

DOI: 10.13376/j.cbils/2018118

文章编号: 1004-0374(2018)09-0987-07



杨文强, 博士, 研究员, 博士生导师, 2008年在中国科学院遗传与发育生物学研究所获博士学位。2009年2月至2017年1月在美国斯坦福卡内基研究所植物生物学系从事博士后研究和助理工作。期间于2009年3月至5月在美国科罗拉多再生能源国家实验室(NREL)访问研究。2016年入选中组部第十三批“青年千人计划”。2017年2月到中国科学院植物研究所工作。目前主持青年千人计划项目、国家自然科学基金面上项目、国家自然科学基金应急项目、中科院青年千人计划项目等。光合作用是世界上最重要的化学反应(1988年诺贝尔奖颁奖词), 人类的衣食住行归根结底都离不开光合作用。莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)是一种单细胞真核绿藻, 被称为“光合绿色酵母”。杨文强实验室利用衣藻为模式生物, 运用当前多学科先进技术结合获得的大量遗传材料, 研究光合作用新的调控机制。同时, 利用比较基因组学的方法, 将衣藻光温响应机制研究的结果与信息应用在小麦等作物光温响应机制上, 为应对高光胁迫、提高光合作用效率等提供理论依据。

基因编辑技术在莱茵衣藻中的应用进展

涂文凤¹, 王月^{1,2}, 杨文强^{1*}

(1 中国科学院植物研究所光生物学重点实验室, 北京 100093; 2 中国科学院大学研究生院, 北京 100049)

摘要: 基因编辑技术已经成为功能基因组学和作物分子育种精准且有力的工具。莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*, 简称衣藻)是光合作用、黑暗异养代谢、厌氧代谢和生物制氢、营养和能量代谢等研究领域的重要模式生物。近20年来, 基因编辑技术, 如锌指核酸酶(ZFNs)、转录激活物样效应物核酸酶(TALENs)、CRISPR/Cas9和CRISPR/Cpf1等的发展, 更加推动了以衣藻为模式生物的研究。现对衣藻中的核基因组靶向基因编辑技术的应用及最新研究进展等进行总结, 以为衣藻相关领域的研究提供参考。

关键词: 莱茵衣藻; 基因编辑; ZFN; TALEN; CRISPR/Cas9; CRISPR/Cpf1

中图分类号: Q943.2; Q78 **文献标志码:** A

Progress in the application of genome editing in *Chlamydomonas reinhardtii*

TU Wen-Feng¹, WANG Yue^{1,2}, YANG Wen-Qiang^{1*}

(1 Key Laboratory of Photobiology, Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093, China;

2 School of Graduate, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: Genome editing has been working as precise and powerful tools in the studies of functional genomics and crop breeding. *Chlamydomonas reinhardtii* is an important model organism in the fields of photosynthesis, dark heterotrophic metabolism, fermentative metabolism and biohydrogen production, nutrients and energy metabolisms, and etc. In the last two decades, the development of genome editing techniques, such as zinc-finger nucleases (ZFN), transcription activator-like effectors nuclease (TALEN), clustered regularly interspaced short palindromic repeat

收稿日期: 2018-06-21

*通信作者: E-mail: wqyang@ibcas.ac.cn; Tel: +86-10-62836945

(CRISPR)/associated protein 9 (Cas9) and CRISPR/Cpf1, has promoted researches on *Chlamydomonas*. In this review, we summarized the application and progress of genome editing techniques targeting *Chlamydomonas* nucleus encoded genes, aiming to provide references to *Chlamydomonas* studies.

Key words: *Chlamydomonas reinhardtii*; gene editing; ZFN; TALEN; CRISPR/Cas9; CRISPR/Cpf1

莱茵衣藻 (*Chlamydomonas reinhardtii*, 简称衣藻) 是一种生活在土壤里的单细胞、单倍体的光合自养真核绿藻, 同时也是一种重要的模式生物^[1]。在分类学上衣藻属于绿藻门团藻目衣藻属, 在进化上具有与维管植物相似的特征, 同时也具有维管植物在进化过程中丢失的特征^[2]。由于其生命周期较短、基因组测序已经完成、转化操作简单, 衣藻已成为一个重要的模式生物, 在研究光合作用调控、趋光性、脂质代谢^[3]、二氧化碳浓缩机制^[4]、厌氧代谢^[5]、细胞周期调控、鞭毛功能和组装、昼夜节律、黑暗代谢^[6]和叶绿体发育等多方面具有极大优势。

衣藻核基因组有 17 条染色体, 大小约为 111.1 Mb, 编码 17 741 个基因^[7]。另外, 大约 203 kb 的叶绿体基因组编码 99 个基因^[8], 大约 16 kb 的线粒体基因组含有 8 个基因^[9]。这两种细胞器基因组都可以通过高效的同源重组技术进行基因转化, 这一特征结合核突变体以及核基因组转化的可用性, 极大地促进了核/细胞器相互作用的研究; 但是, 衣藻核基因组编码的基因不能通过同源重组的方法敲除, 这极大地限制了从遗传角度解析衣藻基因或者蛋白的功能。

基因编辑能在精准的位置精确地改变基因组的结构和基因的功能。人们研发了几种基因编辑工具来提高基因编辑的效率: 同源重组 (HR)、锌指核酸酶 (ZFNs)、转录激活物样效应物核酸酶 (TALENs)、五价肽重复蛋白 (PPRs)、CRISPR/Cas9 系统、CRISPR/Cpf1 系统和 RNA 干扰 (RNAi)^[10]。此外, 定点编辑和寡核苷酸定向诱变有可能在单核苷酸水平上编辑基因组。为了敲除衣藻中的目的基因以进行遗传学研究, 现阶段主要使用两种方法: 随机插入诱变^[11]和化学诱变介导的 TILLING 技术^[12], 这两种方法均需要产生大量的突变体并进行突变体筛选。同时, 在衣藻中基因下调表达可以通过 RNA 干扰 (RNAi) 或人工微 RNA (amiRNA) 的 RNA 沉默技术实现^[13]。这些技术可用于研究单倍体衣藻中的必需基因, 特别是突变致死的基因; 然而, 这些方法通常受效率低以及非特异性靶向的限制^[14]。迄今为止, 已经实现了超过 30 个衣藻核基因的 RNA 干扰, 但该方法存在靶基因功能不完全抑制和脱靶等局限性。

1 基因编辑技术

1.1 RNAi 技术

衣藻含有一种内源性短 RNA (sRNAs), 包括小干扰 RNA (siRNAs) 和小分子 RNA (microRNA)^[15-16], 与基因调控、转座子和转基因沉默有关。衣藻核基因组编码了 RNA 沉默的关键酶: Dicer 和 Argonaute^[17]。这些酶可以将双链 RNA (dsRNA) 加工成 siRNAs, 抑制基因转录或促进 RNA 降解; 但是, 随着时间的推移, 基因敲除的表型可能会消失, 并且目标基因被敲除的概率有很大的差异 (0.3%~50%)^[18]。基于一个包含 cDNA 和 cDNA 反义序列的反向重复设计的 RNA 沉默结构被用于针对各种基因的敲除, 且比反义结构的效率更高^[19], 并被用于敲除多个基因^[20], 但有时表达长 dsRNA 时产生了许多 siRNAs, 其中一些可能会产生非目标效应, 人工 microRNA (amiRNA) 克服了长链 dsRNA 存在的这些问题。amiRNA 是一种内源性 microRNA 的改良版本, 它只产生一个小的可以避免脱靶效应的单链 RNA。在衣藻中, amiRNA 转化株中不同目的基因的敲减表型从 16%~72% 不等^[21]。目前, RNAi 仍然是针对特定基因的最可靠的方法。

1.2 同源重组 (HR)

DNA 同源重组可用于对目的基因进行敲除、修复和修饰, 从而对基因的功能进行研究。但对于大多数真核生物包括衣藻, 由于导入的 DNA 会优先整合进基因组非同源区域, 所以, 靶向核基因的效率都较低。然而, 通过几种途径可以增加 HR 在衣藻中敲除基因的概率, 如两个共转化的具有重叠区的 DNA 片段发生 HR 形成一个基因^[22]; 转化单链 DNA, 即使用纯化的含有与目的片段同源的 ssDNA 完全去除 dsDNA, 可以极大提高 HR 的概率^[23]。另外, 在 HR 更活跃的有丝分裂 (S/M 阶段) 初始时期, 转化同步化的细胞也可以提高 HR 的概率^[24]; 还可以采取与 ZFN 相似的方法, 通过诱导目的基因的双链断裂来增加 HR 比率^[24]; HR 结构可以在目标基因中设计一个抗性标签, 依靠目标基因的启动子来驱动抗生素标记的表达, 通过这种方式, 带有目标基因的 HR 同时将导致耐药性基因

的转化,这与大多数非同源末端连接(non-homologous end joining, NHEJ)事件不会产生耐药性的转化相比,可以极大提高HR筛选的概率^[25]。

1.3 锌指核酸酶(ZFN)

锌指核酸酶(zinc finger nuclease, ZFN)是一种人造的工程核酸酶,最早在1996年被实现^[26],它是由可以识别特异性序列的锌指蛋白结合Fok I核酸内切酶二聚体组成的。每个ZFN一般包含3~6个锌指基序,每个基序可以识别3 bp,即可以识别长达9~18 bp的特异性序列。Fok I限制性核酸内切酶的N端是DNA结合结构域,而C端的结构域具有非特异性的DNA切割活性,Fok I必须二聚体化才能切割DNA双链^[27]。已经开发的ZFN模块可以识别所有(64种)三联体密码子^[28],但在实际操作中ZFN模块的识别特异性受到其他很多因素的影响,并且组装复杂费时费力,这些因素极大地影响了ZFN在实验室中的应用。ZFN最早被应用于植物的基因组编辑是在拟南芥中实现的^[29]。2012年,Sizova等^[24]在衣藻中实现了用ZFN敲除内源的COP3基因:首先通过插入巴罗霉素抗性基因(AphVIII)产生COP3靶序列失活的藻株;设计ZFN以结合此段COP3基因序列,然后用AphVIII ssDNA做模板共转化到失活的AphVIII藻株中,在短COP3基因序列中诱导双链断裂。2017年,Greiner等^[30]优化了ZFN技术,敲除了光受体基因,包括COP1/2、COP3、COP4、COP5、PHOT、UVR8、VGCC、MAT3和aCRY,发现ZENs是通过可控的类似于同源重组的方式对基因进行编辑的;而对于可预测的基因修饰,ZFNs最好与更大的载体供体结合(≥ 750 bp)^[30]。为了更有效地用ZFN技术靶向编辑基因,ZFN基因组应运而生,目前已经确定了覆盖所有基因约93%的超过33万个目标位点,已经鉴定并提供了衣藻基因组中所有潜在ZFN靶位点的质量评分^[31]。

1.4 转录激活因子样效应物核酸酶(TALEN)

TALE来自于植物致病的黄单胞杆菌,可以识别特定序列的DNA,直接对宿主细胞的基因表达进行调节,典型的TALE蛋白有N端的III型分泌所必需的结构、C端的核定位信号(nuclear localization signals, NLS)以及酸性活化结构域(acidic activation domain, AAD),中间的区域有一段长33~34个氨基酸的重复序列在TALEs之间有所不同,重复的数量因蛋白而异,多态性主要集中在第12和13个残基,简称为重复可变二元残基(repeat-variable diresidue,

RVD),RVD与特定核苷酸显示出很强的相关性^[32]。与ZFNs相似,TALENs也是一种人造的工程核酸酶,是由TALEs和Fok I二聚体组成的核酸酶,但是,TALENs的组装比ZFNs要简单许多,所以在植物中也得到更多的应用,但依然较为费时费力。TALEN的靶点设计相比ZFN更简单,也有更强的灵活性,但具有一定的细胞毒性。2011年,TALE首次被应用于植物(拟南芥)基因组编辑^[33]。然而,在衣藻中还没有报道有TALEN用于基因编辑的应用。TALEN靶点也受到一定的限制:TALE的结合位点必须要以T开始,且对DNA甲基化十分敏感^[33]。所以,基于ZFN或TALEN的特异性敲除基因在大多数微藻中很难实现^[33-34]。

1.5 CRISPR/Cas9

CRISPR是在细菌和古生物中发现的一种后天免疫系统,几乎所有的古细菌和大约一半的细菌都具有成簇的规则间隔的短回文重复序列(clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR)和CRISPR相关蛋白(CRISPR associated, Cas)组成的这种原核生物免疫系统,总称为常间回文重复序列丛集蛋白系统。CRISPR/Cas系统通过碱基互补配对来切割噬菌体病毒或质粒等外源DNA:当病毒或外源质粒入侵时,会产生相应的“记忆”保存在细菌的基因组当中,从而抵抗再次入侵^[35]。作为一种有效的基因编辑技术,CRISPR/Cas系统可以在真核细胞中对其基因组的特定位置进行高度灵活且特异的靶向编辑。与ZFN和TALEN技术相比,CRISPR/Cas具有效率高、成本低及易于操作等优势,因此,该技术目前已在多个研究领域得到广泛应用。

CRISPR/Cas系统有3种类型:Type I系统有Cas蛋白最多和最复杂的系统,有特征性的Cas3蛋白,属于解旋酶家族成员,在细菌和古细菌中都有发现^[36];II型系统主要特征是包含标志性的Cas9蛋白,含有核酸酶的RuvC和HNH两个结构域,仅存在于细菌中^[36];III型系统包含特征性的Cas10蛋白,具有和核酸聚合酶以及核酸环化酶同源的结构域,该型主要存在于古细菌中,只有少数细菌是Type III型^[36]。由于操作方便、靶向精确等优点,II型CRISPR系统是当前研究最深入的CRISPR系统。工程CRISPR/Cas9也是基于II型CRISPR系统,且主要具有以下3个主要部分:Cas9蛋白、反式激活crRNA(trans-activating crRNA, tracrRNA)和前体crRNA(precursor crRNA, precrRNA)^[35]。Cas9蛋白参

与 crRNA 的成熟过程，成熟的 crRNA 和 tracrRNA 形成局部双链并结合 Cas9 蛋白，整个核糖核蛋白复合体在 crRNA 的引导下与 DNA 靶序列结合，局部解开 DNA 双链与 crRNA 相结合。最终，Cas9 蛋白的 HNH 核酸酶结构域切割与 crRNA 互补的 DNA 链，类 RuvC 核酸酶结构域切割另一条互补链^[35,37]。tracrRNA 是由重复序列区所转录来的具有发卡结构且含有与 precrRNA 的重复部分互补的一段序列的非编码 RNA；precrRNA 是由整段 CRISPR 序列转录成的，随后 precrRNA 被酶切处理成短的 crRNA 文库，每个文库中含有与“记忆”中的外源 DNA 互补的序列^[38]。在现阶段 CRISPR/Cas9 系统的应用中，已将两种 RNA 融合为一条单链的引导 RNA (single-guide RNA, sgRNA)^[39]，并且有专门的网站可以设计 sgRNA，非常方便，容易操作。2012 年 6 月，Doudna 和 Charpentier 团队联合在 *Science* 杂志上发表 CRISPR/Cas9 作为基因编辑技术的第一篇文章，证明 CRISPR/Cas9 技术在体外具有切割双链 DNA 的活性，并指出 CRISPR 具有在活细胞中修改基因的能力^[40]。2013 年，CRISPR/Cas 首次被用于植物基因组编辑^[41]。2014 年，Weeks 团队首次实现了在衣藻中利用 CRISPR/Cas9 系统进行基因编辑，将 CRISPR 编辑系统两个组件 (Cas9 和 sgRNA) 转入缺乏完整细胞壁的衣藻细胞，在衣藻核基因组中短暂表达；然后，在 24 h 后检查在 4 种不同 sgRNA 靶向基因中的 Cas9/sgRNA 靶位点 DNA 序列中的序列修饰，结果成功敲除了衣藻内源的雷帕霉素敏感性 (FK506-binding protein 12, FKB12) 基因，但效率很低^[42]。虽然 CRISPR/Cas9 系统在一些生物体中进行基因编辑简单、高效且准确，然而，在几种模式微藻内已被证明是极其困难的，利用 Cas9 体内表达和组装核糖核蛋白复合体 (ribonucleoprotein, RNP) 的靶向效率极低，并且在衣藻体内表达 Cas9 可能引起细胞毒性^[42]。

2016 年，Kim 团队成功利用 CRISPR/Cas9 系统敲除了衣藻编码色氨酸合酶 (TSB) β 亚基的 *MAA7* 基因、编码叶绿体捕光天线蛋白定位的辅助因子的基因 *CpSRP43* 和编码 Mg-原卟啉 IX S-腺苷甲硫氨酸 O-甲基转移酶的叶绿素生物合成基因 *ChlM*^[43]。体外 RNP 技术的应用减少了脱靶效应和镶嵌现象，并且在细胞中也可能具有较小的细胞毒性，因为 Cas9 蛋白短暂活跃，然后被细胞内源性蛋白酶降解，所以体外组装 RNP 比体内表达的靶向诱变效率提高 100 倍^[43]。

2016 年，通过 CRISPR/Cas9 系统实现了 ZEP 和 CpFTSY 双基因敲除，提高了光合参数^[44]。2017 年，台湾国立成功大学的 Ng 团队利用 CRISPRi 技术实现了控制碳流向的内源基因 *PEPCI* 的表达量下调，突变藻株的叶绿素含量降低，但是积累了较大的生物量和脂质^[45]，这说明 CRISPRi 定位的转录沉默技术可以在莱茵衣藻中得到应用。CRISPRi 对基因的调控过程不需要双键断裂，所以，与 CRISPR/Cas9 系统基因编辑相比，可以得到更多的转化体。这是第一次在模式微藻莱茵衣藻中通过 CRISPRi 技术实现了高效率的基因抑制。

2017 年，Hegemann 团队优化了 ZFNs 和 CRISPR/Cas9 技术，敲除了光受体基因，包括 *COP1/2*、*COP3*、*COP4*、*COP5*、*PHOT*、*UVR8*、*VGCC*、*MAT3* 和 *aCRY*，并构建了 *chr1chr2* 和 *uvr8phot* 双突变体，利用 *chr1*、*chr2* 和 *mat3* 突变体验证了光受体的重要性^[30]。该研究指出，ZFNs 是通过可控的类似于同源重组的方式对基因进行编辑，而 Cas9 则是通过插入共转化的 DNA 来破坏基因；该研究中将玻璃珠转化改为电击转化，使得转化的效率比 Jiang 等^[42] 的结果提高了 100 倍。在质粒编码的核酸酶系统中，将恢复温度增加至 33 °C 利于基因敲除的进行，但这不影响 Cas9/gRNA RNPs 重组的效率。在莱茵衣藻及其他绿藻的研究中，Cas9 DNA 或者蛋白可以结合小的磷硫酰 (phosphorothioate, PTO) 保护的双链同源重组修复 (homology directed repair, HDR) 供体，以实现快速有效的基因破坏。而对于可预测的基因修饰，ZFNs 最好与更大的载体供体结合 (≥ 750 bp)。近年来的研究表明，利用 CRISPR 技术对衣藻进行基因编辑使用体外组装 RNPs，然后使用电转化法转入细胞壁缺乏的藻株的靶向和转化效率较高。2018 年，Jin 团队利用 CRISPR/Cas9 RNP 体系在 CC-4349 藻株中敲除了玉米黄质环化酶 (ZEP) 基因，以达到同时积累黄体素和玉米黄质的目的，使其玉米黄质的含量升高了 56 倍，产量升高了 47 倍，并用含该突变体的饲料喂养母鸡，使其产的鸡蛋中黄体素和玉米黄质的含量增多了 2 倍^[46]，这为利用衣藻突变体作为原料进行商业生产提供了途径。同时，该团队利用 CRISPR/Cas9 系统构建了敲除参与捕光天线蛋白转运的捕光天线蛋白转运缺失蛋白 (LTD) 的衣藻突变体^[47]，*Crttd1* 突变体的捕光能力和光合能力受到影响，PSI-LHCI 复合体的含量明显降低，同时类囊体膜的结构明显改变，导致其生长受到抑制^[47]。

1.6 CRISPR/Cpf1

CRISPR/Cpf1 与 CRISPR/Cas9 系统非常相似, 但 Cpf1 是没有 tracrRNA 的单链引导 RNA 引导的内切核酸酶, 并且其 PAM 序列富含 T 碱基。Cpf1 具有很多优势: (1) Cpf1 不需要 Cas9 所需要的 tracrRNA; (2) Cpf1-crRNA 所组成的核糖核蛋白复合体可以有效靶向靶序列上游的富含 T 碱基的 PAM 序列 (TTN/TTTN), Cas9 系统则需要在靶序列下游存在富含 G 的 PAM 序列 (NGG), 生物信息学研究表明, 在常见植物中 TTN-PAM 比 NGG-PAM 高约 3 倍; (3) Cpf1 切割 DNA 双链后可以形成 5 个碱基突出的黏性末端, 而 Cas9 切割后则是形成平末端, 这种特性使得 Cpf1 比起 Cas9 可以诱导更大的突变^[48]; (4) Cpf1 除 DNA 酶活性外还具有 RNA 酶的活性, 可以直接将 precrRNA 切割并产生成熟的 crRNA, 因此, 在体内组装 RNPs 编辑多个基因时 Cpf1 系统只需要一个启动子即可驱动表达多个 crRNA; (5) Cpf1 相对分子质量比 Cas9 小很多, 进入细胞更容易, 可以提高编辑成功率^[48]。CRISPR/Cpf1 系统在 2015 年被首次用作基因编辑工具^[48]。Molnar 团队在 2017 年用 CRISPR/Cpf1 系统成功敲除了衣藻内源雷帕霉素敏感性基因 (*FKB12*) 等多个基因, 测试并比较了体外组装 RNP ssODNs 介导的 HDR 和 NHE 导致突变的效率^[12], 得出结论认为, 在 CRISPR/Cpf1 系统中 ssODNs 作为 DNA 修复模板可以在莱茵衣藻中进行高效的 HDR。2016 年, *Nature Biotechnology* 报道, 通过体外 DNA 切割实验结果证实 CRISPR/Cpf1 基因组编辑几乎没有脱靶效应^[49]。现阶段已经开发了 3 种工程 CRISPR/Cpf1 系统: 来自土拉热弗朗西斯菌 (*Francisella novicida*) 的 FnCpf1^[50]、来自直向同源物酸性氨基酸 (*Acidaminococcus* sp) 的 AsCpf1 和来自毛螺科菌 (*Lachnospiraceae bacterium*) 的 LbCpf1^[51]。研究表明, LbCpf1 在植物中比 AsCpf1 更具活性^[12,52]。

2 转化方法

2.1 基因枪转化

经过多年的发展, 衣藻的转化已具有多种方法, 其中莱茵衣藻的基因枪转化是在 20 世纪 80 年代后期开发出来的, 并且首先用于提供补充营养缺陷的天然基因^[53]。然而, 这种方法效率比较低, 并且需要专门的设备, 操作复杂, 较昂贵。

2.2 玻璃珠转化

这种方法不需要专门的设备, 而且相对简单。将要转化的细胞放入带有涡旋搅拌的玻璃珠的管

中。这种方法的局限性是受体藻株必须无细胞壁或者细胞壁较薄^[54], 对有细胞壁的藻株, 需要对细胞进行酶处理以除去转化前的细胞壁。

2.3 电转

电穿孔也是将 DNA 输送到衣藻核中的有效技术。电穿孔是产生转化体的最有效方法之一, 对于给定量的外源 DNA, 突变体的产生量比玻璃珠方法多 100 倍^[55]。

2.4 其他技术

存在用于核基因组转化的其他几种技术, 这些包括碳化硅晶须^[56]、根瘤土壤农杆菌的生物转化^[57]和纳米颗粒^[58]。

CRISPR 技术在衣藻中的应用比在其他植物中的应用较为缓慢, 有诸多原因。将来该技术的应用应该从以下几个方面改进: (1) 改造 Cas9 蛋白结构, 减少其对衣藻细胞的伤害; (2) Cpf1 和 Cas9 蛋白与 gRNA 体外组装的核糖核蛋白复合体系统的优化; (3) 同源重组介导的基因编辑系统的优化; (4) 脱靶效应的排除; (5) 辅助筛选系统的应用、转化方法的优化。

[参 考 文 献]

- [1] Harris EH. *Chlamydomonas* as a model organism. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 2001, 52: 363-406
- [2] Merchant SS, Prochnik SE, Vallon O, et al. The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions. *Science*, 2007, 318: 245-50
- [3] Merchant SS, Kropat J, Liu B, et al. TAG, you're it! *Chlamydomonas* as a reference organism for understanding algal triacylglycerol accumulation. *Curr Opin Biotechnol*, 2012, 23: 352-63
- [4] Wang Y, Duanmu D and Spalding MH. Carbon dioxide concentrating mechanism in *Chlamydomonas reinhardtii*: inorganic carbon transport and CO₂ recapture. *Photosynth Res*, 2011, 109: 115-22
- [5] Grossman AR, Catalanotti C, Yang W, et al. Multiple facets of anoxic metabolism and hydrogen production in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *New Phytol*, 2011, 190: 279-88
- [6] Yang W, Catalanotti C, D'Adamo S, et al. Alternative acetate production pathways in *Chlamydomonas reinhardtii* during dark anoxia and the dominant role of chloroplasts in fermentative acetate production. *Plant Cell*, 2014, 26: 4499-518
- [7] Blaby IK, Blaby-Haas CE, Tourasse N, et al. The *Chlamydomonas* genome project: a decade on. *Trends Plant Sci*, 2014, 19: 672-80
- [8] Maul JE, Lilly JW, Cui L, et al. The *Chlamydomonas reinhardtii* plastid chromosome: islands of genes in a sea of repeats. *Plant Cell*, 2002, 14: 2659-79

- [9] Remacle C, Cardol P, Coosemans N, et al. High-efficiency biolistic transformation of *Chlamydomonas* mitochondria can be used to insert mutations in complex I genes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103: 4771-6
- [10] Mohanta TK, Bashir T, Hashem A, et al. Genome editing tools in plants. *Genes: Basel*, 2017, 8: 399
- [11] Gonzalez-Ballester D, Pootakham W, Mus F, et al. Reverse genetics in *Chlamydomonas*: a platform for isolating insertional mutants. *Plant Methods*, 2011, 7: 24
- [12] Ferenczi A, Pyott DE, Xipnitou A, et al. Efficient targeted DNA editing and replacement in *Chlamydomonas reinhardtii* using Cpf1 ribonucleoproteins and single-stranded DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, 114: 13567-72
- [13] Lv H, Qu G, Qi X, et al. Transcriptome analysis of *Chlamydomonas reinhardtii* during the process of lipid accumulation. *Genomics*, 2013, 101: 229-37
- [14] Boutros M, Ahringer J. The art and design of genetic screens: RNA interference. *Nat Rev Genet*, 2008, 9: 554-66
- [15] Molnár A, Schwach F, Studholme DJ, et al. miRNA control gene expression in the single-cell alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Nature*, 2007, 447: 1126-9
- [16] Zhao T, Li G, Mi S, et al. A complex system of small RNAs in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Genes Dev*, 2007, 21: 1190-203
- [17] Cerutti H, Casas-Mollano JA. On the origin and functions of RNA-mediated silencing: from protists to man. *Curr Genet*, 2006, 50: 81-99
- [18] Schroda M. RNA silencing in *Chlamydomonas*: mechanisms and tools. *Curr Genet*, 2006, 49: 69-84
- [19] Sineshchekov OA, Jung KH, Spudich JL. Two rhodopsins mediate phototaxis to low- and high-intensity light in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99: 8689-94
- [20] Pan J, Wang Q, Snell WJ. An aurora kinase is essential for flagellar disassembly in *Chlamydomonas*. *Dev Cell*, 2004, 6: 445-51
- [21] Zhao T, Wang W, Bai X, et al. Gene silencing by artificial microRNAs in *Chlamydomonas*. *Plant J*, 2009, 58: 157-64
- [22] Sodeinde OA, Kindle KL. Homologous recombination in the nuclear genome of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90: 9199-203
- [23] Zorin B, Hegemann P, Sizova I. Nuclear-gene targeting by using single-stranded DNA avoids illegitimate DNA integration in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryot Cell*, 2005, 4: 1264-72
- [24] Sizova I, Greiner A, Awasthi M, et al. Nuclear gene targeting in *Chlamydomonas* using engineered zinc-finger nucleases. *Plant J*, 2013, 73: 873-82
- [25] Trippens J, Greiner A, Schellwat J, et al. Phototropin influence on eyespot development and regulation of phototactic behavior in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell*, 2012, 24: 4687-702
- [26] Kim YG, Cha J, Chandrasegaran S. Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93: 1156-60
- [27] Smith J, Bibikova M, Whitby FG, et al. Requirements for double-strand cleavage by chimeric restriction enzymes with zinc finger DNA-recognition domains. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28: 3361-9
- [28] Carroll D, Morton JJ, Beumer KJ, et al. Design, construction and *in vitro* testing of zinc finger nucleases. *Nat Protoc*, 2006, 1: 1329-41
- [29] Lloyd A, Plaisier CL, Carroll D, et al. Targeted mutagenesis using zinc-finger nucleases in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102: 2232-7
- [30] Greiner A, Kelterborn S, Evers H, et al. Targeting of photoreceptor genes in *Chlamydomonas reinhardtii* via zinc-finger nucleases and Crispr/Cas9. *Plant Cell*, 2017, 29: 2498-518
- [31] Reyon D, Kirkpatrick JR, Sander JD, et al. ZFNGenome: a comprehensive resource for locating zinc finger nuclease target sites in model organisms. *BMC Genomics*, 2011, 12: 83
- [32] Boch J, Scholze H, Schornack S, et al. Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science*, 2009, 326: 1509-12
- [33] 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: e82
- [34] Daboussi F, Leduc S, Maréchal A, et al. Genome engineering empowers the diatom *Phaeodactylum tricoratum* for biotechnology. *Nat Commun*, 2014, 5: 3831
- [35] Horvath P, Barrangou R. CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. *Science*, 2010, 327: 167-70
- [36] Makarova KS, Wolf YI, Alkhnbashi OS, et al. An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol*, 2015, 13: 722-36
- [37] Bhaya D, Davison M, Barrangou R. CRISPR-Cas systems in bacteria and archaea: versatile small RNAs for adaptive defense and regulation. *Annu Rev Genet*, 2011, 45: 273-97
- [38] Carter J, Wiedenheft B. SnapShot: CRISPR-RNA-guided adaptive immune systems. *Cell*, 2015, 163: 260-e1
- [39] Hsu PD, Lander ES, Zhang F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell*, 2014, 157: 1262-78
- [40] Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 2012, 337: 816-21
- [41] Li JF, Norville JE, Aach J, et al. Multiplex and homologous recombination-mediated genome editing in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana* using guide RNA and Cas9. *Nat Biotechnol*, 2013, 31: 688-91
- [42] Jiang W, Bruggeman AJ, Horken KM, et al. Successful transient expression of Cas9 and single guide RNA genes in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryot Cell*, 2014, 13: 1465-9
- [43] Shin SE, Lim JM, Koh HG, et al. CRISPR/Cas9-induced knockout and knock-in mutations in *Chlamydomonas*

- reinhardtii*. Sci Rep, 2016, 6: 27810
- [44] Baek K, Kim DH, Jeong J, et al. DNA-free two-gene knockout in *Chlamydomonas reinhardtii* via CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins. Sci Rep, 2016, 6: 30620
- [45] Kao PH, Ng IS. CRISPRi mediated phosphoenolpyruvate carboxylase regulation to enhance the production of lipid in *Chlamydomonas reinhardtii*. Bioresour Technol, 2017, 245: 1527-37
- [46] Baek K, Yu J, Jeong J, et al. Photoautotrophic production of macular pigment in a *Chlamydomonas reinhardtii* strain generated by using DNA-free CRISPR-Cas9 RNP-mediated mutagenesis. Biotechnol Bioeng, 2018, 115: 719-28
- [47] Jeong J, Baek K, Yu J, et al. Deletion of the chloroplast LTD protein impedes LHCI import and PSI-LHCI assembly in *Chlamydomonas reinhardtii*. J Exp Bot, 2018, 69: 1147-58
- [48] Zetsche B, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, et al. Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system. Cell, 2015, 163: 759-71
- [49] Kim Y, Cheong SA, Lee JG, et al. Generation of knockout mice by Cpf1-mediated gene targeting. Nat Biotechnol, 2016, 34: 808-10
- [50] Tu M, Lin L, Cheng Y, et al. A 'new lease of life': FnCpf1 possesses DNA cleavage activity for genome editing in human cells. Nucleic Acids Res, 2017, 45: 11295-304
- [51] Zetsche B, Heidenreich M, Mohanraju P, et al. Multiplex gene editing by CRISPR-Cpf1 using a single crRNA array. Nat Biotechnol, 2017, 35: 31-4
- [52] Kim H, Kim ST, Ryu J, et al. CRISPR/Cpf1-mediated DNA-free plant genome editing. Nat Commun, 2017, 8: 14406
- [53] Debuchy R, Purton S, Rochaix JD. The argininosuccinate lyase gene of *Chlamydomonas reinhardtii*: an important tool for nuclear transformation and for correlating the genetic and molecular maps of the ARG7 locus. EMBO J, 1989, 8: 2803-9
- [54] Yamano T, Iguchi H, Fukuzawa H. Rapid transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* without cell-wall removal. J Biosci Bioeng, 2013, 115: 691-4
- [55] Brown LE, Sprecher SL, Keller LR. Introduction of exogenous DNA into *Chlamydomonas reinhardtii* by electroporation. Mol Cell Biol, 1991, 11: 2328-32
- [56] Dunahay TG. Transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* with silicon carbide whiskers. Biotechniques, 1993, 15: 452-5, 457-8, 460
- [57] Pratheesh PT, Vineetha M, Kurup GM. An efficient protocol for the Agrobacterium-mediated genetic transformation of microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. Mol Biotechnol, 2014, 56: 507-15
- [58] Kim S, Lee YC, Cho DH, et al. A simple and non-invasive method for nuclear transformation of intact-walled *Chlamydomonas reinhardtii*. PLoS One, 2014, 9: e101018