

Advances in Genome Directional Editing Technologies of CRISPR/Cas9

Yao Yao, Xueyan Qian, Dongquan Guo*

Agro-Biotechnology Research Institute, Jilin Academy of Agricultural Sciences, Changchun
Email: xzgdq@126.com

Received: Nov. 18th, 2014; revised: Nov. 25th, 2014; accepted: Dec. 8th, 2014

Copyright © 2014 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

Abstract

CRISPR/Cas (Clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated) refers to an adaptive immune system that is gained from the long-term evolution of the organism which is widespread in bacteria and archaea. The system is able to degrade the invading virus or phage DNA. Type II of CRISPR/Cas system has become the most popular method due to its simplicity. This paper summarizes the basic structure, principle, technical characteristics and the progress of CRISPR/Cas, as well as the application prospect of the technology.

Keywords

CRISPR/Cas System, Cas9 Protein, Targeted Genome Modification

基因组定向编辑技术——CRISPR/Cas9 的研究进展

姚 瑶, 钱雪艳, 郭东全*

吉林省农业科学院农业生物技术研究所, 长春
Email: xzgdq@126.com

收稿日期: 2014年11月18日; 修回日期: 2014年11月25日; 录用日期: 2014年12月8日

*通讯作者。

摘要

CRISPR/Cas系统(Clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated)是广泛存在于细菌及古生菌中的,由细菌体长期进化而形成的,能够降解入侵病毒或噬菌体DNA的适应性免疫系统。由于CRISPR/Cas的II型系统比较简单,因此成为目前应用最为广泛的方法。本文主要介绍了CRISPR/Cas系统的基本结构、作用原理、技术特点、研究进展以及该技术可能的应用前景等方面内容。

关键词

CRISPR/Cas系统, Cas9蛋白, 基因定点修饰

1. 引言

随着测序技术的不断进步,越来越多物种的全基因组序列被获得。面对这些海量的基因数据,基因定点编辑技术将是能够高效寻找目标基因,迅速获得基因功能和应用信息,使这些生物基因信息充分得到利用的重要研究手段。基因定点修饰是指外源DNA片段与受体同源片段发生重组,使外源DNA片段整合到染色体的目标位点,与通常的T-DNA标签、转座子标签及逆转座子标签等基因敲除技术相比,基因定点修饰技术不仅能实现基因准确的定点整合,而且可对靶基因进行精细改造如缺失或插入[1]。

目前常用的基因组定点编辑技术包括:锌指核酸酶(Zinc-finger nucleases, ZFNs),转录激活因子效应物核酸酶(Transcription activator like effector nucleases, TALENs),以及近年来兴起的一项新技术——成簇的规律间隔短回文重复序列(Clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR)/Cas9系统三种编辑技术[2] [3]。同ZFNs和TALEs技术相比,CRISPR/Cas9优势在于:该技术以短RNA作为DNA序列的识别序列;识别位点的要求比较多样化;不需形成二聚,仅Cas9蛋白即可完成与FokI酶的功能相似的作用;可一次断裂多个位点;成功率高;对细胞毒性小;应用成本便宜等明显的优势[4] [5]。

2. CRISPR/Cas 技术

2.1. CRISPR 技术研究历史

1987年,日本学者研究*E. coli* K12的碱性磷酸酶基因时,在其编码区的附近首次发现了成簇的规律间隔的短序列,这些序列由14个长度为29bp的重复片段和32~33bp的非重复片段间隔连接[6]。然而这一发现,在当时并未得到足够的重视。随着测序技术的不断成熟,研究人员发现这种间隔重复序列广泛存在于各种细菌和古细菌中。到了2002年,这一独特的序列才被科学家Jansen等[7]将其正式命名为:成簇的、规律间隔的短回文重复序列(Clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR),CRISPR与其关联蛋白(CRISPR-associated proteins, CAS)共同组成了CRISPR/CAS系统。研究发现已经测序过的细菌基因组中约有40%都存在CRISPR位点[8]。

在自然界中,噬菌体与细菌之间是一种捕食与被捕食关系。其中烈性噬菌体是细菌的天然“杀手”,具有杀死和清除细菌的能力。为了躲避噬菌体的攻击,细菌不断的进化出一些防御机制,根据噬菌体侵入宿主的不同阶段,可以将噬菌体抵抗机制分为4个主要类别:吸附抑制,流产感染,限制-修饰系统和穿入阻滞。另外,还有利用噬菌体编码的抗性作用,以及通过人工插入突变的方法获得广泛的噬菌体抵抗菌株[9]。近年来,新兴起的CRISPR系统也是细菌抵御质粒或噬菌体等外源物质侵入的一种适应性免疫防御机制。

在 2005 年, 3 个独立的研究小组几乎同时发表文章[10]-[12]称, 经过对 CRISPR 重复序列进行分析比较后得出, CRISPR 系统可能是细菌抵御质粒或噬菌体等外源物质侵入的一种适应性免疫防御机制。直到 2012 年, 由 RNA 导向的基因组编辑技术 CRISPR/Cas9(CRISPR/CRISPR-associate9)技术才发展起来[13]。

2.2. CRISPR 技术的基因结构

CRISPR 是一个由高度保守的、短的 DNA 正向重复序列(Repeats)组成特殊的重复序列家族, 广泛分布在各种细菌和古细菌基因组中[14], 这些重复序列的长度通常在 21~48 bp 之间, 因具有回文序列, 可以形成发卡结构, 这些序列的重复次数最高可达 250 次[15]。每个重复序列之间均被与之相似的 26~72 bp 左右、长度不等或长度相似的非重复序列间隔开, 称作间隔序列(Spacer), 这些间隔序列长度与细菌种类和 CRISPR 位点有关[16]。CRISPR 通过这些间隔序列对靶基因进行识别。

在 CRISPR 第一个重复序列上游有类似于启动子功能的 CRISPR 前导序列(Leader sequence), 主要用于启动 CRISPR 序列的转录[17], 转录产生的非编码 RNA 被命名为 crRNAs(CRISPR RNAs) [18] [19]。而后, 这些 crRNA 前体和 CRISPR 序列附近的 Cas 蛋白共同参与 CRISPR 免疫防御过程。此外, 在 CRISPR 位点附近存在着一组由 4~10 个保守的 CRISPR 相关基因(CRISPR-associated genes, Cas genes)组成的序列, 称为 CASs(CRISPR-associated sequences, CASs) [15]。

最终, 由重复序列、间隔序列、前导序列和 Cas 蛋白基因共同构成了 CRISPR/Cas 系统。

2.3. CRISPR/Cas 技术结构

按照已测序的大约 40% 的细菌和 90% 的古细菌中的 CRISPR/Cas 系统的结构特点, 该系统可分为三大类型: I 型、II 型、III 型[20] [21]。类型 I: 在细菌和古菌中均存在, 在 Cas3 核酸酶的作用下对入侵的外源 DNA 进行切割降解; 类型 II: 目前仅在细菌中被发现, 由 Cas9 核酸酶参与, 不需要复杂的蛋白复合体, 参与 CRISPR 中 RNA 的加工及剪切外源基因的过程; 类型 III: 主要存在于古菌中, 分为 IIIA 和 IIIB 两种亚型, 主要功能是参与间隔重复序列转录过程及降解靶基因[22]-[24]。其共同特点是 RNA 介导的核酸酶能够特异性地切割外源入侵的 DNA, 包括噬菌体和质粒 DNA[25]。

从整体来看, I 型和 III 型 CRISPR/Cas 系统切割 DNA 双链时需要由多个 Cas 蛋白所形成的复合体进行操作, 而 II 型 CRISPR/Cas 系统仅需要由 1 个 Cas9 蛋白作为切割 DNA 双链的工具。因此, 仅在 Cas9 蛋白、tracrRNA、crRNA 和 RNaseIII 这四种组分的共同作用下即可完成 DNA 双链切割过程。因此, II 型 CRISPR/CAS 系统, 因其工作组分比较简单, 被广泛应用于基因编辑或基因沉默[26]。

2.4. CRISPR/Cas 技术进行基因编辑的基本原理

当噬菌体入侵细菌时, 依赖于原间隔序列毗邻(proto-spacer adjacent motif, PAM)元件对外源 DNA 与自身基因组进行区别, 入侵 DNA 被识别; Cas9 是包含两个切割域(Ruv 和 HNH)的双链 DNA 酶, 两个切割域分别切割靶 DNA 的一条链; Cas 蛋白复合物靶向裂解入侵基因组中的原间隔序列(proto-spacer) [27], 将该基因组上一段大小约为 20 bp 的片段将作为新的间隔序列插入到宿主细胞的 CRISPR 序列的起始序列之后, 形成宿主细胞中新的第一个间隔序列, 从而使细菌体能够对该序列进行储存识别。

当宿主细胞再次受到该类型噬菌体入侵时, 细菌利用新形成的 CRISPR 序列可以迅速响应, 转录生成一条长链 crRNA 前体(pre-crRNA), 随后由 Cas 蛋白复合体在 tracrRNA(trans-activating crRNA)的共同作用下剪切形成成熟体 crRNAs, 其中, 每个 crRNA 都包含一个由单个间隔序列转录而来的区域, 最后形成 tracrRNA-crRNA-Cas9 复合体识别并剪切与 crRNA 互补的位点[28] [29]。

另外, CRISPR/Cas 系统中 Cas9 的两个核酸酶结构域(Ruv 和 HLH)是该系统的基本组成成分, 其中 D10A 和 H840A 位点发生突变, Cas9 蛋白将会失去对 DNA 的切割活性, 但并不影响其与 DNA 结合的能力。这种失去 DNA 切割活性的 Cas9 蛋白被命名为 dCas9(Dead Cas9)。在靶向基因 gRNA 同 dCas9 在细胞中共表达时, 则 sgRNA 可以介导二者的结合。若 dCas9 在靶基因的阅读框内结合, 则可阻断 RNA 聚合酶(RNA polymerase, RNAP)的延伸作用; 如果 dCas9 在靶基因的启动子区域结合, 就可以阻止基因转录的起始[30] [31]。

2.5. CRISPR/Cas 技术特点

在 Cas9 系统发挥识别剪切过程中, tracrRNA 首先与 crRNA 形成 tracrRNA-crRNA 复合体, 接着, Cas9 蛋白识别并与 tracrRNA-crRNA 复合体结合, 然后在 crRNA 的引导下识别并切割靶位点。

为了简化操作过程, 研究人员依据 tracrRNA-crRNA 复合体的结构特征设计了能够被 Cas9 蛋白识别并引导 Cas9 蛋白结合于靶位点的 sgRNA(single guide RNA)结构, sgRNA 能够代替 tracrRNA-crRNA 复合体行使与其相同的功能[13]。

根据目前被广泛应用的 CRISPR-Cas9 系统, 首先需要设计一个可使目标 DNA 双链发生断裂的 sgRNA-Cas9 体系, 即构建编码的 Cas9 蛋白带有核定位信号(nuclear localization signal, NLS)的表达载体, 以及能够同靶基因匹配的 sgRNA 表达载体, 将二者同时导入到宿主细胞内, 使其表达并组装成 sgRNA-Cas9 复合体, 在目标基因 PAM 元件的上游达到 DNA 双链断裂的目的, 而后这个损伤被细胞自身的同源重组(homologous recombination, HR)和非同源末端连接(non-homologous end joining, NHEJ)修复, 最终实现对目标基因组改造的目的[32]。

在进行载体构建中要注意以下几个方面的内容[33]: 为了使 Cas9 蛋白在结合靶基因时更加顺利, 通常在设计 sgRNA 时会加入二级发卡结构和 3'端尾部结构; 一定要严格配对靠近 PAM 元件的 12 个碱基, 保证序列的唯一性; 有研究表明, 在体内 tracrRNA 的长度对于 Cas9 蛋白的表达和活性非常重要, 因而, 在设计 sgRNA 时片段长度不可过短, 一般应大于 67 bp [34]。

在一些研究结果认为, 影响脱靶效应和诱变效率的主要参数有: 基因组 DNA 和 sgRNA 之间核苷酸错配的数量、位置及其分布; Cas9 和 sgRNA 共同作用的表达水平。但大多数的细胞研究并没有独立评估 Cas9 和 sgRNA 的效应。近期, 来自清华大学、哈佛医学院和斯坦福大学等机构的研究人员, 通过优化 sgRNA 的参数提高了 CRISPR/Cas9 系统在果蝇中的特异性和效率, 表明在 Cas9 表达的一定范围内 sgRNA 参数是影响特异性和效率的主要因素[35]。该研究发现, 当 sgRNAs 区域具有三个或更多个核苷酸的错配时, 脱靶效应并没有出现在基因组 DNA 中。还证实了诱变效率与 sgRNA 中的六个前间区序列邻近基序近端核苷酸(proto-spacer adjacent motif proximal nucleotides, PAMPNs)的 GC 含量之间呈很强的正相关性。此外, 研究人员将精心设计的 sgRNA 质粒按照他们已经确定的最佳浓度注入后发现, 通过一个操作步骤可以特异的生成四个基因的突变, 且均为有效基因。最终, 实验人员利用这种优化过参数通过同源定向修复生成 HP1a 的无效等位基因, 取得的显著高于前人报道的整体突变率。根据该实验可以考虑能够利用进行了全面优化的 sgRNA, 简化 CRISPR/Cas9 技术在实验中的过程。

3. CRISPR/Cas9 技术的广泛应用及发展前景

虽然 CRISPR/Cas9 技术在最近两年才开始被应用, 但其发展却十分迅猛, 已经广泛应用在动物的细胞水平、植物、微生物以及人类医学等各方面。

3.1. CRISPR/Cas9 技术的广泛应用

2013 年, Hwang 等[36]实现了 CRISPR/Cas 技术的首个活体实验, 该实验是在斑马鱼上实现的, 研

究同时对斑马鱼的两个基因位点实施定点变异, 开启了使用 CRISPR/Cas 进行基因组编辑的先河。Hwang 等将 Cas9 编码的 mRNA 和特定的向导 RNA 注射到单细胞斑马鱼胚胎内, 在 10 个切割位点中有 8 个位点都发生了切割, 获得了 *drd3*、*gsk3b* 基因的突变体。李明辉[37]将 CRISPR/Cas9 技术应用于养殖鱼类罗非鱼基因敲除, 获得 *ncmos2*、*nawwi*、*dmrtl* 和 *foxl2* 的突变, 该实验结果表明 CRISPR/Cas9 能广泛应用于罗非鱼基因敲除, 且具有普适性的特点。

Li 等[38]通过显微注射的方法将 Cas9 以及 gRNA 的 mRNA 共同注射进小鼠的胚胎干细胞对 *Uhrf2* 基因进行定点修饰, 获得了 *Mc3R*、*Mc4cRL* 两只双基因敲除小鼠, 并且注射针对不同基因的 RNA 序列能够在同一只小鼠中产生多个基因突变。此外, 利用 CRISPR/Cas 技术构建的基因敲除大鼠模型与传统方法构建的同一基因突变大鼠具有一致的表型。Wang 等[39]通过共转染的方法在小鼠的胚胎干细胞中实现 *Tet1*、*Tet2*、*Tet3*、*Uty* 和 *Sry* 等基因的单基因、双基因及多基因的敲除, 敲除效率达 40% 左右, 并通过测序 RFLP 及 DNA 印迹等方法对实验结果进行了验证。同时, 实验用显微共注射 mRNA 的方法获得的 *Tet1* 和 *Tet2* 单基因敲除小鼠以及双基因敲除小鼠的后代表现仍然为敲除阳性。另外, 研究人员利用 CRISPR/Cas 技术诱导大鼠的 *Tet1*、*Tet2*、*Tet3* 基因敲除时, 实现了效率高达 100% 的双等位基纯合突变的单基因敲除以及接近 60% 高效率的三基因同时敲除大鼠, 并且同样得到证实 CRISPR/Cas 系统引入的基因修饰可以通过生殖细胞传递到下一代[40]。

利用 CRISPR/Cas9 在猴的细胞期胚胎注射 Cas9 的 mRNA/sgRNA 系统, 实现了与人类具有很高的相似性的灵长类动物的基因修饰, 获得起始精准遗传修饰, 同时还可实现多个基因的修饰操作, 并有效避免脱靶效应。这种有力的遗传操作技术体系有望在未来研究人类疾病发病机理研究、发育过程和临床治疗方案等方面建立更多理想的基因修饰模型[41]。

Cong 等[42]对人 293T 细胞的 *EMX1* 和 *PVALB* 以及小鼠 *Nero2A* 细胞的 *Th* 实现了多基因的同时敲除, 实验的成功对于在体内进行冗余基因以及上位基因功能的研究提供了依据。梁振伟等[43]利用构建的 *PX330-PM/ft4-Exon7-sgRNA* 质粒对 *PDE10A* 基因(*PDE10A* 表达量异常升高与多种涉及基底神经节神经传递的神经精神系统疾病的发生有关, 如精神分裂症、强迫症和亨廷顿氏舞蹈病等)进行敲除, 利用 *SURVEYOR* 软件和一代测序对敲除效率进行分析检测, 进一步证明构建的质粒系统对 *PDE10A* 基因的敲除是有效的。Mali 等[44]利用 CRISPR-Cas 技术在人的细胞中实现了基因的敲除, 靶向敲除效率分别为 *HEK293* 为 10%~25%, *K562* 为 8%~13%, *iPS* 为 2%~49%。

蔡刘体[45]的文章中对细菌与噬菌体抗性之间的相互关系进行了讨论, 虽然历史上利用噬菌体进行治疗的研究并不成功, 但是从长远角度考虑, 借助 CRISPR/Cas9 系统对细菌与噬菌体抗性之间的研究, 有理由相信在克服了菌体治疗的难点, 充分利用噬菌体治疗的优势后, 噬菌体制剂治疗体系将成为更具安全性和可控性, 为人类疾病治疗增添一种新的技术手段。崔玉军[46]利用鼠疫苗的 CRISPR 位点进行了鼠疫苗的分型和进化研究, 并成功构建了鼠疫苗的进化模型。赵飞等[47]利用 CRISPR/Cas 技术成功地对肠炎沙门菌和鼠伤寒沙门菌进行了分型, 验证该技术能够对同源性较高的同种血清型具有较高的分型能力和较好的区分效果, 在未来可以对更多高度相似的菌类等进行区分。通过对相应菌株中 CRISPR/Cas 序列的分析, 可以对特定菌株进行分析, 为食物中可能菌株的追踪溯源提供有力的依据, 为相关部门在食品安全隐患的监管提供了有效的方法证据[48]。

在植物中的应用方面 CRISPR/Cas9 技术也取得了重大突破, 目前已经应用于烟草、水稻、小麦、拟南芥以及本生烟基因的定点修饰研究中, 但尚未有对重要农作物的农艺性状进行改良的研究。

Shan 等[19]利用 CRISPR/Cas9 技术定点突变了水稻的 *OsPDS*、*OsMPK2*、*OsBADH2* 和 *Os02g23823* 四个基因以及小麦的 *TaMLO* 基因, 在转基因水稻中的突变效率为 4.0%~9.4%; 同时, 该研究还在水稻 *PDS* 基因功能缺失的突变体的 T_0 代获得了纯合突变体。该研究首次证实 CRISPR-Cas 系统能够用于植物

的基因组编辑。Nekrasov 等[49]成功利用 CRISPR/Cas9 系统对烟草基因 PDS 基因进行定点突变, 突变率为 1.8%~2.4%。Li 等[50]也利用 CRISPR/Cas9 在拟南芥和烟草中实现了基因组的定点突变, 其突变率为 1.1%~38.5%, 且发现突变效率与 gRNA 的表达量有关; 还同时证明了 CRISPR/Cas9 系统可在植物中同时对多基因或单基因的多个位点进行定点编辑。Feng Z Y 等[51]也通过对拟南芥和水稻的多个基因进行定点突变, 获得了 26%~80%的高突变效率, 且在 F1 代获得一部分的纯合突变体, 且纯合突变体与嵌合突变体呈现出预期的突变表型。

以上实验均是通过仿照动物、微生物中抵御源侵染的防护机制开发出的, 能对植物基因组进行精确定点修饰的 CRISPR/Cas9 技术, 利用该项技术可以对基因组中任意目标的位置进行编辑, 从而使高效植物分子改良性状成为可能。

3.2. CRISPR/Cas9 的生物信息检索

由于 CRISPR 重复序列具有典型的特征, 因此可以通过搜索其重复序列就可以在目标基因组中找该重复序列。但是由于 CRISPR 重复序列在不同物种中或同一物种不同品系等具有多样性, 且在整个系统中组成十分复杂。

为了能够更加准确地快速的鉴定出 CRISPR/Cas 系统, 近年来陆续开发出了一些专门针对 CRISPR/Cas 系统设计的计算机应用软件, 用于搜索 CRISPR 序列及其 Cas 基因, 如 CRISPRfinder [52], sgRNACas9 [53]等。基于 CRISPRfinder 等计算机软件的搜索比较, 构建了两个独立的数据库(<http://crispr.u-psud.fr/crispr>; <http://crispi.genouest.org>)。sgRNACas9 是一款本地化 CRISPR sgRNA 设计工具, 不限物种, 可设计并评估 off-target, 最大仅有 5 个碱基的错配, 是新开发的程序包, 其中包含批量构建 sgRNA 过表达载体和提取基因组侧翼序列的小程序。

3.3. CRISPR/Cas9 的发展前景

CRISPR/Cas 技术是一项正在发展中的新兴技术, 仍然存在一些缺陷, 如脱靶效应, 系统效率和特异性受不同物种或同一物种的不同基因影响等因素, 因而, 研究探索都是需要不断的进行, 使 CRISPR/Cas 系统具有更广泛的适用性及高效性。

最近在 Cell 杂志上接连发表了两篇研究论文[54] [55], 文中提到新发展的一项技术 SunTag, 并将其结合了 CRISPR 激活技术, 使得在单次实验中系统地探究基因组中所有基因的生物学作用成为可能。在 Vale 研究小组公布的论文中讲述了最新发明 SunTag 技术。这是一套分子挂钩, 其能够将多个拷贝的生物活性分子挂到可用来靶向一些基因或其他的分子的蛋白质支架上; 相比于没有这些挂钩的组装分子, 整合了 SunTag 的分子生物活性显著放大。同时 Weissman 研究小组的实验证实, 整合了 SunTag 的 CRISPR 分子可用于精确地控制基因组内大量基因的表达。利用这一策略鉴别出了阻止癌细胞生长以及调控组织发育的一些基因, 并获得了细菌毒素损伤细胞机制的一些新认识。根据这些研究现象表明, 可以利用 CRISPR 技术来了解生物细胞机理, 致病原因等一些特异基因的作用机制。

根据 CRISPR/Cas 系统能够实现基因定点编辑的特点, 可实现对同一基因的多个位点进行同时编辑; 对多个不同基因同时编辑。这些特点有助于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。多个利用 Cas9 技术进行基因敲除的模型显示出, CRISPR/Cas 技术能够很好的应用于基因治疗以及动物育种, 也使动物、人类、植物中进行多基因敲除成为可能, 对于推动生物基因功能研究和在生物医学研究中的应用具有重要作用。在 CRISPR-Cas 系统的研究中, 已证实的特征有: 对目标基因进行定点修饰; 引入的修饰基因可以通过生殖细胞传递到下一代[39] [40]; 在植物突变体的后代可以获得纯合体[19] [51]。这些特征对于进行植物转基因育种提供了一种新方法, 能迅速获得单拷贝的插入基因、有

效缩短转基因获得纯合体的时间。因此可以看出, CRISPR/Cas 技术还有待进一步发展, 或与其他实验技术手段相结合, 开发出更多更有利有科研发展的新方法。

4. 结语

综上所述, CRISPR/Cas 技术是近年来发展起来的基因组定点编辑技术, 该项技术具有以下这些突出特点: 直接阻滞 DNA 转录, 阻滞级别更高、更准确; 可对多个靶点同时编辑; 能够实现可逆性基因沉默; 沉默效率较高, 载体构建简单, 只需设计目的基因的 sgRNA。这些明显的优势使该技术为人类医学、动物研究以及植物的改良育种等各方面的发展带来了一项强有力的工具, 是基因功能研究的利器。作为一项新技术, 纵然还有许多问题有待解决与发展, 因此也给研究人员以更广阔空间去进行探索和研究, 不断发现、发展该项技术的更多更大的优势。未来, CRISPR/Cas 技术会在实验室中得到广泛的推广, 并成为科研人员了解生物、在改造基因, 解决更多的问题的一项常规的应用手段。

参考文献 (References)

- [1] 王根平, 杜文明, 夏兰琴 (2014) 植物安全转基因技术研究现状与展望. *中国农业科学*, **5**, 823-843.
- [2] Kim, H. and Kim, J. (2014) A guide to genome engineering with programmable nucleases. *Nature Reviews Genetics*, **15**, 321-334.
- [3] Fichtner, F., Castellanos, R.U. and Ulker, B. (2014) Precision genetic modifications: A new era in molecular biology and crop improvement. *Planta*, **239**, 921-939.
- [4] 刘忠松 (2014) 作物遗传育种研究进展III.作物基因工程与基因组编辑. *作物研究*, **3**, 332-337.
- [5] Lei, S.Q., Larson, M.H., Luke, A., et al. (2013) Repurposing CRISPR as an RNA guided platform for sequence-specific control of gene expression. *Cell*, **152**, 1173-1183.
- [6] 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. *Journal of Bacteriology*, **169**, 5429-5433.
- [7] Jansen, R., Embden, J.D., Gaastra, W., et al. (2002). Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Molecular Microbiology*, **43**, 1565-1575.
- [8] Wei, C.X., Liu, J.Y., Yu, Z.S., et al. (2013) TALEN or Cas9-rapid, efficient and specific choices for genome modifications. *Journal of Genetics and Genomics*, **40**, 281-289.
- [9] 黄建军, 胡福泉 (2002) 细菌对噬菌体感染的抵抗. *免疫学杂志*, **3**, 135-145.
- [10] Pourcel, C., Salvginol, G. and Vergnaud, G. (2005) CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies. *Microbiology*, **151**, 653-663.
- [11] Bolotin, A., Quinquis, B., Sorokin, A. and Ehrlich, S.D. (2005) Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology*, **151**, 2551-2561.
- [12] Mojica, F.J., Diez-Villasenor, C., Garcia-Martinez, J. and Soria, E. (2005) Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *Journal of Molecular Evolution*, **60**, 174-182.
- [13] Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J.A. and Charpentier, E. (2012) A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, **337**, 816-821.
- [14] Godde, J.S. and Bickerton, A. (2006) The repetitive DNA elements called CRISPRs and their associated genes, evidence of horizontal transfer among prokaryotes. *Journal of Molecular Evolution*, **62**, 718-729.
- [15] Grissa, I., Vergnaud, G. and Pourcel, C. (2007) The CRISPRdb database and tools to display CRISPRs and to generate dictionaries of spacers and repeats. *BMC Bioinformatics*, **8**, 172.
- [16] Karginov, F.V. and Hannon, G.J. (2011) The CRISPR system, small RNA-guided defense in bacteria and archaea. *Molecular Cell*, **37**, 7-19.
- [17] 李铁民, 杜波 (2011) CRISPR-Cas 系统与细菌和噬菌体的共进化. *遗传*, **3**, 213-218.
- [18] Sorek, R., Kunin, V. and Hugenholtz, P. (2008) CRISPR, a widespread system that provides acquired resistance against phages in bacteria and archaea. *Nature Reviews Microbiology*, **6**, 181-186.
- [19] Shan, Q., Wang, Y., Li, J., Zhang, Y., Chen, K., Liang, Z., et al. (2013) Targeted genome modification of crop plants

- using a CRISPR-Cas system. *Nature Biotechnology*, **31**, 686-688.
- [20] Bikard, D. and Marraffini, L.A. (2012) Innate and adaptive immunity in bacteria, mechanisms of programmed genetic variation to fight bacteriophages. *Current Opinion in Immunology*, **24**, 15-20.
- [21] Wiedenheft, B., Stenberg, S.H. and Doudna, J.A. (2012) RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea. *Nature*, **482**, 331-338.
- [22] Shah, S.A. and Garrett, R.A. (2011) CRISPR/Cas and Cmr modules, mobility and evolution of adaptive immune systems. *Research in Microbiology*, **162**, 27-38.
- [23] Makarova, K.S., Haft, D.H., Barrangou, R., Brouns, S.J., Charpentier, E., Horvath, P., et al. (2011) Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. *Nature Reviews Microbiology*, **9**, 467-477.
- [24] Garneau, J.E., Dupuis, M., Villion, M., Romero, D.A., Barrangou, R., Boyaval, P., et al. (2010) The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature*, **468**, 67-71.
- [25] Mali, P., Yang, L., Esvelt, K.M., Aach, J., Guell, M., DiCarlo, J.E., et al. (2013) RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*, **339**, 823-826.
- [26] Qi, L.S., Larson, M.H., Gilbert, L.A., Doudna, J.A., Weissman, J.S., Arkin, A.P. and Lim, W.A. (2013) Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. *Cell*, **152**, 1173-1183.
- [27] Westra, E.R., Van Erp, P.B., Kunne, T., Wong, S.P., Staals, R.H., Seegers, C.L., et al. (2012) CRISPR immunity relies on the consecutive binding and degradation of negatively supercoiled invader DNA by Cascade and Cas3. *Molecular Cell*, **46**, 595-605.
- [28] Richter, H., Randau, L. and Plagens, A. (2013) Exploiting CRISPR/Cas, interference mechanisms and applications. *International Journal of Molecular Sciences*, **14**, 14518-14531.
- [29] Sampson, T.R., Sawj, S.D., Llewellyn, A.C., Tzeng, Y.L. and Weiss, D.S. (2013) A CRISPR/Cas system mediates bacterial innate immune evasion and virulence. *Nature*, **497**, 254-257.
- [30] Jinek, M., East, A., Cheng, A., Lin, S., Ma, E. and Doudna, J. (2013) RNA-programmed genome editing in human cells. *Elife*, **2**, Article ID: e00471.
- [31] Cheng, A.W., Wang, H., Yang, H., Shi, L., Katz, Y., Theunissen, T.W., et al. (2013) Multiplexed activation of endogenous genes by CRISPR on an RNA-guided transcriptional activator system. *Cell Research*, **23**, 1163-1171.
- [32] Barrangou, R. (2012) RNA-mediated programmable DNA cleavage. *Nature Biotechnology*, **30**, 836-838.
- [33] Miao, J., Guo, D., Zhang, J., Huang, Q., Qin, G., Zhang, X., et al. (2013) Targeted mutagenesis in rice using CRISPR-Cas system. *Cell Research*, **23**, 1233-1236.
- [34] Hsu, P.D., Scott, D.A., Weinstein, J.A., Ran, F.A., Konermann, S., Agarwala, V., et al. (2013) DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nature Biotechnology*, **31**, 827-832.
- [35] Ren, X.J., Yang, Z.H., Xu, J., Sun, J., Mao, D.C., Hu, Y.H., et al. (2014) Enhanced specificity and efficiency of the CRISPR/Cas9 system with optimized sgRNA parameters in *Drosophila*. *Cell Reports*, **9**, 1151-1162.
- [36] Hwang, W.Y., Fu, Y., Reyon, D., Maeder, M.L., Tsai, S.Q., Sander, J.D., et al. (2013) Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. *Nature Biotechnology*, **31**, 227-229.
- [37] 李明辉 (2014) 罗非鱼基因敲除技术的建立及其在性别决定与分化研究中的应用. 博士论文, 西南大学, 重庆.
- [38] Li, D., Qiu, Z., Shao, Y., Chen, Y., Guan, Y., Liu, M., et al. (2013) Heritable gene targeting in the mouse and rat using a CRISPR-Cas system. *Nature Biotechnology*, **8**, 681-683.
- [39] Wang, H.Y., Yang, H., Shivalila, C.S., Dawlaty, M.M., Cheng, A.W., Zhang, F. and Jaenisch, R. (2013) One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell*, **153**, 910-918.
- [40] Li, W., Teng, F., Li, T. and Zhou, Q. (2013) Simultaneous generation and germline transmission of multiple gene mutations in rat using CRISPR-Cas systems. *Nature Biotechnology*, **31**, 684-686.
- [41] 陈永昌, 牛昱宇, 季维智 (2014) 通过 CRISPR/Cas9 和 TALENs 介导的基因打靶技术获得基因修饰的猴模型. *中国细胞生物学学报*, **5**, 557-560.
- [42] Cong, L., Ran, F.A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., et al. (2013) Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, **339**, 819-823.
- [43] 梁振伟, 饶书权, 沈岩, 许琪 (2014) 通过 CRISPR/Cas9 系统敲除人源 PDE10A 基因. *基础医学与临床*, **4**, 439-443.
- [44] Mali, P., Yang, L.H., Esvelt, K.M., Aach, J., Guell, M., DiCarlo, J.E., et al. (2013) RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*, **339**, 823-826.
- [45] 蔡刘体, 陈兴江, 刘艳霞, 石俊雄 (2014) 噬菌体治疗中细菌对噬菌体的抗性. *生物技术通报*, **7**, 33-36.

- [46] 崔玉军 (2008) 鼠疫耶尔森氏菌基因组多态性数据库及鉴定溯源系统的研究. 博士论文, 中国人民解放军军事医学科学院, 北京.
- [47] 赵飞 (2013) 鸡肉中沙门菌的定量检测及分离株 CRISPRs 分子亚分型分析. 硕士论文, 扬州大学, 扬州.
- [48] 狄慧玲, 闫鹤, 石磊 (2014) 食源性单核细胞增生李斯特菌 CRISPR 结构的研究. *现代食品科技*, **8**, 64-69.
- [49] Nekrasov, V., Staskawicz, B., Weigel, D., Jones, J.D. and Kamoun, S. (2013) Targeted mutagenesis in the model plant *Nicotiana benthamiana* using Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nature Biotechnology*, **31**, 691-693.
- [50] Li, J.F., Norville, J.E., Aach, J., McCormack, M., Zhang, D., Bush, J., et al. (2013) Multiplex and homologous recombination-mediated genome editing in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana* using guide RNA and Cas9. *Nature Biotechnology*, **31**, 688-691.
- [51] Feng, Z.Y. and Zhang, B.T. (2013) Efficient genome editing in plants using a CRISPR/Cas system. *Cell Research*, **23**, 1229-1232.
- [52] Grissa, I., Vergnaud, G. and Pourcel, C. (2007) The CRISPRdb database and tools to display CRISPRs and to generate dictionaries of spacers and repeats. *BMC Bioinformatics*, **8**, 172.
- [53] Xie, S.S., Shen, B., Zhang, C.B., Huang, X.X. and Zhang, Y.L. (2014) sgRNAs9: A software package for designing CRISPR sgRNA and evaluating potential off-target cleavage sites. *PLoS ONE*, **9**, Article ID: e100448.
- [54] Tanenbaum, M.E., Gilbert, L.A., Qi, L.S., Weissman, J.S. and Vale, R.D. (2014) A protein-tagging system for signal amplification in gene expression and fluorescence imaging. *Cell*, **158**, 635-646.
- [55] Gilbert, L.A., Horlbeck, M.A., Adamson, B., Villalta, J.E., Chen, Y.W., Whitehead, E.H., et al. (2014) Genome-scale CRISPR-mediated control of gene repression and activation. *Cell*, **159**, 647-661.