



薛永国,刘鑫磊,唐晓飞,等. CRISPR-Cas9 技术在作物中研究进展[J]. 黑龙江农业科学,2020(2):125-130.

CRISPR-Cas9 技术在作物中研究进展

薛永国,刘鑫磊,唐晓飞,曹旦,栾晓燕

(黑龙江省农业科学院 大豆研究所,黑龙江 哈尔滨 150086)

摘要:基因编辑技术 CRISPR-Cas9 系统的出现,为基因功能研究和作物改良提供了技术支持。本文就 CRISPR-Cas9 技术背景、发展等做了简要说明,综述了 CRISPR-Cas9 技术在基因敲除、定点整合和调控转录的应用中的原理、特点与前景,同时总结了针对 CRISPR-Cas9 技术缺点改进的最新研究成果,重点介绍了此技术在作物中应用情况,并对其在作物中的应用前景进行了展望。

关键词:CRISPR-Cas9; 基因编辑; 作物; sgRNA

1987 年,日本微生物学家 Mahfouz 等^[1]在分析大肠杆菌碱性磷酸酶同工酶(Alkaline phosphatase isozyme, ALPLI)序列时,发现在其内部存在一系列间隔串联重复序列,每个重复序列内部具有短回文结构,这些短回文结构是由 29 个保守碱基组成,这些重复序列之间由居间序列(32 个碱基)隔开,这种结构便是 CRISPR 系统(Clustered regularly interspaced short palindromic repeat sequences),是大多数细菌和古细菌中存在的一种天然免疫系统,其结构特点具有明显的规律性的、成簇的、间隔的短回文重复序列特点,可用于对抗入侵的病毒及外源 DNA,但当时还未了解它的生物学功能。2012 年,科学家 Jennifer Doudna 和 Emmanuelle Charpentier 发现细菌用以对抗病毒的 CRISPR-Cas9 系统可以作为简单、灵活的基因组编辑工具,这种技术还得依赖“向导 RNA”的分子与 Cas 类别的蛋白质支持。CRISPR-Cas9 系统具有搜索和替换 DNA 的双重功能,可以通过搜索确定 DNA 的位置,替换碱基从而改变 DNA 的功能^[2],Cas(CRISPR-associated genes, Cas gene),即与 CRISPR 相关基因的蛋白, Cas9 是目前发现的最有效的 Cas 蛋白质。

CRISPR-Cas 系统通常分为 3 种类型, Type I、II 和 III。目前发现的最有效的 Cas 蛋白质

Cas9 蛋白(Cas9 蛋白参与 crRNA 的成熟、降解外来的噬菌体 DNA 或外源质粒),属于 TypeII 系统。CRISPR 系统与 Cas9 蛋白相结合,形成复合体,具有识别和降解外源 DNA 功能。通常 CRISPR 系统需要多种蛋白参与形成复杂的复合体,才能发挥作用,但是研究发现,在 TypeII 系统中,只需要一种蛋白 Cas9 就可以发挥作用。在细胞中,CRISPR-Cas9 复合体促使 RNA 找到目标 DNA 片段, RNA 找到相应片段后引导 Cas9 进入 DNA,发挥其内切酶功能,解开其双螺旋链,切除或者编辑所选基因碱基,促使基因失去/加强功能,而最终细胞中存在的修复功能又促使 DNA 的双螺旋结构恢复。

2013 年,科学家们研究了 CRISPR-Cas9 系统在哺乳动物细胞中的应用,研究发现 CRISPR-Cas9 系统可对多个基因的不同位点同时进行突变,多个靶向 sgRNAs 引导对不同基因的多个位点进行断裂,通过 DNA 修复系统在修复过程中的不精确修复,便在多个断裂点周围同时引发突变^[3-4]。随着 CRISPR/Cas9 系统研究的深入,该技术现已广泛地应用于各类生物体进行探索,目前基因组编辑技术已经在多个模式植物、动物以及其他生物中得到成功应用。2019 年,通过 CRISPR/Cas9 系统中 Cas9 蛋白与逆转录酶的蛋白质偶联,已升级成为更精准和效率更高的基因编辑系统^[5]。CRISPR/Cas9 主要应用表现在基因敲除,定点整合,小片段缺失,染色体重组和多基因敲除方面均有应用。本文就 CRISPR-Cas9 技术背景、发展及原理做了简要说明,重点介绍了 CRISPR-Cas9 在作物中的应用,并对其在作物中的应用前进行了展望。

收稿日期:2019-11-22

基金项目:哈尔滨市应用技术研究开发与开发项目(2017 RAQYJ064);黑龙江省农科院院级课题(2017SJ011)。

第一作者:薛永国(1981-),男,在读博士,助理研究员,从事大豆遗传育种研究。E-mail:xyg81@126.com。

通信作者:栾晓燕(1964-),女,硕士,研究员,从事大豆遗传育种研究。E-mail:luanxiaoyan1201@163.com。

1 在基因敲除中的应用

基因敲除是基因组编辑最简单的应用形式,即利用 CRISPR-Cas9 技术对基因造成突变,使基因失去功能,达到基因沉默或者敲除的目的。CRISPR-Cas9 通常包括 sgRNA 序列、Cas9 蛋白,sgRNA 进行靶基因识别,Cas9 蛋白发挥内切酶功能,致使 DNA 双链断裂,因为 DNA 双链都断裂,便不存在其中一条 DNA 单链作为修复模板的情况,因此基因组将启动非同源末端连接修复途径,这种修复途径是对断裂口的碱基随机填补,会引起碱基插入或丢失,从而导致断裂位点下游序列的阅读框架发生一系列变化,造成移码突变,导致靶基因功能的丧失或减弱。

CRISPR-Cas9 技术的基因敲除功能,主要是依靠 sgRNA 序列对需要敲除的靶基因进行定位,进而引导 CAS9 蛋白发挥作用。因此,sgRNA 序列的设计是极其重要的第一步。sgRNA 序列的设计具有重要的一系列原则,首先要明确靶基因的编码区域,分析其内含子和外显子位置,并在外显子区域上确定待突变的位点,设计相应的 sgRNA 序列。第二为了最大程度的破坏基因的功能,突变位点的选择尽可能靠近起始密码子的位置,这样的突变位置更容易造成移码突变或错义突变,从而达到敲除基因的目的。目前常用的 sgRNA 设计软件有几十款,用于 sgRNA 效能预测和脱靶位点识别的软件工具^[6],最早最知名的有 CRISPR Design,它是由麻省理工学院的张锋团队开发,该软件包含人、小鼠和大鼠等 15 个物种,可提供对基因编辑的脱靶效应评估,可考察脱靶位点碱基错配数,允许 ≤ 4 个碱基错配;PAM 类型包含“NGG”和“NAG”,还可进一步评估脱靶位点是否位于其他基因的外显子内等。还有著名的德国海德堡生物研究中心开发的 sgRNA 序列设计软件 CCTop,提供 sgRNA 在线设计,提供 56 个物种的基因组信息,输入基因序列,在线软件根据 PAM 序列,便可进行 sgRNA 设计评估。国内植物方面 sgRNA 设计软件主要有华中农业大学开发的 CRISPR-P,目前已升级到 V2.0 版本,包含 49 个植物基因组,而且支持 CRISPR-Cas 系统各类引导序列设计,包括 Cpf1^[7-10]。

根据设计好的 sgRNA 序列,构建与 Cas9 蛋

白共表达的表达载体,或者利用 sgRNA 序列,靶基因以及 Cas9 蛋白,组建体外实验生化环境,进行体外验证靶基因的切割或者敲除效率。利用 CRISPR-Cas9 技术构建载体,然后利用转基因技术,或农杆菌介导,或基因枪技术,将载体导入再生体系的再生胚或不定芽等,然后获得再生植株,进行检测,以证实 CRISPR-Cas9 技术的基因敲除的效果。许多试验已表明 CRISPR-Cas9 系统具有简捷和高效特性^[11]。

目前 CRISPR-Cas9 系统的基因敲除功能已在多个植物中进行研究应用,国内在水稻^[12-14]、大豆^[15-16]、拟南芥^[17]、玉米^[18]、烟草^[19]、小麦^[20]等上都有开展。世界上更是将基因编辑技术应用于拟南芥、烟草、水稻、玉米、高粱、小麦、甜橙和番茄等^[21]。

2 在基因定点整合中的应用

利用 CRISPR-Cas9 系统进行基因编辑时,在靶基因的目标位点产生双链断裂后,当细胞内存在修复模板时,细胞会激活 DNA 损伤修复途径,即基因同源重组修复途径,这种修复途径会严格按照修复模板来修复断裂的 DNA 双链。根据这个原理,针对修复模板进行设定,可在基因组目标位点引入特定的碱基,产生精确的突变,这便是基因定点编辑。利用基因同源重组修复途径对双链断裂位点进行修复时,要求修复模板必须与双链断裂位点上下游的序列高度同源,因此在目标位点引入外源基因序列时,通常需要在外源基因的上下游分别设计一段与断裂位点上下游序列高度同源的同源臂序列^[11,21]。利用基因同源重组修复途径进行基因组定点编辑的效率没有利用非同源末端连接修复途径进行基因定点敲除的效率。

一般情况下,基因插入或定点替换都可以通过同源重组修复途径实现。利用 CRISPR-Cas9 系统进行构建载体转化时,同时引入一个供体 DNA 载体或片段,供体 DNA 包含了待插入或替换的基因或核苷酸序列,并在其两侧分别含有足够长的同源 DNA(同源臂)。基因定点插入所用的供体 DNA 通常为双链环状载体或双链线性 DNA;此外还可以使用单链寡核苷酸 DNA(ssDNA),ssDNA 的设计和合成比构建双链 DNA 载体更简单方便。由于非同源末端连接修复途径效

率相比同源重组修复效率高很多,因此,利用非同源末端连接修复途径定点插入基因或 Tag 标签成为一种替代方法。植物的 CRISPR-Cas9 研究中已经有许多基因插入和定点替换的成功例子^[6]。基因同源重组修复途径中修复模板既可以是构建在载体质粒上的双链 DNA 序列,也可以是单链的寡核苷酸序列。在基因编辑中,若靶向整合小于 50 bp 的小片段外源基因时,一般利用单链的寡聚核苷酸序列作为修复模板,同时要求它的同源臂序列比整合片段长约 30 bp,其整合效率要比质粒作为供体模板的整合效率高。若靶向整合大于 100 bp 大片段外源基因时,一般利用供体质粒作为修复模板,其同源臂序列要比整合片段大的多,要求在 800 bp 左右。同时研究表明利用基因同源重组修复途径时,在修复过程中,容易在目标基因的靶位点引起插入突变情况^[11,21]。

3 在基因转录调控中的应用

基因功能解析时一个重要研究方面即是对基因转录调控的研究。在基因转录调控研究时,通常是利用与 DNA 序列特异性结合的蛋白,即转录调控因子,通过结合 DNA 序列进行调控改变目标基因的表达状态,这样便可以对基因的转录调控进行研究,这种与 DNA 特异性结合蛋白,有的是自然存在的,有的是通过人工合成的,可以利用 CRISPR-Cas9 系统创造这种蛋白,以便进行基因转录调控的研究。在 CRISPR-Cas9 系统中,当 Cas9 的两个核酸结构域同时失活时,便不具有核酸酶活性,但在 sgRNA 引导下,仍然具有与靶位点进行结合的能力,这种结构域失活的 Cas9 蛋白称之为 dCas9 蛋白。因此,dCas9 蛋白作为可以与 DNA 序列结合的蛋白,在 sgRNA 的引导下,与目标基因的功能区域相结合,从而调控该基因的转录过程。在原核与真核生物中,dCas9 系统针对基因转录的调控表现为不同的方式。在原核生物细胞中,dCas9 蛋白在 sgRNA 引导下与基因组中的编码区域相结合,阻碍 RNA 聚合酶的结合与延伸,从而有效抑制目标基因的转录。但是在真核生物细胞中,基因的转录调控机制相对比较复杂,基因的转录调控通常需要多个转录调控因子共同作用来实现,利用类似原核生物细胞中的 dCas9 与基因组中的编码区域相结合并不能达到有效抑制基因转录的目的。因此在真核生物细

胞中,需要建立一个可以融合多个转录因子的表达系统,以实现多个转录因子共同作用进行转录调控。因此可以建立 dCas9 蛋白与转录调控因子融合表达的系统,通过将 dCas9 蛋白与转录抑制因子、激活因子在体内融合表达,这样便可以达到多转录因子共同作用,以实现对目标基因的调控,也可以通过 dCas9 技术构建敲除细胞系来确定目标基因的转录调控区域^[11,21]。

4 CRISPR/Cas9 优缺点和在作物中应用前景

CRISPR-Cas9 系统被称为第三代基因编辑技术,CRISPR-Cas9 的优点非常明显,载体系统构建方便,可简单快捷高效地进行基因定点突变和基因编辑。可进行的基因定点突变有 InDel 突变,多位点同时突变,小片段的缺失,编码基因和非编码基因的定点敲除,使其得到迅速推广利用。CRISPR-Cas9 技术应用领域除模型动物构建外包括作物性状改良、基因功能、基因转录调控、基因治疗等^[16]。利用新技术开发出新型 CRISPR-Cas9 sgRNA 文库,可以进行进行基因功能筛查,也可通过高通量测序进行的基因鉴别,这不仅能够快速鉴别对细菌毒性至关重要的基因,还能促成发现参与其他生物过程的基因^[21]。此技术若成功借鉴到植物原生质体与 CRISPR-Cas9 sgRNA 文库相结合,对于高通量建立植物突变体技术也将是突破。CRISPR-Cas9 技术在应用过程中存在脱靶效应,同时 CRISPR-Cas9 利用基因同源重组修复途径时,在目标基因的断裂位点修复过程中,还可能导致碱基的插入或丢失而造成的突变情况,因此其应用于人类基因碱基突变类疾病的临床治病尚有一段距离,但其强大的作用效果和迅速的发展速度,将为人类单基因甚至多基因遗传疾病的治疗提供全新模式。但在 CRISPR-Cas9 技术植物应用中,即使脱靶,也不会造成严重后果,所以也将率先有广泛应用。

CRISPR-Cas9 技术缺点很明显,严重的脱靶性,技术的难点在于如何克服脱靶效应、如何提高基因组改造的效率和特异性,以及如何将这项技术应用于更多的物种等方面^[20]。目前 CRISPR-Cas9 脱靶效应的评价有了一系列进展,CRISPR-Cas9 编辑某种特异性 SNP 而引起的相关脱靶突变可以迅速鉴定,也可以检测基因组中存在的潜

在的脱靶切割位点^[21-22]。随着 CRISPR-Cas9 脱靶效应研究的不断进步,Zhou 等^[23]利用改造的 CRISPR-Cas9 系统,大幅度降低 CRISPR-Cas9 系统在小鼠基因组上的脱靶效应,且不降低基因切割效率。同时双切口法与适当缩短 sgRNA 引导的目标基因位点序列的方法相结合,能够进一步降低脱靶效应^[23]。Slaymaker 等^[24]在改变化脓性链球菌 Cas9 酶的约 1 400 个氨基酸中的 3 个,将“脱靶编辑”显著减少,甚至无脱靶现象。CRISPR-Cas9 系统除了脱靶现象外,还存在一些其他的有待改进的地方。CRISPR-Cas9 系统发挥作用过程中,首先需要 CRISPR 转录形成 CrRNA 与反式作用型 TracrRNA 两种小 RNA 分子,根据互补区域形成配对形成复合体,该复合体才能发挥活性,进行基因定点编辑。这样的载体系统构建相对比较复杂,各部分都需要单独的设计,均需要各自的启动子和终止系列^[25-26]。近期科学家解析了 Cas9 的潜在替代物:Cpf1 (CRISPR from *Prevotella* and *Francisella* 1)酶。Cpf1 切割活性不同于 Cas9 蛋白切割活性,CRISPR-Cas9 切割双链 DNA 产生平末端,而 CRISPR/Cpf1 则产生粘性末端。在细胞的 DNA 损伤修复中,DNA 的粘性末端比平末端能够更有效的实现修复,因此利用 CRISPR/Cpf1 有助于克服 CRISPR-Cas9 局限,让基因编辑工具更准确而高效^[27-28]。中国科学家发现并改造出 Cpf1 系统,不需要反式作用型 tracrRNA 的辅助,便能发挥活性,定向切割靶点双链 DNA,而且能把非成熟型 CrRNA 加工剪切成成熟型 CrRNA,Cpf1 蛋白兼具 DNA 剪切酶和 RNA 修剪酶的功能,Wang 等^[29]利用 CRISPR/Cpf1 系统,运用 4 个 CrRNA 短阵列,进行水稻 RLK 和 CYP81A 家族的 4 个基因同时编辑,各位点均获得敲除突变效果,效率达到 40%~75%。Ma 等^[30]利用 CRISPR-Cpf1 实现了对人多能干细胞的精确高效编辑,这些研究进一步促进 CRISPR-Cas9 技术在植物基因组研究和农作物分子设计育种中的应用^[31-32],Li 等^[33]利用 Cpf1 在水稻上进行同源重组,实现基因 ALS 的精确编辑,使水稻获得了除草剂抗性。同时中国科学家在 CRISPR-Cas9 分子机制研究上取得新进展,揭示了 Anti-CRISPR 蛋白抑制 SpyCas9 活性的分子机制,这些研究为进一步完

善 CRISPR-Cas9 技术,进行基因时空特异性的精确编辑提供基础^[34-35]。Hu 等^[36]利用其创造的噬菌体持续进化功能,改造了 Cas9 蛋白,可以将 spCas9 依靠的 PAM 序列(NGG)扩充到 NG, GAA,GAT,命名为 xCas9,同时降低了脱靶率,极大扩展了 CRISPR 系统对基因编辑的应用范围。Anzalone 等^[5]通过将 CRISPR/Cas9 系统中 Cas9 蛋白与逆转录酶的蛋白质偶联,已经获得突破性进展,可以达到精准编辑和更高的效率。

CRISPR-Cas9 技术对农业具有重大意义,CRISPR-Cas9 技术能够针对作物本身的基因进行精确定点突变或者编辑,基因编辑在作物中水稻的研究走在前列,刘耀光等^[37]统计在水稻高产、高抗、高品质等性状方面都有开展工作,对于水稻稻瘟病、白叶枯病、杂种优势、不育性、株高、支链淀粉、抗除草剂、香味等方面的 *ERF922*、*SWEET13*、*Nramp5*、*Sa F/Sa M*、*Sc*、*S1TPR/S1A4/S1A6*、*CSA*、*TMS5*、*Hd2/Hd4/Hd5*、*DEP1/EP3*、*Gn1a*、*GS3*、*GW2/GW5/TGW6*、*SBEIIb*、*Waxy*、*BADH2*、*ALS*、*EPSPS*、*ACC*、*SLR1* 等基因进行编辑。Miao 等^[38]利用改进的 CRISPR-Cas9 技术对水稻叶绿素 *CAO1* 和分蘖夹角 *LAZY* 进行定点突变,突变率分别达到 83% 和 91.6%。由北大、中科院遗传所和中科院上海植物生所定点突变获得水稻基因编辑后代,定点突破率达到 80% 以上。Qi 等^[39]最先利用 CRISPR-Cas 系统突变了小麦和水稻两个作物的 5 个基因,小麦对应基因的突变效率为 14.5%~38.0%,并且获得了预期的白化和矮小表型水稻突变体,属于定点突变的 *pds* 基因,突变效率为 4.0%~9.4%。Lu 等^[32]利用改造的 CRISPR-Cas9 在水稻中进行多基因编辑,各位点的敲除效率达到 40-75%。Du 等^[40]对比了 TALENs 和 CRISPR-Cas9 在大豆中定点突变效率,成功获得定点基因编辑的突变体,发现这两种均是非常有效的突变技术手段。Meng 等^[41]研究发现 CRISPR-Cas9 在水稻中能够高效编辑 PAM 为 NAG 位点,拓展 CRISPR-Cas9 基因编辑技术在水稻中应用范围。Cai 等^[42]利用 CRISPR-Cas9 成功敲除大豆种的开花基因 *GmFT2a* 和 *GmFT5a*,系统解析了 *GmFT2a* 和 *GmFT5a* 在长短日照条件下的遗传效应,创制了晚开花,延长营养

生长时期的突变材料。Karkute 等^[43]对基因编辑技术在园艺作物中的应用情况总结统计,发现利用 CRISPR-Cas9 进行基因编辑成功进展的园艺作物有番茄,土豆,莴苣等 11 个。丁莉萍等^[6]总结了 CRISPR/Cas9 系统在模式植物、农作物、果树及木本植物、草本植物等 21 个植物物种中进行基因组编辑的成功例子。

单分子实时(SMRT)测序技术能够同时测定任何位点的基因组编辑结果,这种测序技术策略为研究 DNA 修复的通路提供了一种方法,而之前的方法难以研究。SMRT DNA 测序能够灵活评估任一位点的基因组编辑结果,而不需要开发报告系统,从而简化了基因组编辑项目的开发,也扩展了这些技术的应用^[44-45]。CRISPR-Cas9 技术有着无可比拟的优点,将在生命科学领域掀起一场全新的革命。

随着更多 CRISPR-Cas9 分子机制和基础性研究的进展和突破^[23-28],脱靶现象的降低^[46],定点编辑和突变效率更高,多基因同时突变的自动化高通量技术将会出现^[47],通过基因编辑实现作物性状改良、基因调控、抗病毒、抗虫耐逆,以最终提高作物产量和品质^[48-49]。

参考文献:

- [1] Mahfouz M M, Li L X, Sha M M, et al. Denovo-engineered transcription activator-like effector (TALE) hybrid nuclease with novel DNA binding specificity creates double-strand breaks[J]. *Proceedings of National Academy of Science USA*, 2011, 108(6): 2623-2628.
- [2] Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity[J]. *Science*, 2012, 337(6096): 816-821.
- [3] Cong L, Ran F A, Cox D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems [J]. *Science*, 2013, 339(6121): 819-823.
- [4] Mali P, Yang L H, Esvelt K M, et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9[J]. *Science*, 2013, 339(6121): 823-826.
- [5] Anzalone A V, Randolph P B, Davis J R, et al. Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA [J]. *Nature* (2019) doi: 10. 1038/s41586-019-1711-4.
- [6] 丁莉萍, 张杰伟, 马艳, 等. CRISPR/Cas 基因组编辑技术研究进展及其在植物中的应用[J]. *植物生理学报*, 2019, 55(4): 411-424.
- [7] 谢胜松, 张懿, 张利生, 等. CRISPR/Cas9 系统中 sgRNA 设计与脱靶效应评估[J]. *遗传*, 2015, 37(11): 1125-1136.
- [8] Lei Y, Lu L, Liu H Y, et al. CRISPR-P: A Web Tool for

Synthetic Single-Guide RNA Design of CRISPR-System in Plants[J]. *Molecular Plant*, 2014, 7(9): 1494-1496.

- [9] Duan Y D, Hong L, Ling-Ling C, et al. Recent advances in genome editing using CRISPR/Cas9[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 7: 703.
- [10] Liu H, Ding Y, Zhou Y, et al. CRISPR-P 2. 0: an Improved CRISPR-Cas9 tool for genome editing in plants[J]. *Molecular Plant*, 2017, 10(3): 530-532.
- [11] 李佳鑫, 冯炜, 王志钢, 等. CRISPR/Cas9 技术及其在转基因动物中的应用[J]. *中国生物工程杂志*, 2015, 35(6): 109-115.
- [12] Zhang H, Zhang J, Wei P, et al. The CRISPR/Cas9 system produces specific and homozygous targeted gene editing in rice in one generation[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2014, 12(6): 797-807.
- [13] Jin M, Dong S G, Jin Z Z, et al. Targeted mutagenesis in rice using CRISPR-Cas system [J]. *Cell Research*, 2013(10): 1233-1236.
- [14] 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.
- [15] Cai Y, Chen L, Liu X, et al. CRISPR/Cas9-mediated genome editing in soybean hairy roots[J]. *PLOS ONE*, 2015, 10.
- [16] Sun X, Hu Z, Chen R, et al. Targeted mutagenesis in soybean using the CRISPR-Cas9 system[J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: 10342.
- [17] Mao Y, Zhang H, Xu N, et al. Application of the CRISPR-Cas system for efficient genome engineering in plants[J]. *Molecular Plant*, 2013(6): 2008-2011.
- [18] Liang Z, Zhang K, Chen K, et al. Targeted Mutagenesis in zea mays using talens and the CRISPR/Cas system[J]. *Journal of Genetics and Genomics*, 2014, 41(2): 63-68.
- [19] Li J F, Norville J E, Aach J, et al. Multiplex and homologous recombination-mediated genome editing in Arabidopsis and Nicotiana benthamiana using guide RNA and Cas9[J]. *Nature Biotechnology*, 2013, 31(8): 688-91.
- [20] 王延鹏, 程曦, 高彩霞, 等. 利用基因组编辑技术创制抗白粉病小麦[J]. *遗传*, 2013, 36(8): 848.
- [21] 单奇伟, 高彩霞. 植物基因组编辑及衍生技术最新研究进展[J]. *遗传*, 2015(10): 7-27.
- [22] Shen B, Zhang W, Zhang J, et al. Efficient genome modification by CRISPR-Cas9 nickase with minimal off-target effects[J]. *Nature Methods*, 2014, 11(4): 399-402.
- [23] Zhou Y, Zhu S, Cai C, et al. High-throughput screening of a CRISPR/Cas9 library for functional genomics in human cells[J]. *Nature*, 2014, 509(7501): 487-491.
- [24] Slaymaker I M, Gao L, Zetsche B, et al. Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity[J]. *Science*, 2016, 351(6268): 84-88.
- [25] Tsai S Q, Nguyen N T, Malagon-Lopez J, et al. CIRCLE-seq: a highly sensitive in vitro screen for genome-wide CRISPR-Cas9 nuclease off-targets[J]. *Nature Methods*,

- 2017,14(6):563-564.
- [26] Cameron P, Fuller C K, Donohoue P D, et al. Mapping the genomic landscape of CRISPR-Cas9 cleavage[J]. *Nature Methods*, 2017, 14: 600-606.
- [27] Dong D, Ren K, Qiu X, et al. The crystal structure of Cpf1 in complex with CRISPR RNA [J]. *Nature*, 2016, 532(7600): 522-526.
- [28] Fonfara I, Richter H, Bratovi M, et al. The CRISPR-associated DNA-cleaving enzyme Cpf1 also processes precursor CRISPR RNA[J]. *Nature*, 2016, 532(7600): 517-521.
- [29] Wang M, Mao Y, Lu Y, et al. Multiplex gene editing in rice using the CRISPR-Cpf1 system[J]. *Molecular plant*, 2017, 10(7): 1011-1013.
- [30] Ma X, Chen X, Jin Y, et al. Small molecules promote CRISPR-Cpf1-mediated genome editing in human pluripotent stem cells [J]. *Nature communications*, 2018, 9(1): 1303.
- [31] Hu X, Meng X, Liu Q, et al. Increasing the efficiency of CRISPR-Cas9-VQR precise genome editing in rice [J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2017, 16(1): 12771.
- [32] Lu Y M. Precise editing of a target base in the rice genome using a modified CRISPR/Cas9 system [J]. *Molecular Plant (Cell Press)*, 2017, 10(3): 523-525.
- [33] Li S, Li J, Zhang J, et al. Synthesis-dependent repair of Cpf1-induced double-strand DNA breaks enables targeted gene replacement in rice[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2018(doi: 10.1093/jxb/ery245).
- [34] Dong D, Guo M, Wang S, et al. Structural basis of CRISPR-SpyCas9 inhibition by an anti-CRISPR protein[J]. *Nature*, 2017, 546(7658): 436-439.
- [35] Wu D, Guan X, Zhu Y, et al. Structural basis of stringent PAM recognition by CRISPR-C2c1 in complex with sgRNA[J]. *Cell Research*, 2017, 27(5): 705-708.
- [36] Hu J, Miller S M, Geurts M H, et al. Evolved Cas9 variants with broad PAM compatibility and high DNA specificity[J]. *Nature*, 2018, 556(7699): 57-63.
- [37] 刘耀光, 李构思, 张雅玲, 等. CRISPR/Cas 植物基因组编辑技术研究进展[J]. *华南农业大学学报*, 2019, 40(5): 38-49.
- [38] Miao J, Guo D, Zhang J, et al. Targeted mutagenesis in rice using CRISPR-Cas system [J]. *Cell Research*, 2013, 23(10): 1233.
- [39] Qi W S, Yan P W, Jun L, et al. Genome editing in rice and wheat using the CRISPR/Cas system[J]. *Nature Protocols*, 9(10): 2395-2410.
- [40] Du H, Zeng X, Zhao M, et al. Efficient targeted mutagenesis in soybean by talens and CRISPR/Cas9[J]. *Journal of Biotechnology*, 2016, 217: 90-97.
- [41] Meng X, Hu X, Liu Q, et al. Robust genome editing of CRISPR-Cas9 at NAG PAMs in rice[J]. *Science China (Life Sciences)*, 2018, 61(1): 124-127.
- [42] Cai Y, Wang L, Chen L, et al. Mutagenesis of GmFT2a and GmFT5a mediated by CRISPR/Cas9 contributes for expanding the regional adaptability of soybean[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2020, 18(1): 1-12.
- [43] Karkute S G, Singh A K, Gupta O P, et al. CRISPR/Cas9 mediated genome engineering for improvement of horticultural crops[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8: 1635.
- [44] Hendel A, Kildebeck E J, Fine E J, et al. Quantifying genome-editing outcomes at endogenous loci with SMRT sequencing[J]. *Cell Reports*, 2014, 7(1): 293-305.
- [45] 郑武, 谷峰. CRISPR/Cas9 的应用及脱靶效应研究进展[J]. *遗传*, 2015, 37(10): 1003-1010.
- [46] Fu Y F, Sander J D, Reyon D, et al. Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs[J]. *Nat Biotechnol*, 2014, 32(3): 279-284.
- [47] Wang Y, Liu Y, Liu J, et al. Macbeth: multiplex automated Corynebacterium glutamicum base editing method[J]. *Metabolic Engineering*, 2018, 47: 200-210.
- [48] 王春, 王克剑. CRISPR-Cas 系统在植物基因组编辑中的研究进展[J]. *生物工程学报*, 2017, 33(10): 1712-1722.
- [49] Chen K, Wang Y, Zhang R, et al. CRISPR/Cas genome editing and precision plant breeding in agriculture[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2019, 70: 667-697.

Research Progress of CRISPR-Cas9 Technology in Crops

XUE Yong-guo, LIU Xin-lei, TANG Xiao-fei, CAO Dan, LUAN Xiao-yan

(Soybean Research Institute, Heilongjiang Academy Agricultural of Science, Harbin 150086, China)

Abstract: The emergence of CRISPR-Cas9 system provides technical support for gene function research and crop improvement. This paper briefly introduced the background and development of CRISPR-Cas9 technology, summarized the principle, characteristics and prospects of CRISPR-Cas9 technology in gene knockout, site-specific integration and regulatory transcription, including the latest research results on the improvement of CRISPR-Cas9 technology, focused on the application of CRISPR-Cas9 technology in crops, and its application prospects in crops outlook.

Keywords: CRISPR-Cas9; gene editing; crop; sgRNA