

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2020年2月27日 (27.02.2020)



(10) 国际公布号
WO 2020/038384 A1

(51) 国际专利分类号:
CI2N 15/82 (2006.01) *A01H 5/00* (2018.01)
CI2N 15/113 (2010.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2019/101697

(22) 国际申请日: 2019年8月21日 (21.08.2019)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
201810960093.0 2018年8月22日 (22.08.2018) CN

(71) 申请人: 中国科学院遗传与发育生物学研究所 (INSTITUTE OF GENETICS AND DEVELOPMENTAL BIOLOGY, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) [CN/CN]; 中国北京市朝阳区北辰西路1号院, Beijing 100101 (CN)。

(72) 发明人: 高彩霞 (GAO, Caixia); 中国北京市朝阳区北辰西路1号院, Beijing 100101 (CN)。 张华伟 (ZHANG, Huawei); 中国北京市朝阳区北辰西路1号院, Beijing 100101 (CN)。 司小敏 (SI, Xiaomin); 中国北京市朝阳区北辰西路1号院, Beijing 100101 (CN)。

(74) 代理人: 北京永新同创知识产权代理有限公司 (NTD UNIVATION INTELLECTUAL PROPERTY AGENCY LTD); 中国北京市东城区北三环东路36号北京环球贸易中心C座10层, Beijing 100013 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL,

SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

- 包括国际检索报告 (条约第21条 (3))。
- 包括说明书序列表部分 (细则5.2 (a))。

(54) Title: PLANT HAVING IMPROVED SUGAR CONTENT

(54) 发明名称: 具有提高的糖含量的植物

(57) Abstract: A method for producing a plant having an improved sugar content, preferably a non-transgenic plant, and a plant having an improved sugar content, preferably a non-transgenic plant, and derivatives thereof produced thereby. More specifically, uORF for mediating sucrose-induced repression of translation in a plant is destroyed by gene editing to improve the sugar content in the plant.

(57) 摘要: 一种产生具有提高的糖含量的植物, 优选非转基因植物的方法, 以及通过此方法产生的具有提高的糖含量的植物, 优选非转基因植物, 及其后代。更具体而言, 通过基因编辑破坏植物中介导蔗糖诱导的翻译抑制的uORF, 从而提高植物中的糖含量。



WO 2020/038384 A1

具有提高的糖含量的植物

5 技术领域

本发明涉及植物基因工程领域。具体而言，本发明涉及一种产生具有提高的糖含量的植物，优选非转基因植物的方法，以及通过此方法产生的具有提高的糖含量的植物，优选非转基因植物，及其后代。更具体而言，本发明涉及通过基因编辑破坏植物中介导蔗糖诱导的翻译抑制的 uORF，从而提高植物中的糖含量。

10

发明背景

番茄(*Solanum lycopersicum*)是一种世界上广泛栽培的作物，其可作蔬菜又可作水果。目前，消费者对番茄的风味要求越来越高。而番茄果实的甜度是改善番茄风味的重要环节。番茄果实的甜度取决于糖分积累中的蔗糖含量。蔗糖是番茄从叶片源运输到果实库的运转糖，但多数番茄品种果实中主要是葡萄糖和果糖，蔗糖含量却很低。其原因是蔗糖会通过代谢酶如转化酶等将其迅速的转换为葡萄糖和果糖。因此蔗糖的分解是番茄果实中糖积累的主要环节。有研究通过参与糖代谢或信号途径过程中的关键基因如敲除蔗糖水解酶基因来提高番茄果实的糖含量，但效果并不是很明显。也有研究通过环境胁迫(如干旱或高盐胁迫)来影响碳水化合物的新陈代谢和碳水化合物从源到库器官的运输增加番茄果实中的甜度，但是其机制目前并不是很明确。因此到目前为止还没有出现一种有效且非转基因的提高番茄果实中的甜度(糖含量)的方法。

已有研究证明拟南芥体内的蔗糖含量与拟南芥转录因子 *AtbZIP11* 基因的表达之间是负反馈调节关系(Fatemeh Rahmani et al., *Plant Physiology*, July 2009, Vol. 150, pp. 1356-1367)。蔗糖可以作为一种信号分子抑制拟南芥 *AtbZIP11* 基因转录本的翻译，这种现象被称为蔗糖诱导的翻译抑制 (sucrose-induced repression of translation, SIRT)。*AtbZIP11* 的 5'非翻译区中有能够被翻译的开放阅读框(ORF)，这些开放阅读框称为 uORF (upstream open reading frame)。*AtbZIP11* 基因的 5'非翻译区有 4 个 uORF，有研究证明其中保守的 uORF2 (*AtbZIP11* 的第二个 uORF)对于 SIRT 是必须的。当细胞内的蔗糖浓度较高时，会被该基因的 uORF2 感知，从而抑制下游 *AtbZIP11* 基因的表达，进而影响蔗糖合成途径，使机体内的蔗糖含量稳定在某一个特定水平。

之前的研究显示，烟草中 *AtbZIP11* 的直系同源物 *tbz17* 也表现出 uORF 介导的 SIRT (Thalor et al., *PLoS One*, (2012), Volume 7, Issue 3, e33111)。组成型过表达 *tbz17* ORF 的转基因烟草植物叶片中蔗糖水平比野生型植物大约高出 3-4 倍。然而，转基因烟草植物的生长严重受损。

此后，在番茄中也鉴定了 *AtbZIP11* 的同源基因 *SlbZIP1* 和 *SlbZIP2*，在其上游分别包含有 4 个和 3 个 uORF，其中第二个保守的 uORF 即 uORF2 参与 SIRT。Sagor 等人已

经证明(Plant Biotechnology Journal (2016) 14, pp. 1116-1126), 用果实特异性启动子在番茄果实中仅过表达 *SibZIP1* 基因的 ORF 区域(不包括 uORF2), 由于缺少 uORF2 介导的负反馈, 可使细胞内的糖持续上升, 最终使番茄果实甜度提高 1.5 倍。然而, 该策略需要转基因。

- 5 本领域仍然需要具有正常生长表型和提高的糖含量的植物(如番茄植物), 特别是非转基因植物(如非转基因番茄植物)。

发明简述

在一方面, 本发明提供一种产生具有提高的糖含量的植物的方法, 所述方法包括将
10 靶向介导蔗糖诱导的翻译抑制(SIRT)的 uORF 的基因编辑系统导入所述植物, 其中所述基因编辑系统的导入导致所述 uORF 中的突变, 且所述突变导致所述 uORF 编码的多肽的表达减少或缺失, 或所述突变导致所述 uORF 编码的多肽的活性的降低或缺失。

在一些实施方案中, 所述介导 SIRT 的 uORF 编码的多肽包含与 SEQ ID NO:2 具有
15 至少约 50%、至少约 55%、至少约 60%、至少约 65%、至少约 70%、至少约 75%、至少约 80%、至少约 85%、至少约 90%、至少约 95%、至少约 96%、至少约 97%、至少约 99%、甚至至少约 99%序列相同性的氨基酸序列。

在一些实施方案中, 所述突变包括一或多个核苷酸的取代、缺失或添加。

在一些实施方案中, 所述基因编辑系统选自锌指核酸酶系统、TALEN 系统和
CRISPR 系统。在一些实施方案中, 所述 CRISPR 系统是 CRISPR-Cas9 系统。

20 在一些实施方案中, 通过瞬时转化导入所述基因编辑系统, 由此产生具有提高的糖含量的非转基因植物。

在一些实施方案中, 通过稳定转化导入所述基因编辑系统, 由此编码所述基因编辑系统组分的外源核苷酸序列被整合进所述植物基因组。在一些实施方案中, 所述方法进一步包括通过遗传分离获得不含整合的外源核苷酸序列的非转基因植物。

25 在一些实施方案中, 所述植物选自番茄、草莓、拟南芥、烟草、水稻、玉米、大麦、高粱、小麦、马铃薯、胡萝卜、甜椒、西瓜、香瓜、苹果、梨、葡萄、柑橘、橙子、柚子、樱桃、荔枝、红龙果、桃、金钱橘、李子、杏、芒果、无花果、哈密瓜、山楂、香蕉、杨梅、蓝莓、甜菜、猕猴桃、甘蓝、菠萝。

在一些具体实施方案中, 所述植物是番茄。在一些实施方案中, 所述介导 SIRT 的
30 uORF 是 *SibZIP1* 基因的 uORF2, 例如, 所述 *SibZIP1* 基因的 uORF2 编码包含 SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列的多肽。在一些实施方案中, 所述 CRISPR 系统包含至少一种向导 RNA, 所述向导 RNA 靶向 *SibZIP1* 基因的 uORF2 中 SEQ ID NO:3 或 SEQ ID NO:4 所示核苷酸序列; 优选地, 所述 CRISPR 系统包含两种向导 RNA, 所述两种向导 RNA 分别靶向 *SibZIP1* 基因的 uORF2 中 SEQ ID NO:3 和 SEQ ID NO:4 所示核苷酸序列。在一些实施
35 方案中, 所述介导 SIRT 的 uORF 是 *SibZIP2* 基因的 uORF2, 例如, 所述 *SibZIP2* 基因的 uORF2 编码包含 SEQ ID NO:6 所示氨基酸序列的多肽。

在另一方面，本发明提供一种通过本发明的方法产生的植物或其后代，优选地，所述植物或其后代是非转基因的。

附图简述

5 图 1 示出瞬时实验验证番茄 *SibZIP1* 基因的 5' leader 序列中 uORF 的功能。uORF_{*SibZIP1*} 是野生型 5' leader 序列；*uorf_{SibZIP1-A1}*，*uorf_{SibZIP1-A2}*，*uorf_{SibZIP1-3}* 是分别将 5' leader 序列中的三个起始密码子 AUG 突变为 AAA。左图为 LUC/REN 的活性，即代表 LUC 的翻译水平；右图代表 LUC/REN 的转录本水平，REN 为内参基因。

图 2 示出 *SibZIP1* 基因结构(含 5'和 3'非翻译区)以及 T0 突变体 uORF2 的测序结果。
10 划线部分为 sgRNA 靶序列，加粗的为 PAM。

图 3 示出 uORF2 突变体 T0 植物的糖含量测定结果。A：总糖含量；B：蔗糖含量；
C：葡萄糖含量；D：果糖含量。

图 4 示出 uORF2 突变体 T0 植物的生长表型(比例尺为 6cm)。

图 5 示出 uORF2 突变体 T0 植物的果实表型。A：果实大小与成熟度(比例尺为 6mm)；
15 B：果实发育和种子发育(比例尺为 7mm)；C：果实重量。

图 6 示出 *SibZIP1* 基因结构(含 5'和 3'非翻译区)以及 T1 突变体 uORF2 的测序结果。
划线部分为 sgRNA 靶序列，加粗的为 PAM。

图 7 示出 uORF2 突变体 T1 植物的生长表型(比例尺为 8cm)、开花结果表型(比例尺
为 4cm)以及果实表型(比例尺为 1.5cm)。

20 图 8 示出突变体 T1 植物不同组织中 *uorf_{SibZIP1}* 转录本水平变化。

图 9 示出 uORF2 突变体 T1 植物的糖含量测定结果。

发明详述

拟南芥转录因子 *AtbZIP11* 已经被证明在植物内控制糖含量并且受到蔗糖诱导的翻
25 译抑制(SIRT)。在烟草中，在缺少 SIRT 下组成型过表达 *AtbZIP11* 的同源物 *TBZ17*，尽管糖含量提高，但植物生长受到严重影响。这促使研究人员在番茄中使用果实特异性启动子过表达缺少 SIRT 的番茄 *SibZIP1* 基因，结果实现番茄果实糖含量提高，并保持了植物正常生长。然而，使用果实特异性启动子需要进行对番茄植物进行转基因，会增加公众对其安全性的担忧。

30 本发明人发现，通过基因编辑技术原位破坏番茄 *SibZIP1* 基因介导 SIRT 的 uORF，能够显著提高番茄果实中的糖含量。并且，令人意想不到的是，尽管 *SibZIP1* 基因的 SIRT 也是组成型被缺失，番茄植物的正常生长却不受影响，这在农业上具有重大意义。更为重要的是，使用基因编辑技术可以获得具有提高的果实糖含量的非转基因番茄植物，能够消除关于转基因的安全性问题。这是本领域第一次证明可以通过使用基因编辑技术原
35 位破坏介导 SIRT 的 uORF，提高植物中的糖含量。

因此，在一方面，本发明提供一种产生具有提高的糖含量的植物的方法，所述方法

包括将靶向介导蔗糖诱导的翻译抑制(SIRT)的 uORF 的基因编辑系统导入所述植物，其中所述基因编辑系统的导入导致所述 uORF 中的突变，且所述突变导致所述 uORF 编码的多肽的表达减少或缺失，或所述突变导致所述 uORF 编码的多肽的活性的降低或缺失。优选地，所述蔗糖诱导的翻译抑制(SIRT)被降低或被消除。

5 如本发明所用，术语“糖”意指可以提供甜味的碳水化合物，包括但不限于蔗糖、葡萄糖、果糖。在一些实施方案中，所述“糖含量”指的是总糖含量。在一些实施方案中，所述“糖含量”指的是蔗糖含量。在一些实施方案中，所述“糖含量”指的是葡萄糖含量。在一些实施方案中，所述“糖含量”指的是果糖含量。

介导蔗糖诱导的翻译抑制(SIRT)的 uORF 是从植物中其表达受 SIRT 调控的 S 类碱性亮氨酸拉链(basic leucine zipper, bZIP)转录因子 5'非翻译区鉴定出来的保守 uORF，也称作蔗糖控制 uORF(Sucrose Control uORF, SC-uORF)，其在植物糖积累中起负反馈作用(Anika Wiese et al., The Plant Cell, July 2004, Vol. 16, pp. 1717-1729; Sagor et al., Plant Biotechnology Journal (2016) 14, pp. 1116-1126)。此类调节性 uORF 存在于植物基因组的 bZIP 编码基因，但在其它生物体中不存在。例如，所述 uORF 可以是来自拟南芥的
10 *AtbZIP11*，烟草中的 *TBZ17*，番茄的 *SlbZIP1* 和 *SlbZIP2* 的 uORF，例如 5'非翻译区的第二个 uORF(uORF2)。

介导 SIRT 的 uORF 在植物中非常保守(Anika Wiese et al., The Plant Cell, July 2004, Vol. 16, pp. 1717-1729; Sagor et al., Plant Biotechnology Journal (2016) 14, pp. 1116-1126)。所述介导 SIRT 的 uORF 可以来自的植物包括但不限于番茄、草莓、拟南芥、烟草、水稻、玉米、大麦、高粱、小麦、马铃薯、胡萝卜、甜椒、西瓜、香瓜、苹果、梨、葡萄、柑橘、橙子、柚子、樱桃、荔枝、红龙果、桃、金钱橘、李子、杏、芒果、无花果、哈密瓜、山楂、香蕉、杨梅、蓝莓、甜菜、猕猴桃、甘蓝、菠萝。
20

因此，本发明的方法可以应用的植物包括但不限于番茄、草莓、拟南芥、烟草、水稻、玉米、大麦、高粱、小麦、马铃薯、胡萝卜、甜椒、西瓜、香瓜、苹果、梨、葡萄、柑橘、橙子、柚子、樱桃、荔枝、红龙果、桃、金钱橘、李子、杏、芒果、无花果、哈密瓜、山楂、香蕉、杨梅、蓝莓、甜菜、猕猴桃、甘蓝、菠萝。在一些具体实施方式中，所述植物是番茄。
25

在一些实施方案中，所述介导 SIRT 的 uORF 编码的多肽包含与 SEQ ID NO:2 (对应于番茄 *SlbZIP1* 的 uORF2)具有至少约 50%、至少约 55%、至少约 60%、至少约 65%、至少约 70%、至少约 75%、至少约 80%、至少约 85%、至少约 90%、至少约 95%、至少约 96%、至少约 97%、至少约 99%、甚至至少约 99%序列相同性的氨基酸序列。
30

序列“相同性”具有本领域公认的含义，并且可以利用公开的技术计算两个核酸或多肽分子或其区域之间序列相同性的百分比。可以沿着多核苷酸或多肽的全长或者沿着所述分子的特定区域测量序列相同性。(参见，例如：Computational Molecular Biology, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of
35

Sequence Data, Part I, Griffin, A.M., and Griffin, H.G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; and Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991)。虽然存在许多测量两个多核苷酸或多肽之间的相同性的方法，但是术语“相同性”是技术人员公知的(Carrillo, H. & Lipman, D., SIAM J Applied Math 48:1073 (1988))。

在一些具体实施方案中，所述植物是番茄，且所述介导 SIRT 的 uORF 是 *SibZIP1* 基因的 uORF2。在一些实施方案中，*SibZIP1* 基因的核苷酸序列可从 Genbank 中的 Gene ID 543618 获得。例如，所述 *SibZIP1* 基因的 uORF2 编码包含 SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列的多肽。

10 在一些具体实施方案中，所述植物是番茄，且所述介导 SIRT 的 uORF 是 *SibZIP2* 基因的 uORF2。在一些实施方案中，*SibZIP2* 基因的核苷酸序列可从 Genbank 中的 Gene ID: 543618 获得。例如所述 *SibZIP2* 基因的 uORF2 编码包含 SEQ ID NO:6 所示氨基酸序列的多肽。

15 在一些具体实施方案中，所述植物是金钱橘(*Citrus clementina*)，且所述介导 SIRT 的 uORF 是金钱橘 LOC18047493 基因的 uORF，其编码包含 SEQ ID NO:7 所示氨基酸序列的多肽。

在一些具体实施方案中，所述植物是桃(*Prunus persica*)，且所述介导 SIRT 的 uORF 是桃 LOC18767264 基因的 uORF，其编码包含 SEQ ID NO:8 所示氨基酸序列的多肽。

合适的介导 SIRT 的 uORF 还可以例如是 Anika Wiese et al.(The Plant Cell, July 2004, 20 Vol. 16, pp. 1717-1729)中描述的那些。

25 在一些实施方案中，所述 uORF 中的突变包括一或多个核苷酸的取代、缺失或添加。例如，所述突变导致 uORF 中的翻译起始密码子缺失或变为翻译终止密码子，或者导致所述 uORF 的强翻译起始密码子突变为弱翻译起始密码子，使得所述 uORF 编码的多肽不能被翻译或翻译水平下降。或者，所述突变可以是移码突变，使得所述 uORF 编码的多肽不能被正确翻译(例如被截短，或活性位点被突变或缺失)，从而活性被降低或缺失。如本文所用，“uORF 编码的多肽的活性”意指所述多肽介导蔗糖诱导的翻译抑制(SIRT)的能力。

“基因编辑”，也称为基因组编辑，其使用序列特异性核酸酶或其衍生物在生物体基因组中进行核苷酸插入、缺失或取代。基因编辑通常通过在基因组中期望的位置导致 30 位点特异性双链断裂(DSB)，然后在修复 DSB 的过程中引入期望的 DNA 插入、缺失或取代。然而，基因编辑也涵盖不涉及 DSB 的碱基编辑技术。

本领域已知多种基因编辑系统。本发明并不特别限制所使用的基因编辑系统，只要其能够实现所述突变。例如，适于本发明使用的基因编辑系统包括但不限于锌指核酸酶(ZFN)系统、转录激活因子样效应物核酸酶(TALEN)系统和 CRISPR 系统。本领域技术人员能够根据本申请的教导选择或设计合适的基因编辑系统。

“锌指核酸酶”是通过将锌指 DNA 结合结构域与 DNA 切割结构域融合而制备的

人工限制性酶。ZFN 的单个锌指 DNA 结合结构域通常含有 3-6 个单独的锌指重复序列，每个锌指重复序列可以识别例如 3bp 的独特序列。通过组合不同的锌指重复序列，可以靶向不同的基因组序列。

“转录激活因子样效应物核酸酶”是可以经工程化而可以切割特定 DNA 序列的限制性酶，通常通过将转录激活因子样效应物(TALE)的 DNA 结合结构域与 DNA 切割结构域融合而制备。TALE 经工程化后可以结合几乎任何想要的 DNA 序列。

“CRISPR(Clustered regularly interspaced short palindromic repeats, 成簇的规律间隔的短回文重复序列)系统”通常包含可以形成具有序列特异性的复合物的两种组分：CRISPR 核酸酶和相应的向导 RNA。

如本文所用，术语“CRISPR 核酸酶”通常指在天然存在的 CRISPR 系统中存在的核酸酶，以及其修饰形式、其变体(包括切口酶突变体)、或其催化活性片段。CRISPR 核酸酶可以通过与向导 RNA 一起相互作用来识别、结合和/或切割靶核酸结构。该术语涵盖基于 CRISPR 系统的能够在细胞内实现基因编辑的任何核酸酶或其功能性变体。本领域已知多种 CRISPR 核酸酶的功能性变体，例如高特异性变体或切口酶变体，或其与胞苷脱氨酶或腺苷脱氨酶的融合蛋白等。本领域技术人员知晓如何选择合适的 CRISPR 核酸酶功能性变体以实现本发明的目的。

本发明的 CRISPR 基因编辑系统使用的 CRISPR 核酸酶例如可以选自 Cas3、Cas8a、Cas5、Cas8b、Cas8c、Cas10d、Cse1、Cse2、Csy1、Csy2、Csy3、GSU0054、Cas10、Csm2、Cmr5、Cas10、Csx11、Csx10、Csf1、Cas9、Csn2、Cas4、Cpf1、C2c1、C2c3 或 C2c2 蛋白，或这些核酸酶的功能性变体。

在一些实施方案中，所述 CRISPR 核酸酶包括 Cas9 核酸酶或其变体。基于 Cas9 核酸酶或其变体的 CRISPR 基因编辑系统在本文也称作 CRISPR-Cas9 系统。所述 Cas9 核酸酶可以是来自不同物种的 Cas9 核酸酶，例如来自化脓链球菌(*S. pyogenes*)的 spCas9。spCas9 的示例性氨基酸序列如 SEQ ID NO:9 所示。

所述 Cas9 核酸酶变体例如可以包括 Cas9 核酸酶的高特异性变体，例如 Feng Zhang 等人的 Cas9 核酸酶变体 eSpCas9(1.0) (K810A/K1003A/R1060A)、eSpCas9(1.1) (K848A/K1003A/R1060A)，以及 J. Keith Joung 等人开发的 Cas9 核酸酶变体 SpCas9-HF1 (N497A/R661A/Q695A/Q926A)。

或者，所述 Cas9 核酸酶变体还可以包括 Cas9 切口酶(ncas9)，其中 Cas9 核酸酶的 DNA 切割结构域中的两个亚结构域(HNH 核酸酶亚结构域和 RuvC 亚结构域)之一被失活而形成切口酶。在一些实施方案中，可以利用 Cas9 切口酶与靶向待编辑序列上下游的两种 gRNA 组合，实现待编辑序列的缺失，或在供体序列存在下实现待编辑序列的替换。

在一些实施方案中，所述 CRISPR 核酸酶还可以包括 Cpf1 核酸酶或其变体例如高

特异性变体。所述 Cpf1 核酸酶可以是来自不同物种的 Cpf1 核酸酶,例如来自 *Francisella novicida* U112、*Acidaminococcus sp.* BV3L6 和 *Lachnospiraceae bacterium* ND2006 的 Cpf1 核酸酶。基于 Cpf1 核酸酶或其变体的 CRISPR 基因编辑系统在本文也称作 CRISPR-Cpf1 系统。

5 在一些实施方案中,所述 CRISPR 核酸酶还可以包括碱基编辑器(base editor)。碱基编辑器通常是包含脱氨酶和缺失 DNA 切割活性的 CRISPR 核酸酶的融合蛋白。

如本发明所用,“缺失 DNA 切割活性的 CRISPR 核酸酶”包括但不限于 Cas9 切口核酸酶(nCas9)、核酸酶死亡的 Cas9 核酸酶(dCas9)或核酸酶死亡的 Cpf1 核酸酶(dCpf1)。核酸酶死亡的 Cas9 核酸酶(dCas9)或核酸酶死亡的 Cpf1 核酸酶(dCpf1)完全缺失 DNA 切割活性。本领域已知多种缺失 DNA 切割活性的 CRISPR 核酸酶。

如本发明所用,“脱氨酶”是指催化脱氨基反应的酶。在本发明一些实施方式中,所述脱氨酶指的是胞嘧啶脱氨酶,其能够接受单链 DNA 作为底物并能够催化胞苷或脱氧胞苷分别脱氨化为尿嘧啶或脱氧尿嘧啶。在本发明一些实施方式中,所述脱氨酶指的是腺嘌呤脱氨酶,其能够接受单链 DNA 作为底物并能够催化腺苷或脱氧腺苷(A)形成肌苷(I)。本领域已知多种合适的接受单链 DNA 作为底物的胞嘧啶脱氨酶或腺嘌呤脱氨酶,例如 APOBEC1 脱氨酶、激活诱导的胞苷脱氨酶(AID)、APOBEC3G、CDA1,或者例如 Nicloe M. Gaudelli 等人(doi: 10.1038/nature24644, 2017)所公开的 DNA 依赖型腺嘌呤脱氨酶。

通过使用缺失 DNA 切割活性的 CRISPR 核酸酶与脱氨酶融合(形成所谓的“碱基编辑器”),可以实现靶核苷酸序列中的碱基编辑,例如 C 至 T 的转换或 A 至 G 的转换。本领域已知多种碱基编辑器,且本领域技术人员知晓如何选择合适的碱基编辑器以实现本发明的目的。

本发明中用于基因编辑的序列特异性核酸酶,例如锌指核酸酶、转录激活因子样效应物核酸酶或 CRISPR 核酸酶等,还可以包含亚细胞定位信号(如核定位信号)、肽接头、可检测标签等元件。例如,CRISPR 碱基编辑系统中的 CRISPR 核酸酶通常包含一个或多个核定位信号(NLS),以促进其进入细胞核,实现对染色体 DNA 的编辑。

如本文所用,“gRNA”和“向导 RNA”可互换使用,指的是能够与 CRISPR 核酸酶形成复合物并由于与靶序列具有一定互补性而能够将所述复合物靶向靶序列的 RNA 分子。例如,在基于 Cas9 的 CRISPR 基因编辑系统中,gRNA 通常由部分互补形成复合物的 crRNA 和 tracrRNA 分子构成,其中 crRNA 包含与靶序列具有足够相同性以便指导 CRISPR 复合物(Cas9+crRNA+tracrRNA)与该靶序列序列特异性地结合的序列。然而,本领域已知可以设计单向导 RNA(sgRNA),其同时包含 crRNA 和 tracrRNA 的特征。而在基于 Cpf1 的 CRISPR 基因组编辑系统中,gRNA 通常仅由成熟 crRNA 分子构成,其中 crRNA 包含有与靶序列具有足够相同性的序列以便指导复合物(Cpf1+crRNA)与该靶序列序列特异性结合。基于所使用的 CRISPR 核酸酶和待编辑的靶序列(如介导 SIRT 的 uORF)设计合适的 gRNA 属于本领域技术人员的能力范围内。

在一些具体实施方式中,所述植物是番茄,且所述 CRISPR 系统包含至少一种向导 RNA,所述向导 RNA 靶向 *SibZIP1* 基因的 uORF2 中 SEQ ID NO:3 或 SEQ ID NO:4 所示核苷酸序列;优选地,所述 CRISPR 系统包含两种向导 RNA,所述两种向导 RNA 分别靶向 *SibZIP1* 基因的 uORF2 中 SEQ ID NO:3 和 SEQ ID NO:4 所示核苷酸序列。

5 在本发明的实施方案中,所述基因编辑系统可以以各种形式导入植物。例如,对于 CRISPR 系统,CRISPR 核酸酶和向导 RNA 可以在体外产生并组装成核糖核蛋白(RNP),然后导入植物。或者,可以将编码所述 CRISPR 系统的所有组分的表达构建体导入植物,然后在植物细胞中表达出所述组分。或者,可以将编码所述 CRISPR 系统的部分组分的表达构建体以及体外生成的其它组分同时导入植物。

10 因此,本发明的实施方案中,所述 CRISPR 基因编辑系统可以以下述 i)至 v)中至少一种形式导入植物中:

i) 至少一种 CRISPR 核酸酶,和至少一种向导 RNA;

ii) 至少一种包含编码 CRISPR 核酸酶的核苷酸序列的表达构建体,和至少一种向导 RNA;

15 iii) 至少一种 CRISPR 核酸酶,和至少一种包含编码至少一种向导 RNA 的核苷酸序列的表达构建体;

iv) 至少一种包含编码 CRISPR 核酸酶的核苷酸序列的表达构建体,和至少一种包含编码至少一种向导 RNA 的核苷酸序列的表达构建体;

20 v) 至少一种包含编码 CRISPR 核酸酶的核苷酸序列和至少一种编码至少一种向导 RNA 的核苷酸序列的表达构建体。

如本发明所用,“表达构建体”是指适于感兴趣的核苷酸序列在生物体中表达的载体如重组载体。“表达”指功能产物的产生。例如,核苷酸序列的表达可指核苷酸序列的转录(如转录生成 mRNA 或功能 RNA)和/或 RNA 翻译成前体或成熟蛋白质。本发明的“表达构建体”可以是线性的核酸片段、环状质粒、病毒载体,或者,在一些实施方式中,可以是能够翻译的 RNA(如 mRNA)。本发明的“表达构建体”可包含不同来源的调控序列和感兴趣的核苷酸序列,或相同来源但以不同于通常天然存在的方式排列的调控序列和感兴趣的核苷酸序列。“调控序列”和“调控元件”可互换使用,指位于编码序列的上游(5'非编码序列)、中间或下游(3'非编码序列),并且影响相关编码序列的转录、RNA 加工或稳定性或者翻译的核苷酸序列。植物表达调控元件指的是能够在植物中控制感兴趣的核苷酸序列转录、RNA 加工或稳定性或者翻译的核苷酸序列。调控序列可包括但不限于启动子、翻译前导序列、内含子和多腺苷酸化识别序列。

35 将核酸分子(例如本发明的表达构建体等)和/或蛋白质“导入”植物是指用所述核酸和/或蛋白质转化植物,使得所述核酸和/或蛋白质在植物中能够发挥功能。例如,可以用所述核酸和/或蛋白质转化分离的植物细胞或组织,然后从所述经转化的细胞或组织再生植物。或者,可以将本发明的碱基编辑系统转化至完整植物上的特定部位,例如叶片、茎尖、花粉管、幼穗或下胚轴。这特别适合于难以进行组织培养再生的植物的转化。

可用于将核酸分子和/或蛋白质导入植物或植物细胞的方法包括但不限于：基因枪法、PEG 介导的原生质体转化、土壤农杆菌介导的转化、植物病毒介导的转化、花粉管通道法和子房注射法。

5 本发明所用的“转化”包括稳定转化和瞬时转化。“稳定转化”指将外源核苷酸序列导入基因组中，导致外源核苷酸序列稳定遗传。一旦稳定转化，外源核苷酸序列稳定地整合进所述植物的基因组中并且可以传递至其任何连续世代。“瞬时转化”指将核酸分子或蛋白质导入细胞中，执行功能而没有外源基因稳定遗传。瞬时转化中，外源核苷酸序列不整合进基因组中。

10 在一些实施方案中，通过瞬时转化导入所述基因编辑系统，由此产生具有提高的糖含量的非转基因植物。

例如，所述基因编辑系统的导入在不存在选择压力下进行，从而避免外源核苷酸序列在植物基因组中的整合。在一些具体实施方案中，将本发明的基因编辑系统转化至分离的植物细胞或组织，然后使所述经转化的植物细胞或组织再生为完整植物，优选地，在不存在选择压力下进行所述再生，也即是，在组织培养过程中不使用任何针对表达载体上携带的选择基因的选择剂(如抗生素、除草剂等)。不使用选择剂可以提高植物的再生效率，获得不含外源核苷酸序列的经基因编辑的植物。

直接将体外表达的蛋白质和/或体外转录的 RNA 分子转化至植物或植物细胞也是可能的。所述蛋白质和/或 RNA 分子能够在植物细胞中实现基因编辑，随后被细胞降解，避免了外源核苷酸序列在植物基因组中的整合。

20 在一些实施方案中，通过稳定转化导入所述基因编辑系统，由此编码所述基因编辑系统组分的外源核苷酸序列被整合进所述植物基因组。稳定转化可能提高筛选转化体的效率。之后，可以使所获得的经转化的植物的后代进行遗传分离，获得不含整合的外源核苷酸序列的非转基因植物。

25 总言之，通过基因编辑的方法，只需在植物细胞中导入或产生所述基因编辑的组分(如序列特异性核酸酶和/或向导 RNA)即可实现对靶序列的修饰，并且所述修饰可以稳定遗传，无需所述基因编辑系统在植物中持续存在。这样可以避免外源核苷酸序列在植物基因组中的整合，从而具有更高生物安全性。

在另一方面，本发明提供了通过本发明上述的方法产生的植物及其后代，其具有提高的糖含量。优选地，所述植物及其后代是非转基因的。

30 在另一方面，本发明提供了一种具有提高的糖含量的植物，其相对于野生型植物，在介导 SIRT 的 uORF 中包含突变，所述突变导致所述 uORF 编码的多肽的表达减少或缺失，或所述突变导致所述 uORF 编码的多肽活性的降低或缺失。优选地，所述植物是非转基因的。

35 在一些实施方案中，所述突变通过向所述植物导入靶向所述 uORF 的基因编辑系统产生。所述基因编辑系统和/或所述基因编辑系统的导入如上文所定义。在另一些实施方案中，所述突变通过杂交育种导入。

在一些实施方案中,相比于相应的野生型植物或其组织或器官(例如,介导 SIRT 的 uORF 未被突变),本发明的植物或其组织或器官的糖含量增加。所述糖含量增加的组织或器官包括但不限于果实、叶、根、茎、块茎等。“相应的野生型植物”意指通过本发明的方法产生的植物或本发明的植物所衍生自的野生型植物,例如所述野生型植物中介导 SIRT 的 uORF 未被突变。

相比于相应的野生型植物或其组织或器官(例如,介导 SIRT 的 uORF 未被突变),本发明的植物或其组织或器官中的总糖含量增加至少大约 10%、增加至少大约 20%、增加至少大约 30%、增加至少大约 40%、增加至少大约 50%、增加至少大约 60%、增加至少大约 70%、增加至少大约 80%、增加至少大约 90%、增加至少大约 100%、增加至少大约 125%、增加至少大约 150%、增加至少大约 175%、增加至少大约 200%或更高。优选地,相比于相应的野生型植物或其组织或器官(例如,介导 SIRT 的 uORF 未被突变),本发明的植物或其组织或器官中的蔗糖含量增加至少大约 10%、增加至少大约 20%、增加至少大约 30%、增加至少大约 40%、增加至少大约 50%、增加至少大约 60%、增加至少大约 70%、增加至少大约 80%、增加至少大约 90%、增加至少大约 100%、增加至少大约 125%、增加至少大约 150%、增加至少大约 175%、增加至少大约 200%或更高。优选地,相比于相应的野生型植物或其组织或器官(例如,介导 SIRT 的 uORF 未被突变),本发明的植物或其组织或器官中的果糖含量增加至少大约 10%、增加至少大约 20%、增加至少大约 30%、增加至少大约 40%、增加至少大约 50%、增加至少大约 60%、增加至少大约 70%、增加至少大约 80%、增加至少大约 90%、增加至少大约 100%、增加至少大约 125%、增加至少大约 150%、增加至少大约 175%、增加至少大约 200%或更高。优选地,相比于相应的野生型植物或其组织或器官(例如,介导 SIRT 的 uORF 未被突变),本发明的植物或其组织或器官中的葡萄糖含量增加至少大约 10%、增加至少大约 20%、增加至少大约 30%、增加至少大约 40%、增加至少大约 50%、增加至少大约 60%、增加至少大约 70%、增加至少大约 80%、增加至少大约 90%、增加至少大约 100%、增加至少大约 125%、增加至少大约 150%、增加至少大约 175%、增加至少大约 200%或更高。

在一些实施方案中,相比于相应的野生型植物(例如,介导 SIRT 的 uORF 未被突变),本发明的植物在基本上相同或相同的生长条件下具有可比较的(类似的或基本上相同)的生长参数和/或形态参数,包括但不限于生长速率、叶片大小、叶片厚度、果实大小、果实重量、株高、种子萌发率等。

在另一方面,本发明提供了一种植物育种方法,包括

- a) 提供第一植物,其通过本发明上述方法产生;
- b) 提供其中介导 SIRT 的 uORF 未被突变的第二植物;和
- c) 使所述第一植物和所述第二植物杂交。

在一具体方面,本发明提供一种产生具有提高的果实糖含量的番茄(*Solanum lycopersicum*)植物的方法,所述方法包括将靶向番茄 *SlbZIP1* 和/或 *SlbZIP2* 基因的 uORF2

的基因编辑系统导入番茄植物,所述基因编辑系统的导入导致所述 *SlbZIP1* 和/或 *SlbZIP2* 基因的 uORF2 中的突变,且所述突变导致所述 uORF2 编码的多肽的表达减少或缺失,或所述突变导致所述 uORF2 编码的多肽的活性的降低或缺失。所述基因编辑系统和/或所述基因编辑系统的导入如上文所定义。

5 在一些实施方式中,所述 *SlbZIP1* 基因的 uORF2 编码包含 SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列的多肽。在一些实施方式中,所述 *SlbZIP2* 基因的 uORF2 编码包含 SEQ ID NO:6 所示氨基酸序列的多肽。

在一些实施方案中,所述 CRISPR 系统包含至少一种向导 RNA,所述向导 RNA 靶向 *SlbZIP1* 基因的 uORF2 中 SEQ ID NO:3 或 SEQ ID NO:4 所示核苷酸序列。优选地,
10 所述 CRISPR 系统包含两种向导 RNA,所述两种向导 RNA 分别靶向 *SlbZIP1* 基因的 uORF2 中 SEQ ID NO:3 和 SEQ ID NO:4 所示核苷酸序列。

在另一方面,本发明提供一种通过本发明的方法产生的番茄植物或其后代,其具有提高的果实糖含量。在一些优选实施方案中,所述具有提高的果实糖含量的番茄植物是非转基因的。

15 在另一方面,本发明提供了一种具有提高的果实糖含量的番茄植物,其相对于野生型番茄植物,在 *SlbZIP1* 基因和/或 *SlbZIP2* 基因的 uORF2 中包含突变,所述突变导致所述 uORF2 编码的多肽的表达减少或缺失,或所述突变导致所述 uORF2 编码的多肽活性的降低或缺失。优选地,所述番茄植物是非转基因的。

在一些实施方案中,所述突变通过向番茄植物导入靶向 *SlbZIP1* 基因和/或 *SlbZIP2*
20 基因的 uORF2 的基因编辑系统产生。所述基因编辑系统和/或所述基因编辑系统的导入如上文所定义。在另一些实施方案中,所述突变通过杂交育种导入。

本发明的具有提高的糖含量(如果实糖含量)的番茄植物可以衍生自不同的番茄品种,包括但不限于栽培种 M82 (*Solanum lycopersicum* cv. M82)。

相比于相应的野生型番茄植物(例如, *SlbZIP1* 基因和/或 *SlbZIP2* 基因的 uORF2 未被突变),
25 本发明的番茄植物的果实中的总糖含量增加至少大约 10%、增加至少大约 20%、增加至少大约 30%、增加至少大约 40%、增加至少大约 50%、增加至少大约 60%、增加至少大约 70%、增加至少大约 80%、增加至少大约 90%、增加至少大约 100%、增加至少大约 125%、增加至少大约 150%、增加至少大约 175%、增加至少大约 200%或更高。优选地,相比于其衍生自的野生型番茄植物(例如, *SlbZIP1* 基因的 uORF2 未被突
30 变),本发明的番茄植物的果实中的蔗糖含量增加至少大约 10%、增加至少大约 20%、增加至少大约 30%、增加至少大约 40%、增加至少大约 50%、增加至少大约 60%、增加至少大约 70%、增加至少大约 80%、增加至少大约 90%、增加至少大约 100%、增加至少大约 125%、增加至少大约 150%、增加至少大约 175%、增加至少大约 200%或更
35 高。优选地,相比于相应的野生型植物或其组织或器官(例如,介导 SIRT 的 uORF 未被突变),本发明的植物或其组织或器官中的果糖含量增加至少大约 10%、增加至少大约 20%、增加至少大约 30%、增加至少大约 40%、增加至少大约 50%、增加至少大约 60%、

增加至少大约 70%、增加至少大约 80%、增加至少大约 90%、增加至少大约 100%、增加至少大约 125%、增加至少大约 150%、增加至少大约 175%、增加至少大约 200%或更高。优选地，相比于相应的野生型植物或其组织或器官(例如，介导 SIRT 的 uORF 未被突变)，本发明的植物或其组织或器官中的葡萄糖含量增加至少大约 10%、增加至少
5 大约 20%、增加至少大约 30%、增加至少大约 40%、增加至少大约 50%、增加至少大约 60%、增加至少大约 70%、增加至少大约 80%、增加至少大约 90%、增加至少大约 100%、增加至少大约 125%、增加至少大约 150%、增加至少大约 175%、增加至少大约 200%或更高。

10 在一些实施方案中，相比于相应的野生型番茄植物(例如，介导 SIRT 的 uORF 未被突变)，本发明的具有提高的果实糖含量的番茄植物在基本上相同或相同的生长条件下具有可比较的(类似的或基本上相同)的生长参数和/或形态参数，包括但不限于生长速率、叶片大小、叶片厚度、果实大小、果实重量、株高、种子萌发率等。

实施例

15 实施例 1、瞬时实验验证番茄 SlbZIP1 基因的 5' leader 序列中 uORF 的功能

为了检测 SlbZIP1 的第二个 uORF(uORF2)是否和拟南芥中 AtbZIP11 中 uORF2 具有类似的功能，分别将 SlbZIP1 uORF2 的三个起始密码子 AUG 突变为 AAA 以使该起始密码子失去起始翻译功能，从而探索 uORF2 对 SlbZIP1 基因的作用。利用双荧光素酶报告系统(如图 1 所示)，海肾荧光素酶(REN)和萤火虫荧光素酶(LUC)分别利用花椰菜花叶
20 病毒的 35S 启动子驱动表达，其中 REN 是内参对照。将 SlbZIP1 基因的 5' leader 序列的野生型形式和 uORF 突变形式(即分别将三个起始密码子 AUG 突变为 AAA，并分别命名为 uorfSlbZIP1-A1、uorfSlbZIP1-A2、uorfSlbZIP1-A3)构建在 LUC 的上游区域。将这些质粒分别转入番茄原生质体中进行 48 小时的表达，测定 LUC/REN 的转录本和翻译水平。

25

1.1 实验材料和方法

载体名称和来源：pGreenII 0800-LUC (Hellens, R.P. et al. Transient expression vectors for functional genomics, quantification of promoter activity and RNA silencing in plants. *Plant Methods* 1, 13 (2005))

30 原生质体制备及转化：选取 2~3 周大的生长在固体培养基上的番茄幼苗，将其切成细丝并用酶解法分离番茄原生质体细胞，然后将构建好的质粒通过 PEG 介导的转化方法转入原生质体细胞中，在 23°C 条件下黑暗培养 48 小时后收集原生质体。

荧光测定方法：通过双荧光素酶报告基因检测系统在荧光检测仪上对细胞中的相应载体的海肾荧光素酶(REN)和萤火虫荧光素酶(LUC)的表达活性进行测定，其中所得的
35 LUC/REN 的比值即为目标报告基因 LUC 的相对表达量。

mRNA 水平的测定：收集黑暗培养 48 小时后的原生质体，用 TRIzol 试剂提取细胞

中的 RNA 水平，并将其反转为 cDNA，之后用 qRT-PCR 进行定量。

1.2 实验结果

5 结果发现当把第二个 AUG 突变为 AAA 时，可以有效增强下游基因的活性且不影
响其转录本水平(图 1)。说明该基因的 uORF 能够抑制下游基因的翻译水平，其中第二
个起始密码子 AUG 在所述抑制中具有重要的作用。

实施例 2、通过基因编辑敲除 *SibZIP1* 的 uORF2

本实验使用的番茄品种为 M82 (*Solanum lycopersicum* cv. M82)。

10 2.1. sgRNA 的设计

为了能够完全破坏 *SibZIP1* 的 uORF2 翻译形成的多肽，同时设计了 2 种靶向该 uORF
15 的 sgRNA (sgRNA-1 和 sgRNA-2)，使得待突变的序列包含第二个和第三个起始密码子。
将该 2 种 sgRNA 同时构建进 pKSE401 双元载体骨架(Addgene: 62202; 其同时介导 SpCas9
的表达)获得 pKSE401-*SibZIP1*uORF-2sgRNA。将该载体质粒转入根癌农杆菌菌株
LBA4404 内，用于 M82 番茄植物的转化。

SibZIP1-uORF2 序列：

ATGATCCACATGCGTCGAGTTCGCATT**ATGCACTCTTTCTCCGTTGTCTTCCT**GTAC
TGGTTCTATGTGTTTTCATGA (SEQ ID NO:1)。

20 (备注：方框部分为 sgRNA；划线部分为 PAM；斜体所示为起始密码子)

SibZIP1-uORF2 多肽的氨基酸序列：MIHMRRVRIMHSFSVVFYWFYVFS (SEQ ID
NO:2)。

sgRNA-1 靶序列：AATGCGAACTCGACGCATG (SEQ ID NO:3)。

sgRNA-2 靶序列：AAACACATAGAACCAGTAC (SEQ ID NO:4)。

25

2.2. 转化获得突变体

用 1.1 中所获得的带有质粒 pKSE401-*SibZIP1*uORF-2sgRNA 的农杆菌转化番茄品种
M82。以番茄幼苗的子叶作为受体进行农杆菌介导的转化。转化后经过组织培养方法获
得再生番茄植株。植物种植条件：在番茄培养间进行，气温为 25-28℃，光照周期为 16
30 小时光照/8 小时黑暗，光照强度约为 600 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ，常规管理。

2.3. 检测突变体

对获得的转基因植株进行阳性鉴定。提取转基因植株基因组 DNA，用能够扩增
SibZIP1-uORF2 的特异引物对转化有 pKSE401-*SibZIP1*uORF-2sgRNA 的基因组 DNA 进
35 行 PCR 扩增。将 PCR 产物连接至 pEASY®-T1 克隆载体上并挑取阳性克隆进行 Sanger

测序。

结果如图 2 所示。获得了 SlbZIP1-uORF2 突变的 T0 突变体植物。示例性的 T0 突变体(T0-14、T0-15 和 T0-29)的测序结果如图 2 所示，它们的 uORF2 的起始密码子被破坏，且产生移码突变，从而可以阻止形成保守的 uORF2 多肽。

5

实施例 3、SlbZIP1-uORF2 敲除的 T0 突变体植物的获得和表型分析

3.1. 糖分测定

以实施例 2 中所获得 SlbZIP1-uORF2 破坏的 T0 突变体番茄为材料。分别将突变体材料和相应的野生型(WT)植物进行培养至得到成熟番茄果实。在野生型和 T0 突变体植物中分别随机选取 3 个成熟果实，取 1g 鲜重番茄果实，并用 15ml 的 80%乙醇分 3 次在 80℃提取其中的总糖。吸取 50ul 糖溶液冻干，并使用 MSTFA (N-甲基-N-(三甲基硅烷)三氟乙酰胺)进行衍生，之后用 GC-MS(气相色谱-质谱联用仪)对突变体和野生型果实中的各种糖分(蔗糖、葡萄糖、果糖)进行测定并进行差异性分析。

结果如图 3 所示。突变体果实中的总糖含量分别提高至野生型果实的 245.77%，188.85%和 175.62%。其中 T0 突变体果实中蔗糖、葡萄糖和果糖的含量也相对于野生型果实显著提高。

15

3.2. 生长表型

使 T0-14、T0-15 和 T0-29 突变体植物与 WT 植物在同一生长环境里面生长，观察其各项生长指标的差异。植物种植条件：在番茄培养间进行，气温为 25-28℃，光照周期为 16 小时光照/8 小时黑暗，光照强度约为 600 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ，常规管理。

如图 4 所示，突变体植物与 WT 植物的生长无明显差异。如图 5A 所示，突变体和 WT 的果实大小与成熟度无明显差异。如图 5B 所示，突变体和 WT 的果实发育、种子发育无明显差异。WT 与突变体植物分别随机选取 3 株称量所结番茄果实，并进行差异性分析如图 5C 所示，果实重量无明显差异。

25

此外，测量 T0 植物的种子的萌发率。萌发实验如下进行：将保存干燥的番茄种子，放入存有润湿滤纸的培养皿里催芽 3 天左右，待种子露出培根时转移至 32 孔番茄育苗盘中。育苗土为蛭石:草炭(1:1)均匀混合。温度为 25-28℃，16 小时光照，夜间 20-22℃，8 小时黑暗。如下表 1 所示，突变体和 WT 的 T1 代种子萌发率无显著差异。

30

表 1. T0 突变体和 WT 的种子的萌发率

品系	种子总数	萌发数量	种子萌发比 (%)
WT	24	22	91.67
T0-14	24	23	95.83
T0-15	24	20	83.33
T0-29	24	20	83.33

实施例 4、SlbZIP1-uORF2 敲除的 T1 突变体植物的获得和表型分析

从前述实施例的 T0 代植物收获种子，即获得 T1 代种子，将该种子进行萌发并鉴定

基因型，获得稳定遗传的纯合 *uorf_{SibZIP1}* 突变体(如图 6 所示)。每个株系分别选取 5 株个体进行传代以及后续的实验，其中株系 *uorf_{SibZIP1}-1*、*uorf_{SibZIP1}-2*、*uorf_{SibZIP1}-4* 经鉴定均为非转基因突变体苗。非转基因植物鉴定方法包括：针对农杆菌转化载体 pKSE401-SibZIP1uORF-2sgRNA 插入到基因组的 RB 与 LB 之间的序列设计 3 对扩增不同长度片段的特异引物，利用这三对引物分别对所获得的突变体 DNA 进行扩增，如果没有扩增出来目的片段，则为不包含转基因的植株，如果能够扩增出目的条带则为含有转基因的植株。

4.1. 生长表型

使 T1 突变体植物与 WT 植物在同一生长环境里面生长，观察其各项生长指标的差异。植物种植条件：在番茄培养间进行，气温为 25-28℃，光照周期为 16 小时光照/8 小时黑暗，光照强度约为 600 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ，常规管理。

如图 7 所示，突变体植物与 WT 植物的生长无明显差异。如图 7A 所示，突变体生长表型与对照没有明显差异。如图 7B 所示，突变体开花和结果均正常，与对照无明显差异。如图 7C 所示，突变体果实大小和成熟情况与对照无明显差异。此外，如下表 2 所示，突变体和 WT 的种子的萌发率无显著差异。

表 2、T1 突变体和 WT 的种子的萌发率

序号	种子总数	萌发数量	种子萌发比 (%)
WT	45	43	95.6
<i>uorf_{SibZIP1}-1</i>	45	40	88.9
<i>uorf_{SibZIP1}-2</i>	45	43	95.6
<i>uorf_{SibZIP1}-3</i>	45	42	93.3
<i>uorf_{SibZIP1}-4</i>	45	42	93.3

4.2. *uorf_{SibZIP1}* 转录本水平变化

通过用 qRT-PCR 对突变体和对照中果实(图 8A)或其他部位(如花) (图 8B)的 *uorf_{SibZIP1}* 转录本水平进行测定，并以 Slactin 作为内参基因，其结果显示，突变体与对照中的 *uorf_{SibZIP1}* 的转录本水平一致，无明显差异。

4.3. *uorf_{SibZIP1}* 突变体糖含量变化

果实中的甜度主要由糖分的积累所致，因而从对照和 *uorf_{SibZIP1}* 突变体中成熟的果实中分别随机选取生长正常的番茄果实，称取 1g 新鲜的果实，并提取并测定其中的糖分(方法如上所述)。结果(图 9)发现突变体中的总糖(蔗糖、葡萄糖、果糖之和)相比于对照增加了 23%~39%，葡萄糖增加了 13%~34%，果糖增加了 43%~46%，而蔗糖含量则与对照无明显差异。其中蔗糖与对照无差异的主要原因可能是果实中积累的蔗糖迅速被蔗糖酶转化为葡萄糖和果糖。

上述实验结果说明破坏 SibZIP1 的 uORF2，可以解除 uORF2 对 SibZIP1 基因表达的抑制，从而使番茄果实中的糖分含量显著提高。同时令人意想不到的是，uORF2 突变体植物的生长指标和野生型植物基本保持一致。这尤其适合在提高甜度的同时保证番茄

产量，在农业上具有重要意义。此外，对所获得的后代进行筛选，去除基因编辑元件，还可获得不含转基因的甜度提高的番茄品种。

序列表：

- 5 SEQ ID NO:1 SibZIP1-uORF2 核苷酸序列
ATGATCCACATGCGTCGAGTTCGCATTATGCACTCTTTCTCCGTTGTCTTCTGTACTGGTTCTAT
GTGTTTTTCATGA

- 10 SEQ ID NO:2 SibZIP1-uORF2 多肽的氨基酸序列
MIHMRRVRIMHSFSVFLYWFYVFS

- SEQ ID NO:3 sgRNA-1 靶序列
AATGCGAACTCGACGCATG

- 15 SEQ ID NO:4 sgRNA-2 靶序列
AAACACATAGAACCAGTAC

- SEQ ID NO:5 SibZIP2-uORF2 核苷酸序列
20 ATGTCATTCTCTATTTCGCGTGCAGGAGTTCGGATTCTGCATTCTTTCTCAGTAGTCTTTCTTTAC
TGGTTCTACGTGTTTTTCATGA

- SEQ ID NO:6 SibZIP2-uORF2 多肽的氨基酸序列
MSFSIRVRRVRILHSFSVFLYWFYVFS

- 25 SEQ ID NO:7 金钱橘(*Citrus clementina*) LOC18047493 基因的 uORF 氨基酸序列
MKRIRILHSFSVFLYWFYVFS

- SEQ ID NO:8 桃(*Prunus persica*) LOC18767264 基因的 uORF 氨基酸序列
30 MTLMRRVRLIHSFSVFLYWFYVFS

- >SEQ ID NO:9 spCas9 氨基酸序
MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSPKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTA
RRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFHRLSEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLR
KKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKA
35 ILSARLSKSRRLLENLIAQLPGEKKNLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAQLSKDYYDDLDNLLAQ
IGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFF
DQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKNLREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAIL
RRQEDFYFPFLKDNREKIEKILTFRIPIYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEVVVDKGASAQSFIER
MTNFDKNLPNEKVLPHKSLLEYEFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLK
40 EDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLKLIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIIEERL
KTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWRLSRKLINGIRDKQSGKTIIDFLKSDGFANRNFQMQLIHDDSLTFKED
IQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSR
ERMKRIIEGKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKD
DSIDNKVLRSDKNRGSNDNVPSEEVVKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQ
45 LVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVIITLKSCLVSDFRKDFQFYKVIENNYHHAHADAYLNA
VVGITALIKKYPKLESEFVYGDYKVDVVRKMIKSEQEI GKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPL
IETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVL SMPQVNIVKKEVQTTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKYYGG
FDSPTVAYSVLVVAKVEKGSKKLKSVEKLLGITIMERSSEFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLF
ELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLGKSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISE
50 FSKRVILADANLDKVL SAYNKHRDKPIREQAENI IHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDAT
LIHQSI TGLYETRIDLSQLGGD

权利要求书

1. 一种产生具有提高的糖含量的植物的方法,所述方法包括将靶向介导蔗糖诱导的翻译抑制(SIRT)的 uORF 的基因编辑系统导入所述植物,其中所述基因编辑系统的导入导致所述 uORF 中的突变,且所述突变导致所述 uORF 编码的多肽的表达减少或缺失,或所述突变导致所述 uORF 编码的多肽的活性的降低或缺失。

2. 权利要求 1 的方法,所述介导 SIRT 的 uORF 编码的多肽包含与 SEQ ID NO:2 具有至少约 50%、至少约 55%、至少约 60%、至少约 65%、至少约 70%、至少约 75%、至少约 80%、至少约 85%、至少约 90%、至少约 95%、至少约 96%、至少约 97%、至少约 99%、甚至至少约 99%序列相同性的氨基酸序列。

3. 权利要求 1 或 2 的方法,其中所述突变包括一或多个核苷酸的取代、缺失或添加。

4. 权利要求 1-3 中任一项的方法,其中所述基因编辑系统选自锌指核酸酶系统、TALEN 系统和 CRISPR 系统。

5. 权利要求 4 的方法,其中所述 CRISPR 系统是 CRISPR-Cas9 系统。

6. 权利要求 1-5 中任一项的方法,其中通过瞬时转化导入所述基因编辑系统,编码所述基因编辑系统组分的外源核苷酸序列不整合进所述植物基因组,由此产生具有提高的糖含量的非转基因植物。

7. 权利要求 1-6 中任一项的方法,其中通过稳定转化导入所述基因编辑系统,由此编码所述基因编辑系统组分的外源核苷酸序列被整合进所述植物基因组。

8. 权利要求 7 的方法,其进一步包括通过遗传分离获得不含整合的外源核苷酸序列的非转基因植物。

9. 权利要求 1-8 中任一项的方法,其中所述植物选自番茄、草莓、拟南芥、烟草、水稻、玉米、大麦、高粱、小麦、马铃薯、胡萝卜、甜椒、西瓜、香瓜、苹果、梨、葡萄、柑橘、橙子、柚子、樱桃、荔枝、红龙果、桃、金钱橘、李子、杏、芒果、无花果、哈密瓜、山楂、香蕉、杨梅、蓝莓、甜菜、猕猴桃、甘蓝、菠萝。

10. 权利要求 9 的方法,其中所述植物是番茄。

11. 权利要求 10 的方法,其中所述介导 SIRT 的 uORF 是 *SibZIP1* 基因的 uORF2,例如,所述 *SibZIP1* 基因的 uORF2 编码包含 SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列的多肽。

12. 权利要求 11 的方法,其中所述 CRISPR 系统包含至少一种向导 RNA,所述向导 RNA 靶向 *SibZIP1* 基因的 uORF2 中 SEQ ID NO:3 或 SEQ ID NO:4 所示核苷酸序列;优选地,所述 CRISPR 系统包含两种向导 RNA,所述两种向导 RNA 分别靶向 *SibZIP1* 基因的 uORF2 中 SEQ ID NO:3 和 SEQ ID NO:4 所示核苷酸序列。

13. 权利要求 10 的方法,其中所述介导 SIRT 的 uORF 是 *SibZIP2* 基因的 uORF2,例如,所述 *SibZIP2* 基因的 uORF2 编码包含 SEQ ID NO:6 所示氨基酸序列的多肽。

14. 一种通过权利要求 1-13 中任一项的方法产生的植物或其后代,优选地,所述植物或其后代是非转基因的。

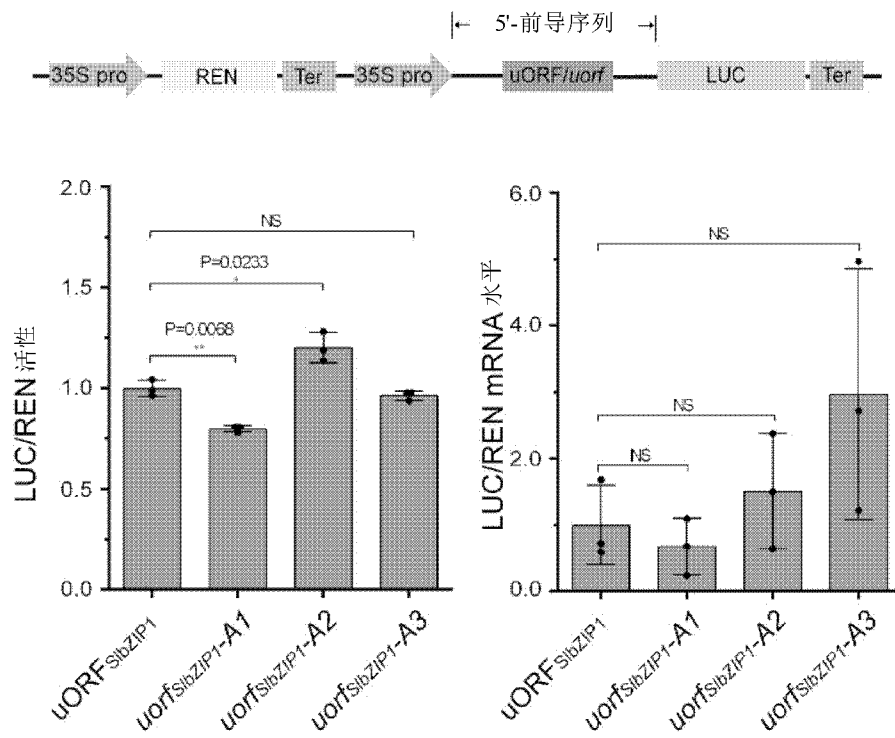


图 1

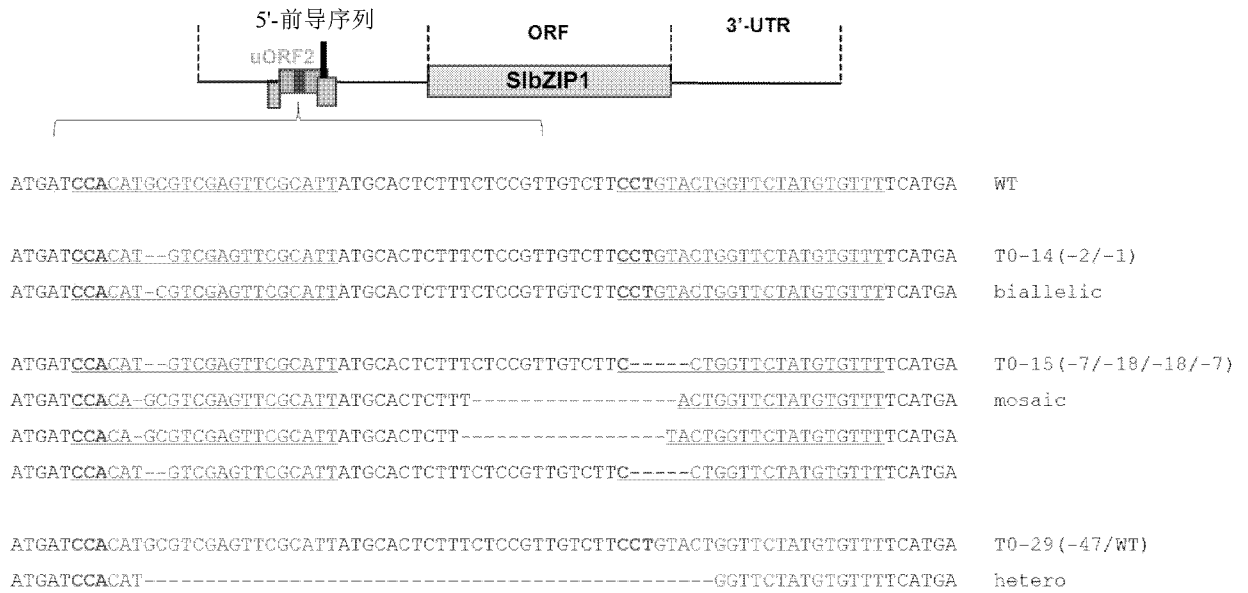
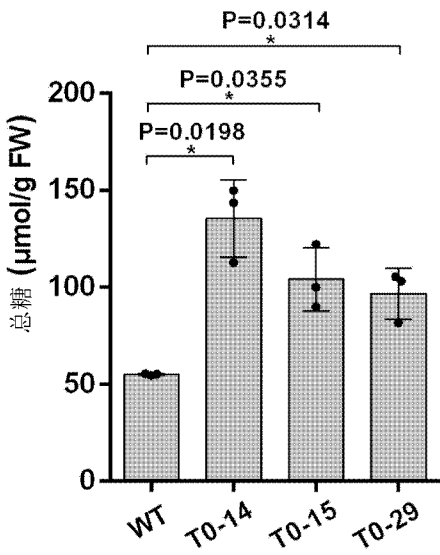
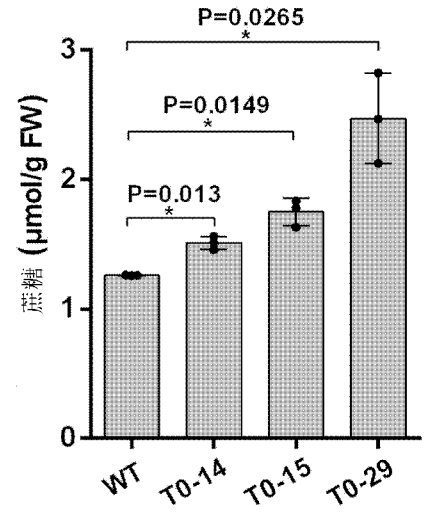


图 2

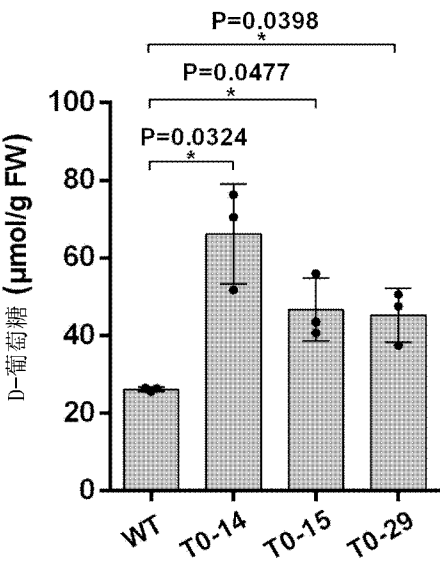
A



B



C



D

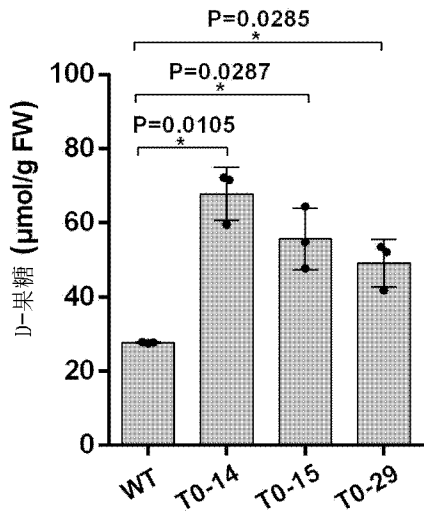


图 3

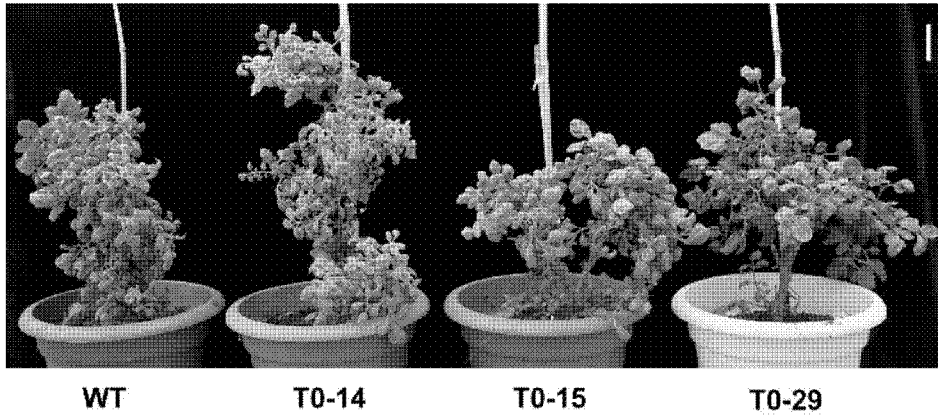
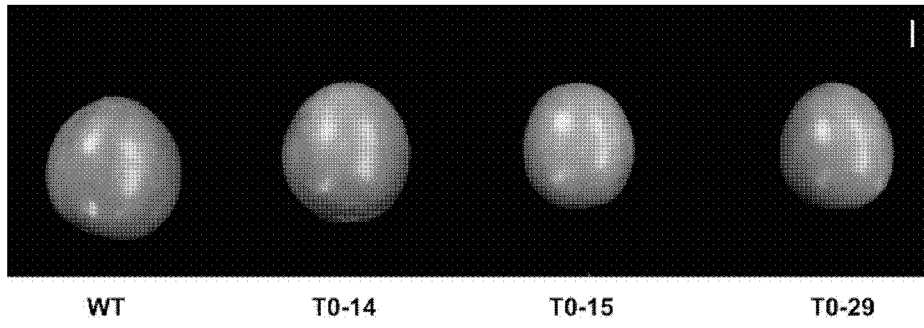
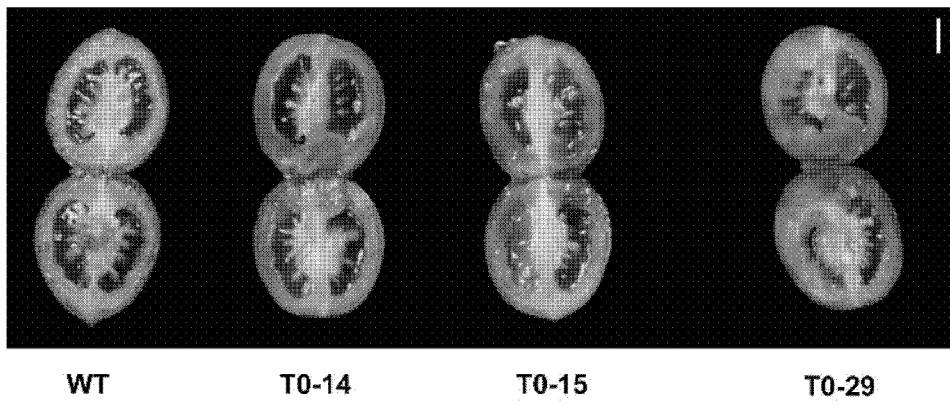


图 4

A



B



C

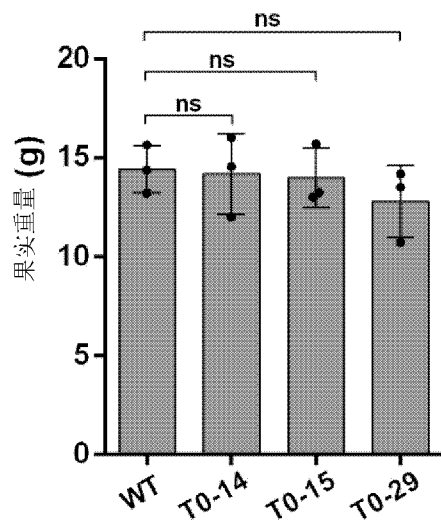


图 5

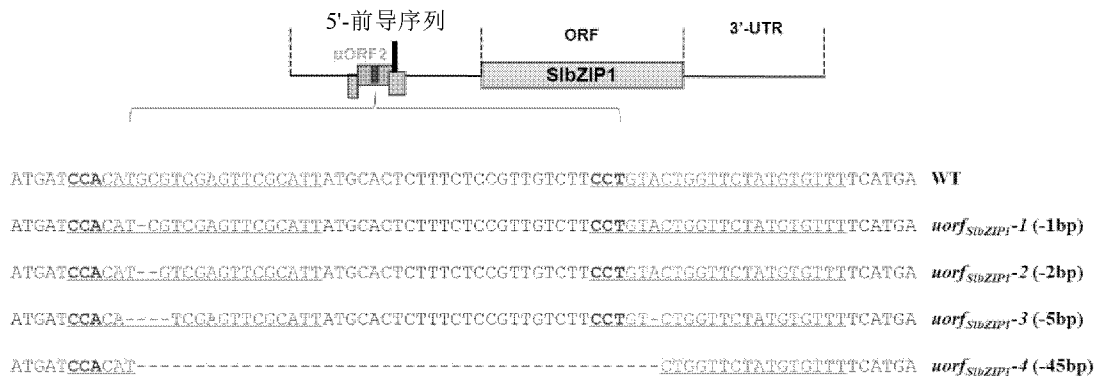
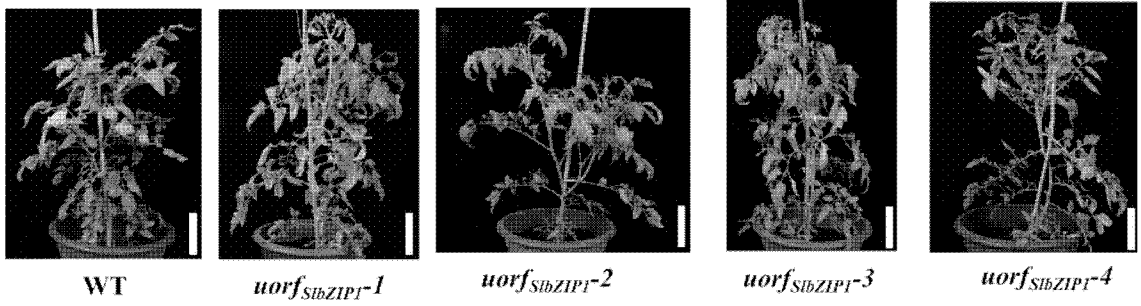
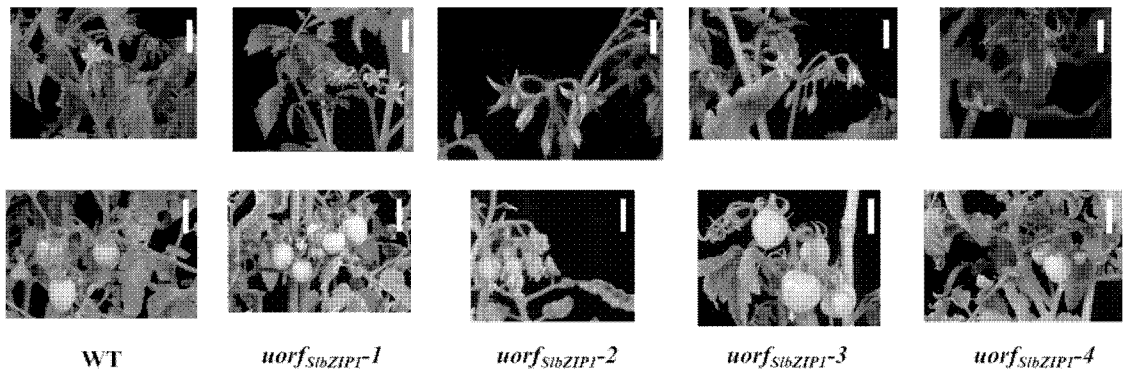


图 6

A



B



C

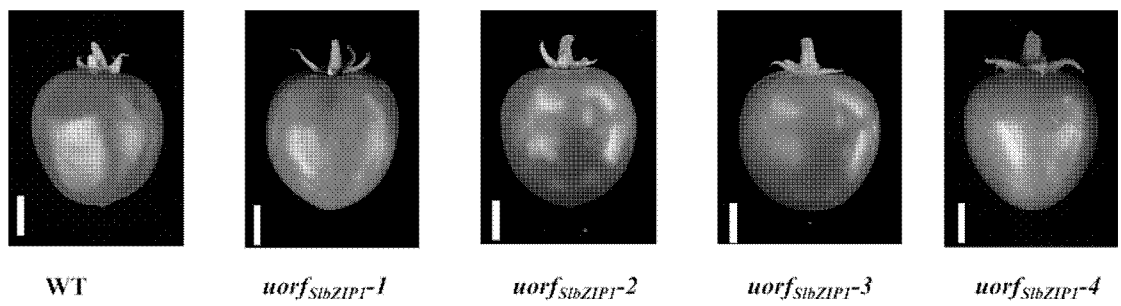
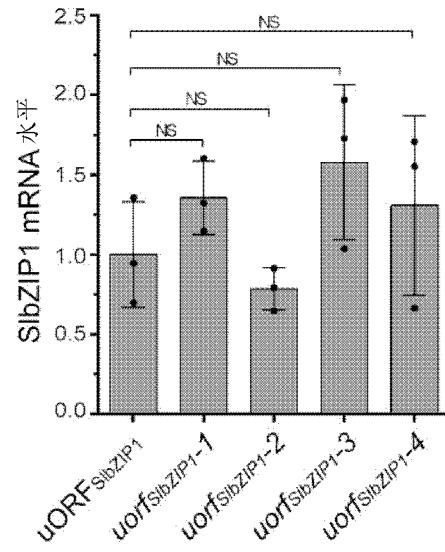


图 7

A



B

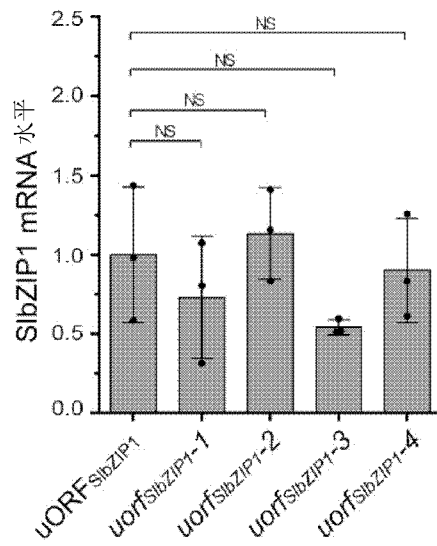


图 8

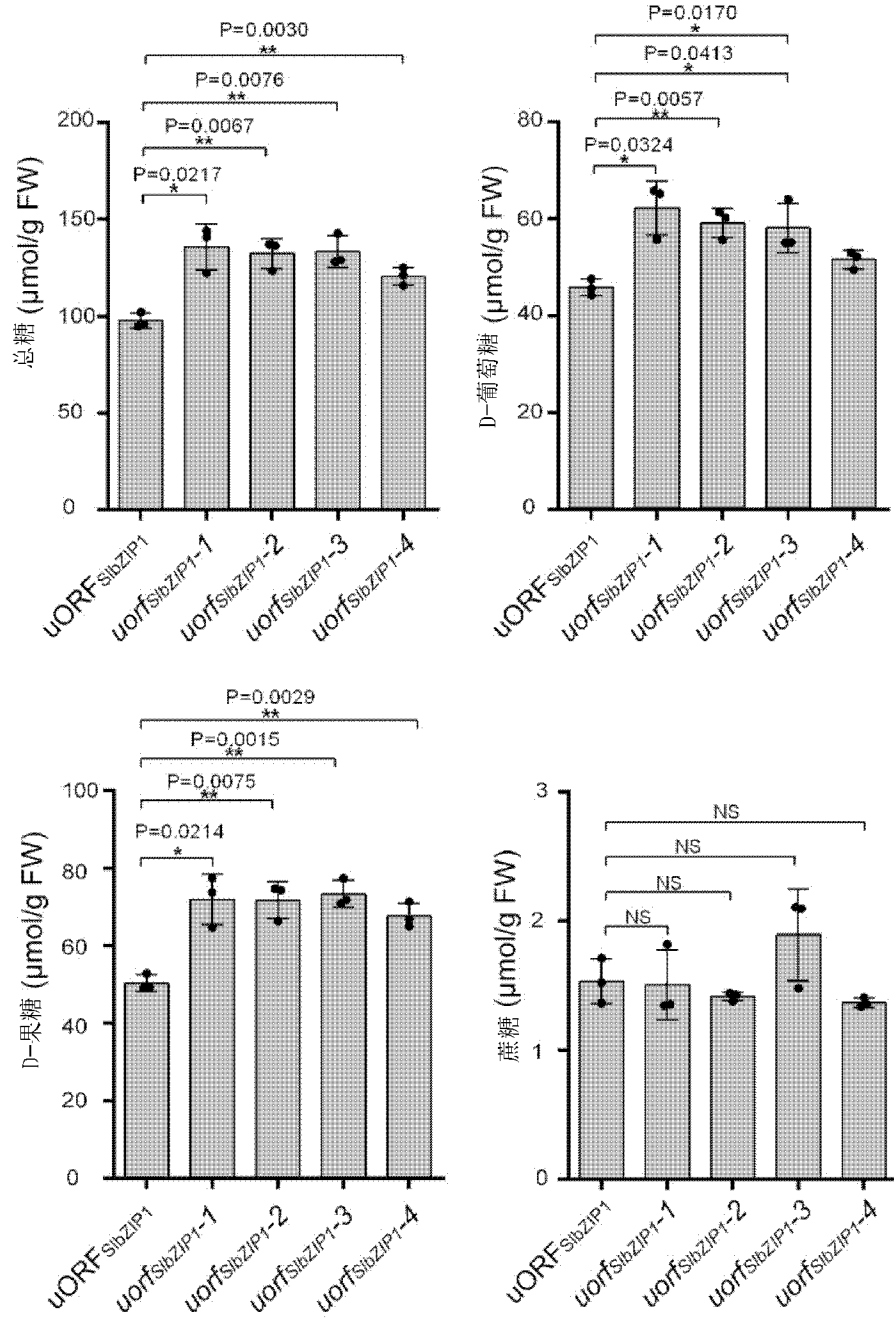


图 9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2019/101697

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
C12N 15/82(2006.01)i; C12N 15/113(2010.01)i; A01H 5/00(2018.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N; A01H		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) VEN, CNABS, PubMed, ISI Web of Knowledge, NCBI Genbank, EMBL-EBI, CNKI: 申请人/发明人, applicant/inventor, 番茄, 糖, 甜, 西红柿, sweeter, tomato, orf, 基因编辑, 序列2-4, sequences 2-4, 序列6, sequence 6, CRISPR, CRISPR-Cas9, high sugar, sucrose, SIRT, AtbZIP11, SlbZIP1, SlbZIP2, uORF2		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SAGOR, G. H. et al. "A Novel Strategy to Produce Sweeter Tomato Fruits with High Sugar Contents by Fruit-Specific Expression of a Single bZIP Transcription Factor Gene" <i>Plant Biotechnology Journal</i> , Vol. 14, 31 December 2016 (2016-12-31), pp. 1116-1126	1-14
A	CN 107312795 A (ZHEJIANG ACADEMY OF AGRICULTURAL SCIENCES) 03 November 2017 (2017-11-03) entire document	1-14
A	CN 106636182 A (VEGETABLE RESEARCH INSTITUTE, SHANXI ACADEMY OF AGRICULTURE SCIENCES) 10 May 2017 (2017-05-10) entire document	1-14
A	CN 107312793 A (HORTICULTURE INSTITUTE OF XINJIANG ACADEMY OF AGRICULTURAL SCIENCE) 03 November 2017 (2017-11-03) entire document	1-14
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 08 November 2019		Date of mailing of the international search report 20 November 2019
Name and mailing address of the ISA/CN China National Intellectual Property Administration (ISA/CN) No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088 China		Authorized officer
Facsimile No. (86-10)62019451		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2019/101697

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	RAHMANI, F. et al. "Sucrose Control of Translation Mediated by an Upstream Open Reading Frame-Encoded Peptide" <i>Plant Physiology</i> , Vol. 150, 31 July 2009 (2009-07-31), pp. 1356-1367	1-14
A	THALOR, S. K. et al. "Deregulation of Sucrose-Controlled Translation of a Bzip-Type Transcription Factor Results in Sucrose Accumulation in Leaves" <i>Plos One</i> , Vol. 7, No. 3, 22 March 2012 (2012-03-22), article no. e33111	1-14
A	白云凤等 (BAI, Yunfeng et al.). "靶向番茄SIACS2基因CRISPR-Cas9 sgRNA的设计和评价 (Design and Evaluation for sgRNAs Targeting SIACS2 Gene in CRISPR/Cas9 System)" <i>生物信息学 (Chinese Journal of Bioinformatics)</i> , Vol. 15, No. 1, 31 March 2017 (2017-03-31), pp. 7-15	1-14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2019/101697

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
CN	107312795	A	03 November 2017	None	
CN	106636182	A	10 May 2017	None	
CN	107312793	A	03 November 2017	None	

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2019/101697

<p>A. 主题的分类 C12N 15/82(2006.01)i; C12N 15/113(2010.01)i; A01H 5/00(2018.01)i 按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类</p>																				
<p>B. 检索领域 检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号) C12N; A01H 包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p>																				
<p>在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用)) VEN, CNABS, PubMed, ISI Web of Knowledge, NCBI Genbank, EMBL-EBI, CNKI: 申请人/发明人, 番茄, 糖, 甜, 西红柿, sweeter, tomato, orf, 基因编辑, 序列2-4, 序列6, CRISPR, CRISPR-Cas9, high sugar, sucrose, SIRT, AtbZIP11, S1bZIP1, S1bZIP2, uORF2</p>																				
<p>C. 相关文件</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>类型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>SAGOR, G.H.等. "A novel strategy to produce sweeter tomato fruits with high sugar contents by fruit-specific expression of a single bZIP transcription factor gene" PLANT BIOTECHNOLOGY JOURNAL, 第14卷, 2016年 12月 31日 (2016 - 12 - 31), 第1116-1126页</td> <td>1-14</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 107312795 A (浙江省农业科学院) 2017年 11月 3日 (2017 - 11 - 03) 全文</td> <td>1-14</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 106636182 A (山西省农业科学院蔬菜研究所) 2017年 5月 10日 (2017 - 05 - 10) 全文</td> <td>1-14</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 107312793 A (新疆农业科学院园艺作物研究所) 2017年 11月 3日 (2017 - 11 - 03) 全文</td> <td>1-14</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>RAHMANI, F.等. "Sucrose control of translation mediated by an upstream open reading frame-encoded peptide" PLANT PHYSIOLOGY, 第150卷, 2009年 7月 31日 (2009 - 07 - 31), 第1356-1367页</td> <td>1-14</td> </tr> </tbody> </table>			类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	X	SAGOR, G.H.等. "A novel strategy to produce sweeter tomato fruits with high sugar contents by fruit-specific expression of a single bZIP transcription factor gene" PLANT BIOTECHNOLOGY JOURNAL, 第14卷, 2016年 12月 31日 (2016 - 12 - 31), 第1116-1126页	1-14	A	CN 107312795 A (浙江省农业科学院) 2017年 11月 3日 (2017 - 11 - 03) 全文	1-14	A	CN 106636182 A (山西省农业科学院蔬菜研究所) 2017年 5月 10日 (2017 - 05 - 10) 全文	1-14	A	CN 107312793 A (新疆农业科学院园艺作物研究所) 2017年 11月 3日 (2017 - 11 - 03) 全文	1-14	A	RAHMANI, F.等. "Sucrose control of translation mediated by an upstream open reading frame-encoded peptide" PLANT PHYSIOLOGY, 第150卷, 2009年 7月 31日 (2009 - 07 - 31), 第1356-1367页	1-14
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求																		
X	SAGOR, G.H.等. "A novel strategy to produce sweeter tomato fruits with high sugar contents by fruit-specific expression of a single bZIP transcription factor gene" PLANT BIOTECHNOLOGY JOURNAL, 第14卷, 2016年 12月 31日 (2016 - 12 - 31), 第1116-1126页	1-14																		
A	CN 107312795 A (浙江省农业科学院) 2017年 11月 3日 (2017 - 11 - 03) 全文	1-14																		
A	CN 106636182 A (山西省农业科学院蔬菜研究所) 2017年 5月 10日 (2017 - 05 - 10) 全文	1-14																		
A	CN 107312793 A (新疆农业科学院园艺作物研究所) 2017年 11月 3日 (2017 - 11 - 03) 全文	1-14																		
A	RAHMANI, F.等. "Sucrose control of translation mediated by an upstream open reading frame-encoded peptide" PLANT PHYSIOLOGY, 第150卷, 2009年 7月 31日 (2009 - 07 - 31), 第1356-1367页	1-14																		
<p><input checked="" type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p>																				
<p>* 引用文件的具体类型: "A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 "E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 "L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) "O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 "P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 "T" 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 "X" 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 "Y" 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 "&" 同族专利的文件</p>																				
国际检索实际完成的日期	国际检索报告邮寄日期																			
2019年 11月 8日	2019年 11月 20日																			
ISA/CN的名称和邮寄地址	受权官员																			
中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088	奚静																			
传真号 (86-10)62019451	电话号码 86-(10)-53961974																			

C. 相关文件		
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	THALOR, S.K. 等. "Deregulation of sucrose-controlled translation of a bZIP-type transcription factor results in sucrose accumulation in leaves" PLOS ONE, 第7卷, 第3期, 2012年 3月 22日 (2012 - 03 - 22), 第e33111篇	1-14
A	白云凤等. "靶向番茄SIACS2基因CRISPR-Cas9 sgRNA的设计和分析" 生物信息学, 第15卷, 第1期, 2017年 3月 31日 (2017 - 03 - 31), 第7-15页	1-14

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2019/101697

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
CN	107312795	A	2017年 11月 3日	无	
CN	106636182	A	2017年 5月 10日	无	
CN	107312793	A	2017年 11月 3日	无	

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2015年1月)