

DOI: 10.13376/j.cblls/2015004

文章编号: 1004-0374(2015)01-0020-06



黄勇平, 博士, 研究员, 中国科学院上海生命科学研究院植物生理生态研究所课题组长。主要从事昆虫分子遗传学研究。黄勇平研究员及其团队主要以鳞翅目昆虫为对象, 研究该类昆虫的性别决定机理, 并以此为理论基础研究昆虫性别的遗传调控。近年来发表研究论文 120 余篇, 其中在 SCI 期刊发表论文 70 余篇。

基因组编辑技术在昆虫功能基因组研究中的应用

张忠杰^{1,2}, 刘晓静^{1,2}, 李木旺^{1,3}, 谭安江², 黄勇平^{2*}

(1 江苏科技大学蚕业研究所, 镇江 212018; 2 中国科学院上海生命科学研究院植物生理生态研究所中国科学院昆虫发育与进化生物学重点实验室, 上海 200032; 3 中国农业科学院蚕业研究所, 镇江 212018)

摘要: 基因组编辑技术是在生物基因组水平上对靶标序列进行定点编辑的一种重要手段。近年来, 锌指核酸酶技术 (ZFNs)、类转录激活因子核酸酶技术 (TALENs)、成簇且规律间隔的短回文重复序列和相关 Cas 蛋白的 DNA 核酸内切酶系统 (CRISPR/Cas) 等基因组编辑技术的相继问世, 为功能基因组的研究提供了有效的实验手段。这 3 种基因组编辑技术的基本工作原理都是通过定点切割基因组 DNA 双链, 从而诱导内源性的修复机制产生定点突变。通过介绍这 3 种技术的国内外研究现状及发展趋势探讨了基因组编辑技术在昆虫科学中的应用发展前景。

关键词: 昆虫; 基因组编辑; ZFNs; TALENs; CRISPR/Cas

中图分类号: Q789; Q819; Q96 **文献标志码:** A

Genome editing technologies and advances in insects

ZHANG Zhong-Jie^{1,2}, LIU Xiao-Jing^{1,2}, LI Mu-Wang^{1,3}, TAN An-Jiang², HUANG Yong-Ping^{2*}

(1 Sericultural Research Institute, Jiangsu University of Science and Technology, Zhenjiang 212018, China; 2 Key Laboratory of Insect Developmental and Evolutionary Biology, Institute of Plant Physiology and Ecology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032, China; 3 Sericultural Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Zhenjiang 212018, China)

Abstract: Genome editing technology is an important tool to operate site-specific modification at the biological genomic level. Recently, the advances of zinc finger nucleases (ZFNs), transcription activator-like effector nucleases (TALENs) and clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR associated protein (CRISPR/Cas) system provide the effective methods to gene functional analysis. The basic working principle of these three genome editing techniques is to generate mutagenesis at targeted sites through making double-strand break and followed by inducing genome endogenous repair mechanisms. In this review, we describe the development trend of three genome editing techniques and introduce the applications of these techniques and explore the future development

收稿日期: 2014-10-22

*通信作者: E-mail: yphuang@sibs.ac.cn

prospect of insects' genes functional analysis.

Key words: insect; genome editing; ZFNs; TALENs; CRISPR/Cas

昆虫是自然界中物种最为丰富的生物类群。多达数百万种的昆虫蕴藏着无数具有重要生理功能和经济价值的功能基因。随着昆虫基因组信息的不断丰富和完善, 功能基因组研究在昆虫科学中的地位越发重要, 而遗传操作则是功能基因组研究中必不可少的手段。传统的昆虫遗传操作手段主要采用病毒转染和基于转座子元件的转基因等方法。病毒转染的方法有可能将病毒自身的病毒元件携带进入宿主生物, 依靠转座子元件的转基因体系则存在转座后稳定性以及随机位点插入造成的位置效应等问题^[1-3]。即便如此, 这些方法也仅在少数几种昆虫中才能得以应用。近年来出现的 ZFNs、TALENs、CRISPR/Cas 等基因组编辑技术则提供了新的昆虫遗传操作手段, 必将极大地促进昆虫功能基因组研究的发展。

1 锌指核酸酶技术的应用

锌指核酸酶 (zinc finger nucleases, ZFNs) 是第一代可编辑的核酸内切酶, 它是由非特异性的 *Fok I* 核酸酶和锌指蛋白串 (zinc finger array, ZF array) 融合而成的人工核酸内切酶^[4]。研究人员可以根据靶点序列设计特定的锌指蛋白结合结构域, 从而结合靶点序列, 由 *Fok I* 核酸酶切割靶点序列使双链断裂引发基因突变。

2002 年, Bibikova 等^[5]通过转基因表达 ZFNs 的方法首次在模式昆虫黑腹果蝇 (*Drosophila melanogaster*) 中对 ZFNs 技术进行了测试, 选取果蝇黄体基因 (*Dmyellow*) 作为靶标基因。*Dmyellow* 是果蝇体表皮色素模型中的一个关键基因, 该基因突变会导致果蝇体表黑色素合成减少而呈现为黄色表皮。转基因果蝇靶点序列以非同源性末端连接 (non-homologous end joining, NHEJ) 的修复方式产生了小片段的缺失或者插入, 50% 的转基因个体表现为嵌合体表型。在随后的果蝇基因组编辑研究中, Bibikova 等^[6]利用针对 *Dmyellow* 基因的转基因表达 ZFNs 品系和产生线性同源配体的品系进行杂交, 靶点序列不仅发生了 NHEJ, 同时在靶点序列中也插入了外源序列。上述方法虽然取得了较好的效果, 但是实验方法复杂耗时。Carroll 等^[7]优化实验方案, 通过胚胎注射表达 ZFNs mRNA, 同样对靶基因进行了敲除, 并且发现同时注射表达 ZFN mRNA 和

环形的同源配体质粒可以在靶点进行同源重组, 插入外源片段。2013 年, Beumer 等^[8]对 ZFNs 技术的应用做了进一步的挖掘, DNA 连接酶 IV 突变体果蝇中 ZFNs 所诱导的同源重组的概率得以提高, 配体部分同源片段的缺失或者单碱基突变同样可以发生同源重组, 单链的寡聚核苷酸链亦可用作配体。

家蚕 (*Bombyx mori*) 不仅具有重要的经济价值, 同时也是鳞翅目的代表性模式昆虫。经过不懈的努力, ZFNs 技术也被运用于家蚕的基因功能分析。家蚕幼虫表皮中尿酸颗粒的缺失会导致表皮出现透明现象, 称为油蚕。Takasu 等^[9]选取家蚕尿酸代谢通路中合成表皮尿酸颗粒所必需的 *BmBLOS2* 和 *Bmwh3* 这两个基因为靶基因, 分别胚胎注射针对这两个基因的 ZFNs mRNA, 当代 (Generation 0, G0) 均产生嵌合体油蚕表型。由于 *BmBLOS2* 基因位于 Z 染色体上, 研究人员认为 G0 代雌性油蚕的比例应高于雄性油蚕, 但是实验数据显示两者之间的比例并无显著的差异, 这表明 ZFNs 对于诱导单等位基因和双等位基因之间并无明显差异。2013 年, Wefers 等^[10]以黑脉金斑蝶 (*Danaus plexippus*) 为实验材料, 选取 *Dpcry2* 基因作为靶标基因, 胚胎注射表达 ZFNs mRNA, 突变遗传率达到 50%。在不完全变态昆虫的基因组编辑方面中, Watanabe 等^[11]首次应用 ZFNs 技术在双斑蟋蟀 (*Gryllus bimaculatus*) 中敲除 *Gblac2* 基因, 证明该系统在不完全变态昆虫中同样起作用。

2 类转录激活因子核酸酶技术的应用

类转录激活因子核酸酶 (transcription activator-like effector nucleases, TALENs) 是第二代可编辑的核酸内切酶, 由非特异性的 *Fok I* 核酸酶和 TALE 蛋白组成^[12]。与 ZFNs 技术不同, ZFNs 技术中的每个 ZF 单体以三联碱基的方式结合 DNA 双链, 这种方式对结合位点的选择有着一定的局限性; 而 TALENs 技术中 TALE 单体以单碱基的方式结合 DNA, 这种结合方式在理论上可以对基因组上的任意位点进行编辑。TALENs 技术采用 DNA 结合结构域模块化的构建方法, 简单易行, 其迅速取代 ZFNs 技术, 成为了主流的基因组编辑方法。

自 2010 年 TALENs 技术问世以来, 全世界多个研究团队分别在斑马鱼 (*Danio rerio*)、小鼠 (*Mus*

musculus)、黑腹果蝇 (*Drosophila melanogaster*) 等模式生物中验证了 TALENs 的特异性切割活性^[13-15]。在昆虫基因组编辑研究中, Liu 等^[16]首次在果蝇中通过胚胎注射编码 TALENs mRNA 的方法敲除了 *Dmyellow* 基因, 获得了嵌合体果蝇, 并在 G1 代获得了稳定遗传的突变品系, 但是其采取传统的酶切连接的方法组装 TALENs 单元模块, 这种方法过于繁琐。2013 年, Sakuma 等^[15] 和 Katsuyama 等^[17] 均采用 Golden gate 方法组装 TALENs 单元模块, 这种方法可以在一天内完成所有 TALENs 单元模块的组装, 相比传统的酶切连接构建方法效率更高。Katsuyama 等^[17] 在 TALENs 元件组装完成后胚胎注射 TALENs 表达载体, 成功敲除了果蝇 *Dmyellow* 基因。TALENs 表达载体胚胎注射的成功进一步减少了 TALENs mRNA 体外转录这一步骤。在进一步的实验中, 研究人员通过注射 TALENs 表达载体和同源重组配体质粒, 以同源重组的方式在靶点敲入标记基因, 标记基因整合效率高达 10.5%。因为多数基因敲除后并无明显的表型, 外源标记基因的整合可以解决突变个体的筛选难题。2014 年, Yu 等^[18] 应用 TALENs 系统, 以 DNA 连接酶 IV 突变体果蝇为材料获得以下进展: 一方面, 构建 *miR-281* 敲除的 TALENs, 选取 *miR-281* 基因座左右两侧各 1.3 kb 和 1.9 kb 的序列作为左右两翼同源臂, 克隆连接至 pBSK 质粒, 同时注射同源配体质粒和 TALENs mRNA, G0 代 *miR-281* 缺失率为 4.5%, G1 代同源重组率为 0.8%, 实现了靶基因的精确删除; 另一方面, 设计 *chameau* 基因的 TALENs, 以 TALENs 靶点两侧 1.0 kb 和 2.3 kb 序列为左右两翼同源臂(以一个 *Sma* I 限制性酶切位点序列替换左侧同源臂中的 13 bp 碱基), 克隆连接至 pBSK 质粒, G0 代同源臂替换率为 5.8%, G1 代同源重组率为 1.4%。这说明在果蝇 DNA 连接酶 IV 突变的遗传背景下可以提高 TALENs 技术所诱导的外源基因插入。

随着 TALENs 技术在果蝇中的广泛验证及应用, 多个研究团队在一些非模式昆虫中同样得到了验证。在家蚕中, Wang 等^[19] 和 Sajwan 等^[20] 均以 *BmBLOS2* 基因为靶点基因, 但采用了不同的 TALENs 结构进行验证。Wang 等^[20] 所构建的 TALENs 的 TALE 蛋白两侧无残余序列, 而 Sajwan 等^[20] 所构建的 TALENs 的 TALE 蛋白在 N 端和 C 端分别含有 287 和 232 个氨基酸残基序列。对比这两种不同结构的 TALENs 所诱导的嵌合体突变以及遗传转化, TALE 蛋白两侧无残余序列的 TALENs 结构效

率更高。2013 年, Takasu 等^[21] 为了进一步提高 TALENs 在家蚕中的敲除效率, 对 TALENs 表达质粒进行了优化处理。其采用 Wang 等^[20] 构建的 TALENs 模式结构, 根据家蚕的密码子偏好性对 TALENs 的 N 端、C 端以及 *Fok* I 结构域的密码子进行优化, 并在 5' 非编码区域添加了科扎克共有序列 (KOZAK) 以及来源于家蚕肌动蛋白基因 5' 非编码区域的 60 bp 序列。除此之外, 在 3' 非编码区域添加了 SV40 及 poly(A) 结构, 以 *BmBLOS2* 作为靶基因, 用 TALENs 间隔区域为 15 bp 的 TALENs mRNA 进行胚胎注射, 在 G0 代获得 82%~100% 的嵌合体油蚕, 而 G1 代遗传转化效率为 10.7%~50%。这一实验结果表明, TALENs 技术在家蚕基因组编辑应用中具有很高的敲除效率。鉴于这种极高的突变效率, 研究人员同样可以对未知表型的基因进行敲除研究, 通过基因组检测确认靶基因敲除。Watanabe 等^[22] 在双斑蟋蟀中应用 TALENs 技术敲除 *Gblac2* 基因, 在 G0 代获得 17% 的嵌合体, 遗传转化率同样是 17%, 并采用 SURVEYOR 核酸酶快速检测基因组的突变, 这一检测方法可以快速地在分子水平上检测靶点的突变。埃及伊蚊 (*Aedes aegypti*) 作为一种登革热媒介昆虫, 危害人类的身体健康, 而对其基因的功能研究一直缺乏有效的方法。TALENs 技术在埃及伊蚊中的成功应用将加速埃及伊蚊的基因功能研究^[23]。

3 CRISPR/Cas技术的应用

CRISPR/Cas 技术是目前应用最广泛的基因组编辑技术, 已运用于各种模式生物的基因组编辑^[24]。CRISPR/Cas 系统是细菌以及古细菌中的一种适应性免疫机制, 主要用于抵抗病毒和外源的 DNA 的入侵^[25]。天然存在的 CRISPR/Cas 系统由 CRISPR 序列元件和 Cas 基因家族组成。CRISPR 序列元件转录生成 crRNA 和 tracrRNA, 与 Cas 基因家族编码的核酸内切酶形成一个复合体, crRNA 和 tracrRNA 在此过程中融合成为 sgRNA, 引导 Cas 蛋白对靶点进行切割^[26]。

在昆虫基因组编辑研究中, CRISPR/Cas 技术首先在黑腹果蝇中得到了应用。2013 年, Bassett 等^[27] 采取 crRNA 和 tracrRNA 融合的策略, 以 T7 启动子启动 sgRNA 的转录, 选取 *Dmyellow* 基因为靶基因, 胚胎注射 sgRNA 和 Cas9 mRNA, 在 G0 代获得高达 88% 的突变嵌合体, 并采用高分辨退火分析的方法快速精确地检测靶基因的突变。

Gratz 等^[28]在 *Dmyellow* 基因上选择了两个 CRISPR/Cas 敲除靶点, 同时注射针对两个靶点的 sgRNA 和 Cas9 mRNA, G0 代嵌合体基因组检测发现靶点间的序列出现了大片段删除。在进一步的实验中, 注射 sgRNA 及 Cas9 的 mRNA 的同时, 提供了同源配体质粒, 成功地对目的基因进行了替换。2014 年, Gratz 等^[29]对 CRISPR/Cas 技术介导的目的基因敲除后同源重组修饰进行了改进, 在左右同源臂的中间加入一个标记基因, 以便于阳性个体的筛选。Sebo 等^[30]用 *Vasa* 启动子建立了一个生殖细胞特异表达 Cas9 的转基因品系, 对该品系的胚胎直接注射表达靶点特异性 sgRNA 的质粒, 在 G1 代获得突变个体, 这种策略只需研究人员注射 sgRNA 的表达载体即可对目的基因进行敲除。Yu 等^[18]在 CRISPR/Cas 技术介导的基因组双链断裂的基础上, 设计一系列的同源配体质粒, 联合 CRISPR 系统对目的基因进行一系列的精确编辑: (1) 基因组片段的精确删除; (2) 基因组 DNA 单碱基替换; (3) 目的靶点精确插入 tag, 追踪目的基因蛋白表达谱。

我们实验室已经证实 CRISPR/Cas 技术同样可以应用于家蚕的基因组编辑^[31]。我们选取家蚕尿酸代谢通路中 *BmBLOS2* 基因作为靶基因, 根据开放阅读框序列选取了两个 23 bp 的 sgRNA 靶点, 通过分别注射两种 sgRNA 与 Cas9 的 mRNA 的混合物, 均获得了 95% 左右的嵌合突变体, 对突变体敲除靶点检测证明存在小片段缺失及插入。在进一步的实验中, 我们同时注射两种 sgRNA 及 Cas9 mRNA, 同样在 G0 代筛选出 95% 左右的嵌合突变体, 基因组检测结果显示除了上述两种基因型突变外, 还产生靶点间大片段 (~3.5 kb) 缺失的基因型。2014 年, Liu 等^[32]测试了 CRISPR/Cas 系统多点编辑在家蚕 BmNs 细胞系中的应用。在同时编辑两个位点时, 基因组不仅出现了大片段缺失, 也出现了倒置的现象。他们针对 6 个目的基因选取了 10 个 sgRNA 靶点, 同时转染 10 种不同 sgRNA 的表达质粒及 Cas9 表达质粒, 所有靶点均产生了突变。综上所述, CRISPR/Cas 技术诱导的单点编辑、多点编辑的成功应用, 为以后基因组结构及基因家族敲除等研究提供了有力的技术支撑。

4 基因组编辑技术的拓展及应用

近几年来, 基因组编辑技术的迅猛发展衍生出了一些以这 3 种技术平台为基础的新兴技术, 如转基因 TALENs、转基因 CRISPR、CRISPRi 以及

CRISPRa 等。这些技术的产生进一步拓展了这 3 种基因组编辑技术的应用范围。

目前, 功能基因组研究中仍然存在一些难题。尽管这 3 种基因组编辑技术为研究人员提供了有效的基因敲除工具, 但是某些基因敲除后并无明显的表型, 或会产生敲除致死的现象, 转基因 TALENs 以及转基因 CRISPR 技术的问世在一定程度上解决了这一问题。2013 年, Andrea 等^[33]在埃及伊蚊中利用转基因的方法建立了两个转基因品系, 分别表达 TALENs 的左臂和右臂, 通过两个品系的杂交, 在子代获得了 TALENs 同时表达的双阳性个体, 并成功敲除了眼着色基因 *kmo*。2014 年, 我们实验室首次在家蚕中应用了转基因 TALENs 技术, 成功地敲除了性别决定基因 *dsx* 的雌性特异剪接体^[34]。但由于目前 TALENs 系统在针对不同基因时需要重新组装 TALENs, 费时费力, 还需要进一步完善组装效率。对于转基因 CRISPR/Cas 系统, 尽管同样需要两个转基因品系, 一个用于表达 Cas9 蛋白, 另一个用于表达 sgRNA, 但由于 Cas9 蛋白是 CRISPR/Cas 系统的通用元件, 仅仅需要建立一个针对靶基因的 sgRNA 表达品系, 或者直接在 Cas9 蛋白表达品系中转入 sgRNA 表达元件, 从而使实验过程得到了简化。Kondo 等^[35]建立了两个转基因果蝇品系, 一个是生殖细胞特异启动子 *Nos* 驱动的 Cas9 表达品系, 另一个是 *U6* 启动子驱动的 sgRNA 表达品系, 杂交子一代突变率高达 91.3%。Sebo 等^[36]延续了转基因 CRISPR/Cas 系统的思路, 仍以果蝇为材料, 采用另一种生殖细胞特异性启动子 *Vasa* 建立了一个 *Vasa*-Cas9 品系, 向 *Vasa*-Cas9 转基因品系胚胎中注射表达 sgRNA 的质粒, G1 代可遗传突变率达 71%, 这一方法进一步简化了实验过程。

CRISPR/Cas 技术发展至今已经不仅可以对基因组序列进行定点切割, 同样可以抑制或激活基因的表达。Qi 等^[37]对 Cas9 进行改造, 点突变 Cas9 的关键核酸内切酶结构域位点, 使得 Cas9 丧失核酸内切酶活性。失活的 Cas9 (dead Cas9, dCas9) 仍然可以结合 sgRNA 形成靶点识别复合体, 从而抑制靶基因的转录起始及延长。Gilbert 等^[38]对 dCas9 做了进一步的改进, 将一些不同种类的核染色质修饰结构域分别与 dCas9 融合, 在 HEK293 细胞中测试, 发现 dCas9-KRAB 融合蛋白在 sgRNA 的引导下成功地下调了目的基因的表达。dCas9 不仅可以抑制基因的表达, 同样可以与转录激活因子 VP64 或 p65AD 融合, 利用 sgRNA 引导 dCas9 激活因子

结合在目的基因上游, 调控序列招募 RNA 聚合酶上调基因的转录表达。

高通量测序技术问世不仅缩短了全基因组测序的时间, 同样也降低了测序的成本。至今已有约 2 万个物种的全基因组测序完成。怎样对如此海量的信息进行处理成为后基因组时代的一大难题。全基因组功能缺失筛选可以让研究人员鉴定出对某种表型起重要作用的一个基因家族。CRISPR/Cas 系统基因组编辑的高效性使得研究人员可以对全基因组实施无偏倚的敲除筛选。2013 年末, 两个研究团队利用慢病毒载体向人类细胞中转染针对所有基因的 sgRNA, 同时在细胞中表达 Cas9 核酸内切酶, 通过标记筛选证明 CRISPR/Cas 系统具备很强的阴性及阳性筛选能力^[39-40]。

5 展望

ZFNs、TALENs、CRISPR/Cas 系统都是非常有效的基因组编辑技术。昆虫作为全世界范围内数量最多的物种, 昆虫科学研究不仅要探索生物学的关键科学问题, 同时与国民经济息息相关的益虫利用和害虫防治也都是昆虫科学面临的重要课题。而基因组编辑技术, 特别是基于 CRISPR/Cas 系统的基因组编辑技术必将对昆虫功能基因组的研究, 进而对昆虫科学研究产生强大的推动力。

[参 考 文 献]

- [1] Vannucci L, Lai M, Chiuppesi F, et al. Viral vectors: a look back and ahead on gene transfer technology. *New Microbiol*, 2013, 36(1): 1-22
- [2] Gaj T, Sirk SJ, Barbas CF 3rd. Expanding the scope of site-specific recombinases for genetic and metabolic engineering. *Biotechnol Bioeng*, 2014, 111(1): 1-15
- [3] Dafa'alla TH, Condon GC, Condon KC, et al. Transposon-free insertions for insect genetic engineering. *Nat Biotechnol*, 2006, 24: 820-1
- [4] Carroll D. Genome engineering with zinc-finger nucleases. *Annu Rev Biochem*, 2014, 83: 409-9
- [5] Bibikova M, Golic M, Golic KG, et al. Targeted chromosomal cleavage and mutagenesis in *Drosophila* using zinc-finger nucleases. *Genetics*, 2002, 161(3): 1169-75
- [6] Bibikova M, Beumer K, Trautman J K, et al. Enhancing gene targeting with designed zinc finger nucleases. *Science*, 2003, 300(5620): 764
- [7] Carroll D, Beumer KJ, Trautman J K. High-efficiency gene targeting in *Drosophila* with zinc finger nucleases. *Methods Mol Biol*, 2010, 649: 271-80
- [8] Beumer KJ, Trautman JK, Mukherjee K, et al. Donor DNA utilization during gene targeting with zinc-finger nucleases. *G3: Bethesda*, 2013, 3(4): 657-64
- [9] Takasu Y, Kobayashi I, Beumer K, et al. Targeted mutagenesis in the silkworm *Bombyx mori* using zinc finger nuclease mRNA injection. *Insect Biochem Mol Biol*, 2010, 40(10): 759-65
- [10] Merlin C, Beaver LE, Taylor OR, et al. Efficient targeted mutagenesis in the monarch butterfly using zinc-finger nucleases. *Genome Res*, 2013, 23(1): 159-68
- [11] Watanabe T, Ochiai H, Sakuma T, et al. Non-transgenic genome modifications in a hemimetabolous insect using zinc-finger and TAL effector nucleases. *Nat Commun*, 2012, 3: 1017
- [12] Wright DA, Li T, Yang B, et al. TALEN-mediated genome editing: prospects and perspectives. *Biochem J*, 2014, 462(1): 15-24
- [13] Li T, Huang S, Zhao X, et al. Modularly assembled designer TAL effector nucleases for targeted gene knockout and gene replacement in eukaryotes. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39(14): 6315-25
- [14] Zu Y, Tong X, Wang Z, et al. TALEN-mediated precise genome modification by homologous recombination in zebrafish. *Nat Methods*, 2013, 10(4): 329-31
- [15] Sakuma T, Hosoi S, Woltjen K, et al. Efficient TALEN construction and evaluation methods for human cell and animal applications. *Genes Cells*, 2013, 18(4): 315-26
- [16] Liu J, Li C, Yu Z, et al. Efficient and specific modifications of the *Drosophila* genome by means of an easy TALEN strategy. *J Genet Genomics*, 2012, 39(5): 209-15
- [17] Katsuyama T, Akmammedov A, Seimiya M, et al. An efficient strategy for TALEN-mediated genome engineering in *Drosophila*. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41(17): e163
- [18] Yu Z, Chen H, Liu J, et al. Various applications of TALEN- and CRISPR/Cas9-mediated homologous recombination to modify the *Drosophila* genome. *Biol Open*, 2014, 3(4): 271-80
- [19] Wang F, Ma S, Xu H, et al. High-efficiency system for construction and evaluation of customized TALENs for silkworm genome editing. *Mol Genet Genomics*, 2013, 288(12): 683-90
- [20] Sajwan S, Takasu Y, Tamura T, et al. Efficient disruption of endogenous *Bombyx* gene by TAL effector nucleases. *Insect Biochem Mol Biol*, 2013, 43(1): 17-23
- [21] Takasu Y, Sajwan S, Daimon T, et al. Efficient TALEN construction for *Bombyx mori* gene targeting. *PLoS One*, 2013, 8(9): e73458
- [22] Watanabe T, Noji S, Mito T. Gene knockout by targeted mutagenesis in a hemimetabolous insect, the two-spotted cricket *Gryllus bimaculatus*, using TALENs. *Methods*, 2014, 69(1): 17-21
- [23] Aryan A, Myles KM, Adelman ZN. Targeted genome editing in *Aedes aegypti* using TALENs. *Methods*, 2014, 69(1): 38-45
- [24] Hsu PD, Lander ES, Zhang F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell*, 2014, 157(6): 1262-78
- [25] Horvath P, Barrangou R. CRISPR/Cas, the immune

- system of bacteria and archaea. *Science*, 2010, 327(5962): 167-70
- [26] Haurwitz RE, Jinek M, Wiedenheft B, et al. Sequence- and structure-specific RNA processing by a CRISPR endonuclease. *Science*, 2010, 329(5997): 1355-8
- [27] Bassett AR, Tibbit C, Ponting CP, et al. Highly efficient targeted mutagenesis of *Drosophila* with the CRISPR/Cas9 system. *Cell Rep*, 2013, 4(1): 220-8
- [28] Gratz SJ, Cummings AM, Nguyen JN, et al. Genome engineering of *Drosophila* with the CRISPR RNA-guided Cas9 nuclease. *Genetics*, 2013, 194(4): 1029-35
- [29] Gratz SJ, Ukken FP, Rubinstein CD, et al. Highly specific and efficient CRISPR/Cas9-catalyzed homology-directed repair in *Drosophila*. *Genetics*, 2014, 196(4): 961-71
- [30] Sebo ZL, Lee HB, Peng Y, et al. A simplified and efficient germline-specific CRISPR/Cas9 system for *Drosophila* genomic engineering. *Fly: Austin*, 2014, 8(1): 52-7
- [31] Wang Y, Li Z, Xu J, et al. The CRISPR/Cas system mediates efficient genome engineering in *Bombyx mori*. *Cell Res*, 2013, 23(12):1414-6
- [32] Liu Y, Ma S, Wang X, et al. Highly efficient multiplex targeted mutagenesis and genomic structure variation in *Bombyx mori* cells using CRISPR/Cas9. *Insect Biochem Mol Biol*, 2014, 49: 35-42
- [33] Aryan A, Anderson MA, MylesK M, et al. TALEN-based gene disruption in the dengue vector *Aedes aegypti*. *PLoS One*, 2013, 8(3): e60082
- [34] Xu J, Wang Y, Li Z, et al. Transcription activator-like effector nuclease (TALEN)-mediated female-specific sterility in the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Mol Biol*, 2014, 23(6): 800-7
- [35] Kondo S, Ueda R. Highly improved gene targeting by germline-specific Cas9 expression in *Drosophila*. *Genetics*, 2013, 195(3): 715-21
- [36] Sebo ZL, Lee HB, Peng Y, et al. A simplified and efficient germline-specific CRISPR/Cas9 system for *Drosophila* genomic engineering. *Fly: Austin*, 2014, 8: 52-57
- [37] Qi LS, Larson MH, Gilbert LA, et al. Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. *Cell*, 2013, 152(5): 1173-83
- [38] Gilbert LA, Larson MH, Morsut L, et al. CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes. *Cell*, 2013, 154(2): 442-51
- [39] Wang T, Wei JJ, Sabatini DM, et al. Genetic screens in human cells using the CRISPR-Cas9 system. *Science*, 2014, 343(6166): 80-4
- [40] Shalem O, Sanjana NE, Hartenian E, et al. Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells. *Science*, 2014, 343(6166): 84-7