



## 评述与展望

### Review and Progress

# ZFNs、TALENs 和 CRISPR-Cas 基因组靶向编辑技术及其在植物中的应用

廖鹏飞<sup>✉</sup>, 聂旺<sup>✉</sup>, 余雅心<sup>✉</sup>, 童普国<sup>✉</sup>, 李绍波<sup>✉</sup>, 朱友林<sup>✉</sup>

南昌大学生命科学学院, 江西省分子生物学与基因工程重点实验室, 南昌, 330031

<sup>✉</sup> 通讯作者, [ylzhu1999@aliyun.com](mailto:ylzhu1999@aliyun.com); <sup>✉</sup> 作者

分子植物育种, 2016 年, 第 14 卷, 第 10 篇 doi: 10.5376/mpb.cn.2016.14.00010

这是一篇采用 Creative Commons Attribution License 进行授权的开放取阅论文。只要对本原作有恰当的引用, 版权所有人允许并同意第三方无条件的使用与传播。

引用格式(中文):

廖鹏飞等, 2016, ZFNs、TALENs 和 CRISPR-Cas 基因组靶向编辑技术及其在植物中的应用, 分子植物育种(online), 14(10): 1062-1071 (doi: 10.5376/mpb.cn.2016.14.00010)

引用格式(英文):

Liao et al., 2016, Effects of  $\gamma$  Ray Irradiation with Different Dosages on Strawberry Seeds and their Genetic Diversity Revealed by ISSR, Fenzi Zhiwu Yuzhong (online) (Molecular Plant Breeding), 14(10): 1062-1071 (doi: 10.5376/mpb.cn.2016.14.0010)

**摘要** ZFNs (Zinc-finger nucleases, 锌指核酸酶)、TALENs (Transcription activator-like effectors nucleases, 转录激活子样效应因子核酸酶)和RNA介导的CRISPR-Cas系统是当今三种主要的基因组靶向编辑技术,ZFNs和TALENs由特异性的DNA结合蛋白融合一个非特异性的核酸酶 *Fok I* 组成, DNA结合蛋白特异识别并结合靶DNA序列, 然后在 *Fok I* 的作用下引起靶位点的DNA双链断裂(Double strand breaks, DSBs); 而CRISPR-Cas系统, 则是由小分子向导RNA通过碱基互补配对与靶基因组序列结合, 而引导Cas核酸酶切割靶位点而引起DSBs。DSBs通过真核细胞DNA修复机制(非同源末端连接和同源重组)进行修复, 从而实现基因组靶向编辑。本综述着重介绍这三种技术的基本结构及其基因组靶向编辑的原理和特点, 对三种技术在植物中的应用进展进行介绍并对其进一步的发展提出了展望。

**关键词** 基因组靶向编辑技术, ZFNs, TALENs, CRISPR/Cas, 基因打靶, DNA双链断裂(DSBs)

## ZFNs, TALENs and CRISPR-Cas Targeted Genome Editing Technologies and Their Applications in Plants

Liao Pengfei<sup>✉</sup>, Nie Wang<sup>✉</sup>, Yu Yaxin<sup>✉</sup>, Tong Pugu<sup>✉</sup>, Li Shaobo<sup>✉</sup>, Zhu Youlin<sup>✉</sup>

Jiangxi Provincial Key Laboratory of Molecular Biology and Genetic Engineering, School of Life Sciences, Nanchang University, Nanchang, 330031

<sup>✉</sup> Corresponding author, [ylzhu1999@aliyun.com](mailto:ylzhu1999@aliyun.com); <sup>✉</sup> Authors

**Abstract** ZFNs (Zinc-finger nucleases), TALENs (Transcription activator-like effector nucleases) and the RNA-guided CRISPR-Cas nuclease system are three main technologies for targeted genome editing. ZFNs and TALENs are composed of a specific DNA-binding protein and a non-specific *Fok I* nuclease domain, the DNA-binding protein bind specifically to the target DNA, and then, double strand breaks (DSBs) are introduced at the target DNA site via the non-specific *Fok I* nuclease. In the CRISPR-Cas, on the other hand, a small guide RNA base pairing with complementary the target genome sequence, leads Cas nuclease to introduce DSBs at targeted site. The precise genome editing will be accomplished when these DSBs are repaired by eukaryotic cell DNA-repair mechanism involving either non-homologous end joining or homologous recombination. This review focused on describing the structures and principles of the above three genome editing technologies, and summarizing their applications in plants and discussing future prospects.

**Keywords** Targeted genome editing technologies, ZFNs, TALENs, CRISPR-Cas, Gene targeting, Double strand breaks (DSBs)

### 研究背景

基因组靶向编辑是指在生物细胞的基因组DNA的预定位点上, 精确地引入DNA序列的变化,

收稿日期: 2016年04月18日

接受日期: 2016年05月15日

发表日期: 2016年05月19日

基金项目: 本研究由国家自然科学基金(31260313)和江西省自然科学基金(20132BAB204012)共同资助

包括碱基的插入、缺失和DNA序列交换等, 进而改变基因的结构或功能(Perez-Pinera et al., 2012)。早在1988年, Paszkowski等(Paszkowski et al., 1988)首次尝试利用基于同源重组的基因打靶技术成功修复了预先在烟草基因组中人为引入的缺失功能的外源基因(APHII), 揭开了人们在植物基因组靶向编辑的序幕。此后该技术在小立碗藓(*Physcomitrella patens*) (Schaefer and Zrđ, 1997)、烟草(*Nicotiana*



*tabacum* L.) (Lee et al., 1990)、拟南芥(*Arabidopsis*) (Hanin et al., 2001)、百脉根(*Lotus japonicas*) (Thykjær et al., 1997)、水稻(*Oryza sativa* L.) (Terada et al., 2002)等多种模式植物内源基因的编辑中得到成功应用,但是,由于该技术效率很低(在 $10^{-5}$ ~ $10^{-3}$ 之间)(Iida and Terada, 2005),严重制约了该技术在高等植物中的广泛应用。

随后,科研人员根据真核生物转录调控因子-ZFP (Zinc finger protein, 锌指蛋白)和植物病原菌的一类分泌蛋白-TALE (Transcription activator-like effector, 转录激活效应子样效应因子)分别开发出了 ZFNs 和 TALENs 技术;以及最近基于原核生物的适应性免疫系统而开发出的 CRISPR-Cas9 技术,前两种技术通过特异的 DNA 结合蛋白与 DNA 靶位点结合,在非特异性的核酸酶 *Fok I* 的作用下引起生物基因组靶位点 DSBs。而 CRISPR-Cas9 则通过小分子向导 RNA (small guide RNA)以碱基互补配对方式与 DNA 序列靶位点结合,引导 Cas9 蛋白到靶位点并对 DNA 产生剪切作用,从而造成基因组靶位点 DSBs,形成的 DSBs 会启动真核细胞 DNA 修复机制。通过两种方式 NHEJ (non-homologous end joining, 非同源末端连接)和 HR (homologous recombination, 同源重组)修复断裂缺口(Wyman and Kanaar, 2006),在修复时可能会引起 DNA 序列的插入、缺失或置换等,从而实现基因组靶向编辑,大大提高了植物基因编辑的效率和简化了实验操作,在植物基因功能研究和农作物改良中展现出广阔的应用前景。本综述详细介绍这三种技术的基本结构及其进行基因组靶向编辑的原理和比较其特点,并着重介绍了三种技术在植物中的应用进展,并对其进一步发展提出了展望。

## 1 ZFNs、TALENs 和 CRISPR-Cas 技术的结构、原理及特点

### 1.1 ZFNs 技术

ZFNs 是由人工构建的锌指蛋白(zinc fingers proteins, ZFPs)和非限制性核酸酶 *Fok I* 两部分组成(Bibikova et al., 2002)。ZFPs 是一类真核生物中普遍存在的基因转录调控因子,在基因的表达调控、细胞分化、胚胎发育和增强植物抗逆性等方面起非常重要的作用(宋冰等, 2010; Liu et al., 2011; Yu et al., 2014; Zang et al., 2015)。

每个锌指蛋白由多个锌指结构域组成,其中 Cys2-His2 (C2H2)型锌指结构域在转录调控因子中广泛存在。Miller 等(Miller et al., 1985)最早发现并阐述了 C2H2 型锌指结构域的功能,在全长为 344 个氨基酸的转录因子 TFIIIA 序列中,13~276 位氨基酸含有 9 个锌指结构域,每个锌指结构域由 30 个氨基酸组成,每个锌指结构域中 8 和 13 位的半胱氨酸(cysteine, Cys)以及 26 和 30 位的组氨酸

(histidine, His)非常保守,他们络合锌离子形成稳定的指形结构,并折叠成  $\alpha$ - $\beta$  二级结构。

锌指蛋白特异识别和结合 DNA 是由于锌指的  $\alpha$ -螺旋嵌入到 DNA 分子的大沟中直接同核苷酸的碱基发生作用, $\alpha$ -螺旋上的-1~+6 位上的氨基酸残基赋予了锌指对 DNA 识别的特异性,其中-1、3、6 氨基酸可以识别位于 DNA 同一条链上 3'到 5'方向连续的 3 个碱基(Pavletich and Pabo, 1991)。这样每个锌指单元可以识别 3 个连续的碱基,理论上替换锌指  $\alpha$ -螺旋上关键的氨基酸残基,保持锌指的基本骨架不变,就可以产生识别不同序列的特异锌指单元。将这些单元串联在一起就可以形成与长 DNA 序列结合且具有特定靶向性的锌指蛋白。人工构建的锌指蛋白通常由 3~6 个 C2H2 型锌指单元串联组成,识别 DNA 链上相连续的 9~18 bp 碱基,锌指核酸酶的另一个组成元件是非特异的 *Fok I* 核酸酶,该酶是 IIS 型的限制性内切酶,只在二聚体状态时才具有酶切活性(Bitinaite et al., 1998),每个锌指蛋白与 *Fok I* 融合构成一个锌指酶单体(ZFN),识别特定的 DNA 位点。当两个单体识别的 DNA 位点相距合适的距离时(6~8 bp),两个锌指酶单体产生酶切功能,从而对 DNA 双链产生剪切并引起靶位点 DSBs。DSBs 诱发真核细胞的 DNA 损伤修复机制,通过 NHEJ 修复 DSBs,可能造成在 DNA 靶位点随机性的碱基的插入或缺失等,引起基因序列的改变,从而实现基因的靶向敲除。如果细胞中存在与靶位点附近序列同源的 DNA 片段,也可能通过 HR 来修复 DSBs,引起 DNA 序列的插入或互换,从而实现基因敲除或敲入(Gaj et al., 2013)。

目前,人们已经开发出多种设计和组装锌指核酸酶的方法,如:模块组装法(modular assembly, MA) (Wright et al., 2006); OPEN 法(oligomerized pool engineering, OPEN) (Maeder et al., 2008)和 CoDA (context dependent assembly system, CoDA) (Sander et al., 2011),此外,还有一些商业公司开发的方法,如 Sangamo Biosciences 公司开发的具有知识产权的双锌指模块组装方法等等。但是不管哪种方法,锌指核酸酶合成和组装程序都比较复杂,价格较贵,一般实验室较难实施。

### 1.2 TALENs 技术

TALENs 是继 ZFNs 之后的另一种较为灵活和高效的靶向编辑技术(Beumer et al., 2013; Chen et al., 2013),TALENs 在结构上与 ZFNs 类似,是由特异性的 DNA 结合蛋白-TALE 蛋白和 *Fok I* 核酸酶两部分组成(Christian et al., 2010)。TALE 蛋白是植物病原体-黄单胞菌(*Xanthomonas* spp.)分泌的一种转录激活子样效应因子,是一类分泌蛋白,在植物细胞中能够特异性地识别并结合寄主靶基因的序列,从而调控寄主的基因表达(Boch and Bonas, 2010)。



TALEs 蛋白分子结构包含有 N-端转运信号 (Translocation signal); C-端含核定位信号 NLSs (Nuclear localization signals)和酸性转录激活域 AD (Acidic activation domain); 以及中间串联重复区, 中间的串联重复区则由多个串联排列的重复序列单元组成, 每个重复序列单元一般含 33~35 个高度保守的氨基酸, 其中第 12 和 13 位氨基酸可变, 被称为重复可变双残基 RVD (Repeat-variable di-residue) (Boch and Bonas, 2010; 赵开军和杨兵, 2012), 研究发现 TALEs 的 RVD 可特异性识别 DNA 碱基, 其规律为: NI 识别 A, NG 识别 T, HD 识别 C, NK 识别 G, NN 识别 G 或 A, NS 可识别 A, C, G, T (Boch et al., 2009; Moscou and Bogdanove, 2009)。

基于 TALEs 蛋白中的 RVD 的两个氨基酸特异识别和结合一个碱基的原则, 因此, 如果 TALE 要特异识别和结合某一核酸序列(靶位点), 理论上可以按照靶位点的序列, 将多个对应 TALE 重复单元经过串联就可以定制出特异识别 DNA 序列的 TALE 蛋白, 在 TALE 蛋白的 C 端融合一个非特异的核酸内切酶 *Fok I* 就构成了可以用于靶向基因组编辑的 TALEN 单体。TALENs 技术对生物基因组特定位点产生剪切作用与 ZFNs 类似, 由两个 TALE 蛋白识别和结合 DNA 靶位点, *Fok I* 核酸酶负责对靶 DNA 进行切割, 从而造成 DNA 的 DSBs, 诱发细胞的 DNA 损伤修复机制, 从而实现对基因组靶位点的编辑。

TALENs 的合成与组装相对于 ZFNs 要简单和灵活, 其关键是要合成 TALE 蛋白串联重复区的编码 DNA 序列, 理论上将多个 TALE 重复单元编码的 DNA 序列通过多次连接即可实现, 但是要合成这种高度重复序列也具有一定的困难和挑战。目前, 已经开发出多种快速、简便合成和组装 TALENs 方法, 如 Golden gate (GG) 组装法 (Weber et al., 2011; Zhang et al., 2011), 快速高通量固相合成法 (Fast Ligation-based Automatable Solid-phase High-throughput, FLASH) (Reyon et al., 2012) 和基于长粘末端的 LIC (Ligation-independent cloning) 组装方法 (Schmid-Burgk et al., 2013) 等。

### 1.3 CRISPR-Cas 技术

CRISPR-Cas 是 2013 年出现的由小分子 RNA 介导的一种靶向基因组编辑新技术, 该技术是基于原核生物(细菌和古菌)一种免疫系统而开发的, 称之为 Clustered regularly interspaced short palindromic repeats-CRISPR-associated proteins (规律成簇间隔短回文重复及其相关蛋白), 简称 CRISPR-Cas 系统 (Sorek et al., 2008; Charpentier and Doudna, 2013)。由于该技术合成简单、周期短、操作灵活、效率高等优点, 目前备受人们关注。

CRISPR-Cas 系统是一类广泛分布于原核生物基

因组的重复结构, 由不连续的高度保守的正向重复序列 (Repeat, R) 与长度相近的间隔序列 (Spacer, S) 排列组成的 R-S 结构, 称之为 CRISPR 基因座 (CRISPR locus), 在 R-S 结构第一个重复序列上游是前导序列 (Leader), 作为启动子可以启动 CRISPR 基因座的转录, 在 CRISPR 基因座附近还存在一些保守的 CRISPR 相关蛋白基因 (cas gene)。因此, 由 Cas 蛋白基因、前导序列和 CRISPR 基因座共同构成 CRISPR-Cas 系统 (Horvath and Barrangou, 2010) (图 1)。

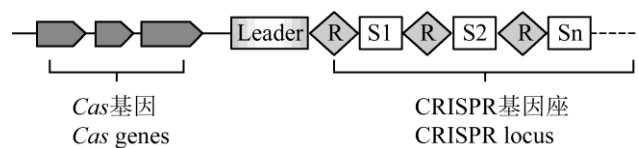


图 1 CRISPR 基因结构

注: S1, S2, Sn 分别表示不同的间隔序列 (Spacers); R 表示同向重复序列 (Repeats)

Figure 1 The structure of CRISPR gene

Note: S1, S2 and Sn represent different Spacers respectively; R represents Repeats

CRISPR-Cas 系统能够降解入侵的噬菌体、质粒等外源核酸物质, 使原核生物(细菌和古菌)具有适应性免疫能力, 根据参与作用的 Cas 蛋白基因的序列和结构特点, CRISPR-Cas 系统可分为 I、II 和 III 型三种类型 (Makarova et al., 2011; Wiedenheft et al., 2012), 其中 I 和 III 型 CRISPR-Cas 系统需要多种蛋白质参与才能形成具有功能的 Cas 蛋白复合物 (Brouns et al., 2008; Liu and Fan, 2014), 而来自于化脓链球菌 (*Streptococcus pyogenes*) 的 II 型的 CRISPR-Cas 是三种类型中最简单的系统, 仅需要一种 Cas9 蛋白 (Garneau et al., 2010; Zhang et al., 2014)。在该系统中, 入侵的外源核酸片段作为间隔序列 (Spacer) 在前导序列与第一段重复序列之间的位置, 整合到 CRISPR locus 中, 然后转录成长链的 CRISPR RNAs 前体物 (pre-crRNAs), 与 tracrRNA (trans-activating crRNA) 部分互补配对, 然后在 Cas9/RNase III 加工下形成成熟的 tracrRNA: crRNA 复合物, 通过 crRNA 与入侵 DNA 上原间隔序列 (Proto-spacer) 碱基互补配对, 从而引导 Cas9 蛋白到原间隔序列的区域, 该过程需要在靶标 DNA 上有一段保守的 PAM (Protospacer adjacent motif) 序列, 对于 II 型 CRISPR 系统一般为 5'-NGG-3' 序列。然后 Cas9 酶的 HNH 剪切域切割与 crRNA 互补的 DNA 链, RuvC-like 域则剪切非互补的 DNA 链, 从而造成该位点的 DSB, 降解入侵噬菌体核酸或质粒 (Liu and Fan, 2014)。

2012 年, Jinek 等 (2012) 报道了将 crRNA 和 tracrRNA 的序列通过 4 个碱基环形结构相连构成一



个嵌合的 sgRNA (small guide RNA) 分子, 通过体外实验证明了该 sgRNA 能使 II 型系统的 Cas9 蛋白能够识别特定的 DNA 序列, 并引起 DNA 的 DSBs, 为以后 CRISPR-Cas 系统应用于基因组靶向编辑开创了里程碑的工作。2013 年 2 月, 两个实验室分别利用该技术成功对人和小鼠细胞的内源基因实现靶向编辑(Cong et al., 2013; Mali et al., 2013), 此后, 该技术在其他物种的应用也竞相报道。

目前, 基于 II 型的 CRISPR-Cas9 系统而改造的基因组编辑技术只需要根据靶 DNA 位点合成一段能够编码大约 100 nt sgRNA 的序列和一个 Cas9 蛋白两种主要元件。对不同的基因位点, 仅需要改变编码 sgRNA 的序列, 而不用重新构建或表达 Cas9 蛋白, 并且可以将多个 sgRNA 串联可以对一个基因的多个位点进行编辑或同时对多个基因进行编辑, 也可以在 RNA 水平上进行编辑(O'Connell et al., 2014)。CRISPR-Cas9 基因组编辑载体的构建也非常

简单、快速, 通过常规的酶切、连接和克隆可在 1~3 天就完成构建工作, 大大简化实验, 在普通分子生物学实验室就能实施。

#### 1.4 三种基因组靶向编辑技术的特点

ZFNs、TALENs 和 CRISPR-Cas 技术在 DNA 靶点识别和结合域、剪切域、靶序列的大小、设计难易程度、靶向修饰效率、脱靶率、多位点编辑难易程度、构建所需要的时间和成本等方面进行比较(Fichtner et al., 2014; Chen and Gao, 2014) (表 1)。CRISPR-Cas9 无论是在设计、构建难易程度, 还是时间、成本, 以及修饰效率上, 显然优于 TALENs 和 ZFNs 两种技术, 但是 CRISPR-Cas9 也存在自身的局限性, 比如选择 DNA 靶位点受限于 PAM 序列不能对基因的任何位点进行编辑, 另外还存在一定的脱靶效应等问题。

表 1 ZFNs、TALENs 和 CRISPR-Cas9 技术特点的比较  
 Table 1 Comparison of ZFNs, TALENs and CRISPR-Cas9

项目	ZFNs	TALENs	CRISPR-Cas9
Subjects			
靶点结合域	锌指(ZFP)结构域	TALE蛋白的RVD串联重复	CRISPR RNA 或小分子向导RNA
Binding domain	ZFP domain	区 TALE RVD repeats domain	CRISPR RNA or Small guide RNA
剪切域	<i>Fok I</i>	<i>Fok I</i>	Cas9
Cleavage domain			
靶序列大小	(9~12 bp)*2	(8~31 bp)*2	20 bp+NGG
length of target sequence			
设计难易	中等	容易	非常容易
Design difficulty	Moderate	Easy	Very easy
构建难易	难	容易	非常容易
Construction difficulty	Difficult	Easy	Very easy
载体构建时间	5~7天	5~7天	1~3天
Time for construction	5~7 d	5~7 d	1~3 d
构建成本	高	中等	低
Cost	High	Moderate	Low
靶向修饰效率	低	高	高
Efficiency	low	High	High
多靶点编辑	难	难	容易
Multiplexing	Difficult	Difficult	Easy
RNA 编辑	不能	不能	能
RNA editing	Incapable	Incapable	Capable
脱靶率	高	低	依物种和 sgRNA 结构不同
Off-target rate	High	Low	According to different species and sgRNA structures



## 2 ZFNs、TALENs 和 CRISPR-Cas 技术在植物中的应用进展

2005 年, Lloyd 等(Lloyd et al., 2005)将包含热激启动子驱动的 ZFNs 编码基因和该 ZFN 的靶向识别序列的载体转入拟南芥基因组, 然后通过热激处理 T1 代转基因苗, 促使编码 ZFNs 的基因表达, 造成 ZFN 识别的靶位点序列的突变, 第一次证明 ZFNs 可以在植物体内正常工作。随后也在拟南芥(Zhang et al., 2010)、烟草(Townsend et al., 2009)、玉米(Shukla et al., 2009)、大豆(Curtin et al., 2011)等植物内源基因的靶向编辑上得到成功的应用(表 2), 但是由于该技术合成组装难度大、修饰效率低、脱靶效应高等问题使其在植物中的应用进展缓慢。

2009 年, 黄单胞菌效应子蛋白 TAL 效应子与寄主靶基因 DNA 特异识别的分子密码的破译, 使植物基因组靶向编辑呈现新的曙光(赵开军和杨兵,

2012), 2010 年, Christian 等(2010)首先通过酵母实验证明 TALENs 的活性, 并构建 TALENs 对拟南芥 ADH1 基因进行了靶向编辑, 随后, Cermak 等(2011)利用高效 Golden Gate 方法构建 TALENs, 在拟南芥原生质体中对 ADH1 进行了编辑, 同年, Mahfouz 等(2011)优化了 TAL 效应子 Hax3 的基因序列, 然后与核酸酶 Fok I 的 DNA 切割域的编码基因融合组成杂合核酸酶 dHax3.N, 将携带有 35S::ATGEBE.TGA.spacer.EBE::uidA 和 35S::dHax3.N 二元载体的农杆菌共浸染烟草叶片进行瞬时表达, 也证明了 TALENs 能够在植物细胞内对靶基因进行定点剪切。2012 年, Li 等(2012)利用 TALENs 技术将水稻感病基因 Os11N3(或称为 OsSWEET14)启动子序列进行靶向编辑, 使水稻白叶枯病原菌 TAL 效应子 AvrXa7 和 PthXo3 失去对 Os11N3 启动子靶点序列的识别, 从而使水稻的抗病能力提高, 展示了该技术在作物改良中的广阔应用前景。随后 TALENs 也成功对烟草(Zhang et al., 2013)、短柄草(Shan et al., 2013b)、小麦(Wang et al., 2014)、大豆(Haun et al., 2014)等多种植物内源基因进行编辑(表 2)。

2013 年, 基于原核生物 II 型 CRISPR-Cas9 系统而开发的一种新的靶向基因组编辑技术的出现, 给基因工程带来技术性的革命(Zhang and Zhou, 2014), 相对比 ZFNs 和 TALENs 该技术更简单, 直接和高效等优点, 其应用和发展非常迅速。在 2013 年 8 月的《Nature biotechnology》期刊上三篇文章分别报道了利用 CRISPR-Cas9 技术对单子叶植物水稻、小麦和双子叶植物烟草、拟南芥的多个内源基因成功进行靶向编辑, Shan 等(2013a)利用该技术对水稻的 4 个基因(OsPDS; OsBADH2; Os02g23823 和 OsMPK2)和小麦 1 个基因(TaMLO)进行定点突变, 在转基因水稻中基因突变效率为 4.0%~9.4%,

并在 T0 代就可获得 PDS 基因敲除的水稻纯合突变体, 还实现了利用 HR 修复途径在特定突变位点精确插入一段包含的两个限制性酶切位点的序列; 展示了该技术在重要粮食作物中的应用前景; Li 等(2013)利用该技术分别在拟南芥和本氏烟中实现了靶基因的定点突变, 突变效率为 1.1%~38.5%之间, 分别成功对两个基因(AtRACK1b 和 AtRACK1c)和同一个基因(AtPDS3)的两个不同位点同时进行编辑; Nekrasov 等(2013)利用 CRISPR-Cas 技术在本氏烟中实现了基因组的定点突变, 突变效率为 1.8%~2.4%; 同年, 北京大学瞿礼嘉实验室(Miao et al., 2013)利用该技术对水稻的叶绿素加氧酶基因 1(CAO1)和散生基因(LAZY1)进行定点突变, 突变效率分别高达 83.3%和 91.6%; 中科院上海植物逆境生物学研究中心朱健康实验室(Feng et al., 2013)利用 CRISPR-Cas 技术分别对拟南芥和水稻实现了基因的定点突变, 突变效率(除了一个位点突变效率为 5%外)比较高, 在 26%~84%之间。此外, 该技术还成功对西红柿(Brooks et al., 2014)、甜橙(Jia and Wang, 2014)等多种植物内源基因进行编辑(表 2), 目前该技术已成为了植物研究的一种热门手段, 本实验室也正在利用该技术在水稻基因功能研究中开展相关工作。

## 3 问题和展望

靶向基因组编辑技术是植物基因功能解析和农作物改良中最直接的手段, 近年, 随着高通量 DNA 测序技术的发展以及众多植物基因组测序工作的完成, 通过基因组靶向编辑可以直接在基因组特定位点实现基因序列的改变以阐明基因的功能, 另一方面, 可以应用该技术对一些控制重要农艺性状的基因进行编辑来改良或改造农作物, 并可在后代的自交或回交等中较容易去除转基因的成分, 既可以避免常规转基因技术基因插入位点的不确定性, 还可以避免常规转基因作物存在的生态和食品安全风险, 有望成为农作物转基因育种的新方法。

ZFNs、TALENs 和 CRISPR-Cas 技术在以上两个方面都展现出了较好的应用前景, 在经过长期探索, 三种技术得到优化和发展, 但仍然存在一些问题需要解决和探讨: 1)都存在脱靶效应, 如何避免脱靶效应和增加其特异性? 一方面可能继续对靶向编辑技术中 DNA 结合域特异识别 DNA 的分子机制进行进一步深入研究, 优化或改进基因组靶向编辑载体使其特异性更高, 另一方面可以通过高通量的方法(如测序技术、生物信息学等)预测和筛选最合适的靶位点, 以尽量避免可能的脱靶效应, 例如在 CRISPR-Cas 系统设计 sgRNA 靶序列识别位点时, 针对一些模式植物已经有网站可以查找和设计较为合适的靶位点和预测可能脱靶位点(Lei et al., 2014); 2)目前基因组靶



表 2 ZFNs、TALENs 和 CRISPR-Cas9 在植物中基因组靶向编辑的例子  
 Table 2 Examples of plant targeted genome editing by ZFNs, TALENs and CRISPR-Cas9

靶向编辑技术 Technologies	植物物种 Plant species	被修饰的基因 Targeted gene names	修饰类型 Modification types	
ZFNs	拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>ADH1</i> , <i>TT4</i> (Zhang <i>et al.</i> , 2010)	NHEJ	
	烟草 <i>Nicotiana tabacum</i>	<i>SurA</i> , <i>SurB</i> (Townsend <i>et al.</i> , 2009)	NHEJ	
	玉米 <i>Zea mays</i>	<i>IPK1</i> (Shukla <i>et al.</i> , 2009)	NHEJ; HR	
	大豆 <i>Glycine max</i>	<i>DCL 1a</i> , <i>DCL1b</i> , <i>DCL4a</i> , <i>DCL4b</i> , <i>RDR6a</i> , <i>RDR6b</i> , <i>HEN1a</i> (Curtin <i>et al.</i> , 2011)	NHEJ	
TALENs	拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>ADH1</i> (Cermak <i>et al.</i> , 2011)	NHEJ	
	烟草 <i>Nicotiana tabacum</i>	<i>SurA</i> ; <i>SurB</i> (Zhang <i>et al.</i> , 2013)	NHEJ; HR	
	水稻 <i>Oryza sativa</i>	EBE of <i>AvrXa7</i> and <i>PthXo3</i> (Li <i>et al.</i> , 2012); <i>OsDEP1</i> , <i>OsBADH2</i> , <i>OsSD1</i> , <i>OsCKX2</i> (Shan <i>et al.</i> , 2013b)	NHEJ	
	大豆 <i>Glycine max</i>	<i>FAD2-1A</i> , <i>FAD2-1B</i> (Haun <i>et al.</i> , 2014)	NHEJ	
	小麦 <i>Triticum aestivum</i>	<i>TaMLO</i> (Wang <i>et al.</i> , 2014)	NHEJ	
	短柄草 <i>Brachypodium</i>	<i>BdABA1</i> , <i>BdCKX2</i> , <i>BdSMC6</i> , <i>BdSPL</i> , <i>BdSBP</i> , <i>BdCO11</i> , <i>BdRHT</i> , <i>BdHTA1</i> (Shan <i>et al.</i> , 2013b)	NHEJ	
	西红柿 <i>Solanum lycopersicum</i>	<i>PRO</i> (Lor <i>et al.</i> , 2014)	NHEJ	
	CRISPR-Cas9	水稻 <i>Oryza sativa</i>	( <i>OsPDS</i> , <i>OsBADH2</i> , <i>Os02g23823</i> , <i>OsMPK2</i> ) (Shan <i>et al.</i> , 2013a); ( <i>YSA</i> , <i>SPP</i> , <i>ROC5</i> ) (Feng <i>et al.</i> , 2013) ; ( <i>CAO1</i> , <i>LAZY1</i> ) (Miao <i>et al.</i> , 2013); (Promoters of <i>OsSWEET14</i> and <i>OsSWEET11</i> ) (Jiang <i>et al.</i> , 2013)	NHEJ; HR
		小麦 <i>Triticum aestivum</i>	<i>TaMLO</i> (Shan <i>et al.</i> , 2013a)	NHEJ
		高粱 <i>Sorghum bicolor</i>	<i>DsRED2</i> (Jiang <i>et al.</i> , 2013)	NHEJ
拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>		( <i>AtPDS3</i> , <i>AtFLS2</i> , <i>AtRACK1b</i> , <i>AtRACK1c</i> ) (Li <i>et al.</i> , 2013); <i>BR11</i> , <i>JAZ1</i> , <i>GAI</i> (Feng <i>et al.</i> , 2013)	NHEJ	
本氏烟 <i>Nicotiana benthamiana</i>		<i>NbPDS3</i> (Li <i>et al.</i> , 2013); <i>NbPDS</i> (Nekrasov <i>et al.</i> , 2013)	NHEJ; HR	
西红柿 <i>Solanum lycopersicum</i>		<i>SIAGO7</i> (Brooks <i>et al.</i> , 2014)	NHEJ	
甜橙 <i>Citrus sinensis</i>		<i>CsPDS</i> (Jia and Wang, 2014)	NHEJ	
地钱 <i>Marchantia polymorpha</i> L.		<i>ARF1</i> (Sugano <i>et al.</i> , 2014)	NHEJ	



向编辑的组成元件转移到植物细胞中最常用的方法为农杆菌 Ti 质粒介导法, 存在浸染效率不高和物种限制等问题, 而一些植物病毒(如双生病毒等 (Baltes et al., 2014))具有浸染效率高和宿主范围广等优点, 将来可能可以改造成为运载这些元件的有效、简单的工具; 3)作为“明星”的 CRISPR-Cas9 技术存在 sgRNA 识别位点受限于 PAM 序列的问题, 因此不能识别基因组任意位点, 大大限制其应用, 而 III 型 CRISPR-Cas 系统识别位点不受 PAM 的限制, 靶位点选择上更自由(李君等, 2013)。因此, 今后对 CRISPR/Cas 系统进行更深入的研究和探索, 使该技术具有更广泛的适用性。相信在不久的将来, 随着人们对生物世界的深入的探索和认识, 高效、特异、简单的基因组靶向编辑技术将会在植物研究领域大放光彩。

### 作者贡献

廖鹏飞完成论文初稿的撰写和修改; 聂旺、余雅心和童普国参与参考文献查找和整理以及图表绘制; 李绍波和朱友林指导论文撰写和修改。全体作者都阅读并同意最终的文本。

### 致谢

本研究由国家自然科学基金(31260313)和江西省自然科学基金(20132BAB204012)共同资助。

### 参考文献

- Baltes N.J., Gil-Humanes J., Cermak T., Atkins P.A., and Voytas D.F., 2014, DNA replicons for plant genome engineering, *Plant Cell*, 26(1): 151-163  
<http://dx.doi.org/10.1105/tpc.113.119792>
- Beumer K.J., Trautman J.K., Christian M., Dahlem T.J., Lake C.M., Hawley R.S., Grunwald D.J., Voytas D.F., and Carroll D., 2013, Comparing zinc finger nucleases and transcription activator-like effector nucleases for gene targeting in *Drosophila*, *G3: Genes Genomes Genetics*, 3(10): 1717-1725
- Bibikova M., Golic M., Golic K.G., and Carroll D., 2002, Targeted chromosomal cleavage and mutagenesis in *Drosophila* using zinc-finger nucleases, *Genetics*, 161(3): 1169-1175
- Bitinaite J., Wah D.A., Aggarwal A.K., and Schildkraut I., 1998, FokI dimerization is required for DNA cleavage, *PNAS*, 95(18): 10570-10575  
<http://dx.doi.org/10.1073/pnas.95.18.10570>
- Boch J., and Bonas U., 2010, Xanthomonas AvrBs3 Family-Type III Effectors: Discovery and Function, *Annu Rev Phytopathol*, 48: 419-436  
<http://dx.doi.org/10.1146/annurev-phyto-080508-081936>
- Boch J., Scholze H., Schornack S., Landgraf A., Hahn S., Kay

- S., Lahaye T., Nickstadt A., and Bonas U., 2009, Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors, *Science*, 326(5959): 1509-1512  
<http://dx.doi.org/10.1126/science.1178811>
- Brooks C., Nekrasov V., Lippman Z.B., and Van Eck J., 2014, Efficient Gene Editing in Tomato in the First Generation Using the Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR-Associated9 System, *Plant Physiol*, 166(3): 1292-1297  
<http://dx.doi.org/10.1104/pp.114.247577>
- Brouns S.J.J., Jore M.M., Lundgren M., Westra E.R., Slijkhuis R.J.H., Snijders A.P.L., Dickman M.J., Makarova K.S., Koonin E.V., and Van Der Oost J., 2008, Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes, *Science*, 321(5891): 960-964  
<http://dx.doi.org/10.1126/science.1159689>
- Cermak T., Doyle E.L., Christian M., Wang L., Zhang Y., Schmidt C., Baller J.A., Somia N.V., Bogdanove A.J., and Voytas D.F., 2011, Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting, *Nucleic Acids Res*, 39(12): e82  
<http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkr218>
- Charpentier E., and Doudna J.A., 2013, Biotechnology: Rewriting a genome, *Nature*, 495(7439): 50-51  
<http://dx.doi.org/10.1038/495050a>
- Chen K.L., and Gao C.X., 2014, Targeted genome modification technologies and their applications in crop improvements, *Plant Cell Rep*, 33(4): 575-583  
<http://dx.doi.org/10.1007/s00299-013-1539-6>
- Chen S.J., Oikonomou G., Chiu C.N., Niles B.J., Liu J., Lee D.A., Antoshechkin I., and Prober D.A., 2013, A large-scale in vivo analysis reveals that TALENs are significantly more mutagenic than ZFNs generated using context-dependent assembly, *Nucleic Acids Res*, 41(4): 2769-2778  
<http://dx.doi.org/10.1093/nar/gks1356>
- Christian M., Cermak T., Doyle E.L., Schmidt C., Zhang F., Hummel A., Bogdanove A.J., and Voytas D.F., 2010, Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases, *Genetics*, 186(2): 757-761  
<http://dx.doi.org/10.1534/genetics.110.120717>
- Cong L., Ran F.A., Cox D., Lin S.L., Barretto R., Habib N., Hsu P.D., Wu X.B., Jiang W.Y., Marraffini L.A., and Zhang F., 2013, Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems, *Science*, 339(6121): 819-823  
<http://dx.doi.org/10.1126/science.1231143>
- Curtin S.J., Zhang F., Sander J.D., Haun W.J., Starker C., Baltes N.J., Reyon D., Dahlborg E.J., Goodwin M.J., Coffman A.P., Dobbs D., Joung J.K., Voytas D.F., and



- Stupar R.M., 2011, Targeted mutagenesis of duplicated genes in soybean with zinc-finger nucleases, *Plant Physiol*, 156(2): 466-473  
<http://dx.doi.org/10.1104/pp.111.172981>
- Feng Z.Y., Zhang B.T., Ding W.N., Liu X.D., Yang D.L., Wei P.L., Cao F.Q., Zhu S.H., Zhang F., Mao Y.F., and Zhu J.K., 2013, Efficient genome editing in plants using a CRISPR/Cas system, *Cell Res*, 23(10): 1229-1232  
<http://dx.doi.org/10.1038/cr.2013.114>
- Fichtner F., Castellanos R.U., and Ülker B., 2014, Precision genetic modifications: a new era in molecular biology and crop improvement, *Planta*, 239(4): 921-939  
<http://dx.doi.org/10.1007/s00425-014-2029-y>
- Gaj T., Gersbach C.A., and Barbas C.F., 2013, ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering, *Trends in Biotechnology*, 31(7): 397-405  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2013.04.004>
- Garneau J.E., Dupuis M.È., Villion M., Romero D.A., Barrangou R., Boyaval P., Fremaux C., Horvath P., Magadán A.H., and Moineau S., 2010, The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA, *Nature*, 468(7320): 67-71  
<http://dx.doi.org/10.1038/nature09523>
- Hanin M., Volrath S., Bogucki A., Briker M., Ward E., and Paszkowski J., 2001, Gene targeting in Arabidopsis, *Plant J.*, 28(6): 671-677  
<http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-313x.2001.01183.x>
- Haun W., Coffman A., Clasen B.M., Demorest Z.L., Lowy A., Ray E., Retterath A., Stoddard T., Juillerat A., Cedrone F., Mathis L., Voytas D.F., and Zhang F., 2014, Improved soybean oil quality by targeted mutagenesis of the fatty acid desaturase 2 gene family, *Plant Biotechnol J.*, 12(7): 934-940  
<http://dx.doi.org/10.1111/pbi.12201>
- Horvath P., and Barrangou R., 2010, CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea, *Science*, 327(5962): 167-170  
<http://dx.doi.org/10.1126/science.1179555>
- Iida S., and Terada R., 2005, Modification of endogenous natural genes by gene targeting in rice and other higher plants, *Plant Mol. Biol.*, 59(1): 205-219  
<http://dx.doi.org/10.1007/s11103-005-2162-x>
- Jia H., and Wang N., 2014, Targeted Genome Editing of Sweet Orange Using Cas9/sgRNA, *PLoS One*, 9(4): e93806  
<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0093806>
- Jiang W.Z., Zhou H.B., Bi H.H., Fromm M., Yang B., and Weeks D.P., 2013, Demonstration of CRISPR/Cas9/sgRNA-mediated targeted gene modification in Arabidopsis, tobacco, sorghum and rice, *Nucleic Acids Res.*, 41(20): e188  
<http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkt780>
- Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M., Doudna J.A., and Charpentier E., 2012, A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity, *Science*, 337(6096): 816-821  
<http://dx.doi.org/10.1126/science.1225829>
- Lee K.Y., Lund P., Lowe K., and Dunsmuir P., 1990, Homologous recombination in plant cells after Agrobacterium-mediated transformation, *Plant Cell*, 2(5): 415-425  
<http://dx.doi.org/10.1105/tpc.2.5.415>  
<http://dx.doi.org/10.2307/3869091>
- Lei Y., Lu L., Liu H.Y., Li S., Xing F., and Chen L.L., 2014, CRISPR-P: a web tool for synthetic single-guide RNA design of CRISPR-system in plants, *Mol. Plant*, 7(9): 1494-1496  
<http://dx.doi.org/10.1093/mp/ssu044>
- Li J., Zhang Y., Chen K.L., Shan Q.W., Wang Y.P., Liang Z., and Gao C.X., 2013, CRISPR/Cas: a novel way of RNA-guided genome editing, *Yichuan(Hereditas)*, 35(11): 1265-1273(李君, 张毅, 陈坤玲, 单奇伟, 王延鹏, 梁振, 高彩霞, 2013, CRISPR/Cas: RNA 靶向的基因组定向编辑新技术, *遗传*, 35(11): 1265-1273)
- Li J.F., Norville J.E., Aach J., McCormack M., Zhang D.D., Bush J., Church G.M., and Sheen J., 2013, Multiplex and homologous recombination-mediated genome editing in Arabidopsis and Nicotiana benthamiana using guide RNA and Cas9, *Nat. Biotechnol*, 31(8): 688-691  
<http://dx.doi.org/10.1038/nbt.2654>
- Li T., Liu B., Spalding M.H., Weeks D.P., and Yang B., 2012, High-efficiency TALEN-based gene editing produces disease-resistant rice, *Nat. Biotechnol*, 30(5): 390-392  
<http://dx.doi.org/10.1038/nbt.2199>
- Liu L., and Fan X.D., 2014, CRISPR-Cas system: a powerful tool for genome engineering, *Plant Mol. Biol.*, 85(3): 209-218  
<http://dx.doi.org/10.1007/s11103-014-0188-7>
- Liu Y.J., Xu Y.Y., Xiao J., Ma Q.B., Li D., Xue Z., and Chong K., 2011, OsDOG, a gibberellin-induced A20/AN1 zinc-finger protein, negatively regulates gibberellin-mediated cell elongation in rice, *J. Plant Physiol.*, 168(10): 1098-1105  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jplph.2010.12.013>
- Lloyd A., Plaisier C.L., Carroll D., and Drews G.N., 2005, Targeted mutagenesis using zinc-finger nucleases in Arabidopsis, *PNAS*, 102(6): 2232-2237  
<http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0409339102>
- Lor V.S., Starker C.G., Voytas D.F., Weiss D., and Olszewski





- N.E., 2014, Targeted mutagenesis of the tomato PROCERA gene using Transcription Activator-Like Effector Nucleases, *Plant Physiol.*, 166(3): 1288-1291  
<http://dx.doi.org/10.1104/pp.114.247593>
- Maeder M.L., Thibodeau-Beganny S., Osiak A., Wright D.A., Anthony R.M., Eichinger M., Jiang T., Foley J.E., Winfrey R.J., Townsend J.A., Unger-Wallace E., Sander J.D., Muller-Lerch F., Fu F.L., Pearlberg J., Gobel C., Dassie J.P., Pruett-Miller S.M., Porteus M.H., Sgroi D.C., Iafrate A.J., Dobbs D., McCray P.B., Cathomen T., Voytas D.F., and Joung J.K., 2008, Rapid "Open-Source" engineering of customized zinc-finger nucleases for highly efficient gene modification, *Mol. Cell*, 31(2): 294-301  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2008.06.016>
- Mahfouz M.M., Li L.X., Shamimuzzaman M., Wibowo A., Fang X.Y., and Zhu J.K., 2011, De novo-engineered transcription activator-like effector (TALE) hybrid nuclease with novel DNA binding specificity creates double-strand breaks, *PNAS*, 108(6): 2623-2628  
<http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1019533108>
- Makarova K.S., Haft D.H., Barrangou R., Brouns S.J.J., Charpentier E., Horvath P., Moineau S., Mojica F.J.M., Wolf Y.I., Yakunin A.F., Van Der Oost J., and Koonin E.V., 2011, Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems, *Nat. Rev. Microbiol.*, 9(6): 467-477  
<http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2577>
- Mali P., Yang L.H., Esvelt K.M., Aach J., Guell M., Dicarlo J.E., Norville J.E., and Church G.M., 2013, RNA-guided human genome engineering via Cas9, *Science*, 339(6121): 823-826  
<http://dx.doi.org/10.1126/science.1232033>
- Miao J., Guo D.S., Zhang J.Z., Huang Q.P., Qin G.J., Zhang X., Wan J.M., Gu H.Y., and Qu L.J., 2013, Targeted mutagenesis in rice using CRISPR-Cas system, *Cell Res.*, 23(10): 1233-1236  
<http://dx.doi.org/10.1038/cr.2013.123>
- Miller J., Mclachlan A.D., and Klug A., 1985, Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from *Xenopus oocytes*, *EMBO J.*, 4(6): 1609-1614
- Moscou M.J., and Bogdanove A.J., 2009, A Simple Cipher Governs DNA Recognition by TAL Effectors, *Science*, 326(5959): 1501  
<http://dx.doi.org/10.1126/science.1178817>
- Nekrasov V., Staskawicz B., Weigel D., Jones J.D.G., and Kamoun S., 2013, Targeted mutagenesis in the model plant *Nicotiana benthamiana* using Cas9 RNA-guided endonuclease, *Nat. Biotechnol.*, 31(8): 691-693  
<http://dx.doi.org/10.1038/nbt.2655>
- O'Connell, M. R., Oakes, B. L., Sternberg, S. H., East-Seletsky, A., Kaplan, M., and Doudna, J. A., 2014, Programmable RNA recognition and cleavage by CRISPR/Cas9, *Nature*, 516: 263-266  
<http://dx.doi.org/10.1038/nature13769>
- Paszkowski J., Baur M., Bogucki A., and Potrykus I., 1988, Gene targeting in plants, *EMBO J.*, 7(13): 4021-4026
- Pavletich N.P., and Pabo C.O., 1991, Zinc finger-DNA recognition: crystal structure of a Zif268-DNA complex at 2.1 Å, *Science*, 252(5007): 809-817  
<http://dx.doi.org/10.1126/science.2028256>
- Perez-Pinera P., Ousterout D.G., and Gersbach C.A., 2012, Advances in targeted genome editing, *Current Opinion Chemical Biol.*, 16(3): 268-277  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2012.06.007>
- Reyon D., Tsai S.Q., Khayter C., Foden J.A., Sander J.D., and Joung J.K., 2012, FLASH assembly of TALENs for high-throughput genome editing, *Nat. Biotechnol.*, 30(5): 460-465  
<http://dx.doi.org/10.1038/nbt.2170>
- Sander J.D., Dahlborg E.J., Goodwin M.J., Cade L., Zhang F., Cifuentes D., Curtin S.J., Blackburn J.S., Thibodeau-Beganny S., Qi Y.P., Pierick C.J., Hoffman E., Maeder M.L., Khayter C., Reyon D., Dobbs D., Langenau D.M., Stupar R.M., Giraldez A.J., Voytas D.F., Peterson R.T., Yeh J.R.J., and Joung J.K., 2011, Selection-free zinc-finger-nuclease engineering by context-dependent assembly (CoDA), *Nat. methods*, 8(1): 67-69  
<http://dx.doi.org/10.1038/nmeth.1542>
- Schaefer D.G., and Zryd J.P., 1997, Efficient gene targeting in the moss *Physcomitrella patens*, *Plant J.*, 11(6): 1195-1206  
<http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-313X.1997.11061195.x>
- Schmid-Burgk J.L., Schmidt T., Kaiser V., Häning K., and Hornung V., 2013, A ligation-independent cloning technique for high-throughput assembly of transcription activator-like effector genes, *Nat. Biotechnol.*, 31(1): 76-81  
<http://dx.doi.org/10.1038/nbt.2460>
- Shan Q.W., Wang Y.P., Li J., Zhang Y., Chen K.L., Liang Z., Zhang K., Liu J.X., Xi J.J., Qiu J.L., and Gao C.X., 2013a, Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system, *Nat. Biotechnol.*, 31(8): 686-688  
<http://dx.doi.org/10.1038/nbt.2650>
- Shan Q.W., Wang Y.P., Chen K.L., Liang Z., Li J., Zhang Y., Zhang K., Liu J.X., Voytas D.F., Zheng X.L., Zhang Y., and Gao C.X., 2013b, Rapid and Efficient Gene Modification in Rice and *Brachypodium* Using TALENs, *Mol. Plant*, 6(4): 1365-1368  
<http://dx.doi.org/10.1093/mp/sss162>
- Shukla V.K., Doyon Y., Miller J.C., Dekelver R.C., Moehle



- E.A., Worden S.E., Mitchell J.C., Arnold N.L., Gopalan S., Meng X.D., Choi V.M., Rock J.M., Wu Y.Y., Katibah G.E., Gao Z.F., McCaskill D., Simpson M.A., Blakeslee B., Greenwalt S.A., Butler H.J., Hinkley S.J., Zhang L., Rebar E.J., Gregory P.D., and Urnov F.D., 2009, Precise genome modification in the crop species *Zea mays* using zinc-finger nucleases, *Nature*, 459(7245): 437-441  
<http://dx.doi.org/10.1038/nature07992>
- Song B., Hong Y., Wang P.W., Wang H., Fu Y.P. and Ding X.Y., 2010, Advances on Plant C2H2-type Zinc Finger Protein, *Jiyinzuxue Yu Yingyong Shengwuxue (Genomics and Applied Biology)*, 29(5):1133-1141 (宋冰, 洪洋, 王丕武, 王贺, 付永平, 丁孝营, 2010, 植物 C2H2 型锌指蛋白的研究进展, 基因组学与应用生物学, 29(5):1133-1141)
- Sorek R., Kunin V., and Hugenholtz P., 2008, CRISPR-a widespread system that provides acquired resistance against phages in bacteria and archaea, *Nat. Rev. Microbiol.*, 6(3): 181-186  
<http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro1793>
- Sugano S.S., Shirakawa M., Takagi J., Matsuda Y., Shimada T., Hara-Nishimura I., and Kohchi T., 2014, CRISPR/Cas9-Mediated Targeted Mutagenesis in the Liverwort *Marchantia polymorpha* L, *Plant Cell Physiol.*, 55(3): 475-481  
<http://dx.doi.org/10.1093/pcp/pcu014>
- Terada R., Urawa H., Inagaki Y., Tsugane K., and Iida S., 2002, Efficient gene targeting by homologous recombination in rice, *Nat. Biotechnol.*, 20(10): 1030-1034  
<http://dx.doi.org/10.1038/nbt737>
- Thykjær T., Finnemann J., Schauser L., Christensen L., Poulsen C., and Stougaard J., 1997, Gene targeting approaches using positive-negative selection and large flanking regions, *Plant Mol. Biol.*, 35(4): 523-530  
<http://dx.doi.org/10.1023/A:1005865600319>
- Townsend J.A., Wright D.A., Winfrey R.J., Fu F.L., Maeder M.L., Joung J.K., and Voytas D.F., 2009, High-frequency modification of plant genes using engineered zinc-finger nucleases, *Nature*, 459(7245): 442-445  
<http://dx.doi.org/10.1038/nature07845>
- Wang Y.P., Cheng X., Shan Q.W., Zhang Y., Liu J.X., Gao C.X., and Qiu J.L., 2014, Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew, *Nat. Biotechnol.*, 32(9): 947-951  
<http://dx.doi.org/10.1038/nbt.2969>
- Weber E., Gruetzner R., Werner S., Engler C., and Marillonnet S., 2011, Assembly of Designer TAL Effectors by Golden Gate Cloning, *PLoS One*, 6(5): e19722  
<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0019722>
- Wiedenheft B., Sternberg S.H., and Doudna J.A., 2012, RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea, *Nature*, 482(7385): 331-338  
<http://dx.doi.org/10.1038/nature11261>
- Wright D.A., Thibodeau-Beganny S., Sander J.D., Winfrey R.J., Hirsh A.S., Eichinger M., Fu F.L., Porteus M.H., Dobbs D., Voytas D.F., and Joung J.K., 2006, Standardized reagents and protocols for engineering zinc finger nucleases by modular assembly, *Nat. Protoc.*, 1(3): 1637-1652  
<http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2006.259>
- Wyman C., and Kanaar R., 2006, DNA double-strand break repair: all's well that ends well, *Annu. Rev. Genet.*, 40: 363-383  
<http://dx.doi.org/10.1146/annurev.genet.40.110405.090451>
- Yu G.H., Jiang L.L., Ma X.F., Xu Z.S., Liu M.M., Shan S.G., and Cheng X.G., 2014, A Soybean C2H2-Type Zinc Finger Gene GmZFP1 Enhanced Cold Tolerance in Transgenic *Arabidopsis*, *PLoS One*, 9(10): e109399  
<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0109399>
- Zang D.D., Wang C., Ji X.Y., and Wang Y.C., 2015, *Tamarix hispida* zinc finger protein ThZFP1 participates in salt and osmotic stress tolerance by increasing proline content and SOD and POD activities, *Plant Sci.*, 235: 111-121  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.plantsci.2015.02.016>
- Zhang F., Maeder M.L., Unger-Wallace E., Hoshaw J.P., Reyon D., Christian M., Li X.H., Pierick C.J., Dobbs D., Peterson T., Joung J.K., and Voytas D.F., 2010, High frequency targeted mutagenesis in *Arabidopsis thaliana* using zinc finger nucleases, *PNAS*, 107(26): 12028-12033  
<http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0914991107>
- Zhang F., Cong L., Lodato S., Kosuri S., Church G.M., and Arlotta P., 2011, Efficient construction of sequence-specific TAL effectors for modulating mammalian transcription, *Nat. Biotechnol.*, 29(2): 149-153  
<http://dx.doi.org/10.1038/nbt.1775>
- Zhang F., Wen Y., and Guo X., 2014, CRISPR/Cas9 for genome editing: progress, implications and challenges, *Hum Mol. Genet.*, 23(R1): R40-R46  
<http://dx.doi.org/10.1093/hmg/ddu125>  
<http://dx.doi.org/10.1093/hmg/ddt394>
- Zhang L.L., and Zhou Q., 2014, CRISPR/Cas technology: a revolutionary approach for genome engineering, *Sci China Life Sci.*, 57(6): 639-640  
<http://dx.doi.org/10.1007/s11427-014-4670-x>
- Zhang Y., Zhang F., Li X.H., Baller J.A., Qi Y.P., Starker C.G., Bogdanove A.J., and Voytas D.F., 2013, Transcription Activator-Like Effector Nucleases Enable Efficient Plant Genome Engineering, *Plant Physiol.*, 161(1): 20-27  
<http://dx.doi.org/10.1104/pp.112.205179>
- Zhao K.J., and Yang B., 2012, TALENs: Molecular Scissors for Site-specific Genome Editing in Plants, *Zhongguo Nongye Kexue (Scientia Agricultura Sinica)*, 45(14): 2787-2792 (赵开军, 杨兵, 2012, TALENs: 植物基因组定点剪辑的分子剪, 中国农业科学, 45(14): 2787-2792)