

网络出版时间:2019-04-01 15:19 DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2019.10.005
网络出版地址:http://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20190401.1518.010.html

CRISPR/Cas9 技术发展及其应用进展

欧阳乐军^{1,2}, 李莉梅¹, 马铭赛^{1,2}, 王玉涛², 尹爱国¹

(1 广东石油化工学院 生物与食品工程学院, 广东 茂名 525000; 2 喀什大学 生命与地理科学学院/
叶尔羌绿洲生态与生物资源研究高校重点实验室, 新疆 喀什 844000)

[摘要] 概括了 CRISPR/Cas9 系统的结构及作用原理, 分析了该系统的不足, 重点阐述了该技术在林木基因组编辑中的应用, 并对 CRISPR/Cas9 系统的未来研究趋势进行了展望。

[关键词] 基因定点编辑; CRISPR/Cas9; 基因功能; 转基因技术

[中图分类号] Q81

[文献标志码] A

[文章编号] 1671-9387(2019)10-0034-07

Development and application progress of CRISPR/Cas9 technology

OUYANG Lejun^{1,2}, LI Limei¹, MA Mingsai^{1,2}, WANG Yutao², YIN Aiguo¹

(1 College of Biological and Food Engineering, Guangdong University of Petrochemical Technology, Maoming, Guangdong 525000, China;
2 The Key Laboratory of Ecology and Biological Resources in Yarkand Oasis at Colleges & Universities under the Department of Education of Xinjiang Uygur Autonomous Region, College of Life and Geographic Sciences, Kashgar University, Kashgar, Xinjiang 844000, China)

Abstract: The article summarizes the structure and mechanism of CRISPR/Cas9 system, analyzes its deficiencies, emphasizes its application in plant gene editing, and prospects its future research trend.

Key words: genome targeted editing; CRISPR/Cas9 system; gene function; transgenic technology

近年来,随着越来越多物种全基因组测序的完成,人类已逐步迈进后基因组时代——功能基因组时代。后基因组时代面临的一个重大挑战是,如何从大量基因组数据库中获得特定基因的功能和相应的应用价值信息,而基因定点编辑技术恰恰是解决这一难题的有力工具。基因定点编辑是指将外源 DNA 片段与受体同源片段进行重组,从而使外源 DNA 片段定向整合到基因组特定位点上的一种技术。与以往的 T-DNA 标签、转座子标签及逆转座子标签等基因敲除技术相比,基因定点编辑技术既能实现基因的定点整合,又可对目标基因进行精准改造,如插入、缺失、替换等,对基因组功能研究具有重大意义^[1]。该技术发展过程中,第一代技术使用锌指核酸内切酶(zinc finger endonuclease,ZFN)进

行编辑,但 ZFN 存在组装困难的问题,需耗费较多的人力、物力和时间才能设计出与 DNA 序列有特异亲和力的结合区,成本高昂且成功率较低^[2];第二代技术的工具为人工核酸酶 TALEN(transcription activator-like effector nuclease),TALEN 除具备 ZFN 的生物基因组精确修饰功能外,基因编辑的效率更高,特异性更强,TALEN 的发现被评为 2012 年十大科学突破之一^[3]。但 TALEN 和 ZFN 属于融合蛋白,设计时均需针对每一个基因位点改变 DNA 结合序列,且还需转录、翻译和组装两个核酸酶,即需要设计相应的蛋白质及其结构,制备成本高且操作复杂,限制了基因编辑技术的进一步发展。2013 年,基因定点编辑技术 CRISPR/Cas9 被研究人员发现,该基因编辑体系只需设计一个 sgRNA

[收稿日期] 2018-09-14

[基金项目] 国家自然科学基金项目(31470677);广东省自然科学基金项目(2017A030307017);广东科技计划项目(2017A030303087);广东高校果蔬加工与贮藏工程技术开发中心项目(2012gczx001);广东省“扬帆计划”高层次人才项目

[作者简介] 欧阳乐军(1977—),男,湖南益阳人,副教授,博士,主要从事林木基因工程研究。E-mail:ouyanglejun@163.com

就可对相关基因进行定点编辑,具有操作简单、成本低、效率高等特点,成为新一代最受欢迎的基因编辑技术^[4]。相比传统的转基因技术,CRISPR/Cas9 技术表达载体插入位点与基因编辑的位点不同,外源插入质粒待基因编辑完成后,可在后代配子形成过程中染色体分离时而被去除,遗传编辑后不留下转基因的痕迹,无需引入外源基因,因而生物安全性高,无转基因争议,应用前景十分广阔^[5]。本研究对 CRISPR/Cas9 的结构、原理及存在问题和不足进行总结,重点阐述该技术在林木基因组编辑中的应用进展,以期对相关研究提供借鉴。

1 CRISPR/Cas9 系统的组成及工作原理

CRISPR/Cas9 系统是基于细菌自身适应免疫防御系统成功改造的一种新的基因编辑技术^[6]。该系统最早于 1987 年由日本学者研究发现,但限于当时测序技术的制约和认识的缺乏,未能引起科学家们的注意;直到 2012 年,科学家才揭开了该系统的真面目——由 RNA 指导靶向外源 DNA 的核酸内切酶免疫系统,并将其改造应用于基因编辑领域。因其较强的靶向性、较广的编辑范围以及较简易的操作性,该技术深受科研人员的青睐,荣获 2013 年十大科学突破奖,成为第三代基因编辑技术^[7]。

1.1 CRISPR/Cas 系统组成

CRISPR/Cas 系统由 CRISPR 序列和与之相连锁的 CRISPR 相关基因(*Cas gene*)组成。虽然多数类型的 CRISPR 系统需要多种 Cas 蛋白参与,但是 II 型 CRISPR 系统只需要 1 种 Cas9 蛋白即可发挥相应的免疫功能,因而被科学家改造和应用最多,也是目前使用最多的编辑技术(CRISPR/Cas9 技术)^[8]。CRISPR 位点由启动子、重复序列及重复序列间的间隔序列构成。在同一 CRISPR 序列中,重复序列是相同的,而间隔序列可以是不同的外源 DNA,并在噬菌体或其他病毒初次入侵时整合至 CRISPR 位点。发挥免疫功能的 II 型 CRISPR 系统的相关基因会被激活转录,并经 Cas9 蛋白和 RNase III 作用形成 CRISPR RNA(crRNA),同时细胞会形成一段与 crRNA 中重复序列配对的 RNA 序列,且带有非配对的约 20 bp 的末端序列,这一整段序列被称为反式作用 CRISPR RNA(trans-acting CRISPR RNA, tracrRNA)。

crRNA 由间隔序列、双链 RNA 序列(重复序列转录的 RNA 和 tracrRNA 配对形成)以及

tracrRNA 非配对区的末端序列组成。间隔序列负责与外源入侵 DNA 配对,双链 RNA 序列可被 Cas9 蛋白识别并结合。在间隔序列与外源 DNA 配对区的上游,外源 DNA 中存在 3~6 个碱基组成的被称为原间隔序列的 PAM 位点(protospacer adjacent motif),Cas9 蛋白通过识别 PAM 位点而作用于间隔序列与外源 DNA 配对的区域,并对外源双链 DNA 进行切割,进而引起外源 DNA 的双链断裂(DSB)。简单而言,Cas9 蛋白可以特异性地识别由 3~6 个碱基组成的 PAM 位点,并对该位点附近的双链分子进行切割。由于间隔序列被整合至宿主细胞 CRISPR 位点时不带有 PAM 位点,因此不会被 Cas9 蛋白识别和切割,即 PAM 可以作为 Cas9 区分异己的标记^[9]。Cas9 蛋白切割双链前须形成切割复合体,即 Cas9 蛋白需要与一个特定的双链 RNA 分子结合形成复合体,这个双链 RNA 即相当于 crRNA 和 tracrRNA 所形成的 RNA 双链。根据这一特点,科学家在实际应用 CRISPR 系统时将这个双链 RNA 改造成一个单向导 RNA(single-guide RNA, sgRNA)。sgRNA 分为 3 部分:可变的 20 nt 的区域,其转录产物可与靶 DNA 配对;42 nt 的发夹结构,其转录产物相当于双链 RNA,可被 Cas9 蛋白特别性识别并结合,形成切割复合体;40 nt 的转录终止子,可终止 sgRN 的转录。CRISPR/Cas9 基因编辑技术是将 sgRNA 和编码 Cas9 蛋白的序列构建到表达载体上共表达,由 sgRNA 引导 Cas9 蛋白对靶标进行切割,从而完成基因编辑。

1.2 CRISPR/Cas9 系统工作机制

为操作方便,科学家将成熟的 tracrRNA-crRNA 二元结构融合成一条 gRNA,这条 gRNA 具有两个关键的部分:5'端的 20 个碱基序列需要与作用的目标位点通过 Watson-Crick 互补配对,同时 3'端的双链结构能够与 Cas9 蛋白结合,两者之间通过一条不影响空间结构的连接环结合在一起。

对化脓链球菌(*Streptococcus pyogenes*)的 gRNA、目标靶序列以及 Cas9 蛋白三复合体晶体结构分析表明:它具有两个主要的颞叶结构,其中识别颞叶结构区用于识别 gRNA 和 DNA 形成的双链,核酸酶颞叶区用于对双链进行切割^[10]。与之前的 ZNF 和 TALEN 相比,CRISPR/Cas9 系统的优越性在于针对不同基因编辑仅需改变 gRNA 5'端前 20 bp 的碱基即可^[11]。其导致基因突变的过程为:首先,Cas9 蛋白与 gRNA 结合形成切割复合体;接着 gRNA 上的序列通过碱基互补配对与基因组

DNA 序列识别;随后切割复合体上的 Cas9 蛋白将 gRNA 识别的基因组 DNA 序列切割,造成双链 DNA 的断裂;最后在 DNA 修复过程形成碱基突变或缺失,从而造成基因的突变或缺失。

2 CRISPR/Cas9 系统的不足

2.1 活性及稳定性差

CRISPR/Cas9 系统在植物中的应用面临两大挑战,一是该表达系统在植物中表达的活性有待进一步提高,二是通过 CRISPR/Cas9 获得的基因编辑后代遗传稳定性不佳^[12]。目前,研究人员构建的 CRISPR/Cas 载体大多只针对基因组的一个靶位点设计 1 个 sgRNA,形成基因的单位点突变。由于 sgRNA 自身效率以及断裂基因的突变修复等原因,这种单位点突变的效率不高。通过设计多个 sgRNA 编辑同一靶标基因可提高基因编辑效率,形成基因组大片段的缺失,有利于运用 PCR 扩增的方法对突变体后代进行鉴定。Zhang 等^[13]将 6 个 gRNA 融合表达到一个载体上,分别用拟南芥 AtU6、AtU3、At7SL 启动子表达 gRNA,结果显示,单突变体的效率在 13%~93%,六突变效率为 1/15,通过一次性表达多个 gRNA 可以对多个靶位点进行编辑。Xing 等^[14]将 U6-26 的启动子和终止子固定在含有 *Bsa* I 酶切位点的载体上,利用 golden gate 重组将 2 个或 3 个 gRNA 融合到载体上,最终得到多个 gRNA 引导 Cas9 蛋白对多个靶点进行编辑。

2.2 靶点选择限制

设计 CRISPR 靶点时,应选择 GC 含量高的靶点序列;同时,需要考虑靶点序列的偏好性,大多研究将 PAM 前 20 个左右的碱基序列作为靶序列,以保证 Cas9 基因的转录激活因子能更好地发挥作用。Wang 等^[15]研究发现,选择后 4 位碱基为嘌呤的靶序列时,靶点 DNA 更易与 Cas9 蛋白结合;Doench 等^[16]通过构建平铺式 sgRNA 文库,筛选发现“CG-GN”(N=C, T 或 A)的 PAM 序列比一般认定的“NGG”PAM 序列效果好。

2.3 启动子低效

不同物种对 Cas 基因和 sgRNA 启动子的要求不同。在原核生物中,用 RNA 聚合酶 III 依赖的启动子 U6 或 U3,在时间、空间以及表达量上都能很好地启动 gRNA 的表达^[17]。而在植物中,非 U6 或者 U3 启动子启动的 gRNA 会出现不能正常表达的现象。因此,为了进一步提高定点编辑技术的应用

范围与成效,用植物体内非 U6 或 U3 启动子启动 gRNA 的表达也是研究热点。对于 Cas9 基因,只有融合在 N 端或两端的核定位信号序列上,才能确保 Cas9 蛋白能被转运到细胞核中并发挥作用,所以应选择高表达且依赖于 RNA 聚合酶 II 的启动子^[18]。目前,单子叶植物中比较常用的启动子是泛素启动子,双子叶植物中广泛应用的是 CaMV35S 启动子^[19]。Feng 等^[20-21]利用 35S 启动优化的 hSpCas9,将目标靶序列嵌入到 AtU6-26(拟南芥)和 OsU6-2(水稻)启动子中,通过拟南芥和水稻的基因定点编辑试验发现,优化的 CRISPR/Cas9 系统可以很好地在拟南芥和水稻中表达,编辑效率为 26%~84%;同时,通过对 *GAI* 基因突变体的后代进行分离比检测,证实约 22%的纯合体可以稳定遗传,这也是有关 CRISPR 编辑后代符合孟德尔定率稳定遗传分离比率的第一次报道。Gao 等^[22]为剔除拟南芥突变体后代中的 Cas9 表达核,创造性地将种皮特异性启动子 At2S3 与荧光蛋白基因 *mCherry* 融合在一起构建 CRISPR/Cas9 载体,通过对突变体后代进行可视化筛选,实现了 Cas9-Free。

2.4 定点插入外源基因低效

目前,利用 CRISPR/Cas9 技术只能对内源基因进行定向敲除,无法实现高效定点插入外源基因,这限制了基因功能的全面研究。Li 等^[23]以拟突变的基因序列为模板,将固定的 ALS1 突变引入到定点的大豆基因组中,获得了氯磺隆抗性大豆植株,但突变效率不高。Svitashev 等^[24]在玉米中通过同源重组修复定点引入 ALS2,获得了氯磺隆抗性的小麦。Sun 等^[6]在水稻中通过提供突变的寡核苷酸双链和构建到载体上的 ALS 突变序列,提高了获得氯磺隆抗性的概率,但上述外源基因定点插入都存在效率不高的问题。笔者将以植物 AS1 基因作为靶向目标的 2 个 sgRNA、1 个 AS1 基因同源臂和筛选标记基因的重组载体,转入到植物中共同表达,发现 sgRNA 与植物基因组中 AS1 基因的 2 个 target 序列识别,使 Cas 蛋白敲除 AS1 基因,AS1 基因同源臂作为同源重组修复的模板修复 AS1 基因,实现了外源基因的定点插入,实现了真正意义上的基因“定点”编辑^[25]。

CRISPR/Cas9 技术除可用来进行基因编辑外,还可调控对基因表达,也可定位运输以及 RNA 沉默,其他功能还有待进一步开发研究,相关问题也有待深入探讨。

3 CRISPR/Cas9 技术在林木基因组定向编辑中的应用

CRISPR 技术功能强大,应用广泛,不仅解决了当前研究中存在的许多技术性问题,还为许多领域的研究带来了革命性的突破。在植物基因组功能研究和遗传改良应用方面,CRISPR/Cas9 技术已在低等植物地钱^[26]、双子叶植物拟南芥^[4,14,20,27-30]、烟草^[27,31-32]、大豆^[33-35]、番茄^[36-37]、马铃薯^[38]、甘蓝型油菜^[39]、单子叶植物水稻^[4,28,40-45]、小麦^[40,42,46]、高粱^[47]、玉米^[14,48]、矮牵牛^[49]、香蕉^[50]等植物中有广泛应用,但木本植物中仅在毛白杨^[51]、苹果^[52]、甜橙^[53]、葡萄^[54]上有所涉及。作为具有重要生态效益与经济效益的木本植物,对其开展基因组定点编辑技术研究具有十分重要的意义。目前多个树种基因组信息的测序完成,为选择 CRISPR/Cas9 靶标奠定了基础,对于一些速生经济林树种如桉树、杨树、松树等,由于其生长周期较长,用常规方法的新种质培育效率低,通过 CRISPR/Cas9 技术实现基因组的定点编辑,以筛选有益的突变性状,进行遗传改良,可为培育优良的林木新种质提供途径;在有关林木的功能基因研究中,由于获得突变体不易,传统方法多是先用外源基因转化再在体内超量表达或利用 RNAi 等,但这类方法无法准确衡量目标基因的时空表达特征,研究结果可靠性差。若能利用 CRISPR/Cas9 技术,并结合基因组测序信息数据构建林木功能基因的突变体库,将有助于加快林木相关功能基因的基础研究,因此本研究对 CRISPR/Cas9 技术在林木基因组研究中的应用成果进行重点阐述。

3.1 在林木基因组定向改良中的应用

杨树(*Populus trichocarpa*)作为首个完成基因组测序的多年生木本植物,是公认的木本模式植物。利用 CRISPR 技术体系的基因组定点编辑研究也在杨树中率先开展。2015 年,美国乔治亚大学的研究人员首次利用 CRISPR/Cas9 系统,在毛白杨(*Populus tomentosa* Carr)中实现了木质素合成相关关键酶基因的定点编辑^[17]。同年 7 月,有中国学者报道,通过 CRISPR/Cas9 系统实现了毛白杨的基因组编辑和靶基因突变^[51]。2016 年,刘婷婷等^[55]利用 CRISPR/Cas9 系统实现了对杨树八氢番茄红素脱氢酶基因的定点敲除,突变率最高达到 86.4%,且证明该系统可快速高效地敲除 2 个以上的目标基因,从而获得多基因突变植株。Jia 等^[53]将甜橙

CsPDS 基因与 *Cas9* 基因共同组装到 pCambia1380 载体中,得到 CRISPR/Cas9 载体,并转化甜橙植株,PCR 检测结果证明 *Cas9* 对靶标基因的突变效率达到 3.2%~3.9%。Nishitani 等^[52]设计 4 个 gRNA,利用 CRISPR/Cas9 系统诱导苹果 *PDS* 基因突变,发现转化后代中有 31.8% 的白化病预期表型,且有一个长 18 bp 的 gRNA 诱导了靶向突变。这些研究结果表明,利用基因编辑技术获得基因定点突变后代的方法切实可行,但编辑效率差异较大,转化后代的突变体发生比例有待提高。最近有研究人员针对林业害虫如松毛线虫的易感基因进行定点编辑敲除^[56],这对于一些林木高发病虫害,如危害桉树的枝瘿姬小蜂、青枯病等的防治提供了一条新思路,对提高林木抗性、培育抗逆新种质具有重要意义。

3.2 在林木基因功能研究中的应用

长期以来,由于缺乏有效的构建相关基因突变体库的方法,林木功能基因的基础研究进展十分缓慢。随着越来越多的木本植物基因组序列完成,包括种植面积很广的经济林作物以及药用植物的相关功能基因研究也越来越受到研究人员的重视。利用 CRISPR/Cas9 技术可有效地对基因进行定向敲除、替换、插入等,同时还可实现多基因同时突变与染色体重组,这为研究人员从反向遗传学角度快速解析基因功能及研究多基因控制代谢相关途径的互作机制奠定了基础。

纤维素合成酶是纤维素合成调控网络中心的下游元件,可直接调控纤维素的合成。徐惠芳等^[57]以中国鹅掌楸纤维素合成酶(Cellulose synthase, CESA)为研究对象,首次构建了具有表达 CESA gRNA 的 CRISPR/Cas9 基因敲除系统,经 PCR 鉴定与测序分析确认,gRNA 已经完整准确地连入所构建的 CRISPR 载体。唐雨薇等^[58]以茶树咖啡碱合成酶基因为靶标,构建了含 2 个 sgRNA 的双靶点 CRISPR/Cas9 基因组定点编辑载体。中国科学院植物研究所运用 CRISPR/Cas9 系统对葡萄酒石酸合成的关键酶基因进行敲除,降低了葡萄细胞中酒石酸的含量,建立了对葡萄悬浮细胞进行 CRISPR/Cas9 基因编辑的技术,证明 CRISPR/Cas9 技术在葡萄基因组编辑中的可行性^[54]。

桉树(*Eucalyptus*)是南方重要的工业用材林树种,具有良好的经济及生态社会效益。近年来,高效的基因组定向编辑 CRISPR/Cas9 技术体系为桉树材质改良、抗性育种提供了可能^[59-60]。笔者基于已测序的巨桉基因转录组数据分析,以巨桉木质素合

成关键酶基因、分裂素氧化酶基因、调控巨桉胚状体发生的不同 miRNA 为靶标,成功构建了 CRISPR/Cas9 系列载体^[61],现正在进行转化及后续的鉴定工作。

4 CRISPR/Cas9 技术研究展望

与其他技术相比,CRISPR/Cas9 技术具有明显的优势,因为该技术体系完成对靶标基因的遗传编辑后,可在后代配子形成过程中随着染色体的分离而去除,在编辑后代中无转基因的痕迹,无需引用外源基因,因此生物安全性高。Zhang 等^[62]采用瞬时表达 CRISPR/Cas9 技术,通过结合基因编辑后细胞离体培养再生获得基因编辑后代植株。用该方法在小麦中顺利培育出了一种无转基因的基因组定点编辑突变植株。Woo 等^[63]将纯化好的 Cas9 蛋白和 gRNA 直接转染到原生质体中,经过组织培养获得了经过基因编辑的突变体。这种非外源基因转化方法可降低公众对传统转基因操作的顾虑,对利用现代生物技术培育林木新种质研究的快速推进意义极为重大。

CRISPR/Cas9 系统的出现使原来复杂或很难实现的研究工作变得简单易行,在获得相关基因序列的基础上,对任何生物基因组均可有效开展定点编辑,这对林木遗传改良与新种质培育意义深远。在 CRISPR/Cas9 技术的应用方面,减少脱靶、提高基因重组效率和基因编辑的稳定遗传性等仍是需要深入探究的问题。

[参考文献]

- [1] 王根平,杜文明,夏兰琴.植物安全转基因技术研究现状与展望[J].中国农业科学,2014,47(5):823-843.
Wang G P, Du W M, Xia L Q. Current status and prospects of research on plant safety transgenic technology [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2014, 47(5): 823-843.
- [2] Sander J D, Joung J K. CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes [J]. Nature Biotechnology, 2014, 32(4): 347-355.
- [3] Bedell V M, Ying W, Campbell J M, et al. *In vivo* genome editing using high efficiency TALENs [J]. Nature, 2012, 491(7422): 114-116.
- [4] Mao Y, Zhang H, Xu N, et al. Application of the CRISPR-Cas system for efficient genome engineering in plants [J]. 2013, 6(6): 2008-2011.
- [5] Donohoue P D, Barrangou R, May A P. Advances in industrial biotechnology using CRISPR-Cas systems [J]. Trends in Biotechnology, 2017, 36(2): 134-146.
- [6] Sun X, Hu Z, Chen R, et al. Targeted mutagenesis in soybean using the CRISPR-Cas9 system [J]. Sci Rep, 2015, 5: 10342.
- [7] Kryštofová S. CRISPR/Cas in genome defense and gene editing [J]. Acta Chimica Slovaca, 2016, 9(1): 68-74.
- [8] Cong L, Ran F A, Cox D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems [J]. Science, 2013, 8(11): 819-823.
- [9] 常振仪,严维,刘东风,等. CRISPR/Cas 技术研究进展 [J]. 农业生物技术学报, 2015, 23(9): 1196-1206.
Chang Z Y, Yan W, Liu D F, et al. The research progress of CRISPR/Cas technological [J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2015, 23(9): 1196-1206.
- [10] Nishimasu H, Ran F A, Hsu P D, et al. Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA [J]. Cell, 2014, 156(5): 935-949.
- [11] Doudna J A, Charpentier E. Genome editing, the new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9 [J]. Science, 2014, 346(6213): 1258096.
- [12] Mao Y, Botella J R, Zhu J K. Heritability of targeted gene modifications induced by plant-optimized CRISPR systems [J]. Cellular & Molecular Life Sciences, 2017, 74(6): 1075-1093.
- [13] Zhang Z, Mao Y, Ha S, et al. A multiplex CRISPR/Cas9 platform for fast and efficient editing of multiple genes in *Arabidopsis* [J]. Plant Cell Reports, 2016, 35(7): 1519-1533.
- [14] Xing H L, Dong L, Wang Z P, et al. A CRISPR/Cas9 toolkit for multiplex genome editing in plants [J]. BMC Plant Biol, 2014, 14(1): 327.
- [15] Wang T, Wei J J, Sabatini D M, et al. Genetic screens in human cells using the CRISPR-Cas9 system [J]. Science, 2014, 343(6166): 80-84.
- [16] Doench J G, Hartenian E, Graham D B, et al. Rational design of highly active sgRNAs for CRISPR-Cas9-mediated gene inactivation [J]. Nature Biotechnology, 2014, 32(12): 1262-1267.
- [17] Zhou X, Jacobs T B, Xue L, et al. Exploiting SNPs for biallelic CRISPR mutations in the outcrossing woody perennial/r populus/r reveals 4-coumarate: CoA ligase specificity and redundancy [J]. New Phytologist, 2015, 208(2): 298-301.
- [18] Khaoula B, Angela C G, Sophien K, et al. Plant genome editing made easy targeted mutagenesis in model and crop plants using the CRISPR/Cas system [J]. Plant Methods, 2013, 9(1): 39.
- [19] Patro S, Kumar D, Ranjan R, et al. The development of efficient plant promoters for transgene expression employing plant virus promoters [J]. 2012, 5(4): 941-944.
- [20] Feng Z, Zhang B, Ding W, et al. Efficient genome editing in plants using a CRISPR/Cas system [J]. Cell Research, 2013, 23(10): 1229-1232.
- [21] Feng Z, Mao Y, Xu N, et al. Multigeneration analysis reveals the inheritance, specificity, and patterns of CRISPR/Cas-induced gene modifications in *Arabidopsis* [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of A-

- merica, 2014, 111(12):4632-4637.
- [22] Gao X, Chen J, Dai X, et al. An effective strategy for reliably isolating heritable and Cas9-free *Arabidopsis* mutants generated by CRISPR/Cas9-mediated genome editing [J]. *Plant Physiology*, 2016, 171(3):1794-1800.
- [23] Li Z, Liu Z B, Xing A, et al. Cas9-guide RNA directed genome editing in soybean [J]. *Plant Physiology*, 2015, 169(2):960-970.
- [24] Svitashv S, Young J K, Schwartz C, et al. Targeted mutagenesis, precise gene editing and site-specific gene insertion in maize using Cas9 and guide RNA [J]. *Plant Physiology*, 2015, 169(2):931-945.
- [25] 欧阳乐军, 李莉梅, 徐锡荣, 等. 一种基于 CRISPR/Cas 体系的同源修复载体构建方法: 中国, 201710981059. 7 [P]. 2017-10-20.
Ouyang L J, Li L M, Xu X R, et al. A method for constructing homologous repair vector based on CRISPR/Cas system. *China*, 201710981059. 7 [P]. 2017-10-20.
- [26] Sugano S S, Shirakawa M, Takagi J, et al. CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis in the liverwort *Marchantia polymorpha* L. [J]. *Plant & Cell Physiology*, 2014, 55(3):475-481.
- [27] 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 [J]. *Plant Journal*, 2015, 80(6):1139-1150.
- [28] 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 [J]. *Molecular Plant*, 2015, 8(8):1274-1284.
- [29] Liu W, Zhu X, Lei M, et al. A detailed procedure for CRISPR/Cas9-mediated gene editing in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Science Bulletin*, 2015, 60(15):1332-1347.
- [30] Hyun Y, Kim J, Cho S W, et al. Site-directed mutagenesis in *Arabidopsis thaliana* using dividing tissue-targeted RGEN of the CRISPR/Cas system to generate heritable null alleles [J]. *Planta*, 2015, 241(1):271-284.
- [31] Nekrasov V, Staskawicz B, Weigel D, et al. Targeted mutagenesis in the model plant *Nicotiana benthamiana* using Cas9 RNA-guided endonuclease [J]. *Nature Biotechnology*, 2013, 31(8):691-693.
- [32] Gao J, Wang G, Ma S, et al. CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis in *Nicotiana tabacum* [J]. *Plant Molecular Biology*, 2015, 87(2):99-110.
- [33] 孙现军. CRISPR/Cas9 基因定点突变体系构建与大豆抗旱相关 *gma-miR160* 功能研究 [D]. 陕西杨凌: 西北农林科技大学, 2015.
Sun X J. Construction of CRISPR/Cas9 site-directed mutagenesis system and functional research of drought-responsive soybean *gma-miR160* [D]. Yangling, Shaanxi: Northwest A&F University, 2015.
- [34] Jacobs T B, Lafayette P R, Schmitz R J, et al. Targeted genome modifications in soybean with CRISPR/Cas9 [J]. *Bmc Biotechnology*, 2015, 15(1):1-10.
- [35] 蔡宇鹏. CRISPR/Cas9 介导的大豆基因组定点编辑研究 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2016.
Cai Y P. CRISPR/Cas9-mediated genome editing in soybean [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2016.
- [36] 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 [J]. *Plant Physiology*, 2014, 166(2):455-469.
- [37] Ito Y, Nishizawa-Yokoi A, Endo M, et al. CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of the RIN locus that regulates tomato fruit ripening [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 467(1):76-82.
- [38] Wang S, Zhang S, Wang W, et al. Efficient targeted mutagenesis in potato by the CRISPR/Cas9 system [J]. *Plant Cell Reports*, 2015, 34(9):1473-1476.
- [39] 李东昊, 姜玲, 刘春林, 等. 甘蓝型油菜 *BnaSDG8* 基因 CRISPR/Cas9 敲除载体的构建及功能探究 [J]. *湖南农业大学学报(自然科学版)*, 2018(4):346-352.
Li D H, Jiang L, Liu C L, et al. Construction of CRISPR/Cas9 knockout vector *BnaSDG8* and its genetic transformation in *Brassica napus* [J]. *Journal of Hunan Agricultural University (Natural Sciences)*, 2018(4):346-352.
- [40] Shan Q, Wang Y, Li J, et al. Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system [J]. *Nature Biotechnology*, 2013, 31(8):686-688.
- [41] Xu R, Li H, Qin R, et al. Gene targeting using the *Agrobacterium tumefaciens*-mediated CRISPR-Cas system in rice [J]. *Rice*, 2014, 7(1):5.
- [42] Shan Q, Wang Y, Li J, et al. Genome editing in rice and wheat using the CRISPR/Cas system [J]. *Nature Protocols*, 2014, 9(10):2395-2410.
- [43] Endo M, Mikami M, Toki S. Biallelic gene targeting in rice [J]. *Plant Physiology*, 2016, 170(2):667-677.
- [44] Liang G, Zhang H, Lou D, et al. Selection of highly efficient sgRNAs for CRISPR/Cas9-based plant genome editing [J]. *Sci Rep*, 2016, 6:21451.
- [45] 沈春修. 水稻 LOC_Os10g05490 位点冷胁迫条件下表达分析及 CRISPR/Cas9 定向编辑 [J]. *浙江农业学报*, 2017, 29(2):177-185.
Shen C X. CRISPR/Cas9 editing and expression analysis of LOC_Os10g05490 in rice under cold stress [J]. *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, 2017, 29(2):177-185.
- [46] Wang Y, Cheng X, Shan Q, et al. Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew [J]. *Nature Biotechnology*, 2014, 32(9):947-951.
- [47] 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 Re-*

- search, 2013, 41(20):188.
- [48] 朱金洁. CRISPR-Cas9 介导的玉米基因组定点编辑研究 [D]. 北京: 中国农业大学, 2015.
Zhu J J. Targeted genome editing in maize using CRISPR-Cas9 [D]. Beijing: China Agricultural University, 2015.
- [49] Zhang B, Yang X, Yang C, et al. Exploiting the CRISPR/Cas9 system for targeted genome mutagenesis in petunia [J]. Scientific Reports, 2016, 6:20315.
- [50] 胡春华, 邓贵明, 孙晓玄, 等. 香蕉 CRISPR/Cas9 基因编辑技术体系的建立 [J]. 中国农业科学, 2017, 50(7):1294-1301.
Hu C H, Deng G M, Sun X X, et al. Establishment of an efficient CRISPR/Cas9-mediated gene editing system in banana [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2017, 50(7):1294-1301.
- [51] Fan D, Liu T, Li C, et al. Efficient CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis in *Populus* in the first generation [J]. Sci Rep, 2015, 5:12217.
- [52] Nishitani C, Hirai N, Komori S, et al. Efficient genome editing in apple using a CRISPR/Cas9 system [J]. Sci Rep, 2016, 6:31481.
- [53] Jia H, Wang N. Targeted genome editing of sweet orange using Cas9/sgRNA [J]. PLoS One, 2014, 9(4):1196-1206.
- [54] 段 伟. 葡萄基因编辑的魔法“剪刀”: CRISPR/Cas9 [J]. 生命世界, 2018(4):24-25.
Duan W. Magical scissors for grape genetic editing [J]. Life World, 2018(4):24-25.
- [55] 刘婷婷, 范 迪, 冉玲玉, 等. 应用 CRISPR/Cas9 技术在杨树中高效敲除多个靶基因 [J]. 遗传, 2015, 37(10):1044-1052.
Liu T T, Fan D, Ran L Y, et al. Highly efficient CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis of multiple genes in *Populus* [J]. Hereditas, 2015, 37(10):1044-1052.
- [56] 刘慧慧, 张永安, 王玉珠, 等. 美国白蛾 *Wnt-1* 基因的基因组编辑 [J]. 林业科学, 2017, 53(3):119-127.
Liu H H, Zhang Y A, Wang Y Z, et al. Genome editing of *Wnt-1* in fall webworm (*Hyphantria cunea*) [J]. Scientia Silvae Sinicae, 2017, 53(3):119-127.
- [57] 徐惠芳, 金磊磊, 徐 璇, 等. 中国鹅掌楸纤维素合酶的 CRISPR/Cas9 基因敲除系统的 gRNA 表达载体构建 [J]. 分子植物育种, 2017, 15(6):2195-2199.
Xu H F, Jin L L, Xu X, et al. Expression vector construction of cellulose synthase gRNA with CRISPR/Cas9 gene knock-out system of *Liriodendron chinense* [J]. Molecular Plant Breeding, 2017, 15(6):2195-2199.
- [58] 唐雨薇, 刘丽萍, 王若娴, 等. 茶树咖啡碱合成酶 CRISPR/Cas9 基因组编辑载体的构建 [J]. 茶叶科学, 2016, 36(4):414-426.
Tang Y W, Liu L P, Wang R X, et al. Development of a CRISPR/Cas9 constructed for genome editing of caffeine synthase in *Camellia sinensis* [J]. Journal of Tea Science, 2016, 36(4):414-426.
- [59] Ouyang L J, Li L M. Effects of an inducible *aiiA* gene on disease resistance in *Eucalyptus urophylla* × *Eucalyptus grandis* [J]. Transgenic Research, 2016, 25(4):441-452.
- [60] 沙月娥, 欧阳乐军, 彭 舒, 等. 桉树胚状体再生与遗传转化的研究进展 [J]. 植物生理学报, 2012, 48(4):325-332.
Sha Y E, Ouyang L J, Peng S, et al. Research progress in plantlet regeneration of somatic embryos and senetic transformation in *Eucalyptus* [J]. Plant Physiology Journal, 2012, 48(4):325-332.
- [61] 欧阳乐军, 袁玉梅, 李莉梅, 等. 巨桉 miR156 CRISPR 载体构建 [J]. 森林与环境学报, 2018, 38(4):488-493.
Ouyang L J, Yuan Y M, Li L M, et al. Construction of *Eucalyptus grandis* miR156 family CRISPR/Cas9 vector [J]. Journal of Forest and Environment, 2018, 38(4):488-493.
- [62] Zhang Y, Liang Z, Zong Y, et al. Efficient and transgene-free genome editing in wheat through transient expression of CRISPR/Cas9 DNA or RNA [J]. Nature Communications, 2016, 7:12617.
- [63] Woo J W, Kim J, Kwon S I, et al. DNA-free genome editing in plants with preassembled CRISPR-Cas9 ribonucleo proteins [J]. Nature Biotechnology, 2015, 33(11):1162-1164.