

# 从随机突变到精确编辑：果蝇基因组编辑技术的发展及演化

苏方<sup>1</sup>, 黄宗靓<sup>1</sup>, 郭雅文<sup>2</sup>, 焦仁杰<sup>1,2</sup>, 李孜<sup>1</sup>, 陈建明<sup>1,3</sup>, 刘继勇<sup>1</sup>

1. 广州医科大学广州霍夫曼免疫研究所, 广州 511436;

2. 中国科学院生物物理研究所脑与认知科学国家重点实验室, 北京 100101;

3. 国家海洋局第三海洋研究所, 厦门 361005

**摘要:** 黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*)是研究生命科学的重要模式动物, 基因组编辑技术的发展有助于人们更好地利用果蝇来进行遗传学、发育生物学、生物医学等领域的研究。从 20 世纪开始, 果蝇基因组编辑技术经历了从随机突变到精确敲除、从单纯的基因突变体制作到多样化的基因组精确编辑的过程。甲基磺酸乙酯(Ethyl methanesulfonate, EMS)化学诱变是利用正向遗传学研究基因功能的重要手段, 但是无法实现果蝇基因的精确敲除。基于同源重组建立的基因打靶技术首次实现对果蝇基因组任意位点的精确编辑, 但效率较低。CRISPR/Cas9(Clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated protein)系统介导的果蝇基因组精确编辑相对于基因打靶技术具有简单、快速、高效的特点。本文以果蝇基因敲除为主线, 系统阐述了果蝇基因组编辑技术的演化, 着重论述了基因打靶、ZFN(Zinc-finger nucleases)、TALEN(Transcription activator-like effector nucleases)及 CRISPR/Cas9 技术的发展和运用。

**关键词:** 果蝇; 基因组编辑; ZFN; TALEN; CRISPR/Cas9

## From random mutagenesis to precise genome editing: the development and evolution of genome editing techniques in *Drosophila*

Fang Su<sup>1</sup>, Zongliang Huang<sup>1</sup>, Yawen Guo<sup>2</sup>, Renjie Jiao<sup>1,2</sup>, Zi Li<sup>1</sup>, Jianming Chen<sup>1,3</sup>, Jiyong Liu<sup>1</sup>

1. Sino-French Hoffmann Institute, Guangzhou Medical University, Guangzhou 511436, China;

2. State Key Laboratory of Brain and Cognitive Science, Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China;

3. State Key Laboratory Breeding Base of Marine Genetic Resources, Third Institute of Oceanography, State Oceanic Administration, Xiamen 361005, China

**Abstract:** *Drosophila melanogaster*, an important model organism for studying life science, has contributed more to the research of genetics, developmental biology and biomedicine with the development of genome editing techniques. *Drosophila* genome-editing techniques have evolved from random mutagenesis to precise genome editing and from simple mutant construction to diverse genome editing methods since the 20th century. Chemical mutagenesis,

收稿日期: 2015-07-27; 修回日期: 2015-10-19

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目(编号: 31201007)资助[Supported by the National Natural Science Foundation of China(No. 31201007)]

作者简介: 苏方, 硕士, 专业方向: 果蝇天然免疫。E-mail: fx-su@126.com

通讯作者: 刘继勇, 博士, 副教授, 研究方向: 果蝇天然免疫。E-mail: mangriver@hotmail.com

陈建明, 博士, 教授, 研究方向: 血细胞进化与适应性。E-mail: chenjm@xmu.edu.cn

李孜, 博士, 教授, 研究方向: 果蝇天然免疫。E-mail: lizi1002@gzhmu.edu.cn

DOI: 10.16288/j.ycz.15-337

网络出版时间: 2015-12-15 15:16:38

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20151215.1516.004.html>

using Ethyl methanesulfonate (EMS), is an important technique to study gene function in forward genetics, however, the precise knockout of *Drosophila* genes could not be achieved. The gene targeting technology, based on homologous recombination, has accomplished the precise editing of *Drosophila* genome for the first time, but with low efficiency. The CRISPR/Cas9 (Clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated protein)-mediated precise genome editing is simple, fast and highly efficient compared with the gene targeting technology in *Drosophila*. In this review, we focus on *Drosophila* gene knockout, and summarize the evolution of genome editing techniques in *Drosophila*, emphasizing the development and applications of gene targeting, zinc-finger nuclease (ZFN), transcription activator-like effector nuclease (TALEN) and CRISPR/Cas9 techniques.

**Keywords:** *Drosophila*; genome editing; ZFN; TALEN; CRISPR/Cas9

基因组编辑是现代分子生物学研究的重要课题,也是基因表达调控、基因功能、药物开发、基因治疗等一系列研究的前提<sup>[1~3]</sup>。从 T. H. Morgan 发现第一只白眼突变果蝇,首次证实基因在染色体上呈线性排列并绘制了第一张基因图谱,果蝇逐渐发展成为现代分子遗传学研究的重要模式动物。果蝇基因组编辑技术,特别是突变体获得技术也经历了一系列的发展演化。20 世纪 20 年代, Morgan 的学生 Muller 应用 X 射线造成基因组损伤使染色体重排,大大提高了果蝇基因突变的频率<sup>[4]</sup>。过去几十年,传统的果蝇突变体制作方法的应用,如化学诱变、转座子介导的突变等,在一定程度上促进了以果蝇为模型的现代生物学研究。1968 年, Lewis 和 Bacher 利用甲基磺酸乙酯 (Ethyl methanesulfonate, EMS) 处理构建了第一个果蝇化学诱变突变体。然而,由于 EMS 诱导产生的点突变筛选困难,大量序列比对和杂交工作费时费力,EMS 化学诱变的方法并未在果蝇突变体获得过程中得到广泛应用<sup>[5]</sup>。直到 20 世纪 80 年代,转座子插入 (Insertion)/跳跃 (Jump-out) 的方法成为基因突变的有力工具。Cooley 等<sup>[6]</sup>利用转座子插入的方法获得 1300 个单个 *P* 因子插入的果蝇品系并用于隐性突变体的大规模筛选。2000 年, Rong 等<sup>[7,8]</sup>建立的基于同源重组的基因打靶 (Homologous recombination mediated gene targeting) 技术首次实现果蝇基因的精确敲除。近年来, ZFN (Zinc-finger nucleases)、TALEN (Transcription activator-like effector nucleases) 及 CRISPR/Cas9 (Clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated protein) 技术的应用,极大丰富和简化了果蝇基因组编辑的手段。

ZFN、TALEN 及 CRISPR/Cas9 介导的基因组精确编辑依赖于细胞 DNA 双链断裂 (Double strand break,

DSB) 的形成及随后的 DNA 损伤修复机制来实现。三者以不同的方式,造成目的基因靶序列的 DNA 形成 DSB。在真核生物细胞中,DSB 修复主要以两种方式进行:非同源末端连接 (Non-homologous end joining, NHEJ) 和同源重组 (Homologous recombination, HR)<sup>[9]</sup>。NHEJ 是一种快速、低精确度的 DNA 损伤修复方式,通过该方式进行的 DSB 修复通常伴随核苷酸碱基的增加、缺失或者替代,从而造成目的基因的移码突变。HR 修复方式则利用同源序列作为模板对 DSB 进行精确修复。利用此原理,在目的基因断裂产生 DSB 的同时导入外源的特定 DNA 序列作为修复模板,可以实现目的基因的精确编辑 (图 1)。

与基因敲除相对应, RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 是另外一种在果蝇功能基因组研究过程中被广泛采用的技术。RNAi 利用 Dicer 核糖核酸酶作用产生 dsRNA (Double-stranded RNA) 与目的 mRNA 配对,促使其降解,从而沉默特定基因的表达。RNAi 不涉及 DNA 的改变。将 RNAi 与 Gal4/UAS 系统结合可以实现果蝇全身或特定组织中的目的基因沉默。基于此, RNAi 被广泛应用于果蝇大规模基因组筛选的研究。RNAi 的不足之处表现在: (1) 容易产生脱靶效应; (2) 目的基因被敲低而并非敲除。上述不足决定了 RNAi 作为诠释果蝇基因功能的辅助手段,因此本文不进行详述。

## 1 传统果蝇突变体制作方法:从 EMS 化学诱变到转座子介导的突变

### 1.1 EMS 诱导突变

自 1968 年 Lewis 和 Bacher 首次使用 EMS 诱导

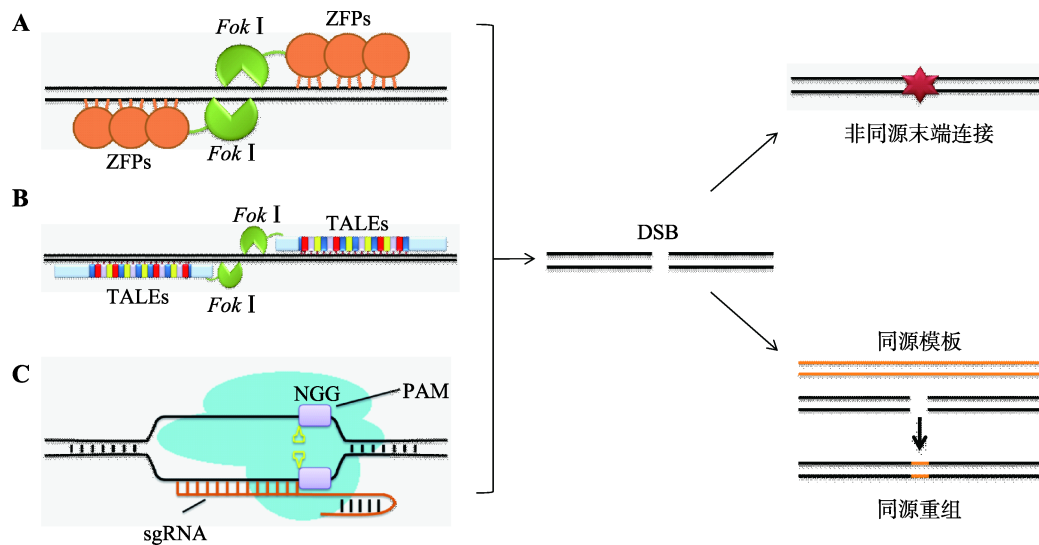


图 1 ZFN、TALEN、CRISPR/Cas9 系统基因组编辑原理

Fig. 1 Schematic principles of ZFN-, TALEN- and CRISPR/Cas9-mediated genome-editing

ZFN、TALEN、CRISPR/Cas9 以不同原理导致靶序列形成 DSB, DSB 通过非同源末端连接(NHEJ)或同源重组(HR)被修复, 实现对靶基因的敲除或精确编辑。A: 3 个串联的 ZFPs(橙色)与 *FokI*(绿色)蛋白结合形成 ZFN, 1 对 ZFNs 结合到 DNA 靶序列并进行剪切形成 DSB; B: TALE 蛋白与 *FokI* (绿色)构成 TALEN, TALEN 形成二聚体剪切靶序列, 形成 DSB; C: sgRNA 识别靶序列并引导 Cas9 蛋白(蓝色)作用形成 DSB。

产生果蝇突变体以来, EMS 一直被用作一种常用的果蝇突变体化学诱变剂。EMS 诱变原理是通过烷基化鸟嘌呤导致 G 与 T 错配, 使 G/C 突变成 A/T, 从而造成基因点突变<sup>[10]</sup>, 导致基因功能的缺失。EMS 诱导果蝇基因突变的效率较低, 但由于其在基因组上的作用位点具有随机性<sup>[11]</sup>, 可以方便地获得同一个基因的不同形式突变体。基于 EMS 诱变产生的突变库进行的遗传学筛选有助于人们发现新的重要信号通路或者某些重要信号通路上新的调节分子或效应分子, 如果蝇 Toll 信号通路。因此, EMS 被广泛应用于果蝇正向遗传学研究。

正向遗传学首先通过人工诱变或者自发突变获得大量基因突变体, 然后根据特定的表型寻找相应基因并对基因的功能进行深入研究。利用 EMS 进行果蝇正向遗传学研究的过程大致如下: 首先将雄蝇饥饿处理 6~16 h, 随后暴露在含有 EMS(0.01~0.03  $\mu\text{m/L}$ ) 的蔗糖溶液 18~24 h。将暴露后的雄果蝇恢复 24 h 后与大量雌蝇进行单杂交, 根据筛选表型的变化(如眼睛大小的改变)鉴定有意义的基因突变体。经过 EMS 诱导的正向遗传学筛选, Yamamoto 等<sup>[12]</sup>鉴定了 Notch 蛋白新的突变体 *Notch<sup>figsaw</sup>*, 揭示了 Notch 在不同的生理条件下选择性结合 Serrate 和 Delta 的

分子机制。Liao 等<sup>[13]</sup>经过 EMS 筛选确定了果蝇 3 号染色体右臂上的 6 个遗传互补群直接影响线粒体的正常功能。

虽然 EMS 诱导产生基因突变相对简单, 但其并未发展成为一种主要的果蝇突变体制作方法。因为其诱变后的突变鉴定过程复杂, 通常必须通过大规模的 DNA 测序才能确定突变发生的具体位置, 因此实验成本高。为了提高 EMS 诱导突变的检出效率, 研究人员开发出 TILLING(Targeting-induced local lesions in genomes)检测技术。TILLING 的基本原理是基于特异性核酸内切酶 *CEL I* 对 DNA 双链错配碱基的识别和作用: 首先提取突变体 DNA, 然后进行特定区段的 PCR 扩增。发生突变的位点形成的碱基错配可以被 *CEL I* 识别并剪切, 凝胶电泳即可得到两条分子量较小的条带。TILLING 在一定程度上解决了 EMS 化学突变检测困难的问题, 特别是通过互补实验已确定突变所在的染色体位置后, 可再用 TILLING 进行精确定位<sup>[14,15]</sup>。除了 TILLING, 高效液相色谱分析法(Denaturing high performance liquid chromatography, DHPLC)也是有效的 EMS 诱导突变的检出方法。该方法将 PCR 扩增的产物加入到高效液相色谱柱, 通过升温使 DNA 双链变性, 存在

错配碱基的双链变性温度较低,因而洗脱的时间不同。该方法突变检测效率可达 95%以上<sup>[16]</sup>。

## 1.2 转座子介导的突变

转座子(Transposon)是一类可以在基因组任意移动的 DNA 元件。利用转座子可以有针对性的对果蝇目的基因进行敲除,在一定程度上克服了 EMS 无法特异性敲除基因的不足<sup>[17]</sup>。转座子介导果蝇基因突变主要通过两种方式:插入和跳跃。其中最常用的转座子是 *P* 因子(*P*-element)及其变体,如 *P*{GT1} 及 *P*{SUPor-P}。野生型 *P* 因子长约 2.9 kb,由两端的反向重复序列(31 bp)和编码转座酶的基因构成。与 EMS 诱变的随机作用不同,*P* 因子通常插入到基因 5'端的转录调控序列附近,从而影响邻近基因的转录。将特定的 DNA 序列(如决定果蝇眼色的 *miniwhite* 基因或隔离序列)整合到 *P* 因子,改造后的 *P* 因子被广泛用于插入突变。迄今为止,利用 *P* 因子插入进行基因敲除计划(*P*-element gene disruption project, PGDP)已在果蝇基因组上得到 16 130 个插入位点 (<http://flypush.imgen.bcm.tmc.edu/pscreen/>)。*P*{GT1} 及 *P*{SUPor-P} 是两类制造插入突变效率较高的 *P* 因子变体<sup>[5]</sup>。*P*{GT1} 包含一个 3'末端缺少多腺苷酸化信号序列的 *miniwhite* 标记基因和一段缺少启动子的 *Gal4* 基因编码序列,在 *Gal4* 编码序列前含有剪切受体序列。当 *P*{GT1} 插入在内源基因启动子之后,3'末端多腺苷酸化信号序列之前时,*P*{GT1} 阻断该基因的正常表达,同时表达 *Gal4* 蛋白和 *miniwhite* 标记基因,果蝇表现为红眼。*P*{SUPor-P} 则通过在 *miniwhite* 两侧构建隔离序列,阻断增强子和启动子的相互作用。当 *P*{SUPor-P} 插入到目的基因的 5'调控区时,即可影响目的基因的转录,导致相应的表型。*P*{PZ} 和 *P*{LacW} 包含有 *LacZ* 基因的编码序列,当它们插入到内源基因启动子附近时,一方面可以阻断被插入基因的转录,一方面可以作为“Enhancer trap”来追踪该基因的表达模式。因为此时 *LacZ* 的表达模式与该插入基因的表达模式相同。

虽然 *P* 因子插入可以作为基因敲除的有效工具,但并非所有基因都能找到合适的 *P* 因子插入品系,因为 *P* 因子在果蝇基因组的插入存在“热点”。为了克服这一缺陷,研究人员向 *PiggyBacs* (*PBac*) 转座子中引入 *P* 因子,构成复合转座子。这样的复合转

座子既具有 *PBac* 在基因组随机插入的特性,又具有 *P* 因子跳跃不精确剪切的特性<sup>[17]</sup>。此外,利用基因组上两个带有 FRT 位点的 *P* 因子插入可以介导果蝇染色体大片缺失<sup>[5]</sup>。

*P* 因子跳跃介导的基因突变是利用了 *P* 因子转位时会发生不精确剪切(Imprecise excision)的特性。*P* 因子在转座酶的作用下,脱离原插入位点,此时容易发生不精确剪切,带走原插入位点两侧的 DNA 序列,如邻近基因的启动子序列或部分 5'端编码序列,造成基因功能的缺失<sup>[5]</sup>。利用此特性,选择目的基因附近适合的 *P* 因子插入品系,与携带 *P* 转座酶的果蝇杂交,通过严格的遗传学筛选,即可获得目的基因的突变体。

## 2 果蝇基因组精确编辑技术

### 2.1 同源重组介导的基因打靶

尽管利用 *P* 因子能够实现部分特定基因的功能缺失,但仍存在许多缺点:(1)*P* 因子通常偏好插入在特定基因的启动子附近,很难实现对该基因其他区域(如重要功能域)的突变;(2)并非所有基因都存在可用的 *P* 因子插入;(3)*P* 因子跳跃引起的 DNA 片段不精确剪切无法准确控制缺失片段的大小,容易导致与之相邻基因的功能缺失;(4)利用 *P* 因子主要是通过 DNA 插入或缺失影响基因的功能,无法实现蛋白编码序列其他形式的改变,如单核苷酸缺失或替换。为了克服上述不足,Rong 等<sup>[7]</sup>建立了利用同源重组进行果蝇基因定向敲除的技术(Homologous recombination mediated gene targeting),又称基因打靶,首次对 *yellow* 基因实现精确敲除。基于同源重组,基因打靶技术首次实现几乎可以对果蝇基因组任意位点进行任何形式的改变,包括基因敲除、核苷酸插入、碱基替换等多种形式的编辑。因此,基因打靶技术的建立是果蝇基因敲除技术质的飞跃。

果蝇基因打靶的基本原理是利用 DNA 损伤修复的同源重组过程,将预先设计好的外源 DNA 序列(与目标基因的内源序列高度同源,一般只包含轻微改变,如插入或缺失单个核苷酸,或 ATG 翻译起始密码子的缺失等)重组进入果蝇基因组,用以替代目标基因的内源序列。待重组的外源 DNA 序列构建于

donor 质粒上之后, 通常通过两种方式, 即 ends-in 或 ends-out, 重组进入基因组(图 2)。利用 ends-in 方式进行果蝇基因打靶主要包括 3 步(图 3): 第一步, 制作包含 donor 质粒的转基因果蝇。体外构建 donor 质粒, 该质粒包含已经设计好的 DNA 片段(含突变位点)、打靶位置两端的同源臂序列,  $w^+$  标记基因、FRT 位点等重要元件。将构建完毕的 donor 质粒转化进入果蝇基因组获得转基因果蝇。第二步, donor

质粒携带的外源 DNA 片段重组至打靶位点(即目的基因)。包含外源 DNA 及同源臂的 donor 片段在 FRT/FLP 系统的作用下环化, 最终以 ends-in 的方式在靶位点重组进入果蝇基因组。此时, 目的基因有两份拷贝, 呈串联排列。第三步, 通过 reduction 去除目的基因的重复拷贝。*I-CreI* 酶切导致在目的基因附近产生 DSB, 再次通过 DNA 重组, 去除目的基因的多余拷贝, 最终获得目的基因精确改变的突变

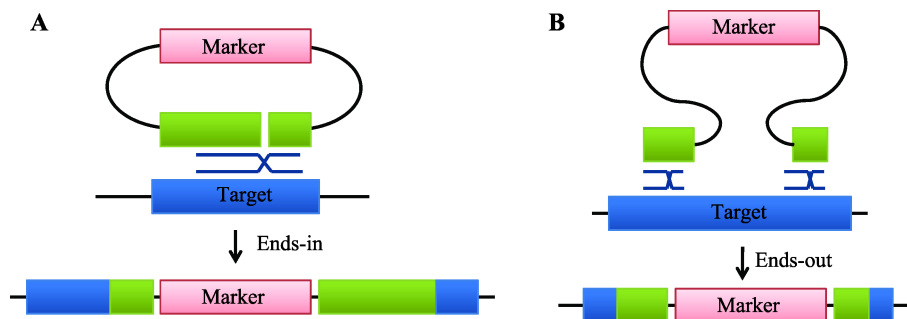


图 2 基因打靶过程中外源 DNA 通过两种方式重组进入基因组

Fig. 2 Two typical forms of gene targeting constructs are shown

A: Ends-in; B: Ends-out.

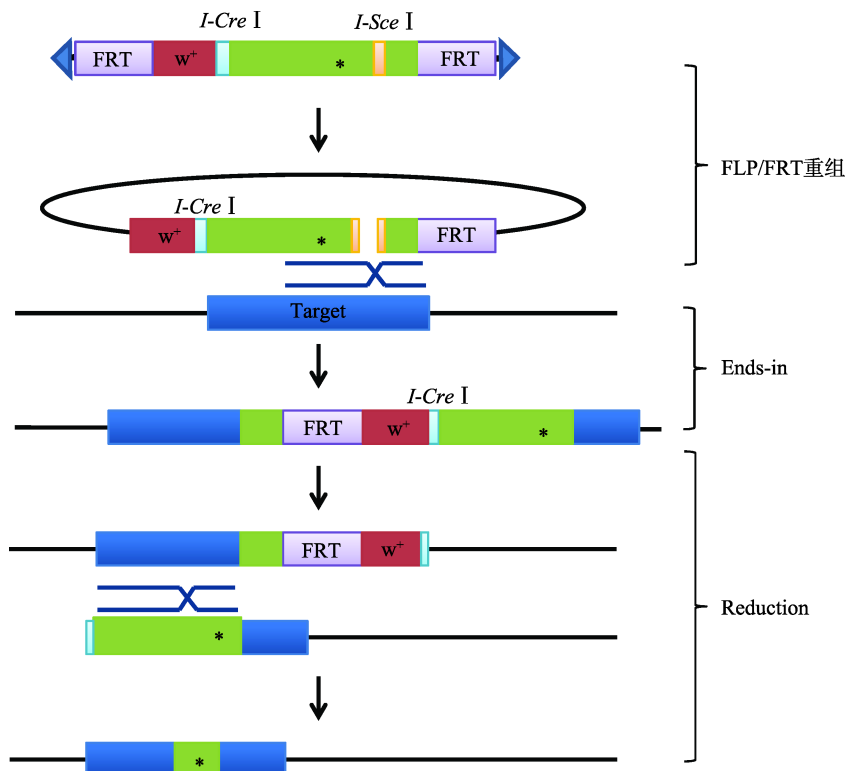


图 3 基于同源重组的基因打靶(Ends-in 方式)流程图

Fig. 3 Ends-in gene targeting flow diagram

FLP (Flippase): 重组酶; FRT (FLP recombinase target): FLP 作用位点;  $w^+$ : *miniwhite* 标记基因; \*代表引入的基因突变或基因编辑。



体。通过 ends-out 方式进行果蝇基因打靶的主要过程与 ends-in 类似,不同之处在于前者直接利用设计的外源 DNA 片段替换基因组上的内源性片段,无需 reduction 步骤。

在酵母和哺乳动物细胞中的实验表明,利用 ends-in 进行基因打靶的效率总体高于 ends-out<sup>[7]</sup>。但整体而言,基因打靶的成功率偏低。无论是 ends-in 还是 ends-out,成功率大约是 1/500~1/30 000 之间<sup>[8]</sup>。此外,如上所述的常规基因打靶技术工作量较大,很难实现对同一个基因制造多个不同形式的突变体(即不同的 allele)。Gao 等<sup>[18]</sup>建立的 SIRT(Site-specific integrase mediated repeated targeting)技术将 ΦC31 定点整合系统与上述基于同源重组的基因打靶技术相结合,只需经过一次 ends-in 打靶,即可方便地获得同一个基因的多种突变体形式(Allelic series)。

SIRT 主要通过两个步骤进行:首先,通过常规的 ends-in 方法将 *attP* 位点导入目的基因附近;其次,构建一个新的 donor 质粒(其中包括 ΦC31 的 *attB* 位点),ΦC31 系统介导该 donor 质粒以较高的效率重组进入果蝇基因组,经过前述类似步骤,最终获得突变体。利用 ΦC31 系统,SIRT 克服了常规基因打靶技术打靶效率低的缺点。SIRT 可以实现对较大的蛋白不同功能域以及基因簇中冗余片段分别进行敲除并进行功能分析。Gao 等<sup>[18]</sup>利用该方法制造了 6 个 *nbs* 突变体,其中包括单个氨基酸替换形成的突变体和全功能缺失突变体。

## 2.2 锌指蛋白核酸酶(ZFN)介导的基因组编辑

ZFNs 由具有特异性 DNA 识别功能的锌指蛋白(DNA 结合域)和核酸内切酶 *Fok* (DNA 切割域)两部分组成<sup>[19]</sup>。相较于同源重组介导的基因打靶,ZFN 制造果蝇突变体的效率高,过程相对简单。由于 *Fok* 核酸内切酶只有在形成二聚体后才能剪切 DNA 产生 DSB,因此利用 ZFN 工作时需要设计一对方向相向且相互靠近的 ZFN(本文称之为左、右 ZFN)结合位点(图 1A)。

利用 ZFN 进行果蝇基因敲除的技术最初由 Bibikova 等<sup>[20]</sup>建立,用于敲除果蝇的 *yellow* 基因。Bibikova 及其同事<sup>[20,21]</sup>构建了分别编码左、右 ZFN(Hsp70 启动子诱导表达)的质粒,并制造相应的转基因果蝇。经过热激诱导,在同时表达左、右 ZFN 的雄性后代中,约 50%表现为体细胞 *yellow* 基因突

变嵌合体,5.7%能产生可遗传的 *yellow* 基因突变体(最终所产生的 *yellow* 突变体比例为 0.44%)。DNA 测序表明突变体在特定位点上存在着碱基的缺失或插入,说明利用 ZFN 能有效诱导 NHEJ 介导的果蝇突变体产生。

如上所述,早期在果蝇中使用 ZFN 技术是通过构建转基因果蝇,热激诱导 ZFN 表达。这种方式一定程度上减轻了 ZFN 过表达引起的毒性,但实验过程复杂<sup>[20~23]</sup>。为了提高工作效率,Beumer 等<sup>[23]</sup>向果蝇胚胎直接注射编码 ZFN 的成熟 mRNA,成功获得 *coil* 和 *pask* 的突变体。这种方法不仅简化了实验操作过程,提高了常规 ZFN 打靶的效率,而且使利用 ZFN 进行果蝇基因组大片段敲除或者同时进行多基因敲除成为可能。此外,在 *Lig4* 基因(编码 NHEJ 修复过程所需的重要蛋白)突变的果蝇中,通过胚胎注射的方式,同时注射编码 ZFN 的 mRNA 和 donor 质粒,能够促使细胞通过同源重组的方式(NHEJ 修复机制被抑制)修复 DSB,实现对目的基因进行多种形式的编辑,如 Beumer 等<sup>[24]</sup>利用 *XbaI* 位点替换 *rosy* 基因中的 ZFN 识别序列。科研人员通过运用胚胎注射 ZFN mRNA 的方法在斑马鱼<sup>[25~27]</sup>、小鼠<sup>[28,29]</sup>、大鼠<sup>[30]</sup>、蛙类<sup>[31]</sup>中都成功获得不同基因突变体。

相对于基于同源重组的基因打靶,ZFN 实用性更高,但同时也具有一定的缺陷,如构建过程复杂、容易产生脱靶效应。针对后者一般可以通过在一个 ZFN 上串联多个锌指蛋白(Zinc-finger proteins, ZFPs)来提高 ZFN 结合的特异性,降低脱靶的概率<sup>[23]</sup>,或者设计一对特定的 *Fok* I 使其形成异源二聚体。有研究指出 *Fok* 异源二聚体与同源二聚体相比,前者与 DNA 之间作用的特异性更高<sup>[32]</sup>。关于 ZFN 的构建方法,主要有模块组装法(Modular assembly)<sup>[33]</sup>和寡聚体库工程化筛选构建法(Oligomerized pool engineering, OPEN)<sup>[34]</sup>。目前,设计新的 ZFN 相当昂贵耗时<sup>[35]</sup>。

## 2.3 TALE 蛋白核酸酶(TALEN)介导的基因组编辑

TALE 蛋白(Transcription activator-like effector)首先在植物病原体—黄单胞杆菌(*Xanthomonas* spp.)中被发现,在病菌侵染时激活植物细胞内特定基因的转录<sup>[36,37]</sup>。TALE 蛋白通常由 3 个结构域组成: N 端的核定位信号结构域、具有转录激活功能的 C 端

结构域以及可识别特定 DNA 序列的串联重复结构域<sup>[36]</sup>。串联重复结构域包含数目不等的(5 至 30 多个, 平均有 17.5 个)重复元件。每个重复元件由 34 个氨基酸残基构成, 其中第 12 和 13 位氨基酸残基, 即重复可变残基(Repeat-variable diresidues, RVDs)对应一个特定的核苷酸(NI-A、NG-T、NN/NK-G、HD-C)<sup>[36-38]</sup>。与 ZFN 类似, 将 TALE 蛋白的 C 端与 *Fok* 结构域结合形成 TALEN, 利用一对 TALENs 结合作用于目的 DNA 序列可以产生 DSB(图 1B), 获得基因突变体。

TALEN 相对于 ZFN 对 DNA 识别的特异性更高, 细胞毒性更低。2012 年, Liu 等<sup>[39]</sup>首次建立了利用 TALEN 进行果蝇基因敲除的方法。通过将编码 TALEN 的成熟 mRNA 直接注射到果蝇( $F_0$ )胚胎中, 成功敲除 *yellow* 基因(X 染色体)和 *CG9797*(3 号染色体)。以 *yellow* 基因敲除为例, 在所有可育的雌性  $F_0$  中, 有 45.1% 的雌性  $F_0$  能够产生 *yellow* 基因突变的后代。在所有雌性  $F_0$  所产生的  $F_1$  子代中, *yellow* 基因突变体为 41.3%。由此可见, 针对相同的基因(*yellow* 基因), TALEN 的突变成功率远高于 ZFN<sup>[39]</sup>。此外, Beumer 等<sup>[40]</sup>在果蝇中利用 TALEN 对两个基因 *rosy* 和 *yellow* 同时进行敲除, 结果也表明用 TALEN 进行基因敲除的成功率明显高于 ZFN。

虽然 TALEN 相较于 ZFN 具有更高的基因敲除效率, 但构建 TALEN 重复结构域的过程仍然较为复杂。为此研究人员开发出多种快速构建的方法, 如“Golden Gate Cloning”<sup>[41]</sup>、“Unit Assembly”<sup>[39,42-44]</sup>和 FLASH (Fast ligation-based automatable solid-phase high-throughput)等。最近 Katsuyama 等<sup>[45]</sup>建立的 easyT 方法可以将 TALEN 的构建过程缩短至 1 d 以内。通过该方法构建的 TALEN 可直接以质粒的形式注射到果蝇胚胎中, 省去注射 mRNA 需要先进行体外转录的过程, 在操作上更为简便。

与 ZFN 类似, TALEN 在果蝇中的应用也并不局限于突变体制作, 还可应用于多种形式的基因编辑。如 Yu 等<sup>[46]</sup>成功利用 TALEN 在果蝇 *chameau* 基因的第二个外显子上插入 *Sma* 酶切位点, 同时造成 *chameau* 基因编码序列移码, 破坏其表达。此外, 将 TALE 蛋白与转录调控因子(如转录激活域 VP64)结合, 可以调控目的基因的表达。如 Cocker

等<sup>[47]</sup>利用 TALERs(TALE-repressors)来调控果蝇发育过程中控制体节形成的 *eve* 基因增强子, 从而影响该基因的转录。

## 2.4 CRISPR/Cas9 介导的基因组编辑

虽然 ZFN 和 TALEN 的建立极大地促进了果蝇基因编辑技术的发展, 但二者作用的本质都是依赖于蛋白质对目的 DNA 序列的识别。因此, 针对一个目的位点, 就需要设计一对相应的 ZFN 或 TALEN, 这样不利于果蝇一步进行多基因的敲除或大规模的基因敲除(如建立果蝇突变体库)。CRISPR/Cas 系统首先在大肠杆菌(*Escherichia coli*)的基因组中被发现, 包含 Cas 基因家族和 CRISPR(Clustered regularly interspaced short palindromic repeat)序列元件。CRISPR 元件转录成熟形成 crRNA(CRISPR RNA), crRNA 与 tracrRNAs(Trans-activating crRNAs)结合形成双链, 引导 Cas 核酸酶作用在外源 DNA 上产生 DSB, 清除入侵者从而保护细菌细胞的内环境<sup>[48-50]</sup>。研究发现, 与 crRNA 结合的外源 DNA 序列后面是否具有 PAM (Protospacer adjacent motif)结构是其能否引导 Cas9 蛋白结合并切割外源 DNA 的关键因素。Jinek 等<sup>[51]</sup>将 crRNA 与 tracrRNA 融合构建出 sgRNA(Single guide RNA)并直接与 Cas9 结合在体外实现了对特定 DNA 序列的切割(图 1C)。

与 ZFN 和 TALEN 相比, 利用 CRISPR/Cas9 系统进行果蝇基因敲除具有明显的优势: (1)在基因组上可以找到更多的 CRISPR/Cas9 潜在靶位点(3'端带有 PAM(NGG)的序列); (2)针对目标基因, CRISPR/Cas9 系统只需合成对应于靶位点的长约 20 bp 左右的 sgRNA, 即可实现对该基因的敲除, 这极大地提高了工作效率; (3)利用 CRISPR/Cas9 系统进行果蝇基因敲除成功率高。Yu 等<sup>[52]</sup>研究显示, 利用该系统敲除果蝇 *yellow* 基因, 超过 65% 的可育雄性  $F_0$  可产生 *yellow* 基因突变体后代。此外, CRISPR/Cas9 对于异染色质化的基因同样能够发挥作用, 如位于 Y 染色体的基因 *kl-3*(*CG17629*), 其基因敲除效率达 100%。

利用 CRISPR/Cas9 进行果蝇基因敲除, 最直接的方法是将特定的 sgRNA 和编码 Cas9 的成熟 mRNA 直接注射进入胚胎( $F_0$ ) 在  $F_1$  代筛选突变体,

如 Yu 等<sup>[52]</sup>的方法。为了简化操作, Gratz 等<sup>[53]</sup>制作了 *Vasa* 启动子驱动的在果蝇生殖腺特异表达 Cas9 的转基因品系。向该品系的胚胎直接注射识别 *ry* 靶序列的 sgRNA 编码质粒, 可以在 15% 的子代中得到 *ry* 突变体。这种方法同时避免了 Cas9 及 sgRNA 体外转录的步骤, 提高了实验效率。此外, 分别制造 Cas9 和 sgRNA 的转基因果蝇, 通过果蝇杂交的方法也能获得满意的突变效率。以定向敲除果蝇 *white(w)* 基因为例, 利用生殖细胞中特异表达的 nos-Cas9 转基因品系与 U6-sgRNA 转基因品系杂交, 可在后代中得到高达 85% 的突变率<sup>[54]</sup>。

利用 CRISPR/Cas9 除了进行基因定向敲除, 还可以方便地进行其他应用, 如基因的条件性敲除、基因大片段敲除、CRISPRi 等。基因条件性敲除将 CRISPR/Cas9 系统与果蝇 Gal4/UAS 系统相结合, 利用组织特异性表达的 Gal4 蛋白驱动 Cas9 转录, 从而在果蝇特定组织中(非全身)实现目的基因的敲除<sup>[55]</sup>。基因大片段敲除通过设计两个 sgRNA(相同染色体上但相隔一定距离)同时作用, 在染色体上实现大片段(~3 kb)敲除<sup>[46,56]</sup>。果蝇基因组大片段敲除为非编码 RNA(Non-coding RNA)功能研究开辟了新的途径。CRISPRi 技术利用功能失活的 Cas9 核酸酶(dCas9)只结合到 PAM 上但不进行 DNA 剪切的特点, 抑制目的基因的转录。Gilbert 等<sup>[57]</sup>将 dCas9 与转录抑制功能域 KRAB 结合并发现 CRISPRi 介导的转录抑制效应与 RNAi 相比具有更高的效率和特异性。

## 2.5 ZFN、TALEN、CRISPR/Cas9 基因组编辑技术的脱靶效应

ZFN、TALEN、CRISPR/Cas9 均能相对高效地实现果蝇基因敲除或基因组编辑, 但三者都可能存在脱靶效应。ZFN、TALEN 以异二聚体形式发挥作用, 一定程度上可以减轻脱靶效应。但是, ZFN 相对于 TALEN, 由于前者的 DNA 识别序列较短(通常每对 ZFN 识别 18 个核苷酸, 而每对 TALEN 通常识别 34 个左右核苷酸), 而且每个锌指蛋白的 DNA 结合能力不同, 存在 DNA 和锌指蛋白间的错配情况, 这些都可能导致 ZFN 相对较高的脱靶效应。此外, 对 ZFN 识别位点的间隔序列(Spacer sequence)研究表明, ZFN 作用的特异性还与间隔序列的长度有关, 间隔序列为 4 bp 或 7 bp 的 ZFN 对目标 DNA 的识别

特异性高于 5~6 bp<sup>[58]</sup>。

CRISPR/Cas9 系统依靠 sgRNA 识别靠近 PAM 的约 20 bp 左右的核苷酸序列。已知紧邻 PAM 结构的 3 个核苷酸的准确匹配对于 CRISPR/Cas9 系统正常发挥功能至关重要。Ren 等<sup>[59]</sup>选择 6 个已知打靶效率较高(大于 80%)的 sgRNA, 使靠近 PAM 结构 5' 一侧的 3 个碱基与靶序列出现错配, 结果均无法产生可遗传突变体。整体而言, 由于 CRISPR/Cas9 靶序列识别长度短(相对于 TALEN), 且部分位置的碱基允许错配, 容易导致脱靶效应。为了有效降低脱靶概率, Mali 等<sup>[60]</sup>利用 Cas9 突变体——Cas9 nickase 实现了只对目标 DNA 序列的单链进行剪切。因此, 与 TALEN 类似, 在 1 对 CRISPR-Cas9 复合体作用下产生 DSB。该方法通过增加 CRISPR-Cas9 nickase 系统的靶序列长度从而降低脱靶概率。

## 3 结语与展望

果蝇作为经典的模式生物, 应用于生命科学研究已有 100 多年的历史。经过一个多世纪的发展, 果蝇遗传学工具得到了极大丰富, 果蝇基因组测序也已完成。但果蝇的秘密, 特别是基因组/蛋白质组的秘密, 人们远未探究清楚。

在过去 80 年, 准确地说在 ZFN 出现之前, 要解开果蝇基因组之谜异常困难, 因为获得单个基因的突变体尚需要投入大量精力, 更不用说结构复杂的基因家族、基因簇、非编码 RNA 的研究。直到 ZFN、TALEN、CRISPR/Cas9 技术的诞生, 使之成为可能。利用这些技术, 人们能够实现对果蝇基因组进行多种精确的编辑, 包括: (1)在果蝇未知功能的基因后插入标记基因从而研究该基因的表达模式和功能, 而无需担忧抗体制备的困难; (2)对于成簇排列的基因家族、冗余功能的基因、非编码 RNA 基因等, 可以通过大片段敲除进行研究; (3)对于结构和功能复杂的蛋白, 可以结合 HR 制备蛋白特定功能域缺陷的突变体, 实现对基因不同功能域的解析; (4)研究果蝇重要信号通路, 如 Notch、Hippo 通路中多因子相互作用, 可以方便地同时制备多基因突变体果蝇, 避免之前复杂的杂交、重组过程; (5)利用 CRISPR/Cas9 进行大规模的基因敲除, 建立果蝇突变体库。



果蝇的遗传学优势体现在便于大规模遗传学筛选,但其前提是存在可用于筛选的基因突变体库(或者 RNAi 品系库)。之前,由于大规模制造果蝇突变体困难,国际上仅存果蝇 RNAi 品系库,如 VDRC 和 NIG。VDRC 自 2007 年建立以来,目前包含约 13 000 个蛋白编码基因共约 27 000 个 RNAi 果蝇品系。VDRC 的建立促进了果蝇功能基因组学的研究,但是 RNAi 技术的先天不足(脱靶效应以及基因的敲低而非完全敲除)一定程度上限制了其更加深入的研究应用。CRISPR/Cas9 技术制作果蝇突变体效率高。通过一次显微注射针对多个基因的 sgRNA,可以实现一次敲除多个目的基因。2014 年 10 月,中国科学家宣布利用 CRISPR/Cas9 基因敲除技术完成斑马鱼 1 号染色体上共 1333 个基因的敲除。果蝇相对于斑马鱼基因操作更简单,我们有理由相信,利用 CRISPR/Cas9 进行果蝇大规模的基因敲除,最终建立果蝇全基因组突变体库是值得期待的。

## 参考文献(References):

- [1] Esvelt KM, Wang HH. Genome-scale engineering for systems and synthetic biology. *Mol Syst Biol*, 2013, 9: 641. [DOI]
- [2] Lu XJ, Xue HY, Ke ZP, Chen JL, Ji LJ. CRISPR-Cas9: a new and promising player in gene therapy. *J Med Genet*, 2015, 52(5): 289–296. [DOI]
- [3] Brommage R. Genetic approaches to identifying novel osteoporosis drug targets. *J Cell Biochem*, 2015, 116(10): 2139–2145. [DOI]
- [4] Rubin GM, Lewis EB. A brief history of *Drosophila*'s contributions to genome research. *Science*, 2000, 287(5461): 2216–2218. [DOI]
- [5] Adams MD, Sekelsky JJ. From sequence to phenotype: reverse genetics in *Drosophila melanogaster*. *Nat Rev Genet*, 2002, 3(3): 189–198. [DOI]
- [6] Cooley L, Kelley R, Spradling A. Insertional mutagenesis of the *Drosophila* genome with single *P* elements. *Science*, 1988, 239(4844): 1121–1128. [DOI]
- [7] Rong YS, Golic KG. Gene targeting by homologous recombination in *Drosophila*. *Science*, 2000, 288(5473): 2013–2018. [DOI]
- [8] Rong YS, Titen SW, Xie HB, Golic MM, Bastiani M, Bandyopadhyay P, Olivera BM, Brodsky M, Rubin GM, Golic KG. Targeted mutagenesis by homologous recombination in *D. melanogaster*. *Genes Dev*, 2002, 16(12): 1568–1581. [DOI]
- [9] Jackson SP. Sensing and repairing DNA double-strand breaks. *Carcinogenesis*, 2002, 23(5): 687–696. [DOI]
- [10] St Johnston, D. The art and design of genetic screens: *Drosophila melanogaster*. *Nat Rev Genet*, 2002, 3(3): 176–188. [DOI]
- [11] Lin SC, Chang YY, Chan CC. Strategies for gene disruption in *Drosophila*. *Cell Biosci*, 2014, 4(1): 63. [DOI]
- [12] Yamamoto S, Charng WL, Rana NA, Kakuda S, Jaiswal M, Bayat V, Xiong B, Zhang K, Sandoval H, David G, Wang H, Haltiwanger RS, Bellen HJ. A mutation in EGF repeat-8 of Notch discriminates between Serrate/Jagged and Delta family ligands. *Science*, 2012, 338(6111): 1229–1232. [DOI]
- [13] Liao TS, Call GB, Guptan P, Cespedes A, Marshall J, Yackle K, Owusu-Ansah E, Mandal S, Fang QA, Goodstein GL, Kim W, Banerjee U. An efficient genetic screen in *Drosophila* to identify nuclear-encoded genes with mitochondrial function. *Genetics*, 2006, 174(1): 525–533. [DOI]
- [14] Berger J, Suzuki T, Senti KA, Stubbs J, Schaffner G, Dickson BJ. Genetic mapping with SNP markers in *Drosophila*. *Nat Genet*, 2001, 29(4): 475–481. [DOI]
- [15] Martin SG, Dobi KC, St Johnston D. A rapid method to map mutations in *Drosophila*. *Genome Biol*, 2001, 2(9): RESEARCH0036. [DOI]
- [16] Bentley A, MacLennan B, Calvo J, Dearolf CR. Targeted recovery of mutations in *Drosophila*. *Genetics*, 2000, 156(3): 1169–1173. [DOI]
- [17] Venken KJ, Bellen HJ. Emerging technologies for gene manipulation in *Drosophila melanogaster*. *Nat Rev Genet*, 2005, 6(3): 167–178. [DOI]
- [18] Gao G, McMahon C, Chen J, Rong YS. A powerful method combining homologous recombination and site-specific recombination for targeted mutagenesis in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(37): 13999–14004. [DOI]
- [19] Kim YG, Cha J, Chandrasegaran S. Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to *FokI* cleavage domain. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(3): 1156–1160. [DOI]
- [20] Bibikova M, Golic M, Golic KG, Carroll D. Targeted chromosomal cleavage and mutagenesis in *Drosophila* using zinc-finger nucleases. *Genetics*, 2002, 161(3): 1169–1175. [DOI]
- [21] Beumer K, Bhattacharyya G, Bibikova M, Trautman JK, Carroll D. Efficient gene targeting in *Drosophila* with zinc-finger nucleases. *Genetics*, 2006, 172(4): 2391–2403. [DOI]
- [22] Bibikova M, Beumer K, Trautman JK, Carroll D. Enhancing gene targeting with designed zinc finger nucleases. *Science*, 2003, 300(5620): 764. [DOI]
- [23] Carroll D. Genome engineering with zinc-finger nucleases.

- Genetics*, 2011, 188(4): 773–782. [DOI]
- [24] Beumer KJ, Trautman JK, Bozas A, Liu JL, Rutter J, Gall JG, Carroll D. Efficient gene targeting in *Drosophila* by direct embryo injection with zinc-finger nucleases. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(50): 19821–19826. [DOI]
- [25] Doyon Y, McCammon JM, Miller JC, Faraji F, Ngo C, Katibah GE, Amora R, Hocking TD, Zhang L, Rebar EJ, Gregory PD, Urnov FD, Amacher SL. Heritable targeted gene disruption in zebrafish using designed zinc-finger nucleases. *Nat Biotechnol*, 2008, 26(6): 702–708. [DOI]
- [26] Meng X, Noyes MB, Zhu LJ, Lawson ND, Wolfe SA. Targeted gene inactivation in zebrafish using engineered zinc-finger nucleases. *Nat Biotechnol*, 2008, 26(6): 695–701. [DOI]
- [27] Foley JE, Yeh JR, Maeder ML, Reyon D, Sander JD, Peterson RT, Joung JK. Rapid mutation of endogenous zebrafish genes using zinc finger nucleases made by Oligomerized Pool ENgineering (OPEN). *PLoS One*, 2009, 4(2): e4348. [DOI]
- [28] Carbery ID, Ji D, Harrington A, Brown V, Weinstein EJ, Liaw L, Cui X. Targeted genome modification in mice using zinc-finger nucleases. *Genetics*, 2010, 186(2): 451–459. [DOI]
- [29] Meyer M, de Angelis MH, Wurst W, Kuhn R. Gene targeting by homologous recombination in mouse zygotes mediated by zinc-finger nucleases. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(34): 15022–15026. [DOI]
- [30] Geurts AM, Moreno C. Zinc-finger nucleases: new strategies to target the rat genome. *Clin Sci (Lond)*, 2010, 119(8): 303–311. [DOI]
- [31] Young JJ, Cherone JM, Doyon Y, Ankoudinova I, Faraji FM, Lee AH, Ngo C, Guschin DY, Paschon DE, Miller JC, Zhang L, Rebar EJ, Gregory PD, Urnov FD, Harland RM, Zeitler B. Efficient targeted gene disruption in the soma and germ line of the frog *Xenopus tropicalis* using engineered zinc-finger nucleases. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(17): 7052–7057. [DOI]
- [32] Doyon Y, Vo TD, Mendel MC, Greenberg SG, Wang J, Xia DF, Miller JC, Urnov FD, Gregory PD, Holmes MC. Enhancing zinc-finger-nuclease activity with improved obligate heterodimeric architectures. *Nat Methods*, 2011, 8(1): 74–79. [DOI]
- [33] Ramirez CL, Foley JE, Wright DA, Muller-Lerch F, Rahman SH, Cornu TI, Winfrey RJ, Sander JD, Fu F, Townsend JA, Cathomen T, Voytas DF, Joung JK. Unexpected failure rates for modular assembly of engineered zinc fingers. *Nat Methods*, 2008, 5(5): 374–375. [DOI]
- [34] Maeder ML, Thibodeau-Beganny S, Osiak A, Wright DA, Anthony RM, Eichinger M, Jiang T, Foley JE, Winfrey RJ, Townsend JA, Unger-Wallace E, Sander JD, Muller-Lerch F, Fu F, Pearlberg J, Gobel C, Dassie JP, Pruett-Miller SM, Porteus MH, Sgroi DC, Iafrate AJ, Dobbs D, McCray PB, Jr. Cathomen T, Voytas DF, Joung JK. Rapid "open-source" engineering of customized zinc-finger nucleases for highly efficient gene modification. *Mol Cell*, 2008, 31(2): 294–301. [DOI]
- [35] Gupta RM, Musunuru K. Expanding the genetic editing tool kit: ZFNs, TALENs, and CRISPR-Cas9. *J Clin Invest*, 2014, 124(10): 4154–4161. [DOI]
- [36] Boch J, Scholze H, Schornack S, Landgraf A, Hahn S, Kay S, Lahaye T, Nickstadt A, Bonas U. Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science*, 2009, 326(5959): 1509–1512. [DOI]
- [37] Christian ML, Demorest ZL, Starker CG, Osborn MJ, Nyquist MD, Zhang Y, Carlson DF, Bradley P, Bogdanove AJ, Voytas DF. Targeting G with TAL effectors: a comparison of activities of TALENs constructed with NN and NK repeat variable di-residues. *PLoS One*, 2012, 7(9): e45383. [DOI]
- [38] Wirt SE, Porteus MH. Development of nuclease-mediated site-specific genome modification. *Curr Opin Immunol*, 2012, 24(5): 609–616. [DOI]
- [39] Liu J, Li C, Yu Z, Huang P, Wu H, Wei C, Zhu N, Shen Y, Chen Y, Zhang B, Deng WM, Jiao R. Efficient and specific modifications of the *Drosophila* genome by means of an easy TALEN strategy. *J Genet Genomics*, 2012, 39(5): 209–215. [DOI]
- [40] Beumer KJ, Trautman JK, Christian M, Dahlem TJ, Lake CM, Hawley RS, Grunwald DJ, Voytas DF, Carroll D. Comparing zinc finger nucleases and transcription activator-like effector nucleases for gene targeting in *Drosophila*. *G3 (Bethesda)*, 2013, 3(10): 1717–1725. [DOI]
- [41] Weber E, Gruetzner R, Werner S, Engler C, Marillonnet S. Assembly of designer TAL effectors by Golden Gate cloning. *PLoS One*, 2011, 6(5): e19722. [DOI]
- [42] Huang P, Xiao A, Tong X, Zu Y, Wang Z, Zhang B. TALEN construction via "Unit Assembly" method and targeted genome modifications in zebrafish. *Methods*, 2014, 69(1): 67–75. [DOI]
- [43] Shen Y, Xiao A, Huang P, Wang W, Zhu Z, Zhang B. TALE nuclease engineering and targeted genome modification. *Hereditas(Beijing)*, 2013, 35(4): 395–409. 沈延, 肖安, 黄鹏, 王唯晔, 朱作言, 张博. 类转录激活因子效应物核酸酶(TALEN)介导的基因组定点修饰技术. 遗传, 2013, 35(4): 395–409. [DOI]
- [44] Shen Y, Huang P, Zhang B. A protocol for TALEN construction and gene targeting in zebrafish. *Hereditas(Beijing)*, 2013, 35(4): 533–544. 沈延, 黄鹏, 张博. TALEN 构建与斑马鱼基因组定点突变的实验方法与流程. 遗传, 2013, 35(4): 533–544. [DOI]
- [45] Katsuyama T, Akamammedov A, Seimiya M, Hess SC, Sievers C, Paro R. An efficient strategy for TALEN-mediated genome engineering in *Drosophila*. *Nucleic Acids*

- Res, 2013, 41(17): e163. [DOI]
- [46] Yu Z, Chen H, Liu J, Zhang H, Yan Y, Zhu N, Guo Y, Yang B, Chang Y, Dai F, Liang X, Chen Y, Shen Y, Deng WM, Chen J, Zhang B, Li C, Jiao R. Various applications of TALEN- and CRISPR/Cas9-mediated homologous recombination to modify the *Drosophila* genome. *Biol Open*, 2014, 3(4): 271–280. [DOI]
- [47] Crocker J, Stern DL. TALE-mediated modulation of transcriptional enhancers *in vivo*. *Nat Methods*, 2013, 10(8): 762–767. [DOI]
- [48] Westra ER, Brouns SJ. The rise and fall of CRISPRs—dynamics of spacer acquisition and loss. *Mol Microbiol*, 2012, 85(6): 1021–1025. [DOI]
- [49] Gaj T, Gersbach CA, Barbas CF 3<sup>rd</sup>. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends Biotechnol*, 2013, 31(7): 397–405. [DOI]
- [50] Zhou J, Xu Q, Yao J, Yu S, Cao S. CRISPR/Cas9 genome editing technique and its application in site-directed genome modification of animals. *Hereditas(Beijing)*, 2015, 37 (10): 1011–1020.  
周金伟, 徐绮嫔, 姚婧, 余树民, 曹随忠. CRISPR/Cas9 基因组编辑技术及其在动物基因组定点修饰中的应用. *遗传*, 2015, 37 (10): 1011–1020. [DOI]
- [51] Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 2012, 337(6096): 816–821. [DOI]
- [52] Yu Z, Ren M, Wang Z, Zhang B, Rong YS, Jiao R, Gao G. Highly efficient genome modifications mediated by CRISPR/Cas9 in *Drosophila*. *Genetics*, 2013, 195(1): 289–291. [DOI]
- [53] Gratz SJ, Ukken FP, Rubinstein CD, Thiede G, Donohue LK, Cummings AM, O'Connor-Giles KM. Highly specific and efficient CRISPR/Cas9-catalyzed homology-directed repair in *Drosophila*. *Genetics*, 2014, 196(4): 961–971. [DOI]
- [54] Kondo S, Ueda R. Highly improved gene targeting by germline-specific Cas9 expression in *Drosophila*. *Genetics*, 2013, 195(3): 715–721. [DOI]
- [55] Xue Z, Wu M, Wen K, Ren M, Long L, Zhang X, Gao G. CRISPR/Cas9 mediates efficient conditional mutagenesis in *Drosophila*. *G3 (Bethesda)*, 2014, 4(11): 2167–2173. [DOI]
- [56] Xu J, Ren X, Sun J, Wang X, Qiao HH, Xu BW, Liu LP, Ni JQ. A Toolkit of CRISPR-based genome editing systems in *Drosophila*. *J Genet Genomics*, 2015, 42(4): 141–149. [DOI]
- [57] Doudna JA, Charpentier E. Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, 2014, 346(6213): 1258096. [DOI]
- [58] Pattanayak V, Guilinger JP, Liu DR. determining the specificities of TALENs, Cas9, and other genome-editing enzymes. *Methods Enzymol*, 2014, 546: 47–78. [DOI]
- [59] Ren X, Yang Z, Xu J, Sun J, Mao D, Hu Y, Yang SJ, Qiao HH, Wang X, Hu Q, Deng P, Liu LP, Ji JY, Li JB, Ni JQ. Enhanced specificity and efficiency of the CRISPR/Cas9 system with optimized sgRNA parameters in *Drosophila*. *Cell Rep*, 2014, 9(3): 1151–1162. [DOI]
- [60] Mali P, Aach J, Stranges PB, Esvelt KM, Moosburner M, Kosuri S, Yang L, Church GM. CAS9 transcriptional activators for target specificity screening and paired nickases for cooperative genome engineering. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(9): 833–838. [DOI]

(责任编辑: 张博)