

CRISPR/Cas9 介导的基因组编辑技术及研究进展与应用

邢国杰¹, 李 桐¹, 郑慧瑾¹, 张 玲^{1*}, 姜晓坤^{2*}

(1. 吉林省农业科学院农业生物技术研究所, 长春 130033; 2. 吉林农业科技学院, 吉林 吉林 132101)

摘 要: CRISPR/Cas 系统是一种从细菌和古生菌中衍生而来的适应性免疫系统, 当细菌遭受病毒或者外源质粒入侵时, 会产生相应的“记忆”, 从而防止外来 DNA 片段的侵袭。CRISPR/Cas9 系统以设计操纵简便、编辑高效与通用性广等优势已经成为改良作物的新一代基因组编辑技术。本文从 CRISPR/Cas9 介导的基因组编辑技术的发展与应用等方面综述其最新研究进展, 并着重介绍该技术的关键影响因素, 为相关研究者提供参考。

关键词: CRISPR/Cas9; 基因编辑; 植物

中图分类号: Q789

文献标识码: A

文章编号: 1003-8701(2017)06-0028-04

Progress in Researches of CRISPR/Cas9 Mediated Plant Genome Editing

XING Guojie¹, LI Tong¹, ZHENG Huijin¹, ZHANG Ling^{1*}, JIANG Xiaokun^{2*}

(1. Agricultural Biotechnology Research Institute, Jilin Academy of Agricultural Sciences, Changchun 130033; 2. Jilin Agricultural Science and Technology College, Jilin 132101, China)

Abstract: CRISPR/Cas9 system is an immune system of prokaryotes, which is used to resist invasion of exogenous genetic material. When bacteria are attacked by viruses or exogenous plasmids, they will generate corresponding memories, so that they can resist their invasion. The CRISPR/Cas9 system has become a new generation of genome editing technology with the advantages of simple design, efficient editing and wide versatility. The latest research progress from the development and application of genome editing technology mediated by CRISPR/Cas9 was reviewed in the paper which focused on the key influencing factors of the technology, so as to provide references for relevant researchers.

Key words: CRISPR/Cas9; Genome editing; Plant

近年来,随着基因组编辑技术的飞速迅猛发展,CRISPR/Cas9 系统已经成为农作物乃至整个植物界的基因功能研究和植物生物育种最主要的研究手段之一^[1-2]。相比于传统的生物育种技术,广大科学家可以利用新一代的基因组编辑技术直接在植物基因组上进行定点突变、基因敲除、插入以及组合编辑等,从而在植物基因组学水平上实现基因功能与调控元件的系统研究,因此在植物生物育种等方面具有广阔的应用前景^[3-5]。CRISPR (clus

tered regularly interspaced short palindromic repeats) 是一种规律成簇的间隔短回文重复,是细菌与古生菌中抵御外源病毒或质粒 DNA 入侵的获得性免疫系统。CRISPR/Cas9 系统有 3 类,现在最为广泛使用的 CRISPR/Cas9 系统是由最简单的 type II CRISPR 改造而来,该系统由含有核酸内切酶活性内切核酸酶蛋白 (Cas9) 和单链的 guide RNA 构成^[5-6]。CRISPR/cas9 系统通过 Cas9 蛋白形成 DNA 双链的断裂 (DNA double stranded break, DSB) 作用机制,从而实现植物基因组编辑。而经过编辑的细胞通过非同源性末端连接的修复会造成插入缺失效应 (insertion and deletion), 进而造成基因的移码突变而达到基因敲除的目的^[7]。在此之前已经发展了多种基因的编辑工具,如: 锌指核酸酶 (ZFN), 转录激活因子样效应子 (TALEN) 等, 并且也已经得到广泛应用。相对于传统敲除技术和其他两类基因编辑工具 TALEN、ZFN 而言, 其操作更

收稿日期: 2017-09-07

基金项目: 吉林省农业科学院自由创新工程项目 (CXGC2017ZY024)

作者简介: 邢国杰 (1971-), 女, 助理研究员, 主要从事植物生物技术育种研究。

通讯作者: 张 玲, 女, 博士, 副研究员, E-mail: LingZ2016@cjaas.com

姜晓坤, 女, 硕士, 高级实验师, E-mail: JXK76@126.com

加简便,敲除效率最高,基因的编辑更加精准,大大降低了脱靶机率^[8]。

1 CRISPR 系统特征及作用原理

CRISPR/cas 系统是由 Cas 蛋白基因、前导序列、CRISPR 基因座共同构成的 CRISPR 基因序列。其中 CRISPR 基因座基因结构的主体是由同向重复序列(repeat)和间隔序列(spacer)构成的多段 R-S 结构组成。此外,在 R-S 结构之前,包括由前导序列(leader)和一系列的 CRISPR 相关蛋白基因座(CRISPR-Associated/CAS genes)。CRISPR 基因座和其相关基因联合能够针对噬菌体感染、质粒接合和转化所造成的基因导入而形成一种特异性的防御机制,因此被称为 CRISPR 干扰^[9-10]。CRISPR 干扰的免疫过程主要包括适应、表达和干扰三个阶段。在适应阶段,CRISPR 系统通过将 DNA 序列插入到前导序列与第一段重复序列之间,且每次插入活动都伴随着重复序列的复制,从而形成一个新的 R-S 单元,其中这段 DNA 序列与质粒或噬菌体上基因片段(原间隔序列 proto-spacers)同源。这种作用方式使得 CRISPR 基因座中存在外源质粒或噬菌体的序列信息,进而为适应性免疫奠定了结构基础。在表达阶段,CRISPR 基因座经过转录形成长链 CRISPR RNA(crRNA)前体,即 pre-crRNA。然后,长链 crRNA 前体将会在重复序列处被 Cas 核酸内切酶加工,形成一段小 crRNA 来识别靶序列。第三阶段是干扰阶段,即靶向干扰,成熟的 crRNAs 引导相关的 Cas9 蛋白到互补靶标,从而使靶序列被特异的 Cas 核酸酶降解。

2 CRISPR/Cas9 技术工作基本原理

CRISPR/Cas9 技术的基本原理就是将核糖体 RNA(rRNA)设计为引导 RNA。使引导 RNA 包含位于 5'-端的靶 DNA 的互补序列以及位于 3'-端的 crRNA 的类似序列,从而利用靶 DNA 的互补序列来定位需编辑的位点,并通过 crRNA 的类似序列与 Cas9 结合,仅设计引导 gRNA 就可实现对含有前间区序列邻近基序(PAM)序列的任一靶 DNA 序列进行敲除、插入与定点突变等修饰。目前一些公司已经推出了商业化的 CRISPR/Cas 载体,将这些必要的元件组合成单个载体,简化了实验设计。这类载体也被称为 All-in-One CRISPR 系统。由于设计操作简单、编辑效率高与通用性好等优势,这类系统被广泛应用于植物基因组编辑^[14-15]。此系统包含两个组分,核酸内切酶 Cas9 和非编码

向导 RNA(gRNA)。gRNA 又由两部分组成:与目标互补的 CRISPR RNA(crRNA)和辅助性的反式激活 crRNA(tracrRNA)。gRNA 指导 Cas9 核酸酶到达特异的基因组位点,而 Cas9 蛋白在目标序列上引入双链 DNA 断裂(DSB)。在 CRISPR/Cas9 诱导的 DNA 断裂后,DSB 可通过细胞修复机制来修复,非同源末端连接(NHEJ)或同源性指导的修复机制。这类表达载体包含 Cas9 核酸酶表达框和 gRNA 克隆框,能够轻松地克隆编码目标特异性 crRNA 的双链 DNA。这样只需单个质粒就能以序列特异的方式编辑和改造基因组位点^[16-17]。

3 影响 CRISPR/Cas9 系统关键因素

CRISPR/Cas9 系统是否能够在目标形状中起作用,其中最为关键的因素之一就是避免 Cas9 的脱靶效应是设计 sgRNA 中关键的一步。尽管控制脱靶效应的规则仍处在起步阶段,但一些准则已经被开发出来,并融入目前的设计算法。目前已有生物信息学工具能帮助确定那些表现出最大的序列独特性的基因组位点,如华中农业大学 CRISPR/Cas9 系统介导的基因组编辑技术 sgRNA 设计和脱靶效应评估软件(sgRNA cas9)、麻省理工大学的 CRISPR 网站等。

此外,CRISPR/Cas9 系统在植物学研究中主要是通过植物稳定高效的遗传转化来对目的基因进行定点编辑敲除,通过基因枪和农杆菌介导的植物遗传转化法来实现将 CRISPR/Cas9 系统带入到植物体内,在 T₀代植株中实施目的基因的编辑,并在自交产生的后代中分离得到目的基因纯合突变体。因此,植物稳定高效的遗传转化体系也是 CRISPR/Cas9 成功高效运用的因素之一。用于植物转化过程中,CRISPR/Cas9 系统虽然缩短了试验周期,但是由于植物遗传转化系统的局限性,部分转基因中存在的嵌合体形式会在一定程度上制约着对于目标基因表型的研究。因此,CRISPR/Cas9 系统的转化更加适用于突变体表型的快速检测。若要进一步分析某个或某些基因的表型,还需通过稳定转化经过后代筛选获得敲除完全的突变体^[18-20]。

4 CRISPR/Cas9 技术在植物基因编辑中的应用

迄今为止,通过 CRISPR/Cas9 技术已经在多种植物中实现了基因定点编辑,包括油菜、柑橘、黄瓜、大豆、棉花、大麦、莴苣、苜蓿、烟草、矮牵

牛、山杨、番茄、马铃薯、高粱、橡胶草、小麦、葡萄和玉米等^[21-24]。在对农作物遗传改良方面,与传统育种技术相比,基因编辑技术已经在很多农作物中发挥了优势。如我国科学家通过基因编辑技术获得抗白粉病的小麦,与传统育种相比,仅用半年时间就可以实现。美国生物公司也通过相关技术获得耐冷藏和不易产生致癌物质的新品种马铃薯。美国杜邦先锋公司通过 CRISPR/Cas9 技术敲除控制直链淀粉合成的基因,从而获得糯玉米新品种。美国孟山都公司已经获得高油酸的基因编辑大豆并准备上市。我国“杂交水稻之父”袁隆平最近宣布,通过对 CRISPR/Cas9 技术的成果利用,获得不吸收镉离子的水稻品种。美国华裔科学家杨亦农博士利用 CRISPR/Cas9 技术在白蘑菇获得不易褐变的、更加易于保存和运输的品种^[25-26]。

此外,CRISPR/Cas9 系统介导的基因组编辑技术在生物工程与生物医学方面有广泛的应用,可利用基因组编辑改造细菌细胞工厂,生产大宗化学品与精细化学品如药品前体等^[27-31]。

5 CRISPR/Cas9 系统展望

CRISPR/Cas9 系统已被用于改良作物各种性状,由于其低成本、精确性和快速性,基因组编辑技术为作物育种提供了前所未有的可能性,并且正在应用于越来越多的植物物种。越来越多的使用 CRISPR 技术改良的植物将在不久的将来进行商业化。基因编辑技术 CRISPR/Cas9 势必会带来生物研究的革命。

除了 CRISPR/Cas9 系统,CRISPR 系统还有其它很多类型存在。Cas9 是当今研究最深入、应用最成熟的一类作用蛋白,CRISPR 序列理论上还可以跟许多其它蛋白共同作用。随着生物技术的不断发展,相信不久的将来其它并未被验证的 CRISPR 系统会被进一步开发与利用。CRISPR 已经成为当今最为主流的科学研究的新技术之一。CRISPR 不仅在植物研究领域引起巨变,而且席卷整个生物领域,如研究人员希望将它应用于包括人在内的哺乳动物中的基因修饰,从而帮助人类攻克各种疑难杂症等。

参考文献:

- [1] 姚祝平,程远,万红建,等.CRISPR/Cas9 基因编辑技术在植物基因工程育种中的应用[J]. 分子植物育种, 2017, 15 (07): 2647-2655.
- [2] 包爱科,白天惠,赵天璇,等.CRISPR/Cas9 系统:基因组定点编辑技术及其在植物基因功能研究中的应用[J]. 草业学

报, 2017, 26(07): 190-200.

- [3] 邢慧丽.CRISPR/Cas9 系统在植物基因组编辑中的应用[D]. 北京: 中国农业大学, 2017.
- [4] 胡添源,高伟,黄璐琦.展望 CRISPR/Cas9 基因编辑技术在药用植物研究中的应用[J]. 中国中药杂志, 2016, 41 (16): 2953-2957.
- [5] 张道微,张超凡,董芳,等.CRISPR/Cas9 系统在培育抗病毒植物新种质中的应用[J]. 遗传, 2016, 38(09): 811-820.
- [6] 马兴亮,刘耀光.植物 CRISPR/Cas9 基因组编辑系统与突变分析[J]. 遗传, 2016, 38(02): 118-125.
- [7] 曾秀英,侯学文.CRISPR/Cas9 基因组编辑技术在植物基因功能研究及植物改良中的应用[J]. 植物生理学报, 2015, 51 (09): 1351-1358.
- [8] 郑小梅,张晓立,于建东,等.CRISPR-Cas9 介导的基因组编辑技术的研究进展[J]. 生物技术进展, 2015(1): 1-9.
- [9] Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity [J]. *Science*, 2012, 337: 816-821.
- [10] Horvath P, Barrangou R. CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea[J]. *Science*, 2010, 327(5962): 167-170.
- [11] Du H, Zeng X, Zhao M, et al. Efficient targeted mutagenesis in soybean by TALENs and CRISPR/Cas9[J]. *J Biotechnol*, 2016, 217: 90-97.
- [12] Fehr W R, Caviness C E, Burmood D T, et al. Stage of development descriptions for soybeans, *Glycine max* (L.) Merrill[J]. *Crop Sci*, 1971, 11: 929-931.
- [13] Gaj T, Gersbach C A, Barbas C F. ZFN, TALEN and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering[J]. *Trends Biotechnol*. 2013, 31: 397-405.
- [14] Jacobs T B, LaFayette P R, Schmitz R J. et al. Targeted genome modifications in soybean with CRISPR/Cas9[J]. *BMC Biotechnol*, 2015: 15,16.
- [15] Jiang W, Zhou H, Bi H, et al. Demonstration of CRISPR/Cas9/sgRNA-mediated targeted gene modification in Arabidopsis, tobacco, sorghum and rice[J]. *Nucleic Acids Res*. 2013, 41, e188.
- [16] 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[J]. *Mol Plant* 2014, 7: 1494-1496.
- [17] Li Z, Liu Z B, Xing A, et al. Cas9-guide RNA directed genome editing in soybean[J]. *Plant Physiol*, 2015, 169: 960-970.
- [18] Liang Z, Zhang K, Chen K. et al. Targeted mutagenesis in *zea mays* using TALENs and the CRISPR/Cas system. *J. Genet. Genom*, 2014, 41: 63-68.
- [19] Ran F A, Hsu P D, Wright J, et al. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat. Protoc*, 2013, 8: 2281-2308.
- [20] Shan Q, Wang Y, Li J, et al. Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system[J]. *Nat. Biotechnol*, 2013, 31: 686-688.
- [21] Sun X, Hu Z, Chen R, et al. Targeted mutagenesis in soybean using the CRISPR-Cas9 system[J]. *Sci Rep*. 2015, 5: 10342.

(下转第 35 页)

(上接第 30 页)

- [22] Upadhyay S K, Kumar J, Alok A, et al. RNA-guided genome

- 及光合物质生产[J]. 西北农业学报, 2013, 22(10): 108-115.
- [4] 张 娣, 潘映雪, 隋虹杰, 等. 高粱播后苗前和苗后除草剂的初步筛选[J]. 东北农业科学, 2016, 41(1): 78-80.
- [5] 石永顺. 高粱除草剂的筛选与评价[J]. 园艺与种苗, 2009, 29(6): 403-404.
- [6] 景小兰, 董良利, 张建华, 等. 中国除草剂的发展现状及其在高粱上的应用[J]. 中国农学通报, 2015, 31(25): 182-185.
- [7] 刘天朋, 赵甘霖, 倪先林, 等. 不同除草剂在不同时期施用的除草效果及对高粱生长的影响[J]. 安徽农业科学, 2012(36): 17564-17566.
- [8] 郭立君, 曾贤杰, 胡照云, 等. 不同浓度除草剂对两系杂交糯高粱父母本生长的影响[J]. 湖南农业科学, 2015(10): 29-31.
- [9] 孙学保, 宋朝辉, 王文庆, 等. 不同类型土壤甜高粱播前除草剂筛选试验[J]. 中国糖料, 2016, 38(2): 41-43.
- [10] 宋朝辉, 孙学保, 李永德, 等. 甜高粱苗期除草剂筛选试验[J]. 中国糖料, 2016, 38(2): 44-45.
- [11] 张 静. 我国除草剂的登记现状及其发展趋势分析[D]. 石家庄: 河北农业大学, 2013.
- [12] 商立云. 浅析酿酒原料对白酒风味质量的作用[N]. 华夏酒报, 2011-1-7 (013).
- [13] 王兆振, 毕亚玲, 丛 聪, 等. 除草剂对作物的药害研究[J]. 农药科学与管理, 2013, 34(5): 68-73.
- [14] 邓志兰, 李 默, 李 岩, 等. 不同除草剂对高粱地杂草防除效果[J]. 吉林农业科学, 2015, 40(4): 54-59.
- [15] 任江萍, 王爱萍, 王智琴, 等. 植物抗除草剂基因研究进展[J]. 山西农业大学学报(自然科学版), 2001, 21(2): 168-172.
- [16] 谭学文. 苗期不同营养液处理对草莓产量形成的影响[J]. 华北农学报, 1996, 11(4): 123-125.
- (责任编辑: 王 昱)



- editing for target gene mutations in wheat[J]. G3 Genes Genomes Genet, 2013, 3: 2233-2238.
- [23] Xie K, Zhang J, Yang Y. Genome-wide prediction of highly specific guide RNA spacers for CRISPR - Cas9-mediated genome editing in model plants and major crops[J]. Mol Plant, 2014, 7: 923-926.
- [24] Zhang H, Zhang J, Wei P, et al. The CRISPR/Cas9 system produces specific and homozygous targeted gene editing in rice in one generation[J]. Plant Biotechnol J, 2014, 12: 797-807.
- [25] Zhou H, Liu B, Weeks D P, et al. Large chromosomal deletions and heritable small genetic changes induced by CRISPR/Cas9 in rice[J]. Nucleic Acids Res, 2014, 42(17): 10903-10914.
- [26] Cai Y, Chen L, Liu X, et al. CRISPR/Cas9-mediated genome editing in soybean hairy roots[J]. PLoS ONE, 2015: 10, e0136064.
- [27] Hale CR, Zhao P, Olson S, et al. RNA-Guided RNA Cleavage by a CRISPR RNA-Cas Protein Complex[J]. Cell, 2009, 139(5): 945-956.
- [28] Zhang F, et al. Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems[J]. Science, 2013, 339(6121): 819-823.
- [29] Westra E R, Swarts DC, Staals RH, et al. The CRISPRs, they are a-changin': How prokaryotes generate adaptive immunity. Annu Rev Genet, 2012, 46: 311-339.
- [30] Marraffini L A, Sontheimer E J. CRISPR interference: RNA-directed adaptive immunity in bacteria and archaea[J]. Nature Rev Genet, 2010, 11(3): 181-190.
- [31] Jiang W, Bikard D, Cox D, et al. RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems[J]. Nature Biotechnology, 2013, 31: 233-239.
- (责任编辑: 王 昱)