

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2013.01265

CRISPR/Cas 系统：RNA 靶向的基因组定向编辑新技术

李君, 张毅, 陈坤玲, 单奇伟, 王延鹏, 梁振, 高彩霞

中国科学院遗传与发育生物学研究所, 植物细胞与染色体工程国家重点实验室, 北京 100010

摘要: CRISPR/Cas 系统广泛存在于细菌及古生菌中, 是机体长期进化形成的 RNA 指导的降解入侵病毒或噬菌体 DNA 的适应性免疫系统。对 I 型 CRISPR/Cas 系统的改造使其成为继锌指核酸酶(ZFNs)和 TALE 核酸酶(TALENs)以来的另一种对基因组进行高效定点修饰的新技术, 与 ZFNs 和 TALENs 相比, CRISPR/Cas 系统更简单, 并且更容易操作。文章重点介绍了 II 型 CRISPR/Cas 系统的基本结构、作用原理及这一技术在基因组定点修饰中的应用, 剖析了该技术可能存在的问题, 展望了 CRISPR/Cas 系统的应用前景, 为开展这一领域的研究工作提供参考。

关键词: CRISPR/Cas 系统; 基因组定点修饰; 向导 RNA

CRISPR/Cas: a novel way of RNA-guided genome editing

LI Jun, ZHANG Yi, CHEN Kun-Ling, SHAN Qi-Wei, WANG Yan-Peng, LIANG Zhen, GAO Cai-Xia

State Key Laboratory of Plant Cell and Chromosome Engineering, Institute of Genetics and Developmental Biology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100010, China

Abstract: Bacteria and archaea have evolved an adaptive immune system, known as type I prokaryotic clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/CRISPR-associated (Cas) system, which uses short RNA to direct the degradation of target sequences present in invading viral and plasmid DNAs. Recent advances in CRISPR/Cas system provide an improved method for genome editing, showing robust and specific RNA-guided endonuclease activity at targeted endogenous genomic loci. It is the latest technology to modify genome DNA specifically and effectively following zinc finger nucleases (ZFNs) and TALE nucleases (TALENs). Compared with ZFNs and TALENs, CRISPR/Cas is much simpler and easier to engineer. This review summarizes recent progress, and discusses the prospects of CRISPR/Cas system, with an emphasis on its structure, principle, applications and potential challenges.

Keywords: CRISPR/Cas system; targeted genome modification; single guide RNA (sgRNA)

收稿日期: 2013-07-16; 修回日期: 2013-09-04

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 383601, 31071479, 31200273)和转基因重大专项(编号: 2013ZX08002-004, 2013ZX08002-005 和 2013ZX08010-002)资助

作者简介: 李君, 博士研究生, 专业方向: 遗传学。E-mail: lijun@genetics.ac.cn

通讯作者: 高彩霞, 博士, 研究员, 博士生导师, 研究方向: 遗传学。E-mail: cxgao@genetics.ac.cn

网络出版时间: 2013-10-14 9:41:22

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20131014.0941.001.html>

在现代生物科学研究中,基因组编辑(Genome editing)技术是人们了解特定基因功能的基础^[1]。随着越来越多物种全基因组测序的完成,科学家们面临的一个挑战就是如何从海量的数据中获得基因功能和应用信息,基因组的定点编辑技术是实现这个目标的重要研究工具,为此也被 *Science* 评为 2012 年十大重要科学进展之一。近年来兴起的基因组定点编辑技术包括以下几种人工核酸酶: 锌指核酸酶(Zinc-finger nucleases, ZFNs)^[2-5], TALE 核酸酶(Transcription activator like effector nucleases, TALENs)^[6-10], 以及近一年来兴起的一项新技术——CRISPR/Cas 系统(CRISPR/Cas system)。这些人工核酸酶都可以在 DNA 靶位点产生 DNA 双链断裂(Double strand breaks, DSBs), 它们对基因组定点编辑是通过控制 DNA 的修复途径实现的, DNA 损伤后产生的 DSBs 激活细胞内固有的非同源末端连接(Non-homologous ending-joining, NHEJ)或同源重组(Homologous recombination, HR)两种不同的修复机制对损伤的 DNA 进行修复^[11], 从而实现对基因组的定点编辑。

ZFNs 由含有串联的锌指 DNA 结构域的转录因子蛋白 ZFA(又被称为锌指蛋白)和非特异性的核酸内切酶 *FokI* 的切割结构域融合而成。ZFNs 中的 DNA 结合域特异性识别并结合与其对应的 DNA 序列, 当两个 ZFN 单体同各自的目标位点特异结合时, 形成有切割活性的 *FokI* 二聚体, 在靶位点将 DNA 切断。关于 ZFNs 在基因组定点改造方面的应用, Klug^[12]做了非常详细的介绍。TALENs 是利用 TAL 效应子的 DNA 结合结构域和非特异性的核酸内切酶 *FokI* 的切割结构域人工合成的核酸酶。TAL 由多个串联重复的单元组成, 每个重复单元通常由 33~35 个氨基酸组成, 重复单元的氨基酸高度保守, 但是各单元的第 12 和 13 位两个氨基酸是可变的, 通常被称为重复可变双残基(Repeat variable di-residue, RVD)^[13,14]。TALENs 的两个 TAL 单体结合在 DNA 双链上, 形成有切割活性的 *FokI* 二聚体在靶位点区将 DNA 切断, TALENs 在基因组定点修饰方面具有广泛的研究和应用^[15]。然而, ZFNs 和 TALENs 这两项技术在实施操作过程中技术难度较大、构建组装时间较长, 一般实验室很难得到有效利用。2013 年初, 基于细菌获得性免疫系统改造而成的一种全新的人工核酸酶 CRISPR/Cas 系统出现了, 该人工核酸酶操作简单, 制作成本低, 适用于普通分子生

物学实验室。

CRISPR/Cas 系统作为一种新兴的基因定点编辑技术逐渐成熟并在多个动植物物种中成功得到应用, 极大地促进了基因功能的研究。CRISPR/Cas 系统广泛分布于细菌和古生菌基因组中, 是在进化过程中形成的一种适应性免疫系统, 可以降解入侵病毒或质粒 DNA^[16-18]。本文将从 型 CRISPR/Cas 系统的基本结构、作用原理、在动植物基因组定点修饰中的应用及其可能存在的问题等方面介绍 CRISPR/Cas 系统的研究进展。

1 CRISPR/Cas 系统

1.1 CRISPR/Cas 系统的基本结构

1987 年, 在 *E.coli* K12 的碱性磷酸酶基因附近区域首次发现了成簇的规律间隔的短回文重复序列^[11], 2002 年科学家将其正式命名为 Clustered regularly interspaced short palindromic repeats(CRISPR)。它是一类新型的 DNA 重复序列, 研究发现约有 40%已经测序过的细菌基因组中都存在 CRISPR 位点^[12], CRISPR 位点通常定位于原核细胞染色体上, 个别定位于质粒中。CRISPR 位点的数量在不同物种间有所不同, CRISPR 中重复序列的数量也随着不同物种而有所变化^[19]。CRISPR 由一系列短的高度保守的正向重复序列(repeats)与长度相似的间隔序列(spacers)间隔排列组成, 如图 1 所示。CRISPR 的间隔序列与一些噬菌体或质粒的序列存在同源性^[13,20], 这些间隔序列为宿主细胞提供了一种对抗外源基因侵染的能力, 是细菌及古生菌进化形成的适应性免疫系统。

CRISPR 位点附近存在着一系列保守的 CRISPR 相关基因(CRISPR-associated genes, *Cas* genes), 这些 *Cas* 基因是 CRISPR 免疫防御途径中的基本组成成分, 往往与 CRISPR 位点的重复序列相连, 如图 1 所示。*Cas* 基因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, *Cas* 蛋白通过位点特异性的切割将入侵 DNA 切断。CRISPR 位点的第一个重复序列上游有 CRISPR 前导序列(Leader sequence), 该前导序列可以作为启动子, 启动 CRISPR 序列的转录^[21], 转录产生的非编码 RNA 被命名为 CRISPR RNAs(crRNAs)^[22], 这些 crRNA 和 *Cas* 蛋白共同参与

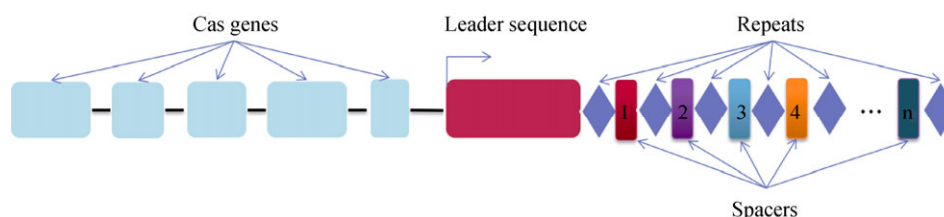


图 1 CRISPR 位点结构

CRISPR 免疫防御过程。这些里程碑式的发现阐明了 CRISPR/Cas 系统通过 crRNA 和 Cas 蛋白共同参与到对外源噬菌体以及质粒的免疫防御过程,同时也为人类更深入的探究 CRISPR/Cas 系统的分子机制奠定了基础。

1.2 CRISPR/Cas 系统作用机制

到目前为止,虽然 CRISPR/Cas 系统的详细作用机制尚未完全阐明,但已基本明确了该作用机制的整个过程,该过程大体分为 3 个阶段:在噬菌体入侵的起始阶段,Cas 蛋白复合物靶向并裂解噬菌体基因组中的原型间隔序列(protospacer),protospacer 接下来整合到宿主基因组的 CRISPR 位点的 5'端;然后这些短的掺入的 protospacer 被转录成 crRNA;最后阶段是在 Cas 蛋白复合物的参与下,靶向和干扰侵入的噬菌体 DNA 序列^[21]。当同种噬菌体再次入侵时,CRISPR 的 repeats 序列截取和保留的入侵噬菌体的某些 DNA 片段形成 spacers,spacers 会转录形成一些小的 crRNA,这些 crRNA 会与 trans-activating crRNA(tracrRNA)形成一种双链二级结构,以此招募 Cas 蛋白,crRNA、tracrRNA 以及 Cas 蛋白形成复合体,识别紧随 protospacer 序列后的 PAM 序列,Cas 蛋白的核酸酶结构域对与 crRNA 互补的双链 DNA 进行切割,从而使细菌具有对抗同类噬菌体再次入侵的能力。

根据 Cas 基因核心元件序列的不同,CRISPR/Cas 免疫系统被分为 3 种类型:Ⅰ型、Ⅱ型和Ⅲ型。

Ⅱ型和Ⅲ型 CRISPR/Cas 免疫系统需要多个 Cas 蛋白形成复合体切割 DNA 双链,而Ⅰ型 CRISPR/Cas 免疫系统只需要一个 Cas9 蛋白来切割 DNA 双链,目前Ⅰ型系统是被改造的最为成功的人工核酸酶。体外实验证明 Cas9 基因是参与 CRISPR 免疫系统的唯一必需基因^[23],Cas9 是由 1 409 个氨基酸组成的多结构域蛋白,含有 2 个核酸酶结构域:氨基端的

RuvC-like 结构域及位于蛋白中间位置的 HNH 核酸酶结构域,HNH 核酸酶结构域可以切割与 crRNA 互补配对的模板链,切割位点位于原型间隔序列毗邻基序(Protospacer adjacent motif, PAM)上游 3nt 处,RuvC-like 结构域可以对另一条链进行切割,切割位点位于 PAM 上游 3~8nt 处^[35]。在 crRNA 与 tracrRNA 形成的双链 RNA 的指导下(图 2a),Cas9 蛋白对靶位点进行切割(图 2)。

1.3 CRISPR/Cas 系统的应用

crRNA 与 tracrRNA 可以形成嵌合 RNA 分子,被称为向导 RNA(Single guide RNA, sgRNA)(图 2b),在 sgRNA 的介导下,Cas9 蛋白在目的基因处切割,形成 DSBs,该过程是 CRISPR/Cas 对基因组进行编辑的基础^[21]。基于Ⅰ型 CRISPR/Cas 系统,科研工作者发明了一种便捷的基因组编辑技术^[24~26],该技术已经成功应用于大肠杆菌^[27]、肺炎双球菌^[27]、酿酒酵母^[28]、斑马鱼^[29]、小鼠细胞^[30]、小鼠^[31,32]、人类多种细胞系^[33]、果蝇^[34]、线虫^[35]、大鼠^[36]、水稻^[37,38]、小麦^[37]、拟南芥^[38,39]以及本生烟^[39,40]中(表 1)。

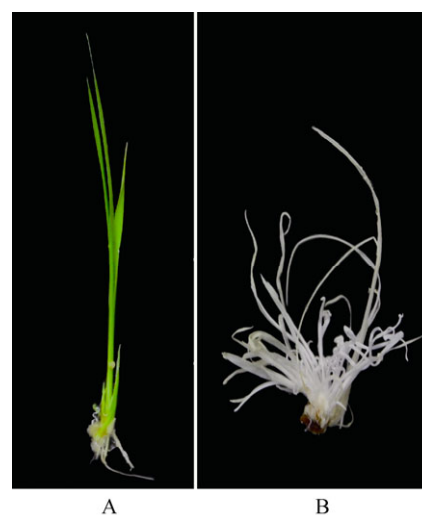
Jienk 等^[41]最先利用 CRISPR 系统作用于含有互补序列的目标 DNA,成功得到了在该 DNA 特定位点的 DSBs,为此后 RNA 介导的基因编辑奠定了基础;证实了由 tracrRNA 和 crRNA 组成的双链 RNA 结构引导 Cas9 蛋白的 HNH 和 RuvC 结构域在靶 DNA 的 PAM 序列上游 3~8 bp 处形成双链断裂;同时发现把 tracrRNA 和 crRNA 整合为一个 RNA 转录本时,也能引导 Cas9 蛋白识别靶序列并切断双链 DNA。此后,Church 实验室通过构建Ⅰ型 CRISPR/Cas 系统在多种人类细胞系中获得了预期的 NHEJ 修复方式产生的基因突变,突变效率与细胞类型和 RNA 表达载体有关,突变效率在 2%~38%之间^[33]。同时,Cong 等^[30]构建了两种不同类型的Ⅰ型 CRISPR/Cas 系统,证明 Cas9 核酸酶在短 RNAs 指导下可以

表 1 目前已报道实现内源基因定点编辑的 CRISPR/Cas9 部分实例列表

物种	靶向基因	修复途径	发表杂志	参考文献
人类细胞	<i>AAVSI</i>	NHEJ, HR	<i>Science</i>	[33]
小鼠细胞	<i>Th</i>	NHEJ, HR	<i>Science</i>	[30]
斑马鱼 (<i>Danio rerio</i>)	<i>fh1, tia11, gsk3b etc.</i>	NHEJ	<i>Nat Bio</i>	[43]
肺炎双球菌 (<i>Diplococcus pneumoniae</i>)	<i>BgaA, srtA, remAM</i>	NHEJ	<i>Nat Bio</i>	[27]
大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)	<i>rpsL</i>	NHEJ	<i>Nat Bio</i>	[27]
酿酒酵母 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	<i>CAN1</i>	NHEJ, HR	<i>Nucleic Acids Res</i>	[28]
小鼠 (<i>Mus musculus</i>)	<i>Tet1, Tet2, Tet3, Sry, Uty</i>	NHEJ, HR	<i>Cell</i>	[32]
果蝇 (<i>Drosophila melanogaster</i>)	<i>Yellow</i>	NHEJ, HR	<i>Genetics</i>	[34]
线虫 (<i>Caenorhabditis elegans</i>)	<i>Unc-119, dpy-13, klp-12</i>	NHEJ	<i>Nat Bio</i>	[35]
大鼠 (<i>Rattus norvegicus</i>)	<i>Mc3R, Mc4R</i>	NHEJ	<i>Nat Bio</i>	[36]
水稻 (<i>Oryza sativa</i>)	<i>PDS, MPK2, BADH2, Os02g23823</i>	NHEJ, HR	<i>Nat Bio</i>	[37]
小麦 (<i>Triticum aestivum</i>)	<i>MLO</i>	NHEJ	<i>Nat Bio</i>	[37]
拟南芥 (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	<i>PDS, FLS</i>	NHEJ	<i>Nat Bio</i>	[39]
本生烟 (<i>Nicotiana benthamiana</i>)	<i>PDS</i>	NHEJ, HR	<i>Nat Bio</i>	[39]

基因组定向编辑新技术, 本实验室不仅获得了 *OsPDS*、*OsMPK2* 以及 *OsBADH2* 基因定向改造的突变体, 并且在 T_0 代获得了水稻 *PDS* 基因功能缺失的纯合突变体, 该突变体呈现预期的白化和矮小表型(图 3); 此外, 该系统还可以利用单链寡核苷酸 DNA(ssDNA) 作为模板, 通过同源重组 DNA 修复途径在基因特定位点精确插入 12 bp 两个限制性内切酶识别序列。首次证实 CRISPR/Cas 系统能够用于作物基因组定点编辑, 该技术的突破有望加速重要农作物水稻、小麦性状改良与分子定向育种^[37], 该文也吸引了广泛的关注, 成为 *Nature Biotechnology* 2013 年 8 月阅读率最高的论文之一。2013 年 8 月 23 日, *Science* 的 News focus 撰文高度评价 CRISPR/Cas 系统在各个物种基因组定点编辑中的广泛应用及在基因工程的应用潜力, 也报道了本实验室在 *OsPDS* 基因功能缺失突变的成功以及作物基因组定点编辑中的贡献^[44]。Jen Sheen 实验室利用 CRISPR/Cas 系统在模式植物拟南芥和本生烟中实现了基因组的定点突变, 突变效率为 1.1%~38.5%; 利用 CRISPR/Cas 系统实现了对两个基因(*AtRACK1b* 和 *AtRACK1c*)或同一个基因的两个不同位点(*AtPDS3*)同时进行编辑; 此外, 以双链 DNA 作为模板, 通过同源重组 DNA 修复方式在烟草 *PDS* 基因的特定位点精确插入 6 bp 的一个限制性内切酶酶切位点^[39]。Sophien Kamoun 实验室

利用 CRISPR/Cas 系统在模式植物本生烟中实现了基因组的定点突变, 突变效率为 1.8%~2.4%^[40]。之后, 朱健康实验室利用 CRISPR/Cas 系统在模式植物拟南芥和水稻中实现了基因组的定点突变, 突变效率为 5%~84%; *GAI* 基因功能缺失的 T_1 代拟南芥植株表现出矮小的表型, *YSA* 基因突变的 T_0 代水稻叶片有白化现象^[38]。

图 3 水稻 *PDS* 基因功能缺失突变体

A: 野生型; B: 水稻 *PDS* 基因纯合突变的功能缺失的白化矮小突变体。

此外, Chang 等^[29]利用 CRISPR/Cas9 系统在斑马鱼胚胎细胞 *etsrp* 基因位点实现了 *mloxP*(modified

loxP)的基因定点插入。Cong 等^[30]和 Mali 等^[33]利用突变的 Cas9 蛋白在人类细胞靶基因位点实现单链断裂,降低了 NHEJ 介导的修复机制,从而增加了 HR 介导的同源重组修复。Qi 等^[45]在大肠杆菌中对 Cas9 的 RuvC like 结构域及 HNH 结构域进行突变,得到失去内切酶活性的 Cas9(dCas9、dead Cas9),sgRNA-dCas9 复合体与目的基因结合后阻止了 RNA 聚合酶与 DNA 的结合,使转录不能正常进行,从而导致基因沉默,下调基因的表达,即在大肠杆菌中实现了 CRISPRi。Gilbert 等^[46]利用 sgRNA-dCas9 复合体在人类细胞以及酵母细胞中实现了 CRISPRi,揭示了 CRISPRi 系统在精确地调节真核生物表达方面的潜力。

1.4 ZFNs、TALENs 和 CRISPR/Cas 系统的比较

通过用户定制的 ZFNs、TALENs 和 CRISPR/Cas 系统改造复杂的基因组,是人工核酸酶在应用中最吸引人的地方。ZFNs 和 TALENs 这两项技术的出现对基因组定点编辑具有革命性的推动作用,但在具体的实施操作过程中技术难度较大、构建组装时间较长,一般实验室很难得到有效利用。与之前的基因定点改造技术 ZFNs 及 TALENs 相比,CRISPR/Cas 系统具有显著优点:可以对任何后面紧随 NGG(PAM)的 20 bp 的序列进行编辑;能同时作用于多个靶位点^[32];此外,载体构建简单,Cas9 基因是相同的,针对特定基因位点只需要设计 sgRNA,而 ZFNs 或 TALENs 对每个基因位点编辑都需要设计和组装两个核酸酶,所以 CRISPR/Cas 系统更容易在实验室中得到推广和应用。

2 技术展望

Ⅱ型 CRISPR/Cas 系统是目前开发的一种快速、简单的对基因组进行定点编辑的新技术,它可以对任何靶位点后紧随 NGG(PAM)的 20 bp 的序列进行定点编辑。但由于受 PAM 的限制,该系统不能对基因的任何位置进行编辑。Ⅲ型 CRISPR/Cas 系统切割 DNA 双链不受 PAM 的限制,靶位点选择时更自由,但需要多个 Cas 蛋白形成复合体发挥功能,因此,对Ⅲ型 CRISPR/Cas 系统进行开发,是 CRISPR/Cas 系统履行基因编辑功能的一个新方向。在某些

TALENs 不能对基因组实现定点编辑的特定位置,CRISPR/Cas 系统可以在该位点实现基因组的定点编辑^[47]。

CRISPR/Cas 系统在实现基因定点编辑时更具有灵活性。由于该系统的靶位点只有 20 bp 左右,可以将几个 sgRNA 串联在一起,实现同时编辑同一基因的多个位点以及同时编辑多个不同基因。同时定点编辑多个基因,有助于人们研究同一基因家族的不同基因的功能以及研究基因间的相互作用机制;在同一染色体中两个不同区域设计两个 sgRNA,可以实现染色体片段的删除。此外,可以在 Cas9 蛋白的末端添加其他功能的蛋白,若功能蛋白为转录激活结构域(例如 VP16 或 VP16 的四聚衍生物 VP64),则可用于激活靶基因的表达;若功能蛋白为甲基化酶,则可以用于调控靶位点的甲基化水平,从而实现基因组上特定位置的甲基化,进行表观遗传学调控的研究。

将 Cas9 蛋白的 RuvC 或是 HNH 结构域突变后,Cas9 只有单链切割活性,即在 DNA 的靶位点,改造后的 CRISPR/Cas9 系统作为切口酶,制造单链切口,高效地介导外源基因的定点插入,大大降低了非同源末端连接这种修复机制带来的风险。CRISPR/Cas 系统对不同物种以及同一物种的不同基因进行定点编辑时,效率存在有较大的差异,因此,研究人员有待于对 CRISPR/Cas 系统进行更多的研究和探索,使该系统具有更广泛的适用性及高效性。

然而,所有基因组定点编辑技术都存在一个不可避免的问题:对基因组非特异性位点随机切割造成脱靶效应(Off-target effects)^[48]。CRISPR/Cas 系统的特异性是由 PAM 前 20 bp 的 RNA-DNA 相互作用决定的,理论上 CRISPR/Cas 系统脱靶的概率会较高。最近的研究表明,CRISPR/Cas 系统在细菌中是特异的;关于水稻 *OsPDS* 基因潜在脱靶的位点,本实验室也做了大量的研究,发现 CRISPR/Cas 系统的特异性是很高的;但在利用 CRISPR/Cas9 系统对水稻的 *OsMPK2* 进行基因定点编辑时,发现了较多碱基的删除,经过分析发现,是 sgRNA 介导的 CRISPR/Cas9 系统分别对靶位点(on-target)以及与靶位点高度相似的序列(off-target)分别进行了切割实现的^[37]。Fu 等^[49]在人类细胞中检测 CRISPR/Cas 系

统的特异性时,发现最多 5 个碱基存在错配情况时,CRISPR/Cas 系统仍会对该位点进行切割,造成脱靶。因此,提高 CRISPR/Cas 系统的特异性是大规模应用该技术的前提,目前看来可以通过以下几个方面提高 CRISPR/Cas 系统的特异性:在设计 sgRNA 时,对决定特异性起重要作用的 8~12 bp 中,至少有两个碱基的错配^[50];CRISPR/Cas 系统对紧随 sgRNA 的 NAG PAM 也具有切割能力,因此,应尽量避免在基因组中 sgRNA 后紧随 NAG^[50];通过生物信息学的方法对 Cas9 的同源蛋白进行评估,找寻具有更高特异性的核酸酶;寻找其他的 PAM,使得 CRISPR 靶序列范围加大;突变 Cas9 核酸酶的 RuvC-like 结构域或 HNH 结构域,将 CRISPR/Cas9 系统改造为切口酶,这样基本不会引起非同源末端连接修复机制,但可以激活细胞的同源重组修复机制,对降低细胞毒性具有一定作用。

3 结 语

综上所述,CRISPR/Cas 系统的出现为基因工程提供了一个强有力的应用新工具,它将给基因组定向编辑的研究和应用领域带来突破性的技术革命,特别是在基因功能解析、人类疾病靶向治疗等应用中有巨大的潜力和广阔的前景;有望加速重要农作物水稻、小麦性状改良与分子定向育种。更令人鼓舞的是,其操作简单、实验周期短、节约成本,有利于在普通实验室推广这一技术,因此,CRISPR/Cas 系统的广泛应用将对生物学研究产生深远的影响。作为一项新技术,CRISPR/Cas 系统也存在一些有待解决和发展的问題,需要研究人员进行更多的研究和探索。我们相信随着 CRISPR/Cas 系统结构与功能研究的进一步完善,可以预见在不久的将来会有越来越多的实验室利用 CRISPR/Cas 系统对基因组进行定点编辑,将有助于人们更好地了解动植物基因的功能。

参考文献(References):

- [1] Esvelt KM, Wang HH. Genome-scale engineering for systems and synthetic biology. *Mol Syst Biol*, 2013, 9(1): 641.
- [2] Bibikova M, Golic M, Golic KG, Carroll D. Targeted chromosomal cleavage and mutagenesis in *Drosophila* using zinc-finger nucleases. *Genetics*, 2002, 161(3): 1169–1175.
- [3] Dreier B, Fuller RP, Segal DJ, Lund CV, Blancafort P, Huber A, Koksche B, Barbas CF. Development of zinc finger domains for recognition of the 5'-CNN-3' family DNA sequences and their use in the construction of artificial transcription factors. *J Biol Chem*, 2005, 280(42): 35588–35597.
- [4] Bibikova M, Beumer K, Trautman JK, Carroll D. Enhancing gene targeting with designed zinc finger nucleases. *Science*, 2003, 300(5620): 764.
- [5] 肖安, 胡莹莹, 王唯晔, 杨志芃, 王展翔, 黄鹏, 佟向军, 张博, 林硕. 人工锌指核酸酶介导的基因组定点修饰技术. *遗传*, 2011, 33(7): 665–683.
- [6] Shan QW, Wang YP, Chen KL, Liang Z, Li J, Zhang Y, Zhang K, Liu JX, Voytas DF, Zheng XL, Zhang Y, Gao CX. Rapid and efficient gene modification in rice and *Brachypodium* using TALENs. *Mol Plant*, 2013, 6(4): 1365–1368.
- [7] Hockemeyer D, Wang HY, Kiani S, Lai CS, Gao Q, Cassady JP, Cost GJ, Zhang L, Santiago Y, Miller JC, Zeitler B, Cherone JM, Meng XD, Hinkley SJ, Rebar EJ, Gregory PD, Urnov FD, Jaenisch R. Genetic engineering of human pluripotent cells using TALE nucleases. *Nat Biotechnol*, 2011, 29(8): 731–734.
- [8] 沈延, 肖安, 黄鹏, 王唯晔, 朱作言, 张博. 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*, 2013, 35(4): 395–409.
- [9] Huang P, Xiao A, Zhou MG, Zhu ZY, Lin S, Zhang B. Heritable gene targeting in zebrafish using customized TALENs. *Nat Biotechnol*, 2011, 29(8): 699–700.
- [10] Tesson L, Usal C, Ménoret S, Leung E, Niles BJ, Remy S, Santiago Y, Vincent AI, Meng XD, Zhang L, Gregory PD, Anegón I, Cost GJ. Knockout rats generated by embryo microinjection of TALENs. *Nat Biotechnol*, 2011, 29(8): 695–696.
- [11] Mahfouz MM, Li LX, Shamimuzzaman M, Wibowo A, Fang XY, Zhu JK. *De novo*-engineered transcription activator-like effector (TALE) hybrid nuclease with novel DNA binding specificity creates double-strand breaks. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(6): 2623–2628.
- [12] Klug A. The discovery of zinc fingers and their applications in gene regulation and genome manipulation. *Annu Rev Biochem*, 2010, 79: 213–231.
- [13] Boch J, Scholze H, Schornack S, Landgraf A, Hahn S, Kay S, Lahaye T, Nickstadt A, Bonas U. Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type effectors. *Science*,

- 2009, 326(5959): 1509–1512.
- [14] Moscou MJ, Bogdanove AJ. A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors. *Science*, 2009, 326(5959): 1501.
- [15] Chen KL, Gao CX. TALENs: Customizable molecular DNA scissors for genome engineering of plants. *J Genet Genomics*, 2013, 40(6): 271–279.
- [16] Wiedenheft B, Sternberg SH, Doudna JA. RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea. *Nature*, 2012, 482(7385): 331–338.
- [17] Bhaya D, Davison M, Barrangou R. CRISPR-Cas systems in bacteria and archaea: versatile small RNAs for adaptive defense and regulation. *Annu Rev Genet*, 2011, 45: 273–297.
- [18] Terns MP, Terns RM. CRISPR-based adaptive immune systems. *Curr Opin Microbiol*, 2011, 14(3): 321–327.
- [19] Wei CX, Liu JY, Yu ZS, Zhang B, Gao GJ, Jiao RJ. TALEN or Cas9 - rapid, efficient and specific choices for genome modifications. *J Genet Genomics*, 2013, 40(6): 281–289.
- [20] Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, Amemura M, Nakata A. 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.
- [21] 李铁民, 杜波. CRISPR-Cas 系统与细菌和噬菌体的共进化. *遗传*, 2011, 33(3): 213–218.
- [22] Sorek R, Kunin V, Hugenholtz P. CRISPR: a widespread system that provides acquired resistance against phages in bacteria and archaea. *Nat Rev Microb*, 2008, 6(3): 181–186.
- [23] Sapranaukas R, Gasiunas G, Fremaux C, Barrangou R, Horvath P, Siksnys V. The *Streptococcus thermophilus* CRISPR/Cas system provides immunity in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39(21): 9275–9282.
- [24] Garneau JE, Dupuis MÈ, Villion M, Romero DA, Barrangou R, Boyaval P, Fremaux C, Horvath P, Magadán AH, Moineau S. The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature*, 2010, 468(7320): 67–71.
- [25] Karginov FV, Hannon GJ. The CRISPR system: small RNA-guided defense in bacteria and archaea. *Mol Cell*, 2010, 37(1): 7–19.
- [26] Horvath P, Barrangou R. CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. *Science*, 2010, 327(5962): 167–170.
- [27] Jiang WY, Bikard D, Cox D, Zhang F, Marraffini LA. RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(3): 233–239.
- [28] DiCarlo JE, Norville JE, Mali P, Rios X, Aach J, Church GM. Genome engineering in *Saccharomyces cerevisiae* using CRISPR-Cas systems. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41(7): 4336–4343.
- [29] Chang NN, Sun CH, Gao L, Zhu D, Xu XF, Zhu XJ, Xiong JW, Xi JJ. Genome editing with RNA-guided Cas9 nuclease in zebrafish embryos. *Cell Res*, 2013, 23(4): 465–472.
- [30] Cong L, Ran FA, Cox D, Lin SL, Barretto R, Habib N, Hsu PD, Wu XB, Jiang WY, Marraffini LA, Zhang F. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 2013, 339(6121): 819–823.
- [31] Shen B, Zhang J, Wu HY, Wang JY, Ma K, Li Z, Zhang XG, Zhang PM, Huang XX. Generation of gene-modified mice via Cas9/RNA-mediated gene targeting. *Cell Res*, 2013, 23(5): 720–723.
- [32] Wang HY, Yang H, Shivalila CS, Dawlaty MM, Cheng AW, Zhang F, Jaenisch R. One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell*, 2013, 153(4): 910–918.
- [33] Mali P, Yang LH, Esvelt KM, Aach J, Guell M, DiCarlo JE, Norville JE, Church GM. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*, 2013, 339(6121): 823–826.
- [34] Gratz SJ, Cummings AM, Nguyen JN, Hamm DC, Donohue LK, Harrison MM, Wildonger J, O'Connor-Giles KM. Genome engineering of *Drosophila* with the CRISPR RNA-guided Cas9 nuclease. *Genetics*, 2013, 194(4): 1029–1035.
- [35] Friedland AE, Tzur YB, Esvelt KM, Colaiacovo MP, Church GM, Calarco JA. Heritable genome editing in *C. elegans* via a CRISPR-Cas9 system. *Nat Methods*, 2013, 10(8): 741–743.
- [36] Li DL, Qiu ZW, Shao YJ, Chen YT, Guan YT, Liu MZ, Li TM, Gao N, Wang LR, Lu XL, Zhao YX, Liu MY. Heritable gene targeting in the mouse and rat using a CRISPR-Cas system. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(8): 681–683.
- [37] Shan QW, Wang YP, Li J, Zhang Y, Chen KL, Liang Z, Zhang K, Liu JX, Xi JJ, Qiu JL, Gao CX. Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(8): 686–688.
- [38] Feng ZY, Zhang BT, Ding WN, Liu XD, Yang DL, Wei PL, Cao FQ, Zhu SH, Zhang F, Mao YF, Zhu JK. Efficient genome editing in plants using a CRISPR/Cas system. *Cell Res*, 2013, 23(10): 1229–1232.

- [39] Li JF, Norville JE, Aach J, McCormack M, Zhang DN, Bush J, Church GM, Sheen J. Multiplex and homologous recombination-mediated genome editing in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana* using guide RNA and Cas9. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(8): 688–691.
- [40] Nekrasov V, Staskawicz B, Weigel D, Jones JDG, Kamoun S. Targeted mutagenesis in the model plant *Nicotiana benthamiana* using Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(8): 691–693.
- [41] Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 2012, 337(6096): 816–821.
- [42] Jinek M, East A, Cheng A, Lin S, Ma E, Doudna J. RNA-programmed genome editing in human cells. *eLife*, 2013, 2: e00471.
- [43] Hwang WY, Fu YF, Reyon D, Maeder ML, Tsai SQ, Sander JD, Peterson RT, Yeh JR, Joung JK. Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(3): 227–229.
- [44] Pennisi E. The CRISPR craze. *Science*, 2013, 341(6148): 833–836.
- [45] Qi LS, Larson MH, Gilbert LA, Doudna JA, Weissman JS, Arkin AP, Lim WA. Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. *Cell*, 2013, 152(5): 1173–1183.
- [46] Gilbert LA, Larson MH, Morsut L, Liu ZR, Brar GA, Torres SE, Stern-Ginossar N, Brandman O, Whitehead EH, Doudna JA, Lim WA, Weissman JS, Qi LS. CRISPR-Mediated modular RNA-Guided regulation of transcription in eukaryotes. *Cell*, 2013, 154(2): 442–451.
- [47] Cho SW, Kim S, Kim JM, Kim JS. Targeted genome engineering in human cells with the Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(3): 230–232.
- [48] Ramalingam S, Annaluru N, Chandrasegaran S. A CRISPR way to engineer the human genome. *Genome Biol*, 2013, 14(2): 107–110.
- [49] Fu YF, Foden JA, Khayter C, Maeder ML, Reyon D, Joung JK, Sander JD. High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(9): 822–826.
- [50] Hsu PD, Scott DA, Weinstein JA, Ran FA, Konermann S, Agarwala V, Li YQ, Fine EJ, Wu XB, Shalem O, Cradick TJ, Marraffini LA, Bao G, Zhang F. DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(9): 827–832.

•综合信息•

2013 年 35 卷第 11 期《遗传》封面说明

随着越来越多物种全基因组测序的完成,科学家们面临的一个重要挑战就是如何从海量的数据中获得有效的基因功能和应用信息,基因组定点编辑技术是实现这个目标的重要研究工具,为此也被评为 2012 年 *Science* 的十大重要科学突破之一。通过对 I 型 CRISPR/Cas 系统的改造,人们获得了一种新型的 RNA 指导的基因组定点编辑新技术,与 ZFNs 和 TALENs 相比,CRISPR/Cas 系统制作成本低,并且更容易操作,更适用于普通分子生物学实验室。该技术自 2013 年问世以来,在多个物种中得到成功应用,掀起了基因组定点编辑工程的第三次浪潮。本期第 1265~1273 页李君,张毅,陈坤玲,高彩霞的文章“CRISPR/Cas 系统:RNA 靶向的基因组定向编辑新技术”一文就 CRISPR/Cas 系统介导的基因编辑技术进行综述,介绍 I 型 CRISPR/Cas 系统的基本结构、作用原理,总结该技术在动植物基因组定点修饰中的应用并对可能存在的问题和应用前景等进行了探讨。同时,也对高彩霞实验室利用 CRISPR/Cas 系统在两大重要农作物水稻和小麦中进行基因定点敲除的研究进行了报道:该实验室利用 CRISPR/Cas 系统成功的对 4 个水稻基因和 1 个小麦基因进行了定点突变,首次实现了 CRISPR/Cas 系统在植物基因组定点编辑,同时优化出可供植物高效应用的 CRISPR/Cas 技术体系。封面图片展示的是通过 CRISPR/Cas 系统获得的水稻 *OsPDS* 基因功能缺失 T_0 突变体,野生型(左)和 *OsPDS* 基因突变体(右图中的标记于此不同!),该突变体呈现预期的白化和矮小表型。该技术的突破有望加速重要农作物水稻、小麦性状改良与分子定向育种。

(李君,张毅,陈坤玲,高彩霞)