



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))。

## 一种利用 CRISPR/Cas9 系统对紫花苜蓿基因定点突变的方法

### 技术领域

本发明属于基因编辑技术领域，尤其涉及一种利用 CRISPR/Cas9 系统对紫花苜蓿基因定点突变的方法。

### 背景技术

紫花苜蓿(*Medicago sativa*.)是广泛种植的豆科牧草，富含优质膳食纤维、食用蛋白、多种维生素（包括维生素 B、维生素 C、维生素 E 等）、多种有益的矿物质以及皂苷、黄酮类、类胡萝卜素、酚醛酸等生物活性成分，蛋白含量高、适口性好，对于提升牲畜的饲料水平具有重要意义。除了作为饲草料作物，紫花苜蓿发达的根系在防治水土流失、环境治理方面发挥重要作用。此外，因为紫花苜蓿根部有大量的固氮微生物共生，紫花苜蓿在改善土壤肥力上也具有重要的意义。针对紫花苜蓿基因功能的研究有助于改善紫花苜蓿的性状，辅助培育具备更优性状的紫花苜蓿新品种。在紫花苜蓿中使用基因沉默技术抑制目的基因的表达是研究基因功能与培育新品种的一种非常有效的手段。

自然界中虽经常发生自发突变，但突变频率极低，大多数基因位点每代自发突变的突变率约为  $10^{-5}$  或  $10^{-6}$ ，且只有发生在配子中的突变才可以传到下一代。通过化学诱变、物理诱变以及 DNA 插入突变等诱变方法处理植物材料，可以在短时间内获得有利用价值的突变体。诱变因素引发的突变频率较高，比自发突变频率高几百倍，甚至上千倍，而且诱发突变的变异范围广泛，类型多样，有时能够诱发产生自然界稀有的或未曾有过的新突变。但是通过诱变方式引入的突变是随机的，很难针对某一位点得到纯合突变体，同样的，使用诱变方法产生的突变只有发生在配子中的突变才可以传到下一代。靶向基因沉默技术是研究特定基因功能的有效手段。目前，针对靶向基因沉默已经开发出 RNAi (RNA 干扰)，以及 ZFN、TALEN、CRISPR/Cas9 等基因编辑技术。RNAi 技术主要降解目的基因转录出来的 mRNA 序列，下调 mRNA 的翻译水平，从而实现抑制目的基因表达的作用。但是，通过 RNAi 技术降低目的基因表达时，目的基因的基因序列没有被突变，在一定程度上仍可能有目的基因表达。相反，使用 ZFN、TALEN、CRISPR/Cas9 技术实现的基因沉默，在 DNA 水平上突变基因序列，使基因彻底

丧失功能。与 RNAi 相比，这三种技术更加稳定、高效。在 TALEN、ZFN、CRISPR/Cas9 三种技术中，TALEN 与 ZFN 需要针对每一个靶位点将识别不同碱基的氨基酸序列元件按靶点序列拼装起来，每一个靶位点都有自己独特的蛋白质序列，这就导致该过程耗时、耗力、成本高昂。与 TALEN 以及 ZFN 不同的是，CRISPR/Cas9 技术是通过 sgRNA 上的靶向序列识别靶位点，靶向序列与靶点之间通过碱基互补配对的方式互相识别，这种方式更加简便、廉价、操作方便。所以，自 2013 年 CRISPR/Cas9 技术被首次应用于基因编辑以来，得到快速、广泛的发展。CRISPR/Cas9 系统是来自动植物的一种获得性免疫系统，可以抵御外源基因的入侵。它主要由 CRISPR 和特异的 Cas9 蛋白组成。CRISPR 是一簇的规律间隔的短回文重复序列，是一类新型的 DNA 重复序列，它由一系列短的高度保守的正向重复序列和长度相似的间隔序列间隔排列组成。Cas9 蛋白是一种由 1409 个氨基酸组成的多结构域蛋白，含有两个核酸酶结构域 RuvC-like 和 HNH。基于 CRISPR/Cas9 的基因组编辑体系包括 2 部分：sgRNA 及酶 Cas9。这种系统能够特异的识别毗邻 PAM (NGG) 基序的靶序列，并在其上游 3nt 处进行切割形成 DSB(double strand break),随后机体通过自身的修复机制如同源重组(HR)、非同源末端连接 (NHEJ) 来修复损伤的 DNA。NHEJ 方式的修复过程能够产生 Indel (包括缺失和插入)，进而导致 DNA 编码序列移码突变。

紫花苜蓿是严格异花授粉的同源四倍体植物，每个座位有四个等位基因，如果需要针对某一座位获得可稳定遗传的纯合突变体品系，最理想的就是获得同时突变了四个等位基因的多个株系，能够实现多个株系间的杂交与稳定遗传；其次就是通过自然发生的或诱变产生的杂合突变体之间的反复杂交获得可稳定遗传的纯合突变体品系，但这是一个耗时、耗力、高投入、低效率的过程。因此综合而言，在紫花苜蓿中利用自然发生的或者诱变产生的突变体通过杂交获得能够稳定遗传的纯合突变体尤为困难，这严重阻碍了紫花苜蓿的研究与育种，尤其针对只有获得纯合体才能表现出性状变化的隐性基因突变而言更加困难。在紫花苜蓿中开发高效的靶向突变技术实现在一个世代之内获得稳定遗传的纯合突变体，对于紫花苜蓿研究与育种意义重大。目前在紫花苜蓿中已知的是使用 RNAi 技术降低紫花苜蓿基因的表达，尚无使用 ZFN、TALEN、CRISPR/Cas9 等基因编辑技术进行基因编辑获得纯合突变体的报道。如上文所述，与 ZFN、TALEN、

CRISPR/Cas9 等基因编辑技术相比, RNAi 因其沉默不彻底以及不稳定的特性, 限制了该技术的应用。在水稻、拟南芥、番茄、杨树、白杨、苹果、小麦、玉米、大豆等物种中通过 CRISPR/Cas9 技术已经成功获得可稳定遗传的纯合突变体, 但在紫花苜蓿中还没有使用 CRISPR/Cas9 等靶向基因编辑技术进行基因编辑的报道。

## 发明内容

为了在同源四倍体植物紫花苜蓿中实现基因编辑, 并运用于生产, 我们针对紫花苜蓿开发了一项利用 CRISPR/Cas9 系统实现定点突变的方法, 实现了紫花苜蓿中的精准定点基因突变, 突变率高达 52%, 并获得了具备理想表型的同时沉默了四个等位基因的纯合突变植株(纯合突变率达 12%), 率先在紫花苜蓿中建立了高效的靶向基因编辑体系, 对紫花苜蓿研究与育种具有重大意义。因此, 本发明拟提供一种利用 CRISPR/Cas9 系统对紫花苜蓿基因定点突变的方法。

本发明的技术方案如下:

一种利用 CRISPR/Cas9 系统对紫花苜蓿基因定点突变的方法, 其特征在于, 所述方法包括以下步骤:

步骤(1) 构建紫花苜蓿中通用的由根癌农杆菌介导转化的双元表达载体 MsCRISPR/Cas9;

步骤(2) 针对紫花苜蓿中的目标基因设计基于 CRISPR/Cas9 的 sgRNA 靶向序列, 将含有编码所述 sgRNA 靶向序列的 DNA 片段连接到紫花苜蓿中通用的载体 MsCRISPR/Cas9 中构建载体 MsCRISPR/Cas9::target;

步骤(3) 使用根癌农杆菌介导转化紫花苜蓿, 实现对紫花苜蓿中特定基因的定点突变。

进一步地, 所述紫花苜蓿包括野生品种、地方品种、育成品种、引进品种。

进一步地, 所述目标基因包括紫花苜蓿基因组中任何有生物学功能的基因或 DNA 序列。

进一步地, 所述的在紫花苜蓿中表达 CRISPR/Cas9 系统的双元表达载体 MsCRISPR/Cas9 的全序列如 SEQ ID NO. 1 所示。

该技术依托的是通过根癌农杆菌对紫花苜蓿进行转化, 通过转化将含有筛选

基因 Hpt 表达框、sgRNA 表达框以及 Cas9 蛋白表达框的 T-DNA 序列整合到紫花苜蓿基因组中获得转基因植株，转化的外源表达元件在紫花苜蓿中表达，从而发挥功能，获得基因敲除的植株。针对农杆菌转化的方式，构建了一个表达载体 MsCRISPR/Cas9。

优选地，所述的在紫花苜蓿中表达 CRISPR/Cas9 系统的二元表达载体 MsCRISPR/Cas9 的骨架载体是 pCambia1300 载体，所述的 pCambia1300 骨架载体上有一段用于转化植物的 T-DNA 区域，所述 T-DNA 区域包含一个左边界重复序列（LB repeat）、一个右边界重复序列（RB repeat）以及左右边界序列内部的用于转化的序列，所述的 T-DNA 区域左右边界内部用于转化的序列中包含表达抗植物筛选剂潮霉素的蛋白的 Hpt 基因表达元件、表达 Cas9 蛋白的表达元件、表达 sgRNA 的表达元件以及 sgRNA 表达元件内部两个 AarI 酶切位点之间的靶点序列，所述 Hpt 基因表达元件内部包含启动 Hpt 基因转录的 Camv 35S promoter(enhanced)启动子序列、表达 Hpt 基因的 CDS 序列和终止 Hpt 基因转录的 Camv poly(A)终止序列，所述表达 Cas9 蛋白的表达元件内部包含启动 Cas9 序列转录的 2xCaMV 35S promoter 启动子序列、表达 Cas9 的 DNA 序列和终止 Cas9 转录的 Nos terminator 终止序列，所述表达 sgRNA 的表达元件内部包含启动 sgRNA 序列转录的蒺藜苜蓿 MtU6 启动子序列和包含有表达 sgRNA 的 DNA 序列。

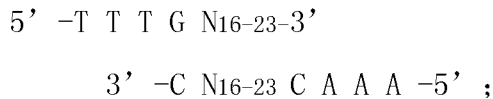
在该载体（图 1）中，LB T-DNA repeat/RB T-DNA repeat 表示 T-DNA 左右边界重复序列；CaMV 35s promoter/MtU6 promoter/2x CaMV 35s promoter 表示启动子元件；Hpt/sgRNA/Cas9 表示基因序列；CaMV poly(A)/NosT 代表终止序列；AarI 代表 sgRNA 靶向序列插入位点。如图 1 所示：使用蒺藜苜蓿 U6 启动子启动 sgRNA 表达；2XCaMV35S 启动子启动 Cas9 基因表达；CaMV35S(Enhanced) 启动子启动筛选标记基因 Hpt 表达。

进一步地，所述的 MtU6 启动子的序列 SEQ ID NO.2 所示。

优选地，所述的表达 sgRNA 的 DNA 序列如 SEQ ID NO.3 所示，表达 sgRNA 的 DNA 序列中第 1 位到第 30 位的序列内部包含两个 AarI 限制性内切酶识别位点，用以针对目标基因构建定点突变的表达载体。

进一步地，所述表达载体 MsCRISPR/Cas9::*target* 构建方法操作如下：

步骤(1) 根据靶点序列设计一对 oligo 引物(18-24bp), 形成如下两端带有接头的 DNA 片段, 并合成:



步骤(2) 将上述合成的引物对进行退火, 形成带粘性末端的互补 DNA 双链片段;

步骤(3) 使用 AarI 限制性内切酶酶切双元表达载体 MsCRISPR/Cas9; 经 CIP 反应去磷酸化后在 0.8-1.2% 的琼脂糖凝胶中进行电泳分离, 回收纯化线性载体;

步骤(4) 将退火化后带粘性末端的互补 DNA 双链片段 DNA 与回收纯化的 MsCRISPR/Cas9 线性载体使用 T4 DNA 连接酶在 16°C 水浴锅中连接 10-16h;

步骤(5) 将连接产物通过热击法转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞, 复苏后涂布于含 50mg/L 卡那霉素的 LB 平板培养基上, 37°C 培养箱培养 12-16h;

步骤(6) 挑取单菌落克隆于 1.5ml 含 50mg/L 卡那霉素的 LB 液体培养基中, 37°C 摇床摇 12-16h;

步骤(7) 使用测序引物 MtU6-T-F 对单克隆菌液进行测序, 选择靶点连接正确的克隆于 50-100ml 含 50mg/L 卡那霉素的 LB 液体培养基中, 37°C 摇床摇 12-16h, 提取质粒。

进一步地, 所述测序引物 MtU6-T-F 的序列如 SEQ ID NO.4 所示。

优选地, 所述使用根癌农杆菌介导转化紫花苜蓿获得突变植株的方法包含以下步骤:

步骤(1) 根癌农杆菌菌种复苏; 将电击转化后的农杆菌菌株涂布于 YM 固体平板培养基中, 25-29 °C 培养 24h-48h; 挑取单克隆, 接种于 30-50mLYM 液体培养基中, 25-29 °C 摇床上 100-220 r/min 摇 24h-48h; 所述 YM 固体培养基和 YM 液体培养基中均包含 30-60 mg/L 卡那霉素和 200-450 mg/L 利福平;

步骤(2) 紫花苜蓿愈伤组织的获得: 所述紫花苜蓿愈伤组织获得过程如下:

挑选饱满、色泽圆润的紫花苜蓿种子, 65-80 % 酒精浸泡 1-3 分钟, 无菌水洗 2-4 次, 每次 0.5-2 分钟; 0.05-0.15 % 升汞浸泡并手摇 6-12 分钟, 无菌水洗 3~5 次, 接种于 MS 固体培养基上, 光照培养箱或培养室中萌发 7-16 天;

取萌发后的子叶和下胚轴, 切成小块接种于愈伤诱导培养基中, 25 $\pm$ 1°C 培

养箱或培养室中暗培养 2~4 天；所述愈伤诱导培养基成分为：SH 基础培养基+1.0-3.0 mg/L 2,4-D (2,4-二氟苯氧乙酸)+0.1-0.3 mg/L KT (激动素)+0.1-0.5mg/L 水解络蛋白+15-40 g/L 蔗糖+5.8-9 g/L 琼脂；优选地，所述愈伤诱导培养基成分为：SH 基础培养基+ 2mg/L 2,4-D+0.2mg/L KT+0.3mg/L 水解络蛋白+30g/L 蔗糖+8g/L 琼脂；

步骤（3）根癌农杆菌侵染紫花苜蓿愈伤组织：所述农杆菌菌株侵染紫花苜蓿愈伤组织过程如下：提前 1-2 天将步骤（1）复苏的根癌农杆菌菌株接种于 50-100mL 的 YM 液体培养基（Sigma 公司）中，25-29 °C 摇床上 100-220 r/min 培养至 OD 值 260/280 在 0.5-0.8 之间；将菌液转移到 50mL 无菌离心管中，离心机中 0-8°C 条件下 3000-4500 r/min 离心 10-15 分钟，取出离心管，弃上清液，加入重悬液重悬至 OD 值 260/280 在 0.5-0.8 之间，加入 50-150 umol/L 乙酰丁香酮，重悬液为 MS 液体培养基；将步骤（2）中诱导的愈伤组织收集到带透气塑料封口膜的无菌三角瓶中，倒入重悬后的农杆菌菌液，用三角瓶自带的封口膜封口，真空泵中抽真空到 0.5kpa，一共抽 0.5-1.5 h，期间每 10-15 min 的时候轻轻摇晃一下；取出三角瓶，25-29 °C 摇床上 100-150 r/min 摇 0.5-1.5 h，倒干菌液，将材料摊开在铺了滤纸的无菌培养皿中晾干；

步骤（4）被根癌农杆菌侵染过的紫花苜蓿愈伤组织共培养：所述共培养过程如下：将晾干的侵染过的材料接种于共培养培养基（培养基中铺一张灭菌滤纸），25±1°C 培养箱中暗培养 2-5 天；所述共培养培养基成分为：MS 基础培养基+1-3 mg/L 2,4-D +0.1-0.3 mg/L KT+15-40 g/L 蔗糖+5.8-9 g/L 琼脂+50-150 umol/L 乙酰丁香酮；优选地，所述共培养培养基成分为：MS 基础培养基+2mg/L 2,4-D+0.2mg/L KT+30g/L 蔗糖+8g/L 琼脂+100umol/L 乙酰丁香酮；

步骤（5）紫花苜蓿愈伤组织筛选培养：所述筛选培养过程如下：将共培养得到的材料接种于筛选培养基，25±1°C 培养箱或培养室中光照培养 30-60 天；所述筛选培养基成分为：SH 基础培养基+1-3 mg/L 2,4-D +0.1-0.3 mg/L KT + 15-40 g/L 蔗糖+5.8-9 g/L 琼脂+150-450 mg/L 头孢噻亏+150-450 mg/L 羧苄青霉素+10-50mg/L 潮霉素；优选地，所述筛选培养基成分为：SH 基础培养基+2mg/L 2,4-D +0.2mg/L KT +30g/L 蔗糖+8g/L 琼脂+250mg/L 头孢噻亏+250mg/L 羧苄青霉素+15mg/L 潮霉素；

步骤(6) 紫花苜蓿愈伤组织分化培养: 将筛选培养后的材料转接至分化培养基, 25±1℃培养箱或培养室中光照培养 15-30 天; 所述分化培养基成分为: UM 基础培养基+0.5-5g/L 水解络蛋白+0.1-2 mg/L 激动素+15-40 g/L 蔗糖+5.8-9 g/L 琼脂+150-450 mg/L 头孢噻亏+4-10 mg/L 潮霉素; 优选地, 所述分化培养基成分为: UM 基础培养基+2g/L 水解络蛋白+0.4mg/L 激动素+30g/L 蔗糖+8g/L 琼脂+250mg/L 头孢噻亏+5mg/L 潮霉素;

步骤(7) 紫花苜蓿再生芽生根培养: 将分化出的 1-3cm 的芽转接至生根培养基, 培养基成分为: MS 基础培养基+0.5-2 mg/L 吲哚丁酸+15-40 g/L 蔗糖+5.8-9 g/L 琼脂+150-450 mg/L 头孢噻肟; 优选地, 所述生根培养基成分为: MS 基础培养基+1mg/L 吲哚丁酸+30g/L 蔗糖+8g/L 琼脂+250mg/L 头孢噻亏;

步骤(8) 紫花苜蓿突变株的筛选与检测, 所述紫花苜蓿突变株的筛选与检测的方法包括 PCR-RE、T7E1 酶切检测与靶点深度测序。检测方法具体如下:

PCR-RE 检测: 将上述获得的再生植株提取 DNA 样品, 针对靶基因序列设计特异性的扩增引物进行扩增。若扩增所得的片段中, 在 Cas9 蛋白切割位点上有特异性内切酶酶切位点, 则发生突变的序列内因其酶切位点丢失不能被限制性内切酶切割。具体操作为: a. 利用针对靶基因设计的特异性引物扩增再生植株与对照植株靶基因片段; b. 将扩增所得目标片段回收, 利用靶点特异的限制性内切酶对目标片段进行酶切; c. 将酶切产物通过琼脂糖凝胶电泳检测, 电泳结果分析: 若再生苗扩增产物进行限制性内切酶酶切后, 电泳条带中有条带与未进行酶切的对照序列条带大小一致且无其他条带, 而进行限制性内切酶酶切的对照序列被切割为两条较小条带, 则说明靶基因被敲除且再生苗为纯合突变类型; 若再生苗扩增产物进行限制性内切酶酶切后, 电泳结果中有条带与未进行酶切的对照序列条带大小一致, 且有条带与进行限制性内切酶酶切后的对照序列的两条较小条带大小一致, 则说明靶基因被敲除且再生苗为杂合突变类型; 若再生苗扩增产物进行限制性内切酶酶切后, 电泳条带中没有条带与未进行酶切的对照序列条带大小一致, 且酶切后的条带与且进行限制性内切酶酶切后的对照序列的两条较小条带大小一致, 则说明靶基因没有被敲除; d. 将上述未被切割的条带回收, 并通过 TA 克隆连接到 pMD19-T 上, 转化大肠杆菌以后挑选一批单克隆进行测序, 分析靶点上的突变类型。

**T7E1 检测：**将上述获得的再生植株提取 DNA 样品，针对靶基因序列设计特异性的扩增引物进行扩增。若扩增所得的靶基因片段中，在 Cas9 蛋白切割位点处没有限制性内切酶酶切位点，则通过 T7E1 酶切方式检测突变植株。具体操作为：a.设计引物扩增靶基因序列；b.将野生型与再生植株的靶基因扩增产物进行混合；c.将混合的产物进行变性、复性；d.使用 T7E1 酶（NEB 公司）对复性后的产物进行酶切，在琼脂糖凝胶电泳进行检测。结果分析：若是再生植株中的靶基因存在突变，则经过变性与复性后，会与野生型植株的扩增产物形成异源双链核酸分子，该异源双链核酸分子能够被 T7E1 酶切割得到两条理想大小的条带；e.将能被 T7E1 酶酶切的再生苗的 PCR 产物进行 TA 克隆连接到 pMD19-T 载体（Takara 公司）上，转化大肠杆菌以后挑选一批单克隆进行测序，分析在靶位点上的突变类型以及再生苗是否为纯合敲除。

**靶点深度测序检测：**将上述获得的再生植株提取 DNA 样品，针对靶基因序列设计特异性的扩增引物进行扩增。将 PCR 产物进行 TA 克隆连接到 pMD19-T 载体上，转化大肠杆菌以后挑选一批单克隆进行靶点深度测序，分析在靶位点上是否有突变、分析突变类型。

同时，本发明还保护利用 CRISPR/Cas9 系统对紫花苜蓿基因定点突变的方法在紫花苜蓿育种和基因编辑紫花苜蓿育种中的应用。

本发明在紫花苜蓿中首次成功建立了基于 CRISPR/Cas9 的基因编辑技术体系，成功实现了对目的基因的敲除并获得了具有明显表型的纯合突变植株。本发明为了在同源四倍体植物紫花苜蓿中实现基因编辑，在基于已有的根癌农杆菌转化紫花苜蓿获得转基因植株的平台基础上，采用农杆菌转化的方法将含有表达抗筛选剂潮霉素的蛋白的 Hpt 基因的表达框、sgRNA 表达框、Cas9 蛋白表达框的 T-DNA 区域整合到紫花苜蓿基因组上，这些元件在紫花苜蓿细胞内转录、翻译并发挥功能，通过筛选获得目的基因被敲除的突变体转化植株。通过转基因方式将 CRISPR/Cas9 系统导入紫花苜蓿中进行表达的关键点在于寻找合适的启动子启动各个元件的表达，其中启动 Hpt 基因转录的 CaMV 35S(Enhanced)启动子与启动 Cas9 基因转录的 2xCaMV 35S 启动子已经被证明可以在紫花苜蓿中启动相关基因转录并发挥功能；启动 sgRNA 转录的启动子一般为 U6 或者 U3 启动子，但在紫花苜蓿中尚无研究 U6/U3 启动子的报道，为了在紫花苜蓿中高效启动 sgRNA

的转录，通过文献资料调研，选择紫花苜蓿的同属近源种蒺藜苜蓿中研究较多的 MtU6 启动子启动 sgRNA 的转录。

与现有的在紫花苜蓿中使用 RNAi 进行基因表达下调的技术相比，本发明的优点在于：

本发明首次在异花授粉的同源四倍体植物紫花苜蓿中使用 CRISPR/Cas9 技术，并获得纯合突变植株；首次使用 MtU6 启动子在紫花苜蓿中启动 sgRNA 转录，MtU6 启动子来源于紫花苜蓿的近源物种蒺藜苜蓿，该启动子已经被证明能够在紫花苜蓿近缘种蒺藜苜蓿中启动 snRNA (small nuclear RNA) 的转录，通过 RNAi 与 CRISPR/Cas9 实现蒺藜苜蓿中的基因表达沉默。在紫花苜蓿中使用蒺藜苜蓿 MtU6 启动 sgRNA 转录比使用其他亲缘关系较远的物种效率会更高。

1. 本发明能够实现异花授粉的同源四倍体紫花苜蓿中在一个世代之内获得纯合突变体，具有重要的科研与应用价值，可以加速紫花苜蓿育种。
2. 首次在紫花苜蓿中建立了基于根癌农杆菌转化的紫花苜蓿 CRISPR/Cas9 基因敲除平台，为紫花苜蓿及其它植物基因编辑奠定基础，可以直接在基因编码序列上进行突变，使目的基因沉默、丧失功能，该技术更加彻底、稳定。
3. 与自然突变以及传统人工诱导突变相比，本发明以更高的突变效率精准地引入突变，能达到突变率 52%（其中纯合突变率达 12%）。
4. 该技术为在紫花苜蓿中进行基因编辑开辟了一个新的领域，为后续同时沉默多个基因、染色体大片段缺失、外源基因精准插入靶点等奠定了技术基础；同时，利用 CRISPR/Cas9 的定点功能，我们可以将 Cas9 蛋白突变失活成为 dCas9，通过在 dCas9 上偶联具备其他功能的蛋白结构域实现靶基因的表达上调/下调、甲基化/去甲基化、碱基替换等。

## 附图说明

图 1 为 MsCRISPR/Cas9 表达载体结构图；

图 2 为将含有 PDS 基因靶点的 CRISPR/Cas9 表达载体 MsCRISPR/Cas9::PDS 通过根癌农杆菌侵染紫花苜蓿获得的野生型与突变型再生植株；

图 3 为紫花苜蓿野生型与突变型植株 PDS 基因 PCR 产物测序结果；

图 4 为将含有 PALM1 基因靶点的 CRISPR/Cas9 表达载体的根癌农杆菌侵染紫花苜蓿获得的再生植株，经 PCR-RE 检测筛选突变植株的琼脂糖凝胶电泳结果；

图 5 为将含有 PALM1 基因靶点的 CRISPR/Cas9 表达载体

MsCRISPR/Cas9::*PALM1* 的根癌农杆菌侵染紫花苜蓿获得的野生型与突变型植株的叶片表型；

图 6 为紫花苜蓿野生型与突变型植株 *PALM1* 基因 PCR 产物测序结果。

## 具体实施方式

下面结合具体实施例对本发明的技术方案做进一步详细说明，但本发明并不局限于以下技术方案。

### 实施例 1 利用 CRISPR/Cas9 系统对花苜蓿中八氢番茄红素脱氢酶编码基因 *PDS* 突变

八氢番茄红素脱氢酶 (phytoene desaturase, PDS)，是类胡萝卜素合成途径中的主要限速酶，可催化无色 C40 八氢番茄红素生成 $\zeta$ -胡萝卜素、链孢红素、番茄红素、3,4-脱氢番茄红素、3,4,3'-脱氢番茄红素或 3,4-脱氢链孢红素等。该基因的突变植株表现出白化表型，便于观察。在植物中以该基因作为靶基因是检测基因敲除体系是否工作以及评估工作效率的一种便捷地方法。

依据紫花苜蓿近源种蒺藜苜蓿中的 *PDS* 序列，设计引物扩增紫花苜蓿 *PDS* 基因序列并测序，依据所得 *PDS* 基因序列并参考蒺藜苜蓿中的案例，设计靶位点；将靶位点连接到载体 1300DM-MtU6(Aar1)-Cas9 的位点上获得针对 *PDS* 基因的敲除载体，将该载体通过上述根癌农杆菌转化的方式转化紫花苜蓿外殖体，并获得再生植株（图 2）。其中表达载体构建、农杆菌菌株的制备、使用农杆菌进行转化、突变体的筛选与检测过程如下：

一、表达载体构建过程如下：

1. 根据靶点序列设计一对 oligo 引物（18-24bp），形成如下两端带有接头的 DNA 片段，并合成：

5'-TTTG N16-23-3'

3'-C N16-23 CAAA -5'；

2. 将上述合成的成对引物进行退火；

3. 使用 Aar1 酶酶切载体 1300DM-MtU6(Aar1)-Cas9；CIP 反应后在 0.8-1.2% 的琼脂糖凝胶中进行分离，割胶回收线性载体；

4. 将退火磷酸化的 DNA 片段与胶回收的 1300DM-MtU6(Aar1)-Cas9 线性载

体使用 T4 DNA 连接酶在 16°C 水浴锅中连接 10-16h;

5.将连接产物通过热击法转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞, 复苏后涂布于含 50mg/L 卡那霉素的 LB 平板培养基上 37°C 培养箱培养 12-16h;

6.挑取单克隆于 1.5ml 含 50mg/L 卡那霉素的 LB 液体培养基中, 37°C 摇床摇 12-16h;

7.使用测序引物对单克隆菌液进行测序, 选择靶点连接正确的克隆于 50-100ml 含 50mg/L 卡那霉素的 LB 液体培养基中, 37°C 摇床摇 12-16h, 提取质粒。测序引物如下:

MtU6-T-F:GGCATGCAAGCTTATCGATAC。

## 二、农杆菌菌株的制备

将上述表达载体通过电击法转化根癌农杆菌菌株 EHA105 感受态细胞中, 复苏并涂布于 YM 培养基 (附加 50mg/L 卡那霉素, 250mg/L 利福平) 中, 28°C 培养 24h-48h; 挑取单克隆, 接种于 30-50ml YM 液体培养基中 (附加 50mg/L 卡那霉素, 250mg/L 利福平), 28°C 摇床上 200r/min 摇 24h-48h。

## 三、使用农杆菌进行转化

使用农杆菌转化的方式将表达 CRISPR/Cas9 系统以及抗植物筛选剂的 Hpt 蛋白的 DNA 序列整合到紫花苜蓿基因组中, 使这些元件的表达产物发挥功能, 通过筛选获得目的基因被沉默的阳性植株。具体的转化方式如下:

1.紫花苜蓿种子萌发: 挑选饱满、色泽圆润的紫花苜蓿种子, 75%酒精浸泡 2 分钟, 无菌水洗两次, 每次 1 分钟; 0.1%升汞浸泡并手摇 10 分钟, 无菌水洗五次。将灭菌种子摊开于含滤纸的无菌大培养皿中, 风干。接种于 MS 固体培养基上, 光照培养箱或培养室中萌发 7-14 天;

2.愈伤组织诱导: 取上述萌发苗的子叶和下胚轴, 无菌手术刀切成小块, 接种于愈伤诱导培养基中, 25 $\pm$ 1°C 培养箱或培养室中暗培养 3 天。愈伤诱导培养基成分为: SH 基础培养基+ 2mg/L 2, 4-D+0. 2mg/L KT+0. 3mg/L 水解络蛋白+30g/L 蔗糖+8g/L 琼脂;;

3.侵染: 提前 1-2 天将上述制备的根癌农杆菌菌株接种于 50-100ml 的 YM 液

体培养基中，28℃摇床上 200r/min 培养至 OD 值 260/280 在 0.5-0.8 之间；将菌液转移到 50ml 无菌离心管中，离心机中 4℃条件下 4000r/min 离心 12 分钟，取出离心管，弃上清液，加入重悬液重悬至 OD 值 260/280 在 0.5-0.8 之间，依据每升加入 100umol 乙酰丁香酮加入对应体积的 100umol/ml 的乙酰丁香酮，重悬液为 MS 液体培养基（MS+30g/L 蔗糖）；将步骤 2 中诱导的外殖体收集到带透气塑料封口膜的 100ml 无菌三角瓶，倒入适量重悬后的菌液（能没过材料即可），用三角瓶自带的封口膜封口，真空泵中抽真空到 0.5kpa，一共抽 1h，期间每 15min 的时候轻轻摇晃一下；取出三角瓶，28℃摇床上 120r/min 摇 1h，倒干菌液，将材料摊开在铺了滤纸的无菌培养皿中晾干；

4.共培养：将上述晾干的侵染过的材料接种于共培养培养基（培养基中铺一张灭菌滤纸），共培养培养基成分为：MS 基础培养基+2mg/L 2,4-D+ 0.2mg/L KT+30g/L 蔗糖+8g/L 琼脂+100umol/L 乙酰丁香酮。25±1℃培养箱或培养室中暗培养 3 天。

5.筛选：将上述共培养材料接种于筛选培养基,筛选培养基成分为：SH 基础培养基+2mg/L 2,4-D+0.2mg/L KT +30g/L 蔗糖+8g/L 琼脂+250mg/L 头孢噻亏+250mg/L 羧苄青霉素+15mg/L 潮霉素；25±1℃培养箱或培养室中光照培养 30-60 天；

6.分化：将上述恢复的材料转接至分化培养基，分化培养基成分为：UM 基础培养基+2g/L 水解络蛋白+0.4mg/L 激动素+30g/L 蔗糖+8g/L 琼脂+250mg/L 头孢噻亏+5mg/L 潮霉素；

7.生根：将上述分化出的 1-3cm 的芽转接至生根培养基，生根培养基成分为：MS 基础培养基+1mg/L 吲哚丁酸+30g/L 蔗糖+8g/L 琼脂+250mg/L 头孢噻亏。

#### 四、 突变体的筛选与检测

靶点深度测序检测：将获得的再生植株提取 DNA 样品，用针对靶基因 PDS 序列的特异性扩增引物进行扩增。将 PCR 产物进行 TA 克隆连接到 pMD19-T 载体上，转化大肠杆菌菌株 DH5α 以后挑选一批单克隆进行靶点深度测序，分析在靶位点上是否有突变、分析突变类型。

通过实验与检测，我们发现：

通过表型观察，获得一株白化苗（图 2），将白化苗提取 DNA 样品并扩增 PDS 基因序列，测序结果（图 3）表明：该植株在靶位点上有 2bp 碱基缺失，碱基缺失位点为 Cas9 蛋白的切割位点。

图 2 表明：野生型（PDS-wt）；突变型（PDS-mt）。野生型植株表现出正常的绿色表型；突变植株表现出白色表型。该结果与白杨、苹果等物种中通过 CRISPR/Cas9 介导的 PDS 基因敲除所获得的植株表型一致。说明所得的白化苗很可能是由导入的 CRISPR/Cas9 系统介导的 PDS 基因突变引起。

图 3 表明：从测序结果看，PDS 突变植株与野生型相比，在靶点上有 2bp 的碱基缺失且该突变发生在 Cas9 蛋白的切割位点上。说明图 2 中的紫花苜蓿白化苗是由 CRISPR/Cas9 切割 PDS 基因靶位点，导致基因修复过程中有 2bp 碱基缺失所引起的。

## 实施例 2 紫花苜蓿中 PALM1 基因突变

与实施例 1 不同之处在于：

依据紫花苜蓿近源种蒺藜苜蓿中的 PALM1 序列，设计引物扩增紫花苜蓿 MsPALM1 基因序列并测序，依据所得 MsPALM1 基因序列设计靶位点；将靶位点连接到载体 MsCRISPR/Cas9 的位点上获得针对 MsPALM1 基因的敲除载体 MsCRISPR/Cas9::*PALM1*，将该载体通过上述根癌农杆菌转化的方式转化紫花苜蓿外殖体，并获得再生植株；检测方式为 PCR-RE，将所获得的再生植株提取基因组 DNA 样品，用针对 MsPALM1 基因包含靶点序列的特异性扩增引物进行扩增，并通过 BstU I 限制性内切酶酶切 PCR 产物筛选突变株（图 4）；并通过表型观察（图 5）与靶点深度测序（图 6）确认突变。

图 4 表明：通过 PCR-RE 检测，在所抽检的 25 株紫花苜蓿再生植株中，共有 13 株突变植株（在 768bp 处有不可被限制性内切酶 BstUI 所切割的条带），其中有 10 株杂合突变株（除了在 768bp 处有不可被限制性内切酶 BstUI 所切割的条带外，还有被限制性内切酶 BstUI 切割后生成的两条带，分别位于 442bp 与 326bp 处），有 3 株纯合突变植株（只在 768bp 处有不可被限制性内切酶 BstUI 所切割的条带）；突变率达 52%，其中纯合突变率达 12%。

图 5 表明，在所抽检的 25 株紫花苜蓿再生植株中，有三株的复叶（从左往右第二、三、四号）表现出明显的表型变化，与对照（从左往右第一号）相比，突变植株的复叶中小叶数由三个变为五个。其中，第 3 号突变株（也即图 4 中的第 20 号）在 PCR-RE 结果中出现微弱的可被 BstUI 限制性内切酶切割的条带，这或许是因为 T0 代植株为嵌合体的原因。

图 6 表明，从图 4 所筛选得到的植株中抽取一部分针对 MsPALM1 基因进行靶点深度测序，在 MsPALM1 基因上的 CRISPR/Cas9 的预定靶点处成功引入了突变。

以上结果表明：使用 CRISPR/Cas9 技术在紫花苜蓿中成功实现定点突变。  
SEQUENCE LISTING

<110> 广东三杰牧草生物科技有限公司

<120> 一种利用 CRISPR/Cas9 系统对紫花苜蓿基因定点突变的方法

<130> 2018.05.03

<160> 4

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 14951

<212> DNA

<213> 人工合成

<400> 1

aacgtcgcca gggcgtaggt ggtcaagcat cctggccagc tccgggcggt cgcgcctggt 60

gccggtgac ttctcgaaa acagcttggg gcagccggcc gcgtgcagtt cggcccgttg 120

gttggtcaag tcttggtcgt cgggtctgac ggggcatag cccagcagge cageggcgge 180

gctctgttc atggcgtaat gtctccggtt ctagtcgcaa gtattctact ttatgcgact 240

aaaacacgcg acaagaaaac gccaggaaaa gggcagggcg gcagcctgtc gcgtaactta 300

ggacttgtgc gacatgtcgt ttcagaaga cggctgcact gaacgtcaga agccgactgc 360

actatagcag cggagggggtt ggatcaaagt actttgatcc cgagggaac cctgtggttg 420

gcacgacat acaaatggac gaacggataa accttttcac gcccttttaa atatccgatt	480
attctaataa acgctctttt ctcttaggtt taccgceaa tatatectgt caaacactga	540
tagtttaatt cccgatctag taacatagat gacaccegc gcgataattt atcctagttt	600
gcgcgctata tttgttttc tatecgtat taaatgtata attgcgggac tctaatcata	660
aaaaccatc tcataaataa cgtcatgcat tacatgttaa ttattacatg cttaacgtaa	720
ttcaacagaa attatatgat aatcatcgca agaccggcaa caggattcaa tcttaagaaa	780
ctttattgcc aaatgttga acgatcgggg aaattcgagc tggcacctg taattcacac	840
gtgggtggg tgggtgggc tagcgtaac actagtcaga tctaccatgg tggactcctc	900
ttagaattcc cgatctagta acatagatga caccgcgcgc gataattat cctagtttgc	960
gcgctatatt ttgtttcta tcgctatta aatgtataat tgcgggactc taatcataaa	1020
aaccatctc ataaataac tcatgatta catgttaatt attacatgct taacgtaatt	1080
caacagaaat tatatgataa tcatcgcaag accggcaaca ggattcaatc ttaagaaact	1140
ttattgcaa atgtttgaac gatcggggaa attcgagctc tatcgatcaa tcaggatcct	1200
tacttttct ttttgectg gccggccttt ttcgtggccg ccggcctttt gtcgectccc	1260
agctgagaca ggtcgatccg tgtctctac aggccggtga tgctctggtg gatcagggtg	1320
gcgtccagca cctctttggt gctggtgtac ctctccggt cgatggtggt gtcaaagtac	1380
ttgaaggcgg cagggctcc cagattggtc agggtaaaca ggtgatgat attctcgccc	1440
tgtctctga tggccttate ccggtgcttg ttgtaggcgg acagcacttt gtccagatta	1500
gcgtcggcca ggatcactct cttggagaac tcgctgatct gctcgatgat ctcgtccagg	1560
tagtgctgt gctgtccac aacagctgt ttctgctcat taccctcggg ggagcccttc	1620
agcttctcat agtggctggc caggtacagg aagttcacat atttggaggg cagggccagt	1680
tcgttccct tctgcagtic gccggcagag gccagcattc tcttccggcc gtttccagc	1740

tcgaacaggg agtacttagg cagcttgatg atcaggtcct tttcacttc tttgtagecc	1800
ttggcttcca gaaagtcgat gggattcttc tcgaagctgc ttctttccat gatggtgatc	1860
cccagcagct ctttcacact cttcagtttc ttggacttgc cttttccac tttggccacc	1920
accagcacag aataggccac ggtggggctg tcgaagccgc cgtacttctt aggggtcccag	1980
tccttcttfc tggcgatcag cttatecctg ttectcttgg gcaggataga ctctttgctg	2040
aagccgcctg tctgcacctc ggtcttttfc acgatattca cttggggcat gctcagcact	2100
ttccgcacgg tggcaaaatc ccggccctta tcccacacga tctccccggt ttcgccgttt	2160
gtctcgatca gaggccgctt ccggatctcg ccgttggcca gggtaatctc ggtcttgaaa	2220
aagttcatga tgttctgta gaagaagtac ttggcggtag ccttgcctgat ttctgctcg	2280
ctcttggcga tcatctccg cacgtcgtac acctttagt cgccgtacac gaactcgtt	2340
tccagcttag ggtactttt gatcagggcg gttcccacga ccggcttcag gtaggcgtcg	2400
tgggcgtggt ggtagtgtt gatctcgcgc actttgtaa actggaaatc cttccggaaa	2460
teggacacca gcttggactt cagggtgatc actttcactt cccggatcag cttgtcattc	2520
tcgtcgtact tagtgttcat ccgggagtcc aggatctgtg ccacgtgctt tgtgatctgc	2580
ccggtttcca ccagctgtct cttgatgaag ccggccctat ccagttcgt caggccgctt	2640
ctctcggcct tggtcagatt gtcgaacttt ctctgggtaa tcagcttggc gttcagcagc	2700
tgccgccagt agttcttcat cttcttcacg acctcttcgg agggcacgtt gtcgctcttg	2760
ccccggttct tgctgcttct ggtcagcacc ttgttgcga tggagtcgtc cttcagaaag	2820
ctctgaggca cgatatggtc cacatcgtag tcggacagcc ggttgatgtc cagttcctgg	2880
tccacgtaca tatcccgcc attctgcagg tagtacaggt acagcttctc gttctgcagc	2940
tgggtgtttt ccacgggggt ttcttccagg atctggctgc ccagctcttt gatgccctct	3000
tcgatccgct tcattctctc gcggctgttc ttctgtccct tctgggtggt ctggttctct	3060

ctggccattt cगतcacgat gttctcgggc ttgtgccggc ccatcacttt cacgagctcg	3120
tccaccacct tcactgtctg caggatgccc ttcttaatgg cggggctgcc ggccagattg	3180
gcaatgtgct cgtgcaggct atcgccttgg ccggacacct gggtttctg gatgtcctct	3240
ttaaaggcca ggctgtctgc gtggatcagc tgcataaagt ttctgttggc gaagccgtcg	3300
gacttcagga aatccaggat tgtcttccc gactgcttgt cccggatgcc gttgatcagc	3360
ttccggctca gctgcccc gcccgtgtat ctcccccct tcagctgctt catcactttg	3420
tcgtgaaca ggtgggcata ggttttcagc cgttctcga tcctctctct gtctcaaac	3480
agtgtcaggg tcagcacgat atctccaga atgtctctgt ttctctcatt gtccaggaag	3540
tcctgtctct tgataatttt cagcagatcg tggatgtgc ccaggagagc gttgaaccga	3600
tcttcacgc cggagatttc cacggagtcg aagcactcga tttcttgaa gtagtctct	3660
ttcagctgct tcacggcac ttccggttg gcttgaaca gcaggtccac gatggccttt	3720
ttctgtctgc cgtcaggaa ggccggcttt ctatctcct cggtcacgta ttcaactttg	3780
gtcagctcgt tatacacggt gaagtactcg tacagcagcc tgtgcttggg cagcaccttc	3840
tcgtgggca ggctctatc gaagtggtc atccgctcga tgaagctctg ggcggaagcg	3900
ccctgtcca cacttctc gaagttccag ggggtgatgg ttctctcgt cttctggtc	3960
atccaggcga atctgctgtt tcccctggcc agagggccca cgtagtaggg gatgcggaag	4020
gtcaggatct tctgatctt ttcccgttg tcttcagga atgggtaaaa atcttctgc	4080
cgccgcagaa tggcgtcag ctctcccagg tggatctggt ggggatgct gccgttctc	4140
aaggctcctt gcttccagc caggtctct ctgttcagct tcacgagcag ttctcgggtg	4200
ccgtccatct ttccaggat gggcttgatg aactttaga actcttctg gctggctccg	4260
ccgtcaatgt agccggcgta gccgttctg ctctggctga agaaaatctc ttgtacttc	4320
tcaggcagct gctgccgac gagagcttcc agcagggtca ggtctggtg gtgctcgtcg	4380

tatctcttga tcatagaggc gctcaggggg gccttgggtga tctcgggtgt cactctcagg 4440

atgtcgtca gcaggatggc gtcggacagg ttcttggcgg ccagaaacag gtcggcgtac 4500

tggtcgcga tctgggccag caggttgtcc aggtcgtcgt cgtaggtgtc cttgctcagc 4560

tgcagtttgg catcctcggc caggtcgaag ttgctcttga agttgggggt caggcccagg 4620

ctcagggcaa tcaggtttcc gaacaggcca ttcttcttct cgccgggcag ctgggcgatc 4680

agattttcca gccgtctgct cttgctcagt ctggcagaca ggatggcctt ggcgtccacg 4740

ccgctggcgt tgatgggggt ttctcgaac agctggttgt aggtctgcac cagctggatg 4800

aacagettgt ccacgtcgt gttgtcgggg ttcaggtcgc cctcgatcag gaagtggccc 4860

cggaacttga tcatgtgggc cagggccaga tagatcagcc gcaggtcggc cttgtcgggt 4920

ctgtccacca gtttcttct caggtggtag atggtgggggt acttctcgtg gtaggccacc 4980

tgtccacga tgtgccgaa gatgggggtgc cgctcgtcgt tctatcctc ttcaccagg 5040

aaggactctt ccagtctgtg gaagaagctg tctccacct tggccatctc gttgctgaag 5100

atctcttga gatagcagat ccggttcttc cgtctgggtgt atcttcttct ggcggttctc 5160

ttcagccggg tggcctcggc tgttccgcg ctgtcgaaca gcagggctcc gatcaggttc 5220

ttcttgatgc tgtgccggtc ggtgttggcc agcaccttga atttcttct gggcaccttg 5280

tactcgtcgg tgatcacggc ccagcccaca gatttgggtc cgatgtccag gccgatgctg 5340

tacttcttgt cggtcgtgg gactccgtgg ataccgacct tccgcttctt ctttggggcc 5400

atcttatcgt catcgtcttt gtaatcaata tcatgatect tgtagctcc gtcgtgttcc 5460

ttatagtcca tctcagatc cgttcgtaaa tggtgaaaat ttcagaaaa ttgcttttgc 5520

ttaaaagaa atgattaaa ttgctgcaat agaagtagaa tgcttgattg cttgagattc 5580

gtttgtttg tatatgttgt gttgaggtcg aggtcctctc caaatgaaat gaacttctt 5640

atatagagga agggcttgc gaaggatagt gggattgtgc gtcacccctt acgtcagtgg 5700

agatataca tcaatccact tgcttgaag acgtggttgg aacgtcttct tttccacga 5760  
 tgctcctcgt ggggtgggggt ccatctttgg gaccactgtc ggcagaggca tcttcaacga 5820  
 tggcctttcc ttatcgcaa tgatggcatt ttaggagcc accttcttt tccactatct 5880  
 tcacaataaa gtgacagata gctgggcaat ggaatccgag gaggtttccg gatatacccc 5940  
 tttgtgaaa agtctcaatt gccctttggt cttctgagac tgtatctttg atatftttgg 6000  
 agtagacaag tgtgtcgtgc tccaccatgt tatcacatca atccacttgc tttgaagacg 6060  
 tggttggaac gtcttcttt tccacgatgc tctcgtggg tgggggtcca tctttgggac 6120  
 cactgtcggc agaggcatct tcaacgatgg ccttctcttt atcgcaatga tggcatttgt 6180  
 aggagccacc ttcctttcc actatcttca caataaagtg acagatagct gggcaatgga 6240  
 atccgaggag gtttccgat attacccttt gttgaaaagt ctcaattgcc ctttggcttt 6300  
 ctgagactgt atctttgata tttttggagt agacaagtgt gtcgtgctcc accatgttga 6360  
 cctgcaggca tgcaagctta tggatacctg cgacctgcag ccaagcttat ccaacatttc 6420  
 acttgagtta actcaatagc aagaataacg tccatagttt cagcattcaa gcaaaacggc 6480  
 caagaaaatc agcttggtaa tttcagtgag acctggacta ccataagcag caccgcctat 6540  
 tacacttaat ggggtaaagt aaaacgagcc acatcacctc cttgatttta aggagcattt 6600  
 gaaggagtat aaaaagaatg tatgtaatgt aaggttgtgt tgtgtcattc aagatagcaa 6660  
 gacggaccaa agcttctatg tatctatcta tgctatgat atgatattg tattgatttg 6720  
 gtttgagtac agtgaggag agggaggaac ttcttcaact gtttatttaa cctgaaactc 6780  
 aactcaaatc actgagagtg aatgttgaga aataagtatt atgtatgtt tgctttgcta 6840  
 ttagtccac atcgcttaca tatactcag ttatattgtt tatatagcct agacgaacag 6900  
 cagggtttgg ctgcaggtg aacacaacac ctgcacacgt ttagagcta gaaatagcaa 6960  
 gftaaaataa ggctagtccg ttatcaactt gaaaagtgg caccgagtcg gtgctttttt 7020

ttaaagcttg gcgcgccggg cccaacatgg tggagcacga cactctcgtc tactccaaga	7080
atatcaaaga tacagtctca gaagaccaa gggctattga gacttttcaa caaagggtaa	7140
tatcgggaaa cctcctcgga ttccattgcc cagctatctg tcacttcate aaaaggacag	7200
tagaaaagga aggtggcacc tacaatgcc atcattgcga taaaggaaag gctatcgttc	7260
aagatgcctc tgccgacagt ggtcccaaag atggaccccc acccacgagg agcatcgtgg	7320
aaaaagaaga cgttccaacc acgtcttcaa agcaagtga ttgatgtgaa catggtggag	7380
cacgacactc tcgtctactc caagaatata aaagatacag tctcagaaga ccaaagggtc	7440
attgagactt ttcaacaaag ggtaatatcg ggaaacctcc tcggattcca ttgcccagct	7500
atctgtcact tcatcaaaag gacagtagaa aaggaaggtg gcacctaca atgccaatcat	7560
tgcgataaag gaaaggctat cgttcaagat gcctctgccg acagtgttcc caaagatgga	7620
ccccacca cgaggagcat cgtggaaaaa gaagacgttc caaccacgtc ttcaaagcaa	7680
gtggattgat gtgatatctc cactgacgta agggatgacg cacaatcca ctatccttcg	7740
caagaccctt cctctatata aggaagtca ttccatttgg agaggacacg ctgaaatcac	7800
cagtctctct ctacaaatct atctctctcg agctttcga gatccggggg gcaatgagat	7860
atgaaaaagc ctgaaactcac cgcgacgtct gtcgagaagt ttctgatcga aaagtgcac	7920
agcgtctccg acctgatgca gctctcggag ggcgagaat ctctgtcttt cagcttcgat	7980
gtaggagggc gtggatatgt cctgcgggta aatagctcgc ccgatggttt ctacaaagat	8040
cgttatgttt atcggcactt tgcacggccc gcctcccga ttccggaagt gcttgacatt	8100
ggggagtfta gcgagagcct gacctattgc atctcccgc gttcacaggg tgtcacgttg	8160
caagacctgc ctgaaaccga actgcccgtt gttctacaac cggtcgcgga ggctatggat	8220
gcgatcgtg cggccgatct tagccagacg agcgggttcg gccattcgg accgcaagga	8280
atcggtcaat aactacatg gcgtgatttc atatgcgca ttgctgatcc ccatgtgtat	8340

cactggcaaa ctgtgatgga cgacaccgtc agtgcgctccg tcgcgcaggc tctcgatgag 8400  
 ctgatgcctt gggccgagga ctgccccgaa gtccggcacc tcgtgcacgc ggatttcggc 8460  
 tccaacaatg tctgacgga caatggcccgc ataacagegg tcattgactg gagcgaggcg 8520  
 atgttcgggg attccaata cgaggtcgcc aacatctct tctggaggcc gtggttggt 8580  
 tgtatggagc agcagacgcg ctacttcgag cggaggcacc cggagcttc aggatecgca 8640  
 cgactccggg cgtatatgct ccgcatggg cttgaccaac tctatcagag cttggttgac 8700  
 ggcaatttcg atgatgcage ttgggcgcag ggtcgatgcg acgcaatcgt ccgatccgga 8760  
 gccgggactg tcgggcgtac aaaaatgcc cgcagaagcg cggccgtctg gaccgatggc 8820  
 tgtttagaag tactcggca tagtggaac cgacgcccc gactcgtcc gagggcaaag 8880  
 aaatagagta gatgccgacc gggatctgct gatcgacaag ctcgagttc tcataataa 8940  
 tgtgtgagta gttccagat aagggaatta ggttcctat agggttcgc tcatgtgtg 9000  
 agcatataag aaacccttag tatgtattg tatttgtaaa atacttctat caataaaatt 9060  
 tetaattcct aaaacaaaa tccagtacta aaatccagat cccccgaatt aattcggcgt 9120  
 taattcagta cafaaaaaac gtccgcaatg tgttattaag ttgtctaage gtcaattgt 9180  
 ttacaccaca atatactctg ccaccagcca gccaacagct ccccgaccgg cagctcggca 9240  
 caaaatcacc actcgataca ggcagcccat cagtccggga cggcgtcagc gggagagccg 9300  
 ttgtaaggcg gcagacttg ctcattgtac cgatgctatt cggaagaacg gcaactaagc 9360  
 tgccgggttt gaaacacgga tgatctcgcg gagggtagca tgttgattgt aacgatgaca 9420  
 gagcgttgct gcctgtgatc accgcgggtt caaaatcggc tccgtcgata ctatgtata 9480  
 cgccaacttt gaaaacaact ttgaaaaagc tgtttctgg tatttaaggt ttagaatgc 9540  
 aaggaacagt gaattggagt tcgtctgtt ataattagct tctggggta tctttaaata 9600  
 ctgtagaaaa gaggaaggaa ataataaatg gctaaaatga gaatcacc ggaattgaaa 9660

aaactgatcg aaaaataccg ctgcgtaaaa gatacggag gaatgtctcc tgctaagga 9720  
 tataagctgg tgggagaaaa tgaaaaccta tatttaaaaa tgacggacag ccggtataaa 9780  
 gggaccacct atgatgtgga acgggaaaag gacatgatgc tatggctgga aggaaagctg 9840  
 cctgttccaa aggtcctgca ctttgaacgg catgatggct ggagcaatct gctcatgagt 9900  
 gaggccgatg gcgtcctttg ctcggaagag tatgaagatg aacaaagccc tgaagatt 9960  
 atcgagctgt atcgaggatg catcaggctc ttactcca tcgacatc ggattgtccc 10020  
 tatacgaata gcttagacag ccgcttagcc gaattggatt acttactgaa taacgatctg 10080  
 gccgatgtgg attgcgaaaa ctgggaagaa gacactccat ttaaagatcc gcgcgagctg 10140  
 tatgatttt taaagacgga aaagcccga gaggaactg tctttccca cggcgacctg 10200  
 ggagacagca acatctttgt gaaagatggc aaagtaagt gctttattga tcttgggaga 10260  
 agcggcaggg cggacaagt gtatgacatt gccttctgcg tccggctgat caggaggat 10320  
 atcggggaag aacagtatgt cgagctatft ttgacttac tgggatcaa gcctgattgg 10380  
 gagaaaataa aatattatat ttactggat gaattgttt agtacctaga atgcatgacc 10440  
 aaaatccctt aacgtgagtt ttcgtccac tgagcgtcag acccctaga aaagatcaaa 10500  
 ggatcttctt gagatccttt tttctgcgc gtaactgct gcttgcaaac aaaaaacca 10560  
 ccgctaccag cgggtggtttg tttgccgat caagagctac caactcttt tccgaagga 10620  
 actggctca gcagagcga gatacfaat actgtcttc tagttagcc gtagtaggc 10680  
 caccactca agaactctgt agcaccgct acatactcg ctctgtaat cctgtacca 10740  
 gtggctgctg ccagtggcga taagtcgtgt ctaccgggt tggactcaag acgatagta 10800  
 ccgataagg cgcagcggtc gggctgaacg gggggttcgt gcacacagcc cagcttgag 10860  
 cgaacgacct acaccgaact gagataccta cagcgtgagc tatgagaaag cgccagctt 10920  
 cccgaaggga gaaaggcga caggtatccg gtaagcggca gggctggaac aggagagcgc 10980

acgaggggagc ttccaggggg aaacgcctgg tatctttata gtcctgtcgg gtttcgccac 11040  
 ctctgacttg agcgtcgatt tttgtgatgc tcgtcagggg ggcggagcct atggaaaaac 11100  
 gccagcaacg cggccttttt acggttcctg gccttttget ggccttttgc tcacatgttc 11160  
 tttcctgcgt tatcccctga ttctgtggat aaccgtatta ccgcctttga gtgagctgat 11220  
 accgctcgcc gcagccgaac gaccgagcgc agcgagtcag tgagcgagga agcggaactg 11280  
 cgcctgatgc ggtatfttct ccttacgcat ctgtgcggta ttacacaccg catatggtgc 11340  
 actctcagta caatctgctc tgatgccga tagttaagcc agtatacaact ccgctatcgc 11400  
 tacgtgactg ggtcatggct gcgccccgac acccgccaac acccgctgac gcgccctgac 11460  
 gggcttgtct gctccccgca tccgctfaca gacaagetgt gaccgtctcc gggagctgca 11520  
 tgtgtcagag gtttcaccg tcatcaccga aacgcgcgag gcagggtgcc ttgatgtggg 11580  
 cgccggcggc cgagtggcga cggcgcggct tgtccgcgcc ctggtagatt gcctggccgt 11640  
 aggccagcca tttttgagcg gccagcggcc gcgataggcc gacgcgaagc ggcggggcgt 11700  
 agggagcgcga gcgaccgaag ggtaggcgcct ttttcagca ctteggtgt gcgctggcca 11760  
 gacagttatg cacagggcag gcgggtttta agagttttaa taagttttaa agagttttag 11820  
 gcggaaaaat cgctttttt ctcttttata tcagtcactt acatgtgtga ccggttccca 11880  
 atgtacggct ttgggttccc aatgtacggg ttccggttcc caatgtacgg ctttgggttc 11940  
 ccaatgtacg tgctatccac aggaaagaga ccttttcgac cttttcccc tgctagggca 12000  
 atttgccta gcatctgctc cgtacattag gaaccggcgg atgcttcgcc ctcgatcagg 12060  
 ttgggttagc gcatgactag gatcgggcca gcctgccccg cctcctcctt caaatcgtac 12120  
 tccggcaggt cafttgacc gatcagcttg cgcacggtga aacagaactt ctgaaactct 12180  
 ccggcgcctc cactgcgttc gtagatcgtc ttgaacaacc atctggcttc tgccttgctt 12240  
 gcggcgcggc gtgccagcgc gtagagaaaa cgcccgatgc cgggatcgat caaaaagtaa 12300

tcggggtgaa ccgtcagcac gtccgggttc ttgccttctg tgatctcgcg gtacatccaa 12360

tcagctagct cgaatcagat gtactccggc cgcccgggtt cgctctttac gatctttag 12420

cggctaatac aggcttcacc ctggataacc gtcaccagge ggccgttctt ggccttcttc 12480

gtacgctgca tggcaacgtg cgtgggtgtt aaccgaatgc aggtttctac caggctctct 12540

ttctgcttcc cgccatcggc tcgccggcag aacttgagta cgtccgcaac gtgtggacgg 12600

aacacggcgc cgggcttgc tcccttccct tcccggtatc ggttcatgga ttcggttaga 12660

tgggaaaccg ccatcagtac caggctgtaa tcccacacac tggccatgcc ggccggccct 12720

gcggaaacct ctacgtgccc gtctggaagc tcgtagegga tcacctgcc agctcgtcgg 12780

tcacgcttcg acagacggaa aacggccacg tccatgatgc tgcgactatc gcgggtgccc 12840

acgtcataga gcatcggaac gaaaaaatct ggttgctcgt cgcccttggg cggttctcta 12900

atcgacggcg caccggtgc cggcgggtgc cgggattctt tgcggattcg atcagcggcc 12960

gcttccaagc attcaccggg gcgtgcttct gctcagatgc gttgccgctg ggcggcctgc 13020

gcggccttca acttctccac caggctatca cccagcgcg cgccgatttg taccgggccc 13080

gatggtttgc gaccgctcac gccgattcct cgggcttggg ggttccagtg ccattgcagg 13140

gccggcagge aaccagccg cttagcctg gccaacgcc cgttctcca cacatggggc 13200

attccacggc gtcggtgctt ggttgttctt gatttccat gccgctcct ttagccgcta 13260

aaattcatct actcatttat tcattgctc atttactctg gtagctgcgc gatgtattca 13320

gatagcagct cggtaatggt ctgcccctgg cgtaccgctg acatcttcag cttggtgtga 13380

tctccgccg gcaactgaaa gttgaccegc ttcattggctg gcgtgtctgc caggctggcc 13440

aacgttcagc ccttgcctgc gcgtgcgctc ggacggccgg cacttagcgt gtttgcctt 13500

ttgetcattt tctctttacc tcattaactc aatagatgtt tgatttaatt tcageggcca 13560

gcgcctggac ctgcgggca gcgtgcctc cgggttctga ttcaagaacg gttgtgccgg 13620

cggeggcagt gcctgggtag ctcacgcgct gcgtgatacg ggactcaaga atgggcagct 13680  
 cgtacceggc cagcgectcg gcaacctcac cgccgatgcg cgtgcctttg atcgcccgcg 13740  
 acacgacaaa ggccgcttgt agccttccat ccgtgacctc aatgcgctgc ttaaccagct 13800  
 ccaccaggtc ggcggtggcc catatgctgt aagggcttgg ctgcaccgga atcagcacga 13860  
 agtcggctgc cttgatcgcg gacacagcca agtccgccgc ctggggcgct ccgtcgatca 13920  
 ctacgaagtc gcgccggccg atggccttca cgtcgcggtc aatcgtcggg cggtcgatgc 13980  
 cgacaacggt tagcggttga tcttcccgca cggccgcca atcgcgggca ctgccctggg 14040  
 gatcggaatc gactaacaga acatcggccc cggcgagtgt cagggcgcgg gctagatggg 14100  
 ttgatggt cgtcttgcct gaccgcctt tctggttaag tacagcgata acctcatgc 14160  
 gttccccttg cgtatttgtt tattfactca tcgcatcata tacgcagcga ccgcatgacg 14220  
 caagctgttt tactcaaata cacatcacct ttttagacgg cggcgctcgg tttctcagc 14280  
 ggccaagctg gccggccagg ccgccagctt ggcatcagac aaaccggcca ggattcatg 14340  
 cagccgcacg gttgagacgt gcgeggcgcg ctggaacacg taccggcccg cgatcatctc 14400  
 cgctcgatc tcttcggtaa tgaaaaacgg ttcgtcctgg ccgtcctggt gcggttcat 14460  
 gcttgttct cttggcgctt attctcggcg gccgccaggg cgtcggcctc ggtcaatgcg 14520  
 tctcaccga aggcaccgcg ccgcctggcc tcggtggcg tcacttctc gctgcgetca 14580  
 agtgcgcggt acagggcga gcgatgcac ccaagcagt cagccgcctc tttcacggtg 14640  
 cgcccttct ggtcgatcag ctgcggggcg tgcgcatct gtgccgggt gagggtaggg 14700  
 cgggggcca acttcacgc tcgggccttg gcggcctcgc gcccgtccg ggtgcggtcg 14760  
 atgattagg aacgctcgaa ctcggaatg ccggcgaaca cggtaaacac catgcggccg 14820  
 gccggcgtgg tgggtcggc ccacggctct gccaggctac gcaggcccgc gccggcctcc 14880  
 tggatgcgct cggcaatgtc cagtagctc cgggtgctgc gggccaggcg gtctagcctg 14940

gtcactgtca c  
14951

<210> 2

<211> 500

<212> DNA

<213> 人工合成

<400> 2

atccaacatt tcaactgagt taactcaata gcaagaataa cgtccatagt tcagcattc 60

aagcaaaaac gccaaagaaa tcagcttggt aatttcagtg agacctggac taccataagc 120

agcaccgcct attacactta atggggtaaa gtaaaacgag ccacatcacc tccttgattt 180

taaggagcat ttgaaggagt ataaaaagaa tgtatgtaat gtaaggttgt gttgtgcat 240

tcaagatagc aagacggacc aaagcttcta tgtatctatc tatgtctatg atatgatgat 300

tgtattgatt tggtttgagt acagtgaggg agagggagga acttcttcac ttgtttattt 360

aacctgaaac tcaactcaaa tcaactgagag tgaatgttga gaaataagta ttatgttatg 420

tttgccttgc tattagtcce acatcgctta catafacttc agttatattg tttatatagc 480

ctagacgaac agcagggttt  
500

<210> 3

<211> 115

<212> DNA

<213> 人工合成

<400> 3

ggctcgcagg tgaacacaac acctgcacac gttttagagc tagaaatagc aagttaaaat 60

aaggctagtc cgttatcaac ttgaaaaagt ggcaccgagt cgggtccttt ttttt 115

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工合成

<400> 4

ggcatgcaag cttatcgata c

21

## 权利要求书

1、一种利用 CRISPR/Cas9 系统对紫花苜蓿基因定点突变的方法，其特征在于，所述方法包括以下步骤：

步骤（1）构建紫花苜蓿中通用的由根癌农杆菌介导转化的双元表达载体 MsCRISPR/Cas9；

步骤（2）针对紫花苜蓿中的目标基因设计基于 CRISPR/Cas9 的靶标序列，将含有编码所述靶标序列的 DNA 片段连接到紫花苜蓿中通用的载体 MsCRISPR/Cas9 中构建载体 MsCRISPR/Cas9::target；

步骤（3）使用根癌农杆菌介导转化紫花苜蓿，实现对紫花苜蓿中特定基因的定点突变。

2、根据权利要求 1 所述的利用 CRISPR/Cas9 系统对紫花苜蓿基因定点突变的方法，其特征在于，所述紫花苜蓿包括野生品种、地方品种、育成品种、引进品种。

3、根据权利要求 1 所述的利用 CRISPR/Cas9 系统对紫花苜蓿基因定点突变的方法，其特征在于，所述目标基因包括紫花苜蓿基因组中任何有生物学功能的基因或 DNA 序列。

4、根据权利要求 1 所述的利用 CRISPR/Cas9 系统对紫花苜蓿基因定点突变的方法，其特征在于，所述的在紫花苜蓿中表达 CRISPR/Cas9 系统的双元表达载体 MsCRISPR/Cas9 的全序列如 SEQ ID NO. 1 所示。

5、根据权利要求 1 所述的利用 CRISPR/Cas9 系统对紫花苜蓿基因定点突变的方法，其特征在于，所述的在紫花苜蓿中表达 CRISPR/Cas9 系统的双元表达载体 MsCRISPR/Cas9 的骨架载体是 pCambia1300 载体，所述的 pCambia1300 骨架载体上有一段用于转化植物的 T-DNA 区域，所述 T-DNA 区域包含一个左边界重复序列 LB repeat、一个右边界重复序列 RB repeat 以及左右边界序列内部的用于转化的序列，所述的 T-DNA 区域左右边界内部用于转化的序列中包含表达抗植物筛选剂潮霉素的蛋白的 Hpt 基因表达元件、表达 Cas9 蛋白的表达元件、表达 sgRNA 的表达元件以及 sgRNA 表达元件内部两个 Aar1 酶切位点之间的靶点序列，所述 Hpt 基因表达元件内部包含启动 Hpt 基因转录的 Camv 35S promoter enhanced 启动子序列、表达 Hpt 基因的 CDS 序列和终止 Hpt 基因转录的 Camv poly A 终止序列，所述表达 Cas9 蛋白的表达元件内部包含启动 Cas9 序列转录

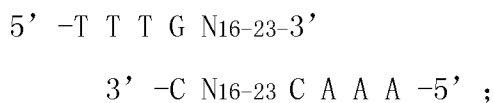
的 2xCaMV 35S promoter 启动子序列、表达 Cas9 的 DNA 序列和终止 Cas9 转录的 Nos terminator 终止序列，所述表达 sgRNA 的表达元件内部包含启动 sgRNA 序列转录的蒺藜苜蓿 MtU6 启动子序列和包含有表达 sgRNA 的 DNA 序列。

6、如权利要求 5 所述的利用 CRISPR/Cas9 系统对紫花苜蓿基因定点突变的方法，其特征在于，所述的 MtU6 启动子的序列如 SEQ ID NO.2 所示。

7、如权利要求 5 所述的利用 CRISPR/Cas9 系统对紫花苜蓿基因定点突变的方法，其特征在于，所述的表达 sgRNA 的 DNA 序列如 SEQ ID NO.3 所示，第 1 位到第 30 位的 DNA 序列中包含两个 AarI 限制性内切酶识别位点，用以针对目标基因构建定点突变的表达载体。

8、如权利要求 1-7 任一所述的利用 CRISPR/Cas9 系统对紫花苜蓿基因定点突变的方法，其特征在于，所述表达载体 MsCRISPR/Cas9::target 构建方法操作如下：

步骤（1）根据靶点序列设计一对 oligo 引物 18-24bp，能形成如下两端带有接头的 DNA 片段，并合成：



步骤（2）将上述合成的引物对进行退火反应，形成带粘性末端的互补 oligo 引物二聚体双链片段；

步骤（3）使用 AarI 限制性内切酶酶切双元表达载体 MsCRISPR/Cas9；经小牛碱性磷酸酶 CIP 去磷酸化反应后在 0.8-1.2%的琼脂糖凝胶中进行电泳分离，回收纯化线性载体；

步骤（4）将退火磷酸化后带粘性末端的互补 DNA 双链片段 DNA 与回收纯化的 MsCRISPR/Cas9 线性载体使用 T4 DNA 连接酶在 16℃水浴锅中连接 10-16h；

步骤（5）将连接产物通过热击法转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞，复苏后涂布于含 50mg/L 卡那霉素的 LB 平板培养基上，37℃培养箱培养 12-16h；

步骤（6）挑取单菌落克隆于 1.5ml 含 50mg/L 卡那霉素的 LB 液体培养基中，37℃摇床摇 12-16h；

步骤（7）使用测序引物 MtU6-T-F 对单克隆菌液进行测序，选择靶点连接正确的单克隆于 50-100ml 含 50mg/L 卡那霉素的 LB 液体培养基中，37℃摇床摇

12-16h, 提取质粒。

9、如权利要求 6 所述的利用 CRISPR/Cas9 系统对紫花苜蓿基因定点突变的方法, 其特征在于, 所述测序引物 MtU6-T-F 的序列如 SEQ ID NO.4 所示。

10、如权利要求 1 所述的利用 CRISPR/Cas9 系统对紫花苜蓿基因定点突变的方法, 其特征在于, 所述使用根癌农杆菌介导转化紫花苜蓿获得突变植株的方法包含以下步骤:

步骤(1) 根癌农杆菌菌种复苏: 将电击转化后的农杆菌菌株涂布于 YM 固体平板培养基中, 25-29 °C 培养 24h-48h; 挑取单克隆, 接种于 30-50mLYM 液体培养基中, 25-29 °C 摇床上 100-220 r/min 摇 24h-48h; 所述 YM 固体培养基和 YM 液体培养基中均包含 30-60 mg/L 卡那霉素和 200-450 mg/L 利福平;

步骤(2) 紫花苜蓿愈伤组织的获得: 所述紫花苜蓿愈伤组织获得过程如下:

挑选饱满、色泽圆润的紫花苜蓿种子, 65-80 %酒精浸泡 1-3 分钟, 无菌水洗 2-4 次, 每次 0.5-2 分钟; 0.05-0.15 %升汞浸泡并手摇 6-12 分钟, 无菌水洗 3~5 次, 接种于 MS 固体培养基上, 光照培养箱或培养室中萌发 7-16 天;

取萌发后的子叶和下胚轴, 切成小块接种于愈伤诱导培养基中, 25±1°C 培养箱或培养室中暗培养 2~4 天; 所述愈伤诱导培养基成分为: SH 基础培养基+1.0-3.0 mg/L 2,4-二氟苯氧乙酸+0.1-0.3 mg/L 激动素+0.1-0.5mg/L 水解络蛋白+15-40 g/L 蔗糖+5.8-9 g/L 琼脂; 优选地, 所述愈伤诱导培养基成分为: SH 基础培养基+ 2mg/L 2,4-二氟苯氧乙酸+0.2mg/L 激动素+0.3mg/L 水解络蛋白+30g/L 蔗糖+8g/L 琼脂;

步骤(3) 根癌农杆菌侵染紫花苜蓿愈伤组织: 所述农杆菌菌株侵染紫花苜蓿愈伤组织过程如下: 提前 1-2 天将步骤(1) 复苏的根癌农杆菌菌株接种于 50-100mL 的 YM 液体培养基中, 25-29 °C 摇床上 100-220 r/min 培养至 OD 值 260/280 在 0.5-0.8 之间; 将菌液转移到 50mL 无菌离心管中, 离心机中 0-8°C 条件下 3000-4500 r/min 离心 10-15 分钟, 弃上清液, 加入重悬液重悬至 OD 值 260/280 在 0.5-0.8 之间, 加入 50-150 umol/L 乙酰丁香酮; 所述重悬液为 MS 基础培养基+30g/L 蔗糖; 将步骤(2) 中诱导的愈伤组织收集到带透气塑料封口膜的无菌三角瓶中, 倒入重悬后的农杆菌菌液, 用三角瓶自带的封口膜封口, 真空泵中抽真空到 0.5kpa, 一共抽 0.5-1.5 h; 取出三角瓶, 25-29 °C 摇床上 100-150

r/min 摇 0.5-1.5 h, 倒干菌液, 晾干;

步骤(4) 将被根癌农杆菌侵染过的紫花苜蓿愈伤组织进行共培养: 所述共培养过程如下: 将晾干的侵染过的材料接种于共培养培养基, 培养基中铺一张灭菌后的滤纸, 25±1℃培养箱中暗培养 2-5 天; 所述共培养培养基成分为: MS 基础培养基+1-3mg/L 2,4-二氟苯氧乙酸+0.1-0.3mg/L 激动素+15-40g/L 蔗糖+5.8-9g/L 琼脂+50-150 umol/L 乙酰丁香酮; 优选地, 所述共培养培养基成分为: MS 基础培养基+2mg/L 2,4-二氟苯氧乙酸+ 0.2mg/L 激动素+30g/L 蔗糖+8g/L 琼脂+100umol/L 乙酰丁香酮;

步骤(5) 紫花苜蓿愈伤组织筛选培养: 所述筛选培养过程如下: 将共培养得到的材料接种于筛选培养基, 25±1℃培养箱或培养室中光照培养 30-60 天; 所述筛选培养基成分为: SH 基础培养基+1-3 mg/L 2,4-二氟苯氧乙酸+0.1-0.3 mg/L 激动素+15-40 g/L 蔗糖+5.8-9 g/L 琼脂+150-450 mg/L 头孢噻亏+150-450 mg/L 羧苄青霉素+10-50mg/L 潮霉素; 优选地, 所述筛选培养基成分为 SH 基础培养基+2mg/L 2,4-二氟苯氧乙酸+0.2mg/L 激动素+30g/L 蔗糖+8g/L 琼脂+250mg/L 头孢噻亏+250mg/L 羧苄青霉素+15mg/L 潮霉素;

步骤(6) 紫花苜蓿愈伤组织分化培养: 将筛选培养后的材料转接至分化培养基, 25±1℃培养箱或培养室中光照培养 15-30 天; 所述分化培养基成分为: UM 基础培养基+0.5-5g/L 水解络蛋白+0.1-2 mg/L 激动素+15-40 g/L 蔗糖+5.8-9 g/L 琼脂+150-450 mg/L 头孢噻亏+4-10 mg/L 潮霉素; 优选地, 所述分化培养基成分为: UM 基础培养基+2g/L 水解络蛋白+0.4mg/L 激动素+30g/L 蔗糖+8g/L 琼脂+250mg/L 头孢噻亏+5mg/L 潮霉素;

步骤(7) 紫花苜蓿再生芽生根培养: 将分化出的 1-3cm 的芽转接至生根培养基, 培养基成分为: MS 基础培养基+0.5-2 mg/L 吲哚丁酸+15-40 g/L 蔗糖+5.8-9 g/L 琼脂+150-450 mg/L 头孢噻亏; 优选地, 所述生根培养基成分为: MS 基础培养基+1mg/L 吲哚丁酸+30g/L 蔗糖+8g/L 琼脂+250mg/L 头孢噻亏;

步骤(8) 紫花苜蓿突变株的筛选与检测, 所述紫花苜蓿突变株的筛选与检测的方法包括 PCR-RE 检测、T7E1 酶切检测与靶点深度测序。

11. 如权利要求 1-10 任一权利要求所述的利用 CRISPR/Cas9 系统对紫花苜蓿基因定点突变的方法在紫花苜蓿育种和基因编辑紫花苜蓿育种中的应用。



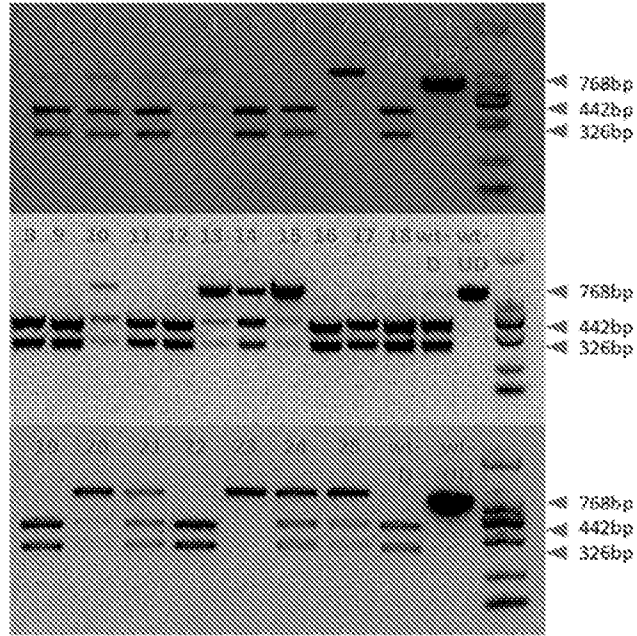


图 4

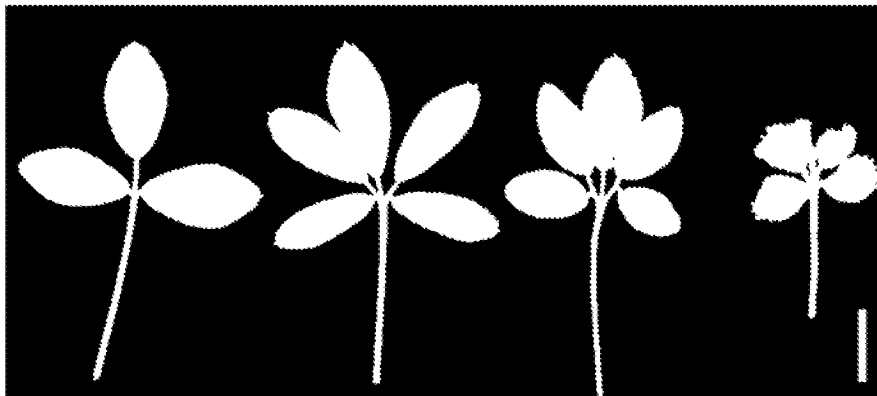


图 5

5'.....ATGTTACACCGCCG CGACCGTGCTCGTCTCCATC.....3'	WT
5'.....ATGTTACACCGCCG CGA- CGTGCTCGTCTCCATC.....3'	-1
5'.....ATGTCCACCGCCG --- CGTGCTCGTCTCCATC.....3'	-4
5'.....ATGTTACACCGCCG -GACCGTGCTCGTCTCCATC.....3'	-1
5'.....ATGTTACACCGCCGGCGACCGTGCTCGTCTCCATC.....3'	+1
5'.....CCGG-----TC.....3'	-60
5'.....ATGTTACACCGCCG C-----T-C-- GTCCTCCATC.....3'	-11/+2

图 6

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

**PCT/CN2019/094630**

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
C12N 15/82(2006.01)i; C12N 9/22(2006.01)i; C12N 15/70(2006.01)i; A01H 5/00(2018.01)i; A01H 6/54(2018.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N; A01H		
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) CNABS, VEN(DWPI+SIPOABS), CNTXT, EPTXT, USTXT, WOTXT, CNKI; PubMed, Elsevier Science, ISI WEB of Science; GenBank+EMBL+DDBJ; 中国专利序列数据库; China Patents Biological Sequence Database: 紫花苜蓿, 苜蓿, 牧蓿, 路蓿, 紫苜蓿, Medicago sativa, crispr, 对申请人和发明人的追踪检索, 对SEQ ID NOs: 1-4的检索, tracking search for applicants and inventors, search for SEQ ID NOs: 1-4		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 108866093 A (GUANGDONG SANJIE HERBAGE BIOTECHNOLOGY CO., LTD.) 23 November 2018 (2018-11-23) see claims 1-11	1-11
PX	CN 108949774 A (GUANGDONG SANJIE HERBAGE BIOTECHNOLOGY CO., LTD.) 07 December 2018 (2018-12-07) see claims 1-11	1-11
X	CN 106676131 A (QINGDAO INSTITUTE OF BIOENERGY AND BIOPROCESS TECHNOLOGY, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) 17 May 2017 (2017-05-17) see abstract, and claims 1-10	1-11
A	WO 2017205834 A1 (THE BOARD OF TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF ILLINOIS ET AL.) 30 November 2017 (2017-11-30) see entire document	1-11
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "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) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "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 "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 "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 "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search <b>23 September 2019</b>		Date of mailing of the international search report <b>08 October 2019</b>
Name and mailing address of the ISA/CN <b>China National Intellectual Property Administration (ISA/CN) No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088 China</b>		Authorized officer
Facsimile No. <b>(86-10)62019451</b>		Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

**PCT/CN2019/094630**

<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	GAO, Ruimin et al. "Gene editing by CRISPR/Cas9 in the obligatory outcrossing <i>Medicago sativa</i> " <i>Planta</i> , Vol. 247, No. 4, 28 February 2018 (2018-02-28), ISSN: 1432-2048, see abstract, and p. 1045, left column	1-11
.....		

**Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)**

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
  - a.  forming part of the international application as filed:
    - in the form of an Annex C/ST.25 text file.
    - on paper or in the form of an image file.
  - b.  furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
  - c.  furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
    - in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
    - on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2.  In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

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

International application No. <b>PCT/CN2019/094630</b>
---

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	108866093	A	23 November 2018	None			
CN	108949774	A	07 December 2018	None			
CN	106676131	A	17 May 2017	None			
WO	2017205834	A1	30 November 2017	AU	2017270579	A1	22 November 2018
				US	2019161765	A1	30 May 2019
				CN	109477118	A	15 March 2019
				BR	112018074094	A2	06 March 2019
				EP	3464601	A1	10 April 2019
				KR	20190010647	A	30 January 2019

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2019/094630

<p><b>A. 主题的分类</b></p> <p>C12N 15/82(2006.01)i; C12N 9/22(2006.01)i; C12N 15/70(2006.01)i; A01H 5/00(2018.01)i; A01H 6/54(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)</p> <p>C12N; A01H</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>数据库: CNABS, VEN(DWPI+SIPOABS), CNTXT, EPTXT, USTXT, WOTXT, CNKI; PubMed, Elsevier Science, ISI WEB of Science; GenBank+EMBL+DDBJ; 中国专利序列数据库 检索词: 紫花苜蓿, 苜蓿, 牧蓿, 路苜, 紫苜蓿, Medicago sativa, crispr, 对申请人和发明人的追踪检索, 对SEQ ID NOs: 1-4的检索</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 108866093 A (广东三杰牧草生物科技有限公司) 2018年 11月 23日 (2018 - 11 - 23) 参见权利要求1-11</td> <td>1-11</td> </tr> <tr> <td>PX</td> <td>CN 108949774 A (广东三杰牧草生物科技有限公司) 2018年 12月 7日 (2018 - 12 - 07) 参见权利要求1-11</td> <td>1-11</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>CN 106676131 A (中国科学院青岛生物能源与过程研究所) 2017年 5月 17日 (2017 - 05 - 17) 参见摘要、权利要求1-10</td> <td>1-11</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>WO 2017205834 A1 (UNIV ILLINOIS等) 2017年 11月 30日 (2017 - 11 - 30) 参见全文</td> <td>1-11</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>Ruimin Gao等. "Gene editing by CRISPR/Cas9 in the obligatory outcrossing Medicago sativa" Planta, 第247卷, 第4期, 2018年 2月 28日 (2018 - 02 - 28), ISSN: 1432-2048, 参见摘要, 第1045页左栏</td> <td>1-11</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 108866093 A (广东三杰牧草生物科技有限公司) 2018年 11月 23日 (2018 - 11 - 23) 参见权利要求1-11	1-11	PX	CN 108949774 A (广东三杰牧草生物科技有限公司) 2018年 12月 7日 (2018 - 12 - 07) 参见权利要求1-11	1-11	X	CN 106676131 A (中国科学院青岛生物能源与过程研究所) 2017年 5月 17日 (2017 - 05 - 17) 参见摘要、权利要求1-10	1-11	A	WO 2017205834 A1 (UNIV ILLINOIS等) 2017年 11月 30日 (2017 - 11 - 30) 参见全文	1-11	X	Ruimin Gao等. "Gene editing by CRISPR/Cas9 in the obligatory outcrossing Medicago sativa" Planta, 第247卷, 第4期, 2018年 2月 28日 (2018 - 02 - 28), ISSN: 1432-2048, 参见摘要, 第1045页左栏	1-11
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求																		
PX	CN 108866093 A (广东三杰牧草生物科技有限公司) 2018年 11月 23日 (2018 - 11 - 23) 参见权利要求1-11	1-11																		
PX	CN 108949774 A (广东三杰牧草生物科技有限公司) 2018年 12月 7日 (2018 - 12 - 07) 参见权利要求1-11	1-11																		
X	CN 106676131 A (中国科学院青岛生物能源与过程研究所) 2017年 5月 17日 (2017 - 05 - 17) 参见摘要、权利要求1-10	1-11																		
A	WO 2017205834 A1 (UNIV ILLINOIS等) 2017年 11月 30日 (2017 - 11 - 30) 参见全文	1-11																		
X	Ruimin Gao等. "Gene editing by CRISPR/Cas9 in the obligatory outcrossing Medicago sativa" Planta, 第247卷, 第4期, 2018年 2月 28日 (2018 - 02 - 28), ISSN: 1432-2048, 参见摘要, 第1045页左栏	1-11																		
<p><input 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>"&amp;" 同族专利的文件</p>																				
<p>国际检索实际完成的日期</p> <p>2019年 9月 23日</p>		<p>国际检索报告邮寄日期</p> <p>2019年 10月 8日</p>																		
<p>ISA/CN的名称和邮寄地址</p> <p>中国国家知识产权局(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>授权官员</p> <p>邵旭倩</p> <p>电话号码 010-62411298</p>																		

## 第1栏 核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1. c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列, 国际检索是基于下列序列列表进行的:
- a.  作为国际申请的一部分提交的:
- 附件C/ST. 25文本文件形式
  - 纸件或图形文件形式
- b.  根据细则13之三. 1(a) 仅为国际检索目的以附件C/ST. 25文本文件形式与国际申请同时提交的:
- c.  仅为国际检索目的在国际申请日之后提交的:
- 附件C/ST. 25文本文件形式(细则13之三. 1(a))
  - 纸件或图形文件形式(细则13之三. 1(b)和行政规程第713段)
2.  另外, 在提交/提供了多个版本或副本的序列列表的情况下, 提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的作为申请一部分的序列列表的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围(如适用)的所需声明。
3. 补充意见:

国际检索报告  
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2019/094630

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	108866093	A	2018年 11月 23日	无			
CN	108949774	A	2018年 12月 7日	无			
CN	106676131	A	2017年 5月 17日	无			
WO	2017205834	A1	2017年 11月 30日	AU	2017270579	A1	2018年 11月 22日
				US	2019161765	A1	2019年 5月 30日
				CN	109477118	A	2019年 3月 15日
				BR	112018074094	A2	2019年 3月 6日
				EP	3464601	A1	2019年 4月 10日
				KR	20190010647	A	2019年 1月 30日