

CRISPR/Cas基因组编辑技术研究进展及其在植物中的应用

丁莉萍¹, 张杰伟¹, 马艳², 陈亚娟¹, 王宏芝^{1,*}, 魏建华^{1,*}

¹北京市农林科学院北京农业生物技术研究中心, 农业基因资源与生物技术北京市重点实验室, 北京100097

²金陵科技学院园艺园林学院, 南京210000

摘要: 基因组编辑技术利用人工核酸酶以精准和可预测的方式来快速改造和修饰基因组, 加速了基础研究和植物育种的进程。近年来兴起的II型CRISPR/Cas9基因组编辑技术成功应用于多种动植物中。CRISPR/Cas9系统在可定制的小型非编码RNA的指导下定向切割基因组DNA双链, 并通过非同源末端连接(NHEJ)和同源重组(HDR)机制进行基因修饰, 从而实现基因组靶标基因的定点改造。本综述介绍了CRISPR/Cas系统的结构及作用原理, 讨论了CRISPR/Cas9系统的靶点效率、脱靶效应以及Cas9突变体的筛选, 并对CRISPR/Cas9系统的表观遗传调控进行了分析。最后我们详细阐述了CRISPR/Cas9技术在植物中的最新应用进展, 并对CRISPR/Cas9系统的发展和应用前景进行了展望, 希望为开展植物基因组编辑方面的研究工作提供参考。

关键词: CRISPR/Cas9; 基因组编辑; 植物

基因组编辑(genome editing)技术是在基因组水平上对DNA序列进行定点改造和修饰的遗传操作技术。近几年来, 随着核苷酸测序技术和人工合成的序列特异性核酸酶(sequence-specific nuclease, SSNs)的加速发展, 基因组编辑技术也进入了快速发展时期, 它在基因功能研究、生物医疗、植物遗传改良和分子育种等方面发挥着重要的作用。

20世纪80年代, 研究者们可以利用同源重组的方法来对特定的基因进行靶向修饰。直到2002年, 基因组编辑技术仅在小鼠(Capecchi 1989)和果蝇(Bellaiche等1999)等少数物种中实现靶向修饰, 且效率极低。进入21世纪, 人工核酸酶SSNs技术的出现和完善, 使得基因组编辑技术能够对基因组特定位点进行高效和精准的靶向编辑, 从而使此项技术具有广泛的发展前景和应用价值。

目前, SSNs主要包括归巢核酸内切酶(mega-nucleases) (Stoddard 2005; Smith等2006)、锌指核酸酶(zinc finger nucleases, ZFNs) (Urnov等2010; Davis和Stokoe 2010)、类转录激活因子效应物核酸酶(transcription activator-like effector nucleases, TALENs) (Moscou和Bodganove 2009; Boch等2009)以及成簇的规律间隔的短回文重复序列CRISPR/Cas系统(clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated Cas, CRISPR/Cas system) (Bhaya等2011; Wiedenheft等2012)。ZFNs和TALENs技术构建难度大、成本高, CRISPR/Cas系

统介导的基因组编辑由于其低成本、精确性和快速性, 在作物遗传改良和分子育种中具有重大的应用价值。CRISPR/Cas系统产生DNA双链断裂(double-strand breaks, DSBs)后主要通过非同源末端连接(non-homologous end joining, NHEJ)或同源重组(homologous recombination, HR)的方式进行修复(Trevino和Zhang 2014; Bortesi和Fischer 2015)。通过这两种方式的基因修复, CRISPR/Cas技术可以在基因的转录因子结合位点、启动子区、外显子(编码序列)、内含子(非编码序列)和非翻译区实现定点基因敲除、特异突变引入及定点修饰。除此之外, CRISPR/Cas技术还可应用于靶向基因敲入或替换、靶向基因转录调控、靶向RNA编辑、多基因敲除等方面(Li等2016; Cheng等2013; Abudayyeh等 2017; Zhang等2016c)。

其中, II型CRISPR/Cas9系统已广泛应用于多种生物体中。此系统不需要组装任何蛋白, 只需要构建各种gRNA表达框, 设计20 bp的靶位点, 制

收稿 2018-10-12 修定 2019-03-15

资助 国家自然科学基金(31800567)、北京市农林科学院科技创新能力建设专项(KJ CX20170203和KJ CX20180201)、北京市自然科学基金面上项目(6192007)、转基因生物新品种培育重大专项(2018ZX08020002)和国家重点研发计划(2016YFD0600104)。

* 共同通讯作者: 王宏芝(wanghongzhi@baafs.net.cn)、魏建华(weijianhua@baafs.net.cn)。

备过程简单易操作。大量的gRNA数据库促进和实现了CRISPR/Cas9在功能基因组上高通量的应用,并且可以实现多靶点的操作。CRISPR/Cas9可以删除掉基因组中冗余的基因,也可以通过在同一染色体上靶向切割两个间隔距离较远的位点,实现基因组中长段序列的缺失、替换或重排。本文对CRISPR/Cas系统的结构和原理、II型CRISPR/Cas9系统的靶点效率、脱靶效应、Cas9突变体的筛选以及CRISPR/Cas9系统的表观遗传调控等进行了概述,并追踪了该系统在植物中的最新应用进展。

1 CRISPR/Cas系统

1.1 CRISPR/Cas系统的结构及作用机制

CRISPR/Cas系统是细菌和古生菌体内的一种获得性免疫机制,在大约50%的细菌和90%的古生菌中存在着这种系统(Makarova等2015)。CRISPR是一类规律性重复的短回文序列簇。以产脓链球菌(*Streptococcus pyogenes* SF370)的典型Type II CRISPR/Cas9为例,CRISPR位点通常由短的高度保守的重复序列(repeats)和间隔序列(spacer)组成,第一个重复序列上游的前导序列(leader sequence)作为启动子启动CRISPR序列转录产生非编码CRISPR RNAs (crRNA)。Cas基因定位在CRISPR位点附近,是一类较大的多态性家族,编码的蛋白具有核酸相关的功能域crRNA与反式激活的trans-activating crRNA (tracrRNA)组成向导RNA (guide RNA, gRNA),指导Cas蛋白通过位点特异性的切割将入侵DNA切断(Brouns等2008; Garneau等2010)。

1.2 CRISPR/Cas系统的研究历史

Ishino等(1987)首次在大肠杆菌(*Escherichia coli*) K12碱性磷酸酶基因的附近区域发现了规律成簇间隔的短回文重复序列。Mojica等(1995)在其他细菌和古细菌中也发现了这一特殊的序列。Jansen等(2002)确定CRISPR相关的Cas基因含有DNA重复序列成簇。Bolotin等(2005)研究人员发现CRISPR的间隔序列与宿主菌的部分DNA序列高度同源,从而推测这些特殊序列可能与细菌抵抗外源遗传物质入侵的防御机制有关。Makarova等(2006)提出CRISPR可能通过一种类似于真核生

物的RNAi机制来行使免疫功能。Barrangou等(2007)确定了CRISPR重复序列的功能,首次发现并证明细菌可能利用CRISPR系统对抵抗噬菌体入侵。Marraffini等(2008)又发现细菌CRISPR系统能阻止外源质粒的转移,首次利用实验验证了CRISPR系统的功能。Gameau等(2010)发现间隔序列指导Cas9切割目标DNA序列。Deltchevad等(2011)确定与Cas9关联的由crRNA和tracrRNA紧密融合形成的sgRNA。Jienk等(2012)最先利用CRISPR系统作用于含有互补序列的目标DNA,成功得到了在该DNA特定位点的双链断裂,为此后RNA介导的基因编辑奠定了基础。美国麻省理工学院张锋实验室的Ran等(2013)研究发现成对的Cas9切口酶能提高脱靶效应。同年,张锋和哈佛医学院George M. Church两家实验室同时发表文章,最先报道了利用CRISPR/Cas9系统在人类细胞和小鼠细胞中成功对目标基因实现了定点编辑(Cong等2013; Mali等2013),从此开启了CRISPR/Cas9技术的热潮。

1.3 CRISPR/Cas系统的分类

根据Cas基因的分类和阻遏复合物的性质,CRISPR/Cas系统可以分为两大类,这两大类进一步分为6个亚类,并且每个亚类都具有特定的Cas基因(Makarova等2011)。Class 1类CRISPR/Cas系统包含type I、type III、type IV三种类型,它们是由多种Cas蛋白复合物进行干扰。Type I的标志性蛋白是Cas3,它结合其他串联蛋白靶向切割外源DNA。Type III型系统利用梯级状复合物,在总体组成和结构上与type I有极大地相似性。Type IV系统主要是类似于Cas5、Cas7和Cas8的蛋白介导的CRISPR/Cas免疫综合效应(Koonin等2017)。

Class 2类CRISPR/Cas系统包含type II、type V、type VI三种类型,它们由单个效应蛋白进行干扰。Type II系统是最广泛的CRISPR/Cas系统,Cas9蛋白属于type II类型,它结合成熟的双链RNA (tracrRNA: crRNA)或者人工合成的单链向导RNA (sgRNA)实施核酸内切酶的功能,已经发展为基因工程常规应用的工具。Cas9通过PAM位点识别目标DNA序列,随后在向导RNA的指导下与DNA碱基配对,Cas9在PAM位点的上游3 bp处产生双链断裂。Type V分为V-A、V-B、V-C,分别对应的效应

蛋白是Cas12a (Cpf1)、Cas12b (C2c1)和Cas12c (C2c3)。其中type V-A型的Cas12a不需要tracrRNA的作用。Cas12a蛋白识别DNA双链上的PAM位点,这些位点位于非目标链上并且是碱基T富集的区域。PAM位点被识别后,crRNA和目标DNA之间形成碱基配对,切割DNA双链,在PAM远端分别产生5和7 bp交错双链断裂。Type VI系统含有2个RxxxH基序,这些基序是在RNA酶中常见的高等真核和原核生物核苷酸(higher eukaryotes and prokaryotes nucleotide, HEPN)结合域。其中编码含有HEPN的效应蛋白Cas13与其他class 2效应蛋白不同,Cas13切割单链RNA (ssRNA)。Cas13酶由crRNA编程并被目标ssRNA激活,整个过程不需要tracrRNA的参与。

2 CRISPR/Cas9系统的靶点效率

CRISPR/Cas9系统是目前应用最为广泛的Cas类型,Cas9对不同靶点的切割效率差异很大。需要从多方面着手考虑Cas9的靶点设计:第一,精心进行靶点的筛选。Moreno-Mateos等(2015)发现靶点富集G而缺乏A可以增加sgRNA的稳定性和活性;Chari等(2015)在基于1 400个靶点和sgRNA的基础上开发了sgRNA的评分系统,并表明在离PAM位点-1位置处,G的偏好性强,T的偏好性差。此外,还有许多用于sgRNA效能预测和脱靶位点识别的软件工具(表1)。表1列出了这些工具的名称、主要特征和网址。第二,优化sgRNA骨架序列。Dang等(2015)特异性地将sgRNA延长了10个碱基,并将sgRNA中连续胸腺嘧啶中的第4个突变为胞嘧啶或鸟嘌呤,经过优化的sgRNA使得CRISPR/Cas9系统的敲除能力提高了将近50%。第三,优化sgRNA表达策略。Xie等(2015)利用内源性tRNA处理系统,通过精确地切割tRNA前体的两端提高CRISPR/Cas9系统的靶向性和多重编辑能力。第四,使用特异性启动子启动Cas9基因的表达。在水稻中,用*Ubiquitin*启动子显然比*CaMV35S*启动子效率高(Hu等2018b)。在拟南芥中,用*CaMV35S*启动Cas9基因在T₁代只产生了嵌合体而没有纯合子或双等位基因突变(Feng等2013, 2014)。然而,将卵细胞特异性启动子用于Cas9的转录翻译可以在T₁代生

成三突变体(Wang等2015c; Yan等2015; Mao等2016)。Feng等(2018)选择玉米减数分裂特异基因*DMC1*的启动子用于驱动Cas9基因的表达,能够在配子中实现高效的基因组编辑,T₀代植株中获得60%~70%的纯合或双等位的突变体。这种突变能够稳定遗传到T₁代,实现了玉米基因组的高效编辑。

3 CRISPR/Cas9系统的脱靶效应

基因组编辑过程中,在靶基因附近产生的脱靶效应造成了非目标序列的切割,产生了不必要的突变,这是CRISPR/Cas9最重要的缺点。对于CRISPR/Cas9系统,选择合适的sgRNA和核酸酶突变体能够有效地降低脱靶效应带来的突变。现已开发了大量的生物信息学工具来识别最佳的sgRNA,并且一些研究组已经发表了有助于降低CRISPR/Cas9系统的脱靶效应的策略。

3.1 降低CRISPR/Cas9脱靶效应的策略

首要方法是使用软件工具来预测非目标位点,提供脱靶预测的网站有:CRISPRscan、E-CRISP、CRISPR-P、CRISPRdirect、CRISPR Design、CHOP-CHOP、CCTop、Cas9 Online Designer、sgRNACas9和CRISPRseek等。除了这些通用程序之外,还存在更专业化的程序如Cas OFFinder、CasOT和GT Scan等,这些程序可以用于预测脱靶位点,但是其数据输出需要额外的计算处理和分析方法。其次,用类似策略的RNA干扰发夹靶向基因,针对同一基因中不同位点设计多gRNA表达框,可能会在同一基因中产生突变(Mikami等2015)。Fu等(2014)报道将gRNA长度由原来的20 bp截短为17~18 bp可以有效地减低脱靶率。截短的gRNA能使RNA和DNA之间的结合能降低到一定程度从而绑定一个特定靶点。另外,导入Cas9和gRNA的方法也能够影响脱靶突变的频率。Cas9和gRNA的瞬时表达(通过mRNA方式导入)或使用Cas9蛋白和gRNA体外表达代替质粒表达Cas9蛋白的方式,这些措施都能观察到较低的脱靶活性(Kim等2014; Woo等2015; Liang等2017)。

PAM位点的特异性和效率影响CRISPR/Cas9的切割效率。新的Cas9变异体和新的导向RNA核酸酶扩大了PAM序列的多样性。SpCas9同源蛋白,

表1 CRISPR/Cas9 sgRNA设计软件列表

Table 1 List of software tools available for CRISPR/Cas9 sgRNA design

软件名称	主要特征	网站地址
CRISPR-Plant	Efficacy prediction in plants	http://www.genome.arizona.edu/crispr/
CTISPRz	Efficacy prediction	http://research.nhgri.nih.gov/CRISPRz/
WU-CRISPR	Efficacy prediction, Off-target prediction	http://crispr.wustl.edu/
CRISPRscan	Efficacy prediction, Off-target prediction	http://www.crisprscan.org/
sgRNA Scorer	Efficacy prediction	https://crispr.med.harvard.edu/
CRISPR-P	Efficacy prediction and Off-target prediction in plant	http://cbl.hzau.edu.cn/cgi-bin/CRISPR
CRISPR RGEN	Efficacy prediction, Off-target prediction	http://www.rgenome.net/
E-CRISP	Efficacy prediction, Off-target prediction	http://www.e-crisp.org/E-CRISP/
CRISPRTarget	Efficacy prediction	http://bioanalysis.otago.ac.nz/CRISPRTarget
CRISPR MultiTargeter	sgRNA design for common and unique sgRNA sites in transcript isoforms and duplicated genes	https://github.com/SergeyPry/CRISPR_MultiTargeter/
CRISPRdirect	Off-target prediction	http://crispr.dbcls.jp/
CHOPCHOP	Off-target prediction, PCR assay design	http://chopchop.cbu.uib.no/
CCTop	Off-target prediction, flexible target site definition	http://crispr.cos.uni-heidelberg.de/
Cas-OFFinder	Off-target prediction	http://www.rgenome.net/cas-offinder/
GT-Scan	Off-target prediction	https://gt-scan.csiro.au/
CasOT	Off-target prediction	http://casot.cbi.pku.edu.cn/
GUIDE-Seq	Off-target prediction	https://www.illumina.com/science/sequencing-method-explorer/kits-and-arrays/guide-seq.html
CRISPR Design	Off-target prediction	http://crispr.mit.edu/
sgRNAcas9	Off-target prediction, local installation	http://www.bio.tools.com
CRISPRseek	Off-target prediction, allele-specific sgRNA design	http://www.bioconductor.org/packages/release/bioc/html/CRISPRseek.html
CRISPR-ERA	Knock-out, knock-in, CRISPRi and gene activation	http://crispr-era.stanford.edu/
CRISPR-Cas	Efficacy prediction	https://en.wikipedia.org/wiki/CRISPR
sgRNA Designer	Efficacy prediction	http://www.broadinstitute.org/rnai/public/analysis-tools/sgrna-design
CRISPI	Efficacy prediction	http://crispi.genouest.org/
ZhangLabGenome engineering	Efficacy prediction	http://www.genome-engineering.org/
ZiFiT targeter	Design ZFN, TALEN and CRISPR	http://zifit.partners.org/ZiFiT/
CRISPRmap	Provide newly sequenced CRISPRs to standard classification system	http://rna.informatik.uni-freiburg.de/CRISPR-map/Input.jsp

如从嗜热链球菌(*Streptococcus thermophilus*)来的StCas9和从金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)来的SaCas9被鉴定并能够诱导植物目标基因组的改变(Saprunauskase等2011; Ran等2015)。StCas9和SaCas9需要更长的PAMs位点, 这些长的位点可以提高基因组编辑的特异性, 降低脱靶效率。Kleinstiver等(2016)开发了一种高保真的SpCas9-HF1蛋白, 其被设计成通过4个附加突变来减少Cas9蛋白与非特异性DNA的接触。在人类细胞中证明这大大降低了脱靶效应到基本上不可检测的水平。Slaymaker等(2016)诱导SpCas9的突变产生eSp-

Cas9突变体, 它具有类似的增强靶点识别特异性的性质。Ran等(2013)开发了Cas9突变体切口酶(D10A和H804A), 切口酶可以在人体细胞中产生单链切口代替双链断裂, 并利用sgRNA分别配对不同链上的2个位点产生DSBs, 随后发生HDR修复, 碱基的缺失和插入可以大幅降低CRISPR/Cas9系统的脱靶效应。Tsai等(2014)将Cas9改造为失去催化活性的Cas (dCas9), 其被剥夺了SSB或DSB的能力, 但可以有效地绑定到靶位点。dCas9与Fok1核酸酶结构域结合形成融合蛋白, 这个融合蛋白需要形成二聚体结构通过2个sgRNA靶向目的基因, 这

两个位点间隔13~18 bp,从而使FokI产生二聚反应和核酸酶活性。由于这两个距离相近的位点出现脱靶的几率小,因此大大提高了基因编辑的特异性。另一种提高基因插入的特异性的方法是首先对实验过程中的特定生物体基因组进行测序,并使用NHEJ抑制剂来增强HDR机制。

3.2 CRISPR/Cas9脱靶效应的检测

最简单的检测方法就是扩增预先选择的潜在脱靶位点,设计引物对扩增的PCR产物进行测序,这种方法快速,适用于大多数实验室,但容易漏掉其他位点突变的情况。全基因组测序不仅可以识别小的InDels和SNP位点,还可以识别结构变异体,如倒置、重排、重复和主要缺失等。但是全基因组测序花费昂贵而且仅适用于较少的克隆,并且需要参考基因组。相对于全基因组测序,全基因组外显子测序可以花费较少的钱,能够对编码蛋白的基因序列有针对性地测序,从而识别外显子中的相关突变,但是非编码区如内含子的突变却不能检测到。至今还没有系统地研究植物中的CRISPR/Cas9特异性。目前已经开发了几种途径如BLESS (Crosetto等2013)、GUIDE-seq (Tsai等2015)、HTGTS (Frock等2015)和Digenome-seq (Kim等2015)等来检测人类细胞中的脱靶变化。高保真核酸酶与优化设计的gRNAs的结合将进一步提高CRISPR/Cas9系统的准确性。

4 CRISPR/Cas9基因编辑突变体的筛选

检测基因组编辑产生的突变的方法包括PCR/RE、T7EI酶切、Sanger测序、下一代测序(NGS)、高分辨率熔解分析(high-resolution melting analysis, HRMA)和荧光PCR毛细管凝胶电泳。每个方法都有它的限制条件。PCR/RE方法受靶位点中存在限制性内切酶位点的限制(Shan等2014)。T7EI酶切依赖于双链DNA的错配,不能区分纯合突变体和野生型,也不能区分双等位基因突变的杂合突变体(Lena等2015)。Sanger测序可以直接提供突变的详细信息。基因组编辑的突变也可以用NGS进行鉴定,然后通过生物信息学软件如Cas-analyzer (Park等2017)、CRISPResso (Pinello等2016)和CRISPR-GA (Güell等2014)分析,检测的灵敏度达到0.01%,

相对于其它检测方法, Sanger测序和NGS费用较贵。在线的生物信息学工具如DSDecode (Liu等2015)和TIDE (Brinkman等2014)可以根据PCR扩增子的色谱图来解码突变类型。HRMA (Dahlem等2012)和荧光PCR毛细管凝胶电泳(Ramlee等2015)需要特殊的仪器。Hua等(2017)运用临界退火温度的特异性高效精确地对水稻和斑马鱼进行突变体筛选,此方法具有简单快速、不受酶切位点限制的优点,适用于大批量的突变体筛选。最近, Liang等(2018)利用CRISPR/Cas系统的体外切割特性,在六倍体小麦和二倍体水稻中建立了一种简单、高效、经济的PCR/RNP植物突变体筛选策略。该方法可以用于检测基因组编辑中经NHEJ修复产生的所有indel突变,为植物中的高通量检测需求提供了强有力的工具,而且在复杂的遗传背景下也能准确地识别多倍体植物中不同基因组中的突变。

5 CRISPR/Cas9系统的表观遗传调控

表观基因组通常指的是影响基因活性和表达的染色体上的变化,但也可以用来表达任何不能从基因组改变产生的可传递表型修饰(Kwon等2017)。通过CRISPR/Cas9技术进行表观基因组修饰是一种将基因表达直接转化为细胞表型的技术,并对基因调控的基本表观遗传机制进行研究(Thakore等2015)。张锋(2014)开发了Cas9表观遗传效应器(epiCas9s)可以在特定位点人工地安装或删除特定的表观遗传标记,这将作为一个更灵活的平台来探索表观遗传修饰在形成基因组调控网络中的因果效应。

近年来,索尔克研究所研究者对植物表观遗传学进行了研究,确定了表观遗传多样性模式,并报道这些表观遗传学改变不仅使植物适应不同的环境,而且有利于它们的生长发育(Thakore等2015)。通过CRISPR/Cas9系统了解植物表观基因组的变化,可以设计生物燃料、抗病性、抗旱性和耐盐性的植物。CRISPR/Cas9系统将通过甲基化和组蛋白修饰在这些基因中产生表观基因组变化。这些表观基因组改变可以增强效应物的活性和疾病抗性,并且还可以激活沉默基因使之在植物发育中发挥新的功能。Hilton等(2015)提出一种新的策

略, 通过以dCas9和DNA甲基转移酶或针对植物启动子的乙酰转移酶的融合蛋白为靶点, 在植物基因组中产生表观遗传学变化, 以激活内源性基因表达。

6 CRISPR/Cas9在植物中的研究进展

CRISPR/Cas9系统的基因组操作正在彻底改变分子生物科学的所有领域, 包括功能基因组学、遗传学、应用生物医学研究和农业生物技术 (Bortesi和Fischer 2015; Kanchiswamy等2015; Teotia等2016; Zlotorynski 2015)。CRISPR/Cas9系统是一种快速发展的基因组编辑技术体系, 通过CRISPR/Cas9系统来提高作物产量、改良品质、增强植物生物和非生物胁迫的耐受性等, 这项技术已经在植物分子生物学和植物基因工程领域得到广泛应用。我们总结了CRISPR/Cas9系统在模式植物、农作物、果树及木本植物、草本植物中进行基因组编辑的成功例子(表2), 并且概述了CRISPR/Cas9基因组编辑技术的最新进展, 包括单碱基编辑、DNA-free基因组编辑以及其他Cas蛋白的应用。

6.1 单碱基基因组编辑系统

单碱基编辑(base editor, BE)是一种独特的基因组编辑系统, 它在基因组目标上创建精确且高度可预测的核苷酸替换, 不需要DSBs或供体DNA模板, 或依赖于NHEJ和HDR。2016年, 美国哈佛大学David Liu实验室首次报道了基于胞嘧啶脱氨酶与CRISPR/Cas9融合形成的单碱基编辑技术。该技术在一定的突变窗口内实现胞嘧啶(cytosine, C)到胸腺嘧啶(thymine, T)的单碱基转换。并且此研究利用胞嘧啶脱氨酶APOBEC1 (能催化C脱氨基变成U, 而U在DNA复制过程中会被识别成T)和尿嘧啶糖基化酶抑制剂UGI (能防止尿嘧啶糖基化酶将U糖基化引起碱基切除修复)研发了第2代和第3代单碱基编辑系统APOBEC-XTEN-dCas9-UGI (BE2)和APOBEC-XTEN-Cas9n-UGI (BE3) (Komor等2016)。2017年, David Liu团队在《Nature》上又报道了一种可通过将腺苷脱氨酶与CRISPR/Cas9融合实现A到G转换的腺嘌呤碱基编辑系统(adenine base editor, ABE), 其原理是一种腺嘌呤脱氨酶(ecTadA)可以对腺嘌呤(A)进行脱氨形成肌苷

(I), 而肌苷在DNA复制中被DNA聚合酶识别为鸟嘌呤(G), 从而通过DNA的复制可以把基因组DNA的A·T碱基对转换成G·C碱基对(Gaudelli等2017)。

单碱基编辑系统在植物品种改良方面有着广泛的应用前景。2017年, 高彩霞研究组构造了高效的植物单碱基编辑系统nCas9-PBE, 成功地在三大重要农作物(小麦、水稻和玉米)基因组中实现高效、精准的单碱基定点突变(Zong等2017)。该实验室近期利用Cas9变体(nCas9-D10A)融合大肠杆菌野生型腺嘌呤脱氨酶(ecTadA)和人工定向进化的腺嘌呤脱氨酶(ecTadA*)二聚体, 建立并优化出高效、精确的植物ABE单碱基编辑系统, 在水稻和小麦中实现高效的A·T到G·C碱基的替换(Li等2018)。碱基编辑系统也被证明在许多模式植物和作物中产生目标点突变(Zong等2017; Lu和Zhu 2017; Li等2017; Hua等2018; Yan等2018)。碱基编辑很大程度上避免了双链断裂后DNA低效率同源重组的缺陷, 可以对靶基因进行密码子编辑, 在作物育种方面具有巨大的应用价值。

6.2 DNA-free基因组编辑系统

在某些国家, 突变植物可能被监管部门视为转基因生物, 这将会减少SSNs在生物技术和农业中潜在的应用范围。利用农杆菌、基因枪或原生质体转化技术将SSNs作为植物蛋白或mRNA瞬时传送到植物细胞中, 在DNA降解之前瞬时表达SSNs, DNA在整合到植物基因组中之前降解并丢失, 获得无外源DNA基因(DNA-free)的编辑植株。或者将Cas9蛋白和gRNA在体外组装成核糖核蛋白复合物(RNPs), 而不是将DNA编码的质粒递送到植物细胞中, 可以减少在宿主基因组中插入重组DNA的可能性(Cho等2013)。

2014年, RGEN (RNA-guided endonucleases) RNPs在转染人体细胞后立即切割染色体靶位点, 并通过细胞内的内源性蛋白酶迅速降解, 降低了脱靶效应(Kim等2014)。Woo等(2015)将RNP导入拟南芥、烟草、莴苣和水稻4种植物的原生质体中能够诱导目标基因组的修饰, 突变效率达到46%。Malnoy等(2016)将纯化的CRISPR/Cas9 RNPs直接导入葡萄和苹果的原生质体中, 获得有效的靶向作

表2 CRISPR/Cas9基因组编辑技术在植物中的应用

Table 2 Applications of CRISPR/Cas9 system in genome editing of plants

植物类别	植物名称(拉丁学名)	目标基因	文献
模式植物	拟南芥(<i>Arabidopsis thaliana</i>)	<i>AtPDS3, AtBON1, ABP1, GAI, CHL11, CHL12, TT4, BRI1, JAZ1, GFP</i>	Feng等2014; Gao等2015b; Jiang等2013; Li等2014
	烟草(<i>Nicotiana tabacum</i>)	<i>NtPDS, NtPDR6, NbFLS2, NbBAK1</i>	Gao等2015a; Li等2014; Lower等2015
农作物	水稻(<i>Oryza sativa</i>)	<i>P OsRAV2, OsPDS, OsYSA, OsROC5, OsFTL11, OsMPK2, OsMPK5, OsEPSPS, OsMYB1, OsDERF1, OsPMS3, OsMSH1, OsSWEET11, OsSWEET14</i>	Duan等2015; Jiang等2013; Lower等2015; Ma等2015; Mikami等2015; Shan等2014; Wang等2015a; Xie和Yang 2013; Zhang等2014; Zhou等2014
	玉米(<i>Zea mays</i>)	<i>ZmPDS, ZmIPK1A, ZmIPK, ZmMRP4, LIG1, MS26, MS45, ALS1, ALS2, ZmHKT1</i>	Liang等2014; Svitashv等2015; Xing等2014
	小麦(<i>Triticum aestivum</i>)	<i>TaLOX2, TaMLO, TaGASR7, TaDEP1, TaNAC2, TaPIN1, TaGW2</i>	Shan等2014; Wang等2014; Zhang等2016b
	大豆(<i>Glycine max</i>)	<i>GmPDS11, GmPDS18, GmFE12, GFP, GmSHR</i>	Jacobs等2015; Cai等2015; Du等2016
	高粱(<i>Sorghum bicolor</i>)	<i>DsRED2</i>	Jiang等2013
	棉花(<i>Gossypium</i> spp.)	<i>GhCLA1, GhVP, GFP</i>	Chen等2017
	果树及木本植物	甜橙(<i>Citrus sinensis</i>)	<i>CsPDS</i>
葡萄(<i>Vitis vinifera</i>)		<i>MLO-7</i>	Malnoy等2016
苹果(<i>Malus domestica</i>)		<i>PDS, DIPM1, DIPM2, DIPM4</i>	Nishitani等2016; Malnoy等2016
柑橘(<i>Citrus</i>)		<i>CsLOB1</i>	Jia等2017
杨树(<i>Populus tomentosa</i>)		<i>PtoPDS, 4CL1, 4CL2</i>	Fan等2015; Tsai和Xue 2015; Zhou等2015
草本植物	土豆(<i>Solanum tuberosum</i>)	<i>Csy1, Csy2, Csy3, Cas6f, StALS1, StAA2</i>	Richter等2012; Butler等2015; Wang等2015b
	苜蓿(<i>Medicago truncatula</i>)	<i>GUS</i>	Michno等2015
	地钱(<i>Marchantia polymorpha</i>)	<i>MpARF1</i>	Sugano等2014
	矮牵牛花(<i>Petunia hybrida</i>)	<i>PDS</i>	Zhang等2016a
	亚麻芥(<i>Camelina sativa</i>)	<i>FAD2</i>	Morineau等2017
	西瓜(<i>Citrullus lanatus</i>)	<i>CIPDS</i>	Tian等2017
	黄瓜(<i>Cucumis sativus</i>)	<i>eIF4E</i>	Chandrasekaran等2016
	番茄(<i>Lycopersicon esculentum</i>)	<i>SLAGO7, ANTI, SP5G</i>	Brooks等2014; Cermak等2015; Soyk等2017

用。同年, Svitashv等(2016)通过基因枪法将RNPs导入玉米胚性细胞中, 再生植株获得等位基因均发生突变的情况。Zhang等(2016b)以DNA或RNA的方式在植物愈伤组织中瞬时表达CRISPR/Cas9蛋白, 在T₀代产生了无转基因并且纯合的小麦突变体, 这种基于瞬时表达的基因组编辑系统是非常特异和有效的。Liang等(2017)通过深度测序分析表明在小麦中RNP介导的基因组编辑中的靶外突变的几率比CRISPR/Cas9 DNA的编辑要低得多。

He等(2018)利用自杀基因与CRISPR载体融合, 开发出高效去除含有Cas9转化事件的新技术, 为快速获得无转基因标记的基因编辑技术的应用提供了新研究策略。

6.3 其他Cas蛋白的应用

最常用的Cas9基因是从化脓性链球菌中分离而来(*SpCas9*), 从金黄色葡萄球菌中发现的*SaCas9*基因比*SpCas9*基因序列短1 kb, 同样具有*SpCas9*的编辑效率(Ran等2015)。来自不同物种的Cas9基因

能够识别特定的PAM位点,通过引入D1135V/R1335Q/T1337 R突变而产生VQR变异体,它们针对非规范的NGA的PAM位点并且具有较少的脱靶效应(Kleinstiver等2016)。最近,一些高保真的Sp-Cas9变异体,包括eSpCas91.0、eSpCas91.1、Sp-Cas9-HF1和HypaCas9,已经被合理地设计以提高编辑的特异性(Slaymaker等2016; Kleinstiver等2016; Chen等2017)。

CRISPR/Cpf1是一个简单有效的Class 2类Type V型CRISPR基因组编辑系统,Cpf1与Cas9的切割方式不同,它在基因的5'端进行交错切割。Cpf1的PAM位点识别T碱基富集的区域,并且它只需要一条42 nt的crRNA链的辅助就能实现双链的切割(Zetsche等2015)。Cpf1介导的基因组编辑导致双链断裂后是通过NHEJ的方式进行修复。目前AsCpf1 (*Acidaminococcus* sp. Cpf1)、LbCpfa (*Lachnospiraceae bacterium* Cpf1)和FnCpf1 (*Francisella novicida* Cpf1)已经报道具有核酸酶活性(Endo等2016; Fonfara等2016; Yamano等2016)。CRISPR/Cpf1技术已成功应用于烟草、大豆和水稻(Kim等2017; Wang等2017b)。这些技术的优点是快速高效地用于植物遗传改良但由于没有引入外源DNA,可不受转基因安全性问题的困扰。

Cas13酶属于Class 2类VI型Cas蛋白。它具有2个高等真核生物和原核生物核苷酸(HEPN)结合的内切酶结构域,能介导精确的RNA剪切功能(Abudayyeh等2016)。目前已鉴定出3个Cas13蛋白家族: Cas13a (以前称为C2c2)、Cas13b和Cas13c (Shmakov等2017)。2017年,张锋实验室证明了Cas13a酶可以用于核酸检测工具,并且Cas13a能够稳定切割细菌和动植物细胞中的RNA,特异性地降低哺乳动物细胞中的内源性RNA和报告RNA水平(Gootenberg等2017)。同年,张锋实验室的Abudayyeh等(2017)人利用Cas13构建一种RNA编辑系统REPAIR (RNA editing for programmable A to I replacement),通过使用催化失活的Cas13 (dCAS13)和RNA腺苷脱氨酶(ADAR)融合,将腺苷转化成肌苷。这种RNA编辑器能够造成RNA的点突变,从而拯救已知的致病突变(G→A),或提前引入终止密码子,造成RNA没有功能。这个系统的升级版RE-

PAIRv2的特异性比REPAIRv1高919倍。2018年,他们又将CRISPR-Cas13a与等温RNA扩增结合,新开发了核酸检测平台SHERLOCK (specific high sensitivity enzymatic reporter UnLOCKing),检测具有单碱基特异性的RNA和DNA。SHERLOCK还可用于检测Zika和登革病毒的特异性菌株,区分致病细菌、并鉴定细胞肿瘤DNA的突变(Gootenberg等2018),具有重要的应用价值。

另外,来源于毛螺菌科(*Lachnospiraceae bacterium*)的ND2006亚型细菌的Cpf1 (简称为LbCas12a)也具有类似Cas13a的“Collateral effect”效应。这种LbCas12a一旦与crRNA结合之后,就能够立马降解单链DNA (ssDNA),从而可以应用于基因突变检测(Chen等2018)。2018年,David Liu研究团队设计出一种称为xCas9新酶,可更多更有效地修改基因组中的位点,进而提高CRISPR/Cas9的效用,同时还可降低脱靶风险(Hu等2018a)。

7 展望

CRISPR/Cas技术的出现为基因组定向编辑提供了一个强有力的应用新工具,相对于ZFN和TALEN技术,CRISPR/Cas基因组编辑技术由于其低成本、精确性和快速性,为植物育种提供了前所未有的可能性,被应用的植物物种不断增长。近5年来II型CRISPR/Cas9系统应用最为广泛(Jiang等2013; Hsu等2014; Ma等2015),并在农业研究领域实现了许多目标,该系统对特定基因组序列材料的修饰和基因组编辑系统的研究具有重要意义。

我们可能会看到CRISPR越来越多地用于阐明植物的基因组结构和基因功能。例如,利用Cas9和Cpf1进行转录调控、可视化基因位点、鉴定表观遗传修饰和调节启动子活性的机制方面,以及建立全基因组关联研究和遗传性状鉴定的单核苷酸多态性之间的因果关系等。除了基因组编辑之外,CRISPR/Cas9系统适用于直接靶向植物感染双生病毒,从而提高植物对双生病毒病的抗性(Ji等2015; Wang等2017a)。CRISPR/Cas9系统已广泛用于植物遗传改良,包括产量水平、营养价值、抗逆性、抗虫性和除草剂抗性优良性状的获得。多重基因组编辑,有助于在主栽品种中快速积累

多个性状,将对有效地改善作物的复杂农艺性状产生显著影响。

植物基因组编辑仍然面临挑战,主要是提高同源重组概率和提高靶向精准性方面。提高植物遗传转化效率,发展高通量基因组编辑体系也能从根本上获得更多的植物基因组编辑突变体(Zhang等2017)。已有研究证明,过量表达从玉米基因组中克隆的*Baby boom*和*Wuschel2*基因能够提高玉米、高粱、甘蔗和籼稻的转基因效率。优化这种方法可以使植物遗传转化减少基因型的限制,从而拓宽基因组编辑应用范围(Lowe等2016)。Durr等(2018)描述了一种新的增强CRISPR的策略。将新型的双元载体(pUbiCAS9-Red and pEciCAS9-Red)、高效的sgRNAs的选择和从细胞培养直接诱导再生植株三者相结合,可以高效地产生可遗传的目标染色体上大基因簇和基因调控序列的缺失。研究结果表明,这种改进的CRISPR/Cas9方法可以为有针对性地产生遗传染色体缺失提供一种快速、有效和低成本的工具,这将为未来的高通量植物功能研究提供一个组学工具。另外,多靶点载体系统的发展、特异性启动子的使用以及多种Cas蛋白的鉴定也对CRISPR/Cas基因组编辑技术的应用和推广起到了极大地推动作用(Xing等2014; Ma等2015; Wang等2015c; Zetsche等2015)。

参考文献(References)

- Abudayyeh OO, Gootenberg JS, Essletzbichler P, et al (2017). RNA targeting with CRISPR-Cas13. *Nature*, 550: 280–284
- Abudayyeh OO, Gootenberg JS, Konermann S, et al (2016). C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector. *Science*, 353: aaf5573
- Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, et al (2007). CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*, 315: 1709–1720
- Bellaïche Y, Mogila V, Perrimon N (1999). I-SceI endonuclease, a new tool for studying DNA double-strand break repair mechanisms in *Drosophila*. *Genetics*, 152: 1037–1044
- Bhaya D, Davison M, Barrangou R (2011). CRISPR-Cas systems in bacteria and archaea: versatile small RNAs for adaptive defense and regulation. *Annu Rev Genet*, 45: 273–297
- Boch J, Scholze H, Schornack S, et al (2009). Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science*, 326: 1509–1512
- Bolotin A, Quinquis B, Sorokin A, et al (2005). Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology*, 151: 2551–2561
- Bortesi L, Fischer R (2015). The CRISPR/Cas9 system for plant genome editing and beyond. *Biotechnol Adv*, 33: 41–52
- Brinkman EK, Chen T, Amendola M, et al (2014). Easy quantitative assessment of genome editing by sequence trace decomposition. *Nucleic Acids Res*, 42: e168
- Brooks C, Nekrasov V, Lippman ZB, et al (2014). Efficient gene editing in tomato in the first generation using the clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated9 system. *Plant Physiol*, 166: 1292–1297
- Brouns SJ, Jore MM, Lundgren M (2008). Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes. *Science*, 321: 960–964
- Butler NM, Atkins PA, Voytas DF, et al (2015). Generation and inheritance of targeted mutations in potato (*Solanum tuberosum* L.) using the CRISPR/Cas system. *PLoS ONE*, 10: e0144591
- Cai Y, Chen L, Liu X, et al (2015). CRISPR/Cas9-mediated genome editing in soybean hairy roots. *PLoS ONE*, 10: e0136064
- Capecchi M (1989). Altering the genome by homologous recombination. *Science*, 244: 1288–1292
- Cermak T, Baltes NJ, Cegan R, et al (2015). High-frequency, precise modification of the tomato genome. *Genome Biol*, 16: 232–245
- Chandrasekaran J, Brumin M, Wolf D, et al (2016). Development of broad virus resistance in non-transgenic cucumber using CRISPR/Cas9 technology. *Mol Plant Pathol*, 17: 1140–1153
- Chari R, Mali P, Moosburner M, et al (2015). Unraveling CRISPR-Cas9 genome engineering parameters via a library-on-library approach. *Nat Methods*, 12: 823–826
- Chen JS, Ma E, Harrington LB, et al (2018). CRISPR-Cas12a target binding unleashes indiscriminate single-stranded DNase activity. *Science*, 360: 436–439
- Chen X, Lu X, Shu N, et al (2017). Targeted mutagenesis in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) using the CRISPR/Cas9 system. *Sci Rep*, 7: 44304
- Cheng AW, Wang H, Yang H, et al (2013). Multiplexed activation of endogenous genes by CRISPR-on, an RNA-guided transcriptional activator system. *Cell Res*, 23: 1163–1171
- Cho SW, Lee J, Carroll D, et al (2013). Heritable gene knock-

- out in *Caenorhabditis elegans* by direct injection of Cas9-sgRNA ribonucleoproteins. *Genetics*, 195: 1177–1180
- Cong L, Ran FA, Cox D, et al (2013). Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 339: 819–823
- Crosetto N, Mitra A, Silva MJ, et al (2013). Nucleotide-resolution DNA double-strand break mapping by next-generation sequencing. *Nat Methods*, 10: 361–365
- Dahlem TJ, Hoshijima K, Jurynek MJ, et al (2014). Simple methods for generating and detecting locus-specific mutations induced with TALENs in the zebrafish genome. *PLoS Genet*, 8: e1002861
- Dang Y, Jia G, Choi J, et al (2015). Optimizing sgRNA structure to improve CRISPR-Cas9 knockout efficiency. *Genome Biol*, 16: 280–289
- Davis D, Stokoe D (2010). Zinc finger nucleases as tools to understand and treat human diseases. *BMC Med*, 8: 42
- Deltcheva E, Chylinski K, Sharma CM, et al (2011). CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature*, 471: 602–607
- Du H, Zeng X, Zhao M, et al (2016). Efficient targeted mutagenesis in soybean by TALENs and CRISPR/Cas9. *J Biotechnol*, 217: 90–97
- Duan YB, Li J, Qin RY, et al (2015). Identification of a regulatory element responsible for salt induction of rice *OsRAV2* through ex situ and in situ promoter analysis. *Plant Mol Biol*, 90: 49–62
- Durr J, Papareddy R, Nakajima K, et al (2018). Highly efficient heritable targeted deletions of gene clusters and non-coding regulatory regions in *Arabidopsis* using CRISPR/Cas9. *Sci Rep*, 8: 4443
- Endo A, Masafumi M, Kaya H, et al (2016). Efficient targeted mutagenesis of rice and tobacco genomes using Cpf1 from *Francisella novicida*. *Sci Rep*, 6: 38169
- Fan D, Liu T, Li C, et al (2015). Efficient CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis in *Populus* in the first generation. *Sci Rep*, 5: 12217
- Feng C, Su H, Han B, et al (2018). High efficiency genome editing using a *dmc1* promoter-controlled CRISPR/Cas9 system in maize. *Plant Biotechnol J*, 16: 1848–1857
- Feng Z, Mao Y, Xu N, 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 Z, Zhang B, Ding W, et al (2013). Efficient genome editing in plants using a CRISPR/Cas system. *Cell Res*, 23: 1229–1232
- Fonfara I, Richter H, Bratovic M, et al (2016). The CRISPR-associated DNA-cleaving enzyme Cpf1 also processes precursor CRISPR RNA. *Nature*, 532: 517–521
- Frock RL, Hu J, Meyers RM, et al (2015). Genome-wide detection of DNA double-stranded breaks induced by engineered nucleases. *Nat Biotechnol*, 33: 179–186
- Fu YF, Sander JD, Reyon D, et al (2014). Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs. *Nat Biotechnol*, 32: 279–284
- Gao J, Wang G, Ma S, et al (2015a). CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis in *Nicotiana tabacum*. *Plant Mol Biol*, 87: 99–110
- Gao Y, Zhang Y, Zhang D, et al (2015b). Auxin binding protein 1 (ABP1) is not required for either auxin signaling or *Arabidopsis* development. *Proc Natl Acad Sci USA*, 112: 2275–2280
- Garneau JE, Dupuis ME, Villion M, et al (2010). The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature*, 468: 67–71
- Gaudelli NM, Komor AC, Rees HA, et al (2017). Programmable base editing of A·T to G·C in genomic DNA without DNA cleavage. *Nature*, 551: 464–471
- Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Kellner MJ, et al (2018). Multiplexed and portable nucleic acid detection platform with Cas13, Cas12a, and Csm6. *Science*, 360: 439–444
- Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Lee JW, et al (2017). Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2. *Science*, 356: 438–442
- Güell M, Yang LH, Church GM (2014). Genome editing assessment using CRISPR Genome Analyzer (CRISPR-GA). *Bioinformatics*, 30: 2968–2970
- He Y, Zhu M, Wang L, et al (2018). Programmed self-elimination of the CRISPR-Cas9 construct greatly accelerates the isolation of edited and transgene-free rice plants. *Mol Plant*, 11: 1210–1213
- Hilton IB, D'ippolito AM, Vockley CM, et al (2015). Epigenome editing by a CRISPR-Cas9-based acetyltransferase activates genes from promoters and enhancers. *Nat Biotechnol*, 33: 510–517
- Hsu PD, Lander EC, Zhang F (2014). Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell*, 157: 1262–1278
- Hu JH, Miller SM, Geurts MH, et al (2018a). Evolved Cas9 variants with broad PAM compatibility and high DNA specificity. *Nature*, 556: 57–63
- Hu X, Meng X, Liu Q, et al (2018b). Increasing the efficiency of CRISPR-Cas9-VQR precise genome editing in rice. *Plant Biotechnol J*, 16: 292–297
- Hua K, Tao X, Yuan F, et al (2018). Precise A·T to G·C base editing in the rice genome. *Mol Plant*, 11: 627–630
- Hua Y, Wang C, Huang J, et al (2017). A simple and efficient method for CRISPR/Cas9-induced mutant screening. *J of*

- Genet Genomics, 44: 207–213
- Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, et al (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: 5429–5433
- Jacobs TB, LaFayette PR, Schmitz RJ, et al (2015). Targeted genome modifications in soybean with CRISPR/Cas9. *BMC Biotechnol*, 15: 16–25
- Jansen R, Embden J, Gastra W, et al (2002). Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Mol Microbiol*, 43: 1565–1575
- Ji X, Zhang H, Zhang Y, et al (2015). Establishing a CRISPR-Cas-like immune system conferring DNA virus resistance in plants. *Nat Plants*, 1: 15144
- Jia H, Wang N (2014). Targeted genome editing of sweet orange using Cas9/sgRNA. *PLoS ONE*, 9: e93806
- Jia H, Zhang Y, Orbovic V, et al (2017). Genome editing of the disease susceptibility gene *CsLOB1* in citrus confers resistance to citrus canker. *Plant Biotechnol J*, 15: 817–823
- Jiang W, Zhou H, Bi H, et al (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, et al (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 337: 816–821
- Kanchiswamy CN, Sargent DJ, Velasco R, et al (2015). Looking forward to genetically edited fruit crops. *Trends Biotechnol*, 33: 62–64
- Kim D, Bae S, Park J, et al (2015). Digenome-seq: genome-wide profiling of CRISPR-Cas9 off-target effects in human cells. *Nat Methods*, 12: 237–243
- Kim H, Kim ST, Ryu J, et al (2017). CRISPR/Cpf1-mediated DNA-free plant genome editing. *Nat Commun*, 8: 14406
- Kim S, Kim D, Cho SW, et al (2014). Highly efficient RNA-guided genome editing in human cells via delivery of purified Cas9 ribonucleoproteins. *Genome Res*, 24: 1012–1019
- Kleinstiver BP, Pattanayak V, Prew MS, et al (2016). High-fidelity CRISPR-Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects. *Nature*, 529: 490–495
- Komor AC, Kim YB, Packer MS, et al (2016). Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature*, 533: 420–424
- Koonin EV, Makarova KS, Zhang F (2017). Diversity, classification and evolution of CRISPR-Cas systems. *Curr Opin Microbiol*, 37: 67–78
- Kwon DY, Zhao YT, Lamonica JM, et al (2017). Locus-specific histone deacetylation using a synthetic CRISPR-Cas9-based HDAC. *Nat Commun*, 8: 15315
- Lena V, Aurore T, Nicolas P (2015). Comparison of T7E1 and surveyor mismatch cleavage assays to detect mutations triggered by engineered nucleases. *G3-Genes Genom Genet*, 5: 407–415
- Li C, Zong Y, Wang Y, et al (2018). Expanded base editing in rice and wheat using a Cas9-adenosine deaminase fusion. *Genome Biol*, 19: 59–67
- Li J, Meng X, Zong Y, et al (2016). Gene replacements and insertions in rice by intron targeting using CRISPR-Cas9. *Nat Plants*, 2: 16139
- Li J, Sun Y, Du J, et al (2017). Generation of targeted point mutations in rice by a modified CRISPR/Cas9 system. *Mol Plant*, 10: 526–529
- Li JF, Zhang D, Sheen J (2014). Cas9-based genome editing in *Arabidopsis* and tobacco. *Method Enzymol*, 546: 459–472
- Liang Z, Chen K, Li T, et al (2017). Efficient DNA-free genome editing of bread wheat using CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein complexes. *Nat Commun*, 8: 14261
- Liang Z, Chen K, Yan Y, et al (2018). Genotyping genome-edited mutations in plants using CRISPR ribonucleoprotein complexes. *Plant Biotechnol J*, 16: 2053–2062
- Liang Z, Zhang K, Chen K, et al (2014). Targeted mutagenesis in *Zea mays* using TALENs and the CRISPR/Cas system. *J Genet Genomics*, 41: 63–68
- Liu W, Xie X, Ma X, et al (2015). DSDecode: a web-based tool for decoding of sequencing chromatograms for genotyping of targeted mutations. *Mol Plant*, 8: 1431–1433
- Lowder LG, Zhang D, Baltus NJ, et al (2015). A CRISPR/Cas9 toolbox for multiplexed plant genome editing and transcriptional regulation. *Plant Physiol*, 169: 971–985
- Lowe K, Wu E, Wang N, et al (2016). Morphogenic regulators *baby boom* and *wuschel* improve monocot transformation. *Plant Cell*, 28: 1998–2015
- Lu Y, Zhu Jk (2017). Precise editing of a target base in the rice genome using a modified CRISPR/Cas9 system. *Mol Plant*, 10: 523–525
- Ma X, Zhang Q, Zhu Q, et al (2015). A robust CRISPR/Cas9 system for convenient, high-efficiency multiplex genome editing in monocot and dicot plants. *Mol Plant*, 8: 1274–1284
- Makarova KS, Haft DH, Barrangou R, et al (2011). Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol*, 9: 467–477
- Makarova KS, Grishin NV, Shabalina SA, et al (2006). A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action. *Biol Direct*, 1:

- 7–32
- Makarova KS, Wolf YI, Alkhnbashi OS, et al (2015). An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol*, 13: 722–736
- Mali P, Yang LH, Esvelt KM, et al (2013). RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*, 339: 823–826
- Malnoy M, Viola R, Jung MH, et al (2016). DNA-free genetically edited grapevine and apple protoplast using CRISPR/Cas9 ribonucleoproteins. *Front Plant Sci*, 7: 1904
- Mao Y, Zhang Z, Feng Z, et al (2016). Development of germ-line-specific CRISPR-Cas9 systems to improve the production of heritable gene modifications in *Arabidopsis*. *Plant Biotechnol J*, 14: 519–532
- Marraffini LA, Sontheimer EJ (2008). CRISPR interference limits horizontal gene transfer in staphylococci by targeting DNA. *Science*, 322: 1843–1845
- Michno JM, Wang X, Liu J, et al (2015). CRISPR/Cas mutagenesis of soybean and *Medicago truncatula* using a new web-tool and a modified Cas9 enzyme. *GM Crops Food*, 6: 243–252
- Mikami M, Toki S, Endo M (2015). Comparison of CRISPR/Cas9 expression constructs for efficient targeted mutagenesis in rice. *Plant Mol Biol*, 88: 561–572
- Mojica F, Ferrer C, Juez G, et al (1995). 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. *Mol Microbiol*, 17: 85–93
- Moreno-Mateos MA, Vejnar CE, Beaudoin JD, et al (2015). CRISPRscan: designing highly efficient sgRNAs for CRISPR-Cas9 targeting *in vivo*. *Nat Methods*, 12: 982–988
- Morineau C, Bellec Y, Tellier F, et al (2017). Selective gene dosage by CRISPR-Cas9 genome editing in hexaploid *Camelina sativa*. *Plant Biotechnol J*, 15: 729–739
- Moscou MJ, Bogdanove AJ (2009). A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors. *Science*, 326: 1501
- Nishitani C, Hirai N, Komori S, et al (2016). Efficient genome editing in apple using a CRISPR/Cas9 system. *Sci Rep-UK*, 6: 31481–31488
- Park J, Lim K, Kim JS, et al (2017). Cas-analyzer: an online tool for assessing genome editing results using NGS data. *Bioinformatics*, 33: 286–288
- Pinello L, Canver MC, Hoban MD, et al (2016) Analyzing CRISPR genome-editing experiments with CRISPResso. *Nat Biotechnol*, 34: 695–697
- Ramlee MK, Yan T, Cheung AM, et al (2015). High-throughput genotyping of CRISPR/Cas9-mediated mutants using fluorescent PCR-capillary gel electrophoresis. *Sci Rep-UK*, 5: 15587
- Ran FA, Cong L, Yan WX, et al (2015). *In vivo* genome editing using *Staphylococcus aureus* Cas9. *Nature*, 520: 186–191
- Ran FA, Hsu PD, Lin CY, et al (2013). Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell*, 154: 1380–1389
- Richter C, Gristwood T, Clulow JS, et al (2012). *In vivo* protein interactions and complex formation in the *Pectobacterium atrosepticum* subtype I-F CRISPR/Cas system. *PLoS ONE*, 7: e49549
- Sapranaukas R, Gasiunas G, Fremaux C, et al (2011). The *Streptococcus thermophilus* CRISPR/Cas system provides immunity in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res*, 39: 9275–9282
- Shan Q, Wang Y, Li J, et al (2014). Genome editing in rice and wheat using the CRISPR/Cas system. *Nat Protoc*, 9: 2395–2410
- Shmakov S, Smargon A, Scott D, et al (2017). Diversity and evolution of class 2 CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol*, 15: 169–182
- Slaymaker IM, Gao L, Zetsche B, et al (2016). Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity. *Science*, 351: 84–88
- Smith J, Grizot S, Arnould S, et al (2006). A combinatorial approach to create artificial homing endonucleases cleaving chosen sequences. *Nucleic Acids Res*, 34: e149
- Soyk S, Muller NA, Park SJ, et al (2017). Variation in the flowering gene SELF PRUNING 5G promotes day-neutrality and early yield in tomato. *Nat Genet*, 49 (1): 162–168
- Stoddard BL (2005). Homing endonuclease structure and function. *Q Rev Biophys*, 38 (11): 49–95
- Sugano SS, Shirakawa M, Takagi J, et al (2014). CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis in the liverwort *Marchantia polymorpha* L. *Plant Cell Physiol*, 55: 475–481
- Svitashev S, Schwartz C, Lenderts B, et al (2016). Genome editing in maize directed by CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein complexes. *Nat Commun*, 7: 13274
- Svitashev S, Young JK, Schwartz C, et al (2015). Targeted mutagenesis, precise gene editing, and site-specific gene insertion in maize using Cas9 and Guide RNA. *Plant Physiol*, 169: 931–945
- Teotia S, Singh D, Tang X, et al (2016). Essential RNA-based technologies and their applications in plant functional genomics. *Trends Biotechnol*, 34: 106–123
- Thakore PI, D’Ippolito AM, Song L, et al (2015). Highly specific epigenome editing by CRISPR-Cas9 repressors for silencing of distal regulatory elements. *Nat Methods*, 12: 1143

- Tian S, Jiang L, Gao Q, et al (2017). Efficient CRISPR/Cas9-based gene knockout in watermelon. *Plant Cell Rep*, 36: 399–406
- Trevino AE, Zhang F (2014). Genome editing using Cas9 nickases. *Method Enzymol*, 546: 161–174
- Tsai CJ, Xue LJ (2015). CRISPRing into the woods. *GM Crops Food*, 6: 206–215
- Tsai SQ, Wyvekens N, Khayter C, et al (2014). Dimeric CRISPR RNA-guided FokI nucleases for highly specific genome editing. *Nat Biotechnol*, 32: 569–576
- Tsai SQ, Zheng Z, Nguyen NT, et al (2015). GUIDE-seq enables genome-wide profiling of off-target cleavage by CRISPR-Cas nucleases. *Nat Biotechnol*, 33: 187–197
- Urnov FD, Rebar EJ, Holmes MC, et al (2010). Genome editing with engineered zinc finger nucleases. *Nat Rev Genet*, 11: 636–46
- Wang M, Liu Y, Zhang C, et al (2015a). Gene editing by cotransformation of TALEN and chimeric RNA/DNA oligonucleotides on the rice *OsEPSPS* gene and the inheritance of mutations. *PLoS One*, 10: e0122755
- Wang M, Lu Y, Botella JR, et al (2017a). Gene targeting by homology-directed repair in rice using a geminivirus-based CRISPR/Cas9 system. *Mol Plant*, 10: 1007–1010
- Wang M, Mao Y, Lu Y, et al (2017b). Multiplex gene editing in rice using the CRISPR-Cpf1 system. *Mol Plant*, 10: 1011–1013
- Wang S, Zhang S, Wang W, et al (2015b). Efficient targeted mutagenesis in potato by the CRISPR/Cas9 system. *Plant Cell Rep*, 34: 1473–1476
- Wang Y, Cheng X, Shan Q, et al (2014). Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew. *Nat Biotechnol*, 32: 947–951
- Wang ZP, Xing HL, Dong L, et al (2015c). Egg cell-specific promoter-controlled CRISPR/Cas9 efficiently generates homozygous mutants for multiple target genes in *Arabidopsis* in a single generation. *Genome Biol*, 16: 144–155
- Wiedenheft B, Sternberg SH, Doudna JA (2012). RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea. *Nature*, 482: 331–338
- Woo JW, Kim J, Kwon S, et al (2015). DNA-free genome editing in plants with preassembled CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins. *Nat Biotechnol*, 33: 1162–1164
- Xie K, Minkenberg B, Yang Y (2015). Boosting CRISPR/Cas9 multiplex editing capability with the endogenous tRNA-processing system. *Proc Natl Acad Sci USA*, 112: 3570–3575
- Xie K, Yang Y (2013). RNA-guided genome editing in plants using a CRISPR-Cas system. *Mol Plant*, 6: 1975–1983
- Xing HL, Dong L, Wang ZP, et al (2014). A CRISPR/Cas9 toolkit for multiplex genome editing in plants. *BMC Plant Biol*, 14: 327–338
- Yamano T, Nishimasu H, Zetsche B, et al (2016). Crystal structure of Cpf1 in complex with guide RNA and target DNA. *Cell*, 165 (4): 949–962
- Yan F, Kuang Y, Ren B, et al (2018). Highly efficient A·T to G·C base editing by Cas9n-guided tRNA adenosine deaminase in rice. *Mol Plant*, 11: 631–634
- Yan L, Wei S, Wu Y, et al (2015). High-efficiency genome editing in *Arabidopsis* using *YAO* promoter-driven CRISPR/Cas9 system. *Mol Plant*, 8: 1820–1823
- Zetsche B, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, et al (2015). Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system. *Cell*, 163: 759–771
- Zhang F (2014). CRISPR-Cas Systems and Methods for Altering Expression of Gene Products. Google Patents, Publication number US8697359 B1
- Zhang B, Yang X, Yang C, et al (2016a). Exploiting the CRISPR/Cas9 system for targeted genome mutagenesis in petunia. *Sci Rep*, 6: 20315
- Zhang H, Zhang J, Wei P, 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
- Zhang HY, Wang XH, Dong L, et al (2017). MISSA 2.0: an updated synthetic biology toolbox for assembly of orthogonal CRISPR/Cas systems. *Sci Rep*, 7: 41993
- Zhang Y, Liang Z, Zong Y, et al (2016b). Efficient and transgene-free genome editing in wheat through transient expression of CRISPR/Cas9 DNA or RNA. *Nat Commun*, 7: 12617
- Zhang Z, Mao Y, Ha S, et al (2016c). A multiplex CRISPR/Cas9 platform for fast and efficient editing of multiple genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell Rep*, 35: 1519–1533
- Zlotorynski E (2015). CRISPR-Cas protection from plant viruses. *Nat Rev Mol Cell Bio*, 16: 642
- Zhou H, Liu B, Weeks DP, et al (2014). Large chromosomal deletions and heritable small genetic changes induced by CRISPR/Cas9 in rice. *Nucleic Acids Res*, 42: 10903–10914
- Zhou X, Jacobs TB, Xue LJ, et al (2015). Exploiting SNPs for biallelic CRISPR mutations in the outcrossing woody perennial *Populus* reveals 4-coumarate: CoA ligase specificity and redundancy. *New Phytol*, 208: 298–301
- Zong Y, Wang Y, Li C, et al (2017). Precise base editing in rice, wheat and maize with a Cas9-cytidine deaminase fusion. *Nat Biotechnol*, 35: 438–440

CRISPR/Cas genome editing technology and its application in genetic improvement of plant

DING Li-Ping¹, ZHANG Jie-Wei¹, MA Yan², CHEN Ya-Juan¹, WANG Hong-Zhi^{1,*}, WEI Jian-Hua^{1,*}

¹Beijing Agro-Biotechnology Research Center, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing Key Laboratory of Agricultural Genetic Resources and Biotechnology, Beijing 100097, China

²College of Horticulture and Landscape Architecture, Jinling Institute of Technology, Nanjing 210000, China

Abstract: Targeted genome editing using artificial nucleases has the potential to accelerate basic research as well as plant breeding by providing the means to modify genomes rapidly in a precise and predictable manner. Until recently, the type II CRISPR/Cas9 genome editing technology has been successfully applied to many animal and plant species. The CRISPR/Cas9 system allows targeted cleavage of genomic DNA guided by a customizable small non-coding RNA, resulting in gene modifications by both non-homologous end joining (NHEJ) and homology-directed repair (HDR) mechanisms. In this review, we introduced the structure and mechanism of CRISPR/Cas system, discussed the target efficiency, off-target effect and the screening of Cas9 mutants in CRISPR/Cas9 system, and analyzed the epigenetic regulation of CRISPR/Cas9 system. Finally, we summarized the latest development and applications of CRISPR/Cas9 technology in plants, as well as highlight challenges and future directions of CRISPR/Cas9 system, which would provide a reference for the research in plant genome editing.

Key words: CRISPR/Cas9; genome editing; plant

Received 2018-10-12 Accepted 2019-03-15

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31800567), the Innovation and Capacity Building Fund in BAAFS (KJCX20170203 and KJCX20180201), the Beijing Natural Science Foundation (6192007), the National Key Program on Transgenic Research (2018ZX08020002), and the National Key R&D Program of China (2016YFD0600104).

*Co-corresponding authors: Wang HZ (wanghongzhi@baafs.net.cn), Wei JH (weijianhua@baafs.net.cn).