

植物中 CRISPR/Cas 系统的应用研究进展

崔娜^{1,2}, 姚佳羽¹, 张杨^{1,3}, 于洋¹,
张彤彤¹, 商亦聪¹, 庞舒予¹, 范海延^{1,2*}

(1 沈阳农业大学 生物科学技术学院, 沈阳 110866; 2 沈阳农业大学 园艺学院, 设施园艺省部共建教育部重点实验室, 沈阳 110866; 3 沈阳宁远进出口贸易有限公司, 沈阳 110031)

摘要: 成簇规律间隔短回文重复—CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeat) 是近年来新兴的基因组编辑技术, 因其操作简便、靶向效率高和应用范围广而备受关注。国内外关于 CRISPR/Cas 系统在细菌和动物研究中的应用报道较多, 但对其在植物研究中的应用报道较少。该文综述了 CRISPR/Cas 系统的发现、结构、作用机制及其在植物研究中的应用, 以期 CRISPR/Cas 系统在提高农作物产量及培育抗性品种等方面的应用研究奠定基础。

关键词: CRISPR; CRISPR/Cas; 植物

中图分类号: Q789 **文献标志码:** A

Research Progress of CRISPR/Cas System in Plant

CUI Na^{1,2}, YAO Jiayu¹, ZHANG Yang^{1,3}, YU Yang¹, ZHANG Tongtong¹,
SHANG Yicong¹, PANG Shuyu¹, FAN Haiyan^{1,2*}

(1 College of Biological Science and Technology, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China; 2 College of Horticulture, Shenyang Agricultural University, Key Laboratory of Protected Horticulture, Ministry of Education, Shenyang 110866, China; 3 Shenyang Ningyuan Imp&Exp Trading Co., Ltd, Shenyang 110031, China)

Abstract: CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeat) is a new genomic editing technology in recent years, which is concerned for easier manipulation, higher targeting efficiency and wider range of applications. However, the research reports about the application of CRISPR/Cas system in bacteria and animals are more than in plants. In this review, the principle, structure, working mechanism and the progress of CRISPR/Cas system in plants were introduced in order to provide foundation to increase crop yield and cultivate resistant breeds by CRISPR/Cas system.

Key words: CRISPR; CRISPR/Cas; plant

基因组编辑技术 (genome editing) 是指在细胞染色体的特定位置点上, 通过对外源 DNA 元件基因组的改造, 从而达到定点改造基因组而获得预期生物遗传性状的技术^[1]。锌指核酸酶 (zinc-finger nu-

cleases, ZFNs)、类转录激活因子效应物核酸酶 (transcription activator like effector nucleases, TALENs) 和 CRISPR/Cas 系统 (成簇规律间隔短回文重复, clustered regularly interspaced short

收稿日期: 2016-11-02; 修改稿收到日期: 2016-12-27

基金项目: “十二五”国家科技支撑计划 (2011BAD12B03); 辽宁省科学事业公益研究基金 (2014002013); 辽宁省教育厅科学技术研究项目 (L2014251)

作者简介: 崔娜 (1968—), 女, 博士, 副教授, 主要从事发育分子生物学研究。E-mail: syaua@163.com

* 通信作者: 范海延, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事发育分子生物学研究。E-mail: hyfan74@163.com

palindromic repeat)是目前三大基因编辑技术,这些人工核酸酶都可以在 DNA 靶位点上进行定向切割,使 DNA 双链断裂(double strand breaks, DSBs),DNA 损伤后产生的 DSB 可以诱发细胞内两种不同的修复机制,即非同源末端连接(non-homologous ending-joining, NHEJ)和同源重组(homologous recombination, HR)^[2],对受损的 DNA 进行修复,从而达到定点编辑基因组的目的。ZFNs 和 TALENs 这两种技术不仅能够提高基因打靶的效率,而且实现了对靶基因的定点断裂和基因敲除,但因实验成本高、技术难度较大而使其在实验室中的应用受到限制^[3]。

CRISPR/Cas 系统是细菌与古生菌在漫长的进化历程中,不断抵御外源病毒或者质粒 DNA 入侵而形成的一种获得性免疫防御系统^[4]。CRISPR/Cas 系统是由一个成簇规则间隔的短回文重复序列(CRISPR)和其位点附近区域保守的 CRISPR 相关基因(Cas)组成,并且广泛分布于细菌、真菌和古生菌中。CRISPR/Cas 系统具有基因编辑效率高^[5]、可编辑基因范围广^[6]、诱导性和可逆性良好^[7]等特点,并能够对真核细胞进行基因编辑^[8],因此诸多科学家和研究者认为它是一种在医疗及生物工程等领域具有广阔应用前景的基因编辑技术,近几年越来越广泛的应用在植物基因编辑研究中。本文主要介绍了 CRISPR/Cas 系统的发现、结构及作用机制,并重点综述了 CRISPR/Cas 系统在植物中的应用研究进展。

1 CRISPR/Cas 系统简介

1.1 CRISPR/Cas 系统的发现概述

1987 年,日本研究人员 Ishino 等^[9]首次在大肠杆菌 K12 的碱性磷酸酶基因下游区域,发现被 32~33 bp 非重复序列间隔开的 DNA 串联重复序列,但是这个发现在当时并未引起重视。1995 年,Moijica 等^[10]发现地中海嗜盐古生菌(*Haloferax mediterranei*)和沃氏盐杆菌(*Haloferax volcanii*)基因组中都存在被 33~39bp 独立隔开的 30 bp 重复序列,Moijica 等^[11]在 2000 年提出把一定长度内由独特序列间隔开的有规律重复序列命名为短规律间隔重复序列(short regularly spaced repeats, SPSPs)。2002 年,Jansen 等^[12]将这种由非重复 DNA 序列间隔开的高度保守的重复序列,正式命名为成簇规律间隔短回文重复序列(CRISPR-clustered regularly interspaced short palindromic repeat)。

2005 年,3 个研究团队^[13-15]均发现 CRISPR 中的间隔序列与外源入侵的噬菌体或质粒的 DNA 序列具有高度一致性,这暗示着 CRISPR 序列可能通过特定的免疫保护机制来抵御外源遗传物质的入侵。随后在 2007 年,Barrangou 等^[4]在嗜热链球菌(*Streptococcus thermophilus*)中首次用实验证明了 CRISPR 系统是细菌或古生菌为抵御噬菌体入侵而形成的获得性免疫防御机制。

随后近 10 年里,随着细菌全基因组测定的完成以及研究技术的不断完善,CRISPR/Cas 系统不仅成功应用于细菌、动物和人类的多种细胞系^[16-23],而且在多种模式植物中也成功实现了定点的基因组突变,如水稻、小麦、烟草及拟南芥等^[24-27]。

1.2 CRISPR/Cas 系统的结构

CRISPR/Cas 系统是由 CRISPR 序列及其位点附近区域的一系列与 CRISPR 相关的保守基因(CRISPR-associated genes, Cas genes)组成(图 1)^[28]。CRISPR 是一种独特的 DNA 重复序列,它是由一个前导区(leader)、多个保守的重复序列(repeat)和多段间隔序列(spacer)构成。前导区一般位于 CRISPR 位点上游,是长度为 300~500 bp、富含 AT 碱基的序列。重复序列一般由长度为 23~50 bp 的碱基组成,序列的 5'端和 3'端相对保守,其序列为 GTTT/g 和 GAAAC。重复序列中具有可以形成发卡结构的二重对称性^[29]。间隔序列一般由长度为 17~84 bp 的碱基组成,其序列与外源噬菌体或质粒的基因组存在同源性^[9,30],甚至有一些间隔序列与噬菌体基因组序列完全一致^[31],这暗示着间隔序列来源于入侵的外源 DNA 组,当含有同样的外源序列入侵细菌机体时,可被机体识别并形成特异性免疫从而保护自身^[32]。

Cas 基因(CRISPR-associated genes, Cas genes)是一系列与 CRISPR 相关的保守基因。它是一类比较大的多态性基因家族,是 CRISPR 免疫防御系统的基本构成,其编码的蛋白质所具有的功能域能够与核酸互作,Cas 基因一般位于 CRISPR 位点下游或是分散于基因组的其他区域^[33-35]。Cas 基因有多种分类方式,其中一种是根据其保守程度分为核心 Cas 基因、亚型特异性 Cas 基因和 RAMP(repeat-associated mysterious proteins)组件基因^[33]。核心 Cas 基因分为 6 种,即 Cas1~Cas6,一般位于质粒或染色体上。其中因 Cas1 蛋白具有结合核酸内切酶活性,可以达到裂解外源 DNA 的目的,而使得 Cas1 基因成为最基本的成员,存在于含

有 CRISPR/Cas 系统的所有细菌中^[36]。Cas3 是一种解旋酶,可与核酸酶融合,进而在切割靶标基因的过程中发挥作用^[37]。亚型特异性 *Cas* 基因主要包含 *Cse*、*Csy*、*Csn*、*Csa*、*Cst*、*Cmr* 等基因家族,这些基因的作用和功能还有待研究。

2 CRISPR/Cas 系统的作用机制

目前研究发现的 CRISPR/Cas 系统有 3 种不同的类型^[38],即 I、II 和 III 型,其中 I 和 III 型均需要依赖庞杂的 *Cas* 蛋白系统来完成免疫过程,而 II 型中的 *Cas* 蛋白只有 1 种,即 Cas9,因其结构组成相对简单,所以也是目前研究最深入的类型。II 型的 CRISPR/Cas 系统一般经过 3 个阶段(图 2):适应、表达和干扰^[39]。在适应阶段,当外源 DNA 入侵细菌或古生菌后,通过非同源重组的方式将其一小段 DNA 序列(原型间隔序列,protospacer)整合到宿主菌的基因组中,整合的位置位于 CRISPR 位点 5'端的 2

个重复序列之间,同时每插入一段外源序列,其重复序列都会复制 1 次,从而获得可变的间隔区(spacer)。

宿主菌对所整合的 DNA 序列并非是随机的,研究发现,在 CRISPR 位点 5'端附近含有一些高度保守的特定序列,被称为前间区序列邻近序列(proto-spacer adjacent motifs,PAMs),但是其具体的作用机制还有待进一步的研究。在表达阶段,CRISPR 基因座首先被转录成 RNA,即前体 CRISPR RNA(pre-crRNA),在 *Cas* 蛋白和核酸酶的作用下对 pre-crRNA 进行剪切和加工,使其成为含有 spacer 序列的 crRNA (CRISPR-derived RNA)。在干扰阶段,当宿主菌再次受到外源 DNA 侵染时,crRNA 便会特异性结合其同源的外源 DNA 序列,然后通过 crRNA 与 *Cas* 蛋白形成的核糖核蛋白复合物^[40]对外源 DNA 序列进行切割,从而使宿主菌免受外源噬菌体或质粒的入侵,达到保护宿主菌的目的。

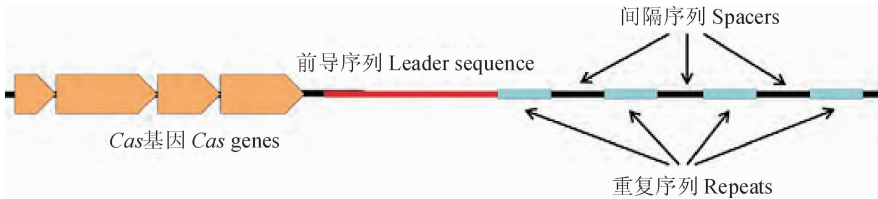


图 1 CRISPR 位点结构^[28]
Fig. 1 CRISPR locus structure^[28]

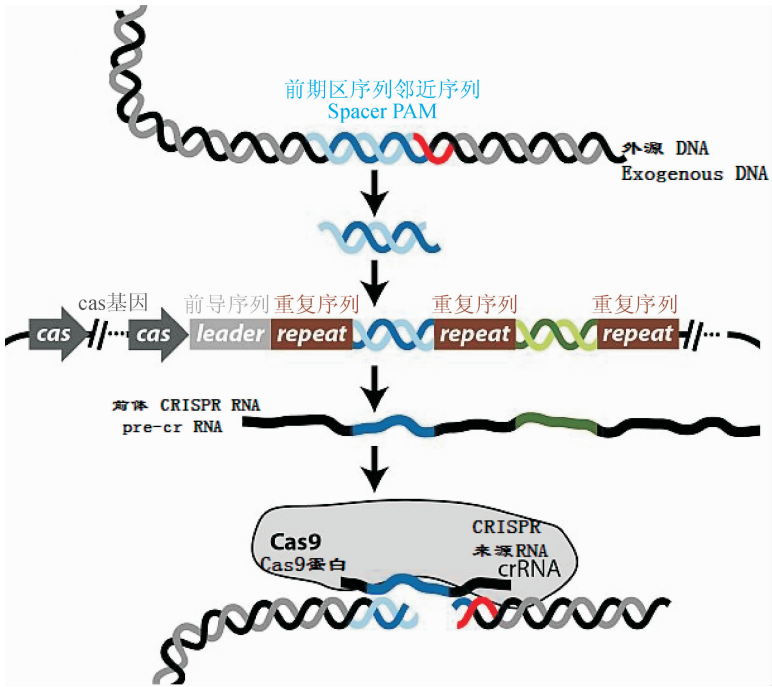


图 2 CRISPR/Cas9 作用机制^[40]
Fig. 2 Acting mechanism of CRISPR/Cas9^[40]

3 CRISPR/Cas 系统研究方法

CRISPR/Cas 系统通过特定启动子驱动 *sgRNA* 和 *Cas9* 基因的表达及融合,形成复合物^[40],进而特异性识别外源 DNA 序列,并对特定定位点进行定点编辑。CRISPR/Cas 基因组编辑技术较 ZFN 和 TALEN 技术简单、快速、高效、准确,但是其较高的脱靶效率成为其广泛应用的一大难题。

如何降低脱靶效应是高效利用 CRISPR/Cas 系统进行基因编辑的关键,而降低基因编辑中脱靶现象的前提是选择合适的 CRISPR/Cas 靶位点以及对脱靶情况的预测,鉴于此,很多设计 CRISPR/Cas 靶位点的网站应运而生。

何春梅等^[41]利用 CRISPR 序列的在线设计软件(<http://www.genome.arizona.edu/crispr/crisprsearch.html>)^[42]筛选出玉米 *ZmRSR1* 基因 5 个可能的 CRISPR 目标序列,并且全部替换正确,为提高玉米种子中淀粉含量,培育优质玉米品种奠定了基础。Patrick 研究团队^[43]所创立的网站(<http://www.genome-engineering.org/>)不仅可以对特定序列设计靶位点,还可以预测各靶位点的潜在脱靶情况。由德国癌症研究中心所开发的 E-Crisp(www.e-crisp.org/E-CRISP/designcrispr),可以对 5 种植物的基因组序列或单个序列设计 *sgRNA* 序列,也可以预测出 *sgRNA* 序列的特异性强弱^[44]。Xie 课题组^[42]所开发的网站(www.genome.arizona.edu/crispr)可以为 8 个代表性植物基因组预测低脱靶位点的 *sgRNAs*,这为植物的基因编辑和改良作物性状提供便利。由美国哈佛大学 Montague 研究组所开创的网站^[45](<https://chop-chop.rc.fas.harvard.edu/>),能够列举出准确的靶序列,并对 *sgRNAs* 的脱靶位点进行预测,但是能够利用该网站的植物只有拟南芥。

除此之外,还有可以设计高效 *sgRNAs* 的在线工具^[46](<http://www.broadinstitute.org/rnai/public/analysis-tools/sgrna-design>)以及为任意给定基因组或用户所提供的序列搜索潜在脱靶位点的在线工具^[47](<http://eendb.zfgenetics.org/casot&http://plants.ensembl.org/info/website/ftp/index.html>)。

除了选择合适的靶位点,筛选高效的 *Cas9* 蛋白或对其进行修饰改造也是提高打靶效率的一种有效途径。Lee 等^[48]将 *Sth Cas9* 蛋白替换成 *Spy Cas9* 蛋白,而 *SpyCas9* 可识别更长的 PAM 序列,从而

提高打靶效率。Slaymaker 等^[49]对化脓性链球菌 *Cas9* 蛋白(*streptococcus pyogenes Cas9 SpCas9*)的 3 个氨基酸序列进行改变,显著降低了脱靶效应。Kleinstiver 等^[50]对酶类 *Cas9* 的不同区域进行处理,通过改变其同 DNA 靶点接触的蛋白部分,显著提高了打靶效率。

4 CRISPR/Cas 编辑技术在植物研究中的应用

随着 CRISPR/Cas 编辑技术在人类细胞及模式动物应用方面的不断完善,近几年也在植物中得到了快速应用,并且成功实现了基因的定点编辑,为 CRISPR/Cas 系统在提高农作物产量及培育抗性品种方面的应用提供了基础^[51]。

Shan 等^[52]利用 CRISPR/Cas 成功地定点突变了水稻的 4 个基因,即 *PDS*、*MPK2*、*BADH2* 和 *Os02g23823*,同时获得 *PDS*、*MPK2* 以及 *BADH2* 这 3 个基因的定向突变体,并且在 T_0 代获得了可呈现白化和矮小表型的水稻纯合 *PDS* 突变体,同时敲除的还有小麦中与抗白粉病相关的 *MLO* 基因。在此项研究中,原生质体中的基因突变效率为 14.5%~38.0%,转基因水稻中的基因突变效率为 4.0%~9.4%。该项研究成果证明了 CRISPR/Cas 系统在植物中基因组定点编辑的可行性,同时为后续植物中通过 CRISPR/Cas 技术实现基因组定点突变奠定了基础。

Feng 等^[25]通过 CaMV 35S 启动子和 AtU6-26 启动子分别驱动 *Cas9* 基因和 *sgRNA* 表达,同时对拟南芥的 *BRI1*、*JAZ1* 和 *GAI* 基因和水稻的 *ROC5*、*SPP* 和 *YSA* 基因实现定点突变,而这些基因的缺失会在表型上体现出来,在 T_1 代拟南芥植株中,突变 *GAI* 基因可导致植株表型矮小;在 T_0 代水稻植株中,突变 *YSA* 基因可导致植株幼苗时期的叶片出现白化现象,突变效率为 5%~84%。该项研究第一次证实了 CRISPR/Cas 系统能够高效定向诱导拟南芥和水稻多基因突变,同时也证明了 CRISPR/Cas 系统不仅应用于拟南芥中,在水稻等作物中也可发挥作用。

Schimpl 等^[53]通过构建同一个 T-DNA 将 *Cas9* 蛋白、*sgRNA* 以及模板 DNA 整合到一起,进而转化到拟南芥中,通过诱导 DNA 双链断裂和同源重组的方式在 *AtADH1* 基因座中成功插入抗卡那霉素基因 *nptII*。该项成果证明了 CRISPR/Cas 系统在植物中定向引入外源 DNA 序列的可行性,为后

续插入目的基因获得植株的预期性状提供可能。

李苗苗等^[54]通过 TALEN 和 CRISPR 两种技术敲除拟南芥中与植株生长相关的 3 个基因 *IAA2*、*SIRT2*、*SAUR41*，并且获得 6 个组合的转基因 T_1 代株系，同时比较这 3 个基因在这两种体系下体细胞的突变效率，为进一步深入研究此 3 个基因在拟南芥生长过程中的功能提供了基础。

Brooks 等^[55]通过 CRISPR/Cas9 系统定点突变 *SLAGO7* 基因来验证该基因在番茄中的作用，该基因的缺失会在植株早期表型中有明显而快速的变化，即宽扁的叶片会变得又细又尖，这些表型上的变化使研究者能够快速判断出 T_0 代植株中 *SLAGO7* 基因是否突变，经验证其突变率为 48%，这证明了番茄中由 CRISPR/Cas9 系统介导的 *SLAGO7* 基因突变是高效的。

Nekrasov 等^[27]在烟草中通过 CaMV35S 和 AtU6 启动子驱动 *Cas9* 基因和 *sgRNA* 表达，同时对 *NbPDS* 基因进行突变，其突变效率为 1.8%~2.4%。雷建峰等^[56]应用 CRISPR/Cas9 基因组编辑技术，以拟南芥 U6 启动子驱动 *GGB sgRNA* 的 CRISPR/Cas9 载体表达，定点敲除了 *GGB* 基因，获得新的拟南芥 *ggb* 突变体，为验证其他作物 *GGB* 同源基因的功能提供互补转基因受体材料。

本实验室正在应用 CRISPR/Cas9 基因组编辑技术，定点敲除番茄中与蔗糖代谢相关的关键酶基因-蔗糖磷酸合成酶基因，及调控蔗糖磷酸合成酶基因表达的 14-3-3 基因，以期为研究 14-3-3 蛋白在番茄蔗糖代谢中的调控作用机制奠定基础。

综上所述，CRISPR/Cas 系统是在 DNA 断裂及损伤修复的基础上实现的基因组编辑功能，通过特定启动子驱动 *sgRNA* 和 *Cas9* 基因的表达并形成复合物^[40]，进而对不同物种的目标基因进行定点敲除、单核苷酸或多核苷酸片段的置换、添加等基因组靶向修饰。CRISPR/Cas 系统的广泛应用已成功

定点编辑拟南芥、水稻和小麦等作物的特定基因，并获得了预期性状。现有结果表明，单子叶植物水稻在 T_0 代就能够获得稳定遗传的转基因植株，而双子叶植物拟南芥则是在 T_2 代之后，这种结果的出现可能是由于植物的转基因方法不同或者是驱动 *Cas9*、*sgRNA* 表达的启动子不同所造成的^[28,57]。

5 问题与展望

与 TALENs、ZFNs 这两种相对成熟的技术相比，利用 CRISPR/Cas 系统来对靶基因进行定向编辑是项全新的技术，同时是在近几年才开始在动物、植物中应用的工具，具有操作简便、作用效率高等特点，甚至应用 CRISPR/Cas9 技术可一次性构建多突转基因鼠^[19]，这为未来针对多基因关联突变致病的研究奠定了基础。但是，应用 CRISPR/Cas 系统来编辑基因也存在一定缺陷。其一，CRISPR 体系需要识别靶位点后的 PAM 元件才能对序列进行切割，这就对所选择的序列造成一定的局限性；其二，CRISPR 识别靶位点主要依赖于靶位点后 PAM 元件的 20bp 核苷酸序列，这就导致 CRISPR/Cas 系统的脱靶率较高。有研究表明^[58]当 CRISPR/Cas 系统中最多有 5 个碱基发生错配时，其系统仍会对靶位点进行切割，但是脱靶现象就会产生。如何降低脱靶率、如何选择靶序列中特异性较高的位置将是提高 CRISPR/Cas 系统应用效率的关键。

尽管 CRISPR/Cas 系统在编辑基因时存在一定缺陷，但是无法否认其作为第三大编辑技术所带来的突破，在基因定向编辑、靶向治疗所具有的广阔前景。有研究表明^[56,59]，在拟南芥和 水稻中 CRISPR/Cas 系统具有较高的特异性，这使得利用 CRISPR/Cas 系统优化农作物小麦、水稻性状，提高作物的抗逆性、抗病性成为可能。同时，随着 CRISPR/Cas 技术的不断发展和完善，CRISPR/Cas 系统也将在未来基因编辑研究中发挥更大的作用。

参考文献：

[1] CHAMBERLAIN J R, SCHWARZE U, WANG P R, *et al.* Gene targeting in stem cells from individuals with osteogenesis imperfecta[J]. *Science*, 2004, **303**(5 661): 1 198-1 201.

[2] MAHFOUZ M M, LI L X, SHAMIMUZZAMAN M, *et al.* De novo-engineered transcription activator-like effector (TALE) hybrid nuclease with novel DNA binding specificity creates double-strand breaks[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 2011, **108**(6): 2 623-2 628.

[3] SHAN Q W, WANG Y P, LI J, *et al.* Genome editing in rice and wheat using the CRISPR/Cas system[J]. *Nature Protocols*, 2014, **9**(10): 2 395-2 410.

[4] BARRANGOU R, FREMAUX C, DEVEAU H, *et al.* CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes[J]. *Science*, 2007, **315**(5 819): 1 709-1 712.

[5] DING Q R, REGAN S N, XIA Y L, *et al.* Enhanced efficien-

- cy of human pluripotent stem cell genome editing through replacing TALENs with CRISPRs[J]. *Cell Stem Cell*, 2013, **12**(4): 393-394.
- [6] BROUNS S J J, JORE M M, LUNDGREN M, *et al.* Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes [J]. *Science*, 2008, **321**(5 891): 960-964.
- [7] QI L S, LARSON M H, GILBERT L A, *et al.* Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression[J]. *Cell*, 2013, **152**(5): 1 173-1 183.
- [8] HWANG W Y, FU Y F, REYON D, *et al.* Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system[J]. *Nature Biotechnology*, 2013, **31**(3): 227-229.
- [9] ISHINO Y, SHINAGAWA H, MAKINO K, *et al.* Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product[J]. *Journal of Bacteriology*, 1987, **169**(12): 5 429-5 433.
- [10] MOJICA F J M, FERRER C, JUEZ G, *et al.* Long stretches of short tandem repeats are present in the largest replicons of the Archaea *Haloferax mediterranei* and *Haloferax volcanii* and could be involved in replicon partitioning[J]. *Molecular Microbiology*, 1995, **17**(1): 85-93.
- [11] MOJICA F J M, DÍZE-VILLASENOR C, SORIA E, *et al.* Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria[J]. *Molecular Microbiology*, 2000, **36**(1): 244-246.
- [12] JANSEN R, VAN EMBDEN J D, GAASTRA W, *et al.* Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes[J]. *Molecular Microbiology*, 2002, **43**(6): 1 565-1 575.
- [13] BOLOTIN A, QUINQUIS B, SOROKIN A, *et al.* Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin[J]. *Microbiology*, 2005, **151**(Pt 8): 2 551-2 561.
- [14] MOJICA F J M, DÍEZ-VILLASEOR C, GARCÍA-MARTÍNEZ J, *et al.* Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements [J]. *Journal of Molecular Evolution*, 2005, **60**(2): 174-182.
- [15] POURCEL C, SALVIGNOL G, VERGNAUD G. CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies[J]. *Microbiology*, 2005, **151**(Pt 3): 653-663.
- [16] JIANG W Y, BIKARD D, COX D, *et al.* RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems[J]. *Nature Biotechnology*, 2013, **31**(3): 233-239.
- [17] DICARLO J E, NORVILLE J E, MALI P, *et al.* Genome engineering in *Saccharomyces cerevisiae* using CRISPR-Cas systems [J]. *Nucleic Acids Research*, 2013, **41**(7): 4 336-4 343.
- [18] CONG L, RAN F A, COX D, *et al.* Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems[J]. *Science*, 2013, **339**(6 121): 819-823.
- [19] WANG H Y, YANG H, SHIVALILA C S, *et al.* One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering [J]. *Cell*, 2013, **153**(4): 910-918.
- [20] MALI P, YANG L H, ESVALE K M, *et al.* RNA-guided human genome engineering via Cas9 [J]. *Science*, 2013, **339**(6121): 823-826.
- [21] GRATZ S J, CUMMINGS A M, NGUYEN J N, *et al.* Genome engineering of *Drosophila* with the CRISPR RNA-guided Cas9 nuclease [J]. *Genetics*, 2013, **194**(4): 1 029-1 035.
- [22] FRIEDLAND A E, TZUR Y B, ESVELT K M, *et al.* Heritable genome editing in *C. elegans* via a CRISPR-Cas9 system[J]. *Nature Methods*, 2013, **10**(8): 741-743.
- [23] LI D L, QIU Z W, SHAO Y J, *et al.* Heritable gene targeting in the mouse and rat using a CRISPR-Cas system[J]. *Nature Biotechnology*, 2013, **31**(8): 681-683.
- [24] SHAN Q W, WANG Y P, LI J, *et al.* Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system[J]. *Nature Biotechnology*, 2013, **31**(8): 686-688.
- [25] FENG Z Y, ZHANG B T, DING W N, *et al.* Efficient genome editing in plants using a CRISPR/Cas system[J]. *Cell Research*, 2013, **23**(10): 1 229-1 232.
- [26] LI J F, NORVILLE J E, AACH J, *et al.* Multiplex and homologous recombination-mediated genome editing in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana* using guide RNA and Cas9 [J]. *Nature Biotechnology*, 2013, **31**(8): 688-691.
- [27] NEKRASOV V, STASKAWICZ B, WEIGEL D, *et al.* Targeted mutagenesis in the model plant *Nicotiana benthamiana* using Cas9 RNA-guided endonuclease[J]. *Nature Biotechnology*, 2013, **31**(8): 691-693.
- [28] 瞿礼嘉,郭冬妹,张金喆,等. CRISPR/Cas 系统在植物基因组编辑中的应用[J]. *生命科学*, 2015, **27**(1): 64-70.
- QU L J, GUO D S, ZHANG J Z, *et al.* The application of CRISPR/Cas system in plant genome editing [J]. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 2015, **27**(1): 64-70.
- [29] GRISSA I, VERGNAUD G, POURCEL C. The CRISPR database and tools to display CRISPRs and to generate dictionaries of spacers and repeats[J]. *BMC Bioinformatics*, 2007, **8**(1): 172-181.
- [30] BOCH J, SCHOLZE H, SCHORNACK S, *et al.* Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors [J]. *Science*, 2009, **326**(5 959): 1 509-1 512.
- [31] HORVATH P, ROMERO D A, COÛTÉ-MONVOISIN A C, *et al.* Diversity, activity, and evolution of CRISPR loci in *Streptococcus thermophilus*[J]. *Journal of Bacteriol*, 2008, **190**(4): 1 401-1 412.
- [32] 李 辉,施振旦. CRISPR/Cas9 新型基因打靶系统的研究进展[J]. *江苏农业学报*, 2013, **29**(4): 907-911.
- LI H, SHI Z D. Research progress of gene targeting technology of CRISPR/Cas9 system[J]. *Jiangsu Journal of Agricultural Sciences*, 2013, **29**(4): 907-911.
- [33] HAFT D H, SELENGUT J, MONGODIN E F, *et al.* A guild of 45 CRISPR-associated(Cas) protein families and multiple CRISPR/Cas subtypes in prokaryotic genomes[J]. *PLoS*

- Computational Biology*, 2005, **1**(6): 474-483.
- [34] GODDE J S, BICKERTON A. The repetitive DNA elements called CRISPRs and their associated genes: evidence of horizontal transfer among prokaryotes[J]. *Journal of Molecular Evolution*, 2006, **62**(6): 718-729.
- [35] JANSEN R, VAN EMBDEN J D A, GAASTRA W, *et al.* Identification of a novel family of sequence repeats among prokaryotes[J]. *OMICS*, 2002, **6**(1): 23-33.
- [36] VAN DER OOST J, JORE M M, WESTRA E R, *et al.* CRISPR-based adaptive and heritable immunity in prokaryotes[J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 2009, **34**(8): 401-407.
- [37] SINKUNAS T, GASIUNAS G, FREMAUX C, *et al.* Cas3 is a single-stranded DNA nuclease and ATP-dependent helicase in the CRISPR/Cas immune system[J]. *The EMBO Journal*, 2011, **30**(7): 1 335-1 342.
- [38] MAKAROVA K S, HAFT D H, BARRANGOU R, *et al.* Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2011, **9**(6): 467-477.
- [39] GUO S C, LV Y, LIN Y X, *et al.* CRISPR/Cas9 systems: the next generation gene targeted editing tool[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, 2015, **85**(2): 377-387.
- [40] SAMANTA M K, DEY A, GAYEN S. CRISPR/Cas9: an advanced tool for editing plant genomes[J]. *Transgenic Research*, 2016, **25**(5): 561-573.
- [41] 何春梅, 刘铁山, 关海英, 等. 一种玉米 CRISPR/Cas9 载体的构建[J]. *山东农业科学*, 2016, **48**(11): 9-12.
- HE C M, LIU T S, GUAN H Y, *et al.* Construction of a maize CRISPR/Cas9 vector[J]. *Shandong Agricultural Sciences*, 2016, **25**(5): 561-573.
- [42] XIE K, ZHANG J, YANG Y. Genome-wide prediction of highly specific guide RNA spacers for CRISPR-Cas9-mediated genome editing in model plants and major crops[J]. *Molecular Plant*, 2014, **7**(5): 923-926.
- [43] HSU P D, SCOTT D A, WEINSTEIN J A, *et al.* DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases[J]. *Nature Biotechnol*, 2013, **31**(9): 827-832.
- [44] HEIGWER F, KERR G, BOUTROS M. E-CRISPR: fast CRISPR target site identification[J]. *Nature Methods*, 2014, **11**(2): 122-123.
- [45] MONTAGUE T G, CRUZ J M, GAGNON J A, *et al.* CHOPCHOP: a CRISPR/Cas9 and TALEN web tool for genome editing[J]. *Nucleic Acids Research*, 2014, **42**(1): 401-407.
- [46] DOENCH J G, HARTENIAN E, GRAHAM D B, *et al.* Rational design of highly active sgRNAs for CRISPR-Cas9-mediated gene inactivation[J]. *Nature Biotechnology*, 2014, **32**: 1 262-1 267.
- [47] XIAO A, CHENG Z C, KONG L, *et al.* CasOT: a genome-wide Cas9/gRNA off-target searching tool[J]. *Bioinformatics*, 2014, **30**(8): 1 180-1 182.
- [48] LEE C M, CRADICK T J, BAO G. The *Neisseria meningitidis* CRISPR-Cas9 system enables specific genome editing in mammalian cells[J]. *Molecular Therapy*, 2016, **24**(3): 645-654.
- [49] SLAYMAKER I M, GAO L Y, ZETSCHE B, *et al.* Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity[J]. *Science*, 2016, **351**(6 268): 84-88.
- [50] KLEINSTIVER B P, PATTANAYAK V, PREW M S, *et al.* High-fidelity CRISPR-Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects[J]. *Nature*, 2016, **529**: 490-495.
- [51] LIU D G, HU R B, PALLA K J, *et al.* Advances and perspectives on the use of CRISPR/Cas9 systems in plant genomics research[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2016, **30**: 70-77.
- [52] SHAN Q W, WANG Y P, LI J, *et al.* Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system[J]. *Nature Biotechnology*, 2013, **31**(8): 686-688.
- [53] SCHIML S, FAUSER F, PUCHTA H. The CRISPR/Cas system can be used as nuclease for *in planta* gene targeting and as paired nickases for directed mutagenesis in *Arabidopsis* resulting in heritable progeny[J]. *The Plant Journal*, 2014, **86**(6): 1 139-1 150.
- [54] 李苗苗. 两种基因定点敲除技术 TALEN 和 CRISPR 在拟南芥中的应用[D]. 杭州: 浙江大学, 2014.
- [55] BROOKS C, NEKRASOV V, LIPPMAN Z B, *et al.* Efficient gene editing in tomato in the first generation using the Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR-Associated9 system[J]. *Plant Physiology*, 2014, **166**: 1 292-1 297.
- [56] 雷建峰, 徐新霞, 李月, 等. CRISPR/Cas9 介导靶向敲除拟南芥 GGB 基因突变体的鉴定[J]. *西北植物学报*, 2016, **36**(5): 857-864.
- LEI J F, XU X X, LI Y, *et al.* Identification of GGB mutant caused by CRISPR/Cas9 in *Arabidopsis*[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2016, **36**(5): 857-864.
- [57] FENG Z Y, MAO Y F, XU N F, *et al.* Multigeneration analysis reveals the inheritance, specificity, and patterns of CRISPR/Cas-induced gene modifications in *Arabidopsis*[J]. *Proceedings of the National Academy Sciences of the USA*, 2014, **111**(12): 4 632-4 237.
- [58] FU Y F, FODEN J A, KHAYTER C, *et al.* High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells[J]. *Nature Biotechnology*, 2013, **31**(9): 822-826.
- [59] ZHANG H, ZHANG J S, WEI P L, *et al.* The CRISPR/Cas9 system produces specific and homozygous targeted gene editing in rice in one generation[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2014, **12**(6): 797-807.

(编辑: 宋亚珍)