

CRISPR-Cas9 基因编辑技术在病毒感染疾病治疗中的应用

殷利眷, 胡斯奇, 郭斐

中国医学科学院/北京协和医学院病原生物学研究所, 卫生部病原系统生物学重点实验室, 北京 100730

摘要: CRISPR-Cas9 基因编辑技术是基于细菌或古细菌 CRISPR 介导的获得性免疫系统衍生而来, 由一段 RNA 通过碱基互补配对识别 DNA, 指导 Cas9 核酸酶切割识别的双链 DNA, 诱发同源重组或非同源末端链接, 进而实现在目的 DNA 上进行编辑。病毒通过特异的受体侵染细胞, 其基因组在细胞内发生复制、转录、翻译等过程完成其生活周期, 某些 DNA 病毒或逆转录病毒基因组会整合到宿主基因组中。基因治疗是病毒感染疾病治疗的新趋势。因此, 基因编辑技术在持续感染的病毒或潜伏感染病毒疾病治疗中具有重大的潜在意义。文章主要从 CRISPR-Cas9 作用机制以及在病毒感染疾病治疗中的应用等方面进行了综述。

关键词: CRISPR; 同源重组; 非同源末端链接; 基因编辑; 病毒

The application of CRISPR-Cas9 gene editing technology in viral infection diseases

Lijuan Yin, Siqi Hu, Fei Guo

MOH Key Laboratory of Systems Biology of Pathogens, Institute of Pathogen Biology, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100730, China

Abstract: The RNA-guided Cas9 nuclease from microbial clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) adaptive immune system has been used to facilitate efficient genome engineering in eukaryotic cells. The specific targeted genome is recognized and cut by gRNA-directed CRISPR/Cas9 complex, specifically by the endonuclease Cas9. The targeted gene locus could be repaired either by homology-directed repair or nonhomologous end joining, thus achieving a desired editing outcome. Viruses infect cells through specific receptors, and then the viral genome is transcribed, replicated and translated to complete its life cycle. As a result, some DNA virus and retrovirus genomes are integrated into the cellular genome. Gene therapy is a new trend to treat viral infected diseases. Given its designable sequence-specific editing of the targeted genome, CRISPR/Cas9 has tremendous potential in treating persistent and latent viral infections. In this review, we summarize the mechanism and progresses of CRISPR/Cas9, and also highlight its therapeutic application in infectious diseases.

Keywords: CRISPR; homology-directed repair; nonhomologous end joining; gene editing; virus

收稿日期: 2014-12-24; 修回日期: 2015-01-29

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 81371808)资助

作者简介: 殷利眷, 硕士研究生, 专业方向: 病毒与宿主限制因子相互作用。E-mail: yljzhx@sina.com

通讯作者: 郭斐, 博士, 研究员, 研究方向: 分子病毒学。E-mail: guoafei@ipbcams.ac.cn

DOI: 10.16288/j.ycz.14-460

网络出版时间: 2015-3-26 10:09:33

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20150326.1009.003.html>

病毒感染是危害人类健康的主要威胁之一,与人类密切相关的有呼吸道病毒、肝炎病毒和艾滋病病毒等。目前应对病毒感染的方法主要依赖疫苗防御和药物治疗。但是,对于很多病毒感染性疾病现在还没有完全有效或彻底的治疗方法,如艾滋病等。随着全基因组测序技术的成熟和基因功能的研究,通过基因编辑进行抗病毒治疗成为可能。最初的基因编辑方法是利用玻璃管注射 DNA 到细胞核或者电转 DNA 进入细胞,进入细胞核中的 DNA 通过同源重组的方式插入到细胞基因组中^[1],从而达到基因编辑的目的。但是,利用该方法将外源 DNA 片段准确插入到目的位置的效率很低。之后又出现了锌指核酶(Zinc-finger nuclease, ZFN)和转录激活样效应核酶(Transcription activator-like effector nuclease, TALEN),这两种核酸酶都是由经过设计的、序列特异性的 DNA 结合元件和非特异性的 DNA 切割结构域结合而成的嵌合体^[2,3],其作用机制分别是锌指蛋白或者转录激活样效应蛋白衍生构建的 DNA 识别蛋白模块和具有双链 DNA 切割活性的 FokI 核酸酶偶联,特异的切割目标双链 DNA,产生双链断裂 DNA,然后激活细胞内的同源重组(Homology-directed repair, HDR)或者非同源末端连接(Nonhomologous end joining, NHEJ)^[4],利用细胞自身的修复机制对 DNA 进行遗传学修饰,大大提高了在目的区域发生删除、错配或插入突变的机率。两者分别通过多个锌指结构组合或者氨基酸重复序列组合识别不同的 DNA 序列,但这种方式识别靶向位点非常有限,并且识别模块的构建也非常复杂。2013 年,出现了一种全新的基因编辑技术——clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/CRISPR-associated 9(Cas9), CRISPR-Cas9 作用方式不同于 ZFN 和 TALEN,此系统通过 RNA 与目标 DNA 互补,指导 Cas9 核酸酶切割互补的双链 DNA^[5]。这一新系统具有制备简单、成本低、作用高效等优点,开发后获得了快速发展。本文主要综述了 CRISPR-Cas9 系统的作用机制和其在病毒感染疾病治疗中的应用。

1 CRISPR-Cas9 作用机制

CRISPR 即成簇的、规律间隔的短回文重复序列,是基因组中一个含有多个短重复序列的位点^[6]。Yoshizumi Ishino 等^[7]在研究大肠杆菌 *iap* 基因调控

碱性磷酸酶同工酶转换时发现了这种重复序列-间隔序列-重复序列的结构。2005 年,3 个研究团队都报道了 CRISPR 的间隔序列与噬菌体基因组和质粒高度同源,猜想 CRISPRs 可能是细菌或古细菌的一种新的免疫系统^[8-10]。Barrangou 等^[11]将嗜热链球菌与不同的噬菌体共培养,筛选具有噬菌体抗性的菌株,通过 DNA 测序发现 CRISPR 座位中有了新的间隔序列,该间隔序列来自侵染的噬菌体,并且证实了 CRISPR 和其相关的 *cas* 基因赋予了细菌对噬菌体的抗性,通过插入或删除靶向噬菌体的间隔序列可增强或者削弱细菌的噬菌体抗性。总之,CRISPR-Cas9 是细菌的一种“获得性免疫系统”。

最初人们假想 CRISPR 介导的获得性免疫机制类似于 RNA 干扰,而 Barrangou 等^[11]研究发现 CRISPR 介导的噬菌体抗性需要 *cas* 基因。之后,Emmanuelle Charpentier 实验室发现 CRISPR 介导的免疫需要两个 RNA,分别是反式激活 RNA(trans-activating crRNA, tracrRNA)和 CRISPR RNA。tracrRNA 与 CRISPR RNA 互补配对,激活 RNAase 和 Csn,对 CRISPR RNA 进行剪切,使之成为成熟的 crRNA^[12]。2006 年,Jinek 等^[13]从酿脓链球菌(*Streptococcus pyogenes*)中分离纯化 Cas9 蛋白,发现 Cas9 介导的双链 DNA 的断裂也依赖于 crRNA-guide 和 tracrRNA。Garneau 等^[14]研究发现细菌 CRISPR-Cas 系统通过特异的间隔序列介导,对特异的靶向序列编辑,最终将外源入侵质粒或者噬菌体 DNA 进行平末端切割。

CRISPR-Cas9 介导的细菌获得性免疫具体机制如图 1 所示。

当外源噬菌体或质粒进入细菌后,细菌通过识别特异的 PAM(Protospacer adjacent motif)序列,将外源 DNA 加工成大小合适的间隔序列,插入到 CRISPR 序列中。CRISPR 位点表达反式激活 crRNA(tracrRNA),与重复区域的 pre-crRNA 配对,在 Cns 和 RNase 作用下形成成熟的 crRNA。Cas9 蛋白有识别 crRNA 和具有核酸酶功能的环状区域,核酸酶区域包含 HNH 核酸酶和 RuvC 样核酸酶结构域,分别切割互补和不互补的目标 DNA 链。Cas9 识别目标基因中的 PAM 序列,crRNA 识别位于 PAM 5' 端互补的 20 bp DNA 序列,继而稳定 Cas9 和基因组的结合,导致靶位点的切割,基因组发生双链断裂。

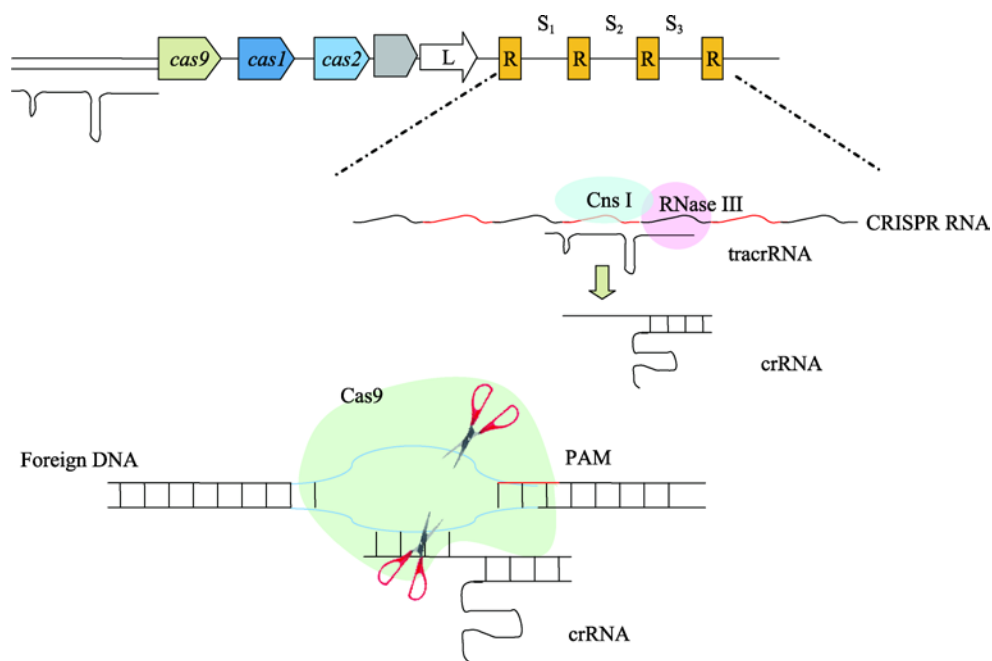


图 1 CRISPR-Cas9 干扰外源 DNA 入侵示意图

发生双链断裂的 DNA 利用细胞自身的修复机制(同源重组/非同源末端链接)对 DNA 进行遗传学修饰。

2013 年 2 月,在 Jinek^[13]和 Gasiunas^[15]报道 CRISPR-Cas9 可以分离 dsDNA 之后的 6 个月左右, Cong 等^[5]和 Mali 等^[16]分别在 *Science* 上发表文章证明 RNA 指导的 Cas9 核酶能够对人的 *EMX1*、*PVALB*、*PPP1R12C* 基因和小鼠 *Th* 基因进行切割,被编辑的基因发生同源重组或非同源末端链接;同时, Jinek 等^[17]和 Cho 等^[18]分别在 *Elife* 和 *Nat Biotechnol* 上发表文章,证明 RNA 指导的 Cas9 能够编辑人网格蛋白轻链(Human clathrin light chain, *CLTA*)基因和 *CCR5* 等基因。这是首次将 CRISPR-Cas9 系统作为真核细胞的基因组编辑工具。

2 CRISPR-Cas9 在病毒感染疾病治疗中的应用

在发现 CRISPR-Cas9 系统可以编辑哺乳动物基因组之后,该技术得到了迅速的推广应用,包括动物模型构建、基因功能研究、肿瘤基因敲除等^[19,20]。在病毒感染疾病治疗方面,ZFN 和 TALEN 技术曾被广泛应用,但介于两者构建复杂、编辑效率低、靶位点局限性等特性,新的基因编辑技术 CRISPR-Cas9 引起了大家的关注并开始探索该技术在病毒疾病治疗中的应用。

2.1 编辑受体基因序列阻止病毒入侵

病毒表面蛋白与细胞表面受体蛋白相互作用是病毒侵入细胞的必要环节。*CCR5* 蛋白是 HIV 入侵淋巴细胞的关键辅助受体。研究发现,欧洲少部分人群 *CCR5* 基因缺失 32 bp 碱基,这部分人群不易被 HIV 感染。另外,目前唯一得到彻底治愈的 HIV 患者即“柏林病人”,其同时患有白血病,通过化疗破坏其自身骨髓后,植入具有 *CCR5*Δ32 突变型的骨髓,体内才检测不到 HIV 病毒,而且不需要服用药物。已有研究利用锌指酶技术敲除艾滋病血液 T 细胞或者 CD4 造血干细胞中的艾滋病毒受体 *CCR5*,能有效降低病毒水平,提高 CD4 细胞存活率,并且锌指酶制剂已进入临床实验阶段^[21-23]。由此可见,利用基因编辑技术构建 *CCR5*Δ32 CD4 T 细胞对阻碍 HIV 感染或复制具有重要作用。Lin 等^[24]利用 CRISPR-Cas9 和转座技术完整地缺失了诱导的多能干细胞 *CCR5* 的 32 bp 序列,HIV-1 感染 *CCR5* 突变的细胞和正常细胞,感染 1 d 去除病毒,加入 CD4 细胞维持 HIV-1 复制,16 d 后发现在正常的 iPSC 中检测到 HIV,但是 *CCR5* 突变的细胞中没有检测到 HIV。这说明 CRISPR-Cas9 编辑的 *CCR5*Δ32 细胞可以有效阻碍 HIV 侵入,更重要的是,CRISPR-Cas9 编辑细胞受体是治疗病毒感染疾病的有效方案之一。

2.2 清除潜伏感染的 HIV-1 基因组

HIV-1 基因组由两条正链 RNA 组成,感染淋巴细胞或单核细胞后,在逆转录酶作用下形成双链 DNA,进入细胞核,整合酶介导双链 DNA 整合到细胞染色体中。部分整合的 DNA 处于转录抑制状态,潜藏于细胞中。目前的药物治疗只能在一定程度上抑制 HIV 复制,但不能彻底清除 HIV;另外,药物治疗并不能针对潜藏的 HIV。因此,基因编辑是一个有望彻底治愈艾滋病的途径。Ebina 等^[25]通过设计针对 LTR 的 gRNA,与 hCas9 共转染整合有 HIV-1 骨架(含有 GFP 标签)的 Jurkat 细胞,经过 3 轮转染,流式分析 GFP 阳性细胞比例由 97.8% 下降到 35.5%。通过设计引物进行 LTR 扩增及测序,检测到插入或缺失突变,发生突变的比例达到 90%,成功限制了原病毒的激活和表达。Hu 等^[26]构建了靶向 HIV-1 LTR U3 启动子的 gRNA-Cas9 质粒,转染整合有单轮次感染的 HIV 基因的小胶质细胞和 T4 细胞,结果发现 Cas9 能够消除整合的病毒基因组。以上结果表明该技术具有彻底清除潜伏的 HIV 基因组的可能性。

2.3 清除疱疹病毒基因组

疱疹病毒家族在人群中广泛传播,大于 90% 的人群至少感染一种疱疹病毒。Epstein-Barr 病毒 (EBV) 是疱疹病毒家族成员之一,为双链 DNA 病毒,感染单核细胞,是一种肿瘤病毒。目前没有有效的疫苗和治疗药物。EBV 感染细胞后,DNA 进入细胞核,以环化的状态作为附加体滞留在细胞核。Wang 等^[27]采用 EBV 慢性感染的细胞——Raji 细胞,针对 EBV 基因组 6 个不同的功能位点设计了 7 个 gRNA,利用核转染方式将靶向 EBV 基因组的 gRNA-Cas9 质粒转入细胞核。实验分析发现 EBV 基因组的特异位点被有效编辑;随培养时间计算存活的细胞数目,发现转染 Cas9-gRNA 的细胞增值效率较对照组降低,即降低了 EBV 致癌效应,Annexin V 染色发现细胞膜完整,但是磷脂酰丝氨酸外翻,说明 Cas9-gRNA 将 EBV 基因组扰乱后细胞恢复了正常的凋亡途径;数字 PCR 检测 Cas9-gRNA 处理后的细胞中 EBV 基因组拷贝数,以 Cas9 未处理的细胞为对照,发现 25% 的细胞检测不到 EBV 基因组,认为 EBV 基因组被彻底清除,50% 的细胞中 EBV 基因拷贝数都有不同程度的降低。Bi 等^[28]构建了靶向单纯疱疹病毒

(Herpes simplex virus, HSV)胸腺激酶基因 *UL23* 的 gRNA,分离位点处于限制性酶 *BsiW* 中,在 Cas9-gRNA 存在下,*BsiW* 的酶活性显著降低,生长曲线发现病毒复制能力降低,病毒滴度减少,在靶位点检测到错配和缺失突变。由此可见,CRISPR-Cas9 基因编辑技术有望用于治疗慢性病毒感染疾病。

2.4 编辑人乳头瘤病毒基因组

人乳头瘤病毒(Human papillomavirus, HPV)是一种 DNA 病毒,属于乳头瘤病毒科乳头瘤病毒属,其 16、18、31、33 和 45 亚型属高风险 HPV,约 90% 的宫颈癌与之有关^[29]。在这类癌细胞中,HPV DNA 整合到宿主基因组中,并高表达病毒原癌基因 *E6* 和 *E7*。*E6* 诱导细胞肿瘤抑制因子 p53 降解,*E7* 干扰视网膜母细胞瘤(Retinoblastoma, Rb)蛋白稳定性,从而干扰细胞周期阻滞和细胞衰老。Zhen 等^[30]构建了靶向 *E6* 和 *E7* 的 gRNA,将 Cas9 质粒和 gRNA 质粒转染 SiHa 细胞,转染 48 h 收集细胞提取 RNA,qPCR 检测发现 *E6*、*E7* 表达量下降比例超过 90%;MTT 比色分析发现细胞活性显著降低;将转染有 Cas9 和 gRNA 的 SiHa 细胞通过颈背注射移植到小鼠,单转染 Cas9 作为对照,实验组小鼠肿瘤体积和重量显著低于对照组。Edward 等^[31]设计了针对 HPV-18 *E6* 和 *E7* 读码框的 gRNA,构建到含有 Cas9 的 px330 载体,293T 细胞含有 HPV-18 *E6* 和 *E7* 的 DNA 质粒,HIV *rev* 基因以及 *GFP* 为报告基因;Cas9 转染 293T 细胞,3 d 后检测 GFP 表达比例,发现 GFP 阳性比例较对照组显著下降;用 HeLa 细胞进行 Surveyor 实验分析并进行测序,检测到 *E6* 和 *E7* 基因发生缺失或插入突变 Western blot 检测 *rev* 蛋白表达显著降低,并且发现靶向 *E6* 基因后,p53 蛋白含量升高,靶向 *E7* 基因后,Rb 蛋白含量升高。因此,Cas9 编辑技术有望应用于乳头瘤病毒引发的宫颈癌治疗。

2.5 编辑乙型肝炎病毒基因组

Hepatitis B 病毒(HBV)是一种 DNA 病毒,属于嗜肝病毒科。基因组进入细胞核后形成超螺旋 DNA,是抗病毒治疗的主要障碍之一。Lin 等^[32]体外将 HBV 表达质粒和靶向 HBV 基因组的 gRNA-Cas9 质粒共转染 Huh-7 细胞,检测发现 HBV 核心蛋白和表面蛋白的表达量明显降低;体内实验中,将 HBV 表

达质粒和靶向 HBV 基因组的 gRNA-Cas9 质粒共注射到 HBV 肝炎耐受小鼠的尾静脉,检测发现小鼠血清表面抗原水平较对照组明显降低。虽然该研究缺乏 gRNA-Cas9 直接靶向 HBV 慢性感染小鼠的体内实验,但是也说明 CRISPR-Cas9 编辑技术对持续 HBV 感染疾病有潜在的治疗意义。

3 CRIPR-Cas9 技术存在的脱靶问题和优化策略

Cas9 核酸酶可以在 sgRNA 指导下结合任何含有 PAM 序列的 DNA,sgRNA 中 20 个核苷酸序列通过碱基互补配对靶向特定 DNA,稳定 Cas9 与目的 DNA 的结合。可以通过改变 sgRNA 序列,使之结合到任意位点,sgRNA 与目标 DNA 互补配对确保 Cas9 作用位点特异性。但是,后续研究发现根据碱基错配数目、位置以及碱基特性差异,Cas9 容许 gRNA 20nt 序列与靶 DNA 之间存在不同数目的错配^[5,33,34]。引起的脱靶问题,限制 Cas9 编辑技术在临床中的应用。为降低 Cas9 脱靶效应,提高特异性,Ran 等^[35]利用只能切割互补 DNA 单链的部分核酸酶功能缺陷的 Cas9(D10A),在靶位点设计两条 gRNA,分别与正负链 DNA 互补配对,使得突变型 Cas9 分别切割正负链 DNA,引发特定位置的双链断裂。该方案提高了 CRISPR-Cas9 编辑的特异性,并且保持其核酸酶活性。Shen 等^[36]利用 D10A 或者 H840A 突变的 Cas9 核酸酶编辑 X 相关的雄激素受体基因(*Ar*),测序和 T7EN 实验发现突变的 Cas9 能有效编辑 *Ar*,并未检测到脱靶现象。Tsai 等^[37]将核酸酶活性缺失的 dCas9 与 DNA 非特异性限制性核酸内切酶 *Fok* 融合表达,构建了 CRISPR RNA 指导的 *Fok* 编辑技术,*Fok* 编辑位点的选择依赖于两条 gRNA,与单个 gRNA 指导的 Cas9 相比,增加了靶位点的特异性。

4 结语与展望

由细菌免疫系统衍生的新的基因编辑技术 CRISPR-Cas9 与 ZFN 和 TALEN 相比较,具有设计简单、应用灵活、操作简便等优点,在敲除细胞表面受体和切割病毒基因组、抑制病毒复制中有显著效果。但是,在未来临床应用以及基因治疗中还有很长的一段路要走,还存在一些困难,比如提高 Cas9

编辑的准确性,避免脱靶现象出现;高效的导入细胞方法以及确保细胞靶向性等等。研究人员需要不断优化系统,通过改造 CRISPR 编辑方法,如 CRISPR-Cas9 缺刻酶^[35]或者 CRISPR-RNA 指导 *Fok* I 酶^[37],降低脱靶效应;采用腺病毒载体提高 Cas9 基因转导效率等^[38]。CRISPR-Cas9 作为新的基因编辑技术,在慢性病毒感染或潜伏病毒感染疾病中具有巨大的潜在科学研究和临床治疗意义。

参考文献

- [1] Capecchi MR. Gene targeting in mice: functional analysis of the mammalian genome for the twenty-first century. *Nat Rev Genet*, 2005, 6(6): 507–512. [\[DOI\]](#)
- [2] Urnov FD, Rebar EJ, Holmes MC, Zhang HS, Gregory PD. Genome editing with engineered zinc finger nucleases. *Nat Rev Genet*, 2010, 11(9): 636–646. [\[DOI\]](#)
- [3] Miller JC, Tan SY, Qiao GJ, Barlow KA, Wang JB, Xia DF, Meng XD, Paschon DE, Leung E, Hindley SJ, Dulay GP, Hua KL, Ankoudinova I, Cost GJ, Urnov FD, Zhang HS, Holmes MC, Zhang L, Gregory PD, Rebar EJ. A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. *Nat Biotechnol*, 2011, 29(2): 143–148. [\[DOI\]](#)
- [4] Wyman C, Kanaar R. DNA double-strand break repair: all's well that ends well. *Annu Rev Genet*, 2006, 40: 363–383. [\[DOI\]](#)
- [5] Cong L, Ran FA, Cox D, Lin SL, Barretto R, Habib N, Hsu PD, Wu XB, Jiang WY, Marraffini LA, Zhang F. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 2013, 339(6121): 819–823. [\[DOI\]](#)
- [6] Sorek R, Kunin V, Hugenholtz P. CRISPR—a widespread system that provides acquired resistance against phages in bacteria and archaea. *Nat Rev Microbiol*, 2008, 6(3): 181–186. [\[DOI\]](#)
- [7] Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, Amemura M, Nakata A. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J Bacteriol*, 1987, 169(12): 5429–5433. [\[DOI\]](#)
- [8] Bolotin A, Quinquis B, Sorokin A, Ehrlich SD. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology*, 2005, 151(8): 2551–2561. [\[DOI\]](#)
- [9] Mojica FJM, Díez-Villaseñor C, García-Martínez J, Soria E. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *J Mol Evol*, 2005, 60(2): 174–182. [\[DOI\]](#)

- [10] 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. *Microbiology*, 2005, 151(3): 653–663. [\[DOI\]](#)
- [11] Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, Boyaval P, Moineau S, Romero DA, Horvath P. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*, 2007, 315(5819): 1709–1712. [\[DOI\]](#)
- [12] Deltcheva E, Chylinski K, Sharma CM, Gonzales K, Chao YJ, Pirzada ZA, Eckert MR, Vogel J, Charpentier E. CRISPR RNA maturation by *trans*-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature*, 2011, 471(7340): 602–607. [\[DOI\]](#)
- [13] Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 2012, 337(6096): 816–821. [\[DOI\]](#)
- [14] Garneau JE, Dupuis MÈ, Villion M, Romero DA, Barrangou R, Boyaval P, Fremaux C, Horvath P, Magadán AH, Moineau S. The CRISPR/Cas bacterial immune tem cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature*, 2010, 468(7320): 67–71. [\[DOI\]](#)
- [15] Gasiunas G, Barrangou R, Horvath P, Siksnys V. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(39): E2579–E2586. [\[DOI\]](#)
- [16] Mali P, Yang LH, Esvelt KM, Aach J, Guell M, DiCarlo JE, Norville JE, Church GM. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*, 2013, 339(6121): 823–826. [\[DOI\]](#)
- [17] Jinek M, East A, Cheng A, Lin S, Ma EB, Doudna J. RNA-programmed genome editing in human cells. *Elife*, 2013, 2: e00471. [\[DOI\]](#)
- [18] Cho SW, Kim S, Kim JM, Kim JS. Targeted genome engineering in human cells with the Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(3): 230–232. [\[DOI\]](#)
- [19] Ota S, Kawahara A. Zebrafish: a model vertebrate suitable for the analysis of human genetic disorders. *Congenit Anom*, 2014, 54(1): 8–11. [\[DOI\]](#)
- [20] Xue W, Chen SD, Yin H, Tammela T, Papagiannakopoulos T, Joshi NS, Cai WX, Yang GL, Bronson R, Crowley DG, Zhang F, Anderson DG, Sharp PA, Jacks T. CRISPR-mediated direct mutation of cancer genes in the mouse liver. *Nature*, 2014, 514(7522): 380–384. [\[DOI\]](#)
- [21] Holt N, Wang JB, Kim K, Friedman G, Wang XC, Taupin V, Crooks GM, Kohn DB, Gregory PD, Holmes MC, Cannon PM. Human hematopoietic stem/progenitor cells modified by zinc-finger nucleases targeted to *CCR5* control HIV-1 *in vivo*. *Nat Biotechnol*, 2010, 28(8): 839–847. [\[DOI\]](#)
- [22] Perez EE, Wang JB, Miller JC, Jouvenot Y, Kim KA, Liu O, Wang N, Lee G, Bartsevich VV, Lee YL, Guschin DY, Rupniewski I, Waite AJ, Carpenito C, Carroll RG, Orange JS, Urnov FD, Rebar EJ, Ando D, Gregory PD, Riley JL, Holmes MC, June CH. Establishment of HIV-1 resistance in CD4⁺ T cells by genome editing using zinc-finger nucleases. *Nat Biotechnol*, 2008, 26(7): 808–816. [\[DOI\]](#)
- [23] Tebas P, Stein D, Tang WW, Frank I, Wang SQ, Lee G, Spratt SK, Surosky RT, Giedlin MA, Nichol G, Holmes MC, Gregory PD, Ando DG, Kalos M, Collman RG, Binder-Scholl G, Plesa G. Gene editing of *CCR5* in autologous CD4 T cells of persons infected with HIV. *N Engl J Med*, 2014, 370(10): 901–910. [\[DOI\]](#)
- [24] Ye L, Wang JM, Beyer AI, Teque F, Cradick TJ, Qi ZX, Chang JC, Bao G, Muench MO, Yu JW, Levy JA, Kan YW. Seamless modification of wild-type induced pluripotent stem cells to the natural CCR5 32 mutation confers resistance to HIV infection. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111(26): 9591–9596. [\[DOI\]](#)
- [25] Ebina H, Misawa N, Kanemura Y, Koyanagi Y. Harnessing the CRISPR/Cas9 system to disrupt latent HIV-1 provirus. *Sci Rep*, 2013, 3: 2510. [\[DOI\]](#)
- [26] Hu WH, Kaminski R, Yang F, Zhang YG, Cosentino L, Li F, Luo B, Alvarez-Carbonell D, Garcia-Mesa Y, Karn J, Mo XM, Khalilli K. RNA-directed gene editing specifically eradicates latent and prevents new HIV-1 infection. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111(31): 11461–11466. [\[DOI\]](#)
- [27] Wang JB, Quake SR. RNA-guided endonuclease provides a therapeutic strategy to cure latent herpesviridae infection. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111(36): 13157–13162. [\[DOI\]](#)
- [28] Bi YW, Sun L, Gao DD, Ding C, Li ZH, Li YD, Cun W, Li QH. High-efficiency targeted editing of large viral genomes by RNA-guided nucleases. *PLoS Pathog*, 2014, 10(5): e1004090. [\[DOI\]](#)
- [29] De Villiers EM. Heterogeneity of the human papillomavirus group. *J Virol*, 1989, 63(11): 4898–4903. [\[DOI\]](#)
- [30] Zhen S, Hua L, Takahashi Y, Narita S, Liu YH, Li Y. *In vitro* and *in vivo* growth suppression of human papillomavirus 16-positive cervical cancer cells by CRISPR/Cas9. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 450(4): 1422–1426. [\[DOI\]](#)
- [31] Kennedy EM, Kornepati AVR, Goldstein M, Bogerd HP, Poling BC, Whisnant AW, Kastan MB, Cullen BR. Inacti-

- vation of the human papillomavirus E6 or E7 gene in cervical carcinoma cells by using a bacterial CRISPR/Cas RNA-guided endonuclease. *J Virol*, 2014, 88(20): 11965–11972. [\[DOI\]](#)
- [32] Lin SR, Yang HC, Kuo YT, Liu CJ, Yang TY, Sung KC, Lin YY, Wang HY, Wang CC, Shen YC, Wu FY, Kao JH, Chen DS, Chen PJ. The CRISPR/Cas9 system tates clearance of the intrahepatic HBV templates *in vivo*. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2014, 3(8): e186. [\[DOI\]](#)
- [33] Fu YF, Foden JA, Khayter C, Maeder ML, Reyon D, Joung JK, Sander JD. High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(9): 822–826. [\[DOI\]](#)
- [34] Hsu PD, Scott DA, Weinstein JA, Ran FA, Konermann S, Agarwala V, Li YQ, Fine EJ, Wu XB, Shalem O, Cradick TJ, Marraffini LA, Bao G, Zhang F. DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(9): 827–832. [\[DOI\]](#)
- [35] Ran FA, Hsu PD, Lin CY, Gootenberg JS, Konermann S, Trevino AE, Scott DA, Inoue A, Matoba S, Zhang Y, Zhang F. Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell*, 2013, 154(6): 1380–1389. [\[DOI\]](#)
- [36] Shen B, Zhang WS, Zhang J, Zhou JK, Wang JY, Chen L, Wang L, Hodgkins A, Iyer V, Huang XX, Skarnes WC. Efficient genome modification by CRISPR-Cas9 nickase with minimal off-target effects. *Nat Methods*, 2014, 11(4): 399–402. [\[DOI\]](#)
- [37] Tsai SQ, Wyvekens N, Khayter C, Foden JA, Thapar V, Reyon D, Goodwin MJ, Aryee MJ, Joung JK. Dimeric CRISPR RNA-guided FokI nucleases for highly specific genome editing. *Nat Biotechnol*, 2014, 32(6): 569–576. [\[DOI\]](#)
- [38] Maggio I, Holkers M, Liu J, Janssen JM, Chen XY, Goncalves MA. Adenoviral vector delivery of RNA-guided CRISPR/Cas9 nuclease complexes induces targeted mutagenesis in a diverse array of human cells. *Sci Rep*, 2014, 4: 5105. [\[DOI\]](#)

(责任编辑: 谢建平)