

CRISPR/Cas9: 基因编辑的新时代

林锦莹^{1,2} 赵兰^{1,2} 欧阳松应^{1,2*}

(¹福建师范大学生命科学学院, 福州 350117; ²南方生物医学研究中心, 福州 350117)

摘要 基因编辑技术是通过核酸内切酶对基因组DNA进行定向改造的技术, 可以实现对特定DNA碱基的缺失、替换等, 常用的四种基因编辑工具分别是: 巨型核酸酶、锌指核酸酶、转录激活因子样效应物核酸酶以及CRISPR/Cas9系统。其中CRISPR/Cas9系统作为一种新型的基因组编辑技术具有组成简单、特异性好、切割效率高的优点。该文对CRISPR/Cas9系统的结构组成和功能机制, 动植物基因靶向编辑和人类在遗传性疾病、病毒感染性疾病以及肿瘤方面进行综述, 旨在对CRISPR/Cas9系统的现状和发展进行总结和展望。

关键词 CRISPR/Cas9系统; 基因编辑工具; 疾病治疗; CRISPRi/CRISPRa

CRISPR/Cas9: a New Era of Gene Editing

LIN Jinying^{1,2}, ZHAO Lan^{1,2}, OUYANG Songying^{1,2*}

(¹College of Life Sciences, Fujian Normal University, Fuzhou 350117, China;

²FJNU Biomedical Research Center of South, Fuzhou 350117, China)

Abstract Gene editing techniques use endonucleases to make desired changes within genomic DNA by insertion, deletion or substitution of DNA sequences. Four types of endonucleases are commonly used as gene editing tools: meganucleases, zinc finger nucleases, transcription activator-like effector nucleases, and CRISPR/Cas9 systems. Among these tools, the CRISPR/Cas9 system is a new gene editing technology remarked for simplicity, good targeting specificity and high cutting efficiency. This article reviews structural and functional characteristics of CRISPR/cas9 systems, as well as their current or potential applications in editing of animal and plant genes and treatment of human genetic diseases, viral diseases, and tumors. Current progress in research and applications of CRISPR/Cas9 systems is summarized and future perspectives are discussed.

Keywords CRISPR/Cas9 system; gene editing tools; disease treatment; CRISPRi/CRISPRa

基因编辑技术(genome editing technologies)是在基因组中对特定基因进行精准修饰的基因工程技术, 通过核酸内切酶对DNA进行靶向切割产生DNA双链断裂(double strand breaks, DSB), 诱导体内细胞产生两种修复机制, 即非同源末端连接(non-homologous end joining, NHEJ)和同源重组修复(homology di-

rected repair, HDR)^[1], 并以这两种修复机制来对DSB进行修复, 从而实现基因靶向修饰。同源重组修复比非同源末端连接更加精准, 不会出现随机的碱基插入或丢失, 能够根据供体中目的基因的碱基序列通过同源重组整合到靶点上。基因编辑技术在近十年发展迅速, 目前最主要的四种不同类型的基因编

收稿日期: 2021-01-04 接受日期: 2021-02-24

国家自然科学基金(批准号: 31770948)、福建省科技厅项目(批准号: 2020Y4007、2021H0004)、福建省海洋经济发展补助项目(批准号: FJHJF-L-2020-2)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0591-22868199, E-mail: ouyangsy@fjnu.edu.cn

Received: January 4, 2021 Accepted: February 24, 2021

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31770948), Fujian Provincial Department of Science and Technology Project (Grant No.2020Y4007, 2021H0004), Fujian Provincial Marine Economic Development Subsidy Project (Grant No.FJHJF-L-2020-2)

*Corresponding author. Tel: +86-591-22868199, E-mail: ouyangsy@fjnu.edu.cn

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5495>

辑工具分别是：巨型核酸酶(meganucleases, MNs)、锌指核酸酶(zinc finger endonucleases, ZFNs)、转录激活因子样效应物核酸酶(transcription activator-like effector nucleases, TALENs)和CRISPR/Cas9(clustered regularly interspaced short palindromic repeats/associated nuclease 9)系统。

在基因编辑领域发展过程中,巨型核酸酶技术识别位点较大、识别效率低下,限制其使用范围;ZFN由锌指蛋白和Fok I核酸内切酶人工融合而成,剪切过程需要Fok I核酸内切酶二聚化,在这过程中一旦产生异源二聚体便会导致脱靶效应,且存在较强的细胞毒性难以用于体内实验;TALENs技术虽然精确度较高,但需要从头合成引导蛋白,构建难度较大且成本费用高^[2-4];CRISPR/Cas9系统是由RNA引导的核酸酶,可以通过编码多个引导序列来同时编辑基因组中的多个位点,具有组成简单、特异性好、切割效率高的特点^[5]。本文简述了CRISPR/Cas9系统的结构组成和功能机制,主要对CRISPR/Cas9系统在动植物基因靶向编辑、人类疾病治疗和预防方面的应用进展进行综述。

1 CRISPR/Cas9系统简述

CRISPR/Cas系统是细菌和古细菌抵制外源核酸及噬菌体入侵的适应性免疫系统^[6-8],其基因组位点结构具有显著的多样性,根据所编码效应蛋白的不同分成两大类^[9]。第一大类是由多个Cas蛋白组成的多亚基效应复合物,包括I型、III型以及IV型^[10-12]。第二大类包括II型、V型以及VI型,是由单个大的Cas

蛋白组成的效应器复合体。V型系统的效应蛋白包括Cas12a、Cas12b和CasX等^[13-15]。VI型系统具有识别切割RNA的功能,其效应蛋白包括已经报道的Cas13a、Cas13b和Cas13d^[16-19]。II型主要分为A、B和C三个亚型,II型CRISPR/Cas基因座通常由操纵子中的三到四个cas基因组成,除了共同存在于所有II型中的cas1和cas2两种基因外,csn2基因单独存在于A亚型中,而cas4基因在B亚型、II-C亚型的一个变体中存在,这两种基因主要发挥了适应作用^[20-21]。第二大类型II型CRISPR/Cas系统中研究最多且应用最广的是Cas9蛋白,其通过碱基配对的方式与sgRNA(single guide RNA)形成Cas9蛋白复合物,参与靶双链DNA的切割^[22-23](图1)。2014年,DOUDNA等^[24-25]利用结构生物学方法相关的功能实验解析了Cas9单蛋白、Cas9-sgRNA二元复合物和Cas9-sgRNA-DNA三元复合物的结构与分子机制。

Cas9蛋白存在多种直系同源物,包括已被广泛研究的来自于化脓链球菌(*Streptococcus pyogenes*)的CRISPR/SpCas9蛋白、来源于金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)的CRISPR/SaCas9蛋白、发现于新弗朗西斯菌(*Francisella novicida*)中的CRISPR/FnCas9蛋白和来源于空肠弯曲杆菌(*Campylobacter jejuni*)的CRISPR/CjCas9蛋白^[26-28]。

1.1 CRISPR/Cas9系统的结构研究

CRISPR/SpCas9系统由SpCas9蛋白和sgRNA共同构成,其中sgRNA可识别约20 nt的靶序列^[30]。SpCas9蛋白由1 368个氨基酸组成,结构主要分为REC lobe(recognition lobe)和NUC lobe(nuclease lobe),连

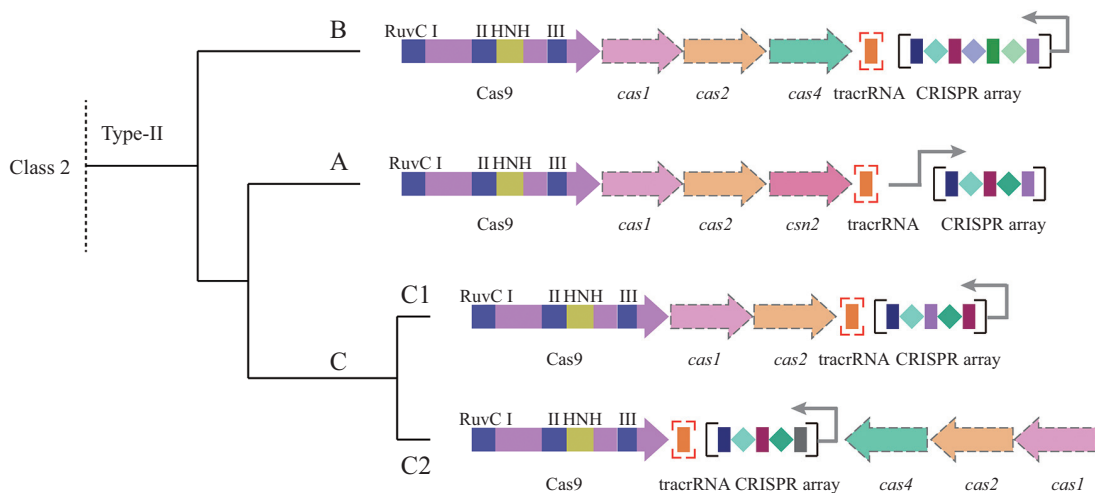


图1 II型CRISPR/Cas系统的分类(根据参考文献[29]修改)

Fig.1 Classification of the type-II CRISPR/Cas system (modified from reference[29])

接REC lobe和NUC lobe的是富含精氨酸的BH(bridge helix)结构域。REC lobe由三个 α 螺旋结构域Helical-1、Helical-2和Helical-3组成。NUC lobe分别由RuvC结构域、HNH结构域和PI结构域(PAM-interacting domain)三个结构域组成,其中RuvC结构域负责切割非目标链;HNH结构域负责切割目标链;PI结构域主要与PAM(proto-spacer adjacent motifs)的识别有关^[24]。与*SpCas9*蛋白不同,*SaCas9*蛋白、*蛋白和*CjCas9*蛋白具有额外的WED(wedge domain)结构域,该结构域主要功能是参与识别sgRNA和PAM区^[31]。*

1.2 CRISPR/Cas9系统的作用机制

当外源噬菌体侵染宿主细胞时,宿主细胞的

CRISPR/Cas9系统通过PAM来识别特定外源序列并进行加工,随后将其插入特定位置。CRISPR基因座首先转录形成pre-crRNA (precursor RNA), pre-crRNA再加工得到成熟crRNA(CRISPR RNA),加工过程需要核酸内切酶的参与。此时成熟的crRNA与tracrRNA(trans-activating crRNA)结合组成sgRNA, Cas蛋白与sgRNA结合形成核糖核蛋白复合物,该复合物通过与PAM的识别结合,对外源核酸物质进行切割。保守的PAM序列通常用于系统进行自我与非我识别,避免发生错误的自身切割,最终使得宿主成功抵御外源遗传物质^[32-36](图2)。

当Cas9-sgRNA复合物正确识别外源核酸上的PAM序列后,靶双链DNA进行解旋使sgRNA在种子

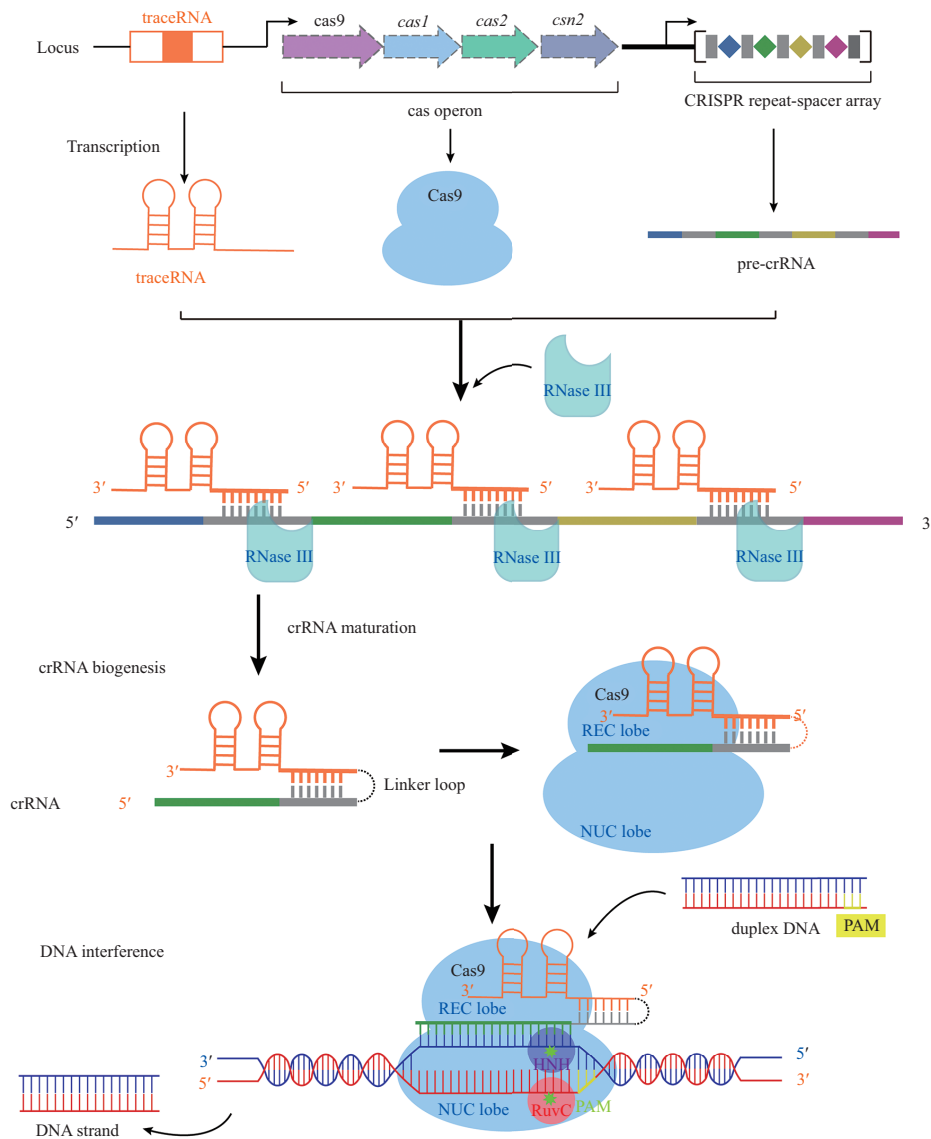
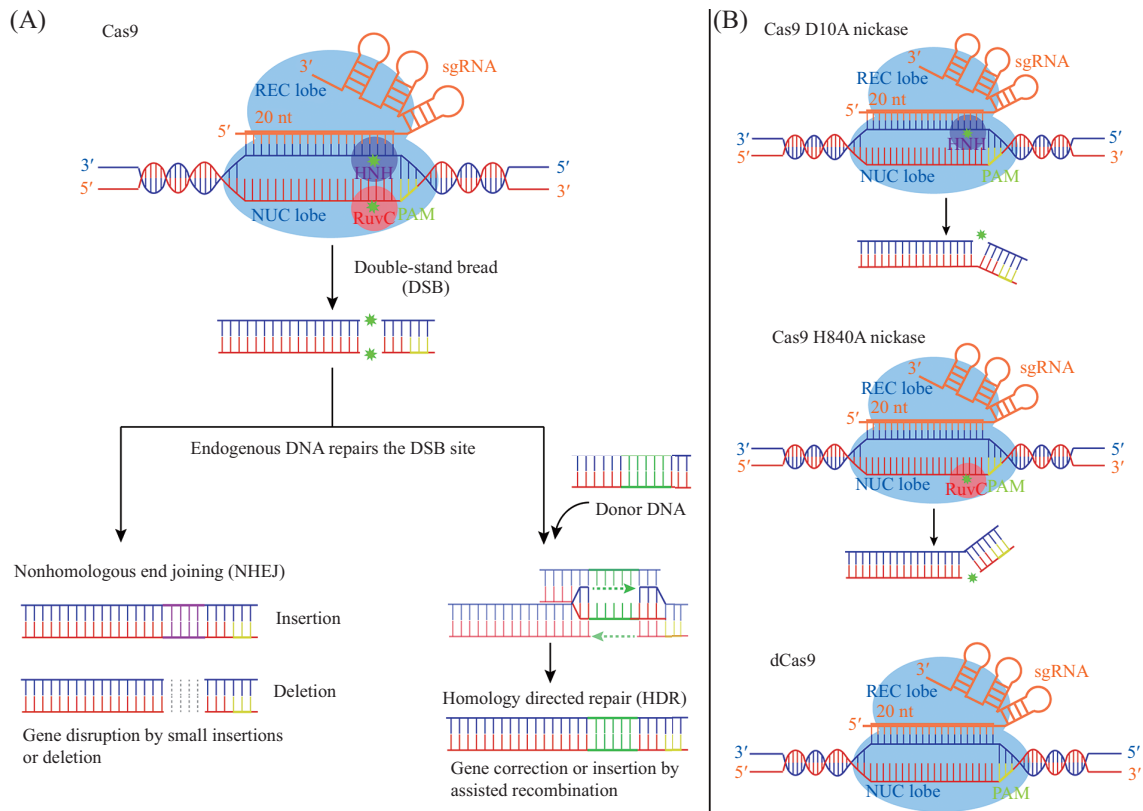


图2 CRISPR/Cas9系统的功能机制(根据参考文献[37]修改)

Fig.2 Functional characteristics of CRISPR/Cas9 system (modified from reference [37])



A: Cas9切割双链DNA后进行的非同源末端连接(NHEJ)和同源重组修复(HDR); B: 当HNH结构域或RuvC结构域分别失活时, 仅切割双链DNA中的一条单链, 当HNH结构域和RuvC结构域均失活时产生无切割活性的dCas9。

A: CRISPR/Cas9-mediated gene editing via non-homologous end joining (NHEJ) and homology directed repair (HDR) after cleaves double stranded DNA; B: in Cas9 nickases, inactivated endonuclease activity of either HNH or RuvC domain allows cleavage of only one strand in target dsDNA. In dCas9, both endonuclease catalytic sites are inactivated so that dCas9 only retains the ability to bind target dsDNA sequences.

图3 CRISPR/Cas9介导的基因编辑原理

Fig.3 Principles of CRISPR/Cas9-mediated gene editing

区域(seed region)与靶DNA序列结合, 从而形成了“R-loop”结构, 激活切割位点用于切割目标链与非目标链的双链DNA, 造成DNA双链断裂, 断裂处为平末端。当有外源同源重组模板DNA(donor DNA)存在时, 可依照同源片段对断裂位点进行精确修复, 此即同源重组修复(homology directed repair, HDR), 而在不存在donor DNA时, DNA双链断裂将激发生物体内的非同源末端连接(non-homologous end joining, NHEJ), 在断裂处插入或缺失基因片段。CRISPR/Cas9系统可用作分子剪刀, 在基因组内生成可编程的靶向切割, 更加利于基因组编辑策略^[38-39](图3A)。

2 CRISPR/Cas9在动植物中的基因编辑

CRISPR/Cas9系统实现了基因的定点修饰——碱基插入、删除替换、单碱基编辑等, 成功对包括水稻、小麦、斑马鱼以及哺乳动物在内的动植物进

行精准编辑。

2013年SHAN等^[40]通过设计CRISPR/Cas9的sgRNA成功靶向敲除水稻中的*OsPDS*基因使其获得白粉病抗性, 这是利用CRISPR/Cas9系统首次对水稻进行基因组修饰。SOYK等^[41]对番茄中的*SP5G*基因进行突变, 使得番茄在栽培过程中对光周期敏感度下降, 从而提高番茄作物的产量, 证实了CRISPR/Cas9在植物体内可以进行高效的基因编辑工作, 特别是对于农作物(包括水稻、马铃薯、玉米、番茄、白菜等)提高产量和抗病能力方面有着重大进展^[42]。

HWANG等^[43]设计与*fh*基因序列互补的sgRNA, 实现了对斑马鱼胚胎多个基因进行敲除, 最高效率达59.4%。CONG等^[5]对Cas9进行转换后成功对哺乳动物细胞基因组中多个位点进行编辑, 从而证明了CRISPR/Cas9技术的可编程性和广泛适用性。NIU等^[44]在灵长类动物食蟹猴的实验中, 利用单细胞胚胎显微注射技术将CRISPR/Cas9-sgRNA复合物注射

到食蟹猴的胚胎中,对 *Ppar-g*和 *Rag1*两个基因进行编辑,有效实现位点特异性基因修饰,同时该实验建立多个遗传突变且无可检测的脱靶效应,确认CRISPR/Cas9系统可用于灵长类动物基因组靶向的成功,创建灵长类动物基因组工程。2017年NIU等^[45]利用CRISPR/Cas9敲除猪成纤维细胞基因组中的 *PERV*基因成功灭活了内源性逆转录病毒(porcine endogenous retroviruses, PERVs),且通过体细胞移植技术将PERVs灭活后的细胞系移植入母猪子宫,并成功生产出PERVs灭活的小猪,这一实验的成功降低了猪器官异体移植的感染风险,为异体移植技术作出了贡献。

3 CRISPR/Cas9在疾病治疗中的基因编辑

经过科研人员的不断探索与研发,CRISPR/Cas9系统作为一个强大的RNA引导的DNA靶向平台在基因治疗方面有着显著的贡献^[37]。

3.1 CRISPR/Cas9应用于治疗遗传性疾病

CRISPR/Cas9系统通过直接注射的方式实现治疗目的,以假肥大性肌营养不良(duchenne muscular dystrophy, DMD)为例,DMD是一种原发于人体肌肉组织的X连锁隐性遗传病。BENGTSSON等^[46]分别利用CRISPR/*SpCas9*系统和CRISPR/*SaCas9*系统对DMD疾病模型小鼠 *mdx^{4cv}*体内的 *DMD*基因进行突变,随后利用腺相关病毒(adeno-associated virus, AAV)作为载体删除错误的外显子,以此在小鼠体内产生少量肌营养不良蛋白,有效缓解DMD小鼠的肌肉萎缩。NELSON等^[66]分别将CRISPR/*SaCas9*和两个sgRNA装入AAV病毒载体中,使用AAV-CRISPR基因编辑系统靶向删除 *mdx*模型小鼠 *DMD*基因中23号外显子,表达了功能正常的抗肌萎缩蛋白,并发现通过静脉注射入AAV-CRISPR系统的新生小鼠一年后还具有较高的基因编辑效率且体内抗肌萎缩蛋白仍保持高表达,这有望使假肥大性肌营养不良得到治愈。

莱伯氏先天性黑朦症(Leber congenital amaurosis, LCA)是一种遗传性视网膜病变,且多数是由常染色体上的不同基因突变引起的,最常见的有 *RPE65*和 *CEP290*两种基因的突变,治疗莱伯氏先天性黑朦2型(LCA2)主要通过LUXTURNAL疗法将携带未突变的 *RPE65*基因的AAV腺相关病毒注射入视网膜色素上皮细胞中,从而使其持续表达正常的 *RPE65*基

因,以延缓或抑制视网膜色素细胞的退化达到治疗效果。然而莱伯氏先天性黑朦症10型(LCA10)却无法复制LCA2的治疗途径,是因为引起LCA10的突变基因 *CEP290*编码序列较大,无法将 *CEP290*包装进AAV腺病毒来进行传统的基因疗法,所以2020年 Editas Medicine公司改变了治疗思路,利用AAV病毒载体将CRISPR/*SaCas9*和sgRNA递送到人视网膜细胞中,实现了 *CEP290*突变基因内含子的删除或序列倒位从而恢复了 *CEP290*基因的正常表达,达到了治疗的目的。这是全球首例在患者体内给药的CRISPR基因编辑疗法,这项治疗是基因编辑疗法的一个里程碑^[47]。

除了改造组织干细胞,CRISPR/Cas9系统对于血液类疾病的研究较为深入,已应用于遗传性酪氨酸血症I型^[48]、输血依赖性 β -地中海贫血(transfusion-dependent β -thalassemia, TDT)和镰状细胞性贫血(Sickle cell disease, SCD)等,其中TDT和SCD最常见的治疗方式是输入红细胞或铁螯合剂,易出现中毒现象且无法根治,但在2020年实现了功能性治愈,FRANGOUL等^[49]使用CRISPR/Cas9对患者的造血干细胞和祖细胞中的CD34⁺细胞进行 *BCL11A*基因靶向沉默,再回输入患者体内以重新激活胎儿血红蛋白的产生,该临床试验均达到良好治疗效果,患者后续已不需要再接受输血治疗。

3.2 CRISPR/Cas9应用于治疗病毒感染性疾病

在治疗病毒感染性疾病方面,通常使用CRISPR/Cas9系统靶向病毒基因使其无法完成复制和传播的方式,例如:CRISPR/Cas9系统基因编辑用于ADIS/HIV-1的治疗,靶向敲除HIV共同受体CCR5和CXCR4可以减少HIV-1感染并清除原病毒,甚至能进一步消除潜伏的HIV病毒^[50-51]。

单纯疱疹病毒-1(herpes simplex virus-1, HSV-1)是以人为自然宿主,极易感染人群的一种典型病毒,可引发人类多种疾病,如龈口炎、角膜炎甚至脑炎,HSV-1在中枢神经系统中复制且具有潜伏期。ROEHM等^[52]通过CRISPR/Cas9系统在HSV-1中敲除 *ICP0*基因,降低人类细胞对HSV-1病毒感染性,从而达到预防和治疗的效果。

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)是具有部分双链DNA的病毒,HBV在受感染的肺细胞核中以共价闭合DNA(cccDNA)复制的形式存在,cccDNA在细胞内持续性感染是导致慢性乙肝的主要原

因, 而一旦停止服用治疗药物就易导致乙型肝炎的复发, 因此清除被感染肝细胞内的cccDNA在临床上治愈慢性乙型肝炎的关键。MOYO等^[53]利用CRISPR/Cas9在体外培养细胞和小鼠体内成功破坏cccDNA, 达到治疗慢性乙型肝炎的效果。

3.3 CRISPR/Cas9应用于治疗肿瘤方面

在肿瘤治疗方面, 利用CRISPR/Cas9敲除程序性细胞死亡蛋白-1(programmed cell death protein-1, PD-1), 并将PD-1缺失的T细胞再转移入患者体内, 提高识别癌细胞的概率^[54], 2020年LU等^[51]针对晚期非小细胞肺癌(non-small-cell lung cancer, NSCLC), 在晚期患者体内输入破坏PD-1的T细胞, 从临床研究结果看, 基因编辑效率在8.7%~31.2%之间且PD-1表达水平明显降低, 得出CRISPR/Cas9基因编辑的T细胞的临床应用通常是安全可行的, 这一成功无疑是对癌症治愈方面的一大进步。

4 CRISPR/Cas9在其他方面的应用

CRISPR/Cas9通过建立sgRNA基因组文库在全基因组高通量筛选和基因表达调控方面也有重大作用, 在全基因组高通量筛选方面可以靶向蛋白质和基因编码区域。除了靶向DNA, 还可以靶向microRNA、lncRNA等RNA序列^[55]。WANG等^[56]利用基于激酶组学的CRISPR/Cas9功能基因组学筛查发现了调控基因转录的细胞周期蛋白依赖性激酶(cyclin-dependent kinases, CDKs)可能是潜在的肝癌治疗靶点, 其中CDK7在肝癌组织中高表达, 这为治疗肝癌提供了医学价值。

通过在Cas9的RuvC和HNH结构域中同时引入两个突变(H840A、D10A), 设计出的一种“死亡”Cas9(dead Cas9, dCas9), 该蛋白可与DNA结合, 却没有核酸内切酶活性^[57](图3B)。dCas9蛋白可以与阻遏结构域(krüppel-associated box, KRAB)融合, 实现高效的转录沉默过程, 被称为CRISPR干扰(CRISPR interference, CRISPRi)系统, 其基因沉默水平显著高于传统RNAi技术^[58]。融合转录激活因子(如VP64、p65、VP16)产生CRISPR激活系统(CRISPR activation, CRISPRa)可用于激活基因表达, 为了更好地提高过表达水平, 可将三元转录激活因子VPR(VP64-p65-Rta)^[59]SunTag短肽或利用SAM系统将MS2发夹结构^[60]与dCas9进行融合。CRISPRi/CRISPRa的目的是实现内源基因的转录抑制和转录激活, 通过将

dCas9与不同的效应蛋白融合而使得CRISPR/Cas9蛋白能够应用于基因的转录抑制(CRISPRi)、转录激活(CRISPRa)、表观遗传调控和荧光定位等方面。CRISPRi和CRISPRa是CRISPR/Cas9系统调控基因表达的一部分。除了遗传筛选, CRISPRa还可以通过对内源基因的激活实现一些疾病的成体治疗等。dCas9与荧光标记(如GFP)融合产生RNA引导的位点特异性实时成像系统, 用于可视化细胞内的靶向DNA序列, 且还可利用多种CRISPR细胞成像系统来同时标记追踪多个基因组位点^[61]。DREISSIG等^[62]同时使用两个dCas9同源物在植物活细胞中检测到相间端粒的运动, 对检测活细胞中染色质动力学展现了潜力。

5 展望

2020年10月, DOUDNA和CHARPENTIER因对CRISPR基因编辑技术的贡献被授予诺贝尔化学奖, 这意味着CRISPR基因编辑技术正迎来其发展高峰。基因编辑技术的飞速发展改善人类生活和健康方面提供了重大进展, CRISPR/Cas9系统对基因的定点修饰应用于提高农作物产量及增强农作物抗病性, 对于动物基因编辑方面的探究, 以及对于疾病治疗中的应用十分广泛, 甚至解决了之前难以治愈的一些疾病问题, 但是能否安全有效地使用这一基因编辑工具, 仍然是人类面临的挑战。而在当前开发中, 最主要的是设计出在人类细胞中产生最小的脱靶效应的基因编辑技术, 例如SLAYMAKER等^[63]设计了增强的特异性SpCas9(eSpCas9), CHEN等^[64]通过SpCas9的REC3域中的点突变设计了超精确的Cas9变异体(Hypa-Cas9), WALTON等^[65]设计出最新开发的Cas9变体SpG和SpRY等, 这些变体的设计都是对CRISPR/Cas9工具进行的改良, 使其更好地为患者提供安全有效的治疗选择。随着科研工作者们对于CRISPR/Cas9的探索不断地深入, 仍需注意的是不能随意越过道德伦理的红线, 例如“基因编辑婴儿”事件就是利用CRISPR/Cas9系统编辑了人类胚胎中的基因, 这种做法违背道德伦理且产生了恶劣的社会影响, 如何规范编辑技术的使用值得深思。现阶段基因编辑技术还促进了细胞成像、功能基因筛选、基因诊断等领域的发展, 随着CRISPR/Cas9系统作为工具的使用不断改进, 相信不仅是基因编辑技术, 在其他领域CRISPR/Cas9也能够成为具有划时代意义的生物学技术。

参考文献 (References)

- [1] TAKATA M, SASAKI M S, SONODA E, et al. Homologous recombination and non-homologous end-joining pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells [J]. *EMBO J*, 1998, 17(18): 5497-508.
- [2] REDONDO P, PRIETO J, MUÑOZ I G, et al. Molecular basis of xeroderma pigmentosum group C DNA recognition by engineered meganucleases [J]. *Nature*, 2008, 456(7218): 107-11.
- [3] KIM Y G, CHA J, CHANDRASEGARAN S. Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(3): 1156-60.
- [4] BOCH J, SCHOLZE H, SCHORNACK S, et al. Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors [J]. *Science*. 2009, 326(5959): 1509-12.
- [5] CONG L, RAN F A, COX D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems [J]. *Science*, 2013, 339(6121): 819-23.
- [6] KOONIN E V, MAKAROVA K S, WOLF Y I. Evolutionary genomics of defense systems in archaea and bacteria [J]. *Ann Rev Microbiol*, 2017, doi: 10.1146/annurev-micro-090816-093830.
- [7] HILLE F, RICHTER H, WONG S P, et al. The biology of CRISPR-Cas: backward and forward [J]. *Cell*, 2018, 172(6): 1239-59.
- [8] GARNEAU J E, DUPUIS M E, VILLION M, et al. The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA [J]. *Nature*, 2010, 468(7320): 67-71.
- [9] RUSSEL J, PINILLA-REDONDO R, MAYO-MUÑOZ D, et al. CRISPRCasTyper: automated identification, annotation, and classification of CRISPR-Cas Loci [J]. *CRISPR J*, 2020, 3(6): 462-9.
- [10] SINKUNAS T, GASIUNAS G, FREMAUX C, et al. Cas3 is a single-stranded DNA nuclease and ATP - dependent helicase in the CRISPR/Cas immune system [J]. *EMBO J*, 2011, 30(7): 1335-42.
- [11] KAZLAUSKIENE M, KOSTIUK G, VENCLOVAS C, et al. A cyclic oligonucleotide signaling pathway in type III CRISPR-Cas systems [J]. *Science*, 2017, 357(6351): 605-9.
- [12] MAKAROVA K S, WOLF Y I, ALKHNABASHI O S, et al. An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2015, 13(11): 722-36.
- [13] ZETSCHKE B, GOOTENBERG J S, ABUDAYYEH O O, et al. Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system [J]. *Cell*, 2015, 163(3): 759-71.
- [14] YANG H, GAO P, RAJASHANKAR K R, et al. PAM-dependent target DNA recognition and cleavage by C2c1 CRISPR-Cas endonuclease [J]. *Cell*, 2016, 167(7): 1814-28.
- [15] LIU J, ORLOVA N, OAKES B L, et al. CasX enzymes comprise a distinct family of RNA-guided genome editors [J]. *Nature*, 2019, 566(7743): 218-23.
- [16] ZHANG B, YE W W, YE Y M, et al. Structural insights into Cas13b-guided CRISPR RNA maturation and recognition [J]. *Cell Res*, 2018, 28(12): 1198-201.
- [17] ZHANG B, YE Y M, YE W W, et al. Two HEPN domains dictate CRISPR RNA maturation and target cleavage in Cas13d [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 2544.
- [18] EASTSELETSKY A, OCONNELL M R, KNIGHT S C, et al. Two distinct RNase activities of CRISPR-C2c2 enable guide-RNA processing and RNA detection [J]. *Nature*, 2016, 538(7624): 270-3.
- [19] SMARGON A, COX D B, PYZOCHA N, et al. Cas13b is a type VI-B CRISPR-associated RNA-guided RNase differentially regulated by accessory proteins Csx27 and Csx28 [J]. *Mol Cell*, 2017, 65(4): 618-30.
- [20] BURSTEIN D, HARRINGTON L B, STRUTT S C, et al. New CRISPR-Cas systems from uncultivated microbes [J]. *Nature*, 2017, 542(7640): 237-41.
- [21] CHYLINSKI K, RHUN A L, CHARPENTIER E, et al. The tracrRNA and Cas9 families of type II CRISPR-Cas immunity systems [J]. *RNA Biol*, 2013, 10(5): 726-37.
- [22] JINEK M, CHYLINSKI K, FONFARA I, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity [J]. *Science*, 2012, 337(6096): 816-21.
- [23] FONFARA I, LERHUN A, CHYLINSKI K, et al. Phylogeny of Cas9 determines functional exchangeability of dual-RNA and Cas9 among orthologous type II CRISPR-Cas systems [J]. *Nucleic Acids Res*, 2014, 42(4): 2577-90.
- [24] JINEK M, JIANG F, TAYLOR D W, et al. Structures of Cas9 endonucleases reveal RNA-mediated conformational activation [J]. *Science*, 2014, 343(6176): 1247997.
- [25] YAMANO T, NISHIMASU H, ZETSCHKE B, et al. Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA [J]. *Cell*, 2014, 165(4): 949-62.
- [26] XIE H H, GE X L, YANG F Y, et al. High-fidelity SaCas9 identified by directional screening in human cells [J]. *PLoS Biol*, 2020, 18(7): e3000747.
- [27] HIRANO H, GOOTENBERG J S, HORII T, et al. Structure and engineering of Francisella novicida Cas9 [J]. *Cell*, 2016, 164(5): 950-61.
- [28] KIM E, KOO T, PARK S W, et al. In vivo genome editing with a small Cas9 orthologue derived from campylobacter jejuni [J]. *Nat Commun*, 2017, doi: 10.1038/ncomms14500.
- [29] MAKAROVA K S, WOLF Y I, IRANZO J, et al. Evolutionary classification of CRISPR-Cas systems: a burst of class 2 and derived variants [J]. *Nat rev Microbiol*, 2020, 18(2): 67-83.
- [30] WRIGHT A V, NUÑEZ J K, DOUDNA J A. Biology and applications of CRISPR systems: Harnessing nature's toolbox for genome engineering [J]. *Cell*, 2016, 164(1/2): 29-44.
- [31] WANG J, ZHANG C, FENG B. The rapidly advancing Class 2 CRISPR-Cas technologies: a customizable toolbox for molecular manipulations [J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(6): 3256-70.
- [32] MOJICA F J, DíEZ-VILLASEÑOR C, GARCÍA-MARTÍNEZ J, et al. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements [J]. *J Mol Evol*, 2005, 60(2): 174-82.
- [33] 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 [J]. *Microbiology*, 2005, 151(3): 653-63.
- [34] BOLOTIN A, QUINQUIS B, SOROKIN A, et al. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin [J]. *Microbiology*, 2005, 151(8): 2551-61.

- [35] MOJICA F J, DIEZ-VILLASENOR C, GARCIA-MARTINEZ J, et al. Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system [J]. *Microbiology*, 2009, 155(Pt 3): 733-40.
- [36] HALE C R, ZHAO P, OLSON S, et al. RNA-guided RNA cleavage by a CRISPR RNA-Cas protein complex [J]. *Cell*, 2009, 139(5): 945-56.
- [37] JIANG F, DOUDNA J A. CRISPR-Cas9 structures and mechanisms [J]. *Annu Rev Biophys*, 2017, 46(1): 505-29.
- [38] SELLE K, BARRANGOU R. Harnessing CRISPR-Cas systems for bacterial genome editing [J]. *Trends Microbiol*, 2015, 23(4): 225-32.
- [39] WATERS C A, STRANDE N T, PRYOR J M, et al. The fidelity of the ligation step determines how ends are resolved during non-homologous end joining [J]. *Nat Commun*, 2014, doi: 10.1038/ncomms5286.
- [40] SHAN Q W, WANG Y P, LI J, et al. Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system [J]. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(8): 686-8.
- [41] SOYK S, MÜLLER NA, PARK S J, et al. Variation in the flowering gene SELF PRUNING 5G promotes day-neutrality and early yield in tomato [J]. *Nat Genet*, 2017, 49(1): 162-8.
- [42] SETH K, HARISH. Current status of potential applications of repurposed Cas9 for structural and functional genomics of plants [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 480(4): 499-507.
- [43] HWANG W Y, FU Y F, REYON D, et al. Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system [J]. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(3): 227-9.
- [44] NIU Y Y, SHEN B, CUI Y Q, et al. Generation of gene-modified cynomolgus monkey via Cas9/RNA-mediated gene targeting in one-cell embryos [J]. *Cell*, 2014, 156(4): 836-43.
- [45] NIU D, WEI H J, LIN L, et al. Inactivation of porcine endogenous retrovirus in pigs using CRISPR-Cas9 [J]. *Science*, 2017, 357(6357): 1303-7.
- [46] BENGTTSSON N E, HALL J K, ODOM G L, et al. Muscle-specific CRISPR/Cas9 dystrophin gene editing ameliorates pathophysiology in a mouse model for Duchenne muscular dystrophy [J]. *Nat Commun*, 2017, 8: 14454.
- [47] LEDFORD H. CRISPR treatment inserted directly into the body for first time [J]. *Nature*, 2020, 579(7798): 185.
- [48] YIN H, XUE W, CHEN S D, et al. Genome editing with Cas9 in adult mice corrects a disease mutation and phenotype [J]. *Nat Biotechnol*, 2014, 32(6): 551-3.
- [49] FRANGOUL H, ALTSHULER D, CAPPELLINI M D, et al. CRISPR-Cas9 gene editing for sickle cell disease and β -thalassemia [J]. *N Engl J Med*, 2021, 384(3): 252-60.
- [52] ROEHM P C, SHEKARABI M, WOLLEBO H S, et al. Inhibition of HSV-1 replication by gene editing strategy [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 23146.
- [53] MOYO B, BLOOM K, SCOTT T, et al. Advances with using CRISPR/Cas-mediated gene editing to treat infections with hepatitis B virus and hepatitis C virus [J]. *Virus Res*, 2018, 244: 311-20.
- [54] XU L, YANG H, GAO Y, et al. CRISPR/cas9-mediated ccr5 ablation in human hematopoietic stem/progenitor cells confers hiv-1 resistance *in vivo* [J]. *Mol Ther*, 2017, 25(8): 1782-9.
- [55] HECKL D, CHARPENTIER E. Toward whole-transcriptome editing with CRISPR-Cas9 [J]. *Mol Cell*, 2015, 58(4): 560-2.
- [56] WANG C, JIN H, GAO D, et al. A CRISPR screen identifies CDK7 as a therapeutic target in hepatocellular carcinoma [J]. *Cell Res*, 2018, 28(6): 690-2.
- [57] QI L S, LARSON M H, GILBERT L A, et al. Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression [J]. *Cell*, 2013, 152(5): 1173-83.
- [58] TAN S Z, REISCH C R, PRATHER K L J, et al. A robust CRISPR interference gene repression system in pseudomonas [J]. *J Bacteriol*, 2018, 200(7): e00575-17
- [59] CHAVEZ A, SCHEIMAN J, VORA S, et al. Highly efficient Cas9-mediated transcriptional programming [J]. *Nat methods*, 2015, 12(4): 326-8.
- [60] LIU Y, WAN X Y, WANG B J. Engineered CRISPRa enables programmable eukaryote-like gene activation in bacteria [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 3693.
- [61] YANG G, HUANG X. Methods and applications of CRISPR/Cas system for genome editing in stem cells [J]. *Cell Regen*, 2019, 8(2): 33-41.
- [62] DREISSIG S, SCHIML S, SCHINDELE, et al. Live-cell CRISPR imaging in plants reveals dynamic telomere movements [J]. *Plant J*, 2017, 91(4): 565-73.
- [63] SLAYMAKER I M, GAO L, ZETSCHE B, et al. Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity [J]. *Science*, 2016, 351(6268): 84-8.
- [64] CHEN J S, DAGDAS Y S, KLEINSTIVER B P, et al. Enhanced proofreading governs CRISPR-Cas9 targeting accuracy [J]. *Nature*, 2017, 550(7676): 407-10.
- [65] WALTON R T, CHRISTIE K A, WHITTAKER M N, et al. Unconstrained genome targeting with near-PAMless engineered CRISPR-Cas9 variants [J]. *Science*, 2020, 368(6488): 290-6.
- [66] NELSON C E, WU Y Y, GEMBERLING M P, et al. Long-term evaluation of AAV-CRISPR genome editing for Duchenne muscular dystrophy [J]. *Nat Med*, 2019, 25(3): 427-32.