

基于 CRISPR/Cas9 的激活系统研究进展

丁霄, 潘转霞, 杨六六, 罗晓丽, 姜南, 竹梦婕, 吴翠翠, 兰刚, 李朋波

山西农业大学 棉花研究所, 山西 运城 044000

丁霄, 潘转霞, 杨六六, 罗晓丽, 姜南, 竹梦婕, 吴翠翠, 兰刚, 李朋波. 基于 CRISPR/Cas9 的激活系统研究进展. 生物工程学报, 2022, 38(8): 2713-2724.

DING X, PAN ZX, YANG LL, LUO XL, JIANG N, ZHU MJ, WU CC, LAN G, LI PB. Advances of CRISPR/Cas9 activation system. Chin J Biotech, 2022, 38(8): 2713-2724.

摘 要: 基因编辑技术自问世以来就一直作为生物技术领域的研究热点。基因编辑工具成簇的规律间隔短回文重复序列及其相关系统 (CRISPR/Cas 系统) 具有特异性、简便性和灵活性等优点, 为研究人员提供了丰富的遗传操作工具, 也让 CRISPR/Cas 系统的应用在多种生物中得到了飞速发展。特别是将转录激活因子与失活的 Cas 蛋白结合, 可在 RNA 转录水平实现基因表达特异性调控, 为生物技术在医学研究及农业领域的发展做出了重要的贡献。外源基因的过表达是验证基因功能和基因调控的常用方法, 然而由于载体容量的限制难以实现多基因过表达。基于 CRISPR/Cas9 激活系统可在不同向导 RNA 的引导下对多个基因进行调控, 实现调控水平验证基因功能。本文通过对 CRISPR/Cas9 激活系统组成及不同激活策略进行总结, 整理针对过度激活的解决方案, 为 CRISPR/Cas9 激活系统应用于棉花遗传改良及除草剂抗性研究提供更多参考。

关键词: 基因编辑; CRISPR/Cas; 向导 RNA 改造; 转录激活元件

Advances of CRISPR/Cas9 activation system

DING Xiao, PAN Zhuanyxia, YANG Liuliu, LUO Xiaoli, JIANG Nan, ZHU Mengjie,
WU Cuicui, LAN Gang, LI Pengbo

Institute of Cotton, Shanxi Agricultural University, Yuncheng 044000, Shanxi, China

Abstract: Gene editing technology has been a hotspot in the field of biotechnology. CRISPR/Cas systems are efficient gene editing tools because of its specificity, simplicity and flexibility, these

Received: January 19, 2022; **Accepted:** April 6, 2022; **Published online:** April 13, 2022

Supported by: Research Project on Agricultural Science and Technology Innovation of Shanxi Academy of Agricultural Sciences (YGJPY2010); The Central Government Guides Local Science and Technology Development Fund Project, China

Corresponding author: LI Pengbo. E-mail: lpbmhs@126.com

基金项目: 山西省农业科学院农业科技创新研究课题 (YGJPY2010); 中央引导地方科技发展资金项目

features enabled the rapid application of CRISPR/Cas systems in a variety of organisms. Moreover, the combination of transcriptional activator with dead Cas protein can achieve specific regulation of gene expression at the transcription level, which has made important contributions to the development of biotechnology in medical and agriculture. Overexpression of foreign genes is a common method to verify gene function and regulation. However, due to the limitation of vector capacity, it is difficult to achieve overexpression of multiple genes. CRISPR/Cas9 activation system can regulate the expression of multiple genes under the guidance of different guide RNAs to verify gene functions at the regulatory level. This review summarizes the composition of the CRISPR/Cas9 activation system and different activation strategies, and summarizes solutions for excessive activation. It may facilitate the application of CRISPR/Cas9 activation system in genetic improvement of cotton and herbicide resistance research.

Keywords: genome editing; CRISPR/Cas; guide RNA modification; transcription activating element

基因表达涉及多个生命过程,包括 DNA 转录成信使 RNA (messenger RNA, mRNA)、mRNA 的剪接、翻译和翻译后修饰。精确控制 DNA 转录成 mRNA 的过程,是全面控制基因表达这一复杂过程的重要步骤。精确调控基因表达,将会有助于我们对细胞生理学的理解,这对于生物技术的进步是必不可少的。

对于内源基因表达的调控,经典研究是利用异源转录因子 (transcriptional factor, TF) 异位表达调控特定目标基因启动子,通过将一系列 TFs 靶向启动子进而激活/抑制基因的表达^[1]。例如,在哺乳动物中,4 种转录因子的同时上调使分化细胞逆转形成诱导的多能干细胞^[2],由于 TF 与 DNA 结合的特异性限制,难以自由调节更多基因的表达。随后科研人员利用人工设计启动子,用 TF 结合位点调节控制靶基因来绕过上述限制^[3],但复杂的方案设计使其在实际应用中并不常见。此外,自然存在的 TF 通常具有广泛的 DNA 结合活性,限制了该方法的特异性。

与 TF 固定结合位点不同,位点特异性核酸酶 (site specific nuclease, SSN),如 CRISPR/Cas9

已经作为多用途工具出现,大大提高了分子生物学家的研究能力^[4-7]。这些 SSN 系统最初是作为基因组编辑工具出现的,能够在特定基因组内的任何位置引入 DNA 双链断裂 (double strand breaks, DSB)^[8-10]。在已知的 DNA 结合模块中,利用融合到转录激活子或抑制子元件的失活 Cas9 (dead Cas9, dCas9) 核酸酶^[9,11],在不同 gRNA 的引导下,可以有效实现多个基因的调控^[12]。相较于锌指核酸酶 (zinc finger nuclease, ZFN)^[13]或转录激活物样效应物核酸酶 (transcription activator-like effector nuclease, TALEN)^[14]需要为每个目标序列重新编码调节蛋白,通过合成 gRNA 和 DNA 之间的碱基配对识别特定的 DNA 靶点的 CRISPR/dCas9 系统具有明显的优势^[15]。

本文回顾了基于 CRISPR/Cas9 系统的转录激活系统的出现与发展,并对这些新技术的应用潜力及存在的问题和挑战作简要讨论。

1 CRISPR/Cas9 激活系统的组成

1.1 CRISPR/dCas9

Cas9 是在细菌中发现的特异性 DNA 核酸

内切酶，如化脓性链球菌 (*Streptococcus pyogenes*)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、嗜热链球菌 (*Streptococcus thermophilus*) 等。Cas9 是一种多功能蛋白，具有两个核酸酶结构域，即 HNH 结构域和 RuvC 结构域。首先，Cas9 与两个小的非编码 RNA 形成核糖核蛋白复合物，即 CRISPR RNA (crRNA) 和反式激活 crRNA (trans-activating crRNA, tracrRNA); 其次，Cas9 的 RNA 复合体开始寻找合适的前间隔序列邻近基序(protospacer adjacent motif, PAM)，如化脓性链球菌 Cas9 (*Streptococcus pyogenes* cas9, SpCas9) 的 5'-NGG-3' 序列^[16]。识别出 PAM 序列后，Cas9 的 RNA 复合体从 PAM 序列后的前 10–12 个核苷酸解开 DNA 双链，如果 DNA 序列与 crRNA 靶序列相匹配，则 Cas9 的 HNH 核酸酶结构域将切割靶标链，而 RuvC 结构域将切割非靶标链^[17-19]。

2013 年, Qi 等将 CRISPR/Cas9 系统中 Cas9 蛋白的两个保守的内切核酸酶结构域进行突变，即 RuvC 结构域的第 10 位天冬氨酸突变为丙氨酸 (D10A) 和 HNH 结构域的第 840 位组氨酸突变为丙氨酸 (H840A)，使 Cas9 蛋白失去内切核酸酶活性使其成为 dCas9，dCas9 不能切

割 DNA 但仍能与特定 DNA 序列结合^[15]。dCas9 结合到转录起始位点 (transcription start sites, TSS) 上游启动子区域可以破坏 RNA 聚合酶或转录因子与启动子的结合，造成了在不改变基因组的情况下抑制基因表达的效果，因此被称为 CRISPR 干扰 (CRISPR interference, CRISPRi)，在原核生物中抑制强度最多可达到 1 000 倍^[20]。相反地，转录激活也可以通过改造 dCas9 来实现。Bikard 等在大肠杆菌中将 dCas9 蛋白与 ω 亚基融合，研究结果表明这种融合蛋白使报告基因在转录水平上提高了 2.8 倍，这种由 CRISPR 介导的转录激活称为 CRISPR 激活 (CRISPR activation, CRISPRa)^[21]。CRISPR 介导的转录调控如图 1 所示。

1.2 gRNA

gRNA 是由 tracrRNA 和 crRNA 融合形成的单个嵌合 RNA，用于将 dCas9 导向其靶标，它包含两个对 CRISPR 系统至关重要的区域，即支架区和间隔区^[10]。间隔区通常含有在启动子区与靶基因中发现的互补的核苷酸，支架区域则负责与 dCas9 形成复合物。由于 gRNA 的间隔区可以针对任何可能的序列进行修饰，具有与间隔区序列互补序列的任何基因或核苷酸都可能成为靶标，因此 CRISPR 系统具有极大的

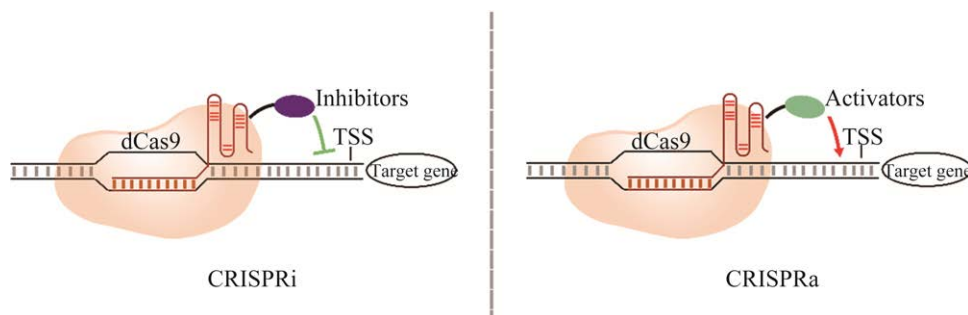


图 1 dCas9 蛋白介导的转录调控图示

Figure 1 Diagram of dCas9-mediated transcriptional repression and activation.

灵活性。gRNA 中负责与 Cas9 结合的序列同样也负责与 dCas9 结合形成复合物。并且由多个 gRNA 引导的 dCas9 可以同时结合几个不同的靶基因^[22]，有效提高了 CRISPR/dCas9 系统的灵活性和多重性。支架区改造的同时可以实现不同调控元件的挂载以及调控效率的提升^[23]。

1.3 转录调控因子

转录调控因子本质上是嵌合蛋白，其 DNA 结合结构域与控制转录机制的功能结构域相连，促进关键辅因子的募集从而调控转录^[24]。在 CRISPR/dCas9 系统中，通过将转录调控因子与 gRNA 或 dCas9 融合，实现对目的基因的转录调控。转录调控因子一方面包括转录阻遏因子，例如 KRAB (krüppel-associated box) 结构域，KRAB 的功能是通过募集共抑制因子来抑制转录，抑制作用由共抑制因子 KRAB 相关蛋白 1 (krab-associated protein 1, KAP-1) 的结合介导，KRAB-KAP 复合物会导致异染色质复合物的形成，最终导致基因沉默^[25]。转录调控因子另一方面即转录激活因子，例如单纯疱疹病毒蛋白 16 (herpes simplex virus protein, VP16) 的转录激活区 (transcription activation domain, TAD) 四聚体 VP64, VP64 的酸性残基被认为通过招募和稳定启动前复合物来激活转录^[26]。在可用的基因转录调控系统中，由于 gRNA 易于更改，并特异性定位新的靶标基因，多个不同 gRNA 向导的 dCas9 可以同时结合几个不同的靶位点^[22]。因此，基于 CRISPR/dCas 的转录调控工具与 ZFN^[27] 或 TALEN^[14] 相比，拥有其他两者无法企及的优势。

植物中也有特异性的转录调控因子，如与乙烯应答因子/乙烯反应元件结合蛋白 (ethylene responsive factor/ethylene-responsive element binding proteins, ERF/EREBP) 家族相关的植物转录调控因子^[28-31]。含有保守结构域 L/FDLNL/F (x) P 和 LxLxL 的乙烯反应因子相

关的反应抑制 (ethylene-responsive element binding factor-associated amphiphilic repression, EAR) 基序作为一个有效的植物转录阻遏因子，即使在激活元件存在的情况下也能保持其活性，而含有保守的谷氨酸 (glutamic acid, E)、天冬氨酸 (aspartic acid, D) 和亮氨酸 (leucine, L) 残基组成的 EDLL 短基序，在 TATA-box 或 GCC 的近端和远端位置都具有靶基因激活活性，是可以用于内源基因转录激活的强大工具^[32-33]。

2 利用 CRISPR/dCas9 实现转录激活的策略

如上所述，在不加修饰的 dCas9 靶向到目的基因启动子后会对其转录产生抑制作用。因此，想要通过 dCas9 进行转录激活调控，转录激活效应子是必不可少的。通过将转录激活效应子与 dCas9 融合，或修饰 gRNA 成为支架并利用它招募转录激活效应子都可以实现对目的基因的激活调控。以下将比较使用这两种策略的不同激活系统并对其效率进行评价。

2.1 转录激活效应子与 dCas9 融合

研究表明，将单纯疱疹病毒蛋白 VP16 的 TAD 四聚体构成的 VP64 作为可以招募和稳定启动前复合物的转录因子^[34]与 dCas9 蛋白融合称为 dCas9-VP64，当 dCas9-VP64 通过 gRNA 靶向到目标基因的启动子序列时募集调节目标基因启动子的转录因子实现转录激活^[35]。然而，dCas9-VP64 仅仅低强度地激活靶基因表达。在这个基础之上，研究人员又尝试将其他不同的激活剂与 dCas9 串联在一起，于是产生了以下 3 个系统。

2.1.1 SunTag 系统

在超新星标签 (SuperNovaTag, SunTag) 系统中，dCas9 与串联的重复多肽 GCN4 融合，并且每个重复多肽 GCN4 与带有转录调控因子的单链可变区片段抗体 (single chain fragment

variable, scFv) 结合实现转录调控。与最原始的 dCas9-VP64 相比, 使用 SunTag 系统可以将多个转录调控因子如十一易位蛋白 (ten-eleven translocation, TET) 或其他调控元件 X 募集到 dCas9 上, 实现多效激活^[36], 如图 2 所示。

2.1.2 dCas9-VPR 系统

研究人员将一系列已知的具有转录作用的候选效应子融合到 dCas9 的 C 末端, 在人类 HEK 293T 细胞中对报告基因进行荧光分析, 评估它们的转录激活效率。在这些被测试的复合蛋白中,

dCas9-VP64、dCas9-p65 和 dCas9-Rta 的激活效果最佳。其中, VP64 是单纯疱疹蛋白 16 的 TAD 四聚体, p65 则是核因子 κ B (nuclear factor kappa-B, NF- κ B) 蛋白质家族中的成员, 通过和该家族中的 p50 结合形成蛋白质二聚体后执行转录激活的功能^[37]。转录激活蛋白(replication and transcription activator, Rta) 主要由 Y 疱疹病毒 ORF50 所编码, 是 Y 疱疹病毒中具有序列保守性的一个蛋白分子。进一步以 dCas9-VP64 为起始支架在 C 端扩展融合上 p65 和 Rta 构成 VP64-p65-Rta (VPR) 激活元件, 如图 3 所示。与最原始的 dCas9-

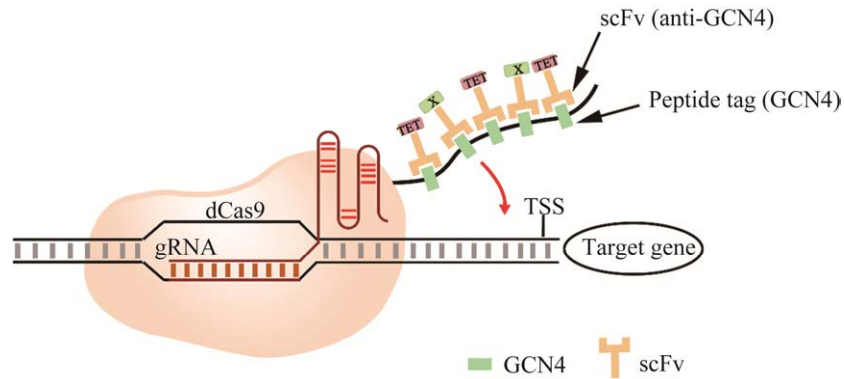


图 2 改良 SunTag 系统可同时招募 TET 和其他转录调控元件

Figure 2 Modified SunTag system for simultaneous recruitment of TET and another factor (factor X).

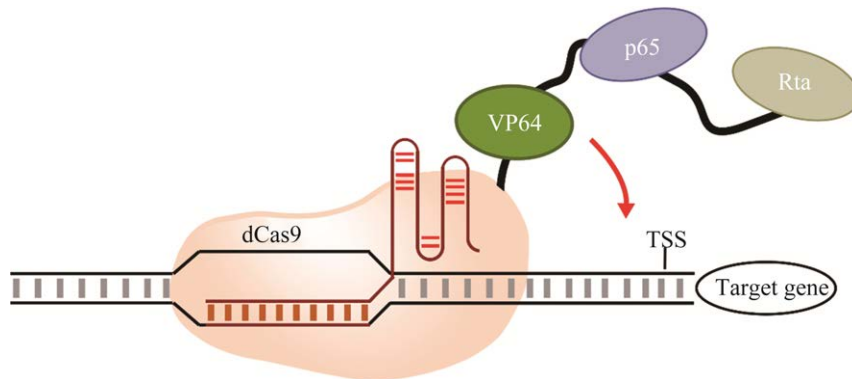


图 3 dCas9-VPR 系统图示

Figure 3 The diagram of dCas9-VPR system. The dCas9 fused with VP64-p65-Rta to activate the target gene.

VP64 激活元件相比, dCas9-VP64 表现出更高的内源性靶标激活水平, 从 22 倍提高到了 320 倍^[38]。

2.1.3 dCas9-TV 系统

Li 等用 VP16 的八聚体 VP128 代替了 VP64 来修饰 dCas9-VP64, 观察到 dCas9-VP128 可以将 LUC 激活 5 倍以上, 胜过了 dCas9-VP64 的 2 倍效果。然后引入了包括 EDLL 和 ERF2m (modified ERF2) 以及来自黄单胞菌 (*Xanthomonas*) TALE 的 TAD 作为增强 dCas9-VP128 活性的第二步。结果显示, VP128 与最多 4 个拷贝的串联 ERF2m-EDLL 基序的组合可以激活 LUC 表达, 相对于基础水平, 其激活效率高达 12.6 倍; 将 VP128 与最多 6 个拷贝的 TALE TAD (TAL) 结合, LUC 表达的最大激活程度超过了 55 倍。因此他们得出结论, dCas9-6TAL-VP128 是强转录激活因子, 并命名为 dCas9-TV^[39], 如图 4 所示。Xiong 等利用 dCas9-TV 同时将水稻中的 *OsGW7* 和 *OsER1* 上调高达 3 738 倍, 活性至少可以持续到第 4 代。同时在拟南芥中实现 *AtFLS2* 的转录上调^[40]。

2.2 改造 gRNA 成为招募转录激活效应子的支架

研究 RNA 定位的常用方法是将 MS2 噬菌

体外壳蛋白 (ms2 phage coat protein, MCP) 与绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 融合结合 RNA 3'UTR 区域中的 MS2 发卡结构, 用 GFP 分子标记 RNA 分子^[41]。RNA 固有的模块化 and 可编程性, 使其可以用于协调生物组装。首先, RNA 可以通过碱基互补配对的原则识别 DNA 靶标; 其次, RNA 拥有 RNA-蛋白质相互作用域, 用来募集特定的蛋白质。在以往的研究中, RNA 支架协调功能蛋白组装的能力已经得到了很好的证明^[42]。利用 CRISPR/dCas9 系统进行转录激活的第二种策略是将 gRNA 作为支架并招募转录激活效应子。

2.2.1 scRNA 系统

Zalatan 等使用能够募集 RNA 结合蛋白的 RNA 域去扩展 CRISPR 系统本身的 gRNA 序列, 使其成为支架 RNA (scaffold RNA, scRNA), 实现了通过修饰 gRNA 募集转录激活因子, 实现对特定基因进行转录激活的功能^[43]。

在这套系统中, 研究人员首先将识别招募转录激活因子模块 MS2、PP7 和 com 的 RNA 发夹结构域引入 gRNA 的 3'末端, 再分别由 MCP、PCP 和 Com RNA 结合蛋白识别, 随后再将转录激活因子 VP64 融合到相应的 RNA 结合蛋白上, 如图 5 所示。

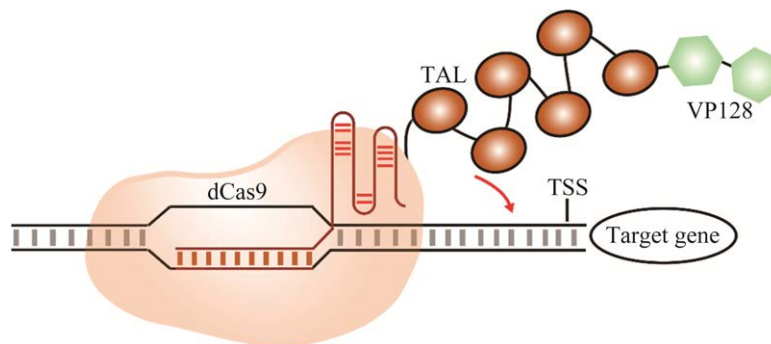


图 4 dCas9-TV 系统图示

Figure 4 The diagram of dCas9-TV system.

2.2.2 SAM 系统

协同激活系统 (synergistic activation mediator, SAM)的构建仍旧是通过改造 gRNA 茎环来实现的。Konermann 等确定了 dCas9 的晶体结构,并观察到 gRNA 的茎环远端 4 bp 完全不与 Cas9 的氨基酸侧链相互作用,因此茎环 4 和茎环 2 可以添加与蛋白质相互作用的 RNA 域,以促进转录激活因子向 dCas9 复合物的募集^[44]。为了进一步提高 dCas9 介导的基因激活效率,研究人员通过 MS2 将带有 VP64 的 dCas9 融合蛋白和 NF-κB 反式激活亚基 p65 结合在一起,再引入人热休克因子 1 (human heat shock

transcription factor 1, HSF1) 的激活域作为第三激活域^[44],如图 6 所示。

2.2.3 CRISPR-Act2.0 系统

CRISPR-Act2.0 系统是一种改进的多重转录激活系统^[45]。通过改变 gRNA 的结构,在 gRNA 的茎环上引入 MS2,创造多个 MS2 茎环,再将 MCP-VP64 蛋白募集到结合位点上。这套系统可以将 4 个 VP64 蛋白招募到 gRNA 上,再加上 dCas9-VP64 复合物本身带有的一个 VP64,这套系统总共可以将 5 个激活剂带到目标位置上,如图 7 所示。CRISPR-Act2.0 系统与之前的 dCas9-VP64 相比,将转录激活的效率提高了 3-4 倍。

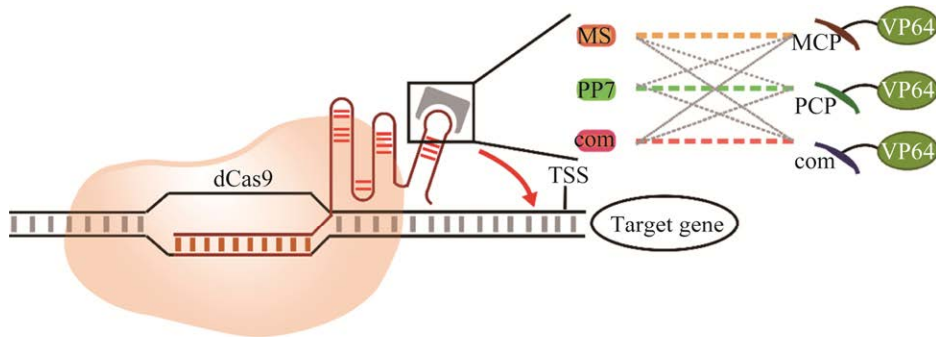


图 5 scRNA 系统图示

Figure 5 The diagram of scRNA system.

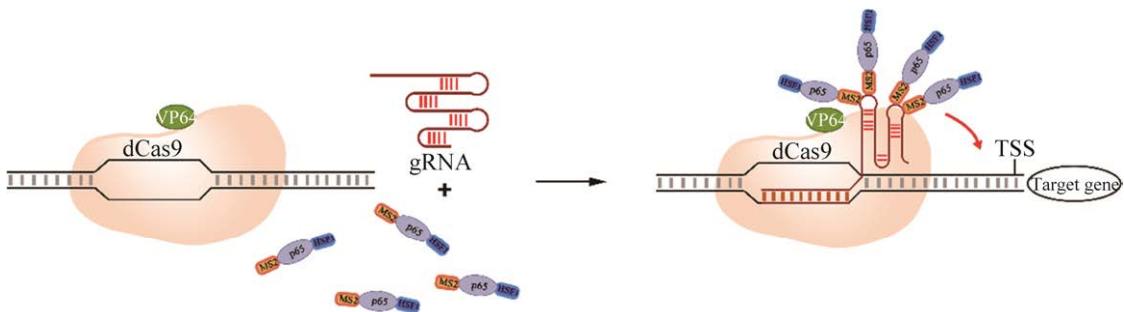


图 6 SAM 系统图示

Figure 6 The diagram of SAM system.

2.2.4 CRISPR-Act3.0 系统

Pan 等结合了 dCas9-VP64、gR2.0 支架、10xGCN4 SunTag 和新开发的 2xTAD 激活剂构成新的激活系统 CRISPR-Act3.0^[46], 如图 8 所示。该系统可实现多基因高效激活。为实现更多识别结合位点进一步将 Cas9 替换为 CRISPR-Cas12b 或 SpCas9 变体 SpRY, 扩展 CRISPR 激活的靶向范围。

在功能基因组学中, 一个核心问题是定义基因表达与表型特征之间的因果关系。CRISPR 激活体系提供了一种新的方法, 通过靶向植物中的基因激活来简化和加速此类研究。为了提

高 CRISPR 的激活效力, 靶向灵活性和可扩展性, 未来 CRISPR 激活系统依旧存在改进提升的空间。

3 结语

本文回顾了基于 CRISPR/dCas9 激活系统开发的策略, 这些策略可用于内源基因转录调控的研究, 但在其他物种中的应用仍处于验证阶段。因此存在许多研究机会, 例如, 多基因激活系统可实现大规模的转录调控, 以了解基因调控网络筛选关键驱动因子^[47]; 其次, 代谢途径中的多个关键基因的上调通常会产生

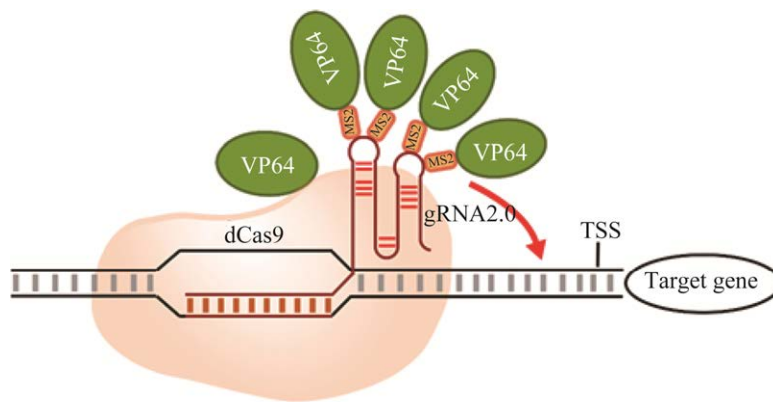


图 7 CRISPR-Act2.0 系统图示

Figure 7 The diagram of CRISPR-Act2.0 system.



图 8 CRISPR-Act3.0 系统图示

Figure 8 The diagram of CRISPR-Act3.0 system.

有价值的商业产物^[48], 合成生物学在植物领域将有大的突破; 第三, 蛋白复合物的功能提升需要同时调控多个基因的转录^[49], 多基因激活工具有助于蛋白复合体功能区域的研究; 最后, 针对病原体攻击的多个防御基因的定向激活是一种在不影响性状的情况下提高植物免疫的潜在策略^[50]。同时, 一些新的基因编辑工具特别是 Cas12a 含 T 的 PAM 与启动子的 AT box 相对应, 42–44 个核苷酸的 crRNA, 更有利于多个启动子的调控^[51]。

基于 CRISPR/Cas9 的转录激活系统仍在不断更新和升级中。例如, Chiarella 等利用化学遗传表观修饰元件 (chemical epigenetic modifier, CEM) 改进了基于 CRISPR/dCas9 的转录激活系统。这套系统能够募集内源染色质激活元件来激活目标基因的表达, 从而消除了对外源转录激活元件的需求, 实现了剂量依赖性激活靶基因的表达^[52]。Gamboa 等也做出了新的尝试, 将热激基因开关与 dCas9 复合物整合在一起, 以短时间加热脉冲来远程控制基因激活和抑制^[53]。实验结果表明, 以热量作为触发器的 dCas9-VP64 复合物的激活强度取决于热脉冲, 短短 15 min 的热激活就可以实现 dCas9 表达的显著提高。这种热触发的 CRISPR/dCas9 转录激活系统具有无创的优点。对于植物内源基因的诱导调控, 光调控提供了一种新的激活调控解决方案, Ochoa-Fernandez 等研究开发了一种可用于植物的光开关元件 (plant usable light-switch elements, PULSE) 来解决光遗传学工具与植物生长需求兼容性的问题, 将蓝光感应抑制调节和红光感应激活调节结合在一起使基因表达只在红光下被激活, 在白光或黑暗中则不活跃。将 PULSE 与 CRISPR/Cas9 介导的基因激活系统 (dCas9-TV) 相结合, 展示了其对拟南芥的光控制激活作用^[54]。

相较于具备切割活性的核酸酶往往造成基因组不确定的改变, 及在多位点编辑的过程中导致染色体重排或缺失^[55], CRISPR 转录调控体系应用的 dCas9 核酸酶可有效避免以上问题, 在实际应用中体现了各类优势。但该技术依旧存在挑战, 即如何创建多个 gRNA 串联的长序列, 并预测不同靶向基因的编辑效率^[56]; 在多重位点 CRISPR 编辑体系下, 随着细胞中 gRNA 数量的增加, 必然存在不同 gRNA 竞争相对减少的核酸酶, 这种竞争反过来会改变每个 gRNA 的效率^[57], 同时更多类型的 gRNA 对受体本身的 RNA 调控同样存在不确定性^[58]。相信未来会克服以上技术难题, 基于 CRISPR 的转录调控技术将获得进一步的提升。

目前 CRISPR/Cas9 系统已在几种作物上定向修饰除草剂靶标基因以获得抗除草剂性状, 为作物分子育种提供了新的途径。例如, 利用 CRISPR/Cas9 技术, 通过非同源修复机制获得抗草甘膦水稻, 以及通过单碱基编辑和 PE 系统采用碱基替代和插入策略定向修饰内源性 EPSPS 基因得到了含有不连续点突变的抗除草剂水稻。以及通过编辑 ALS UTR 区调高目标基因表达实现除草剂抗性^[59]。然而目前并没有关于利用 CRISPR/Cas9 转录激活系统激活内源基因以创造抗除草剂作物的报告。通过农杆菌介导的遗传转化将不同的转录激活元件结合 dCas9 导入棉花中, 比较不同激活元件在棉花中激活效率的差异。进一步设计靶标激活除草剂目标基因如 GhEPSP 或 GhALS, 实现棉花除草剂耐受性提高。相较于传统外源基因的过表达以及内源基因突变存在基因漂移导致超级杂草的风险, CRISPR 转录激活需具备 dCas9、转录激活元件及对应的 gRNA (sgRNA 为靶向启动子的序列, 为 gRNA 的一部分, 其余部分均一致, 这里用 gRNA) 三个要素, 极大降低了超

级杂草的风险。进一步配合转录组分析挖掘棉花响应除草剂基因,利用荧光蛋白 GFP 等验证该基因启动子除草剂诱导活性,实现 CRISPR 转录激活的诱导型调控,避免过度激活给棉花带来的能量及物质负担。未来基于 CRISPR 的转录调控在棉花以及其他作物中通过串联多个不同除草剂靶标基因启动子的 gRNA,同时激活多个除草剂靶标基因,实现多重除草剂抗性,有效避免使用单一除草剂导致的杂草抗性,对创制除草剂抗性材料的应用具有重要价值(目前相关工作未发表)。

REFERENCES

- [1] Spitz F, Furlong EEM. Transcription factors: from enhancer binding to developmental control. *Nature Reviews Genetics*, 2012, 13(9): 613-626.
- [2] Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature*, 2007, 448(7151): 313-317.
- [3] Kumar S, AlAbed D, Whitteck JT, et al. A combinatorial bidirectional and bicistronic approach for coordinated multi-gene expression in corn. *Plant Mol Biol*, 2015, 87(4/5): 341-353.
- [4] Puchta H, Fauser F. Synthetic nucleases for genome engineering in plants: prospects for a bright future. *Plant J*, 2014, 78(5): 727-741.
- [5] Carroll D. Genome engineering with targetable nucleases. *Annu Rev Biochem*, 2014, 83: 409-439.
- [6] Voytas DF. Plant genome engineering with sequence-specific nucleases. *Annu Rev Plant Biol*, 2013, 64: 327-350.
- [7] Weeks DP, Spalding MH, Yang B. Use of designer nucleases for targeted gene and genome editing in plants. *Plant Biotechnol J*, 2016, 14(2): 483-495.
- [8] Cong L, Ran FA, Cox D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 2013, 339(6121): 819-823.
- [9] Ma XL, Zhu QL, Chen YL, et al. CRISPR/Cas9 platforms for genome editing in plants: developments and applications. *Mol Plant*, 2016, 9(7): 961-974.
- [10] Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 2012, 337(6096): 816-821.
- [11] Lowder L, Malzahn A, Qi YP. Rapid evolution of manifold CRISPR systems for plant genome editing. *Front Plant Sci*, 2016, 7: 1683.
- [12] Maeder ML, Linder SJ, Cascio VM, et al. CRISPR RNA-guided activation of endogenous human genes. *Nat Methods*, 2013, 10(10): 977-979.
- [13] Lindhout BI, Pinas JE, Hooykaas PJJ, et al. Employing libraries of zinc finger artificial transcription factors to screen for homologous recombination mutants in *Arabidopsis*. *Plant J*, 2006, 48(3): 475-483.
- [14] Liu WS, Rudis MR, Peng YH, et al. Synthetic TAL effectors for targeted enhancement of transgene expression in plants. *Plant Biotechnol J*, 2014, 12(4): 436-446.
- [15] 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.
- [16] Chylinski K, Le Rhun A, Charpentier E. The tracrRNA and Cas9 families of type II CRISPR-Cas immunity systems. *RNA Biol*, 2013, 10(5): 726-737.
- [17] Nishimasu H, Cong L, Yan WX, et al. Crystal structure of *Staphylococcus aureus* Cas9. *Cell*, 2015, 162(5): 1113-1126.
- [18] Jinek M, Jiang FG, Taylor DW, et al. Structures of Cas9 endonucleases reveal RNA-mediated conformational activation. *Science*, 2014, 343(6176): 1247997.
- [19] Anders C, Niewoehner O, Duerst A, et al. Structural basis of PAM-dependent target DNA recognition by the Cas9 endonuclease. *Nature*, 2014, 513(7519): 569-573.
- [20] Wang Y, Zhang ZT, Seo SO, et al. Gene transcription repression in *Clostridium beijerinckii* using CRISPR-dCas9. *Biotechnol Bioeng*, 2016, 113(12): 2739-2743.
- [21] Bikard D, Jiang WY, Samai P, et al. Programmable repression and activation of bacterial gene expression using an engineered CRISPR-Cas system. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41(15): 7429-7437.
- [22] Didovyk A, Borek B, Tsimring L, et al. Transcriptional regulation with CRISPR-Cas9: principles, advances, and applications. *Curr Opin Biotechnol*, 2016, 40: 177-184.
- [23] Li ZX, Xiong XY, Li JF. The working dead: repurposing inactive CRISPR-associated nucleases as programmable transcriptional regulators in plants. *aBIOTECH*, 2020, 1(1): 32-40.
- [24] Piatek A, Ali Z, Baazim H, et al. RNA-guided

- transcriptional regulation in planta via synthetic dCas9-based transcription factors. *Plant Biotechnol J*, 2015, 13(4): 578-589.
- [25] Collins T, Stone JR, Williams AJ. All in the family: the BTB/POZ, KRAB, and SCAN domains. *Mol Cell Biol*, 2001, 21(11): 3609-3615.
- [26] Perez-Pinera P, Ousterout DG, Brunger JM, et al. Synergistic and tunable human gene activation by combinations of synthetic transcription factors. *Nat Methods*, 2013, 10(3): 239-242.
- [27] Lindhout BI, Pinas JE, Hooykaas PJJ, et al. Employing libraries of zinc finger artificial transcription factors to screen for homologous recombination mutants in *Arabidopsis*. *Plant J*, 2006, 48(3): 475-483.
- [28] Tiwari SB, Belachew A, Ma SF, et al. The EDLL motif: a potent plant transcriptional activation domain from AP2/ERF transcription factors. *Plant J*, 2012, 70(5): 855-865.
- [29] Azzeme AM, Abdullah SNA, Aziz MA, et al. Oil palm drought inducible DREB1 induced expression of DRE/CRT- and non-DRE/CRT-containing genes in lowland transgenic tomato under cold and PEG treatments. *Plant Physiol Biochem*, 2017, 112: 129-151.
- [30] Abdullah SNA, Azzeme AM, Ebrahimi M, et al. Crop improvement[M]. [S.l.]: Springer, 2017: 71-99.
- [31] Ebrahimi M, Abdullah SNA, Abdul Aziz M, et al. Oil palm EgCBF₃ conferred stress tolerance in transgenic tomato plants through modulation of the ethylene signaling pathway. *J Plant Physiol*, 2016, 202: 107-120.
- [32] Lowder LG, Zhang DW, Baltus NJ, et al. A CRISPR/Cas9 toolbox for multiplexed plant genome editing and transcriptional regulation. *Plant Physiol*, 2015, 169(2): 971-985.
- [33] Lowder LG, Paul JW, Qi Y. Plant gene regulatory networks[M]. [S.l.]: Springer, 2017: 167-184.
- [34] Perez-Pinera P, Kocak DD, Vockley CM, et al. RNA-guided gene activation by CRISPR-Cas9-based transcription factors. *Nat Methods*, 2013, 10(10): 973-976.
- [35] Paul JW 3rd, Qi YP. CRISPR/Cas9 for plant genome editing: accomplishments, problems and prospects. *Plant Cell Rep*, 2016, 35(7): 1417-1427.
- [36] Morita S, Horii T, Kimura M, et al. Synergistic upregulation of target genes by TET1 and VP64 in the dCas9-SunTag platform. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(5): 1574.
- [37] Van Essen D, Engist B, Natoli G, et al. Two modes of transcriptional activation at native promoters by NF-kappaB p65. *PLoS Biol*, 2009, 7(3): e73.
- [38] Chavez A, Scheiman J, Vora S, et al. Highly efficient Cas9-mediated transcriptional programming. *Nat Methods*, 2015, 12(4): 326-328.
- [39] Li ZX, Zhang DD, Xiong XY, et al. A potent Cas9-derived gene activator for plant and mammalian cells. *Nat Plants*, 2017, 3(12): 930-936.
- [40] Xiong XY, Liang JP, Li ZX, et al. Multiplex and optimization of dCas9-TV-mediated gene activation in plants. *J Integr Plant Biol*, 2021, 63(4): 634-645.
- [41] Fusco D, Accornero N, Lavoie B, et al. Single mRNA molecules demonstrate probabilistic movement in living mammalian cells. *Curr Biol*, 2003, 13(2): 161-167.
- [42] Delebecque CJ, Lindner AB, Silver PA, et al. Organization of intracellular reactions with rationally designed RNA assemblies. *Science*, 2011, 333(6041): 470-474.
- [43] Zalatan JG, Lee ME, Almeida R, et al. Engineering complex synthetic transcriptional programs with CRISPR RNA scaffolds. *Cell*, 2015, 160(1/2): 339-350.
- [44] Konermann S, Brigham MD, Trevino AE, et al. Genome-scale transcriptional activation by an engineered CRISPR-Cas9 complex. *Nature*, 2015, 517(7536): 583-588.
- [45] Malzahn A, Zhang Y, Qi Y. *Plant Genome Editing With CRISPR Systems: Methods and Protocols*. New York: Springer, 2019: 83-93.
- [46] Pan CT, Wu XC, Markel K, et al. CRISPR-Act3.0 for highly efficient multiplexed gene activation in plants. *Nat Plants*, 2021, 7(7): 942-953.
- [47] Joung J, Kirchgatterer PC, Singh A, et al. CRISPR activation screen identifies BCL-2 proteins and B3GNT2 as drivers of cancer resistance to T cell-mediated cytotoxicity. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 1606.
- [48] Zorrilla-López U, Masip G, Arjó G, et al. Engineering metabolic pathways in plants by multigene transformation. *Int J Dev Biol*, 2013, 57(6/7/8): 565-576.
- [49] Dzivenu OK, Park HH, Wu H. General co-expression vectors for the overexpression of heterodimeric protein complexes in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif*, 2004, 38(1): 1-8.
- [50] Wally O, Punja ZK. Genetic engineering for increasing fungal and bacterial disease resistance in crop plants. *GM Crops*, 2010, 1(4): 199-206.

-
- [51] Safari F, Zare K, Negahdaripour M, et al. CRISPR Cpf1 proteins: structure, function and implications for genome editing. *Cell Biosci*, 2019, 9: 36.
- [52] Chiarella AM, Butler KV, Gryder BE, et al. Dose-dependent activation of gene expression is achieved using CRISPR and small molecules that recruit endogenous chromatin machinery. *Nat Biotechnol*, 2020, 38(1): 50-55.
- [53] Gamboa L, Phung EV, Li HX, et al. Heat-triggered remote control of CRISPR-dCas9 for tunable transcriptional modulation. *ACS Chem Biol*, 2020, 15(2): 533-542.
- [54] Ochoa-Fernandez R, Abel NB, Wieland FG, et al. Optogenetic control of gene expression in plants in the presence of ambient white light. *Nat Methods*, 2020, 17(7): 717-725.
- [55] Shou J, Li JH, Liu YB, et al. Precise and predictable CRISPR chromosomal rearrangements reveal principles of Cas9-mediated nucleotide insertion. *Mol Cell*, 2018, 71(4): 498-509.e4.
- [56] McCarty NS, Graham AE, Studená L, et al. Multiplexed CRISPR technologies for gene editing and transcriptional regulation. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 1281.
- [57] Zhang SY, Voigt CA. Engineered dCas9 with reduced toxicity in bacteria: implications for genetic circuit design. *Nucleic Acids Res*, 2018, 46(20): 11115-11125.
- [58] Mao YF, Yang XX, Zhou YT, et al. Manipulating plant RNA-silencing pathways to improve the gene editing efficiency of CRISPR/Cas9 systems. *Genome Biol*, 2018, 19(1): 149.
- [59] Lu Y, Wang JY, Chen B, et al. A donor-DNA-free CRISPR/Cas-based approach to gene knock-up in rice. *Nat Plants*, 2021, 7(11): 1445-1452.

(本文责编 郝丽芳)