

(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



(10) 国际公布号

WO 2018/103686 A1

(43) 国际公布日
2018年6月14日 (14.06.2018)

(51) 国际专利分类号:

C12N 15/09 (2006.01) C12N 15/63 (2006.01)

C12N 15/11 (2006.01) C12N 15/66 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2017/114962

(22) 国际申请日: 2017年12月7日 (07.12.2017)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
201611115749.6 2016年12月7日 (07.12.2016) CN

(71) 申请人: 中国科学院上海生命
科学研究院 (SHANGHAI INSTITUTES FOR
BIOLOGICAL SCIENCES, CHINESE ACADEMY OF
SCIENCES) [CN/CN]; 中国上海市徐汇区岳阳
路319号, Shanghai 200031 (CN)。

(72) 发明人: 朱健康 (ZHU, Jiankang); 中国上海市徐
汇区岳阳路320号, Shanghai 200031 (CN)。王东
(WANG, Dong); 中国上海市徐汇区岳阳路320
号, Shanghai 200031 (CN)。华凯 (HUA, Kai); 中
国上海市徐汇区岳阳路320号, Shanghai 200031
(CN)。刘志红 (LIU, Zhihong); 中国上海市徐
汇区岳阳路320号, Shanghai 200031 (CN)。

(74) 代理人: 上海一平知识产权代理有限公
司 (XU & PARTNERS, LLC.); 中国上海市普陀
区真北路958号天地科技广场1号楼106
室, Shanghai 200333 (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: CHLOROPLAST GENOME EDITING METHOD

(54) 发明名称: 叶绿体基因组编辑方法

(57) Abstract: Provided is a chloroplast genome editing method. In particular, provided are a nucleic acid construct, a vector, or a vector combination for plant genome site-specific editing based on a CRISPR technology, and a plant genome site-specific editing method. The nucleic acid construct comprises a nucleic acid construct of formula I and/or a nucleic acid construct of formula II, the nucleic acid construct of formula I comprises a chloroplast targeting signal peptide-nuclease expression cassette, and the nucleic acid construct of formula II comprises an ncRNA-sgRNA expression cassette. With this method, a nuclease and a corresponding sgRNA can be introduced into a chloroplast, so that gene knockout or homologous recombination and targeted insertion of a foreign segment can be carried out simply and efficiently at a predetermined chloroplast genomic site. This method can be used to improve a trait of a crop from the chloroplast genome level.

(57) 摘要: 提供了叶绿体基因组编辑方法。具体地, 提供了基于CRISPR技术的植物基因组定点编辑的核酸构建物、载体或载体组合、以及植物基因组定点编辑方法。所述核酸构建物包括式I核酸构建物和/或式II核酸构建物, 所述式I核酸构建物包含叶绿体定位信号肽-核酸酶表达盒, 所述的式II核酸构建物包含ncRNA-sgRNA表达盒。利用该方法, 可以将核酸酶和对应的sgRNA导入叶绿体, 从而在预定的叶绿体基因组位点, 简便而高效地进行基因敲除、或者同源重组和外源片段的定向插入。该方法可用于从叶绿体基因组水平改良作物的性状。



WO 2018/103686 A1

叶绿体基因组编辑方法

技术领域

5 本发明涉及生物技术领域，具体地，涉及 RNA 引导的植物叶绿体基因组编辑。

背景技术

10 现有的叶绿体基因组编辑技术主要依赖于基因枪技术，外源 DNA 通过同源重组的方法插入到植物的叶绿体基因组上，并且只能在少数的植物里获得稳定遗传的叶绿体转基因植株。另外基于同源重组的叶绿体转化没法在叶绿体基因组上造成双链 DNA 破坏。最新出现的 CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats) 技术被广泛的应用于植物细胞核基因组编辑，它通过 RNA 把 DNA 核酸内切酶例如 Cas9 带到与 RNA 序列匹配的 DNA 区域进行切割。

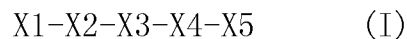
15 迄今为止还没有基于 CRISPR 技术对植物的叶绿体基因组进行编辑，所以本领域迫切需要开发简便高效的叶绿体基因组编辑方法。

发明内容

20 本发明的目的在于提供一种高通用性、高特异性、高效地对植物叶绿体进行基因编辑的方法。

在本发明的第一方面，提供了一种核酸构建物，所述的核酸构建物选自下组：

(1) 式 I 核酸构建物：



25 式中，

X1 为启动子元件；

X2 为叶绿体定位信号肽元件；

X3 为核酸酶元件；

X4 为无或标记基因元件；

30 X5 为终止子；

(2) 式 II 核酸构建物：

Y1-Y2-Y3-Y4-Ya-Y5-Yb-Y6 (II)

式中，

Y1 为启动子元件；

Y2 为 ncRNA 元件；

5 Y3 为无或标记基因元件；

Y4 为无或 RNA 切割酶元件；

Ya 和 Yb 各自独立地为无或 RNA 切割酶识别元件；

Y5 为 sgRNA 元件；

Y6 为终止子；

10 (3) 包括式 I 构建物和式 II 构建物的构建物。

在另一优选例中，所述的式 I 和式 II 结构为 5' 至 3' 方向。

在另一优选例中，所述 X1 选自：35S、UBQ。

在另一优选例中，所述 X2 选自：infA、RbcS。

在另一优选例中，所述 X4 选自下组：GFP、YFP、RFP。

15 在另一优选例中，所述 X5 为 Nos 终止子。

在另一优选例中，所述 Y1 为 35S 启动子。

在另一优选例中，所述 Y3 选自下组：GFP、YFP、RFP。

在另一优选例中，所述 Ya 为 Csy4 识别序列。

在另一优选例中，所述 Yb 为 Csy4 识别序列。

20 在另一优选例中，所述 Y6 为 Nos 终止子。

在另一优选例中，所述式 I 核酸构建物中核酸酶元件 X3 选自下组：

(1) Cas9；

(2) Cpf1；

(3) 锌指核酸酶(ZFN)；

25 (3) 转录活化剂样核酸酶(TALENS)；

(4) 巨核酸酶(meganuclease)；

或其组合。

在另一优选例中，所述式 I 核酸构建物中叶绿体定位信号肽元件 X2 为叶绿体信号肽 infA。

30 在另一优选例中，所述式 II 核酸构建物中 ncRNA 元件 Y2 来自类病毒、或病毒。

在另一优选例中，所述式 II 核酸构建物中 ncRNA 元件序列如 SEQ ID No. : 5 所示。

在另一优选例中，所述式 II 核酸构建物中 RNA 切割酶元件 Y4 为 Csy4。

在另一优选例中，所述 Csy4 序列如 SEQ ID No. : 6 所示。

- 5 在另一优选例中，所述式 II 核酸构建物中 sgRNA 元件 Y5 为 spCas9 sgRNA。
在另一优选例中，所述 Y5 如 SEQ ID No. : 8 或 9 所示。

在本发明的第二方面，提供了一种载体或载体组合，所述载体或载体组合含有本发明的第一方面所述的核酸构建物。

- 10 在另一优选例中，所述的式 I 核酸构建物和式 II 核酸构建物位于不同载体上。
在另一优选例中，所述的式 I 核酸构建物和式 II 核酸构建物位于同一载体上。

在本发明的第三方面，提供了一种试剂组合，包括：

(i) 本发明的第二方面所述的载体或载体组合。

15

在本发明的第四方面，提供了一种植物叶绿体基因编辑方法，包括步骤：

(i) 将 (a) 本发明的第二方面所述的载体或载体组合以及 (b) 任选的供体核酸片段，导入植物细胞、植物组织或植物 (植株)，从而在所述植物细胞、植物组织或植物中产生基因编辑；和

- 20 (ii) 任选地，对发生所述基因编辑的植物细胞或植物进行检测、筛选或鉴定。

在另一优选例中，所述的方法还包括：

(iii) 对步骤 (ii) 中经鉴定发生了所述基因编辑的植物细胞、植物组织或植物进行再生或培养。

- 25 在另一优选例中，所述的基因编辑包括基因敲除、定点插入、基因置换、或其组合。

在另一优选例中，所述的定向插入包括基于同源重组或非同源重组末端连接的定点插入。

在另一优选例中，所述的基因编辑包括单位点或多位点的基因编辑。

在另一优选例中，所述导入为通过农杆菌导入。

- 30 在另一优选例中，所述导入为通过基因枪导入。

在另一优选例中，所述导入为通过显微注射法、电击法、超声波法和聚乙二

醇(PEG)介导法导入。

在另一优选例中,所述的植物选自下组:农作物、树木、花卉。

在另一优选例中,所述的植物选自下组:禾本科植物、豆科植物和十字花科植物。

- 5 在另一优选例中,所述的植物包括:拟南芥、小麦、大麦、燕麦、玉米、水稻、高粱、粟、大豆、花生、烟草和番茄。

应理解,在本发明范围内中,本发明的上述各技术特征和在下文(如实施例)中具体描述的各技术特征之间都可以互相组合,从而构成新的或优选的技术方案。限于篇幅,在此不再一一累述。

附图说明

图 1 显示用 CRISPR/Cas9 突变叶绿体里的 GFP;

(A)显示使用的质粒图谱。所述载体用的是 35S 启动子(P35S)和 nos 终止子(Tnos)。infA 的信号肽(TPinfA)和类病毒上的一段非编码 RNA(ncRNA) 被用来将来自 *Streptococcus pyogenes* (化脓链球菌)的 Cas9 和 sgRNA 带到叶绿体。

(B)显示 Cas9-GFP 融合蛋白(上图)和 GFP 的 mRNA(下图)被运进叶绿体。

(C)显示通过 CRISPR/Cas9 对叶绿体基因组上的 aadA16gfp 基因进行突变。本实验用到的 2 个 sgRNA 的靶点(sgRNA1 和 sgRNA2);用 2 个载体:35S 启动子驱动带有叶绿体信号肽 infA 的 Cas9 和 35S 启动子驱动非编码 RNA 引导的带有 Csy4 和 2 个 Csy4 识别位点的 sgRNA2 瞬时转化 pMSK56 植株(下图)和没有转化载体的(上图),然后拍摄荧光显微镜图片。

(D)显示转化有 CRISPR/Cas9 pMSK56 植株的叶绿体里 GFP 蛋白数量比没有转化的植株少。植物转化有 sgRNA1 和 sgRNA2 被命名为 Cas9_PT1 和 Cas9_PT2。从 *Nicotiana tabacum*(烟草)叶绿体里提取的蛋白被用作野生型对照(WT)。位于内质网上的 BiP 蛋白被当作细胞质标记;位于叶绿体外膜上的 Toc75 蛋白(用箭头指出的位置)被当作叶绿体标记。每个样本的上样量为 30 微克蛋白。(标尺:10 微米)。

图 2 显示从 2 个模式植物里提取完整的叶绿体。烟草(A)和拟南芥(B)的 Western blot 结果。箭头标记出 Toc75 特异蛋白的位置。分别从叶片和完整的叶绿体里提取蛋白。对于叶片,上样量为 20 微克蛋白;对于叶绿体,上样量

为 30 微克蛋白。

图 3 显示测序验证 sgRNA1 和 sgRNA2 的环化逆转录 PCR 产物。sgRNA1 和 sgRNA2 的环化逆转录 PCR 产物的序列色谱，每个测了 3 个独立的克隆。

图 4 显示测序结果发现在转化有 sgRNA2 的 pMSK56 植物的 *aadA16GFP* 里有插入 DNA 片段（图 4A）；PCR 验证只有在转化有 sgRNA2 的 pMSK56 植物的叶绿体 DNA 能够扩增到条带（图 4B）。

图 5 显示运用 CRISPR/Cas9 降低叶绿体基因组上 *aadA16gfp* 基因的表达。在 pMSK56 的 CRISPR/Cas9 T1 代转基因植株里(*aadA16gfpT1-1*~*aadA16gfpT1-5*) 检测没有核酸酶活性的 Cas9 (dCas9) 表达量。dCas9 蛋白表达量高的植株里 GFP 的表达量低。没有 CRISPR/Cas9 的 pMSK56 植株作为对照，即 control。

图 6 显示在拟南芥里靶向降低 *rpl33* 的表达量。(A) 实验里用到的质粒图谱。PUBQ 和 TUBQ 分别代表 AtUBQ1 的启动子和终止子。(B) 通过 CRISPR/Cas9 系统对拟南芥 var2 植株叶绿体基因组上的 *rpl33* 基因进行 knockdown。本实验用到的 2 个 sgRNAs 分别靶向 *rpl33* 基因的模板链 (T) 和非模板链 (NT)。CK 代表得是从只转化了没有 sgRNA 的 CRISPR/Cas9 系统的 var2 植株。含有 sgRNA 靶向 *rpl33* 模板链和 sgRNA 靶向 *rpl33* 非模板链 CRISPR/Cas9 载体的拟南芥 var2 T1 代植株被分别标记为 33T 和 33NT。var2 引起的叶杂色表型被恢复和没有被恢复的植株被分别标记为 S 和 NS。

图 7 显示靶向降低 *rpl33* 的表达可以恢复 *var2* 突变介导的叶杂色表型。从左到右分别是转化不含有 sgRNA，sgRNA 靶向 *rpl33* 模板链和 sgRNA 靶向 *rpl33* 非模板链 CRISPR/Cas9 载体的拟南芥 *var2* 植株。灰色箭头指出得是通过靶向降低 *rpl33* 的表达已经恢复叶杂色表型的植株。

具体实施方式

本发明人经过广泛而深入的研究、首次构建了一种基于 CRISPR 技术的叶绿体基因组定点编辑系统、以及用于叶绿体基因组定点编辑的核酸构建物、载体或载体组合、以及叶绿体基因组定点编辑方法。本发明的方法可以在预定的植物基因组位点、简便而高效地进行基因敲除或者同源重组和外源片段的定向插入。在此基础上完成了本发明。

典型地，本发明 CRISPR 编辑系统中核酸酶采用 Cas9 蛋白，通过叶绿体信号肽 *infA* 将 Cas9 蛋白带进叶绿体；采用非编码 RNA(ncRNA)，例如来自类病毒的

ncRNA 将 sgRNA(例如 spCas9 sgRNA)带进叶绿体,从而实现对叶绿体基因组上基因的敲除。与传统的基因枪技术相比,本发明方法不仅降低了操作难度,提高了叶绿体基因定点编辑的效率和精确性,而且降低了操作成本。此外,本发明方法还可有效用于那些无法进行基因枪转化的植物品种。

5

术语

除非另外定义、本文使用的所有技术和科学术语的意义与本发明所属领域普通技术人员通常所理解的相同。本文中述及的所有出版物和其他参考文献都通过引用纳入本文。

10 如本文所用、所述的“含有”、“具有”或“包括”包括了“包含”、“主要由……构成”、“基本上由……构成”、和“由……构成”。

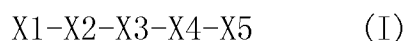
如本文所用、术语“操作性相连”或“可操作地连于”指这样一种状况、即线性DNA序列的某些部分能够调节或控制同一线性DNA序列其它部分的活性。例如、如果启动子控制序列的转录、那么它就是可操作地连于编码序列。

15

基于核酸酶的植物基因组定点编辑的核酸构建物和方法

本发明提供了一种核酸构建物,所述的核酸构建物选自:

(1) 式 I 核酸构建物:



20 式中,

X1 为启动子元件;

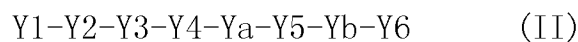
X2 为叶绿体定位信号肽元件;

X3 为核酸酶元件;

X4 为无或标记基因元件;

25 X5 为终止子;

(2) 式 II 核酸构建物:



式中,

Y1 为启动子元件;

30 Y2 为 ncRNA 元件;

Y3 为无或标记基因元件;

Y4 为无或 RNA 切割酶元件；

Ya、Yb 为无或 RNA 切割酶识别元件；

Y5 为 sgRNA 元件；

Y6 为终止子；

5 (3) 包括式 I 构建物和式 II 构建物的构建物。

在上述结构式中，“-”表示键。

在本发明中、上述的各元件可用常规方法(如 PCR 法、人工全合成)制备、然后用常规方法进行连接、从而形成本发明所述的核酸构建物。如需要、在连接反应之前、可以任选地进行酶切反应。

10 此外、本发明的所述核酸构建物可以是线性的、也可以是环状的。本发明的所述核酸构建物可以是单链的、也可以是双链的。本发明的所述核酸构建物可以是 DNA、也可以是 RNA、或 DNA/RNA 杂合。

如本文所用、“标记基因”指基因编辑过程中用来筛选基因编辑成功的细胞的基因，可用于本申请的标记基因没有特别限制、包括基因编辑领域常用的各种标记基因，代表性例子包括(但不限于)：绿色荧光蛋白(GFP)、黄色荧光蛋白(YFP)、潮霉素抗性基因(Hyg)、卡那霉素抗性基因(NPTII)、新霉素基因、或嘌呤霉素抗性基因。

15

如本文所用，术语“植物启动子”指能够在植物细胞中启动核酸转录的核酸序列。该植物启动子可以是来源于植物、微生物(如细菌、病毒)或动物等，或者是人工合成或改造过的启动子。代表性的例子包括(但不限于)：35S 启动子。

20

如本文所用，术语“植物终止子”指能够在植物细胞中可使转录停止的终止子。该植物转录终止子可以是来源于植物、微生物(如细菌、病毒)或动物等，或者是人工合成或改造过的终止子。代表性的例子包括(但不限于)：Nos 终止子。

如本文所用，术语“信号肽”是指新合成的蛋白质向分泌通路转移的短肽链。代表性的例子包括(但不限于)：infA 信号肽。

25

如本文所用，典型地，所述式 I 核酸构建物中核酸酶元件 X3 选自下组：

(1) Cas9；

(2) Cpf1；

(3) 锌指核酸酶(ZFN)；

30 (3) 转录活化剂样核酸酶(TALENS)；

(4) 巨核酸酶(meganuclease)；

或其组合。

如本文所用、术语“核酸酶元件”指编码具有切割活性的核酸酶的核苷酸序列。在插入的多聚核苷酸序列被转录和翻译从而产生功能性核酸酶的情况下、技术人员会认识到、因为密码子的简并性、有大量多聚核苷酸序列可以编
5 码相同的多肽。另外、技术人员也会认识到不同物种对于密码子具有一定的偏好性、可能会根据在不同物种中表达的需要、会对核酸酶的密码子进行优化、这些变异体都被术语“核酸酶元件”所具体涵盖。

此外，术语“核酸酶元件”特定地包括了全长的、与 Cas9 和/或 Cpf1 基因序列基本相同的序列、以及编码出保留 Cas9 和/或 Cpf1 蛋白功能的蛋白质的
10 的序列。

典型地，术语“核酸酶元件”为来自化脓链球菌 (*Streptococcus pyogenes*) 的 Cas9 蛋白的编码序列。

优选地，本发明所述式 I 核酸构建物中叶绿体定位信号肽元件 X2 为叶绿体信号肽 infA。

15 典型地，本发明所述式 II 核酸构建物中 ncRNA 元件 Y2 来自类病毒。

优选地，本发明所述式 II 核酸构建物中 ncRNA 元件序列如 SEQ ID No. : 5 所示。

典型地，本发明所述式 II 核酸构建物中 RNA 切割酶元件 Y4 为 Csy4。

优选地，本发明所述 Csy4 序列如 SEQ ID No. :6 所示。

20 典型地，本发明所述式 II 核酸构建物中 sgRNA 元件 Y5 为 spCas9 sgRNA。

优选地，本发明所述 sgRNA 序列如 SEQ ID No. :8 或 9 所示。

本发明还提供了一种载体或载体组合，所述载体或载体组合含有本发明所述的核酸构建物。

优选地，本发明所述的式 I 核酸构建物和式 II 核酸构建物位于同一载体上。

25 在本发明的核酸构建物和/或载体中、一些元件之间是可操作连接的。例如当启动子与编码序列可操作连接时、指所述启动子能够启动所述编码序列的转录。

本发明还提供了含有上述载体或载体组合的试剂组合以及试剂盒，它们可用于本发明的植物叶绿体基因编辑方法。

本发明还提供了一种植物叶绿体基因编辑方法，包括步骤：

30 (i) 将 (a) 本发明所述的载体或载体组合以及 (b) 任选的供体核酸片段，导入植物细胞、植物组织或植物，从而在所述植物细胞、植物组织或植物中产生基因编辑；

和

(ii) 任选地, 对发生所述基因编辑的植物细胞或植物进行检测、筛选或鉴定。

在本发明中、所述的基因编辑包括基因敲除、定点插入、基因置换、或其组合。

5 本发明的植物基因编辑方法、可用于改良各类植物、尤其是对农作物进行改良。

如本文所用、术语“植物”包括全植株、植物器官(如叶、茎、根等)、种子和植物细胞以及它们的子代。可用于本发明方法的植物的种类没有特别限制、一般包括任何可进行转化技术的高等植物类型、包括单子叶、双子叶植物

10 和裸子植物。

本发明的主要优点在于:

(1) 首次利用 CRISPR 技术在叶绿体基因组上造成了有效的双链 DNA 的切割以及基因编辑;

15 (2) 有效降低了叶绿体基因编辑的成本和难度;

(3) 大幅拓宽了叶绿体基因编辑物种的广度。

下面结合具体实施例, 进一步阐述本发明。应理解, 这些实施例仅用于说明本发明而不用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法, 通常按照常规条件如 Sambrook 等人, 分子克隆: 实验室手册 (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) 中所述的条件, 或按照制造厂商所建议的条件。除非另外说明, 否则百分比和份数按重量计算。本发明中所涉及的实验材料如无特殊说明均可从市售渠道获得。

25 材料

实验中所用的拟南芥材料为野生型 Col-0。Col-0 种子用 5% 次氯酸钠消毒后播种于 1/2MS 固体培养基上, 平板 4℃ 处理三天后放入光照培养箱 (22 度, 16 hrs 光照/8 hrs 黑暗) 培养 10-14 天, 然后移苗到营养土中, 温室继续培养。

实验所用烟草为野生型 *Nicotiana tabacum* (烟草) 和以 *Nicotiana tabacum* 为受体的叶绿体转基因植株 pMSK56 (pMSK56 叶绿体基因组上编码有 *aadAGFP* 融合基因)。pMSK56 转基因植株为一种常规的烟草植株 (Khan and Maliga, 1999)。

30

Nicotiana tabacum 及 pMSK56 的种子播于营养土中，放置于温室 (26 度，16 hrs 光照/8 hrs) 培养 10 天左右，单株幼苗移栽到营养土中，相同条件继续培养 3 周左右用于瞬时转化实验。

5 方法

目标位点设计

对于 SpCas9 蛋白，其 PAM 序列要求为 5' -NGG-3'，因此叶绿体基因组上合适的靶位点为 5' -N₂₀NGG-3'。

10 载体构建

pCam1300-35S-ncRNA-GFP, pCam1300-35S-ncRNA-GFP-spsgRNA 载体的构建

实验中能将 RNA 导入到叶绿体中的 ncRNA 参照了 (Gómez and Pallás, 2010) 文中的序列，人工合成后连入到市售的 pUC57 载体中得到 pUC57-ncRNA。ncRNA 序列，GFP 编码序列，spsgRNA 骨架分别从 pUC57-ncRNA, pGWB505, pCas9 (AtU6) 载体扩增得到，ncRNA-GFP, ncRNA-GFP-spsgRNA 可以通过叠连 PCR 的方法依次连接在一起，PCR 产物回收，用 XmaI, BamHI 消化后连入到 pCam1300-35S 载体中的 35S 启动子 (SEQ ID No. : 1) 和 NOS 终止子 (SEQ ID No. : 2) 之间得到载体 pCam1300-35S-ncRNA-GFP, pCam1300-35S-ncRNA-GFP-sgRNA。

20 核苷酸序列 SEQ ID No. : 1

TCAACATGGTGGAGCACGACACACTTGTCTACTCCAAAAATATCAAAGATACAGTCTCAGAAGACC
AAAGGGCAATTGAGACTTTTCAACAAAGGGTAATATCCGGAAACCTCCTCGGATTCCATTGCCAGCTATC
TGTCACCTTTATTGTGAAGATAGTGGAAAAGGAAGGTGGCTCCTACAAATGCCATCATTGCGATAAAGGAAA
GGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCCCACCCACGAGGAGCATCGTGG
25 AAAAAAGAAGACGTTCCAACCACGTCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATAACATGGTGGAGCAGCAGACA
CTTGTCTACTCCAAAAATATCAAAGATACAGTCTCAGAAGACCAAAGGGCAATTGAGACTTTTCAACAAAG
GGTGATATCCGGAAACCTCCTCGGATTCCATTGCCAGCTATCTGTCACTTTATTGTGAAGATAGTGGAAA
AGGAAGGTGGCTCCTACAAATGCCATCATTGCGATAAAGGAAAAGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGAC
AGTGGTCCCAAAGATGGACCCCCACCCACGAGGAGCATCGTGGAAAAAGAAGACGTTCCAACCACGTCTTC
30 AAAGCAAGTGGATTGATGTGATATCTCCACTGACGTAAGGGATGACGCACAATCCCACTATCCTTCGCAAG
ACCCTTCTCTATATAAGGAAGTTCATTTCAATTTGGAGAGGACCTCGACCTCAACACAACATATAAAAAAC

AAACGAATCTCAAGCAATCAAGCATTCTACTTCTATTGCAGCAATTTAAATCATTCTTTTAAAGCAAAG
 CAATTTTCTGAAAATTTTCACCATTTACGAACGATA

核苷酸序列 SEQ ID No. : 2

5 TGATTGATCGATAGAGCTCGAATTTCCCGATCGTTCAAACATTTGGCAATAAAGTTTCTTAAGAT
 TGAATCCTGTTGCCGGTCTTGCATGATTATCATATAATTTCTGTTGAATTACGTTAAGCATGTAATAATT
 AACATGTAATGCATGACGTTATTTATGAGATGGGTTTTTATGATTAGAGTCCCGCAATTATACATTTAATA
 CGCGATAGAAAACAAAATATAGCGCGCAAAGTAGGATAAATTATCGCGCGCGGTGTCATCTATGTTACTAG
 ATCGG

10

pCam1300-35S-infA-Cas9-GFP 载体的构建

叶绿体定位信号 infA(SEQ ID No. : 3)从拟南芥 cDNA 文库中扩增获得。
 Cas9, GFP(SEQ ID No. : 4)编码序列分别从载体 pCas9(AtU6), pGWB505 上扩
 增得到, infA, Cas9, GFP 三个片段通过 Gibson assembly 的方法连入
 15 pCam1300-35S 载体的 35S 启动子和 NOS 终止子之间得到
 pCam1300-35S-infA-Cas9-GFP 载体。

核苷酸序列 SEQ ID No. : 3

ATGCTTCAACTCTGCTCCACTTTCCGTCCTCAACTTCTTCTTCTTGTCAATTCCGATTTACAAAT
 20 GCGTTTTGATTCCCCAAATAAACTATGTTGCAAGCAATTCAGTTGTGAATATCCGGCCAATGATACGATG
 CCAGAGAGCAAGCGGAGGAAGAGGAGGAGCTAATAGAAGCAAA

核苷酸序列 SEQ ID No. : 4

ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTTCGAGCTGGACGGCGAC
 25 GTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAA
 GTTCATCTGCACCACCGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCACCCCTCGTGACCACCTTCACCTACGGCGTGC
 AGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCAGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTAC
 GTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGG
 CGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACA
 30 AGCTGGAGTACAACACTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTG
 AACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCC

CATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCCACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACC
 CCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCACTCACGGCATGGAC
 GAGCTGTACAAGTAA

5 pCam1300-35S-infA-Cas9 载体的构建

用上游引物 5' 端带有终止密码子的引物从 pCam1300-35S 载体上扩增出 NOS 终止子, PCR 产物回收后用 BamHI 和 EcoRI 进行双酶切。再将 GFP 基因和 NOS 终止子从 pCam1300-35S-infA-Cas9-GFP 载体用 BamHI 和 EcoRI 切除, 片段回收后与上述回收的 NOS 终止子连接得到 pCam1300-35S-infA-Cas9 载体。

10

pCam1300-35S-ncRNA-Csy4-sgRNA 载体的构建

C 端带有 3×Frag 标签的 Csy4 基因 (SEQ ID No. : 6) 由人工合成连入到 pUC57 载体中得到 pUC57-Csy4。ncRNA 序列 (SEQ ID No. : 5), Csy4-3×Frag 编码区, sgRNA 骨架分别从 pUC57-ncRNA, pUC57-Csy4, pCas9 (AtU6) 载体扩增
 15 得到。sgRNA 骨架上, 下游加有 20 nt 的 Csy4 识别位点 (SEQ ID No. : 7)。另外两个 AarI 酶切位点加在 Csy4-3×Frag 编码区下游。ncRNA 序列, Csy4-3×Frag 编码区, sgRNA 骨架用叠连 PCR 的方法依次连接在一起, PCR 产物回收, 用 XmaI, BamHI 消化后连入到 pCam1300-35S 载体中的 35S 启动子和 NOS 终止子之间。

20 核苷酸序列 SEQ ID No. : 5

TTGGCGAAACCCCATTTTCGACCTTTCGGTCTCATCAGGGGTGGCACACACCACCCTATGGGGAGAG
 GTCGTCCTCTATCTCTCCTGGAAGGCCGGAGCAATCCAAAAGAGGTACACCCACCCATGGGTCCGGACTTT
 AAATTCGGAGGATTCGTCTTTAAACGTTCCCTCCAAGAGTCCCTTCCCCAAACCCTTACTTTGTAAGTGTG
 GTTCGGCGAATGTACCGTTTCGTCCTTTCGGACTCATCAGGGAAAGTACACACTTTCGGACGGTGGGTTCG
 25 TCGACACCTCTCCCCCTCCAGGTACTATCCCCTTCCAGGATTTGTTCCC

核苷酸序列 SEQ ID No. : 6

ATGGACCACTATCTGGACATCAGACTGAGGCCCGATCCTGAGTTCCTCCCGCCAGCTGATGAGC
 GTGCTGTTTGGCAAGCTGCATCAGGCTCTGGTCGCCAAGGCGGAGACAGAATCGGCGTGTCTTCCCCGA
 30 CCTGGACGAGTCCCGGAGTCGCCTGGGCGAGCGGCTGAGAATCCACGCCAGCGCAGACGATCTGCGCGCCC
 TGCTGGCCCGGCCTTGGCTGGAGGGCCTGCGGGATCATCTGCAGTTTGGCGAGCCCGCCGTGGTGCCACAC

CCAACACCCTACCGCCAGGTGAGCCGCGTGCAGGCCAAGTCAAATCCCCGAGAGACTGCGGCGGAGGCTGAT
 GAGGCGACATGATCTGAGCGAGGAGGAGGCCAGAAAGAGAATCCCCGACACAGTGGCCAGAGCCCTGGATC
 TGCCATTTGTGACCCTGCGGAGCCAGAGCACTGGCCAGCATTTTCAGACTGTTTCATCAGACACGGGCCCTG
 CAGGTTACAGCCGAGGAGGGCGGATTTACATGCTATGGCCTGTCTAAAGGCGGCTTCGTGCCCTGGTTCTA

5 A

核苷酸序列 SEQ ID No. : 7

GTTCACTGCCGTATAGGCAG

10 pCam1300-UBQ-spsgRNA-35S-Cas9 载体的构建

以拟南芥 Col-0 基因组为模板分别扩增出 UBQ1 基因 (AT3G52590) 的启动子 UBQpro 和终止子 UBQTer。从 pCam1300-35S-ncRNA-Csy4-sgRNA 载体中扩增出 ncRNA-Csy4-sgRNA 片段，以叠连 PCR 的方法将 UBQpro、ncRNA-Csy4-spsgRNA、UBQTer 三段依次连接在一起，PCR 回收产物用 HindIII 和 XmaI 消化后连入
 15 pCambia1300 载体之中，得到 pCam1300-UBQ-spsgRNA 载体。从 pCam1300-35S-infA-Cas9 载体中扩增出 35S-infA-Cas9-NOS 片段，PCR 产物回收后利用 Gibson assembly 的方法连入 pCam1300-UBQ-sgRNA 载体中得到 pCam1300-UBQ-sgRNA-35S-Cas9。

20 sgRNA 装入相应目标载体

对于载体 pCam1300-35S-ncRNA-Csy4-sgRNA 和 pCam1300-UBQ-sgRNA-35S-Cas9，选取 5' -N₂₀NGG-3' 作为靶标序列。分别合成上游引物 GCAGN₂₀ 和下游引物 AAACN₂₀，上下游引物退火后形成带有 4 nt 接头的短双链 DNA 片段。载体 pCam1300-35S-ncRNA-Csy4-sgRNA 和 pCam1300-UBQ-sgRNA-35S-Cas9 用 AarI 酶消
 25 化 4 小时后电泳，切胶回收，然后与退火形成的短链 DNA 片段连接。

蛋白瞬时定位实验

载体 pCam1300-35S-ncRNA-GFP，pCam1300-35S-ncRNA-GFP-sgRNA，pCam1300-35S-infA-Cas9-GFP 通过冻融法转入农杆菌 GV3101 感受态中，农杆菌
 30 菌 28 度黑暗培养两天，挑取单克隆于 5ml LB 抗性培养基 (50 mg/L 卡那霉素，25 mg/L 利福平) 中，28 °C，240 rpm 培养 16 小时，以 1: 100 的比例转接到

新的 5 ml LB 抗性培养基中(培养基中另加有 2 μ M 的乙酰丁香酮, 10 mM MES, pH 5.6), 28 $^{\circ}$ C, 240 rpm 培养过夜到 $OD_{600}=3$ 。4000 rpm, 10 min 收集菌体, 用 10 mM MES pH 5.6, 10 mM $MgCl_2$, 10 μ m 乙酰丁香酮溶液将菌体悬起, 调 OD_{600} 到 0.6-0.8。室温静置 2-3 小时后, 用不带针头的 1ml 医用注射器将农杆菌注射到 4 周左右生长状态良好烟草叶片背面。培养 60-72 小时后取样观察蛋白定位。

pMSK56 报告基因 aadA-GFP 敲除

选取 aadA-GFP 报告基因中符合 5' - $N_{20}NGG$ -3' 序列要求的位点。合成相应的 sgRNA 序列, 退火后连入 AarI 酶切过的 pCam1300-35S-ncRNA-Csy4-spsgRNA 载体中。构建好的载体连同空载 pCam1300-35S-infA-Cas9 载体转入农杆菌 GV3101 感受态中。另外, 为了抑制 RNAi 引起的转录后沉默现象, 将表达 p19 蛋白的载体也转入农杆菌 GV3101 感受态中。农杆菌 28 $^{\circ}$ C 黑暗培养两天, 挑取单克隆于 5ml LB 抗性培养基(50 mg/L 卡那霉素, 25 mg/L 利福平)中, 28 $^{\circ}$ C, 240 rpm 培养 16 小时, 以 1: 100 的比例转接到新的 5 ml LB 抗性培养基中(培养基中另加有 2 μ M 的乙酰丁香酮, 10 mM MES, pH 5.6), 28 度, 240 rpm 培养过夜到 $OD_{600}=3$ 。4000 rpm, 10 min 收集菌体, 用 10 mM MES pH 5.6, 10 mM $MgCl_2$, 10 μ m 乙酰丁香酮溶液将菌体悬起, 调 OD_{600} 到 1.5。表达 p19 的农杆菌 OD_{600} 调到 1.0。将含 pCam1300-35S-ncRNA-Csy4-sgRNA, pCam1300-35S-infA-Cas9, p19 载体的三种农杆菌以 1: 1: 1 的比例混合, 室温静置 2-3 小时后, 用不带针头的 1ml 医用注射器将农杆菌注射到 4 周左右生长状态良好烟草叶片背面。培养 60-72 小时后取样观察 GFP 信号的变化。

拟南芥转化与筛选

选取合适的 sgRNA 序列依前述方法装入 pCam1300-UBQ-sgRNA-35S-Cas9 载体中。相应载体转入农杆菌 GV3101 中。选取健壮的盛花期的 Col-0 以浸花法进行遗传转化, 正常护理一个月后收种得 T_0 代种子。 T_0 代种子用 5% 次氯酸钠消毒后在含 50 mg/L 潮霉素的 1/2 MS 平板上筛选, 阳性苗移栽到营养土中放置于温室继续培养。

叶绿体提取与 Western blot 检测

在冷库中将植物组织在预冷的 0.33 M sorbitol, 20 mM tricine (pH 8.4),

5 mM EGTA, 5 mM EDTA, 10 mM NaHCO₃, 0.1 % (w/v) BSA 中按照 4 ml 每 mg 的比例用 Polytron ® 匀浆器打碎。用 3 层纱布过滤一次, 再用一层 Miracloth 过滤一次。在 4 度离心机中 2000 g 离心 2 分钟, 用 0.33 M sorbitol, 20 mM HEPES (pH 7.9), 5 mM MgCl₂, 2.5 mM EDTA, 10 mM NaHCO₃, 0.1 % (w/v) BSA, 2 mM ascorbate 将沉淀悬浮起来。将悬浮液置于 40/100 % (v/v) 的 Percoll (sigma) 梯度上 4 度离心 30 分钟 (40 % (v/v) Percoll 溶液: 0.33 M sorbitol, 20 mM HEPES (pH 7.9), 5 mM MgCl₂, 2.5 mM EDTA, 10 mM NaHCO₃, 0.2 % (w/v) BSA, 2 mM ascorbate, 40 % (v/v) Percoll; 100 % (v/v) Percoll 溶液: 0.33 M sorbitol, 20 mM HEPES (pH 7.9), 5 mM MgCl₂, 2.5 mM EDTA, 10 mM NaHCO₃, 0.2 % (w/v) BSA, 2 mM ascorbate, 100 % (v/v))。收集位于两层 Percoll 梯度中间的完整叶绿体, 加入 10 ml 0.33 M sorbitol, 20 mM HEPES (pH 7.9), 5 mM MgCl₂, 2.5 mM EDTA, 10 mM NaHCO₃, 0.1 % (w/v) BSA, 2 mM ascorbate, 2000 g 4 度离心 2 分钟。得到的沉淀即为叶绿体。

在提好的叶绿体中加入 200 μl 50 mM Tris-HCl (pH 6.8), 2% (w/v) SDS, 10 % (v/v) 甘油, 1 % (v/v) 巯基乙醇。在 95 度煮 5 分钟, 用最大的速度在 4 度离心 15 分钟, 转移上清到一个新管中。每 μl 上清中加入 2 μl 150 mM Tris-HCl (pH 6.8), 6 % (w/v) SDS, 0.3 % (w/v) 溴酚蓝, 30 % (v/v) 甘油, 3 % (v/v) 巯基乙醇。用 8% 的 SDS-PAGE 胶分离蛋白, 将分离后的蛋白在 105 V 的电压下用 Bio-Rad 仪器转移到 PVDF (Millipore) 膜上。在 20 mM Tris-HCl (pH 8), 150 mM NaCl, 0.1% (V/V) Tween 20, 5% SKIM MILK POWDER, 中封闭 1 小时。在 20 mM Tris-HCl (pH 8), 150 mM NaCl, 0.1% (V/V) Tween 20, 2% SKIM MILK POWDER 中将一抗 (anti-TOC75, anti-Bip (agrisera), anti-GFP (abcam)) 用合适的比例稀释之后, 将 PVDF 膜孵育 1 小时。用 20 mM Tris-HCl (pH 8), 150 mM NaCl, 0.1% (V/V) Tween 20 洗 4 次, 时间分别为 15 分钟, 5 分钟, 5 分钟, 5 分钟。在 20 mM Tris-HCl (pH 8), 150 mM NaCl, 0.1% (V/V) Tween 20, 2% SKIM MILK POWDER 中将二抗 (abmart) 用合适的比例稀释之后, 将 PVDF 膜孵育 1 小时。用 20 mM Tris-HCl (pH 8), 150 mM NaCl, 0.1% (V/V) Tween 20 洗 4 次, 时间分别为 15 分钟, 5 分钟, 5 分钟, 5 分钟。用 Tanon™ High-sig ECL Western Blotting Substrate 显色之后用 X 光片显影。

30 叶绿体 DNA 提取和测序

用 DNeasy Plant Maxi Kit (QIAGEN) 提取叶绿体 DNA, 跑胶对提取的叶绿

体 DNA 进行质量检测确定没有 RNA 污染和获得的 DNA 分子量大致范围。然后使用 COVARIS S220 把叶绿体 DNA 片段选择打断至 450-600bp, 定容体积到 60ul, 使用 Illumina DNA Sample Preparation Kit 加入 40ul End Repair Mix, 30 度处理 30 分钟, 加入 160ul AMPure XP Beads 纯化, 定容到 17.5ul 加入 12.5ul A-Tailing Mix, 37 度 30 分钟, 加入 2ul DNA Adapter Index, 3ul Resuspension Buffer 和 2.5ul Ligation Mix, 30 度反应 30 分钟, 加入 5ul Stop Ligation Buffer 混匀后加入 42ul AMPure XP Beads 纯化, 然后定容至 10ul, 用 Qubit 定量与 Agilent 2100 Bioanalyzer 检测片段大小。最后用 illumina HiSeq2500 Rapid 模式 PE250 测序。

10

实施例 1

在烟草里验证叶绿体信号肽 infA 和非编码 RNA 能分别把 Cas9-GFP 融合蛋白和 GFP mRNA 带进叶绿体

15 构建 35S 启动子驱动的带有叶绿体信号肽 infA 的 Cas9 和 GFP 融合蛋白(图 1A); 构建 35S 启动子驱动的连接有非编码 RNA 的 GFP。把这 2 个载体在烟草里进行瞬时转化验证, 发现由 GFP 发出的绿色荧光和叶绿素发出的红色荧光在叶绿体里共定位, 证明叶绿体信号肽 infA 和非编码 RNA 能分别把 Cas9-GFP 融合蛋白和 GFP mRNA 带进叶绿体(图 1B)。

20 实施例 2

在烟草里验证非编码 RNA 能引导带有 Csy4 和 2 个 Csy4 识别位点的 sgRNA 到叶绿体里

25 构建 35S 启动子驱动非编码 RNA 引导的带有 Csy4 和 2 个 Csy4 识别位点的 sgRNA, 然后通过瞬时转化烟草。农杆菌转化烟草 3 天半后, 提取烟草的叶绿体。通过 Western blot 证明烟草的叶绿体被很好的纯化获得(图 2), BiP 和 Toc75 分别作为细胞质和叶绿体的标记。

30 接下来对获得的叶绿体提取 RNA, 然后通过环化逆转录 PCR(circularized reverse transcription PCR, cRT-PCR)对 sgRNA 进行检测。测序结果: 在检测的 6 个克隆中(各 3 个克隆), 在叶绿体里均分别存在被 Csy4 切割后形成的成熟 sgRNA(图 3)。

实施例 3

利用 CRISPR 在 pMSK56 植株的叶绿体基因组上进行双链 DNA 破坏

构建 35S 启动子驱动的带有叶绿体信号肽 *infA* 的 Cas9，然后把它与实验步骤 2 里构建的 35S 启动子驱动非编码 RNA 引导的带有 Csy4 和 2 个 Csy4 识别位点的 sgRNA (图 1A)。

在本实施例中，分别选取了 2 个不同的靶点：sgRNA1 (SEQ ID No. : 8) 和 sgRNA2 (SEQ ID No. : 9) 共转化 pMSK56 植株。在 pMSK56 植株的叶绿体基因组上有 *aadA16GFP* 基因，这个基因编码的 *aadA*-GFP 融合蛋白在叶绿体里发绿色荧光，所以每个叶绿体都有来自 *aadA*-GFP 的绿色荧光和来自叶绿素的红色荧光 (图 1C)。而被这 2 个载体共转化后的 pMSK56 植株里，观察到了只有红色荧光而没有绿色荧光的叶绿体 (图 1C)，这就表明叶绿体上 *aadA16GFP* 可能被突变了，接下来提取了野生型烟草、pMSK56、以及分别转化了 35S 启动子驱动的带有叶绿体信号肽 *infA* 的 Cas9 和 35S 启动子驱动非编码 RNA 引导的带有 Csy4 和 2 个 Csy4 识别位点的 sgRNA 的叶绿体。Western blot 证明，转化有 Cas9 和 sgRNA 的 pMSK56 植株里的 *aadA*-GFP 蛋白的数量减少了。

核苷酸序列 SEQ ID No. : 8

TGCACGACGACATCATTCCGGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTAT
CAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTT

20

核苷酸序列 SEQ ID No. : 9

AGAAGGTCTTAAAGTCGCCAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTAT
CAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTT

25 实施例 4

利用二代测序技术检测 CRISPR 在叶绿体基因组上的突变

对实施例 3 中转化有 sgRNA2 的 pMSK56 植物的叶片提取叶绿体，然后用 DNeasy Plant Maxi Kit (Qiagen) 提取叶绿体 DNA，然后用二代测序技术检测在报告基因 *aadA16GFP* 的突变。测序结果发现在转化有 sgRNA2 的 pMSK56 植物的 *aadA16GFP* 里有插入 DNA 片段 (图 4A, 方框内的序列为插入 DNA 片段)，然后按照相应的序列设计引物 PCR 验证了这个结果，只有在转化有 sgRNA2 的 pMSK56

30

植物的叶绿体 DNA 能够扩增到条带（图 4B）。

实施例 5

利用 CRISPR 在 pMSK56 植株的叶绿体基因组上进行靶向 knockdown

- 5 构建 35S 启动子驱动的带有叶绿体信号肽 *infA* 的没有核酸酶活性的 Cas9（dCas9:D10A 和 H840A），和 35S 启动子驱动非编码 RNA 引导的带有 Csy4 和 2 个 Csy4 识别位点的 sgRNA（靶向 *aadA16gfp* 基因）转化 pMSK56 植株。发明人在 5 个 T1 代转基因单株里分别运用 western blot 和实时定量 PCR 分别检测了 dCas9 和 *gfp* 基因的表达量。发明人发现 dCas9 蛋白的表达量与 GFP 的表达量
- 10 呈现负相关（图 5），即 dCas9 蛋白表达量高的植株里 GFP 的表达量低。

实施例 6

利用 CRISPR 在拟南芥 *var2* 植株的叶绿体基因组上进行靶向 knockdown，从而恢复它的叶杂色表型。

- 15 构建 UBQ 启动子驱动的带有叶绿体信号肽 *infA* 的没有核酸酶活性的 Cas9（dCas9），和 35S 启动子驱动非编码 RNA 引导的带有 Csy4 和 2 个 Csy4 识别位点的 sgRNA 转化拟南芥 *var2* 植株（图 6A）。sgRNA 靶向的基因为叶绿体基因组上的 *rpl33*（图 6B）。发明人在 T1 代转基因植株里发现靶向降低 *rpl33* 的表达可以恢复 *var2* 突变介导的叶杂色表型（图 7, 表 1），然后对这些表型恢复
- 20 和没有恢复的植物提取 RNA 进行实时定量 PCR 检测。发现在 *rpl33* 的表达量在这 2 类植物里都有降低（图 6C），表达量较低的植株可以恢复 *var2* 突变介导的叶杂色表型。

表 1. *var2* 突变体靶向敲低 *rpl33* 后叶杂色表型统计

载体	转基因植株的数量	表型恢复的植株	效率
没有 sgRNA 的 CRISPR/Cas9 载体	60	0	0
靶向 <i>rpl33</i> 模板链的 CRISPR/Cas9 载体	48	2	4.16
靶向 <i>rpl33</i> 非模板链的 CRISPR/Cas9 载体	32	2	6.25

在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考，就如同每一篇文献
 5 被单独引用作为参考那样。此外应理解，在阅读了本发明的上述讲授内容之后，本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改，这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

参考文献

10 Gómez, G., and Pallás, V. (2010). Noncoding RNA Mediated Traffic of Foreign mRNA into Chloroplasts Reveals a Novel Signaling Mechanism in Plants. *PloS one* 5, e12269.

Haurwitz, R.E., Jinek, M., Wiedenheft, B., Zhou, K., and Doudna, J.A. (2010). Sequence- and Structure-Specific RNA Processing by a CRISPR
 15 Endonuclease. *Science* 329, 1355-1358.

Khan, M.S., and Maliga, P. (1999). Fluorescent antibiotic resistance marker for tracking plastid transformation in higher plants. *Nat Biotech* 17, 910-915.

权 利 要 求

1. 一种核酸构建物，其特征在于，所述的核酸构建物选自下组：

(1) 式 I 核酸构建物：

5 X1-X2-X3-X4-X5 (I)

式中，

X1 为启动子元件；

X2 为叶绿体定位信号肽元件；

X3 为核酸酶元件；

10 X4 为无或标记基因元件；

X5 为终止子；

(2) 式 II 核酸构建物：

Y1-Y2-Y3-Y4-Ya-Y5-Yb-Y6 (II)

式中，

15 Y1 为启动子元件；

Y2 为 ncRNA 元件；

Y3 为无或标记基因元件；

Y4 为无或 RNA 切割酶元件；

Ya 和 Yb 各自独立地为无或 RNA 切割酶识别元件；

20 Y5 为 sgRNA 元件；

Y6 为终止子；

(3) 包括式 I 构建物和式 II 构建物的构建物。

2. 如权利要求 1 所述的核酸构建物，其特征在于，所述式 I 核酸构建物中核酸酶元件 X3 选自下组：

25 (1) Cas9；

(2) Cpf1；

(3) 锌指核酸酶；

(3) 转录活化剂样核酸酶；

(4) 巨核酸酶；

30 或其组合。

3. 如权利要求 1 所述的核酸构建物，其特征在于，所述式 I 核酸构建物中叶

绿体定位信号肽元件 X2 为叶绿体信号肽 infA。

4. 如权利要求 1 所述的核酸构建物，其特征在于，所述式 II 核酸构建物中 ncRNA 元件 Y2 来自类病毒。

5. 如权利要求 1 所述的核酸构建物，其特征在于，所述式 II 核酸构建物中 RNA 切割酶元件 Y4 为 Csy4。

6. 如权利要求 1 所述的核酸构建物，其特征在于，所述式 II 核酸构建物中 sgRNA 元件 Y5 为 spCas9 sgRNA。

7. 一种载体或载体组合，其特征在于，所述载体或载体组合含有权利要求 1-6 中任一所述的核酸构建物。

10 8. 如权利要求 7 所述的载体或载体组合，其特征在于，所述的式 I 核酸构建物和式 II 核酸构建物位于同一载体上。

9. 一种试剂组合，其特征在于，包括：(i) 权利要求 7 所述的载体或载体组合。

10. 一种植物叶绿体基因编辑方法，其特征在于，包括步骤：

15 (i) 将(a)权利要求 7 所述的载体或载体组合以及(b)任选的供体核酸片段，导入植物细胞、植物组织或植物，从而在所述植物细胞、植物组织或植物中产生基因编辑；和

(ii) 任选地，对发生所述基因编辑的植物细胞或植物进行检测、筛选或鉴定。

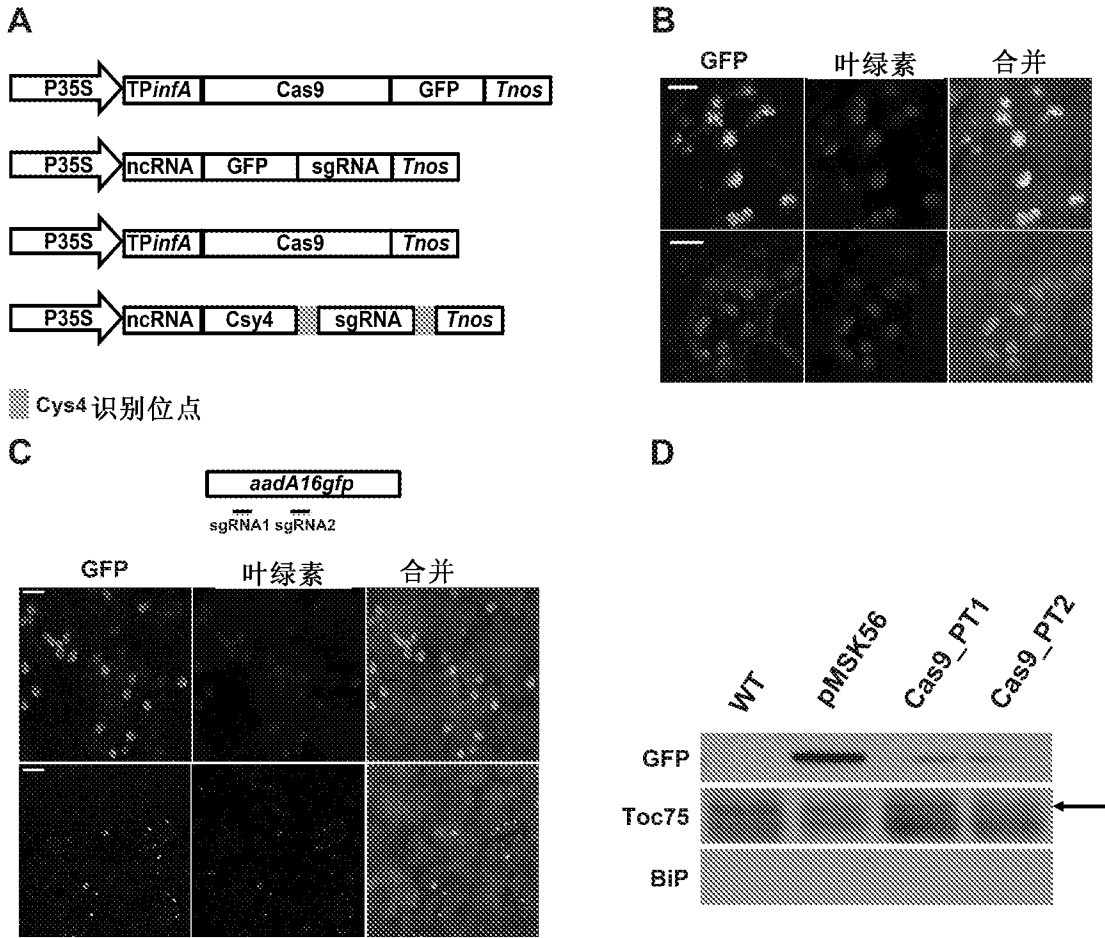


图 1

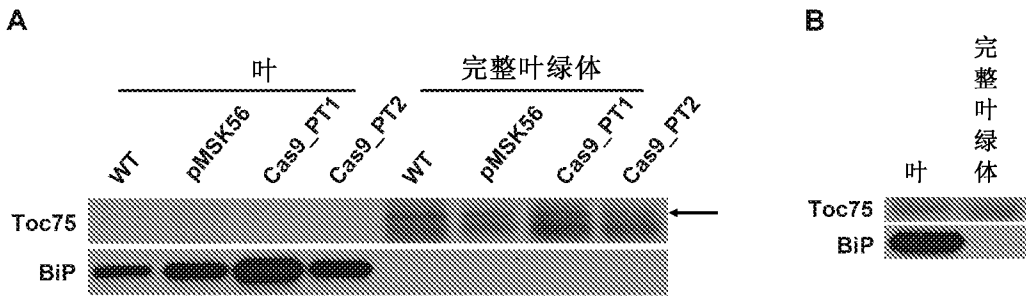
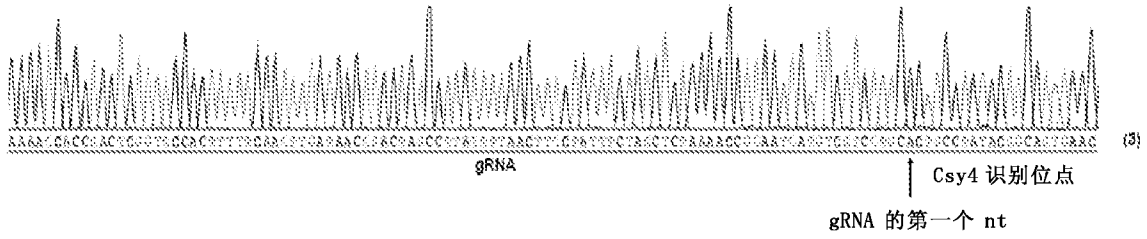


图 2

sgRNA1



sgRNA2

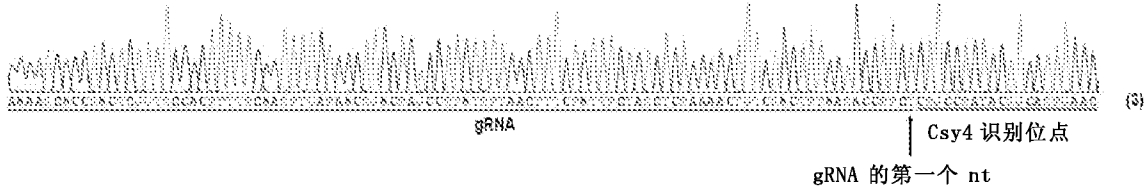
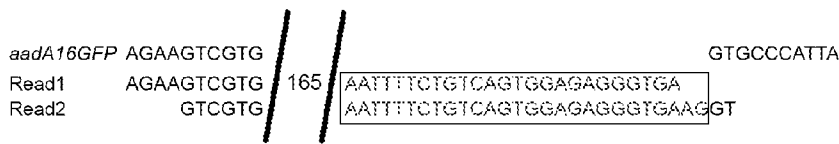


图 3

A



B

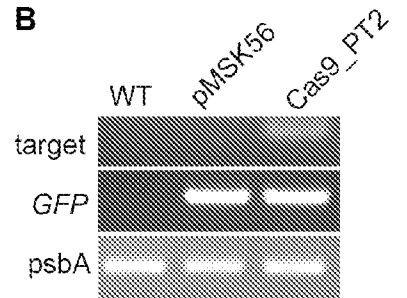


图 4

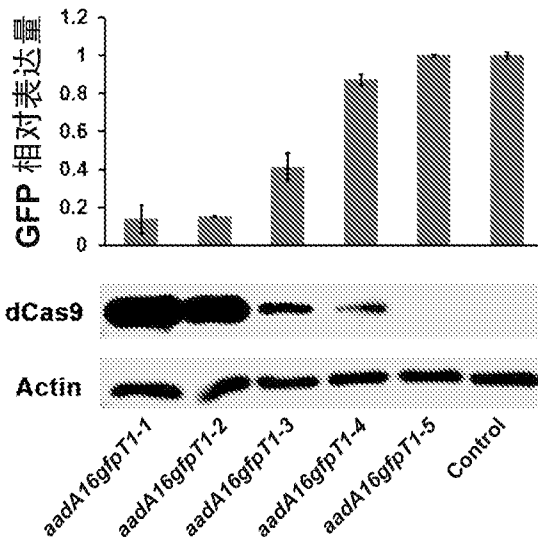


图 5

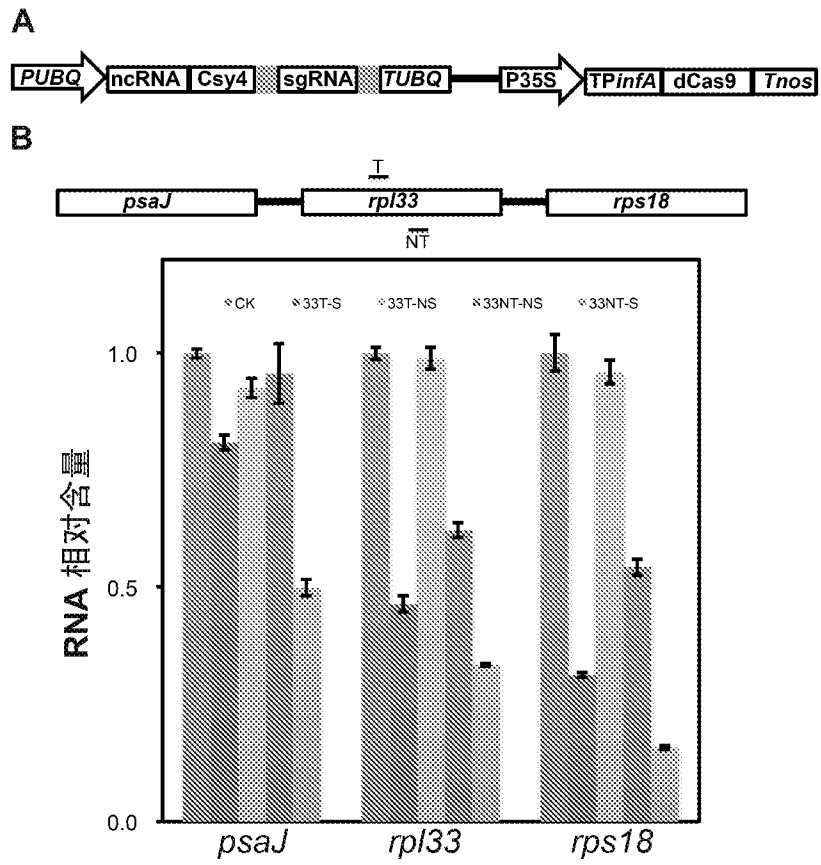


图 6



图 7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2017/114962

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 15/09 (2006.01) i; C12N 15/11 (2006.01) i; C12N 15/63 (2006.01) i; C12N 15/66 (2006.01) 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

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, PubMed, ISI Web of Knowledge, CNKI, Gen-Bank: 申请人/发明人, 基因编辑, 核酸, 载体, 构建体, 构建物, 核酸酶, 核酸内切酶, 锌指核酸酶, 转录活化剂样核酸酶, 巨核酸酶, 向导 RNA, 启动子, 信号肽, 叶绿体, 终止子, gene editing, nucleic acids, vector, nuclease, endonuclease, cas9, CRISPR/CAS9, Cpf1, zinc-finger nuclease, transcriptional activation nuclease, meganuclease, guide RNA, sgRNA, promoter, signal peptide, chloroplast, terminator

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 105602935 A (NIE, Lingyun), 25 May 2016 (25.05.2016), claims 1-11, description, paragraphs 0002-0004, and figures 2-3	1-10
A	CN 103981215 A (RICE INSTITUTE, ANHUI ACADEMY OF AGRICULTURAL SCIENCES), 13 August 2014 (13.08.2014), entire document	1-10
A	CN 103981216 A (RICE INSTITUTE, ANHUI ACADEMY OF AGRICULTURAL SCIENCES), 13 August 2014 (13.08.2014), entire document	1-10
A	FRANCIS, Q., "The CRISPR-Cas9 Technology: Closer to the Ultimate Toolkit for Targeted Genome Editing.", Plant Science., volume 242, 08 September 2015 (08.09.2015), pages 65-76	1-10
A	VEJNAR, C.E. et al., "Optimization Strategies for the CRISPR-Cas9 Genome-Editing System.", Cold Spring Harbor Protocols., 2016(10), 03 October 2016 (03.10.2016), pages 829-832	1-10

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>"&" document member of the same patent family</p>
---	---

<p>Date of the actual completion of the international search</p> <p style="text-align: center;">12 February 2018</p>	<p>Date of mailing of the international search report</p> <p style="text-align: center;">23 February 2018</p>
<p>Name and mailing address of the ISA</p> <p>State Intellectual Property Office of the P. R. China</p> <p>No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao</p> <p>Haidian District, Beijing 100088, China</p> <p>Facsimile No. (86-10) 62019451</p>	<p>Authorized officer</p> <p style="text-align: center;">LI, Zidong</p> <p>Telephone No. (86-10) 53961971</p>

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2017/114962

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CHO, S.W. et al., "Targeted Genome Engineering in Human Cells with the Cas9 RNA-Guided Endonuclease.", Nature Biotechnology., 31(3), 29 January 2013 (29.01.2013), pages 230-232	1-10
A	JINEK, M. et al., "RNA-Programmed Genome Editing in Human Cells.", eLIFE., volume 2, 29 January 2013 (29.01.2013), e00471, pages 1-9	1-10
A	MALI, P. et al., "RNA-Guided Human Genome Engineering via Cas9.", Science., volume 339, 15 February 2013 (15.02.2013), pages 823-826	1-10
A	CONG, Le et al., "Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems.", Science., volume 339, 15 February 2013 (15.02.2013), pages 819-823	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2017/114962

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 105602935 A	25 May 2016	None	
CN 103981215 A	13 August 2014	CN 103981215 B	29 June 2016
CN 103981216 A	13 August 2014	CN 103981216 B	22 June 2016

<p>A. 主题的分类</p> <p>C12N 15/09(2006.01)i; C12N 15/11(2006.01)i; C12N 15/63(2006.01)i; C12N 15/66(2006.01)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. 检索领域</p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)</p> <p>C12N</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))</p> <p>VEN, CNABS, PubMed, ISI Web of Knowledge, CNKI, GenBank, 申请人/发明人, 基因编辑, 核酸, 载体, 构建体, 构建物, 核酸酶, 核酸内切酶, 锌指核酸酶, 转录活化剂样核酸酶, 巨核酸酶, 向导RNA, 启动子, 信号肽, 叶绿体, 终止子, gene editing, nucleic acids, vector, nuclease, endonuclease, cas9, CRISPR/CAS9, Cpf1, zinc-finger nuclease, transcriptional activation nuclease, meganuclease, guide RNA, sgRNA, promoter, signal peptide, chloroplast, terminator</p>																				
<p>C. 相关文件</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>X</td> <td>CN 105602935 A (聂凌云) 2016年 5月 25日 (2016 - 05 - 25) 权利要求1-11, 说明书第0002-0004段, 图2-3</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 103981215 A (安徽省农业科学院水稻研究所) 2014年 8月 13日 (2014 - 08 - 13) 全文</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 103981216 A (安徽省农业科学院水稻研究所) 2014年 8月 13日 (2014 - 08 - 13) 全文</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>Francis Quétier. "The CRISPR-Cas9 technology: Closer to the ultimate toolkit for targeted genome editing." Plant Science., 第242卷, 2015年 9月 8日 (2015 - 09 - 08), 第65-76页</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>VEJNAR, C.E.等. "Optimization Strategies for the CRISPR - Cas9 Genome-Editing System." Cold Spring Harbor Protocols., 第2016卷, 第10期, 2016年 10月 3日 (2016 - 10 - 03), 第829-832页</td> <td>1-10</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	X	CN 105602935 A (聂凌云) 2016年 5月 25日 (2016 - 05 - 25) 权利要求1-11, 说明书第0002-0004段, 图2-3	1-10	A	CN 103981215 A (安徽省农业科学院水稻研究所) 2014年 8月 13日 (2014 - 08 - 13) 全文	1-10	A	CN 103981216 A (安徽省农业科学院水稻研究所) 2014年 8月 13日 (2014 - 08 - 13) 全文	1-10	A	Francis Quétier. "The CRISPR-Cas9 technology: Closer to the ultimate toolkit for targeted genome editing." Plant Science., 第242卷, 2015年 9月 8日 (2015 - 09 - 08), 第65-76页	1-10	A	VEJNAR, C.E.等. "Optimization Strategies for the CRISPR - Cas9 Genome-Editing System." Cold Spring Harbor Protocols., 第2016卷, 第10期, 2016年 10月 3日 (2016 - 10 - 03), 第829-832页	1-10
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求																		
X	CN 105602935 A (聂凌云) 2016年 5月 25日 (2016 - 05 - 25) 权利要求1-11, 说明书第0002-0004段, 图2-3	1-10																		
A	CN 103981215 A (安徽省农业科学院水稻研究所) 2014年 8月 13日 (2014 - 08 - 13) 全文	1-10																		
A	CN 103981216 A (安徽省农业科学院水稻研究所) 2014年 8月 13日 (2014 - 08 - 13) 全文	1-10																		
A	Francis Quétier. "The CRISPR-Cas9 technology: Closer to the ultimate toolkit for targeted genome editing." Plant Science., 第242卷, 2015年 9月 8日 (2015 - 09 - 08), 第65-76页	1-10																		
A	VEJNAR, C.E.等. "Optimization Strategies for the CRISPR - Cas9 Genome-Editing System." Cold Spring Harbor Protocols., 第2016卷, 第10期, 2016年 10月 3日 (2016 - 10 - 03), 第829-832页	1-10																		
<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:</p> <p>"A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件</p> <p>"E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利</p> <p>"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)</p> <p>"O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"&" 同族专利的文件</p>																				
<p>国际检索实际完成的日期</p> <p>2018年 2月 12日</p>		<p>国际检索报告邮寄日期</p> <p>2018年 2月 23日</p>																		
<p>ISA/CN的名称和邮寄地址</p> <p>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</p> <p>传真号 (86-10)62019451</p>		<p>受权官员</p> <p>李子东</p> <p>电话号码 (86-10)53961971</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
A	CHO, S.W.等. "Targeted genome engineering in human cells with the Cas9 RNA-guided endonuclease." Nature Biotechnology., 第31卷, 第3期, 2013年 1月 29日 (2013 - 01 - 29), 第230-232页	1-10
A	JINEK, M.等. "RNA-programmed genome editing in human cells." eLIFE., 第2卷, 2013年 1月 29日 (2013 - 01 - 29), e00471, 第1-9页	1-10
A	MALI, P.等. "RNA-Guided Human Genome Engineering via Cas9." SCIENCE., 第339卷, 2013年 2月 15日 (2013 - 02 - 15), 第823-826页	1-10
A	CONG, Le等. "Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems." SCIENCE., 第339卷, 2013年 2月 15日 (2013 - 02 - 15), 第819-823页	1-10

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2017/114962

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	105602935	A	2016年 5月 25日	无			
CN	103981215	A	2014年 8月 13日	CN	103981215	B	2016年 6月 29日
CN	103981216	A	2014年 8月 13日	CN	103981216	B	2016年 6月 22日