



高彩霞课题组主要从事重要农作物基因组定向编辑技术方法的研究与应用、农作物遗传转化技术体系的建立与应用,以及小麦、玉米、水稻等重要基因的功能解析及基因组编辑定向设计分子育种研究。他们率先利用 CRISPR/Cas 系统实现水稻和小麦的基因组编辑,并利用该技术首创抗白粉病小麦新材料和改良水稻的香味品质,近期他们将该 CRISPR 切割系统引入植物,在植物中建立了DNA病毒防御体系。相关成果以通讯作者身份发表在 *Nature Biotechnology*、*Nature Plants*、*Nature Protocols*、*PLoS Biology*、*Molecular Plant*、*Plant Biotechnology Journal* 和 *Journal of Genomics and Genetics* 等期刊上。

植物基因组编辑及衍生技术最新研究进展

单奇伟, 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 100101

摘要: 基因组编辑技术已经在多个模式植物、动物以及其他生物中得到成功应用。基因组编辑是利用序列特异核酸酶(Sequence-specific nucleases, SSNs)在基因组特定位点产生 DNA 双链断裂(Double-strand breaks, DSBs),从而激活细胞自身修复机制——非同源末端连接(Non-homologous end joining, NHEJ)或同源重组(Homologous recombination, HR),实现基因敲除、染色体重组以及基因定点插入或替换等。锌指核酸酶(Zinc finger nuclease, ZFN)、TALEN(Transcription activator-like effector nuclease)和 CRISPR/Cas9(Clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated 9)系统是最主要的 3 类 SSNs。ZFN 和 TALEN 是利用蛋白与 DNA 结合方式靶向特定的基因组位点,而最新的 CRISPR/Cas9 系统则是利用更简单的核苷酸互补配对方式结合在基因组靶位点,其构建简单、效率更高效,因而促进了基因组编辑在植物中的广泛应用。利用基因组编辑技术除了实现植物基因定点突变外,还可以将 SSNs 的 DNA 结合域与其他功能蛋白融合,实现基因的靶向激活、抑制和表观调控等衍生技术。本文从基因组编辑技术的原理与优势、SSNs 组成及构建方法、基因组编辑及衍生技术在植物中应用、优化 SSNs 突变效率和减少脱靶突变方法等方面进行了系统介绍,并对未来需要迫切解决的一些问题进行了分析和展望。

关键词: 基因组编辑; ZFN; TALEN; CRISPR/Cas9; 同源重组; 脱靶突变

Research progress of genome editing and derivative technologies in plants

Qiwei Shan, Caixia Gao

State Key Laboratory of Plant Cell and Chromosome Engineering, Institute of Genetics and Developmental Biology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

Abstract: Genome editing technologies using engineered nucleases have been widely used in many model organisms. Genome editing with sequence-specific nuclease (SSN) creates DNA double-strand breaks (DSBs) in the genomic target sites that are primarily repaired by the non-homologous end joining (NHEJ) or homologous recombination (HR).

收稿日期: 2015-04-13; 修回日期: 2015-06-18

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 31420103912 和 31271795)和转基因重大专项(编号: 2014ZX0801003B)资助

作者简介: 单奇伟, 博士, 研究方向: 遗传学。E-mail: qwshan@icloud.com

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

DOI: 10.16288/j.ycz.15-156

网络出版时间: 2015-9-1 11:14:07

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20150901.1114.006.html>

nation (HR) pathways, which can be employed to achieve targeted genome modifications such as gene mutations, insertions, replacements or chromosome rearrangements. There are three major SSNs—zinc finger nuclease (ZFN), transcription activator-like effector nuclease (TALEN) and clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated 9 (CRISPR/Cas9) system. In contrast to ZFN and TALEN, which require substantial protein engineering to each DNA target, the CRISPR/Cas9 system requires only a change in the guide RNA. For this reason, the CRISPR/Cas9 system is a simple, inexpensive and versatile tool for genome engineering. Furthermore, a modified version of the CRISPR/Cas9 system has been developed to recruit heterologous domains that can regulate endogenous gene expression, such as activation, depression and epigenetic regulation. In this review, we summarize the development and applications of genome editing technologies for basic research and biotechnology, as well as highlight challenges and future directions, with particular emphasis on plants.

Keywords: genome editing; ZFN; TALEN; CRISPR/Cas9; homologous recombination; off-target mutation

随着生命科学研究进入基因组时代, 越来越多物种的基因组完成测序, 解读与改造基因组的功能就显得非常紧迫。以基因组编辑(Genome editing)为基础的反向遗传学技术是基因组改造与基因功能研究必不可少的手段之一^[1]。基因组编辑技术是一项可以与分子克隆、PCR 等技术相媲美的技术突破, 虽然出现仅仅 10 余年, 但已显著地促进了生物学研究的迅猛发展, 应用前景广阔。以序列特异核酸酶(Sequence-specific nucleases, SSNs)为工具的基因组编辑技术已在全世界掀起了研究热潮。2012 年 *Science* 将其列入年度 10 大科学进展, 以 TALEN 为代表的 SSNs 被誉为“基因组巡航导弹”。2013 年 *Science* 再次将 SSNs 技术的新星 CRISPR/Cas9 列入年度十大科学进展。2014 年 *Nature Methods* 将基因组编辑技术评为过去 10 年间对生物学研究最有影响力的 10 项研究方法之一。

1 基因组编辑技术的原理及优势

1.1 基因组编辑技术的原理及 DNA 断裂修复机制

近几年, 生物学家们巧妙地利用蛋白质结构与功能领域的研究成果, 将特异识别与结合 DNA 的蛋白质结构域和核酸内切酶结构域融合, 创造出能够按照人们意愿特异切割 DNA 的 SSNs, 并藉此实现了对基因组特定位点的靶向修饰, 即基因组编辑。SSNs 主要包括 3 种类型: 锌指核酸酶(Zinc finger nuclease, ZFN)、类转录激活因子效应物核酸酶(Transcription activator-like effector nuclease, TALEN)和成簇的规律间隔的短回文重复序列及其相关系统(Clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated 9, CRISPR/Cas9 system)(图 1, A~C)。它

们的共同特征是能够作为核酸内切酶切割特定的 DNA 序列, 创造 DNA 双链断裂(Double-strand breaks, DSBs)。在真核生物中, DSBs 的修复机制是高度保守的, 主要包括两种途径: 非同源末端连接(Non-homologous end joining, NHEJ)和同源重组(Homologous recombination, HR)。通过 NHEJ 方式, 断裂的染色体会重新连接, 但往往是不精确的, 断裂位置会产生少量核苷酸的插入或删除, 从而产生基因敲除突变体; 通过 HR 方式, 在引入同源序列的情况下, 以同源序列为模板进行合成修复, 从而产生精确的定点替换或者插入突变体^[2](图 2)。在这两种途径中, NHEJ 方式占绝对主导, 可以发生在几乎所有类型的细胞以及不同的细胞周期中(G₁、S 和 G₂ 期); 然而, HR 发生频率很低, 主要发生在 S 和 G₂ 期^[3]。

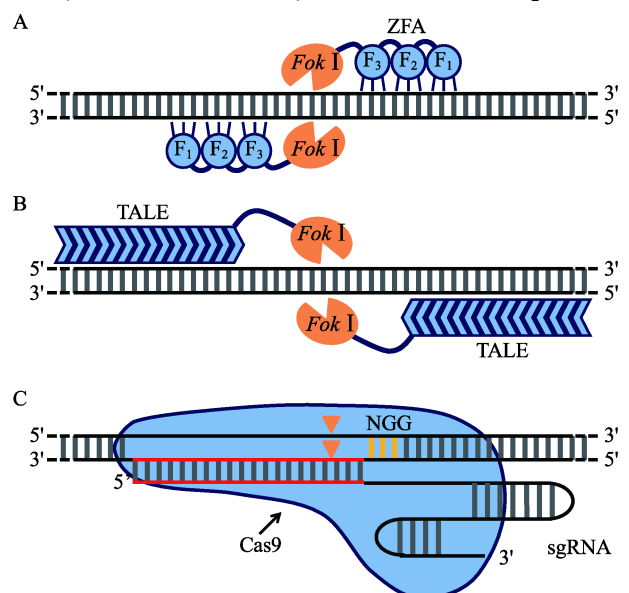


图 1 3 种序列特异核酸酶(SSNs)模式图

A: 锌指核酸酶; B: TALE 核酸酶; C: CRISPR/Cas9 系统。

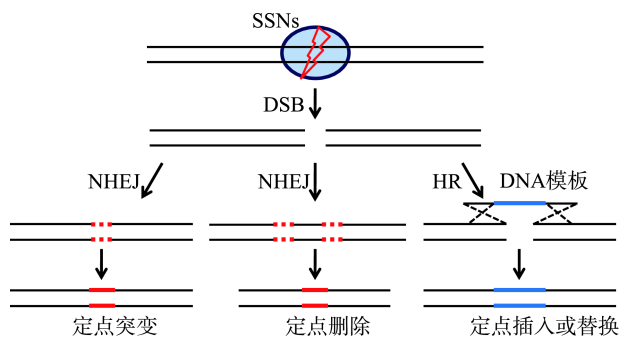


图 2 DNA 双链断裂(DSBs)修复途径

序列特异核酸酶(SSNs)可以在基因组特定位点制造 DNA 双链断裂,通过 NHEJ 途径修复实现定点突变(左);在同一条染色体上制造两个 DSBs,通过 NHEJ 途径修复实现定点删除(中);在提供供体 DNA 模板时,可以通过 HR 途径精确修复,实现定点插入或定点替换(右)。

1.1.1 NHEJ 途径

根据具体修复方式和参与修复的蛋白因子,可以将 NHEJ 分为两类:一类是 Classical NHEJ (cNHEJ);另一类是 Alternative NHEJ (aNHEJ)^[4]。这两种机制在所有真核生物中是高度保守的。通过 cNHEJ 途径,SSN 诱导的 DSBs 末端首先被具有环状结构的 Ku 蛋白异源二聚体(Ku70、Ku80)结合以防止 DNA 断裂末端进一步降解,最后在特定的 DNA 连接酶的作用下,将两个开放的末端重新连接(图 3A)。在连接前可能经过末端加工过程,因而产生几个核苷酸的插入或删除 (Indel),但多数情况下不经过加工过程而直接恢复为原始序列。从基因组编辑的角度看,经过末端加工产生少量核苷酸插入或删除是更有意义的。如果 DSBs 发生在编码基因的 ORF 区,插入或删除非 3 整数倍的核苷酸,可能造成移码突变使基因功能完全丧失。

如果 cNHEJ 途径被抑制或 DSBs 两侧含有几个或十几个核苷酸的微同源序列,则可能通过 aNHEJ 途径修复。研究表明,DSBs 末端分别发生 5' 至 3' 方向的 DNA 切除,释放出可局部互补配对的单链末端,微同源序列互补配对,再经过末端处理和重新连接修复 DSBs 缺口。修复后微同源序列恰好位于 DSBs 的结合点。由于发生了核苷酸的删除,造成遗传信息丢失,因此在基因组编辑过程中 aNHEJ 修复方式很容易产生突变(图 3B)。研究表明,这两种 NHEJ 途径在细胞中会相互竞争。与野生型相比,拟南芥 *ku80* 突变体 Indel 突变效率增加 2.6 倍,并且 DSBs 位置核苷酸降解长度也有所增加^[5]。

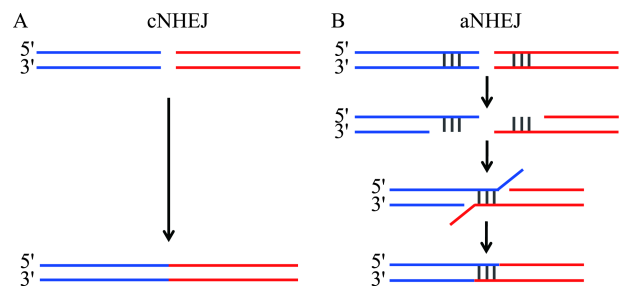


图 3 两种非同源末端连接(NHEJ)修复途径方式(参考文献[3]修改绘制)

A : cNHEJ ; B : aNHEJ。

1.1.2 HR 途径

根据发生方式的不同,HR 可以分为两类:单链退火(Single-strand annealing, SSA)和合成依赖链退火(Synthesis-dependent strand annealing, SDSA)。DSBs 产生后,在这两种途径下 DNA 断裂末端都会发生 5'至 3'方向的 DNA 切除,形成 3'单链末端。SSA 途径类似 aNHEJ 途径,DSBs 两端各有一段同源序列,同源序列区域直接退火形成互补双链,再经过末端加工和连接修复 DSBs(图 4A)。在基因组串联重复区域,SSA 是主要的 DSBs 修复方式^[6]。

SDSA 途径是依赖 DNA 合成的修复过程,基因组编辑过程中同源重组通常是指这种方式。DSB 经过 5'至 3'方向的 DNA 切除产生的一个 3'单链末端入侵同源供体 DNA 模板,形成 D-loop 环状结构,再利用同源 DNA 的互补链作为模板进行 DNA 合成修复,当延伸至可以与 DSB 另一个单链末端互补配对

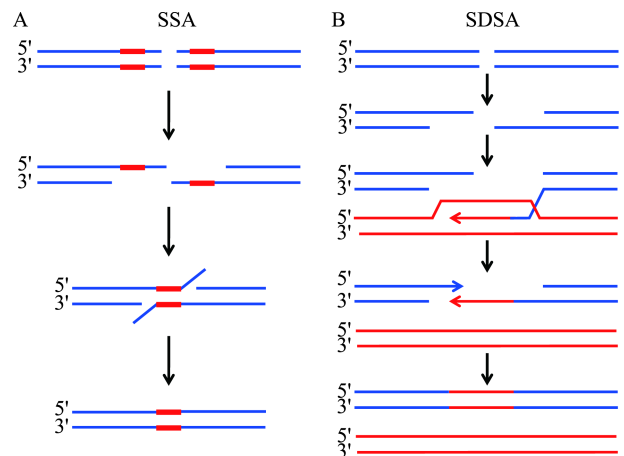


图 4 两种同源重组(HR)修复途径方式(参考文献[3]修改绘制)

A : SSA ; B : SDSA。

位置时,脱离 D-loop 结构,两个单链 DSB 末端退火形成双链,完成修复过程(图 4B)。SDSA 途径最终结果就是完成从同源 DNA 至 DSB 遗传信息的转换过程。SDSA 途径发生频率非常低,相同条件下只有 SSA 方式的 10%~20%^[7]。

1.2 基因组编辑技术优势

当前遗传改良或基因修饰途径存在许多缺陷。例如:传统杂交育种周期长,需要多个世代,耗时费力,且受物种间生殖隔离限制和不良基因连锁的影响;物理或化学诱变法虽然可以在基因组上随机产生大量突变位点,但突变位点鉴定十分困难;传统基因打靶方法效率极低(通常仅 10^{-6} ~ 10^{-5}),并且只限于少数物种如酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、小鼠(*Mus musculus*)等;RNAi 方法下调基因表达不够彻底,其后代的基因沉默效果减弱甚至完全消失,不能稳定遗传。相比于上述方法,基因组编辑技术优势非常明显:(1)所有 SSNs 都可以通过设计 DNA 结合蛋白(或导向 RNA)使其靶向编辑基因组的任意位点,精确性非常高;(2)原理简单易懂,而且技术操作简便、成本相对低廉,原则上适用于任意物种;(3)利用 SSNs 定点突变目的基因具有非常高的效率,通常从几个或十几个转化株系中就能筛选到符合要求的基因突变材料,对于活性高的 SSNs 在 T_0 代就可以得到纯合突变体。目前,基因组编辑技术已成功应用于酵母、线虫(*Caenorhabditis elegans*)、果蝇(*Drosophila melanogaster*)、斑马鱼(*Danio rerio*)、小鼠、人类(*Homo sapiens*)细胞、拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、烟草(*Nicotiana tabacum*)、大豆(*Glycine max*)、水稻(*Oryza sativa*)、小麦(*Triticum aestivum*)、大麦(*Hordeum vulgare*)和玉米(*Zea mays*)等多种模式生物及经济作物中^[8]。

2 SSNs 组成及构建方法

2.1 ZFNs 组成及构建方法

ZFNs 是通过基因工程方法将锌指蛋白 DNA 结合域(ZFA)和核酸内切酶 *Fok* 的切割结构域融合而成,DNA 结合域通常由 3~6 个 Cys2His2 类型的锌指单元串联而成^[9]。每个锌指单元含有 1 个 α 螺旋和 2 个 β 折叠结构,并且整合 1 个锌原子。1 个锌

指单元能特异识别 DNA 单链上 3 个连续的核苷酸;由多个锌指单元串联形成的 ZFA 结构域则可识别更长的靶序列,同时增加了 DNA 靶向修饰的特异性。当两个 ZFN 单体按照一定的距离和方向同各自的目标位点特异结合,两个 *Fok* 切割结构域恰好可形成二聚体的活性形式,在两个结合位点的间隔区(Spacer,通常为 5~7 bp)切割 DNA(图 1A)。

理论上每个锌指单元识别 3 个核苷酸,1 个包含 64 个锌指的文库就可以识别所有的串联三联体核苷酸。在应用中发现单个锌指的识别特性在不同的串联锌指单元 ZFA 中差异非常大,是由于相邻锌指造成的上下文背景起了重要影响。当前主要有 4 种设计方案,包括:模块组装方案(Modular assembly, MA)^[10]、基于文库筛选的 OPEN 方案^[11]、Sangamo 公司私有的双锌指模块组装方案(Two-finger modules)^[12]和上下文依赖组装方案(CoDA)^[13]。MA 方案虽然简便,但完全不考虑上下文背景作用,其成功率最低。另外 3 种方案都考虑了上下文的背景影响。当前有几种程序可以辅助设计 ZFN 靶位点,具体见表 1。

2.2 TALEN 组成及构建方法

类转录激活因子效应物(Transcription activator-like effector, TALE)是黄单胞杆菌属(*Xanthomonas*)植物病原菌通过 II 型分泌系统分泌到宿主细胞中的一种毒性蛋白,可以识别植物特定基因启动子序列,启动感病基因表达。TALE 核酸酶(TALENs)就是利用 TALE 的 DNA 结合域和 *Fok* 的切割结构域合成的人工核酸酶^[14](图 1B)。TALE 的 DNA 结合域包含 1 个由数量不等的重复单元串联组成的重复序列结构,这些重复单元通常由 33~35 个高度保守的氨基酸组成,第 12 和 13 位氨基酸可变,被称为重复可变双残基(Repeat variable diresidue, RVD)。每个 RVD 与核苷酸 A、T、C、G 存在简单对应的关系,即 NI 识别 A、HD 识别 C、NG 识别 T 和 NN 识别 G^[15,16]。TALE 蛋白以这种“一个重复单位一个核苷酸”的对应方式特异识别并结合 DNA。2012 年,TALE 蛋白晶体结构被解析出来,结构显示 TALE 的重复单元组成 Helix-loop-helix 的结构围绕 DNA 双螺旋主沟呈右手螺旋状排列,结构还显示 RVD 的两个残基中第一位氨基酸稳定 RVD loop 作用,第二位氨基酸与碱基特异识别相关^[17,18],这些信息为改造 TALE 蛋

表 1 SSNs 资源及在线程序

程序名称	用途	网址
ZiFi Targeter software	设计 ZFN/ZFA	zifit.partners.org/ZiFiT
Zinc-finger tools	设计 ZFN/ZFA	www.scripps.edu/barbas/zfdesign/zfdesignhome.php
The Segal lab software site	设计 ZFN/ZFA	zinc.genomecenter.ucdavis.edu:8080/Plone
The ZFN-Site	搜索脱靶位点	ccg.vital-it.ch/tagger/targetsearch.html
E-TALEN	设计 TALEN	www.e-talen.org/E-TALEN/
Mojo Hand	设计 TALEN	www.talendesign.org/
TALEN design tool	设计 TALEN	talendesign.org/wordpress/
TAL Effector Nucleotide Targeter 2.0	设计 TALEN/TALE	talen-nt.cac.cornell.edu/
ZiFiT Targeter software	设计 TALEN/TALE	zifit.partners.org/ZiFiT/
Genome engineering resources	设计 TALE 及其他资源	www.genome-engineering.org/
EENdb	人工核酸酶数据库	eendb.zfgenetics.org/index.php
Scoring algorithm for predicting TALEN activity (SAPTA)	预测 TALE(N)活性	baolab.bme.gatech.edu/Research/BioinformaticTools/TAL_targeter.html
TAL Plasmids Sequence Assembly Tool	生成 TALE 质粒全长序列	baolab.bme.gatech.edu/Research/BioinformaticTools/assembleTALSequences.html
PROGNOS tool	搜索 TALEN 和 ZFN 脱靶位点	baolab.bme.gatech.edu/Research/BioinformaticTools/prognos.html
TALENoffer	搜索 TALEN 脱靶位点	galaxy2.informatik.uni-halle.de:8976/
E-PCR	搜索脱靶位点	www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/epcr/
E-CRISP	设计 CRISPR	www.e-crisp.org/E-CRISP/
sgRNA Designer	设计 CRISPR	www.broadinstitute.org/rnai/public/analysis-tools/sgrna-design
CRISPRTarget	设计 CRISPR	brownlabtools.otago.ac.nz/CRISPRTarget/crispr_analysis.html
ZiFiT Targeter software	设计 CRISPR	zifit.partners.org/ZiFiT/
CHOPCHOP	设计 CRISPR 和 TALEN	chopchop.rc.fas.harvard.edu
CRISPR-P	设计植物 CRISPR	cbi.hzau.edu.cn/crispr/
CRISPR-PLANT	设计植物 CRISPR	www.genome.arizona.edu/crispr/index.html
Genome engineering resources	设计 CRISPR 及其他资源	www.genome-engineering.org/
crispr-cas.org	CRISPR 相关资源	www.crispr-cas.org/
RGEN tools	设计 CRISPR 并搜索脱靶位点	www.rgenome.net/
CasOT	搜索 CRISPR 脱靶位点	eendb.zfgenetics.org/casot/
Cas-OFFinder	搜索 CRISPR 脱靶位点	www.rgenome.net/cas-offinder/
Addgene	质粒共享平台	www.addgene.org

白提供了结构基础。

由于 TALE 蛋白 DNA 结合域的高度串联重复特性,使 TALE 表达载体的合成和搭建具有一定困难。科研人员开发了多种方法,包括简单直接的模块组装法^[19]、Golden Gate 组装方法^[20]、高通量合成 TALE 的固相组装^[21]和不依赖连接的克隆方法^[22]等。Golden Gate 组装方法利用 IIS 型限制性内切酶切割位点位于识别序列外部的特性,各个 TALE 重复单元质粒经酶切后产生不同的 4nt 粘性末端,具有兼容粘性末端的 DNA 片段可按照正确顺序连接成完

整的多 RVD 模块。表 1 汇总了当前各种 TALEN 辅助设计程序。

2.3 CRISPR/Cas 系统组成及构建方法

CRISPR/Cas 系统是在细菌的天然免疫系统内发现的,广泛存在于细菌及古生菌中,主要功能是抵抗入侵的病毒及外源 DNA。CRISPR/Cas 系统由 CRISPR 序列与 Cas 基因家族组成,其中 CRISPR 由一系列高度保守的重复序列(Repeat)与间隔序列(Spacer)相间排列组成。在 CRISPR 序列附近存在高

度保守的 CRISPR 相关基因(CRISPR-associated gene, Cas gene), 这些基因编码的蛋白具有核酸酶功能, 可以对 DNA 序列进行特异性切割^[23,24]。

根据 Cas 基因核心元件序列的不同, CRISPR/Cas 可以分为 I 型、II 型和 III 型系统^[23]。这 3 类系统又可以根据其编码 Cas 蛋白而分为更多的亚类。I 型和 II 型 CRISPR/Cas 免疫系统需要多个 Cas 蛋白形成的复合体切割 DNA 双链, 而 III 型只需要 1 个 Cas9 蛋白。Cas9 蛋白包含氨基端的 RuvC-like 结构域及位于蛋白中间位置的 HNH 核酸酶结构域, HNH 核酸酶结构域切割与单导向 RNA (Single guide RNA, sgRNA) 互补配对的模板链, RuvC-like 结构域对另 1 条链进行切割。切割位点位于原型间隔序列毗邻基序(Protospacer adjacent motif, PAM)上游 3nt 处。自 2012 年起, 人们优化了 II 型 CRISPR/Cas 系统, 利用 Cas9 蛋白和 sgRNA 构成简单的 sgRNA/Cas9 系统^[25, 26], 使其能够在真核生物中发挥类似 ZFN 和 TALEN 那样靶向切割 DNA 的作用(图 1C)。Cas9 蛋白与 sgRNA 结合形成 RNA-蛋白质复合物, 共同完成识别并切割 DNA 靶序列的功能。其中, Cas9 蛋白作为核酸酶切割双链 DNA, 而 sgRNA 则通过碱基互补配对决定靶序列的特异性。

2014 年, 链球菌(*Streptococcus pyogenes*)和放线菌(*Actinomyces naeslundii*) Cas9 蛋白的三维晶体结构被解析出来^[27,28]。结果发现, Cas9 家族的成员具有相同的核心结构, 这一结构可以裂开两瓣形成钳状, 一瓣负责目标识别, 另一瓣具有核酸酶活性能切断 DNA。两瓣中间有 1 个带正电的沟槽, 可以容纳 sgRNA:DNA 异源双链分子。目标识别瓣对于结合 sgRNA 和 DNA 是必须的, 而核酸酶瓣包含 HNH 和 RuvC 核酸酶结构域, 它们所处位置恰好可以分别切开一条 DNA 链。Cas9 蛋白单独存在时处于非活性状态, 但与 sgRNA 结合后, 它的三维结构会经历剧烈的改变, 允许 Cas9 与目标 DNA 结合。这一结构可以帮助改良 Cas9 核酸酶, 设计不影响其功能的小 Cas9 变体, 使其更适合基础研究和基因工程。目前已积累了大量的 CRISPR 靶位点设计网络程序, 详见表 1。

2.4 ZFN、TALEN 和 CRISPR/Cas9 系统的比较及选择

3 种 SSNs 技术相比较, 在效率、特异性及设计

上各有不同。由于锌指单元同其靶序列的对应性并不特异, ZFN 表现出较明显的脱靶效应(Off-target effect), 并且获得有效的 ZFN 相当困难, 这两点严重妨碍了该技术的广泛应用。TALEN 和 CRISPR/Cas9 系统相互补充, 各具优点: TALEN 优势是特异性高, 脱靶效应较低, 但 TALEN 蛋白较大, 并且序列重复性强, 表达载体构建较为繁琐; CRISPR/Cas9 系统在设计 and 构建上更为简单, 突变不同的靶位点时仅需重新设计、合成与靶序列互补的 sgRNA, 而不需要更换 Cas9 核酸酶, 为 CRISPR/Cas9 系统应用提供了极大便利。由于 sgRNA 与靶位点通过核苷酸配对相互识别, 个别核苷酸位点改变并不会对该系统的突变活性造成显著影响, 因此, CRISPR/Cas9 系统的特异性较 TALEN 稍差。目前 ZFN 基本上被 TALEN 和 CRISPR/Cas9 替代。TALEN 的优势是特异性高, 脱靶效应较低; 而 CRISPR/Cas9 系统的优势则是使用简便、成本低(表 2)。

在动物或人类的基因治疗等应用中, SSNs 脱靶效应可能造成致命后果。然而在植物中脱靶效应不是主要制约因素, 可以通过全基因组测序检测是否存在脱靶, 或者通过与亲本多次回交的方法去除脱靶突变。另据报道, CRISPR/Cas9 系统在植物中没有严重的脱靶突变^[29,30], 而且目前已有多种方法可以在一定程度上减少 CRISPR 脱靶, 提高靶向特异性。因此, 从简便、效率和多基因编辑角度考虑, 3 种 SSNs 中首选 CRISPR/Cas9, TALEN 次之。在基因组编辑以外的其他领域, TALE 效应因子相对更容易与其他功能结构域融合, 行使靶向激活、抑制和表观修饰等功能; 将无核酸酶活性的 dCas9(dead Cas9)与功能蛋白融合, 也能赋予 CRISPR 系统多种功能, 但 sgRNA 由 RNA 聚合酶 III 转录, 目前没有可精确调控的 sgRNA 启动子, 因此, 从可扩展性及精细调控方面 TALE 略胜一筹^[31]。

3 基因组编辑技术在植物生物学及分子育种研究中的应用

3.1 基因敲除

基因敲除是基因组编辑最简单的应用形式, 只需要 SSNs 在靶位点制造 1 个 DSB 断裂。利用 SSNs 基因敲除的植物种类包括拟南芥、烟草、矮牵牛(*Petunia hybrida*)、水稻、大豆、玉米和小麦等(表 3)。

表 2 ZFNs、TALENs 和 CRISPR/Cas9 系统比较

比较项目	ZFNs	TALENs	CRISPR/Cas9
结合原则	蛋白-DNA	蛋白-DNA	RNA-DNA
核心元件	ZFA- <i>Fok I</i>	TALE- <i>Fok I</i>	sgRNA, Cas9
花费 (成本)	高	相对较高	低
组装难易程度	困难	比较困难但已有改进	简单、快速
构建载体时间	> 7 d	5~7 d	3 d
靶位点长度(bp)	18~36 (2×9 或 2×18)	22~60 (2×11~30)	23 (包含 PAM 序列)
对靶位点限制	富含 G 区域	以 T 开始 A 结束	以 NGG 或 NAG 序列(PAM)结束
靶位点密度	每 100 bp 序列 1 个靶位点	很高	每 8 bp 含有 1 个靶位点(NGG PAM)
成功率	低	高	高
平均突变效率	低并且差异很大(~10%)	高(~20%)	高(~20%)
脱靶频率	高	低	变异较大
基因长度(kb)	~1×2	~3×2	4.2 SpCas9; 0.1 sgRNA
蛋白大小(kDa)	40	105	160
多基因编辑	困难	困难	容易

表 3 植物基因组编辑汇总

基因修饰类型	SSN 类型	物种	靶基因	转化方法	参考文献
体外酶切实验	TALEN	拟南芥	<i>PDS3</i>	无	[107]
瞬时 LUC 基因实验	TALEN	拟南芥	<i>CRUCIFERIN3</i>	农杆菌介导法	[108]
瞬时 YFP 基因实验	TALEN	烟草	<i>NPTII</i>	PEG 法转化原生质体	[109]
NHEJ 启动子突变	TALEN	水稻	<i>OsIIN3</i> 启动子	农杆菌介导法	[33]
NHEJ 启动子突变	TALEN	大麦	<i>HvPAPhy_a</i> 启动子	农杆菌介导法	[110]
NHEJ 基因敲除	ZFN	烟草	<i>ALS (SurA, SurB)</i>	电穿孔	[11]
NHEJ 基因敲除	ZFN	拟南芥	<i>ADH1, TT4</i>	农杆菌介导法	[32]
NHEJ 基因敲除	ZFN	拟南芥	<i>ABI4</i>	农杆菌介导法	[5]
NHEJ 基因敲除	ZFN	大豆	<i>eGFP, DCL4a, DCL4b</i> 等	<i>A. rhizogenes</i> 介导法	[111]
NHEJ 基因敲除	TALEN	拟南芥	<i>ADH1</i>	PEG 法转化原生质体	[19]
NHEJ 基因敲除	TALEN	拟南芥	<i>ADH1, TT4, MAPKKK1</i> 等	农杆菌介导法	[51]
NHEJ 基因敲除	TALEN	水稻、二穗短柄草	<i>OsBADH2, OsDEP1, BdCKX2</i> 等	农杆菌介导法	[52]
NHEJ 基因敲除	TALEN	烟草	<i>ALS (SurA, SurB)</i>	PEG 法转化原生质体	[48]
NHEJ 基因敲除	TALEN	大豆	<i>FAD2-1A, FAD2-1B</i>	<i>A. rhizogenes</i> 介导法	[35]
NHEJ 基因敲除	TALEN	小麦	<i>MLO1</i>	基因枪	[36]
NHEJ 基因敲除	TALEN	大麦	<i>GFP</i>	农杆菌介导转化胚性花粉细胞	[112]
NHEJ 基因敲除	TALEN	玉米	<i>PDS, IPK1A, IPK, MRP4</i>	农杆菌介导法	[113]
NHEJ 基因敲除	TALEN	番茄	<i>PRO</i>	农杆菌介导法	[114]
NHEJ 基因敲除	CRISPR/Cas	拟南芥	<i>GAI, BRI1, JAZ1</i> 等	农杆菌介导法	[30]
NHEJ 基因敲除	CRISPR/Cas	拟南芥	<i>GFP</i>	农杆菌介导法	[115]
NHEJ 基因敲除	CRISPR/Cas	拟南芥	<i>FT</i>	农杆菌介导法	[116]
NHEJ 基因敲除	CRISPR/Cas	拟南芥	<i>ADH1</i>	农杆菌介导法	[117]
NHEJ 基因敲除	CRISPR/Cas	拟南芥、水稻	<i>AtBRI1, OsROC5, OsSPP</i> 等	农杆菌介导法	[39]
NHEJ 基因敲除	CRISPR/Cas	拟南芥、水稻	<i>AtCHL1, AtCHL2, AtTT4, OsMYB</i>	农杆菌介导法	[118]

续表

基因修饰类型	SSN 类型	物种	靶基因	转化方法	参考文献
NHEJ 基因敲除	CRISPR/Cas	拟南芥、烟草	<i>PDS3</i> , <i>FLS2</i> , <i>RACK1</i>	农杆菌介导法	[37]
NHEJ 基因敲除	CRISPR/Cas	拟南芥、水稻、高粱	<i>mGFP</i> , <i>SWEET11</i> , <i>SWEET14</i>	农杆菌介导法	[119]
NHEJ 基因敲除	CRISPR/Cas	烟草	<i>PDS</i>	农杆菌介导法	[38]
NEHJ 基因敲除	CRISPR/Cas	烟草	<i>PDS</i> , <i>PDR6</i>	农杆菌介导法	[120]
NHEJ 基因敲除	CRISPR/Cas	水稻	<i>CAO1</i> , <i>LAZY1</i>	农杆菌介导法	[42]
NHEJ 基因敲除	CRISPR/Cas	水稻	<i>MYB1</i> , <i>YSA</i> , <i>ROC5</i> 等	农杆菌介导法	[29]
NHEJ 基因敲除	CRISPR/Cas	水稻	<i>MPK5</i>	PEG 法转化原生质体	[41]
NEHJ 基因敲除	CRISPR/Cas	水稻	<i>SWEET11</i> , <i>13</i> , <i>1a</i> , <i>1b</i>	农杆菌介导法	[53]
NHEJ 基因敲除	CRISPR/Cas	水稻、小麦	<i>OsPDS</i> , <i>TaMLO</i>	基因枪	[40]
NHEJ 基因敲除	CRISPR/Cas	小麦、烟草	<i>TaINOX</i> , <i>TaPDS</i> , <i>NbPDS</i>	农杆菌介导法	[121]
NHEJ 基因敲除	CRISPR/Cas	玉米	<i>IPK</i>	PEG 法转化原生质体	[113]
NHEJ 基因敲除	CRISPR/Cas	地钱	<i>ARF1</i>	农杆菌介导法	[122]
NHEJ 基因敲除	CRISPR/Cas	甜橙	<i>PDS</i>	农杆菌介导法	[123]
NHEJ 基因敲除	CRISPR/Cas	番茄	<i>AGO7</i>	农杆菌介导法	[124]
NHEJ 基因删除和倒位	ZFN	拟南芥	<i>RPP4</i> 基因簇	农杆菌介导法	[50]
NHEJ 基因删除和倒位	TALEN	水稻	<i>BADH2</i>	基因枪	[52]
NHEJ 基因删除	TALEN	拟南芥	<i>GLL22</i> 基因簇	农杆菌介导法	[51]
NHEJ 基因删除	CRISPR/Cas	小麦、烟草	<i>TaINOX</i>	农杆菌介导法	[121]
NHEJ 基因删除	CRISPR/Cas	拟南芥	<i>TT4</i>	农杆菌介导法	[118]
NEHJ 基因删除	CRISPR/Cas	烟草	<i>PDS</i>	农杆菌介导法	[120]
NHEJ 基因删除	CRISPR/Cas	水稻	<i>SWEET1</i> , <i>11</i> , <i>13</i> , <i>14</i>	农杆菌介导法	[53]
NHEJ 多基因敲除	TALEN	水稻	<i>BADH2</i> , <i>CKX2</i> , <i>DEP1</i>	基因枪	[34]
NHEJ 多基因敲除	CRISPR/Cas	拟南芥	<i>TRY</i> , <i>CPC</i> , <i>ETC2</i>	农杆菌介导法	[54]
NEHJ 基因替换	ZFN	拟南芥、烟草	<i>QQR-ZFN</i>	农杆菌介导法	[125]
NHEJ 基因插入	TALEN	小麦	<i>MLO1</i>	基因枪	[36]
SSA 基因修复	CRISPR/Cas	拟南芥	<i>GUUS</i>	农杆菌介导法	[30]
HR 核苷酸插入	CRISPR/Cas	水稻	<i>PDS</i>	PEG 法转化原生质体	[40]
HR 核苷酸插入	CRISPR/Cas	烟草	<i>PDS3</i>	农杆菌介导法	[37]
HR 核苷酸替换	ZFN	拟南芥	<i>PPO</i>	农杆菌介导法	[126]
HR 核苷酸替换	ZFN	烟草	<i>SurA</i> , <i>SurB</i>	电穿孔	[46]
HR 核苷酸替换和基因插入	TALEN	烟草	<i>ALS (SurA, SurB)</i>	PEG 法转化原生质体	[48]
HR 基因插入	CRISPR/Cas	拟南芥	<i>ADH1</i>	农杆菌介导法	[117]
HR 基因插入	ZFN	玉米	<i>IPK1</i>	Whisker 介导法	[47]
HR 基因插入	ZFN	烟草	<i>CHN50</i>	农杆菌介导法	[127]
HR 基因叠加	ZFN	玉米	<i>CCR5</i> , <i>AAVS1</i> , <i>Rosa26</i> , <i>Prmt1</i>	基因枪	[128]

Zhang 等^[32]用 OPEN(Oligomerized pool engineering)方法设计 ZFN 敲除拟南芥 *ADH1* 和 *TT4* 基因, 并利用雌激素诱导启动子表达, T_1 代分别有 7% 和 16% 的植物含有体细胞突变, 突变能够稳定传递到后代, 并获得 20% 纯合突变植物。纯合 *adh1* 突变体具有预期丙烯醇抗性, 而 *tt4* 突变体种皮因缺失花

青素而呈现黄色。

Li 等^[33]利用 TALEN 方法突变水稻蔗糖外排转运基因 *OsSWEET14* 启动子区域, 破坏细菌性病原菌分泌的效应蛋白在基因组上的结合位点, 从而提高水稻白叶枯病抗性。Shan 等^[34]对水稻甜菜碱乙醛脱氢酶基因(*OsBADH2*)的编码区设计 TALEN, *badh2*

纯和突变体稻米 2AP 含量显著增加, 提高了稻米的香味品质。Haun 等^[35]利用 TALEN 方法同时敲除大豆脂肪脱氢酶 2 基因家族两个成员 *FAD2-1A* 和 *FAD2-1B*, 纯合突变体(*aabb*)油酸含量从 20% 提高到 80%, 并同时降低对人体健康有害的亚油酸含量(从 50% 到 4%), 因此改善了大豆油的品质。Wang 等^[36,37]利用 TALEN 方法同时敲除 *MLO* 基因在小麦 A、B 和 D 基因组上的 3 个拷贝, 获得对白粉病具有广谱和持久抗性的纯合小麦突变体 *tamlo-aabdd*。

CRISPR/Cas9 系统具有简捷和高效特性, 目前已在多个植物中得到应用, 如拟南芥、烟草、水稻、玉米、高粱、小麦、甜橙(*Citrus sinensis*)和番茄(*Solanum lycopersicum*)等(表 3)。在拟南芥和烟草原生质体中, NHEJ 突变效率分别达到 5.6% 和 38.5%^[38]。此外, 利用农杆菌侵染方法稳定转化拟南芥, T₁ 植物中有 26%~84% 突变效率^[39]。Shan 等^[40]利用水稻偏爱密码子优化 Cas9 核酸酶基因, 并采用水稻小核 RNA 的 U3 启动子和小麦 U6 启动子转录 sgRNA, 定点敲除水稻 *PDS* 和小麦 *MLO* 等基因, 在 T₀ 代就获得纯合基因敲除水稻突变体, 突变效率达到 10%。Xie 等^[41]在水稻原生质体中检测到 3.5%~10.6% 突变效率, 植物中突变效率为 3%~8%。Miao 等^[42]分别敲除水稻叶绿素 A 加氧酶基因 *CAO1* 和控制分蘖夹角的 *LAZY1* 基因, T₁ 代纯合 *cao1* 和 *lazy1* 突变体分别呈现叶片叶绿素含量降低和分蘖夹角增大表型。

3.2 基因插入和定点替换

一般情况下, 基因插入或定点替换都可以通过 HR 方式实现, 转化 SSNs 同时引入一个供体 DNA 载体或片段, 供体 DNA 包含了待插入或替换的基因或核苷酸序列并在其两侧分别含有足够长的同源 DNA(同源臂)。基因定点插入所用的供体 DNA 通常为双链环状载体或双链线性 DNA; 此外还可以使用单链寡核苷酸 DNA(ssDNA), ssDNA 的设计和合成比构建双链 DNA 载体更简单方便^[43]。由于 NHEJ 效率相比 HR 效率高很多, 因此, 利用 NHEJ 途径定点插入基因或 Tag 标签成为一种替代方法^[44]。植物中基因插入和定点替换的成功例子见表 3。

Voytas 实验室最早尝试用 HR 方式精确编辑植物基因组, 他们首先在烟草中整合了功能缺失的 *gus:nptII* 筛选基因, 该基因上含有 ZFN(Zif268)识别

序列。再把 ZFN 和供体 DNA 转入含有 *gus:nptII* 基因的烟草原生质体中, 从卡那霉素抗性克隆中筛选到有 10% 发生同源重组^[45]。Townsend 等^[46]利用 ZFN 技术, 通过 HR 途径分别定点替换烟草乙酰乳酸合成酶基因(*SuRA*、*SuRB*)的 3 个关键核苷酸位点, 得到抗除草剂烟草, 基因打靶效率在 0.2%~4% 之间。Shukla 等^[47]在玉米中用 ZFN 定点突变肌醇六磷酸生物合成最后一步的关键酶基因 *IPK1*, 同时插入抗除草剂基因 *PAT*, 玉米的肌醇六磷酸含量减少, 营养品质得到改良, 且减少了对环境的有机磷污染, 基因打靶效率在大部分实验中高达 10% 以上。

Zhang 等^[48]在烟草原生质体中转化 TALEN 和供体 DNA, 有 30% 细胞发生 *ALS* 基因突变, 另外高达 14% 烟草原生质体细胞 *ALS* 基因位点整合了 *YFP* 报告基因; 另一组不加筛选剂实验中, 烟草 *ALS* 基因关键核苷酸替换效率达到 4%。Wang 等^[36]在小麦原生质体细胞 *MLO* 基因位点通过 NHEJ 途径整合不含启动子的 *GFP* 报告基因, 流式细胞仪检测到 6.5% 细胞有 GFP 表达, 测序结果证明 *GFP* 按照正确读码框整合在 *MLO* 位点。在另一项研究中, 科研人员将 His-tag 和 Myc-tag 按照 NHEJ 方式整合在小麦 *MLO* 位点, 效率达到 1.4% 和 2.6%, 并且按照孟德尔分离比例传递到 T₁ 代。

利用 CRISPR/Cas9 系统, Shan 等^[38]和 Li 等^[40]分别在水稻和烟草的原生质体 *PDS* 基因上通过 HR 途径插入 1 个或多个限制性内切酶位点, 并利用酶切和测序方法验证了 HR 效率。Fauser 等^[49]在拟南芥中利用 *DGU.US* 和 *IU.GUS* 两个 *GUS* 报告基因系统, 证明 Cas9 核酸酶和 Cas9 切口酶都能有效诱导 HR, 且 Cas9 切口酶效率更高。

3.3 染色体重组及多基因敲除

多个 SSNs 同时导入细胞可以实现染色体片段删除、倒位、易位等染色体重组突变和多基因同步敲除突变。染色体重组和多基因敲除是反向遗传学和现代生物技术的重要工具, 基因大片段删除技术对于研究非编码 RNA、基因调控序列和冗余基因功能具有重要作用; 利用多基因敲除技术研究复杂性状或数量性状, 能够在较短时间获得多基因同步敲除突变体, 加快研究进程。Qi 等^[50]利用农杆菌转化

法同时转化两对 ZFNs,在拟南芥中同时删除了含有 8 个抗病基因长度为 55 kb 的 *RPP4* 基因簇,体细胞中突变效率在 1% 左右;在另一组实验中, Qi 等获得了长约为 9 Mb 染色体片段删除,同时检测到染色体倒位和片段重复的现象。借助于 TALEN 技术, Christian 等^[51]和 Shan 等^[52]分别在拟南芥和水稻中实现 4.4 kb 和 1.3 kb 基因片段删除。CRISPR/Cas9 系统由于构建简单,因此在染色体重组和多基因编辑领域更有优势, Zhou 等^[53]利用 CRISPR 系统在水稻中实现了 115~245 kb 大片段删除,其中包含了 2~3 个不同的基因簇,进一步表明 SSN 在染色体大片段删除中的有效性。

多基因同步敲除技术在植物中也有报道, Shan 等^[34]通过基因枪法同时导入 3 对 TALENs, 分别靶向控制水稻产量和品质性状基因 *DEP1*、*CKX2* 和 *BADH2*, 在 T_0 代获得一系列单基因、两基因及三基因共同敲除株系, 其中三基因突变效率达到 1.9%(4/207)。Xing 等^[54]构建了一套适合进行植物多基因编辑的 CRISPR/Cas9 载体系统, 在拟南芥的 T_1 代植物中实现三基因同步敲除。最近, Xie 等^[55]利用内源的转运 RNA(Transfer RNA, tRNA)加工系统提高了 CRISPR/Cas9 进行多基因编辑的能力, 他们将多个 tRNA-sgRNA 结构串联排列, 从构建的一个多顺反子 tRNA-sgRNA 基因(PTG)可以转录并加工成多个 sgRNA。利用这一策略在水稻中实现多达 8 个位点同时突变, 并且个别位点效率高达 100%。而且由于 tRNA 及其加工系统在所有生物中都是非常保守的, 这一策略有望在其他物种的多基因编辑中广泛应用。

3.4 SSNs 与其他生物技术相结合的创新研究成果

SSNs 技术与其他先进生物技术相结合, 已经产生了很多意想不到的巨大突破。例如, CRISPR/Cas9 系统的简便和低成本使全基因组水平的定向编辑(Genome-wide editing)变为现实, 通过构建靶向几千个甚至上万个基因的大规模 sgRNA 文库, 再结合功能性筛选平台和深度测序技术, 以高通量方式研究疾病相关的基因, 这一技术还有望研究更广泛的生物学问题^[56-58]。华盛顿大学的研究团队将 CRISPR/Cas9 系统与饱和基因组编辑和深度测序技术相结合,

检测大量单个核苷酸位点突变带来的功能性影响, 这一研究可能推动对一些顺式调控元件和反式作用因子进行高分辨率的功能解析, 并大大提高人们解读未知基因变异的能力^[59]。华人科学家简悦威院士将 CRISPR/Cas9 与 piggyBac 转座子结合, 修改引起 β -地中海贫血病的 *HBB* 基因, 在诱导多能干细胞(iPSC)中实现无痕基因校正^[60]。另外, SSNs 及其他衍生的转录组、表观基因组靶向修饰工具在合成生物学领域也已发挥重要作用^[61,62]。

4 SSNs 的相关衍生技术及应用

除基因组编辑技术以外, DNA 结合蛋白 ZFA 或 TALE 可以与多种功能蛋白融合而行使其其他靶向修饰作用; 同理, 无 DNA 切割活性的 dCas9 (dead Cas9) 也可以与其他功能蛋白融合, 借助 sgRNA 靶向特定位置进行基因修饰。目前, 已报道与 ZFA、TALE 或 dCas9 融合的功能蛋白包括 VP64 KRAB 和 TET1 等, 它们负责转录激活、转录抑制、表观调控和靶向 RNA 编辑等。这些 SSNs 相关衍生技术为生物学研究提供了更多的遗传学工具(图 5)。

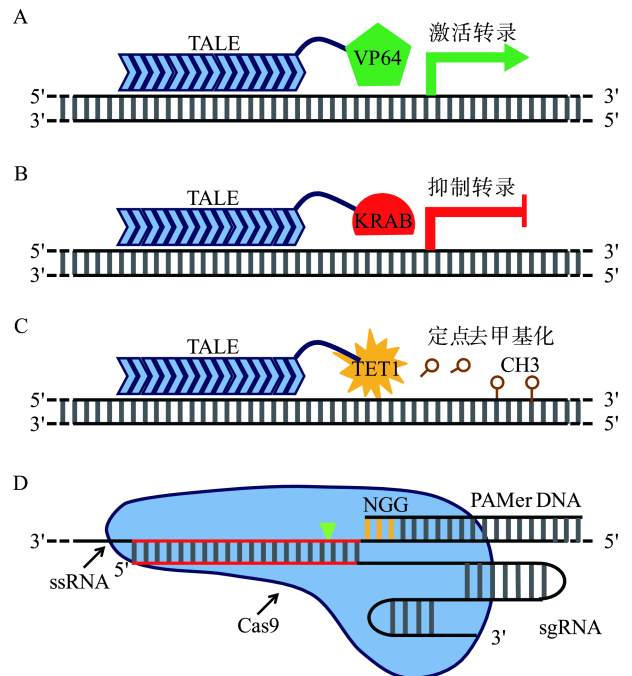


图 5 SSN 衍生应用技术

A: TALE-VP64 融合蛋白用于靶向激活基因表达; B: TALE-KRAB 融合蛋白用于靶向抑制基因表达; C: TALE-TET1 融合蛋白用于染色体定点去甲基化; D: CRISPR/Cas9 系统用于切割单链 RNA。

4.1 靶向基因激活

Sanchez 等^[63]将编码 3 个串联的锌指蛋白 Zif268 与疱疹病毒的转录激活结构域 VP16 或 VP64(即 4×VP16)基因融合, 产生融合蛋白 ZF-VP16 或 ZF-VP64。拟南芥瞬时表达实验和稳定转化实验中, 融合蛋白都可以激活报告基因 *LUC* 和 *GFP* 的转录。Morbiter 等^[64]利用 *AvrBS3* 的 TALE 骨架并将其 RVD 替换, 靶向番茄 *BS4*、拟南芥 *EGL3* 和拟南芥 *KNAT1* 启动子上特定位点, 所有 dTALE 都能特异性地激活 3 个基因。Liu 等^[65]在烟草实验中利用农杆菌注射方法瞬时表达 TALE-VP64 或 TALE-VP16 融合蛋白, 靶向 35S 启动子的 TATA-Box 旁侧序列, 可以显著增强橙色荧光蛋白报告基因(*pporRFP*)的表达。实验结果还表明, 靶向激活作用具有累加效应, 即多个不同的 TALE 融合蛋白共同使用比单个 TALE 融合蛋白的激活作用更强。此外, 利用 TALE 融合蛋白激活转基因烟草中的 *AtPAP1* 基因, 烟草叶片注射后合成大量花青素因而呈现深紫色, 进一步证明人工合成 TALE 融合蛋白可以用于植物内源基因的靶向激活。Baazim^[66]采用 CRISPR/dCas9 系统在烟草中进行定点激活实验, 通过在 dCas9 的 C-末端融合激活结构域 EDLL 或 TAD (TAL effector 激活结构域), 农杆菌注射烟草叶片后对烟草叶盘进行染色或半定量 PCR 实验, 表明 *GUS* 基因或 *PDS* 基因可以被激活。上述靶向激活实验的效率通常较低, 为进一步提高效率, Tanenbaum 等^[67]开发了一种名为“SunTag”的蛋白标签信号放大系统, 可以高效率定向激活靶标基因。这一系统通过在 dCas9 末端融合能与单链抗体 scFv 特异性结合的串联多肽链 GCN4, 从而将多个 VP64 激活结构域募集至靶标基因启动子区域, 对人类细胞中低表达丰度基因 *CXCR4*, 转录效果增强 10~50 倍; 对高表达基因的激活效果也能达到 3 倍以上。另外, Konermann 等^[68]重新设计 CRISPR-Cas9 激活复合体, 采用 sgRNA2.0、NLS-dCas9-VP64 和 MS2-p65-HSF1 蛋白复合体这个优化组合能大幅度提高转录激活效率, 在人类细胞中实现同时激活十个内源基因, 并能够上调长基因间非编码 RNA(lincRNA)的转录水平; 此外, 还构建靶向人类全基因组水平的 70 290 个 sgRNA 文库, 进行大规模 Gain-of-function(GOF)遗传筛选抗 BRAF 蛋白抑制剂的细胞克隆。

4.2 靶向基因抑制

Mahfouz 等^[69]利用 dHAX3 的 TALE 骨架与 SRDX 转录抑制结构域构建嵌合蛋白 dHax3.SRDX 转化拟南芥, 该融合蛋白能够靶向 *RD29A* 启动子区域, 报告基因 *RD29A::LUC* 和拟南芥内源基因 *RD29A* 的转录都受到明显抑制。Baazim^[66]在 dCas9 蛋白的 3'-末端融合 SRDX 转录抑制结构域, 构建 dCas9-SRDX 融合蛋白, 在 sgRNA 引导下, 半定量 PCR 实验表明可以靶向性抑制烟草 *PDS* 基因。在人类细胞及动物研究领域, Zhang 等^[70]构建了一套基于 TALE-KRAB 的转录抑制载体系统, 并利用不同的荧光蛋白进行标记, 可以同时抑制小鼠的多个内源基因, 例如同时转入靶向两个基因 *c.Kit* 和 *PU.1* 的 3 个 TALE-KRAB 载体, 结合 FACS 荧光分选方法和 qPCR 鉴定, 表明小鼠 MEFs 细胞两个基因的表达水平分别降低 50%和 80%。Gilbert 等^[71]利用 CRISPR 系统首先在人类细胞和酵母中实现靶基因表达的精确调控, 通过将无切割活性的 dCas9 与转录抑制结构域 KRAB 融合, 可以显著沉默多个内源基因的表达。RNA 测序表明 CRISPRi 介导的转录抑制具有很高的靶向特异性。最近, 加州大学的科研人员设计了一种 CRISPR 的引导 RNA, 在上面加入了效应蛋白的招募位点, 即支架 RNA(scRNA)系统。scRNA 同时定义了靶位点和调控功能, 能同时对不同的基因进行激活或抑制。这种支架 RNA 可以用来设计多基因转录程序, 在激活一些基因的同时抑制另一些基因。利用这种方法, 成功在酵母中重新编程了一个复杂的代谢通路。研究还显示, scRNA 在哺乳动物和酵母中均能有效发挥调控功能^[72]。

4.3 靶向表观修饰

对表观基因组的定向修饰是另外一个重要研究方向。基因组的表观修饰包括 DNA 和组蛋白的甲基化、去甲基化、乙酰化和去乙酰基化等, 在基因的表达调控方面发挥重要作用。目前在植物领域还没有靶向表观修饰研究的报道, 只有少数几篇文章是在人类细胞、哺乳动物和细菌中的研究。Meister 等^[73]将天然存在的异源二聚体甲基转移酶 M.EcoHK3II 的两个亚基分别与识别 9 bp 长的锌指蛋白融合, 构建锌指甲基转移酶, 可以特异性地对大肠杆菌靶位点进行 DNA 甲基化修饰, 而不会造成非靶位点的甲

基化。最近有两个实验室报道利用 TALE 融合蛋白修改哺乳动物内源基因的表现状态。Mendenhall 等^[74]利用 TALE 与组蛋白去甲基化酶 LSD1 融合构建的 TALE-LSD1 蛋白研究增强子上的组蛋白印记对转录调控的作用,表明融合蛋白可以有效地去除靶向增强子位点的染色质修饰,而不会影响对照区域;他们还发现通过融合蛋白失活增强子往往导致下调临近基因的表达,从而确定了增强子的靶向基因。Koner mann 等^[75]将 TALE 与光诱导系统结合构建了 LITE 系统,在串联 mSin3 结构域(SID4X)的作用下,靶标基因 *Grm2* 的转录水平下降,同时 *Grm2* 基因启动子区域 H3K9 乙酰化水平降低两倍,表明转录作用被抑制。此外, Maeder 等^[76]开发了一种可在人类细胞中有效定点去甲基化的方法,通过采用 TALE-TET1 羟化酶催化结构域融合蛋白,可以改变启动子上关键 CpG 区域的甲基化状态,进而显著增加人类内源基因的表达水平。

4.4 靶向 RNA 编辑

RNAi 是真核生物中一个最重要的 RNA 水平的转录调控机制。此前, CRISPR/Cas9 系统被认为只能切割双链 DNA,不能靶向 RNA,然而最近研究发现 CRISPR/Cas9 系统也可以用来对 RNA 进行靶向编辑。O'Connell 等^[77]研究表明,当提供合适的含 PAM 序列的寡核苷酸(PAMer)DNA 时,Cas9 核酸酶可以特异性地结合并切断与 sgRNA 互补配对的单链 RNA (ssRNA),PAMer DNA 的作用类似于 PAM 序列,它能够激活 Cas9 核酸酶活性从而切断 DNA 或 RNA,研究还表明这一技术可以用来从细胞中分离特定的内源 mRNA 转录本。最近研究发现,有些古菌的 II 型 CRISPR 系统能够切割 RNA。例如,Zebec 等^[78]发现嗜热古菌 *Sulfolobus solfataricus* 能利用 CRISPR 系统特异性降解入侵病毒的 mRNA,qPCR 实验表明超过 40% 的 mRNA 可以被降解,利用纯化的 CMR 复合体在体外实验中证实了切割相同的 mRNA 底物。另外,通过重新设计 crRNA 证明这一系统可以靶向其他基因,靶标基因的 mRNA 和蛋白质水平降低 50% 左右。此外,Tamulaitis 等^[79]和 Staals 等^[80]发现 *Streptococcus thermophilus* 和 *Thermus thermophilus* 中的 I-A 型 CRISPR 系统也能特异性降解 RNA。

植物中广泛存在一类称为 PPR 的蛋白家族,包括许多序列特异性 RNA 结合蛋白,它们参与了细胞器中 RNA 代谢的许多方面,包括 RNA 稳定性、加工、编辑和翻译等过程。PPR 蛋白由 2~30 个串联的 PPR 重复单元组成,每个重复单元包含 35 个氨基酸,它可以特异性地识别一个核糖核苷酸,2~3 个特定的氨基酸决定了识别特异性,这与 TALE 蛋白识别 DNA 方式非常类似。因此,PPR 有可能经过人工设计并作为特异性的 RNA 结合蛋白用于靶向 RNA 编辑。Yagi 等^[81]在其综述中系统介绍了 PPR 蛋白的研究进展情况。

5 优化 SSNs 突变效率及减少脱靶效应的方法

5.1 提高 SSNs 切割效率及突变活性的方法

SSNs 突变活性的高低决定了能否获得预期的定点修饰个体及获得突变的频率。目前有以下几种提高 SSNs 活性的方法:

第一、在细胞或生物体内高水平表达 SSNs 可以提高突变效率,但同时也可能会提高脱靶突变。例如,Ramakrishna 等^[82]发现在培养人类细胞时加入蛋白酶抑制剂可抑制 ZFNs 蛋白降解,进而显著增加 ZFNs 诱导的突变效率;在 30 培养哺乳动物细胞比 37 下 SSNs 的表达水平更高,可以提高 ZFNs 和 TALENs 的突变效率^[12];采用合适的强启动子表达 SSNs 也可以在一定程度上提高突变效率。

第二、通过同时表达核酸外切酶提高突变效率。Certo 等^[83]报道转化 SSNs 同时共同转化 DNA 断裂末端加工核酸外切酶(Exo1、Trex2 等),可以避免 DSBs 通过 cNHEJ 途径完好修复,因而提高 aNHEJ 途径的突变效率。

第三、TALE 蛋白骨架结构对突变效率影响很大。研究报道适当截短 TALE 蛋白 N 端和 C 端可提高其在人类细胞、烟草和家畜中的活性。有实验表明截短 TALE 蛋白 N 端和 C 端(特别是 C 端)可以提高蛋白的稳定性,并且能帮助蛋白正确折叠^[48,83]。而且,由于 TALEN 蛋白较大,截短后还有利于载体构建及遗传转化。

第四、TALE 蛋白对靶位点的表现状态比较敏感,特别是 DNA 的甲基化修饰(5mC)会明显抑制 TALEN 的切割活性。研究表明采用两种 RVD(N*或

NG; *为第 13 位缺失)代替 HD 识别 5mC 甲基化的 DNA 位点,可以提高 TALE 蛋白靶向识别能力^[85,86]。另外,在设计 TALEN 靶向位点时可以尽量避免富含 CG 区域以减少 DNA 甲基化带来的影响。

第五、对于 CRISPR/Cas9 系统,通过优化 sgRNA 设计可以提高该系统的成功率和突变效率。Doench 等^[87]利用抗体着色和流式细胞仪分析方法系统比较了不同 sgRNAs 在基因敲除实验中的活性,发现一系列能增强 sgRNA 活性的序列特征。具体而言,CGGT 往往比典型的 NGG 序列更好。通过研究 1841 个 sgRNA 中活性较高的 sgRNA,他们得出了评分规则,并编写了在线设计高活性 sgRNA 的程序 sgRNA Designer(表 1)。另外, Ren 等^[88]发现紧邻 PAM 序列上游的 6 个核苷酸的 GC 含量与 sgRNA 诱导的突变效率有显著的正相关性,即 GC 含量越高,突变效率越高。

5.2 同源重组机制与提高定点插入或替换效率

提高 HR 效率是基因组编辑研究最重要也是最迫切任务之一。在 DSBs 修复的两种机制中, NHEJ 是占绝对主导的,而 HR 只发生在特定细胞类型和细胞周期中。

首先通过 DSB 修复机制的研究,使天平向 HR 方向倾斜。Ku 和 Lig4 蛋白是 NHEJ 修复中必不可少的,在拟南芥中的实验表明, *ku70* 或 *lig4* 突变体背景下 HR 与 NHEJ 修复比例显著提高^[89],但很多物种 *lig4* 突变体是致死的,因此开发一种专门针对 Lig4 蛋白的小分子抑制剂实现瞬时消减其活性,对于提高 HR 介导的基因定点插入或替换有重要价值^[8]。SMC6 参与姐妹染色单体间的同源重组过程,有趣的是,拟南芥 *smc6b* 背景下 NHEJ 和 HR 的效率分别提高了 6~8 倍和 3~4 倍,但具体机制需进一步阐释^[89]。在人类细胞实验中,利用只切开 DNA 一条单链的 ZFN、TALEN 和 Cas9 切口酶(Nickase),能提高 HR/NHEJ 比例^[26,90]。DNA 单链缺刻不经过 NHEJ 修复,在靶位点的 indel 突变减少,但可以提高 HR 效率。所有真核生物 HR 修复的起始步骤都是在 Exo1 等核酸外切酶作用下按照 5 → 3 方向降解 DSB 末端,3 单链寡核苷酸 DNA 末端能够结合 Rad51 多聚体蛋白并搜寻同源序列。在水稻中,表达 SSNs 同时超表达 OsExo1 和(或)OsRecQ14 核酸外

切酶,能够促进 HR 和 SSA 效率^[91];在人类细胞和大鼠中,超表达 Exo1 或另一种核酸外切酶 Trex2 提高了 NHEJ 介导的基因敲除效率,但对 HR 是否有影响并未研究^[83]。对 DNA 修复机制特别是 HR 修复过程的研究将有助于人们采用适当方法提高基因组编辑中定点插入或替换的效率。在细胞周期的不同阶段,DSB 修复方式不同,研究表明 HR 主要发生在晚 S 期和 G₂ 期;而 NHEJ 可以发生在所有的细胞周期。因此,细胞周期在很大程度上影响了两种 DSB 修复方式的选择。Lin 等^[92]采用了一种化学诱导的方法首先将培养的人类细胞同步化至 S 期,在此时期将体外组装的 Cas9-sgRNA 核糖核蛋白复合体 RNP 转染 HEK293T 细胞,与非同步化细胞相比,HR 效率提高 38% 左右。

其次,通过优化供体 DNA 模板(数量、长度、类型、导入方式等)提高 HR 效率是另一条途径。Baltes 等^[93]利用双生病毒(Geminivirus)载体表达 SSNs 和 DNA 模板,已在烟草中表明提高了 HR 效率。双生病毒是造成很多植物病害的小分子(3 kb 左右)单链 DNA 病毒,如菜豆黄矮病毒(BeYDV)、小麦矮缩病毒(WDV)等。改造的病毒载体保留了复制子(Replicon)元件,并用 SSNs 和 DNA 模板代替致病和病毒运动基因,病毒载体在植物细胞内能够大量复制,因此提高 SSNs 和 DNA 模板数量,与普通 T-DNA 载体相比,HR 效率提高 1~2 个数量级。此外,Replicon 复制起始蛋白的多效性作用进一步提高了基因打靶效率。DNA 模板同源臂的长度也影响 HR 效率,双链 DNA 模板的同源臂长度一般为 1~4 kb,即在 DSB 两侧等分成大约 0.5~2 kb。Byrne 等^[94]在人类诱导多能干细胞 iPSC 中系统研究了基因打靶载体设计对 HR 效率的影响,研究表明在无任何辅助筛选条件下,长度为 2.7 kb 的 *THY1* 基因的纯合替换效率最高可以达到 11%。最优化的基因打靶载体参数为大约 2 kb 同源臂长度,而且环状的载体比线性化载体效率要高。然而,Shin 等^[95]利用 TALEN 技术在斑马鱼中进行的 *GFP* 报告基因定点插入实验表明,较长的同源臂和线性化的供体 DNA 载体更有利于 HR,同时还发现,在较短的一侧同源臂的内部切断供体 DNA 载体获得的 HR 效率最高,定点插入事件的传代效率能达到 10% 以上,具体机制尚不清楚。最近发现较短基因序列的精确修饰,

可以采用单链寡核苷酸 DNA 作为模板,同源臂的长度甚至可以仅为 40nt,即两侧各有 20nt^[43]。Puchta 实验室采用一种称为植物体内基因打靶的策略提高同源重组效率^[96],首先在植物基因组上稳定整合 SSNs 及供体 DNA 模板,SSNs 表达后同时切开基因组靶位点及供体 DNA 两侧的识别位点,释放出线性供体 DNA,发生 HR 修复。传统基因打靶实验中 DNA 模板由 T-DNA 载体提供,而植物体内基因打靶在所有细胞及植物发育周期中都能发生,因此 HR 发生频率可能更高。

另外,NHEJ 是 DSB 的主要修复方式,多个研究报告在人类细胞、斑马鱼、拟南芥、烟草和小麦中,利用没有同源臂的双链或单链 DNA 模板,成功实现基因替换或定点插入^[36,44],有些实验同时利用抗生素筛选基因(*HPT* 或 *PUR0*)或荧光报告基因(*GFP*)的作用,进一步提高靶向编辑效率。尽管 NHEJ 方式不能保证与 HR 一样的精确,基因片段可能被反向插入或者在 DSBs 连接处产生核苷酸的插入或缺失,但 NHEJ 的效率要远高于 HR,因此在精确性要求不高情况下,开启了基因打靶的一种新方法。

5.3 减少脱靶效应

脱靶(Off-target)是指 SSNs 在其靶位点以外的其他位置切割并产生突变,脱靶突变可能会造成非常严重后果。目前,减少或避免由 SSNs 引起的脱靶效应的方法有以下几种:

第一、最重要的是在设计靶位点时选择特异性较好的位点,由于在全基因组上没有和其相似性高的序列而可以最大限度减少脱靶。全外显子组和全基因组测序分析表明靶向特异性位点的 ZFNs、TALENs 和 CRISPR/Cas9 系统不会引起细胞中明显的脱靶突变^[97,98]。目前已有一些 TALEN 和 CRISPR/Cas9 靶位点设计及脱靶位点预测工具,可以帮助使用者选择高活性、高特异性的靶向位点,例如 The ZFN-Site, PROGNOS Tool 和 CasOT 等(表 1)。

第二、*Fok* 核酸酶需要形成二聚体才能切断 DNA,而使用 ZFN 和 TALEN 技术时可能会出现同型二聚体切割造成的脱靶,即两个 ZFN-L,或两个 TALEN-R 形成的二聚体。通过优化 *Fok* 切割结构域,使其只有形成异型二聚体,如 ZFN-L/ZFN-R 或 TALEN-L/TALEN-R 时,二聚化的 *Fok* 才具有切割

活性,从而可以避免同型二聚体导致的脱靶突变^[99]。

第三、对于 CRISPR/Cas9 系统,据报道可以使用截短的 sgRNA(即 17、18 或 19nt 导向序列),将脱靶效应降低几个数量级,且不影响靶位点处的突变效率^[100]。sgRNA 截短后可能使 RNA-DNA 复合体对核苷酸错配更加敏感,因而提高靶向特异性。但对于 ZFNs 或 TALENs,适当延长识别序列长度才能提高其靶向特异性^[101]。此外,据报道 TALE 蛋白 C 末端特定位点的 3 个或 7 个氨基酸(精氨酸或赖氨酸)替换成谷氨酰胺可以将人类细胞中的脱靶效应降低十倍左右,且不影响靶位点切割活性^[101]。

第四、SSNs 的脱靶效应可以通过优化核酸酶的表达水平来降低。高浓度的 SSNs 可以增加脱靶频率。例如,使用重组蛋白或体外转录的 mRNA 直接转化细胞,由于其可以在细胞内快速降解,因此可以减少脱靶频率^[102,103]。另外,采用诱导型启动子或在特定组织中表达的启动子转录 SSNs,这种时空特异性表达 SSNs 方式也能减少脱靶效应。

第五、利用两个 sgRNA 引导 Cas9 切口酶或 Cas9-*Fok* I 融合蛋白,在互补双链 DNA 上分别形成两个单链 DNA 断裂,当两个 sgRNA 靶位点距离较近且方向正确时,可以形成双链 DNA 断裂。由于两个 sgRNA 具有加倍的识别序列长度,因此可以极大降低脱靶突变,特异性提高 50~1500 倍,并且靶位点处基因敲除效率与野生型 Cas9 核酸酶相当^[90,104]。

6 基因组编辑在植物分子育种应用中的机遇及技术展望

第一代转基因技术自 20 世纪 80 年代诞生至今已有 30 年时间,很多转基因作物如玉米、大豆、油菜和棉花在世界各地都被种植,但转基因作物的生物安全性问题一直备受关注。基因组编辑技术的出现为植物分子育种应用提供了前所未有的新机遇。由于基因组编辑具有精确靶向基因组特定位点的特性,首先将 SSN 导入植物细胞,实现靶标基因进行定点修饰后,再从后代中筛选只有目标基因突变而不含有 SSN 表达载体的株系(图 6)。根据其修饰的方式主要分为三类:基因敲除、少数核苷酸精确替换和基因定点插入。前两类修饰的结果与自然突变或人工诱变非常相似,只有少数核苷酸的改变,无外源 DNA 导入;而第三类存在外源 DNA 导入。国

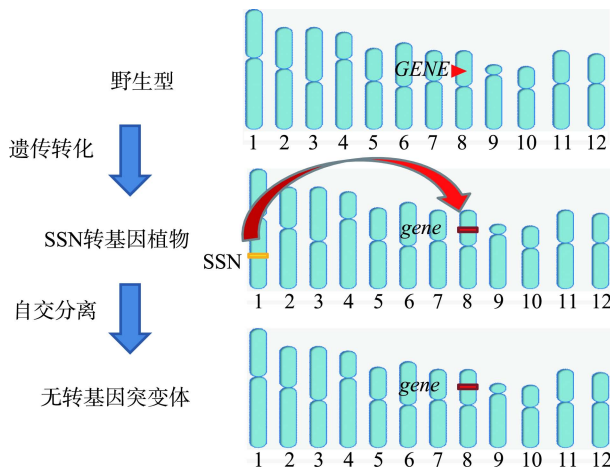


图 6 基因组编辑技术应用于植物分子育种

实际上对基因组编辑技术创制的植物新品种是否属于转基因尚无定论, 目前欧盟对 GMO 调控比较严格, 只要有外源 DNA 转入细胞就视为转基因, 而不论最终产品中是否还有外源 DNA 存在; 美国 USDA 根据最终产品属性进行评价, 用 ZFN 和 TALEN 方式产生的前两类基因修饰不受转基因调控^[105], 利用 CRISPR/Cas9 技术产生的作物是否如此目前还没有相关规定。迄今为止, 美国 USDA 已认可至少 3 项利用基因组编辑技术创制的植物产品不属于转基因范畴: 一项是通过 ZFN 技术创制的低肌醇六磷酸的玉米品系; 另一项是通过 TALEN 技术创制的耐冷藏低丙烯酰胺的马铃薯; 还有一项是通过 TALEN 技术创制的高油酸的大豆。2014 年 3 月, 加拿大也通过了其第一个基因组编辑油菜品种, 该抗除草剂油菜品种是由美国 Cibus Global 公司研发, 预计在 2016 年能够上市销售^[106]。目前我国对于基因组编辑植物是否属于转基因尚无相关规定, 因此, 亟待相关部门出台政策规定以正确引导基因组编辑研究。

自从序列特异核酸酶发明以来, 经过短短的十几年时间, 基因组编辑及相关领域已经取得了革命性变化, 特别是 CRISPR/Cas9 技术的出现, 极大地加快了植物功能基因组学以及分子育种的研究步伐。但目前也存在一些亟待解决的问题: 首先是精确基因定点编辑的能力, 即通过 HR 途径实现定点插入或替换的效率。不同物种和细胞类型中 HR 频率差异很大, 而且不同文章中报道的基因打靶载体设计以及提高效率方法也不尽相同。在植物中如何提高效率还需要进行深入系统的探索, 建立一套适合植

物的体系。本文 5.2 部分中论述的方法多在动物体系中得到验证, 在植物体内是否有效还需要实验证明。其次, 在提高基因编辑效率的同时, 还要避免产生脱靶突变, 特别是在利用 CRISPR 系统时。本文 5.3 部分多种方法可以提高基因组编辑的特异性, 比如利用 Cas9 切口酶等, 这些方法应该同样能够用于植物基因组编辑研究。另外 Cas9 蛋白晶体结构研究成果能够帮助设计出具有高切割活性和高特异性的小 Cas9 核酸酶突变体。第三, 多基因编辑技术在植物中目前已能实现 3~4 个基因同时敲除, 更多个基因(10 个或以上)同时敲除尚无报道。CRISPR/Cas9 系统无疑是多基因编辑最好的选择, 但可能的困难包括特定物种中只有有限的 RNA 聚合酶启动子可以利用, 因此需要鉴定多个能高效转录 sgRNA 的自身或近缘物种中的启动子, 或者采用其他系统同时表达多个 sgRNA, 例如 Xie 等开发的多顺反子 tRNA-sgRNA 系统利用了 tRNA 的自身加工机制可以将一个转录本加工成多个独立的 sgRNA, 大大提高了植物多基因编辑的能力^[55]; 另外一个困难是缺少简易且高通量的多基因编辑载体构建方法。第四, 在人类细胞系中利用全基因组水平 CRISPR 文库进行功能基因的遗传筛选已经比较成熟, 未来几年中在植物(或植物细胞)中建立大规模 CRISPR 遗传筛选平台对于加快功能基因鉴定和基因组学研究都有重要意义。困难在于植物中缺乏合适的细胞培养及高效转化体系。第五, 基因组编辑的衍生技术如靶向激活、抑制、表观修饰以及基因组呈像等在植物中研究很少, 特别是定点表观调控和基因组呈像尚属空白, 未来在这一领域还应该有更多的原创研究, 建立适合不同植物的靶向基因表达调控等研究工具。

参考文献

- [1] Voytas DF. Plant genome engineering with sequence-specific nucleases. *Annu Rev Plant Biol*, 2013, 64(1): 327–350. [DOI]
- [2] Symington LS, Gautier J. Double-strand break end resection and repair pathway choice. *Annu Rev Genet*, 2011, 45(1): 247–271. [DOI]
- [3] Puchta H, Fauser F. Synthetic nucleases for genome engineering in plants: prospects for a bright future. *Plant J*, 2013, 78(5): 727–741. [DOI]
- [4] Mladenov E, Iliakis G. Induction and repair of DNA

- double strand breaks: The increasing spectrum of non-homologous end joining pathways. *Mutat Res Fund Mol Mech Mut*, 2011, 711(1–2): 61–72. [DOI]
- [5] Osakabe K, Osakabe Y, Toki S. Site-directed mutagenesis in *Arabidopsis* using custom-designed zinc finger nucleases. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(26): 12034–12039. [DOI]
- [6] Siebert R, Puchta H. Efficient repair of genomic double-strand breaks by homologous recombination between directly repeated sequences in the plant genome. *Plant Cell*, 2002, 14(5): 1121–1131. [DOI]
- [7] Orel N, Kyryk A, Puchta H. Different pathways of homologous recombination are used for the repair of double-strand breaks within tandemly arranged sequences in the plant genome. *Plant J*, 2003, 35(5): 604–612. [DOI]
- [8] Carroll D. Genome engineering with targetable nucleases. *Annu Rev Biochem*, 2014, 83(1): 409–439. [DOI]
- [9] Kim YG, Cha J, Chandrasegaran S. Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(3): 1156–1160. [DOI]
- [10] Kim JS, Lee HJ, Carroll D. Genome editing with modularly assembled zinc-finger nucleases. *Nat Methods*, 2010, 7(2): 91. [DOI]
- [11] Maeder ML, Thibodeau-Beganny S, Osiak A, Wright DA, Anthony RM, Eichtinger M, Jiang T, Foley JE, Winfrey RJ, Townsend JA, Unger-Wallace E, Sander JD, Müller-Lerch F, Fu FL, Pearlberg J, Göbel C, Dassie JP, Pruett-Miller SM, Porteus MH, Sgroi DC, Iafrate AJ, Dobbs D, McCray PB Jr, Cathomen T, Voytas DF, Joung JK. Rapid "open-source" engineering of customized zinc-finger nucleases for highly efficient gene modification. *Mol Cell*, 2008, 31(2): 294–301. [DOI]
- [12] Doyon Y, Choi VM, Xia DF, Vo TD, Gregory PD, Holmes MC. Transient cold shock enhances zinc-finger nuclease-mediated gene disruption. *Nat Methods*, 2010, 7(6): 459–460. [DOI]
- [13] Sander JD, Dahlborg EJ, Goodwin MJ, Cade L, Zhang F, Cifuentes D, Curtin SJ, Blackburn JS, Thibodeau-Beganny S, Qi Y, Pierick CJ, Hoffman E, Maeder ML, Khayter C, Reyon D, Dobbs D, Langenau DM, Stupar RM, Giraldez AJ, Voytas DF, Peterson RT, Yeh JRJ, Joung JK. Selection-free zinc-finger-nuclease engineering by context-dependent assembly (CoDA). *Nat Methods*, 2010, 8(1): 67–69. [DOI]
- [14] 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. [DOI]
- [15] 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 III effectors. *Science*, 2009, 326(5959): 1509–1512. [DOI]
- [16] Moscou MJ, Bogdanove AJ. A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors. *Science*, 2009, 326(5959): 1501. [DOI]
- [17] Deng D, Yan CY, Pan XJ, Mahfouz M, Wang JW, Zhu JK, Shi YG, Yan N. Structural basis for sequence-specific recognition of DNA by TAL effectors. *Science*, 2012, 335(6069): 720–723. [DOI]
- [18] Mak ANS, Bradley P, Cernadas RA, Bogdanove AJ, Stoddard BL. The crystal structure of TAL effector PthXo1 bound to its DNA target. *Science*, 2012, 335(6069): 716–719. [DOI]
- [19] Li T, Huang S, Zhao XF, Wright DA, Carpenter S, Spalding MH, Weeks DP, Yang B. Modularly assembled designer TAL effector nucleases for targeted gene knockout and gene replacement in eukaryotes. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39(14): 6315–6325. [DOI]
- [20] Cermak T, Doyle EL, Christian M, Wang L, Zhang Y, Schmidt C, Baller JA, Somia NV, Bogdanove AJ, Voytas DF. Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39(12): e82. [DOI]
- [21] Reyon D, Tsai SQ, Khayter C, Foden JA, Sander JD, Joung JK. FLASH assembly of TALENs for high-throughput genome editing. *Nat Biotechnol*, 2012, 30(5): 460–465. [DOI]
- [22] Schmid-Burgk JL, Schmidt T, Kaiser V, Höning K, Hornung V. A ligation-independent cloning technique for high-throughput assembly of transcription activator-like effector genes. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(1): 76–81. [DOI]
- [23] Sorek R, Lawrence CM, Wiedenheft B. CRISPR-mediated adaptive immune systems in bacteria and archaea. *Annu Rev Biochem*, 2013, 82(1): 237–266. [DOI]
- [24] 李君, 张毅, 陈坤玲, 单奇伟, 王延鹏, 梁振, 高彩霞. CRISPR/Cas 系统: RNA 靶向的基因组定向编辑新技术. *遗传*, 2013, 35(11): 1265–1273. [DOI]
- [25] 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. [DOI]
- [26] 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. [DOI]

- [27] Jinek M, Jiang FG, Taylor DW, Sternberg SH, Kaya E, Ma EB, Anders C, Hauer M, Zhou KH, Lin S, Kaplan M, Iavarone AT, Charpentier E, Nogales E, Doudna JA. Structures of Cas9 endonucleases reveal RNA-mediated conformational activation. *Science*, 2014, 343(6176): 1247997. [DOI]
- [28] Nishimasu H, Ran FA, Hsu PD, Konermann S, Shehata SI, Dohmae N, Ishitani R, Zhang F, Nureki O. Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA. *Cell*, 2014, 156(5): 935–949. [DOI]
- [29] Zhang H, Zhang JS, Wei PL, Zhang BT, Gou F, Feng ZY, Mao YF, Yang L, Zhang H, Xu NF, Zhu JK. The CRISPR/Cas9 system produces specific and homozygous targeted gene editing in rice in one generation. *Plant Biotechnol J*, 2014, 12(6): 797–807. [DOI]
- [30] Feng ZY, Mao YF, Xu NF, Zhang BT, Wei PL, Yang DL, Wang Z, Zhang ZJ, Zheng R, Yang L, Zeng L, Liu XD, Zhu JK. Multigeneration analysis reveals the inheritance, specificity, and patterns of CRISPR/Cas-induced gene modifications in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111(12): 4632–4637. [DOI]
- [31] Bogdanove AJ. Principles and applications of TAL effectors for plant physiology and metabolism. *Curr Opin Plant Biol*, 2014, 19: 99–104. [DOI]
- [32] Zhang F, Maeder ML, Unger-Wallace E, Hoshaw JP, Reyon D, Christian M, Li XH, Pierick CJ, Dobbs D, Peterson T, Joung JK, Voytas DF. High frequency targeted mutagenesis in *Arabidopsis thaliana* using zinc finger nucleases. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(26): 12028–12033. [DOI]
- [33] Li T, Liu B, Spalding MH, Weeks DP, Yang B. High-efficiency TALEN-based gene editing produces disease-resistant rice. *Nat Biotechnol*, 2012, 30(5): 390–392. [DOI]
- [34] Shan QW, Zhang Y, Chen KL, Zhang K, Gao CX. Creation of fragrant rice by targeted knockout of the *OsBADH2* gene using TALEN technology. *Plant Biotechnol J*, 2015, 13(6): 791–800. [DOI]
- [35] Haun W, Coffman A, Clasen BM, Demorest ZL, Lowy A, Ray E, Retterath A, Stoddard T, Juillerat A, Cedrone F, Mathis L, Voytas DF, Zhang F. Improved soybean oil quality by targeted mutagenesis of the fatty acid desaturase 2 gene family. *Plant Biotechnol J*, 2014, 12(7): 934–940. [DOI]
- [36] Wang YP, Cheng X, Shan QW, Zhang Y, Liu JX, Gao CX, Qiu JL. Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew. *Nat Biotechnol*, 2014, 32(9): 947–951. [DOI]
- [37] 王延鹏, 程曦, 高彩霞, 邱金龙. 利用基因组编辑技术创制抗白粉病小麦. *遗传*, 2014, 36(8): 848. [DOI]
- [38] Li JF, Norville JE, Aach J, McCormack M, Zhang DD, 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. [DOI]
- [39] 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. [DOI]
- [40] 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. [DOI]
- [41] Xie KB, Yang YN. RNA-guided genome editing in plants using a CRISPR-Cas system. *Mol Plant*, 2013, 6(6): 1975–1983. [DOI]
- [42] Miao J, Guo DS, Zhang JZ, Huang QP, Qin GJ, Zhang X, Wan JM, Gu HY, Qu LJ. Targeted mutagenesis in rice using CRISPR-Cas system. *Cell Res*, 2013, 23(10): 1233–1236. [DOI]
- [43] Bedell VM, Wang Y, Campbell JM, Poshusta TL, Starker CG, Krug II RG, Tan WF, Penheiter SG, Ma AC, Leung AYH, Fahrenkrug SC, Carlson DF, Voytas DF, Clark KJ, Essner JJ, Ekker SC. *In vivo* genome editing using a high-efficiency TALEN system. *Nature*, 2012, 491(7422): 114–118. [DOI]
- [44] Maresca M, Lin VG, Guo N, Yang Y. Obligate ligation-gated recombination (ObLiGaRe): custom-designed nuclease-mediated targeted integration through nonhomologous end joining. *Genome Res*, 2013, 23(3): 539–546. [DOI]
- [45] Wright DA, Townsend JA, Winfrey RJ Jr, Irwin PA, Rajagopal J, Lonosky PM, Hall BD, Jondle MD, Voytas DF. High-frequency homologous recombination in plants mediated by zinc-finger nucleases. *Plant J*, 2005, 44(4): 693–705. [DOI]
- [46] Townsend JA, Wright DA, Winfrey RJ, Fu FL, Maeder ML, Joung JK, Voytas DF. High-frequency modification of plant genes using engineered zinc-finger nucleases. *Nature*, 2009, 459(7245): 442–445. [DOI]
- [47] Shukla VK, Doyon Y, Miller JC, DeKever RC, Moehle EA, Worden SE, Mitchell JC, Arnold NL, Gopalan S, Meng X, Choi VM, Rock JM, Wu YY, Katibah GE, Zhifang G, McCaskill D, Simpson MA, Blakeslee B, Greenwalt SA, Butler HJ, Hinkley SJ, Zhang L, Rebar EJ,

- Gregory PD, Urnov FD. Precise genome modification in the crop species *Zea mays* using zinc-finger nucleases. *Nature*, 2009, 459(7245): 437–441. [DOI]
- [48] Zhang Y, Zhang F, Li XH, Baller JA, Qi YP, Starker CG, Bogdanove AJ, Voytas DF. TALENs enable efficient plant genome engineering. *Plant Physiol*, 2013, 161(1): 20–27. [DOI]
- [49] Fauser F, Schiml S, Puchta H. Both CRISPR/Cas-based nucleases and nickases can be used efficiently for genome engineering in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 2014, 79(2): 348–359. [DOI]
- [50] Qi YP, Li XH, Zhang Y, Starker CG, Baltes NJ, Zhang F, Sander JD, Reyon D, Joung JK, Voytas DF. Targeted deletion and inversion of tandemly arrayed genes in *Arabidopsis thaliana* using zinc finger nucleases. *G3: Genes/Genom/Genet*, 2013, 3(10): 1707–1715. [DOI]
- [51] Christian M, Qi YP, Zhang Y, Voytas DF. Targeted mutagenesis of *Arabidopsis thaliana* using engineered TAL effector nucleases (TALENs). *G3: Genes/Genomes/Genetics*, 2013, 3(10): 1697–1705. [DOI]
- [52] 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. [DOI]
- [53] Zhou HB, Liu B, Weeks DP, Spalding MH, Yang B. Large chromosomal deletions and heritable small genetic changes induced by CRISPR/Cas9 in rice. *Nucleic Acids Res*, 2014, 42(17): 10903–10914. [DOI]
- [54] Xing HL, Dong L, Wang ZP, Zhang HY, Han CY, Liu B, Wang XC, Chen QJ. A CRISPR/Cas9 toolkit for multiplex genome editing in plants. *BMC Plant Biol*, 2014, 14: 327. [DOI]
- [55] Xie KB, Minkenberg B, Yang YN. Boosting CRISPR/Cas9 multiplex editing capability with the endogenous tRNA-processing system. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112(11): 3570–3575. [DOI]
- [56] Wang T, Wei JJ, Sabatini DM, Lander ES. Genetic screens in human cells using the CRISPR/Cas9 system. *Science*, 2013, 343(6166): 80–84. [DOI]
- [57] Shalem O, Sanjana NE, Hartenian E, Shi X, Scott DA, Mikkelsen T, Heckl D, Ebert BL, Root DE, Doench JG, Zhang F. Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells. *Science*, 2013, 343(6166): 84–87. [DOI]
- [58] Zhou YX, Zhu SY, Cai CZ, Yuan PF, Li CM, Huang YY, Wei WS. High-throughput screening of a CRISPR/Cas9 library for functional genomics in human cells. *Nature*, 2014, 509(7501): 487–491. [DOI]
- [59] Findlay GM, Boyle EA, Hause RJ, Klein JC, Shendure J. Saturation editing of genomic regions by multiplex homology-directed repair. *Nature*, 2014, 513(7516): 120–123. [DOI]
- [60] Xie F, Ye L, Chang JC, Beyer AI, Wang JM, Muench MO, Kan YW. Seamless gene correction of β -thalassemia mutations in patient-specific iPSCs using CRISPR/Cas9 and *piggyBac*. *Genome Res*, 2014, 24(9): 1526–1533. [DOI]
- [61] Baltes NJ, Voytas DF. Enabling plant synthetic biology through genome engineering. *Trends Biotechnol*, 2015, 33(2): 120–131. [DOI]
- [62] de Lange O, Binder A, Lahaye T. From dead leaf, to new life: TAL effectors as tools for synthetic biology. *Plant J*, 2014, 78(5): 753–771. [DOI]
- [63] Sanchez JP, Ullman C, Moore M, Choo Y, Chua NH. Regulation of gene expression in *Arabidopsis thaliana* by artificial zinc finger chimeras. *Plant Cell Physiol*, 2002, 43(12): 1465–1472. [DOI]
- [64] Morbitzer R, Römer P, Boch J, Lahaye T. Regulation of selected genome loci using de novo-engineered transcription activator-like effector (TALE)-type transcription factors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(50): 21617–21622. [DOI]
- [65] Liu WS, Rudis MR, Peng YH, Mazarei M, Millwood RJ, Yang JP, Xu WZ, Chesnut JD, Stewart CN. Synthetic TAL effectors for targeted enhancement of transgene expression in plants. *Plant Biotechnol J*, 2013, 12(4): 436–446. [DOI]
- [66] Baazim H. RNA-guided transcriptional regulation in plants via dCas9 chimeric proteins. *Bioscience*, 2014. <http://hdl.handle.net/10754/316715>. [DOI]
- [67] Tanenbaum ME, Gilbert LA, Qi LS, Weissman JS, Vale RD. A protein-tagging system for signal amplification in gene expression and fluorescence imaging. *Cell*, 2014, 159(3): 635–646. [DOI]
- [68] Konermann S, Brigham MD, Trevino AE, Joung J, Abudayyeh OO, Barcena C, Hsu PD, Habib N, Gootenberg JS, Nishimasu H, Nureki O, Zhang F. Genome-scale transcriptional activation by an engineered CRISPR-Cas9 complex. *Nature*, 2014, 517(7536): 583–588. [DOI]
- [69] Mahfouz MM, Li LX, Piatek M, Fang XY, Mansour H, Bangarusamy D, Zhu JK. Targeted transcriptional repression using a chimeric TALE-SRDX repressor protein. *Plant Mol Biol*, 2012, 78(3): 311–321. [DOI]
- [70] Zhang ZH, Wu E, Qian ZJ, Wu WS. A multicolor panel

- of TALE-KRAB based transcriptional repressor vectors enabling knockdown of multiple gene targets. *Sci Rep*, 2014, 4: 7338. [DOI]
- [71] 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. [DOI]
- [72] Zalatan JG, Lee ME, Almeida R, Gilbert LA, Whitehead EH, La RM, Tsai JC, Weissman JS, Dueber JE, Qi LS, Lim WA. Engineering complex synthetic transcriptional programs with CRISPR RNA scaffolds. *Cell*, 2015, 160(1–2): 339–350. [DOI]
- [73] Meister GE, Chandrasegaran S, Ostermeier M. Heterodimeric DNA methyltransferases as a platform for creating designer zinc finger methyltransferases for targeted DNA methylation in cells. *Nucleic Acids Res*, 2010, 38(5): 1749–1759. [DOI]
- [74] Mendenhall EM, Williamson KE, Reyon D, Zou JY, Ram O, Joung JK, Bernstein BE. Locus-specific editing of histone modifications at endogenous enhancers. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(12): 1133–1136. [DOI]
- [75] Konermann S, Brigham MD, Trevino AE, Hsu PD, Heidenreich M, Cong L, Platt RJ, Scott DA, Church GM, Zhang F. Optical control of mammalian endogenous transcription and epigenetic states. *Nature*, 2013, 500(7463): 472–476. [DOI]
- [76] Maeder ML, Angstman JF, Richardson ME, Linder SJ, Cascio VM, Tsai SQ, Ho QH, Sander JD, Reyon D, Wilkinson MF, Joung JK. Targeted DNA demethylation and activation of endogenous genes using programmable TALE-TET1 fusion proteins. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(12): 1137–1142. [DOI]
- [77] O'Connell MR, Oakes BL, Sternberg SH, East-Seletsky A, Kaplan M, Doudna JA. Programmable RNA recognition and cleavage by CRISPR/Cas9. *Nature*, 2014, 516(7530): 263–266. [DOI]
- [78] Zebec Z, Manica A, Zhang J, White MF, Schleper C. CRISPR-mediated targeted mRNA degradation in the archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Nucleic Acids Res*, 2014, 42(8): 5280–5288. [DOI]
- [79] Tamulaitis G, Kazlauskienė M, Manakova E, Venclovas Č, Nwokeoji AO, Dickman MJ, Horvath P, Siksnys V. Programmable RNA shredding by the type III-A CRISPR-Cas system of *Streptococcus thermophilus*. *Mol Cell*, 2014, 56(4): 506–517. [DOI]
- [80] Staals RHJ, Zhu YF, Taylor DW, Kornfeld JE, Sharma K, Barendregt A, Koehorst JJ, Vlot M, Neupane N, Urlaub H, Heck AJ, Nogales E, Doudna JA, Shinkai A, van der Oost J. RNA targeting by the type III-A CRISPR-Cas Csm complex of *Thermus thermophilus*. *Mol Cell*, 2014, 56(4): 518–530. [DOI]
- [81] Yagi Y, Nakamura T, Small I. The potential for manipulating RNA with pentatricopeptide repeat proteins. *Plant J*, 2014, 78(5): 772–782. [DOI]
- [82] Ramakrishna S, Kim YH, Kim H. Stability of zinc finger nuclease protein is enhanced by the proteasome inhibitor MG132. *PLoS One*, 2013, 8(1): e54282. [DOI]
- [83] Certo MT, Gwiawza KS, Kuhar R, Sather B, Curinga G, Mandt T, Braut M, Lambert AR, Baxter SK, Jacoby K, Ryu BY, Kiem HP, Gouble A, Paques F, Rawlings DJ, Scharenberg AM. Coupling endonucleases with DNA end-processing enzymes to drive gene disruption. *Nat Methods*, 2012, 9(10): 973–975. [DOI]
- [84] Miller JC, Tan SY, Qiao GJ, Barlow KA, Wang JB, Xia DF, Meng XD, Paschon DE, Leung E, Hinkley SJ, Dulay GP, Urnov FD, Zhang HS, Holmes MC, Zhang L, Gregory PD, Rebar EJ. A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. *Nat Biotechnol*, 2011, 29(2): 143–148. [DOI]
- [85] Deng D, Yin P, Yan CY, Pan XJ, Gong XQ, Qi SQ, Xie T, Mahfouz M, Zhu JK, Yan N, Shi YG. Recognition of methylated DNA by TAL effectors. *Cell Res*, 2012, 22(10): 1502–1504. [DOI]
- [86] Valton J, Dupuy A, Daboussi F, Thomas S, Maréchal A, Macmaster R, Melliand K, Juillerat A, Duchateau P. Overcoming Transcription Activator-like Effector (TALE) DNA binding domain sensitivity to cytosine methylation. *J Biol Chem*, 2012, 287(46): 38427–38432. [DOI]
- [87] Doench JG, Hartenian E, Graham DB, Tothova Z, Hegde M, Smith I, Sullender M, Ebert BL, Xavier RJ, Root DE. Rational design of highly active sgRNAs for CRISPR-Cas9-mediated gene inactivation. *Nat Biotechnol*, 2014, 32(12): 1262–1267. [DOI]
- [88] Ren XJ, Yang ZH, Xu J, Sun J, Mao DC, Hu YH, Yang SJ, Qiao HH, Wang X, Hu Q, Deng P, Liu LP, Ji JY, Li JB, Ni JQ. Enhanced specificity and efficiency of the CRISPR/Cas9 system with optimized sgRNA parameters in *Drosophila*. *Cell Rep*, 2014, 9(3): 1151–1162. [DOI]
- [89] Qi YP, Zhang Y, Zhang F, Baller JA, Cleland SC, Ryu Y, Starker CG, Voytas DF. Increasing frequencies of site-specific mutagenesis and gene targeting in *Arabidopsis* by manipulating DNA repair pathways. *Genome Res*, 2013, 23(3): 547–554. [DOI]
- [90] Mali P, Aach J, Stranges PB, Esvelt KM, Moosburner M,

- Kosuri S, Yang LH, Church GM. CAS9 transcriptional activators for target specificity screening and paired nickases for cooperative genome engineering. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(9): 833–838. [DOI]
- [91] Kwon YI, Abe K, Osakabe K, Endo M, Nishizawa-Yokoi A, Saika H, Shimada H, Toki S. Overexpression of *OsRecQ14* and/or *OsExo1* enhances DSB-induced homologous recombination in rice. *Plant Cell Physiol*, 2012, 53(12): 2142–2152. [DOI]
- [92] Lin S, Staahl BT, Alla RK, Doudna JA. Enhanced homology-directed human genome engineering by controlled timing of CRISPR/Cas9 delivery. *eLife*, 2014, 3: e04766. [DOI]
- [93] Baltes NJ, Gil-Humanes J, Cermak T, Atkins PA, Voytas DF. DNA replicons for plant genome engineering. *Plant Cell*, 2014, 26(1): 151–163. [DOI]
- [94] Byrne SM, Ortiz L, Mali P, Aach J, Church GM. Multi-kilobase homozygous targeted gene replacement in human induced pluripotent stem cells. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43(3): e21. [DOI]
- [95] Shin J, Chen JK, Solnica-Krezel L. Efficient homologous recombination-mediated genome engineering in zebrafish using TALE nucleases. *Development*, 2014, 141(19): 3807–3818. [DOI]
- [96] Fauser F, Roth N, Pacher M, Ilg G, Sánchez-Fernández R, Biesgen C, Puchta H. *In planta* gene targeting. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(19): 7535–7540. [DOI]
- [97] Yusa K, Rashid ST, Strick-Marchand H, Varela I, Liu PQ, Paschon DE, Miranda E, Ordonez A, Di Santo JP, Lomas DA, Bradley A, Vallier L. Targeted gene correction of α_1 -antitrypsin deficiency in induced pluripotent stem cells. *Nature*, 2011, 478(7369): 391–394. [DOI]
- [98] Smith C, Gore A, Yan W, Abalde-Atristain L, Li Z, He CX, Wang Y, Brodsky RA, Zhang K, Cheng LZ, Ye ZH. Whole-genome sequencing analysis reveals high specificity of CRISPR/Cas9 and TALEN-based genome editing in human iPSCs. *Cell Stem Cell*, 2014, 15(1): 12–13. [DOI]
- [99] Doyon Y, Vo TD, Mendel MC, Greenberg SG, Wang JB, Xia DF, Miller JC, Urnov FD, Gregory PD, Holmes MC. Enhancing zinc-finger-nuclease activity with improved obligate heterodimeric architectures. *Nat Methods*, 2011, 8(1): 74–79. [DOI]
- [100] Fu YF, Sander JD, Reyon D, Cascio VM, Joung JK. Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs. *Nat Biotechnol*, 2014, 32(3): 279–284. [DOI]
- [101] Guilinger JP, Pattanayak V, Reyon D, Tsai SQ, Sander JD, Joung JK, Liu DR. Broad specificity profiling of TALENs results in engineered nucleases with improved DNA-cleavage specificity. *Nat Methods*, 2014, 11(4): 429–435. [DOI]
- [102] Gaj T, Guo J, Kato Y, Sirk SJ, Barbas CF. Targeted gene knockout by direct delivery of zinc-finger nuclease proteins. *Nat Methods*, 2012, 9(8): 805–807. [DOI]
- [103] Cai YJ, Bak RO, Mikkelsen JG, Golub T. Targeted genome editing by lentiviral protein transduction of zinc-finger and TAL-effector nucleases. *eLife*, 2014, 3: e01911. [DOI]
- [104] Guilinger JP, Thompson DB, Liu DR. Fusion of catalytically inactive Cas9 to FokI nuclease improves the specificity of genome modification. *Nat Biotechnol*, 2014, 32(6): 577–582. [DOI]
- [105] Ledford H. US regulation misses some GM crops. *Nature*, 2013, 500(7463): 389–390. [DOI]
- [106] Jones HD. Regulatory uncertainty over genome editing. *Nat Plants*, 2015, 1: 14011. [DOI]
- [107] Li L, Piatek M, Atef A, Piatek A, Wibowo A, Fang X, Sabir J, Zhu JK, Mahfouz M. Rapid and highly efficient construction of TALE-based transcriptional regulators and nucleases for genome modification. *Plant Mol Biol*, 2012, 78(4–5): 407–416. [DOI]
- [108] Johnson RA, Gurevich V, Levy AA. A rapid assay to quantify the cleavage efficiency of custom-designed nucleases *in planta*. *Plant Mol Biol*, 2013, 82(3): 207–221. [DOI]
- [109] Beurdeley M, Bietz F, Li J, Thomas S, Stoddard T, Juillerat A, Zhang F, Voytas DF, Duchateau P, Silva GH. Compact designer TALENs for efficient genome engineering. *Nat Commun*, 2013, 4: 1762. [DOI]
- [110] Wendt T, Holm PB, Starker CG, Christian M, Voytas DF, Brinch-Pedersen H, Holme IB. TAL effector nucleases induce mutations at a pre-selected location in the genome of primary barley transformants. *Plant Mol Biol*, 2013, 83(3): 279–285. [DOI]
- [111] Curtin SJ, Zhang F, Sander JD, Haun WJ, Starker C, Baltes NJ, Reyon D, Dahlborg EJ, Goodwin MJ, Coffman AP, Dobbs D, Joung JK, Voytas DF, Stupar RM. Targeted mutagenesis of duplicated genes in soybean with zinc-finger nucleases. *Plant Physiol*, 2011, 156(2): 466–473. [DOI]
- [112] Gurushidze M, Hensel G, Hiekel S, Schedel S, Valkov V, Kumlehn J. True-breeding targeted gene knock-out in barley using designer TALE-nuclease in haploid cells. *PLoS One*, 2014, 9(3): e92046. [DOI]
- [113] Liang Z, Zhang K, Chen KL, Gao CX. Targeted

- mutagenesis in *Zea mays* using TALENs and the CRISPR/Cas system. *J Genet Genom*, 2014, 41(2): 63–68. [DOI]
- [114] Lor VS, Starker CG, Voytas DF, Weiss D, Olszewski NE. Targeted mutagenesis of the tomato *PROCERA* gene using TALENs. *Plant Physiol*, 2014, 166(3): 1288–1291. [DOI]
- [115] Jiang WZ, Yang B, Weeks DP. Efficient CRISPR/Cas9-mediated gene editing in *Arabidopsis thaliana* and inheritance of modified genes in the T2 and T3 generations. *PLoS One*, 2014, 9(6): e99225. [DOI]
- [116] Hyun Y, Kim J, Cho SW, Choi Y, Kim JS, Coupland G. Site-directed mutagenesis in *Arabidopsis thaliana* using dividing tissue-targeted RGEN of the CRISPR/Cas system to generate heritable null alleles. *Planta*, 2015, 241(1): 271–284. [DOI]
- [117] Schiml S, Fauser F, Puchta H. The CRISPR/Cas system can be used as nuclease for *in planta* gene targeting and as paired nickases for directed mutagenesis in *Arabidopsis* resulting in heritable progeny. *Plant J*, 2014, 80(6): 1139–1150. [DOI]
- [118] Mao YF, Zhang H, Xu NF, Zhang BT, Gao F, Zhu JK. Application of the CRISPR-Cas system for efficient genome engineering in plants. *Mol Plant*, 2013, 6(6): 2008–2011. [DOI]
- [119] Jiang WZ, Zhou HB, Bi HH, Fromm M, Yang B, Weeks DP. Demonstration of CRISPR/Cas9/sgRNA-mediated targeted gene modification in *Arabidopsis*, tobacco, sorghum and rice. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41(20): e188. [DOI]
- [120] Gao JP, Wang GH, Ma SY, Xie XD, Wu XW, Zhang XT, Wu YQ, Zhao P, Xia QY. CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis in *Nicotiana tabacum*. *Plant Mol Biol*, 2015, 87(1–2): 99–110. [DOI]
- [121] Upadhyay SK, Kumar J, Alok A, Tuli R. RNA guided genome editing for target gene mutations in wheat. *G3: Genes/Genom/Genet*, 2013, 3(12): 2233–2238. [DOI]
- [122] Sugano SS, Shirakawa M, Takagi J, Matsuda Y, Shimada T, Hara-Nishimura I, Kohchi T. CRISPR/Cas9 mediated targeted mutagenesis in the liverwort *Marchantia polymorpha* L. *Plant Cell Physiol*, 2014, 55(3): 475–481. [DOI]
- [123] Jia HG, Wang N. Targeted genome editing of sweet orange using Cas9/sgRNA. *PLoS One*, 2014, 9(4): e93806. [DOI]
- [124] Brooks C, Nekrasov V, Lippman ZB, Van Eck J. Efficient gene editing in tomato in the first generation using the clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated9 system. *Plant Physiol*, 2014, 166(3): 1292–1297. [DOI]
- [125] Weinthal DM, Taylor RA, Tzfira T. Nonhomologous end joining-mediated gene replacement in plant cells. *Plant Physiol*, 2013, 162(1): 390–400. [DOI]
- [126] de Pater S, Pinas JE, Hooykaas PJJ, van der Zaal BJ. ZFN-mediated gene targeting of the *Arabidopsis* protoporphyrinogen oxidase gene through *Agrobacterium*-mediated floral dip transformation. *Plant Biotechnol J*, 2013, 11(4): 510–515. [DOI]
- [127] Cai CQ, Doyon Y, Ainley WM, Miller JC, DeKolver RC, Moehle EA, Rock JM, Rebar EJ, Collingwood TN, Rubin-Wilson B, Gregory PD, Urnov FD, Petolino JF. Targeted transgene integration in plant cells using designed zinc finger nucleases. *Plant Mol Biol*, 2009, 69(6): 699–709. [DOI]
- [128] Ainley WM, Sastry-Dent L, Welter ME, Murray MG, Zeitler B, Amora R, Corbin DR, Miles RR, Arnold NL, Strange TL, Simpson MA, Cao Z, Carroll C, Pawelczak KS, Blue R, West K, Rowland LM, Perkins D, Samuel P, Dewes CM, Shen L, Sriram S, Evans SL, Rebar EJ, Zhang L, Gregory PD, Urnov FD, Webb SR, Petolino JF. Trait stacking via targeted genome editing. *Plant Biotechnol J*, 2013, 11(9): 1126–1134. [DOI]

(责任编辑: 张博)