



Metode CRISPR/CAS dan Minimalisasi Off-Target: Review

Sophia^{1*}, Muhammad Antony J¹, Muh Aswad Ashan¹, Hafizh Fadhullah¹, Rika M Jannah¹

¹Program Studi Pemuliaan dan Bioteknologi Tanaman, Departemen Agronomi dan Hortikultura,
Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor

Corresponding Author: sophianasutionsophia@apps.ipb.ac.id

Info Artikel	Abstrak
<p>Kata Kunci: <i>CRISPR</i>, <i>Cas9</i>, <i>sgRNA</i>, <i>Off-target</i></p> <p>Diterima: 5 Desember 2023 Disetujui: 20 Desember 2023</p>	<p>Aplikasi bioteknologi dengan pendekatan rekayasa genetika seperti <i>genome editing</i> berhasil dalam memperbaiki sifat tanaman dengan tujuan meningkatkan kualitas hasil. Keberhasilan CRISPR/Cas9 untuk memodifikasi genom dengan presisi yang belum pernah terjadi sebelumnya dapat disebabkan oleh akurasi, efisiensi, efektivitas biaya, dan kemudahan penggunaan. Mekanisme pengeditan genom CRISPR/Cas9 adalah memanipulasi gen dengan cara menyisipkan, mengganti, menghapus satu basa atau lebih pada sekuen tertentu. Oleh karena adanya penyisipan atau pergantian gen tersebut, metode CRISPR/Cas dapat menyebabkan efek di luar target (<i>off-target</i>) yang merusak pada tingkat genomik. Artikel ini membahas perkembangan CRISPR/Cas9, mekanisme CRISPR/Cas9, dan metode minimalisasi <i>off-target</i> yang sering terjadi pada sistem CRISPR/Cas9. Metode dalam meminimalisir <i>off-target</i> dari penggunaan CRISPR/Cas9 dapat dilakukan melalui beberapa cara yaitu: (1) modifikasi sgRNA terkait konten GC sgRNA, panjang sgRNA, truncated gRNA, modifikasi kimia sgRNA, dan modifikasi sgRNA in silico, (2) modifikasi protein Cas, dan (3) metode <i>delivery</i> CRISPR.</p>

1. PENDAHULUAN

Kemajuan bioteknologi dalam bidang pertanian menjadi peluang besar dalam pengembangan dan perbaikan karakter agronomi tanaman. Aplikasi bioteknologi dengan pendekatan rekayasa genetika berhasil dalam memperbaiki sifat tanaman dengan tujuan meningkatkan kualitas hasil. Salah satu teknik masa kini ialah *genome editing*. Pengeditan genom atau *genome editing* merupakan teknologi masa kini yang mulai dikembangkan dengan prinsip manipulasi gen dengan mengganti, menyisipkan, dan menghapus satu basa atau lebih pada sekuen tertentu dengan bantuan enzim nuklease yang sifatnya seperti gunting molekuler. Teknologi ini terbagi menjadi tiga teknik, yaitu Zinc Finger Nuclease (ZFN), Transcription Activator-Like Effector Nuclease (TALEN), dan Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeat (CRISPR) associated Cas9 (CRISPR/Cas9).

Studi awal yang dilakukan pada tanaman adalah pada spesies tanaman model *Arabidopsis thaliana* dan *Nicotiana benthamiana* (Feng et al. 2013; Li et al. 2013; Nekrasov et al. 2013). Setelah itu, mulai banyak laporan tentang aplikasi pengeditan genom pada tanaman budidaya seperti pada padi (Jiang et al. 2013; Wang et al. 2016), gandum (Shan et al. 2013), jagung (Char et al. 2016), kentang (Butler et al. 2015), tomat (Pan et al. 2016), dan jeruk manis (Jia dan Wang 2014). Adapun aplikasinya dilakukan untuk mendapatkan sifat unggul, yang meliputi ketahanan penyakit dan toleran terhadap cekaman abiotik, perbaikan nutrisi dan peningkatan produktivitas. Saat ini, teknik CRISPR/Cas9 lebih banyak digunakan dalam perbaikan sifat tanaman. Selain lebih mudah, teknik ini memiliki kelebihan

yaitu mutasi DNA dapat dilakukan pada genom yang berukuran besar melalui pendekatan transgenik dengan integrasi T-DNA yang membawa CRISPR/Cas9, dimana keduanya dapat dipisahkan dengan metode segregasi sehingga tidak meninggalkan marker genetik.

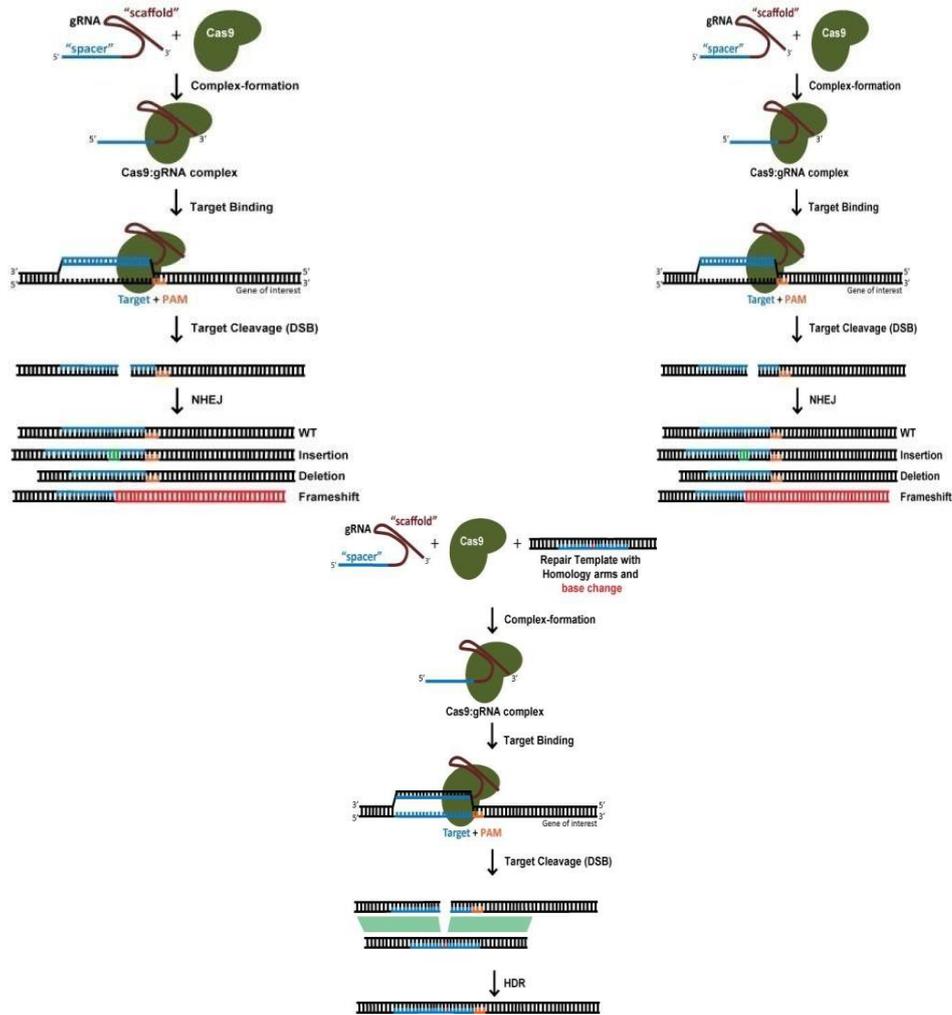
Keberhasilan CRISPR/Cas9 untuk memodifikasi genom dengan presisi yang belum pernah terjadi sebelumnya dapat disebabkan oleh akurasi, efisiensi, efektivitas biaya, dan kemudahan penggunaan dari pada alat pengeditan gen klasik (ZFNs dan TALEN). Namun, alat CRISPR/Cas9 menyebabkan efek di luar target yang merusak pada tingkat genomik. Berbagai teknik dilaporkan, termasuk pendekatan bioinformatika yang berbeda seperti untuk deteksi *in silico* mutasi di luar target bersama dengan peningkatan efisiensi sesuai target untuk memperbaiki efek off-target. Dalam modifikasi sgRNA, sgRNA yang sesuai merupakan cara sederhana untuk mengurangi efek di luar target dan transformasi atau transient delivery berbasis RNP cocok dalam banyak kasus untuk mendapatkan aktivitas sesuai target yang lebih tinggi. Selain itu, memilih varian Cas juga penting untuk mengurangi efek di luar target. Para peneliti sedang berlomba menciptakan varian Cas9 yang direkayasa dan teknik penargetan gen baru dengan efek off-target yang dapat diabaikan dalam sel tanaman untuk peningkatan pengeditan gen terapeutik atau genom. Alat pengeditan utama yang dikembangkan saat ini memiliki peluang di masa depan untuk mengobati penyakit genetik dengan efek off-target minimum dalam sel tumbuhan, hewan, dan manusia. Namun, perlu studi lebih lanjut untuk pengembangan sistem CRISPR untuk mengobati penyakit genetik dalam bidang pertanian dan kesehatan. Artikel ini membahas perkembangan CRISPR/Cas9 dan bagaimana meminimalisir off-target yang sering terjadi pada sistem CRISPR/Cas9 melalui pemilihan variasi Cas yang sesuai.

2. METODE

Mekanisme CRISPR Secara Umum

Mekanisme pengeditan genom CRISPR/Cas9 adalah memanipulasi gen dengan cara menyisipkan, mengganti, menghapus satu basa atau lebih pada sekuen tertentu dengan enzim nuklease yang sifatnya seperti gunting molekuler, disebut dengan Cas9. Segmen sgRNA dirancang untuk mengarahkan Cas9 dan mengenali urutan target dalam gen yang diinginkan melalui komponen pasangan basa komplementer 5'crRNA. Protein Cas9 tidak dapat aktif tanpa adanya sgRNA. Nuklease Cas9 membuat double-stranded breaks (DSB) di situs tiga pasangan basa hulu ke Protospacer Adjacent Motif (PAM). Urutan PAM pendek (panjang 2–5 pasangan basa) dikonservasi urutan DNA hilir ke situs pemotongan dan ukurannya bervariasi tergantung pada spesies bakteri. Setelah Cas9 menemukan situs target dengan PAM yang sesuai, hal tersebut memicu pemotongan sekuen DNA diikuti dengan pembentukan RNA-DNA hibrida, protein Cas9 diaktifkan untuk memotong DNA. Setelah sekuen terpotong dengan Cas9, terdapat 2 mekanisme perbaikannya, yakni (Gambar 1): (1). *Non-Homologous End Joining* (NHEJ). Proses repair yang terjadi berupa indel dan substitusi, yang diharapkan sekuen tersebut mengalami mutasi. Tujuan perbaikan ini untuk menonaktifkan gen tertentu agar tidak terekspresi. (2). *Homology Directed Repair* (HDR). Mekanisme perbaikannya membutuhkan template. Umumnya digunakan dalam tujuan untuk mengaktifkan gen tertentu. Metode ini lebih sulit dilakukan dibandingkan dengan NHEJ.

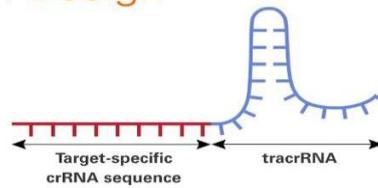
Penargetan gen CRISPR/Cas9 memerlukan single guide RNA khusus (sgRNA) yang berisi urutan penargetan (urutan crRNA) dan urutan Cas9 nuclease-recruiting sequence (tracrRNA). Wilayah crRNA (Gambar 2) adalah urutan 20-nukleotida yang homolog dengan wilayah dalam gen target dan akan mengarahkan aktivitas nuklease Cas9. Panduan dalam memilih wilayah DNA genom yang sesuai dengan urutan crRNA dari sgRNA adalah (Gambar 3): 1) Ujung 3' dari urutan target DNA harus memiliki urutan motif berdekatan (PAM) proto-spacer (5'-NGG-3'). 20 nukleotida hulu dari urutan PAM akan menjadi urutan penargetan anda (crRNA), dan nuklease Cas9 akan membelah sekitar tiga basa di hulu PAM. 2) Urutan PAM mutlak diperlukan untuk pembelahan, tetapi BUKAN bagian dari urutan sgRNA dan oleh karena itu tidak boleh dimasukkan dalam sgRNA. 3) Urutan target dapat berada pada salah satu untai DNA.



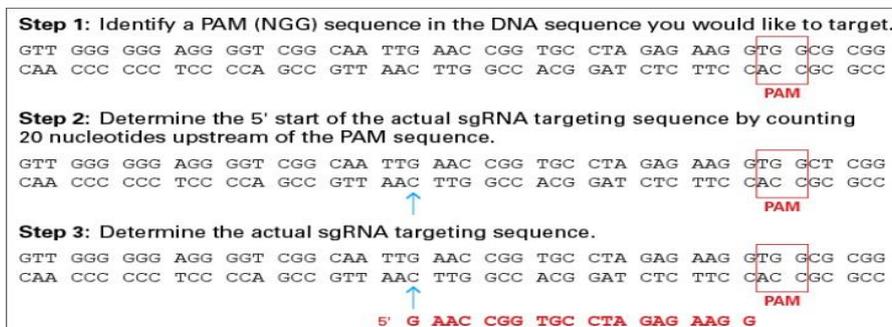
Gambar 1. Mekanisme perbaikan menggunakan NHEJ (kiri) dan HDR (kanan) Design sgRNA

Design sgRNA

sgRNA Design



Gambar 2. Bagian crRNA dan tracrRNA



Gambar 3. Tahapan pembuatan sgRNA

Terdapat beberapa online tools (misalnya, Desain CRISPR atau CHOPCHOP) yang mendeteksi urutan PAM dan membuat daftar kemungkinan urutan crRNA dalam wilayah DNA tertentu. Algoritma memprediksi efek di luar target di tempat lain dalam genom, memilih crRNA paling spesifik untuk diaplikasikan. Tips mendesain sgRNA dengan menemukan bahwa sgRNA terbaik untuk beberapa gen yang diuji memiliki G pada posisi 1 dan A atau T pada posisi 17 (Tabel 1).

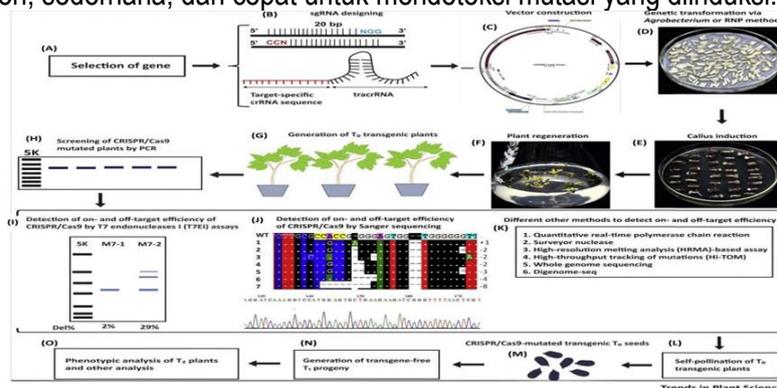
Tabel 1. Optimal sgRNA

Target	sgRNAs
CD81	GCAGCCCTCCACTCCCATGG
CXCR4	GGGCAATGGATTGGTCATCC
EMX1	GAGTCCGAGCAGAAGAAGAA
AcGFP1	GTGAATCGCATCGAGCTGAC
ZsGreen1	GACCATGAAGTACCGCATGG

Sintesis sgRNA diproduksi menggunakan Kit *Transkripsi In Vitro Guide-it* sgRNA. Menggunakan kit tersebut, PCR digunakan untuk menghasilkan DNA templat yang berisi urutan pengkodean sgRNA di bawah kendali promotor T7. Kemudian, transkripsi *in vitro* menggunakan templat produk PCR digunakan untuk menghasilkan sgRNA yang dapat dimurnikan untuk pengujian efisiensi dan/atau transduksi sel.

Mekanisme Aplikasi CRISPR pada Tanaman

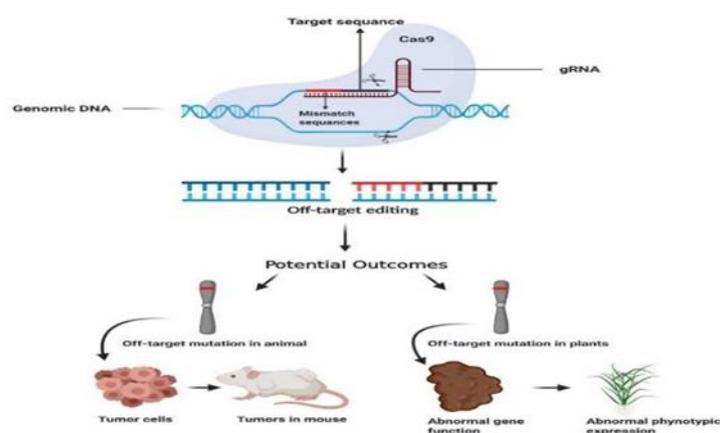
Metode *Screening* yang efisien di awal sangat penting dalam mengidentifikasi mutasi yang diinduksi untuk menganalisis berbagai regenerasi tanaman yang akan diedit genomnya, baik jalur yang digunakan dari pemilihan gen target hingga transformasi genetik dengan sistem CRISPR/Cas9. Urutan DNA yang bermutasi dapat dengan mudah ditentukan dengan memperkuat lokus dan mengurutkan produk PCR. qPCR dapat digunakan untuk membedakan mutasi homozigot dan heterozigot, dan pendekatan ini telah divalidasi pada beberapa spesies tanaman, termasuk *Arabidopsis thaliana*, jagung (*Zea mays*), sorgum (*Sorghum bicolor*), dan padi (*Oryza sativa*). qPCR adalah metode yang efisien, sederhana, dan cepat untuk mendeteksi mutasi yang diinduksi.



Gambar 4. Mekanisme CRISPR/Cas-9. Transformasi genetik dari seleksi gen hingga analisis tanaman (A) Seleksi gen target (B) Merancang *Single-guide* RNA (C) Konstruksi vektor (D) Transformasi genetik melalui *Agrobacterium/ribonucleoprotein* (RNP) (E) Induksi kalus (F) Regenerasi tanaman dari CRISPR/Cas9 (G) Generasi tanaman transgenik bermutasi CRISPR/Cas9 (H) *Screening* tanaman transgenik dengan PCR (I) Deteksi efisiensi on- dan *off-target* tanaman yang bermutasi oleh T7E1 (J) Deteksi efisiensi on- dan *off-target* dengan pengurutan Sanger (K) Metode berbeda untuk mendeteksi efisiensi on- dan *off-target* (L) Penyerbukan sendiri tanaman transgenik T0 menghasilkan tanaman T1 homozigot (M) CRISPR/Cas9-mutasi T0 biji (N) Generasi keturunan T1 bebas transgen (O) Analisis fenotipik tanaman T1 dan analisis lainnya.

Off-Target (Diluar Target) Pada CRISPR/Cas9

Beberapa penelitian telah mengungkapkan bahwa Cas9 berikatan dengan situs genomik yang tidak diinginkan untuk pembelahan, yang disebut sebagai efek di luar target. Efisiensi target CRISPR/Cas9 ditentukan melalui 20 urutan nukleotida situs gRNA dan PAM yang berdekatan dengan lokus target. Lebih dari tiga basa ketidaksesuaian antara sekuens target dan 20 nukleotida gRNA dapat mengakibatkan efek di luar target. Ini telah menunjukkan bahwa 4 basa ketidakcocokan di ujung PAM-distal menginduksi efek di luar target. Para peneliti telah mengusulkan dua jenis efek di luar target, jenis pertama dari efek di luar target yang mungkin terjadi karena urutan homologi dari lokus target dan jenis berikutnya dari situs di luar target terjadi di genom selain situs target. Efek di luar target menyebabkan jenis masalah yang parah pada organisme pada tingkat genom, penghapusan besar dan penataan ulang genom, dapat terjadi sebagai akibat dari pemutusan dsDNA. Efek *off-target* dapat menyebabkan mutasi genetik mematikan yang menyebabkan hilangnya fungsi gen, akhirnya sel kanker pada hewan dan fenotipe yang tidak diinginkan (sensitivitas penyakit) pada tanaman (Gambar 5) (Naeem 2020).



Gambar 5. Waktu terbentuknya plb sekunder pada anggrek *P. amabilis* Pengaruh mutasi off-target pada fenotipe hewan dan tumbuhan. Off-target menyebabkan mutasi genetik. Dalam sistem (CRISPR)/Cas9, gRNA terkadang mengikat selain lokus target, situs di luar target. Ini dapat mengaktifkan onkogen yang memulai pembentukan sel tumor dalam tubuh hewan atau dapat mengubah fungsi gen yang mengarah pada ekspresi fenotipe yang tidak diinginkan (sensitif terhadap penyakit) pada tanaman (Naeem 2020).

Metode Meminimalisir Off-Target (Diluar Target)

Keberhasilan CRISPR/Cas9 untuk memodifikasi genom dengan presisi yang belum pernah terjadi sebelumnya dapat disebabkan oleh akurasi, efisiensi, efektivitas biaya, dan kemudahan penggunaan daripada alat pengeditan gen klasik (ZFNs dan TALEN). Namun, alat CRISPR/Cas9 menyebabkan efek di luar target yang merusak pada tingkat genomik. Berbagai teknik dilaporkan, termasuk pendekatan bioinformatika seperti dalam deteksi *in silico* memperlihatkan mutasi di luar target bersamaan dengan peningkatan efisiensi sesuai target untuk memperbaiki efek di luar target. Dalam meminimalisir off-target, modifikasi dilakukan pada sgRNA, sgRNA yang terpotong (*truncated* sgRNA) menetapkan cara sederhana untuk mengurangi efek di luar target dan delivery CRISPR/Cas9 berbasis RNP cocok dalam banyak kasus untuk mendapatkan aktivitas sesuai target yang lebih tinggi. Selain itu, memilih varian Cas juga penting untuk mengurangi efek di luar target yang bergantung pada sifat eksperimen (Naeem 2020).

Metode Minimalisir Off-Target: Modifikasi sgRNA

Pengeditan gen oleh CRISPR/Cas9 bergantung pada spesifisitas sgRNA (berapa banyak sgRNA yang terikat ke situs target) dan efisiensi (berapa banyak sgRNA membuat DSB di situs target), yang membantu dalam pembelahan genom dengan memandu Cas9. Namun, untuk merancang gRNA

yang efisien dengan efek off-target yang rendah adalah pekerjaan yang menantang. Penerapan CRISPR/Cas9 dalam perspektif yang lebih luas tergantung pada kapasitasnya untuk menargetkan DNA berdasarkan urutan sgRNA sintesis, yaitu dua puluh (20) urutan pemandu nukleotida. Telah dilaporkan bahwa urutan sgRNA dianggap sebagai faktor kunci yang tercermin dalam meningkatkan efisiensi pembelahan dan spesifisitas penargetan. Berbeda dengan alat pengeditan genom konvensional yaitu teknik ZFNs dan TALENs, CRISPR/Cas9 memiliki keunggulan karena mutasi penargetan multiplex yang dapat dibuat dengan pengenalan banyak sgRNA secara real-time ke dalam sel (Naeem 2020).

Konten GC sgRNA

Para peneliti menemukan bahwa urutan struktural sgRNA berdampak pada aktivitas pengeditan gen CRISPR/Cas9 yang tepat sasaran. Analisis struktural sgRNA dilakukan untuk menguji aktivitasnya. Komponen GC antara 40%-60% dalam urutan sgRNA meningkatkan aktivitas sesuai target karena kandungan GC pada 40%-60% menstabilkan DNA atau dupleks RNA, serta menghindari pengikatan di luar target. Posisi efek urutan sgRNA-target-sgRNA pada pengeditan, posisi residu purin di ujung empat nukleotida meningkatkan efisiensi pengeditan. Guanin lebih disukai pada 20 posisi gRNA dan Sitosin pada 16 posisi untuk meningkatkan pengeditan sesuai target. Konsisten dengan temuan ini, korelasi positif antara persentase GC bagian proksimal PAM dari sgRNA melalui mutagenesis telah diselidiki. Parameter itu membantu merancang gRNA yang lebih baik (Naeem 2020).

Panjang sgRNA dan mismatches

Banyak penelitian mengungkapkan bahwa mutasi yang tidak diinginkan dapat dipengaruhi oleh panjang sgRNA, seperti pada panjang 17 nukleotida sgRNA mengungkapkan efisiensi pengeditan genom yang lebih tinggi. Sebaliknya, panjangnya (18-20 bp) menunjukkan efisiensi pengeditan genom yang rendah. Pedoman untuk menghilangkan potensi efek di luar target dilaporkan dalam sel manusia yaitu; 1) urutan target memiliki lebih dari tiga ketidakcocokan dalam kisaran 7-10 bp dari PAM harus dihindari, 2) 12 bp dari PAM, tonjolan (*bulldges*) sgRNA harus dihindari untuk mengurangi efek di luar target (Naeem 2020).

Truncated gRNA

Kejadian di luar target dilaporkan menurun 500 kali lipat, tanpa mempengaruhi akurasi target, dengan memperpendek panjang sgRNA 20 bp pertama menjadi 17/18 bp. Sebaliknya, perubahan minimum yang tidak diinginkan diamati pada sel mamalia ketika 17 bp sgRNA digunakan. Tiga nukleotida pada ujung 5' sgRNA secara signifikan menurunkan efek yang tidak diinginkan dalam sistem sel mamalia. Menggabungkan sgRNA dan Cas9 dengan nickase berpasangan secara signifikan menurunkan efek di luar target. Penekanan *off-target* RNA (dOTS) adalah strategi terbaru yang dikembangkan di mana sgRNA terpotong mengarahkan pengikatan Cas9 dengan menekan pembelahan. Ini telah berhasil menghasilkan penurunan efek di target dan meningkatkan aktivitas sesuai target 40 kali lipat (Naeem 2020).

Modifikasi Kimia sgRNA

Penggabungan 2'-O-metil-3'-fosfonoasetat dalam tulang punggung sgRNA ribosa-fosfat menyebabkan modifikasi spesifik lokasi yang menyebabkan pengurangan 40-120 kali lipat pada pembelahan di luar target sambil mempertahankan kinerja sesuai target. Ekspresi jangka panjang dari sistem CRISPR menyebabkan banyak efek di luar target. Merancang dan mengirimkan sistem CRISPR *self-restricted* dengan *co-expressing* sgRNA ke target Cas9 yang membatasi ekspresi CRISPR mengarah pada pengurangan efek *off-target*. Modifikasi struktur hairpin pada 50 hulu sgRNA meningkatkan spesifisitas Cas9 dan Cas12 sebesar 55 kali lipat mengurangi efek di luar target (Naeem 2020).

Modifikasi sgRNA Secara *in Silico*

Desain sgRNA yang cermat sangat penting untuk penargetan CRISPR/Cas9 yang tepat. Untuk penelitian CRISPR/Cas9 yang sukses, efek di luar target dapat diprediksi melalui alat *in silico*. Peneliti mengidentifikasi bahwa CRISPR/Cas9 dapat menghasilkan situs di luar target dalam kondisi tertentu. Ilmuwan mulai menghasilkan banyak data di situs yang tidak ditargetkan dengan menggunakan sistem CRISPR yang berbeda dengan strategi yang berbeda. Data yang dihasilkan digunakan untuk mengembangkan model prediksi *in silico* berbasis algoritma untuk mendeteksi dan mengukur efek di luar target. Prediksi *in silico* dapat meminimalkan efek di luar target melalui perangkat lunak yang dirancang secara algoritmik. Model berbasis algoritma dikategorikan ke dalam dua kelompok (1) model berbasis keselarasan, dimana algoritma berbasis konvensional digunakan dengan sgRNA disejajarkan dengan genom referensi dan efek di luar target dilihat berdasarkan pada dasar homologi urutan; (2) Model berbasis skor, dirancang secara algoritmik canggih, sgRNA yang paling tepat dipilih untuk eksperimen dari skor dan peringkat diberikan berdasarkan situs di luar target yang teridentifikasi (Tabel 2) (Naeem 2020).

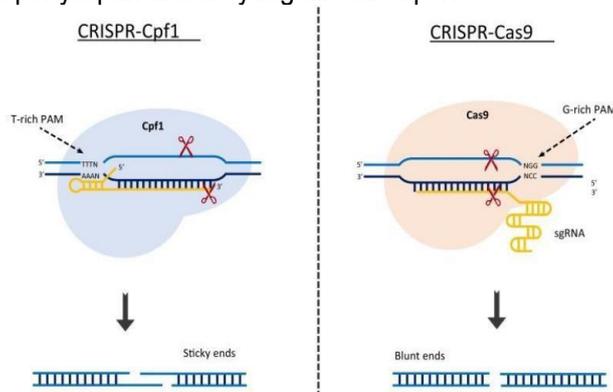
Tabel 2. Alat bioinformatika untuk mendeteksi dan mengevaluasi efisiensi guide RNA (gRNA)

Tool	Description	Method	Web Source
CasOT	A biased genome-wide off-target detecting online tool required paired gRNA with unlimited mismatch number.	Alignment	http://eendb.zfgenetics.org/casot/
Cas-OFFinder	Very fast and versatile <i>in silico</i> based tool, detect off-target site with unlimited mismatch numbers.	Alignment	http://www.rgenome.net/cas-offinder
FlashFry	A fast tool to find off-target sites and provides valuable information about GC contents, on/off-target score for targeted loci.	Alignment	http://aaronmck.github.io/FlashFry/
CrisFlash	An algorithm-based tool to detect off-target effects incorporates user-supplied variant data with unlimited mismatches.	Alignment	https://github.com/crisflash
MIT	It can find out potential off-target sites in the early stages of gene editing with 20 bp gRNA without PAM.	Scoring	http://www.genome-engineering.org/
CFD	An extensively used tool for off-target evaluation and detection, with 20 bp gRNA and PAM.	Scoring	http://www.broadinstitute.org/rnai/public/software/index
CRISTA	Machine learning tool with numerous features, GC contents, RNA secondary structure and epigenetic factors.	Scoring	http://crista.tau.ac.il/
Elevation	Machine learning with two layers regression model based developed, with epigenetic factors.	Scoring	https://crispr.mL
DeepCRISPR	The latest deep learning-based tool can predict on-target and off-target cleavage sites simultaneously, with epigenetic factors.	Scoring	http://www.deepcrispr.net/

Metode Meminimalisir Off-Target: Modifikasi Protein Cas Cas 12a

Cpf1 adalah alternatif untuk sistem tipe Cas9 yang berkinerja lebih baik dari pada Cas9, karena sitotoksitas yang lebih rendah dan toleransi terhadap ketidakcocokan, yang sangat mengurangi aktivitas off-target. Dalam beberapa eksperimen pengeditan (Kim et al. 2016; Kim et al. 2017; Kleinstiver et al. 2016) pengeditan genom dengan Cpf1 menunjukkan sedikit atau tidak ada ketidakcocokan selama aktivitas protein. Berbeda dengan Cas9, Cpf1 dapat memproses crRNA prekursornya sendiri dan tidak membutuhkan protein tambahan seperti RNase III. Selain itu, Cpf1 lebih kecil menunjukkan aktivitas RNase, beberapa homolog Cpf1 (subtipe V-B dan V-E) tidak memerlukan tracrRNA. Perbedaan luar biasa lainnya dibandingkan dengan Cas9 adalah pengenalan situs PAM. Ketika Cas9 PAM terletak di hilir situs DSB Cas9, PAM Cpf1 terletak di hulu situs pembelahannya (Gambar 6). Sistem Cpf1 bergantung pada urutan nukleotida dengan kaya-T di ujung 5' dari urutan proto spacer (5'-TTTN-3' atau 5'-TTTV-3'; V = A, C, atau G, dalam beberapa kasus), berlawanan dengan Cas9 yang memiliki nukleotida kaya-G (urutan NGG). Sementara Cas9 menghasilkan pemutusan DNA ujung tumpul, Cpf1 menghasilkan DSB dengan ujung terpintal pada posisi distal PAM yang dapat memberikan manfaat diantaranya untuk strategi knockin, meningkatkan efisiensi untuk penyisipan gen berbasis non homologous end joining (NHEJ).

Selain itu, Cpf1 dianggap sebagai alat genome editing yang lebih cocok dari pada CRISPR/Cas9 karena hanya membutuhkan 42-nt CRISPR RNA (crRNA), sedangkan Cas9 menggunakan sekitar 100-nt gRNA. Genome editing yang dimediasi Cpf1 lebih murah dari pada SpCas9 karena hanya membutuhkan sekuens RNA (sgRNA) yang pendek. Cpf1 terdiri dari domain endonuklease mirip RuvC bersama dengan domain Nuc untuk membelah DNA, akan tetapi Cpf1 tidak memiliki domain His-Asn-His (HNH) yang termasuk satu situs aktif dalam domain RuvC. Protein Cpf1 memiliki aktivitas RNase dan telah digunakan untuk memproses susunan crRNA untuk genome editing pada tanaman. Fitur-fitur ini meningkatkan efisiensi penyisipan di situs yang dibelah Cpf1.



Gambar 6. Proses DSB oleh Cpf1 dibandingkan dengan Cas9 (Rusk 2019)

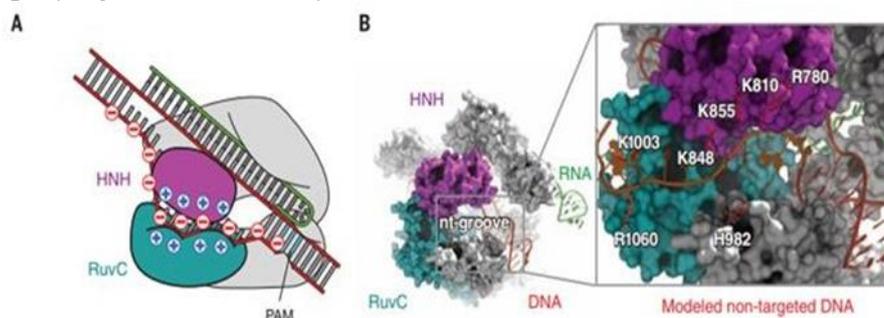
Cpf1 adalah kompleks yang lebih kecil dibandingkan dengan CRISPR Cas9, artinya lebih mudah pengiriman kompleks ke sel. Tentang ketidakcocokan, tidak seperti Cas9, Cpf1 tidak mentolerir ganda ketidakcocokan antara memandu RNA dan situs target. Satu-satunya pengecualian adalah ujung 3' dari Cpf1 crRNA, dimana ganda ketidaksesuaian ditoleransi antara posisi 19-24, dan ketidakcocokan tunggal ditoleransi pada posisi satu, delapan dan sembilan. Di sebuah studi oleh Kleinstiver *et al.* (2016) penghapusan empat hingga enam pasangan basa pada ujung 3' dari Cpf1 crRNA telah tidak berpengaruh pada kemampuan penargetan Cpf1 (Kleinstiver *et al.* 2016). Salah satu keuntungan utama dari Cpf1 dibandingkan dengan Cas9 adalah aktivitas di luar target yang rendah. Dalam sebuah percobaan oleh Kim *et al.* (2016) Cpf1 menunjukkan enam situs di luar target untuk LbCpf1 dan 12 untuk AsCpf1. Sebaliknya, Cas9 memiliki aktivitas di luar target di lebih dari 90 situs. Dalam percobaan yang sama Kim *et al.* (2016) mampu mendemonstrasikan yang telah dirakit sebelumnya, Cpf1 rekombinan tidak memiliki aktivitas di luar target sama sekali.

eSpCas9

Pembelahan atau pemotongan DNA yang dimediasi Cas9 bergantung pada pemisahan untai DNA. Ketidakcocokan antara sgRNA dan target DNA-nya dalam 8 hingga 12 nukleotida proksimal PAM pertama dapat menghilangkan aktivitas nuklease. Namun, aktivitas nuklease ini dapat dipulihkan dengan mengganti DNA dengan DNA yang cocok pada lokasi tersebut. Peneliti berhipotesis bahwa aktivitas nuklease diaktifkan oleh pemisahan untai dan berhipotesis bahwa dengan melemahkan aktivitas helikase Cas9, mismatches antara sgRNA dan DNA target akan berkurang terutama dalam hal energi untuk melakukan aktivitas nuklease, menghasilkan pengurangan aktivitas pembelahan di lokasi yang tidak sesuai target (Gambar 7) (Slaymaker *et al.* 2016).

Struktur kristal SpCas9 dalam kompleks dengan RNA pemandu dan DNA target memberikan dasar untuk meningkatkan spesifisitas melalui rekayasa rasional. Struktur mengungkapkan alur yang bermuatan positif, diposisikan antara domain yang berinteraksi HNH, RuvC, dan PAM di SpCas9, yang kemungkinan terlibat dalam menstabilkan untai nontarget dari DNA target (Gambar 7A dan 7B). Peneliti berhipotesis bahwa netralisasi residu bermuatan positif dalam alur untai non-target (nt-groove) ini dapat melemahkan pengikatan untai non-target dan mendorong rehibridisasi antara untai DNA

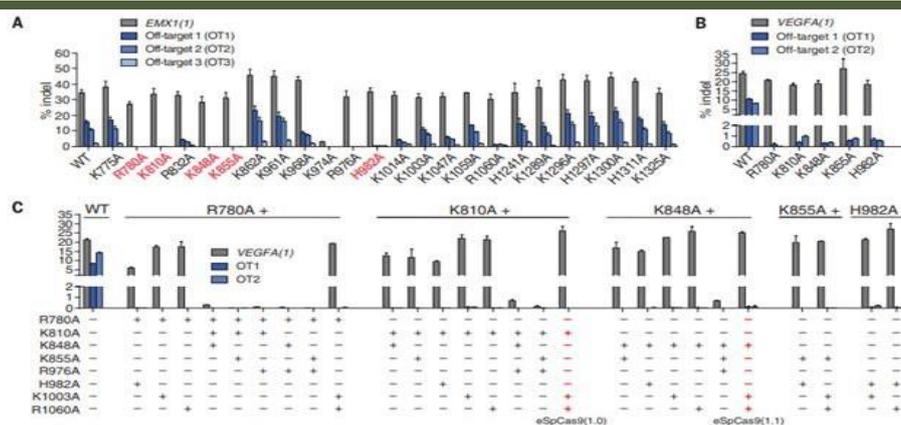
target dan non-target, sehingga membutuhkan pasangan basa yang lebih ketat antara sgRNA dan untai DNA target (Slaymaker et al. 2016).



Gambar 7. Mutagenesis yang dipandu struktur meningkatkan spesifisitas SpCas9. (A) Model Cas9 yang membuka lokasi yang menyoroti muatan pada DNA dan alur-nt. Alur-nt antara domain RuvC (hijau) dan HNH (magenta) menstabilkan pelepasan DNA melalui interaksi DNA nonspesifik dengan untai nonkomplementer. Interaksi RNA:cDNA dan Cas9:ncDNA mendorong pelepasan DNA dalam persaingan melawan rehibridisasi cDNA:ncDNA. (B) Struktur kristal SpCas9 (Protein Data Bank ID 4UN3) menunjukkan nt-groove yang terletak di antara domain HNH (magenta) dan RuvC (hijau). Untai DNA nontarget (merah) dimodelkan secara manual ke dalam nt-groove (inset).

Prinsip diatas telah diuji peneliti menghasilkan mutan SpCas9 yang terdiri dari substitusi alanin secara individu pada 31 residu bermuatan positif dalam alur- nt dan melakukan penilaian pada perubahan spesifisitas pengeditan genom (Gambar 7A). Mutan asam amino tunggal diuji spesifisitasnya dengan menargetkannya ke situs target EMX1(1) dalam sel ginjal embrionik manusia (HEK) menggunakan urutan panduan yang telah divalidasi sebelumnya; dilakukan pengecekan pembentukan indel pada situs on-target dan tiga situs genomik *off-target* (OT) yang diketahui. Lima dari 31 mutan asam amino tunggal mengurangi aktivitas di ketiga lokasi di luar target dengan keunggulan setidaknya 10 kali lebih baik dibandingkan dengan SpCas9 tipe liar (WT) sambil mempertahankan efisiensi pembelahan sesuai target, dan enam lainnya meningkatkan spesifisitas dengan faktor 2 sampai 5 kali. Mutan ini juga menunjukkan peningkatan spesifisitas ketika diuji pada lokus kedua, VEGFA (1) (Gambar 8B) (Slaymaker et al. 2016).

Meskipun beberapa mutan asam amino tunggal lebih spesifik dari pada WT SpCas9 ketika menargetkan EMX1(1) dan VEGFA (1), indel di luar target masih dapat dideteksi (~0,5%) (Gambar 8B). Untuk lebih meningkatkan spesifisitas, peneliti melakukan mutagenesis kombinatorial menggunakan mutan asam amino tunggal teratas yang diidentifikasi pada tahap awal. Delapan dari 34 mutan kombinasi mempertahankan aktivitas sesuai target tipe liar dan menampilkan level indel di luar target yang tidak terdeteksi di EMX1(1) OT1, VEGFA (1) OT1, dan VEGFA (1) OT2 (Gambar 8C). Untuk memastikan bahwa penurunan aktivitas di luar target yang diamati tidak disertai dengan pengurangan aktivitas sesuai target, peneliti mengukur pembentukan indel sesuai target di 10 situs target di tiga lokus genom menggunakan 14 mutan teratas dan memberi peringkat berdasarkan kombinasi aktivitas yang sesuai target dan penurunan aktivitas di luar target. Peneliti mengidentifikasi tiga mutan dengan efisiensi tinggi (tingkat WT pembentukan indel sesuai target) dan spesifisitas SpCas9 (K855A), SpCas9 (K810A/ K1003A/R1060A) [juga disebut sebagai eSpCas9 (1,0)], dan SpCas9 (K848A/K1003A/R1060A) [juga disebut sebagai eSpCas9 (1.1)]. Ketiga varian ini dipilih untuk analisis lebih lanjut (Slaymaker et al. 2015).



Gambar 8. Mutasi titik pada Cas9 meningkatkan spesifisitas penargetan. (A) Penyaringan mutan alanin untuk peningkatan spesifisitas. Lima mutan pemberi spesifisitas teratas disorot dengan warna merah. (B) Penilaian mutan tunggal teratas di lokus di luar target tambahan. (C) Mutan kombinasi meningkatkan spesifisitas dibandingkan dengan mutan tunggal. eSpCas9(1.0) dan eSpCas9(1.1) disorot dengan warna merah.

SpCas9-HF

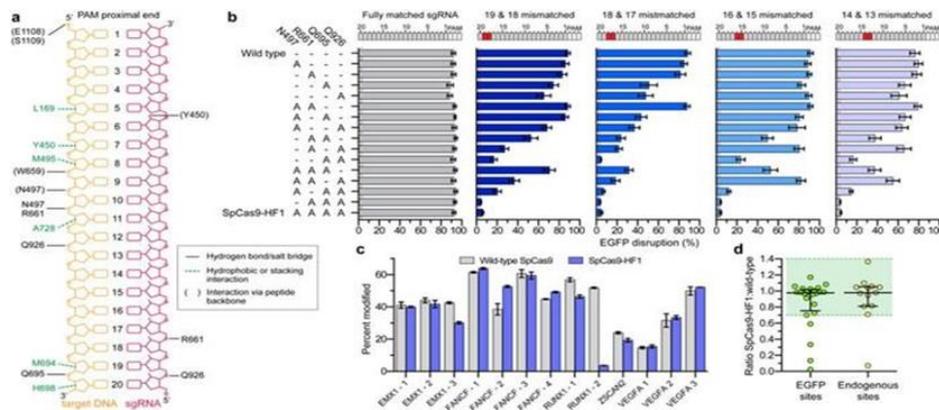
Peneliti awalnya berhipotesis bahwa efek di luar target SpCas9 dapat diminimalkan dengan mengurangi interaksi non-spesifik dengan situs DNA targetnya. Kompleks SpCas9-sgRNA membelah situs target yang terdiri dari urutan NGG PAM (dikenal oleh SpCas9) dan urutan protospacer 20 bp yang berdekatan (yang melengkapi ujung 5' sgRNA). Peneliti berteori bahwa kompleks SpCas9-sgRNA mungkin memiliki lebih banyak energi dari pada yang dibutuhkan untuk pengenalan optimal dari situs DNA target yang dimaksudkan, sehingga memungkinkan pembelahan situs di luar target yang tidak cocok (Kleinstiver et al. 2016).

Studi struktural menunjukkan bahwa kompleks DNA target SpCas9-sgRNA mencakup beberapa kontak DNA yang dimediasi SpCas9, termasuk ikatan hidrogen langsung yang dibuat oleh empat residu SpCas9 (N497, R661, Q695, Q926) ke tulang punggung fosfat dari untai DNA target (Gambar. 8a). Peneliti membayangkan bahwa gangguan pada satu atau lebih dari kontak ini dapat mengubah energi kompleks SpCas9-sgRNA sehingga dapat mempertahankan cukup untuk aktivitas sesuai target yang kuat tetapi memiliki kemampuan yang berkurang untuk membelah situs di luar target yang tidak cocok (Kleinstiver et al. 2016).

Dipandu oleh hipotesis kelebihan energi ini, pertama-tama peneliti membuat 15 varian SpCas9 berbeda yang memuat semua kemungkinan kombinasi tunggal, ganda, rangkap tiga, dan empat kali lipat dari substitusi N497A, R661A, Q695A, dan Q926A untuk menguji apakah kontak yang dibuat oleh residu ini dapat dibuang untuk on-target aktivitas (Gambar. 1b). Untuk percobaan ini, kami menggunakan uji gangguan EGFP berbasis sel manusia. Menggunakan sgRNA bertarget EGFP, yang sebelumnya telah ditunjukkan dapat secara efisien menginduksi mutasi penyisipan atau penghapusan (indels) dalam gen reporter EGFP ketika dipasangkan dengan SpCas9 tipe liar, peneliti menemukan bahwa semua 15 varian SpCas9 memiliki aktivitas yang sebanding dengan SpCas9 tipe liar (Gambar. 8b, batang abu-abu). Dengan demikian, substitusi alanin dari satu atau semua residu ini tidak mengurangi efisiensi pembelahan SpCas9 sesuai target dengan sgRNA yang ditargetkan EGFP ini (Kleinstiver et al. 2016).

Selanjutnya, peneliti berusaha menilai aktivitas relatif dari semua 15 varian SpCas9 di situs target yang tidak cocok. Untuk melakukan ini, peneliti mengulangi uji gangguan EGFP dengan turunan dari sgRNA bertarget EGFP yang digunakan dalam percobaan sebelumnya yang berisi pasangan basa tersubstitusi pada posisi mulai dari 13 hingga 19 (penomoran dimulai dengan 1 untuk basa paling proksimal (jauh) dari PAM dan diakhiri dengan 20 untuk basis paling distal (dekat) dari PAM; Gambar 8b). Analisis ini mengungkapkan bahwa salah satu varian tersubstitusi tiga kali lipat (R661A/Q695A/Q926A) dan varian substitusi empat kali lipat (N497A/R661A/Q695A/Q926A) keduanya

menunjukkan gangguan EGFP minimal pada level yang rendah dengan keempat sgRNA yang tidak cocok (Gambar. 8b, batang berwarna). Berdasarkan hasil ini, peneliti memilih varian substitusi empat kali lipat (selanjutnya disebut sebagai SpCas9-HF1 untuk varian High-Fidelity #1) (Kleinstiver *et al.* 2016).

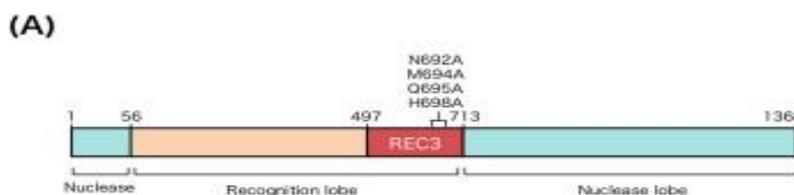


Gambar 9. Identifikasi dan karakterisasi varian SpCas9 yang mengandung substitusi pada residu yang membentuk kontak DNA non-spesifik. a) Skema yang menggambarkan interaksi SpCas9 tipe liar dengan DNA target: dupleks sgRNA, berdasarkan PDB 4O08 dan 4UN3. b) Karakterisasi varian SpCas9 yang mengandung substitusi alanin pada posisi yang membentuk ikatan hidrogen dengan tulang punggung DNA. SpCas9 tipe liar dan variannya dinilai menggunakan uji gangguan EGFP sel manusia ketika diprogram dengan sgRNA yang sangat cocok atau sgRNA yang sebagian tidak cocok. Bilah kesalahan mewakili s.e.m. untuk n = 3; tingkat rata-rata kehilangan EGFP latar belakang diwakili oleh garis putus-putus merah. c) Aktivitas sesuai target SpCas9 dan SpCas9-HF1 tipe liar di 13 situs endogen yang diukur dengan uji T7E1. Bilah kesalahan mewakili s.e.m. untuk n = 3. d) Rasio aktivitas sesuai target SpCas9-HF1 dengan SpCas9 tipe liar. Rentang median dan interkuartil ditampilkan; interval dengan >70% aktivitas tipe liar disorot dalam warna hijau.

HypaCas9

Penggunaan pasangan Cas9 nickase atau FokI-dCas9 dapat mengurangi efek off-target, namun pasangan Cas9 tersebut memiliki keterbatasan lokus pada saat dirancang karena memerlukan desain gRNA pada untai plus dan minus dalam jarak terbatas. Oleh karena itu, untuk mempertahankan keragaman lokus target yang sebanding dengan wildtype (WT)-Cas9, perlu ditingkatkan akurasi pendekatan yang hanya membutuhkan satu gRNA untuk setiap lokus target. Varian Cas9 yang akurasi pengenalan targetnya perlu ditingkatkan dengan substitusi asam amino. Salah satu varian ini, hyper-accurate (Hypa) Cas9, menunjukkan akurasi yang jauh lebih tinggi dari pada WT-Cas9 dan meminimalkan pembelahan di luar target (off-target).

Varian Cas9 menunjukkan akurasi yang jauh lebih tinggi dari pada WT-Cas9 dan meminimalkan pembelahan di luar target (off-target). Prinsip kerja dalam pengenalan targetnya ditingkatkan dengan substitusi asam amino berupa Alanin. Empat substitusi Alanin yaitu N692A, M694A, Q695A, dan H698A dalam domain REC3-nya yang bertindak sebagai efektor alosterik dari domain nukleasenya (Gambar 10).



Gambar 10. Konstruksi plasmid ekspresi HypaCas9. A) Skema konstruksi HypaCas9 dengan substitusi alanin

Metode Minimalisir Off-Target: Metode Delivery CRISPR

Metode pengiriman (delivery) yang digunakan untuk memperkenalkan pengeditan sgRNA/Cas9 memiliki peran dalam akurasi sistem CRISPR/Cas.

Metode Pengiriman CRISPR Secara Viral

Adeno-associated virus (AAV) contoh sistem pengiriman vektor virus, telah digunakan secara luas untuk mengirimkan komponen penyuntingan gen dalam terapi gen. Virus ini menawarkan keuntungan dari respon imun yang dapat diabaikan (bawaan atau adaptif) dan tidak diketahui berasosiasi atau menyebabkan penyakit pada manusia. Namun, ia memiliki kelemahan ketika digunakan untuk mengirimkan sistem pengeditan gen CRISPR/Cas, metode pengiriman berbasis virus didasari dengan Cas9 dan gRNA dikemas ke dalam DNA plasmid yang dikirimkan melalui vektor virus ke sel target. Seperti disebutkan sebelumnya, ini memungkinkan komponen pengkode gen CRISPR/Cas9 ada secara terus-menerus dalam tipe sel target, yang menghasilkan peningkatan level Cas9 dan peningkatan kemungkinan aktivitas di luar target. Virus Adeno (AdV) secara alami menunjukkan potensi yang sedikit untuk berintegrasi ke dalam genom sel target, ini merupakan karakteristik yang menguntungkan untuk membatasi efek di luar target. Namun, AdVs menimbulkan respons imun dan saat ini, tidak mungkin untuk sepenuhnya mengesampingkan integrasinya ke dalam genom inang (Naeem 2020).

Metode Pengiriman CRISPR Non-Viral

Eksresi berlebih dari komponen pengeditan dapat meningkatkan mutasi di luar target ketika CRISPR/Cas bertahan lama di nukleus, ini diamati selama co-ekspresi Cas9 dan sgRNA berbasis plasmid ke dalam sel target. Namun, jika protein Cas9 dan gRNA dikirim sebagai kompleks RNP, selang waktu pengeditan dapat dipersingkat, yang mengurangi efek di luar target. Sejak bentuk RNP dari nuklease bebas dari DNA eksogen, dengan cepat terdegradasi dalam sel atau diencerkan dalam pembelahan sel mitosis. Secara umum, metode pengiriman dapat dikelompokkan menjadi viral atau non-viral. Elektroporasi adalah metode transfeksi fisik yang menggunakan arus listrik tegangan tinggi sebagai akibatnya pori-pori kecil sementara terbentuk pada membran sel. Namun, metode ini mungkin tidak selalu cocok untuk aplikasi *in vivo* karena tegangan tinggi yang diterapkan melintasi membran sel yang menyebabkan toksisitas sel, meskipun elektroporasi tidak memungkinkan untuk aplikasi CRISPR/Cas9 *in vivo*. Elektroporasi menunjukkan jumlah mutasi *off-target* yang rendah pada protoplas tanaman ketika sgRNA dan Cas9 dikirim sebagai kompleks RNP. Kompleks RNP dengan transfeksi yang dimediasi liposom mengungkapkan minimalisasi mutasi di luar target dibandingkan dengan transfeksi DNA plasmid (Naeem 2020).

Nanopartikel lipid adalah alat pengiriman untuk mentransfer molekul yang berbeda ke sel target. Ini umumnya digunakan untuk pengiriman asam nukleat yang dimuat di dalam liposom kationik, yang dapat dengan mudah melewati membran sel target. Komponen CRISPR/Cas9 dapat dikirim sebagai kompleks RNP karena Cas9 dan sgRNA tetap bersama karena sifat anioniknya. Metodologi pengiriman lain menggunakan vesikel (nano vesikel yang diturunkan dari sel) untuk mengirimkan Cas9 dan sgRNA sebagai RNP ke sel target. Sejak RNP, tidak ada risiko ekspresi berkelanjutan dari Cas9 (yang meningkatkan konsentrasi Cas9 dan meningkatkan risiko pengeditan di luar target) (Naeem 2020).

Pengaruh metode transformasi yang berbeda pada mutasi *off-target* pada tanaman telah ditinjau. Metode pengiriman gen non-virus terbaru yang dikembangkan, polyethyleneimine (PEI), magnetic nanoparticles (MNPs) menggunakan biomaterial terbukti bermanfaat, tidak beracun dengan efek *off-target* yang rendah, MNP dianggap sebagai strategi terbaik untuk sistem mediasi pengeditan gen CRISPR-Cas (Naeem 2020).

3. KESIMPULAN

Mekanisme pengeditan genom CRISPR/Cas9 adalah memanipulasi gen dengan cara menyisipkan, mengganti, menghapus satu basa atau lebih pada sekuen tertentu menggunakan enzim

nuklease yang sifatnya seperti gunting molekuler, disebut dengan Cas9. Adanya *Off-Target* dari penggunaan CRISPR/Cas9 menyebabkan masalah pada organisme pada tingkat genom, seperti mutasi genetik mematikan yang menyebabkan hilangnya fungsi gen, fenotipe yang tidak diinginkan (sensitivitas penyakit), dan penataan ulang genom. Metode untuk meminimalisir *Off-Target* dapat dilakukan dengan beberapa cara yaitu: (1) modifikasi sgRNA terkait konten GC sgRNA, panjang sgRNA, truncated gRNA, modifikasi kimia sgRNA, dan modifikasi sgRNA secara *In Silico*. (2) modifikasi protein Cas. (3) metode delivery CRISPR.

DAFTAR PUSTAKA

- Butler, N.M., Atkins, P.A., Voytas, D.F., Douches, D.S. (2015). Generation and inheritance of targeted mutations in potato (*Solanum tuberosum* L.) using the CRISPR/Cas system. *PLoS One*, 10: e0144591.
- Char, S.N., Neelakandan, A.K., Nahampun, H., Frame, B., Main, M., Spalding, M.H., Becraft, P.W., Meyers, B.C., Walbot, V., Wang, K., Yang, B. (2017). An Agrobacterium-delivered CRISPR/Cas9 system for high-frequency targeted mutagenesis in maize. *Plant Biotechnol J.*, 15:257-268.
- Feng, Z., Zhang, B., Ding, W., Liu, X., Yang, D., Wei, P., Cao, F., Zhun, S., Feng, Z., Mao, Y., Zhu, J. (2013). Efficient genome editing in plants using a CRISPR/Cas system. *Cell Res.* 23:1229-1232.
- Jia, H., Wang, N. (2014). Targeted genome editing of sweet orange using Cas9/sgRNA. *Plos One*, 9(4): e93806.
- Jiang, W., Zhou, H., Bi, H., Fromm, M., Yang, B., Weeks, D.P. (2013). Demonstration of CRISPR/Cas9/sgRNA-mediated targeted gene modification in Arabidopsis, tobacco, sorghum and rice. *Nucleic Acids Res.*, 41(20): e188.
- Kim, D., Kim, J., Hur, J.K., Been, K.W., Yoon, S., Kim, J.S. (2016). Genome-wide analysis reveals specificities of Cpf1 endonucleases in human cells. *Nature Biotechnology*, 34 (8): 863.
- Kim, H.K., Song, M., Lee, J., Menon, A.V., Jung, S., Kang, Y.M., Choi, J.W., Woo, E., Koh, H.C., Nam, J.W. (2017). In vivo high-throughput profiling of CRISPR–Cpf1 activity. *Nature methods*, 14(2): 153.
- Kleinstiver, B.P., Tsai, S.Q., Prew, M.S., Nguyen, N.T., Welch, M.M., Lopez, J.M., McCaw, Z.R., Aryee, M.J., Joung, J.K. (2016). Genome-wide specificities of CRISPR-Cas Cpf1 nucleases in human cells. *Nature Biotechnology*, 34(8): 869.
- Kleinstiver, B.P., Pattanayak, V., Prew, M.S., Tsai, S.Q., Nguyen, N.T., Zheng, Z., Joung, J.K. (2016). High-fidelity CRISPR-Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects. *Nature*, 529(7587): 490–495. <https://doi.org/10.1038/nature16526>
- Li, J.F., Norville, J.E., Aach, J., McCormack, M., Zhang, D., Bush, J. (2013). Multiplex and homologous recombination-mediated genome editing in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana* using guide RNA and Cas9. *Nat Biotechnol.*, 31:688–91.
- Naeem, M., Majeed, S., Hoque, M.Z., Ahmad, I. (2020). Latest developed strategies to minimize the off-target effects in CRISPR-Cas-mediated genome editing. *Cells*, 9(7):1608.

-
- Nekrasov, V., Staskawicz, B., Weigel, D., Jones, J.D., Kamoun, S. (2013). Targeted mutagenesis in the model plant *Nicotiana benthamiana* using Cas9 RNA- guided endonuclease. *Nat Biotechnol.*, 31:691-693.
- Pan, C.T., Ye, L., Qin, L., Liu, X., He, Y.J., Wang, J., et al. (2016). CRISPR/Cas9-mediated efficient and heritable targeted mutagenesis in tomato plant in the first and later generation. *Sci. Rep.*, 6:24765.
- Rusk, N. (2019). Spotlight on Cas12. *Nature methods*, 16(3): 215.
- Shan, Q., Wang, Y., Li, J., Zhang, Y., Chen, K., Liang, Z., Zhang, K., Liu, J., Xi, J.J., Qiu, J.L. (2013). Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR- Cas system. *Nat Biotechnol.*, 31: 686-688.
- Slaymaker, I.M., Gao, L., Zetsche, B., Scott, D.A., Yan, W.X., Zhang, F. (2016). Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity. *Science*, 351(6268): 84-88.
- Wang, F., Wang, C., Liu, P., Lei, C., Hao, W., Gao, Y. (2016). Enhanced rice blast resistance by CRISPR/Cas9-targeted mutagenesis of the ERF transcription factor gene OsERF922. *Plos One*, 11: e0154027.