

生物技术的发展 年鉴 (2013)

SHENGWU JISHU
FAZHAN NIANJIAN

主编 陈 薇 曹 诚

生物技术的发展年鉴(2013)

主 编 陈 薇 曹 诚

军事医学科学出版社

图书在版编目(CIP)数据

生物技术发展年鉴. 2013 / 陈薇, 曹诚主编. —北京:
军事医学科学出版社.

ISBN 978-7-5163-0491-4

I. ①生… II. ①陈… ②曹… III. ①生物工程-技术发展-
中国-2013-年鉴 IV. ①Q81-54

中国版本图书馆CIP数据核字(2014)第255297号

策划编辑: 孙 宇 责任编辑: 吕连婷

出 版: 军事医学科学出版社

地 址: 北京市海淀区太平路27号

邮 编: 100850

联系电话: 发行部: (010) 66931049

编辑部: (010) 66931039, 66931038, 66931053

传 真: (010) 63801284

网 址: <http://www.mmssp.cn>

印 装: 北京宏伟双华印刷有限公司

发 行: 新华书店

开 本: 787mm × 1092mm 1/16

印 张: 14.75

字 数: 363千字

版 次: 2014年12月第1版

印 次: 2014年12月第1次

定 价: 88.00元

本社图书凡缺、损、倒、脱页者, 本社发行部负责调换

《生物技术发展年鉴(2013)》

编委会

主 编 陈 薇 曹 诚

副 主 编 韩 铁

编 者 (按姓氏汉语拼音为序)

陈红星 陈昭烈 崔 艳 高 婷 何 涛 何 湘
侯利华 胡显文 黄君健 金 蕊 林艳丽 凌 焱
刘 波 刘纯杰 刘先凯 刘珠果 师明磊 孙志伟
王恒樑 王 俊 王 芃 王 荣 王艳春 王友亮
魏从文 郝永义 熊向华 徐俊杰 杨 冠 杨 晓
杨志新 叶玲玲 殷 瑛 于 蕊 余云舟 袁盛凌
宰晓东 张惟材 张 彦 赵志虎 钟 辉 周建光
周晓巍 朱 力

审 稿 马清钧 黄培堂 张兆山 俞炜源 杨 晓 陈昭烈
胡显文 吴 军 孙志伟 戴秋云 王恒樑 钟 辉
赵志虎 梁 龙 叶棋浓 周建光 黄君健 徐俊杰
阎明凡

学 术 秘 书 田德桥

序

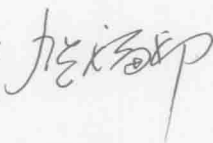
月晕知风，础润知雨。2014年4月1日，曾孕育互联网与GPS、被誉为“全球军事科技发展风向标”与“美国最伟大科技创新工场”的国防高级研究计划局（DARPA）正式设立生物技术办公室，旨在“改变游戏规则、创造游戏规则”，从国家安全的战略高度强化生物科技与工程科技、信息科技等的交叉融合及其统领与辐射作用，进一步巩固其在国防科技领域的领先优势。正如DARPA局长阿尔提·普拉巴卡尔3月26日在国会众议院听证会上所指出的，生物是大自然的终极创新者，任何创新都应该利用网络化、复杂性的生物学大师来获取灵感与解决方案。美国这一重大动向预示，生物科技将成为未来军事革命、经济社会发展和大国博弈的战略制高点。

史往今来，先行者胜、先胜者王。在生物科技领域，总体上我国与西方发达国家的差距相对较小，在部分领域并驾齐驱，在有的领域甚至处于引领地位。基于现代生物技术的生物产业正面临着前所未有的发展机遇，已成为我国战略性新兴产业之一。我国的生物科技创新力量一定要勇于担当、奋力超越、引领潮流，在中华民族伟大复兴进程中做出突出贡献。

他山之石，可以攻玉。面对创新驱动生物科技进步、加速生物经济发展、服务国防军队现代化的强烈需求，我院生物工程研究所全维动态追踪年度生物技术的发展前沿，审慎研判国际生物科技重大创新，粹其精华成此年鉴。我相信，年鉴的攻玉价值必将日益显现，必将对我国生物科技的创新发展产生深远的历史性影响。

是为序。

中国科学院院士
军事医学科学院院长



二〇一四年九月九日

前言

生物技术是当今世界发展最快的技术领域之一，正在迅速发展并与其他学科领域渗透融合。生物技术的快速发展推动科学进步，促进经济发展，改变人们生活，并影响人类社会的发展进程。近几年，生命科学、生物技术及相关领域的论文总数占到全球自然科学论文的 50% 以上，*Science* 评选的年度十大科技突破中，生命科学和生物技术领域常常占到一半以上。进入 21 世纪，人类社会的发展面临着健康需求、粮食短缺、能源保障、环境污染、生物安全等系列重大挑战，生物技术为我们应对这些重大挑战提供了重要途径和手段。

1953 年 Watson 和 Crick 阐明了 DNA 双螺旋结构，奠定了分子生物学的基础，自此生物技术和生命科学开始突飞猛进地发展，重组技术、测序技术、PCR 技术、蛋白质工程技术、RNAi 技术、反向遗传学技术、基因治疗技术等不断促进着科技的进步，极大地改变了人们的生活。近些年，生物新技术层出不穷，TALENs 和 CRISPR/CAS 基因操作技术、单细胞测序技术、3D 打印技术、肿瘤免疫治疗技术等正在促使生命科学和医学科学突飞猛进。当然，生物技术是一把“双刃剑”，具有两用性的特点，其也可能被滥用而产生危害。如何避免和应对生物技术谬用是世界各国共同面临的问题。

军事医学科学院生物工程研究所是军队从事生物高技术研究的重要机构，一直密切跟踪国际生物技术的发展前沿。研究所组织科研一线的科技人员，尤其是一些青年科研骨干将全球生物技术的发展现状和年度主要进展编撰成册，供相关领域的科研人员和管理人员参考，并计划逐年出版。

本书针对 2013 年度生物技术发展，包括基因操作技术、合成生物学与测序技术、组学技术、生物制药技术、生物治疗技术、生物材料技术、生物信息学技术、生物成像技术、克隆技术、神经生物学技术等 10 个部分，共 25 个具体内容。在内容选择上尽可能覆盖生物技术的各个方面。每个具体内容按照概述、技术进展、重大进展对军事医学的影响、展望等几个部分进行编写。书中大部分参考文献来源于 2013 年度 *Science*, *Nature*, *Cell*, *Nature Biotechnology* 等权威期刊的研究论文。

本书编写得到了军事医学科学院领导、院机关的大力支持，同时研究所一些多年从事生物技术研究的专家对书稿进行了审阅并提出了许多宝贵意见，在此一并表示诚挚的感谢。

由于编写人员的经验不足，书中难免会有一些遗漏或阐述不够准确的地方，希望广大读者提出宝贵意见。

编 者

2014 年 8 月

Contents 目 录

基因操作技术	1
TALEN 和 CRISPR/Cas 技术及应用	3
合成生物学与测序技术	15
合成生物学	17
单细胞测序和原位测序	32
组学技术	43
基因组构象研究技术	45
蛋白质组学技术	53
系统代谢工程	61
微生物与人类健康	70
生物制药技术	77
重组蛋白表达系统	79
抗原递送技术研究	90
结构生物学指导疫苗设计	98
核酸疫苗	105
抗体工程	108
生物治疗技术	127
T 细胞治疗	129
肿瘤免疫治疗	137
RNA 干扰技术及其在基因治疗中的应用	143
病毒载体	148
生物材料技术	159
生物材料在再生医学中的应用	161
生物 3D 打印技术	167

纳米材料用于药物递送或作为治疗方法	173
生物信息学技术.....	179
大数据驱动计算生物学变革	181
生物成像技术	189
CLARITY 技术	191
低温电子显微镜	195
迷你胞内探针	204
克隆技术	211
采用体细胞核移植技术制备人胚胎干细胞	213
神经生物学技术.....	219
脑机接口及直接脑脑接口研究进展	221

基因操作技术 >>>

TALEN和CRISPR/Cas技术及应用

郝永义 王 荣 王 俊 杨 冠 杨志新 陈红星 杨 晓 周晓巍

1 概述

限制性核酸内切酶是一类能识别特定的 DNA 序列,并在识别位点或其周围切割双链 DNA 的一类内切酶,该类内切酶广泛存在于原核生物和古细菌体内,是原核生物抵抗外源生物入侵的防御系统。它的这种独特功能使其成为解析基因结构和功能、开发基因工程产品所必备的工具,极大地推动了 20 世纪 70 年代重组 DNA 技术的兴起和蓬勃发展。

然而,一般的限制性内切酶识别位点较短(一般 4 ~ 6bp),因此只能在体外对不太长的 DNA 序列进行酶切操作,而对于长达数十甚至上百兆碱基的染色体序列,很容易找到多个相同的酶切位点,从而造成非靶点切割(即脱靶效应),严重制约了这项技术在体内研究中的应用。锌指核酸酶(Zinc-Finger Nucleases, ZFNs)^[1-3]、TALEN^[4]和 CRISPR/Cas^[5]是最近几年兴起的新一代限制性 DNA 酶切工具,该类内切酶有一个共同特征,即 DNA 识别和 DNA 切割分别由两个不同的功能元件执行, DNA 切割元件功能只有在 DNA 识别元件的指导下才能实现。与 DNA 限制性内切酶相比,其 DNA 识别元件可以识别较长的 DNA 序列,从而提高其特异性,达到染色体组存在的唯一位点,从而为基因组编辑创造了条件。然而,这些新型的限制性 DNA 酶识别和切割的方式各有特点,导致其应用方式各有差别。鉴于 TALEN 和 CRISPR/Cas 技术的潜在优势和前景,本文对这两个技术的进展及未来应用作如下介绍。

2 技术进展

2.1 TALEN技术

2.1.1 TALEN技术简介

TALENs [transcription activator-like (TAL) effector nucleases] 的中文名为转录激活因子样效应物核酸酶,是特异性 TALE 蛋白 DNA 结合域(也称 TAL 模序)与非特异性 DNA 核酸内切酶(常用 Fok I 核酸内切酶的 DNA 剪切结构域)融合^[6]。TALEN 的 DNA 结合结构域由植物病原体黄单胞菌(*Xanthomonas* sp.)的转录激活因子样效应物(TAL)蛋白家族的多个 TAL 重复单元串联而成,可以进入细胞核并结合特定 DNA 序列。典型的 TAL 重复单元包括 34 个氨基酸,除了第 12、13 位被称作重复可变的双氨基酸序列(di-residus, RVDs)外,均高度保守。RVD 与所识别的碱基对 A、G、C、T 有恒定的对应关系(如

HD、NG、NI 和 NN 分别对应 C、T、A、G), 每个重复单元可以根据 RVD 介导识别特定的 DNA 靶序列。TAL 重复序列两端由不可变的 N- 端半重复 (repeat 0.5) 单元组成, 可以导向结合一个胸腺嘧啶, 从而决定了每个靶序列的第一个核酸。其 DNA 切割结构域通常来自无序序列特异性的 Fok I 核酸内切酶。由于 TALEs 设计简单, 构建容易, 特异性高, 而且可以靶向更长的基因序列, 已成为科研人员进行基因组编辑的重要工具 (图 1)。

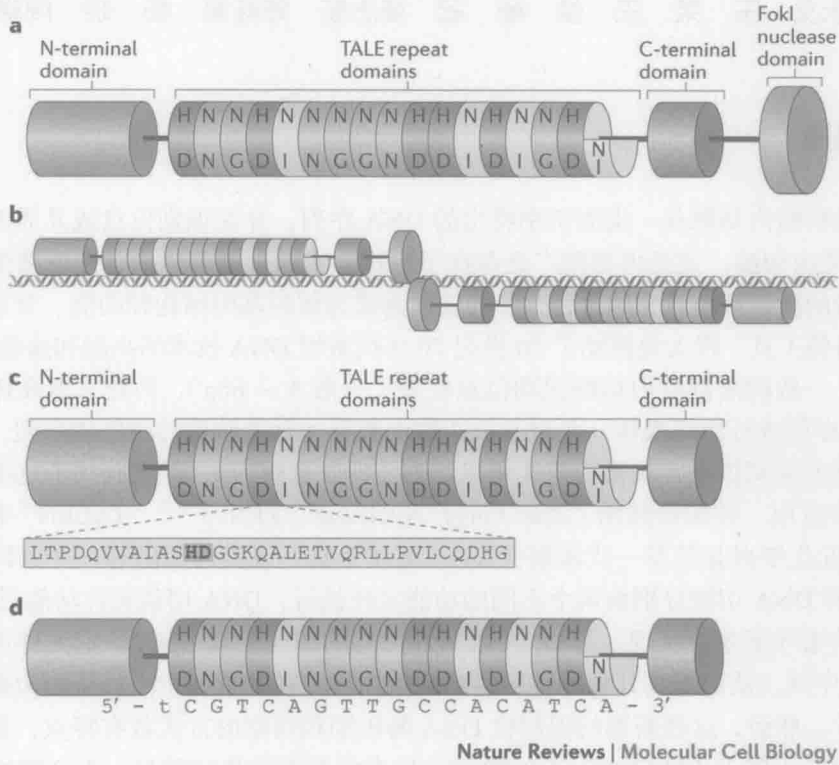


图 1 TALENs 和 TALEN 重复单元模式图^[4]

a: TALEN 结构; b: TALEN 作用模式 (二聚体); c: TALEN 的 DNA 结合域 (灰色背景氨基酸序列为一个重复单元的 34 个氨基酸序列, 其中 HD 为 RVD); d: TALEN 靶向识别 DNA

2012 年, J. Keith Joung 等^[7] 开发了一种称为 FLASH (快速连接自动化固相高通量, Fast ligation-based automatable solid-phase high-throughput) 的系统, 该系统通过磁珠原位固定法对编码 TALEN 的 DNA 片段进行组装, 通过液相洗脱系统自动构建 DNA, 在一天内可以构建多达 96 种 TALEN, 每个 TALEN 成本约为 75 美元。此外, Joung 还开发了一种手动的 FLASH, 使实验室无需借助机器设备即可在一天内构建 24 种 TALEN 序列。通过对 FLASH 组装 TALEN 内源活性检测实验证实, 85% ~ 90% 的 FLASH 装配 TALEN 在人类细胞中具有高度基因组编辑活性, 表明通过 TALEN 技术基本上可以靶向任何目标 DNA 序列, 其靶向切割 DNA 效率大大超越了其他核酸酶技术, 成为体内限制性核酸内切酶的主流工具, 在 2012 年被评为当年十大科学进展之一。

2.1.2 TALEN技术应用

TALEN 技术首先应用于基因修饰生物。对动物基因组进行编辑需要从编码质粒上体外转录得到 TALEN 的 mRNA, 将其显微注射到单细胞期胚胎中。一旦 TALEN 的 mRNA 翻译成蛋白, TALEN 蛋白会结合到靶序列上, Fok I 核酸酶二聚化并产生一个 DSB (double-strand breaks)。DSBs 会通过同源重组 (homologous recombination, HR) 或非同源末端连接 (non-homologous end joining, NHEJ) 途径得到修饰。靶向敲入基因修饰可以通过与共注射的 ODNs (oligodeoxynucleotides) 或包括同源序列的能作为修复模板的基因打靶质粒进行同源重组来实现。DSBs 也可以通过不需要模板的非同源末端连接来修复关闭, 这通常会导致核酸缺失, 编码区内的移码突变 (基因敲除)。两种不同机制的修复方式在显微注射后的细胞核中都有可能进行, 也就是说一组进行了显微注射的胚胎中可能同时得到基因敲入和敲除的突变, 之后需要对出生的后代进行基因型鉴定, 来鉴别所需基因修饰的首建者动物。

TALEN 技术修饰基因组也已经被应用到过去被认为很难进行基因修饰的模式生物中, 如果蝇、爪蟾、大鼠、猪等。除此之外, TALEN 也已经在牛、蚕、蟋蟀等中成功应用。仅在国内, TALEN 技术介导的基因修饰成果颇丰。北京大学朱作言、张博实验室与美国加州洛杉矶分校林硕合发明了一种构建 TALE 重复序列的简便方法, 并率先报道应用 TALEN 技术在斑马鱼中获得可遗传的靶向突变, 通过同源重组实现基因精确修饰、利用两对 TALEN 进行斑马鱼染色体大片段的靶向删除或倒位^[8]; 还建立了国际首例 EEN 网络数据库和知识库 EENdb (<http://eendb.zfgenetics.org/>)^[9]。中科院生物物理所焦仁杰实验室与美国佛罗里达大学邓武民合作首次报道在果蝇中利用 TALEN 成功得到可以通过种系遗传的靶向基因突变^[10]; 西南大学夏庆友实验室利用两对 TALEN 在家蚕中对 BmBlos2 基因实现了 800 bp 的染色体片段删除^[11]; 中科院遗传发育所高彩霞实验室与成都电子科技大学张勇合作在水稻和短柄草中成功实现 TALEN 介导的基因敲除和大片段缺失突变^[12]; 华东师范大学刘明耀和李大力实验室应用 TALEN 成功制备了基因敲除小鼠^[13]; 香港中文大学赵晖实验室与中科院广州生物医药健康研究院陈永龙、美国 NIH 的 I. B. Dawid 及香港中文大学郑汉其合作用爪蟾实现了 TALEN 介导的基因组定点突变^[14]; 西南大学王小佳和宋明实实验室在甘蓝中建立了基于 TALEN 的基因打靶技术^[15]; 中科院广州生物医药与健康研究所赖良学和裴端卿实验室利用 TALEN 技术成功制备了 RAG1 和 RAG2 基因突变的兔子^[16]; 中科院生物物理所欧光朔实验室通过在线虫体内表达 TALEN 蛋白实现了条件性基因突变^[17]; 西北农林科技大学张智英实验室建立了一种快速构建 TALEN 表达载体的方法^[18]。

2.2 CRISPR/Cas技术

2.2.1 CRISPR/Cas技术简介

CRISPR/Cas (Clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated nuclease) 技术是 2013 年开发的一种新的 DNA 靶向编辑工具, 其 DNA 特异识别是靠一小段发夹 RNA 结构实现的, 而 DNA 剪切则是凭借结合于 RNA 上的 Cas 核酸酶执行^[19, 20]。CRISPR 序列是存在于微生物基因组中, 由长度 25 ~ 50 bp 的重复序列 (repeat, R) 和间区序列 (spacer, S) 间隔成簇排列 (R-S 结构) 而成的 DNA 序列, 而 Cas 则是存在于

CRISPR 簇侧翼序列附近的多态性家族基因, 编码可与 CRISPR 区域发生作用的一组功能域蛋白 (具有核酸酶、解旋酶、整合酶和聚合酶等的活性), 在指导 RNA (guide RNA) 的引导下对靶位点进行切割。此外, 在 CRISPR 位点的第一个重复序列上游有 CRISPR 前导序列 L (Leader), 该前导序列可以作为启动子, 启动 CRISPR 序列的转录。前导序列、R-S 结构以及一系列的 Cas 组成了完整的 CRISPR/Cas 系统。人们发现这些 CRISPR 序列能与病毒或质粒 DNA 序列相匹配, 表明 CRISPR/Cas 系统能够编码“适应性”免疫系统, 在细菌的获得性免疫中发挥作用 (图 2)。

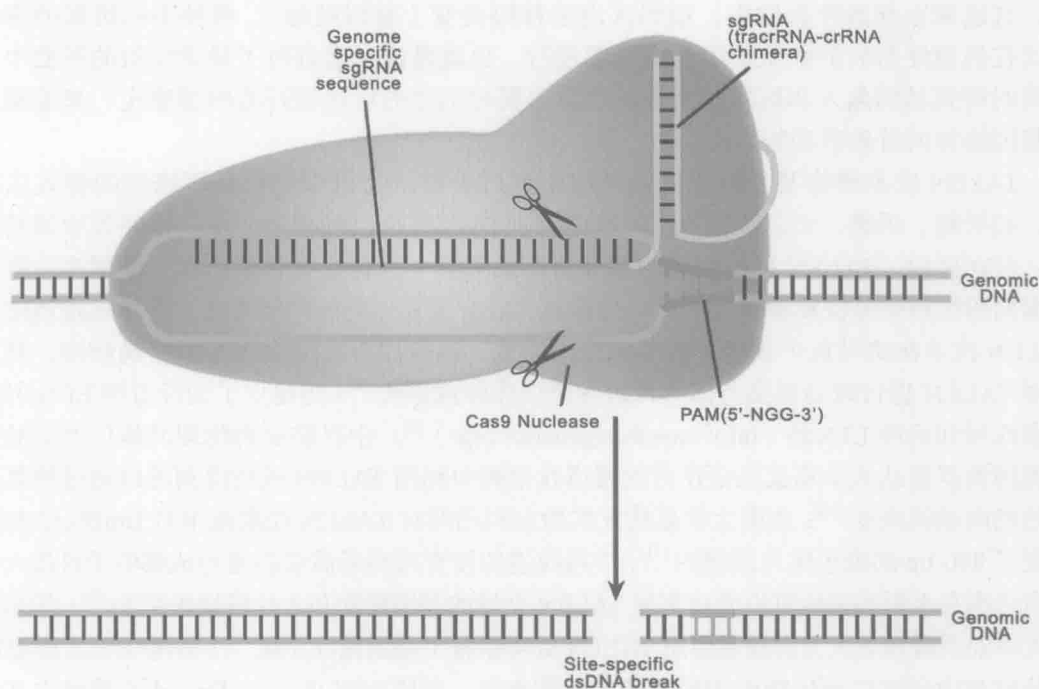


图 2 CRISPR/Cas9 介导的基因组剪切模式图 (图片来源: 广州复能基因有限公司网站)

CRISPR/Cas 系统的作用机制可分为 3 个阶段: ①获得 spacer。在噬菌体首次侵入时, CRISPR/Cas 系统裂解噬菌体基因组中短的原间隔序列 (proto-spacer), 加工后将其整合到宿主基因组中 CRISPR 位点的 5' 端 (spacer), 每一次整合都伴随着重复序列的复制, 进而形成一个新的 R-S 单元。② CRISPR 基因座的转录及后加工。CRISPR 基因座首先转录为长的 crRNA (CRISPR RNA) 前体 (precursor crRNA, pre-crRNA), 该前体在重复序列处被剪切, 而后被 Cas 内切酶加工成小的成熟的 crRNA。③ CRISPR/Cas 系统发挥功能。当噬菌体再次侵染时, 成熟的 crRNA 结合相关的 Cas 蛋白形成 crRNA-Cas 复合物, crRNA 通过碱基互补靶向结合噬菌体基因组中的目标 DNA, 随后 Cas 蛋白对目标 DNA 进行切割。

CRISPR/Cas 系统对外源 DNA 的特异性识别, 除了要求 spacer 序列和 proto-spacer 序列一致外, 在 proto-spacer 毗邻处还需要有特定的 DNA 模序 (proto-spacer adjacent motif, PAM), 该 PAM 因 Cas 酶种类不同而异。

CRISPR/Cas 系统按照 cas 基因、重复序列等的不同特性主要可以分为三类,它们产生 crRNA 和靶向入侵核酸的机制有所不同。I 型 CRISPR/Cas 系统, crRNA 前体经过 Cas6 endoribonuclease 和 Cascade 蛋白复合体处理成短片段,在 crRNA 的引导下, Cascade 指导 Cas3 核酸酶切断入侵的 DNA。在 III-A 型系统中, DNA 是靶分子,具体参与执行 CRISPR 免疫功能的核酸酶或蛋白质目前尚不清楚。II B 亚型系统中,体外实验表明一种由 Cmr 蛋白组成的复合体会切割 crRNA 所互补识别的 RNA 分子。II 型 CRISPR/Cas 系统中,生成 crRNA 需要 Cas9 蛋白、反式激活 crRNA (trans-activating crRNA, tracrRNA) 和 Rnase III。crRNA 通过碱基配对与 tracrRNA 结合,形成杂交分子。这一 tracrRNA:crRNA 二元复合体指导 Cas9 蛋白酶在 crRNA 靶向结合位点剪切外源双链 DNA。

当前用于基因组靶向识别剪切的 CRISPR/Cas 系统是来自动物性链球菌 SF370 的 type II 型 CRISPR 基因座^[5, 21, 22],该基因座含有四个 Cas 基因 (Cas1, Cas2, Csn2 和 Cas9),两个非编码 RNA,即 tracrRNA 和 pre-crRNA。实验表明,只需将 Cas9 基因、crRNA 和 tracrRNA 三种元件导入细胞就可实现对靶 DNA 的剪切,另外把 crRNA 和 tracrRNA 构建为嵌合 RNA (single guide chimeric RNA, gRNA) 同样能实现靶基因剪切。Cas9 核酸酶含有两个 DNA 切割结构域,一个与 HNH 核酸酶同源,切割互补链 DNA,另一个与 RuvC 核酸酶同源,切割非互补链 DNA。相比于 TALEN 技术,CRISPR/Cas 系统在设计上更为简便,如同设计基因扩增引物一样,只需要选择适合的基因靶点并据此设计 20bp 大小的寡核苷酸片段即可进行 CRISPR/Cas 系统组装和基因编辑,其成本远小于 ZFNs 和 TALEN。

2.2.2 CRISPR/Cas 技术应用

2012 年, Jinek 等^[5]最先利用 CRISPR/Cas 系统作用于体外的含有互补序列的目标 DNA,切割形成 DSBs,切割位点位于 PAM 上游 3 ~ 8 bp 处,为 RNA 介导的基因组编辑的应用奠定了基础;并且把 crRNA:tracrRNA 二元复合体改造为单链 RNA 嵌合体,也能指导 Cas9 蛋白在特定位点的剪切,有可能更加简化 CRISPR/Cas 系统的构建;如果对 Cas9 蛋白的 HNH 核酸酶结构域及 RuvC I 结构域进行修改,还能实现对目标单链的切割。

2013 年初,来自 MIT 的张峰研究小组^[22]构建了两种 CRISPR/Cas 系统,实现了对人 293T 细胞的 EMX1 和 PVALB 基因以及小鼠 Nero2A 细胞的 Th 基因的定点突变;并且 RuvC I 结构域改构后的 Cas9 同样可以在人源细胞中实现对目标基因的单链切割;此外,更令科研人员振奋的是,通过设计多段 crRNA 可以实现对同一个细胞的多个位点进行切割,并且把 Cas9、crRNA 及 tracrRNA 序列构建于同一个质粒上进行转染即可完成切割,大大降低了操作的难度。同一期的 *Science* 杂志发表了来自哈佛的 Church 研究小组^[21]利用改造的 CRISPR/Cas9 系统用于人类细胞基因组编辑的研究成果。Mali 等实现了对 293T、K562 以及 iPS 细胞中基因组靶位点的双链或单链切割,从而激活细胞的 DNA 修复机制(包括非同源重组的末端连接 NHEJ 修复和精确的同源重组 HR 机制),得到的突变效率与细胞类型和 RNA 表达载体有关,突变效率为 2% ~ 38%。

两篇论文的不同之处在于, Mali 等的实验结果表明,使用 crRNA 与 tracrRNA 融合的 sgRNA 能够获得比较高的切割效率;而 Cong 等的结果表明 sgRNA 的切割效率较低。但随后在 *Nature Biotechnology* 以及 *Cell Research* 上同期发表的两篇相关研究论文使用的都

是与 Mali 相同的 sgRNA, 都获得不错的打靶效率。尤其是 Hwang 等^[23] 利用 sgRNA 靶向的 CRISPR/Cas9 系统不仅成功地在斑马鱼胚胎中实现了 *fh1*、*apoea* 等基因定点突变, 突变的效率与 TALENs 在该位点引起突变的效率相近, 而且还利用该系统获得了 TALENs 未能获得的突变体, 获得了 *drd3*、*gsk3b* 基因的突变体。就目前的结果来看, 似乎使用 sgRNA 的效率更高, 可能是由于 Mali 等的 sgRNA 的 3' 端保留更完整的 *tracrRNA* 序列, 结构上更加接近天然的 *crRNA*:*tracrRNA* 结构。但他们的打靶位点并非针对同一种细胞的同一位点, 因此这一点有待证明。此外, Jienk 等对 sgRNA 进一步的研究表明, 延伸 RNA 序列的 3' 端能增加靶 DNA 的突变效率; sgRNA 与 Cas9 的整合是 Cas9 介导 DNA 剪切的限速步骤。

随后, 该系统成功应用于大肠杆菌及肺炎双球菌^[24]、酿酒酵母^[25]、果蝇^[26]、线虫^[27]、小鼠^[23, 28]、大鼠^[29], 尤其是 Wang 等^[28] 在小鼠中利用 sgRNA 靶向的 CRISPR/Cas9 系统实现了 *Tet1*、*Tet2*、*Tet3*、*Sry*、*Uty* 多基因同时定点突变。

此外, CRISPR/Cas 系统在植物中的应用也取得了重大进展。2013 年 8 月, *Nature Biotechnology* 同期刊登了 3 篇应用该系统在重要农作物水稻、小麦以及模式植物拟南芥和本生烟中取得的多个基因的成功定点敲除、插入等基因组定点编辑的操作。其中有来自国内的 3 个实验室的合作成果^[12] (分别来自中国科学院遗传与发育生物学研究所、微生物研究所、北京大学分子医学研究所), 定点突变了水稻的 4 个基因和小麦的 1 个基因, 不仅获得了 *OsPDS*、*OsMPK2* 以及 *OsBADH2* 基因定向改造的突变体, 并且在 T_0 代获得了水稻 *PDS* 基因功能缺失的纯合突变体, 该突变体呈现预期的白化和矮小表型; 此外, 该系统还可以利用单链寡核苷酸 DNA (ssDNA) 作为模板, 通过同源重组 DNA 修复途径在基因特定位点精确插入 12bp 的限制性内切酶识别序列。首次证实 CRISPR/Cas 系统能够用于作物基因组定点编辑, 该技术的突破有望加速重要农作物水稻、小麦性状改良与分子定向育种。Jen Sheen 实验室^[30] 利用 CRISPR/Cas 系统在模式植物拟南芥和本生烟中实现了对两个基因 (*AtRACK1b* 和 *AtRACK1c*) 或同一个基因的两个不同位点 (*AtPDS3*) 同时进行编辑; 此外, 以双链 DNA 作为模板, 通过同源重组 DNA 修复方式在烟草 *PDS* 基因的特定定位点精确插入 6bp 的一个限制性内切酶酶切位点。Sophien Kamoun 实验室^[31] 利用 CRISPR/Cas 系统在模式植物本生烟中实现了基因组的定点突变, 突变效率为 1.8% ~ 2.4%。同期, *Science* 的 Elizabeth Pennis 撰文^[32] 高度评价了 CRISPR/Cas 系统在各个物种基因组定点编辑中的广泛应用及在基因工程的应用潜力。之后, 朱健康实验室^[33] 利用 CRISPR/Cas 系统在模式植物拟南芥和水稻中实现了基因组高效的定点突变, 突变效率为 5% ~ 84%; *GAI* 基因功能缺失的 T_1 代拟南芥植株表现出矮小的表型, *YSA* 基因突变的 T_0 代水稻叶片有白化现象。

除了用于定点的基因编辑, CRISPR/Cas9 系统也用于目的基因的转录干扰, 即 CRISPR 干扰 (CRISPR interference, CRISPRi)。Qi 等^[34] 在大肠杆菌中对 Cas9 的 *RuvC* like 结构域及 *HNH* 结构域进行突变, 得到失去内切酶活性的 Cas9 (dead Cas9, dCas9), sgRNA-dCas9 复合体与目的基因结合后阻止了 RNA 聚合酶与 DNA 的结合, 使转录不能正常进行。Gilbert 等^[35] 利用 sgRNA-dCas9 复合体在人类细胞以及酵母细胞中也实现了 CRISPR 干扰, 揭示了 CRISPR 干扰系统在精确调节真核生物表达方面的潜力。CRISPR 干扰具有高度特异性, 能够靶向干扰单个或同时干扰多个基因, 而且通过可诱导启动子的