

基因编辑技术的研究及在玉米中的应用

张东民, 张晓星, 朱 慧, 张德贵, 翁建峰, 郝转芳, 李明顺

(中国农业科学院作物科学研究所, 北京 100081)

摘 要: 尽管人类已经发现并应用 ZFN、TALEN 基因编辑技术来实现对基因的定向改变, 但由于操作复杂、成本较高, 一直限制着基因组学的研究进展。基因的低成本、高效率、操作简单的编辑技术一直是生物分子领域亟待解决的问题。2013 年《科学》(Science) 杂志上两篇有关 CRISPR/Cas 的报道标志着基因编辑技术取得了重大突破。CRISPR 是从细菌、古菌基因组中发现特殊的 DNA 重复序列家族。目前, 该技术已经成功应用于水稻、斑马鱼、小鼠等动植物中, 实现了对特定基因的定向修饰。简要介绍 CRISPR/Cas 的发现历史、组成、作用原理和最新研究进展, 对该技术在玉米研究中的应用进行展望。

关键词: 玉米; 基因编辑; CRISPR/Cas

中图分类号: S513.035.3

文献标识码: A

Research and Application of Gene Editing Technology in Maize

ZHANG Dong-min, ZHANG Xiao-xing, ZHU Hui, ZHANG De-gui,

WENG Jian-feng, HAO Zhuan-fang, LI Ming-shun

(Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract: Although ZFN and TALEN have been discovered and applied in gene editing, both of the two technologies are complex operation and high cost, which have restricted the progress of genomics research. Therefore, the low cost, high efficiency, and simple editing technology has been an urgent problem in molecular biology. Under that circumstance, two reports about CRISPR/Cas in “Sciences” make a breakthrough in this field in 2013. CRISPR is a special DNA repeat family found in the genomes of bacteria and archaea. And at present, the technology has been successfully applied to the rice, zebrafish, mouse and other animals and plants, to achieve a targeted modification of specific genes. In this paper, the discovery history, composition, function and the newest discovery of CRISPR/Cas were briefly introduced, and prospects for the application of this technology in maize research.

Key words: Maize; Gene editing; CRISPR/Cas

在过去的几十年里, 基因技术飞速发展, 现阶段有许多作物已经完成测序, 进入了人工编辑辅助育种阶段。基因编辑技术也逐渐从 ZFN、TALEN 技术发展到了应用 CRISPR/Cas 系统进行编辑的阶段。2012 年, TALEN 被《科学》(Science) 杂志评为十大科学突破之一^[1], 2013 年科学家发现基因编辑的另一个突破性技术 CRISPR/Cas(Clustered, regularly

interspaced short palindromic repeats-CRISPR-associated proteins) 系统。ZFN、TALEN 技术是由结合蛋白与核酸内切酶 FokI 融合而成, 需要针对不同的靶基因设计不同的核酸酶^[2], 脱靶频率高。与 ZFN、TALEN 技术相比, CRISPR/Cas 系统只需合成一个向导 RNA(sgRNA) 就能实现对基因的特异性修饰^[3], 且其靶点分布频率高, 可以简便高效的实现定向编辑, 包括插入、替换和敲除, 真正实现了设计简单、低成本和高效率。

1 发现历史

1987 年, 日本科学家 Ishino 等在大肠杆菌的碱性磷酸酶基因附近中发现了间隔重复序列, 随后的研究发现, 这种序列广泛存在于细菌和古菌中^[4]。

录用日期: 2017-05-17

基金项目: 国家玉米产业技术体系项目(CAR02-01)

作者简介: 张东民(1995-), 女, 山东泰安人, 硕士, 从事玉米遗传育种研究。Tel: 13021062121 E-mail: zdm5865@163.com
李明顺为本文通讯作者。E-mail: limingshun@caas.cn

2002年, Horvath等科学家在完成嗜热链球菌 *Streptococcus Thermophilus* 的全基因组序列测序后, 提出了CRISPR(Clustered regularly interspaced short palindromic repeats)的概念, 又称成簇间隔短回文序列^[5]。2006年, Makarova等运用生物信息学分析的方法推测CRISPR系统可能以一种类似于真核生物RNAi的方式实现免疫功能^[6]。2007年, Barrangou等首次发现并证明细菌可能利用CRISPR系统能够抵抗噬菌体的入侵^[7]。2012年, Jinek等的研究取得突破性进展, 发现Type II CRISPR系统中的Cas9是个核酸酶, 这个核酸酶结合2个RNA(crRNA, tracrRNA)就可以切割双链DNA^[8]。2013年, Le Cong等与Prashant等发在《SCIENCES》期刊上的两篇有关CRISPR/Cas9进行人和鼠基因的定点编辑宣告该定点突变技术获得了重大的突破^[9,10]。

2 CRISPR的基因座结构组成

CRISPR的基因座结构简单且较固定, 主要由3部分组成, 5'端为tracrRNA基因, 中间是Cas蛋白编码基因, 包括Cas9、Cas1、Cas2和Csn2, 3'端为CRISPR基因座。CRISPR基因座是由启动子、间隔序列、重复序列排列组成^[11], 其中, 重复序列高度保守, 长度通常在21~48 bp, 在不同物种中存在差异; 间隔序列长度约为26~72 bp, CRISPR通过这些间隔序列(Space)与靶基因进行识别。

3 CRISPR系统分类

根据CRISPR/Cas信息处理阶段与执行阶段的差异性, 可以将CRISPR系统分为Type I、Type II、Type III共3种类型。

Type I系统是CRISPR/Cas系统中Cas蛋白最多和最复杂的系统, 包含6个蛋白, 其中, 有特征性的Cas3蛋白, 该蛋白具有解旋酶和核酸酶功能, 是干扰阶段的主要作用酶类^[12]。在表达阶段, 多个Cas蛋白与成熟的crRNA共同结合形成CRISPR相关抗病毒防御复合物CASCAD (CRISPR associated complex for antiviral defense), CASCAD与入侵的外源DNA结合, 促使CASCAD内的crRNA与外源DNA的互补链配对形成R环结构, Cas3的核酸酶识别R环结构后先将互补链切开, 随后在Cas3的解旋酶和核酸酶作用下再将非互补链切开^[13-15]。

Type II型系统的主要特征是包含一个标志性的Cas9蛋白(分子质量很大的多功能蛋白)参与crRNA的成熟以及降解入侵的噬菌体DNA或是外源质粒。Cas9蛋白在crRNA的成熟和靶标DNA的剪切

中发挥重要作用, 并且反式编码小RNA (trans-encoded small RNA, tracrRNA) 在其中扮演了导向的角色^[16]。Cas9蛋白包含两个功能结构域, 一个在N端, 有类似于Ruc核酸酶的活性; 一个在中部, 有类似HNH核酸酶的活性。嗜热性链球菌具有典型的Type II CRISPR/Cas系统, 它的CRISPR/Cas系统编码tracrRNA (trans-activating crRNA), 其指导RNase III和Cas9完成前体crRNA的成熟。随后tracrRNA还能与成熟的crRNA的重复序列配对形成RNA二聚体, 进而和Cas9蛋白结合成核糖核蛋白复合体, 发挥识别和降解入侵的外源DNA功能^[17]。

Type III系统包含特征性的Cas10蛋白, 其具有RNA酶活性和类似于Type I的CASCAD功能^[18]。Cas10主要参与crRNA的成熟和剪切入侵外源DNA。目前发现Type III有两种亚型Type III A和Type III B。激烈热球菌的CRISPR/Cas系统属于Type III A型, 它干扰的靶标是mRNA^[19]; 表皮葡萄球菌CRISPR/Cas系统属于Type III B型, 它的靶标与Type I和Type II CRISPR/Cas系统相同, 是DNA^[20], 反映了自然界中的CRISPR/Cas系统的多态性。

在以上3类CRISPR/Cas系统中, Type II型系统的核糖核蛋白复合物相对简单, 除crRNA和tracrRNA外, 只有Cas9这1个蛋白。3种类型的CRISPR/Cas系统的分布也有所不同, Type I系统在细菌和古细菌中都有发现; Type II系统仅存在于细菌中; Type III型大多存在于古细菌中, 只有少数的细菌是Type III型^[21]。20世纪90年代末期, 测序技术开始飞速发展, 越来越多的细菌和古细菌的基因组信息被解密, 科学家们发现, 一些特殊的菌株中同时存在多种类型的CRISPR/Cas系统, 推测基因的水平转移可能是导致这一现象的主要原因, 例如一些包含有CRISPR/Cas系统的质粒、转座子元件, 在不同的菌株之间的转移^[22-25]。

4 作用原理

尽管CRISPR/Cas分为3种类型, 不同类型系统之间的主要作用机制有差异, 但是对于这3种类型都包含相同的3个阶段, 适应、表达和干扰。第一是CRISPR的高度可变的间隔区的获得(Space acquisition); 第二是CRISPR系统基因的表达(包括基因座的转录和转录后的成熟加工、Cas的转录翻译); 第三是CRISPR/Cas系统活性的发挥或者是对外源遗传物质的干扰^[26]。

在第一阶段, 当噬菌体、质粒等外源DNA侵袭细菌时, 其中的一段DNA序列(Protospacer)会整合到

宿主菌的 CRISPR 的 5' 端的两个重复序列之间。CRISPR/Cas 系统识别外源 DNA 中的 PAM 序列 (NGG), 特定的 Cas 蛋白将 PAM 旁边的序列加工成间隔序列整合到细菌基因组的 CRISPR 位点上, 这些间隔序列被同向重复序列隔开, 保证了 CRISPR 系统对自身序列和外源序列的正确识别^[27]。

在第二阶段, 细菌体内的 CRISPR 基因座转录出前体 crRNA (pre-crRNA), 保守的蛋白编码基因转录翻译出一种 RNA 导向双链 DNA (dsDNA) 核酸酶——Cas 蛋白。pre-crRNA 由 tracrRNA 指导在 Cas 蛋白的作用下被剪切为小的 RNA, 这些小的 RNA 就是成熟 crRNA。成熟 crRNA 通过碱基配对与 tracrRNA 结合成二聚体复合物 tracr/crRNA, 被称为向导 RNA (single guide RNA, sgRNA)。sgRNA 中的 crRNA 结合与其互补的外源 DNA 序列, 决定了酶的特异性; tracrRNA 引导 Cas 蛋白接近靶位点进行切割。通过人工设计这两种 RNA, 可以改造形成具有引导作用的 sgRNA, 足以引导 Cas 蛋白对 DNA 定点切割。同时也有推测称 tracrRNA 的 5' 端与成熟的 crRNA 3' 端有部分序列 (约 13 bp) 配对形成的茎环结构对维持 crRNA 与靶点的配对可能十分重要^[28]。

第三阶段的干扰是 CRISPR/Cas 抵御外源遗传物质入侵最关键的步骤。成熟的 crRNA 与特异的 Cas 蛋白形成核糖核蛋白复合物, 再与外源 DNA 结合并扫描到外源 DNA, 寻找其上的靶序列, crRNA 的间隔序列与靶序列互补配对, 外源 DNA 在配对的特定位置被核糖核蛋白复合物切割。CRISPR/Cas9 系统的剪切位点位于 crRNA 互补序列下游邻近的 PAM (Protospacer Adjacent Motif) 区, 主要序列为 NGG, PAM 区对于 CRISPR/Cas9 系统的活性是必须的。

5 研究进展

2017年1月,张锋实验室在《Cell》上发表关于第二类 CRISPR/Cas 系统中 Cpf1 的综述^[29], 介绍 Cpf1 系统相对于 Cas9 系统的优势, Cpf1 系统编辑成功率更高, 剪切位置的不同使得其选择和校正错误的余地更大, 产生黏性末端, 便于新 DNA 序列的插入。

2017年2月,张锋实验室在《Molecular Cell》杂志上发表关于两个新型的 RNA 靶向 CRISPR 系统的文章^[30], 这类新系统利用了一种新的 Cas 酶——Cas13b。研究发现, Cas13b 具有靶向和编辑 RNA 的能力。仅靶向 RNA 的这一能力使得研究人员能够以高通量地方式特异性地操纵 RNA, 从而用于研究广泛的生物过程。Cas13b 与之前发表的 Cas13a 有

一些共同的特性, 仅需要单个向导 RNA 就能够找到靶标。此外, Cas13b 能够同时靶向多个 RNA 转录本。

与此同时, 中国科学院遗传与发育生物学研究所高彩霞课题组同样在《自然·生物技术》杂志上发表了一篇关于单碱基突变的基因编辑技术的文章^[31]。该课题组在前期工作基础上, 借鉴哺乳动物单碱基编辑方法, 利用 Cas9 变体 (nCas9-D10A) 融合大鼠胞嘧啶脱氨酶 (rAPOBEC1) 和尿嘧啶糖基化酶抑制剂 (UGI), 构建了高效的植物单碱基编辑系统 nCas9-PBE, 成功地在三大重要农作物 (小麦、水稻和玉米) 基因组中实现高效、精确的单碱基定点突变。nCas9-PBE 单碱基编辑系统成功建立和应用, 为高效和大规模创制单碱基突变体提供了一个可靠方案, 为作物遗传改良和新品种培育提供了重要技术支撑。

6 CRISPR/Cas 在作物中的应用

CRISPR/Cas 系统已经成功应用于水稻、斑马鱼、小鼠等物种的基因编辑, 并且随着该技术的发展, 经过人工改造的 CRISPR/Cas 系统也迅速被应用到拟南芥、小麦、玉米、水稻等不同植物的基因组的定向编辑研究中, 并且获得较高的诱导突变率和可稳定遗传的基因组编辑植株。

北京大学瞿礼嘉教授实验室使用该技术进行水稻叶绿素合成基因 *CAO1* 和分蘖夹角控制基因 *LAZY1* 的定点突变实验, 发现有 83.3% 的 T₁ 转基因植株中 *CAO1* 相应位点发生了突变, 有高达 91.6% 的 T₁ 转基因植株中 *LAZY1* 相应位点发生了突变。*LAZY* 突变的纯合体比例达到 50%, 均表现出分蘖夹角变大的突变表型^[32]。Zhang 等通过研究 CRISPR/Cas9 在 2 个水稻亚种的 11 个靶基因中诱导突变的效率、特点、遗传性及特异性, 发现突变效率非常高^[33]。至此, 很多研究结果都表明, CRISPR/Cas9 系统在水稻中有很高的特异性, 利用 CRISPR/Cas9 系统可实现对水稻特定基因的高效、可稳定遗传及特异性的定点突变。Wang 等利用 CRISPR/Cas9 基因组编辑技术对小麦 Ta MLO 进行了定向突变, 在原生质体和转基因植物中的鉴定结果表明, 突变只发生在 A 基因组上, 为小麦基因功能的研究以及培育小麦新品种提供了一个全新的技术路线^[34]。中国科学院遗传与发育生物学研究所 Liang 等率先建立了玉米的 TALENs 和 CRISPR/Cas9 基因定向编辑系统, 并且在玉米原生质体中比较了 TALENs 和 CRISPR/Cas9 诱导 ZmIPK 同一位点的突变效率, 发现 CRISPR/Cas9 的诱导突变为率为 13.1%, TALEN 的突变诱导率为

9.1%^[35]。中国农业科学院作物科学研究所谢传晓课题组对 CRISPR/Cas9 系统进行了改良设计,利用双元 RNA 向导的 CRISPR/Cas9 系统分别对植物两个 MiRNA 基因的基因座 (MiR169a 和 MiR827a) Pri-miRNA 区域实现了人工删除,删除效率分别达到 20% 和 24%。

7 前景展望

7.1 敲除作物的目的基因

有了前人成功的案例,设想可以利用已知的玉米的信息,根据自己的目的来对基因进行编辑,使其发生缺失、插入和替换等。现在已知 *Opaque2(O2)* 野生型玉米的胚乳呈现硬质透明的特点,当 *O2* 基因发生隐形突变,突变体玉米的胚乳呈现粉质不透明的特点。Mertz^[36]等通过对玉米子粒胚乳氨基酸含量进行分析,发现 *o2* 突变玉米中的胚乳中赖氨酸的含量比普通玉米提高了至少 70%,其余的氨基酸含量也与正常玉米有所差异,也就是说 *o2* 突变玉米有不一样的氨基酸组成模式。为了提高玉米的品质,可以利用 CRISPR/Cas9 技术对正常型玉米中的 *O2* 基因进行编辑,采用敲除使其突变为 *o2*,最终达到获得新型 *o2* 突变玉米的目的。除了 *o2* 突变体,前人还相继发现了新的高赖氨酸玉米突变体,如 *fl2*、*opaque7*、*opaque6*、*De-30* 等。这些突变体也能够不同程度的改变胚乳氨基酸的组成,增加赖氨酸的含量。

所有突变体中,*opaque6* 基因突变导致赖氨酸的含量最高,但是由于 *o6* 基因隐性纯合体大多在苗期死亡,很难在育种和生产上使用。*o7* 基因表现较为复杂的遗传方式,其胚乳表现似为一种阈值性状。*fl2* 基因表现半显性,遗传方式具有剂量效应。国际玉米小麦改良中心 (CIMMYT) 专家在 20 世纪 60 年代后期开展了高赖氨酸玉米材料的筛选工作。实践证明,*o2* 基因纯合突变体是用于高赖氨酸玉米育种的最好选择^[37]。

7.2 替换作物的目的基因

谢传晓课题组在之前研究的基础上,尝试采用一个核定位表达的 eGFP 修改模板对 *TFL1* 基因的一个特定区段在删除的基础之上进行定点替换。经过一系列实验验证后,证实通过该实验成功地实现了目标基因的替换,双元 RNA 向导的 CRISPR/Cas9 系统技术可以作为目标基因替换的工具。该研究成果可以应用于目标基因的定点定向替换,从而实现将目标基因进行分子设计、遗传改良和生产应用。

7.3 可以作为病毒杀手

最新报道 Cas9 系统还可以作为病毒杀手保护

宿主。有研究小组将 Cas9 系统做了一定修改,将其注入蚕卵,作为家蚕的免疫系统,使其能够识别并攻击家蚕的核型多角体病毒。当病毒进攻到家蚕体内时,该免疫系统就会将病毒撕碎,从而起到保护宿主的作用。这项技术通过保护家蚕能够提高丝绸产量,而且科学家也正在进一步研究证实其能够抵抗人类病毒。

CRISPR/Cas9 技术是现代研究作物遗传育种的有效工具,应用该技术可以进一步提高作物的产量,增强作物抗性及培育优质作物。该技术操作简单便捷、成本较低,突变频率高,但是怎样合理的应用该技术是一个值得思考的问题。

参考文献:

- [1] Breakthrough of the year. The runners-up[J]. Science, 2012, 338(6114): 1525-1532.
- [2] Kim Y G. Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1996, 93(3): 1156-1160.
- [3] Jinek Martin, Chylinski Krzysztof, Fonfara Ines, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity[J]. Science (New York, N.Y.), 2012, 337(6096): 816-821.
- [4] Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, et al. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product[J]. Journal of Bacteriology, 1987, 169: 5429-5433.
- [5] Horvath P, Barrangou R. CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea[J]. Science, 2010, 327(5962): 167-170.
- [6] Kira S Makarova, Nick V Grishin, Svetlana A Shabalina, et al. 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[J]. Biology Direct, 2006, 1(1): 7-26.
- [7] Barrangou Rodolphe, Fremaux Christophe, Deveau H el ene, et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes [J]. Science(New York, N.Y.), 2007, 315(5819): 1709-1712.
- [8] Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity[J]. Science, 2012, 337: 816-821.
- [9] Le Cong, F Ann Ran, David Cox, et al. Multiplex genome engineering using crispr cas[J]. Systems Science, 2013, 339(15): 19-822.
- [10] Prashant Mali, Luhan Yang, Kevin M Esvelt, et al. RNA-Guided human genome engineering via cas9[J]. Science, 2013, 339(15): 823-825.
- [11] 陈伟潘. CRISPR/Cas9 系统在水稻基因编辑中的应用研究进展 [J]. 南方农业, 2015, 9(3): 135-136. Chen W P. Application of CRISPR/Cas9 sSystem in rice Gene editors[J]. South China Agriculture, 2015, 9(3): 135-136. (in Chinese)
- [12] Sinkunas Tomas, Gasiunas Giedrius, Fremaux Christophe, et al. Cas3 is a single-stranded DNA nuclease and ATP-dependent helicase in the CRISPR/ Cas immune system[J]. The EMBO Journal, 2011, 30(7): 1335-1342.

- [13] Haurwitz R E, Jinek M, Wiedenheft B, et al. Sequence- and structure-specific RNA processing by a CRISPR endonuclease[J]. *Science*, 2010, 329(5997): 1355-1358.
- [14] Blake Wiedenheft. Structural Basis for endonuclease activity of a conserved protein implicated in CRISPR-mediated genome defense[J]. *Structure*, 2009, 17(6): 904-912.
- [15] Wiedenheft B. RNA-guided complex from a bacterial immune system enhances target recognition through seed sequence interactions [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108(25): 10092-10097.
- [16] Garneau Josiane E, Dupuis Marie-Ève, Villion Manuela, et al. The CRISPR/ Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA[J]. *Nature*, 2010, 468(7320): 67-71.
- [17] Deltcheva E, Chylinski K, Sharma C M, et al. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III [J]. *Nature*, 2011, 471(7340): 602-607.
- [18] Anantharaman V, Iyer L M, Aravind L. Presence of a classical RRM-fold palm domain in Thg1-type 3'-5' nucleic acid polymerases and the origin of the GGDEF and CRISPR polymerase domains [J]. *Biol Direct*, 2010, 5: 43.
- [19] Caryl R Hale. RNA-Guided RNA cleavage by a CRISPR RNA-Cas protein complex[J]. *Cell*, 2009, 139(5): 945-956.
- [20] Marraffini L A, Sontheimer E J. CRISPR interference limits horizontal gene transfer in staphylococci by targeting DNA[J]. *Science*, 2008, 322(5909): 1843-1845.
- [21] Terns Michael P, Terns Rebecca M. CRISPR-based adaptive immune systems[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2011, 14(3): 321-327.
- [22] James S Godde, Amanda Bickerton. The repetitive DNA elements called CRISPRs and their associated genes: evidence of horizontal transfer among prokaryotes[J]. *Journal of Molecular Evolution*, 2006, 62(6): 718-729.
- [23] John F Heidelberg, William C Nelson, Thomas Schoenfeld, et al. Germ warfare in a microbial Mat Community: CRISPRs provide insights into the Co-Evolution of host and viral genomes[J]. *PLoS Clinical Trials*, 2009, 4(1): 0-0.
- [24] Horvath P. Comparative analysis of CRISPR loci in lactic acid bacteria genomes[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2009, 131(1): 62-70.
- [25] Portillo M C, Gonzalez J M. CRISPR elements in the thermococcales: evidence for associated horizontal gene transfer in *pyrococcus furiosus*[J]. *Journal of Applied Genetics*, 2009, 50(4): 421-430.
- [26] 方锐, 畅飞, 孙照霖, 等. CRISPR/Cas9介导的基因组定点编辑技术[J]. *Progress In Biochemistry and Biophysics*, 2013, 40(8): 691-702.
- [27] Fang R, Chang F, Sun Z L, et al. CRISPR/Cas9-mediated genomic fixed-point editing[J]. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 2013, 40(8): 691-702. (in Chinese)
- [27] 郑小梅, 张晓立, 于建东, 等. CRISPR-Cas9介导的基因组编辑技术的研究进展[J]. *生物技术进展*, 2015(1): 1-9, 78-79.
- [27] Zheng X M, Zhang X L, Yu J D, et al. Research on CRISPR-Cas9-mediated genomic editing techniques[J]. *Advances in Biotechnology*, 2015(1): 1-9, 78-79. (in Chinese)
- [28] Gasiunas G, Barrangou R, Horvath P, et al. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(39): E2579-2586.
- [29] Makarova K S, Zhang F, Koonin E V. SnapShot: Class 2 CRISPR-Cas Systems. *Cell*. 2017 Jan 12;168(1-2):328-328.e1. doi: 10.1016/j.cell.2016.12.038.
- [30] Aaron A S, David B T C, Neena K P, et al. Cas13b is a type VI-B CRISPR-associated RNA-guided RNase differentially regulated by accessory proteins Csx27 and Csx28[J]. *Molecular Cell*. January 5, 2017. doi:10.1016/j.molcel.2016.12.023
- [31] Zong Y, Wang Y P, Li C, et al. Precise base editing in rice, wheat and maize with a Cas9-cytidine deaminase fusion[J]. *Nature Biotechnology*. 2017 Feb 27. doi: 10.1038/nbt.3811.
- [32] Miao J, Guo D, Zhang J, et al. Targeted mutagenesis in rice using CRISPR-Cas system[J]. *Cell Research*, 2013, 23: 1233-1236.
- [33] Zhang H, Zhang J, Wei P, et al. The CRISPR/Cas9 system produces specific and homozygous targeted gene editing in rice in one generation[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2014, 12(6): 797-807.
- [34] Wang Y, Cheng X, Shan Q, et al. Simultaneous editing of three homeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew[J]. *Nature Biotechnology*, 2014, 32(9): 947-951.
- [35] Liang Z, Zhang K, Chen K, et al. Targeted mutagenesis in *Zea mays* using TALENs and the CRISPR[J]. *Journal of Genetics and Genomics*, 2014, 41: 63-68.
- [36] Edwin T Mertz. Mutant gene that changes protein composition and increases lysine content of maize endosperm[J]. *Science*, 1964, 145(3629): 279-280.
- [37] 姜伟. 优质蛋白玉米标记辅助选择技术体系的建立[D]. 内蒙古农业大学硕士毕业论文, 2003.

(责任编辑: 朴红梅)