

基因编辑技术及其在基因治疗中的应用

任云晓^{1,2,3}, 肖茹丹^{1,4}, 娄晓敏^{1,2,3,4}, 方向东^{1,2,3,4}

1. 中国科学院北京基因组研究所, 中国科学院基因组科学与信息重点实验室, 北京 100101
2. 中国科学院大学中丹学院, 北京 101408
3. 中国-丹麦科研教育中心, 北京 101408
4. 中国科学院大学生命科学学院, 北京 100049

摘要: 基因编辑技术是以特异性改变遗传物质靶向序列为目标的技术。近年来, 锌指核酸酶(zinc finger nuclease, ZFN)、类转录激活因子效应核酸酶(transcription activator-like effector nuclease, TALEN)、规律成簇的间隔短回文重复(regular clustering of short palindrome repeats, CRISPR)和单碱基编辑(base editing, BE)技术的相继出现, 不仅为基因功能研究提供了有力的工具, 还为生命医学提供了新的治疗方案。基因编辑技术已经大范围应用于动物细胞模型的构建、药物靶点的筛查和基因功能研究等, 在基因治疗领域也展现出广阔的应用前景。本文就基因编辑技术的研究进展及其在基因治疗中的应用进行了概述, 并对基因编辑技术的原理、发展史、优缺点以及在基因治疗中的应用前景和机遇挑战进行了讨论, 以期为基础基因编辑技术的临床转化提供参考。

关键词: 基因编辑技术; CRISPR/Cas9; 单碱基编辑; 基因治疗

Research advance and application in the gene therapy of gene editing technologies

Yunxiao Ren^{1,2,3}, Rudan Xiao^{1,4}, Xiaomin Lou^{1,2,3,4}, Xiangdong Fang^{1,2,3,4}

1. CAS Key Laboratory of Genome Sciences and Information, Beijing Institute of Genomics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China
2. Sino-Danish College, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 101408, China
3. Sino-Danish Center for Education and Research, Beijing 101408, China
4. Life Sciences College, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract: Gene editing technologies are used to specifically edit the target sequence. With the development of zinc finger nuclease (ZFN), transcription activator-like effector nuclease (TALEN), regular clustering of short palindrome repeats (CRISPR) and single base editing (BE) techniques, gene editing technologies not only provide powerful tools for gene functional studies, but also offer new therapeutic strategies in biomedical research. Gene editing has demonstrated broad application prospects in the gene therapy field, as well as in the construction of animal and cell models, drug target

收稿日期: 2018-08-16; 修回日期: 2018-10-27

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 31471115, 81670109, 81672698)资助 [Supported by the National Natural Science Foundation of China (Nos. 31471115, 81670109, 81672698)]

作者简介: 任云晓, 硕士研究生, 专业方向: 疾病组学与转化医学研究。E-mail: renyunxiao16@big.ac.cn

通讯作者: 方向东, 博士, 研究员, 研究方向: 干细胞与复杂疾病临床组学与转化医学。E-mail: fangxd@big.ac.cn

DOI: 10.16288/j.ycz.18-142

网络出版时间: 2018/12/6 10:42:06

URI: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20181206.1041.002.html>

screening and gene functional research. In this review, we summarize several typical gene editing technologies, their characteristics and applications in gene therapy and discusses their opportunities and challenges in gene therapy, thereby providing critical insights and references on the clinical application of gene editing technologies.

Keywords: gene editing technologies; CRISPR/Cas9; BE; gene therapy

基因编辑技术是以改变目的基因序列为目的, 实现定点突变、插入或敲除的技术。从 20 世纪末人们就开始对基因编辑技术进行探索, 但直到 2013 年 CRISPR/Cas9(clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/CRISPR-associated protein 9)技术成功用于哺乳动物细胞, 才极大地推动了基因编辑技术的发展热潮^[1]。

真核生物的基因组包含数十亿个碱基, 对其基因组的操作一直面临挑战。同源重组技术(homologous recombination, HR)是最早的基因编辑技术, 也是真核生物基因编辑的一个重大突破。其原理是将外源性目的基因导入受体细胞, 通过同源序列交换, 使外源性 DNA 片段取代原位点上的基因, 从而达到使特定基因失活或修复缺陷基因的目的。但是对高等真核生物来说, 外源 DNA 与目的 DNA 自然重组率非常低, 只有 $10^{-7} \sim 10^{-6}$ ^[2,3]; 若要得到稳定遗传的纯合体基因敲除模型, 至少需要两代遗传, 因此 HR 的大规模应用受到了一定的限制。

为应对这一挑战, 一系列基于核酸酶的基因编辑技术相继出现, 实现了在真核生物尤其是哺乳动物中精准有效的基因编辑。与传统的基因编辑技术相比, 基于核酸酶的基因编辑技术减少了外源基因随机插入, 提高了对基因组特定片段进行精确修饰的几率。目前基因编辑技术主要包括以下几种: 人工介导的锌指核酸酶技术(zinc finger nucleases, ZFNs)、类转录激活因子效应核酸酶技术(transcription activator-like effectors nucleases, TALENs)、规律成簇的间隔短回文重复相关蛋白技术(CRISPR/Cas9)和单碱基编辑(base editor, BE)技术等^[4]。

基因编辑技术掀起的研究热潮, 一方面是因为基因编辑技术本身的发展, 更为精准、高效、低成本的基因编辑技术不断地被开发出来; 另一方面基因编辑技术作为一项重要的工具, 在基因筛查、动物、细胞模型构建等基础研究中发挥着重要的作用, 也为许多疾病的基因治疗提供了新的思路^[2-4]。因此,

本文从基因编辑技术的发展历程及其在基因治疗中的探索和应用进行概述, 并对基因编辑技术面临的挑战和机遇进行讨论。

1 基因编辑技术研究进展

基于 DNA 核酸酶的基因编辑技术发展迅速, 从第一代 DNA 核酸酶编辑系统 ZFNs、第二代 TALENs 到第三代 CRISPR/Cas9 系统, 基因编辑效率不断提高、成本逐渐降低, 应用范围不断扩大。ZFNs、TALENs 和 CRISPR/Cas9 等 3 种基因编辑技术都是在基因组靶标位点引起 DNA 双链断裂(double-strand breaks, DSBs), 进而激活细胞内部修复机制的基础上建立的。细胞内 DNA 双链断裂的修复机制包括易引起随机插入、缺失的异源末端连接(non-homologous end joining, NHEJ)和需要同源模板存在才可以激活的同源重组修复(homology directed repair, HDR)^[5,6]。2016 年, BE 技术的开发实现了在不引起 DNA 双链断裂和无需同源模板的情况下的单个碱基转换, 有效地规避了基于双链 DNA 断裂后 NHEJ 和 HDR 修复的基因编辑技术的不足。

1.1 ZFNs

20 世纪 90 年代, *Fok I* 酶的发现促进了 ZFNs 的出现^[7,8]。1996 年, 美国约翰霍普金斯大学环境卫生科学系 Chandrasegaran 团队构建了基于 *Fok I* 酶和锌指蛋白融合的 ZFNs 技术^[9]。ZFNs 包含两个结构域: DNA 结合的锌指蛋白区域和限制性核酸内切酶 *Fok I* 的核酸酶切活性区域(图 1)。锌指蛋白区域决定了 ZFNs 的序列特异性。锌指基序一般由 30 个氨基酸组成, 其结合锌离子的保守区域通常为 4 个半胱氨酸或 2 个半胱氨酸和 2 个组氨酸, 其空间结构由 1 个 α 螺旋和 2 个反向的 β 平行结构组成。 α 螺旋的 1、3、6 位的氨基酸分别特异性地识别并结合 DNA 序列中的 3 个连续的碱基。由于不同的锌指基

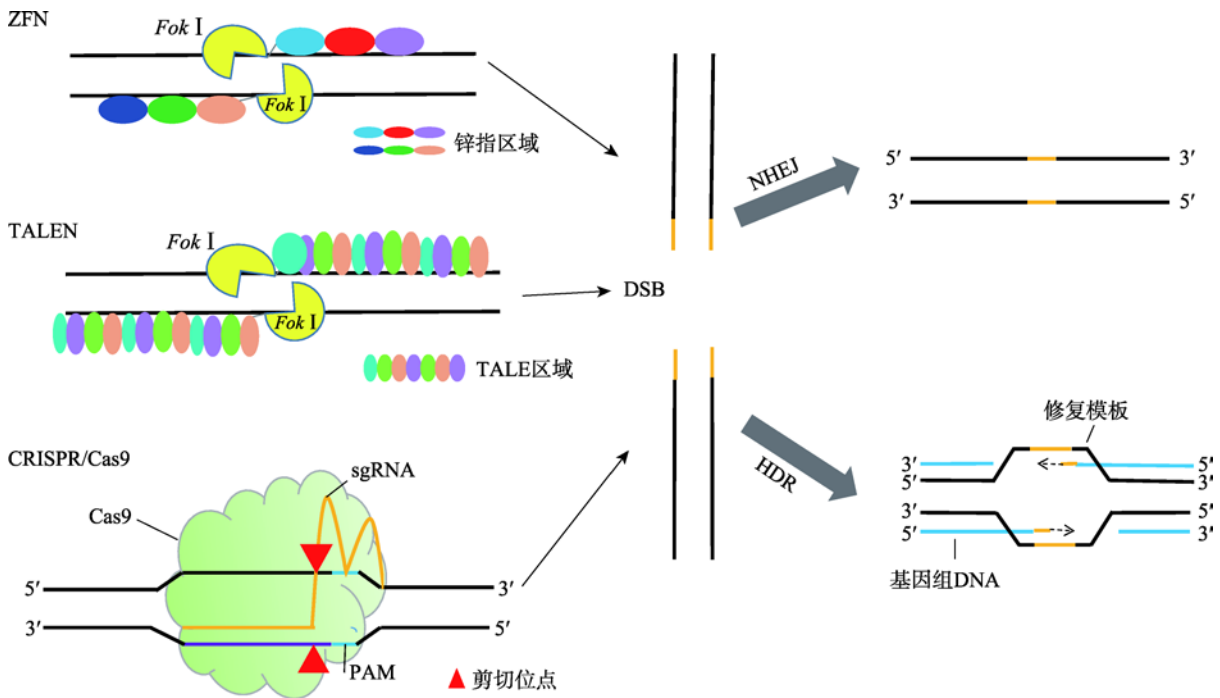


图 1 ZFN、TALEN 和 CRISPR/Cas9 的结构和 DNA 断裂修复类型

Fig. 1 The structure of ZFN, TALEN, CRISPR/Cas9 and the repair types of DNA DSBs

序中 α 螺旋的 1、3、6 位氨基酸不同, 因此由 3~6 个不同锌指基序组成的锌指蛋白区域与 *Fok* 核酸酶区域连接就构成了可以特异识别 DNA 序列并进行切割的人工核酸酶。*Fok* 必须二聚化才具有活性。由于 *Fok* 自身二聚化也能对 DNA 进行切割, 但是切割效率低且易产生非特异切割, 所以在设计 ZFNs 时可以对 *Fok* 进行突变, 使之不能形成同源二聚体。当两个结合不同靶序列的突变的 *Fok* 被 5~7 bp 的 spacers 隔开就可以形成具有核酸酶的活性的异源二聚体^[10,11]。这样设计的 ZFNs 可以增加其 DNA 序列识别的特异性。

基于 Chandrasegaran 的工作, 美国犹他大学医学院生物化学系的 Dana Carroll 团队使用 ZFNs 注入果蝇胚胎, 第一次实现了在动物中的基因编辑^[12,13]。随后, 科学家用 ZFNs 技术在动物、植物和人类细胞中都实现了靶基因的编辑^[10,14]。尽管 ZFNs 技术在多个物种中成功进行了基因编辑, 但是锌指蛋白的设计费时费力, 成本较高, 限制了该方法的大规模应用^[14,15]。

1.2 TALENs

2009 年, 美国爱荷华州立大学植物病理学与生

物信息学系的 Adam J. Bogdanove 团队和德国马丁卢瑟大学生物研究所的 Ulla Bonas 团队分别发现了来自植物致病黄单胞菌属的转录激活效应蛋白 (transcription-activator-like effector, TALE) 和 DNA 的相互作用^[16,17]。将 TALE 蛋白与 *Fok* 酶区域结合构建了新一代的核酸酶编辑技术——TALENs^[14,18]。TALENs 的组成和 ZFNs 的相似之处是在其羧基末端也含有 *Fok* 核酸酶结构域, 不同之处是 TALENs 的 DNA 结合域为 TALE 蛋白(图 1)^[19]。TALE 蛋白中每个识别模块由 34 个氨基酸组成, 除了第 12 和 13 位氨基酸外其余氨基酸序列都是保守的, 第 12 和 13 位氨基酸称为可变的双氨基酸残基(repeat variable di-residue, RVD)。RVD 决定了 TALE 识别并结合的 DNA 碱基。4 种不同的碱基都有与之对应的 TALE 识别模块。因此构建 TALEN 人工核酸酶时, 只需要按照目标序列的顺序将不同的 TALE 识别模块的序列连接起来, 再与 *Fok* 的编码序列融合即可。相对于 ZFNs 来说, TALENs 的设计变得容易, 对任意的 DNA 序列理论上都可以设计和构建一个特异的 TALEN 核酸酶。但是目标序列的每个碱基都需要一个 TALE 识别模块, 因此 TALENs 的构建过程工作

量较大。此外,TALENs 在人类细胞中的细胞毒性较低^[14,20]。2011 年,Miller 等^[18]第一次使用 TALENs 在人类细胞中对 *NTF3* 和 *CCR5* 基因进行编辑,证明了 TALEN 核酸酶对内源靶向基因的调节和修饰作用。

1.3 CRISPR/Cas9

2012 年 CRISPR/Cas9 的体外重构和 2013 年在人类细胞中证明了其基因编辑功能,标志着新一代基因编辑时代的开始^[21,22]。CRISPR/Cas9 系统来源于细菌和古细菌的天然获得性免疫系统,通过 CRISPR RNA (crRNA)和 trans-activating crRNA (tracrRNA)以及 Cas9 蛋白组成的复合体抵御外源性 DNA 的入侵。CRISPR/Cas9 系统发挥作用的基本过程可以分为 3 个阶段:第一个阶段为间隔序列获得期,质粒或噬菌体携带的 DNA 片段被宿主的核酸酶切割成短的 DNA 片段,符合条件的 DNA 片段整合进宿主 CRISPR 位点成为 crRNA 重复序列间的间隔序列;第二个阶段为 CRISPR/Cas9 表达期,Cas9 蛋白表达,CRISPR 序列由 pre-crRNA 加工为成熟的 crRNA,成熟的 crRNA 包含间隔序列,靶向结合于外来入侵的 DNA;第三阶段为 DNA 干扰期,Cas9 蛋白在向导 crRNA 的引导下识别靶向位点,并调节基因组的剪切^[22]。根据 Cas 蛋白的不同,CRISPR/Cas 系统可以分为 5 类:类型 I 和 II 的 CRISPR 位点包含 crRNA 与多个 Cas 蛋白形成的复合物;类型 III (Cas9)和类型 V(Cpf1)只需要 RNA 介导的核酸酶^[23]。许多 CRISPR 系统都依赖于临近 crRNA 靶向位点的 PAM (proto-spacer adjacent motif)序列,PAM 序列的缺失将会导致 I 型和 II 型 CRISPR 系统的自我剪切^[24]。

广泛用于基因编辑的 CRISPR/Cas9 是 II 型 CRISPR 系统,由 Cas9 蛋白和 sgRNA(single guide RNA)组成。sgRNA 是根据 crRNA 和 tracrRNA 形成的高级结构设计的,与 Cas9 核酸酶蛋白结合,指导其识别并剪辑靶向序列,靶向序列附近必需存在含有 NGG 或者 NAG 的 PAM 基序^[25~27](图 1)。

相比较 ZFNs 和 TALENs,CRISPR/Cas9 通过一段与目标 DNA 片段匹配的向导 RNA 引导核酸酶识别靶向位点,提高了 Cas9 核酸酶的特异性;同时,Cas9 在 sgRNA 的引导下以单体蛋白的形式发挥功

能,不像 ZFNs 和 TALENs 的 *FokI* 酶只有二聚化才具有切割靶向 DNA 的活性,因此 CRISPR/Cas9 也避免了精细复杂的蛋白质设计或组装的需要。但是,由于 CRISPR/Cas9 来自于原核生物天然获得性免疫系统抵御外来遗传物质的防御系统,Cas9 核酸酶可能继承了序列特异性低的特点,使其非特异性切割的几率增加,造成脱靶效应增多。不同的科研团队提出了不同的方法修饰或编辑 Cas9 和 sgRNA 以降低脱靶效应^[28,29]。如将 Cas9 蛋白与 *FokI* 核酸酶、锌指蛋白或者 TALE 蛋白结合提高 Cas9 的特异性^[30~32];用失活的 Cas9 蛋白和 *FokI* 区域融合形成新的核酸酶,使其只有在核酸酶二聚化时才具有活性;Fatih 等^[32]将锌指蛋白或者 TALE 蛋白与 Cas9 蛋白变体融合增强核酸酶的特异性。另一种降低脱靶效应的方法是使用切口酶代替核酸酶,产生单链断裂而不是双链断裂,单链断裂不能诱导 NHEJ 的修复,仍然可以激活 HR 的精确修复^[14]。单链断裂可以使脱靶效应降低,但修复效率也降低,因此有人提出了使用双切口酶的方法,既提高了基因编辑的特异性也提高了编辑的效率^[33]。

1.4 BE

ZFNs、TALENs 和 CRISPR/Cas9 技术都依赖于在靶位点诱导双链断裂进而激活 DNA 的 NHEJ 和 HDR。NHEJ 容易引起随机插入和缺失,造成移码突变,进而影响靶基因的功能;HDR 尽管精确性高于 NHEJ,但是其在细胞中的同源重组修复效率低,约为 0.1%~5%。BE 技术的出现有效地改善了以上问题^[34,35]。

2016 年 4 月,美国哈佛大学 David Liu 实验室第一次发表了不需要 DNA 双链断裂也不需要同源模板即可进行单碱基转换的基因编辑技术——BE 技术。该技术基于无核酸酶活性的 dCas9 (Inactive, or dead Cas9)或有单链 DNA 切口酶活性的 Cas9n (Cas9 nickase)、胞嘧啶脱氨酶、尿嘧啶糖基化酶抑制子(uracil DNA glycosylase inhibitor, UGI)以及 sgRNA 形成的复合体,在不引起双链 DNA 断裂的情况下,直接使靶向位点的胞嘧啶(Cytosine, C)脱氨基变成尿嘧啶(Uracil, U);由于尿嘧啶糖基化酶抑制子的存在,抑制了 U 的切除;随着 DNA 复制,U 被胸腺嘧啶(Thymine, T)取代;同时,互补链上原来

与 C 互补的鸟嘌呤(Guanine, G)将会替换为腺嘌呤(Adenine, A),最终实现了在一定的活性窗口内 C 到 T 和 G 到 A 的单碱基精准编辑。BE 技术的出现促进了点突变基因编辑的有效性和使用范围^[36]。

David Liu 团队对 4 种胞嘧啶脱氨酶——hAID (human activation induced deaminase)、hAPOBEC3G (human apolipoprotein B mRNA-editing enzyme-catalytic polypeptide-like-3G)、rAPOBEC1 (rat apolipoprotein B mRNA-editing enzyme 1)和七鳃鳗(*Lethenteron camtschaticum*)来源的 AID 类似物 PmCDA1 进行评估,发现 rAPOBEC1 具有最高的脱氨酶活性^[36]。他们通过将 rAPOBEC1 与 dCas9 的 N 末端以及 16 个残基的 XTEN 连接体融合,组成了第一代碱基编辑器 BE1 (rAPOBEC1-XTEN- dCas9),具有 5 nt 的活性窗口^[36]。第二代碱基编辑器 BE2 (APOBEC-XTEN-dCas9-UGI)融入了 UGI 抑制了 U 糖基化引起碱基切除修复,编辑效率在人类细胞比 BE1 高 3 倍^[36]。第三代碱基编辑器 BE3 (APOBEC-XTEN-dCas9(A840H)-UGI)恢复了 Cas9 HNH 区域 840 位置组氨酸的催化作用,可以剪切非编辑链上与编辑链上 U 互补的 G 碱基,对非编辑链的剪切使 BE3 的编辑效率比 BE2 高 2~6 倍^[36]。

随着单碱基编辑技术的出现,日本科学家基于 PmCDA1 和 dCas9 或 Cas9n 以及鸟嘌呤糖苷化酶抑制子 UGI 的融合,也开发了 PMCDATA-dCas9/Cas9n-UGI 的单碱基编辑器^[37]。中国科学院上海营养与健康研究院常兴研究组开发了基于 hAID 的 dCas9-AIDx 单碱基编辑系统,用于耐药突变的筛选^[38]。

2017 年,David Liu 实验室对 BE 技术做了多方面改进。首先针对常用的化脓性链球菌(*Streptococcus pyogenes*)的 Cas9(SpCas9)蛋白靶向范围较窄,只识别含有 NGG 或 NGA 的 PAM 序列的靶位点的限制,他们使用金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus Aureus*)的 Cas9 (SaCas9)、SaCas9 突变体(SaCas9-KKH)、SpCas9 突变体(SpCas9-VQR、SpCas9-EQR、SpCas9-VRER)替代 SpCas9,可以识别含有 NGG、NGA、NGAN、NGAG、NGGG、NNGRRT 和 NNNRRT 的 PAM 序列,从而显著提高了单碱基基因编辑的靶向范围。其次,他们通过突变胞嘧啶脱氨酶,降低酶的活性、改变底物的结合和构象,或者直接降低底物进入胞

嘧啶脱氨酶活性区域的能力,缩小了单碱基编辑系统的活性窗口,从 5 个核苷酸窗口缩小至 1~2 个核苷酸活性窗口^[39]。再次,David Liu 实验室通过对 BE3 引入突变来减少脱靶效应,产生了高保真的碱基编辑器(high-fidelity base editor, HF-BE3)^[40]。随后,他们又报道了基于 *E. coli* TadA (ecTadA)的新型单碱基编辑器——腺嘌呤碱基编辑器(adenine base editors, ABEs),实现了 A·T 碱基对向 G·C 碱基对的转换。经过不断的改进,第 7 代的腺嘌呤碱基编辑器将靶向的 A·T 碱基转化为 G·C 碱基对可以达到约 50%的效率(人类细胞),并且引入插入或缺失的频率低于 0.1%^[34]。

2 基因编辑技术在基因治疗中的应用

从 1996 年对 ZFNs 第一次进行体外验证到 2012 年 CRISPR/Cas9 技术的出现和之后的蓬勃发展(图 2),基因编辑技术发展迅速,编辑效率和精确性不断提高,应用领域也不断拓宽。不仅可用于表达调控和基因功能的研究、细胞动物模型的构建、癌基因和药物靶点的筛选,在基因治疗中更是具有巨大的发展前景,为单基因遗传病、癌症等疾病提供了新的治疗方法^[41,42]。

基因治疗通过导入正常基因或者编辑修复缺陷基因,实现治疗疾病的目的。目前,利用基因编辑技术在多种疾病,如单基因遗传病、眼科疾病、艾滋病及肿瘤等的基因治疗中得到了应用^[43]。

镰状细胞病(sickle cell disease, SCD)是由于 β -珠蛋白基因的第 7 个密码子的单基因点突变造成的。Hoban 等^[44]利用 ZFNs 特异性靶向于 β -珠蛋白基因,并诱导 CD34⁺造血干细胞和祖细胞中的 DNA 被切割。当 ZFNs 与整合酶缺陷型慢病毒载体或寡核苷酸供体一起传进细胞时,有效地实现了 β -珠蛋白基因座的基因矫正。Hoban 的研究为镰状型细胞性贫血的基因治疗提供了重要的方法路径^[44]。

基因编辑技术不仅应用于遗传性疾病的治疗,在非遗传性疾病中也有重大的突破。与年龄相关的黄斑衰退(age-related macular degeneration, AMD)是导致成人失明的主要原因,脉络膜新血管形成(choroidal neovascularization, CNV)是其主要病理学特征,血管生成因子如 VEGFA (vascular endothelial growth factor

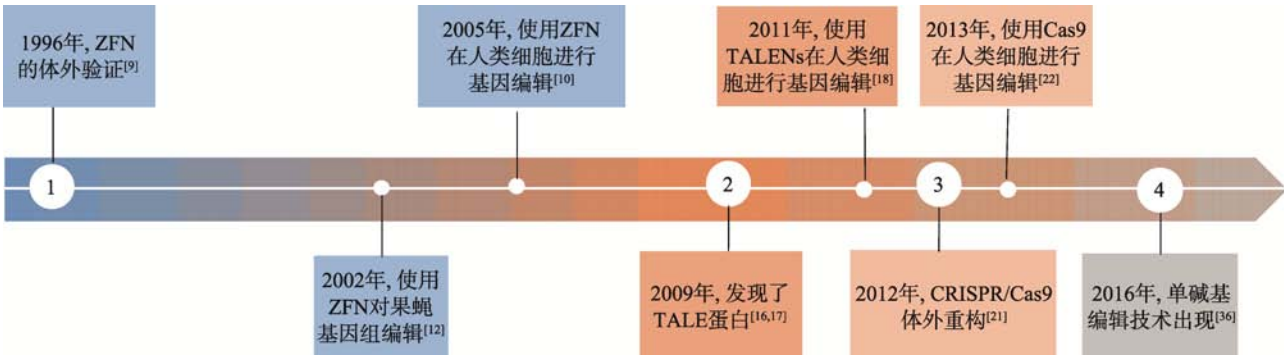


图 2 基因编辑技术的发展和应
Fig. 2 Development and application of genome editing technologies

表 1 ZFNs、TALENs、CRISPR/Cas9 和 BE 技术的比较
Table 1 Comparison of ZFN, TALEN, CRISPR/Cas9 and BE

基因编辑技术	优点	缺点
ZFNs	靶向传递基因的效率 高； 靶向结合效率高	核酸酶设计成功率 低； 可能有较高的脱靶 率； 不适合高通量靶 向目的基因
TALENs	特异性高，容易 设计； 靶向结合效率 高； 核酸酶设计成功 较高	靶向传递效率 低； 重复序列可能 造成非特异性剪 切； 通量低
CRISPR/Cas9	编辑效率更高； 操作简单，成本 低； 通量上无限制	脱靶效率较高； 同源重组效率 低
BE	脱靶效应低； 单碱基精准转 换	不能进行敲除和 敲入； 靶点临近的非靶 向胞嘧啶的编辑

A, VEGFA)基因的高表达是造成病变的主要原因^[45,46]。Kim 等^[47]将预先设计好的 Cas9 核糖核蛋白 (ribonucleoprotein, RNP)导入成年小鼠眼中,使视网膜色素上皮中 VEGFA 基因失活;并且在 AMD 的小鼠模型中发现 cas9 RNPs 有效地减少了脉络膜新血管生成的面积。该研究表明 CRISPR/Cas9 技术有可能用于非遗传性退行性眼部疾病的局部治疗。

基因编辑技术在艾滋病、肿瘤治疗等领域也取得了初步进展。第一次在人类中应用靶向核酸酶是利用 ZFNs 技术编辑 CCR5 基因抵抗 HIV。研究者从 HIV 病人中提取 T 细胞,用 ZFNs 技术干扰 T 细胞中 CCR5 基因,由于 CCR5 基因是大部分 HIV 菌株尤其是早期感染菌株的辅助受体,干扰 CCR5 基因的表达可以抗 HIV 感染,表明基因编辑技术可能成为艾滋病治疗的新方向^[48-51]。

基因编辑应用于肿瘤治疗,主要是与免疫治疗相结合,尤其是与 CAR (chimeric antigen receptor) T

细胞,该方法在白血病、淋巴瘤和部分实体瘤中有巨大的发展前景^[52,53]。CARs 包括肿瘤细胞特异抗原的胞外单链可变片段和细胞内嵌合信号域,可以激活 T 细胞和杀伤肿瘤细胞^[53]。Ren 等^[54]使用 CRISPR/Cas9 系统同时破坏多个基因位点,产生的 TCR (T cell receptor)和 HLA-I (HLA class I)缺陷的 CAR T 细胞可作为通用的 CAR T 细胞,用于免疫治疗;除了产生通用的 CAR T 细胞,基因编辑技术也可通过敲除编码 T 细胞抑制受体或信号分子的基因如 PD1 (programmed cell death protein 1)和 CTLA4 (cytotoxic T lymphocyte-associated protein 4),用于产生增强型 CAR T 细胞^[53,55,56]。

2016 年,四川大学华西医院卢铀团队开展了 CRISPR 基因编辑技术的临床实验,从转移性非小细胞肺癌患者中分离出 T 细胞,并使用 CRISPR/Cas9 技术敲除细胞中的 PD-1 基因,在体外扩增到一定量后再重新输回患者体内,达到杀死肿瘤细胞的目的^[57,58]。

但是简单的敲除 T 细胞的抑制因子是一把双刃剑, 真正投入临床使用还需要进一步研究敲除这些抑制因子是否会引起细胞的不可控制的增殖或者产生严重的自身免疫^[53]。

由于 BE 技术是在不造成双链 DNA 断裂的情况下进行的精确碱基转换, 这对于基因治疗而言无疑是一个非常有效的工具。 β -地中海贫血是由于珠蛋白基因(hemoglobin-beta, *HBB*)突变所致, 中国和东南亚地区的发病原因主要是 *HBB* 基因 A 到 G 的突变。2017 年, 中山大学黄军就团队利用单碱基编辑技术在不能发育成熟的人类三元核胚胎中战对 *HBB* 的点突变进行编辑, 即将碱基 G 改为 A 从而修正错误。该研究是第一个利用 BE 技术对遗传疾病突变位点进行精准修复的研究, 为治疗新生儿 β -型地中海贫血症, 甚至为其他遗传性疾病的治疗打开了新窗口^[59]。Chadwick 团队也通过 BE 技术实现 *PCSK9* 基因的敲除, 从而降低血浆胆固醇的水平^[60]。

3 基因编辑技术面临的挑战

尽管基因编辑技术在基因治疗领域展现了广阔的应用前景, 但是目前仍然面临着诸多挑战, 如脱靶效应、传递系统的有效性和安全性、免疫排斥反应、伦理争论等。

3.1 脱靶效应

脱靶效应会导致假表型, 造成错误的理解和解读, 是限制基因编辑技术应用的重要原因。脱靶效应面临两个问题: 一是如何从技术本身降低脱靶效应; 二是如何提高检测方法的灵敏性。降低脱靶效应的可行性策略有减少 NHEJ 修复引入的插入和缺失, 如使用单切口酶活性突变体和不需要双链断裂激活修复的 BE 技术等^[33,58]; 改进 sgRNA 的设计, 如在保证一定的 sgRNA 结合靶点效率的基础上, 截短 sgRNA 的长度^[59,61]; 提高核酸酶蛋白的特异性, 如 David Liu 研究组通过在 Cas9 蛋白特定位点插入羟基他莫昔芬应激性内含肽(hydroxytamoxifen (4-HT)-responsive intein)产生小分子激活 Cas9 核酸酶, 使 Cas9 靶向编辑的特异性提高了 25 倍^[62]。

目前脱靶效应的检测方法有基于全基因组范围

内检测 DSBs 的方法, 该方法可以无偏向性地评估 Cas9 剪切的特异性, 如通过 NHEJ 将双链寡聚脱氧核苷酸整入 DSBs, 进而扩增和测序的 GUIDE-Seq (genome-wide unbiased identification of DSBs enabled by sequencing)^[63], 以及用 Cas9 体外消化分离基因组 DNA, 然后进行全基因组测序的 Digenome-Seq (digested genome sequencing)^[29]。虽然两种方法都无偏向性, 且敏感性较好, 但是两者都需要参考基因组, GUIDE-Seq 整合双链寡聚脱氧核苷酸进入 DSBs 的效率不高, Digenome-Seq 检验 gRNA 费用昂贵, 且检测多个 gRNA 时测序深度也受限制^[64]。因此, 脱靶效应仍然是基因编辑技术未来发展必需解决的问题之一。

3.2 核酸酶的传递效率和安全性

核酸酶的传送系统包括病毒、质粒、RNA 和蛋白质的系统, 其中病毒载体系统具有较高的编辑效率和插入突变, 较低的脱靶效应和较高的免疫反应, 如 AAV (adeno-associated virus) 载体和慢病毒载体广泛用于靶向基因向细胞的传送, 但是其对传输物质大小有限制; 质粒型载体在编辑效率、插入突变、脱靶效应和免疫反应均具有中等表现; RNA 或蛋白质核酸复合物均不具有插入突变的功能, 但普遍认为以蛋白核酸复合物进行传输具有起效快且无长期表达的特点, 因而具有较低的脱靶效应^[64]。就 BE 系统来说, 需要 Cas9 与胞嘧啶脱氨酶、UGI、sgRNA 的融合, 序列组成较长。如果使用 AAV 载体, 其对包装物质 4.7 kb 长度的限制, 使 BE 系统无法被包装进去。可以考虑将 BE 系统拆分包装成两个病毒, 但是系统拆分后的编辑效率是否会受到影响尚不得知。因此, 提高核酸酶传送系统的有效性和安全性将会进一步促进基因编辑的应用, 有研究表明脂质体可能在基因编辑传送系统中展现巨大的发展潜力^[2]。

3.3 基因编辑引起的副作用

美国斯坦福大学儿科血液学家 Matthew Porteus 和 Kenneth Weinberg 的研究小组发现人体中普遍存在 Cas9 抗体, 如果使用 CRISPR/Cas9 进行治疗, 可能引发人体剧烈的免疫反应, 最终导致治疗失败, 但是目前有关基因编辑可能引起免疫反应的研究还

相对较少^[65]。

近期, *Nature Medicine* 发表了分别来自瑞典卡罗林斯卡研究所和美国剑桥诺华生物医学研究院的研究^[66,67]。他们分别独立发现 CRISPR/Cas9 基因编辑过程造成的 DNA 双链断裂可以激活 p53 通路。这意味着基因编辑成功的细胞很可能成为潜在的癌细胞, 利用 CRISPR/Cas9 进行临床治疗可能无意中增加患癌症的风险。

CRISPR/Cas9 技术除了面临脱靶问题, 可能还面临染色体结构异常的问题。Kosicki 等^[68]在 *Nature Biotechnology* 上报导了 Cas9 还可能在作用靶点附近导致大规模的 DNA 删除, 在部分情况下, 甚至引起复杂的 DNA 重排。研究人员通过长读长测序和大范围的 PCR 基因型鉴定发现在小鼠胚胎干细胞和人类造血祖系细胞内, 可能出现数千 DNA 碱基的删除, 导致临近基因或调控序列受到影响并改变细胞功能。因此引起的 DNA 重排问题也成为了 CRISPR/Cas9 技术面临的另一个安全隐患^[68]。

除了上述挑战之外, 基因编辑技术在基因治疗中的应用仍可能有很多意想不到的问题出现。但无论如何, 技术的发展总会遇到瓶颈, 瓶颈的攻克也将必然给技术的应用带来更广阔的空间。

3.4 基因编辑中的伦理问题

基因编辑技术为遗传性疾病、肿瘤等多种疾病带来了治疗的希望, 但是人类胚胎细胞的基因编辑引起了社会上广泛的讨论和激烈的争议。一方面, 对胚胎细胞的基因编辑有助于基础科学研究, 促进我们了解人类胚胎发育的分子机制, 有利于实现在早期胚胎发育时期治愈疾病的目标; 另一方面基因编辑技术可能产生的脱靶或者其他基因编辑失误, 从而导致慢性疾病或者严重的致残个体, 这些对人类的繁衍和生活方式等都将产生非常大的危害。然而, 目前很多国家的法律对基因编辑技术应用于基因治疗的监管措施依然存在大量空白。

4 结语与展望

基因编辑技术的快速发展极大地提高了我们对真核细胞基因组进行精准改变的能力。可编辑的核

酸酶, 尤其是编辑效率更高、操作简单、成本低的 CRISPR/Cas 系统, 彻底改变了我们对基因组功能的研究; 单碱基编辑技术的出现和不断改进, 实现了单个碱基的精准转换, 降低了脱靶效率。虽然目前基因编辑技术仍然面临着脱靶效率和潜在的免疫反应等副作用的问题, 相信在未来多学科的交叉融合和科学家的共同合作下, 新一代基因编辑技术将更加简便、高效、精确, 目前存在的问题也会逐步得到解决^[69]。随着人们对疾病的新的有效靶点的不断认识和新的基因编辑技术的不断发展, 基因编辑治疗方案的大规模临床应用将成为可能, 特别是对那些传统疗法难以治愈的疾病, 可以通过纠正致病基因或引入有益突变来达到治愈疾病的目的。基因编辑技术的临床转化和应用研究值得拭目以待, 这将成为下一代转化疗法和治疗范例的关键, 也将促进个体化医疗的快速发展。

参考文献(References):

- [1] Mali P, Yang L, Esvelt KM, Aach J, Guell M, DiCarlo JE, Norville JE, Church GM. RNA-guided human genome engineering via Cas9 prashant. *Science*, 2013, 339(6121): 823–826. [DOI]
- [2] Hsu PD, Lander ES, Zhang F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell*, 2014, 157(6): 1262–1278. [DOI]
- [3] Kim H, Kim JS. A guide to genome engineering with programmable nucleases. *Nat Rev Genet*, 2014, 15(5): 321–334. [DOI]
- [4] Gaj T, Gersbach CA, Barbas CF. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends Biotechnol*, 2013, 31(7): 397–405. [DOI]
- [5] Ahmad HI, Ahmad MJ, Asif AR, Adnan M, Iqbal MK, Mehmood K, Muhammad SA, Bhuiyan AA, Elokil A, Du X, Zhao C, Liu X, Xie S. A review of crispr-based genome editing: Survival, evolution and challenges. *Curr Issues Mol Biol*, 2018, 28: 47–68. [DOI]
- [6] Musunuru K. The hope and hype of CRISPR-Cas9 genome editing: A review. *JAMA Cardiol*, 2017, 2(8): 914–919. [DOI]
- [7] Li L, Wu LP, Chandrasegaran S. Functional domains in Fok I restriction endonuclease. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89(10): 4275–4279. [DOI]
- [8] Kim YG, Chandrasegaran S. Chimeric restriction endonuclease. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91(3): 883–887. [DOI]

- [9] Kim YG, Cha J, Chandrasegaran S. Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to *Fok* I cleavage domain. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(3): 1156–1160. [DOI]
- [10] Durai S, Mani M, Kandavelou K, Wu J, Porteus MH, Chandrasegaran S. Zinc finger nucleases: Custom-designed molecular scissors for genome engineering of plant and mammalian cells. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33(18): 5978–5990. [DOI]
- [11] Xiao A, Hu YY, Wang WY, Yang ZP, Wang ZX, Huang P, Tong XJ, Zhang B, Lin S. Progress in zinc finger nuclease engineering for targeted genome modification. *Hereditas (Beijing)*, 2011, 33(7): 665–683.
肖安, 胡莹莹, 王唯晔, 杨志芃, 王展翔, 黄鹏, 佟向军, 张博, 林硕. 人工锌指核酸酶介导的基因组定点修饰技术. *遗传*, 2011, 33(7): 665–683. [DOI]
- [12] Bibikova M, Golic M, Golic KG, Carroll D. Targeted chromosomal cleavage and mutagenesis in *Drosophila* using zinc-finger nucleases. *Genetics*, 2002, 161(3): 1169–1175. [DOI]
- [13] Bibikova M, Beumer K, Trautman JK, Carroll D. Enhancing gene targeting with designed zinc finger nucleases. *Science*, 2003, 300(5620): 764. [DOI]
- [14] Kim J-S. Genome editing comes of age. *Nat Protoc*, 2016, 11(9): 1573–1578. [DOI]
- [15] Hatada I, Horii T. Genome editing: A breakthrough in life science and medicine. *Endocr J*, 2016, 63(2): 105–110. [DOI]
- [16] Moscou MJ, Bogdanove AJ. A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors. *Science*, 2009, 326(5959): 1501. [DOI]
- [17] 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]
- [18] Miller JC, Tan S, Qiao G, Barlow KA, Wang J, 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 Lei, Gregory PD, Rebar EJ. A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. *Nat Biotechnol*, 2011, 29(9): 143–148. [DOI]
- [19] Eid A, Mahfouz MM. Genome editing: The road of CRISPR/Cas9 from bench to clinic. *Exp Mol Med*, 2016, 48: e265. [DOI]
- [20] Ramani V, Shendure J, Duan Z. Understanding spatial genome organization: methods and insights. *Genom Prot Bioinf*, 2016, 14(20): 7–20. [DOI]
- [21] Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E, Charpentier E. A programmable Dual-RNA-Guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 2012, 337(6096): 816–821. [DOI]
- [22] 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]
- [23] Shah SA, Garrett RA. CRISPR/Cas and Cmr modules, mobility and evolution of adaptive immune systems. *Res Microbiol*, 2011, 162(1): 27–38. [DOI]
- [24] Makarova KS, Zhang F, Koonin E V. SnapShot: Class 2 CRISPR-Cas systems. *Cell*, 2017, 168(1–2): 328–328.e1. [DOI]
- [25] Chira S, Gulei D, Hajitou A, Zimta AA, Cordelier P, Berindan-Neagoe I. CRISPR/Cas9: Transcending the reality of genome editing. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2017, 7: 211–222. [DOI]
- [26] Wilson JM. The Past, present, and future of gene therapy from Nobel Laureate David Baltimore. *Hum Gene Ther Clin Dev*, 2017, 28(2): 65–67. [DOI]
- [27] Flagfeldt DB, Siewers V, Huang L, Nielsen J. Characterization of chromosomal integration sites for heterologous gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 2009, 26(10): 545–551. [DOI]
- [28] Cho SW, Kim S, Kim Y, Kweon J, Kim HS, Bae S, Kim JS. Analysis of off-target effects of CRISPR/Cas-derived RNA-guided endonucleases and nickases. *Cold Spring Harb Lab Press Method*, 2014, 24(1): 132–141. [DOI]
- [29] Kim D, Bae S, Park J, Kim E, Kim S, Yu HR, Hwang J, Kim JI, Kim JS. Digenome-seq: genome-wide profiling of CRISPR-Cas9 off-target effects in human cells. *Nat Methods*, 2015, 12(3): 237–243. [DOI]
- [30] Tsai SQ, Wyvekens N, Khayter C, Foden JA, Thapar V, Reyon D, Goodwin MJ, Aryee MJ, Joung JK. Dimeric CRISPR RNA-guided *Fok* nucleases for highly specific genome editing. *Nat Biotechnol*, 2014, 32(6): 569–576. [DOI]
- [31] Guilinger JP, Thompson DB, Liu DR. Fusion of catalytically inactive Cas9 to *Fok* nuclease improves the specificity of genome modification. *Nat Biotechnol*, 2014, 32(6): 577–582. [DOI]
- [32] Bolukbasi M F, Gupta A, Oikemus S, Derr AG, Garber M, Brodsky M H, Zhu LJ, Wolfe SA. DNA-binding domain fusions enhance the targeting range and precision of Cas9. *Nat Methods*, 2017, 12: 39–46. [DOI]
- [33] Mali P, Aach J, Stranges PB, Esvelt KM, Moosburner M, Kosuri S, Yang LH, Church GM. CAS9 transcriptional activators for target specificity screening and paired nickases for cooperative genome engineering. *Nat Biotechnol*, 2013,

- 31(9): 833–838. [DOI]
- [34] Gaudelli NM, Komor AC, Rees HA, Packer MS, Badran AH, Bryson DI, Liu DR. Publisher Correction: Programmable base editing of A • T to G • C in genomic DNA without DNA cleavage. *Nature*, 2018, 559(7714): E8. [DOI]
- [35] Wei Y, Zhang XH, Li DL. The “new favorite” of gene editing technology-single base editors. *Hereditas(Beijing)*, 2017, 39(12): 1115–1121.
魏瑜, 张晓辉, 李大力. 基因编辑之“新宠”—单碱基基因组编辑系统. *遗传*, 2017, 39(12): 1115–1121. [DOI]
- [36] Komor AC, Kim YB, Packer MS, Zuris JA, Liu DR. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature*, 2016, 533(7603): 420–424. [DOI]
- [37] Nishida K, Arazoe T, Yachie N, Banno S, Kakimoto M, Tabata M, Mochizuki M, Miyabe A, Araki M, Hara KY, Shimatani Z, Kondo A. Targeted nucleotide editing using hybrid prokaryotic and vertebrate adaptive immune systems. *Science*, 2016, 353(6304): pii: aaf8729. doi: 10.1126/science.aaf8729. [DOI]
- [38] Ma Y, Zhang J, Yin W, Zhang Z, Song Y, Chang X. Targeted AID-mediated mutagenesis (TAM) enables efficient genomic diversification in mammalian cells. *Nat Methods*, 2016, 13(2): 1029–1035. [DOI]
- [39] Kim YB, Komor AC, Levy JM, Packer MS, Zhao KT, Liu DR. Increasing the genome-targeting scope and precision of base editing with engineered Cas9-cytidine deaminase fusions. *Nat Biotechnol*, 2017, 35(4): 371–376. [DOI]
- [40] Rees HA, Komor AC, Yeh WH, Caetano-Lopes J, Warman M, Edge ASB, Liu DR. Improving the DNA specificity and applicability of base editing through protein engineering and protein delivery. *Nat Commun*, 2017, 8: 15790. [DOI]
- [41] Mourad NI, Gianello P. Gene editing, gene therapy, and cell xenotransplantation: cell transplantation across species. *Curr Transplant Reports*, 2017, 4(3): 193–200. [DOI]
- [42] Shalem O, Sanjana N E, Zhang F. High-throughput functional genomics using CRISPR–Cas9. *Nat Rev Genet*, 2015, 16(5): 299–311. [DOI]
- [43] Ackermann M, Kuhn A, Kunkiel J, Merkert S, Martin U, Moritz T, Lachmann N. Ex vivo generation of genetically modified macrophages from human induced pluripotent stem cells. *Transfus Med Hemother*, 2017, 44(3): 135–142. [DOI]
- [44] Hoban MD, Cost GJ, Mendel MC, Romero Z, Kaufman ML, Joglekar AV, Ho M, Lumaquin D, Gray D, Lill GR, Cooper AR, Urbinati F, Senadheera S, Zhu A, Liu PQ, Paschon DE, Zhang L, Rebar EJ, Andrew Wilber, Xiaoyan Wang, Philip D. Gregory, Michael C. Holmes, Andreas Reik, Roger P. Hollis and Donald B. Kohn. Correction of the sickle cell disease mutation in human hematopoietic stem/progenitor cells. *Blood*, 2015, 125(17): 2597–2604. [DOI]
- [45] Huang X, Zhou G, Wu W, Duan Y, Ma G, Song J, Xiao R, Vandenberghe L, Zhang F, D’Amore PA, Lei H. Genome editing abrogates angiogenesis in vivo. *Nat Commun*, 2017, 8(1): 112. [DOI]
- [46] Jain A, Zode G, Kasetti RB, Ran FA, Yan W, Sharma TP, Bugge K, Searby CC, Fingert JH, Zhang F, Clark AF, Sheffield VC. CRISPR-Cas9–based treatment of myocilin-associated glaucoma. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, 114(42): 11199–11204. [DOI]
- [47] Kim K, Park SW, Kim JH, Lee SH, Kim D, Koo T, Kim K, Kim JH, Kim JS. Genome surgery using Cas9 ribonucleoproteins for the treatment of age-related macular degeneration. *Genome Res*, 2017, 27(3): 419–426. [DOI]
- [48] Wang CX, Cannon PM. The clinical applications of genome editing in HIV. *Blood*, 2016, 127(21): 2546–2552. [DOI]
- [49] Wang Q, Chen S, Xiao Q, Liu Z, Liu S, Hou P, Zhou L, Hou W, Ho W, Li C, Wu L, Guo D. Genome modification of CXCR4 by *Staphylococcus aureus* Cas9 renders cells resistance to HIV-1 infection. *Retrovirology*, 2017, 14(1): 5. [DOI]
- [50] Wang CX, Cannon PM. Clinical applications of genome editing to HIV cure. *AIDS Patient Care STDS*, 2016, 30(12): 539–544. [DOI]
- [51] Liu Z, Chen S, Jin X, Wang Q, Yang K, Li C, Xiao X, Hou P, Liu S, Wu S, Hou W, Xiong Y, Kong C, Zhao X, Wu L, Li C, Sun G, Guo D. Genome editing of the HIV co-receptors CCR5 and CXCR4 by CRISPR-Cas9 protects CD4⁺T cells from HIV-1 infection. *Cell Biosci*, 2017, 7: 47. [DOI]
- [52] Maus MV, Grupp SA, Porter DL, June CH. Antibody-modified T cells: CARs take the front seat for hematologic malignancies. *Blood*, 2014, 123: 2625–2635. [DOI]
- [53] Ren J, Zhao Y. Advancing chimeric antigen receptor T cell therapy with CRISPR/Cas9. *Protein Cell*, 2017, 8(9): 634–643. [DOI]
- [54] Ren J, Liu X, Fang C, Jiang S, June CH, Zhao Y. Multiplex genome editing to generate universal CAR T cells resistant to PD1 inhibition. *Clin Cancer Res*, 2018, 23(9): 2255–2266. [DOI]
- [55] Lloy A, Vickery ON, Laugel B. Beyond the antigen

- receptor: editing the genome of T-cells for cancer adoptive cellular therapies. *Front Immunol*, 2013, 4: 221. [DOI]
- [56] Hoos A. Development of immuno-oncology drugs-from CTLA4 to PD1 to the next generations. *Nat Rev Drug Discov*, 2016, 15(4): 235–247. [DOI]
- [57] Cyranoski D. Chinese scientists to pioneer first human CRISPR trial. *Nature*, 2016, 535(7613): 476–477. [DOI]
- [58] Cyranoski D. CRISPR gene-editing tested in a person for the first time. *Nature*, 2016, 539: 479. [DOI]
- [59] Liang P, Ding C, Sun H, Xie X, Xu Y, Zhang X, Sun Y, Xiong Y, Ma W, Liu YX, Wang Y, Fang J, Dan L, Zhou S, Zhou C, Huang J. Correction of β -thalassemia mutant by base editor in human embryos. *Protein Cell*, 2017, 8(11): 811–822. [DOI]
- [60] Chadwick AC, Wang X, Musunuru K. In vivo base editing of PCSK9(proprotein convertase Subtilisin/Kexin type 9) as a therapeutic alternative to genome editing. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2017, 37(9): 1741–1747. [DOI]
- [61] Yin S, He GF, Lai FN, Xie FY, JY. The off-target effect of CRISPR/Cas9. *Biotechnol Bull*, 2016, 32(3): 31–37. 尹琄, 贺桂芳, 赖方祯, 谢凤云, 马俊宇. CRISPR/Cas9 系统的脱靶效应. 生物技术通报, 2016, 32(3): 31–37. [DOI]
- [62] Davis KM, Pattanayak V, Thompson DB, Zuris JA, Liu DR. Small molecule-triggered Cas9 protein with improved genome-editing specificity. *Nat Chem Biol*, 2015, 11(5): 316–318. [DOI]
- [63] Tsai SQ, Zheng Z, Nguyen NT, Liebers M, Ved V, Thapar V, Wyvekens N, Khayter C, Iafrate AJ, Le LP, Aryee MJ, Joung JK. GUIDE-seq enables genome-wide profiling of off-target cleavage by CRISPR-Cas nucleases. *Nat Biotechnol*, 2015, 33(2): 187–197. [DOI]
- [64] Zischewski J, Fischer R, Bortesi L. Detection of on-target and off-target mutations generated by CRISPR/Cas9 and other sequence-specific nucleases. *Biotechnol Adv*, 2016, 35(1): 95–104. [DOI]
- [65] Mout R, Ray M, Lee YW, Scaletti F, Rotello VM. In vivo delivery of CRISPR/Cas9 for therapeutic gene editing: progress and challenges. *Bioconjug Chem*, 2017, 28(4): 880–884. [DOI]
- [66] Ihry RJ, Worringner KA, Salick MR, Frias E, Ho D, Theriault K, Kommineni S, Chen J, Sondey M, Ye C, Randhawa R, Kulkarni T, Yang Z, McAllister G, Russ C, Reece-Hoyes J, Forrester W, Hoffman GR, Dolmetsch R, Kaykas A. P53 inhibits CRISPR – Cas9 engineering in human pluripotent stem cells. *Nat Med*, 2018, 24(7): 939–946. [DOI]
- [67] Haapaniemi E, Botla S, Persson J, Schmierer B, Taipale J. CRISPR–Cas9 genome editing induces a p53-mediated DNA damage response. *Nat Med*, 2018, 24(7): 927–930. [DOI]
- [68] Kosicki M, Bradley A. Repair of CRISPR–Cas9-induced double-stranded breaks leads to large deletions and complex rearrangements. *Nat Biotechnol*, 2018, 36(8): 765–771. [DOI]
- [69] Zhang GS, Yang Y, Zhang LM, Dai XH. Application of machine learning in the CRISPR/Cas9 system. *Hereditas (Beijing)*, 2018, 40(9): 704–723. 张桂珊, 杨勇, 张灵敏, 戴宪华. 机器学习方法在 CRISPR/Cas9 系统中的应用. 遗传, 2018, 40(9): 704–723. [DOI]

(责任编辑: 吴强)