



评述

中国知名大学及研究院所专栏 中国农业科学院植物保护研究所专辑

CRISPR/Cas9 技术在植物基因功能研究和新种质创制中的应用与展望

严芳, 周焕斌*

中国农业科学院植物保护研究所, 北京 100094

* 联系人, E-mail: hbzhou@ippcaas.cn

收稿日期: 2015-12-20; 接受日期: 2016-03-14; 网络版发表日期: 2016-05-25

国家重点基础研究发展计划(批准号: 2012CB721103)和国家自然科学基金(批准号: 21325627)资助

摘要 基因组定点编辑是利用人工核酸酶, 对复杂生物基因组特定位点快速而精确地进行遗传改造的一项新技术. 尤其是最近从细菌和古细菌的获得性免疫防御反应中改造而来的 CRISPR/Cas9 系统, 因其简单、廉价、高效以及通用的特性, 目前已经广泛地应用于植物、动物、微生物等各种生物体和细胞的基因功能和应用研究中. CRISPR/Cas9 系统的原理在于其携带的 Cas9 核酸酶——RNA 导向的 dsDNA 结合蛋白, 能够在靶位点对双链 DNA 进行定点切割, 随后引发的非同源末端连接或者同源重组修复, 导致了靶位点 DNA 的缺失、插入、替换甚至染色体大片段重排. 本文对 CRISPR/Cas9 技术的作用机理和应用进行概括, 侧重于模式植物和农作物的最新进展, 探讨这一新型基因组定点编辑技术在植物基因功能研究和新种质创制中的进一步发展.

关键词 基因组定点编辑, 人工核酸酶, CRISPR/Cas9, 基因突变, 种质

民以食为天, 纵观历史长河, 每一次的农业生产变革都对人类的繁衍生息和社会文明的发展产生深远影响. 农业生产资料的获得, 尤其是保证粮食的稳定供给一直都是人类社会可持续发展的重大课题. 当前, 社会人口爆炸性的增长, 可利用耕地面积的减少, 自然资源的短缺以及生态环境的恶化使地球不堪重负, 传统的农业育种方式在解决这一问题上杯水车薪^[1]. 进入 21 世纪以来, 全基因组测序、基因功能鉴定和转基因等技术手段的不断涌现让现代生物技术在农业上发挥了前所未有的作用, 而物种的

核心种质创制, 包括分离用于基因功能解析的突变体, 在现代分子农业研究中处于关键地位.

在正向遗传学方面, 利用甲基亚硝基脲(methylnitrosourea, MNU)、甲基磺酸乙酯(ethylmethylsulfone, EMS)、 γ 射线、快中子等理化诱变手段, 或者 T-DNA、转座子插入等生物学诱变手段, 研究人员获得了大量的遗传变异材料, 由此分离得到数目众多且与植物各器官发育、根际营养吸收、逆境胁迫、微生物互作相关的突变体^[2-5], 在很大程度上加快了植物重要功能基因的分离和分子机制解析, 优秀农艺

引用格式: 严芳, 周焕斌. CRISPR/Cas9 技术在植物基因功能研究和新种质创制中的应用与展望. 中国科学: 生命科学, 2016, 46: 498–513
Yan, F, Zhou H B. Overviews and applications of the CRISPR/Cas9 system in plant functional genomics and creation of new plant germplasm. Sci Sin Vitae, 2016, 46: 498–513, doi: 10.1360/N052016-00158

性状作物材料的发掘和育种等过程。然而, 这种途径由于涉及繁重的后期鉴定工作, 目前仅双子叶模式植物拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)和单子叶农作物水稻(*Oryza sativa*)存在基因组范围相对饱和的突变体资源, 供大家使用^[6,7]。在反向遗传学方面, 基于单链 RNA 沉默(microRNA)或者双链 RNA 干扰的基因沉默技术^[8,9], 或者病毒诱导的内源基因沉默技术较常使用^[10], 但均存在基因沉默的不彻底、遗传不稳定性及脱靶问题^[9]。最为关键的是, 对于有重大应用价值的功能基因, 利用现代生物技术所获得的转基因材料, 在应用上涉及田间释放的转基因生物安全问题, 并由此引发公众的顾虑。

面对各种物种海量的基因组序列信息, 如何将遗传信息和其控制的表型联系起来? 长期以来, 研究人员一直在探索能够在生物体内进行特定位点的基因打靶(gene targeting)技术。不像在细菌、酵母等简单微生物中, 利用其体内的同源重组机制能较容易地实现 DNA 定点置换, 高等植物和动物中的基因打靶十分困难^[11]。直到最近几年一系列人工核酸酶的开发成功, 尤其是 CRISPR/Cas9(clustered regulatory interspaced short palindromic repeat/CRISPR associated protein)技术的建立, 因其操作简单、成本低、效率高以及通用性强, 受到了广泛关注, 已成功应用于细菌、真菌、植物、动物等生物体中, 并在新一代无生物安全风险的转基因植物材料开发以及人类疾病治疗研究中展示了巨大的潜力^[12-16], 形成了一股 CRISPR 热潮, 先后被 *Science* 等多个权威杂志评为重大科学进展或突破技术。本文主要介绍 CRISPR 的构成、作用机理和应用, 侧重于植物上的最新研究进展, 对其在植物基础科学研究和农业应用研究上的进一步发展进行探讨。

1 植物基因组定点编辑技术的历史

1.1 基因组定点编辑的原理

基因组定点编辑是一种在生物体内基因组特定位点人为地对遗传物质进行改造的基因打靶技术, 其引起的遗传信息改变在世代间能够进行稳定传递和功能呈现。基因组定点编辑的原理在于利用人工核酸酶在生物基因组靶位点处进行切割, 产生 DNA 双链断裂(DNA double-strand breaks, DSB), 由此激活细胞的 DSB 修复机制而达到目的。生物体内存在着

两种不同的主要修复机制: 非同源末端连接(non-homologous end joining, NHEJ)修复和同源重组修复(homology-directed repair, HDR)^[17]。通常, 非同源末端连接修复机制保真度较低, 它会在切割位点产生数个核苷酸的缺失或插入, 由此导致了所在靶位点基因的阅读框架移位, 基因功能丧失; 当存在 DNA 模板时, 高保真的同源重组修复机制启动, 其利用模板与 DSB 两侧序列之间的同源性发生 DNA 片段的交换, 由此导致了基因靶位点的定点修饰或外源 DNA 片段的插入^[11]。值得注意的是, 在大部分复杂生物体内, 非同源末端连接修复机制在外源 DNA 片段的插入过程中占主导地位, 同源重组发生的概率非常低^[18,19]。

1.2 植物基因组定点编辑技术的发展

基因组定点编辑的技术核心在于人工核酸酶这把分子剪刀的使用(表 1)。最初出现的是大范围核酸酶(meganuclease), 来源于酵母线粒体的 I-Sce I 和绿藻叶绿体的 I-Cre I 是这类酶的典型代表, 它们识别 12~40 bp 的 DNA 碱基对并高度特异地在靶位点进行双链 DNA 切割, 但由于这类酶的 DNA 识别结构域和内切酶结构域高度重叠, 难以进行人为改造, 致使它仅在少数植物上成功应用^[20-22]。第一个真正具有应用价值的人工核酸酶是锌指核酸酶(zinc-finger nucleases, ZFN), 它由能特异识别 DNA 双链的锌指结构域与具有序列非特异性切割活性的 Fok I 结构域两部分组成, 人工改变锌指模块的组成可实现对特定 DNA 序列的切割, 目前已经成功应用于多种植物中^[22-24]。锌指核酸酶设计比较复杂, 阵列中各个锌指模块因位置和次序不同而相互影响, 从而影响了其基因打靶的特异性, 导致较严重的脱靶现象及伴随产生的对植物细胞的毒性^[25]。2009 年, 来自于黄单胞菌所分泌的 III 型效应蛋白 TALE 所携带的数个 DNA 结合模块被成功解码^[26], 促使了人工核酸酶的进一步升级, 其 DNA 结合结构域采用了 TALE 的重复模块, 此类转录激活因子效应物核酸酶(transcription activator like effector nucleases, TALEN)应运而生并得以飞速发展^[27-29]。不同于锌指核酸酶, TALEN 中的 DNA 结合模块与 4 个 DNA 碱基具有较严谨的对应关系, 所以 TALEN 的设计、组装和打靶的严谨性较锌指核酸酶好。但是, 类似于锌指核酸酶, TALEN 中的 Fok I 结构域需要二聚体化才能行使

表 1 比较核酸酶 ZFN, TALEN 及 CRISPR/Cas9 的优缺点

特征	ZFN	TALEN	CRISPR/Cas9
DNA 识别	锌指蛋白结构域	TALE 识别模块	crRNA, sgRNA
核酸酶	<i>Fok I</i>	<i>Fok I</i>	Cas9
作用模式	蛋白二聚体, 蛋白/DNA 互作	蛋白二聚体, 蛋白/DNA 互作	蛋白/RNA 异聚体, RNA/DNA 配对
靶位点序列	18~36 bp	30~40 bp	17~22 bp
靶位点 DNA 甲基化敏感性	敏感	敏感	敏感程度较低
多个靶位点突变	较少使用	较少使用	容易使用
突变效率	低	适中	较高
脱靶率	比 TALEN 高	较低	比 ZFN 和 TALEN 高
操作程度	周期长, 设计难	周期较长, 操作较复杂	周期短, 操作简单
人工改造	未使用	基因转录激活、阻遏 携带乙酰转移酶、去甲基化酶等	基因转录激活、阻遏 携带荧光蛋白、乙酰转移酶等
物种应用	动物、植物、真核细胞	动物、植物、真核细胞	细菌、真菌、动物、植物、真核细胞

内切酶功能, 由此导致打靶载体过大, 遗传操作复杂, 限制了其在植物上的广泛应用. 直到 2013 年, 一种来源于细菌和古细菌, 由 RNA 引导的新型核酸酶技术——CRISPR/Cas9 系统在人类和小鼠 (*Mus musculus*) 细胞中被报道^[30,31], CRISPR/Cas9 利用 RNA 引导序列与靶位点 DNA 序列以 Watson-Crick 碱基配对而定位, 且 Cas9 单体行使功能, 这种简单的靶向切割属性引起了研究人员的空前关注. 目前在植物研究领域, CRISPR/Cas9 技术已在拟南芥^[32,33]、烟草 (*Nicotiana tabacum* L.)^[34]、水稻^[35,36]、大豆 (*Glycine max* (Linn.) Merr.)^[37,38]、番茄 (*Lycopersicon esculentum* Mill.)^[39]、玉米 (*Zea mays* L.)^[40]、大麦 (*Hordeum vulgare* L.)^[41]、小麦 (*Triticum aestivum* L.)^[16]、马铃薯 (*Solanum tuberosum*)^[38] 等模式植物和农作物研究中百花齐放, 展现出骄人的成绩和广阔的应用前景. 总的来说, CRISPR/Cas9 技术呈现了几大优势: 操作简单、极高的突变效率、等位基因和同源基因的同时突变、多位点突变以及染色体大片段缺失与倒位、大规模基因功能筛选等.

2 CRISPR 技术的原理与发展

2.1 CRISPR 系统的构成

CRISPR 系统在所有的古细菌和将近 1/2 的细菌中均被发现, 介导了对噬菌体、病毒和其他外源遗传物质入侵的防御反应^[42]. CRISPR 系统通常由两个相邻的部分组成: Cas 基因簇和 CRISPR 阵列. 其中, CRISPR 阵列由高度保守的重复序列 (repeat) 和变异

较大的间隔序列 (spacer) 交替排列组成, 其最终转录生成的众多小 crRNA (CRISPR RNA) 引导了 Cas 蛋白对入侵 DNA 的切割. 基于重复序列、Cas 基因序列的差异、以及 Cas 簇的组成不同, CRISPR 系统被划分为 3 种不同类型^[43]. 相对于 I 型和 III 型 CRISPR 系统中较复杂的核酸酶蛋白复合体, II 型较为简单 (图 1). 研究发现, 嗜热链球菌 (*Streptococcus thermophilus*) 的 II 型 CRISPR 系统中, 单个 Cas9 便能行使对 DNA 切割的功能, 整个过程还涉及成熟的 crRNA 与 tracrRNA (trans-activating RNA) 配对形成的 RNA 二聚体, 以及 RNase III 的作用^[44]. 进一步将 crRNA 的 3' 末端与 tracrRNA 的 5' 末端融合, 组成的 sgRNA (single guide RNA) 保留了它们引导 Cas9 对靶位点 DNA 进行切割的属性^[45]. 由此, 在借助各生物体细胞内源 RNase III 的条件下, 人工改造的 II 型 CRISPR 系统仅携带有 Cas9 核酸酶和 sgRNA 两个组分, 研究人员只需要简单改变 sgRNA 中 5' 端的 ~20 bp 引导序列便能完成对不同 DNA 靶位点的切割^[30,31].

II 型 CRISPR 系统很多, 大约有 1000 多种 Cas9 基因被分离获得, 编码着含有 900~1600 个氨基酸大小不等的核酸酶, 它们由相似的结构域构成: RuvC 和 HNH 两个核酸酶结构域, 以及 REC 结构域, 其中, REC 结构域的变异决定了 Cas9 蛋白的大小^[13]. Cas9 对靶位点 (protospacer) DNA 双链的切割依赖于紧随靶位点后的 PAM (protospacer adjacent motifs), 它的长度一般为 2~5 个碱基, 不同来源的 Cas9 识别不同的 PAM 序列^[46]. 分离于化脓链球菌 (*Streptococcus pyogenes*) 的 spCas9, 所识别的 PAM 序列主要为

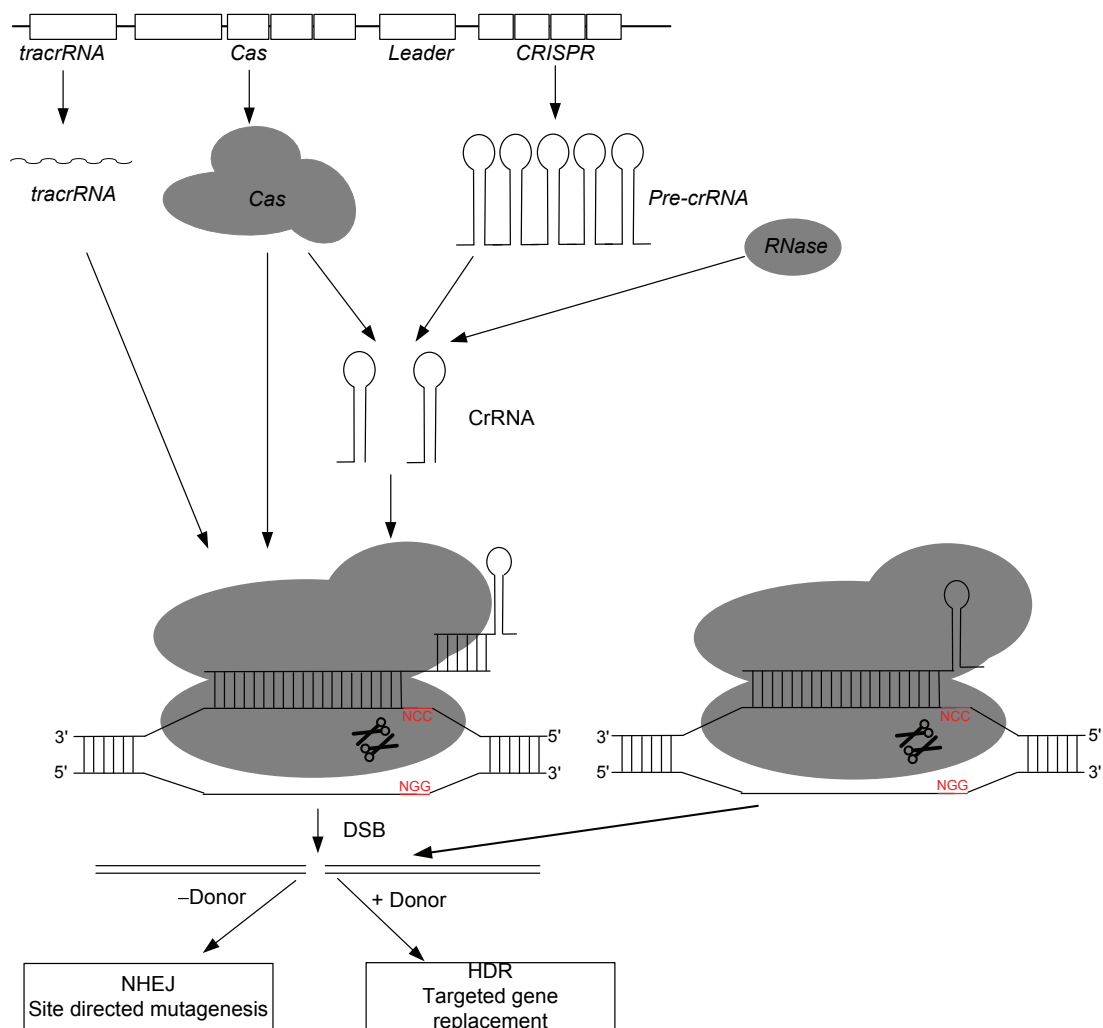


图 1 CRISPR/Cas9 的作用原理图

5'-NGG, 对 5'-NAG 的靶位点也有一定的切割能力^[47]。进一步发现, 根据结构信息而人工改造 Cas9, 其识别的 PAM 序列和严谨性也随之改变, 这无疑进一步扩大了 CRISPR/Cas 技术的使用范围^[48,49]。

2.2 CRISPR/Cas9 技术的作用机制

晶体结构解析表明, 单个的 Cas9 维持着一种酶活自抑制构型^[50]。RNA 二聚体与 REC 叶(lobe)的结合, 促使 Cas9 构象发生改变, 导致 PAM 的互作(PI)结构域被打开, REC 叶与 NUC 叶(含 RuvC 和 HNH 结构域)共同形成中央通道, 用以承载后续的 RNA-DNA 异源双链分子^[50,51]。Cas9-RNA 复合物以三维立体、随机碰撞的方式在基因组中寻找靶位点, PI 结构域与 PAM 的互作在此过程中扮演着关键角色^[52]。它

们的结合促发了 DNA 双螺旋向 PAM 的上游方向解链, RNA 单链得以进入并与其配对, 形成 DNA-RNA 异源双链分子, 此过程被认为进一步地激发了 Cas9-sgRNA 复合物发生构象变化, 由非功能活性向有功能活性转变^[52,53]。最终在基因组靶位点处, HNH 核酸酶结构域在与 RNA 配对的 DNA 链 PAM 序列上游第 3 个核苷酸处进行切割, RuvC 核酸酶结构域在非配对 DNA 链 PAM 序列上游第 3~8 个核苷酸处进行切割, 造成 DNA 双链断裂^[13]。

研究也发现, REC 叶与 RNA-DNA 结合时, 主要由 REC 中的精氨酸富集螺旋桥(arginine-rich bridge)与靶位点 DNA 3'端的 8~12 个核苷酸相互作用。结合一系列点突变的 sgRNA 引导切割实验表明, PAM 序列上游的 8~12 个核苷酸为种子序列, 它决定

了 Cas9 对位点切割的特异性^[30,51,54]。另外也发现,当 PAM 序列上游的核苷酸为 14~15 bp 时,此 dRNA 能引导 Cas9 结合 DNA,但无法诱导复合体对 DNA 的切割活性,正常的引导序列长度为 17 bp 以上^[55]。

2.3 CRISPR/Cas9 技术的人工改造

为了提高对靶位点 DNA 切割的特异性, Cas9 蛋白中天冬氨酸 D10 或组氨酸 H840 被突变成丙氨酸残基,形成具有单链 DNA 酶切活性的 Cas9n 或 Cas9H840A 切口酶(nickase),配合一对 sgRNA 使用,分别切割 DNA 正反两条链上的相邻靶位点,可以较好地改善 CRISPR/Cas 的脱靶效应^[56]。为了进一步提高切割效率, D10 和 H840 被同时突变,生成完全无酶活的 dCas9,与 Fok I 结构域融合在一起,组装成一种全新的人工核酸酶 fCas9,它利用一对 sgRNA 进行引导, Fok I 结构域对靶位点 DNA 双链进行切割^[57,58]。fCas9 的切割特异性有了显著提高,但切割效率差强人意^[57,58]。然而,最新研究表明,根据 Cas9 晶体结构提供的信息,人为突变其中相关几个位点的氨基酸所获得的 eSpCas9 和 SpCas9-HF1,特异性获得较大程度的提高^[59,60]。另一方面,改变 sgRNA 自身互补双链的碱基和长度,在改善 CRISPR/Cas9 的切割效率上也获得了成功^[61]。

dCas9 在基因表达的转录水平调控上也有显著效果。CRISPRi 技术由单个 dCas9 蛋白行使功能,其结合靶基因启动子区后,通过干扰 RNA 聚合酶所在的转录复合体而有效地阻遏细菌基因转录^[62,63]。进一步将 dCas9 与 KRAB, SID, RNAP, SRDX 等转录阻遏结构域相融合,在真核生物细胞中也能有效地阻遏基因转录^[64~66]。相反,融合有 VP16/VP64, p65, EDLL 等转录激活结构域的 dCas9 蛋白,对靶基因的转录有促进作用,且多条 sgRNA 的配合使用效果更佳^[67,68]。最新一代的基因表达调控技术利用 dCas9-SunTag/scFv 或 MS2-sgRNA/MCP,将多个效应蛋白引导到同一个靶位点,在细胞内实现了最大程度的激活或阻遏效果,高达 100 倍^[69~71]。同样原理,利用 dCas9 与人类乙酰转移酶 p300 的催化结构域,能够实现对靶位点启动子区和增强子区的组蛋白 H3K27 乙酰化修饰,从而在靶基因的转录前水平进行调控^[72]。更为巧妙的是,利用同一个有活性的 Cas9 蛋白,结合使用 dRNA 和 sgRNA,可以做到同一个生物体细胞不同基因的编辑和激活表达^[55]。

3 CRISPR/Cas9 技术在植物上的应用

3.1 植物基因组单位点定点编辑

过去 3 年, CRISPR/Cas9 技术在植物学研究中的应用的范围不断扩大,模式植物拟南芥、本氏烟(*Nicotiana benthamiana*),农作物水稻、玉米、小麦,其他经济作物蔬菜、水果、林木等均有涉及,所用的受体材料、转化技术、载体元件种类繁多(表 2)。已有研究表明, crRNA-tracrRNA 的二聚体或长度较短的 sgRNA(+48)虽在水稻原生质体中成功引导 Cas9 蛋白对靶位点进行有效切割,但在转基因植株中,它们的效率显著低于 sgRNA(+85)^[35,77];野生型 Cas9 基因和按人类密码子优化的 Cas9 基因在植物中异源表达时,相对于按自身物种密码子优化的 Cas9 基因,其切割效率有待于进一步提高^[32,35]。在植物上,利用 RNA 聚合酶 III 型 U6 或 U3 启动子驱动 sgRNA(+85)的转录,和表达按植物密码子优化的 Cas9 基因,借助植物的原生质体系统、发根农杆菌诱导产生的不定根系统、根癌农杆菌介导瞬时表达系统或愈伤组织的瞬时表达系统,研究人员快速而有效地在众多植物中验证了 CRISPR/Cas9 技术的有效功能^[33,34,79,94]。

拟南芥是二倍体双子叶模式植物,农杆菌介导的稳定遗传转化表明, DNA 突变被分别成功引入到基因靶位点中,其中 *BR11* 基因的突变效率高达 84%, 50% 以上的 T1 植株显露出 *bril* 突变体的症状,由此说明 Cas9 核酸酶在当代便对两个等位基因进行切割,使之突变产生相应表型^[32]。最有意义的研究来自于多倍体植物,因为多个基因的功能冗余性使传统的基因功能研究在此举步维艰。研究表明, CRISPR/Cas9 技术分别在四倍体大豆 *DD20* 和 *DD43* 两个靶位点上造成了 59% 和 76% 的突变率,其中 31.5% 和 44.1% 的植株证明为双等位基因突变^[37];在普通烟草中, *NtPDS* gRNA4 的效率高达 81.1%, 36.4% 的 T₀ 代转基因植株直接显示 *PDS* 功能完全丧失而导致的白化表型^[94]。CRISPR/Cas9 技术的高效性在多个单子叶植物中也得到了证实,借助按水稻密码子优化的 Cas9 基因, *SWEET13* 等基因位点发生了 100% 的突变,且所有被检测的等位基因均出现了数个核苷酸的插入或缺失^[35]。CRISPR/Cas9 技术在六倍体小麦里也呈现了其精巧的一面,利用 *MLO-A1*, *MLO-B1* 和 *MLO-D1* 复等位基因序列之间的微小差异,研究人员精确地突变了单个基因 *MLO-A1*^[16]。最近, CRISPR/

表 2 CRISPR/Cas9 介导的植物基因组定点突变^{a)}

物种	材料	启动子	Cas9	启动子	引导 RNA	转化方式	突变基因	突变效率	突变形式	脱靶研究是否 是 是 是	是否删除片 段大小	删除 效率	参考 文献
大豆 (<i>Glycine max</i>)	胚细胞	2X CaMV 35S	人	U6	sgRNA	基因枪	<i>Glyma07g14530</i> , <i>Glyma01g38150</i> <i>Glyma11g07220</i>	0%~14%	Mono-, Bi-allelic	测序	ND	ND	[73]
	发状根	2X CaMV 35S	人	U6	sgRNA	发根农杆菌	<i>Glyma07g14530</i>	95%	Mono-, Bi-allelic Chimeric	测序	ND	ND	[73]
	原生质体	CaMV 35S	水稻	AtU6-26 GmU6-10	sgRNA	聚乙二醇	<i>Glyma06g14180</i> , <i>Glyma08g02290</i> , <i>Glyma12g37050</i>	ND	Heterozygous	RE-PCR 测序	ND	ND	[74]
	发状根	CaMV 35S	水稻	AtU6-26, sgRNA GmU6-10	sgRNA	发根农杆菌	<i>Glyma06g14180</i> , <i>Glyma08g02290</i> , <i>Glyma12g37050</i>	3.2%~20.2%	Mono-, Bi-allelic	RE-PCR 测序	ND	ND	[74]
水稻	植株	EF1A2 PIN II	WT	U6	sgRNA	基因枪	<i>DD20</i> , <i>DD43</i> <i>ALS1</i>	59%~76%	Mono-, Bi-allelic Homozygous	ND	ND	ND	[37]
	原生质体	Ubip	水稻	U3	sgRNA	聚乙二醇	<i>MPKs</i>	4%~45%	ND	ND	ND	ND	[36]
	原生质体	2X CaMV 35S	水稻	OsU3	sgRNA	聚乙二醇	<i>OsPDS</i> , <i>OsMPK2</i> <i>OsBADH2</i>	14.5%~38%	ND	ND	ND	ND	[75]
	原生质体	CaMV 35S	人	U3 U6	sgRNA	聚乙二醇	<i>OsMPK5</i>	3%~8%	ND	T7E1 RE-qPCR	ND	ND	[76]
(Oryza sativa)	原生质体	CaMV 35S	衣藻	U6	sgRNA	聚乙二醇	<i>OsSWEET14</i> <i>OsSWEET11</i>	90.9%	ND	ND	ND	ND	[77]
	植株	Ubip	水稻	U3	sgRNA	根癌农杆菌	<i>MPKs</i>	44%~100%	Mono-, Bi-allelic	ND	ND	350~ 750bp	[36]
	植株	OsUBQ	人	AtU6	sgRNA	根癌农杆菌	<i>OsMYB1</i>	50%	Mono-, Bi-allelic	ND	ND	ND	[78]
	植株	ZmUBQ	水稻	OsU3	sgRNA, crRNA:tracrRNA	根癌农杆菌	<i>CAO1</i> , <i>LAZY1</i>	83.3%~91.6%	Mono-, Bi-allelic	ND	ND	ND	[79]
	植株	CaMV 35S	人	OsU6-2	sgRNA	根癌农杆菌	<i>ROC5</i> , <i>SPP</i> , <i>YSA</i>	5%~75%	Mono-, Bi-allelic Homozygous	ND	ND	ND	[32]
	植株	CaMV 35S	水稻	U3	sgRNA	根癌农杆菌	<i>gDxRed-1</i> , <i>2</i> , <i>3</i> , <i>OsMPK2</i>	7.6%~68.7%	Bi-allelic, Homozygous	ND	ND	ND	[80]
	植株	2 XCaMV 35S	水稻	OsU3	sgRNA	根癌农杆菌	<i>OsBADH2</i> , <i>OsMPK2</i>	7.1%~9.4%	Mono-, Bi-allelic, Homozygous	RE-PCR	ND	ND	[75]
	植株	2 XCaMV 35S	水稻	OsU3	sgRNA	根癌农杆菌	<i>CDKB1</i> , <i>CDKA2</i> , <i>CDKA2</i>	55.2%~69%	Mono-, Bi-allelic	测序	ND	ND	[81]
	植株	ZmUBQ, CaMV 35S	植物	OsU3, OsU6b, OsU6c	sgRNA	根癌农杆菌	<i>OsFTL1</i> , <i>Os07g0261200</i> , <i>Os02g0700600</i>	85.4%	Mono-, Bi-allelic Homozygous, Chimeric	ND	ND	ND	[82]
	植株	OsUBQ	水稻	U6	sgRNA	根癌农杆菌	<i>SWEET11</i> , <i>13</i> , <i>SWEET1a</i> , <i>1b</i>	12.5%~100%	Mono-, Bi-allelic	T7E1 测序	否	115~ 245kb	[35]
植株	2 XCaMV 35S	人、植	人、植	U6-26	sgRNA	根癌农杆菌	<i>BEL</i>	2.1%~15.6%	Mono-, Bi-allelic	ND	ND	ND	[83]

(续表 2)

物种	材料	启动子	Cas9	启动子	引导 RNA	转化方式	突变基因	突变效率	突变形式	脱靶研究是否 手段 脱靶	是否 删除 遗传 片段大小	删除 效率	参考文献
水稻 (<i>Oryza sativa</i>)	愈伤	ZmUBQ	水稻	OsU3	sgRNA	基因枪	ALS	ND	Homozygote heterozygote	ND	ND	ND	[84]
	愈伤	2 XCaMV 35S	水稻	OsU6	sgRNA	根癌农杆菌	DL	77.8%	bi-allelic	ND	ND	ND	[85]
拟南芥	原生质体	CaMV 35S	At	U6	sgRNA	聚乙二醇	APDS3, AtFLS2	1.1%~5.6%	ND	ND	ND	ND	[33]
(<i>Arabidopsis</i>)	原生质体	CaMV 35S	植物	U6-1	sgRNA	聚乙二醇	AtBON1	20%	ND	ND	ND	ND	[86]
(<i>is thaliana</i>)	原生质体	CaMV 35S	At	U6	sgRNA	聚乙二醇	AtRACK1b, AtRACK1c	2.5%~2.7%	ND	RE-PCR	否	ND	[33]
	植株	CaMV 35S	At	U6	sgRNA	根癌农杆菌	AtPDS3	2.7%	Mono-allelic	ND	ND	48 bp	[33]
	植株	AtUBQ1	人	AtU6	sgRNA	根癌农杆菌	GUS, CHLI1, CHLI2, TT4	38%~89%	ND	ND	ND	230 bp	[78]
	植株	PcUbi4-2	At	AtU6-26	sgRNA	根癌农杆菌	ADH1	42.8%	Heterozygous	ND	是	ND	[87]
	植株	CaMV 35S	衣藻	U6	sgRNA	根癌农杆菌	GFP	37%~95%	ND	ND	是	ND	[88]
	植株	PcUbi4-2	At	U6-26	sgRNA	根癌农杆菌	ADH1, TT4, RTEL1	26.7%	Mono-, Bi-allelic Heterozygous, Chimeras	ND	是	ND	[89]
	植株	CaMV 35S	人	AtU6-26	sgRNA	根癌农杆菌	BRU1, JAZ1, GAI, YFP	26%~84%	Mono-, Bi-allelic Homozygous, Chimeric	RE-PCR 测序	是	ND	[32, 90]
	植株	ICU2-p	人	AtU6-26	sgRNA	根癌农杆菌	FT, SPL4	10%~84.78%	Mono-, Bi-allelic	测序	否	ND	[90]
	植株	ZmUBQ	植物	U3 U6	sgRNA	基因枪	At5g55580, At1g16210	35.6%	Mono-, Bi-allelic Homozygous, Chimeric	ND	是	ND	[82]
	植株	Egg cell-specific promoters	At	U6-26p U6-26t U6-29P	sgRNA	根癌农杆菌	TRY, CPC, ETC2	24.8%	Bi-allelic Homozygous	测序	否	ND	[34]
	植株	Promoter of hsp	At	U6-26	sgRNA	根癌农杆菌	BRU1, PDS3	4.3%~90.5%	ND	ND	是	ND	[91]
	植株	YAO, 35S	At	U6-26	sgRNA	根癌农杆菌	ADH1	3.8%~77.7%	Homozygous, Bi-allelic	ND	是	ND	[92]
	植株	PcUbi4-2	At	U6-26	sgRNA	根癌农杆菌	PYL	13%~93%	Bi-allelic Homozygous	ND	是	ND	[93]
	植株	AtUBQ1 promoter	人	AtU6-26, AtU3b AtU7SL-2	sgRNA	根癌农杆菌	NbPDS3	37.7%~38.5%	ND	ND	ND	ND	[33]
本氏烟 (<i>Nicotiana glauca</i>)	原生质体	CaMV 35S	植物	U6	sgRNA	聚乙二醇	NbPDS	63%	Chimeric	ND	ND	ND	[94]
(<i>benthamiana</i>)	原生质体	CaMV 35S	At	U6	sgRNA	根癌农杆菌	NbPDS3	37.7%~38.5%	Homozygous	ND	ND	ND	[33]
	植株	CaMV 35S	At	U6	sgRNA	根癌农杆菌	NbPDS3	4.8%	Mono-, Bi-allelic	ND	ND	ND	[95]
	植株	CaMV 35S	人	U6	sgRNA	根癌农杆菌	PDS	1.8%~2.4%	ND	RE-PCR	否	ND	[86]
	植株	CaMV 35S	At	U6	sgRNA	VIGE	NbPDS3, NbIsphH	75%~85%	ND	ND	ND	ND	[96]

(续表 2)

物种	材料	启动子	Cas9	启动子	引导 RNA	转化方式	突变基因	突变效率	突变形式	脱靶研究是否 手段 脱靶	是否 删除片 遗传 段大小	删除 效率	参考 文献
烟草 (<i>Nicotiana tabacum</i>)	原生质体	2 XCaMV 35S	烟草	AtU6-26	sgRNA	聚乙二醇	<i>NtPDS</i> <i>NtPDR6</i>	16.2%~20.3%	ND	ND	ND	1.8kb	6%~7.7% [94]
番茄 (<i>Solanum lycopersicum</i>)	植株	2 XCaMV 35S	烟草	AtU6-26	sgRNA	根癌农杆菌	<i>NtPDS</i>	81.8%~87.5%	Mono-, Bi-allelic Heterozygous	RE/PCR 测序	ND	ND	ND [97]
	植株	CaMV 35S	烟草	U6	sgRNA	根癌农杆菌	<i>NtPDR6</i> <i>SHSR</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND [98]
	植株	CaMV 35S	水稻	AtU6	sgRNA	根癌农杆菌	<i>Slago7</i> , <i>solyc08g041770</i> , <i>07g0021170</i> , <i>12g044760</i>	75%~100%	Bi-allelic, Homozygous, Chimeric	ND	是	90~ 140 bp	ND [39]
小麦 (<i>Triticum aestivum</i>)	植株	CaMV 35S	水稻	AtU6	sgRNA	根癌农杆菌	<i>ANT1</i>	75%	ND	T7EI	是	ND	ND [99]
	细胞 悬浮系	CaMV 35S	人	CaMV 35SsgRNA		根癌农杆菌	<i>Inox</i> , <i>pds</i>	18%~22%	ND	测序	否	ND	24~53 bp 2.8% [100]
玉米 (<i>Zea mays</i> L.)	植株	CaMV 35S	水稻	TaU6	sgRNA	根癌农杆菌	<i>TaMLO</i>	28.5%	ND	RE-PCR	否	ND	ND [75]
	原生质体	2 XCaMV 35S	水稻	ZmU3	sgRNA	聚乙二醇	<i>ZmIPK</i>	16.4%~19.1%	ND	ND	ND	ND	ND [40]
高粱 (<i>Sorghum bicolor</i> (L.) Moench)	未成熟胚	ZmUbi	玉米	ZmU6	sgRNA	根癌农杆菌	<i>PSY1</i>	65.8%~86.87%	Heterozygous	ND	是	1~7 bp	ND [101]
	未成熟胚	CaMV 35S	<i>Sp</i>	U3	sgRNA	根癌农杆菌	<i>Zmzb7</i>	19%~31%	Homozygous Heterozygous	PCR-RE	否	ND	ND [102]
	未成熟胚	rice Actin 1	水稻	U6-26	sgRNA	根癌农杆菌	<i>DsRED2</i>	27.78%	ND	ND	ND	ND	ND [77]
马铃薯 (<i>Solanum tuberosum</i>)	植株	CaMV 35S	水稻	StU6P	sgRNA	根癌农杆菌	<i>StIAA2</i>	ND	Mono-, Bi-allelic Heterozygous	测序	是	2~18 bp	ND [38]
	植株	CaMV 35S	人	CaMV 35SsgRNA		根癌农杆菌	<i>CsPDS</i>	3.2%~3.9%	Heterozygous	RE-PCR	否	ND	ND [103]
毛白杨 (<i>Populus tomentosa</i>)	植株	CaMV 35S	At	AtU3b, AtU3d, AtU6-1, AtU6-29	sgRNA	根癌农杆菌	<i>ProPDS</i>	89.3%	Mono-, Bi-allelic Homozygous	ND	ND	116 bp	ND [104]
	植株	CaMV 35S		AtU6	sgRNA	根癌农杆菌	<i>eIF4E</i>	40%	Heterozygous	CRISPR-P program	是	ND	ND [105]

a) ND: 未确定

Cas9 技术在毛白杨中也应用成功, T_0 代转基因植株 *PDS* 基因突变效率高达 89.3%, 当代出现白化表型^[104]. 由此可见, CRISPR/Cas9 技术能广泛而高效地应用于植物基因功能研究和新种质创制中.

3.2 植物基因组多位点定点编辑和 DNA 片段删除

CRISPR/Cas9 技术的强大功能还体现在它同时对多个不同靶位点的操作能力, 由此避免了常规杂交, 直接创造多基因突变体, 极大地节约了研究周期. 例如, 利用一对 sgRNA 分别针对拟南芥 *TT4* 基因的两个不同靶位点, 在 58 个 T_1 转基因植株中各产生了 84% 和 74% 的突变率, 其中 26% 的突变株中发生了两个 sgRNA 靶位点之间 230 bp 的基因组 DNA 片段丢失^[78]. 利用一个携带有 8 个 sgRNA 的表达载体转化水稻, 在 T_0 代转基因植株中发现了 *FTL* 基因家族中的 7 个成员在不同特定位点的移码突变及其伴随的叶片早衰表型^[90]. 多个 sgRNA 的使用并不降低 Cas9 核酸酶对 DNA 的切割效率, 如对于 *PTG9*:Cas9 的 T_0 水稻转基因植株中 5 个 RE 靶位点进行检测, 发现双等位基因突变率在 50% 左右, 单个靶位点之间效率不相上下, 测序结果进一步揭示了 *MPK1*, *MPK2*, *MPK5* 和 *MPK6* 基因中所有 8 个靶位点均发生了 DNA 变化, 包括因两对 sgRNA 同时发生作用而导致在 *MPK1* 和 *MPK5* 基因内部分别产生了 350 和 750 bp 的 DNA 片段缺失^[36]. 成对 sgRNA 的使用在染色体大片段的删除上表现出巨大的潜力, 利用多对针对 *OsCPS4* 与 *CYP99A2* 和 *CYP76M5* 与 *CYP76M6* 靶基因的 sgRNA 组合, 将两个分别 170 kb 和 245 kb 的水稻植保素合成代谢途径相关基因簇成功删除, 并获得转基因植株^[35].

3.3 植物基因组 DNA 片段定点置换

Cas9 核酸酶形成的 DNA 双链断裂, 可以有效地激活拟南芥细胞中同源重组机制, 使非功能的 GFP 或 GUS 蛋白向有功能转变^[88,90]. 同样, 在存在外源 DNA 模板的情况下, CRISPR/Cas9 技术利用植物细胞同源重组机制可以实现对靶基因的改造或外源大片段的插入. 研究人员将编码乙酰乳酸和酶的 *ALS* 基因片段定点置换, 成功地在特定位点改造氨基酸序列, 获得了抗除草剂的水稻、玉米植株和大豆愈伤组织^[16,37,84]. 研究同时发现, 单链或双链 DNA 模板对同源重组均有效^[16]. 利用靶位点两端各 1 kb 的同源

臂, 外源潮霉素磷酸转移酶基因是整个阅读框大片段也被同源重组整合到大豆基因组中, 由此获得的大豆植株具有对潮霉素的抗性^[37]. 另外在番茄中的研究表明, 借助双生病毒复制子元件, 提高植物转化细胞中的模板 DNA 含量, 编辑位点的整合效率被提高了 10 倍^[99].

3.4 植物基因表达在转录水平上的控制

类似于动物系统, 借助 sgRNA 对 dCas9 蛋白的引导作用, 与 dCas9 蛋白融合在一起的各转录调控结构域在植物中能对特定靶基因的表达进行调控. 初步利用 dCas9:EDLL 和 dCas9:TAD 对外源 *GUS* 报告基因与本氏烟内源 *PDS* 基因的激活研究发现, 不同 sgRNA 之间存在协调促进作用; 设计 sgRNA 时, 正反链靶位点和空间上的分布都是需要考虑的因素^[106]. 相同的结论也适合 dCas9:SRDX 介导的对烟草内源 *PDS* 基因表达的阻遏效应^[106].

3.5 突变基因的稳定遗传分离

对数个不同物种多个突变靶位点多世代追踪分析表明, 双等位基因突变(homozygous or biallelic mutations)在第二代开始便稳定地进行传递^[35,91,99,107,108]. 例如, 水稻 *SWEET13* 基因的 T_0 突变体株#7, 启动子区携带有 4 和 11 bp 的缺失, 通过 T_1 代分离群体的 T7EI 和测序分析发现, -4 和 -11 bp 突变稳定, 没有出现新的靶位点突变; 两个突变基因型呈现 1:2:1 的孟德尔分离比; 个别单株已经检测不到 T-DNA 区的存在^[35]. 继续对#7-1(-4 bp)和#7-4(-11 bp)的 T_2 代株系追踪发现, 它们已经完全纯合, 且不存在任何转基因元件^[35]. 而对于单个基因位点的突变体(heterozygous mutation)植株, T_2 或者 T_3 拟南芥群体发生了偏分离甚至出现新的突变类型, 由此说明, 转基因植株携带的 Cas9 核酸酶和 sgRNA, 在后代植株中对野生型靶位点依然行使了功能^[82,90].

与水稻、玉米、小麦等物种使用愈伤组织进行遗传转化不同, 拟南芥的蘸花法转化决定了其卵细胞是 T-DNA 的受体, 胚胎干细胞第一次分裂后才对 T-DNA 进行吸收经常造成转基因的嵌合体现象, 由此获得的 CRISPR/Cas9 造成的基因靶位点修饰在遗传分离上比较复杂, 在后面多世代中会出现新的突变体类型并发生分离^[90,108]. 最近研究发现, 利用两

个串联的来自于 *ECL1.1* 和 *ECL2* 基因的卵细胞特异启动子, 结合增强子和 *rbcs E9* 终止子来调控 *Cas9* 基因在拟南芥卵细胞和单细胞阶段胚胎中的表达, 可有效地避免嵌合体的发生^[97]. 利用组织特异性表达的启动子, 像 *SPL-p*, *YAO-p*, *ICU2p* 等驱动 *Cas9* 也能达到同样的效果^[91-94,109,110].

4 CRISPR/Cas9 技术在植物新种质创制中的问题和对策

4.1 CRISPR/Cas9 技术引起的脱靶效应

CRISPR/Cas9 技术的高效性使研究人员在发展这一技术的开始便对它的脱靶效应有所关注. 研究表明, 带有错配位点的 sgRNA 仍能引导 *Cas9* 核酸酶对靶位点进行切割, 结合全基因组重测序、ChIP-seq 或潜在靶位点的序列分析发现, CRISPR/Cas9 技术在人类、哺乳动物细胞等系统中引起了严重的脱靶效应^[47,111-115]. 追根溯源, 这一切都是由 sgRNA 与靶位点 DNA 配对时存在种子序列, 以及不严谨性而造成的^[49]. 然而, CRISPR/Cas9 技术的脱靶现象似乎因物种和位点而异. 对所有 *SWEET13* 基因突变体独立单株中的 6 个潜在靶位点进行了跟踪, 序列分析显示它们均为野生型^[35]. 对拟南芥和水稻的转基因突变植株进行大规模全基因组重测序, 研究人员并没有找到明显的非靶位点突变, 脱靶现象仅低概率地存在于一个位点上^[90,116]. 但也有报道显示, 利用 sgRNA 的错配, *CDKA2*, *CDKB1*, *CDKB2* 的多基因敲除突变体成功获得^[81].

为了降低 CRISPR/Cas9 技术引起的脱靶效应, 研究人员改造出了 *Cas9* 切口酶并在拟南芥上应用成功, 但与 *Cas9* 核酸酶相比, 其效率显著降低, 约 740 倍^[87,108]. sgRNA 的长度减至 17 bp 或者适当的 GC 含量, 以及改良版本的 eSpCas9 和 SpCas9-HF, 在动物系统中被认为可提高 CRISPR/Cas9 技术基因打靶的严谨性^[59,60,117-119], 但在植物中还有待进一步证实. 然而, CRISPR/Cas9 技术在植物上引起的脱靶效应并不是一个关键问题. 因为通过严谨的 sgRNA 设计, 以及辅助的基因互补实验, 研究人员可以很好地进行基因的功能验证; 而对于植物新种质的创制, 多个独立突变单株的多代回交, 结合基因组重测序, 便能很好地解决这一问题.

4.2 CRISPR/Cas9 技术的关键点

如表 1 所示, CRISPR/Cas9 技术因其使用门槛低、高效率、通用性强已经在植物的应用上表现出强大的潜力, 预计在不久的将来会有愈来愈多的报道出现在更多的物种上. 综合现有的数据, 基本发现 *Cas9* 基因的表达水平和 sgRNA 的转录调控无非是基因打靶载体的两大重要因素. 来自于化脓链球菌的 *spCas9* 基因目前在各物种中使用最为广泛, 其野生型也能在不少物种中引起靶位点 DNA 编辑事件. 然而, 密码子优化后的 *Cas9* 基因使用效果更佳. 目前已基本发现, 按拟南芥密码子优化的 *Cas9* 基因可以在其他的双子叶植物上使用, 而按水稻或玉米优化的 *Cas9* 基因也可以拓展到其他的单子叶植物上, 这一切都是基于靶位点 DNA 编辑水平的高低. 与 ZFN 和 TALEN 类似, *Cas9* 蛋白对细菌和植物细胞均有一定的毒性, 即使在使用带内含子序列的玉米 ubiquitin 启动子时, 对大肠杆菌的毒性依然明显. 现在还不清楚其他来源的 *Cas9* 基因, 如 *nmCas9* 或 *stCas9* 等蛋白是否存在类似的问题. 总之, 对于 CRISPR/Cas9 基因的应用, 认为 CRISPR 的效率和特定 *Cas9* 基因的表达量之间存在着一条相关曲线.

植物上 sgRNA 的转录基本由 RNA 聚合酶 III 型 U6 或 U3 启动子驱动. 类似于 *Cas9*, 来自于拟南芥和水稻的 U6 启动子分别适用于单子叶和双子叶植物. 打靶载体中 sgRNA 的数目决定了靶位点的多少. 本研究发现, 由于其高度的重复性, sgRNA 达到 4 个时, 细菌和植物体内的同源重组机制会一定程度的破坏载体元件. 这时使用不同的序列差异较大的 III 型启动子尤为必要. 最新报道也显示, 利用细胞内 tRNA 的后熟过程, 单个 III 型启动子驱动的一条由多个 tRNA 和 sgRNA 相间排列的序列, 能够生成 8 条有功能活性的 sgRNA^[36], 这种方案也不失为一个好的策略.

sgRNA 设计的严谨性也是 CRISPR/Cas9 技术的关键点, 目前已有多个在线网站提供植物 sgRNA 的设计服务^[120-122]. 通常来说, 对于 *spCas9* 蛋白, 设计其识别的靶位点序列为 GN₁₉NGG, 35%~70% 的 GC 含量、无复杂的二级结构, 以及避免染色体上可能的表观修饰位点.

5 展望

随着科技的高速发展,人类已经进入大数据时代,海量的各物种信息促使“拟南芥 2010”和“水稻 2020”等计划相应而生.对植物基因组相关遗传信息进行功能注释是人类利用自然资源的起点,而将已获得的宝贵基因资源应用于实际生产中是农业生命科学研究的最终目的,植物基因组定点编辑技术,尤其是 CRISPR/Cas9 系统因为其简单易行、通用性和高效性成为了贯穿这一过程的利器.

CRISPR/Cas9 技术已经在小鼠、人类等生物体细胞全基因组范围基因敲除筛选中展现了强大的性能,相对于植物中所运用的 T-DNA,EMS,射线等化学、物理或生物诱变物的使用局限性,建立全基因组范围的 CRISPR/Cas9 基因敲除群体在水稻、玉米、烟草等作物上不失为不错的选择.尤其是以种传病毒为介质时,简单的农杆菌注射接种简单易行,使研究周期明显缩短.另外,同源重组造成的对内源基因的原位标签,可以在研究中真实呈现靶基因的生理

功能.由此可见,CRISPR/Cas9 技术将会极大地促进植物基因资源的发掘.

利用 ZFN 和 TALEN 人工核酸酶定点修饰特定基因位点,研究人员已经成功地创建出抗白叶枯病水稻、抗白粉病小麦、抗除草剂玉米、加工品质改善的马铃薯等人工植物新种质,靶基因位点的微小差异以及转基因骨架 T-DNA 的缺失使之类似于常规手段诱变产生的种质资源,因此被定义为 GEC (genome-edited crops)植物,科研界对其管理框架目前已被提出,相信不久的将来可以被允许进行田间释放和生产应用^[16,28,123~125].另外,直接 Cas9 蛋白和 RNA,结合利用原生质体再生体系,这种不通过 DNA 遗传操作的技术也给研究者们提供了一个崭新的思路^[126].新一代的 CRISPR/Cas9 技术在这一方面已如箭在弦上,充分利用各物种的安全港区域(safe harbor locus),CRISPR/Cas9 介导的新一代转基因技术将极大扩展分子育种、分子聚合育种的范畴,缓解人类农业生产和食品安全危机.

参考文献

- 1 The World Bank Group. Food Security. Washington DC: The word Bank, 2015
- 2 Zuo J, Li J. Molecular dissection of complex agronomic traits of rice: a team effort by Chinese scientists in recent years. *Nat Sci Rev*, 2014, 1: 253–276
- 3 Kondou Y, Higuchi M, Matsui M. High-throughput characterization of plant gene functions by using gain-of-function technology. *Annu Rev Plant Biol*, 2010, 61: 373–393
- 4 Jiang S Y, Ramachandran S. Natural and artificial mutants as valuable resources for functional genomics and molecular breeding. *Int J Biol Sci*, 2010, 6: 228–251
- 5 Parry M A J, Madgwick P J, Bayon C, et al. Mutation discovery for crop improvement. *J Exp Bot*, 2009, 60: 2817–2825
- 6 Lloyd J, Meinke D. A comprehensive dataset of genes with a loss-of-function mutant phenotype in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 2012, 158: 1115–1129
- 7 Wang N, Long T, Yao W, et al. Mutant resources for the functional analysis of the rice genome. *Mol Plant*, 2013, 6: 596–604
- 8 Tiwari M, Sharma D, Trivedi P K. Artificial microRNA mediated gene silencing in plants: progress and perspectives. *Plant Mol Biol*, 2014, 86: 1–18
- 9 Kamthan A, Chaudhuri A, Kamthan M, et al. Small RNAs in plants: recent development and application for crop improvement. *Front Plant Sci*, 2015, 6: 208
- 10 Lacomme C. Strategies for altering plant traits using virus-induced gene silencing technologies. In: Mysore K S, Senthil-Kumar M, eds. *Plant Gene Silencing. Methods in Molecular Biology*. New York: Springer, 2015, 1287: 25–41
- 11 Voytas D F. Plant genome engineering with sequence-specific nucleases. *Annu Rev Plant Biol*, 2013, 64: 327–350
- 12 Araki M, Ishii T. Towards social acceptance of plant breeding by genome editing. *Trends Plant Sci*, 2015, 20: 145–149
- 13 Hsu P D, Lander E S, Zhang F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell*, 2014, 157: 1262–1278
- 14 Nagamangala Kanchiswamy C, Sargent D J, Velasco R, et al. Looking forward to genetically edited fruit crops. *Trends Biotechnol*, 2015, 33: 62–64
- 15 van Erp P B, Bloomer G, Wilkinson R, et al. The history and market impact of CRISPR RNA-guided nucleases. *Curr Opin Virol*, 2015, 12: 85–90

- 16 Wang Y, Cheng X, Shan Q, et al. Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew. *Nat Biotechnol*, 2014, 32: 947–951
- 17 Chapman J R, Taylor M R G, Boulton S J. Playing the end game: DNA double-strand break repair pathway choice. *Mol Cell*, 2012, 47: 497–510
- 18 Lee K Y, Lund P, Lowe K, et al. Homologous recombination in plant cells after agrobacterium-mediated transformation. *Plant Cell*, 1990, 2: 415–425
- 19 Swoboda P, Gal S, Hohn B, et al. Intrachromosomal homologous recombination in whole plants. *EMBO J*, 1994, 13: 484–489
- 20 Ayar A, Wehrkamp-Richter S, Laffaire J B, et al. Gene targeting in maize by somatic ectopic recombination. *Plant Biotechnol J*, 2013, 11: 305–314
- 21 Lloyd A H, Wang D, Timmis J N. Single molecule PCR reveals similar patterns of non-homologous DSB repair in tobacco and *Arabidopsis*. *PLoS One*, 2012, 7: e32255
- 22 Gao H R, Smith J, Yang M Z, et al. Heritable targeted mutagenesis in maize using a designed endonuclease. *Plant J*, 2010, 61: 176–187
- 23 Zhang F, Maeder M L, Unger-Wallace E, et al. High frequency targeted mutagenesis in *Arabidopsis thaliana* using zinc finger nucleases. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107: 12028–12033
- 24 Petolino J F. Genome editing in plants via designed zinc finger nucleases. *In Vitro Cell Dev-Pl*, 2015, 51: 1–8
- 25 Carroll D. Genome engineering with zinc-finger nucleases. *Genetics*, 2011, 188: 773–782
- 26 Boch J, Scholze H, Schornack S, et al. Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science*, 2009, 326: 1509–1512
- 27 Li T, Huang S, Zhao X F, et al. Modularly assembled designer TAL effector nucleases for targeted gene knockout and gene replacement in eukaryotes. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39: 6315–6325
- 28 Li T, Liu B, Spalding M H, et al. High-efficiency TALEN-based gene editing produces disease-resistant rice. *Nat Biotechnol*, 2012, 30: 390–392
- 29 Chen K L, Gao C X. Talens: customizable molecular DNA scissors for genome engineering of plants. *J Genet Genomics*, 2013, 40: 271–279
- 30 Cong L, Ran F A, Cox D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 2013, 339: 819–823
- 31 Mali P, Yang L H, Esvelt K M, et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*, 2013, 339: 823–826
- 32 Feng Z Y, Zhang B T, Ding W N, et al. Efficient genome editing in plants using a CRISPR/Cas system. *Cell Res*, 2013, 23: 1229–1232
- 33 Li J F, Norville J E, Aach J, et al. Multiplex and homologous recombination-mediated genome editing in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana* using guide RNA and Cas9. *Nat Biotechnol*, 2013, 31: 688–691
- 34 Nekrasov V, Staskawicz B, Weigel D, et al. Targeted mutagenesis in the model plant *Nicotiana benthamiana* using Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nat Biotechnol*, 2013, 31: 691–693
- 35 Zhou H B, Liu B, Weeks D P, et al. Large chromosomal deletions and heritable small genetic changes induced by CRISPR/Cas9 in rice. *Nucleic Acids Res*, 2014, 42: 10903–10914
- 36 Xie K B, Minkenberg B, Yang Y N. Boosting CRISPR/Cas9 multiplex editing capability with the endogenous tRNA-processing system. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112: 3570–3575
- 37 Li Z, Liu Z B, Xing A, et al. Cas9-guide RNA directed genome editing in soybean. *Plant Physiol*, 2015, 169: 960–970
- 38 Wang S, Zhang S, Wang W, et al. Efficient targeted mutagenesis in potato by the CRISPR/Cas9 system. *Plant Cell Rep*, 2015, 34: 1473–1476
- 39 Brooks C, Nekrasov V, Lippman Z B, et al. Efficient gene editing in tomato in the first generation using the clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated9 system. *Plant Physiol*, 2014, 166: 1292–1297
- 40 Liang Z, Zhang K, Chen K L, et al. Targeted mutagenesis in *Zea mays* using talens and the CRISPR/Cas system. *J Genet Genomics*, 2014, 41: 63–68
- 41 Lawrenson T, Shorinola O, Stacey N, et al. Induction of targeted, heritable mutations in barley and *Brassica oleracea* using RNA-guided Cas9 nuclease. *Genome Biol*, 2015, 16: 258
- 42 Makarova K S, Wolf Y I, Koonin E V. Comparative genomics of defense systems in archaea and bacteria. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41: 4360–4377
- 43 Makarova K S, Haft D H, Barrangou R, et al. Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol*, 2011, 9: 467–477
- 44 Deltcheva E, Chylinski K, Sharma C M, et al. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature*,

- 2011, 471: 602–607
- 45 Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 2012, 337: 816–821
- 46 Esvelt K M, Mali P, Braff J L, et al. Orthogonal Cas9 proteins for RNA-guided gene regulation and editing. *Nat Methods*, 2013, 10: 1116–1121
- 47 Hsu P D, Scott D A, Weinstein J A, et al. DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nat Biotechnol*, 2013, 31: 827–832
- 48 Kleinstiver B P, Prew M S, Tsai S Q, et al. Engineered CRISPR-Cas9 nucleases with altered PAM specificities. *Nature*, 2015, 523: 481–485
- 49 Kleinstiver B P, Prew M S, Tsai S Q, et al. Broadening the targeting range of *Staphylococcus aureus* CRISPR-Cas9 by modifying PAM recognition. *Nat Biotechnol*, 2015, 33: 1293–1298
- 50 Jinek M, Jiang F, Taylor D W, et al. Structures of Cas9 endonucleases reveal RNA-mediated conformational activation. *Science*, 2014, 343: 1247997
- 51 Nishimasu H, Ran F A, Hsu P D, et al. Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA. *Cell*, 2014, 156: 935–949
- 52 Sternberg S H, Redding S, Jinek M, et al. DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9. *Nature*, 2014, 507: 62–67
- 53 Gasiunas G, Barrangou R, Horvath P, et al. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109: E2579–E2586
- 54 Jiang W Y, Bikard D, Cox D, et al. RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems. *Nat Biotechnol*, 2013, 31: 233–239
- 55 Dahlman J E, Abudayyeh O O, Joung J, et al. Orthogonal gene knockout and activation with a catalytically active Cas9 nuclease. *Nat Biotechnol*, 2015, 33: 1159–1161
- 56 Ran F A, Hsu P D, Lin C Y, et al. Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell*, 2013, 154: 1380–1389
- 57 Wyvekens N, Topkar V V, Khayter C, et al. Dimeric CRISPR RNA-guided FokI-dCas9 nucleases directed by truncated gRNAs for highly specific genome editing. *Hum Gene Ther*, 2015, 26: 425–431
- 58 Tsai S Q, Wyvekens N, Khayter C, et al. Dimeric CRISPR RNA-guided FokI nucleases for highly specific genome editing. *Nat Biotechnol*, 2014, 32: 569–576
- 59 Slaymaker I M, Gao L, Zetsche B, et al. Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity. *Science*, 2016, 351: 84–88
- 60 Kleinstiver B P, Pattanayak V, Prew M S, et al. High-fidelity CRISPR-Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects. *Nature*, 2016, 529: 490–495
- 61 Dang Y, Jia G, Choi J, et al. Optimizing sgRNA structure to improve CRISPR-Cas9 knockout efficiency. *Genome Biol*, 2015, 16: 280
- 62 Larson M H, Gilbert L A, Wang X, et al. CRISPR interference (CRISPRi) for sequence-specific control of gene expression. *Nat Protoc*, 2013, 8: 2180–2196
- 63 Qi L S, Larson M H, Gilbert L A, et al. Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. *Cell*, 2013, 152: 1173–1183
- 64 Gilbert L A, Larson M H, Morsut L, et al. CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes. *Cell*, 2013, 154: 442–451
- 65 Bikard D, Jiang W Y, Samai P, et al. Programmable repression and activation of bacterial gene expression using an engineered CRISPR-Cas system. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41: 7429–7437
- 66 Konermann S, Brigham M D, Trevino A E, et al. Optical control of mammalian endogenous transcription and epigenetic states. *Nature*, 2013, 500: 472–476
- 67 Hu J B, Lei Y, Wong W K, et al. Direct activation of human and mouse *Oct4* genes using engineered TALE and Cas9 transcription factors. *Nucleic Acids Res*, 2014, 42: 4375–4390
- 68 Cheng A W, Wang H Y, Yang H, et al. Multiplexed activation of endogenous genes by CRISPR-on, an RNA-guided transcriptional activator system. *Cell Res*, 2013, 23: 1163–1171
- 69 Gilbert L A, Horlbeck M A, Adamson B, et al. Genome-scale CRISPR-mediated control of gene repression and activation. *Cell*, 2014, 159: 647–661
- 70 Konermann S, Brigham M D, Trevino A E, et al. Genome-scale transcriptional activation by an engineered CRISPR-Cas9 complex. *Nature*, 2015, 517: 583–588
- 71 Zalatan J G, Lee M E, Almeida R, et al. Engineering complex synthetic transcriptional programs with CRISPR RNA scaffolds. *Cell*,

- 2015, 160: 339–350
- 72 Hilton I B, D'Ippolito A M, Vockley C M, et al. Epigenome editing by a CRISPR-Cas9-based acetyltransferase activates genes from promoters and enhancers. *Nat Biotechnol*, 2015, 33: 510–517
 - 73 Jacobs T B, LaFayette P R, Schmitz R J, et al. Targeted genome modifications in soybean with CRISPR/Cas9. *BMC Biotechnol*, 2015, 15: 16
 - 74 Sun X J, Hu Z, Chen R, et al. Targeted mutagenesis in soybean using the CRISPR-Cas9 system. *Sci Rep*, 2015, 5: 10342
 - 75 Shan Q W, Wang Y P, Li J, et al. Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system. *Nat Biotechnol*, 2013, 31: 686–688
 - 76 Xie K, Yang Y. RNA-guided genome editing in plants using a CRISPR-Cas system. *Mol Plant*, 2013, 6: 1975–1983
 - 77 Jiang W, Zhou H, Bi H, et al. Demonstration of CRISPR/Cas9/sgRNA-mediated targeted gene modification in *Arabidopsis*, tobacco, sorghum and rice. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41: e188
 - 78 Mao Y, Zhang H, Xu N, et al. Application of the CRISPR-Cas system for efficient genome engineering in plants. *Mol Plant*, 2013, 6: 2008–2011
 - 79 Miao J, Guo D S, Zhang J Z, et al. Targeted mutagenesis in rice using CRISPR-Cas system. *Cell Res*, 2013, 23: 1233–1236
 - 80 Mikami M, Toki S, Endo M. Parameters affecting frequency of CRISPR/Cas9 mediated targeted mutagenesis in rice. *Plant Cell Rep*, 2015, 34: 1807–1815
 - 81 Endo M, Mikami M, Toki S. Multigene knockout utilizing off-target mutations of the CRISPR/Cas9 system in rice. *Plant Cell Physiol*, 2015, 56: 41–47
 - 82 Ma X, Zhang Q, Zhu Q, et al. A robust CRISPR/Cas9 system for convenient, high-efficiency multiplex genome editing in monocot and dicot plants. *Mol Plant*, 2015, 8: 1274–1284
 - 83 Xu R F, Li H, Qin R Y, et al. Gene targeting using the *Agrobacterium tumefaciens*-mediated CRISPR-Cas system in rice. *Rice*, 2014, 7: 5
 - 84 Sun Y, Zhang X, Wu C, et al. Engineering herbicide resistant rice plants through CRISPR/Cas9-mediated homologous recombination of the acetolactate synthase. *Mol Plant*, 2016, 9: 628–631
 - 85 Ikeda T, Tanaka W, Mikami M, et al. Generation of artificial drooping leaf mutants by CRISPR-Cas9 technology in rice. *Genes Genet Syst*, 2015, 90: 231–235
 - 86 Li J F, Zhang D, Sheen J. Cas9-based genome editing in *Arabidopsis* and tobacco. *Method Enzymol*, 2014, 546: 459–472
 - 87 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: 1139–1150
 - 88 Jiang W, Yang B, Weeks D P. Efficient CRISPR/Cas9-mediated gene editing in *Arabidopsis thaliana* and inheritance of modified genes in the T2 and T3 generations. *PLoS One*, 2014, 9: e99225
 - 89 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: 348–359
 - 90 Feng Z, Mao Y, Xu N, et al. Multigeneration analysis reveals the inheritance, specificity, and patterns of CRISPR/Cas-induced gene modifications in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111: 4632–4637
 - 91 Yan L, Wei S, Wu Y, et al. High-efficiency genome editing in *Arabidopsis* using YAO promoter-driven CRISPR/Cas9 system. *Mol Plant*, 2015, 8: 1820–1823
 - 92 Steinert J, Schiml S, Fauser F, et al. Highly efficient heritable plant genome engineering using Cas9 orthologues from *Streptococcus thermophilus* and *Staphylococcus aureus*. *Plant J*, 2015, 84: 1295–1305
 - 93 Zhang Z J, Mao Y F, Ha S, et al. A multiplex CRISPR/Cas9 platform for fast and efficient editing of multiple genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell Rep*, 2015, doi: 10.1007/s00299-015-1900-z
 - 94 Gao J P, Wang G H, Ma S Y, et al. CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis in *Nicotiana tabacum*. *Plant Mol Biol*, 2015, 87: 99–110
 - 95 Ali Z, Abul-faraj A, Li L X, et al. Efficient virus-mediated genome editing in plants using the CRISPR/Cas9 system. *Mol Plant*, 2015, 8: 1288–1291
 - 96 Yin K Q, Han T, Liu G, et al. A geminivirus-based guide RNA delivery system for CRISPR/Cas9 mediated plant genome editing. *Sci Rep*, 2015, 5: 14926
 - 97 Wang Z P, Xing H L, Dong L, et al. Egg cell-specific promoter-controlled CRISPR/Cas9 efficiently generates homozygous mutants for multiple target genes in *Arabidopsis* in a single generation. *Genome Biol*, 2015, 16: 144
 - 98 Ron M, Kajala K, Pauluzzi G, et al. Hairy root transformation using *Agrobacterium rhizogenes* as a tool for exploring cell type-specific

- gene expression and function using tomato as a model. *Plant Physiol*, 2014, 166: 455–469
- 99 Cermak T, Baltes N J, Cegan R, et al. High-frequency, precise modification of the tomato genome. *Genome Biol*, 2015, 16: 232
- 100 Huang S, Weigel D, Beachy R N, et al. A proposed regulatory framework for genome-edited crops. *Nat Genet*, 2016, 48: 109–111
- 101 Zhu J J, Song N, Sun S L, et al. Efficiency and inheritance of targeted mutagenesis in maize using CRISPR-Cas9. *J Genet Genomics*, 2016, 43: 25–36
- 102 Feng C, Jing Yuan J, Wang R, et al. Efficient targeted genome modification in maize using CRISPR/Cas9 system. *J Genet Genomics*, 2016, 43: 37–43
- 103 Jia H G, Wang N. Targeted genome editing of sweet orange using Cas9/sgRNA. *PLoS One*, 2014, 9: e93806
- 104 Fan D, Liu T T, Li C F, et al. Efficient CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis in populus in the first generation. *Sci Rep*, 2015, 5: 12217
- 105 Chandrasekaran J, Brumin M, Wolf D, et al. Development of broad virus resistance in non-transgenic cucumber using CRISPR/Cas9 technology. *Mol Plant Pathol*, 2016, doi: 10.1111/mpp.12375
- 106 Piatek A, Ali Z, Baazim H, et al. RNA-guided transcriptional regulation in planta via synthetic dCas9-based transcription factors. *Plant Biotechnol J*, 2015, 13: 578–589
- 107 Ma X L, Zhang Q Y, Zhu Q L, et al. A robust CRISPR/Cas9 system for convenient, high-efficiency multiplex genome editing in monocot and dicot plants. *Mol Plant*, 2015, 8: 1274–1284
- 108 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: 348–359
- 109 Hyun Y, Kim J, Cho S, et al. Site-directed mutagenesis in *Arabidopsis thaliana* using dividing tissue-targeted rgen of the CRISPR/Cas system to generate heritable null alleles. *Planta*, 2015, 241: 271–284
- 110 Mao Y, Zhang Z, Feng Z, et al. Development of germ-line-specific CRISPR-Cas9 systems to improve the production of heritable gene modifications in *Arabidopsis*. *Plant Biotechnol J*, 2016, 14: 519–532
- 111 Fu Y F, Foden J A, Khayter C, et al. High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. *Nat Biotechnol*, 2013, 31: 822–826
- 112 Carroll D. Staying on target with CRISPR-Cas. *Nat Biotechnol*, 2013, 31: 807–809
- 113 Lin Y N, Cradick T J, Brown M T, et al. CRISPR/Cas9 systems have off-target activity with insertions or deletions between target DNA and guide RNA sequences. *Mol Ther*, 2014, 22: S94–S95
- 114 O’Geen H, Henry I M, Bhakta M S, et al. A genome-wide analysis of Cas9 binding specificity using chip-seq and targeted sequence capture. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43: 3389–3404
- 115 Tsai S Q, Zheng Z, Nguyen N T, et al. Guide-seq enables genome-wide profiling of off-target cleavage by CRISPR-Cas nucleases. *Nat Biotechnol*, 2015, 33: 187–197
- 116 Zhang H, Zhang J S, Wei P L, et al. The CRISPR/Cas9 system produces specific and homozygous targeted gene editing in rice in one generation. *Plant Biotechnol J*, 2014, 12: 797–807
- 117 Ren X J, Yang Z H, Xu J, et al. Enhanced specificity and efficiency of the CRISPR/Cas9 system with optimized sgRNA parameters in *Drosophila*. *Cell Rep*, 2014, 9: 1151–1162
- 118 Fu Y F, Sander J D, Reyon D, et al. Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs. *Nat Biotechnol*, 2014, 32: 279–284
- 119 Doench J G, Hartenian E, Graham D B, et al. Rational design of highly active sgRNAs for CRISPR-Cas9-mediated gene inactivation. *Nat Biotechnol*, 2014, 32: 1262–1267
- 120 Yan M, Zhou S R, Xue H W. CRISPR primer designer: design primers for knockout and chromosome imaging CRISPR-Cas system. *J Integr Plant Biol*, 2015, 57: 613–617
- 121 Lei Y, Lu L, Liu H Y, et al. CRISPR-P: a web tool for synthetic single-guide RNA design of CRISPR-system in plants. *Mol Plant*, 2014, 7: 1494–1496
- 122 MacPherson C R, Scherf A. Flexible guide-RNA design for CRISPR applications using protospacer workbench. *Nat Biotechnol*, 2015, 33: 805–806
- 123 Shukla V K, Doyon Y, Miller J C, et al. Precise genome modification in the crop species *Zea mays* using zinc-finger nucleases. *Nature*, 2009, 459: 437–441
- 124 Clasen B M, Stoddard T J, Luo S, et al. Improving cold storage and processing traits in potato through targeted gene knockout. *Plant Biotechnol J*, 2015, 14: 169–176

- 125 Huang S, Weigel D, Beachy R N, et al. A proposed regulatory framework for genome-edited crops. *Nat Genet*, 2016, 48: 109–111
- 126 Woo J W, Kim J, Kwon S I, et al. DNA-free genome editing in plants with preassembled CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins. *Nat Biotechnol*, 2015, 33: 1162–1164

Overviews and Applications of the CRISPR/Cas9 System in Plant Functional Genomics and Creation of New Plant Germplasm

YAN Fang & ZHOU HuanBin

Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100094, China

The clustered, regularly interspaced, short palindromic repeats (CRISPR)/CRISPR associated proteins (Cas9) system is a recently developed groundbreaking technology which enables the production of highly specific genome modification with high efficiency and specificity. The CRISPR/Cas9 system is derived from the adaptive immunity system in bacteria and archaeas, it uses Cas9, a RNA-guided nuclease, to create double-strand breaks in the genomic loci of interest. The repair of breaks through either non-homologous end joining or homonologous recombination leads to insertions, deletions, replacements or larger chromosomal rearrangements at the desired sites of genome. The CRISPR/Cas9 system is facile, highly efficient and widely used in diverse cells and organisms, including the species that have traditionally been a challenge in their genetic manipulations. In this review, we provide an overview of recent advances with the CRISPR/Cas9 system, highlight their practicalities on a variety of plants, and discuss the key points and prospective application in plant functional studies as well as crop improvement in the near future.

targeted genome editing, artificial nuclease, CRISPR/Cas9, gene mutation, germplasm

doi: 10.1360/N052016-00158