(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 111630175 B
(45)授权公告日 2023.08.18

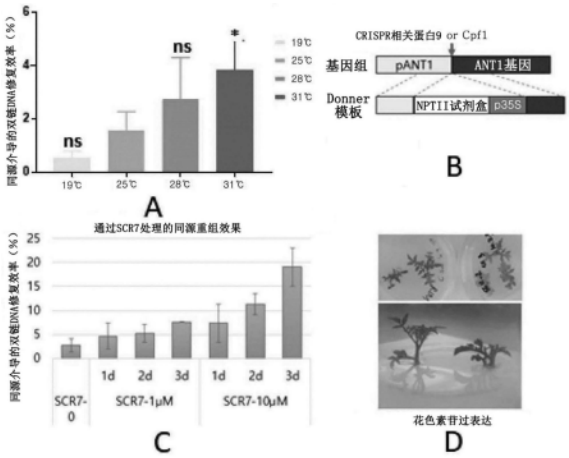
(21)申请号 201980009486.6
(22)申请日 2019.01.11
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 111630175 A
(43)申请公布日 2020.09.04
(30)优先权数据
10-2018-0007579 2018.01.22 KR
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2020.07.21
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/KR2019/000501 2019.01.11
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2019/143077 KO 2019.07.25
(73)专利权人 庆尚大学校产学协力团
地址 韩国庆尚南道
(72)发明人 金在演 吴天万
韦鲁·斯万卡雅尼 米尔蒂·川
金知谐 成演瑀 郑世正 金贤晶
(74)专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限公司 11002
专利代理师 孙永梅 刘翠娥
(51)Int.Cl.
C12N 15/82(2006.01)
C12N 15/10(2006.01)
C12N 15/113(2006.01)
C12N 15/90(2006.01)
C12N 9/22(2006.01)
(56)对比文件
WO 2017066175 A1,2017.04.20
JP 2018000129 A,2018.01.11
CN 106282228 A,2017.01.04
Chantal LeBlanc等.Increased efficiency of targeted mutagenesis by CRISPR/Cas9 in plants using heat stress.《The Plant Journal》.2017,
审查员 管冰
权利要求书1页 说明书19页
序列表13页 附图10页

(54)发明名称

在植物体中基于同源重组提高基因编辑效率的方法

(57)摘要

本发明涉及在植物体中基于同源重组提高基因编辑效率的方法,包括在植物细胞的组织培养过程中优化温度及光周期条件或者利用多复制子(multiple replicon)来表达同源介导的双链DNA修复(HDR,homology-directed DNA repair)所需因子及效率增加因子或者调节非同源末端连接(NHEJ,non-homologous end joining)途径的步骤。



CN 111630175 B

1.一种在植物体中基于同源重组提高基因编辑效率的方法,其作为利用基因剪刀系统的植物体的基因编辑方法,其特征在于,包括在植物细胞的组织培养过程中优化温度及光周期条件的步骤,上述组织培养的温度条件为在共培养植物组织后,在29～33℃的条件下培养4～6天后,在26～30℃的条件下培养4～6天,上述组织培养的光周期条件为由6～10小时的明期及14～18小时的暗期组成的短日照条件。

2.根据权利要求1所述的在植物体中基于同源重组提高基因编辑效率的方法,其特征在于,还包括利用多复制子、调节同源介导的双链DNA修复途径或非同源末端连接途径的步骤。

3.根据权利要求2所述的在植物体中基于同源重组提高基因编辑效率的方法,其特征在于,上述复制子为基于双生病毒的复制子。

4.根据权利要求2所述的在植物体中基于同源重组提高基因编辑效率的方法,其特征在于,上述调节同源介导的双链DNA修复途径为调节选自由RPA1A、RPA1B、RPA1C、RPA1D、RAD51B、RAD51C、RAD51D、RAD51、DMC1、RAD52-1、RAD52-2、RAD54、XRCC1、XRCC2、XRCC3、ATM、XRS2/NBS、Mre11、rad50、Brca1、Brca2A、Brca2B、CtlP/Com1/Sae2及exo1组成组中的一种以上的表达或通过处理同源介导的双链DNA修复途径的激活剂来激活同源介导的双链DNA修复的途径。

5.根据权利要求2所述的在植物体中基于同源重组提高基因编辑效率的方法,其特征在于,上述调节非同源末端连接途径为调节选自由KU70、KU80及LIG4组成的组中的一种以上的表达或通过处理非同源末端连接途径的抑制剂来抑制非同源末端连接途径。

6.根据权利要求2所述的在植物体中基于同源重组提高基因编辑效率的方法,其特征在于,上述基因剪刀系统包含选自由CRISPR相关蛋白9、Cpf1、转录激活因子样效应物核酸酶、锌指核酸酶或它们功能上的类似物组成的组中的一种以上的核酸水解酶及能够向所要编辑的靶基因组位置诱导上述核酸水解酶的向导RNA作为有效成分。

7.根据权利要求6所述的在植物体中基于同源重组提高基因编辑效率的方法,其特征在于,由序列表中序列1的碱基序列组成的拟南芥端粒重复序列结合蛋白1内含子插入于上述核酸水解酶中。

在植物体中基于同源重组提高基因编辑效率的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及在植物体中基于同源重组提高基因编辑效率的方法。

背景技术

[0002] 在植物系统中通过同源重组(HR,homologous recombination)或同源介导的双链DNA修复(HDR,homology-directed DNA repair)的基因组校正技术在在植物基因工程研究中被认为是里程碑式的领域。虽然同源重组常发生在生成单倍体的生殖细胞的减数分裂中,但并未发生在体细胞的有丝分裂。据报告,同源介导的双链DNA修复为与非同源末端连接(non-homologous end joining,NHEJ)一同在DNA受损时发生的修复途径,同源介导的双链DNA修复的发生频率为非同源末端连接的1/1000。据1990年代初的报告,在烟草属植物(Nicotiana species)中双链断裂(DSB,double strand break)可增加同源介导的双链DNA修复,虽然早在20年前便已公开通过诱导双链断裂来使基因组变形的基因剪刀或基因组校正/编辑技术,但基因组校正/编辑技术的使用在植物系统中是非常受限的,而且,随着最近3代成簇的规律间隔的短回文重复序列/其相关蛋白9(CRISPR/Cas9)系统的导入,提高同源介导的双链DNA修复效率的研究也逐渐活跃。若使用成簇的规律间隔的短回文重复序列/其相关蛋白9系统向基因组的特定位置基因造成双链断裂,则当通过作为在体细胞中优势的DNA修复途径的非同源末端连接途径发生DNA修复时,通常因不确定的修复可生成多种插入缺失(insertion-deletion,Indel)突变。虽然这种技术有利于获取随机化的插入缺失突变,但并不属于真正的基因组校正/编辑技术。基于同源介导的双链DNA修复的基因组校正/编辑技术是一种可以随意更改DNA碱基序列的技术,例如,外来基因的靶特异性插入、切割特定DNA片段或代替相似的DNA等,通过双链断裂的诱导可大幅提高同源介导的双链DNA修复的效率的事实在同源介导的双链DNA修复研究中起到非常重要的作用。然而,尽管双链断裂诱导大幅提高了同源介导的双链DNA修复的效率,但同源介导的双链DNA修复效率仍然非常低,仅为非同源末端连接的约1/100,这与实际应用相差甚远。因此,为了通过双链断裂改善植物同源介导的双链DNA修复技术,已经付出了许多努力,其中,通过使用病毒复制子(viral replicon)取得了备受瞩目的进步。

[0003] Baltes等(2014,Plant Cell 26(1):151-163)通过使用诱导现有双链断裂的锌指核酸酶(ZFN,Zinc Finger Nuclease)和基于双生病毒(geminivirus)的病毒复制子来扩增同源介导的双链DNA修复模板,从而显著提高在烟草属植物中同源介导的双链DNA修复效率。将含有锌指核酸酶和同源介导的双链DNA修复模板的双生病毒复制子加载到三螺旋DNA并通过农杆菌注入到烟草后,若通过滚环式复制生成原型的复制子并通过表达锌指核酸酶来向有缺陷的GUS靶基因诱导双链断裂,则通过加载到复制子的同源介导的双链DNA修复模板产生同源介导的双链DNA修复。据报告,在番茄中同时使用转录激活因子样效应物核酸酶(TALENs,Transcription activator-like effector nucleases)和CRISPR相关蛋白9(Cas9,CRISPR associated protein 9)的情况下,这种技术具有非常好的效果(Cermak et al.,2015,Genome Biology 16(1):232)。作者们通过该论文作出了如下报告,即,以花色素

通过同源介导的双链DNA修复过度积累的愈伤组织数量为基准所使用的每个子叶的同源介导的双链DNA修复效率约为10～13％，在这种条件下，若以三螺旋DNA插入在基因组的事件数量为基准进行换算，则可以为1～1.5％，而且，若以暂时表达转录激活因子样效应物核酸酶及Cas9的细胞为基准进行换算，则可以为0.1～0.15％，水平依然较低。相比仅使用现有双链断裂的三螺旋DNA系统，最少可提高5～10倍。但以具有同源介导的双链DNA修复事件的愈伤组织为基准，在获取产生同源介导的双链DNA修复的植物时会发生其他损失，因此，可从每1000个中期待1个左右，但由于这也需要利用通过花色素苷的积累报道分子使用及除草剂抗性或抗生素抗性上的特性，与基于同源介导的双链DNA修复的基因组编辑技术的普及相距甚远。根据最近发表的结果，虽然通过在水稻中使用稻矮缩病毒(WDV，Wheat dwarf virus)复制子来将以T_0转化体基准的的同源介导的双链DNA修复基因敲入(knock-in)效率提高至19.4％，在这种情况下，Cas9不仅使用预表达的愈伤组织，而且还可将作为抗生素抗性基因的NPTII结构体插入同源介导的双链DNA修复模板来作为通过抗生素进行筛选的结果，也距离在不插入外部基因且仅编辑靶基因的碱基序列的新育种基因技术相距甚远(Wang et al.2017，Mol Plant.10(7)：1007-1010)。因此，进一步提高获得同源介导的双链DNA修复愈伤组织的效率以及优化从这种愈伤组织获得同源介导的双链DNA修复植物的过程为非常重要的步骤。

[0004] 基因组校正技术在动物系统中的进步要快于植物，在如老鼠或人的哺乳类情况下，同源介导的双链DNA修复的发生效率高于植物，这可能是部分性地由以寡核苷酸形式将多个分子传递至细胞的动物系统上的性质引起的。至今为止，在用于提高植物体细胞中同源介导的双链DNA修复效率的系统中最有效的系统为通过病毒复制子提供同源介导的双链DNA修复或同时表达和调节各种因子，以便提高额外同源介导的双链DNA修复的效率。但具有如下缺点，即，若将这种多个因子放入复制子，则随着复制子的大小增加，复制数量会减少并变得不稳定，因此，需要努力克服这一问题。

[0005] 此外，据报告，通过额外处理多种小的化学物质可提高同源介导的双链DNA修复效率。据报告，其中，抑制与同源介导的双链DNA修复具有竞争关系的非同源末端连接途径的多个化学物质抑制剂中用于抑制连接酶(ligase)IV的SCR7吡嗪(pyrazine)(2,3-二氢-6,7-二苯基-2-硫代-4-(1H)-蝶啶酮(2,3-Dihydro-6,7-diphenyl-2-thioxo-4(1H)-pteridinone))处理可提高同源介导的双链DNA修复约2～19倍。此外，据报告，虽然报告中能够提高重组酶(recombinase)RAD51的活性的RAD51蛋白激活剂-1(RS-1，RAD51-stimulatory compound 1)处理也能够在老鼠中提高同源介导的双链DNA修复效率，但尚未报告对植物系统起到作用。

[0006] 大部分的植物组织培养在22～25℃的条件下进行，相反，成簇的规律间隔的短回文重复序列/其相关蛋白9是否也能够在这种温度下进行还尚未可知。据最近的报告，在37℃的条件下，通过激活拟南芥系统中的Cas9功能可提高插入缺失突变的频率(LeBlanc et al.，2018，Plant J.93(2)：377-386)。但对于Cpf1(CRISPR from Prevotella and Francisella 1)酶，没有这种报告，并且，也没有利用于植物的同源介导的双链DNA修复的报告。

[0007] 虽然将同源介导的双链DNA修复的效率实用性地提高到能够适用于产业上是一件非常具有价值的事情，但以现在的细胞水平中同源介导的双链DNA修复的效率还处于非常

低的水平,当以这种细胞制备植物个体来进行计算时,除非利用抗生素或除草剂抗性,否则以现在的实情难以适用于现在的产业。因此,需要一种能够进一步提高在植物中的同源介导的双链DNA修复效率的系统。

[0008] 另一方面,虽然韩国公开专利第2017-0081268号公开了与包含用于编辑对烟草脆裂病毒(TRV)序列和对象基因组的靶序列介导序列特异性切断的单一向导RNA(sgRNA)的酸序列结构体的植物细胞及其基因编辑用途有关的用于编辑基因组的核酸结构体,但并未公开在植物体中基于同源重组提高基因编辑效率的方法。

发明内容

[0009] 技术问题

[0010] 本发明通过如上所述的要求而导出,本发明人为了通过将植物体中仅作为低效率实验水平的同源重组技术与基因剪刀及组织培养技术相结合来显著提高其效率,通过CRISPR基因剪刀系统和与植物组织培养条件及基于同源介导的双链DNA修复的DNA修复机制、多复制子(multiple replicon)的使用相关的多种分子的激活剂或抑制剂的组合来提高番茄植物体中同源重组的效率,并通过确认最佳条件来完成了本发明。

[0011] 技术方案

[0012] 为了解决上述问题,本发明提供在植物体中基于同源重组(homologous recombination)提高基因编辑效率的方法,其作为利用基因剪刀系统的植物体的基因编辑方法,包括在植物细胞的组织培养过程中优化温度及光周期条件或者利用多复制子(multiple replicon)或者调节同源介导的双链DNA修复(HDR,homology-directed DNA repair)途径或非同源末端连接(NHEJ,non-homologous end joining)途径的步骤。

[0013] 发明的效果

[0014] 本发明的方法作为能够自由编辑基因组技术,可代替现有的基于插入缺失(Indel)或基于碱基编辑器(base editor)的CRISPR基因组编辑技术,可非常准确地导入对农作物有用的等位基因,在开发转基因(GM,genetically modified)农作物时,可将其用作将导入的基因向特定染色体的特定位置进行基因聚合的技术,因此,可用于各种农作物的新育种手段。并且,在基础科学中也可用于标记各种蛋白质或植物(in planta)蛋白质工程。

附图说明

[0015] 图1示出温度处理条件对于同源介导的双链DNA修复效率的影响的结果(A部分)、用于测定同源介导的双链DNA修复效率而使用的报道分子结构体示意图(B部分)、通过处理用于抑制非同源末端连接途径的SCR7吡嗪(Pyrazine)抑制剂提高基于同源介导的双链DNA修复的基因校正效率的结果(C部分)以及通过同源介导的双链DNA修复过量生产花色素苷的番茄植物体的状态(D部分)。

[0016] 图2为示出本发明的同源介导的双链DNA修复效率上升战略的图,示出了通过从初始植物体细胞的低同源介导的双链DNA修复效率、双重螺旋切断、使用复制子的同源介导的双链DNA修复模板的复制量的增加、转化/CRISPR基因剪刀或同源介导的双链DNA修复途径活性增加、阻隔非同源末端连接途径、通过同源介导的双链DNA修复途径酶表达的活性提高

以及多复制子的使用等来提高同源介导的双链DNA修复效率的战略。

[0017] 图3为示出使用番茄的用于提高同源介导的双链DNA修复效率的培养条件确定结果的图。种子发芽:在25℃的环境中以暗条件下3～4天及光照条件下3～4天进行处理;预培养:在25℃的暗条件下培养1天;本培养:在25℃的暗条件下培养2天;后续培养:通过在500mg/l的替门汀(timentin)或头孢噻肟(cefotaxim)中清洗两次来消除农杆菌,并用无菌沃特曼滤纸进行干燥后,在相同的选择性培养基中在明/暗周期、25～31℃的条件下培养5天并以10～12天为间隔进行后续培养。

[0018] 图4为示出通过初始探索获得的基于同源介导的双链DNA修复的基因校正获得的过量生产花色素苷的番茄植物的图。HR ex 6-light/-dark为同源重组实验的编号为6(第六个)的实验,意味着在明(light)或暗(dark)条件下培养10天。

[0019] 图5为示出基于CRISPR/Cpf1的同源介导的双链DNA修复结构体的最简单的结构的图。

[0020] 图6为示出基于dCRISPR/Cpf1的同源介导的双链DNA修复结构体升级及对照区结构体的图。

[0021] 图7为示出在其他温度条件下具有CRISPR结构体中每个细胞的同源介导的双链DNA修复效率的结果的图。*:p＜0.05,ns:无显著差异(no significantly different)。

[0022] 图8为示出在其他光周期中具有CRISPR结构体中每个细胞的同源介导的双链DNA修复效率的结果的图。

[0023] 图9为示出使用基于CRISPR/Cpf1的结构体的同源介导的双链DNA修复事件植物的图。

[0024] 图10为示出通过非同源末端连接抑制剂(SCR7吡嗪)处理的同源介导的双链DNA修复效率变化的图。

[0025] 图11为示出用于诱导同源介导的双链DNA修复途径因子的过表达的CRISPR/Cpf1及dCas9-sun结构体的图。

[0026] 图12为示出来源于豆黄矮病毒(BeYDV)的复制子的结构的示意图。

[0027] 图13为示出在ANT1同源介导的双链DNA修复模板内的DNA结构的图。

[0028] 图14为示出通过使用用于扩增大基因间区(LIR)的接合部的特异性引物来对从转化成含有豆黄矮病毒载体pLSL.R.GGFP的农杆菌的子叶中按培养期间分离的基因组DNA的每种病毒载体的释放进行PCR分析的结果的图。

[0029] 图15为示出通过使用用于扩增大基因间区(LIR)的接合部的特异性引物来对从转化成含有豆黄矮病毒载体pLSL.GFP.R的农杆菌的子叶中按培养期间分离的基因组DNA中的每种病毒载体的释放进行PCR分析的结果的图。

[0030] 图16为示出分析豆黄矮病毒载体pLSL.R.GGFP及pLSL.GFP.R的病毒复制本释放的动力模式的结果的图。

[0031] 图17示出多复制子系统和从其分离的复制子的分离的图。通过组合3个大基因间区(LIR)和3个小基因间区(SIR)制备3个复制子。只不过,由于同源介导的双链DNA修复模板由一个复制子构成,因此,包含基因组DNA和Cpf1表达结构体的多种同源介导的双链DNA修复促进因子在其他复制子中表达。

具体实施方式

[0032] 为了实现本发明的目的，本发明提供在植物体中基于同源重组(homologous recombination)提高基因编辑效率的方法，其作为利用基因剪刀系统的植物体的基因编辑方法，包括在植物细胞的组织培养过程中优化温度及光周期条件或者利用多复制子(multiple replicon)或者调节同源介导的双链DNA修复(HDR，homology-directed DNA repair)途径或非同源末端连接(NHEJ，non-homologous end joining)途径的步骤。

[0033] 根据本发明一实例，提供在植物体中基于同源重组提高基因编辑效率的方法，包括在植物细胞的组织培养过程中优化温度及光周期条件、利用多复制子、调节同源介导的双链DNA修复途径或非同源末端连接途径的步骤。

[0034] 根据本发明一实例的方法，上述组织培养的最佳温度条件可以为在共培养(cocultivation)植物组织后，在29～33℃的条件下培养4～6天，随后在26～30℃的条件下培养4～6天，优选地，可以为在31℃的条件下培养5天，随后在28℃的条件下培养5天，但并不限定于此。最佳光周期条件可以为由6～10小时的明期及14～18小时的暗期组成的短日照(short day)条件，但并不限定于此，根据植物体的种类最佳条件可有所不同。

[0035] 根据本发明一实例的方法，上述复制子为基于双生病毒(geminivirus)的复制子，本发明的上述双生病毒可以为豆黄矮病毒(BeYDV，Bean Yellow Dwarf virus)，但并不限定于此。

[0036] 根据本发明一实例的方法的特征在于，将上述同源介导的双链DNA修复途径的调节和有关同源介导的双链DNA修复模板、gRNA及表达基因通过组成具有3个大基因间区(LIR，large intergenic region)和3个小基因间区(SIR，small intergenic region)的多复制子系统来最大化同源介导的双链DNA修复模板的复制数量，同时过表达多种因子(图17)。更具体地，本发明的复制子可由序列表中序列28的碱基序列组成，但并不限定于此。

[0037] 根据本发明一实例的方法，上述调节同源介导的双链DNA修复途径可以为调节(诱导或抑制)选自由RPA1A(复制蛋白A(replication protein A))、RPA1B、RPA1C、RPA1D、RAD51B(RAD51旁系同源基因B(paralog B))、RAD51C、RAD51D、RAD51、DMC1(DNA减数分裂重组酶1(Meiotic Recombinase 1))、RAD52-1、RAD52-2、RAD54、XRCC1(X射线损伤交叉互补蛋白1(X-Ray Repair Cross Complementing 1))、XRCC2、XRCC3、ATM(ATM丝氨酸/苏氨酸激酶(Serine/THReonine Kinase))、XRS2/NBS(MRN/X)、Mre 11(MRN/X)、rad50(MRN/X)、Brca1(BRCA1，DNA修复相关(DNA repair associated))、Brca2A、Brca2B、CtlP/Com1/Sae2及exo1组成组中的一种以上的表达或通过处理同源介导的双链DNA修复途径的激活剂(activator)来激活同源介导的双链DNA修复的途径，上述调节非同源末端连接途径可以为调节选自由KU70(XRCC6)、KU80(XRCC5)及LIG4组成的组中的一种以上的表达或通过处理它们的抑制剂来抑制非同源末端连接途径。

[0038] 根据本发明一实例的方法，上述基因剪刀系统可包含选自由Cas9(CRISPR associated protein 9)、Cpf1(CRISPR from Prevotella and Francisella 1)、转录激活因子样效应物核酸酶(Transcription activator-like effector nuclease)、锌指核酸酶(Zinc Finger Nuclease)或它们功能上的类似物组成的组中的一种以上的核酸水解酶及能够向所要编辑的靶基因组位置诱导上述核酸水解酶的向导RNA作为有效成分，但并不限定于此。

[0039] 根据本发明一实例的方法,由序列表中序列1的碱基序列组成的拟南芥端粒重复序列结合蛋白(AtTrp1,Arabidopsis thaliana telomeric repeat-binding protein)内含子插入于上述核酸水解酶中。更具体地,当上述核酸水解酶为来源于酿脓链球菌的CRISPR相关蛋白9(SpCas9,Streptococcus pyogenes Cas9)时,拟南芥端粒重复序列结合蛋白内含子序列插入于从SpCas9编码序列的ATG的A碱基到117nt碱的位置中,当上述核酸水解酶为来源于毛螺科菌ND2006的Cpf1(LbCpf1,Lachnospiraceae bacterium ND2006 Cpf1)时,拟南芥端粒重复序列结合蛋白内含子序列可插入于从LbCpf1编码序列的ATG的A碱基到138nt碱的位置中。

[0040] 现在为止,在植物系统中的基于同源介导的双链DNA修复(HDR,homology-directed DNA repair)的效率非常低,因此作为基因组校正技术并不适合在产业上使用。为了提高同源介导的双链DNA修复效率而需要解决的技术问题如下:

[0041] 1)用于提高同源介导的双链DNA修复的效率的双重螺旋切断稳定表达在对象基因部位中用于有效诱导DNA双重螺旋切断的Cas9或Cpf1等的核酸水解酶。

[0042] 2)同源介导的双链DNA修复依赖于同源介导的双链DNA修复模板的复制数量,由此实现病毒复制子的稳定复制。

[0043] 3)利用农杆菌实现用于将基因剪刀元件有效传递至植物细胞内的优化转化。

[0044] 4)Cas9及Cpf1等在植物系统中能够表现出高活性。

[0045] 5)通过优化同源介导的双链DNA修复中使用的多个生物元件的克隆装配(cloning assembly)来实现表达优化。

[0046] 6)实现用于优化参与同源介导的双链DNA修复的相关因子的表达的遗传和化学环境。

[0047] 为了解决如上所述的问题,本发明提供逐步优化战略及手段。

[0048] 1.基于DNA双重螺旋切断的同源介导的双链DNA修复效果

[0049] DNA双重螺旋切断为用于提高同源介导的双链DNA修复效率的核心要素中的一个。为了靶位置的双重螺旋切断,本发明使用了优化人密码子的SpCas9(序列30)或LbCpf1(序列31)。通过向SpCas9及LbCpf1 CDS内插入具有增强子(enhancer)功能的拟南芥端粒重复序列结合蛋白1(AtTrp1,Arabidopsis thaliana telomeric repeat-binding protein)内含子(序列1)来实现基因表达及表达的RNA的稳定性。SpCas9及LbCpf1在诱导番茄同源介导的双链DNA修复均表现良好,其操作效率根据gRNA筛选表现出了敏感的反应。在通过LbCpf1进行的实验中,两个距离约为50nt的gRNA显示出了比使用一个gRNA进行双链断裂更好的同源介导的双链DNA修复效果。并且,为了实现SpCas9或LbCpf1的稳定表达,通过将具有增强子功能的拟南芥泛素延伸蛋白1(AtUBQ1,rabidopsis thaliana ubiquitin extension protein 1)序列1内含子(序列2)添加至35S启动子的5'UTR来诱导稳定的表达。

[0050] 2.用于提高同源介导的双链DNA修复效率的复制子制备

[0051] 同源介导的双链DNA修复依赖于同源介导的双链DNA修复模板的复制数量,因此,为了优化豆矮花叶病毒(Bean dwarf mosaic virus)复制子的稳定复制,通过在Rep基因的起始密码子之前插入科扎克共有(Kozak consensus)序列(序列3)来提高Rep翻译的效率。

[0052] 3.用于提高同源介导的双链DNA修复效率的复制子-三螺旋DNA分离制备

[0053] 豆矮花叶病毒(Bean dwarf mosaic virus)复制子装载于三螺旋DNA内并使用农

杆菌向植物细胞导入。在此情况下,随着其大小的增加,复制子的稳定性、转化性会降低,在植物细胞中的复制数量也随之减少。由于需要多种因子的表达,当复制子的大小过大时,虽然可通过使用两个各包含不同复制子三螺旋DNA的独立农杆菌同时感染同一植物细胞,但由于这比单一农杆菌方式效率低,因此本发明人使用了多复制子(multiple replicon)系统。通过转化装载多复制子的一个三螺旋DNA并通过在一个细胞中将其分离成两个以上复制子来操作,从而可对提高同源介导的双链DNA修复效率作出贡献。由于本发明的多复制子系统具有3个大基因间区和3个小基因间区,当注入于细胞时,具有分离成3个复制子的特性(图17)。

[0054] 4.通过农杆菌进行转化后的植物细胞的培养条件优化

[0055] 植物细胞与动物细胞不同,具有厚的细胞壁,通常通过农杆菌传递基因,因此需要使用农杆菌将基因剪刀元件有效地传递到植物细胞,从传递的三螺旋DNA优化复制子的形成、复制、多种遗传剪刀工具的表达等。

[0056] 为此,为了优化通过农杆菌的植物细胞的转化,应该优化用于植物细胞培养的培养基条件,例如激素等,除此之外,应优化温度及光周期(光处理)条件。在本发明中,实验了19℃、25℃、28℃及31℃的温度条件。使用SpCas9及LbCpf1系统中的同源介导的双链DNA修复效率均随着温度的提高而上升。但是,虽然在高浓度的长时间处理能够增加同源介导的双链DNA修复事件,由于发生同源介导的双链DNA修复事件的植物体的再分化率过低,因此决定在28℃及31℃条件下处理的优化时间,在本发明中,选择在28℃/31℃的条件下处理5天/5天。并且,在以暗条件、短日照处理及长日照处理等的暗光周期条件下调查同源介导的双链DNA修复效率的结果如下,即,在互不相同的光周期条件下,SpCas9系统在同源介导的双链DNA修复效率上并没有显著差异,但在LbCpf1系统的情况下,相比在暗周期处理,在光周期处理的同源介导的双链DNA修复效率更高。并且,相比长日照处理,短日照处理的同源介导的双链DNA修复效率更高。

[0057] 5.复制子内多种生物元件试剂盒配置优化需要

[0058] 为了实现高效率的同源介导的双链DNA修复,需要通过用于同源介导的双链DNA修复的多个生物元件的克隆装配优化的表达优化。通过启动子、终止剂位置、方向等可对基因表达或复制子的复制数量产生影响。尤其,需要观察用作同源介导的双链DNA修复模板的DNA具有哪种启动子,并防止形成RNA双重螺旋。

[0059] 6.同源介导的双链DNA修复途径的基因优化

[0060] 为了用于优化参与同源介导的双链DNA修复的相关因子表达的基因的表达调节,首先,调查存在于番茄中的同源介导的双链DNA修复途径基因。通过与同源介导的双链DNA修复途径相关的多个因子(RPA1A(replication protein A)、RPA1B、RPA1C、RPA1D、RAD51B(RAD51 paralog B)、RAD51C、RAD51D、RAD51、DMC1(DNA Meiotic Recombinase 1)、RAD52-1、RAD52-2、RAD54、XRCC1(X-Ray Repair Cross Complementing 1)、XRCC2、XRCC3、ATM(ATM Serine/Threonine Kinase)、XRS2/NBS(MRN/X)、Mre 11(MRN/X)、rad50(MRN/X)、Brcal(BRCA1,DNArepair associated)、Brca2A、Brca2B、CtlP/Com1/Sae2、exo1)的表达分析来将S1MRE11、RAD51D、XRRC2、BRCA2、RAD54、ATM、RAD51、RAD52-1、RAD51B基因选定为靶基因,将识别其启动子部位的1个或2个gRNA设计成通过U6启动子进行表达,同时使用35S启动子-5' UTR UBQ1内含子表达dCas9-sun tag//scAb-VP64。在这种情况下,dCas9-sun标签通过gRNA

结合于启动子,sun标签通过与单链抗体(scAb,single chain Antibody)-VP64激活效应物(activation effector)相结合来促进转移。作为另一方式,通过向gRNA附着pumilio蛋白或其他RNA结合蛋白质的结合序列来直接向pumilio募集包含VP64等的激活效应物或可使用pumilio-sun tag//scAb-VP64式的扩增系统。在这种情况下,pumilio蛋白可代替为MS2(MS2 bacteriophage capsid RNA-binding protein)或dCsy4(catalytically inactive Csy4)等RNA结合蛋白质,VP64也可通过多种激活效应物进行代替。

[0061] 表1

[0062] 与同源介导的双链DNA修复途径相关的多个因子的gRNA

[0063]

		gRNA1同源介导的双链DNA修复(序列)	链(strand)	gRNA2同源介导的双链DNA修复	链(strand)
1	SlMRE11	ATCAAGTTAACGTTTATCTT(4)	m	ATTAGAGATTATAAATTTAA(5)	m
2	RAD51D	Tttacaataatatatagtaa(6)	p	Aagttgttagctagagtttc(7)	p

[0064]

3	XRRC2	TTTTAAAAGAAAAAATTAAA(8)	m	Atacatatttatgtttgtta(9)	p
4	BRCA2	Tgcccaactaacgctcaaaa(10)	p	Tgataataacaaaaatgacg(11)	p
5	RAD54	AAAAAAATTTGTATGTTGTT(12)	m	tattattttatgttattgtt(13)	p
6	ATM	Tagcatatgaccaaaataaa(14)	p	Taacaaaacagaaaaagaag(15)	p
7	RAD51	Atgtgacccaatactttaag(16)	p	Tataccttaaactatattc(17)	p
8	RAD52-1	TTCTATGCATAAATAATTAA(18)	m	Gagagaaagaagcctcctca(19)	p
9	RAD51B	AGCTCTAAATGATAAAGTTG(20)	m		

[0065] *m:负链(minus strand);p:正链(plus strand)

[0066] 7.同源介导的双链DNA修复途径的化学、基因优化

[0067] 作为与上述5.接近方法同时或单独使用的方法,即,通过化学因子激活同源介导的双链DNA修复途径调节蛋白质的方法。作为RAD51的激活剂(activator)使用了RS-1,从结果中确认到,同源介导的双链DNA修复效率约提高了3倍。

[0068] 8.与同源介导的双链DNA修复具有竞争关系的非同源末端连接途径或通过用于抑制同源介导的双链DNA修复的因子的基因调节的同源介导的双链DNA修复优化

[0069] 与同源介导的双链DNA修复具有竞争关系的非同源末端连接(NHEJ,non-homologous end joining)途径中广为人知的蛋白质可以为KU70(XRCC6)、KU80(XRCC5)及LIG4等。并且,众所周知,可存在各种基因,例如,SMC6B、AtMMS21(SMC5/6成分(component))、ABO4、FAS1、RFC1、INO80、RecQ4a、FANCM、RecQ4b、RTEL1等,其基因突变可促进同源介导的双链DNA修复。

[0070] 本发明使用了如下方法,即,通过使用作为与同源介导的双链DNA修复途径具有竞

争关系的非同源末端连接途径的连接酶IV的抑制剂的Scr7吡嗪化学物质来阻隔非同源末端连接途径，从而提高同源介导的双链DNA修复效率。相比对照组，Scr7吡嗪可提高至4倍的同源介导的双链DNA修复效率。

[0071] 以下，通过实施例详细说明本发明。但是，下述实施例仅为本发明的示例，下述实施例并不限定本发明的内容。

[0072] 材料及方法

[0073] 1.实验材料

[0074] 用于本发明的材料及试剂等如下述表2所示。

[0075] 表2

[0076] 用于本发明的材料及试剂

[0077]

<table>
<tr><td></td><td>来源</td><td></td><td>来源</td></tr>
<tr><td colspan="2">植物材料(Plant materials)</td><td colspan="2">试剂(Reagents)</td></tr>
<tr><td>番茄品种(Tomato variety Cultivar)红灯(Hongkwang)</td><td>当地公司(Local company)</td><td rowspan="6">植物激素(Plant hormones)；乙酰丁香酮(Acetosyringone)；碳氢化合物(Hydrocarbon)；β-D葡糖醛酸(β-D Glucuronide)(X-Gluc)；用于植物组织培养的化学品(Chemicals for plant tissue culture)；MS盐和维生素(MS salts and vitamins)；MS盐和B5维生素(MS salts and B5 vitamins)、植物琼脂(PhytoAgar)、麦芽糖(Maltose)。</td><td rowspan="6">默克，美国(Sigma，USA)；DUCHEFA Biochemie B.V，荷兰(The Netherlands)</td></tr>
<tr><td colspan="2">细菌(Bacteria)</td></tr>
<tr><td>大肠杆菌(Escherichia coli)10β</td><td>纽英伦，美国(EB，USA)</td></tr>
<tr><td>农杆菌(Agrobacterium tumefaciens)GV3101::pMP90</td><td>庆尚大学，韩国(GNU. Korea)</td></tr>
<tr><td colspan="2">DNA载体(DNA vectors)</td></tr>
<tr><td>pTC147</td><td rowspan="4">Addgene，美国</td></tr>
<tr><td>pTC217</td><td rowspan="3"></td></tr>
<tr><td>Golden Gate tool kit</td></tr>
<tr><td>MoClo Tool kit</td></tr>
<tr><td colspan="2">试剂(Reagents)</td><td colspan="2"></td></tr>
<tr><td>核苷酸(dNTPs)</td><td rowspan="2">Fermentas，立陶宛(Lithuania)</td><td>H_2O</td><td>使用微孔系统处理(Treated with Millipore system)(美国)</td></tr>
<tr><td>phusion DNA聚合酶(Phusion TaqDNA polymerase)</td><td colspan="2">试剂盒(Kits)</td></tr>
</table>

[0078]

PfuDNA聚合酶(PfuDNA polymerase)		RevertAid™ H minus 逆转录酶(RevertAid™ H minus reverse transcriptase)(1stcDNAstrandsynthesis)	Fermentas，立陶宛(Lithuania)
T4 DNA连接酶(T4 DNA ligase)	NEB, USA	FirstChoice® RLM-RACE (5 RACE)	Invitrogene (生命技术(Life Technology))
限制性酶(BpiI，BsaI and others)		CloneJE™ PCR cloning	Fermentas，立陶宛(Lithuania)
T7E1核酸内切酶(T7E1 endonuclease)		质粒DNA分离试剂盒(Plasmid DNA isolation kit)(小型和中型(mini and midi))；DNA提取试剂盒(DNA extraction kit)	BIOFACT，韩国(Korea)；Qiagen，德国(Germany)
		总基因组DNA分离试剂盒(Total genomic DNA isolation kit)(微型制备(mini preps))；总RNA提取试剂盒(Total RNA extraction kit)	Qiagen，德国(Germany)

[0079] 2.通过PCR的DNA扩增

[0080] 用于本发明的PCR反应物的组成成分及PCR扩增条件如下述表3及表4所示。

[0081] 表3

[0082] PCR反应物组成成分

[0083]

成分	浓度	使用量(μl)
反应缓冲液	10X	2
dNTPs	2.5mM	2
正向引物	10μM	1
反向引物	10μM	1
模板DNA	1-10ng	1
Taq聚合酶	1U/μl	1
蒸馏水	-	高达20(up to 20)

[0084] 表4

[0085] PCR反应条件

[0086]

步骤	温度(℃)	时间	循环次数	
1	94-95	4-5分钟	1	转变性
2	94-95	20-60秒钟	20-40	变性
3	引物Tm	20-60秒钟		结合
4	72	~1分钟/kb		伸张
5	72	1-10分钟	1	最终伸张
6	4-15	∞	-	保存

[0087] 3.农杆菌渗入法

[0088] 利用各自的同源介导的双链DNA修复载体分别对根癌农杆菌GV3101::pMP90菌株进行转化。通过压力渗透(pressure infiltration)方法使在番茄叶片中的每个农杆菌进行瞬时表达(transient expression)。直至吸光度达到1.0为止,将农杆菌培养液在600nm中进行培养后,在渗透前一小时,处理200μM的乙酰丁香酮(acetosyringone)。

[0089] 4.番茄转化及病毒挑战感染

[0090] 将在生物体外进行的生物体外(In vitro)条件下培养的来源于红灯品种的番茄子叶外植体通过包含同源介导的双链DNA修复结构体的农杆菌进行转化。在25±2℃的温度条件下,在含有30g/l的蔗糖的1/2MS培养基(pH 5.8)中以16小时的明条件/8小时的暗条件的方式培养红灯品种的无菌种子。收集7天龄的幼苗,并将其子叶细切成0.2～0.3cm的大小。将细切的切片(外植体)放置于包含预培养基(MS基础盐(basal salts),Gamborg B5维生素(vitamins),2.0mg/l的玉米蛋白反式异构体(Zeatin trans-isomer),0.1mg/l的吲哚乙酸(IAA,indolyl acetic acid),1mM的腐胺(putrescine),30g/l的葡萄糖(glucose),pH5.8)的板上进行1天的预处理。使用带有尖刺的东西刺入预培养的外植体,并转化成含有同源介导的双链DNA修复结构体的根癌农杆菌GV3101::pMP90。然后,将外植体转移至共培养基后,在25℃的暗条件下培养2天。随后,将外植体转移至非筛选培养基中培养5天后,通过选择性培养基进行传代培养。为了获得最高的再生效率,以10天为间隔进行传代。当根部充分生长时(1.5～3.0cm),通过转移至生根培养基(rooting medium)来诱导完整的植物体的生长。将从生根培养基生长的植物体转移至蛭石(vermiculite)端口进行驯化后,将其转移到温度为26±2℃并以16小时的明/8小时的暗的方式维持光周期的温室里的土壤中。

[0091] 5.基于豆黄矮病毒复制子释放的PCR的检测

[0092] 为了分析豆黄矮病毒原型复制子释放的动力倾向,使用了单一结构豆黄矮病毒载体pLSL.GFP.R、pLSL.R.GGFP及非病毒载体pAGM4723。

[0093] 表5

[0094] 用于本发明的主要载体

[0095]

结构体名称(Construct name)	应用(Application)
pLSL.GFP.R(Cermak et al.2015)	病毒循环检测(Virus Circularization detection)
pLSL.R.GGFP	病毒循环检测(Virus Circularization detection)
pAGM4723	非病毒载体(Non-viral vector)，复制子检测控制(replicon detection control)
pTC147(Cermak et al.2015)	35S: ANT1表达，非复制三螺旋DNA转化效率控制(35S: ANT1 expressing，non-replicating T-DNA transformation efficiency control)
pTC217(Cermak et al.2015)	豆黄矮病毒ANT1-GT三螺旋DNA载体，在复制子中带有Cas9/gRNA1b (BeYDV ANT1-GT T-DNA vector with Cas9/gRNA1b in the replicon)

[0096] 利用包含上述各个载体的农杆菌对番茄子叶进行转化，待进行转化后，在2天、5天、9天、12天、16天、30天后，在各个组中回收2个子叶并用400mg/l的替门汀(timentin)进行清洗后在-80℃的条件下保藏。然后，利用嗅化十六烷基三甲铵(CTAB，Cetyl trimethylammonium bromide)从每个试样中提取基因组DNA，并使用下述表6中的引物进行PCR。将PCR产物加载到1％(w/v)的琼脂糖凝胶并使用ImageJ程序(imagej.nih.gov/ij/)来计算谱带强度，并利用甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH，Glyceraldehyde3-phosphate dehydrogenase)进行标准化。

[0097] 表6

[0098] 用于调查复制子形成的引物

[0099]

引物	序列信息(5'→3')(序列)	产物大小	应用
GR-F1	TTGAGATGAGCACTTGGGATAG(21)	545 bp	pLSL.GFP.R中的病毒环化检测(virus circularization detection in pLSL.GFP.R)
35S-R5	CGTAAGCCTCTCTAACCATCTG(22)		
GR-F1	TTGAGATGAGCACTTGGGATAG	537 bp	pLSL.R.GGFP中的病毒环化检测(virus circularization detection in pLSL.R.GGFP)
tOCS-R1	GTTCTGTCAGTTCCAAACGTAAA(23)		
pVS1-F1	ATCTCGCGGTACATCCAATC(24)	521 bp	从番茄农杆菌中检测载体矢量主干 (To detect vector Backbone from Agrobacterium in tomato)
pVS1-R1	TTCGTTCCGATGCTCTATGAC(25)		
GADPH-F	CCATAACCTAATTTCTCTCTC(26)	1208 bp	内部控制(internal control)
GADPH-R	GTCATGAGACCCTCAACAAT(27)		

[0100] 6.测定同源介导的双链DNA修复频率

[0101] 为了测定Cas9的同源介导的双链DNA修复频率,在感染农杆菌的21天后,在pTC217(BeYDV,Cas9/gRNA1b)病毒复制子感染的子叶和转化成pTC147(35S:ANT1 T-DNA)对照区载体的子叶中计算紫色斑点。通过在pTC217中生成的愈伤组织计算出的紫色斑点总数中除以在pTC217中生成的愈伤组织计算出的紫色斑点总数便可以计算出同源介导的双链DNA修复的频率。

[0102] 实施例1.利用花色素苷标记的同源重组效率分析

[0103] 为了在番茄农作物中调查基于同源介导的双链DNA修复的基因剪刀的效率性,将35S启动子通过同源介导的双链DNA修复插入在用于调节花色素苷合成的作为转录因子的ANT1基因的转录起始位置的上游启动子位置中,并通过ANT1基因的活性化的花色素苷过表达来诱导形成紫红色的愈伤组织。

[0104] 当同源介导的双链DNA修复模板(序列29)可通过在35S启动子碱基序列和其上游中插入pNos-NPTII-OCSt来进行同源介导的双链DNA修复事件时,获取卡那霉素抗性。此时,具有同源性的上部碱基序列为1043bp,下部碱基序列为592bp。并且,在其上部添加了两个转录激活因子样效应物核酸酶(TALEN)结合部位或dSaCas9(D10A,N580A)/gRNA结合部位。DNA双重螺旋切断可使用来源于酿脓链球菌的CRISPR相关蛋白9(SpCas9,Streptococcus pyogenes Cas9)/gRNA、来源于毛螺科菌ND2006的Cpf1(LbCpf1,Lachnospiraceae bacterium ND2006 Cpf1)/gRNA1或LbCpf1/gRNA1/gRNA2等,在同源介导的双链DNA修复模板中的gRNA(向导RNA)互补碱基序列通过位点特异性突变(site-specific mutation)以防

止被Cas9或Cpf1切断的方式进行。具有最简单形态的基因剪刀复制子由SpCas9/LbCpf1、1～2个的gRNA、ANT1同源重组(HR)模板组成，并进一步构成基于dCas9(dead Cas9)的转移激活系统、基于dCas9的同源介导的双链DNA修复模板积累系统。成功发生同源介导的双链DNA修复的愈伤组织或植物因花色素苷的过度积累呈紫红色。直到现在，所获得的同源介导的双链DNA修复效率作为除以35S-ANT1载体的值，表现出约20％的同源介导的双链DNA修复事件效率，当使用30多片子叶时，成功获得了一个同源介导的双链DNA修复植物。

[0105] 并且，为了提高同源重组效率，对温度、光照条件等进行了多种变形。

[0106] 表7

[0107] 利用番茄红灯F_1的用于提高同源介导的双链DNA修复效率的初始温度和光照条件探索

[0108]

编号	结构体(Construct)	同源介导的双链DNA修复(HDR)ex3	同源介导的双链DNA修复(HDR)ex3	同源介导的双链DNA修复(HDR)ex5(30dpt，在28℃	同源介导的双链DNA修复(HDR)ex5(30dpt，在28℃
		25℃	32℃	的光照条件下)	的暗条件下)
1	pTC147	289/29*	282/32	413/54	411/52
2	pTC217	5/31	13/33	10/69	28/60

[0109]

[0110] *紫色愈伤组织数量/子叶数量pTC147表示每个子叶三螺旋DNA转化为花色素苷的愈伤组织数量，pTC217表示每个子叶通过同源介导的双链DNA修复产生的愈伤组织数量。

[0111] 表8

[0112] 调查不同温度条件下的同源介导的双链DNA修复效率(培养后第21天的结果)

[0113]

编号	温度(℃)	结构体(Construct)	总外植体*	TPS[1]	HRE[2]	HRC[3]
1	19	pTC147	111	2164		
		pTC217	157	19	11.97±6.39	0.54±0.25
2	25	pTC147	131	2008		
		pTC217	149	30	22.08±8.86	1.57±0.71
3	28	pTC147	113	1714		
		pTC217	150	60	47.62±31.40	**2.72±1.59**
4	**31**	pTC147	116	1428		
		pTC217	141	57	44.85±15.54	**3.84±1.10**

[0114] *:在相同条件下反复进行4次实验;TPS:紫色斑点总数;HRE:总外植体的平均同源介导的双链DNA修复效率(%);HRC:通过作为对照区的pTC147的紫色斑点的总数量标准化的同源介导的双链DNA修复效率平均。

[0115] 从上述表8确认到，同源介导的双链DNA修复效率随着在高温处理而上升。并且，由于在转化21天后的未成熟番茄根中产生花色素苷，预计高标准误差会与实际基因编辑相混淆。

[0116] 并且,分析了当使用CRISPR/Cpf1系统及其的升级系统时的同源介导的双链DNA修复效率。其结果,在使用CRISPR/Cpf1系统的初始结构体的版本中成功发现了同源介导的双链DNA修复事件。7711-1及7721-1分别为并不具有Rep和gRNA的对照组(表9)。并且,CRISPR/Cpf1的升级版本优化金门集元件(Goldengate assembly)在第2级生产过程中的方向性,以便减少在初始版本中自体结构体的RNAi效应,这样不仅可提升现有的基于CRISPR/Cpf1的结构体的效果,而且相比其他研究小组发布的基于成簇的规律间隔的短回文重复序列/其相关蛋白9的结构体可表现出更高的同源重组效果(表10)。

[0117] 表9

[0118] 使用CRISPR/Cpf1系统的同源介导的双链DNA修复效率测定

[0119]

编号	结构体(construct)	总外植体	TPS	HRE	HRC
1	7711-1	320	1	0.48±0.48	0.03±0.03
2	7721-1	233	1	0.46±0.46	0.03±0.03
3	7731-1	315	58	17.67±7.86	1.01±0.44

[0120] 表10

[0121] 使用CRISPR/Cpf1升级系统的同源介导的双链DNA修复效率测定

[0122]

编号	结构体(construct)	温度上*	总外植体	TPS	HRE	HRC
1	pTC147	5.31-5.25	63	1073		
		5.31-5.28	63	1154		
		10.31	65	1084		
2	pTC217	5.31-5.25	43	23	53.46±1.09	3.58±0.74
		5.31-5.28	69	37	54.80±6.19	3.16±0.64
		10.31	70	47	67.80±14.29	3.92±0.75
3	**8161-1**	5.31-5.25	71	58	76.12±18.96	4.51±0.74
		5.31-5.28	**68**	**52**	**77.55±5.84**	**4.43±0.64**
		10.31	59	45	75.40±3.97	4.44±0.75
4	7731-1	5.31-5.25	70	28	40.78±3.21	2.62±0.55
		5.31-5.28	75	25	32.25±2.71	1.82±0.27
		10.31	75	22	29.32±4.80	1.68±0.09
5	82611-2	5.31-5.25	24	1	4.17	0.34
		5.31-5.28	28	3	10.71	0.67
		10.31	23	1	4.35	0.26
6	8131-4	5.31-5.25	67	14	21.03±6.22	1.35±0.44
		5.31-5.28	76	11	14.27±6.40	0.81±0.41
		10.31	52	7	12.97±12.97	0.77±0.77

[0123]

7	8141-2	5.31-5.25	66	6	10.50±4.76	0.76±0.45
		5.31-5.28	73	4	6.35±2.72	0.37±0.18
		10.31	77	4	4.53±2.27	0.27±0.14
8	8151-1	5.31-5.25	68	10	14.0±5.60	0.81±0.25
		5.31-5.28	66	5	8.99±4.50	0.48±0.25
		10.31	68	3	3.33±3.33	0.16±0.16

[0124] *5.31-5.25:共培养(cocultivation)后,将外植体在31℃的条件下处理5天后,在25℃的条件下处理5天;5.31-5.28:共培养后,将外植体在31℃的条件下处理5天后,在28℃的条件下处理5天;10.31:共培养后,将外植体在31℃的条件下处理10天。

[0125] 并且,如下述表11所示,使用升级版本的CRISPR/Cpf1分析通过转化后的光周期的同源介导的双链DNA修复效率的结果。通过下述表可确认到,相比在DD条件下,基于CRISPR/Cpf1的结构体在L/D条件下,尤其在短日照条件(short day)下的效率上升了两倍。

[0126] 表11

[0127] 转化后所使用的光周期的同源介导的双链DNA修复效率比较

[0128]

编号	结构体(Construct)	光周期	总外植体	TPS	HRE	HRC
1	pTC147	DD	55	1147		
		8L/16D	56	1116		
		16L/8D	62	1260		
2	pTC217	DD	33	20	60.61	2.90
		8L/16D	41	32	78.05	3.61
		16L/8D	34	20	58.82	2.68
3	**8161-1**	**DD**	**57**	**54**	**102.78±30.56**	**4.94±1.49**
		8L/16D	**59**	**124**	**206.82±11.59**	**9.44±0.66**
		16L/8D	**58**	**100**	**171.88±3.88**	**7.91±0.10**
4	8253-2	DD	52	33	57.42±39.25	2.75±1.87
		8L/16D	73	46	58.84±33.84	2.70±1.58
		16L/8D	63	10	14.30±4.30	0.66±0.19
5	82611-2	DD	23	7	30.43	1.47
		8L/16D	12	5	41.67	1.87
		16L/8D	22	3	13.64	0.63

[0129] DD:共培养(cocultivation)后,将外植体在31℃的暗条件下处理10天;8L/16D:共培养后,将外植体在31℃的条件下以8小时的明/16小时的暗周期处理10天;16L/8D:共培养后,将外植体在31℃的条件下以16小时的明/8小时的暗周期处理10天。

[0130] 实施例2.通过SCR7吡嗪处理提高植物同源重组频率

[0131] 大部分的DNA修复通过非同源末端连接途径发生，而基于同源介导的双链DNA修复的修复发生在一部分。据现有的研究报告，在哺乳类中可通过阻断非同源末端连接途径来提高同源介导的双链DNA修复效率。据报告，作为哺乳类连接酶IV的抑制剂的SCR7吡嗪可将同源介导的双链DNA修复在小鼠中提高至约19倍，在人类细胞系中提高至5倍。根据Nishizawa-Yokoi等(2016,Plant Physiol.170(2):653-666)提出的观点，在植物中，连接酶IV在水稻的非同源末端连接途径中能够起到重要作用。但是，尚未有关于SCR7吡嗪对植物同源介导的双链DNA修复有何影响的报告。因此，本发明人使用Cas9结构pTC217(具有Cas9/gRNA1b的豆黄矮病毒)分析了根据不同的培养时间(0天、1天、2天和3天)，不同的SCR7吡嗪浓度(0μM、1μM、10μM)来处理的效果。其结果，同源介导的双链DNA修复频率随着SCR7吡嗪处理时间(期间)和浓度而增加(表12～表14)。

[0132] 表12

[0133] 通过非同源末端连接抑制剂处理的同源介导的双链DNA修复效率变化(tomato cv.Tom-Heart,21dpi)

[0134]

结构体(Construct)				pTC147(T-DNA)		pTC217		
非同源末端连接(NHEJ)抑制剂-SCR7(2nd处理)浓度	条件	温度	总子叶数量	紫色斑点(Purple spot)/子叶(平均)	紫色斑点(Purple spots)(合计)	紫色斑点(Purple spot)/子叶(平均)	紫色斑点(Purple spots)(合计)	编辑效率*
0	16L/8D	25℃	52	27.1	1409	0.88	46	3.2
1μM	16L/8D	25℃	52	22.2	1154	1	52	4.5
10μM	16L/8D	25℃	52	21.8	1137	2.61	136	11.9

[0135] 编辑效率：总紫色斑点(total purple spots)(pTC217)/总紫色斑点(total purple spots)(pTC147)×100

[0136] 表13

[0137] 不同非同源末端连接抑制剂处理期间的同源介导的双链DNA修复效率变化1(tomato cv.Hong-Kwang,21dpi)

[0138]

结构体(Construct)					pTC147 (T-DNA)		pTC217		
SCR7处理浓度	SCR7处理期间	光周期条件*	温度	总子叶数量	紫色斑点(Purple spot)/子叶(平均)	紫色斑点(Purple spots)(合计)	紫色斑点(Purple spot)/子叶(平均)	紫色斑点(Purple spots)(合计)	编辑效率*
0		DD→16L/8D	28℃	35	23.9	839	0.32	11	1.31
1μM	1天	DD→16L/8D	28℃	35	28.7	1005	0.55	19	1.89
	2天	DD→16L/8D	28℃	35	26.9	942	0.93	32	3.39
	3天	DD→16L/8D	28℃	35	23.2	813	1.8	63	7.74
10μM	1天	DD→16L/8D	28℃	35	20.1	703	0.68	24	3.41
	2天	DD→16L/8D	28℃	35	18.8	658	1.75	61	9.27
	3天	DD→16L/8D	28℃	35	14.2	497	3.26	114	22.93

[0139] 光周期条件:进行10天的暗处理(DD)后,进行16小时的明处理/8小时的暗处理。

[0140] 表14

[0141] 不同非同源末端连接抑制剂处理期间的同源介导的双链DNA修复效率变化2(tomato cv.Hong-Kwang,21dpi)

[0142]

结构体(Construct)					pTC147(T-DNA)		pTC217		
SCR7处理浓度	SCR7处理期间	光周期条件	温度	总子叶数量	紫色斑点(Purple spot)/子叶(平均)	紫色斑点(Purple spots)(合计)	紫色斑点(Purple spot)/子叶(平均)	紫色斑点(Purple spots)(合计)	编辑效率*
0		DD→16L/8D	28℃	35	20.9	732	0.90	31	4.23
1μM	1天	DD→16L/8D	28℃	35	26.0	912	1.96	68	7.45
	2天	DD→16L/8D	28℃	35	17.9	627	1.29	45	7.17
	3天	DD→16L/8D	28℃	35	18.9	663	1.44	50	7.54

[0143]

10μM	1天	DD→16L/8D	28℃	35	22.9	802	2.60	91	11.34
	2天	DD→16L/8D	28℃	35	21.5	754	2.91	102	13.52
	3天	DD→16L/8D	28℃	35	18.8	660	2.85	100	15.15

[0144] 实施例3.豆黄矮病毒复制复制子释放的动力模式

[0145] 本发明人在农杆菌感染的番茄子叶(cotyledon)系统中发现了最大限度地释放原型豆黄矮病毒复制子的最佳时间点。病毒复制子从传递到植物细胞核的线性三螺旋DNA以原型形态进行释放,并通过滚环式复制向每个细胞扩增至数百至数千个。最大限度地释放复制子的动力信息可提供有关将小分子适用于组织培养系统的最佳时期信息。为了研究复制子释放的动力模式,通过包含豆黄矮病毒载体pLSL.GFP.R(Cermak et al.,2015)、pLSL.R.GGFP及非病毒载体pAGM4723的农杆菌对子叶进行转化。使用特异性引物并通过PCR

分析检测病毒原型，上述特异性引物可扩增从感染的子叶分离的基因组DNA中两个大基因间区域的接合部。据报道，在包含感染农杆菌的番茄子叶的pLSL.GFP.R中，豆黄矮病毒复制子可稳定2天到8周。但尚未报告复制病毒释放的最长时间。本发明人利用2至30天的样品，从各分析时间点上发现了稳定的BeLSV原型形态的pLSL.GFP.R及pLSL.R.GGFP。感染2天后，复制子原型在载体系统中处于非常低的水平，而5天后，在pLSL.R.GGFP载体系统中突然增加到最大。感染9天后，随着在pLSL.GFP.R载体系统中的最大值逐渐增加，复制子开始逐渐减少，但在感染后分析30天的样品中，复制子还稳定维持着。在非病毒载体样品中未发现复制子(图14至图16)。

[0001] <110> 庆尚大学校产学协力团
[0002] <120> 在植物体中基于同源重组提高基因编辑效率的方法
[0003] <130> PCT1863-CN
[0004] <160> 31
[0005] <170> KoPatentIn 3.0
[0006] <210> 1
[0007] <211> 110
[0008] <212> DNA
[0009] <213> 拟南芥
[0010] <400> 1
[0011] gtaaagcctc gatttttggg tttaggtgtc tgcttattag agtaaaaaca catcctttga 60
[0012] aattgtttgt ggtcatttga ttgtgctctt gatccattga attgctgcag 110
[0013] <210> 2
[0014] <211> 304
[0015] <212> DNA
[0016] <213> 拟南芥
[0017] <400> 2
[0018] gtaaatttct gtgttcctta ttctctcaaa atcttcgatt ttgttttcgt tcgatcccaa 60
[0019] tttcgtatat gttctttggt ttagattctg ttaatcttag atcgaagatg attttctggg 120
[0020] tttgatcgtt agatatcatc ttaattctcg attagggttt catagatatc atccgatttg 180
[0021] ttcaaataat ttgagttttg tcgaataatt actcttcgat ttgtgatttc tatctagatc 240
[0022] tggtgttagt ttctagtttg tgcgatcgaa tttgtcgatt aatctgagtt tttctgatta 300
[0023] acag 304
[0024] <210> 3
[0025] <211> 13
[0026] <212> DNA
[0027] <213> 人工序列
[0028] <220>
[0029] <223> 科扎克序列
[0030] <400> 3
[0031] agactcaatg atg 13
[0032] <210> 4
[0033] <211> 20
[0034] <212> DNA
[0035] <213> 人工序列
[0036] <220>
[0037] <223> gRNA
[0038] <400> 4
[0039] atcaagttaa cgtttatctt 20
[0040] <210> 5
[0041] <211> 20

[0042] <212> DNA
[0043] <213> 人工序列
[0044] <220>
[0045] <223> gRNA
[0046] <400> 5
[0047] attagagatt ataaatttaa 20
[0048] <210> 6
[0049] <211> 20
[0050] <212> DNA
[0051] <213> 人工序列
[0052] <220>
[0053] <223> gRNA
[0054] <400> 6
[0055] tttacaataa tatatagtaa 20
[0056] <210> 7
[0057] <211> 20
[0058] <212> DNA
[0059] <213> 人工序列
[0060] <220>
[0061] <223> gRNA
[0062] <400> 7
[0063] aagttgttag ctagagtttc 20
[0064] <210> 8
[0065] <211> 20
[0066] <212> DNA
[0067] <213> 人工序列
[0068] <220>
[0069] <223> gRNA
[0070] <400> 8
[0071] ttttaaaaga aaaaattaaa 20
[0072] <210> 9
[0073] <211> 20
[0074] <212> DNA
[0075] <213> 人工序列
[0076] <220>
[0077] <223> gRNA
[0078] <400> 9
[0079] atacatattt atgtttgtta 20
[0080] <210> 10
[0081] <211> 20
[0082] <212> DNA
[0083] <213> 人工序列

[0084] <220>

[0085] <223> gRNA

[0086] <400> 10

[0087] tgcccaacta acgctcaaaa 20

[0088] <210> 11

[0089] <211> 20

[0090] <212> DNA

[0091] <213> 人工序列

[0092] <220>

[0093] <223> gRNA

[0094] <400> 11

[0095] tgataataac aaaaatgacg 20

[0096] <210> 12

[0097] <211> 20

[0098] <212> DNA

[0099] <213> 人工序列

[0100] <220>

[0101] <223> gRNA

[0102] <400> 12

[0103] aaaaaaattt gtatgttgtt 20

[0104] <210> 13

[0105] <211> 20

[0106] <212> DNA

[0107] <213> 人工序列

[0108] <220>

[0109] <223> gRNA

[0110] <400> 13

[0111] tattatttta tgttattgtt 20

[0112] <210> 14

[0113] <211> 20

[0114] <212> DNA

[0115] <213> 人工序列

[0116] <220>

[0117] <223> gRNA

[0118] <400> 14

[0119] tagcatatga ccaaaataaa 20

[0120] <210> 15

[0121] <211> 20

[0122] <212> DNA

[0123] <213> 人工序列

[0124] <220>

[0125] <223> gRNA

[0126] <400> 15

[0127] taacaaaaca gaaaaagaag 20

[0128] <210> 16

[0129] <211> 20

[0130] <212> DNA

[0131] <213> 人工序列

[0132] <220>

[0133] <223> gRNA

[0134] <400> 16

[0135] atgtgaccca atactttaag 20

[0136] <210> 17

[0137] <211> 20

[0138] <212> DNA

[0139] <213> 人工序列

[0140] <220>

[0141] <223> gRNA

[0142] <400> 17

[0143] tataccctta aactatattc 20

[0144] <210> 18

[0145] <211> 20

[0146] <212> DNA

[0147] <213> 人工序列

[0148] <220>

[0149] <223> gRNA

[0150] <400> 18

[0151] ttctatgcat aaataattaa 20

[0152] <210> 19

[0153] <211> 20

[0154] <212> DNA

[0155] <213> 人工序列

[0156] <220>

[0157] <223> gRNA

[0158] <400> 19

[0159] gagagaaaga agcctcctca 20

[0160] <210> 20

[0161] <211> 20

[0162] <212> DNA

[0163] <213> 人工序列

[0164] <220>

[0165] <223> gRNA

[0166] <400> 20

[0167] agctctaaat gataaagttg 20

[0168] <210> 21
[0169] <211> 22
[0170] <212> DNA
[0171] <213> 人工序列
[0172] <220>
[0173] <223> 引物
[0174] <400> 21
[0175] ttgagatgag cacttgggat ag 22
[0176] <210> 22
[0177] <211> 22
[0178] <212> DNA
[0179] <213> 人工序列
[0180] <220>
[0181] <223> 引物
[0182] <400> 22
[0183] cgtaagcctc tctaaccatc tg 22
[0184] <210> 23
[0185] <211> 23
[0186] <212> DNA
[0187] <213> 人工序列
[0188] <220>
[0189] <223> 引物
[0190] <400> 23
[0191] gttctgtcag ttccaaacgt aaa 23
[0192] <210> 24
[0193] <211> 20
[0194] <212> DNA
[0195] <213> 人工序列
[0196] <220>
[0197] <223> 引物
[0198] <400> 24
[0199] atctcgcggt acatccaatc 20
[0200] <210> 25
[0201] <211> 21
[0202] <212> DNA
[0203] <213> 人工序列
[0204] <220>
[0205] <223> 引物
[0206] <400> 25
[0207] ttcgttccga tgctctatga c 21
[0208] <210> 26
[0209] <211> 21

[0210] <212> DNA

[0211] <213> 人工序列

[0212] <220>

[0213] <223> 引物

[0214] <400> 26

[0215] ccataaccta atttctctct c 21

[0216] <210> 27

[0217] <211> 20

[0218] <212> DNA

[0219] <213> 人工序列

[0220] <220>

[0221] <223> 引物

[0222] <400> 27

[0223] gtcatgagac cctcaacaat 20

[0224] <210> 28

[0225] <211> 3085

[0226] <212> DNA

[0227] <213> 人工序列

[0228] <220>

[0229] <223> 多复制子

[0230] <400> 28

[0231] ggtctcatgc cgttgttgtg actccgaggg gttgcctcaa actctatctt ataaccggcg 60

[0232] tggaggcatg gaggcagggg tattttggtc attttaatag atagtggaaa atgacgtgga 120

[0233] atttacttaa agacgaagtc tttgcgacaa gggggggccc acgccgaatt taatattacc 180

[0234] ggcgtggccc ccccttatcg cgagtgcttt agcacgagcg gtccagattt aaagtagaaa 240

[0235] atttcccgcc cactagggtt aaaggtgttc acactataaa agcatatacg atgtgatggt 300

[0236] atttgatgga gcgtatattg tatcaggtat ttccgttgga tacgaattat tcgtacgacc 360

[0237] ctcgctttgg gtacgtcacg tggctcgagc gcgtagtcct cggtaatatc gcagaacaaa 420

[0238] agtacctgat atcgagtgta cttcaagtca gtgggaaatc aataaaatga ttattttatg 480

[0239] aatatatttc attgtgcaag tagatagaaa ttacatatgt tacataacac acgaaataaa 540

[0240] caaaaaaaga caatccaaaa acaaacaccc caaaaaaaat aatcacttta gataaactcg 600

[0241] tatgaggaga ggcacgtgat cgctagtgcc tgagacgcca gtgccttagg caggtgcgag 660

[0242] tacgctcgac acctgcggta gggatccacg tctcagggac tttgggtatc acgtggctcg 720

[0243] agcgcgtagt cctcggtaat atcgcagaac aaaagtacct gatatcgagt gtacttcaag 780

[0244] tcagtgggaa atcaataaaa tgattatttt atgaatatat ttcattgtgc aagtagatag 840

[0245] aaattacata tgttacataa cacacgaaat aaacaaaaaa agacaatcca aaaacaaaca 900

[0246] ccccaaaaaa aataatcact ttagataaac tcgtatgagg agaggcacgt tgccgggtag 960

[0247] cagaaggcat gttgttgtga ctccgagggg ttgcctcaaa ctctatctta taaccggcgt 1020

[0248] ggaggcatgg aggcaggggt attttggtca ttttaataga tagtggaaaa tgacgtggaa 1080

[0249] tttacttaaa gacgaagtct ttgcgacaag gggggggccca cgccgaattt aatattaccg 1140

[0250] gcgtggcccc cccttatcgc gagtgcttta gcacgagcgg tccagattta aagtagaaaa 1200

[0251] tttcccgccc actagggtta aaggtgttca cactataaaa gcatatacga tgtgatggta 1260

[0252] tttgatggag cgtatattgt atcaggtatt tccgttggat acgaattatt cgtacgaccc 1320
[0253] tcggcgcgtg ccttgtcttc gtcgactagt ctagaagaca agggaagctt tgggtacgtc 1380
[0254] acgtggctcg agcgcgtagt cctcggtaat atcgcagaac aaaagtacct gatatcgagt 1440
[0255] gtacttcaag tcagtgggaa atcaataaaa tgattatttt atgaatatat ttcattgtgc 1500
[0256] aagtagatag aaattacata tgttacataa cacacgaaat aaacaaaaaa agacaatcca 1560
[0257] aaaacaaaca ccccaaaaaa aataatcact ttagataaac tcgtatgagg agaggcacgt 1620
[0258] tgcctcagtg actcgacgat tcccgagcaa aaaaagtctc cccgtcacac atgtagtggg 1680
[0259] tgacgcaatt atctttaaag taatccttct gttgacttgt cattgataac atccagtcct 1740
[0260] cgtcaggatt gcaaagaatt atagaaggga tcccaccttt tattttcttc ttttttccat 1800
[0261] atttagggtt gacagtgaaa tcagactggc aacctattaa ttgcttccac aatgggacga 1860
[0262] acttgaaggg gatgtcgtcg atgatattat aggtggcgtg ttcatcgtag ttggtgaaat 1920
[0263] cgatggtacc gttccaatag ttgtgtcgtc cgagacttct agcccaggtg gtctttccgg 1980
[0264] tacgagttgg tccgcagatg tagaggctgg ggtgtcggat tccattcctt ccattgtcct 2040
[0265] tgttaaatcg gccatccatt caaggtcaga ttgagcttgt tggtatgaga caggatgtat 2100
[0266] gtaagtataa gcgtctatgc ttacatggta tagatgggtt tccctccagg agtgtagatc 2160
[0267] ttcgtggcag cgaagatctg attctgtgaa gggcgacaca tacggttcag gttgtggagg 2220
[0268] gaataatttg ttggctgaat attccagcca ttgaagcttt gttgcccatt catgagggaa 2280
[0269] ttcttccttg atcatgtcaa gatattcctc cttagacgtt gcagtctgga taatagttct 2340
[0270] ccatcgtgcg tcagatttgc gaggagaaac cttatgatct cggaaatctc ctctggtttt 2400
[0271] aatatctccg tcctttgata tgtaatcaag gacttgttta gagtttctag ctggctggat 2460
[0272] attagggtga tttccttcaa aatcgaaaaa agaaggatcc ctaatacaag gttttttatc 2520
[0273] aagctggaga agagcatgat agtgggtagt gccatcttga tgaagctcag aagcaacacc 2580
[0274] aaggaagaaa ataagaaaag gtgtgagttt ctcccagaga aactggaata aatcatctct 2640
[0275] ttgagatgag cacttgggat aggtaaggaa aacatattta gattggagtc tgaagttctt 2700
[0276] actagcagaa ggcattttgg gagttgttgt gactccgagg ggttgcctca aactctatct 2760
[0277] tataaccggc gtggaggcat ggaggcaggg gtattttggt cattttaata gatagtggaa 2820
[0278] aatgacgtgg aatttactta aagacgaagt ctttgcgaca agggggggcc cacgccgaat 2880
[0279] ttaatattac cggcgtggcc ccccccttatc gcgagtgctt tagcacgagc ggtccagatt 2940
[0280] taaagtagaa aatttcccgc ccactagggt taaaggtgtt cacactataa aagcatatac 3000
[0281] gatgtgatgg tatttgatgg agcgtatatt gtatcaggta tttccgttgg atacgaatta 3060
[0282] ttcgtacgac cctcgggatg agacc 3085
[0283] <210> 29
[0284] <211> 4196
[0285] <212> DNA
[0286] <213> 人工序列
[0287] <220>
[0288] <223> HDR模板
[0289] <400> 29
[0290] ggaggagttt ggtccccaag tacttaaatt ggtccccaag tacttaccac aacacttgtc 60
[0291] ggtgagatta tttaatgctg attagattag acaaaaatta attagttttg agtagtggcg 120
[0292] taagtgtaaa taattagtct ctttttttaac ttagaaaata gtttaatcct tagtataaat 180
[0293] agtcaaaatc actggaatga aaaacagttt ttaatttttc caaatttgat tctgatacca 240

[0294] tgttaaattc gtggttcaaa atcactgcaa tgaaaagagc aatattgttt aacttttttt 300
[0295] aggaaaatcg aattgattta tagtcagttg atatagagtg aatacataag gaacatatac 360
[0296] agttgataca attgtataat tcgttcatac acttaataca aagtgaaccc acaaggaaca 420
[0297] tatacactta atataattgt attccttgat acaaaccaat tttgttcgtg tctctactct 480
[0298] ctatttcaat ttcgcttgac tctttacttt ttctaatatg tagctataaa tcgtaattaa 540
[0299] acaatactat atctctaaat ctcttattaa gctcaaacta tggtcatatt cgaaaaaatc 600
[0300] cttttaaata ttggtcccct ctcacgatta atgatagtta taactaacat tcaaatttta 660
[0301] gttgtacttg acatctaaaa cttaaaaaat agtacaagtt aacttttttct ttttttttaaa 720
[0302] aaaaggaaat acttgtattt atttttttaa tatatagtta tatttttggt tatttgaaaa 780
[0303] tacttgatct gtcatgtatg ctcagttaaa tatcgtcaca ttatagagaa aaaagtaata 840
[0304] ggagaaaaaa attaaaaatt atttcgaaaa atcaaaattt ttttttgatt gaaatgaaag 900
[0305] atgggtttcc caatcgaggc tggcaggata ggtacattgg gaaatttgga tttgtgtgtt 960
[0306] gaaaatgatt gttcaatttg gcttttataa catttgtcgt ttataaggtg tagaaggctc 1020
[0307] tctacaagtt ggtagttaca atttaataca cctgaattcg gatccggagc ggagaattaa 1080
[0308] gggagtcacg ttatgacccc cgccgatgac gcgggacaag ccgttttacg tttggaactg 1140
[0309] acagaaccgc aacgttgaag gagccactga gccgcgggtt tctggagttt aatgagctaa 1200
[0310] gcacatacgt cagaaaccat tattgcgcgt tcaaaagtcg cctaaggtca ctatcagcta 1260
[0311] gcaaatattt cttgtcaaaa atgctccact gacgttccat aaattcccct cggtatccaa 1320
[0312] ttagagtctc atattcactc tcctattttt acaacaatta ccaacaacaa caaacaacaa 1380
[0313] acaacattac aattacattt acaattacca tggttgaaca agatggattg cacgcaggtt 1440
[0314] ctccggccgc ttgggtggag aggctattcg gctatgactg ggcacaacag acaatcggct 1500
[0315] gctctgatgc cgccgtgttc cggctgtcag cgcaggggcg cccggttctt tttgtcaaga 1560
[0316] ccgacctgtc cggtgccctg aatgaactgc aggacgaggc agcgcggcta tcgtggctgg 1620
[0317] ccacgacggg cgttccttgc gcagctgtgc tcgacgttgt cactgaagcg ggaagggact 1680
[0318] ggctgctatt gggcgaagtg ccggggcagg atctcctgtc atctcacctt gctcctgccg 1740
[0319] agaaagtatc catcatggct gatgcaatgc ggcggctgca tacgcttgat ccggctacct 1800
[0320] gcccattcga ccaccaagcg aaacatcgca tcgagcgagc acgtactcgg atggaagccg 1860
[0321] gtcttgtcga tcaggatgat ctggacgaag agcatcaggg gctcgcgcca gccgaactgt 1920
[0322] tcgccaggct caaggcgcgc atgcccgacg gcgaggatct cgtcgtgact catggcgatg 1980
[0323] cctgcttgcc gaatatcatg gtggaaaatg gccgcttttc tggattcatc gactgtggcc 2040
[0324] ggctgggtgt ggcggaccgc tatcaggaca tagcgttggc tacccgtgat attgctgaag 2100
[0325] agcttggcgg cgaatgggct gaccgcttcc tcgtgcttta cggtatcgcc gctcccgatt 2160
[0326] cgcagcgcat cgccttctat cgccttcttg acgagttctt ctgagcggga ctctggggtt 2220
[0327] cgctagagtc ctgctttaat gagatatgcg agacgcctat gatcgcatga tatttgcttt 2280
[0328] caattctgtt gtgcacgttg taaaaaacct gagcatgtgt agctcagatc cttaccgccg 2340
[0329] gtttcggttc attctaatga atatatcacc cgttactatc gtatttttat gaataatatt 2400
[0330] ctccgttcaa tttactgatt gtaccctact acttatatgt acaatattaa aatgaaaaca 2460
[0331] atatattgtg ctgaataggt ttatagcgac atctatgata gagcgccaca ataacaaaca 2520
[0332] attgcgtttt attattacaa atccaatttt aaaaaaagcg gcagaaccgg tcaaacctaa 2580
[0333] aagactgatt acataaatct tattcaaatt tcaaaagtgc cccaggggct agtatctacg 2640
[0334] acacaccgag cggcgaacta ataacgctca ctgaagggaa ctccggttcc ccgccggcgc 2700
[0335] gcatgggtga gattccttga agttgagtat tggccgtccg ctctaccgaa agttacgggc 2760

[0336] accattcaac ccggtccagc acggcggccg ggtaaccgac ttgctgcccc gagaattatg 2820

[0337] cagcattttt ttggtgtatg tgggccccaa atgaagtgca ggtcaaacct tgacagtgac 2880

[0338] gacaaatcgt tgggcgggtc cagggcgaat tttgcgacaa catgtcgagg ctcagccgct 2940

[0339] gtcagtcaac atggtggagc acgacactct ggtctactcc aaaaatgtca aagatacagt 3000

[0340] ctcagaagat caaagggcta ttgagacttt tcaacaaagg ataatttcgg gaaacctcct 3060

[0341] cggattccat tgcccagcta tctgtcactt catcgaaagg acagtagaaa aggaaggtgg 3120

[0342] ctcctacaaa tgccatcatt gcgataaagg aaaggctatc attcaagatc tctctgccga 3180

[0343] cagtggtccc aaagatggac ccccacccac gaggagcatc gtggaaaaag aagaggttcc 3240

[0344] aaccacgtct acaaagcaag tggattgatg tgacatctcc actgacgtaa gggatgacgc 3300

[0345] acaatcacac tatccttcgc aagacccttc ctctatataa ggaagttcat ttcatttgga 3360

[0346] gaggacacgc tcgagtataa gagctcattt ttacaacaat taccaacaac aacaaacaac 3420

[0347] aaacaacatt acaattacat ttacaattat cgatacaatg aagtatatat agacaataaa 3480

[0348] aaagtagtat aatatattat caaattatta tgaacagtac atctatgtcc tcattgggag 3540

[0349] tgagaaaagg ttcatggact gatgaagaag attttcttct aagaaaatgt attgataagt 3600

[0350] atggtgaagg aaaatggcat cttgttccca taagagctgg taactattaa attaactatc 3660

[0351] acgttatttt tatttgtctt tctgtctcat tttatttgac gttattacga atatcatctg 3720

[0352] aaaatgtacg tgcaggtctg aatagatgtc ggaaaagttg tagattgagg tggctgaatt 3780

[0353] atctaaggcc acatatcaag agaggtgact ttgaacaaga tgaagtggat ctcattttga 3840

[0354] ggcttcataa gctcttaggc aacaggcatg caagtttatg ttttgacaaa atttgattag 3900

[0355] tatatattat atatacgtgt gactatttca tctaaatgtt acgttatttt acgtagatgg 3960

[0356] tcacttattg ctggtagact tcccggaagg acagctaacg atgtgaaaaa ctattggaac 4020

[0357] actaatcttc taaggaagtt aaatactact aaaattgttc ctcgcgaaaa gattaacaat 4080

[0358] aagtgtggag aaattagtac taagattgaa attataaaac ctcaacgacg caagtatttc 4140

[0359] tcaagcacaa tgaagaatgt tacaaacaat aatgtaattt tggacgagga ggaaca 4196

[0360] <210> 30

[0361] <211> 4302

[0362] <212> DNA

[0363] <213> 人工序列

[0364] <220>

[0365] <223> 优化人密码子的SpCas9

[0366] <400> 30

[0367] atgcccaaga agaagcgcaa ggtgggacgc gtctgcagga tatcaagctt gcggtaccgc 60

[0368] gggcccggga tcgccaccat ggataaaaag tattctattg gtttagacat cggcactaat 120

[0369] tccgttggat gggctgtcat aaccgatgaa tacaaagtac cttcaaagaa atttaaggtg 180

[0370] ttggggaaca cagaccgtca ttcgattaaa aagaatctta tcggtgccct cctattcgat 240

[0371] agtggcgaaa cggcagaggc gactcgcctg aaacgaaccg ctcggagaag gtatacacgt 300

[0372] cgcaagaacc gaatatgtta cttacaagaa atttttagca atgagatggc caaagttgac 360

[0373] gattctttct ttcaccgttt ggaagagtcc ttccttgtcg aagaggacaa gaaacatgaa 420

[0374] cggcacccca tctttggaaa catagtagat gaggtggcat atcatgaaaa gtacccaacg 480

[0375] atttatcacc tcagaaaaaa gctagttgac tcaactgata aagcggacct gaggttaatc 540

[0376] tacttggctc ttgcccatat gataaagttc cgtgggcact ttctcattga gggtgatcta 600

[0377] aatccggaca actcggatgt cgacaaactg ttcatccagt tagtacaaac ctataatcag 660

[0378] ttgtttgaag agaaccctat aaatgcaagt ggcgtggatg cgaaggctat tcttagcgcc 720

[0379] cgcctctcta aatcccgacg gctagaaaac ctgatcgcac aattacccgg agagaagaaa 780

[0380] aatgggttgt tcggtaacct tatagcgctc tcactaggcc tgacaccaaa ttttaagtcg 840

[0381] aacttcgact tagctgaaga tgccaaattg cagcttagta aggacacgta cgatgacgat 900

[0382] ctcgacaatc tactggcaca aattggagat cagtatgcgg acttatttt ggctgccaaa 960

[0383] aaccttagcg atgcaatcct cctatctgac atactgagag ttaatactga gattaccaag 1020

[0384] gcgccgttat ccgcttcaat gatcaaaagg tacgatgaac atcaccaaga cttgacactt 1080

[0385] ctcaaggccc tagtccgtca gcaactgcct gagaaatata aggaaatatt ctttgatcag 1140

[0386] tcgaaaaacg ggtacgcagg ttatattgac ggcggagcga gtcaagagga attctacaag 1200

[0387] tttatcaaac ccatattaga gaagatggat gggacggaag agttgcttgt aaaactcaat 1260

[0388] cgcgaagatc tactgcgaaa gcagcggact ttcgacaacg gtagcattcc acatcaaatc 1320

[0389] cacttaggcg aattgcatgc tatacttaga aggcaggagg atttttatcc gttcctcaaa 1380

[0390] gacaatcgtg aaaagattga gaaaatccta acctttcgca taccttacta tgtgggaccc 1440

[0391] ctggcccgag ggaactctcg gttcgcatgg atgacaagaa agtccgaaga aacgattact 1500

[0392] ccatggaatt ttgaggaagt tgtcgataaa ggtgcgtcag ctcaatcgtt catcgagagg 1560

[0393] atgaccaact ttgacaagaa tttaccgaac gaaaaagtat tgcctaagca cagtttactt 1620

[0394] tacgagtatt tcacagtgta caatgaactc acgaaagtta agtatgtcac tgagggcatg 1680

[0395] cgtaaacccg cctttctaag cggagaacag aagaaagcaa tagtagatct gttattcaag 1740

[0396] accaaccgca aagtgacagt taagcaattg aaagaggact actttaagaa aattgaatgc 1800

[0397] ttcgattctg tcgagatctc cggggtagaa gatcgattta atgcgtcact tggtacgtat 1860

[0398] catgacctcc taaagataat taaagataag gacttcctgg ataacgaaga gaatgaagat 1920

[0399] atcttagaag atatagtgtt gactcttacc ctctttgaag atcgggaaat gattgaggaa 1980

[0400] agactaaaaa catacgctca cctgttcgac gataaggtta tgaaacagtt aaagaggcgt 2040

[0401] cgctatacgg gctggggacg attgtcgcgg aaacttatca acgggataag agacaagcaa 2100

[0402] agtggtaaaa ctattctcga ttttctaaag agcgacggct tcgccaatag gaactttatg 2160

[0403] cagctgatcc atgatgactc tttaaccttc aaagaggata tacaaaaggc acaggtttcc 2220

[0404] ggacaagggg actcattgca cgaacatatt gcgaatcttg ctggttcgcc agccatcaaa 2280

[0405] aagggcatac tccagacagt caaagtagtg gatgagctag ttaaggtcat gggacgtcac 2340

[0406] aaaccggaaa acattgtaat cgagatggca cgcgaaaatc aaacgactca gaaggggcaa 2400

[0407] aaaaacagtc gagagcggat gaagagaata gaagagggta ttaaagaact gggcagccag 2460

[0408] atcttaaagg agcatcctgt ggaaaatacc caattgcaga acgagaaact ttacctctat 2520

[0409] tacctacaaa atggaaggga catgtatgtt gatcaggaac tggacataaa ccgtttatct 2580

[0410] gattacgacg tcgatcacat tgtaccccaa tccttttga aggacgattc aatcgacaat 2640

[0411] aaagtgctta cacgctcgga taagaaccga gggaaaagtg acaatgttcc aagcgaggaa 2700

[0412] gtcgtaaaga aaatgaagaa ctattggcgg cagctcctaa atgcgaaact gataacgcaa 2760

[0413] agaaagttcg ataacttaac taaagctgag aggggtggct tgtctgaact tgacaaggcc 2820

[0414] ggatttatta aacgtcagct cgtggaaacc cgccaaatca caaagcatgt tgcacagata 2880

[0415] ctagattccc gaatgaatac gaaatacgac gagaacgata agctgattcg ggaagtcaaa 2940

[0416] gtaatcactt taaagtcaaa attggtgtcg gacttcagaa aggattttca attctataaa 3000

[0417] gttagggaga taaataacta ccaccatgcg cacgacgctt atcttaatgc cgtcgtaggg 3060

[0418] accgcactca ttaagaaata cccgaagcta gaaagtgagt ttgtgtatgg tgattacaaa 3120

[0419] gtttatgacg tccgtaagat gatcgcgaaa agcgaacagg agataggcaa ggctacagcc 3180

[0420] aaatacttct tttattctaa cattatgaat ttctttaaga cggaaatcac tctggcaaac 3240

[0421] ggagagatac gcaaacgacc tttaattgaa accaatgggg agacaggtga aatcgtatgg 3300

[0422] gataagggcc gggacttcgc gacggtgaga aaagttttgt ccatgcccca agtcaacata 3360

[0423] gtaaagaaaa ctgaggtgca gaccggaggg ttttcaaagg aatcgattct tccaaaaagg 3420

[0424] aatagtgata agctcatcgc tcgtaaaaag gactgggacc cgaaaaagta cggtggcttc 3480

[0425] gatagcccta cagttgccta ttctgtccta gtagtggcaa aagttgagaa gggaaaatcc 3540

[0426] aagaaactga agtcagtcaa agaattattg gggataacga ttatggagcg ctcgtctttt 3600

[0427] gaaaagaacc ccatcgactt ccttgaggcg aaaggttaca aggaagtaaa aaaggatctc 3660

[0428] ataattaaac taccaaagta tagtctgttt gagttagaaa atggccgaaa acggatgttg 3720

[0429] gctagcgccg gagagcttca aaaggggaac gaactcgcac taccgtctaa atacgtgaat 3780

[0430] ttcctgtatt tagcgtccca ttacgagaag ttgaaaggtt cacctgaaga taacgaacag 3840

[0431] aagcaacttt ttgttgagca gcacaaacat tatctcgacg aaatcataga gcaaatttcg 3900

[0432] gaattcagta agagagtcat cctagctgat gccaatctgg acaaagtatt aagcgcatac 3960

[0433] aacaagcaca gggataaacc catacgtgag caggcggaaa atattatcca tttgtttact 4020

[0434] cttaccaacc tcggcgctcc agccgcattc aagtattttg acacaacgat agatcgcaaa 4080

[0435] cgatacactt ctaccaagga ggtgctagac gcgacactga ttcaccaatc catcacggga 4140

[0436] ttatatgaaa ctcggataga tttgtcacag cttgggggtg acgcctatcc ctatgacgtg 4200

[0437] cccgattatg ccagcctggg cagcggctcc cccaagaaaa aacgcaaggt ggaagatcct 4260

[0438] aagaaaaagc ggaaagtgga cggcattggt agtgggagct aa 4302

[0439] <210> 31

[0440] <211> 3882

[0441] <212> DNA

[0442] <213> 人工序列

[0443] <220>

[0444] <223> 优化人密码子的LbCpf1

[0445] <400> 31

[0446] atgcccaaga agaagcgcaa ggtgggacgc gtctgcagga tatcaagctt gcggtaccgc 60

[0447] gggcccggga tcgccaccat gagcaagctg gagaagttta caaactgcta ctccctgtct 120

[0448] aagaccctga ggttcaaggc catccctgtg ggcaagaccc aggagaacat cgacaataag 180

[0449] cggctgctgg tggaggacga gaagagagcc gaggattata agggcgtgaa gaagctgctg 240

[0450] gatcgctact atctgtcttt tatcaacgac gtgctgcaca gcatcaagct gaagaatctg 300

[0451] aacaattaca tcagcctgtt ccggaagaaa accagaaccg agaaggagaa taaggagctg 360

[0452] gagaacctgg agatcaatct gcggaaggag atcgccaagg ccttcaaggg caacgagggc 420

[0453] tacaagtccc tgtttaagaa ggatatcatc gagacaatcc tgccagagtt cctggacgat 480

[0454] aaggacgaga tcgccctggt gaacagcttc aatggcttta ccacagcctt caccggcttc 540

[0455] tttgataaca gagagaatat gttttccgag gaggccaaga gcacatccat cgccttcagg 600

[0456] tgtatcaacg agaatctgac ccgctacatc tctaatatgg acatcttcga gaaggtggac 660

[0457] gccatctttg ataagcacga ggtgcaggag atcaaggaga agatcctgaa cagcgactat 720

[0458] gatgtggagg atttctttga gggcgagttc tttaactttg tgctgacaca ggagggcatc 780

[0459] gacgtgtata acgccatcat cggcggcttc gtgaccgaga gcggcgagaa gatcaagggc 840

[0460] ctgaacgagt acatcaacct gtataatcag aaaaccaagc agaagctgcc taagtttaag 900

[0461] ccactgtata agcaggtgct gagcgatcgg gagtctctga gcttctacgg cgagggctat 960

[0462] acatccgatg aggaggtgct ggaggtgttt agaaacaccc tgaacaagaa cagcgagatc 1020

[0463] ttcagctcca tcaagaagct ggagaagctg ttcaagaatt ttgacgagta ctctagcgcc 1080

[0464] ggcatctttg tgaagaacgg ccccgccatc agcacaatct ccaaggatat cttcggcgag 1140

[0465] tggaacgtga tccgggacaa gtggaatgcc gagtatgacg atatccacct gaagaagaag 1200

[0466] gccgtggtga ccgagaagta cgaggacgat cggagaaagt ccttcaagaa gatcggctcc 1260

[0467] ttttctctgg agcagctgca ggagtacgcc gacgccgatc tgtctgtggt ggagaagctg 1320

[0468] aaggagatca tcatccagaa ggtggatgag atctacaagg tgtatggctc ctctgagaag 1380

[0469] ctgttcgacg ccgattttgt gctggagaag agcctgaaga agaacgacgc cgtggtggcc 1440

[0470] atcatgaagg acctgctgga ttctgtgaag agcttcgaga attacatcaa ggccttcttt 1500

[0471] ggcgagggca aggagacaaa cagggacgag tccttctatg gcgattttgt gctggcctac 1560

[0472] gacatcctgc tgaaggtgga ccacatctac gatgccatcc gcaattatgt gacccagaag 1620

[0473] ccctactcta aggataagtt caagctgtat tttcagaacc ctcagttcat gggcggctgg 1680

[0474] gacaaggata aggagacaga ctatcgggcc accatcctga gatacggctc caagtactat 1740

[0475] ctggccatca tggataagaa gtacgccaag tgcctgcaga agatcgacaa ggacgatgtg 1800

[0476] aacggcaatt acgagaagat caactataag ctgctgcccg gccctaataa gatgctgcca 1860

[0477] aaggtgttct tttctaagaa gtggatggcc tactataacc ccagcgagga catccagaag 1920

[0478] atctacaaga atggcacatt caagaagggc gatatgttta acctgaatga ctgtcacaag 1980

[0479] ctgatcgact tctttaagga tagcatctcc cggtatccaa agtggtccaa tgcctacgat 2040

[0480] ttcaactttt ctgagacaga gaagtataag gacatcgccg gcttttacag agaggtggag 2100

[0481] gagcagggct ataaggtgag cttcgagtct gccagcaaga aggaggtgga taagctggtg 2160

[0482] gaggagggca agctgtatat gttccagatc tataacaagg acttttccga taagtctcac 2220

[0483] ggcacaccca atctgcacac catgtacttc aagctgctgt ttgacgagaa caatcacgga 2280

[0484] cagatcaggc tgagcggagg agcagagctg ttcatgaggc gcgcctccct gaagaaggag 2340

[0485] gagctggtgg tgcacccagc caactcccct atcgccaaca agaatccaga taatcccaag 2400

[0486] aaaaccacaa ccctgtccta cgacgtgtat aaggataaga ggttttctga ggaccagtac 2460

[0487] gagctgcaca tcccaatcgc catcaataag tgccccaaga acatcttcaa gatcaataca 2520

[0488] gaggtgcgcg tgctgctgaa gcacgacgat aacccctatg tgatcggcat cgataggggc 2580

[0489] gagcgcaatc tgctgtatat cgtggtggtg gacggcaagg gcaacatcgt ggagcagtat 2640

[0490] tccctgaacg agatcatcaa caacttcaac ggcatcagga tcaagacaga ttaccactct 2700

[0491] ctgctggaca agaaggagaa ggagaggttc gaggcccgcc agaactggac ctccatcgag 2760

[0492] aatatcaagg agctgaaggc cggctatatc tctcaggtgg tgcacaagat ctgcgagctg 2820

[0493] gtggagaagt acgatgccgt gatcgccctg gaggacctga actctggctt taagaatagc 2880

[0494] cgcgtgaagg tggagaagca ggtgtatcag aagttcgaga agatgctgat cgataagctg 2940

[0495] aactacatgg tggacaagaa gtctaatcct tgtgcaacag gcggcgccct gaagggctat 3000

[0496] cagatcacca ataagttcga gagctttaag tccatgtcta cccagaacgg cttcatcttt 3060

[0497] tacatccctg cctggctgac atccaagatc gatccatcta ccggctttgt gaacctgctg 3120

[0498] aaaaccaagt ataccagcat cgccgattcc aagaagttca tcagctcctt tgacaggatc 3180

[0499] atgtacgtgc ccgaggagga tctgttcgag tttgccctgg actataagaa cttctctcgc 3240

[0500] acagacgccg attacatcaa gaagtggaag ctgtactcct acggcaaccg gatcagaatc 3300

[0501] ttccggaatc ctaagaagaa caacgtgttc gactgggagg aggtgtgcct gaccagcgcc 3360

[0502] tataaggagc tgttcaacaa gtacggcatc aattatcagc agggcgatat cagagccctg 3420

[0503] ctgtgcgagc agtccgacaa ggccttctac tctagcttta tggccctgat gagcctgatg 3480

[0504] ctgcagatgc ggaacagcat cacaggccgc accgacgtgg attttctgat cagccctgtg 3540

[0505] aagaactccg acggcatctt ctacgatagc cggaactatg aggcccagga gaatgccatc 3600

[0506] ctgccaaaga acgccgacgc caatggcgcc tataacatcg ccagaaaggt gctgtgggcc 3660

[0507] atcggccagt tcaagaaggc cgaggacgag aagctggata aggtgaagat cgccatctct 3720

[0508] aacaaggagt ggctggagta cgcccagacc agcgtgaagc acgcctatcc ctatgacgtg 3780

[0509] cccgattatg ccagcctggg cagcggctcc cccaagaaaa aacgcaaggt ggaagatcct 3840

[0510] aagaaaaagc ggaaagtgga cggcattggt agtgggagct aa 3882

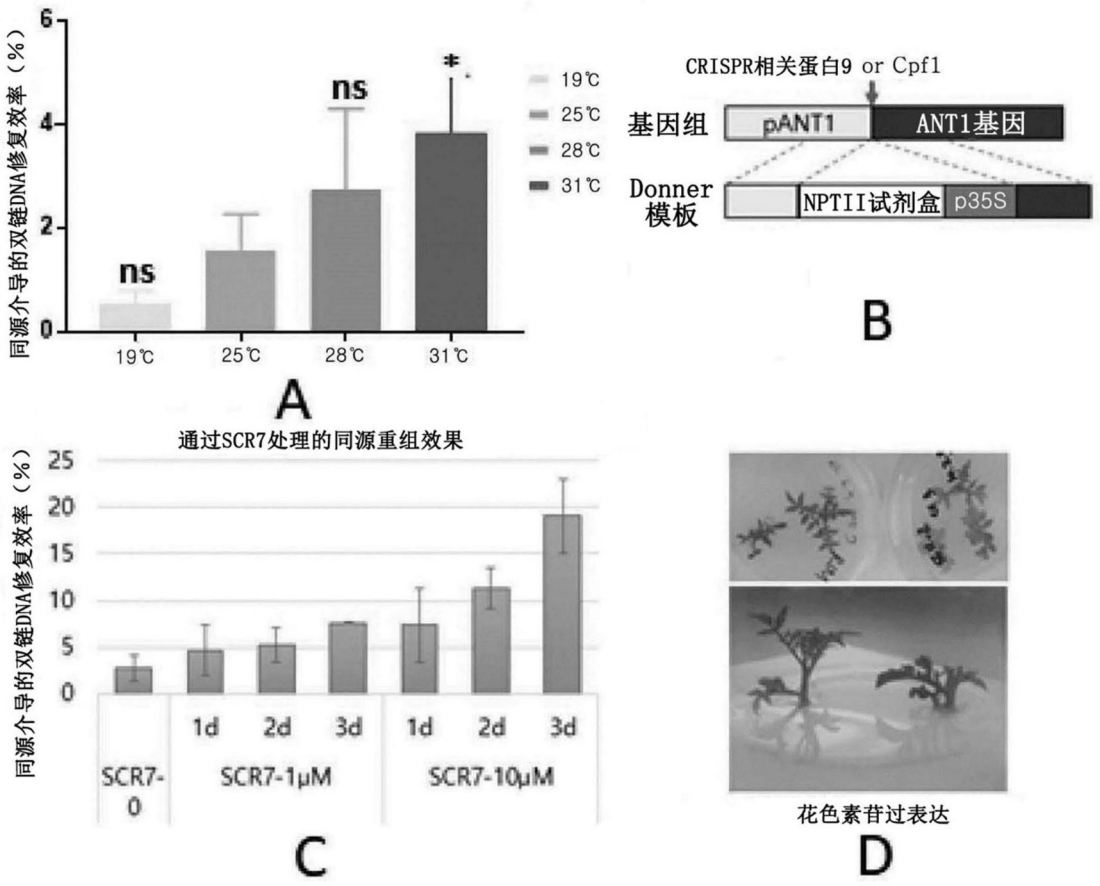

同源介导的双链DNA修复效率（%）
6
4
2
0
ns
ns
*
19℃
25℃
28℃
31℃
A
19℃
25℃
28℃
31℃
CRISPR相关蛋白9 or Cpf1
基因组
pANT1
ANT1基因
Donner
模板
NPTII试剂盒
p35S
B
通过SCR7处理的同源重组效果
同源介导的双链DNA修复效率（%）
25
20
15
10
5
0
1d
2d
3d
1d
2d
3d
SCR7-0
SCR7-1μM
SCR7-10μM
C
花色素苷过表达
D

图1

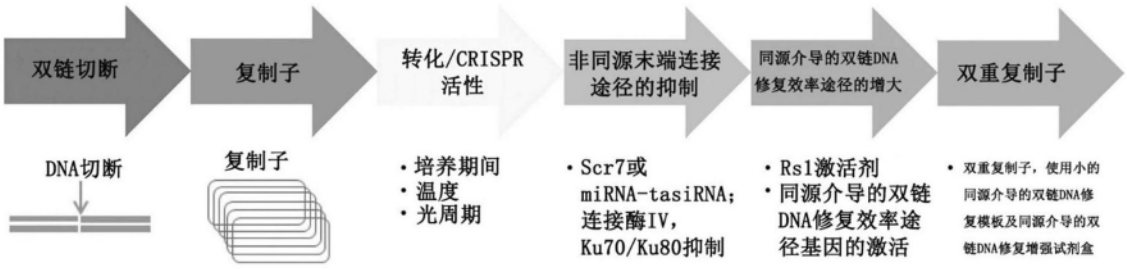
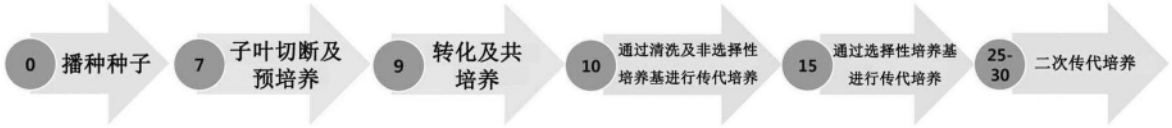

双链切断
复制子
转化/CRISPR活性
非同源末端连接途径的抑制
同源介导的双链DNA修复效率途径的增大
双重复制子
DNA切断
复制子
• 培养期间
• 温度
• 光周期
• Scr7或miRNA-tasiRNA；连接酶IV，Ku70/Ku80抑制
• Rs1激活剂
• 同源介导的双链DNA修复效率途径基因的激活
• 双重复制子，使用小的同源介导的双链DNA修复模板及同源介导的双链DNA修复增强试剂盒

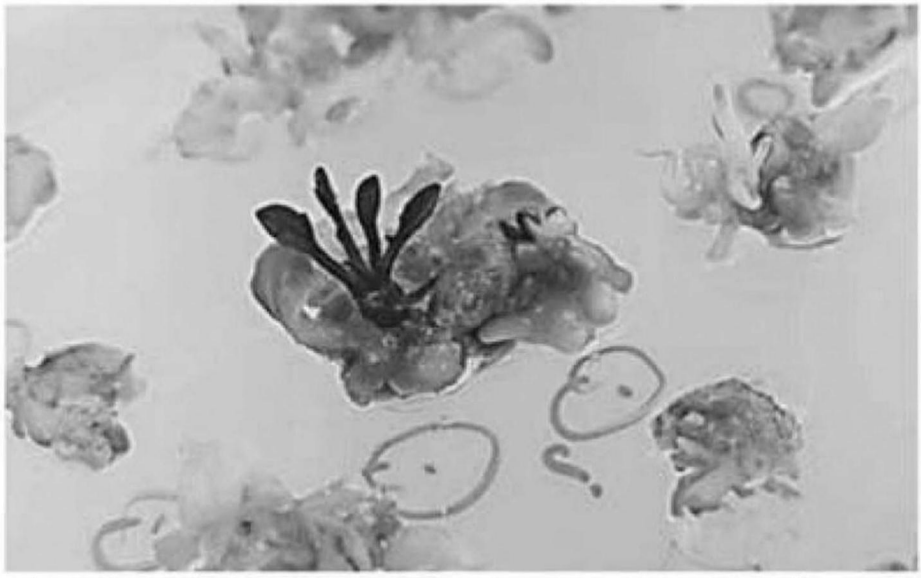
图2



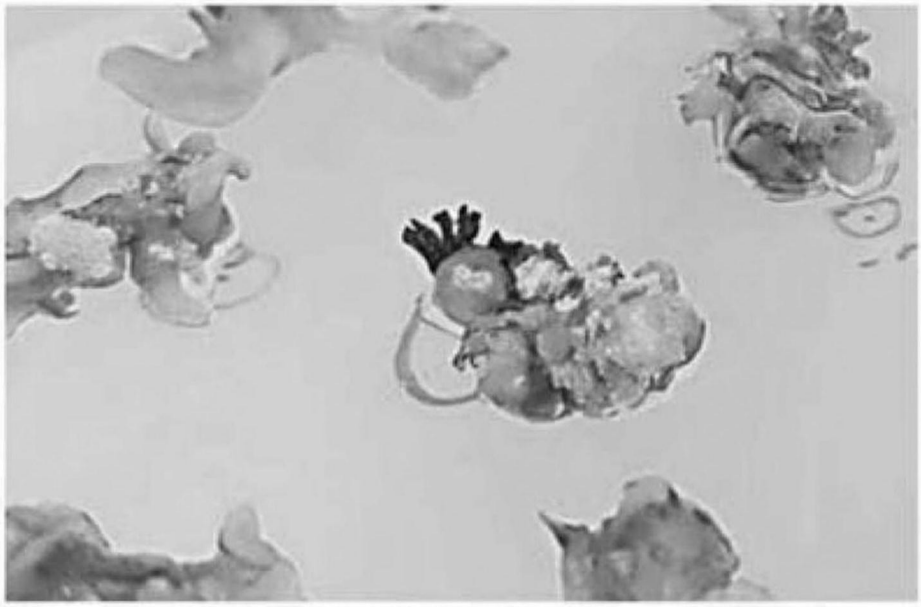
外植体（explant）处理：

- 种子发芽：25℃，暗条件3～4天及明条件3～4天
- 预培养：25℃，暗条件1天
- 共培养：25℃，暗条件2天
- 清洗：使用500mg/L替门汀或头孢噻肟进行两次，用无菌沃特曼滤纸进行干燥
- 清洗后：25～31℃的明/暗条件下培养
- 非选择性培养基中的培养：5天
- 依次传代培养：以10～12天的间隔进行

图3



转化后再生的同源介导的双链DNA修复编辑的番茄根，
HR ex 6-light



转化后再生的同源介导的双链DNA修复编辑的番茄根，
HR ex 6-Dark

图4

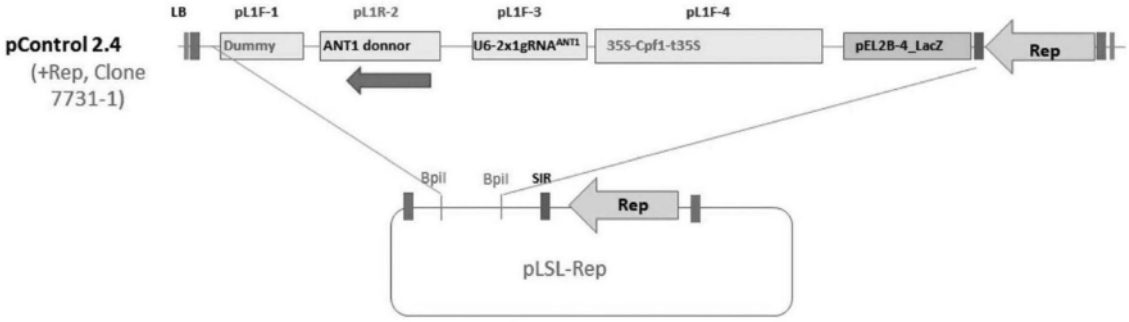

pControl 2.4
(+Rep, Clone 7731-1)
LB
pL1F-1
pL1R-2
pL1F-3
pL1F-4
Dummy
ANT1 donnor
U6-2x1gRNA^ANT1
35S-Cpf1-t35S
pEL2B-4_LacZ
Rep
BpiI
BpiI
SIR
Rep
pLSL-Rep

图5

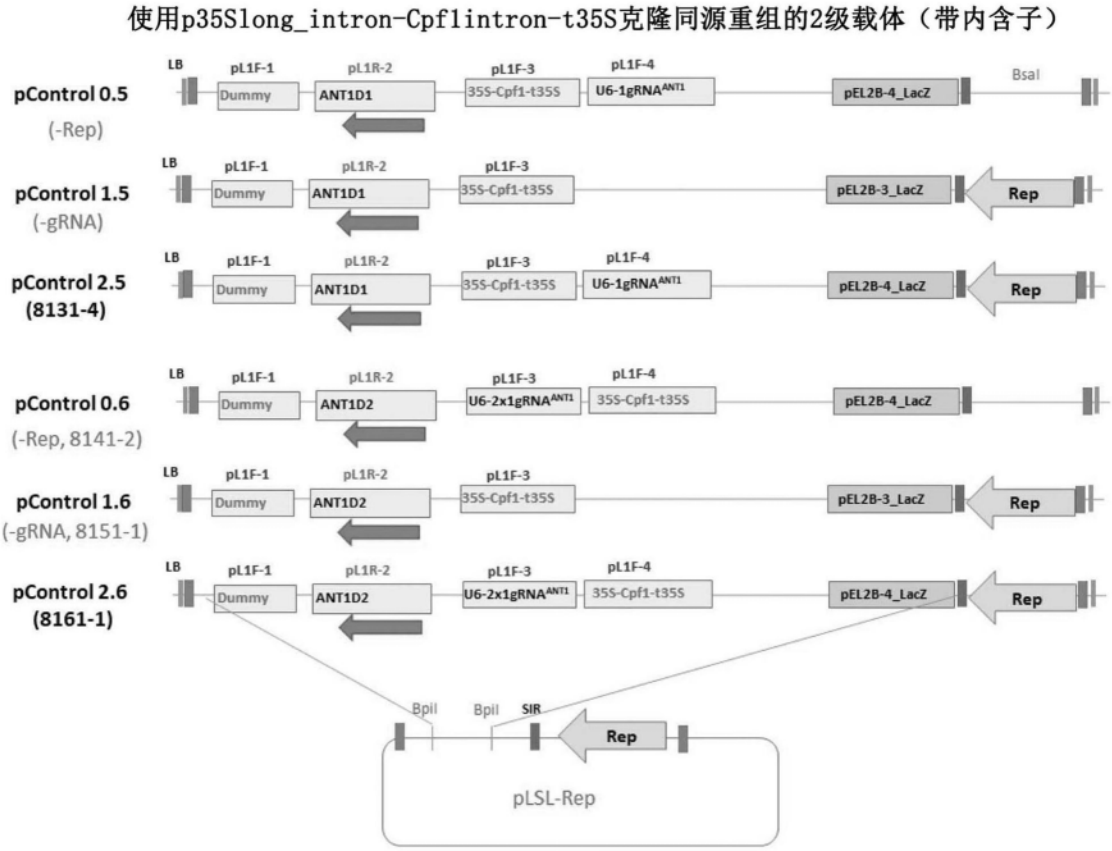

使用p35Slong_intron-Cpf1intron-t35S克隆同源重组的2级载体（带内含子）
pControl 0.5
(-Rep)
pControl 1.5
(-gRNA)
pControl 2.5
(8131-4)
pControl 0.6
(-Rep, 8141-2)
pControl 1.6
(-gRNA, 8151-1)
pControl 2.6
(8161-1)
LB
pL1F-1
pL1R-2
pL1F-3
pL1F-4
Dummy
ANT1D1
ANT1D2
35S-Cpf1-t35S
U6-1gRNA^ANT1
U6-2x1gRNA^ANT1
pEL2B-4_LacZ
pEL2B-3_LacZ
BsaI
Rep
BpiI
BpiI
SIR
pLSL-Rep

图6

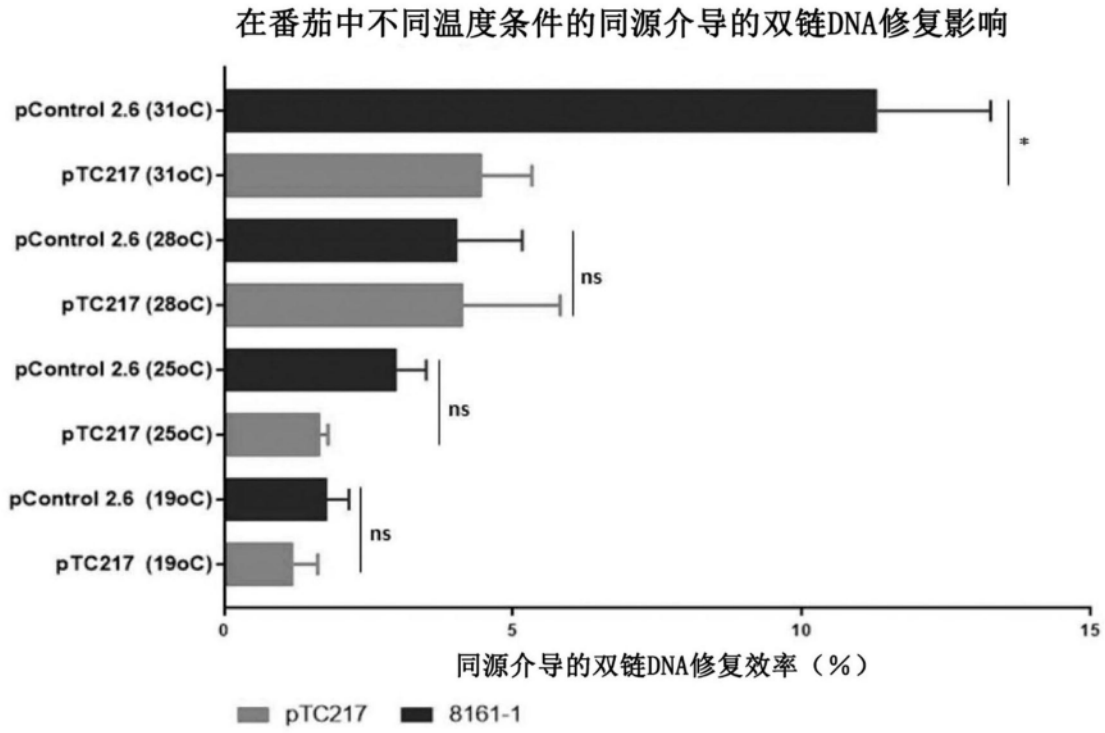
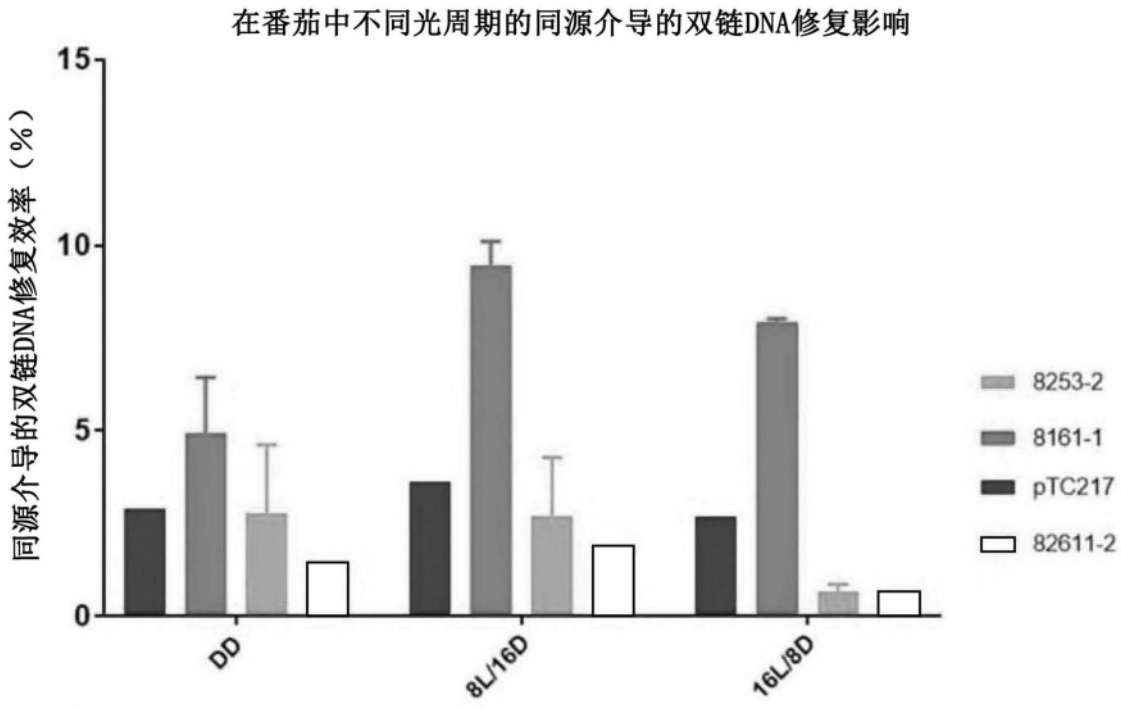


图7



DD:共培养后，将外植体在31℃的暗条件下培养10天
8L/16D:共培养后，将外植体在31℃的条件下以8小时的明/16小时的暗周期处理10天
16L/8D:共培养后，将外植体在31℃的条件下以16小时的明/8小时的暗周期处理10天

图8

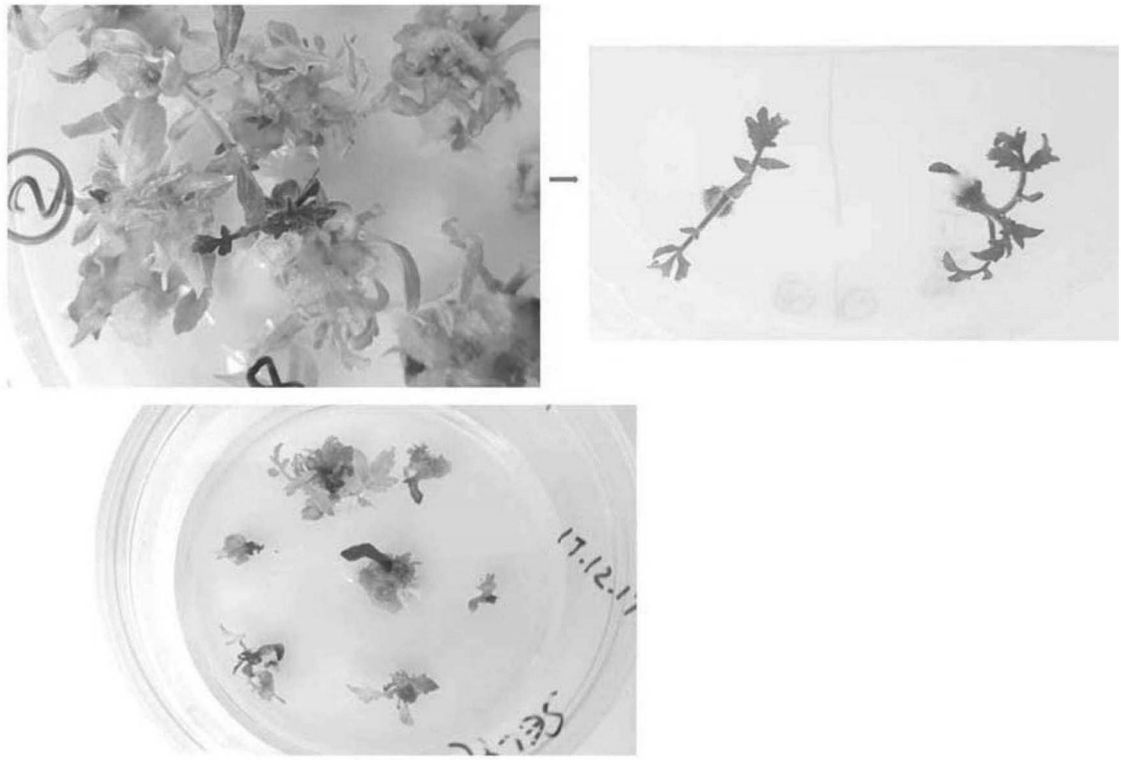


图9

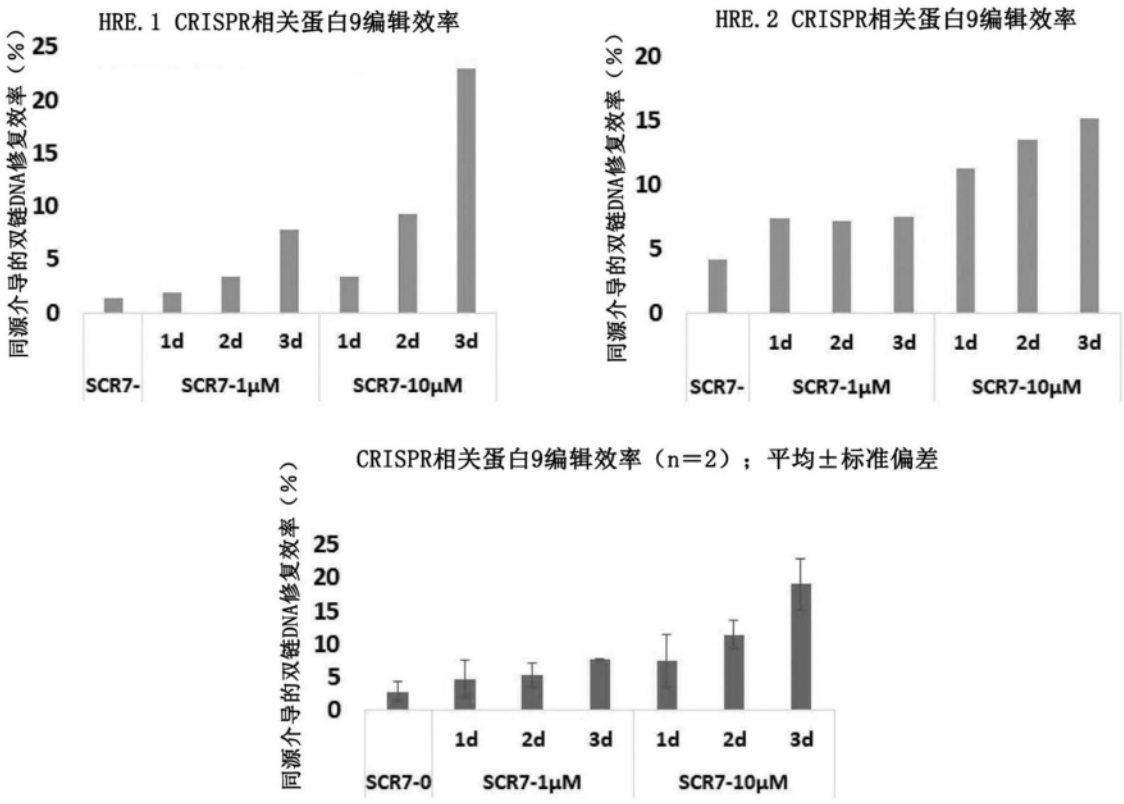

HRE.1 CRISPR相关蛋白9编辑效率
同源介导的双链DNA修复效率（%）
25
20
15
10
5
0
1d
2d
3d
1d
2d
3d
SCR7-
SCR7-1μM
SCR7-10μM
HRE.2 CRISPR相关蛋白9编辑效率
同源介导的双链DNA修复效率（%）
20
15
10
5
0
1d
2d
3d
1d
2d
3d
SCR7-
SCR7-1μM
SCR7-10μM
CRISPR相关蛋白9编辑效率（n=2）；平均±标准偏差
同源介导的双链DNA修复效率（%）
25
20
15
10
5
0
1d
2d
3d
1d
2d
3d
SCR7-0
SCR7-1μM
SCR7-10μM

图10

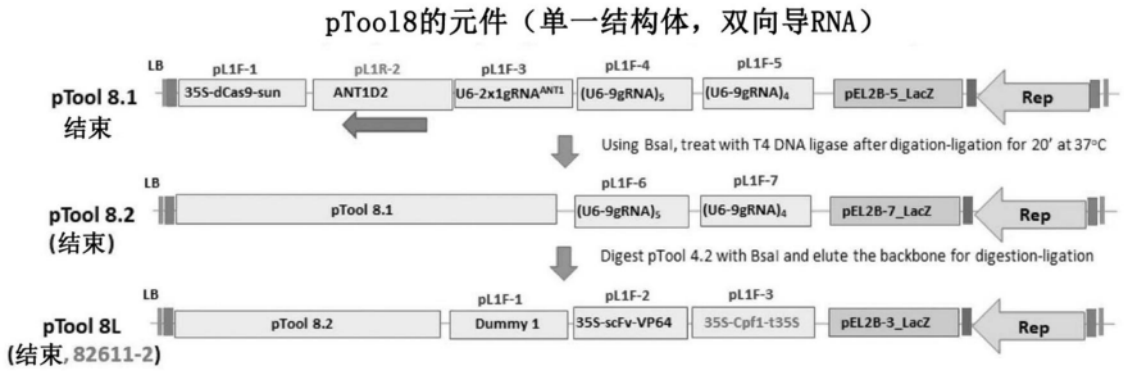

pTool18的元件（单一结构体，双向导RNA）
pTool 8.1
结束
LB
pL1F-1
35S-dCas9-sun
pL1R-2
ANT1D2
pL1F-3
U6-2x1gRNA^ANT1
pL1F-4
(U6-9gRNA)5
pL1F-5
(U6-9gRNA)4
pEL2B-5_LacZ
Rep
Using BsaI, treat with T4 DNA ligase after digation-ligation for 20' at 37°C
pTool 8.2
(结束)
pTool 8.1
pL1F-6
pL1F-7
pEL2B-7_LacZ
Digest pTool 4.2 with BsaI and elute the backbone for digestion-ligation
pTool 8L
(结束, 82611-2)
pTool 8.2
pL1F-1
Dummy 1
pL1F-2
35S-scFv-VP64
pL1F-3
35S-Cpf1-t35S
pEL2B-3_LacZ

图11


LB
大基因间区
TGCC
番茄红素
n
GGGA
小基因间区
Rep/RepA
大基因间区
RB

图12

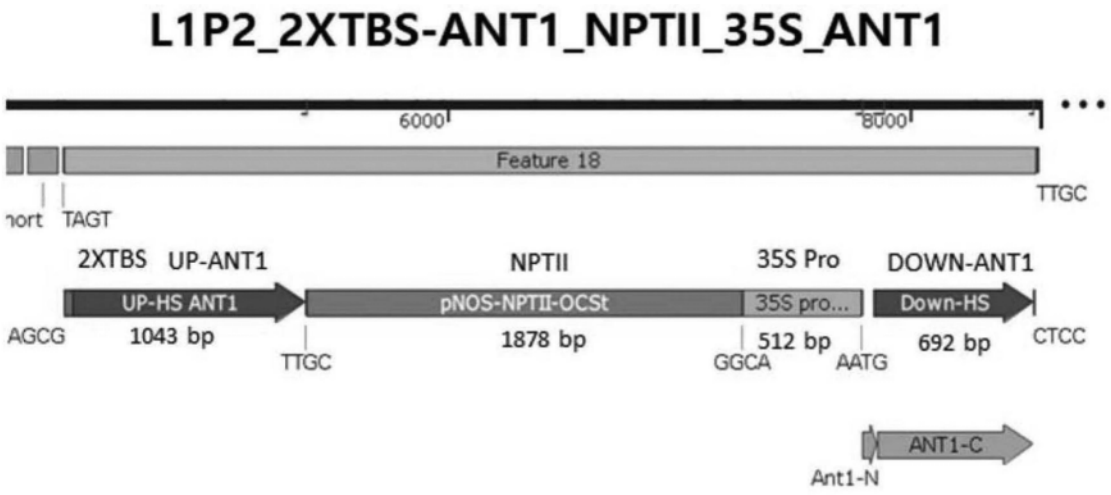

L1P2_2XTBS-ANT1_NPTII_35S_ANT1
6000
8000
Feature 18
TTGC
TAGT
2XTBS
UP-ANT1
NPTII
35S Pro
DOWN-ANT1
UP-HS ANT1
pNOS-NPTII-OCSt
35S pro...
Down-HS
AGCG
1043 bp
TTGC
1878 bp
512 bp
GGCA
AATG
692 bp
CTCC
ANT1-C
Ant1-N

图13

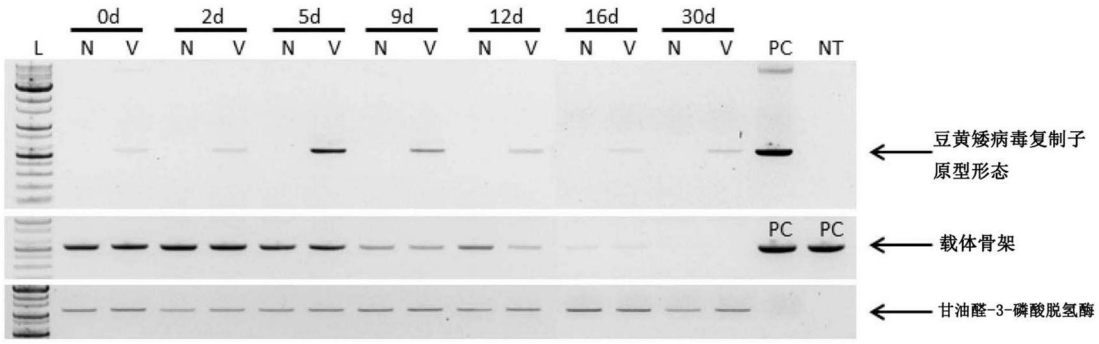

0d
2d
5d
9d
12d
16d
30d
L
N V N V N V N V N V N V N V PC NT
豆黄矮病毒复制子
原型形态
PC PC
载体骨架
甘油醛-3-磷酸脱氢酶

图14

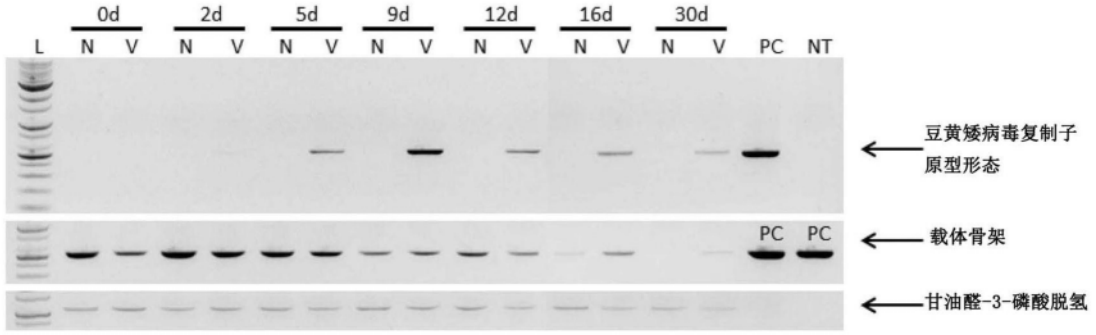

0d
2d
5d
9d
12d
16d
30d
L
N V N V N V N V N V N V N V PC NT
豆黄矮病毒复制子
原型形态
PC PC
载体骨架
甘油醛-3-磷酸脱氢

图15

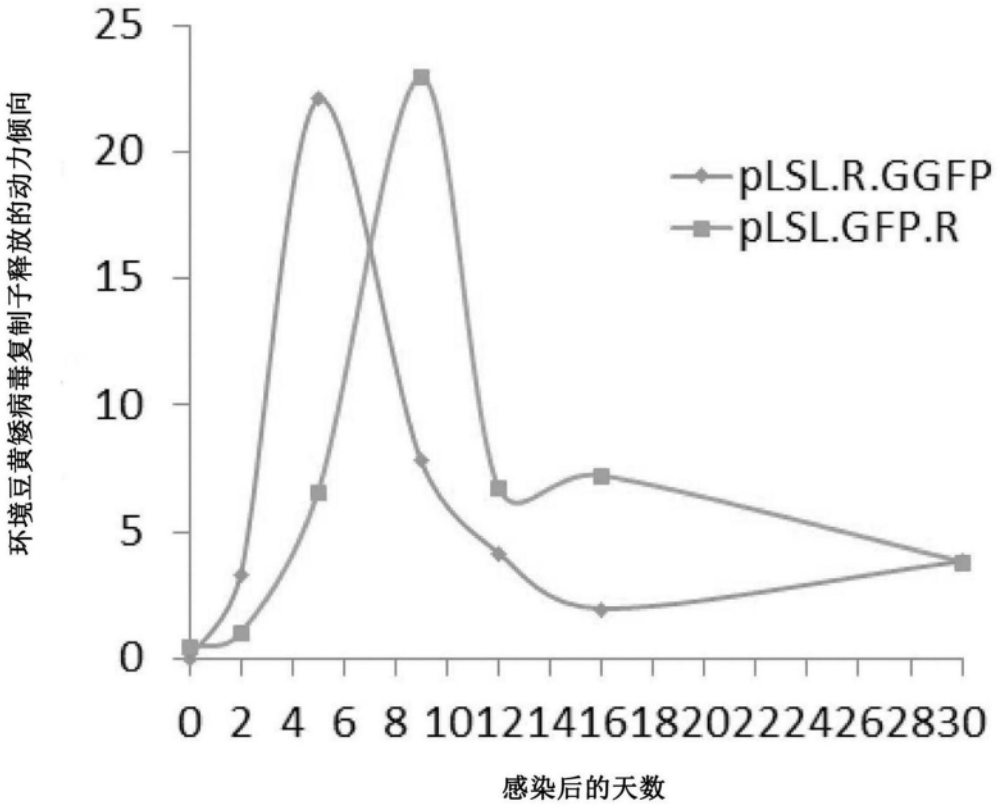

环境豆黄矮病毒复制子释放的动力倾向
25
20
15
10
5
0
0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22 24 26 28 30
感染后的天数
pLSL.R.GGFP
pLSL.GFP.R

图16

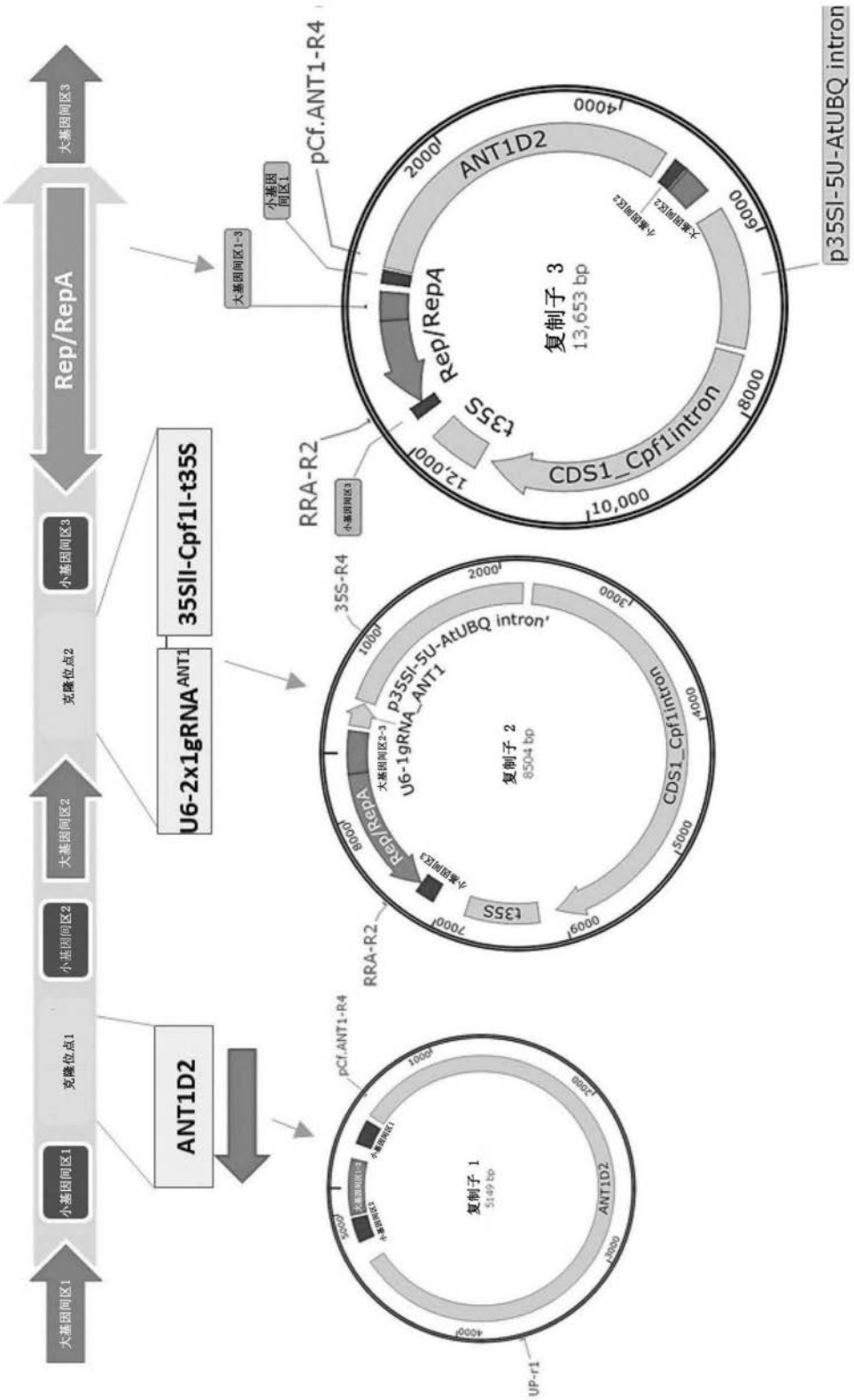

大基因间区1
小基因间区1
克隆位点1
小基因间区2
大基因间区2
克隆位点2
小基因间区3
大基因间区3
Rep/RepA
ANT1D2
U6-2x1gRNA ANT1
35SII-Cpf1I-t35S
pCf.ANT1-R4
RRA-R2
35S-R4
复制子 1
复制子 2
8504 bp
复制子 3
13,653 bp
p35SI-5U-AtUBQ intron
CDS1_Cpf1intron
t35S
UP-r1

图17