

CRISPR/Cas9 系统的分子机制及其在人类疾病基因治疗中的应用

璩良, 李华善, 姜运涵, 董春升

苏州大学生物医学研究院, 苏州大学医学部, 苏州 215123

摘要: CRISPR/Cas 系统是广泛存在于细菌和古生菌中的适应性免疫系统, 用来抵抗外来病毒或质粒的入侵。近几年, 由 II 型 CRISPR/Cas 适应性免疫系统改造而来的 CRISPR/Cas9 基因组编辑技术蓬勃发展, 被广泛地应用于生命科学研究的各个领域, 并取得了革命性的变化。文章主要综述了 CRISPR/Cas9 基因组编辑技术的起源与发展及在生命科学各研究领域的应用, 重点介绍了该系统在人类疾病基因治疗方面的最新应用及脱靶效应, 以期为相关领域的科研人员提供参考。

关键词: CRISPR/Cas9 系统; 适应性免疫; 基因组编辑

The molecular mechanism of CRISPR/Cas9 system and its application in gene therapy of human diseases

Liang Qu, Huashan Li, Yunhan Jiang, Chunsheng Dong

Institutes of Biology and Medical Sciences (IBMS), School of Medicine, Soochow University, Suzhou 215123, China

Abstract: CRISPR/Cas system is an adaptive immune system that confers resistance to exogenous virus or plasmid in bacteria and archaea. In recent years, the booming CRISPR/Cas9 genome editing technology modified from type II CRISPR/Cas adaptive immune system has been widely applied to various research fields of life science and led to revolutionary changes. In this review, we summarize the origin and development of CRISPR/Cas9 genome editing technology as well as its applications in life science research. We focus on the latest application of this system in gene therapy of human diseases and the associated side/off-target effects, which may provide references for researchers in related areas.

Keywords: CRISPR/Cas9 system; adaptive immune system; genome editing

基因组编辑技术产生于 20 世纪 80 年代, 是通过自然状态下同源重组(Homologous recombination, HR)途径对内源性基因进行定点敲除或者替换。由于

细胞发生随机同源重组的效率只有百万分之一, 且耗时长、成本高, 因此限制了基因组编辑技术的广泛应用^[1,2]。

收稿日期: 2015-03-16; 修回日期: 2015-07-23

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: K113415011), 江苏省大学生创新创业训练计划项目(编号: 201310285046Z)和苏州市科技局项目(编号: SYS201452)资助

作者简介: 璩良, 本科生, 专业方向: 生物技术(免疫工程)。E-mail: quliangsuda@163.com

通讯作者: 董春升, 副教授, 研究方向: 免疫学。E-mail: chunshengdong@suda.edu.cn

DOI: 10.16288/j.ycz.15-109

网络出版时间: 2015-8-4 9:37:07

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20150804.0937.004.html>

21 世纪初, 科研人员相继开发出锌指核酸酶 (Zinc finger nuclease, ZFN) 技术^[3,4]和转录激活因子样效应物核酸酶 (Transcription activator-like effector nucleases, TALEN) 技术^[5~7], 基因组编辑技术得到迅速发展。细胞内有两种 DNA 损伤修复途径: 一种是同源介导修复 (Homology directed repair, HDR), 可实现准确的 DNA 修复, 不会产生基因突变; 另一种是非同源末端连接 (Non-homologous end joining, NHEJ), 会产生 DNA 序列的突变。2013 年初 *Science*、*Nature*、*Biotechnology* 和 *Cell* 等杂志几乎同时报道了一种不依赖于 *FokI* 核酸酶的基因组编辑技术—Clustered regularly interspaced short palindromic repeats / associated nuclease 9 (CRISPR/Cas9), 该技术是由细菌或古生菌中的 CRISPR/Cas 适应性免疫系统发展而来。CRISPR/Cas9 核酸酶可以在哺乳动物细胞中进行基因组编辑, 实现对靶基因的敲除、突变、插入以及基因抑制和激活等^[8~11]。作为一种新的基因组编辑技术, CRISPR/Cas9 具有明显的优势: (1) 质粒构建容易, 只要向载体上插入一段 20 bp 的能够转录为 sgRNA 的 DNA 片段即可。而 ZFN 和 TALEN 在构建表达质粒时, 需将多个 DNA 片段连接后再插入载体中, 尤其是 TALEN 载体的构建, 通常需要将 7~9 段 1000 bp 以上 DNA 连接后插入目的载体; (2) 操作简单, 在真核细胞中同时表达 Cas9 蛋白和靶向目的基因的单向 RNA (Single-guide RNA, sgRNA), 就可以实现对靶基因 DNA 的编辑; (3) 利用 CRISPR/Cas9 技术可在大部分的细胞和个体中实现基因组编辑, 可同时对多个靶点进行修饰, 实验周期短, 最快仅需两个月。本文主要综述了 CRISPR/Cas9 适应性免疫系统的分子机制以及在基因组编辑中的应用, 特别是在人类疾病基因治疗中的应用。

1 细菌 CRISPR/Cas9 适应性免疫系统的分子机制

1.1 CRISPR/Cas9 系统的结构和作用原理

CRISPR 是一个特殊的 DNA 重复序列家族, 广泛分布于细菌和古生菌基因组中。CRISPR/Cas 系统主要分为 Type I、Type II、Type III 3 种不同类型。Type I 是 CRISPR 系统中 Cas 蛋白种类最多和最复杂的一种, 多种 Cas 蛋白与成熟的 crRNA (CRISPR RNA) 一起参与外源 DNA 的降解^[12,13]。Type II 系统

中的 Cas 蛋白是 Cas10 蛋白, 该系统分为 A 和 B 两种类型: A 型介导 mRNA 的降解^[14], B 型介导外源 DNA 的降解^[15]。Type II 系统中只有一种核酸酶—Cas9 核酸酶, 在该系统中 Cas9 蛋白与 crRNA 参与对抗外源噬菌体和质粒的入侵^[16,17]。目前, Type II 系统在基因组编辑中应用的最为广泛。如图 1 所示, CRISPR 位点通常由短的高度保守的重复序列组成, 重复序列的长度通常为 21~48 bp, 重复序列之间被 26~72 bp 间隔序列 (Spacer) 隔开^[18~20]。CRISPR 就是通过这些间隔序列识别外源 DNA。Cas 系列基因存在于 CRISPR 位点附近, 其中 II 型 CRISPR/Cas9 免疫系统依赖 Cas9 内切酶家族靶向并切割外源 DNA^[20], 在这一系统中, crRNA 通过碱基配对与 tracrRNA (Trans-activating crRNA) 结合形成双链 RNA, 此 tracrRNA/crRNA 二元复合物指导 Cas9 蛋白在特定的位点切割 DNA, 其中 Cas9 的 HNH 核酸酶结构域切割互补链, 其 RuvC-like 结构域切割非互补链^[21]。

近期研究也表明, 这样的双链二元复合体 RNA 可以被 sgRNA 所替换, Cas9 核酸酶能在 sgRNA 引导下对靶 DNA 序列进行切割, 它与 *FokI* 酶功能类似, 但是并不需要形成二聚体就能发挥作用^[22,23] (图 2)。

1.2 CRISPR/Cas9 系统应对病毒和质粒入侵的免疫机制

病毒或质粒入侵细菌后, 其基因组 DNA 暴露于细菌胞浆之中, CRISPR 重复序列转录、翻译出的 Cas 复合物对外来 DNA 进行剪切, 产生新的 spacer 序列。如果产生的新 spacer 序列能够与 CRISPR array 内部的短重复序列部分互补, 将会通过某种未知的方式整合到细菌基因组的 CRISPR array 序列中, 从而对该病毒或质粒产生特异性免疫记忆^[22~25]。当同类的病毒或者质粒再次入侵该细菌时, 被插入的新的 spacer 序列与短重复序列一起融合转录为 crRNA, 转录的 spacer 序列可以与病毒或者质粒的 DNA 进行互补, 而与 spacer 序列融合的短重复序列可以与 tracrRNA 部分互补形成 RNA 和 RNA 复合物, 此 RNA 二元复合物可与 Cas9 核酸酶结合, 并引导 Cas9 核酸酶切割特定互补序列的双链 DNA, 从而破坏入侵病毒或者质粒的 DNA, 使其不能在细菌内进行复制。具体机制如图 3 所示。

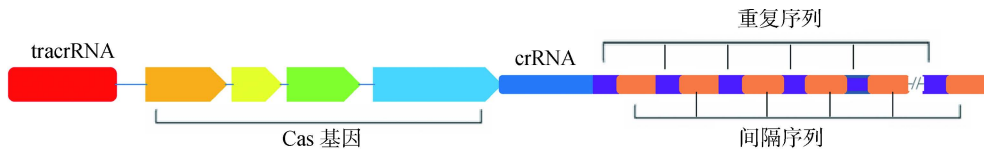


图 1 CRISPR/Cas 的结构

CRISPR/Cas9 由一系列的 Cas 基因和短重复序列组成, 这些短重复序列被间隔序列隔开, 外源 DNA 入侵细菌后会被切割并整合到短重复序列与间隔序列之间, 实现对外源 DNA 的免疫记忆。

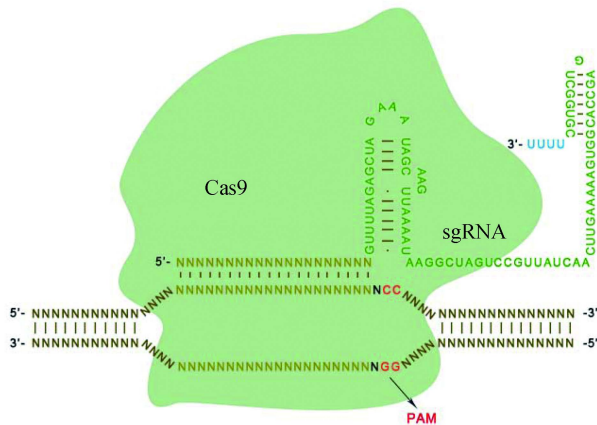


图 2 CRISPR/Cas9 作用原理

sgRNA 与 Cas9 核酸酶结合后, sgRNA 引导 Cas9 核酸酶识别并结合到靶 DNA 序列, 形成 Cas9 核酸酶、sgRNA 和 DNA 三元复合物, 然后 Cas9 核酸酶发挥核酸酶活性, 在靶 DNA 序列特定位点进行切割, 产生双链末端断裂。

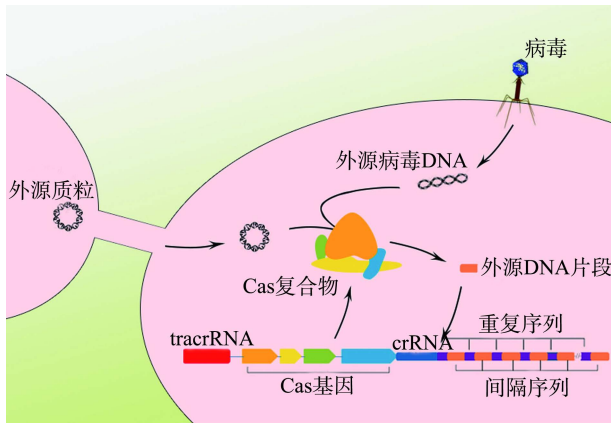


图 3 CRISPR/Cas9 系统应对病毒和质粒入侵的免疫机制

噬菌体或外源质粒入侵细菌之后, 细菌内的 Cas 核酸酶复合物将外源 DNA 切割, 并将切断的部分外源 DNA 整合到细菌基因组的短重复序列处, 从而实现对外源噬菌体或质粒的免疫记忆; 当该类噬菌体或质粒再次入侵细菌时, 外源 DNA 的短重复序列转录的 RNA 会引导 Cas 核酸酶切割外源噬菌体或质粒的 DNA, 实现清除外源噬菌体或质粒的免疫防御功能。

2 CRISPR/Cas9 系统的应用

研究证明 \square 型 CRISPR/Cas9 系统只需利用 Cas9

核酸酶与 sgRNA 协同作用就可以完成对入侵 DNA 的切割^[26]。目前, 全世界多个科研团队相继证明了 CRISPR/Cas9 核酸酶可以在线虫 (*Caenorhabditis elegans*)、斑马鱼 (*Danio rerio*)、果蝇 (*Drosophila melanogaster*)、细菌和酵母等模式生物细胞内进行基因组编辑。sgRNA 引导 Cas9 核酸酶在特定的 DNA 序列进行切割产生双链末端断裂, 细胞可以通过 HDR 或 NHEJ 两种途径进行修复, 当细胞通过 NHEJ 途径进行修复时, 在连接处有碱基的缺失与插入, 会产生开放阅读框的移码突变使靶基因失活, 实现基因敲除^[27,28]。CRISPR/Cas9 技术作为生命科学领域研究技术手段的一个革命性的突破, 在构建基因敲除小鼠、遗传性疾病研究、抗病毒研究、癌症研究、功能基因筛选、转录调控研究、单分子标记研究和基因治疗研究等领域中有着广泛应用。

2.1 CRISPR/Cas9 系统在基因编辑上的应用

CRISPR/Cas9 作为最新的基因组编辑技术, 最直接的应用就是对靶基因进行精确的编辑。靶向目的基因的 sgRNA 和 Cas9 核酸酶在真核细胞内共表达, sgRNA 可以引导 Cas9 核酸酶识别靶基因序列并进行切割产生双链末端断裂 DNA, 引发胞内 HDR 或者 NHEJ DNA 修复途径。当细胞内转有目的基因同源臂的外源 DNA 时, 可以通过 HDR 途径实现外源基因的敲入^[27-31]。最近, 中国医学科学院张连峰教授利用 CRISPR/Cas9 系统成功地将 *EGFP* 基因敲入 *TRDMT1* 基因座位上^[32]。袁晶等^[33]运用 Cas9 基因组编辑技术, 对疟原虫 (*Plasmodium*) 的基因组实行了基因删除、基因敲入和核苷酸替换。该研究将 Cas9 质粒、sgRNA 质粒与含有同源臂的 donor 质粒通过电穿孔的方法转到疟原虫的细胞核中, 成功地实现了对 1.7 kb、4.0 kb 和 5.0 kb 大小的基因删除, 发现同源臂越长, 基因删除的效率越高。此外, 他们运用类似的方法成功在疟原虫 *PYO3652* 基因上融合了 *myc* 标签和 *gfp* 标记。用此方法可以便于后续的

免疫印迹和免疫荧光等实验操作,而不需要购买一些昂贵的抗体或耗费大量的时间制备抗体。荧光标记(如 GFP, mCherry 等)的引入为观察体内细胞显微条件下蛋白的表达与定位提供了极大的便利。

2.2 CRISPR/Cas9 系统在基因治疗遗传性疾病方面的应用

CRISPR/Cas9 技术在基因治疗遗传性疾病方面也有着广泛的应用前景。人类基因组中约有 25 000 个基因,其中大约 3000 个基因的突变与人类疾病相关,如血友病、苯丙酮尿症、囊性纤维病等。CRISPR/Cas9 技术可以使基因组中突变的基因失活或者纠正突变的基因,因此可以从根本上治愈这些基因突变导致的遗传性疾病。2014 年, *Nature Biotechnology*、*Science* 杂志相继报道了运用 CRISPR/Cas9 技术治疗 *FAH* 基因突变的酪氨酸血症^[31]和杜氏肌营养不良疾病^[34]。同年 8 月 5 日, Xie 等^[35]报道了通过该技术治疗地中海贫血症,该研究者将地中海贫血症患者的皮肤细胞诱导分化为诱导性多功能干细胞(Inducible pluripotent stem cell, iPSC),随后利用 CRISPR/Cas9 技术修复 *HBB* 基因,并将基因修复后的 iPSC 诱导分化成红细胞,该红细胞能够稳定表达正常的 *HBB* 蛋白。该研究利用了 piggyBac 转座子,因此细胞基因组中没有插入基因编辑操作所带的筛选标记。此研究不仅为治疗人类地中海贫血症提供了很好的思路,也为以后干细胞的基因治疗提供了一种全新的借鉴方法。2013 年,李劲松课题组以小鼠为模型,利用 CRISPR/Cas9 技术纠正白内障模型小鼠受精卵中的 *Crygc* 基因,发现由该处理组受精卵发育而来的小鼠的白内障症状较对照组有了显著地改善^[36]。

2.3 CRISPR/Cas9 系统在基因治疗病毒感染性疾病方面的应用

CRISPR/Cas9 技术在治疗病毒感染性疾病中也有着良好的应用前景。2013 年 11 月 14 日, *Virus* 杂志上的一篇综述对 CRISPR/Cas9 技术用于治疗人类免疫缺陷病毒(HIV-1)感染进行了展望^[37],指出可以将 HIV 感染者的骨髓干细胞分离出来,运用 Cas9 基因组编辑技术在体外将 HIV-1 的宿主细胞辅助受体 *CCR5* 或 *CXCR4* 基因失活,再将 *CCR5* 或 *CXCR4* 基因失活的 CD34⁺造血干细胞回输给该患者,这些

经过基因编辑的骨髓干细胞可以分化为产生抵抗 HIV-1 感染的 CD4⁺T 细胞。另外, Kamel Khalili 研究小组采取直接靶向 HIV-1 基因组 DNA 的治疗策略:利用 CRISPR/Cas9 构建靶向 HIV-1 的 LTR U3 区的 sgRNA^[38],该 sgRNA 可以引导 Cas9 核酸酶识别已经整合到 HIV-1 感染者细胞基因组上的病毒前基因组 DNA,并在 5'LTR U3 区和 3'LTR U3 区进行切割,从而可以从感染者的基因组上切除已经整合的病毒前基因组 DNA,因而可以抑制 HIV-1 在体内的复制,但是 HIV-1 前基因组 DNA 在感染者 CD4⁺T 细胞中拷贝数较多, Cas9 核酸酶是否能将 CD4⁺T 细胞中整合的病毒前基因组拷贝都切除还有待进一步验证。

慢性乙型肝炎由人类乙型肝炎病毒(HBV)感染导致,是肝硬化和肝癌的主要诱因之一。HBV 的共价闭合环状 DNA(cccDNA)对于病毒的持续性感染起了主要作用。因此,清除被感染肝细胞内的 HBV cccDNA 是临床上彻底治愈慢性乙型肝炎的关键。多项研究表明, CRISPR/Cas9 技术可以特异性地靶向 HBV cccDNA,从而有效抑制 HBV 的复制^[39-43]。Seeger 等^[42]采用了稳定表达 HBV 受体 NTCP 的 HepG2 细胞系,然后用 HBV 去感染该细胞并转染表达 Cas9 蛋白和靶向 HBV cccDNA 的 sgRNA,证实 Cas9 核酸酶的确可以靶向切割 HBV 的基因组 cccDNA,并使其通过 NHEJ 途径进行修复,引起核苷酸的缺失或插入,从而抑制 HBV 在肝细胞内的复制。我们实验室也成功构建了靶向 HBV 基因组的 Cas9 质粒并证明在细胞和小鼠体内能有效清除 HBV cccDNA,抑制病毒复制^[39]。此外, Suenaga 等^[44]运用 CRISPR/Cas9 技术对单纯疱疹病毒(HSV)基因组进行基因组编辑,成功实现了对 HSV 基因组进行基因敲除与敲入,这些突变后的 HSV 可以应用于癌症治疗,该研究为其他 DNA 病毒如 EB 病毒、巨细胞病毒等的基因组学研究提供了一种新的思路。

2.4 CRISPR/Cas9 系统在癌症方面的应用

2014 年, Torres 等^[45]首次报道了应用 CRISPR/Cas9 技术构建癌症模型的研究,在该研究中 Cas9 在特异性 sgRNA 的引导下,在染色体特定位点 DNA 处进行切割,使被切割的染色体发生倒位和异位,准确模拟了人类一些肿瘤例如急性髓系白血病和尤文氏肉瘤的形成过程。同年, Xue 等^[46]运用 CRISPR/Cas9

基因组编辑技术成功地将抑癌基因 *p53* 和 *pten* 进行双突变, 构建了肝癌动物模型。Platt 等^[47]报道了小鼠肿瘤模型, 将器官靶向的各种亚型的 AAV 载体作为 CRISPR/Cas9 的递送系统, 在肝、脑、肺等器官中实现 Cas9 核酶的特异性表达, 并且成功构建了肺腺癌小鼠模型。由此可见, AAV 载体与 CRISPR/Cas9 技术的联合运用将会在癌症的个体化治疗中发挥越来越重要的作用。

2.5 CRISPR/Cas9 系统在高通量筛选和功能基因组学上的应用

近来, 基于 CRISPR/Cas9 系统慢病毒介导的功能基因筛选文库在高通量筛选和功能基因组学的应用取得了很大进展。2014 年 1 月, Shalem 等^[48]成功构建了由慢病毒介导的靶向 18 080 个基因的 CRISPR-Cas9 knockout(GeCKO)文库。他们首先运用 GeCKO 文库验证了肿瘤细胞或多能干细胞生存相关的几个已知基因, 然后又以黑色素瘤为模型, 通过该文库成功筛选了在黑色素瘤发生过程中几个关键基因, 如 *NF2*、*CUL3*、*TADA2B* 和 *TADA1*。与此同时, Wang 等^[49]也成功地构建了基于 CRISPR/Cas9 系统的慢病毒 sgRNA 基因筛选文库, 并通过此文库证实了 DNA 错配修复过程中的所有关键基因, 而且还发现了抗肿瘤药 etoposide 作用的两个靶基因 *TOP2A* 和 *CDK6*。北京大学魏文胜教授课题组也报道了基于 CRISPR/Cas9 系统的慢病毒 sgRNA 细胞文库^[50], 并且建立了功能基因筛选平台以及通过高通量测序技术分析数据的一整套技术路线。他们利用这一基因筛选技术, 成功鉴定出白喉毒素和炭疽毒素的细胞表面受体, 为研究病原菌与宿主相互作用和信号通路提供了极大的便利。

2.6 CRISPR/Cas9 系统在研究基因表达调控方面的应用

sgRNA 可以引导 Cas9 核酸酶识别并切割靶 DNA 序列, 对 Cas9 蛋白中具有核酸酶活性的结构域进行突变得到无核酸酶活性的 Cas9 (dCas9), 再将其与一个转录抑制或者转录激活调节的结构域融合表达, 表达的融合蛋白在 sgRNA 的引导下靶向识别目的基因启动子区域, 融合表达的转录激活结构域或转录调节结构域会招募相关的转录因子, 从而准确特异地调控靶基因的表达(图 4)。已有报道表明利

用此原理建立 CRISPR-ON 系统^[51], 转录激活结构域显著地激活了 *IL1RN*、*SOX2* 和 *OCT4* 报告基因的表达。Qi 等^[52,53]利用类似的方法在人类细胞和酵母细胞中成功实现了对基因的激活或抑制。在该研究中, 他们将这种 Cas9 介导的抑制细胞内基因表达的方法称为 CRISPRi。CRISPRi 有以下优势: (1) 针对不同的目的基因, 只需设计一个 sgRNA 即可; (2) 可以在同一个细胞中设计多个针对不同基因启动子的 sgRNA, 同时研究多个基因的表达、激活或抑制; (3) RNAi 作用于翻译阶段, 而 CRISPR 作用于转录阶段, 因此 CRISPR 调控基因表达的效率会高很多, 作用会更明显。

2.7 CRISPR/Cas9 系统在活细胞单分子标记领域中的应用

活细胞单分子标记技术是研究细胞内单个分子构象变化和动力学的一门前沿技术。2013 年, Chen 等^[54]将 Cas9 核酸酶中具有核酸酶活性的结构域进行突变, 使其丧失核酸酶活性, 再将失去核酸酶活性的 dCas9 蛋白与绿色荧光蛋白 EGFP 融合; 在活细胞内, 靶向染色体端粒重复序列的 sgRNA 将 dCas9-EGFP 引导到端粒区域, 使得染色体末端端粒区域发出荧光, 借此可以清晰观察活细胞内端粒的延伸与缩短; 在此基础上, 他们设计了靶向单拷贝基因 *MUC4* 的 sgRNA, 成功观察到绿色荧光蛋白基因标记的 *MUC4* 基因。由此可见, CRISPR/Cas9 系统与单分子标记技术的有效结合, 可为研究活细胞内染色体和基因的构象和动力学提供一种强大工具。

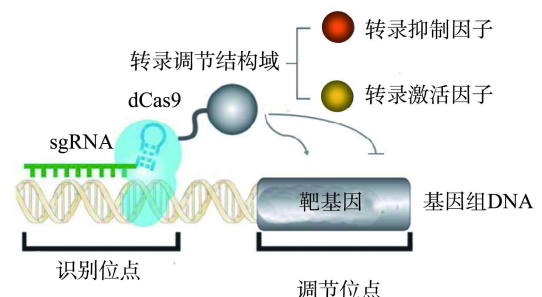


图 4 Cas9 系统调控基因表达的作用机制

定点突变后失去核酸酶活性的 dCas9 融合了转录抑制因子或转录激活因子, 在靶向特定基因启动子的 sgRNA 的引导下识别并结合到该基因的启动子处, 从而实现融合表达的转录抑制或转录激活因子准确特异地调控靶基因的表达。

3 CRISPR/Cas9 系统的发展与展望

CRISPR/Cas9 系统是靶向基因编辑的一项利器,在构建基因敲除细胞系和基因敲除动物模型、基因治疗遗传疾病和感染性疾病等研究领域有良好的应用前景,但是该技术也存在着一定弊端如脱靶效应,这也是基因治疗应用中急需解决的问题之一。脱靶效应会导致基因组中其他序列突变、癌基因激活等不良后果,给临床应用带来风险。Duan 等^[55]通过深度测序分析靶向 *emx1* 基因的 sgRNA 结合位点发现,除了 OT2-1 和 OT2-4 两个位点外,大部分脱靶效应位点虽然含有与靶向 RNA 互补的 10~12 bp 的种子序列和 3 bp 的 PAM 序列(NGG),但 Cas9 并不切割这些脱靶位点。研究人员还发现 Cas9 核酸酶的脱靶效应具有细胞特异性,他们猜想染色质构象和其他的表观遗传因素参与此调控。2013 年 9 月,张锋课题组通过将 Cas9 蛋白的核酸酶结构域突变,使得突变的 dCas9 蛋白只能对靶向 DNA 的一条链进行切割。这样对于某个基因 DNA 双链的切割可以通过设计两条不同识别序列的 sgRNA 完成,该策略可使脱靶效应降低 1000 倍^[30]。随后, Tsai 等^[56]和 Guilinger 等^[57]各自报道了融合蛋白 dCas9-FokI 可有效降低 CRISPR 的脱靶效应。研究人员通过构建表达 dCas9-FokI,两个 sgRNA 分别引导 dCas9-FokI 结合到相距 15~20 bp 的靶 DNA 区域, FokI 实现二聚化而被激活,对中间的 DNA 序列进行切割,产生双链末端断裂。

如何有效地将 Cas9 基因组编辑质粒准确地靶向运输到特定的细胞、组织和器官中,实现精确导向的基因治疗^[58-62],也是当今基因治疗领域的一大难题。在体外对一些细胞进行基因组编辑,可以用电穿孔或病毒载体将 Cas9 基因组编辑质粒转入细胞之中。电穿孔的方法进行基因转染对细胞的损伤较大,这些细胞在体外经过电穿孔处理后,细胞的活力可能会降低,回输到体内后达不到理想的效果。病毒载体如逆转录病毒载体、慢病毒载体、腺病毒载体等在体外应用比较广泛^[63-65]。利用慢病毒载体可以使细胞稳定、持续表达 Cas9 核酸酶和 sgRNA,从而取得较高的基因敲除效率,但也会相对地增加 Cas9 核酸酶的脱靶效应;值得注意的是,慢病毒载体在细胞基因组中随机整合,可能会激活癌基因的表达,在应用于基因治疗时不容忽视。在体内基因递送和基因治疗应用中,腺相关病毒 AAV

载体应用十分广泛。Platt 等^[47]将 CRISPR/Cas9 基因编辑系统与 AAV 系统相结合,成功地对小鼠脑细胞进行了基因编辑,还构建了肺腺癌小鼠模型。也有报道利用 AAV 递送 Cas9 基因编辑系统,成功地对小鼠脑部神经细胞的多个基因进行编辑,观察到了小鼠行为上的变化^[66]。除了 AAV 载体外,纳米颗粒和脂质体也是一种充满前景的递送工具^[67,68]。纳米颗粒或脂质体可以包裹按一定比例配制的表达 Cas9 核酸酶的 mRNA 和 sgRNA,作为药物被摄入体内。这可以更好地控制服用剂量,并且也极大的降低了机体对于外来刺激的免疫反应。

综上所述,CRISPR/Cas9 基因组编辑技术是生命科学领域一项重要的发现与创造,在生命科学研究的领域具有广泛应用,随着 CRISPR/Cas9 系统的发展,其在人类疾病基因治疗中必将具有光明的应用前景。

参考文献

- [1] Keeney S, Giroux CN, Kleckner N. Meiosis-specific DNA double-strand breaks are catalyzed by Spo11, a member of a widely conserved protein family. *Cell*, 1997, 88(3): 375-384. [DOI]
- [2] Szostak JW, Orr-Weaver TL, Rothstein RJ, Stahl FW. The double-strand-break repair model for recombination. *Cell*, 1983, 33(1): 25-35. [DOI]
- [3] Miller JC, Holmes MC, Wang JB, Guschin DY, Lee YL, Rupniewski I, Beausejour CM, Waite AJ, Wang NS, Kim KA, Gregory PD, Pabo CO, Rebar EJ. An improved zinc-finger nuclease architecture for highly specific genome editing. *Nat Biotechnol*, 2007, 25(7): 778-785. [DOI]
- [4] Urnov FD, Miller JC, Lee YL, Beausejour CM, Rock JM, Augustus S, Jamieson AC, Porteus MH, Gregory PD, Holmes MC. Highly efficient endogenous human gene correction using designed zinc-finger nucleases. *Nature*, 2005, 435(7042): 646-651. [DOI]
- [5] Boch J, Scholze H, Schornack S, Landgraf A, Hahn S, Kay S, Lahaye T, Nickstadt A, Bonas U. Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science*, 2009, 326(5959): 1509-1512. [DOI]
- [6] Christian M, Cermak T, Doyle EL, Schmidt C, Zhang F, Hummel A, Bogdanove AJ, Voytas DF. Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. *Genetics*, 186(2): 757-761. [DOI]
- [7] Miller JC, Tan SY, Qiao GJ, Barlow KA, Wang JB, Xia DF, Meng XD, Paschon DE, Leung E, Hinkley 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]
- [8] 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]
- [9] Jiang WY, Bikard D, Cox D, Zhang F, Marraffini LA. RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(3): 233–239. [DOI]
- [10] 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]
- [11] Wang HY, Yang H, Shivalila CS, Dawlaty MM, Cheng AW, Zhang F, Jaenisch R. One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell*, 2013, 153(4): 910–918. [DOI]
- [12] Sroubek J, Krishnan Y, McDonald TV. Sequence and structure-specific elements of HERG mRNA determine channel synthesis and trafficking efficiency. *FASEB J*, 2013, 27(8): 3039–3053. [DOI]
- [13] Wiedenheft B, van Duijn E, Bultema JB, Waghmare SP, Zhou KH, Barendregt A, Westphal W, Heck AJR, Boekema EJ, Dickman MJ, Doudna JA. RNA-guided complex from a bacterial immune system enhances target recognition through seed sequence interactions. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(25): 10092–10097. [DOI]
- [14] Hale CR, Zhao P, Olson S, Duff MO, Graveley BR, Wells L, Terns RM, Terns MP. RNA-guided RNA cleavage by a CRISPR RNA-Cas protein complex. *Cell*, 2009, 139(5): 945–956. [DOI]
- [15] Marraffini LA, Sontheimer EJ. CRISPR interference limits horizontal gene transfer in staphylococci by targeting DNA. *Science*, 2008, 322(5909): 1843–1845. [DOI]
- [16] 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]
- [17] 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 system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature*, 2010, 468(7320): 67–71. [DOI]
- [18] Heler R, Marraffini LA, Bikard D. Adapting to new threats: the generation of memory by CRISPR-Cas immune systems. *Mol Microbiol*, 2014, 93(1): 1–9. [DOI]
- [19] Jansen R, van Embden JDA, Gaastra W, Schouls LM. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Mol Microbiol*, 2002, 43(6): 1565–1575. [DOI]
- [20] Mojica FJ, Díez-Villaseñor C, Soria E, Juez G. Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria. *Mol Microbiol*, 2014, 36(1): 244–246. [DOI]
- [21] 张智辉, 董少忠, 寸犇. 基因组定点编辑技术的研究进展. *生命科学*, 2013, 25(7): 735–742. [DOI]
- [22] 李铁民, 杜波. CRISPR-Cas 系统与细菌和噬菌体的共进化学. *遗传*, 2011, 33(3): 213–218. [DOI]
- [23] 王菲, 罗恩杰. CRISPR 及其在原核生物防御系统中的作用. *热带医学杂志*, 2008, 8(10): 1104–1106. [DOI]
- [24] Chylinski K, Le Rhun A, Charpentier E. The tracrRNA and Cas9 families of type II CRISPR-Cas immunity systems. *RNA Biol*, 2013, 10(5): 726–737. [DOI]
- [25] 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]
- [26] Hwang WY, Fu YF, Reyon D, Maeder ML, Tsai SQ, Sander JD, Peterson RT, Yeh JR, Joung JK. Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(3): 227–229. [DOI]
- [27] Chylinski K, Makarova KS, Charpentier E, Koonin EV. Classification and evolution of type II CRISPR-Cas systems. *Nucleic Acids Res*, 2014, 42(10): 6091–6105. [DOI]
- [28] Liu YY, Ma SY, Wang XG, Chang JS, Gao J, Shi R, Zhang JD, Lu W, Zhao P, Xia QY. Highly efficient multiplex targeted mutagenesis and genomic structure variation in *Bombyx mori* cells using CRISPR/Cas9. *Insect Biochem Mol Biol*, 2014, 49: 35–42. [DOI]
- [29] Auer TO, Del Bene F. CRISPR/Cas9 and TALEN-mediated knock-in approaches in zebrafish. *Methods*, 2014, 69(2): 142–150. [DOI]
- [30] 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]
- [31] Yin H, Xue W, Chen SD, Bogorad RL, Benedetti E, Grompe M, Kotliansky V, Sharp PA, Jacks T, Anderson DG. Genome editing with Cas9 in adult mice corrects a disease mutation and phenotype. *Nat Biotechnol*, 2014, 32(6): 551–553. [DOI]
- [32] Ma YW, Ma J, Zhang X, Chen W, Yu L, Lu YD, Bai L, Shen B, Huang XX, Zhang LF. Generation of *eGFP* and

- Cre* knockin rats by CRISPR/Cas9. *FEBS J*, 2014, 281(17): 3779–3790. [DOI]
- [33] Zhang C, Xiao B, Jiang YY, Zhao YH, Li ZK, Gao H, Ling Y, Wei J, Li SN, Lu MK, Su XZ, Cui HT, Yuan J. Efficient editing of malaria parasite genome using the CRISPR/Cas9 system. *MBio*, 2014, 5(4): e01414–14. [DOI]
- [34] Long CZ, McAnally JR, Shelton JM, Mireault AA, Bassel-Duby R, Olson EN. Prevention of muscular dystrophy in mice by CRISPR/Cas9-mediated editing of germline DNA. *Science*, 2014, 345(6201): 1184–1188. [DOI]
- [35] Xie F, Ye L, Chang JC, Beyer AI, Wang JM, Muench MO, Kan YW. Seamless gene correction of β -thalassemia mutations in patient-specific iPSCs using CRISPR/Cas9 and *piggyBac*. *Genome Res*, 2014, 24(9): 1526–1533. [DOI]
- [36] Wu YX, Liang D, Wang YH, Bai MZ, Tang W, Bao SM, Yan ZQ, Li DS, Li JS. Correction of a genetic disease in mouse via use of CRISPR-Cas9. *Cell Stem Cell*, 2013, 13(6): 659–662. [DOI]
- [37] Manjunath N, Yi GH, DangY, Shankar P. Newer gene editing technologies toward HIV gene therapy. *Viruses*, 2013, 5(11): 2748–2766. [DOI]
- [38] Hu WH, Kaminski R, Yang F, Zhang YG, Cosentino L, Li F, Luo B, Alvarez-Carbonell D, Garcia-Mesa Y, Karn J, Mo XM, Khalili 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]
- [39] Dong CS, Qu L, Wang HY, Wei L, Dong YS, Xiong SD. Targeting hepatitis B virus cccDNA by CRISPR/Cas9 nuclease efficiently inhibits viral replication. *Antiviral Res*, 2015, 118: 110–117. [DOI]
- [40] Kennedy EM, Bassit LC, Mueller H, Kornepati AVR, Bogerd HP, Nie T, Chatterjee P, Javanbakht H, Schinazi RF, Cullen BR. Suppression of hepatitis B virus DNA accumulation in chronically infected cells using a bacterial CRISPR/Cas RNA-guided DNA endonuclease. *Virology*, 2015, 476: 196–205. [DOI]
- [41] 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 facilitates clearance of the intrahepatic HBV templates *in vivo*. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2014, 3(8): e186. [DOI]
- [42] Seeger C, Sohn JA. Targeting hepatitis B virus with CRISPR/Cas9. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2014, 3(12): e216. [DOI]
- [43] Zhen S, Hua L, Liu YH, Gao LC, Fu J, Wan DY, Dong LH, Song HF, Gao X. Harnessing the clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR)/CRISPR-associated Cas9 system to disrupt the hepatitis B virus. *Gene Ther*, 2015, 22(5): 404–412. [DOI]
- [44] Suenaga T, Kohyama M, Hirayasu K, Arase H. Engineering large viral DNA genomes using the CRISPR-Cas9 system. *Microbiol Immunol*, 2014, 58(9): 513–522. [DOI]
- [45] Torres R, Martin MC, Garcia A, Cigudosa JC, Ramirez JC, Rodriguez-Perales S. Engineering human tumour-associated chromosomal translocations with the RNA-guided CRISPR-Cas9 system. *Nat Commun*, 2014, 5: 3964. [DOI]
- [46] Xue W, Chen SD, Yin H, Tammela T, Papagiannakopoulos T, Joshi NS, Cai WX, Yang G, 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]
- [47] Platt RJ, Chen SD, Zhou Y, Yim MJ, Swiech L, Kempton HR, Dahlman JE, Parnas O, Eisenhaure TM, Jovanovic M, Graham DB, Jhunjhunwala S, Heidenreich M, Xavier RJ, Langer R, Anderson DG, Hacohen N, Regev A, Feng GP, Sharp PA, Zhang F. CRISPR-Cas9 knockin mice for genome editing and cancer modeling. *Cell*, 2014, 159(2): 440–455. [DOI]
- [48] Shalem O, Sanjana NE, Hartenian E, Shi X, Scott DA, Mikkelsen TS, Heckl D, Ebert BL, Root DE, Doench JG, Zhang F. Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells. *Science*, 2014, 343(6166): 84–87. [DOI]
- [49] Wang T, Wei JJ, Sabatini DM, Lander ES. Genetic screens in human cells using the CRISPR-Cas9 system. *Science*, 2014, 343(6166): 80–84. [DOI]
- [50] Zhou YX, Zhu SY, Cai CZ, Yuan PF, Li CM, Huang YY, Wei WS. High-throughput screening of a CRISPR/Cas9 library for functional genomics in human cells. *Nature*, 2014, 509(7501): 487–491. [DOI]
- [51] Cheng AW, Wang HY, Yang H, Shi LY, Katz Y, Theunissen TW, Rangarajan S, Shivalila CS, Dadon DB, Jaenisch R. Multiplexed activation of endogenous genes by CRISPR-on, an RNA-guided transcriptional activator system. *Cell Res*, 2013, 23(10): 1163–1171. [DOI]
- [52] Gilbert LA, Larson MH, Morsut L, Liu ZR, Brar GA, Torres SE, Stern-Ginossar N, Brandman O, Whitehead EH, Doudna JA, Lim WA, Weissman JS, Qi LS. CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes. *Cell*, 2013, 154(2): 442–451. [DOI]
- [53] Qi LS, Larson MH, Gilbert LA, Doudna JA, Weissman JS, Arkin AP, Lim WA. Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. *Cell*, 2013, 152(5): 1173–1183. [DOI]
- [54] Chen BH, Gilbert LA, Cimini BA, Schnitzbauer J, Zhang W, Li GW, Park J, Blackburn EH, Weissman JS, Qi LS,

- Huang B. Dynamic imaging of genomic loci in living human cells by an optimized CRISPR/Cas system. *Cell*, 2013, 155(7): 1479–1491. [DOI]
- [55] Duan JZ, Lu GQ, Xie Z, Lou ML, Luo J, Guo L, Zhang Y. Genome-wide identification of CRISPR/Cas9 off-targets in human genome. *Cell Res*, 2014, 24(8): 1009–1012. [DOI]
- [56] 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]
- [57] Guilinger JP, Thompson DB, Liu DR. Fusion of catalytically inactive Cas9 to FokI nuclease improves the specificity of genome modification. *Nat Biotechnol*, 2014, 32(6): 577–582. [DOI]
- [58] 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*, 28(8): 839–847. [DOI]
- [59] Nishimasu H, Ran FA, Hsu PD, Konermann S, Shehata SI, Dohmae N, Ishitani R, Zhang F, Nureki O. Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA. *Cell*, 2014, 156(5): 935–949. [DOI]
- [60] Sebastiano V, Maeder ML, Angstman JF, Haddad B, Khayter C, Yeo DT, Goodwin MJ, Hawkins JS, Ramirez CL, Batista LFZ, Artandi SE, Wernig M, Joung JK. In situ genetic correction of the sickle cell anemia mutation in human induced pluripotent stem cells using engineered zinc finger nucleases. *Stem Cells*, 2011, 29(11): 1717–1726. [DOI]
- [61] Yusa K, Rashid ST, Strick-Marchand H, Varela I, Liu PQ, Paschon DE, Miranda E, Ordóñez A, Hannan NRF, Rouhani FJ, Darche S, Alexander G, Marciniak SJ, Fusaki N, Hasegawa M, Holmes MC, Di Santo JP, Lomas DA, Bradley A, Vallier L. Targeted gene correction of α_1 -antitrypsin deficiency in induced pluripotent stem cells. *Nature*, 2011, 478(7369): 391–394. [DOI]
- [62] Zou JZ, Mali P, Huang XS, Dowey SN, Cheng LZ. Site-specific gene correction of a point mutation in human iPS cells derived from an adult patient with sickle cell disease. *Blood*, 2011, 118(17): 4599–4608. [DOI]
- [63] Liu YJ, Chen CY, He HX, Wang DS, E LL, Liu ZY, Liu HC. Lentiviral-mediated gene transfer into human adipose-derived stem cells: role of NELL1 versus BMP2 in osteogenesis and adipogenesis *in vitro*. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2012, 44(10): 856–865. [DOI]
- [64] Verma IM, Somia N. Gene therapy-promises, problems and prospects. *Nature*, 1997, 389(6648): 239–242. [DOI]
- [65] Voit RA, McMahon MA, Sawyer SL, Porteus MH. Generation of an HIV resistant T-cell line by targeted "stacking" of restriction factors. *Mol Ther*, 2013, 21(4): 786–795. [DOI]
- [66] Swiech L, Heidenreich M, Banerjee A, Habib N, Li YQ, Trombetta J, Sur M, Zhang F. *In vivo* interrogation of gene function in the mammalian brain using CRISPR-Cas9. *Nat Biotechnol*, 2015, 33(1): 102–106. [DOI]
- [67] Kormann MSD, Hasenpusch G, Aneja MK, Nica G, Flemmer AW, Herber-Jonat S, Huppmann M, Mays LE, Illenyi M, Schams A, Griesse M, Bittmann I, Handgretinger R, Hartl D, Rosenecker J, Rudolph C. Expression of therapeutic proteins after delivery of chemically modified mRNA in mice. *Nat Biotechnol*, 2011, 29(2): 154–157. [DOI]
- [68] Zuris JA, Thompson DB, Shu Y, Guilinger JP, Bessen JL, Hu JH, Maeder ML, Joung JK, Chen ZY, Liu DR. Cationic lipid-mediated delivery of proteins enables efficient protein-based genome editing *in vitro* and *in vivo*. *Nat Biotechnol*, 2015, 33(1): 73–80. [DOI]

(责任编辑: 谢建平)