

王金, 上海师范大学副研究员, 硕士生导师, 优青, 中国生物工程学会合成生物学专业委员会委员。主要研究方向是CRISPR介导的DNA编辑和核酸检测; 开发了新型DNA体外无缝拼接/编辑技术; 提出了基于CRISPR/Cas12a的新型生物元器件拼接标准; 开发了基于CRISPR的微生物基因编辑/基因调控技术; 开发了基于CRISPR/Cas12的核酸检测体系(HOLMES), 并有望建成一套准确、灵敏、低价、快速的分子诊断体系。

基因合成与基因组编辑

刘晓¹ 王慧媛¹ 熊燕¹ 赵国屏² 王金^{3*}

(¹中国科学院上海营养与健康研究所, 上海 200031; ²中国科学院分子植物科学卓越创新中心, 植物生理生态研究所, 上海 200032; ³上海师范大学, 生命科学学院, 上海 200234)

摘要 合成生物学被认为是继“发现DNA双螺旋”和“人类基因组测序计划”之后的又一次生物技术革命, 有望在工业制造、医药、农业、环境和能源等诸多领域带来变革。DNA合成和基因编辑是合成生物学的基石, 其技术进步也是推动合成生物学快速发展的主要动力。该文重点介绍了DNA合成和基因编辑领域的主要技术及其研究进展, 包括利用芯片oligo池的高通量基因合成技术和CRISPR介导的第三代基因组编辑系统等。

关键词 合成生物学; 基因合成; DNA组装; 基因组编辑; CRISPR

Progress in Gene Synthesis and Genome Editing

LIU Xiao¹, WANG Huiyuan¹, XIONG Yan¹, ZHAO Guoping², WANG Jin^{3*}

(¹Shanghai Institute of Nutrition and Health, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China; ²CAS Center for Excellence in Molecular Plant Sciences, Shanghai Institute of Plant Physiology and Ecology, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032, China; ³College of Life Sciences, Shanghai Normal University, Shanghai 200234, China)

Abstract Synthetic biology is considered to be the next biotechnological revolution, following the discovery of the Double Helix and the Human Genome Sequencing Project, and is expected to bring about changes in many fields, such as industrial manufacturing, medicine, agriculture, environment and bioenergy. As the cornerstones of synthetic biology, DNA synthesis and gene editing technologies are the main driving force for the rapid development of synthetic biology. In this review, we focus on the main technologies and research progress in DNA synthesis and gene editing, including high-throughput gene synthesis using oligo pools and the CRISPR-mediated third-generation genome editing system.

Keywords synthetic biology; gene synthesis; DNA assembly; genome editing; CRISPR

合成生物学是将生命科学与工程学融合而成的一门新兴学科, 通过引入工程学理念, 采取正向工

程学“自下而上”的策略来改造或重头设计新的生命体^[2]。早在2004年, 美国《技术评论》便认为合成

*通讯作者。Tel: 021-54971125, E-mail: wangj01@hotmail.com

*Corresponding author. Tel: +86-21-54971125, E-mail: wangj01@hotmail.com

网络出版时间: 2019-12-11 10:32:00

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20191211.1031.012.html>

生物学将成为改变世界的十大新技术之一。近几年, 合成生物学更是迈入了高速发展阶段, 并有望在工业制造、医药、农业、环境和能源等诸多领域引领新一代生物科技革命。合成生物学的广阔前景不仅吸引了大量科研人员的加入, 也引起了资本市场的关注。在2018年, 合成生物学公司Zymergen成功完成了4亿美元的C轮融资, 而整个合成生物学领域更是吸纳了惊人的38亿美金的社会资本。不仅如此, 各国政府也非常重视和支持合成生物学的研究和产业发展, 而美国更是将其上升到了国家安全的高度, 其商务部工业安全署在去年发布的拟进行管制领域就包含了合成生物学。

作为一门生物学与工程学融合的学科, 合成生物学研究可归纳为“设计-合成-测试”的循环实验过程^[3], 其中, DNA合成是整个合成生物学的基础, 也是不可或缺的关键步骤。本文就合成生物学中与DNA合成相关的研究技术及其进展加以介绍, 包括寡核苷酸(oligo)合成、基因合成、DNA拼接和基因组编辑等。

1 Oligo合成

长期以来, oligo被大量用于基因克隆、基因突变、靶标核酸捕获等实验目的; 同时, oligo也是基因合成的基本单元, 被广泛应用于DNA序列的从头合成。Oligo合成的历史可追溯到上世纪50年代, 最早是用磷酸二酯法合成了寡聚二核苷酸^[4]。而到上世纪80年代, 人们又开发了亚磷酰胺化学法(phosphoramidite chemistry)合成oligo^[5], 这也是后来oligo自动化合成的反应原理。目前, 商品化DNA合成仪普遍采用柱式固相亚磷酰胺化学法来合成oligo, 其经过脱保护、偶联、封闭和氧化四步反应循环, 使核苷酸单体不断添加到增长的寡核苷酸链上。随着技术的不断成熟, 柱法合成的通量和成本都不断取得突破, 例如, 可一次性合成768条, 而每条的合成量可低至1 nmol。然而, 化学合成法无法保证每一步100%的反应效率, 且在合成的过程中还会产生副反应(如脱嘌呤反应^[6]); 因此, 为保证合成oligo的完整性和产量, 一般的合成长度都不超过200个核苷酸。如果需要合成更长DNA序列, 可先合成短链oligo, 然后再拼成长链DNA。

随着合成生物学的快速发展, 现有的柱式化学合成法无论在合成通量还是成本方面都是无法满足

整个产业日益增长的需求。因此, 基于芯片技术的oligo化学合成法越来越受到重视, 并在合成质量、通量和成本等多方面取得了突破性进展。Affymetrix公司最早尝试了芯片合成oligo^[7-9], 并在上世纪90年代成功开发了掩模光刻技术(mask-based photolithographic), 利用光对核苷亚磷酰胺进行选择性脱保护, 以实现在芯片的特定位置进行化学反应以完成特定oligo序列的合成。之后, 无掩模程序的开发更是大大简化了光刻法合成技术^[10]。除了光激活控制脱保护外, 还有CustomArray公司开发的基于半导体的电化学法^[11], 以及Agilent和Twist Bio公司开发的喷墨打印核苷酸技术等^[12-13]。相比于传统的柱式合成法, 基于芯片的oligo合成在价格上要便宜2~4个数量级(每个核苷酸大约花费0.000 01~0.001 00美元, 相比于柱式的0.050 00美元)^[14]。同时, 芯片法还具备超高的合成通量, 可一次性合成几千到几十万条oligo。另外, 芯片法还可以缩小反应体积, 减少试剂使用量, 实现更环保的oligo合成, 是未来合成生物学的重要发展方向之一。

但是芯片合成oligo法的错误率要普遍高于柱式合成法; 其中, 只有喷墨打印技术合成的质量与柱式法相当, 可达到每600个核苷酸出现1个错误^[12]。因此, 在使用芯片oligo时要充分考虑oligo质量对后续实验的影响, 特别是对oligo的准确度要求非常高的基因合成领域。而在某些应用场景, 如利用芯片法oligo进行外显子杂交捕获等, 其对oligo准确率的要求并不高, 所以已经开始大量使用芯片法合成的oligo池。

此外, oligo还可以通过酶法来催化合成, 该想法的提出至少可追溯到上世纪60年代^[15], 而末端脱氧核苷酸转移酶(TdT)的发现则加速了该项研究的发展进程^[16-17]。与化学法相比, 酶促法的作用条件更加温和, 且对oligo的损伤较少, 并可减少了副产物的生成, 因而有助于提高oligo合成的准确率和长度。然而, 酶促合成法目前还处于科研探索阶段, 离真正的产业化还有一段距离。

2 基因合成

合成生物学的很多工作, 包括异源基因的密码子优化、遗传通路/代谢途径等的人工构建、基因组的重新设计与合成以及病毒疫苗的研制等都离不开基因合成。然而, 受现有oligo合成的技术原理所

限,无法直接合成所需长度的目标DNA序列。可行的方法是将目标序列分解为多条短oligo进行合成,再利用基因合成方法将oligo拼接成所需的DNA序列;其中,主流的基因合成方法包括连接法^[18]和聚合酶循环组装法(polymerase cycling assembly, PCA)^[19]。连接法的准确率较高,且在合成复杂DNA序列时有优势,而PCA方法使用的oligo量更少,合成效率也更高。随着oligo质量的逐步提升以及各种除错技术的发明,大多数商业化公司都使用PCA法。当然,两种方法也可以联合使用,例如在ΦX174噬菌体基因组的合成过程中便使用了耐高温且更严谨的Taq连接酶介导的连接反应和PCA反应^[20]。

基因合成产物中的突变绝大多数来自oligo自身,少部分来自PCR等过程引入的突变。为了提高基因合成的效率、降低后续的测序验证成本,需要提高oligo的合成质量以降低错误率。一般来说,柱法合成的oligo需经过PAGE甚至是HPLC纯化以去除不纯或大小不对的引物^[21-22];而对于芯片法合成的oligo池,可利用高通量测序法来挑选正确的oligo用于后续的基因合成^[23-24]。在对基因合成产物进行克隆、测序验证之前,还可加入除错步骤。具体做法是通过“高温变性”让合成的双链DNA解链,然后进行“退火”以使每一条链随机地与另一条互补链结合形成双链,从而在突变碱基与正确碱基间形成错配,再利用识别错配的核酸酶(如CEL内切酶)将含有错配的双链切断^[25-26]或者用MutS蛋白特异结合错配的双链来除错^[27-28]。

基于芯片oligo池的高通量基因合成方法是未来发展方向之一。然而,芯片oligo池除了有oligo质量的问题外,成千上万条的oligo混在一起也给后续的基因合成工作带来很大挑战。一个解决思路是在每一组oligo两端添加不同的标签序列,然后经过多轮PCR将oligo池分成多个含有双链短DNA片段的亚组,生成再结合使用多酶混合物将标签序列切除并生成混合的单链oligo亚组,并最终利用各亚组oligo合成目标DNA序列^[26]。另一种选择是将oligo分组后利用GoldenGate的方法进行快速组装,再结合高通量测序法来挑选无错的序列^[29]。相比之下,GoldenGate法在拼接复杂序列时更有优势,但是其要求待拼接序列中不能含有某些Type IIS酶的切割位点,所以无法实现任意序列的合成。除此之外,还有多家生物科技公司在开发新的拼接方法,但是这

些商业化公司往往不会公开其具体的实验方案,但是可根据其对待拼接序列的要求来推测大致的实验方案。一般来说,无论何种实验方案,何种来源的oligo,都只能一步法合成1 Kb左右的DNA片段,而更长的序列则需要在此基础上继续拼接获得。

3 DNA拼接

发生在上世纪70年代的首次DNA实验是通过限制性内切酶和连接酶来完成的,开启了基因工程的生物技术革命^[30-31]。近些年,DNA构建的需求日益增长,也因此催生了大量DNA拼接技术的诞生,包括依赖于各种Type II型限制性内切酶的拼接、位点特异性重组、体外无痕拼接和体内无痕拼接等(图1)。

3.1 位点依赖型拼接

为了简化DNA拼接流程,使不同DNA序列间的拼接过程像搭乐高积木一样简单,Knight等^[32]在2003年首次提出一套DNA体外拼接的BioBrick标准,即在生物元件两端分别加上一组标准化的Type II型限制性内切酶切割位点(含两个同尾酶),以实现不同元件间的迭代拼接。Keasling团队随后使用了一组新的同尾内切酶,并推出了改进版BglBrick标准,从而实现两个蛋白间融合表达。为了应对长片段DNA的拼接,我们团队分别发明了基于归位内切酶的iBrick标准^[33]和利用Cas12a蛋白的C-Brick标准^[34-35],其中C-Brick标准更是具有拼接简单、识别位点长、残留疤痕短、可表达融合蛋白等优势。鉴于标准化拼接的优势,国际基因工程机器大赛(iGEM)将BioBrick采纳为组装标准。不过,该类方法也有拼接速度慢、有疤痕以及无法拼接太大DNA片段等不足之处。对于大的DNA片段,无论是连接效率还是转化宿主的效率都非常低,这也是常规的酶切连接方法很难克隆大片段DNA的原因。

位点特异性重组用的是噬菌体整合酶系统,可特异识别配对的attB/attP位点,并介导配对位点间的重组^[36]。目前,商业化的Gateway系统是比较成熟的技术,其使用的是λ整合酶,可将含有attB与attP重组位点的DNA片段直接克隆到目标载体上^[37]。另外,通过在DNA片段两端加上多组正交的attB/attP位点,便可一步法高效拼接多个DNA片段^[38-39]。虽然Gateway类的拼接方法在拼接大片段、复杂片段、数量较多的片段等方面有较大优势,但其和BioBrick等拼接标准类似,都会在拼接完成的序列中留下疤痕;

因此, 在实际应用中, 使用者需要考虑这些疤痕是否会影响后续的实验。

3.2 不依赖于序列的快速、无痕拼接

同样是使用酶切-连接的方法, Golden Gate方法由于使用了Type IIS限制性内切酶, 这类酶的切割位点位于识别位点之外, 可以做到无痕拼接, 并且可以一次性拼接多个DNA片段^[40]。该方法的唯一不足之处在于Type IIS酶的识别位点较短, 导致序列内部往往存在酶切位点, 因而不适合长片段DNA的拼接。为此, 我们团队开发了改进版的Master Ligation方法, 主要优点在于使用了*MspJ* I酶。该酶兼具Type IIS和IIM的特征, 仅识别甲基化修饰的位点(可通过PCR的引物添加)并且切割位点位于识别位点之外, 属于序列不依赖型的、多片段DNA拼接技术^[41]。

另一个主流的拼接方向是不使用限制性内切酶, 但是依赖于待拼接片段间的重复序列。在上世纪80年代末发明的OE-PCR技术就是利用片段间的重复序列进行退火, 再结合PCR技术进行扩增, 从而完成了多片段DNA的体外拼接^[42]。紧接着, 研究人员又发明了“不依赖于连接的克隆方法”, 即利用片段间存在同源序列的特征进行变性/退火以形成带缺口的环形DNA分子, 之后转化大肠杆菌并利用宿主的修复系统来修复DNA分子上的缺口^[43]。可以说, 该工作是继“酶切-连接”法克隆DNA之后的又一开创

性发明, 其利用宿主修复系统帮助拼接的研究思路很可能影响了后来发明的各种不依赖于序列的体外拼接方法, 包括SLIC方法^[44]、SLiCE方法^[45]、USER方法^[46-47]以及Gibson Assembly方法^[48]等。在以上方法中, Gibson Assembly在合成生物学领域应用最广, 其基于外切酶、DNA聚合酶和连接酶的组合作用, 在50 °C的反应条件下, 一步法完成多个DNA片段的快速拼接^[48-49]。首先, T5外切酶作用于待拼接片段后生成可互补配对的黏性末端并自发配对形成双链DNA结构, 然后再利用DNA聚合酶将空隙补齐, 最后在Taq连接酶的作用下, 缺口被连好并形成完整的DNA分子。高效的Gibson Assembly方法可拼接Mb(Mega base)级别的DNA片段^[48], 也被用来拼接完整的细菌基因组^[50]。此外, 一些商业公司也推出了37 °C条件下反应的一步法多片段无缝克隆试剂盒(如吐露港生物科技有限公司的Ezmax系列), 可在体外快速、高效拼接多个DNA片段。

除了体外拼接外, 利用宿主体内的重组活力进行体内拼接也是一种非常好的选择, 其中, 常用的宿主包括酿酒酵母^[50]、大肠杆菌^[51]、枯草芽孢杆菌^[52]以及某些模式植物^[53]等。酿酒酵母体内的同源重组活力很强, 且暂时未知其拼接DNA大小的上限; Gibson等^[50]在酿酒酵母中成功拼接了约600 Kb的生殖支原体基因组; 赵惠民团队^[54]也利用酿酒酵母体组

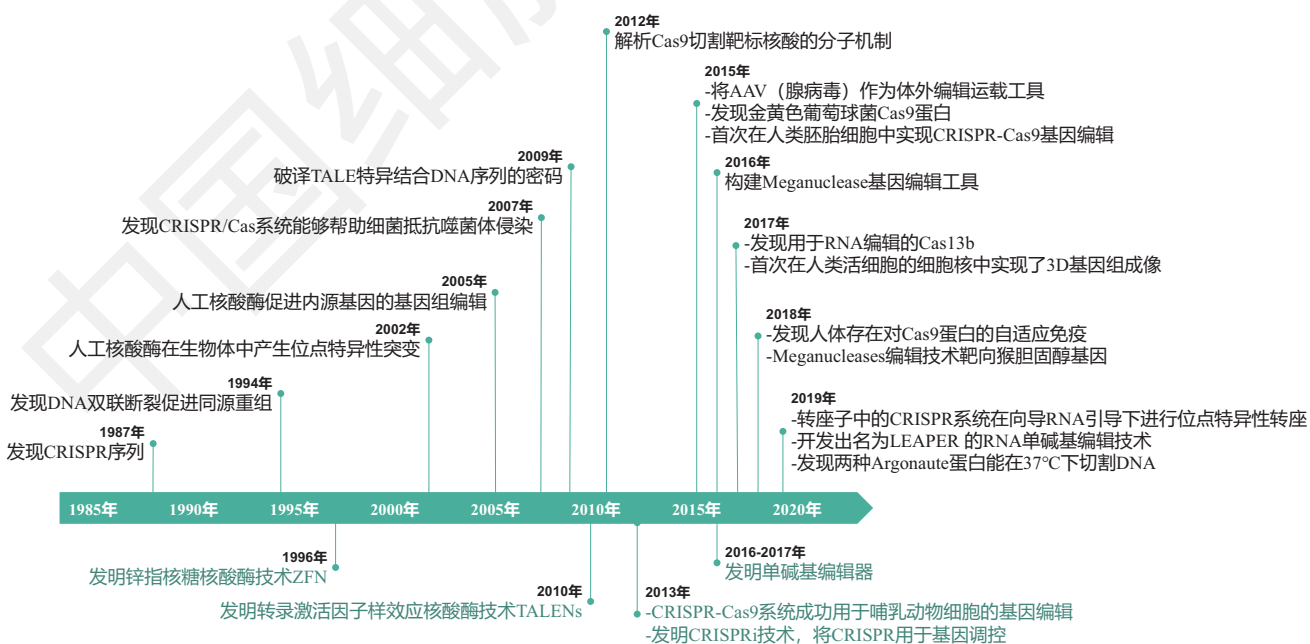


图1 基于芯片oligo池进行基因合成的主要途径

Fig.1 Strategies for gene synthesis using array-derived oligo pools

装了生物代谢基因簇。大肠杆菌自身的重组活性较弱,但是通过在大肠杆菌中表达RecET系统可成功克隆大于50 Kb的基因簇^[55];大肠杆菌的优势主要在于其较快的生长速度。然而,对于多个片段的拼接,酿酒酵母系统仍然是首选。

4 基因组的合成与编辑

从头合成生命一直是合成生物学家的重要目标,其中基因组的合成是关键步骤之一,也是DNA合成的最高要求。近年来,随着体内和体外各种拼接技术、测序技术以及染色体操作的逐渐成熟,科学家们已经先后攻克了病毒、细菌、真菌的基因组从头合成,并正在探索人类基因组编写计划(HGP-write)。可以说,基因组的从头合成体现了科学家“写”基因组的能力;而基因组的编辑则要求科学家具备“改”的本领,这对于基础研究、农业作物育种以及基因治疗等都有着非常重要的作用。特别是CRISPR等新型基因编辑系统的发明和完善,更是为基因组编辑领域注入了全新的活力。

4.1 基因组合成

人类通过化学法合成的第一条基因组是脊髓灰质炎病毒的基因组,其流程是先合成DNA,然后再体外转录成具备细胞侵染能力的病毒RNA基因组^[56]。之后,Venter团队^[20]通过全化学合成的方法陆续合成了ΦX174噬菌体基因以及生殖支原体的基因组^[49]。到了2010年,该团队又从头设计、合成和组装了长为1.1 Mb的蕈状支原体基因组,并通过替换山羊支原体细胞中的基因组,成功创造了人工细胞——“辛西娅”^[57]。此后,Boeke团队^[58]也用从头合成法完成了2条酿酒酵母染色体臂的合成继而启动

了合成酵母基因组计划(Sc2.0),目标是用人工合成的染色体替换酵母自身的16条染色体。目前,Sc2.0计划已取得了丰硕的研究成果,并陆续完成了包括2、3、5、6、10和12号染色体在内6条人工染色体的设计与合成,其中,我国的科学家团队主导了其中3条的合成^[59-61]。2018年,中国科学院合成生物学重点实验室覃重军团队^[62]又运用基因组编辑技术将酿酒酵母细胞的16条染色体连接为1条,首次创造了单染色体酿酒酵母。该项工作是继“辛西娅”合成和Sc2.0之后的又一里程碑式的研究成果,也为研究细胞衰老等基础的科学问题提供了很好的模型。此外,通过对全基因组范围内的密码子进行替换和从头合成,Chin团队^[63]成功地将64种密码子减少为61种,释放的密码子空位有助于将来工业生产各种修饰蛋白质。

4.2 CRISPR基因组编辑系统

得益于扎实的基础研究,模式微生物(包括大肠杆菌和酿酒酵母等)的基因组编辑体系相对成熟,而对于高等真核生物(如哺乳动物细胞和植物等)来说,一直缺乏高效的基因组编辑技术。近年来,随着一系列位点特异性切割蛋白的发现和运用,高等真核细胞的基因组编辑技术也获得了飞快发展(图2)。最早用于基因组编辑的锌指蛋白,也被称为第一代基因组编辑系统,可通过工程化改造使其识别特异的碱基序列,并通过融合Fok I核酸酶结构域形成锌指蛋白核酸酶(zinc-finger nuclease, ZFN)。ZFN可针对基因组上特定位点进行高效切割来实现基因组编辑^[64-66]。另一个可工程化改造的核酸酶是转录激活因子样效应物核酸酶(transcription activator-like nuclease, TALEN)^[67-69]。与锌指蛋白类似,

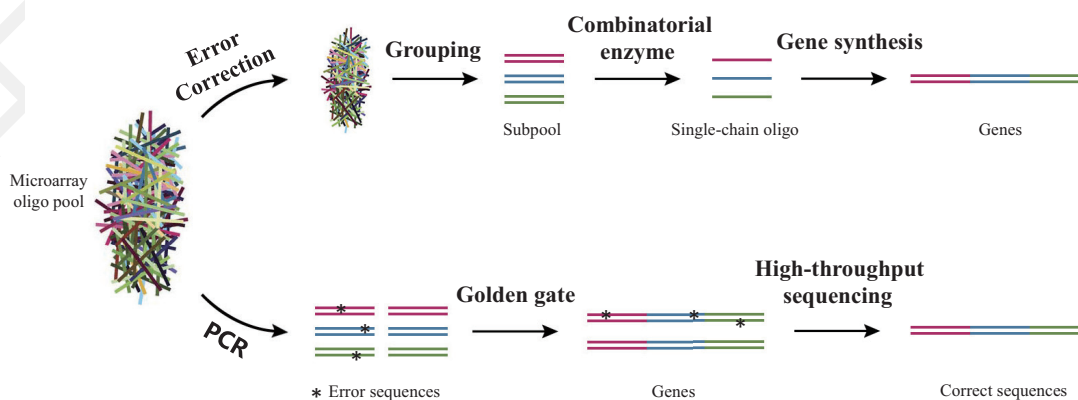


图2 基因编辑技术发展历程
Fig. 2 The history of gene editing technologies

也可工程化改造使其识别特异的核酸序列, 然后通过融合 *Fok I* 核酸酶来实现基因组的高效编辑。在实际编辑过程中, ZFN和TALEN两类系统都需要同时靶向目标位点的两侧来促使 *Fok I* 形成二聚体以切断基因组双链DNA。相比之下, TALEN的可编辑性和切割效率都要明显优于ZFN, 所以也被称为第二代基因组编辑系统。尽管如此, 当编辑基因组上的不同位点时, 需要重新构建ZFN和TALEN, 其对应的工作量和成本非一般研究团队所能够承受, 因此, 这两类技术并没有获得大范围的推广和应用。而最近几年开发的来源于原核生物的CRISPR系统(clustered regularly interspaced short palindromic repeats)则以其简便、高效和低成本的优势迅速掀起了基因组编辑的新一代革命, 因此也被誉为第三代基因组编辑系统^[70-71]。在向导RNA的引导下, CRISPR相关蛋白(Cas)会特异性结合到靶标位点并将靶标双链DNA切断。以上基因组编辑系统的共同点都是在特定靶标位点引起双链DNA的断裂, 然后借助于宿主细胞自身的非同源末端连接系统来修复断裂位点并引入突变或转入同源模板来完成精确修复。

CRISPR系统被认为是细菌/古菌的免疫系统, 在向导RNAs的引导下, Cas蛋白与向导RNA形成的复合物可以特异结合入侵的核酸并将其切断, 从而能够保护宿主免受外来核酸的入侵^[70,72-74]。目前鉴定的比较清楚的Cas蛋白有Cas9^[70-71,74]、Cas12a^[75-76]、Cas12b^[77-78]、Cas14^[79-80]、Cas13^[81-83]等, 其中除Cas13切割靶标RNA外, 其余Cas蛋白均识别/切割靶标单链或双链DNA。在向导RNA的引导下, Cas蛋白结合靶标核酸形成复合物, 然后把靶标核酸切断。为了保证特异切割入侵核酸同时不误切宿主自身的核酸序列, 向导RNA上的向导序列需与靶标核酸序列互补配对, 同时靶标双链DNA上需具备PAM位点(proto-spacer-adjacent motifs)时, Cas蛋白才能识别和切割。而对于Cas13来说, 靶标RNA序列附近需含有PFS位点(proto-spacer flanking site)。此外, 不同Cas蛋白的向导RNA也不一样。例如, Cas9除了需要crRNA(CRISPR RNA)外, 还需要tracrRNA与crRNA通过碱基配对的方式形成一个与Cas9作用的复合RNA结构^[84]。为了简便起见, 也可以将crRNA与tracrRNA连接起来, 形成一条sgRNA(single guide RNA)^[70]。而部分Cas蛋白, 像Cas12a, 则仅需要一条

crRNA, 而并不需要tracrRNA。基于以上特征, 研究人员发现, 针对不同的靶标位点, 只需要设计和合成一条新的向导RNA即可, 而无需重新编辑Cas蛋白, 这比ZFN和TALEN要容易得多。

自Jinek等^[70]于2012年在体外揭示了Cas9的切割机制之后, CRISPR系统被迅速引入哺乳动物细胞中用于基因组编辑^[71], 之后被快速推广至不同的物种, 包括各种植物细胞和微生物等^[85-86]。由于CRISPR系统的高效性, 人们又将其用于多位点的基因编辑^[87]、大片段DNA删除^[88]以及各种突变库筛选^[89-90]等目的。从2013年起, CRISPR研究逐渐成为热点, 且每年发表的研究论文急剧增加; 至2018年, 一年内在PubMed上检索到的与CRISPR有关的研究论文已经超过5 000篇。

在进行基因组编辑时, 特别是针对哺乳动物细胞, 编辑的精准性尤其重要。为了降低脱靶率, 研究人员尝试了不同的方法。例如, 通过构建Cas9突变体, 降低其与非靶标序列的亲合力, 从而获得精确度更高的eCas9和HFCas9突变体^[91-92]; 构建只能切割靶标双链DNA中一条链的nCas9或者将失去切割活性的dCas9连上*Fok I*, 在切割靶标位点时, 在靶标位点两侧设计切割位点以实现双链DNA的断裂^[93]; 使用Cas9-sgRNA的RNP复合物来代替质粒系统, 可以降低Cas蛋白浓度并缩短Cas蛋白的作用时间, 进而降低脱靶率^[94]; 优化sgRNA的结构或改变sgRNA向导序列的长度^[95]。此外, 还可以通过调控Cas9的切割活力来提供精准度, 如用小分子化合物、光、配体等来调控^[96-99]。不同的Cas蛋白也具有不同的脱靶率, 像野生型Cas12a的脱靶率要比野生型Cas9的低^[100]。

除了基因编辑外, CRISPR系统还被广泛应用于基因表达调控、表观遗传修饰、基因组成像以及最近发展起来的基因诊断等^[101-104]。除DNA编辑外, 基于CRISPR-Cas13的编辑系统还可实现RNA水平的编辑, 包括RNA剪切、RNA量的调控、RNA碱基编辑等^[105-108]。另外, 科学家也在不停寻找用于基因编辑的新型编辑技术, 包括Argonaute蛋白和CRISPR转座子等。与Cas蛋白不同, Argonaute可在磷酸化的ssDNA引导下特异切割靶标双链DNA, 但是通常需要较高的作用温度^[109], 因而限制了其在哺乳动物细胞中的应用。韩春雨团队最初发现的NgAgo蛋白认为可以应用于哺乳动物细胞的基因组编辑, 但是其实验结果一直无法重复, 相关论文也已被作者撤稿。

不过,最近也有不少研究团队挖掘了新的Argonaute蛋白,并证明其在37 °C条件下可以工作^[110],但是这方面的工作显然还需要更多研究团队的跟进。此外,最近也有研究发现,在转座子中的CRISPR系统能够在向导RNA引导下进行位点特异性转座,这也为基因组定点插入外源DNA提供了新的思路^[111-112]。

4.3 单碱基编辑器

除CRISPR系统外,单碱基编辑器也成为了治疗因基因突变导致的遗传疾病的热门工具之一,其可以比较精确、又很高效地将一种碱基突变为另一种碱基,在这过程中不引起靶标双链DNA的断裂。最早开发的碱基编辑器是将dCas9或nCas9与胞苷脱氨酶融合,从而将特异靶标位点的胞嘧啶转化为尿嘧啶,随后通过DNA复制或修复,最终将尿嘧啶变为胸腺嘧啶^[113]。目前,针对胞嘧啶的碱基编辑器包括BE3、BE4和BE4max等,编辑窗口为2~5个碱基^[114]。研究人员还使用循环置换的Cas9变体产生4个胞嘧啶和4个腺嘌呤碱基编辑器,编辑窗口从4~5个核苷酸扩展到最多8~9个核苷酸,并能够减少副产物的形成^[115]。最近研究人员又开发了腺嘌呤碱基编辑器(adenine base editor, ABE),可以将腺嘌呤转化为肌苷,最终转化为鸟嘌呤^[116]。除了哺乳动物细胞外,碱基编辑器也在微生物和植物中获得了广泛的应用^[117]。但是,碱基编辑器也存在脱靶率高的致命问题,而且不仅有DNA的脱靶,最新的研究也表明,包括BE3、BE3-hA3A和ABE7.10等在内的系统还有大量的RNA脱靶率^[118-119]。此外,ADAR腺嘌呤脱氨酶也被用于RNA的碱基编辑,例如可以将ADAR或其催化功能域与失活的Cas13融合^[107,120],也可以直接用人工合成的RNA来招募内源的ADAR用于RNA碱基编辑^[121-122]。

5 小结

随着合成生物学的快速发展,很多新的研究方向开始从实验室开始走向商业化应用,包括基因挖掘、遗传线路构建和代谢通量优化等,这一方面促进人工合成DNA和编辑需求的急剧增长,同时也催生了各种新技术的发明和完善。另外,HGP-write的启动以及DNA存储等应用场景的挖掘更是对DNA合成的成本、通量和速度提出了更高的要求。可以类比的是,随着高通量测序技术的发展,DNA测序在过去十几年内发生了革命性的变化;从2007到2012年,DNA测序的耗费下降了4个数量级^[123]。未来随

着芯片法合成的oligo质量不断提高以及各种新型拼接技术的发明和完善,DNA合成的成本也将会大幅度降低,预计到2030年,DNA合成成本或将降至每对碱基0.000 000 1美元^[124]。同时,基于酶法的DNA合成技术也被寄予厚望,并有望引领新一代的DNA合成革命^[125]。

DNA编辑由于在生物工程、农业和基因治疗等多个方面都起着至关重要的作用,无论是科研界还是资本市场都对各类新型编辑技术倾注了大量热情。目前,基于CRISPR的第三代基因组编辑系统无论在简便性、效率还是成本等方面都体现了其无与伦比的优势。但是,CRISPR技术在农业方面的应用还面临着各种政策的考验和生态安全性的担忧,而其在基因治疗方面则主要受脱靶率和伦理等方面的困扰。此外,目前CRISPR领域的核心专利基本上都掌握在外国公司手中,除我们团队拥有CRISPR分子诊断的核心专利外^[126],国内没有任何CRISPR基因编辑的底层专利,这对我国的基因编辑相关产业来说绝对不是一个好消息。因此,开发具备自主知识产权的底层基因编辑技术是迫在眉睫,也期待在未来第四代、第五代基因组编辑系统的开发过程中能够看到中国科学家的原创性贡献。

参考文献 (References)

- 1 Andrianantoandro E, Basu S, Karig DK, Weiss R. Synthetic biology: new engineering rules for an emerging discipline. *Mol Syst Biol* 2006; 2: 2006.0028.
- 2 赵国屏. 合成生物学: 开启生命科学“会聚”研究新时代. *中国科学院院刊* 2018; 33(11): 14.
- 3 Endler L, Rodriguez N, Juty N, Chelliah V, Laibe C, Li C, *et al.* Designing and encoding models for synthetic biology. *J R Soc Interface* 2009; 6 Suppl 4: S405-17.
- 4 Michelso AM, Tod S. Nucleotides part XXXII. Synthesis of a dithymidine dinucleotide containing a 3'-5'-internucleotidic linkage. *J Chem Society* 1955: 6.
- 5 Beaucage SL, Caruthers MH. Deoxynucleoside phosphoramidites: a new class of key intermediates for deoxypolynucleotide synthesis. *Tetrahedron Letters* 1981; 22(20): 3.
- 6 LeProust EM, Peck BJ, Spirin K, McCuen HB, Moore B, Namsaraev E, *et al.* Synthesis of high-quality libraries of long (150 mer) oligonucleotides by a novel depurination controlled process. *Nucleic Acids Res* 2010; 38(8): 2522-40.
- 7 Fodor SP, Read JL, Pirrung MC, Stryer L, Lu AT, Solas D. Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis. *Science* 1991; 251(4995): 767-73.
- 8 Pease AC, Solas D, Sullivan EJ, Cronin MT, Holmes CP, Fodor SP. Light-generated oligonucleotide arrays for rapid DNA sequence analysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91(11): 5022-6.

- 9 Gao X, LeProust E, Zhang H, Srivannavit O, Gulari E, Yu P, *et al.* A flexible light-directed DNA chip synthesis gated by deprotection using solution photogenerated acids. *Nucleic Acids Res* 2001; 29(22): 4744-50.
- 10 Singh-Gasson S, Green RD, Yue Y, Nelson C, Blattner F, Sussman MR, *et al.* Maskless fabrication of light-directed oligonucleotide microarrays using a digital micromirror array. *Nat Biotechnol* 1999; 17(10): 974-8.
- 11 Ghindilis AL, Smith MW, Schwarzkopf KR, Roth KM, Peyvan K, Munro SB, *et al.* CombiMatrix oligonucleotide arrays: genotyping and gene expression assays employing electro-chemical detection. *Biosens Bioelectron* 2007; 22(910): 1853-60.
- 12 Saaem I, Ma KS, Marchi AN, LaBean TH, Tian J. *In situ* synthesis of DNA microarray on functionalized cyclic olefin copolymer substrate. *ACS Appl Mater Interfaces* 2010; 2(2): 491-7.
- 13 Hughes TR, Mao M, Jones AR, Burchard J, Marton MJ, Shannon KW, *et al.* Expression profiling using microarrays fabricated by an ink-jet oligonucleotide synthesizer. *Nat Biotechnol* 2001; 19(4): 342-7.
- 14 Kosuri S, Church GM. Large-scale *de novo* DNA synthesis: technologies and applications. *Nat Methods* 2014; 11(5): 499-507.
- 15 Bollum FJ. Oligodeoxyribonucleotide-primed reactions catalyzed by calf thymus polymerase. *J Biol Chem* 1962; 237: 1945-9.
- 16 Jensen MA, Davis RW. Template-independent enzymatic oligonucleotide synthesis (TiEOS): its history, prospects, and challenges. *Biochemistry* 2018; 57(12): 1821-32.
- 17 Palluk S, Arlow DH, de Rond T, Barthel S, Kang JS, Bector R, *et al.* *De novo* DNA synthesis using polymerase-nucleotide conjugates. *Nat Biotechnol* 2018; 36(7): 645-50.
- 18 Agarwal KL, Buchi H, Caruthers MH, Gupta N, Khorana HG, Kleppe K, *et al.* Total synthesis of the gene for an alanine transfer ribonucleic acid from yeast. *Nature* 1970; 227(5253): 27-34.
- 19 Stemmer WP, Cramer A, Ha KD, Brennan TM, Heyneker HL. Single-step assembly of a gene and entire plasmid from large numbers of oligodeoxyribonucleotides. *Gene* 1995; 164(1): 49-53.
- 20 Smith HO, Hutchison CA, 3rd, Pfannkoch C, Venter JC. Generating a synthetic genome by whole genome assembly: phiX174 bacteriophage from synthetic oligonucleotides. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100(26): 15440-5.
- 21 Ellington A, Pollard JD, Jr. Introduction to the synthesis and purification of oligonucleotides. *Curr Protoc Nucleic Acid Chem* 2001; Appendix 3: Appendix 3C.
- 22 Andrus A, Kuimelis RG. Analysis and purification of synthetic nucleic acids using HPLC. *Curr Protoc Nucleic Acid Chem* 2001; Chapter 10: Unit 10.5.
- 23 Matzas M, Stahler PF, Kefer N, Siebelt N, Boisguerin V, Leonard JT, *et al.* High-fidelity gene synthesis by retrieval of sequence-verified DNA identified using high-throughput pyrosequencing. *Nat Biotechnol* 2010; 28(12): 1291-4.
- 24 Schwartz JJ, Lee C, Shendure J. Accurate gene synthesis with tag-directed retrieval of sequence-verified DNA molecules. *Nat Methods* 2012; 9(9): 913-5.
- 25 Quan J, Saaem I, Tang N, Ma S, Negre N, Gong H, *et al.* Parallel on-chip gene synthesis and application to optimization of protein expression. *Nat Biotechnol* 2011; 29(5): 449-52.
- 26 Kosuri S, Eroshenko N, Leproust EM, Super M, Way J, Li JB, *et al.* Scalable gene synthesis by selective amplification of DNA pools from high-fidelity microchips. *Nat Biotechnol* 2010; 28(12): 1295-9.
- 27 Carr PA, Park JS, Lee YJ, Yu T, Zhang S, Jacobson JM. Protein-mediated error correction for *de novo* DNA synthesis. *Nucleic Acids Res* 2004; 32(20): e162.
- 28 Wan W, Li L, Xu Q, Wang Z, Yao Y, Wang R, *et al.* Error removal in microchip-synthesized DNA using immobilized MutS. *Nucleic Acids Res* 2014; 42(12): e102.
- 29 Kim H, Han H, Ahn J, Lee J, Cho N, Jang H, *et al.* 'Shotgun DNA synthesis' for the high-throughput construction of large DNA molecules. *Nucleic Acids Res* 2012; 40(18): e140.
- 30 Cohen SN, Chang AC, Boyer HW, Helling RB. Construction of biologically functional bacterial plasmids *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1973; 70(11): 3240-4.
- 31 Lobban PE, Kaiser AD. Enzymatic end-to end joining of DNA molecules. *J Mol Biol* 1973; 78(3): 453-71.
- 32 Anderson J, Dueber JE, Leguia M, Wu GC, Goler JA, Arkin AP, *et al.* BglBricks: a flexible standard for biological part assembly. *J Biol Eng* 2010; 4(1): 1.
- 33 Liu JK, Chen WH, Ren SX, Zhao GP, Wang J. iBrick: a new standard for iterative assembly of biological parts with homing endonucleases. *PLoS One* 2014; 9(10): e110852.
- 34 Li SY, Zhao GP, Wang J. Protocols for C-brick DNA standard assembly using Cpf1. *J Vis Exp* 2017; doi: 10.3791/55775.
- 35 Li SY, Zhao GP, Wang J. C-brick: a new standard for Assembly of Biological Parts Using Cpf1. *ACS Synth Biol* 2016; 5(12): 1383-8.
- 36 Hartley JL, Temple GF, Brasch MA. DNA cloning using *in vitro* site-specific recombination. *Genome Res* 2000; 10(11): 1788-95.
- 37 Busso D, Delagoutte-Busso B, Moras D. Construction of a set Gateway-based destination vectors for high-throughput cloning and expression screening in *Escherichia coli*. *Anal Biochem* 2005; 343(2): 313-21.
- 38 Sasaki Y, Sone T, Yoshida S, Yahata K, Hotta J, Chesnut JD, *et al.* Evidence for high specificity and efficiency of multiple recombination signals in mixed DNA cloning by the Multisite Gateway system. *J Biotechnol* 2004; 107(3): 233-43.
- 39 Zhang L, Zhao G, Ding X. Tandem assembly of the epothilone biosynthetic gene cluster by *in vitro* site-specific recombination. *Sci Rep* 2011; doi:10.1038/srep00141.
- 40 Engler C, Kandzia R, Marillonnet S. A one pot, one step, precision cloning method with high throughput capability. *PLoS One* 2008; 3(11): e3647.
- 41 Chen WH, Qin ZJ, Wang J, Zhao GP. The MASTER (methylation-assisted tailorable ends rational) ligation method for seamless DNA assembly. *Nucleic Acids Res* 2013; 41(8): e93.
- 42 Horton RM, Hunt HD, Ho SN, Pullen JK, Pease LR. Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension. *Gene* 1989; 77(1): 61-8.
- 43 Shuldiner AR, Scott LA, Roth J. PCR-induced (ligase-free) subcloning: a rapid reliable method to subclone polymerase chain reaction (PCR) products. *Nucleic Acids Res* 1990; 18(7): 1920.
- 44 Li MZ, Elledge SJ. Harnessing homologous recombination *in vitro* to generate recombinant DNA via SLIC. *Nat Methods* 2007; 4(3): 251-6.
- 45 Zhang Y, Werling U, Edelmann W. SLiCE: a novel bacterial cell

- extract-based DNA cloning method. *Nucleic Acids Res* 2012; 40(8): e55.
- 46 Smith C, Day PJ, Walker MR. Generation of cohesive ends on PCR products by UDG-mediated excision of dU, and application for cloning into restriction digest-linearized vectors. *PCR Methods Appl* 1993; 2(4): 328-32.
- 47 Nour-Eldin HH, Geu-Flores F, Halkier BA. USER cloning and USER fusion: the ideal cloning techniques for small and big laboratories. *Methods Mol Biol* 2010; 643: 185-200.
- 48 Gibson DG, Young L, Chuang RY, Venter JC, Hutchison CA, 3rd, Smith HO. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nat Methods* 2009; 6(5): 343-5.
- 49 Gibson DG, Benders GA, Andrews-Pfannkoch C, Denisova EA, Baden-Tillson H, Zaveri J, *et al.* Complete chemical synthesis, assembly, and cloning of a *Mycoplasma genitalium* genome. *Science* 2008; 319(5867): 1215-20.
- 50 Gibson DG, Benders GA, Axelrod KC, Zaveri J, Algire MA, Moodie M, *et al.* One-step assembly in yeast of 25 overlapping DNA fragments to form a complete synthetic *Mycoplasma genitalium* genome. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105(51): 20404-9.
- 51 Zhang Y, Muylers JP, Testa G, Stewart AF. DNA cloning by homologous recombination in *Escherichia coli*. *Nat Biotechnol* 2000; 18(12): 1314-7.
- 52 Yonemura I, Nakada K, Sato A, Hayashi J, Fujita K, Kaneko S, *et al.* Direct cloning of full-length mouse mitochondrial DNA using a *Bacillus subtilis* genome vector. *Gene* 2007; 391(1/2): 171-7.
- 53 Zhu C, Naqvi S, Breitenbach J, Sandmann G, Christou P, Capell T. Combinatorial genetic transformation generates a library of metabolic phenotypes for the carotenoid pathway in maize. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105(47): 18232-7.
- 54 Shao Z, Zhao H, Zhao H. DNA assembler, an *in vivo* genetic method for rapid construction of biochemical pathways. *Nucleic Acids Res* 2009; 37(2): e16.
- 55 Fu J, Bian X, Hu S, Wang H, Huang F, Seibert PM, *et al.* Full-length RecE enhances linear-linear homologous recombination and facilitates direct cloning for bioprospecting. *Nat Biotechnol* 2012; 30(5): 440-6.
- 56 Cello J, Paul AV, Wimmer E. Chemical synthesis of poliovirus cDNA: generation of infectious virus in the absence of natural template. *Science* 2002; 297(5583): 1016-8.
- 57 Gibson DG, Glass JI, Lartigue C, Noskov VN, Chuang RY, Algire MA, *et al.* Creation of a bacterial cell controlled by a chemically synthesized genome. *Science* 2010; 329(5987): 52-6.
- 58 Annaluru N, Muller H, Mitchell LA, Ramalingam S, Stracquadanio G, Richardson SM, *et al.* Total synthesis of a functional designer eukaryotic chromosome. *Science* 2014; 344(6179): 55-8.
- 59 Xie ZX, Li BZ, Mitchell LA, Wu Y, Qi X, Jin Z, *et al.* "Perfect" designer chromosome V and behavior of a ring derivative. *Science* 2017; 355(6329). pii: eaaf4704.
- 60 Zhang WM, Zhao GH, Luo ZQ, Lin YC, Wang LH, Guo YK, *et al.* Engineering the ribosomal DNA in a megabase synthetic chromosome. *Science* 2017; 355(6329). pii: eaaf3981.
- 61 Shen Y, Wang Y, Chen T, Gao F, Gong JH, Abramczyk D, *et al.* Deep functional analysis of synII, a 770-kilobase synthetic yeast chromosome. *Science* 2017; 355(6329). pii: eaaf4791.
- 62 Shao YY, Lu N, Wu ZF, Cai C, Wang SS, Zhang LL, *et al.* Creating a functional single-chromosome yeast. *Nature* 2018; 560(7719): 331.
- 63 Fredens J, Wang KH, de la Torre D, Funke LFH, Robertson WE, Christova Y, *et al.* Total synthesis of *Escherichia coli* with a re-coded genome. *Nature* 2019; 569(7757): 514.
- 64 Kim YG, Cha J, Chandrasegaran S. Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93(3): 1156-60.
- 65 Kim HJ, Lee HJ, Kim H, Cho SW, Kim JS. Targeted genome editing in human cells with zinc finger nucleases constructed via modular assembly. *Genome Res* 2009; 19(7): 1279-88.
- 66 Lombardo A, Genovese P, Beausejour CM, Colleoni S, Lee YL, Kim KA, *et al.* Gene editing in human stem cells using zinc finger nucleases and integrase-defective lentiviral vector delivery. *Nat Biotechnol* 2007; 25(11): 1298-306.
- 67 Sun N, Liang J, Abil Z, Zhao H. Optimized TAL effector nucleases (TALENs) for use in treatment of sickle cell disease. *Mol Biosyst* 2012; 8(4): 1255-63.
- 68 Li T, Huang S, Zhao X, Wright DA, Carpenter S, Spalding MH, *et al.* Modularly assembled designer TAL effector nucleases for targeted gene knockout and gene replacement in eukaryotes. *Nucleic Acids Res* 2011; 39(14): 6315-25.
- 69 Christian M, Cermak T, Doyle EL, Schmidt C, Zhang F, Hummel A, *et al.* Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. *Genetics* 2010; 186(2): 757-61.
- 70 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): 816-21.
- 71 Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, *et al.* Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* 2013; 339(6121): 819-23.
- 72 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.
- 73 Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, Boyaval P, Moineau S, *et al.* CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science* 2007; 315(5819): 1709-12.
- 74 Gasiunas G, Barrangou R, Horvath P, Siksnys V. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; 109(39): E2579-86.
- 75 Fagerlund RD, Staals RH, Fineran PC. The Cpf1 CRISPR-Cas protein expands genome-editing tools. *Genome Biol* 2015; 16: 251.
- 76 Zetsche B, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Slaymaker IM, Makarova KS, Essletzbichler P, *et al.* Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system. *Cell* 2015; 163(3): 759-71.
- 77 Strecker J, Jones S, Koopal B, Schmid-Burgk J, Zetsche B, Gao L, *et al.* Engineering of CRISPR-Cas12b for human genome editing. *Nat Commun* 2019; 10(1): 212.
- 78 Teng F, Cui T, Feng G, Guo L, Xu K, Gao Q, *et al.* Repurposing CRISPR-Cas12b for mammalian genome engineering. *Cell Discov* 2018; 4: 63.
- 79 Aquino-Jarquin G. CRISPR-Cas14 is now part of the artillery for

- gene editing and molecular diagnostic. *Nanomedicine* 2019; 18: 428-31.
- 80 Harrington LB, Burstein D, Chen JS, Paez-Espino D, Ma E, Witte IP, *et al.* Programmed DNA destruction by miniature CRISPR-Cas14 enzymes. *Science* 2018; 362(6416): 839-42.
- 81 Abudayyeh OO, Gootenberg JS, Konermann S, Joung J, Slaymaker IM, Cox DB, *et al.* C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector. *Science* 2016; 353(6299): aaf5573.
- 82 Barrangou R, Gersbach CA. Expanding the CRISPR Toolbox: Targeting RNA with Cas13b. *Mol Cell* 2017; 65(4): 582-4.
- 83 Smargon AA, Cox DBT, Pyzocha NK, Zheng K, Slaymaker IM, Gootenberg JS, *et al.* Cas13b is a type VI-B CRISPR-associated RNA-guided RNase differentially regulated by accessory proteins Csx27 and Csx28. *Mol Cell* 2017; 65(4): 618-30, e7.
- 84 Deltcheva E, Chylinski K, Sharma CM, Gonzales K, Chao Y, Pirezada ZA, *et al.* CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature* 2011; 471(7340): 602-7.
- 85 Jiang Y, Chen B, Duan C, Sun B, Yang J, Yang S. Multigene editing in the *Escherichia coli* genome via the CRISPR-Cas9 system. *Appl Environ Microbiol* 2015; 81(7): 2506-14.
- 86 Xie K, Yang Y. RNA-guided genome editing in plants using a CRISPR-Cas system. *Mol Plant* 2013; 6(6): 1975-83.
- 87 Zetsche B, Heidenreich M, Mohanraju P, Fedorova I, Kneppers J, DeGennaro EM, *et al.* Multiplex gene editing by CRISPR-Cpf1 using a single crRNA array. *Nat Biotechnol* 2017; 35(1): 31-4.
- 88 Cermak T, Curtin SJ. Design and assembly of CRISPR/Cas9 reagents for gene knockout, targeted insertion, and replacement in wheat. *Methods Mol Biol* 2017; 1679: 187-212.
- 89 Zhou Y, Zhu S, Cai C, Yuan P, Li C, Huang Y, *et al.* High-throughput screening of a CRISPR/Cas9 library for functional genomics in human cells. *Nature* 2014; 509(7501): 487-91.
- 90 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): 267-73.
- 91 Kleinstiver BP, Pattanayak V, Prew MS, Tsai SQ, Nguyen NT, Zheng Z, *et al.* High-fidelity CRISPR-Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects. *Nature* 2016; 529(7587): 490-5.
- 92 Slaymaker IM, Gao L, Zetsche B, Scott DA, Yan WX, Zhang F. Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity. *Science* 2016; 351(6268): 84-8.
- 93 Renouf B, Piganeau M, Ghezraoui H, Jasin M, Brunet E. Creating cancer translocations in human cells using Cas9 DSBs and nCas9 paired nicks. *Methods Enzymol* 2014; 546: 251-71.
- 94 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): 1012-9.
- 95 Zhang JP, Li XL, Neises A, Chen W, Hu LP, Ji GZ, *et al.* Different effects of sgRNA length on CRISPR-mediated gene knockout efficiency. *Sci Rep* 2016; 6: 28566.
- 96 Nunez JK, Harrington LB, Doudna JA. Chemical and biophysical modulation of Cas9 for tunable genome engineering. *ACS Chem Biol* 2016; 11(3): 681-8.
- 97 Zetsche B, Volz SE, Zhang F. A split-Cas9 architecture for inducible genome editing and transcription modulation. *Nat Biotechnol* 2015; 33(3): 139-42.
- 98 Truong DJ, Kuhner K, Kuhn R, Werfel S, Engelhardt S, Wurst W, *et al.* Development of an intein-mediated split-Cas9 system for gene therapy. *Nucleic Acids Res* 2015; 43(13): 6450-8.
- 99 Nihongaki Y, Kawano F, Nakajima T, Sato M. Photoactivatable CRISPR-Cas9 for optogenetic genome editing. *Nat Biotechnol* 2015; 33(2): 755-60.
- 100 Hur JK, Kim K, Been KW, Baek G, Ye S, Hur JW, *et al.* Targeted mutagenesis in mice by electroporation of Cpf1 ribonucleoproteins. *Nat Biotechnol* 2016; 34(8): 807-8.
- 101 Adli M. The CRISPR tool kit for genome editing and beyond. *Nat Commun* 2018; 9(1): 1911.
- 102 Barrangou R, Doudna JA. Applications of CRISPR technologies in research and beyond. *Nat Biotechnol* 2016; 34(9): 933-41.
- 103 Ledford H. Beyond CRISPR: A guide to the many other ways to edit a genome. *Nature* 2016; 536(7615): 136-7.
- 104 Dominguez AA, Lim WA, Qi LS. Beyond editing: repurposing CRISPR-Cas9 for precision genome regulation and interrogation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2016; 17(1): 5-15.
- 105 Matsoukas IG. Commentary: RNA editing with CRISPR-Cas13. *Front Genet* 2018; 9: 134.
- 106 Ali Z, Mahas A, Mahfouz M. CRISPR/Cas13 as a Tool for RNA Interference. *Trends Plant Sci* 2018; 23(5): 374-8.
- 107 Cox DBT, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Franklin B, Kellner MJ, Joung J, *et al.* RNA editing with CRISPR-Cas13. *Science* 2017; 358(6366): 1019-27.
- 108 Abudayyeh OO, Gootenberg JS, Essletzbichler P, Han S, Joung J, Belanto JJ, *et al.* RNA targeting with CRISPR-Cas13. *Nature* 2017; 550(7675): 280-4.
- 109 Lapinaite A, Doudna JA, Cate JHD. Programmable RNA recognition using a CRISPR-associated Argonaute. *P Natl Acad Sci USA* 2018; 115(13): 3368-73.
- 110 Cao Y, Sun W, Wang J, Sheng G, Xiang G, Zhang T, *et al.* Argonaute proteins from human gastrointestinal bacteria catalyze DNA-guided cleavage of single- and double-stranded DNA at 37 °C. *Cell Dis* 2019; 5: 38.
- 111 Strecker J, Ladha A, Gardner Z, Schmid-Burgk JL, Makarova KS, Koonin EV, *et al.* RNA-guided DNA insertion with CRISPR-associated transposases. *Science* 2019; 365(6448): 48-53.
- 112 Klompe SE, Vo PLH, Halpin-Healy TS, Sternberg SH. Transposon-encoded CRISPR-Cas systems direct RNA-guided DNA integration. *Nature* 2019; 571(7764): 219-25.
- 113 Zalatan JG, Lee ME, Almeida R, Gilbert LA, Whitehead EH, La Russa M, *et al.* Engineering complex synthetic transcriptional programs with CRISPR RNA scaffolds. *Cell* 2015; 160(1/2): 339-50.
- 114 Koblan LW, Doman JL, Wilson C, Levy JM, Tay T, Newby GA, *et al.* Improving cytidine and adenine base editors by expression optimization and ancestral reconstruction. *Nature Biotechnology* 2018; 36(9): 843.
- 115 Huang TP, Zhao KT, Miller SM, Gaudelli NM, Oakes BL, Fellmann C, *et al.* Circularly permuted and PAM-modified Cas9 variants broaden the targeting scope of base editors. *Nat Biotechnol* 2019; 37(6): 626.
- 116 Gaudelli NM, Komor AC, Rees HA, Packer MS, Badran AH, Bryson DI, *et al.* Programmable base editing of A•T to G•C in

- genomic DNA without DNA cleavage. *Nature* 2017; 551(7681): 464-71.
- 117 Hess GT, Tycko J, Yao D, Bassik MC. Methods and applications of CRISPR-mediated base editing in eukaryotic genomes. *Mol Cell* 2017; 68(1): 26-43.
- 118 Zuo EW, Sun YD, Wei W, Yuan TL, Ying WQ, Sun H, *et al.* Cytosine base editor generates substantial off-target single-nucleotide variants in mouse embryos. *Science* 2019; 364(6437): 289.
- 119 Zhou CY, Sun YD, Yan R, Liu YJ, Zuo EW, Gu C, *et al.* Off-target RNA mutation induced by DNA base editing and its elimination by mutagenesis. *Nature* 2019; 571(7764): 275.
- 120 Jing X, Xie BR, Chen LX, Zhang NB, Jiang YY, Qin H, *et al.* Implementation of the CRISPR-Cas13a system in fission yeast and its repurposing for precise RNA editing. *Nucleic Acids Res* 2018; 46(15): e90.
- 121 Qu L, Yi Z, Zhu S, Wang C, Cao Z, Zhou Z, *et al.* Programmable RNA editing by recruiting endogenous ADAR using engineered RNAs. *Nat Biotechnol* 2019; 37(9): 1059-69.
- 122 Merkle T, Merz S, Reautschnig P, Blaha A, Li Q, Vogel P, *et al.* Precise RNA editing by recruiting endogenous ADARs with antisense oligonucleotides. *Nat Biotechnol* 2019; 37(2): 133.
- 123 Shendure J, Balasubramanian S, Church GM, Gilbert W, Rogers J, Schloss JA, *et al.* DNA sequencing at 40: past, present and future. *Nature* 2017; 550(7676): 345-53.
- 124 Palluk S, Arlow DH, de Rond T, Barthel S, Kang JS, Bector R, *et al.* De novo DNA synthesis using polymerase-nucleotide conjugates. *Nat Biotechnol* 2018; 36(7): 645.
- 125 The Future of DNA Data Storage. (Potomac Institute for Policy Studies, 2018).
- 126 王金, 成秋香, 李诗渊, 李晓晏, 李林显. Application of Cas Protein, Method for Detecting Target Nucleic Acid Molecule and Kit. PCT/CN2018/082769. 2019-01-17.[2019-09-20]. <https://patentscope2.wipo.int/search/en/detail.jsf?docId=WO2019011022&tab=PCTBIBLIO>.