

综述 Reviews

基因组编辑新技术: CRISPR/Cas系统在生物基因组学中的研究进展

吴彩云, 罗秉轮, 孙玉强*

杭州师范大学生命与环境科学学院, 杭州310036

摘要: 近两年, CRISPR/Cas技术的发现和应用, 迅速丰富和发展了基因组编辑技术, 并以此演化更多基因组研究的手段。基因组编辑是指将外源DNA元件导入到细胞染色体特定位点, 定点改造基因组, 获得预期的生物体基因组序列发生遗传改变的技术, 包括通过基因敲入(knock-in)、基因敲除(knock-out)定点改造基因组从而改变基因组中的特定基因、基因表达方式或调控其它基因表达模式等, 达到研究基因功能的目的。目前, 基因组编辑技术主要有锌指核酸酶(ZFNs)、转录激活因子样效应物核酸酶(TALENs)和CRISPR/Cas系统。CRISPR/Cas系统是细菌及古细菌在进化过程中形成, 主要针对侵入的噬菌体等生物外源基因在体内整合或切除从而产生获得性免疫系统。根据出现特定CRISPR蛋白编码基因相邻位点重复数, CRISPR/Cas系统分为三种类型, 系统I和III目前不适合应用。而系统II最为简单, 应用最广泛, 由crRNA、tracrRNA以及Cas9蛋白组成。本文主要讨论最新的基因组编辑技术CRISPR/Cas系统的结构特点、作用原理及在基因组定点修饰方面的应用, 并对该技术运用中所遇到或可能遇到的脱靶等问题及潜在的应用前景进行分析。

关键词: 基因组编辑; 同源重组; CRISPR/Cas; 脱靶效应

A New Genome Edited Technology: CRISPR/Cas System and Its Research Progress in Biological Genomics

WU Cai-Yun, LUO Bing-Lun, SUN Yu-Qiang*

College of Life and Environmental Science, Hangzhou Normal University, Hangzhou, Zhejiang 310036, China

Abstract: In past two years, CRISPR/Cas system works as a new genome editing technology for its unique advantages and specialty, quickly enriches and promotes the genome editing technologies, and was applied rapidly in various species. More techniques were created on the base of CRISPR/Cas system for genome research. Genome editing refers that the foreign DNA components imported to the specific loci at chromosomes in cells to modify target genome for obtaining the desired genetic changes. There are many ways for studying gene expression pattern, such as gene knockout and knock in, which are the conventional ways to study function of the target genes. Recently, genome editing technologies mainly included ZFNs, TALENs and CRISPR/Cas system. CRISPR/Cas system originated from the acquired immunity of bacterias and archaeobacteria, which used to defense against viruses and plasmids infecting by targeting the specific nucleic acid sequence. Based on the presence of genes that coded specific Cas protein located in close proximity to the repetitive arrays, CRISPR/Cas was classified into three groups. Type I and III required multiple proteins to find and cut target DNA, they are not readily applicated. In contrast, type II CRISPR system is simple and popularly used for just easily obtaining crRNA, tracrRNA and Cas9 protein. We discussed here on the structure, function, mechanism and applications of CRISPR/Cas, and further discussed the challenges as off-target and prospects.

Key words: genome editing; homologous recombination (HR); CRISPR/Cas; off-target

生物体的进化和变异, 主要通过同源重组和非同源重组两种不同的方式将外源基因整合到基因组中, 发生同源重组的基因组DNA序列通常不变, 通过加入同源重组的供体DNA, 可以实现对基因组的精确修饰和改造。由于在植物中自发同源重组的概率很低, 对植物基因组进行精确修饰和改造非常困难, 提高同源重组的效率并使基因组高效编辑成为关键。改善基因组定点编辑效率的

策略和方法一直备受关注, 比较有效的有: 通过调节相关的因子提高同源重组效率、利用正负筛选系统提高同源重组植株筛选效率。此外, 近几年

收稿 2015-07-13 修定 2015-10-09

资助 浙江省自然科学基金(LR14C130001)和杭州市科委种子种苗专项(20140932H10)。

* 通讯作者(E-mail: sunyuq1109@hotmail.com; Tel: 0571-28862816)。

利用研究反向遗传学的新方法如人工核酸内切酶技术等, 开启了基因组编辑的新里程碑, 核酸内切酶定向特异切割DNA靶序列, 造成双链断裂, 实现基因组结构的定点改变, 广泛应用于包括植物在内的任何物种进行基因组精确编辑(沈延等2013)。在归巢核酸酶(Redondo等2008)、ZFN(Miller等1985)、TALEN(Moscou和Bogdanove 2009; Boch等2009)广泛应用之后, CRISPR-Cas系统以其操作简便、精确、靶位点广泛、效率高、细胞毒性低等优点迅速应用于动物、植物和微生物的基因组编辑, 已经成为时下备受关注生物技术。本文从CRISPR/Cas复合体的结构、作用机制、构建方法、研究成果、进展和应用前景、以及存在问题进行研究、归纳和探讨。

1987年Ishino报告了一项表面上“微不足道”的研究发现: 一种编码碱性磷酸酶的细菌基因序列邻近存在一个不同寻常的DNA片段, 这一DNA片段中间是一段短的重复核苷酸序列, 两侧为短的特异片段, 当时指出“这些序列的生物学意义尚

不清楚”(Inshino等1987)。现在, 这些“生物学意义尚不清楚的DNA序列”已经掀起轩然大波, 基因片段的生物学和科学意义已被阐述清楚, 并且引发了新一轮的研究和应用热潮, 成为生物学研究新的里程碑。大量实验证明, 这段DNA序列是复杂免疫系统的一部分, 而细菌具备这种独特的、高度适应的免疫系统, 使他们能成功防御来自某种噬菌体的多次进攻(Horvath等2010)。最初看起来“微不足道”研究发现, 现已成了编辑不同生物基因组的简易、高效、精确的生物学工具(图1)。2013年短时间内, 包括《Science》和《Nature Biotechnology》等杂志上已经连续发表了5篇相关的论文, 详细介绍CRISPR/Cas对多种生物的基因组进行遗传改造, 涉及到人类胚胎干细胞(Mali等2013)、小鼠(Wang等2013)、斑马鱼胚胎(Hwang等2013)、线虫胚胎(Friedland等2013)及水稻(Shan等2014)、拟南芥(Zhu等2014)等。目前的模式动物生物技术中, 胚胎干细胞的诱导是一个绕不开的过程, 而CRISPR/Cas9技术进行动物生物学研究无需胚胎

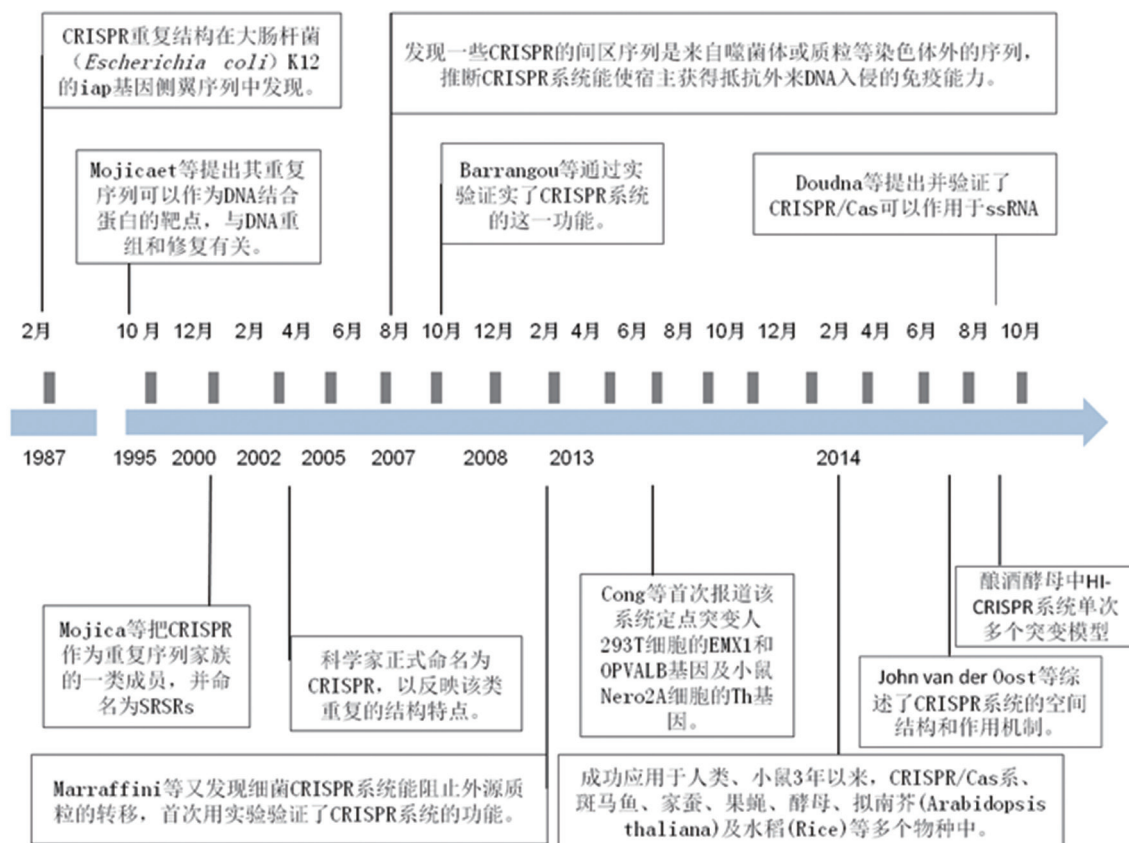


图1 CRISPR/Cas研究发展中重要事件

Fig.1 Important events during CRISPR/Cas development

干细胞, 因此动物遗传学研究可能将不再局限于有限数量的模式生物了, 这打破了模式生物的定义。实践逐渐证明, 我们可以利用CRISPR/Cas在更多的物种中简便、高效地进行和完成基因组水平的定向操作。

1 CRISPR基因座的基本结构

一个典型的CRISPR/Cas基因座由一个编码Cas蛋白的操纵子和一个重复间隔序列组成(图2)。当外源噬菌体、质粒等入侵后, 新的间隔序列就会产生并插入到前导序列和原有的第一个重复序列之间, 同时宿主获得了抵抗相应的噬菌体或质粒的再次入侵的免疫能力(Koonin和Wolf 2008;

Sorek等2008) (图3)。由于间隔序列获取的过程的不同, Cas蛋白有不同类型。根据Cas基因数量和序列的差异, CRISPR/Cas可以分为3个类型: 系统I、II及III。每个类型又可根据其Cas蛋白基因的不同再分为几个亚类。CRISPR/Cas系统依赖由多个Cas蛋白组成的复合体引起免疫性, 不同的CRISPR-Cas系统需要不同数量和类型的蛋白参与, 其中在很多细菌的胞内都只需要一种内切酶(endonuclease), 我们将这种CRISPR-Cas系统称作II型系统(Type II systems), 系统II主要分布于细菌中, 尤其是产脓链球菌(*Streptococcus pyogenes*), 核心蛋白元件为Cas9蛋白(Horvath等2010)。

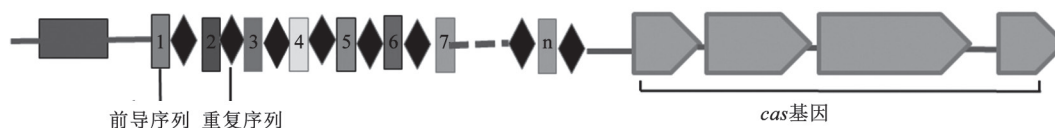


图2 CRISPR基本结构示意图

Fig.2 The primary structure of CRISPR

“n”表示不同来源的间隔序列。

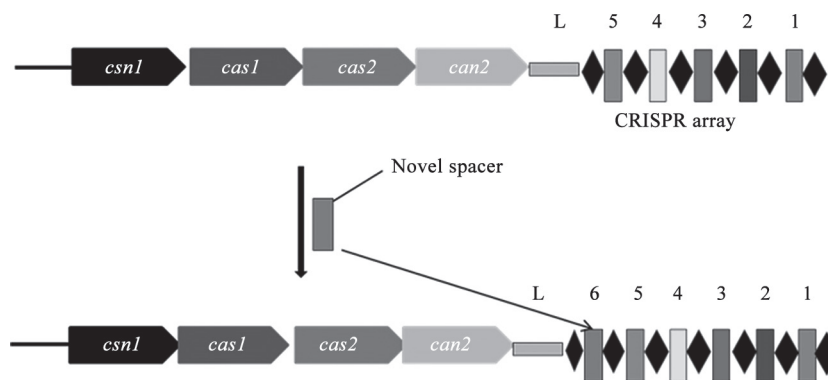


图3 CRISPR/Cas系统新闻隔序列的获得示意图

Fig.3 the sketch map of the new sequence of interval obtaining in CRISPR/Cas system

2 CRISPR/Cas II系统介导基因组靶向修饰的分子作用机制

2.1 间隔序列的获得

当外源病毒或质粒入侵时, 宿主免疫系统识别外源核酸中的特殊序列并通过非同源重组的方式整合到自身基因组的CRISPR序列中, 获得抵抗相应噬菌体或质粒再次入侵的免疫能力。CRISPR系统从外源基因组中获取的间隔序列并不是随机的, 是一类具有特定碱基的间隔序列, 可以认

为是特定入侵物的特征DNA序列。研究发现外源核酸中整合的间隔序列其附近具有间隔邻近基序(protospacer adjacent motif), 如嗜热链球菌NNAGAAW基序(Deveau等2008)和NGGNG基序(Horvath等2008)。PAM基序位于间隔序列的5'或3'端(Lillestol等2009; van der Ploeg等2009)。目前, PAM基序的识别、前间区序列的选取、间区序列长度的确定, 需要哪些蛋白参与以及具体机制并不清楚。应用时根据靶基因上的PAM位点及PAM

位点上游18~22 bp的短序列确定目的基因的编辑位点。

2.2 pre-crRNA的转录加工

CRISPR经转录产生pre-crRNA与tracrRNA形成pre-crRNA:tracrRNA复合物,复合物在Cas9作用下,被核糖核酸内切酶RNase III切割,产生成熟的crRNA(图4)。然后,Cas9蛋白作为内切酶在向导RNA的指引下,对各种入侵的外源DNA分子进行识别、结合和定点切割,一般在靶基因的PAM位点上游3~8个碱基位点进行切割。识别保守的间隔相邻基序(proto-spacer adjacent motifs, PAM),形成一个有功能的DNA-RNA杂交双链和蛋白的复合物,该复合物的形成需要两个RNA分子参与,即

CRISPR RNA (crRNA)和反式作用CRISPR RNA (trans-acting CRISPR RNA, tracrRNA)。最近研究发现,这两种RNA可以被“改装”成一种单导向RNA (single-guide RNA, sgRNA),这个sgRNA帮助Cas9内切酶对DNA进行定点切割(Mali等2013)。DNA双链断裂,之后启动修复机制修复断裂的DNA双链。损伤后的DNA有同源重组(Liu和Rao 2011)和非同源末端连接(Fu等2013)两种修复机制。由于同源重组修复需要同源模板修复缺失,而在修复的同时又很难在近距离找到合适的模板。非同源末端连接可以快速修复损伤的染色体保持其完整性,细胞往往更偏向于非同源末端连接修复损伤(Hartenian和Doench 2015)。

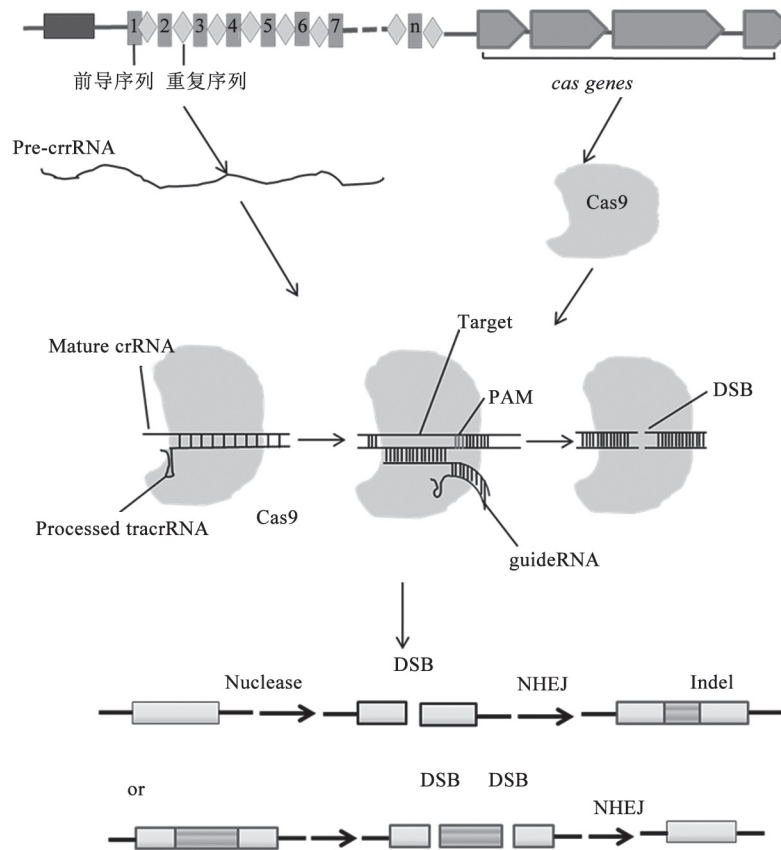


图4 细胞内CRISPR/Cas作用示意图

Fig.4 the sketch map of mechanism of CRISPR/Cas in cells.

3 脱靶现象

CRISPR/Cas9系统确定靶位点的唯一限制性条件就是3'末端的PAM位点,和PAM前端的18~22 bp的gRNA序列(Jinek等2012)。广泛的靶位点选择空间在一定程度上更容易造成靶位点错配。

CRISPR/Cas9与靶位点识别的特异性主要依赖于靠近gRNA PAM位点的10~12个碱基的配对,而远离PAM位点的8~10个碱基的错配对靶位点识别影响不明显(Jiang等2013; Sapranuskas等2011)。CRISPR/Cas9中的脱靶现象是在距离PAM序列8~

12 bp区域有可能由于guideRNA的错配,造成CRISPR/Cas9系统不能准确识别靶位点并产生非特异性切割(Semenova等2011)。2013年12月哈佛大学David R Liu实验室在《Nature Biotechnology》报道了脱靶现象,选择人*CLTA*基因4个靶位点,共设计了8条不同序列的gRNA,通过体外筛选和高通量测序,4个靶位点都存在脱靶现象,脱靶率高达84%。这表明该系统可以发生非特异性切割,引起基因组非靶向位点的突变,造成细胞毒性,研究结果的不确定性和不可预料性,增加繁琐的研究工作量(Pattanayak等2013)。所以降低脱靶率,提高编辑的精确度是需要解决的一个关键问题。目前主要从以下几方面着手的:一、靶位点的选择,通过序列同源性比对,找到合适的靶位点(Wang等2014)。二、gRNA的选择,gRNA的长度与其特异性相关,根据一些gRNA选择软件如:sgRNACas9 (<http://www.biotoools.com/en/>)、Optimized CRISPR Design (<http://crispr.mit.edu/>)、Cas9 Design (<http://cas9.cbi.pku.edu.cn/>)等,通过序列比对筛选出合适长度的gRNA(Fu等2014)。三、调整实验过程中gRNA和Cas9的比例,提高Cas9蛋白的切割活性,改善CRISPR/Cas9系统的作用效率(Allan等2015; David等2013)。

4 CRISPR/Cas9技术在多种生物中的尝试及研究现状

CRISPR/Cas系统是源于细菌及古细菌的一种后天免疫系统,它可以利用靶位点特异性的RNA指导Cas蛋白对靶位点序列进行修饰。自2013年以来,CRISPR/Cas系统已经成功应用于人类、小鼠、斑马鱼、家蚕、果蝇、酵母、拟南芥及水稻等多个物种中。中国科学院上海生命科学研究院的朱健康教授利用拟南芥对CRISPR/Cas系统诱导的基因修饰的遗传度、特异性及模式进行了多代分析,对T₀代转基因植株的检测表明,CRISPR/Cas系统在所有11个靶基因位点都产生了突变,突变率高达66.7%,且超过一半(6/11)的靶基因位点在T₀代获得纯合突变体。基因突变在后代的遗传分析符合经典的孟德尔定律。对突变类型分析表明,单碱基的突变类型超过70%,且大部分(53.9%)为单碱基的插入;超过10个碱基的突变类型为3.7%。通过基因组重测序和比对,仅在只有一个碱基不同的潜在靶位点检测到突变,表明该系统在拟南

芥基因组编辑中具有很高的特异性(Zhu等2014)。

应用于可编辑RNA的Cas蛋白。CRISPR原本是细菌抵御病毒感染的免疫体系,而一些病毒的遗传物质是RNA,加州大学伯克利分校的研究小组在《Nature》发表了一种方法可以编程CRISPR/Cas蛋白复合物(包括Cas9内切酶和引导RNA),并且在序列特异性的靶位点识别切割RNA。这一研究有可能改变现有的RNA研究模式,为检测、分析和操控RNA转录物奠定了基础。该实验利用专门设计的PAM递呈寡核苷酸(PAMmers),在避开对应的DNA序列的同时,Cas9特异定向结合或切割RNA靶点,还可利用它从细胞里分离出特异的内源性信使RNA。该实验也揭示了PAM结合与RCas9底物选择之间的基本联系,表明RCas9无需遗传诱导标签,在可编程RNA转录物识别方面进行深入和大规模的研究应用(O'Connell等2014)。

利用CRISPR/Cas9系统启动基因调控。2014年12月10日《Nature》的一篇文章报道,改造后的CRISPR/Cas可以有效启动活细胞中的任何基因,这个改良能够更简便地研究不同基因的功能;改造后的CRISPR技术,可以快速对整个基因组进行功能筛选,帮助人们鉴定涉及特定疾病的基因(Konermann等2015)。CRISPR/dCas9系统改良用于启动基因的研究进行多次研究,将Cas9连上活化结构域,聚合转录装置启动转录过程,但不能持续启动基因转录。张锋等在获得CRISPR/Cas系统晶体结构后对CRISPR-Cas9进行改造,改造后的CRISPR系统成功激活了10个基因。这些基因的转录水平增加2倍以上,基因的活性呈几个数量级的增加。随后建立了人类引导RNA文库,特定靶向和标注超过2万个人类基因组基因,这类被标注的基因大约25 000个,其中已有超过3 000的突变与疾病表现型联系起来,更多的遗传变异正在被发现,有助于我们了解致病的机制和潜在基因治疗的策略(Cox等2015; Lander等2011; Hsu等2014)。

5 CRISPR/Cas技术在基因组编辑应用中的特异性及优势

经过多年的发展,ZFN技术已经成功应用于体外培养的人类细胞及多种模式生物,甚至一期临床试验研究。但其局限性不能忽略:(1) ZFP的氨基酸序列与靶向DNA序列不能一一对应,自然界中无法找到能够识别3个连续核苷酸的锌酯结

构域,所以ZFNs的靶位点的选择受到了限制;(2)ZFN技术专利的垄断及设计合成难度较大,一般实验室无法承担起高额成本,广泛使用困难;(3)基因组多位点的脱靶现象,使ZFNs带来的细胞毒性很强(Carroll等2008)。这种固有的局限性在很大程度上阻碍了ZFN技术的广泛发展。90年代以来,第一个TALE基因被克隆、RVD与靶点核苷酸的对应关系的破译及以后的各种TALE序列组装模型被开发,但是其装备过程所需的大量非常昂贵内切酶,精确、快速、高通量的合成TALE序列需要特殊的设备和技术,再加上一系列的测序验证,小规模实验室是无法完成工作的。除了昂贵繁琐的载体构建工作,脱靶效应及载体所带来的未知的细胞毒性又是TALENs一个重要的局限。

基因功能的研究及验证需要快速、准确和有利的实验技术,但是包括ZFNs和TALENs等基因编辑技术已经满足不了科学研究发展的需求,带来不必要的弊端也更加明显,这些弊端阻碍技术进一步应用。而CRISPR/Cas的发现迅速成了基因组编辑的利器,在保持了基因编辑核酸酶能精确编辑靶向基因位点的基础上,兼备了载体构建简单、快速、低成本、效率高等优势。这种基因组改造技术还可以被应用于合成生物学(synthetic biology)、基因定向干扰或者多重基因干扰(即基因网络干扰)和基因治疗等领域。除了在基因组改造方面作为靶向修饰的工具之外,还可以将其改造为调控基因表达的工具,即CRISPR干扰(CRISPR interference, CRISPRi)技术。Qi等(2013)通过突变的方式,使Cas9内切酶活性丧失(dCas9),与sgRNA共同导入细胞后,与靶基因结合,对正常表达进行可逆的阻断,能够代替脱靶频繁的siRNA技术成为可能。使用Cas9平台还可以进行基因沉默等方面的操作(如Cas9蛋白失活),或者赋予Cas9蛋白更多新的功能(如使其具有转录因子样的转录活性等)。

6 问题及展望

CRISPR/Cas9系统作为一种新的基因编辑技术,为科研人员提供了基因组编辑的便利,该系统也在不断完善和发展。近年,使用该系统进行基因编辑有大量的成功报道,但是在CRISPR/Cas9的构建方法、识别模式、作用效率、细胞毒性等各

方面也发现了问题,需要解决和调整该系统的研究方向。

在靶序列识别方面,CRISPR/Cas9 II要求有PAM的存在,作用载体才能结合靶基因,这一条件既是该系统的严谨也是其作用范围的的限制。不断地技术完善工作通过寻找不同来源、有不同识别及切割需求的系统,通过对不同系统的深入研究,可能克服这一局限。在作用效率和细胞毒性方面,CRISPR/Cas9有较高的编辑效率,可能细胞毒性小,也可能是实验的偶然因素,都没有通过大数据的统计,没有足够的证据和稳定的重复实验证明(Pattanayak等2013)。

能确定的是,CRISPR/Cas9能有效地切割DNA产生双链断裂DNA,这是基因修饰可利用的有效工具,改变了传统的基因编辑方法,提高了工作效率。系统切割产生双链断裂后,如果通过NHEJ修复,造成移码突变,可导致基因功能的丧失,造成基因敲除;通过同源重组修复,可以入特定的突变或DNA插入片段。利用该系统,已经获得了基因敲除或敲入的各种模式生物及人的iPS细胞。目前,借其高效率的切割,CRISPR/Cas9技术可同步一次性敲除两个或多个基因。同时作用两个位点产生条件性的基因敲除也成为了事实,大大缩短了构建敲除载体的时间,提高工作效率。

总之,作为新的基因组编辑技术,CRISPR/Cas系统提高了基因组序列修饰和编辑的效率,促进了基因功能的研究。其中呈现出来的问题也将不断解决,克服其缺点,更好地解决基因编辑技术中的问题,推动基因组功能研究快速深入和完成。

参考文献

- 沈延,肖安,黄鹏,王唯晔,朱作言,张博(2013). 类转录激活因子效应物核酸酶(TALEN)介导的基因组定点修饰技术. 遗传, 35 (4): 395~409
- Allan B, Tan EP, Li YL, Yusa K (2015). Off-target assessment of CRISPR-Cas9 guiding RNAs in human iPS and mouse ES cells. *Genesis*, 53 (2): 225~236
- Boch J, Scholze H, Schornack S, Landgraf A, Hahn S, KayS, Lahaye T, Nickstadt A, Bonas U (2009). Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science*, 326 (5959): 1509~1512
- Carroll D (2008). Progress and prospects: zinc-finger nucleases as gene therapy agents. *Gene Ther*, 15 (22): 1463~1468
- Cox DB, Platt RT, Zhang F (2015). Therapeutic genome editing: prospects and challenges. *Nat Med*, 21 (2): 121~131

- Deveau H, Barrangou R, Garneau JE, Labonté J, Fremaux C, Boyaval P, Romero DA, Horvath P, Moineau S (2008). Phage response to CRISPR-encoded resistance in *Streptococcus thermophilus*. *J Bacteriol*, 190 (4): 1390~1400
- Feng ZY, Mao YF, Xu NF, Zhang BT, Wei PL, Yang DL, Zhang ZJ, Zheng R, Yang L, Zhu JK (2014). Multigeneration analysis reveals the inheritance, specificity, and patterns of CRISPR/Cas-induced gene modifications in *Arabidopsis*. *Proc Acad Natl Sci USA*, 111: 4632~4637
- Friedland AE, Tzur YB, Esvelt KM, Colaiácovo MP, Church GM, Calarco JA (2013). Heritable genome editing in *C. elegans* via a CRISPR-Cas9 system. *Nat Methods*, 10 (8): 741~743
- Fu Y, Foden JA, Khayteraaaaa C, Maeder ML, Reyon D, Joung JK, Sander JD (2013). High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. *Nat Biotechnol*, 31 (9): 822~826
- Fu Y, Sander JD, Reyon D, Cascio VM, Joung JK (2014). Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs. *Nat Biotechnol*, 32: 279~284
- Hartenian E, Doench JG (2015). Genetic screens and functional genomics using CRISPR/Cas9 technology. *FEBS J*, 282: 1383~1393
- Horvath P, Barrangou R (2010). CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. *Science*, 327 (5962): 167~170
- Horvath P, Romero DA, Coute-Monvoisin A, Richards M, Deveau H, Moineau S, Boyaval P, Fremaux C, Barrangou R (2008). Diversity, activity, and evolution of CRISPR loci in *Streptococcus thermophilus*. *J Bacteriol*, 190 (4): 1401~1412
- Hsu PD, Lander ES, Zhang F (2014). Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell*, 157 (6): 1262~1278
- Hwang WY, Fu YF, Reyon D, Maeder ML, Tsai SQ, Sander JD, Petersin RT, Yeh JR, Joung JK (2013). Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. *Nat Biotechnol*, 31 (3): 227~229
- Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, Amemura M, Nakata A (1987). Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J Bacteriol*, 169 (12): 5429~5433
- Jiang W, Bikard D, Cox D, Zhang F, Marraffini LA (2013). RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems. *Nat Biotechnol*, 31 (3): 233~239
- 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 (6096): 816~821
- Konermann S, Brigham MD, Trevino AE, Joung J, Abudayyeh OO, Barcena C, Hsu PD, Habib N, Gootenberg JS, Nishimasu H et al (2015). Genome-scale transcriptional activation by an engineered CRISPR-Cas9 complex. *Nature*, 517 (7536): 583~588
- Koonin EV, Wolf YI (2008). Genomics of bacteria and archaea: the emerging dynamic view of the prokaryotic world. *Nucleic Acids Res*, 36 (21): 6688~6719
- Lander ES (2011). Initial impact of the sequencing of the human genome. *Nature*, 470: 187~197
- Lillestol RK, Shah SA, Brugger K, Redder P, Phan H, Christiansen J, Garrett RA (2009). CRISPR families of the crenarchaeal genus *Sulfolobus*: bidirectional transcription and dynamic properties. *Mol Microbiol*, 72 (1): 259~272
- Liu Y, Rao M (2011). Gene targeting in human pluripotent stem cells. *Methods Mol Biol*, 767: 355~367
- Mali P, Yang LH, Esvelt KM, Aach J, Guell M, DiCarlo JE, Norville JE, Church GM (2013). RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*, 339 (6121): 823~826
- Miller J, McLaehlan AD, Klug A (1985). Repetitive zinc binding domains in the protein transcription factor III A from *Xenopus oocytes*. *EMBO J*, 4 (6): 1609~1614
- Moscou MJ, Bogdanove AJ (2009). A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors. *Science*, 326 (5959): 1501
- O'Connell MR, Oakes BL, Sternberg SH, East-Seletsky A, Kaplan M, Doidna JA (2014). Programmable RNA recognition and cleavage by CRISPR/Cas9. *Nature*, 516 (7530): 263~266
- Pattanayak V, Lin S, Giolinger J, Ma E, Doidna JA, Liu DR (2013). High-throughput profiling of off-target DNA cleavage reveals RNA-programmed Cas9 nucleosome specificity. *Nat Biotechnol*, 31 (9): 839~843
- Qi LS, Larsin MH, Gilbert LA, Weissman JS, Arkin AP, Lim WA (2013). Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. *Cell*, 152 (5): 1173~1183
- Redondo P, Prieto J, Muñoz IG, Alibés A, Stricher F, Serrano L, Cabaniols JP, Daboussi F, Arnould S, Perez C et al (2008). Molecular basis of xeroderma pigmentosum group C DNA recognition by engineered meganucleases. *Nature*, 456: 107~111
- Sapranaukas R, Gasiunas G, Fremaux C, Barrangou R, Horvath P, Siksnys V (2011). The *Streptococcus thermophilus* CRISPR/Cas system provides immunity in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res*, 39: 9275~9282
- Semenova EV, Jore M, Datsenko KA, Semenova A, Westra E, Wanner BL (2011). Interference by clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR) RNA is governed by a seed sequence. *Proc Natl Acad Sci USA*, 108 (25): 10098~10103
- Shan QW, Wang YP, Li J, Gao CX (2014). Genome editing in rice and wheat using the CRISPR/Cas system. *Nat Protoc*, 157: 2395~2410
- Sorek R, Kunin V, Hugenoltz P (2008). CRISPR a widespread system that provides acquired resistance against phages in bacteria and archaea. *Nat Rev Microbiol*, 6 (3): 181~186
- van der Ploeg JR (2009). Analysis of CRISPR in *Streptococcus mutants* suggests frequent occurrence of acquired immunity against infection by M102-like bacteriophages. *Microbiology*, 155 (6): 1966~1976
- Wang HY, Yang H, Shivalila CS, Dawlaty MM, Cheng AW, Zhang F, Jaenisch R (2013). One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell*, 153 (4): 910~918
- Wang T, Wei JJ, Sabatini DM, Lander ES (2014). Genetic screens in human cells using the CRISPR-Cas9 system. *Science*, 343 (6166): 80~84