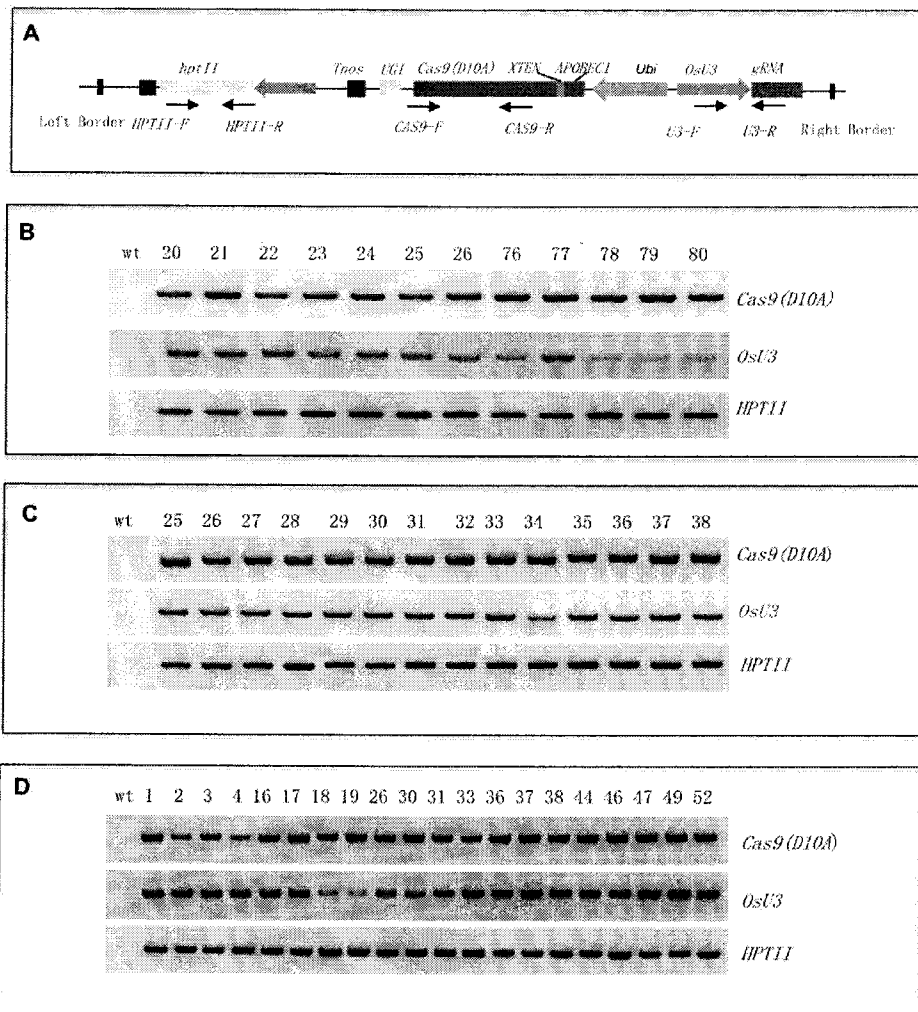


图 2

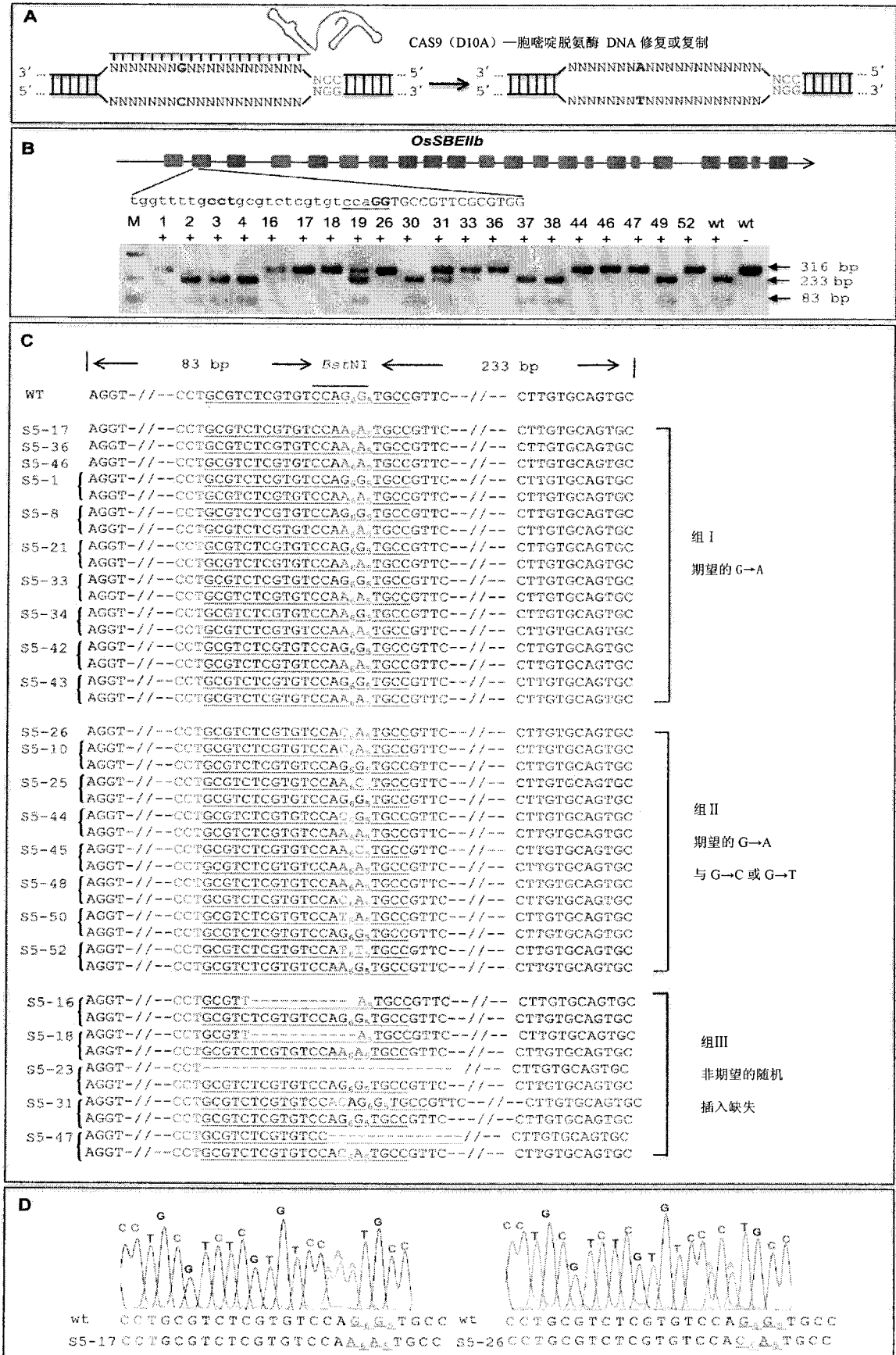


图 3

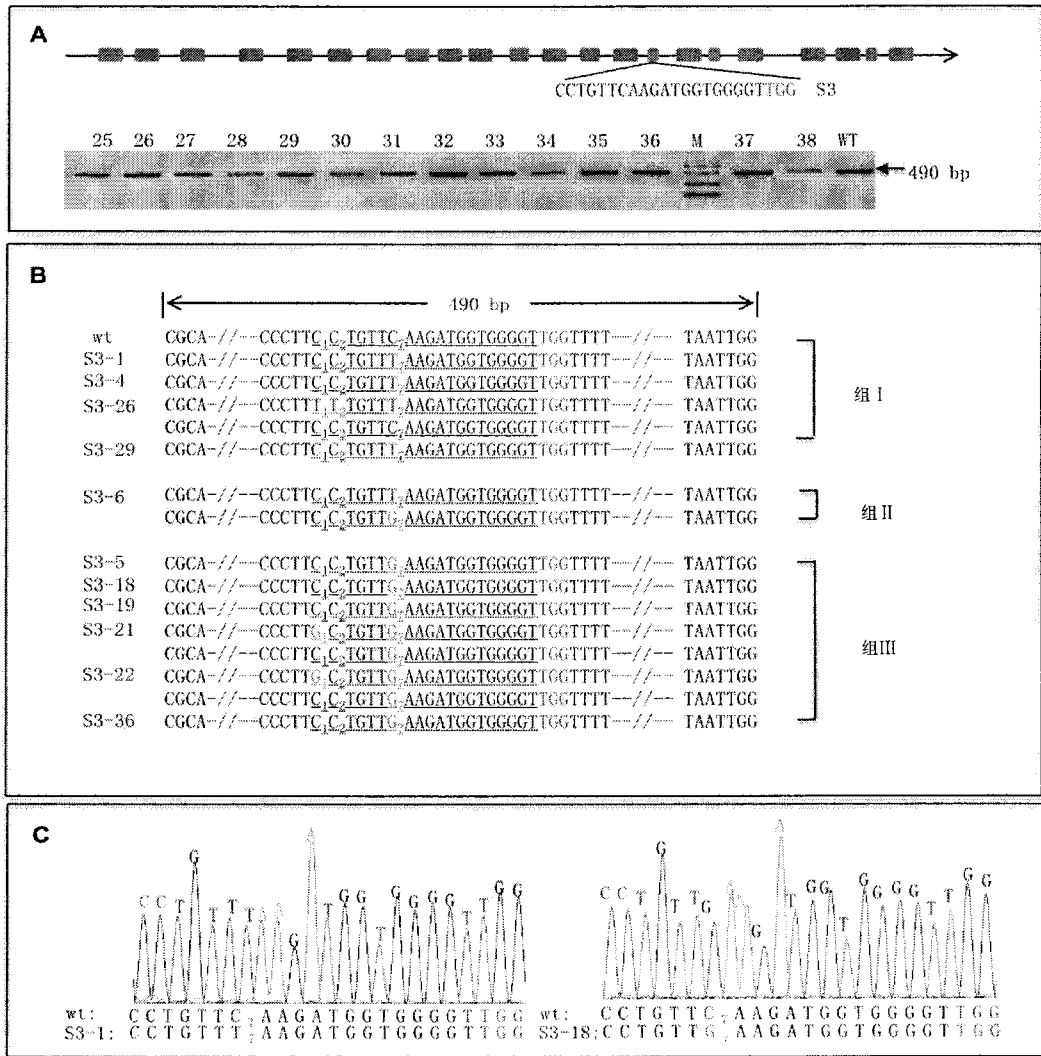


图 4

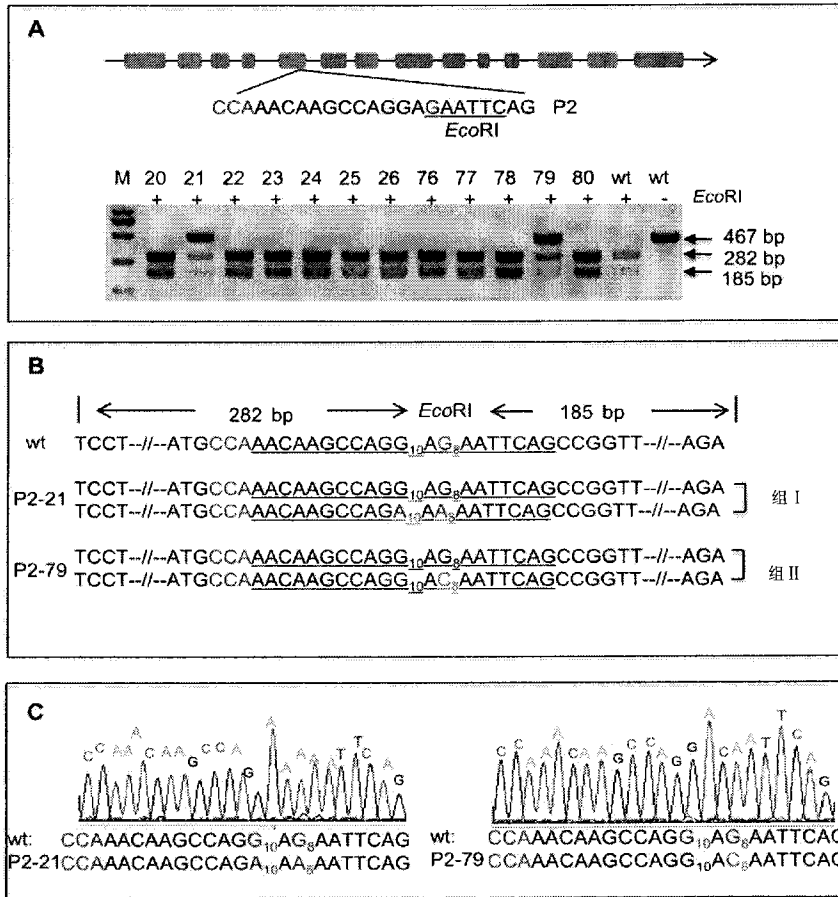


图 5

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2017/110349

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 15/82 (2006.01) i; A01H 5/00 (2018.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N 15/-; A01H 5/-

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

VEN, CNABS, CNKI, WANFANG DATABASE, NCBI, PubMed, ISI web of Knowledge, Elsevier Science Direct, Bio-Sequence Database of Chinese Patent, Google: CRISPR/nCas9, CRISPR, Cas9, nCas9, CRISPR/Cas9, dCas9, D10A, AID, cytidine deaminase, 尿嘧啶 DNA 糖基化酶抑制蛋白, Uracil DNA glycosylase inhibitor, glycosylase inhibitor, plant, crop, corn

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 107043779 A (INSTITUTE OF CROP SCIENCE, CHINESE ACADEMY OF AGRICULTURAL SCIENCES), 15 August 2017 (15.08.2017), claims 1-10	1-29
PX	CN 106834341 A (CHINA AGRICULTURAL UNIVERSITY), 13 June 2017 (13.06.2017), claims 1-14	1-29
PX	CN 106609282 A (SHANGHAI INSTITUTES FOR BIOLOGICAL SCIENCES, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES), 03 May 2017 (03.05.2017), claims 1-10	1-29
PX	WO 2017090761 A1 (NAT. UNIV. CORP. KOBE UNIV.), 01 June 2017 (01.06.2017), the abstract, and claims 1-18	1-29
PX	WO 2017070632 A2 (PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD COLLEGE), 27 April 2017 (27.04.2017), the abstract, and claims 1-302	1-29
X	WO 2015133554 A1 (NAT. UNIV. CORP. KOBE UNIV.), 11 September 2015 (11.09.2015), the abstract, claims 1-21, and description, paragraphs 0089, 0100-0101 and 0124	1
Y	WO 2015133554 A1 (NAT. UNIV. CORP. KOBE UNIV.), 11 September 2015 (11.09.2015), the abstract, claims 1-21, and description, paragraphs 0089, 0100-0101 and 0124	1-29

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>“&amp;” document member of the same patent family</p>
---	---

Date of the actual completion of the international search  
17 January 2018

Date of mailing of the international search report  
25 January 2018

Name and mailing address of the ISA  
State Intellectual Property Office of the P. R. China  
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao  
Haidian District, Beijing 100088, China  
Facsimile No. (86-10) 62019451

Authorized officer  
YAO, Jinxiao  
Telephone No. (86-10) 010-53961955

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/CN2017/110349

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 105934516 A (PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD COLLEGE), 07 September 2016 (07.09.2016), the abstract, and claims 1-62 PLOSKY, B.S. "CRISPR-Mediated Base Editing without DNA Double-Strand Breaks", Molecular Cell, vol. 62, 19 May 2016 (19.05.2016), pages 477-478 WO 2014186686 A2 (TWO BLADES FOUNDATION), 20 November 2014 (20.11.2014), entire document	1-29 1-29 1-29

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International application No.  
PCT/CN2017/110349

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 107043779 A	15 August 2017	None	
CN 106834341 A	13 June 2017	None	
CN 106609282 A	03 May 2017	None	
WO 2017090761 A1	01 June 2017	None	
WO 2017070632 A2	27 April 2017	WO 2017070633 A3	13 July 2017
		US 2017121693 A1	04 May 2017
		WO 2017070633 A2	27 April 2017
		WO 2017070632 A3	08 June 2017
WO 2015133554 A1	11 September 2015	EP 3115457 A1	11 January 2017
		SG 11201609211 V A	29 December 2016
		CA 2947941 A1	11 September 2015
		US 2017073670 A1	16 March 2017
		EP 3115457 A4	09 August 2017
		JP 6206893 B2	04 October 2017
		JP WO2015133554 A1	06 April 2017
		CN 106459957 A	22 February 2017
CN 105934516 A	07 September 2016	US 2015166980 A1	18 June 2015
		US 9068179 B1	30 June 2015
		EP 3080265 A1	19 October 2016
		US 2016304846 A1	20 October 2016
		CA 2933625 A1	18 June 2015
		US 2015166985 A1	18 June 2015
		AU 2014362208 A1	30 June 2016
		US 2015166984 A1	18 June 2015
		US 9840699 B2	12 December 2017
		US 2015166983 A1	18 June 2015
		WO 2015089406 A1	18 June 2015
		US 2015165054 A1	18 June 2015
		US 2015166982 A1	18 June 2015
		JP 2017500035 A	05 January 2017
		US 2015166981 A1	18 June 2015
WO 2014186686 A2	20 November 2014	WO 2014186686 A3	08 January 2015

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2017/110349

<p><b>A. 主题的分类</b> C12N 15/82(2006.01)i; A01H 5/00(2018.01)i</p> <p>按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类</p>																										
<p><b>B. 检索领域</b></p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号) C12N15/-; A01H 5/-</p> <p>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p> <p>在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用)) VEN, CNABS, CNKI, 万方数据库, NCBI, PubMed, ISI web of Knowledge, Elsevier Science Direct, Bio-Sequence Database of Chinese Patent, Google: CRISPR/nCas9, CRISPR, Cas9, nCas9, CRISPR/Cas9, dCas9, D10A, AID, cytidine deaminase, 尿嘧啶DNA糖基化酶抑制蛋白, Uracil DNA glycosylase inhibitor, glycosylase inhibitor, plant, crop, corn</p>																										
<p><b>C. 相关文件</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>类型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>PX</td> <td>CN 107043779 A (中国农业科学院作物科学研究所) 2017年 8月 15日 (2017 - 08 - 15) 权利要求1-10</td> <td>1-29</td> </tr> <tr> <td>PX</td> <td>CN 106834341 A (中国农业大学) 2017年 6月 13日 (2017 - 06 - 13) 权利要求1-14</td> <td>1-29</td> </tr> <tr> <td>PX</td> <td>CN 106609282 A (中国科学院上海生命科学研究院) 2017年 5月 3日 (2017 - 05 - 03) 权利要求1-10</td> <td>1-29</td> </tr> <tr> <td>PX</td> <td>WO 2017090761 A1 (NAT. UNIV. CORP. KOBE UNIV.) 2017年 6月 1日 (2017 - 06 - 01) 摘要、权利要求1-18</td> <td>1-29</td> </tr> <tr> <td>PX</td> <td>WO 2017070632 A2 (PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD COLLEGE) 2017年 4月 27日 (2017 - 04 - 27) 摘要、权利要求1-302</td> <td>1-29</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>WO 2015133554 A1 (NAT. UNIV. CORP. KOBE UNIV.) 2015年 9月 11日 (2015 - 09 - 11) 摘要、权利要求1-21、说明书0089, 0100-0101, 0124段</td> <td>1</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>WO 2015133554 A1 (NAT. UNIV. CORP. KOBE UNIV.) 2015年 9月 11日 (2015 - 09 - 11) 摘要、权利要求1-21、说明书0089, 0100-0101, 0124段</td> <td>1-29</td> </tr> </tbody> </table>			类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	PX	CN 107043779 A (中国农业科学院作物科学研究所) 2017年 8月 15日 (2017 - 08 - 15) 权利要求1-10	1-29	PX	CN 106834341 A (中国农业大学) 2017年 6月 13日 (2017 - 06 - 13) 权利要求1-14	1-29	PX	CN 106609282 A (中国科学院上海生命科学研究院) 2017年 5月 3日 (2017 - 05 - 03) 权利要求1-10	1-29	PX	WO 2017090761 A1 (NAT. UNIV. CORP. KOBE UNIV.) 2017年 6月 1日 (2017 - 06 - 01) 摘要、权利要求1-18	1-29	PX	WO 2017070632 A2 (PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD COLLEGE) 2017年 4月 27日 (2017 - 04 - 27) 摘要、权利要求1-302	1-29	X	WO 2015133554 A1 (NAT. UNIV. CORP. KOBE UNIV.) 2015年 9月 11日 (2015 - 09 - 11) 摘要、权利要求1-21、说明书0089, 0100-0101, 0124段	1	Y	WO 2015133554 A1 (NAT. UNIV. CORP. KOBE UNIV.) 2015年 9月 11日 (2015 - 09 - 11) 摘要、权利要求1-21、说明书0089, 0100-0101, 0124段	1-29
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求																								
PX	CN 107043779 A (中国农业科学院作物科学研究所) 2017年 8月 15日 (2017 - 08 - 15) 权利要求1-10	1-29																								
PX	CN 106834341 A (中国农业大学) 2017年 6月 13日 (2017 - 06 - 13) 权利要求1-14	1-29																								
PX	CN 106609282 A (中国科学院上海生命科学研究院) 2017年 5月 3日 (2017 - 05 - 03) 权利要求1-10	1-29																								
PX	WO 2017090761 A1 (NAT. UNIV. CORP. KOBE UNIV.) 2017年 6月 1日 (2017 - 06 - 01) 摘要、权利要求1-18	1-29																								
PX	WO 2017070632 A2 (PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD COLLEGE) 2017年 4月 27日 (2017 - 04 - 27) 摘要、权利要求1-302	1-29																								
X	WO 2015133554 A1 (NAT. UNIV. CORP. KOBE UNIV.) 2015年 9月 11日 (2015 - 09 - 11) 摘要、权利要求1-21、说明书0089, 0100-0101, 0124段	1																								
Y	WO 2015133554 A1 (NAT. UNIV. CORP. KOBE UNIV.) 2015年 9月 11日 (2015 - 09 - 11) 摘要、权利要求1-21、说明书0089, 0100-0101, 0124段	1-29																								
<p><input checked="" type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p>																										
<p>* 引用文件的具体类型: “A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 “E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 “L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件 (如具体说明的) “O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 “P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件</p> <p>“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 “X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 “Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 “&amp;” 同族专利的文件</p>																										
<p>国际检索实际完成的日期 2018年 1月 17日</p>		<p>国际检索报告邮寄日期 2018年 1月 25日</p>																								
<p>ISA/CN的名称和邮寄地址 中华人民共和国国家知识产权局 (ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451</p>		<p>受权官员 姚进孝 电话号码 (86-10)010-53961955</p>																								

C. 相关文件		
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
Y	CN 105934516 A (哈佛大学的校长及成员们) 2016年 9月 7日 (2016 - 09 - 07) 摘要、权利要求1-62	1-29
Y	PLOSKY, B. S. "CRISPR-Mediated Base Editing without DNA Double-Strand Breaks" Molecular Cell, 第62卷, 2016年 5月 19日 (2016 - 05 - 19), 第477-478页	1-29
A	WO 2014186686 A2 (TWO BLADES FOUNDATION) 2014年 11月 20日 (2014 - 11 - 20) 全文	1-29

国际检索报告  
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2017/110349

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	107043779	A	2017年 8月 15日	无			
CN	106834341	A	2017年 6月 13日	无			
CN	106609282	A	2017年 5月 3日	无			
WO	2017090761	A1	2017年 6月 1日	无			
WO	2017070632	A2	2017年 4月 27日	WO	2017070633	A3	2017年 7月 13日
				US	2017121693	A1	2017年 5月 4日
				WO	2017070633	A2	2017年 4月 27日
				WO	2017070632	A3	2017年 6月 8日
WO	2015133554	A1	2015年 9月 11日	EP	3115457	A1	2017年 1月 11日
				SG	11201609211V	A	2016年 12月 29日
				CA	2947941	A1	2015年 9月 11日
				US	2017073670	A1	2017年 3月 16日
				EP	3115457	A4	2017年 8月 9日
				JP	6206893	B2	2017年 10月 4日
				JP	WO2015133554	A1	2017年 4月 6日
				CN	106459957	A	2017年 2月 22日
CN	105934516	A	2016年 9月 7日	US	2015166980	A1	2015年 6月 18日
				US	9068179	B1	2015年 6月 30日
				EP	3080265	A1	2016年 10月 19日
				US	2016304846	A1	2016年 10月 20日
				CA	2933625	A1	2015年 6月 18日
				US	2015166985	A1	2015年 6月 18日
				AU	2014362208	A1	2016年 6月 30日
				US	2015166984	A1	2015年 6月 18日
				US	9840699	B2	2017年 12月 12日
				US	2015166983	A1	2015年 6月 18日
				WO	2015089406	A1	2015年 6月 18日
				US	2015165054	A1	2015年 6月 18日
				US	2015166982	A1	2015年 6月 18日
				JP	2017500035	A	2017年 1月 5日
				US	2015166981	A1	2015年 6月 18日
WO	2014186686	A2	2014年 11月 20日	WO	2014186686	A3	2015年 1月 8日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2009年7月)