技术方法 DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.001305

新型基因组编辑蛋白 FnCpf1 的表达、鉴定及多克隆抗体的制备

孙 菱[1],卢 楠[1],杨 春[1],康月茜[1],杨 婕[1],何永林[1],方陈城[1],吴宣艳[1],王瑜伟[2]
(1. 重庆医科大学分子医学与肿瘤研究中心病原生物学实验室,重庆 400016;2. 重庆市中医院检验科,重庆 400011)

【摘 要】**目的**:构建土拉弗朗西丝菌 Novicida 亚种 Cpf1 蛋白编码基因的原核表达质粒,在大肠杆菌中表达、纯化重组 FnCpf1 蛋白后,制备兔抗 FnCpf1 多克隆抗体。**方法**:利用 PCR 技术扩增 FnCpf1 基因,将其克隆到原核表达载体 pET-32a(+)中并转化大肠杆菌 BL21(DE3),IPTG 诱导目的蛋白的表达,通过镍离子金属螯合磁珠亲和纯化得到纯度较高的 FnCpf1 蛋白,将纯化蛋白免疫新西兰大白兔制备 FnCpf1 多克隆抗体,并用间接 ELISA 法检测兔抗血清效价、Western blot 鉴定其特异性。**结果**:扩增得到 3 900 bp 的目的基因片段,克隆到表达载体 pET-32a(+)后,通过双酶切及测序证实 pET-32a(+)-FnCpf1 表达载体构建成功,可诱导表达相对分子质量 160 kD 的目的蛋白,经 SDS-PAGE 分析其为可溶性,通过镍离子金属螯合磁珠亲和纯化得到纯度为 95%以上的 FnCpf1 蛋白,制备多克隆抗体并检测兔抗 FnCpf1 抗血清 ELISA 效价达 1:512 000,Western blot 结果显示制备的抗体可较好地与 FnCpf1 蛋白特异性结合。**结论**:在原核系统中成功表达了 FnCpf1 重组蛋白,并用纯化后的蛋白制备出兔抗 FnCpf1 抗体,效价及特异性均良好,为进一步探讨 Cpf1 蛋白的生物学特性打下实验基础。

【关键词】基因编辑;CRISPR-Cas;FnCpf1;多克隆抗体
【中图分类号】R392.11 【文献标志码】A 【收稿日期】2016-07-25

Prokaryotic expression and the antiserum preparation of FnCpf1, a novel genome editing protein encoding gene

Sun Ling[1], Lu Nan[1], Yang Chun[1], Kang Yuexi[1], Yang Jie[1], He Yonglin[1], Fang Chencheng[1], Wu Xuanyan[1], Wang Yuwei[2]
(1. Center for Molecular Medicine and Cancer Research, Laboratory of Pathogenic Biology, Chongqing Medical University; 2. Clinical Laboratory, Chongqing Traditional Chinese Medicine Hospital)

【Abstract】***Objective***: To construct the prokaryotic expression vector of Cpf1 of Francisella tularensis subsp. Novicida, to express the recombinant protein in *E.coli* BL21 and purify it to prepare FnCpf1 polyclonal antibody. ***Methods***: FnCpf1 gene was amplified by PCR and subcloned into a prokaryotic expression vector pET-32a(+). Then the pET-32a(+)-FnCpf1 was transformed into E. coli BL21 and the recombinant FnCpf1 was induced with IPTG. The FnCpf1 protein was purified by the nickel ion chelating beads affinity purification and was used to immunize rabbits. The titer and specificity of the polyclonal antibody was respectively measured by Indirect enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) and Western blot. ***Results***: Restriction and sequencing analysis proved that recombinant plasmid pET32a(+)-FnCpf1 was constructed correctly. SDS-PAGE analysis showed that FnCpf1 with a relative molecular mass of 160 kD was expressed in a soluble form. The purity of the purified protein reached more than 95 percent. ELISA showed the titer of FnCpf1 polyclonal antibody was 1:512 000 and Western blot test demonstrated that the polyclonal antibody could specifically bind with FnCpf1 recombinant protein. ***Conclusion***: FnCpf1 recombinant protein is successfully expressed in the prokaryotic system and FnCpf1 polyclonal antibody is prepared with high titer and specificity, which would lay the foundation for further study on the biological characteristics of Cpf1.

【Key words】genome editing; CRISPR-Cas; FnCpf1; polyclonal antibody

作者介绍:孙 菱,Email:760227515@qq.com,研究方向:CRISPR 相关方面研究。
通信作者:杨 春,Email:yangchunim@163.com。
基金项目:重庆市科委基础科学与前沿技术研究资助项目(编号:cstc2016jcyjA0277);重庆市教委科学技术研究资助项目(编号:KJ1500203);重庆市卫计委西医资助项目(编号:2015MSXM081)。
优先出版:http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20170609.1112.020.html (2017-06-09)

CRISPR-Cas 系统是一种原核生物特有的抵御外来 DNA 入侵的适应性免疫系统，广泛存在于细菌、古细菌等基因组中，由成簇的规律间隔的短回文重复序列（CRISPR）与其附属的蛋白（CRISPR-associated，Cas）构成[1]。根据效应蛋白的组分可将 CRISPR-Cas 系统分为两大类[2-4]：一类是利用多种蛋白复合体发挥作用，另一类的效应蛋白则是只有单一组分的蛋白，如二类Ⅱ型中的 Cas9。

近年来基于 CRISPR 系统中的 Cas9 蛋白创立出最常用的靶向基因组编辑工具[5-6]，但是目前研究认为 Cas9 系统表现不稳定，其较高的脱靶率严重阻碍了此技术在疾病基因预防和治疗方面的应用[7-8]。因为脱靶效应会导致严重的不良后果如癌基因的激活等，而 CRISPR-Cpf1 可能克服 Cas9 系统的脱靶等问题，Cpf1 是张锋团队[9]近期发现的 CRISPR-Cas 家族最新的一员，存在于多种菌株，研究者在16个备选的 Cpf1 家族蛋白中发现有 2 个在人类细胞中具有强大的核酸酶活性，提示我们可以利用Cpf1系统促进基因编辑技术在人类细胞中的开展。Cpf1 系统只需要一条 RNA 引导效应蛋白切割靶基因，与 Cas9 系统相比，结构及操作更简单、基因编辑效果更精准。Cpf1 优化和扩充了 CRISPR 系列的基因编辑工具，在生物技术及基因治疗等领域必将具有非凡的潜力和光明的应用前景。

本实验通过基因工程技术构建 FnCpf1 的原核表达载体，诱导表达重组蛋白并通过镍离子金属螯合磁珠亲和纯化，制备出较高效价的兔抗 FnCpf1多克隆抗体，为进一步探讨 Cpf1 蛋白的生物学特性打下实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株及质粒 pY001（pFnCpf1_full）购自 Addgene 公司，大肠杆菌 DH5α 感受态细胞购自 Novagen 公司，大肠杆菌 BL21（DE3）和质粒表达载体 pET-32a(+)均为本实验室保存。

1.1.2 主要试剂 质粒小量提取试剂盒购自 OMEGA 公司，胶回收试剂盒、PrimeSTAR HS DNA Polymerase、DNA marker DL 10000 购自 TaKaRa 公司，T4DNA 连接酶、*Bam*HⅠ、*Sal*Ⅰ内切酶购自 NEB 公司，SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒、异丙基硫代半乳糖苷（IPTG）、氨苄青霉素、溶菌酶购自碧云天生物技术公司，预染蛋白 Marker（pageruler prestaninen protein ladder 26616）购自 Fermentas 公司，组氨酸标签蛋白纯化试剂盒购自海狸纳米科技有限公司，超滤离心管（15 mL 50 kD）购自 Millipore 公司，BCA 蛋白定量试剂盒购自康为世纪生物科技有限公司，兔抗 His 标签多克隆抗体购自 Proteintech 公司，DAB 显色试剂盒、HRP 标记的山羊抗兔 IgG 购自中杉金桥生物技术有限公司，弗氏佐剂购自 Sigma 公司，健康雌性新西兰大白兔购自重庆医科大学实验动物中心。

1.2 方法

1.2.1 引物的设计和合成 根据 GenBank 提供的 FnCpf1 基因序列（GenBank ID：WP_003040289.1）进行引物的设计，BmFnCpF：5'-CCCGGATCCATGTCAATTTATCAAGAA-3'，SalFnCpR：5'-CCCGTCGACTTAGTTATTCCTATTCTGC-3'，划线部分分别为引入的 *Bam*HⅠ酶切位点、*Sal*Ⅰ酶切位点。引物由成都擎科梓熙生物技术有限公司合成。

1.2.2 FnCpf1 基因片段的扩增 用含 100 μg/mL 氯霉素的 LB 培养基小量扩增 pY001 菌液并提取质粒，以此作为模板，PCR 扩增 FnCpf1 基因。反应参数：95 ℃预变性 10 min；95 ℃变性 30 s，55 ℃退火 30 s，72 ℃延伸 4 min，共 34 个循环；72 ℃后延伸 10 min。反应结束后，取 50 μL 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳，紫外灯下观察结果，按胶回收试剂盒操作方法回收目的片段。

1.2.3 pET-32a(+)-FnCpf1 表达载体的构建 小量提取 pET-32a(+)质粒。把 pET-32a(+)质粒和回收后的 PCR 产物各取 20 μL，分别用 *Bam*HⅠ和 *Sal*Ⅰ双酶切，胶回收得到载体片段 pET-32a(+)和目的基因片段，然后加 T4 DNA 连接酶于 37 ℃水浴 4 h 将两者连接。之后把连接产物化学转化至大肠杆菌 DH5α 感受态细胞中，涂布于含 100 μg/mL 氨苄青霉素的 LB 琼脂平板，挑选阳性单克隆小量扩增并提取质粒，以 *Bam*HⅠ和 *Sal*Ⅰ进行双酶切鉴定，鉴定正确的重组质粒送成都擎科梓熙生物技术有限公司测序分析。

1.2.4 重组蛋白在大肠杆菌 BL21 中的诱导表达 将测序正确的重组表达质粒化学转化至大肠杆菌 BL21 中，挑取阳性克隆接种于 5 mL 含 100 μg/mL 氨苄青霉素的 LB 培养液 37 ℃振荡过夜，次日取 200 μL 菌液到 10 mL 的 Kan/LB，37 ℃扩大培养至 $A_{600\,nm}$ 约 0.2，降温到 21 ℃培养至 $A_{600\,nm}$ 为 0.6时，加 IPTG 至终浓度 0.5 mmol/L，21 ℃、100 r/min 诱导过夜，次日 8 000 r/min 离心 10 min 收集菌体并用 1 mL PBS 重悬，分别取上清和沉淀进行 SDS-PAGE 分析以检测其表达形式。

1.2.5 镍离子金属螯合磁珠对目的蛋白的亲和纯化 取 500 mL 重组菌液，离心收集菌体，反复冻融 3 次，用 5 mL 含 3 mmol/L 咪唑的 Binding Buffer 重悬，加入 20 mg 溶菌酶和终浓度为 1 mmol/L PMSF 混匀，冰浴超声碎菌共 30 min（设置：工作时间 3 s、间隙时间 3 s、功率 200 J），8 000 r/min、4 ℃离心 45 min 分离上清；将上清倒入预处理过的磁珠，4 ℃旋转混合 1 h，倒出流穿液待检；分别用 50、80 mmol/L 的 Wahing Buffer 各洗涤磁珠 3 次，每次加 3 mL Wahing Buffer 用低温

摇床快速振摇 5 min 使磁珠悬浮起来，收集每次的洗涤液；再用 3 mL 500 mmol/L 的 Elution Buffer 振摇 5 min 并重复 3 次以洗脱目标蛋白。将纯化产物加入超滤离心管中，5 000 r/min 离心 10 min 浓缩蛋白，再用 PBS 换液 3 次。将收集的蛋白进行 SDS-PAGE 凝胶电泳分析。

1.2.6 纯化蛋白的 Western blot 鉴定 取少量纯化产物经 7.5%的 SDS-PAGE 分离胶电泳，根据目的蛋白分子量大小比对预染 Marker 130 kD、180 kD 条带切胶，以 350 mA 恒流电转 2 h 移至 PVDF 膜上，封闭液封闭 4 h，利用封闭液稀释的兔抗 His 标签多克隆抗体(1:4 000)4 ℃孵育过夜，然后用 PBS-T(含 0.2%Tween20) 将膜洗涤 3 次，每次 10 min，用封闭液稀释 HRP 标记羊抗兔 IgG 抗体(1:3 000)室温慢摇孵育 2 h，再用 PBS-T 洗涤 3 次，每次 10 min。最后用 DAB 显色。

1.2.7 兔抗 FnCpf1 抗血清制备 首次免疫前，取新西兰大白兔耳缘静脉血 2 mL，分离血清，放-80 ℃保存以作对照。首次免疫新西兰大白兔，将纯化的 FnCpf1 与等体积弗氏完全佐剂高速振荡 20 min，充分乳化至滴于清水中不散开，取 2 mL 乳化液多点皮下注射于兔子的颈后、臀背部以及两侧腹股沟，每个点注射约 0.1 mL。2 周后进行第 2 次加强免疫，此次用不完全佐剂与蛋白进行乳化，其他方法同前。10 d 后用 1 mL 不加佐剂的纯化蛋白加强免疫，皮下、皮内联合多点注射。每次免疫注射前，取 2 mL 耳缘静脉血保存备用。末次免疫 7 d 后，对大白兔进行心脏采血 40 mL，全血 37 ℃静置 1 h，4 ℃过夜，2 500 r/min 离心 15 min 收集血清。

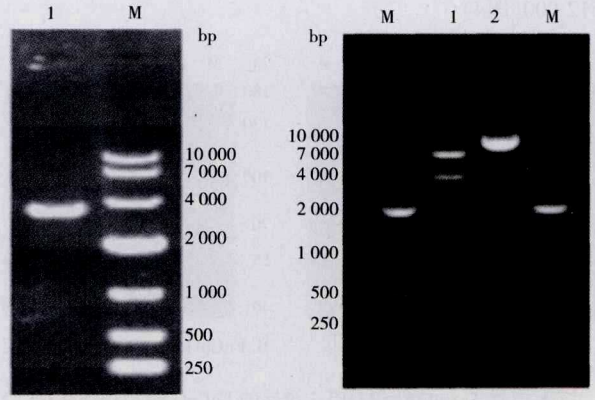
1.2.8 兔抗血清特异性的鉴定 将诱导表达的 FnCpf1 蛋白样品经 7.5%的 SDS-PAGE 电泳后，转膜 2 h，封闭 4 h，用自己制备的兔抗 FnCpf1 抗血清(1:500)4 ℃静置过夜，PBS-T洗涤 3 次，HRP 标记的羊抗兔 IgG(1:3 000)孵育 2 h，PBS-T 洗涤，DAB 显色观察结果。

1.2.9 间接 ELISA 法检测兔抗血清效价 用 7 μg/mL 纯化的 FnCpf1 重组蛋白 37 ℃、4 h 包被 96 孔酶联板，封闭液 4 ℃封闭过夜，弃液体，PBS-T 洗涤 3 次，加入倍比稀释的抗血清，37 ℃放置 1 h，去除液体后洗 3 次，加入 HRP 标记的羊抗兔 IgG(1:8 000)37 ℃放置 45 min，弃液体后洗涤并拍干，每孔加 100 μL TMB 37 ℃避光显色 10 min，各加 50 μL 终止液，用酶标仪测定 450 nm 波长处的吸光度值。

2 结 果

2.1 pET-32a(+)-FnCpf1 表达载体的构建及鉴定

以 pY001 质粒为模板，PCR 扩增产物经 1%琼脂糖凝胶电泳分析，在 3 900 bp 处出现清晰的阳性条带(图 1A)，与预期大小一致。重组表达质粒用 *Bam*H Ⅰ、*Sal* Ⅰ双酶切的产物经琼脂糖凝胶初步鉴定成功(图 1B)。测序证实碱基序列与 GenBank 中 FnCpf1 基因序列(WP_003040289.1)一致，证明 pET-32a(+)-FnCpf1 表达载体构建成功。



1:3 900 bp 的 FnCpf1 基因扩增产物；M:DNA DL 10 000 marker

A. FnCpf1 基因片段的 PCR 扩增

1:重组质粒 pET-32a(+)-FnCpf1；2:重组质粒经 *Bam*H Ⅰ和 *Sal* Ⅰ的酶切产物；M:DNA DL10 000 marker

B. 重组质粒 pET-32a(+)-FnCpf1 的酶切鉴定

图 1 FnCpf1 基因片段的 PCR 扩增及其重组质粒的酶切鉴定

Fig.1 PCR amplification of FnCpf1 gene fragments and the identification of recombinant plasmid

2.2 目的蛋白的诱导表达、纯化、鉴定

按上述条件，在终浓度 0.5 mmol/L 的 IPTG，21 ℃、100 r/min 诱导过夜后目的蛋白产量高。诱导产物经 7.5% SDS-PAGE 分析，在相对分子质量约为 160 kD 处发现有一条目的蛋白条带，此条带与预期产物的大小相符，并且与未诱导的菌体相比，此位置的条带诱导前后表达量有明显差异，说明 FnCpf1 原核表达成功。碎菌后通过对上清及沉淀分析(图 2A)，发现目的蛋白大量存在于上清中，说明目的蛋白是可溶性的。所以用能特异性结合 His-tag 的镍离子金属螯合磁珠对蛋白进行纯化。Image Lab 的体积工具分析结果表明，纯化的 FnCpf1 蛋白纯度达 95%以上。由于 pET-32a(+)-FnCpf1 带有 His-tag，Western blot 分析显示诱导表达的FnCpf1 重组蛋白、纯化的 FnCpf1 蛋白可与 His 标签多克隆抗体发生抗原抗体反应，在相对分子质量约 160 kD 处均可见明显条带，大小与预期一致，而空载大肠杆菌 BL21 全菌蛋白样品在此位置则没有出现目的蛋白条带(图 2B)。通过BCA 法测得纯化、超滤后的蛋白浓度为 1.4 mg/mL。

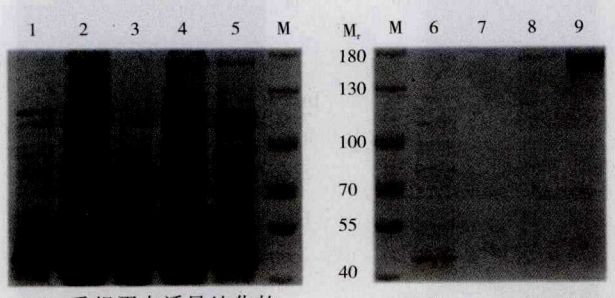
2.3 兔抗 FnCpf1 抗血清的 Western blot 鉴定

用重组蛋白 FnCpf1 为抗原制备的抗血清作一抗，以免疫前的血清作阴性对照，分别对诱导表达 FnCpf1 的全菌蛋白样品进行 Western blot 分析，结果显示兔抗血清可与 FnCpf1 蛋白反应(图 3)，在相对分子质量约 160 kD 处可见明显条带。

2.4 间接 ELISA 法检测抗血清效价

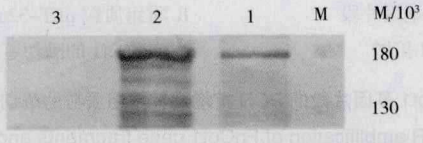
以免疫前取的兔血清作阴性对照，将第 3 次免疫后心脏采血分离的血清以 1:(4 000~2 048 000)倍比稀释做 ELISA，测 450 nm 处 A 值，当($A_{阳}-A_{空}$)/($A_{阴}-A_{空}$)>2.1 时对应的最大稀释倍数为抗体效价，测得抗 FnCpf1 抗血清效价约为 1:

512 000(图4)。



A. 重组蛋白诱导纯化的 SDS-PAGE 分析　　B. FnCpf1 的 Western blot 鉴定

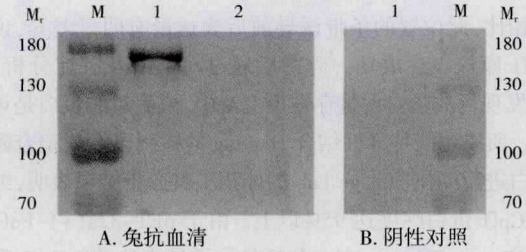
1：未诱导的 FnCpf1；2：IPTG 诱导的 FnCpf1 全菌；3：FnCpf1 经 IPTG诱导碎菌后的沉淀；4：FnCpf1 经 IPTG 诱导碎菌后的上清；5：结合磁珠后的流穿液；M：蛋白 Marker；6/7：洗涤液；8：洗脱的纯化样品；9：纯化样品的浓集液



M：蛋白 Marker；1：纯化样品；2：IPTG 诱导的 FnCpf1；3：IPTG 诱导的 BL21

图 2　重组蛋白诱导、纯化的 SDS-PAGE 分析及 Western blot 鉴定

Fig.2　SDS-PAGE and Western blot analysis of recombinant FnCpf1 expression induced by IPTG and purification



A. 兔抗血清　　B. 阴性对照

M：蛋白 Marker；1：IPTG 诱导的 FnCpf1；2：IPTG 诱导的 BL21　　1：IPTG 诱导的 FnCpf1；M：蛋白 Maker

图 3　兔抗血清的 Western blot 鉴定

Fig.3　Western blot results of rabbit antiserum

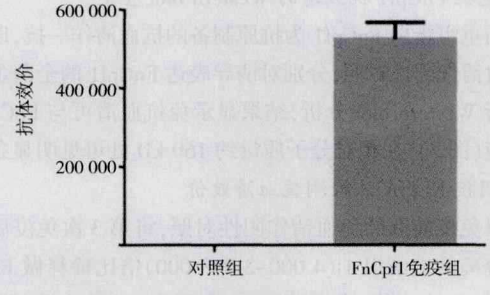


图 4　兔抗血清效价的 ELISA 测定

Fig.4　Detection of rabbit antiserum titer by ELISA

3　讨　论

CRISPR-Cas 系统是一种广泛存在于细菌和古细菌中的、抵御外来遗传物质入侵的适应性免疫系统，由 crRNA 引导 Cas 蛋白对靶基因进行切割。其中 Cas9 在 CRISPR 系列的基因编辑系统中属于“元老”级别的成员，但在应用中仍发现一些缺陷和不足，Cas9 系统虽然会在 crRNA 的引导下特异性识别靶序列，但还是存在明显的脱靶效应，妨碍了它的进一步应用，特别是临床疾病的基因治疗方面，因为疾病治疗中发生基因编辑的脱靶是非常危险的。

然而去年新发现的 CRISRP-Cpf1 则可能克服 Cas9 系统应用中的这些不足和限制，Cpf1 系统被归为 CRISPR-Cas 系统的二类 V 型[10-11]，相比于 Cas9 系统更为简单、精准，是近期发现的一种继 Cas9 之后炙手可热的新一代基因组编辑工具。Cpf1 系统与 Cas9 系统相比具有其独特的优势：Cpf1 系统结构更简单，不依靠 tracrRNA，只需要一条 RNA 协助 Cpf1 蛋白对靶基因进行切割，从而简化了基因编辑工具的设计过程；最重要的一点是，Cas9 蛋白切割双链 DNA 产生平末端，而 Cpf1 产生黏性末端，有利于基因更有效、精准地插入[12-14]；Cpf1 切口远离识别位点，避免了识别位点的突变，所以能继续引导下一次切割，为校正编辑提供多次机会；Cpf1 系统识别T含量高的 PAM，因此有利于在基因组 AT 含量高的生物中进行基因编辑[15]。

自张锋团队发现 Cpf1 以来，很快就有研究者们对 Cpf1 系统的晶体结构、识别机制、切割原理等进行探究。有研究者通过生物物理学和生化研究手段揭示 Cpf1 结合 crRNA 后，结构从延伸型变成紧凑型，经历了一个本质的构型改变[16]。研究还发现 Cpf1 具有两个独立的催化部分，RNase 部分对核糖具有特异性但是不能切割 DNA，同样 DNase 部分只对 DNA 有切割活性。Cpf1 是目前发现的第一个对 RNA 的切割具有核酸序列特异性及结构特异性且同时具有 DNase 和 RNase 活性的核酸酶。Cpf1 先对 pre-crRNA 进行切割处理从而得到成熟 crRNA，再和上一步反应得到的 crRNA 切割入侵的 DNA，这个机制打开了序列特异性基因组工程、基因沉默的大门，促进了多路技术的发展[17]。现已将 Cpf1 成功应用于小鼠、果蝇的基因敲除[18-19]，并展望能将其应

用于先天性眼病、HIV 等疾病的治疗。

Cpf1 扩展和提升了基因编辑及其他生物技术领域的研究，有望推动整个基因功能研究领域的研究进展，对基因治疗工具的研究具有深远的意义。而抗体对于研究蛋白的功能是一种基本且重要的工具，且全世界范围内还未开发出 Cpf1 相关产品，目前还没有商品化的抗体，对其蛋白纯化工艺等研究也未见具体报道，总体来说，对于 Cpf1 的研究还处在起步阶段。

本实验选择土拉弗朗西丝菌 Novicida 亚种为模板提取 Cpf1 基因，构建了 FnCpf1 原核表达质粒 pET-32a(+)-FnCpf1，诱导表达、纯化过程中对条件进行了不断的摸索，比如培养温度、IPTG 浓度、诱导时间等，最后采用了上述的诱导、纯化条件，制备出的蛋白纯度较高，将纯化蛋白免疫新西兰大白兔得到 FnCpf1 多克隆抗体，经间接 ELISA 法检测出其效价较高，且 Western blot 显示其特异性较好。故本实验制备了大量效价较高、特异性较好的兔抗FnCpf1 多克隆抗体，用于进一步探讨 Cpf1 蛋白的功能所需，以期为生物技术的开发提供一条新的思路，从而推动基因功能研究、疾病的基因治疗等各个相关领域的研究。

参 考 文 献

[1] Sorek R, Kunin V, Hugenholtz P. CRISPR--a widespread system that provides acquired resistance against phages in bacteria and archaea[J]. Nat Rev Microbiol, 2008, 6(3): 181-186.

[2] Makarova KS, Haft DH, Barrangou R, et al. Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems[J]. Nat Rev Microbiol, 2011, 9(6): 467-477.

[3] Wiedenheft B, Sternberg SH, Doudna JA. RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea[J]. Nature, 2012, 482(7385): 331-338.

[4] Bhaya D, Davison M, Barrangou R. CRISPR-Cas systems in bacteria and archaea: versatile small RNAs for adaptive defenseand regulation[J]. Annu Rev Genet, 2011, 45(45): 273-297.

[5] Hsu PD, Lander ES, Zhang F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering[J]. Cell, 2014, 157(6): 1262-1278.

[6] Jiang W, Marraffini LA. CRISPR-Cas: new tools for genetic manipulations from bacterial immunity systems[J]. Annu Rev Microbiol, 2015, 69(1): 209-228.

[7] Mali P, Aach J, Stranges PB, et al. Cas9 transcriptional activators for target specificity screening and paired nickases for cooperative genome engineering[J]. Nat Biotechnol, 2013, 31(9): 833-838.

[8] Pattanayak V, Lin S, Guilinger JP, et al. High-throughput profiling of off-target DNA cleavage reveals RNA-programmed Cas9 nuclease specificity[J]. Nat Biotechnol, 2013, 31(9): 839-843.

[9] 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.

[10] Schunder E, Rydzewski K, Grunow R, et al. First indica-tion for a functional CRISPR/Cas system in Francisella tularensis[J]. Int J Med Microbiol, 2013, 303(2): 51-60.

[11] Vestergaard G, Garrett RA, Shah SA, et al. CRISPR adaptive immune systems of Archaea[J]. RNA Biol, 2014, 11(2): 156-167.

[12] Garneau JE, Dupuis MÈ, Villion M, et al. The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA[J]. Nature, 2010, 468(7320): 67-71.

[13] 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.

[14] Gasiunas G, Barrangou R, Horvath P, et al. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2012, 109(39): E2579-2586.

[15] Gardne MJ, Shallom SJ, Carlton JM, et al. Sequence of Plasmodium faciparum chromosomes 2, 10, 11 and 14[J]. Nature, 2002, 419(6906): 531-534.

[16] Dong D, Ren K, Qiu X, et al. The crystal structure of Cpf1 in complex with CRISPR RNA[J]. Nature, 2016, 532(7600): 522-526.

[17] Fonfara I, Richter H, Bratovič M, et al. The CRISPR-associated DNA-cleaving enzyme Cpf1 also processes precursor CRISPR RNA[J]. Nature, 2016, 532(7600): 517-521.

[18] Kim Y, Cheong SA, Lee JG, et al. Generation of knockout mice by Cpf1-mediated gene targeting[J]. Nat Biotechnol, 2016, 34(8): 808-810.

[19] Port F, Bullock SL. Augmenting CRISPR applications in Drosophila with tRNA-flanked sgRNAs[J]. Nat Methods, 2016, 13(10): 852-854.

（责任编辑：方 济）