



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107119071 A

(43)申请公布日 2017.09.01

(21)申请号 201710423992.2

(22)申请日 2017.06.07

(71)申请人 江苏三黍生物科技有限公司
地址 226000 江苏省南通市陈桥街道集美路188号陈桥高科创业园十楼

(72)发明人 张鹏 吴银亮 周文智

(51)Int.Cl.
C12N 15/82(2006.01)
A01H 5/00(2006.01)

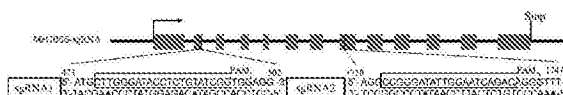
权利要求书1页 说明书22页
序列表6页 附图6页

(54)发明名称

一种降低植物直链淀粉含量的方法及应用

(57)摘要

本发明涉及生物技术和植物转基因技术领域,具体涉及一种降低植物直链淀粉含量的方法及应用,步骤一:利用多元sgRNA的CRISPR/Cas9系统编辑薯类植物GBSSI基因序列;步骤二:步骤一中所述的CRISPR/Cas9多元系统包括:系统中含有两个及两个以上的sgRNA序列的CRISPR/Cas9系统;步骤三:步骤二中的CRISPR/Cas9多元系统的sgRNA核苷酸序列选自下组:(a)如SEQ ID NO:1核苷酸序列中的核酸序列;(b)将SEQ ID NO:1核苷酸序列经过一个或多个核苷酸的取代、缺失或添加而形成的,且具有(a)核苷酸功能的由(a)衍生的核酸序列;它可以显著调节薯类植物的储藏根的发育性状,可以显著调节薯类植物的直链淀粉含量,在植物淀粉品质的遗传改良上具有良好的应用前景。



1. 一种降低植物直链淀粉含量的方法及应用,其特征在于:它采用如下的方法步骤:

步骤一:利用多元sgRNA的CRISPR/Cas9系统编辑薯类植物GBSSI基因序列;

步骤二:步骤一中所述的CRISPR/Cas9多元系统包括:系统中含有两个及两个以上的sgRNA序列的CRISPR/Cas9系统;

步骤三:步骤二中的CRISPR/Cas9多元系统的sgRNA核苷酸序列选自下组:

(a) 如SEQ ID NO:1核苷酸序列中的核酸序列;

(b) 将SEQ ID NO:1核苷酸序列经过一个或多个核苷酸的取代、缺失或添加而形成的,且具有(a)核苷酸功能的由(a)衍生的核酸序列;

(c) 与(a)限定的核酸序列有70%以上同源性且具有(a)核苷酸功能的由(a)衍生的多核苷酸序列;

步骤四:上述步骤一中的,对GBSSI基因的编辑包括如下方面:

(a) 对GBSSI基因所在基因组区域的编辑或对包含GBSSI基因所在基因组区域的编辑;

(b) 对(a)中编辑包括:单个或多个核酸位点的取代、缺失或添加;

步骤五:终止植物中GBSSI多肽的表达或终止有生物功能的GBSSI多肽的形成,从而能提高薯类植物淀粉中直链淀粉含量,降低薯类植物淀粉中支链淀粉以及调节薯类植物储藏根重量、直径或数目;

步骤六:上述步骤五中的终止植物中GBSSI多肽的表达或终止有生物功能的GBSSI多肽的形成包括:将带有步骤三的sgRNA核苷酸序列的多元CRISPR/Cas9载体分子转入植物,从而编辑植物中基因组中GBSSI基因核苷酸序列,进而终止植物中GBSSI多肽的表达或终止有生物功能的GBSSI多肽的形成的表达;

步骤七:降低植物直链淀粉含量和提高支链淀粉含量的方法还包括后续步骤:

从终止GBSSI多肽的表达或终止有生物功能的GBSSI多肽的形成后的植物中,选择出相较调节前植物而言性状获得变化的植物,包括:

直接产生的较调节前而言性状获得变化的植物;

杂交或者自交产生的有外源基因的相较调节前植物而言性状获得变化的植物;

杂交或者自交产生的无外源基因的相较调节前植物而言性状获得变化的植物。

2. 根据权利要求1所述的一种降低植物直链淀粉含量的方法及应用,其特征在于:所述的薯类植物包括:木薯、甘薯、马铃薯、山药、芋头、葛根、魔芋、洋姜和雪莲果。

3. 根据权利要求1所述的一种降低植物直链淀粉含量的方法及应用,其特征在于:编辑GBSSI核苷酸序列的sgRNA靶向GBSSI基因组核苷酸序列;优选靶向GBSSI基因组的第477-496位和1722-1741位。

4. 根据权利要求1所述的一种降低植物直链淀粉含量的方法及应用,其特征在于:利用多元CRISPR/Cas9系统编辑GBSSI基因组序列调节其表达的物质的用途,用于调节薯类植物的淀粉组成和性质。

一种降低植物直链淀粉含量的方法及应用

【技术领域】

[0001] 本发明涉及生物技术和植物转基因技术领域,具体涉及一种降低植物直链淀粉含量的方法及应用。

【背景技术】

[0002] 薯类植物主要指具有可供食用块根或地下茎的一类陆生作物。有块根、块茎类,如番薯(红薯、甘薯)、木薯、马铃薯、薯蓣(山药)、脚板薯等,多行无性繁殖,只留薯块作种,并可以用藤本进行繁殖。这类植物一般耐寒力较弱,多在无霜季节栽培,低温会抑制薯类作物的生长,造成块根或块茎的减产,因此种植薯类作物尽量避免长时间的低温期;此外,疏松、肥沃、深厚的土壤和多量钾肥有利于提高薯类作物产量及品质。

[0003] 淀粉作为重要的粮食和工业原材料在国民生产中具有重要的意义。淀粉的组成包含直链淀粉和支链淀粉两大部分。直链淀粉是D-葡萄糖基以 α -(1,4)糖苷键连接的多糖链,分子中有200个左右葡萄糖基,分子量 $1\sim 2\times 10^5$,聚合度990,空间构象卷曲成螺旋形,每一回转为6个葡萄糖基。支链淀粉分子中除有 α -(1,4)糖苷键的糖链外,还有 α -(1,6)糖苷键连接的分支,分子中含300~400个葡萄糖基,分子量 $>2\times 10^7$,聚合度7200,各分支也都是卷曲成螺旋形。不同直链淀粉含量的淀粉在工业运用和食品加工中具有极大地差异。

[0004] 因此,研究薯类植物淀粉的组成和性质,找到调节储藏根性状的关键性因素,是本领域研究的重点。

【发明内容】

[0005] 本发明的目的在于针对现有技术的缺陷和不足,提供一种降低植物直链淀粉含量和提高支链淀粉含量的方法。

[0006] 本发明所述的一种降低植物直链淀粉含量和提高支链淀粉含量的方法,它采用如下的方法步骤:

[0007] 步骤一:利用多元sgRNA的CRISPR/Cas9系统编辑薯类植物GBSSI基因序列;

[0008] 步骤二:步骤一中所所述的CRISPR/Cas9多元系统包括:系统中含有两个及两个以上的sgRNA序列的CRISPR/Cas9系统;

[0009] 步骤三:步骤二中的CRISPR/Cas9多元系统的sgRNA核苷酸序列选自下组:

[0010] (a) 如SEQ ID NO:1核苷酸序列中的核酸序列;

[0011] (b) 将SEQ ID NO:1核苷酸序列经过一个或多个核苷酸的取代、缺失或添加而形成的,且具有(a)核苷酸功能的由(a)衍生的核酸序列;

[0012] (c) 与(a)限定的核酸序列有70%以上同源性且具有(a)核酸功能的由(a)衍生的多核酸序列;

[0013] 步骤四:上述步骤一中的,对GBSSI基因的编辑包括如下方面:

[0014] (a) 对GBSSI基因所在基因组区域的编辑或对包含GBSSI基因所在基因组区域的编辑;

[0015] (b)对(a)中编辑包括:单个或多个核酸位点的取代、缺失或添加;

[0016] 步骤五:终止植物中GBSSI多肽的表达或终止有生物功能的GBSSI多肽的形成,从而能提高薯类植物淀粉中直链淀粉含量,降低薯类植物淀粉中支链淀粉以及调节薯类植物储藏根重量、直径或数目;

[0017] 步骤六:上述步骤五中的终止植物中GBSSI多肽的表达或终止有生物功能的GBSSI多肽的形成包括:将带有步骤三的sgRNA核苷酸序列的多元CRISPR/Cas9载体分子转入植物,从而编辑植物中基因组中GBSSI基因核苷酸序列,进而终止植物中GBSSI多肽的表达或终止有生物功能的GBSSI多肽的形成的表达;

[0018] 步骤七:降低植物直链淀粉含量和提高支链淀粉含量的方法还包括后续步骤:

[0019] 从终止GBSSI多肽的表达或终止有生物功能的GBSSI多肽的形成后的植物中,选择出相较调节前植物而言性状获得变化的植物,包括:

[0020] 直接产生的较调节前而言性状获得变化的植物;

[0021] 杂交或者自交产生的有外源基因的相较调节前植物而言性状获得变化的植物;

[0022] 杂交或者自交产生的无外源基因的相较调节前植物而言性状获得变化的植物。

[0023] 进一步地,所述的薯类植物包括:木薯、甘薯、马铃薯、山药、芋头、葛根、魔芋、洋姜和雪莲果。

[0024] 进一步地,编辑GBSSI核苷酸序列的sgRNA靶向GBSSI基因组核苷酸序列;优选靶向GBSSI基因组的第477-496位和1722-1741位。

[0025] 进一步地,利用多元CRISPR/Cas9系统编辑GBSSI基因组序列调节其表达的物质的用途,用于调节薯类植物的淀粉组成和性质。

[0026] 采用上述结构后,本发明有益效果为:本发明所述的一种降低植物直链淀粉含量和提高支链淀粉含量的方法,它发现通过CRISPR/Cas9多元系统编辑薯类植物基因组中GBSSI基因,调节GBSSI多肽在薯类植物中的表达,可以显著调节薯类植物的储藏根的发育性状可以显著调节薯类植物的直链淀粉含量,在植物淀粉品质的遗传改良上具有良好的应用前景。

【附图说明】

[0027] 此处所说明的附图是用来提供对本发明的进一步理解,构成本申请的一部分,但并不构成对本发明的不当限定,在附图中:

[0028] 图1是本发明中的sgRNA在GBSSI基因组序列中位置示意图。灰色方框区为外显子区,黑色线区是内含子区。

[0029] 图2是本发明中的CRISPR/Cas9多元载体示意图。其中sgRNA-cas9是中间过渡载体;pCAMBIA 1301S为终表达载体.sgRNA1、sgRNA2利用拟南芥U6启动子启动;Cas9基因由拟南芥uBQ启动子启动,带有flag标签。终载体中带有潮霉素抗性基因:hyg II,以CaMV35S启动子启动。

[0030] 图3是本发明中的转基因植株Southern blot鉴定。Mark:λ-HindIII Marker,基因组DNA通过HindIII酶切,琼脂糖胶分离、转膜后用潮霉素探针杂交,红色字体为单拷贝植株。DNA提取材料为温室盆栽苗叶片。

[0031] 图4是本发明中的CRISPR/Cas9转基因植株PCR检测结果。M:DL2000plus marker;

WT:野生型对照组;L系列:转基因系列株系。DNA提取材料为温室盆栽苗叶片,PCR扩增后琼脂糖凝胶电泳分离,红色标记为待选株系。

[0032] 图5是本发明中的二元CRISPR/Cas9基因编辑效果检测。DNA提取材料为温室盆栽苗叶片,PCR扩增后琼脂糖凝胶电泳分离,测序。

[0033] A:MeGBSSI-sg-1表示PCR产物中大片段测序结果中MeGBSSI-cas9二元体系中sgRNA1位点的基因编辑结果;MeGBSSI-sg-2表示MeGBSSI-cas9二元体系中sgRNA2位点的基因编辑结果。

[0034] B:MeGBSSI-sg-out表示PCR中小片段的测序结果,即敲除目的基因后测序结果。其中红色为sgRNA序列;蓝色为PAM序列;紫色为插入序列;“--”表示核酸被删除;灰色为原始序列。

[0035] 图6是本发明中的用多元sgRNA介导的CRISPR-Cas9技术改造木薯后直链淀粉含量。取种植室外大田生长六个月的野生型和转基因植株,提取淀粉,测定直链淀粉和支链淀粉含量。WT:野生型木薯淀粉;MeGI系列:多元sgRNA介导的CRISPR-Cas9系统编辑后的转基因植株。

【具体实施方式】

[0036] 下面将结合附图以及具体实施例来详细说明本发明,其中的示意性实施例以及说明仅用来解释本发明,但并不作为对本发明的限定。

[0037] 如图1-图6所示,本具体实施方式所述的一种降低植物直链淀粉含量的方法及应用,其陈述如下:

[0038] 本发明的“薯类植物”也称为“薯类作物”,主要指具有可供食用块根或地下茎的一类的陆生作物。包括但不限于:大戟科的块根植物如木薯、旋花科的块根植物如甘薯,茄科的块茎植物如马铃薯,薯蓣科的块根植物如山药,天南星科的块茎植物如芋头、魔芋,豆科块根植物如葛根,菊科块茎植物如洋姜,雪莲果等。

[0039] 本发明包括CRISPR/Cas9多元载体系统;其中:

[0040] 1) 本发明中的术语“多元”是指带有两个或多余两个基本上保持本发明中GBSSI核苷酸序列中的sgRNA序列相同的生物学功能或活性的核苷酸序列。

[0041] 多元可以是两个或两个以上的sgRNA均来自于SEQ ID NO:1所在区域;

[0042] 或两个或两个以上的sgRNA至少有一个来自于SEQ ID NO:1所在区域;

[0043] 或两个或两个以上的sgRNA均来自SEQ ID NO:1所在区域以外,但敲除或编辑区域包含SEQ ID NO:1。

[0044] 任何一种GBSSI基因组来源的sgRNA的生物活性核苷酸片段都可以应用到本发明中。

[0045] 本发明中,sgRNA的生物活性片段的含义是指作为一种核苷酸序列,其仍然能保持正常的sgRNA的全部或部分功能。通常情况下,生物活性片段至少保持50%的正常的sgRNA的活性。在更优选的条件下,活性片段能够保持全长SRD多肽的60%、70%、80%、90%、95%、99%、或100%的活性。

[0046] 2) 本发明的sgRNA序列可以是如下陈述:

[0047] GBSSI基因组中内含子区域中的核苷酸序列或者有一个或多个核苷酸被取代的但

仍具有本发明中sgRNA功能的核苷酸序列；

[0048] 或GBSSI基因组中外显子区域中的核苷酸序列或者有一个或多个核苷酸被取代的但仍具有本发明中sgRNA功能的核苷酸序列

[0049] 或突变或者敲除区域包含本发明中GBSSI基因组整个或者部分区域的核苷酸序列或者有一个或多个核苷酸被取代的但仍具有本发明中sgRNA功能的核苷酸序列。根据本文的定义这些多元、sgRNA属于本领域熟练技术人员公知的范围。

[0050] 3) 在本发明中,术语“GBSSI基因组”指具有生物活性的SEQ ID NO:1序列的多核苷酸。该术语还包括具有与GBSSI核苷酸相同功能的SEQ ID NO:1序列的变异形式。这些变异形式包括(但并不限于):若干个(通常为1-150个,较佳地1-90个,更佳地1-60个,最佳地1-30个,还更佳如1-24个、1-15个)核苷酸的缺失、插入和/或取代。例如,在本领域中,不同品种来源的木薯GBSSI基因组序列存在多态性,通常不会改变核苷酸序列的功能。又比如,在C末端和/或N末端添加一个或数个标签序列通常也不会改变核算序列的功能。

[0051] 4) GBSSI核苷酸序列的变异形式包括:同源序列、保守性变异体、等位变异体、天然突变体、诱导突变体、在高或低的严紧度条件下能与GBSSI核酸序列杂交的DNA序列。

[0052] 5) 任何与GBSSI基因序列同源性高(比如与SEQ ID NO:1所示的序列的同源性为70%或更高;优选的,同源性为80%或更高;更优选的,同源性为90%或更高,如同源性95%,98%或99%)的、且具有GBSSI基因序列相同功能的核酸序列也包括在本发明内。

[0053] 6) 应理解,虽然本发明的GBSSI基因序列优选获自木薯,但是获自其它植物的与木薯GBSSI基因序列高度同源(如具有70%以上,如80%、90%、95%、甚至98%序列相同性)的其它多核苷酸也在本发明考虑的范围之内。比对序列相同性的方法和工具也是本领域周知的,例如BLAST。

[0054] 7) 本发明还涉及编码,本发明中的GBSSI多肽或其保守性变异多肽的多核苷酸序列。

[0055] 多核苷酸可以是DNA形式或RNA形式。

[0056] DNA形式包括cDNA、基因组DNA或人工合成的DNA。

[0057] DNA可以是单链的或是双链的。DNA可以是编码链或非编码链。

[0058] 编码成熟多肽的编码区序列可以与SEQ ID NO:1所示的编码区序列相同或者是简并的变异体。如本文所用,“简并的变异体”在本发明中是指编码具有SEQ ID NO:2的蛋白质,但与SEQ ID NO:1所示的编码区序列有差别的核酸序列。

[0059] 编码SEQ ID NO:2的成熟多肽的多核苷酸包括:只编码成熟多肽的编码序列;成熟多肽的编码序列和各种附加编码序列;成熟多肽的编码序列(和任选的附加编码序列)以及非编码序列。

[0060] 术语“编码多肽的多核苷酸”可以是包括编码所述多肽的多核苷酸,也可以是还包括附加编码和/或非编码序列的多核苷酸。

[0061] 8) 本发明还涉及与上述的序列杂交且两个序列之间具有至少50%,较佳地至少70%,更佳地至少80%相同性的多核苷酸。

[0062] 9) 本发明的GBSSI基因序列全长序列或其片段通常可以用PCR扩增法、重组法或人工合成的方法获得。

[0063] 对于PCR扩增法,可根据本发明所公开的有关核苷酸序列,尤其是开放阅读框序列

来设计引物,并用市售的cDNA库或按本领域技术人员已知的常规方法所制备的cDNA库作为模板,扩增而得有关序列。

[0064] 10) 本发明也涉及包含所述的多核苷酸的载体,以及用所述的载体或GBSSI基因序列经基因工程产生的宿主细胞。

[0065] 11) 本发明还提供了一种调节薯类植物的淀粉组成和性质的方法,该方法包括调节所述薯类植物中GBSSI多肽的表达。

[0066] 更优选地,所述的方法包括:编辑所述薯类植物中GBSSI基因组核苷酸序列,调节GBSSI多肽的表达(包括使终止GBSSI多肽的表达或终止有生物学功能的GBSSI多肽的形成),从而调节薯类植物淀粉的直链淀粉和支链淀粉的含量,包括:提高薯类植物淀粉中直链淀粉含量;降低薯类植物淀粉中支链淀粉的含量;调节薯类植物储藏根重量、直径或数目。

[0067] 可以采用本发明中涉及的基因编辑系统来终止GBSSI多肽的表达或终止有生物学功能的GBSSI多肽的形成。

[0068] 12) 作为本发明的一种实施方式,提供了一种通过CRISPR/Cas9多元系统编辑薯类植物基因组中GBSSI基因,调节GBSSI多肽在薯类植物中的表达,从而提高薯类植物直链淀粉含量同时降低支链淀粉含量的方法。

[0069] 其方法包括:步骤一:将携带GBSSI基因组sgRNA的多元CRISPR/Cas9载体分子转入植物组织、器官或种子,获得转化入所述编辑功能的植物组织、器官或种子;步骤二:将步骤一获得的转入了所述携带GBSSI基因组sgRNA的多元CRISPR/Cas9载体分子的植物组织、器官或种子再生成植物。

[0070] 作为一种优选的实例,其方法包括以下步骤:

[0071] (i) 提供携带可编辑GBSSI基因组的载体的农杆菌,所述的载体选自下组:

[0072] (a) 含有启动的sgRNA和Cas9多肽的编码基因或基因片段的载体;

[0073] (b) 含有可在植物体内编辑GBSSI基因组和甘薯序列的载体;

[0074] (ii) 将植物的组织或器官与步骤(i)中的农杆菌接触,从而使所述载体转入植物组织或器官。

[0075] 较佳地,其方法还包括:

[0076] (iii) 选择出转入了所述载体的植物组织或器官;和

[0077] (iv) 将步骤(iii)中的植物组织或器官再生成植物。

[0078] 基于GBSSI基因的核苷酸序列,可以设计出在导入植物体后可特异性识别GBSSI靶点的多核苷酸。设计时要考虑到特异性以及编辑的效率。本发明对sgRNA序列的制备方法没有特别的限制,包括但不限于:化学合成法,体外转录法等。应理解,本领域技术人员在得知了CRISPR/Cas9多元系统的组成、sgRNA序列与植物性状的相关性以后,可以以各种途径制备出所述的表达系统,从而用于调节植物性状。所述的多元系统可通过转基因技术被输送到植物体内,或还可采用本领域已知的多种技术被输送到植物体内。

[0079] 13) 作为本发明的优选,提供了一种效果优异的sgRNA分子,可特异性的编辑GBSSI基因组序列;并且经验证,其具有良好的调节GBSSI多肽生物学功能的效果。sgRNA分子是含有SEQ ID NO:1中第477-496位和1722-1741位所示的核苷酸序列的分子,构成二元系统。

[0080] 14) 本发明还提供了一种构成二元系统,所述二元系统含有两个sgRNA序列,可以

在基因组中定向敲除大片段序列。所述的双元系统在导入到植物体内后,可在基因组中两个特异的靶点同时编辑基因组,编辑后在造成两个靶点突变的同时还可以将两个靶点间的核苷酸序列片段敲除。通常,所述的双元系统位于表达载体上。

[0081] 15) 本发明还包括利用前述任一种方法获得的植物,所述的植物包括但不限于从终止GBSSI多肽的表达或终止有生物功能的GBSSI多肽的形成后的植物中选择出相较调节前植物而言性状获得变化的植物,例如:直接产生的较调节前而言性状获得变化的植物;杂交或者自交产生的有外源基因的相较调节前植物而言性状获得变化的植物;杂交或者自交产生的无外源基因的相较调节前植物而言性状获得变化的植物。可采用任何适当的常规手段,包括试剂、温度、压力条件等来实施所述的方法。

[0082] 下面结合具体实施例,进一步阐述本发明。应理解,这些实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件如J. 萨姆布鲁克等编著,分子克隆实验指南,第三版,科学出版社,2002中所述的条件,或按照制造厂商所建议的条件。

[0083] 具体实施例一:木薯MeGBSSI基因sgRNA的选择和合成:

[0084] 本发明中,为获得木薯MeGBSSI基因sgRNA序列,本司利用NCBI数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)找到了木薯的MeGBSSI基因组核苷酸序列。全长2097bp;将此三个基因序列通过Blastp及Blastn在RIKEN cassava cDNA数据库(<http://www.brc.riken.jp/inf/en/index.shtml>)中搜索找到其基因组序列,全长3397bp,包含13个外显子,编码699个氨基酸。

[0085] 从基因组序列中筛选出特异的sgRNA序列MeGBSSI-sgRNA1:5'-TTGGGATACCTCTGTATCGG-3';MeGBSSI-sgRNA2:5'-CGGGATATTGGAATCAGACA-3',合成sgRNA序列。如下:

[0086] sgRNA1:

[0087] LP:5'-GATTGTTGGGATACCTCTGTATCGG-3';

[0088] RP:5'-AAACCCGATACAGAGGTATCCCAAC-3';

[0089] sgRNA2:

[0090] LP:5'-GATTGCGGGATATTGGAATCAGACA-3'

[0091] RP:5'AAACTGTCTGATTCCAATATCCCGC-3';

[0092] 具体实施例二:木薯MeGBSSI基因CRISPR/Cas9双元载体的构建及转基因木薯的获得:

[0093] 本司首先通过BbsI酶切方法分别将两个sgRNA片段导入到两个sgRNA-cas9中间载体中,然后在利用KpnI和XbaI双酶切将任意一sgRNA导入sgRNA-cas9中间载体形成双元中间过渡载体:sgRNA1-cas9-sgRNA2。再将构建好的双元中间过渡载体转入表达载体pCAMBIA1301S中。然后将sgRNA1-cas9-sgRNA2-P1301s转入农杆菌LBA4404,再通过农杆菌侵染木薯脆性悬浮愈伤,侵染后的愈伤组织通过再生、筛选等过程得到阳性植株,分别将sgRNA1-cas9-sgRNA2-P1301s转基因木薯记作MeGBSSI-cas9,分别缩写为MeGI。如图1、图2所示。

[0094] 具体实施例三:MeGBSSI-Cas9转基因木薯的分子鉴定:

[0095] 通过农杆菌介导的木薯悬浮愈伤转化共获得sgRNA1-cas9-sgRNA2-P1301s阳性转基因木薯MeGI-1、5、12、16、17等共20个株系,随后通过Southern blot筛选最后获得单拷贝

转基因植株为MeGI L1/L2/L4/L9等共4个株系。

[0096] 具体实施例四“MeGBSSI-Cas9转基因木薯的基因编辑检测

[0097] 为了验证CRISPR/Cas9的基因编辑效果,本发明人分别提取了转基因木薯的基因组,设计扩增引物:FP:5'-GTGATGTTCTTGGAGGACTCCCC-3';RP:5'-CCTGGACGTCCATGCCATTTATA-3'通过PCR扩增单拷贝植株中MeGBSSI的目的编辑片段。结果显示,在MeGBSSI-Cas9系列转基因株系中,L2/L4/L9/L12中有小片段出现(图3),测序结果显示小片段为理论敲除后的序列,且在sgRNA1和sgRNA2的靶点处存在插入突变(图4);对大片段测序结果显示,在sgRNA1和sgRNA2编辑位点也存在突变现象其中包括插入突变、删除突变、替换(图4)。说明我们的双元系统具有很高的基因敲除效率和编辑效率。

[0098] 具体实施例五:MeGBSSI-Cas9转基因木薯对淀粉组成成分的影响

[0099] 在大田中,观察野生型木薯以及MeGBSSI-Cas9转基因木薯的生长、发育以及产量性状。

[0100] 于四月中旬从三亚种苗库中收获MeGBSSI-Cas9转基因木薯的种茎,在上海五库中试试验田中起垄,垄高50cm,垄间距为100cm,将种茎扦插于垄上,随后铺上地膜,在前三个月平均每周浇一次水,保持土壤潮湿,三个月以后,20天左右浇一次水,保持土壤不旱即可,并于第五个月施加一次复合肥,直至收获。

[0101] 提取野生型及转基因木薯成熟储藏根中的淀粉,测定其直链淀粉含量。结果显示野生型木薯直链淀粉含量为26%,在MeGBSSI-Cas9直链淀粉含量显著下降,介于5%-23%之间。

[0102] 在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考,就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解,在阅读了本发明的上述讲授内容之后,本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改,这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

[0103]

SEQUENCE LISTING

<110> 江苏三黍生物科技有限公司

<120> 一种降低植物直链淀粉含量的方法及应用

<130> 20170607

<160> 10

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 3397

<212> DNA

<213> Manihot esculenta

<400> 1

atggcaactg taatagctgc acatttagtt tccaggagct cacacttgag catccatgca 60

ttagagacta aggctaataa gttgtctcac actggaccct ggacccaaac tatcactccc 120

aatggtttaa ggtccctcaa cactatggat aaactccaaa tgaagacaca atcaaaaagca 180

gigaaaaagg tctctgccac cggcaatggt aggctgctg ccaaaattat ttgtggcat 240

ggaatgaatt taatctttgt tggagetgaa gttggtcct ggagcaaaac tgggtgactt 300

ggtgatgttc ttggaggact cccccctgcc atggccgtaa gtagaggacc cttcttttgt 360

[0104]

tctttctgcc tcgctttggt ttaattaata tgctgaattc aactgttaet cctctttcag 420

gcaagagggc accggtcat gacagtgtct ccccgtatg accagtacaa ggatgcttgg 480

gatacctctg tateggtgga ggtatctttt cttattttta agaggcattt tctttctttg 540

ttatgtatct ccaattgtag gatttttttt aaaaattttt tttctcttc tagctatgtg 600

catctegatt ctcatittgca gattaanaatt ggagatagaa ttgaaactgt ccgctttctc 660

cactcctaca aaagaggagt tgategggtc ttcgtggatc atccaatggt ccttgagaag 720

gttgaaaga acttgcaata attatagaaa cttgtatagg aaaaaacatt tcgattgctt 780

cttttctctg attccaaact tgttttaate ttaaggtatg gggcaaaact ggatctaaaa 840

tatatgccc aagagcaggt ttggattacc aggacaacca actgagattt agettgttat 900

gccttgtaag tcttgcattt gtttcttttt tcccaaat gaacaaagga taatgttttt 960

tccaagtaaa cggegtttct tcttaaaaag aactcttta ttgagattca tgeatcgtct 1020

agtgetgctt tacagtttgt agctagcagg cggttattca aaaagtttc cctetaatac 1080

ctgcagctg ctctggagge accgagagtt ctgaacttga acagcagcaa aaatttctca 1140

ggaccctacg gtgtgfactt tttaccaaaa tcttaattgg gattttcaat ttctctgttg 1200

aaaagtaact atttttaaac caatgcattt tgctttctta aattcttaat gcaggagaag 1260

[0105]

aagttgcctt cattgccaac gactggcaca ctgctctgct tccatgitat ctaaaagcca 1320

tttaccaacc tatggggatt tacaaacacg ccaaggtttt taccctett aattgggact 1380

gaatagttaa tgattctgga ttacttgaaa gtgtcatttt cggggttggg gacttgtttg 1440

ttttttaat cgatgatagg ttgccttttg catccacaac attgcatatc agggaagatt 1500

tgeettetea gacttcccac gacttaatct gccagataaa ttcaaaaget cttttgactt 1560

tatcgatggg tatgattatt agggcagttg gtcttgccaa tgtgactccc gttgtttatg 1620

gittccatga attacttctc ttgcctagtg ttgaaaggct ttgctcttct tgcaggtat 1680

gagaagcccg tgaaggaag gaaaatcaat tggatgaagg cgggatatt ggaatcagac 1740

agggttttga ctgtgagccc atactatgcc caagaagtca tctctggagt tgaagagge 1800

gtcgagctgg ataacttcat tcgtaaaact ggcattgctg gtattataaa tggcatggac 1860

gtccaggagt ggaatcctgt tacagataaa tacattgaca tccactaega tgccacaact 1920

gtgagtgcct cgcagtaatt tgaagtttgt aagcagtaca taatcaatag caaatgatgg 1980

tgatcgttgg gatttttctt gttcaggtta tggacgcaaa acctttgttg aaggaagccc 2040

ttcaagcaga agtcggattg cctgttgata ggaatgttcc ttgatagge ttcatggta 2100

gattagaaga gcagaagggt tcagatattt ttgttgacgc tatttcccaa ttggttgaac 2160

[0106]

acaatgtgca gatagfaatc cttgtaagta tcagaattaa ggatgtcett ggttgtgttg 2220

tgagacatgc cgtgtctgaa gatatgactt gttctttcag ggaactggca aaaagaaatt 2280

tgagaagcag attgagcatc tggaggtttt gtaccctgac aaggcaagag gagttgcaaa 2340

attcaatgtg ccgttggcgc acatgateac agctggtgca gactttatgc tggttccaag 2400

tagatttgag cctgtggtc tcattcagtt gcatgctatg cgatatggaa cagtaatggc 2460

gtaagecct tttcttctcc tttctatggc tgctatctg attctaatac caatggetta 2520

tggcatgget tttcccgctca gttgcegcga tggcagtaca tggcagttaa caacatctaa 2580

tcttgegeca ggttcccatt gttgcttcta ctggtggtct tgttgatact gttaaagaag 2640

gttacacagg attccaaatg ggggccttgc gcgttgaagt aagtaaagag gcgattgctg 2700

caattttatt cttttcgctc taaatattga aacgatgcga ctcaccagtg ggatattttc 2760

cagtgtgaca aaattgattc agcagatgta gctgcgatag ttaaaactgt ggcaagaget 2820

cttggcaett atgetaccgc tgcattaaga gaaatgatcc tgaattgeat ggcccaagac 2880

ttgtcatgga aggtttgtat atgactaagt atctaggagg ctcactctca ttgttaacta 2940

acctattctt tgagtgcaaa ttggattgac tggtagcact ttgcaagaga aaagcttaca 3000

agtatgcatt atggtttgat gcagggacca gccagaatgt gggagaaaat gctcctggac 3060

[0107]

ctggaagttag ctggcagcga acctggcact gaaggggagg agatcgctcc tcttgctaag 3120

gagaacgttc ccacgccttg agcagcaagg ataataataa tcttgacggt gtagaaatat 3180

tgacatttat ggatatacgt taacgcgcag ataaatatcc attccagtag getagtctgc 3240

tgggatcaaa ggcacccttt gttttctat tccaacggcc atgatttctt tgtgaagggt 3300

gaatggtgtc tgaatcagtg ttaaagagaa tttaacaacta acgtattaca gcctttgcct 3360

ggcgttatgt gcgtaaataa aggttcatct tetgaca 3397

<210> 2

<211> 695

<212> PRT

<213> Manihot esculenta

<400> 2

Met Ala Thr Val Ile Ala Ala His Phe Val Ser Arg Ser Ser His Leu

1 5 10 15

Ser Ile His Ala Leu Glu Thr Lys Ala Asn Asn Leu Ser His Thr Gly

20 25 30

Pro Trp Thr Gln Thr Ile Thr Pro Asn Gly Leu Arg Ser Leu Asn Thr

35 40 45

Met Asp Lys Leu Gln Met Lys Thr Gln Ser Lys Ala Val Lys Lys Val
 50 55 60

Ser Ala Thr Gly Asn Gly Arg Pro Ala Ala Lys Ile Ile Cys Gly His
 65 70 75 80

Gly Met Asn Leu Ile Phe Val Gly Ala Glu Val Gly Pro Trp Ser Lys
 85 90 95

[0108] Thr Gly Gly Leu Gly Asp Val Leu Gly Gly Leu Pro Pro Ala Met Ala
 100 105 110

Ala Arg Gly His Arg Val Met Thr Val Ser Pro Arg Tyr Asp Gln Tyr
 115 120 125

Lys Asp Ala Trp Asp Thr Ser Val Ser Val Glu Ile Lys Ile Gly Asp
 130 135 140

Arg Ile Glu Thr Val Arg Phe Phe His Ser Tyr Lys Arg Gly Val Asp
 145 150 155 160

Arg Val Phe Val Asp His Pro Met Phe Leu Glu Lys Val Trp Gly Lys
 165 170 175

Thr Gly Ser Lys Ile Tyr Gly Pro Arg Ala Gly Leu Asp Tyr Gln Asp
 180 185 190

Asn Gln Leu Arg Phe Ser Leu Leu Cys Leu Ala Ala Leu Glu Ala Pro
 195 200 205

Arg Val Leu Asn Leu Asn Ser Ser Lys Asn Phe Ser Gly Pro Tyr Gly
 210 215 220

[0109]

Glu Glu Val Ala Phe Ile Ala Asn Asp Trp His Thr Ala Leu Leu Pro
 225 230 235 240

Cys Tyr Leu Lys Ala Ile Tyr Gln Pro Met Gly Ile Tyr Lys His Ala
 245 250 255

Lys Val Ala Phe Cys Ile His Asn Ile Ala Tyr Gln Gly Arg Phe Ala
 260 265 270

Phe Ser Asp Phe Pro Arg Leu Asn Leu Pro Asp Lys Phe Lys Ser Ser
 275 280 285

Phe Asp Phe Ile Asp Gly Tyr Glu Lys Pro Val Lys Gly Arg Lys Ile
 290 295 300

Asn Trp Met Lys Ala Gly Ile Leu Glu Ser Asp Arg Val Leu Thr Val
 305 310 315 320

Ser Pro Tyr Tyr Ala Gln Glu Val Ile Ser Gly Val Glu Arg Gly Val
 325 330 335

[0110] Glu Leu Asp Asn Phe Ile Arg Lys Thr Gly Ile Ala Gly Ile Ile Asn
 340 345 350

Gly Met Asp Val Gln Glu Trp Asn Pro Val Thr Asp Lys Tyr Ile Asp
 355 360 365

Ile His Tyr Asp Ala Thr Thr Val Met Asp Ala Lys Pro Leu Leu Lys
 370 375 380

Glu Ala Leu Gln Ala Glu Val Gly Leu Pro Val Asp Arg Asn Val Pro
 385 390 395 400

Leu Ile Gly Phe Ile Gly Arg Leu Glu Glu Gln Lys Gly Ser Asp Ile
 405 410 415

Phe Val Ala Ala Ile Ser Gln Leu Val Glu His Asn Val Gln Ile Val
 420 425 430

Ile Leu Gly Thr Gly Lys Lys Lys Phe Glu Lys Gln Ile Glu His Leu
 435 440 445

Glu Val Leu Tyr Pro Asp Lys Ala Arg Gly Val Ala Lys Phe Asn Val
 450 455 460

[0111]

Pro Leu Ala His Met Ile Thr Ala Gly Ala Asp Phe Met Leu Val Pro
 465 470 475 480

Ser Arg Phe Glu Pro Cys Gly Leu Ile Gln Leu His Ala Met Arg Tyr
 485 490 495

Gly Thr Val Pro Ile Val Ala Ser Thr Gly Gly Leu Val Asp Thr Val
 500 505 510

Lys Glu Gly Tyr Thr Gly Phe Gln Met Gly Ala Leu His Val Glu Cys
 515 520 525

Asp Lys Ile Asp Ser Ala Asp Val Ala Ala Ile Val Lys Thr Val Ala
530 535 540

Arg Ala Leu Gly Thr Tyr Ala Thr Ala Ala Leu Arg Glu Met Ile Leu
545 550 555 560

Asn Cys Met Ala Gln Asp Leu Ser Trp Lys Gly Pro Ala Arg Met Trp
565 570 575

[0112] Glu Lys Met Leu Leu Asp Leu Glu Val Thr Gly Ser Glu Pro Gly Thr
580 585 590

Glu Gly Glu Glu Ile Ala Pro Leu Ala Lys Glu Asn Val Pro Thr Pro
595 600 605

Ala Ala Arg Ile Ile Leu Ile Leu Thr Val Lys Tyr His Leu Trp Ile
610 615 620

Tyr Val Asn Ala Gln Ile Asn Ile His Ser Ser Arg Leu Val Cys Trp
625 630 635 640

[0113]

Asp Gln Arg His Pro Leu Phe Phe Tyr Ser Asn Gly His Asp Phe Phe
 645 650 655

Val Lys Gly Glu Trp Cys Leu Asn Gln Cys Arg Glu Phe Thr Thr Asn
 660 665 670

Val Leu Gln Pro Leu Pro Gly Val Met Cys Val Asn Lys Gly Ser Ser
 675 680 685

Ser Asp Lys Lys Lys Lys Met
 690 695

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工合成

<220>

<221> misc_feature

<223> sgRNA1

<400> 3

ttgggataacc

tctgtatcgg

[0114]

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工合成

<220>

<221> misc_feature

<223> sgRNA2

<400> 4

cgggatattg

gaatcagaca

20

<210> 5

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工合成

<220>

<221> misc_feature

<223> sgRNA1-LP

<400> 5

gattggtggg atacctctgt atcgg

25

[0115]

<210> 6

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工合成

<220>

<221> misc_feature

<223> sgRNA1-RP

<400> 6

aaaccogata cagaggtatc ccaac

25

<210> 7

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工合成

<220>

<221> misc_feature

<223> sgRNA2-IP

<400> 7

gattgeggga tattggaatc agaca

25

<210> 8

<211> 25

[0116]

<212> DNA

<213> 人工合成

<220>

<221> misc_feature

<223> sgRNA2-RP

<400> 8

aaactgtctg attccaatat cccgc

25

<210> 9

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工合成

<220>

<221> misc_feature

<223> 引物序列

<400> 9

gtgatgttct tggaggactc ccc

23

<210> 10

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工合成

[0117]

<220>

<221> misc_feature

<223> 引物序列

<400> 10

cctggacgtc catgccattt ata

23

SEQUENCE LISTING

<110> 江苏三黍生物科技有限公司

<120> 一种降低植物直链淀粉含量的方法及应用

<130> 20170607

<160> 10

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 3397

<212> DNA

<213> *Manihot esculenta*

<400> 1

```

atggcaactg taatagctgc acatttagtt tccaggagct cacacttgag catccatgca 60
ttagagacta aggctaataa gttgtctcac actggaccct ggacceaaac tactactccc 120
aatggtttaa ggtccctcaa cactatggat aaactccaaa tgaagacaca atcaaaagca 180
gtgaaaaagg tctctgccac cggcaatggg aggccctgctg ccaaattat ttgtggctat 240
ggaatgaatt taatctttgt tggagctgaa gttggctcct ggagcaaaac tgggtgactt 300
ggatgatgtt ttggaggact cccccctgcc atggccgtaa gtagaggacc cttcttttgt 360
tctttctgcc tcgccttggg ttaattaata tgctgaattc aactgttact cctctttcag 420
gcaagagggc accgcgtcat gacagtgtct ccccgctatg accagtacaa ggatgcttgg 480
gatacctctg tatcgggtga ggtatctttt cttattttta agaggcattt tctttctttg 540
ttatgtatct ccaattgtag gatttttttt aaaaattttt tttctcttc tagctatgtg 600
catctcgatt ctcatattgca gattaaaatt ggagatagaa ttgaaactgt ccgcttcttc 660
cactcctaca aaagaggagt tgatcgggtc ttcgtggatc atccaatggt ccttgagaag 720
gttggaaaga acttgcaata attatagaaa cttgtatagg aaaaacatt tcgattgctt 780
ctttttcctg attccaaact tgttttaate ttaaggtatg gggcaaaact ggatctaaaa 840
tatatggccc aagagcaggt ttggattacc aggacaacca actgcgattt agcttgttat 900
gccttgtaag tcttgcaatt gtttcttttt tccccaaatt gaacaaagga taatgttttt 960
tccaagtaaa cggcgtttct tcttaaaaag acactcttta ttgagattca tgcacgtctt 1020
agtctgctt tacagtttgt agctagcagg cggttattca aaaagttttc cctctaatac 1080
ctgcaggctg ctctggagge accgagagtt ctgaacttga acagcagcaa aaatttctca 1140
ggaccctacg gtgtgtactt tttaccaaaa tcttaattgg gattttcaat ttctctgttg 1200
aaaagtaact atttttaaac caatgcattt tgctttctta aattcttaat gcaggagaag 1260
aagttgcctt cattgccaac gactggcaca ctgctctgct tccatgttat ctaaaagcca 1320
tttaccacc tatggggatt tacaacacg ccaagtttt taccctctt aattgggact 1380
gaatagttaa tgattctgga ttacttgaat gtgtcatttt cggggttggg gacttgtttg 1440
tttttttaat cgatgatagg ttgccttttg catccacaac attgcatatc agggagatt 1500
tgccttctca gacttccac gacttaatct gccagataaa ttcaaaagct cttttgactt 1560
tatcgatggg tatgattatt agggcagttg gtcttgccaa tgtgactccc gttgtttatg 1620

```

gtttccatga attacttctc ttgcctagtg ttgaaagget ttgcttcttct tgtcaggtat 1680
 gagaagccccg tgaaggggaag gaaaatcaat tggatgaagg ccgggatatt ggaatcagac 1740
 agggtttttga ctgtgagccc atactatgcc caagaagtca tctctggagt tgaagaggc 1800
 gtcgagctgg ataacttcat tcgtaaaact ggcatgtctg gtattataaa tggcatggac 1860
 gtccaggagt ggaatcctgt tacagataaa tacattgaca tccactacga tgccacaact 1920
 gtgagtgcct cgcagtaatt tgaagtttgt aagcagtaca taatcaatag caaatgatgg 1980
 tgatcgttgg gatttttctt gttcaggtta tggacgcaa acctttgttg aaggaagccc 2040
 ttcaagcaga agtcggattg cctgttgata ggaatgttcc tttgataggc ttatttgga 2100
 gattagaaga gcagaagggt tcagatattt ttgttgacg tatttcccaa ttggttgaac 2160
 acaatgtgca gatagtaate cttgtaagta tcagaattaa ggatgtcctt ggttgtgttg 2220
 tgagacatgc cgtgtctgaa gatatgactt gttctttcag ggaactggca aaaagaaatt 2280
 tgagaagcag attgagcacc tggaggtttt gtaccctgac aaggcaagag gagttgcaa 2340
 attcaatgtg ccgttggcgc acatgateac agctggtgca gactttatgc tggttccaag 2400
 tagatttgag ccctgtggtc tcattcagtt gcattgctat cgatatgaa cagtaatggc 2460
 gctaaagcct tttcttctcc tttctatggc tgetatctg attctaata ccatggetta 2520
 tggcatggct tttcccgtca gttgccgcaa tggcagtaca tggcagttaa caacatctaa 2580
 tctttgcgca ggttcccatt gttgetteta ctggtgtct tgttgatact gttaaagaag 2640
 gttacacagg attccaaatg ggggccttgc gcgttgaagt aagtaaagag gcgattgctg 2700
 caattttatt cttttcgtc taaatattga aacgatgca ctcaccagtg ggatattttc 2760
 cagtgtgaca aaattgattc agcagatgta gctgcgatag ttaaaactgt ggcaagagct 2820
 cttggcactt atgctaccgc tgcattaaga gaaatgatcc tgaattgcat ggcccaagac 2880
 ttgtcatgga aggtttgtat atgactaagt atctaggagg ctcattcteta ttgttaacta 2940
 acctattctt tgagtgcaa ttggattgac tggtagcact ttgcaagaga aaagcttaca 3000
 agtatgcatt atggtttgat gcagggacca gccagaatgt gggagaaaat gctcctggac 3060
 ctggaagtgt ctggcagcga acctggcact gaaggggagg agatcgctcc tcttgctaag 3120
 gagaacgttc ccacgccttg agcagcaagg ataataata tcttgacggt gtagaaatat 3180
 tgacatttat ggatatacgt taacgcgcag ataaatatcc attccagtag gctagtctgc 3240
 tgggatcaaaa ggcacccttt gttttctat tccaacggcc atgatttctt tgtgaagggt 3300
 gaatgggtgc tgaatcagtg ttaaagagaa ttacaacta acgtattaca gcctttgcct 3360
 ggcgttatgt gcgtaaataa aggttcatct tetgaca 3397

<210> 2

<211> 695

<212> PRT

<213> Manihot esculenta

<400> 2

Met Ala Thr Val Ile Ala Ala His Phe Val Ser Arg Ser Ser His Leu

1 5 10 15

Ser Ile His Ala Leu Glu Thr Lys Ala Asn Asn Leu Ser His Thr Gly

20 25 30

Pro Trp Thr Gln Thr Ile Thr Pro Asn Gly Leu Arg Ser Leu Asn Thr
 35 40 45
 Met Asp Lys Leu Gln Met Lys Thr Gln Ser Lys Ala Val Lys Lys Val
 50 55 60
 Ser Ala Thr Gly Asn Gly Arg Pro Ala Ala Lys Ile Ile Cys Gly His
 65 70 75 80
 Gly Met Asn Leu Ile Phe Val Gly Ala Glu Val Gly Pro Trp Ser Lys
 85 90 95
 Thr Gly Gly Leu Gly Asp Val Leu Gly Gly Leu Pro Pro Ala Met Ala
 100 105 110
 Ala Arg Gly His Arg Val Met Thr Val Ser Pro Arg Tyr Asp Gln Tyr
 115 120 125
 Lys Asp Ala Trp Asp Thr Ser Val Ser Val Glu Ile Lys Ile Gly Asp
 130 135 140
 Arg Ile Glu Thr Val Arg Phe Phe His Ser Tyr Lys Arg Gly Val Asp
 145 150 155 160
 Arg Val Phe Val Asp His Pro Met Phe Leu Glu Lys Val Trp Gly Lys
 165 170 175
 Thr Gly Ser Lys Ile Tyr Gly Pro Arg Ala Gly Leu Asp Tyr Gln Asp
 180 185 190
 Asn Gln Leu Arg Phe Ser Leu Leu Cys Leu Ala Ala Leu Glu Ala Pro
 195 200 205
 Arg Val Leu Asn Leu Asn Ser Ser Lys Asn Phe Ser Gly Pro Tyr Gly
 210 215 220
 Glu Glu Val Ala Phe Ile Ala Asn Asp Trp His Thr Ala Leu Leu Pro
 225 230 235 240
 Cys Tyr Leu Lys Ala Ile Tyr Gln Pro Met Gly Ile Tyr Lys His Ala
 245 250 255
 Lys Val Ala Phe Cys Ile His Asn Ile Ala Tyr Gln Gly Arg Phe Ala
 260 265 270
 Phe Ser Asp Phe Pro Arg Leu Asn Leu Pro Asp Lys Phe Lys Ser Ser
 275 280 285
 Phe Asp Phe Ile Asp Gly Tyr Glu Lys Pro Val Lys Gly Arg Lys Ile
 290 295 300
 Asn Trp Met Lys Ala Gly Ile Leu Glu Ser Asp Arg Val Leu Thr Val
 305 310 315 320
 Ser Pro Tyr Tyr Ala Gln Glu Val Ile Ser Gly Val Glu Arg Gly Val
 325 330 335
 Glu Leu Asp Asn Phe Ile Arg Lys Thr Gly Ile Ala Gly Ile Ile Asn

	340		345		350
Gly Met Asp Val Gln Glu Trp Asn Pro Val Thr Asp Lys Tyr Ile Asp					
	355		360		365
Ile His Tyr Asp Ala Thr Thr Val Met Asp Ala Lys Pro Leu Leu Lys					
	370		375		380
Glu Ala Leu Gln Ala Glu Val Gly Leu Pro Val Asp Arg Asn Val Pro					
385		390		395	400
Leu Ile Gly Phe Ile Gly Arg Leu Glu Glu Gln Lys Gly Ser Asp Ile					
	405		410		415
Phe Val Ala Ala Ile Ser Gln Leu Val Glu His Asn Val Gln Ile Val					
	420		425		430
Ile Leu Gly Thr Gly Lys Lys Lys Phe Glu Lys Gln Ile Glu His Leu					
	435		440		445
Glu Val Leu Tyr Pro Asp Lys Ala Arg Gly Val Ala Lys Phe Asn Val					
	450		455		460
Pro Leu Ala His Met Ile Thr Ala Gly Ala Asp Phe Met Leu Val Pro					
465		470		475	480
Ser Arg Phe Glu Pro Cys Gly Leu Ile Gln Leu His Ala Met Arg Tyr					
	485		490		495
Gly Thr Val Pro Ile Val Ala Ser Thr Gly Gly Leu Val Asp Thr Val					
	500		505		510
Lys Glu Gly Tyr Thr Gly Phe Gln Met Gly Ala Leu His Val Glu Cys					
	515		520		525
Asp Lys Ile Asp Ser Ala Asp Val Ala Ala Ile Val Lys Thr Val Ala					
	530		535		540
Arg Ala Leu Gly Thr Tyr Ala Thr Ala Ala Leu Arg Glu Met Ile Leu					
545		550		555	560
Asn Cys Met Ala Gln Asp Leu Ser Trp Lys Gly Pro Ala Arg Met Trp					
	565		570		575
Glu Lys Met Leu Leu Asp Leu Glu Val Thr Gly Ser Glu Pro Gly Thr					
	580		585		590
Glu Gly Glu Glu Ile Ala Pro Leu Ala Lys Glu Asn Val Pro Thr Pro					
	595		600		605
Ala Ala Arg Ile Ile Leu Ile Leu Thr Val Lys Tyr His Leu Trp Ile					
	610		615		620
Tyr Val Asn Ala Gln Ile Asn Ile His Ser Ser Arg Leu Val Cys Trp					
625		630		635	640
Asp Gln Arg His Pro Leu Phe Phe Tyr Ser Asn Gly His Asp Phe Phe					
	645		650		655

Val Lys Gly Glu Trp Cys Leu Asn Gln Cys Arg Glu Phe Thr Thr Asn
 660 665 670

Val Leu Gln Pro Leu Pro Gly Val Met Cys Val Asn Lys Gly Ser Ser
 675 680 685

Ser Asp Lys Lys Lys Lys Met
 690 695

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工合成

<220>

<221> misc_feature

<223> sgRNA1

<400> 3

ttgggatacc tctgtatcgg 20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工合成

<220>

<221> misc_feature

<223> sgRNA2

<400> 4

cgggatattg gaatcagaca 20

<210> 5

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工合成

<220>

<221> misc_feature

<223> sgRNA1-LP

<400> 5

gattgttggg atacctctgt atcgg 25

<210> 6

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工合成

<220>

<221> misc_feature

<223> sgRNA1-RP
<400> 6
aaacccgata cagaggtatc ccaac 25
<210> 7
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工合成
<220>
<221> misc_feature
<223> sgRNA2-LP
<400> 7
gattgcggga tattggaatc agaca 25
<210> 8
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工合成
<220>
<221> misc_feature
<223> sgRNA2-RP
<400> 8
aaactgtctg attccaatat cccgc 25
<210> 9
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工合成
<220>
<221> misc_feature
<223> 引物序列
<400> 9
gtgatgttct tggaggactc ccc 23
<210> 10
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工合成
<220>
<221> misc_feature
<223> 引物序列
<400> 10
cctggacgtc catgccattt ata 23

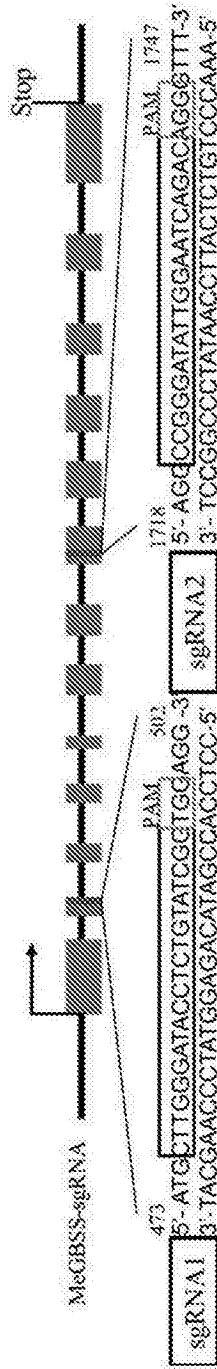


图1

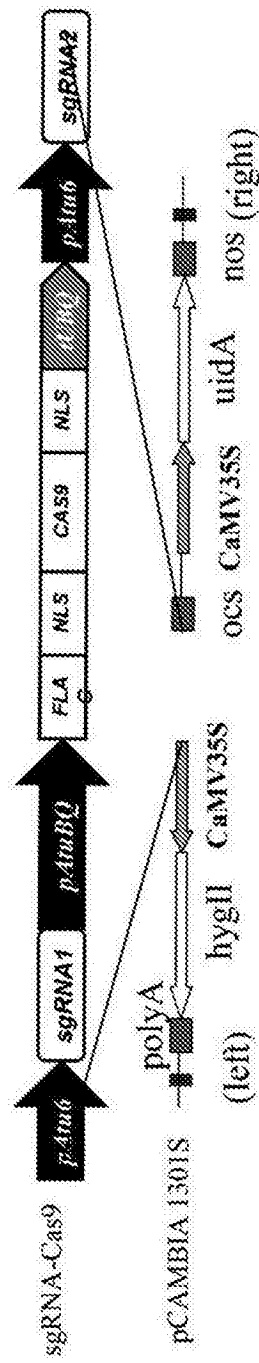


图2



图3

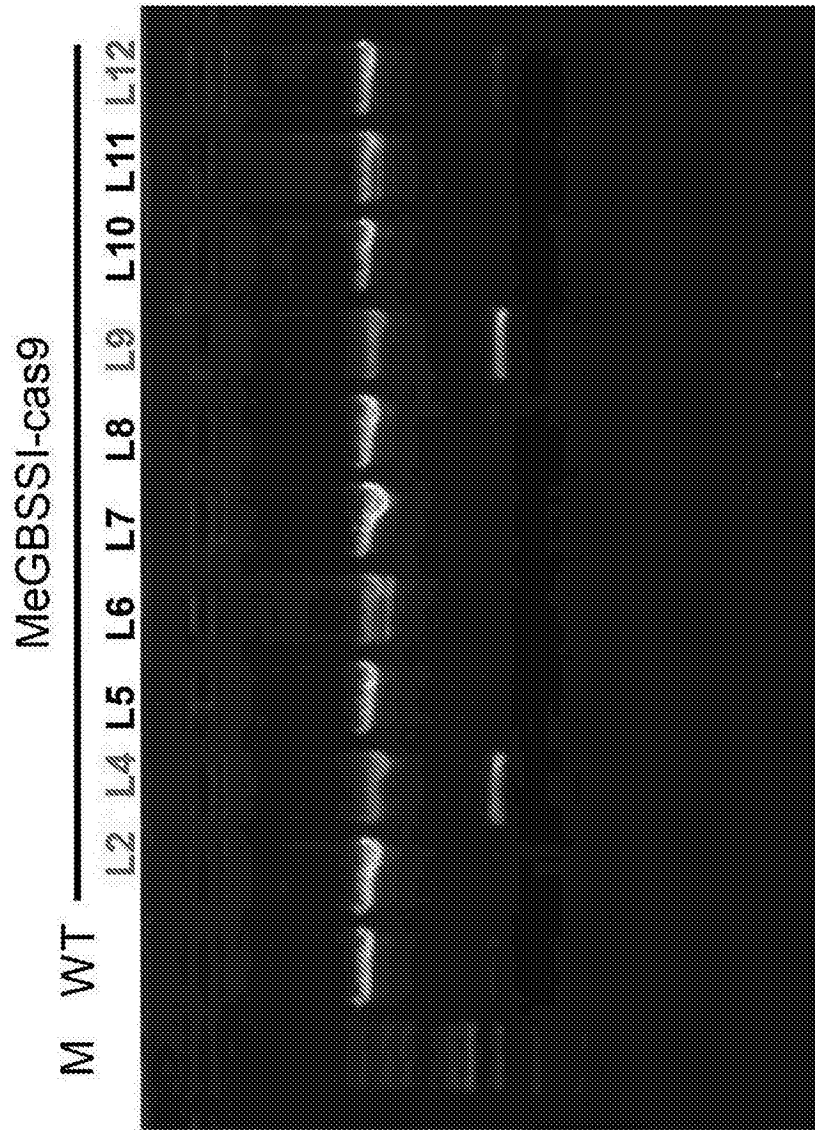


图4

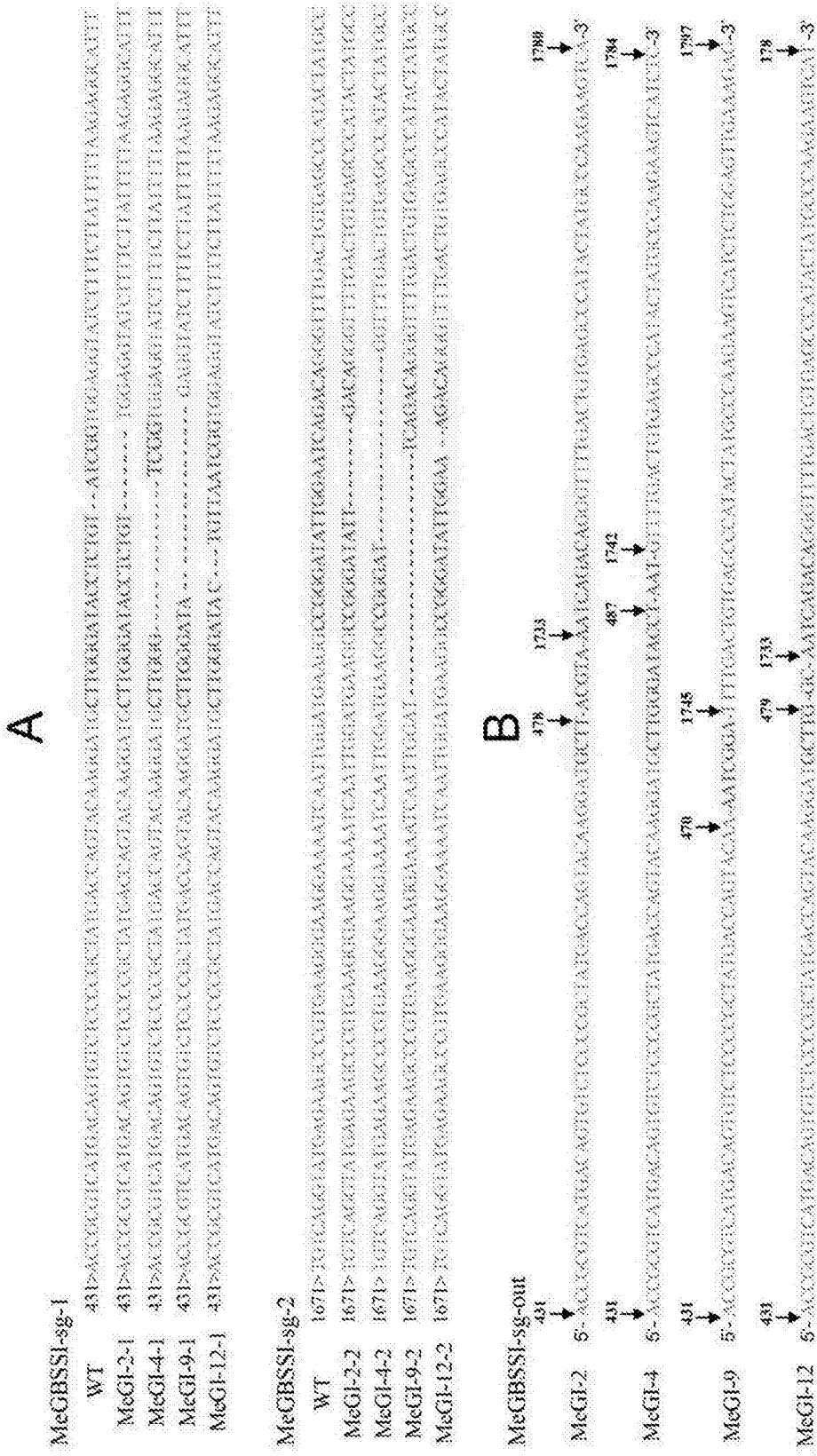


图5

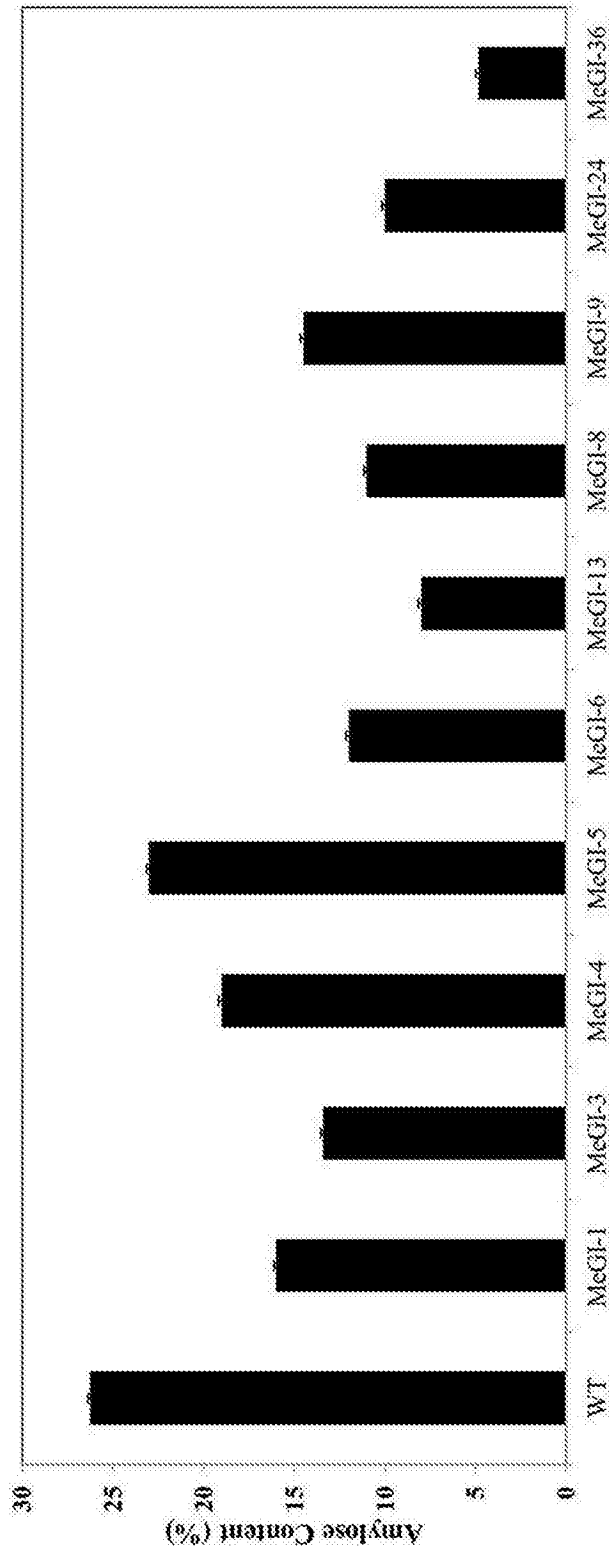


图6