

2025年度作物分子育种领域专业技术转移转化能力提升班(湖北·武汉)

# 植物基因组编辑与突变分析软件与技术

谢先荣

xiexianrong@scau.edu.cn

华南农业大学 农学院

2025年10月10日



# 提 纲

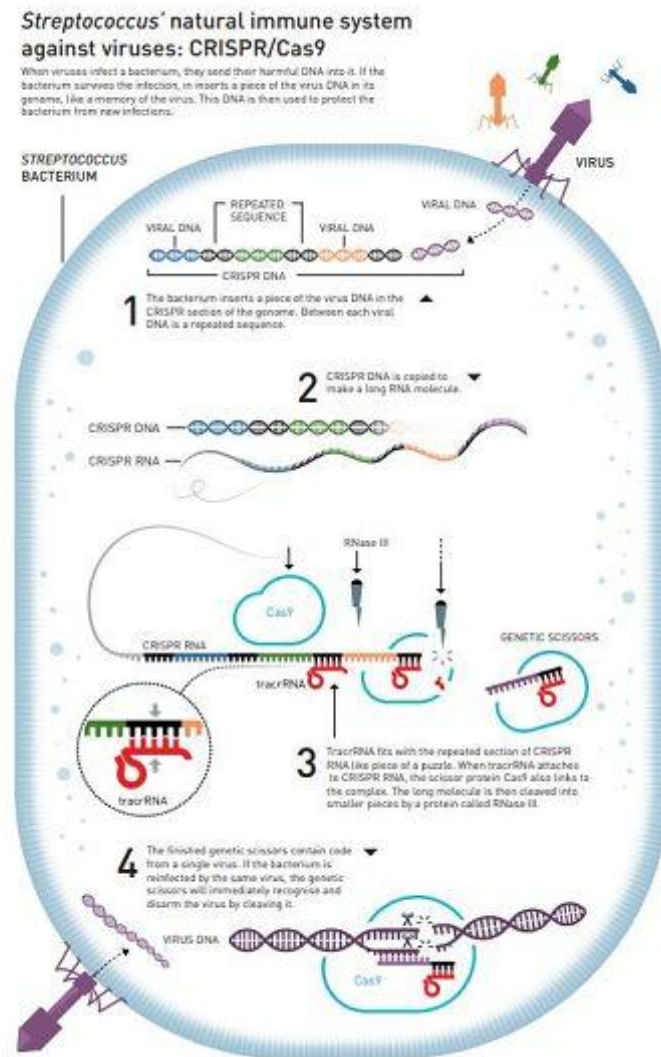
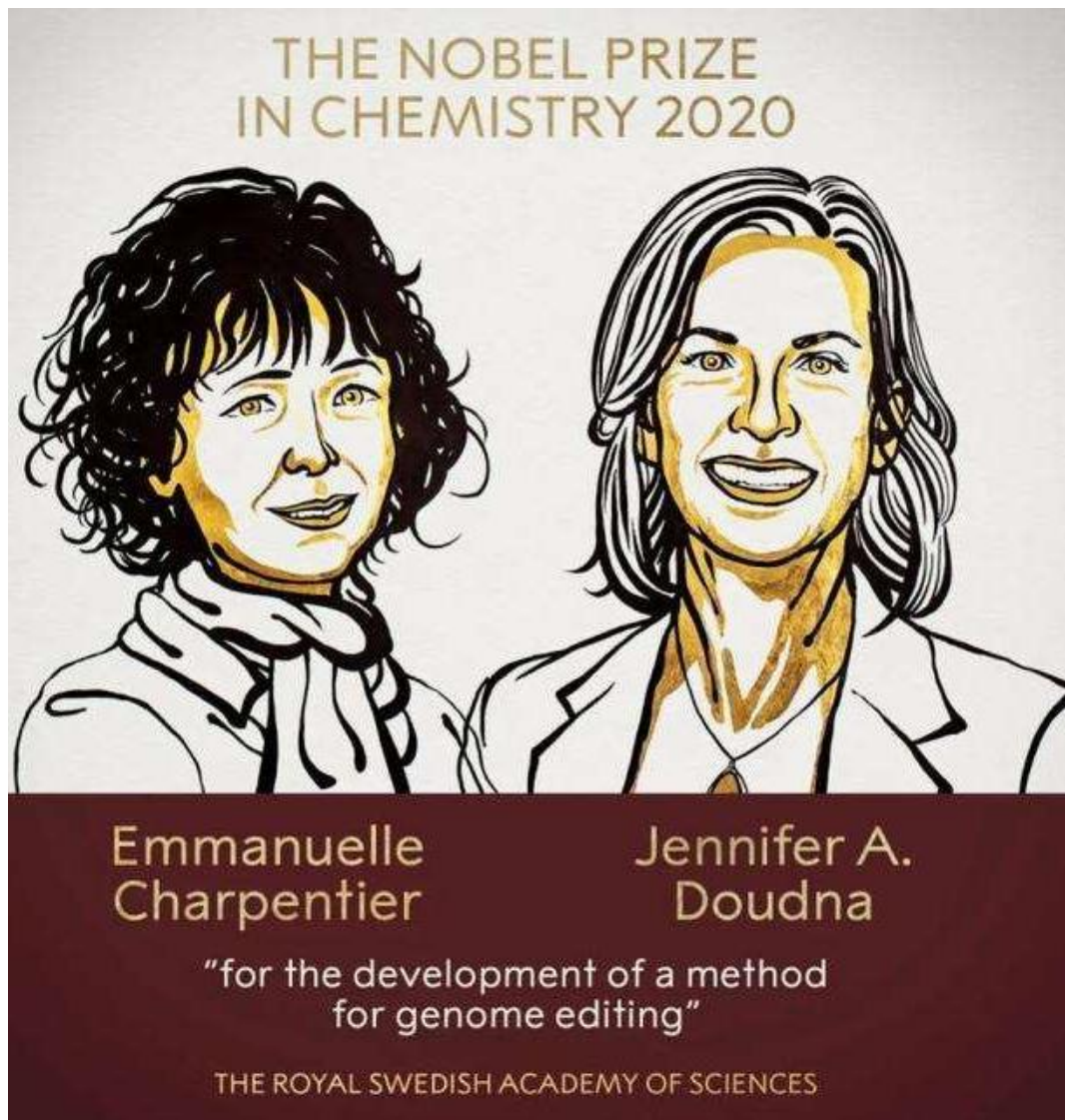
- ◆ 基因组编辑技术的原理和发展
- ◆ 植物多基因编辑载体系统pYLCRISPR/Cas9
- ◆ 一站式的植物基因组编辑设计和突变分析平台
- ◆ 基因组编辑技术在遗传改良中的应用

# 提 纲

- ◆ 基因组编辑技术的原理和发展
- ◆ 植物多基因编辑载体系统pYLCRISPR/Cas9
- ◆ 一站式的植物基因组编辑设计和突变分析平台
- ◆ 基因组编辑技术在遗传改良中的应用

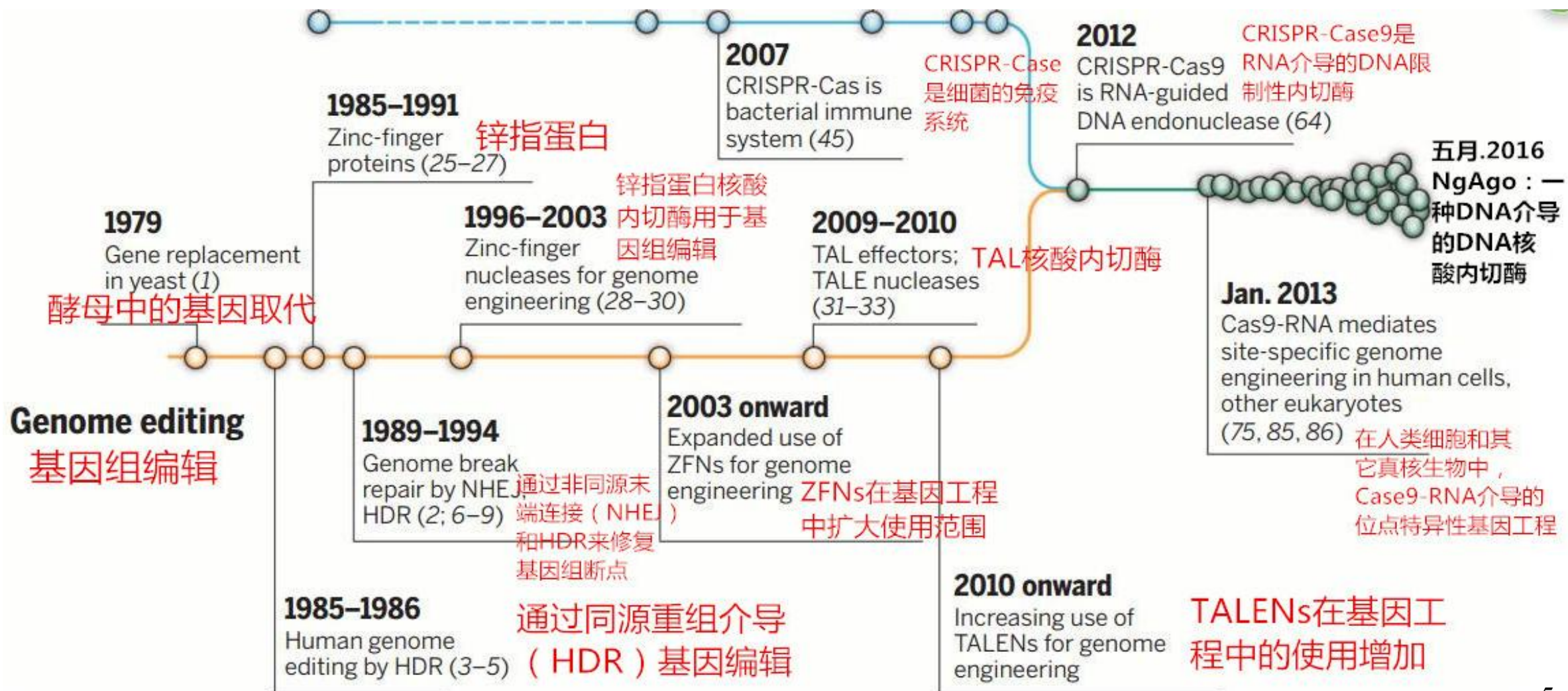
# 基因组编辑技术

2020年CRISPR/Cas基因组编辑技术获诺贝尔化学奖



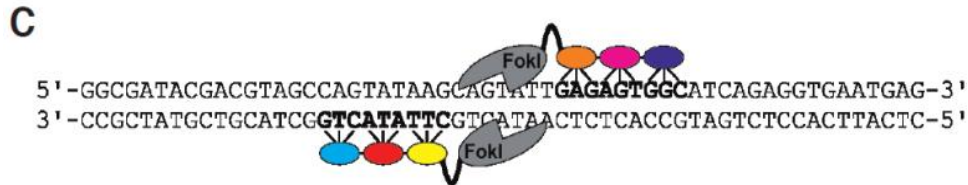
# 基因组编辑技术的发展历史

## 基因组编辑技术的发展历史

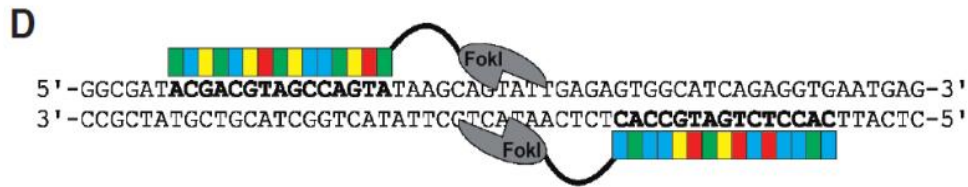


# 基因组编辑技术的发展历史

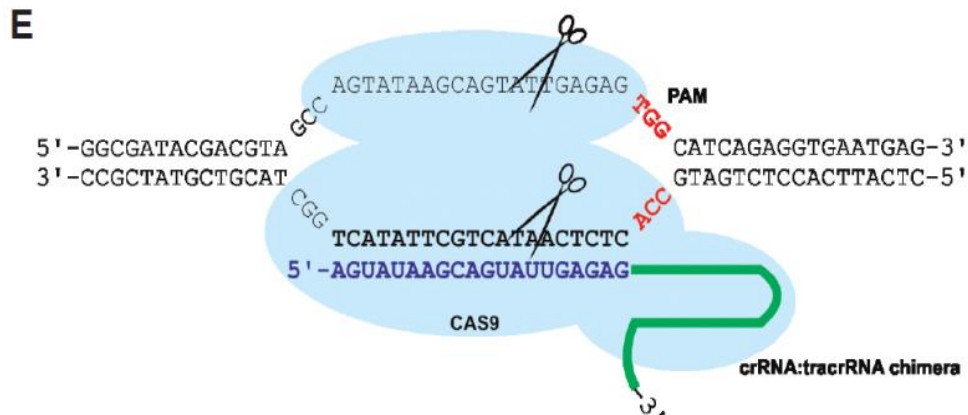
## 三种基因组编辑技术的对比



**锌指核酸酶 ZFN：锌指结构域识别 + Fok I**  
**ZFNs：设计、操作难度大、成本高**



**类转录激活因子效应物核酸酶TALEN**  
**TALENs：操作难度较大、成本较高**



**CRISPR/Cas基因编辑：操作简便、成本低、精准、高效**

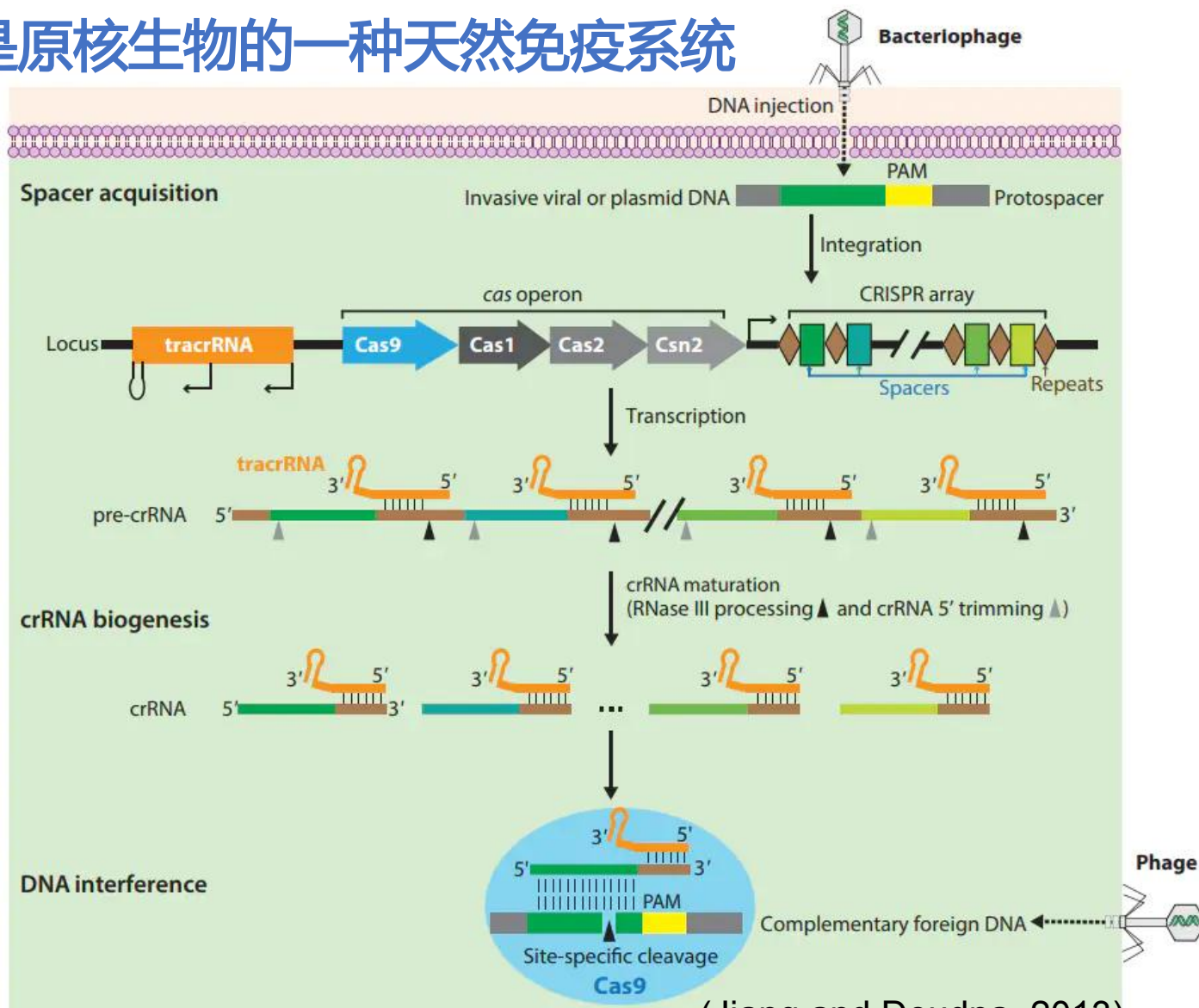
# CRISPR/Cas基因组编辑技术原理

## CRISPR/Cas系统是原核生物的一种天然免疫系统

I. Adaptation  
间隔序列获得

II. Expression  
crRNA形成

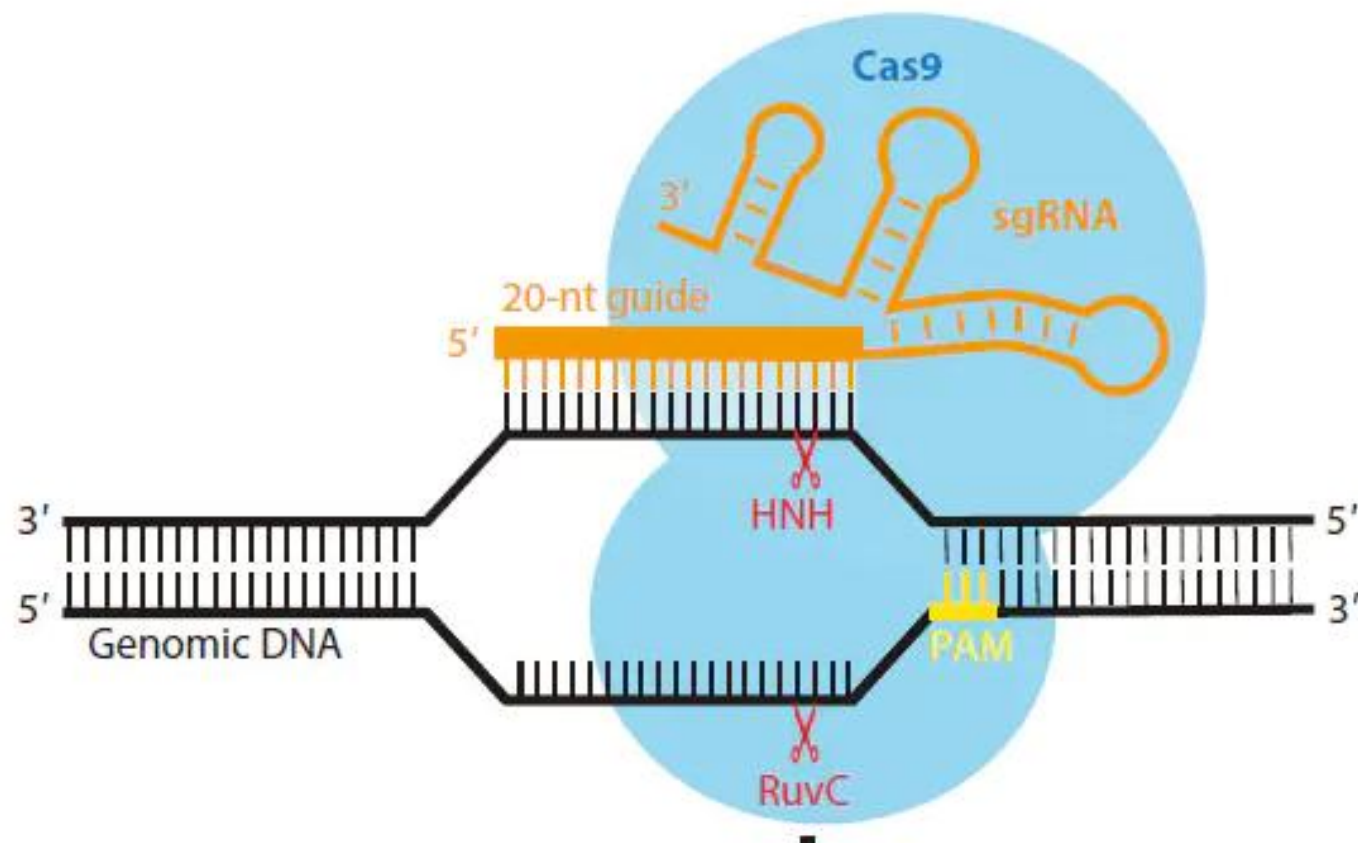
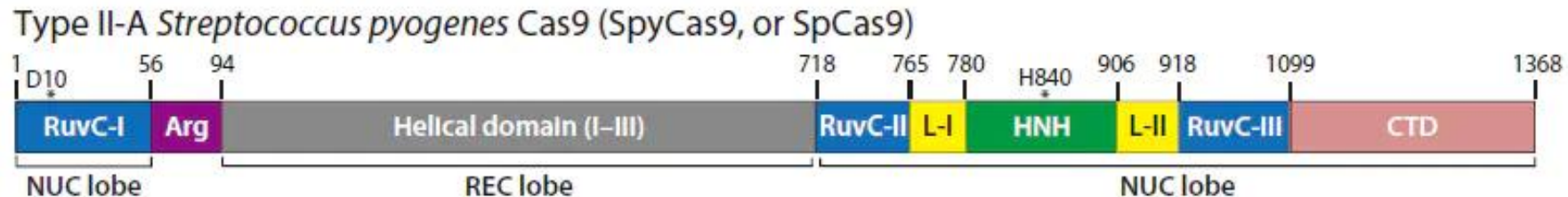
III. Interference  
剪切外源DNA



(Jiang and Doudna, 2013)

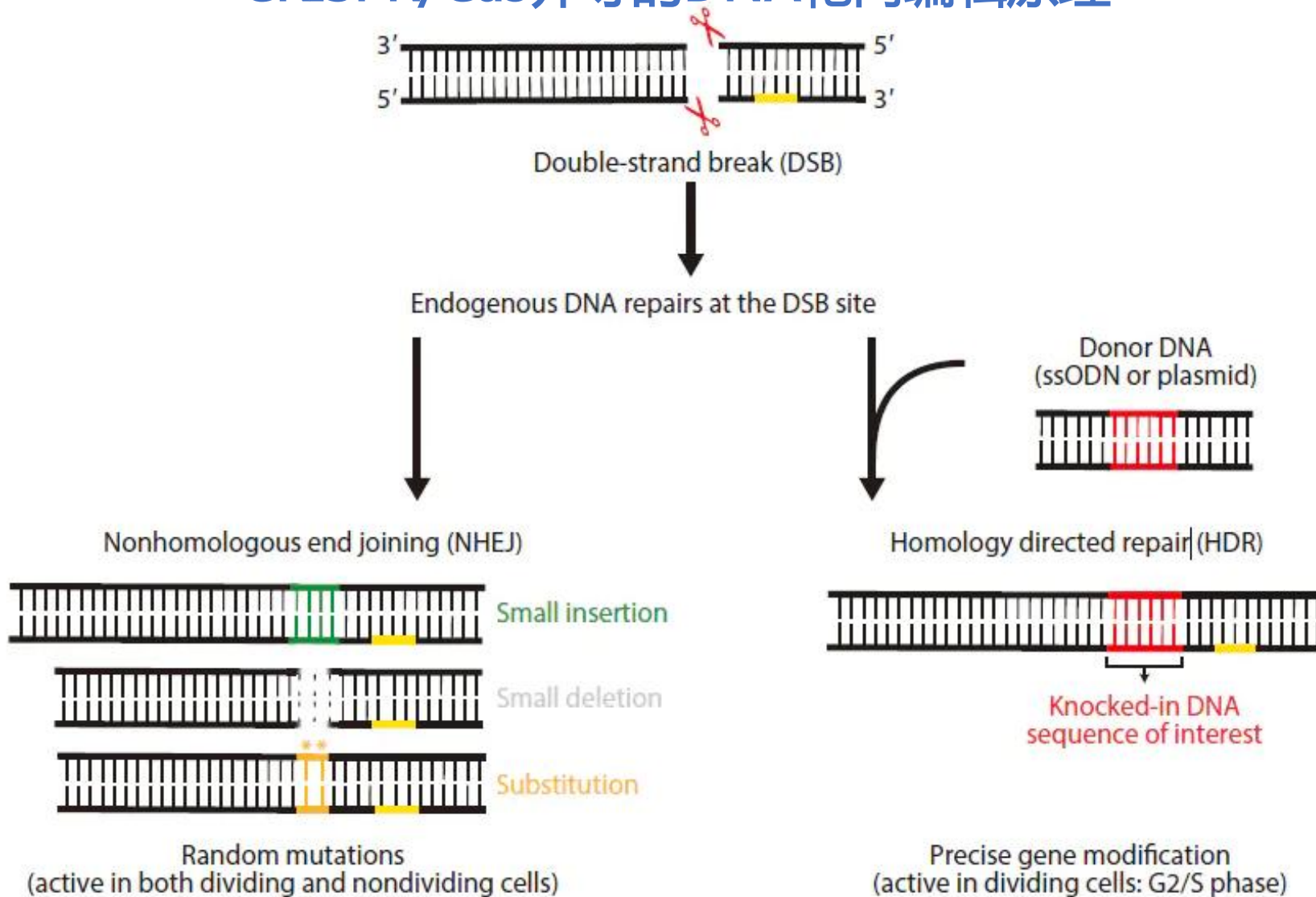
# CRISPR/Cas基因组编辑技术原理

## CRISPR/Cas介导的DNA靶向编辑原理

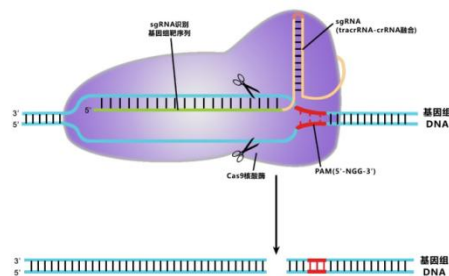


# CRISPR/Cas基因组编辑技术原理

## CRISPR/Cas介导的DNA靶向编辑原理



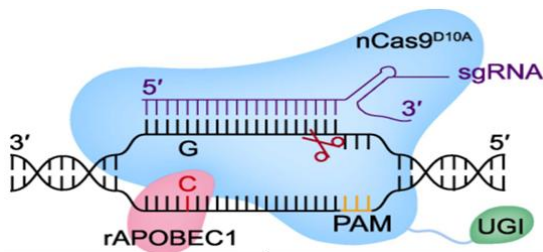
# 基于CRISPR/Cas系统的靶向修饰技术及特点



**基因敲除  
(Gene Knockout)**



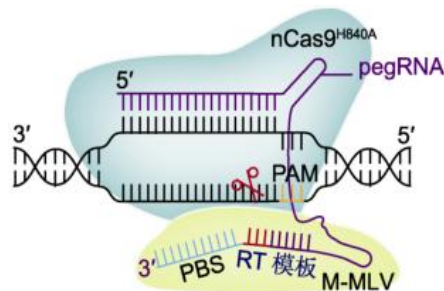
**靶点切割/突变**



**单碱基编辑  
(Base Editing)**



**CBE : C>T (G>A)  
ABE : A>G (T>C)  
CGBE: C >G (G>C)**



**引导编辑  
(Prime Editing)**



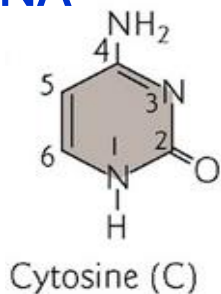
**片段插入/替换**

# 基因组编辑衍生技术——单碱基编辑

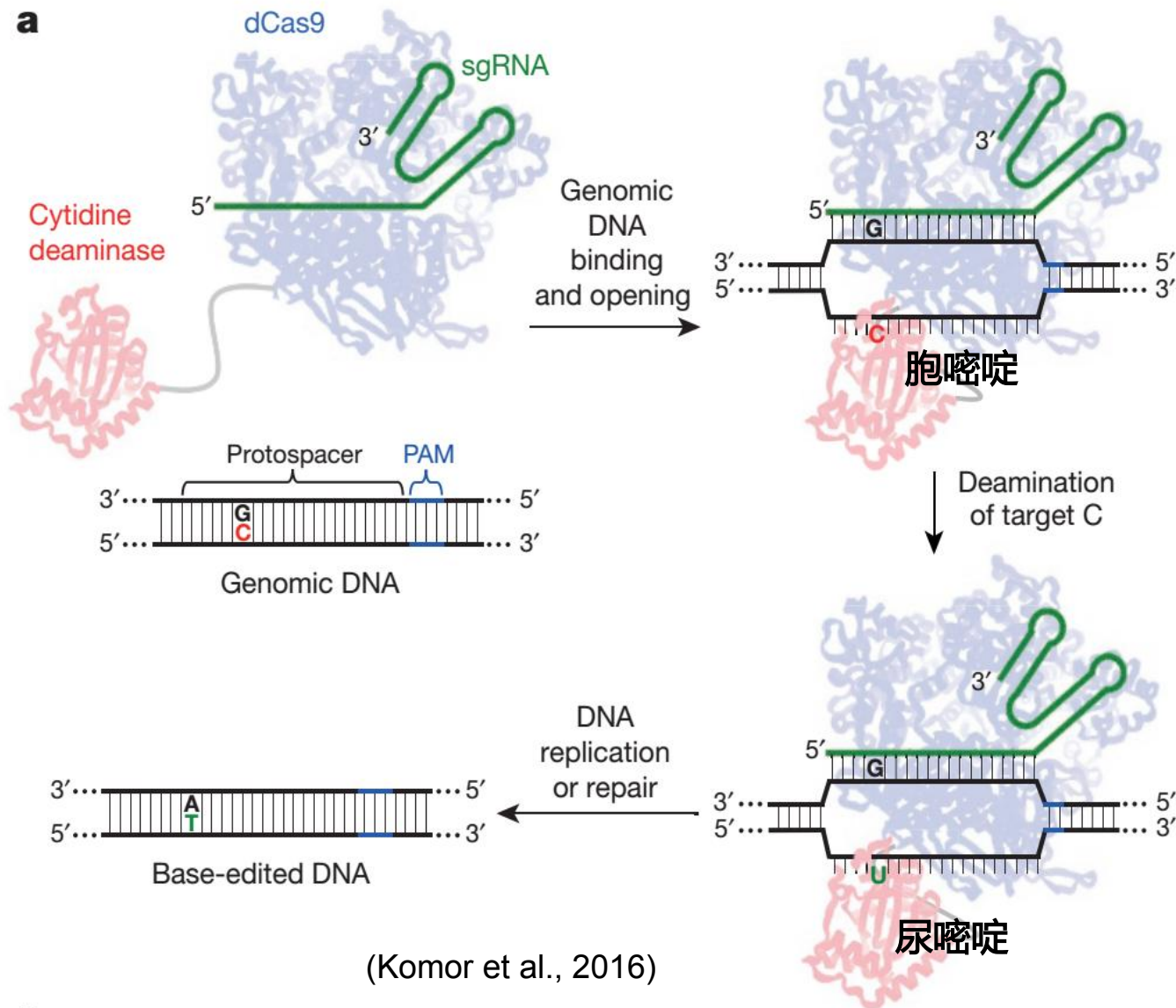
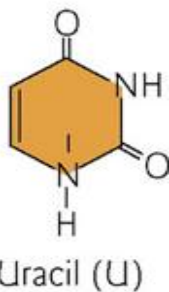
## 单碱基编辑系统--CBE

**C·G → T·A**

- dCas9 (无切割活性)
- 胞嘧啶脱氨酶
- sgRNA



脱氨

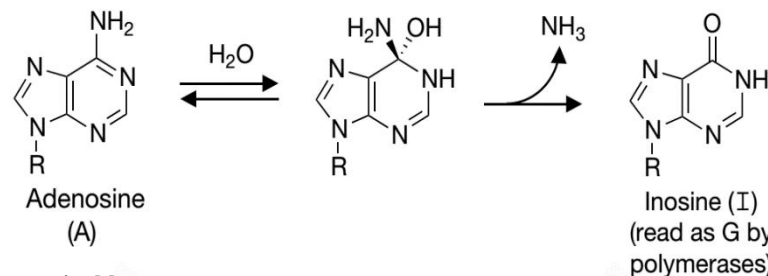


# 基因组编辑衍生技术——单碱基编辑

## 单碱基编辑系统--ABE

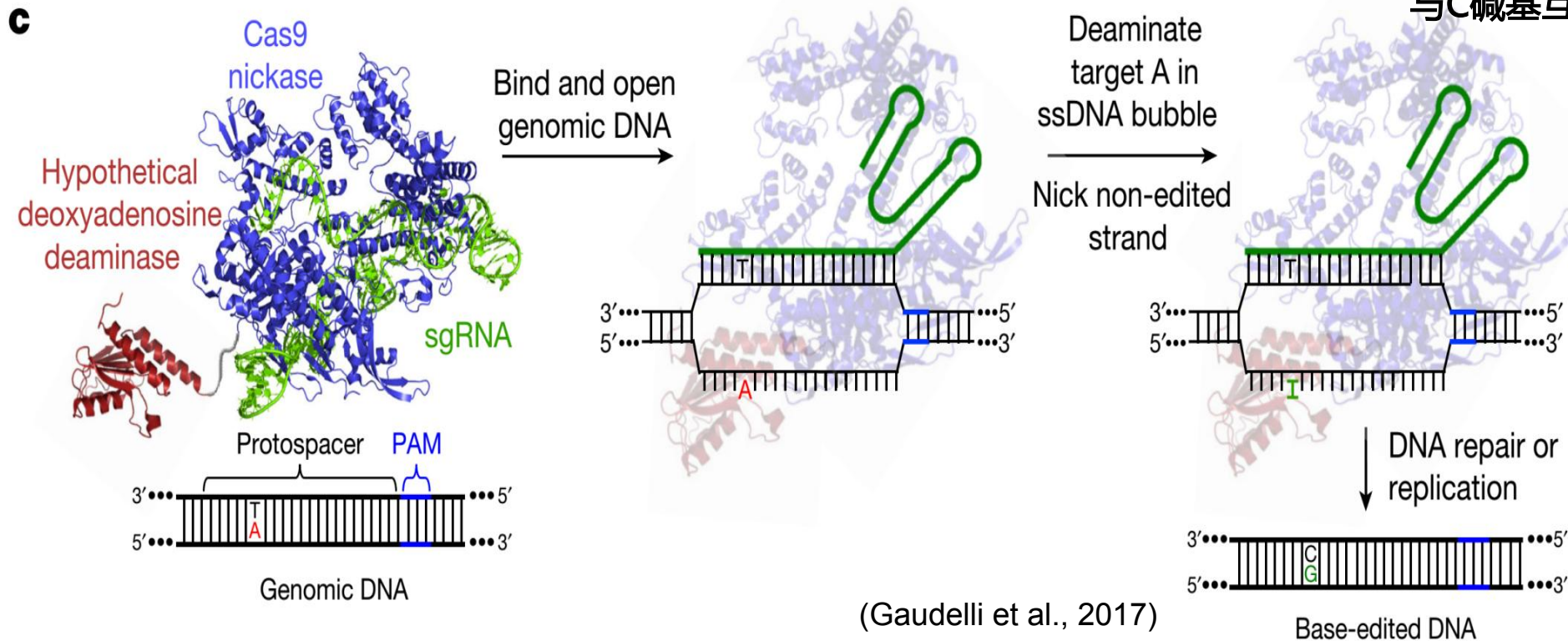
**T·A → C·G**

- dCas9
- 腺嘌呤脱氨酶
- sgRNA



腺苷

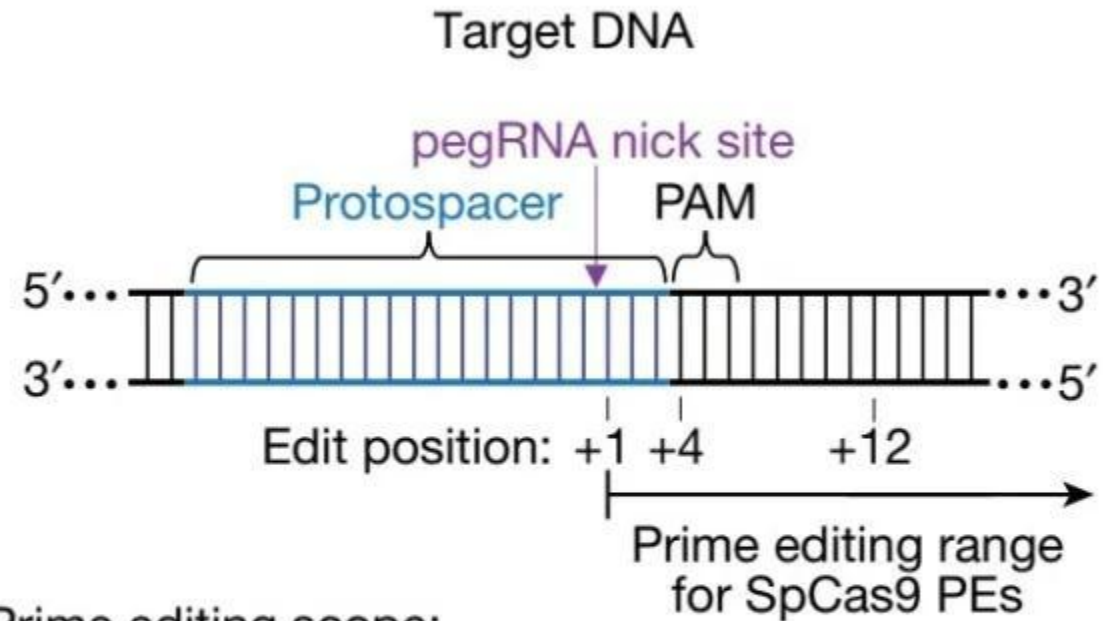
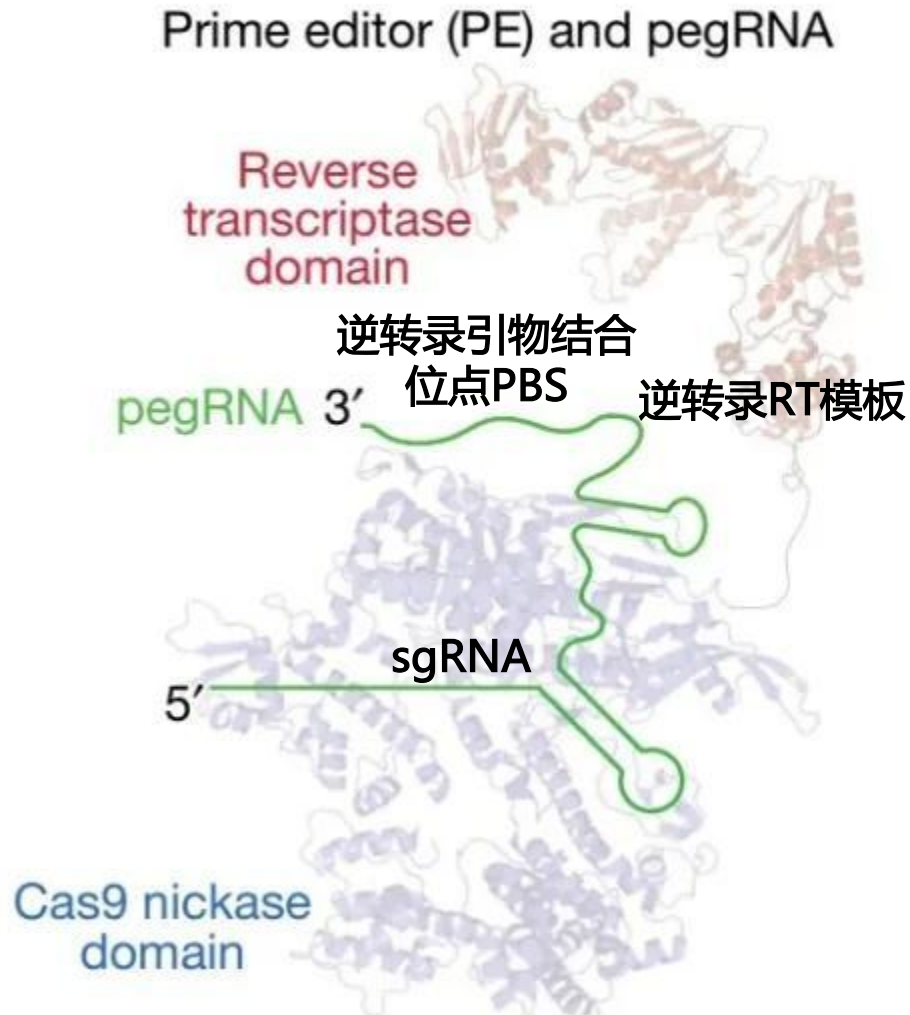
肌苷(次黄嘌呤),  
与C碱基互补配对



# 基因组编辑衍生技术——先导编辑

## 先导编辑技术(PE)

任意碱基的转换、小片段的插入/替换



Prime editing scope:

All 4 transition point mutations

All 8 transversion point mutations

Insertions (1 bp to  $\geq 44$  bp)

Deletions (1 bp to  $\geq 80$  bp)

Combinations of the above

知乎 @强者的决心

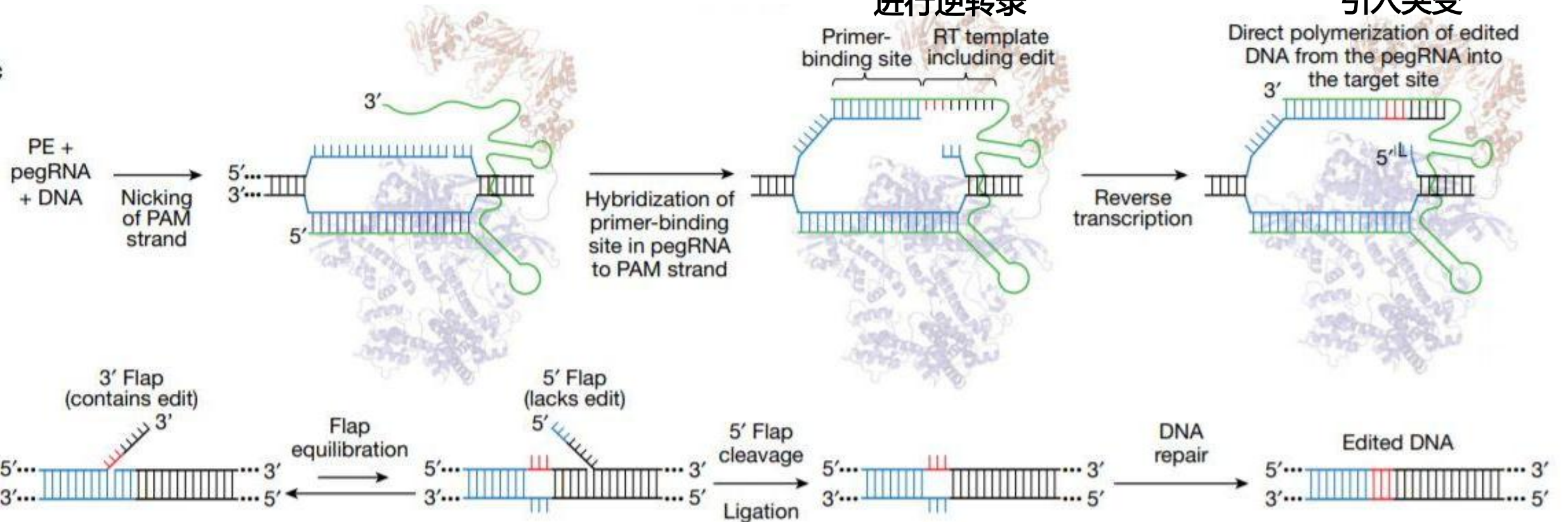
# 基因组编辑衍生技术——先导编辑

## 先导编辑技术(PE)

靶向目标区，产生单链切口

以RT模板(含突变位点)进行逆转录

经逆转录后插入模板序列，引入突变



(Anzalone et al., 2019)

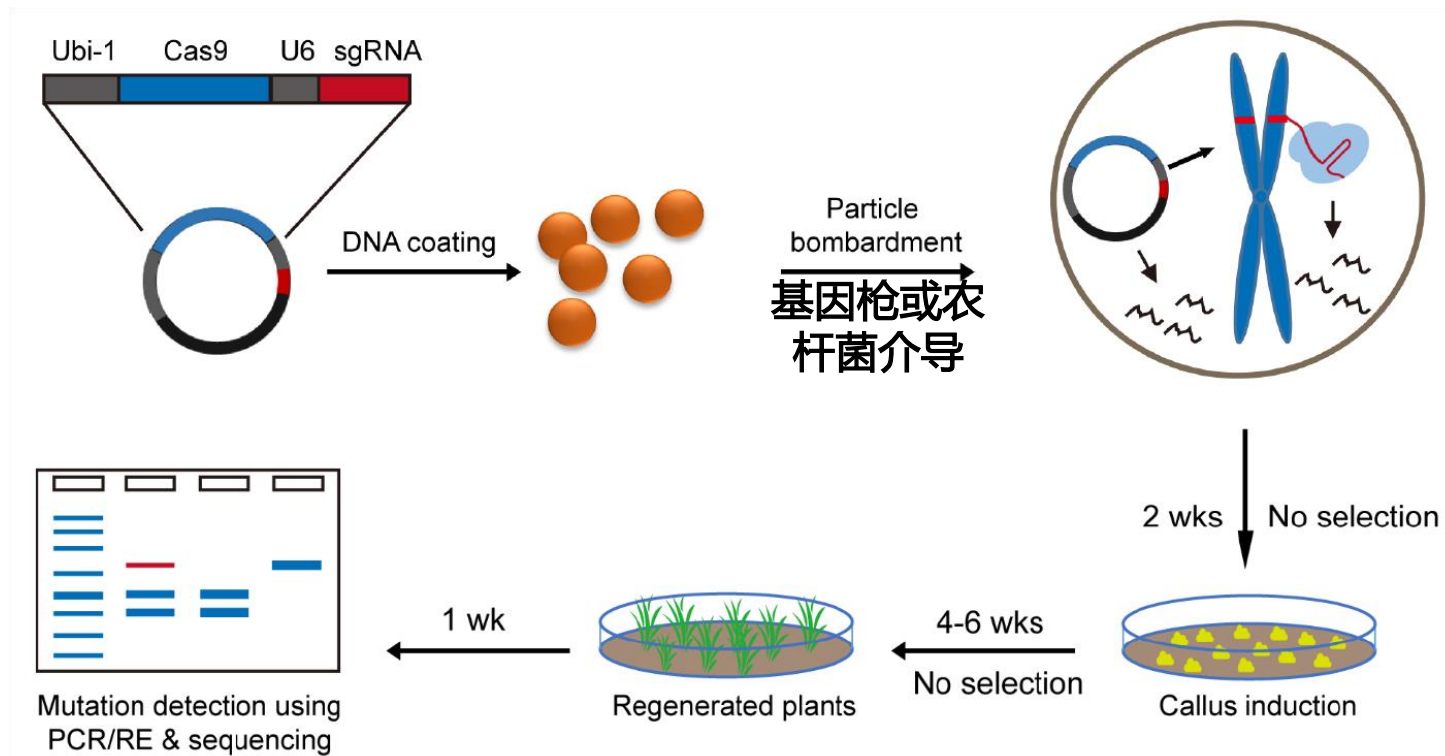
# 提 纲

- ◆ 基因组编辑技术的原理和发展
- ◆ **植物多基因编辑载体系统pYLCRISPR/Cas9**
- ◆ 一站式的植物基因组编辑设计和突变分析平台
- ◆ 基因组编辑技术在遗传改良中的应用

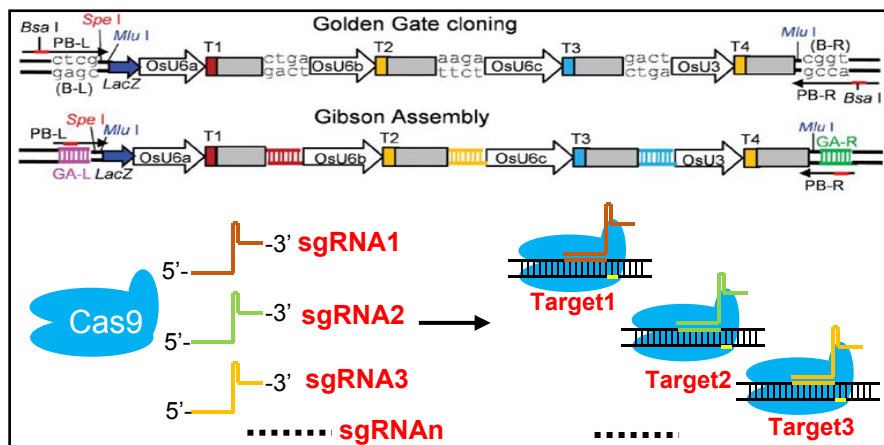
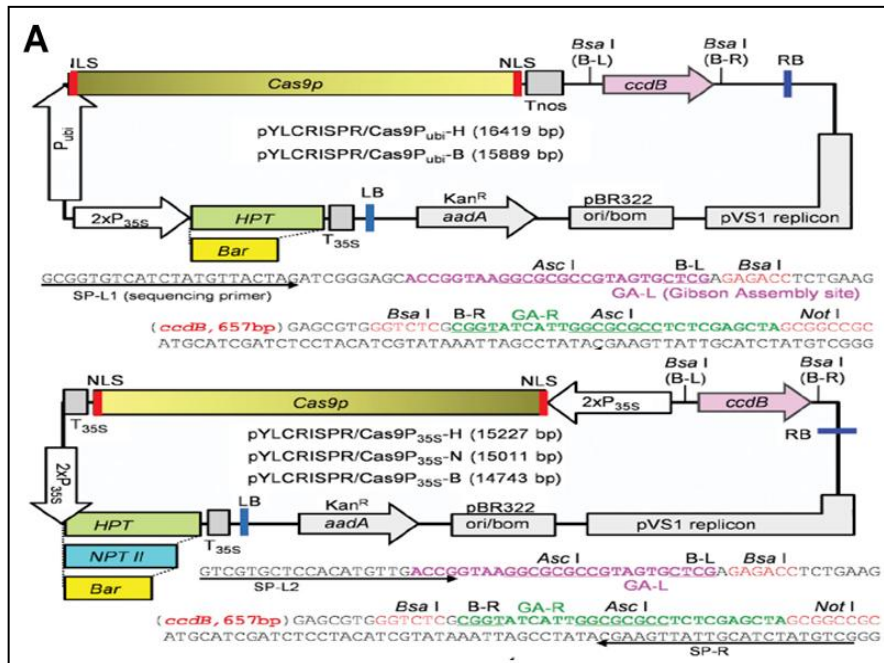
# 在植物中如何开展CRISPR/Cas基因编辑实验？

植物中开展基因编辑的步骤：

1. gRNA设计(靶点特异性和效率)
2. 载体构建
3. 遗传转化
4. 转化植株的靶点突变分析
5. 表型鉴定



# 植物多基因编辑载体系统pYLCRISPR/Cas9



适用于单、双子叶植物

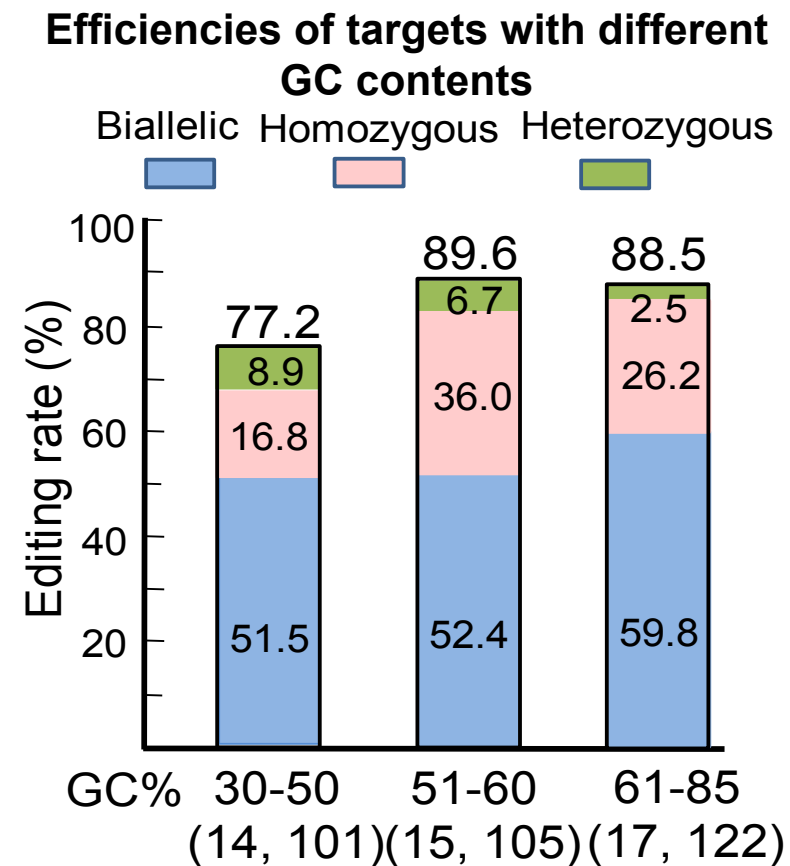
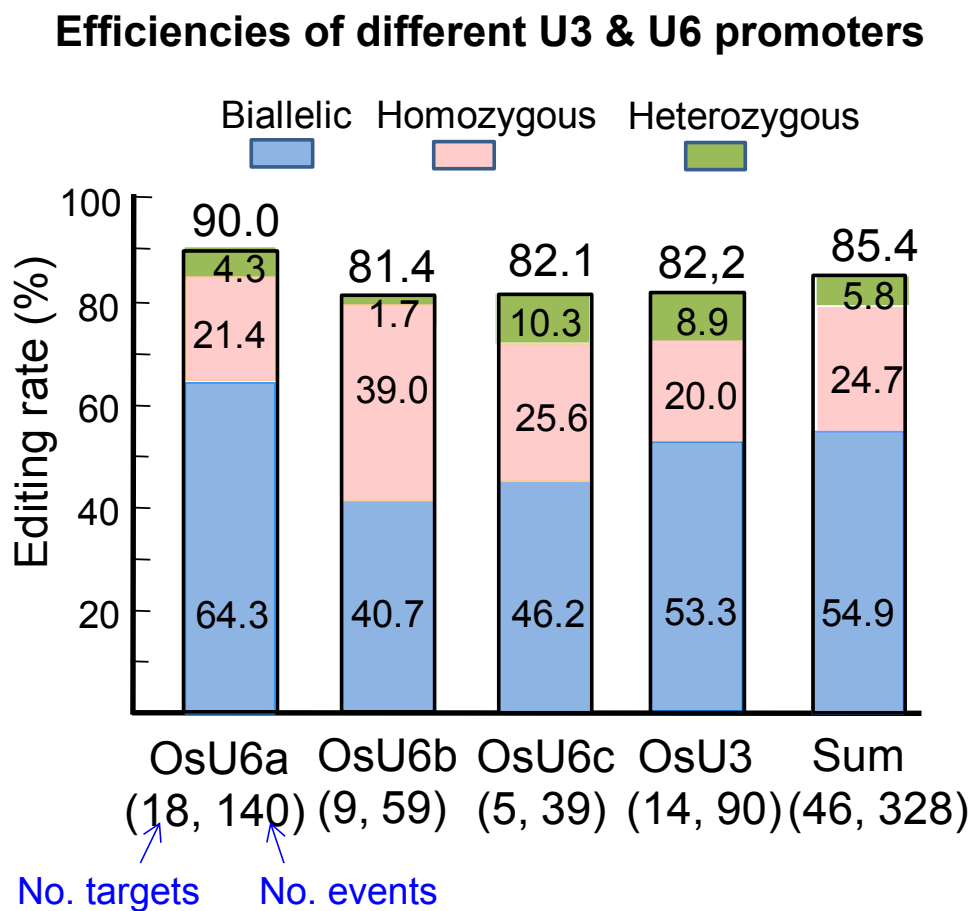
优点：

同时靶向植物基因组的多个靶点(最新版本最多可同时编辑40个靶点)，实现**高效、精准、可控**的快速育种

- 该系统被国内外**1200**多家研究机构与育种单位使用，是目前使用最广泛的系统之一
- 在国际著名期刊Mol Plant等期刊发表**8**篇技术论文，申请专利**2**件，授权**1**件

(Ma et al., 2015)

# 植物多基因编辑载体系统pYLCRISPR/Cas9

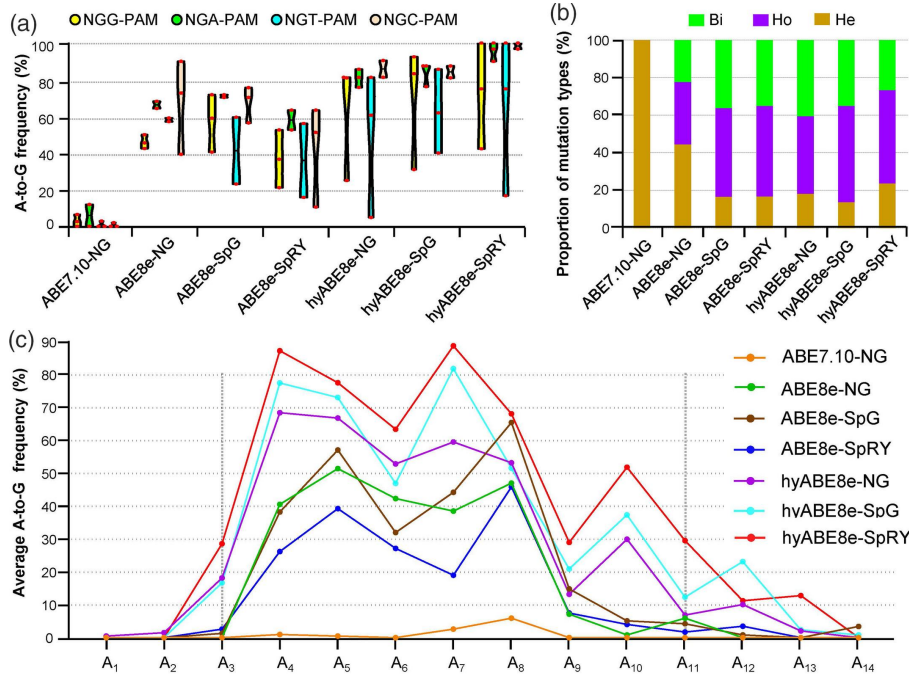
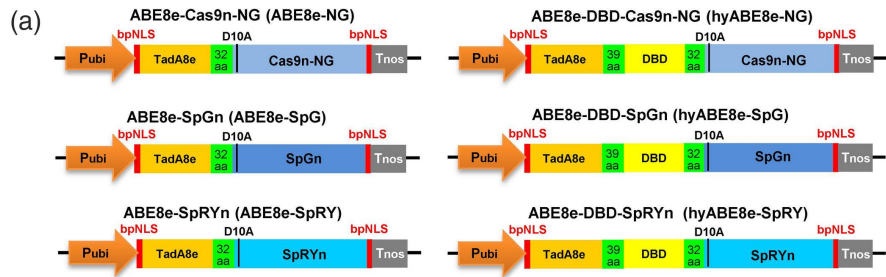


The average editing rate up to **85.4%** in rice

Ma *et al.*, 2015, Mol. Plant

# 团队开发的单碱基编辑系统 ( PhieABEs )

► PhieABEs: a PAM-less/free high-efficiency adenine base editor toolbox with wide target scope in plants

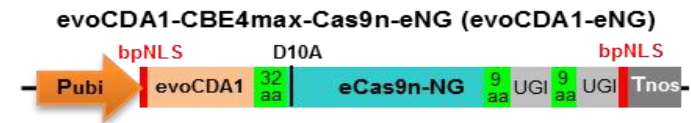
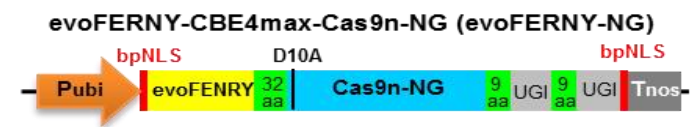
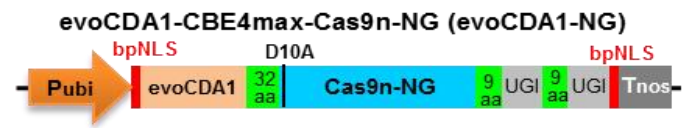
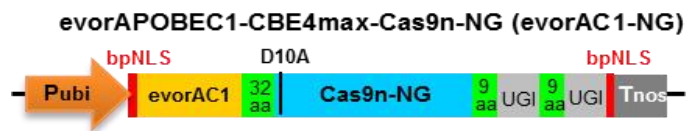
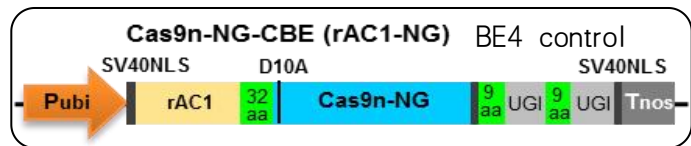


Target site (TS)	Target sequence (5'-3') NGN PAM	ABE7.10		ABE8e		ABE8e-DBD		
		ABE7.10-NG	ABE8e-NG	ABE8e-SpG	ABE8e-SpRY	hyABE8e-NG	hyABE8e-SpG	hyABE8e-SpRY
OsSPL14-TS1	AGAGAGAGCACAGCTCGAGT <b>CGG</b>	2.6% <sup>a</sup> (1/38)	42.5% (17/40)	59.0% (23/39)	21.1% (4/19)	81.0% (34/42)	92.5% (37/40)	75.0% (45/60)
OslAA13-TS2	CCAA <b>CCCA</b> CTGCTCGCC <b>CTGA</b>	11.9% <sup>a</sup> (5/42)	64.3% (18/28)	71.8% (28/39)	52.6% (10/19)	75.8% (25/33)	87.5% (35/40)	96.7% (58/60)
OsSPL7-TS3	GAGAGAGCAC <b>CCAGCCGACGCT</b>	2.9% <sup>a</sup> (1/35)	57.1% (16/28)	23.1% (9/39)	15.8% (3/19)	60.6% (20/33)	61.9% (26/42)	69.2% (18/26)
LF1-TS4	TGGGATGAAGGTTCCATGCT <b>AGC</b>	2.0% <sup>a</sup> (1/51)	90.0% (36/40)	75.7% (28/37)	63.4% (26/41)	81.3% (26/32)	81.0% (34/42)	100.0% (26/26)
OsGBSSI-TS5	CACCGGATCGTCAACGGCA <b>TGG</b>	0 <sup>b</sup> (0/36)	50.0% (14/28)	71.8% (28/39)	52.6% (10/19)	-	-	-
OsSPL14-TS6	ATGGAGATGCCAGTGGAGG <b>AGG</b>	-	45.5% (10/22)	40.5% (15/37)	36.6% (15/41)	-	-	-
OsMADS57-TS7	TGTGAACAGAGAGGTGCCAC <b>AGA</b>	-	68.2% (15/22)	70.3% (26/37)	63.4% (26/41)	-	-	-
OsCKX2-TS8	ACCGACGACGCGGTGACG <b>GGT</b>	0 <sup>b</sup> (0/31)	59.1% (13/22)	59.5% (22/37)	56.1% (23/41)	-	-	-
OsEUI1-TS9	TCCACCATGCA <b>CCACGACGCTCGC</b>	0 <sup>b</sup> (0/22)	39.3% (11/28)	56.4% (22/39)	10.5% (2/19)	-	-	-
OsSPL7-TS10	GGGAAGGGAAGGAGAAGG <b>CGC</b>	-	72.7% (16/22)	70.3% (26/37)	51.2% (21/41)	-	-	-
OsSPL4-TS11	GCGGAAGGAGAAGCGAGG <b>CGG</b>	-	-	-	-	25.0% (8/32)	31.0% (13/42)	42.3% (11/26)
OsCKX2-TS12	GAGCTCAAGCTCCGCGCG <b>CGG</b>	6.5% <sup>b</sup> (2/31)	-	-	-	81.3% (26/32)	83.3% (35/42)	100.0% (26/26)
OsEUI1-TS13	ACGGACCCGGAGCTCATCG <b>GCA</b>	0 <sup>b</sup> (0/22)	-	-	-	85.7% (36/42)	87.5% (35/40)	90.0% (54/60)
OsSPL4-TS14	TCAGAAGAGAGGAGCTGC <b>GGA</b>	-	-	-	-	81.3% (26/32)	76.2% (32/42)	100.0% (26/26)
OsWaxy-TS15	ATCTCTGCAC <b>TGAATTGTT</b>	0 <sup>b</sup> (0/36)	-	-	-	4.8% (2/42)	40.0% (16/40)	16.7% (10/60)
OsMADS57-TS16	ATCACAGCAAGAGAAAGG <b>AGT</b>	-	-	-	-	81.3% (26/32)	85.7% (36/42)	100.0% (26/26)
OsWaxy-TS17	CTCGCCAAGGAGACGTGG <b>TGC</b>	0 <sup>b</sup> (0/36)	-	-	-	90.5% (38/42)	87.5% (35/40)	96.7% (58/60)
<b>Average efficiency</b>		2.6%	59.3%	59.7%	46.7%	67.8%	73.9%	78.5%

Tan et al.,  
2022, PBJ

# 团队开发的单碱基编辑系统 ( PhieCBEs )

- PhieCBEs: Plant high-efficiency cytidine base editors ( 胞嘧啶编辑器 ) with expanded target range

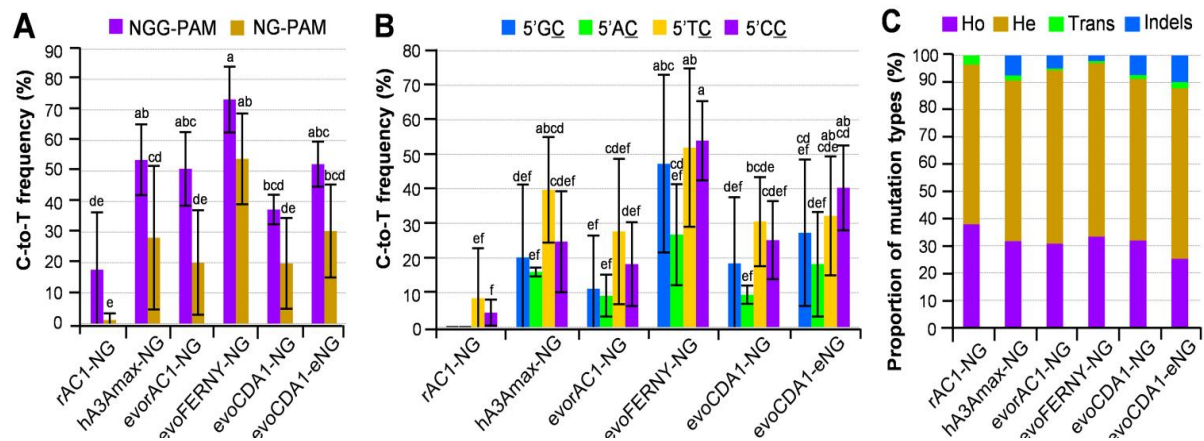


Target site	Target sequence (5'-3')	BE4	BE4max	evoBE4max			
		rAC1-NG	hA3Amax-NG	evorAC1-NG	evoFERNY-NG	evoCDA1-NG	evoCDA1-eNG
T1	ACCCCCACAGGCTCGCGAGGG	8.3% (2/24)	55.9% (19/34)	45.5% (15/33)	68.8% (22/32)	43.3% (13/30)	57.6% (19/33)
T2	GTCGTCGGCGGCATGGTGAAGG	4.2% (1/24)	58.8% (20/34)	<b>66.7%</b> (22/33)	59.4% (19/32)	30.3% (10/30)	51.5% (17/33)
T3	ACCGCCACCGTCGTCGCCAATGT	0 (0/24)	20.6% (7/34)	6.1% (2/33)	50.0% (16/32)	26.7% (8/30)	36.4% (12/33)
T4	ATGCATGCATGCACCCATGCTGC	0 (0/24)	2.9% (1/34)	0 (0/33)	40.6% (13/32)	0 (0/30)	9.1% (3/33)
T5	ATCTCTGCACCTGAATTGAATGT	0 <sup>a</sup> (0/30)	27.6% (8/29)	15.6% (5/32)	44.8% (13/29)	12.0% (3/25)	18.8% (6/32)
T6	TCCACCATGCACCACGACGTCGC	0 <sup>a</sup> (0/18)	17.2% (5/29)	31.3% (10/32)	51.7% (15/29)	16.0% (4/25)	34.4% (11/32)
T7	GAGCTCAAGCTCCGCGCCGGGG	<b>50.0%</b> <sup>a</sup> (12/24)	65.5% (19/29)	56.3% (18/32)	<b>86.3%</b> (25/29)	40.0% (10/25)	<b>59.4%</b> (19/32)
T8	ATCAGCGACCGGATCTCCCCCGT	5.6% <sup>a</sup> (1/18)	<b>72.4%</b> (21/29)	46.9% (15/32)	82.7% (24/29)	<b>44.0%</b> (11/25)	53.1% (17/32)
T9	ACATTCTCCCAGTTCCTCGCAGG	8.3% <sup>a</sup> (3/36)	34.5% (10/29)	34.4% (11/32)	79.3% (23/29)	36.0% (9/25)	40.6% (13/32)
Average efficiency		8.5%	39.5%	33.6%	<b>62.6%</b>	27.6%	40.1%

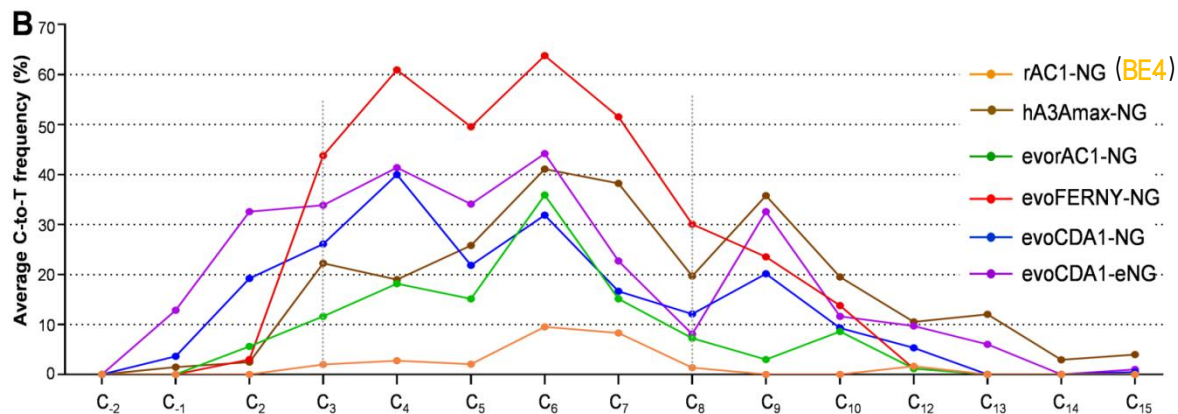
平均编辑效率：62.6%

# 团队开发的单碱基编辑系统 ( PhieCBEs )

PhieCBE消除了靶序列偏好性，编辑窗口内的靶点具有更好的编辑机会



编辑窗口内效率较高



# 提 纲

- ◆ 基因组编辑技术的原理和发展
- ◆ 植物多基因编辑载体系统pYLCRISPR/Cas9
- ◆ **一站式的植物基因组编辑设计和突变分析平台**
- ◆ 基因组编辑技术在遗传改良中的应用

# 一站式基因编辑设计和分析平台CRISPR-GE

<http://skl.scau.edu.cn/>

<http://www.crispr-ge.com/superdecode/>

 **BE target** 单碱基编辑靶点设计

**GeneCat**

基因序列结构提取

*seqDownload*

序列下载

基于MMEJ的  
大片段删除 **MMEJ-KO**

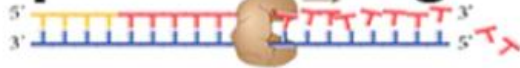


**targetDesign**

靶点设计

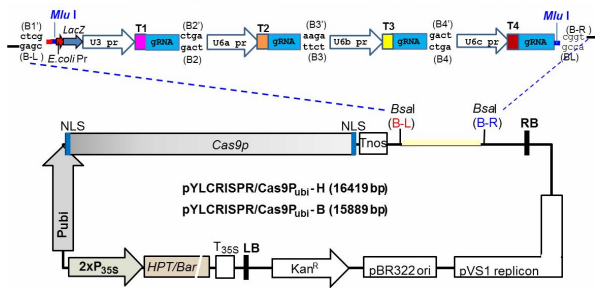
引物设计


**primerDesign**



编辑载体

**CRISPR/Cas9 vectors**



  
Edited organisms

脱靶评估

**off Target**

基于多种测序方法的突变分析

**SuperDecode**

**DSD DecodeM**

基于Sanger测序的突变分析

# 一站式基因编辑设计和分析平台CRISPR-GE

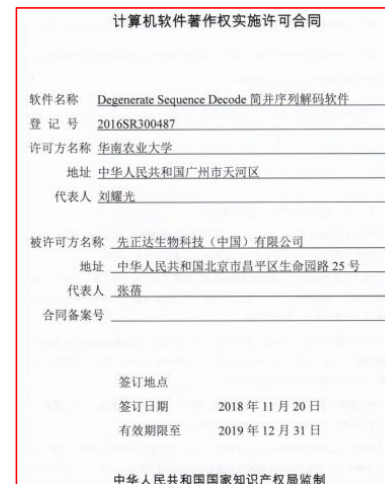
## CRISPR-GE使用情况

每月访问量约 **2.5** 万次

7年半累计访问 **500** 万次



软件著作权



软件授权给先正达公司使用

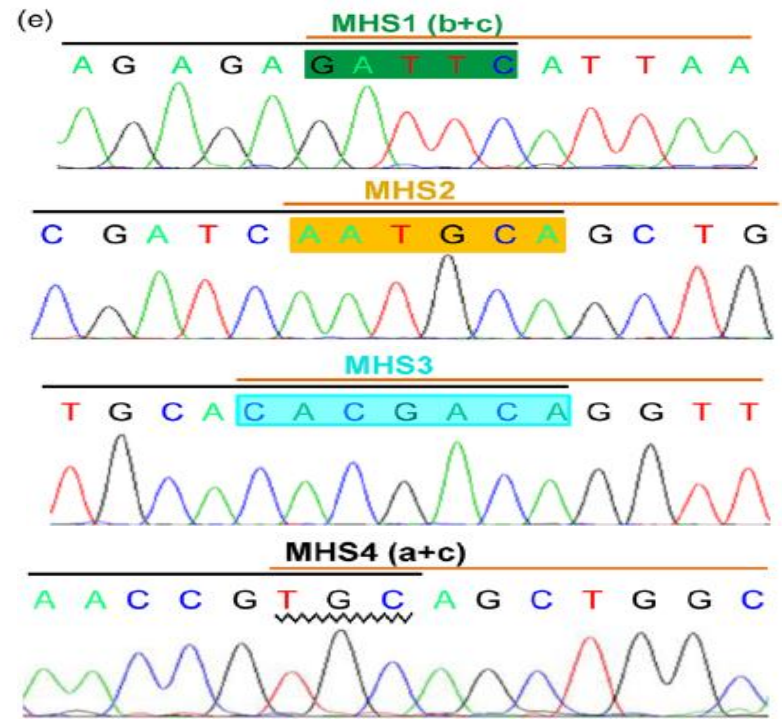
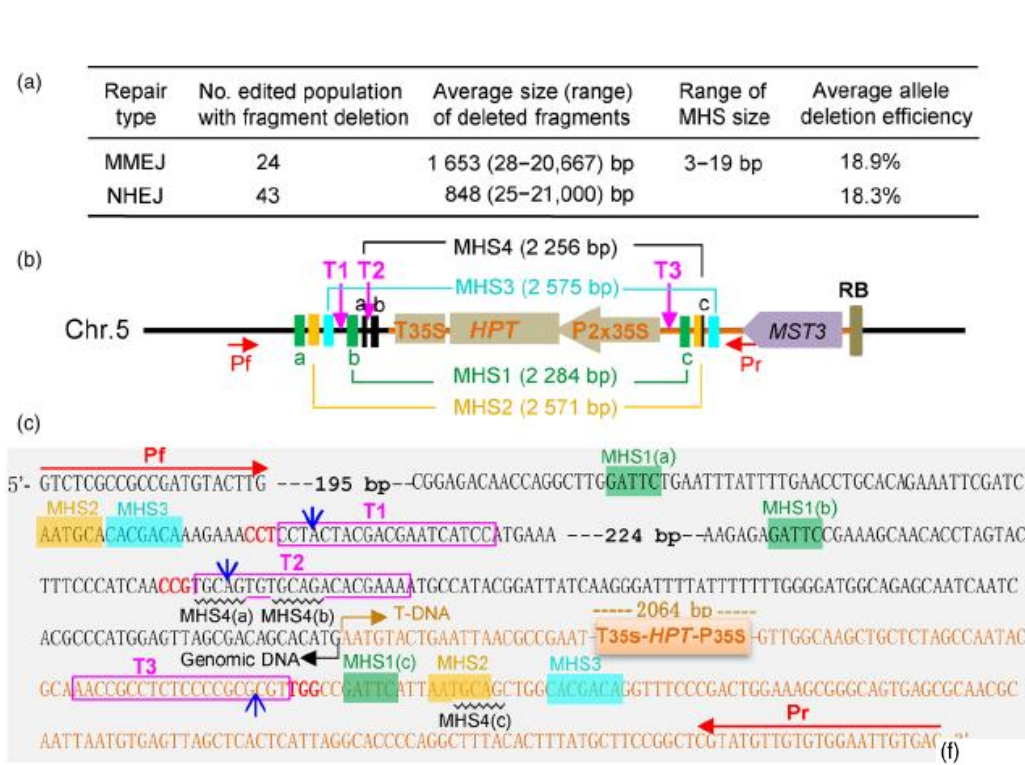
CRISPR-GE是国际上  
高频使用的基因编辑软件  
系统之一





# 借助微同源介导的末端连接(MMEJ) 提高片段删除的效率

适用场景：启动子/UTR/调控元件编辑、miRNA位点编辑等



Tan *et al.*, Plant Biotech J, 2020

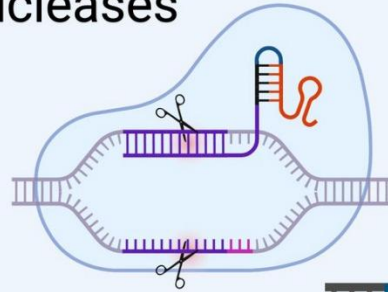
No. T <sub>0</sub> plant	Repair type	Deletion-junction sites	HPT-deletion plant	Plant deletion rate %	Total plant deletion rate %	Allele deletion rate %
21	MMEJ	MHS1(b+c)	# 4, 8, 17, 20, 21	23.8 (5/21)	52.4 (11/21)	14.3 (6/42) for ho $\Delta$ ; 23.8 (8/42) for he $\Delta$
		MHS2	# 11, 15	9.5 (2/21)		
		MHS3	# 1	4.8 (1/21)		
		MHS4(a+c)	# 14, 18, 19	14.3 (3/21)		
	NHEJ		# 3, 5, 9	14.3 (3/21)	14.3 (3/21)	7.1 (3/42) for he $\Delta$

# 如何高效、准确的检测基因组编辑产生的突变？

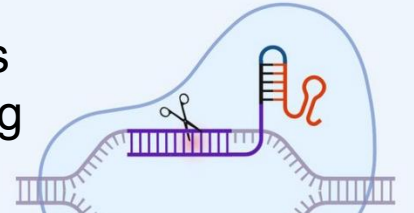
## Mutations:

- Small deletion/insertion (most frequently)
- Base substitutions
- Fragment deletion/insertion
- Fragment inversion

Cas nucleases



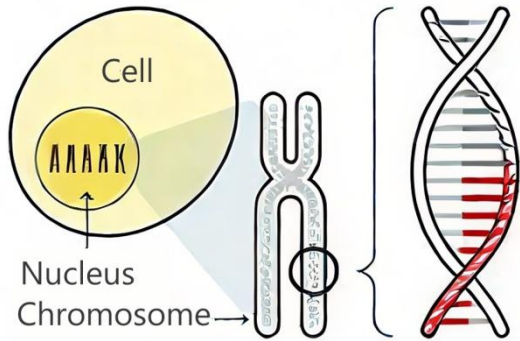
Base editors  
Prime editing



Genome editing outcomes

# 基因组编辑产生的常见突变类型

## 不同的基因型



Editing outcomes

<i>GCTGAATCTTTTCACTaGCAGGttgct-3'</i>	Allele 1
<i>GCTGAATCTTTTCACTaGCAGGttgct-3'</i>	Allele 2
<i>GCTGAATCTTTTCACT-GCAGGttgct-3'</i>	Reference
<div style="display: flex; justify-content: space-around; width: 100%;"> <span>Target sequence</span> <span>PAM</span> </div>	
<i>GCTGAATCTTTTCACT-GCAGGttgct-3'</i>	Allele 1
<i>GCTGAATCTTTTCACTtGCAGGttgct-3'</i>	Allele 2
<i>GCTGAATCTTTTCACT-GCAGGttgct-3'</i>	Reference
<i>TGGCAAGGAGTCCGTTCTCGGcagtc-3'</i>	Allele 1
<i>TGGCAAGGAGTCCGTT-CTCGGcagtc-3'</i>	Allele 2
<i>TGGCAAGGAGTCCGTTCTCGGcagtc-3'</i>	Reference
<i>GGCGGCCGCTCTTCCGCGGGTGGagcgc-3'</i>	Allele 1
<i>GGCGGGCAGGA-----GGagcgc-3'</i>	Allele 2
<i>GGCGGCCGCTCTTCCGCGGGTGGagcgc-3'</i>	Reference
<i>TGGCAAGGAGTCCGT--CCTCGGcagtc-3'</i>	Allele 1
<i>TGGCAAGGAGTCCGTTaCCTCGGcagtc-3'</i>	Allele 2
<i>TGGCAAGGAGTCCGTT-CCTCGGcagtc-3'</i>	Reference
<i>GTCGGCCG-----ACGGgcagtc-3'</i>	Allele 1
<i>GTCGGCCGGCAGC-----TGACGGgcagtc-3'</i>	Allele 2
<i>GTCGGCCGGCAGCCGGATGACGGgcagtc-3'</i>	Reference
<i>ATCTCGTAAGAACGCCG-CGGAGGctga-3'</i>	Allele 1
<i>ATCTCGTAAGAA-----G-CGGAGGctga-3'</i>	Allele 2
<i>ATCTCGTAAGAACGCCGTGGAGGctga-3'</i>	Allele 3
<i>ATCTCGTAAGAACGCCG-CGGAGGctga-3'</i>	Reference

Homozygous

Heterozygous

Biallelic

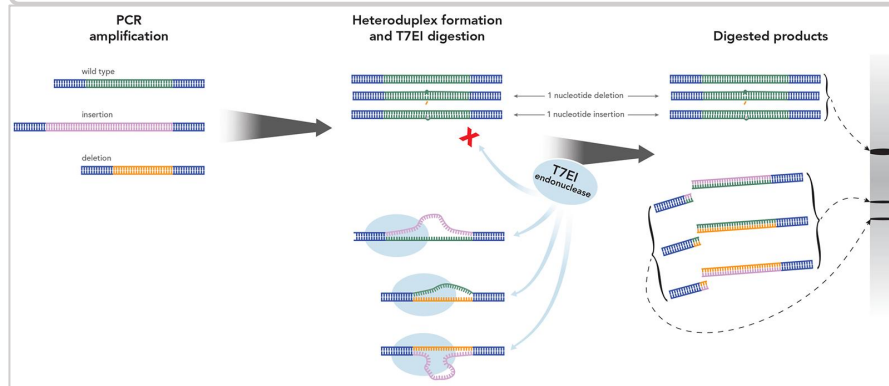
Complicate



# 用于检测基因组编辑突变的方法

## 非测序的方法

T7EI assay; Surveyor assay  
Restriction enzyme; Cc-qPCR; HRM



## 基于测序的方法

### Sanger

DSDecode; ICE; TIDE;  
TIDER; EditR; BEAT

### NGS

Hi-TOM; CrisprStitch;  
AGEseq; CRISPResso2;  
Cas-Analyzer



# 用于检测基因组编辑突变的方法

## ➤ 基于测序的DNA变异检测方法（可以获得突变的具体序列）

（1）一代Sanger测序（具有高度的准确性和简单、快捷等特点）

适用性：小量/中等量样本的突变分析

（2）二代测序NGS（通量大、敏感度高、信息量丰富）

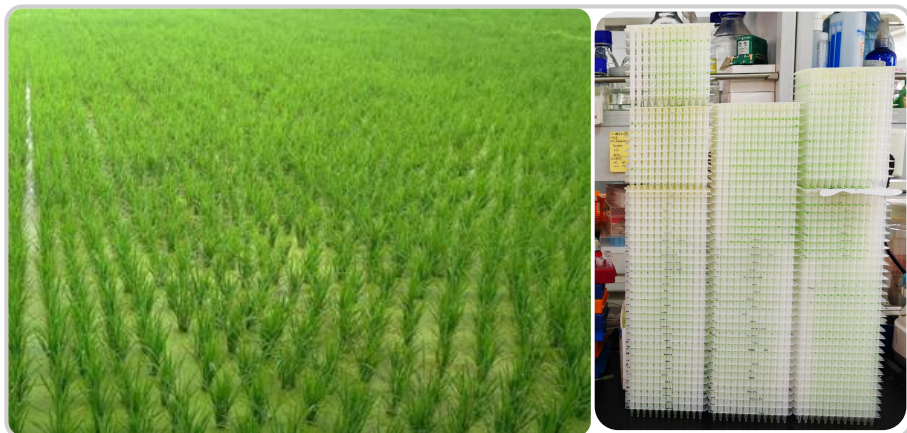
适用性：大量样本的DNA变异筛查，低频变异发现，变异频率测定

（3）单分子测序（长读长，可检测出较大结构变异，但成本高）

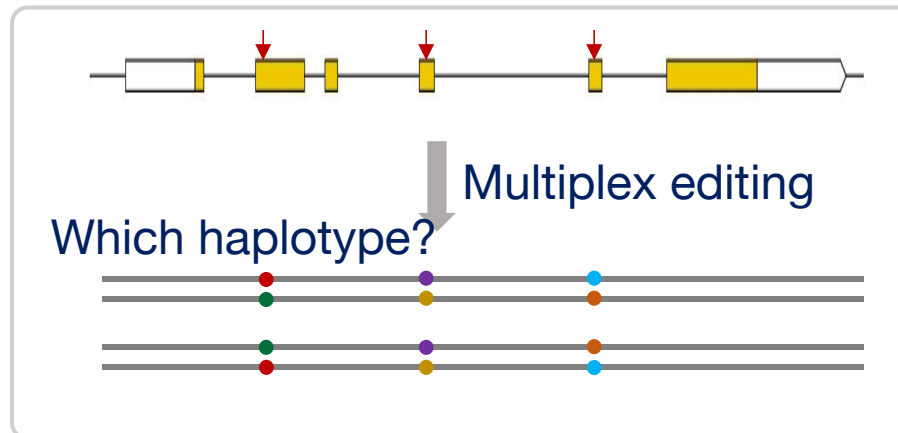
适用性：少量样本、饱和突变、定向进化等。

# 现有方法在大量样品检测中的局限性

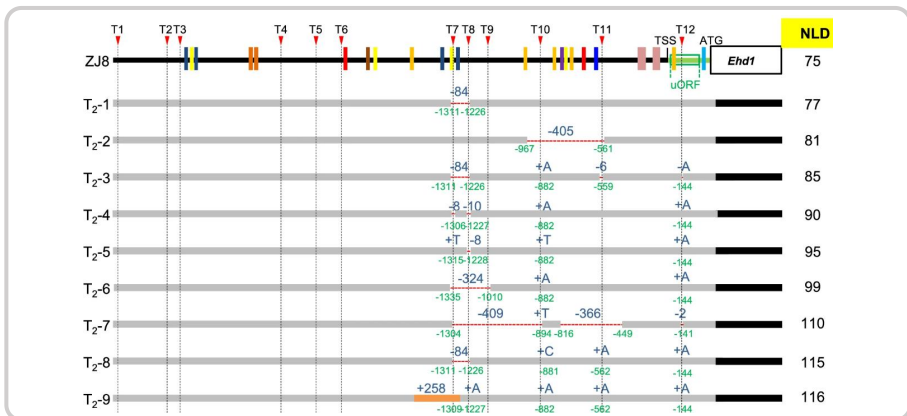
- 大量样本的检测工作量大



- 多靶点突变难以获得单倍型



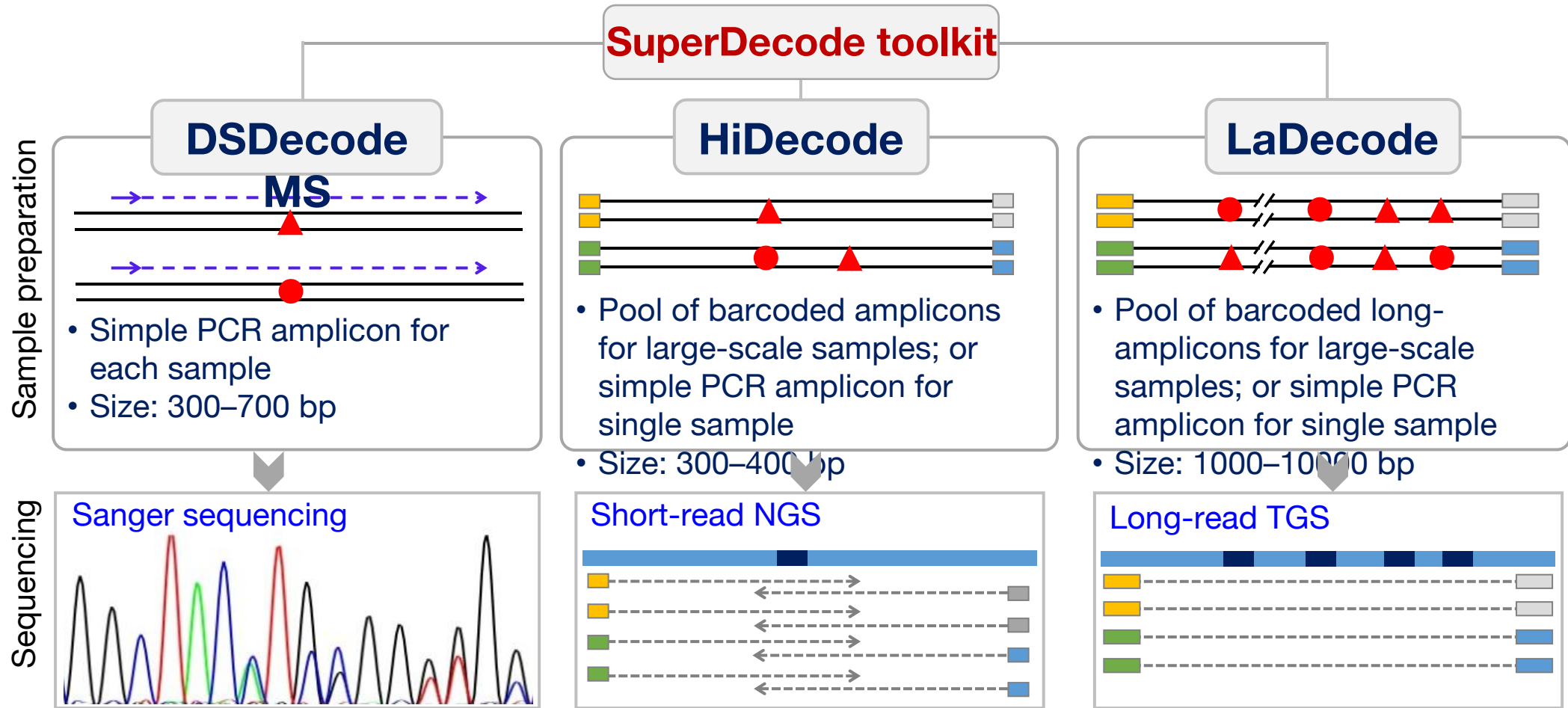
- 多靶点编辑常导致结构变异



- 网络版在线工具数据传输难



# SuperDecode: 用于检测基因组编辑突变的超级解码工具



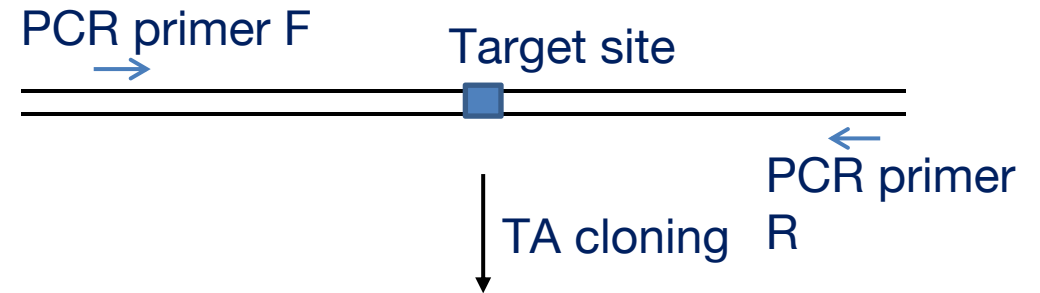
SuperDecode provide standalone package and web-based service (Qi et al., *Mol. Plant*, 2025)

<http://www.crispr-ge.com/superdecode/>

# DSDecodeMS模块

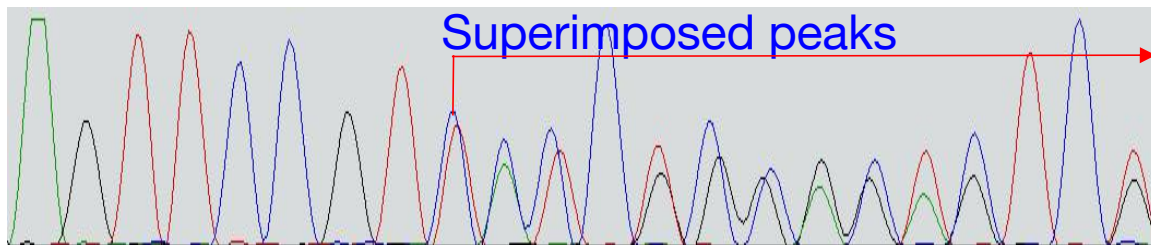
➤ **DSDecodeMS** is used for analyzing mutations from Sanger sequencing

Type 1 (WT/In)	$\begin{array}{l} \text{Allele 1} \\ \text{Allele 2} \\ \text{Reference} \end{array}$ <p style="text-align: center;">Target sequence      PAM</p>	$\begin{array}{l} \text{Allele 1} \\ \text{Allele 2} \\ \text{Reference} \end{array}$
Type 2 (WT/Del)	$\begin{array}{l} \text{Allele 1} \\ \text{Allele 2} \\ \text{Reference} \end{array}$	$\begin{array}{l} \text{Allele 1} \\ \text{Allele 2} \\ \text{Reference} \end{array}$
Type 3 (WT/Del/Subs)	$\begin{array}{l} \text{Allele 1} \\ \text{Allele 2} \\ \text{Reference} \end{array}$	$\begin{array}{l} \text{Allele 1} \\ \text{Allele 2} \\ \text{Reference} \end{array}$
Type 4 (Del/In)	$\begin{array}{l} \text{Allele 1} \\ \text{Allele 2} \\ \text{Reference} \end{array}$	$\begin{array}{l} \text{Allele 1} \\ \text{Allele 2} \\ \text{Reference} \end{array}$
Type 5 (Del1/Del2)	$\begin{array}{l} \text{Allele 1} \\ \text{Allele 2} \\ \text{Reference} \end{array}$	$\begin{array}{l} \text{Allele 1} \\ \text{Allele 2} \\ \text{Reference} \end{array}$



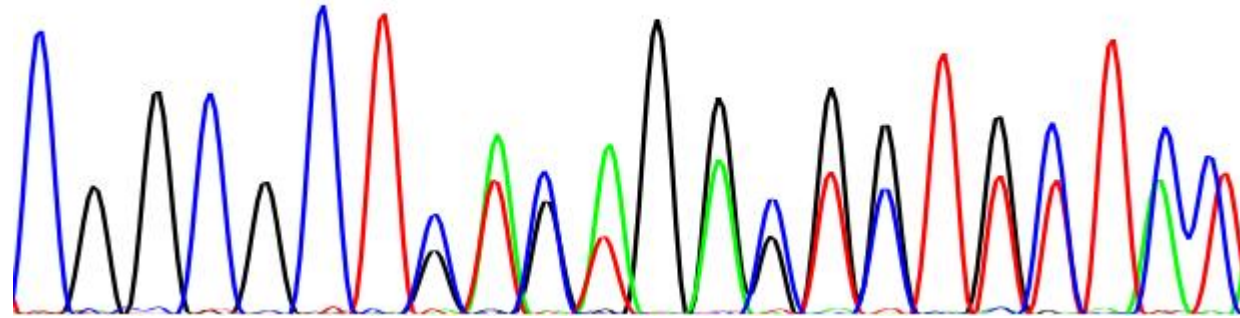
↓ Mono-clones

Sanger sequencing of multiple clones



# DSDecodeMS模块解码测序套峰

Sanger sequencing peaks

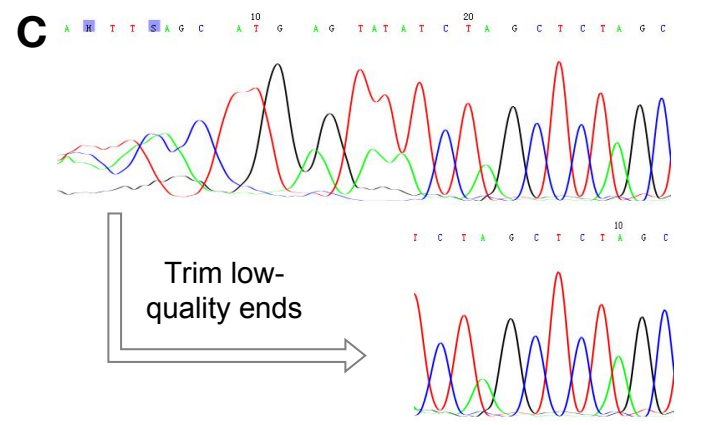
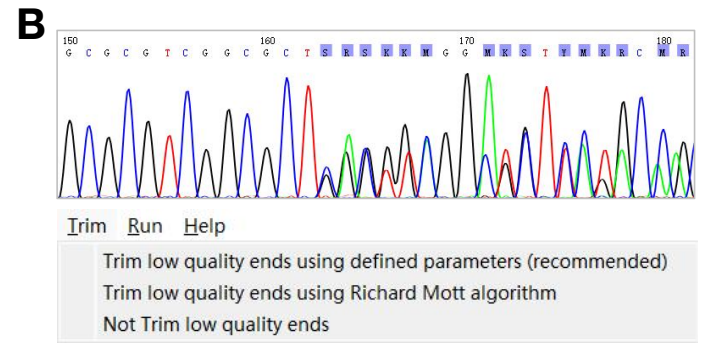


Input: Wild-sequence  
Target site

**DSDecode method**

Wild-seq: CGGCGCTG-CTGAGGCTGTTCTAC  
Allele1 : CGGCGCT--CTGAGGCTGTTCTAC (deletion)  
Allele2 : CGGCGCT**GA**CTGAGGCTGTTCTAC (insertion)

# DSDecodeMS适用于二倍体和少量样本的突变分析

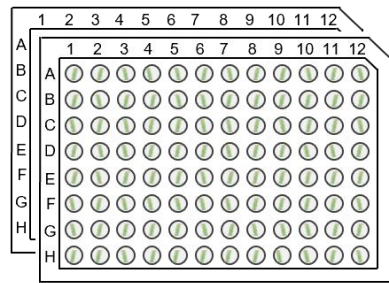


- Applications**
- Diploid organisms
  - Several samples (less than 30 samples)
  - Heterozygous or biallelic mutations
  - One- or two targets per amplicon

# HiDecode模块

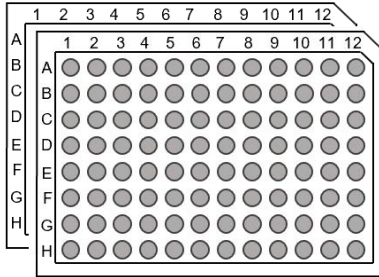
➤ **HiDecode** is used for large-scale mutation analysis from short-reads

sequencing  
Large-scale samples



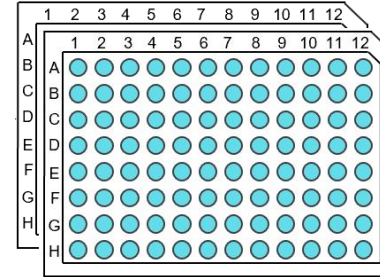
1st round PCR  
Site-specific PCR

Specific PCR products



2nd round PCR  
Add unique barcodes

Barcoded PCR products

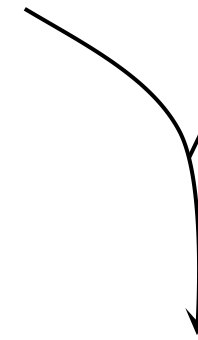


- 96 x n (up to 96 plate)
- 12 x 8 in a plate

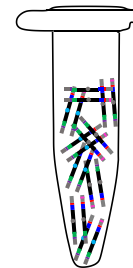
Single sample



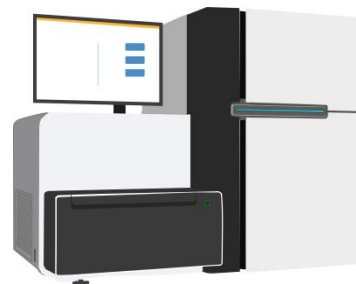
Site-specific PCR



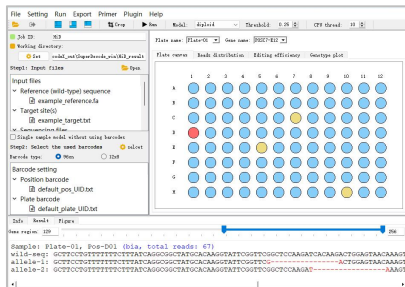
Pooling product



Sequencing



HiDecode analysis



# HiDecode模块提供了交互式的分析界面和可视化结果

**A**

**File input and settings**

File Setting Run Export Primer Plugin Help

Model: diploid Threshold: 0.25 CPU thread: 10

Job ID: HiD

Working directory: codeX\_out\SuperDecode\_win\HiD\_result

Step1: Input files

Input files

- Reference (wild-type) sequence: example\_reference.fa
- Target site(s): example\_target.txt
- Sequencing files

Step2: Select the used barcodes

Barcode type: 96xn 12x8

Barcode setting

- Position barcode: default\_pos\_UID.txt
- Plate barcode: default\_plate\_UID.txt

**Plate canvas and summary plot**

Plate name: Plate-01 Gene name: POSC7-E12

Plate canvas Reads distribution Editing efficiency Genotype plot

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

A B C D E F G H

**Decoding results and visualization of the selected sample**

Gene region: 129 256

Sample: Plate-01, Pos-D01 (bia, total reads: 67)

wild-seq: GCTTCCTGTTTTTTCTTTATCAGGCGGCTATGCACAAGGTATTCGGTTCGGCTCCAAGATCACAAGACTGGAGTAACAAAGT

allele-1: GCTTCCTGTTTTTTCTTTATCAGGCGGCTATGCACAAGGTATTCGGTTCG-----ACTGGAGTAACAAAGT

allele-2: GCTTCCTGTTTTTTCTTTATCAGGCGGCTATGCACAAGGTATTCGGTTCGGCTCCAAGAT-----AAAGT

**B**

Plate name: Plate-01 Gene name: POSAI-C6

Plate canvas Reads distribution Editing efficiency Genotype plot

Reads distribution: Bar chart showing reads for Pos-A01 to Pos-C07.

Editing efficiency: Bar chart showing editing efficiency for Pos-A01 to Pos-C07.

**C**

Plate canvas Reads distribution Editing efficiency Genotype plot

POSC7-E12

Pos-C08

Pos-C09

Pos-C10

Pos-C11

Pos-C12

Pos-D01

Pos-D02

Pos-D03

Pos-D04

Pos-D05

Pos-D06

Pos-D07

Pos-D08

Pos-D09

Pos-D10

Pos-D11

Pos-D12

Pos-E01

Pos-E02

Pos-E03

Pos-E04

Pos-E06

Legend: Deletion (blue bar), Insertion (yellow triangle), SNP (green dot), SV (purple bar)

## Applications

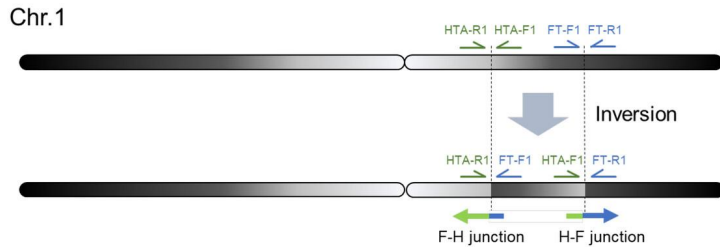
- Diploid or polyploid organisms, cell lines, protoplasts, or calli

- Large-scale samples (96 x n; or 12 x 8)
- Small mutations, including chimeric

# LaDecode模块

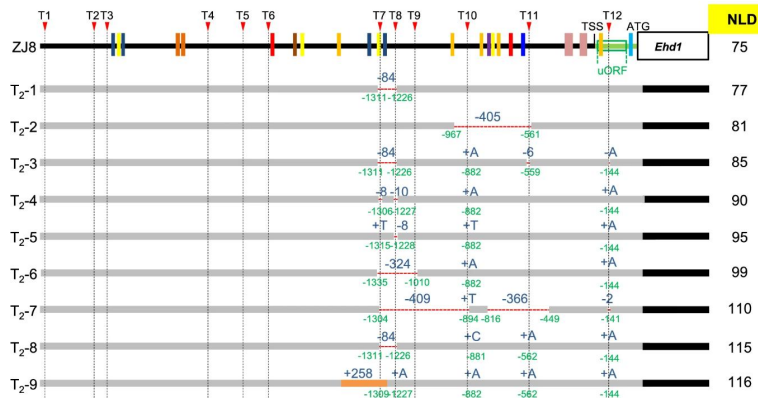
➤ **LaDecode** is developed for analyzing structural variations induced by multiplex editing (eg. Promoter tiling-deletion; saturation mutagenesis)

• Genome editing mediated inversion

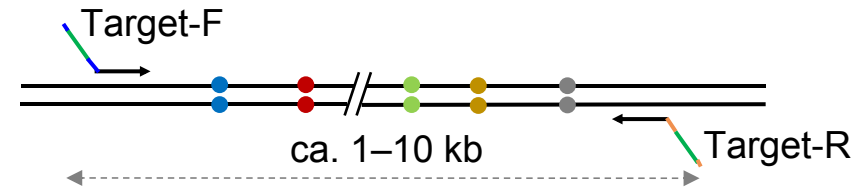


Nobusawa *et al.*, 2025, PBJ

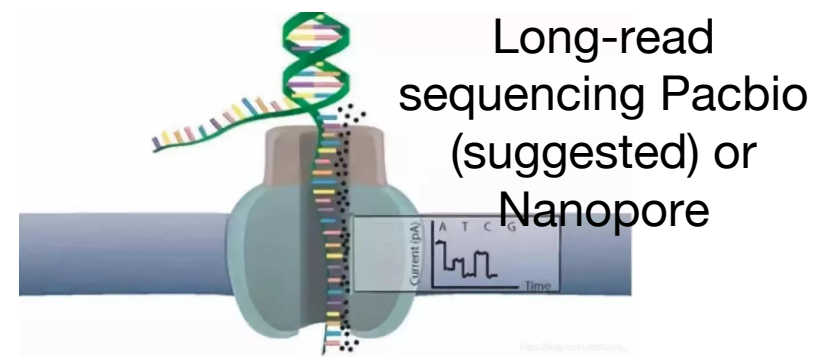
• Random fragment-deletion/inversion



Li *et al.*, 2023, TAG

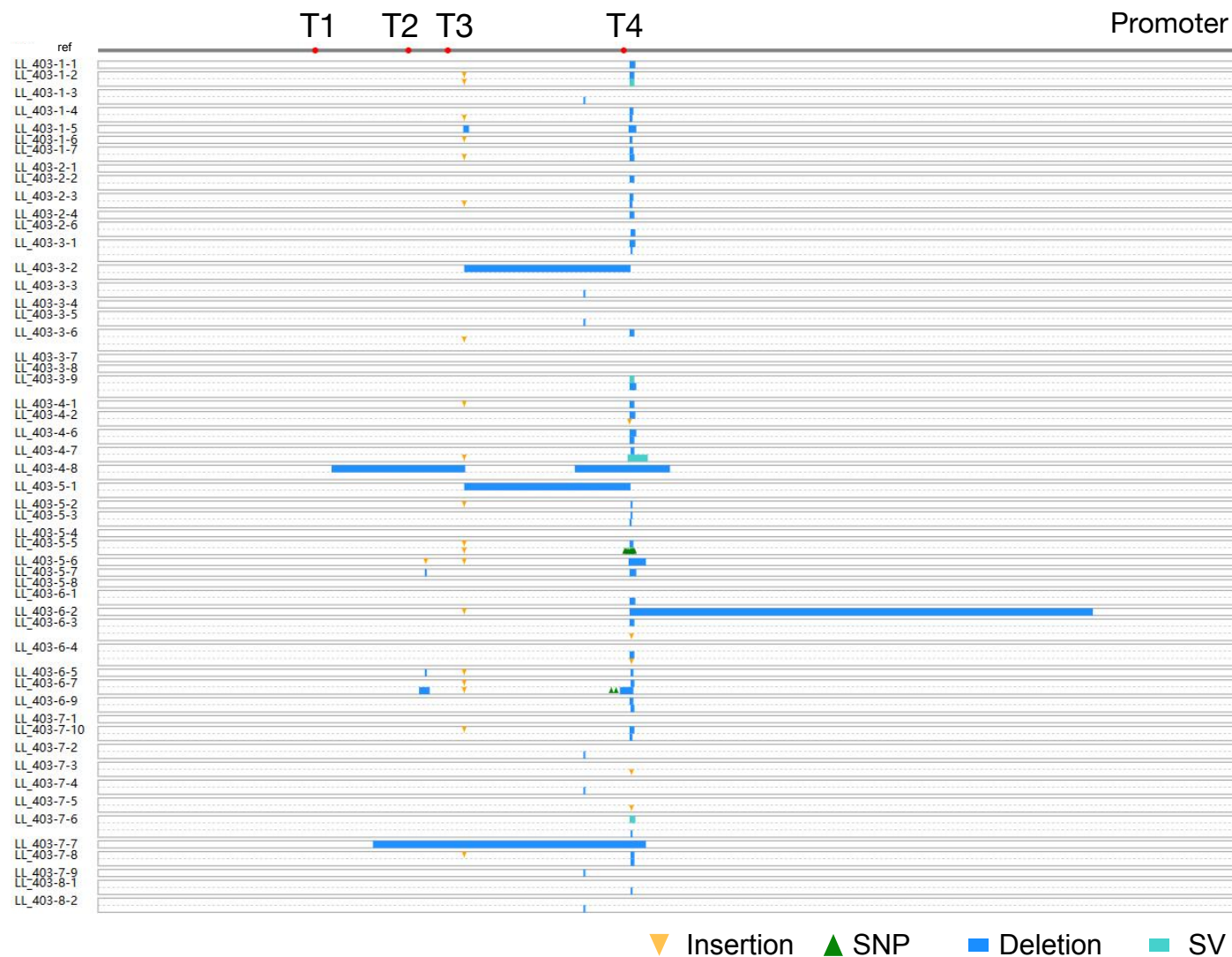
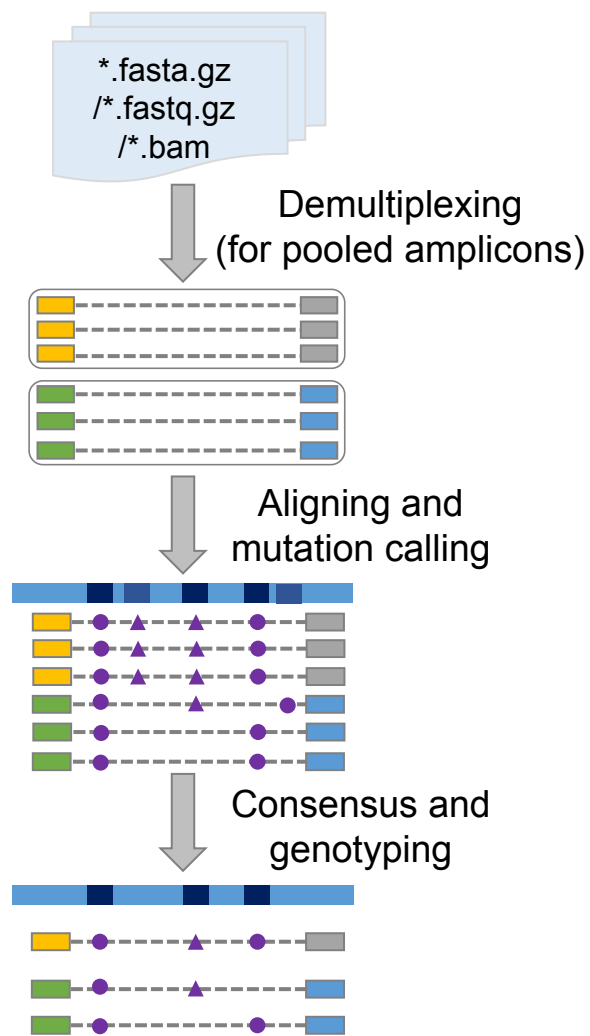


- Site-specific PCR
- Add unique long-barcode
- Pooling products



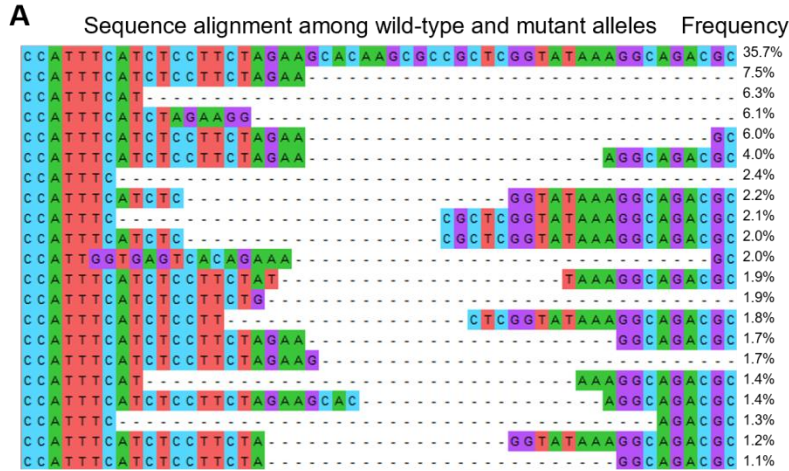
Long-read sequencing Pacbio (suggested) or Nanopore

# LaDecode可以有效鉴定不同突变类型(包括结构变异)

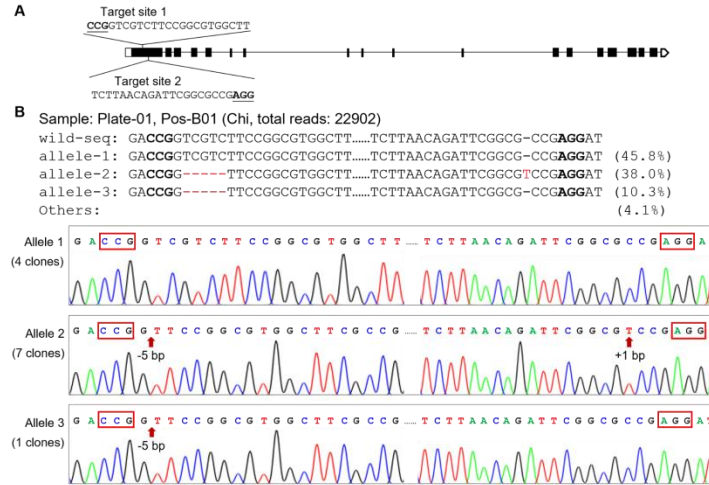


# SuperDecode在突变分析中的应用场景

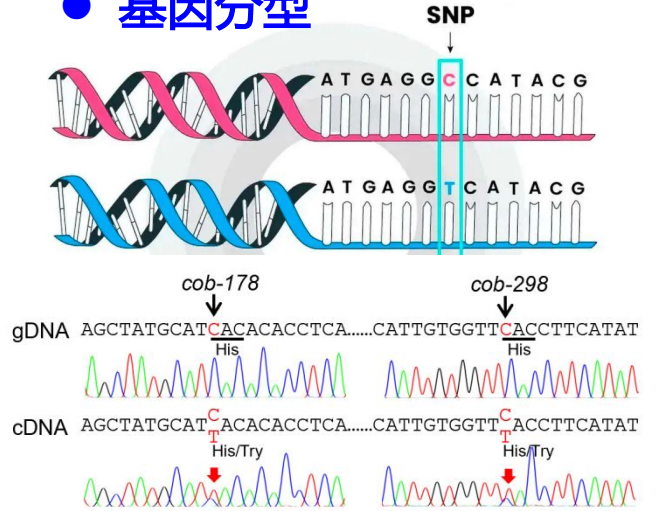
## ● 细胞系突变分析



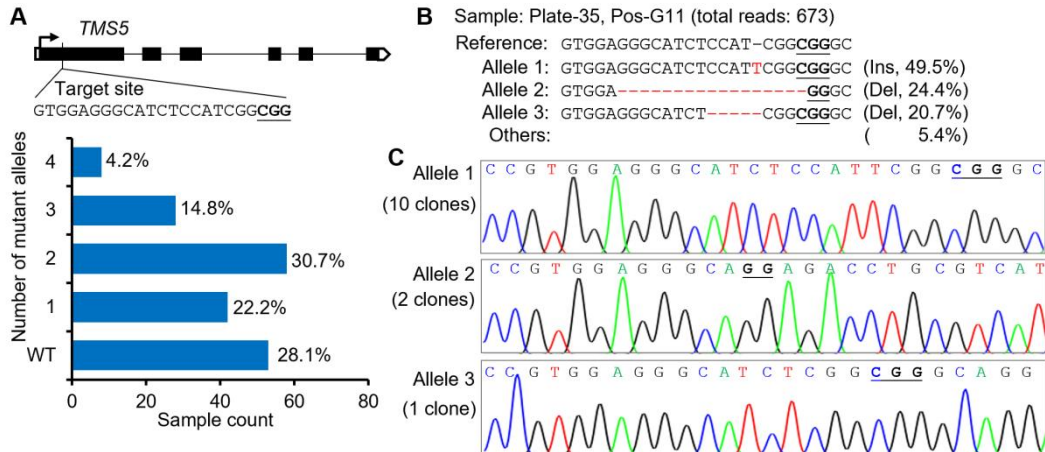
## ● 嵌合突变分析



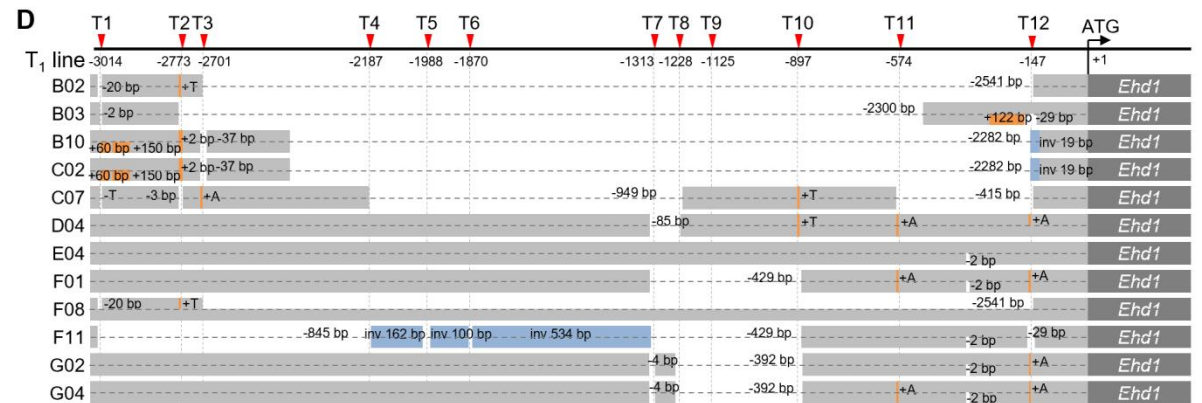
## ● 基因分型



## ● 多倍体植物的突变检测



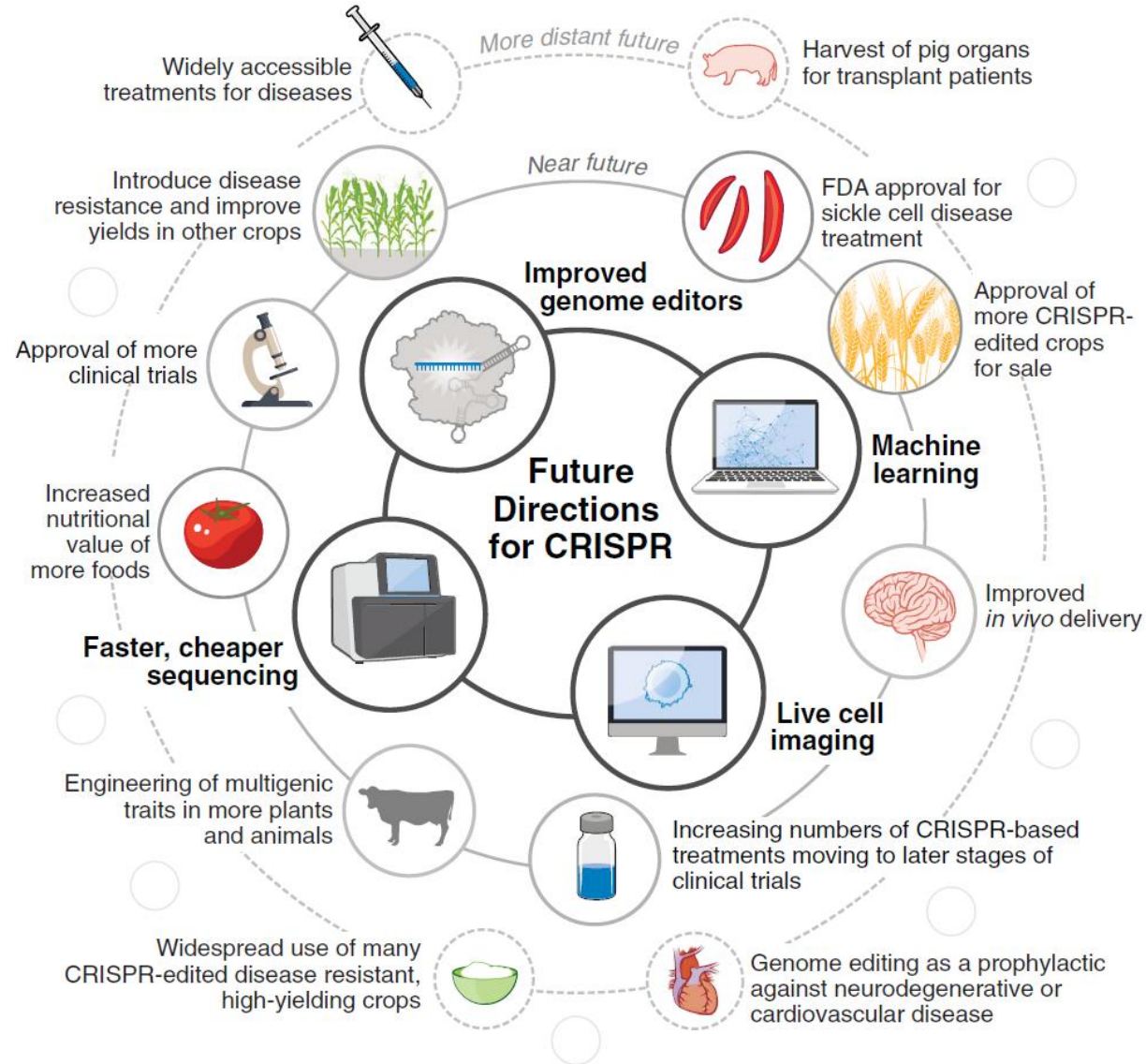
## ● 基因编辑突变或自然突变导致的结构变异检测



# 提 纲

- ◆ 基因组编辑技术的原理和发展
- ◆ 植物多基因编辑载体系统pYLCRISPR/Cas9
- ◆ 一站式的植物基因组编辑设计和突变分析平台
- ◆ **基因组编辑技术在遗传改良中的应用**

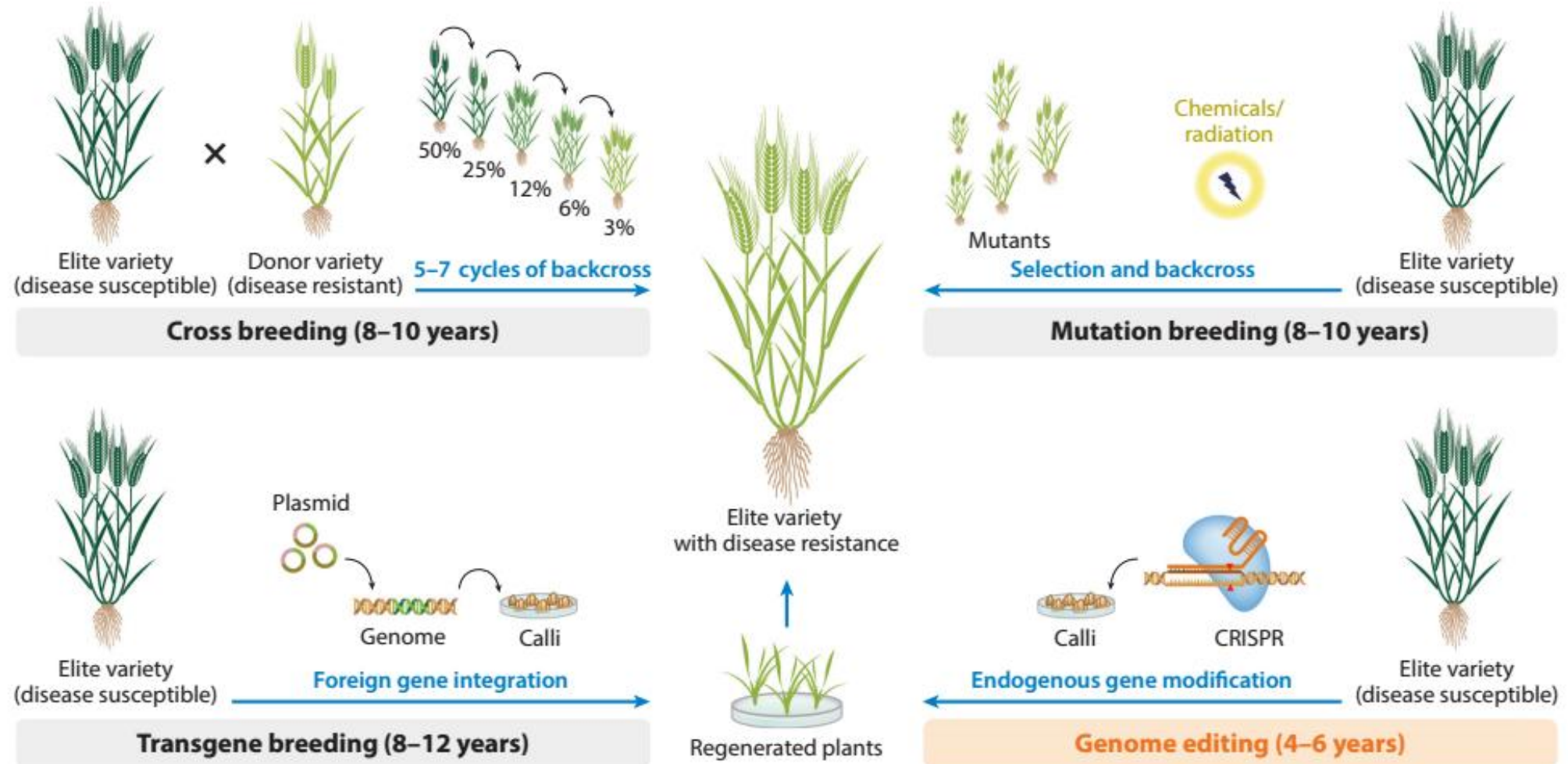
# 基因组编辑技术已广泛应用在生命科学和农学等领域



(Wang and Doudna, 2023)

# 基因编辑技术在农作物遗传改良中的应用前景

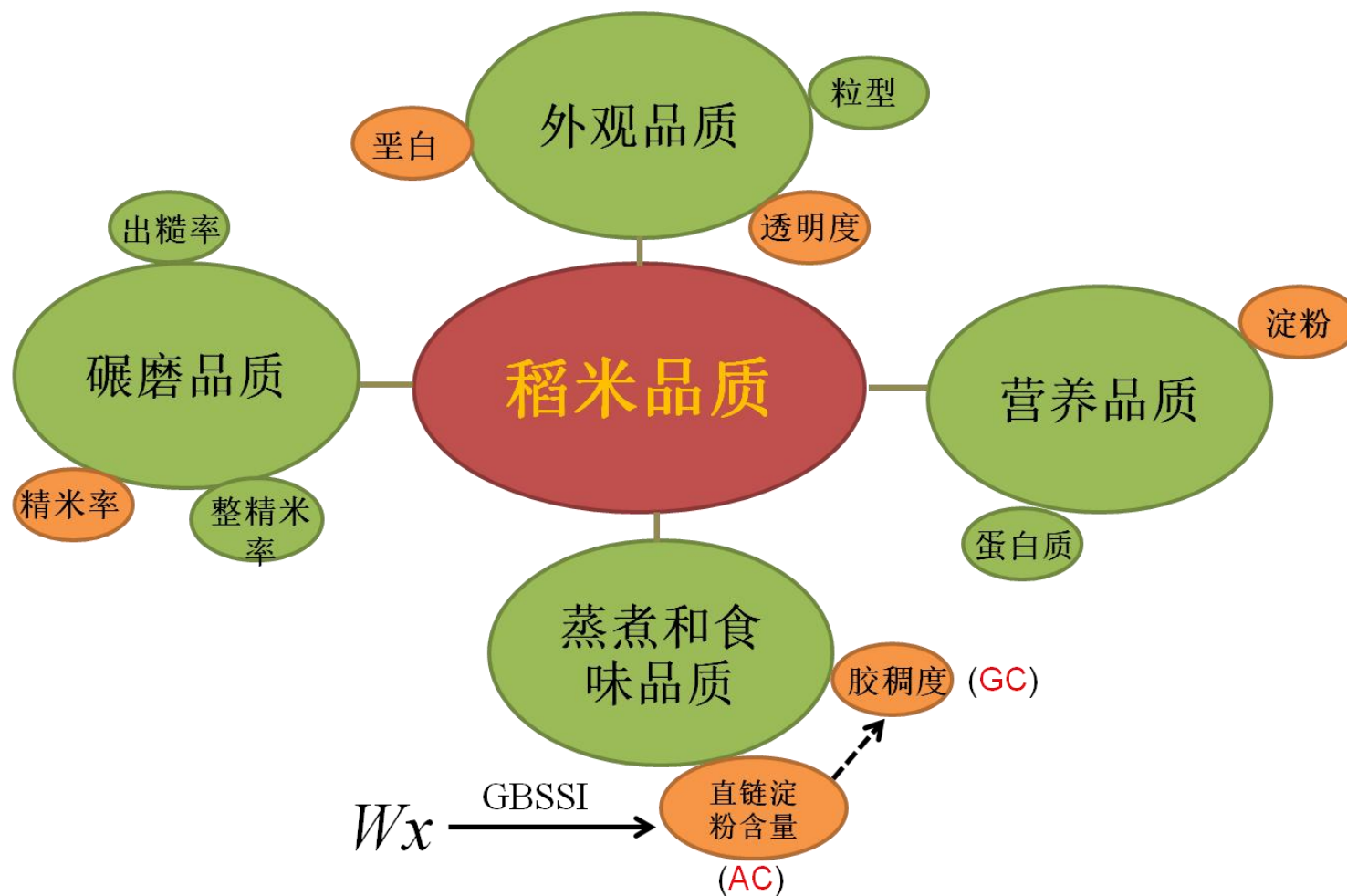
## 利用基因编辑技术加速农作物遗传改良，创新种质



(Chen et al., 2019, Annu. Rev. Plant Biol.)

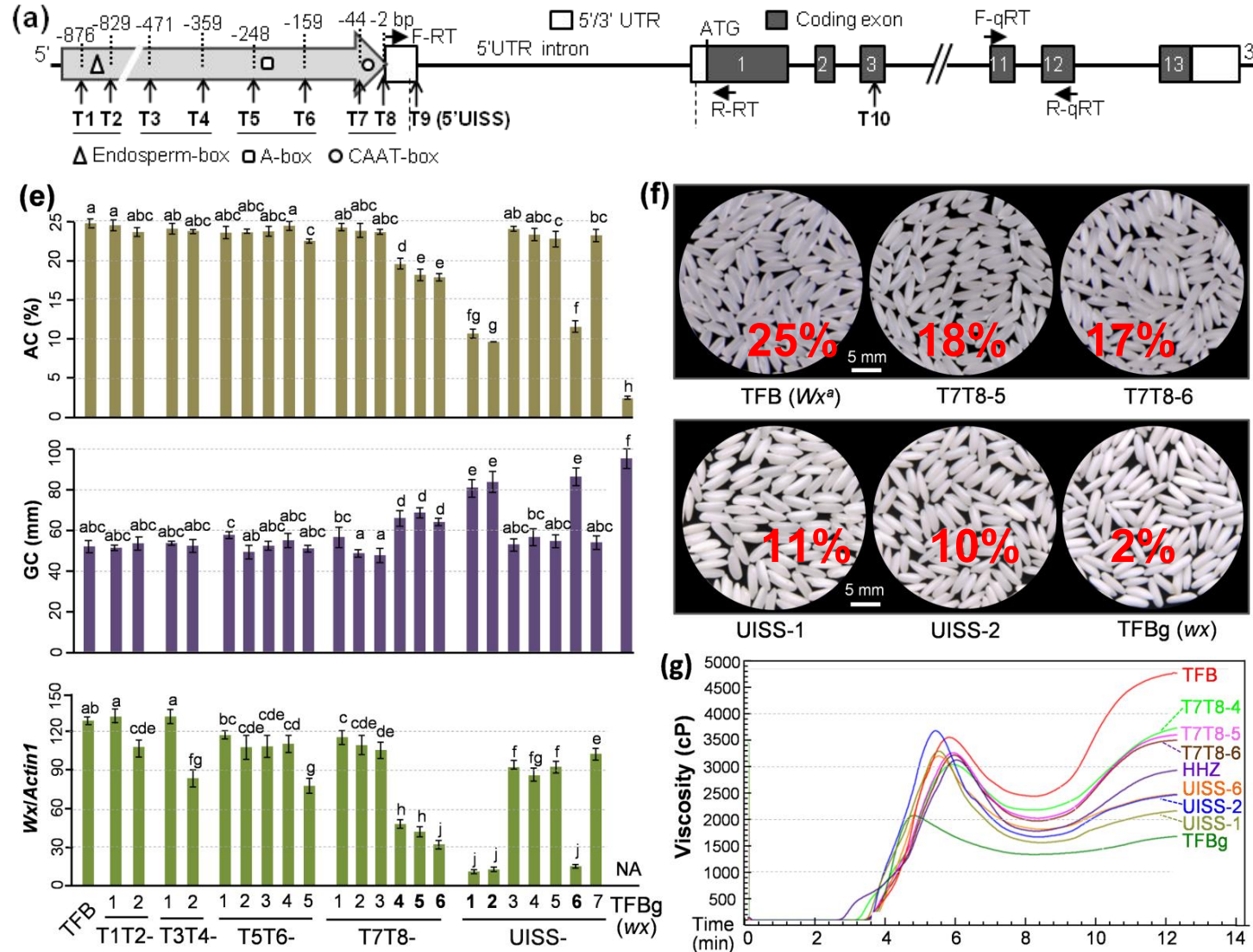
# 多基因编辑系统在育种中的应用

- 编辑  $Wx$  基因创制改善稻米食味品质



# 多基因编辑系统在育种中的应用

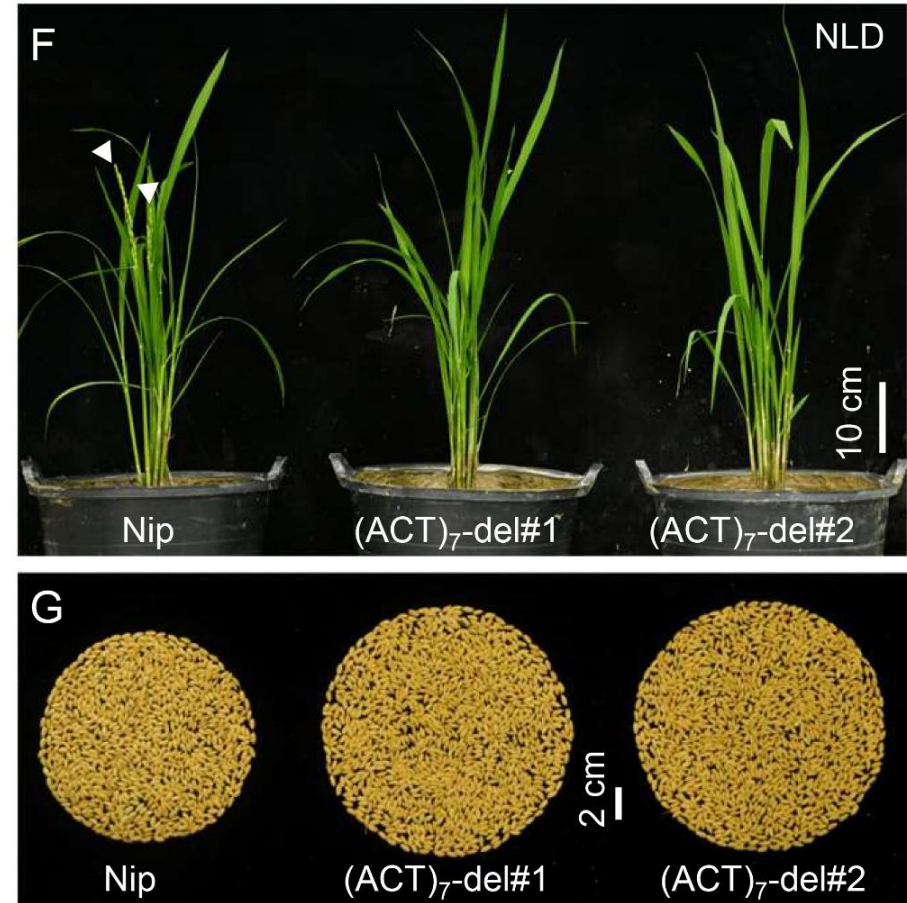
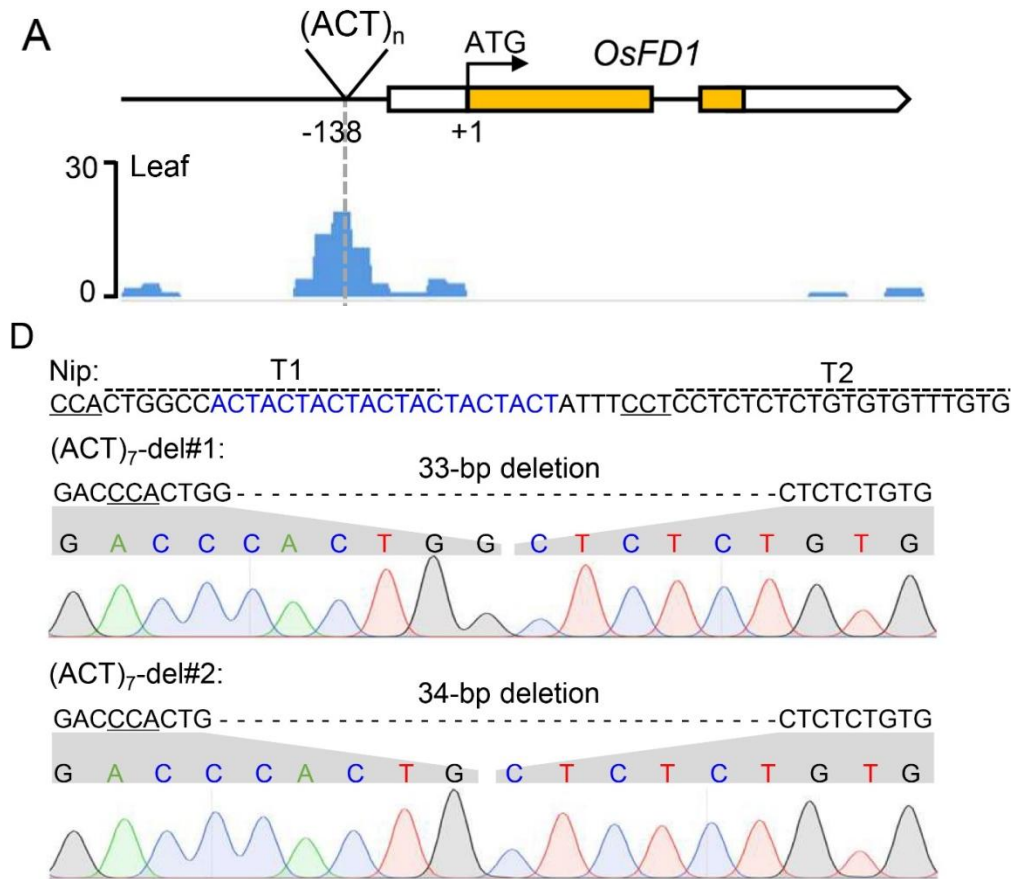
多基因编辑 *Wx* 基因，创制直链淀粉含量(AC)适宜的优质米



(Zeng et al., 2020, PBJ)

# 操作短串联重复序列(STR)调控水稻农艺性状

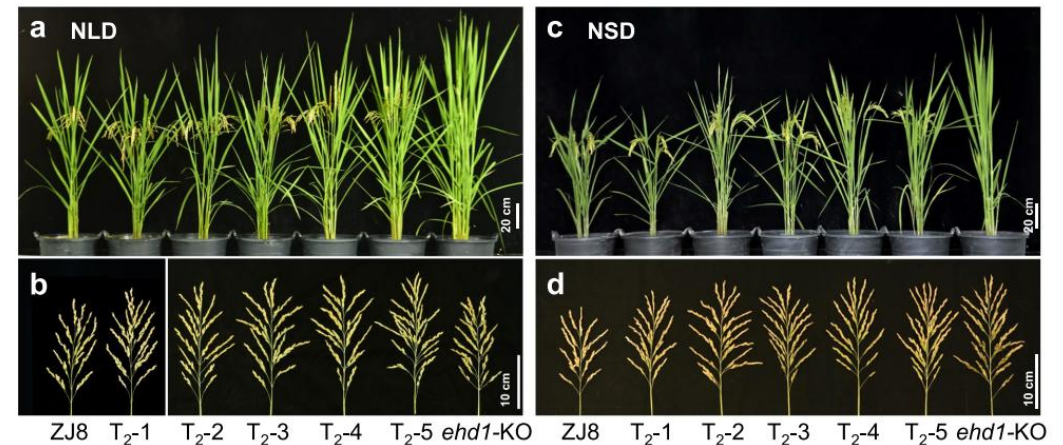
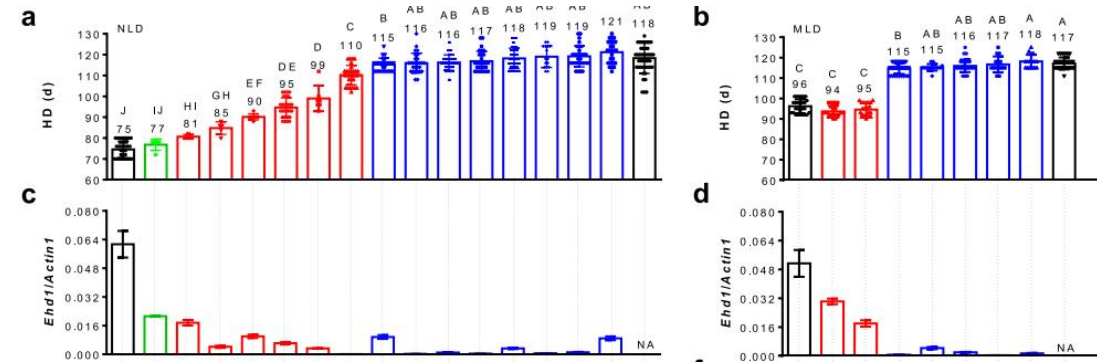
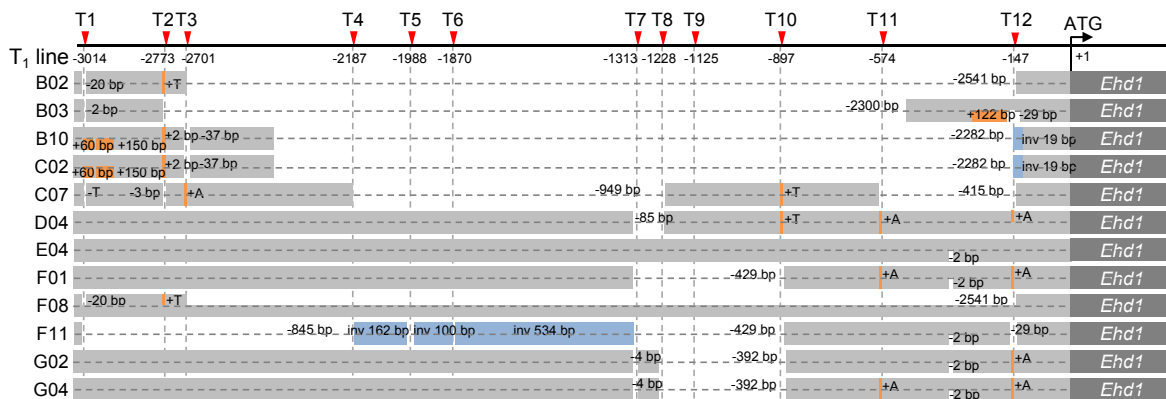
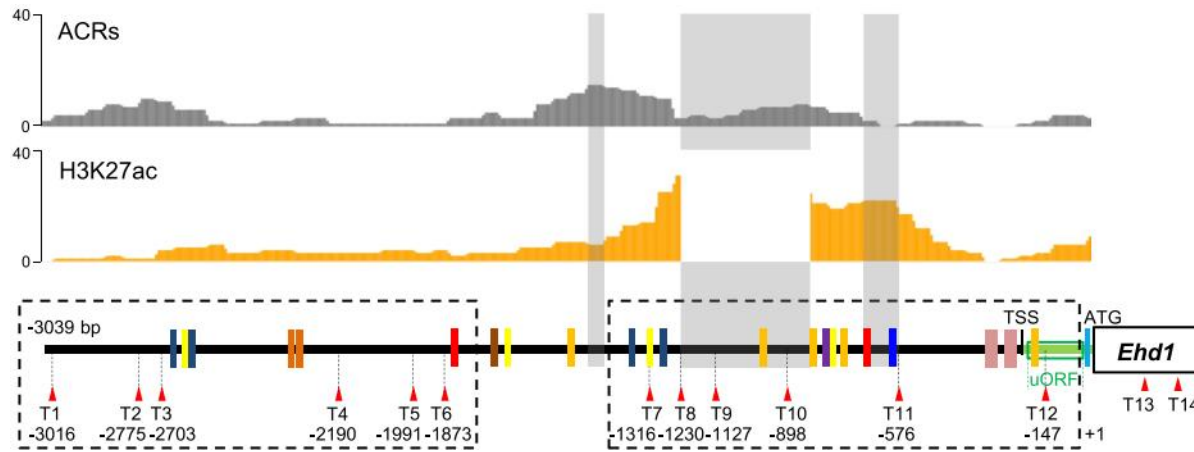
- 系统鉴定了水稻群体中的STR变异图谱及其对基因表达的影响
- 编辑*OsFD1*上游的(ACT)<sub>n</sub> STR调控水稻抽穗期和产量



(Tan *et al.*, 2025, J. Genet. Genomics)

# 启动子多靶点编辑调控水稻生育期

- 在粳稻中嘉8号中，通过多靶点编辑*Ehd1*启动子，延长品种的抽穗期，增加产量，适应广州种植。



# 多基因编辑创制改良型海稻86



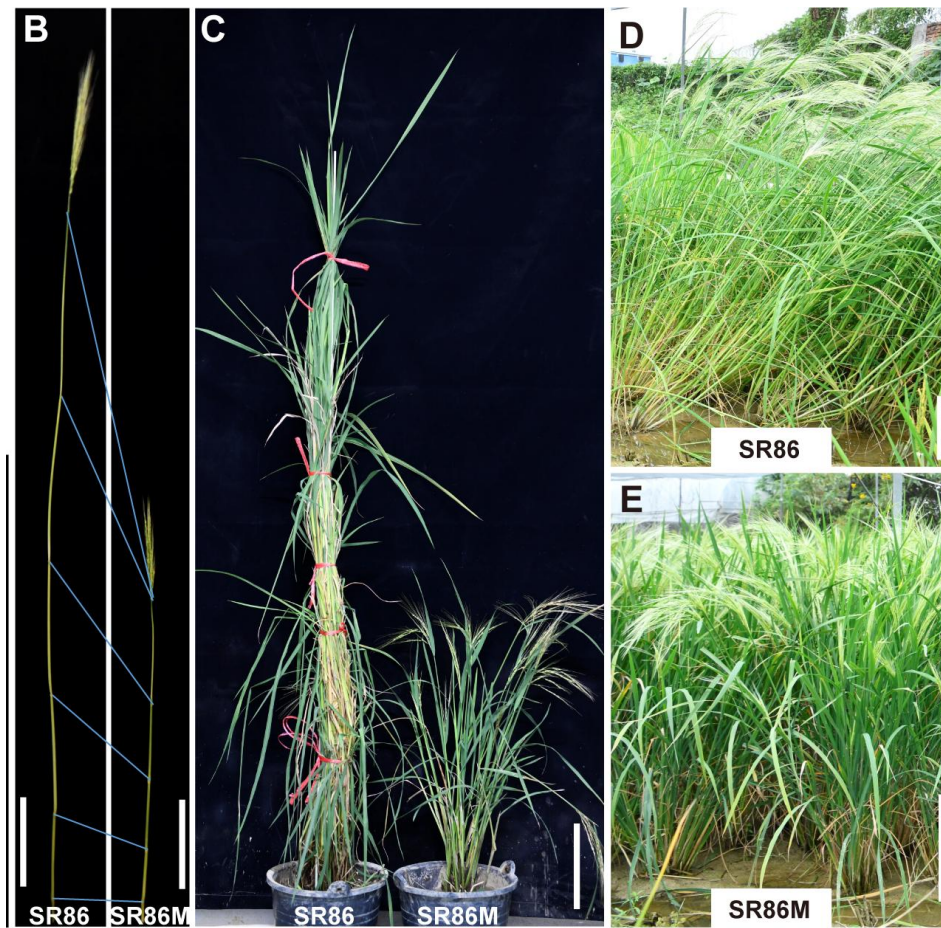
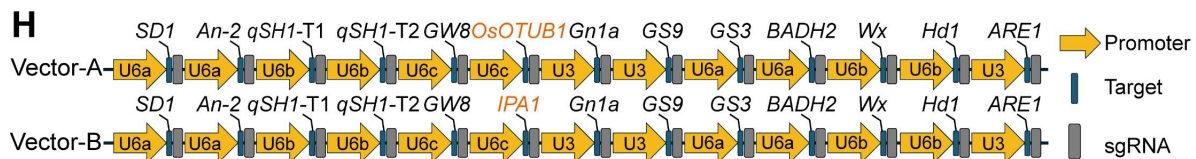
海水稻具有显著的耐盐碱性

如何最大程度的保留其耐盐碱性，  
对其生产农艺性状进行改良？

- 株高
- 感光性
- 落粒型
- 氮肥利用
- 粒型
- 粒数
- 品质
- 芒长

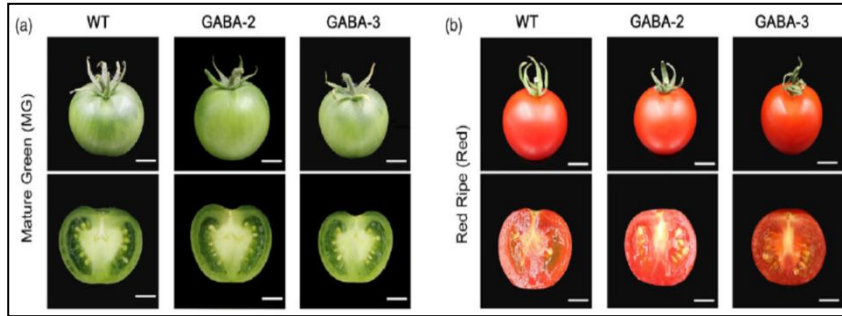
# 多基因编辑创制改良型海稻86

- 构建了13靶点的编辑载体，改良海稻86的农艺性状：株高降低、株型改良、粒型细长、粒数增加、感光性削弱、香味和氮肥利用率增加

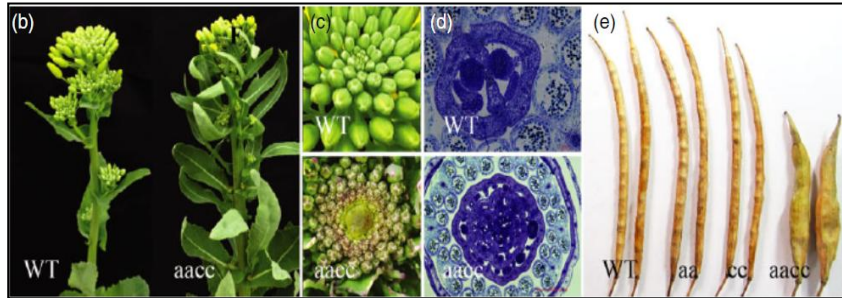


# 多基因编辑系统在育种中的应用

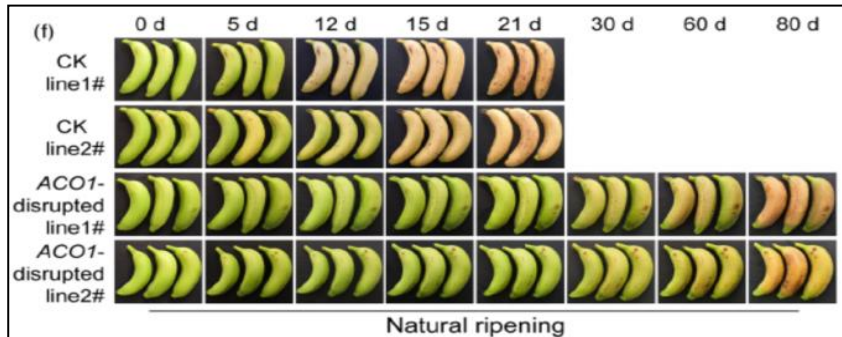
## 其他团队应用团队的植物多基因编辑平台育的代表成果



中国农业大学朱鸿亮团队通过编辑5个关键基因调控番茄中的 $\gamma$ -氨基丁酸 ( $\gamma$ -GABA) 的合成代谢, 创制了 $\gamma$ -氨基丁酸大量积累的番茄新种质, 成果发表在 *Plant Biotechnol J* ( Li et al.,2018 )



华中农业大学范楚川课题组通过编辑甘蓝型油菜CLAVATA信号途径的3个基因, 创建了具有多粒性和抗裂角的突变体, 为培育高产油菜提供了重要种质资源, 发表在 *Plant Biotechnol J* ( Yang et al.,2018 )



广东省农业科学院易干军团队编辑香蕉乙烯合成的关键基因ACO1, 获得贮运期显著延长 ( 可达80天 ) 的香蕉新种质, 发表在 *Plant Biotechnol J* ( Hu et al.,2021 )

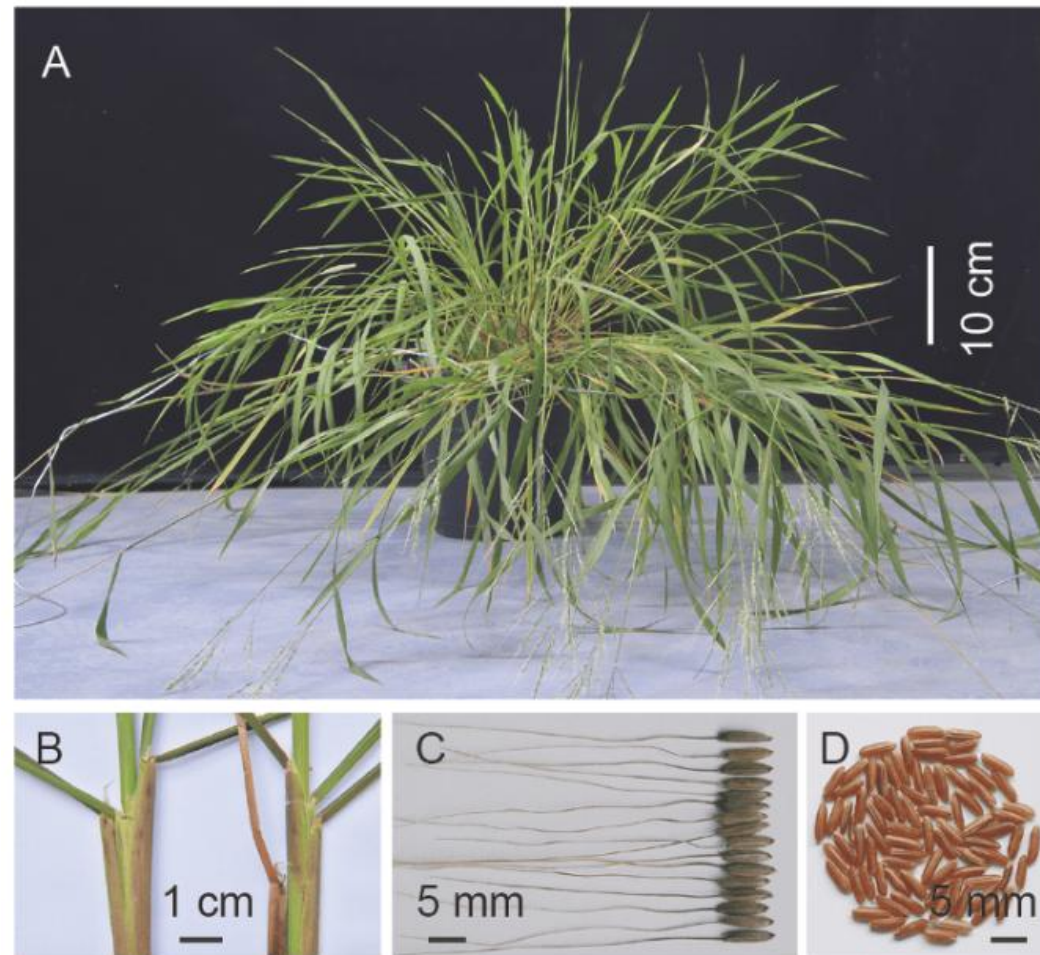
华南农业大学庄楚雄团队编辑TMS5基因快速培育多个水稻温敏不育系, 发表在 *Sci Rep.* ( Zhou, et al., 2016)

# 利用多基因编辑技术有望从头驯化野生稻

- 野生稻经过漫长的人工选择，驯化为栽培稻，有没方法加快驯化过程？



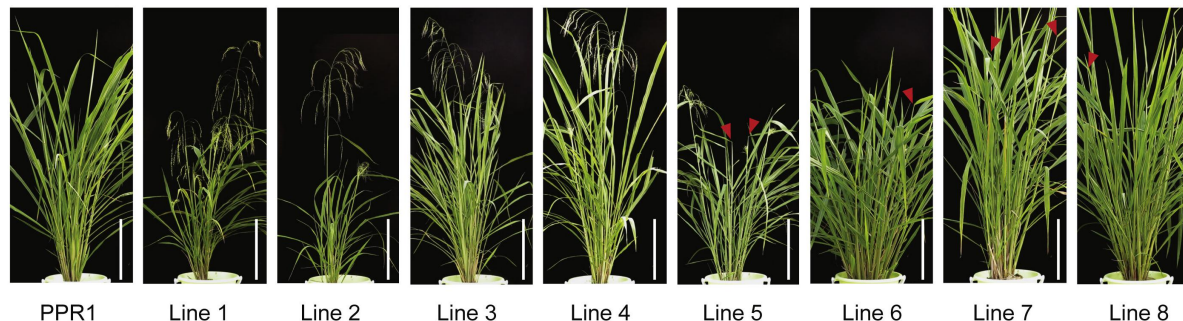
茂名高州野生稻，2023年拍摄



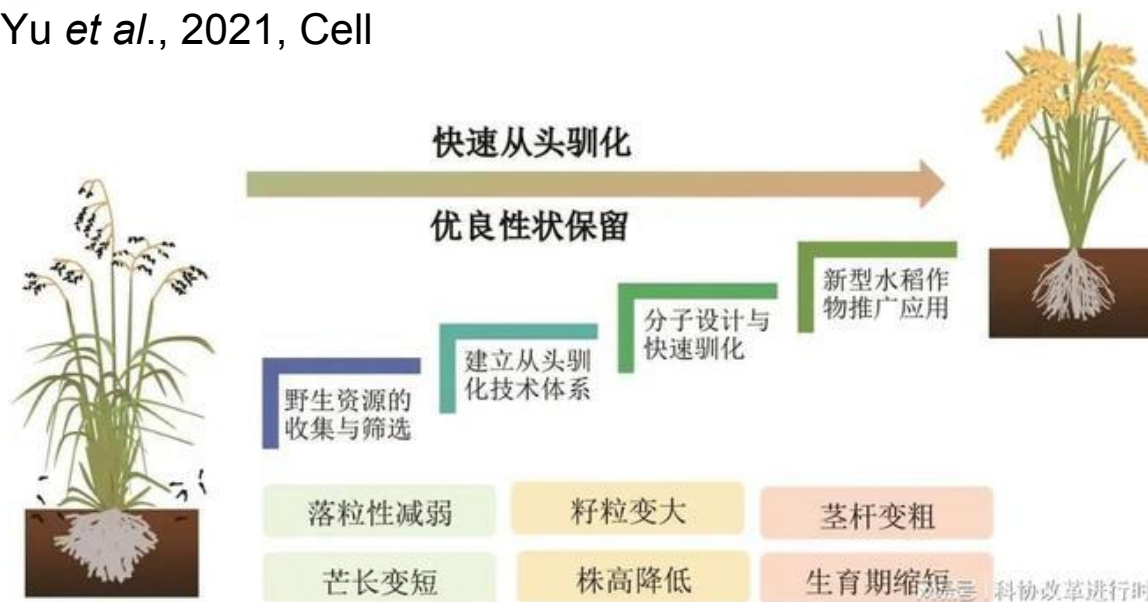
(Xie *et al.*, 2021, *Sci. China Life Sci.*)

# 利用多基因编辑技术有望从头驯化野生稻

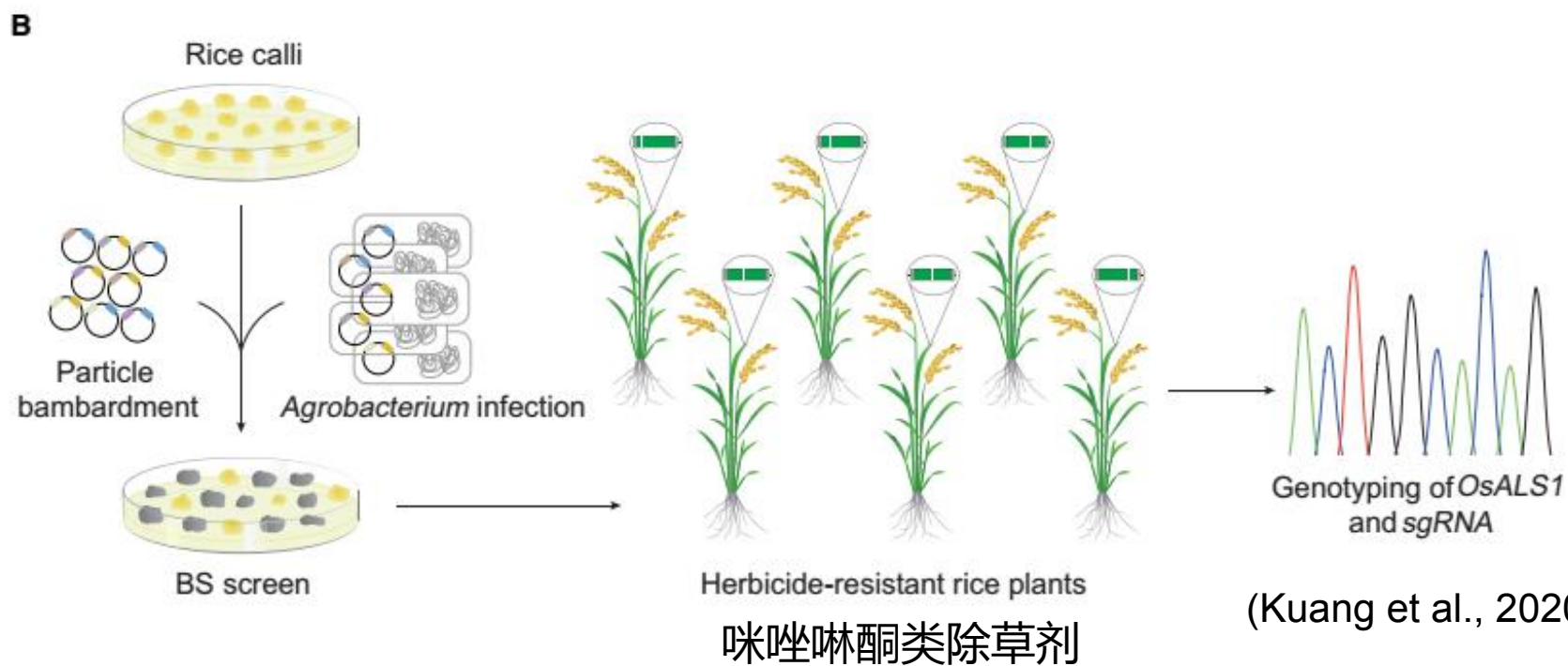
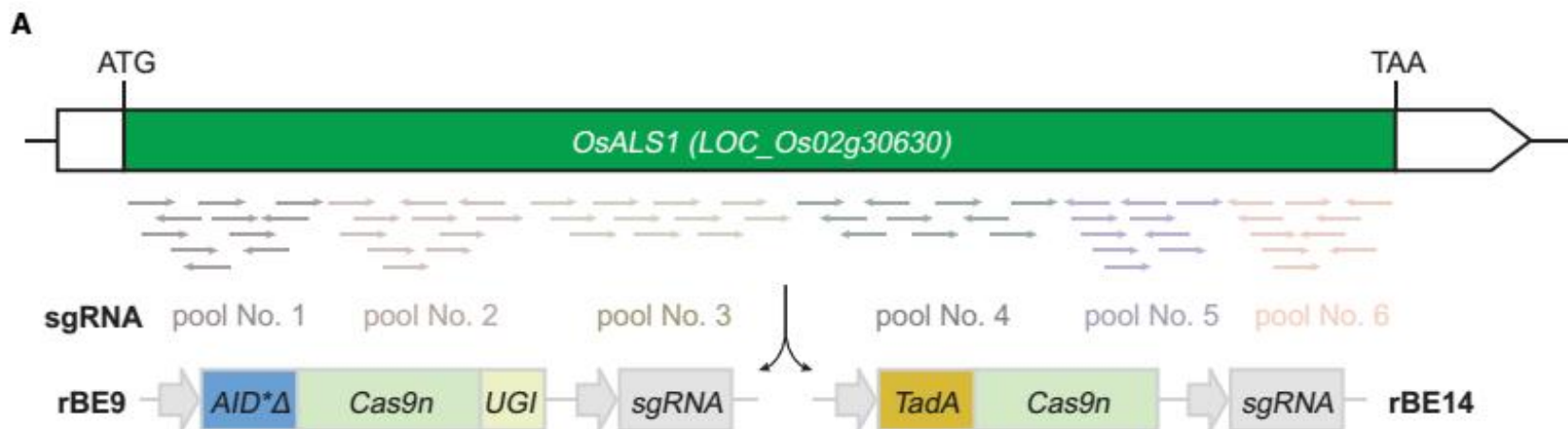
李家洋院士团队利用基因编辑，对异源四倍体高秆野生稻进行从头定向驯化。



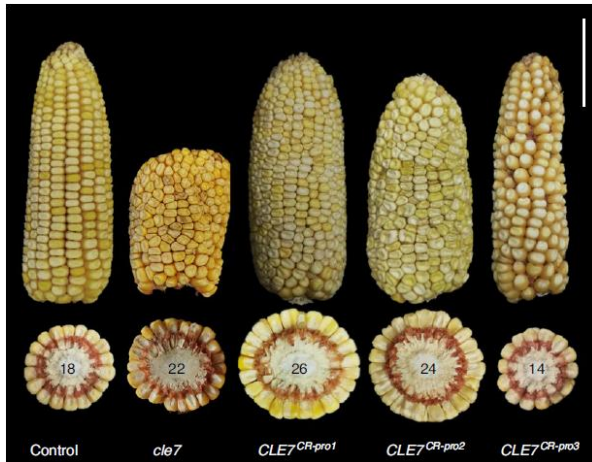
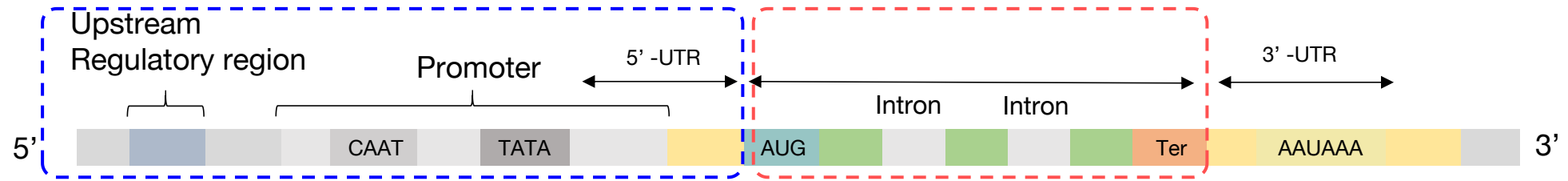
Yu et al., 2021, Cell



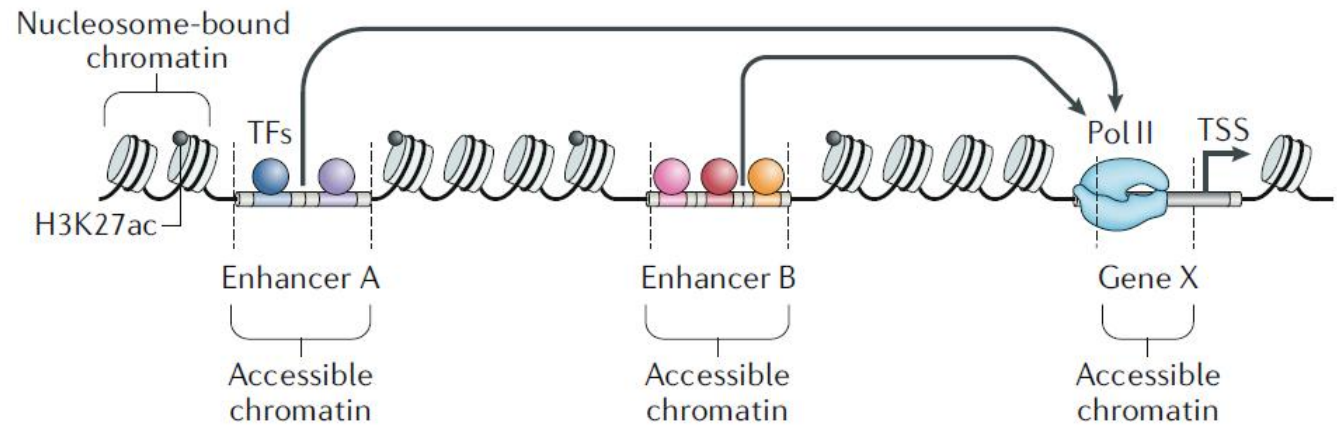
# 利用基因编辑对基因进行饱和突变，创制抗除草剂水稻



# 编辑启动子/UTR等调控区微调基因表达，提高农作物产量



(Liu et al., 2021)

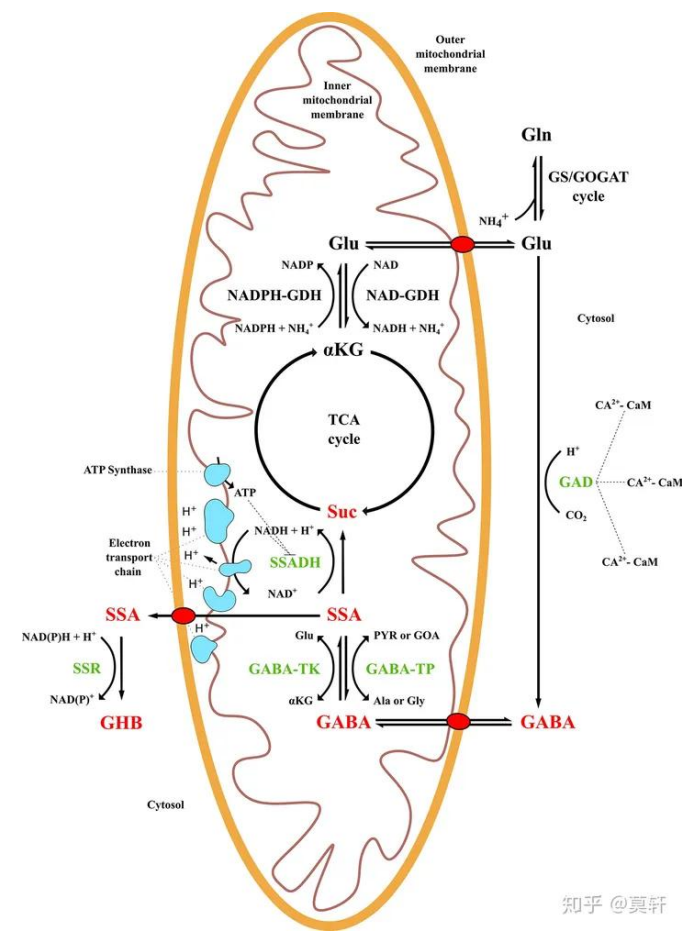


(Minnoye et al., 2021)

# 利用基因编辑创制富含 $\gamma$ -氨基丁酸(GABA)的番茄

通过基因编辑创制富含 $\gamma$ -氨基丁酸(GABA)的番茄。利用基因组编辑技术破坏了其中一个名为SIGAD3的基因的一部分，得到的基因编辑番茄中的GABA水平是普通番茄的11-12倍。

GABA为哺乳动物中枢神经系统的抑制性神经递质，具有促进睡眠、抗脑衰老、缓解焦虑等功效



# 国外批准和上市的部分基因编辑农产品

2023年5月，美国首款基因编辑蔬菜(芥菜)上市，通过基因编辑消除了芥菜的苦味，使其尝起来更像生菜。Pairwise 与美国百年餐饮服务公司 PFG的 Peak Fresh Produce 产品线联合，在 PFG 服务网覆盖的特定餐厅和商店销售。

2020 年美国农业部批准 Pairwise 的基因编辑芥菜



Dan Jenkins  
Regulatory Strategy and Quality Lead  
Pairwise  
807 East Main Street  
Suite 4-100  
Durham, NC 27701

Re: Confirmation of the regulatory status of genome edited *Brassica juncea* lines with improved flavor



# 国外批准和上市的部分基因编辑农产品

## 外国批准和上市的部分基因编辑农产品

- 2016年美国农业部批准了一种基因编辑改良的食用双孢菇，它多酚氧化酶基因被删除，使蘑菇不容易褐化。



- 2021年，日本Sanatech Seed公司推出基因编辑西红柿（富含 $\gamma$ -氨基丁酸）



# 国外批准和上市的部分基因编辑农产品

2024年，加拿大卫生部公布将1项基因编辑马铃薯列入用于食品的非新型植物产品清单。无需进行上市前安全评估。



2024年，Pairwise公司利用 CRISPR 技术开发出首个无籽黑莓



# 不同国家对基因编辑作物 ( GEC ) 的政策

国家	对GEC定义 (不含外源基因)	管理政策	管理对象 (研发过程、产品)
美国	Non-GMO	开放应用	产品 → 已有100多种基因编辑植物新品种被美国农业部指定为不受管制的品种 (高油酸大豆、抗白粉病小麦、油分改良亚麻荠、高油含量山茶花等)
加拿大	Non-GMO	开放应用	产品
澳大利亚	Non-GMO	开放应用	产品
日本	Non-GMO	开放应用	产品
阿根廷	Non-GMO	开放应用	产品
巴西	Non-GMO	开放应用	个案而定
智利	Non-GMO	开放应用	个案而定
以色列	Non-GMO	开放应用	个案而定
瑞典	Non-GMO	开放应用	个案而定
法国	Non-GMO	开放应用	产品
中国	Non-GMO	开放应用	产品 已有10个
英国	Non-GMO	开放应用	产品
欧盟	GMO → Non-GMO	监管 → 开放应用	研发过程和产品

# 我国生物技术育种的相关管理法规

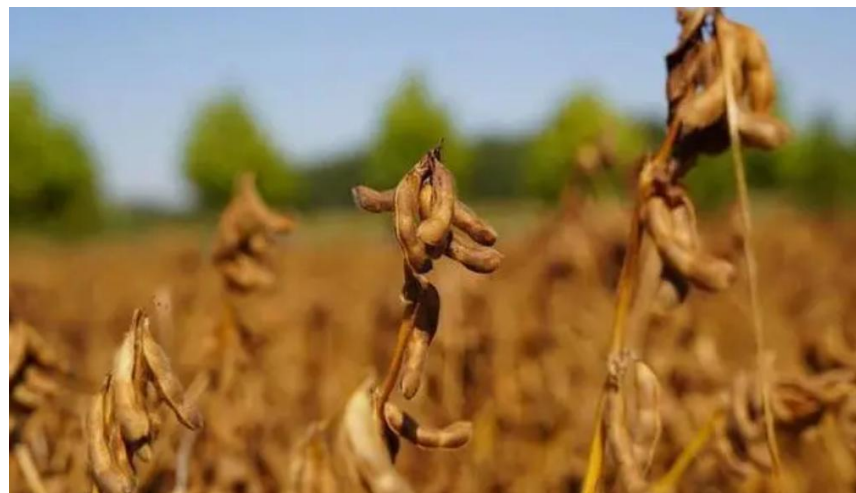
---

1. 《主要农作物品种审定办法》
2. 《农作物种子生产经营许可管理办法》
3. 《农业转基因生物安全管理条例》
4. 《农业转基因生物安全评价管理办法》
5. 《农业用基因编辑植物安全评价指南（试行）》
6. 《农业用基因编辑植物评审细则》

# 我国颁发的第一个基因编辑安全证书

## 我国颁发首个基因编辑植物安全证书

2023年4月28日，农业农村部发放了首个基因编辑（高油酸）大豆的基因编辑生物安全证书



2023 年农业用基因编辑生物安全证书（生产应用）批准清单


序号	审批编号	申报单位	项目名称	有效期	有效区域
1	农基安证字（2023）第 114 号	山东舜丰生物科技有限公司	突变 <i>gmfad2-1a</i> 和 <i>gmfad2-1b</i> 基因品质性状改良大豆 AE15-18-1 生产应用的安全证书	2023 年 4 月 21 日至 2028 年 4 月 20 日	/

# 现已颁发的基因编辑安全证书

审批编号	申报单位	项目名称
农基安证字（2023）第350号	山东舜丰生物科技有限公司	突变 <i>GmELF3a</i> 基因生理性状改良大豆25T93-1生产应用的安全证书
农基安证字（2023）第351号	苏州齐禾生科生物科技有限公司	突变 <i>GmFAD2-1A</i> 和 <i>GmFAD2-1B</i> 基因品质性状改良大豆P16生产应用的安全证书
农基安证字（2024）第053号	山东舜丰生物科技有限公司	突变 <i>Br2</i> 基因产量性状改良玉米179AC19-13-13生产应用的安全证书
农基安证字（2024）第054号	苏州齐禾生科生物科技有限公司、中国科学院遗传与发育生物学研究所	突变 <i>TaMLO-A1</i> 、 <i>TaMLO-B1</i> 、 <i>TaMLO-D1</i> 和 <i>TaMLOX</i> 基因抗病小麦MLO-KNRNP生产应用的安全证书
农基安证字（2024）第294号	苏州齐禾生科生物科技有限公司、北京齐禾生科生物科技有限公司	突变 <i>GmLn</i> 基因产量性状改良大豆QH64112生产应用的安全证书
农基安证字（2024）第295号	中国种子集团有限公司	突变 <i>GmEI</i> 和 <i>GmEILD</i> 基因生理性状改良大豆E001SYFT生产应用的安全证书
农基安证字（2024）第296号	未米生物科技（海南）有限公司、华中农业大学	突变 <i>ZmNL4</i> 基因产量性状改良玉米KN-NL4-2生产应用的安全证书
农基安证字（2024）第297号	苏州齐禾生科生物科技有限公司、江苏省农业科学院、北京齐禾生科生物科技有限公司	突变 <i>Wx</i> 基因品质性状改良水稻118-9-15生产应用的安全证书
农基安证字（2024）第298号	苏州齐禾生科生物科技有限公司、中国科学院遗传与发育生物学研究所	突变 <i>TaALS</i> 基因耐除草剂小麦TaALS-4生产应用的安全证书

生活美好，事业如意！





**谢 谢！**  
**敬请批评指正！**  
**欢迎交流与合作！**