(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 118488780 A
(43)申请公布日 2024.08.13

(21)申请号 202280087136.3
(22)申请日 2022.11.04
(30)优先权数据
2021903546 2021.11.05 AU
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2024.07.01
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/AU2022/051328 2022.11.04
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2023/077199 EN 2023.05.11
(71)申请人 联邦科学技术研究组织
地址 澳大利亚澳大利亚首都领地
(72)发明人 J·罗 柳青 李忠谊 周雪荣
(74)专利代理机构 永新专利商标代理有限公司 72002
专利代理师 左路 区斌
(51)Int.Cl.
A01H 1/00(2006.01)
A01H 1/04(2006.01)
A01H 5/10(2018.01)
A01H 6/46(2018.01)
C12N 15/82(2006.01)
C12N 9/02(2006.01)
C12Q 1/6895(2018.01)
C07K 14/415(2006.01)

权利要求书5页 说明书60页
序列表（电子公布） 附图11页

(54)发明名称

改良谷粒

(57)摘要

本发明涉及一种具有高油酸含量和经改善的油稳定性的谷粒和麸皮,如稻米谷粒和麸皮。

CN 118488780 A

1.一种有繁殖力的谷粒,其包括经基因修饰的FAD2-1基因和经基因修饰的LOX3基因,其中所述谷粒包括

i)至少一些FAD 2-1蛋白活性,其中当与野生型谷粒相比时,所述FAD2-1活性降低;以及

ii)当与所述野生型谷粒相比时,降低的LOX3蛋白活性。

2.根据权利要求1所述的谷粒,其是稻米谷粒。

3.根据权利要求1或权利要求2所述的谷粒,其中从所述谷粒中提取的油比从所述野生型谷粒中提取的油更稳定。

4.根据权利要求1至3中任一项所述的谷粒,其中所述谷粒的总脂肪酸含量包括至少50%、至少60%、至少70%、至少75%、50%至80%、55%至75%、55%至70%的油酸(w/w干重)。

5.根据权利要求1至4中任一项所述的谷粒,其中所述谷粒具有共计18%、少于15%、15%至22%或15%至21%的棕榈酸(w/w干重)。

6.根据权利要求1至5中任一项所述的谷粒,其中所述谷粒的总脂肪酸含量包括少于20%、少于15%、少于10%、少于5%、2%至20%或5%至15%的亚油酸(w/w干重)。

7.根据权利要求1至6中任一项所述的谷粒,其中所述谷粒不具有LOX3蛋白活性。

8.根据权利要求1至7中任一项所述的谷粒,其对于所述经基因修饰的LOX3基因是纯合的。

9.根据权利要求1至8中任一项所述的谷粒,其中所述LOX3基因的基因修饰是所述LOX3基因中的过早终止密码子。

10.根据权利要求1至9中任一项所述的谷粒,其对于所述经基因修饰的FAD2-1基因是纯合的。

11.根据权利要求1至10中任一项所述的谷粒,其对于所述经基因修饰的FAD2-1基因是杂合的。

12.根据权利要求11所述的谷粒,其包括以下中的一项:

i)野生型FAD2-1等位基因和敲除FAD 2-1等位基因;

ii)野生型FAD2-1等位基因和FAD 2-1等位基因,所述FAD 2-1等位基因产生减少量的FAD2-1蛋白和/或编码具有降低的FAD2-1蛋白活性的FAD2-1蛋白;或者

iii)FAD 2-1等位基因和敲除FAD 2-1等位基因,所述FAD 2-1等位基因产生减少量的FAD2-1蛋白和/或编码具有降低的FAD2-1蛋白活性的FAD2-1蛋白。

13.根据权利要求1至12中任一项所述的谷粒,其中所述经基因修饰的FAD2-1基因编码突变体FAD2-1蛋白。

14.根据权利要求13所述的谷粒,其中突变体FAD2-1的Δ12去饱和酶活性比野生型FAD2-1蛋白的Δ12去饱和酶活性低5%至95%、低20%至80%、低40%至70%或低50%至60%。

15.根据权利要求1至14中任一项所述的谷粒,其中所述具有降低的FAD2-1蛋白活性的FAD2-1蛋白包括如SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:11中所示的氨基酸序列。

16.根据权利要求1至15中任一项所述的谷粒,其对于所述谷粒的基因组中的其它FAD2基因具有野生型活性。

17.根据权利要求1至16中任一项所述的谷粒,其中所述基因修饰中的一种或两种基因修饰是通过对祖先谷类植物进行基因编辑来引入的。

18.根据权利要求1至17中任一项所述的谷粒,其中当与所述野生型谷粒相比时,所述谷粒具有降低的FATB活性。

19.根据权利要求1至18中任一项所述的谷粒,其不包括外源性dsRNA。

20.一种谷类麸皮,其包括经基因修饰的细胞,所述经基因修饰的细胞包括

i)至少一些FAD 2-1蛋白活性,其中当与野生型谷类麸皮相比时,所述FAD2-1活性降低;以及

ii)当与所述野生型谷类麸皮相比时,降低的LOX3蛋白活性。

21.根据权利要求20所述的麸皮,其具有权利要求2至19中任一项中所定义的特征中的一个或多个特征。

22.一种经提取的谷粒油或谷类麸皮油,其总脂肪酸含量包括50%至80%或55%至80%的油酸(w/w干重),并且诱导时间为至少25小时,如通过在110℃下在20升/小时的气流速率下进行的Rancimat测试测量的。

23.一种经提取的谷粒油或谷类麸皮油,其比从缺乏权利要求1的i)和ii)的谷粒或麸皮中提取的谷类油更稳定。

24.根据权利要求22或权利要求23所述的经提取的谷粒或麸皮油,其是稻米谷粒或稻米麸皮油。

25.根据权利要求22至24中任一项所述的经提取的谷粒或麸皮油,其总脂肪酸含量包括55%至75%或55%至70%的油酸(w/w干重)。

26.根据权利要求22至25中任一项所述的经提取的谷粒或麸皮油,其总脂肪酸含量包括少于22%、少于21%、少于20%、少于18%、少于15%、15%至22%或15%至21%的棕榈酸(w/w干重)。

27.根据权利要求22至26中任一项所述的经提取的谷粒或麸皮油,其总脂肪酸含量包括少于20%、少于15%、少于10%、少于5%、2%至20%或5%至15%的亚油酸(w/w干重)。

28.一种基本上经纯化的和/或重组突变体FAD2-1蛋白,其Δ12去饱和酶活性比对应的野生型FAD 2-1蛋白的Δ12去饱和酶活性低5%至95%、低20%至80%、低40%至70%或低50%至60%。

29.根据权利要求28所述的蛋白,其包括SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:11中所示的氨基酸序列。

30.一种分离的和/或外源性多核苷酸,其编码根据权利要求28或权利要求29所述的蛋白。

31.一种载体,其包括根据权利要求30所述的多核苷酸。

32.根据权利要求31所述的载体,其中所述多核苷酸与启动子可操作地连接。

33.一种细胞,优选地稻米细胞,其包括如权利要求1中所定义的基因修饰、根据权利要求30所述的多核苷酸或根据权利要求31或权利要求32所述的载体。

34.根据权利要求33所述的细胞,其是稻米谷粒细胞。

35.根据权利要求33或权利要求34所述的细胞,其是稻米麸皮细胞。

36.根据权利要求33至35中任一项所述的细胞,其中所述多核苷酸被整合到所述细胞

的基因组中。

37.一种有繁殖力的谷类植物,优选地稻米植物,其包括根据权利要求1至19中任一项所述的谷粒、根据权利要求20或权利要求21所述的谷类麸皮、根据权利要求28或权利要求29所述的蛋白、根据权利要求30所述的多核苷酸、根据权利要求31或权利要求32所述的载体或根据权利要求33至36中任一项所述的细胞中的一者或多者。

38.一种生长在田地中的至少100种根据权利要求37所述的稻米植物的群体。

39.一种产生根据权利要求33至36中任一项所述的细胞的方法,所述方法包括将如权利要求1中所定义的基因修饰、根据权利要求30所述的多核苷酸或根据权利要求31或权利要求32所述的载体引入到细胞中的步骤。

40.一种鉴定具有降低的FAD 2-1蛋白活性的FAD 2-1蛋白的方法,所述方法包括

i)获得具有与SEQ ID NO:1至9中的任一者或多者中所示的氨基酸序列至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或至少99.5%相同但不相同的氨基酸序列的多肽;

ii)通过确定所述多肽在Δ12位置处将双键引入到油酸中的能力来评估所述多肽的FAD 2-1蛋白活性;以及

iii)选择具有一些FAD 2-1蛋白活性但FAD 2-1蛋白活性低于由SEQ ID NO:1至9中的任一者中所示的氨基酸序列组成的蛋白质的FAD 2-1蛋白活性的多肽。

41.一种产生经基因修饰的谷类植物的方法,所述方法包括

i)将基因修饰引入到谷类细胞中,使得所述基因修饰编码根据权利要求28或权利要求29所述的蛋白;以及

ii)由所述细胞产生植物。

42.根据权利要求41所述的方法,其进一步包括分析所述植物的繁殖力,以及选择有繁殖力的植物。

43.根据权利要求41或权利要求42所述的方法,其进一步包括分析所述植物或其后代的谷粒和/或麸皮的脂肪酸组成,以及选择产生具有如权利要求3至5中任一项中所定义的总脂肪酸含量的谷粒和/或麸皮的植物。

44.根据权利要求41至43中任一项所述的方法,其中

i)所述细胞不编码功能性LOX3蛋白;或者

ii)所述方法进一步包括引入基因修饰,使得所述植物或其后代不编码其谷粒和/或麸皮中的功能性LOX3蛋白。

45.根据权利要求41至44中任一项所述的方法,其进一步包括从步骤ii)的所述植物采集谷粒,所述谷粒具有所述基因修饰。

46.根据权利要求45所述的方法,其进一步包括由经基因修饰的谷粒产生一代或多代经基因修饰的子代植物,所述子代植物具有所述基因修饰。

47.一种产生根据权利要求37所述的谷类植物的方法,所述方法包括将具有包括至少一些FAD 2-1蛋白活性的谷粒的第一经基因修饰的亲本植物与具有包括当与野生型谷粒相比时降低的LOX3蛋白活性的谷粒的第二经基因修饰的亲本植物杂交,其中当与所述野生型谷粒相比时,所述FAD2-1蛋白活性降低。

48.一种选择根据权利要求37所述的谷类植物或来自所述植物的谷粒的方法,所述方

法包括以下步骤

i)筛选产生根据权利要求1至21中任一项所述的谷粒或麸皮或存在所述基因修饰的谷类植物、谷粒或麸皮的群体,其中的每一者是从祖谷类细胞、谷粒或植物的诱变处理中获得的;以及

ii)从步骤(i)的所述群体中选择产生根据权利要求1至19中任一项所述的谷粒的谷类植物或谷粒,

由此选择所述谷类植物或所述谷粒。

49.根据权利要求48所述的方法,其中步骤ii)包括:

i)分析包括来自子代植物或其谷粒的DNA的样品的所述基因修饰;和/或

ii)分析所述谷粒或其麸皮中的脂肪酸含量。

50.一种用于鉴定根据权利要求37所述的谷类植物的方法,所述方法包括以下步骤

i)从谷类植物中获得核酸样品;以及

ii)筛选所述样品中存在或不存在第一基因修饰和第二基因修饰,当与野生型谷粒相比时,所述第一基因修饰降低但不消除植物的谷粒中的FAD 2-1蛋白活性,当与野生型谷粒相比时,所述第二基因修饰降低所述植物的谷粒中的LOX3蛋白活性。

51.一种产生经提取的谷粒和/或谷类麸皮油的方法,所述方法包括:

i)从权利要求1至21中任一项的谷类植物中获得谷粒和/或麸皮;以及

ii)从所述谷粒和/或所述谷类麸皮中提取油。

52.根据权利要求51所述的方法,其中所提取的油是根据权利要求22至27中任一项所述的。

53.一种产生谷类植物部分的方法,所述方法包括:

a)使根据权利要求37所述的谷类植物或至少100种此类谷类植物在田地中生长;以及

b)从一种或多种谷类植物中采集所述谷类植物部分。

54.根据权利要求53所述的方法,其中所述部分是谷粒。

55.一种产生从谷粒获得的谷类面粉、麸皮、全麦面粉、麦芽、淀粉或油的方法,所述方法包括:

a)获得根据权利要求37所述的植物的谷粒或根据权利要求1至21中任一项所述的谷粒和/或麸皮;以及

b)加工所述谷粒以产生所述面粉、所述麸皮、所述全麦面粉、所述麦芽、所述淀粉或所述油。

56.根据权利要求55所述的方法,其中所述油是谷类麸皮油。

57.一种通过根据权利要求51或权利要求52所述的方法获得的或能够通过所述方法获得的脂质或油。

58.一种由根据权利要求37所述的植物或由根据权利要求1至21中任一项所述的谷粒和/或麸皮产生的产物。

59.根据权利要求58所述的产物,其包括所述基因修饰。

60.根据权利要求58或权利要求59所述的产物,其中所述产物是食物成分、饮料成分、食物产品或饮料产品。

61.一种制备权利要求60的所述食物或饮料成分的方法,所述方法包括加工根据权利

要求37所述的谷类植物的谷粒、根据权利要求1至21中任一项所述的谷粒和/或麸皮或来自所述谷粒的麸皮、面粉、全麦面粉、麦芽、淀粉或油,以产生所述食物或饮料成分。

62.一种制备权利要求60的所述食物或饮料产品的方法,所述方法包括加工根据权利要求37所述的谷类植物的谷粒、根据权利要求1至21中任一项所述的谷粒和/或麸皮或来自所述谷粒的麸皮、面粉、全麦面粉、麦芽、淀粉或油,以产生食物或饮料。

63.一种制备食物的方法,所述方法包括在根据权利要求23至27或57中任一项所述的谷类油中烹饪可食用物质。

64.一种根据权利要求37所述的谷类植物或其部分或根据权利要求1至21中任一项所述的谷粒和/或麸皮的用途,其用作动物饲料或食物或用于产生供动物食用的饲料或供人类食用的食物。

65.一种组合物,其包括权利要求28或权利要求29的多肽、根据权利要求30所述的多核苷酸、根据权利要求31或权利要求32所述的载体、根据权利要求33至36中任一项所述的细胞或根据权利要求23至27或57中任一项所述的油中的一者或多者,以及一种或多种可接受的载剂。

改良谷粒

技术领域

[0001] 本发明涉及一种具有高油酸含量和经改善的油稳定性的谷粒和麸皮,如稻米谷粒和麸皮。

背景技术

[0002] 稻米(亚洲稻(Oryza sativa L.))是世界上一半以上人口最重要的主食之一,尤其是在亚洲,其产量占世界总产量的约90%。世界上绝大多数的稻米是作为“白米”食用的,所述白米实质上是稻米谷粒的胚乳,是通过研磨采集的谷粒以去除外部的麸皮层和胚芽(胚胎和盾片)而产生的。这样做主要是因为“糙米”不容易保存,尤其是在炎热的热带条件下。糙米的营养品质和潜在的健康益处吸引了营养学家、育种家和植物生物技术学家越来越多的兴趣。

[0003] 稻米麸皮

[0004] 稻米麸皮是稻米谷粒的外部棕色层并且其包含胚胎、果皮、糊粉层和亚糊粉层。尽管已知所述稻米麸皮富含矿物质、蛋白质、油和粗纤维,但其主要是作为白米研磨的副产物获得的。目前全球产量为大约6600-7500万吨。通常,稻米麸皮由14-16%的蛋白质、12-23%的脂质和8-10%的粗纤维组成(Juliano,1985)。

[0005] 稻米麸皮油

[0006] 稻米麸皮是稻米麸皮油(RBO)的来源。随着对人类健康益处的证实,对RBO作为食用油,例如用于烹饪的兴趣不断增加。研究表明,RBO食用可显著降低低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C),并增加高脂血症患者的抗氧化能力(Bumrungpert等人2019;Berger等人,2005)。RBO健康特性与3-4.5%高的不皂化物重要次要组分有关,如生育酚、植物甾醇、萜烯和混合类异戊二烯,而其它植物油的含油量为大约1%。RBO通常含有1.8%的植物甾醇、1.2-1.7%的γ-谷维素、至多0.17%的生育三烯酚和0.08%的生育酚(Pal和Pratap,2017)。这些微量成分越来越受到关注,因为一些已经显示出对皮肤健康、衰老、视力和血液胆固醇或预防乳腺癌或心血管疾病具有有益作用(Theriault等人,1999;Moghadasian和Frohlich,1999)。这些生物活性组分还显示出改善高胆固醇饮食大鼠的脂质谱(Ha等人,2005)。主要在麸皮中发现的另一个重要组分是维生素A前体。然而,这些营养和健康益处通过稻米的抛光和白米的食用而丧失。

[0007] 谷类中的脂肪酸生物合成酶的修饰

[0008] 与在油籽中的脂肪酸生物合成和修饰方面所做的大量工作相比,谷类中的油修饰相对来说还未被探索。这可能是由于谷粒中的油含量低得多(约1.5-6重量%),并且因此认为谷类中的油在人类饮食中的重要性较低。

[0009] 表1.与淀粉相关的植物脂质的选择的脂肪酸的脂肪酸组成(总脂肪酸的wt%)。

[0010]

植物	16:0	18:1	18:2
小麦	35-44	6-14	42-52
大麦	55	4	36

黑麦	23	41	35
燕麦	40	22	35
玉蜀黍	37	11	46
玉蜀黍-高直链淀粉	36	20	38
玉蜀黍-蜡质	36	23	36
小米	36	28	29
稻米	37-48	9-18	29-46

[0011] 数据改编自:Morrison(1988)。

[0012] 通过抛光稻米谷粒的外层获得的营养丰富的稻米麸皮外层是含有如生育三烯酚和γ-谷维素等抗氧化化合物的极好的食物来源,所述γ-谷维素也是植物雌激素(Rukmini和Raghuram,1991)。已经发现稻米麸皮油中存在的生物活性化合物可以降低人体胆固醇(Most等人,2005)。

[0013] 需要改善麸皮层中的谷粒脂质谱,以提高全谷粒谷类的效用和保质期,并防止麸皮和RBO的酸败,而无需进一步加工。还需要如稻米等谷类品种,其产生的谷粒具有经改善的有益于健康的油组成,同时在储存时更稳定,允许在人类饮食中更多地使用例如糙米、稻米麸皮和RBO。

发明内容

[0014] 本发明人已经产生具有经改善的油特性的谷粒和麸皮。

[0015] 因此,在第一方面,本发明提供了有繁殖力的谷粒,所述有繁殖力的谷粒包括经基因修饰的FAD2-1基因和经基因修饰的LOX3基因,其中所述谷粒包括:

[0016] i)至少一些FAD 2-1蛋白活性,其中当与野生型谷粒相比时,所述FAD2-1活性降低;以及

[0017] ii)当与所述野生型谷粒相比时,降低的LOX3蛋白活性。

[0018] 在一实施例中,所述谷粒是稻米、高粱、小麦、燕麦、黑麦、大麦或玉蜀黍谷粒。在一实施例中,所述谷粒是高粱谷粒。在一实施例中,所述谷粒是稻米谷粒。

[0019] 在一实施例中,从所述谷粒中提取的油比从所述野生型谷类中提取的油更稳定。

[0020] 在一实施例中,所述谷粒的总脂肪酸含量包括至少50%、至少60%、至少70%、至少75%、50%至80%、55%至75%、55%至70%的油酸(w/w干重)。在一实施例中,其中所述谷粒的总脂肪酸含量包括55%至75%的油酸(w/w干重)。在一实施例中,所述谷粒的总脂肪酸含量包括55%至65%的油酸(w/w干重)。

[0021] 在一实施例中,所述谷粒的总脂肪酸含量包括少于22%、少于21%、少于20%、少于18%、少于15%、15%至22%或15%至21%的棕榈酸(w/w干重)。在一实施例中,所述谷粒的总脂肪酸含量包括10%至15%的棕榈酸(w/w干重)。在一实施例中,所述谷粒的总脂肪酸含量包括10%至13%的棕榈酸(w/w干重)。

[0022] 在一实施例中,所述谷粒的总脂肪酸含量包括少于20%、少于15%、少于10%、少于5%、2%至20%或5%至15%的亚油酸(w/w干重)。在一实施例中,所述谷粒的总脂肪酸含量包括15%至25%的亚油酸(w/w干重)。

[0023] 在一实施例中,所述谷粒的总脂肪酸含量包括55%至65%的油酸、10%至15%的

棕榈酸和15％至25％的亚油酸。

[0024] 在一实施例中,所述谷粒对于FAD 2-1等位基因、LOX3敲除、FATB2敲除、FATB3敲除和FATB4敲除是纯合的,所述FAD 2-1等位基因产生减少量的FAD2-1蛋白和/或编码具有降低的FAD2-1蛋白活性的FAD2-1蛋白。

[0025] 在一实施例中,所述谷粒对于FAD 2-1等位基因、LOX3敲除、FATB1敲除和FATB4敲除是纯合的,所述FAD 2-1等位基因产生减少量的FAD2-1蛋白和/或编码具有降低的FAD2-1蛋白活性的FAD2-1蛋白。

[0026] 在一实施例中,所述谷粒对于FAD 2-1等位基因、LOX3敲除、FATB1敲除、FATB2敲除、FATB3敲除和FATB4敲除是纯合的,所述FAD 2-1等位基因产生减少量的FAD2-1蛋白和/或编码具有降低的FAD2-1蛋白活性的FAD2-1蛋白。

[0027] 在一实施例中,所述谷粒不具有LOX3蛋白活性。例如,所述基因修饰是所述LOX3基因中的过早终止密码子。

[0028] 在一实施例中,所述谷粒对于所述LOX3基因中的所述基因修饰是纯合的。在一实施例中,所述LOX3基因的所述基因修饰是所述LOX3基因中的过早终止密码子。

[0029] 在一实施例中,所述谷粒对于所述FAD2-1基因中的所述基因修饰是纯合的。

[0030] 在一实施例中,所述谷粒对于所述FAD2-1基因中的所述基因修饰是杂合的。

[0031] 在一实施例中,所述谷粒包括野生型FAD2-1等位基因和敲除FAD 2-1等位基因。

[0032] 在一实施例中,所述谷粒包括野生型FAD2-1等位基因和FAD 2-1等位基因,所述FAD 2-1等位基因产生减少量的FAD2-1蛋白和/或编码具有降低的FAD2-1蛋白活性的FAD2-1蛋白。

[0033] 在一实施例中,所述谷粒包括FAD 2-1等位基因和敲除FAD 2-1等位基因,所述FAD 2-1等位基因产生减少量的FAD2-1蛋白和/或编码具有降低的FAD2-1蛋白活性的FAD2-1蛋白。

[0034] 在一实施例中,所述经基因修饰的FAD2-1基因编码突变体FAD2-1蛋白。在一实施例中,突变体FAD2-1的Δ12去饱和酶活性比野生型FAD2-1蛋白的Δ12去饱和酶活性低5％至95％、低20％至80％、低40％至70％或低50％至60％。在一实施例中,所述谷粒突变体FAD2-1的Δ12去饱和酶活性比如由SEQ ID NO:1至9中的任一者中所示的氨基酸序列组成的FAD 2-1蛋白等野生型FAD2-1蛋白的Δ12去饱和酶活性低5％至95％、低20％至80％、低40％至70％或低50％至60％。

[0035] 在一实施例中,所述具有降低的FAD2-1蛋白活性的FAD2-1蛋白包括如SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:11中所示的氨基酸序列或由其组成。在一实施例中,所述具有降低的FAD2-1蛋白活性的FAD2-1蛋白具有经修饰的翻译起始位点。

[0036] 在一实施例中,所述谷粒对于所述谷粒的基因组中的其它FAD2基因具有野生型活性。例如,本发明的稻米谷粒具有野生型FAD 2-2、FAD 2-3和FAD 2-4活性。

[0037] 在一实施例中,所述基因修饰中的一种或两种基因修饰是通过对祖先谷类植物进行基因编辑来引入的。

[0038] 在一实施例中,当与所述野生型谷粒相比时,所述谷粒具有降低的FATB活性。在一实施例中,所述FATB是FATB1。

[0039] 在一个实施例中,所述谷粒不包括外源性dsRNA。

[0040] 在另外的方面,本发明提供了一种谷类麸皮,所述谷类麸皮包括经基因修饰的细胞,所述经基因修饰的细胞包括:

[0041] i)至少一些FAD 2-1蛋白活性,其中当与野生型谷类麸皮相比时,所述FAD2-1活性降低;以及

[0042] ii)当与所述野生型谷类麸皮相比时,降低的LOX3蛋白活性。

[0043] 所述麸皮可以具有上文所定义的本发明的谷粒的任何相关特征,如脂肪酸谱。例如,在一实施例中,所述麸皮是稻米麸皮。

[0044] 一方面,本发明提供了一种经提取的谷粒油或谷类麸皮油,所述经提取的谷粒油或谷类麸皮油的总脂肪酸含量包括50%至80%或55%至80%的油酸(w/w干重),并且诱导时间为至少25小时,如通过在110℃下在20升/小时的气流速率下进行的Rancimat测试测量的。

[0045] 另一方面,本发明提供一种经提取的谷粒油或谷类麸皮油,所述经提取的谷粒油或谷类麸皮油比从缺乏本发明的i)和ii)的谷粒或麸皮中提取的谷类油更稳定。在一实施例中,这方面的经提取的谷粒或麸皮油的总脂肪酸含量包括50%至80%或55%至80%的油酸(w/w干重)。

[0046] 在一实施例中,所述谷类油是稻米、高粱、小麦、燕麦、黑麦、大麦或玉蜀黍油。在一实施例中,所述麸皮油是稻米、高粱、小麦、燕麦、黑麦、大麦或玉蜀黍麸皮油。在一实施例中,所述油是高粱谷粒油或麸皮油。在一实施例中,所述油是稻米谷粒油或麸皮油。

[0047] 在一实施例中,本发明的经提取的谷粒或麸皮油的总脂肪酸含量包括55%至75%或55%至70%的油酸(w/w干重)。在一实施例中,本发明的经提取的谷粒或麸皮油的总脂肪酸含量包括55%至65%的油酸(w/w干重)。

[0048] 在一实施例中,本发明的经提取的谷粒或麸皮油的总脂肪酸含量包括少于22%、少于21%、少于20%、少于18%、少于15%、15%至22%或15%至21%的棕榈酸(w/w干重)。在一实施例中,本发明的经提取的谷粒或麸皮油的总脂肪酸含量包括10%至15%的棕榈酸(w/w干重)。在一实施例中,本发明的经提取的谷粒或麸皮油的总脂肪酸含量包括10%至13%的棕榈酸(w/w干重)。

[0049] 在一实施例中,本发明的经提取的谷粒或麸皮油的总脂肪酸含量包括少于20%、少于15%、少于10%、少于5%、2%至20%或5%至15%的亚油酸(w/w干重)。在一实施例中,本发明的经提取的谷粒或麸皮油的总脂肪酸含量包括15%至25%的亚油酸(w/w干重)。

[0050] 在一实施例中,本发明的经提取的谷粒或麸皮油的总脂肪酸含量包括55%至65%的油酸、10%至15%的棕榈酸和15%至25%的亚油酸。

[0051] 在另外的方面,本发明提供了一种基本上经纯化的和/或重组突变体FAD2-1蛋白,其Δ12去饱和酶活性比由SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列组成的FAD2-1蛋白的Δ12去饱和酶活性、比对应的野生型FAD 2-1蛋白的Δ12去饱和酶活性低5%至95%、低20%至80%、低40%至70%或低50%至60%。

[0052] 因此,这方面排除了野生型FAD 2-1蛋白,如由SEQ ID NO:1至9中的任一者所示的氨基酸序列组成的那些。

[0053] 在一实施例中,所述突变体FAD 2-1包括与SEQ ID NO:1至9中的任一者或多者中所示的氨基酸序列至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或至少95.5%相同

的氨基酸序列。

[0054] 在一实施例中,所述突变体FAD 2-1包括与SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或至少95.5%相同的氨基酸序列。

[0055] 在一实施例中,所述突变体FAD 2-1包括与SEQ ID NO:6中所示的氨基酸序列至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或至少95.5%相同的氨基酸序列。

[0056] 在一实施例中,所述蛋白包括SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:11中所示的氨基酸序列。

[0057] 在一实施例中,所述突变体是野生型蛋白的N末端截短。在一实施例中,所述突变体缺乏野生型FAD 2-1蛋白的前六个氨基酸中的一个或多个或全部。在一实施例中,所述突变体由具有经基因修饰的翻译起始位点的FAD2-1基因编码。

[0058] 另一方面,本发明提供了一种分离的和/或外源性多核苷酸,所述分离的和/或外源性多核苷酸编码本发明的蛋白。

[0059] 另一方面,本发明提供了一种载体,所述载体包括本发明的多核苷酸。

[0060] 在一实施例中,所述多核苷酸与启动子可操作地连接。

[0061] 还提供了一种细胞,优选地稻米细胞,所述细胞包括如本文所定义的基因修饰、本发明的多核苷酸或本发明的载体。

[0062] 在一实施例中,所述细胞是谷类植物细胞。本发明的谷类植物细胞的实例包含但不限于小麦、燕麦、黑麦、大麦、稻米、玉米、高粱或玉蜀黍细胞。在一实施例中,所述细胞是高粱细胞。在一实施例中,所述细胞是稻米细胞。

[0063] 在优选实施例中,所述细胞是如稻米麸皮细胞等稻米谷粒细胞。

[0064] 在一实施例中,所述多核苷酸被整合到所述细胞的基因组中。

[0065] 在另外的方面,本发明提供了一种谷类植物,所述谷类植物包括本发明的谷粒、本发明的谷类麸皮、本发明的蛋白、本发明的多核苷酸、本发明的载体或本发明的细胞中一种或多种或所有。在一实施例中,所述植物是高粱植物。

[0066] 还提供了一种生长在田地中的至少100种如本发明的稻米植物等植物的群体。

[0067] 在又另一方面,本发明提供了一种产生本发明的细胞的方法,所述方法包括将如本文所定义的基因修饰、本发明的多核苷酸或本发明的载体引入到细胞中的步骤。

[0068] 另一方面,本发明提供了一种鉴定具有降低的FAD 2-1蛋白活性的FAD 2-1蛋白的方法,所述方法包括:

[0069] i)获得具有与SEQ ID NO:1至9中的任一者或多者中所示的氨基酸序列至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或至少99.5%相同但不相同的氨基酸序列的多肽;

[0070] ii)通过确定所述多肽在Δ12位置处将双键引入到油酸中的能力来评估所述多肽的FAD 2-1蛋白活性;以及

[0071] iii)选择具有一些FAD 2-1蛋白活性但FAD 2-1蛋白活性低于由SEQ ID NO:1至9中的任一者中所示的氨基酸序列组成的蛋白质的FAD 2-1蛋白活性的多肽。

[0072] 在实施例中,与对应的野生型FAD2-1相比,评估部分i)的多肽。例如,在一实施例中,所述方法包括:

[0073] i)获得具有与SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列至少90%、至少95%、至少96%、

至少97％、至少98％、至少99％或至少99.5％相同但不相同的氨基酸序列的多肽;

[0074] ii)通过确定所述多肽在Δ12位置处将双键引入到油酸中的能力来评估所述多肽的FAD 2-1蛋白活性;以及

[0075] iii)选择具有一些FAD 2-1蛋白活性但FAD 2-1蛋白活性低于由SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列组成的蛋白质的FAD 2-1蛋白活性的多肽。

[0076] 在一实施例中,i)的多肽是野生型FAD2-1多肽的N末端和/或C末端截短。

[0077] 另一方面,本发明提供了一种产生经基因修饰的谷类植物的方法,所述方法包括:

[0078] i)将基因修饰引入到谷类细胞中,使得所述基因修饰编码本发明的蛋白;以及

[0079] ii)由所述细胞产生植物。

[0080] 在一实施例中,所述方法进一步包括分析所述植物的繁殖力,以及选择有繁殖力的植物。

[0081] 在一实施例中,所述方法进一步包括分析所述植物或其后代的谷粒和/或麸皮的脂肪酸组成,以及选择产生具有如本文所定义的总脂肪酸含量的谷粒和/或麸皮的植物。

[0082] 在一实施例中,所述细胞不编码功能性LOX3蛋白。

[0083] 在一实施例中,所述方法进一步包括引入基因修饰,使得所述植物或其后代不编码其谷粒和/或麸皮中的功能性LOX3蛋白。

[0084] 在一实施例中,所述方法进一步包括从步骤ii)的所述植物采集谷粒,所述谷粒具有所述基因修饰。

[0085] 在一实施例中,所述方法进一步包括由经基因修饰的谷粒产生一代或多代经基因修饰的子代植物,所述子代植物具有所述基因修饰。

[0086] 另一方面,本发明提供了一种产生本发明的谷类植物的方法,所述方法包括将具有包括至少一些FAD 2-1蛋白活性的谷粒的第一经基因修饰的亲本植物与具有包括当与野生型谷粒相比时降低的LOX3蛋白活性的谷粒的第二经基因修饰的亲本植物杂交,其中当与所述野生型谷粒相比时,所述FAD 2-1蛋白活性降低。

[0087] 另一方面,本发明提供了一种选择本发明的谷类植物或来自所述植物的谷粒的方法,所述方法包括以下步骤:

[0088] i)筛选产生如本文所定义的谷粒或麸皮或存在所述基因修饰的谷类植物、谷粒或麸皮的群体,其中的每一者是从祖谷类细胞、谷粒或植物的诱变处理中获得的;以及

[0089] ii)从步骤(i)的所述群体中选择产生如本文所定义的谷粒的谷类植物或谷粒,

[0090] 由此选择所述谷类植物或所述谷粒。

[0091] 在一实施例中,步骤ii)包括:

[0092] i)分析包括来自子代植物或其谷粒的DNA的样品的所述基因修饰;和/或

[0093] ii)分析所述谷粒或其麸皮中的脂肪酸含量。

[0094] 另一方面,本发明提供了一种用于鉴定本发明的谷类植物的方法,所述方法包括以下步骤:

[0095] i)从谷类植物中获得核酸样品;以及

[0096] ii)筛选所述样品中存在或不存在第一基因修饰和第二基因修饰,当与野生型谷粒相比时,所述第一基因修饰降低但不消除植物的谷粒中的FAD 2-1蛋白活性,当与野生型谷粒相比时,所述第二基因修饰降低所述植物的谷粒中的LOX3蛋白活性。

[0097] 另一方面,本发明提供了一种产生经提取的谷粒和/或谷类麸皮油的方法,所述方法包括:

[0098] i)从本发明的谷类植物中获得谷粒和/或麸皮;以及

[0099] ii)从所述谷粒和/或所述谷类麸皮中提取油。

[0100] 在一实施例中,所提取的油如本文所定义的。

[0101] 另一方面,本发明提供了一种产生谷类植物部分的方法,所述方法包括:

[0102] a)使本发明的谷类植物或至少100种此类谷类植物在田地中生长;以及

[0103] b)从一种或多种谷类植物中采集所述谷类植物部分。

[0104] 在一实施例中,所述部分是谷粒。

[0105] 另一方面,本发明提供了一种产生从谷粒获得的谷类面粉、麸皮、全麦面粉、麦芽、淀粉或油的方法,所述方法包括:

[0106] a)获得本发明的植物的谷粒或本发明的谷粒和/或麸皮;以及

[0107] b)加工所述谷粒以产生所述面粉、所述麸皮、所述全麦面粉、所述麦芽、所述淀粉或所述油。

[0108] 在一实施例中,所述油是如稻米麸皮油等谷类麸皮油。

[0109] 另一方面,本发明提供了一种通过本发明的方法获得的或可通过所述方法获得的脂质或油。

[0110] 另一方面,本发明提供了一种由本发明的植物或由本发明的谷粒和/或麸皮产生的产物。

[0111] 在一实施例中,所述产物包括所述基因修饰。

[0112] 在一实施例中,所述产物是食物成分、饮料成分、食物产品或饮料产品。

[0113] 在一实施例中,所述食物成分或饮料成分选自由以下组成的组:全麦面粉、面粉、麸皮、淀粉、麦芽和油。

[0114] 在一实施例中,所述食物产品选自由以下组成的组:动物饲料、早餐谷类和小吃食物。

[0115] 在一实施例中,所述饮料产品是包装饮料或包括乙醇的饮料。

[0116] 另一方面,本发明提供了一种制备本发明的食物或饮料成分的方法,所述方法包括加工本发明的谷类植物的谷粒、本发明的谷粒和/或麸皮或来自所述谷粒的麸皮、面粉、全麦面粉、麦芽、淀粉或油,以产生食物或饮料成分。

[0117] 另一方面,本发明提供了一种制备本发明的食物或饮料产品的方法,所述方法包括加工本发明的谷类植物的谷粒、本发明的谷粒和/或麸皮或来自所述谷粒的麸皮、面粉、全麦面粉、麦芽、淀粉或油,以产生食物或饮料。

[0118] 另一方面,本发明提供了一种制备食物的方法,所述方法包括在本发明的如稻米油等谷类油中烹饪可食用物质。

[0119] 还提供了一种本发明的谷类植物或其部分或本发明的谷粒和/或麸皮的用途,其用作动物饲料或食物或用于产生供动物食用的饲料或供人类食用的食物。

[0120] 另一方面,本发明提供了一种组合物,所述组合物包括本发明的多肽、本发明的多核苷酸、本发明的载体、本发明的细胞或本发明的油中的一者或多者,以及一种或多种可接受的载剂。

[0121] 除非另有明确说明,否则本文中的任何实施例在进行必要的修改后应被视为适用于任何其它实施例。

[0122] 本发明的范围不受本文所描述的具体实施例的限制,所述具体实施例旨在仅用于例示的目的。如本文所描述,功能等效的产物、组合物和方法显然在本发明的范围内。

[0123] 贯穿本说明书,除非另有明确说明或上下文另有要求,否则对单个步骤、物质组合物、步骤组或物质组合物组的提及应被视为涵盖这些步骤、物质组合物、步骤组或物质组合物组中的一个和多个(即,一个和多个)。

[0124] 在下文中通过以下非限制性实例并参考附图来描述本发明。

附图说明

[0125] 图1.来自稻米的OsFAD2的cDNA序列比对。FAD2基因中的gRNA1和gRNA2的向导RNA靶序列由靶标1和靶标3条示出。

[0126] 图2.pYLCRISPR_Cas9Pubi-H中的CRISPR基因编辑载体V1.

[0127] 图3.OsFATB基因的经翻译的蛋白序列与拟南芥(Arabidopsis)FATB1的比对。星号*示出了经比对的序列中的催化三联体(天冬氨酸N-227、组氨酸H-229和半胱氨酸C-264)的位点。

[0128] 图4.载体2FATB gRNA连接产物(金门,BsaI):pYLCRISPR_Cas9Pubi-H-V2。

[0129] 图5.半种子脂肪酸组成。A,V1-13和Neg的T_3种子;B,来自V1-13的单个圆锥花序的T_2种子。

[0130] 图6.A)株系基因型关键如下:KD是指fad2-1 KD/KD+lox3KO基因型;LOX是FAD2WT+lox3-KO基因型;并且Neg是阴性对照。B)FAD2-KO是纯合的fad2-1 KO/KO株系;Neg是指阴性对照;FAD2-KD是指fad2-1 KD/KD+lox3KO基因型;FAD2-KD/KO是指fad2-1 KD/KO+lox3-KO;并且LOX3是指FAD2-1WT+lox3 KO基因型。

[0131] 图7.V2突变体的半种子脂肪酸组成T_3种子如表5和7中所描述的。*为了便于引用,b1、b2、b3和b4分别是指FATB1、FATB2、FATB3和FATB4中的一种或多种的突变形式的存在。NEG是阴性对照,并且Nip是指野生型日本晴(Nipponbare)。

[0132] 图8.高油酸和低棕榈酸基因型的总脂肪酸组成。糙米中有五种主要脂肪酸(16:0、18:0、18:1、18:2和18:3)和一些次要脂肪酸,如肉豆蔻酸(14:0)和20:0。

[0133] 图9.通过Rancimat测试的稻米麸皮油提取物的氧化稳定性。A,从经基因修饰的突变体和FAD2-RNAi株系提取的稻米麸皮油的总脂肪酸组成。B,KD是指fad2-1KD/KD+lox3KO基因型;LOX是FAD2WT+lox3-KO基因型;并且Neg是阴性对照。C,FAD2是FAD2-RNAi沉默株系,NEG是阴性对照。

[0134] 图10.在3天的储存刺激测定中,由基因编辑的突变体和FAD2 RNAi沉默株系的稻米麸皮样品产生已醛化合物。D0(第0天)和D3(第3天)指示在储存刺激前后取样的时间点。A,KD是指fad2-1 KD/KD+lox3KO基因型;KK是指fad2-1 KD/KO+lox3KO基因型;LOX是FAD2WT+lox3-KO基因型;并且Neg是阴性对照。B,FAD2是指FAD2-RNAi沉默株系并且NC是对应的阴性对照。

[0135] 图11.野生型谷类FAD2-1蛋白的比对。

[0136] 图12.野生型谷类LOX3蛋白的比对。

[0137] 序列表符号说明

[0138] SEQ ID NO:1-稻米FAD 2-1

[0139] SEQ ID NO:2-大麦FAD 2-1

[0140] SEQ ID NO:3-玉蜀黍FAD 2-1

[0141] SEQ ID NO:4-二穗短柄草(Brachypodium distachyon)FAD 2-1

[0142] SEQ ID NO:5-欧洲油菜(Brassica napus)FAD 2-1

[0143] SEQ ID NO:6-大豆(Glycine max)FAD 2-1

[0144] SEQ ID NO:7-红花(Carthamus tinctorius)FAD 2-1

[0145] SEQ ID NO:8-油橄榄(Olea europaea)FAD 2-1

[0146] SEQ ID NO:9-谷子(Setaria italica)FAD 2-1

[0147] SEQ ID NO:10-突变体FAD2-1A

[0148] SEQ ID NO:11-突变体FAD2-1B

[0149] SEQ ID NO:12-稻米FAD 2-2

[0150] SEQ ID NO:13-稻米FAD 2-3

[0151] SEQ ID NO:14-稻米FAD 2-4

[0152] SEQ ID NO:15-编码稻米FAD 2-1的多核苷酸序列

[0153] SEQ ID NO:16-编码稻米FAD 2-2的多核苷酸序列

[0154] SEQ ID NO:17-编码稻米FAD 2-3的多核苷酸序列

[0155] SEQ ID NO:18-编码稻米FAD 2-4的多核苷酸序列

[0156] SEQ ID NO:19-稻米FATB-1

[0157] SEQ ID NO:20-稻米FATB-2

[0158] SEQ ID NO:21-稻米FATB-3

[0159] SEQ ID NO:22-稻米FATB-4

[0160] SEQ ID NO:23-稻米LOX3

[0161] SEQ ID NO:24-短花稻(Oryza brachyantha)LOX3

[0162] SEQ ID NO:25-大豆LOX3

[0163] SEQ ID NO:26-玉蜀黍LOX3

[0164] SEQ ID NO:27-燕麦(Avena sativa)LOX3

[0165] SEQ ID NO:28-大麦LOX3

[0166] SEQ ID NO:29-小麦(Triticum aestivum)LOX3

[0167] SEQ ID NO:30至37-RNA向导

[0168] SEQ ID NO:38-FATB基序

[0169] SEQ ID NO:39-拟南芥FATB1

[0170] SEQ ID NO:40-谷类LOX3共有序列

[0171] SEQ ID NO:41至56-氨基酸基序

具体实施方式

[0172] 一般技术和定义

[0173] 除非另外特别说明,否则本文所使用的所有技术和科学术语应被视为具有与本领

域(例如,在细胞培养、分子遗传学、包含基因编辑的基因修饰、蛋白质化学、食物制备和生物化学)的普通技术人员通常所理解的含义相同的含义。

[0174] 除非另外指示,否则本发明中所使用的重组蛋白、细胞培养和免疫学技术是本领域技术人员众所周知的标准程序。此类技术在以下来源的文献中进行了描述和解释:如J.Perbal,《分子克隆实用指南(A Practical Guide to Molecular Cloning)》,约翰威利父子出版公司(John Wiley and Sons)(1984);J.Sambrook等人,《分子克隆:实验室手册(Molecular Cloning:A Laboratory Manual)》,冷泉港实验室出版社(Cold Spring Harbour Laboratory Press)(1989);T.A.Brown(编辑),《基本分子生物学:实用方法(Essential Molecular Biology:A Practical Approach)》,第1卷和第2卷,IRL出版社(IRL Press)(1991);D.M.Glover和B.D.Hames(编辑),《DNA克隆:实用方法(DNA Cloning:APractical Approach)》,第1-4卷,IRL出版社(1995和1996);以及F.M.Ausubel等人(编辑),《当代分子生物学实验指南(Current Protocols in Molecular Biology)》,格林出版协会(Greene Pub.Associates)和威利国际科学出版公司(Wiley-Interscience)(1988,包含迄今为止的所有更新);Ed Harlow和David Lane(编辑)《抗体:实验室手册(Antibodies:A Laboratory Manual)》,冷泉港实验室,(1988);以及J.E.Coligan等人(编辑),《当代免疫学指南(Current Protocols in Immunology)》,约翰威利父子出版公司(包含迄今为止的所有更新)。

[0175] 术语“和/或”,例如“X和/或Y”应被理解为意指“X和Y”或“X或Y”,并且应被视为对两个含义或任一含义提供明确支持。

[0176] 如本文所使用的,除非相反地说明,否则术语约是指指定值的+/-10%,更优选地+/-5%,更优选地+/-1%。

[0177] 贯穿本说明书,词语“包括(comprise)”或如“包括(comprises)”或“包括(comprising)”等变体将被理解为暗示包含所陈述要素、整数或步骤或者要素、整数或步骤组,但不排除任意其它要素、整数或步骤或者要素、整数或步骤组。

[0178] 术语“经基因修饰的”、“基因修饰”或其变体是指任何由人类进行的基因操作并且包含通过转化或转导、基因编辑、突变细胞中的基因和改变或调节细胞或生物体中的基因的调节将基因引入到细胞中,以对其或其子代等进行这些操作。

[0179] 如本文所使用的,“油”是主要包括脂质并且在室温下为液体的组合物。例如,本发明的油优选地包括至少75重量%、至少80重量%、至少85重量%或至少90重量%的脂质。通常,经纯化的油包括油中的脂质的至少90重量%的三酰甘油(TAG)。如本文所描述的,可以存在如二酰基甘油(DAG)、游离脂肪酸(FFA)、磷脂和甾醇等油的次要组分。在一实施例中,本发明的油是谷粒和/或麸皮油。

[0180] 如本文所使用的,术语“稻米油”是指从如包括至少60%(w/w)脂质的稻米植物的麸皮层等谷粒/种子或其一部分获得的组合物。稻米油在室温下通常是液体。脂质包括长度为至少6个碳的脂肪酸。脂肪酸通常呈酯化形式,例如三酰甘油、磷脂。本发明的稻米油包括油酸。本发明的稻米油还可以包括如棕榈酸、亚油酸、肉豆蔻酸、硬脂酸和/或亚麻酸等至少一些其它脂肪酸。脂肪酸可以是游离脂肪酸和/或以三酰甘油(TAG)的形式存在。在一实施例中,在本发明的稻米油中至少50%、更优选地至少70%、更优选地至少80%的脂肪酸被发现是TAG。本发明的稻米油可以形成如糊粉层或胚胎/盾片等稻米谷粒/种子的一部分或其

一部分,其统称为“稻米麸皮”。可替代地,本发明的稻米油已经从稻米谷粒/种子或稻米麸皮中提取。实例1中提供了此类提取程序的实例。因此,在一个实施例中,本发明的“稻米油”是“基本上经纯化的”或“经纯化的”稻米油,所述稻米油已经从一种或多种其它脂质、核酸、多肽或与其天然状态相关的其它污染分子中分离出来。优选的是,基本上经纯化的稻米油至少60%不含、更优选地至少75%不含、更优选地至少90%不含与其天然相关的其它组分。在优选实施例中,在提取之后,当与完整种子/谷粒或麸皮中的比率相比时,油酸与亚油酸的比率、棕榈酸与油酸的比率和/或棕榈酸与亚油酸的比率还未显著改变(例如,改变不超过5%)。在另外的实施例中,稻米油没未暴露于如氢化等过程,当与完整种子/谷粒或麸皮中的比率相比时,所述氢化可能改变油酸与亚油酸、棕榈酸与油酸和/或棕榈酸与亚油酸的比率。本发明的稻米油可以进一步包括非脂肪酸分子,如但不限于γ-谷维素和甾醇。

[0181] 可以通过本领域已知的任何方法从稻米谷粒或麸皮中提取稻米油。这通常涉及用如乙醚、石油醚、氯仿/甲醇或丁醇混合物等非极性溶剂提取。可以用水饱和的丁醇提取与谷粒中的淀粉相关的脂质。稻米油可以通过本领域已知的方法“脱胶”以除去多糖,或者以其它方式处理以除去污染物或提高纯度、稳定性或颜色。油中的三酰甘油和其它酯可以水解以释放游离脂肪酸,或者油被氢化或化学或酶处理,如本领域已知的。

[0182] 在从稻米种子或麸皮中提取之后的稻米油通常包括被称为γ-谷维素的脂质组。如本文所使用的,“包括γ-谷维素”是指油中存在至少0.1%(w/w)的γ-谷维素化合物。在提取之后和从TAG中去除之前,稻米油中的γ-谷维素的水平通常为1.5-3.5%(w/w)。化合物通常是阿魏酸(4-羟基-3-甲氧基肉桂酸)的甾醇酯和其它三萜烯酯的混合物。环木菠萝烯醇阿魏酸酯(Cycloartenyl ferulate)、24-亚甲基环木菠萝烷醇阿魏酸酯和阿魏酸樟脑酯是谷维素中的主要阿魏酸酯,β-谷甾醇阿魏酸酯和阿魏酸豆甾醇酯含量较低。γ-谷维素的存在被认为有助于保护稻米油消费者免受如心脏病和癌症等慢性疾病的侵害,并且因此γ-谷维素的存在是有利的。

[0183] 如本文所使用的,“Rancimat”方法是基于加速老化的众所周知的测试。空气在不断升高的温度下通过反应容器中的样品。脂肪酸在这个过程期间被氧化。测试结束时会形成挥发性的二次反应产物,所述产物被气流导入到测量容器中,在所述测量容器中,所述产物被测量溶液(蒸馏水)吸收。由于离子反应产物的吸收,连续记录的电导率增加。副反应产物出现的时间被称为诱导时间。所述诱导时间表征油和脂肪的氧化稳定性。

[0184] 如本文所使用的,术语“稻米麸皮”是指在内部白米谷粒与稻米种子/谷粒的外壳以及谷粒的胚胎/盾片之间的层(糊粉层)。稻米麸皮是糙米抛光以产生白米的主要副产物。

[0185] 如本文所使用的,术语“Fad2蛋白”是指进行将油酸转化为亚油酸的去饱和酶反应的蛋白。因此,术语“Fad2蛋白活性”是指油酸向亚油酸的转化。如本文所使用的,术语“Fad2-1蛋白”是指FAD2-1蛋白的进化保守亚类,其通常在种子中表达。FAD 2-1蛋白的实例具有SEQ ID NO:1至9中的任一者所示的氨基酸序列。稻米中有四种Fad2多肽(Zaplin等人,2013;WO 2008/006171),命名为OsFAD2-1(LOC_Os02g48560)(SEQ ID NO:1)、OsFAD2-2(LOC_Os07g23430)(SEQ ID NO:12)、OsFAD2-3(LOC_Os07g23410)(SEQ ID NO1:3)和OsFAD2-4(LOC_Os07g23390)(SEQ ID NO:14)(图1)。天然存在的FAD2酶通常包括三个富含组氨酸的基序,所述基序与用于生物化学催化的双铁-氧复合物的形成有关(Shanklin等人,1998)。在一实施例中,当与如SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列相比时,稻米FAD2-1蛋

白具有至少95％、至少97％、至少99％或至少99.5％相同的氨基酸序列,或与其相同。

[0186] 如本文所使用的,术语“LOX”或其变体是指催化脂质的过氧化的脂氧合酶(LOX;EC 1.13.11.12)。脂氧合酶具有氨基末端β-桶,现在被称为PLAT(多囊蛋白-1,脂氧合酶,α-毒素)结构域和容纳催化铁的更大的α-螺旋结构域。脂氧合酶具有氨基末端β-桶,现在被称为PLAT(多囊蛋白-1,脂氧合酶,α-毒素)结构域和容纳催化铁的更大的α-螺旋结构域(Newcomer和Brash,2015)。LOX被分类为三种类型(Mizuno等人,2003)。I型脂氧合酶位于叶绿体中并且是应激诱导型的;II型脂氧合酶位于细胞质中,源自双子叶植物,并且不是应激诱导型的;III型脂氧合酶位于细胞质中,源自单子叶植物并且与种子发芽有关。I型LOX具有转运肽,这在II型和III型LOX中是不存在的。根据酶对底物烃骨架中的碳9或碳13的偏好,LOX也被分类为9-LOX或13-LOX,产生9(S)-氢过氧基-和9(S)-氢过氧基-衍生物(Feussner和Wasternack,2002)。基于生物信息学分析,推测稻米基因组(rice.plantbiology.msu.edu)具有14个LOX蛋白基因。已经在发育中的稻米种子中鉴定了三种III型LOX的同工酶(LOX1、LOX2和LOX3)(Ohta等人,1986)。其中LOX3是最丰富的酶。LOX3蛋白的实例具有SEQ ID NO:23至29中的任一者所示的氨基酸序列。在一实施例中,当与如SEQ ID NO:23中所示的氨基酸序列相比时,稻米LOX3蛋白具有至少95％、至少97％、至少99％或至少99.5％相同的氨基酸序列,或与其相同。如本文所使用的,术语“LOX3蛋白活性”是指如稻米谷粒等谷粒中的脂肪酸的过氧化。

[0187] 如本文所使用的,术语“FatB多肽”指水解棕榈酰-ACP以产生游离棕榈酸的蛋白质。因此,术语“FatB活性”是指棕榈酰-ACP水解以产生游离棕榈酸。如本文所使用的,术语“FatB-1蛋白”是指FATB蛋白的进化保守亚类,其通常在种子中表达。有四个稻米OsFATB基因被命名为FATB1(LOC_Os06g05130)(SEQ ID NO:19)、FATB2(LOC_Os11g43820)(SEQ ID NO:20)、FATB3(LOC_Os02g43090)(SEQ ID NO:21)和FATB4(LOC_Os06g39520)(SEQ ID NO:22)(WO 2008/006171)。在一实施例中,当与如SEQ ID NO:21中所示的氨基酸序列相比时,稻米FATB-1蛋白具有至少95％、至少97％、至少99％或至少99.5％相同的氨基酸序列,或与其相同。

[0188] 如本文所使用的,短语“更稳定”是相对术语。稳定性是指油的氧化稳定性。具体地,当在相同条件下储存相同时间长度时,“更稳定”的油(如本发明的稻米油)的氧化程度比来自野生型植物(缺乏本发明的基因修饰)的油的氧化程度更低。如本文所描述的,提高稳定性的一个措施是己醛产生(参见实例9)。

[0189] 术语“种子”和“谷粒”在本文中可互换使用。根据上下文,“谷粒”通常是指成熟、采集的谷粒,但也可以是指在吸入或发芽之后的谷粒。成熟谷粒的水分含量通常小于约18-20％。

[0190] 如本文所使用的,“有繁殖力的”谷粒能够发芽以产生有繁殖力的植物,而有繁殖力的植物能够产生有繁殖力的谷粒。在一实施例中,当与缺乏基因修饰的对应的野生型植物相比时,本发明的植物至少能够产生50％或更多或75％或更多量的有繁殖力的谷粒。

[0191] 如本文所使用的“野生型”是指尚未根据本发明修饰的细胞、组织或植物。野生型细胞、组织或植物可以用作对照,以与如本文所描述的经修饰的细胞、组织或植物比较外源性核酸的表达水平或性状修饰的程度和性质。适合作为参考标准的野生型稻米品种包含日本晴。

[0192] 多肽

[0193] 术语“多肽”和“蛋白质”通常可互换使用。

[0194] “基本上经纯化的多肽”或“经纯化的多肽”意指通常已经与脂质、核酸、其它肽和与其天然状态相关的其它污染分子分离的多肽。优选地,基本上经纯化的多肽至少90%不含与其天然相关的其它组分。在一实施例中,本发明的多肽具有不同于天然存在的FAD2-1和/或LOX3多肽的氨基酸序列,即氨基酸序列变体。

[0195] 如植物等经基因修饰的生物体,和本发明的宿主细胞可以包括编码本发明的多肽的外源性多核苷酸。在这些情况下,植物和细胞产生重组多肽。在多肽的上下文中,术语“重组”是指由当由细胞产生的外源性多核苷酸编码的多肽,所述多核苷酸已经通过重组DNA或RNA技术,例如转化引入到细胞或祖细胞中。通常地,细胞包括导致要产生改变的量的多肽的非内源性基因。在一实施例中,“重组多肽”是通过在植物细胞中表达外源性(重组)多核苷酸而制备的多肽。

[0196] 多肽的同一性%通过GAP(Needleman和Wunsch,1970)分析(GCG程序)确定,其中空位产生罚分=5并且空位延伸罚分=0.3。查询序列的长度为至少300个氨基酸,并且GAP分析在至少300个氨基酸的区内比对两个序列。更优选地,查询序列的长度为至少325个氨基酸,并且GAP分析在至少335个氨基酸的区内比对两个序列。甚至更优选地,查询序列的长度为至少350个氨基酸,并且GAP分析在至少350个氨基酸的区内比对两个序列。甚至更优选地,GAP分析在其整个长度上比对两个序列。

[0197] 关于定义的多肽,应当理解,比上文提供的那些更高的同一性%数字将涵盖优选实施例。因此,在适用的情况下,根据最小同一性%数字,优选的是,多肽包括与相关指定的SEQ ID NO至少96%、更优选地至少97%、更优选地至少98%、更优选地至少99%、更优选地至少99.1%、更优选地至少99.2%、更优选地至少99.3%、更优选地至少99.4%、更优选地至少99.5%、更优选地至少99.6%、更优选地至少99.7%、更优选地至少99.8%并且甚至更优选地至少99.9%相同的氨基酸序列。

[0198] 本文定义的多肽的氨基酸序列突变体/变体,具体地FAD2-1和/或LOX3突变体/变体可以通过将适当的核苷酸变化引入到核酸中或通过体外合成期望的多肽来制备。此类突变体包含例如氨基酸序列内残基的缺失、插入或取代。可以进行缺失、插入和取代的组合以实现最终构建体,条件是最终肽产物具有期望的特性。优选的氨基酸序列突变体相对于参考多肽具有一个、两个、三个、四个或少于10个氨基酸变化。突变体/变体可以是N末端和/或C末端截短的。

[0199] 在一实施例中,与如缺乏前三个、四个、五个或六个N末端氨基酸等野生型序列相比,具有降低的活性的FAD2-1蛋白具有N末端截短。在一实施例中,突变体缺乏野生型FAD2-1蛋白的前六个氨基酸。在一实施例中,与如缺乏至少后100个、200个、300个、400个、500个、600个左右的C末端氨基酸等野生型序列相比,具有降低的活性,优选地不具有活性的LOX3蛋白具有C末端截短。在一实施例中,突变体缺乏野生型LOX3蛋白的后约500个C末端氨基酸。在一实施例中,经基因修饰的LOX3基因仅编码野生型LOX3蛋白的前约91个氨基酸。

[0200] 突变体(改变的)多肽可以使用本领域已知的任何技术来制备,例如使用定向进化、合理设计策略或诱变(参见下文)。使用本文所描述的技术可以容易地筛选源自突变/改变的DNA的产物,以确定当在如稻米等植物中表达时,是否赋予降低的FAD 2-1蛋白活性或

LOX3蛋白活性。例如,所述方法可以包括产生具有表达突变/改变的DNA的基因修饰的植物,并确定植物的谷粒的繁殖力和脂肪酸谱。

[0201] 在设计氨基酸序列突变体时,突变位点的位置和突变的性质将取决于要修饰的特性。突变位点可以单独或连续修饰,例如通过(1)首先用保守的氨基酸选择,并且然后根据获得的结果用更激进的选择进行取代;(2)使靶标残基缺失或(3)插入与定位位点相邻的其它残基。

[0202] 氨基酸序列缺失的范围通常为约1个至15个残基,更优选地约1个至10个残基,以及通常约1个至5个连续残基,但在敲除如LOX3等突变体的情况下可能甚至更大。

[0203] 取代突变体已经去除多肽分子中的至少一个氨基酸残基,并且在其位置中插入不同的残基。在期望维持某种活性的情况下,优选的是在相关蛋白质家族中高度保守的氨基酸定位处进行更保守的取代。保守取代的实例示出于表2中“示例性取代”标题下。

[0204] 表2.示例性取代。

[0205]

原始 残基	示例性 取代
Ala (A)	val; leu; ile; gly
Arg (R)	lys

[0206]

Asn (N)	gln; his
Asp (D)	glu
Cys (C)	ser
Gln (Q)	asn; his
Glu (E)	asp
Gly (G)	pro、ala
His (H)	asn; gln
Ile (I)	leu; val; ala
Leu (L)	ile; val; met; ala; phe
Lys (K)	arg
Met (M)	leu; phe
Phe (F)	leu; val; ala
Pro (P)	gly
Ser (S)	thr
Thr (T)	ser
Trp (W)	tyr
Tyr (Y)	trp; phe
Val (V)	ile; leu; met; phe; ala

[0207] 在一实施例中,当与天然存在的多肽相比时,突变体/变体多肽具有一个或两个或三个或四个保守氨基酸变化。表2中提供了保守氨基酸变化的详细信息。

[0208] 基于与密切相关多肽的比较,野生型多肽的初级氨基酸序列可以用于设计其变

体/突变体(例如,如图11和12所示)。本领域技术人员将会理解,在密切相关的蛋白质中高度保守的残基更有可能被改变,特别是用非保守取代,从而降低活性。

[0209] 在一实施例中,具有降低的活性的FATB1具有被LNHVKTCW(SEQ ID NO:42)替代的氨基酸序列LNHVKTAG(SEQ ID NO:41)。在一实施例中,具有降低的活性的FATB1具有被FLAAENSG(SEQ ID NO:44)或FLAAEKTV(SEQ ID NO:45)替代的氨基酸序列FLAAEKOW(SEQ ID NO:43)。在一实施例中,具有降低的活性的FATB1具有被FLAAENSG替代的氨基酸序列FLAAEKOW。

[0210] 在一实施例中,具有降低的活性的FATB2具有被MIRSYEDWC*(SEQ ID NO:47)替代的氨基酸序列MIRSYEIGAD(SEQ ID NO:46)。

[0211] 在一实施例中,具有降低的活性的FATB3具有被MIRSYEDWC*(SEQ ID NO:47)或MIRSYDWR*(SEQ ID NO:48)替代的氨基酸序列MIRSYEIGAD(SEQ ID NO:46)。在一实施例中,具有降低的活性的FATB3具有被MIRSYEDWC*替代的氨基酸序列MIRSYEIGAD。

[0212] 在一实施例中,具有降低的活性的FATB4具有被GLLGDFWL(SEQ ID NO:50)、GLLGDGFW(SEQ ID NO:51)、GLLGDFG(SEQ ID NO:52)或GLLFWLNA(SEQ ID NO:53)替代的氨基酸序列GLLGDGFG(SEQ ID NO:49)。在一实施例中,具有降低的活性的FATB4具有被GLLGDFWL(SEQ ID NO:50)替代的氨基酸序列GLLGDGFG(SEQ ID NO:49)。

[0213] 在一实施例中,FAD2-1敲除具有从N末端缺失的氨基酸序列MGAGGR(SEQ ID NO:54)。在一实施例中,FAD2-1敲除具有被Aa177'PYVYHTIG'aa184(SEQ ID NO:56)替代的氨基酸序列Aa177'PYVYHNPIG'aa185(SEQ ID NO:55)。在一实施例中,FAD2-1敲除具有从N末端缺失的氨基酸序列MGAGGR和被Aa177'PYVYHTIG'aa184替代的氨基酸序列Aa177'PYVYHNPIG'aa185。

[0214] 在一实施例中,本发明的谷粒、麸皮和/或植物对于以下是纯合的:

[0215] i)仅编码野生型LOX3蛋白的前约91个氨基酸的LOX3基因;

[0216] ii)编码在N末端处缺乏MGAGGR并且包括Aa177'PYVYHTIG'aa184的FAD2-1多肽的FAD2-1基因;

[0217] iii)编码以MIRSYEDWC*(SEQ ID NO:47)结尾的多肽的FATB2基因;

[0218] iv)编码以MIRSYEDWC*(SEQ ID NO:47)结尾的多肽的FATB3基因;以及

[0219] v)编码包括GLLGDFWL的多肽的FATB4基因。

[0220] 在一实施例中,本发明的谷粒、麸皮和/或植物对于以下是纯合的:

[0221] i)仅编码野生型LOX3蛋白的前约91个氨基酸的LOX3基因;

[0222] ii)编码在N末端处缺乏MGAGGR并且包括Aa177'PYVYHTIG'aa184的FAD2-1多肽的FAD2-1基因;

[0223] iii)编码包括FLAAENSG的多肽的FATB1基因;以及

[0224] iv)编码包括GLLGDFWL的多肽的FATB4基因。

[0225] 在一实施例中,谷粒、麸皮或植物具有野生型磷脂酶D(PLD)活性。

[0226] 定向进化

[0227] 在定向进化中,随机诱变应用于蛋白质,并且选择方案用于挑选出具有期望的品质的变体,例如降低的活性。然后应用另外轮次的突变和选择。典型的定向进化策略涉及三个步骤:

[0228] 1)多样化:编码所关注的蛋白质的基因被随机突变和/或重组,以产生大的基因变体文库。变体基因文库可以通过易错PCR构建(参见例如Leung,1989;Cadwell和Joyce,1992),从由亲本模板制备的DNaseI消化的片段池中(Stemmer,1994a;Stemmer,1994b;Crameri et al.,1998;Coco et等人,2001)从简并寡核苷酸(Ness等人,2002,Coco,2002)或从两者的混合物,或甚至从未消化的亲本模板(Zhao等人,1998;Eggert等人,2005;Jézéquek等人,2008)并且通常通过PCR组装。也可以通过同源或非同源重组从体内或体外重组的亲本序列制备文库(Ostermeier等人,1999;Volkov等人,1999;Sieber等人,2001)。变体基因文库也可以通过将所关注的基因亚克隆到合适的载体中,将载体转化到如大肠杆菌XL-1red(Stratagene公司(Stratagene))等"突变"菌株中,并将经转化的细菌繁殖合适的代数来构建。如Harayama(1998)广泛描述的,也可以通过对所关注的基因进行DNA改组(即,通过随机片段化和重组对选择的突变体基因进行体外同源重组)来构建变体基因文库。

[0229] 2)选择:使用筛选或选择来测试文库中的具有期望的性质的突变体(变体)的存在。筛选可以手工鉴定和分离高性能突变体,而选择可以自动消除所有无功能的突变体。筛选可以涉及筛选已知保守氨基酸基序的存在。可替代地或另外,筛选可以涉及在宿主生物体或其部分中表达经突变的多核苷酸,并测定活性水平。

[0230] 3)扩增:在选择或筛选中鉴定的变体被复制许多倍,使研究人员能够对其DNA进行测序,以便了解以及发生什么突变。

[0231] 这三个步骤统称为定向进化的"轮次"。大多数实验将需要多于一个轮次。在这些实验中,前一轮次的"获胜者"在下一轮次中被多样化以创建新的文库。在实验结束时,使用生物化学方法表征所有进化的蛋白质或多核苷酸突变体。

[0232] 合理设计

[0233] 基于已知的关于蛋白质结构和折叠信息,可以合理地设计蛋白质。这可以通过从头开始设计(从头设计)或基于天然支架的重新设计来实现(参见例如Hellinga,1997;以及Lu和Berry,《蛋白质结构设计与工程(Protein Structure Design and Engineering)》,《蛋白质手册(Handbook of Proteins)》2,1153-1157(2007))。蛋白质设计通常涉及鉴定折叠成给定或目标结构的序列,并且可以使用计算机模型来完成。计算蛋白质设计算法在序列构象空间中搜索当折叠到目标结构时能量低的序列。计算蛋白质设计算法使用蛋白质能量学模型来评估突变如何影响蛋白质的结构和功能。这些能量函数通常包括分子力学、统计学(即基于知识的)和其它经验术语的组合。合适的可用软件包含IPRO(迭代蛋白质重新设计和优化)、EGAD(蛋白质设计的遗传算法)、Rosetta设计、Sharpen和Abalone。

[0234] 多核苷酸和基因

[0235] 本发明是指各种多核苷酸。如本文所使用的,"多核苷酸"或"核酸"或"核酸分子"意指核苷酸的聚合物,其可以是DNA或RNA或其组合,并且包含基因组DNA、mRNA、cRNA和cDNA。不太优选的多核苷酸包含tRNA、siRNA、shRNA和hpRNA。其可以是细胞、基因组或合成来源的DNA或RNA,例如在自动合成仪上制备,并且可以与碳水化合物、脂质、蛋白质或其它物质组合,用荧光或其它基团标记,或与固相载体连接以进行本文所定义的特定活性,或包括一种或多种不存在于自然界中经修饰的核苷酸,这是本领域技术人员众所周知的。聚合物可以是单链、基本上双链或部分双链的。如本文所使用的碱基配对是指核苷酸之间的标准碱基配对,包含G:U碱基对。"互补"意指两种多核苷酸能够沿其长度的部分或沿一种或两

种的全长进行碱基配对(杂交)。术语“多核苷酸”在本文中可与术语“核酸”互换使用。本发明的优选多核苷酸编码本发明的多肽。

[0236] “分离的多核苷酸”意指如果多核苷酸存在于自然界中,通常已经从与所述多核苷酸的天然状态相关或连接的多核苷酸序列中分离的多核苷酸。优选地,如果存在于自然界中,则分离的多核苷酸至少90%不含与其天然相关的其它组分。优选地,多核苷酸不是天然存在的,例如通过以不存在于自然界中的方式与两个较短的多核苷酸序列共价接合(嵌合多核苷酸)。

[0237] 本发明可以涉及基因活性的修饰以及嵌合基因的构建和使用。如本文所使用的,术语“基因”包含包括蛋白质编码区或在细胞中转录但未翻译的任何脱氧核糖核苷酸序列,以及相关非编码和调节区。此类相关区通常位于编码区或转录区的5’端和3’端两者上附近,距任一端约2kb。在这方面,基因可以包含如启动子、增强子、终止和/或多腺苷酸化信号等与给定基因天然相关的控制信号或异源控制信号,在这种情况下,基因被称为“嵌合基因”。位于编码区的5’并且存在于mRNA上的序列被称为5’非翻译序列。位于编码区的3’或下游并且存在于mRNA上的序列被称为3’非翻译序列。术语“基因”涵盖cDNA和基因组形式的基因两者。

[0238] 含有转录区的基因的基因组形式或克隆可以用被称为“内含子”或“间插区”或“间插序列”的非编码序列中断,所述非编码序列可以与基因的“外显子”同源或异源。如本文所使用的,“内含子”是作为初级RNA转录物的部分被转录但不存在于成熟mRNA分子中的基因的片段。内含子被从核转录物或初级转录物中去除或“剪接掉”;因此内含子不存在于信使RNA(mRNA)中。内含子可能含有如增强子等调节元件。如本文所使用的“外显子”是指在RNA分子未被翻译的情况下,与成熟mRNA或成熟RNA分子中存在的RNA序列相对应的DNA区。mRNA在翻译期间起作用,以指定新生多肽中的氨基酸的序列或次序。术语“基因”包含编码本文所描述的本发明的蛋白质的全部或部分的合成或融合分子以及与上述任一种互补的核苷酸序列。可以将基因引入到适当的载体中以用于细胞中的染色体外维持,或者优选地用于整合到宿主基因组中。

[0239] 如本文所使用的,“嵌合基因”是指包括不在自然界中接合的共价接合的序列的任何基因。通常地,嵌合基因包括不一起存在于自然界中的调节和转录或蛋白质编码序列。因此,嵌合基因可以包括源自不同来源的调节序列和编码序列或源自相同来源但以与存在于自然界中的方式不同的方式布置的调节序列和编码序列。在一实施例中,蛋白质编码区与和所述基因异源的启动子或聚腺苷酸化/终止子区可操作地连接,由此形成嵌合基因。术语“内源性”在本文中是指在与所研究植物处于相同发育阶段的未经修饰的植物中通常存在或产生的物质。“内源性基因”是指在生物体的基因组中处于其自然位置的天然基因。如本文所使用的,“重组核酸分子”、“重组多核苷酸”或其变体是指已经通过重组DNA/RNA技术构建或修饰的核酸分子。术语“外来多核苷酸”或“外源性多核苷酸”或“异源多核苷酸”等是指通过实验操作引入到细胞的基因组中的任何核酸。

[0240] 外来或外源性基因可以是插入到非天然生物体或细胞中的基因、引入到天然宿主内的新位置中的天然基因或嵌合基因。可替代地,外来或外源性基因可以是编辑生物体或细胞的基因组或由其衍生的子代的结果。“转基因”是通过转化程序引入到基因组中的基因。

[0241] 此外,术语“外源性”在多核苷酸(核酸)的上下文中是指存在于不天然包括多核苷酸的细胞中的多核苷酸。

[0242] 多核苷酸的同一性%通过GAP(Needleman和Wunsch,1970)分析(GCG程序)确定,其中空位产生罚分=5并且空位延伸罚分=0.3。查询序列的长度为至少900个核苷酸,并且GAP分析在至少900个核苷酸的区内比对两个序列。优选地,查询序列的长度为至少975个核苷酸,并且GAP分析在至少975个核苷酸的区内比对两个序列。甚至更优选地,查询序列的长度为至少1,050个核苷酸,并且GAP分析在至少1,050个核苷酸的区内比对两个序列。甚至更优选地,GAP分析在其整个长度上比对两个序列。

[0243] 关于定义的多核苷酸,应当理解,比上文提供的那些更高的同一性%数字将涵盖优选的实施例。因此,在适用的情况下,根据最小同一性%数字,优选的是,多核苷酸包括与相关指定的SEQ ID NO至少50%、至少60%、更优选地至少70%、更优选地至少75%、更优选地至少80%、更优选地至少85%、更优选地至少90%、更优选地至少91%、更优选地至少92%、更优选地至少93%、更优选地至少94%、更优选地至少95%、更优选地至少96%、更优选地至少97%、更优选地至少98%、更优选地至少99%、更优选地至少99.1%、更优选地至少99.2%、更优选地至少99.3%、更优选地至少99.4%、更优选地至少99.5%、更优选地至少99.6%、更优选地至少99.7%、更优选地至少99.8%并且甚至更优选地至少99.9%相同的多核苷酸序列。

[0244] 本发明还涉及寡核苷酸的用途,例如在筛选本发明的多核苷酸或编码多肽的多核苷酸的方法中。如本文所使用的,“寡核苷酸”是长度至多50个核苷酸的多核苷酸。此类寡核苷酸的最小大小是在寡核苷酸与本发明的核酸分子上的互补序列之间形成稳定杂交体所需的大小。其可以是RNA、DNA,或者任一者的组合或衍生物。寡核苷酸通常是10至30个核苷酸的相对较短的单链分子,通常长度为15-25个核苷酸。当在扩增反应中用作用于基因组编辑的向导、探针或引物时,此类寡核苷酸的最小大小是在寡核苷酸与靶核酸分子上的互补序列之间形成稳定杂交体所需的大小。优选地,寡核苷酸的长度为至少15个核苷酸、更优选地至少18个核苷酸、更优选地至少19个核苷酸、更优选地至少20个核苷酸、更优选地至少22个核苷酸、甚至更优选地至少25个核苷酸。本发明的用作探针的寡核苷酸通常与如放射性同位素、酶、生物素、荧光分子或化学发光分子等标记缀合。

[0245] 如本领域技术人员所知,本文所描述的寡核苷酸引物的序列可以在一定程度上变化,而不影响其对本发明的方法的有用性。可用于本发明的方法的本文所公开的寡核苷酸的“变体”(根据其用途,本文也被称为“引物”或“探针”)包含不同大小的分子,和/或能够与接近本文所定义的特定寡核苷酸分子的基因组的基因组杂交的分子。例如,变体可以包括另外的核苷酸(如1、2、3、4个或更多)或更少的核苷酸,只要其仍然与靶区杂交即可。此外,可以在不影响寡核苷酸与靶区杂交的能力的情况下取代几个核苷酸。另外,可以容易地设计变体,所述变体杂交接近(例如但不限于50个核苷酸内或100个核苷酸内)本文所定义的特异性寡核苷酸杂交的基因组区。

[0246] 本发明包含寡核苷酸,所述寡核苷酸可以用作例如RNA导向的核酸内切酶的向导(参见,例如SEQ ID NO:30-37),鉴定核酸分子的探针,或产生核酸分子的引物。探针和/或引物可以用于从其它物种克隆本发明的多核苷酸的同源物。此外,本领域已知的杂交技术还可以用于筛选此类同源物的基因组或cDNA文库。

[0247] 当与天然存在的分子相比时,本发明的多核苷酸具有一种或多种基因修饰,所述一种或多种基因修饰是核苷酸残基的缺失、插入或取代。本发明的多核苷酸或寡核苷酸的变体包含不同大小的与本文所定义的参考多核苷酸分子或寡核苷酸分子的基因组接近的稻米(例如)基因组的分子和/或能够与所述稻米(例如)基因组杂交的分子。例如,变体可以包括另外的核苷酸(如1、2、3、4个或更多)或更少的核苷酸,只要其仍然与靶区杂交即可。此外,可以在不影响寡核苷酸与靶区杂交的能力的情况下取代几个核苷酸。另外,可以容易地设计变体,所述变体杂交接近例如50个核苷酸内,即本文所定义的特异性寡核苷酸杂交的植物基因组区。具体地,这包含编码相同多肽或氨基酸序列但核苷酸序列因基因密码的冗余而变化的多核苷酸。术语"多核苷酸变体"和"变体"还包含天然存在的等位基因变体。

[0248] 核酸构建体

[0249] 本发明包含包括本发明的多核苷酸的核酸构建体,以及含有这些多核苷酸的载体和宿主细胞,其产生和使用方法,以及其用途。本发明涉及可操作地连接(connected)或连接(linked)的元件。"可操作地连接(operably connected或operably linked)"等是指处于功能关系的多核苷酸元件的连接。通常,可操作地连接的核酸序列是连续连接的,并且在需要连接两个蛋白质编码区的情况下,是连续的并且处于阅读框中。当RNA聚合酶将两个编码序列转录成单个RNA时,编码序列与另一个编码序列"可操作地连接",如果所述单个RNA被翻译,则被翻译成具有源自两个编码序列的氨基酸的单个多肽。编码序列不需要彼此连续,只要表达的序列最终被加工以产生期望的蛋白质即可。

[0250] 如本文所使用的,术语"顺式作用序列"、"顺式作用元件"或"顺式调节区"或"调节区"或类似术语应被理解为任何核苷酸序列,当其相对于可表达的基因序列适当定位和连接时,其能够至少部分地调节基因序列的表达。本领域技术人员将意识到,顺式调节区可以能够以转录水平或转录后水平激活、沉默、增强、抑制或以其它方式改变基因序列的表达水平和/或细胞类型特异性和/或发育特异性。在本发明的优选实施例中,顺式作用序列是增强或刺激可表达基因序列的表达的激活因子序列。

[0251] 使启动子或增强子元件与可转录多核苷酸"可操作地连接"意味着将可转录多核苷酸(例如,编码蛋白质的多核苷酸或其它转录物)置于启动子的调节控制下,所述启动子随后控制所述多核苷酸的转录。在异源启动子/结构基因组合的构建中,通常优选的是,将启动子或其变体定位在距可转录多核苷酸的转录起始位点一定距离处,所述距离和所述启动子与其在其自然环境中控制的蛋白质编码区之间的距离大致相同;即衍生启动子的基因。如本领域已知的,可以在不损失功能的情况下适应该距离的一些变化。类似地,调节序列元件(例如,操作子、增强子等)相对于要置于其控制下的可转录多核苷酸的优选定位通过元件在其自然环境中的定位来定义;即衍生所述元件的基因。

[0252] 如本文所使用的,"启动子"或"启动子序列"是指基因区,通常位于RNA编码区的上游(5'),其控制所关注的细胞中的转录的启动和水平。"启动子"包含经典基因组基因的转录调节序列,如TATA-box和CCAAT-box序列,以及另外的调节元件(即,上游激活序列、增强子和沉默子),其对发育和/或环境刺激作出应答或以组织特异性或细胞类型特异性的方式来改变基因表达。启动子通常但不一定(例如,一些PolIII启动子)定位于结构基因上游,其调节所述结构基因的表达。此外,包括启动子的调节元件通常定位于基因转录的起始位点2kb内。启动子可以含有另外的位于起始位点的更远侧的特异性调节元件,以进一步增强细

胞中的表达,和/或改变与其可操作地连接的结构基因的表达的定时或诱导性。

[0253] “组成型启动子”是指在如植物等生物体的许多或所有组织中指导可操作地连接的转录序列的表达的启动子。如本文所使用的,术语组成型并不一定指示基因在所有细胞类型中以相同水平表达,而是基因在多种细胞类型中表达,尽管水平上的一些变化通常是可检测的。如本文所使用的,“选择性表达”是指几乎完全在例如植物的特定器官,例如胚乳、胚胎、叶、果实、块茎或根中表达。在优选实施例中,启动子选择性地或优先地在植物,优选地谷类植物的叶和/或茎中表达。因此,选择性表达可以与组成型表达形成对比,所述组成型表达是指在植物所经受的大部分或全部条件下在植物的许多或所有组织中的表达。

[0254] 选择性表达还可能导致基因表达产物在特定植物组织、器官或如成年或幼苗等发育阶段的区室化。特定的亚细胞位置,如质体、胞质溶胶、液泡或质外体空间中的区室化可以通过以下来实现:在基因产物的结构中包含适当的信号,例如信号肽,以运输到所需的细胞区室,或者在半自主细胞器(质体和线粒体)的情况下,将具有适当调节序列的转基因直接整合到细胞器基因组中。

[0255] “组织特异性启动子”或“器官特异性启动子”是这样的启动子,相对于许多其它组织或器官,优选地在例如植物中的大多数(如果不是所有的话)其它组织或器官,在一个组织或器官中优先表达。通常地,启动子在特定组织或器官中的表达水平是在其它组织或器官中的表达水平的10倍。

[0256] 本发明所设想的启动子对于要转化的宿主植物可以是天然的,或者可以源自替代性来源,其中区在宿主植物中具有功能。其它来源包含农杆菌属(Agrobacterium)T-DNA基因,如用于胭脂碱、章鱼碱(octopine)、甘露碱的生物合成的基因的启动子,或其它冠瘿碱启动子,组织特异性启动子(参见例如US 5,459,252和WO 91/13992);来自病毒(包含宿主特异性病毒)的启动子,或部分或完全合成的启动子。在单子叶和双子叶植物中有功能的许多启动子是本领域众所周知的(参见例如Greve,1983;Salomon等人,1984;Garfinkel等人,1983;Barker等人,1983);包含从植物和病毒中分离的各种启动子,如花椰菜花叶病毒启动子(CaMV 35S,19S)。用于评估启动子活性的非限制性方法由Medberry等人(1992和1993);Sambrook等人(1989,同上);以及US 5,164,316公开。

[0257] 可替代地或另外地,启动子可以是诱导型启动子或发育调节型启动子,其能够在例如植物的适当发育阶段驱动引入的多核苷酸的表达。可以采用的其它顺式作用序列包含转录和/或翻译增强子。增强子区是本领域技术人员众所周知的,并且可以包含ATG翻译起始密码子和相邻序列。当包含时,起始密码子应和与外来或外源性多核苷酸相关的编码序列的阅读框同相,以确保整个序列的翻译(如果要翻译的话)。翻译起始区可以由转录起始区的来源提供,或者由外来或外源性多核苷酸提供。序列还可以源自被选择用于驱动转录的启动子的来源,并且可以被特异性修饰以增加mRNA的翻译。

[0258] 本发明的核酸构建体可以包括约50至1,000个核苷酸碱基对的可以包含转录终止序列的3’非翻译序列。3’非翻译序列可以含有转录终止信号,所述转录终止信号可以包含或者可以不包含多腺苷酸化信号以及能够影响mRNA加工的任何其它调节信号。多腺苷酸化信号的作用是将多腺苷酸束添加到mRNA前体的3’端。尽管变化并不罕见,但是多腺苷酸化信号通常通过存在与规范形式5’AATAAA-3’的同源性来识别。不包含聚腺苷酸化信号的转录终止序列包含包括一系列四个或更多个胸苷的PolI或PolIII RNA聚合酶的终止子。合适

的3'非翻译序列的实例是含有来自根癌农杆菌(Agrobacterium tumefaciens)的章鱼碱合酶(octopine synthase,ocs)基因或胭脂碱合酶(nopaline synthase,nos)基因的聚腺苷酸化信号的3'转录非翻译区(Bevan等人,1983)。合适的3'非翻译序列还可以源自植物基因,如核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶(ssRUBISCO)基因,尽管本领域技术人员已知的其它3'元件也可以采用。

[0259] 由于转录起始位点与编码序列起点之间插入的DNA序列,即非翻译的5'前导序列(5'UTR),如果被翻译和转录,可能影响基因表达,因此也可以采用特定的前导序列。合适的前导序列包含那些包括被选择用于指导外来或内源性DNA序列的最佳表达的序列的前导序列。例如,此类前导序列包含优选的共有序列,所述优选的共有序列可以增加或维持mRNA稳定性并防止不适当的翻译起始,如例如Joshi(1987)所描述的。

[0260] 载体

[0261] 本发明包含载体用于操纵或转移基因构建体的用途。"载体"或"嵌合载体"意指核酸分子,优选地源自例如质粒、噬菌体或植物病毒的DNA分子,核酸序列可以插入或克隆到其中。载体优选地是双链DNA,并且含有一个或多个独特的限制性位点,并且可以能够在包含靶细胞或组织或其祖细胞或组织的限定宿主细胞中自主复制,或者能够整合到限定宿主的基因组中,使得克隆的序列是可复制的。因此,载体可以是自主复制的载体,即作为染色体外实体存在的载体,其复制独立于染色体复制,例如线性或闭合环状质粒、染色体外元件、微小染色体或人工染色体。载体可以含有任何确保自我复制的方式。可替代地,载体可以是这样一种载体,当引入到细胞中时,所述载体被整合到接受者细胞的基因组中,并与整合到其中的染色体一起复制。载体系统可以包括单个载体或质粒、一起含有要引入到宿主细胞的基因组或转座子中的总DNA的两个或更多个载体或质粒。载体的选择将通常取决于载体与要引入到载体中的细胞的相容性。载体还可以包含选择标志物,如抗生素抗性基因、除草剂抗性基因或可以用于选择合适转化体的其它基因。此类基因的实例是本领域技术人员众所周知的。

[0262] 本发明的核酸构建体可以引入到如质粒等载体中。质粒载体通常包含在原核和真核细胞中提供表达盒的容易选择、扩增和转化的另外的核酸序列,例如pUC衍生的载体、pSK衍生的载体,pGEM衍生的载体、pSP衍生的载体、pBS衍生的载体或者含有一个或多个T-DNA区的二元载体。另外的核酸序列包含用于提供载体自主复制的复制起点,优选地编码抗生素或除草剂抗性的可选择的标志物基因、提供多个位点以插入核酸构建体中编码的核酸序列或基因的独特多克隆位点,以及增强原核和真核(尤其是植物)细胞转化的序列。

[0263] "标志物基因"意指向表达标志物基因的细胞赋予不同表型并且因此允许此类经转化的细胞与没有标志物的细胞区别开来的基因。可选择标志物基因赋予一种性状,可以基于对选择剂(例如,除草剂、抗生素、辐射、热或其它损害未经转化的细胞的处理)的抗性"选择"所述性状。可筛选标志物基因(或报告基因)赋予一种可以通过观察或测试,即通过"筛选"鉴定的性状(例如,β-葡萄糖醛酸酶、荧光素酶、GFP或不存在于未经转化的细胞中的其它酶活性)。标志物基因和所关注的核苷酸序列不必连接。

[0264] 为了促进转化体的鉴定,核酸构建体期望地包括可选择或可筛选标志物基因作为外来或外源性多核苷酸或除此之外还包括外来或外源性多核苷酸。标志物的实际选择并不重要,只要所述标志物与所选植物细胞组合具有功能性(即,选择性)即可。标志物基因和所

关注的外来或外源性多核苷酸不必连接,因为如例如描述于US 4,399,216中的未连接基因的共转化也是植物转化中的高效过程。

[0265] 细菌可选择标志物的实例是赋予如氨苄青霉素、红霉素、氯霉素或四环素抗性等抗生素抗性,优选地卡那霉素抗性的标志物。用于选择植物转化体的示例性可选择标志物包含但不限于编码潮霉素B抗性的hyg基因;赋予针对卡那霉素、巴龙霉素、G418的抗性的新霉素磷酸转移酶(nptII)基因;来自大鼠肝脏的赋予针对谷胱甘肽衍生的除草剂的抗性的谷胱甘肽-S-转移酶基因,如例如EP 256223中所描述的;在过表达时赋予针对谷氨酰胺合成酶抑制剂,如草丁膦的抗性的谷氨酰胺合成酶基因,如例如WO 87/05327中所描述的;来自绿产色链霉菌(Streptomyces viridochromogenes)的赋予针对选择性剂草丁膦的抗性的乙酰转移酶基因,如例如EP 275957中所描述的;编码赋予针对N-膦酰基甲基甘氨酸的耐受性的5-烯醇式丙酮酰莽草酸-3-磷酸合酶(EPSPS)的基因,如例如Hinchee等人(1988)所描述的;赋予针对双丙氨膦的抗性的bar基因,如例如WO91/02071中所描述的;赋予针对溴草腈的抗性的腈水解酶基因,如来自臭鼻克雷伯菌(Klebsiella ozaenae)的bxn(Stalker等人,1988);赋予针对甲氨蝶呤的抗性的二氢叶酸还原酶(DHFR)基因(Thillet等人,1988);突变体乙酰乳酸合酶基因(ALS),其赋予针对咪唑啉酮、磺酰脲或其它ALS抑制化学物质的抗性(EP 154,204);赋予针对5-甲基色氨酸的抗性的经突变的邻氨基苯甲酸合酶基因;或赋予针对除草剂的抗性的茅草枯(dalapon)脱卤素酶基因。

[0266] 优选的可筛选标志物包含但不限于编码各种显色底物已知的β-葡萄糖醛酸酶(GUS)的uidA基因;编码显色底物已知的酶的β-半乳糖苷酶基因;绿松蛋白基因(Prasher等人,1985),其可用于钙敏感生物发光检测;绿色荧光蛋白基因或其衍生物;萤光素酶(luc)基因(Ow等人,1986),其允许生物发光检测;以及本领域已知的其它基因。如本说明书中所使用的,“报告分子”意指通过其化学性质提供分析可鉴定信号的分子,所述信号有助于通过参考蛋白质产物来确定启动子活性。

[0267] 优选地,核酸构建体稳定地并入到例如植物的基因组中。因此,核酸包括允许分子并入到基因组中的适当元件,或者将构建体置于可以并入到植物细胞的染色体中的适当载体中。

[0268] 本发明的一个实施例包含重组载体,所述重组载体包含至少一种本发明的多核苷酸分子,所述多核苷酸分子插入到能够将核酸分子递送到宿主细胞中的任何载体中。此类载体含有异源核酸序列,即非天然存在的与本发明的核酸分子相邻的核酸序列,并且优选地源自与衍生核酸分子的物种不同的物种。载体可以是RNA或DNA,也可以是原核或真核,并且通常是病毒或质粒。

[0269] 许多适于稳定转染植物细胞或适于建立经基因修饰的植物的载体已描述于以下中:例如Pouwels等人,《克隆载体:实验室手册(Cloning Vectors:A Laboratory Manual)》,1985,增刊1987;Weissbach和Weissbach,《用于植物分子生物学的方法(Methods for Plant Molecular Biology)》,学术出版社(Academic Press),1989;以及Gelvin等人,《植物分子生物学手册(Plant Molecular Biology Manual)》,克拉维尔科学出版社(Kluwer Academic Publishers),1990。通常地,植物表达载体包含例如在5’和3’调节序列的转录控制下的一个或多个克隆的植物基因和显性可选择标志物。此类植物表达载体还可以含有启动子调节区(例如,控制诱导型或组成型、环境调节或发育调节或细胞或组织特异

性表达的调节区)、转录起始开始位点、核糖体结合位点、RNA处理信号、转录终止位点和/或多腺苷酸化信号。

[0270] 重组细胞

[0271] 本发明的另一个实施例包含重组细胞,所述重组细胞包括用一种或多种本发明的重组分子转化的宿主细胞,或其子代细胞。核酸分子转化到细胞中可以通过将核酸分子插入到细胞中的任何方法来完成。转化技术包含但不限于转染、粒子轰击/生物射弹、电穿孔、显微注射、脂质转染、吸附和原生质体融合。在一实施例中,基因编辑用于使用例如靶向核酸酶如TALEN、Cpf1、MAD7和Cas9-CRISPR或由其衍生的经工程化的核酸酶转化靶细胞。

[0272] 重组细胞可以保持单细胞,或者可以生长成组织、器官或多细胞生物体。本发明的经转化的核酸分子可以保持在染色体外,或者可以以这种保留其表达能力的方式整合到经转化的(即,重组)细胞的染色体内的一个或多个位点中。优选的宿主细胞是植物细胞、更优选地谷类植物的细胞、更优选地稻米或高粱细胞并且甚至更优选地稻米细胞。

[0273] 基因组编辑

[0274] 核酸内切酶可以用于在基因组DNA中产生单链或双链断裂。真核细胞中的基因组DNA断裂使用非同源末接合(NHEJ)或同源定向修复(HDR)途径来修复。NHEJ可能导致不完全修复,从而导致不想要的突变,并且HDR可以通过使用外源提供的修复DNA模板实现精确的基因插入。CRISPR相关(Cas)蛋白已经受到了极大的关注,尽管转录激活子样效应子核酸酶(TALEN)和锌指核酸酶仍然有用,但CRISPR-Cas系统为基因组修饰提供了更简单、通用和更廉价的工具(Doudna和Charpentier,2014)。

[0275] 使用各种核酸酶或核酸酶的组合将CRISPR-Cas系统分类为三个主要的组。在1类CRISPR-Cas系统(I、III和IV型)中,效应子模块由多蛋白复合物组成,而2类系统(II、V和VI型)仅使用一种效应蛋白(Makarova等人,2015)。Cas包含与侧接CRISPR基因座偶联或接近或定位在其附近的基因。Haft等人(2005)提供了对Cas蛋白家族的综述。

[0276] 核酸酶由合成的小向导RNA(sgRNA或gRNA)引导,所述合成的小向导RNA可以包含或可以不包含tracRNA,从而将CRISPR-Cas系统简化为两个基因:核酸内切酶和sgRNA(Jinek等人2012)。sgRNA通常处于U3或U6小核RNA启动子的调节控制之下。sgRNA识别特异性基因和基因的用于靶向的部分。原间隔子相邻基序(PAM)与靶位点相邻,从而限制了基因组中的潜在CRISPR-Cas靶标的数量,尽管核酸酶的扩增也增加了PAM的可用数量。有许多网络工具可用于设计gRNA,包含CHOPCHOP(http://chopchop.cbu.uib.no)、CRISPR设计https://omictools.com/crispr-design-tool、E-CRISP http://www.e-crisp.org/E-CRISP/、Geneious或Benchling https://benchling.com/crispr。

[0277] CRISPR-Cas系统是迄今为止真核生物工作中最常用的系统,使用Cas9效应蛋白,通常使用RNA导向的酿脓链球菌(Streptococcus pyogenes)Cas9或多种植物物种中的优化序列变体(Luo等人,2016)。Luo等人(2016)总结了许多研究,其中基因已经成功靶向各种植物物种,从而在内源性基因开放阅读框和/或启动子中产生插入缺失和功能丧失突变体表型。由于植物细胞上的细胞壁,CRISPR-Cas机制向细胞中的递送和成功的转基因再生通常使用根癌农杆菌感染(Luo等人,2016)或质粒DNA粒子轰击或生物弹道递送。适用于谷类转化的载体包含pCXUNcas9(Sun等人,2016)或可从Addgene获得的pYLCRISPR/Cas9Pubi-H(Ma等人,2015,登录号KR029109.1)。

[0278] 替代性CRISPR-Cas系统是指含有核酸酶RuvC结构域但不含HNH结构域的效应子酶,所述效应子酶包含Cas12酶,所述Cas12酶包含Cas12a、Cas12b、Cas12f、Cpf1、C2c1、C2c3和经工程化的衍生物。Cpf1在PAM远侧定位处以交错的方式产生双链断裂,并且作为较小的核酸内切酶可以为某些物种提供优势(Begemann等人,2017)。其它CRISPR-Cas系统包含RNA导向的RNA酶,所述RNA导向的RNA酶包含Cas13、Cas13a(C2c2)、Cas13b、Cas13c。

[0279] 序列插入或整合

[0280] CRISPR-Cas系统可以与核酸序列的提供组合,以指导同源修复以将序列插入到基因组中。植物转基因的靶向基因组整合使转基因能够在同一基因座处连续添加。这种"顺式基因堆叠"将极大地简化随后的育种工作,其中所有转基因作为单一基因座遗传。当与靶位点的CRISPR/Cas9切割偶联时,转基因可以通过侧接序列同源性促进的同源定向修复整合到该基因座中。这种方法可以用于在没有连锁累赘的情况下快速引入新的等位基因,或者引入不天然存在的等位变体。

[0281] 切口酶

[0282] CRISPR-Cas II系统使用具有两个酶促切割结构域RuvC和HNH结构域的Cas9核酸酶。突变已被证明将双链切割改变为单链切割,并产生被称为切口酶或核酸酶失活的Cas9的技术变体。RuvC子结构域切割非互补DNA链,并且HNH子结构域切割与gRNA互补的DNA链。切口酶或核酸酶失活的Cas9保留由gRNA引导的DNA结合能力。子结构域中的突变是本领域已知的,例如具有D10A突变或H840A突变的化脓性链球菌(S.pyogenes)Cas9核酸酶。

[0283] 基因组碱基编辑或修饰

[0284] 已经通过将脱氨酶与Cas9结构域融合来创建碱基编辑器(WO 2018/086623)。通过融合,脱氨酶可以利用gRNA指导的序列靶向,通过DNA中胞苷的脱氨作用使靶向的胞苷(C)转化为尿嘧啶(U)。细胞的错配修复机制然后用T替代U。合适的胞苷脱氨酶可以包含APOBEC1脱氨酶、激活诱导的胞苷脱氨基酶(AID)、APOBEC3G和CDA1。进一步地,Cas9脱氨酶融合物可以是具有切口酶活性的经突变的Cas9以产生单链断裂。已经表明,切口酶蛋白在促进同源性定向修复方面可能更高效(Luo等人,2016)。

[0285] 无载体基因组编辑或基因组修饰

[0286] 最近,使用Cas9/sgRNA核糖核蛋白的无载体方法已被描述为成功减少脱靶事件。所述方法需要Cas9核糖核蛋白(RNP)的体外表达,所述RNP被转化到细胞或原生质体中,并且不依赖于Cas9被整合到宿主基因组中,由此减少与Cas9基因的随机整合相关的不期望的侧切。仅需要短的侧接序列就在体外形成稳定的Cas9和sgRNA稳定的核糖核蛋白。Woo等人(2015)产生了预组装的Cas9/sgRNA蛋白/RNA复合物,并将其引入到拟南芥、稻米、生菜和烟草的原生质体中,并在再生植物中观察到至多45%的靶向诱变频率。RNP和体外在包含双子叶植物(Woo等人,2015)和单子叶植物玉蜀黍(Svitashev等人,2016)以及小麦(Liang等人,2017)的几个物种中得到了证实。使用CRISPR-Cas 9体外转录物或核糖核蛋白对植物进行基因组编辑充分描述于Liang等人(2018)以及Larroude等人(2019)中。

[0287] 用于基因插入的方法

[0288] 可以用靶向整合位点的Cas9基因和sgRNA基因以及DNA修复模板轰击植物胚胎。DNA修复模板可以是合成的DNA片段或127-mer寡核苷酸,其中各自编码cDNA或所关注的基因。轰击的细胞在组织培养基上生长。使用CTAB DNA提取方法从愈伤组织或T0植物叶组织

中提取的DNA可以通过PCR进行分析以确认基因整合。如果pcr证实所关注的基因的存在,则选择T1植物。

[0289] 所述方法包括将被称为供体DNA和核酸内切酶的所关注的DNA序列引入到植物细胞中。核酸内切酶在靶位点处产生断裂,从而允许供体DNA的第一同源区和第二同源区与其对应的同源基因组区进行同源重组。切割的基因组DNA充当DNA序列的受体。供体与基因组之间的所得DNA交换导致供体DNA的所关注的多核苷酸整合到植物基因组中的靶位点中的链断裂中,由此改变原始靶位点并产生改变的基因组序列。

[0290] 供体DNA可以通过本领域已知的任何方式引入。例如,提供了具有靶位点的植物。供体DNA可以通过已知的转化方法提供给植物,包含农杆菌属介导的转化或生物弹道粒子轰击。RNA导向的Cas或Cpf1核酸内切酶在靶位点处切割,供体DNA插入到经转化的植物的基因组中。

[0291] 尽管同源重组在植物体细胞中发生的频率较低,但在所选核酸内切酶靶位点处引入双链断裂(DSB)似乎增加/刺激了这一过程。不断努力产生Cas,具体地Cas9和Cas12a/Cpf1、变体或如MAD7或Cms1等替代物可能会提高效率。

[0292] 经基因修饰的植物

[0293] 如本文所使用的术语“植物”作为名词是指全植物,并且是指植物界的任何成员,但作为形容词是指存在于植物中、从植物中获得、源自植物或与植物相关的任何物质,例如植物器官(例如,叶、茎、根、花)、单个细胞(例如,花粉)、种子、植物细胞等。生根发芽的小植株和发芽种子也包含在“植物”的含义中。如本文所使用的术语“植物部分”是指一种或多种从植物中获得的并且包括植物的基因组DNA的植物组织或器官。植物部分包含营养结构(例如,叶、茎)、根、花器官/结构、种子(包含胚胎、子叶和种皮)、植物组织(例如,维管组织、地面组织等)、细胞以及其子代。如本文所使用的术语“植物细胞”是指从植物中获得的或植物中的细胞,并且包含源自植物的原生质体或其它细胞、产生配子的细胞和再生成全植物的细胞。植物细胞可以是培养中的细胞。“植物组织”意指植物中或从植物中获得的分化组织(“外植体”),或源自未成熟或成熟胚胎、种子、根、芽、果实、块茎、花粉、如冠瘿瘤等肿瘤组织和如愈伤组织等培养中的各种形式的植物细胞聚集体的未分化组织。种子中或来自种子的示例性植物组织是子叶、胚胎和胚胎轴。因此,本发明包含植物和植物部分以及包括这些的产物。

[0294] 如本文所使用的,术语“种子”是指植物的“成熟种子”,所述成熟种子准备采集或已经从植物上采集,如通常在田间进行商业采集,或者是在受精之后并且在种子休眠建立之前和采集之前存在于植物中的“发育中的种子”。

[0295] 如本文所使用的“经基因修饰的植物”或其变体是指含有一种或多种基因变异的植物,如通过基因编辑引入的,在相同物种、品种或栽培变种的野生型植物中没有发现。

[0296] 设想用于本发明实践的植物包含单子叶植物和双子叶植物两者。靶标植物包含但不限于以下:谷类(例如,小麦、大麦、黑麦、燕麦、稻米、玉蜀黍、高粱和相关作物);葡萄;甜菜(糖甜菜和饲料甜菜);梨果、核果和无核小果(苹果、梨、李子、桃子、杏仁、樱桃、草莓、覆盆子和黑浆果);豆科植物(豆类、扁豆、豌豆、大豆);油料植物(油菜或其它芸苔、芥菜、罂粟、橄榄、向日葵、藏红花、亚麻、椰子、蓖麻油植物、可可豆、花生);黄瓜植物(葫芦、黄瓜、甜瓜);纤维植物(棉花、亚麻、大麻、黄麻);柑橘类水果(橙子、柠檬、柚子、橘子);蔬菜(菠菜、

生菜、芦笋、卷心菜、胡萝卜、洋葱、西红柿、土豆、辣椒);樟科(鳄梨、肉桂、樟脑);或植物,如玉蜀黍、烟草、坚果、咖啡、甘蔗、茶、藤本植物、啤酒花、草皮、香蕉和天然橡胶植物,以及观赏植物(花、灌木、阔叶树和如针叶树等常绿植物)。优选地,植物是谷类植物。在一实施例中,谷类植物是稻米植物或高粱植物。在一实施例中,谷类植物是稻米。在一实施例中,谷类植物是玉蜀黍。在一实施例中,谷类植物是黑小麦。在一实施例中,谷类植物是燕麦。在一实施例中,谷类植物是大麦。

[0297] 关于双子叶植物和其种子或麸皮,在相关的情况下,与谷类相关的实施例中的每个实施例也适用于本发明的双子叶植物。

[0298] 如本文所使用的,术语"稻米"指稻属(Genus Oryza)的任何物种,包含其祖先,以及其通过与其它物种杂交产生的子代。优选的是,植物是商业栽培的稻,例如水稻的品系或栽培变种或品种,或者适合于谷粒的商业生产。

[0299] 在一实施例中,经基因修饰的植物对于每一种和每一种已经引入的基因变异是纯合的,使得其子代不会针对期望的表型而分离。

[0300] 如本文所使用的,术语"与等基因植物相比"或类似短语是指等基因植物,或相对于经基因修饰的植物基本上是等基因植物,但没有基因变异。优选地,对应的等基因植物属于与所关注的经基因修饰的植物的祖先相同的栽培变种或品种。如本文所使用的"野生型"或"对应的"是指尚未根据本发明修饰的细胞、组织或植物。野生型或对应的细胞、组织或植物可以用作对照,以与如本文所描述的经修饰的细胞、组织或植物比较突变体/变体蛋白的表达水平或性状修饰的程度和性质。

[0301] 如本发明的上下文中所定义的,经基因修饰的植物包含已经使用重组技术经基因修饰的植物的子代,其中子代包括所关注的基因变异。此类子代可以通过初级经基因修饰的植物的自身受精或通过将此类植物与同一物种的另一种植物杂交来获得。这通常是为了调节期望的植物或植物器官中的至少一种本文所定义的蛋白质的产生。经基因修饰的植物部分包含所述植物的包括基因变异的所有部分和细胞,例如培养的组织、愈伤组织和原生质体。

[0302] 如本发明的上下文中所定义的,经基因修饰的植物包含已经使用重组技术经基因修饰以在期望的植物或植物器官中产生至少一种如本文所定义的多肽的植物(以及所述植物的部分和细胞)和其子代。经基因修饰的植物可以使用本领域已知的技术产生,如通常描述于以下文献中的技术:A.Slater等人,《植物生物技术-植物的基因操纵(Plant Biotechnology-The Genetic Manipulation of Plants)》,牛津大学出版社(Oxford University Press)(2003);N.G.Halford,《作物技术:基因修饰和基因组编辑(Crop Technology:Genetic Modification and genome editing)》,世界科技出版私人有限公司(World Scientific Publ Co Pte Ltd)(2018);以及P.Christou和H.Klee,《植物生物学手册(Handbook of Plant Biotechnology)》,John Wiley和Sons(2004)。

[0303] 在一实施例中,经基因修饰的植物对于每一种和每一种已经引入的基因修饰是纯合的,使得其子代不会针对期望的表型而分离。经基因修饰的植物对引入的基因修饰也可以是杂合的,例如在由杂交种子生长的F1子代中。此类植物可以提供本领域众所周知的优势,如杂交活力。

[0304] 已经描述了用于将基因直接递送到细胞中的四种通用方法:(1)化学方法(Graham

等人,1973);(2)物理方法,如显微注射(Capecchi,1980);电穿孔(参见例如WO 87/06614;US 5,472,869、5,384,253;WO 92/09696和WO 93/21335);以及基因枪(参见例如US 4,945,050和US 5,141,131);(3)病毒载体(Clapp,1993;Lu等人,1993;Eglitis等人,1988);以及(4)受体介导的机制(Curiel等人,1992;Wagner等人,1992)。

[0305] 可以使用的加速方法包含例如微弹轰击等。用于将转化核酸分子递送到植物细胞的方法的一个实例是微弹轰击。该方法已综述于Yang等人,《用于基因转移的粒子轰击技术(Particle Bombardment Technology for Gene Transfer)》,英国牛津的牛津出版社(Oxford Press,Oxford,England)(1994)中。可以用核酸涂覆并通过推进力递送到细胞中的非生物粒子(微粒)。示例性粒子包含包括钨、金、铂等粒子。除了作为可复制转化单子叶植物的有效方式之外,微弹轰击的特别优势在于既不需要原生质体的分离,也不需要农杆菌属感染的易感性。适用于本发明的粒子递送系统是可从伯乐实验室(Bio-Rad Laboratories)获得的氦加速PDS-1000/He枪。对于轰击,可以将未成熟胚胎或衍生的靶细胞,如来自未成熟胚胎的盾叶或愈伤组织布置在固体培养基上。

[0306] 在另一替代性实施例中,质体可以被稳定地转化。所公开的用于高等植物中质体转化的方法包含含有选择性标志物的DNA的粒子枪递送和通过同源重组将DNA靶向质体基因组(US 5,451,513;US 5,545,818;US 5,877,402;US 5,932479和WO 99/05265)。

[0307] 农杆菌属介导的转移是广泛应用的将基因引入到植物细胞中的系统,因为DNA可以被引入到整个植物组织中,由此绕过了由原生质体再生完整植物的需要。使用农杆菌属介导的植物整合载体将DNA引入到植物细胞中是本领域众所周知的(参见例如US5,177,010;US 5,104,310;US 5,004,863;US 5,159,135)。进一步地,T-DNA的整合是相对精确的导致很少的重排的过程。要转移的DNA区由边界序列定义,并且间插的DNA通常插入到植物基因组中。

[0308] 农杆菌属转化载体能够在大肠杆菌以及农杆菌属中复制,允许方便的操作,如所描述的(Klee等人,《植物DNA感染剂(Plant DNA Infectious Agents)》,Hohn和Schell,(编辑),Springer-Verlag,纽约的斯普林格出版社(Springer-Verlag,New York),(1985):179-203)。此外,用于农杆菌属介导的基因转移的载体的技术进步已经改进了载体中的基因和限制性位点的排列,以促进能够表达各种多肽编码基因的载体的构建。所描述的载体具有方便的多接头区,所述多接头区侧接启动子和聚腺苷酸化位点,用于直接表达插入的多肽编码基因并且适用于本发明的目的。另外,含有武装和去武装Ti基因两者的农杆菌属可以用于转化。在那些农杆菌属介导的转化高效的植物品种中,由于基因转移的容易和定义的性质,其是选择的方法。

[0309] 使用农杆菌属转化方法形成的经基因修饰的植物通常在一条染色体上含有单个基因基因座。此类经基因修饰的植物针对所添加的基因可以被称为半合子。更优选的是对所添加的结构基因是纯合的经基因修饰的植物;即含有两个所添加的基因的经基因修饰的植物,一个基因位于染色体对的每个染色体上的同一基因座处。纯合经基因修饰的植物可以通过对含有单个添加基因的独立的分离体经基因修饰的植物进行性交配(自交),使产生的一些种子发芽,并分析所得植物的所关注的基因来获得。

[0310] 还应当理解,两种不同的经基因修饰的植物也可以交配/杂交以产生含有两种独立分离的外源性基因的后代。适当子代的自交可以产生两种外源性基因是纯合的植物。与

营养繁殖一样,也可以设想与亲本植物的回交和与未经基因修饰的植物的远交。对通常用于不同性状和作物的其它育种方法的描述可以在Fehr,《栽培变种开发的育种方法(Breeding Methods for Cultivar Development)》,J.Wilcox(编辑)威斯康星州麦迪逊市的美国农学学会(American Society of Agronomy,Madison Wis.)(1987)中找到。

[0311] 使用基于磷酸钙沉淀、聚乙二醇处理、电穿孔和这些处理的组合的方法可以实现植物原生质体的转化。这些系统在不同植物品种上的应用取决于从原生质体再生特定植物品系的能力。描述了从原生质体再生谷类的说明性方法(Fujimura等人,1985;Toriyama等人,1986;Abdullah等人,1986)。

[0312] 还可以使用其它细胞转化方法,并且包含但不限于通过以下将如DNA等多核苷酸引入到植物中:直接转移到花粉中、将如DNA等多核苷酸注射到植物的生殖器官中或将如DNA等多核苷酸直接注射到未成熟胚胎的细胞中,然后再对干燥的胚胎进行再水合。

[0313] 由单个植物原生质体转化体或由各种经转化的外植体再生、发育和培养植物在本领域是众所周知的(Weissbach等人,《用于植物分子生物学的方法》,圣地亚哥学术出版社(Academic Press,San Diego),(1988))。这种再生和生长过程通常包含选择经转化的细胞的步骤,通过胚胎发育的通常阶段到生根的小植株阶段培养这些个体化细胞。经基因修饰的胚胎和种子类似地再生。此后将所得经基因修饰的生根芽种植在如土壤等适当的植物生长培养基中。

[0314] 含有外来、外源性基因的植物的发育或再生在本领域是众所周知的。优选地,再生植物是自花授粉的,以提供纯合的经基因修饰的植物。否则,从再生植物中获得的花粉被杂交到具有农艺学上重要的株系的种子植物中。相反,来自这些重要株系植物的花粉用于为再生植物授粉。使用本领域技术人员众所周知的方法培养本发明的含有期望的基因修饰的经基因修饰的植物。

[0315] 主要通过使用根癌农杆菌转化双子叶植物并获得经基因修饰的植物的方法已经针对以下公开:棉花(US 5,004,863、US 5,159,135、US 5,518,908);大豆(US 5,569,834、US 5,416,011);芸苔(US 5,463,174);花生(Cheng等人,1996);以及豌豆(Grant等人,1995)。

[0316] 用于通过引入外源性核酸将基因变异引入到植物中以及从原生质体或未成熟植物胚胎再生植物的如小麦和大麦等谷类植物的转化方法在本领域是众所周知的,参见例如CA 2,092,588、AU 61781/94、AU 667939、US 6,100,447、WO 97/048814、US 5,589,617、US 6,541,257,以及WO 99/14314中列出的其它方法。优选地,通过根癌农杆菌介导的转化程序产生经基因修饰的小麦或大麦植物。携带期望的核酸构建体的载体可以被引入到组织培养植物或外植体的可再生小麦细胞,或如原生质体等合适的植物系统中。可再生小麦细胞优选地来自未成熟胚胎的盾片、成熟胚胎、源自这些胚胎的愈伤组织或分生组织。

[0317] 为了确认基因变异存在于经基因修饰的细胞和植物中,可以使用本领域技术人员已知的方法进行聚合酶链式反应(PCR)扩增或Southern印迹分析。经基因修饰的基因的表达产物可以根据产物的性质以多种方式中的任一种检测,并且包含蛋白质印迹和酶测定。定量蛋白质表达和检测不同植物组织中的复制的一种特别有用的方式是使用如GUS等报告基因。一旦已经获得了经基因修饰的植物,就可以使其生长以产生具有期望的表型的植物组织或部分。可以采集植物组织或植物部分和/或收集种子。种子可以用作生长具有期望的

特性的组织或部分的另外的植物的来源。

[0318] 标志物辅助选择

[0319] 标志物辅助选择是一种公认的选择杂合植物的方法,在经典育种计划中,当与轮回亲本回交时需要所述杂合植物。每个回交世代中的植物群体对通常以1:1比率存在于回交群体中的所关注的基因来说将是杂合的,并且分子标志物可以用于区分基因的两个等位基因。通过例如从幼芽中提取DNA,并用渗入的理想性状的特定标志物进行测试,可以提前选择植物进行另外的回交,同时将能量和资源集中在更少的植物上。为了进一步加快回交程序,来自未成熟种子(开花后25天)的胚胎可以切除,并在无菌条件下在营养培养基上生长,而不是使种子完全成熟。

[0320] 本领域已知的任何分子生物学技术都可以用于本发明的方法中。此类方法包含但不限于使用核酸扩增、核酸测序、用适当标记的探针进行核酸杂交、单链构象分析(SSCA)、变性梯度凝胶电泳(DGGE)、异源双链体分析(HET)、化学切割分析(CCM)、催化核酸切割或其组合(参见例如Lemieux,2000;Langridge等人,2001)。本发明还包含使用分子标志物技术来检测与(例如)赋予降低的活性的FAD 2-1基因或LOX3基因的等位基因相关的多态性。此类方法包含检测或分析限制性片段长度多态性(RFLP)、RAPD、扩增片段长度多态性(AFLP)和微卫星(简单序列重复序列,SSR)多态性。紧密连接的标志物可以通过本领域众所周知的方法容易地获得,如集团分离分析法(Bulked Segregant Analysis),如综述于Langridge等人(2001)中。

[0321] 在一实施例中,用于标志物辅助选择的连接基因座与编码本发明的多肽的基因相距至少1cM、或0.5cM、或0.1cM或0.01cM。

[0322] “聚合酶链式反应”(“PCR”)是一种反应,在所述反应中使用由“上游”和“下游”引物组成的“一对引物”或“一组引物”,以及如DNA聚合酶等聚合催化剂,并且通常是热稳定聚合酶,由靶多核苷酸制备复制副本。用于PCR的方法在本领域已知,并且例如在“PCR”(M.J.McPherson和S.G Moller(编辑),牛津BIOS科学出版社有限公司(BIOS Scientific Publishers Ltd,Oxford),(2000))中教导。可以对从逆转录mRNA获得的cDNA进行PCR,所述逆转录mRNA从表达FAD 2-1基因和/或LOX3基因的植物细胞分离,所述基因赋予植物改变的谷粒脂肪酸含量。然而,如果对从植物中分离的基因组DNA进行PCR,通常会更容易。

[0323] 引物是一种能够以序列特异性的方式与靶序列杂交并在PCR期间延伸的寡核苷酸序列。扩增子或PCR产物或PCR片段或扩增产物是包括引物和新合成的靶序列的拷贝的延伸产物。多重PCR系统含有同时产生多于一个扩增子的多组引物。引物可以与靶序列完全匹配,或者可以含有可能导致在特异性靶序列中引入限制性酶或催化核酸识别/切割位点的内部错配的碱基。引物还可以含有另外的序列和/或含有经修饰或经标记的核苷酸,以有助于扩增子的捕获或检测。DNA的热变性、引物退火到其互补序列以及用聚合酶延伸退火的引物的重复循环导致靶序列的指数扩增。术语靶标或靶序列或模板是指被扩增的核酸序列。

[0324] 用于核苷酸序列的直接测序的方法是本领域技术人员众所周知的,并且可以在例如Ausubel等人(同上)和Sambrook等人(同上)中找到。可以通过任何合适的方法进行测序,例如,双脱氧测序、化学测序或其变化。直接测序的优势在于确定特定序列的任何碱基对中的变异。

[0325] TILLING

[0326] 本发明的植物可以使用被称为TILLING(基因组中靶向诱导的局部损伤)的方法产生。第一步,通过用化学诱变剂处理种子(或花粉),在植物群体中诱导引入的突变,如新型单个碱基对变化,并且然后将植物推进到突变稳定遗传的一代。DNA是提取的,并且种子由群体的所有成员储存,以创建可以随时间的推移重复访问的资源。

[0327] 对于TILLING测定,PCR引物被设计成特异性扩增所关注的单个基因靶标。如果靶标是基因家族的成员或多倍体基因组的部分,则特异性尤其重要。接下来,染料标记的引物可以用于从多个个体的汇集的DNA中扩增PCR产物。这些PCR产物被变性并再退火以允许形成错配的碱基对。错配或异源双链体既表示天然存在的单个核苷酸多态性(SNP)(即,来自群体的几种植物可能携带相同的多态性),也表示诱导的SNP(即仅罕见的单独植物可能显示突变)。在异源双链体形成后,使用识别并切割错配的DNA的核酸内切酶,如Cel I是在TILLING群体中发现新型SNP的关键。

[0328] 使用这种方法,可以筛选成千上万的植物,以鉴定基因组的任何基因或特异性区中的具有单个碱基变化以及小插入或缺失(1-30bp)的任何个体。被测定的基因组片段的大小可以在0.3kb至1.6kb的任何范围内。在8倍池化、1.4kb片段(忽略SNP检测因噪声而有问题的片段末端)和每次测定96个泳道的情况下,这种组合允许每次单个测定筛选至多一百万个碱基对的基因组DNA,从而使TILLING成为一种高通量技术。

[0329] TILLING进一步描述于Slade和Knauf(2005)以及Henikoff等人(2004)中。

[0330] 除了能够高效检测突变之外,高通量TILLING技术是检测自然多态性的理想技术。因此,通过异源双链到已知序列来询问未知同源DNA揭示了多态位点的数量和定位。核苷酸变化和小插入和缺失两者均被鉴定出来,包含至少一些重复数多态性。这被称为Ecotilling(Comai等人,2004)。

[0331] 每个SNP通过其在几个核苷酸内的近似定位进行记录。因此,每个单倍型都可以基于其移动性进行存档。使用用于错配切割测定的相同扩增的DNA的等分试样,可以以相对较小的增量努力获得序列数据。单个反应的左或右测序引物是根据其与多态性的接近程度来选择的。测序仪软件进行多重比对并发现碱基变化,这在每种情况下都证实了凝胶带。

[0332] 与目前用于大多数SNP发现的全测序方法相比,Ecotilling可以更廉价地进行。可以筛选含有排列的生态型DNA的板,而不是来自经诱变的植物的DNA池。由于检测是在具有几乎碱基对分辨率的凝胶上进行的,并且背景图案跨泳道均匀,可以匹配大小相同的条带,因此在单个步骤中发现SNP并对其进行基因分型。以这种方式,SNP的最终测序是简单且高效的,更重要的是用于筛选的相同PCR产物的等分试样可以进行DNA测序。

[0333] 植物/谷粒加工

[0334] 本发明的谷粒/种子,优选地谷粒,并且更优选地稻米或高粱谷粒或本发明的其它植物部分可以使用本领域已知的任何技术进行加工以产生食物成分、食物或非食物产品。

[0335] 本领域常规实践的技术可以用于提取、加工和分析由本发明的细胞、植物、种子、麸皮等产生的油。通常,植物种子经过烹饪、压榨和提取以产生原油,然后对所述原油进行脱胶、精炼、漂白和除臭。稻米通常被研磨以去除壳,并被抛光以从白米中去除麸皮层。通常,用于粉碎种子和麸皮的技术是本领域已知的。例如,种子可以通过用水喷洒来调温,以将水分含量提高至例如8.5%,并使用间隙设定为0.23至0.27mm的光滑辊来进行薄片化。根据种子的类型,在粉碎之前可能不添加水。稻米麸皮可以通过蒸汽在100℃或以上加热。加

热使酶失活,促进细胞进一步破裂,使油滴聚结,并使蛋白质颗粒聚集,所有这些都有利于提取过程。

[0336] 稻米麸皮在稻米研磨期间分离。通常可以通过加热或辐射来稳定麸皮,并且然后使用如所描述的化学和/或物理方法回收稻米麸皮油。关于稻米麸皮和稻米麸皮油的综述,参见《稻米麸皮和稻米麸皮油化学、加工和利用(Rice Bran and Rice Bran Oil Chemistry,Processing and Utilization)》AOCS出版社(AOCS Press),(2019)编辑:Ling-Zhi Cheong,Xuebing Xu,ISBN 9780128128282。脱脂稻米麸皮提供了适合人类食物和动物饲料的营养丰富的膳食。可以进行进一步加工以从稻米麸皮油或膳食中分离出有价值的脂肪酸、淀粉或植酸盐。可替代地,稻米麸皮可以发酵。

[0337] 在实施例中,大部分油通过螺旋压机被释放。然后例如用己烷,使用伴热柱对从螺旋压机排出的滤饼进行溶剂提取。可替代地,通过压榨操作产生的原油可以通过具有开槽金属丝排水顶部的沉降罐,以去除在压榨操作期间与油一起挤出的固体。澄清的油可以通过板和框过滤器以去除任何残留的精细固体颗粒。如果需要,从提取过程中回收的油可以与澄清的油混合以产生共混原油。

[0338] 一旦从原油中汽提了溶剂,将压榨和提取的部分组合,并进行正常的油加工程序。如本文所使用的,当与本发明的油结合使用时,术语“经纯化的”通常意指提取的脂质或油已经经受一个或多个增加脂质/油组分的纯度的加工步骤。例如,纯化步骤可以包括由以下组成的组中的一项或多项或全部:对提取的油脱胶、除臭、脱色、干燥和/或进行分级分离。

[0339] 脱胶是提炼油的早期步骤,并且其主要目的是从油中去除大部分磷脂,所述磷脂可以占总提取的脂质的大约1-2%而存在。在70-80℃下向原油中添加通常含有磷酸的约2%的水导致大部分磷脂分离,伴有痕量金属和颜料。去除的不溶性材料主要是磷脂和三酰甘油的混合物,并且也称为卵磷脂。脱胶可以通过将浓磷酸添加到粗籽油中以将不可水合的磷脂转化为可水合的形式,并且螯合存在的微量金属。通过离心将胶与土壤分离。

[0340] 碱炼是用于处理原油的精炼工艺之一,有时也称为中和。所述碱炼通常在脱胶之后和漂白之前。在脱胶之后,可以通过添加足量的碱溶液以滴定所有的脂肪酸和磷酸并且去除由此形成的肥皂来处理油。合适的碱性材料包含氢氧化钠、氢氧化钾、碳酸钠、氢氧化锂、氢氧化钙、碳酸钙和氢氧化铵。此过程通常在室温下进行并且去除游离脂肪酸级分。通过离心或通过提取到肥皂的溶剂中来去除肥皂,并且用水洗涤中和的油。如果需要,油中任何过量的碱可以用如盐酸或硫酸等合适的酸中和。

[0341] 漂白是一种精炼工艺,其中通过使用氮气或蒸汽或在真空中操作,在存在漂白土(0.2-2.0%)和不存在氧气的情况下,将油在90-120℃下加热持续10-30分钟。油加工中的这一步骤旨在去除不需要的颜料(类胡萝卜素、叶绿素、棉酚等),并且所述过程还去除氧化产物、痕量金属、硫化合物和痕量肥皂。

[0342] 除臭是在高温(200-260℃)和低压(0.1-1mm Hg)下对油和脂肪进行处理。这通常通过以约0.1毫升/分钟/100毫升油的速率将蒸汽引入到油中来实现。在喷射约30分钟后,使油在真空下冷却。通常将油转移到玻璃容器中并且用氩气冲洗,然后在冷藏下储存。这种处理改善了油的颜色并且去除了大部分挥发性物质或有气味的化合物,包含任何剩余的游离脂肪酸、单酰基甘油和氧化产物。

[0343] 冬化是有时在油的商业生产中使用的方法,用于通过在低于环境温度下结晶将油

和脂肪分离成固体(硬脂)和液体(油精)级分。其最初用于棉籽油以产生无固体产物。其通常用于降低油的饱和脂肪酸含量。

[0344] 酯交换是在TAG内与其之间交换脂肪酸或将脂肪酸转移到另一种醇中以形成酯的过程,最初通过从TAG中释放脂肪酸作为游离脂肪酸或脂肪酸酯,通常是脂肪酸甲酯或乙酯。当与分级分离过程相结合时,酯交换可以用于改变脂质的脂肪酸组成。酯交换可以使用化学(例如,强酸或碱催化)或酶促方法,后者使用脂肪酶,所述脂肪酶可以对TAG上脂肪酸具有位置特异性(sn-1/3或sn-2特异性)或偏爱一些脂肪酸而不是其它脂肪酸。增加油中LC-PUFA浓度的脂肪酸分级分离可以通过本领域已知的方法中的任何方法实现,例如冷冻结晶、使用尿素形成复合物、分子蒸馏、超临界流体提取和银离子络合。使用尿素形成复合物是一种优选的方法,因为其简单并且有效地降低了油中饱和和单不饱和脂肪酸的水平。最初,通过在酸或碱催化的反应条件下水解,油的TAG被分解成其成分脂肪酸,通常呈脂肪酸酯的形式,由此一mol的TAG与至少3mol的醇(例如,用于乙酯的乙醇或用于甲酯的甲醇)反应,其中过量的醇用于使形成的烷基酯和还形成的甘油能够分离或通过脂肪酶分离。脂肪酸组成通常不会通过处理而改变的这些游离脂肪酸或脂肪酸酯然后可以与尿素的乙醇溶液混合以形成复合物。

[0345] 在一个实施例中,产物是全谷粒面粉,例如超细研磨的全谷粒面粉或由约100%的谷粒制备的面粉。全谷粒面粉包含精制面粉成分(精制面粉或精制面粉)和粗粒级分(超细研磨的粗粒级分)。

[0346] 精制面粉可以是例如通过研磨和筛干净的如稻米或高粱谷粒等谷粒而制备的面粉。精制面粉的粒度被描述为其中不少于98%的面粉通过开口不大于编织金属丝布的指定为“212微米(U.S.金属丝70)”的开口的布的面粉。粗粒级分包含以下中的至少一种:麸皮和胚芽。例如,胚芽是存在于谷粒核中的胚胎植物。胚芽包含脂质、纤维、维生素、蛋白质、矿物质和如类黄酮等植物营养素。麸皮包含几个细胞层,并且具有大量的脂质、纤维、维生素、蛋白质、矿物质和如类黄酮等植物营养素。进一步地,粗粒级分可以包含糊粉层,所述糊粉层还包含脂质、纤维、维生素、蛋白质、矿物质和如类黄酮等植物营养素。虽然在技术上被认为是胚乳的部分,但糊粉层表现出与麸皮相同的许多特性,并且因此通常在研磨期间与麸皮和胚芽一起被去除。糊粉层含有蛋白质、维生素和如阿魏酸等植物营养素。

[0347] 进一步地,粗粒级分可以与精制面粉成分共混。粗粒级分可以与精制面粉成分混合以形成全谷粒面粉,因此提供营养价值、纤维含量和抗氧化能力相较于精制面粉的营养价值、纤维含量和抗氧化能力增加的全谷粒面粉。例如,在烘焙商品、小吃产品和食物产品中,粗粒级分或全谷粒面粉可以以各种量用于替代精制面粉或全谷粒面粉。本发明的全谷粒面粉(即超细研磨的全谷粒面粉)也可以直接向消费者销售,以用于其自制的烘焙产品。在示例性实施例中,全谷粒面粉的造粒谱使得全谷粒面粉的98重量%的颗粒小于212微米。

[0348] 在另外的实施例中,使存在于全谷粒面粉和/或粗粒级分中的麸皮和胚芽内的酶失活,以使全谷粒面粉和/或粗粒级分稳定。稳定是使用蒸汽、加热、辐射或其它处理来使存在于麸皮和胚芽层中的酶失活的过程。经过稳定处理的面粉保留了其烹饪特性,并且保质期更长。

[0349] 在另外的实施例中,全谷粒面粉、粗粒级分或精制面粉可以是食物产品的组分(成分),并且可以用于产生食物产品。例如,食物产品可以是百吉饼、饼干、面包、小圆面包、羊

角面包、饺子、英式松饼、松饼、皮塔面包、快速面包、冷藏/冷冻面团产品、面团、烤豆、墨西哥卷饼、辣椒、玉米卷、玉米粉蒸肉、玉米粉圆饼、盖饼、即食谷类、即食餐、馅料、微波餐、布朗尼、蛋糕、芝士蛋糕、咖啡蛋糕、曲奇饼、甜点、糕点、甜卷饼、糖果棒、派皮、饼馅、婴儿食物、烘焙混合物、面糊、面包屑、肉汁混合物、肉类增量剂、肉类替代品、调味品混合物、汤混合物、肉汁、油面酱、沙拉酱、汤、酸奶油、面条、意大利面、拉面、炒面、捞面、冰淇淋包、冰淇淋棒、冰淇淋甜筒、冰淇淋三明治、薄脆饼干、烤面包丁、甜甜圈、蛋卷、挤压零食、水果和谷粒棒、微波小吃产品、营养棒、煎饼、半烘焙面包产品、脆饼干、布丁、格兰诺拉麦片制品、小吃薯片、小吃食物、小吃混合物、华夫饼、披萨饼皮、动物食物或宠物食物。

[0350] 在替代性实施例中,全谷粒面粉、精制面粉或粗粒级分可以是营养补充剂的组分。例如,营养补充剂可以是添加到饮食中的含有一种或多种另外成分的产品,通常包含:维生素、矿物质、香草、氨基酸、酶、抗氧化剂、香草、香料、益生菌、提取物、益生元和纤维。本发明的全谷粒面粉、精制面粉或粗粒级分包含维生素、矿物质、氨基酸、酶和纤维。例如,粗粒级分含有大量的膳食纤维以及其它必需营养素,如B族维生素、硒、铬、锰、镁和抗氧化剂,这些对健康饮食至关重要。例如,22克的本发明的粗粒级分递送了个体每日推荐纤维食用量的33%。营养补充剂可以包含任何已知的帮助个体整体健康的营养成分,实例包含但不限于维生素、矿物质、其它纤维组分、脂肪酸、抗氧化剂、氨基酸、肽、蛋白质、叶黄素、核糖、ω-3脂肪酸和/或其它营养成分。补充剂可以以但不限于以下形式递送:速溶饮料混合物、即饮饮料、营养棒、威化饼干、曲奇饼、凝胶丸、胶囊、咀嚼物、咀嚼片和药丸。一个实施例以调味奶昔或麦芽型饮料的形式递送纤维补充剂,该实施例作为儿童的纤维补充剂可能特别有吸引力。

[0351] 在另外的实施例中,研磨工艺可以用于制备多谷粒面粉或多谷粒粗粒级分。例如,来自一种类型的谷粒的麸皮和胚芽可以被研磨并与研磨的胚乳或另一种类型的谷类的全谷粒谷类面粉共混。可替代地,一种类型的谷粒的麸皮和胚芽可以被研磨并与研磨的胚乳或另一种类型的谷粒的全谷粒面粉共混。可以设想,本发明涵盖混合一种或多种谷粒的麸皮、胚芽、胚乳和全谷粒面粉中的一种或更多种的任何组合。这种多谷粒方法可以用于制备定制面粉,并利用多种类型的谷粒的品质和营养成分来制备一种面粉。

[0352] 可以设想,本发明的全谷粒面粉、粗粒级分和/或谷粒产品可以通过本领域已知的任何研磨工艺产生。示例性实施例涉及在单个料流中研磨谷粒,而不将谷粒的胚乳、麸皮和胚芽分离成单独的料流。经清洁和调和的谷粒被输送到第一通道研磨机,如锤磨机、辊磨机、针磨机、冲击式磨机、圆盘磨机、空气磨碎机、凹口磨机等。在研磨之后,谷粒被排出并输送到筛分器。进一步地,可以设想,本发明的全谷粒面粉、粗粒级分和/或谷粒产品可以通过许多其它工艺进行改性或增强,如:发酵、即时化、挤出、封装、烤、烘烤等。

[0353] 麦芽制造

[0354] 本发明提供的基于麦芽的饮料涉及酒精饮料(包含蒸馏饮料)和非酒精饮料,其通过使用麦芽作为其起始材料的一部分或全部来产生。实例包含啤酒、发泡酒(happoshu)(低麦芽啤酒饮料)、威士忌、低酒精基于麦芽的饮料(例如,酒精含量低于1%的基于麦芽的饮料)和非酒精饮料。

[0355] 麦芽制造是通过对大麦和小麦谷粒等谷粒进行控制浸泡和发芽,然后进行干燥的过程。这一系列事件对于导致谷粒修饰的许多酶的合成是重要的,这一过程主要是解聚死

亡的胚乳细胞壁和动员谷粒营养物。在随后的干燥过程中,由于化学褐变反应会产生香味和颜色。尽管麦芽的主要用途是用于饮料生产,但其也可以用于其它工业过程,例如作为烘焙工业中的酶源,或作为食品工业中的调味剂和着色剂,例如作为麦芽或麦芽粉,或间接作为麦芽糖浆等。

[0356] 在一个实施例中,本发明涉及产生麦芽组合物的方法。所述方法优选地包括以下步骤:

[0357] (i)提供本发明的如大麦或小麦谷粒等谷粒;

[0358] (ii)浸泡所述谷粒;

[0359] (iii)在预定的条件下使浸泡过的谷粒发芽;以及

[0360] (iv)干燥所述发芽的谷粒。

[0361] 例如,麦芽可以通过Hoseney(《谷类科学与技术原理(Principles of Cereal Science and Technology)》,第二版,1994:明尼苏达州圣保罗的美国谷类化学家协会(American Association of Cereal Chemists,St.Paul,Minn.))中描述的任何方法产生。然而,用于产生麦芽的任何其它合适的方法也可以用于本发明,如用于产生特种麦芽的方法,包含但不限于烘焙麦芽的方法。

[0362] 麦芽主要用于酿造啤酒,但也用于产生蒸馏酒。酿造包括麦芽汁生产、主要发酵和二次发酵以及后处理。首先将麦芽研磨,搅拌到水中并加热。在这种"糖化"期间,麦芽制造中激活的酶将核中的淀粉降解成可发酵的糖。经产生的麦芽汁澄清,添加酵母,将混合物发酵并进行后处理。

[0363] 实例

[0364] 实例1-材料和方法

[0365] 突变体的生成

[0366] gRNA设计

[0367] 使用Geneius Prime 2019.1.1(www.geneious.com)进行稻米FAD2、LOX3和FATB的DNA序列的计算机分析、DNA序列注释和比对、载体设计和蛋白质序列预测。稻米OsFAD2-1、OsLOX3和OsFATB1、2、3、4基因序列从稻米基因组注释计划(rice.plantbiology.msu.edu/)获得,用于设计gRNA。所有的gRNA富含长度为19或20bp的GC,并与规范PAM(5'-NGG-3')连接。基因编辑载体V1靶向OsFAD2-1、OsLOX3和OsFATB1,而基因编辑载体V2靶向OsFATB1、2、3和4。在载体V1中,gRNA-1针对LOC_OS02g48560(OsFAD2-1)的nt 3317～3336靶向,与CDS的nt 3～22(20bp)相对应,覆盖第二个框内ATG(CDS的nt 19～21)。gRNA-2针对LOC_OS02g48560的nt3846～3865靶向,与OsFAD2-1 CDS的nt 532～551相对应。gRNA-3是在第1外显子中的编号31至编号50区处设计的,并且gRNA-4是在跨OsLOX3的第1内含子和第2外显子的编号467与编号486之间的20bp处设计的。gRNA-5是在OsFATB1的第2外显子(编号523-542)的开始处设计的。在V2中,gRNA-6靶向OsFATB1的第1外显子中的编号323-342。将gRNA-7设计到OsFATB2和3两者的第二外显子中的编号451-470处的保守区。gRNA-8靶向OsFATB4的第2外显子的编号624-643之间的20bp。

[0368] 载体构建

[0369] 由分别驱动gRNA-1～5的两个OsU3启动子和三个OsU6启动子(OsU6a、OsU6b、OsU6c)组成的多gRNA表达盒在GeneArt(德国雷根斯堡的赛默飞世尔科技公司(Thermo

Fisher Scientific,Regensburg,Germany))处商业合成。通过GeneArt将每个盒克隆到pMA-RQ的BsaI限制性位点中。然后按照Ma等人(2015)的描述,通过用BsaI同时消化并用金门克隆系统连接,将pMA-RQ中的表达盒克隆到pYLCRISPR/Cas9Pubi-H中。

[0370] 在15μL反应中,将50ng的每种gRNA表达盒和载体与BsaI、T4连接酶和连接缓冲液混合。在PCR机器中设置连接反应,在37℃下3分钟和在16℃下4分钟的25个循环,和在50℃下5分钟和在80℃下5分钟的1个循环。然后将产物在转化到农杆菌属中之前保持在4℃。通过使用PCR标志物(引物SP1和SP2)扩增含有gRNA盒的质粒DNA片段来证实所得阳性克隆(V1和V2,克隆的细节参见实例2)。V1和V2的PCR产物的分子大小分别为3143bp和1739bp。通过农杆菌属介导的转化,V1和V2载体用于转化稻米。

[0371] 农杆菌属介导的稻米转化

[0372] 在稍加修饰的情况下将载体V1或V2转化到农杆菌属菌株AGL1中用于稻米转化(Toki等人,2006)。从日本晴栽培变种的成熟种子中去除壳。然后将种子用75%乙醇和25%漂白剂连续消毒,并且然后在MilliQ水中洗涤8次。将种子转移到pH 5.8的N6D固体培养基(含有维生素3.99g/L、肌醇100mg/L、蛋白胨(粗蛋白)300mg/L、脯氨酸2.9g/L、蔗糖30g/L和2ml/L的2,4-D(1mg/ml)的CHU[N6]基础培养基)中,以在25℃生长室中在24小时紫色和蓝色光下诱导愈伤组织。

[0373] 2N6-AS培养基*

[0374]

化学品	1 L 的量
含维生素的 CHU [N6]基础培养基	3.99 g
肌醇	100 mg
酪蛋白氨基酸	300 mg
葡萄糖	10 g
蔗糖	30 g
2,4-D（1 mg/mL） - 将 100 mg 的 2,4-D 溶解于 1 mL 乙醇中 - 添加 3 ml 的 1 N KOH - 用 1 N HCl 调节至 H 6	2 mL

[0375] *用1M KOH/NaOH将pH调节至5.2。使用时添加乙酰丁香酮2mg/L。高压釜。

[0376] 再生培养基*

[0377]

化学品	1 L 的量
蔗糖	30 g
山梨醇	30 g
酪蛋白氨基酸	2 g
MS-基础盐或含维生素	4.33 g
B5 维生素（x1000） - 不含维生素的 MS-基础可选	1 ml

[0378]

- 肌醇 - 烟酸 - 吡哆醇 HCl - 硫胺素 HCl - MiliQ 水	- 10 g - 100 mg - 100 mg - 1 g - 100 ml
NAA（储备 2 mg/ml）	10 µl
激动素（储备 5 mg/ml）	400 µl

[0379] *用1M KOH/NaOH将pH调节至5.8。添加植物凝胶3g/L。高压釜。

[0380] 诱导4-6周之后收集愈伤组织,并与含有V1或V2的AGL1在2N6-AS液体培养基中在室温下在黑暗中共培养3天。然后用含有特美汀(timentin)(150mg/L)的无菌水洗涤愈伤组织,并用滤纸吸干。经转化的愈伤组织在含有特美汀(150mg/L)和抗生素潮霉素(35mg/L)的N6D培养基板上在室温下在黑暗中选择3-4周。将抗性愈伤组织转移到含有潮霉素的再生培养基中以发育根,并在室温下在生长室中在黑暗中培养3-4周。将再生的小植株转移到含有泰美汀和潮霉素的MS培养基中,用于在生长室中进一步的植物发育。

[0381] MS培养基*

[0382]

化学品	1 L 的量
蔗糖	30 g
MS-基础盐或含维生素	4.33 g
B5 维生素（x1000） - 不含维生素的 MS-基础可选 - 肌醇 - 烟酸 - 吡哆醇 HCl - 硫胺素 HCl - MiliQ 水	1 mL - 10 g - 100 mg - 100 mg - 1 g - 100 mL

[0383] *用1M KOH/NaOH将pH调节至5.8。添加植物凝胶3g/L。高压釜。

[0384] 然后将经转化的稻米植物移植到具有通用盆栽混合物的盆中,并置于生长室中(12小时光周期,在光照下30℃并且在黑暗中24℃)。植物每三(3)天浇水一次,直到分蘖期为止,这时盆栽植物被转移到玻璃房。

[0385] 确定稻米植物中的靶向突变

[0386] 14个转基因株系的T_0至T_3植物在自然日光下在22℃至26.5℃下在CSIRO布拉克山科学创新园(CSIRO Black Mountain Scientific Innovation Park)(澳大利亚首都堪培拉(Canberra,ACT,Australia))的人工气候室中生长。从每个植物的叶组织中制备基因组DNA样品(100ng/µL)。叶组织在液氮中快速冷冻,并使用筷子在2mL管中磨碎。向每个样品中添加约600µL提取缓冲液(100mM Tris-HCl pH 8.0,50mM EDTA,1.25％SDS),以通过振荡悬浮。将样品在65℃下在烘箱中温育至少一小时。在冷却之后,向每个样品中添加300µL的冷6M乙酸铵,以在4℃下沉淀。将上清液通过离心收集并添加300µL异丙醇以沉淀DNA。将沉淀通过离心收集并用250µL的70％乙醇洗涤。添加约50µL Mili-Q水,并将样品保持在室温下过夜以溶解DNA。使用NanoDrop分光光度计(型号ND-1000,NanoDrop)测量DNA的浓度。

[0387] 使用Geneius Prime 2019.1.1设计PCR引物,以扩增覆盖gRNA靶区的DNA片段。PCR

混合物含有2μL的5x Taq聚合酶缓冲液、0.5μL的每种引物(10nM)、100ng模板DNA和0.07μL的MyTaq聚合酶(Thermo),最终体积为10μL。以下PCR程序用于扩增:在95℃下2分钟,在95℃下15秒、在58℃下15秒和在72℃下32秒的34个循环,随后在72℃下5分钟并保持在12℃下。将PCR产物稀释10倍,并用虾碱性磷酸酶(SAP)以2.5:1(v/v)的比率在37℃下净化15分钟并且在80℃下净化15分钟。将清洁的DNA产物(2.8μL)与0.3μL前向或反向引物和BigDye缓冲液混合至最终体积为20μl。PCR在以下条件下进行:在94℃下5分钟,在96℃下10秒、在50℃下5秒和在60℃下4分钟的30次循环,并保持在12℃下。将BigDye产物与2μL的3M NaOAc(pH 4.8-5)和50μL的冰冷100%乙醇混合,以在-80℃下沉淀30分钟。将沉淀物用200μL的70%乙醇洗涤,并在真空旋转干燥器中干燥,然后提交给Sanger测序服务(澳大利亚堪培拉的澳大利亚国立大学(ANU)机构(Australian National University(ANU)facility,Canberra Australia))。

[0388] 脂肪酸甲酯的制备

[0389] 在成熟之后,采集种子,在37℃下干燥约两周,然后手动脱粒。然后使用3M ESPE CapMax™匀浆器(德国塞费尔德的ESPE)将糙米的单/多谷粒(用于筛选的单/半谷粒,用于表征纯合子表型的多谷粒)研磨成面粉。按照Zaplin等人(2013)描述的程序,来自单/多谷粒的约3-5mg的面粉样品用于制备脂肪酸甲酯(FAME)。

[0390] 对于叶、根和花药组织,植物部分在冷冻干燥机(BencheTop Pro型号BTP-8ZLEVX,SP科技公司(SP Scientific))中干燥。用剪刀将干燥的植物部分切开,并且每次重复将5-10mg的样品称重到2mL小瓶中。向每个小瓶中添加600μL的1N甲醇HCl,并在80℃下将样品甲基化2小时,并紧紧地盖上盖子。在小瓶冷却至室温之后,添加300μL的0.9% NaCl和300μL己烷,并在振荡器(Ratek型号MTV1,澳大利亚的Ratek仪器有限公司(Ratek Instruments Pty Ltd,Australia))中混合5分钟。将样品以1700g离心5分钟(型号2-6E,西格玛公司(Sigma))。将大约280μL的含有FAME的上层己烷相转移到锥形玻璃插入物中,并在氮气下蒸发5-10分钟。将FAME再次溶解于50μL己烷中。

[0391] 通过气相色谱法分析脂肪酸谱

[0392] FAME通过气相色谱法(7890A GC;加利福尼亚州圣克拉拉的安捷伦科技公司(Agilent Technologies,Santa Clara,CA)),配备有SGE BPX70柱(0.25mm直径,30m长,2.5μm膜厚度,安捷伦),50:1分流,基本如(Zhou等人,2011)所描述的。将柱温度编程为初始温度为150℃保持1分钟,以3℃/分钟升至210℃,然后以50℃/分钟进一步升至240℃保持1.4分钟。氦是载气,柱顶压力为17.334psi并且平均速度为30厘米/秒。通过使用安捷伦科技ChemStation软件(Rev B.04.03)对峰进行整合来分析脂肪酸谱,并将总脂肪酸组成计算为每个样品中的整体百分比。

[0393] 稻米麸皮挥发性化合物的SPME GC-MS分析

[0394] 在抛光糙米谷粒期间,从TP-3000PEARLEST谷粒抛光机(美国的Kett公司(Kett,USA))中收集稻米麸皮(占全谷粒的10重量%)。将麸皮样品立即储存在-80℃下以避免变质。使用50/30μm二乙烯基苯-羧甲基-聚二甲基硅氧烷(DVB/CAR/PDMS)10mm长的Stableflex纤维(美国的色谱科公司(Supelco,USA))对挥发性化合物进行顶部空间(HS)-SPME GC-MS分析,用于自动化自动进样器。将纤维在使用之前在270℃下预调节30分钟。

[0395] 为了分析样品,在提取之前,将含有100mg的样品的10mL顶部空间磁盖小瓶在60℃

下预温育5分钟。使用Combi-Pal自动进样器HTX PAL(CTC分析公司(CTC Analytics))在60℃下在搅拌下提取挥发物60分钟。在不分流模式下,将样品在250℃的注射器温度下解吸1分钟。在样品解吸前后,在250℃下在具有氦气流的针式加热器中对纤维进行5分钟的调节,以减少样品残留。通过配备有Shimadzu Stabilwax-DA柱(30m x 0.25mm x 0.25μm)的Shimadzu QP2010 Plus GC-MS分析从纤维上解吸的挥发性化合物。载气是恒定流速为1毫升/分钟的氦气。烘箱升温程序开始于45℃保持5.5分钟,以3℃/分钟加热至170℃并且以7℃/分钟升温至250℃,保持2分钟。在EI模式下以70eV获得离子碎裂,并以35至350m/z的全扫描模式进行扫描。通过比较NIST质谱文库和线性保留指数校准标准(甚至正构烷烃C10-C40)来鉴定挥发物。从不同化合物类别和空白(空HS小瓶,含10ng的内部标准品2,4,6-三甲基吡啶)购买的真实标准品也进行了分析,以进行分析质量控制。质谱匹配仅被认为具有最小80%的相似性指数。

[0396] 实例2-从稻米中鉴定和分离FAD2基因

[0397] 由OsFAD2基因编码的Δ12-去饱和酶(脂肪酸去饱和酶2)负责在Δ12位置处将双键引入到18:1脂肪酸中。稻米中的OsFAD2基因家族有四个成员(Zaplin等人,2013),命名为OsFAD2-1(LOC_Os02g48560)、OsFAD2-2(LOC_Os07g23430)、OsFAD2-3(LOC_Os07g23410)和OsFAD2-4(LOC_Os07g23390)。从基因库检索这些水稻FAD2的基因组序列。cDNA序列被导出并示出于图1中,所述图示出了Fad2 cDNA序列的比对。OsFAD2-1同种型在翻译起始密码子ATG之后具有框内ATG密码子(nt 19～21)。为OsFAD2-1的CRISPR编辑设计的gRNA包含该第二ATG(图1),如下文所概述的。

[0398] 用于转化的T-DNA二元载体的示意图如图2所示。在表3中,株系V1-13的经修饰的FAD2氨基酸序列中的星号指示终止密码子的位置。

[0399] gRNA与V1和V2的载体设计

[0400] 对于CRISPR-Cas9编辑,gRNA或单向导RNA的碱基配对控制切割的特异性和切割的位点。如实例1中所描述进行向导RNA设计。为了评估FAD2-1基因对谷粒中的油含量的贡献,设计了靶向位置nt3-22的gRNA-1(GGGTGCCGGCGGCAGGATGA)(SEQ ID NO:30)和靶向位置nt 532-551的gRNA-2(TACGTGTACCACAACCCGAT)(SEQ ID NO:31)。FAD2-1与两个gRNA区内的三个其它成员共享低同源性。gRNA-1靶向来自覆盖第二ATG的起始密码子的端部的20bp,并且gRNA-2靶向FAD2-1中的起始密码子下游的532bp处,用于实例5中的V1的载体设计和实例6中的载体设计V2。

[0401] 实例3-从稻米中鉴定和分离LOX3基因

[0402] 稻米脂氧合酶(LOX;EC 1.13.11.12)催化脂质的过氧化。根据蛋白质序列,LOX被分类为三种类型(Mizuno等人,2003)。I型脂氧合酶位于叶绿体中并且是应激诱导型的;II型脂氧合酶位于细胞质中,源自双子叶植物,并且不是应激诱导型的;III型脂氧合酶位于细胞质中,源自单子叶植物并且与种子发芽有关。I型LOX具有转运肽,这在II型和III型LOX中是不存在的。根据酶对底物烃骨架中的碳9或碳13的偏好,LOX也被分类为9-LOX或13-LOX,产生9(S)-氢过氧基-和9(S)-氢过氧基-衍生物(Feussner和Wasternack,2002)。基于生物信息学分析,推测稻米基因组(rice.plantbiology.msu.edu)具有14个LOX蛋白基因。蛋白质比对示出LOX序列相对良好保守(Umate,2011)。

[0403] 包含亚油酸和亚麻酸的多不饱和脂肪酸(PUFA)是种子中不同LOX的常见底物。稻

米谷粒中存在的LOX被认为在膜或储存脂质中的脂肪酸过氧化中起重要作用。稻米种子中的LOX活性与如正己醛等挥发性化合物的产生相关,所述正己醛源自脂质过氧化,是储存的稻米种子中的不新鲜或腐败异味的主要组分。

[0404] 已经在发育中的稻米种子中鉴定了三种III型LOX的同工酶(LOX1、LOX2和LOX3)(Ohta等人,1986)。其中LOX3是最丰富的酶(Ida等人,1983)。LOX3酶被纯化并表征为9-LOX(Ohta等,1986)。泰国稻米品种DawDam含有导致LOX3基因的翻译过早终止的点突变,导致无效突变体稻米品种(Suzuki等人,1993;Suzuki和Matsukura,1997)。这种突变与稻米谷粒储存期间的不新鲜气味的减少相关(Suzuki等人,1999)。Xu等人(2015)使用RNAi沉默来降低转基因实验植物中的LOX3活性,从而产生具有经改善的种子耐储存性的谷粒。相反,Ma等人(2015)使用TALEN靶向和下调LOX3,并证实种子老化是复杂的过程。他们提出,LOX3种子寿命效应可能与脂肪酸的过氧化无关,因为稻米谷粒中的LOX1、LOX2和LOX3同工酶之间据称存在功能冗余。虽然LOX3缺乏未示出会影响稻米的主要农艺性状(Ma等人,2015),但认识到,沉默稻米中的所有LOX1、LOX2和LOX3同工酶会导致植物具有不利的农艺行为,如在DawDam品种中观察到的(RoyChowdury等人,2016)。

[0405] 为了有效地改善稻米谷粒储存品质,应该在不损害营养含量和农艺性状的情况下实现LOX活性的失活。为了评估LOX3基因对稻米麸皮或麸皮油的脂质氧化稳定性的贡献,在实例5中的载体V1和实例6中的载体V2中设计了gRNA-3(GACGAGCTCCGCAACCTGCG)(SEQ ID NO:32)和gRNA-4(CGTGCGTGCAGATCCGGACT)(SEQ ID NO:33)。gRNA-3设计用于靶向第1外显子,并且gRNA-4靶向跨越LOX3的第1内含子(nt 30～50)和第2外显子(nt 467～486)的20bp。

[0406] 实例4-从稻米中鉴定和分离FATB基因

[0407] FATB基因编码棕榈酰-ACP硫酯酶,其具有优先从酰基-酰基载剂蛋白中释放长度为16个或更少的碳的脂肪酸的活性。使用基于同源性的搜索,用拟南芥AtFATB序列AtACPTE32(NCBI登录号AF213480)鉴定了推定的稻米FATB序列。使用的程序是Megablast,可在NCBI(www.ncbi.nlm.nih.gov/)上使用默认参数。基于与拟南芥中的AF213480的同源性,在稻米基因组注释项目数据库(http://rice.plantbiology.msu.edu/)中鉴定的来自稻米的最类似序列是四个OsFATB基因(Ouyang等人2007)。这四个OsFATB基因分别命名为FATB1(LOC_Os06g05130)、FATB2(LOC_Os11g43820)、FATB3(LOC_Os02g43090)和FATB4(LOC_Os06g39520)。每个稻米FATB基因包括6个外显子。

[0408] 稻米FATB序列从对应的编码序列翻译成氨基酸序列(图3)并检查保守基序的存在。在AtFATB序列中被认为是必需的氨基酸残基通常被称为催化三联体,是半胱氨酸264、天冬酰胺227和组氨酸229。与AtFATB1一致,催化三联体(天冬氨酸N-227、组氨酸H-229和半胱氨酸C-264)位于图2中所示的FATB的C末端处(Yuan等人,1996;Mayer和Shanklin,2005)。FATB1和FATB2含有所有三种催化氨基酸残基,并且FATB4含有在FATB1和FATB2序列中发现的保守基序NQHVNN(SEQ ID NO:38)中的三种催化氨基酸中的两种(N-227和H-229)。然而,所有三种催化氨基酸残基和NQHVNN(SEQ ID NO:38)在FATB3中不存在。

[0409] 使用具有默认参数的程序CLUSTAL进行序列比较。FATB1(LOC_Os06g05130)与FATB4(LOC_Os06g39520)之间在整个编码序列上的核苷酸序列同一性为64.6%,其推导的氨基酸序列之间的同一性为54.3%。已知从FATB1、FATB2、FATB3和FATB4推导的蛋白质分别

与427、425、298和357个氨基酸的氨基酸序列相对应。

[0410] FATB的基因编辑

[0411] 为了评估FATB1基因对稻米谷粒中的棕榈酸含量的贡献,将gRNA-5靶向OsFATB1的第二外显子(CTGAACCATGTGAAAACTGC)(SEQ ID NO:34)的开头并将其包含在载体V1中(参见实例1)。其它FATB成员的功能尚不明确。因此,通过基因编辑进一步表征了每个FATB基因对谷粒中的C16:0含量的贡献。基因编辑载体V2含有gRNA-6～gRNA-8(参见实例1)。gRNA-6(TCCTGGCAGCTGAGAAGCAG)(SEQ ID NO:35)和gRNA-8(GGGCTGCTAGGAGATGGTTT)(SEQ ID NO:36)设计用于编辑FATB1和FATB4,而gRNA-7(ATGATTCGGTCCTACGAGAT)(SEQ ID NO:37)同时靶向FATB2和FATB3两者的保守区。

[0412] 实例5-用载体V1对稻米FAD2-1、LOX3和FATB1进行基因编辑

[0413] 由Ma等人(2016)证实并由Zafar等人(2020年)审查的稻米的多重基因组编辑方法正在迅速发展,因为其有可能通过同时编辑几个基因来提供无转基因的植物改良方法。然而,在不需要进一步加工的情况下,改变稻米的麸皮层中的脂质谱以提高全谷粒稻米的效用和保质期并防止麸皮和RBO酸败的稻米基因工程尚未成功实现。

[0414] gRNA和V1的载体设计

[0415] 为了构建基因编辑载体V1,本发明人设计了两个靶向FAD2-1的gRNA(LOC_Os02g48560)、两个靶向LOX3的gRNA(LOC_Os03g49350)和一个靶向FATB1的gRNA(LOC_Os06g05130),如实例2、3和4中所描述的。按照Ma等人(2015)描述的方法产生载体。每个gRNA受稻米启动子的控制,gRNA靶向U3启动子驱动的FAD2-1,gRNA靶向U6a启动子驱动的LOX3,并且gRNA靶向U6c启动子驱动的FATB1。

[0416] 用于CRISPR基因编辑的T-DNA二元载体V1如图2所示。gRNA-1靶向来自覆盖第二ATG的起始密码子的端部的20bp(nt 3-22),并且gRNA-2靶向FAD2-1的起始密码子下游的nt 532-551处。gRNA-3是在第一外显子中的nt 31至50区处设计的,并且gRNA-4是在跨LOX3的第一内含子和第二外显子的20bp(nt 467-486)处设计的。gRNA-5是在FATB1的第二外显子(nt 523-542)的开始处设计的。示出了多gRNA表达盒的示意图,并且详细的质粒图在图2中示出。

[0417] 稻米转化

[0418] 按照Toki等人(2006)描述的方法,将V1载体转化到用于稻米转化的农杆菌属菌株AGL1中,并按照实例1进行了修饰。

[0419] 在组织培养由日本晴栽培变种产生的经转化的愈伤组织之后,获得了总共14个携带潮霉素抗性基因的T_0转基因株系。叶组织用于从每个转基因株系制备DNA样品。如实例1中所描述对DNA进行PCR扩增,并对PCR产物进行测序。

[0420] 经编辑的等位基因

[0421] 通过对从三个候选基因的对应的基因组DNA扩增的PCR产物进行sanger测序,鉴定出四个经编辑的株系。成功编辑的植物在本文中被称为V1-4、V1-7、V1-12和V1-13(表3)。

[0422] 株系V1-4在gRNA-5区处编辑一个fatb1的经突变的等位基因,插入一个核苷酸,导致引入过早终止密码子的移码,而FAD2-1和LOX3没有变化。T_0植物正常生长,但繁殖力降低。

[0423] 株系V1-12是双等位基因编辑的,在LOX3基因中携带突变(在gRNA-3处-7/+1,在

gRNA-4处+1/+1),而FAD2-1和FATB1基因没有变化。gRNA-3的靶位点处的株系V1-12中的lox3突变均导致下游过早终止密码子。

[0424]

表 3. V1 株系

基因	株系	基因型	等位基因	gRNA	gRNA	编辑产生的氨基酸序列		
V1 T0 株系								
FAD2				gRNA1（位置 3-22）	gRNA2（位置 532-551）			
	Nip	FAD2/LOX3/FATB1		Nt1'ATGGGTGCCGGCGGCAGGATGACGG'nt25	Nt532'TACGTGTACCACAACCCGATCGG'nt554	Aa1'MGAGGRMTE'aa9	Aa178'YVYHNPIG'aa185
	V1-4	FAD2/LOX3/fatb1		WT	WT	WT	WT
	V1-7	fad2/lox3/FATB1	AL1	Nt1'ATGGGTGCCGGCGGCAGGATTGACGG'nt26	Nt533'TACGTGTACCACAACCCCGATCGG'nt556	Aa1'MGAGGRIDG'aa9	NA 由于过早终止密码子
			AL2	Nt1'ATGGGTG----------ACGG'nt11	Nt518'TACGTGTACCACAA---GATCGG'nt537	Aa1'MGDGEGAGG'aa9	NA 由于过早终止密码子
	V1-12	FAD2/lox3/FATB1		WT	WT	WT	WT
	V1-13	fad2/lox3/FATB1	KD	nt1'ATGGGTGCCGGCGG----ATGACGG'nt21	nt519'TACGTGTACCACA---CGATCGG'nt547	aa1'MGAGG*'aa5/aa1'MTE'aa3	NA 由于过早终止密码子/Aa172'YVYHT-IG'aa178
			KO	nt1'ATGGGTGCCGGCGGCAGGA**G**TGACGG'nt26	CGTACGTGTACCCAACCCAGATCGG	Aa1'MGAGGRSDG'aa9	NA 由于过早终止密码子
LOX3				gRNA3（位置 31-50）	gRNA4（位置 467-486）		
	Nip	FAD2/LOX3/FATB1		nt31'GACGAGCTCCGCAACCTGCGCGG'nt53	Nt467'CGTGCGTGCAGATCCGGACTCGG'nt487	Aa11'DELRNLRGD'aa18	Aa156'ACVQIRTR'aa163
	V1-4	FAD2/LOX3/fatb1		WT	WT	WT	
	V1-7	fad2/lox3/FATB1	AL1	400+ bp 缺失	未知	未知	未知
			AL2	未知 由于测序不佳	未知 由于测序不佳	未知	未知

[0425]

	V1-12	FAD2/ lox3/ FATB1	AL3	nt31'GACGAGCTCC------GCGCGG'nt46	Nt460'CGTGCGTGCAGATCCGGA**A**CTCGG'nt483	Aa11'DELRAATT'aa18	Aa71'PIRTNSES'aa77
			AL4 (KO)	nt31'GACGAGCTCCGCAACCT**A**GCGCGG'nt54	Nt468'CGTGCGTGCAGATCCGGA**A**CTCGG'nt491	Aa11'DELRNLAR'aa18	Aa73'HRSGTRRV'aa80
	V1-13	fad2/ lox3/ FATB1	AL5 (KO)	nt31'GACGAGCTCCGCAA--TGCGCGG'nt51	Nt465'CGTGCGTGCAGATCCGGA**A**CTCGG'nt488	Aa11'DELRNARR'aa18	Aa72'HRSGTRRV'aa79
			AL6	nt31'GACGAGCTCCGCAACC-GCGCGG'nt52	Nt466'CGTGCGTGCAGATCC--ACTCGG'nt487	Aa11'DELRNRAA'aa18	Aa73'PIHSESRL'aa80
	FATB1			gRNA5 (位置 523-542)			
	Nip	FAD2/ LOX3/ FATB1		Nt623'CTGAACCATGTGAAAACTGCTGG'nt645	NA	Aa175'LNHVKTAG'aa182	NA
	V1-4	FAD2/ LOX3/ fatb1	All	Nt623'CTGAACCATGTGAAAAC**C**TGCTGG'nt646	NA	Aa175'LNHVKTCW'aa182	NA
	V1-7	fad2/ lox3/ FATB1		WT	NA	WT	NA
	V1-12	FAD2/ lox3/ FATB1		WT	NA	WT	NA
	V1-13	fad2/ lox3/ FATB1		WT	NA	WT	NA

[0426] 株系V1-7和V1-13在FAD2-1和LOX3基因座处是双等位基因杂合的,这意味着FAD2-1和LOX3两者被编辑,但是FATB1序列被证实野生型。V1-7 fad2中的突变导致gRNA-1区(在

gRNA-1处+1/-14)中的等位基因1中的插入和等位基因2中的14bp缺失,以及gRNA-2靶区(在gRNA-2处A->C/-43)中的等位基因1中的核苷酸取代和等位基因2中的43bp缺失。基因编辑导致FAD2-1中的gRNA-1区下游的过早终止密码子。V1-7 T_0植物生长正常,但被认为是无菌的。Zaplin等人(2013)先前示出,RNAi抑制可以成功地以组织特异性方式抑制FAD2-1表达,从而导致与野生型相比更高的油酸稻米。最近,在Abe等人(2018)使用CRISPR-CAS9基因编辑技术产生的高油酸稻米FAD2-1敲除(KO)突变体中,没有报告显著的农艺学缺陷,但是没有呈现支持植物生长的数据。相比之下,敲除亚麻荠(Camelina sativa)FAD2-1、FAD2-2和FAD2-3示出显著的植物生长缺陷(Morineau等人,2017)。根据观察,稻米FAD2-1基因中的完全敲除(KO)突变诱导T_0植物无繁殖力最可能是由于花药中缺乏C18:3n3,如下文所讨论的。

[0427] V1-13株系中的FAD2-1编辑导致gRNA1区(在gRNA-1处-4/+1)中以及gRNA2区(在gRNA-2处-3/+1)中的等位基因1中的小缺失和等位基因2中的单核苷酸插入,导致fad2-1的gRNA-1区下游中的1至10个氨基酸的缺失,这被称为fad2敲除(KD)或fad2-KD。所得fad2-KD编码截短的蛋白质,从N末端(来自gRNA1编辑)缺失前六个氨基酸残基。另外,通过gRNA2编辑产生了N182/P183至T182的突变。

[0428] 允许V1-12和V1-13自花授粉,目的是分离T_1子代中的fad2-1和lox3的经编辑的等位基因。从V1-12的T_1和T_2子代中获得对于单基因KO突变体中的lox3、等位基因1和等位基因2(表3)是纯合的植物。等位基因或'A1'是指同一基因座处的经编辑的等位基因。在与lox3-等位基因5或等位基因6组合的V1-13的T_1和T_2子代中鉴定出对于fad2-1 KD是纯合的植物。然而,通过Sanger测序,仅在V1-13的杂合子子代中发现fad2-1等位基因2和fad2-1等位基因1。

[0429]

表 4. V2 T_2 株系。

基因	株系	基因型	等位基因	gRNA 靶序列	氨基酸序列
FATB1				gRNA6（位置 323-342）	
	Nip			TTTCCTGGCAGCTGAGAAGCAGTGG	FLAAEKOW
	V2-2-2.3-4	*fatb*4		WT	WT
	V2-12-1.2-13	*fatb*1/2 HE		TTTCCTGGCAGCTGAGAA -CAGTGG	FLAAE**NSG**
	V2-12-1.2-12	*fatb*1/4		TTTCCTGGCAGCTGAGAA -CAGTGG	FLAAE**NSG**
	V2-8-4.1-3	*fatb* 2/3		WT	WT
	V2-12-1.1-4	*fatb*1/3/4	A12	TTTCCTGGCAGCTGAGAA -CAGTGG	FLAAE**NSG**
	V2-26-1.1-3	*fatb*2/3/4		WT	WT
	V2-28-4.4-11	*fatb* 1 HE /2/3/4		TTTCCTGGCAGCTGAGAAGACAGTGG / WT	FLAAE**KTV**
FATB2				**gRNA7（位置 451-470）**	
	Nip			TTCATGATTCGGTCCTACGAGATTGG	MIRSYEIGAD
	V2-2-2.3-4	*fatb* 4		WT	WT
	V2-12-1.2-13	*fatb* 1/2HE		TTCATGATTCGGTCCTACGAAGATTGG / WT	MIRSYE**DWC* / WT**
	V2-12-1.2-12	*fatb* 1/4		WT	WT
	V2-8-4.1-3	*fatb* 2/3	A11	TTCATGATTCGGTCCTACGAAGATTGG	MIRSYE**DWC***
	V2-12-1.1-4	*fatb* 1/3/4		WT	WT
	V2-26-1.1-3	*fatb* 2/3/4	A12	TTCATGATTCGGTCCTACGAAGATTGG	MIRSYE**DWC***
	V2-28-4.4-11	*fatb* 1HE/2/3/4		156 bp 缺失	--------- 26/08/2020

[0430]

FATB3				**gRNA7（位置 451-470）**	
	Nip			TTCATGATTCGGTCCTACGAGATTGG	MIRSYEIGAD
	V2-2-2.3-4	*fatb* 4		WT	WT
	V2-12-1.2-13	*fatb*1/2HE		WT	WT
	V2-12-1.2-12	*fatb* 1/4		WT	WT
	V2-8-4.1-3	*fatb* 2/3	A11	TTCATGATTCGGTCCTACGAAGATTGG	MIRSYE**DWC***
	V2-12-1.1-4	*fatb*1/3/4	A11	TTCATGATTCGGTCCTACGAAGATTGG	MIRSYE**DWC***
	V2-26-1.1-3	*fatb*2/3/4	A11	TTCATGATTCGGTCCTACGAAGATTGG	MIRSYE**DWC***
	V2-28-4.4-11	*fatb* 1HE/2/3/4		TTCATGATTCGGTCCTACGA - - TTGG	MIRSY-**DWR***
FATB4				**gRNA8（位置 624-643）**	
	Nip			GCTGGGCTGCTAGGAGATGGTTTTGG	GLLGDGFG
	V2-2-2.3-4	*fatb* 4	A11	GCTGGGCTGCTAGGAGAT - - TTTTGG	GLLGD**FWL**
	V2-12-1.2-13	*fatb*1/2HE		WT	WT
	V2-12-1.2-12	*fatb*1/4		GCTGGGCTGCTAGGAGATGGTTTTTGG	GLLGDGF**W**
	V2-8-4.1-3	*fatb* 2/3	A12	GCTGGGCTGCTAGGAG AT- - -TTTGGC	GLLGD-F**G**
	V2-12-1.1-4	*fatb* 1/3/4	A11	GCTGGGCTGCTAGGAGAT - - TTTTGG	GLLGD**FWL**
	V2-26-1.1-3	*fatb* 2/3/4	A11	GCTGGGCTGCTAGGAGAT - - TTTTGG	GLLGD**FWL**
	V2-28-4.4-11	*fatb* 1HE/2/3/4		GCTGGGCTGCTA - -- --- - - TTTTGG	GLL**FWLNA**

[0431] 表5.所得基因型和不育性的汇总。

[0432]

株系	基因型	代	圆锥花序不育性

V1-7	FAD2-KO/KO	T_0	49/49,100%
V1-13-1.5	FAD2-KD/KO	T_1	10/43,13.5%
V1-13-1.4	FAD2-KD/KO	T_1	2/43,4.6%
V1-13-1.5-8	FAD2-KD/KO	T_2	9/57,15.8%
V1-13-1.5-11	FAD2-KD/KO	T_2	7/59,11.9%
V1-13-1.5-10	FAD2-KD	T_2	7/52,13.5%
V1-13-6.5-6	FAD2-KD	T_2	6/88,6.8%
V1-13-6.5-4	FAD2-KD	T_2	9/89,10.1%
V1-12-1.6-4	LOX3-KO	T_2	5/56,8.9%
V1-12-1.6-7	LOX3-KO	T_2	8/98,8.1%
V2-8-2.2-1	Neg对照	T2	2/63,3.2%
V2-16-2.3-1	Neg对照	T_2	4/69,5.8%

[0433] 生长表型

[0434] V1-13自交株系的繁殖力通过圆锥花序不育性来评估。为了考虑lox3-KO的作用,还包含V1-12自交株系。选择具有最多发育小花的圆锥花序,并对每个植物进行标记。在种子在植物上成熟之后,收集圆锥花序并在37℃下干燥。记录无菌小花的数量,并通过除以总小花数量以百分比计算不育性。植物在昼/夜温度为26℃/22℃的温室中生长。在具有fad2-1KO的株系中,圆锥花序不育性较高(表5)。没有观察到关于种子物理特性和外观的显著差异。

[0435] 实例6-用载体V2编辑多个FATB基因

[0436] gRNA和V2的载体设计

[0437] 先前的结果指示,编码FATB(脂肪酰基-ACP硫酯酶B)同种型的基因在植物组织中的其功能和流行程度不同(Zaplin等人,2013)。为了评估每个FATB基因对种子油含量和组成的贡献,设计了V2载体。V2载体设计用于在对应的靶基因中产生突变:FATB1(LOC_Os06g05130)、FATB2(LOC_Os11g43820)、FATB3(LOC_Os02g43090)和FATB4(LOC_Os06g39520)。V2载体包括gRNA6、gRNA7和gRNA8;其中gRNA7在保守的共同区同时靶向FATB2和FATB3两者,如实例1和4中所描述的。进行实验是为了试图敲除所得植物中的相应FATB酶活性。

[0438] 按照Ma等人(2015)中所描述的方法产生载体,并如实例1中所描述进行修饰。将每个gRNA置于稻米启动子的控制下;U3启动子用于驱动gRNA6表达、U6a启动子用于驱动gRNA7表达并且U6b启动子用于gRNA8。用于转化的T-DNA二元载体和质粒图的示意图如图4所示。

[0439] 稻米转化

[0440] 按照Toki等人(2006)描述的方法,将V2载体转化到用于稻米转化的农杆菌属菌株AGL1中,并按照实例1进行了修饰。

[0441] 通过Sanger测序在V2突变体群体中鉴定出经基因编辑的T_0 V2株系,如实例1和5中所描述的。观察到多个有繁殖力植物,并选择四个株系V2-2、V2-8、V2-12和V2-26进行分析。T_0 V2株系在温室中生长,并允许自花授粉直到T_3代为止(表4)。四个株系的子代被鉴定为携带4种OsFATB KO等位基因的6种不同组合,如(表6)所示。所有的FATB同种型成功编辑。

[0442] 表6.由选择的T_2 V2株系携带的fatb敲除(KO)突变体的组合。

[0443]

株系	基因型	FATB-1	FATB-2	FATB-3	FATB-4
V2-2-2.3-4	fatb 4	WT	WT	WT	KO
V2-8-4.1-3	fatb 2/3/4	WT	KO	KO	WT
V2-12-1.1-4	fatb1/3/4	KO	WT	KO	KO
V2-26-1.1-3	fatb 2/3/4	WT	KO	KO	KO
V2-12-1.2-13	fatb 1/2HE	KO	HE	WT	WT
V2-12-1.2-12	fatb 1/4	KO	WT	WT	KO
V2-8-2.2	Neg	WT	WT	WT	WT

[0444] 注意:基因型列指示通过基因编辑修饰的FATB基因。WT、HE和Neg分别是野生型、杂合的和阴性对照。

[0445] 讨论

[0446] 通常,观察到突变是导致移码突变的1或2个碱基对插入或缺失。当编辑导致3个碱基对插入或缺失时,这导致蛋白质中的一个氨基酸的添加或缺失(参见例如株系V2-8-4.1-3)。预期氨基酸缺失或插入不可能影响酶活性,除非其发生在影响3D结构或酶活性的必需区中。不育性的发生率似乎与fatb1/2基因型相关,因为观察到没有一个子代被鉴定为fatb1/2纯合子。

[0447] 实例7-基因编辑的稻米植物的脂肪酸谱

[0448] 为了分析基因编辑对脂肪酸组成的影响,从V1转化的稻米植物和阴性分离对照株系V2-8-4.1-3('Neg')的谷粒、花药、叶和根样品中分离总脂质。通过GC-FID确定每种脂质提取物的脂肪酸组成,如实例1中所描述的。结果呈现于表6中并且所述数据中的一些数据在图5中以图形方式呈现。每种脂肪酸的比例表示为谷粒的种子油中的总脂肪酸的百分比,如通过GC所述确定的,如实例1中所描述的。

[0449] 表6.V1突变体的种子、花药、叶和根组织中的总脂肪酸组成。

[0450]

样品	稻米植物株系	C14:0 (%)	C16:0 (%)	C16:1 (%)	C18:0 (%)	C18:1 (%)	C18:1d11 (%)	C18:2 (%)	C18:3n3 (%)
种子									
fad2-KO+lox3-KO	V1-13-3.4	0.16	10.73	0.30	3.21	82.19	0.00	1.55	0.35
fad2-KO/KD+lox3-KO	V1-13-1.4	0.50	16.42	0.18	2.48	68.13	1.02	9.99	0.73
fad2-KD+lox3-KO	V1-13-1.4	0.91	21.14	0.19	3.23	55.31	1.02	15.93	1.07
FAD2-WT+ lox3-KO	V1-12-1.6	1.12	23.01	0.00	2.99	26.36	1.01	43.95	1.57
FAD2-RNAi	株系 D	0.34	20.03	0.24	2.60	53.26	1.42	18.89	1.11
Neg	V2-8-2.2	0.77	22.66	0.15	2.71	28.51	2.21	40.18	1.20
花药									
fad2-KO+lox3-KO	V1-7	0.00	15.48	0.00	5.11	61.92	0.00	0.00	9.98
fad2-KO/KD+lox3-KO	V1-13-1.4	0.34	21.22	0.00	9.65	19.49	0.78	9.03	37.25
fad2-KD+lox3-KO	V1-13-1.4	0.40	25.01	0.00	10.36	4.68	0.59	9.23	48.14
FAD2-WT+lox3-KO	V1-12-1.6	0.42	26.22	0.00	12.17	1.23	0.54	8.58	49.08
Neg	V2-8-2.2	0.48	26.24	0.00	10.68	1.14	0.49	8.49	50.19
叶									
fad2-KO+lox3-KO	V1-7	0.00	10.33	2.16	0.00	43.03	0.00	2.50	37.29
fad2-KO/KD+lox3-KO	V1-13-1.4	0.00	15.19	3.07	0.00	7.97	0.00	7.96	62.53
fad2-KD+lox3-KO	V1-13-1.4	0.00	13.40	3.10	1.74	2.82	0.00	11.15	64.76
FAD2-WT+lox3-KO	V1-12-1.6	0.43	14.46	1.85	2.06	1.34	0.16	11.25	65.30
Neg	V2-8-2.2	0.84	17.05	2.68	0.66	1.66	0.59	11.90	61.50
根									
fad2-KO+lox3-KO	V1-7	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
fad2-KO/KD+lox3-KO	V1-13-1.4	1.26	17.63	0.29	2.50	31.36	0.72	22.05	9.30
fad2-KD+lox3-KO	V1-13-1.4	0.43	24.05	0.10	1.22	14.64	0.54	34.26	11.61
FAD2-WT+lox3-KO	V1-12-1.6-	0.40	23.77	0.27	3.33	6.94	1.55	35.03	14.70
Neg	V2-8-2.2	0.55	24.75	0.23	1.96	5.95	0.46	43.13	11.15

[0451] 通常观察到,携带经编辑的fad2-1等位基因的突变体表现出脂肪酸组成的改变。然而,当与阴性对照(Neg)的脂肪酸组成相比时,仅lox3被编辑的突变体中的脂肪酸组成相对没有变化。在成熟种子中,观察到与Neg相比,所有fad2-1突变体中的C18:1的增加是以C18:2和C16:0为代价的。C18:1中最显著的增加是在fad2-1 KO/lox3 KO株系中发现的(增加54%),并且最小增加是在fad2-1 KD/lox3 KO株系中发现的(增加27%),fad2-1 KO/KD(增加40%)在两种油谱之间观察到。值得注意的是,在fad2-1KO/lox3-KO中C18:2降低到1%以下,并且在fad2-1 KD/KO株系中观察到4倍的降低。令人惊讶的是,fad2突变株系中的C18:3n3的比例在fad2-1KO和fad2-1 KO/KD株系中降低至低于总FFA的1%,但当与对照相比时,在fad2-1 KD纯合株系中相对没有变化。

[0452] 发现对照日本晴栽培变种的花药含有大约50% C18:3n3、26% C16:0、9% C18:2

和11％ C18:0。与种子组织相比,来自含有较高C18:1的植物的花药和叶油含量在fad2-1突变体中的C18:3n3和C18:2中具有主要的权衡。例如,来自fad2-1 KO株系的花药的脂肪酸组成为大约62％ C18:1,并表现出C18:2和C18:3n3的显著减少。在fad2-1 KO/KD中,C18:1的变化不太明显,但花药中仍有18％增加,并且叶中有6％增加,分别以C18:3n3和C18:2为代价。而fad2-1 KD与对照相比,在脂肪酸组成上仅示出微小的差异。

[0453] 在根组织中,fad2-1 KO/KD株系油含有显著较高水平的C18:1,是对照的5倍,并且C16:0和C18:2两者降低(7％和21％)。源自fad2-1 KD的油组成变化不太明显,以C18:2为代价的C18:1的增加较小。在所有组织类型中,发现FAD2 WT/lox3KO的脂肪酸组成与阴性对照相当。

[0454] V1-13的T3单个种子的总脂肪酸组成

[0455] 从自交另外的代的V1-13株系中进行半种子FAC,以研究突变体V1-13中的C18:1和C18:2含量和脂肪酸比率的表型变化的遗传。所有V1-13株系和子代含有经突变的LOX3基因(KO),导致LOX3蛋白不表达。在fad2-1KO/KD的种子中观察到C18:1和C18:2比率的种子到种子变异。

[0456] 无论fad2-1基因型如何,似乎单独的种子的C18:1和C18:2含量高度相关(图5)。C18:2水平从35％降低至几乎为零,并且C18:1含量从约30％增加至70％。该观察结果先前在棉花、拟南芥和稻米的FAD2 RNAi转基因植物中报道(Chapman等人,2001;Zaplin等人,2013;Stoutjesdijk等人,2002),并被视为抑制程度的可变性。在CRISPR突变体中没有操纵FAD2-1基因表达的情况下,结果表明,在种子发育期间,FAD2酶活性在某种程度上出于一些原因可能是不稳定的。含有超过70％ C18:1的种子在数百个T_1至T_3种子中几乎没有斑点,这进一步指示fad2-1 KO纯合子可能在繁殖力方面较差,并且在农学上不太有用。在V1-13 T_1植物的一个圆锥花序中的43个小花中,3个小花在种子发育中失败,并且40个发育成有活力的种子,其中在20个取样的种子中比率(C18:1/C18:2)在8至13之间,并且在另外20个种子中比率在2至4之间(图5)。株系中的fad2-1的对应的基因型分别被证实为fad2-1 KO/KD和fad2-1 KD/KD。

[0457] 发芽率

[0458] 为了分析FAD2基因的突变对种子繁殖力的影响,按照实例1使回收的种子在花盆中生长。

[0459] 在植物成熟并干燥之后,将fad2-1KD+lox3-KO、FAD2-WT+lox3-KO和野生型Nipponbare(Neg)中的每一种的圆锥花序在温室中的水中浸泡两周。与FAD2-WT+lox3-KO和NEG相比,fad2-KD+lox3-KO的圆锥花序上的种子表现出较高的发芽率和活力。发芽率观察如下。

[0460]

株系基因型	有活力的种子/总种子	发芽率
FAD2-WT+lox3-KO	57/68	83.8%
fad2-KD+lox3-KO	78/85	91.8%
Neg（对照）	57/85	67.1%

[0461] 为了观察生长习性,使种子在花盆中生长,如实例1中所描述的。携带fad2-1 KO/KO等位基因的突变体株系表现出种子发芽和植物发育延迟(图6)。纯合的fad2-1 KO/KO突

变体不能在正常生长条件下存活。相比之下,杂合和纯合的KD突变体能够成熟和结实,没有明显的农艺学差异。fad2-1 KD/KO的植物高度略低于其它突变体和阴性对照。

[0462] 讨论

[0463] 各种组织中的细胞的膜脂质需要不饱和脂肪酸(UFA)来满足脂肪酸平衡,以维持细胞功能,使植物能够应对环境胁迫(He和Ding,2020)。脂质和其衍生物(脂肪酸、蜡和磷脂)对花粉壁成熟和活力至关重要(Shi等人,2015)。最近的研究报告了GhFAD2-3的下调可能会导致棉花的雄性不育性,因为花药蜡和角质中的亚油酸显著减少(Liu等人,2019)。花药发育受损,外表面异常皱缩(Liu等人,2019)。V13子代的花药的脂肪酸组成示出,在对应的fad2突变体基因型中,油酸显著增加,并且棕榈酸和亚麻酸在不同水平上减少(表7)。

[0464] 单个圆锥花序的不育率在突变体株系的子代中各不相同,其中一些不育率是阴性对照的两倍多。种子组也有所不同,一些株系比阴性对照产生更多的种子,并且其它株系产生更少的种子。

[0465] 在这项研究中,本发明人观察到与不育性相关的fad2等位基因分离模式。fad2 KO和KD等位基因在V1-13子代中分离,影响脂肪酸的油酸含量(表7)。发现在V1-13子代的种子中,fad2-KO/KD株系含有约超过68%的油酸,并且产生fad2-KD基因型的其余子代含有约55%的油酸。一个具有fad2-KO纯合基因型的恢复株系含有超过82%的油酸(表7)。这表明敲除FAD2基因导致稻米的高度不育性。

[0466] 实例8-V2突变体的T_3单个种子的总脂肪酸组成

[0467] 先前对稻米中编码FATB同种型的基因的分析示出,FATB1(LOC_Os06g05130)和FATB2(LOC_Os11g43820)比其它两个基因在谷粒中的表达更高。为了分析基因编辑对脂肪酸组成的影响,将健康的恢复的V2株系繁殖到T_3群体。从V2转化的稻米植物和阴性对照株系V2-8-2.2的谷粒中分离总脂质。通过GC-FID确定每种脂质提取物的脂肪酸组成,如实例1中所描述的。数据呈现于表8中并且所述数据中的一些数据在图7中以图形方式呈现。每种脂肪酸的相对比例表示为谷粒的种子油中的总脂肪酸的百分比,如通过GC所述确定的,如实例1中所描述的。

[0468] 表8.V2突变体株系的种子和叶中的总脂肪酸组成。

[0469]

基因型	样品	C14:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:1d11	C18:2	C18:3n3
种子									
*fatb*4	V2-2-2.3-4	0.00	23.68	0.21	2.62	31.18	0.97	38.91	1.32
*fatb*1/2he	V2-12-1.2-13	0.00	15.14	0.30	3.02	31.84	1.18	45.91	1.33
*fatb*1/4	V2-12-1.2-12	0.00	19.91	0.23	2.79	33.72	0.99	39.56	1.36
*fatb*2/3	V2-8-4.1-3	0.00	14.94	0.27	3.18	37.57	1.10	40.23	1.34
*fatb*1/3/4	V2-12-1.1-4	0.00	21.23	0.25	2.85	31.08	1.02	41.02	1.33
*fatb*2/3/4	V2-26-1.1-3	0.00	14.71	0.30	3.59	35.06	1.14	42.65	1.34
*fatb*1HE/2/3/4	V2-8-2.2-1	0.00	9.48	0.00	4.64	44.21	1.01	37.99	1.80

[0470]

NEG	V2-2-2.3-4	0.00	21.36	0.23	2.43	35.94	1.04	36.23	1.24
叶									
*fatb*4	V2-2-2.3-4	0.00	16.61	2.62	1.45	0.00	0.00	14.18	62.90
*fatb*1/2HE	V2-12-1.2-13	0.00	13.60	3.03	1.24	0.00	0.00	16.30	63.50
*fatb*1/4	V2-12-1.2-12	0.00	15.53	3.25	0.49	0.00	0.00	11.39	67.06
*fatb*2/3	V2-8-4.1-3	0.84	14.42	2.60	1.13	1.68	0.00	15.74	61.31
*fatb*1/3/4	V2-12-1.1-4	0.00	15.77	2.89	1.40	0.00	0.00	14.69	63.30
*fatb*2/3/4	V2-26-1.1-3	0.97	14.61	2.79	1.29	1.11	0.00	12.43	64.36
*fatb*1HE/2/3/4	V2-28-4.4-11	0.00	10.83	1.55	0.00	2.36	0.00	22.65	60.41
NC	V2-8-2.2-1	0.82	17.14	2.72	1.67	0.59	0.00	11.84	61.34

[0471] *为便于参考,1、2、3和4分别是指FATB1、FATB2、FATB3和FATB4基因。

[0472] 比较6个选择的V2突变体的C16:0(棕榈酸)含量,令人惊讶的是,与阴性对照相比,在fatb2/3株系中示出显著60%降低,并且在fatb 2/3/4株系中示出55%降低。类似地,与阴性对照相比,在fatb1/2HE突变体株系中也观察到棕榈酸含量的显著降低(约32%),所述突变体株系含有约17.5%的棕榈酸FAC,而在阴性对照中为约26.6%(图7)。当与阴性对照(Neg)相比时,fatb4、fatb1和fatb1/4HE之间的C16:0%含量差异不显著。该结果表明fatb4敲除并不直接影响种子的棕榈酸含量。当与fatb4突变组合时,fatb1敲除导致种子中的棕榈酸含量的非显著减少。在这项工作之前,稻米中每个FATB基因成员的功能还不清楚。该数据表明,FATB2基因是FATB家族中对种子中的C16:0含量有贡献的主要基因。

[0473] 实例9-用突变体稻米株系育种

[0474] V1和V2株系可以用于开发基因上不同的基因背景或种质,而没有有害的农艺学效应,并具有含有经改善的营养组合物和经改善的保存期的稻米谷粒的益处。进行了两个独立的实验;(i)以在早籼稻米中开发基因背景并且(ii)将V1和V2突变体组合。

[0475] 早籼

[0476] 为了测试低C18:2是否影响早籼品种的不育性,将含有fad2-1 KO/KD和lox3 KO突变两者的突变体V1-13与早籼稻米品种IR36ae杂交。

[0477] 在子代中观察到一些有繁殖力的株系并收集种子。使两个F1种子生长,并使植物

成熟,注意到从这些F1株系中仅收集到少量种子。测试总脂肪酸组成,如实例1中所描述的。发现株系ae1.5-1和ae1.5-2包括74.6%和72.8%的C18:1含量,并且C18:2含量分别显著降低1.6%和1.8%。与实验株系ae1.5-1和ae1.5-2中分别为16.5%和17.4%相比,棕榈酸含量从阴性对照中的21.1%降低。进一步的工作正在进行中,以检查早籼稻米是否是超高油酸突变的稻米的期望的背景。

[0478] V1-13和V2-12杂交

[0479] 在V1-13与V2-12 T0植物之间进行杂交,以在子代中组合OsFAD2-1、OsLOX3和OsFatB的经编辑的等位基因。V1-13含有OsFad2-KO/KD和OsLox3-KO突变基因型两者,并且V2-12包括经突变的FatB2/3/4基因型。在开花之前一天随机选择V1-13的圆锥花序进行杂交。通过使用剪刀去除花瓣顶部的1/3来将小花剪开。在不损伤柱头的情况下使用镊子去除每个小花的花药。然后将圆锥花序含有在植物上的封套中以避免污染。第二天,当V2-12的2-5个花药从花瓣向外延伸到鲱鱼花粉时,用镊子收集这些花药。然后将花药轻轻摇动放入到V1-13小花中。连续三天对圆锥花序上的所有小花重复该操作。

[0480] 通过sanger测序将命名为LFF的F1植物证实为携带来自V2-12 T_0植物的OsFAD2-1-KD、OsLOX3-KO、OsFatB1-KO、OsFatB2-KO、OsFatB4-KO。在杂交的子代中鉴定出新的类型的OsFAD2-1-KO(表9)。新的OsFAD2-1-KO在gRNA1处含有22bp缺失并且在gRNA2处含有17bp缺失。新的等位基因的存在指示V1 CRISPR-Cas9仍然存在并具有活性,靶向OsFAD2-1基因座以产生新的编辑。来自LFF的F2种子的半种子脂肪酸组成分析呈现了来自V1和V2群体的种子脂质的不同的谱(图8)。OsFAD2-KD/KO+OsFatB2-KO和OsFAD2-KD+OsFatB2-KO示出来自OsFAD2-KD/KO和OsFAD2-KD的C16:0中的约另外的5-10%降低,C18:1中的8-13%增加,以及C18:2的4-5%增加。令人惊讶的是,与FAD2 KD/KO和FATB2-KO的组合实现了与V1 FAD2-KO株系类似的油酸(C18:1)水平,但是由于FATB2-KO的组合使棕榈酸(C16:0)含量进一步降低和C18:2降低至约4%总FFA而得到改善。

[0481] 使用PCR和sanger测序对F2群体进行基因分型,如实例1中所描述的。选择具有OsFAD2-1-KD但分离出新的OsFAD2-1-KO的子代,具有OsLOX3-KO、OsFatB1-KO、OsFatB2-KO、OsFatB4-KO,命名为LEF-KD1、LEF-KD3和LEF-KD5,用于F3种子中的进一步分析。KD1和KD3的基因型是OsFAD2-1-KD、OsLOX3-KO、FatB1-KO、FatB4-KO,KD5是OsFAD2-1-KD、OsLOX3-KO、FatB2-KO、FatB3-KO、FatB4-KO。使F3植物再次生长以分析F4种子。对F4汇集的种子和单个种子进行脂肪酸谱分析。结果(表10)表明,LEF-KD1、LEF-KD3和LEF-KD5在F4种子中可能是纯合的。

[0482] 表9.LFF的F1植物的OsFAD2-1 gRNA区处的基因型和氨基酸序列(V1-13与V2-12之间的杂交)

[0483]

等位基因	gRNA1	gRNA2	编辑产生的氨基酸序列	
	Nt1'ATGGGTGCCGGCGGCAGGATGACGGAGAAGGAGCGGGAGGAG'nt42	Nt529'CCGTACGTGTACCACAACCCGATCGGC'nt555	Aa1'MGAGGRMTEKEREE aa14	Aa177'PYVYHNPIG'aa185
AL1-KO	Nt1'ATGGGTGCCGGCGG----------GAGGAG'n	Nt529'CCGTA----------TCGGC'nt538	Aa1'MGAGGRSSR'aa9	Aa177'PYRP'aa180

	t20			
AL2-KD	Nt1'ATGGGTGCCGGCGG---ATGACGGGAGAAGGAGCGGGAGGAG'nt39	Nt529'CCGTACGTGTACCACA---CGATCGGC'nt552	MGAGG*'aa5/aa1'MTE'aa3	Aa177'PYVYH-TIG'aa184

[0484]

[0485] 表10.选择的LEF子代的种子脂肪酸谱。

样品	C14:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:1d11	C18:2	C18:3n3
汇集的种子								
TA2	0.5	21.7	0.2	3.3	45.2	2.5	25.4	1.2
ZH11	1.1	24.6	0.3	2.9	32.8	1.8	35.5	1.1
F3 种子 LEF-KD1	0.1	11.5	0.4	3.1	56.7	2.4	24.2	1.4
F3 种子 LEF-KD3	0.5	16.1	0.3	3.0	57.0	2.7	19.1	1.2
F3 种子 LEF-KD5	0.2	10.8	0.3	3.0	63.5	2.5	18.1	1.6
F4 种子 LEF-KD1-1	0.5	17.8	0.3	3.1	50.7	3.2	23.2	1.2
F4 种子 LEF-KD1-2	0.2	10.5	0.4	3.0	57.9	2.7	23.8	1.5
F4 种子 LEF-KD1-3	0.2	10.9	0.4	3.0	58.6	2.6	22.7	1.6
F4 种子 LEF-KD1-4	0.5	16.4	0.3	3.1	53.2	2.0	23.1	1.3
F4 种子 LEF-KD1-5	0.3	13.5	0.3	2.9	54.9	2.2	24.6	1.3
F4 种子 LEF-KD1-6	0.2	10.7	0.4	2.9	60.9	2.3	20.8	1.7
F4 种子 LEF-KD3-1	0.5	16.0	0.3	3.1	55.4	1.9	21.3	1.5
F4 种子 LEF-KD3-2	0.6	19.6	0.3	3.3	49.4	2.0	23.4	1.3
F4 种子 LEF-KD3-3	0.6	16.2	0.3	3.2	54.4	2.2	21.7	1.4
F4 种子 LEF-KD3-4	0.8	18.0	0.3	3.3	53.1	1.8	21.2	1.4
F4 种子 LEF-KD3-5	0.6	15.6	0.3	3.3	54.7	2.5	21.7	1.3
F4 种子 LEF-KD3-6	0.6	16.1	0.3	3.3	55.1	2.4	20.9	1.3
F4 种子 LEF-KD3-7	0.6	16.0	0.3	3.3	55.8	1.7	20.8	1.4
F4 种子 LEF-KD5-1	0.2	10.4	0.3	2.9	60.2	2.0	22.4	1.6
F4 种子 LEF-KD5-2	0.2	10.8	0.4	2.8	60.2	1.8	22.2	1.6
单个种子								
F4 种子 LEF-KD1-1 编号 1	0.5	17.9	0.3	3.2	50.6	3.7	22.7	1.1
F4 种子 LEF-KD1-1 编号 2	0.5	18.1	0.4	3.5	53.2	3.1	19.8	1.5
F4 种子 LEF-KD1-1 编号 3	0.6	18.7	0.4	3.3	50.2	2.8	22.9	1.2
F4 种子 LEF-KD1-1 编号 4	0.6	18.5	0.0	3.6	49.8	4.7	21.5	1.4

[0486]

	F4 种子 LEF-KD1-2 编号 1	0.1	10.6	0.3	2.9	53.1	3.1	28.6	1.3
	F4 种子 LEF-KD1-2 编号 2	0.1	10.6	0.4	3.3	58.2	4.1	22.0	1.3
	F4 种子 LEF-KD1-2 编号 3	0.2	11.2	0.3	3.5	57.2	3.1	23.3	1.2
	F4 种子 LEF-KD1-2 编号 4	0.1	11.5	0.4	3.5	57.4	3.1	22.6	1.3
	F4 种子 LEF-KD1-2 编号 5	0.1	11.4	0.4	3.2	56.1	3.0	24.4	1.4
	F4 种子 LEF-KD5-1 编号 1	0.2	10.9	0.4	3.6	64.5	3.2	16.0	1.3
	F4 种子 LEF-KD5-1 编号 2	0.2	10.9	0.4	3.3	62.7	3.0	18.0	1.4
[0487]	F4 种子 LEF-KD5-1 编号 3	0.2	10.3	0.3	3.3	63.5	3.0	17.7	1.6
	F4 种子 LEF-KD5-1 编号 4	0.2	11.4	0.4	3.1	59.5	3.1	20.7	1.6
	F4 种子 LEF-KD5-1 编号 5	0.2	12.7	0.4	2.9	56.6	2.8	22.6	1.7
	F4 种子 LEF-KD5-2 编号 1	0.2	11.0	0.3	3.0	55.0	2.8	26.4	1.4
	F4 种子 LEF-KD5-2 编号 2	0.2	11.3	0.4	3.2	59.2	3.2	20.7	1.9
	F4 种子 LEF-KD5-2 编号 3	0.2	12.0	0.4	2.8	55.7	2.8	24.2	1.9
	F4 种子 LEF-KD5-2 编号 4	0.2	11.0	0.4	3.1	60.1	2.8	20.9	1.4
	F4 种子 LEF-KD5-2 编号 5	0.2	10.9	0.4	3.6	62.0	2.9	18.2	1.8

[0488] 实例9-稻米麸皮和稻米麸皮油的氧化稳定性

[0489] 加速酸败测试涉及使用取样器检测储存在高温(40℃)下的谷粒的顶部空间中的挥发物的GC。挥发物,具体地已醛在野生型和经基因编辑的植物以及杂交产生的子代储存时的产生的比较。这是稻米工业中储存谷粒并且还储存稻米麸皮的重要质量问题。

[0490] 从糙米中分离的稻米麸皮通过0.5mm筛子,然后在加速储存模拟之后用于顶部空间分析。将含有300mg稻米麸皮的小瓶在37℃烘箱中温育并盖上盖子。在不同的时间点(第0、2、4和8天)将小瓶从烘箱中取出,并在HS-SPME分析之前储存在-80℃下。从麸皮中释放的气体样品可以通过在80℃下加热或通过自然扩散在小瓶的顶部空间中获得。顶部空间中的挥发性组分通过直接注射到GC-MS机器进行分析(Suzuki等人,1999)。香气化合物的解吸是然后通过加热完成的,被捕获的分子通过GC进行分析并使用标准品进行鉴定。在体外从亚油酸产生已醛已经由Nielsen等人(2004)证实。

[0491] Rancimat是标准化测试,以通过将样品暴露于热和增加的空气体积中产生的加速老化过程来测量脂肪和油的氧化稳定性。氧化发生之前经过的时间是氧化稳定性指数。将稻米的样品提供给新南威尔士州的初级产业部(Department of Primary Industries New South Wales,DPI NSW)。通过DPI NSW ISO659方法提取稻米麸皮油。约1.8g的稻米麸皮油用于Rancimat测试。在来自经基因编辑的突变体和储存的RNAi株系的稻米麸皮提取物中确定总脂肪酸组成的变化(表11)(WO 2008/006171)。DPI NSW服务实验室根据标准ISO方法110℃气流20升/小时进行Rancimat测试。

[0492] 表11.从CRISPR突变体和RNAi株系提取的稻米麸皮油的总脂肪酸组成。

[0493]

样品	C14:0	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3n3	其它
fad2-1 KD/KD+*lox3*KO	0.31	13.12	1.61	62.43	19.77	1.04	1.71
*FAD2*WT+*lox3*KO	0.40	17.43	1.53	37.79	39.99	1.19	1.66
NEG	0.38	17.66	2.13	37.26	39.61	1.19	1.78
FAD2-RNAi	0.00	15.61	2.23	49.91	27.38	1.34	3.53
*NEG	0.33	16.87	2.22	35.62	39.25	1.55	4.16

[0494] *NEG是来自先前FAD2-RNAi实验(WO 2008/006171)中储存的对照株系的阴性对照。

[0495] 可食用油行业使用油的诱导时间来指示氧化稳定性质量。如图9所示,来自fad2-1KD+lox3 KO株系的稻米麸皮油的氧化稳定性被测量为39.86小时,是阴性对照在18.00小时的诱导时间的两倍多。FAD2-1 WT+lox3 KO突变体株系示出19.09小时的轻微增加,与阴性对照相比增加约1小时。相比之下,FAD2-RNAi油诱导时间为12.37小时,与其阴性对照(7.28小时)相比示出1.7倍增加。这表明来自油中的fad2-1 KD+lox3 KO和FAD2-RNAi株系的稻米麸皮油中的C18:2水平的较低百分比含量有助于这些株系与其相应对照相比具有更高的氧化稳定性。在分析中,fad2-1 KD/KD+lox3 KO与FAD2-RNAi沉默的株系之间的C18:2含量有8%的差异,这将有助于两个株系之间的稻米麸皮油稳定性的变化。这有力地支持了结论,即来自fad2-1 KD/KD+lox3 KO的稻米麸皮不仅比先前公布的FAD2-RNAi株系具有经改善的油组成,而且提供了更大的稳定性和更长的稻米谷粒和稻米麸皮本身的保质期。LOX3的敲除与fad2-1 KD突变的组合可能阻止C18:2在研磨之后和在提取油之前的储存期间的氧化,与阴性对照相比,有助于提高氧化稳定性。本文测试的FAD2突变的蛋白的降低的活性在实例10中示出。然而,应当注意,由于不同的采集年份,RNAi和基因编辑的样品可能不适合直接用于比较。

[0496] 已醛

[0497] 顶部空间结果指示,在40℃下3天的模拟储存处理期间,每个样品中的己醛化合物积累增加。所有样品中的己醛的总量增加,但速度不同,并且起始浓度不同(图10)。

[0498] 在储存刺激之前,在具有fad2-1 KO/KD+lox3KO、fad2-1KD/KD+lox3KO或FAD2WT+lox3KO的突变体株系之间,己醛的量相当于约100-200ng/g,而在阴性对照中测量的己醛水平超过700ng/g。这指示亚油酸的过氧化可能已经在研磨过程期间或刚好在研磨之后开始。在储存刺激之后,在阴性对照中观察到己醛产量的最显著增加,在测试时间段期间增加近2.5倍,使得在测试结束时超过1700ng/g。在fad2-1KO/KD+lox3KO和fad2-1KD/KD+lox3KO中,己醛的最低量为大约400-500ng/g。lox3株系(即FAD2WT+lox3KO)示出己醛产量增加超过4倍,达到约650ng/g。

[0499] 为了与FAD2-RNAi中的己醛的量进行比较,计算对照的百分比。相对于其阴性对照株系,FAD2-RNAi产生约44%己醛。相比之下,fad2-1 KO/KD+lox3KO和fad2-1KD/KD+lox3KO以及FAD2WT+lox3KO分别是其阴性对照的29%、25%和37%。由fad2-1 KO/KD+lox3KO和fad2-1KD/KD+lox3KO产生的己醛低于FAD2WT+lox3KO的事实指示,在高油酸背景下敲除LOX3可以进一步降低C18:2过氧化和过氧化的速率,如通过产生己醛的能力所测量的。lox3突变体在第0天也具有较低的己醛生产水平。所有突变体在第3天示出比阴性对照的第0天

样品更低水平的己醛积累。当lox3 KO与FAD2-1的表达的减少相组合时,己醛水平可以比单纯敲除LOX3单独的表达多减少15-20%。

[0500] 实例10-FAD2突变体的活性

[0501] 合成FAD2-1 WT、fad2-1 KD和fad2-1 KD变体,并将其克隆到酵母表达载体pYES2中,以分别产生pXZP1101和pXZP1102。将质粒转化到酵母菌株S288C中用于选择,并在SD-Ura(glu)板上选择转化体。然后选择每个转化体的至少三个阳性单菌落,在30℃下在3mL的SD-Ura(glu)中进行过夜细胞培养。通过离心收集细胞,然后用无菌H_2O洗涤,并重新悬浮于3mL的SD-Ura(gal)中至OD 0.1,然后接种于5mL酵母最小培养基SD-Ura(gal)中。在细胞培养2-3天之后,采集细胞,用H_2O洗涤并冷冻干燥用于FAME制备,随后进行总脂肪酸组成的GC分析。通过C18:2/(C18:1+C18:2)之间的比率测量的转化率用于评估酵母转化体中的FAD2-1酶活性。在载体对照细胞中,几乎检测不到C18:2,表明S288C中不存在内源性FAD2(表12)。FAD2-1 WT示出约48%的C18:2转化率,然而经突变的fad2-1 KD酶示出仅30%的降低的转化率,与为野生型的大约60%至62%的对照野生型酶相比,活性降低近20%。fad2-1 KD中的转化率的变化表明,由于N末端处的6个氨基酸截短,酶活性降低。

[0502] 表12.FAD2-1突变体实验A的活性。

[0503]

样品	C16:0 (%)	C16:1 (%)	C18:0 (%)	C18:1 (%)	C18:1d11 (%)	C18:2 (%)	转化率
载体对照	8.67	23.94	9.00	56.35	1.27	0.00	0.00
FAD2-1							
WT	22.66	30.61	11.14	17.11	2.24	15.87	0.48
fad2-1	23.54	34.10	10.51	20.32	2.19	8.90	0.30

[0504] KD

[0505] 为了鉴定其它合适的突变体,在酵母系统中表达fad2-1 KD酶变体。变体在表13中示出。FAD2-WT活性表示模型中的约100%转化率。如所示出,另外的突变体示出一定的转化效率,例如M3突变体保留约4%的野生型活性。

[0506] FAD2作为同二聚体酶发挥作用,FAD2的无功能突变体的表达可能通过形成无功能异二聚体而抑制其活性。本研究中使用的Cas9/sgRNA构建体靶向起始密码子,并在靶向FAD2基因的5'区中引起移码突变,破坏N末端FAD2结构域。本发明人示出了酵母模型中的移码突变导致的活性降低。

[0507] 表13.FAD2-1突变体的活性

[0508]

样品	C14:0	C14:1	C16:0	C16:1	C16:	C18:0	C18:1	C18:1 d11	C18:2	C16:1->16:2 转化率（%）	C18:1->18:2 转化率（%）
pYES2 对照	0.2	0.0	7.1	28.1	0.0	7.3	56.2	1.1	0.0	0.0	0.0
OsFAD2-WT 对照	0.6	0.1	21.1	29.5	6.1	9.7	15.7	1.7	15.7	17.1	50.0
OsFAD2-KD	0.7	0.1	21.9	34.2	2.9	9.2	20.4	1.7	8.8	7.8	30.2
OsFAD2-M1	0.9	0.2	21.7	42.0	0.0	7.2	26.3	1.7	0.0	0.0	0.0
OsFAD2-M2	0.8	0.2	21.7	41.5	0.0	7.5	26.5	1.7	0.0	0.0	0.0
OsFAD2-M3	0.8	0.2	21.7	41.2	0.2	7.6	26.0	1.7	0.5	0.6	2.0
OsFAD2-M4	0.9	0.2	21.9	41.5	0.1	7.3	26.2	1.8	0.2	0.2	0.8
OsFAD2-M5	1.0	0.2	25.2	38.1	0.0	8.5	25.3	1.6	0.2	0.0	0.8

[0509] 在MSU的稻米基因组注释数据库(http://rice.plantbiology.msu.edu/index.shtml)中,发现了FAD2-1的六个替代性开放阅读框(ORF),其中4个从起始密码子(第2ATG)开始。而ORF1和ORF6分别从内含子中的第1ATG和外显子的5端中的第3ATG开始。据推测,所有的ORF可以编码FAD2-1同种型的蛋白质。fad2-1 KD等位基因中的4bp缺失在5个可能的ORF中诱导移码,但在第6替代性ORF中没有诱导移码。由于突变,对应的蛋白质编码错误,并且导致过早终止密码子,使翻译中止。据预测,ORF6没有被中断,因为4bp缺失正好发生在第3ATG之前。预测的ORF6编码截短的酶FAD2-KD,从N末端去除6个氨基酸残基。FAD2-KD蛋白的酶活性降低至野生型酶FAD2-1的约2/3,如该实例中所示。因此,携带KD突变的经突变的稻米株系中的较高C18:1含量可以归因于野生型ORF和/或所有5个替代性ORF的敲除,并且ORF6的保留有助于残余酶活性。使用本领域常用的工具可以制备稳定降低FAD2-1的表达和/或活性的替代性编辑策略。

[0510] 本申请要求于2021年11月5日提交的AU 2021903546的优先权,所述申请的全部内容通过引用并入本文。

[0511] 本领域的普通技术人员将了解在不脱离概括地描述的本发明的精神或范围的情况下,可以对如特定实施例中所展示的本发明作出许多变化和/或修改。因此,本发明的实施例应当在所有方面都被视为是说明性的而非限制性的。

[0512] 本文所讨论和/或引用的所有公开整体并入本文。

[0513] 关于已包含在本说明书中的对文件、法令、材料、装置、制品等的任何讨论仅仅是出于为本发明提供上下文的目的。这不应由于其在本申请的每项权利要求的优先权日期之前已存在而被视为承认这些事项中的任何或全部事项形成现有技术基础的一部分或者是与本发明相关的领域中的公知常识。

[0514] 参考文献

[0515] Abe等人(2018)《植物生理学与生物化学(Plant Physiol Biochem)》131:58-62。

[0516] Abdullah等人(1986)《生物技术(Biotechnology)》4:1087。

[0517] Barker等人(1983)《植物分子生物学(Plant Mol.Biol.)》2:235-350。

[0518] Begemann等人(2017)《科学报告(Sci Rep.)》7:11606。

[0519] Berger等人(2005)《欧洲营养学杂志(Eur.J.Nutr.)》44:163-173。

[0520] Bevan等人(1983)《核酸研究(Nucl.Acid Res.)》11:369-385。

[0521] Bumrungpert等人(2019)《替代与补充医学杂志(J.Altern.Complement.Med.)》25:353-358。

[0522] Cadwell和Joyce(1992)PCR方法应用(PCR Methods Appl.)》2:28-33。

[0523] Capecchi(1980)《细胞(Cell)》22:479-488。

[0524] Chapman等人(2001)《美国石油化学家协会杂志(Journal of the American Oil Chemists'Society)》78:941-947。

[0525] Cheng等人(1996)《植物细胞报告(Plant Cell Rep.)》15:653-657。

[0526] Clapp等人(1993)《围产期学杂志(Clin.Perinatol.)》20:155-168。

[0527] Coco等人(2001)《自然生物技术(Nature Biotechnology)》19:354-359。

[0528] Coco(2002)《自然生物技术》20:1246-1250。

[0529] Comai等人(2004)《植物杂志(Plant J)》37:778-786。

[0530] Crameri等人(1998)《自然(Nature)》391:288-291。

[0531] Curiel等人(1992)《人类基因疗法(Hum.Gen.Ther.)》3:147-154。

[0532] Doudna和Charpentier(2014)《科学(Science)》28:346(6213):1258096。

[0533] Eggert等人(2005)《生物化学(Chembiochem)》6:1062-1067。

[0534] Eglitis等人(1988)《生物技术(Biotechniques)》6:608-614。

[0535] Feussner和Wasternack(2002)《植物生物学年度评论(Annu Rev Plant Biol)》,53:275-97。

[0536] Fujimura等人(1985)《植物组织培养快报(Plant Tissue Cultural Letters)》2:74。

[0537] Garfinkel等人(1983)《细胞》27:143-153。

[0538] Graham等人(1973)《病毒学(Virology)》54:536-539。

[0539] Grant等人(1995)《植物细胞报告》15:254-258。

[0540] Greve(1983)《应用遗传学杂志(J.Mol.Appl.Genet.)》1:499-511。

[0541] Ha(2005)《营养研究(Nutrition research)》25:597-606。

[0542] Harayama(1998)《生物技术趋势(Trends Biotechnol.)》16:76-82。

[0543] Haft等人(2005)计算生物学(Computational Biology),《PLoS计算生物学(PLoS Comput Biol)》1(6):e60。

[0544] He和Ding(2020)《植物科学前沿(Frontiers in Plant Science)》,11:562785-85。

[0545] Hellinga(1997)《美国国家科学院院刊(Proc.Natl.Acad.Sci.)》94:10015-10017。

[0546] Henikoff等人(2004)《植物生理学(Plant Physiol)》135:630-636。

[0547] Hinchee等人(1988)《生物技术(Biotech.)》6:915。

[0548] Ida等人(1983)《农业与生物化学(Agricultural and Biological Chemistry)》47:637-41。

[0549] Jézéquek等人(2008)《生物技术》45:523-532。

[0550] Jinek等人(2012)《科学》337:816-821。

[0551] Joshi(1987)《核酸研究》15:6643-6653。

[0552] Juliano(1985)《稻米:化学与技术(Rice:Chemistry and Technology)》(美国谷类化学家协会(American Association of Cereal Chemists))。

[0553] Langridge等人(2001)《澳大利亚农业研究杂志(Aust.J.Agric.Res.)》52:1043-1077。

[0554] Lemieux(2000)《当代基因组学(Current Genomics)》1:301-311。

[0555] Leung等人(1989)《技术(Technique)》1:11-15。

[0556] Liang等人(2017)《自然通讯(Nat Commun.)》8:14261。

[0557] Liang等人(2018)《植物生物技术杂志(Plant Biotechnol J.)》16:2053-2062。

[0558] Liang等人(2019)《分子生物学方法(Methods Mol Biol.)》1917:327-335。

[0559] Liu等人(2019)《BMC植物生物学(BMC Plant Biology),19:393-93。

[0560] Lu等人(1993)《实验医学杂志(J.Exp.Med.)》178:2089-2096。

[0561] Luo等人(2016)《植物细胞报告》35(7):1439-1450。

[0562] Ma等人(2015)《分子植物(Mol Plant)》,8:1274-84。

[0563] Makarova(2015)《自然微生物学综述(Nat.Rev.Microbiol.)》13:722-736。

[0564] Mayer和Shanklin(2005)《生物化学杂志(Journal of Biological Chemistry)》,280:3621-27。

[0565] Medberry等人(1992)《植物细胞(Plant Cell)》4:185-192。

[0566] Medberry等人(1993)《植物杂志》3:619-626。

[0567] Mizuno等人(2003)《植物细胞生理学(Plant Cell Physiol)》,44:1168-75。

[0568] Moghadasian和Frohlich(1999)《美国医学杂志(Am.J.Med.)》107:5 88-94。

[0569] Morineau等人(2017)《植物生物技术杂志》15:729-739。

[0570] Morrison(1988)《谷类科学杂志(J Cereal Sci.)》8:1-15。

[0571] Most等人(2005)《美国临床营养学杂志(Am J Clin Nutr)》81:64-8。

[0572] Needleman和Wunsch(1970)《分子生物学杂志(J.Mol Biol.)》45:443-453。

[0573] Ness等人(2002)《自然生物技术》20:1251-1255。

[0574] Newcomer和Brash(2015)《(蛋白质科学(Protein Sci.)》24:298-309。

[0575] Nielsen等人(2004)《农业与食物化学杂志(Journal of Agricultural and Food Chemistry)》52:23 15-232 1。

[0576] Ohta等人(1986)《植物细胞生理学》27:911-918。

[0577] Ostermeier等人(1999)《自然生物技术》17:1205-1209。

[0578] Ouyang等人(2007)《核酸研究(Nucleic Acids Research)》,35:D883-D87。

[0579] Ow等人(1986)《科学》234:856-859。

[0580] Pal和Pratap(2017)《油脂科学杂志(J.Oleo.Sci.)》66:551-556。

[0581] Prasher等人(1985)《生物化学与生物物理研究通讯(Biochem.Biophys.Res.Comm.)》126:1259-68。

[0582] RoyChowdury等人(2016)《国际生物医学研究(Biomed.Res.Int.)》doi:10.1155/2016/4275904。电子版2016年6月15日。

[0583] Rukmini和Raghuram(1991)《美国营养学院杂志(J.Am.Coll.Nutr)》10:593-601。

[0584] Salomon等人(1984)《欧洲分子生物学杂志(EMBO J.)》3:141-146。

[0585] Shanklin等人(1998)《植物生理学与植物分子生物学年刊(Annu.Rev.Physiol.Plant Mol.Biol.)》49:611-641。

[0586] Shi等人(2015)《植物科学趋势(Trends in Plant Science)》,20:741-53。

[0587] Sieber等人(2001)《自然生物技术》19:456-460。

[0588] Slade和Knauf(2005)《转基因研究(Transgenic Res.)》14:109-115。

[0589] Stalker等人(1988)《科学》242:419-423。

[0590] Stemmer(1994a)《美国国家科学院院刊》91:10747-10751。

[0591] Stemmer(1994b)《自然》370(6488):389-391。

[0592] Stoutjesdijk等人(2002)《植物生理学》129:1723-1731。

[0593] Sun等人(2016)《分子植物(Molecular Plant)》9:628-631。

[0594] Suzuki等人(1993)《农业与食物化学杂志(J Agric Food Chem)》,47:1119-24。

[0595] Suzuki等人(1999)《农业与食物化学杂志》,47:1119-24。

[0596] Suzuki和Matsukura(1997)《植物科学(Plant Science)》,125:119-26。

[0597] Svitashev等人(2016)《自然通讯》7:13274。

[0598] Theriault等人(1999)《临床生物化学(Clin.Biochem.)》32:309-19。

[0599] Thillet等人(1988)《生物化学杂志(J.Biol.Chem.)》263:12500。

[0600] Toki等人(2006)《植物学杂志(The Plant Journal),47:969-76。

[0601] Toriyama等人(1986)《理论和应用遗传学(Theor.Appl.Genet.)》205:34。

[0602] Umate(2011)《植物信号与行为(Plant Signaling&Behavior)》,6:335-38。

[0603] Volkov等人(1999)《核酸研究》27:e18。

[0604] Wagner等人(1992)《美国国家科学院院刊》89:6099-6103。

[0605] Woo等人(2015)《自然生物技术(Nat Biotechnol.)》33:1162-1164。

[0606] Xu等人(2015)《植物生物技术杂志》13:526-539。

[0607] Yuan等人(1996)《生物化学杂志》,271:11034a-34。

[0608] Zafar等人(2020)《实验植物学杂志(J.Exp.Botany)》71:470-479。

[0609] Zaplin等人(2013)《功能植物生物学(Functional Plant Biology)》40:996-1004。

[0610] Zhao等人(1998)《自然生物技术》16:258-261。

[0611] Zhou等人(2011)《生物化学杂志》286:43644-43650。

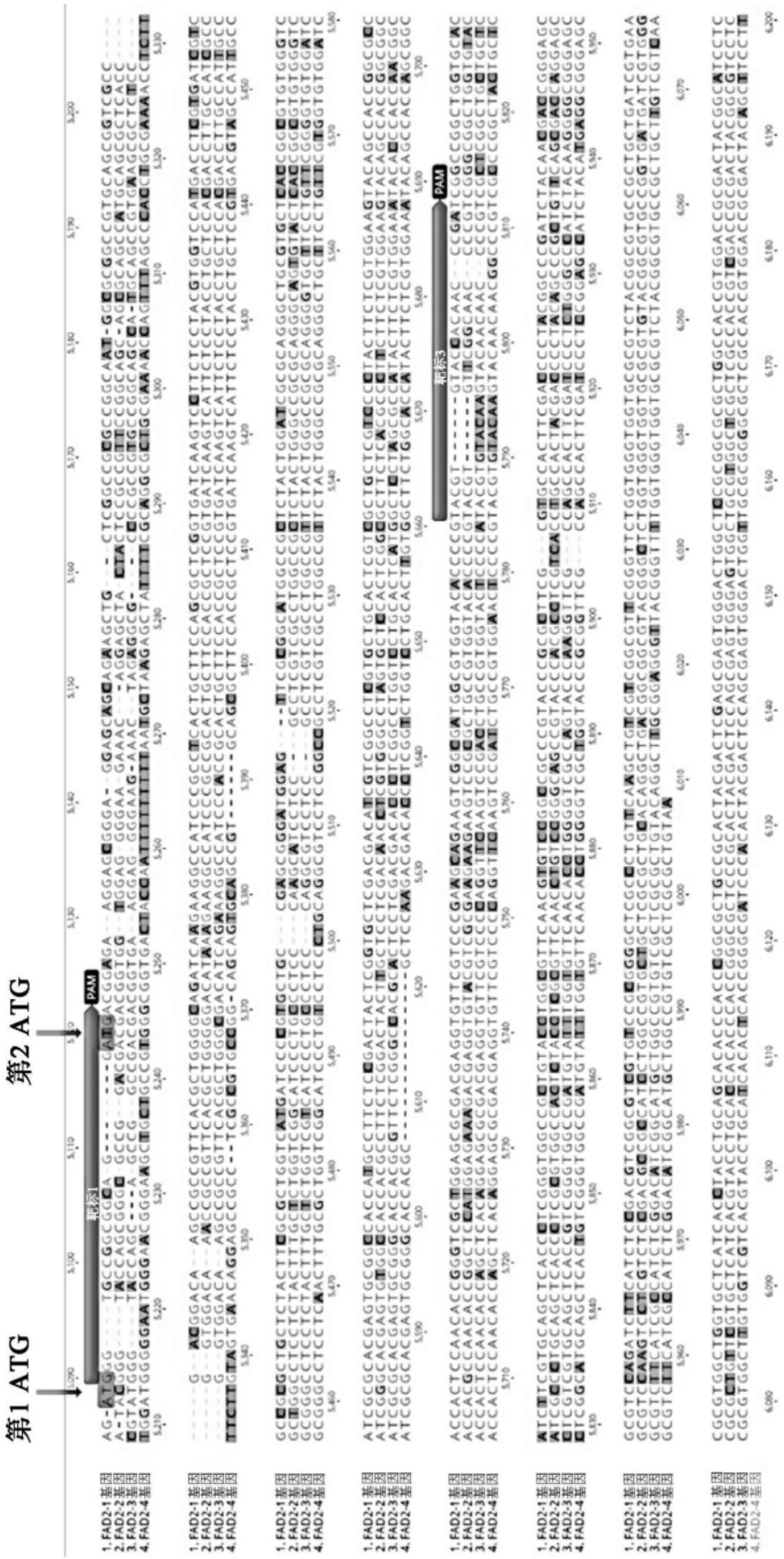


图1

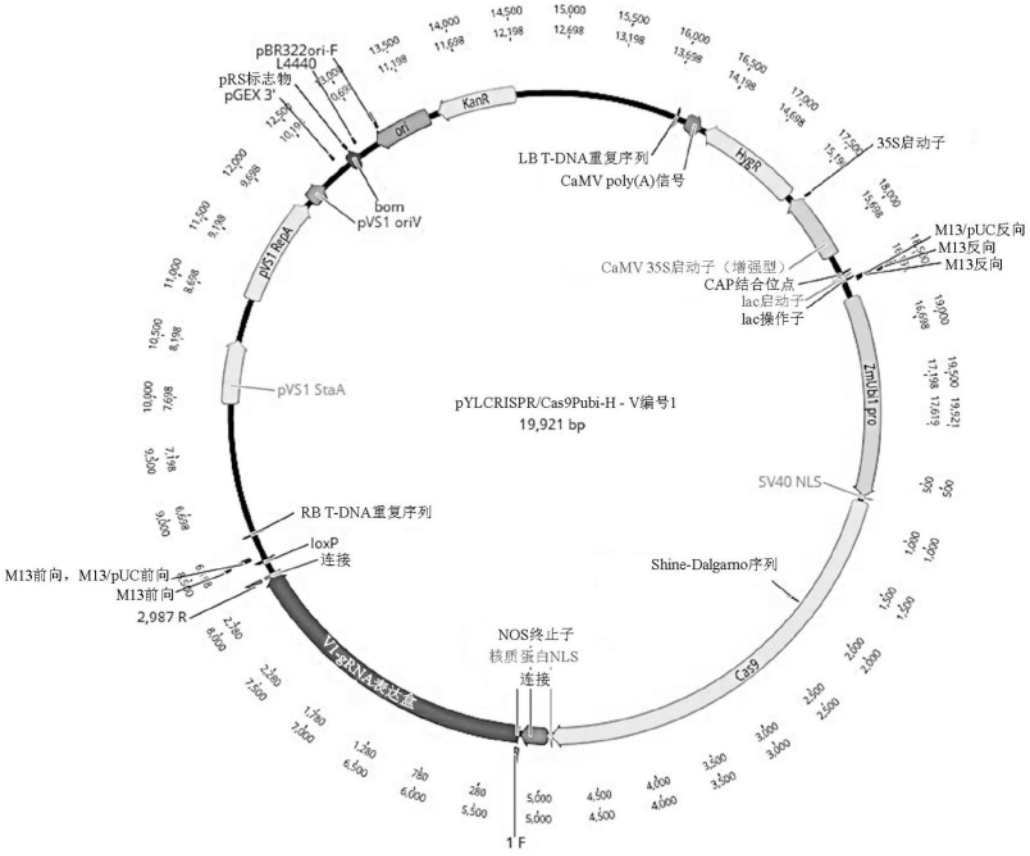

pBR322ori-F
L4440
pRS标志物
pGEX 3'
ori
KanR
LB T-DNA重复序列
CaMV poly(A)信号
HygR
35S启动子
M13/pUC反向
M13反向
M13反向
CaMV 35S启动子（增强型）
CAP结合位点
lac启动子
lac操作子
born
pVS1 oriV
pVS1 RepA
pVS1 StaA
pYLCRISPR/Cas9Pubi-H - V编号1
19,921 bp
ZmUbi1 pro
SV40 NLS
RB T-DNA重复序列
loxP
连接
M13前向，M13/pUC前向
M13前向
2,987 R
Shine-Dalgarno序列
NOS终止子
核质蛋白NLS
连接
Cas9
VLncRNA表达盒
1 F

图2

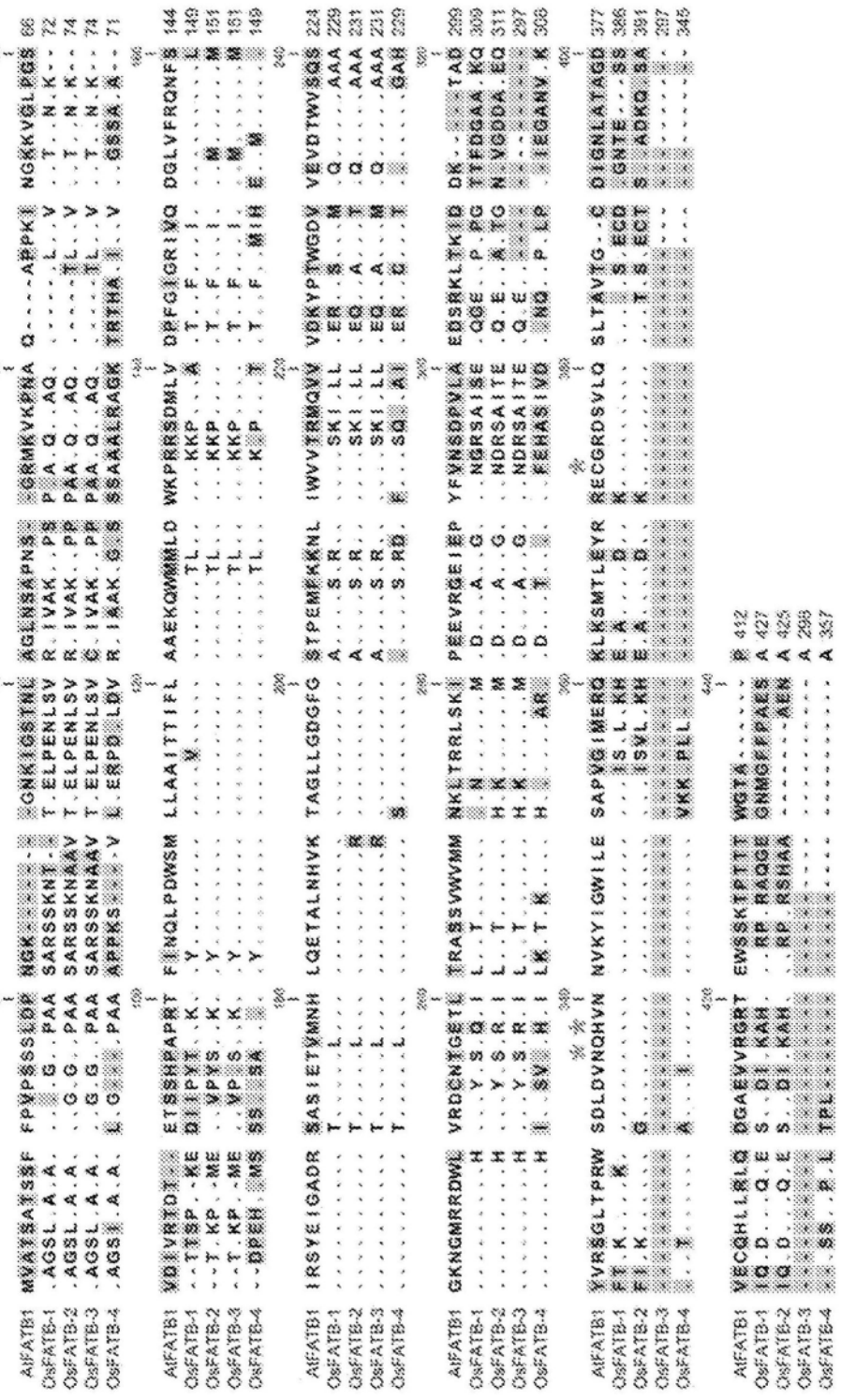


图3

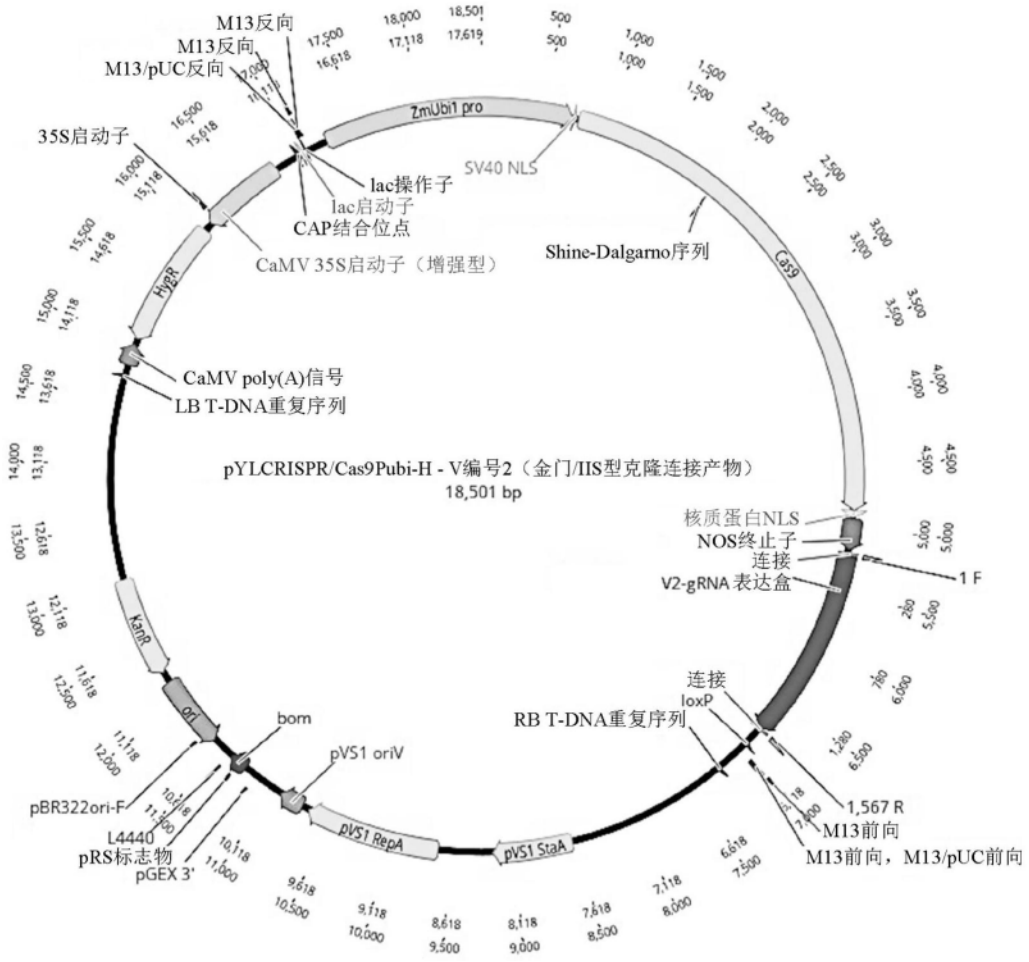

M13反向
M13反向
M13/pUC反向
35S启动子
lac操作子
lac启动子
CAP结合位点
CaMV 35S启动子（增强型）
ZmUbi1 pro
SV40 NLS
Shine-Dalgarno序列
Cas9
核质蛋白NLS
NOS终止子
连接
V2-gRNA 表达盒
1 F
连接
loxP
RB T-DNA重复序列
1,567 R
M13前向
M13前向，M13/pUC前向
pVS1 StaA
pVS1 RepA
pVS1 oriV
born
ori
KanR
pBR322ori-F
L4440
pRS标志物
pGEX 3'
HygR
CaMV poly(A)信号
LB T-DNA重复序列
pYLCRISPR/Cas9Pubi-H - V编号2（金门/IIS型克隆连接产物）
18,501 bp

图4

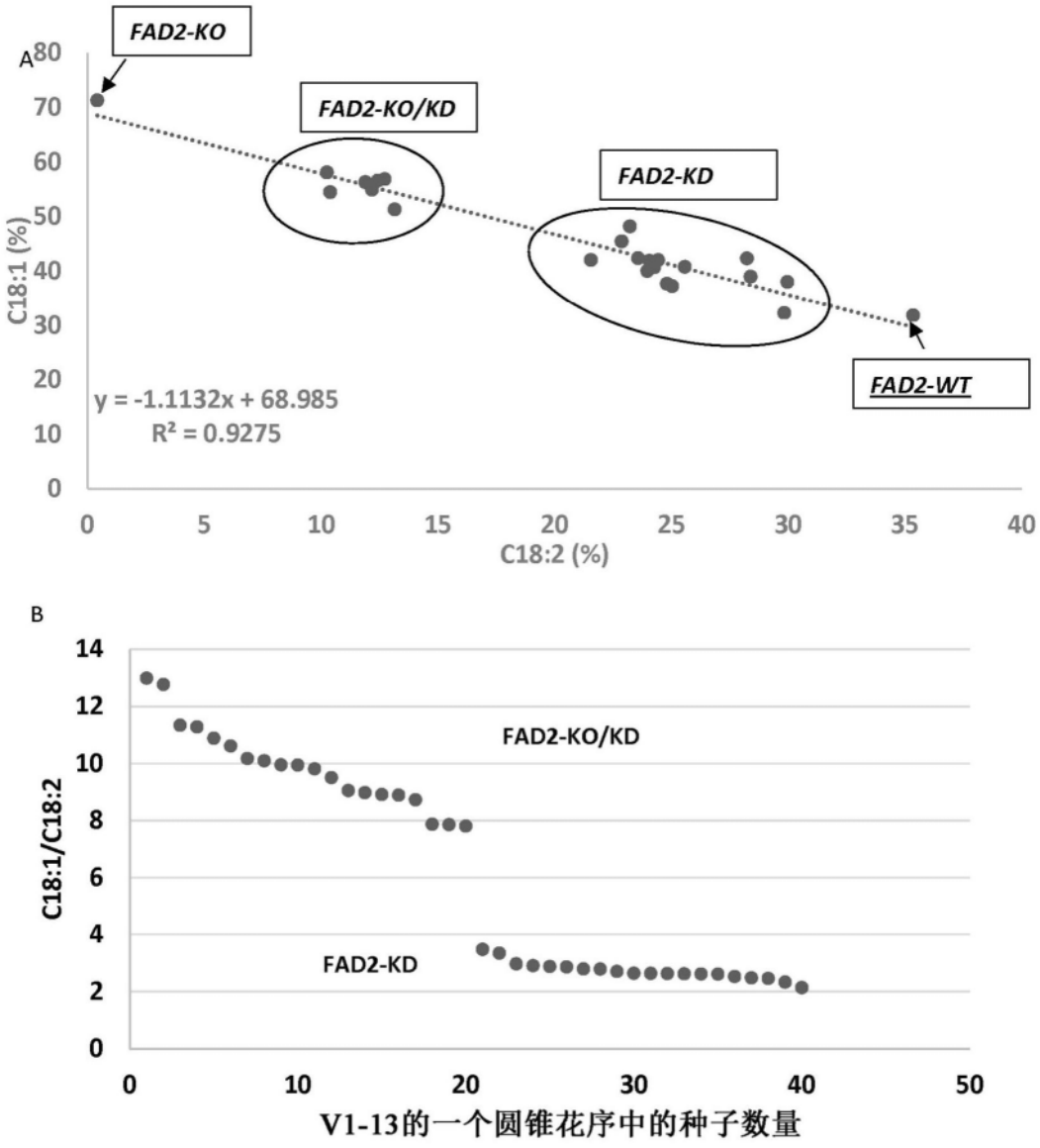

A
FAD2-KO
FAD2-KO/KD
FAD2-KD
FAD2-WT
y = -1.1132x + 68.985
R² = 0.9275
C18:1 (%)
C18:2 (%)
0
10
20
30
40
50
60
70
80
0
5
10
15
20
25
30
35
40
B
C18:1/C18:2
FAD2-KO/KD
FAD2-KD
V1-13的一个圆锥花序中的种子数量
0
2
4
6
8
10
12
14
0
10
20
30
40
50

图5

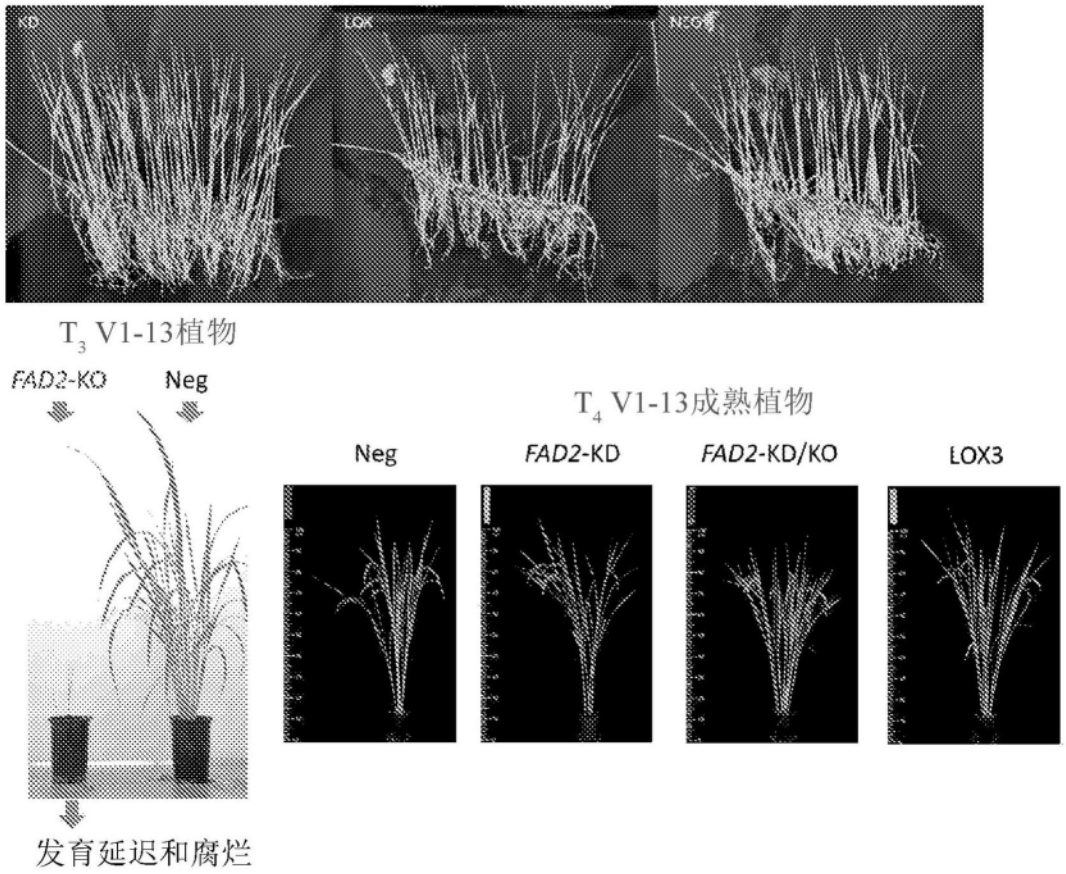

KD
LOX
NEG
T3 V1-13植物
FAD2-KO
Neg
发育延迟和腐烂
T4 V1-13成熟植物
Neg
FAD2-KD
FAD2-KD/KO
LOX3

图6

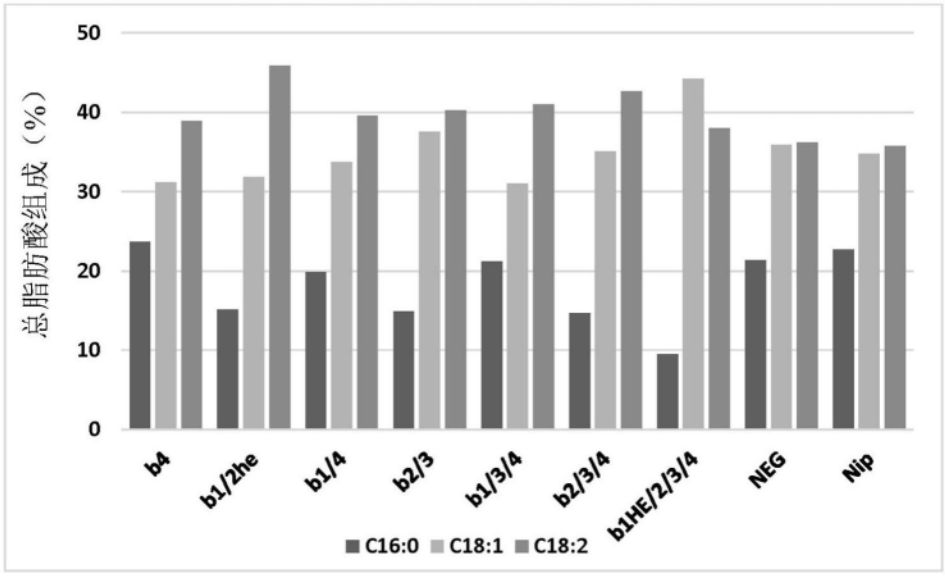

总脂肪酸组成（%）
50
40
30
20
10
0
b4
b1/2he
b1/4
b2/3
b1/3/4
b2/3/4
b1HE/2/3/4
NEG
Nip
C16:0
C18:1
C18:2

图7

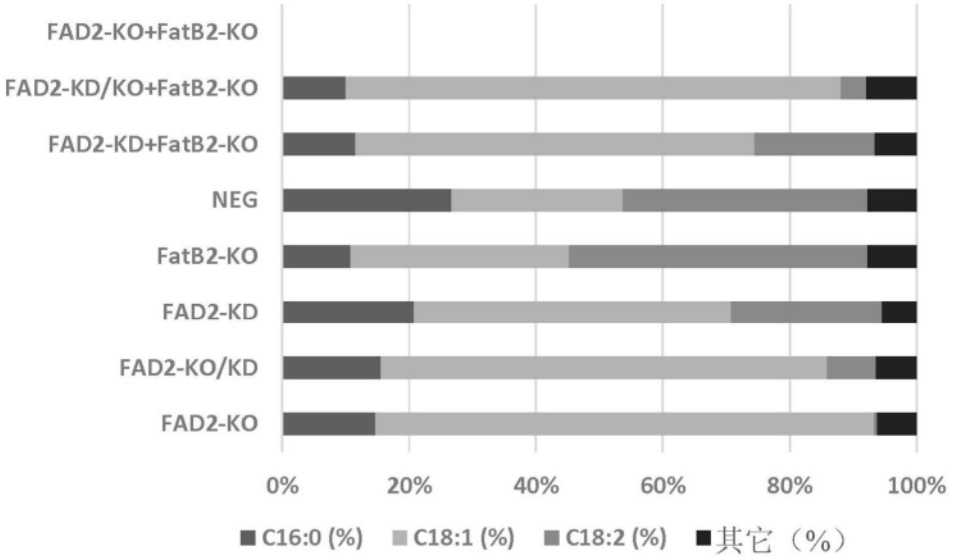

FAD2-KO+FatB2-KO
FAD2-KD/KO+FatB2-KO
FAD2-KD+FatB2-KO
NEG
FatB2-KO
FAD2-KD
FAD2-KO/KD
FAD2-KO
0%
20%
40%
60%
80%
100%
C16:0 (%)
C18:1 (%)
C18:2 (%)
其它（%）

图8

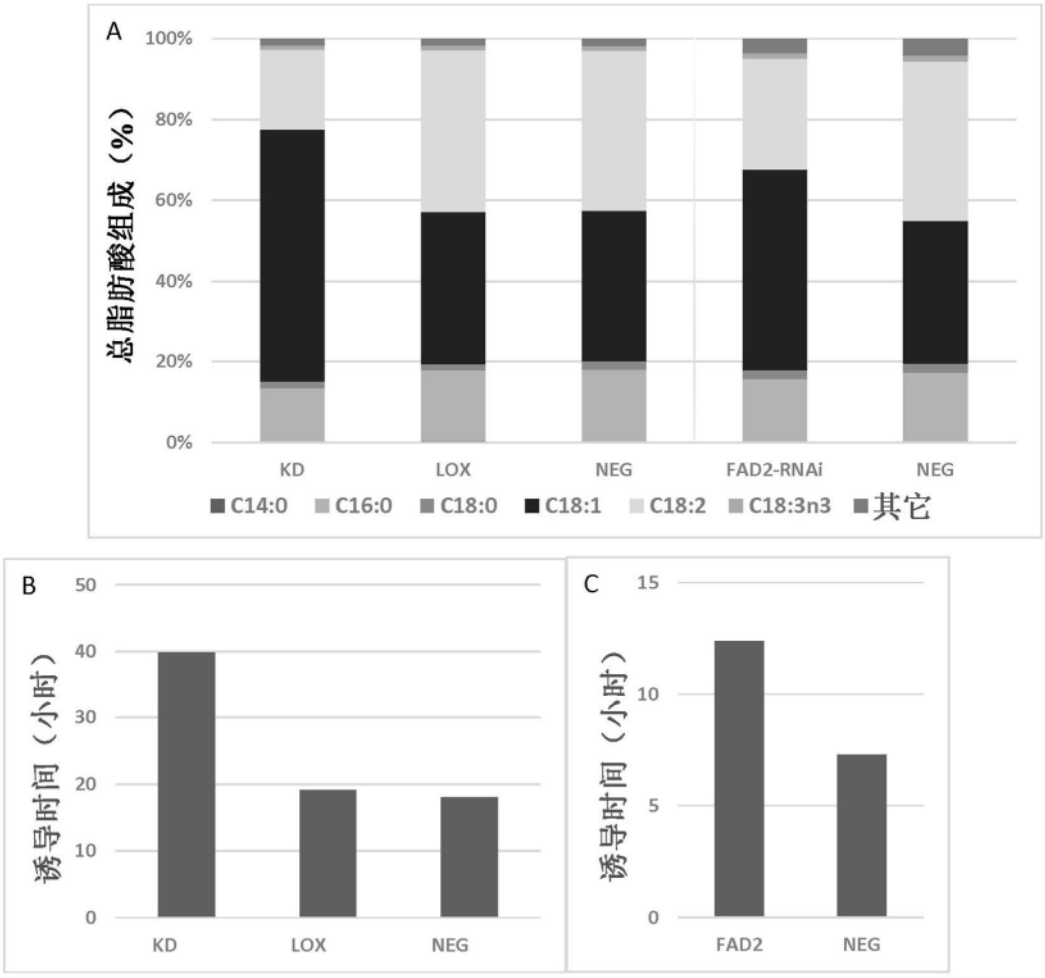

A
总脂肪酸组成（%）
100%
80%
60%
40%
20%
0%
KD
LOX
NEG
FAD2-RNAi
NEG
C14:0
C16:0
C18:0
C18:1
C18:2
C18:3n3
其它
B
诱导时间（小时）
50
40
30
20
10
0
KD
LOX
NEG
C
诱导时间（小时）
15
10
5
0
FAD2
NEG

图9

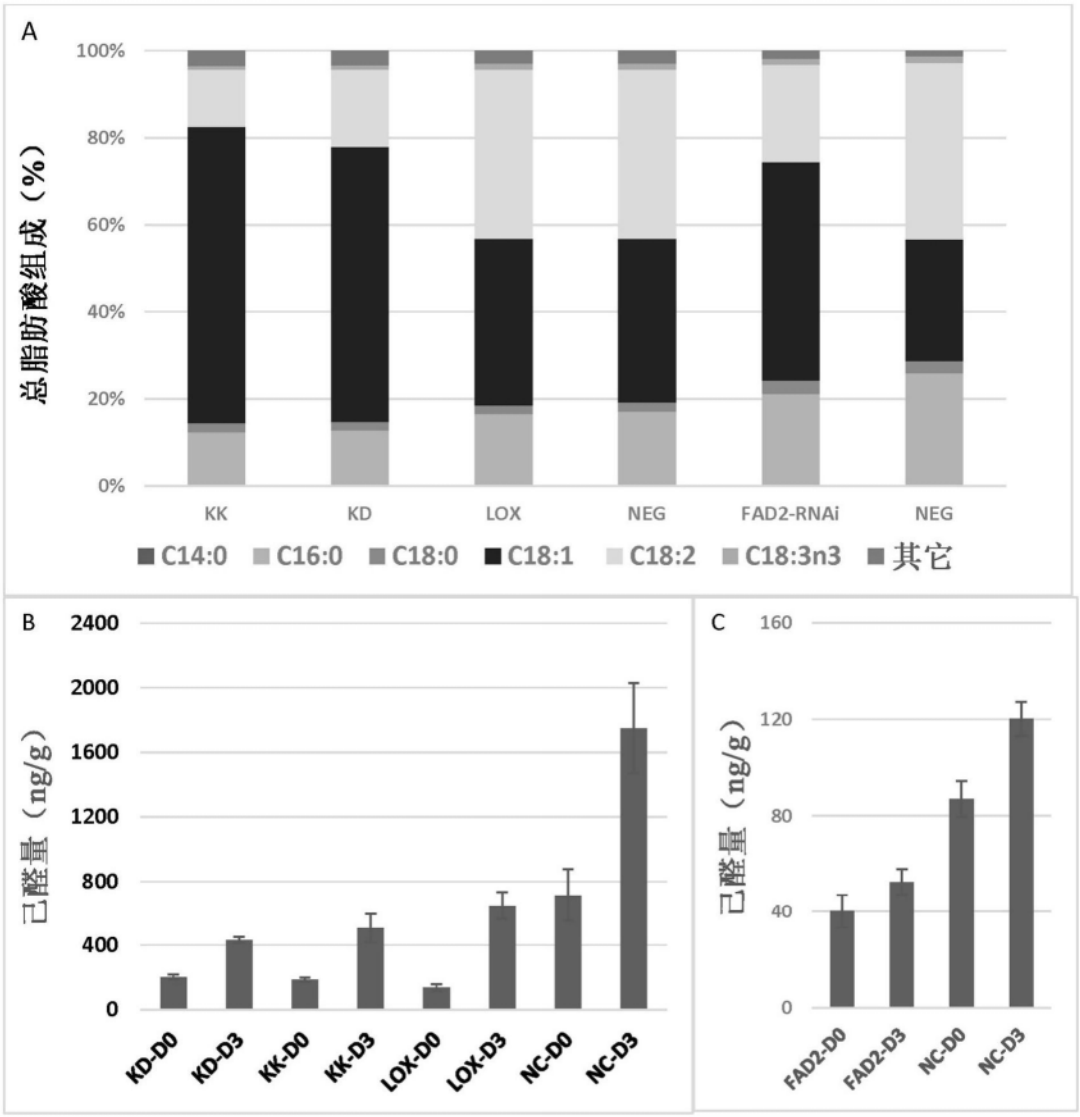

A
总脂肪酸组成（%）
100%
80%
60%
40%
20%
0%
KK
KD
LOX
NEG
FAD2-RNAi
NEG
C14:0
C16:0
C18:0
C18:1
C18:2
C18:3n3
其它
B
己醛量（ng/g）
2400
2000
1600
1200
800
400
0
KD-D0
KD-D3
KK-D0
KK-D3
LOX-D0
LOX-D3
NC-D0
NC-D3
C
己醛量（ng/g）
160
120
80
40
0
FAD2-D0
FAD2-D3
NC-D0
NC-D3

图10

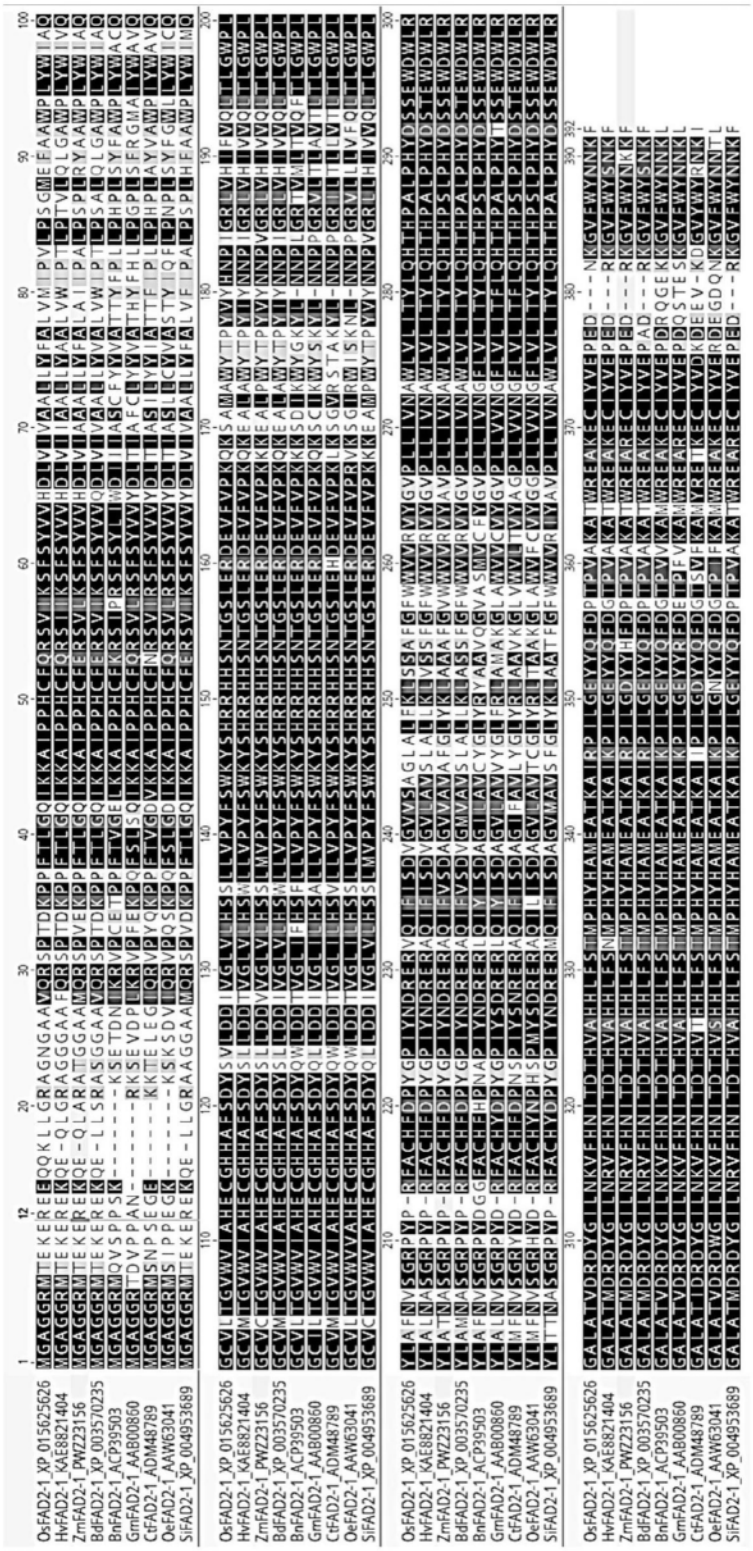


图11

图12

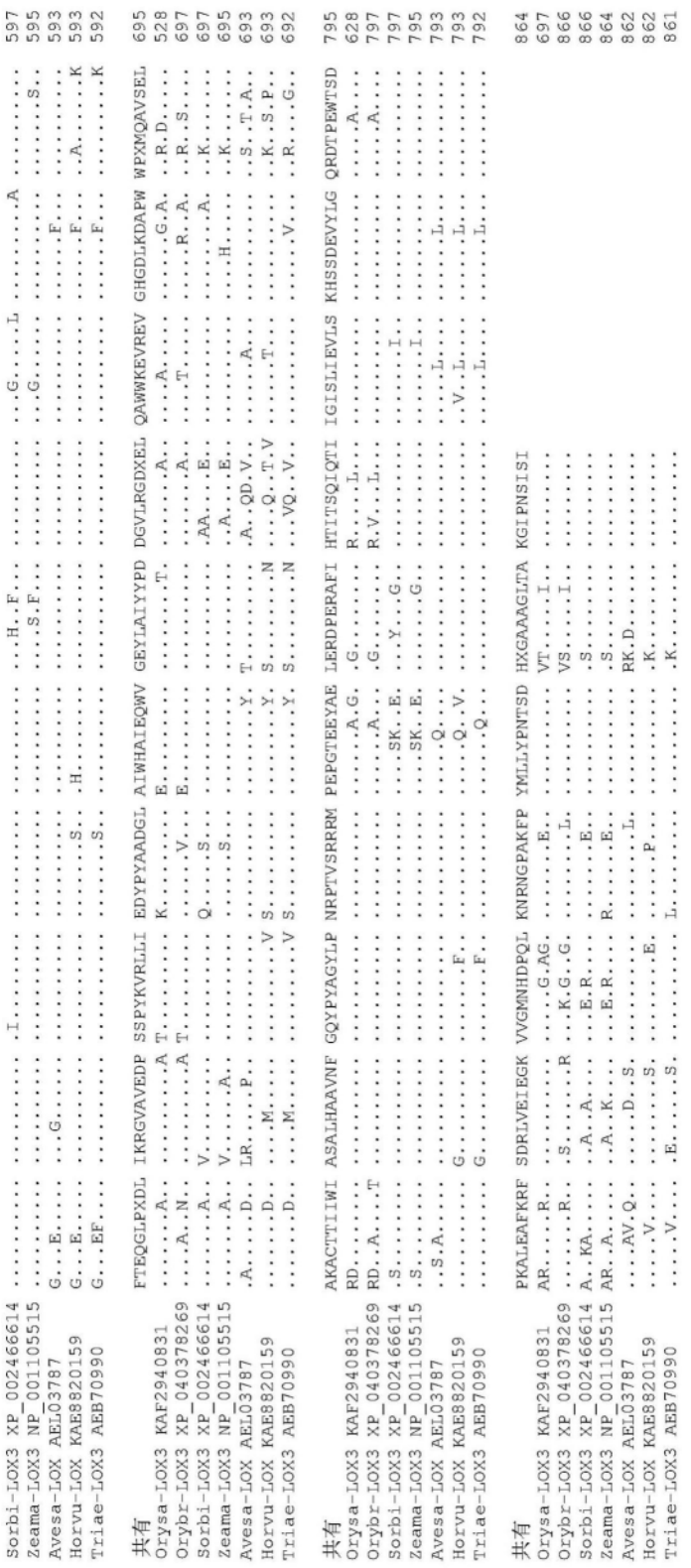


图12(续)