



刘悦,兰英,李青超,等. CRISPR/Cas9 基因编辑及其在农业领域的应用[J]. 黑龙江农业科学, 2024(10):95-101.

CRISPR/Cas9 基因编辑及其在农业领域的应用

刘悦,兰英,李青超,赵秀梅,刘洋,王立达,王俊强,韩业辉

(黑龙江省农业科学院 齐齐哈尔分院,黑龙江 齐齐哈尔 161006)

摘要:为提高作物产量及品质,基因编辑技术被广泛应用。成簇规律间隔短回文重复及关联蛋白(CRISPR/Cas9)系统是细菌、古细菌抵御外源物质入侵的获得性免疫系统,是继锌指核酸酶(ZFN)、转录激活因子样效应物核酸酶(TAL)以后的第三代基因编辑技术。本文就 CRISPR/Cas9 系统的历史起源,以及 CRISPR/Cas9 系统的基因结构,其中包括 CRISPR 相关核酸酶(Cas9)、特异性 CRISPR RNA(crRNA)以及反式激活 CRISPR RNA(tracrRNA)进行概述;同时对该系统的作用原理,从间隔序列的获取阶段、表达阶段及免疫干扰阶段进行综述;另外对该系统在功能基因研究、基因组学筛选等领域,以及农业等相关领域的应用方面也展开了讨论,并对其将会产生的风险(脱靶效应)及解决方法进行总结,以期对农作物品种选育及功能基因的挖掘奠定基础。

关键词:CRISPR/Cas9 系统;基因编辑;农业;脱靶效应

CRISPR/Cas9 系统(Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR Associated Protein 9)是来源于酿脓链球菌的Ⅱ型适应性免疫系统,主要存在于细菌和古细菌中,是它们抵御外来物质入侵的独特机制^[1]。当外源物质入侵时,宿主细胞对外源物质的保守间隔相邻基序(PAM)进行识别,把外源物质的 DNA 序列整合到自己的序列中;然后,转录成前体 crRNA(pre-crRNA),通过 tracrRNA 的激发作用,在 Cas9 的加工下,得到成熟的 crRNA,crRNA 和 tracrRNA 组成向导 sgRNA 来锚定 DNA,Cas9 在 sgRNA 指导下对靶向 DNA 进行切割,使基因组 DNA 双链断裂(Double-Strand Breaks,DSBs),从而进行 DNA 修复,CRISPR/Cas9 主要通过非同源末端连接(NHEJ)和同源重组(HR)进行修复^[2-4],也可通过微同源末端连接(MMEJ, Microhomology-Mediated End Joining)和单链退火(Single-Strand Annealing,SSA)等非同源重组途径进行修复。与传统的基因编辑技术相比,此修复能力赋予该系统效率高、方便快捷、周期短等优点。

CRISPR/Cas9 系统广泛应用于农业、生命科学研究等各个领域^[5]。利用 CRISPR/Cas9 系统精确控制基因以提高作物产量、品质及对各种环境胁迫的耐受性是育种家长期追求的目标^[6]。有

研究发现 CRISPR/Cas9 编辑的 AGRO8 基因提高了玉米的抗旱性^[7]。另有研究通过 CRISPR/Cas9 系统对番茄 *SlJaz2* 基因进行敲除,使番茄对细菌斑点病有较强抗性^[8]。另外,基于 CRISPR/Cas9 系统,通过突变的方式形成 dCas9 蛋白,dCas9 蛋白通过与转录激活与抑制因子结合来调控基因表达,即 CRISPR 干扰与激活技术(CRISPRi/CRISPRa)。有研究应用 CRISPR 干扰与激活技术成功构建了发酵效率更高的缬氨酸生产菌^[9],这种新型、特异性强的基因编辑技术,对功能缺失与获得研究方面意义深远。两种技术相互补充,不仅能分析基因功能,获得全面的结果分析,也能使筛选结果更加准确,为研制相应药物进行基因治疗打下基础^[10]。同时,基于高通量 CRISPR 筛选技术,也能更好地研究植物基因工程育种,进而造福于人类^[11]。此外,CRISPR/Cas9 系统在基因敲入、敲除构建突变体并在作物育种改良中应用广泛,CRISPR/Cas9 系统中 Cas9 与 sgRNA 复合体识别特异序列,并实现对目标位点的切割后,通过同源重组(HR)和非同源末端连接(NHEJ)两种修复机制,在连接重组过程中实现基因敲入与敲除^[12]。

CRISPR/Cas9 系统的基因编辑高效、快速且应用广泛的同时,也存在的脱靶效应,给研究者造

收稿日期:2024-03-11

基金项目:黑龙江省省属科研院所科研业务费项目(CZKYF2023-1-B012,CZKYF2024-1-C008);齐齐哈尔市科学技术计划重点项目(ZDGG-202207);齐齐哈尔市科技计划联合引导项目(LNYGG-2024003);齐齐哈尔市科技计划创新激励项目(CNYGG-2023027)。

第一作者:刘悦(1995—),女,硕士,助理研究员,从事基因工程研究。E-mail:2563522180@qq.com。

成巨大的困扰,本文就 CRISPR/Cas9 系统的作用原理、应用、脱靶效应及其改进方法进行综述。

1 CRISPR/Cas 系统的起源与基因结构

1.1 CRISPR/Cas 系统的起源

1987 年,日本科研小组在大肠杆菌 K12 的 *iap* 基因侧翼序列中,发现 CRISPR 的重复结构^[13]。经过不断研究和探索,在 2002 年,科学家为了反映这类重复序列的结构特点,将其正式命名为 CRISPR^[14]。2007 年有研究发现 CRISPR 的间隔序列是来自质粒或噬菌体等染色体外的序列,并通过实验证实 CRISPR 系统能使细菌等宿主具备独特的抵御外来 DNA 入侵的免疫能力^[15]。2008 年经研究发现细菌 CRISPR 系统能阻止外源基因转移,首次用试验证实 CRISPR 系统功能^[16]。2013 年,科研人员发现 CRISPR 系统 crRNA 对目标序列的特异性识别,引导 Cas 核酸酶准确定位目标基因并进行精确切割这一特性,使 CRISPR/Cas 系统更广泛地为人们所熟知^[17]。

1.2 CRISPR/Cas9 的基因结构

成簇规律间隔短回文重复及关联蛋白(CRISPR/Cas9)系统存在于大约 40% 的细菌和 90% 古生菌基因组中,该系统赋予它们抵御外来 DNA 入侵的能力。由于 CRISPR/Cas 基因保守性及位点构成不同,目前该系统分为 3 种类型,即 I 型、II 型和 III 型(表 1)^[18],I 型系统特有的蛋白是 Cas3,在系统中负责在干扰阶段对外源核酸序列剪切;II 型系统的 Cas9 蛋白负责剪切外源核酸序列,也参与 crRNA 的生成;III 型系统的特有蛋白是 Cas10,具体功能有待进一步研究。CRISPR/Cas9 源于酿脓链球菌体内,属于 II 型 CRISPR/Cas 系

统,该系统较简单,是由 RNA 指导的 Cas9 基因,它主要由特异性 CRISPR RNA(crRNA)、CRISPR 相关核酸酶(Cas9)以及反式激活 CRISPR RNA(tracrRNA)3 个基本结构构成。

CRISPR 序列是由 1 个前导序列(Leader)、多个重复序列(Repeats)和间隔序列(Spacers)组成。前导序列是具有物种特异性,且位于上游的序列,长度为 300~500 bp,其作用类似于启动子。多个重复序列被间隔序列隔开呈半回文结构,重复序列长度为 21~48 bp。而间隔序列是外源物质入侵后,使细胞获得免疫能力,并且能通过这些间隔序列,对靶基因进行调控的作用。

Cas9 基因区位于 CRISPR 序列区附近,通常由 4~10 个保守基因组成,既可以切割双链 DNA,起到 DNA 核酸酶的作用,也可以加工前体 crRNA,使其成为成熟 crRNA,它的功能类似于 folk 酶,但不需要形成二聚体才有活性。Cas9 蛋白有两个核酸酶结构域,其一是 HNH 结构域,可以对 DNA 序列剪切,该序列与 crRNA 互补;另一个是 Ruvc 结构域,可以对与 crRNA 非互补的 DNA 序列进行剪切,经过它们的共同作用,使 DNA 双链产生切口,可能正是因为 Ruvc 和 HNH 这样的单链切割作用机制,才容易导致突变的发生^[19]。

TracrRNA 位于 Cas 操纵子上游,与 CRISPR 重复序列互补,它可以激发 Cas9 和相应核酸酶对 pre-crRNA 进行加工,使它成为成熟 crRNA^[20]。另有研究发现,只有在 tracrRNA 和 crRNA 共同存在时,才能引导 Cas9 对外源核酸进行剪切,即向导 RNA(sgRNA)。

表 1 RISPR/Cas 系统 3 种类型的发现、特有蛋白及作用

系统类型	发现	特有蛋白	相应蛋白作用
I 型	在细菌,古细菌都有发现	Cas3 蛋白	Cas3 蛋白有解旋酶和核酸酶活性,在 I 型系统中,负责在干扰阶段对外源核酸序列剪切
II 型	仅在细菌中发现	Cas9 蛋白	Cas9 蛋白是一种 RNA 介导下的 RNA 内切酶,在 II 型系统中,负责剪切外源核酸序列,也参与 crRNA 生成
III 型	发现于古细菌和少数细菌中	Cas10 蛋白	准确功能尚不清楚

2 CRISPR/Cas9 系统的作用原理及其脱靶效应

2.1 CRISPR/Cas9 系统的作用原理

CRISPR/Cas 系统是细菌用于抵抗噬菌体和其他病毒侵染的一套免疫系统,当细菌受到病毒

攻击时,会作出以切割破坏外源 DNA 为目标的防御反应。CRISPR/Cas 系统作为一种可以抵御外来入侵的独特机制,其作用原理主要分为:间隔序列的获取阶段、表达阶段和免疫干扰阶段。

2.1.1 间隔序列的获取 宿主细胞对外源核酸

的识别和选择是通过 PAM 序列识别的,PAM 位于外源核酸间隔序列前体侧翼处,是一段保守短序列,一般长为 2~5 bp,酿脓链球菌中 PAM 为 NGG 序列。当外源病毒、质粒或噬菌体侵染细菌时,宿主细胞通过外源核酸的 PAM 序列,来对入侵物质进行识别,从而确定其具体位置。然后外源 DNA 的部分 DNA 序列,通过非同源重组的方式,被整合到前导序列和重复序列之间,并随着重复序列而复制,为了保证形成 R-S 结构,重复序列的复制是随着间隔序列的加入而进行的。但该结构并不会无限制的延伸下去,可通过删除机制进行调控^[21]。

2.1.2 CRISPR/Cas 系统的表达阶段 表达阶段包括转录和转录后的加工两个过程。首先,在前导序列的调控下,CRISPR 转录生成 pre-crRNA,同时 tracrRNA 也被转录生成,形成 pre-crRNA 与 tracrRNA 的复合物,即双链 RNA。然后 Cas9 和双链 RNA 特异性内切酶 RNase III 对 pre-crRNA 进行切割,该切割是在 tracrRNA 的激发作用下加工产生成熟的 crRNA^[21-22]。

2.1.3 免疫干扰阶段 经加工成熟的 crRNA 与 tracrRNA 形成双链的向导 RNA,并与 Cas 蛋白结合成复合体,当相同的外源病毒、质粒等再次侵入细菌时,Cas9 在向导 RNA(sgRNA)指引下,识别并结合靶 DNA 序列,使其双链解开形成 R-loop,并通过 Cas9 的 HNH 核酸酶区和 RuvC 核酸区切割靶基因,使得靶基因 PAM 位点上游 3~8 个碱基处双链断裂(DSB),从而起到对宿主菌的保护作用^[23-24]。

双链断裂后,可引起高度精确的碱基切除修复机制对靶 DNA 进行修复,主要有以下两种机制,一种是非同源末端连接修复(NHEJ),其引入插入/缺失突变,从而达到基因敲除的效果。另一种是同源定向修复(HDR),主要是将外源基因转入基因同源的序列中,起到基因敲入的效果^[25],这两种修复机制同时也为遗传性基因疾病的治疗带来希望。

2.2 CRISPR/Cas9 系统的脱靶效应

CRISPR/Cas9 系统已成为最有效的基因编辑工具,其应用非常广泛,但是该系统使用时存在的脱靶效应,会造成假表型现象,从而导致错误的解释。研究影响 CRISPR/Cas9 脱靶因素,并对其进行改造,将为以后的研究做出巨大贡献^[26-28]。

2.2.1 影响 CRISPR/Cas9 脱靶因素 首先,PAM 序列是被 Cas9 识别的特殊序列,位于外源物质 3'端,当外源物质侵入时,宿主细胞可以识别外源物质 PAM 序列,如果 PAM 序列前 17~20 个核苷酸与 sgRNA 序列相同,那么 sgRNA/Cas9 复合物可以结合在外源序列上,Cas9 在外源序列前 3 个碱基处,将其断裂成双链 DNA,它的典型序列是 NGG,N 可以被任何核苷酸替换。另外,PAM 近端 1~12 位碱基被定义为种子区域,Cas9 切割效率由该区域所决定,故 PAM 序列的碱基组成、序列长短和种子区域等都是影响 CRISPR/Cas9 脱靶因素之一^[29]。

其次,sgRNA 的结构和其引导序列的长度也是影响脱靶效应的因素之一。改变 sgRNA 本身的结构,可以影响 sgRNA 的转录效率,从而对 sgRNA 表达水平和 Cas9 与 sgRNA 组合效率产生影响。另外,sgRNA 与外源物质的 PAM 序列前 17~20 个核苷酸序列互补结合成杂交链,这些核苷酸是 sgRNA 引导的序列长度,能够影响 sgRNA 的稳定性,从而对靶位点的专一性产生影响^[30]。

再次,Cas9/sgRNA 的丰度是影响脱靶效应的重要因素之一。研究表明,过多的 Cas9/sgRNA 组合物,会增加 sgRNA 的错配程度。Cas9 与种子区域序列的亲合性或改变 sgRNA 和 Cas9 的表达水平,都会影响靶位点的专一性^[31]。若脱靶造成的突变,恰好得到目的基因表型,则会造成假阳性和错误的解释,从而导致一系列连锁效应,影响结果分析和实验的准确性。

综上所述,CRISPR/Cas9 系统在基因编辑中也面临着风险和问题。其一,主要是 CRISPR/Cas9 系统的脱靶效应,脱靶可能会影响染色体的稳定性,使基因功能丧失,各信号通路被中断;其二,是突变基因的传代问题,基于 CRISPR/Cas9 系统获得的突变体一般发生在体细胞,其突变位点很难遗传下去,从而导致实验的不稳定性;其三,是靶点效率问题,不同靶点被 CRISPR/Cas9 系统切割的效率差异较大,有些靶点会检测不到突变位点。

2.2.2 降低脱靶效应的改进方法 如上所述,PAM 序列结构与附近的种子区域都会影响脱靶效应,PAM 典型序列是 NGG,若 N 只是固定的某一种核苷酸,那么就会相应提高 Cas9 识别的专一性;另外,若 PAM 序列比原来序列长,也会使

靶位点更加准确,但同时也会降低目的序列可设计的位点数,所以要根据实验要求来具体分析^[32]。

设计并改变 sgRNA 序列也是有效降低脱靶效应的因素之一。为了提高 sgRNA 的特异性,应设计 sgRNA 与种子区域至少有 2 个错配碱基,也可以在 sgRNA 的 3'端、5'端加长或缩短修饰,应尽可能降低脱靶效应与 sgRNA 配对碱基数,同时,将 sgRNA 引导序列长度由标准的 20 个核苷酸,截短到 17~18 个核苷酸,能够在一定程度上降低脱靶效应^[33]。

控制 Cas9/sgrNA 丰度或用突变体 dCas9,也会有效降低脱靶效应。若增加 Cas9/sgrNA 的丰度,会使其他正确靶点结合率增加,但随之也增加了脱靶效应,故相应地降低 Cas9/sgrNA 丰度,会有效降低脱靶效应^[34]。另外,若只切割一条 DNA 链或不切割 DNA 链的突变 dCas9 配合 sgRNA,分别切割单链 DNA,若产生错配,一个切口也很快会被细胞修复,若没有错配,用 2 个 dCas9 和 sgRNA 产生 2 个切口,也会得到双链断裂的 DNA,从而大大降低了脱靶效应。经过仔细的靶标选择,脱靶突变在 CRISPR/Cas9 介导的水稻基因编辑中是罕见的,在利用 CRISPR/Cas9 系统的 T 代中,将来有望产生可遗传的靶向基因组修饰水稻^[35]。

随着 CRISPR/Cas9 系统的不断改进,通过设计并改变 sgRNA 序列以及控制 Cas9/sgrNA 丰度等降低脱靶效应;另有研究通过生殖细胞特异启动子驱动 Cas9 来实现突变基因的向下遗传^[36];另有通过优化对靶点的筛选来提高靶点突变的效率等问题。相信在研究者们共同努力下,CRISPR/Cas9 系统会更加完善,完善后的基因编辑系统必将为遗传育种改良带来更大的贡献。

3 基于 CRISPR/Cas9 系统的衍生技术

基于 CRISPR/Cas9 系统,进一步加工改造成一种新型、特异性强的基因编辑技术,即 CRISPR 干扰技术,该技术能抑制基因表达,从而实现类似 RNAi 的作用。CRISPRi 通过突变 Cas9 的 2 个活性位点,形成缺陷的 Cas9 (dCas9),使它没有切割 DNA 双链的功能,在 sgRNA 识别靶序列时,由于 dCas9 与靶 DNA 启动子的结合,从而使得 RNA 聚合酶与启动子的结合被阻止,使转录终止,抑制基因的表达^[37]。CRISPRi 技术不切割自己的序列,并且抑制基因表达过程,具有高度特异性、可逆性、可诱导性等特点,对功能缺失研究方

面意义重大。与此同时,CRISPR 激活技术,也是通过失活 Cas9,从而引入转录激活子,精确激活靶基因表达,对功能获得研究方面意义深远。两种技术相互补充,不仅能分析基因功能,获得全面的结果分析,也能使筛选结果更加准确^[38]。有研究利用 CRISPRi 技术抑制人 Hela 细胞的转铁蛋白受体(CD71)和 C-X-C 趋化因子受体(CXCR4)基因表达^[39]。

基于以上几种技术原理,CRISPR/Cas9 系统已用于高通量筛选全基因组,高通量筛选平台构建方式如下,首先是建立 sgRNA 慢病毒筛选文库,慢病毒载体选择有两种类型,一种是 Cas9 和 sgRNA 序列构建在 1 个慢病毒载体上,即单质粒系统;另一种是 Cas9 和 sgRNA 分别构建在 2 个不同的慢病毒载体上,即双质粒系统,构建好合适的载体后,插入不同的 sgRNA,建立文库^[40]。接下来是目的细胞的感染与功能性筛选和富集,对已建好的文库进行慢病毒包装,并进行目的细胞的感染后,根据研究需要进行功能筛选。有以下两种筛选方式,其一是阳性筛选,是指在一定筛选压力作用下,少数能存活的细胞是研究者所需要的,可以进一步获得存活细胞富集的 sgRNA。其二是阴性筛选,是指通过筛选可鉴定出某些特殊基因,如引起细胞功能异常或缺失的基因,通过比较筛选起始时间和筛选终止时间的 sgRNA 丰度差,从而鉴定出所对应的基因^[41]。此项技术,可以广泛应用于基因组筛选相关领域的研究,有助于研究功能基因并挖掘新基因。

4 CRISPR/Cas9 系统在农业相关领域的应用

CRISPR/Cas9 基因编辑技术,主要分为体内和体外两种应用,体外对基因组片段进行靶向切割以替代传统的限制性内切酶或 PCR 克隆,体内应用主要在细胞或个体水平上实现基因的敲除和插入的基因编辑。相比早期基因编辑技术,不仅载体构建简单,只需要根据靶基因位点,对 sgRNA 进行设计使得突变效率显著提高,而且可以同时高效快速地编辑多基因位点,是一种新型的基因编辑技术^[42]。

4.1 在农作物遗传育种改良中的应用

CRISPR/Cas9 系统是一种自然产生的基因编辑工具,它的发现和修饰为研究基因功能和精确作物育种开辟了新的时代。目前,CRISPR/Cas9 基因组编辑已经用于改良作物的许多不同性状,

有研究通过 CRISPR/Cas9 介导的基因组编辑技术替换乙酰乳酸合成酶(ALS)的两个氨基酸残基,成功获得了多个抗除草剂水稻品系,不仅可以 NHEJ 产生多个水稻和小麦突变体植株用于功能分析和遗传改良,而且还可以通过 CRISPR/Cas9 介导的碱基编辑精确替代蛋白质中的单个或几个氨基酸残基,定向诱变氨基酸转运体基因改良稻米品质,大大扩展了修饰水稻和小麦重要性状的基因,为作物品种选育提供了一种新的策略^[43-44]。另外在大豆育种方面,利用 CRISPR/Cas9 技术对大豆 AMS 同源基因进行靶向编辑,从而获得稳定的雄性不育系,为大豆杂交育种提供新的不育系材料^[45]。另有研究通过 CRISPR/Cas9 系统,对番茄 SlCLV3 启动子序列的不同靶位点进行编辑,筛选获得高产突变株系,为作物产量数量性状遗传育种提供了新途径^[46]。CRISPR/Cas9 的基因组编辑系统已经被建立在几乎所有的主要作物上,它可以影响农作物对病原体的抗性和非生物耐性、植物发育和形态,甚至次级代谢和纤维发育等方面,CRISPR/Cas 基因编辑已经成为一种成熟的生物技术工具^[47]。

4.2 在农作物病原菌及植物抗病中的应用

植物病害的发生不仅会影响植物的生长发育,还会降低作物的产量和质量。CRISPR/Cas9 被用作基因编辑工具以来,它已经被迅速用于创建具有植物抗性的基因组编辑突变体,这些突变体可以使植物抵抗由真菌、病毒和细菌引起的各种疾病。有研究发现,应用 CRISPR/Cas9 技术抑制小麦及大麦 *MLO* 基因,可减少其白粉病的发生^[48-49]。另有研究通过 CRISPR/Cas9 系统沉默 ERF 转录因子基因 *OsERF922*,能使水稻植株在其幼苗期及分蘖期的抗稻瘟病能力都显著提高^[50]。同时 CRISPR/Cas9 技术在植物抗病性的应用可能与植物水杨酸(SA)水平的增加和免疫反应的转录激活相关,通过 CRISPR-Cas9 介导 *DMR6* 同源基因的功能缺失可以使番茄对几种病原体产生抗性^[51]。CRISPR/Cas9 技术不仅广泛应用于水稻、小麦等主要作物,同时在拟南芥、烟草上也开展了大量的基因组定点编辑研究,为构建植物突变体模型,从而为深入进行植物遗传改良奠定坚实的基础^[52]。

5 结语与展望

CRISPR/Cas9 系统是细菌和古细菌防御外来入侵的特殊机制,是高效、快捷的第三代基因编辑技

术。随着这几年研究的不断深入,以 CRISPR/Cas9 系统为基础所建立的高通量筛选平台,可以广泛应用于作物遗传育种研究,CRISPR/Cas9 系统除了能对植物进行定点突变,还能切割整段双链 DNA,另外也能通过同源重组机制突变特殊类型的基因,从而精确控制基因,在农作物病原菌及植物抗病中广泛应用,给农业领域带来了巨大的创新和突破。相比传统的转基因技术,CRISPR/Cas9 系统具有操作简单、成本低、周期短等优点。同时,基于 CRISPR/Cas9 系统衍生的 CRISPRi/CRISPRa 技术已经被整合到难以进行遗传操作的细菌染色体上,相信经对可诱导表达 CRISPRi 和 CRISPRa 工具的不断开发,将会使其应用领域更加广泛。

CRISPR/Cas9 系统存在的脱靶效应,是研究者们面临的重大挑战。最近,科学家通过改变 sgRNA 的二级结构,在一定程度上降低了脱靶效应。另外基于 CRISPR/Cas9 基因编辑技术多数集中在室内研究,未来应加强在田间的应用研究。相信 CRISPR/Cas9 系统的不断改进和完善,能够为农作物遗传育种改良和抗病品种的选育带来巨大贡献。

参考文献:

- [1] 蒋蕾阳,周志军,常岩林. 新型基因编辑技术 CRISPR/Cas9 系统研究现状[J]. 河北大学学报(自然科学版), 2016, 36(1): 84-93.
- [2] LAI Z, HUANG Z T, SUN J T, et al. The recent progress of CRISPR/Cas genome editing technology and its application in crop improvement[J]. Chinese Science Bulletin, 2022, 67(17): 1923-1937.
- [3] MCCAW M E, LEE K, KANG M, et al. Development of a transformable fast-flowering mini-maize as a tool for maize gene editing [J]. Frontiers in Genome Editing, 2021, 2: 622227.
- [4] CHOI S H, AHN W S, JIE E Y, et al. Development of late-bolting plants by CRISPR/Cas9-mediated genome editing from mesophyll protoplasts of lettuce[J]. Plant Cell Reports, 2022, 41(7): 1627-1630.
- [5] CAO J T, QIU M, YE W W, et al. *Phytophthora sojae* transformation based on the CRISPR/Cas9 system [J]. Bio-protocol, 2022, 12(6): e4352.
- [6] ROSSATO M, MARCOLUNGO L, de ANTONI L, et al. CRISPR-Cas9-based repeat depletion for high-throughput genotyping of complex plant genomes[J]. Genome Research, 2023, 33(5): 787-797.
- [7] SHI J R, GAO H R, WANG H Y, et al. ARGOS8 variants generated by CRISPR-Cas9 improve maize grain yield under field drought stress conditions [J]. Plant Biotechnology Journal, 2017, 15(2): 207-216.

- [8] ORTIGOSA A, GIMENEZ-IBANEZ S, LEONHARDT N, et al. Design of a bacterial speck resistant tomato by CRISPR/Cas9-mediated editing of *SlJAZ2* [J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2019, 17(3): 665-673.
- [9] CHEN Q C, CHUAI G H, ZHANG C, et al. Toward a molecular mechanism-based prediction of CRISPR-Cas9 targeting effects[J]. *Science Bulletin*, 2022, 67(12): 1201-1204.
- [10] 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(7): 2647-2655.
- [11] 宋明,付瑞峰,曹怡然,等. 利用 CRISPR-Cas9 技术制备水稻 LOC_Os01g07170 突变体[J]. *分子植物育种*, 2019, 17(3): 827-833.
- [12] AHERN J O, LARA-SÁEZ I, ZHOU D Z, et al. Non-viral delivery of CRISPR-Cas9 complexes for targeted gene editing via a polymer delivery system[J]. *Gene Therapy*, 2022, 29(3/4): 157-170.
- [13] POURCEL C. CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies[J]. *Microbiology*, 2005, 151(3):653-663.
- [14] BOLOTIN A. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin[J]. *Microbiology*, 2005, 151(8):2551-61.
- [15] HSU P D, LANDER E S, ZHANG F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering[J]. *Cell*, 2014, 157(6): 1262-1278.
- [16] CONG L, RAN F A, COX D, et al. Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems [J]. *Science*, 2013, 339(6121).
- [17] DOUDNA J A, CHARPENTIER E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9 [J]. *Science*, 2014, 346(6213): e1258096.
- [18] 赵宏图,王艳丽. CRISPR-Cas 系统中 crRNA 产生及干扰机制的研究[J]. *生命科学*, 2016, 28(5): 584-591.
- [19] CARRASCO-PADILLA C, RODA-NAVARRO P. CRISPR/Cas9-mediated genome editing assists protein dynamics studies in live cells[J]. *European Journal of Cell Biology*, 2022, 101(2): 151203.
- [20] LIU X Y, XIONG W, QI Q Q, et al. Rational guide RNA engineering for small-molecule control of CRISPR/Cas9 and gene editing[J]. *Nucleic Acids Research*, 2022, 50(8): 4769-4783.
- [21] JIANG D. Cellular RNAs guide CRISPR-cas9 [J]. *Science*, 2021, 372(6545): 929.10-929.
- [22] OKAFOR I C, CHOI J, HA T. Single molecule methods for studying CRISPR Cas9-induced DNA unwinding[J]. *Methods*, 2022, 204: 319-326.
- [23] ALLEN A J, GUZMAN LUNA V, FURLEY H J, et al. Generation of enhanced ribosomes for optimal protein overexpression via CRISPR-Cas9-assisted recombineering [J]. *Biophysical Journal*, 2021, 120(3): 200a.
- [24] 王玮玮,刘瑞琪,吴勇延,等. CRISPR/Cas9 基因编辑系统研究进展及其在动物基因编辑研究中的应用[J]. *畜牧兽医学报*, 2016, 47(7): 1299-1305.
- [25] 寇天赐,胡又佳. CRISPR/Cas9 技术及其在药物研发中的应用[J]. *药物生物技术*, 2015, 22(6): 530-534.
- [26] 王干诚,马明,叶延帆,等. 基于 CRISPR/Cas9 系统高通量筛选研究功能基因[J]. *遗传*, 2016, 38(5): 391-401.
- [27] BURIAN J, LIBIS V K, HERNANDEZ Y A, et al. High-throughput retrieval of target sequences from complex clone libraries using CRISPRi[J]. *Nature Biotechnology*, 2023, 41(5): 626-630.
- [28] 包勇,姜小筱,杨永华. RNA 编辑技术 CRISPR/Cas9 的原理及功能[J]. *药学研究*, 2016, 35(1): 1-9.
- [29] WANG Y P, CHENG X, SHAN Q W, 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.
- [30] WANG F J, WANG C L, LIU P Q, et al. Enhanced rice blast resistance by CRISPR/Cas9-targeted mutagenesis of the ERF transcription factor gene OsERF922 [J]. *PLoS One*, 2016, 11(4): e0154027.
- [31] THOMAZELLA D P T, SEONG K, MACKELPRANG R, et al. Loss of function of a DMR6 ortholog in tomato confers broad-spectrum disease resistance[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2021, 118(27): e2026152118.
- [32] PYOTT D E, SHEEHAN E, MOLNAR A. Engineering of CRISPR/Cas9-mediated potyvirus resistance in transgene-free *Arabidopsis* plants[J]. *Molecular Plant Pathology*, 2016, 17(8): 1276-1288.
- [33] WANG H Y, YANG H, SHIVALILA C S, et al. One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/cas-mediated genome engineering[J]. *Cell*, 2013, 153(4): 910-918.
- [34] CARROLL D. Progress and prospects: zinc-finger nucleases as gene therapy agents[J]. *Gene Therapy*, 2008, 15(22): 1463-1468.
- [35] SHARMA G, SHARMA A R, BHATTACHARYA M, et al. CRISPR-Cas9: a preclinical and clinical perspective for the treatment of human diseases[J]. *Molecular Therapy*, 2021, 29(2): 571-586.
- [36] CORSI G I, GADEKAR V P, GORODKIN J, et al. CRISPRroots: on- and off-target assessment of RNA-seq data in CRISPR-Cas9 edited cells [J]. *Nucleic Acids Research*, 2022, 50(4): e20.
- [37] KANDURI V, LaVIGNE D, LARSEN J. Current advances toward the encapsulation of Cas9[J]. *ACS Macro Letters*, 2021, 10(12): 1576-1589.
- [38] KREUTER J, STARK G, MACH R L, et al. Fast and efficient CRISPR-mediated genome editing in *Aureobasidium* using Cas9 ribonucleoproteins[J]. *Journal of Biotechnology*, 2022, 350: 11-16.
- [39] MATSUMOTO D, KISHI K, MATSUGIE E, et al. Cas9-

Geminin and Cdt1-fused anti-CRISPR protein synergistically increase editing accuracy[J]. FEBS Letters, 2023, 597(7): 985-994.

[40] YU M Y, LIU X W, CHENG H B, et al. Latest progress in the study of nanoparticle-based delivery of the CRISPR/Cas9 system[J]. Methods, 2021, 194: 48-55.

[41] NEWMAN A, STARRS L, BURGIO G. Cas9 cuts and consequences: detecting, predicting, and mitigating CRISPR/Cas9 on- and off-target damage: techniques for detecting, predicting, and mitigating the on- and off-target effects of Cas9 editing[J]. BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology, 2020, 42(9): e2000047.

[42] XU R F, LI H, QIN R Y, et al. Generation of inheritable and “transgene clean” targeted genome-modified rice in later generations using the CRISPR/Cas9 system [J]. Scientific Reports, 2015, 5: 11491.

[43] 瞿礼嘉,郭冬妹,张金喆,等. CRISPR/Cas 系统在植物基因组编辑中的应用[J]. 生命科学, 2015, 27(1): 64-70.

[44] GRATZ S J, CUMMINGS A M, NGUYEN J N, et al. Genome engineering of *Drosophila* with the CRISPR RNA-guided Cas9 nuclease[J]. Genetics, 2013, 194(4): 1029-1035.

[45] MEHRYAR M M, SHI X, LI J W, et al. DNA polymerases in precise and predictable CRISPR/Cas9-mediated chromosomal rearrangements[J]. BMC Biology, 2023, 21(1): 288.

[46] FU R J, HE W, DOU J Z, et al. Systematic decomposition of sequence determinants governing CRISPR/Cas9 specificity [J]. Nature Communications, 2022, 13(1): 474.

[47] RODRÍGUEZ-LEAL, DANIEL, LEMMON Z H, MAN J, et al. Engineering quantitative trait variation for crop improvement by genome editing [J]. Cell, 2017, 14: 470-480.

[48] LI J Y, LI S Y, SUN Y W, et al. CRISPR/Cas9-mediated genome editing for rice and wheat improvement[C]//中国作物学会. 第八届全国小麦基因组学及分子育种大会. 2017:20.

[49] CHEN X, YANG S X, ZHANG Y H, et al. Generation of male-sterile soybean lines with the CRISPR/Cas9 system[J]. The Crop Journal, 2021, 9(6): 1270-1277.

[50] WANG S Y, YANG Y H, GUO M, et al. Targeted mutagenesis of amino acid transporter genes for rice quality improvement using the CRISPR/Cas9 system [J]. The Crop Journal, 2020, 8(3): 457-464.

[51] GOWDA A K, MISHRA S B, BARMAN M, et al. CRISPR/Cas9: a revolutionary tool for recent advances in crop improvement: a review[J]. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, 2020, 9(11): 200-214.

[52] LAWRENSON T, HARWOOD W A, 常静,等. 利用 CRISPR/Cas9 敲除大麦靶基因[J]. 耕作与栽培, 2020, 40(2): 57-59, 62.

CRISPR / Cas9 Gene Editing and Its Application in Agriculture

LIU Yue, LAN Ying, LI Qingchao, ZHAO Xiumei, LIU Yang, WANG Lida, WANG Junqiang, HAN Yehui

(Qiqihar Branch, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Qiqihar 161006, China)

Abstract: Gene editing techniques are widely used to improve crop yield and quality. Clustered regularly interspaced short palindromic repeats and associated protein (CRISPR/Cas9) system is the acquired immune system of bacteria, archaea resist exogenous substances invasion, the zinc finger nuclease (ZFN), transcription activator like effector nuclease (TALEN) after the third generation of gene editing technology. This article discussed the historical origins of the CRISPR/Cas9 system; An overview of the gene structure of the CRISPR/Cas9 system, including CRISPR related nucleases (Cas9), specific CRISPR RNA (crRNA), and trans activated CRISPR RNA (tracrRNA). At the same time, the working principle of the system was summarized from three stages, as the acquisition stage of interval sequences, the expression stage, and the immune interference stage. In addition, discussions have been conducted on the application of the system in functional gene research, genomic screening, and related fields such as agriculture. And it summarized the risks (off target effects) and solutions that will arise, to lay the foundation for crop variety selection and the exploration of functional genes.

Keywords: CRISPR/Cas9 system; gene editing; agriculture; miss effect