

# 基于 CRISPR/Cas9 系统在全基因组范围内筛选功能基因及调控元件研究进展

刘思远<sup>1,2</sup>, 易国强<sup>2</sup>, 唐中林<sup>2,3</sup>, 陈斌<sup>1</sup>

1. 湖南农业大学动物科学技术学院, 长沙 410128

2. 中国农业科学院农业基因组研究所, 岭南现代农业科学与技术广东省实验室深圳分中心, 农业部农业基因数据分析重点实验室, 深圳 518120

3. 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 北京 100193

**摘要:** CRISPR/Cas9 系统是一种近年来被广泛应用于基因组编辑的强大工具。通过将 CRISPR/Cas9 系统中的 Cas9 蛋白突变后, 使其失去剪切活性而成为 dCas9 (nuclease-dead Cas9), 再结合基因功能丧失(loss-of-function, LOF)、基因功能激活(gain-of-function, GOF)以及非编码功能基因鉴定技术即可实现全基因组高通量的功能基因及调控元件靶向鉴定和筛选。目前, 该技术已被广泛应用于疾病免疫机理、药物靶点筛选和动物遗传育种等研究, 为生命医学和基础科学带来了全新高效的技术方法和研究思路。本文综述了基于 CRISPR/Cas9 技术在全基因组中高通量筛选功能基因及调控元件的方法及研究进展, 重点阐述了 CRISPR/Cas9 系统在动物细胞中筛选功能性基因的方法, 以期为基因编辑及相关研究领域提供参考。

**关键词:** CRISPR/Cas9; 全基因组筛选; 功能基因; 调控元件

收稿日期: 2020-01-02; 修回日期: 2020-04-08

**基金项目:** 湖南省生猪产业技术体系岗位专家项目(编号: 2019-2021), 深圳市技术攻关项目(编号: JSGG20180507182028625), 转基因生物新品种培育重大专项(编号: 2016ZX08006002-005)和广东省重点领域研发计划(现代种业)项目(编号: 2018B020203002)资助 [Supported by Position Expert of Hunan Province Pig Industry Technology System (No. 2019-2021), Shenzhen Key Technology Projects (No. JSGG20180507182028625), National Science and Technology Major Project of China (No. 2016ZX08006002-005), and the Key R&D Programmes of Guangdong Province (No. 2018B020203002)]

**作者简介:** 刘思远, 在读博士研究生, 专业方向: 动物遗传育种与繁殖。E-mail: 515970802@qq.com

易国强, 研究员, 研究方向: 功能基因组和表观遗传学。E-mail: yiguogiang@caas.cn

刘思远和易国强为并列第一作者。

**通讯作者:** 唐中林, 研究员, 博士生导师, 研究方向: 动物基因组与育种。E-mail: tangzhonglin@caas.cn

陈斌, 教授, 博士生导师, 研究方向: 猪的遗传育种。E-mail: chenbin7586@126.com

DOI: 10.16288/j.ycz.19-390

网络出版时间: 2020/4/24 13:09:02

URI: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20200424.1053.002.html>

# Progress on genome-wide CRISPR/Cas9 screening for functional genes and regulatory elements

Siyuan Liu<sup>1,2</sup>, Guoqiang Yi<sup>2</sup>, Zhonglin Tang<sup>2,3</sup>, Bin Chen<sup>1</sup>

1. College of Animal Science & Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China

2. Genome Analysis Laboratory of the Ministry of Agriculture, Shenzhen Branch, Guangdong Laboratory for Lingnan Modern Agriculture, Agricultural Genomics Institute at Shenzhen, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Shenzhen 518120, China

3. Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China

**Abstract:** The CRISPR/Cas9 system is a powerful tool which has been extensively used for genome editing in the past few years. Nuclease-dead Cas9 (CRISPR/dCas9), a Cas9 protein mutant without splicing ability, along with loss-of-function (LOF), gain-of-function (GOF), or non-coding genes scanning approaches can reveal genome-scale functional determinants. CRISPR/Cas9 has been widely adopted to decipher disease mechanisms and pinpoint drug targets in the life science field, and also provide novel insights into animal genetics and breeding. In this review, we summarize the research progress in high-throughput CRISPR/Cas9 screening for revealing the functional genes and regulatory elements in the whole genome. We also highlight the applications of CRISPR/Cas9 system in the animal cells, providing a reference for gene editing and other related research in related fields.

**Keywords:** CRISPR/Cas9; genome-wide screening; functional gene; regulatory elements

成簇的规律间隔的短回文重复序列及其相关蛋白(clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated 9, CRISPR/Cas9)具有低成本、高效率和操作便捷等优点,已被广泛应用于遗传改良、分子育种和分子生物学等基因组编辑领域<sup>[1-3]</sup>。CRISPR/Cas9 系统是一种存在于多数古生菌中的免疫系统<sup>[4-6]</sup>,该系统在微生物中抵御外源 DNA 的感染,微生物利用 Cas9 酶切割外源基因序列使入侵序列被破坏并失活,随后将捕获的片段储存于本身基因组中组成新的间隔区(spacer),并保持免疫记忆<sup>[7]</sup>。基于 Cas9 蛋白结合启动子前导区转录生成的 CRISPR RNAs (crRNA)等元件形成的复合体可识别基因序列上原间隔物相邻基序(protospacer adjacent motif, PAM)位点,并进行靶向剪切的工作模式,研究者只需合成一条长度在 22 nt 左右与目的序列互补的向导 RNA(single guide RNA, sgRNA),引导 Cas9 复合体结合到基因组上不同的 PAM 位点就可达到对基因组进行靶向切割的目的<sup>[8]</sup>。CRISPR/Cas9 系统切割 DNA 后会导致双碱基键断裂(double-strand break, DSB),从而产生移码突变和碱基缺失

等现象,随后引发 DNA 修复机制,即通过非同源末端连接(non-homologous end joining, NHEJ)途径直接修复缺口,或利用同源直接修复(homology directed repair, HDR)在断裂处引入同源粘性末端的 DNA 片段<sup>[9,10]</sup>。

由于 CRISPR/Cas9 系统在编码区与非编码区均可精准打靶目的基因片段,因此可实现全基因组敲除、大片段基因敲入和调控基因表达等功能<sup>[11,12]</sup>。目前,在全基因组范围内筛选表型是基因功能研究的热点方向,将 CRISPR/Cas9 系统与全基因组鉴定和后续的功能分析技术相结合,可以在分子、细胞和个体层面对生物进行全基因组范围的功能筛选,从而获得新的功能基因或特异性遗传位点,加快后续研究进展<sup>[13]</sup>。

本文综述了利用 CRISPR/Cas9 系统在全基因组中高通量筛选功能基因和调控元件的方法及其研究进展,并阐述了该方法在筛选功能性长链非编码 RNA、癌症基因、生长发育性状相关的功能基因及调控元件等相关领域中的应用情况。同时剖析了这种方法存在的问题和未来发展方向,以期后续筛选和验证

证动物功能基因及调控元件提供研究方法和参考。

## 1 基于 CRISPR/Cas 基因编辑技术的全基因组筛选工具

CRISPR/Cas9 系统利用 sgRNA 的引导性和 Cas9 蛋白的定点识别及切割功能, 可以直接对靶标基因进行靶向切割, 从而干扰基因表达。在此基础上, 科研人员开发出了 CRISPR-Cas9 全基因组敲除文库、CRISPR 干扰系统(CRISPR interference, CRISPRi)与 CRISPR 基因转录激活系统(CRISPR activation, CRISPRa)。其中, CRISPR-Cas9 全基因组敲除文库是通过全基因组的打靶 sgRNA, 利用 CRISPR/Cas9 系统在细胞群内高通量的靶向敲除目的基因, 从而获得单基因敲除的单克隆细胞库。后两种系统都需要利用突变后失去核酸内切酶活性的 Cas9 (nuclease-dead mutants of Cas9, dCas9)酶, 并使其与 sgRNA 共同靶向基因组特定定位点的功能<sup>[14]</sup>。其中, CRISPR 干扰系统是利用 sgRNA 引导 dCas9 在打靶基因的转录起始位点(transcription start sites, TSS)融合转录抑制因子 KRAB (Krüppel-associated box), 从而可以高效的抑制靶标目的基因的表达, 导致基因功能丧失(loss-of-function, LOF), 该系统也被称作 CRISPRi 系统<sup>[15]</sup>。相反, CRISPRa 系统则可以通过 dCas9 在 TSS 位点招募转录激活因子如 VP64、p65、Rta 以及相关蛋白形成“dCas-X”的复合体, 进而显著促进内源靶标基因的表达, 促进内源基因的高水平转录, 使基因呈现基因功能激活(gain-of-function, GOF)<sup>[16]</sup>。因此, 通过 sgRNA 引导 dCas9 靶向基因的两种调控手段, 可实现对全基因组范围内基因的精准调控<sup>[17,18]</sup>。目前, CRISPR/Cas9 技术及 CRISPR-dCas9 系统已经应用于高通量筛选编码基因、启动子及增强子和长链非编码 RNA 等序列的功能。2013 年, Gilbert 等<sup>[14]</sup>通过测试 CRISPR-dCas9 系统中 dCas9 蛋白与 cCas9、dCas9-KRAB、dCas9-CS 和 dCas9-WRPW 等 4 种不同的融合蛋白工作效率, 并在 GFP 随机整合的人胚肾细胞(HEK293)中产生了不同程度的荧光蛋白表达沉默, 有效证明了 dCas9-KRAB 融合蛋白所导致的基因沉默效率最高。同时, 通过

RNA-seq 实验表明 CRISPRi 在真核细胞中介导的转录抑制具有高度特异性。Ganguly 等<sup>[19]</sup>利用 CRISPRi 系统在嗜热杆菌(*H. thermocellum*)中准确地抑制了中央代谢乳酸脱氢酶和磷酸转乙酰酶基因的表达。Joung 等<sup>[11]</sup>在 2017 年通过 CRISPR/Cas9 系统在人的细胞系中分别开发出全基因组敲除文库和转录激活元件筛选系统, Konermann 等<sup>[20]</sup>通过优化改造后的 CRISPRa 系统促进了基因在细胞内的转录激活, 并同时激活了多个基因的高表达以及高效上调了靶标 lncRNAs 的转录本, 最终大规模筛选了抵抗 BRAF 抑制剂的激活基因, 在细胞层面证明了 CRISPRa 系统作为上调基因表达的转录激活工具的诸多优势。

## 2 全基因组功能基因筛选原理和技术流程

设计一个全基因组功能筛查的首要条件是如何针对全基因组设计特异性高的 sgRNA 库, 并将其包装入可稳定转染的病毒载体中<sup>[21]</sup>, 其次需要选择合适的受体样本进行功能分析和验证<sup>[22]</sup>。Liu 等<sup>[23]</sup>在 2015 年报道了一种名为“CRISPR-ERA”的 sgRNA 在线设计网站, 可在全基因组中预测高效而特异的 sgRNA, 用于 CRISPR 系统介导的基因编辑、抑制和激活。2017 年, Zhao 等<sup>[24]</sup>建立了一种名为“CRISPR-offinder”的基因组 sgRNA 自定义设计软件, 可针对不同实验目的设计 sgRNA 并评估其打靶效率。

在细胞层面的全基因组功能筛查流程可分为以下几个步骤: (1)确定表型与基因筛选范围; (2)构建全基因组敲除或激活基因的 sgRNA 文库; (3)包装慢病毒文库, 通过低感染复数(multiplicity of infection, MOI)的全基因组慢病毒文库并感染目的细胞, 构建稳定表达 sgRNA 的细胞文库并获得稳定表达株<sup>[25]</sup>; (4)筛选细胞表型: 对转染后的细胞施加抗生素或药物等压力并保留能存活的细胞(阳性筛选)、挑选死亡细胞(阴性筛选)或细胞增殖能力和筛选标记基因等; (5)分别提取筛选后细胞的基因组并建库; (6)利用高通量测序手段获得细胞文库中的 sgRNA 序列信息, 并筛选目的性状的关联基因等步骤<sup>[11,26]</sup>。CRISPR/Cas9 全基因组功能筛选系统具体工作流程如图 1 所示。

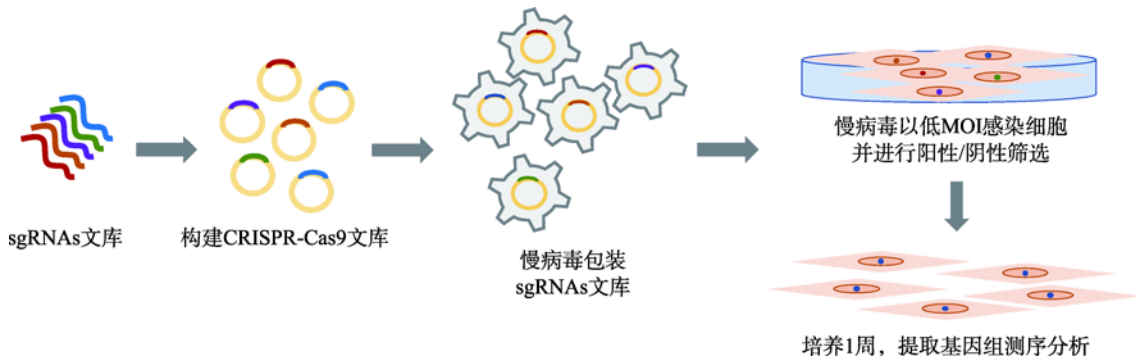


图 1 CRISPR/Cas9 全基因组功能筛选系统工作流程

Fig. 1 Workflow of genome-wide CRISPR/Cas9 functional screening system

### 3 CRISPR/Cas9 鉴定不同功能基因及调控元件

#### 3.1 挖掘功能性长链非编码 RNA

随着全基因组测序成本降低, 结合第二代和第三代基因测序手段, 利用高通量数据筛选全基因组中功能基因的实验方法变得愈来愈流行。全基因组功能基因筛查是最为全面的基因检测及验证手段之一。RNA 干扰(RNA interference, RNAi)是一种已标准化的基因沉默工具, 靶标基因组中成熟的 RNA, 可高效且低成本的抑制靶标基因表达, 但 RNAi 无法将干扰覆盖到编码基因本身, 只能影响基因在转录后的表达但不能抑制基因表达, 且存在较高的错配率与其他 mRNA 的抑制效应, 因此干扰效果不全面<sup>[27,28]</sup>。而 CRISPRi 可在转录起始区域发挥阻止转录的作用, 此外 CRISPRi 还可以靶标细胞核内的转录本, RNAi 试剂则很难做到这一点。因此, 利用 CRISPRi 进行基因组高通量功能元件筛选比以往的 RNAi 和 cDNA 文库等基因表达干扰手段更有优势。

长链非编码 RNA (long non-coding RNAs, lncRNAs) 是一种长度为 200 nt 以上的转录本, 虽然不能编码为蛋白质, 但对动物的生长发育、细胞功能、疾病和植物驯化机制等方面有着重要的影响和调控作用<sup>[29~31]</sup>。2017 年, Liu 等<sup>[15]</sup>对 7 种细胞系中的 16,401 个 lncRNAs 基因座进行了高通量 CRISPR 打靶干扰, 筛选出细胞生长过程中必须存在的 499 个 lncRNA 基因座位点, 并且这些具有生长调控功能的

lncRNA 存在细胞类型特异性。2019 年, Cai 等<sup>[32]</sup>通过 CRISPRi 对人表皮细胞中 2263 个 lncRNA 进行了表达筛选, 并新鉴定了 9 个具有调节角质细胞增殖功能的候选 lncRNA, 其中 PRANCR 具有重要的调控皮肤表皮稳态的作用。Esposito 等<sup>[33]</sup>也汇总了近年来 CRISPR 相关筛选技术在发现新癌基因 lncRNA 具有很大的应用潜力。Liu 等<sup>[34]</sup>在 2018 年从 10,996 个 lncRNA 中鉴定出 230 个对于慢性粒细胞白血病 K562 细胞的细胞生长至关重要的 lncRNA, 并验证了该方法的稳健性和特异性。CRISPRi 为鉴定全基因组功能性 lncRNA 提供了一种高效手段。

#### 3.2 筛选生长发育性状的功能基因

转录组学和比较基因组学一直是挖掘影响机体发育过程关键基因和转录调控机制的常用方法。2007 年, Tang 等<sup>[35]</sup>利用长标签基因表达系列分析的方法绘制了中外不同猪种在多个胚胎发育期骨骼肌发育的转录组图谱, 证实了通城猪和长白猪相比有更慢的肌肉生长速度和更为复杂的分子形成机制。Li 等<sup>[36]</sup>还利用基因表达芯片技术比较了中国梅山猪背最长肌和比目鱼肌的转录组差异, 发现差异表达基因在 TGF-beta、Wnt 和 MAPK 等信号通路富集。多组学分析技术只能预测肌肉生长发育阶段中潜在的相关基因和蛋白靶标位点, 无法直接获得与预测基因相对应表型数据, 因此, 为了能精确的筛选出与表型直接相关的基因并同时验证, 基于 CRISPR/Cas9 的全基因组功能筛选是更为有效的方法。为寻找到影响肌细胞生成的新调控元件, Bi 等<sup>[37]</sup>在 2017 年利用结合 CRISPR 技术和全基因组在小鼠



成肌细胞融合和成肌纤维形成过程中所需基因的功能丧失筛选技术,鉴定出了一种名为 Myomixer 的肌肉特异性肽,该蛋白对于胚胎发生过程中融合和骨骼肌形成起着至关重要的作用。*Tnfrsf11* 是人类和小鼠破骨细胞形成所必需的基因,与牙齿、头骨、长骨塑性和软骨等组织的形成密切相关。MacLeod 等<sup>[38]</sup>利用 dCas9 融合 KRAB 的 CRISPRi 系统抑制了小鼠 *Tnfrsf11* 的表达,并成功建立了淋巴结发育失败和骨质增生等表型。与野生型病理表型相比较,CRISPRi 转基因小鼠具有更明显的病理表型。这些结果表明,CRISPRi 所介导的基因 LOF 方法可以有效的抑制动物基因组上的靶基因表达,并有望搭建动物生长发育过程中的相关表型,对以后研究不同细胞类型的特异性功能丧失有极大的帮助。

### 3.3 筛选与疾病相关的功能基因

基于 CRISPR/Cas9 系统的全基因组功能筛查方法已广泛应用于医学、免疫学和药理学等领域<sup>[39]</sup>,研究者不仅建立了 *HPRT1* 基因定点突变细胞模型<sup>[40]</sup>,还成功筛选出人急性髓细胞性白血病等疾病的潜在治疗靶点。令人惊喜的是,为了进一步建立小鼠等多种哺乳动物的疾病模型,科研人员正迅速将全基因组功能基因筛选技术应用于实验动物中。Chen 等<sup>[41]</sup>针对肿瘤生长和转移过程中进行了全基因组 CRISPR/Cas9 介导的全基因组基因的 LOF 规模筛选,在非转移性小鼠癌细胞系中构建了含有 67,405 种 sgRNA 的细胞文库,并在小鼠体内富集了文库靶向的基因,鉴定出 624 条 sgRNAs 高度靶向的基因在特定功能丧失或突变后会驱动肿瘤的生长和转移。Shi 等<sup>[42]</sup>在 2015 年利用全基因组 CRISPR/Cas9 系统联合 sgRNA 鉴别了小鼠骨髓源永生巨噬细胞(iBMDMs)中参与炎症激活因子 caspase-1 和细菌脂多糖受体 caspase-11 介导的细胞凋亡的宿主因子中发现了消皮素 D (gasdermin D, GSDMD)底物蛋白,并验证了对 GSDMD 的切割介导细胞焦亡。Napier 等<sup>[43]</sup>在鼠巨噬细胞细胞系中创建了一种 CRISPR-Cas9 全基因组文库的方法曾应用于筛选 caspase-11 介导细胞死亡过程中的新介体<sup>[44]</sup>,并筛选出 Cpb1-C3-C3aR 途径在促炎症传导、依赖 caspase-11 细胞死亡过程和败血症中的新作用。

### 3.4 在其他研究领域的应用

全基因组基因编辑打靶技术目前广泛应用于癌症基因、药物靶点挖掘、微生物反应器制备、病毒感染机制以及 CRISPRi/a 系统的优化和改良等研究方面。通过 CRISPR/Cas9 系统及全基因组功能筛选工具建立的疾病模型,为深入研究癌症致病机理和关键功能基因提供了新思路<sup>[40,45]</sup>。2016 年, Tzelepis 等<sup>[46]</sup>通过优化 CRISPR-Cas9 系统,在人急性髓细胞性白血病细胞(acute myeloid leukemia, AML)中进行全基因组遗传脆弱性的隐性筛选,鉴定出一种新的 *KAT2A* 潜在的治疗靶点,还确定了 *BRD4*、*DOT1L* 和 *MEN1* 等其他几种已知的治疗靶标。同年, Zotova 等<sup>[47]</sup>利用 CRISPR-Cas9 基因敲除(GeCKO)文库载体整合入 CEM T 细胞和 Raji B 细胞中并通过免疫荧光分离阳性单抗,并且新鉴定出肿瘤转移抑制因子 CD82 的新单抗 BF4。为了结合实验目的和研究所需,科研人员针对 Cas 蛋白功能进行了不同的功能修饰,CRISPR/Cas9 编辑系统慢慢趋于定制化<sup>[48]</sup>。Polstein 等将 dCas9 蛋白与融合隐花色素 2 (cryptochromes, CRY2)和碱性螺旋环螺旋蛋白 1 (cryptochrome-interacting basic-helix-loop-helix 1, C1B1)后,便可通过 sgRNA 靶向转录激活区域并高效抑制内源基因的表达<sup>[49]</sup>。

在微生物基因编辑领域,2017 年, Zhang 等<sup>[50]</sup>通过改造后的 CRISPR-Cas Cpf1 蛋白(DNase-dead Cpf1 mutant, ddCpf1)系统在大肠杆菌中实现了一次性多重基因的调控,并通过 RNA-Seq 技术验证了该系统介导的基因表达抑制具有高特异性,有望在细胞和临床研究中取得下一步进展。经过不断的优化和改善, Li 等<sup>[51]</sup>在 2018 年基于 FnCRISPR-Cpf1 系统建立了一种新型高效的链霉菌基因组编辑工具,补充了链霉菌菌株的多基因编辑领域里的技术空白,并有望利用与其他放线菌中药物活性天然产物的开发。在 2019 年, Depardieu 等<sup>[52]</sup>建立了可应用于多种细菌中的 CRISPRi 筛选系统,这些应用均为日后建立大规模原核表达和筛选系统奠定了基础。

综上所述,基于 CRISPR/Cas9 和 CRISPRi/a 技术可以系统地建立全基因组目标区域的 sgRNA 文库和细胞文库,在动物体内和体外研究个体发育及疾病发生和进化过程等方面的功能基因筛选都是一种

有效的方法。

## 4 结语与展望

近几年来, CRISPR/Cas9 技术在各类基础科研中的便利性和重要性与日俱增<sup>[53-55]</sup>。同时, CRISPR/Cas9 全基因组功能筛选鉴定技术在农业精准育种、遗传改良、生命医学、分子治疗和多基因编辑等方面飞速发展, 并取得了一系列成绩。例如, 利用 CRISPR/Cas9 系统结合体细胞核移植(somatic cell nuclear transfer, SCNT)等技术已成功制备了斑马鱼(*Danio rerio*)、小鼠(*Mus musculus*)、猪(*Sus scrofa*)、黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*)和食蟹猴(*Macaca fascicularis*)等基因编辑和转基因动物模型<sup>[56-60]</sup>。由于 CRISPR/Cas9 全基因组功能筛选在 sgRNA 文库和细胞文库搭建的前期需要花费大量的时间成本, 目前该方法较多的应用于人癌症基因的摸索和疾病模型的搭建等研究领域或在动物细胞中进行功能验证。但在今后的研究中, CRISPR/Cas9 全基因组功能筛选技术势必会普及到动植物的全基因组育种工作中, 该技术也为人们理解基因遗传机制、三维基因组调控、生长发育调控和病毒等疾病的治病机理建立了新思路<sup>[61-63]</sup>。

单细胞测序是以单个细胞为单位进行的全基因组或转录组扩增的高通量测序手段, 该技术可以揭示单个细胞的基因结构、基因表达状态以及细胞间的异质性, 是目前研究肿瘤、细胞发育生物学、微生物学等生物学领域的热点<sup>[64-66]</sup>。如果在前期结合 CRISPR 基因编辑技术, 对功能筛选后的单个基因编辑细胞进行高通量组分分析, 可以获得相关性状更清晰的差异信息<sup>[67,68]</sup>。因此, 全基因组功能筛选技术在农业生物和相关学科的研究中还有很大的利用空间。

## 参考文献(References):

- [1] Baliou S, Adamaki M, Kyriakopoulos AM, Spandidos DA, Panayiotidis M, Christodoulou I, Zoumpourlis V. CRISPR therapeutic tools for complex genetic disorders and cancer (Review). *Int J Oncol*, 2018, 53(2): 443-468. [DOI]
- [2] Kruminis-Kaszkiel E, Juranek J, Maksymowicz W, Wojtkiewicz J. CRISPR/Cas9 technology as an emerging tool for targeting Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS). *Int J Mol Sci*, 2018, 19(3): 906. [DOI]
- [3] Crispo M, Mulet AP, Tesson L, Barrera N, Cuadro F, Dos Santos-Neto PC, Nguyen TH, Creneguy A, Brusselle L, Anegon I, Menchaca A. Efficient generation of myostatin knock-out sheep using CRISPR/Cas9 technology and microinjection into zygotes. *PLoS One*, 2015, 10(8): e0136690. [DOI]
- [4] Jansen R, Embden JD, Gastra W, Schouls LM. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Mol Microbiol*, 2002, 43(6): 1565-1575. [DOI]
- [5] 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]
- [6] Brouns SJJ, Jore MM, Lundgren M, Westra ER, Slijkhuys RJH, Snijders APL, Dickman MJ, Makarova KS, Koonin EV, Van der Oost J. Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes. *Science*, 2008, 321(5891): 960-964. [DOI]
- [7] Pourcel C, Salvignol G, Vergnaud G. CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies. *Microbiology*, 2005, 151(Pt 3): 653-663. [DOI]
- [8] Anders C, Niewoehner O, Duerst A, Jinek M. Structural basis of PAM-dependent target DNA recognition by the Cas9 endonuclease. *Nature*, 2014, 513(7519): 569-573. [DOI]
- [9] Wyman C, Kanaar R. DNA double-strand break repair: all's well that ends well. *Annu Rev Genet*, 2006, 40: 363-383. [DOI]
- [10] Mao Z, Bozzella M, Seluanov A, Gorbunova V. DNA repair by nonhomologous end joining and homologous recombination during cell cycle in human cells. *Cell Cycle*, 2008, 7(18): 2902-2906. [DOI]
- [11] Joung J, Konermann S, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Platt RJ, Brigham MD, Sanjana NE, Zhang F. Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout and transcriptional activation screening. *Nat Protoc*, 2017, 12(4): 828-863. [DOI]
- [12] Chowdhury TA, Kocejka C, Eisa-Beygi S, Kleinstiver BP, Kumar SN, Lin CW, Li K, Prabhudesai S, Joung K, Ramchandran R. Temporal and spatial post-transcriptional regulation of zebrafish tie1 mRNA by long noncoding RNA during brain vascular assembly. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2018, 38(7): 1562-1575. [DOI]

- [13] Li HH, Huang CH. Functional genetic screening using CRISPR-Cas9 system. *Chin J Biotech*, 2018, 34(4): 461–472.  
李欢欢, 黄承浩. 基于 CRISPR-Cas9 的功能基因筛选研究进展. *生物工程学报*, 2018, 34(4): 461–472. [DOI]
- [14] 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]
- [15] 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 noncoding RNA loci in human cells. *Science*, 2017, 355(6320). pii:aah7111. [DOI]
- [16] Perez-Pinera P, Kocak DD, Vockley CM, Adler AF, Kabadi AM, Polstein LR, Thakore PI, Glass KA, Ousterout DG, Leong KW, Guilak F, Crawford GE, Reddy TE, Gersbach CA. RNA-guided gene activation by CRISPR-Cas9-based transcription factors. *Nat Methods*, 2013, 10(10): 973–976. [DOI]
- [17] Kampmann M. CRISPRi and CRISPRa screens in mammalian cells for precision biology and medicine. *ACS Chem Biol*, 2018, 13(2): 406–416. [DOI]
- [18] Chavez A, Scheiman J, Vora S, Pruitt BW, Tuttle M, P R Iyer E, Lin S, Kiani S, Guzman CD, Wiegand DJ, Ter-Ovanesyan D, Braff JL, Davidsohn N, Housden BE, Perrimon N, Weiss R, Aach J, Collins JJ, Church GM. Highly efficient Cas9-mediated transcriptional programming. *Nat Methods*, 2015, 12(4): 326–328. [DOI]
- [19] Ganguly J, Martin-Pascual M, van Kranenburg R. CRISPR interference (CRISPRi) as transcriptional repression tool for *Hungateiclostridium thermocellum* DSM 1313. *Microb Biotechnol*, 2019, 13(2): 339–349. [DOI]
- [20] 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]
- [21] Doench JG, Fusi N, Sullender M, Hegde M, Vaimberg EW, Donovan KF, Smith I, Tothova Z, Wilen C, Orchard R, Virgin HW, Listgarten J, Root DE. Optimized sgRNA design to maximize activity and minimize off-target effects of CRISPR-Cas9. *Nat Biotechnol*, 2016, 34(2): 184–191. [DOI]
- [22] Sanjana NE, Shalem O, Zhang F. Improved vectors and genome-wide libraries for CRISPR screening. *Nat Methods*, 2014, 11(8): 783–784. [DOI]
- [23] Liu HL, Wei Z, Dominguez A, Li YD, Wang XW, Qi LS. CRISPR-ERA: a comprehensive design tool for CRISPR-mediated gene editing, repression and activation. *Bioinformatics*, 2015, 31(22): 3676–3678. [DOI]
- [24] Zhao CZ, Zheng XG, Qu WB, Li GL, Li XY, Miao YL, Han XS, Liu XD, Li ZH, Ma YL, Shao QZ, Li HW, Sun F, Xie SS, Zhao SH. CRISPR-offinder: a CRISPR guide RNA design and off-target searching tool for user-defined protospacer adjacent motif. *Int J Biol Sci*, 2017, 13(12): 1470–1478. [DOI]
- [25] Chen C, Hao S, Bai Y, Zhang JP, Zhang JB, Cheng T. Establishment and optimization of genome-wide CRISPR/Cas9-sgRNA screening system in THP1 cell line for functional oncogenes and tumor suppressor genes. *Scientia Sinica Vitae*, 2016, 46(7): 839–850.  
陈晨, 郝莎, 白杨, 张健萍, 张孝兵, 程涛. CRISPR/Cas9-sgRNA 全基因组文库筛选人单核细胞白血病功能性促癌/抑癌基因体系的建立与优化. *中国科学: 生命科学*, 2016, 46(7): 839–850. [DOI]
- [26] Morgens DW, Deans RM, Li A, Bassik MC. Systematic comparison of CRISPR/Cas9 and RNAi screens for essential genes. *Nat Biotechnol*, 2016, 34(6): 634–636. [DOI]
- [27] Schuster A, Erasmus H, Fritah S, Nazarov PV, van Dyck E, Niclou SP, Golebiewska A. RNAi/CRISPR screens: from a pool to a valid hit. *Trends Biotechnol*, 2019, 37(1): 38–55. [DOI]
- [28] Klann TS, Black JB, Chellappan M, Safi A, Song L, Hilton IB, Crawford GE, Reddy TE, Gersbach CA. CRISPR-Cas9 epigenome editing enables high-throughput screening for functional regulatory elements in the human genome. *Nat Biotechnol*, 2017, 35(6): 561–568. [DOI]
- [29] Wang Z, Yang Y, Li S, Li K, Tang Z. Analysis and comparison of long non-coding RNAs expressed in the ovaries of Meishan and Yorkshire pigs. *Anim Genet*, 2019, 50(6): 660–669. [DOI]
- [30] Yu X, Wang Z, Sun H, Yang Y, Li K, Tang Z. Long non-coding MEG3 is a marker for skeletal muscle development and meat production traits in pigs. *Anim Genet*, 2018, 49(6): 571–578. [DOI]
- [31] Zheng XM, Chen J, Pang HB, Liu S, Gao Q, Wang JR, Qiao WH, Wang H, Liu J, Olsen KM, Yang QW. Genome-wide analyses reveal the role of noncoding variation in complex traits during rice domestication. *Sci Adv*, 2019, 5(12): eaax3619. [DOI]
- [32] Cai P, Otten AB, Cheng B, Ishii MA, Zhang W, Huang BB,

- Qu K, Sun BK. A genome-wide long noncoding RNA CRISPRi screen identifies PRANCER as a novel regulator of epidermal homeostasis. *Genome Res*, 2020, 30(1): 22–34. [DOI]
- [33] Esposito R, Bosch N, Lanzós A, Polidori T, Pulido-Quetglas C, Johnson R. Hacking the cancer genome: Profiling therapeutically actionable long Non-coding RNAs using CRISPR-Cas9 screening. *Cancer cell*, 2019, 35(4): 545–557. [DOI]
- [34] Liu Y, Cao ZZ, Wang YN, Guo Y, Xu P, Yuan PF, Liu ZH, He Y, Wei WS. Genome-wide screening for functional long noncoding RNAs in human cells by Cas9 targeting of splice sites. *Nat Biotechnol*, 2018, 36(12): 1203–1210. [DOI]
- [35] Tang ZL, Li Y, Wan P, Li XP, Zhao SH, Liu B, Fan B, Zhu MJ, Yu M, Li K. LongSAGE analysis of skeletal muscle at three prenatal stages in Tongcheng and Landrace pigs. *Genome Biology*, 2007, 8(6): R115. [DOI]
- [36] Li Y, Xu ZY, Li HY, Xiong YZ, Zuo B. Differential transcriptional analysis between red and white skeletal muscle of Chinese Meishan pigs. *Int J Biol Sci*, 2010, 6(4): 350–360. [DOI]
- [37] Bi PP, Ramirez-Martinez A, Li H, Cannavino J, Mcanally JR, Shelton JM, Sánchez-Ortiz E, Bassel-Duby R, Olson EN. Control of muscle formation by the fusogenic micro-peptide myomixer. *Science*, 2017, 356(6335): 323–327. [DOI]
- [38] MacLeod RS, Cawley KM, Gubrij I, Nookaew I, Onal M, O'Brien CA. Effective CRISPR interference of an endogenous gene via a single transgene in mice. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 17312. [DOI]
- [39] Ahmad HI, Ahmad MJ, Asif AR, Adnan M, Iqbal MK, Mehmood K, Muhammad SA, Bhuiyan AA, Elokil A, Du XY, Zhao CZ, Liu XD, Xie SS. A Review of CRISPR-Based genome editing: Survival, evolution and challenges. *Curr Issues Mol Biol*, 2018, 28: 47–68. [DOI]
- [40] Zhang K, Liu W, Liu XF, Chen YS, Liu XH, He ZY. Generation of cell strains containing point mutations in HPRT1 by CRISPR/Cas9. *Hereditas (Beijing)*, 2019, 41(10): 939–949.
- 张楷, 刘蔚, 刘小凤, 陈瑶生, 刘小红, 何祖勇. 利用 CRISPR/Cas9 系统构建人 HPRT1 基因定点突变细胞株. *遗传*, 2019, 41(10): 939–949. [DOI]
- [41] Chen S, Sanjana NE, Zheng K, Shalem O, Lee K, Shi X, Scott DA, Song J, Pan JQ, Weissleder R, Lee H, Zhang F, Sharp PA. Genome-wide CRISPR screen in a mouse model of tumor growth and metastasis. *Cell*, 2015, 160(6): 1246–1260. [DOI]
- [42] Shi JJ, Zhao Y, Wang K, Shi XY, Wang Y, Huang HW, Zhuang YH, Cai T, Wang FC, Shao F. Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death. *Nature*, 2015, 526(7575): 660–665. [DOI]
- [43] Napier BA, Monack DM. Creating a RAW264.7 CRISPR-Cas9 genome wide library. *Bio Protoc*, 2017, 7(10): 1–10. [DOI]
- [44] Napier BA, Brubaker SW, Sweeney TE, Monette P, Rothmeier GH, Gertsch NA, Puschnik A, Carette JE, Khatri P, Monack DM. Complement pathway amplifies caspase-11-dependent cell death and endotoxin-induced sepsis severity. *J Exp Med*, 2016, 213(11): 2365–2382. [DOI]
- [45] Liu H, Li DM, Zhu LY, Lai LJ, Yan WY, Lu YS, Wei Y, Huang YQ, Fang M, Su YG, Yang F, Shu W. Research on the knockout of LMNA gene by CRISPR/Cas9 system in human cell lines. *Hereditas(Beijing)*, 2019, 41(1): 66–75.
- 刘恒, 李东明, 朱兰玉, 赖乐锦, 闫婉云, 陆玉双, 韦伊, 黄月琪, 方媚, 苏元港, 杨芳, 舒伟. 利用 CRISPR/Cas9 敲除人源细胞系中 LMNA 基因的研究. *遗传*, 2019, 41(1): 66–75. [DOI]
- [46] Tzelepis K, Koike-Yusa H, De Braekeleer E, Li Y, Metzakopian E, Dovey OM, Mupo A, Grinkevich V, Li M, Mazan M, Gozdecka M, Ohnishi S, Cooper J, Patel M, McKerrell T, Chen B, Domingues AF, Gallipoli P, Teichmann S, Pöschner H, McDermott U, Saez-Rodriguez J, Huntly B, Iorio F, Pina C, Vassiliou GS, Yusa K. A CRISPR dropout screen identifies genetic vulnerabilities and therapeutic targets in acute myeloid leukemia. *Cell Rep*, 2016, 17(4): 1193–1205. [DOI]
- [47] Zotova A, Zotov I, Filatov A, Mazurov D. Determining antigen specificity of a monoclonal antibody using genome-scale CRISPR-Cas9 knockout library. *J Immunol Methods*, 2016, 439: 8–14. [DOI]
- [48] Covarrubias S, Robinson EK, Shapleigh B, Vollmers A, Katzan S, Hanley N, Fong N, McManus MT, Carpenter S. CRISPR/Cas-based screening of long non-coding RNAs (lncRNAs) in macrophages with an NF- $\kappa$ B reporter. *J Biol Chem*, 2017, 292(51): 20911–20920. [DOI]
- [49] 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]
- [50] Zhang XC, Wang JM, Cheng QX, Zheng X, Zhao GP, Wang J. Multiplex gene regulation by CRISPR-ddCpf1. *Cell Discov*, 2017, 3: 17018. [DOI]
- [51] Li L, Wei K, Zheng G, Liu X. CRISPR-Cpf1-Assisted multiplex genome editing and transcriptional repression in



- streptomycetes. *Appl Environ Microbiol*, 2018, 84(18): e00827–18. [DOI]
- [52] Depardieu F, Bikard D. Gene silencing with CRISPRi in bacteria and optimization of dCas9 expression levels. *Methods*, 2019, 172: 61–75. [DOI]
- [53] Li W, Teng F, Li TD, 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]
- [54] Huang JJ, Cao CW, Zheng GM, Zhao JG. Genome editing technologies drive the development of pig genetic improvement. *Hereditas(Beijing)*, 2017, 39(11): 1078–1089. 黄娇娇, 曹春伟, 郑国民, 赵建国. 基因组编辑技术在猪遗传改良中的应用. *遗传*, 2017, 39(11): 1078–1089. [DOI]
- [55] Li S, Yang YY, Qiu Y, Chen YH, Xu LL, Ding QR. Applications of genome editing tools in precision medicine research. *Hereditas(Beijing)*, 2017, 39(3): 177–188. 李爽, 杨圆圆, 邱艳, 陈彦好, 徐璐薇, 丁秋蓉. 基因组编辑技术在精准医学中的应用. *遗传*, 2017, 39(3): 177–188. [DOI]
- [56] Wu YX, Liang D, Wang YH, Bai MZ, Tang W, Bao SM, Yan ZQ, Li DS, Li JS. Correction of a genetic disease in mouse via use of CRISPR-Cas9. *Cell Stem Cell*, 2013, 13(6): 659–662. [DOI]
- [57] 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]
- [58] Yan S, Tu ZC, LIU ZM, Fan NN, Yang HM, Yang S, Yang WL, Zhao Y, Ouyang Z, Lai CD, Yang HQ, Li L, Liu QS, Shi H, Xu GQ, Zhao H, Wei HJ, Pei Z, Li SH, Lai LX, Li XJ. A huntingtin knockin pig model recapitulates features of selective neurodegeneration in huntington's disease. *Cell*, 2018, 173(4): 989–1002.e13. [DOI]
- [59] Kimura Y, Hisano Y, Kawahara A, Higashijima SI. Efficient generation of knock-in transgenic zebrafish carrying reporter/driver genes by CRISPR/Cas9-mediated genome engineering. *Sci Rep*, 2014, 4: 6545. [DOI]
- [60] Tong XL, Fang CY, Gai TT, Shi J, Lu C, Dai FY. Applications of the CRISPR/Cas9 system in insects. *Hereditas(Beijing)*, 2018, 40(4): 266–278. 童晓玲, 方春燕, 盖婷婷, 石津, 鲁成, 代方银. CRISPR/Cas9 系统在昆虫中的应用. *遗传*, 2018, 40(4): 266–278. [DOI]
- [61] Liu PF, Wu Q. Probing 3D genome by CRISPR/Cas9. *Hereditas(Beijing)*, 2020, 42(1): 18–31. 刘沛峰, 吴强. CRISPR/Cas9 基因编辑在三维基因组研究中的应用. *遗传*, 2020, 42(1): 18–31. [DOI]
- [62] Wang J, Huang J, Xu R. Seamless genome editing in *Drosophila* by combining CRISPR/Cas9 and piggyBac technologies. *Hereditas(Beijing)*, 2019, 41(5): 422–429. 王珏, 黄娟, 许蕊. 利用 CRISPR/Cas9 和 piggyBac 实现果蝇基因组无缝编辑. *遗传*, 2019, 41(5): 422–429. [DOI]
- [63] Tang LC, Gu F. Next-generation CRISPR-Cas for genome editing: focusing on the Cas protein and PAM. *Hereditas(Beijing)*, 2020, 42(3): 236–249. 唐连超, 谷峰. CRISPR-Cas 基因编辑系统升级: 聚焦 Cas 蛋白和 PAM. *遗传*, 2020, 42(3): 236–249. [DOI]
- [64] Wen L, Tang FC. Single-cell sequencing in stem cell biology. *Genome Biol*, 2016, 17: 71. [DOI]
- [65] Li L, Dong J, Yan LY, Yong J, Liu XX, Hu YQ, Fan XY, Wu XL, Guo HS, Wang XY, Zhu XH, Li R, Yan J, Wei Y, Zhao YY, Wang W, Ren YX, Yuan P, Yan ZQ, Hu BQ, Guo F, Wen L, Tang FC, Qiao J. Single-Cell RNA-Seq analysis maps development of human germline cells and gonadal niche interactions. *Cell Stem Cell*, 2017, 20(6): 858–873. [DOI]
- [66] Bian SH, Hou Y, Zhou X, Li XL, Yong J, Wang YC, Wang WD, Yan J, Hu BQ, Guo HS, Wang JL, Gao S, Mao yn, Dong J, Zhu P, Xiu DR, Yan LY, Wen L, Qiao J, Tang FC, Fu W. Single-cell multiomics sequencing and analyses of human colorectal cancer. *Science*, 2018, 362(6418): 1060–1063. [DOI]
- [67] Kanesaka Y, Okada M, Ito S, Oyama T. Monitoring single-cell bioluminescence of Arabidopsis leaves to quantitatively evaluate the efficiency of a transiently introduced CRISPR/Cas9 system targeting the circadian clock gene *ELF3*. *Plant Biotechnol*, 2019, 36(3): 187–193. [DOI]
- [68] Diaz-Hernandez ME, Khan NM, Trochez CM, Yoon T, Maye P, Presciutti SM, Gibson G, Drissi H. Derivation of notochordal cells from human embryonic stem cells reveals unique regulatory networks by single cell-transcriptomics. *J Cell Physiol*, 2019, 235(6): 5241–5255. [DOI]