

· 综述 ·

## 成簇规律间隔短回文重复序列及其相关蛋白基因系统的发展及应用研究进展

谭晶洁<sup>1</sup> 彭毅志<sup>2</sup> 黄广涛<sup>1</sup><sup>1</sup>遵义医科大学附属医院烧伤整形外科 563003; <sup>2</sup>陆军军医大学(第三军医大学)第一附属医院全军烧伤研究所, 创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室, 重庆 400038

通信作者: 黄广涛, Email: haitao3140@sina.com

**【摘要】** 成簇规律间隔短回文重复序列及其相关蛋白基因(CRISPR/Cas)系统,作为一种新兴的基因编辑系统,根据 Cas 蛋白的数量可分为一类系统和二类系统。二类系统中的 CRISPR/Cas9 仅借助 Cas9 蛋白和单链向导 RNA 即可对目标核酸进行切割,是目前应用最为广泛的 CRISPR/Cas 系统。除了基因编辑在遗传病治疗中的应用,CRISPR/Cas 系统衍生出的多种技术在疾病相关基因的筛查、基因表达调控、病原微生物的快速检测和防治等领域也展现了巨大的应用前景。本文就 CRISPR/Cas 系统的发现历程及其衍生的几个主要技术的应用进行总结,旨在为生命科学领域研究人员提供参考。

**【关键词】** 基因; 成簇规律间隔短回文重复序列及其相关蛋白基因系统; 基因编辑; 衍生技术

**基金项目:** 国家自然科学基金青年基金(81801916、81960353); 贵州省科技计划(黔科合支撑[2020]4Y003 号)

### Research advances on the development and application of clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/CRISPR-associated protein system

Tan Jingjie<sup>1</sup>, Peng Yizhi<sup>2</sup>, Huang Guangtao<sup>1</sup><sup>1</sup>Department of Burns and Plastic Surgery, the Affiliated Hospital of Zunyi Medical University, Zunyi 563003, China; <sup>2</sup>State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Burn Research, the First Affiliated Hospital of Army Medical University (the Third Military Medical University), Chongqing 400038, China

Corresponding author: Huang Guangtao, Email: haitao3140@sina.com

**【Abstract】** Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/CRISPR-associated (Cas) protein

DOI: 10.3760/cma.j.cn501120-20200329-00201

本文引用格式: 谭晶洁, 彭毅志, 黄广涛. 成簇规律间隔短回文重复序列及其相关蛋白基因系统的发展及应用研究进展[J]. 中华烧伤杂志, 2021, 37(7): 681-687. DOI: 10.3760/cma.j.cn501120-20200329-00201. Tan JJ, Peng YZ, Huang GT. Research advances on the development and application of clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/CRISPR-associated protein system[J]. Chin J Burns, 2021, 37(7): 681-687. DOI: 10.3760/cma.j.cn501120-20200329-00201.

system, as an emerging gene editing system, can be divided into class 1 and class 2 systems according to the number of Cas protein. The CRISPR/Cas9 in class 2 system can cleave target nucleic acid only with the help of Cas9 protein and single-stranded guide RNA, which is currently the most widely used CRISPR/Cas system. In addition to gene editing in the treatment of genetic diseases, a variety of CRISPR/Cas system derived technologies have vast application prospect in the fields of disease-related gene screening, gene expression regulation, and rapid detection, prevention, and control of pathogens. This article summarizes the discovery process of CRISPR/Cas system and applications of several major CRISPR/Cas derived technologies, aiming to provide a reference for researchers in the field of life science.

**【Key words】** Genes; Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/CRISPR-associated protein system; Gene editing; Derived technologies

**Fund program:** National Natural Science Foundation of China for Youth (81801916, 81960353); Science and Technology Support Project of Guizhou Province of China (NO. 20204Y003)

成簇规律间隔短回文重复序列及其相关蛋白基因(CRISPR/Cas)系统是细菌的获得性免疫系统,通过特异性识别并剪切噬菌体或质粒的特定序列进而清除外源性核酸的感染<sup>[1-2]</sup>。CRISPR/Cas 系统能够特异性识别并剪切双链 DNA,这一特性被开发用于细菌和细胞的基因编辑<sup>[3-4]</sup>。CRISPR/Cas 系统存在于 45% 的细菌和 87% 的古核生物中。根据 Cas 蛋白的数目不同,CRISPR/Cas 系统目前可以分为一类系统和二类系统两大类,而每个大类又可以分为不同的亚型。CRISPR/Cas9 系统(属于二类 II 型 CRISPR/Cas 系统)只需要 1 个 Cas9 蛋白就可以特异性切割目的 DNA 序列,是目前在真核细胞和原核细胞的基因编辑中应用最广泛、最具代表性的 CRISPR/Cas 系统<sup>[3,5-6]</sup>。

CRISPR/Cas 系统除了用于基因编辑技术,还衍生出多种技术,如基因表达调控的 CRISPR 干扰(CRISPRi)和 CRISPR 激活(CRISPRa)技术、利用 CRISPR/Cas9 系统构建的高通量文库筛选技术、快速灵敏检测技术(如 SHERLOCK 技术)等。本文就 CRISPR/Cas 系统的发现历程和 CRISPR/Cas 系统衍生技术进行综述,旨在提高对 CRISPR/Cas 系统及其衍生技术的认识,为科研过程中选择合适的基因编辑方法提

供参考。

## 1 CRISPR/Cas 系统的发现历程

### 1.1 用作基因编辑工具之前

CRISPR/Cas 系统是细菌和古核生物特有的一种天然防御系统,用于抵抗病毒或外源性质粒的侵害。1987年,日本科学家 Ishino 等<sup>[7]</sup>首次在大肠埃希菌碱性磷酸酶的编码基因附近发现了一种特殊的 DNA 回文序列,但无法确定这段序列的功能。随后的 10 余年,陆续有相关研究指出类似的重复序列存在于多种细菌及古核生物中。直到 2002 年, Jansen 等<sup>[8]</sup>才将这段序列正式命名为 CRISPR,并将邻近 CRISPR 位点的一系列基因命名为 *Cas*,并发现了 *Cas1*、*Cas2*、*Cas3*、*Cas4* 基因。2005 年, Mojica 等<sup>[11]</sup>观察到, CRISPR 中的间隔序列与宿主菌的染色体外遗传物质具有高度的同源性,并由此提出 CRISPR 可能参与细菌免疫功能的假说,该假说在 2007 年由 Horvath 和 Barrangou<sup>[9]</sup>首次证实。2012 年,研究者通过体外实验证明成熟的 CRISPR RNA (crRNA) 通过碱基互补配对与反式激活 crRNA (tracrRNA) 形成特殊的双链 RNA 结构,指导 Cas9 蛋白引起目标 DNA 双链断裂<sup>[10]</sup>。随着研究的深入, CRISPR 的功能逐渐被揭示。

### 1.2 开发为基因编辑工具之后

2013 年初,研究者首次利用 CRISPR/Cas9 系统实现对人 293T 细胞 *EMX1* 和 *PVALB* 基因以及小鼠 *Neuro2a* 细胞 *Th* 基因的定点突变<sup>[11-12]</sup>。同年, Mali 等<sup>[13]</sup>利用 CRISPR/Cas9 系统在人 293T 细胞和 K652 细胞基因的靶位点形成双链或单链的切口,从而激活细胞的 DNA 修复机制,高效介导外源基因定点插入靶位点。作为一种全新的基因组定点改造技术, CRISPR/Cas9 比锌指核酸酶和转录激活因子样效应物核酸酶能实现更精确、更广泛的基因编辑修饰。该技术开发后,迅速成为生命科学技术研究领域的新热点。2015—2017 年,研究者相继报道了一种不同于 Cas9 的新型二类 CRISPR 效应因子 Cpf1 (现被称为 CRISPR/Cas12a) 和来自纤毛菌属靶向 RNA 的 CRISPR 效应因子 C2e2 (现被称为 Cas13a)<sup>[14-16]</sup>。在此基础上,研究者开发了 SHERLOCK 技术,用于检测寨卡病毒和登革热病毒的特定菌株等<sup>[17]</sup>。四川大学华西医院的卢铀团队率先运用 CRISPR/Cas 技术进行全球首例抗非小细胞肺癌人类临床试验<sup>[18]</sup>。2018—2019 年, CRISPR/Cas 技术更是在多方面取得进展, Liu 等<sup>[19]</sup>研究发现的新型基因编辑工具 CasX 在原生细菌之外也能发挥作用,抗 CRISPR 蛋白能抑制 CRISPR/Cas 系统的功能<sup>[20]</sup>,转座子编码的 CRISPR/Cas 系统能介导 RNA 引导的 DNA 整合<sup>[21]</sup>,且外源 DNA 的原间隔邻近基序 (protospacer adjacent motif, PAM) 与 Cas9 之间存在多种相互作用机制等<sup>[22]</sup>。

## 2 CRISPR/Cas 系统在基因编辑中的应用

基因编辑技术是对某一核苷酸序列中的特定基因位点进行人为改变,插入、删除、替换或修饰基因组中的特定目的基因使其表达性状改变的一种新兴分子生物技术。自

2013 年开发第 3 代人工核酸内切酶 (CRISPR/Cas9) 技术以来,该技术迅速在基因功能研究、疾病诊疗、作物品种改良、动物模型构建等领域得到广泛应用并转向各类临床试验<sup>[11]</sup>。科学家还根据 Cas 蛋白的多样性发现了各种不同的系统,如 CRISPR/Cas12a 系统<sup>[14]</sup>、CRISPR/Cas12b 系统<sup>[23]</sup>、CRISPR/Cas13 系统<sup>[16, 24-25]</sup>、CRISPR-dCas 系统<sup>[26]</sup>、CRISPR/Cas14 系统<sup>[27]</sup>等,这些系统也相继被改造并用于 DNA 或者 RNA 编辑,扩大了基因编辑的范围。但目前仍以 CRISPR/Cas9 技术应用最为广泛且具代表性。

### 2.1 CRISPR/Cas9 基因编辑作用原理与局限

CRISPR/Cas9 系统作用原理即 crRNA 通过碱基配对与 tracrRNA 结合形成 crRNA-tracrRNA 复合物。为简化操作,研究者通过人工融合 crRNA 和 tracrRNA,将其改造成具有单一引导作用的可识别约 20 个碱基靶序列片段的小向导 RNA (small guide RNA, sgRNA)。sgRNA 可与靶 DNA 结合,引导 Cas9 蛋白靶向基因组 DNA,利用 Cas9 蛋白的 2 个核酸内切酶结构域进行双向剪切,形成 DNA 双链切口 (double-strand DNA break, DSB),并通过激活非同源末端连接修复 (non-homologous end-joining repair, NHEJR) 或同源重组修复 (homology-directed repair, HDR) 途径进行基因修饰,从而实现靶基因的插入、缺失、修复或替换<sup>[11]</sup>。研究表明,仅改变 sgRNA 序列就可使 CRISPR/Cas9 对不同靶基因序列进行定向剪切;sgRNA 表达水平与基因编辑效率密切相关,通过设计合适的 sgRNA 靶点,可提高 CRISPR/Cas9 的基因编辑效率<sup>[28]</sup>。Jinek<sup>[29]</sup>课题组还观察到 sgRNA 的表达对 Cas9 的活性至关重要且 sgRNA 的 3' 端的适当延伸能够显著增加 Cas9 系统的活性。此外,在基因切割过程中, Cas9 核酸内切酶对靶位点的识别依赖靶序列 3' 端的 PAM,不同的 Cas9 核酸内切酶对应的 PAM 序列亦不同。

在 CRISPR/Cas9 基因编辑过程中,外源 DNA 的间隔区序列与目标基因序列进行碱基互补配对时允许个别碱基的错配,这一特点导致基因组中与目标 DNA 序列只有较少碱基差别的非目标 DNA 也会被误切,基因编辑中这种现象被称为脱靶效应<sup>[30]</sup>。脱靶现象的存在很大程度上阻碍了 CRISPR/Cas9 系统的应用。已知导致脱靶效应的因素主要有 sgRNA 和 PAM 对目标基因的识别准确率降低,sgRNA 的结构与长度以及其他干扰因素等,其中 sgRNA 与靶序列的错配是产生脱靶效应的主要原因。因此,目前减少脱靶效应的主要方法是优化和改进 sgRNA,改造 Cas9 蛋白以及应用 Cas9 蛋白类似物,优化脱靶检测技术等。

### 2.2 CRISPR/Cas9 系统在动物中的应用

**2.2.1 动物基因功能研究** 精准的基因靶向修饰不仅可以清楚地了解目的基因的功能,更有利于深入了解疾病的发生机制并制订相应的治疗方案。CRISPR/Cas9 作为一种基因定点编辑技术,在基因组解析上是阐明基因功能的重要工具。CRISPR/Cas9 技术敲除基因高效,可在多种细胞及生物体的特定位点进行精确切割和修饰,可通过不同的修复途径,包括 NHEJ 或 HDR,实现基因敲入或基因突变,现已被成

功应用于斑马鱼、小鼠、大鼠、猪、食蟹猴等动物的基因敲除或敲入动物模型构建<sup>[31]</sup>,为研究动物基因功能相关机制提供了有力支持。

**2.2.2 动物细胞系的建立** 随着 CRISPR/Cas 技术的迅速发展,其在动物细胞系的建立方面也起到了重要作用。Li 等<sup>[32]</sup>成功培育出酪氨酸酶基因敲除猪和帕金森病模型猪,首次利用 CRISPR/Cas9 技术与体细胞克隆相结合方式,实现大型家禽双基因的等位敲除,对人类遗传性疾病的研究具有重要意义。此外,CRISPR/Cas9 技术为构建稳定高产的重组细胞提供了可能性,利用该技术可以进行高效的基因敲除,甚至多个基因的同时敲除,提高同源重组效率<sup>[33]</sup>。在疾病治疗方面,CRISPR/Cas9 对干细胞的基因修饰技术成为构建疾病模型、筛选药物靶点、制备治疗型干细胞的关键技术<sup>[34]</sup>。

**2.2.3 动物模型构建** 传统的生物模型建立依赖于胚胎干细胞,CRISPR/Cas 技术可摆脱这一局限,以简易的操作作为动物模型的构建提供了高效的方法。目前,用于人类疾病研究的基因编辑动物模型主要为小鼠、大鼠等啮齿类动物和以猪为代表的大型动物,非人灵长类动物在近几年也有被报道作为理想的动物模型用来研究认知和脑疾病等。2014 年,研究者首次通过尾静脉注射 CRISPR 系统以及同源臂模板序列到小鼠肝脏,破坏了 *p53* 和 *pten* 2 个抑癌基因,实现了重要癌基因的点突变,由此构建了小鼠肝脏肿瘤模型<sup>[35]</sup>。Long 等<sup>[36]</sup>通过 CRISPR/Cas9 技术将 Duchenne 型肌营养不良症的小鼠中 *dmd* 基因突变,有效缓解了小鼠的肌肉萎缩。Li 等<sup>[37]</sup>利用 CRISPR/Cas9 技术成功构建大鼠多基因同步敲除模型。2015 年, Wang 等<sup>[38]</sup>应用 CRISPR/Cas9 技术成功获得了 *parkin*、*dj-1*、*pink1* 3 个基因敲除猪,构建了帕金森病动物模型。2019 年,中科院神经科学研究所通过 CRISPR/Cas9 技术构建了睡眠紊乱与精神相关异常的生物节律核心基因 *BMAL1* 敲除的猕猴<sup>[39]</sup>,随后通过体细胞核移植技术构建了一批遗传背景一致的生物节律紊乱猕猴模型<sup>[40]</sup>,为研究昼夜节律紊乱和精神紊乱相关疾病奠定了坚实的基础。

### 2.3 CRISPR/Cas9 系统在植物中的应用

近年来,CRISPR/Cas9 系统因其定点修饰、高效定向等优势,被应用于多种植物的基因组编辑,如拟南芥、烟草、水稻、大豆、番茄、马铃薯等。研究者利用 CRISPR/Cas9 系统可对全基因组任何基因进行编辑,以获得产量、品质更高,抗性更强的优良品种<sup>[41]</sup>。目前该系统在植物基因组编辑中的应用主要包括基因功能研究和作物遗传改良。

**2.3.1 植物基因功能研究** CRISPR/Cas9 基因编辑技术能快速、有针对性地敲除目的基因,获得突变体,进一步研究基因的功能。Feng 等<sup>[42]</sup>利用 CRISPR/Cas9 系统对拟南芥 7 个基因的 12 个不同靶点进行基因编辑,观察到其产生的突变类型主要为 1 个碱基对的插入突变和短的缺失突变,其中 T1~T3 代转基因植株突变率分别为 71.2%、58.3%、79.4%,从而确定了 CRISPR/Cas9 诱导的基因突变在拟南芥中可以稳定遗传,为后续植物基因功能研究奠定了基础。

**2.3.2 农作物遗传改良** 农作物在传统育种过程中存在

着各种各样的问题,如品质、产量以及抗病虫害防御机制等受到限制,CRISPR/Cas 技术引导的分子育种在农业领域掀起了新的革命。与传统的转基因技术、RNA 干扰等基因编辑手段相比,CRISPR/Cas 系统通过传代可以分离得到没有转基因片段的植物材料,并可同时编辑多个目标基因,而不改变作物原本的优良性状。如玉米的 *ZmIPK* 基因改造后植酸合成更合理<sup>[43]</sup>;水稻 *OsERF922* 基因改造后,稻瘟病抗性增强<sup>[44]</sup>;野生番茄 *SP*、*O*、*FW2.2*、*CycB* 基因改造后,果实数量及品质提高等<sup>[45]</sup>。相信在不久的将来,CRISPR 技术在农业分子育种中会有更广阔的应用。

### 2.4 CRISPR/Cas9 系统的临床应用

从遗传学的研究到直接发现致病基因再到运用 CRISPR/Cas9 基因敲除技术治疗遗传性疾病,CRISPR/Cas9 系统有望在医疗领域推动多项疾病治疗的研究进展。

**2.4.1 基因治疗** 在基因功能研究的基础上,科研工作者们利用 CRISPR/Cas9 特异性切割核苷酸序列,使靶基因产生定点突变的性质,展开了对人类遗传性疾病的治疗研究。传统的基因治疗手段是利用慢病毒或腺相关病毒载体等将正常基因导入细胞,但致病基因依然存在,而 CRISPR/Cas9 技术介导的基因治疗可以对基因组进行精确编辑,将正常的基因片段引入细胞中替代有缺陷的基因,从而达到从根本上治愈疾病的目的。慢性髓系白血病 (chronic myeloid leukemia, CML) 的发生常与体内抑癌基因 *ASXL1* 的突变有关,并且影响患者的预后。Valletta 等<sup>[46]</sup>利用 CRISPR/Cas9 技术靶向修复 KBM5 细胞中 *ASXL1* 的无效突变,显著降低了 KBM5 细胞的增殖速率,增强了细胞的分化,延长了 CML 小鼠生存时间。Liang 等<sup>[47]</sup>将改良的 CRISPR/Cas9 技术应用于单碱基基因编辑,修复了  $\beta$ -珠蛋白生成障碍性贫血患者 hbb-28A 到 G 的单碱基突变。

**2.4.2 肿瘤免疫疗法** 肿瘤的治疗在医学上一直备受关注,近年来 CRISPR/Cas 技术已经被广泛应用于肿瘤治疗领域。肿瘤免疫治疗是指通过增强特异性免疫细胞对肿瘤的防御能力,并阻遏其他调节性免疫细胞对肿瘤的保护作用,从免疫防御的角度来控制肿瘤细胞的生长及扩散<sup>[48]</sup>。目前肿瘤细胞免疫治疗的方法主要包括:特异性 T 细胞受体修饰的 T 细胞治疗和嵌合抗原受体修饰的 T 细胞治疗 (chimeric antigen receptor T cell immunotherapy, CAR-T),其中 CAR-T 治疗白血病和淋巴瘤的效果显著,是一种具有特异性的过继性免疫效应细胞治疗方法;与传统肿瘤治疗方法相比,CAR-T 靶向精确,在杀伤肿瘤组织的同时对正常组织的损害更小,且杀伤效果更持久<sup>[49]</sup>。2017 年, Eyquem 等<sup>[50]</sup>利用 CRISPR/Cas9 技术构建了新一代 CAR-T,避免了 CAR 基因的随机插入,进一步提高了 CAR-T 在肿瘤免疫治疗方面的效率和安全性。但 CAR-T 应用于实体瘤,如黑色素瘤等存在许多障碍,不同于血液系统对肿瘤无屏障作用,黑色素瘤是一种实体肿瘤,其自身微环境形成的物理屏障对 CAR-T 是一种阻碍,这导致 CAR-T 的抗肿瘤活性受到抑制<sup>[51]</sup>。虽然目前已有相关策略来规避此影响,如利用免疫抑制细胞因子

增强 T 细胞在肿瘤微环境中的存活能力、分泌细胞因子的能力及肿瘤杀伤能力<sup>[52]</sup>,但肿瘤免疫疗法运用于实体瘤的治疗仍需克服诸多困难。

### 2.5 CRISPR/Cas9 基因编辑的科学性与伦理

CRISPR/Cas9 基因编辑技术推动了基础疾病发生机制的理论研究、疾病模型构建、临床治疗,为遗传病患者带来福音;但由于 CRISPR/Cas 基因编辑技术可能对人类基因库产生不可逆的影响,其潜在的伦理问题不容忽视。2015 年,中山大学黄军教授在《Protein and Cell》杂志上发表了首篇关于修改人类胚胎基因的论文<sup>[53]</sup>,旨在运用 CRISPR/Cas 技术修改可能导致严重 β-珠蛋白生成障碍性贫血患者的基因,一时引起国内外广泛关注与伦理争议。2015 年 12 月,各国在首届人类基因组编辑国际峰会达成共识:在当前技术水平下,应禁止对人类相关生殖细胞系的基因修饰和编辑,但是鼓励基因编辑技术的基础研究及体细胞基因编辑的临床应用。2018 年,在第二届人类基因组编辑国际峰会召开前 1 天,贺建奎团队宣布,1 对名为露露和娜娜的免疫艾滋病的基因编辑婴儿在中国健康诞生。随即引起国内外轩然大波,不久露露和娜娜中有 1 人被证实存在脱靶效应,贺建奎事件遭到了各界人士的强烈谴责。在技术安全性未得到保证,伦理道德尚未得到接受的前提下,贺建奎事件无疑在基因编辑学界产生了严重的不良影响,为人类胚胎基因编辑敲响了警钟。总之,人类基因编辑技术要建立在健全的法律法规制度、伦理规范、监督管理体系的前提下,才能良性发展,为人类带来福祉,切不可触碰道德红线。

## 3 CRISPR/Cas 衍生技术

### 3.1 基因表达调控

CRISPR/Cas9 系统除了用于基因编辑<sup>[54]</sup>,还可以用于基因表达调控,如 CRISPRa 和 CRISPRi<sup>[55-56]</sup>,Cas9 剪切双链 DNA 依赖 2 个核酸酶结构域——HNH 结构域和 RuvC 结构域。Qi 等<sup>[26]</sup>等突变了 HNH 结构域和 RuvC 结构域中各一个氨基酸位点(*D10A* 和 *H841A*),使得突变后的 Cas9 失去了剪切 DNA 的能力,即催化失活的 Cas9(dCas9)。dCas9 虽然失去了剪切 DNA 的能力,但是仍能够在 sgRNA 的引导下结合到靶序列。dCas9-sgRNA-DNA 能够阻断 RNA 聚合酶与启动子的结合、延伸等过程,进而阻断转录过程,达到沉默基因表达的功能,即 CRISPRi<sup>[26]</sup>。当 dCas9 偶联一些转录因子时,这些转录因子在 sgRNA 的引导下结合到增强子区域,则可以显著激活基因的表达,即 CRISPRa<sup>[57-58]</sup>。如果此时 dCas9 偶联的是转录阻碍蛋白,同样可以达到抑制基因表达的作用,即 CRISPR 抑制。

CRISPRi 系统靶向序列可以选择启动子区域:起始密码 ATG 区域或 ATG 下游区域<sup>[26, 59]</sup>。CRISPRi 靶向启动子区域可以阻止 RNA 聚合酶与启动子的结合,CRISPRi 靶向 ATG 区域或 ATG 下游区域则可以抑制 RNA 聚合酶的延伸过程,上述 2 种情况均可达到抑制 DNA 转录的目的。研究表明,选择 ATG 下游区域时尽量选择靠近 ATG 近端,因为该处抑制

基因表达效率明显高于靶向 ATG 远端<sup>[26]</sup>。在选择靶向序列时,需要遵循 3 个原则:该序列在基因组中是特异存在的、序列 5' 端含有 CCN 序列、尽量选择 ATG 区域或靠近 ATG 区域。

Maeder 等<sup>[60]</sup>将转录因子的转录激活结构域 VP64 融合表达在 dCas9 蛋白上,在 sgRNA 的引导下,VP64-dCas9 可以结合在人的 *vfgfa* 基因启动区域,激活 *vfgfa* 的表达。Matharu 等<sup>[61]</sup>将 VP64-dCas9 分别结合到 *Sim1* 基因的启动子和增强子区域,以激活 *sim1* 基因的表达,由于 *sim1* 基因的表达具有组织特异性,CRISPRa 同样具有组织特异性。

### 3.2 CRISPR/Cas9 文库筛选技术

文库筛选技术是快速寻找调控特定表型的重要或关键基因的重要方法,可利用该技术进行功能基因的高通量筛选。CRISPR/Cas9 文库也被广泛用于功能基因筛选、必需基因筛选、药物靶点和耐药靶点筛选、病毒受体或作用靶点筛选等<sup>[62-64]</sup>。CRISPR/Cas9 文库筛选技术的优势为实验过程简洁、设计灵活、操作简便等。Zhou 等<sup>[65]</sup>开发了一种慢病毒敲除文库,通过功能筛选联合高通量测序分析的基因识别方法,成功找到细胞内介导炭疽和白喉毒素感染的必需宿主基因。Shalem 等<sup>[5]</sup>在人体细胞内建立 CRISPR/Cas9 敲除文库,该文库使用 64 751 条 sgRNA 靶向人细胞中的 18 080 个基因,鉴定了癌症和多能干细胞中细胞生存所必需的基因,并使用黑色素瘤模型筛选了与维莫非尼耐药性有关的基因。

### 3.3 用于病毒和病原菌及小分子的快速精准检测

CRISPR/Cas 系统还可被用于快速精准检测领域,如 DNA 病毒、RNA 病毒、病原菌和部分小分子的检测。2018 年,Chen 等<sup>[66]</sup>观察到 Cas12a 不仅能剪切其结合的靶标 DNA,也能剪切其他的非靶标单链 DNA,这种切割活性依赖 Cas12a 的激活。于是他们将单链 DNA 两端分别用荧光基因和淬灭基团标记,当检测样本中含有靶标 DNA 时,Cas12a 会在 sgRNA 的引导下被激活,切割靶标 DNA 的同时也能切割被标记的单链 DNA,达到检测目的。该团队成功用 Cas12a 检测人乳头瘤病毒,检测灵敏度达到 92%<sup>[66]</sup>。Cas13a 与 Cas12a 具有类似的酶活性,只是 Cas13a 结合的靶标分子是单链 RNA,因此 Cas13a 也被用于 RNA 病毒和分子的快速检测。2017 年,研究者将 CRISPR/Cas13a 系统联合等温扩增技术用于 RNA 病毒的快速检测<sup>[17]</sup>。Shen 等<sup>[67]</sup>开发了一种变构探针催化联合 CRISPR/Cas13a 检测技术,用于牛奶中沙门菌的高敏检测,灵敏度达到 10 CFU/mL。

### 3.4 CRISPR/Cas 系统在抗耐药菌中的应用

CRISPR 还被用于特异性的清除含有某一毒力基因或耐药基因的细菌,进而达到针对性清除病原菌的目的,即所谓的 CRISPR 抗生素<sup>[68-69]</sup>。CRISPR 最大的优点为能够高效、特异地清除 DNA 序列。由于细菌不像真核细胞,没有较强的 NHEJ 功能,不能迅速有效地修复被切断的 DNA,这一特点使得利用 CRISPR 系统作为抗生素使用成为可能。利用 CRISPR 系统及人工改造的 sgRNA 特异性识别与切割耐药细菌的特有靶向序列(耐药基因、毒力基因、必需基因等),从而使耐药细菌对抗生素的敏感性得以恢复甚至致其死亡。目

前 CRISPR 系统作为抗生素的研究已在大肠埃希菌和金黄色葡萄球菌中进行。

CRISPR 系统不仅能特异性地杀死特定基因型的细菌<sup>[70]</sup>,还能特异性清除某些含有毒力基因或耐药基因的病原菌<sup>[71-72]</sup>,使耐药细菌重新变成敏感细菌。虽然 CRISPR 抗生素在抗菌应用领域展现了良好的应用前景,但仍面临很多阻碍:(1)缺乏一个高效的运载工具。目前多使用质粒或噬菌体传递 CRISPR 系统,但是由于质粒的转化条件要求高、结合效率低,噬菌体的宿主谱狭窄等使得 CRISPR 系统目前尚没有一个很好的运载工具。(2)抗 CRISPR 系统蛋白的存在。细菌在进化过程中可以通过 CRISPR 系统对抗噬菌体的感染,同样,噬菌体也编码了一些抗 CRISPR 系统蛋白,这些蛋白虽然分子量比较小,但是广泛存在于很多噬菌体中<sup>[73-75]</sup>。为突破这些阻碍,科学家正尝试利用基因改造噬菌体、寻找广谱结合质粒等方式寻找合适的 CRISPR 系统运载工具。

#### 4 总结与展望

CRISPR/Cas 系统的发现经历了一个漫长的过程,自 2012 年被开发为基因编辑工具以来,CRISPR/Cas 系统因成本低、操作简便、靶向精确等优势在近几年得到迅速发展与应用,尤其是二类 II 型 CRISPR/Cas9 基因组编辑技术已被成功应用于多种动植物中,利用人工核酸酶以精准和可预测的方式来快速改造和修饰基因组,加速了动植物基因功能研究、作物育种、疾病诊疗的研究进程。理论上,CRISPR/Cas9 系统在可设计的 sgRNA 的指导下定向切割基因组 DNA 双链,产生 DSB 并激活 NHEJ 或 HDR 修复途径进行基因修饰,从而实现基因组靶基因的定点改造,但是在实践操作中仍然有许多问题亟待解决,如需要减少脱靶效应,提高基因编辑效率和递送效率,降低免疫原性等。

如前所述,sgRNA 和 PAM 是 CRISPR/Cas9 系统发挥作用的 2 个重要条件。在基因编辑过程中,Cas9 先识别 PAM 序列,待 sgRNA 与靶序列特异性结合时,Cas9 才能完成对目的基因的切割。sgRNA 本身具有一定容错能力,其与靶序列的错配是产生脱靶现象最主要的原因;Cas9 对 PAM 序列的识别错误也会导致脱靶效应。其他一些因素如递送载体包装问题,蛋白切割效率问题则会影响基因编辑效率等。针对这些问题,科研工作者虽已寻找出多种解决策略,比如 sgRNA 的优化与改造,CRISPR/Cas 基因编辑工具的开发与优化,研究更精确的脱靶效应检测方法,尝试新的递送方法等,但是仍然有诸多难题需要克服。

CRISPR/Cas 技术是把双刃剑,在带动科技进步的同时也不可避免会引发一系列道德伦理问题。世界各国仍需完善相关法律法规,在运用 CRISPR/Cas 技术的道路上应严守道德底线。因此,结合以上对 CRISPR/Cas 系统的发展历程,CRISPR/Cas 技术的原理与应用以及相关衍生技术、存在的问题等分析,应认识到 CRISPR/Cas 作为一种新兴基因编辑工具极具潜力,随着研究的深入与技术革新,CRISPR/Cas 将在更广阔的领域展现其新的活力,但应使 CRISPR/Cas 技

术良性发展,以为人类健康带来福祉。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] Mojica FJ, 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): 174-182. DOI: 10.1007/s00239-004-0046-3.
- [2] Mojica FJ, Díez-Villaseñor C. The on-off switch of CRISPR immunity against phages in *Escherichia coli*[J]. *Mol Microbiol*, 2010, 77(6): 1341-1345. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2010.07326.x.
- [3] Lander ES. The heroes of CRISPR[J]. *Cell*, 2016, 164(1/2): 18-28. DOI: 10.1016/j.cell.2015.12.041.
- [4] Marraffini LA. CRISPR/Cas immunity in prokaryotes[J]. *Nature*, 2015, 526(7571): 55-61. DOI: 10.1038/nature15386.
- [5] Shalem O, Sanjana NE, Hartenian E, et al. Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells[J]. *Science*, 2014, 343(6166): 84-87. DOI: 10.1126/science.1247005.
- [6] Koike-Yusa H, Li Y, Tan EP, et al. Genome-wide recessive genetic screening in mammalian cells with a lentiviral CRISPR-guide RNA library[J]. *Nat Biotechnol*, 2014, 32(3): 267-273. DOI: 10.1038/nbt.2800.
- [7] 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]. *J Bacteriol*, 1987, 169(12): 5429-5433. DOI: 10.1128/jb.169.12.5429-5433.1987.
- [8] Jansen R, Embden JD, Gaastra W, et al. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes[J]. *Mol Microbiol*, 2002, 43(6): 1565-1575. DOI: 10.1046/j.1365-2958.2002.02839.x.
- [9] Horvath P, Barrangou R. CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea[J]. *Science*, 2010, 327(5962): 167-170. DOI: 10.1126/science.1179555.
- [10] Wiedenheft B, Sternberg SH, Doudna JA. RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea[J]. *Nature*, 2012, 482(7385): 331-338. DOI: 10.1038/nature10886.
- [11] Cong L, Ran FA, Cox D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems[J]. *Science*, 2013, 339(6121): 819-823. DOI: 10.1126/science.1231143.
- [12] Ran FA, Hsu PD, Lin CY, et al. Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity[J]. *Cell*, 2013, 154(6): 1380-1389. DOI: 10.1016/j.cell.2013.08.021.
- [13] Mali P, Yang L, Esvelt KM, et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9[J]. *Science*, 2013, 339(6121): 823-826. DOI: 10.1126/science.1232033.
- [14] Zetsche B, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, et al. Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system[J]. *Cell*, 2015, 163(3): 759-771. DOI: 10.1016/j.cell.2015.09.038.
- [15] Shmakov S, Abudayyeh OO, Makarova KS, et al. Discovery and functional characterization of diverse class 2 CRISPR-Cas systems[J]. *Mol Cell*, 2015, 60(3): 385-397. DOI: 10.1016/j.molcel.2015.10.008.
- [16] Abudayyeh OO, Gootenberg JS, Konermann S, et al. C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector[J]. *Science*, 2016, 353(6299): aaf5573. DOI: 10.1126/science.aaf5573.
- [17] Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Lee JW, et al. Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2[J]. *Science*, 2017, 356(6336): 438-442. DOI: 10.1126/science.aam9321.
- [18] Cyranoski D. CRISPR gene-editing tested in a person for the

- first time[J]. *Nature*, 2016, 539(7630): 479. DOI: 10.1038/nature.2016.20988.
- [19] Liu JJ, Orlova N, Oakes BL, et al. CasX enzymes comprise a distinct family of RNA-guided genome editors[J]. *Nature*, 2019, 566(7743):218-223. DOI: 10.1038/s41586-019-0908-x.
- [20] Bubeck F, Hoffmann MD, Harteveld Z, et al. Engineered anti-CRISPR proteins for optogenetic control of CRISPR/Cas9[J]. *Nat Methods*, 2018, 15(11): 924-927. DOI: 10.1038/s41592-018-0178-9.
- [21] Klompe SE, Vo PLH, Halpin-Healy TS, et al. Transposon-encoded CRISPR-Cas systems direct RNA-guided DNA integration[J]. *Nature*, 2019, 571(7764): 219-225. DOI: 10.1038/s41586-019-1323-z.
- [22] Hirano S, Abudayyeh OO, Gootenberg JS, et al. Structural basis for the promiscuous PAM recognition by *Corynebacterium diphtheriae* Cas9[J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 1968. DOI: 10.1038/s41467-019-09741-6.
- [23] Yang H, Gao P, Rajashankar KR, et al. PAM-dependent target DNA recognition and cleavage by C2c1 CRISPR-Cas endonuclease[J]. *Cell*, 2016, 167(7): 1814-1828. e12. DOI: 10.1016/j.cell.2016.11.053.
- [24] Smargon AA, Cox D, Pyzocha NK, 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): 618-630. e7. DOI:10.1016/j.molcel.2016.12.023.
- [25] Yan WX, Chong S, Zhang H, et al. Cas13d is a compact RNA-targeting type VI CRISPR effector positively modulated by a WYL-domain-containing accessory protein[J]. *Mol Cell*, 2018, 70(2):327-339. e5. DOI:10.1016/j.molcel.2018.02.028.
- [26] Qi LS, Larson MH, Gilbert LA, et al. Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression[J]. *Cell*, 2012, 151(3):844. DOI:10.1016/j.cell.2012.01.019.
- [27] Harrington LB, Burstein D, Chen JS, et al. Programmed DNA destruction by miniature CRISPR-Cas14 enzymes[J]. *Science*, 2018, 362(6416): 839-842. DOI: 10.1126/science.aav4294.
- [28] Dominguez AA, Lim WA, Qi LS. Beyond editing: repurposing CRISPR-Cas9 for precision genome regulation and interrogation [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2016, 17(1): 5-15. DOI: 10.1038/nrm.2015.2.
- [29] Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity[J]. *Science*, 2012, 337(6096): 816-821. DOI: 10.1126/science.1225829.
- [30] 王影,李相敬,邱丽娟. CRISPR/Cas9 基因组定点编辑中脱靶现象的研究进展[J]. *植物学报*, 2018, 53(4):528-541. DOI:10.11983/CBB18004.
- [31] 刘树君,多曙光. CRISPR/Cas 基因编辑系统的研究进展及应用[J]. *内蒙古大学学报(自然科学版)*, 2019, 50(5): 557-563. DOI:10.13484/j.nmgdxzbk.20190511.
- [32] Li X, Yang Y, Bu L, et al. Rosa26-targeted swine models for stable gene over-expression and Cre-mediated lineage tracing[J]. *Cell Res*, 2014, 24(4): 501-504. DOI: 10.1038/cr.2014.15.
- [33] 唐子华,陈加荣,丁洁,等. 不同打靶位点影响人诱导多能干细胞 MYO7A 杂合突变位点的基因校正中 CRISPR/Cas9 介导的同源重组效率[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2019, 35(9): 975-985. DOI:10.13865/j.cnki.cjbmb.2019.09.08.
- [34] 王晔博. CRISPR/Cas9 靶向编辑技术的优化及其在干细胞中的应用[D]. 杭州:浙江大学, 2016.
- [35] Xue W, Chen S, Yin H, et al. CRISPR-mediated direct mutation of cancer genes in the mouse liver[J]. *Nature*, 2014, 514(7522): 380-384. DOI: 10.1038/nature13589.
- [36] Long C, McAnally JR, Shelton JM, et al. Prevention of muscular dystrophy in mice by CRISPR/Cas9-mediated editing of germline DNA[J]. *Science*, 2014, 345(6201): 1184-1188. DOI: 10.1126/science.1254445.
- [37] Li W, Teng F, Li T, et al. Simultaneous generation and germline transmission of multiple gene mutations in rat using CRISPR-Cas systems[J]. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(8):684-686. DOI: 10.1038/nbt.2652.
- [38] Wang X, Cao C, Huang J, et al. One-step generation of triple gene-targeted pigs using CRISPR/Cas9 system[J]. *Sci Rep*, 2016, 6:20620. DOI: 10.1038/srep20620.
- [39] Qiu P, Jiang J, Liu Z, et al. BMAL1 knockout macaque monkeys display reduced sleep and psychiatric disorders[J]. *National Science Review*, 2019, 6(1): 87-100.
- [40] Liu Z, Cai Y, Liao Z, et al. Cloning of a gene-edited macaque monkey by somatic cell nuclear transfer[J]. *National Science Review*, 2019, 6(1): 107-114.
- [41] Zafar SA, Zaidi SS, Gaba Y, et al. Engineering abiotic stress tolerance via CRISPR/Cas-mediated genome editing[J]. *J Exp Bot*, 2020, 71(2):470-479. DOI:10.1093/jxb/erz476.
- [42] Feng Z, Mao Y, Xu N, et al. Multigeneration analysis reveals the inheritance, specificity, and patterns of CRISPR/Cas-induced gene modifications in *Arabidopsis*[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, 111(12):4632-4637. DOI: 10.1073/pnas.1400822111.
- [43] Liang Z, Zhang K, Chen K, et al. Targeted mutagenesis in *Zea mays* using TALENs and the CRISPR/Cas system[J]. *J Genet Genomics*, 2014, 41(2):63-68. DOI:10.1016/j.jgg.2013.12.001.
- [44] Wang F, Wang C, Liu P, et al. Enhanced rice blast resistance by CRISPR/Cas9-targeted mutagenesis of the ERF transcription factor gene OsERF922[J]. *PLoS One*, 2016, 11(4):e0154027. DOI: 10.1371/journal.pone.0154027.
- [45] Zsögön A, Čermák T, Naves ER, et al. De novo domestication of wild tomato using genome editing[J]. *Nat Biotechnol*, 2018[2020-03-29]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30272678/>. [published online ahead of print October 1, 2018]. DOI:10.1038/nbt.4272.
- [46] Valletta S, Dolatshad H, Bartenstein M, et al. ASXL1 mutation correction by CRISPR/Cas9 restores gene function in leukemia cells and increases survival in mouse xenografts[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(42): 44061-44071. DOI: 10.18632/oncotarget.6392.
- [47] Liang P, Ding C, Sun H, et al. Correction of  $\beta$ -thalassemia mutant by base editor in human embryos[J]. *Protein Cell*, 2017, 8(11): 811-822. DOI:10.1007/s13238-017-0475-6.
- [48] 龚晨雨,陈昭,邵红伟,等. CRISPR/Cas9 基因编辑技术在肿瘤免疫治疗中的应用[J]. *中国免疫学杂志*, 2018, 34(1):122-126. DOI:10.3969/j.issn.1000-484X.2018.01.024.
- [49] Mollanoori H, Shahraki H, Rahmati Y, et al. CRISPR/Cas9 and CAR-T cell, collaboration of two revolutionary technologies in cancer immunotherapy, an instruction for successful cancer treatment[J]. *Hum Immunol*, 2018, 79(12):876-882. DOI: 10.1016/j.humimm.2018.09.007.
- [50] Eyquem J, Mansilla-Soto J, Giavridis T, et al. Targeting a CAR to the TRAC locus with CRISPR/Cas9 enhances tumour rejection [J]. *Nature*, 2017, 543(7643): 113-117. DOI: 10.1038/nature21405.
- [51] 邓心怡,顾建英. 嵌合抗原受体-T 细胞免疫治疗在黑素瘤中的应用进展 [J]. *中国临床医学*, 2019, 26(6): 942-945. DOI: 10.12025/j.issn.1008-6358.2019.20190737.
- [52] Kloss CC, Lee J, Zhang A, et al. Dominant-negative TGF- $\beta$  receptor enhances PSMA-targeted human CAR T cell proliferation and augments prostate cancer eradication[J]. *Mol Ther*, 2018, 26(7):1855-1866. DOI:10.1016/j.ythme.2018.05.003.

- [53] Liang P, Xu Y, Zhang X, et al. CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human trippronuclear zygotes[J]. *Protein Cell*, 2015, 6(5): 363-372. DOI: 10.1007/s13238-015-0153-5.
- [54] Yin S, Huang G, Zhang Y, et al. Phage Abp1 rescues human cells and mice from infection by pan-drug resistant *Acinetobacter baumannii*[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 44(6): 2337-2345. DOI: 10.1159/000486117.
- [55] Kampmann M. CRISPRi and CRISPRa screens in mammalian cells for precision biology and medicine[J]. *ACS Chem Biol*, 2018, 13(2): 406-416. DOI: 10.1021/acscchembio.7b00657.
- [56] Nir-Paz R, Gelman D, Khouri A, et al. Successful treatment of antibiotic-resistant, poly-microbial bone infection with bacteriophages and antibiotics combination[J]. *Clin Infect Dis*, 2019, 69(11): 2015-2018. DOI: 10.1093/cid/ciz222.
- [57] Sanson KR, Hanna RE, Hegde M, et al. Optimized libraries for CRISPR-Cas9 genetic screens with multiple modalities[J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 5416. DOI: 10.1038/s41467-018-07901-8.
- [58] Popova AV, Shneider MM, Myakinina VP, et al. Characterization of myophage AM24 infecting *Acinetobacter baumannii* of the K9 capsular type[J]. *Arch Virol*, 2019, 164(5): 1493-1497. DOI: 10.1007/s00705-019-04208-x.
- [59] Oliveira H, Costa AR, Ferreira A, et al. Functional analysis and antivirulence properties of a new depolymerase from a myovirus that infects *Acinetobacter baumannii* capsule K45[J]. *J Virol*, 2019, 93(4): e01163-18. DOI: 10.1128/JVI.01163-18.
- [60] Maeder ML, Linder SJ, Cascio VM, et al. CRISPR RNA-guided activation of endogenous human genes[J]. *Nat Methods*, 2013, 10(10): 977-979. DOI: 10.1038/nmeth.2598.
- [61] Matharu N, Rattanasopha S, Tamura S, et al. CRISPR-mediated activation of a promoter or enhancer rescues obesity caused by haploinsufficiency[J]. *Science*, 2019, 363(6424): eaau0629. DOI: 10.1126/science.aau0629.
- [62] Lek A, Zhang Y, Woodman KG, et al. Applying genome-wide CRISPR-Cas9 screens for therapeutic discovery in facioscapulo-humeral muscular dystrophy[J]. *Sci Transl Med*, 2020, 12(536): eaay0271. DOI: 10.1126/scitranslmed.aay0271.
- [63] Choudhury A, Fenster JA, Fankhauser RG, et al. CRISPR/Cas9 recombineering-mediated deep mutational scanning of essential genes in *Escherichia coli*[J]. *Mol Syst Biol*, 2020, 16(3): e9265. DOI: 10.15252/msb.20199265.
- [64] Liu HJ, Jian L, Xu J, et al. High-throughput CRISPR/Cas9 mutagenesis streamlines trait gene identification in maize[J]. *Plant Cell*, 2020, 32(5): 1397-1413. DOI: 10.1105/tpc.19.00934.
- [65] Zhou Y, Zhu S, Cai C, et al. High-throughput screening of a CRISPR/Cas9 library for functional genomics in human cells[J]. *Nature*, 2014, 509(7501): 487-491. DOI: 10.1038/nature13166.
- [66] Chen JS, Ma E, Harrington LB, et al. CRISPR-Cas12a target binding unleashes indiscriminate single-stranded DNase activity[J]. *Science*, 2018, 360(6387): 436-439. DOI: 10.1126/science.aar6245.
- [67] Shen J, Zhou X, Shan Y, et al. Sensitive detection of a bacterial pathogen using allosteric probe-initiated catalysis and CRISPR-Cas13a amplification reaction[J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 267. DOI: 10.1038/s41467-019-14135-9.
- [68] Selle K, Fletcher JR, Tuson H, et al. In vivo targeting of clostridioides difficile using phage-delivered CRISPR-Cas3 antimicrobials[J]. *mBio*, 2020, 11(2): e00019-20. DOI: 10.1128/mBio.00019-20.
- [69] Bikard D, Barrangou R. Using CRISPR-Cas systems as antimicrobials[J]. *Curr Opin Microbiol*, 2017, 37: 155-160. DOI: 10.1016/j.mib.2017.08.005.
- [70] Gholizadeh P, Köse Ş, Dao S, et al. How CRISPR-Cas system could be used to combat antimicrobial resistance[J]. *Infect Drug Resist*, 2020, 13: 1111-1121. DOI: 10.2147/IDR.S247271.
- [71] Hou M, Sun S, Feng Q, et al. Genetic editing of the virulence gene of *Escherichia coli* using the CRISPR system[J]. *PeerJ*, 2020, 8: e8881. DOI: 10.7717/peerj.8881.
- [72] Bikard D, Euler CW, Jiang W, et al. Exploiting CRISPR/Cas nucleases to produce sequence-specific antimicrobials[J]. *Nat Biotechnol*, 2014, 32(11): 1146-1150. DOI: 10.1038/nbt.3043.
- [73] Marino ND, Pinilla-Redondo R, Csörgő B, et al. Anti-CRISPR protein applications: natural brakes for CRISPR-Cas technologies[J]. *Nat Methods*, 2020, 17(5): 471-479. DOI: 10.1038/s41592-020-0771-6.
- [74] Zhang K, Wang S, Li S, et al. Inhibition mechanisms of AcrF9, AcrF8, and AcrF6 against type I-F CRISPR-Cas complex revealed by cryo-EM[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2020, 117(13): 7176-7182. DOI: 10.1073/pnas.1922638117.
- [75] Athukoralage JS, McMahon SA, Zhang C, et al. An anti-CRISPR viral ring nuclease subverts type III CRISPR immunity[J]. *Nature*, 2020, 577(7791): 572-575. DOI: 10.1038/s41586-019-1909-5.

(收稿日期: 2020-03-29)