

# 基因编辑技术及其在中国的研究发展

陈一欧<sup>1,4,5</sup>, 宝颖<sup>1</sup>, 马华峥<sup>1</sup>, 伊宗裔<sup>1,4,5</sup>, 周卓<sup>1,2,3,6</sup>, 魏文胜<sup>1,2,3,4,6</sup>

1. 北京大学生命科学学院, 北京 100871
2. 北京大学生物医学前沿创新中心, 北京 100871
3. 北京未来基因诊断高精尖创新中心, 北京 100871
4. 北大-清华生命科学联合中心, 北京 100871
5. 北京大学前沿交叉学科研究院, 北京 100871
6. 北京大学基因组编辑研究中心, 北京 100871

**摘要:** 基因编辑技术是一种能够对生物体的基因组及其转录产物进行定点修饰或者修改的技术, 早期基因编辑技术包括归巢内切酶、锌指核酸内切酶和类转录激活因子效应物。近年来, 以 CRISPR/Cas9 系统为代表的新型技术使基因编辑的研究和应用领域得以迅速拓展。本文对基因编辑技术的原理、技术发展及其应用进行了阐述, 对我国在基因编辑机制研究及技术发展、基因编辑动植物模型构建、基因治疗等领域的研究进展进行了回顾, 并对基因技术的发展前景及趋势进行了展望。

**关键词:** 基因编辑; 遗传工程; CRISPR; 基因功能; 疾病模型; 基因治疗

## Gene editing technology and its research progress in China

Yiou Chen<sup>1,4,5</sup>, Ying Bao<sup>1</sup>, Huazheng Ma<sup>1</sup>, Zongyi Yi<sup>1,4,5</sup>, Zhuo Zhou<sup>1,2,3,6</sup>,  
Wensheng Wei<sup>1,2,3,4,6</sup>

1. School of Life Science, Peking University, Beijing 100871, China
2. Biomedical Pioneering Innovation Center, Peking University, Beijing 100871, China
3. Beijing Advanced Innovation Center of Genomics, Beijing 100871, China
4. PKU-Tsinghua Center for Life Sciences, Beijing 100871, China
5. Academy for Advanced Interdisciplinary Studies, Peking University, Beijing 100871, China
6. Peking University Genome Editing Research Center, Beijing 100871, China

**Abstract:** Gene editing is a technology for precision modification of genome sequences or expressing transcripts. Early versions of such techniques include homing endonuclease, zinc finger endonuclease and transcription-like activator effectors. The CRISPR/Cas9 system has recently emerged as a powerful and versatile gene editing tool for a broad spectrum of applications. In this review, we discuss the recent development and applications of gene editing technology, and particularly focus on the progress in China, with the emphasis on mechanistic studies, development of new and extended

收稿日期: 2018-07-10; 修回日期: 2018-09-07

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 31430025)资助[Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 31430025)]

作者简介: 陈一欧, 博士研究生, 专业方向: 生物化学与分子生物学。E-mail: cyo1992@hotmail.com

通讯作者: 魏文胜, 博士, 研究员, 研究方向: 基因编辑。E-mail: wswei@pku.edu.cn

DOI: 10.16288/j.ycz.18-195

网络出版时间: 2018/9/11 15:24:26

URI: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20180911.1523.005.html>

technologies, the applications in animals, plants and the therapeutics.

**Keywords:** gene editing; genetic engineering; CRISPR; gene function; disease model; gene therapy

随着人类基因组计划的完成和高通量测序技术的发展, 人们读取大量序列信息的能力得到飞速提升。“读”取能力的提高进一步激发了人们改写生物体内遗传序列信息的需求, 而近年来发展迅速的基因编辑技术则大幅提高了这种“写”的能力。这种特殊的生物技术能够让研究者对基因组序列或者基因转录产物进行人为编辑, 以改变目的基因或调控元件的序列、表达量或功能。这一革命性技术一经问世就冲击到生命科学的各个研究领域, 必将在未来相当长时间内对人类健康、疾病治疗、新药研发、物种改良以及生命科学基础研究等众多方面产生广泛而深远的影响, 也是世界范围内竞争最为激烈的下一代核心生物技术。本文在介绍基因编辑技术发展的基础上, 对我国在该领域的研究进行了回顾性总结, 并对该领域的前沿研究进展和应用发展进行了综述, 旨在为了解基因编辑技术的发展历程及利用该技术进行深入研究提供理论依据。

## 1 基因编辑技术的发展

早期基因编辑技术包括归巢内切酶(homing endonuclease, HEs)、锌指核酸内切酶(zinc finger endonuclease, ZFN)和类转录激活因子效应物(transcription activator-like effector nucleases, TALENs), 但脱靶效应或组装复杂性限制了这些技术在基因编辑领域中的应用。近年来, 以 CRISPR/Cas9 系统为代表的新型基因编辑技术飞速发展, 并开始在诸多生物学领域中得到广泛应用。

### 1.1 早期基因编辑技术

#### 1.1.1 归巢内切酶

早期的基因编辑技术依赖于细胞内同源重组途径(homologous recombination, HR)将外源 DNA 序列插入基因组<sup>[1]</sup>。通过在外源 DNA 序列两端加入同源臂, 能够实现外源序列的精确整合。然而真核生物中同源重组发生频率极低, 约为  $1/10^6 \sim 1/10^9$ <sup>[2]</sup>; 并

且相对于靶位点而言, 外源序列更容易随机整合到基因组上其他位点, 造成脱靶效应, 从而限制了该技术的应用<sup>[3]</sup>。

研究表明, 利用归巢内切酶在目的位点附近引入双链断裂(double-strand break, DSB)能够激活损伤修复机制参与断裂修复<sup>[4, 5]</sup>, 进而提高基因编辑效率。真核生物中产生 DNA 双链断裂后的修复途径除 HR 外, 主要为非同源末端连接(non-homologous end joining, NHEJ)。与同源介导的修复(homology-directed repair, HDR)相比, NHEJ 发生频率更高, 且直接对断裂位点进行修复而不依赖于模板, 但容易引起 DNA 接口处碱基的插入或缺失, 造成移码突变, 从而导致基因的敲除<sup>[2, 6]</sup>。

#### 1.1.2 ZFNs 和 TALENs 技术

由于归巢内切酶的 DNA 识别和切割功能位于同一结构域, 使其编辑位点受到序列的限制<sup>[7]</sup>, 因此人们把目光转向了锌指核酸内切酶<sup>[8-10]</sup>和类转录激活因子效应物<sup>[11, 12]</sup>。

ZFN 和 TALEN 均为人工构建的工程核酸酶, DNA 结合结构域与 FokI 核酸内切酶的切割结构域分开, 使得人们可以对 DNA 结合结构域进行设计, 改变其对 DNA 序列的识别特异性, 实现对目的位点的精确编辑<sup>[13, 14]</sup>。ZFN 对于 DNA 序列的特异性识别主要依赖于锌指蛋白(zinc finger protein, ZFP), 但 ZFN 设计成本较高, 且序列的上下文依赖效应会降低编辑效率<sup>[15, 16]</sup>。

TALEN 对于 DNA 序列的特异性识别依赖于 TALE 蛋白(transcription activator-like effectors, TALEs)中的 RVDs (repeat variable diresidues)。由于 TALE/TALEN 的模块化和构建的优势, 人工编码 TALE 蛋白比 ZFN 在基因编辑和转录调控中有着更为广泛的应用<sup>[17]</sup>, 如 Yang 等<sup>[18]</sup>首次破解了全部 400 种可能的 RVD 碱基识别偏好性, Zhang 等<sup>[19]</sup>解码了 TALE 蛋白对 DNA 表观修饰 5-甲基胞嘧啶和 5-羟甲基胞嘧啶的特异性识别。当然, ZFN 和 TALEN 技术均

依赖蛋白质对 DNA 序列的特异性识别,组装的复杂性是限制它们在基因编辑中应用的主要障碍。

## 1.2 CRISPR/Cas9 系统

### 1.2.1 CRISPR/Cas9 系统的发现

CRISPR/Cas (clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated proteins)系统是目前应用最为广泛的基因编辑工具。1987 年,日本大阪大学 Nakata 研究组首次在大肠杆菌 *iap* 基因的 3'端侧翼序列中发现了 5 段长为 29nt 的重复回文序列,它们由 32nt 的非重复序列隔开,且这 5 段重复序列不与任何已知的原核生物序列同源<sup>[20]</sup>。2000 年,西班牙阿利坎特大学 Mojica 研究组在多种原核生物中均发现了该类重复序列<sup>[21]</sup>。2002 年,荷兰乌得勒支大学 Jansen 研究组将这种成簇的规律间断短重复序列命名为 CRISPR,将位于 CRISPR 位点侧翼的基因命名为 Cas (Cas 1~Cas 4),并发现其具有与解旋酶和内切酶相似的结构<sup>[22]</sup>,但其作用机制仍未知。随后的一些研究猜测其可能参与细菌的免疫机制<sup>[23, 24]</sup>。2007 年,美国丹尼斯克公司 Horvath 等<sup>[25]</sup>首次通过病毒侵染实验确定了 CRISPR/Cas 在细菌中起到抵抗病毒侵染的功能。

随着研究的深入,科学家们发现了多种 CRISPR/Cas 系统,根据 Cas 蛋白的数量可以分为两类(Class I 和 Class II),根据 Cas 的结构和功能可分为 6 种 (Type I~VI),并可进一步分为多个亚型(Subtype)<sup>[26, 27]</sup>。相比 Class I,Class II 仅需一个 Cas 蛋白,因此目前基因编辑中常用的系统均为 Class II,比如 Cas9,以

及不需要 tracrRNA 的 Cpf1 (Cas12a)<sup>[28]</sup>和具有 RNA 切割活性的 Cas13<sup>[29]</sup>。

### 1.2.2 CRISPR/Cas9 系统的作用机制

经过 20 多年的研究,人们对 CRISPR/Cas 系统的作用机制有了相对清晰的了解。以 CRISPR/Cas9 为例,细菌对外来病毒的入侵分为 3 步:(1) 病毒入侵时,CRISPR/Cas 系统将病毒的 DNA 切成短片段,并插入重复序列之间,作为“记忆”储存<sup>[30~33]</sup>;(2) 同种病毒再次入侵时,CRISPR 阵列及 Cas9 基因转录,Cas9 翻译为蛋白,转录出的 tracrRNA 与 pre-crRNA 互补配对,经过内源核糖核酸酶(RNase)加工成熟,最后形成 Cas9-crRNA-tracrRNA 的三聚体<sup>[34]</sup>;(3) 在 crRNA 与病毒 DNA 互补配对之前,Cas9 需要与特定的 PAM (protospacer adjacent motif)序列结合以区别病毒和自身基因组,Cas 识别并结合 PAM 后将 DNA 双链解旋,crRNA 在 PAM 上游与目标序列互补配对。在 PAM 和靶点序列均匹配时,Cas9 构象发生改变,其双链内切酶的活性被激活,在 PAM 上游的特定位置将病毒的双链 DNA 切断<sup>[35~37]</sup>。

### 1.2.3 CRISPR/Cas9 系统的发展

这种特异性识别并切割 DNA 产生 DSB 的特性十分适合基因编辑工具的要求。2012 年,美国加州大学伯克利分校 Doudna 和 Charpentier 研究组首次在体外证明了 CRISPR/Cas9 特异性切割靶标 DNA 的功能,并将 crRNA-tracrRNA 改造为 sgRNA (single guide RNA)<sup>[38]</sup> (图 1)。2013 年,美国麻省理工学院

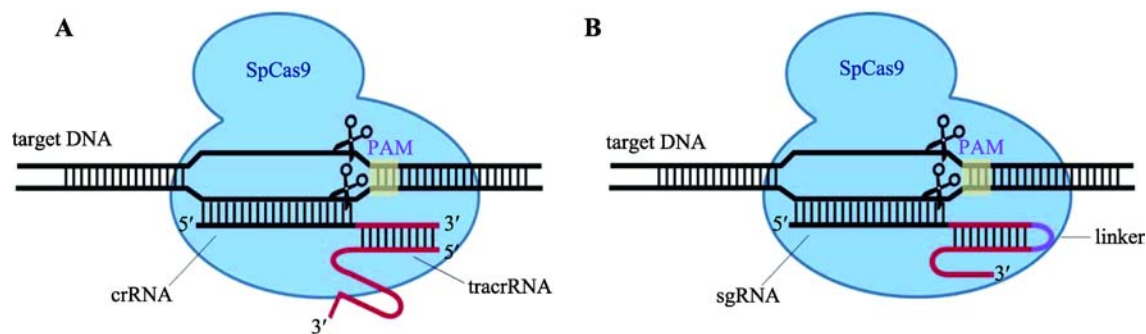


图 1 crRNA-tracrRNA 改造为 sgRNA 示意图

Fig. 1 Transformation of crRNA-tracrRNA into sgRNA

A: 天然化脓性链球菌内的“靶向 DNA-crRNA-tracrRNA-SpCas9”复合体; B: 将 crRNA 和 tracrRNA 改造为 sgRNA 后的模式图。

Feng Zhang 和哈佛大学 George Church 研究组首次在哺乳动物细胞系中利用 CRISPR/Cas9 实现了基因编辑<sup>[39, 40]</sup>。自此, 全球各地的实验室开始投入到这一新型基因编辑工具的研究中。目前 CRISPR/Cas9 系统已应用于多种领域, 如调控体内基因表达<sup>[41]</sup>、构建动物的疾病模型<sup>[42]</sup>、研究各种细胞内基因调控网络<sup>[43]</sup>、基因的高通量筛选<sup>[44~47]</sup>等; 同时, 人们对 CRISPR/Cas 系统进行了深入探索, 细菌中具有种类丰富的 Cas, 不同的 Cas 具有各自的特性, 包括 PAM 序列、蛋白大小以及切割活性, 扩展了 CRISPR/Cas 系统的应用范围<sup>[29, 48]</sup>。除了目前常用的 SpCas9 (来自化脓性链球菌 *Streptococcus pyogenes* 的 Cas9) 和 SaCas9 (来自金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* 的 Cas9), 研究者对野生型 Cas 蛋白进行人工改造, 如 dCas9 (dead Cas9)<sup>[49]</sup> 和 xCas9 (一种 SpCas9 突变体)<sup>[50]</sup> 等, 进一步提高了人们对此系统的操作和应用水平。由于其作用机制灵活、易于操作、种类多样的优点, CRISPR/Cas 的应用和方法学的研究得以迅速发展。

### 1.3 CRISPR/Cpf1 (Cas12a) 系统

Cpf1 与 Cas9 同属第二类 CRISPR 系统, 但在 pre-crRNA 的加工上, Cpf1 系统没有 tracrRNA, 而是由其本身的 RNase 结构域完成整个加工过程<sup>[28]</sup>。加工成熟的 crRNA 与 Cpf1 结合后, 能激活其核酸内切酶的活性以切割靶标 DNA 片段<sup>[51]</sup>。Cpf1 发挥核酸内切酶作用的是 Ruv-C 样核酸内切酶结构域和特有的 Nuc 结构域, 二者分别切割靶标片段的非互补链和互补链<sup>[52]</sup>。Cpf1-crRNA 可在不依赖于 PAM 的情况下切割单链 DNA, 产生特定长度片段和随机小片段<sup>[53, 54]</sup>。

相比 Cas9, Cpf1 系统无需 tracrRNA 且 crRNA 更短, 所以目前其主要应用为多位点基因编辑和大片段的删除。利用 Cpf1 系统则可以在一个质粒上用启动子串联多个 pre-crRNA, 在 Cpf1 的作用下加工出单独的成熟 crRNA<sup>[55]</sup>, 大大缩减了片段合成的长度<sup>[56]</sup>。此外, 由于 Cpf1 能够识别富含 T 碱基片段, 扩充了 CRISPR/Cas 系统基因编辑范围, 包括单碱基编辑<sup>[57]</sup> 和基因表达调控<sup>[58]</sup>。然而, 5'-TTTN-3' 的 PAM 也限制了 Cpf1 的应用空间, 因此研究者们

对 Cpf1 识别 PAM 的结构域进行了改造, 扩大了 PAM 识别范围<sup>[59, 60]</sup>。

## 2 中国在基因编辑领域的研究进展

近年来, 我国科学家在基因编辑领域取得了令人鼓舞的进展, 在基因编辑系统发展、机制研究、构建基因编辑动植物模型和基因治疗等方面取得了突出的成绩。

### 2.1 基因编辑系统机制研究与发展

中国科学院生物物理所王艳丽研究组和哈尔滨工业大学黄志伟研究组对 Cpf1-crRNA 复合物、SpyCas-sgRNA-AcrIIA4 复合物、Cas1-Cas2-DNA 复合物、Cas13a 蛋白、Cas13a-crRNA 复合物以及 CRISPR 系统 Cascade 复合物等进行了结构解析及机制分析<sup>[61~65]</sup>, 为理解基因编辑工作原理及其调控机制提供了重要依据。

中国科学院健康科学研究所常兴研究组利用靶向性胞嘧啶脱氨酶在体内实现了高效、高通量 DNA 碱基编辑新方法; 上海科技大学陈佳研究组发展了一系列基于 CRISPR/Cpf1 的新型碱基编辑器(Cpf1-BE)<sup>[66, 67]</sup>。北京大学魏文胜研究组建立了基于 CRISPR 系统的高通量筛选方法, 并在全基因组范围内实现了对编码基因和非编码基因的功能性筛选<sup>[44, 68]</sup>。

### 2.2 动植物模型构建

2013 年, 中国科学院动物研究所周琪研究组首次利用 CRISPR/Cas9 系统实现了大鼠多基因快速同时敲除<sup>[69]</sup>, 并建立了多种基因编辑动物模型。近期, 中国科学院广州生物医药与健康研究院赖良学研究组利用 CRISPR 技术成功构建了亨廷顿病疾病猪模型<sup>[70]</sup>。

在遗传信息与生理特性上, 食蟹猴、猕猴等灵长类动物与人类具有更高的相似性, 是作为人类疾病研究的理想模型。2016 年, 中山大学中山医学院项鹏、华南农业大学兽医学院杨世华和中国科学院动物研究所周琪研究组在食蟹猴中应用 TALEN 技术实现了 *MCPH1* 基因(最早被鉴定出来的小头症相关基因)突变, 成功获得了人类小头畸形症的疾病模



型猴<sup>[71]</sup>。昆明理工大学季维智等利用基因编辑技术构建了多种灵长类动物疾病模型,如利用 TALEN 技术构建了瑞特综合征食蟹猴模型<sup>[72]</sup>,该成果入选了“2017 年中国生命科学十大进展”。2018 年初, *Cell Research* 杂志连续发表两篇分别来自中国科学院神经科学研究所杨辉和季维智等研究组的论文,报道了世界首例表达荧光蛋白基因敲入的食蟹猴<sup>[73, 74]</sup>。

在植物基因编辑方面,中国科学院遗传与发育生物学研究所高彩霞、中国科学院上海植物逆境生物研究中心朱健康和华南农业大学刘耀光等研究组分别利用 CRISPR-Cas9 系统在拟南芥、水稻、小麦、玉米等多种植物中成功实现了基因编辑,为植物基因研究及农作物遗传改良提供了平台<sup>[75-79]</sup>。

### 2.3 基因治疗

2016 年, *Nature* 杂志报道了中国率先开展的世界首个人类 CRISPR 临床试验。研究者计划将 PD-1 (Programmed cell death protein 1, 一种重要免疫抑制蛋白) 敲除的 T 细胞注射到化疗、放疗和其他治疗均无效的转移性非小细胞肺癌患者体内,以促进机体针对癌细胞的免疫反应<sup>[80]</sup>。中山大学黄军就研究组首次在不能存活的人类三核受精卵中应用 CRISPR/

Cas9 技术对  $\beta$ -地中海贫血症的致病基因进行了基因编辑<sup>[67]</sup>。由于涉及人类胚胎编辑,这项研究在世界范围内引起了广泛讨论,使科学界和全社会对其应用前景和可能涉及的伦理风险产生了关注。

### 2.4 交流平台

为推动我国基因编辑技术研发及其在生命科学基础研究、农业畜牧业育种以及基因治疗等医学领域的应用,防范其可能带来的生物安全风险和伦理争议,提升我国在基因编辑相关科学前沿、重大应用及下游产业化等领域的国际竞争力,2016 年 6 月,国家科技部发起召开了“香山科学会议—基因编辑技术的研究与应用”,针对我国基因编辑研究现状和所面临的机遇和挑战进行了探讨。2017 年 9 月,中国首个基因组编辑学术团体—中国遗传学会基因组编辑分会在北京成立,中国遗传学会名誉理事长李家洋担任大会主席(图 2),该学会的成立为从事基因编辑研究的学者提供了良好的学术交流平台。2018 年 4 月,第一届基因编辑技术方向的冷泉港国际会议:“冷泉港亚洲会议—基因组编辑全面讨论”于苏州召开,来自世界各地的科学家就基因编辑的最新研究进展开展了广泛而深入的讨论。



图 2 李家洋在中国遗传学会基因组编辑分会成立大会上发言

Fig. 2 Jiayang Li spoke at the inaugural meeting of the genome editing branch of the genetics society of China

图片转载自中国遗传学会网站 [http://www.gsc.ac.cn/zhxw/201710/t20171012\\_384673.html](http://www.gsc.ac.cn/zhxw/201710/t20171012_384673.html).

### 3 基因编辑技术最新研究进展

随着 CRISPR/Cas 系统的发现, 新一代基因编辑技术在全世界范围引起了研究者的广泛关注。研究者们对 CRISPR/Cas 系统进行了深入研究, 包括对 CRISPR/Cas9 系统进行优化、拓展 CRISPR/Cas 系统应用范围、开发 RNA 编辑系统和利用 CRISPR/Cas 系统进行高通量筛选。

#### 3.1 CRISPR/Cas9 系统的优化

对 CRISPR/Cas9 系统的优化包括探索未知的 CRISPR 家族蛋白外以及对已知的 Cas 蛋白进行改造。针对大家较为熟知的 Cas9 蛋白, 改造主要包括以下 3 个方面。

##### 3.1.1 减少 Cas9 蛋白体积, 使其更易于通过病毒载体系统进行体内表达

目前最常用的 SpCas9 和 SaCas9 蛋白分别由 1368 和 1053 个氨基酸组成, 研究者在 2017 年发现了已知体积最小的 Cas9 蛋白, CjCas9, 仅有 984 个氨基酸<sup>[81]</sup>, 而对已发现的 Cas9 蛋白的体积减少尚无有效的方法。

##### 3.1.2 减少 Cas9 蛋白脱靶效应, 提高专一性和保真度

在检测 Cas9 蛋白脱靶效应的研究中, 研究者通过对 Cas9 蛋白在全基因组造成的 DSB 进行分析来确定其脱靶位点, 如 GUIDE-seq<sup>[82]</sup>和 Digenome-Seq<sup>[83]</sup>分析等。每种分析方法各有利弊, 目前对于确定 Cas9 造成的基因组 DSB 位点仍具有挑战。

在减少 Cas9 蛋白脱靶效应方面, 研究者通过对 SpCas9 蛋白部分位点进行突变降低了其脱靶效应<sup>[84, 85]</sup>。如将 SpCas9 的 Asn 497、Arg 661、Gln 695、Gln 926 氨基酸突变为 Ala, 得到 SpCas9-HF, 研究人员通过 GUIDE-seq 方法对整个基因组进行脱靶分析, 发现与 SpCas9 相比, SpCas9-HF 的脱靶显著减少<sup>[85]</sup>。另一方面, Cas9 蛋白具有多个负责不同功能的结构域, 研究人员针对 SpCas9 的 REC3 结构域(负责识别 sgRNA 和靶向序列形成的互补链并控制 HNH 核酸酶以调节总体催化能力)进行突变也获得

了更高特异性的 HypaCas9<sup>[86]</sup>。部分研究表明通过结构导向的设计来优化 Cas9 也能增强其特异性<sup>[84]</sup>。

除了针对 Cas9 蛋白本身进行优化外, 有研究表明降低 Cas9 在体内活化的时间也可以降低其脱靶效应, 如直接向细胞内递送 sgRNA 和 Cas9 蛋白的核糖核苷酸蛋白(RNP)复合物, 或将 Cas9 蛋白拆分为两部分再利用小分子诱导使之在细胞内重新结合成完整的 Cas9 蛋白<sup>[87, 88]</sup>。

##### 3.1.3 增加 Cas9 蛋白的靶向范围, 即拓展 PAM 识别范围

研究者利用筛选或蛋白质进化的手段获得了具有较普遍 PAM 的 SaCas9 和 SpCas9 的变体<sup>[50, 89, 90]</sup>, 如 Johnny 等<sup>[50]</sup>通过对 SpCas9 进行突变体筛选得到了可以广泛增加靶向范围的 xCas9, 其不仅可以识别传统的 PAM 序列, 还可以识别 NG、GAA 和 GAT, 大大增加了 Cas9 的靶向范围。除上述手段外, 也有研究者从蛋白质结构的角度优化 FnCas9 (Francisella novicida Cas9)从而改变其 PAM 序列<sup>[91]</sup>。

#### 3.2 拓展 CRISPR/Cas 系统的应用范围

除了对目标基因进行切割编辑, CRISPR/Cas 系统还被用于其他方面。通过 dCas9 融合或招募其他酶或者蛋白, 即可利用 dCas9 定位靶向 DNA 序列的特性将酶或蛋白带到靶向区域, 从而进行基因的单碱基编辑、基因表达的激活与抑制、特定定位点的表观遗传、特定定位点的成像和染色体三维结构等研究<sup>[92]</sup>。下面以基因的单碱基编辑和基因表达激活与抑制为例进行介绍。

##### 3.2.1 碱基编辑系统

Komor 等<sup>[93]</sup>最近报道将 nCas9 (nickase Cas9)与 APOBEC1 脱氨酶和尿嘧啶糖基酶抑制蛋白(uracil glycosylase inhibitor, UGI)融合, 可在靶位点有效地将胞嘧啶(C)转化为胸腺嘧啶(T), 这个过程不会引起双链 DNA 断裂。另外, 通过将 RNA 腺苷脱氨酶进行蛋白质功能进化使之可以使其识别 DNA 底物, 再将其融合至 nCas9 可以实现靶位点的腺嘌呤(A)到鸟嘌呤(G)的转化<sup>[94]</sup>。这些单位点的碱基编辑技术极大的拓展了基因编辑的应用范围, 实现了对基因的定

点编辑。除了 APOBEC1 蛋白外,激活诱导腺苷脱氨酶(AID)也可以被融合到 dCas9 后实现定点的碱基编辑。值得注意的是,在复合物中没有 UGI 的情况下,dCas9-AID 复合物可作为一种强大的局部诱变剂,成为功能获得性筛选的新工具<sup>[66, 95, 96]</sup>。

### 3.2.2 CRISPR 介导的基因表达调控

在基因表达调控方面,CRISPR 系统也有广泛的应用前景。dCas9 与 DNA 有很强的结合能力,因此会阻止其他 DNA 蛋白与 DNA 结合从而对基因的表达造成影响<sup>[97]</sup>。将转录抑制复合物如 KRAB 与 dCas9 融合会抑制该位点附近基因的表达,即形成 CRISPRi (CRISPR interference)系统<sup>[98]</sup>。与之相反,将单纯疱疹病毒 16-氨基酸长反式激活结构域(VP16)的 4 个串联拷贝组成的 VP64 与 dCas9 融合会介导基因表达的上调,即形成 CRISPRa (CRISPR activation)系统<sup>[99]</sup>。利用上述两套 CRISPR 介导基因表达调控的方法,研究者可以对感兴趣的基因进行功能研究,或者在全基因组范围内进行基因功能筛选。

## 3.3 RNA 编辑系统

除了针对 DNA 进行基因编辑,CRISPR 蛋白家族中的 Cas13 可以利用 gRNA (guide RNA)靶向 RNA。目前已经发现 Cas13a (也被称为 C2c2)<sup>[100]</sup>、Cas13b<sup>[101]</sup>、Cas13c<sup>[102]</sup>和 Cas13d<sup>[103]</sup>;这 4 种蛋白都具有该功能。上述蛋白由于具有 RNA 结合特性,从而被发展成为核糖核酸的检测器<sup>[104]</sup>。在将 Cas13 蛋白连接作用于 RNA 腺嘌呤脱氨酶后,通过对 gRNA 的优化即可针对 RNA 上特定位点的腺嘌呤进行脱氨,从而使腺嘌呤转化为次黄嘌呤(Inosine, I),生物体内的翻译系统会将 I 识别为鸟嘌呤,实现腺嘌呤到鸟嘌呤的转变,但目前该技术仍存在脱靶较严重的问题<sup>[29]</sup>。虽然这项技术仅限于腺嘌呤到鸟嘌呤的转变,但是将 Cas13 蛋白融合其他脱氨酶或者表观修饰酶后可以大大拓展该技术在 RNA 编辑、调控中的应用范围。

## 3.4 利用 CRISPR/Cas9 系统进行高通量筛选

遗传分析的重要目的之一即鉴别引起生物特定表型的基因。其对应的基因筛选方法包括反向(假设法)和正向遗传筛选。反向遗传筛选利用已知研究结

果来检测特定基因变异的表型。而正向遗传筛选通过“表型到基因型”的研究方法大范围修饰或调节基因的表达,从而筛选出产生特殊表型的细胞或生物体,进而分析其对应的基因突变,是发现和注释功能性遗传元件的有力工具<sup>[105]</sup>。

通过基因编辑技术在细胞、组织或动物模型水平删除、插入以及改造 DNA 序列,能够帮助研究者进一步研究基因或调控原件在生物中的功能和机制。目前,CRISPR/Cas9 系统已经用于大规模构建基因敲除文库,并可在人类全基因组水平上进行大规模基因或调控原件的筛选及相关研究<sup>[44, 45, 106~109]</sup>。

在哺乳动物细胞中,CRISPR/Cas9 文库筛选是通过一系列步骤进行的,包括 gRNA 库的构建、慢病毒转导、细胞筛选和数据分析等。针对蛋白质编码基因,最常见的 CRISPR 筛选为直接利用 Cas9 对靶基因进行敲除从而对细胞的表型进行筛选。这类筛选主要用于功能丧失型的筛选<sup>[44~46, 110]</sup>。针对非编码基因,由于单纯的通过 Cas9 蛋白破坏其结构并不能造成其功能的完全缺失,因此对非编码基因的筛选较蛋白质编码基因的筛选更困难。对于 lncRNA (long non-coding RNA)筛选,通过配对 gRNA 即 pgRNA (paired-gRNA)对 lncRNA 进行大片的敲除也是 lncRNA 筛选的手段之一,如 Zhu 等<sup>[68]</sup>利用该方法筛选出 51 个对癌症细胞生长起到促进或者抑制作用的 lncRNA。

近期,Han 等<sup>[107]</sup>开发了能够与 21 321 个药物靶基因组合的包含了 490 000 对 gRNA 的配对 RNA 文库,并在 K562 细胞中鉴定了几种发挥协同作用的药物组合。Najam 等<sup>[108]</sup>使用两种正交的 Cas9 酶,即 SaCas9 和 SpCas9,进行正交组合遗传筛选,并通过该方法对基因之间的相互作用进行了大规模分析。

除此之外,CRISPRa 和 CRISPRi 也是非常有效的工具。如 Joung 等<sup>[109]</sup>利用 CRISPRa 对编码基因附近的 lncRNA 进行筛选;Liu 等<sup>[106]</sup>利用 CRISPRi 针对 7 种不同细胞系中的 16 401 个 lncRNA 位点进行筛选,发现 lncRNA 具有很高的细胞特异性。

## 4 基因编辑技术的应用

基因编辑技术在基因功能研究、药物开发、疾



病治疗和作物育种等方面有着重要意义和广阔的应用前景。如前文所述, 基因编辑技术可以在全基因组范围进行基因功能研究, 除此之外, 该技术也被广泛应用于生物治疗以及药物研究等领域。

#### 4.1 疾病模型构建

很多疾病的致病机制十分复杂, 比如癌症, 通常涉及多种抑癌基因或致癌基因的遗传改变。因此构建适合的疾病模型对探索疾病的发生和进展以及抗癌药物的筛选有着重要的意义。对于已知致病基因的疾病, 研究人员可以运用 CRISPR/Cas9 等基因编辑技术, 构建对应的基因突变动物或细胞模型, 从而进一步进行药物或其他治疗方式的研究。对于功能未知或者部分未知的基因, 研究人员可以通过构建疾病模型从而进一步明确疾病与基因之间的关系。

研究人员应用基因编辑技术, 已经实现了多种疾病的体内和体外疾病模型的构建。目前, 科学家们在鼠科动物上实现了多种疾病模型的构建, 如利用 CRISPR 技术靶向 *Pten* 和 *p53* (两种抑癌基因) 构造的肝癌模型<sup>[111]</sup>以及诱导 *CD74-ROS1*, *EML4-ALK* 和 *KIF5B-RET* 融合导致的肺癌模型等<sup>[112]</sup>。对于一些由多基因突变导致的人类复杂疾病, CRISPR/Cas9 技术可以同时进行多基因编辑, 如 Zuckermann 等<sup>[113]</sup>通过在小鼠大脑中单基因敲除(*Ptch1*)和多基因敲除(*Trp53*, *Pten*, *Nf1*), 成功构建了成神经管细胞瘤和胶质细胞瘤疾病模型。此外, 研究人员还应用 CRISPR/Cas9 技术在小鼠中构建了心肌病和心力衰竭模型<sup>[114]</sup>。Paquet 等<sup>[115]</sup>利用 CRISPR/Cas9 技术将特定点突变引入人诱导多能干细胞中, 实现了基因单拷贝和多拷贝编辑, 从而得到携带阿尔茨海默病相关突变的细胞。

#### 4.2 基因诊断与核酸检测

CRISPR 系统具有用一条 sgRNA 靶向 DNA 或者 RNA 的特性, 利用该特点研究者开发了一系列的工具用于检测样品中是否存在某种特定的核酸, 从而实现即时检测病原体、基因分型和疾病监测等功能。以 SHERLOCK (specific high-sensitivity enzymatic reporter unlocking) 系统为例, Cas13 蛋白识别目标

RNA 后会被激活从而切割其周围 RNA, 利用这个特性, 可对特定病原体的核酸进行检测。目前该系统已成功用于寨卡病毒和登革热病毒不同菌株的检测, 具有灵敏度高、便利廉价的优势<sup>[116]</sup>。除了针对 RNA, 研究者还利用 Cas12a 和 Csm6 等蛋白, 开发了升级版的 SHERLOCK 系统<sup>[104]</sup>, 可以检测出肺癌患者血液样本中的游离肿瘤 DNA, 并能够在单一反应中同时检测寨卡病毒和登革热病毒。

#### 4.3 靶向基因治疗

广义上的基因治疗是指在 DNA 水平上, 通过特定的技术手段用正常的基因来替换或者补偿致病基因突变, 从而达到治疗目的。常用的基因治疗方法包括用非病毒载体方法、慢病毒载体或腺病毒载体向体内注射正常基因, 或者利用近几年崛起的基因编辑技术纠正致病突变等<sup>[117]</sup>。

传统的基因治疗手段可将正常基因导入细胞, 但致病突变依然存在, 不能从根本上治愈疾病。而基因编辑技术可以对基因进行精准编辑, 从而修复或修饰内源致病突变<sup>[117-119]</sup>。因此, 以 CRISPR/Cas9 系统为代表的基因编辑技术在临床治疗上具有广阔的应用前景。

目前, 国内外已经发表了数篇应用基因编辑技术在模式动物中纠正遗传疾病致病基因的报道<sup>[120]</sup>。2014 年, Yin 等<sup>[121]</sup>首次应用 CRISPR/Cas9 技术实现了体内致病基因编辑。研究人员将 CRISPR/Cas9 系统注射到患有类型酪氨酸血症(一种致死遗传病)的疾病模型小鼠肝脏中, 纠正了致病基因 *Fah* 的突变, 并回复了小鼠体重减轻等疾病表型。Dever 等<sup>[122]</sup>利用 CRISPR/Cas9 技术修复了人体造血干细胞中导致镰刀型细胞贫血症的基因  $\beta$ -globin, 并成功注射到小鼠体内, 改造的造血干细胞在小鼠体内 16 周后仍保持正常分化。同年, *Science* 报道了研究人员通过 CRISPR/Cas9 技术恢复了患杜氏肌营养不良症 (Duchenne muscular dystrophy, DMD) 小鼠的肌肉功能<sup>[123-125]</sup>。2018 年初, 研究者应用 CRISPR/Cas9 技术成功修复了小鼠致聋基因 *TMC1* 突变<sup>[126]</sup>。Hawthornth 等<sup>[127]</sup>利用 CRISPR/Cas9 技术在人类成体红细胞系中实现了 5 个血型相关基因的同时敲除, 增强其输血相容性, 为长期输血的患者的同种免疫以



及稀有血型输血时难以匹配血型的难题带来了新的解决方法。

#### 4.4 动植物物品系培育

应用 CRISPR/Cas9 等技术在农作物或动物基因中进行基因编辑,与传统杂交等育种方法相比,可以精确、快速培育出新品种<sup>[128]</sup>。在植物育种方面,研究者利用基因编辑技术可以加速作物培育过程或获得利于其生长的抗性<sup>[129]</sup>。如在水稻中对 *OsEPSPS* 基因(编码与草甘膦具亲和能力的 5-烯醇式丙酮酰-莽草酸-3-磷酸合成酶)进行定点替换,可获得抗草甘膦除草剂的表型<sup>[130]</sup>,以及通过基因敲除、改造启动子等方法加速水稻培育过程、获得抗旱和抗其他类型除草剂的农作物品种等<sup>[131~134]</sup>。

在动物物品系培养方面,研究者同样可以通过基因编辑技术得到具有优良性状的猪、牛、羊等家畜<sup>[135~140]</sup>。如研究者利用 ZFNs<sup>[140]</sup>和 CRISPR/Cas9<sup>[141]</sup>技术通过 *MSTN* 基因敲除获得了高瘦肉率转基因猪。在疾病防治方面,Whitworth 等<sup>[142]</sup>利用 CRISPR/Cas9 技术得到的 *CD163* (清道夫受体,参与机体免疫过程)敲除猪可以对猪繁殖与呼吸综合征 (PRRS) 病毒耐受。

## 5 基因编辑技术展望

CRISPR/Cas 系统作为近几年来发展起来的新一代基因编辑技术,自问世以来就获得了极大的关注。由于可以精确改变内源致病基因,基因编辑技术有望从根本上治愈某些遗传疾病;通过基因编辑技术得到的新品种中不引入外源基因,可以使作物改良的过程更加迅速和安全。基因编辑技术在临床上的应用已经在世界范围得到重视,如美国国立卫生研究院(NIH)于 2018 年年初宣布,将启动 1.9 亿美元用于体细胞基因编辑研究计划。基因编辑技术正逐步改变生命科学和医学研究的面貌。

虽然研究者们利用 CRISPR/Cas 系统开发了很多强有力的基因编辑工具,但是这些工具仍存着一些问题。首先是递送方式的问题,由于 AAV 病毒(adeno-associated virus)递送至细胞的 DNA 片段容量有限,而 Cas 蛋白过大,因此有必要寻找一个新的

较小的 Cas 蛋白或者人工改造生成较小的 Cas 蛋白。其次,Cas9 蛋白本身及最新开发的碱基编辑技术仍存在脱靶效应,因此开发精准的基因编辑技术十分重要。最后,由于 Cas9 蛋白是细菌来源的蛋白,近期有报道称大部分人可能存在对 Cas9 蛋白的适应性免疫反应。因此,上述技术距离临床应用还有很长的路要走。

同时,基因编辑技术的应用上也存在着一些亟待解决的问题。如在靶向基因治疗中,目前该技术应用于人体的案例还鲜有报道,并且追踪时间有限,安全性评估信息不够全面;在靶向基因治疗技术广泛应用于人类之前,科学家们还需要在更多的动物上进行安全性和有效性测试;基因编辑技术的效率和精准性还需要进一步的提高,确保避免脱靶效应可能带来的副作用;在胚胎中进行基因编辑仍面临着伦理方面的争议,在单细胞阶段进行基因编辑还存在遗传嵌合等问题,因此,相应的政策法规还需要进一步完善。

随着研究者的不断深入探索,基因编辑技术正在逐步发展成熟,具有极大的研究潜力和广阔的应用前景。相信在不久的将来,基因编辑技术会在人类生产和临床疾病治疗中发挥其无可替代的价值。

## 参考文献(References):

- [1] Rudin N, Haber JE. Efficient repair of HO-induced chromosomal breaks in *Saccharomyces cerevisiae* by recombination between flanking homologous sequences. *Mol Cell Biol*, 1988, 8(9): 3918–3928. [DOI]
- [2] Capecchi MR. Altering the genome by homologous recombination. *Science*, 1989, 244(4910): 1288–1292. [DOI]
- [3] Lin FL, Sperle K, Sternberg N. Recombination in mouse L-cells between DNA introduced into cells and homologous chromosomal sequences. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1985, 82(5): 1391–1395. [DOI]
- [4] Jasin M. Genetic manipulation of genomes with rare-cutting endonucleases. *Trends Genet*, 1996, 12(6): 224–228. [DOI]
- [5] Belfort M, Roberts RJ. Homing endonucleases: keeping the house in order. *Nucleic Acids Res*, 1997, 25(17): 3379–3388. [DOI]
- [6] Jeggo PA. DNA breakage and repair. *Adv Genet*, 1998,

- 38: 185–218. [DOI]
- [7] Smith J, Grizot S, Arnould S, Duclert A, Epinat JC, Chames P, Prieto J, Redondo P, Blanco FJ, Bravo J, Montoya G, Paques F, Duchateau P. A combinatorial approach to create artificial homing endonucleases cleaving chosen sequences. *Nucleic Acids Research*, 2006, 34(22): e149. [DOI]
- [8] Urnov FD, Miller JC, Lee YL, Beausejour CM, Rock JM, Augustus S, Jamieson AC, Porteus MH, Gregory PD, Holmes MC. Highly efficient endogenous human gene correction using designed zinc-finger nucleases. *Nature*, 2005, 435(7042): 646–651. [DOI]
- [9] Kim YG, Cha J, Chandrasegaran S. Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to FokI cleavage domain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996, 93(3): 1156–1160. [DOI]
- [10] Urnov FD, Rebar EJ, Holmes MC, Zhang HS, Gregory PD. Genome editing with engineered zinc finger nucleases. *Nat Rev Genet*, 2010, 11(9): 636–646. [DOI]
- [11] Li T, Huang S, Jiang WZ, Wright D, Spalding MH, Weeks DP, Yang B. TAL nucleases (TALNs): hybrid proteins composed of TAL effectors and FokI DNA-cleavage domain. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39(1): 359–372. [DOI]
- [12] Li T, Huang S, Zhao X, Wright DA, Carpenter S, Spalding MH, Weeks DP, Yang B. Modularly assembled designer TAL effector nucleases for targeted gene knockout and gene replacement in eukaryotes. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39(14): 6315–6325. [DOI]
- [13] Christian M, Cermak T, Doyle EL, Schmidt C, Zhang F, Hummel A, Bogdanove AJ, Voytas DF. Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. *Genetics*, 2010, 186(2): 757–761. [DOI]
- [14] Miller JC, Tan S, Qiao G, Barlow KA, Wang J, Xia DF, Meng X, Paschon DE, Leung E, Hinkley SJ, Dulay GP, Hua KL, Ankoudinova I, Cost GJ, Urnov FD, Zhang HS, Holmes MC, Zhang L, Gregory PD, Rebar EJ. A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. *Nat Biotechnol*, 2011, 29(2): 143–148. [DOI]
- [15] Wolfe SA, Nekudova L, Pabo CO. DNA recognition by Cys2His2 zinc finger proteins. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 2000, 29: 183–212. [DOI]
- [16] Reyon D, Tsai SQ, Khayter C, Foden JA, Sander JD, Joung JK. FLASH assembly of TALENs for high-throughput genome editing. *Nat Biotechnol*, 2012, 30(5): 460–465. [DOI]
- [17] Boettcher M, McManus MT. Choosing the right tool for the job: RNAi, TALEN, or CRISPR. *Mol Cell*, 2015, 58(4): 575–585. [DOI]
- [18] Yang J, Zhang Y, Yuan P, Zhou Y, Cai C, Ren Q, Wen D, Chu C, Qi H, Wei W. Complete decoding of TAL effectors for DNA recognition. *Cell Res*, 2014, 24(5): 628–631. [DOI]
- [19] Zhang Y, Liu L, Guo S, Song J, Zhu C, Yue Z, Wei W, Yi C. Deciphering TAL effectors for 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine recognition. *Nat Commun*, 2017, 8(1): 901. [DOI]
- [20] Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, Amemura M, Nakata A. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J Bacteriol*, 1987, 169(12): 5429–5433. [DOI]
- [21] Mojica FJ, Diez-Villasenor C, Soria E, Juez G. Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria. *Mol Microbiol*, 2000, 36(1): 244–246. [DOI]
- [22] Jansen R, Van Embden JDA, Gaastra W, Schouls LM. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Mol Microbiol*, 2002, 43(6): 1565–1575. [DOI]
- [23] Bolotin A, Quinquis B, Sorokin A, Ehrlich SD. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology*, 2005, 151(Pt 8): 2551–2561. [DOI]
- [24] Makarova KS, Grishin NV, Shabalina SA, Wolf YI, Koonin EV. A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action. *Biol Direct*, 2006, 1: 7. [DOI]
- [25] Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, Boyaval P, Moineau S, Romero DA, Horvath P. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*, 2007, 315(5819): 1709–1712. [DOI]
- [26] Makarova KS, Wolf YI, Alkhnbashi OS, Costa F, Shah SA, Saunders SJ, Barrangou R, Brouns SJ, Charpentier E, Haft DH, Horvath P, Moineau S, Mojica FJ, Terns RM, Terns MP, White MF, Yakunin AF, Garrett RA, Van Der Oost J, Backofen R, Koonin EV. An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol*, 2015, 13(11): 722–736. [DOI]
- [27] Shmakov S, Abudayyeh OO, Makarova KS, Wolf YI, Gootenberg JS, Semenova E, Minakhin L, Joung J, Konermann S, Severinov K, Zhang F, Koonin EV. Discovery and functional characterization of diverse

- Class 2 CRISPR-Cas systems. *Mol Cell*, 2015, 60(3): 385–397. [DOI]
- [28] Zetsche B, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Slaymaker IM, Makarova KS, Essletzbichler P, Volz SE, Joung J, Van Der Oost J, Regev A, Koonin EV, Zhang F. Cpf1 is a single rna-guided endonuclease of a Class 2 CRISPR-Cas system. *Cell*, 2015, 163(3): 759–771. [DOI]
- [29] Cox DBT, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Franklin B, Kellner MJ, Joung J, Zhang F. RNA editing with CRISPR-Cas13. *Science*, 2017, 358(6366): 1019–1027. [DOI]
- [30] Wright AV, Liu JJ, Knott GJ, Doxzen KW, Nogales E, Doudna JA. Structures of the CRISPR genome integration complex. *Science*, 2017, 357(6356): 1113. [DOI]
- [31] Kieper SN, Almendros C, Behler J, McKenzie RE, Nobrega FL, Haagsma AC, Vink JNA, Hess WR, Brouns SJJ. Cas4 Facilitates PAM-Compatible Spacer Selection during CRISPR adaptation. *Cell Rep*, 2018, 22(13): 3377–3384. [DOI]
- [32] Yosef I, Goren MG, Qimron U. Proteins and DNA elements essential for the CRISPR adaptation process in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40(12): 5569–5576. [DOI]
- [33] Heler R, Samai P, Modell JW, Weiner C, Goldberg GW, Bikard D, Marraffini LA. Cas9 specifies functional viral targets during CRISPR-Cas adaptation. *Nature*, 2015, 519(7542): 199–202. [DOI]
- [34] 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]
- [35] Barrangou R, Marraffini LA. CRISPR-Cas systems: Prokaryotes upgrade to adaptive immunity. *Mol Cell*, 2014, 54(2): 234–244. [DOI]
- [36] Sternberg SH, Redding S, Jinek M, Greene EC, Doudna JA. DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9. *Nature*, 2014, 507(7490): 62–67. [DOI]
- [37] Nishimasu H, Ran FA, Hsu PD, Konermann S, Shehata SI, Dohmae N, Ishitani R, Zhang F, Nureki O. Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA. *Cell*, 2014, 156(5): 935–949. [DOI]
- [38] 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]
- [39] 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]
- [40] Mali P, Yang L, 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]
- [41] Gilbert LA, Horlbeck MA, Adamson B, Villalta JE, Chen Y, Whitehead EH, Guimaraes C, Panning B, Ploegh HL, Bassik MC, Qi LS, Kampmann M, Weissman JS. Genome-scale CRISPR-mediated control of gene repression and activation. *Cell*, 2014, 159(3): 647–661. [DOI]
- [42] Wang H, Yang H, Shivalila CS, Dawlaty MM, Cheng AW, Zhang F, Jaenisch R. One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell*, 2013, 153(4): 910–918. [DOI]
- [43] Parnas O, Jovanovic M, Eisenhaure TM, Herbst RH, Dixit A, Ye CJ, Przybylski D, Platt RJ, Tirosh I, Sanjana NE, Shalem O, Satija R, Raychowdhury R, Mertins P, Carr SA, Zhang F, Hacohen N, Regev A. A genome-wide CRISPR screen in primary immune cells to dissect regulatory networks. *Cell*, 2015, 162(3): 675–686. [DOI]
- [44] Zhou Y, Zhu S, Cai C, Yuan P, Li C, Huang Y, Wei W. High-throughput screening of a CRISPR/Cas9 library for functional genomics in human cells. *Nature*, 2014, 509(7501): 487–491. [DOI]
- [45] Shalem O, Sanjana NE, Hartenian E, Shi X, Scott DA, Mikkelsen T, Heckl D, Ebert BL, Root DE, Doench JG, Zhang F. Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells. *Science*, 2014, 343(6166): 84–87. [DOI]
- [46] Koike-Yusa H, Li Y, Tan EP, Velasco-Herrera Mdel C, Yusa K. Genome-wide recessive genetic screening in mammalian cells with a lentiviral CRISPR-guide RNA library. *Nat Biotechnol*, 2014, 32(3): 267–273. [DOI]
- [47] Wang T, Wei JJ, Sabatini DM, Lander ES. Genetic screens in human cells using the CRISPR-Cas9 system. *Science*, 2014, 343(6166): 80–84. [DOI]
- [48] Chen JS, Ma E, Harrington LB, Da Costa M, Tian X, Palefsky JM, Doudna JA. CRISPR-Cas12a target binding unleashes indiscriminate single-stranded DNase activity. *Science*, 2018, 360(6387): 436–439. [DOI]
- [49] 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]

- [50] Hu JH, Miller SM, Geurts MH, Tang W, Chen L, Sun N, Zeina CM, Gao X, Rees HA, Lin Z, Liu DR. Evolved Cas9 variants with broad PAM compatibility and high DNA specificity. *Nature*, 2018, 556(7699): 57–63. [\[DOI\]](#)
- [51] Fonfara I, Richter H, Bratovic M, Le Rhun A, Charpentier E. The CRISPR-associated DNA-cleaving enzyme Cpf1 also processes precursor CRISPR RNA. *Nature*, 2016, 532(7600): 517–521. [\[DOI\]](#)
- [52] Yamano T, Nishimasu H, Zetsche B, Hirano H, Slaymaker IM, Li YQ, Fedorova I, Nakane T, Makarova KS, Koonin EV, Ishitani R, Zhang F, Nureki O. Crystal structure of Cpf1 in complex with guide RNA and target DNA. *Cell*, 2016, 165(4): 949–962. [\[DOI\]](#)
- [53] Chen JS, Ma EB, Harrington LB, Da Costa M, Tian XR, Palefsky JM, Doudna JA. CRISPR-Cas12a target binding unleashes indiscriminate single-stranded DNase activity. *Science*, 2018, 360(6387): 436–439. [\[DOI\]](#)
- [54] Li SY, Cheng QX, Liu JK, Nie XQ, Zhao GP, Wang J. CRISPR-Cas12a has both *cis*- and *trans*-cleavage activities on single-stranded DNA. *Cell Res*, 2018, 28(4): 491–493. [\[DOI\]](#)
- [55] Zetsche B, Heidenreich M, Mohanraju P, Fedorova I, Kneppers J, Degennaro EM, Winblad N, Choudhury SR, Abudayyeh O, Gootenberg JS, Wu WY, Scott DA, Severinov K, Van Der Oost J, Zhang F. Multiplex gene editing by CRISPR-Cpf1 using a single crRNA array. *Nat Biotechnol*, 2017, 35(1): 31–34. [\[DOI\]](#)
- [56] Wang MG, Mao YF, Lu YM, Tao XP, Zhu JK. Multiplex gene editing in rice using the CRISPR-Cpf1 system. *Mol Plant*, 2017, 10(7): 1011–1013. [\[DOI\]](#)
- [57] Li XS, Wang Y, Liu YJ, Yang B, Wang X, Wei J, Lu ZY, Zhang YX, Wu J, Huang XX, Yang L, Chen J. Base editing with a Cpf1-cytidine deaminase fusion. *Nat Biotechnol*, 2018, 36(4): 324–327. [\[DOI\]](#)
- [58] Tak YE, Kleinstiver BP, Nunez JK, Hsu JY, Horng JE, Gong JY, Weissman JS, Joung JK. Inducible and multiplex gene regulation using CRISPR-Cpf1-based transcription factors. *Nat Methods*, 2017, 14(12): 1163–1166. [\[DOI\]](#)
- [59] Gao LY, Cox DBT, Yan WX, Manteiga JC, Schneider MW, Yamano T, Nishimasu H, Nureki O, Crosetto N, Zhang F. Engineered Cpf1 variants with altered PAM specificities. *Nat Biotechnol*, 2017, 35(8): 789–792. [\[DOI\]](#)
- [60] Li SY, Zhang X, Wang WS, Guo XP, Wu ZC, Du WM, Zhao YD, Xia LQ. Expanding the scope of CRISPR/Cpf1-mediated genome editing in rice. *Mol Plant*, 2018, 11(7): 995–998. [\[DOI\]](#)
- [61] Dong, Guo M, Wang S, Zhu Y, Wang S, Xiong Z, Yang J, Xu Z, Huang Z. Structural basis of CRISPR-SpyCas9 inhibition by an anti-CRISPR protein. *Nature*, 2017, 546(7658): 436–439. [\[DOI\]](#)
- [62] Dong D, Ren K, Qiu X, Zheng J, Guo M, Guan X, Liu H, Li N, Zhang B, Yang D, Ma C, Wang S, Wu D, Ma Y, Fan S, Wang J, Gao N, Huang Z. The crystal structure of Cpf1 in complex with CRISPR RNA. *Nature*, 2016, 532(7600): 522–526. [\[DOI\]](#)
- [63] Liu L, Li X, Ma J, Li Z, You L, Wang J, Wang M, Zhang X, Wang Y. The molecular architecture for RNA-guided RNA cleavage by Cas13a. *Cell*, 2017, 170(4): 714–726.e710. [\[DOI\]](#)
- [64] Liu L, Li X, Wang J, Wang M, Chen P, Yin M, Li J, Sheng G, Wang Y. Two distant catalytic sites are responsible for C2c2 RNase activities. *Cell*, 2017, 168(1–2): 121–134.e112. [\[DOI\]](#)
- [65] Wang J, Li J, Zhao H, Sheng G, Wang M, Yin M, Wang Y. Structural and mechanistic basis of PAM-dependent spacer acquisition in CRISPR-Cas systems. *Cell*, 2015, 163(4): 840–853. [\[DOI\]](#)
- [66] Ma Y, Zhang J, Yin W, Zhang Z, Song Y, Chang X. Targeted AID-mediated mutagenesis (TAM) enables efficient genomic diversification in mammalian cells. *Nat Methods*, 2016, 13(12): 1029–1035. [\[DOI\]](#)
- [67] Li X, Wang Y, Liu Y, Yang B, Wang X, Wei J, Lu Z, Zhang Y, Wu J, Huang X, Yang L, Chen J. Base editing with a Cpf1-cytidine deaminase fusion. *Nat Biotechnol*, 2018, 36(4): 324–327. [\[DOI\]](#)
- [68] Zhu S, Li W, Liu J, Chen CH, Liao Q, Xu P, Xu H, Xiao T, Cao Z, Peng J, Yuan P, Brown M, Liu XS, Wei W. Genome-scale deletion screening of human long non-coding RNAs using a paired-guide RNA CRISPR-Cas9 library. *Nat Biotechnol*, 2016, 34(12): 1279–1286. [\[DOI\]](#)
- [69] Li W, Teng F, Li T, Zhou Q. Simultaneous generation and germline transmission of multiple gene mutations in rat using CRISPR-Cas systems. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(8): 684–686. [\[DOI\]](#)
- [70] Yan S, Tu Z, Liu Z, Fan N, Yang H, Yang S, Yang W, Zhao Y, Ouyang Z, Lai C, Yang H, Li L, Liu Q, Shi H, Xu G, Zhao H, Wei H, Pei Z, Li S, Lai L, Li XJ. A huntingtin knockin pig model recapitulates features of selective neurodegeneration in Huntington's disease. *Cell*, 2018, 173(4): 989–1002.e1013. [\[DOI\]](#)
- [71] Ke Q, Li W, Lai X, Chen H, Huang L, Kang Z, Li K, Ren J, Lin X, Zheng H, Huang W, Ma Y, Xu D, Chen Z, Song X, Lin X, Zhuang M, Wang T, Zhuang F, Xi J, Mao FF, Xia H, Lahn BT, Zhou Q, Yang S, Xiang AP.



- TALEN-based generation of a cynomolgus monkey disease model for human microcephaly. *Cell Res*, 2016, 26(9): 1048–1061. [DOI]
- [72] Chen Y, Yu J, Niu Y, Qin D, Liu H, Li G, Hu Y, Wang J, Lu Y, Kang Y, Jiang Y, Wu K, Li S, Wei J, He J, Wang J, Liu X, Luo Y, Si C, Bai R, Zhang K, Liu J, Huang S, Chen Z, Wang S, Chen X, Bao X, Zhang Q, Li F, Geng R, Liang A, Shen D, Jiang T, Hu X, Ma Y, Ji W, Sun YE. Modeling Rett syndrome using TALEN-edited MECP2 mutant cynomolgus monkeys. *Cell*, 2017, 169(5): 945–955.e910. [DOI]
- [73] Yao X, Liu Z, Wang X, Wang Y, Nie YH, Lai L, Sun R, Shi L, Sun Q, Yang H. Generation of knock-in cynomolgus monkey via CRISPR/Cas9 editing. *Cell Res*, 2018, 28(3): 379–382. [DOI]
- [74] Cui Y, Niu Y, Zhou J, Chen Y, Cheng Y, Li S, Ai Z, Chu C, Wang H, Zheng B, Chen X, Sha J, Guo X, Huang X, Ji W. Generation of a precise Oct4-hrGFP knockin cynomolgus monkey model via CRISPR/Cas9-assisted homologous recombination. *Cell Res*, 2018, 28(3): 383–386. [DOI]
- [75] Feng Z, Zhang B, Ding W, Liu X, Yang DL, Wei P, Cao F, Zhu S, Zhang F, Mao Y, Zhu JK. Efficient genome editing in plants using a CRISPR/Cas system. *Cell Res*, 2013, 23(10): 1229–1232. [DOI]
- [76] Zong Y, Wang Y, Li C, Zhang R, Chen K, Ran Y, Qiu JL, Wang D, Gao C. Precise base editing in rice, wheat and maize with a Cas9-cytidine deaminase fusion. *Nat Biotechnol*, 2017, 35(5): 438–440. [DOI]
- [77] Wang Y, Cheng X, Shan Q, Zhang Y, Liu J, Gao C, Qiu JL. Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew. *Nat Biotechnol*, 2014, 32(9): 947–951. [DOI]
- [78] Shan Q, Wang Y, Li J, Zhang Y, Chen K, Liang Z, Zhang K, Liu J, Xi JJ, Qiu JL, Gao C. Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(8): 686–688. [DOI]
- [79] Ma X, Zhang Q, Zhu Q, Liu W, Chen Y, Qiu R, Wang B, Yang Z, Li H, Lin Y, Xie Y, Shen R, Chen S, Wang Z, Chen Y, Guo J, Chen L, Zhao X, Dong Z, Liu YG. A robust CRISPR/Cas9 system for convenient, high-efficiency multiplex genome editing in monocot and dicot plants. *Mol Plant*, 2015, 8(8): 1274–1284. [DOI]
- [80] Cyranoski D. Chinese scientists to pioneer first human CRISPR trial. *Nature*, 2016, 535(7613): 476–477. [DOI]
- [81] Kim E, Koo T, Park SW, Kim D, Kim K, Cho HY, Song DW, Lee KJ, Jung MH, Kim S, Kim JH, Kim JH, Kim JS. In vivo genome editing with a small Cas9 orthologue derived from *Campylobacter jejuni*. *Nat Commun*, 2017, 8: 14500. [DOI]
- [82] Tsai SQ, Zheng Z, Nguyen NT, Liebers M, Topkar VV, Thapar V, Wyvekens N, Khayter C, Iafrate AJ, Le LP, Aryee MJ, Joung JK. GUIDE-seq enables genome-wide profiling of off-target cleavage by CRISPR-Cas nucleases. *Nat Biotechnol*, 2015, 33(2): 187–197. [DOI]
- [83] Kim D, Bae S, Park J, Kim E, Kim S, Yu HR, Hwang J, Kim JI, Kim JS. Digenome-seq: genome-wide profiling of CRISPR-Cas9 off-target effects in human cells. *Nat Methods*, 2015, 12(3): 237–243, 231. [DOI]
- [84] Slaymaker IM, Gao L, Zetsche B, Scott DA, Yan WX, Zhang F. Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity. *Science*, 2016, 351(6268): 84–88. [DOI]
- [85] Kleinstiver BP, Pattanayak V, Prew MS, Tsai SQ, Nguyen NT, Zheng Z, Joung JK. High-fidelity CRISPR-Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects. *Nature*, 2016, 529(7587): 490–495. [DOI]
- [86] Chen JS, Dagdas YS, Kleinstiver BP, Welch MM, Sousa AA, Harrington LB, Sternberg SH, Joung JK, Yildiz A, Doudna JA. Enhanced proofreading governs CRISPR-Cas9 targeting accuracy. *Nature*, 2017, 550(7676): 407–410. [DOI]
- [87] Lin S, Staahl BT, Alla RK, Doudna JA. Enhanced homology-directed human genome engineering by controlled timing of CRISPR/Cas9 delivery. *eLife*, 2014, 3: e04766. [DOI]
- [88] Kim S, Kim D, Cho SW, Kim J, Kim JS. Highly efficient RNA-guided genome editing in human cells via delivery of purified Cas9 ribonucleoproteins. *Genome Res*, 2014, 24(6): 1012–1019. [DOI]
- [89] Kleinstiver BP, Prew MS, Tsai SQ, Topkar VV, Nguyen NT, Zheng Z, Gonzales AP, Li Z, Peterson RT, Yeh JR, Aryee MJ, Joung JK. Engineered CRISPR-Cas9 nucleases with altered PAM specificities. *Nature*, 2015, 523(7561): 481–485. [DOI]
- [90] Kleinstiver BP, Prew MS, Tsai SQ, Nguyen NT, Topkar VV, Zheng Z, Joung JK. Broadening the targeting range of *Staphylococcus aureus* CRISPR-Cas9 by modifying PAM recognition. *Nat Biotechnol*, 2015, 33(12): 1293–1298. [DOI]
- [91] Hirano H, Gootenberg JS, Horii T, Abudayyeh OO, Kimura M, Hsu PD, Nakane T, Ishitani R, Hatada I, Zhang F, Nishimasu H, Nureki O. Structure and engineering of *Francisella novicida* Cas9. *Cell*, 2016, 164(5): 950–961. [DOI]

- [92] Adli M. The CRISPR tool kit for genome editing and beyond. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 1911. [DOI]
- [93] Komor AC, Kim YB, Packer MS, Zuris JA, Liu DR. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature*, 2016, 533(7603): 420–424. [DOI]
- [94] Gaudelli NM, Komor AC, Rees HA, Packer MS, Badran AH, Bryson DI, Liu DR. Programmable base editing of A\*T to G\*C in genomic DNA without DNA cleavage. *Nature*, 2017, 551(7681): 464–471. [DOI]
- [95] Hess GT, Fresard L, Han K, Lee CH, Li A, Cimprich KA, Montgomery SB, Bassik MC. Directed evolution using dCas9-targeted somatic hypermutation in mammalian cells. *Nat Methods*, 2016, 13(12): 1036–1042. [DOI]
- [96] Kescu C, Adli M. CRISPR-Cas9-AID base editor is a powerful gain-of-function screening tool. *Nat Methods*, 2016, 13(12): 983–984. [DOI]
- [97] 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]
- [98] Gilbert LA, Larson MH, Morsut L, Liu Z, Brar GA, Torres SE, Stern-Ginossar N, Brandman O, Whitehead EH, Doudna JA, Lim WA, Weissman JS, Qi LS. CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes. *Cell*, 2013, 154(2): 442–451. [DOI]
- [99] Cheng AW, Wang H, Yang H, Shi L, Katz Y, Theunissen TW, Rangarajan S, Shivalila CS, Dadon DB, Jaenisch R. Multiplexed activation of endogenous genes by CRISPR-on, an RNA-guided transcriptional activator system. *Cell Res*, 2013, 23(10): 1163–1171. [DOI]
- [100] Abudayyeh OO, Gootenberg JS, Konermann S, Joung J, Slaymaker IM, Cox DB, Shmakov S, Makarova KS, Semenova E, Minakhin L, Severinov K, Regev A, Lander ES, Koonin EV, Zhang F. C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector. *Science*, 2016, 353(6299): aaf5573. [DOI]
- [101] Smargon AA, Cox DBT, Pyzocha NK, Zheng K, Slaymaker IM, Gootenberg JS, Abudayyeh OA, Essletzbichler P, Shmakov S, Makarova KS, Koonin EV, Zhang F. Cas13b is a type VI-B CRISPR-associated RNA-Guided RNase differentially regulated by accessory oroteins Csx27 and Csx28. *Mol Cell*, 2017, 65(4): 618–630.e617. [DOI]
- [102] Shmakov S, Smargon A, Scott D, Cox D, Pyzocha N, Yan W, Abudayyeh OO, Gootenberg JS, Makarova KS, Wolf YI, Severinov K, Zhang F, Koonin EV. Diversity and evolution of class 2 CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol*, 2017, 15(3): 169–182. [DOI]
- [103] Yan WX, Chong S, Zhang H, Makarova KS, Koonin EV, Cheng DR, Scott DA. Cas13d is a compact RNA-targeting type VI CRISPR effector positively modulated by a WYL-domain-containing accessory protein. *Mol Cell*, 2018, 70(2): 327–339.e325. [DOI]
- [104] Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Kellner MJ, Joung J, Collins JJ, Zhang F. Multiplexed and portable nucleic acid detection platform with Cas13, Cas12a, and Csm6. *Science*, 2018, 360(6387): 439–444. [DOI]
- [105] Shalem O, Sanjana NE, Zhang F. High-throughput functional genomics using CRISPR-Cas9. *Nat Rev Genet*, 2015, 16(5): 299–311. [DOI]
- [106] Liu SJ, Horlbeck MA, Cho SW, Birk HS, Malatesta M, He D, Attenello FJ, Villalta JE, Cho MY, Chen Y, Mandegar MA, Olvera MP, Gilbert LA, Conklin BR, Chang HY, Weissman JS, Lim DA. CRISPRi-based genome-scale identification of functional long non-coding RNA loci in human cells. *Science*, 2017, 355(6320): 355. [DOI]
- [107] Han K, Jeng EE, Hess GT, Morgens DW, Li A, Bassik MC. Synergistic drug combinations for cancer identified in a CRISPR screen for pairwise genetic interactions. *Nat Biotechnol*, 2017, 35(5): 463–474. [DOI]
- [108] Najm FJ, Strand C, Donovan KF, Hegde M, Sanson KR, Vaimberg EW, Sullender ME, Hartenian E, Kalani Z, Fusi N, Listgarten J, Younger ST, Bernstein BE, Root DE, Doench JG. Orthologous CRISPR-Cas9 enzymes for combinatorial genetic screens. *Nat Biotechnol*, 2018, 36(2): 179–189. [DOI]
- [109] Joung J, Engreitz JM, Konermann S, Abudayyeh OO, Verdine VK, Aguet F, Gootenberg JS, Sanjana NE, Wright JB, Fulco CP, Tseng YY, Yoon CH, Boehm JS, Lander ES, Zhang F. Genome-scale activation screen identifies a lncRNA locus regulating a gene neighborhood. *Nature*, 2017, 548(7667): 343–346. [DOI]
- [110] Sanjana NE, Shalem O, Zhang F. Improved vectors and genome-wide libraries for CRISPR screening. *Nat Methods*, 2014, 11(8): 783–784. [DOI]
- [111] Xue W, Chen S, Yin H, Tammela T, Papagiannakopoulos T, Joshi NS, Cai W, Yang G, Bronson R, Crowley DG, Zhang F, Anderson DG, Sharp PA, Jacks T. CRISPR-mediated direct mutation of cancer genes in the

- mouse liver. *Nature*, 2014, 514(7522): 380–384. [DOI]
- [112] Choi PS, Meyerson M. Targeted genomic rearrangements using CRISPR/Cas technology. *Nat Commun*, 2014, 5: 3728. [DOI]
- [113] Zuckermann M, Hovestadt V, Knobbe-Thomsen CB, Zapatka M, Northcott PA, Schramm K, Belic J, Jones DT, Tschida B, Moriarity B, Largaespada D, Roussel MF, Korshunov A, Reifemberger G, Pfister SM, Lichter P, Kawauchi D, Gronych J. Somatic CRISPR/Cas9-mediated tumour suppressor disruption enables versatile brain tumour modelling. *Nat Commun*, 2015, 6: 7391. [DOI]
- [114] Carroll KJ, Makarewich CA, Mcanally J, Anderson DM, Zentilin L, Liu N, Giacca M, Bassel-Duby R, Olson EN. A mouse model for adult cardiac-specific gene deletion with CRISPR/Cas9. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113(2): 338–343. [DOI]
- [115] Paquet D, Kwart D, Chen A, Sproul A, Jacob S, Teo S, Olsen KM, Gregg A, Noggle S, Tessier-Lavigne M. Efficient introduction of specific homozygous and heterozygous mutations using CRISPR/Cas9. *Nature*, 2016, 533(7601): 125–129. [DOI]
- [116] Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Lee JW, Essletzbichler P, Dy AJ, Joung J, Verdine V, Donghia N, Daringer NM, Freije CA, Myhrvold C, Bhattacharyya RP, Livny J, Regev A, Koonin EV, Hung DT, Sabeti PC, Collins JJ, Zhang F. Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2. *Science*, 2017, 356(6336): 438–442. [DOI]
- [117] Wang HX, Li M, Lee CM, Chakraborty S, Kim HW, Bao G, Leong KW. CRISPR/Cas9-based genome editing for disease modeling and therapy: Challenges and opportunities for nonviral delivery. *Chem Rev*, 2017, 117(15): 9874–9906. [DOI]
- [118] Dunbar CE, High KA, Joung JK, Kohn DB, Ozawa K, Sadelain M. Gene therapy comes of age. *Science*, 2018, 359(6372): pii: eaan4672. [DOI]
- [119] Boulad F, Mansilla-Soto J, Cabriolu A, Riviere I, Sadelain M. Gene Therapy and genome editing. *Hematol Oncol Clin North Am*, 2018, 32(2): 329–342. [DOI]
- [120] Mansilla-Soto J, Riviere I, Boulad F, Sadelain M. Cell and Gene Therapy for the beta-thalassemias: advances and prospects. *Hum Gene Ther*, 2016, 27(4): 295–304. [DOI]
- [121] Yin H, Xue W, Chen S, Bogorad RL, Benedetti E, Grompe M, Koteliensky V, Sharp PA, Jacks T, Anderson DG. Genome editing with Cas9 in adult mice corrects a disease mutation and phenotype. *Nat Biotechnol*, 2014, 32(6): 551–553. [DOI]
- [122] Dever DP, Bak RO, Reinisch A, Camarena J, Washington G, Nicolas CE, Pavel-Dinu M, Saxena N, Wilkens AB, Mantri S, Uchida N, Hendel A, Narla A, Majeti R, Weinberg KI, Porteus MH. CRISPR/Cas9 beta-globin gene targeting in human haematopoietic stem cells. *Nature*, 2016, 539(7629): 384–389. [DOI]
- [123] Tabebordbar M, Zhu K, Cheng JKW, Chew WL, Widrick JJ, Yan WX, Maesner C, Wu EY, Xiao R, Ran FA, Cong L, Zhang F, Vandenbergh LH, Church GM, Wagers AJ. *In vivo* gene editing in dystrophic mouse muscle and muscle stem cells. *Science*, 2016, 351(6271): 407–411. [DOI]
- [124] Nelson CE, Hakim CH, Ousterout DG, Thakore PI, Moreb EA, Castellanos Rivera RM, Madhavan S, Pan X, Ran FA, Yan WX, Asokan A, Zhang F, Duan D, Gersbach CA. *In vivo* genome editing improves muscle function in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Science*, 2016, 351(6271): 403–407. [DOI]
- [125] Long C, Amoasii L, Mireault AA, Mcanally JR, Li H, Sanchez-Ortiz E, Bhattacharyya S, Shelton JM, Bassel-Duby R, Olson EN. Postnatal genome editing partially restores dystrophin expression in a mouse model of muscular dystrophy. *Science*, 2016, 351(6271): 400–403. [DOI]
- [126] Gao X, Tao Y, Lamas V, Huang M, Yeh WH, Pan B, Hu YJ, Hu JH, Thompson DB, Shu Y, Li Y, Wang H, Yang S, Xu Q, Polley DB, Liberman MC, Kong WJ, Holt JR, Chen ZY, Liu DR. Treatment of autosomal dominant hearing loss by *in vivo* delivery of genome editing agents. *Nature*, 2018, 553(7687): 217–221. [DOI]
- [127] Hawksorth J, Satchwell TJ, Meinders M, Daniels DE, Regan F, Thornton NM, Wilson MC, Dobbe JG, Streekstra GJ, Trakarnsanga K, Heesom KJ, Anstee DJ, Frayne J, Toye AM. Enhancement of red blood cell transfusion compatibility using CRISPR-mediated erythroblast gene editing. *EMBO Mol Med*, 2018, 10: e8454. [DOI]
- [128] Huang YQ, Li GL, Yang HQ, Wu ZF. Progress and application of genome-edited pigs in biomedical research. *Hereditas (Beijing)*, 2018, 40(8): 632–646. 黄耀强, 李国玲, 杨化强, 吴珍芳. 基因编辑猪在生物医学研究中的应用. *遗传*, 2018, 40(8): 632–646. [DOI]
- [129] Zhang DW, Zhang CF, Dong F, Huang YL, Zhang Y,

- Zhou H. Application of CRISPR/Cas9 system in breeding of new antiviral plant germplasm. *Heredita (Beijing)*, 2016, 38(9): 811–820.
- 张道微, 张超凡, 董芳, 黄艳岚, 张亚, 周虹. CRISPR/Cas9 系统在培育抗病毒植物新种质中的应用. *遗传*, 2016, 38(9): 811–820. [DOI]
- [130] Li J, Meng X, Zong Y, Chen K, Zhang H, Liu J, Li J, Gao C. Gene replacements and insertions in rice by intron targeting using CRISPR-Cas9. *Nat Plants*, 2016, 2: 16139. [DOI]
- [131] Shi J, Gao H, Wang H, Lafitte HR, Archibald RL, Yang M, Hakimi SM, Mo H, Habben JE. ARGOS8 variants generated by CRISPR-Cas9 improve maize grain yield under field drought stress conditions. *Plant Biotechnol J*, 2017, 15(2): 207–216. [DOI]
- [132] Zhou H, He M, Li J, Chen L, Huang Z, Zheng S, Zhu L, Ni E, Jiang D, Zhao B, Zhuang C. Development of commercial thermo-sensitive genic male sterile rice accelerates hybrid rice breeding using the CRISPR/Cas9-mediated TMS5 editing system. *Sci Rep*, 2016, 6: 37395. [DOI]
- [133] Sun Y, Zhang X, Wu C, He Y, Ma Y, Hou H, Guo X, Du W, Zhao Y, Xia L. Engineering herbicide-resistant rice plants through CRISPR/Cas9-mediated homologous recombination of acetolactate synthase. *Mol Plant*, 2016, 9(4): 628–631. [DOI]
- [134] Wang M, Lu Y, Botella JR, Mao Y, Hua K, Zhu JK. Gene Targeting by homology-directed repair in rice using a geminivirus-based CRISPR/Cas9 system. *Mol Plant*, 2017, 10(7): 1007–1010. [DOI]
- [135] Hai T, Teng F, Guo R, Li W, Zhou Q. One-step generation of knockout pigs by zygote injection of CRISPR/Cas system. *Cell Res*, 2014, 24(3): 372–375. [DOI]
- [136] Liu X, Wang Y, Tian Y, Yu Y, Gao M, Hu G, Su F, Pan S, Luo Y, Guo Z, Quan F, Zhang Y. Generation of mastitis resistance in cows by targeting human lysozyme gene to beta-casein locus using zinc-finger nucleases. *Proc Biol Sci*, 2014, 281(1780): 20133368. [DOI]
- [137] Luo J, Song Z, Yu S, Cui D, Wang B, Ding F, Li S, Dai Y, Li N. Efficient generation of myostatin (MSTN) biallelic mutations in cattle using zinc finger nucleases. *PloS One*, 2014, 9(4): e95225. [DOI]
- [138] Ni W, Qiao J, Hu S, Zhao X, Regouski M, Yang M, Polejaeva IA, Chen C. Efficient gene knockout in goats using CRISPR/Cas9 system. *PloS One*, 2014, 9(9): e106718. [DOI]
- [139] Cui C, Song Y, Liu J, Ge H, Li Q, Huang H, Hu L, Zhu H, Jin Y, Zhang Y. Gene targeting by TALEN-induced homologous recombination in goats directs production of beta-lactoglobulin-free, high-human lactoferrin milk. *Sci Rep*, 2015, 5: 10482. [DOI]
- [140] Qian L, Tang M, Yang J, Wang Q, Cai C, Jiang S, Li H, Jiang K, Gao P, Ma D, Chen Y, An X, Li K, Cui W. Targeted mutations in myostatin by zinc-finger nucleases result in double-musled phenotype in Meishan pigs. *Sci Rep*, 2015, 5: 14435. [DOI]
- [141] Wang K, Ouyang H, Xie Z, Yao C, Guo N, Li M, Jiao H, Pang D. Efficient generation of myostatin mutations in pigs using the CRISPR/Cas9 system. *Sci Rep*, 2015, 5: 16623. [DOI]
- [142] Whitworth KM, Rowland RR, Ewen CL, Tribble BR, Kerrigan MA, Cino-Ozuna AG, Samuel MS, Lightner JE, McLaren DG, Mileham AJ, Wells KD, Prather RS. Gene-edited pigs are protected from porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Nat Biotechnol*, 2016, 34(1): 20–22. [DOI]

(责任编辑: 高彩霞)