

1. 一种应用于植物上的 CRISPR/Cas9 载体的构建方法，其特征在于，所述 CRISPR/Cas9 载体由 pSG 和 pCC 基本载体组成，其构建方法包括：

步骤 1、PSG 载体的构建包括：

步骤 1-1、以 pX330 质粒为模板，使用高保真酶 PrimeSTAR HS DNA Polymerase 扩增 sgRNA 片段，回收该片段，标记为 sgRNA1，引物序列为 SEQ ID NO.1 所示的 Sg1-F 和 SEQ ID NO.2 所示的 Sg1-R；

步骤 1-2、使用 EcoRI-HF 和 XbaI 分别双酶切 pUC19 和 sgRNA1，回收目的片段后按 1: 7 的摩尔比进行连接，得到重组质粒 pSG1，测序，保留序列完全正确的阳性质粒；

步骤 1-3、以 pSG1 质粒为模板，使用高保真酶 PrimeSTAR HS DNA Polymerase 扩增 sgRNA 片段，回收该片段，标记为 sgRNA，引物序列为 SEQ ID NO.3 所示的 Sg2-F 和 SEQ ID NO.4 所示的 Sg2-R；

步骤 1-4、使用 EcoRI-HF 和 XbaI 双酶切 pUC19，使用 BsaI 酶切 sgRNA，回收目的片段后按 1: 7 的摩尔比进行连接，得到重组质粒 pSG，测序，保留序列完全正确的阳性质粒。

步骤 2、PCC 载体的构建包括：

步骤 2-1、以 pX330 质粒为模板，使用高保真酶 PrimeSTAR HS DNA Polymerase 扩增 hSpCas9 片段，其中引物 Cas-F: Cas-R1: Cas-R2=1.5: 0.2: 1.3，回收该片段，标记为 hSpCas9，Cas-F 的序列如 SEQ ID NO.5 所示，Cas-R1 的序列如 SEQ ID NO.6 所示，Cas-R2 的序列如 SEQ ID NO.7 所示；

步骤 2-2、使用 NcoI-HF 和 BstEII-HF 分别双酶切 pCAMBIA1302 和 hSpCas9，回收目的片段后按 1: 5 的摩尔比进行连接，得到重组质粒 pCC1，测序，保留序列完全正确的阳性质粒；

步骤 2-3、以 pCAMBIA1302 质粒为模板，使用高保真酶 PrimeSTAR HS DNA Polymerase 扩增 CaMV 35 enhanced promoter 片段，回收该片段，标记为 CaMV-ep，引物序列为 SEQ ID NO.8 所示的 CaMV-ep-F 和 SEQ ID NO.9 所示的

CaMV-ep-R;

步骤 2-4、使用 HindIII 和 NcoI 分别双酶切 pCC1 和 CaMV-ep，回收目的片段后按 1: 5 的摩尔比进行连接，得到重组质粒 pCC，测序，保留序列完全正确的阳性质粒;

步骤 3、CRISPR/Cas9 载体构建:

步骤 3-1、S1:靶序列退火复性: 根据选定的靶序列，合成互补的 Oligo DNA，将合成的 Oligo DNA 序列进行退火复性获得 DNA 双链序列，并稀释;

步骤 3-2、S2:PSG 载体的酶切: 采用限制性内切酶 BbsI 酶切 pSG 载体，酶切产物经超薄产物纯化试剂盒进行回收;

步骤 3-3、S3:连接和转化: 配置连接体系，将 S1 获得的稀释后的 DNA 双链序列与 S2 获得的酶切产物进行连接反应，将获得的全部连接产物采用热激发转化至大肠杆菌 JM109 中;

步骤 3-4、S4:重组质粒的鉴定和提取: 分别挑单菌落于 LB/Amp 液体培养基中震荡培养，分别以 M13 fwd 和 Oligo-R 为引物进行菌液 PCR 鉴定，将验证正确的菌液转接到新鲜的 LB/Amp 液体培养基中，培养后进行质粒的提取，得到重组质粒;

步骤 3-5、S5:重组质粒和 PCC 质粒的双酶切: 将得到的重组质粒和 PCC 质粒进行双酶切，酶切产物经 1%的琼脂糖凝胶电泳后，采用凝胶回收试剂盒分别回收目标片段;

步骤 3-6、S6:连接、转化和鉴定: 配置连接体系，将 S5 获得的酶切回收目标片段进行连接反应，将获得的全部连接产物采用热激发转化至大肠杆菌 JM109 中，挑单菌落于 LB/Kan 液体培养基中震荡培养，并进行菌液 PCR 鉴定，将阳性菌液转接到新鲜的 LB/Kan 液体培养基中培养，提取质粒，即获得构建好的 CRISPR/Cas9 载体;—。

所述 PSG 载体的构建包括:

以 pX330 质粒为模板，使用高保真酶 PrimeSTAR HS DNA Polymerase 扩增

~~sgRNA 片段，回收该片段，标记为 sgRNA1，引物序列为 SEQ ID NO.1 所示的 Sg1-F 和 SEQ ID NO.2 所示的 Sg1-R；~~

~~使用 EcoRI-HF 和 XbaI 分别双酶切 pUC19 和 sgRNA1，回收目的片段后按 1: 7 的摩尔比进行连接，得到重组质粒 pSG1，测序，保留序列完全正确的阳性质粒；~~

~~以 pSG1 质粒为模板，使用高保真酶 PrimeSTAR HS DNA Polymerase 扩增 sgRNA 片段，回收该片段，标记为 sgRNA，引物序列为 SEQ ID NO.3 所示的 Sg2-F 和 SEQ ID NO.4 所示的 Sg2-R；~~

~~使用 EcoRI-HF 和 XbaI 双酶切 pUC19，使用 BsaI 酶切 sgRNA，回收目的片段后按 1: 7 的摩尔比进行连接，得到重组质粒 pSG，测序，保留序列完全正确的阳性质粒。~~

~~1. 根据权利要求 1 所述的应用于植物上的 CRISPR/Cas9 载体的构建方法，其特征在于，所述 PCC 载体的构建包括：~~

~~1. 以 pX330 质粒为模板，使用高保真酶 PrimeSTAR HS DNA Polymerase 扩增 hSpCas9 片段，其中引物 Cas-F: Cas-R1: Cas-R2=1.5: 0.2: 1.3，回收该片段，标记为 hSpCas9，Cas-F 的序列如 SEQ ID NO.5 所示，Cas-R1 的序列如 SEQ ID NO.6 所示，Cas-R2 的序列如 SEQ ID NO.7 所示；~~

~~2. 使用 NcoI-HF 和 BstEII-HF 分别双酶切 pCambia1302 和 hSpCas9，回收目的片段后按 1: 5 的摩尔比进行连接，得到重组质粒 pCC1，测序，保留序列完全正确的阳性质粒；~~

~~3. 以 pCambia1302 质粒为模板，使用高保真酶 PrimeSTAR HS DNA Polymerase 扩增 CaMV 35 enhanced promoter 片段，回收该片段，标记为 CaMV=ep，引物序列为 SEQ ID NO.8 所示的 CaMV=ep-F 和 SEQ ID NO.9 所示的 CaMV=ep-R；~~

~~4. 使用 HindIII 和 NcoI 分别双酶切 pCC1 和 CaMV=ep，回收目的片段后按 1: 5 的摩尔比进行连接，得到重组质粒 pCC，测序，保留序列完全正确的阳~~

~~性质粒。~~

~~5.2.~~ 根据权利要求 ~~21~~ 所述的应用于植物上的 CRISPR/Cas9 载体的构建方法，其特征在于，在步骤 ~~S13-1~~ 中，合成一对互补的 Oligo DNA，即序列为 SEQ ID NO.10 所示的 Oligo-F 和序列为 SEQ ID NO.11 所示的 Oligo-R。

~~6.3.~~ 根据权利要求 ~~21~~ 所述的应用于植物上的 CRISPR/Cas9 载体的构建方法，其特征在于，在步骤 ~~S13-1~~ 中，合成两对互补的 Oligo DNA，分别为序列为 SEQ ID NO.12 所示的 Oligo1-F，序列为 SEQ ID NO.13 所示的 Oligo1-R，序列为 SEQ ID NO.14 所示的 Oligo2-F 及序列为 SEQ ID NO.15 所示的 Oligo2-R。

~~7.4.~~ 根据权利要求 ~~32~~ 或 ~~43~~ 所述的应用于植物上的 CRISPR/Cas9 载体的构建方法，其特征在于，在步骤 ~~S13-1~~ 中，将所述合成的 Oligo DNA 序列进行退火复性的反应程序为：95℃变性 5min，每 30s 降温 1℃，降温至 25℃，并于 4℃保存；~~。~~

~~5.~~ ~~5.根据权利要求 1 所述的应用于植物上的 CRISPR/Cas9 载体的构建方法，其特征在于，在所述步骤 S23-2 中，PSG 载体的酶切的反应体系为 100μL，37℃反应过夜，65℃反应 20min。~~

~~8.~~

~~6.~~ 根据权利要求 ~~31~~ 所述的应用于植物上的 CRISPR/Cas9 载体的构建方法，其特征在于，在所述步骤 ~~S43-4~~ 中，所得到的重组质粒为 pSG-CZ；在所述步骤 S5 中，将得到的 pSG-CZ 重组质粒、pCC 质粒分别采用 EcoRI-HF 和 XbaI 进行双酶切，37℃酶切 3h 后，65℃反应 20min 得到所述酶切产物。

~~7.~~ 根据权利要求 ~~42~~ 所述的应用于植物上的 CRISPR/Cas9 载体的构建方法，其特征在于，在所述步骤 ~~S43-4~~ 中，所得到的重组质粒为 pSG-CZ1 和 pSG-CZ2；所述步骤 S5 中，将得到的 pSG-CZ1 重组质粒采用 EcoRI-HF 和 KpnI 进行双酶切，pSG-CZ2 重组质粒采用 XbaI 和 KpnI 进行双酶切；或将得到的 pSG-CZ1 重组质粒采用 EcoRI-HF 和 BamHI 进行双酶切，pSG-CZ2 重组质粒采用 XbaI 和

BamHI 进行双酶切；并将 pCC 质粒采用 EcoRI-HF 和 XbaI 进行双酶切，37℃酶切 3h 后，65℃反应 20min，得到所述酶切产物。

8. 根据权利要求 31 或 64 所述的应用于植物上的 CRISPR/Cas9 载体的构建方法，其特征在于，在所述步骤 S63-6 中，所述菌液 PCR 鉴定以 M13 rev 和 Oligo-R 为引物。

9. 根据权利要求 42 或 75 所述的应用于植物上的 CRISPR/Cas9 载体的构建方法，其特征在于，在所述步骤 S63-6 中，所述菌液 PCR 鉴定以 Oligo1-F 和 Oligo2-R 为引物。