

## CRISPR/Cas 系统的分类及研究现状

高维崧, 窦金萍, 韦双, 刘兴健, 张志芳, 李轶女\*

中国农业科学院生物技术研究所, 北京 100081

**摘要:** CRISPR 技术作为一种新型的基因编辑技术, 被广泛应用于微生物、动物和植物领域。对 CRISPR/Cas 系统的起源、分类特点等进行了阐述, 重点梳理了 CRISPR/Cas 系统分类的发展历程, 并根据最新分类方法, 介绍了不同类型的 CRISPR/Cas 系统的作用机制、内部不同蛋白的作用特点及应用与发展, 以期探寻更多的 CRISPR/Cas 系统, 扩大该系统的应用领域。

**关键词:** CRISPR/Cas 系统; 基因编辑; 分类

**DOI:** 10.19586/j.2095-2341.2021.0198

中图分类号: Q78 文献标志码: A

## Classification and Research Status of CRISPR/Cas Systems

GAO Weisong, DOU Jinping, WEI Shuang, LIU Xingjian, ZHANG Zhifang, LI Yinyu\*

*Biotechnology Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China*

**Abstract:** Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) is a rapid developed gene editing technology which is widely used in microorganisms, animals and plants. In this article, the origin and classification characteristics of CRISPR/Cas systems was explained, and we focused on the development process of CRISPR/Cas system classification, and introduced the action mechanism of different types of CRISPR/Cas system, the action characteristics, application and development of different internal proteins according to the latest classification methods. This paper aimed to explore more CRISPR/Cas systems and expand the application of this system.

**Key words:** CRISPR/Cas systems; gene editing; classification

1953年 Watson 和 Crick 发现了 DNA 的双螺旋结构, 标志着人们对基因的研究进入一个新的阶段, 围绕基因开展的研究逐年增加, 相关研究技术也随之迅猛发展, 其中基因编辑技术从早期的同源重组技术, 已发展为核酸酶基因编辑技术、基于人工核酸酶的锌指核酸酶技术 (zinc finger nucleases, ZFN) 和类转录激活因子效应的核酸酶技术 (transcription activator-like effectors nucleases, TALEN), 近年来, 规律成簇的间隔短回文重复序列 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR) 快速发展, 成为新一代的基因编辑技术。CRISPR 技术因具有操作简单、编辑效

率高等优势, 已广泛运用于基因育种、新药研发、疾病治疗等领域, 被称为第三代基因编辑技术。基于 CRISPR 技术的不同用途, 更多种类的 CRISPR/Cas (CRISPR-associated) 系统逐渐被发现和完善。本文旨在对 CRISPR/Cas 系统的起源和发展进行综述, 并重点介绍 CRISPR 技术分类的发展及各类型的特点, 以期借助已知的系统发现新的 Cas 蛋白, 并发掘 CRISPR/Cas 系统更多的应用。

### 1 CRISPR/Cas 系统的起源和发展

1987 年日本大阪大学 Ishino 等<sup>[1]</sup>首次发现

收稿日期: 2021-12-23; 接受日期: 2022-01-27

基金项目: 国家自然科学基金项目 (32072796; 32002236); 宁夏回族自治区重点研发计划项目 (2020BFG02017)。

联系方式: 高维崧 E-mail: caasgaows@163.com; \* 通信作者 李轶女 E-mail: liyiny@caas.cn

CRISPR/Cas系统具有短重复序列(short sequence repeats, SSR)的特点;2000年Mojica等<sup>[2]</sup>发现这些SSR存在于许多细菌和古细菌中,并将其命名为规则的短间隔重复序列(short regularly spaced repeats, SRSRs);2001年,She等<sup>[3]</sup>进一步命名为大簇的20 nt串联重复序列(large cluster of 20-nt tandem repeat sequences, LCTR);2002年,Jansen等<sup>[4]</sup>先后将这段序列命名为间隔的正向重复序列(spacers interspaced direct repeats, SPIDR)和CRISPR<sup>[5]</sup>,同时将与其功能可能相关的4个基因(*Cas1*、*Cas2*、*Cas3*、*Cas4*)命名为CRISPR-associated (*Cas*)基因,且这种命名方式沿用至今,在后续的研究中,发现相关的*Cas*基因也按照数字规律命名。

2012年Jinek等<sup>[6]</sup>研究发现,利用RNA引导Cas9蛋白的系统可以导致目标基因的DNA双链断裂,即理论上通过改变RNA的序列可以实现对任何基因进行编辑,并预言CRISPR/Cas系统作为基因编辑技术具有巨大潜力。2013年,Cong等<sup>[7]</sup>对化脓性链球菌的CRISPR/Cas9系统进行了密码子优化,并加入了核定位信号来促进系统在哺乳动物细胞核中的表达,最终成功对哺乳动物细胞基因进行了编辑,正式开启了CRISPR/Cas系统在生命科学领域的运用;同时该实验室还开发出了配套的sgRNA设计程序和CRISPR/Cas9系统的慢病毒载体,以提高该方法的编辑效率。经过多年的发展与改进,使用CRISPR载体对目标基因进行基因编辑已经变得十分简便,尤其是其在基因治疗研究领域的应用,为从根源上治愈一些目前传统医疗手段难以治疗的遗传性疾病带来新的希望<sup>[8]</sup>。

## 2 CRISPR/Cas系统分类的变更历史

2005年,Haft等<sup>[10]</sup>基于40多种细菌和真菌的分析结果,结合*Cas1*蛋白进化树的拓扑学分析以及*Cas*基因的操纵子序列信息等方面的差异,首次对CRISPR/Cas系统进行了分类,并将其分别归于8个基因组中,4个核心蛋白的名字沿用了2002年Jansen等<sup>[5]</sup>的命名方式,而8个基因组中编码蛋白的基因命名由细菌来源和数字组成,如*cse1* (CRISPR system of *E. coli* gene number 1)<sup>[9]</sup>,这种分类方法虽然简单,但对于关系较远又有一定联

系的蛋白分类命名并不科学。

2011年,美国国立生物信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)提出了一种以*Cas1*、*Cas2*基因为系统核心的全新分类方式。Makarova等<sup>[11]</sup>基于系统发育、基因组和结构分析的证据将现有的CRISPR/Cas系统分为I型、II型、III型,大多数的CRISPR/Cas系统可归于3个类型之中,其余暂时无法分类的命名为U型,并将之前发现的部分基因进行了重新分类命名,如将I-C中的*cmx5*重命名为*Cas5*,*cmx6*重命名为*Cas6*,在亚型的基础上进一步引用字母来避免一些同源基因无法被分类,如*cse3*和*csy4*被重命名为*Cas6e*和*Cas6f*。

2015年,Makarova等<sup>[12]</sup>对所有已知的93个CRISPR/Cas系统的蛋白家族进行分析并建立了一个包括394个位置特异性计分矩阵(position-specific scoring matrices, PSSM)的书库,其中229个PSSMs是新增的,其利用这些矩阵搜索了2751个完整注释过细菌和真菌的基因组,预测出了1694个完整*Cas*基因的基因座。最终,1574个(93%)完整的基因座被分入先前已经分出的类型中或者新分类出的IV型、V型系统中。经过分析总结,Makarova等<sup>[12]</sup>认为应从更广泛、更基础的角度对CRISPR/Cas系统进行分类,即将拥有多亚基crRNA效应复合物的归入一类,而少数蛋白亚基行使功能的被归入另一类,向下分类可以分出5个型,16个亚型,进而形成了现在应用的分类方法。

## 3 CRISPR/Cas系统的分类现状

截至2019年3月1日,NCBI上共有13116个完整的古细菌和细菌的基因组,利用Blast技术可以鉴定到7915个*Cas*位点<sup>[13]</sup>。NCBI通过实验、计算等方法对这些基因位点进行分析与分类,不符合先前发现特点的*Cas*基因被列入新的型或亚型中,此外还利用一些基因组的预测工具,对CRISPR/Cas系统进行了分析与预测。截至2019年Makarova等<sup>[13]</sup>关于CRISPR/Cas系统分类的研究中,亚型的分类数量达到了33个,较2015年增加了1倍,并且分出两个新的型,包括蛋白体型比II型更小的V型系统<sup>[14-15]</sup>,和以RNA为切割目标的VI型<sup>[16]</sup>。目前来看,这种分类方法已经逐渐趋

向于稳定,对 CRISPR/Cas 系统的分类也趋近于补充和完善的阶段。现在已知的 CRISPR/Cas 系统

分为 2 个大类 6 个型,每个型又分为多个亚型,每个型包含的 Cas 蛋白也存在差异,详见表 1。

表 1 CRISPR/Cas 系统包含的亚型与蛋白<sup>[13]</sup>  
Table 1 Subtypes and proteins contain in CRISPR /Cas systems<sup>[13]</sup>

大类	型	亚型	包含的 Cas 蛋白
第一大类	I 型	I -A、I -B、I -C、I -D、I -E、I -F1、I -F2、I -F3	Cas1、Cas2、Cas3、Cas4、Cas5、Cas6、Cas7、Cas8
	III 型	III -A、III -B、III -C、III -D、III -E、III -F	Cas1、Cas2、Cas5、Cas6、Cas7、Cas10、Cas11
	IV 型	IV -A、IV -B、IV -C	Cas1、Cas2、Cas5、Cas6、Cas7
第二大类	II 型	II -A、II -B、II -C1、II -C2	Cas1、Cas2、Cas4、Cas9
	V 型	V -A、V -B1、V -B2、V -C、V -D、V -E、V -F1、V -F1(V -U3)、V -F2、V -F3、V -G、V -U1、V -U2、V -U4、V -K(V -U5)	Cas1、Cas2、Cas4、Cas12
	VI 型	VI -A、VI -B1、VI -B2、VI -C、VI -D	Cas1、Cas2、Cas13

### 3.1 CRISPR/Cas 系统中的第一大类

CRISPR/Cas 系统中的第一大类系统中包含的蛋白是由多个 Cas 蛋白组成的效应模块,其中一些组成 crRNA 结合复合物,共同发挥作用。从起源来看,组成第一大类的工作元件是从不同的系统中移动组合而来的。整体来看第一大类的核心蛋白是解旋酶 Cas3、Cas8 和聚合酶 Cas10 组成的复合体<sup>[17]</sup>。第一大类进一步可分为 I 型、III 型和 IV 型 3 个型。

**3.1.1 I 型** 目前在 CRISPR/Cas 系统中 I 型占比最高,且含有很多有缺陷的亚型,如 I -F 和 I -B 亚型。Cas1、Cas2 是目前 CRISPR/Cas 系统中保守性最高的蛋白,几乎所有的 CRISPR/Cas 系统中第一阶段都有 Cas1 和 Cas2 的参与。Cas1 蛋白有整合酶的作用,其可以切割细菌基因组上重复区的特异位点,再将外源基因插入其中。在大肠杆菌中观察到 Cas2 会与 Cas1 结合形成复合物,但 Cas2 蛋白的活性区域被突变破坏后系统仍能获取外来核酸,这表明 Cas2 蛋白可能存在其他特殊的功能,与 Cas1 蛋白整合酶的功能不同<sup>[18]</sup>。Cas1 基因通常与其他 Cas 基因共同存在,并与所有 I 型、II 型系统、大部分 III -A 亚型系统和部分 III -B 亚型系统相关<sup>[19]</sup>,这对于 CRISPR/Cas 系统亚型的分类具有重要意义。

Cas3 蛋白负责目标核酸的切割,其既是 I 型系统的标志,又是很多亚型中均含有的蛋白,由于 Cas3 存在普遍性,推测 Cas3 可能有重要的功能。Cas3 蛋白上有 ATP 的结合位点,推测其可能与

ATP 结合并有 ATP 酶的活性,之后的研究表明这种活性在单链 DNA (single-stranded DNA, ssDNA) 存在时会显著增强,而双链 DNA (dsDNA, double-stranded DNA) 和 RNA 的存在并不会影响 Cas3 的 ATP 酶活性<sup>[20]</sup>。因此认为 Cas3 蛋白具有 ssDNA 依赖的 ATP 酶活性,并可以降解 ssDNA。

Cas4 蛋白广泛存在于 I 型、II 型和 V 型系统中,因而在大部分 CRISPR/Cas 系统中都可以找到 Cas4 蛋白,对其功能进行研究发现,Cas4 蛋白有助于适应阶段的定位过程<sup>[21]</sup>。实验证明,敲除 Cas4 蛋白基因会导致细菌对一些病毒适应能力丧失<sup>[22]</sup>。Plagens 等<sup>[23]</sup>的研究显示,Cas4 蛋白与 Cas1 和 Cas2 蛋白间存在蛋白质-蛋白质间的相互作用,进一步研究证明 Cas4 蛋白参与适应阶段。Cas4 蛋白单独存在时未表现出活性,而与 Cas1 或 Cas2 结合后,复合物可以依次对间隔序列进行加工,完成适应阶段的功能。

在绝大多数 I 型和 III 型系统中,对 pre-crRNA 进行加工的工作主要是由来自重复序列相关未知蛋白(repeat-associated mysterious proteins, RAMPs)家族的 Cas6 蛋白完成的。在某些亚型,如 I -C 系统中,Cas6 蛋白加工 pre-crRNA 的工作由同样来自 RAMPs 家族的 Cas5 蛋白完成<sup>[24]</sup>,而在 I -E 系统中,Cas5 和 Cas6 组成蛋白复合物来共同完成这部分工作<sup>[25]</sup>。

**3.1.2 III 型** III 型系统是特殊的 CRISPR 类型,因其不仅具有对入侵 DNA 的抵抗能力,还表现出对入侵 RNA 的抵抗能力,Cas10 蛋白是 III 型中的

标志蛋白,有4个保守结构域。在Ⅲ-E型系统中,Cas7与Cas11组成多亚基的蛋白集合体,这个集合体可以在无其他蛋白的辅助下加工生成成熟的crRNA,具有很高的切割特异性,但切割效率低于理想值。从形态来看Ⅲ-E型系统虽然类似于第二大类的CRISPR/Cas系统,但是经过结构域和序列的分析,最终还是被列入了Ⅲ型中。与其他Ⅲ型系统不同,Ⅲ-F型系统在2015年就被鉴定出来,但因为种类太少不具备成为单独亚型的条件,2019年分类时,Ⅲ-F型系统已在12个基因组中被发现,因此才将其分为单独的亚型。Ⅲ-F型系统内部有类似Cas7和Cas10的蛋白质,因此被预测为可以切割DNA,但类似于Cas10蛋白的亚基上环化酶和聚合酶的结构域无活性<sup>[26]</sup>。虽然Ⅲ型是发现较早的对RNA有切割功能的CRISPR/Cas系统,但目前对RNA改造的热点为体型更小的Ⅵ型系统,原因可能是多亚基的第一大类系统实际应用于基因编辑领域存在诸多问题。

**3.1.3 IV型** 最初的IV型系统是在肺炎链球菌中发现的,且最开始被分类为U型。IV型系统很多都缺少类似于切割核酸的核酸酶蛋白,但其间隔区序列中可以检测到来自不同质粒的核酸,因此猜测IV型的CRISPR功能可能与抵抗外来质粒有关。IV型系统的起源目前仍不确定,但基因分析显示IV型系统中有类似于Cas5和Cas7的蛋白质<sup>[27]</sup>,这些证据显示效应复合物IV型系统可能是高度分化的I型或Ⅲ型系统的衍生物<sup>[28]</sup>。

## 3.2 CRISPR/Cas系统的第二大类

第二大类系统中的功能蛋白包含的是单个、多结构域的crRNA的结合蛋白,这个结合蛋白包含了实行切割核酸需要的全部组件。第二大类系统一直是研究应用的热点,其仅需要一个基因就能完成第一大类系统许多基因共同合作才能完成的工作。目前第二大类的CRISPR/Cas系统比第一大类中的系统更简便,是生物技术应用的首选。第二大类虽然仅占整个CRISPR/Cas系统的20%,但研究较多,并进一步发展作为基因编辑的工具,第二大类分类中包括Ⅱ型、V型和Ⅵ型3个型。

**3.2.1 Ⅱ型** Ⅱ型系统中的代表为CRISPR/Cas9蛋白系统,目前使用的Cas9蛋白主要是源于产脓链球菌(*Streptococcus pyogenes*)和嗜热链球菌

(*Streptococcus thermophilus*)。Ⅱ型系统发挥功能的过程中Cas1、Cas2、Cas4蛋白负责重复间隔区的建立,且在表达阶段有RNaseⅢ来帮助crRNA的形成,而剩余的工作由Cas9蛋白完成。在Cas9发挥功能的过程中,有两类RNA发挥了作用,crRNA可以与DNA上的部分碱基互补配对,引导Cas9蛋白与DNA的结合,且tracrRNA(trans-activating crRNA)可以促进crRNA的成熟<sup>[12]</sup>。当crRNA引导RNA与Cas9蛋白组成的切割复合体移动到特定位点后,Cas9蛋白的两个DNA切割结构域(HNH和RuvC)开始发挥作用,HNH结构域切割与crRNA互补的链,RuvC结构域切割另一条链。

CRISPR/Cas9系统是一种新型基因编辑技术,因具有简单、快捷等优势,已成为CRISPR/Cas系统中应用最为广泛的技术,且逐渐运用于各个领域,如其可将家禽的*NHE1*基因精确敲除,并制备出对禽白血病病毒J亚群产生抗性的个体<sup>[29]</sup>;对*Top1*基因进行操作甚至可以100%控制小鼠后代的性别<sup>[30]</sup>;通过基因编辑改变传统的育种方法<sup>[31]</sup>,如通过敲除基因*PYL1*、*PYL4*、*PYL6*可以增加水稻的粒数和粒长<sup>[32]</sup>,敲除基因*GW2*、*GW5*、*TGW6*可以提高水稻粒的质量<sup>[33]</sup>;检测食品中微生物的源头来预防疾病的爆发<sup>[34]</sup>。

CRISPR/Cas9系统除了基础的通过双链断裂来进行基因编辑外,经过改造和修饰后,其还开发了更多的用途,如使Cas蛋白的核酸切割部位失活后,Cas蛋白到目标位点附近就不会进行核酸的切割,最终形成无活性的Cas9蛋白,即dCas9蛋白,在Cas蛋白上面连接一些转录抑制因子或者转录激活因子,就可以对目标位点的基因进行抑制或者激活,通过将细胞核定位信号和表位标签引入dCas9,标记靶标基因和其相互作用的蛋白质来达成染色质免疫沉淀(Chromatin immunoprecipitation assay, ChIP)的目的<sup>[35-36]</sup>,CRISPR/Cas9系统还可用于研究表观遗传学编辑、染色质状态及细胞分化或疾病进程等表型之间的关系<sup>[37]</sup>。

**3.2.2 V型** 2015年Zetsche等<sup>[38]</sup>经过分析新定义了一种类型——V型,之前发现的蛋白名称在分出V型系统后有了对应的名称,即Cpf1(Cas12a)、C2c1(Cas12b)、C2c2(Cas13a)、C2c3(Cas12c)、CasY(Cas12d)和CasX(Cas12e)<sup>[39]</sup>。V

型系统与 Cas9 系统相似又存在差异, Cas9 系统中形成 crRNAs 需要 tracrRNA 的帮助, 而 Cpf1 系统则不需要; Cas9 系统发挥功能时需要的 PAM 序列富含 G 碱基, 而 Cpf1 系统的 PAM 序列富含 T 碱基; Cas9 系统切割核酸的蛋白结构域有 HNH 和 RuvC 这两个, 而 Cpf1 系统只有一个类似 RuvC 的结构域。这就使得 Cpf1 的功能蛋白比 Cas9 小很多<sup>[40]</sup>, 同时 Cpf1 系统在使用时只需要 1 条 42 nt 左右的 RNA, 而不需如 Cas9 系统一样插入 1 条 100 nt 左右的 RNA 序列。Cas9 蛋白在切割双链 DNA 后, 留下的 DNA 末端为平末端, 而 Cas12a 蛋白切割时则留下粘性末端, 这种结构有利于基因修复时的非同源末端连接 (non-homologous end joining, NHEJ), 使得基因更精准插入, 至于单个核酸切割结构域切割开 DNA 双链, 其作用机理仍在研究中。

虽然 V 型系统的技术研究尚不成熟, 但因其具有检测成本低、反应速度快等优势, 在很多领域率先得到了应用, 如基于 Cas12a 蛋白的核酸检测技术可以在几个小时内对苹果树中的主流病毒病进行检测<sup>[41]</sup>; 利用 Cas12a 结合特异性的 crRNA 和荧光探针, 可以使 CRISPR 技术用于肉类掺假的检测<sup>[42]</sup>; 针对新型冠状病毒肺炎疫情, CRISPR/Cas 系统也可发挥作用, 一种基于 Cas12a 蛋白的技术可以筛选出流感病毒 A、流感病毒 B 与新型冠状病毒, 为流行病学检测筛查提供了一条新的途径<sup>[43-44]</sup>; 随着细菌抗药性逐渐增强, CRISPR 技术也可作为治疗细菌感染的一种新方法<sup>[45]</sup>。

**3.2.3 VI 型** 最开始对 VI 型系统的描述是发现了一种异于 III 型系统的具有 RNA 切割能力的 CRISPR/Cas 系统, 相比于多亚基组成功能单位的 III 型系统, VI 型系统的蛋白元件大小明显更具优势。通过基因组识别陆续发现了 C2c2 (Cas13a)、Cas13b<sup>[46]</sup>、Cas13c 等 RNA 引导的 RNA 内切酶<sup>[16]</sup>。目前运用 Cas13 仍具有挑战性, 原因为早期研究的 Cas13 编辑器大小与常用的腺相关病毒 (adeno-associated virus, AAV) 载体承载能力不合适, 而且目前 VI 型系统的脱靶率远超过使用标准。但进一步研究发现, 部分 Cas13 家族的蛋白体型更小, 因此, 可将这些小体积 Cas 蛋白包装进 AAV 载体中, 来促进 VI 型系统的应用<sup>[47]</sup>。目前 VI 型在很多领域都展开了应用<sup>[48]</sup>, 且近两年新冠疫情的爆发在一定程度上也加速了 VI 型系统的发展, 已

有很多实验室开始利用 Cas13 蛋白的特性来快速检测新型冠状病毒<sup>[49]</sup>, 以及研制对抗新型冠状病毒甚至其他 RNA 病毒的小分子药物<sup>[50]</sup>。

## 4 展望

CRISPR/Cas 系统规律的分类, 标志着 CRISPR/Cas 系统科学研究的规范化。从 CRISPR 技术开始应用于基因编辑领域, 到现在在各个领域得到广泛应用仅经过了短短几年的时间, 但关于基因编辑技术的研究以稳定的速度增长, 证明 CRISPR 技术是一种功能强大的基因编辑手段。但 CRISPR 技术仍有许多需要改进的地方, 如脱靶率高很大程度上阻碍了 CRISPR 技术在基因治疗方面的应用, 未来对于技术的改进可以侧重于探索降低脱靶率的方法、寻找更适合的运输载体、减少工作元件的规模等方面, 应用领域的扩展也会促进技术的更新。随着生物信息学相关技术的发展, 借助目前已知的蛋白, 未来还可能发现更多新的 CRISPR/Cas 系统, 或出现效率更高、安全性更好的新型 Cas 蛋白; 同时通过更深入的研究, 或许能够发现不同微生物抵抗外来大分子物质机制相似的部分, 而微生物的抵抗机制与人类免疫系统是否存在相似之处尚有待进一步挖掘。

## 参 考 文 献

- [1] ISHINO Y, SHINAGAWA H, MAKINO K, *et al.* Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product[J]. *J. Bacteriol.*, 1987, 169(12): 5429-5433.
- [2] MOJICA F J, DIEZ-VILLASENOR C, SORIA E, *et al.* Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of archaea, bacteria and mitochondria[J]. *Mol. Microbiol.*, 2000, 36(1): 244-246.
- [3] SHE Q, SINGH R K, CONFALONIERI F, *et al.* The complete genome of the crenarchaeon *Sulfolobus solfataricus* P2[J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001, 98(14): 7835-7840.
- [4] JANSEN R, EMBDEN J D, GAASTRA W, *et al.* Identification of a novel family of sequence repeats among prokaryotes[J]. *OMICS*, 2002, 6(1): 23-33.
- [5] JANSEN R, EMBDEN J D A, GAASTRA W, *et al.* Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes[J]. *Mol. Microbiol.*, 2002, 43(6): 1565-1575.
- [6] JINEK M, CHYLINSKI K, FONFARA I, *et al.* A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity[J]. *Science*, 2012, 337(6096): 816-821.
- [7] CONG L, RAN F A, COX D, *et al.* Multiplex genome engineering

- using CRISPR/Cas systems[J]. *Science*, 2013, 339(6121): 819-823.
- [ 8 ] KOBLAN L W, ERDOS M R, WILSON C, *et al.* In vivo base editing rescues Hutchinson-Gilford progeria syndrome in mice[J]. *Nature*, 2021, 589(7843): 608-614.
- [ 9 ] MAKAROVA K S, GRISHIN N V, SHABALINA S A, *et al.* A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action[J/OL]. *Biol. Direct.*, 2006, 1: 7 [2022-04-18]. <https://doi.org/10.1186/1745-6150-1-7>.
- [ 10 ] HAFT D H, SELENGUT J, MONGODIN E F, *et al.* A guild of 45 CRISPR-associated (Cas) protein families and multiple CRISPR/Cas subtypes exist in prokaryotic genomes[J/OL]. *PLoS Comput. Biol.*, 2005, 1(6): e60[2022-04-18]. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.0010060>.
- [ 11 ] MAKAROVA K S, HAFT D H, BARRANGOU R, *et al.* Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems[J]. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2011, 9(6): 467-477.
- [ 12 ] MAKAROVA K S, WOLF Y I, ALKHNASHI O S, *et al.* An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems[J]. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2015, 13(11): 722-736.
- [ 13 ] MAKAROVA K S, WOLF Y I, IRANZO J, *et al.* Evolutionary classification of CRISPR-Cas systems: a burst of class 2 and derived variants[J]. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2019, 18(2): 67-83.
- [ 14 ] BURSTEIN D, HARRINGTON L B, STRUTT S C, *et al.* New CRISPR-Cas systems from uncultivated microbes[J]. *Nature*, 2017, 542(7640): 237-241.
- [ 15 ] YAN W X, HUNNEWELL P, ALFONSE L E, *et al.* Functionally diverse type V CRISPR-Cas systems[J]. *Science*, 2019, 363(6422): 88-91.
- [ 16 ] ABUDAYYEH O O, GOOTENBERG J S, KONERMANN S, *et al.* C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector[J/OL]. *Science*, 2016, 353(6299): aaf5573[2022-04-18]. <https://doi.org/10.1126/science.aaf5573>.
- [ 17 ] KOONIN E V, MAKAROVA K S. Origins and evolution of CRISPR-Cas systems[J/OL]. *Philos. Trans. R Soc. Lond. B Biol. Sci.*, 2019, 374(1772): 20180087[2022-04-18]. <https://doi.org/10.1098/rstb.2018.0087>.
- [ 18 ] NUNEZ J K, KRANZUSCH P J, NOESKE J, *et al.* Cas1-Cas2 complex formation mediates spacer acquisition during CRISPR-Cas adaptive immunity[J]. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 2014, 21(6): 528-534.
- [ 19 ] MAKAROVA K S, WOLF Y I, KOONIN E V. The basic building blocks and evolution of CRISPR-CAS systems[J]. *Biochem. Soc. Trans.*, 2013, 41(6): 1392-1400.
- [ 20 ] SINKUNAS T, GASUNAS G, FREMAUX C, *et al.* Cas3 is a single-stranded DNA nuclease and ATP-dependent helicase in the CRISPR/Cas immune system[J]. *EMBO J.*, 2011, 30(7): 1335-1342.
- [ 21 ] KIEPER S N, ALMENDROS C, HAAGSMA A C, *et al.* Cas4-Cas1 is a protospacer adjacent motif-processing factor mediating half-site spacer integration during CRISPR adaptation[J]. *CRISPR J.*, 2021, 4(4): 536-548.
- [ 22 ] LI M, WANG R, ZHAO D, *et al.* Adaptation of the *Haloarcula hispanica* CRISPR-Cas system to a purified virus strictly requires a priming process[J]. *Nucl. Acids Res.*, 2014, 42(4): 2483-2492.
- [ 23 ] PLAGENS A, TJADEN B, HAGEMANN A, *et al.* Characterization of the CRISPR/Cas subtype I-A system of the hyperthermophilic crenarchaeon *Thermoproteus tenax*[J]. *J. Bacteriol.*, 2012, 194(10): 2491-500.
- [ 24 ] NAM K H, HAITJEMA C, LIU X, *et al.* Cas5d protein processes pre-crRNA and assembles into a cascade-like interference complex in subtype I-C/Dvulg CRISPR-Cas system[J]. *Structure*, 2012, 20(9): 1574-84.
- [ 25 ] BROUNS S J J, JORE M M, LUNDGREN M, *et al.* Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes[J]. *Science*, 2008, 321(5891): 960-964.
- [ 26 ] CATCHPOLE R J, TERNS M P. New Type III CRISPR variant and programmable RNA targeting tool: Oh, thank heaven for Cas7-11[J]. *Mol. Cell*, 2021, 81(21): 4354-4356.
- [ 27 ] MAKAROVA K S, KARAMYCHEVA S, SHAH S A, *et al.* Predicted highly derived class 1 CRISPR-Cas system in Haloarchaea containing diverged Cas5 and Cas7 homologs but no CRISPR array[J/OL]. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2019, 366(7): fnz079[2022-04-18]. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnz079>.
- [ 28 ] OZCAN A, PAUSCH P, LINDEN A, *et al.* Type IV CRISPR RNA processing and effector complex formation in *Aromatoleum aromaticum*[J]. *Nat. Microbiol.*, 2019, 4(1): 89-96.
- [ 29 ] KOSLOVA A, TREFIL P, MUCKSOVA J, *et al.* Precise CRISPR/Cas9 editing of the NHE1 gene renders chickens resistant to the J subgroup of avian leukosis virus[J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2020, 117(4): 2108-2112.
- [ 30 ] DOUGLAS C, MACIULYTE V, ZOHREN J, *et al.* CRISPR-Cas9 effectors facilitate generation of single-sex litters and sex-specific phenotypes[J/OL]. *Nat. Commun.*, 2021, 12(1): 6926 [2022-04-18]. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-27227-2>.
- [ 31 ] 曹巧,史占良,张国丛,等. CRISPR/Cas9 技术在小麦育种中的应用进展[J]. *生物技术进展*, 2021, 11(6): 661-667.
- [ 32 ] VOSS-FELS K P, STAHL A, HICKEY L T. Q&A: modern crop breeding for future food security[J/OL]. *BMC Biol.*, 2019, 17(1): 18[2022-04-18]. <https://doi.org/10.1186/s12915-019-0638-4>.
- [ 33 ] MIAO C, XIAO L, HUA K, *et al.* Mutations in a subfamily of abscisic acid receptor genes promote rice growth and productivity[J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2018, 115(23): 6058-6063.
- [ 34 ] MONTE D F M, NETHERY M A, BARRANGOU R, *et al.* Whole-genome sequencing analysis and CRISPR genotyping of rare antibiotic-resistant *Salmonella enterica* serovars isolated from food and related sources[J/OL]. *Food Microbiol.*, 2021, 93: 103601 [2022-04-18]. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103601>.
- [ 35 ] FUJITA T, FUJII H. Efficient isolation of specific genomic regions and identification of associated proteins by engineered DNA-binding molecule-mediated chromatin immunoprecipitation (enChIP) using CRISPR[J]. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2013, 439(1): 132-136.
- [ 36 ] BIKARD D, JIANG W, SAMAI P, *et al.* Programmable repression and activation of bacterial gene expression using an engineered CRISPR-Cas system[J]. *Nucl. Acids Res.*, 2013, 41(15): 7429-7437.
- [ 37 ] HSU P D, LANDER E S, ZHANG F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering[J]. *Cell*, 2014,

- 157(6): 1262-1278.
- [38] ZETSCHE B, GOOTENBERG J S, ABUDAYYEH O O, *et al.*. Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system[J]. *Cell*, 2015, 163(3): 759-771.
- [39] 李树磊,徐妙云,郑红艳,王磊. CRISPR/Cpf1 单碱基编辑系统的构建及应用[J]. *生物技术进展*, 2021, 11(6): 732-740.
- [40] GAO P, YANG H, RAJASHANKAR K R, *et al.*. Type V CRISPR-Cas Cpf1 endonuclease employs a unique mechanism for crRNA-mediated target DNA recognition[J]. *Cell Res.*, 2016, 26(8): 901-913.
- [41] JIAO J, KONG K, HAN J, *et al.*. Field detection of multiple RNA viruses/viroids in apple using a CRISPR/Cas12a-based visual assay[J]. *Plant Biotechnol. J.*, 2021, 19(2): 394-405.
- [42] LIU H, WANG J, ZENG H, *et al.*. RPA-Cas12a-FS: A front-line nucleic acid rapid detection system for food safety based on CRISPR-Cas12a combined with recombinase polymerase amplification[J/OL]. *Food Chem.*, 2021, 334: 127608[2022-04-18]. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem>.
- [43] MAYURAMART O, NIMSAMER P, RATTANABURI S, *et al.*. Detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 and influenza viruses based on CRISPR-Cas12a[J]. *Exp. Biol. Med.*, 2021, 246(4): 400-405.
- [44] HE C, LIN C, MO G, *et al.*. Rapid and accurate detection of SARS-CoV-2 mutations using a Cas12a-based sensing platform[J/OL]. *Biosens. Bioelectron.*, 2021, 198: 113857[2022-04-18]. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2021.113857>.
- [45] WU Y, BATTALAPALLI D, HAKEEM M J, *et al.*. Engineered CRISPR-Cas systems for the detection and control of antibiotic-resistant infections[J/OL]. *J. Nanobiotechnol.*, 2021, 19(1): 401[2022-04-18]. <https://doi.org/10.1186/s12951-021-01132-8>.
- [46] ZHANG B, YE W, YE Y, *et al.*. Structural insights into Cas13b-guided CRISPR RNA maturation and recognition[J]. *Cell Res.*, 2018, 28(12): 1198-1201.
- [47] 谢宇宙,付伟,闫超杰,等. 基于 CRISPR/Cas 原理的转基因产品检测技术研究进展[J]. *生物技术进展*, 2021, 11(4): 430-437.
- [48] KANNAN S, ALTAE-TRAN H, JIN X, *et al.*. Compact RNA editors with small Cas13 proteins[J]. *Nat. Biotechnol.*, 2021: 40(2): 194-197.
- [49] KHAN W A, BARNEY R E, TSONGALIS G J. CRISPR-cas13 enzymology rapidly detects SARS-CoV-2 fragments in a clinical setting[J/OL]. *J. Clin. Virol.*, 2021, 145: 105019[2022-04-18]. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2021.105019>.
- [50] LI S, ZHANG H, ZHANG L, *et al.*. LinearTurboFold: Linear-time global prediction of conserved structures for RNA homologs with applications to SARS-CoV-2[J/OL]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2021, 118(52): e2116269118[2022-04-18]. <https://doi.org/10.1073/pnas.2116269118>.