



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN) (11)  
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ



1-0048905

(51)<sup>2021.01</sup> C12N 15/63; C12N 15/11

(13) B

- 
- (21) 1-2022-03291 (22) 13/10/2020  
(86) PCT/CN2020/120633 13/10/2020 (87) WO 2021/088601 A1 14/05/2021  
(30) 201911081617.X 07/11/2019 CN; 202010821877.2 15/08/2020 CN;  
202010974151.2 16/09/2020 CN  
(45) 25/07/2025 448 (43) 26/09/2022 414A  
(73) QINGDAO KINGAGROOT CHEMICAL COMPOUND CO., LTD. (CN)  
No.53, Qinglonghe Road, Huangdao District, Qingdao, Shandong 266000, China  
(72) JIANG, Linjian (CN); MO, Sudong (CN); WANG, Jiyao (CN); LI, Yucai (CN); QI,  
Wei (CN); LI, Huarong (CN); CHEN, Bo (CN).  
(74) Công ty TNHH Lê & Lê (LE & LE)
- 

- (54) PHƯƠNG PHÁP TẠO ĐỘT BIẾN MỚI Ở SINH VẬT, PHƯƠNG PHÁP SÀNG  
LỌC CÁC SỰ KIỆN CHỈNH SỬA ĐỘC LẬP VỚI DẤU HIỆU CHUYỂN GEN  
NGOẠI LAI, PHƯƠNG PHÁP CHỈNH SỬA TẠM THỜI KHÔNG CHUYỂN GEN  
CỦA BỘ GEN SINH VẬT VÀ THỰC VẬT

(21) 1-2022-03291

(57) Sáng chế đề cập đến lĩnh vực kỹ thuật của công nghệ di truyền và đặc biệt liên quan đến phương pháp tạo đột biến vị trí cụ thể ở một sinh vật trong trường hợp không có khuôn mẫu ADN nhân tạo và các ứng dụng của chúng. Phương pháp này bao gồm các bước sau: tạo tuần tự hai hoặc nhiều đoạn đứt gãy ADN tại một vị trí cụ thể trong bộ gen của sinh vật và sửa chữa chúng một cách tự nhiên tương ứng, trong đó đoạn đứt gãy ADN sau đó được tạo ra dựa trên trình tự mới được tạo ra từ lần sửa chữa đứt gãy ADN trước đó. Trong sáng chế này, mục tiêu mới được thiết kế dựa trên trình tự được hình thành bởi sự kiện sửa chữa mới được tạo ra bằng cách chỉnh sửa tuần tự, và do đó, các đột biến có thể được hình thành liên tiếp nhiều lần tại một vị trí cụ thể trong bộ gen, làm phong phú thêm các loại sự kiện sửa chữa sau khi ADN bị đứt gãy, và nhận ra các đột biến thay thế, xóa và chèn bazơ mới mà không thể có được trong một lần chỉnh sửa gen duy nhất.

Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp sàng lọc các sự kiện chỉnh sửa độc lập với dấu hiệu chuyển gen ngoại lai, phương pháp để chỉnh sửa tạm thời không chuyển gen của bộ gen sinh vật và các ứng dụng của chúng.

### **Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập**

Sáng chế đề cập đến lĩnh vực kỹ thuật của công nghệ di truyền, và đặc biệt liên quan đến phương pháp tạo đột biến theo vị trí cụ thể ở một sinh vật trong trường hợp không có khuôn mẫu ADN nhân tạo và việc sử dụng nó.

### **Tình trạng kỹ thuật của sáng chế**

Công nghệ kỹ thuật gen để chỉnh sửa bộ gen của sinh vật đã được sử dụng rộng rãi trong sản xuất công nghiệp và nông nghiệp, chẳng hạn như vi sinh vật biến đổi gen thường được sử dụng trong lĩnh vực dược phẩm và hóa học, cây trồng biến đổi gen có khả năng kháng sâu bọ và kháng thuốc diệt cỏ trong lĩnh vực nông nghiệp. Với sự ra đời của các nucleaza có vị trí cụ thể, bằng cách đưa một phân mảnh có mục tiêu vào bộ gen của sinh vật nhận và gây ra sự sửa chữa tự phát, có thể đạt được việc chỉnh sửa bộ gen theo vị trí cụ thể và sửa đổi bộ gen chính xác hơn.

Các công cụ chỉnh sửa gen chủ yếu bao gồm ba loại nucleaza trình tự chuyên biệt (SSN): nucleaza ngón tay kẽm (ZFN), nucleaza hiệu ứng giống chất kích hoạt phiên mã (TALEN) và hệ thống các trình tự palindromic ngắn được lặp lại tập trung thành một cụm (CRISPR) liên kết với Cas (hệ thống CRISPR/Cas). Các nucleaza trình tự chuyên biệt là các nucleaza có thể lập trình được có thể tạo ra các đứt gãy sợi kép ADN (DSBs) tại các vị trí cụ thể trong bộ gen. Các đứt gãy sợi kép ADN kích hoạt con đường sửa chữa ADN nội sinh để sửa chữa các tổn thương ADN trong tế bào, nhưng quá trình sửa chữa dễ dàng dẫn đến những thay đổi trong trình tự ADN tại các vị trí mục tiêu, do đó tạo ra các đột biến tại các vị trí quan tâm. Công nghệ này cho phép các nhà sinh học xác định chính xác gen mục tiêu và chỉnh sửa nó. Trong số đó, cả ZFN và TALEN đều cần thiết kế các mô-đun protein nhận dạng cụ thể cho trình tự mục tiêu, do đó có thông lượng thấp và hoạt động phức tạp. Tuy nhiên, protein Cas phổ biến trong hệ thống CRISPR/Cas, trong đó ARN dẫn đường (gARN) có thể được hình thành bởi một CRISPR-ARN cụ thể (crARN) được thiết kế cho một mình vị trí mục tiêu hoặc kết hợp

với ARN vận chuyển (tracrARN), hoặc chỉ một ARN dẫn đường (sgARN) là đủ, crARN và tracrARN cùng nhau hoặc một mình sgARN có thể được lắp ráp với protein Cas để tạo thành phức hợp ribonucleoprotein (RNP), trình tự mục tiêu được xác định trên cơ sở mô típ liền kề protospacer (PAM) trong bộ gen, do đó thực hiện chỉnh sửa ở vị trí cụ thể. Và do đó, nó đã trở thành một công cụ chỉnh sửa gen chính vì hoạt động đơn giản, phạm vi ứng dụng rộng và thông lượng cao.

Nucleaza cụ thể theo trình tự có thể tạo ra các đứt gãy sợi kép ADN tại các vị trí cụ thể trong bộ gen. Những đứt gãy sợi kép ADN này có thể được sửa chữa thành nhiều kiểu sửa chữa khác nhau, chủ yếu là chèn hoặc xóa bazơ. Ví dụ, hai loại sự kiện chỉnh sửa CRISPR / Cas9 phổ biến nhất là chèn một bazơ khi đứt gãy hoặc xóa một bazơ khi đứt gãy (Shen et al. 2018. Predictable and precise template-free CRISPR editing of pathogenic variants. Nature. DOI: 10,1038/s41586-018-0686-x). Việc chèn hoặc xóa các bazơ trong vùng mã hóa sẽ gây ra đột biến dịch chuyển khung, dẫn đến mất chức năng gen. Do đó, mục đích chính của các công cụ chỉnh sửa gen trên vẫn là thực hiện việc loại bỏ gen.

Người ta luôn coi rằng việc sử dụng riêng nucleaza theo trình tự cụ thể không thể tạo ra đột biến về kiểu thay thế bazơ. Để đạt được mục đích này, tình trạng kỹ thuật đề xuất ba giải pháp: 1) thêm một đoạn ADN ngoại sinh làm khuôn sửa chữa để bắt đầu con đường sửa chữa tái tổ hợp tương đồng; 2) hợp nhất deaminase với Cas9 để phát triển tuần tự các công cụ chỉnh sửa bazơ đơn lẻ cho C thành T và A thành G; 3) dung hợp enzym phiên mã ngược với Cas9, sử dụng pegARN để hướng dẫn tổng hợp và thay thế sợi ADN nhỏ. Tuy nhiên, hiệu quả chỉnh sửa của ba giải pháp này thấp hơn đáng kể so với hiệu quả loại bỏ gen và đoạn ADN ngoại sinh được đưa vào đồng thời và enzym phiên mã ngược có thể dễ dàng gây ra lo ngại về an toàn sinh học. Hiệu ứng ngoài mục tiêu của chỉnh sửa bazơ đơn lẻ cũng hạn chế ứng dụng tiềm năng của nó trong liệu pháp tế bào. Đặc biệt đối với các dự án nhân giống cây trồng dài hạn, làm thế nào để nâng cao hiệu quả thay thế bazơ tại vị trí mục tiêu đồng thời giảm bớt lo ngại của các cơ quan quản lý về an toàn sinh học là một vấn đề cần được giải quyết trong việc ứng dụng công nghệ chỉnh sửa gen.

Tóm lại, có những nhu cầu kỹ thuật cấp thiết trong lĩnh vực liệu pháp tế bào và

nhân giống sinh học để thay thế bazơ cụ thể cho từng vị trí bằng cách chỉ sử dụng loại nucleaza cụ thể có mục tiêu mà không đưa vào một đoạn ADN ngoại lai, đặc biệt là thông qua hệ thống chỉnh sửa chuyên tiếp không chuyên gen để hoàn thành hiệu quả chỉnh sửa thay thế bazơ cho từng vị trí cụ thể.

### **Bản chất kỹ thuật của sáng chế**

Sáng chế đề xuất phương pháp tạo đột biến theo vị trí cụ thể ở một sinh vật chỉ bằng cách tạo ra các đứt gãy sợi kép trên bộ gen và không cung cấp khuôn mẫu ADN nhân tạo, và việc sử dụng phương pháp này.

Các giải pháp kỹ thuật được áp dụng bởi sáng chế như sau:

Phương pháp tạo đột biến mới ở sinh vật, bao gồm các bước sau: tạo tuần tự hai hoặc nhiều đoạn đứt gãy ADN tại một vị trí cụ thể trong bộ gen của sinh vật và sửa chữa chúng một cách tự nhiên, trong đó đoạn đứt gãy ADN sau này được tạo ra dựa trên một trình tự mới được tạo ra từ quá trình sửa chữa đứt gãy ADN trước đó.

Theo một phương án cụ thể, "đứt gãy ADN" đạt được bằng cách cung cấp nucleaza có đặc tính nhắm mục tiêu vào tế bào của một sinh vật để tiếp xúc với vị trí cụ thể của ADN bộ gen.

Theo một phương án cụ thể, "nucleaza có đặc tính nhắm mục tiêu" là ZFN, TALEN hoặc hệ thống CRISPR/Cas.

Theo một phương án cụ thể, "tạo tuần tự hai hoặc nhiều đoạn ADN tại một vị trí cụ thể" đề cập đến việc dựa trên trình tự mới được tạo ra từ sự kiện sửa chữa đoạn đứt gãy ADN trước đó do chỉnh sửa ZFN hoặc TALEN gây ra, một protein ZFN hoặc TALEN mới được thiết kế để cắt vị trí một lần nữa.

Theo một phương án cụ thể khác, "tạo tuần tự hai hoặc nhiều đứt gãy ADN tại một vị trí cụ thể" đề cập đến việc dựa trên trình tự mới được tạo ra từ sự kiện sửa chữa đứt gãy ADN trước đó do hệ thống CRISPR / Cas gây ra, ARN mục tiêu mới được thiết kế để cắt vị trí một lần nữa. Ví dụ: lần cắt thứ hai được thực hiện lại tại vị trí bằng cách thiết kế một ARN mục tiêu mới trên cơ sở trình tự mới được tạo ra từ sự kiện sửa chữa đứt đoạn đầu tiên của chỉnh sửa Cas9. Theo cách tương tự, lần cắt thứ ba được thực hiện

tại vị trí bằng cách thiết kế một ARN mục tiêu mới trên cơ sở một trình tự mới được tạo ra từ sự kiện sửa chữa đứt lần thứ hai, v.v., như thể hiện trong Fig. 1.

Theo một phương án cụ thể, "hai hoặc nhiều đoạn đứt gãy ADN" được tạo ra bằng cách phân phối tuần tự các nucleaza được nhắm mục tiêu khác nhau vào các tế bào nhận thuộc các thể hệ khác nhau, trong đó tế bào đột biến đã hoàn thành quá trình chỉnh sửa trước đó được sử dụng làm tế bào nhận để nhận phân phối nucleaza nhắm mục tiêu cho lần chỉnh sửa sau, do đó thực hiện chỉnh sửa lần thứ hai để tạo đột biến theo vị trí cụ thể. Phương pháp này được ưu tiên sử dụng cho các hệ thống chỉnh sửa ZFN và TALEN.

Theo một phương án cụ thể khác, "hai hoặc nhiều đoạn đứt gãy ADN" được tạo ra bằng cách cung cấp các nucleaza nhắm mục tiêu khác nhau cho các mục tiêu khác nhau vào cùng một tế bào nhận. Phương pháp này được ưu tiên sử dụng cho hệ thống chỉnh sửa CRISPR / Cas.

Theo một phương án cụ thể, "hai hoặc nhiều đoạn đứt gãy ADN" được tạo ra khi phức hợp RNP được hình thành bởi cùng một nucleaza CRISPR / Cas tương ứng với các gARN hoặc sgARN khác nhau cắt liên tiếp các trình tự mục tiêu tương ứng.

Theo một phương án cụ thể khác, "hai hoặc nhiều đoạn đứt gãy ADN" được tạo ra khi phức hợp RNP được tạo thành bởi mỗi trong số hai hoặc nhiều nucleaza CRISPR / Cas nhận ra các trình tự PAM khác nhau với gARN hoặc sgARN tương ứng, cắt liên tiếp các trình tự mục tiêu tương ứng. Ví dụ, trình tự PAM được Cas9 nhận ra từ *Streptococcus pyogenes* là "NGG" hoặc "NAG" (Jinek et al., "A programmable dual-ARN-guided ADN endonucleaza in adaptive bacterial immunity", Science 2012, 337:816- 821), trình tự PAM được Cas9 nhận ra của *Staphylococcus aureus* là "NNGRRT" hoặc "NNGRR(N)", trình tự PAM được nhận ra bởi *Neisseria meningitidis* Cas9 là NNNNGATT, và trình tự PAM được nhận ra bởi *Streptococcus thermophilus* Cas9 là NNAGAAW. Bằng cách này, cửa sổ có thể chỉnh sửa của phân tử ADN lớn hơn.

Theo một phương án cụ thể, nucleaza được nhắm mục tiêu là bất kỳ nucleaza CRISPR / Cas nào có khả năng thực hiện sự chỉnh sửa bộ gen.

Theo một phương án cụ thể, nucleaza được nhắm mục tiêu là ở dạng ADN.

Theo một phương án cụ thể khác, nucleaza được nhắm mục tiêu ở dạng mRNA hoặc protein thay vì ADN. Dạng protein được ưu tiên.

Theo một phương án cụ thể, phương pháp phân phối nucleaza mục tiêu vào tế bào được chọn từ, nhưng không giới hạn ở: 1) phương pháp truyền tế bào qua trung gian PEG; 2) phương pháp truyền tế bào qua trung gian liposome; 3) phương pháp biến nạp điện tử; 4) vi tiêm; 5) bắn phá bằng súng gen; 6) phương pháp biến nạp qua trung gian vi khuẩn *Agrobacterium*.

Trong phương pháp này, mục tiêu mới được thiết kế dựa trên một trình tự mới được tạo ra từ lần sửa chữa đứt gãy ADN trước đó, và do đó, các đột biến có thể được hình thành tuần tự nhiều lần tại một vị trí cụ thể trong bộ gen, do đó làm phong phú thêm các loại sự kiện sửa chữa sau đứt gãy ADN theo cấp số nhân và tạo ra các loại đột biến thay thế bazơ mới, xóa và chèn mà không thể có được bằng cách chỉnh sửa gen đơn lẻ, do đó phương pháp này phù hợp để được sử dụng như một công cụ để tạo ra các đột biến mới. Phương pháp này có thể được mô tả ngắn gọn là phương pháp cắt / chỉnh sửa tuần tự được lập trình hoặc cắt / chỉnh sửa liên tiếp.

Theo một phương án cụ thể, mục tiêu mới được thiết kế dựa trên một trình tự cụ thể mới được dự đoán sẽ được tạo ra từ quá trình sửa chữa đứt đoạn trước đó tại một vị trí cụ thể của bộ gen sinh vật, sau đó thực hiện chỉnh sửa trình tự, và do đó đột biến cuối cùng có thể xảy ra tại vị trí đó có thể được thiết kế trước để đạt được chỉnh sửa mong đợi.

Theo một phương án cụ thể khác, mục tiêu mới được thiết kế dựa trên một trình tự mới được dự đoán sẽ được tạo ra từ quá trình sửa chữa đứt đoạn trước đó tại một vị trí cụ thể của bộ gen sinh vật, chỉnh sửa tuần tự sau đó được thực hiện, và ngoài sự kiện chỉnh sửa dự kiến, nhiều loại đột biến khác nhau cuối cùng có thể được tạo ra tại địa điểm, do đó, phương pháp này có thể được sử dụng như một công cụ để tạo ra các đột biến khác nhau.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế còn cung cấp phương pháp tạo ra đột biến mới ở sinh vật, bao gồm bước sau: tạo ra liên tiếp hai hoặc nhiều đoạn đứt gãy ADN tại một vị trí cụ thể trong gen ở cấp độ bộ gen hoặc nhiễm sắc thể của sinh vật, do đó đạt được

sự thay thế, xóa hoặc chèn bazơ chính xác.

Theo một phương án cụ thể, "tạo ra liên tiếp hai hoặc nhiều đoạn đứt gãy ADN tại một vị trí cụ thể" đề cập đến việc ARN mục tiêu mới được thiết kế dựa trên trình tự mới được tạo ra từ sự kiện sửa chữa đứt đoạn trước đó, và quá trình cắt được thực hiện lại tại cùng một vị trí.

Theo một phương án cụ thể, "đoạn đứt gãy ADN" đạt được bởi một nucleaza với đặc tính nhắm mục tiêu.

Sáng chế còn đề xuất đột biến mới thu được bằng phương pháp nói trên.

Sáng chế còn đề xuất một đoạn protein hoặc đoạn có hoạt tính sinh học của chúng mà có đột biến mới nói trên.

Sáng chế còn đề xuất axit nucleic, bao gồm trình tự axit nucleic hoặc trình tự bổ sung của chúng mà mã hóa protein hoặc đoạn có hoạt tính sinh học của chúng.

Sáng chế này còn đề xuất axit nucleic, bao gồm:

(a) trình tự nucleotit mã hóa ARN mục tiêu, trong đó

ARN mục tiêu bao gồm ít nhất hai ARN mục tiêu, trong đó ARN mục tiêu thứ nhất nhắm mục tiêu vào một ADN để gây ra sự đứt gãy trong ADN, và ARN mục tiêu thứ hai nhắm mục tiêu vào trình tự được tạo ra từ sự kiện sửa chữa đứt gãy trước đó và tạo ra sự đứt gãy một lần nữa.

Theo một phương án cụ thể, axit nucleic còn bao gồm (b) trình tự nucleotit mã hóa polypeptit Cas.

Theo một phương án cụ thể, ARN mục tiêu là sgARN hoặc gARN.

Theo một phương án cụ thể, polypeptit Cas và ARN mục tiêu có trong tế bào in vitro hoặc tế bào ex vivo.

Sáng chế còn đề xuất vector biểu hiện tái tổ hợp, bao gồm axit nucleic nói trên và trình tự khởi đầu được liên kết chức năng với nó.

Sáng chế còn đề xuất thêm cassette biểu hiện, bao gồm axit nucleic đã nói ở trên.



Sáng chế này còn đề xuất tế bào chủ, bao gồm cassette biểu hiện đã nói ở trên.

Sáng chế này còn đề xuất sinh vật được tái sinh bằng cách sử dụng tế bào chủ đã nói ở trên.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp để tách ADN mục tiêu, phương pháp này bao gồm việc tiếp xúc với ADN mục tiêu với một phức hợp, trong đó phức hợp này bao gồm:

(a) polypeptit Cas; và

(b) ít nhất hai ARN mục tiêu, trong đó ARN mục tiêu thứ nhất nhắm mục tiêu vào ADN để gây ra đứt gãy ADN và ARN mục tiêu sau nhắm mục tiêu trình tự được tạo ra từ sự kiện sửa chữa đứt gãy trước đó và tạo ra sự đứt gãy một lần nữa.

Theo một phương án cụ thể, ARN mục tiêu là sgARN hoặc gARN.

Theo một phương án cụ thể, ADN mục tiêu có trong tế bào vi khuẩn, tế bào nhân thực, tế bào thực vật hoặc tế bào động vật.

Theo một phương án cụ thể, ADN mục tiêu là ADN nhiễm sắc thể.

Theo một phương án cụ thể, polypeptit Cas và ARN mục tiêu có trong tế bào in vitro hoặc tế bào ex vivo.

Theo một phương án cụ thể, việc tiếp xúc bao gồm đưa chất sau vào tế bào: (a) polypeptit Cas hoặc polynucleotit mã hóa polypeptit Cas và (b) ARN mục tiêu hoặc polynucleotit ADN mã hóa ARN mục tiêu.

Sáng chế này còn đề xuất chế phẩm, bao gồm:

(a) polypeptit Cas, hoặc polynucleotit mã hóa polypeptit Cas; và

(b) ít nhất hai ARN mục tiêu, hoặc polynucleotide ADN mã hóa các ARN mục tiêu, trong đó ARN đầu tiên nhắm mục tiêu vào ADN để gây ra sự đứt gãy trong ADN và ARN mục tiêu thứ hai nhắm mục tiêu vào trình tự được tạo ra từ sự kiện sửa chữa đứt gãy trước đó và tạo ra sự đứt gãy một lần nữa.

Theo một phương án cụ thể, ARN nhắm mục tiêu là sgARN hoặc gARN.

Theo một phương án cụ thể, polypeptit Cas và ARN nhắm mục tiêu có trong tế bào in vitro hoặc tế bào ex vivo.

Sáng chế còn đề xuất việc sử dụng chế phẩm để sản xuất thuốc chữa bệnh.

Căn bệnh có thể được điều trị bằng chế phẩm của sáng chế bao gồm, nhưng không giới hạn ở, bệnh do đột biến gen đơn lẻ, chẳng hạn như bệnh tyrosin di truyền loại 1, bệnh phenylketon niệu, bệnh lão nhi, bệnh hồng cầu hình liềm, v.v.. Quá trình sửa chữa tế bào tự phát được thực hiện bằng cách cung cấp vào tế bào protein Cas và thành phần crARN hoặc sgARN được mong đợi để sửa chữa vị trí đột biến gây bệnh để tạo ra một protein chức năng bình thường, và do đó sẽ thu được hiệu quả điều trị..

Sáng chế này còn đề xuất bộ dụng cụ, bao gồm:

(a) polypeptit Cas, hoặc axit nucleic bao gồm trình tự nucleotit mã hóa polypeptit Cas; và

(b) ít nhất hai ARN nhắm mục tiêu, hoặc axit nucleic bao gồm trình tự nucleotit mã hóa ARN nhắm mục tiêu, trong đó ARN nhắm mục tiêu thứ nhất nhắm vào ADN để gây ra sự đứt gãy trong ADN và ARN nhắm mục tiêu thứ hai nhắm vào trình tự được tạo ra từ sự kiện sửa chữa đứt gãy trước đó và tạo ra sự đứt gãy một lần nữa;

trong đó (a) và (b) ở trong cùng một đồ chứa hoặc các đồ chứa riêng biệt.

Theo một phương án cụ thể, ARN nhắm mục tiêu là sgARN hoặc gARN.

Theo một phương án cụ thể, ARN nhắm mục tiêu trong (b) ở trong cùng một đồ chứa hoặc các đồ chứa riêng biệt.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp để sàng lọc các sự kiện chỉnh sửa độc lập với các dấu hiệu chuyển gen ngoại sinh, bao gồm các bước sau:

1) hai hoặc nhiều đoạn đứt gãy ADN được tạo ra liên tiếp theo trình tự tại một vị trí cụ thể của gen mục tiêu thứ nhất của tế bào nhận và được sửa chữa một cách tự nhiên tương ứng, trong đó đoạn ADN sau đó được tạo ra dựa trên trình tự mới được tạo ra từ việc sửa chữa đoạn đứt gãy ADN trước đó;

2) các sự kiện chỉnh sửa nhất định được tạo ra sau khi vị trí cụ thể của gen mục

tiêu thứ nhất được cắt và sửa chữa một cách tuần tự, có thể tạo ra một tế bào đột biến có khả năng chống lại áp lực chọn lọc nhất định để tạo ra một tính trạng có thể chọn lọc kiểu hình, áp lực chọn lọc tương ứng được áp dụng để lựa chọn tính trạng, và tế bào, mô, cơ quan hoặc sinh vật hoàn chỉnh có chứa các sự kiện chỉnh sửa như vậy sẽ bị phân lập;

3) tùy ý, ngoài gen mục tiêu thứ nhất, một nucleaza nhắm mục tiêu cho ít nhất một gen mục tiêu thứ hai được sử dụng để chỉnh sửa một vị trí mục tiêu khác cùng một lúc, và sự kiện chỉnh sửa của gen mục tiêu thứ hai được làm giàu và sàng lọc đồng bộ thông qua việc sàng lọc tính trạng có thể chọn lọc được tạo ra bởi các đột biến của gen mục tiêu thứ nhất, và tế bào, mô, cơ quan hoặc sinh vật hoàn chỉnh chứa đồng thời các sự kiện chỉnh sửa của gen mục tiêu thứ nhất và của ít nhất một gen mục tiêu thứ hai được phân lập.

Theo một phương án cụ thể, "gen mục tiêu thứ nhất" là một gen mã hóa vị trí ít nhất một tính trạng có thể chọn lọc kiểu hình, trong đó ít nhất một tính trạng có thể chọn lọc kiểu hình là tính trạng kháng/chống chịu hoặc tính trạng có ưu thế sinh trưởng.

Theo một phương án cụ thể, "vị trí cụ thể của gen mục tiêu thứ nhất" đề cập đến vị trí mà tại đó một dạng đột biến nhất định được tạo ra sau khi cắt và sửa chữa liên tiếp, có khả năng tạo ra tế bào nhận với khả năng chống lại áp lực chọn lọc nhất định để tạo ra ít nhất một tính trạng kháng/chống chịu có thể chọn lọc kiểu hình hoặc tính trạng có ưu thế sinh trưởng.

Theo một phương án cụ thể, "dạng đột biến nhất định" bao gồm sự thay thế của một bazơ đơn lẻ, sự thay thế của nhiều bazơ, hoặc chèn vào hoặc xóa một số lượng bazơ không xác định.

Theo một phương án cụ thể, "áp lực chọn lọc nhất định" có thể là áp suất môi trường hoặc áp suất tạo ra từ một hợp chất được thêm vào; ví dụ, áp suất môi trường là nhiệt độ cao, nhiệt độ thấp hoặc tình trạng thiếu oxy và tương tự; áp suất do một hợp chất thêm vào có thể là áp suất do nồng độ ion muối, thuốc kháng sinh, cytotoxin, thuốc diệt cỏ, v.v..

Theo một phương án cụ thể, "đứt gãy ADN" đạt được bằng cách cung cấp một

nucleaza có đặc tính nhắm mục tiêu vào tế bào của một sinh vật để tiếp xúc với một vị trí cụ thể của ADN bộ gen.

Theo một phương án cụ thể, "nucleaza có thuộc tính nhắm mục tiêu" là loại nucleaza CRISPR/Cas bất kỳ có khả năng thực hiện chỉnh sửa bộ gen.

Theo một phương án cụ thể, dấu hiệu, "hai hoặc nhiều đoạn đứt gãy ADN được tạo liên tiếp theo trình tự tại một vị trí cụ thể", đề cập đến dấu hiệu dựa trên một trình tự mới được hình thành bởi sự kiện sửa chữa đứt gãy ADN trước đó được tạo bởi hệ thống CRISPR/Cas, một ARN mục tiêu mới được thiết kế để cắt vị trí một lần nữa.

Theo một phương án cụ thể, "hai hoặc nhiều đoạn đứt gãy ADN" được tạo ra khi phức hợp RNP được tạo thành bởi cùng một nucleaza CRISPR/Cas tương ứng với các gARN hoặc sgARN khác nhau cắt liên tiếp các trình tự mục tiêu tương ứng.

Theo một phương án cụ thể khác, "hai hoặc nhiều đoạn đứt gãy ADN" được tạo ra khi phức hợp RNP được tạo thành tương ứng bởi mỗi trong số hai hoặc nhiều nucleaza CRISPR/Cas nhận biết trình tự PAM khác nhau với gARN hoặc sgARN tương ứng, cắt liên tiếp các trình tự mục tiêu tương ứng. Bằng cách này, cửa sổ có thể chỉnh sửa của phân tử ADN lớn hơn.

Theo một phương án cụ thể, "gen mục tiêu thứ hai" đề cập đến một gen khác mã hóa khác với gen mục tiêu thứ nhất.

Theo một phương án cụ thể, "nucleaza nhắm mục tiêu cho ít nhất một gen mục tiêu thứ hai" và nucleaza CRISPR/Cas được sử dụng để tạo đứt gãy ADN tại một vị trí cụ thể của gen mục tiêu thứ nhất là giống nhau.

Theo một phương án cụ thể khác, "nucleaza được nhắm mục tiêu cho ít nhất một gen mục tiêu thứ hai" và nucleaza CRISPR/Cas được sử dụng để tạo ra đứt gãy ADN tại một vị trí cụ thể của gen mục tiêu thứ nhất là khác nhau. Bằng cách này, có nhiều vị trí chỉnh sửa có thể lựa chọn hơn trên gen mục tiêu thứ hai.

Theo một phương án cụ thể, nucleaza được nhắm mục tiêu ở dạng ADN.

Theo một phương án cụ thể khác, nucleaza được nhắm mục tiêu ở dạng mRNA hoặc protein thay vì ADN. Dạng protein được ưu tiên.

Theo một phương án cụ thể, phương pháp phân phối nucleaza mục tiêu vào tế bào được chọn từ, nhưng không giới hạn ở: 1) phương pháp truyền tế bào qua trung gian PEG; 2) phương pháp truyền tế bào qua trung gian liposome; 3) phương pháp biến nạp điện tử; 4) phương pháp vi tiêm; 5) phương pháp bắn phá bằng súng gen; hoặc 6) phương pháp biến nạp qua trung gian vi khuẩn *Agrobacterium*.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp chỉnh sửa tạm thời không chuyển gen của bộ gen sinh vật, bao gồm các bước sau:

1) sự kết hợp của ít nhất hai đoạn crARN hoặc sự kết hợp của ít nhất hai đoạn sgARN được thiết kế và tổng hợp cho một vị trí cụ thể của gen mục tiêu thứ nhất của tế bào nhận, trong đó tổ hợp crARN kết hợp với tracrARN hoặc tổ hợp sgARN đơn lẻ có khả năng hướng dẫn một protein Cas tương ứng tạo tuần tự hai hoặc nhiều đoạn đứt gãy ADN tại vị trí cụ thể trong gen mục tiêu thứ nhất của tế bào nhận và sửa chữa chúng một cách tự nhiên tương ứng, trong đó đoạn đứt gãy ADN sau đó được tạo ra dựa trên trình tự mới được tạo ra từ sự sửa chữa đứt gãy ADN trước đó;

2) một lượng thích hợp protein CRISPR/Cas hoặc mARN tương ứng của chúng được trộn với tổ hợp của các đoạn crARN và đoạn tracrARN hoặc với sự kết hợp của các đoạn sgARN đơn lẻ như trên được thiết kế và tổng hợp trước có khả năng hướng dẫn chỉnh sửa theo vị trí cụ thể của gen mục tiêu thứ nhất để tạo ra các dấu hiệu chọn lọc nội sinh, tùy ý, ít nhất một trong các đoạn crARN và tracrARN được tổng hợp nhân tạo hoặc các đoạn sgARN được tổng hợp nhân tạo nhằm mục tiêu đến gen mục tiêu thứ hai, thứ ba hoặc nhiều hơn, và quá trình ủ được thực hiện in vitro để tạo thành phức hợp RNP;

3) phức hợp RNP ở trên được đưa vào tế bào nhận và tiếp xúc với vị trí cụ thể của ADN bộ gen để chỉnh sửa gen;

4) theo một tính trạng có thể chọn lọc kiểu hình được tạo ra bởi sự chỉnh sửa theo vị trí cụ thể của gen mục tiêu thứ nhất bởi phức hợp RNP, một áp lực chọn lọc tương ứng được áp dụng để thực hiện chọn lọc tính trạng, và tế bào, mô, cơ quan hoặc sinh vật hoàn chỉnh có chứa sự kiện chỉnh sửa được phân lập, và tùy ý, tế bào, mô, cơ quan hoặc sinh vật hoàn chỉnh chứa đồng thời các sự kiện chỉnh sửa của gen mục tiêu thứ

nhất và của ít nhất một trong số gen mục tiêu thứ hai, thứ ba hoặc nhiều hơn được phân lập.

Theo một phương án cụ thể, "gen mục tiêu thứ nhất" là một gen mã hóa vị trí ít nhất một tính trạng có thể chọn lọc kiểu hình, trong đó ít nhất một tính trạng có thể chọn lọc kiểu hình là tính trạng kháng/chống chịu hoặc tính trạng có ưu thế sinh trưởng.

Theo một phương án cụ thể, "vị trí cụ thể của gen mục tiêu thứ nhất" đề cập đến vị trí mà tại đó một dạng đột biến nhất định được tạo ra sau khi cắt và sửa chữa liên tiếp, có khả năng tạo ra tế bào nhận với khả năng chống lại một áp lực chọn lọc nhất định để tạo ra ít nhất một tính trạng kháng/chống chịu có thể chọn lọc kiểu hình hoặc tính trạng có ưu thế sinh trưởng.

Theo một phương án cụ thể, "dạng đột biến nhất định" bao gồm sự thay thế của một bazơ đơn lẻ, sự thay thế của nhiều bazơ, hoặc chèn vào hoặc xóa một số lượng bazơ không xác định.

Theo một phương án cụ thể, "áp lực chọn lọc nhất định" có thể là áp suất môi trường hoặc áp suất tạo ra từ một hợp chất được thêm vào; ví dụ, áp suất môi trường là nhiệt độ cao, nhiệt độ thấp hoặc tình trạng thiếu oxy và những yếu tố tương tự; áp suất tạo ra từ một hợp chất được thêm vào có thể là áp suất do nồng độ ion muối, thuốc kháng sinh, cytotoxin hoặc thuốc diệt cỏ, và những chất tương tự.

Theo một phương án cụ thể, protein CRISPR/Cas là nucleaza CRISPR/Cas bất kỳ có khả năng thực hiện chỉnh sửa bộ gen.

Theo một phương án cụ thể, dấu hiệu "tạo hai hoặc nhiều đứt gãy ADN liên tiếp tại vị trí cụ thể" đề cập đến dấu hiệu dựa trên trình tự mới được hình thành bởi sự kiện sửa chữa đứt gãy ADN trước đó được tạo bởi hệ thống CRISPR/Cas, một ARN mục tiêu mới được thiết kế để cắt vị trí lần nữa.

Theo một phương án cụ thể, "hai hoặc nhiều đứt gãy ADN" được tạo ra khi phức hợp RNP được tạo thành bởi cùng một nucleaza CRISPR/Cas tương ứng với các gARN hoặc sgARN khác nhau cắt liên tiếp các trình tự mục tiêu tương ứng.

Theo một phương án cụ thể khác, "hai hoặc nhiều đoạn ADN" được tạo ra khi phức

hợp RNP được tạo thành tương ứng bởi mỗi trong số hai hoặc nhiều nucleaza CRISPR / Cas nhận ra các trình tự PAM khác nhau với gARN hoặc sgARN tương ứng, cắt liên tiếp các trình tự mục tiêu tương ứng. Bằng cách này, cửa sổ có thể chỉnh sửa của phân tử ADN lớn hơn.

Theo một phương án cụ thể, "gen mục tiêu thứ hai, thứ ba hoặc nhiều hơn" đề cập đến các gen khác mã hóa khác với gen mục tiêu thứ nhất.

Theo một phương án cụ thể, "ít nhất một trong các đoạn crARN và tracrARN được tổng hợp nhân tạo hoặc các đoạn sgARN được tổng hợp nhân tạo nhằm mục tiêu đến gen mục tiêu thứ hai, thứ ba hoặc nhiều hơn" chia sẻ cùng một protein Cas với crARN hoặc sgARN nhằm mục tiêu đến gen mục tiêu thứ nhất.

Theo một phương án cụ thể khác, "ít nhất một trong các đoạn crARN và tracrARN được tổng hợp nhân tạo hoặc các đoạn sgARN được tổng hợp nhân tạo nhằm mục tiêu đến gen mục tiêu thứ hai, thứ ba hoặc nhiều hơn" và crARN hoặc sgARN nhằm mục tiêu vào gen mục tiêu thứ nhất sử dụng các protein Cas nhận biết các trình tự PAM khác nhau. Bằng cách này, có nhiều vị trí chỉnh sửa có thể lựa chọn nhiều hơn trên gen mục tiêu thứ hai.

Theo một phương án cụ thể, phương pháp phân phối phức hợp RNP vào tế bào được chọn từ, nhưng không giới hạn ở: 1) phương pháp truyền tế bào qua trung gian PEG; 2) phương pháp truyền tế bào qua trung gian liposome; 3) phương pháp biến nạp điện tử; 4) phương pháp vi tiêm; 5) phương pháp bắn phá bằng súng gen; và các phương pháp tương tự.

Sáng chế này còn đề xuất phương pháp để chỉnh sửa tạm thời không chuyển gen của bộ gen thực vật, bao gồm các bước sau:

1) sự kết hợp của ít nhất hai đoạn crARN hoặc sự kết hợp của ít nhất hai đoạn sgARN được thiết kế và tổng hợp cho một vị trí cụ thể của gen mục tiêu thứ nhất của tế bào hoặc mô thực vật nhận, tổ hợp crARN kết hợp với tracrARN hoặc tổ hợp sgARN đơn lẻ là có khả năng hướng dẫn một protein Cas tương ứng tạo ra liên tiếp hai hoặc nhiều đoạn đứt gãy ADN tại vị trí cụ thể trong gen mục tiêu thứ nhất của tế bào nhận và sửa chữa chúng một cách tự nhiên tương ứng, trong đó đoạn đứt gãy ADN sau đó

được tạo ra dựa trên trình tự mới được tạo ra từ sửa chữa đứt gãy ADN trước đó;

2) một lượng thích hợp protein CRISPR/Cas hoặc mARN tương ứng của chúng được trộn với tổ hợp các đoạn crARN và đoạn tracrARN hoặc với tổ hợp của các đoạn sgARN đơn lẻ như trên được thiết kế và tổng hợp trước có khả năng hướng dẫn chỉnh sửa theo vị trí cụ thể của gen mục tiêu thứ nhất để tạo ra các dấu hiệu chọn lọc nội sinh, tùy ý, ít nhất một trong các đoạn crARN và tracrARN được tổng hợp nhân tạo hoặc các đoạn sgARN được tổng hợp nhân tạo nhằm mục tiêu đến gen mục tiêu thứ hai, thứ ba hoặc nhiều hơn, và quá trình ử được thực hiện trong ống nghiệm để tạo thành phức hợp RNP;

3) phức hợp RNP ở trên được đưa vào tế bào hoặc mô thực vật nhận và tiếp xúc với vị trí cụ thể của ADN bộ gen để đạt được sự chỉnh sửa gen;

4) theo một tính trạng có thể chọn lọc kiểu hình được tạo ra bởi sự chỉnh sửa vị trí cụ thể của gen mục tiêu thứ nhất bởi phức hợp RNP, một áp lực chọn lọc tương ứng được áp dụng để thực hiện chọn lọc tính trạng, và tế bào, mô, cơ quan hoặc cây hoàn chỉnh có chứa sự kiện chỉnh sửa được phân lập và tùy ý, một tế bào, mô, cơ quan hoặc cây hoàn chỉnh chứa đồng thời các sự kiện chỉnh sửa của gen mục tiêu thứ nhất và của ít nhất một trong số các gen mục tiêu thứ hai, thứ ba hoặc nhiều hơn được phân lập.

Theo một phương án cụ thể, "gen mục tiêu thứ nhất" là một gen mã hóa vị trí ít nhất một tính trạng có thể chọn lọc kiểu hình, trong đó ít nhất một tính trạng có thể chọn lọc kiểu hình là tính trạng kháng/chống chịu hoặc tính trạng có ưu thế sinh trưởng.

Theo một phương án cụ thể, "vị trí cụ thể của gen mục tiêu thứ nhất" đề cập đến vị trí mà tại đó một dạng đột biến nhất định được tạo ra sau khi cắt và sửa chữa liên tiếp tại vị trí đó, có thể tạo ra tế bào nhận khả năng chống lại áp lực chọn lọc nhất định để tạo ra ít nhất một tính trạng kháng/chống chịu có thể chọn lọc kiểu hình hoặc tính trạng có ưu thế sinh trưởng.

Theo một phương án cụ thể, "dạng đột biến nhất định" bao gồm sự thay thế bazơ đơn lẻ, thay thế một số lượng nhiều bazơ hoặc chèn vào hoặc xóa một số lượng bazơ không xác định.

Theo một phương án cụ thể, "áp lực chọn lọc nhất định" có thể là áp suất môi



trường hoặc áp suất tạo ra từ một hợp chất được thêm vào; ví dụ, áp suất môi trường tốt nhất là nhiệt độ cao, nhiệt độ thấp hoặc tình trạng thiếu oxy và tương tự; áp suất do một hợp chất thêm vào có thể là áp suất do nồng độ ion muối, kháng sinh, cytotoxin, thuốc diệt cỏ, v.v..

Theo một phương án cụ thể, "tế bào hoặc mô thực vật nhận" là tế bào hoặc mô bất kỳ có thể đóng vai trò là người nhận để biểu hiện tạm thời và có thể được tái sinh thành cây hoàn chỉnh thông qua nuôi cấy mô. Cụ thể, tế bào là tế bào nguyên sinh hay còn gọi là tế bào huyền phù; mô tốt nhất là mô sẹo, phôi chưa trưởng thành, phôi trưởng thành, lá, ngọn chồi, cành non, trụ lá dưới mầm, v.v..

Theo một phương án cụ thể, protein CRISPR/Cas là nucleaza CRISPR/Cas bất kỳ có khả năng thực hiện chỉnh sửa bộ gen.

Theo một phương án cụ thể, dấu hiệu "tạo liên tục hai hoặc nhiều đứt gãy ADN tại vị trí cụ thể" đề cập đến dấu hiệu dựa trên trình tự mới được hình thành bởi sự kiện sửa chữa đứt gãy ADN trước đó được tạo bởi hệ thống CRISPR / Cas, một ARN mục tiêu mới được thiết kế để cắt vị trí lần nữa.

Theo một phương án cụ thể, "hai hoặc nhiều đứt gãy ADN" được tạo ra khi phức hợp RNP được tạo thành bởi một nucleaza CRISPR/Cas tương ứng với các gARN hoặc sgARN khác nhau cắt liên tiếp các trình tự mục tiêu tương ứng.

Theo một phương án cụ thể khác, "hai hoặc nhiều đứt gãy ADN" được tạo ra khi phức hợp RNP được tạo thành tương ứng bởi mỗi trong số hai hoặc nhiều nucleaza CRISPR/Cas nhận ra các trình tự PAM khác nhau với gARN hoặc sgARN tương ứng, cắt liên tiếp các trình tự mục tiêu tương ứng. Bằng cách này, cửa sổ có thể chỉnh sửa của phân tử ADN lớn hơn.

Theo một phương án cụ thể, "gen mục tiêu thứ hai, thứ ba hoặc nhiều hơn" đề cập đến các gen khác có mã hóa khác với gen mục tiêu thứ nhất.

Theo một phương án cụ thể, "ít nhất một trong các đoạn crARN và tracrARN được tổng hợp nhân tạo hoặc các đoạn sgARN được tổng hợp nhân tạo nhằm mục tiêu đến gen mục tiêu thứ hai, thứ ba hoặc nhiều hơn" chia sẻ cùng một protein Cas với crARN hoặc sgARN nhằm mục tiêu đến gen mục tiêu thứ nhất.

Theo một phương án cụ thể khác, "ít nhất một trong các đoạn crARN và tracrARN được tổng hợp nhân tạo hoặc các đoạn sgARN được tổng hợp nhân tạo nhằm mục tiêu đến gen mục tiêu thứ hai, thứ ba hoặc nhiều hơn" và crARN hoặc sgARN nhằm mục tiêu vào gen mục tiêu thứ nhất sử dụng các protein Cas nhận biết các trình tự PAM khác nhau. Bằng cách này, có nhiều vị trí chỉnh sửa có thể lựa chọn hơn trên gen mục tiêu thứ hai.

Theo một phương án cụ thể, phương pháp đưa phức hợp RNP vào tế bào thực vật được chọn từ, nhưng không giới hạn ở: 1) phương pháp biến nạp tế bào nguyên sinh qua trung gian PEG; 2) phương pháp vi tiêm; 3) phương pháp bắn phá bằng súng gen; 4) phương pháp trung gian sợi cacbua silic; 5) phương pháp thâm nhập chân không, hoặc bất kỳ phương pháp đưa vào tạm thời nào khác. Phương pháp bắn phá bằng súng gen được ưu tiên.

Theo một phương án cụ thể, "gen mục tiêu thứ nhất" là ít nhất một gen nội sinh mã hóa ít nhất một tính trạng có thể chọn lọc kiểu hình được chọn từ tính kháng/chống chịu thuốc diệt cỏ, trong đó tính kháng/chống chịu thuốc diệt cỏ được chọn từ nhóm bao gồm tính kháng/chống chịu với chất ức chế EPSPS (bao gồm cả glyphosat); kháng/chống chịu chất ức chế tổng hợp glutamin (bao gồm glufosinat); kháng/chống chịu với chất ức chế ALS hoặc AHAS (bao gồm imidazolin hoặc sulfonylure); kháng/chống chịu với chất ức chế ACCase (bao gồm axit aryloxyphenoxypropionic (FOP)); kháng/chống chịu với chất ức chế sinh tổng hợp chất caroten, bao gồm các chất ức chế sinh tổng hợp carotenoid của bước phytoen desaturaza (PDS), chất ức chế 4-hydroxyphenylpyruvat dioxygenaza (HPPD) hoặc các chất ức chế mục tiêu sinh tổng hợp carotenoid khác; kháng/chống chịu với chất ức chế xenluloza; kháng/chống chịu với chất ức chế tổng hợp lipid; kháng/chống chịu với chất ức chế axit béo chuỗi dài; kháng/chống chịu với chất ức chế lắp ráp vi ống; kháng/chống chịu tác nhân tránh điện tử quang hệ I; kháng/chống chịu chất ức chế quang hệ II (bao gồm carbamat, triazin và triazon); kháng/chống chịu chất ức chế PPO; và kháng/chống chịu với hormon sinh trưởng tổng hợp (bao gồm dicamba, 2,4-D (tức là, axit 2,4-diclophenoxyaxetic)). Trong đó, gen mục tiêu thứ nhất được chọn từ PsbA, ALS, EPSPS, ACCase, PPO, HPPD, PDS, GS, DOXPS, TIR1, AFB5, và một số dạng đột biến được tạo ra sau khi cắt và sửa

chữa tuần tự tại các vị trí cụ thể của các gen mục tiêu thuốc diệt cỏ này có thể tạo cho tế bào thực vật nhận khả năng kháng/chống chịu với các loại thuốc diệt cỏ tương ứng.

Theo một phương án cụ thể, "gen mục tiêu thứ nhất" là ALS, và "vị trí cụ thể của gen" đề cập đến vị trí A122, P197, R198, D204, A205, D376, R377, W574, S653 hoặc G654 trong trình tự axit amin của protein AtALS *Arabidopsis* (ví dụ, như được thể hiện trong SEQ ID NO:1), và các vị trí axit amin trong protein ALS của một thực vật khác tương ứng với các vị trí axit amin nêu trên bằng cách sử dụng trình tự axit amin AtALS làm tiêu chuẩn tham chiếu. CrARN hoặc sgARN nhắm mục tiêu trình tự mục tiêu bao gồm trình tự mã hóa vị trí trình tự axit amin của protein AtALS được chọn từ nhóm bao gồm A122, P197, R198, D204, A205, D376, R377, W574, S653, G654 hoặc kết hợp bất kỳ của chúng, và trình tự mục tiêu bao gồm trình tự mã hóa vị trí axit amin trong protein ALS của một thực vật khác tương ứng với các vị trí axit amin nêu trên, và sự kết hợp bất kỳ của chúng, bằng cách sử dụng trình tự axit amin AtALS làm tiêu chuẩn tham chiếu. Vị trí ALS W574 được ưu tiên. Áp lực chọn lọc tốt nhất là xử lý bằng pyroxsulam hoặc nicosulfuron.

Theo một phương án cụ thể, "gen mục tiêu thứ nhất" là ACCase, và "vị trí cụ thể của gen" đề cập đến vị trí I1781, E1874, N1878, W1999, W2027, I2041, D2078, C2088 hoặc G2096 trong trình tự axit amin của protein AmACCCase *Alopecurus myosuroides* (ví dụ, như được thể hiện trong SEQ ID NO: 3, và trình tự gen như được thể hiện trong SEQ ID NO: 4), và các vị trí axit amin trong protein ACCCase của cây một lá mầm khác tương ứng với các vị trí axit amin nêu trên bằng cách sử dụng trình tự axit amin AmACCCase làm tiêu chuẩn tham chiếu. CrARN hoặc sgARN nhắm mục tiêu trình tự mục tiêu bao gồm trình tự mã hóa vị trí trình tự axit amin AmACCCase được chọn từ nhóm bao gồm I1781, E1874, N1878, W1999, W2027, I2041, D2078, C2088, G2096 hoặc kết hợp bất kỳ của chúng, và trình tự mục tiêu bao gồm trình tự mã hóa vị trí axit amin trong protein ACCCase của cây một lá mầm khác tương ứng với vị trí axit amin nêu trên, và sự kết hợp bất kỳ của chúng, bằng cách sử dụng trình tự axit amin AmACCCase làm tiêu chuẩn tham chiếu. Vị trí ACCCase W2027 được ưu tiên. Áp lực chọn lọc tốt hơn là xử lý với quizalofop-p-ethyl.

Theo một phương án cụ thể, "gen mục tiêu thứ nhất" là HPPD, và "vị trí cụ thể của

gen" đề cập đến vị trí H141, L276, P277, N338, G342, R346, D370, P386, K418 hoặc G419 trong trình tự axit amin của protein OsHPPD *Oryza sativa* (như được thể hiện trong SEQ ID NO: 5, và trình tự bộ gen như được thể hiện trong SEQ ID NO: 6), và các vị trí axit amin trong protein HPPD của một thực vật khác tương ứng với các vị trí axit amin nêu trên bằng cách sử dụng trình tự axit amin OsHPPD làm tiêu chuẩn tham chiếu. CrARN hoặc sgARN nhắm mục tiêu trình tự mục tiêu bao gồm trình tự mã hóa vị trí trình tự axit amin OsHPPD được chọn từ nhóm bao gồm H141, L276, P277, N338, G342, R346, D370, P386, K418, G419 hoặc kết hợp bất kỳ của chúng, và trình tự mục tiêu bao gồm trình tự mã hóa vị trí axit amin trong protein HPPD của một thực vật khác tương ứng với vị trí axit amin nêu trên, và sự kết hợp bất kỳ của chúng, bằng cách sử dụng trình tự axit amin OsHPPD làm tiêu chuẩn tham chiếu. Áp lực chọn lọc tốt hơn là xử lý với bisclafentrazon.

Theo một phương án cụ thể, "gen mục tiêu thứ nhất" là PPO, và "vị trí cụ thể của gen" đề cập đến vị trí S128, V217, S223, V364, K373, L423, Y425 hoặc W470 trong trình tự axit amin của protein OsPPO1 *Oryza sativa* (như được thể hiện trong SEQ ID NO: 7, và trình tự bộ gen như được thể hiện trong SEQ ID NO: 8), và các vị trí axit amin trong protein PPO của một thực vật khác tương ứng với các vị trí axit amin nêu trên bằng cách sử dụng trình tự axit amin của OsPPO1 làm tiêu chuẩn tham chiếu. CrARN hoặc sgARN nhắm mục tiêu trình tự mục tiêu bao gồm trình tự mã hóa vị trí trình tự axit amin OsPPO1 được chọn từ nhóm bao gồm S128, V217, S223, V364, K373, L423, Y425, W470 hoặc kết hợp bất kỳ của chúng, và trình tự mục tiêu bao gồm trình tự các vị trí axit amin nêu trên tương ứng với protein PPO của một loài thực vật khác và bất kỳ sự kết hợp nào của chúng sử dụng trình tự axit amin OsPPO1 làm tiêu chuẩn tham chiếu. Áp lực chọn lọc tốt hơn là xử lý với saflufenacil.

Theo một phương án cụ thể, "gen mục tiêu thứ nhất" là TIR1, và "vị trí cụ thể của gen" đề cập đến vị trí F93, F357, C413 hoặc S448 trong trình tự axit amin của protein OsTIR1 *Oryza sativa* (như được thể hiện trong SEQ ID NO: 9, và trình tự bộ gen như được thể hiện trong SEQ ID NO: 10), và các vị trí axit amin trong protein TIR1 của một thực vật khác tương ứng với các vị trí axit amin nêu trên bằng cách sử dụng trình tự axit amin OsTIR1 làm tiêu chuẩn tham chiếu. CrARN hoặc sgARN nhắm mục tiêu trình tự

mục tiêu bao gồm trình tự mã hóa vị trí trình tự axit amin OsTIR1 được chọn từ nhóm bao gồm F93, F357, C413, S448 hoặc kết hợp bất kỳ của chúng, và trình tự mục tiêu bao gồm trình tự mã hóa vị trí axit amin trong protein TIR1 của một thực vật khác tương ứng với vị trí axit amin nêu trên, và bất kỳ sự kết hợp nào của chúng, bằng cách sử dụng trình tự axit amin OsTIR1 làm tiêu chuẩn tham chiếu. Áp lực chọn lọc tốt hơn là xử lý 2,4-D.

Sáng chế còn đề xuất hệ thống chỉnh sửa tạm thời không chuyển gen bằng cách sử dụng phương pháp nói trên.

Ngoài ra, sáng chế còn đề xuất việc sử dụng hệ thống chỉnh sửa tạm thời không chuyển gen đã nói ở trên làm điểm đánh dấu chọn lọc.

Ngoài ra, sáng chế còn đề xuất việc sử dụng hệ thống chỉnh sửa tạm thời không chuyển gen đã nói ở trên để điều trị bệnh.

Ngoài ra, sáng chế còn đề xuất việc sử dụng hệ thống chỉnh sửa tạm thời không chuyển gen đã nói ở trên trong nhân giống sinh học.

Sáng chế còn đề xuất thực vật biến đổi gen thu được bằng phương pháp nói trên, bộ gen của nó chứa sự kiện chỉnh sửa của gen mục tiêu thứ nhất, và thực vật biến đổi gen thu được theo cách không chuyển gen.

Sáng chế bổ sung đề xuất một loại thực vật biến đổi gen thu được bằng phương pháp nói trên, bộ gen của nó chứa sự kiện chỉnh sửa của gen mục tiêu thứ nhất, và còn chứa ít nhất một sự kiện chỉnh sửa gen mục tiêu thứ hai, và thực vật biến đổi gen được tạo ra theo cách không chuyển gen.

Sáng chế cũng đề xuất thêm một loại thực vật biến đổi gen thu được bằng phương pháp nói trên, bộ gen của nó chứa ít nhất một sự kiện chỉnh sửa gen mục tiêu thứ hai, và thực vật biến đổi gen được tạo ra theo cách không chuyển gen, trong đó sự kiện chỉnh sửa của gen mục tiêu thứ nhất đã bị loại bỏ bằng cách tách gen.

Sáng chế còn đề xuất bộ gen của thực vật biến đổi gen thu được bằng phương pháp nói trên, bộ gen bao gồm: 1) sự kiện chỉnh sửa của gen mục tiêu thứ nhất; 2) sự kiện chỉnh sửa của gen mục tiêu thứ nhất và sự kiện chỉnh sửa của ít nhất một gen mục tiêu

thứ hai; hoặc 3) ít nhất một sự kiện chỉnh sửa gen mục tiêu thứ hai, trong đó sự kiện chỉnh sửa gen mục tiêu thứ nhất đã bị loại bỏ bằng cách tách gen; trong đó thực vật biến đổi gen thu được theo cách không chuyển gen.

Một khía cạnh khác của sáng chế đề xuất một đột biến gen thực vật mới thu được bằng phương pháp nói trên.

Sáng chế cũng đề xuất một dạng đột biến mới được tạo ra ở cây trồng, bao gồm một hoặc sự kết hợp của hai hoặc nhiều dạng sau đây:

thay thế axit aspartic tại vị trí tương ứng với *Arabidopsis* ALS376 bằng bất kỳ axit amin nào khác, thay thế tryptophan tại vị trí tương ứng với *Arabidopsis* ALS574 bằng bất kỳ axit amin nào khác, thay thế serin tại vị trí tương ứng với *Arabidopsis* ALS653 bằng bất kỳ axit amin nào khác, hoặc thay thế serin tại vị trí tương ứng với *Arabidopsis* ALS654 bằng bất kỳ axit amin nào khác; hoặc thay thế tryptophan tại vị trí tương ứng với *Alopecurus myosuroides* ACCase2027 bằng bất kỳ axit amin nào khác.

Theo một phương án cụ thể, trong đó axit aspartic tại vị trí tương ứng với *Arabidopsis* ALS376 được thay thế bằng axit glutamic (D376E), tryptophan tại vị trí tương ứng với *Arabidopsis* ALS574 được thay thế bằng leucin hoặc methionin (W574L hoặc W574M), serin tại vị trí tương ứng với *Arabidopsis* ALS653 được thay thế bằng asparagin hoặc arginin (S653N hoặc S653R), hoặc glycin tại vị trí tương ứng với *Arabidopsis* ALS654 được thay thế bằng axit aspartic (G654D), trong đó các vị trí của các axit amin được đề cập bằng cách sử dụng các vị trí của các axit amin tương ứng trong *Arabidopsis thaliana* làm tham chiếu; hoặc, tryptophan tại vị trí tương ứng với *Alopecurus myosuroides* ACCase2027 được thay thế bằng leucin hoặc cystein (W2027L hoặc W2027C), trong đó vị trí của axit amin được đề cập bằng cách sử dụng vị trí của axit amin tương ứng trong *Alopecurus myosuroides* làm tham chiếu.

Theo một phương án cụ thể khác, dạng đột biến là S653R/G654D, trong đó vị trí của axit amin được đề cập bằng cách sử dụng vị trí của axit amin tương ứng trong *Arabidopsis thaliana* làm tham chiếu.

Theo một phương án cụ thể, axit aspartic ở vị trí 350 của *Oryza sativa* ALS được thay thế bằng bất kỳ axit amin nào khác, tryptophan ở vị trí 548 của *Oryza sativa* ALS

được thay thế bằng bất kỳ axit amin nào khác, hoặc tryptophan ở vị trí 561 của *Solanum tuberosum* L. ALS2 được thay thế bởi bất kỳ axit amin nào khác; hoặc tryptophan ở vị trí 2038 của *Oryza sativa* ACCase2 được thay thế bằng bất kỳ axit amin nào khác.

Theo một phương án cụ thể khác, axit aspartic ở vị trí 350 của *Oryza sativa* ALS được thay thế bằng axit glutamic (D350E), tryptophan ở vị trí 548 của *Oryza sativa* ALS được thay thế bằng leucin hoặc methionin (W548L hoặc W548M), hoặc tryptophan ở vị trí 561 của *Solanum tuberosum* L. ALS2 được thay thế bằng leucin hoặc methionin (W561L hoặc W561M); hoặc, tryptophan tại vị trí 2038 của *Oryza sativa* ACCase2 được thay thế bằng leucin hoặc cystein (W2038L hoặc W2038C), trong đó trình tự axit amin của protein *Oryza sativa* ALS được thể hiện trong SEQ ID NO: 11, trình tự axit amin của protein *Solanum tuberosum* L. StALS2 được hiển thị trong SEQ ID NO: 19 và trình tự axit amin của protein *Oryza sativa* ACCase2 được hiển thị trong SEQ ID NO: 13.

Sáng chế còn đề xuất protein hoặc đoạn có hoạt tính sinh học của chúng có đột biến mới nói trên.

Sáng chế cũng đề xuất axit nucleic, bao gồm trình tự axit nucleic hoặc trình tự bổ sung của nó mã hóa protein hoặc đoạn có hoạt tính sinh học của chúng.

Sáng chế còn đề xuất một vector biểu hiện tái tổ hợp, bao gồm axit nucleic và một trình tự khởi đầu được liên kết chức năng với nó.

Sáng chế còn đề xuất thêm cassette biểu hiện, bao gồm axit nucleic.

Sáng chế này còn đề xuất tế bào thực vật, bao gồm cassette biểu hiện.

Sáng chế này còn đề xuất thực vật được tái sinh bằng cách sử dụng tế bào thực vật.

Một khía cạnh khác của sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất cây trồng có khả năng kháng hoặc chống chịu với thuốc diệt cỏ được cải thiện, bao gồm việc tái sinh tế bào thực vật thành thực vật.

Một khía cạnh khác của sáng chế đề xuất phương pháp kiểm soát cỏ dại trong khu vực canh tác thực vật, trong đó thực vật bao gồm cây trồng nói trên hoặc cây trồng được sản xuất theo phương pháp nói trên, trong đó phương pháp này bao gồm việc áp dụng

cho địa điểm trồng trọt một hoặc nhiều loại thuốc diệt cỏ với lượng có hiệu quả để kiểm soát cỏ dại.

Một khía cạnh khác của sáng chế cũng đề xuất việc sử dụng đột biến mới, protein hoặc đoạn có hoạt tính sinh học của chúng, axit nucleic, vectơ biểu hiện tái tổ hợp hoặc cassette biểu hiện trong việc cải thiện tính kháng hoặc tính chống chịu của tế bào thực vật, mô thực vật, bộ phận của thực vật hoặc thực vật để diệt cỏ.

Sáng chế này có các hiệu quả kỹ thuật tuyệt vời sau đây:

Dựa trên các trình tự được tạo ra từ sự kiện sửa chữa mới được tạo ra bằng cách chỉnh sửa liên tiếp, các mục tiêu mới có thể được thiết kế, có thể tạo đột biến liên tiếp nhiều lần tại một vị trí cụ thể trong bộ gen, do đó làm phong phú theo cấp số nhân các loại sự kiện sửa chữa sau khi ADN đứt gãy, và nhận ra các dạng đột biến thay thế bazơ, đột biến mất đoạn và đột biến chèn mà không thể có được bằng một lần chỉnh sửa gen. Tức là, sơ đồ cắt/chỉnh sửa tuần tự được lập trình được thông qua bởi sáng chế, sử dụng trình tự được tạo ra từ lần sửa chữa chỉnh sửa gen trước đó làm mục tiêu chỉnh sửa gen sau này, có thể cung cấp cho CRISPR/Cas các chức năng mới về chỉnh sửa bazơ đơn lẻ và xóa và chèn vị trí chính xác thông qua việc loại trực tiếp đơn giản.

Sáng chế có thể thực hiện sàng lọc các sự kiện chỉnh sửa gen trong trường hợp không có dấu hiệu ngoại sinh, tiếp tục nhận ra việc chỉnh sửa gen không chuyển gen và có thể sàng lọc hiệu quả các sự kiện chỉnh sửa, và có thể làm giảm đáng kể mối lo ngại về an toàn sinh học của phương pháp này trong liệu pháp tế bào và nhân giống sinh học.

Đặc biệt, phương pháp chỉnh sửa tạm thời không chuyển gen ở thực vật được cung cấp bởi sáng chế chỉ liên quan đến protein Cas và các đoạn nhỏ gARN hoặc sgARN được tổng hợp nhân tạo, mà không có sự tham gia của ADN ngoại sinh trong toàn bộ quá trình, và tạo ra các dấu hiệu lựa chọn kháng nội sinh bằng cách chỉnh sửa gen mục tiêu thứ nhất thông qua cắt/chỉnh sửa tuần tự, để sự kiện chỉnh sửa có thể được sàng lọc một cách hiệu quả, thực sự mà không cần đến các thao tác biến đổi gen, và do đó, phương pháp này tương đương với gây đột biến hóa học hoặc nhân giống bằng bức xạ, cũng không yêu cầu liên tục nhiều thế hệ phân tách và phát hiện các thành phần chuyển gen ngoại sinh, do đó rút ngắn chu kỳ nhân giống, đảm bảo an toàn sinh học, tiết kiệm



chi phí giám sát và phê duyệt, và cung cấp triển vọng ứng dụng tuyệt vời trong việc nhân giống chính xác cây trồng.

### **Mô tả chi tiết sáng chế**

Trong sáng chế này, trừ khi có quy định khác, các thuật ngữ khoa học và kỹ thuật được sử dụng ở đây có nghĩa thường được hiểu bởi những người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Ngoài ra, hóa học protein và axit nucleic, sinh học phân tử, nuôi cấy mô và tế bào, vi sinh vật học, các thuật ngữ liên quan đến miễn dịch học và quy trình phòng thí nghiệm được sử dụng ở đây là tất cả các thuật ngữ và quy trình thông thường được sử dụng rộng rãi trong các lĩnh vực tương ứng. Đồng thời, để hiểu rõ hơn về sáng chế, các định nghĩa và giải thích các thuật ngữ liên quan được cung cấp dưới đây.

Thuật ngữ "bộ gen" như được sử dụng ở đây đề cập đến tất cả các phần bổ sung của vật chất di truyền (gen và trình tự không mã hóa) có trong mỗi tế bào hoặc vi rút hoặc bào quan của một sinh vật, và/hoặc bộ gen hoàn chỉnh được thừa hưởng từ cha mẹ dưới dạng một đơn vị (đơn bội).

Thuật ngữ "chỉnh sửa gen" đề cập đến các chiến lược và kỹ thuật để biến đổi có mục tiêu cụ thể đối với bất kỳ thông tin di truyền hoặc bộ gen nào của sinh vật sống. Do đó, thuật ngữ này bao gồm chỉnh sửa các vùng mã hóa gen, nhưng cũng bao gồm chỉnh sửa các vùng không phải là vùng mã hóa gen của bộ gen. Nó cũng bao gồm chỉnh sửa hoặc sửa đổi thông tin di truyền khác của nhân (nếu có) và tế bào.

Thuật ngữ "nucleaza CRISPR/Cas" có thể là nucleaza dựa trên CRISPR hoặc trình tự axit nucleic mã hóa giống nhau, bao gồm nhưng không giới hạn ở: 1) Cas9, bao gồm SpCas9, ScCas9, SaCas9, xCas9, VRER-Cas9, EQR-Cas9, SpG-Cas9, SpRY-Cas9, SpCas9-NG, NG-Cas9, NGA-Cas9 (VQR), v.v.; 2) Cas12, bao gồm LbCpf1, FnCpf1, AsCpf1, MAD7, v.v., hoặc bất kỳ biến thể hoặc dẫn xuất nào của nucleaza dựa trên CRISPR nói trên; tốt hơn là, trong đó ít nhất một nucleaza dựa trên CRISPR bao gồm một đột biến so với trình tự kiểu đại tương ứng, để nucleaza dựa trên CRISPR thu được nhận ra một trình tự PAM khác. Khi được sử dụng ở đây, "nucleaza dựa trên CRISPR" là bất kỳ nucleaza nào đã được xác định trong hệ thống CRISPR tự nhiên, sau đó được phân lập từ nền tự nhiên của nó, và tốt hơn là đã được sửa đổi hoặc kết hợp thành cấu

trúc tái tổ hợp cần quan tâm, thích hợp làm công cụ cho kỹ thuật bộ gen được nhắm mục tiêu. Miễn là nucleaza dựa trên CRISPR kiểu đại ban đầu cung cấp khả năng nhận dạng ADN, tức là các đặc tính liên kết, thì bất kỳ nucleaza dựa trên CRISPR nào cũng có thể được sử dụng và được lập trình lại tùy ý hoặc được đột biến theo cách khác để phù hợp với các phương án khác nhau của sáng chế.

Thuật ngữ "CRISPR" đề cập đến một kỹ thuật thao tác di truyền cụ thể theo trình tự dựa trên các đoạn lặp lại palindromic ngắn xen kẽ nhau đều đặn, khác với sự can thiệp của ARN điều chỉnh sự biểu hiện của gen ở cấp độ phiên mã.

" nucleaza Cas9" và "Cas9" được sử dụng thay thế cho nhau ở đây, và đề cập đến nucleaza được hướng dẫn bằng ARN bao gồm protein Cas9 hoặc đoạn của nó (ví dụ, protein chứa miền phân cắt ADN hoạt động của Cas9 và/hoặc miền liên kết gARN của Cas9). Cas9 là một thành phần của hệ thống chỉnh sửa bộ gen CRISPR/Cas (cụm lặp lại palindrome ngắn xen kẽ thường xuyên và các hệ thống liên quan). Nó có thể nhắm mục tiêu và cắt các trình tự mục tiêu ADN dưới sự hướng dẫn của ARN dẫn đường để tạo thành các đứt gãy chuỗi kép ADN (DSB).

" protein Cas" hoặc " polypeptit Cas" đề cập đến một polypeptit được mã hóa bởi gen Cas (liên kết với CRISPR). Protein Cas gồm có endonucleaza Cas. Protein Cas có thể là một loại protein vi khuẩn hoặc vi khuẩn cổ. Ví dụ, các protein Cas CRISPR loại I đến III ở đây thường bắt nguồn từ sinh vật nhân sơ; protein Cas loại I và loại III có thể có nguồn gốc từ vi khuẩn hoặc các loài vi khuẩn cổ, và protein Cas loại II (tức là, Cas9) có thể có nguồn gốc từ các loài vi khuẩn. "Protein Cas" bao gồm protein Cas9, protein Cpf1, protein C2c1, protein C2c2, protein C2c3, Cas3, Cas3-HD, Cas5, Cas7, Cas8, Cas10, Cas12a, Cas12b hoặc kết hợp hoặc phức hợp của chúng.

"Biến thể Cas9" hoặc "Biến thể endonucleaza Cas9" đề cập đến một biến thể của endonucleaza Cas9 gốc, trong đó khi được kết hợp với crARN và tracrARN hoặc với sgARN, biến thể endonucleaza Cas9 vẫn giữ được khả năng nhận biết, liên kết với tất cả hoặc một phần của trình tự ADN mục tiêu và tùy ý tháo cuộn tất cả hoặc một phần của trình tự mục tiêu ADN, cắt tất cả hoặc một phần của trình tự mục tiêu ADN, hoặc cắt tất cả hoặc một phần của trình tự mục tiêu ADN. Các biến thể endonucleaza Cas9 bao gồm các biến thể endonucleaza Cas9 được mô tả ở đây, trong đó các biến thể

endonucleaza Cas9 khác với endonucleaza Cas9 gốc theo cách sau: Các biến thể endonucleaza Cas9 (khi được tạo phức với gARN để tạo thành phức hợp endonucleaza hướng polynucleotit có khả năng sửa đổi vị trí mục tiêu) có ít nhất một đặc tính được cải thiện, chẳng hạn, nhưng không giới hạn ở, tăng hiệu suất biến nạp, tăng hiệu quả chỉnh sửa ADN, giảm cắt ngoài mục tiêu, hoặc kết hợp bất kỳ của chúng, so với endonucleaza Cas9 gốc (tạo phức hợp với cùng một gARN để tạo thành phức hợp endonucleaza hướng polynucleotit có khả năng sửa đổi cùng một vị trí mục tiêu).

Các biến thể endonucleaza Cas9 được mô tả ở đây bao gồm các biến thể có thể liên kết và cắt các vị trí mục tiêu ADN sợi đôi khi liên kết với crARN và tracrARN hoặc với sgARN, trong khi endonucleaza Cas gốc có thể liên kết với vị trí mục tiêu và dẫn đến đứt sợi đôi (phân cắt) khi liên kết với crARN và tracrARN hoặc với sgARN.

"ARN hướng dẫn" và "gARN" được sử dụng thay thế cho nhau ở đây, và đề cập đến trình tự ARN hướng dẫn được sử dụng để nhắm mục tiêu một gen cụ thể để hiệu chỉnh bằng công nghệ CRISPR, thường bao gồm các phân tử crARN và tracrARN bổ sung một phần để tạo thành phức hợp, trong đó crARN chứa một trình tự có đủ sự bổ sung với trình tự mục tiêu để lai với trình tự mục tiêu và chỉ đạo phức hợp CRISPR (Cas9 + crARN + tracrARN) liên kết cụ thể với trình tự mục tiêu. Tuy nhiên, trong lĩnh vực kỹ thuật, người ta đã biết rằng một ARN hướng dẫn đơn (sgARN) có thể được thiết kế, chứa cả các đặc tính của crARN và tracrARN.

Thuật ngữ "ARN hướng dẫn đơn" và "sgARN" được sử dụng thay thế cho nhau ở đây, và đề cập đến sự dung hợp tổng hợp của hai phân tử ARN, bao gồm sự dung hợp của crARN (CRISPR ARN) của miền nhắm mục tiêu thay đổi (được liên kết với trình tự bắt cặp tracr lai với tracrARN) và tracrARN (ARN CRISPR kích hoạt trans). SgARN có thể bao gồm các đoạn crARN hoặc crARN và các đoạn tracrARN hoặc tracrARN của hệ thống CRISPR/Cas loại II có thể tạo thành phức hợp với Cas endonucleaza loại II, trong đó phức hợp hướng dẫn endonucleaza ARN/Cas có thể hướng endonucleaza Cas đến vị trí mục tiêu ADN để endonucleaza Cas có thể nhận ra, liên kết tùy ý vào vị trí mục tiêu ADN, và tùy ý rạch vị trí mục tiêu ADN hoặc cắt (tạo đứt gãy sợi đơn hoặc sợi kép) vị trí mục tiêu ADN.

Theo một số phương án, (các) ARN hướng dẫn và Cas9 có thể được phân phối đến

tế bào dưới dạng phức hợp ribonucleoprotein (RNP). RNP bao gồm protein Cas9 tinh khiết tạo phức với gARN, và được biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật rằng RNP có thể được phân phối hiệu quả đến nhiều loại tế bào, bao gồm nhưng không giới hạn ở tế bào gốc và tế bào miễn dịch (Addgene, Cambridge, MA, Mirus Bio LLC, Madison, WI).

Mô típ liền kề protospacer (PAM) ở đây đề cập đến trình tự nucleotit liền kề với trình tự mục tiêu (được nhắm mục tiêu) (prespacer) được hệ thống endonucleaza gARN/Cas nhận ra. Nếu trình tự ADN mục tiêu không liền kề với trình tự PAM thích hợp, thì endonucleaza Cas có thể không thể nhận biết thành công trình tự ADN mục tiêu. Trình tự và độ dài của PAM ở đây có thể khác nhau tùy thuộc vào protein Cas hoặc phức hợp protein Cas đang được sử dụng. Trình tự PAM có thể có độ dài bất kỳ, nhưng thường có độ dài là 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 hoặc 20 nucleotit.

Khi được sử dụng ở đây, thuật ngữ "sinh vật" hoặc "cơ thể sống" bao gồm động vật, thực vật, nấm, vi khuẩn và các loại tương tự.

Khi được sử dụng ở đây, thuật ngữ "tế bào chủ" bao gồm tế bào thực vật, tế bào động vật, tế bào nấm, tế bào vi khuẩn và các loại tương tự.

Trong sáng chế này, "động vật" bao gồm nhưng không giới hạn ở động vật có xương sống, chẳng hạn như con người, động vật có vú không phải người, chim, cá, bò sát, lưỡng cư, v.v., cũng như động vật không xương sống, chẳng hạn như côn trùng.

Trong sáng chế này, "thực vật" nên được hiểu là bất kỳ sinh vật đa bào phân biệt nào có khả năng thực hiện quang hợp, cụ thể là các cây một lá mầm hoặc cây hai lá mầm, ví dụ, (1) cây lương thực: *Oryza* spp., như *Oryza sativa*, *Oryza latifolia*, *Oryza sativa*, *Oryza glaberrima*; *Triticum* spp., như *Triticum aestivum*, *T. Turgidum*ssp. *durum*; *Hordeum* spp., như *Hordeum vulgare*, *Hordeum arizonicum*; *Secale cereale*; *Avena* spp., như *Avena sativa*, *Avena fatua*, *Avena byzantine*, *Avena fatua* var. *sativa*, *Avena hybrida*; *Echinochloa* spp., như *Pennisetum glaucum*, *Sorghum*, *Sorghum bicolor*, *Sorghum vulgare*, *Triticale*, *Zea mays* hoặc ngô, kê, gạo, kê Foxtail, kê Proso, *Sorghum bicolor*, *Panicum*, *Fagopyrum* spp., *Panicum miliaceum*, *Setaria italica*, *Zizania palustris*, *Eragrostis tef*, *Panicum miliaceum*, *Eleusine coracana*; (2) cây họ đậu:

Glycine spp. như *Glycine max*, *Soja hispida*, *Soja max*, *Vicia* spp., *Vigna* spp., *Pisum* spp., đậu ruộng, *Lupinus* spp., *Vicia*, *Tamarindus indica*, *Lens culinaris*, *Lathyrus* spp., Lablab, đậu tằm, đậu xanh, đậu đỏ, đậu; (3) cây lấy dầu: *Arachis hypogaea*, *Arachis* spp., *Sesamum* spp., *Helianthus* spp. như *Helianthus annuus*, *Elaeis* như *Elaeis guineensis*, *Elaeis oleifera*, đậu tương, *Brassicinapus*, *Brassica oleracea*, *Sesamum orientale*, *Brassica juncea*, Oilseed rape, *Camellia oleifera*, cây cọ dầu, ô liu, thầu dầu, *Brassica napus* L., canola; (4) cây lấy sợi: *Agave sisalana*, *Gossypium* spp. như *Gossypium*, *Gossypium barbadense*, *Gossypium hirsutum*, *Hibiscus cannabinus*, *Agave sisalana*, *Musa textilis* Nee, *Linum usitatissimum*, *Corchorus capsularis* L, *Boehmeria nivea* (L.), *Cannabis sativa*, *Cannabis sativa*; (5) cây ăn quả: *Ziziphus* spp., *Cucumis* spp., *Passiflora edulis*, *Vitis* spp., *Vaccinium* spp., *Pyrus communis*, *Prunus* spp., *Psidium* spp., *Punica granatum*, *Malus* spp., *Citrullus lanatus*, *Citrus* spp., *Ficus carica*, *Fortunella* spp., *Fragaria* spp., *Crataegus* spp., *Diospyros* spp., *Eugenia uniflora*, *Eriobotrya japonica*, *Dimocarpus longan*, *Carica papaya*, *Cocos* spp., *Averrhoa carambola*, *Actinidia* spp., *Prunus amygdalus*, *Musa* spp. (*musa acuminata*), *Persea* spp. (*Persea Americana*), *Psidium guajava*, *Mammea Americana*, *Mangifera indica*, *Canarium album* (*Olea europaea*), *Caricapapaya*, *Cocos nucifera*, *Malpighia emarginata*, *Manilkara zapota*, *Ananas comosus*, *Annona* spp., *Citrus reticulata* (*Citrus* spp.), *Artocarpus* spp., *Litchi chinensis*, *Ribes* spp., *Rubus* spp., lê, đào, mơ, mận, dâu tây đỏ, chanh, quýt, sầu riêng, cam, dâu, việt quýt, dưa hami, cây xạ hương, cây chà là, cây óc chó, cây anh đào; (6) cây thân rễ: *Manihot* spp., *Ipomoea batatas*, *Colocasia esculenta*, củ cải, *Allium cepa* (hành), hoa huệ *eleocharis* (hạt dẻ nước), *Cyperus rotundus*, *Rhizoma dioscoreae*; (7) cây rau: *Spinacia* spp., *Phaseolus* spp., *Lactuca sativa*, *Momordica* spp, *Petroselinum crispum*, *Capsicum* spp., *Solanum* spp. (chẳng hạn *Solanum tuberosum*, *Solanum integrifolium*, *Solanum lycopersicum*), *Lycopersicon* spp. (chẳng hạn *Lycopersicon esculentum*, *Lycopersicon lycopersicum*, *Lycopersicon pyriforme*), *Macrotyloma* spp., Kale, *Luffa acutangula*, đậu lăng, đậu bắp, hành tây, khoai tây, atisô, măng tây, bông cải xanh, cải Brussels, bắp cải, cà rốt, súp lơ trắng, cần tây, cải xanh, bí, *Benincasa hispida*, *Asparagus officinalis*, *Apium graveolens*, *Amaranthus* spp., *Allium* spp., *Abelmoschus* spp., *Cichorium endivia*, *Cucurbita* spp., *Coriandrum sativum*, *B.carinata*, *Rapbanus sativus*, *Brassica* spp. (chẳng hạn *Brassica*

napus, *Brassica rapa* ssp., Canola, hạt cải dầu, cải củ, cải củ, cải lá, bắp cải, mù tạt đen, canola (hạt cải dầu), cải Brussels, Solanaceae (cà tím), *Capsicum annuum* (ớt ngọt), dưa chuột, luffa, Cải thảo, cải dầu, cải bắp, cải thìa, lá hẹ, ngó sen, củ sen, xà lách; (8) cây hoa: *Tropaeolum minus*, *Tropaeolum majus*, *Canna indica*, *Opuntia* spp., *Tagetes* spp., *Cymbidium* (orchid), *Crinum asiaticum* L., *Clivia*, *Hippeastrum rutilum*, *Rosa rugosa*, *Rosa Chinensis*, *Jasminum sambac*, *Tulipa gesneriana* L., *Cerasus* sp., *Pharbitis nil* (L.) Choisy, *Calendula officinalis* L., *Nelumbo* sp., *Bellis perennis* L., *Dianthus caryophyllus*, *Petunia hybrida*, *Tulipa gesneriana* L., *Lilium brownie*, *Prunus mume*, *Narcissus tazetta* L., *Jasminum nudiflorum* Lindl., *Primula malacoides*, *Daphne odora*, *Camellia japonica*, *Michelia alba*, *Magnolia liliiflora*, *Viburnum macrocephalum*, *Clivia miniata*, *Malus spectabilis*, *Paeonia suffruticosa*, *Paeonia lactiflora*, *Syzygium aromaticum*, *Rhododendron simsii*, *Rhododendron hybridum*, *Michelia figo* (Lour.) Spreng., *Cercis chinensis*, *Kerria japonica*, *Weigela florida*, *Fructus forsythiae*, *Jasminum mesnyi*, *Parochetus communis*, *Cyclamen persicum* Mill., *Phalaenopsis hybrid*, *Dendrobium nobile*, *Hyacinthus orientalis*, *Iris tectorum* Maxim, *Zantedeschia aethiopica*, *Calendula officinalis*, *Hippeastrum rutilum*, *Begonia semperflorenshybr*, *Fuchsia hybrida*, *Begonia maculata* Raddi, *Geranium*, *Epipremnum aureum*; (9) cây thuốc: *Carthamus tinctorius*, *Mentha* spp., *Rheum rhabarbarum*, *Crocus sativus*, *Lycium chinense*, *Polygonatum odoratum*, *Polygonatum Kingianum*, *Anemarrhena asphodeloides* Bunge, *Radix ophiopogonis*, *Fritillaria cirrhosa*, *Curcuma aromatica*, *Amomum villosum* Lour., *Polygonum multiflorum*, *Rheum officinale*, *Glycyrrhiza uralensis* Fisch, *Astragalus membranaceus*, *Panax ginseng*, *Panax notoginseng*, *Acanthopanax gracilistylus*, *Angelica sinensis*, *Ligusticum wallichii*, *Bupleurum sinenses* DC., *Datura stramonium* Linn., *Datura metel* L., *Mentha haplocalyx*, *Leonurus sibiricus* L., *Agastache rugosus*, *Scutellaria baicalensis*, *Prunella vulgaris* L., *Pyrethrum carneum*, *Ginkgo biloba* L., *Cinchona ledgeriana*, *Hevea brasiliensis* (hoang dại), *Medicago sativa* Linn, *Piper Nigrum* L., *Radix Isatidis*, *Atractylodes macrocephala* Koidz; (10) cây nguyên liệu: *Hevea brasiliensis*, *Ricinus communis*, *Vernicia fordii*, *Morus alba* L., Hops *Humulus lupulus*, *Betula*, *Alnus cremastogyne* Burk., *Rhus verniciflua* stokes; (11) cây trồng đồng cỏ: *Agropyron* spp., *Trifolium* spp., *Miscanthus sinensis*, *Pennisetum* sp., *Phalaris arundinacea*, *Panicum virgatum*, prairiegrasses,

Indiangrass, Big bluestem grass, *Phleum pratense*, turf, cyperaceae (*Kobresia pygmaea*, *Carex pediformis*, *Carex humilis*), *Medicago sativa* Linn, *Phleum pratense* L., *Medicago sativa*, *Melilotus suaveolens*, *Astragalus sinicus*, *Crotalaria juncea*, *Sesbania cannabina*, *Azolla imbricata*, *Eichhornia crassipes*, *Amorpha fruticosa*, *Lupinus micranthus*, *Trifolium*, *Astragalus adsurgens* pall, *Pistia stratiotes* linn, *AlteARNnthera philoxeroides*, *Lolium*; (12) cây lấy đường: *Saccharum* spp., *Beta vulgaris*; (13) cây lấy nước: *Camellia sinensis*, *Camellia Sinensis*, tea, Coffee (*Coffea* spp.), *Theobroma cacao*, *Humulus lupulus* Linn.; (14) cây cỏ: *Ammophila arenaria*, *Poa* spp. (*Poa pratensis* (bluegrass)), *Agrostis* spp. (*Agrostis matsumurae*, *Agrostis palustris*), *Lolium* spp. (*Lolium*), *Festuca* spp. (*Festuca ovina* L.), *Zoysia* spp. (*Zoysiajaponica*), *Cynodon* spp. (*Cynodon dactylon*/bermudagrass) , *Stenotaphrum secunda tum* (*Stenotaphrum secundatum*), *Paspalum* spp., *Eremochloa ophiuroides* (centipedegrass), *Axonopus* spp. (carpetweed), *Bouteloua dactyloides* (buffalograss), *Bouteloua* var. spp. (*Bouteloua gracilis*), *Digitaria sanguinalis*, *Cyperusrotundus*, *Kyllingabrevifolia*, *Cyperusamuricus*, *Erigeron canadensis*, *Hydrocotylesibthorpioides*, *Kummerowiastrata*, *Euphorbia humifusa*, *Viola arvensis*, *Carex rigescens*, *Carex heterostachya*, turf; (15) cây trồng: *Pinus* spp., *Salix* spp., *Acer* spp., *Hibiscus* spp., *Eucalyptus* spp., *Ginkgo biloba*, *Bambusa* sp., *Populus* spp., *Prosopis* spp., *Quercus* spp., *Phoenix* spp., *Fagus* spp., *Ceiba pentandra*, *Cinnamomum* spp., *Corchorus* spp., *Phragmites australis*, *Physalis* spp., *Desmodium* spp., *Populus*, *Hedera helix*, *Populus tomentosa* Carr, *Viburnum odoratissimum*, *Ginkgo biloba* L., *Quercus*, *Ailanthus altissima*, *Schima superba*, *Ilex pur-purea*, *Platanus acerifolia*, *ligustrum lucidum*, *Buxus megistophylla* Levl., Dahurian larch, *Acacia mearnsii*, *Pinus massoniana*, *Pinus khasys*, *Pinus yunnanensis*, *Pinus finlaysoniana*, *Pinus tabuliformis*, *Pinus koraiensis*, *Juglans nigra*, *Citrus limon*, *Platanus acerifolia*, *Syzygium jambos*, *Davidia involucre*, *Bombax malabarica* L., *Ceiba pentandra* (L.), *Bauhinia blakeana*, *Albizia saman*, *Albizia julibrissin*, *Erythrina corallodendron*, *Erythrina indica*, *Magnolia gradiflora*, *Cycas revolute*, *Lagerstroemia indica*, coniferous, macrophanerophytes, Frutex; (16) cây lấy hạt: *Bertholletia excelsea*, *Castanea* spp., *Corylus* spp., *Carya* spp., *Juglans* spp., *Pistacia vera*, *Anacardium occidentale*, *Macadamia* (*Macadamia integrifolia*), *Carya illinoensis* Koch, *Macadamia*, *Pistachio*, *Badam*, other plants that produce nuts; (17) các loại cây khác: *arabidopsis*

thaliana, Bra chiaria eruciformis, Cenchrus echinatus, Setaria faberi, eleusine indica, Cadaba farinose, algae, Carex elata, oARNmental plants, Carissa macrocarpa, Cynara spp., Daucus carota, Dioscorea spp., Erianthus sp., Festuca arundinacea, Hemerocallis fulva, Lotus spp., Luzula sylvatica, Medicago sativa, Melilotus spp., Morus nigra, Nicotiana spp., Olea spp., Ornithopus spp., Pastinaca sativa, Sambucus spp., Sinapis sp., Syzygium spp., Tripsacum dactyloides, Triticosecale rimpau, Viola odorata, và các loại cây tương tự.

Theo một phương án cụ thể, thực vật được chọn từ gạo, ngô, lúa mì, đậu tương, hướng dương, cao lương, cải dầu, cỏ linh lăng, bông, lúa mạch, kê, mía, cà chua, thuốc lá, sắn, khoai tây, khoai lang, cải thảo, bắp cải, dưa chuột, hoa hồng Trung Quốc, Scindapsus aureus, dưa hấu, dưa, dâu tây, việt quất, nho, táo, cam quýt, đào, lê, chuối, v.v..

Khi được sử dụng ở đây, thuật ngữ "thực vật" bao gồm toàn bộ thực vật và thể hệ con cháu, tế bào, mô hoặc bộ phận bất kỳ của thực vật. Thuật ngữ "bộ phận thực vật" bao gồm bất kỳ bộ phận nào của thực vật, bao gồm, ví dụ, nhưng không giới hạn ở: hạt (bao gồm hạt trưởng thành, phôi chưa trưởng thành không có vỏ hạt và hạt chưa trưởng thành); cành giâm; tế bào thực vật; nuôi cấy tế bào thực vật; cơ quan thực vật (ví dụ: phần hoa, phôi, hoa, quả, chồi, lá, rễ, thân và các mô cây bên ngoài liên quan). Mô thực vật hoặc cơ quan thực vật có thể là hạt, mô sẹo, hoặc bất kỳ quần thể tế bào thực vật nào khác được tổ chức thành một đơn vị cấu trúc hoặc chức năng. Tế bào thực vật hoặc nuôi cấy mô có thể tái sinh một cây có các đặc điểm sinh lý và hình thái của cây mà tế bào hoặc mô đó được tạo ra, và có thể tái sinh một cây có kiểu gen về cơ bản giống với cây đó. Ngược lại, một số tế bào thực vật không thể tái sinh thực vật. Tế bào có thể tái sinh trong tế bào thực vật hoặc tế bào nuôi cấy mô có thể là phôi, nguyên bào, tế bào mô phân sinh, mô sẹo, phần hoa, lá, bao phấn, rễ, ngọn rễ, tơ, hoa, nhân, gai, lõi, vỏ, hoặc thân..

Các bộ phận của cây bao gồm các bộ phận có thể thu hoạch và các bộ phận có thể được sử dụng để nhân giống cây con. Các bộ phận của cây có thể được sử dụng để nhân giống, chẳng hạn, bao gồm, nhưng không giới hạn ở: hạt; quả; cành giâm; cây con; củ; và gốc ghép. Các bộ phận có thể thu hoạch của thực vật có thể là bất kỳ bộ phận hữu



ích nào của thực vật, bao gồm, ví dụ, nhưng không giới hạn ở: hoa; phần hoa; cây con; củ; lá; thân cây; quả; hạt giống; và rễ.

Tế bào thực vật là đơn vị cấu tạo và sinh lý của thực vật. Khi được sử dụng ở đây, tế bào thực vật bao gồm nguyên bào và nguyên bào có thành tế bào một phần. Tế bào thực vật có thể ở dạng tế bào đơn lẻ cô lập hoặc tập hợp tế bào (ví dụ, mô sẹo rời và tế bào nuôi cấy), và có thể là một phần của các đơn vị mô bậc cao (ví dụ, mô thực vật, cơ quan thực vật và thực vật). Do đó, tế bào thực vật có thể là nguyên bào, tế bào sinh giao tử, tế bào hoặc tập hợp các tế bào có khả năng tái sinh toàn bộ cây. Do đó, theo các phương án ở đây, hạt chứa nhiều tế bào thực vật và có khả năng tái sinh thành toàn bộ cây được coi là "bộ phận thực vật".

Khi được sử dụng ở đây, thuật ngữ "tế bào nguyên sinh" dùng để chỉ tế bào thực vật có thành tế bào bị loại bỏ hoàn toàn hoặc một phần và có màng kép lipit lộ ra. Thông thường, tế bào nguyên sinh là một tế bào thực vật biệt lập không có thành tế bào, có khả năng tái tạo tế bào nuôi cấy hoặc toàn bộ cây.

Cây "con" bao gồm bất kỳ thế hệ tiếp theo nào của cây.

Thuật ngữ "vi khuẩn" có nghĩa là tất cả các sinh vật nhân sơ, bao gồm tất cả các sinh vật trong Kingdom Procaryotae. Thuật ngữ "vi khuẩn" bao gồm tất cả các vi sinh vật được coi là vi khuẩn, bao gồm Mycoplasma, Chlamydia, Actinomyces, Streptomyces, và Rickettsia. Tất cả các dạng vi khuẩn được bao gồm trong định nghĩa này, bao gồm cầu khuẩn, trực khuẩn, xoắn khuẩn, tế bào hình cầu, tế bào nguyên sinh, v.v. Thuật ngữ này cũng bao gồm các sinh vật nhân sơ Gram âm hoặc Gram dương. "Gram âm" và "Gram dương" có nghĩa là một mẫu nhuộm sử dụng các phương pháp nhuộm Gram nổi tiếng trong lĩnh vực này (xem, ví dụ, Finegold và Martin, Diagnostic Microbiology, 6th Ed., CV Mosby St. Louis, pp. 13 -15[1982]). "Vi khuẩn Gram dương" là vi khuẩn có thể giữ lại chất màu ban đầu dùng để nhuộm Gram, làm cho các tế bào bị nhuộm có màu xanh đậm đến tím dưới kính hiển vi. "Vi khuẩn Gram âm" không giữ lại màu ban đầu dùng để nhuộm Gram, nhưng có thể được nhuộm bằng phản chất nhuộm. Do đó, vi khuẩn Gram âm có màu đỏ sau phản ứng nhuộm Gram.

Khi được sử dụng ở đây, thuật ngữ "nấm" dùng để chỉ các sinh vật nhân chuỗi như

nấm mốc và nấm men, bao gồm cả nấm lưỡng hình.

Thuật ngữ "khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ" và "khả năng kháng thuốc diệt cỏ" có thể được sử dụng thay thế cho nhau và cả hai đều đề cập đến khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ và kháng thuốc diệt cỏ. "Cải thiện khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ" và "cải thiện khả năng kháng thuốc diệt cỏ" có nghĩa là khả năng chống chịu hoặc kháng thuốc diệt cỏ được cải thiện so với cây có chứa gen kiểu hoang dã.

Thuật ngữ "kiểu hoang dã" dùng để chỉ phân tử axit nucleic hoặc protein có thể được tìm thấy trong tự nhiên.

Trong sáng chế này, thuật ngữ "vị trí trồng trọt" bao gồm vị trí trồng cây theo sáng chế, chẳng hạn như đất, và cũng bao gồm, ví dụ, hạt giống cây trồng, cây con và cây trồng phát triển. Thuật ngữ "lượng hiệu quả kiểm soát cỏ dại" dùng để chỉ một lượng thuốc diệt cỏ đủ để ảnh hưởng đến sự sinh trưởng hoặc phát triển của cỏ mục tiêu, ví dụ, để ngăn chặn hoặc ức chế sự sinh trưởng hoặc phát triển của cỏ dại mục tiêu, hoặc để tiêu diệt cỏ dại. Thuận lợi là, lượng hiệu quả kiểm soát cỏ dại không ảnh hưởng đáng kể đến sự sinh trưởng và/hoặc phát triển của hạt giống cây trồng, cây con hoặc cây trồng theo sáng chế. Những người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể xác định số lượng hiệu quả trong việc kiểm soát cỏ dại như vậy thông qua các thí nghiệm thông thường.

Thuật ngữ "ADN mục tiêu" khi được sử dụng ở đây dùng để chỉ polynucleotit ADN bao gồm "vị trí mục tiêu" hoặc "trình tự mục tiêu".

Thuật ngữ "ly giải" có nghĩa là sự phân cắt của xương sống cộng hóa trị của một phân tử ADN. Quá trình ly giải có thể được bắt đầu bằng nhiều phương pháp, bao gồm nhưng không giới hạn ở quá trình thủy phân bằng enzym hoặc thủy phân hóa học của các liên kết phosphodiester. Có thể có cả ly giải sợi đơn và sợi kép, và ly giải sợi kép có thể xảy ra do hai sự kiện ly giải sợi đơn riêng biệt. Quá trình ly giải ADN có thể dẫn đến các đầu bị cùn hoặc so le. Theo một số phương án, phức hợp bao gồm ARN nhắm mục tiêu ADN và polypeptit sửa đổi vị trí cụ thể được sử dụng cho quá trình ly giải ADN sợi kép được nhắm mục tiêu.

Thuật ngữ "gen" bao gồm một đoạn axit nucleic biểu hiện một phân tử chức năng

(chẳng hạn, nhưng không giới hạn ở protein cụ thể), bao gồm các trình tự điều hòa trước (trình tự không mã hóa 5') và sau (trình tự không mã hóa 3') trình tự mã hóa.

Trình tự ADN "mã hóa" một ARN cụ thể là trình tự axit nucleic ADN có thể được phiên mã thành ARN. Các polynucleotit ADN có thể mã hóa một ARN (mARN) có thể được dịch mã thành một protein, hoặc các polynucleotit ADN có thể mã hóa một ARN không thể dịch mã thành protein (ví dụ: tARN, rARN hoặc ARN nhắm mục tiêu ADN; cũng là được gọi là ARN "không mã hóa" hoặc "ncARN").

Các thuật ngữ "polypeptit", "peptit" và "protein" được sử dụng thay thế cho nhau trong sáng chế và dùng để chỉ polyme của các gốc axit amin. Các thuật ngữ được áp dụng cho các polyme axit amin trong đó một hoặc nhiều gốc axit amin là các chất tương tự hóa học nhân tạo của các axit amin tương ứng và có trong tự nhiên, cũng như các polyme axit amin có trong tự nhiên. Các thuật ngữ "polypeptit", "peptit", "trình tự axit amin" và "protein" cũng có thể bao gồm các dạng sửa đổi của chúng, bao gồm nhưng không giới hạn ở quá trình glycosyl hóa, liên kết lipid, sulfat hóa,  $\gamma$ -carboxyl hóa dư lượng axit glutamic, hydroxyl hóa và ADP-ribosyl hóa.

Thuật ngữ "đoạn có hoạt tính sinh học" dùng để chỉ đoạn có một hoặc nhiều gốc axit amin bị xóa khỏi đầu tận cùng N và/hoặc C của protein trong khi vẫn duy trì hoạt động chức năng của nó.

Đối với các thuật ngữ liên quan đến thay thế axit amin được sử dụng trong phần mô tả, chữ cái đầu tiên đại diện cho một axit amin xuất hiện tự nhiên ở một vị trí nhất định trong một trình tự cụ thể, số sau đại diện cho vị trí trong trình tự tương ứng và chữ cái thứ hai đại diện cho một amin khác axit để thay thế axit amin có trong tự nhiên. Ví dụ, W574L có nghĩa là tryptophan ở vị trí 574 được thay thế bởi leucin. Đối với đột biến kép hoặc đột biến đa bội, mỗi đột biến được phân tách bằng dấu "/".

Thuật ngữ "polynucleotit" và "axit nucleic" được sử dụng thay thế cho nhau và bao gồm ADN, ARN hoặc các tế bào lai của chúng, có thể là chuỗi kép hoặc chuỗi đơn.

Các thuật ngữ "trình tự nucleotit" và "trình tự axit nucleic" đều đề cập đến trình tự các bazơ trong ADN hoặc ARN.

Khi được sử dụng trong sáng chế này, "cassette biểu hiện", "vector biểu hiện" và

"cấu trúc biểu hiện" đề cập đến một vector chẳng hạn như vector tái tổ hợp thích hợp để biểu hiện trình tự nucleotit quan tâm ở cây trồng. Thuật ngữ "biểu hiện" đề cập đến việc sản xuất một sản phẩm chức năng. Ví dụ, sự biểu hiện của trình tự nucleotit có thể đề cập đến sự phiên mã của trình tự nucleotit (chẳng hạn như phiên mã để tạo ra mARN hoặc ARN chức năng) và/hoặc quá trình dịch mã ARN thành một protein tiền thân hoặc trưởng thành.

"Cấu trúc biểu hiện" theo sáng chế có thể là đoạn axit nucleic mạch thẳng, plasmid hình tròn, vector virus, hoặc, theo một số phương án, có thể là ARN (chẳng hạn như mARN) có thể được dịch mã.

"Cấu trúc biểu hiện" của sáng chế có thể bao gồm trình tự điều hòa và trình tự nucleotit quan tâm từ các nguồn khác nhau, hoặc trình tự điều hòa và trình tự nucleotit quan tâm từ cùng một nguồn nhưng được sắp xếp theo cách khác với trình tự thường xảy ra trong tự nhiên.

Thuật ngữ "vector biểu hiện tái tổ hợp" hoặc "cấu trúc ADN" được sử dụng thay thế cho nhau ở đây và dùng để chỉ phân tử ADN bao gồm vector và ít nhất một đoạn chèn. Các vector biểu hiện tái tổ hợp thường được tạo ra với mục đích biểu hiện và/hoặc nhân giống đoạn chèn hoặc để xây dựng các trình tự nucleotit tái tổ hợp khác. Đoạn chèn có thể được liên kết chức năng hoặc có thể được liên kết không chức năng với trình tự khởi đầu và có thể liên kết chức năng hoặc có thể liên kết không chức năng với trình tự điều hòa ADN.

Thuật ngữ "trình tự điều hòa" và "yếu tố điều hòa" có thể được sử dụng thay thế cho nhau và đề cập đến trình tự nucleotit nằm ở phía trên (trình tự không mã hóa 5'), ở giữa hoặc ở phía dưới (trình tự không mã hóa 3') của trình tự mã hóa, và ảnh hưởng đến quá trình phiên mã, xử lý ARN, sự ổn định hoặc dịch mã của một trình tự mã hóa liên quan. Các yếu tố điều hòa biểu hiện thực vật đề cập đến trình tự nucleotit có thể kiểm soát quá trình phiên mã, xử lý ARN hoặc ổn định hoặc dịch mã của trình tự nucleotit quan tâm ở thực vật.

Các trình tự điều hòa có thể bao gồm, nhưng không giới hạn ở, trình tự khởi động, trình tự dẫn đầu dịch mã, intron và trình tự nhận dạng polyA.

Thuật ngữ "trình tự khởi đầu" dùng để chỉ một đoạn axit nucleic có khả năng kiểm soát quá trình phiên mã của một đoạn axit nucleic khác. Theo một số phương án của sáng chế, trình tự khởi đầu là trình tự khởi đầu có khả năng kiểm soát quá trình phiên mã gen trong tế bào thực vật, bất kể nó có nguồn gốc từ tế bào thực vật hay không. Trình tự khởi đầu có thể là trình tự khởi đầu cấu tạo hoặc trình tự khởi đầu mô cụ thể hoặc trình tự khởi đầu được điều chỉnh phát triển hoặc trình tự khởi đầu cảm ứng.

Thuật ngữ "trình tự khởi đầu cấu tạo" dùng để chỉ trình tự khởi đầu thường gây ra biểu hiện gen ở hầu hết các loại tế bào trong hầu hết các trường hợp. "Trình tự khởi đầu dành riêng cho mô" và "trình tự khởi đầu ưu tiên cho mô" được sử dụng thay thế cho nhau và đề cập đến trình tự khởi đầu chủ yếu nhưng không nhất thiết được biểu hiện độc quyền trong mô hoặc cơ quan, và cũng được biểu hiện trong một tế bào hoặc loại tế bào cụ thể. "Trình tự khởi đầu được điều chỉnh phát triển" dùng để chỉ một trình tự khởi đầu có hoạt động được xác định bởi một sự kiện phát triển. "Trình tự khởi đầu cảm ứng" phản ứng với kích thích nội sinh hoặc ngoại sinh (môi trường, hormon, tín hiệu hóa học, v.v.) để biểu hiện một cách chọn lọc trình tự ADN liên kết chức năng.

Khi được sử dụng ở đây, thuật ngữ "được liên kết chức năng" dùng để chỉ kết nối của yếu tố điều hòa (ví dụ, nhưng không giới hạn ở, trình tự khởi động, trình tự kết thúc phiên mã, v.v.) với trình tự axit nucleic (ví dụ, trình tự mã hóa hoặc mở khung đọc) sao cho quá trình phiên mã của trình tự nucleotit được kiểm soát và điều hòa bởi yếu tố điều hòa phiên mã. Các kỹ thuật để liên kết chức năng vùng yếu tố điều hòa với phân tử axit nucleic đã được biết đến trong lĩnh vực này.

Việc "đưa" phân tử axit nucleic (chẳng hạn như plasmid, đoạn axit nucleic mạch thẳng, ARN, v.v.) hoặc protein vào thực vật đề cập đến việc biến đổi tế bào của thực vật bằng axit nucleic hoặc protein để axit nucleic hoặc protein có thể hoạt động trong tế bào thực vật. Thuật ngữ "biến nạp" được sử dụng trong sáng chế bao gồm biến nạp ổn định và biến nạp tạm thời.

Thuật ngữ "biến nạp ổn định" đề cập đến việc đưa trình tự nucleotit ngoại sinh vào hệ gen thực vật dẫn đến sự kế thừa ổn định của gen ngoại sinh. Sau khi được biến nạp ổn định, trình tự axit nucleic ngoại sinh được tích hợp ổn định vào bộ gen của thực vật và bất kỳ thế hệ kế tiếp nào của chúng.

Thuật ngữ "biến nạp tạm thời" dùng để chỉ việc đưa phân tử axit nucleic hoặc protein vào tế bào thực vật để thực hiện chức năng không dẫn đến sự di truyền ổn định của gen ngoại lai. Trong quá trình biến nạp tạm thời, trình tự axit nucleic ngoại sinh không được tích hợp vào bộ gen của thực vật.

Trừ khi được định nghĩa khác, tất cả các thuật ngữ khoa học và kỹ thuật được sử dụng ở đây có cùng ý nghĩa như thường được hiểu bởi các thuật ngữ thông thường trong lĩnh vực kỹ thuật mà sáng chế đề cập đến. Mặc dù bất kỳ phương pháp và vật liệu nào tương tự hoặc tương đương với những phương pháp được mô tả ở đây cũng có thể được sử dụng trong thực hành hoặc thử nghiệm theo sáng chế, các phương pháp và vật liệu ưu tiên được mô tả ở đây.

Tất cả các ấn phẩm và bằng sáng chế được trích dẫn trong bản mô tả này được đưa vào đây bằng cách tham chiếu như thể mỗi ấn phẩm hoặc bằng sáng chế được chỉ định chính xác và riêng biệt để được đưa vào bằng cách tham chiếu, và được đưa vào đây bằng cách tham chiếu để bộc lộ và mô tả các phương pháp và/hoặc vật liệu liên quan đến các ấn phẩm được trích dẫn. Việc trích dẫn bất kỳ ấn phẩm nào mà nó đã được xuất bản trước ngày nộp đơn không được hiểu là sự thừa nhận rằng sáng chế không đủ điều kiện để xuất bản trước các xuất bản của sáng chế hiện có. Ngoài ra, ngày xuất bản được cung cấp có thể khác với ngày xuất bản thực tế, điều này có thể yêu cầu xác minh độc lập.

Trừ khi được nêu hoặc ngụ ý cụ thể, khi được sử dụng ở đây, các thuật ngữ "một", "một" và "cái" có nghĩa là "ít nhất một". Tất cả các bằng sáng chế, đơn đăng ký sáng chế và các ấn phẩm được đề cập hoặc trích dẫn ở đây đều được đưa vào đây bằng cách viện dẫn với tính toàn vẹn của chúng, với cùng một mức độ trích dẫn như thể chúng được trích dẫn riêng lẻ.

### **Mô tả vắn tắt các hình vẽ**

Fig. 1 thể hiện sơ đồ của phương pháp tạo ra các đột biến mới ở sinh vật theo sáng chế. Trong hình, chỉ Cas9 với NGG là PAM được lấy làm ví dụ; theo cách tương tự, các biến thể Cas9 khác với PAM khác nhau (chẳng hạn như NG) cũng có thể được sử dụng.

Fig. 2 thể hiện sơ đồ thiết kế gARN tại các vị trí gen ALS W574 và S653 của *Arabidopsis thaliana*.

Fig. 3 thể hiện các chủng kháng thuốc trừ cỏ *Arabidopsis thaliana* thế hệ T2 được biến nạp với hai vector cắt/chỉnh sửa tuần tự được lập trình khác nhau. pQY743 và pQY745 là các số vector. Các chủng kháng thuốc có khả năng ra rễ bình thường, nhưng chủng Col-0 kiểu hoang dã và các chủng không kháng thuốc thì không.

Fig. 4 thể hiện sơ đồ trình tự các đỉnh của gen ALS của chủng *Arabidopsis thaliana* thế hệ T2 kháng imazapic, trong đó chữ T được chỉ ra bởi mũi tên đã bị đột biến từ G, dẫn đến đột biến W574L.

Fig. 5 thể hiện thiết kế của sơ đồ cắt/chỉnh sửa tuần tự được lập trình tại vị trí W574 của gen ALS của *Arabidopsis thaliana*. Trình tự T-ADN biểu hiện bốn gen, sgARN1, sgARN2, Cas9 và HygR. Trong số đó, sgARN1 và Cas9 tạo thành một phức hợp, cắt codon W574 của ALS trong bộ gen, và dự kiến sẽ hình thành kiểu gen -G thông qua quá trình sửa chữa tự phát của tế bào. Trình tự mới này có thể được nhận biết và cắt bởi phức hợp được hình thành bởi sgARN2 và Cas9, và hình thành kiểu gen + T thông qua quá trình sửa chữa tự phát của tế bào, dẫn đến W574L.

Fig. 6 thể hiện các cây con kháng bệnh của *Arabidopsis thaliana* được sàng lọc bằng imazapic và kết quả giải trình tự của vị trí ALS W574.

Fig. 7 thể hiện thiết kế của sơ đồ cắt/chỉnh sửa tuần tự được lập trình tại vị trí S653 của gen ALS của *Arabidopsis thaliana*. Trình tự T-ADN biểu hiện bốn gen, sgARN1, sgARN2, Cas9 và HygR. Trong số đó, sgARN1 và Cas9 tạo thành một phức hợp cắt codon S653 của ALS trong bộ gen. Sau quá trình sửa chữa tự phát của tế bào, kiểu gen a -G được hình thành. Trình tự này có thể được nhận biết và cắt bởi phức hợp được tạo thành bởi sgARN2 và Cas9. Sau quá trình tự sửa chữa tế bào, kiểu gen a + A được hình thành, dẫn đến S653N.

Fig. 8 thể hiện các cây con kháng bệnh của *Arabidopsis thaliana* được sàng lọc bằng imazapic và kết quả giải trình tự của vị trí ALS S653. Bảng bên trái hiển thị kết quả sàng lọc cây giống kháng bệnh và tỷ lệ cây giống kháng bệnh, bảng bên phải hiển thị sơ đồ trình tự các đỉnh và kiểu đột biến của vị trí S653.

Fig. 9 thể hiện thiết kế của sơ đồ cắt/chỉnh sửa tuần tự được lập trình tại vị trí W574 của gen ALS của *Arabidopsis thaliana*. Trình tự T-ADN biểu hiện bốn gen, sgARN1, sgARN2, Cas9 và HygR. Trong số đó, sgARN1 và Cas9 tạo thành một phức hợp, chúng cắt codon W574 của ALS trong bộ gen. Sau quá trình sửa chữa tự phát của tế bào, kiểu gen + A được hình thành. Trình tự này có thể được nhận biết và cắt bởi phức hợp được tạo thành bởi sgARN2 và Cas9. Sau khi tự sửa chữa tế bào, kiểu gen -G được hình thành, dẫn đến W574M. Hai sự cắt sử dụng các vị trí PAM khác nhau.

Fig. 10 thể hiện thiết kế của sơ đồ cắt/chỉnh sửa tuần tự được lập trình tại vị trí W2038 của gen ACCase2 của *Oryza sativa*. Vị trí này tương ứng với vị trí W2027 của gen ACCase2 của *Alopecurus myosuroides*. Trình tự T-ADN biểu hiện bốn gen, sgARN1, sgARN2, Cas9 và HygR. Trong số đó, sgARN1 và Cas9 tạo thành một phức hợp cắt codon W2038 của ACCase trong bộ gen. Kiểu gen A -G được hình thành sau quá trình tự sửa chữa của tế bào. Trình tự này có thể được nhận biết và cắt bởi phức hợp được tạo thành bởi sgARN2 và Cas9. Sau khi tự sửa chữa tế bào, kiểu gen a + T được hình thành, dẫn đến W2038L.

Fig. 11 thể hiện mô sẹo kháng bệnh của *Oryza sativa* được đồng sàng lọc với hygromycin (50 ug/L) và quizalofop-p (50 ug/L) và kết quả giải trình tự của vị trí W2038.

Fig. 12 thể hiện sơ đồ điện di trên gel polyacrylamit của các protein SpCas9 và NGA-Cas9 được tạo ra bởi sự biểu hiện prokaryotic và được tinh sạch. Dải được chỉ định bằng mũi tên là dải protein Cas9.

Fig. 13 thể hiện hoạt động cắt in vitro của protein Cas9 tinh khiết trên các đoạn ADN chứa vị trí mục tiêu OsALS W548 và vị trí mục tiêu OsACCCase2 W2038, được phát hiện bằng điện di trên gel agarose, và có thể thấy rằng chỉ khi protein Cas9 và đoạn sgARN được thêm vào tại đồng thời, các đoạn ADN có thể được cắt theo kích thước mong đợi.

Fig. 14 thể hiện sơ đồ các đỉnh sắp xếp trình tự của vị trí mục tiêu OsALS W548 của tế bào nguyên sinh *Oryza sativa* đã biến nạp RNP, và vị trí này tương ứng với vị trí ALS W574 của *Arabidopsis thaliana*. Tại vị trí được chỉ ra bởi mũi tên, ngoài đỉnh tín



hiệu cơ sở G ban đầu, còn có một đỉnh tín hiệu cơ sở T thu được do đột biến, dẫn đến đột biến W548L.

Fig. 15 thể hiện mô sọ kháng của *Oryza sativa* được chỉnh sửa bởi RNP tại vị trí OsACCCase2 W2038 và được sàng lọc với 50ug/L quizalofop-p. Mũi tên chỉ ra mô sọ kháng.

Fig. 16 thể hiện sơ đồ trình tự các đỉnh của vị trí mục tiêu OsACCCase2 W2038 của cây con *Oryza sativa* được phân biệt với mô sọ kháng. T được chỉ ra bởi mũi tên đã bị đột biến từ G, dẫn đến đột biến W2038L.

Fig. 17 mô tả thử nghiệm khả năng kháng của cây con được chỉnh sửa OsACCCase2 W2038L thế hệ T1 với Haloxypop-p. Từ trái sang phải, cây con số 1 cho thấy kết quả của việc kiểm soát xử lý nước đối với loại cây đại Huaidao số 5 (một giống lúa), và cây con số 2 đến số 4 cho thấy kết quả của cây con Huaidao số 5 kiểu hoang dã và hai dòng biến đổi gen RNP thế hệ T1 W2038L được chỉnh sửa QY367-7-12 và QY367-7-18, tất cả đều được xử lý với 5 g/mu thành phần hoạt chất Haloxypop-p (mu, một đơn vị diện tích, 1 mu = 1/15 héc-ta). Rõ ràng là các chủng được chỉnh sửa đã phát triển khả năng kháng Haloxypop-p.

Fig. 18 mô tả thử nghiệm sức kháng của cây con được chỉnh sửa OsACCCase2 W2038L thế hệ T1 với quizalofop-p. Từ trái sang phải, cây con số 1 cho thấy kết quả của việc kiểm soát xử lý nước của Huaidao số 5 kiểu đại, và cây con số 2 đến 4 cho kết quả của Huaidao số 5 kiểu đại và hai chủng đã chỉnh sửa W2038L thế hệ T1 được biến nạp bằng súng bắn gen RNP QY367-5-10 và QY367-5-21, tất cả đều được xử lý với 5 g/mu hoạt chất quizalofop-p. Rõ ràng là các chủng đã được chỉnh sửa đã phát triển khả năng kháng với quizalofop-p.

Fig.19 cho thấy mô sọ kháng bệnh *Oryza sativa* được chỉnh sửa đồng thời bởi RNP tại vị trí OsACCCase2 W2038 và gen OsBADH2 và sàng lọc bằng quizalofop-p 50ug/L. Mũi tên chỉ mô sọ kháng.

Fig. 20 thể hiện sơ đồ trình tự các đỉnh của vị trí mục tiêu OsACCCase2 W2038 của cây con đã chỉnh sửa vị trí kép thế hệ T0. T được chỉ ra bởi mũi tên đã bị đột biến từ G, dẫn đến đột biến W2038L.

Fig. 21 thể hiện sơ đồ trình tự các đỉnh của vị trí mục tiêu OsBADH2 của cây con đã chỉnh sửa vị trí kép thể hệ T0. Đột biến đồng hợp tử +A xảy ra ở điểm chỉ ra bằng mũi tên.

Fig. 22 thể hiện mô sẹo kháng của *Oryza sativa* được RNP chỉnh sửa đồng thời tại vị trí OsALS W548 và gen OsSWEET14 và được sàng lọc với 5mg/L pyroxsulam. Mũi tên chỉ ra mô sẹo kháng.

Fig. 23 thể hiện sơ đồ trình tự các đỉnh của vị trí mục tiêu OsALS W548 của cây con đã chỉnh sửa vị trí kép thể hệ T0. Cả hai đỉnh tín hiệu bazơ G và bazơ T đều xuất hiện ở vị trí được chỉ ra bằng mũi tên, dẫn đến đột biến W548L.

Fig. 24 thể hiện sơ đồ trình tự các đỉnh của vị trí mục tiêu OsSWEET14 của cây con đã chỉnh sửa vị trí kép thể hệ T0. Đột biến đồng hợp tử -C xảy ra tại vị trí được chỉ ra bởi một mũi tên.

Fig. 25 mô tả thử nghiệm khả năng kháng của cây con được chỉnh sửa vị trí OsALS W548 và cây con được chỉnh sửa vị trí kép OsSWEET14 thể hệ T1 đối với nicosulfuron. Từ trái sang phải, cây con số 1 cho thấy kết quả của việc kiểm soát xử lý nước của Huaidao số 5 kiểu đại, và cây con số 2 đến 3 cho thấy kết quả của Huaidao số 5 kiểu đại và chủng đã chỉnh sửa W548L thể hệ T1 được biến nạp bằng súng bắn gen RNP QY360-7-11, cả hai đều được xử lý với 4 g/mu thành phần hoạt chất nicosulfuron. Rõ ràng là chủng đã được chỉnh sửa đã phát triển tính kháng với nicosulfuron.

Fig. 26 mô tả thử nghiệm khả năng kháng của cây con đã chỉnh sửa vị trí OsALS W548 và cây con đã chỉnh sửa vị trí kép OsSWEET14 thể hệ T1 đối với flucarbazone-Na. Từ trái sang phải, cây con số 1 cho thấy kết quả của việc kiểm soát xử lý nước của Huaidao số 5 kiểu đại, và cây con số 2 đến 3 cho thấy kết quả của Huaidao số 5 kiểu đại và chủng đã chỉnh sửa W548L thể hệ T1 được biến nạp bằng súng bắn gen RNP QY360-7-9, cả hai đều được xử lý bằng 2 g/mu thành phần hoạt chất flucarbazone-Na. Rõ ràng là chủng đã được chỉnh sửa đã phát triển khả năng kháng flucarbazone-Na.

Fig. 27 mô tả thử nghiệm khả năng kháng của cây con đã được chỉnh sửa vị trí OsALS W548 và cây con được chỉnh sửa vị trí kép OsSWEET14 thể hệ T1 đối với imazapic. Từ trái sang phải, cây con số 1 cho thấy kết quả của việc kiểm soát xử lý nước

của cây Huaidao số 5 kiểu dại và cây con số 2 đến 3 cho thấy kết quả của Huaidao số 5 kiểu dại và chúng đã chỉnh sửa W548L thế hệ T1 được biến nạp bằng súng bắn gen RNP QY360-7-11, cả hai đều được xử lý với 7 g/mu thành phần hoạt chất imazapic. Rõ ràng là chúng đã được chỉnh sửa đã phát triển khả năng kháng imazapic.

Fig. 28 mô tả thử nghiệm khả năng kháng của cây con đã được chỉnh sửa vị trí OsALS W548 và cây con được chỉnh sửa vị trí kép OsSWEET14 thế hệ T1 đối với pyroxsulam. Từ trái sang phải, cây con số 1 cho thấy kết quả của việc kiểm soát xử lý nước của cây Huaidao số 5 kiểu dại và cây con số 2 đến 4 cho thấy kết quả của Huaidao số 5 kiểu dại và chúng đã chỉnh sửa W548L thế hệ T1 được biến nạp bằng súng bắn gen RNP QY360-7-2 và QY360-7-11, cả hai đều được xử lý với 2 g/mu thành phần hoạt chất pyroxsulam. Rõ ràng là chúng đã được chỉnh sửa đã phát triển khả năng kháng pyroxsulam.

Fig. 29 mô tả sơ đồ cắt/chỉnh sửa theo trình tự được lập trình của gen HBB trong tế bào 293T. A. Thiết kế các vị trí gen HBB để cắt/chỉnh sửa theo trình tự được lập trình trong các tế bào 293T được hiển thị; B. Hiệu suất biến nạp theo trình tự cắt/chỉnh sửa gen HBB được lập trình trong tế bào 293T sau 48 giờ biến nạp của mỗi vector chỉnh sửa; C. Tỷ lệ kiểu chỉnh sửa gen được tạo ra từ việc cắt/chỉnh sửa theo trình tự có lập trình của gen HBB và cắt/chỉnh sửa vị trí đơn của gen HBB trong tế bào 293T; WT: kiểu dại, indel: kiểu gen xóa hoặc chèn, C-> T SNP: kiểu gen có sự thay thế bazơ C thành T khi cắt.

#### Mô tả danh mục trình tự

Các trình tự chính liên quan đến sáng chế được tóm tắt như sau, và các trình tự liên quan được cung cấp trong danh mục trình tự.

SEQ ID NO:	Mô tả trình tự
1	Trình tự axit amin của protein ALS từ <i>Arabidopsis thaliana</i>
2	Trình tự ADN của gen ALS từ <i>Arabidopsis thaliana</i>
3	Trình tự axit amin của protein AmACCCase từ <i>Alopecurus myosuroides</i>
4	Trình tự ADN của gen AmACCCase từ <i>Alopecurus myosuroides</i>

5	Trình tự axit amin của protein OsHPPD từ <i>Oryza sativa</i>
6	Trình tự ADN bộ gen của protein OsHPPD từ <i>Oryza sativa</i>
7	Trình tự axit amin của protein OsPPO1 từ <i>Oryza sativa</i>
8	Trình tự ADN bộ gen của protein OsPPO1 từ <i>Oryza sativa</i>
9	Trình tự axit amin của protein OsTIR1 từ <i>Oryza sativa</i>
10	Trình tự ADN bộ gen của protein OsTIR1 từ <i>Oryza sativa</i>
11	Trình tự axit amin của protein ALS từ <i>Oryza sativa</i>
12	Trình tự ADN của gen ALS từ <i>Oryza sativa</i>
13	Trình tự axit amin của protein ACCase2 từ <i>Oryza sativa</i>
14	Trình tự ADN bộ gen của ACCase2 từ <i>Oryza sativa</i>
15	Trình tự ADN của protein SpCas9 được tối ưu hóa bằng codon thực vật
16	Trình tự ADN của protein NGA-Cas9 được tối ưu hóa bằng codon thực vật
17	Trình tự ADN bộ gen của OsBADH2 từ <i>Oryza sativa</i>
18	Trình tự ADN bộ gen của OsSWEET14 từ <i>Oryza sativa</i>
19	Trình tự axit amin của protein StALS2 từ khoai tây ( <i>Solanum tuberosum L.</i> )
20	Trình tự ADN của gen StALS2 từ khoai tây ( <i>Solanum tuberosum L.</i> )
21	Trình tự ADN của gen HBB (hemoglobin subunit beta) trong tế bào thận phôi thai người 293T
22	Trình tự CDS của gen HBB trong tế bào thận phôi thai người 293T
23	Trình tự axit amin của gen HBB trong tế bào thận phôi thai người 293T

### Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế sẽ được giải thích thêm cùng với các ví dụ sau. Các ví dụ sau đây được minh họa bằng các ví dụ, nhưng phạm vi bảo hộ của sáng chế không bị giới hạn trong các ví dụ này. Các phương pháp thử nghiệm trong các ví dụ sau, trừ khi có quy định khác, là các phương pháp được mô tả trong sinh học phân tử, công nghệ nuôi cấy mô và sổ tay nông học thường được sử dụng. Ví dụ, các bước cụ thể có thể được tìm thấy

trong: "Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3rd edition)" (Sambrook, J., Russell, David W., 2001, Cold Spring Harbor), "Plant Propagation by Tissue Culture" (Edwin F. George, Michael A. Hall, Geert-Jan De Klerk, 2008, Springer). Các nguyên liệu, thuốc thử, dụng cụ, v.v. được sử dụng trong các ví dụ sau có thể được lấy từ các nguồn thương mại trừ khi có quy định khác.

Ví dụ 1: Thiết kế sự thay thế bazơ có thể dự đoán được đưa vào bằng cách cắt/chỉnh sửa tuần tự được lập trình cho các vị trí W574 và S653 của gen ALS của *Arabidopsis thaliana*

#### A. Các nguyên liệu thực nghiệm

##### 1. Nguyên liệu *Arabidopsis thaliana*

*Arabidopsis thaliana* Col-0 kiểu hoang dã là một mô hình của cây hai lá mầm, hạt giống ban đầu của nó được cung cấp bởi Khoa Cỏ dại, Trường Cao đẳng Bảo vệ Thực vật, Đại học Nông nghiệp Trung Quốc, và việc nhân giống và bảo quản chúng được thực hiện bởi phòng thí nghiệm của chúng tôi theo các phương pháp tiêu chuẩn trong lĩnh vực này.

##### 2. Vector

Các vector plasmid pCBC-dT1T2 (Xing HL, Dong L, Wang ZP, Zhang HY, Han CY, Liu B, Wang XC, Chen QJ 2014. A CRISPR/Cas9 toolkit for multiplex genome editing in plants. BMC Plant Biol. Nov 29;14(1):327, xem [https://www.addgene.org/50590/for\\_details](https://www.addgene.org/50590/for_details)), pHEE401E (xem Wang ZP, Xing HL, Dong L, Zhang HY, Han CY, Wang XC, Chen QJ Genome Biol. 2015 Jul 21; 16:144. doi: 10.1186/s13059-015-0715-0. [https://www.addgene.org/71287/for\\_specific\\_information](https://www.addgene.org/71287/for_specific_information)), và pHEE401E-NG (the mutation as reported in Nishimasu et al. 2018 Engineered CRISPR-Cas9 nucleaza with expanded Targeting space. Science 361(6408):1259-1262. doi: 10.1126/science.aas9129 was introduced into pHEE401E to construct vector pHEE401E-NG capable of recognizing NG PAM) được mua từ trang web Addgene hoặc do phòng thí nghiệm của chúng tôi xây dựng theo các phương pháp sinh học phân tử thông thường và được phòng thí nghiệm của chúng tôi lưu giữ.

##### 3. Thiết bị chính

Súng pipet, nồi cách thủy, thiết bị PCR (Bio-rad T100), thiết bị điện di (WIX-EP600), máy ảnh gel, máy sấy điện, máy ly tâm (Eppendorf 5424R), dụng cụ lọc mô thông lượng cao, máy lắc, cân điện tử, máy đo pH, v.v.

#### 4. Thuốc thử chính

Polymeraza ADN có độ trung thực cao (mua từ Tsingke Bio), bộ phục hồi gel agarose và bộ chiết plasmid (mua từ Sparkjade), ligase ADN BsaI và T4 (mua từ NEB), tế bào khả nạp Trans5 $\alpha$  và tế bào khả nạp EHA105 (mua từ TransGen Biotech, Bắc Kinh, Trung Quốc), tế bào khả nạp GV3101 *Agrobacterium* (mua từ Shanghai AngyuBio), Tris, EDTA, kanamycin, cephalosporin, hygromycin, agarosa, bột men, trypton, NaCl (mua từ Sangon Biotech), bột MS, sucroza, Silwet-77, hygromycin (mua từ Solarbio), thuốc nhuộm axit nucleic (Dured), etanol tuyệt đối (mua từ Sinopharm), v.v..

#### 5. Chuẩn bị các dung dịch chính

1) Chất khử trùng hạt giống: 4mL SDS 10%, 20mL NaClO, thêm nước để tạo thành 200mL.

2) Bộ đệm chiết SDS: 40mL Tris  $\cdot$ HCl (pH 8,0) 1M, 50mL EDTA 0,1M, 10mL NaCl 5M, 10mL SDS 10%, thêm nước để tạo thành 200mL.

3) Dung dịch truyền nhiễm: 1,5g sucroza, 9 $\mu$ L Silwet-77, thêm 30mL nước siêu tinh khiết.

4) Môi trường rắn LB: 5g bột men, 10g trypton, 10g NaCl, 15g agar, thêm nước để tạo thành 1L, khử trùng ở nhiệt độ 121°C trong 15 phút, đổ lên một cái đĩa để sử dụng sau này.

5) 50 $\times$  TAE stock: 242g Tris, 37,2g Na<sub>2</sub>EDTA $\cdot$ 2H<sub>2</sub>O, thêm 800mL nước siêu tinh khiết, khuấy đều cho tan, thêm 57,1mL axit axetic, khuấy đều, cuối cùng pha loãng thành 1L bằng nước khử ion, và bảo quản ở nhiệt độ phòng.

6) Môi trường rắn MS: cân 4,42g bột MS và 10g đường sucroza, thêm 800mL nước siêu tinh khiết, điều chỉnh đến pH 5,8, thêm nước để tạo thành 1L, thêm 10g phytigel, khử trùng ở 121°C trong 15 phút, và đổ trên một cái đĩa để sử dụng sau này.

## B. Phương pháp thử nghiệm

### 1. Thiết kế và xây dựng vectơ mục tiêu kép CRISPR/Cas9

#### 1.1 Thiết kế mục tiêu

Trình tự gen *Arabidopsis thaliana* ALS được thể hiện trong SEQ ID NO: 2. Trình tự mục tiêu gARN1 (5'-GCATGGTTATGCAATGGGA-3') của 19 bazơ được thiết kế bằng cách sử dụng AGA gần vị trí *Arabidopsis thaliana* ALS574 là PAM, người ta dự đoán rằng một bazơ G sẽ bị xóa giữa 3-4 vị trí đầu tiên của PAM sau khi chỉnh sửa, sau đó gARN2 trình tự mục tiêu thứ hai (5'-GGCATGGTTATGCAATGGA-3') được thiết kế dựa trên trình tự được tạo ra từ việc xóa, và người ta dự đoán rằng một bazơ T sẽ được chèn qua lần chỉnh sửa thứ hai, do đó thực hiện chuyển đổi TGG-TTG, như thể hiện trong Fig. 2.

Tương tự, trình tự mục tiêu gARN3 (5'-TGCCGATGATCCCGAGTGG-3') của 19 bazơ được thiết kế bằng cách sử dụng TGG gần vị trí *Arabidopsis thaliana* ALS653 làm PAM, người ta dự đoán rằng một bazơ G sẽ bị xóa giữa 3-4 vị trí đầu tiên của PAM sau khi chỉnh sửa, thì trình tự mục tiêu thứ hai gARN4 (5'-TTGCCGATGATCCCGATGG-3') được thiết kế dựa trên trình tự được tạo ra từ việc xóa, và người ta dự đoán rằng một bazơ A sẽ được chèn sau lần chỉnh sửa thứ hai, do đó thực hiện chuyển đổi AGT -AAT, như được thể hiện trong Fig. 2.

#### 1.2 Cấu trúc vectơ

Phương pháp được mô tả bởi Xing HL, Dong L, Wang ZP, Zhang HY, Han CY, Liu B, Wang XC, Chen QJ 2014. Bộ công cụ CRISPR/Cas9 để chỉnh sửa bộ gen ghép ở thực vật. *BMC Plant Biol.* Nov 29;14(1): 327 đã được theo dõi. Cụ thể, plasmid dT1T2 được sử dụng làm khuôn để khuếch đại đoạn mục tiêu kép vị trí ALS574 và 653 tương ứng để tạo cassette biểu hiện sgARN. Các xương sống vectơ của pHEE401E và pHEE401E-NG được phân hủy bằng BsaI, và các dải được cắt ra khỏi gel và phục hồi, và các đoạn mục tiêu được sử dụng trực tiếp cho phản ứng thắt sau khi phân hủy. T4 ADN ligase được sử dụng để thắt các xương sống vectơ và đoạn mục tiêu, các sản phẩm thắt được biến nạp thành các tế bào khả nạp Trans5 $\alpha$ , các monoclon khác nhau được chọn ra để giải trình tự. Sau khi xác nhận thông qua giải trình tự, Bộ tách chiết mini

Sparkjade High Purity Plasmid được sử dụng để chiết các plasmid nhằm thu được các plasmid tái tổ hợp, chúng được đặt tên tương ứng là pQY743 và pQY745.

## 2. Thiết kế các đoạn mồi để phát hiện mục tiêu

Mồi để phát hiện mục tiêu lấy các vị trí mục tiêu ALS574 và ALS653 làm trung tâm, trong đó mồi để phát hiện thượng lưu cách vị trí mục tiêu ALS574 khoảng 100bp, và mồi để phát hiện hạ lưu cách vị trí mục tiêu ALS653 khoảng 280bp. Trình tự mồi như sau:: 574/653checking-F: 5'ATTGACGGAGATGGAAGCTT3', và 574/653checking-R: 5'CCAAACTGAGCCAGTCACAA3'.

## 3. Thành lập hệ thống biến nạp gen *Arabidopsis thaliana*

### 3.1. Biến nạp *Agrobacterium*

Các plasmid tái tổ hợp đã xây dựng được biến nạp thành các tế bào khả nạp của *Agrobacterium* GV3101 để thu được các tế bào *Agrobacterium* tái tổ hợp.

### 3.2. Chuẩn bị dung dịch nhiễm vi khuẩn *Agrobacterium*

1) Vi khuẩn *Agrobacterium* đã hoạt hóa được chọn và cấy truyền vào 30ml môi trường lỏng YEP (chứa 25mg/L Rif và 50mg/L Kan), và được nuôi cấy trong điều kiện lắc với tốc độ 200 vòng/phút và 28°C qua đêm cho đến khi giá trị OD600 khoảng 1,0-1,5.

2) Sau khi ly tâm ở tốc độ 6000 vòng/phút trong 10 phút, vi khuẩn *Agrobacterium* được thu thập và phần nổi phía trên được loại bỏ.

3) *Agrobacterium* được tạo huyền phù lại trong dung dịch nhiễm trùng (không cần điều chỉnh pH) đến giá trị OD600 = 0,8 để sử dụng sau.

### 3.3. Biến nạp *Arabidopsis thaliana*

1) Trước khi biến nạp cây trồng cần chú ý xem cây có sinh trưởng tốt, cụm hoa xum xuê, không bị căng thẳng hay không. Lần biến nạp đầu tiên được thực hiện khi cây cao khoảng 20 cm. Tưới nước đúng cách khi đất khô. Các quả cải lớn lên đã bị cắt bằng kéo vào ngày trước khi biến nạp.

2) Chùm hoa của cây cần biến nạp được nhúng vào dung dịch trên trong 30 giây



đến 1 phút và khuấy nhẹ, trên cây bị xâm nhập phải có một lớp màng lỏng.

3) Sau khi biến nạp xong, cây được nuôi cấy trong bóng tối 24 giờ, sau đó đưa ra ngoài và đặt trong môi trường ánh sáng bình thường để cây phát triển..

4) Sau một tuần, lần biến nạp thứ hai có thể được thực hiện theo cách tương tự.

### 3.4. Thu hoạch hạt giống

Sau khi hạt trưởng thành, chúng được thu hoạch. Sau khi thu hoạch, hạt được sấy khô trong lò ở 37°C trong khoảng một tuần..

## 4. Lựa chọn cây chuyên gen

Hạt được xử lý bằng chất khử trùng trong 5 phút, rửa bằng nước khử ion 5 lần, và rải đều trên môi trường tuyển chọn MS (chứa 30µg/mL hygromycin, 100µg/mL cephalosporin), môi trường được đặt trong tủ ẩm nhẹ (nhiệt độ 22°C, 16 giờ ánh sáng, 8 giờ tối, cường độ ánh sáng 100-150µmol/m<sup>2</sup>/s, độ ẩm 75%), và một tuần sau, cây con dương tính được chọn và cấy vào đất.

## 5. Phát hiện cây đột biến T1

### 5.1 Tách chiết ADN bộ gen

1) Lá của cây *Arabidopsis thaliana* được cắt và đặt trong ống ly tâm 2mL, thêm bi thép, và lá được nghiền bằng dụng cụ dung giải mô năng suất cao.

2) Sau khi nghiền xong, 400µL dung dịch đệm chiết SDS được thêm vào, trộn ngược và ủ trong nồi cách thủy 65°C trong 15 phút và trộn ngược sau mỗi 5 phút.

3) Quá trình ly tâm được thực hiện ở tốc độ 13.000 vòng/phút trong 5 phút.

4) 300µL của chất huyền phù được dùng pipet và chuyển sang ống ly tâm 1,5mL mới, một thể tích tương đương của isopropanol được làm lạnh trước ở -20°C được thêm vào ống ly tâm, và ống ly tâm được đặt ở -20°C trong 1 giờ hoặc qua đêm.

5) Quá trình ly tâm được thực hiện ở tốc độ 13.000 vòng/phút trong 10 phút và chất huyền phù được loại bỏ.

6) 500µL etanol 70% được thêm vào ống ly tâm để rửa viên, dung dịch rửa được

loại bỏ sau khi ly tâm (cẩn thận để không loại bỏ viên), làm khô ở nhiệt độ phòng, 30 $\mu$ L nước siêu tinh khiết được thêm vào để hòa tan ADN, và ADN được lưu trữ ở -20°C.

## 5.2 Khuếch đại PCR

Bộ gen thực vật T1 được chiết xuất được sử dụng làm mẫu, các đoạn môi phát hiện được sử dụng để khuếch đại đoạn mục tiêu, 5 $\mu$ L sản phẩm khuếch đại được dùng pipet và phát hiện bằng điện di trên gel agarose 1%, và được chụp ảnh bằng máy ảnh gel. Sản phẩm còn lại được giao cho công ty giải trình tự để trực tiếp thực hiện giải trình tự.

## 6. Phát hiện cây đột biến T2

Sau khi hạt của chủng T1 được thu hoạch từ một cây đơn lẻ, hạt của các chủng khác nhau của hai vector được chọn và trải trên môi trường chọn lọc imazapic (môi trường MS + 0,24 $\mu$ g/mL imazapic) để thực hiện chọn lọc, và các cây con dương tính được cấy vào đất một tuần sau đó và được phát hiện phân tử, trong đó phương pháp giống như bước 5.

Các đoạn môi đã sử dụng và trình tự của chúng:

Tên đoạn môi	Trình tự (5'-3')
ALS574-F	ATATATGGTCTCGATTGGCATGGTTATGCAATGG GAGTTTTAGAGCTAGAAATA
ALS574-R	ATTATTGGTCTCGAACTCCATTGCATAACCATG CCCAATCTCTTAGTCGACTC
ALS653-F	ATATATGGTCTCGATTGTGCCGATGATCCCGAGT GGGTTTTAGAGCTAGAAATA
ALS653-R	ATTATTGGTCTCGAAACCCATCGGGATCATCGGC AACAATCTCTTAGTCGACTC
ALS574/653checkin g-F	ATTGACGGAGATGGAAGCTT
ALS574/653checkin g-R	CCAAACTGAGCCAGTCACAA

## C. Kết quả thực nghiệm

## 1. Phát hiện kiểu gen của cây T1

Hạt giống T1 được chọn lọc bằng môi trường kháng MS hygromycin, tổng số 32 cây con dương tính thu được với vectơ pQY743, và tổng số 18 cây con dương tính thu được với vectơ pQY745. Đối với mỗi vectơ, 10 cây con được chọn và ADN bộ gen lá của chúng được chiết tách để phát hiện vị trí mục tiêu. Người ta thấy rằng không có sự chỉnh sửa nào xảy ra trong thế hệ T1 tại vị trí ALS574, và đã có những sự kiện chỉnh sửa đáp ứng được mong đợi của thiết kế tại vị trí ALS653. Kết quả phát hiện được thể hiện trong Bảng 1:

Bảng 1: Các dạng đột biến của cây T1

Vị trí ALS	Số vectơ	Số cây T1	Dạng chỉnh sửa
574	pQY743	1-10	WT
653	pQY745	3,4-8,10	Chimera
		1,2,9	Heterozygote

## 2. Kết quả tuyển chọn hạt giống thế hệ T2

Sau khi thu hoạch hạt giống thế hệ T2 của cây đơn lẻ, chúng được trải trên môi trường kháng imazapic để thực hiện chọn lọc, có thể thấy rằng Col-0 kiểu dại không thể phát triển trên môi trường kháng, trong khi cây dương tính với các chủng đột biến có thể phát triển bình thường trên môi trường kháng, như thể hiện trong Fig. 3.

Đối với mỗi vectơ, 10 cây con được chọn và ADN bộ gen của chúng được chiết xuất từ lá để phát hiện phân tử. Người ta thấy rằng có 6 chủng cho vectơ pQY743 bị đột biến đồng hợp tử theo mong đợi, tức là đột biến từ TGG thành TTG, như thể hiện trong Fig. 4. Ngoài ra, có 1 chủng bị đột biến dị hợp tử, và có 3 chủng bị đột biến gen ảo. Kết quả phát hiện được thể hiện trong Bảng 2.

Bảng 2: Các dạng đột biến của cây T2

Vị trí ALS	Số vectơ	Số cây T2	Dạng chỉnh sửa
574	pQY743	2,3,5,6,7,9	Homozygote
		4	Heterozygote

		1,8,10	Chimera
--	--	--------	---------

Các kết quả trên cho thấy rằng bằng cách sử dụng giải pháp kỹ thuật cắt/chỉnh sửa tuần tự được lập trình theo sáng chế, có thể đạt được thiết kế và nhận ra các đột biến mong đợi tại vị trí mục tiêu, và các đột biến thay thế bazơ chỉ có thể được thực hiện bằng cách thiết kế các tổ hợp sgARN liên tiếp chỉ với protein Cas9.

Ví dụ 2: Đạt được nhiều dạng đột biến bằng cách cắt/chỉnh sửa tuần tự được lập trình tại các vị trí W574 và S653 của gen ALS *Arabidopsis thaliana*

Các bước hoạt động để thiết kế, xây dựng vectơ và biến nạp và lựa chọn *Arabidopsis thaliana* được thực hiện bằng cách tham khảo ví dụ 1. Đối với vị trí AtALS W574, thiết kế vectơ giống như thiết kế của ví dụ 1. Giản đồ của vectơ được thể hiện trong Fig. 5, và người ta mong đợi rằng đột biến W574L sẽ được nhận ra bởi -G đầu tiên sau đó + T tại một vị trí cụ thể. Không có sự kiện chỉnh sửa nào được phát hiện trong thế hệ T1 của vectơ *Arabidopsis thaliana* đã biến nạp. Thế hệ T2 của *Arabidopsis thaliana* chuyển gen đã được chọn lọc bằng 0,24 mg/L imazapic, và một số lượng lớn cây kháng thuốc diệt cỏ đã được thu, như thể hiện ở bảng bên trái của Fig. 6, việc phát hiện phân tử của những cây kháng thuốc này đã được thực hiện, kết quả giải trình tự sản phẩm PCR cho thấy không chỉ đột biến W574L được mong đợi xuất hiện tại vị trí W574, mà còn xuất hiện một đột biến kháng W574M khác, như thể hiện trong bảng bên phải của Fig. 6..

Đối với vị trí AtALS S653, thiết kế vectơ giống như thiết kế của ví dụ 1. Biểu đồ vectơ được thể hiện trong Fig. 7, và dự kiến rằng đột biến S653N sẽ được nhận ra trước tiên bởi -G sau đó + A tại một vị trí cụ thể. Một sự kiện chỉnh sửa dự kiến của S653N đã được phát hiện trong thế hệ T1 của vectơ *Arabidopsis thaliana* đã biến nạp. Thế hệ T2 của *Arabidopsis thaliana* chuyển gen liên tục được chọn lọc với 0,24 mg/L imazapic, và một số lượng lớn cây kháng thuốc diệt cỏ đã thu được, như thể hiện trong bảng bên trái của Fig. 8, việc phát hiện phân tử được thực hiện đối với những cây kháng thuốc này, kết quả giải trình tự sản phẩm PCR cho thấy không chỉ đột biến S653N dự kiến xảy ra tại vị trí S653, mà còn xảy ra hai đột biến kháng thuốc khác S653R và S653R/G654D, như thể hiện trong bảng bên phải của Fig. 8.

Các kết quả trên cho thấy rằng bằng cách sử dụng giải pháp kỹ thuật cắt/chỉnh sửa theo trình tự được lập trình theo sáng chế, ngoài các đột biến dự kiến được thiết kế cho vị trí mục tiêu, các dạng đột biến đa chức năng cũng có thể được tạo ra bằng cách thiết kế các tổ hợp sgARN theo trình tự chỉ với protein Cas9 tương ứng, sao cho nó là một công cụ thích hợp để tạo ra các đột biến chức năng mới.

Ví dụ 3: Tạo đột biến kháng W574M bằng cách sử dụng các PAM khác nhau để thực hiện cắt/chỉnh sửa tuần tự được lập trình gần vị trí W574 của gen ALS *Arabidopsis thaliana*

Các bước hoạt động để thiết kế, xây dựng vector và biến nạp và lựa chọn *Arabidopsis thaliana* được thực hiện bằng cách tham khảo ví dụ 1, ngoại trừ, đối với trình tự 5'CTTGGCATGGTTATGCAATGgg3' gần vị trí AtALS W574, GG gần vị trí W574 được sử dụng đầu tiên làm PAM để thiết kế sgARN1: 5'CTTGGCATGGTTATGCAATG3', trong đó vị trí W574 được gạch chân và NG PAM được thể hiện ở dạng in nghiêng. Người ta dự đoán rằng một trình tự mới 5'CTTGGCATGGTTATGCAAATGGGAag3' được hình thành bởi + A sau khi cắt và sửa chữa. AG được sử dụng như một vị trí PAM mới để thiết kế sgARN2: 5'CTTGGCATGGTTATGCAAATGGGA3', và kiểu gen -G được hình thành sau quá trình sửa chữa tự phát của tế bào, tạo ra W574M. Tức là, các vị trí PAM khác nhau đã được sử dụng cho hai cảnh giâm trong sơ đồ này. Sơ đồ vector được thể hiện trong Fig. 9. Vector được sử dụng để biến đổi cây *Arabidopsis thaliana*, dòng chuyển gen thể hệ T1 đã được phát hiện kiểu gen từ đó phát hiện sự kiện chỉnh sửa dự kiến của W574M, và cây cho thấy khả năng kháng với xử lý imazapic.

Kết quả cho thấy rằng bằng cách sử dụng giải pháp kỹ thuật của sáng chế và sử dụng các PAM khác nhau để thực hiện cắt/chỉnh sửa theo trình tự được lập trình, việc chỉnh sửa có thể được thực hiện trong một phạm vi trình tự rộng hơn để thu được sự thay thế axit amin.

Ví dụ 4: Thiết kế sự thay thế bazơ có thể dự đoán được cho các vị trí D350 và W548

của gen ALS *Oryza sativa*

Sự đột biến được báo cáo trong Nishimasu et al. 2018 Engineered CRISPR-Cas9 nucleaza with expanded targeting space. Science 361(6408):1259-1262. doi: 10.1126/science.aas9129 was introduced into pHUE411 (A CRISPR/Cas9 toolkit for multiplex genome editing in plants. Xing HL, Dong L, Wang ZP, Zhang HY, Han CY, Liu B, Wang XC, Chen QJ. BMC Plant Biol. 2014 Nov 29;14(1):327. 10.1186/s12870-014-0327-y, xem chi tiết trong <https://www.addgene.org/71287/>) để xây dựng vectơ pHUE411-NG có khả năng nhận ra NG PAM.

Trình tự gen ALS *Oryza sativa* được thể hiện trong SEQ ID NO: 12. Bằng cách sử dụng 5'GGCGTGCGGTTTGATGATCG3' (phần gạch chân là vị trí OsALS-D350 tương ứng với ALS-D376 *Arabidopsis thaliana*) và một trình tự mới 5'GGCGTGCGGTTTGATGACG3' được dự đoán sẽ được tạo ra từ việc chỉnh sửa làm mục tiêu, vectơ mục tiêu kép được xây dựng theo phương pháp được mô tả trong Xing HL, Dong L, Wang ZP, Zhang HY, Han CY, Liu B, Wang XC, Chen QJ. BMC Plant Biol. 2014, và nó được mong đợi để có được sự chuyển đổi GAT-GAA, dẫn đến đột biến OsALS D350E.

Bằng cách sử dụng 5'GGTATGGTTGTGCAATGGGA3' (phần được gạch chân là vị trí OsALS-W548 tương ứng với ALS-W574 *Arabidopsis thaliana*) và một trình tự mới 5'GGTATGGTTGTGCAATGGA 3' được dự đoán sẽ được tạo ra từ việc chỉnh sửa làm mục tiêu, vectơ mục tiêu kép được xây dựng và nó được mong đợi để thu được sự chuyển đổi TGG-TTG, dẫn đến đột biến OsALS W548L.

Sau đó, hai vectơ này được chuyển vào *Oryza sativa* để thu được các cây chuyển gen, và việc xác định chỉ ra rằng các cây có sự thay thế mong đợi D350E và W548L đã thu được. Kết quả nghiên cứu sinh học kháng thuốc diệt cỏ trên đồng ruộng cho thấy các thể đột biến D350E và W548L có khả năng kháng thuốc diệt cỏ ức chế ALS.

Ví dụ 5: Thiết kế sự thay thế bazơ có thể dự đoán được và lựa chọn nhiều dạng đột biến cho vị trí W2038 của gen ACCase2 *Oryza sativa*

Trình tự gen ACCase2 *Oryza sativa* được thể hiện trong SEQ ID NO: 14, trong đó

vị trí OsACCCase2 W2038 tương ứng với vị trí ACCCase W2027 của *Alopecurus myosuroides*. AGG gần vị trí này được sử dụng làm PAM để thiết kế sgARN1: 5'TTCATCCTCGCTAAC-TGAG3', và người ta dự đoán rằng một trình tự mới được hình thành bởi -G sau khi cắt và sửa chữa. AGG liên tục được sử dụng làm PAM để thiết kế sgARN2: 5'CTTC-ATCCTCGCTAACTGAG3', và kiểu gen +T được hình thành sau khi cắt và sửa chữa lại, dẫn đến đột biến W2038L. SgARN1 và sgARN2 được xây dựng trên vector pHUE411 để tạo thành vector chỉnh sửa và giảm đồ vector được thể hiện trong Fig. 10.

Vector chỉnh sửa được sử dụng để biến đổi mô sẹo của Huaidao No 5 (một giống lúa), và sau 3 tuần đồng chọn lọc với 50 µg/L hygromycin và 50 µg/L quizalop-p, đã thu được một số lượng lớn các mô sẹo kháng, như được hiển thị trên bảng bên trái của Fig. 11. Mô sẹo kháng thuốc được lấy để xác định kiểu gen, và người ta thấy rằng không chỉ đột biến W2038L được mong đợi mà còn xảy ra đột biến W2038C, như được hiển thị trên bảng bên phải của Fig. 11.

Các kết quả trên của quá trình cắt/chỉnh sửa theo trình tự có lập trình của gen *Oryza sativa* cho thấy giải pháp kỹ thuật của sáng chế có thể áp dụng cho cả cây một lá mầm và cây hai lá mầm..

#### Ví dụ 6: Sự biểu hiện và tinh sạch của các protein SpCas9 và NGA-Cas9

##### 1. Dụng cụ thí nghiệm và thuốc thử

Bảng 3: Thuốc thử thử nghiệm

Thuốc thử	Điều chế và sử dụng
polymeraza ADN Q5	Được mua từ NEB
polymeraza ADN I5 và dung dịch phản ứng I5	Được mua từ Tsingke Bio
dNTPs	Shanghai Sangon
nhựa Ni-NTA	Shanghai Sangon
Tris/NaCl/imidazol	Shanghai Sangong
DTT	Shanghai Sangong

$\beta$ -mercaptoetanol	Sigma
Gel đúc sẵn SDS-PAGE	Nanjing GenScript
Cột Superdex200	GE Healthcare

Bảng 4: Dụng cụ thực nghiệm

Dụng cụ	Model
Thiết bị PCR	Bio-rad T100
Giường lắc nhiệt độ không đổi	Ounuo HNY-200B
Máy đánh thủng tế bào	Ningbo Xinzhi JY92-IIN
Thiết bị điện di	WIX-EP600
Chất tinh chế protein	GE AKTA tinh khiết
Máy ly tâm lạnh công suất lớn tốc độ cao	Xiangzhi ZX21K
Máy ly tâm tốc độ cao	Eppendorf 5424R
Máy xem phim ánh sáng trắng	Beijing Liuyi WD-9406
Máy ảnh gel axit nucleic	Beijing Sage ChampGel™ 5000
Máy quang phổ vi mô	DS-II

## 2. Phương pháp thử nghiệm

### 2.1 Xây dựng vector biểu hiện pET15b-Cas9

Trình tự ADN của protein SpCas9 và NGA-Cas9 thu được sau khi tối ưu hóa codon thực vật lần lượt được hiển thị trong SEQ ID NO: 15 và SEQ ID NO: 16, và các trình tự được tổng hợp bởi GenScript dưới dạng ADN mẫu.

Sau khi trình tự NG-Cas9 và NGA-Cas9 được khuếch đại riêng biệt, hai đoạn này được liên kết với vector biểu hiện pET15b bằng phương pháp truyền, được chuyển đổi thành DH5a và được giải trình tự sau khi xác minh.

Bảng 5: Hệ thống khuếch đại xác minh PCR và môi

	Hệ thống, 50 ul
2× dung dịch phản ứng I5	25 ul



AND mẫu	1 ul
Mồi xuôi và ngược	mỗi loại 2 ul
Nước siêu tinh khiết	được bổ sung đến 50 ul
Trình tự mồi:	5'-3'
pET15b-NG Cas9 -F	gtgccgcgcggcagccatatggattacaaggaccacgacg
pET15b-NG Cas9-R	tttgtagcagccggatcctcacttcttcttctgcctgc
pET15b-NGA Cas9 -F	tgccgcgcggcagccatatgatggattacaaggaccacgacg
pET15b-NG Cas9 -R	tttgtagcagccggatcctcacttcttcttctggcctgtccc

## 2.2 Biểu hiện và tinh chế protein

Các vectơ biểu hiện đã xây dựng được biến đổi thành *Escherichia coli Rosetta* (DE3), sự biểu hiện của chúng được gây ra bởi IPTG, và vi khuẩn được thu hoạch, ly giải và tinh sạch bằng cột Ni-NTA. Phương pháp cụ thể như sau:

a) Các vectơ biểu hiện tái tổ hợp được chuyển thành dòng Rosetta (DE3), một khuẩn lạc đơn lẻ được chọn vào 10 ml môi trường LB, kháng CmR + Amp (pET15b) hoặc CmR + Kana (pET28a), được nuôi cấy ở 200 vòng/phút ở 37°C qua đêm, được chuyển vào bình lắc 2 L chứa 1 L môi trường LB, được nuôi cấy ở 37°C và 200 vòng/phút cho đến khi OD600 đạt 0,6-0,8, làm lạnh đến 18°C, sự biểu hiện của nó được tạo ra với 0,5 mM IPTG qua đêm, và vi khuẩn được thu hoạch bằng cách ly tâm ở 4000g.

b) Các vi khuẩn sau khi thu hoạch được tạo huyền phù lại trong dung dịch đệm Ni A: HEPES 50 mM, pH 7,4, NaCl 500 mM, imidazol 20 mM,  $\beta$ -mercaptoethanol 5 mM, được bổ sung với PMSF với nồng độ cuối cùng là 1 mM và 250 ul chất ức chế Cocktail, và sau đó trộn đều.

c) Sau khi các tế bào tái tạo huyền phù được đánh thủng bởi một máy đánh thủng siêu âm, chúng được ly tâm ở 40000g trong 30 phút ở 4°C, và phần nổi phía trên được thu thập và đưa qua cột Ni-NTA.

d) Tinh chế qua cột Ni-NTA: phần nổi sản phẩm dung giải được kết hợp với nhựa trong 20 phút, rửa giải bằng dung dịch đệm A chứa imidazol 50 mM để loại bỏ tạp chất, và cuối cùng được rửa giải bằng dung dịch đệm rửa giải chứa imidazol 400 mM.

e) Hệ thống điện di trên gel SDS-PAGE được sử dụng để phát hiện hiệu quả tinh chế của protein.

f) Thẩm tách được thực hiện bằng cách thay đổi đệm thành HEPES 50 mM pH 7,5, KC1150 mM, DTT1 mM, glycerol 3%.

h) Mẫu cuối cùng được điện di trên gel SDS-PAGE để phát hiện hiệu quả tinh sạch của protein. Sau khi cô đặc bằng siêu lọc, protein được đông lạnh ở  $-80^{\circ}\text{C}$  để sử dụng sau này.

### 2.3 Kết quả biểu hiện và tinh sạch của protein dung hợp Cas9

Kết quả tinh sạch của các protein SpCas9 và NGA-Cas9 được thể hiện trong Fig. 12. Các mũi tên chỉ ra các dải protein Cas9, cho thấy rằng độ tinh khiết cao hơn đã đạt được.

Ví dụ 7: Hoạt động phân cắt enzym in vitro của các protein SpCas9 và NGA Cas9 được phát hiện riêng biệt tới các vị trí mục tiêu OsACCcase2 W2038 và OsALS W548

1. Trình tự ADN của gen OsALS và OsACCcase2 được đưa vào công cụ trực tuyến CRISPOR (<http://crispor.tefor.net/>), các sgARN sau đây được thiết kế cho W548 của OsALS (axit amin thứ 548 của OsALS, trình tự axit amin của protein ALS *Oryza sativa* được thể hiện trong SEQ ID NO: 11) tương ứng với vị trí axit amin 574 của protein ALS *Arabidopsis thaliana* và W2038 của OsACCcase2 (axit amin thứ 2038 của OsACCcase2, trình tự axit amin của protein ACCcase2 *Oryza sativa* được thể hiện trong SEQ ID NO: 13) tương ứng với vị trí axit amin 2027 của *Alopecurus myosuroides*, và các sgARN này được tổng hợp bởi GenScript:

>sgARN1-548-G:

5'GGGUAUGGUUGUGCAAUGGGAguuuuagagcuagaaaauagcaaguuaaaauaaggc  
uaguccguuaucaacuugaaaaaguggcaccgagucggugc3'

> sgARN1-2038-G:

5'GUUCAUCCUCGCUAACUGGAGguuuuuagagcuagaaaauagcaaguuaaaauaaggcu

aguccguuaucaacuugaaaaaguggcaccgagucggugc3'

2. Các môi phát hiện cụ thể, OsALS265AA-F: 5'ggtcttgcgtctggttggc3' và OsALS-end-R: 5'ccatgccaagcacatcaacaag3', được sử dụng để khuếch đại đoạn có chứa vị trí mục tiêu OsALS W548 và sản phẩm PCR có độ dài 1200 bp.

Các môi phát hiện cụ thể, OsACC1750AA-F: 5'gcgaagaagactatgctcgtattgg3' và OsACC2196AA-R: 5'cttaatcacaccttcgcagcc3', được sử dụng để khuếch đại đoạn có chứa vị trí mục tiêu OsACCCase W2038, và sản phẩm PCR có độ dài 1500 bp.

Hệ thống PCR được thể hiện trong bảng sau:

Thành phần	Thể tích
2× dung dịch phản ứng I5	25 $\mu$ L
Môi xuôi (10 $\mu$ M)	2 $\mu$ L
Môi ngược (10 $\mu$ M)	2 $\mu$ L
Mẫu ADN bộ gen	2 $\mu$ L
Nước siêu tinh khiết	Added to 50 $\mu$ L

3. Phản ứng PCR được thiết lập, và các điều kiện phản ứng được thể hiện trong bảng sau:

Bước	Nhiệt độ	Thời gian
Tiền biến tính	98 °C	30 giây
Chu kỳ khuếch đại 30-35	98 °C	15 giây
	58 °C	15 giây
	72 °C	30 giây
Kéo dài cuối cùng	72 °C	3 phút

4. Các sản phẩm PCR được phát hiện bằng điện di trên gel agarose và được giải trình tự để xác minh thêm. Sau khi được xác minh chính xác, gel được cắt để phục hồi các đoạn ADN. Các đoạn ADN phục hồi được hòa tan bằng cách thêm 30ul nước siêu tinh khiết không chứa ARNase, và nồng độ của chúng được đo.

5. Hệ thống phát hiện sau được sử dụng để phát hiện hoạt động của protein Cas9,

và sau khi hệ thống được chuẩn bị, nó được ủ ở 37°C trong 1 giờ.

Thành phần	Thể tích
protein Cas9	0,5 $\mu$ L (1ug)
sgARN	0,5 $\mu$ L (1ug)
10 $\times$ đệm phản ứng Cas9	2 $\mu$ L
đoạn ADN phục hồi	X $\mu$ L (100ng)
nước siêu tinh khiết không chứa ARNase	bổ sung đến 20 $\mu$ L

6. Sau khi phản ứng hoàn thành, hệ thống được xử lý ở 65°C trong 10 phút, được bổ sung 4  $\mu$ l bộ đệm tải 6  $\times$  ADN, và chạy trên gel agarose 2% để phát hiện kích thước dải.

Kết quả được thể hiện trong Fig. 13, và có thể thấy rằng các protein Cas9 đã được tinh sạch có thể cắt sợi kép ADN tại các vị trí mục tiêu đã thiết kế chỉ khi có sự hiện diện của sgARN.

Ví dụ 8: Đạt được đột biến W548L tại vị trí OsALS548 bằng cách biến đổi tế bào nguyên sinh *Oryza sativa* với hai phức hợp RNP nhằm mục tiêu khác nhau

1. Việc điều chế tế bào nguyên sinh *Oryza sativa* và biến nạp qua trung gian PEG được thực hiện dựa trên phương pháp sửa đổi một phần đã được công bố (Bart et al., 2006), và các bước điều chế cụ thể như sau:

(1) Đầu tiên, những cây con *Oryza sativa* làm tế bào nguyên sinh đã được chuẩn bị. Giống lúa là Nipponbare. Hạt gạo được xát vỏ trước, và hạt đã xát vỏ được tráng bằng cồn 75% trong 1 phút, xử lý bằng natri hypoclorit 5% (v/v) trong 20 phút, sau đó rửa bằng nước vô trùng hơn 5 lần, đặt trên một bàn cực sạch và thổi khô, sau đó cho vào bình nuôi cấy mô chứa 1/2 môi trường MS, mỗi bình 20 hạt. Tế bào nguyên sinh được chuẩn bị bằng cách ủ hạt ở 26°C và 12 giờ ánh sáng trong khoảng 10 ngày.

(2) Các bẹ lá của cây con được chọn, dùng dao cạo Gillette sắc bén cắt thành các mảnh khoảng 1 mm, cho vào mannitol 0,6M và môi trường nuôi cấy MES (công thức: mannitol 0,6M, MES 0,4M, pH 5,7) để sử dụng sau này. Sau khi tất cả các vật liệu được cắt, chúng được chuyển vào 20 mL dung dịch enzym phân giải (công thức: xenlulaza R10/RS 1,5% (YaKult Honsha), Mecerozyme R10 0,5% (YaKult Honsha), mannitol 0,5M, KCl 20mM, MES 20mM, pH 5,7, CaCl<sub>2</sub> 10mM, BSA 0,1%, β-mercaptoetanol 5 mM), bọc trong lá nhôm và đặt trong máy lắc ở nhiệt độ 28°C. Quá trình phân giải enzym được thực hiện ở tốc độ 50 vòng/phút trong bóng tối trong khoảng 4 giờ, và tốc độ được tăng lên 100 vòng/phút trong 2 phút cuối cùng;

(3) Sau khi phân giải enzym, một thể tích tương đương của dung dịch W5 (công thức: NaCl 154mM, CaCl<sub>2</sub> 125mM, KCl 15mM, MES 15mM) được thêm vào, lắc theo chiều ngang trong 10 giây để giải phóng tế bào nguyên sinh. Các tế bào là kết quả của quá trình phân giải enzym được lọc qua rây 300 mesh và ly tâm ở 150 g trong 5 phút để thu thập tế bào nguyên sinh;

(4) Các tế bào được rửa hai lần bằng dung dịch W5, và tế bào nguyên sinh được thu thập bằng cách ly tâm ở 150 g trong 5 phút;

(5) Tế bào nguyên sinh đã được tạo huyền phù lại bằng một lượng dung dịch MMG thích hợp (công thức: MgCl<sub>2</sub> 3,05g/L, MES 1g/L, mannitol 91,2g/L), và nồng độ tế bào nguyên sinh bằng khoảng  $2 \times 10^6$  tế bào/mL.

## 2. Điều chế phức hợp RNP:

Theo trình tự vị trí mục tiêu OsALS548 GGGTATGGTTGTGCAATGGGAgga (vị trí OsALS W548 được gạch chân, tương ứng với W574 ALS *Arabidopsis thaliana*, và vị trí PAM được nhận ra bởi protein Cas9 được thể hiện ở dạng chữ thường in nghiêng), protein NGA-Cas9 đã tinh chế được lựa chọn để điều chế phức hợp RNP. GGA được sử dụng làm PAM để thiết kế >CrARN1-548-G: 5'-GGGUAUGGUUGUGCAAUGGGAguuuuagagcuaugcu-3', người ta dự đoán rằng một bazơ G sẽ bị xóa giữa 3-4 vị trí đầu tiên của PAM sau khi chỉnh sửa, và sau đó trình tự dẫn đến việc xóa ở trên được sử dụng để thiết kế >CrARN2-548+T: 5'-UGGGUAUGGUUGUGCAAUGGGAguuuuagagcuaugcu-3', dự đoán rằng một bazơ T

sẽ được chèn sau lần chỉnh sửa thứ hai để có được sự chuyển đổi TGG-TTG.

>CrARN1-548-G và >CrARN1-548+T được tổng hợp bởi Công ty công nghệ sinh học GenScript, và sgARN cũng được tổng hợp:

>sgARN1-548-G:

5'GGGUAUGGUUGUGCAAUGGGAguuuuagagcuagaaaagcaaguuaaaauaaggc  
uaguccguuaucaacuugaaaaaguggcaccgagucggugc3'

>sgARN2-548+T:

5'UGGGUAUGGUUGUGCAAUGGGAguuuuagagcuagaaaagcaaguuaaaauaaggc  
uaguccguuaucaacuugaaaaaguggcaccgagucggugc3'.

crARN và GenCRISPR tracrARN (GenScript SC1933) đã tổng hợp được trộn đều, được thêm với bộ đệm ủ crARN & tracrARN (GenScript SC1957-B) và ủ để điều chế gARN theo hướng dẫn. Trình tự tracrARN là 5'-agcauagcaaguuaaaauaaggcuaguccguuaucaacuugaaaaaguggcaccgagucggugcuuu-3'.

Hệ thống phản ứng RNP được chuẩn bị theo bảng sau, và sau khi hệ thống phản ứng được chuẩn bị, nó được ủ ở 25°C trong 10 phút.

Thành phần	Thể tích
protein Cas9 NGA	10µL (20 µg)
gARN hoặc sgARN	10µL (20 µg)
10x× đệm phản ứng Cas9	10 µL
nước siêu tinh khiết không chứa ARNse	70 µL

### 3. Biến nạp tế bào nguyên sinh

(1) 200 µl tế bào nguyên sinh đã tạo huyền phù lại MMG như đã chuẩn bị ở trên được lấy và thêm vào phức hợp RNP (20µg protein Cas9, 20µg sgARN) được tạo ra sau khi ủ, và nhẹ nhàng lắc để trộn đều.

(2) Thêm một lượng bằng nhau dung dịch PEG 40% (w/v) (công thức: PEG 40% (w/v), mannitol0,5M , CaCl<sub>2</sub> 100mM) vào, lắc nhẹ để trộn đều và để ở 28°C trong bóng tối trong 15 phút;

(3) Sau khi cảm ứng và biến nạp, 1,5 mL dung dịch W5 được thêm vào từ từ, lắc nhẹ để trộn đều các tế bào, và các tế bào được thu thập bằng cách ly tâm ở 150 g trong 3 phút. Bước này được lặp lại một lần;

(4) Các tế bào được tạo huyền phù lại bằng cách thêm 1,5 mL dung dịch W5, đặt trong tủ ẩm 28°C và nuôi cấy trong bóng tối trong 12-16 giờ. Các tế bào phải được ủ từ 48 đến 60 giờ nếu chúng được sử dụng để tách chiết ADN hệ gen tế bào nguyên sinh.

#### 4. Phát hiện sự kiện chỉnh sửa mục tiêu bộ gen

(1) ADN tế bào nguyên sinh được tách chiết bằng phương pháp CTAB được sửa đổi một phần, và phương pháp này được mô tả cụ thể như sau: tế bào nguyên sinh được ly tâm và loại bỏ phần nổi phía trên, 500 µL dung dịch chiết ADN được thêm vào, lắc và trộn đều, và ủ trong nồi cách thủy 65°C trong 1 giờ; mẫu được làm lạnh sau khi ủ trong nồi cách thủy, thêm vào một lượng cloroform tương đương, đảo ngược vài lần để trộn đều và ly tâm ở tốc độ 10,000 vòng/phút trong 10 phút; 400 µl phần nổi phía trên được lấy và chuyển sang ống ly tâm 1,5 mL mới, thêm 1 mL etanol 70% (v/v), và để kết tủa ở -20°C trong 20 phút; ADN được kết tủa bằng cách ly tâm ở tốc độ 12,000 vòng/phút trong 15 phút, kết tủa được làm khô trong không khí và sau đó được hòa tan bằng cách thêm 50 µl nước siêu tinh khiết, và được bảo quản ở -20°C để sử dụng sau này

(2) Các môi dành riêng cho gen được sử dụng để khuếch đại đoạn có chứa vị trí mục tiêu W548 và các môi phát hiện sau được thiết kế cho vị trí mục tiêu:

OsALS500AA-F: 5'GGCTAACCCAGGTGTCACAG3',

OsALS-3'UTR-R: 5'CCATGCCAAGCACATCAAACAAG3'

Hệ thống phản ứng PCR được thể hiện trong bảng sau:

Thành phần	Thể tích
2× dung dịch phản ứng I5	25 µL
Môi xuôi (10 µM)	2 µL
Môi ngược (10 µM)	2 µL
Mẫu ADN bộ gen	2 µL

Nước siêu tinh khiết	bổ sung đến 50 $\mu$ L
----------------------	------------------------

(3) Phản ứng PCR được thiết lập, và các điều kiện phản ứng chung được trình bày trong bảng sau:

Bước	Nhiệt độ	Thời gian
Tiền biên tính	98 °C	30 giây
Chu kỳ khuếch đại 30-35	98 °C	15 giây
	58 °C	15 giây
	72 °C	30 giây
Kéo dài cuối cùng	72 °C	3 phút

(4) Việc phát hiện được thực hiện bằng điện di trên gel agarose, và các đoạn PCR được phục hồi và giải trình tự.

#### 5. Kết quả thử nghiệm:

Bằng cách sử dụng gARN được điều chế với crARN và tracrARN tổng hợp bằng cách ủ hoặc sử dụng trực tiếp sgARN tổng hợp, phức hợp RNP hoạt động có thể được hình thành với protein NGA-Cas9 tinh khiết. Bằng cách xác định trình tự vị trí được nhắm mục tiêu OsALS548, đột biến từ TGG thành TTG có thể được phát hiện, điều này chứng tỏ rằng đột biến tại vị trí cụ thể của vị trí mục tiêu trong tế bào có thể đạt được bằng cách cắt/chỉnh sửa tuần tự được lập trình tạo ra từ phức hợp RNP kết hợp với crARN hoặc sgARN theo thứ tự tuần tự. Như được thể hiện trong Fig. 14, tại điểm mũi tên trong biểu đồ của các đỉnh sắp xếp trình tự mục tiêu OsALS548 tế bào nguyên sinh, ngoài đỉnh tín hiệu bazơ G ban đầu, còn có đỉnh tín hiệu bazơ T được tạo ra từ đột biến, dẫn đến đột biến W548L tại vị trí OsALS548.

Ví dụ 9: Đạt được đột biến W2038L tại vị trí OsACCCase2 W2038 bằng cách bắn phá mô sẹ *Oryza sativa* bằng hai phức hợp RNP được nhắm mục tiêu khác nhau

#### 1. Điều chế phức hợp RNP:



Theo trình tự vị trí mục tiêu OsACCCase2 W2038 GTTCATCCTCGCTAACTGGAG<sub>gag</sub>, trong đó vị trí OsACCCase2 W2038, tương ứng với *Alopecurus myosuroides* ACCCase W2027, được gạch chân, và vị trí PAM được nhận ra bởi protein Cas9 được thể hiện ở dạng chữ thường in nghiêng, protein SpCas9 tinh khiết được chọn để điều chế phức hợp RNP. GGA được sử dụng làm PAM để thiết kế >CrARN1-2038-G: 5'-GUUCAUCCUCGCUAACUGGAG<sub>g</sub>uuuuagagcuaugcu-3', dự đoán rằng một bazơ G sẽ bị xóa giữa 3-4 vị trí đầu tiên của PAM sau khi chỉnh sửa, sau đó trình tự được tạo ra từ việc xóa được sử dụng để thiết kế >CrARN2-2038+T: 5'-UGUUCAUCCUCGCUAACUGAG<sub>g</sub>uuuuagagcuaugcu-3', người ta dự đoán rằng một bazơ T sẽ được chèn vào sau lần chỉnh sửa thứ hai, do đó thu được chuyển đổi TGG-TTG.

>CrARN1-2038-G và >CrARN2-2038+T được tổng hợp bởi Công ty công nghệ sinh học GenScript, và sgARN cũng được tổng hợp:

>sgARN1-2038-G:

5'GUUCAUCCUCGCUAACUGGAG<sub>g</sub>uuuuagagcuaagaaauagcaaguuaaaaauaaggcu aguccguuaucaacuugaaaaaguggcaccgagucggugc 3'

>sgARN2-2038+T:

5'UGUUCAUCCUCGCUAACUGAG<sub>g</sub>uuuuagagcuaagaaauagcaaguuaaaaauaaggcu aguccguuaucaacuugaaaaaguggcaccgagucggugc 3'.

crARN và GenCRISPR tracrARN đã tổng hợp (GenScript SC1933) được trộn đều, được bổ sung với đệm ủ crARN & tracrARN (GenScript SC1957-B) và ủ để điều chế gARN theo hướng dẫn.

Các phức hợp RNP được điều chế bằng cách ủ trong cùng một hệ thống phản ứng như trong ví dụ 8. Lấy số lượng 10 cuộc bắn phá súng gen để biến nạp như ví dụ: 20 µg protein Cas9, 20 µg gARN hoặc sgARN, 10 µl đệm phản ứng 10× Cas9, được tạo tổng cộng lên đến 100 µl bằng nước siêu tinh khiết không chứa ARNase, ủ ở 25°C trong 10 phút và trộn nhẹ.

## 2. Cảm ứng mô sẹo *Oryza sativa*

Hạt giống *Oryza sativa* trưởng thành và tròn trịa được chọn lọc, tách vỏ và khử trùng theo các bước sau:

(1) Hạt lúa (*Oryza sativa*) được tách vỏ, trong đó giống lúa là Huaidao No. 5, được mua từ chợ hạt giống.

(2) Hạt được rửa bằng nước vô trùng không giới hạn số lần cho đến khi nước rửa trở nên trong.

(3) Sau khi được khử trùng bằng cồn 70% trong 1 phút, hạt sau đó được đặt trong natri hypoclorit 10% trên máy lắc nằm ngang và ủ trong 25 phút dưới chế độ lắc..

(4) Sau khi khử trùng bằng natri hypoclorit, hạt được rửa bằng nước vô trùng trong 5 lần. Hạt được gieo trên môi trường cảm ứng mô sẹo (công thức: bột MS (4,42g/L) + 2,4-D (2mg/L) + sucroza (30g/L) + phytigel (4g/L)), và được nuôi cấy trong bóng tối ở 28°C để tạo ra mô sẹo.

### 3. Bản phá RNP súng bắn gen:

#### (1) Nuôi cấy ưu trương

Mô sẹo có khả năng sinh phôi tốt được chuyển sang môi trường ưu trương (công thức: bột MS (4,42g/L) + 2,4-D (2mg/L) + sucroza (30g/L) + D-mannitol (0,4M) ) + phytigel (4g/L)), hoạt động vô trùng được thực hiện trên một băng ghế siêu sạch, và việc nuôi cấy được thực hiện trong bóng tối ở 25°C trong 4-6 giờ.

(2) Chuẩn bị huyền phù bột vàng: bằng cách sử dụng ống EP 1,5 mL nhập khẩu, cân 30 mg bột vàng (đường kính 0,6  $\mu\text{m}$ ); được thêm với 1 mL etanol 70%, chịu xoáy tốt, và để trên đá lạnh trong 10 phút. Sau khi ly tâm trong 1 phút, phần nổi phía trên được loại bỏ; thêm 1 mL nước vô trùng, cho vào máy xoáy kỹ, ly tâm trong 1 phút, loại bỏ phần nổi phía trên và lặp lại thao tác trên 3 lần. 500  $\mu\text{L}$  glycerol đã khử trùng (50%) được thêm vào, xoáy kỹ lưỡng để điều chế huyền phù bột vàng với nồng độ 60  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , được bảo quản ở -20°C.

(3) 50  $\mu\text{L}$  huyền phù bột vàng (60  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) được lấy, thêm với 100  $\mu\text{L}$  phức hợp RNP đã điều chế, và trộn nhẹ.

(4) 15  $\mu$ l hỗn hợp RNP/bột vàng được lấy và đặt vào giữa màng có thể phân tách của súng bắn gen để bàn PDS-1000 (Bio-Rad), thổi khô, và sau đó bắn phá theo hướng dẫn của thiết bị.

Thông số bắn phá: độ chân không là 26-28, khoảng cách là 6 cm, và áp suất không khí là 1100 psi hoặc 1350 psi.

(5) Sau khi bắn phá xong, mô sẹo được nuôi cấy trên môi trường ưu trương ở 25°C qua đêm (trong 16 giờ) trong bóng tối..

#### 4. Chọn lọc, phân hóa và tạo rễ:

(1) Sau khi mô sẹo bị bắn phá được nuôi cấy qua đêm, nó được chuyển sang môi trường cảm ứng, và được nuôi cấy để phục hồi ở 28°C trong một tuần.

(2) Sau một tuần phục hồi, mô sẹo được chuyển sang môi trường chọn lọc (công thức: bột N6 4,1g/L + casein thủy phân 0,3 g/L + prolin 2,8 g/L + 2,4-D 2 mg/L + sucroza 3% + quizalofop-p 50 ug/L + Cef (cephalosporin) 500 mg/L + inositol 0,1 g/L + phytigel 0,35%, pH 5,8) để thực hiện chọn lọc trong 3-4 tuần; để chỉnh sửa OsACCCase2 W2038 sau này, quizalofop-p 50 ug/L đã được sử dụng để chọn lọc, như thể hiện trong Fig. 15.

(3) Mô sẹo kháng được chọn có trạng thái sinh trưởng tốt được chuyển sang môi trường phân hóa (công thức: bột MS (4,42g/L) + KT (1mg/L) + sucroza (30g/L) + phytigel (4,5g/L) + quizalofop-p 50 ug/L, pH 5,8), và được nuôi cấy ở 28°C dưới ánh sáng để tạo ra sự phân hóa trong 2-4 tuần.

(4) Các cây con đã phân hóa được chuyển sang môi trường tạo rễ (công thức: 1/2 bột MS (2,3g/L) + sucroza (30g/L) + phytigel (4,5g/L)) để tạo rễ, cây con được ủ sau khi ra rễ xong, sau đó chuyển sang bầu đầy đất và đặt trong nhà kính để nuôi trồng.

5. Phát hiện các sự kiện chỉnh sửa mục tiêu trong mô sẹo kháng và cây con nuôi cấy mô T0:

Tổng số 11 mô sẹo kháng đã thu được trong quá trình chọn lọc, ADN của chúng được tách chiết bằng phương pháp CTAB. Các môi phát hiện cho vị trí mục tiêu được thiết kế như sau: OsACC2038test-F: 5'CTGTAGGCATTTGAAACTGCAGTG3',

OsACC2038test-R: 5'GCAATCCTGGAGTTCCT-CTGACC3', và đoạn PCR có chứa vị trí OsACCCase2 W2038 đã được khuếch đại, phục hồi và giải trình tự. Việc phát hiện trình tự cho thấy 10 trong số chúng có đột biến từ TGG thành TTG tại vị trí OsACCCase2 W2038, trong đó 3 mẫu là đột biến đồng hợp tử.

Đối với cây con nuôi cấy mô thể hệ T0 thu được bằng cách phân hóa mô sẹo kháng, ADN của chúng được tách chiết để phát hiện trình tự vị trí mục tiêu chỉnh sửa, và cũng có một đột biến đồng hợp tử từ TGG thành TTG tại vị trí OsACCCase2 W2038, như thể hiện trong Fig. 16.

#### 6. Thử nghiệm khả năng kháng của cây con thể hệ T1 đối với thuốc diệt cỏ ức chế ACCase

Sau khi nhân giống dòng T0 có chứa đột biến W2038L, các cây con đột biến thể hệ T1 được kiểm tra khả năng kháng thuốc diệt cỏ với quizalofop-p và haloxyfop-p ở nồng độ ngoài đồng ruộng. Có thể thấy rằng chủng đột biến OsACCCase2 W2038L đã kháng đáng kể với hai loại thuốc diệt cỏ ức chế ACCase này, như thể hiện trong Fig. 17-18.

Tóm lại, bằng cách sử dụng gARN được điều chế với crARN và tracrARN tổng hợp bằng cách ủ, hoặc sử dụng trực tiếp sgARN tổng hợp, phức hợp RNP hoạt động có thể được hình thành với protein SpCas9 đã được tinh sạch; mô sẹo được bắn phá bằng súng bắn gen có thể được chọn bằng cách sử dụng quizalofop-p trong giai đoạn nuôi cấy mô; đột biến đồng hợp tử từ TGG sang TTG có thể được phát hiện bằng cách giải trình tự vị trí mục tiêu OsACCCase2 W2038 của cây con nuôi cấy mô thể hệ T0; đột biến có thể được di truyền sang thể hệ T1 và cho thấy khả năng kháng thuốc diệt cỏ ức chế ACCase, điều này đã chứng minh thêm rằng quá trình cắt/chỉnh sửa theo trình tự được lập trình được tạo ra từ phức hợp RNP kết hợp với crARN hoặc sgARN nhằm mục tiêu tuần tự có thể đạt được đột biến vị trí cụ thể của vị trí mục tiêu trong tế bào, và có thể hướng dẫn sản xuất các dấu hiệu chọn nội sinh tế bào để chọn lọc nuôi cấy mô, từ đó tạo ra cây trồng kháng thuốc trừ cỏ.

Ví dụ 10: Các phức hợp RNP nhắm mục tiêu khác nhau đồng thời chỉnh sửa vị trí

OsACCcase2 W2038 và gen OsBADH2 của mô sẹo *Oryza sativa*

Phức hợp RNP được điều chế bằng phương pháp theo ví dụ 8, quy trình bắn phá bằng súng bắn gen và quy trình nuôi cấy mô giống như quy trình của ví dụ 9. Bên cạnh crARN hoặc sgARN nhắm mục tiêu vào vị trí OsACCcase2 W2038, crARN hoặc sgARN nhắm mục tiêu đến gen OsBADH2 được thêm vào đồng thời, và chúng được ủ với protein SpCas9 để tạo thành phức hợp RNP nhắm mục tiêu cho gen mục tiêu thứ hai OsBADH2. Thực hiện bắn phá bằng súng bắn gen, cây con nuôi cấy mô thể hệ T0 thu được sau khi nuôi cấy phục hồi, sàng lọc, phân hóa và tạo rễ, và thể hệ T1 thu được bằng cách nhân giống.

Trình tự bộ gen OsBADH2 *Oryza sativa* được thể hiện trong SEQ ID NO: 17. Theo công cụ trực tuyến CRISPOR (<http://crispor.tefor.net/>), trình tự vị trí mục tiêu CCAAGTACCTCCGCGCAATCGcgg được chọn, trong đó vị trí PAM được nhận ra bởi protein Cas9 được thể hiện ở dạng chữ thường in nghiêng, và protein SpCas9 tinh khiết được chọn để điều chế phức hợp RNP. CGG được sử dụng làm PAM để thiết kế >CrARN1-OsBADH2: 5'-CCAAGUACCUCCGCGCAAUCGguuuuagagcuaugcu-3', người ta dự đoán rằng đột biến kháng thuốc của OsACCcase2 W2038L và sự kiện đột biến loại trực tiếp của OsBADH2 có thể được phát hiện đồng thời trong mô sẹo kháng thuốc thu được bằng cách chọn lọc quizalofop-p.

>CrARN1-OsBADH2 được tổng hợp bởi Công ty Công nghệ Sinh học GenScript, và sgARN cũng được tổng hợp:

>OsBADH2-  
sgARN:5'CCAAGUACCUCCGCGCAAUCGguuuuagagcuagaaaagcaaguuaaaauaag  
gcuaguccguuaucaacuugaaaaaguggcaccgagucggugc3'.

Mô sẹo kháng được chọn theo các bước biến nạp trong ví dụ 9, như được thể hiện trong Fig. 19, và mô sẹo kháng thuốc đã được chọn lọc và chịu sự phân hóa và xuất hiện cây con, và trình tự tại các vị trí mục tiêu OsACCcase2 và OsBADH2 của mô sẹo và cây con nuôi cấy mô thể hệ T0 đã được giải trình tự. Các môi phát hiện mục tiêu OsBADH2 là:

OsBADH2-check F: 5'CATCGGTACCCTCCTCTTC3'

OsBADH2-check R: 5'ATCGATCGATTTGGGGCTCA3'

Kết quả là, tổng số 13 mô sạo kháng thuốc đã thu được bằng cách chọn lọc, sự kiện đột biến OsACCCase2 W2038L được phát hiện ở 11 trong số chúng, và việc phát hiện trình tự mục tiêu OsBADH2 cho 11 mẫu mô sạo này cho thấy 8 trong số chúng đồng thời chứa sự chỉnh sửa sự kiện tại vị trí mục tiêu OsBADH2. Trong cây con nuôi cấy mô thể hệ T0 thu được bằng cách phân hóa, sự tồn tại của đột biến OsACCCase2 W2038L và đột biến đồng hợp tử OsBADH2 + A đã được phát hiện, như thể hiện trong Fig. 20-21.

Tóm lại, sau khi mô sạo lúa bị bắn phá bằng súng bắn gen với phức hợp RNP nhắm mục tiêu crARN- hoặc sgARN nhắm mục tiêu tuần tự để thực hiện chỉnh sửa vị trí cụ thể của OsACCCase2 W2038 và đồng thời thêm phức hợp RNP nhắm mục tiêu nhắm mục tiêu gen mục tiêu thứ hai OsBADH2, việc lựa chọn mô sạo có thể được thực hiện trong giai đoạn nuôi cấy mô với quizalofop-p; đột biến OsACCCase2 W2038 và việc loại trực tiếp nhắm mục tiêu của OsBADH2 xảy ra đồng thời ở 61% mô sạo kháng thuốc, và các chủng chứa đột biến đồng hợp tử của OsBADH2 đã được phát hiện trong cây con nuôi cấy mô thể hệ T0. Điều này chỉ ra rằng việc cắt/chỉnh sửa tuần tự kết hợp với biến nạp RNP để chỉnh sửa vị trí cụ thể của các gen kháng thuốc có thể tạo ra các dấu hiệu chọn lọc nội sinh, và việc bổ sung áp lực chọn lọc tương ứng có thể đồng thời sàng lọc các sự kiện chỉnh sửa của gen mục tiêu thứ hai, do đó đạt được chỉnh sửa vị trí cụ thể của bộ gen bằng các phương pháp không chuyển gen.

Ví dụ 11: Các phức hợp RNP được nhắm mục tiêu khác nhau đồng thời chỉnh sửa vị trí OsALS548 và gen OsSWEET14 của mô sạo *Oryza sativa*

Các phức hợp RNP nhắm mục tiêu cho vị trí OsALS548 được chuẩn bị bằng phương pháp theo ví dụ 8, trong đó trình tự crARN và sgARN tương ứng như trong ví dụ 8, tương ứng:

>CrARN1-548-G: 5'-GGGUAUGGUUGUGCAAUGGGAguuuuagagcuaugcu-3',

>CrARN2-548+T: 5'-UGGGUAUGGUUGUGCAAUGGGAguuuuagagcuaugcu-3',

>sgARN1-548-G:

5'GGGUAUGGUUGUGCAAUGGGAguuuuagagcuagaaaagcaaguuaaaauaaggc  
uaguccguuaucaacuugaaaaaguggcaccgagucgguc3',

>sgARN2-548+T:

5'UGGGUAUGGUUGUGCAAUGGGAguuuuagagcuagaaaagcaaguuaaaauaaggc  
uaguccguuaucaacuugaaaaaguggcaccgagucgguc3'.

Đề cập đến ví dụ 8, gARN hoặc sgARN được ủ với NGA-Cas9 để điều chế phức hợp RNP nhắm vào vị trí OsALS548.

Ngoài phức hợp RNP nhắm mục tiêu cho vị trí OsALS548, crARN hoặc sgARN cho gen OsSWEET14 được thêm vào đồng thời, và phức hợp RNP nhắm mục tiêu cho gen mục tiêu thứ hai OsSWEET14 được hình thành bằng cách ủ với protein SpCas9. Cây con nuôi cấy mô thể hệ T0 thu được bằng cách thực hiện bắn phá bằng súng bắn gen, nuôi cấy phục hồi, chọn lọc, phân hóa, tạo rễ, và thể hệ T1 thu được bằng cách nhân giống. Áp suất chọn lọc là 5 mg/L pyroxsulam.

Trình tự bộ gen OsSWEET14 *Oryza sativa* được thể hiện trong SEQ ID NO: 18. Theo công cụ trực tuyến CRISPOR (<http://crispor.tefor.net/>), trình tự vị trí mục tiêu GAGCTTAGCACCTGGTTGGAGggg được chọn lọc, trong đó các vị trí PAM được nhận ra bởi protein SpCas9 được thể hiện ở dạng chữ thường in nghiêng, và protein SpCas9 tinh khiết được chọn lọc để điều chế phức hợp RNP. GGG được sử dụng làm PAM để thiết kế:

>CrARN1-OsSWEET14:

5'-GAGCUUAGCACCUUGGUUGGAGguuuuagagcuaugcu-3', và người ta dự đoán rằng đột biến kháng thuốc của OsALS W548L và đột biến loại trực tiếp của OsSWEET14 có thể được phát hiện đồng thời trong mô sẹo kháng thuốc thu được bằng cách chọn lọc pyroxsulam.

>CrARN1-Os SWEET14 được tổng hợp bởi Công ty Công nghệ Sinh học GenScript, và sgARN cũng được tổng hợp:

>Os SWEET14-sgARN:

5'GAGCUUAGCACCCUGGUUGGAGguuuuagagcuagaaauagcaaguuaaaaauaaggc  
uaguccguuaucaacuugaaaaaguggcaccgagucggugc3'.

Mô sẹo kháng thuốc được chọn theo quy trình bắn phá bằng súng bắn gen và quy trình nuôi cấy mô như được mô tả trong ví dụ 9, như được thể hiện trong Fig. 22, và mô sẹo kháng thuốc được chọn để thực hiện quá trình phân hóa và xuất hiện cây con, trong đó công thức môi trường chọn lọc là: 4,1g/L bột N6 + 0,3 g/L casein thủy phân + 2,8 g/L prolin + 2 mg/L 2,4-D + 3% sucroza + 5 mg/L pyroxsulam + 500 mg/L Cef (cephalosporin) + 0,1 g/L inositol + 0,35% phytigel, pH 5,8.

Trình tự tại vị trí OsALS548 và vị trí mục tiêu OsSWEET14 của mô sẹo và cây con nuôi cấy mô thế hệ T0 đã được xác định trình tự. Các môi phát hiện vị trí mục tiêu OsSWEET14 là:

OsSWEET14-check F: 5' ATGGGTGCTGATGATTATCTTGTAT3'

OsSWEET14-check R: 5' TGAAGAGACATGCCAGCCATTG3'

Kết quả là, tổng cộng 9 calli kháng được chọn lọc, sự kiện đột biến OsALS W548L được phát hiện ở 8 trong số chúng, và việc phát hiện trình tự mục tiêu OsSWEET14 trong 8 mẫu mô sẹo này cho thấy 5 trong số chúng cũng chứa chỉnh sửa sự kiện tại vị trí mục tiêu OsSWEET14. Trong cây con nuôi cấy mô thế hệ T0 thu được bằng cách phân hóa, cả đột biến OsALS W548L và đột biến đồng hợp tử OsSWEET14-C đều có thể được phát hiện, như thể hiện trong Fig. 23-24.

Sau khi nhân giống các chủng T0 trong đó sự xuất hiện của đột biến OsALS W548L được phát hiện, các chủng cây con đột biến thế hệ T1 được thử nghiệm khả năng kháng thuốc diệt cỏ với pyroxsulam, imazapic, nicosulfuron và flucarbazone-Na ở nồng độ thực địa. Có thể thấy rằng chủng đột biến OsALS W548L cho thấy khả năng kháng đáng kể đối với tất cả 4 loại thuốc diệt cỏ ức chế ALS này, như thể hiện trong Fig. 25-28.

Tóm lại, bằng cách sử dụng gARN được điều chế với crARN và tracrARN tổng hợp bằng cách ủ hoặc sử dụng trực tiếp sgARN tổng hợp, phức hợp RNP hoạt động có



thể được hình thành với protein NGA Cas9 đã được tinh sạch, đột biến tại vị trí cụ thể của vị trí mục tiêu trong tế bào có thể đạt được bằng cách cắt/chỉnh sửa theo trình tự được lập trình tạo ra từ phức hợp RNP kết hợp với crARN hoặc sgARN nhằm mục tiêu tuần tự, việc lựa chọn mô sẹo bị bắn phá bằng súng bắn gen có thể được thực hiện với pyroxsulam ở giai đoạn nuôi cấy mô, đột biến từ TGG thành TTG được phát hiện bằng cách giải trình tự vị trí mục tiêu OsALS548 của cây con nuôi cấy mô thế hệ T0, và đột biến này có thể được di truyền sang Thế hệ T1 và cho thấy khả năng kháng thuốc diệt cỏ ức chế ALS.

Sau khi mô sẹo lúa bị bắn phá bằng súng bắn gen bằng cách thêm đồng thời phức hợp RNP nhằm mục tiêu vào gen mục tiêu thứ hai OsSWEET14 và sử dụng protein SpCas9 nhận biết NGG PAM, việc chọn lọc mô sẹo được thực hiện bằng pyroxsulam ở giai đoạn nuôi cấy mô. Đột biến OsALS W548L và loại trực tiếp có mục tiêu của OsSWEET14 xảy ra đồng thời ở 55% mô sẹo kháng thuốc, sự xuất hiện của đột biến đồng hợp tử OsSWEET14 có thể được phát hiện ở cây con nuôi cấy mô thế hệ T0, điều này cũng chỉ ra rằng các điểm đánh dấu lựa chọn nội sinh có thể được tạo ra bằng cách cắt/chỉnh sửa theo trình tự được lập trình kết hợp với chỉnh sửa theo vị trí cụ thể của các gen kháng được tạo ra từ sự biến nạp PNP, và các sự kiện chỉnh sửa của gen mục tiêu thứ hai có thể được chọn cùng một lúc bằng cách sử dụng đồng thời các protein Cas9 đã nhận ra các vị trí PAM khác nhau và thêm một áp lực chọn lọc tương ứng, do đó đạt được việc chỉnh sửa bộ gen theo vị trí cụ thể bằng các phương tiện không chuyển gen.

Ví dụ 12: Tạo đột biến W561L tại vị trí StALS561 bằng cách bắn phá các mẫu cây khoai tây (*Solanum tuberosum L.*) với hai phức hợp RNP được nhắm mục tiêu khác nhau

Trình tự axit amin của protein StALS2 *Solanum tuberosum L.* được thể hiện trong SEQ ID NO: 19, và trình tự của gen StALS2 *Solanum tuberosum L.* được thể hiện trong SEQ ID NO: 20. Các phương pháp điều chế phức hợp RNP và bắn phá bằng súng gen được tham chiếu đến ví dụ 8-9, và các sgARN cho trình tự ban đầu và trình tự đã chỉnh sửa được thiết kế cho vị trí StALS2W561 của *Solanum tuberosum L.* StALS2 tương

ứng với vị trí ALS574 *Arabidopsis thaliana* như sau:

>StALS561- G:

5'GGGAAUGGUGGUUCAGUGGGAguuuuagagcuagaaaagcaaguuaaaauaaggc  
uaguccguuaucaacuugaaaaaguggcaccgagucggugc3'

>StALS561 +T:

5'UGGGAAUGGUGGUUCAGUGGGAguuuuagagcuagaaaagcaaguuaaaauaaggc  
uaguccguuaucaacuugaaaaaguggcaccgagucggugc3',

Và các phức hợp RNP được điều chế theo phương pháp được mô tả trong ví dụ 8.

Giống khoai tây nhận là Atlantic hoặc Favorita, lá, thân và chồi nách của chúng được sử dụng làm mẫu cấy. Các phương pháp bắn phá bằng súng gen và chọn lọc và phân hóa như sau:

(1) Lá: Toàn bộ lá được cắt và trải phẳng trên môi trường M6 ưu trương (công thức: 4,42g/L bột MS + 1 ml/L vitamin B5 (Phytotechlab, G219) + 30g/L sucroza + 8g/L agar + 2mg/L 2,4-D + 0,8mg/L zeatin riboside + 0,2M mannitol + 250mg/L Cef), khoảng 5-6 chiếc lá được sử dụng cho mỗi lần bắn phá. Sau khi ủ trước 24 giờ, quá trình bắn phá bằng bột vàng được thực hiện. Sau khi bị bắn phá, chúng được nuôi cấy liên tục trong môi trường M6 ưu trương trong bóng tối trong 2 ngày, sau đó được chuyển sang môi trường M6 (4,42g/L bột MS +1 ml/L vitamin B5 (Phytotechlab, G219) + 30g/L sucroza + 8g/L agar + 2mg/L 2,4-D + 0,8mg/L zeatin riboside + 250mg/L Cef) và nuôi cấy liên tục trong 1 tuần, sau đó chuyển sang môi trường M6 với áp suất chọn lọc sau 1 tuần, việc chọn lọc mô sẹo kháng được thực hiện với áp suất chọn lọc là 20µg/L chlorsulfuron (công thức: 4,42g/L bột MS + 1 ml/L vitamin B5 (Phytotechlab, G219) + 30g/L sucroza + 8g/L agar + 2mg/L 2,4-D + 0,8mg/L zeatin riboside + 250mg/L Cef + 20µg/L chlorsulfuron), 4 tuần sau, chúng được chuyển sang môi trường cảm ứng chồi R4 có chứa áp suất chọn lọc (công thức: 4,42g/L bột MS + 1 ml/L bitamin B5 (Phytotechlab, G219) + 30g/L sucroza + 8g/L agar + 2mg/L GA3 + 0,8mg/L zeatin riboside + 250mg/L Cef + 20µg/L chlorsulfuron) cho đến khi cây con xuất hiện.

(2) Thân: Các thân khoai tây (không có chồi nách) được lấy và cắt dọc với các vết

rạch hướng lên trên, và đặt trên môi trường CIMI (4,42g/L bột MS + 20g/L sucrose + 8g/L agar + 0,5 mg/L zeatin nucleoside + 2mg/L 2,4-D + 250mg/L Cef + 20µg/L chlorsulfuron), tiếp theo là bắn phá bằng súng bắn gen, nuôi cấy trong bóng tối 1 ngày sau bắn phá, thân cây được chuyển sang môi trường CIMI mới và nuôi cấy liên tục trong 1 tuần, sau đó thân cây được chuyển sang môi trường SIMI có chứa áp suất chọn lọc (công thức: 4,42g/L bột MS + 20g/L sucroza + 8g/L agar + 1mg/L zeatin riboside + 0,1mg/L GA3 + 250mg/L Cef + 20µg/L chlorsulfuron) để thực hiện việc chọn lọc các chồi kháng cho đến khi cây con xuất hiện.

(3) Chồi nách: Các chồi nách được lấy từ thân củ khoai tây, cắt dọc và chuyển sang môi trường CIMI, với các vết rạch hướng lên trên, đặt trên môi trường CIMI, tiếp theo là bắn phá bằng súng bắn gen, nuôi cấy trong bóng tối 1 ngày sau khi bắn phá, chúng được chuyển sang môi trường CIMI mới và được nuôi cấy liên tục trong 1 tuần, sau đó chúng được chuyển sang môi trường SIMI có chứa áp suất chọn lọc để thực hiện việc chọn lọc các chồi kháng cho đến khi cây con xuất hiện.

Các môi phát hiện cho vị trí StALS2 W561 là:

StALS561-Check F: 5'GTGGATTAGGAGCAATGGGATTT3'

StALS561-Check R: 5' TTATTTTAGATAATACAATGCCTCG3'

Sau khi phát hiện, sự kiện chỉnh sửa W561L xảy ra tại vị trí StALS2 W561 của cây giống cấy mô khoai tây thế hệ T0 đã được sàng lọc tính kháng, điều này chứng tỏ rằng phương pháp chỉnh sửa gen chuyển tiếp không chuyển gen do sáng chế cung cấp là phù hợp với các loại cây trồng như khoai tây mà một yếu tố chuyển gen ngoại sinh khó có thể được tách ra và loại bỏ bằng cách tự ghép hoặc lai.

Ví dụ 13: Sử dụng thành công sơ đồ cắt/chỉnh sửa tuần tự được lập trình để thay thế bazơ trong các tế bào 293T của con người

Gen HBB (haemoglobin subunit beta) trong tế bào thận phôi thai người 293T (trình tự ADN của chúng được thể hiện trong SEQ ID NO: 21, trình tự CDS của chúng được thể hiện trong SEQ ID NO: 22, và trình tự axit amin của chúng được thể hiện được trong

SEQ ID NO: 23) đã được chọn, vị trí mục tiêu để cắt/chỉnh sửa tuần tự sgARN được thiết kế trong vùng của exon đầu tiên, trong đó mục tiêu thứ nhất là catggtgcaCctgactcctgAGG. SgARN nhận ra mục tiêu này được đặt tên là sgHBB, và người ta dự đoán rằng sự xóa một bazơ C có thể được tạo ra ở đoạn cắt sgARN của vị trí này. Mục tiêu thứ hai là ccatggtgcatctgactctgAGG, đã nhận ra trình tự với sự xóa một bazơ C được tạo ra từ quá trình cắt/chỉnh sửa mục tiêu thứ nhất, và sgARN của mục tiêu này được đặt tên là sgHBB-c. SgARN không có vị trí mục tiêu trong tế bào 293T được thiết kế và đặt tên là sgNOTAR, được sử dụng như một plasmid bổ sung cho quá trình chuyển nạp trong thí nghiệm.

Theo thiết kế trên, các đoạn ADN mạch đơn bổ sung lần lượt được tổng hợp. Sau khi ủ, chúng được liên kết vào các plasmid px458 (addgene: 48138) được tiêu hóa bằng enzym BbsI, và chuyển thành *E. coli* DH5a khả nạp. Sau khi các khuẩn lạc đơn lẻ *E. coli* thu được được xác minh bằng cách giải trình tự, plasmid được chiết và tinh chế bằng bộ chiết plasmid không chứa nội độc tố (Tiangen Bio).

Tế bào 293T đang phát triển mạnh mẽ được tiêu hóa và phân lập bằng trypsin 0,05% (Gibico), pha loãng với môi trường DMEM (10% huyết thanh nhau thai bò; kháng kép penicillin + streptomycin) và được cấy vào đĩa nuôi cấy 24 giếng, và đặt trong tủ ấm carbon dioxid qua đêm. Vào ngày hôm sau, chúng được trộn riêng với, theo cách cắt/chỉnh sửa tuần tự: plasmid sgHBB và sgHBB-c, mỗi loại 0,5ug; cắt/chỉnh sửa mục tiêu đơn lẻ: plasmid sgHBB và sgNOTAR mỗi loại 0,5ug; không kiểm soát mục tiêu: pEGFP-c1 plasmid 1ug. Sự biến nạp được thực hiện với lipofectamine3000 (Invitrogen). Có 3 lần lặp lại cho mỗi nhóm.

48 giờ sau khi biến nạp, ảnh được chụp bằng kính hiển vi huỳnh quang để ghi lại hiệu suất biến nạp, và tổng số ADN của mỗi giếng được tách chiết bằng bộ chiết axit nucleic (Omega).

Các đoạn mồi trình tự Hi-tom được thiết kế như sau:

Hi-HBB-F: gaggtgagtacggtgtgcGCTTACATTTGCTTCTGACACAACCT;

Hi-HBB-R: gagttggatgctggatggTCTATTGGTCTCCTTAAACCTGTCTTG.

Các đoạn mồi này được sử dụng để thực hiện PCR đối với mỗi mẫu ADN. Việc

giải trình tự thông lượng cao của các sản phẩm PCR được thực hiện bằng phương pháp Hi-tom (Sci China Life Sci. 2019 Jan;62(1):1-7. doi: 10,1007/s11427-018-9402-9).

Dữ liệu thống kê về kết quả giải trình tự được thể hiện trong Bảng 6 và Bảng 7. Những dữ liệu này chỉ ra rằng phương pháp cắt/chỉnh sửa tuần tự tại vị trí HBB tạo ra kết quả chỉnh sửa từ C thành T (dẫn đến đột biến P6S) với tỷ lệ khoảng 1,67%, trong khi phương pháp cắt/chỉnh sửa mục tiêu đơn lẻ không thể tạo ra sự thay thế bazơ như vậy.

Bảng 6: Các kiểu chỉnh sửa được tạo ra bởi các tổ hợp sgARN khác nhau trong thí nghiệm cắt/chỉnh sửa tuần tự của gen HBB trong tế bào 293T, và số đọc của các kiểu gen khác nhau được phát hiện bằng giải trình tự Hi-Tom

Kiểu gen	cắt/chỉnh sửa tuần tự được lập trình HBB lặp lại lần 1	cắt/chỉnh sửa tuần tự được lập trình HBB lặp lại lần 2	cắt/chỉnh sửa tuần tự được lập trình HBB lặp lại lần 3	cắt/chỉnh sửa mục tiêu đơn lẻ HBB lặp lại lần 1	cắt/chỉnh sửa mục tiêu đơn lẻ HBB lặp lại lần 2	cắt/chỉnh sửa mục tiêu đơn lẻ HBB lặp lại lần 3	biến nạp GFP lặp lại lần 1	biến nạp GFP lặp lại lần 2
WT	6025	6037	6003	5776	5636	5614	7564	7430
Xóa 1	555	593	613	1170	1134	1120	252	288
Xóa 2	594	625	410	465	509	405		
Xóa 3	304	263	258		260	243		
Xóa 4		222						
Xóa 5			220		217			
Xóa 6								
Xóa 7	312	223	232	274	229	278		
Chèn				273		308		
C->T SNP	168		230					
tổng	7958	7963	7966	7958	7985	7968	7816	7718

Bảng 7: Thống kê tổng hợp tỷ lệ các kiểu chỉnh sửa được tạo ra bởi các tổ hợp sgARN khác nhau trong thí nghiệm cắt/chỉnh sửa tuần tự các gen HBB trong tế bào 293T

Kiểu gen	cắt/chỉnh sửa tuần tự được lập trình HBB	cắt/chỉnh sửa mục tiêu đơn lẻ HBB	cơ sở biến nạp GFP	tỉ lệ cắt/chỉnh sửa tuần tự được lập trình HBB	tỉ lệ cắt/chỉnh sửa mục tiêu đơn lẻ HBB	tỉ lệ cơ sở biến nạp GFP
WT	18065	17026	14994	75,63%	71,21%	96,52%
Xóa 1	1761	3424	540	7,37%	14,32%	3,48%
Xóa 2	1629	1379	0	6,82%	5,77%	0,00%
Xóa 3	825	503	0	3,45%	2,10%	0,00%
Xóa 4	222	0	0	0,93%	0,00%	0,00%
Xóa 5	220	217	0	0,92%	0,91%	0,00%
Xóa 6	0	0	0	0,00%	0,00%	0,00%
Xóa 7	767	781	0	3,21%	3,27%	0,00%
Chèn	0	581	0	0,00%	2,43%	0,00%
C->T SNP	398	0	0	1,67%	0,00%	0,00%
tổng	23887	23911	15534	100,00%	100,00%	100,00%

Ghi chú: WT đại diện cho kiểu hoang dã; Xóa đại diện cho kiểu gen bị xóa; Chèn đại diện cho kiểu gen của phần chèn; C-> T SNP đại diện cho kiểu gen với sự thay thế bazơ từ C thành T ở chỗ cắt; tổng đại diện cho tổng số.

Ngoài ra, thiếu máu hồng cầu hình liềm và bệnh  $\beta$ -thalassemia đều là bệnh thiếu máu bẩm sinh di truyền do đột biến gen HBB mã hóa tiểu đơn vị hemoglobin  $\beta$  của người trưởng thành. Những bệnh nhân mắc các bệnh này có thể cần truyền máu hoặc các liệu pháp khác trong suốt cuộc đời. Kết quả của thí nghiệm trên đã chứng minh rằng thông qua giải pháp kỹ thuật cắt/chỉnh sửa theo trình tự được lập trình được đề xuất bởi sáng chế, một tổ hợp crARN hoặc sgARN có thể được thiết kế cho vị trí đột biến của gen HBB để gây ra sự sửa chữa mong đợi ở vị trí đột biến, để tế bào tạo ra hemoglobin hoạt động và phục hồi chức năng, do đó đạt được hiệu quả điều trị. Nghĩa là, chế phẩm được cung cấp bởi sáng chế có công dụng điều trị bệnh.

Sau nhiều thử nghiệm cùng lúc, bởi vì phương pháp mới này hoàn toàn dựa trên các chức năng hiện có của Cas9, phương pháp của sáng chế sẽ hoàn toàn có thể áp dụng để đạt được các chức năng mới là thay thế bazơ, xóa và chèn các đoạn cụ thể vào các sinh vật khác (thực vật, động vật, nấm hoặc vi khuẩn, v.v.) nơi Cas9 có thể hoạt động tốt.

Tất cả các ấn phẩm công bố và đơn đăng ký sáng chế được đề cập trong phần mô tả đều được đưa vào tài liệu này bằng cách tham chiếu, như thể mỗi ấn phẩm công bố hoặc đơn đăng ký sáng chế được kết hợp riêng lẻ và cụ thể ở đây bằng cách tham chiếu.

Mặc dù sáng chế nói trên đã được mô tả chi tiết hơn bằng ví dụ và phương án để hiểu rõ ràng, nhưng rõ ràng là một số thay đổi và sửa đổi nhất định có thể được thực hiện trong phạm vi của các yêu cầu bảo hộ kèm theo, và những thay đổi và sửa đổi đó đều nằm trong phạm vi của sáng chế.

## Yêu cầu bảo hộ

1. Phương pháp tạo đột biến mới ở sinh vật, bao gồm các bước sau: tạo tuần tự hai hoặc nhiều đoạn đứt gãy ADN tại một vị trí cụ thể trong bộ gen của sinh vật và sửa chữa chúng một cách tự nhiên tương ứng, trong đó đoạn đứt gãy ADN sau đó được tạo ra dựa trên một trình tự mới được tạo từ lần sửa chữa đoạn đứt gãy ADN trước đó, trong đó,

"đứt gãy ADN" đạt được bằng cách cung cấp nucleaza có đặc tính nhắm mục tiêu vào tế bào của một sinh vật để tiếp xúc với vị trí cụ thể của ADN bộ gen;

"tạo tuần tự hai hoặc nhiều đứt gãy ADN tại một vị trí cụ thể" đề cập đến việc dựa trên trình tự mới được tạo ra từ sự kiện sửa chữa đoạn đứt gãy ADN trước đó do hệ thống CRISPR / Cas gây ra, ARN mục tiêu mới được thiết kế để cắt vị trí một lần nữa.

"hai hoặc nhiều đứt gãy ADN" được tạo ra bằng cách cung cấp các nucleaza nhắm mục tiêu khác nhau cho các mục tiêu khác nhau vào cùng một tế bào nhận, tức là, được tạo ra khi các phức RNP được hình thành bởi cùng một nucleaza CRISPR/Cas tương ứng với các gRNA hoặc sgARN khác nhau cắt tuần tự các chuỗi mục tiêu tương ứng, hoặc được tạo ra khi các phức RNP tương ứng được hình thành bởi mỗi trong số hai hoặc nhiều nucleaza CRISPR/Cas nhận ra các chuỗi PAM khác nhau với gARN hoặc sgARN tương ứng cắt tuần tự các chuỗi mục tiêu tương ứng;

nucleaza được nhắm mục tiêu là bất kỳ nucleaza CRISPR / Cas nào có khả năng thực hiện sự chỉnh sửa bộ gen.

2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó phương pháp khác biệt ở chỗ, nucleaza được nhắm mục tiêu là ở dạng ADN.

3. Phương pháp theo điểm 1, trong đó phương pháp khác biệt ở chỗ, nucleaza được nhắm mục tiêu là ở dạng mRNA hoặc protein thay vì ADN.

4. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó khác biệt ở chỗ, phương pháp phân phối nucleaza mục tiêu vào tế bào được chọn từ: 1) phương pháp truyền tế bào qua trung gian PEG; 2) phương pháp truyền tế bào qua trung gian liposome; 3) phương pháp biến nạp điện tử; 4) vi tiêm; 5) bắn phá bằng súng gen; và 6)



phương pháp biến nạp qua trung gian vi khuẩn *Agrobacterium*.

5. Phương pháp sàng lọc các sự kiện chỉnh sửa độc lập với dấu hiệu chuyển gen ngoại sinh, bao gồm các bước sau:

1) hai hoặc nhiều đứt gãy ADN được tạo ra liên tiếp theo trình tự tại một vị trí cụ thể của gen mục tiêu thứ nhất của tế bào nhận và được sửa chữa một cách tự nhiên tương ứng, trong đó đứt gãy ADN sau đó được tạo ra dựa trên một trình tự mới được tạo ra từ lần sửa chữa đứt gãy ADN trước đó;

2) một số sự kiện chỉnh sửa nhất định được tạo ra sau khi vị trí cụ thể của gen mục tiêu thứ nhất được cắt và sửa chữa một cách tuần tự, có thể tạo ra một tế bào đột biến có khả năng chống lại áp lực chọn lọc nhất định để tạo ra một tính trạng có thể chọn lọc kiểu hình, áp lực chọn lọc tương ứng được áp dụng để thực hiện chọn lọc tính trạng, và tế bào, mô, cơ quan hoặc sinh vật hoàn chỉnh có chứa các sự kiện chỉnh sửa như vậy sẽ bị phân lập;

trong đó, "đứt gãy ADN" đạt được bằng cách đưa một nucleaza có đặc tính nhắm mục tiêu vào tế bào của sinh vật để tiếp xúc với vị trí cụ thể của ADN bộ gen;

"nucleaza được nhắm mục tiêu" là bất kỳ nucleaza CRISPR/Cas nào có khả năng thực hiện chỉnh sửa bộ gen;

"liên tục tạo ra hai hoặc nhiều đứt gãy ADN tại một vị trí cụ thể" đề cập đến việc dựa trên trình tự mới được hình thành bởi sự kiện sửa chữa đứt gãy ADN trước đó do hệ thống CRISPR/Cas tạo ra, một ARN mục tiêu mới được thiết kế để cắt lại vị trí đó;

"hai hoặc nhiều đứt gãy ADN" được tạo ra khi các phức hợp RNP được hình thành bởi cùng một nucleaza CRISPR/Cas tương ứng với các gARN hoặc sgARN khác nhau cắt tuần tự các chuỗi mục tiêu tương ứng, hoặc được tạo ra khi các phức RNP tương ứng được hình thành bởi mỗi trong số hai hoặc nhiều nucleaza CRISPR/Cas nhận ra các chuỗi PAM khác nhau với gARN hoặc sgARN tương ứng cắt tuần tự các chuỗi mục tiêu tương ứng.

6. Phương pháp theo điểm 5, trong đó khác biệt ở chỗ, phương pháp còn bao gồm bước 3): ngoài gen mục tiêu thứ nhất, một nucleaza được nhắm mục tiêu cho ít nhất một

gen mục tiêu thứ hai được sử dụng để chỉnh sửa một vị trí mục tiêu khác cùng một lúc, và sự kiện chỉnh sửa của gen mục tiêu thứ hai được làm giàu và sàng lọc đồng bộ thông qua sàng lọc tính trạng có thể chọn được tạo ra bởi các đột biến của gen mục tiêu thứ nhất, và tế bào, mô, cơ quan hoặc sinh vật hoàn chỉnh chứa đồng thời các sự kiện chỉnh sửa của gen mục tiêu và của ít nhất một gen mục tiêu thứ hai được phân lập.

7. Phương pháp theo điểm 5 hoặc 6, trong đó khác biệt ở chỗ, "gen mục tiêu thứ nhất" là gen mã hóa vị trí ít nhất một tính trạng có thể chọn lọc kiểu hình, trong đó ít nhất một tính trạng có thể chọn lọc kiểu hình là tính trạng kháng/chống chịu hoặc tính trạng có ưu thế sinh trưởng.

8. Phương pháp theo điểm 5 hoặc 6, trong đó khác biệt ở chỗ, "vị trí cụ thể gen mục tiêu thứ nhất" đề cập đến vị trí mà tại đó một dạng đột biến nhất định được tạo ra sau khi cắt và sửa chữa liên tiếp, có khả năng tạo ra tế bào nhận với khả năng chống lại áp lực chọn lọc nhất định để tạo ra ít nhất một tính trạng kháng/chống chịu có thể chọn lọc kiểu hình hoặc tính trạng có ưu thế sinh trưởng.

9. Phương pháp theo điểm 8, trong đó khác biệt ở chỗ, "dạng đột biến nhất định" bao gồm sự thay thế của một bazơ đơn lẻ, sự thay thế của nhiều bazơ, hoặc chèn vào hoặc xóa một số lượng bazơ không xác định.

10. Phương pháp theo điểm 5 hoặc 6, trong đó khác biệt ở chỗ, "áp lực chọn lọc nhất định" có thể là áp lực môi trường hoặc áp lực tạo ra từ một hợp chất được thêm vào.

11. Phương pháp theo điểm 10, trong đó khác biệt ở chỗ, áp lực môi trường là nhiệt độ cao, nhiệt độ thấp hoặc thiếu oxy; áp lực do hợp chất thêm vào là nồng độ ion muối, kháng sinh, độc tố tế bào hoặc thuốc diệt cỏ.

12. Phương pháp theo điểm 6, trong đó khác biệt ở chỗ, "gen mục tiêu thứ hai" dùng để chỉ một gen khác có mã hóa khác với gen mục tiêu thứ nhất.

13. Phương pháp theo điểm 6, trong đó khác biệt ở chỗ, "nucleaza được nhắm mục tiêu cho ít nhất một gen mục tiêu thứ hai" và nucleaza CRISPR/Cas được sử dụng để tạo ra sự phá vỡ ADN tại một vị trí cụ thể của gen mục tiêu thứ nhất là giống nhau hoặc khác nhau.

14. Phương pháp theo điểm 6, trong đó khác biệt ở chỗ, trong đó nucleaza được nhắm mục tiêu ở dạng ADN.

15. Phương pháp theo điểm 6, trong đó khác biệt ở chỗ, trong đó nucleaza được nhắm mục tiêu ở dạng mRNA hoặc protein thay vì ADN.

16. Phương pháp theo điểm 6, trong đó khác biệt ở chỗ, phương pháp phân phối nucleaza được nhắm mục tiêu vào tế bào được chọn từ: 1) phương pháp chuyển nạp tế bào qua trung gian PEG; 2) phương pháp chuyển hóa tế bào qua trung gian liposome; 3) phương pháp biến đổi điện di; 4) vi tiêm; 5) bắn phá súng gen; và 6) phương pháp biến nạp qua trung gian *Agrobacteria*.

17. Phương pháp chỉnh sửa tạm thời không chuyển gen của bộ gen sinh vật, bao gồm các bước sau:

1) sự kết hợp của ít nhất hai đoạn crARN hoặc sự kết hợp của ít nhất hai đoạn sgARN được thiết kế và tổng hợp cho một vị trí cụ thể của gen mục tiêu thứ nhất của tế bào nhận, trong đó tổ hợp crARN kết hợp với tracrARN hoặc tổ hợp sgARN đơn lẻ có khả năng hướng dẫn một protein Cas tương ứng tạo tuần tự hai hoặc nhiều đoạn đứt gãy ADN tại vị trí cụ thể trong gen mục tiêu thứ nhất của tế bào nhận và sửa chữa chúng một cách tự nhiên tương ứng, trong đó đoạn đứt gãy ADN sau đó được tạo ra dựa trên trình tự mới được tạo ra từ sự sửa chữa đứt gãy ADN trước đó;

2) một lượng thích hợp protein CRISPR/Cas hoặc mRNA tương ứng của chúng được trộn với tổ hợp của các đoạn crARN và đoạn tracrARN hoặc với sự kết hợp của các đoạn sgARN đơn lẻ như trên được thiết kế và tổng hợp trước có khả năng hướng dẫn chỉnh sửa theo vị trí cụ thể của gen mục tiêu thứ nhất để tạo ra các dấu hiệu chọn lọc nội sinh;

3) phức hợp RNP ở trên được đưa vào tế bào nhận và tiếp xúc với vị trí cụ thể của ADN bộ gen để chỉnh sửa gen;

4) theo một tính trạng có thể chọn lọc kiểu hình được tạo ra bởi sự chỉnh sửa theo vị trí cụ thể của gen mục tiêu thứ nhất bởi phức hợp RNP, áp lực chọn lọc tương ứng được áp dụng để thực hiện chọn lọc tính trạng, và tế bào, mô, cơ quan hoặc sinh vật hoàn chỉnh có chứa sự kiện chỉnh sửa được phân lập;

trong đó, protein CRISPR/Cas là nucleaza CRISPR/Cas bất kỳ có khả năng thực hiện chỉnh sửa bộ gen;

dấu hiệu "tạo tuần tự hai hoặc nhiều đứt gãy ADN tại một vị trí cụ thể" đề cập đến tính năng dựa trên trình tự mới được hình thành bởi sự kiện sửa chữa đứt gãy ADN trước đó do hệ thống CRISPR/Cas tạo ra, một ARN mục tiêu mới được thiết kế để cắt lại vị trí đó;

"hai hoặc nhiều đứt gãy ADN" được tạo ra khi các phức hợp RNP được hình thành bởi cùng một nucleaza CRISPR/Cas tương ứng với các gARN hoặc sgARN khác nhau cắt tuần tự các chuỗi mục tiêu tương ứng, hoặc được tạo ra khi các phức RNP tương ứng được hình thành bởi mỗi trong số hai hoặc nhiều nucleaza CRISPR/Cas nhận ra các chuỗi PAM khác nhau với gRNA hoặc sgARN tương ứng cắt tuần tự các chuỗi mục tiêu tương ứng.

18. Phương pháp theo điểm 17, trong đó khác biệt ở chỗ, bước 2) còn bao gồm ít nhất một trong số các đoạn crARN và tracrARN được tổng hợp nhân tạo hoặc các đoạn sgARN được tổng hợp nhân tạo nhắm vào gen mục tiêu thứ hai, thứ ba hoặc nhiều hơn được bổ sung thêm và quá trình ủ được tiến hành trong ống nghiệm để tạo thành phức hợp RNP.

19. Phương pháp theo điểm 18, trong đó khác biệt ở chỗ, bước 4) còn phân lập tế bào, mô, cơ quan hoặc sinh vật hoàn chỉnh chứa đồng thời các sự kiện chỉnh sửa của gen mục tiêu thứ nhất và của ít nhất một trong số gen mục tiêu thứ hai, thứ ba hoặc nhiều hơn.

20. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm 17 đến 19, trong đó khác biệt ở chỗ, "gen mục tiêu thứ nhất" là một gen mã hóa vị trí ít nhất một tính trạng có thể chọn lọc kiểu hình, trong đó ít nhất một tính trạng có thể chọn lọc kiểu hình là tính trạng kháng/chống chịu hoặc tính trạng có ưu thế sinh trưởng.

21. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm 17 đến 19, trong đó khác biệt ở chỗ, "vị trí cụ thể của gen mục tiêu thứ nhất" đề cập đến vị trí mà tại đó một dạng đột biến nhất định được tạo ra sau khi cắt và sửa chữa liên tiếp, có khả năng tạo ra tế bào nhận với khả năng chống lại áp lực chọn lọc nhất định để tạo ra ít nhất một tính trạng

kháng/chống chịu có thể chọn lọc kiểu hình hoặc tính trạng có ưu thế sinh trưởng.

22. Phương pháp theo điểm 21, trong đó khác biệt ở chỗ, "dạng đột biến nhất định" bao gồm sự thay thế của một bazơ đơn lẻ, sự thay thế của nhiều bazơ, hoặc chèn vào hoặc xóa một số lượng bazơ không xác định.

23. Phương pháp theo điểm 21, trong đó khác biệt ở chỗ, "áp lực chọn lọc nhất định" có thể là áp lực môi trường hoặc áp lực tạo ra từ một hợp chất được thêm vào.

24. Phương pháp theo điểm 23, trong đó khác biệt ở chỗ, áp lực môi trường là nhiệt độ cao, nhiệt độ thấp hoặc thiếu oxy; áp lực do hợp chất thêm vào là nồng độ ion muối, kháng sinh, độc tố tế bào hoặc thuốc diệt cỏ.

25. Phương pháp theo điểm 18 hoặc 19, trong đó khác biệt ở chỗ, "gen mục tiêu thứ hai hoặc thứ ba hoặc nhiều hơn" dùng để chỉ các gen khác có mã hóa khác với gen mục tiêu thứ nhất.

26. Phương pháp theo điểm 18 hoặc 19, trong đó khác biệt ở chỗ, "ít nhất một trong số các đoạn crARN và tracrARN được tổng hợp nhân tạo hoặc các đoạn sgARN được tổng hợp nhân tạo nhắm vào gen mục tiêu thứ hai, thứ ba hoặc nhiều hơn" chia sẻ cùng một protein Cas với crARN hoặc sgARN nhắm mục tiêu vào gen mục tiêu thứ nhất.

27. Phương pháp theo điểm 18 hoặc 19, trong đó khác biệt ở chỗ, "ít nhất một trong số các đoạn crARN và tracrARN được tổng hợp nhân tạo hoặc các đoạn sgARN được tổng hợp nhân tạo nhắm vào gen mục tiêu thứ hai, thứ ba hoặc nhiều hơn" và crARN hoặc sgARN nhắm mục tiêu vào gen mục tiêu thứ nhất sử dụng các protein Cas nhận biết các trình tự PAM khác nhau.

28. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 17 đến 19, trong đó khác biệt ở chỗ, phương pháp phân phối phức hợp RNP vào tế bào được chọn từ: 1) phương pháp chuyển nạp tế bào qua trung gian PEG; 2) phương pháp chuyển hóa tế bào qua trung gian liposome; 3) phương pháp biến đổi điện di; 4) vi tiêm; và 5) bắn phá súng gen.

29. Phương pháp chỉnh sửa tạm thời không chuyển gen bộ gen thực vật, bao gồm các bước sau:

1) sự kết hợp của ít nhất hai đoạn crARN hoặc sự kết hợp của ít nhất hai đoạn sgARN được thiết kế và tổng hợp cho một vị trí cụ thể của gen mục tiêu thứ nhất của tế bào hoặc mô thực vật nhận, trong đó tổ hợp crARN kết hợp với tracrARN hoặc chỉ riêng tổ hợp sgARN có khả năng hướng dẫn protein Cas tương ứng để tạo ra một cách tuần tự hai hoặc nhiều đoạn ADN tại vị trí cụ thể trong gen mục tiêu thứ nhất của tế bào nhận và sửa chữa chúng một cách tự nhiên tương ứng, trong đó đứt gãy ADN sau này được tạo ra dựa trên trình tự mới được tạo ra từ quá trình sửa chữa đứt gãy ADN trước đó;

2) một lượng protein CRISPR/Cas thích hợp hoặc mARN tương ứng của nó được trộn với sự kết hợp của các đoạn crARN và đoạn tracrARN hoặc chỉ với sự kết hợp của các đoạn sgARN như được thiết kế và tổng hợp trước ở trên để có khả năng hướng dẫn việc chỉnh sửa tại địa điểm cụ thể đối với gen mục tiêu thứ nhất tạo ra các dấu hiệu chọn lọc nội sinh;

3) phức hợp RNP ở trên được đưa vào tế bào hoặc mô thực vật nhận và tiếp xúc với vị trí cụ thể của bộ gen ADN để đạt được chỉnh sửa gen;

4) theo đặc điểm có thể chọn lọc về kiểu hình được tạo ra bằng cách chỉnh sửa gen mục tiêu thứ nhất ở vị trí cụ thể bằng phức hợp RNP, áp lực chọn lọc tương ứng được áp dụng để tạo ra sự lựa chọn cho tính trạng và tế bào, mô, cơ quan hoặc cây hoàn chỉnh có chứa sự kiện chỉnh sửa được phân lập;

trong đó, protein CRISPR/Cas là nucleaza CRISPR/Cas bất kỳ có khả năng thực hiện chỉnh sửa bộ gen;

dấu hiệu "tạo hai hoặc nhiều đứt gãy ADN liên tiếp tại vị trí cụ thể" đề cập đến dấu hiệu dựa trên trình tự mới được hình thành bởi sự kiện sửa chữa đứt gãy ADN trước đó được tạo bởi hệ thống CRISPR/Cas, một ARN mục tiêu mới được thiết kế để cắt vị trí lần nữa;

trong đó "hai hoặc nhiều đứt gãy ADN" được tạo ra khi phức hợp RNP được tạo thành bởi cùng một nucleaza CRISPR/Cas tương ứng với các gARN hoặc sgARN khác nhau cắt liên tiếp các trình tự mục tiêu tương ứng, hoặc được tạo ra khi phức hợp RNP được tạo thành tương ứng bởi mỗi trong số hai hoặc nhiều nucleaza CRISPR / Cas nhận ra các trình tự PAM khác nhau với gARN hoặc sgARN tương ứng, cắt liên tiếp các trình

tự mục tiêu tương ứng.

30. Phương pháp theo điểm 29, trong đó khác biệt ở chỗ, bước 2) còn bao gồm ít nhất một trong số các đoạn crARN và tracrARN được tổng hợp nhân tạo hoặc các đoạn sgARN được tổng hợp nhân tạo nhắm vào gen mục tiêu thứ hai, thứ ba hoặc nhiều hơn được bổ sung thêm và quá trình ủ được tiến hành trong ống nghiệm để tạo thành phức hợp RNP.

31. Phương pháp theo điểm 30, trong đó khác biệt ở chỗ, bước 4) còn phân lập tế bào, mô, cơ quan hoặc thực vật hoàn chỉnh đồng thời chứa các sự kiện chỉnh sửa của gen mục tiêu thứ nhất và của ít nhất một trong số các gen mục tiêu thứ hai, thứ ba hoặc nhiều hơn.

32. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 29 đến 31, trong đó khác biệt ở chỗ, trong đó "gen mục tiêu thứ nhất" là một gen mã hóa vị trí ít nhất một tính trạng có thể chọn lọc kiểu hình, trong đó ít nhất một tính trạng có thể chọn lọc kiểu hình là tính trạng kháng/chống chịu hoặc tính trạng có ưu thế sinh trưởng.

33. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 29 đến 31, trong đó khác biệt ở chỗ, trong đó "vị trí cụ thể của gen mục tiêu thứ nhất" đề cập đến vị trí mà tại đó một dạng đột biến nhất định được tạo ra sau khi cắt và sửa chữa liên tiếp, có khả năng tạo ra tế bào nhận với khả năng chống lại áp lực chọn lọc nhất định để tạo ra ít nhất một tính trạng kháng/chống chịu có thể chọn lọc kiểu hình hoặc tính trạng có ưu thế sinh trưởng.

34. Phương pháp theo điểm 33, trong đó khác biệt ở chỗ, "dạng đột biến nhất định" bao gồm sự thay thế của một bazơ đơn lẻ, sự thay thế của nhiều bazơ, hoặc chèn vào hoặc xóa một số lượng bazơ không xác định.

35. Phương pháp theo điểm 33, trong đó khác biệt ở chỗ, "áp lực chọn lọc nhất định" có thể là áp lực môi trường hoặc áp lực tạo ra từ một hợp chất được thêm vào.

36. Phương pháp theo điểm 35, trong đó khác biệt ở chỗ, áp lực môi trường là nhiệt độ cao, nhiệt độ thấp hoặc thiếu oxy; và áp lực tạo ra từ một hợp chất được thêm vào là áp suất tạo ra từ nồng độ ion muối, kháng sinh, độc tố tế bào hoặc thuốc diệt cỏ.

37. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 29 đến 31, trong đó khác biệt ở chỗ, "tế bào hoặc mô thực vật nhận" là bất kỳ tế bào hoặc mô nào có thể đóng vai trò là tế bào nhận biểu hiện nhất thời và có thể được tái sinh thành thực vật hoàn chỉnh thông qua nuôi cấy mô.

38. Phương pháp theo điểm 37, trong đó khác biệt ở chỗ, tế bào là tế bào nguyên sinh hoặc tế bào huyền phù; và mô là mô sẹo, phôi chưa trưởng thành, phôi trưởng thành, lá, đầu chồi, cành non hoặc trụ dưới lá mầm.

39. Phương pháp theo điểm 30 hoặc 31, trong đó khác biệt ở chỗ, "gen mục tiêu thứ hai, thứ ba hoặc nhiều hơn" dùng để chỉ các gen khác có mã hóa khác với gen mục tiêu thứ nhất.

40. Phương pháp theo điểm 30 hoặc 31, trong đó "ít nhất một trong các đoạn crARN và tracrARN được tổng hợp nhân tạo hoặc các đoạn sgARN được tổng hợp nhân tạo nhắm mục tiêu đến gen mục tiêu thứ hai, thứ ba hoặc nhiều hơn" chia sẻ cùng một protein Cas với crARN hoặc sgARN nhắm mục tiêu đến gen mục tiêu thứ nhất.

41. Phương pháp theo điểm 30 hoặc 31, trong đó khác biệt ở chỗ, "ít nhất một trong số các đoạn crARN và tracrARN được tổng hợp nhân tạo hoặc các đoạn sgARN được tổng hợp nhân tạo nhắm vào gen mục tiêu thứ hai, thứ ba hoặc nhiều hơn" và crARN hoặc sgARN nhắm mục tiêu vào gen mục tiêu thứ nhất sử dụng các protein Cas nhận biết các trình tự PAM khác nhau.

42. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm 29-31, trong đó khác biệt ở chỗ, phương pháp đưa phức hợp RNP vào tế bào thực vật được chọn từ: 1) phương pháp biến nạp tế bào nguyên sinh qua trung gian PEG; 2) vi tiêm; 3) bắn phá súng gen; 4) phương pháp qua trung gian sợi cacbua silic; hoặc 5) phương pháp xâm nhập chân không và bất kỳ phương pháp đưa vào tạm thời nào khác.

43. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm 29-31, trong đó khác biệt ở chỗ, "gen mục tiêu thứ nhất" là ít nhất một gen nội sinh mã hóa ít nhất một tính trạng có thể chọn lọc kiểu hình được chọn từ tính kháng/chống chịu thuốc diệt cỏ, trong đó tính kháng/chống chịu thuốc diệt cỏ được chọn từ nhóm bao gồm tính kháng/chống chịu với chất ức chế EPSPS, kháng/chống chịu chất ức chế tổng hợp glutamin, kháng/chống



chịu với chất ức chế ALS hoặc AHAS, kháng/ chống chịu với chất ức chế ACCase, kháng/ chống chịu với chất ức chế sinh tổng hợp chất caroten, kháng/ chống chịu với chất ức chế xenluloza; kháng/ chống chịu với chất ức chế tổng hợp lipid; kháng/ chống chịu với chất ức chế axit béo chuỗi dài; kháng/ chống chịu với chất ức chế lắp ráp vi ống; kháng/ chống chịu tác nhân tránh điện từ quang hệ I; kháng/ chống chịu chất ức chế quang hệ II, hoặc kháng/ chống chịu chất ức chế PPO; và kháng/ chống chịu với hormon sinh trưởng tổng hợp.

44. Phương pháp theo điểm 43, trong đó khác biệt ở chỗ, "gen mục tiêu thứ nhất" được chọn từ PsbA, ALS, EPSPS, ACCase, PPO, HPPD, PDS, GS, DOXPS, TIR1 và AFB5.

45. Phương pháp theo điểm 44, trong đó khác biệt ở chỗ, "gen mục tiêu thứ nhất" là ALS, và "vị trí cụ thể của gen" đề cập đến vị trí A122, P197, R198, D204, A205, D376, R377, W574, S653 hoặc G654 trong trình tự axit amin của protein AtALS *Arabidopsis*, và các vị trí axit amin trong protein ALS của một thực vật khác tương ứng với các vị trí axit amin nêu trên bằng cách sử dụng trình tự axit amin AtALS làm tiêu chuẩn tham chiếu; hoặc

CrARN hoặc sgARN nhằm mục tiêu trình tự mục tiêu bao gồm trình tự mã hóa vị trí trình tự axit amin của protein AtALS được chọn từ nhóm bao gồm A122, P197, R198, D204, A205, D376, R377, W574, S653, G654 và kết hợp bất kỳ của chúng, và trình tự mục tiêu bao gồm trình tự mã hóa vị trí axit amin trong protein ALS của một thực vật khác tương ứng với các vị trí axit amin nêu trên, và sự kết hợp bất kỳ của chúng, bằng cách sử dụng trình tự axit amin AtALS làm tiêu chuẩn tham chiếu.

46. Phương pháp theo điểm 44, trong đó khác biệt ở chỗ, "gen mục tiêu thứ nhất" là ACCase, và "vị trí cụ thể của gen" đề cập đến vị trí I1781, E1874, N1878, W1999, W2027, I2041, D2078, C2088 hoặc G2096 trong trình tự axit amin của protein AmACCase *Alopecurus myosuroides*, và các vị trí axit amin trong protein ACCase của cây một lá mầm khác tương ứng với các vị trí axit amin nêu trên bằng cách sử dụng trình tự axit amin AmACCase làm tiêu chuẩn tham chiếu; hoặc

CrARN hoặc sgARN nhằm mục tiêu trình tự mục tiêu bao gồm trình tự mã hóa vị

trình tự axit amin AmACCCase được chọn từ nhóm bao gồm I1781, E1874, N1878, W1999, W2027, I2041, D2078, C2088, G2096 và kết hợp bất kỳ của chúng, và trình tự mục tiêu bao gồm trình tự mã hóa vị trí axit amin trong protein ACCCase của cây một lá mầm khác tương ứng với vị trí axit amin nêu trên, và sự kết hợp bất kỳ của chúng, bằng cách sử dụng trình tự axit amin AmACCCase làm tiêu chuẩn tham chiếu.

47. Phương pháp theo điểm 44, trong đó khác biệt ở chỗ, "gen mục tiêu thứ nhất" là HPPD, và "vị trí cụ thể của gen" đề cập đến vị trí H141, L276, P277, N338, G342, R346, D370, P386, K418 hoặc G419 trong trình tự axit amin của protein OsHPPD *Oryza sativa*, và các vị trí axit amin trong protein HPPD của một thực vật khác tương ứng với các vị trí axit amin nêu trên bằng cách sử dụng trình tự axit amin OsHPPD làm tiêu chuẩn tham chiếu; hoặc

CrARN hoặc sgARN nhắm mục tiêu trình tự mục tiêu bao gồm trình tự mã hóa vị trí trình tự axit amin OsHPPD được chọn từ nhóm bao gồm H141, L276, P277, N338, G342, R346, D370, P386, K418, G419 và kết hợp bất kỳ của chúng, và trình tự mục tiêu bao gồm trình tự mã hóa vị trí axit amin trong protein HPPD của một thực vật khác tương ứng với vị trí axit amin nêu trên, và sự kết hợp bất kỳ của chúng, bằng cách sử dụng trình tự axit amin OsHPPD làm tiêu chuẩn tham chiếu.

48. Phương pháp theo điểm 44, trong đó khác biệt ở chỗ, "gen mục tiêu thứ nhất" là PPO, và "vị trí cụ thể của gen" đề cập đến vị trí S128, V217, S223, V364, K373, L423, Y425 hoặc W470 trong trình tự axit amin của protein OsPPO1 *Oryza sativa*, và các vị trí axit amin trong protein PPO của một thực vật khác tương ứng với các vị trí axit amin nêu trên bằng cách sử dụng trình tự axit amin của OsPPO1 làm tiêu chuẩn tham chiếu; hoặc

CrARN hoặc sgARN nhắm mục tiêu trình tự mục tiêu bao gồm trình tự mã hóa vị trí trình tự axit amin OsPPO1 được chọn từ nhóm bao gồm S128, V217, S223, V364, K373, L423, Y425, W470 và kết hợp bất kỳ của chúng, và trình tự mục tiêu bao gồm trình tự các vị trí axit amin nêu trên tương ứng với protein PPO của một loài thực vật khác và bất kỳ sự kết hợp nào của chúng sử dụng trình tự axit amin OsPPO1 làm tiêu chuẩn tham chiếu.

49. Phương pháp theo điểm 44, trong đó khác biệt ở chỗ, "gen mục tiêu thứ nhất" là TIR1, và "vị trí cụ thể của gen" đề cập đến vị trí F93, F357, C413 hoặc S448 trong trình tự axit amin của protein OsTIR1 *Oryza sativa*, và các vị trí axit amin trong protein TIR1 của một thực vật khác tương ứng với các vị trí axit amin nêu trên bằng cách sử dụng trình tự axit amin OsTIR1 làm tiêu chuẩn tham chiếu; hoặc

CrARN hoặc sgARN nhắm mục tiêu trình tự mục tiêu bao gồm trình tự mã hóa vị trí trình tự axit amin OsTIR1 được chọn từ nhóm bao gồm F93, F357, C413, S448 và kết hợp bất kỳ của chúng, và trình tự mục tiêu bao gồm trình tự mã hóa vị trí axit amin trong protein TIR1 của một thực vật khác tương ứng với vị trí axit amin nêu trên, và bất kỳ sự kết hợp nào của chúng, bằng cách sử dụng trình tự axit amin OsTIR1 làm tiêu chuẩn tham chiếu.

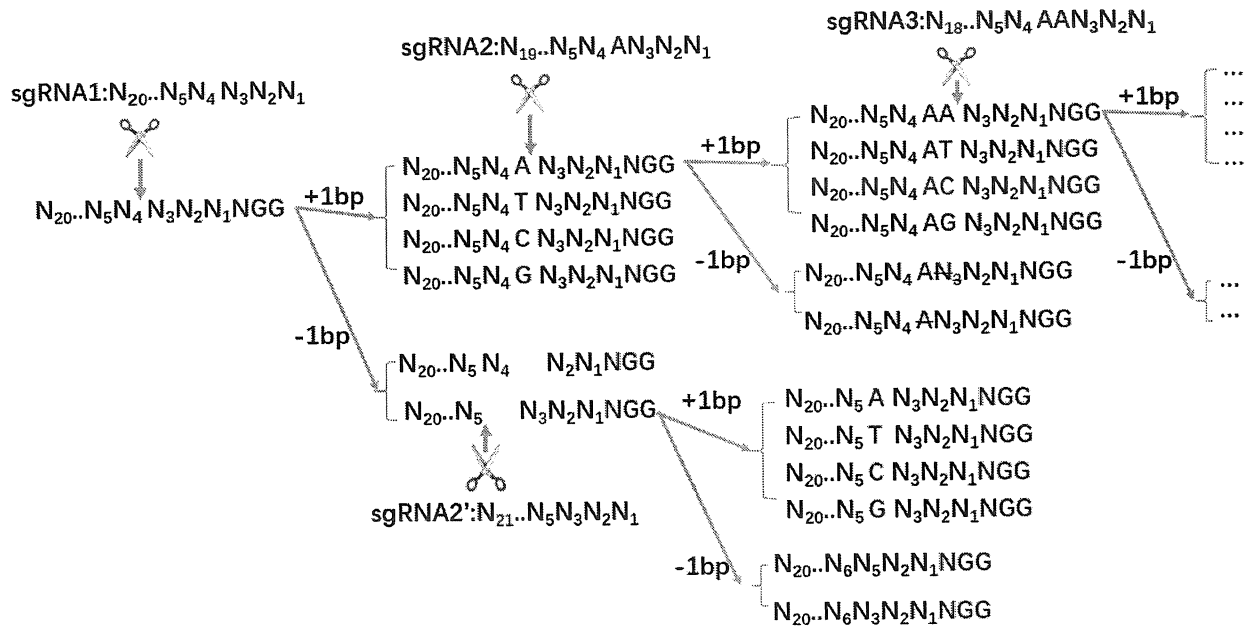
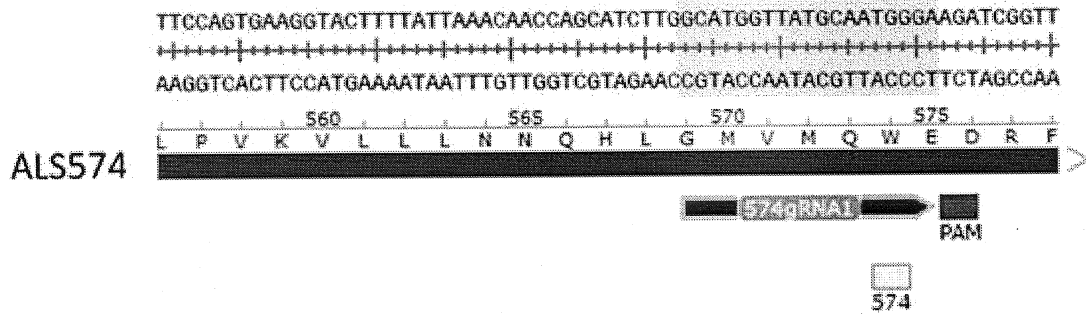


FIG. 1



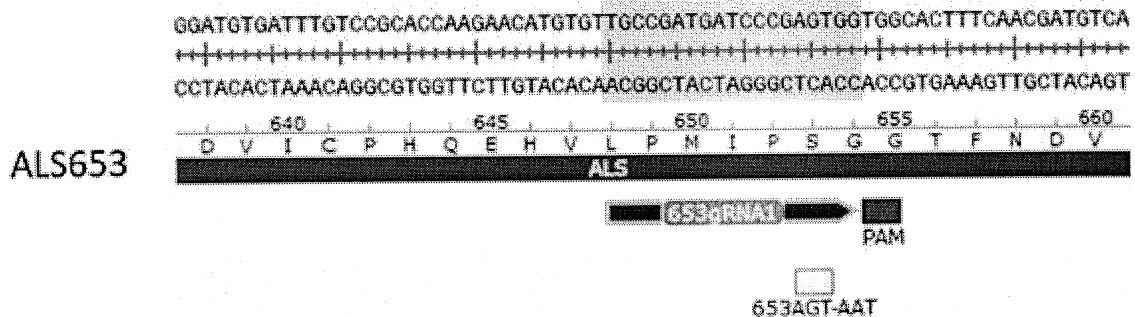
gRNA1: GC ATG GTT ATG CAA TGG GA

Mục tiêu mới: ATG GTT ATG CAA T G GA

gRNA2: GGC ATG GTT ATG CAA T G GA

Trình tự mới: C ATG GTT ATG CAA TTG GA

W→L



gRNA1: TG CCG ATG ATC CCG AGT GG

Mục tiêu mới: CCG ATG ATC CCG A T GG

gRNA2: TTG CCG ATG ATC CCG A T GG

Trình tự mới: G CCG ATG ATC CCG AAT GG

S→N

FIG. 2

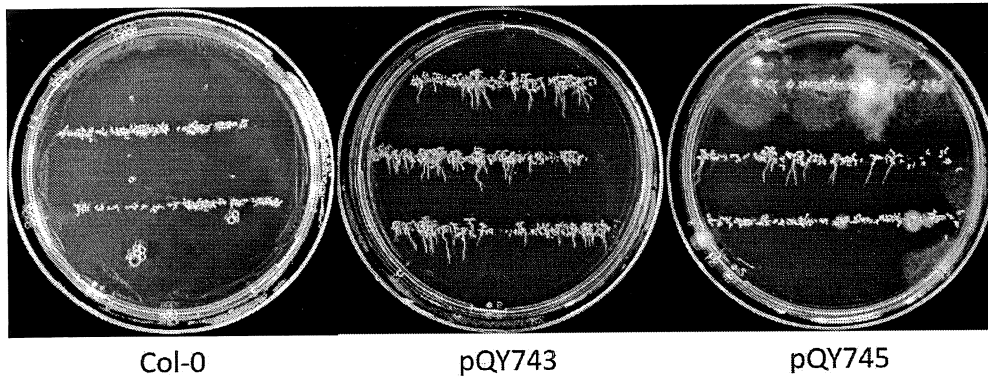


FIG. 3

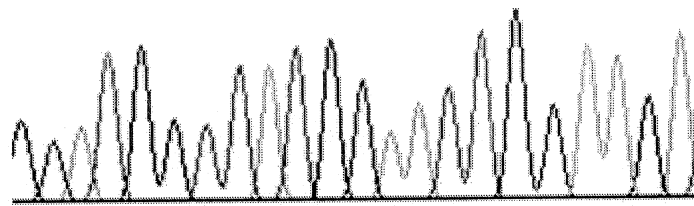


FIG. 4

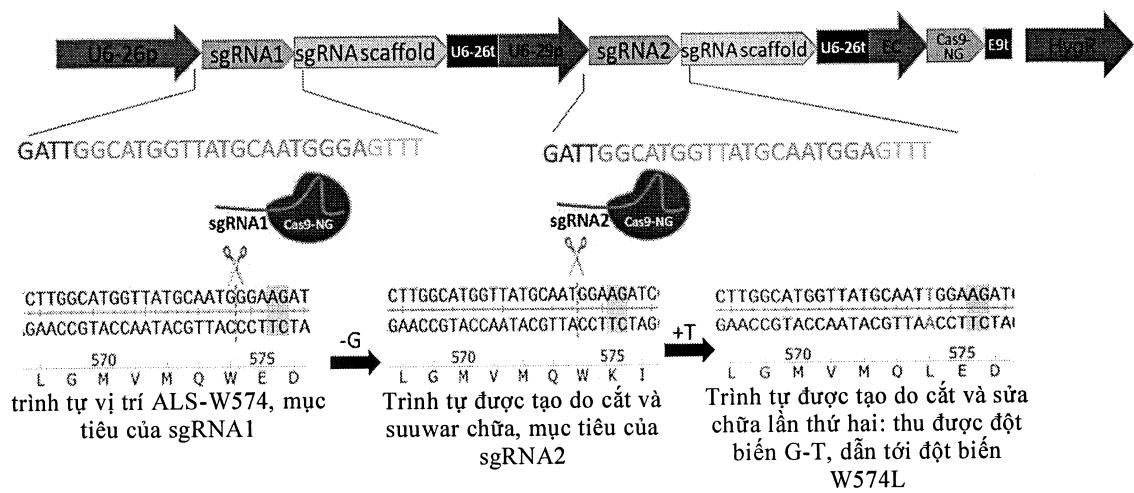


FIG. 5

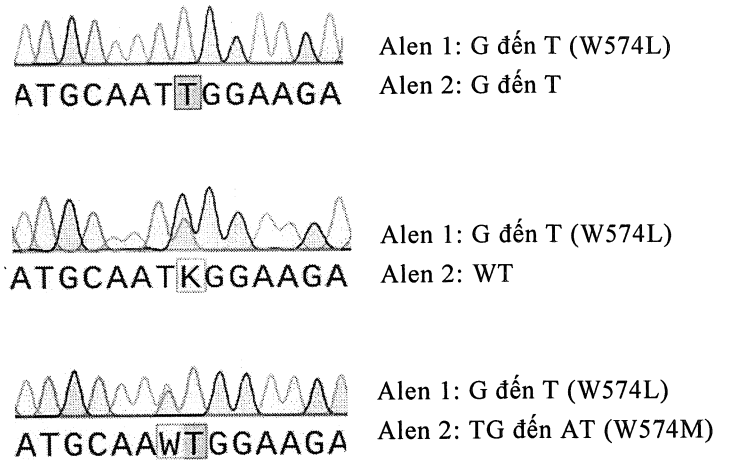
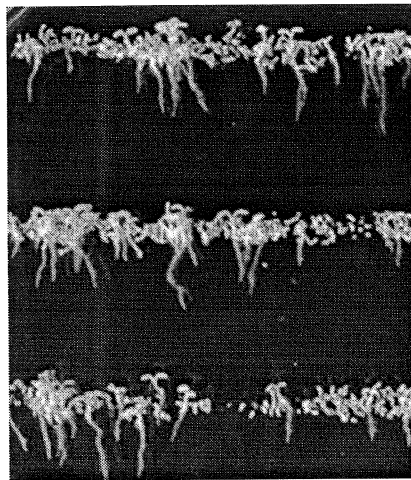


FIG. 6

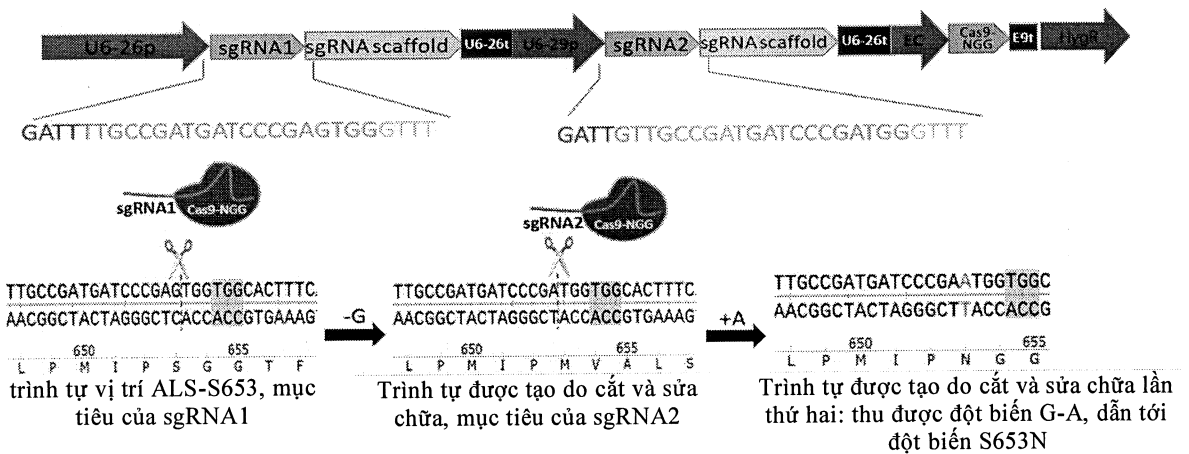


FIG. 7

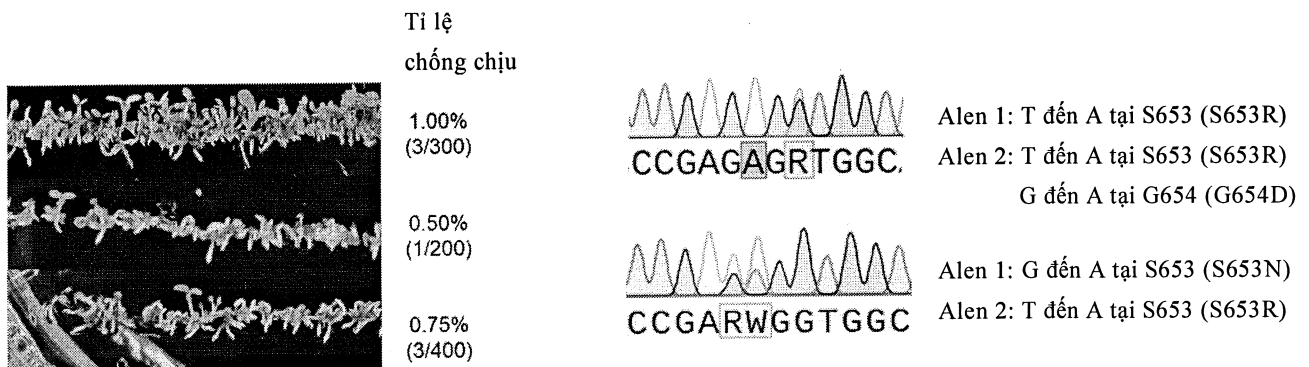


FIG. 8

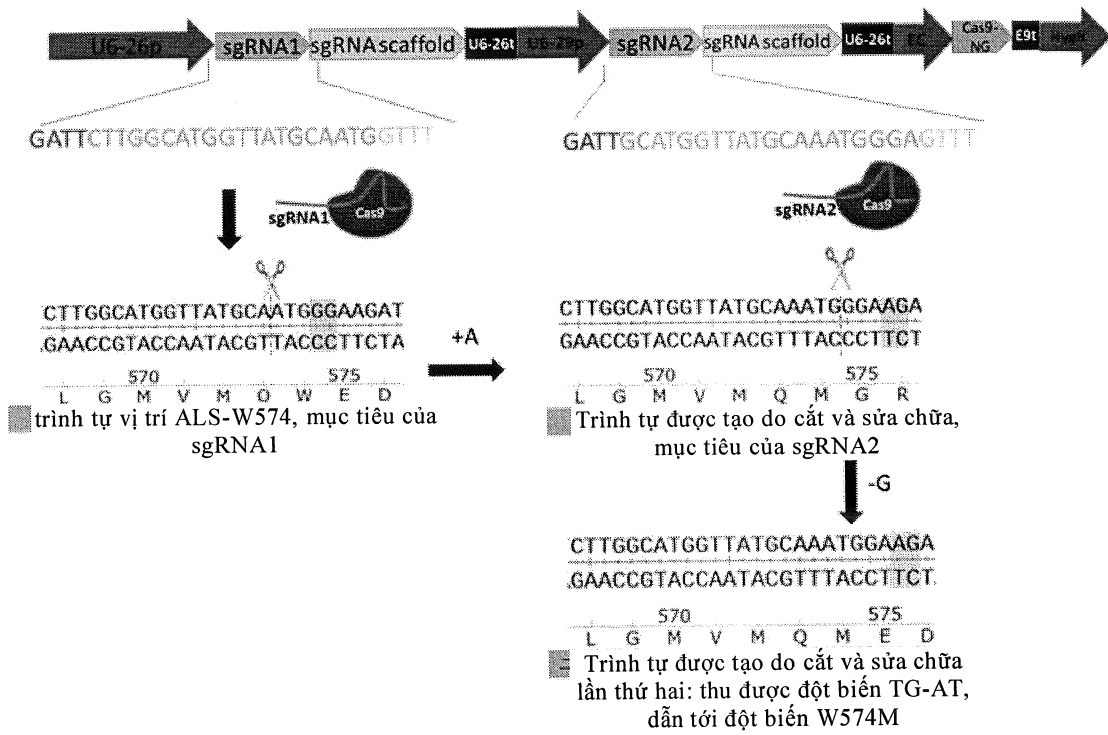


FIG. 9

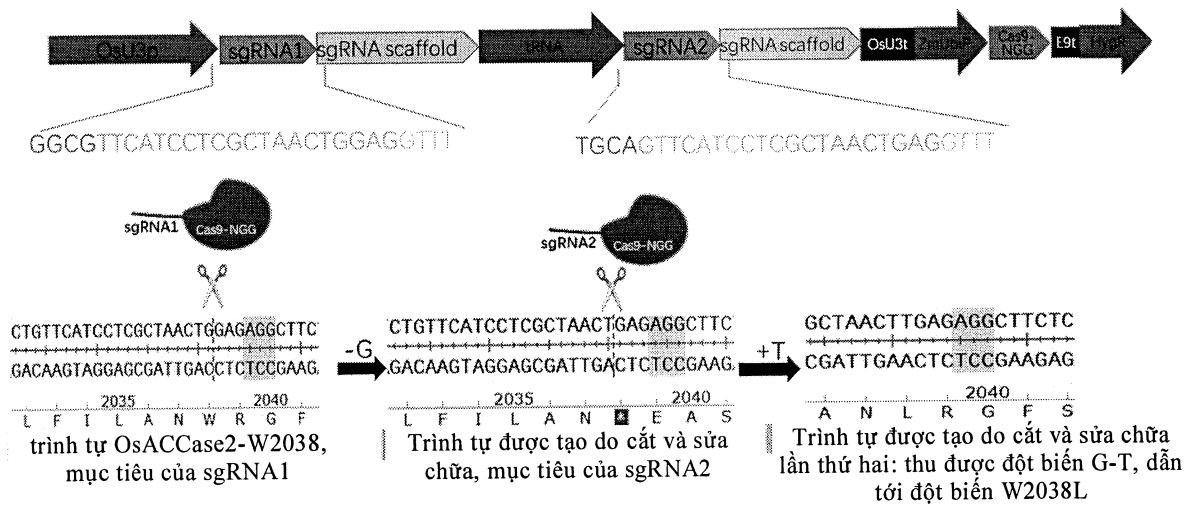


FIG. 10



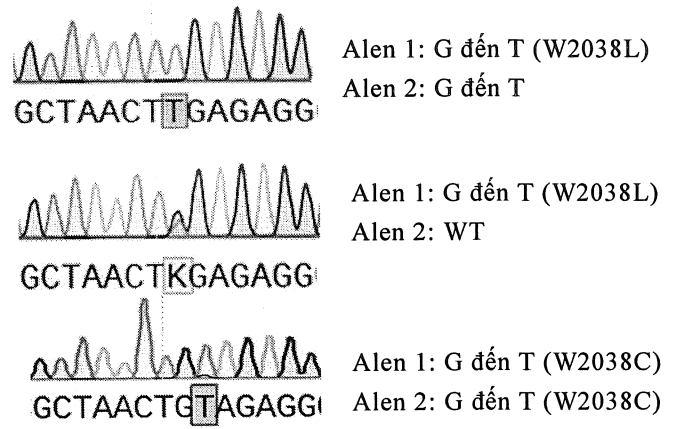
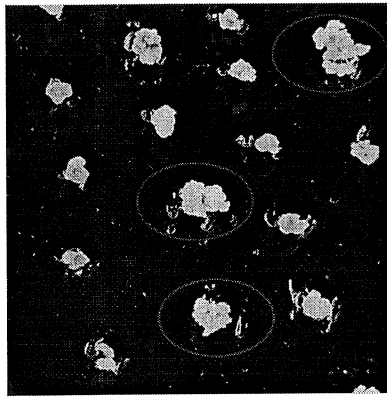


FIG. 11

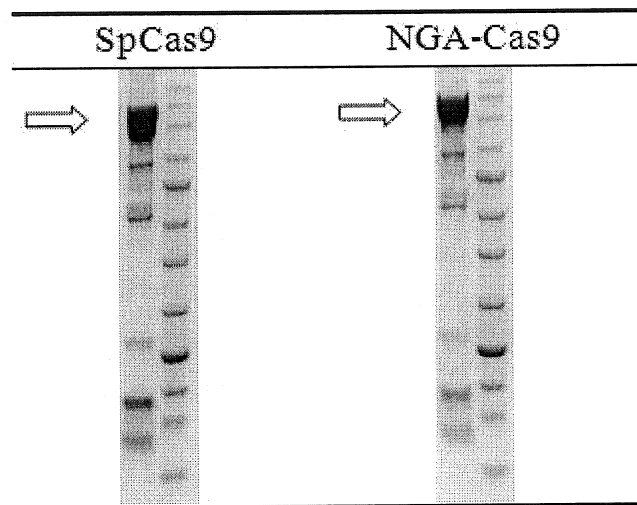


FIG. 12

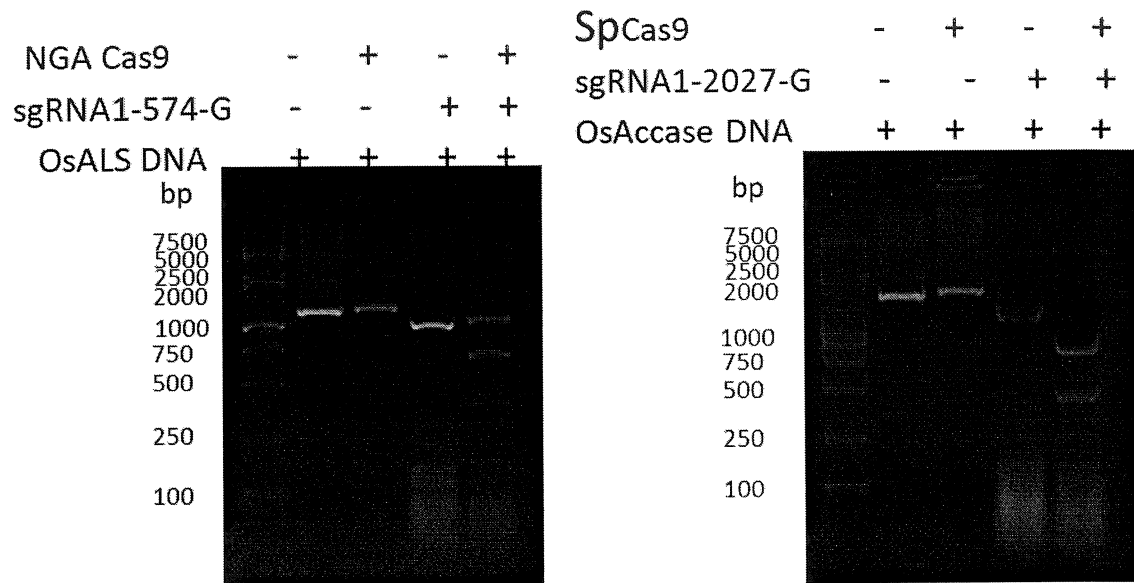


FIG. 13

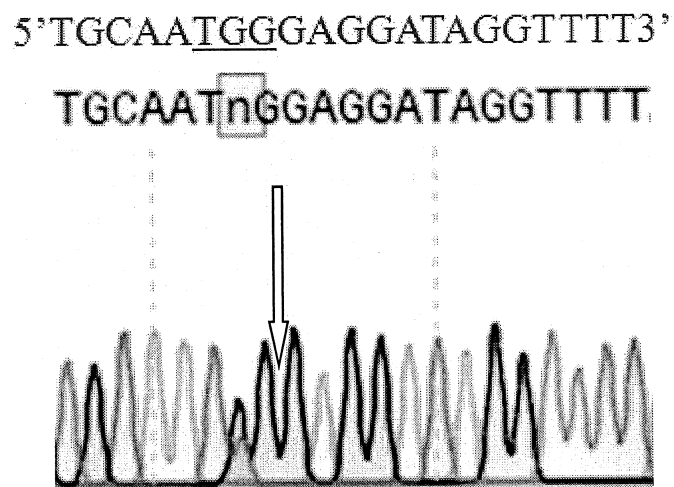


FIG. 14

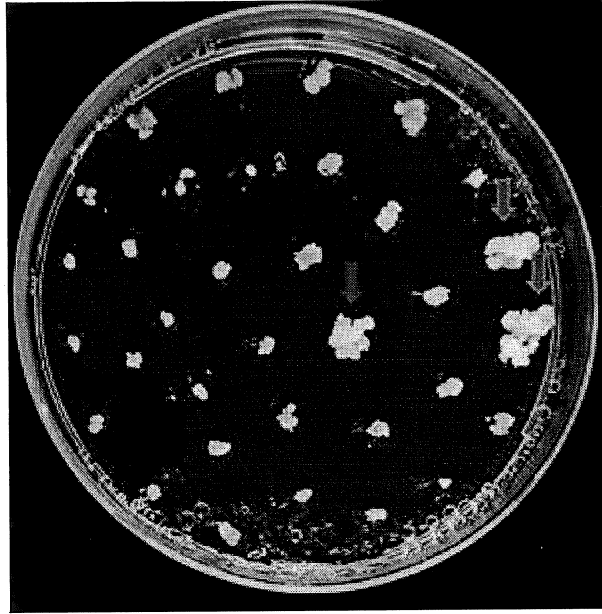


FIG. 15

5'CTCGCTAACTGGAGAGGGCTTC3'  
CTCGCTAACTTGAGAGGGCTTC'

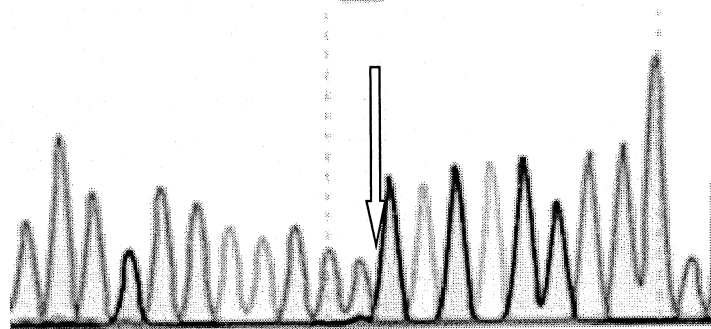


FIG. 16



FIG. 17



FIG. 18

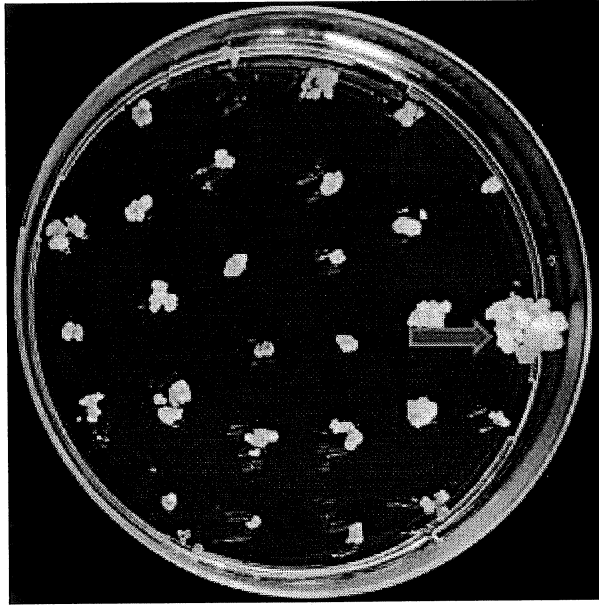


FIG. 19

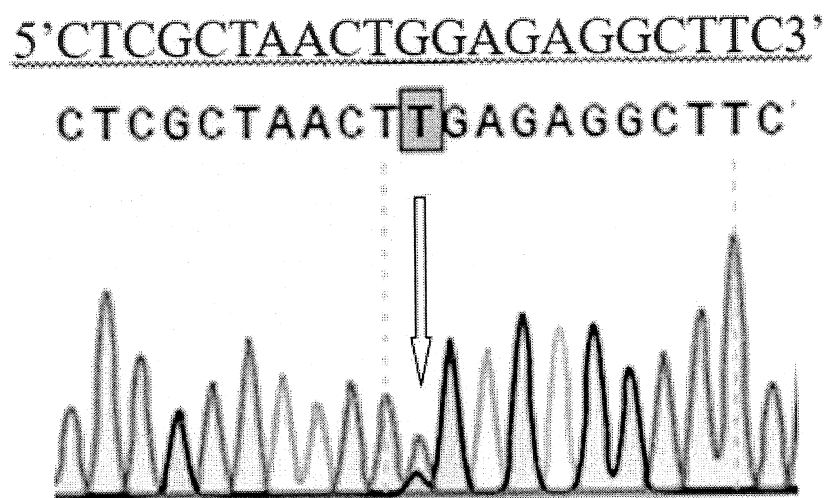


FIG. 20

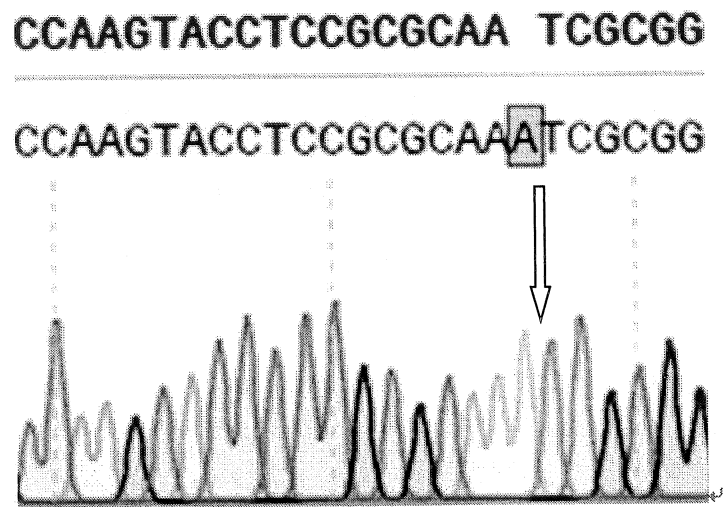


FIG. 21

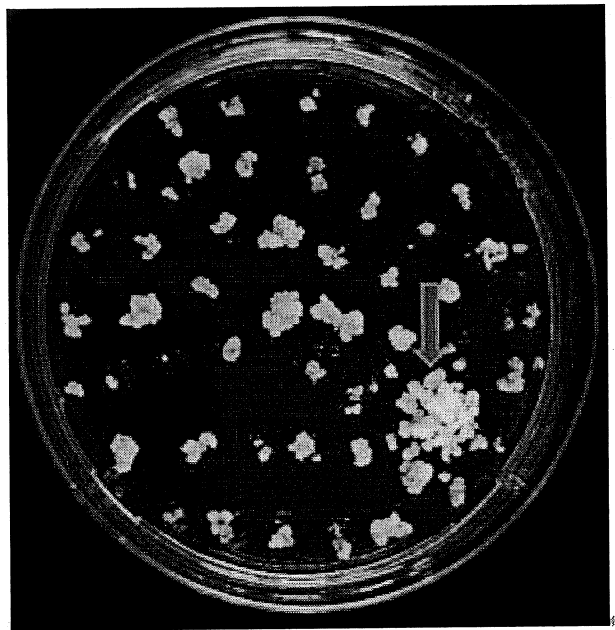


FIG. 22

5'TGCAATGGGAGGATAGGTTTT3'

TGCAATGGGAGGATAGGTTTT,

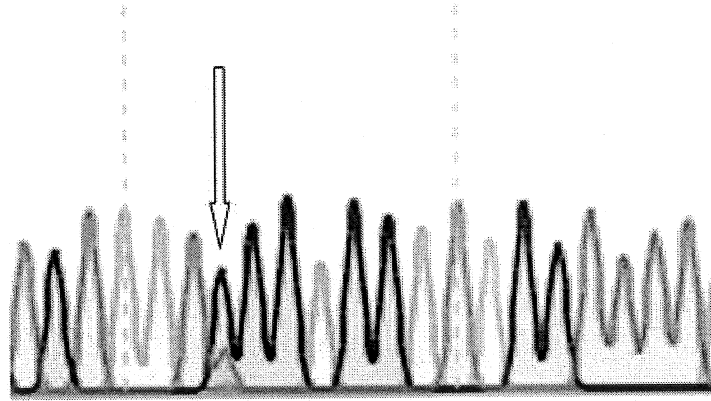


FIG. 23

aaaccccctccaaccagggtgct

AAACCCCCTC-AACCAGGTGCT

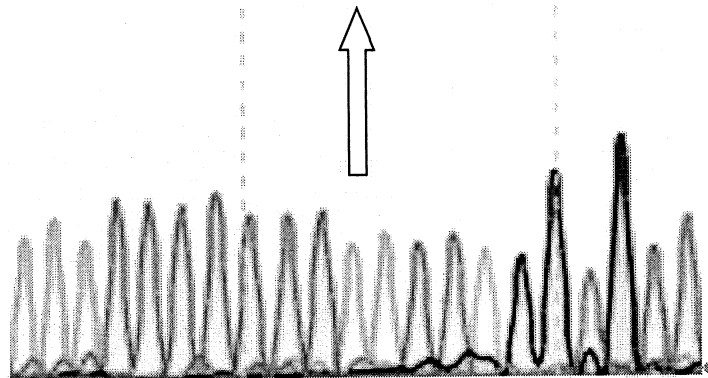


FIG. 24



FIG. 25



FIG. 26



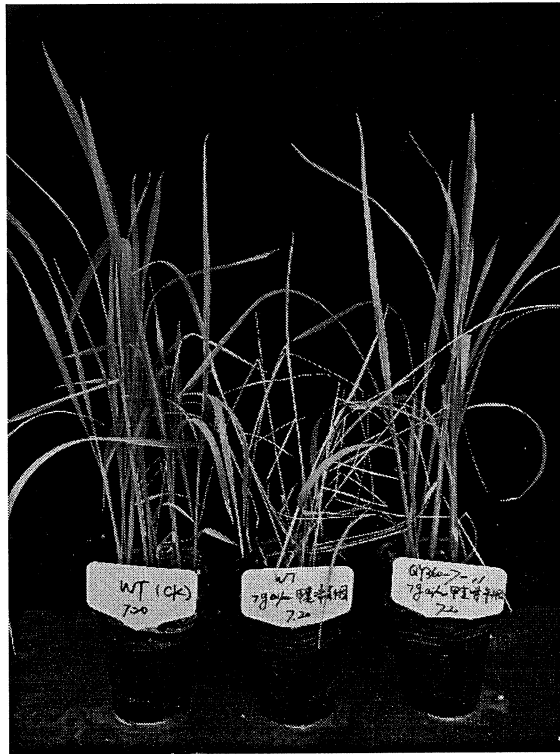


FIG. 27



FIG. 28

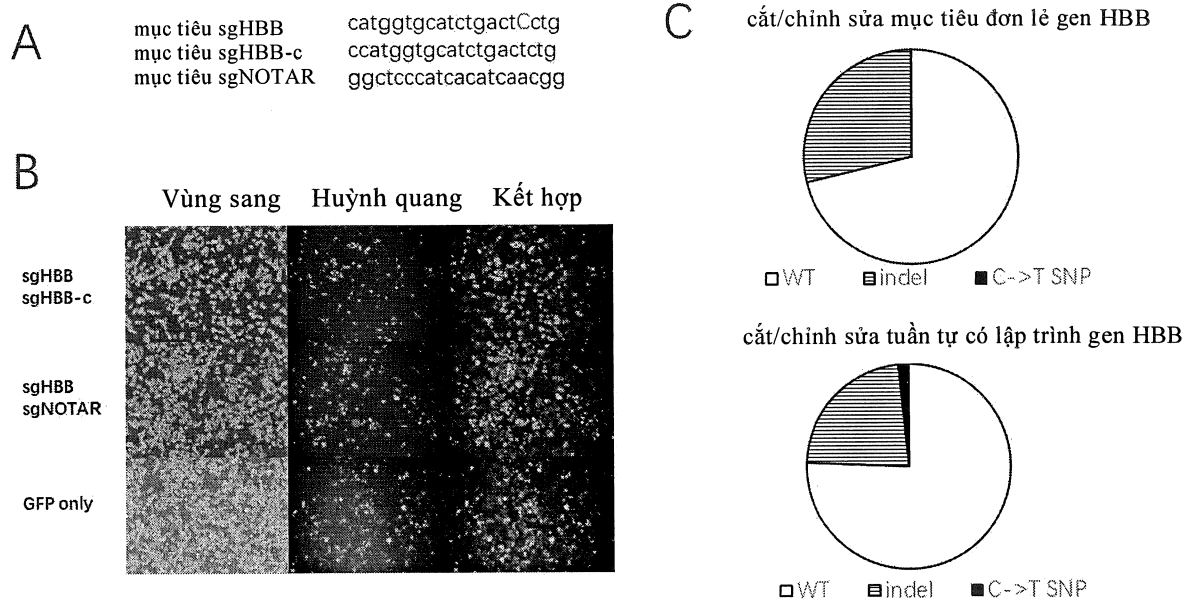


FIG. 29