

## 综述 Reviews

## CRISPR/Cas9基因组编辑技术在植物基因功能研究及植物改良中的应用

曾秀英<sup>1</sup>, 侯学文<sup>1,2,\*</sup>华南农业大学生命科学学院<sup>1</sup>植物逆境生物学研究中心; <sup>2</sup>广东省植物功能基因组与生物技术重点实验室, 广州510642

**摘要:** CRISPR/Cas是发现于细菌和古细菌基因组中的特殊结构, 参与细菌和古细菌破坏噬菌体和外源质粒的免疫保护。科学家将II型CRISPR/Cas改造成为一个组装简便、高效和精准的基因组编辑工具, 并迅速在动物、植物和微生物基因功能研究和遗传改造中获得广泛应用。本文介绍CRISPR/Cas9技术出现近两年来, 在水稻、小麦、高粱、拟南芥、烟草、甜橙等植物中的研究情况, 在此基础上对该技术的优点和需要进一步改进的地方提出了看法。

**关键词:** 成簇的、规律间隔的短回文重复序列; 成簇的、规律间隔的短回文重复序列相关核酸酶9; 基因组编辑技术; 植物基因功能; 植物改良

## Application of CRISPR/Cas9 Genome Editing Technology in Functional Genomics and Improvement of Plants

ZENG Xiu-Ying<sup>1</sup>, HOU Xue-Wen<sup>1,2,\*</sup><sup>1</sup>Research Center of Plant Stress Biology, <sup>2</sup>Key Laboratory of Plant Functional Genomics and Biotechnology, Education Department of Guangdong Province, College of Life Sciences, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China

**Abstract:** CRISPR/Cas is a specific gene structure found in the genome of bacteria and archaea, and is the immune system of bacteria and archaea involved in destroying phage and exogenous plasmids. CRISPR/Cas9, a convenient, precise and efficient genome editing technology, was developed according to the mechanism of type II CRISPR/Cas recently. From then on this technology has been broadly utilized to study gene functions and genetic modification of animal, plant and microorganism. The recent developments of CRISPR/Cas9 genome editing technology in rice, wheat, sorghum, *Arabidopsis*, tobacco and sweet orange, etc, were analyzed in detail in this paper. The advantages and further improvement aspects of this technology were also discussed at the end of this paper.

**Key words:** CRISPR; CAS9; genome editing technology; plant gene function; plant improvement

自从1956年Crick提出中心法则以来, 基因组DNA是遗传信息携带者的观念就已经确立。此后人们也开发了许多调控基因表达的技术, 如超表达技术(Prellich 2012)、T-DNA插入(Krysan等1999)、转座子技术(Zhang等2005)、反义技术(Bourque 1995)、RNAi技术(Kusaba 2004)和miRNA技术(Gupta 2015)等等, 虽然这些技术都能调控相关基因的表达, 但它们均不能对目标基因进行准确的直接修饰, 因而还不能称为基因组编辑技术。开发出精准、简便和高效的基因组编辑技术一直是分子生物学家的梦想。经过多年的努力, 目前已经拥有锌指核酸酶(zinc finger nucleases, ZFNs)(Urnov等2010)、转录因子样效应物核酸酶(transcription activator-like effector nucleases, TALENs)

(Bedell等2012)和成簇的、规律间隔的短回文重复序列相关核酸酶9系统(clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated 9, CAS9)(Mali等2013)这3类基因组编辑技术。ZFNs出现于上世纪90年代, TALENs出现于2011年, CAS9出现于2013年初, 它们均能对植物、动物和微生物进行基因组编辑, 这3类技术共同的特点是均由DNA序列识别元件和非特异核酸酶两部分构成, 不同点是它们实现DNA序列识别的方式(Gaj等2013)。ZFNs和TALENs技术的原理和应用已经有

收稿 2015-03-27 修定 2015-08-19

资助 国家自然科学基金(30971709)。

\* 通讯作者(E-mail: hxw1969@scau.edu.cn; Tel: 020-85287961)。

很多文章介绍(de Pater等2009; Wood等2011; Li等2012; 李奇和安海龙2013)。CRISPR/CAS9的技术原理、发现历程等也在多篇文章中有详细介绍(Horvath和Barrangou 2010; Jinek等2012), 本文将对近期CRISPR/Cas9在植物基因功能研究及改良中的应用进行梳理, 探讨其优缺点并展望其应用前景, 以便促进该技术在植物研究领域中的应用。

## 1 CRISPR/Cas9系统在单子叶植物中的应用

### 1.1 水稻

水稻不仅是单子叶模式植物, 同时也是具有全球意义的重要粮食作物, 因此对水稻的研究具有明显的双重意义。Shan等(2013)报道用针对相应靶基因的sgRNA和含核定位信号且用水稻偏好密码子优化的CAS9共同转化水稻原生质体, 结果表明针对*OsPDS*的突变率在14.5%至20%之间, 针对*OsBAHD2*、*Os02g23823*和*OsMPK2*的插入/缺失比例在26.5%至38%之间; 他们用CAS9、sgRNA和靶位点同源的单链DNA共同侵染水稻原生质体, 在29个克隆中找到了2个同源修复(homology directed repair, HDR)。随后他们用基因枪法转化水稻胚性愈伤组织, 针对*OsPDS-SPI*打靶, 在获得的96条独立的转基因水稻株系中, 发现了9条突变株系(9.4%), 其中3株双等位基因突变的株系具有矮化和白化的特征表型; 针对*OsBAHD2*打靶, 在98条独立的转基因水稻株系中, 发现了7条突变株系(7.1%)。为了进一步提高转化效率, Feng等(2013)将由*OsU6-2*启动子驱动的sgRNA和35S启动子驱动的含核定位信号并优化的*hSpCAS9*亚克隆到同一个表达载体中, 选取了水稻*ROC5*、*SPP*和*YSA*三个易于观察表型的基因进行研究, 在获得的T<sub>1</sub>代转基因株系中突变效率除*SPP*仅为5%外, 其余两个基因高达26%~84%, 且大约10%的T<sub>1</sub>代*YSA*是纯合突变株系。Miao等(2013)采用玉米UBI启动子驱动带有NLS信号且水稻编码优化的CAS9和U3启动子驱动sgRNA的表达载体, 为了有助于CAS9的结合和R环的形成, 他们采用含活动间隔子、延长的发夹区和长的3'末端的sgRNA。针对*CHLORO-PHYLL OXYGENASE 1 (CAOI)*获得的30株转基因株系, 其中25株(83.3%)在PAM上游有3~4个碱基的插入或缺失, 其中4个株系(13.3%)是纯合子; 针对*LAZY1*获得的12株转基因株系中有11株(91.6%)在PAM上游存在碱基的插入或缺失, 其中6个株系

(50%)是纯合子。Zhang等(2014)针对*OsPDS*、*OsPMS3*、*OsEPSPS*、*OsDERF1*、*OsMSH1*、*OsMYB5*、*OsMYB1*、*OsROC5*、*OsSPP*和*OsYSA*基因分别设计sgRNA, 获得的T<sub>0</sub>代转基因株系中平均44.4%产生了突变, 其中7.7%的突变株系是纯合突变。对于T<sub>0</sub>代是纯合的突变株系, T<sub>1</sub>代能够稳定遗传下去; 对于T<sub>0</sub>代2个等位基因发生不同突变的突变株系, T<sub>1</sub>代按照经典的孟德尔遗传规律进行分离, 上述两种情况均没有发生新的突变和回复突变。采用全基因组深度测序, 在这些转基因株系中没有发现大规模的脱靶现象, 只是在一个与靶位点仅相差1 bp的地方发现了低频率的脱靶现象(9.7%), 说明可以通过精心选择靶位点来降低或消除脱靶现象。我们分别针对*OsRUS1*与*OsRUS2*设计了sgRNA, 通过农杆菌介导的胚性愈伤侵染, 在获得的独立的T<sub>0</sub>代转基因苗中, 测序分析表明, 有部分转基因苗出现插入或缺失突变(未发表资料)。

CRISPR/Cas9技术不仅能在基因功能的研究中发挥作用, 而且还可用来创造出有用的育种材料。水稻苯达松敏感致死基因*BEL*的功能缺失将使水稻失去对苯达松和磺酰脲类除草剂的抗性, 如果将敏感突变体*bel*用于两系法杂交水稻生产, 就可避免因不育系的自交而产生的杂交制种的污染。Xu等(2014)将2个35S启动子驱动植物密码子优化的*pSpCAS9*和拟南芥U6-26启动子驱动的以水稻*BEL*为靶标的sgRNA整合于一个表达载体中, 通过农杆菌侵染转化水稻胚性愈伤, 在获得的90条独立的转基因株系中, 发现了14条株系发生插入、缺失突变, 其中有部分是纯合突变株, 并表现出对除草剂苯达松敏感的表型, 为拓宽杂交水稻的亲本材料和杂交制种的安全性提供了新的途径。他们的研究还发现CAS9的表达水平、靶位点的核酸组成(GC含量)以及靶区域的表现遗传等对基因突变的效率均有影响。这些研究报告充分表明, CRISPR/Cas9基因编辑技术可以成功地对水稻基因进行编辑, 不仅在阐明基因的功能方面, 而且在水稻品种改良方面具有良好的应用前景。

### 1.2 小麦

小麦是重要的粮食作物之一, 获得对小麦基因组的编辑能力对小麦基因功能研究和作物改良具有重要意义。面包小麦是异源六倍体, 大部分基因具有3个相似但不完全相同的拷贝, 再加上基

基因组巨大(17 000 Mb)和高达80%~90%的重复序列,使得对其基因组的改造难度较大。Shan等(2013)采用如前所述的编辑水稻基因组的载体构建策略,针对小麦*TaMLO*基因,以小麦原生质体为材料,结果表明小麦原生质体突变效率在30%左右。Wang等(2014)设计了针对*TaMLO-A1*的sgMLO-A1,在72条T<sub>0</sub>代转基因株系中找到4条独立的突变株系(5.6%),与用TALEN技术获得的突变率相当,他们正在大量的突变株系中筛选3个*TaMLO*基因均发生突变的株系,因为3个*TaMLO*基因同时突变可以赋予小麦对白粉病的抗性。由于CRISPR/Cas9能够同时对几个靶基因进行编辑,使得该技术在小麦等异源多倍体植物的基因功能研究和遗传改良方面,相比其它技术更有优势。

### 1.3 玉米

玉米不仅是研究植物遗传和基因功能的重要模式植物,而且还是粮食、饲料、发酵及生物质能源的重要原料。虽然植酸中的磷大约占玉米种子总磷的75%,但植酸是抗营养因子,不能被单胃动物消化,排泄到环境中造成污染,因此降低玉米中的植酸含量具有非常重要的意义。Liang等(2014)针对玉米中植酸合成的关键酶基因*ZmIPK*构建了2个不同位点的CRISPR/Cas9载体,靶位点1含*SacI*酶切位点,靶位点2含*BamHI*酶切位点,采用PEG介导的方法转化玉米原生质体,在暗中培育48 h后提取基因组DNA进行PCR-RE (PCR-限制性酶切)分析,靶位点1和2的突变频率分别为16.4%和19.1%,测序分析表明发生了不同程度的插入与缺失。这一研究说明CRISPR/Cas9在改良玉米品质方面可能起到重要作用。

### 1.4 高粱

高粱是禾本科中重要的粮食和经济作物,提高其产量和品质也是作物基因工程重要的研究内容。Jiang等(2013)构建了Y158农杆菌双元表达载体,在T-DNA中含有4个独立基因:玉米泛素I启动子驱动的错码的红色荧光蛋白基因*DsRED2*;水稻ACTIN I启动子驱动的适合单子叶植物表达的*CAS9*;水稻U6启动子驱动的sgRNA (针对*DsRED2*编码起始区);以及CaMV 35S启动子驱动的*GFP-NPTII*融合基因,起抗性筛选及观察作用。用农杆菌介导法转化高粱未成熟胚,2周后筛选到了具GFP荧光的稳定转化细胞,18个具GFP荧光的稳

定转化的细胞株中有5个具有*DsRED2*红色荧光,考虑到仅有三分之一的可能性将错码的基因校正为具正确读码的*DsRED2*,说明该Cas9系统在高粱胚中的编辑效率还是很高的。

## 2 CRISPR/Cas9系统在双子叶植物中的应用

### 2.1 拟南芥

拟南芥是最重要的双子叶模式植物,对它的研究推动了植物科学的快速发展。Li等(2013)将密码子优化适合在植物中表达的*pcoCAS9*置于35SPPDK杂合组成型启动子驱动,针对拟南芥*AtPDS*基因的sgRNA由拟南芥U6启动子驱动,将此两个质粒1:1转化拟南芥原生质体,获得大约5.6%的突变频率;同样将针对*AtFLS2*的sgRNA与*pcoCAS9*按1:1共转化拟南芥原生质体,获得大约1.1%的突变频率。为了验证该技术在整体植株中是否同样有效,他们将针对*AtPDS3*的sgRNA和*pcoCAS9*亚克隆于同一个植物表达载体中,用农杆菌注射法侵染拟南芥叶片,测序分析表明突变频率为2.7%。为了检测该技术的专一性,从*AtRACK1b*和*AtRACK1c*选择一段相同序列作为靶点,而与*AtRACK1a*仅有2个核苷酸不同,实验结果表明,*AtRACK1b*和*AtRACK1c*分别获得2.5%与2.7%的突变频率,但*AtRACK1a*却未发现任何突变。针对*AtPDS3*设计了2个靶点的sgRNA与*pcoCAS9*共转化,发现这两个靶点的突变频率达7.7%,说明该技术可以对多个位点进行编辑。这些研究表明,CRISPR/Cas9技术对拟南芥原生质体及叶片细胞中的靶基因可以相当特异地进行编辑。

CRISPR/Cas9在编辑拟南芥植株中靶基因的能力又如何呢?Feng等(2013)针对*BRI1*设计了3个不同位点的sgRNA,针对*JAZ1*设计了1个sgRNA,针对*GAI*设计了1个sgRNA,分别将它们与带核定位信号的*CAS9*亚克隆于植物表达载体中,通过浸花法转化拟南芥。针对*BRI1*的T<sub>1</sub>代50%以上表现出生长延迟及卷叶的*bri1*突变体的表型;针对*GAI*的T<sub>1</sub>代25%以上表现出矮化的表型。虽然在针对*JAZ1*的T<sub>1</sub>代没有发现突变体的表型,通过靶位点RE-PCR (限制性酶切-PCR)分析,发现在T<sub>1</sub>代中有30%至84%的突变频率。而且还在多数的T<sub>1</sub>代转基因株系中发现2种以上的突变类型,说明在植株的生长发育过程中,CAS9可能在持续发挥作用。Mao等(2013)将分别针对镁离子螯合酶亚基I的



*CHLI1*和*CHLI2*的sgRNA与*CAS9*同时亚克隆到一个植物表达载体中,通过农杆菌介导法转化拟南芥,在60个T<sub>1</sub>代转化子中,有23株因为严重的白化表型不能形成真叶而死亡,其余株系生长缓慢,并且多数株系的叶片具有嵌合色。选择3株具嵌合色叶片的转基因株系进行测序分析,发现3个株系的2个基因均发生突变。另外针对*TT4*基因的2个靶位点,这两个位点之间间隔230 bp,在58株T<sub>1</sub>代转基因株系中,89%的株系在第一个位点有突变,84%的株系在第二个位点有突变,74%的T<sub>1</sub>代植株在2个位点均存在突变,其中26%的株系在2个位点之间出现了大片的缺失,表明该技术不仅可以对2个以上基因进行编辑,而且可以进行大片的基因缺失。这些研究报告表明,CRISPR/Cas9能在拟南芥基因组的编辑上发挥高效作用,对基因功能的研究将起到十分积极的作用。

## 2.2 大豆

大豆富含油脂和蛋白,是重要的油料作物和植物蛋白的来源。Sun等(2015)分别用来自拟南芥的AtU6启动子和大豆的GmU6启动子,构建了针对大豆*Gm06g14180*、*Gm08g02290*和*Gm12g37050*的CRISPR/Cas9载体,利用PEG介导的方法转化大豆原生质体,培养48 h后提取转化原生质体的DNA,采用RE-PCR分析法表明靶位点发生了突变,测序分析进一步表明*Gm06g14180*和*Gm12g37050*的靶位点发生了碱基的替换,*Gm08g02290*的靶位点发生了碱基的替换和缺失。他们进一步采用含上述CRISPR/Cas9载体的毛根农杆菌K599侵染大豆下胚轴获得毛状根,提取DNA后采用PCR-RE分析表明,单等位基因和双等位基因的突变均存在;测序分析表明,不同基因的突变形式也有所不同,多数*Gm06g14180*的突变是单碱基的插入,*Gm08g02290*和*Gm12g37050*的突变大都是多个碱基的缺失。使用大豆GmU6启动子的打靶效率明显高于使用拟南芥AtU6启动子的打靶效率;在原生质体和毛状根转化体系中均发现了一定的脱靶现象。Jacobs等(2015)构建了针对*GFP*的5'和3'的两个CRISPR/Cas9载体,采用毛根农杆菌K599介导侵染大豆Jack-GFP子叶获得毛状根,在针对*GFP* 5'的靶位点获得的17个毛状根中15个失去了*GFP*荧光,而针对*GFP* 3'的靶位点获得的22个毛状根中仅4个失去了*GFP*荧光,可见针对5'的效率远高于3'的。接着他

们构建了针对9个大豆内源基因的CRISPR/Cas9载体,分别用毛根农杆菌介导获得毛状根和基因枪法转化体细胞胚,在毛状根转化事件中有7个基因的平均插入-缺失频率达到70%以上,这比用TALEN技术获得的3%~7%突变频率高了10多倍;采用体细胞胚的转化事件,发现突变频率随着培养时间的延长而增加,说明CAS9可持续对野生型靶位点发挥作用。在其中两个基因的CRISPR/Cas9载体的转化事件中发现了脱靶现象,但脱靶事件发生频率远低于靶位点的突变频率,如针对靶位点*Gm11g07220*的突变频率高达95%~100%,发生在*Gm01g38150*的脱靶频率2%~13%。这些研究表明CRISPR/Cas9技术在编辑、改良大豆基因方面能起到重要作用。

## 2.3 烟草

烟草是重要的双子叶模式植物之一,同时也是重要的经济作物。Nekrasov等(2013)将拟南芥U6启动子驱动针对烟草*PDS*基因的sgRNA和*CAS9-GFP*质粒的工程农杆菌注射烟草叶片,2 d后提取注射区域组织的DNA。因为靶位点含有*MlyI*酶切位点,采用RE-PCR方法分析表明突变率为1.8%~2.4%。将此片段克隆,挑选20个不同的克隆测序,发现其中17个具有插入/缺失,分属于9种类型。他们进一步将注射上述工程农杆菌的叶片在抗性培养基上筛选,用再生植株的叶片提取DNA分析,在30株再生植株中发现2株发生了突变。其中一株含1种突变和野生型DNA,说明可能是杂合体或嵌合体;另外一株存在4种突变和野生型DNA,表明是嵌合体。Li等(2013)采用与前述拟南芥中相同的sgRNA:*pcoCAS9*构建策略,针对烟草中的*PDS*设计了2个靶位点,在烟草原生质体中位点1的突变率为37.7% (43/114),位点2的突变率为38.5% (25/65),并且主要出现多碱基的缺失或插入,而极少出现拟南芥那样单碱基的插入缺失或替换,目前尚不清楚这种现象与植物种类抑或其生理状态有关。为了研究HDR同源修复效率,在针对烟草*PDS*位点1突变时,除sgRNA:*pcoCAS9*外,还提供含*AvrII*酶切位点的547 bp的同源序列供体,该片段PCR的*AvrII*酶切分析表明,HDR替换率为10.7%;测序表明HDR替换率为9.0%。这一技术为定点、高效及简便地插入基因片段提供了方便的技术手段。

## 2.4 甜橙

柑橘是世界范围广泛种植的水果,采用分子育种技术对其品质进行改良是今后育种的方向。Jia和Wang (2014)将针对CsPDS基因的sgRNA与CAS9共同亚克隆于植物表达载体pCambia1380中,采用柑橘黄单胞菌Xcc促进的农杆菌注射法将构建的载体导入甜橙叶片中,处理4 d后从处理区域的叶片提取基因组DNA,因靶位点含有MfeI酶切位点,采用RE-PCR方法表明突变频率在3.2%~3.9%之间,与在拟南芥和烟草叶片中的突变频率相当。进一步将处理组的片段克隆后挑选28个克隆去测序,发现其中24个发生了11种类型的插入、缺失及碱基替换突变。他们还检测了脱靶的可能性,在甜橙基因组中存在可能的46个脱靶位点,其中14个含有MfeI酶切位点,有8个位点成功扩增到了PCR产物,但如果先用MfeI酶切处理基因组DNA,则不能扩增出PCR产物,初步表明没有检测到脱靶效应。本实验成功表明,CRISPR/Cas9技术也能在甜橙中应用,为今后利用该技术进行柑橘的品种改良奠定了基础。

## 3 其他植物

目前,大部分关于CRISPR/Cas9在植物中的应用的报道是以被子植物为研究对象,在进化上处于较为低端的植物是否也能利用此技术进行基因组编辑呢?地钱(*Marchantia polymorpha*)作为研究陆生植物进化的模式植物,对其研究可以解开陆生植物的进化奥秘。Sugano等(2014)以地钱U6-1的启动子驱动针对生长素正调控因子ARF1基因的sgRNA,以及35S或MpEFpro启动子驱动的含核定位信号的CAS9,通过农杆菌转化系统共转化地钱壳孢子,经NAA抗性和潮霉素抗性筛选后在T<sub>1</sub>代中共获得了5棵(11.1%)突变植株,经检测在PAM的3 bp上游区域发生了3、6和30 bp的缺失以及39 bp插入与569 bp缺失等突变。而且这些突变能够以胞芽无性生殖的方式稳定遗传给后代。

## 4 CRISPR/Cas9引入突变的遗传特性

前面的实验大多以植物原生质体或叶片农杆菌注射的方法,表明Cas9技术能够对植物基因组进行有效编辑,但是这些编辑的遗传稳定性如何,遵循什么样的规律进行遗传,脱靶情况如何等问题却较少涉及,而这些问题对于分子育种却十分重要。Feng等(2014)以拟南芥为材料,针对这些问

题进行了研究,他们对拟南芥GAI、BRI1等7个基因的12个位点采用CRISPR/Cas9技术进行编辑,在T<sub>1</sub>代中均发现了突变,但在T<sub>1</sub>代转基因植株中只检测到了嵌合型和野生型,而没有纯合子、杂合子或双等位基因的突变存在。以GAI的T<sub>2</sub>代转基因株系为例,发现了野生型、纯合子、杂合子、等位基因的不同突变和嵌合体五种类型,T<sub>2</sub>代纯合子株系其T<sub>3</sub>代仍为纯合子,T<sub>2</sub>代杂合子等位基因的不同突变的T<sub>3</sub>代则按经典的孟德尔遗传定律(1:2:1)进行分离,且不管CAS9是否存在都不会产生新的突变类型。对于CAS9仍然存在其他3种T<sub>2</sub>代类型,由于CAS9能够持续对野生型基因进行编辑,会产生比较复杂分离类型,但也遵循孟德尔遗传定律。采用对突变株进行深度全测序、与靶位点相似序列的手动比对以及可能的脱靶位点的PCR扩增测序等手段,均未发现脱靶,再结合上述即使CAS9存在,突变的纯合子及等位基因突变能够忠实地往下遗传而不被进一步编辑的事实,表明在植物中该技术具有很高的特异性,这与人类细胞中报告的高脱靶率不同。Jiang等(2014)利用读码框发生偏移的无功能的GFP为研究对象,在T<sub>1</sub>代拟南芥中研究表明有37%~95%在靶位点发生了突变,其中大约三分之一具有正常的GFP荧光,在T<sub>2</sub>、T<sub>3</sub>代能稳定遗传,本研究再次表明CRISPR/Cas9引起的突变与其它技术产生的突变一样,是稳定且符合孟德尔遗传定律的。这些工作表明Cas9技术在改良作物方面具有明确的应用前景。

## 5 展望

从目前的研究来看,CRISPR/Cas9基因组编辑技术是目前科学家掌握的对基因组精确编辑的最佳技术。主要体现在以下几个方面:(1)靶位点选择的广泛性:CRISPR/Cas9技术选择靶位点的要求是具有NGG的PAM序列,而这一序列在基因组中广泛存在,可以在任意基因中都能找到数个靶位点,并对它们进行编辑,如以5'-AN(n)-GG-3'搜索,如果n为20,则可以在水稻基因组中找到大约3 183 497个靶位点,在cDNA中找到大约566 367个靶位点,平均每个基因有9个靶位点;如果将n放宽到19、20、21,则水稻基因组中靶位点增加到大约11 572 498个,在cDNA中靶位点增加到大约566 367个,平均每个基因有32个靶位点;同样在小麦A、D基因组中每个基因大约可以找到21个潜在

的靶位点(Shan等2013),其他植物潜在靶位点的情况与此类似。而其他如T-DNA插入突变、物理化学诱变技术则对一些小基因,或具有特殊结构或组成的基因却很难获得突变体。(2)基因编辑靶位点的特异性高:虽然在人类细胞中CRISPR/Cas9技术具有较高的脱靶率,在小鼠及斑马鱼中具有相对低的脱靶率,但从目前的研究来看植物中的特异性却好很多,在水稻中发现较少的脱靶率(Shan等2013; Xie和Yang 2013),在拟南芥及烟草中没有发现脱靶的情况(Li等2013; Nekrasov等2013; Feng等2014)。(3)载体组装简便而经济:ZFN和TALEN的组装不仅成本高,技术要求也高,需要精心的设计和经验丰富的操作人员,而CRISPR/Cas9的组装只需要设计合成20 bp的引物,具有分子生物学背景的人员就可快速完成。(4)可以获得没有筛选基因、报告基因等外源基因的转基因植物:因为CAS9的作用位点与其插入位点一般不同,CAS9等外源插入基因可以在后代的分离中很容易与靶突变位点发生分离,从而获得无外源基因的遗传改良作物(Zhou等2014),大大提高人们对转基因作物的接受程度。(5)可以同时多个基因进行编辑:可以将针对多个靶点的sgRNA与CAS9亚克隆于同一个转化载体中,一次转化就可能获得多个位点突变的突变体,大大提高了基因编辑效率(Li等2013)。Ma等(2015)报道一个基于PCR及Golden gate连接或Gibson组装构建CRISPR/Cas9双元载体的技术体系,该方法理论上最大装载量是240个sgRNA,一次组装即可完成;他们用该技术体系构建了一个针对水稻8个位点的CRISPR/Cas9双元载体,结果表明7个靶位点均发生了突变。正是因为CRISPR/Cas9技术集上述优点于一身,自2013年3月首次报道以来,迅速成为动植物基因组编辑的研究热点(Khaoula等2013),将在推动基础科学、生物技术的发展,以及农作物品种改良方面发挥巨大的作用。

虽然CRISPR/Cas9技术具有明显的优势,但也存在进一步改进的地方。一是进一步提高编辑效率:(1)采用表达水平及活性高的CAS9基因:不同来源的CAS9基因,在植物中的表达水平和活性是不同的,造成突变效率也不同。一般来说,采用植物偏好密码子编码的CAS9基因,其表达水平较高,突

变频率也会相应提高。(2)精心选择靶位点:实验发现不同的靶位点之间突变效率存在明显差异。随着研究资料的积累,将越来越清楚靶位点或靶位点附近哪些因素(如GC含量、染色体结构等)对突变频率产生影响,便于设计出更佳的靶位点。Lei等(2014)提供了一个26种植物设计sgRNA和检测脱靶位点的开放的网络平台(<http://cbi.hzau.edu.cn/cgi-bin/CRISPR>),输入一段序列该软件就可找出这段序列所有能够设计sgRNA的靶点并打分排列,并且对每一个sgRNA序列同时查询脱靶可能性并打分排列,综合考虑这两项得分就可找到最佳的靶位点。(3)利用生物自身的tRNA处理系统表达多个sgRNA和提高sgRNA的表达水平,提高CRISPR/Cas9技术的编辑能力和效率:Xie等(2015)将tRNA-gRNA相间重复排列,形成一个多顺反子表达盒。因为tRNA基因中含有转录增强子,该tRNA-gRNA多顺反子的表达水平比单独的sgRNA表达水平高;并且生物体内有精确的tRNA剪辑机制,能够在体内精确地释放出tRNA和gRNA。他们利用这一构建策略构建了分别针对水稻MPK1、MPK2、MPK5和MPK6的多个tRNA-gRNA多顺反子,分别包含2、4及8个gRNA,并获得了稳定的水稻转基因株系,结果表明这一策略对靶位点的编辑能力和效率普遍明显高于传统的sgRNA方法。

二是进一步提高靶位点专一性,降低直至消除脱靶。前文已提及植物中的脱靶率大大低于动物中的脱靶率,而且植物中的脱靶产生的后果不如动物中的那样严重,又很容易通过后代的分离而消除。尽管如此,通过对靶位点的精心选择,以及对载体的优化改良等技术手段,可以进一步提高该技术打靶位点的专一性。(1)精心选择与设计靶位点:由于系统的特异性取决于与靶序列互补的长20 bp的RNA序列以及位于靶序列3'端的PAM结构,且只有靠近3'端的8~12 bp碱基是种子序列,剩下的8~10 bp碱基的错配对靶位点的识别影响较小;可以通过搜索基因组序列,选择尽量特异的靶序列,如果不能做到20 bp均特异,则至少在靠近PAM序列的12 bp要特异。Bae等(2014)设计了一个查找CRISPR/Cas9潜在脱靶位点的软件Cas-OFFinder,这样在设计sgRNA时就可预先检测是否存在潜在的脱靶位点,找到特异性更高的靶位



点。(2)通过改良sgRNA的结构,提高与靶位点的结合稳定性来降低脱靶效应:因为CAS9对DNA链的切割是基于sgRNA对DNA链的识别,良好设计的sgRNA结构有助于对靶位点的特异识别与稳定结合,从而对降低脱靶率有帮助。Fu等(2014)研究了去除远端碱基对sgRNA结合靶点的影响,发现17 bp的gRNA具有较高的打靶效率,且大大降低了脱靶率。(3)采用对靶位点识别更为严谨的CAS9缺口酶: CAS9核酸酶的晶体结构已被破解,这为今后设计出更小、更有效及其他应用的CAS9奠定了基础(Jinek等2014; Nishimasu等2014)。Fauser等(2014)通过将野生型CAS9的RuvC结构域中的天冬氨酸残基转换成丙氨酸(D10A),CAS9转变为只切割单链的缺口酶,虽然通过NHEJ(非同源末端连接)修复而产生的突变远远低于产生双链缺口(double strand break, DSB)的CAS9,但通过HDR的修复能力却与CAS9相当,说明需要HDR修复时可以采用CAS9缺口酶,这样可以大大提高发生HDR的效率;单个缺口酶形成的单链缺口(single strand break, SSB)能被正确修复,不能产生突变,只有成对的缺口酶形成的DSB才能产生有效的突变,这样需要识别的核苷酸序列就从20个提高到40个,有利于提高靶位点的专一性,降低脱靶频率(Cong等2013; Mali等2013; Seung等2014)。Schiml等(2014)设计了针对拟南芥*RTELI*的两个sgRNA,二者之间间隔18 bp,与CAS9缺口酶亚克隆在同一个T-DNA中转化拟南芥,对T<sub>1</sub>代转基因株系的体细胞基因组测序分析表明,与CAS9核酸酶不同,CAS9缺口酶主要产生的是缺失突变(63.6%),插入突变占28.1%,而且插入的片段一般比CAS9核酸酶的大;同时插入/缺失的占8.3%,没有发现脱靶现象。

三是如何提高同源重组HDR的发生频率,便于在基因组的设计位点插入所需功能的基因。目前多数研究集中在利用CRISPR/Cas9造成靶位点的破坏,从而使目标基因失去功能的研究方面。如何改造该技术及供体基因载体的设计,利用HDR在基因组特定位点引入功能基因,这将是今后CRISPR/Cas9技术重点发展的方向,一旦获得突破必将使该技术在植物改良方面起到更大的作用。

随着CRISPR/Cas9技术的改进和完善,如靶位点的突变效率和特异性的进一步提高,同源重组

更广泛的应用等,可以预见该技术编辑植物基因组的能力必将越来越强,从而快速推动基因的功能研究和物种的改良。

### 参考文献

- 李奇,安海龙(2013). ZFN/TALEN技术与作物遗传改良.植物生理学报, 49 (7): 626~636
- Bae S, Park J, Kim JS (2014). Cas-OFFinder: a fast and versatile algorithm that searches for potential off-target sites of Cas9 RNA-guided endonucleases. *Bioinformatics*, 30: 1473~1475
- Bedell VM, Wang Y, Campbell JM, Poshusta TL, Starker CG, Krug II RG, Tan WF, Penheiter SG, Ma AC, Leung AYH et al (2012). *In vivo* genome editing using a high-efficiency TALEN system. *Nature*, 491: 114~118
- Bourque JE (1995). Antisense strategies for genetic manipulations in plants. *Plant Sci*, 105: 125~149
- Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, Hsu PD, Wu X, Jiang W, Marraffini LA et al (2013). Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 339: 819~823
- de Pater S, Neuteboom LW, Pinas JE, Hooykaas PJJ, van der Zaal BJ (2009). ZFN-induced mutagenesis and gene-targeting in *Arabidopsis* through *Agrobacterium*-mediated floral dip transformation. *Plant Biotechnol J*, 7: 821~835
- Fauser F, Schiml S, Puchta H (2014). Both CRISPR/Cas-based nucleases and nickases can be used efficiently for genome engineering in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 79: 348~359
- Feng ZY, Mao YF, Xu NF, Zhang BT, Wei PL, Yang DL, Wang Z, Zhang ZI, Zheng R, Yang L et al (2014). Multigeneration analysis reveals the inheritance, specificity, and patterns of CRISPR/Cas-induced gene modifications in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 111: 4632~4637
- Feng ZY, Zhang BT, Ding WN, Liu XD, Yang DL, Wei PL, Gao FQ, Zhu SH, Zhang F, Mao YF et al (2013). Efficient genome editing in plants using a CRISPR/Cas system. *Cell Res*, 23: 1229~1232
- Fu Y, Sander JD, Reyon D, Cascio VM, Joung JK (2014). Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs. *Nat Biotechnol*, 32 (3): 279~284
- Gaj T, Gersbach C, Barbas III CF (2013). ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends Biotechnol*, 31 (7): 397~405
- Gupta PK (2015). MicroRNAs and target mimics for crop improvement. *Curr Sci*, 108 (9): 1624~1633
- Horvath P, Barrangou R (2010). CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. *Science*, 327: 167~170
- Jacobs TB, LaFayette PR, Schmitz RJ, Parrott WA (2015). Targeted genome modifications in soybean with CRISPR/Cas9. *BMC Biotechnol*, 15: 16~25
- Jia HG, Wang N (2014). Targeted genome editing of sweet orange using Cas9/sgRNA. *PLoS ONE*, 9: e93806
- Jiang W, Yang B, Weeks DP (2014). Efficient CRISPR/Cas9-mediated gene editing in *Arabidopsis thaliana* and inheritance of modified genes in the T2 and T3 generations. *PLoS ONE*, 9 (6): e99225

- Jiang WZ, Zhou HB, Bi HH, Fromm M, Yang B, Weeks DP (2013). Demonstration of CRISPR/Cas9/sgRNA-mediated targeted gene modification in *Arabidopsis*, tobacco, sorghum and rice. *Nucleic Acids Res*, 41: e188
- Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 337: 816-821
- Jinek M, Jiang FG, Taylor DW, Sternberg SH, Kaya E, Ma EB, Anders C, Hauer M, Zhou KH, Lin S et al (2014). Structures of Cas9 endonucleases reveal RNA-mediated conformational activation. *Science*, doi: 10.1126/science.1247997
- Khaoula B, Angela C, Sophien K, Vladimir N (2013). Plant genome editing made easy: targeted mutagenesis in model and crop plants using the CRISPR/Cas system. *Plant Methods*, 9: 39-49
- Krysan PJ, Young JC, Sussman MR (1999). T-DNA as an insertional mutagen in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 11: 2283-2290
- Kusaba M (2004). RNA interference in crop plants. *Curr Opin Biotech*, 15: 139-143
- Lei Y, Lu L, Liu HY, Li S, Xing F, Chen LL (2014). CRISPR-P: A web tool for synthetic single-guide RNA design of CRISPR-system in plants. *Mol Plant*, 7: 1494-1496
- Li JF, Norville JE, Aach J, McCormack M, Zhang DD, Bush J, Church GM, Sheen J (2013). Multiplex and homologous recombination-mediated genome editing in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana* using guide RNA and Cas9. *Nat Biotechnol*, 31: 688-691
- Li T, Liu B, Spalding MH, Weeks DP, Yang B (2012). High-efficiency TALEN-based gene editing produces disease-resistant rice. *Nat Biotechnol*, 30 (5): 390-392
- Liang Z, Zhang K, Chen KL, Gao CX (2014). Targeted mutagenesis in *Zea mays* using TALENs and the CRISPR/Cas system. *J Genet Genomics*, 41: 63-68
- Ma XL, Zhang QY, Zhu QL, Liu W, Chen Y, Qiu R, Wang B, Yang ZF, Li HY, Lin YR et al (2015). A robust CRISPR/Cas9 system for convenient, high-efficiency multiplex genome editing in monocot and dicot plants. *Mol Plant*, doi: 10.1016/j.molp.2015.04.007
- Mali P, Esvelt KM, Church GM (2013). Cas9 as a versatile tool for engineering biology. *Nat Methods*, 10 (10): 957-963
- Mali P, Yang L, Esvelt KM, Aach J, Guell M, DiCarlo JE, Norville JE, Church GM (2013). RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*, 339: 823-826
- Mao YF, Zhang H, Xu NF, Zhang BT, Gou F, Zhu JK (2013). Application of the CRISPR-Cas system for efficient genome engineering in plants. *Mol Plant*, 6: 2008-2011
- Miao J, Guo DS, Zhang JZ, Huang QP, Qin GJ, Zhang X, Wan JM, Gu HY, Qu LJ (2013). Targeted mutagenesis in rice using CRISPR-Cas system. *Cell Res*, 23: 1233-1236
- Nekrasov V, Staskawicz B, Weigel D, Jones JDG, Kamoun S (2013). Targeted mutagenesis in the model plant *Nicotiana benthamiana* using Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nat Biotechnol*, 31: 691-693
- 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: 935-949
- Prelich G (2012). Gene overexpression: uses, mechanisms, and interpretation. *Genetics*, 190: 841-854
- Schiml S, Fauser F, Puchta H (2014). 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. *Plant J*, 80 (6): 1139-1150
- Seung W, Sojung K, Yongsub K, Kweon J, Kim HS, Bae S, Kim JS (2014). Analysis of off-target effects of CRISPR/Cas-derived RNA-guided endonucleases and nickases. *Genome Res*, 24: 132-141
- Shan QW, Wang YP, Li J, Zhang Y, Chen KL, Liang Z, Zhang K, Liu JX, Xi JZJ, Qiu JL et al (2013). Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system. *Nat Biotechnol*, 31: 686-688
- Shan QW, Zhang Y, Chen KL, Zhang K, Gao CX (2015). Creation of fragrant rice by targeted knockout of the *OsBADH2* gene using TALEN technology. *Plant Biotechnol J*, doi: 10.1111/pbi.12312
- Sugano SS, Shirakawa M, Takagi J, Matsuda Y, Shimada T, Hara-Nishimura I, Kohchi T (2014). CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis in the liverwort *Marchantia polymorpha* L. *Plant Cell Physiol*, 55 (3): 457-481
- Sun XJ, Hu Z, Chen R, Jiang QY, Song GH, Zhang H, Xi YJ (2015). Targeted mutagenesis in soybean using the CRISPR-Cas9 system. *Sci Rep*, 5: 10342
- Urnov FD, Rebar EJ, Holmes MC, Zhang HS, Gregory PD (2010). Genome editing with engineered zinc finger nucleases. *Nat Rev Genet*, 11: 636-646
- Wang YP, Cheng X, Shan QW, Zhang Y, Liu JX, Gao CX, Qiu JL (2014). Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew. *Nat Biotechnol*, 32 (9): 947-952
- Wood AJ, Lo TW, Zeitler B, Pickle CS, Ralston EJ, Lee AH, Amora R, Miller JC, Leung E, Meng XD et al (2011). Targeted genome editing across species using ZFNs and TALENs. *Science*, 333: 307
- Xie K, Minkenberg B, Yang YN (2015). Boosting CRISPR/Cas9 multiplex editing capability with the endogenous tRNA-processing system. *Proc Natl Acad Sci USA*, 112 (11): 3570-3575
- Xie K, Yang YN (2013). RNA-guided genome editing in plants using a CRISPR-Cas system. *Mol Plant*, 6: 1975-1983
- Xu RF, Li H, Qin RY, Wang L, Li L, Wei PC, Yang JB (2014). Gene targeting using the *Agrobacterium tumefaciens*-mediated CRISPR-Cas system in rice. *Rice*, 7: 5-8
- Zhang CF, Kitsberg D, Chy H, Zhou Q, Morrison JR (2005). Transposon-mediated generation of targeting vectors for the production of gene knockouts. *Nucleic Acids Res*, 33 (3): e24
- Zhang H, Zhang JS, Wei PL, Zhang BT, Gou F, Feng ZY, Mao YF, Yang L, Zhang H, Xu NF et al (2014). The CRISPR/Cas9 system produces specific and homozygous targeted gene editing in rice in one generation. *Plant Biotechnol J*, 12: 797-807
- Zhou HB, Liu B, Weeks DP, Spalding M, Yang B (2014). Large chromosomal deletions and heritable small genetic changes induced by CRISPR/Cas9 in rice. *Nucleic Acids Res*, 42 (17): 10903-10914