

· 高校生物学教学 ·

# CRISPR/Cas9 基因编辑技术水稻育种应用的实验教学设计

刘亚萍, 马伯军, 陈析丰\*

浙江师范大学生命科学学院 生物学国家级实验教学示范中心, 浙江 金华 321004

刘亚萍, 马伯军, 陈析丰. CRISPR/Cas9 基因编辑技术水稻育种应用的实验教学设计[J]. 生物工程学报, 2024, 40(4): 1237-1250.  
LIU Yaping, MA Bojun, CHEN Xifeng. Experimental teaching design of CRISPR/Cas9 technology in rice breeding application[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(4): 1237-1250.

**摘要:** CRISPR/Cas9 基因编辑技术在作物育种中已具有重要的应用价值, 理解与掌握该项技术能够为生物学、农学等专业的学生从事相关科研工作打好基础。为了将 CRISPR/Cas9 技术融入高校的实验教学中, 设计开发了一个创新性教学实验“利用 CRISPR/Cas9 技术提高水稻植株的白叶枯病抗性”。该实验有助于学生更好地理解 CRISPR/Cas9 技术原理, 掌握其操作流程和方法, 学习应用该技术对水稻进行定向分子育种改良。在拓展学生知识和技能的同时, 推进实验教学的改革与创新。  
**关键词:** CRISPR/Cas9; 基因编辑技术; 水稻育种; 实验教学设计

## Experimental teaching design of CRISPR/Cas9 technology in rice breeding application

LIU Yaping, MA Bojun, CHEN Xifeng\*

National Experimental Teaching Demonstration Center of Biology, College of Life Sciences, Zhejiang Normal University, Jinhua 321004, Zhejiang, China

**Abstract:** The CRISPR/Cas9 gene editing technology has proven to be valuable in crop breeding applications. Understanding and mastering this technology will provide a strong foundation for students majoring in biology, agronomy, and related fields to engage in scientific research and work. To incorporate CRISPR/Cas9 technology into experimental teaching courses at colleges, an innovative teaching experiment entitled “Enhancing the resistance of rice plants to bacterial blight disease using CRISPR/Cas9 technology” was designed. The experiment

资助项目: 国家自然科学基金(32071987); 浙江省自然科学基金(LZ23C130004)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32071987) and the Natural Science Foundation of Zhejiang Province (LZ23C130004).

\*Corresponding author. E-mail: xfchen@zjnu.cn

Received: 2023-05-19; Accepted: 2023-09-27; Published online: 2023-10-10

allows students to deepen their understanding of the basic principles of CRISPR/Cas technology, acquire proficiency in its protocol, and learn to apply the technology for targeted molecular breeding of rice. It not only expands students' knowledge and skills, but also promotes the reform and innovation of experimental teaching methods.

**Keywords:** CRISPR/Cas9; gene editing technology; rice breeding; experimental teaching design

2020年,诺贝尔化学奖授予了堪称“基因魔剪”的成簇规则间隔短回文重复/CRISPR相关9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeat/CRISPR-associated 9, CRISPR/Cas9)基因编辑技术。该项技术可实现对细胞的DNA进行精确编辑,且相较之前的锌指核酸酶(zinc finger nucleases, ZNFs)、转录激活因子样效应物核酸酶(transcription activator-like effector nuclease, TALEN)等基因编辑技术更简单、高效,在植物、动物、微生物及医学研究中得到广泛应用<sup>[1]</sup>,使生物技术的发展向前迈了一大步,也成为生命科学研究中的一项经典实验手段,而基于CRISPR/Cas9系统的各类新型基因编辑技术也发展迅速。因此,掌握CRISPR/Cas9技术的基本原理和方法,已成为生物学、农学等相关专业高校学生所必备的知识,为今后从事相关科研工作打下坚实的基础。而且,CRISPR/Cas9技术涉及遗传学、分子生物学、基因工程的原理和实验操作,也是生物工程、生物技术、生物科学等专业课程中的重要知识组成。利用CRISPR/Cas9技术开设相关的教学实验,不仅能帮助学生更好理解相关的学科知识、掌握该项技术,也有助于学生提升理论联系实际的能力。

目前,已有一些文献报道了CRISPR/Cas9教学实验设计,主要是采用动物细胞系,如人HELA细胞、人胚肾细胞293T (human embryonic kidney 293T cells, HEK 293T)等或微生物,对外源导入的绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)、红色荧光蛋白(monomer cherry, MCHERRY)等编码荧光蛋白的报告基因进行靶向编辑,并通

过观察荧光信号的变化验证目的基因是否发生突变<sup>[2-6]</sup>。目前,水稻的CRISPR/Cas9技术已经非常成熟,以重要农作物水稻为材料开展基因编辑创新性实验探索与实践,对培养学生学习前沿基础理论与应用创新实践相结合的意识更具有现实意义。但由于CRISPR/Cas9基因编辑技术需要遗传转化,对于高等生物来说从细胞再生出转化个体是个比较耗时的过程,如薛秀花等<sup>[7]</sup>曾利用模式植物拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)设计了一个CRISPR/Cas9发育生物学的教学实验,对拟南芥肌动蛋白编码基因*AtFH8*进行靶向突变及其表型鉴定,教学设计的课时共计32学时,历时8周。而课堂教学的时间有限,难以安排。

近期,笔者对CRISPR/Cas9技术在植物基因编辑应用方面进行了系统的综述<sup>[8]</sup>,也通过CRISPR/Cas9多基因编辑技术对水稻进行快速的定向育种改良<sup>[9]</sup>,结合多年克隆水稻抗白叶枯病基因的科研实践<sup>[10]</sup>,设计了一个创新性教学实验案例——“利用CRISPR/Cas9技术提高水稻植株的白叶枯病抗性”,让学生理解CRISPR/Cas9技术的原理与方法,从作物分子育种的角度引导学生将专业知识学以致用。本实验的设计思路主要来源于以下几个原因:一是水稻作为我国最重要的粮食作物和单子叶模式植物,其基因组序列及其基因注释信息都相对完善,而且其遗传转化技术体系也非常成熟<sup>[11]</sup>;二是水稻白叶枯病的人工接种方法简单,其抗病、感病表型在叶片上极其明显,易于鉴别且实施周期短;三是选择的水稻易感白叶枯病基

因 *OsSWEET11*<sup>[12]</sup>, 研究已证明该基因突变可显著提高水稻的抗病性<sup>[13-14]</sup>。因此, 选用重要作物开展植物基因的靶向编辑, 并获得具有育种应用的有利性状, 在教学中可有效激发学生的学习兴趣, 拓宽学生的专业知识, 提高学生的实践能力。该实验教学可在 4 周内完成, 课堂教学仅需 12 学时。本文详细阐述了该实验课的教学设计、实验步骤、结果分析以及过程性评价的方式, 为“基因工程实验”“生物技术实验”“植物细胞工程实验”“遗传学实验”等课程的教学设计提供借鉴。

## 1 实验教学设计

### 1.1 实验目的

通过学习 CRISPR/Cas9 技术的基本原理和技术流程, 掌握该技术的实验方法, 学习利用该技术对水稻等作物的目的基因进行编辑, 达成学生对 CRISPR/Cas9 技术独立操作的动作技能目标、验证巩固与讨论思考的认知目标、耐心细致与不断探究的情感目标。

### 1.2 实验原理

成簇规则间隔短回文重复序列(clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR)由多个短而保守的重复序列区和间隔

区组成。CRISPR/Cas9 系统会转录具有序列特异性的单向导 RNA (single guide RNA, sgRNA)、表达核酸酶活性的 Cas9 蛋白, sgRNA 可引导 Cas9 蛋白靶向目的 DNA 序列, Cas9 蛋白通过识别前间隔序列邻近基序(protospacer adjacent motif, PAM; NGG, N 代表 ATCG 任一碱基), 在 PAM 上游产生 DNA 双链断裂, 随后细胞通过非同源末端连接(non-homologous end joining, NHEJ)方式在 DNA 修复过程中导致碱基的插入、缺失或替换, 从而实现对目的基因的靶向编辑(图 1)。

植物 *SWEET* 基因是一类公认的感病基因, 编码糖转运的跨膜蛋白。其中, 水稻 *OsSWEET11* 基因是研究比较清楚的与白叶枯病菌致病性相关的感病基因, 也是被白叶枯病菌广泛利用的感病基因之一<sup>[12]</sup>。当白叶枯病菌入侵水稻时, 会释放一种类似转录因子的效应子蛋白(transcription activator-like effector, TALE)到水稻细胞中诱导 *OsSWEET11* 基因的表达, 促进细胞的糖分向维管束转运, 从而使病原菌获得更多的养分, 有利于其更好地生长与繁殖, 最终导致水稻植株发病。因此, 根据 *OsSWEET11* 基因的编码区(coding sequence, CDS)设计靶向的 sgRNA, 构建 *OsSWEET11* 基因靶向编辑的 CRISPR/Cas9 载体质粒, 通过农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)介

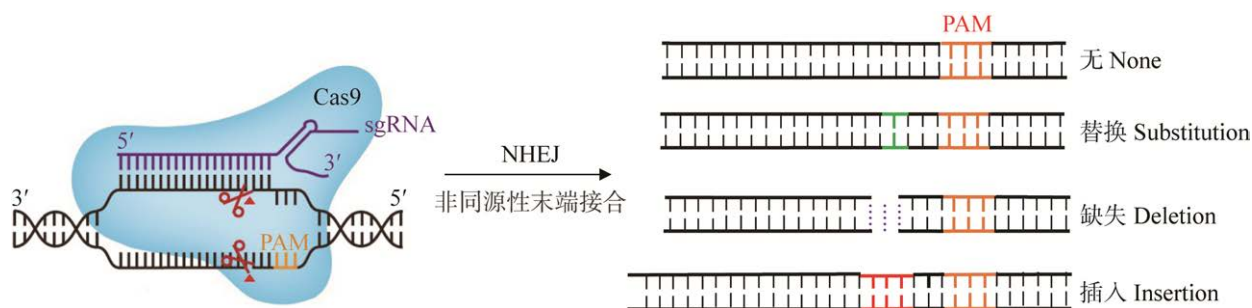


图 1 CRISPR/Cas9 基因编辑技术的原理 sgRNA: 单向导 RNA; PAM: 前间隔序列邻近基序; NHEJ: 非同源性末端接合

Figure 1 Principles of CRISPR/Cas9 technology in gene editing. sgRNA: Single guide RNA; PAM: Protospacer adjacent motif; NHEJ: Non-homologous end joining.

导的植物遗传转化技术, 将包含 CRISPR/Cas9 序列的 T-DNA 插入到水稻感病品种的基因组中, 获得敲除 *OsSWEET11* 基因的编辑植株, 其细胞中的糖分不能被白叶枯病菌有效利用, 使得白叶枯病菌不能正常生长, 从而获得了对白叶枯病菌的广谱抗性。

### 1.3 实验材料及所需的试剂和仪器

#### 1.3.1 实验材料

易感白叶枯病的水稻(*Oryza sativa* L.)品种中花 11 作为本实验的基因编辑材料; 白叶枯病原菌黄单胞菌水稻致病变种(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, *Xoo*), 选择强毒性的生理小种 PXO99 菌株(中国农业科学院提供)用于抗病性的鉴定。

#### 1.3.2 实验试剂

CRISPR/Cas9 载体试剂盒(Biogle)、快速 DNA 提取检测试剂盒(TIANGEN)、GeneRed 核酸染料(TIANGEN)、水稻营养液(Coolaber)、LB 肉汤(Solarbio)。常规试剂: 乙二胺四乙酸二钠、三氯甲烷、异丙醇、乙酸钾、乙醇、卡那霉素、蛋白胨、琼脂和蔗糖。

#### 1.3.3 实验仪器

高速离心机(Eppendorf)、水浴锅(上海森信实验仪器有限公司)、电子天平(Sartorius)、恒温摇床(上海知楚仪器有限公司)、高压灭菌锅(HIRAYAMA)、超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司)、光照培养箱(宁波江南仪器厂)、PCR

仪(Biometra)、水平电泳槽(BIO-RAD)、电泳仪(BIO-RAD)、凝胶成像仪(UVP)。

### 1.4 实验步骤及情况分析

#### 1.4.1 *OsSWEET11* 基因的编辑靶点设计

根据 *OsSWEET11* 基因在水稻基因组中的注释号 LOC\_Os08g42350, 从国家水稻数据中心(www.ricedata.com)中获得该基因的序列, 该基因的基因组序列从起始密码子(ATG)至终止密码子(TGA)共长 2 251 bp, 包含 5 个外显子和 4 个内含子(图 2)。首先, 利用 CRISPR/Cas9 靶点设计的在线软件 CRISPR-GE<sup>[15]</sup> (<http://skl.scau.edu.cn/targetdesign/>), 以 NGG 作为 PAM 序列、靶向序列的长度设置为 20 个碱基, 选择以日本晴(Nipponbare)作为参考基因组, 在 *OsSWEET11* 基因的编码区设计靶向其 CDS 序列的 sgRNA; 同时, 为了能够获得基因功能缺失的移码突变, sgRNA 的靶向位置应避免太靠近 ATG (后面同阅读框的 ATG 可能会翻译蛋白)或终止密码子(没有影响蛋白功能性保守结构域的编码序列); 再次, 为了提高编辑的效率, 应选择不含连续 4 个 T 碱基、G+C 含量为 50%–70%的 sgRNA, 有研究表明高 G+C 含量 sgRNA 在水稻基因组中的编辑效率更高<sup>[16]</sup>; 最后, 要考虑 sgRNA 的全基因脱靶效应(off-target), CRISPR-GE 软件给出的潜在的脱靶位置(potential off-target sites) (max score)预估值建议小于 0.7。

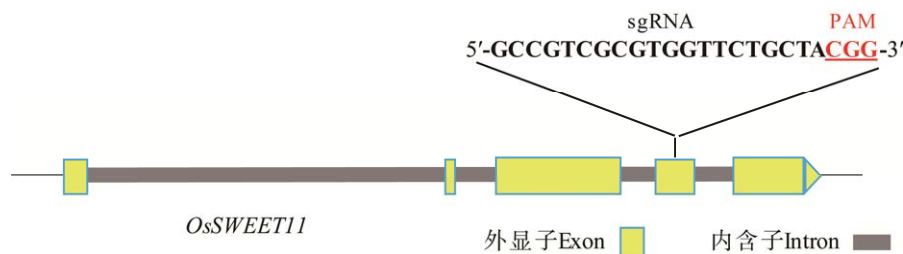


图 2 水稻 *OsSWEET11* 基因结构及其靶向 sgRNA 位置的示意图

Figure 2 Schematic diagram of the gene structure and location of the targeting sgRNA of *OsSWEET11* gene.

利用 CRISPR-GE 在 *OsSWEET11* 基因中搜索 sgRNA, 由于 *OsSWEET11* 基因的第 1、2 个外显子序列非常短(图 2), 因此选择第 3、4 个外显子进行编辑更合适, 且符合以上条件的 sgRNA 共有 24 个(表 1), 其中位于基因第 4 个外显子上的第 11 号 sgRNA 序列(5'-GCCGTCGCGTGGTTCTGCTA-3')的 GC 含量最高(65%), 在水稻基因组中脱靶效应预估值为 0.27 (表 1), 因此确定为 *OsSWEET11* 基因编辑的靶向 sgRNA。

#### 1.4.2 *OsSWEET11* 基因的 CRISPR/Cas9 载体构建

根据 1.4.1 设计的第 11 号 sgRNA 序列合成

相应的上、下游引物, 采用单子叶植物基因编辑 CRISPR/Cas9 载体试剂盒(Biogle), 构建 *OsSWEET11* 基因的编辑载体, 载体质粒结构如图 3A 所示。首先, 将以上设计的 sgRNA 序列导入 Biogle 公司的网站(<http://biogle.cn/index/excrispr>), 自动生成相应的上、下游引物序列, 并委托杭州尚亚赛生物技术公司合成引物 DNA; 其次, 将 sgRNA 序列的上、下游引物进行退火形成双链 DNA, 再与线性化的 CRISPR/Cas9 载体进行连接反应, 将 sgRNA 序列插入至 CRISPR/Cas9 载体中 U6 启动子后面(图 3A), 具体方法详见试剂盒的操作说明; 然后, 参考

表 1 水稻 *OsSWEET11* 基因预测的 sgRNA 靶位点序列

Table 1 The sequences of predicted sgRNA targeting to the *OsSWEET11* gene in rice

编号 No.	sgRNA 序列+PAM sgRNA sequence+PAM	位置 Position (bp)	G+C 含量 G+C content (%)	潜在脱靶位置(最大值) Potential off-target sites (max score)
1	CCGAGGAAGTGGACCTGGTGGGG	1 554-1 535	60	0.103
2	GAAGTGGACCTGGTGGGGCTTGG	1 549-1 530	60	0.110
3	GCTGTGGATCTTCTACGCGCTGG	1 321-1 340	60	0.131
4	CGCTGGTGAAGACCAACTCGAGG	1 338-1 357	60	0.165
5	GCCGAGGAAGTGGACCTGGTGGG	1 555-1 536	60	0.218
6	ACCATCAACGCCTTCGGCTGCGG	1 370-1 389	60	0.225
7	CGTAGGGGTCCTTGGTGAAGAGG	1 818-1 799	60	0.250
8	CTGCTACGGCCTCTTCACCAAGG	1 787-1 806	60	0.258
9	CTGCTGACCATCAACGCCTTCGG	1 364-1 383	55	0.262
10	GCGTCGAGTTCATGCCGATCGGG	1 726-1 745	60	0.270
11	GCCGTCGCGTGGTTCTGCTACGG	1 773-1 792	65	0.274
12	CCCACCAGGTCAAGTTCCTCGG	1 532-1 551	60	0.292
13	ACTTGACCTGGTGGGGCTTGGGG	1 547-1 528	60	0.332
14	ACAAGAAGAAGTCGACGGGAGGG	1 257-1 276	50	0.341
15	GAGGTAGAGGACGATGTAGGCGG	1 423-1 404	55	0.350
16	TGCCGAGGAAGTGGACCTGGTGG	1 556-1 537	60	0.357
17	CGGCATGAAGTTCGACGCTTGG	1 742-1 723	60	0.421
18	GACGAGGTAGAGGACGATGTAGG	1 426-1 407	55	0.431
19	TTGCAGGGCGACGTTCTTGCAGG	1 231-1 250	60	0.454
20	TACAAGAAGAAGTCGACGGGAGG	1 256-1 275	50	0.675
21	AACTTGACCTGGTGGGGCTTGGG	1 548-1 529	55	0.700
22	GACGTCGAGGAGGAGGAAGAAGG	1 483-1 464	60	0.710
23	GAGGAGGAGGAAGAAGGCGAGGG	1 477-1 458	60	0.722
24	GACGAAGACGGCCATGGAGAAGG	1 591-1 572	60	1.000

标准步骤转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ ，涂布于含卡那霉素的 LB 平板上，37 °C 倒置培养过夜后，挑取单克隆菌落寄送生物技术公司，对插入位点的 sgRNA 序列进行测序验证，测序引物为 5'-CCCAGTCACGACGTT GTAAA-3' (图 3B)。构建成功的载体，在 U6 启动子后面插入了 *OsSWEET11* 基因靶向编辑的 sgRNA 序列(图 3B)。

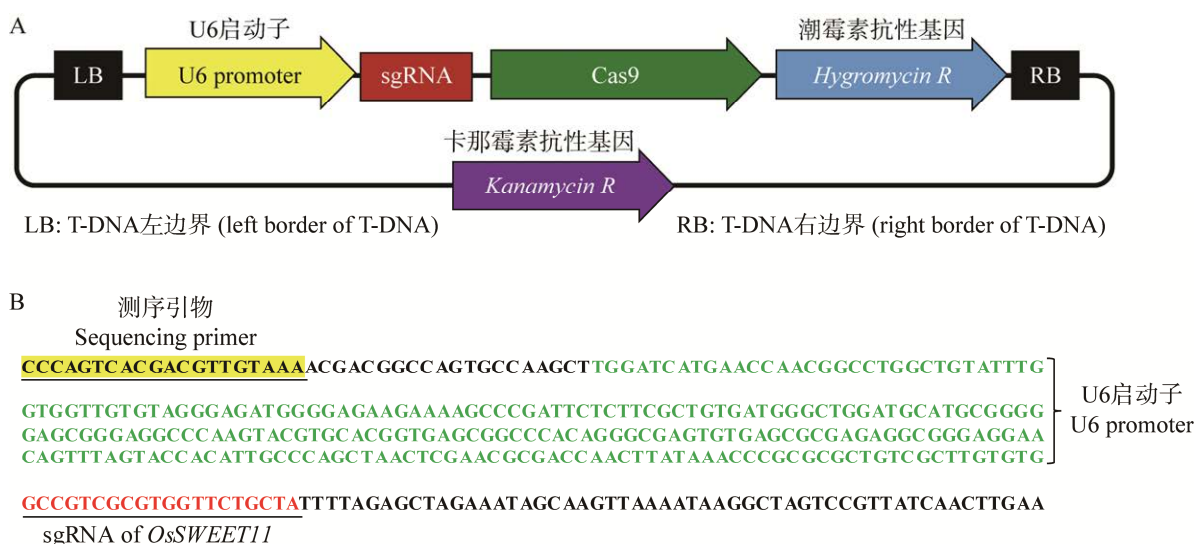
### 1.4.3 CRISPR/Cas9 载体的水稻遗传转化

将 1.4.2 构建的 CRISPR/Cas9 编辑载体，通过农杆菌(*A. tumefaciens*)介导法<sup>[11]</sup>遗传转化到易感白叶枯病的水稻品种中花 11 中，获得相应的转基因植株。此步骤包含水稻愈伤诱导、

农杆菌侵染、抗性愈伤筛选和植株再生等，转基因的技术体系已非常成熟，耗时大约 3-5 个月，为了节省时间，此步骤以课件方式演示操作的过程，技术流程如图 4 所示。

### 1.4.4 转基因植株 *OsSWEET11* 基因编辑靶点的测序鉴定

提前准备好水稻 *OsSWEET11* 基因编辑的转基因植株，可以选择该基因不同类型的编辑植株(图 5A)，与野生型对照中花 11 一起，采用国际水稻研究所的培养液配方<sup>[17]</sup>，在人工气候箱(28 °C; 12 h 光照/12 h 黑暗)中预先进行水培。同时，根据目的基因的序列，提前设计并合成



**图 3** 水稻 *OsSWEET11* 基因编辑的 CRISPR/Cas9 载体结构图与 sgRNA 位点测序结果 A: CRISPR/Cas9 载体的结构. T-DNA 包含由 U6 启动子和 *Cas9* 驱动的 sgRNA，以及用于在水稻转化中选择潮霉素抗性基因，卡那霉素抗性基因在大肠杆菌中用于载体质粒复制时的选择. B: CRISPR/Cas9 载体的测序结果插入了目的 sgRNA，测序引物(黄色)用于对插入的 sgRNA(红色)进行测序，U6 启动子(绿色)是来自水稻的组成型表达启动子

**Figure 3** Schematic diagram of CRISPR/Cas9 vector and sequencing result of sgRNA site for *OsSWEET11* gene editing in rice. A: Structure of CRISPR/Cas9 vector. The T-DNA contains the sgRNA driven by the U6 promoter and the *Cas9* gene, and the hygromycin resistance gene for selection in rice transformation. The kanamycin resistance gene is used for selection in *E. coli* when the replication of vector plasmid. B: The sequencing result of CRISPR/Cas9 vector inserted the interest sgRNA, the sequencing primer (yellow) was used for sequencing the sgRNA inserted (red), and U6 promoter (green) was a constitutive expression promoter from rice.

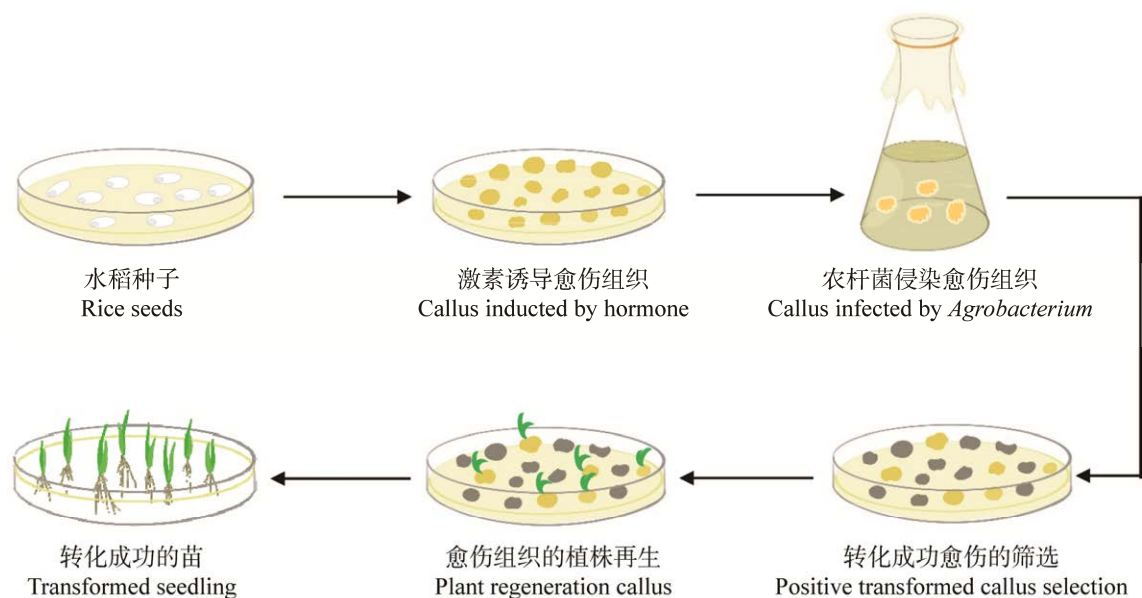


图 4 农杆菌介导水稻遗传转化的技术流程

Figure 4 Technical flow of rice genetic transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*.

一对引物(5'-GCATTATGTAGCTGAGCATTTC-3'与 5'-GATCACCTCCGGCTTGTCTGC-3'),用于 PCR 扩增 *OsSWEET11* 基因的编辑位点序列。

取水稻转基因植株的新鲜叶片,采用快速 DNA 提取检测试剂盒(TIANGEN)分别提取各植株的基因组 DNA,按照产品说明操作,10 min 内可完成 DNA 提取;再利用该试剂盒的 PCR 试剂和提前合成的引物制备 PCR 反应体系,PCR 扩增程序为:94 °C 预变性 3 min;94 °C 变性 30 s,60 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 60 s,35 个循环;72 °C 延伸 5 min。制备 1.5% 琼脂糖凝胶,分别取 5 μL 的 PCR 产物,在 120 V 电压下电泳 20 min,用 GeneRed 核酸染料(TIANGEN)染色 5 min,在凝胶成像仪中拍照,将含有单一清晰条带的 PCR 产物寄送生物技术公司测序。

采用序列比对软件(如 SeqMan)对各转基因植株的 PCR 产物测序结果与 *OsSWEET11* 基因序列进行比对,观察测序的信号峰图,分析靶向编辑位点是否发生碱基突变。如图 5A 所示,选择的 *KO-1*、*KO-2* 和 *KO-3* 三种基因编辑植株,

在 sgRNA 靶位点的 PAM (即 NGG)附近鉴定到了不同类型的突变:*KO-1* 植株为插入 1 个碱基 T,*KO-2* 植株为插入 1 个碱基 C,*KO-3* 植株为缺失 1 个碱基 C。这 3 种类型都导致 *OsSWEET11* 基因发生了移码突变,即基因被敲除(knock out, KO)。

#### 1.4.5 *OsSWEET11* 基因敲除植株的白叶枯病抗性鉴定

待水稻植株生长至 3-5 叶期,将白叶枯病菌生理小种 PXO99 菌株接种于常规的 PSA 培养基中,于 100 r/min 摇床 28 °C 培养 36-48 h,配制成  $1 \times 10^9$  CFU/mL 菌悬液,用剪刀蘸取适量的菌悬液,在完全展开的水稻叶尖 1-2 cm 处剪一下。接种第 10 天后,观察接种叶片剪口处的表型,对照品种中花 11 的叶片上已出现约 10 cm 的白色病斑,并有往叶片基部延伸的趋势,表现出明显的感病性。而 *OsSWEET11* 基因敲除植株(*KO-1*、*KO-2* 和 *KO-3*)只有约 0.2 cm 的白色或褐色病斑,明显增强了抗病性(图 5B),同时,取下接种叶片对病斑长度进行测量和统

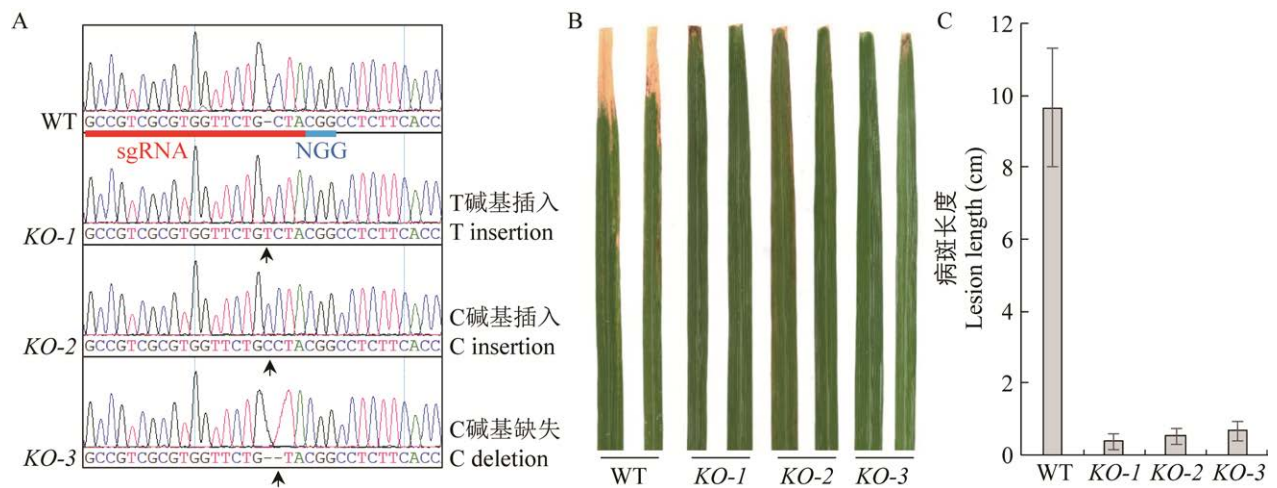


图5 水稻 *OsSWEET11* 基因敲除植株的编辑靶点测序与白叶枯病抗性表型 A: 来自不同敲除系(KO-1、KO-2 和 KO-3)的 *OsSWEET11* 基因中 CRISPR/Cas9 靶位点的测序结果. B: 接种白叶枯病菌株 PXO99 的叶片. C: 10 d 后接种叶片病斑长度的测量统计. WT 为水稻野生型品种中花 11

Figure 5 Editing target sequencing and bacterial-blight resistance phenotype of the *OsSWEET11* knockout rice plants. A: Sequencing results of CRISPR/Cas9 target site in *OsSWEET11* gene from different knockout lines (KO-1, KO-2 and KO-3). B: Pictures of leaves inoculated by *Xoo* strain PXO99. C: Lesion-length measurement of the leaves inoculated after 10 days. WT refers to the rice wild-type variety Zhonghua 11.

计, 绘制成柱状图(图 5C)。结果表明, 通过 CRISPR/Cas9 技术对 *OsSWEET11* 基因进行敲除突变, 可有效增强水稻植株对白叶枯病的抗性。

## 2 教学进度安排

本实验为综合性大型实验, 包括教师讲解、学生设计、分组实施、过程评价和总结交流等多个环节, 课堂教学安排 12 学时, 连续 4 周完成(表 2)。可将 4-6 个学生组成一个小组, 各小组独立进行实验, 组内成员分工协作, 共同完成任务要求。在实验教学中, 学生要将阶段性的结果反馈给教师, 教师对学生的实验进展给予及时评分和记录, 作为该实验总成绩的过程性评价依据, 学生每人最终需各自完成实验报告, 并以小组为单位汇报与讨论。

### 2.1 第 1 周 CRISPR/Cas9 技术原理讲解与目的基因编辑载体构建

课前准备: 教师需购买 CRISPR/Cas9 载体

试剂盒、合成 *OsSWEET11* 基因靶向编辑的 sgRNA 相应引物, 准备好载体转化大肠杆菌实验所需的试剂与设备; 学生需通过查阅文献了解 CRISPR/Cas9 技术的基本原理, 在前期的实验课中掌握大肠杆菌转化的标准方法和无菌操作。

课堂教学: 首先, 教师讲解 CRISPR/Cas9 技术原理与实验流程、水稻白叶枯病及 *OsSWEET11* 基因的相关原理, 并教学生如何使用 CRISPR/Cas9 靶点设计软件和序列比对软件(1 h); 然后, 要求学生根据水稻 *OsSWEET11* 基因的序列, 自行设计该基因靶向编辑的 sgRNA 序列, 对其结果给予及时的评分, 并提出一个最优化 sgRNA 序列的建议(1 h); 最后, 将已合成的 sgRNA 序列相应引物和 CRISPR/Cas9 载体试剂盒提供给学生, 让其根据试剂盒的操作说明, 完成 sgRNA 与载体连接的步骤(1 h)。

课后任务: 学生将连接好的载体转化大肠杆菌(1 d), 在筛选平板上挑取单克隆菌落, 用



表 2 实验教学内容与进度安排

Table 2 Teaching content and schedule of the experimental courses

周数与实验内容 Weeks and experimental content	进度安排 Schedule	教师的教学与准备工作 Teaching and preparation of teacher	学生需要完成的任务 Tasks for students to finish
第 1 周 CRISPR/Cas9 技术原理讲解 与目的基因编 辑载体构建 First week Instruction of the principle of CRISPR/Cas9 technology and construct the vector for target gene editing	课前准备 Pre-class preparation  课堂教学 (3 学时) Teaching in class (three classes)  课后任务 After-class tasks	购买 CRISPR/Cas9 载体试剂盒 Purchase of the CRISPR/Cas9 vector kit 合成 <i>OsSWEET11</i> 基因的 sgRNA 序列引物 Synthesis of the primers sgRNA of <i>OsSWEET11</i> gene 准备载体转化大肠杆菌实验所需的试剂与设备 Preparation of the reagents and equipment required for the vector transformation of <i>E. coli</i>  讲解 CRISPR/Cas9 的技术原理与方法、水稻白叶枯 病及 <i>OsSWEET11</i> 基因相关原理 Explanation of the technical principle and method of CRISPR/Cas9, as well as the principles related to <i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> and <i>OsSWEET11</i> gene 指导如何获得 <i>OsSWEET11</i> 基因序列及 CRISPR-GE、 序列比对等软件的使用方法 Instruction on how to obtain the <i>OsSWEET11</i> gene sequence and the use of CRISPR-GE and sequence comparison software 对学生设计的 sgRNA 给予评价并确定最佳方案 Evaluation of the sgRNA designed by students and determine the best solution 提供 sgRNA 引物、CRISPR/Cas9 载体试剂盒 Supply of sgRNA primers and CRISPR/Cas9 vector kits  联系测序的生物技术公司，寄学生的测序样品 Contact with the sequencing biotechnology company and delivery of the students' sequencing samples 接收公司的测序结果，并转发给对应的学生 Receival of the sequencing results from the company and forwarding them to the corresponding students	了解 CRISPR/Cas9 技术的基本原理和 流程 Understanding of the basic principle and process of CRISPR/Cas9 technology 掌握标准大肠杆菌转化的方法和无菌 操作 Mastering of the standard method and sterile operation of <i>E. coli</i> transformation 理解 CRISPR/Cas9 的技术原理与方法 Understanding of the technical principle and method of CRISPR/Cas9 掌握 CRISPR-GE、序列比对等软件的 使用方法 Mastering of the protocol of CRISPR-GE and sequence alignment software 在 <i>OsSWEET11</i> 基因编码区设计 sgRNA 序列 Design of sgRNA sequences in the coding region of <i>OsSWEET11</i> gene 根据试剂盒说明，完成 sgRNA 与载体 连接 Completion of the connection between sgRNA and the vector according to the instructions of the reagent kit 将连接好的载体质粒转化大肠杆菌 Transformation of the connected vector plasmid into <i>E. coli</i> 挑取单克隆菌落，确定测序样品 Selection of monoclonal colonies and determine sequencing samples 对测序结果进行分析载体是否构建 成功 Analysis of the sequencing results and the positive vectors 掌握 PCR 操作技术与使用方法 Mastering of the instructions of PCR 掌握琼脂糖凝胶的制备、电泳、凝胶 成像系统使用的方法 Mastering of the methods of preparation of agarose gel, electrophoresis, and gel imaging system
第 2 周 CRISPR/Cas9 载体转基因水 稻的获得及其 编辑靶点 PCR 扩增	课前准备 Pre-class preparation	获得水稻 <i>OsSWEET11</i> 基因的 CRISPR/Cas9 敲除植 株，并与野生型对照一起培养至 3-5 叶期 Obtainment of CRISPR/Cas9 knockout plants of the <i>OsSWEET11</i> gene in rice and culture together with the wild type until the 3-5 leaf stage 购买植物快速 DNA 提取检测试剂盒 Purchase of a rapid plant DNA extraction and detection kit	掌握 PCR 操作技术与使用方法 Mastering of the instructions of PCR 掌握琼脂糖凝胶的制备、电泳、凝胶 成像系统使用的方法 Mastering of the methods of preparation of agarose gel, electrophoresis, and gel imaging system

(待续)

(续表 2)

周数与实验内容 Weeks and experimental content	进度安排 Schedule	教师的教学与准备工作 Teaching and preparation of teacher	学生需要完成的任务 Tasks for students to finish
Second week Obtainment of CRISPR/Cas9 vector transgenic rice and perform PCR amplification on its editing targets	课堂教学 (3 学时) Teaching in class (three classes)	合成 <i>OsSWEET11</i> 基因靶位点扩增的 PCR 引物 Synthesis of PCR primers for amplification of <i>OsSWEET11</i> gene target sites 准备 DNA 提取、PCR 及电泳所需的试剂与设备 Preparation of the reagents and equipment required for DNA extraction, PCR, and electrophoresis 课件演示 CRISPR/Cas9 载体遗传转化的过程 Demonstration of the process of CRISPR/Cas9 vector genetic transformation using courseware 提供 <i>OsSWEET11</i> 基因的敲除植株 Supply of <i>OsSWEET11</i> gene knockout plants 提供靶位点 PCR 引物与快速 DNA 提取检测试剂盒 Supply of PCR primers of target sites and rapid DNA extraction an detection kits 听取学生汇报载体测序情况, 并给予评分 Listening to students' reports on vector sequencing and evaluation	掌握水稻 CRISPR/Cas9 载体遗传转化的 过程 Mastering of the process of CRISPR/Cas9 vector genetic transformation in rice 利用快速 DNA 提取检测试剂盒提取 水稻植株的 DNA、配制 PCR 反应体系及程序运行 Extraction of DNA from rice plants using a rapid DNA extraction and detection kit, setting up a PCR reaction system, and running a program 根据测序结果汇报各自载体构建的 情况 Reporting the construction of each vector based on the sequencing results PCR 产物的电泳检测, 准备测序样品 Detection of PCR products by electrophoresis and preparation of sequencing samples 通过软件对测试结果进行序列比对分析 Sequence alignment analysis of test results with the software 管理各自的水稻材料, 确保正常生长 Management of their respective rice materials and maintaining normal growth 了解水稻白叶枯病接种的方法与发病 的特征 Understanding of the inoculation method and characteristic of bacterial blight 将 PCR 产物的电泳和测序结果制作成 PPT Reporting the electrophoresis and sequencing results of PCR products with slide
第 3 周 水稻 <i>OsSWEET11</i> 基因编辑植株的 突变类型分析与 白叶枯病接种 Third week Analysis of the mutation types of rice <i>OsSWEET11</i>	课前准备 Pre-class preparation	活化白叶枯病菌株与制备接种的菌悬液 Activation of <i>Xoo</i> and preparation of the bacterial suspension for inoculation 准备接种所需的剪刀与试管 Preparation of scissors and test tubes required for inoculation	
	课后任务 After-class tasks	分析学生电泳结果, 确定是否符合测序要求 Analysis of student electrophoresis results and the sequencing results 联系测序的生物技术公司, 寄学生的测序样品 Contact with the sequencing biotechnology company and delivery of the students' sequencing samples 接收公司的测序结果, 并转发给对应的学生 Receival of the sequencing results from the company and forward them to the corresponding students	

(待续)

(续表 2)

周数与实验内容 Weeks and experimental content	进度安排 Schedule	教师的教学与准备工作 Teaching and preparation of teacher	学生需要完成的任务 Tasks for students to finish
gene edited plants and inoculation of <i>Xoo</i>	课堂教学 (3 学时) Teaching in class (three classes)	听取学生汇报靶位点的测序结果, 并给予评分 Listening to students' reports on the sequencing results of target sites and evaluation 指导学生明确目的基因的突变类型, 确定敲除植株 Instruction and clarification of the mutation type of the target gene and the knockout plant 讲解白叶枯病菌的接种、抗病表型的鉴定方法 Explanation of the inoculation methods of <i>Xoo</i> and identification methods of disease resistance phenotypes 提供白叶枯病菌悬液, 指导学生接种水稻材料 Supply of suspension of <i>Xoo</i> and guide students to inoculate rice materials	汇报编辑植株靶位点的 PCR 测序结果 Reporting the PCR sequencing results of edited plant target sites 讨论 <i>OsSWEET11</i> 基因的突变类型 Discussion of the mutation types of the <i>OsSWEET11</i> gene 对各自的水稻材料接种白叶枯病菌 Inoculation of their respective rice materials with <i>Xoo</i>
	课后任务 After-class tasks	观察接种后发病情况, 指导学生观察记录 Observation of the incidence of infection after inoculation and instructions	管理接种后的水稻材料, 从接种 5 d 后, 观察编辑植株的发病情况, 并做好 跟踪记录 Management of the rice materials after inoculation, observation of the disease incidence of the edited plants from 5 days after inoculation, and keeping tracking records
第 4 周 水稻 <i>OsSWEET11</i> 基因编辑植株的 白叶枯病抗性鉴 定与总结汇报 Fourth week Reports on characterization of the resistance of rice <i>OsSWEET11</i> gene edited plants to bacterial blight	课前准备 Pre-class preparation	组织学生对实验结果进行 PPT 总结汇报 Organization of students to conduct a PPT for summary report on the experimental results 收集学生在实验过程中遇到的问题, 并整理归类 Collection and categorization the problems encountered by students during the experiment	接种 10 d 后, 取接种叶片拍照及测 量统计病斑长度, 鉴定编辑植株的 抗病性 After 10 days of inoculation, taking photos of the inoculated leaves and measuring the length of the disease spots to identify the disease resistance of the edited plants
	课堂教学 (3 学时) Teaching in class (three classes)	组织学生以小组 PPT 形式总结汇报, 给予评分 Students' report with slide and evaluation by teachers 开展问题讨论与师生互动, 或提出一些引导性问题 供学生讨论 Answering the questions and discussion with the heuristic method	总结汇报各实验环节的进展和最终 结果 Summary and reporting the progress and final results of each experimental stage 提出实验遇到的问题, 相互间交流 讨论 Discussion of the problems encountered in the experiment with each other
	课后任务 After-class tasks	结合过程性评价与实验报告, 给予实验总成绩 Grading the students based on the process evaluation and experimental report	每位学生撰写实验报告 Each student writes an experimental report

液体培养基进行独立的扩大培养(1 d), 然后寄生物技术公司进行测序(3-4 d), 并通过软件分析测序结果, 确定载体是否构建成功。

## 2.2 第 2 周 CRISPR/Cas9 载体转基因水稻的获得及其编辑靶点 PCR 扩增

课前准备: 教师需获得水稻 *OsSWEET11* 基因的 CRISPR/Cas9 敲除植株(如: *KO-1*、*KO-2* 和 *KO-3*), 也可委托科研单位或生物技术公司进行创制, 并将水稻材料培养至 3-5 叶期; 购买植物快速 DNA 提取检测试剂盒, 合成 *OsSWEET11* 基因靶位点扩增的 PCR 引物, 准备 DNA 提取、PCR 扩增与电泳的试剂与设备; 掌握 PCR 操作技术、DNA 琼脂糖凝胶电泳、凝胶成像系统的使用方法。

课堂教学: 首先, 教师通过课件、视频等方式演示 CRISPR/Cas9 载体的水稻遗传转化过程, 讲解如何获得目的基因的编辑植株, 强调水稻转基因体系已非常成熟, 并提供参考文献供学生课后自习(0.5 h); 然后, 教师将提前准备好的 *OsSWEET11* 基因编辑植株及其对照分发给学生, 要求学生对照植株进行统一编号, 并提供扩增靶位点的 PCR 引物与快速 DNA 提取检测试剂盒, 让学生按照说明书提取植株的 DNA (0.5 h)、配制 PCR 反应体系(0.5 h)、运行 PCR 程序(1.5 h)。在 PCR 运行过程中, 教师听取学生汇报载体构建的情况, 并及时给予评分。

课后任务: 学生采用琼脂糖凝胶电泳技术, 检测 PCR 扩增的产物, 分析其条带是否够清晰、特性好、浓度高, 教师及时给予指导和评分, 对 PCR 产物质量不符合测序要求的, 可要求学生重新进行 PCR 及电泳检测(1 d); 然后, 将合格的 PCR 产物寄送生物技术公司测序(3-4 d), 并通过软件对测试结果进行序列比对分析。水稻由学生各自管理, 要求学生每天巡视培养箱的条件是否稳定, 定期更换营养液, 确保水稻

正常生长。

## 2.3 第 3 周 水稻 *OsSWEET11* 基因编辑植株的突变分析与白叶枯病接种

课前准备: 教师需活化白叶枯病菌株, 制备好用于接种的白叶枯病菌悬液, 准备多把剪刀和试管; 使学生了解水稻白叶枯病接种的方法与发病的特征, 将上周 PCR 产物的电泳和测序结果, 制作成 PPT 准备汇报。

课堂教学: 首先, 教师听取学生对各自水稻材料中 *OsSWEET11* 基因编辑靶点序列的比对分析, 明确目的基因的突变类型, 确定 *OsSWEET11* 基因的敲除植株, 教师给予及时指导和评分(1 h); 然后, 教师演示如何用剪叶法接种白叶枯病菌, 讲解叶片感病后的特征、病斑的测量方法、抗感病的标准等(1 h); 最后, 提供白叶枯病菌悬液, 指导学生对各组的水稻材料进行接种(1 h)。

课后任务: 接种后的水稻由学生各自继续管理, 从接种 5 d 后, 开始观察野生型对照及编辑植株的发病情况, 并做好跟踪记录。

## 2.4 第 4 周 水稻 *OsSWEET11* 基因编辑植株的白叶病抗性鉴定与总结汇报

课前准备: 在水稻接种白叶病菌 10 d 后, 要求学生取水稻植株的接种叶片拍照, 测量接种叶片的病斑长度与统计绘图, 确定编辑植株的白叶枯病抗性; 收集学生在实验过程中遇到的问题, 整理归类后, 准备解答的内容; 学生制作好总结汇报的 PPT。

课堂教学: 教师组织学生对实验结果进行 PPT 汇报与总结交流, 包括 sgRNA 靶向序列的设计方案、构建的 CRISPR/Cas9 载体的测序结果、水稻植株 *OsSWEET11* 基因的编辑靶点序列的鉴定及其白叶枯病抗性情况等, 教师给予及时评分(1.5 h); 要求学生提出在实验过程中遇到的各种问题, 师生进行交流互动, 找出原因,

提出解决办法；教师也可提出一些引导性的问题展开讨论，如 CRISPR/Cas9 编辑位点与 PAM 的距离(即编辑活性窗口)、sgRNA 脱靶效应及其非靶向编辑的位点等(1.5 h)。

课后任务：学生根据整个实验结果和课堂交流，从实验原理、实验步骤、结果分析和讨论等多方面撰写总结报告，教师将给予评分，作为本实验总成绩的重要组成部分。

### 3 实验教学目标

#### 3.1 掌握基因编辑的基本技术

CRISPR/Cas9 基因编辑技术具有操作简便、精确度高、脱靶率低、效率高和耗时短等特点。该技术是目前研究者们最常用的基因编辑技术，被广泛应用于动物、植物、微生物研究等各个领域。通过该实验的学习，掌握 CRISPR/Cas9 的技术原理、研究方法、实验流程，包括如何设计和选择目的基因的编辑靶标、如何构建基因编辑载体、如何分析靶点的编辑情况等关键性的步骤，学会运用该技术对植物的目的基因开展编辑工作，达到学以致用目的。

#### 3.2 锻炼学生的实践能力

高校生命科学相关专业的教学都需要理论与实践相结合，将科学前沿引入教学实践结合，能更好地激发学生的学习热情，增强学生分析问题、解决问题的实践创新能力。该综合性实验包含了序列分析、引物设计、在线软件使用等生物信息学技术，也涉及载体构建、转基因、DNA 的提取、PCR 扩增等分子生物学技术，还包括基因突变与表型关系的遗传学分析，涵盖了多个学科知识和技术，真正将课堂上所学理论应用于科学研究中，多方位训练学生的科研思维，全面提升学生的实践能力。

#### 3.3 促进学生的团队合作

本实验涉及前沿科学研究和多个实验操作

技术，较其他实验工作量大，周期长。如果让学生独立完成本实验，难度较大，其中任何一个步骤出错就可能后续实验无法进行，实验结果不理想。因此，将学生分成 4-6 人的小组，小组内每个人充分发挥自身优势，利用强项分工合作，共同完成本实验。在这样一个创新性教学实验案例中，实验教师的各种提前准备、引领、示范和以身作则的投入，师生合作互动实验创新的推进，对动作技能目标、认知目标、情感目标达成起到潜移默化的作用，实验的成功率会更高，教学效果会更好，还可以培养学生协作互助的精神，提高团队合作能力。

### 4 结语

CRISPR/Cas9 技术给基因组定向编辑的研究和应用带来突破性进展，在基因功能研究、人类疾病靶向治疗、作物分子设计育种等领域有广阔的前景。将前沿热点技术引入大学本科的实验教学，开设一个综合创新性实验，不仅能开阔学生的知识视野、提高学生的专业技能，而且还能激发学生的科研兴趣、培养学生的协作精神，在教学中真正实现理论学习与实践应用的有机结合，为高校创新型人才的培养提供科研训练的素材。

### REFERENCES

- [1] CHEN KL, WANG YP, ZHANG R, ZHANG HW, GAO CX. CRISPR/Cas genome editing and precision plant breeding in agriculture[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2019, 70: 667-697.
- [2] 谢胜松, 刘向东, 曾翠平, 马云龙, 王海燕. CRISPR/Cas9 技术在分子生物学创新性实验教学中的应用[J]. *生命的化学*, 2016, 36(1): 117-125.
- [3] XIE SS, LIU XD, ZENG CP, MA YL, WANG HY. Application of CRISPR/Cas9 technology in innovative experimental teaching of molecular biology[J]. *Chemistry of Life*, 2016, 36(1): 117-125 (in Chinese).
- [3] 张敏, 宋亚坤, 吕沫, 贾方兴, 刘杰, 卢希彬, 王益

- 林, 余春红. 基于 CRISPR/Cas9 基因编辑技术的本科教学实验体系的创建与实践[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2021, 37(1): 135-143.
- ZHANG M, SONG YK, LÜ M, JIA FX, LIU J, LU XB, WANG YL, YU CH. Construction and practice of experimental system for undergraduate teaching based on CRISPR/Cas9 gene editing technology[J]. China Industrial Economics, 2021, 37(1): 135-143 (in Chinese).
- [4] 赵慧, 高永峰, 周武艺, 倪春林. 基于酵母杂交的 CRISPR/Cas9 基因编辑教学实验设计与应用效果[J]. 实验技术与管理, 2021, 38(11): 70-76.
- ZHAO H, GAO YF, ZHOU WY, NI CL. Design and application effect of CRISPR/Cas9 gene-editing teaching experiment based on mating yeast[J]. Experimental Technology and Management, 2021, 38(11): 70-76 (in Chinese).
- [5] 魏远, 王宏刚, 孟琦, 王家乐, 李艳君, 朱玉山, 赵立青. CRISPR/Cas9 技术在本科实验教学中的应用[J]. 实验技术与管理, 2021, 38(9): 195-197, 203.
- WEI Y, WANG HG, MENG Q, WANG JL, LI YJ, ZHU YS, ZHAO LQ. Application of CRISPR/Cas9 technology in undergraduate experimental teaching[J]. Experimental Technology and Management, 2021, 38(9): 195-197, 203 (in Chinese).
- [6] 王宏刚, 魏远, 李艳君, 朱玉山. T7E1 检测 CRISPR-Cas9 基因编辑效果实验设计[J]. 实验技术与管理, 2023, 40(5): 38-41.
- WANG HG, WEI Y, LI YJ, ZHU YS. Experimental design on testing the effect of CRISPR-Cas9 gene editing by T7E1[J]. Experimental Technology and Management, 2023, 40(5): 38-41 (in Chinese).
- [7] 薛秀花, 车敏画, 赵孟瑶, 向本琼. CRISPR/Cas9 技术在发育生物学创新性实验教学中的应用[J]. 高校生物学教学研究(电子版), 2018, 8(2): 47-51.
- XUE XH, CHE MH, ZHAO MY, XIANG BQ. The application of CRISPR/Cas9 technology in developmental biology innovative experiment teaching[J]. Biology Teaching in University (Electronic Edition), 2018, 8(2): 47-51 (in Chinese).
- [8] 何晓玲, 刘鹏程, 马伯军, 陈析丰. 基于 CRISPR/Cas9 的基因编辑技术研究进展及其在植物中的应用[J]. 植物学报, 2022, 57(4): 508-531.
- HE XL, LIU PC, MA BJ, CHEN XF. Advance in gene-editing technology based on CRISPR/Cas9 and its application in plants[J]. Bulletin of Botany, 2022, 57(4): 508-531 (in Chinese).
- [9] LIU PC, HE LM, MEI L, ZHAI WX, CHEN XF, MA BJ. Rapid and directional improvement of elite rice variety via combination of genomics and multiplex genome editing[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2022, 70(20): 6156-6167.
- [10] CHEN XF, LIU PC, MEI L, HE XL, CHEN L, LIU H, SHEN SR, JI ZD, ZHENG XX, ZHANG YC, GAO ZY, ZENG DL, QIAN Q, MA BJ. *Xa7*, a new executor *R* gene that confers durable and broad-spectrum resistance to bacterial blight disease in rice[J]. Plant Communications, 2021, 2(3): 100143.
- [11] NISHIMURA A, AICHI I, MATSUOKA M. A protocol for *Agrobacterium*-mediated transformation in rice[J]. Nature Protocols, 2006, 1(6): 2796-2802.
- [12] CHU ZH, YUAN M, YAO JL, GE XJ, YUAN B, XU CG, LI XH, FU BY, LI ZK, BENNETZEN JL, ZHANG QF, WANG SP. Promoter mutations of an essential gene for pollen development result in disease resistance in rice[J]. Genes & Development, 2006, 20(10): 1250-1255.
- [13] OLIVA R, JI CH, ATIENZA-GRANDE G, HUGUET-TAPIA JC, PEREZ-QUINTERO A, LI T, EOM JS, LI CH, NGUYEN H, LIU B, AUGUY F, SCIALLANO C, LUU VT, DOSSA GS, CUNNAC S, SCHMIDT SM, SLAMET-LOEDIN IH, VERA CRUZ C, SZUREK B, FROMMER WB, et al. Broad-spectrum resistance to bacterial blight in rice using genome editing[J]. Nature Biotechnology, 2019, 37(11): 1344-1350.
- [14] XU ZY, XU XM, GONG Q, LI ZY, LI Y, WANG S, YANG YY, MA WX, LIU LY, ZHU B, ZOU LF, CHEN GY. Engineering broad-spectrum bacterial blight resistance by simultaneously disrupting variable TALE-binding elements of multiple susceptibility genes in rice[J]. Molecular Plant, 2019, 12(11): 1434-1446.
- [15] XIE XR, MA XL, ZHU QL, ZENG DC, LI GS, LIU YG. CRISPR-GE: a convenient software toolkit for CRISPR-based genome editing[J]. Molecular Plant, 2017, 10(9): 1246-1249.
- [16] MA XL, ZHANG QY, ZHU QL, LIU W, CHEN Y, QIU R, WANG B, YANG ZF, LI HY, LIN YR, XIE YY, SHEN RX, CHEN SF, WANG Z, CHEN YL, GUO JX, CHEN LT, ZHAO XC, DONG ZC, LIU YG. A robust CRISPR/Cas9 system for convenient, high-efficiency multiplex genome editing in monocot and dicot plants[J]. Molecular Plant, 2015, 8(8): 1274-1284.
- [17] YOSHIDA S, FOMO DA, COCK JH, GOMEZ KA. Laboratory Manual for Physiological Studies of Rice[M]. Philippines: International Rice Research Institute, 1976: 61-66.

(本文责编 郝丽芳)