

DOI: 10.13376/j.cbls/2015015

文章编号: 1004-0374(2015)01-0099-08

CRISPR/Cas系统及其在昆虫基因功能研究中的应用

张敏菁¹, 张春红¹, 孙学鹏², 李红叶², 祝增荣^{1*}

(1 浙江大学昆虫科学研究所, 杭州 310029; 2 浙江大学生物技术研究所, 杭州 310029)

摘要: 近年来在众多细菌和古细菌中发现一类成簇的、有规律间隔的短回文重复序列 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR) 结构家族, 通过对其及相关基因 (CRISPR-associated genes, Cas gene) 的系统研究得知, 它是生物体长期进化形成的获得性免疫系统, 由 RNA 介导, 降解入侵病毒或者噬菌体 DNA。众多研究者将 CRISPR/Cas 系统改造成第三代人工核酸酶, 用于靶向编辑基因组, 目前已广泛应用于人类细胞、小鼠、大鼠、斑马鱼、细菌、果蝇、酵母、线虫等。综述了此系统的基本结构、原理及在昆虫上的应用、展望前景, 为今后开展昆虫基因功能研究提供一定的技术参考。

关键词: CRISPR/Cas9 系统; 昆虫; 基因组编辑技术; 同源重组

中图分类号: Q789; Q819; Q96 **文献标志码:** A

CRISPR/Cas: the emerging tool for insect genomic study

ZHANG Min-Jing¹, ZHANG Chun-Hong¹, SUN Xue-Peng², LI Hong-Ye², ZHU Zeng-Rong^{1*}

(1 Institute of Entomology Science, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China;

2 Institute of Biotechnology, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

Abstract: The clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) system was originally discovered as acquired immunity system in numerous bacteria and archaea. Systematic analysis of CRISPR and its associated genes (CASs) revealed the crucial roles in defending external invasion of viruses and phages via RNA-mediated DNA degrading. The natural CRISPR/Cas system has been remolded as the third generation artificial nuclease, which is a powerful and promising tool for targeted genome editing. Currently, CRISPR/Cas-based genome editing has been successfully applied in a increasing number of species, such as human, mice, rats, zebrafish, bacteria, fruit flies, yeast and nematodes. In this paper, we reviewed the structural basis and mechanisms of CRISPR/Cas system, and discussed the prospective application in insect genomics, to provide some technical references for insect gene function study in the future.

Key words: CRISPR/Cas9; insect; genome editing; homologous recombination

随着越来越多昆虫物种全基因组测序的完成, 如黑腹果蝇 (*Drosophila melanogaster*)、赤拟谷盗 (*Tribolium castaneum*)、家蚕 (*Bombyx mori*)、金小蜂 (*Nasonia*)、豌豆蚜 (*Acyrtosiphon pisum*)、小菜蛾 (*Plutella xylostella*) 等^[1-6], 昆虫学工作者们面临的重大挑战就是如何从海量的基因组数据中获得基因功能等有效的信息, 而要实现这个目标的重要工具就是基因组编辑 (genome editing) 技术^[1], 因此, 在现代生物学研究中, 掌握和运用基因组编辑技术显得尤为重要。

近年来兴起的基因组编辑技术主要有锌指核酸酶 (zinc-finger nucleases, ZFNs)^[7-8]、转录激活因子样效应因子核酸酶 (transcription activator like effector

收稿日期: 2014-06-26; 修回日期: 2014-08-13

基金项目: 国家重点基础研究发展规划 (“973” 计划) (2010CB126200); 农业部公益性(农业)行业项目(2014-03030); 科技部十二五科技支撑项目(2012BAD19B01); 国家自然科学基金项目(31371935); 上海市长三角科技联合攻关项目(13395810100)

*通信作者: E-mail: zrzhou@zju.edu.cn

nucleases, TALENs)^[9-11], 以及最近的一种新兴技术——成簇的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 system)^[12-13] (表 1)。本文将着重介绍 CRISPR/Cas 系统的基本结构、作用机制、在昆虫中的应用及其与前两者基因组编辑技术的比较。

锌指核酸酶 (ZFN) 是第一代人工核酸内切酶, 由可特异性结合 DNA 的锌指蛋白和非特异性的核酸内切酶 *Fok I* 融合而成, 能够在多种生物体基因组的特定位置造成双链缺口 (double-strand break, DSB), 从而诱发细胞内修复机制产生突变体^[14]。每个锌指蛋白结合域由大约 30 个氨基酸组成, 能够特异性识别靶标序列上 3~4 个碱基。锌指核酸酶的靶标序列含有两个锌指蛋白结合位点, 两个结合位点之间的间隔序列是核酸内切酶 *Fok I* 切割位点。ZFNs 中使用的无明显序列特异性的 *Fok I* 是以天然存在的有特定识别序列的 *Fok I* 为基础, 进行工程化改造得到的。

2012 年, 第二代人工核酸内切酶转录激活因子样效应因子核酸酶 (TALEN) 被 *Science* 评为十大科学突破之一^[15], 它与锌指核酸酶原理相似, 都能精确修饰基因组。转录激活因子样效应因子 (TALEs) 最早在植物病原体黄单胞杆菌 (*Xanthomonas*) 中被发现^[9], 由 34 个氨基酸的重复单元组成, 每个单元可以识别一个碱基, 特异性通常由其第 12、13

位的两个氨基酸决定。人工改造 TALEs 的氨基酸序列和长度, 可使之与各种效应元件, 如转录活化因子、转录抑制因子、转座酶、DNA 等结合, 从而对基因组的结构进行改造。

1 CRISPR/Cas系统介绍

CRISPR/Cas 系统最早于 1987 年在大肠杆菌 K12 中被发现, 它是一段碱性磷酸酶基因附近的串联间隔重复序列^[13]。2002 年, Jansen 等^[16] 将其正式命名为 clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)。CRISPRdb 是一个由巴黎大学维护的专门收录 CRISPR 信息的数据库, 通过分析发现, 有 40% 的细菌基因组或质粒中存在至少一个 CRISPR 基因座^[17-18]。不同物种间 CRISPR 位点数量、CRISPR 中重复序列和间隔序列的数量都有所不同^[16,19-20]。

1.1 CRISPR/Cas系统基本结构

CRISPR/Cas 系统由 CRISPR 序列及其位点附近的一系列保守的相关基因 (CRISPR-associated genes, Cas genes) 组成。CRISPR 由一系列短的高度保守的正向重复序列 (repeats) 与长度相似的间隔序列 (spacers) 间隔排列组成。Cas 基因编码的蛋白质具有核酸相关的功能域, 可位点特异性切割 DNA 双链。CRISPR 和 Cas 基因之间有一段作为启动子的 CRISPR 前导序列 (leader sequence), 可启动 CRISPR 序列转录^[21]。

表1 TALEN、ZFN及CRISPR/Cas系统的比较

	TALEN	ZFN	CRISPR/Cas
特异性靶向原理	蛋白质介导, 每个TALE由34个氨基酸的重复单元组成, 每个单元可以识别一个碱基, 特异性通常由其第12、13位的两个氨基酸决定。	蛋白质介导, 每个锌指蛋白结合域由大约30个氨基酸组成, 能够特异性识别靶标序列上3~4个碱基。	RNA介导, sgRNA (single strand RNA)上20个碱基的向导序列以及紧跟于靶序列后的PAM序列。
核酸内切酶	FOK I家族的非特异性核酸内切酶	FOK I家族的非特异性核酸内切酶	含有两个核酸酶结构域的Cas蛋白, 一个在蛋白质中间的HNH核酸酶结构域和一个位于N端的RuvC-like结构域分别切割DNA的两条链
质粒构建	将多个重复单元通过分子克隆或是以固相为基础的TALE重复组装方法串联起来。	将多个重复单元通过分子克隆或是以固相为基础的锌指重复组装方法串联起来。	只需改变sgRNA中20或30个碱基的向导序列即可
应用范围	能够与各种效应元件, 如转录活化因子、转录抑制因子、转座酶、DNA等搭配, 对基因组的结构或者功能进行改造等。	能够与各种效应因子结构域, 如核酸酶结构域、转录激活因子结构域、位点特异性的重组酶结构域等搭配, 对基因组中的目标位点进行各种遗传修饰。	几乎可以在sgRNA的介导下对任意的DNA序列进行切割。

Cas 基因具有较高的多样性, 功能丰富。根据 Cas 基因序列和 CRISPR/Cas 系统免疫机制可将系统大致分为 3 类: I、II、III 类^[22]。I 和 III 类都具有多个 Cas 蛋白。I 类系统在古细菌和细菌中都有发现, 而 III 类大多存在于古细菌中, 鲜有出现在细菌中^[16], 这两种类型都是由多个 Cas 蛋白形成的复合体参与 DNA 切割。II 类仅存在于细菌中^[16], 且只需一个 Cas9 蛋白来切割 DNA^[23], 因此, 这个类型的系统是被改造得最多的人工核酸酶。Cas9 是由 1 409 个氨基酸组成的含有两个核酸酶结构域的蛋白质, 一个在蛋白质中间的 HNH 核酸酶结构域和一个位于 N 端的 RuvC-like 结构域分别切割 DNA 的两条链^[24]。目前, 此系统已应用于人类细胞、小鼠、大鼠、斑马鱼、细菌、果蝇、酵母、线虫、水稻等^[24-29], 成功定向敲除基因, 本文将介绍该系统在昆虫中的应用。

1.2 CRISPR/Cas作用机制

虽然 CRISPR/Cas 的详细机制还未完全阐明, 但已基本明确其作用机制可大致分为 3 个阶段: 适应、表达、干扰^[30]。第一阶段, 外来入侵 DNA 中的原型间隔序列 (protospacer) 被整合到宿主基因组的 CRISPR 位点 5' 端的两个重复序列之间^[21], 虽然目前还不清楚整合位点选择的机理, 但很有可能是保守性的 Cas 蛋白在起作用, 如靠近 protospacer 的 1~4 个碱基高度保守, 称为 PAM (protospacer adjacent motifs), 被认为在位点识别中起到重要作用^[31]。第二阶段分为两个步骤, 第一步是 CRISPR

转录产生前体非编码 RNA (precursor crRNA, pre-crRNA); 第二步是长链 pre-crRNA 加工成短链 crRNA, 在 II 型系统中, 大分子蛋白 Cas9 在这一步中起到重要作用。短链 crRNA 再与 trans-activating crRNA (tracrRNA) 形成双链二级结构^[32], 以指导 Cas 蛋白切割。第三阶段是 crRNA 和 tracrRNA 的二元复合物与 Cas 蛋白结合, 识别特异性位点并对双链 DNA 进行切割, 产生 DSB, II 型系统切割位点位于 PAM 上游 3~8 nt 处^[24]。

在细菌和古细菌的原始免疫系统中, crRNA 和 tracrRNA 与 Cas 蛋白结合发挥作用。而优化后的系统中, crRNA 和 tracrRNA 的二元复合体可简化为 single strand sgRNA, 它必须包括一个互补于靶基因序列的引导序列和一个可与 Cas9 蛋白结合的支架序列^[30]。因此, 只需表达两个产物——sgRNA 和 Cas 蛋白, 便能简便地、有效地修饰生物体基因组 (图 1)^[33]。

在 CRISPR/Cas 系统的作用下, 靶标位置产生 DSB, DSB 诱导细胞引发非同源末端连接修复 (non-homologous end joining, NHEJ) 或同源重组 (homologous recombination, HR) 修复机制对 DSB 进行修复, 最终产生突变体^[34]。

同源重组修复是以同源链为模板的修复机制, 有位点特异性的核酸酶 (site-specific nuclease) 参与, 其保真度非常高。利用 HR 可以插入一个或者多个基因, 也可以进行单碱基替换。而非同源末端连接修复机制是另外一种不会用到同源模板链的修复机

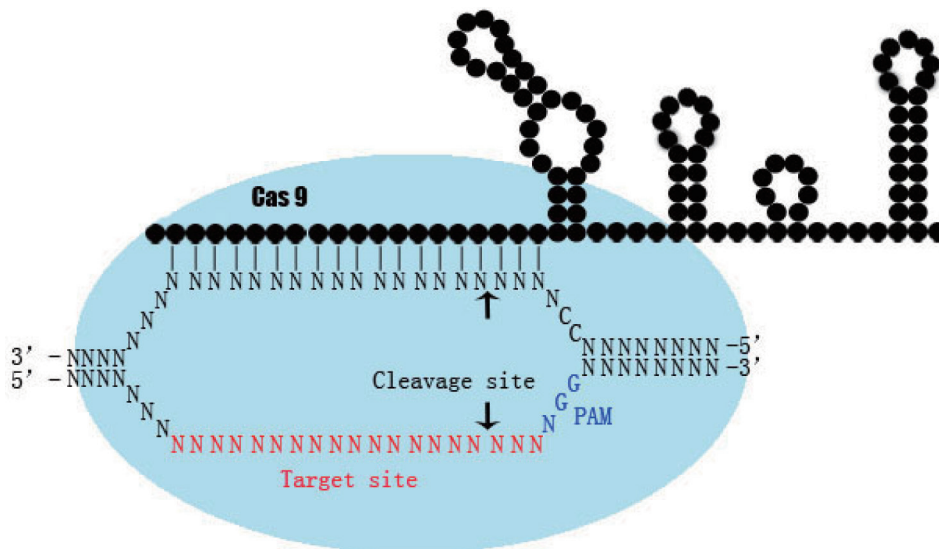


图1 用于基因组编辑的双元件CRISPR/Cas9系统示意图^[43]

制, 所以在断裂处容易出现小的插入或者缺失突变, 常常会导致移码突变, 使基因的功能遭到破坏。而在 CRISPR/Cas 中, 主要是依靠 NHEJ 来产生突变。

1.3 脱靶效应

有实验发现, CRISPR/Cas 系统存在脱靶效应, 即由于其对靶位点的识别主要依靠 13 个碱基及 PAM 序列, 这样的序列在大的基因组中很容易出现重复, 因而会被 Cas 蛋白非特异性地切割。研究表明, Cas 蛋白对于 sgRNA 5' 端初始碱基的错配有一定的容忍度。当 5' 端错配多于 1 个碱基, 可能出现脱靶效应。而在 sgRNA 的 3' 端的错配, 通常会导致无法靶向切割^[35-38]。也有研究表明, 在人类细胞中有 5 个碱基错配的情况下, Cas9 蛋白仍能切割双链^[39-40]。但在以果蝇、家蚕为对象的实验中, 使用 CasOT (Cas9/sgRNA off-target searching tool) 工具、PCR 扩增和测序方法, 结果未检测到脱靶效应^[41-42], 说明不同物种之间, Cas9 的保真性存在一定差异。

2 CRISPR/Cas系统在果蝇中的应用

2013 年至今已有多个研究团队在黑腹果蝇中运用 CRISPR/Cas 系统对果蝇基因组进行靶向编辑^[41,43-50], 不同点在于他们使用不同的方法产生系统的两大元件, 即 Cas9 蛋白和 sgRNA, 以达到编辑基因组的目的。

2.1 共注射表达sgRNA和Cas9蛋白的质粒

第一种果蝇突变体的产生是依靠两种质粒共注射的方法。Gratz 等^[45] 将一个在 Hsp70 启动子下表达 Cas9 基因的质粒和另一个在来自 U6 基因的 *pol III* 启动子下表达 sgRNA 的质粒共注射到果蝇合胞体胚层。以能够遗传给后代的 *yellow* 作为靶标基因, 检测突变效率结果发现, 细胞自发进行 NHEJ 修复后, 66% 的被注射果蝇产生突变, 而仅 5.9% 的被注射的果蝇产生了至少一个突变体后代。而注射两种 sgRNA, 它们分别靶向 *yellow* 基因两端序列, 会引起目标基因大片段缺失并提高突变效率。

相似地, Ren 等^[41] 比较了不同启动子、sgRNA 支架长短对突变效率的影响。研究发现, 在 *nos* 启动子下表达 Cas9 基因的质粒和在 U6b 启动子下表达短支架 sgRNA 的质粒共注射后, 突变效率最高, 约为 3.2%。

此种方法虽然操作简便, 但产生突变体后代的比例较低。

2.2 共注射sgRNA和表达Cas9蛋白的mRNA

Bassett 等^[51] 将离体转录好的 sgRNA 与表达

Cas9 蛋白的 mRNA 一起注射到果蝇早期胚胎中, 靶标基因是 *yellow*。有 88% 的果蝇产生了至少一个突变体后代。Yu 等^[50] 利用相同的方法对 *yellow* 等 7 个基因进行定向修饰, 突变效率达到 80% 左右。

这种方法的突变效率高, 并且能在基因组上广泛应用。与共注射质粒的方法比较, 研究者认为两者效率的差异来源于 sgRNA 和 Cas9 蛋白的表达水平^[43]。注射体外转录好的 RNA, 在果蝇胚胎中表达水平高于质粒, 但是从实验操作而言, 体外转录这一步需要花费大量时间。

2.3 转基因果蝇杂交

Kondo 等^[52] 通过两种转基因果蝇杂交产生突变体后代。一种转基因果蝇在 *nanos* 启动子下, 在生殖细胞中表达 Cas9 蛋白; 另一种转基因果蝇在 U6 启动子下普遍表达 sgRNA。检测结果发现, 有 90% 的果蝇产生了至少一个突变体后代, 并且两种 sgRNA 共表达会产生最大 1.6 kb 的片段缺失, 突变效率更高。

虽然这种方法的突变效率和可育比例高, 但缺点是每修饰一个靶标基因就需要产生一种新的转基因果蝇, 时间成本过高。不仅如此, 突变体产生后还需移去转入的 sgRNA 和 Cas9 基因, 操作较为复杂。

2.4 向转Cas9基因的果蝇注射编码sgRNA的质粒

Sebo 等^[53] 在生殖细胞系表达 *vasa-Cas9* 的转基因果蝇中注射编码 sgRNA 的质粒, 70% 的果蝇产生突变体后代。Ren 等^[41] 也用此种方法实验, 不同点在于使用的是 *nanos* 启动子, 获得突变的效率为 92.9%。

相较前三种介绍的方法, 此方法通过只在生殖细胞中表达 Cas9 蛋白而避免在体细胞产生突变, 影响细胞正常生长和发展^[43], 并且其具有操作简便、突变效率高、可育比例高等优势, 故应用范围广。实际上, CRISPR/Cas9 打靶效率因基因座不同, 甚至基因座相同而因位点不同差异很大。因此, 为了控制变量来比较不同方法运用此系统的差异, Gratz 等^[46] 就对同一基因位点进行实验, 结果发现共注射 gRNA 和 *hsp70-Cas9* 质粒的果蝇有 8% 产生了突变体后代, 而所有后代中 1.4% 是突变体; 向 *vasa-Cas9* 转基因果蝇注射 gRNA 的果蝇有 53% 产生了突变体后代, 而所有后代中 15% 是突变体。可见, 两者打靶效率差异十分明显, 并且只在生殖细胞中表达 Cas9 蛋白的果蝇健康, 纯合可育。

3 CRISPR/Cas系统在家蚕中的应用

家蚕不仅是一种具有很高经济价值的吐丝昆虫, 还是研究鳞翅目昆虫的模式生物。为了更深入地研究它, 许多昆虫学工作者利用不同的生物技术工具对其基因组进行编辑。在家蚕中应用 CRISPR/Cas 系统定向敲除基因也已获得成功。研究者选择家蚕尿酸盐代谢通路中的 *BmBLOS2* 基因作为靶标基因, 设计了两个靶向位点及 sgRNA, 通过显微注射的方法, 将编码 Cas9 的 mRNA 和 sgRNA 混合注射到家蚕胚胎, 成功获得了高突变效率的家蚕突变体, 并且能够稳定遗传^[54-55]。

西南大学家蚕基因组学国家重点实验室也以家蚕为对象, 选择了 *BmKu70* 作为靶标基因, 利用 CRISPR/Cas 系统在家蚕核细胞进行定向敲除^[56]。他们采用的是转入质粒 DNA, 无需体外转录, 比直接注射 RNA 更方便快捷且不易降解。当家蚕核细胞转入针对 6 个基因的 10 条 sgRNAs 时, 所有靶标位点都产生了定向突变, 表明此系统可以诱导多个基因同时突变, 并且没有脱靶现象^[57]。除此之外, CRISPR/Cas9 还能诱导高频率定向基因组结构变化, 如大的染色体的缺失或倒置。综上所述, 高效率的定向基因编辑、基因组结构改变以及多位点同时编辑的实现, 为研究者精确、复杂地操控基因提供了强有力的技术支持。

4 基于同源重组修复的靶位点精确编辑

很多研究侧重于关注在靶标位点是否产生了插入或缺失, 而有少数实验室报道了利用基于同源重组修复 (HR) 途径修复的 CRISPR/Cas 基因修饰^[58]。通过非同源末端连接修复 (NHEJ) 途径修复产生的突变片段大小具有不确定性, 小到 1 个碱基, 大到几百个碱基^[59]。虽然利用 NHEJ 途径修复产生一个基因的突变体的效率高, 但由于其造成缺失或插入的片段大小不可预测, 故无法在基因组产生精确的插入、删除或置换, 也就难以应用于活体基因功能研究^[49]。然而, HR 修复途径可弥补这个缺陷。HR 修复途径是以同源链为模板, 保真度非常高, 因此, 利用 HR 途径可以对基因组靶标位点进行精确修饰。

Gratz 等^[46]构建了一个 HR 修复途径所需的供体 DNA 载体, 包含为了快速整合同源臂的多克隆位点、为了随后接近基因座的 attP ΦC31 噬菌体重组位点、可见标记 3xP3DsRed 以及在其旁的 loxP 位点 (为了标记能被移除)。将此载体与编码 gRNA

的 DNA 共注射到 *vasa-Cas9* 转基因果蝇胚胎中, 16% 的果蝇产生了精确突变。

Yu 等^[49]选择了果蝇的两个基因座——*CG4221* 和 *CG5961* 作为研究对象, 利用 CRISPR/Cas 系统和 HR 途径进行实验。供试果蝇选择 *Ligase4* 突变体 (*Lig4^{l69}*), 因为 *Ligase4* 基因功能丧失后, NHEJ 途径被阻断, 故细胞会启动 HR 途径修复 DSBs。在 *CG4221* 突变体中, *CG4221* 的大小为 0.12 kb 的 F-box 域被 *loxP* 精确置换, 导致基因功能丧失。在 *CG5961* 突变体中有相似的结果。在同源供体 DNA 上, 设计一个 Hind III 限制性位点, 通过 HR 途径, 成功置换了 *CG5961* 基因座中第一个编码外显子 40 bp 的内源 DNA 片段。值得一提的是, 同样是 HR 修复途径, 利用 TALEN 的突变效率低于 CRISPR/Cas 系统。

Port 等^[47]利用转基因 Cas9 系和通用的 gRNA 表达质粒, 与寡核苷酸供体一起, 通过同源重组进行精确基因组编辑, 而且不需要可见的标记。他们设计了一个寡核苷酸供体 DNA 以引入一个 11 bp 的序列, 这个序列包括 BgIII 限制性酶的识别位点。将供体 DNA 注射到 *act-cas9 U6:3-gRNA-e* 胚胎, 产生 DSB 并诱发细胞 HR 产生突变体, 突变体效率达到 40%, 并且测序发现, 在靶位点有供体 DNA 的精确整合。

Bassett 等^[44]验证了在果蝇 S2 细胞系中, 依靠 HR 的 CRISPR/Cas9 系统也能产生精确突变。有研究表明, 短单链 DNA 寡核苷酸 (ssDNA) 和长双链 DNA (dsDNA) 供体都能作为模板, 在果蝇和其他物种中实现 HR 途径。因此, 他们共转染 gRNA 切割位点两边的 DNA 供体, PCR 检测结果发现, 同源臂越长, 整合效率越高, 并且最优的同源臂长 (通过同源基因靶标) 为 1 kb。通过这个技术, 研究者有可能可以控制果蝇细胞系的遗传, 甚至可以研究基因组维度的细胞表型。

5 简便方法筛选突变体

基于 PCR 的筛选突变体方法, 花费大量人力物力, 且效率不高。Yu 等^[49]开发了一种简便筛选的方法, 它利用的是果蝇 *white* 基因标记。他们首先构建含有 *white* 编码序列的 pP[RS3]^{3M} 载体, 再将 gRNA 和外源供体 DNA (pP[RS3]^{3M}-yellow^{white-K-1}) 共注射到果蝇胚胎, *yellow* 基因的突变体可通过是否为 *white⁺* 表型 (红眼) 来判断。此方法不需要高通量的 PCR 和酶解, 只需显微镜观察, 因此简单、

快速、准确且适用范围广。Gratz 等^[46]也设计了一种方法,但只适用于在靶标位点包含已标记的转座子的果蝇株系,如 *DSH3PXI^{EY08084}* 果蝇。这种方法利用已标记的转座子在修复过程中缺失来筛选成功的突变体。目前在家蚕的突变体筛选法中,应用普遍的仍是 PCR 扩增并测序,只有当靶标基因的突变会改变易观察表型,如体色时,才能通过肉眼观察简便筛选^[42]。因此,未来需进一步优化筛选方法,达到对难以从表型筛选的位点进行快速筛选的目的。

6 总结与展望

CRISPR/Cas II 型系统因其系统成分简单、操作方便、突变效率高的优点,已成为现在发展最为迅速、国内外学者广泛研究开发、应用于多种生物体基因组的定向基因编辑技术。由于受到 PAM (NGG) 的限制,它不能对所有靶标位点进行编辑,但越来越多的研究显示,不同细菌中 CRISPR/Cas 的 PAM 不同,有 CWT、GAA 等^[31,60],因此,可以适应不同靶位点,适用范围将更广。

作为第三代人工核酸酶——CRISPR/Cas 系统具有显著优势。首先,CRISPR 的靶向突变效率要高于 TALEN^[49];其次,ZFN 与 TALEN 的 DNA 特异性结合域都是蛋白质,因此,在实际操作中需要根据靶标序列设计合成蛋白质,构建组装时间长且成本高。而新兴的 CRISPR/Cas 由 RNA 介导,每个靶标位点只需替换已构建好的载体中的 20 nt 碱基,重复利用率高而操作简便、节省成本^[61]。

虽然对 CRISPR/Cas 系统的基础研究及应用已开展得如火如荼,但其详细作用机制还未完全阐明。在应用方面,CRISPR/Cas 系统也存在一定缺陷。第一,不同生物体突变效率差别大,就如比如在果蝇中突变效率高而在酵母中突变效率低,因此,可能并不适用于所有生物体,不同昆虫亦然。第二,虽然在黑腹果蝇、家蚕中应用未检测到脱靶效应,但有文献报道在其他生物体上应用时出现脱靶效应,如小鼠、人等^[62-63]。因此,需要研发新方法来解决脱靶问题,如南京大学模式动物研究所黄行许课题组利用 Cas9 切口酶和成对 sgRNA,在高效突变小鼠基因基础上,大大降低 CRISPR/Cas9 系统的脱靶效应^[64]。第三,目前应用普遍的突变体筛选法仍是 PCR 扩增并测序检测,只有当靶标基因的突变会改变易观察表型时,才能通过肉眼观察简便筛选。因此,未来需进一步优化筛选方法、缩短筛选时间,达到对难以从表型筛选的位点进行快速筛选的目

的。此外,CRISPR/Cas9 系统目前还只限于对核基因组的编辑,无法完成对细胞器基因组的操作,而 TALEN 系统通过改造后已经能对线粒体基因组进行改造^[65]。

2014 年初,在人类细胞中完成了基于 CRISPR/Cas 系统的全基因组敲除筛选,发现靶向 18 080 个基因的全基因组 CRISPR/Cas9 敲除 (genome-scale CRISPR/Cas9knockout, GeCKO) 文库的慢病毒传递,能在人类细胞中进行正向和负向的选择性筛选^[66]。这对于在昆虫中应用此全基因组筛选平台具有重要意义。例如,为了找到特定蛋白质在某一昆虫中的受体,可针对此昆虫的全基因组设计覆盖每个基因的 sgRNA 库,得到敲除了相应基因的昆虫个体,再进行蛋白筛选,最终获得相关受体基因。

随着昆虫全基因组测序的不断发展,人们已经获得了黑腹果蝇、赤拟谷盗、家蚕、寄生蜂、豌豆蚜、小菜蛾等昆虫的全基因组,因此,怎么样把海量基因组信息转化成有意义的基因组功能变得尤为重要。而 CRISPR/Cas9 系统便可以帮助我们对昆虫的几乎任意基因进行人工操作,对研究昆虫基因功能、代谢通路等具有重要意义。

综上所述,CRISPR/Cas 系统作为一项新技术,有令人瞩目的优势,但也有需要解决和改善的缺陷。果蝇作为模式生物为今后对此系统的应用研究打下了基础,因此,需要研究人员进行更多的探索和实践,在不断完善 CRISPR/Cas 系统功能的基础上,利用 CRISPR/Cas 系统对昆虫全基因组功能注释发挥重要作用,以求对人类了解自然产生深远的影响。

[参 考 文 献]

- [1] Myers EW, Sutton GG, Delcher AL, et al. A whole-genome assembly of *Drosophila*. *Science*, 2000, 287(5461): 2196-204
- [2] Richards S, Gibbs RA, Weinstock GM, et al. The genome of the model beetle and pest *Tribolium castaneum*. *Nature*, 2008, 452(7190): 949-55
- [3] Xia Q, Guo Y, Zhang Z, et al. Complete resequencing of 40 genomes reveals domestication events and genes in silkworm (*Bombyx*). *Science*, 2009, 326(5951): 433-6
- [4] Werren JH, Richards S, Desjardins CA, et al. Functional and evolutionary insights from the genomes of three parasitoid *Nasonia* species. *Science*, 2010, 327(5963): 343-8
- [5] International Aphid Genomics Consortium. Genome sequence of the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. *PLoS Biol*, 2010, 8(2): e1000313
- [6] You M, Yue Z, He W, et al. A heterozygous moth genome provides insights into herbivory and detoxification. *Nat*

- Genet, 2013, 45(2): 220-5
- [7] Choo Y, Klug A. Selection of DNA binding sites for zinc fingers using rationally randomized DNA reveals coded interactions. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91(23): 11168-72
- [8] Choo Y, Klug A. Toward a code for the interactions of zinc fingers with DNA: selection of randomized fingers displayed on phage. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91(23): 11163-67
- [9] Boch J, Scholze H, Schornack S, et al. Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. Science, 2009, 326(5959): 1509-12
- [10] Bonas U, Stall RE, Staskawicz B. Genetic and structural characterization of the avirulence gene *avrBs3* from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. Mol Gen Genet, 1989, 218(1): 127-36
- [11] Cermak T, Doyle EL, Christian M, et al. Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting. Nucleic Acids Res, 2011, 39(12): e82
- [12] Brouns SJ, Jore MM, Lundgren M, et al. Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes. Science, 2008, 321(5891): 960-4
- [13] 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 Bacteriol, 1987, 169(12): 5429-33
- [14] Kim YG, Cha J, Chandrasegaran S. Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93(3): 1156-60
- [15] 方锐, 畅飞, 孙照霖, 等. CRISPR/Cas9介导的基因组定点编辑技术. 生物化学与生物物理进展, 2013, 40(8): 691-702
- [16] Jansen R, Embden J, Gaastra W, et al. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. Mol Microbiol, 2002, 43(6): 1565-75
- [17] Grissa I, Vergnaud G, Pourcel C. The CRISPRdb database and tools to display CRISPRs and to generate dictionaries of spacers and repeats. BMC Bioinform, 2007, 8: 172
- [18] Grissa I, Vergnaud G, Pourcel C. CRISPRFinder: a web tool to identify clustered regularly interspaced short palindromic repeats. Nucleic Acids Res, 2007, 35(2): W52
- [19] Wei C, Liu J, Yu Z, et al. TALEN or Cas 9 rapid, efficient and specific choices for genome modifications. J Genet Genomics, 2013, 40(6): 281-9
- [20] Godde JS, Bickerton A. The repetitive DNA elements called CRISPRs and their associated genes: evidence of horizontal transfer among prokaryotes. J Mol Evol, 2006, 62(6): 718-29
- [21] 李铁民, 杜波. CRISPR-Cas系统与细菌和噬菌体的共进化. 遗传, 2011, 33(3): 213-8
- [22] Haft DH, Selengut J, Mongodin EF, et al. A guild of 45 CRISPR-associated (Cas) protein families and multiple CRISPR/Cas subtypes exist in prokaryotic genomes. PLoS Comput Biol, 2005, 1(6): e60
- [23] Garneau JE, Dupuis MÈ, Villion M, et al. The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. Nature, 2010, 468(7320): 67-71
- [24] Friedland AE, Tzur YB, Esvelt KM, et al. Heritable genome editing in *C. elegans* via a CRISPR-Cas9 system. Nat Methods, 2013, 10(8): 741-3
- [25] Hwang WY, Fu Y, Reyon D, et al. Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. Nat Biotechnol, 2013, 31(3): 227-9
- [26] DiCarlo JE, Norville JE, Mali P, et al. Genome engineering in *Saccharomyces cerevisiae* using CRISPR-Cas systems. Nucleic Acids Res, 2013, 41(7): 4336-43
- [27] Li D, Qiu Z, Shao Y, et al. Heritable gene targeting in the mouse and rat using a CRISPR-Cas system. Nat Biotechnol, 2013, 31(8): 681-3
- [28] Cho SW, Kim S, Kim JM, et al. Targeted genome engineering in human cells with the Cas9 RNA-guided endonuclease. Nat Biotechnol, 2013, 31(3): 230-2
- [29] Miao J, Guo D, Zhang J, et al. Targeted mutagenesis in rice using CRISPR-Cas system. Cell Res, 2013, 23(10): 1233-6
- [30] Guo SC, Lv Y, Lin YX, et al. CRISPR/Cas9 systems: the next generation gene targeted editing tool. Proc Natl Acad Sci India B: Biol Sci, 2014: 1-11
- [31] Mojica F, Diez-Villasenor C, Garcia-Martinez J, et al. Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system. Microbiology, 2009, 155(3): 733-40
- [32] Deltcheva E, Chylinski K, Sharma CM, et al. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. Nature, 2011, 471(7340): 602-7
- [33] Dahlem TJ, Hoshijima K, Jurynech MJ, et al. Simple methods for generating and detecting locus-specific mutations induced with TALENs in the zebrafish genome. PLoS Genet, 2012, 8(8): e1002861
- [34] 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
- [35] Cong L, Ran FA, Cox D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. Science, 2013, 339(6121): 819-23
- [36] Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. Science, 2012, 337(6096): 816-21
- [37] Mali P, Yang L, Esvelt KM, et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9. Science, 2013, 339(6121): 823-26
- [38] Hsu PD, Scott DA, Weinstein JA, et al. DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. Nat Biotechnol, 2013, 31(9): 827-32
- [39] Jiang W, Bikard D, Cox D, et al. RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems. Nat Biotechnol, 2013, 31(3): 233-9
- [40] Fu Y, Foden JA, Khayter C, et al. High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. Nat Biotechnol, 2013, 31(9): 822-6
- [41] Ren X, Sun J, Housden BE, et al. Optimized gene editing

- technology for *Drosophila melanogaster* using germ line-specific Cas9. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(47): 19012-7
- [42] Wei W, Xin H, Roy B, et al. Heritable Genome Editing with CRISPR/Cas9 in the silkworm, *Bombyx mori*. *PLoS One*, 2014, 9(7): e101210
- [43] Bassett AR, Liu JL. CRISPR/Cas9 and genome editing in *Drosophila*. *J Genet Genomics*, 2014, 41(1): 7-19
- [44] Bassett AR, Tibbit C, Ponting CP, et al. Mutagenesis and homologous recombination in *Drosophila* cell lines using CRISPR/Cas9. *Biol Open*, 2014, 3(1): 42-9
- [45] 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
- [46] 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
- [47] Port F, Chen HM, Lee T, Bullock SL. An optimized CRISPR/Cas toolbox for efficient germline and somatic genome engineering in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, 111(29): E2967-76
- [48] 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
- [49] 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: 271-80
- [50] Yu Z, Ren M, Wang Z, et al. Highly efficient genome modifications mediated by CRISPR/Cas9 in *Drosophila*. *Genetics*, 2013, 195(1): 289-91
- [51] 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
- [52] Kondo S, Ueda R. Highly improved gene targeting by germline-specific Cas9 expression in *Drosophila*. *Genetics*, 2013, 195(3): 715-21
- [53] 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
- [54] 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
- [55] Daimon T, Kiuchi T, Takasu Y. Recent progress in genome engineering techniques in the silkworm, *Bombyx mori*. *Dev Growth Differ*, 2014, 56(1): 14-25
- [56] Ma S, Chang J, Wang X, et al. CRISPR/Cas9 mediated multiplex genome editing and heritable mutagenesis of *BmKu70* in *Bombyx mori*. *Sci Rep*, 2014, 4: 4489
- [57] 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
- [58] Baena-Lopez LA, Alexandre C, Mitchell A, et al. Accelerated homologous recombination and subsequent genome modification in *Drosophila*. *Development*, 2013, 140(23): 4818-25
- [59] Beumer KJ, Trautman JK, Mukherjee K, et al. Donor DNA utilization during gene targeting with zinc-finger nucleases. *Genes Genomes Genet*, 2013, 3(4): 657-64
- [60] Esvelt KM, Mali P, Braff JL, et al. Orthogonal Cas9 proteins for RNA-guided gene regulation and editing. *Nat Methods*, 2013, 10(11): 1116-21
- [61] 张智辉, 董少忠, 寸鞅. 基因组定点编辑技术的研究进展. *生命科学*, 2013, 25(7): 735-42
- [62] Wu Y, Liang D, Wang Y, et al. Correction of a genetic disease in mouse via use of CRISPR-Cas9. *Cell Stem Cell*, 2013, 13(6): 659-62
- [63] Fu Y, Foden JA, Khayter C, et al. High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. *Nat Biotech*, 2013, 31(9): 822-6
- [64] Shen B, Zhang W, Zhang J, et al. Efficient genome modification by CRISPR-Cas9 nickase with minimal off-target effects. *Nat Methods*, 2014, 11(4): 399-402
- [65] Bacman SR, Williams SL, Pinto M, et al. Specific elimination of mutant mitochondrial genomes in patient-derived cells by mitoTALENs. *Nat Med*, 2013, 19(9): 1111-3
- [66] Shalem O, Sanjana NE, Hartenian E, et al. Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells. *Science*, 2014, 343(6166): 84-7