

CRISPR/Cas9 技术在水稻育种中的基因编辑实验教学设计

吕若彤, 寇云霞, 肖雨佳, 艾鹏飞*, 王雁伟*

河北科技大学食品与生物学院, 石家庄 050018

摘要 CRISPR/Cas9 技术作为一种高效的基因组编辑工具, 在生命科学领域的应用已经变得越来越广泛。将这一技术引入大学的实验教学中, 能够帮助学生更深入地理解前沿科研进展, 增强科研创新实践能力。本文设计了一个创新性教学实验, “利用 CRISPR/Cas9 技术研究敲除水稻 *SSA1* (*seedling stage albino1*) 基因对表型的影响”。该实验旨在帮助学生加深理解 CRISPR/Cas9 技术的原理和实验流程, 直观认识到 *SSA1* 基因在水稻生长发育中发挥的重要作用的同时, 提高学生实验操作的能力和严谨的科研思维, 培养学生的探索能力和创新精神。

关键词 CRISPR/Cas9, 基因编辑, 水稻, 实验教学设计

为了对生物的基因组进行改造, 科学家开发过各种基因组编辑工具, 如诱导染色体变异的锌指核酸酶(zinc finger nuclease, ZFN)和转录激活因子样效应物核酸酶(transcription activator-like effector nuclease, TALEN), 它们依赖蛋白质的合成机制, 识别特异性序列, 制造双链断裂(double strand break, DSB), 这些基因组编辑工具在使用过程中需要复杂的蛋白质设计和工程化过程, 在应用方面的设计和制造过程比较繁琐, 增加了操作的复杂性, 且需要更多的技术和资源(Sander et al., 2011; Reyon et al., 2012)。RNA 干扰(RNA interference, RNAi)技术不能完全敲除靶序列, 而是能够快速沉默目的基因, 但会出现难以预测的脱靶效应, 即引发非特异性基因沉默, 特别是同源基因或与目的基因序列相关的基因(McManus et al., 2002)。因此, 研究人员一直在严格优化基因组编辑技术, 改善现有基因编辑技术的局限性, 以便更精确地改变目的基因(苗春妍等, 2023)。成簇的规则间隔短回文重复/CRISPR 相关蛋白 9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeat and CRISPR-associated protein9, CRISPR/Cas9)技术作为一种通过 RNA 引导 DNA 靶向的多功能基因编辑技术, 它的出现使之前基因编辑技术上出现的不足得到了缓解, 与 ZFN 和 TALEN 等技术相比, CRISPR/Cas9 技术的优势在于设计简单, 效率更高, 既能实现对目的基因的功能性敲除(knock out)又能实现敲入(knock in), 表现出高效的基因组改造能力(何晓玲等, 2022)。不仅如此, CRISPR/Cas9 技术通过对 3'和 5'末端的 3 个末端核苷酸进行修饰, 可以在一定程度上提高靶点编辑效率, 降低脱靶效应(Asmamaw Mengstie et al., 2024)。此外, 来源广泛的 Cas9 蛋白扩展了基因组编辑的设计和应用范围, 为研究人员提供了更多的选择(Steinert et al., 2015)。基于 CRISPR/Cas9 原理, 科学家逐步改造设计出了高效、精准的单碱基编辑系统, 为生物基因组功能的解析、作物遗传改良和新品种培育等提供了强有力的技术支持(苏钺凯等, 2019; Li et al., 2025)。尽管 CRISPR/Cas9 技术已取得了诸多进展, 但仍有一些问题有待进一步探索。例如 Cas9 蛋白是如何从其设计的 sgRNA 中分离出来并进行 DNA 裂解的具体机制, 至今尚不完全明了, 需进一步研究

收稿日期: 2025-04-27; 接受日期: 2025-07-29

基金项目: 河北省高等学校科学研究项目(No.BJK2024165)、河北省教育科学“十四五”规划青年专项课题(No.2406039)、河北科技大学引进人才科研启动基金(No.QD2023010)和河北省教育厅在读研究生创新能力培养资助项目(No.CXZZSS2025067)

* 通讯作者。E-mail: 1820482432@qq.com; wangyanwei01@caas.cn

来探索和阐明(Li et al., 2023)。尽管通过优化 sgRNA 序列、控制 Cas9-sgRNA 复合物的稳定性、使用能够提升切割效率的 Cas9 突变体等手段在一定程度上能改善 CRISPR/Cas9 技术的特异性靶向效果(Liu et al., 2021),但在植物非生物胁迫耐受性、产量和抗病性等多基因性状的编辑过程中,仍存在着一定的非特异编辑情况,需科学家持续研究以清除脱靶效应(Kumar et al., 2023)。

水稻(*Oryza sativa*)基因组约为 440 Mbp,是禾本植物中较小的基因组之一(Liu et al., 2018),其基因序列比较保守,通过研究水稻基因组,可以为其他禾本科作物基因组中同源基因提供信息,为重要性状基因功能的研究提供有价值的参考(Moore et al., 1995; Gale and Devos, 1998)。过去几年,CRISPR/Cas9 技术在基因组工程领域的应用取得了显著突破,作为目前主流的基因编辑技术,使用方便、所需设备少、成本低,且水稻的组织培养实验材料简单,技术成熟,成苗率高。将两者结合作为高校的教学实验,是学生理解基因编辑基本原理,掌握基因编辑技术在植物领域中应用技能的有效途径,这种实践教学模式还能促进学生将理论与实践操作相结合,培养其科研素养和创新思维,提升学生发现问题、解决问题的能力,为未来开展科研工作打下理论基础与实验基础。

此前,在自创的水稻突变体库中发现了一份苗期白化致死表型的突变体,将其命名为 *ssa1* (*seedling stage albino 1*)突变体。经过实验研究发现,SSA1 基因的突变其植株的叶绿体发生结构性破坏,致使叶绿素含量减少,植株出现白化现象(Wang et al., 2022)。因水稻白化现象明显易于观察,本文以 SSA1 基因为编辑对象,设计成教学实验——“利用 CRISPR/Cas9 技术研究敲除水稻 SSA1 基因对表型的影响”,作为生物科学与生物技术专业《专业综合实验》课程中的一个实验项目。

1 实验教学设计

1.1 实验目的

学生通过实际的实验操作能够深入学习 CRISPR/Cas9 技术的原理与具体步骤,直观地认识到 SSA1 基因的敲除对水稻植株生长发育的影响。对 CRISPR/Cas9 技术的学习,能够帮助学生掌握实验设计、操作技巧和结果分析等科研方法,增强他们创新思维和解决实际问题的能力,为未来科研或技术创新打下坚实基础。

1.2 实验原理

CRISPR/Cas9 主要由 Cas9 蛋白和小导向 RNA (single guide RNA, sgRNA)两部分组成。没有 sgRNA 的 Cas9 蛋白无法发挥功能,是非活性的,只有当 Cas9 与 sgRNA 结合后,Cas9 蛋白才会被激活。原间隔序列邻近基序(protospacer adjacent motif, PAM)与目的基因片段特异性位点相邻,是 Cas9 蛋白进行识别的靶点,Cas9 蛋白和 sgRNA 复合体首先识别目的基因中的 PAM 序列,从而完成与目标基因的结合。在整个目标基因的识别过程中,sgRNA 中的前 20 个负责互补配对的碱基中,靠近 PAM 端的 8-12 个碱基是核心序列,在识别特异性上起重要作用(王影等, 2018)。Cas9 蛋白上存在 HNH 和 RuvC 两个核酸酶结构域,HNH 结构域能够切割与 sgRNA 中靶向序列互补的 DNA 链,RuvC 结构域能够切割与互补链相反的 DNA 链(Nishimasu et al., 2014)。在 Cas9 蛋白识别到 sgRNA 与 PAM 所在 DNA 片段特异性结合后,Cas9 利用 HNH 和 RuvC 两个结构域切割目的序列的 DNA 双链,触发内源性 DNA 修复途径非同源末端连接(non-homologous end-joining, NHEJ)途径,诱导发生 DSB(谢先荣等, 2021),NHEJ 途径的修复容易出错,导致目的基因功能丧失(Baltes and Voytas, 2015)(图 1)。

叶绿体基因组由核基因组编码的 RNA 聚合酶(nuclear-encoded RNA polymerase, NEP)和质体基因组编码的 RNA 聚合酶(plastid-encoded RNA polymerase, PEP)共同转录(Wang et al., 2024), 本实验室通过对水稻 *ssa1* 突变体进行研究, 发现 *ssa1* 突变体中部分叶绿体基因 RNA 编辑发生异常, 致使叶片叶绿体发育受阻, 进而使植株表现为白化致死的表型。根据水稻 *SSA1* 基因的编码区(coding sequence, CDS)序列选取 20 bp 靶向片段作为 sgRNA 中的靶向序列, 构建敲除水稻 *SSA1* 基因的 CRISPR/Cas9 敲除载体。通过利用携带 CRISPR/Cas9 敲除载体的农杆菌(*Agrobacterium*)侵染水稻愈伤组织, 敲除野生型水稻中的 *SSA1* 基因, 培育出 *ssa1* 突变体植株。

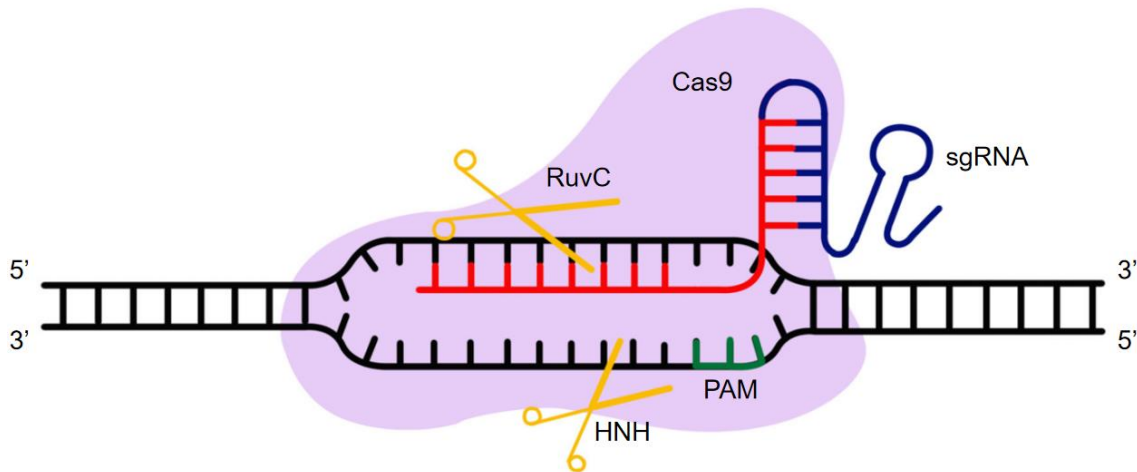


图 1 CRISPR/Cas9 基因编辑技术的原理

Cas9 与 sgRNA 结合后, 通过与 PAM 所在片段的特异性结合确定目的序列, HNH 结构域切割与 sgRNA 中目标序列互补的 DNA 链, RuvC 结构域切割与互补链相反的 DNA 链。

Figure 1 Principles of CRISPR/Cas9 technology in gene editing

Upon binding to sgRNA, Cas9 determines the target sequence by binding specifically to the fragment where PAM is located, the HNH structural domain cuts the DNA strand that is complementary to the target sequence in the sgRNA, and the RuvC structural domain cuts the DNA strand that is opposite to the complementary strand.

1.3 实验材料与仪器

1.3.1 实验材料

水稻日本晴种子和幼苗; 大肠杆菌(*Escherichia coli*) *DH5 α* ; 农杆菌 *AGL1*; YLCRISPR/Cas9-MH; *Bsal*-HF 和其他常用的限制性内切酶; 2 \times Phanta Flash Master Mix; DNA Polymerase; dNTPs Mix; T4 DNA ligase buffer 和 T4 DNA ligase; Cutsmart buffer; 质粒小提试剂盒; TAE 溶液; 核酸染料; DNA Maker; TE 缓冲溶液; 琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒; DNA 提取试剂盒; 氨苄青霉素抗性(100 μ g/mL); 卡那霉素抗性(50 μ g/mL); 利福平抗性(50 μ g/mL); NaCl; 胰蛋白酶; 酵母粉; 琼脂及其他基础实验材料。

1.3.2 实验仪器

超净工作台; 电子天平; 水浴锅; 水平电泳槽; 电泳仪; 光照培养箱; 高速离心机; 高压灭菌锅; 恒温摇床; PCR 仪; 凝胶成像仪; 无菌培养皿; 移液枪; 2 mL 离心管、1.5 mL 离心管、PCR 管。

1.4 实验步骤

1.4.1 基因的靶位点设计

国家水稻数据中心(<https://www.ricedata.cn/>)中显示水稻 *SSA1* 基因的基因组序列全长 2958 bp, 由 2 个外显子和 1 个内含子组成(图 2)。利用在线软件工具包 CRISPR-GE (<http://skl.scau.edu.cn/>) (曾栋昌等, 2018), 进入设计靶点的“target Design”板块, 选择水稻日本晴作为参考基因组以及 5'-NGG-3'的 PAM 序列类型, 在 *SSA1* 基因的 CDS 区中查找长度 20 bp 的靶向序列。为了使基因突变效果更好, 在第一个外显子上选取 CRISPR-GE 工具包给出的 G+C 含量在 60%-70%、潜在的脱靶位置(potential off-target sites) (max score)<0.2、与非特异序列连续配对碱基数(pairing with sgRNA)<8 nt 的序列作为潜在靶位点。

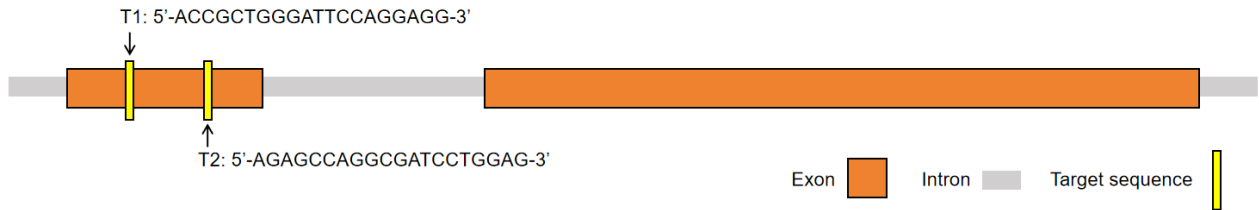


图 2 *SSA1* 基因结构示意图与靶向 sgRNA 的位置图

SSA1 基因包含两个外显子和一个内含子, 利用 CRISPR-GE 工具包在第一个外显子上选择了两个合适的靶向序列。

Figure 2 Schematic representation of the gene structure and sgRNA target sequences of the *SSA1* gene

The *SSA1* gene contains two exons and one intron, and two suitable targeting sequences were selected on the first exon according to the CRISPR-GE toolkit.

在 CRISPR-GE 工具包中搜索 *SSA1* 基因的靶向 sgRNA 序列, 符合以上条件的 sgRNA 共有 11 个(表 1), 其中编号为 4 (5'-ACCGCTGGGATTCCAGGAGG-3', T1)和 6 (5'-AGAGCCAGGCGATCCTGGAG-3', T2)的目标序列 GC 含量高达 65%, 潜在脱靶效应值较低, 且两个目的序列不重叠(表 1), 因此确定为 *SSA1* 基因编辑的靶位点。

表 1 预测的水稻 *SSA1* 基因 sgRNA 靶位点序列

Table 1 Prediction of sgRNA sequences targeting the *SSA1* gene in rice

序号	目的序列	位置	GC (%)	潜在脱靶位点(最高分值)
1	CTTGACAGCCAGGCGATCC TGG	372 - 353	65	0.053
2	CCTCGTCGTCGTCCAAATCC AGG	214 - 195	60	0.089
3	GAGGACGAGGAGACCGAGTT TGG	220 - 239	60	0.096
4	ACCGCTGGGATTCCAGGAGG CGG	167 - 148	65	0.119
5	CCAGCGCAAGTGGATCACCC AGG	420 - 439	65	0.131
6	AGAGCCAGGCGATCCTGGAG CGG	367 - 348	65	0.159
7	GCTACCGCTGGGATTCCAGG AGG	170 - 151	65	0.162
8	GGCTGTTCCAGGGAGAGGCG TGG	242 - 261	70	0.178
9	GGAAGGCAGCGTCGTTGTTG CGG	502 - 483	60	0.185
10	CTCGGGCAGCTCCTCCAGCT CGG	336 - 317	70	0.186
11	GACGCTACCGCTGGGATTCC AGG	173 - 154	65	0.194

The CRISPR-GE toolkit gives the target sequences at the first exon of the *SSA1* gene in rice, that are consistent with a G+C content

of 60%-70%, potential off-target sites (max score)<0.2.

1.4.2 构建 CRISPR/Cas9 的 SSA1 基因敲除载体

根据上述选择的靶位点序列, 进入 CRISPR-GE 工具包 (Ma et al., 2015) 中进行引物设计的 “primerDesign” 板块, 选择 “Go to primerDesign-V (Vector) tool”, 导入靶位点序列, 在 “Promoter” 选择相应的 U3/U6a 启动子, 在 “Method” 中选择 “Method 2” (Overlapping PCR 法), 点击 “Design”, 程序自动根据选用的不同的 OsU3/U6 启动子, 生成相应的用于构建表达盒的基因特异性引物序列 (表 2)。

表 2 构建 sgRNA 表达盒的引物

Table 2 Primers for constructing sgRNA expression cassette

序号	引物名称	序列(5'-3')
1	U3-F	TTCAGAggtctcTctcgACTAGTGAATCGGCAGCAAAGG
2	OsU3T ₁	CCTCCTGGAATCCCAGCGGTgccacggatcatctgc
3	sgRT ₁	CCGCTGGGATTCCAGGAGGgttttagagctagaaat
4	U3gR-R	AGCGTGggtctcGtcagGGTCCATCCACTCCAAGCTC
5	U6a-F	TTCAGAggtctcTctgaCACTGGAATCGGCAGCAAAGG
6	OsU6aT ₂	CTCCAGGATCGCCTGGCTCTCggcagccaagccagca
7	sgRT ₂	AGAGCCAGGCGATCCTGGAGGgttttagagctagaaat
8	U6agR-R	AGCGTGggtctcGaccgACGCGTCCATCCACTCCAAGCTC

构建表达盒采用 Overlapping PCR 法, 以 pUC18 质粒载体为模板 (图 3), 进行两轮 PCR 反应 (图 3B)。针对含 U3 启动子和 T1 靶位点表达盒的构建: 第一轮 PCR 由两个 PCR 反应构成; 第一个 PCR 反应以 U3-F 和 OsU3T₁ 为引物, 以含 U3 启动子序列的 pUC18 质粒载体为模板, 扩增出 U3 启动子, 同时将靶位点引入到 U3 启动子序列下游; 第二个 PCR 反应以 sgRT₁ 和 U3gR-R 为引物, 以含通用 sgRNA 序列的 pUC18 质粒载体为模板, 扩增出 sgRNA, 同时将靶位点引入 sgRNA 序列的上游; 至此, U3 启动子序列的下游和 sgRNA 序列的上游都含有 T1 靶位点序列, 即分别获得了 OsU3-T1 和 T1-sgRNA 两种产物。第二轮 PCR 由一个 PCR 反应构成, 该反应以 U3-F 和 U3gR-R 为引物, 以第一轮 PCR 反应中获得的两种 PCR 产物混合为模板进行扩增, 因 OsU3-T1 和 T1-sgRNA 两种产物中都含有靶位点 T1 序列, 扩增过程中能将两种产物融合连接, 获得 OsU3-T1-sgRNA 产物, 此即含 U3 启动子和 T1 靶位点的表达盒。针对含 U6a 启动子和 T2 靶位点表达盒的构建, 其过程与前一个表达盒 (OsU3-T1-sgRNA) 的构建方法较为一致, 在各步 PCR 扩增过程中更换相应的扩增引物和模板即可, 最终构建完成后获得 OsU6a-T2-sgRNA 产物, 此即含 U6a 启动子和 T2 靶位点的表达盒。两个表达盒相互独立, 在每个表达盒的上下游都引入了用于后续酶切反应的 *Bsa* I 酶切位点, 为后续边切边连过程做准备。

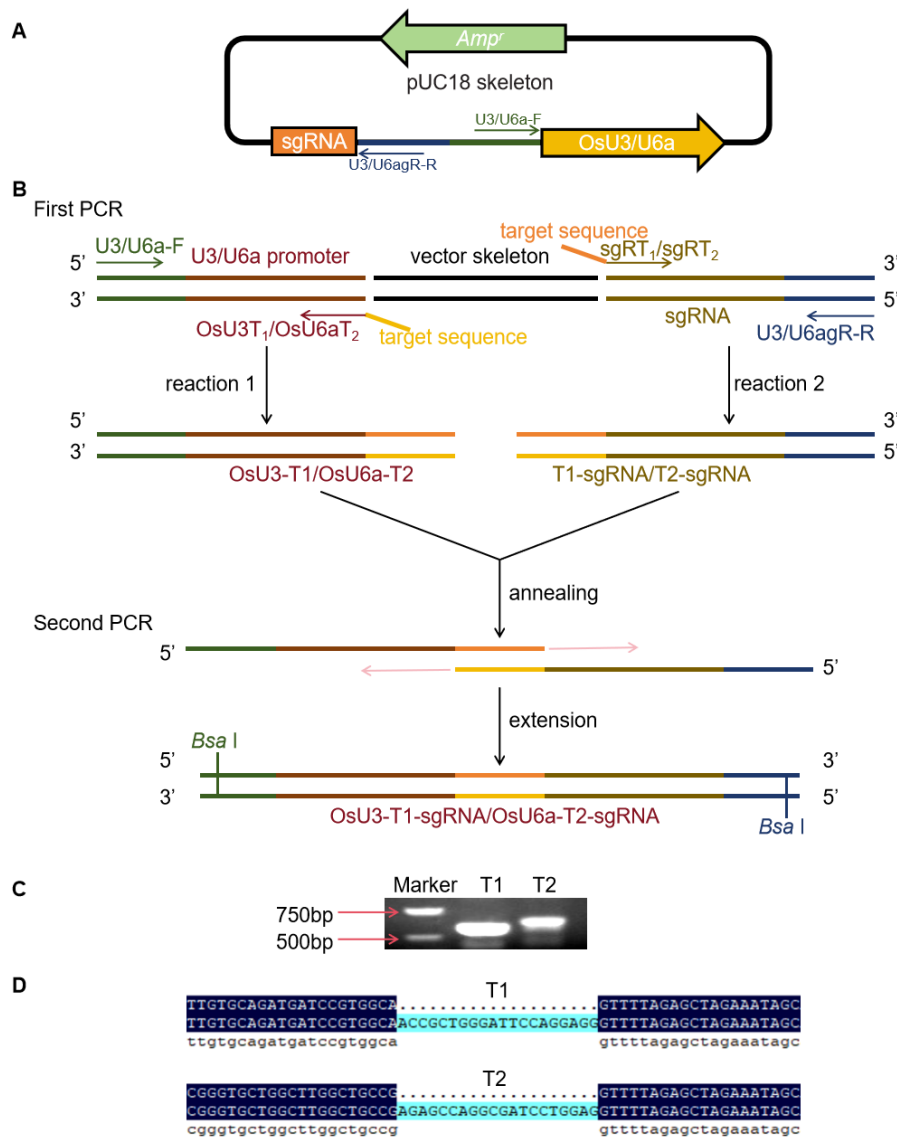


图 3 Overlapping PCR 法构建表达盒

(A) pUC18 质粒载体为的 Overlapping PCR 法的 PCR 扩增模板，本实验用的 pUC18 质粒经改造含有 U3/U6a 启动子和 sgRNA 序列；(B) Overlapping PCR 法构建表达盒需要两轮 PCR；(C) 第二轮 PCR 反应扩增的电泳条带，T1 为 OsU3-T1-gRNA 表达盒，长度为 599 bp；T2 为 OsU6a-T2-gRNA 表达盒，长度为 728 bp；(D) 阳性大肠杆菌质粒测序结果比对。

Figure 3 Construction of expression cassette using Overlapping PCR method

(A) The pUC18 plasmid vector was used as the PCR amplification template for the Overlapping PCR method. The pUC18 plasmid used in this experiment was modified to contain the U3/U6a promoter and sgRNA sequence; (B) The Overlapping PCR method to construct the expression cassette requires two rounds of PCR; (C) Electrophoretic bands amplified by the second round of PCR reaction, T1 is OsU3-T1-gRNA expression cassette with a length of 599 bp; T2 is OsU6a-T2-gRNA expression cassette with a length of 728 bp; (D) Alignment of plasmid sequencing results from positive *Escherichia coli* clones.

对第一轮 PCR 产物进行凝胶电泳检测，采用 1.5% 琼脂糖凝胶，PCR 产物取 3~5 μL，检测出反应 1 的产物 OsU3-T1 长度约为 460 bp，OsU6a-T2 长度约为 580 bp；反应 2 的产物 T1-sgRNA 和 T2-sgRNA

长度均约为 140 bp。同样, 采用 1.5%琼脂糖凝胶电泳进行第二轮 PCR 产物的检查(图 3)。利用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒对第二轮 PCR 产物进行回收。

第二轮 PCR 产物回收完成后获得了两个独立的“OsU3-T1-sgRNA”和“OsU6a-T2-sgRNA”表达盒, 之后, 配制“边切边连”反应中的单酶切体系 15 μL (表 3), 在 37°C下孵育 10 min, 随后在体系中加入 8 U 的 T4 DNA ligase buffer 和 20 U 的 T4 DNA ligase 得到 T4 连接反应体系, 进行 14 个 PCR 控温循环 (37°C 2 min, 10°C 3 min, 20°C 5 min), 最后, 37°C 2 min。将携带 T1 和 T2 序列的两个完整表达盒在同一体系中同时插入到 pYLCRISPR/Cas9 载体中, 实现表达盒与载体的组装(图 4)。

表 3 “边切边连”中的单酶切反应体系

Table 3 Single enzyme cleavage reaction system in the “cut and connect”

药品名称	用量
CutSmart Buffer	8 U
pYLCRISPR/Cas9 质粒	60~80 ng
第二轮 PCR 回收产物(表达盒 1、2)	20~30 ng
<i>Bsa</i> I-HF	6 U
ddH ₂ O	补充到 15
	μL

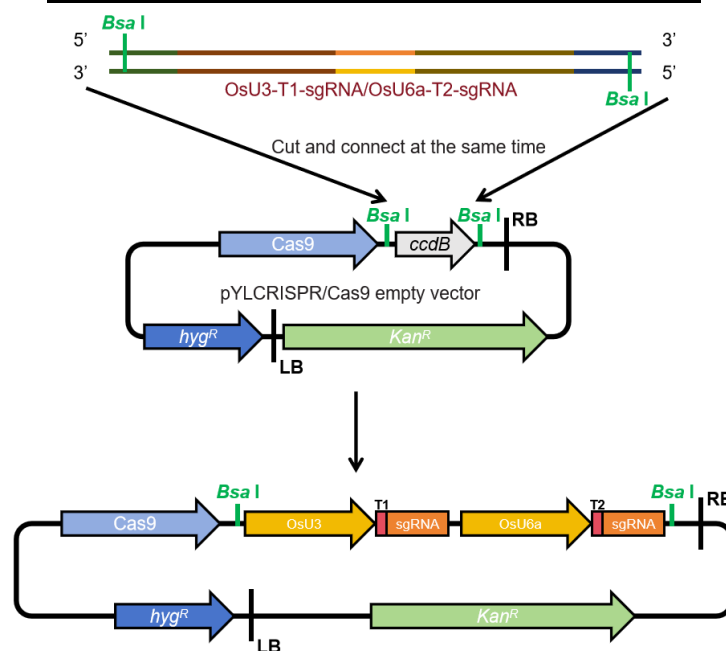


图 4 构建水稻 *SSA1* 基因编辑的 CRISPR/Cas9 载体示意图

Figure 4 Schematic diagram of constructing CRISPR/Cas9 vector for rice *SSA1* gene editing.

取 5 μL “边切边连”反应产物转化大肠杆菌 *DH5 α* , 涂布含有卡那霉素的培养基平板, 倒置在 37°C培养箱中过夜暗培养。待大肠杆菌单菌落出现后, 挑取合适的单菌落, 进行菌落 PCR 验证, 将含有目标 PCR 条带的菌落与对应测序引物一同寄送生物公司测序(表 4), 确保 pYLCRISPR/Cas9 载体中插入的靶位点序列正确(图 3)。

表 4 检测 CRISPR/Cas9 载体中目的 sgRNA 插入情况的测序引物

Table 4 The sequencing primers for testing the insertion of the target sgRNAs in CRISPR/Cas9 vectors

引物名称	序列(5'-3')
SP1	CCCGACATAGATGCAATAACTTC
SP2	GCGCGGTGTCATCTATGTTACTA

1.4.3 CRISPR/Cas9 载体的水稻遗传转化

利用农杆菌冻融转化法, 将构建好的 CRISPR/Cas9 载体导入到农杆菌 *AGL1* 中, 为之后的水稻遗传转化做准备。水稻的遗传转化涉及多个步骤, 即水稻愈伤诱导、愈伤继代、农杆菌侵染、共培养、抗性筛选、预分化、分化生根和壮苗炼苗等, 最终培育出转基因植株(图 5)。基本步骤如下: (1) 将水稻日本晴种子去壳消毒, 28°C 在愈伤组织诱导培养基上暗培养水稻去壳种子 28 d; (2) 待去壳种子上长出新的可以脱落的小粒愈伤组织时, 配制愈伤组织继代培养基, 28°C 暗培养新长出的愈伤组织 7 d; (3) 提前 1 d 在含有抗性的 LB 培养基上均匀涂布接种含有 CRISPR/Cas9 载体的农杆菌, 28°C 暗培养 1 d, 将培养好的农杆菌刮下放入活化培养基中, 28°C 摇培 1 h, 至菌液 OD₆₀₀ 值达 0.1-0.15, 把经过 7 d 继代培养的愈伤组织放入培养液, 90 rpm 摇培 30 min; (4) 侵染完成倒掉菌液, 用无菌滤纸吸干愈伤组织水分, 在共培养培养基上 22°C 暗培养愈伤组织 3 d; (5) 用无菌水清洗共培养完成的愈伤组织, 至无菌水清亮, 再将愈伤组织放入恢复培养液中 120 rpm 摇培 1 h, 把愈伤组织捞出吸干, 在加有筛选抗性的选择培养基上 28°C 暗培养愈伤组织 4 周; (6) 待选择培养基上新的愈伤颗粒长出, 在预分化培养基上 28°C 暗培养新长出的愈伤组织 7 d; (7) 待愈伤颗粒长至偏白, 绿豆大小后, 转移到分化生根培养基, 28°C 光照培养 4 周; (8) 待愈伤组织分化成健壮幼苗后, 28°C (12 h 光培/12 h 暗培) 在壮苗培养基上培养。此实验耗时约 4 个月, 因此, 只在课上进行水稻愈伤继代、农杆菌侵染和共培养 3 部分水稻组培实验步骤, 其余内容以课件的形式演示操作。

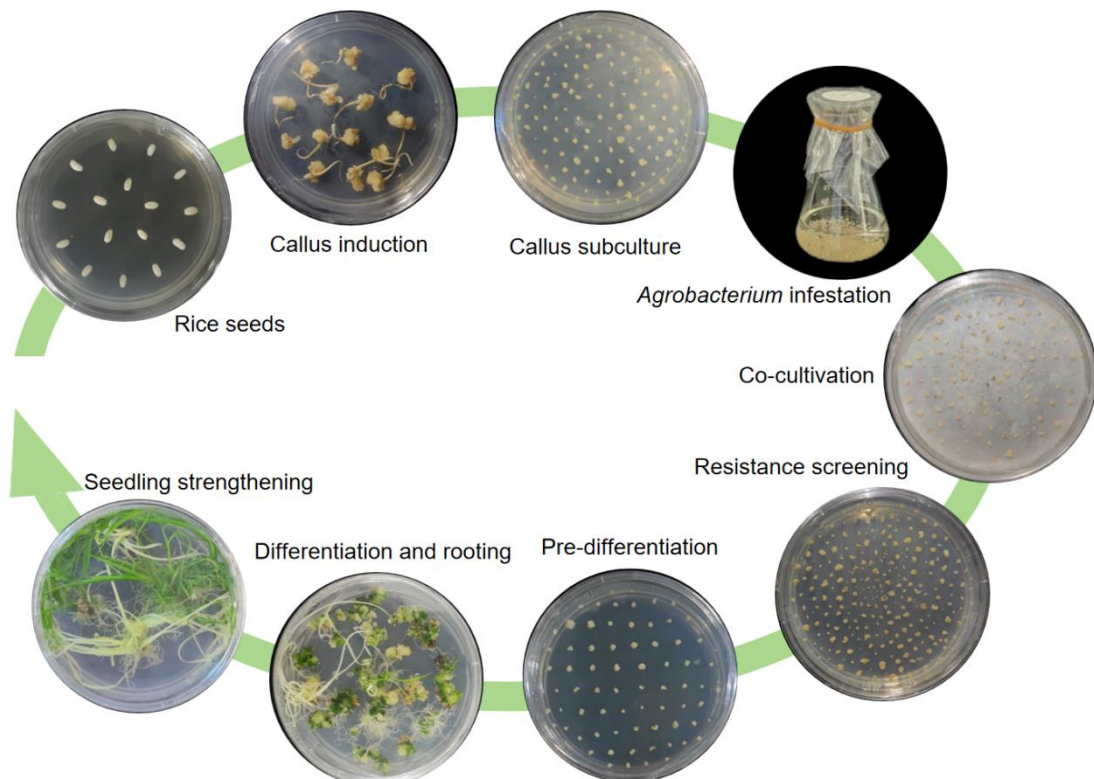


图 5 水稻的遗传转化过程

水稻的遗传转化包括水稻愈伤诱导、愈伤继代、农杆菌侵染、共培养、抗性筛选、预分化、分化生根、壮苗等步骤，最终获得转基因植株。

Figure 5 Genetic transformation process in rice

Genetic transformation of rice includes the steps of rice callus induction, callus subculture, *Agrobacterium* infestation, co-cultivation, resistance screening, pre-differentiation, differentiation and rooting, and seedling strengthening, and ultimately obtaining transgenic plants.

1.4.4 SSA1 基因敲除植株靶位点的测序鉴定与表型观察

提前准备好水稻 SSA1 基因的敲除转基因植株，设置光照培养箱 28°C 12 h 光照/12 h 黑暗，与野生型 (WT) 对照组共同培养(图 6)。为检验水稻 CRISPR/Cas9 转基因植株中的 SSA1 基因是否被敲除，采用 PCR 扩增的方式进行分子鉴定。设计并合成扩增水稻 SSA1 基因序列的测序引物(表 5)，选取水稻 ssa1 植株 3 叶期的新鲜叶片切取长度约 4 cm，重约 50 mg 的片段，按照快速 DNA 提取试剂盒的方法，从 WT 和 ssa1 植株(白化)的叶片中提取基因组 DNA，并进行 PCR 扩增。

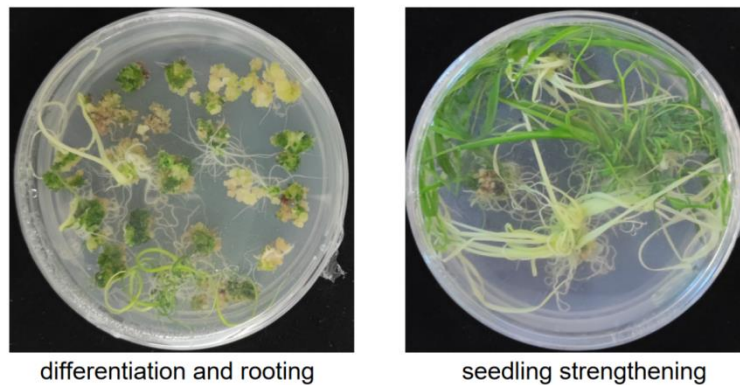


图 6 WT 和 ssa1 突变体在分化生根期和壮苗期的表型比较

图中所示为遗传转化后获得的组培苗，实际实验操作中教师为学生准备的是该基因被特异性敲除后通过杂合植株收获保存的种子苗。

Figure 6 Phenotypic comparison of WT and ssa1 mutants at the differentiating rooting stage and at the seedling strengthening stage

The figure displays tissue-cultured seedlings obtained after genetic transformation; however, in actual experimental practice, the instructor provides students with seed-grown seedlings derived from homozygous mutant plants generated through specific knockout of the target gene and preserved for teaching purposes.

表 5 检测水稻植株中目的基因的测序引物

Table 5 The sequencing primers for detection of SSA1 gene in rice plants

引物名称	序列(5'-3')
SSA1-CXF	GATAGAGGAGCGACAAGGCTT
SSA1-CXR	TGCATGTTTAGTGGGGATGC

Based on the sequence of the target gene, this primer pair was designed and synthesized for PCR amplification of the editing site sequence of the SSA1 gene.

取 5 μ L PCR 产物用 1.5% 琼脂糖凝胶进行电泳检测, 含有目的条带的 PCR 样品送至生物公司进行 Sanger 测序。根据公司返回的测序结果, 在 DNAMAN 序列比对软件中对各 *ssa1* 植株的结果序列与 WT 基因序列进行比对, 分析 *ssa1* 植株发生的碱基突变类型(图 7)。如图, 在 *ssa1-1* 突变体中观察到 T1 序列上出现 A 碱基的单核苷酸缺失, 在 *ssa1-2* 突变体中观察到 T2 序列上出现 C 碱基的单核苷酸插入, 这两种类型都导致 *SSA1* 基因发生了突变, 基因功能丧失。

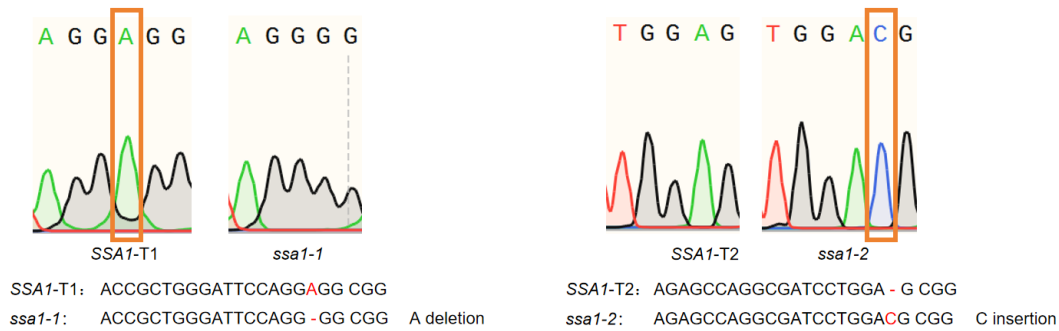


图 7 水稻 *SSA1* 基因敲除的靶向测序

ssa1-1 的 T1 上出现了“A (腺嘌呤)”的单核苷酸缺失, *ssa1-2* 的 T2 上出现了“C(胞嘧啶)”的单核苷酸插入。

Figure 7 The target sequencing of the *SSA1* gene knockout in rice

A single nucleotide deletion of “A (adenine)” on targeting sequence 1 was observed in *ssa1-1* and a single nucleotide insertion of “C (cytosine)” on targeting sequence 2 was observed in *ssa1-2*.

2 教学进度安排

实验采用理论讲解和实际操作相结合的方式, 连续五周共 20 个学时的教学安排。学生分为若干小组, 每组 3-5 人, 每组独立进行实验, 组内学生合理分工合作, 共同完成实验任务。在实验教学过程中, 要求学生定期向教师汇报每个阶段的实验结果, 教师根据实验教学过程和学生汇报情况进行指导和评价。最后, 要求以小组为单位进行汇报和讨论, 每个学生需独立撰写实验报告, 分享自己的实验成果和感想。

2.1 第 1 周 CRISPR/Cas9 技术原理的讲解及靶序列的确定, 利用 Overlapping PCR 法进行表达盒的构建(4 学时)

2.1.1 课前准备

布置预习任务, 督促学生课前自主查阅 CRISPR/Cas9 技术的相关文献, 以熟悉其基本原理与发展历史, 初步了解 Overlapping PCR 法构建表达盒的实验步骤。

2.1.2 课堂教学

首先, 教师分享基因序列的查找方法, 利用动画讲解 CRISPR/Cas9 技术原理与 Overlapping PCR 法构建表达盒的实验流程, 强调实验过程中的注意事项, 演示 CRISPR-GE 工具包的使用方法(45 min); 然后, 要求学生查找 *SSA1* 基因序列, 并根据水稻 *SSA1* 基因的序列自行选取该基因的靶序列, 再让学生口头分享本组靶序列的选择依据, 共同探讨最优的靶位点序列, 生成 Overlapping PCR 法所需的相应引物(45 min); 之后, 将已合成好的引物提供给学生, 让学生根据实验步骤合作进行构建 sgRNA 表达盒中的两轮 PCR 实验(90 min), 各组学生整理好本组的第二轮 PCR 反应产物放于 -20°C 保存以便下节课使用。

2.1.3 课后任务

学生认真整理课上学习的内容,明确合成的引物在 **Overlapping PCR** 法中的具体作用。教师为每组学生提供水稻 **WT** 种子和 **ssa1** 杂合突变体种子,各组学生自行组织发苗、种植和管理,要求每组派代表不定时巡视培养箱,检查其环境条件是否稳定,以保证水稻植株的正常生长。

2.2 第2周 **SSA1** 基因的敲除载体构建(4学时)

2.2.1 课前准备

督促学生复习 **Overlapping PCR** 法构建表达盒的步骤,查阅资料预习大肠杆菌转化实验的操作步骤和要点,思考实验过程中的注意事项。

2.2.2 课堂教学

教师带领学生回顾上次课学习的 **Overlapping PCR** 法构建表达盒的步骤,学生将上次课得到的第二轮 **PCR** 反应产物进行凝胶电泳验证(45 min);对条带正确的反应产物进行凝胶回收,采用“边切边连”法将 **sgRNA** 表达盒与 **CRISPR/Cas9** 空载体相连接(45 min),由于酶切酶连过程耗时较长,为提高课堂教学效率,教师为学生提前准备好构建成功的 **SSA1** 基因敲除载体,学生活化大肠杆菌 **DH5 α** 感受态细胞,将敲除载体转入其中,在加有卡那霉素的 **LB** 固体培养基上涂布转化入水稻 **SSA1** 基因敲除载体的大肠杆菌(90 min),完成后放 37°C 培养。

2.2.3 课后任务

学生将课上获得的酶切酶连产物放入冰箱-20°C 妥善保存;每组派代表从本组经过过夜培养后的抗性筛选平板中挑取大小适中、颜色乳白、凸度较为饱满、长势良好的大肠杆菌单菌落进行菌落 **PCR**,对含目标条带的单菌落,用含有卡那霉素的抗性培养基进行接种和摇培,过夜摇培后将菌液放入 4°C 保菌;同时,每组派代表巡视培养箱运行情况与水稻苗生长情况。

2.3 第3周利用冻融法转化 **CRISPR/Cas9** 敲除载体入农杆菌以及水稻愈伤组织继代培养(4学时)

2.3.1 课前准备

布置预习任务,督促学生预习冻融法转化农杆菌与水稻遗传转化的实验步骤;每组派代表提前 1 d 将构建好的阳性重组菌进行接种和过夜摇培。

2.3.2 课堂教学

首先,教师详细讲解冻融法转化农杆菌的原理与实验流程,通过图片、视频动画等方式演示水稻遗传转化的实验过程,讲解获得水稻 **SSA1** 基因敲除植株的实验机理(45 min);然后,将提前准备的质粒小提试剂盒与诱导培养后的水稻愈伤组织颗粒分发给各组学生,学生按照试剂盒的要求从摇培的大肠杆菌菌液中提取质粒,利用冻融法把质粒转化入农杆菌 **AGL1** 中,在等待农杆菌复苏活化时,学生把水稻愈伤组织转移到愈伤组织继代培养基上,在光照培养箱中设置 28°C 暗培养,注意对愈伤组织进行遮光处理(120 min);之后,将活化后的农杆菌离心浓缩,涂布含有抗性的 **LB** 培养基(15 min),涂布后 28°C 暗培养农杆菌,等待单菌落长出。

2.3.3 课后任务

农杆菌长出后,每组派代表挑选各自组农杆菌平板上长出的单菌落,进行菌落 **PCR** 与电泳验证,对含目标条带的单菌落进行冻存保菌;每组关照培养箱中植株生长情况和愈伤组织继代培养的生长情况。

2.4 第4周农杆菌侵染水稻愈伤组织并进行共培养(4学时)

2.4.1 课前准备

每组派学生代表提前 48 h 将含有目标质粒的冻存农杆菌菌株涂布接种在含相应抗性(卡那霉素和利福平)的培养基平板上, 28°C 倒置培养。

2.4.2 课堂教学

教师详细讲解水稻农杆菌侵染与共培养的具体实验步骤, 指导学生做好实验前的准备工作, 强调实验中的注意事项, 学生刮取培养基平板上长出的农杆菌并接种到活化培养液中摇培, 每隔 20 min 对菌液 OD₆₀₀ 值进行一次测定, 至 OD₆₀₀ 值为 0.1-0.15 (90 min); 之后将经过一周继代培养的水稻愈伤组织放入活化后的农杆菌菌液中进行接触侵染(45 min), 侵染完成后捞出愈伤组织置于无菌滤纸上吸净愈伤组织上沾有的液体, 并将干燥的愈伤组织转移到共培养培养基上(45 min), 转移完成后设置光照培养箱 22°C 进行暗培养。

2.4.3 课后任务

每个小组派代表检查培养箱情况与共培养水稻愈伤组织生长情况, 共培养 3 d 后观察记录愈伤组织生长状态。

2.5 第 5 周转基因植株突变分析与表型观察, 以及总结汇报(4 学时)

2.5.1 课前准备

教师提前准备 DNA 提取检测试剂盒、检测水稻植株中 *SSA1* 基因目的序列的引物、PCR 扩增等相关材料与设备, 并通过收集学生在实验过程中出现的各种问题与不当操作, 将其整理和归类, 为课堂上的讨论环节做准备; 学生准备好本组的 WT 植株与 *SSA1* 基因被敲除的水稻转基因植株, 同时, 每组制作一份用于汇报总结的 PPT, 以便在课堂上展示和分享本组的实验成果及思考。

2.5.2 课堂教学

教师让学生对本组中的 *ssa1* 植株和 WT 植株进行编号, 为学生提供植物 DNA 提取试剂盒与 PCR 扩增引物。学生按照 DNA 提取的实验步骤规范操作, 用 *ssa1* 植株叶片提取 DNA (90 min)。对提取的 DNA 进行 PCR 扩增, 扩增完成后取 3-5 μL 利用琼脂糖凝胶电泳扩增检测并分析, 教师适时进行指导和评价; 在 PCR 反应期间, 教师组织学生观察 *ssa1* 植株的表型, 结合已报道的基因作用机制进行思考, 并讨论和总结转基因植株表现出表型的原因。然后, 学生通过 PPT 展示实验结果, 并进行总结与分享; 教师引导学生讨论各组在实验过程中遇到的各种问题, 提出解决方法(90 min)。

2.5.3 课后任务

教师挑选每组扩增检测后条带位置正确且清晰的剩余 PCR 产物样品寄送生物公司测序, 并将公司返回的测序结果分发给各组, 各组学生比对分析公司返回的 *ssa1* 植株目的 DNA 片段测序结果与 WT 基因序列是否一致, 分析不同 *ssa1* 植株的碱基突变类型。每个学生都需根据整个实验过程及课堂讨论, 综合分析实验结果, 撰写一份详细的实验报告。实验报告内容应包括利用 CRISPR/Cas9 技术获得水稻 *ssa1* 突变体整体实验原理的阐述, 对其中每个实验步骤的清晰回顾并详细记录, 以及对实验结果的分析与反思。同时, 还需对实验数据进行分析, 评估自己组内实验结果与预期的符合度, 并探讨可能的误差源和改进方向。

3 教学考核方式

过程性考核注重评价学生学习时的态度、方法,强调持续性和全面性。它不仅关注学生的学习成果,还通过反馈作用及时调节教学过程,促进学生能力的全面发展(陈玉清等,2022)。本实验教学采用过程性评价(50分)和实验报告成绩(50分)这2方面相结合对学生学习情况进行评分,总分100分(表6)。过程性评价主要考察学生课堂表现、实验操作规范程度以及课后实验结果汇报情况;其中课堂表现主要依据出勤情况、实验学习态度是否严肃认真等方面进行评分,共计10分;实验操作规范程度主要依据每组学生的实验操作是否符合要求(尤其无菌操作)、数据记录是否准确、实验设备是否合理使用、是否遵守注意事项等,共计20分;课后实验结果汇报主要考察学生对于实验过程的理解以及总结能力,对是否能够清晰表达实验结果、分析数据、提出结论进行评估,共计20分;实验报告成绩,主要包括报告撰写的完整性、规范性等,共计50分。采用过程性评价方式,改进了只关注实验结果最终呈现的局限,全面评估学生在实验中的各方面表现,重视学生在实验过程中展现的操作规范、思维分析和沟通协调能力,促使学生在实验学习中不断完善自己,提升综合素质。

表6 实验教学过程性评价表

Table 6 Experimental teaching process assessment form

评价项目	评价标准	评分
课堂表现 (10分)	出勤情况良好,无缺勤;学习态度严谨,有较强的实验参与度;对实验内容有较好的理解和实践操作。	9-10分
	出勤情况较好,偶尔缺席;学习态度较为认真,实验参与度一般;对实验内容有一定理解,但操作不够积极。	7-8分
	出勤情况不佳,经常缺席;学习态度不够认真,实验参与度较低;对实验内容的理解和操作存在困难。	5-6分
实验操作规范程度 (20分)	所有实验操作严格遵循操作规程;数据记录准确、完整;严格遵守实验的注意事项。	18-20分
	大部分实验操作符合要求,存在少量不规范的操作;数据记录基本准确;注意事项遵守良好。	14-17分
	实验操作较不规范,导致实验结果存在不准确的风险;数据记录存在遗漏;实验过程中需经常提醒注意事项。	10-13分
课后实验结果汇报 (20分)	汇报内容条理清晰,结构合理;深刻理解实验过程,能充分分析实验结果;在汇报中回答问题展现出扎实的理论基础和实践经验。	18-20分
	汇报内容较为清晰,部分内容表达不够准确;对实验过程有一定理解;汇报过程中能够较好地回答问题,有时解释不够充分。	14-17分
	汇报内容不够清晰;实验过程理解模糊,数据分析存在遗漏;汇报过程中对问题的回答较为含糊。	10-13分
实验报告成绩 (50分)	报告内容完整,格式符合要求;语言表达清晰,逻辑严密;无明显错误,报告整体质量高。	46-50分
	报告内容较为完整,部分环节描述不够详尽;格式基本符合要求;整体	36-45分

能反映实验过程,有一些语言表达或逻辑上的问题。

报告内容不够完整,存在部分内容遗漏;语言表达模糊,不够准确;报

25-35 分

告整体质量较低,实验过程和结果存在理解问题。

4 实验教学创新成效

4.1 引导和启发学生的探究式实验学习思维

教师通过讲解 CRISPR/Cas9 技术的原理,引导学生设计合适的 sgRNA,并选择合适的载体系统,使学生全面掌握基因编辑的基础理论和操作技能;在 PCR 实验中,教师指导学生理解关键步骤并警示实验注意事项,督促学生在实验中深入思考目标基因功能、实验变量、对照组设计以及如何检测基因编辑效果等,培养了批判性思维和问题解决能力;此外,通过启发式提问和互动讨论,有效激发了学生的创新思维;教师还鼓励学生分析实验失败原因,增强学生探究式学习思维的培养,激发了他们对科学研究的兴趣。

4.2 培养学生动手操作和解决实际问题的能力

在生命科学高等教育中,理论与实践的紧密结合为学生的综合能力培养奠定了坚实基础。通过亲自参与基因编辑实验,学生能够将抽象的 CRISPR/Cas9 等理论知识转化为具体的实验操作,深化理解。基础实验操作如基因敲除载体构建、DNA 提取、PCR 扩增、农杆菌转化和水稻遗传转化等,不仅帮助学生深入解析实验结果,还增强了其动手能力;在实验过程中,学生不仅学习如何运用实验室设备和技术,更在面对实验中的挑战时,培养了独立思考和解决问题的能力,从而提升了创新意识和实践操作的综合素质。

4.3 培养学生的协作精神和团队合作能力

在实验学习过程中,学生通过组内分工合作和组间协作,共同完成实验任务,充分发挥团队优势。组内合作不仅促使学生合理分配并高效执行实验任务,还培养了他们在遇到突发问题时的应变能力。通过小组成员的共同参与,学生能够弥补个人的不足,并在交流与合作中,学会协调资源、处理不同意见,提升团队凝聚力。不仅促进了学生之间的相互支持与共同进步,还为他们未来适应多样化团队合作提供了实践基础,显著提升了学生的综合素质和竞争力。

5 讨论

CRISPR/Cas9 技术简单、高效、特异性较强,是修饰植物基因组的有效工具,兼具同时修改多个基因位点的特点,将这种前沿技术融入到大学实验课教学中,设计并实施一个集创新和实践于一体的综合实验项目,对学生的视野拓展、专业技能提升、科研兴趣激发和团队合作能力培养具有较大意义。本论文设计的实验是本校生物科学和生物技术专业的学生《专业综合实验》课程中的其中一个综合性实验,开课学期为第 7 学期,属高年级学生的课程,与其直接相关的先修课程包括《生物化学实验》、《分子生物学实验》、《细胞工程实验》、《植物生物学实验》等,学生在先修课程中涉及和学习过关于 PCR、琼脂糖凝胶电泳等技术,实验共安排 20 学时,分 5 周完成,每周设计一整个半天的时间(整上午或整下午),在正常教学安排时,半天一般安排为 4 个学时,即 4 个 45 min,每个学时中间都会安排课间活动时间;在进行实际实验授课活动时,上午(8:00-12:00)或下午(2:00-6:00)是完整用于实验活动的,并未细分 4 个

45 min, 也未明确规定每隔 45 min 一定有一个课间时间, 本论文所设计实验分别在 2023 年和 2024 年秋季学期各开设过 1 轮, 学生和教师都能够完成各项实验操作和授课活动, 效果良好, 各兄弟院校在借鉴该实验设计是应充分考虑和结合学生学情、开课时间、教学条件等情况, 进行学时上的教改探索, 促进教学效率提升。本课程组在进行实验设计时选取水稻叶绿体发育控制基因 *SSA1* 为研究对象, 该基因的纯合突变植株苗期整株白化, 为学生更为直观地理解和观察基因突变与表型形成之间的联系提供材料基础。同时, 由于白化植株不能进行光合作用, 突变株长至 4-5 叶期时会萎蔫致死, 实验过程中学生进行突变植株分子鉴定所用的种子是利用 *SSA1* 基因杂合突变植株进行种植繁殖获得的, 杂合突变植株的突变方式并不十分明确, 且教师是将(可能的)多种不同突变方式的种子提供给学生, 以加深学生对多种突变与一种表现之间对应关系的理解, 同类型院校在进行相应实验设计时可依据实际情况选用合适的基因及其表型, 以促进学生对实验过程的理解和掌握。借助 *Overlapping* 法进行表达盒构建时, 第一轮 PCR 中的两个 PCR 反应获得的产物长度分别为 580 bp (U3/U6a 启动子)和 140 bp (sgRNA), 本课程组教师在进行预实验和实际实验开设中发现, 这两个 PCR 反应产物长度较短, 扩增效率较高, 扩增完成后无需进行琼脂糖凝胶电泳检测, 可将产物直接用于第二轮 PCR 扩增, 不会对后续实验造成影响, 各院校可依情况选做。本设计实验在利用冻融法进行农杆菌转化时, 依本课程组教师的实践经验, 农杆菌菌株 *AGL1* 转化效率高达 90%以上, 对转化单菌落进行检测时只需进行菌落 PCR 而无需测序, 各院校可依实际选用的农杆菌菌株种类等情况选做该步骤。通过设计创新型实验对学生进行引导是提升学生创新能力, 增强其解决实际问题的有效途径, 为高校培养具备多元素质的复合型人才保驾护航。

作者贡献声明

吕若彤: 完成实验、分析数据和撰写论文; 寇云霞, 肖雨佳: 分析数据; 艾鹏飞, 王雁伟: 修订文章内容及审校图表, 提供资金和技术支持。

参考文献

- 陈玉清, 刘平, 兰蕾, 陈礼明, 戴亦军 (2022). 生物化学教学中过程性学习评价的实践与思考. 生命的化学 42(09), 1781-1787.
- 何晓玲, 刘鹏程, 马伯军, 陈析丰 (2022). 基于 CRISPR/Cas9 的基因编辑技术研究进展及其在植物中的应用. 植物学报 57, 508-531.
- 苗春妍, 李铭铭, 左鑫, 丁宁, 杜家方, 李娟, 张重义, 王丰青 (2023). 湖北地黄 CRISPR/Cas9 基因编辑体系的建立. 植物学报 58, 905-916.
- 苏钺凯, 邱镜仁, 张晗, 宋振巧, 王建华 (2019). CRISPR/Cas9 系统在植物基因组编辑中技术改进与创新的研究进展. 植物学报 54, 385-395.
- 王影, 李相敢, 邱丽娟 (2018). CRISPR/Cas9 基因组定点编辑中脱靶现象的研究进展. 植物学报 53, 528-541.
- 谢先荣, 曾栋昌, 谭健韬, 祝钦泷, 刘耀光 (2021). 基于 CRISPR 编辑系统的 DNA 片段删除技术. 植物学报 56, 44-49.
- 曾栋昌, 马兴亮, 谢先荣, 祝钦泷, 刘耀光 (2018). 植物 CRISPR/Cas9 多基因编辑载体构建和突变分析的操作方法. 中国科学: 生命科学 48, 783-794.

Asmamaw Mengstie M, Teshome Azezew M, Asmamaw Dejenie T, Teshome AA, Tadele Admasu F, Behaile

- Teklemariam A, Tilahun Mulu A, Mekonnen Agidew M, Adugna DG, Geremew H, Abebe EC** (2024). Recent advancements in reducing the off-target effect of CRISPR-Cas9 genome editing. *Biologics: targets and therapy* **18**, 21-28.
- Baltes NJ, Voytas DF** (2015). Enabling plant synthetic biology through genome engineering. *Trends Biotechnol* **33**(2), 120-131.
- Gale MD, Devos KM** (1998). Comparative genetics in the grasses. *PNAS* **95**(5), 1971-1974.
- Kumar M, Prusty MR, Pandey MK, Singh PK, Bohra A, Guo BZ, Varshney RK** (2023). Application of CRISPR/Cas9-mediated gene editing for abiotic stress management in crop plants. *Frontiers in plant science* **14**, 1157678.
- Li CH, Liu B, Dong HS, Yang B** (2025). Enhancing resistance to bacterial blight in rice using CRISPR-based base editing technology. *The Crop Journal* **13**, 115-124.
- Li YZ, Liang J, Deng BF, Jiang YL, Zhu JY, Chen LK, Li M, Li J** (2023). Applications and prospects of CRISPR/Cas9-mediated base editing in plant breeding. *CIMB* **45**(2), 918-935.
- Liu F, Wang PD, Zhang XB, Li XF, Yan XH, Fu DH, Wu G** (2018). The genetic and molecular basis of crop height based on a rice model. *Planta* **247**(1), 1-26.
- Liu QE, Yang F, Zhang JJ, Liu H, Rahman S, Islam S, Ma WJ, She MY** (2021). Application of CRISPR/Cas9 in crop quality improvement. *Int J Mol Sci* **22**(8), 4206.
- Ma XL, Zhang QY, Zhu QL, Liu W, Chen Y, Qiu R, Wang B, Yang ZF, Li HY, Lin YR, Xie YY, ShenRX, Chen SF, WangZ, Chen YL, GuoJX, Chen LT, Zhao XC, Dong ZC, Liu YG** (2015). A robust CRISPR/Cas9 system for convenient, high-efficiency multiplex genome editing in monocot and dicot plants. *Mol. Plant* **8**(8), 1274-1284.
- McManus MT, Sharp PA** (2002). Gene silencing in mammals by small interfering RNAs. *Nat Rev Genet* **3**(10), 737-747.
- Moore G, Devos KM, Wang Z, Gale MD** (1995). Cereal genome evolution. Grasses, line up and form a circle. *Current biology: CB* **5**(7), 737-739.
- Nishimasu H, Ran FA, Hsu PD, Konermann S, Shehata SI, Dohmae N, Ishitani R, Zhang F, Nureki O** (2014). Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA. *Cell* **156**(5), 935-949.
- Reyon D, Tsai SQ, Khayter C, Foden JA, Sander JD, Joung JK** (2012). FLASH assembly of TALENs for high-throughput genome editing. *Nat Biotechnol* **30**(5), 460-465.
- Sander JD, Dahlborg EJ, Goodwin MJ, Cade L, Zhang F, Cifuentes D, Curtin SJ, Blackburn JS, Thibodeau-Beganny S, Qi Y, Pierick CJ, Hoffman E, Maeder M L, Khayter C, Reyon D, Dobbs D, Langenau DM, StuparRM, Giraldez AJ, Voytas DF, Joung JK** (2011). Selection-free zinc-finger-nuclease engineering by context-dependent assembly (CoDA). *Nat Methods* **8**(1), 67-69.
- Steinert J, Schiml S, Fauser F, Puchta H** (2015). Highly efficient heritable plant genome engineering using Cas9 orthologues from *Streptococcus thermophilus* and *Staphylococcus aureus*. *Plant J* **84**, 1295-1305.
- Wang J, Palomar VM, Min JH, Wierzbicki AT** (2024). PAP₁ and PAP₇ are required for association of plastid-encoded RNA polymerase with DNA. *Plant Mol Biol* **114**(5), 100.

Wang YW, Yang ZM, Zhang M, Ai PF (2022). A chloroplast-localized pentatricopeptide repeat protein involved in RNA editing and splicing and its effects on chloroplast development in rice. *BMC plant biology* **22**(1), 437.

Experimental Teaching Design for Gene Editing in Rice Breeding by CRISPR/Cas9 Technology

Ruotong Lü, Yunxia Kou, Yujia Xiao, Pengfei Ai*, Yanwei Wang*

College of Food Science and Biology, Hebei University of Science and Technology, Shijiazhuang 050018, China

Abstract CRISPR/Cas9 technology, as an efficient genome editing tool, has gained increasingly widespread application in the life sciences. Incorporating this technology into university experimental teaching enables students to deepen their understanding of cutting-edge research advances while enhancing their innovative research capabilities and practical skills. In this paper, we have designed an innovative teaching experiment, "Using CRISPR/Cas9 technology to study the effect of knocking out rice *SSA1*(*seedling stage albino1*)gene on phenotype". This experiment helps students to deepen their understanding of the principles and experimental procedures of CRISPR/Cas9 technology and to recognize the important role played by the *SSA1* gene in rice growth and development. At the same time, the experiment can improve students' ability of experimental operation and rigorous scientific research thinking, and cultivate students' exploratory skills and innovative spirit.

Key words CRISPR/Cas9, gene editing, rice, experimental instructional design

*Author for correspondence. E-mail: wangyanwei01@caas.cn

通讯作者简介

王雁伟，河北科技大学食品与生物学院教师，硕士生导师。主要从事植物分子生物学与作物遗传育种研究。研究成果发掘了一系列影响光合作用产物运输和叶绿体生长发育相关分子模块和调控通路。已发表科研论文 20 余篇，其中 SCI15 余篇；申请专利 2 项；主持和参与科研项目 5 项等。