植物学报 *Chinese Bulletin of Botany* 2019, **54** (3): 385–395, www.chinbullbotany.com
doi: 10.11983/CBB18151

·专题论坛·

CRISPR/Cas9系统在植物基因组编辑中技术改进与创新的研究进展

苏钺凯，邱镜仁，张晗，宋振巧，王建华*

山东农业大学农学院，泰安 271018

摘要 CRISPR/Cas9基因组编辑技术是一项对基因组进行精准修饰的技术，可实现对靶标基因的碱基插入、缺失或DNA片段替换。随着人们对CRISPR/Cas9系统的了解逐渐加深，其在科研、农业和医疗等领域的应用也越来越广泛。该文简要介绍了CRISPR/Cas9基因组编辑技术的发展以及工作原理，总结了近几年对该技术进行优化与改进的研究进展，包括基因组编辑效率的提升、基因组编辑范围的扩展、单碱基精准编辑以及多基因同时编辑、基因组编辑安全性的提升以及基因片段替换与基因靶向转录调控，以期为深入开展这一领域的研究提供参考。

关键词 CRISPR/Cas9，基因组编辑，遗传改良，植物基因组

苏钺凯，邱镜仁，张晗，宋振巧，王建华 (2019). CRISPR/Cas9系统在植物基因组编辑中技术改进与创新的研究进展. 植物学报 **54**, 385–395.

在现代生物学研究中，基因组编辑技术(genome editing)是一种通过人工设计和改造核酸酶达到对基因组进行定点修饰的技术(Chamberlain et al., 2004)。该技术可以使研究人员在极短的时间内模拟基因的自然突变，甚至能够完成自然选择中无法完成的基因演变。从最初的归巢核酸内切酶(meganucleases) (Puchta et al., 1993; Redondo et al., 2008)到第1代人工核酸内切酶——锌指核酸酶(zinc finger nucleases, ZFNs) (Durai et al., 2005)，再到第2代人工核酸内切酶——类转录激活效应因子核酸酶(transcription activator-like effector nucleases, TALENs) (Miller et al., 2011; Li et al., 2012)，以及近几年兴起的第3代人工核酸内切酶——CRISPR/Cas9系统(Cong et al., 2013; Jinek et al., 2013)，基因组编辑技术已经逐渐成为基因改造及基因功能研究中不可或缺的技术手段(Shan and Gao, 2015)。尤其是CRISPR/Cas9技术，凭借其效率高、成本低和操作简单等优势(Gaj et al., 2013; Mussolino and Cathomen, 2013)，自创始之初便展现出非常广阔的应用前景。2013年8月，3家实验室同时发表了CRISPR/Cas9技术在植物基因组编辑中的应用(Shan et al., 2013; Nekrasov et al., 2013; Li et al., 2013)，由此拉开了CRISPR/Cas9技术在植物中应用的序幕。本文简要介绍CRISPR系统的发现与原理，重点阐述近几年在植物领域对CRISPR/Cas系统进行的优化与改造以及基因组编辑技术在植物领域面临的挑战。

1 CRISPR/Cas9基因组编辑技术

1.1 CRISPR/Cas系统的起源

CRISPR/Cas系统最早是由日本大阪大学的一个研究团队在1987年对大肠杆菌碱性磷酸酶基因进行研究时发现的(Ishino et al., 1987)，只是当时这一段特殊的重复序列并未引起普遍关注。随后研究人员发现在细菌和古细菌的基因组中广泛存在这种带有间隔序列的多个重复序列回文结构。2002年，科学家最终将这种重复序列正式命名为CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats)序列(Jansen et al., 2002)。虽然人们猜测该序列可能与细菌的自身免疫功能有关，但直到2007年，Barrangou

收稿日期: 2018-07-02; 接受日期: 2018-08-09
基金项目：国家重点研发计划(No.2017YFC1702705)、山东省现代农业产业技术体系(No.SDAIT-20-04)和山东省重点研发计划(No.2017CXGC1302)

* 通讯作者。E-mail: jhwangjh@163.com

© 植物学报 Chinese Bulletin of Botany

等(2007)才通过实验首次发现并证明嗜热链球菌利用CRISPR/Cas系统抵御噬菌体的入侵。2008年，研究人员在表皮葡萄球菌(*Staphylococcus epidermidis*) (Marraffini and Sontheimer, 2008)和大肠杆菌(*Escherichia coli*) (Brouns et al., 2008)中均发现成熟的crRNAs (CRISPR RNAs)可以与Cas9蛋白形成复合体，并通过实验证明该复合体可以干扰噬菌体的增殖。这些研究为CRISPR系统此后突飞猛进地发展奠定了基础，科学家由此逐步揭开了CRISPR系统作用机理的神秘面纱。

1.2 CRISPR/Cas9基因组编辑技术的原理

目前，应用于基因组编辑的CRISPR系统主要以来自酿脓链球菌(*Streptococcus pyogenes*)的CRISPR/Cas9系统应用最广，且研究得最为透彻。该系统由Cas9蛋白、crRNA和tracrRNA (trans-activating CRISPR RNA) 3部分组成。其中，crRNA是由pre-crRNA (precursor crRNA)经tracrRNA和RNase III加工后得到，主要负责引导CRISPR/Cas系统对特异靶位点的识别(Deltcheva et al., 2011)。每个crRNA只有几十个碱基，与前2代基因组编辑技术ZFNs和TALENs相比，载体变得更小，更加容易构建，且这个系统识别的PAM (protospacer adjacent motif)序列NGG广泛存在于各物种的基因组序列中(Gasiunas et al., 2012)。Jinek等(2012)揭示了II型CRISPR

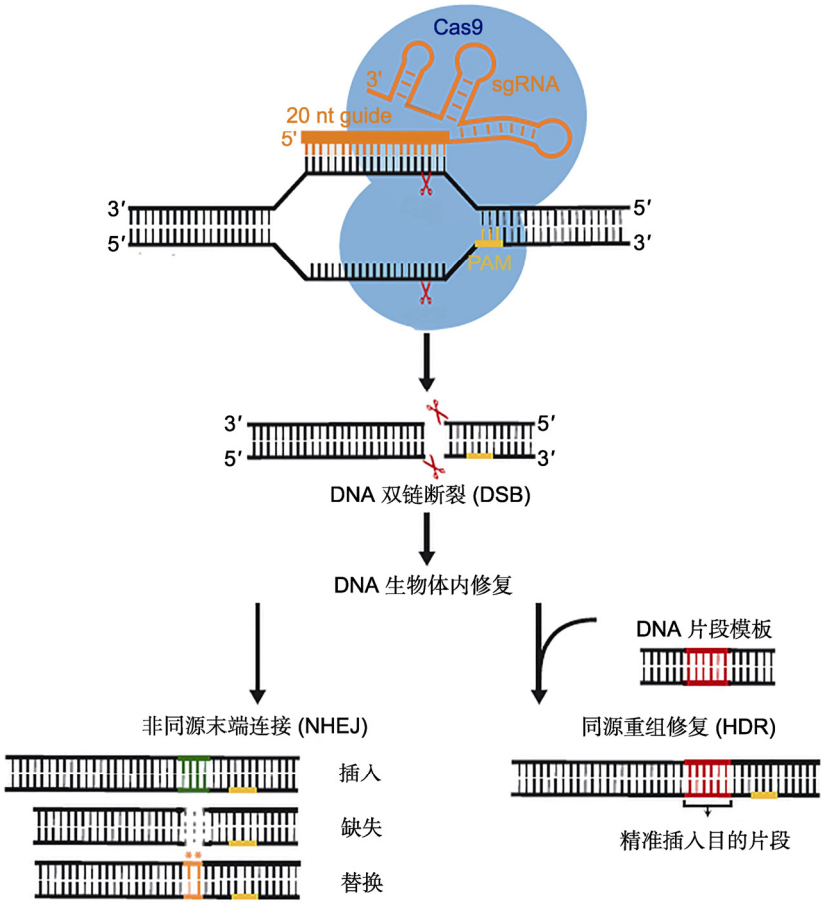

图1 CRISPR/Cas9基因组编辑原理(Jiang and Doudna, 2017)
来自酿脓链球菌(*Streptococcus pyogenes*)的Cas9蛋白(SpCas9)与包含20 nt识别序列的向导RNA (sgRNA)结合，然后定向切割位于原型间隔序列毗邻基序(PAM)区域上游的靶序列造成双链断裂(DSB)，最终借助生物体内自身修复实现基因组编辑。

Figure 1 The schematic diagram of CRISPR/Cas9 genome editing (Jiang and Doudna, 2017)
The Cas9 protein from *Streptococcus pyogenes* (SpCas9) and associated guide RNA (sgRNA), containing a 20 nt recognition sequence, will cleave a target sequence located upstream of the protospacer adjacent motif (PAM) region, resulting in double-strand break (DSB). Ultimately use the repair in the organism to achieve genome editing.

© 植物学报 Chinese Bulletin of Botany

系统切割DNA双链的分子机制并完成对CRISPR/Cas9系统的改造和优化，他们开创性地将原本分开作用的crRNA和tracrRNA整合形成1条sgRNA (single guide RNA)，并成功地在体外定点切割线性寡聚核苷酸片段和环状质粒DNA。他们还对Cas9不同结构域的作用以及PAM序列的重要性等多个问题进行研究，这些研究成为CRISPR/Cas9基因组编辑系统最终能广泛应用于生物体的重要基础(Cong et al., 2013)。至此，CRISPR/Cas9基因组编辑体系已初步成型。简化后的CRISPR/Cas9系统只由两部分组成: sgRNA和Cas9蛋白。首先，成功表达的sgRNA通过自身的Cas9把手(Cas9 handle)与Cas9蛋白形成复合体；然后，复合体开始搜寻并匹配PAM序列，随后sgRNA的碱基互补配对区序列通过碱基互补配对原则识别目标基因的靶序列；最后，Cas9蛋白利用自身的核酸内切酶活性对靶序列进行切割，形成DNA双链断裂(double-strand break, DSB)(图1)。

真核生物细胞内有2种修复DSB的方式: 一种是非同源末端连接(nonhomologous end-joining, NHEJ)，另一种是同源重组修复(homology-directed repair, HDR)。在自然条件下，同源重组修复出现的概率极低，因此细胞中DSB的修复方式主要为NHEJ (Symington and Gautier, 2011)。在NHEJ修复过程中，断裂链的末端会直接随机连接，修复后的DNA双链容易出现个别碱基的缺失或插入，使靶基因的核苷酸序列发生移位，从而导致基因功能的改变，正是利用这一点可以使经过CRISPR/Cas9系统编辑后的基因被敲除；在提供同源序列的情况下，HDR途径会以同源序列为模板进行合成修复，从而对Cas9切割的目标DNA序列进行精确编辑，如特定核苷酸序列的定点替换或者插入突变体。

2 CRISPR/Cas9基因组编辑技术在植物领域中的改进与创新

目前，在医学(Liang et al., 2015)、农业(Xing et al., 2016)和生物制药(Peng et al., 2015)等领域的研究中，CRISPR/Cas9基因组编辑技术都发挥了不可替代的作用。相比动物和微生物，CRISPR/Cas9在植物中的应用相对滞后，但近几年在科学家的不懈努力下，CRISPR/Cas9系统在植物领域中得到了不断的改进与优化，研究成果层出不穷，主要集中在以下几个方面。

2.1 CRISPR/Cas9技术的编辑效率

2.1.1 CRISPR系统元件对基因组编辑效率的影响

研究人员发现靶位点的核酸组成(即GC含量)、Cas9的表达水平以及靶区域的表观遗传等都会对基因组编辑效率产生影响。Ma等(2015)研究发现高GC碱基(50%–70%)含量在水稻(*Oryza sativa*)目标基因组中的编辑效率相对更高，同时还发现sgRNA中目标配对序列茎环结构的形成往往会降低基因组编辑效率。Xu等(2014)为了比较未优化和优化后的Cas9基因编辑效率，分别使用经过水稻密码子优化和人类(*Homo sapiens*)细胞密码子优化后的Cas9基因(p Spcas9和Spcas9)靶向编辑2个相同的位点，结果表明p Spcas9比Spcas9突变效率显著提高。然而在双子叶植物中，使用在人类细胞中进行优化后的密码子同样可以进行高效的基因组编辑，Cas9基因密码子的优化可能并不是必需的。此外，通过使用化学修饰的sgRNA和Cas9进行基因组编辑也可以提高基因组编辑效率。Hendel等(2015)通过核苷亚磷酰胺对sgRNA的稳定作用进行深度测序，结果显示，在3'和5'末端对3个末端核苷酸的修饰改善了靶位点的编辑效率，同时脱靶位效应有所下降。

2018年，中国科学院遗传与发育生物学研究所韩方普团队使用玉米(*Zea mays*) DMC1基因启动子，构建DPC (DMC1 promoter-controlled) CRISPR-Cas9载体系统，并用其转化玉米幼胚，结果发现抗性愈伤组织的基因编辑效率高达100%，并在T_0代植株中就出现了60%–70%的纯合或双等位突变体。经全基因组测序分析，在预测的1 000多个潜在脱靶位点处并没有发现脱靶突变(Feng et al., 2018)。

2.1.2 环境因素对基因编辑效率的影响

Le Blanc等(2017)的研究结果表明，与在标准温度(22°C)下连续生长的植物相比，在37°C经历热激的拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)显示出更高的基因编辑效率。依赖于GFP报告基因的定量分析表明，拟南芥在37°C处理后体细胞基因表达量可以提高5倍，生殖细胞基因表达量可以提高100倍以上。该团队还发现温度对突变率的影响不限于拟南芥，在37°C热激的

柑橘(*Citrus reticulata*)中CRISPR/Cas9的靶向突变效率也有类似的增加。体外实验证明，来自化脓链球菌的Cas9 (SpCas9)在37°C比在22°C下活性更高，更易产生双链DNA断裂，由此表明温度对CRISPR/Cas9的体内作用机制具有潜在影响。

2.2 CRISPR/Cas9技术的编辑范围

除应用最广的SpCas9外，其它不同来源的Cas9也具有基因编辑能力。研究人员从金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)中找到1种较小的Cas9核酸酶(SaCas9) (Ran et al., 2015)，它比SpCas9小25%，PAM识别序列为NNGRRT。此外，来自嗜热乳链球菌(*Streptococcus thermophilus*)的Cas9核酸酶(St1Cas9)可以识别NNAGAA的PAM序列(Deveau et al., 2008; Horvath, 2008)。Steinert等(2015)将经密码子优化的SaCas9和St1Cas9两种Cas9蛋白成功应用于拟南芥中，并获得了较高的基因组编辑效率。这些SpCas9同源蛋白的发现扩大了基因组编辑的范围，为研究人员提供了更多的选择。

Meng等(2018)发现CRISPR/Cas9系统能够在水稻中高效识别和编辑NAG位点，相比传统的NGG位点，NAG邻近基序靶位点的容错能力更低，表现出更低的脱靶效应。这项研究成果不仅拓展了CRISPR/Cas9系统在水稻基因组中的可编辑范围，而且也表明在进行基因组编辑时需更多考虑到NAG邻近基序处的潜在脱靶效应。中国水稻研究所王克剑课题组(Hu et al., 2016)通过定点突变的方法对SpCas9蛋白进行改造，获得了2种SpCas9变体(VQR和VRER)，并通过一系列的转基因实验证明，在水稻中VQR可以高效识别NGA的PAM序列，而VRER则可以识别NGCG的PAM序列。这2种突变体使得CRISPR/Cas9系统在水稻中的可编辑范围拓展到原有的2倍以上。随后，他们又通过修饰sgRNA的结构以及使用强内源启动子，显著提高了VQR变体的编辑效率(Hu et al., 2017a)。哈佛大学David Liu研究团队利用噬菌体辅助持续进化(PACE)方法获得SpCas9最新突变体xCas9, xCas9可识别的PAM位点为NG、GAA和GAT，并且成功应用于转录激活、基因敲除和单碱基编辑。研究表明，xCas9不仅应用范围更大，而且特异性要高于SpCas9 (Xing et al., 2014)。

2.3 多基因同时编辑与单碱基精准编辑

在后基因组时代，功能基因组研究的重心逐渐由单一基因转向多基因功能研究。CRISPR/Cas9技术凭借其简单、高效等优点使多基因同时敲除变得可行。Xing等(2014)构建了1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代中实现了三基因同步敲除。Xie等(2015)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-ssgRNA结构串联排列，并通过单个多顺反子转录、加工成多个ssgRNA。利用这一策略在水稻中实现了多达8个位点同时突变，其中个别位点效率高达100%。由于tRNA及其加工系统在所有生物中都非常保守，因此这一策略有望在其它物种的多基因编辑中广泛应用。Yu等(2018)则发现在敲除多基因时，通常做法是针对1个基因设计1条sgRNA，这种设计方法虽然提高了敲除效率，但每多加1条sgRNA，脱靶风险将呈指数级增加。为了解决这一问题，该研究组以编码拟南芥核糖体大亚基AtRPL10亚家族的3个同源基因*AtRPL10A* (*AT1G14320*)、*AtRPL10B* (*AT1G26910*)及*AtRPL10C* (*AT1G66580*)为切入点，通过序列分析找到同时满足编辑3个基因的1条sgRNA，利用Cas9同时编辑3个基因。经单克隆测序分析统计，显示在Line9植株中，*AtRPL10A*、*AtRPL10B*以及*AtRPL10C*的编辑效率分别为8.8%、3.8%及23.6%。

2016年，在哺乳动物细胞中成功对靶标基因实现了单碱基编辑(C-T)。随后，单碱基编辑技术在水稻、小麦(*Triticum aestivum*)、玉米、拟南芥和番茄(*Solanum lycopersicum*)等多种植物中得到应用，然而所采用的APOBEC1胞嘧啶脱氨酶表现出对TC的偏好性，对序列为GC的编辑效率较低。鉴于此，Ren等(2018)采用人的AID胞嘧啶脱氨酶替换APOBEC1的方法，在水稻中解决了TC偏好性问题，对GC和TC都有较高的编辑效率。

大肠杆菌腺嘌呤脱氨酶(ecTadA)能够对正常DNA上的腺嘌呤进行脱氨，将腺嘌呤A转变为次黄嘌呤I，损伤DNA在重新复制过程中被聚合酶作用，导致A-T配对转换为G-C配对(Gaudelli et al., 2017)。2018年4月，中国农业科学院植物保护研究所Yan等(2018)引入TadA及其2个突变体TadA*7.10和TadA*7.8，并将其密码子优化后，分别与CRISPR/Cas9

系统融合，开发了rBE14、rBE15、rBE17和rBE18多套碱基编辑器，对*OsMPK6*、*OsMPK13*、*OsSERK2*及*OsWRKY45*四个水稻内源基因靶位点进行编辑，成功获得预期的水稻突变体材料，效率高达62%。同时，该套系统引入了全新的紫外激活GFP检测系统，可以通过手持式紫外灯直接照射水稻组织，使后代群体中的转基因分离检测十分便利。*Molecular Plant*同期还发表了中国科学院上海植物逆境生物学研究中心朱健康研究团队关于单碱基编辑的研究，该文报道，通过融合SpCas9 (D10A)和ecTadA*7.10的方法实现了对*IPA1*等基因的编辑，编辑效率高达45.2% (Kai et al., 2018)。

中国科学院遗传与发育生物学研究所高彩霞研究组利用Cas9变体(nCas9-D10A)融合ecTadA和ecTadA*二聚体(Li et al., 2018)，建立并优化了高效精确的植物ABE (Adenine Base Editor)单碱基编辑系统，在植物中实现了高效的A·T转换为G·C的碱基替换，为植物基因组功能解析和作物遗传改良及新品种培育提供了重要技术支撑。

2.4 CRISPR/Cas9技术的安全性

人们对CRISPR/Cas9技术安全性的担心主要围绕2个问题，一是基因组编辑系统的脱靶效应，二是基因组编辑过程中外源基因的插入。

2.4.1 降低脱靶效应

目前，所有的基因组编辑技术都存在脱靶问题(王影等, 2018)。在已完成全基因组测序的情况下，可以使用在线工具预测脱靶位点，从而选择脱靶概率相对较低的sgRNA进行实验。然而，许多植物的基因组还没有完全测序，且在许多作物中，相同物种的不同品种在可变基因座处具有多态性(Mikami et al., 2016)。相比哺乳动物系统中大量的信息(Corrigan-Curay et al., 2015)，目前描述植物中CRISPR/Cas9基因组编辑的脱靶效应的数据还较少，植物系统中可能影响靶点特异性的潜在因素尚不清楚。

从生物信息学角度来看，较长的DNA靶序列会降低脱靶错配的可能性，但Fu等(2014)发现长度为17–19 nt的sgRNA显示出比原先20 nt的sgRNA更好的靶向活性，同时脱靶率更低；然而，将sgRNA进一步缩短至15 nt则导致其活性丧失。对此可解释为：在错配位点缩短的sgRNA与DNA的结合能力降低，从而保持较高的靶点编辑效率以及更低的脱靶效应。

Endo等(2015)研究发现在植物中进行基因编辑时，通常需要同时修饰多个同源基因，即具有相似但不相同的DNA序列的基因，以获得期望的表型，于是他们利用CRISPR/Cas9的这种脱靶效应来诱导多种同源基因的敲除。他们针对细胞周期蛋白依赖性激酶B2 (*CDKB2*)设计了一段20 bp的序列作为sgRNA，这20 bp与其它水稻CDK基因(*CDKA1*、*CDKA2*和*CDKB1*)具有不同数目的错配，并在水稻中验证了该方法的可行性。Kweon等(2017)开发出一种融合向导RNA (fgRNA)，通过与Cas9和Cpf1蛋白共同发挥功能来降低脱靶效应，并且不会降低其特异性和编辑效率。

2.4.2 消除外源基因插入

近年来，转基因作物的安全性一直处于社会舆论的风口浪尖，基因组编辑技术的出现为植物分子育种提供了前所未有的新机遇。传统转基因技术插入位点随机，常导致许多不利结果，如内源基因被破坏及外源基因沉默；而基因组编辑的插入位点与编辑位点通常相隔较远，通过自交得到的F_1代中，可以比较容易地分离得到不含有外源转基因成分的植株。

Woo等(2015)将纯化的Cas9蛋白与sgRNA预组装成蛋白质复合物溶液，之后利用生成的蛋白质复合物溶液转染到拟南芥、烟草(*Nicotiana tabacum*)、莴苣(*Lactuca sativa*)和水稻的原生质体中，在再生植物中实现了46%的靶向诱变，且靶向位点的突变如同自然突变一样，可以通过生殖细胞遗传给下一代。该方法在不将外源DNA导入细胞的情况下编辑植物基因组，避免了使用可能会导致外源DNA介入的农杆菌介导法，使安全性显著提高。

Liang等(2018)通过基因枪将CRISPR/Cas9 IVT (*in vitro* transcripts)和RNP (核糖核蛋白复合体)导入小麦未成熟幼胚，建立了基因组定点修饰的DNA-free基因组编辑体系。该方法只需要9–11周即可在T_0代获得不含外源DNA的靶向修饰小麦突变体。由于IVT和RNP是以瞬时表达方式发挥作用，故可成功避免外源DNA整合到宿主基因组中且大大降低了脱靶效应。

水稻中的*CYP81A6*编码P450细胞色素蛋白，该蛋白失活后水稻对除草剂苯达松表现敏感。基因编辑

后的个体中如果有CRISPR/Cas9存在且正常表达就会对苯达松表现敏感。浙江大学舒庆尧研究团队将靶标为*CYP81A6*的RNAi干涉片段与CRISPR/Cas9编辑元件串联整合,得到96个独立转化事件, 其中29个事件对苯达松表现敏感(CRISPR/Cas9正常表达)。后续通过在T_1代喷施苯达松, 就可筛选得到不含外源基因的植株(Lu et al., 2017)。

华中农业大学赵云德研究团队通过利用自杀基因与CRISPR载体融合, 开发出高效去除含有Cas9转化事件的新技术, 通过基因型鉴定发现所有的T_1代植株都不含有Cas9 (He et al., 2018)。这些DNA-free基因组编辑体系的建立将有助于进一步完善作物基因组编辑技术, 推进基因组编辑育种产业化进程。

2017年, 美国农业部(USDA)宣布将不会对采用基因组编辑工具CRISPR/Cas9进行遗传工程改造的双孢蘑菇(*Agaricus bisporus*)实施管控。这种蘑菇是由宾夕法尼亚州立大学的杨亦农(Yinong Yang)课题组改造的一种抗褐变白蘑菇(Waltz, 2016), 也是全球第一例获得商业化许可的基因编辑食品。

2.5 基因片段的插入与替换

目前, CRISPR/Cas9系统在植物领域中的应用大部分都通过NHEJ修复方式形成错配, 从而造成基因靶向敲除; 而在植物染色体上定点插入或替换一段序列一直以来都是困扰科学家的一个难题, 必须要借助HDR修复方式才能解决。Schiml等(2015)首次报道了通过CRISPR/Cas9系统利用HDR介导的修复机制在拟南芥*ADH1*基因位点上实现卡那抗性片段的导入。Sun等(2016)通过HDR修复方式修饰了水稻内源性*ALS*基因, 从而使其具有抗除草剂特性, 并发现当质粒和自由双链DNA形态同时存在时, 提供HDR供体能够有效提高植物同源重组修复效率。同年, 高彩霞团队与李家洋团队合作, 利用Cas9和1对sgRNA从DNA供体上剪切下一段序列, 之后再插入到水稻基因组的靶位点上, 从而实现基因的靶向敲入(Li et al., 2016)。据报道, 以小麦矮缩病毒WDV (wheat dwarf virus)作为载体, 通过提高供体DNA的拷贝数, 可以大幅提升敲入效率, 并在水稻中获得成功, 敲入效率最高可达19.4% (Wang et al., 2017)。

朱健康研究团队报道了一种在拟南芥中基于二代转化策略与CRISPR/Cas9系统的超长基因片段高效精准敲入以及替换技术(Miki et al., 2018)。它无需任何标记辅助筛选就可以在拟南芥基因组精准定向地实现单氨基酸或大片段的插入或替换, 效率高达5%–10%, 极大地推动了高等植物基因编辑技术的发展。

2.6 靶向基因转录调控

将不同的功能蛋白(转录抑制、转录激活的蛋白元件)与dCas9 (Dead Cas9, 无DNA切割活性的Cas9)融合表达, 利用sgRNA的特异性引导功能, 可以实现转录抑制或转录激活等不同的遗传操作。Baazim (2014)采用CRISPR/dCas9系统在烟草的瞬时转化实验中成功实现了对目标基因表达的激活与干扰。在dCas9的C端融合转录激活因子EDLL或TAD (TAL effector激活结构域), 通过半定量PCR实验, 结果表明*GUS*基因或*PDS*基因可以被激活; 在dCas9蛋白的C端融合SRDX转录抑制结构域, 结果表明dCas9--SRDX可以靶向性干扰烟草*PDS*基因的表达。Cheng等(2016)构建出一种全新的基因调控系统, 称为Casilio系统。该系统包括dCas9蛋白, 附带有多个Pumilio/FBF结合位点的sgRNA以及与Pumilio/FBF结构域融合的效应蛋白, 将CRISPR/Cas9系统和Pumilio RNA结合蛋白结合在一起, 可实现对基因的高效调控。美国马里兰大学戚益平实验室与中国电子科技大学张勇实验室合作开发的CRISPR-Act 2.0比该实验室报道的第1代dCas9-VP64系统更具转录激活效应, 已在水稻细胞中成功进行多基因激活, 表明该系统在植物基因调控中具有很好的应用前景(Lowder et al., 2018)。

3 展望

与前2代基因编辑技术相比, CRISPR/Cas9技术的出现为广大科研人员提供了一个简单、廉价且高效的遗传操作平台, 不仅能为基础研究提供强大支持, 还能将功能基因组学的研究成果加速向产品转化(李红和谢卡斌, 2017)。尤其在植物研究中, 基因组编辑技术独有以下优势: 其一不涉及伦理问题; 其二脱靶效应对植物的影响较小, 即使在T_0代有脱靶现象发生, 在后代分离中也可以把脱靶位点分离出去。

随着CRISPR/Cas9基因组编辑技术的不断改进和创新, 人们对CRISPR/Cas9系统运行机理的了解

进一步加深, 原本一些困扰研究人员的问题已经迎刃而解。例如, PAM限制基因组编辑范围和单碱基的精准编辑。然而, 植物基因组编辑也依然存在着一些亟待解决的问题。例如, 如何更高效地将基因组编辑材料运送到目的植物中, 随后产生定点编辑的植物(Altpeter et al., 2016)。目前, 虽然有多种可用的遗传转化方法, 但往往仅局限于特定的基因型、组织和培养类型, 并不能应用于所有的植物品种。另外, 目前大多数的基因组编辑依旧聚焦于创制DSB进而破坏基因功能, 仅有少数报道是运用HDR修复方式对内源基因进行序列插入和替换, 其主要原因是由于缺乏对基因组编辑的分子机理研究, 同时还缺少转化多种基因组编辑材料的有效手段与工具(冉毅东等, 2017)。

近年来, 一些新的基因组编辑系统不断问世。2015年, 麻省理工学院张峰团队报道了一种新的CRISPR效应蛋白Cas12a (Cpf1) (Zetsche et al., 2015), 并先后在动物(Kim et al., 2016; Hur et al., 2016)、微生物(Ungerer and Pakrasi, 2016)以及植物(Xu et al., 2017; Hu et al., 2017b)的基因组编辑中成功应用。Cas13a (C2c2)是能够靶向和切割噬菌体基因组的单链RNA (ssRNA)分子。据Aman等(2018)报道, Jesser等使用CRISPR/Cas13a干扰植物中的RNA病毒——芜菁花叶病毒(TuMV), 并取得了成功。以色列的科学家在细菌体内发现了10种新的免疫防御系统, 这些新系统将为开发新的基因组编辑工具带来希望(Doron et al., 2018)。相信在不久的将来, 不断改进优化的CRISPR/Cas9系统以及更多新型的基因组编辑技术必将在作物遗传改良和品种选育方面发挥更大的作用。

参考文献

李红, 谢卡斌 (2017). 植物CRISPR基因组编辑技术的新进展. 生物工程学报 **33**, 1700–1711.

冉毅东, 梁振, 张毅, 高彩霞 (2017). 植物基因组编辑试剂材料的导入及转化系统的研究现状及前景. 中国科学: 生命科学 **47**, 1159–1176.

王影, 李相敢, 邱丽娟 (2018). CRISPR/Cas9基因组定点编辑中脱靶现象的研究进展. 植物学报 **53**, 528–541.

Altpeter F, Springer NM, Bartley LE, Blechl AE, Brutnell TP, Citovsky V, Conrad LJ, Gelvin SB, Jackson DP, Kausch AP, Lemaux PG, Medford JI, Orozco-Cárdenas ML, Tricoli DM, Van Eck J, Voytas DF, Walbot V, Wang K, Zhang ZJ, Stewart Jr CN (2016). Advancing crop transformation in the era of genome editing. *Plant Cell* **28**, 1510–1520.

Aman R, Ali Z, Butt H, Mahas A, Aljedaani F, Khan MZ, Ding S, Mahfouz M (2018). RNA virus interference via CRISPR/Cas13a system in plants. *Genome Biol* **19**, 1.

Baazim H (2014). RNA-guided transcriptional regulation in plants via dCas9 chimeric proteins. Ph.D. thesis. Thuwal, Kingdom of Saudi Arabia: King Abdullah University of Science and Technology. pp. 32–48.

Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, Boyaval P, Moineau S, Romero DA, Horvath P (2007). Crispr provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science* **315**, 1709–1712.

Brouns SJ, Jore MM, Lundgren M, Westra ER, Slijkhuis RJ, Snijders AP, Dickman MJ, Makarova KS, Koonin EV, van der Oost J (2008). Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes. *Science* **321**, 960–964.

Chamberlain JR, Schwarze U, Wang PR, Hirata RK, Hankenson KD, Pace JM, Underwood RA, Song KM, Sussman M, Byers PH, Russell DW (2004). Gene targeting in stem cells from individuals with *Osteogenesis imperfecta*. *Science* **303**, 1198–1201.

Cheng AW, Jillette N, Lee P, Plaskon D, Fujiwara Y, Wang W, Taghbalout A, Wang H (2016). Casilio: a versatile CRISPR-Cas9-Pumilio hybrid for gene regulation and genomic labelling. *Cell Res* **26**, 254–257.

Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, Hsu PD, Wu X, Jiang W, Marraffini LA, Zhang F (2013). Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* **339**, 819–823.

Corrigan-Curay J, O'Reilly M, Kohn DB, Cannon PM, Bao G, Bushman FD, Carroll D, Cathomen T, Joung JK, Roth D, Sadelain M, Scharenberg AM, VON Kalle C, Zhang F, Jambou R, Rosenthal E, Hassani M, Singh A, Porteus MH (2015). Genome editing technologies: defining a path to clinic: genomic editing: establishing preclinical toxicology standards, Bethesda, Maryland 10 June 2014. *Mol Ther* **23**, 796.

Deltcheva E, Chylinski K, Sharma CM, Gonzales K, Chao Y, Pirzada ZA, Eckert MR, Vogel J, Charpentier E (2011). CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature* **471**, 602–607.

Deveau H, Barrangou R, Garneau JE, Labonté J, Fremaux C, Boyaval P, Romero DA, Horvath P, Moineau S (2008). Phage response to CRISPR-encoded resistance in *Streptococcus thermophilus*. *J Bacteriol* **190**, 1390–1400.

Doron S, Melamed S, Ofir G, Leavitt A, Lopatina A, Keren M, Amitai G, Sorek R (2018). Systematic discovery of antiphage defense systems in the microbial pangenome. *Science* **359**, eaar4120.

Durai S, Mani M, Kandavelou K, Wu J, Porteus MH, Chandra-segaran S (2005). Zinc finger nucleases: custom-designed molecular scissors for genome engineering of plant and mammalian cells. *Nucleic Acids Res* **33**, 5978–5990.

Endo M, Mikami M, Toki S (2015). Multigene knockout utilizing off-target mutations of the CRISPR/Cas9 system in rice. *Plant Cell Physiol* **56**, 41.

Feng C, Su H, Bai H, Wang R, Liu Y, Guo X, Liu C, Zhang J, Yuan J, Birchler JA, Han F (2018). High efficiency genome editing using a dmc1 promoter-controlled CRISPR/Cas9 system in maize. *Plant Biotechnol J* **16**, 1848–1857.

Fu Y, Sander JD, Reyon D, Cascio VM, Joung JK (2014). Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs. *Nat Biotechnol* **32**, 279–284.

Gaj T, Gersbach CA, Barbas III CF (2013). ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends Biotechnol* **31**, 397–405.

Gasiunas G, Barrangou R, Horvath P, Siksnys V (2012). Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* **109**, E2579–E2586.

Gaudelli NM, Komor AC, Rees HA, Packer MS, Badran AH, Bryson DI, Liu DR (2017). Programmable base editing of A•T to G•C in genomic DNA without DNA cleavage. *Nature* **551**, 464–471.

He Y, Zhu M, Wang L, Wu J, Wang Q, Wang R, Zhao Y (2018). Programmed self-elimination of the CRISPR/Cas9 construct greatly accelerates the isolation of edited and transgene-free rice plants. *Mol Plant* **11**, 1210–1213.

Hendel A, Bak RO, Clark JT, Kennedy AB, Ryan DE, Roy S, Steinfeld I, Lunstad BD, Kaiser RJ, Wilkens AB, Bacchetta R, Tsalenko A, Dellinger D, Bruhn L, Porteus MH (2015). Chemically modified guide RNAs enhance CRISPR-Cas genome editing in human primary cells. *Nat Biotechnol* **33**, 985–989.

Horvath P, Romero DA, Coûté-Monvoisin AC, Richards M, Deveau H, Moineau S, Boyaval P, Fremaux C, Barrangou R (2008). Diversity, activity, and evolution of CRISPR loci in *Streptococcus thermophilus*. *J Bacteriol* **190**, 1401.

Hu JH, Miller SM, Geurts MH, Tang W, Chen L, Sun N, Zeina CM, Gao X, Rees HA, Lin Z, Liu DR (2018). Evolved Cas9 variants with broad PAM compatibility and high DNA specificity. *Nature* **556**, 57–63.

Hu X, Meng X, Liu Q, Li J, Wang K (2017a). Increasing the efficiency of CRISPR-Cas9-VQR precise genome editing in rice. *Plant Biotechnol J* **16**, 292–297.

Hu X, Wang C, Fu Y, Liu Q, Jiao X, Wang K (2016). Expanding the range of CRISPR/Cas9 genome editing in rice. *Mol Plant* **9**, 943–945.

Hu X, Wang C, Liu Q, Fu Y, Wang K (2017b). Targeted mutagenesis in rice using CRISPR-Cpf1 system. *J Genet Genomics* **44**, 71–73.

Hur JK, Kim K, Been KW, Baek G, Ye S, Hur JW, Ryu SM, Lee YS, Kim JS (2016). Targeted mutagenesis in mice by electroporation of Cpf1 ribonucleo proteins. *Nat Biotechnol* **34**, 807–808.

Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, Amemura M, Nakata A (1987). Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J Bacteriol* **169**, 5429–5433.

Jansen R, van Embden JD, Gaastra W, Schouls LM (2002). Identification of a novel family of sequence repeats among prokaryotes. *OMICS* **6**, 23–33.

Jiang F, Doudna JA (2017). CRISPR-Cas9 structures and mechanisms. *Ann Rev Biophy* **46**, 505–529.

Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* **337**, 816–821.

Jinek M, East A, Cheng A, Lin S, Ma E, Doudna J (2013). RNA-programmed genome editing in human cells. *eLife* **2**, e00471.

Kai H, Tao X, Yuan F, Dong W, Zhu JK (2018). Precise A·T to G·C base editing in the rice genome. *Mol Plant* **11**, 627–630.

Kim Y, Cheong SA, Lee JG, Lee SW, Lee MS, Baek IJ, Sung YH (2016). Generation of knockout mice by Cpf-1-mediated gene targeting. *Nat Biotechnol* **34**, 808–810.

Kweon J, Jang AH, Kim DE, Yang JW, Yoon M, Rim SH, Kim JS, Kim Y (2017). Fusion guide RNAs for orthogonal gene manipulation with Cas9 and Cpf1. *Nat Commun* **8**, 1723.

Le Blanc C, Zhang F, Mendez J, Lozano Y, Chatpar K, Irish VF, Jacob Y (2017). Increased efficiency of targeted mutagenesis by CRISPR/Cas9 in plants using heat stress. *Plant J* **93**, 377–386.

Li C, Zong Y, Wang YP, Jin S, Zhang DB, Song QN, Zhang R, Gao CX (2018). Expanded base editing in rice and wheat using a Cas9-adenosine deaminase fusion. *Genome Biol* **19**, 59.

Li J, Meng X, Zong Y, Chen K, Zhang H, Liu J, Li J, Gao C (2016). Gene replacements and insertions in rice by intron targeting using CRISPR-Cas9. *Nat Plants* **2**, 16139.

Li JF, Norville JE, Aach J, McCormack M, Zhang D, Bush J, Church GM, Sheen J (2013). Multiplex and homologous recombination-mediated genome editing in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana* using guide RNA and Cas9. *Nat Biotechnol* **31**, 688–691.

Li T, Liu B, Spalding MH, Weeks DP, Yang B (2012). High-efficiency talen-based gene editing produces disease-resistant rice. *Nat Biotechnol* **30**, 390–392.

Liang PP, Xu YW, Zhang XY, Ding CH, Huang R, Zhang Z, Lv J, Xie XW, Chen YX, Li YJ, Sun Y, Bai YF, Zhou SY, Ma WB, Zhou CQ, Huang JJ (2015). CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human tripronuclear zygotes. *Prot Cell* **6**, 363–372.

Liang Z, Chen K, Zhang Y, Liu J, Yin K, Qiu JL, Gao C (2018). Genome editing of bread wheat using biolistic delivery of CRISPR/Cas9 *in vitro* transcripts or ribonucleo proteins. *Nat Protoc* **13**, 413–430.

Lowder LG, Zhou J, Zhang Y, Malzahn A, Zhong Z, Hsieh TF, Voytas DF, Zhang Y, Qi Y (2018). Robust transcriptional activation in plants using multiplexed CRISPR-Act 2.0 and mTALE-Act systems. *Mol Plant* **11**, 245–256.

Lu HP, Liu SM, Xu SL, Chen WY, Zhou X, Tan YY, Huang JZ, Shu QY (2017). CRISPR-S: an active interference element for a rapid and inexpensive selection of genome-edited, transgene-free rice plants. *Plant Biotechnol J* **15**, 1371–1373.

Ma X, Zhang Q, Zhu Q, Liu W, Chen Y, Qiu R, Wang B, Yang Z, Li H, Lin Y, Xie Y, Shen R, Chen S, Wang Z, Chen Y, Guo J, Chen L, Zhao X, Dong Z, Liu YG (2015). A robust CRISPR/Cas9 system for convenient, high-efficiency multiplex genome editing in monocot and dicot plants. *Mol Plant* **8**, 1274–1284.

Marraffini LA, Sontheimer EJ (2008). CRISPR interference limits horizontal gene transfer in *Staphylococci* by targeting DNA. *Science* **322**, 1843–1845.

Meng XB, Hu XX, Liu Q, Song XG, Gao CX, Li JY, Wang KJ (2018). Robust genome editing of CRISPR-Cas9 at NAG PAMs in rice. *Sci China Life Sci* **61**, 122–125.

Mikami M, Toki S, Endo M (2016). Precision targeted mutagenesis via Cas9 paired nickases in rice. *Plant Cell Physiol* **57**, 1058–1068.

Miki D, Zhang W, Zeng W, Feng Z, Zhu JK (2018). CRISPR/Cas9-mediated gene targeting in *Arabidopsis* using sequential transformation. *Nat Commun* **9**, 1967.

Miller JC, Tan S, Qiao G, Barlow KA, Wang J, Xia DF, Meng X, Paschon DE, Leung E, Hinkley SJ, Dulay GP, Hua KL, Ankoudinova I, Cost GJ, Urnov FD, Zhang HS, Holmes MC, Zhang L, Gregory PD, Rebar EJ (2011). A tale nuclease architecture for efficient genome editing. *Nat Biotechnol* **29**, 143–148.

Mussolino C, Cathomen T (2013). RNA guides genome engineering. *Nat Biotechnol* **31**, 208–209.

Nekrasov V, Staskawicz B, Weigel D, Jones JDG, Kamoun S (2013). Targeted mutagenesis in the model plant *Nicotiana benthamiana* using Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nat Biotechnol* **31**, 691–693.

Peng J, Wang Y, Jiang JY, Zhou XY, Song L, Wang LL, Ding C, Qin J, Liu LP, Wang WH, Liu JQ, Huang XX, Wei H, Zhang P (2015). Production of human albumin in pigs through CRISPR/Cas9-mediated knockin of human cDNA into swine albumin locus in the zygotes. *Sci Rep* **5**, 16705.

Puchta H, Dujon B, Hohn B (1993). Homologous recombination in plant cells is enhanced by *in vivo* induction of double strand breaks into DNA by a site-specific endonuclease. *Nucleic Acids Res* **21**, 5034–5040.

Ran FA, Cong L, Yan WX, Scott DA, Gootenberg JS, Kriz AJ, Zetsche B, Shalem O, Wu X, Makarova KS, Koonin EV, Sharp PA, Zhang F (2015). *In vivo* genome editing using *Staphylococcus aureus* Cas9. *Nature* **520**,

186–191.

Redondo P, Prieto J, Muñoz IG, Alibés A, Stricher F, Serrano L, Cabaniols JP, Daboussi F, Arnould S, Perez C, Duchateau P, Pâques F, Blanco FJ, Montoya G (2008). Molecular basis of xeroderma pigmentosum group C DNA recognition by engineered meganucleases. *Nature* **456**, 107–111.

Ren B, Yan F, Kuang Y, Li N, Zhang D, Zhou X, Lin H, Zhou H (2018). Improved base editor for efficiently inducing genetic variations in rice with CRISPR/Cas9-guided hyperactive hAID mutant. *Mol Plant* **11**, 623–626.

Schiml S, Fauser F, Puchta H (2015). 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* **80**, 1139–1150.

Shan JW, Gao CX (2015). Research progress of genome editing and derivative technologies in plants. *Hereditas* **37**, 953–973.

Shan Q, Wang Y, Li J, Zhang Y, Chen K, Liang Z, Zhang K, Liu J, Xi JJ, Qiu JL, Gao C (2013). Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system. *Nat Biotechnol* **31**, 686–688.

Steinert J, Schiml S, Fauser F, Puchta H (2015). Highly efficient heritable plant genome engineering using Cas9 orthologues from *Streptococcus thermophilus* and *Staphylococcus aureus*. *Plant J* **84**, 1295–1305.

Sun Y, Zhang X, Wu C, He Y, Ma Y, Hou H, Guo X, Du W, Zhao Y, Xia L (2016). Engineering herbicide-resistant rice plants through CRISPR/Cas9-mediated homologous recombination of acetolactate synthase. *Mol Plant* **9**, 628–631.

Symington LS, Gautier J (2011). Double-strand break end resection and repair pathway choice. *Annu Rev Genet* **45**, 247–271.

Ungerer J, Pakrasi HB (2016). Cpf1 is a versatile tool for CRISPR genome editing across diverse species of cyanobacteria. *Sci Rep* **6**, 39681.

Waltz E (2016). Gene-edited CRISPR mushroom escapes US regulation. *Nature* **532**, 293.

Wang M, Lu Y, Botella JR, Mao Y, Hua K, Zhu JK (2017). Gene targeting by homology-directed repair in rice using a geminivirus-based CRISPR/Cas9 system. *Mol Plant* **10**, 1007–1010.

Woo JW, Kim J, Kwon SI, Corvalán C, Cho SW, Kim H, Kim SG, Kim ST, Choe S, Kim JS (2015). DNA-free genome editing in plants with preassembled CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins. *Nat Biotechnol* **33**, 1162–1164.

Xie K, Minkenberg B, Yang Y (2015). Boosting CRISPR/Cas9 multiplex editing capability with the endogenous tRNA-processing system. *Proc Natl Acad Sci USA* **112**, 3570–3575.

Xing HL, Dong L, Wang ZP, Zhang HY, Han CY, Liu B, Wang XC, Chen QJ (2014). A CRISPR/Cas9 toolkit for multiplex genome editing in plants. *BMC Plant Biol* **14**, 327.

Xing YY, Yang J, Ren J (2016). Application of CRISPR/Cas9 mediated genome editing in farm animals. *Hereditas* (*Beijing*) **38**, 217–226.

Xu R, Li H, Qin R, Wang L, Li L, Wei P, Yang J (2014). Gene targeting using the *Agrobacterium tumefaciens*-mediated CRISPR-Cas system in rice. *Rice* **7**, 5.

Xu R, Qin R, Li H, Li D, Li L, Wei P, Yang J (2017). Generation of targeted mutant rice using a CRISPR-Cpf1 system. *Plant Biotechnol J* **15**, 713–717.

Yan F, Kuang YJ, Ren B, Wang JW, Zhang DW, Lin HH, Yang B, Zhou XP, Zhou HB (2018). High-efficient A·T to G·C base editing by Cas9n-guided tRNA adenosine deaminase in rice. *Mol Plant* **11**, 631–634.

Yu Z, Chen Q, Chen W, Zhang X, Mei F, Zhang P, Zhao M, Wang X, Shi N, Jackson S, Hong Y (2018). Multigene editing via CRISPR/Cas9 guided by a single-sgRNA seed in *Arabidopsis*. *J Integr Plant Biol* **60**, 376–381.

Zetsche B, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Slaymaker IM, Makarova KS, Essletzbichler P, Volz SE, Joung J, van der Oost J, Regev A, Koonin EV, Zhang F (2015). Cpf1 is a single RNA-guided Endonuclease of a Class 2 CRISPR-Cas system. *Cell* **163**, 759–771.

© 植物学报 Chinese Bulletin of Botany

Recent Progress in Evolutionary Technology of CRISPR/Cas9 System for Plant Genome Editing

Yuekai Su, Jingren Qiu, Han Zhang, Zhenqiao Song, Jianhua Wang*

College of Agronomy, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, China

Abstract CRISPR/Cas9 genome editing is used for precisely modifying the genome, enabling nucleotide insertion, deletion, or DNA fragment replacement in targeted gene(s). With more understanding of the CRISPR/Cas9 system, this technology has been widely applied in research, agriculture, medical treatment and other fields. This article briefly introduces the discovery and working principle of the CRISPR/Cas9 genome-editing technology, and summarizes the research progress in optimizing and improving the technology in recent years, including improving the gene editing efficiency, the range expansion of gene editing, base editing and multigene editing, the safety enhancement of genome editing, replacing gene fragments and transcriptional regulation of targeted genes, to provide references for thorough research work in this area.

Key words CRISPR/Cas9, genome editing, genetic improvement, plant genomes

Su YK, Qiu JR, Zhang H, Song ZQ, Wang JH (2019). Recent progress in evolutionary technology of CRISPR/Cas9 system for plant genome editing. *Chin Bull Bot* **54**, 385–395.

* Author for correspondence. E-mail: jhwangjh@163.com

(责任编辑: 白羽红)

© 植物学报 Chinese Bulletin of Botany