

CRISPR/Cas9 介导的基因编辑技术研究进展

李聪, 曹文广

中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 北京 100193

李聪, 曹文广. CRISPR/Cas9 介导的基因编辑技术研究进展. 生物工程学报, 2015, 31(11): 1531-1542.

Li C, Cao WG. Advances in CRISPR/Cas9-mediated gene editing. Chin J Biotech, 2015, 31(11): 1531-1542.

摘要: CRISPR/Cas9 (Clustered regulatory interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated protein 9)是最近发现的一种新型的基因组定点编辑技术。CRISPR 即成簇的、有规律的、间隔短回文重复序列, 是人们在研究大肠杆菌编码的碱性磷酸酶基因时发现的, 它原本是存在于细菌和古细菌基因组中含有多个短重复序列的基因位点, 能够为自身提供一种特异性免疫保护机制, 抵御外来病毒、质粒等遗传元件的入侵。CRISPR 系统主要依赖 crRNA (CRISPR RNA) 和 tracrRNA (Trans-activating chimeric RNA) 结合并导向 Cas (CRISPR-associated system) 蛋白来对外源 DNA 进行序列特异性降解。目前已经发现了 3 种类型的 CRISPR/Cas 系统: I 型、II 型和 III 型。其中 II 型系统组分为简单, 主要依赖的是 Cas9 核心蛋白, 在 RNA 的介导下, Cas9 蛋白能够识别靶序列进行切割造成 DNA 的双链断裂 (Double-strand breaks, DSB)。在此基础上, 人们对基因组的特定位点进行基因打靶、基因定点插入、基因修复等各种遗传操作。这种新的基因组定点编辑技术比类转录激活因子效应物核酸酶 (Transcription activator-like effector nuclease, TALEN) 和锌指核酸酶 (Zinc-finger nuclease, ZFN) 技术设计更加简单、更容易操作, 势必会有更广泛的应用。目前, 利用该技术已在多个物种的细胞和个体水平上实现了遗传操作。文中将从 CRISPR/Cas9 的来源、结构、作用机理方面介绍其研究进展, 为开展这一领域的研究工作提供参考。

关键词: 基因编辑, CRISPR/Cas9 系统, 单链向导 RNA, 脱靶效应

Received: November 30, 2014; **Accepted:** February 13, 2015

Supported by: National Transgenic Major Program (Nos. 2013ZX08008-003, 2014ZX08008-003).

Corresponding author: Wenguang Cao. Tel: +86-10-62810587; E-mail: ggwcao@163.com

国家转基因重大专项 (Nos. 2013ZX08008-003, 2014ZX08008-003) 资助。

网络出版时间: 2015-04-16

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20150416.1654.001.html>

Advances in CRISPR/Cas9-mediated gene editing

Cong Li, and Wenguang Cao

Institute of Animal Sciences and Veterinary Medicine, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China

Abstract: Clustered regulatory interspaced short palindromic repeats (CRISPR) found in bacteria and archaea genome that contains multiple short repeats loci, provides acquired immunity against invading foreign DNA via RNA-guided DNA cleavage. The first inkling of this hot new genetic engineering tool turned up in 1987, when a research team observed an oddly repetitive sequence at one end of a bacterial gene. Now three types of CRISPR/Cas system have been identified: types I, II and III. In the type II CRISPR/Cas9 system, short segments of foreign DNA termed ‘spacers’ are integrated within the CRISPR genomic loci, transcribed and processed into short CRISPR RNA (crRNA). These crRNAs anneal to trans-activating crRNA (tracrRNA) and direct sequence-specific cleavage in that a double-strand break (DSB) is generated by Cas proteins. Based on these findings, various genetic methods, including gene targeting (Gene disruption), gene insertion, gene correction etc., are being designed to manipulate the genomes of different species at specific loci. Compared with zinc finger nucleases (ZFN) and transcription activator-like effector nucleases (TALEN), CRISPR/Cas9 is simpler with higher specificity and less toxicity. This review summarizes recent progress, discusses the prospects of CRISPR/Cas9 system, with an emphasis on its structure, principle, applications and potential challenges, and provides a useful reference for researchers who are interested in this new technique.

Keywords: gene editing, CRISPR/Cas9 system, single-guide RNA, off-target effect

基因组靶向修饰技术是指通过某种途径对基因组 DNA 特定位点进行改造的一种手段。自 1987 年 Thompsso 等^[1]建立起完整的 ES 细胞基因敲除小鼠模型至今经过 20 多年的发展, 该技术已经建立起许多理论与方法, 其中, 锌指核酸酶 (Zinc-finger nucleases, ZFN) 以及类转录激活因子效应物核酸酶 (Transcription activator-like effector nucleases, TALEN) 技术的应用较为广泛。但由于这两项技术 DNA 结合结构域的改造较为复杂, 特别是 ZFN, 往往需要构建庞大的锌指表达文库, 筛选工作量大, 成为限制其发展的瓶颈^[2]。CRISPR/Cas9 (Clustered regulatory interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated protein 9) 技术是最近发现的一种基因组靶向修饰技术。与之前的技术相比, CRISPR/Cas9 技术是通过一段 RNA

来识别靶位点, 因而在设计和构建上更加简单。迄今为止, CRISPR/Cas9 技术已成功应用于肺炎链球菌 *Streptococcus pneumoniae*、大肠杆菌 *Escherichia coli*^[3]、芽殖酵母 *Saccharomyces cerevisiae*^[4]、秀丽线虫 *Caenorhabditis elegans*^[5]、果蝇 *Drosophila melanogaster*^[6]、斑马鱼 *Danio rerio*^[7-8]、小鼠 *Mus musculus*^[9]、大鼠 *Rattus norvegicus*^[10]、拟南芥^[11]、玉米 *Zea mays*^[12]、水稻和小麦 *Triticum aestivum*^[13] 以及包括 iPS 细胞在内的人体外培养细胞系^[14] 等多个物种内源性基因的定点修饰。本文将从 CRISPR/Cas9 的来源、结构以及在基因组定点修饰中的应用等方面介绍其研究进展。

1 CRISPR/Cas 系统的研究历程

1987 年, Ishino 等^[15]在对大肠杆菌编码的

碱性磷酸酶基因研究时发现该基因编码区下游存在一段由长度为 29 bp 的重复片段 (Repeats) 和 32–33 bp 的非重复片段 (Spacers) 间隔相连的重复序列。之后的研究发现这种重复结构在细菌和古细菌中普遍存在^[16]。随着人们对该结构的逐渐了解, 2002 年, 这种结构被正式定义为 Clustered regulatory interspaced short palindromic repeats (CRISPR)^[17-18]。生物信息序列分析发现, 在人类已知物种中, 有 40% 的细菌和将近 90% 的古细菌的基因组或质粒中存在至少一个 CRISPR 位点^[19-20], 而且其间隔序列与一些噬菌体或质粒的序列存在同源性^[21], 由此预测该结构可能是原核生物在进化过程中普遍存在的一种获得性免疫系统^[22-23]。随后, 两个不同的研究小组分别发现该系统可以使细菌具有抵御噬菌体入侵和外源质粒转移的功能^[24-25], 揭开了探究 CRISPR/Cas 系统分子机制的序幕, 为后续研究奠定了基础。

2 CRISPR/Cas 系统的结构与分类

CRISPR 作为一种特殊的 DNA 重复序列, 主要由多段长度 25–50 bp 的高度保守的重复片段和 26–72 bp 长度的间隔片段间隔串联而成。

对重复片段的结构分析发现, 其序列存在二重对称性, 即可以形成发夹结构^[26-27]。对间隔片段的研究表明, 它们可能是某些入侵遗传单位在细菌内的残留, 为细菌提供一种抵抗外源 DNA 的特异性免疫^[28]。对间隔片段的序列比对证实, 约有 2% 的间隔片段在 GenBank 中能找到相匹配的质粒或噬菌体序列^[29-30], 这可能是由于目前只有极少数噬菌体和质粒被发现并测序。在该串联结构的上游是前导序列 (Leader) 和一系列 CRISPR 相关蛋白基因 (CRISPR-associated genes, Cas genes), 它们共同组成了 CRISPR 基因序列 (图 1)。

CRISPR/Cas 系统在抵御外来噬菌体入侵时, 一般经历适应、表达和干扰三个阶段^[31-33]。于是, Makarova 等^[34-35]根据适应阶段的高度保守性及表达和干扰阶段的差异性, 将 CRISPR 系统分为 3 大类型: I 型、II 型和 III 型。其中, I 型和 III 型 CRISPR 系统介导外源 DNA 降解过程中需要多种 Cas 蛋白参与反应, 形成的切割复合体结构复杂^[36-38], II 型系统组分较为简单, 只需要一个 Cas9 蛋白来切割 DNA 双链。以产脓链球菌 *Streptococcus pyogenes* 为例, Cas9 蛋白和两种非编码 RNA: crRNA (CRISPR RNA)

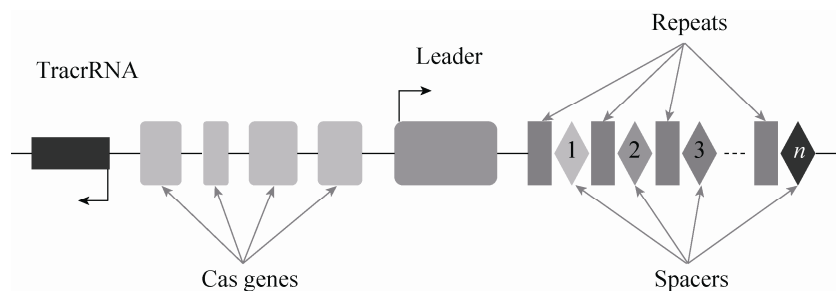


图 1 CRISPR 位点结构图

Fig. 1 The structure of CRISPR loci.

和 tracrRNA (trans-activating chimeric RNA) 形成的复合体即可特异性降解外源 DNA^[39]。因此, 目前以 II 型 CRISPR 系统为基础的 CRISPR/Cas9 系统在基因组编辑中的应用较为广泛。

3 CRISPR/Cas9 的作用机理

当外源 DNA 入侵细菌时, 其 CRISPR 系统会特异性地捕获一段被称为 proto-spacers 的外源 DNA 序列插入到前导序列与间隔重复序列之间, 并伴随一次重复片段的复制, 这样就形成了一段新的重复单元, 这些重复单元就是细菌特异性免疫的结构基础。需要注意的是, 外源 DNA 的捕获并不是完全随机的, 在这些被捕获的 DNA 序列下游常有一段序列保守的特殊结构, 被称为 PAM (Proto-spacer adjacent motifs) 位点^[30]。PAM 位点的存在可能是 CRISPR 系统区分自身 DNA 与外源 DNA 而避免发生自身免疫的机制之一^[40], 同时也是基因编辑时靶序列选择的重要要求^[31,41-42]。之后, 形成的重复单元会被转录形成前体 CRISPR RNA (Pre-crRNA), 在 RNase III 的作用下成熟。成熟的 crRNA 与 tracrRNA 通过碱基配对形成双链 RNA 结构, 并进一步与 Cas9 蛋白结合形成靶向切割复合体对外源 DNA 进行特异切割, 达到识别和降解外源 DNA 的目的。

根据上述原理, 只需合成定制的 crRNA, 将其插入到合适的质粒中, 与分别表达 tracrRNA 和 Cas9 蛋白的质粒共转染细胞, 或体外转录成 RNA 后注射到特定细胞中, 就可以建立基因敲除的细胞系或动物模型。crRNA 的作用是通过碱基配对识别基因组靶序列, 而不需

要像 ZFN 和 TALEN 那样构建复杂的识别蛋白, 极大简化了试验流程。另外, 与 ZFN 和 TALEN 技术中用到的 *Fok I* 不同的是, Cas9 蛋白存在 HNH 和 RuvC 两个活性位点^[43]可以分别切割与 crRNA 互补的 DNA 链和非互补链, 从而引入 DSB^[44], 不需形成二聚体发挥作用, 而且切割活性特别高。Jinek 等^[44]还发现, 将 crRNA: tracrRNA 双链 RNA 结构改造成单链导向 RNA (Single-guide RNA, sgRNA) 同样能够指导 Cas9 蛋白特异切割双链 DNA, 这进一步提高了操作简便性 (图 2)。

4 CRISPR/Cas9 靶位点选择及相关工具

任何一种基因编辑技术, 靶位点的选择都是首要问题。前面已经提到, 在 CRISPR/Cas9 系统中, 靶序列只有在 3'端存在 PAM 位点, 它才能够被 crRNA 准确识别。不同来源的 CRISPR/Cas9 系统, PAM 位点保守序列也不同, 如嗜热乳链球菌 *Streptococcus thermophilus* 来源的 CRISPR/Cas9 系统识别的 PAM 位点序列为 NNAGAA^[45], 脑膜炎奈瑟氏菌 *Neisseria meningitidis* 来源的为 NNNNGATT^[46], 产脓链球菌来源的为 NGG 等。目前在各个实验室广泛应用的 CRISPR/Cas9 系统主要是产脓链球菌来源的, 在此作重点介绍。

根据统计学意义, 在生物体基因组中, 应该每 8 bp 就会出现一个 NGG PAM 位点^[47]。这虽然在一定程度上限制了靶位点的选择, 但也提高了对靶位点的识别效率 (相当于增加了两个识别碱基)。近来, Zhang 实验小组通过设计并计算大量不同 sgRNA 的打靶效率后, 发现 PAM 位点序列为 NAG 也可被识别, 但是打靶

几乎涵盖了每个已知的基因。他们将编码这些 sgRNA 的基因和编码 Cas9 蛋白的基因一起转运到人细胞中，从而筛选出某些有特定功能的基因。Wang 等^[51]更是设计了 73 151 种 sgRNA 来靶向人基因组中 7 114 种基因，发现被不同 sgRNA 靶向相同基因的细胞具有不同的存活率，并根据这些数据，推断出一些似乎控制 CRISPR/Cas9 系统切割效率的规则。这都证实 CRISPR/Cas9 极其适合作为一种在全基因组范围内探究特定基因功能的工具。

5.2 在模式生物构建中的应用

ES 细胞是传统方法构建生物模型的重要限制条件，而 CRISPR/Cas9 技术不需要经过 ES 细胞就可以在短时间内产生突变个体，这或许可以使得遗传学研究不再局限于具有 ES 细胞的有限模式生物，从而再次改变遗传工程动物模型的构建方式，甚至可能重新定义哪些物种可作为模式生物。

目前 CRISPR/Cas9 技术已经在微生物、植物、动物及各种细胞中实现了应用 (表 1)。

表 1 部分已报道成功利用 CRISPR/Cas9 实现基因组编辑的实例

Table 1 Partial list of examples of CRISPR/Cas9-mediated genome editing

No.	Species	Genes	References
1	<i>Homo sapiens</i>	<i>AASVI, EMX1, PVALB</i>	[14]
2	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>srtA, bgaA</i>	[3]
3	<i>Escherichia coli</i>	<i>rpsL</i>	[3]
4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>CAN1, LYP1, ADE2</i>	[4]
5	<i>Toxoplasma gondii</i>	<i>rop18</i>	[52]
6	<i>Caenorhabditis elegans</i>	<i>dpy, klp</i>	[5]
7	<i>Drosophila melanogaster</i>	<i>yellow, white</i>	[6]
8	<i>Danio rerio</i>	<i>drd3, fh, etsrp</i>	[7]
9	<i>Xenopus tropicalis</i>	<i>ptf1a/p48, hhex, pat</i>	[53]
10	<i>Mus musculus</i>	<i>Th</i>	[9]
11	<i>Rattus norvegicus</i>	<i>Mc4r, Mc4r, Tet1</i>	[10]
12	<i>Macaca fascicularis</i>	<i>Ppar-γ, Rag1</i>	[54]
13	<i>Sus scrofa</i>	<i>vWF</i>	[55]
14	<i>Bos taurus</i>	<i>NANOG</i>	[56]
15	<i>Ovis arise</i>	<i>MSTN</i>	[57]
16	<i>Oryza sativa</i>	<i>ROC5, CAO1, PDS</i>	[13]
17	<i>Triticum aestivum</i>	<i>MLO</i>	[13]
18	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>BR11, JAZ1</i>	[11]
19	<i>Nicotiana benthamiana</i>	<i>PDS</i>	[58]
20	<i>Zea mays</i>	<i>MRP4, IPK</i>	[12]

5.3 在新品种改造和培育中的应用

传统的转基因技术改造和培育新品种一般采用外源基因随机整合的方式,转基因表达的可控性差。CRISPR/Cas9 技术则可以进行定点修饰,达到高效定向。Shan 等^[13]用 CRISPR/Cas9 技术敲掉了一个小麦基因,得到了耐白粉病 (Powdery mildew) 小麦新品种。该团队还利用 CRISPR/Cas9 技术定点突变了水稻和小麦两种作物的 *PDS* 和 *MLO* 等 5 个基因。原生质体中基因突变效率为 14.5%–38.0%, 水稻转基因植物中突变效率 4.0%–9.4%, 并且在 T₀ 代获得了水稻纯合 *PDS* 突变体, 呈现预期的白化和矮小表型。Han 等^[57]利用该技术成功获得了肌肉生长抑制素 (Myostatin, *MSTN*) 基因敲除的绵羊。

另外,猪、牛、羊等大型家畜的基因单核苷酸多态性 (Single nucleotide polymorphism, SNP) 也能够显著影响其生产性能。例如,绵羊 *MSTN* 基因 3'端非翻译区的 SNP 导致肌肉生长抑制因子在肌肉中的表达下降,显著促进绵羊肌肉的增长^[59]。由此,我们可以利用 CRISPR/Cas9 技术对基因组进行精确地编辑,引入我们需要的 SNP,这不仅降低了转基因的不稳定性,而且大大缩短了育种年限。有实验证明 CRISPR/Cas9 可以简便高效地实现多个位点切割^[60],因此可以实现一次将多个 SNP 同时引入到种畜基因组中,从而再次提高育种效率。

目前,本课题组已经利用 CRISPR/Cas9 技术成功敲除了绵羊胎儿成纤维细胞中的 *MSTN* 基因,并成功建系,验证了该系统在绵羊基因编辑应用中的可行性。另外,我们还以 *MSTN* 基因缺失细胞为供体通过核移植方法生产了 *MSTN* 基因失活胚胎,并完成了相当数量的胚胎

移植,预计近期可获得 *MSTN* 基因敲除的绵羊个体。考虑到转基因生物安全的问题,我们下一步还将利用体外转录获得 Cas9 蛋白 mRNA 与 sgRNA 一起注射到受精卵,胚胎移植后获得基因敲除绵羊,以消除转染质粒随机整合到个体基因组中的潜在风险。

5.4 在基因治疗中的应用

从基因编辑技术诞生之初,人们就试图将正常的基因片段引入细胞中替代有缺陷的基因,以此来达到基因治疗的目的。但是传统方法的随机整合率高,难以精确控制。利用 CRISPR/Cas9 能够对特异的核苷酸序列切割,产生定点突变的性质,为人类遗传性疾病的治疗带来了新的思路。

Wu 等^[61]利用 CRISPR/Cas9 取代了引起小鼠白内障的一个单碱基对突变。他们利用该技术在受精卵突变等位基因处切割 DNA,并向其提供野生型等位基因作为修复模板,从而纠正了破坏的等位基因序列。实验表明,33%注入 CRISPR/Cas9 的突变体受精卵长成了无白内障小鼠。Clevers 研究组^[62]利用 CRISPR/Cas9 在人类干细胞中纠正了与囊性纤维化有关的缺陷。囊性纤维化跨膜转导受体 (Cystic fibrosis trans-membrane conductor receptor, CFTR) 基因在人体中缺失可导患者该受体蛋白错误折叠,研究人员通过 CRISPR/Cas9 技术及一个包含插入修补序列的供体质粒,纠正了来自囊性纤维化患者细胞样品的培育肠干细胞的遗传缺陷,这些细胞约有一半培育成了功能正常的微型肠,但是这一技术的效率还是很低,因为用于临床这一效率应该达到 100%。

在感染哺乳动物细胞时,为了不被宿主免

疫系统所发现,细菌会通过 CRISPR 系统关闭自身脂蛋白的合成^[63]。因此,如何通过抑制入侵菌种的 CRISPR 系统并使宿主免疫系统能够识别,为相关疫苗的研发提供了一个很好的思路。2013 年 11 月,数位 CRISPR/Cas9 研究领域的专家创办了一家名为 Editas Medicine 的公司,旨在研究直接修改与疾病有关的基因来治疗疾病的方法^[64]。这是该技术在基因治疗领域发展的里程碑式的事件。

6 CRISPR/Cas9 与 ZFN 和 TALEN 比较

ZFN、TALEN 和 CRISPR/Cas9 系统都可以通过用户定制而对复杂基因组进行定点编辑,这也是它们最吸引人的地方。ZFN 和 TALEN 作为里程碑式的技术,至今仍在广泛应用。而 CRISPR/Cas9 作为新一代的基因编辑技术,有着 ZFN 和 TALEN 无可比拟的优势:1) 可用位置更多。理论上,在基因组中每 8 bp 就有一个适合 CRISPR/Cas9 编辑的位点,分布频率很高。而对于 ZFN 和 TALEN,在基因组中平均分别要 500 bp 和 125 bp 才会有一个合适的编辑位点^[47]。2) 可同时编辑多个位点。Wang 等^[60]利用 CRISPR/Cas9 技术一次性构建了含 5 个突变位点转基因鼠;Zhou 团队^[10]也构建了同时包含 3 个突变位点的基因敲除大鼠,而且 3 基因同时敲除的效率高达 59.1%。这对于 ZFN 和 TALEN 两项技术而言是难以实现的。3) 识别域的构建更简单。在 CRISPR/Cas9 系统中,想要改变靶序列识别位点只需改变一段短的 RNA 序列即可。而 ZFN 和 TALEN 则需要根据不同的识别序列组装和构建十分复杂的蛋白识别域,费时费力,所以 CRISPR/Cas9 技术更容易得到推广

和应用。

7 CRISPR/Cas9 技术存在的问题

脱靶效应是存在于所有基因组靶向修饰技术中的一道难题,它会对基因组非特性序列进行切割,造成未知突变,增加后期的鉴定工作量。CRISPR/Cas9 系统中,对靶序列的识别主要是依靠一段 20 bp 的短 RNA,但是研究表明当存在单个甚至多达 5 个碱基错配时,切割仍能正常发生^[65]。进一步研究发现,在这 20 bp 中只有位于 PAM 位点前 12 bp 的种子序列对靶位点识别影响较大,即总共只有 14 bp (PAM 中的 GG 和种子序列) 是靶位点识别的关键序列^[66-67]。这在生物体庞大的基因组中很容易出现脱靶位点,从而引入意外突变。除此之外,Vikram 等^[68]研究发现,高浓度的 Cas9 蛋白和 sgRNA 也会导致较高的脱靶活性,脱靶活性最高可达 84%。

针对脱靶效率高的问题,Patrick 等^[48]构建了一个计算机模型,利用该模型可以对靶序列进行全基因组比对,筛选出特异性最高的靶序列,再结合调整 sgRNA 的剂量以达到高打靶、低脱靶的效果。Ran 等^[69]通过突变 Cas9 核酸酶的 DNA 切割结构域,将 CRISPR/Cas9 系统改造为切口酶,然后配对使用,能够使脱靶活性降低 50-1500 倍,但是打靶效率也随之降低。

8 展望与结语

CRISPR/Cas9 技术的出现,极大地提高了人们对基因序列修饰与编辑的能力,除此之外,该技术在其他方面也显示出很好的应用前景。Qi 等^[70]将 Cas9 蛋白的两个切割结构域都进行

了突变,使其彻底失去内切酶活性,但与 sgRNA 形成的复合物仍具有特异结合靶位点的能力。当该复合物与靶位点结合后,虽不能切割靶位点,但却抑制了 RNA 聚合酶或其他转录因子的结合,在转录水平上下调了基因表达,起到类似于 RNA 干扰的作用。据此,我们还可以在突变的 Cas9 蛋白末端连接其他功能蛋白,如 DNA 乙酰化酶或 VP64 转录激活结构域,可以实现对靶位点乙酰化水平或基因表达水平的调控。当然,这能否按照我们预期的那样发挥作用还有待于进一步研究。

最近, Martin 等^[71]首次利用 X 射线晶体衍射技术成像了这种酶的精细三维结构,这对人们改良 Cas9 蛋白提供了巨大帮助。另外,研究人员首次发现利用专门设计的 PAM 递呈寡核苷酸(PAM-presenting oligonucleotides, PAMmers),可以使 Cas9 蛋白特异结合或切割 RNA 靶点,同时避开对应的 DNA 序列,这一发现无疑为 RNA 的功能研究、分析和操控提出了新的思路,同时又进一步提高该技术的应用价值^[72]。

当然,目前关于 CRISPR/Cas9 系统还有许多亟待解决的问题,如 CRISPR/Cas9 系统的基因组编辑效率是否高于 ZFN 和 TALEN 技术; Cas9 蛋白作为细菌蛋白,是否会引起其他物种的免疫反应;如何更好地提高同源重组介导的基因编辑效率等。相信随着人们深入和全面的研究,CRISPR/Ca9 技术将会展现出其无比强大的生命力。

REFERENCES

- [1] Thomppson KR, Capecchi MR. Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell*, 1987, 51(3): 503–512.
- [2] Thomas G, Charles A, Carlos F. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas based methods for genome engineering. *Trends Biotechnol*, 2013, 31(7): 397–405.
- [3] Jiang W, Bikard D, Cox D. RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(3): 233–239.
- [4] James E, Julie EN, Prashant M. Genome engineering in *Saccharomyces cerevisiae* using CRISPR-Cas systems. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41(7): 4336–4343.
- [5] Friedland AE, Tzur YB, Esvelt KM, et al. Heritable genome editing in *C. elegans* via a CRISPR-Cas9 system. *Nat Methods*, 2013, 10(8): 741–743.
- [6] Andrew RB, Charlotte T, Chris PP. Highly efficient targeted mutagenesis of *Drosophila* with the CRISPR/Cas9 system. *Cell Rep*, 2013, 4(1): 220–228.
- [7] Chang N, Sun C, Gao L. Genome editing with RNA-guided Cas9 nuclease in zebrafish embryos. *Cell Res*, 2013, 23(4): 465–472.
- [8] Jao LE, Wente SR, Chen W. Efficient multiplex biallelic zebrafish genome editing using a CRISPR nuclease system. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(34): 13904–13909.
- [9] Shen B, Zhang J, Wu H. Generation of gene-modified mice via Cas9/RNA-mediated gene targeting. *Cell Res*, 2013, 23(5): 720–723.
- [10] Wei L, Fei T, Tianda L, et al. Simultaneous generation and germline transmission of multiple gene mutations in rat using CRISPR-Cas systems. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(8): 684–686.
- [11] Feng ZY, Zhang BT, Ding WN. Efficient genome editing in plants using a CRISPR/Cas system. *Cell Res*, 2013, 23(10): 1229–1232.
- [12] Liang Z, Zhang K, Chen KL, et al. Targeted mutagenesis in *Zea mays* using TALENs and the CRISPR/Cas system. *J Genet Genomics*, 2014, 41(2): 63–68.
- [13] Shan QW, Wang Y, Li J, et al. Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(8): 686–688.

- [14] Mali P, Yang L, Esvelt KM, et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*, 2013, 339(6121): 823–826.
- [15] Ishino Y, Shinagawa H, Makino K. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli* and identification of the gene product. *J Bacteriol*, 1987, 169(12): 5429–5433.
- [16] Lillestøl R, Redder P, Garrett RA. A putative viral defence mechanism in archaeal cells. *Archaea*, 2006, 2(1): 59–72.
- [17] Coffey A, Ross RP. Bacteriophage-resistance systems in dairy starter strains, molecular analysis to application. *Anton Leeuw*, 2002, 82(1): 303–321.
- [18] Jansen R, Embden JD, Gaastra W. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Mol Microbiol*, 2002, 43(6): 1565–1575.
- [19] Grissa I, Vergnaud G, Pourcel C. The CRISPRdb database and tools to display CRISPRs and to generate dictionaries of spacers and repeats. *BMC Bioinformatics*, 2007, 8(1): 172–181.
- [20] Klug A. The discovery of zinc fingers and their applications in gene regulation and genome manipulation. *Q Rev Biophys*, 2010, 79: 213–231.
- [21] Boch J, Scholze H, Schornack S. Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science*, 2009, 326(5959): 1509–1512.
- [22] Bolotin A, Quinquis B, Sorokin A. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extra-chromosomal origin. *Microbiology*, 2005, 151(8): 2551–2561.
- [23] Mojica FJ, Diez VC, Garcia MJ. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *J Mol Evol*, 2005, 60(2): 174–182.
- [24] Barrangou R, Fremaux C, Deveau H. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*, 2007, 315(5819): 1709–1712.
- [25] Marraffini LA, Sontheimer EJ. CRISPR interference limits horizontal gene transfer in *Staphylococci* by targeting DNA. *Science*, 2008, 322(5909): 1843–1845.
- [26] Jansen R, Embden JD, Gaastra W. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Mol Microbiol*, 2002, 43(6): 1565–1575.
- [27] Kunin V, Sorek R, Hugenholtz P. Evolutionary conservation of sequence and secondary structures in CRISPR repeats. *Genome Biol*, 2007, 8(4): R61.
- [28] Poucel 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. *Microbiology*, 2005, 151(3): 653–663.
- [29] Mojica FJ, Ferrer C, Juez G. Long stretches of short tandem repeats are present in the largest replicons of the *Archaea Halofera mediterranei* and *Halofera volcanii* and could be involved in replicon partitioning. *Mol Microbiol*, 1995, 17(1): 85–93.
- [30] Heidelberg JF, Nelson WC, Schoenfeld T. Germ warfare in a microbial matcommunity: CRISPR provide insights into the co-evolution of host and viral genomes. *PLoS ONE*, 2009, 4(1): e4169.
- [31] Brouns SJ, Jore MM, Lundgren M. Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes. *Science*, 2008, 321(5891): 960–964.
- [32] Garneau JE, Dupuis M, Villion M. The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature*, 2010, 468(7320): 67–71.
- [33] Haft DH, Selengut J, Mongodin EF, et al. A guild of 45 CRISPR-associated (Cas) protein families and multiple CRISPR/Cas subtypes exist in prokaryotic genomes. *PLoS Comput Biol*, 2005, 1(6): 474–483.
- [34] Makarova KS, Haft DH, Barrangou R. Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol*, 2011, 9(6): 467–477.
- [35] Makarova KS, Aravind L, Wolf YI, et al. Unification of Cas protein families and a simple scenario for the origin and evolution of CRISPR-Cas systems. *Biol Direct*, 2011, 6(38): 1–27.
- [36] Gesner EM, Schellenberg MJ, Garside EL. Recognition and maturation of effector RNAs in a

- CRISPR interference pathway. *Nat Struct Mol Biol*, 2011, 18(6): 688–692.
- [37] Sashital DG, Jinek M, Doudns JA. An RNA-induced conformational change required for CRISPR RNA cleavage by the endoribonuclease Cse3. *Nat Struct Molr Biol*, 2011, 18(6): 680–687.
- [38] Lintner NG, Frankel KA, Tsutakawa SE. The structure of the CRISPR-associated protein Cas3 provides insight into the regulation of the CRISPR/Cas system. *J Mol Biol*, 2011, 405(4): 939–955.
- [39] Deltcheva E, Chylinski K, Sharma CM. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature*, 2011, 471(7340): 602–607.
- [40] Sternberg SH, Redding S, Jinek M, et al. DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9. *Nature*, 2014, 507(7490): 62–67.
- [41] Beloglazova N, Brown G, Zimmerman MD. A novel family of sequence-specific endoribonucleases associated with the clustered regularly interspaced short palindromic repeats. *J Biochem*, 2008, 283(29): 20361–20371.
- [42] Semenova E, Nagornykh M, Pyatnitskiy M. Analysis of CRISPR system function in plant pathogen *Xanthomonas oryzae*. *FEMS Microbiol Lett*, 2009, 296(1): 110–116.
- [43] Villion M, Moineau S. The double-edged sword of CRISPR-Cas systems. *Cell Res*, 2013, 23(1): 15–17.
- [44] Jinek M, Chylinski K, Fonfara I. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 2012, 337(6096): 816–821.
- [45] Kevin ME, Prashant M, Jonathan LB. Orthogonal Cas9 proteins for RNA-guided gene regulation and editing. *Nat Methods*, 2013, 10(11): 1116–1121.
- [46] Hou Z, Zhang Y, Propson NE. Efficient genome engineering in human pluripotent stem cells using Cas9 from *Neisseria meningitidis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(39): 15644–15649.
- [47] Carlson DF, Walton MW, Fahrenkrug SC. Precision editing of large animal genomes. *Adv Genet*, 2012, 80: 37–97.
- [48] Patrick DH, David A, Joshua AW, et al. DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(9): 827–832.
- [49] Hwang WY, Fu Y, Reyon D, et al. Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(3): 227–229.
- [50] Shalem O, Sanjana NE, Hartenian E. Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells. *Science*, 2014, 343(6166): 84–87.
- [51] Wang T, Wei JJ, Sabatini DM. Genetic screens in human cells using the CRISPR/Cas9 system. *Science*, 2014, 343(6166): 80–84.
- [52] Shen B, Brown KM, Lee TD. Efficient gene disruption in diverse strains of *Toxoplasma gondii* using CRISPR/Cas9. *MBio*, 2014, 5(3): e01114.
- [53] Guo X, Zhang T, Hu Z. Efficient RNA/Cas9-mediated genome editing in *Xenopus tropicalis*. *Development*, 2014, 141(3): 707–714.
- [54] Niu Y, Shen B, Cui YQ. Generation of gene modified cynomolgus monkey via Cas9/RNA mediated gene targeting in one-cell embryos. *Cell*, 2014, 156(4): 836–843.
- [55] Hai T, Teng F, Guo RF, et al. One-step generation of knockout pigs by zygote injection of CRISPR/Cas system. *Cell Res*, 2014, 24(3): 372–375.
- [56] Heo YT, Quan X, Xu YN, et al. CRISPR/Cas9 nuclease-mediated gene knock-in in bovine-induced pluripotent cells. *Stem Cells Dev*, 2015, 24(3): 393–402.
- [57] Han HB, Ma YH, Wang T, et al. One-step generation of myostatin gene knockout sheep via the CRISPR/Cas9 system. *Front Agr Sci Eng*, 2014, 1(1): 2–5.
- [58] Li JF, Norville JE, Aach J, et al. Multiplex and homologous recombination-mediated genome editing in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana* using guide RNA and Cas9. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(8): 688–691.

- [59] Clop A, Marcq F, Takeda H. A mutation creating a potential illegitimate microRNA target site in the myostatin gene affects muscularity in sheep. *Nat Genet*, 2006, 38(7): 813–818.
- [60] Wang H, Yang H, Shivalila CS. One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell*, 2013, 153(4): 910–918.
- [61] Wu Y, Liang D, Wang YH. Correction of a genetic disease in mouse via use of CRISPR-Cas9. *Cell Stem Cell*, 2013, 13(6): 659–662.
- [62] Schwank G, Koo BK, Sasselli V, et al. Functional repair of CFTR by CRISPR/Cas9 in intestinal stem cell organoids of cystic fibrosis patients. *Cell Stem Cell*, 2013, 13(6): 653–658.
- [63] Sampson TR, Saroj SD, Llewellyn AC. A CRISPR-CAS system mediates bacterial innate immune evasion and virulence. *Nature*, 2013, 497(7448): 254–257.
- [64] Helen S. CRISPR technology leaps from lab to industry. *J Nematol*, 2014, 46(2): 130–260.
- [65] Fu Y, Foden JA, Khayter C. High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(9): 822–826.
- [66] Cong L, Ran FA, Cox D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 2013, 339(6121): 819–823.
- [67] Cem K, Sevki A, Ritambhara S, et al. Genome-wide analysis reveals characteristics of off-target sites bound by the Cas9 endonuclease. *Nat Biotechnol*, 2014, 32(7): 677–683.
- [68] Vikram P, Steven L, John PG, et al. High-throughput profiling of off-target DNA cleavage reveals RNA-programmed Cas9 nuclease specificity. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(9): 839–843.
- [69] Ran FA, Hsu PD, Lin CY, et al. Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell*, 2013, 154(6): 1380–1389.
- [70] Qi LS, Larson MH, Gilbert LA, et al. Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. *Cell*, 2013, 152(5): 1173–1183.
- [71] Martin J, Fuguo J, David WT, et al. Structures of Cas9 endonucleases reveal RNA-mediated conformational activation. *Science*, 2014, 43(6176): 1247997.
- [72] O'Connell MR, Oakes BL, Sternberg SH, et al. Programmable RNA recognition and cleavage by CRISPR/Cas9. *Nature*, 2014, 516(7530): 263–266.

(本文责编 陈宏宇)