

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2023.08.010

贾凌, 许冰心, 叶冬梅, 等. 内含肽介导的撕裂 Cas9: 一种非转基因的植物基因编辑系统 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2023, 45(8): 105-112.

# 内含肽介导的撕裂 Cas9: 一种非转基因的植物基因编辑系统

贾凌, 许冰心, 叶冬梅, 李亚秀, 夏庆友

西南大学 前沿交叉学科研究院生物学研究中心, 重庆 400715

**摘要:** CRISPR/Cas9 技术在植物的基础研究以及谷物的遗传改造方面展现出了前所未有的潜力. 目前植物基因编辑方法大多是基于农杆菌介导的遗传转化, 该方法不仅涉及转基因过程, 容易引发公众关注, 同时该方法对较难转化的植物而言有一定的技术挑战. 研究开发了一个简单的非转基因植物基因编辑方法, 即采用病毒递送的方式将片段化的 Cas9 和 gRNA 运送到烟草中. 为了适应马铃薯病毒 X 载体的运载能力, 将金黄色葡萄球菌 SaCas9 分成 3 个部分, 用 2 个片段化的内含肽将其连接成完整的 Cas9 蛋白. 结果表明: 在培养的细胞和植物叶片中, 2 个片段化的内含肽均能使 3 个片段化的 Cas9 重组为完整的 Cas9 蛋白. 将 3 个片段化的载体和 1 个 sgRNA 载体注射到叶片中, 能对 *PDS* 基因进行靶向编辑. 该非转基因的植物基因编辑方法可能对其他多种植物有一定的应用效果.

**关键词:** CRISPR/Cas9 技术; 基因工程; 基因组修饰;

植物基因编辑

中图分类号: S961.6

文献标志码: A

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



文章编号: 1673-9868(2023)08-0105-08

## Intein-Mediated Split-Cas9: a Transgene-Free Plant Genome Editing System

JIA Ling, XU Bingxin, YE Dongmei, LI Yaxiu, XIA Qingyou

Biological Science Research Center, Academy for Advanced Interdisciplinary Studies,  
Southwest University, Chongqing 400715, China

**Abstract:** Clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated protein 9 (CRISPR/Cas9)-

收稿日期: 2021-10-11

基金项目: 重庆市科技局英才计划“包干制”项目(cstc2021ycjh-bgzxm0005); 西南大学博士启动基金项目(SWU120012).

作者简介: 贾凌, 博士研究生, 讲师, 主要从事烟草基因编辑研究.

通信作者: 夏庆友, 博士, 教授.

induced genomic engineering has shown unprecedented perspectives for basic plant research and crop genetic improvements. However, current plant genome editing methods are mostly based on *Agrobacterium* transformation. This procedure involves transgenic intermediates that could raise regulatory concerns and technical challenges when used with hard-to-transform plants. Here, we describe a simple transgene-free plant editing method for tobacco using viral delivery of spliced Cas9/gRNA. To fit the delivery capacity of the systemic infectious potato virus X vector, we split the *Staphylococcus aureus* Cas9 into three parts by combining two split-inteins. We showed that trans-splicing two inteins reconstitutes the full Cas9 protein in cultured cells and plant leaves. The direct injection of three split-Cas9 vectors and a gRNA vector into leaves could induce targeted genomic modifications with high efficiency. Our method revealed that Cas9 could be trans-spliced into three separate parts. This new simple transgene-free plant editing method may be applicable to various other plant species.

**Key words:** CRISPR/Cas9; genomic engineering; genomic modifications; plant genome editing

近年来, 锌指核酸酶(ZFNs)、转录激活物样效应器核酸酶(TALENs)、聚集的规则间隔短回文重复序列/CRISPR 相关蛋白 9(CRISPR/Cas9)等基因编辑技术在动植物中得到了快速的发展<sup>[1]</sup>. CRISPR/Cas9 由于其高效性、简便性以及低成本等优点迅速成为最受欢迎的基因编辑技术之一, 该技术不仅在生物学方面起着革命性的突破作用, 在人类疾病防治和动植物育种方面也具有较大潜力<sup>[2-3]</sup>. 随着其重要性的增加, CRISPR/Cas9 系统先后在拟南芥、烟草、高粱、水稻、黄豆、玉米和其他植物中建立起来<sup>[4-7]</sup>. CRISPR/Cas9 的递送方法主要是基于传统的遗传转化(比如农杆菌)致使外源 DNA 片段插入到靶标宿主的基因组上<sup>[8]</sup>. 由于缺乏有效的方法, 很多植物难于进行遗传转化. 尽管通过杂交选择后代的方法可以分离转基因元件, 但在基因编辑过程中涉及的转基因未来仍可能会引发公众和监管部门的注意<sup>[9]</sup>. 为了克服监管障碍, Woo 等<sup>[10]</sup>在体外将 Cas9 蛋白和 gRNA 复合物进行组装后, 利用聚乙二醇将其转染到原生质体中, 从而在拟南芥、烟草、莴苣和水稻的再生植株中实现靶向突变. 该策略在玉米和小麦中也展现了很高的效率和更低的脱靶<sup>[11-12]</sup>, 然而, 该方法的前提必须是要分离获得靶标植物的原生质体, 否则该策略就不能进行. 目前该方法在大部分的非模式植物中基本上还没有成功, 而病毒递送 CRISPR 元件也许是一个比较好的方法, 原因如下: 1) 病毒不会整合到宿主植物基因组中, 因此其产生的是非转基因植物<sup>[13]</sup>; 2) RNA 病毒能高量表达外源蛋白<sup>[14]</sup>; 3) 马铃薯病毒 X(PVX)能从一个细胞移动到另外一个细胞, 从而系统感染植物<sup>[15]</sup>. 由于大部分的病毒载体只能运载较小的蛋白, 比如锌指核酸酶<sup>[16]</sup>等, 而来源于金黄色葡萄球菌的 SaCas9 (3.1kb)由于其太大, 因此不能直接在植物病毒中表达. 有研究报道, 可以将 Cas9 分成两段在病毒载体中独立表达, 然后采用多种系统将分段的 Cas9 连接起来, 从而行使完整 Cas9 的编辑作用, 这些系统包括: 1) sgRNA 作为支架用于 Cas9 组装; 2) 雷帕霉素控制的 FKBP/FRB 系统; 3) 光调控的磁性系统; 4) 内含肽<sup>[17-19]</sup>. Moretti 等<sup>[20]</sup>采用腺相关病毒载体(rAAV)运载内含肽介导的 Cas9, 成功在杜兴氏肌肉萎缩症模型猪中进行体细胞基因编辑, 有效改善了骨骼肌和心肌衰竭.

本研究我们开发了一个内含肽介导的片段化 Cas9 系统, 用于植物的基因编辑. 将 SaCas9 基因分割成 3 个部分, 通过内含肽 DnaB 或 DnaE 将其进行组合, 并采用马铃薯病毒 X 载体进行递送, 使其能系统感染烟草.

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

研究使用的 HEK293FT, 是一种人胚胎肾细胞系, 保存于西南大学前沿交叉学科研究院生物学研究中

心。在 37 °C 条件下, 用 Dulbecco 改良的 Eagle 氏培养基、约 5% 的 CO<sub>2</sub> 和 10% 的胎牛血清(合格, Invitrogen)培养细胞。植物材料使用栽培烟草红花大金元, 在烟草的 4 片真叶期用于瞬时转染。

## 1.2 载体构建

利用化学方法合成 EF1a 启动子后, 采用 *Nco* I, *Sal* I 和 *Xho* I 酶切连接的方法将 EF1a 启动子插入到 PUC-V4-N-SaCas9 载体上, 以形成含有 SV40 终止子的 EF1a-V4-N 载体。在金斯瑞生物科技有限公司化学合成 gRNA-T4S 和 12 个内含肽介导的撕裂 SaCas9 (V1-N-SaCas9, V1-M-SaCas9, V1-C-SaCas9, V2-N-SaCas9, V2-M-SaCas9, V2-C-SaCas9, V3-N-SaCas9, V3-M-SaCas9, V3-C-SaCas9, V4-N-SaCas9, V4-M-SaCas9, V4-C-SaCas9), 并通过 *Nco* I 和 *Sal* I 将其插入到 EF1a-V4-N 载体, 以构建 EF1a-V1/V2/V3/V4-N/M/C-SaCas9 载体。采用 *Cla* I 和 *Sal* I 将内含肽介导的撕裂 SaCas9 克隆到马铃薯病毒 X 载体 (PGR107) 上, 以形成 PGR107-V4 的 4 个系列载体: PGR107-V4-N-SaCas9, PGR107-V4-M-SaCas9, PGR107-V4-C-SaCas9 和 PGR107-gRNA-T4S。

## 1.3 单链退火系统的构建和荧光素酶活性检测

基于 Huang 等<sup>[21]</sup> 描述的方法构建单链退火系统 (SSA)。在 SSA 中, 采用人巨细胞病毒启动子启动荧光素酶 (LUC) 的表达<sup>[21]</sup>。将荧光素酶切分成 3 个部分, 分别命名为 LUC-A (317 bp), LUC-B (871 bp) 和 LUC-C (465 bp)。将终止子 (TGA) 和 gRNA 靶位点置放于 2 个 LUC-B 之间, 从而将 LUC 分成 2 个部分。当 Cas9 和 gRNA 加入到 SSA 中, gRNA 会引导 Cas9 去切割 DNA, 从而形成双链缺口, 2 个 LUC-B 可基于 SSA 形成完整的荧光素酶, 用 pRL-TK 载体表达海肾荧光素酶 (RUC) 作为对照组。将 HEK293FT 细胞置放在有培养基的 24 孔板中, 加入 300 ng 内含肽介导的撕裂 SaCas9 (EF1a-V<sub>x</sub>-N-SaCas9, EF1a-V<sub>x</sub>-M-SaCas9 和 EF1a-V<sub>x</sub>-C-SaCas9), 300 ng 的 EF1a-gRNA, 150 ng 的 SSA 质粒和 50 ng 海肾荧光素酶质粒, 利用脂质体 2000 将其共转染到细胞中。48 h 后, 收集细胞, 基于操作手册采用双荧光素酶检测系统测定荧光素酶 (LUC) 和海肾荧光素酶 (RUC) 的活性。每个实验重复 3 次。

## 1.4 病毒侵染

基于 Pandey 等<sup>[22]</sup> 的方法进行少许修改, 进行病毒感染的瞬时侵染实验, 主要包括以下步骤: 将 4 种质粒 (PGR107-V4-N-SaCas9, PGR107-V4-M-SaCas9, PGR107-V4-C-SaCas9 和 PGR107-gRNA-T4S) 转化到农杆菌 GV3101 菌株中, 挑取阳性克隆子在含有卡那霉素 (50 mg/L) 和利福平 (25 mg/L) 的酵母抽提物牛肉培养基中 28 °C 生长 16 h; 通过离心的方式收集农杆菌细胞, 并将其利用侵染溶液 (含 10 mmol/L MES, 10 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 和 200 μmol/L 乙酰丁香酮) 重悬, 使农杆菌细胞的光密度在 1.6~2.0 范围内; 将 4 种农杆菌按照 1:1:1:1 的比例进行混合, 并将其放置在 25 °C 培养箱中静置 4~6 h; 使用注射器针头将上述混合的重新悬浮的农杆菌渗透到植株叶片的远轴表面。

## 1.5 DNA 提取和突变检测

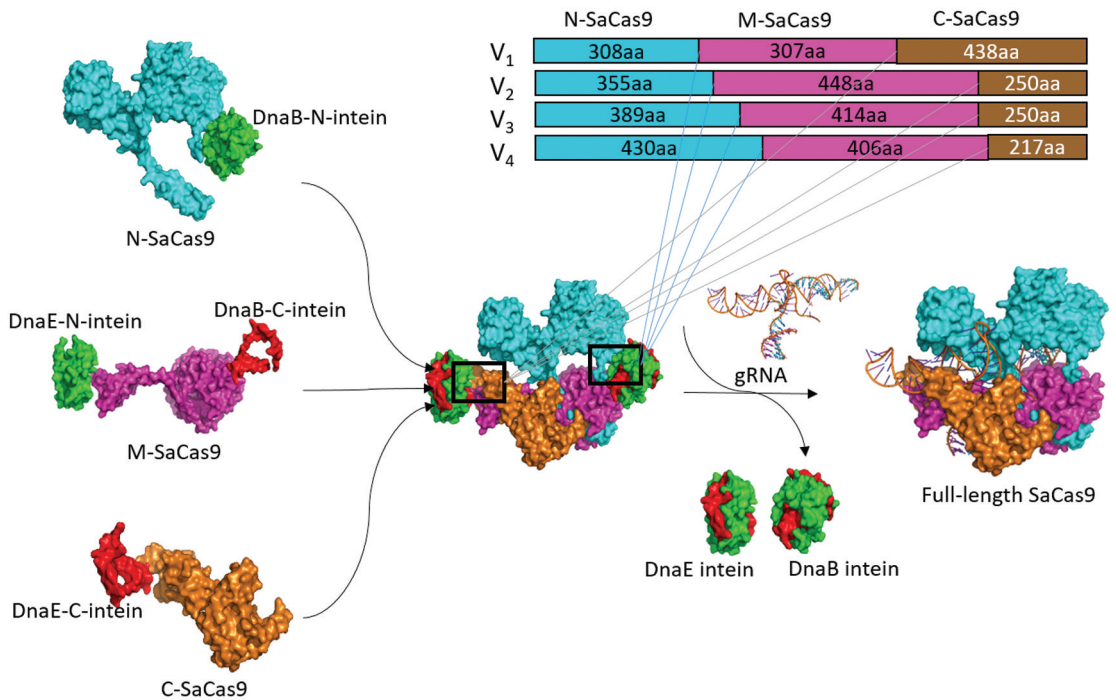
将农杆菌注射到烟草叶片 15 d 后, 收集新长出的叶片以及注射的叶片, 采用 EasyPure Plant Genomic DNA Kit 提取烟草叶片的 DNA, 并以此为模板, 设计引物进行 PCR 扩增, 采用 PEASY-T5 进行 TA 克隆, 最后在华大基因公司进行 Sanger 测序。通过序列分析, 以判定 DNA 的突变形式和突变效率。

# 2 结果与分析

## 2.1 内含肽介导的撕裂 SaCas9 系统的设计

当植物病毒载体运送外源 DNA 时, 外源 DNA 的大小和蛋白表达的稳定性呈现出负相关<sup>[23]</sup>。SaCas9 基因的大小是 3.1 kb, 我们将 SaCas9 的编码序列分成 3 部分以适应马铃薯病毒 X 载体 (PGR107) 的运载能力。内含肽介导蛋白表达的方法被应用于体内重新产生全长的 SaCas9 蛋白。基于 SaCas9 蛋白的晶体结构

鉴定了 7 个可能的潜在切割位点<sup>[24]</sup>, 从而形成了 4 个 N 端形式, 称为  $N^{1-308}$ ,  $N^{1-355}$ ,  $N^{1-389}$  和  $N^{1-430}$ , 4 个中间体形式, 称为  $M^{309-615}$ ,  $M^{356-803}$ ,  $M^{390-803}$  和  $M^{431-836}$ , 3 个 C 端形式, 称为  $C^{616-1053}$ ,  $C^{804-1053}$  和  $C^{837-1053}$ . 内含肽介导的撕裂 SaCas9 是由 N 端、M 端和 C 端的 SaCas9, 经由内含肽 DnaB 或 DnaE 连接而来(图 1). 为了确保内含肽介导的撕裂 SaCas9 具有核酸酶的活性, 将 SaCas9 设计了 4 种形式(V1, V2, V3 和 V4). V1 采用 SaCas9<sup>1-308</sup>, SaCas9<sup>309-615</sup> 和 SaCas9<sup>616-1053</sup> 作为撕裂 Cas9, 形成的 3 种融合结构称为 V1-N-SaCas9, V1-M-SaCas9 和 V1-C-SaCas9; V2 采用 SaCas9<sup>1-355}</sup>, SaCas9<sup>356-803}</sup> 和 SaCas9<sup>804-1053}</sup> 作为撕裂 Cas9, 形成的 3 种融合结构称为 V2-N-SaCas9, V2-M-SaCas9 和 V2-C-SaCas9; V3 采用 SaCas9<sup>1-389}</sup>, SaCas9<sup>390-803}</sup> 和 SaCas9<sup>804-1053}</sup> 作为撕裂 Cas9, 形成的 3 种融合结构称为 V3-N-SaCas9, V3-M-SaCas9 和 V3-C-SaCas9; V4 采用 SaCas9<sup>1-430}</sup>, SaCas9<sup>431-836}</sup> 和 SaCas9<sup>837-1053}</sup> 作为撕裂 Cas9, 形成的 3 种融合结构称为 V4-N-SaCas9, V4-M-SaCas9 和 V4-C-SaCas9.



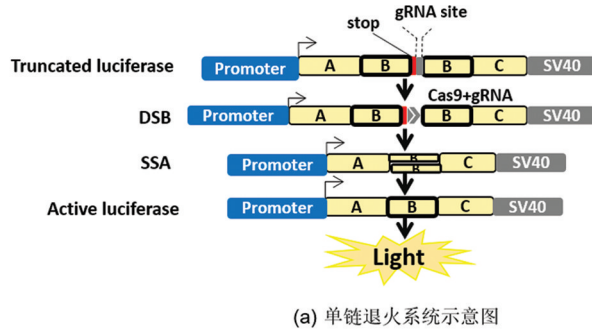
基于撕裂内含肽重建的属性, 撕裂内含肽的一部分将其自身分成两种形式(N-intein 和 C-intein), 并与 SaCas9 的 N 端、中间部分、C 端相连, 最终形成有活性的全长 SaCas9 蛋白. 撕裂 SaCas9 共有 4 种形式: V1, V2, V3, V4. 蓝色表示 SaCas9 的 N 端序列, 紫色表示 SaCas9 的中间部分序列, 土黄色表示 SaCas9 的 C 端序列; 绿色表示内含肽 DnaB 和 DnaE 的 N 端, 红色表示内含肽 DnaB 和 DnaE 的 C 端.

图 1 内含肽介导的撕裂 SaCas9 重构

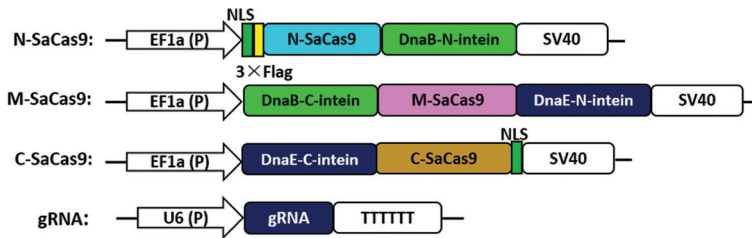
## 2.2 内含肽介导的撕裂 SaCas9 在 SSA 中有活性

为了高效测试内含肽介导的撕裂 SaCas9 是否具有活性, 我们构建了单链退火系统(SSA), 将荧光素酶基因分成 3 个部分, 包括 A, B 和 C 区域(图 2). 将终止子和 gRNA 靶位点放于 2 个 B 区域之间. 如果添加的 Cas9 蛋白具有活性, Cas9 能将 gRNA 靶位点切割形成双链缺口, 基于 SSA 修复机制, 荧光素酶的 B 区域将被修复, 形成一个完整的荧光素酶基因, 因此荧光素酶的活性就能被检测到(图 2a). 在该实验中, 内含肽介导的撕裂 SaCas9 的 4 种形式(SaCas9-V1/V2/V3/V4)和 gRNA 在载体中分别被组装起来(图 2b). gRNA, EF1a-N/M/C-SaCas9 和 SSA 载体同时转染到 HEK293FT 哺乳动物细胞中, 48 h 后检测荧光素酶的活性. 结果表明在 4 种测试形式中, 有 2 种形式(V3 和 V4)的 LUC/RUC 的比例显著高于对照组(只有 SSA 和 pRL-TK 载体)(图 2c). 该结果表明了内含肽 DnaB 和 DnaE 能高效介导全长 Cas9 蛋白的形成. V1 和 V2 不能使 3 部分的 SaCas9 片段形成全长 SaCas9 的原因可能是第 306 号、315 号、或第 613 号氨基酸残

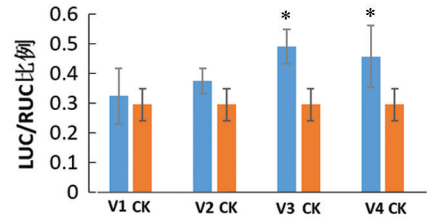
基起了十分重要的作用. 此外, SSA 活性暗示了重新形成的 Cas9 蛋白保留了基因编辑的活性, 基于此, 选择 V4 用于后续研究.



(a) 单链退火系统示意图



(b) 内含肽介导的撕裂 SaCas9 和 gRNA 质粒载体构建示意图



(c) 内含肽介导的撕裂 SaCas9 的 4 种形式

a 图中黄色的 A, B, C 分别表示荧光素酶基因的 3 部分. b 图中蓝色的 N-SaCas9、紫色的 M-SaCas9、土黄色 C-SaCas9 分别表示 SaCas9 的 N 端、中间部分和 C 端的序列, 并均由 EF1a 启动子启动; 绿色的 DnaB-N-intein, DnaB-C-intein 分别表示内含肽 DnaB 的 N 端和 C 端序列; 深蓝色的 DnaE-N-intein, DnaE-C-intein 分别表示内含肽 DnaE 的 N 端和 C 端序列; SV40 为终止子. c 图中 CK 表示对照组, V1, V2, V3, V4 分别是撕裂 SaCas9 的 4 种形式.

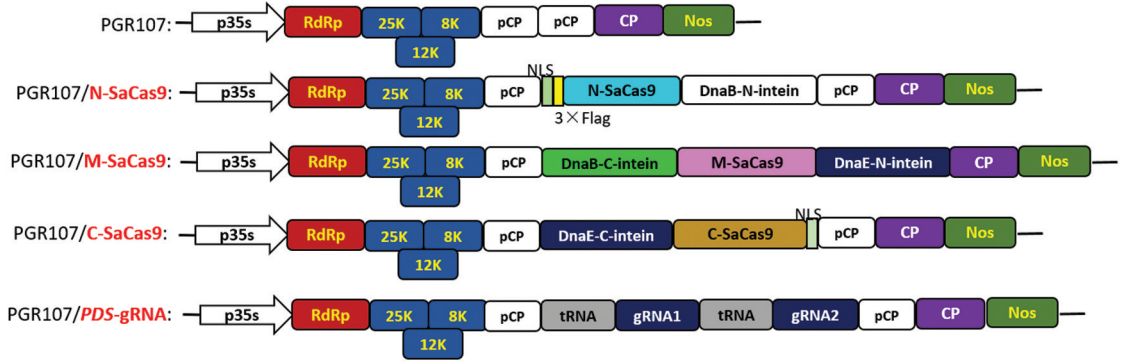
图 2 撕裂 SaCas9 在 HEK293FT 细胞系中的活性检测

### 2.3 内含肽介导的撕裂 SaCas9 能通过马铃薯病毒 X 递送到烟草中有效靶向 PDS 基因

为了进一步检测内含肽介导的撕裂 SaCas9 是否能在植物中有效引起突变, 构建了 V4 形式的撕裂 SaCas9 到 PGR107 载体中, CP 启动子控制了撕裂 SaCas9 的表达, gRNA 也在 CP 启动子中表达. 应用 tRNA 系统构建了 2 个 gRNA 靶向 PDS 基因(图 3a). 将 4 种含有 PGR107-V4-N-SaCas9, PGR107-V4-M-SaCas9, PGR107-V4-C-SaCas9 和 PGR107-gRNA-T4S 质粒的农杆菌侵染处于 4~6 叶期的烟草叶片中, 15 d 后, 在烟草叶片上出现了白化的表型(图 3b), 而在对照组(只有 PGR107 载体)中, 没有出现白化的表型. 为了探究白化表型是否是由于植物病毒载体表达的撕裂 SaCas9 引起的, 收集了 5 个植株新发育的叶片, 进行 DNA 提取、PCR 扩增、TA 克隆和 Sanger 测序, 序列分析表明在 2 号植株中在 gRNA 位点 1 上有单碱基的删除和替换, 在第 4 号和第 5 号植株上出现了单碱基的删除(图 3c). 以上结果暗示由于移码突变, PDS 基因不能被翻译成正确的蛋白, 从而使烟草叶片变为白色, 而经由内含肽介导的撕裂 SaCas9 引起 PDS 突变的频率较低, 在 1.25%~5.00% 之间(表 1). 该结果可能是因为 SaCas9 被分成了 3 个部分, 而仅有少部分形成了全长 SaCas9 分子.

表 1 在烟草叶片中检测 PDS 突变

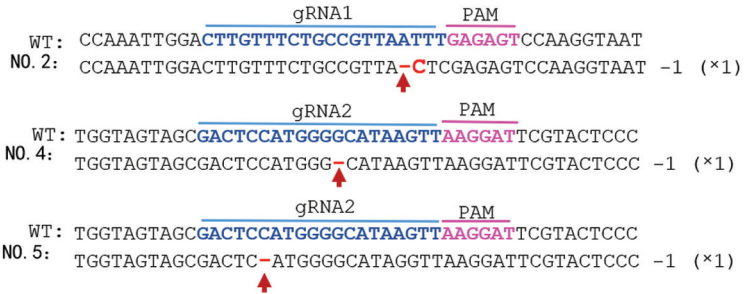
烟草植株编号	阳性克隆子数目/总克隆子数目	突变率/%
1	0/46	0.00
2	1/80	1.25
3	0/28	0.00
4	1/20	5.00
5	1/39	2.56



(a) 内含肽介导的撕裂 SaCas9 和 gRNA 质粒载体构建示意图



(b) 瞬时转染农杆菌后的叶片



(c) 烟草叶片 PDS 基因的靶位点突变

a 图中 PGR107 表示马铃薯病毒载体 X; PGR107/N-SaCas9, PGR107/M-SaCas9, PGR107/C-SaCas9 表示将 SaCas9 的 N 端、中间部分和 C 端的序列分别构建到 PGR107 载体上; DnaB-N-intein, DnaB-C-intein 分别表示内含肽 DnaB 的 N 端和 C 端序列; DnaE-N-intein, DnaE-C-intein 分别表示内含肽 DnaE 的 N 端和 C 端序列。b 图中 PGR107-scaffold 表示注射含有质粒 PGR107 农杆菌后的新叶片; Split-SaCas9-V4 + gRNA 表示注射有混合质粒 Split-SaCas9-V4 + gRNA 农杆菌后的新叶片。c 图中红色短线表示碱基删除; 红色字母表示碱基替换; NO. # 表示第几号植株。

图 3 撕裂 SaCas9 在烟草中对 PDS 进行编辑

### 3 结论与讨论

在本研究中,我们构建了内含肽介导的撕裂 SaCas9 载体。采用 SSA 系统,在一种哺乳动物细胞系中证实了内含肽介导的撕裂 SaCas9 活性。采用瞬时侵染的方法,发现马铃薯病毒 X 载体(PGR107)能运载撕裂 SaCas9, SaCas9 能在新长出的叶片中表达,并能实现靶向编辑烟草的内源基因。

目前已经开发了两种非转基因的基因组编辑策略,以推广和应用基因组编辑方法产生新的植物:1) 从大肠杆菌中纯化到核酸酶(Cas9, Cpf1)和 gRNA 在体外进行组装,将该复合物通过聚乙二醇或是基因枪递送到原生质中,之后由原生质体再生形成非转基因的小苗<sup>[11-12]</sup>; 2) 通过植物病毒载体瞬时表达锌指核酸酶<sup>[16]</sup>。以上两种方法与传统 RNA 引导的核酸内切酶(RGEN)相比,能得到非转基因植株,但外源 DNA 不会插入到宿主基因组中。由于第 1 种方法效率高、时间少、脱靶率低,已经成功应用到一些双子叶(拟南芥、烟草、莴苣、马铃薯和牵牛花)和单子叶植物(水稻、玉米和小麦)中<sup>[10-12, 23, 25-26]</sup>。在 RNA 引导的核酸内切酶复合物方法中用到的原生质体分离、转染以及再生步骤,则会阻止该方法在其他植物中的应用和延伸。由于便携的操作和不需要原生质体, Marton 等<sup>[16]</sup>采用 TRV 成功在烟草和牵牛花中表达了锌指核酸酶,并获得了可以遗传的基因编辑植株。

马铃薯病毒 X 是一种单链病毒,不能被整合到宿主基因组 DNA 中<sup>[23]</sup>。此外,马铃薯病毒 X 在多个组

织中可以高量表达, 且能系统感染, 所以该病毒被应用于基因功能研究以降低基因的表达量或是在植物中表达具有商业价值的蛋白<sup>[15, 22]</sup>. 在本研究中, 采用马铃薯病毒 X 表达 SaCas9 蛋白, 可获得非转基因的编辑烟草植株.

本研究采用内含肽介导的撕裂 SaCas9 蛋白成功在烟草叶片中编辑了 *PDS* 基因, 然而该系统的编辑效率不是很高, 主要的原因可能是 SaCas9 被分成了 3 个部分, 而 3 个部分比 2 个部分组装形成长 SaCas9 的概率低, 因此探寻更小的 Cas9<sup>[27]</sup>或是运载能力更大的载体, 或许能提高撕裂 SaCas9 的效率. 如果该系统的效率能得到提升, 那么其可能在植物基因功能研究上成为一个简单且有效的基因编辑方法.

## 参考文献:

- [1] GAJ T, GERSBACH C A, BARBAS C. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-Based Methods for Genome Engineering [J]. *Trends in Biotechnology*, 2013, 31(7): 397-405.
- [2] WALTZ E. Gene-edited CRISPR Mushroom Escapes US Regulation [J]. *Nature*, 2016, 532(7599): 293.
- [3] LU X J, XUE H Y, KE Z P, et al. CRISPR-Cas9: a New and Promising Player in Gene Therapy [J]. *Journal of Medical Genetics*, 2015, 52(5): 289-296.
- [4] JIANG W Z, ZHOU H B, BI H H, et al. Demonstration of CRISPR/Cas9/sgRNA-mediated Targeted Gene Modification in Arabidopsis, Tobacco, Sorghum and Rice [J]. *Nucleic Acids Research*, 2013, 41(20): e188.
- [5] JACOBS T B, LAFAYETTE P R, SCHMITZ R J, et al. Targeted Genome Modifications in Soybean with CRISPR/Cas9 [J]. *BMC Biotechnology*, 2015, 15: 16.
- [6] FENG C, YUAN J, WANG R, et al. Efficient Targeted Genome Modification in Maize Using CRISPR/Cas9 System [J]. *Journal of Genetics and Genomics*, 2016, 43(1): 37-43.
- [7] BELHAJ K, CHAPARRO-GARCIA A, KAMOUN S, et al. Editing Plant Genomes with CRISPR/Cas9 [J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2015, 32: 76-84.
- [8] LUO S, LI J, STODDARD T J, et al. Non-transgenic Plant Genome Editing Using Purified Sequence-specific Nucleases [J]. *Molecular Plant*, 2015, 8(9): 1425-1427.
- [9] JONES H D. Regulatory Uncertainty over Genome Editing [J]. *Nature Plants*, 2015(1): 14011.
- [10] WOO J W, KIM J, KWON S I, et al. DNA-free Genome Editing in Plants with Preassembled CRISPR-Cas9 Ribonucleoproteins [J]. *Nature Biotechnology*, 2015, 33(11): 1162-1164.
- [11] SVITASHEV S, SCHWARTZ C, LENDERTS B, et al. Genome Editing in Maize Directed by CRISPR-Cas9 Ribonucleoprotein Complexes [J]. *Nature Communications*, 2016(7): 13274.
- [12] LIANG Z, CHEN K L, LI T D, et al. Efficient DNA-free Genome Editing of Bread Wheat Using CRISPR/Cas9 Ribonucleoprotein Complexes [J]. *Nature Communications*, 2017(8): 14261.
- [13] MARILLONNET S, THOERINGER C, KANDZIA R, et al. Systemic *Agrobacterium Tumefaciens*-mediated Transfection of Viral Replicons for Efficient Transient Expression in Plants [J]. *Nature Biotechnology*, 2005, 23(6): 718-723.
- [14] GLEBA Y, KLIMYUK V, MARILLONNET S. Viral Vectors for the Expression of Proteins in Plants [J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2007, 18(2): 134-141.
- [15] ROSS A F. Systemic Acquired Resistance Induced by Localized Virus Infections in Plants [J]. *Virology*, 1961, 14(3): 340-358.
- [16] MARTON I, ZUKER A, SHKLARMAN E, et al. Nontransgenic Genome Modification in Plant Cells [J]. *Plant Physiology*, 2010, 154(3): 1079-1087.

- [17] TRUONG D J J, KÜHNER K, KÜHN R, et al. Development of an Intein-mediated Split-Cas9 System for Gene Therapy [J]. *Nucleic Acids Research*, 2015, 43(13): 6450-6458.
- [18] NUÑEZ J K, HARRINGTON L B, DOUDNA J A. Chemical and Biophysical Modulation of Cas9 for Tunable Genome Engineering [J]. *ACS Chemical Biology*, 2016, 11(3): 681-688.
- [19] SCHMELAS C, GRIMM D. Split Cas9, not Hairs-advancing the Therapeutic Index of CRISPR Technology [J]. *Biotechnology Journal*, 2018, 13(9): 1700432.
- [20] MORETTI A, FONTEYNE L, GIESERT F, et al. Somatic Gene Editing Ameliorates Skeletal and Cardiac Muscle Failure in Pig and Human Models of Duchenne Muscular Dystrophy [J]. *Nature Medicine*, 2020, 26(2): 207-214.
- [21] HUANG P, XIAO A, ZHOU M G, et al. Heritable Gene Targeting in Zebrafish Using Customized TALENs [J]. *Nature Biotechnology*, 2011, 29(8): 699-700.
- [22] PANDEY S K, NOOKARAJU A, FUJINO T, et al. Virus-induced Gene Silencing (VIGS)-mediated Functional Characterization of Two Genes Involved in Lignocellulosic Secondary Cell Wall Formation [J]. *Plant Cell Reports*, 2016, 35(11): 2353-2367.
- [23] AVESANI L, MARCONI G, MORANDINI F, et al. Stability of Potato Virus X Expression Vectors is Related to Insert Size: Implications for Replication Models and Risk Assessment [J]. *Transgenic Research*, 2007, 16(5): 587-597.
- [24] NISHIMASU H, CONG L, YAN W X, et al. Crystal Structure of Staphylococcus Aureus Cas9 [J]. *Cell*, 2015, 162(5): 1113-1126.
- [25] XIE K B, MINKENBERG B, YANG Y N. Boosting CRISPR/Cas9 Multiplex Editing Capability with the Endogenous TRNA-processing System [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2015, 112(11): 3570-3575.
- [26] ANDERSSON M, TURESSON H, OLSSON N, et al. Genome Editing in Potato via CRISPR-Cas9 Ribonucleoprotein Delivery [J]. *Physiologia Plantarum*, 2018, 164(4): 378-384.
- [27] PAUSCH P, AL-SHAYEB B, BISOM-RAPP E, et al. CRISPR-Cas $\Phi$  from Huge Phages is a Hypercompact Genome Editor [J]. *Science*, 2020, 369(6501): 333-337.

责任编辑 周仁惠