

靶向基因编辑技术在秀丽隐杆线虫中的应用

陈向阳, 冯雪竹 and 光寿红

Citation: 中国科学: 生命科学 ; doi: 10.1360/N052017-00250

View online: <http://engine.scichina.com/doi/10.1360/N052017-00250>

Published by the [《中国科学》杂志社](#)

Articles you may be interested in

[基于CRISPR/Cas9基因编辑技术的人类遗传疾病基因治疗相关研究进展](#)

中国科学: 生命科学 **47**, 1130 (2017);

[CRISPR/Cas9技术在生物医学领域的非病毒及病毒载体](#)

中国科学: 生命科学 **47**, 1141 (2017);

[基因组编辑技术及其在昆虫研究中的应用](#)

中国科学: 生命科学 **43**, 1105 (2013);

[植物基因组编辑试剂材料的导入及转化系统的研究现状及前景](#)

中国科学: 生命科学 **47**, 1159 (2017);

[腺相关病毒载体的靶向策略探讨](#)

科学通报 **52**, 1107 (2007);



靶向基因编辑技术在秀丽隐杆线虫中的应用

陈向阳*, 冯雪竹, 光寿红*

中国科学技术大学生命科学学院, 中国科学院分子细胞科学卓越创新中心, 合肥 230027

* 联系人, E-mail: xychen91@ustc.edu.cn; sguang@ustc.edu.cn

收稿日期: 2017-10-27; 接受日期: 2017-12-16; 网络版发表日期: 2018-03-08

国家重大科学研究计划(批准号: 2017YFA0102903)、国家自然科学基金(批准号: 81501329, 31371323, 31671346, 91640110)和安徽省自然科学基金(批准号: 1608085MC50)资助

摘要 遗传突变体和转基因是生物学研究的基础, 是揭示生物体内各个基因相互作用的生物学研究对象. 秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*)是遗传学研究的模式生物, 如何有效地诱导特定基因发生突变和构建转基因线虫品系是秀丽线虫遗传学研究的两个重要方面. 近些年来, 靶向基因编辑技术迅速发展, 使得科研人员可以在秀丽线虫中快速而高效地编辑特定基因. 本文就线虫中靶向基因编辑的方法, 特别是CRISPR/Cas9技术, 以及目的线虫品系的筛选进行了综述.

关键词 秀丽隐杆线虫, 靶向基因编辑, CRISPR/Cas9技术

秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*)是一种可以在土壤中独立生存的非寄生性线虫, 主要以土壤中的大肠杆菌为食, 两侧对称, 体长约1 mm, 全身透明, 平均寿命可以达到二十多天^[1,2]. 有雌雄同体和雄性两种性别. 一条雌雄同体秀丽隐杆线虫自体受精可以产生约300个后代; 与雄性个体交配后的雌雄同体线虫最多可以产生约1000个后代. 秀丽隐杆线虫的繁殖周期大约是3天, 极大地节约了遗传学实验所需要的时间; 约300个个体的后代繁殖率为遗传筛选提供了大量的可能发生突变的线虫个体. 繁殖迅速和大量后代的遗传学特性使得秀丽隐杆线虫被广泛应用于生命科学研究中.

秀丽隐杆线虫是第一个被完成全基因组测序的多细胞真核生物, 其基因组由大约97 M个碱基对组成,

编码了约两万多个蛋白编码基因, 超过40%的线虫基因在其他物种中有同源基因^[3]. 研究人员通过遗传学突变手段构建了大量的线虫突变体和转基因线虫品系. 这些品系可以从美国线虫遗传学中心(Caenorhabditis Genetics Center, CGC)和日本国家生物资源项目(National BioResource Project, NBRP)数据库中获取^[4,5].

线虫遗传学家使用多种化学诱变剂和物理诱变剂来诱导基因组发生随机突变, 正向遗传筛选参与特定生物学通路的蛋白质因子或者非编码RNA. 常用的化学试剂包括甲基磺酸乙酯(ethyl methanesulphonate, EMS)和三甲基补骨脂素(trimethylpsoralen, TMP)^[6,7]. 这些化学诱变剂大多诱导DNA序列发生点突变. 常用的物理诱变剂包括短波长紫外线(ultraviolet, UV)和高

引用格式: 陈向阳, 冯雪竹, 光寿红. 靶向基因编辑技术在秀丽隐杆线虫中的应用. 中国科学: 生命科学, 2018, 48

Chen X Y, Feng X Z, Guang S H. Application of targeted genome-editing technologies in *Caenorhabditis elegans* (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2018, 48, doi: 10.1360/N052017-00250

子射线(ionizing radiation, IR), 其多用于诱导DNA大片段的缺失以及染色体水平上的变异^[7]。秀丽线虫中还可以使用转座子诱变的方法进行遗传学筛选和突变基因鉴定, 包括线虫内源性*Tc3*转座子和来源于果蝇(*Drosophila melanogaster*)的*Mos1*转座子^[8]。最近, 研究人员设计了一种miniSOG系统来诱导基因组发生随机突变。miniSOG是一个由106个氨基酸残基组成的荧光蛋白, 其在蓝光照射下可以产生单态氧自由基。将miniSOG与组蛋白融合在一起, 表达于线虫生殖腺中, 在蓝光照射下, miniSOG产生的氧自由基可以诱导线虫DNA发生随机突变^[9]。

外源的DNA片段可以通过多种手段随机整合进线虫的基因组中。将目的质粒混合物显微注射进线虫的生殖腺中后, 这些质粒DNA之间可以发生分子间的重组和连接, 继而形成一个多拷贝的额外染色体。这个大的额外染色体可以在线虫细胞中复制, 并遗传至部分后代^[10]。其后可以使用UV照射的方式将额外染色体整合进线虫基因组的随机位点上。同时, 微粒轰击技术(microparticle bombardment)也可以将特定外源DNA片段随机整合进线虫的基因组中, 所获得的多是低拷贝数的转基因线虫^[11]。该方法适用于构建生殖腺表达的转基因线虫品系。这是因为在线虫的生殖腺中, 多拷贝数的转基因的表达容易被RNA干扰通路所抑制。最近, 研究人员设计了一种miniMos方法, 用以高效率整合目的DNA片段^[12]。miniMos是优化后的*Mos1*转座子, 通过将目的DNA片段置于miniMos转座子中, 在外源*Mos1*转座酶的帮助下, 可以将携带有目的DNA序列的转座子随机整合进线虫的基因组中。

上述诱导突变的方式皆是无选择性的随机突变, 诱变处理后会在整个基因组中引入随机突变。这些方法常用于筛选未知基因, 却无法靶向诱导特定基因发生序列改变。研究人员优化并使用了一系列可以靶向操作特定基因的实验技术, 包括FLP/FRT和Cre/*LoxP*重组技术、*Mos1*转座子技术、ZFNs技术、TALENs技术和CRISPR/Cas9技术。这些技术使得研究者们可以快速而有效地靶向编辑目的基因, 极大地促进了秀丽线虫的研究。

1 FLP/FRT和Cre/*LoxP*靶向序列重组技术

FLP/FRT和Cre/*LoxP*重组系统被广泛应用于诱导

染色体重排和条件性调控基因表达^[13-15]。靶向特定DNA序列的重组酶FLP和Cre分别结合FRT (flippase recognition target)和*LoxP* (locus of X-over P1)序列, 然后催化两个FRT序列之间和两个*LoxP*序列之间的重组。这些重组酶介导的编辑方法已成功应用于诱导DNA序列缺失或倒置, 以控制线虫基因的表达^[15]。如果重复序列方向相同, 将导致序列之间的DNA片段发生切除; 反向重复则会导致两个重复元件之间的DNA序列发生反转。可以通过反转原来颠倒的启动子或编码序列, 或者消除含有转录终止信号的DNA片段来激活特定基因的表达; 通过去除启动子或编码区序列使得基因失活。组织特异性启动子或者热激启动子的使用可以条件性驱动重组酶的表达, 继而实现组织和发育时间特异性的基因操作。另外, FLP/FRT和Cre/*LoxP*技术与单拷贝转基因技术共用可以去除阳性选择标记基因, 从而简化转基因线虫的构建步骤^[16-18]。

2 基于*Mos1*转座子系统的突变体构建

*Mos1*转座子是mariner/*Tc1*转座子家族的一员, 其在果蝇属*Drosophila mauritiana*中被发现。*Mos1*转座酶可以催化该转座子在宿主基因组中的移入和移出。通过外源提供*Mos1*转座酶, *Mos1*转座子可以随机插入秀丽线虫的基因组中^[19,20]。该技术在秀丽线虫中首先被用于进行正向遗传学筛选, 当该转座子插入基因组中时, 会随机破坏某些基因序列, 产生可遗传突变。通过优化的环形PCR测序方法, 可以很方便地将*Mos1*插入的位点鉴定出来, 从而找出发生突变的性状相关基因。

研究人员对该系统进行了一系列的优化, 并且将*Mos1*序列随机插入线虫基因组中, 筛选出一系列*Mos1*插入型线虫突变品系。基于筛选到的*Mos1*转座子线虫文库, 再进行*Mos1*序列切除操作, 可以在特定DNA位点上形成双链断裂。如果在DNA修复的同时, 给予有着特定序列突变的外源DNA双链片段作为修复模板, 那么在同源重组修复后, 该特定的序列变异可以被引入基因组中, 包括点突变和DNA大片段缺失^[21]。这个方法被称为MosTIC (*Mos1* excision-induced transgene-instructed gene conversion)。现今, 常用的促使*Mos1*转座酶在线虫生殖腺中表达的方法是将表达该酶的质粒显微注射进线虫的生殖腺中, 一般使用*hsp-16.48*, *glh-2*或者*eft-3*基因的启动子^[22,23]。但是, 这套基因靶向编辑系统需要预先筛选到特定基因的*Mos1*序列插入型

线虫突变体。尽管线虫NemaGENETAG组织诱导筛选出了上万个*MosI*插入的线虫品系,但是仍旧有大量的基因无法通过该手段进行编辑^[24,25]。

现今,*MosI*系统多用于荧光蛋白标记的转基因线虫品系的构建^[26]。研究人员选取了一系列有着转座子插入的线虫,其分别位于线虫的6条染色体上。最常用的是*MosI*转座子插入于二号染色体的EG4322线虫品系,其相应的插入突变被命名为*utTi5605*。将表达目的荧光蛋白的DNA序列置于外源修复模板之间,在*MosI*转座酶切割DNA产生双链断裂后,通过同源重组修复,目的片段可以精确地插入到该位点中,进而构建出单拷贝转基因线虫品系。为了方便筛选出目的转基因线虫品系,该系统选取了内源性*unc-119*基因发生突变的线虫突变体。该突变导致线虫呈现出运动不协调表型,并且使得线虫在食物缺失时不能进入dauer状态。相应的,在目标插入序列上,增加了一个来源于*C. brenneri*线虫品系的野生型的*Cbr-unc-119*序列,用Unc恢复表型进行转基因筛选。在显微注射时,会同时使用一系列在特定组织中表达红色荧光蛋白的质粒,用做负筛选的标记性状。进一步的,研究人员使用了可以在热激条件下表达毒性蛋白的质粒,用于去除携带有额外染色体的非目的转基因线虫品系。该单拷贝转基因线虫构建方法被称为*MosI*介导的单拷贝转基因构建技术(*MosI*-mediated single-copy insertion, MosSCI),方便了研究人员对表达于线虫生殖腺的基因的研究。因为在生殖腺中,多拷贝转基因的表达是被RNA干扰通路所抑制的。

*MosI*转座子技术的使用建立于*MosI*转座子插入型线虫品系,这使得很多基因无法被编辑。同时,利用该技术构建转基因线虫的周期较长,约为半个月时间。但是,通过使用*eft-3*等强启动子来促使*MosI*转座酶的表达,以及多种正负筛选表型质粒的使用,*MosI*转座子技术的实验流程得以简化,效率也得到了很大的提高^[27]。而且,相比于UV照射随机引入基因组中的多拷贝转基因,*MosI*转座子技术所构建的转基因是单拷贝的,其不易被线虫体内RNA干扰系统所沉默,因而可以用于构建表达于秀丽线虫生殖腺中的转基因。

3 ZFNs技术和TALENs技术

锌指核糖核酸酶(zinc-finger nucleases, ZFNs),其

整个蛋白由两个结构域所组成:DNA识别结合结构域和核糖核酸内切酶结构域。其中,DNA识别结合结构域是由串联排列的Cys2-His2锌指蛋白所构成,可以靶向结合一个特定的三联体碱基序列^[28]。锌指蛋白广泛存在于高等生物和低等生物中,在生物体中可以调控基因转录,在细胞分化、个体发育中行使重要功能。锌指蛋白是四面体结构,由多个Cys和His氨基酸残基所组成,锌离子螯合在蛋白中,可以促进锌指蛋白的折叠和维持蛋白结构的稳定。其蛋白二级结构是 α 螺旋- β 折叠- β 折叠。其中, α 螺旋承载了识别特定DNA碱基序列的功能。不同组合的锌指蛋白可以结合不同的DNA序列,从而可以设计出特定的锌指蛋白DNA识别结构域组合以识别结合不同的DNA序列。

ZFNs的核糖核酸内切酶结构域来源于非特异性的内切酶Fok I。Fok I酶是发现于细菌*Flavobacterium okeanoikoites*中的一种二类限制性核酸内切酶,其由N端的DNA结合结构域和C端的非特异性DNA切割结构域所组成^[28]。在未结合DNA时,N端结构域可以通过蛋白构象抑制C端内切酶活性。当其结合靶向DNA双螺旋后,C端结构域得以释放,并以二聚体形式产生内切酶活性,分别切割DNA双链中的一条链,形成DNA双链断裂。

将不同序列组合的锌指蛋白和Fok I内切酶活性结构域融合在一起可以靶向切割特定的DNA序列。常用的ZFNs系统中的一个锌指组合多由3个锌指蛋白组成,可以识别9 bp的DNA序列,一对锌指蛋白组合则可以识别18 bp的DNA序列。为了进一步提高DNA靶向的特异性,减少脱靶事件的发生,研究人员使用了更多串联排布的锌指蛋白组合以识别更长的特异性DNA序列。

将锌指蛋白与具有转录调控活性的蛋白结构域连接起来,可形成转录调控复合物,靶向调控特定基因的转录水平^[29]。锌指蛋白与转录激活因子融合后,可以靶向激活基因的表达;反之,与抑制性因子连接后,可以抑制基因的表达。

ZFNs技术已经被成功应用于靶向编辑线虫基因。Carroll研究组^[30]使用体细胞ZFNs技术,高效地编辑了位于额外染色体上和基因组内的基因。Meyer研究组^[31]成功在生殖腺中使用了ZFNs技术,诱导了一系列可遗传的突变,如绿色荧光蛋白基因和内源性基因*ben-1*和*rex-1*。

转录激活因子样效应物核酸酶(transcription activator-like (TAL) effector nucleases, TALENs), 同ZFNs一样, TALENs也是一种可以靶向切割特定DNA序列的人工合成酶。TALENs的DNA识别结构域为其转录激活结构域, 即TAL结构域^[32]。与ZFNs相同, 行使DNA切割活性的是Fok I 核酸内切酶的C端结构域。同样地, 切割DNA时也需要两个TALENs元件的二聚体化。

TAL蛋白是黄单胞杆菌(*Xanthomonas bacteria*)在侵入植物时所合成分泌的一种蛋白质^[33]。在宿主植物细胞中, 其可以结合特异的启动子序列来调控相应基因的表达, 从而促进细菌侵染宿主植物细胞, 提高宿主对该细菌的易感性。TAL蛋白中的转录激活结构域由一组高度保守重复的34个氨基酸序列所组成, 该序列中相应的氨基酸残基为: LTPEQVVAIASNIGGK-QALETVQALLPVLCAHG。每一个重复元件只在第12位和第13位的氨基酸残基上有所不同^[34]。这两个不同的氨基酸残基被命名为重复可变双残基(repeat variable diresidues, RVDs)。不同的RVDs可以结合单独的碱基, 残基NN, NI, HD和NG可以分别识别鸟嘌呤脱氧核苷酸、腺嘌呤脱氧核苷酸、胞嘧啶脱氧核苷酸和胸腺嘧啶脱氧核苷酸。

研究人员将TAL蛋白与Fok I 的非特异性内切酶结构域融合在一起, 构建了靶向基因编辑的TALENs系统。通过使用这4种RVDs的不同组合, 可以构建靶向特定DNA序列的TALENs酶。科研工作者一般按照9 bp碱基的识别长度来设计TALENs。同ZFNs一样, TALENs行使切割功能时也要以二聚体形式, 这样使得其可以有18 bp长度的DNA序列的特异性。当然, 也可以使用靶向更长序列的TALENs, 以提高DNA编辑的序列专一性, 减少非目的序列编辑事件的发生。

TALENs靶向基因编辑系统已经被成功应用于秀丽隐杆线虫中。Meyer研究组^[31]首先将TALENs系统引入到线虫中, 构建了针对于线虫基因表达系统的质粒体系, 并且使用该技术成功地编辑了一系列内源性基因, 包括*ben-1*, *rex-1*和*unc-119*, 获得了相应的可遗传线虫突变体。不仅是诱导靶向基因的随机突变, TALENs还可以帮助实现精准基因编辑。Meyer研究组用该技术切割特定DNA序列的同时, 给予外源人工合成的单链核糖核酸片段(ssOligos), 其可以作为DNA双链断裂后的修复模板, 将ssOligos里的序列引入基因组

中。同时, 欧光朔研究组^[35]发展了条件性体细胞TALENs的技术手段, 通过使用特定组织启动子和热激启动子来表达TALENs, 可以在线虫特定组织或特定发育阶段中编辑目的基因。该研究组在线虫中成功编辑了*dpy-5*, *lon-2*, *mab-5*, *gfp*和*cor-1*等基因。

ZFNs技术和TALENs技术中DNA序列的靶向识别与结合依赖于特定的DNA碱基结合元件组合, 这使得设计和构建序列特异性核酸酶的步骤非常繁琐, 时间较长, 约为5~7天时间。同时, 因为靶向编辑时需要内切酶Fok I 的二聚体化, 所以这两种基因编辑技术的效率较低, 并且在同一组实验中难以对多个靶点进行同时编辑。这些缺点使得这两类技术的广泛使用受到了限制。

4 CRISPR/Cas9靶向基因编辑技术

近些年来, CRISPR RNA指导的Cas9核酸酶(CRISPR/Cas9)技术的发展极大地简化了靶向基因编辑的实验流程^[36]。规律成簇间隔短回文重复/CRISPR相关蛋白(clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated proteins, CRISPR/Cas), 是广泛存在于细菌和古细菌中的一种抵抗噬菌体的免疫系统^[37]。该系统有两个主要组成组分: Cas蛋白和CRISPR DNA序列元件。Cas蛋白作为催化核心行使整合DNA序列和加工crRNA (CRISPR RNA)的功能。CRISPR重复序列储存了相应的外源DNA信息, 并可以表达出crRNA。CRISPR由大量的DNA重复序列组成, 这些重复序列被可变的DNA间隔序列(spacers)分隔开。通常, 重复序列和间隔序列的长度为25~40个核苷酸, 也有少许更长序列。间隔序列大都来源于噬菌体的基因组, 其也被称为可移动遗传元件(mobile genetic elements, MGEs)。*cas*基因位于CRISPR基因簇内, 通常与CRISPR序列相邻。Cas蛋白经guide RNA导向, 可以靶向结合和切割特定DNA序列, 诱导DNA双链产生断裂。这些双链断裂经非同源重组修复后会引入缺失或者插入突变, 使得外源病毒DNA被破坏, 导致病毒基因发生移码改变, 从而抵抗病毒的侵染。

Cas9蛋白属于II型CRISPR系统, 其可以直接加工pre-crRNA, 并且结合crRNA和tracrRNA形成Cas9/crRNA/tracrRNA复合物。该复合物可以在不需要其他Cas蛋白辅助的情况下编辑DNA序列。研究人员设计

了将crRNA和tracrRNA表达于同一条链的单一导向RNA (sgRNA), 使得CRISPR/Cas9基因编辑技术的使用更为简易. 如图1所示, sgRNA序列5'端的20个碱基起着识别靶标DNA序列的作用; Cas9蛋白与sgRNA复合物可以靶向结合与sgRNA 5'端20个碱基序列互补的DNA序列, 随后Cas9蛋白行使DNA切割功能, 破坏PAM序列前第3个碱基和第4个碱基之间的磷酸二酯键, 产生平末端型DNA双链断裂. Cas9蛋白有两个结构域, RuvC结构域和HNH结构域. 前者切割与sgRNA间隔序列非互补的DNA链, 后者则切割与sgRNA间隔序列互补的DNA链.

在Cas9蛋白切割DNA双链的特定位置后, 断裂位点处会发生两种类型的修复. 其中之一为同源重组修复, 即断裂的DNA双链以细胞内同源染色体上的另一个DNA序列拷贝为模板进行修复, 成为与未切割前的序列相同的DNA序列. 另一种修复则是DNA非同源末端连接(non-homologous end joining, NHEJ)修复方式, 该种修复由LIG-4等酶所介导, 可以在断裂的位点处引入随机突变, 包括插入或者缺失少许碱基. 这些碱基变异将会改变蛋白质编码框, 或者在蛋白质特定位置上引入氨基酸突变, 以达到基因敲除或突变的目的. 同时, 如果在修复时引入外源DNA重组修复模板, 则可以将模板中的碱基序列差异原位引入到基因组中去. 该种编辑多用于构建荧光蛋白标记的转基因线虫品系, 或者进行靶向基因的点突变操作.

4.1 CRISPR/Cas9技术在秀丽隐杆线虫中的应用

CRISPR/Cas9技术已经成功应用于编辑秀丽隐杆

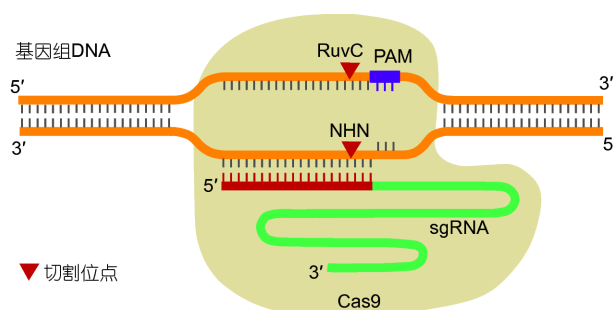


图1 CRISPR/Cas9靶向基因编辑模式图

Cas9蛋白与sgRNA形成的Cas9/sgRNA复合物可以结合与sgRNA 5'末端20 nt序列互补的DNA片段, 并切割PAM基序前第3个碱基和第4个碱基之间的磷酸二酯键, 形成DNA双链断裂. RuvC结构域和HNH结构域分别切割DNA双链中的一条链

线虫遗传基因, 诱导可遗传的突变和转基因线虫品系的构建^[34,38]. 研究人员设计并实现了一系列将Cas9蛋白和sgRNA表达在线虫生殖腺中的方式^[16,39-45]. 常用的方式是将表达Cas9蛋白和sgRNA的质粒显微注射进线虫的生殖腺中, 在*eft-3*启动子和*U6*启动子的驱动下, 在生殖腺中分别表达出Cas9蛋白和sgRNA, 经自发组装后在细胞核中结合和切割特定的DNA序列. 同时, 也可以将体外合成的sgRNA与表达Cas9蛋白的mRNA共注射入线虫的生殖腺中; 或者在体外合成sgRNA和纯化Cas9蛋白, 孵育后将Cas9/sgRNA复合物直接显微注射进线虫的生殖腺中. 以上3种表达Cas9蛋白和sgRNA的方式都可以有效地靶向编辑线虫的基因, 诱导线虫突变体的产生. 除了在生殖腺中实现线虫基因的编辑外, 将Cas9蛋白表达于特定的体细胞组织中, 可以诱导基因条件性敲除, 从而研究致死性基因在胚胎后发育的功能^[46-50]. 欧光朔研究组通过使用该策略, 研究了一系列致死性基因在线虫神经元迁移, 神经元轴突生长和神经纤毛建成等过程中所起的作用. 与体细胞TALENs技术相比, 体细胞CRISPR/Cas9技术更为高效, 而且操作更为便捷. 同时, 刘东研究组^[50]设计了一套CRISPR/Cas9基因编辑的喂食流程. 直接喂食*pie-1p::Cas9*转基因线虫品系表达sgRNA (由T7启动子在细菌中启动转录)的大肠杆菌, 可以在不进行显微注射操作的条件下进行基因敲除.

Cas9蛋白切割DNA后, 通过非同源重组修复, 可以在靶位点处引入随机突变. 除此之外, 通过提供外源DNA修复模板, 还可以对特定位置进行精准编辑^[51-53]. 秀丽隐杆线虫中, 常用的修复模板包括左右重组臂长度在300~2000 bp的质粒修复载体. 同时, 短的单链DNA片段(single-stranded oligodeoxynucleotides, ssODNs)也可以作为重组修复模板. 薛定研究组^[51]使用ssODNs, 诱导了一系列靶标基因发生目的碱基突变. ssODNs可以由化学合成直接得到, 极大地简化了CRISPR外源修复模板的构建过程.

使用单一sgRNA可以诱导目的基因发生少许碱基的缺失和插入, 而多个sgRNA的共同使用则可以诱导大片段DNA缺失和染色体水平上的重排^[53,54]. 本研究组使用双sgRNA的策略, 通过构建DNA大片段缺失突变体, 编辑了一系列基因, 包括蛋白质编码基因、lincRNA基因和DNA重复序列等. 而且, 本研究组使用该策略成功地诱导了23.7 kb长度的大片段染色体的缺

失, 证明了CRISPR/Cas9技术可以在线虫中直接对大片染色体进行编辑。同时, 本研究组使用靶向不同染色体的sgRNA, 构建了一系列染色体易位型线虫品系^[55]。Mitani研究组^[56]使用双sgRNA和重组修复的策略, 筛选了一系列染色体倒置型线虫品系。这些染色体重排型线虫可用于构建线虫遗传平衡子, 用于保存致死性基因突变。

除了靶向编辑特定的基因, 刘东研究组^[57]实现了使用CRISPR/Cas9技术对秀丽线虫目的基因表达水平的调控, 即CRISPRi和CRISPR-on技术。将dCas9蛋白与转录激活因子或者转录抑制因子相结合, 在多个sgRNA的导向下, 可以较为有效地地上调或者下调特定基因的表达水平。

4.2 sgRNA和Cas9蛋白的优化与功能DNA元件构建的简化

sgRNA序列与编辑效率之间的关系至今仍未得到有效揭示, 使得sgRNA的选择缺少客观的评估。为了进一步提高线虫中Cas9蛋白靶向特定基因的编辑效率, 研究人员对已有的CRISPR系统进行了一系列优化。Meyer研究组^[58]通过对多个sgRNA序列与切割效率的分析和实验验证, 提出了sgRNA 3'末端GGNGG基序原则, 即离PAM motif最近的两个碱基为鸟嘌呤的sgRNA的效率普遍较高; 同时, 将第一个颈环结构加以延伸的sgRNA变体sgRNA (F+E)相比于原sgRNA的编辑效率也有了显著的提高^[59]。常用的Cas9蛋白, 其识别的PAM序列为NGG序列, 这限制了sgRNA的可选择性。Fire研究组^[60]构建了两个Cas9蛋白变体, 其识别的PAM序列分别是NGA和NGCG, 扩大了sgRNA靶标序列的选择范围。

直接应用体外合成的sgRNA和纯化的Cas9蛋白大大简化了基因组编辑实验, 但是, 纯化sgRNA和Cas9蛋白的操作繁杂而昂贵。研究人员设计了一系列优化的sgRNA和同源重组修复模板构建的流程, 进一步简化了CRISPR/Cas9技术靶向基因编辑的操作, 为高通量基因编辑提供了技术支撑。

Ward^[59]使用了融合PCR手段进行sgRNA表达线性载体的构建, 去除了分子克隆质粒构建的流程。Jorgensen研究组^[61]设计了一种方便而高效的模块化质粒构建策略, 称为SapTrap。在该策略中, 所有特异的DNA元件皆通过体外合成得到, 包括sgRNA 5'末端20 nt的导

向RNA序列和短的同源重组臂序列。而其他的常量模块化组件, 则皆来源于供体质粒, 包括多种蛋白标签序列、筛选标记组件和连接组件。这些常量模块化组件皆通过Sap I内切酶酶切供体质粒后产生。通过设计元件连接处的DNA序列, 可以使得这些元件在被Sap I内切酶酶切后, 按Golden Gate Assembly方式依次连接, 最终生成目的质粒。

Seydoux研究组^[62]设计了一种体内重组策略进行靶向基因编辑, 省去了复杂的分子克隆流程。在这个策略中, 研究人员共同使用了ssODNs和长链PCR片段。在Cas9蛋白靶向切割DNA后, 含有短链重组修复臂的ssODNs可以启动重组修复反应。同时, ssODNs与长链DNA之间也有相同的短的重组修复序列, 使得在ssODNs启动重组修复后, 可以继续以长链DNA为次一级的修复模板进行复制修复。通过使用不同组合的ssODNs与长链DNA修复模板, 可以使得多个DNA双链依次连接组合, 并整合进目的基因组位点中。

4.3 靶向编辑后目的线虫筛选流程的简化

被编辑后产生的突变体可以通过简单的表型筛选和PCR筛选进行鉴别。为了进一步简化突变体筛选流程, 研究人员设计了一系列简易的筛选方式。如图2A所示, Mello研究组^[63]设计了一种co-CRISPR的筛选流程: 即在注射靶向目的基因的sgRNA的同时, 注射靶向另一个表型基因的sgRNA, 如*unc-22*。通过筛选产生Unc表型的线虫, 来富集目的基因发生突变的线虫突变体。Fire研究组^[64]在此基础上设计了co-conversion的筛选流程: 即使用显性突变为标记基因, 在显微注射时共导入靶向表型基因的sgRNA和单链重组修复模板。如图2B所示, DNA重组修复时, 会在标记基因处引入显性突变, 在杂合子情况下产生形态学表型。Ward研究组^[59]则直接使用了*pha-1(e2123)*突变体线虫, 该突变体只能生活在15°C的环境里。通过使用co-conversion方法直接编辑该突变体的*pha-1*突变位点, 更加有效地缩小了子代的筛选范围。

研究人员也使用了多种表型筛选标记来简化线虫CRISPR编辑流程, 这些表型标记在基因编辑时会与目的序列共同插入特定的DNA位点。在MosSCI系统中使用的*Cbr-unc-119(+)*基因, 常被用于CRISPR/Cas9系统中^[16]。通过筛选Unc表型恢复型线虫, 以富集发生编辑的转基因线虫。抗生素抗性基因, 如杀稻瘟菌素(*blasti-*

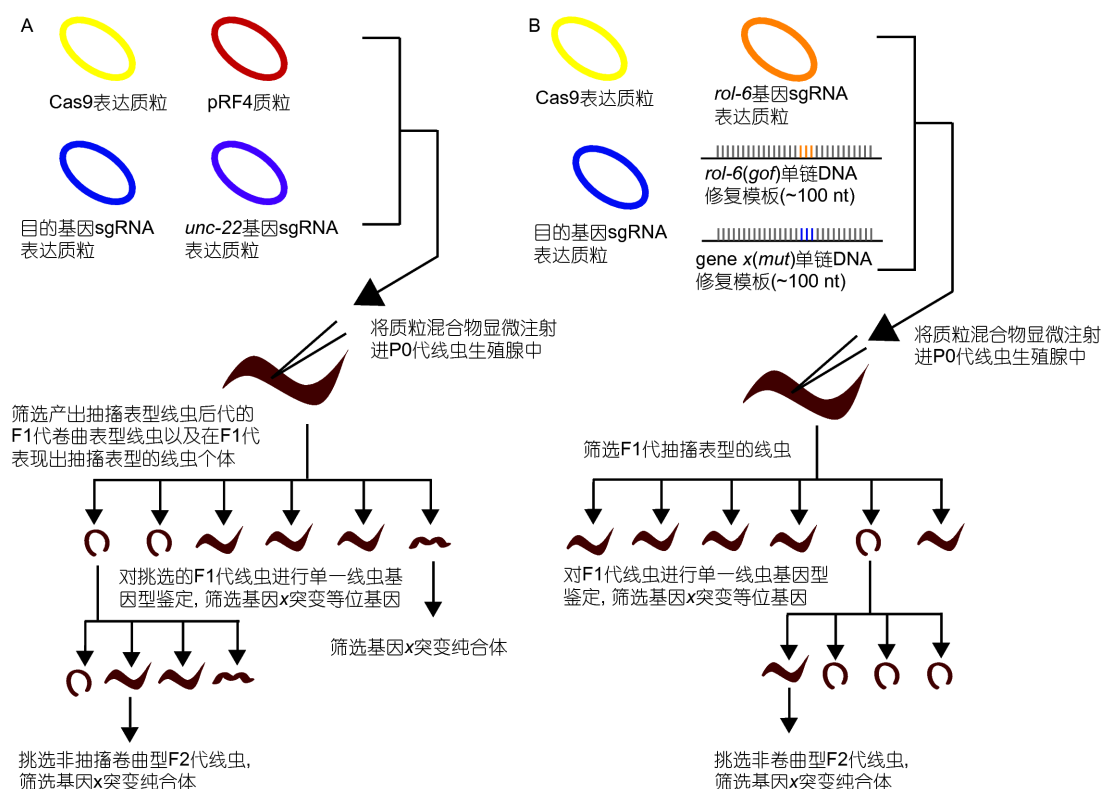


图 2 co-CRISPR和co-conversion策略示意图

A: co-CRISPR策略中使用了pRF4质粒作为共注射标记质粒。该质粒表达出ROL-6(R71C)蛋白,使得线虫出现卷曲表型。*unc-22*突变体线虫会出现抽搐表型,该突变性状被用作共编辑标记性状。显微注射后,将F₁代抽搐表型或者卷曲表型的线虫分别转移至新的培养板上,并观察其F₂代线虫表型。对后代有抽搐表型线虫的F₁代线虫进行单一线虫基因型鉴定,筛选目的基因*x*的等位基因,并进一步筛选出无抽搐表型的基因*x*突变纯合体; B: co-conversion策略中使用了显性突变等位基因作为共编辑标记基因。*rol-6(su1006)*突变是显性突变,即杂合子和纯合子线虫皆表现出卷曲表型。显微注射的混合物中,除了Cas9蛋白表达质粒和sgRNA表达质粒外,还含有与sgRNA切割位点对应的长约100 nt的单链DNA修复模板,该模板上含有目的碱基突变序列。挑选F₁代卷曲表型的线虫,并对其进行单一线虫基因型鉴定,筛选出目的基因*x*的等位基因,并进一步筛选出无抽搐表型的基因*x*突变纯合体

cidin)抗性基因、潮霉素(*hygromycin*)抗性基因和新霉素(*neomycin*)抗性基因,也被用于目的线虫品系的筛选过程中^[18,65]。同时,苯菌灵抗性表型也可以作为靶向DNA序列插入的筛选标记^[39]。为了综合使用这些筛选标记,研究者设计了共筛选标记组合:每个组合都包括了一个表型标记基因和一个抗生素抗性基因,经同源重组修复后,该组合会与目的DNA片段共同插入线虫的基因组中。这些共筛选标记可以经过简单的Cre/*LoxP*重组编辑后从基因组中去除。Calarco研究组^[18]将*neomycin*抗性基因(*rps-27p::neoR*)和荧光蛋白标记基因(*myo-2p::gfp*)结合起来设计了共筛选组合。该组合两边插入了*LoxP*序列,并且位于荧光蛋白DNA序列的内含子中。通过进一步的Cre酶表达质粒显微注射操

作,可以筛选到去除共筛选组合序列的目的转基因线虫品系。Goldstein研究组^[65]设计了含有*hsp-16.41p::Cre*序列的热激去除筛选组合,进一步简化了序列插入和标记基因的去流程序。如图3所示,该筛选组合使用了*sqt-1(e1350)*和潮霉素抗性基因。同时,为了简化去除筛选组合序列的流程,在插入序列中同时加入了热激表达的*hsp-16.41p::Cre*基因。插入了*sqt-1(e1350)*的线虫品系会出现显著的Rol表型,在后续的热激操作中通过直接筛选正常表型的线虫品系以获得目的转基因线虫。

致死性基因的突变体因生长和生殖上的缺陷,其纯合子突变的线虫个体不能传代培养。所以,突变基因必须以杂合子形式保存,并在实验中挑选纯合子后

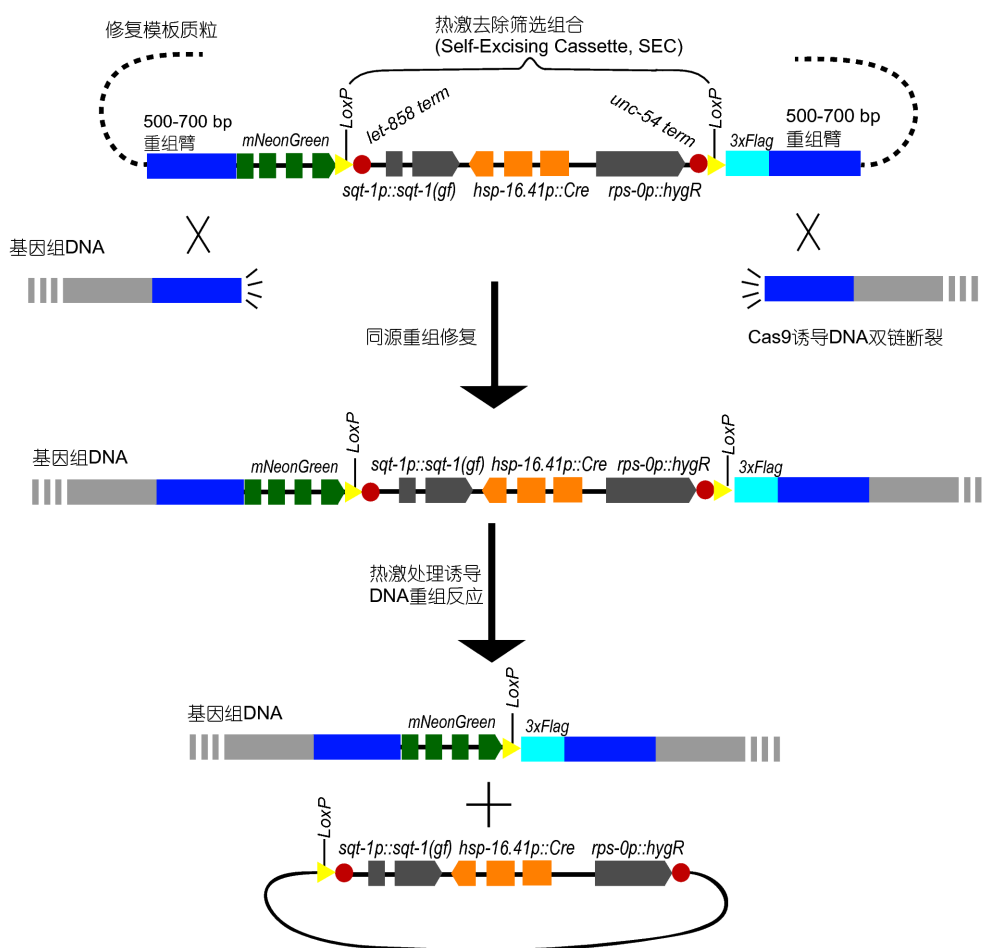


图3 利用可热激去除的筛选组合筛选目的线虫品系示意图

该组合中包含有 *sqt-1p::sqt-1(e1350)*, *hsp-16.41p::Cre* 和 *rps-0p::hygR* 筛选元件。 *sqt-1(e1350)* 突变是显性突变, *sqt-1p::sqt-1(e1350)* 序列表达出 SQT-1(R69C) 蛋白, 使得线虫表现出卷曲表型; *rps-0p::hygR* 序列给予线虫潮霉素抗性; *hsp-16.41p::Cre* 元件在热激后, 可以表达出 Cre 重组酶, 催化两个 *LoxP* 序列之间的操作反应。筛选组合 DNA 片段的两侧各含有一个 *LoxP* 序列, 该序列组合被置于荧光蛋白 DNA 序列的内含子中。 Cas9 蛋白切割靶标 DNA 序列后, 通过同源重组修复方式, 荧光蛋白序列和共筛选序列可以整合进特定的基因组位点。通过潮霉素筛选和表型观察手段, 目的线虫品系可以被有效地筛选出来。经过进一步的热激处理, 共筛选组合序列将被去除, 最终获得目的转基因线虫品系。留下的一个 *LoxP* 序列位于内含子中, 并不会影响到荧光蛋白的表达

代进行实验分析。遗传平衡子被广泛应用于致死性基因突变的保存^[66]。致死性基因的编辑是遗传学研究的重要方面, 本研究组^[55]将遗传平衡子系统和 CRSIRP/Cas9 技术统一起来, 通过直接在染色体易位型遗传平衡子线虫中编辑致死性基因, 根据简单的表型连锁分析, 进行了一系列致死性基因的编辑, 包括 *csr-1* 和 *mes-6*。易位型染色体和正常染色体分别被标记了不同的表型基因突变, 包括 *Dpy* 表型突变和 *Unc* 表型突变。致死性基因突变的杂合子线虫可以以野生型表型传代, 发生突变的基因则被连锁了特定形态学表型基因

突变, 使得纯合子突变体的挑选十分的方便。

5 展望

遗传随机诱变和靶向基因编辑技术极大地推进了线虫遗传学的发展。化学诱变剂、物理诱变剂和生物转座子诱变等手段可以诱导基因组范围内的随机突变, 促进了线虫正向遗传学的发展。近些年来, 靶向基因编辑技术发展迅速, 推进了线虫反向遗传学研究, 包括 *Cre/LoxP* 和 *FRT/FLP* 重组酶技术、*Mos1* 转座子技

术、ZFNs技术、TALENs技术和CRISPR/Cas9技术。这些技术使用靶向特定DNA序列的重组酶、转座酶和核酸酶,方便了科研人员靶向编辑目的基因,从而研究特定基因在线虫细胞功能的行使以及线虫个体生长发育过程中的作用。将正向遗传学手段和反向遗传学手段结合于一起,筛选参与特定生物学通路的基因,并研究该基因在该通路中的具体作用,从而可以对基因功能和细胞生物学机制进行细致而详尽的研究。

根据技术属性和实验目的的不同,可以选择特定的靶向基因编辑技术。Cre/LoxP技术和FLP/FRT技术使用识别特定DNA序列的重组酶,而Mos1转座子技术中的转座酶则只能识别Mos1序列。所以,使用这两类编辑技术前,需要预先构建携带有相应功能元件的线虫品系。而ZFNs技术、TALENs技术和CRISPR/Cas9技术则可以编辑任意遗传学背景的线虫品系。ZFNs技术和TALENs技术使用人工构建的特定蛋白结构域组合来识别目的DNA序列,诱导Fok I酶切结构域二聚体化并切割靶标DNA。CRISPR/Cas9技术中Cas9蛋白在sgRNA元件的导向下,结合并切割特定的DNA位点。表1总结了这些基因编辑技术在线虫中使用的利弊。尽管近些年来CRISPR/Cas9技术极大地简化了基因操纵的过程,但是将其他靶向编辑技术与Cas9蛋白编辑结合起来,则可以建立流水线型的基因组编辑流程,进一步简化目的线虫的筛选过程。例如,研究人员将Cre/LoxP技术和CRISPR/Cas9技术综合使用,可以很方便地将插入基因组中的共筛选标记基因去除。同时,借助于CRISPR/Cas9技术,可以将含有LoxP或者FRT序列的功能元件原位插入基因组相应位点上,建立条件

性基因编辑的线虫品系。

许多基因在线虫各种组织中或者不同生长发育阶段中起着多方面的重要作用。条件性基因编辑手段极大地方便了研究人员对这类基因的操控过程,包括Cre/LoxP重组技术,体细胞TALENs技术和体细胞CRISPR/Cas9技术。通过使用组织特异性启动子和热激启动子,可以将这些酶表达于特定的生长发育阶段或者特定的线虫组织中,从而条件性地编辑线虫基因,研究该类基因在特定组织和细胞中的功能。同时,通过将CRISPR/Cas9技术与线虫遗传平衡子系统结合起来,可以很方便地编辑致死性基因,并且稳定保存筛选到的突变基因。这些基因编辑策略为致死性基因的研究提供了技术上的支撑。

高通量基因编辑对于线虫遗传学和细胞生物学研究有着重要意义,包括全基因组蛋白荧光标记和基因突变体构建。过去几十年来,有很多线虫研究组参与了全基因组基因敲除项目,构建了大量的遗传突变体线虫。同时,科研人员也构建了大量的额外染色体型转基因线虫品系,用以观察目的蛋白在线虫中的表达情况。例如,在启动子序列后融合gfp序列或者cds::gfp序列。然而,使用CRISPR/Cas9技术将荧光蛋白DNA序列原位插入目的基因位点则可以更为有效地标记内源性基因,以反映其原始表达水平和组织分布。Goldstein研究组现已将共筛选组合策略与SapTrap策略结合起来,设计了基于SapTrap方法的共筛选组合重组模板质粒的构建体系。未来,随着Cas9基因编辑技术的进一步优化,研究人员可以构建覆盖全基因组的转基因线虫品系库和突变体库,从而加速秀丽线虫的研究进程。

表1 比较不同靶向基因编辑技术在秀丽隐杆线虫中的优缺点

	Cre/LoxP和FLP/FRT	Mos1TIC	ZFNs	TALENs	CRISPR/Cas9
功能酶	Cre重组酶和FLP反转酶	Mos1转座酶	Fok I 核酸酶	Fok I 核酸酶	Cas9核酸酶
识别方式	蛋白质-DNA	蛋白质-DNA	蛋白质-DNA	蛋白质-DNA	RNA-DNA
编辑方式	DNA重组	Mos1转座子转座	诱导DSBs产生	诱导DSBs产生	诱导DSBs产生
序列特异性	LoxP和FRT序列	Mos1转座子	无	无	PAM基序
线虫遗传背景	额外染色体转基因线虫	Mos1插入型线虫	任何	任何	任何
特异性设计	将目的DNA片段置于LoxP序列或者FRT序列之间	将目的DNA片段置于重组修复模板之间	每一个锌指结构组件可以识别一个特异的三碱基组	每一个TALE组件可以识别一个特异的碱基	sgRNA 5'端20 nt碱基序列
应用	条件性调控基因表达,共筛选标记基因的去除	精准序列编辑,转基因线虫构建	基因敲除	基因敲除、条件性基因敲除和精准序列编辑	基因敲除、条件性基因敲除、精准序列编辑和染色体编辑

参考文献

- 1 Brenner S. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 1974, 77: 71–94
- 2 Corsi A K, Wightman B, Chalfie M. A transparent window into biology: a primer on *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 2015, 200: 387–407
- 3 *C. elegans* Sequencing Consortium. Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. *Science*, 1998, 282: 2012–2018
- 4 Antoshechkin I, Sternberg P W. The versatile worm: genetic and genomic resources for *Caenorhabditis elegans* research. *Nat Rev Genet*, 2007, 8: 518–532
- 5 Barstead R, Moulder G, Cobb B, et al. Large-scale screening for targeted knockouts in the *Caenorhabditis elegans* genome. *G3-Genes Genom Genet*, 2012, 2: 1415–1425
- 6 Anderson P. Mutagenesis. *Methods Cell Biol*, 1995, 48: 31–58
- 7 Kutscher L M, Shaham S. Forward and reverse mutagenesis in *C. elegans*. *WormBook*, 2014, in press, doi: 10.1895/wormbook.1.167.1
- 8 Bessereau J L. Insertional mutagenesis in *C. elegans* using the *Drosophila* transposon *Mos1*: a method for the rapid identification of mutated genes. *Methods Mol Biol*, 2006, 351: 59–73
- 9 Noma K, Jin Y. Optogenetic mutagenesis in *Caenorhabditis elegans*. *Nat Commun*, 2015, 6: 8868
- 10 Mello C C, Kramer J M, Stinchcomb D, et al. Efficient gene transfer in *C. elegans*: extrachromosomal maintenance and integration of transforming sequences. *EMBO J*, 1991, 10: 3959–3970
- 11 Schweinsberg P J, Grant B D. *C. elegans* gene transformation by microparticle bombardment. *WormBook*, 2013, in press, doi: 10.1895/wormbook.1.166.1
- 12 Frøkjær-Jensen C, Davis M W, Sarov M, et al. Random and targeted transgene insertion in *Caenorhabditis elegans* using a modified *Mos1* transposon. *Nat Methods*, 2014, 11: 529–534
- 13 Yu Y, Bradley A. Mouse genomic technologies: engineering chromosomal rearrangements in mice. *Nat Rev Genet*, 2001, 2: 780–790
- 14 Golic K G, Golic M M. Engineering the *Drosophila* genome: chromosome rearrangements by design. *Genetics*, 1996, 144: 1693–1711
- 15 Hubbard E J. FLP/FRT and Cre/lox recombination technology in *C. elegans*. *Methods*, 2014, 68: 417–424
- 16 Dickinson D J, Ward J D, Reiner D J, et al. Engineering the *Caenorhabditis elegans* genome using Cas9-triggered homologous recombination. *Nat Methods*, 2013, 10: 1028–1034
- 17 Lo T W, Pickle C S, Lin S, et al. Precise and heritable genome editing in evolutionarily diverse nematodes using TALENs and CRISPR/Cas9 to engineer insertions and deletions. *Genetics*, 2013, 195: 331–348
- 18 Norris A D, Kim H M, Colaiácovo M P, et al. Efficient genome editing in *Caenorhabditis elegans* with a toolkit of dual-marker selection cassettes. *Genetics*, 2015, 201: 449–458
- 19 Bessereau J L, Wright A, Williams D C, et al. Mobilization of a *Drosophila* transposon in the *Caenorhabditis elegans* germ line. *Nature*, 2001, 413: 70–74
- 20 Williams D C, Boulton T, Ruaud A F, et al. Characterization of *Mos1*-mediated mutagenesis in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 2005, 169: 1779–1785
- 21 Frøkjær-Jensen C, Davis M W, Hollopetter G, et al. Targeted gene deletions in *C. elegans* using transposon excision. *Nat Methods*, 2010, 7: 451–453
- 22 Robert V, Bessereau J L. Targeted engineering of the *Caenorhabditis elegans* genome following *Mos1*-triggered chromosomal breaks. *EMBO J*, 2007, 26: 170–183
- 23 Robert V J, Davis M W, Jørgensen E M, et al. Gene conversion and end-joining-repair double-strand breaks in the *Caenorhabditis elegans* germline. *Genetics*, 2008, 180: 673–679
- 24 Bazopoulou D, Tavernarakis N. The NemaGENETAG initiative: large scale transposon insertion gene-tagging in *Caenorhabditis elegans*. *Genetica*, 2009, 137: 39–46
- 25 Vallin E, Gallagher J, Granger L, et al. A genome-wide collection of *Mos1* transposon insertion mutants for the *C. elegans* research community. *PLoS ONE*, 2012, 7: e30482

- 26 Frøkjær-Jensen C, Wayne Davis M, Hopkins C E, et al. Single-copy insertion of transgenes in *Caenorhabditis elegans*. *Nat Genet*, 2008, 40: 1375–1383
- 27 Frøkjær-Jensen C, Davis M W, Ailion M, et al. Improved *Mos1*-mediated transgenesis in *C. elegans*. *Nat Methods*, 2012, 9: 117–118
- 28 Urnov F D, Rebar E J, Holmes M C, et al. Genome editing with engineered zinc finger nucleases. *Nat Rev Genet*, 2010, 11: 636–646
- 29 Tan S, Guschin D, Davalos A, et al. Zinc-finger protein-targeted gene regulation: genomewide single-gene specificity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 11997–12002
- 30 Morton J, Davis M W, Jorgensen E M, et al. Induction and repair of zinc-finger nuclease-targeted double-strand breaks in *Caenorhabditis elegans* somatic cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103: 16370–16375
- 31 Wood A J, Lo T W, Zeitler B, et al. Targeted genome editing across species using ZFNs and TALENs. *Science*, 2011, 333: 307–307
- 32 Joung J K, Sander J D. TALENs: a widely applicable technology for targeted genome editing. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2013, 14: 49–55
- 33 Moscou M J, Bogdanove A J. A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors. *Science*, 2009, 326: 1501–1501
- 34 Chen X, Feng X, Guang S. Targeted genome engineering in *Caenorhabditis elegans*. *Cell Biosci*, 2016, 6: 60
- 35 Cheng Z, Yi P, Wang X, et al. Conditional targeted genome editing using somatically expressed TALENs in *C. elegans*. *Nat Biotechnol*, 2013, 31: 934–937
- 36 Hsu P D, Lander E S, Zhang F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell*, 2014, 157: 1262–1278
- 37 Rath D, Amlinger L, Rath A, et al. The CRISPR-Cas immune system: biology, mechanisms and applications. *Biochimie*, 2015, 117: 119–128
- 38 Dickinson D J, Goldstein B. CRISPR-based methods for *Caenorhabditis elegans* genome engineering. *Genetics*, 2016, 202: 885–901
- 39 Chen C, Fenk L A, de Bono M. Efficient genome editing in *Caenorhabditis elegans* by CRISPR-targeted homologous recombination. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41: e193–e193
- 40 Chiu H, Schwartz H T, Antoshechkin I, et al. Transgene-free genome editing in *Caenorhabditis elegans* using CRISPR-Cas. *Genetics*, 2013, 195: 1167–1171
- 41 Cho S W, Lee J, Carroll D, et al. Heritable gene knockout in *Caenorhabditis elegans* by direct injection of Cas9-sgRNA ribonucleoproteins. *Genetics*, 2013, 195: 1177–1180
- 42 Friedland A E, Tzur Y B, Esvelt K M, et al. Heritable genome editing in *C. elegans* via a CRISPR-Cas9 system. *Nat Methods*, 2013, 10: 741–743
- 43 Katic I, Großhans H. Targeted heritable mutation and gene conversion by Cas9-CRISPR in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 2013, 195: 1173–1176
- 44 Tzur Y B, Friedland A E, Nadarajan S, et al. Heritable custom genomic modifications in *Caenorhabditis elegans* via a CRISPR-Cas9 system. *Genetics*, 2013, 195: 1181–1185
- 45 Waaijers S, Portegijs V, Kerver J, et al. CRISPR/Cas9-targeted mutagenesis in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 2013, 195: 1187–1191
- 46 Shen Z, Zhang X, Chai Y, et al. Conditional knockouts generated by engineered CRISPR-Cas9 endonuclease reveal the roles of coronin in *C. elegans* neural development. *Dev Cell*, 2014, 30: 625–636
- 47 Li W, Yi P, Ou G. Somatic CRISPR-Cas9-induced mutations reveal roles of embryonically essential dynein chains in *Caenorhabditis elegans* cilia. *J Cell Biol*, 2015, 208: 683–692
- 48 Tian D, Diao M, Jiang Y, et al. Anillin regulates neuronal migration and neurite growth by linking RhoG to the actin cytoskeleton. *Curr Biol*, 2015, 25: 1135–1145
- 49 Li W, Ou G. The application of somatic CRISPR-Cas9 to conditional genome editing in *Caenorhabditis elegans*. *genesis*, 2016, 54: 170–181
- 50 Liu P, Long L, Xiong K, et al. Heritable/conditional genome editing in *C. elegans* using a CRISPR-Cas9 feeding system. *Cell Res*, 2014, 24: 886–889
- 51 Zhao P, Zhang Z, Ke H, et al. Oligonucleotide-based targeted gene editing in *C. elegans* via the CRISPR/cas9 system. *Cell Res*, 2014, 24: 247–250
- 52 Katic I, Xu L, Ciosk R. CRISPR/Cas9 genome editing in *Caenorhabditis elegans*: evaluation of templates for homology-mediated repair and knock-ins by homology-independent DNA repair. *G3-Genes Genom Genet*, 2015, 5: 1649–1656
- 53 Paix A, Wang Y, Smith H E, et al. Scalable and versatile genome editing using linear DNAs with microhomology to Cas9 sites in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 2014, 198: 1347–1356
- 54 Chen X, Xu F, Zhu C, et al. Dual sgRNA-directed gene knockout using CRISPR/Cas9 technology in *Caenorhabditis elegans*. *Sci Rep*, 2014, 4: 7581

- 55 Chen X, Li M, Feng X, et al. Targeted chromosomal translocations and essential gene knockout using CRISPR/Cas9 technology in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 2015, 201: 1295–1306
- 56 Iwata S, Yoshina S, Suehiro Y, et al. Engineering new balancer chromosomes in *C. elegans* via CRISPR/Cas9. *Sci Rep*, 2016, 6: 33840
- 57 Long L, Guo H, Yao D, et al. Regulation of transcriptionally active genes via the catalytically inactive Cas9 in *C. elegans* and *D. Rerio*. *Cell Res*, 2015, 25: 638–641
- 58 Farboud B, Meyer B J. Dramatic enhancement of genome editing by CRISPR/Cas9 through improved guide RNA design. *Genetics*, 2015, 199: 959–971
- 59 Ward J D. Rapid and precise engineering of the *Caenorhabditis elegans* genome with lethal mutation co-conversion and inactivation of NHEJ repair. *Genetics*, 2015, 199: 363–377
- 60 Bell R T, Fu B X H, Fire A Z. Cas9 variants expand the target repertoire in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 2016, 202: 381–388
- 61 Schwartz M L, Jorgensen E M. SapTrap, a toolkit for high-throughput CRISPR/Cas9 gene modification in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 2016, 202: 1277–1288
- 62 Paix A, Schmidt H, Seydoux G. Cas9-assisted recombineering in *C. elegans*: genome editing using *in vivo* assembly of linear DNAs. *Nucleic Acids Res*, 2016, 44: e128
- 63 Kim H, Ishidate T, Ghanta K S, et al. A Co-CRISPR strategy for efficient genome editing in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 2014, 197: 1069–1080
- 64 Arribere J A, Bell R T, Fu B X H, et al. Efficient marker-free recovery of custom genetic modifications with CRISPR/Cas9 in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 2014, 198: 837–846
- 65 Dickinson D J, Pani A M, Heppert J K, et al. Streamlined genome engineering with a self-excising drug selection cassette. *Genetics*, 2015, 200: 1035–1049
- 66 Edgley M L, Baillie D L, Riddle D L, et al. Genetic balancers. *WormBook*, 2006, in press, doi: 10.1895/wormbook.1.89.1

Application of targeted genome-editing technologies in *Caenorhabditis elegans*

CHEN XiangYang, FENG XueZhu & GUANG ShouHong

CAS Center for Excellence in Molecular Cell Science, School of Life Sciences, University of Science and Technology of China, Hefei 230027, China

Genetic mutants and transgenes are essential to revealing genes' functions and interactions in organisms, which are the basis of biological research. *C. elegans* is one of the best model organisms for genetic research. Two critical technologies in *C. elegans* research are introducing mutations in specific genes or chromosomal loci and constructing transgenic animals. In recent years, targeted gene editing techniques have been developed rapidly to facilitate precise and efficient gene and chromosomal editing applications. In this review, we summarize the site-specific genome editing methods and the development of mutant screening procedures in *C. elegans*.

***C. elegans*, targeted gene editing, CRISPR/Cas9**

doi: [10.1360/N052017-00250](https://doi.org/10.1360/N052017-00250)