

文章编号: 1674-7054(2023)01-0050-10



CRISPR/Cas9 技术在昆虫基因功能研究中的应用及优化

刘露露^{1,2}, 林哲^{2,3}, 邹振^{2,3}

(1. 河北大学生命科学学院, 河北保定 071002; 2. 中国科学院动物研究所 农业虫害鼠害综合治理研究国家重点实验室, 北京 100101; 3. 中国科学院大学生物互作卓越创新中心, 北京 100049)

摘要: 主要概述了 CRISPR/Cas9 技术应用于涉及鞘翅目、鳞翅目、膜翅目、半翅目、直翅目和双翅目的昆虫在色素沉着、抗性、嗅觉、交配和性别发生等方面的研究进展, 包括基因敲除和基因敲入技术的应用, 同时总结了目前 CRISPR/Cas9 系统的优化方案, 最后对改良 CRISPR/Cas9 系统在昆虫基因组研究和农业害虫防控的应用前景进行了展望。利用基因编辑技术对昆虫基因功能进行探究是除基因过表达、RNA 干扰等方法外的一种有效策略。CRISPR/Cas9 技术是近年来出现并迅速发展的第三代基因编辑工具, 以操作简便、成本低和编辑效率高等优点而被广泛应用于生物科学中的各个分支。

关键词: 基因编辑技术; CRISPR/Cas9; 基因敲除; 基因敲入

中图分类号: Q 78; Q963 **文献标志码:** A

引用格式: 刘露露, 林哲, 邹振. CRISPR/Cas9 技术在昆虫基因功能研究中的应用及优化 [J]. 热带生物学报, 2023, 14(1): 50-59. DOI: 10.15886/j.cnki.rdsxb.2023.01.006

随着基因测序技术的发展, 基因编辑系统逐渐成为生物科学领域研究的有力工具, 也是昆虫基因功能研究的重要手段。2013 年第三代基因编辑技术 Clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated protein 9 (CRISPR/Cas9) 被首次应用在真核细胞中成功进行了基因编辑^[1], 随后该技术以其操作简便、材料成本低和效率高等优势, 被迅速应用于人类细胞^[2-4]、小鼠 (*Mus musculus*)^[5]、大鼠 (*Rattus norvegicus*)^[6]、斑马鱼 (*Danio rerio*)^[7]、酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)^[8]、果蝇 (*Drosophila melanogaster*)^[9] 和家蚕 (*Bombyx mori*)^[10] 等的研究中。本研究系统综述了 CRISPR/Cas9 技术在非模式昆虫色素表型、杀虫剂抗性和神经行为学研究中的应用情况及优化改良方案, 旨在为昆虫基因学的深入研究和农业害虫的绿色防控提供参考。

1 基因编辑技术的由来

在 CRISPR/Cas9 基因编辑技术诞生之前, 锌指核酸酶 (zinc finger nuclease, ZFN) 技术^[11] 和类转录激活因子效应物核酸酶 (transcription activator-like effector nuclease, TALEN) 技术^[12] 是常用的基因编辑工具, ZFN 技术由锌指蛋白结构域特异性识别靶基因一单链上的三联子位点, FokI 核酸切割酶进行切割^[13-15]; TALEN 技术通过 TALE 蛋白串靶向识别 DNA, 二聚化的 FokI 进行切割^[16-17], 二者均基于蛋白质对 DNA 的识别。

CRISPR/Cas9 原理与 ZFN 和 TALEN 的蛋白质-DNA 识别模式不同, 该技术对 DNA 靶标位点的识别更加准确。CRISPR/Cas9 系统的发展最早源于 1987 年, Ishino 等^[18] 在大肠杆菌 *K12* 中首次发现一段含 29 个碱基的重复序列。直到 2002 年 Jansen 等^[19] 将这种结构命名为规律间隔成簇短回

收稿日期: 2022-10-11

修回日期: 2022-12-15

基金项目: 国家自然科学基金 (31872298)

第一作者: 刘露露 (1998-), 女, 河北大学生命科学学院 2022 级硕士研究生. 15139151993. E-mail: coralsealiu@163.com

通信作者: 邹振 (1975-), 男, 博士, 研究员. 研究方向: 昆虫学. E-mail: zouzhen@ioz.ac.cn

文重复序列(CRISPR),并认为此序列仅存在于古生菌和细菌中,在真核生物和病毒中不存在。2005年研究者发现在病毒和质粒中也具有CRISPR序列,推测其可能与细菌适应性免疫功能相关^[20-22]。科学家利用噬菌体感染嗜热链球菌(*Streptococcus thermophilus*),终于发现了细菌捕获噬菌体基因片段并插入到自身基因组的机制,证实该系统确是细菌的适应性免疫系统^[23]。随后,2008—2012年,研究人员相继发现了CRISPR/Cas9免疫系统的作用靶点及CRISPR RNA(crRNA)、反式激活 crRNA(trans-activating CRISPR RNA, tracrRNA)和 Cas9 蛋白等参与分子,并表明该系统可应用于基因编辑^[24-27]。2013年,张锋团队^[8]实现了此技术在真核细胞中的首次应用。

CRISPR/Cas9 系统含一个源于酿脓链球菌(*Streptococcus pyogenes*)的 Cas9 效应蛋白,该蛋白在一条 sgRNA(single guide RNA)或 gRNA(guide RNA)的引导下即可实现对靶基因的特异性剪切。当靶标 DNA 产生双链断裂缺口(double strand break, DSB),在其断裂位点,细胞启动自我修复机制,即非同源末端连接(non-homologous end joining, NHEJ)或同源介导的双链 DNA 修复

(homology-directed repair, HDR)。NHEJ 是一种容易出错的修复机制,过程中通常出现碱基缺失或插入,导致移码突变,破坏目的基因开放阅读框,实现基因敲除(gene knockout);HDR 修复机制则更加精确,通过引入外源 DNA 作为修复模板,就能够实现基因敲入(gene knockin)。

2 CRISPR/Cas9 技术在昆虫基因功能研究中的应用

在昆虫基因功能研究中,遗传学手段主要依靠基因可遗传的操纵。1982年,P element 在果蝇中实现敲除而使基因功能丧失。然而在非模式昆虫中,直到 21 世纪 90 年代才利用 Mariner, piggyBac 等转座子技术实现,但繁琐、成功率低。虽然基于双链 RNA 的基因沉默技术在昆虫中广泛使用,但其存在转染效率低、遗传不稳定等缺点。自从 2013 年张锋和 Church 两个团队相继报道 CRISPR/Cas9 系统在人和小鼠细胞中成功实现基因的定点编辑以来^[1,4],此技术已广泛应用于昆虫基因功能研究当中,其中主要是农业昆虫(表 1),这极大地推进了昆虫科学研究的发展。

表 1 CRISPR/Cas9 技术在非模式生物昆虫中的部分应用

| 目 | 物种 | 基因 | 功能 | 敲除/敲入 | 导入形式 | 参考文献 |
|--------------------|---|--|--------------------------|-------------------|---|----------------------|
| | 马铃薯甲虫 <i>Leptinotarsa decemlineata</i> | <i>vest</i> | 翅膀发育 | 敲除 | Cas9 RNP | [28] |
| 鞘翅目 Coleoptera | 赤拟谷盗 <i>Tribolium castaneum</i> | <i>EGFP</i> <i>cardinar</i> <i>vermillion</i> | 荧光基因 色素沉着 色素沉着 | 敲除/敲入 敲除 敲除 | U6-sgRNA质粒, Cas9 mRNA/sgRNA Cas9 protein/sgRNA Cas9 protein/sgRNA | [29] [30] [31] |
| | 异色瓢虫 <i>Harmonia axyridis</i> | <i>nAChRa6</i> | 杀虫剂抗性 | 敲除 | Cas9 protein/sgRNA | [32] |
| | | <i>PHYHD1</i> | 卵子大小 | 敲除 | Cas9 protein/sgRNA | [33] |
| | | <i>tim</i> | 昼夜行为节律 | 敲除 | U6-sgRNA质粒 | [34] |
| | 家蚕 <i>Bombyx mori</i> | <i>BLOS2</i> | 色素沉着 | 敲除 | a. Cas9/sgRNA质粒 b. Cas9 mRNA/sgRNA | [35] |
| | | a. <i>NHEJ-related genes</i> , b. <i>TUDOR-SN</i> | a. 细胞生长速率 b. 参与应激颗粒形成 | a. 敲除 b. 敲入 | Cas9/gRNA质粒 | [36] |
| 鳞翅目 Lepidoptera | | <i>ggnbp2</i> | 配子发生 | 敲除 | U6-sgRNA质粒 | [37] |
| | 棉铃虫 <i>Helicoverpa armigera</i> | <i>SNMP2</i> <i>ABCC2, ABCC3</i> | 性信息素识别 杀虫剂抗性 | 敲除 敲除 | Cas9 mRNA/sgRNA Cas9 protein/sgRNA | [38] [39] |
| | 柑橘凤蝶 <i>Papilio xuthus</i> | <i>yellow, spineless</i> | 色素沉着 | 敲除 | Cas9 protein/sgRNA | [40] |
| | 小红蛱蝶 <i>Vanessa cardui</i> | <i>yellow, spineless</i> | 色素沉着 | 敲除 | Cas9 protein/sgRNA | [40] |

续表 1

| 目 | 物种 | 基因 | 功能 | 敲除/敲入 | 导入形式 | 参考文献 |
|--------------------|--|-------------------------------------|-------------------------|-------|--------------------|------|
| | 斜纹夜蛾 <i>Spodoptera litura</i> | <i>Ebony</i> | 色素沉着 | 敲除 | Cas9 mRNA/sgRNA | [41] |
| | 欧洲玉米螟 <i>Bacillus thuringiensis</i> | <i>ABCC2</i> | 杀虫剂抗性 | 敲除 | Cas9 protein/sgRNA | [42] |
| | 二化螟 <i>Chilo suppressalis</i> | <i>Ebony</i> | 色素沉着 | 敲除 | Cas9 protein/sgRNA | [43] |
| | 小菜蛾 <i>Plutella xylostella</i> | <i>ABCC2, ABCC3</i> | 杀虫剂抗性 | 敲除 | Cas9 protein/sgRNA | [44] |
| | 番茄夜蛾 <i>Tuta Absoluta</i> | <i>cinnabar</i> | 色素沉着 | 敲除 | Cas9 protein/sgRNA | [45] |
| | 印度跳蚁 <i>Harpegnathos saltator</i> | <i>Orco</i> | 信息素感知 | 敲除 | Cas9 protein/sgRNA | [46] |
| | | <i>Mrjp1</i> | 雄性发育 | 敲除 | Cas9 mRNA/sgRNA | [47] |
| 膜翅目 Hymenoptera | 西方蜜蜂 <i>Apis mellifera</i> | a. <i>Mrjp1</i> , b. <i>Pax6</i> | a. 雄性发育 b. 胚胎器官的形态发育 | 敲除 | Cas9 protein/sgRNA | [48] |
| | | <i>yellow-y</i> | 色素沉着 | 敲除 | Cas9 protein/sgRNA | [49] |
| | 丽蝇蛹集金小蜂 <i>Nasonia vitripennis</i> | <i>cinnabar</i> | 色素沉着 | 敲除 | Cas9 protein/sgRNA | [50] |
| | | <i>cinnabar</i> | 色素沉着 | 敲除 | Cas9 RNP | [51] |
| | 褐稻虱 <i>Nilaparvata lugens</i> | <i>CSAD</i> | 色素沉着 | 敲除 | Cas9 RNP | [52] |
| | | <i>InR1, InR2</i> | 调节发育和寿命 | 敲除 | Cas9 RNP | [53] |
| 半翅目 Hemiptera | 烟粉虱 <i>Bemisia tabaci</i> | <i>white</i> | 色素沉着 | 敲除 | Cas9 RNP | [54] |
| | | <i>TRP</i> | 温度感知 | 敲除 | Cas9 mRNA/sgRNA | [55] |
| | 翅叶蝉 <i>Homalodisca vitripennis</i> | <i>cinnabar, white</i> | 色素沉着 | 敲除 | Cas9 protein/sgRNA | [56] |
| | 绿盲蝽 <i>Apolygus lucorum</i> | <i>white</i> | 色素沉着 | 敲除 | Cas9 protein/sgRNA | [57] |
| | 东亚飞蝗 <i>Locusta migratoria</i> | <i>Or35</i> | 气味受体 | 敲除 | Cas9 protein/sgRNA | [58] |
| 直翅目 Orthoptera | | <i>dsRNase2</i> | / | 敲除 | Cas9 RNP | [59] |
| | 双斑蟋 <i>Gryllus bimaculatus</i> | <i>Ubx, abd-A</i> | 调节组织器官形态发生 | 敲除/敲入 | Cas9 mRNA/sgRNA | [60] |
| | | <i>Ku70, lig4</i> | DNA连接与转录等功能 | 敲除/敲入 | Cas9 mRNA/sgRNA | [61] |
| 双翅目 Diptera | 埃及伊蚊 <i>Aedes aegypti</i> | <i>dsx, sxl</i> | 性别发生 | 敲除 | Cas9 protein/sgRNA | [62] |
| | | <i>Op1, Op2</i> | 视觉感知 | 敲除 | U6-gRNA质粒 | [63] |
| | 冈比亚按蚊 <i>Anopheles gambiae</i> | <i>FREPI</i> | 疟原虫易感性及自身生长发育 | 敲除 | U6-gRNA质粒 | [64] |

2.1 基因敲除技术在昆虫基因功能研究中的应用

2.1.1 在昆虫色素沉着的表型可塑性上的应用

早期基因敲除技术集中研究昆虫体色、眼色和翅色等色素基因,对于探索昆虫的遗传发育具有重要意义。在褐稻虱(*Nilaparvata lugens*)中,Chen等^[52]敲除黑色素代谢基因 *CSAD*(cysteine sulfinic acid decarboxylase)诱导 G0 代的突变,证明 *CSAD* 是成虫正常体色的必需基因;Xue等^[65]成功

验证 *cinnabar* 和 *white* 基因的沉默会引起褐稻虱红色复眼和白色复眼可遗传突变。Khan等^[66]利用 CRISPR/Cas9 技术敲除棉铃虫(*Helicoverpa armigera*)体细胞的色素沉着基因 *white*、*brown*、*scarlet* 和 *ok*,结果发现:*white* 的敲除对卵、一龄幼虫和成虫眼色有影响;*scarlet* 敲除后产生了一龄无色幼虫和黄色成虫;*brown* 敲除不影响其色素沉着表型;*ok* 的敲除使幼虫角质层变透明及眼色变黑。昆虫的翅色通常也是由多基因决定的。研究

人员对偏瞳蔽眼蝶 (*bicyclus anynana*) 的眼色进行研究, 发现通过 CRISPR/Cas9 系统敲除 *TH*、*DDC*、*aaNAT*、*yellow* 和 *ebony* 基因会影响其翅膀的结构组成和翅色^[67]。

2.1.2 在杀虫剂抗性研究上的应用 研究昆虫对杀虫剂的抗性机制对防治害虫有重要作用。2016 年, Wang 等^[68] 通过基因组敲除技术证明棉铃虫 *CAD* 基因是 Bt(Bactospeine) 杀虫剂 CryIAc 毒素受体; 2017 年, 该团队又通过基因敲除分别建立了 1 个 *ABCA2* 基因第二外显子上 2 bp 缺失的突变品系和 1 个类似 r2 突变的 5 bp 缺失品系, 证明了棉铃虫 *ABCA2* 对 Bt 杀虫剂 Cry2Aa 和 Cry2Ab 毒素的高抗性^[69]。在对亚洲玉米螟 (*Ostrinia furnacalis*) 的研究中发现, *ABCC2* 基因对 Cry1Fa 具有高水平抗性, 而对 Cry1Ab 和 Cry1Ac 抗性较低^[42]。草地贪夜蛾 (*Spodoptera frugiperda*) *ABCC2* 基因的敲除使其对 Cry1F 的抗性增加 118 倍^[70]。双酰胺类杀虫剂具有胃毒作用, 对鳞翅目昆虫防治效果好, 但小菜蛾 (*Plutella xylostella*) 由于其繁殖能力强和周期短的特点很快产生了抗药性^[71], Troczka 等^[72] 发现其抗药性与鱼尼丁受体 G4946E 的突变有关。随后 Zuo 等^[73] 利用 CRISPR/Cas9 技术在甜菜夜蛾 (*Spodoptera exigua*) 中证明鱼尼丁受体 G4946E 突变, 对氯虫苯甲酰胺、氯虫酰胺和氯虫双酰胺的抗性分别提高 223、336 和 1000 倍以上。

2.1.3 在昆虫神经行为学研究中的应用 化学信息素信号通过昆虫神经外周组织接受, 触角神经组织处理, 进而在脑部中枢神经系统嗅觉和其他感受器官共同指导昆虫觅食、交配、生殖等^[74-75]。Garczynski 等^[76] 通过该技术靶向敲除苹果蠹蛾 (*Cydia pomonella*) 的 *OR1* 基因, 发现对突变雌虫繁殖力影响严重。烟草天蛾 (*Manduca sexta*) 的嗅觉受体 *ORCO* 被敲除后, 其觅食行为发生变化, 而产卵行为不变^[77]。Ye 等^[78] 通过 CRISPR/Cas9 敲除棉铃虫编码信息素结合蛋白 (Pheromone binding proteins) 基因 *PBPI*, 证实 *PBPI* 在雌虫性信息素的感知中具有重要作用, 性信息素的感知与交配有关。敲除斜纹夜蛾信息素结合蛋白基因 *PBP3* 引起突变体对性信息素感知能力显著下降^[79]。

研究昆虫性别分化有利于农业昆虫的种群控制和害虫防治。家蚕和小菜蛾 *ser2* 基因敲除引起

雄性个体不育, 但并不影响突变体的交配行为, 最终将雄性不育表型传递给后代^[80]。在家蚕和斜纹夜蛾中, *osp* 基因的敲除使突变雌性的交配行为不变, 但所产的卵不发育^[81]。Markert 等^[82] 利用 TALENS 和 CRISPR/Cas9 系统使君主斑蝶 (*Danaus plexippus*) 时钟相关基因 *cryptochrome2* (*cry2*) 和 *clock* (*cl*) 突变, 发现 *clk* 是位于 Z 性染色体的性别连锁基因; 敲除 *clk* 会破坏其羽化的昼夜节律。

2.2 基因敲入技术在昆虫基因功能研究中的应用 基因敲入难于基因敲除, 该技术利用细胞自身的 HDR 修复机制通过靶向编辑系统将外源基因定点整合到基因组中。果蝇中基因敲入的应用较多。如, Xue 等^[83] 将 sgRNA 与环状 DNA 供体注射到果蝇胚胎, 成功实现了同源重组介导的荧光基因敲入; Zimmer 等^[84] 使用 CRISPR/Cas9 系统引入了果蝇 nAChR α 6 受体中的同源突变, 发现该受体 G275E 突变显著增加了果蝇对多杀菌素的抗性; 随后 Lamb 等^[85] 利用该技术在果蝇的目标位点实现了精确替换。基因敲入在其他农业昆虫中也有一些相关报道。如, 2015 年, Gillies 等^[29] 将非同源末端连接产生的突变引入赤拟谷盗 (*Tribolium castaneum*), 证实这种突变能传递给下一代, 并在 14% 的注射个体中观察到标记的定向敲入; 2021 年, Matsuoka 等^[60] 通过将供体序列敲入双斑蟋 (*Gryllus bimaculatus*) 基因 *Ubx*、*abd-A* 的外显子来破坏目标基因的功能, 将成功应用于 *Hox* 相关基因的功能分析。

3 CRISPR/Cas9 技术的优化与改良

传统的 CRISPR/Cas9 基因组编辑技术是通过引入 DSB 进行基因编辑的, 但由于细胞修复机制的复杂性和多变性, 在实验操作中脱靶效应 (off-target effect) 和编辑效率低仍然是目前需要面对的难题。Cas9 活性、sgRNA 序列设计和靶 DNA 位点下游 PAM 序列识别等都是造成脱靶效应或增加脱靶效应风险的因素。目前已经报道了许多针对该技术改良优化以提升基因编辑成功率方案, 如选择不同的 Cas9 同源蛋白^[86-88], 优化 sgRNA 靶点的设计^[89-90]; 也可通过优化 Cas9 RNP 的传递方式和提高 sgRNA-Cas9 复合物的浓度^[91] 等进行该技术改良和优化。

3.1 Cas9 同源蛋白优化 CRISPR/Cas9 研究人员将突变引入 Cas9 蛋白的 D10A 或 H840A, 即使一个 HNH 结构域或 RuvC 结构域失去活性或同时失活, 以得到仅具有结合能力和单链裂解活性或不具裂解活性的 dCas9(deadCas9)蛋白; dCas9 在 sgRNA 导向下与 DNA 结合的功能不受影响^[92-93]。CRISPR/dCas9 系统能够调控基因的转录抑制和转录激活^[93-94], 如 Liu 等^[95] 将 dCas9 与调控因子 DNMT3A 融合, O'Geen 等^[96] 将 dCas9 与调控因子 FOG1 融合, 二者的目的均是使基因转录水平得到抑制。上述 Cas9 蛋白均为来源于酿脓链球菌的 SpCas9 蛋白, 近年来还发现了来自金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)的 SaCas9 蛋白。SaCas9 在晶体结构和基因组编辑效率方面和 SpCas9 非常相似, 但其分子量小, 首选 PAM 序列为 5'-NNGRRT(N 为任意核苷酸; R=A 或 G), 增加了靶位点识别的特异性^[97-98]。2017 年, Ma 等^[99] 通过用 SaCas9 替换 SpCas9 编码序列构建载体, 选取 *BmKu70* 为靶点, 成功验证了 SaCas9/sgRNA 介导的新型 CRISPR/Cas9 系统在家蚕中的应用, 基因编辑效率达到 11.9%。除此之外, Hu、Guo 等^[100-101] 均报道了一种 Cas9 的变体—xCas9 3.7, 它的突变使 PAM 序列的识别不及 Cas9 精准, 但可灵活识别多个 PAM 序列, 这是由 E1219 构象变化导致盐桥不稳定引起的。xCas9 3.7 变体无论是在体外生化实验还是在胞内实验都表现出优良的 PAM 识别兼容性和 DNA 靶向性, 为解决基因编辑效率问题提供了更多选择^[100]。

3.2 sgRNA 靶点设计优化 CRISPR/Cas9 研究发现, sgRNA 基因编辑效率与靶 DNA PAM 序列附近 10~12 bp 碱基的 GC 含量成正比^[102], 且含量在 40%~80% 具有切割效率^[103]。Gagnon 等还发现, 5'-GA sgRNAs 的切割效率与 5'-GG sgRNAs 相比存在轻微下降。对于 sgRNA 的长度设计, 研究者存在争议。早期研究通常设计 20 个核苷酸序列, Fu 等^[104] 认为低于 20 个核苷酸序列的短 sgRNA 能够在不影响基因编辑效果的条件下降低脱靶风险, 而 Kleinstiver 等^[105] 则认为无法增加靶位点识别特异性, 且还会降低基因编辑效率, 因此问题有待进一步探索。Zhang 等^[106] 根据鳞翅目昆虫的 CRISPR/Cas9 技术进行了总结, 建议使用 CasBLASTR web 工具识别任一单链的

GGN₁₈NGG 或 N₂₀NGG 序列, 以确定 sgRNA 靶位点; 并建议基因插入用含有 EGFP 蛋白编码序列和同源臂的供体质粒来匹配 Cas9 位点两侧序列。

3.3 Cas9 RNP 传递方式优化 CRISPR/Cas9 Rodriguez 等^[107] 受卵黄蛋白前体(Yolk Protein Precursor)通过受体介导的内吞作用进入卵巢过程的启发, 开发了一种受体介导的卵巢分子转运(Receptor-Mediated Ovary Transduction of Cargo, ReMOT control)技术, 使配体 P2C 肽与 Cas9 蛋白结合, 从而介导 Cas9 核糖核蛋白(Cas9 RNP)从雌性蚊子血淋巴转导到发育中的卵母细胞, 实现了可遗传给后代的基因编辑, 效率达到 30%。2020 年, 研究人员又利用 ReMOT 控制技术融合 EGFP 对丽蝇蛹集金小蜂(*Nasonia vitripennis*)基因 *cinnabar* 进行编辑, 成功观察到卵巢输送的荧光标记^[51]。Shirai 等^[30] 利用该技术通过向赤拟谷盗成虫进行显微注射, 建立了新的 *cardinal* 突变系。Heu 等^[54] 也利用该技术以 BtKV 作为卵巢靶向肽配体, 成功完成了在烟粉虱(*Bemisia tabaci*)上的基因编辑。此外, Wu 等^[108] 开发了一种新型的蛋白质电晕纳米颗粒——结合介导的蛋白质冠状体, 由 Cas9 RNP、纳米粒子核心和亲和配体构成, 具有高效传递、高稳定性和低细胞毒性等优点。

3.4 sgRNA-Cas9 复合物优化 CRISPR/Cas9 最新研究认为 sgRNA 与 Cas9 蛋白的浓度比例与脱靶效应密切相关^[91], 复合体的浓度较高时, 错配即使发生在 PAM 区或邻近 PAM 区, DNA 切割仍然继续进行, 这种现象在低浓度时则不会发生, 因此在实验中应选择合适的启动子以控制 sgRNA 和 Cas9 的表达量。此外, Svitashv 等^[109] 的研究表明在体外先将 Cas9 和 sgRNA 组装成复合物 Cas9 RNP 后再导入受体中也有利于降低脱靶效应。

4 展 望

CRISPR/Cas9 系统介导的基因编辑技术是近些年最有力的基因编辑技术之一。哺乳动物中利用 CRISPR/Cas9 技术筛选致病菌和毒素的研究方法已得到广泛应用, 在昆虫中亦有报道^[110]。在 Perrimon 教授团队开发的果蝇 S2R+细胞全基因 CRISPR/Cas9 文库基础上^[111], 董民教授团队开发了一种质粒介导的 sgRNA 文库转染, 通过位点特异性重组实现稳定整合, 研究结果表明, 在免疫细胞中表达的 Vsg 是发光杆菌(*Photobacterium*)

luminescens)Tc 毒素的特异性受体; Vsg 敲除的果蝇血细胞对该毒素具有抗性。此研究为农业昆虫及媒介传染病昆虫靶向毒素和病原菌的鉴定提供了全新的研究方案。虽然在模式昆虫和许多非模式昆虫中都已初步建立了 CRISPR/Cas9 基因编辑系统,但与基因敲除相比,基因敲入研究鲜有报道,这可能是由于 CRISPR/Cas9 系统对基因组 DNA 靶向切割后,虽然通过同源重组修复能够实现目的片段的插入,但整合效率和成功率依然很低,未来的基因敲入系统还需要继续探索优化。

CRISPR/Cas9 基因组编辑技术在近些年发展迅速,由于在此基础上构建的基因驱动 (gene drive) 系统在理论上能驱动性状的变化趋势,因此可用于调控害虫种群的性别比例,为害虫防治提供新策略^[12]。化学杀虫剂的不合理使用不仅危及人类健康,也使许多害虫对化学杀虫剂产生强烈的抗药性,从而引起更加严重的药剂滥用,造成恶性循环。基因驱动策略是一个重要的发展方向。基因驱动策略是指特定基因在种群中偏向性地遗传给下一代的现象,最早由帝国理工大学遗传学家 Austin Burt 在 2003 年提出^[113],其原理是基于归巢内切酶或人工核酸酶构建而成的驱动系统。目前基于 CRISPR/Cas9 构建的基因驱动系统已在斯氏按蚊 (*Anopheles stephensi*)^[114]、冈比亚按蚊 (*Anopheles gambiae*)^[115] 等昆虫上成功建立了理论模型,为降低疟疾传播风险提供理论支撑。然而,由于这种技术的应用存在不可控性,一旦在种群中广泛扩散,可能对生物种群和生态链造成破坏,因此,建立安全、可控、高效及稳定的基因驱动系统有待科学家继续研究。

目前,利用 CRISPR/Cas9 工具开展的昆虫相关工作主要集中在鉴定功能基因和实验优化改良等基础研究上;新型和多样 CRISPR/Cas9 体系的不断发展与构建,将会推动农业害虫的绿色防控工作得到高度重视与快速推进,基于 CRISPR/Cas9 构建的基因驱动系统的安全性也将得到持续关注。

参考文献:

- [1] CONG L, RAN F A, COX D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems [J]. *Science*, 2013, 339: 819 – 824.
- [2] CHO S W, KIM S, KIM J M, et al. Targeted genome engineering in human cells with the Cas9 RNA-guided en-

- donuclease [J]. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(3): 230 – 232.
- [3] JINEK M, EAST A, CHENG A, et al. RNA-programmed genome editing in human cells [J]. *Elife*, 2013, 2: e00471.
- [4] MALI P, YANG L H, ESVELT K M, et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9 [J]. *Science*, 2013, 339: 829 – 833.
- [5] MANGUSO R T, POPE H W, ZIMMER M D, et al. *in vivo* CRISPR screening identifies Ptpn2 as a cancer immunotherapy target [J]. *Nature*, 2017, 547(7664): 413 – 418.
- [6] SMALLEY E. CRISPR mouse model boom, rat model renaissance [J]. *Nat Biotechnol*, 2016, 34(9): 893 – 894.
- [7] HWANG W Y, FU Y, REYON D, et al. Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system [J]. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(3): 227 – 229.
- [8] SADHU M J, BLOOM J S, DAY L, et al. Highly parallel genome variant engineering with CRISPR-Cas9 [J]. *Nat Genet*, 2018, 50(4): 510 – 514.
- [9] PORT F, BULLOCK S L. Augmenting CRISPR applications in *Drosophila* with tRNA-flanked sgRNAs [J]. *Nat Methods*, 2016, 13(10): 852 – 854.
- [10] WANG Y, LI Z, XU J, et al. The CRISPR/Cas system mediates efficient genome engineering in *Bombyx mori* [J]. *Cell Res*, 2013, 23(12): 1414 – 1416.
- [11] KIM Y G, CHA J, CHANDRASEGARAN S. Hybrid restriction enzymes: Zinc finger fusions to Fok I cleavage domain [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996, 93(3): 1156 – 1160.
- [12] LI T, HUANG S, ZHAO X, et al. Modularly assembled designer tal effector nucleases for targeted gene knockout and gene replacement in eukaryotes [J]. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39(14): 6315 – 6325.
- [13] WAH D A, BITINALTE J, SCHILDKRAUT I, et al. Structure of FokI has implications for DNA cleavage [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998, 95(18): 10564 – 10569.
- [14] BIBIKOVA M, BEUMER K, TRAUTMAN J K, et al. Enhancing gene targeting with designed zinc finger nucleases [J]. *Science* 2003; 300(5620): 764. PAVLETICH N P, PABO C O. Zinc finger-DNA recognition: Crystal structure of a Zif268-DNA complex at 2.1 Å [J]. *Science* 1991; 252(5007): 809-817.
- [15] BOCH J, BONAS U. Xanthomonas AvrBs3 family-type III effectors: discovery and function [J]. *Annu Rev Phytopathol*, 2010, 48: 419 – 436.
- [16] SCHOLZE H, BOCH J. Tal effectors are remote controls for gene activation [J]. *Curr Opin Microbiol*, 2011, 14(1): 47 – 53.
- [17] ISHINO Y, SHINAGAWA H, MAKINO K, et al. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product [J]. *J Bacteriol*, 1987, 169(12): 5429 – 5433.
- [18] JANSEN R, JDA V E, GAASTRA W, et al. Identifica-

- tion of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes [J]. *Mol Microbiol*, 2002, 43(6): 1565 – 1575.
- [19] BOLOTIN A, QUINQUIS B, SOROKIN A, et al. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin [J]. *Microbiol (Reading)* 2005; 151(Pt 8): 2551–2561.
- [20] MOJICA F J, DIEZ-VILLASENOR C, GARCIA-MARTINEZ J, et al. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements [J]. *J Mol Evol*, 2005, 60(2): 174 – 182.
- [21] POURCEL C, SALVIGNOL G, VERGNAUD G. CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies [J]. *Microbiol (Reading)* 2005; 151(Pt 3): 653–663.
- [22] BARRANGOU R, FREMAUX C, DEVEAU H, et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes [J]. *Science*, 2007, 315: 1709 – 1713.
- [23] BROUNS S J J, JORE M M, LUNDGREN M, et al. Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes [J]. *Science*, 2008, 321(5801): 960 – 964.
- [24] DELTCHEVA E, CHYLINSKI K, SHARMA C M, et al. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III [J]. *Nature*, 2011, 471(7340): 602 – 607.
- [25] GARNEAU J E, DUPUIS M E, VILLION M, et al. The CRISPR/CAS bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA [J]. *Nature*, 2010, 468(7320): 67 – 71.
- [26] 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 – 822.
- [27] GUI S, TANING C N T, WEI D, et al. First report on CRISPR/Cas9-targeted mutagenesis in the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* [J]. *J Insect Physiol*, 2020, 121: 104013.
- [28] GILLES A F, SCHINKO J B, AVEROF M. Efficient CRISPR-mediated gene targeting and transgene replacement in the beetle *Tribolium castaneum* [J]. *Development*, 2015, 142(16): 2832 – 2839.
- [29] SHIRAI Y, DAIMON T. Mutations in cardinal are responsible for the red-1 and peach eye color mutants of the red flour beetle *Tribolium castaneum* [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020, 529(2): 372 – 378.
- [30] ADRIANOS S, LORENZEN M, OPPERT B. Metabolic pathway interruption: CRISPR/Cas9-mediated knockout of tryptophan 2, 3-dioxygenase in *Tribolium castaneum* [J]. *J Insect Physiol*, 2018, 107: 104 – 109.
- [31] 刘帅, 王兴亮, 施雨, 等. 异色瓢虫 nAChR α 6 基因的敲除及其对杀虫剂敏感性的影响 [J]. *植物保护学报*, 2020, 47(3): 478 – 487.
- [32] FUJII T, BANNO Y. Enlargement of egg size by CRISPR/Cas9-mediated knockout of a sex-linked gene in the silkworm, *Bombyx mori* [J]. *J Insect Biotechnol Sericol*, 2018, 87: 71 – 78.
- [33] ADDO N M, SUN X, QIN S, et al. CRISPR/Cas9-based knockout reveals that the clock gene timeless is indispensable for regulating circadian behavioral rhythms in *Bombyx mori* [J]. *Insect Sci*, 2021, 28(5): 1414 – 1425.
- [34] ZENG B, ZHAN S, WANG Y, et al. Expansion of CRISPR targeting sites in *Bombyx mori* [J]. *Insect Biochem Mol Biol*, 2016, 72: 31 – 40.
- [35] ZHU L, MON H, XU J, et al. CRISPR/Cas9-mediated knockout of factors in non-homologous end joining pathway enhances gene targeting in silkworm cells [J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 18103.
- [36] 刘洪镔, 汪丽枝, 刘祖莲, 等. 利用 CRISPR/Cas9 二元转基因体系探究家蚕配子生成素结合蛋白基因 *Bmgnbp2* 的功能 [J]. *昆虫学报*, 2021, 64(3): 309 – 317.
- [37] 刘帅. 棉铃虫性信息素识别及交配后行为的调控机制研究 [D]. 长春: 东北师范大学, 2021.
- [38] WANG J, MA H, ZHAO S, et al. Functional redundancy of two ABC transporter proteins in mediating toxicity of *Bacillus thuringiensis* to cotton bollworm [J]. *PLoS Pathog*, 2020, 16(3): e1008427.
- [39] PERRY M, KINOSHITA M, SALDI G, et al. Molecular logic behind the three-way stochastic choices that expand butterfly colour vision [J]. *Nature*, 2016, 535(7611): 280 – 284.
- [40] BI H L, XU J, HE L, et al. CRISPR/Cas9-mediated ebony knockout results in puparium melanism in *Spodoptera litura* [J]. *Insect Sci*, 2019, 26(6): 1011 – 1019.
- [41] WANG X, XU Y, HUANG J, et al. CRISPR-mediated knockout of the *ABCC2* gene in *Ostrinia furnacalis* confers high-level resistance to the *Bacillus thuringiensis* Cry1Fa toxin [J]. *Toxins (Basel)*, 2020, 12(4): 246.
- [42] SUN H, HUANG J M, LIU Y, et al. Knockout of ebony gene leads to melanin pigmentation in the rice stem borer, *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Crambidae) [J]. *Acta Entomol Sin*, 2021, 64(12): 1367 – 1376.
- [43] 孙丹. CRISPR/Cas9 介导的小菜蛾对 Bt CRY1Ac 毒素抗性的分子机制研究 [D]. 长沙: 湖南大学, 2020.
- [44] JI S X, BI S Y, WANG X D, et al. First report on CRISPR/Cas9-based genome editing in the destructive invasive pest *Tuta absoluta* (meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) [J]. *Front Genet*, 2022, 13: 865622.
- [45] YAN H, OPACHALOEMPHAN C, MANCINI G, et al. An engineered Orco mutation produces aberrant social behavior and defective neural development in ants [J]. *Cell*, 2017, 170(4): 736 – 747.
- [46] KOHNO H, SUENAMI S, TAKEUCHI H, et al. Production of knockout mutants by CRISPR/Cas9 in the European honeybee, *Apis mellifera* L [J]. *Zoolog Sci*, 2016, 33(5): 505 – 512.
- [47] HU XF, ZHANG B, LIAO C H, et al. High-efficiency CRISPR/Cas9-mediated gene editing in honeybee (*Apis*

- mellifera*) embryos [J]. *G3 (Bethesda)*, 2019, 9(5): 1759 – 1766.
- [48] NIE H Y, LIANG L Q, LI Q F, et al. CRISPR/Cas9 mediated knockout of *Amyyellow-y* gene results in melanization defect of the cuticle in adult *Apis mellifera* [J]. *J Insect Physiol*, 2021, 132: 104264.
- [49] LI M, AU L Y C, DOUGLAH D, et al. Generation of heritable germline mutations in the jewel wasp *Nasonia vitripennis* using CRISPR/Cas9 [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 901.
- [50] RODRIGUEZ D C, BENETTA E D, HEU C C, et al. Germline mutagenesis of *Nasonia vitripennis* through ovarian delivery of CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein [J]. *Insect Mol Biol*, 2020, 29(6): 569 – 577.
- [51] CHEN J X, LI W X, LYU J, et al. CRISPR/Cas9-mediated knockout of the *NICSAD* gene results in darker cuticle pigmentation and a reduction in female fecundity in *Nilaparvata lugens* (Hemiptera: Delphacidae) [J]. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 2021, 256: 110921.
- [52] ZHAO Y, HUANG G, ZHANG W. Mutations in *NlInR1* affect normal growth and lifespan in the brown planthopper *Nilaparvata lugens* [J]. *Insect Biochem Mol Biol*, 2019, 115: 103246.
- [53] HEU C C, MCCULLOUGH F M, LUAN J, et al. CRISPR-Cas9-based genome editing in the silverleaf whitefly (*Bemisia tabaci*) [J]. *CRISPR J*, 2020, 3(2): 89 – 96.
- [54] 王原, 吕志创, 万方浩. 烟粉虱 CRISPR/Cas9 系统的建立及其在 BtTRP 基因温度耐受性功能验证中的应用 [J]. *中国生物防治学报*, 2018, 34(2): 254 – 258.
- [55] PACHECO I S, DOSS A A, VINDIOLA B G, et al. Efficient CRISPR/Cas9-mediated genome modification of the glassy-winged sharpshooter *Homalodisca vitripennis* (Germar) [J]. *Sci Rep*, 2022, 12(1): 6428.
- [56] 左恺然. 绿盲蝽对毒死蜱的抗性机理研究及 CRISPR/Cas9 基因敲除体系的构建 [D]. 南京: 南京农业大学, 2019.
- [57] CHEN D, TANG J X, LI B, et al. CRISPR/Cas9-mediated genome editing induces exon skipping by complete or stochastic altering splicing in the migratory locust [J]. *BMC Biotechnol*, 2018, 18(1): 60.
- [58] ZHANG T T, WEN T M, YUE Y, et al. Egg tanning improves the efficiency of CRISPR/Cas9-mediated mutant locust production by enhancing defense ability after microinjection [J]. *J Integr Agr*, 2021, 20(10): 2716 – 2726.
- [59] MATSUOKA Y, NAKAMURA T, WATANABE T, et al. Establishment of CRISPR/Cas9-based knock-in in a hemimetabolous insect: targeted gene tagging in the cricket *Gryllus bimaculatus* [J]. *bioRxiv* 2021.doi:https://doi.org/10.1101/2021.05.10.441399
- [60] BASU S, ARYAN A, OVERCASH J M, et al. Silencing of end-joining repair for efficient site-specific gene insertion after TALEN/CRISPR mutagenesis in *Aedes aegypti* [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015, 112(13): 4038 – 4043.
- [61] ZULHUSSNAIN M, ZAHOOR M K, RANIAN K, et al. CRISPR Cas9 mediated knockout of sex determination pathway genes in *Aedes aegypti* [J]. *Bull Entomol Res*, 2022: 1 – 10.
- [62] ZHAN Y, ALONSO SAN ALBERTO D, RUSCH C, et al. Elimination of vision-guided target attraction in *Aedes aegypti* using CRISPR [J]. *Curr Biol*, 2021, 31(18): 4180 – 4187.
- [63] DONG Y, SIMOES M L, MAROIS E, et al. CRISPR/Cas9-mediated gene knockout of *Anopheles gambiae* FREP1 suppresses malaria parasite infection [J]. *PLoS Pathog*, 2018, 14(3): 1006898.
- [64] XUE W H, XU N, YUAN X B, et al. CRISPR/Cas9-mediated knockout of two eye pigmentation genes in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Hemiptera: Delphacidae) [J]. *Insect Biochem Mol Biol*, 2018, 93: 19 – 26.
- [65] KHAN S A, REICHELT M, HECKEL D G. Functional analysis of the ABCs of eye color in *Helicoverpa armigera* with CRISPR/Cas9-induced mutations [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 40025.
- [66] MATSUOKA Y, MONTEIRO A. Melanin pathway genes regulate color and morphology of butterfly wing scales [J]. *Cell Rep*, 2018, 24(1): 56 – 65.
- [67] WANG J, ZHANG H, WANG H, et al. Functional validation of cadherin as a receptor of Bt toxin Cry1Ac in *Helicoverpa armigera* utilizing the CRISPR/Cas9 system [J]. *Insect Biochem Mol Biol*, 2016, 76: 11 – 17.
- [68] WANG J, WANG H, LIU S, et al. CRISPR/Cas9 mediated genome editing of *Helicoverpa armigera* with mutations of an ABC transporter gene *HaABCA2* confers resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry2A toxins [J]. *Insect Biochem Mol Biol*, 2017, 87: 147 – 153.
- [69] JIN M H, TAO J H, LI Q, et al. Genome editing of the *SfABCC2* gene confers resistance to Cry1F toxin from *Bacillus thuringiensis* in *Spodoptera frugiperda* [J]. *J Integr Agr*, 2021, 20(3): 815 – 820.
- [70] TROCZKA B J, WILLIAMSON M S, FIELD L M, et al. Rapid selection for resistance to diamide insecticides in *Plutella xylostella* via specific amino acid polymorphisms in the ryanodine receptor [J]. *Neurotoxicology*, 2017, 60: 224 – 233.
- [71] TROCZKA B, ZIMMER C T, ELIAS J, et al. Resistance to diamide insecticides in diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) is associated with a mutation in the membrane-spanning domain of the ryanodine receptor [J]. *Insect Biochem Mol Biol*, 2012, 42(11): 873 – 880.
- [72] ZUO Y, WANG H, XU Y, et al. CRISPR/Cas9 mediated G4946E substitution in the ryanodine receptor of *Spodoptera exigua* confers high levels of resistance to diamide insecticides [J]. *Insect Biochem Mol Biol*, 2017, 89: 79 – 85.

- [73] FLEISCHER J, PREGITZER P, BREER H, et al. Access to the odor world: olfactory receptors and their role for signal transduction in insects [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2018, 75(3): 485 – 508.
- [74] 刘伟, 王桂荣. 昆虫嗅觉中枢系统对外周信号的整合编码研究进展 [J]. *昆虫学报*, 2020, 63(12): 1536 – 1545.
- [75] GARCZYNSKI S F, MARTIN J A, GRISET M, et al. CRISPR/Cas9 editing of the codling moth (Lepidoptera: Tortricidae) *CpomOR1* gene affects egg production and viability [J]. *J Econ Entomol*, 2017, 110(4): 1847 – 1855.
- [76] FANDINO R A, HAVERKAMP A, BISCH-KNADEN S, et al. Mutagenesis of odorant coreceptor Orco fully disrupts foraging but not oviposition behaviors in the hawkmoth *Manduca sexta* [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2019, 116(31): 15677 – 15685.
- [77] YE Z F, LIU X L, HAN Q, et al. Functional characterization of PBP1 gene in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) by using the CRISPR/Cas9 system [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 8470.
- [78] ZHU G H, XU J, CUI Z, et al. Functional characterization of SlitPBP3 in *Spodoptera litura* by CRISPR/Cas9 mediated genome editing [J]. *Insect Biochem Mol Biol*, 2016: 1 – 9.
- [79] XU X, BI H, WANG Y, et al. Disruption of the ovarian serine protease (Osp) gene causes female sterility in *Bombyx mori* and *Spodoptera litura* [J]. *Pest Manag Sci*, 2020, 76(4): 1245 – 1255.
- [80] XU X, WANG Y, BI H, et al. Mutation of the seminal protease gene, serine protease 2, results in male sterility in diverse lepidopterans [J]. *Insect Biochem Mol Biol*, 2019, 116: 103243.
- [81] MARKERT M J, ZHANG Y, ENUAMEH M S, et al. Genomic access to monarch migration using talen and CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis [J]. *G3 (Bethesda)*, 2016, 6(4): 905 – 915.
- [82] XUE Z, REN M, WU M, et al. Efficient gene knock-out and knock-in with transgenic Cas9 in *Drosophila* [J]. *G3 (Bethesda)*, 2014, 4(5): 925 – 929.
- [83] ZIMMER C T, GARROOD W T, PUINEAN A M, et al. A CRISPR/Cas9 mediated point mutation in the alpha 6 subunit of the nicotinic acetylcholine receptor confers resistance to spinosad in *Drosophila melanogaster* [J]. *Insect Biochem Mol Biol*, 2016, 73: 62 – 69.
- [84] LAMB A M, WALKER E A, WITTKOPP P J. Tools and strategies for scarless allele replacement in *Drosophila* using CRISPR/Cas9 [J]. *Fly (Austin)*, 2017, 11(1): 53 – 64.
- [85] CASINI A, OLIVIERI M, PETRIS G, et al. A highly specific SpCas9 variant is identified by *in vivo* screening in yeast [J]. *Nat Biotechnol*, 2018, 36(3): 265 – 271.
- [86] KIM E, KOO T, PARK S W, et al. *in vivo* genome editing with a small Cas9 orthologue derived from *Campylobacter jejuni* [J]. *Nat Commun*, 2017, 8: 14500.
- [87] TANING C N T, VAN EYNDE B, YU N, et al. CRISPR/Cas9 in insects: Applications, best practices and biosafety concerns [J]. *J Insect Physiol*, 2017, 98: 245 – 257.
- [88] CAGLIARI D, SMAGGHE G, ZOTTI M, et al. RNAi and CRISPR/Cas9 as functional genomics tools in the neotropical stink bug, *Euschistus heros* [J]. *Insects*, 2020, 11(12): 838.
- [89] GILBERT L A, HORLBECK M A, ADAMSON B, et al. Genome-scale CRISPR-mediated control of gene repression and activation [J]. *Cell*, 2014, 159(3): 647 – 661.
- [90] PATTANAYAK V, LIN S, GUILINGER J P, et al. High-throughput profiling of off-target DNA cleavage reveals RNA-programmed Cas9 nuclease specificity [J]. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(9): 839 – 843.
- [91] 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 U S A*, 2012, 109(39): 2579 – 2586.
- [92] QI L S, LARSON M H, GILBERT L A, et al. Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression [J]. *Cell*, 2013, 152(5): 1173 – 1183.
- [93] HILTON I B, D'IPPOLITO A M, VOCKLEY C M, et al. Epigenome editing by a CRISPR-Cas9-based acetyltransferase activates genes from promoters and enhancers [J]. *Nat Biotechnol*, 2015, 33(5): 510 – 517.
- [94] LIU X S, WU H, JI X, et al. Editing DNA methylation in the mammalian genome [J]. *Cell*, 2016, 167(1): 233 – 247.
- [95] O'GEEN H, REN C, NICOLET C M, et al. dCas9-based epigenome editing suggests acquisition of histone methylation is not sufficient for target gene repression [J]. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45(17): 9901 – 9916.
- [96] NISHIMASU H, CONG L, YAN W X, et al. Crystal structure of *Staphylococcus aureus* Cas9 [J]. *Cell*, 2015, 162(5): 1113 – 1126.
- [97] RAN F A, CONG L, YAN W X, et al. *in vivo* genome editing using *Staphylococcus aureus* Cas9 [J]. *Nature*, 2015, 520(7546): 186 – 191.
- [98] MA S, LIU Y, LIU Y, et al. An integrated CRISPR *Bombyx mori* genome editing system with improved efficiency and expanded target sites [J]. *Insect Biochem Mol Biol*, 2017, 83: 13 – 20.
- [99] GUO M, REN K, ZHU Y, et al. Structural insights into a high fidelity variant of SpCas9 [J]. *Cell Res*, 2019, 29(3): 183 – 192.
- [100] HU J H, MILLER S M, GEURTS M H, et al. Evolved Cas9 variants with broad PAM compatibility and high DNA specificity [J]. *Nature*, 2018, 556(7699): 57 – 63.
- [101] REN X, YANG Z, XU J, et al. Enhanced specificity

- and efficiency of the CRISPR/Cas9 system with optimized sgRNA parameters in *Drosophila* [J]. *Cell Rep*, 2014, 9(3): 1151 – 1162.
- [102] GAGNON J A, VALEN E, THYME S B, et al. Efficient mutagenesis by Cas9 protein-mediated oligonucleotide insertion and large-scale assessment of single-guide RNAs [J]. *PLoS One*, 2014, 9(5): e98186.
- [103] FU Y, SANDER J D, REYON D, et al. Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs [J]. *Nat Biotechnol*, 2014, 32(3): 279 – 284.
- [104] KLEINSTIVER B P, PATTANAYAK V, PREW M S, et al. High-fidelity CRISPR-Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects. *Nature* 2016; 529(7587): 490-495.
- [105] ZHANG L L, REED R D. A practical guide to CRISPR/Cas9 genome editing in Lepidoptera [M]//Diversity and evolution of butterfly wing patterns. Springer, Singapore, 2017: 155-172.
- [106] RODRIGUEZ D C, MACIAS V M, HUGHES G L, et al. Targeted delivery of CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein into arthropod ovaries for heritable germline gene editing [J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 3008.
- [107] WU J, PENG H, LU X, et al. Binding-mediated formation of ribonucleoprotein corona for efficient delivery and control of CRISPR/Cas9 [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2021, 60(20): 11104 – 11109.
- [108] SVITASHEV S, SCHWARTZ C, LENDERTS B, et al. Genome editing in maize directed by CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein complexes [J]. *Nat Commun*, 2016, 7: 13274.
- [109] XU Y, VISWANATHA R, SITSEL O, et al. CRISPR screens in *Drosophila* cells identify Vsg as a Tc toxin receptor [J]. *Nature*, 2022, 610(7931): 349 – 355.
- [110] VISWANATHA R, LI Z C, HU Y H, et al. Pooled genome-wide CRISPR screening for basal and context-specific fitness gene essentiality in *Drosophila* cells [J]. *Elife*, 2018, 7: e36333.
- [111] CHAMPER J, BUCHMAN A, AKBARI O S. Cheating evolution: engineering gene drives to manipulate the fate of wild populations [J]. *Nat Rev Genet*, 2016, 17(3): 146 – 159.
- [112] BURT A. Site-specific selfish genes as tools for the control and genetic engineering of natural populations [J]. *Proc Biol Sci*, 2003, 270(1518): 921 – 928.
- [113] GANTZ V M, BIER E. The mutagenic chain reaction: a method for converting heterozygous to homozygous mutations [J]. *Science*, 2015, 348(6233): 442 – 444.
- [114] HAMMOND A, GALIZI R, KYROU K, et al. A CRISPR-Cas9 gene drive system targeting female reproduction in the malaria mosquito vector *Anopheles gambiae* [J]. *Nat Biotechnol*, 2016, 34(1): 78 – 83.
- [115] ALPHEY L. Can CRISPR-Cas9 gene drives curb malaria [J]. *Nat Biotechnol*, 2016, 34(2): 149 – 150.

An application and optimization of CRISPR/Cas9 system in functional analysis of insect genes: A review and prospect

LIU Lulu^{1,2}, LIN Zhe^{2,3}, ZOU Zhen^{2,3}

(1. Institute of Life Science and Green Development, School of Life Science, Hebei University, Baoding, Hebei 071002; 2. State Key Laboratory of Integrated Management of Pest Insects and Rodents, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101; 3. CAS Center for Excellence in Biotic Interactions, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: In addition to gene overexpression and RNA interference, it is also an effective strategy to use gene editing technology to explore the function of insect genes. CRISPR/Cas9 technology is a third-generation gene editing tool that has developed rapidly in recent years. It is widely used in diverse areas of life science research due to its simple operation, low material cost, and high editing efficiency. A review was made of the application of CRISPR/Cas9 in the pigmentation, insecticide resistance, olfactory transduction, mating, and sex determination of Coleoptera, Lepidoptera, Hymenoptera, Hemiptera, Orthoptera, and Diptera insects, including gene knockout and gene knockin. And recent optimization strategies for the CRISPR/Cas9 system were summarized, based on which a prospect for application of the optimized CRISPR/Cas9 system in insect functional genomics study and agricultural pest management was made.

Keywords: gene editing technology; CRISPR/Cas9; gene knockout; gene knockin