

CRISPR/Cas9 系统在昆虫中的应用

童晓玲^{1,2}, 方春燕^{1,2}, 盖婷婷^{1,2}, 石津^{1,2}, 鲁成^{1,2}, 代方银^{1,2}

1. 西南大学, 家蚕基因组生物学国家重点实验室, 重庆 400715

2. 西南大学生物技术学院, 农业部蚕桑生物学与遗传育种重点实验室, 重庆 400715

摘要: CRISPR/Cas9(clustered regularly interspaced short palindromic repeat/CRISPR-associated nuclease 9)技术是一种 RNA 引导的基因组靶向编辑技术, 能对基因组序列进行精确编辑, 在探究基因功能、修复受损基因、沉默有害基因、改良品质性状等方面具有广阔的应用前景。近年来, 随着对 CRISPR/Cas9 系统研究的不断深入和改造, 该系统以其操作简易、省时、高效等优点在生物学研究的众多领域中得以推广和应用, 特别是在果蝇(*Bombyx mori*)、家蚕(silkworm)、埃及伊蚊(*Aedes aegypti*)和蝴蝶(butterfly)等多种昆虫中。本文概述了 CRISPR/Cas9 的结构、作用原理及发展优化, 总结了 CRISPR/Cas9 导入昆虫的策略和在昆虫中的应用, 以及对 CRISPR/Cas9 系统产生脱靶问题的应对策略, 以期对经济昆虫和有益昆虫的分子育种、害虫的生物技术防控等研究提供参考。

关键词: CRISPR/Cas9; 基因组编辑; 昆虫; 应用

Applications of the CRISPR/Cas9 system in insects

Xiaoling Tong^{1,2}, Chunyan Fang^{1,2}, Tingting Gai^{1,2}, Jin Shi^{1,2}, Cheng Lu^{1,2}, Fangyin Dai^{1,2}

1. State Key Laboratory of Silkworm Genome Biology, Southwest University, Chongqing 400715, China

2. Key Laboratory of Sericultural Biology and Genetic Breeding, Ministry of Agriculture, College of Biotechnology, Southwest University, Chongqing 400715, China

Abstract: The CRISPR/Cas9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeat/CRISPR-associated) system guides Cas9 to specific genomic locations by a short RNA search string. This technology enables the systematic interrogation of mammalian genome editing, repairing damaged genes, silencing harmful genes and improving quality traits. In recent years, with the introduction of the CRISPR/Cas9 system for easy, fast and efficient genetic modification, it has been possible to conduct meaningful functional studies in a broad array of insect species, such as *Drosophila*, *Bombyx mori*,

收稿日期: 2017-10-16; 修回日期: 2018-01-21

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863 计划)项目(编号: 2013AA102507), 国家自然科学基金项目(编号: 31472153, 31372379)和现代农业产业技术体系专项(编号: CARS-18)资助[Supported by the The National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No.2013AA102507), the National Natural Science Foundation of China (Nos.31472153, 31372379) and the Technical System Special of Modern Agricultural industry of China (No. CARS-18)]

作者简介: 童晓玲, 博士, 副教授, 硕士生导师, 研究方向: 昆虫发育遗传。E-mail: xltong@swu.edu.cn

方春燕, 硕士研究生, 专业方向: 昆虫发育遗传。E-mail: 1039453631@qq.com

童晓玲和方春燕并列第一作者。

通讯作者: 代方银, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向: 动物遗传学。E-mail: fydai@swu.edu.cn

DOI: 10.16288/j.yczz.17-263

网络出版时间: 2018/1/26 11:18:47

URI: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20180126.1118.002.html>

Aedes aegypti and butterflies et al. In this review, we summarize the application of CRISPR/Cas9 in different insect species, discuss methods for its promotion, and consider its application for future insect studies.

Keywords: CRISPR/Cas9; genome editing; insects; application

昆虫种类繁多,形态各异,是地球上数量最多的动物群体,在生态系统中扮演着重要的角色,与人类生活密切相关。例如,绢丝类昆虫家蚕是丝绸业的生物基础;显花农作物的授粉主要由授粉性昆虫如蝴蝶、蜜蜂等完成;有的昆虫还是传播疾病的媒介,如按蚊传播的疟疾即是一种致命性传染疾病,《2017 年世界疟疾报告》显示 2016 年全球共发生约 2.2 亿疟疾病例,其中死亡人数约 44.5 万人。

随着许多昆虫基因组测序的完成,为深入了解昆虫生长、发育、变态、进化和繁殖提供了全新的信息支持,相关基因功能解析取得了突破性的进展。在后基因组时代,通过基因组编辑(genome editing)阐释昆虫学的各种科学问题已成为昆虫学研究的重要手段。基因组编辑技术是一种在基因组水平对 DNA 序列进行改造的遗传操作技术,能够实现基因定点插入或缺失突变、基因敲除、多位点或多基因同时突变和片段删除等精确操作。目前,已报道的基因组编辑技术包括锌指核酸酶(zinc-finger nucleases, ZFN)^[1]、类转录激活因子核酸酶(transcription activator like effector nucleases, TALEN)^[2,3]和成簇规律间隔短回文重复序列系统(clustered regularly interspaced short palindromic repeat/CRISPR-associated nuclease 9, CRISPR/Cas9)^[4]。ZFN 和 TALEN 复合体由多个酶亚基组成,不同靶位点通过构建不同的工程核酸,利用蛋白质和 DNA 结合的方式执行靶位点的序列识别和切割活性,因其设计比较复杂,实验过程较为繁琐,从而限制了其更为广泛的应用。CRISPR/Cas 系统作为第三代基因编辑技术,是基于简单的核苷酸互补配对方式结合在基因组靶位点实现定点突变,其具有实验过程简单、耗时短和工作量小等优势,已成功应用于多种生物的基因组编辑。本文主要阐述了 CRISPR/Cas9 的结构及作用原理,总结了 CRISPR/Cas9 导入昆虫的方法和应用及脱靶应对策略,以期对经济昆虫和有益昆虫的分子育种、害虫的生物技术防控等研究提供参考。

1 CRISPR/Cas9 系统的结构及作用原理

CRISPR/Cas 系统是 1987 年由日本学者在大肠杆菌中发现的一系列串联间隔短回文序列,这种短回文序列广泛存在于细菌和古细菌中,是一种后天性免疫系统^[5]。CRISPR/Cas 系统由 CRISPR 基因座, tracrRNA 基因和一系列 Cas 蛋白基因组成。根据 Cas 序列及免疫机制的不同,CRISPR/Cas 系统被分为 I 型、II 型和 III 型。目前,应用最为广泛的是肺炎链球菌 *S. pneumoniae* Cas9(SpCas9)系统,即 II 型系统。与 I 型和 III 型系统相比,II 型系统组成成分简单,由靶位点特异性 CRISPR-derived RNA(crRNA)、反式激活 crRNA(trans-activating crRNA, tracrRNA)和 Cas9 核酸内切酶 3 个组件构成。CRISPR/Cas9 系统依赖 Cas9 蛋白靶向并切割基因组序列,其中 crRNA 和 tracrRNA 通过碱基互补配对形成二聚体,该二聚体与 Cas9 蛋白结合形成 RNA-蛋白复合物,二聚体识别原型间隔序列毗邻基序(proto-spacer adjacent motif, PAM)前的靶位点序列^[6]。Cas9 蛋白含有 HNH 和 RuvC 两个内切酶结构域,其中 HNH 结构域切割与二聚体互补配对的靶序列,RuvC 结构域切割含有 PAM 的序列,从而产生断裂双链(double-DNA strand breaks, DSBs)^[7]。DSBs 能够诱导细胞引发非同源末端连接修复(nonhomologous end joining, NHEJ)或同源重组修复机制(homologous-directed repair, HDR)对 DSBs 进行修复^[8]。产生的 DSBs 在没有模板链的情况下会诱导 NHEJ 修复机制,这种修复机制通过碱基的随机插入、缺失或替换而导致基因功能丧失从而产生新的突变。HDR 是通过细胞自身的姊妹染色单体或外源同源重组模板链介导的修复机制,可以实现靶基因的精准修复。正是通过 HDR 和 NHEJ 这两种修复机制实现了对靶序列的定点插入、敲除或修饰等编辑方式(图 1)。

2013 年初,美国麻省理工学院张锋研究团队首

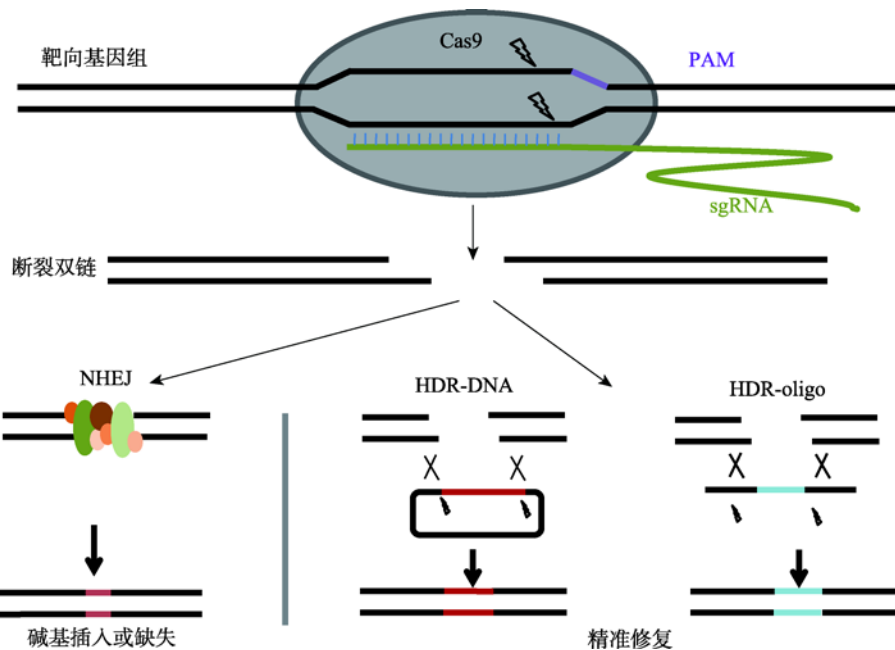


图 1 CRISPR/Cas9 系统基因组编辑原理

Fig. 1 A schematic principle of CRISPR/Cas9-mediated genome editing

CRISPR/Cas9 系统在基因组特定位点形成 DSB, DSB 通过非同源末端连接修复(NHEJ)或者同源重组修复机制(HDR), NHEJ 能在特定位点产生随机插入、缺失导致移码突变, HDR 可通过提供的模板链实现在基因组特定位点的精确编辑。

次利用该系统针对 *EXM1* 和 *PACLB* 基因在哺乳动物细胞中实现了定点编辑,同时证明 crRNA 与 tracrRNA 的成熟与结合不需要体外的 RNase III^[4]。同时,美国哈佛大学 Church 实验室在 *Science* 上发表的研究表明,经改造过的 crRNA 与 tracrRNA 形成的 sgRNA 同样能引导 Cas9 蛋白进行编辑^[9]。作者针对 *AAVS1* 基因在 HEK293T、人慢性粒细胞白血病 K562 细胞及多能干细胞中的编辑效率进行了比较,编辑效率从 2%~25% 不等,推测同一基因在不同细胞系中由于其表现状态不同而导致突变效率不同。随后美国加州大学伯克利分校 Doudna 实验室在 *eLife* 上发表论文,她们对 gRNA 序列的 3 端进行加长以稳定结构,表明较长的 3 端能提高编辑效率。正是这几篇论文的相继报道,将 CRISPR/Cas9 系统在真核生物中的应用推向高潮^[10]。

2 CRISPR/Cas9 系统导入昆虫的策略

基因组编辑技术日趋完善,研究者们期望借助基因组编辑技术阐明基因在个体发育过程中的作用。在昆虫中,主要有以下 4 种策略可将 CRISPR/Cas9

系统的两个组件导入昆虫体内从而实现目的基因的靶向突变。(1)通过共同注射 Cas9 蛋白质粒和 sgRNA 质粒到早期胚胎得到相应突变体(图 2A)。Ren 等^[11]对 CRISPR/Cas9 系统进行优化,比较不同启动子启动 Cas9 蛋白及 sgRNA 序列长短对突变效率的影响,结果表明在 *nos* 启动子下表达 Cas9 蛋白的质粒和在 U6b 启动子下表达最短序列 sgRNA 的质粒共同注射后,突变效率最高约为 3.2%,但突变遗传至下一代的效率较低。(2)将 Cas9 与 sgRNA 的表达盒在体外转录形成相应的 mRNA,将其共同注射以达到编辑靶标基因的目的(图 2B)。Bassett 等^[12]将 Cas9 蛋白和靶向 *yellow* 基因的 sgRNA 进行体外转录形成 mRNA,注射进果蝇胚胎有 88% 的个体产生了至少一个可遗传突变。Yu 等^[13]利用相同的办法对 *yellow* 等 7 个基因进行定点修饰,其突变率甚至高达 100%。且这种办法不受 gRNA 启动子序列限制,能在基因组上广泛应用,但就实验成本而言,体外转录需要更多的经费支持。(3)制作在生殖细胞中表达 Cas9 蛋白的转基因系,随后在该转基因系产生的早期胚胎中注射 sgRNA,产生相应的突变体(图 2C)。(4)通过转基因手段产生 Cas9 和 sgRNA 稳定的转基因品

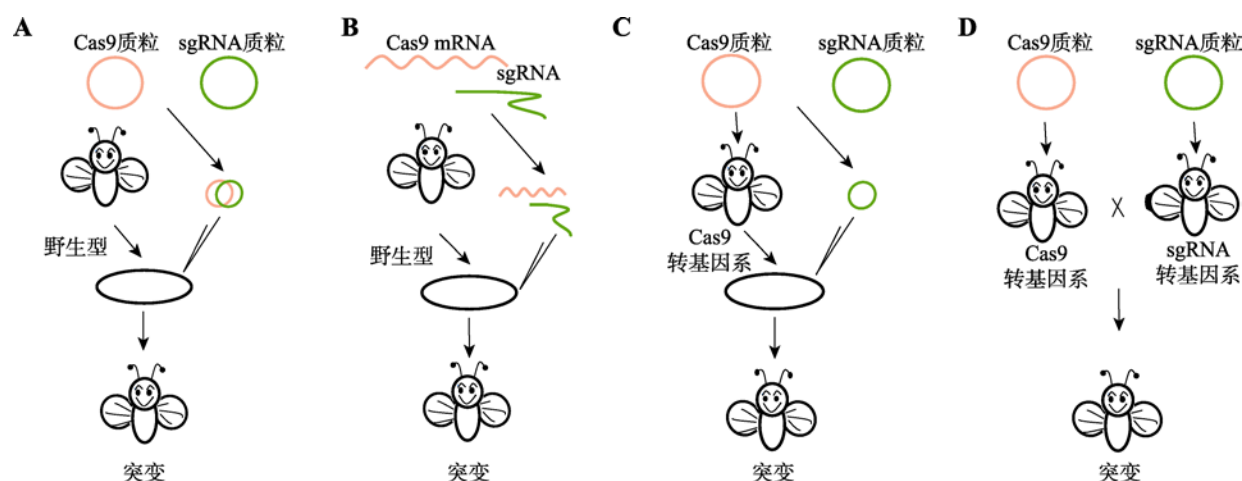


图2 CRISPR/Cas9 系统导入昆虫的普遍策略

Fig. 2 Commonly used delivery strategies of the CRISPR system in insects

A: Cas9(橙色)与 sgRNA(绿色)以质粒形式同时显微注射入野生型昆虫卵(黑色椭圆)中; B: Cas9(橙色)与 sgRNA(绿色)体外转录形成RNA 后同时显微注射入野生型昆虫卵中; C: 首先获得 Cas9 转基因系, 将 sgRNA 质粒注射入 Cas9 转基因系昆虫卵中; D: 分别获得 Cas9 和 sgRNA 的转基因系, 将两个转基因系杂交获得突变体。

系, 相互杂交产生突变后代(图 2D)。为了提高遗传效率, 可利用在生殖细胞中特异性表达的启动子如 *Vasa*、*nanos* 启动 Cas9 蛋白表达。利用该种办法突变效率较高, 且可通过共表达两种 sgRNA 产生大片段缺失, Gratz 等^[14]利用 *Vasa* 驱动 Cas9 在果蝇生殖细胞中表达, 实现特异性编辑靶标基因 *ry*, 其中有 15% 的个体能够将突变表型传递至下一代。利用不同的生殖细胞系特异性表达的启动子启动 Cas9 蛋白获得的突变效率不同, 但均能获得较多的突变后代^[15]。

通过以上策略获得的突变体一般会存在马赛克现象。Cas9 mRNA 翻译成蛋白需要一定的时间, 此外 Cas9 蛋白和 gRNA 形成的复合体半衰期比较长, 使其在受精卵卵裂后依然具有核酸内切酶的活性, 导致在不同的卵裂细胞基因组中进行切割而产生不同的靶位点修饰, 形成嵌合体。近期发表在 *Cell Research* 的研究表明, 针对老鼠 *Tyr* 基因的第 4 个外显子设计 5 个毗邻的靶标位点, 将其同时与 Cas9 转入老鼠胚胎细胞, G_0 代所有个体均表现为白化现象, 而在注射单个靶位点的老鼠中, 只存在少量的突变个体, 且大部分是以嵌合或野生形态存在的, 表明针对某个基因的关键外显子设计多个靶标位点能在 G_0 代实现完全敲除的目的, 消除马赛克现象^[16]。在哺乳动物细胞中可通过电转的方式将 Cas9 蛋白和 gRNA 导入早期受精卵中, 这种策略在一定程度

上降低了嵌合体的产生, 但是完全避免嵌合体的产生还需进一步探究^[17]。

3 CRISPR/Cas9 系统在昆虫中的应用及拓展

自 2013 年成功将 CRISPR/Cas9 系统应用于真核生物细胞以来, 该技术已经被广泛应用于各种生物中。CRISPR/Cas9 作为一种强大的基因编辑系统, 已经成为科学研究的有力工具。同时研究者们利用天才般想象力不断完善 CRISPR/Cas9 系统并拓展其应用领域。迄今为止, 利用 CRISPR/Cas9 系统已经在果蝇^[18-21]、家蚕^[5]、蚊子^[26-28]和蝴蝶^[29-31]等昆虫中开展了研究并取得了一定成果(表 1)。

3.1 靶向敲除

黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*)作为奠定经典遗传学基础的重要模式生物之一, 对其染色体的组成、基因编码和定位的认识, 是其他生物无法比拟的。因此, 基于清晰的遗传背景和便捷的遗传操纵, Gratz 等^[14]首次尝试将 CRISPR/Cas 系统应用于果蝇, 分别在 *yellow* 基因 5'端和 3'端设计了 2 个 gRNA 位点, 分子检测表明该基因发生了 4.6 kb 的大片段删除。同年, Yu 等^[3]将位于 Y 染色体上的基因 *kl-3* 成功敲除, 且其敲除效率高达 100%, 由此证明

表 1 CRISPR/Cas9 在昆虫中的应用

Table 1 The applications of CRISPR/Cas9 in insects

昆虫	基因	导入策略	突变形式	参考文献
黑腹果蝇 (<i>Drosophila melanogaster</i>)	<i>Yellow, white</i>	mRNA	Knock-out	[38]
	<i>Yellow, rosy</i>	Plasmid	Knock-out, Knock-in	[14]
	<i>Ast, capa, Ccap, Crz, Eh, Mip, npf, miR-219, miR-315, White</i>	Transgene, plasmid	Knock-out	[15]
	<i>White</i>	Transgene, plasmid	Knock-out	[11]
	<i>Phosphoglycerate kinase</i>	Plasmid	Knock-out	[13]
	<i>Ebony, yellow, white</i>	Cas9-transgene, plasmid	Knock-out, Knock-in	[39]
	<i>Sosy, DSH3PX1</i>	Cas9-transgene, plasmid	Knock-out, Knock-in	[40]
	<i>Nicotinic acetylcholine receptor</i>	dCas9-VPR-transgene, plasmid	Transcriptional activation	[41]
	<i>Ebony, Singed</i>	Cas9-protein, mRNA	Knock-out	[42]
	<i>Piwi</i>	Cas9 ^{D10A} -transgene, plasmid	Knock-out, Knock-in	[43]
	<i>Ebony, vermilion, yellow, white</i>	Cas9-transgene, plasmid	Knock-out	[20]
	<i>EGFP, Mrfp</i>	Cas9-transgene, plasmid	Knock-out	[21]
	<i>Ms(3)k81, white, yellow</i>	Cas9-transgene, plasmid	Knock-out, Knock-in	[44]
	<i>Bam, nos, yellow, cid, notch</i>	CRISPR/Cas9 conditional mutagenesis, transgene	Knock-out	[45]
	<i>Ebony, sepia, forked, curled, wnt</i>	Cas9-transgene, plasmid	Knock-out	[19]
	<i>Da6, G275E</i>	Plasmid	Knock-out, Knock-in	[46]
	<i>AatII, M4790I</i>	Cas9-transgene, plasmid	Knock-in	[47]
	<i>Wg, hnt, cut, scute</i>	dCas9-VPR-transgene	Cas9 transcriptional activators	[48]
	<i>Ebony, lbk</i>	nos-Cas9-transgene, plasmid	Co-CRISPR-knock-out	[49]
	<i>WingGFP-tan</i>	Plasmid	scarless allele replacement	[50]
斑翅果蝇 (<i>D. suzukii</i>)	<i>White, Sex Lethal</i>	Plasmid	Knock-out	[51]
埃及伊蚊 (<i>Aedes aegypti</i>)	<i>miR-309</i>	mRNA	Knock-out	[52]
	<i>Nix</i>	Cas9-transgene, plasmid	Gene Drive	[53]
	<i>Nix</i>	Cas9-protein, mRNA	Knock-out	[37]
	<i>ECFP</i>	mRNA	Knock-out	[54]
	<i>Kmo, lig4, ku70, r2d2, lops</i>	Cas9-protein, mRNA	Knock-out	[57]
致乏库蚊 (<i>Culex quinquefasciatus</i>)	<i>CYP9M10</i>	mRNA	Knock-out	[55]
冈比亚按蚊 (<i>Anopheles gambiae</i>)	<i>AGAP005958, AGAP011377, AGAP007280</i>	Plasmid	Gene drive, Knock-out, Knock-in	[26]
史按蚊 (<i>Anopheles stephensi</i>)	<i>Hydroxylase^{white}</i>	Plasmid	Gene drive, Knock-in	[56]
家蚕 (<i>Bombyx mori</i>)	<i>BmBLOS2</i>	mRNA	Knock-out	[22]
	<i>Kynu-2, yellow-e, ebony, BmBlos2, tyrosine hydroxylase, red egg, flugellos</i>	Cas9-protein, mRNA, plasmid	Knock-out	[24]
	<i>Bmku70</i>	Plasmid	Knock-out	[25]
	<i>Bm-ok, BmKMO, BmTH, Bmtan</i>	mRNA	Knock-out	[57]
	<i>BmBLOS2, EGFP</i>	Plasmid	Knock-out	[32]
	<i>BmBlos2, BmP25, BmSericin1, BmSericin3</i>	SpCas9/SaCas9/AsCpf-protein, plasmid, mRNA	Knock-out	[33]

续表

昆虫	基因	导入策略	突变形式	参考文献
柑橘凤蝶 (<i>Papilio xuthus</i>)	<i>Abdominal-B, ebony, frizzled</i>	mRNA	Knock-out	[29]
小红蛱蝶 (<i>Vanessa cardui</i>)	<i>Spalt, distal-less</i>	Cas9-protein, mRNA	Knock-out	[58]
鹿眼蛱蝶 (<i>Junonia coenia</i>)	<i>Spalt, distal-less</i>	Cas9-protein, mRNA	Knock-out	[31]
小菜蛾 (<i>Plutella xylostella</i>)	<i>Abdominal-A</i>	mRNA	Knock-out	[59]
斜纹夜蛾 (<i>Spodoptera litura</i>)	<i>SlitPBP3</i>	mRNA	Knock-out	[60]
	<i>Slabd-A</i>	mRNA	Knock-out	[61]
棉铃虫 (<i>Helicoverpa armigera</i>)	<i>Cadherin</i>	mRNA	Knock-out	[62]
	<i>HarmPBP1</i>	mRNA	Knock-out	[63]
	<i>HaABCA2</i>	Cas9-protein, mRNA	Knock-out	[64]
	<i>HarmOR16</i>	mRNA	Knock-out	[65]
	<i>White, Brown, Scarlet, Ok</i>	mRNA	Knock-out	[66]
棉叶虫 (<i>Spodoptera littoralis</i>)	<i>SlitOrco</i>	Cas9-protein, mRNA	Knock-out	[67]
赤拟谷盗 (<i>Tribolium castaneum</i>)	<i>EGFP</i>	Plasmid, mRNA	Knock-out, Knock-in	[68]
	<i>W, Ace2, TC010993</i>	Plasmid	Gene drive	[69]
	<i>Robo2/3</i>	<i>nos</i> -Cas9-transgene, plasmid	Knock-out, Knock-in	[70]
飞蝗 (<i>Locusta migratoria</i>)	<i>Orco</i>	mRNA	Knock-out	[71]
双斑蟋 (<i>Gryllus bimaculatus</i>)	<i>Dop1</i>	mRNA	Knock-out	[72]

CRISPR/Cas 系统不仅对常染色体上的基因靶位点有效,而且对性染色体上的位点同样高效。

家蚕(*Bombyx mori*)作为一种泌丝结茧类昆虫,具有悠久的驯化历史和很高的经济价值。家蚕作为研究鳞翅目昆虫的模式生物,许多学者利用 CRISPR/Cas9 系统对其进行基因编辑,从而实现探究基因功能和预防蚕病的目的。Wang 等^[22]首次在家蚕中成功应用 CRISPR/Cas9 系统,以 *BmBLOS2* 为靶基因,设计了针对 *BmBLOS2* 基因的两个靶位点,通过显微注射,将编码 Cas9 和 sgRNA 的 mRNA 混合注射进家蚕胚胎,获得了高突变率的可遗传的油蚕突变体,且在基因组上实现了大片段删除。Liu 等^[4]以 *BmBLOS2* 基因为靶标,将带有核定位信号的 Cas9 表达载体和 sgRNA 表达载体共转染 BmN 细胞,经检测发现 CRISPR/Cas9 系统能有效介导 BmN 细胞内的基因编辑,并且能实现多个基因的编辑。由于受 RNA Pol III 启动子的限制,sgRNA 的靶位点设计通常是以

GN19NGG 或 GGN18NGG 的形式进行的,也因此限制了该系统在基因组上找到最佳靶位点的范围。针对这一问题,Zeng 等^[32]对 CRISPR/Cas9 系统在家蚕中的应用进行了优化,以 U6 启动子为例,在家蚕中设计了以 A、T、C、G 为起始碱基的靶位点序列,分析发现 N20NGG 能实现在细胞及个体水平特异性敲除,并可稳定遗传。此外,研究人员以 *Bm-ok*、*BmKMO*、*BmTH*、*Bmtan* 和 *Bm-Wnt1* 为靶位点,将 Cas9 和 SgRNA 以 mRNA 的形式注射进胚胎,实现了靶基因的定点编辑。为了进一步提高 CRISPR/Cas9 系统在家蚕中的敲除效率,Ma 等^[33]将在驱动 Cas9 表达的启动子前加上 HR3 enhancer,敲除效率提高 3.5 倍,同时为了拓宽编辑位点在基因组上的范围,作者将 SpCas9 替换成 SaCas9 和 AsCpf1,以 *BmBLOS2* 为靶位点,统计表明 SpCas9 的敲除效率从 9.30%~14.13%不等,AsCpf1 的敲除效率在 8.7%和 16.7%之间,SaCas9 敲除效率为 11.9%。病毒病

作为蚕业生产上危害最为严重的疾病, 培育抗性品种应对蚕病是目前有效地策略之一。Chen 等^[34]将 BmNPV 中 *early-1 (ie-1)* 和 *me53* 为靶标, 用 piggybac 转座子在家蚕中导入 Cas9 和 gRNA, 形成稳定转基因系, 分析表明能有效编辑 BmNPV 基因组, 并抑制 BmNPV 在家蚕体内的复制和扩散。

蚊子作为传播各类疾病的媒介, 与人类健康息息相关。Dong 等^[35]利用 CRISPR/Cas9 系统以 *ECFP* 为靶标, 将 *ECFP* 转基因系蚊子中的 *ECFP* 基因破坏, 获得相应突变体, 突变率为 5.5%; Kistler 等通过改进 CRISPR/Cas9 系统以及调整 Cas9 浓度, 将突变效率提升至 24%^[36]; Hall 等^[30]应用 CRISPR/Cas9 系统对 *Nix* 进行研究, 发现昆虫中第一个 M 因子^[37]。在蝴蝶中, 对 *Abd-B* 敲除后, 高达 92.5% 个体出现突变表型; 对生物钟基因 *cry2* 和 *clk* 敲除后, 得到可遗传突变后代, 同时说明 *clk* 能影响蝴蝶在迁移过程中的生理节律^[31]。

3.2 时空特异性编辑

如果对一些机体发育所必须的基因进行敲除, 会导致机体产生严重的生理缺陷而死亡。因此, 这限制了对于探究某些基因在特定发育时间段的功能研究。为此, Xue 等^[45]为了达到在时间和空间特异性敲除特定基因的目的, 在果蝇中构建了条件性诱变系统(CRISPR/Cas9-mediated conditional mutagenesis, CMCM)。该系统由在翅膀、卵巢、眼睛及精巢中特异性启动子驱动 GAL4 的表达的转基因系及含有 Cas9 和 gRNA 的表达盒的 UAS 转基因品系构成, G_1 代时将两品系杂交后获得相应的特异性敲除个体。

在昆虫中, 驱动 gRNA 表达最为广泛的启动子为 U6、U3 及 T7 等, 这类启动子属于Ⅲ型启动子, 其表达特征为全身性、全时间表达。Zhao 等^[73]在 gRNA 序列前后加上核酸酶序列, 该结构可通过具有组织时期特异性Ⅱ型启动子驱动表达, 转录表达的 pre-gRNA 利用加在两端的核酸酶将其剪切形成成熟的短的 gRNA, gRNA 引导 Cas9 酶切割目标序列。此外, 在各个 gRNA 之间用 tRNA 串联之后还可实现时间空间的多位点编辑^[74]。

3.3 靶向敲入

在基因组特定位点整合进外源 DNA 序列称为

靶向敲入(targeted knock-in)。通常情况下, 在插入基因两端需要添加与基因组靶标序列的同源臂, 其长度在几十到几千个碱基之间, 有研究表明其插入效率与同源臂长度之间存在正向线性关系^[75]。在果蝇、家蚕以及蚊子等昆虫中, 研究者通过 ssODNs (single-stranded oligodeoxynucleotides) 模板链、带有同源臂的 PCR 双链模板链或者质粒模板链对 CRISPR/Cas9 系统产生的 DSB 进行外源基因的插入, 从而实现外源基因的靶向敲入^[39,56,76]。

在细胞内, 一旦 DSB 产生, 会诱导 NHEJ 和 HR 两种修复机制, 这两种机制会竞争性地与 DSB 处结合以完成修复, 因此通过导入外源模板链实现对断裂双链的重组修复, 其效率是极低的。研究表明, 通过抑制与 NHEJ 修复途径相关蛋白(如 Ku70、Ku80 和 Ligase IV) 的活性以提高 HR 修复机制, 可实现外源基因的靶向插入^[77]。Ma 等^[25]在家蚕 Ku70 敲除系中靶向插入 3xp3-DsRed-sv40 的表达盒, 与在非 Ku70 敲除系中靶向插入 3xp3-DsRed-sv40 的个体中进行荧光强度检测, 发现前者荧光强度更强, 表明敲除 Ku70 后, 提高了机体精准修复的效率。Liu 等^[24]在家蚕细胞系中敲除 NHEJ 途径相关因子, 使 HR 途径修复提高 7 倍, 此外也表明模板链的同源重组臂在 100 bp 时仍能实现精确的靶向插入。

靶向敲入标签蛋白基因使其与靶基因融合表达, 可以实现追踪靶基因的时空表达, 达到实时观测靶基因的表达部位、表达时期等目的, 从而解析靶基因的作用机制。Mavor 等^[78]在 *Rab8* 基因的 N 末端插入 Tag 标签, 通过标签对 *Rab8* 基因进行定位和功能研究, 发现 *Rab8* 在早期果蝇胚胎的沟陷形成过程中起到重要的作用; Li 等^[79]利用同样的办法在 *Rn* 基因 3'端加上蛋白标签, 对其进行亚细胞定位发现其表达于前体嗅觉感受器, 对前体受体细胞分化具有重要作用。此外还可在基因组特定位点插入整合酶位点如 loxP、-Sce 或 phiC31 以实现外源基因的单拷贝插入。

3.4 转录水平调控

Cas9 蛋白有两个内切酶核酸结构域—RuvC1 和 HNH, 分别切割 DNA 的两条链。对核酸酶进行点突变可获得缺失酶切活性的 Cas9D10A 和 Cas9H840A 两种突变体, 这两种突变体只能对 DNA 的其中一条

链进行切割。因此, 如果将两个核酸内切酶结构域同时突变即可获得内切酶完全丧失的 Cas9 突变体即 dCas9(dead Cas9)^[80]。当 dCas9 结合于基因的编码序列或者调控序列区域即可有效地阻止基因转录, 从而实现基因表达的敲低或沉默, 这也就是所谓的 CRISPR 干扰(CRISPR interference, CRISPRi)技术。Ghosh 等^[81]利用 CRISPRi 技术干涉 *roX1* 和 *roX2* 基因的表达时发现, 该技术可在 RNA 水平显著下调两个基因的表达。将催化失活的 dCas9 和转录激活因子 p65、和 Rta 和 VP64 融合表达形成 dCas9-VPR 复合体, 在 sgRNA 的特异性引导下该复合体可激活特定基因的表达(CRISPR active, CRISPRa)。美国哈佛-麻省理工学院 Broad 研究所 Konermann 团队^[82]对 sgRNA 骨架进行修饰, 使其能招募 RNA 结合蛋白, 该结合蛋白与转录激活因子融合表达, 使 sgRNA 同样能与转录激活因子结合, 作者将该系统命名为 SAM(synergistic activation mediator system), 同 dCas9-VPR 相比, SAM 系统能大幅度上调基因的表达。有研究表明, 当 dCAS9 上融合蓝光激活的 *CIB1* 和 *CRY2* 基因并连接上一个转录激活因子 P65 时, 在蓝光(激发 GFP)照射条件下, *ILIRN* 基因就能够被过表达, 从而使过表达成为一个可控的过程^[83]。目前在酵母、人、鼠及果蝇细胞中已经证实了该技术的可行性。CRISPRi 和 CRISPRa 技术已经成为研究基因及其顺式作用元件之间的调控关系的更为快速和有效的方法。

3.5 基因驱动技术

基因驱动技术(gene drive)是指一个能将特定性状快速扩散到群体中的方法。基于基因驱动技术, 可以将人为改造的基因比如性别决定因子、生长发育相关因子等扩散到野生生物群体中, 以控制有害生物群体数量。目前, 基于 CRISPR/Cas9 系统的基因驱动(CRISPR/Cas9 gene drive, CGD)技术在蚊子中的应用最具代表性^[84]。研究表明, 蚊子中 *Nix* 基因为位于 Y 染色体上的雄性决定因子, 在雌性蚊子的胚胎中加入 *Nix* 基因可导致胚胎向雄性转换或者死亡, 因此 Hall 等^[37]尝试利用 CRISPR/Cas9 系统将 *Nix* 基因插入到雌性蚊子的胚胎基因组中, 得到经过改造的雄性蚊子, 将其释放到野外与雌性蚊子杂交后会得到更多的雄性蚊子或者不育的雄性蚊子, 以减

少雌性蚊子的数量, 达到控制蚊子群体数量的目的。

早在 30 多年前, 科学家们就已经使用其他编辑工具如 ZFN、TALEN 等对昆虫基因组进行编辑, 然而自 CRISPR/Cas9 这个突破性技术问世以来, 因其简洁的编辑方式受到了极大的青睐, 由其衍生的生物安全问题也受到全世界的关注。基因驱动技术也存在一系列的弊端, 它既然能让蚊子灭绝, 那么就不排除使包括人在内的其他物种遭受破坏; 另一方面, 如果真正实现有害物种的灭绝, 那么可能会对生物链造成不可逆的影响。当然, 研究者们也采用了一系列的措施来规避基因驱动技术带来的弊端, 比如对基因驱动系统进行改造, 将靶向靶基因的靶位点改为靶向 Cas9, 当机体自身 Cas9 蛋白表达时就能将插在基因组中的 Cas9 蛋白敲除, 使其丧失驱动功能^[85]; 将 CRISPR 与 Cas9 基因分开到不同的载体上, 以降低驱动效率; 在应用上实现严格可逆, 比如拆分基因驱动系统(split gene drive systems)^[86]。然而这种通过 CRISPR/Cas9 系统释放携带有驱动系统的昆虫必须要求严格的风险评估及可能产生的生态后果。

4 结语和展望

CRISPR/Cas9 系统以其设计简单、容易操作及价格低廉等优势, 得到科研工作者的青睐和广泛的应用, 但其在昆虫的研究和应用领域中仍然存在的一系列不容忽视的问题。

首先, 提高靶向编辑精准性和避免脱靶的问题。在人类基因组中每 8~12 个碱基即可出现 NGG 这种简单的三联碱基, 而在鳞翅目昆虫家蚕中每 6.5 个碱基即可出现这种三联碱基, 这种高频率为寻找靶位点提供了便利。然而相对于点突变、等位基因识别等编辑工作就需要对靶位点进行更精确的定位, 对核苷酸需要更严格的分辨率, 因此就需要选择性更广的 PAM 基序来引导 Cas 蛋白识别靶位点, 比如脑膜炎奈瑟菌(*Neisseriameningitidis*, NmeCas9)的 CRISPR-Cas9 需要较长的 PAM 识别基序 NNNNGATT, 虽然降低了可编辑位点, 但是编辑精确度提高, 脱靶率降低^[87]。

其次, 进一步提高基因组编辑的效率。在昆虫

中,利用显微注射的策略导入外源片段时,其转化效率也与插入片段大小有关,片段越大其转化效率越低。张锋研究团队作为 CRISPR/Cas9 系统在真核生物中应用的先行者,一直在对该系统进行着精益求精的改进。2015 年,他们通过搜寻整个细菌群体,在 *Staphylococcus aureus* 找到了更小的可替代的 Cas9 酶,根据菌属来源将其分别命名为 *Acidaminococcus* sp. Cpf1 (AsCpf1) 和 *Lachnospiraceae* bacterium Cpf1 (LbCpf1)^[88]。与传统的 Cas9 比较,这些核酸酶有如下几个特点:(1) Cpf1 酶在识别靶位点过程中仅需要一条 crRNA 即可,而非像 SpCas9 酶需要 crRNA/tracrRNA 二聚体引导 Cas9 酶识别靶位点;(2) PAM 识别基序 TTTN 位于 3'端,而非 5'端;(3) Cpf1 酶切割双链时产生粘性末端(overhang),而非平齐末端(blunt-ended),可能有效提高精准插入外源 DNA,实现 HDR 整合;(4) Cpf1 切口远离靶位点,这表示即使靶位点已经发生基因编辑,仍可进行再次编辑。正是 Cpf1 酶的这些特性可能为更精确的基因编辑打开了一扇大门。

再者,社会对 CRISPR/Cas 系统编辑品种的认可问题。利用 CRISPR/Cas 系统对基因组中的靶基因进行定点突变,具有与自然突变或者诱导突变相似的效果,可获得在基因组上无转基因痕迹的可遗传的突变品系,理论上可消除人们对传统转基因引入外源基因产生的恐惧。然而,其脱靶效应对物种产生的影响尚缺乏系统评价,因此各国对其推广持不同意见,目前还没有 CRISPR/Cas 编辑新品种大面积推广的报道。

尽管 CRISPR/Cas 系统还存在一些问题,但通过 CRISPR/Cas 系统的不断改进以及其衍生出的各项技术,为昆虫基因功能、昆虫生物反应器、害虫防控、经济昆虫分子改良等领域的研究提供了新途径和新思路,必将在昆虫学研究领域带来新的应用和巨大发展。

参考文献(References):

- [1] Kim YG, Cha J, Chandrasegaran S. Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusion to *FokI* cleavage domain. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93(3): 1156–1160. [DOI]
- [2] Li T, Huang S, Zhao XF, Wright DA, Carpenter S, Spalding MH, Weeks DP, Bing Y. Modularly assembled designer TAL effector nucleases for targeted gene knockout and gene replacement in eukaryotes. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39(14): 6315–6325. [DOI]
- [3] Moscou MJ, Bogdanove AJ. A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors. *Science*, 2009, 326(5959): 1501–1501. [DOI]
- [4] Cong L, Ran FA, Cox D, Lin SL, Barretto R, Habib N, Hsu PD, Wu XB, Jiang WY, Marraffini LA, Zhang F. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 2013, 339(6121): 819–823. [DOI]
- [5] Jiang WY, Bikard D, Cox D, Zhang F, Marraffini LA. RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(3): 233–239. [DOI]
- [6] Garneau JE, Dupuis MÈ, Villion M, Romero DA, Barrangou R, Boyaval P, Fremaux C, Horvath P, Magadán AH, Moineau S. The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature*, 2010, 468(7320): 67–71. [DOI]
- [7] Deltcheva E, Chylinski K, Sharma CM, Gonzales K, Chao Y, Pirzada ZA, Eckert MR, Vogel J, Charpentier E. CRISPR RNA maturation by *trans*-encoded small RNA and host factor RNase . *Nature*, 2011, 471(7340): 602–607. [DOI]
- [8] Jackson SP. Sensing and repairing DNA double-strand breaks. *Carcinogenesis*, 2002, 23(5): 687–696. [DOI]
- [9] Mali P, Yang LH, Esvelt KM, Aach J, Guell M, DiCarlo JE, Norville JE, Church GM. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*, 2013, 339(6121): 823–826. [DOI]
- [10] Jinek M, East A, Cheng A, Lin S, Ma EB, Doudna J. RNA-programmed genome editing in human cells. *eLife*, 2013, 2: e00471. [DOI]
- [11] Ren XJ, Sun J, Housden BE, Hu YH, Roesel C, Lin SL, Liu LP, Yang ZH, Mao DC, Sun LZ, Wu QJ, Ji JY, Xi JZ, Mohr SE, Xu J, Perrimon N, Ni JQ. Optimized gene editing technology for *Drosophila melanogaster* using germ line-specific Cas9. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(47): 19012–19017. [DOI]
- [12] Bassett A, Liu JL. CRISPR/Cas9 mediated genome engineering in *Drosophila*. *Methods*, 2014, 69(2): 128–136. [DOI]
- [13] Yu ZS, Ren MD, Wang ZX, Zhang B, Rong YS, Jiao RJ, Gao GJ. Highly efficient genome modifications mediated by CRISPR/Cas9 in *Drosophila*. *Genetics*, 2013, 195(1): 289–291. [DOI]

- [14] Gratz SJ, Cummings AM, Nguyen JN, Hamm DC, Donohue LK, Harrison MM, Wildonger J, O'Connor-Giles KM. Genome engineering of *Drosophila* with the CRISPR RNA-guided Cas9 nuclease. *Genetics*, 2013, 194(4): 1029–1035. [DOI]
- [15] Kondo S, Ueda R. Highly improved gene targeting by germline-specific Cas9 expression in *Drosophila*. *Genetics*, 2013, 195(3): 715–721. [DOI]
- [16] Zuo EW, Cai YJ, Li K, Wei Y, Wang BA, Sun YD, Liu Z, Liu JW, Hu XD, Wei W, Huo XN, Shi LY, Tang C, Liang D, Wang Y, Nie YH, Zhang CC, Yao X, Wang X, Zhou CY, Ying WQ, Wang QF, Chen RC, Shen Q, Xu GL, Li JS, Sun Q, Xiong ZQ, Yang H. One-step generation of complete gene knockout mice and monkeys by CRISPR/Cas9-mediated gene editing with multiple sgRNAs. *Cell Res*, 2017, 27(7): 933–945. [DOI]
- [17] Hashimoto M, Yamashita Y, Takemoto T. Electroporation of Cas9 protein/sgRNA into early pronuclear zygotes generates non-mosaic mutants in the mouse. *Dev Biol*, 2016, 418(1): 1–9. [DOI]
- [18] Gratz SJ, Rubinstein CD, Harrison MM, Wildonger J, O'Connor-Giles KM. CRISPR-Cas9 genome editing in *Drosophila*. *Curr Protoc Mol Biol*, 2015, 41: 7–19. [DOI]
- [19] Port F, Bullock SL. Creating heritable mutations in *Drosophila* with CRISPR-Cas9. In: Dahmann C, ed. *Drosophila*. Methods in Molecular Biology. New York, NY: Humana Press, 2016, 1478: 145–160. [DOI]
- [20] Ren XJ, Yang ZH, Xu J, Sun J, Mao DC, Hu YH, 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]
- [21] Sebo ZL, Lee HB, Peng Y, Guo Y. A simplified and efficient germline-specific CRISPR/Cas9 system for *Drosophila* genomic engineering. *Fly*, 2014, 8(1): 52–57. [DOI]
- [22] Wang YQ, Li ZQ, Xu J, Zeng BS, Ling L, You L, Chen YZ, Huang YP, Tan AJ. The CRISPR/Cas system mediates efficient genome engineering in *Bombyx mori*. *Cell Res*, 2013, 23(12): 1414–1416. [DOI]
- [23] 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. [DOI]
- [24] Liu YY, Ma SY, Wang XG, Chang JS, Gao J, Shi R, Zhang JD, Lu W, Liu Y, Zhao P, Xia QY. Highly efficient multiplex targeted mutagenesis and genomic structure variation in *Bombyx mori* cells using CRISPR/Cas9. *Insect Biochem Mol Biol*, 2014, 49: 35–42. [DOI]
- [25] Ma S, Chang J, Wang X, Liu Y, Zhang J, Lu W, Gao J, Shi R, Zhao P, Xia Q. CRISPR/Cas9 mediated multiplex genome editing and heritable mutagenesis of BmKu70 in *Bombyx mori*. *Sci Rep*, 2014, 4: 4489. [DOI]
- [26] Hammond A, Galizi R, Kyrou K, Simoni A, Siniscalchi C, Katsanos D, Gribble M, Baker D, Marois E, Russell S, Burt A, Windbichler N, Crisanti A, Nolan T. A CRISPR-Cas9 gene drive system targeting female reproduction in the malaria mosquito vector *Anopheles gambiae*. *Nat Biotechnol*, 2016, 34(1): 78–83. [DOI]
- [27] Kumar A, Lualdi M, Lyozin GT, Sharma P, Loncarek J, Fu XY, Kuehn MR. Nodal signaling from the visceral endoderm is required to maintain *Nodal* gene expression in the epiblast and drive DVE/AVE migration. *Dev Biol*, 2015, 400(1): 1–9. [DOI]
- [28] Okamoto KW, Robert MA, Gould F, Lloyd AL. Feasible introgression of an anti-pathogen transgene into an urban mosquito population without using gene-drive. *PLoS Negl Trop Dis*, 2014, 8(7): e2827. [DOI]
- [29] Li XY, Fan DD, Zhang W, Liu GC, Zhang L, Zhao L, Fang XD, Chen L, Dong Y, Chen Y, Ding Y, Zhao RP, Feng MJ, Zhu YB, Feng Y, Jiang XT, Zhu DY, Xiang H, Feng XK, Li SC, Wang J, Zhang GJ, Kronforst MR, Wang W. Outbred genome sequencing and CRISPR/Cas9 gene editing in butterflies. *Nat Communicat*, 2015, 6: 8212. [DOI]
- [30] Markert MJ, Zhang Y, Enuameh MS, Reppert SM, Wolfe SA, Merlin C. Genomic access to monarch migration using TALEN and CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis. *G3(Bethesda)*, 2016, 6(4): 905–915. [DOI]
- [31] Zhang LL, Reed RD. Genome editing in butterflies reveals that spalt promotes and Distal-less represses eyespot colour patterns. *Nat Communicat*, 2016, 7: 11769. [DOI]
- [32] Zeng BS, Zhan S, Wang YQ, Huang YP, Xu J, Liu Q, Li ZQ, Huang YP, Tan J. Expansion of CRISPR targeting sites in *Bombyx mori*. *Insect Biochem Mol Biol*, 2016, 72: 31–40. [DOI]
- [33] Ma SY, Liu Y, Liu YY, Chang JS, Zhang T, Wang XG, Shi R, Lu W, Xia XJ, Zhao P, Xia QY. An integrated CRISPR *Bombyx mori* genome editing system with improved efficiency and expanded target sites. *Insect Biochem Mol Biol*, 2017, 83: 13–20. [DOI]
- [34] Chen SQ, Hou CX, Bi HL, Wang YQ, Xu J, Li MW, James AA, Huang YP, Tan AJ. Transgenic clustered regularly interspaced short palindromic repeat/Cas9-mediated viral

- gene targeting for antiviral therapy of bombyx mori nucleopolyhedrovirus. *J Virol*, 2017, 91(8): e02465–16. [DOI]
- [35] Dong SZ, Lin JY, Held NL, Clem RJ, Passarelli AL, Franz AWE, Tang YP. Heritable CRISPR/Cas9-mediated genome editing in the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Plos One*, 2015, 10(3): e0122353. [DOI]
- [36] Kistler KE, Vosshall LB, Matthews BJ. Genome engineering with CRISPR-Cas9 in the mosquito *Aedes aegypti*. *Cell Reports*, 2015, 11(1): 51–60. [DOI]
- [37] Hall AB, Basu S, Jiang XF, Qi YM, Timoshevskiy VA, Biedler JK, Sharakhova MV, Elahi R, Anderson MA, Chen XG, Sharakhov , Adelman ZN, Tu Z. A male-determining factor in the mosquito *Aedes aegypti*. *Science*, 2015, 348(6240): 1268–1270. [DOI]
- [38] Bassett AR, Tibbit C, Ponting CP, Liu JL. Highly efficient targeted mutagenesis of *Drosophila* with the CRISPR/Cas9 system. *Cell Rep*, 2013, 4(1): 220–228. [DOI]
- [39] Gokcezade J, Sienski G, Duchek P. Efficient CRISPR/Cas9 plasmids for rapid and versatile genome editing in *Drosophila*. *G3(Bethesda)*, 2014, 4(11): 2279–2282. [DOI]
- [40] 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]
- [41] Lin SL, Ewen-Campen B, Ni XC, Housden BE, Perrimon N. *In Vivo* transcriptional activation using CRISPR/Cas9 in *Drosophila*. *Genetics*, 2015, 201(2): 433–442. [DOI]
- [42] Lee JS, Kwak SJ, Kim J, Kim AK, Noh HM, Kim JS, Yu K. RNA-guided genome editing in *Drosophila* with the purified Cas9 protein. *G3(Bethesda)*, 2014, 4(7): 1291–1295. [DOI]
- [43] Ren XJ, Yang ZH, Mao DC, Chang Z, Qiao HH, Wang X, Sun J, Hu Q, Cui Y, Liu LP, Ji JY, Xu J, Ni JQ. Performance of the Cas9 nickase system in *Drosophila melanogaster*. *G3(Bethesda)*, 2014, 4(10): 1955–1962. [DOI]
- [44] Xue ZY, Ren MD, Wu MH, Dai JB, Rong YS, Gao GJ. Efficient gene knock-out and knock-in with transgenic Cas9 in *Drosophila*. *G3(Bethesda)*, 2014, 4(5): 925–929. [DOI]
- [45] Xue ZY, Wu MH, Wen KJ, Ren MD, Long L, Zhang XD, Gao GJ. CRISPR/Cas9 mediates efficient conditional mutagenesis in *Drosophila*. *G3(Bethesda)*, 2014, 4(11): 2167–2173. [DOI]
- [46] Zimmer CT, Garrood WT, Puinean AM, Eckel-Zimmer M, Williamson MS, Davies TGE, Bass C. A CRISPR/Cas9 mediated point mutation in the alpha 6 subunit of the nicotinic acetylcholine receptor confers resistance to spinosad in *Drosophila melanogaster*. *Insect Biochem Mol Biol*, 2016, 73: 62–69. [DOI]
- [47] Douris V, Papapostolou KM, Ilias A, Roditakis E, Kounadi S, Riga M, Nauen R, Vontas J. Investigation of the contribution of RyR target-site mutations in diamide resistance by CRISPR/Cas9 genome modification in *Drosophila*. *Insect Biochem Mol Biol*, 2017, 87: 127–135. [DOI]
- [48] Ewen-Campen B, Yang-Zhou D, Fernandes VR, Gonzalez DP, Liu LP, Tao R, Ren X, Sun J, Hu Y, Zirin J, Mohr SE, Ni JQ, Perrimon N. Optimized strategy for *in vivo* Cas9-activation in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, 114(35): 9409–9414. [DOI]
- [49] Kane NS, Vora M, Varre KJ, Padgett RW. Efficient screening of CRISPR/Cas9-induced events in *Drosophila* using a Co-CRISPR strategy. *G3(Bethesda)*, 2017, 7(1): 87–93. [DOI]
- [50] Lamb AM, Walker EA, Wittkopp PJ. Tools and strategies for scarless allele replacement in *Drosophila* using CRISPR/Cas9. *Fly*, 2017, 11(1): 53–64. [DOI]
- [51] Li F, Scott MJ. CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of the white and sex lethal loci in the invasive pest, *Drosophila suzukii*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 469(4): 911–916. [DOI]
- [52] Zhang Y, Zhao B, Roy S, Saha TT, Kokoza VA, Li M, Raikhel AS. microRNA-309 targets the H omeobox gene SIX4 and controls ovarian development in the mosquito *Aedes aegypti*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113(33): E4828–E4836. [DOI]
- [53] Basu S, Aryan A, Overcash JM, Samuel GH, Anderson MA, Dahlem TJ, Myles KM, Adelman ZN. Silencing of end-joining repair for efficient site-specific gene insertion after TALEN/CRISPR mutagenesis in *Aedes aegypti*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112: 4038–4043. [DOI]
- [54] Dong SZ, Lin JY, Held NL, Clem RJ, Passarelli AL, Franz AWE. Heritable CRISPR/Cas9-mediated genome editing in the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *PLoS One*, 2015, 10(3): e0122353. [DOI]
- [55] Itokawa K, Komagata O, Kasai S, Ogawa K, Tomita T. Testing the causality between CYP9M10 and pyrethroid resistance using the TALEN and CRISPR/Cas9 technologies. *Sci Rep*, 2016, 6: 24652. [DOI]
- [56] Gantz VM, Jasinskiene N, Tatarenkova O, Fazekas A, Macias VM, Bier E, James AA. Highly efficient Cas9-

- mediated gene drive for population modification of the malaria vector mosquito *Anopheles stephensi*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112(49): E6736–E6743. [DOI]
- [57] Wei W, Xin HH, Roy B, Dai JB, Miao YG, Gao GJ. Heritable genome editing with CRISPR/Cas9 in the silkworm, *Bombyx mori*. *PLoS One*, 2014, 9(7): e101210. [DOI]
- [58] Perry M, Kinoshita M, Saldi G, Huo L, Arikawa K, Desplan C. Molecular logic behind the three-way stochastic choices that expand butterfly colour vision. *Nature*, 2016, 535(7611): 280–284. [DOI]
- [59] Huang YP, Chen YZ, Zeng BS, Wang YJ, James AA, Gurr GM, Yang G, Lin XJ, Huang YP, You MS. CRISPR/Cas9 mediated knockout of the abdominal-A homeotic gene in the global pest, diamondback moth (*Plutella xylostella*). *Insect Biochem Mol Biol*, 2016, 75: 98–106. [DOI]
- [60] Zhu GH, Xu J, Cui Z, Dong XT, Ye ZF, Niu DJ, Huang YP, Dong SL. Functional characterization of *SlitPBP3* in *Spodoptera litura* by CRISPR/Cas9 mediated genome editing. *Insect Biochem Mol Biol*, 2016, 75: 1–9. [DOI]
- [61] Bi HL, Xu J, Tian AJ, Huang YP. CRISPR/Cas9-mediated targeted gene mutagenesis in *Spodoptera litura*. *Insect Sci*, 2016, 23(3): 469–477. [DOI]
- [62] Jing W, Zhang HN, Wang HD, Shan Z, Zuo YY, Yang YH, Wu YD. Functional validation of cadherin as a receptor of Bt toxin Cry1Ac in *Helicoverpa armigera* utilizing the CRISPR/Cas9 system. *Insect Biochem Mol Biol*, 2016, 76: 11–17. [DOI]
- [63] Ye ZF, Liu XL, Han Q, Liao H, Dong XT, Zhu GH, Dong SL. Functional characterization of *PBP1* gene in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) by using the CRISPR/Cas9 system. *Sci Rep*, 2017, 7: 8470. [DOI]
- [64] Wang J, Wang HD, Liu SY, Liu LP, Tay WT, Walsh TK, Yang YH, Wu YD. CRISPR/Cas9 mediated genome editing of *Helicoverpa armigera* with mutations of an ABC transporter gene HaABCA2 confers resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry2A toxins. *Insect Biochem Mol Biol*, 2017, 87: 147–153. [DOI]
- [65] Chang HT, Liu Y, Ai D, Jiang XC, Dong SL, Wang GR. A Pheromone antagonist regulates optimal mating time in the moth *Helicoverpa armigera*. *Curr Biol*, 2017, 27(11): 1610–1615.e3. [DOI]
- [66] Khan SA, Reichelt M, Heckel DG. Functional analysis of the ABCs of eye color in *Helicoverpa armigera* with CRISPR/Cas9-induced mutations. *Sci Rep*, 2017, 7: 40025. [DOI]
- [67] Koutroumpa FA, Monsempes C, François MC, De Cian A, Royer C, Concordet JP, Jacquín-Joly E. Heritable genome editing with CRISPR/Cas9 induces anosmia in a crop pest moth. *Sci Rep*, 2016, 6: 29620. [DOI]
- [68] Gilles AF, Schinko JB, Averof M. Efficient CRISPR-mediated gene targeting and transgene replacement in the beetle *Tribolium castaneum*. *Development*, 2015, 142(16): 2832–2839. [DOI]
- [69] Drury DW, Dapper AL, Siniard DJ, Zentner GE, Wade MJ. CRISPR/Cas9 gene drives in genetically variable and non-randomly mating wild populations. *Sci Adv*, 2017, 3(5): e1601910. [DOI]
- [70] Evans TA. CRISPR-based gene replacement reveals evolutionarily conserved axon guidance functions of *Drosophila* Robo3 and *Tribolium* Robo2/3. *Evodevo*, 2017, 8: 10. [DOI]
- [71] Li Y, Zhang J, Chen DF, Yang PC, Jiang F, Wang XH, Kang L. CRISPR/Cas9 in locusts: Successful establishment of an olfactory deficiency line by targeting the mutagenesis of an odorant receptor co-receptor (Orco). *Insect Biochem Mol Biol*, 2016, 79: 27–35. [DOI]
- [72] Awata H, Watanabe T, Hamanaka Y, Mito T, Noji S, Mizunami M. Knockout crickets for the study of learning and memory: Dopamine receptor Dop1 mediates aversive but not appetitive reinforcement in crickets. *Sci Rep*, 2015, 5: 15885. [DOI]
- [73] Gao YB, Zhao YD. Self-processing of ribozyme-flanked RNAs into guide RNAs *in vitro* and *in vivo* for CRISPR-mediated genome editing. *J Integrat Plant Biol*, 2014, 56(4): 343–349. [DOI]
- [74] Xu L, Zhao L, Gao Y, Xu J, Han R. Empower multiplex cell and tissue-specific CRISPR-mediated gene manipulation with self-cleaving ribozymes and tRNA. *Nucleic Acids Res*, 2016, 45(5): e28. [DOI]
- [75] Li GL, Zhong GL, Mo JX, Quan R, Wu ZF, Li ZC, Yang HQ, Zhang XW. Advances in site-specific integration of transgene in animal genome. *Hereditas (Beijing)*, 2017, 39(2): 98–109.
- 李国玲, 钟翠丽, 莫健新, 全绒, 吴珍芳, 李紫聪, 杨化强, 张献伟. 动物基因组定点整合转基因技术研究进展. *遗传*, 2017, 39(2): 98–109. [DOI]
- [76] Somers J, Nguyen J, Lumb C, Batterham P, Perry T. *In vivo* functional analysis of the *Drosophila melanogaster* nicotinic acetylcholine receptor Da6 using the insecticide spinosad. *Insect Biochem Mol Biol*, 2015, 64: 116–127. [DOI]
- [77] Maruyama T, Dougan SK, Truttmann MC, Bilate AM, In-

- gram JR, Ploegh HL. Increasing the efficiency of precise genome editing with CRISPR-Cas9 by inhibition of nonhomologous end joining. *Nat Biotechnol*, 2015, 33(5): 538–542. [DOI]
- [78] Mavor LM, Miao H, Zuo ZY, Holly RM, Xie Y, Loerke D, Blankenship JT. Rab8 directs furrow ingression and membrane addition during epithelial formation in *Drosophila melanogaster*. *Development*, 2016, 143(5): 892–903. [DOI]
- [79] Li QY, Scott B, Sumie O, Volkan PC. Examination of endogenous rotund expression and function in developing *Drosophila* olfactory system using CRISPR-Cas9-mediated protein tagging. *G3(Bethesda)*, 2015, 5(12): 2809–2816. [DOI]
- [80] Qi LS, Larson MH, Gilbert LA, Doudna JA, Weissman JS, Arkin AP, Lim WA. Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. *Cell*, 2013, 152(5): 1173–1183. [DOI]
- [81] Ghosh S, Tibbit C, Liu JL. Effective knockdown of *Drosophila* long non-coding RNAs by CRISPR interference. *Nucleic Acids Res*, 2016, 44(9): e84. [DOI]
- [82] Konermann S, Brigham MD, Trevino AE, Joung J, Abudayyeh OO, Barcena C, Hsu PD, Habib N, Gootenberg JS, Nishimasu H, Nureki O, Zhang F. Genome-scale transcriptional activation by an engineered CRISPR-Cas9 complex. *Nature*, 2015, 517(7536): 583–588. [DOI]
- [83] Polstein LR, Gersbach CA. A light-inducible CRISPR-Cas9 system for control of endogenous gene activation. *Nat Chem Biol*, 2015, 11(3): 198–200. [DOI]
- [84] Unckless RL, Messer PW, Connallon T, Clark AG. Modeling the manipulation of natural populations by the mutagenic chain reaction. *Genetics*, 2015, 201(2): 425–431. [DOI]
- [85] Wu B, Luo LQ, Gao XJ. Cas9-triggered chain ablation of cas9 as a gene drive brake. *Nat Biotechnol*, 2016, 34(2): 137–138. [DOI]
- [86] Akbari OS, Bellen HJ, Bier E, Bullock SL, Burt A, Church GM, Cook KR, Duchek P, Edwards OR, Esvelt KM, Gantz VM, Golic KG, Gratz SJ, Harrison MM, Hayes KR, James AA, Kaufman TC, Knoblich J, Malik HS, Matthews KA, O'Connor-Giles KM, Parks AL, Perrimon N, Port F, Russell S, Ueda R, Wildonger J. Safeguarding gene drive experiments in the laboratory. *Science*, 2015, 349(6251): 927–929. [DOI]
- [87] Yan Z, Rajan R, Seifert HS, Mondragón A, Sontheimer EJ. DNase H activity of *Neisseria meningitidis* Cas9. *Molecular Cell*, 2015, 60(2): 242–255. [DOI]
- [88] Fonfara I, Richter H, Bratovič M, Le Rhun A, Charpentier E. The CRISPR-associated DNA-cleaving enzyme Cpf1 also processes precursor CRISPR RNA. *Nature*, 2016, 532(7600): 517–521. [DOI]

(责任编辑: 张博)