

CRISPR/Cas9 介导的基因组编辑技术 及应用研究进展

孙玉章¹, 孙明军¹, 代永联², 尹仁福³, 丁 壮³

(1. 中国动物卫生与流行病学中心, 山东青岛 266032; 2. 青岛市畜牧兽医研究所, 山东青岛 266100; 3. 吉林大学动物医学学院, 吉林长春 130062)

摘 要: 成簇的规律间隔的短回文重复序列及其相关蛋白系统 (Clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR / CRISPR-associated nuclease system, CRISPR/Cas) 是广泛存在于细菌和古细菌的适应性免疫系统, 其中由 II 型 CRISPR/Cas 系统改造而来的第三代基因组编辑技术——CRISPR/Cas9 系统已广泛应用于生命科学研究的多个领域。本文主要从 CRISPR/Cas9 系统的发现、作用原理、应用进展及与其他新兴的基因组编辑技术的对比等四个方面进行阐述, 重点介绍其最新研究进展, 并展望了 CRISPR/Cas9 系统的应用前景。

关键词: CRISPR/Cas9; 基因组编辑; 应用进展

中图分类号: S851.3 文献标识码: A 文章编号: 1005-944X (2016) 00-0000-00

DOI: 10.3969/j.issn.1005-944X.2016.00.000

Research Advances in CRISPR/Cas9-mediated Genome Editing and Its Application

Sun Yuzhang¹, Sun Mingjun¹, Dai Yonglian², Yin Renfu³, Ding Zhuang³

(1. China Animal Health & Epidemiology Center, Qingdao, Shandong 266032;
2. Qingdao Institute of Husbandry & Veterinary Science, Qingdao, Shandong 266100;
3. College of Veterinary Medicine, Jilin University, Changchun, Jilin 130062)

Abstract: Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR), together with the associated sequences (Cas genes and Cas proteins) widely exist in adaptive immune system of bacteria and archaea. CRISPR/Cas9 system, the third generation genome editing technology, which was established on the basis of the type II CRISPR/Cas system, has been widely applied in many fields of life science research. In this review, its discovery, function mechanism, application progress, and comparison analysis on other emerging genome editing technologies were introduced. Furthermore, the application prospect of the CRISPR/Cas9 system was described.

Key words: CRISPR/Cas9 system; genome editing; application progress

基因组编辑技术 (Genome Editing) 是通过人为改变基因特定位点的核苷酸序列, 实现针对基因组中特定目的基因片段的插入、删除、替换或修饰的新兴分子生物学技术。该技术是通过在目的基因特定位点切割产生 DNA 的双链断裂 (DNA double strand breaks, DSBs), 进而诱发机体固有的同

源重组 (Homology directed recombination repair, HR) 和非同源末端连接 (Non-homologous end-joining, NHEJ) 两种自我修复机制, 从而实现对基因组的定点编辑^[1]。

传统的基因组编辑技术主要依赖机体自发的同源重组修复机制来实现对目的基因的定点敲除、替换或修饰, 效率极低 ($10^{-6} \sim 10^{-9}$), 应用受限。近二十年来兴起的人工核酸内切酶 (Engineered endonuclease, EEN) 极大地改变了这一现状。目前常用的 EEN 有四类: 归巢核酸内切酶 (Meganucleases/

基金项目: 国家公益性行业 (农业) 科研专项 (201303033); 国家自然科学基金资助项目 (31402195); 教育部高校博士点基金博导类项目 (20110061110005)

通讯作者: 丁 壮

LAGLIDADG homing endonucleases, LHE), 锌指核酸酶 (Zinc finger nucleases, ZFNs), 类转录激活因子效应物核酸酶 (Transcription activator like effector nucleases, TALENs) 和成簇的规律间隔的短回文重复序列及其相关蛋白系统 (Clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR / CRISPR-associated nuclease system, CRISPR/Cas)。其中 CRISPR/Cas 系统是 2013 年以来发展起来的第三代基因编辑技术, 融合了经典遗传学和反向遗传学 (Reverse Genetics) 的研究方法, 以其设计简单、效率高、重复性好和周期短等特点迅速成为一种应用前景广阔的基因组编辑工具。本文仅对这一技术的发展、作用机理及其应用进展等方面的内容进行简述。

1 CRISPR/Cas 系统的发现和分类

CRISPR/Cas 是一种广泛存在于古细菌和细菌基因组中的适应性免疫系统, 其序列特征最先由日本学者于 1987 年发现。但直到 2008 年, 该系统才被证明可以类似于真核细胞中 RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 的方式抵御外源微生物或质粒的入侵。

根据系统发育及作用的分子机制, CRISPR/Cas 系统可分为 3 个类型 (I 型、II 型与 III 型)^[2]: I 型系统在细菌和古细菌中都有发现, 其核心蛋白为具有 DNA 核酸酶和解旋酶功能的 Cas3 蛋白, 同时需要 Cas5、Cas7 等多种 Cas 蛋白辅助发挥作用; II 型系统目前发现仅存在于细菌中, 其核心蛋白为具有 RuvC 核酸酶和 HNH 核酸酶活性的 Cas9 蛋白; III 型系统多存在于古细菌中, 其核心蛋白为具有 RNA 酶活性的 Cas10 蛋白, 同时需要 Cas6 等多种蛋白。三种类型的 CRISPR 系统发挥作用都需要有 Cas1 和 Cas2 等核心 Cas 蛋白的存在, 这是因为 Cas1 和 Cas2 蛋白在获得新的间隔序列中具有重要作用。

相对于 I 型和 III 型系统, II 型系统组分简单, 仅需 Cas9 蛋白、CRISPR RNA (crRNA) 与反式激活 crRNA (trans-activating crRNA, tracrRNA) 相互作用就能起到靶向切割目的基因 DNA 的功能, 因此在 2012 年 Jinek 等^[3]率先证明了 CRISPR/

Cas9 系统对 DNA 的体外切割作用之后, 短短几年间, 基于 II 型系统的 CRISPR/Cas9 系统被迅速改进为应用广泛的基因组编辑工具。

2 CRISPR/Cas9 系统的作用机理

CRISPR/Cas9 系统的主体结构为前导序列 (Leader)、CRISPR 基因座和相邻的多个 Cas 基因组成 (图 1)。前导序列具有种属特异性, 是一段进化保守的非编码序列。前导序列紧邻 CRISPR 基因座的 5' 端且富含 AT 碱基, 参与 crRNA 的转录并决定新的间隔序列插入基因组中的方向。CRISPR 基因座位点由高度保守的重复序列 (Repeats) 与长度不等的间隔序列 (Spacers) 相间串联而成。

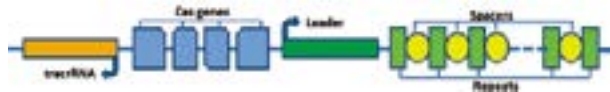


图 1 CRISPR/Cas9 系统的位点结构

细菌抵抗外源微生物感染的 CRISPR/Cas9 免疫机制主要分为适应、表达和干扰 3 个阶段^[4]。

(1) 适应: CRISPR/Cas9 系统中的 Cas1、Cas2 协同其他相关 Cas 蛋白将外源微生物基因组的某个特定片段整合到 CRISPR 位点的前导区之后, 第一个重复序列之前, 在此后的复制中作为一个新的间隔序列存在。(2) 表达: 前导序列指导 CRISPR 转录为 pre-crRNA 时, 其 5' 端的 tracrRNA 同时转录并通过碱基互补与 pre-crRNA 形成 RNA 二聚体, 在 Cas9 与 RNAase III 的联合作用下剪切为成熟的 crRNA/tracrRNA 二聚体。(3) 干扰: 成熟的 crRNA/tracrRNA 二聚体通过碱基互补作用识别外源微生物基因组中的靶位点, 在 Cas9 蛋白核酸酶的作用下切割该靶位点的 DNA 双链, 进而使外源微生物失活。

通过人工改造的 CRISPR/Cas9 系统切割目的基因片段的作用机理与细菌抵抗外源微生物感染的 CRISPR/Cas9 机制类似, 主要是在形成 crRNA/tracrRNA 二聚体的 crRNA 编码序列中人为替换为目的基因特定位点的序列, 从而构建成为能够指导 Cas9 蛋白特异切割目的基因 DNA 特定位点的单链向导

RNA (Single-guide RNA, sgRNA)。在 Cas9 蛋白切割目的基因的 DNA 双链后形成 DSBs, 并激活细胞的 HR 和 NHEJ 两种自我修复机制, 从而实现对目的基因组的插入、敲除或修饰等编辑方式 (图 2)。

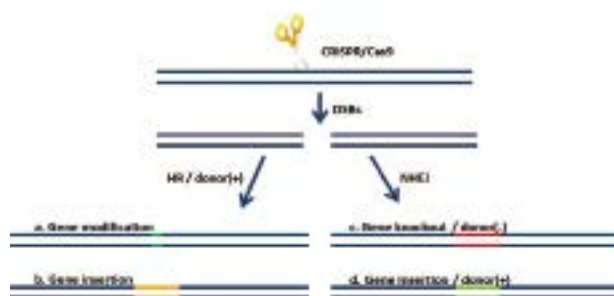


图 2 CRISPR/Cas9 系统的基因组定点编辑方式

3 CRISPR/Cas9 技术的应用进展

3.1 CRISPR/Cas9 应用于植物遗传育种研究

传统植物育种的转基因技术是将外源基因导入植物细胞后通过激活植物细胞的自发同源重组机制随机整合到植物基因组中, 进而通过筛选表型获得目标性状的突变株。由于植物中自发同源重组的低效率和整合位点的随机性, 长期以来要实现植物基因组的精确编辑比较困难。CRISPR/Cas9 系统的出现和应用使得对植物基因组进行高效精确的编辑成为可能。

2013 年 Mao 等^[5]率先利用 CRISPR/Cas9 系统实现了模式植物拟南芥基因组中特定目的基因片段的定点突变。2014 年 Zhang 等通过测试 CRISPR/Cas9 系统对 2 个水稻亚种的 11 个靶基因的编辑特点, 证实 CRISPR/Cas9 系统在水稻中具有很高的特异性和编辑效率 (66.7%)。同年, Wang 等^[6]利用 TALEN 和 CRISPR-Cas9 技术在六倍体面包小麦中成功实现了同时编辑 3 个同源等位基因, 获得了具有白粉病抗性的新品种小麦。CRISPR/Cas9 系统为实现作物稳定高效的定向育种 (产量、抗性 or 品质等) 提供了有力的遗传学工具。

3.2 CRISPR/Cas9 应用于动物基因组遗传修饰

2013 年 Cong 等^[7]和 Mali 等^[8]几乎同时利用 CRISPR/Cas9 系统分别在 293T 细胞、K562 细胞和 iPS 细胞中实现了不同程度的基因敲除, 从此开启了真核细胞中基因组高效定点编辑的崭新时代。同

年, Wang 等^[9]通过 CRISPR/Cas9 技术仅耗时 3~4 周便一次性获得了同时敲除 5 个基因的小鼠。

相对于传统的显微注射法和慢病毒介导的 RNAi 技术的遗传育种方法, CRISPR/Cas9 系统的高效率、多靶位、短周期和易筛选等特点迅速掀起了动物基因组遗传修饰的研究高峰, 并衍生出了 CRISPR 干扰 (CRISPR interference, CRISPRi) 等一系列新兴技术。

2015 年 Chen 等利用 CRISPR/Cas9 系统靶向沉默猕猴的肌营养不良蛋白基因, 显著降低了突变体的肌营养不良蛋白表达和肌肉退化现象。同年, Crispo 等利用 CRISPR/Cas9 技术结合显微注射法制备出敲除肌肉生长抑制素基因的转基因绵羊, 转基因效率高达 45.5%, 远高于常规转基因技术。

3.3 CRISPR/Cas9 应用于人类疾病模型构建

人类癌症的发生和发展过程中伴随着许多原癌基因和肿瘤抑制基因发生遗传学和表观遗传学的改变, 通过培育遗传基因缺陷的小鼠品系对于系统性模拟和研究癌症的发生和发展过程具有重要意义。相对于传统的基于 Cre-loxp 基因打靶的模型构建方法, CRISPR/Cas9 系统成本更低、效率更高, 目前已经成功建立起了肝癌、肺癌等多种癌症模型的小鼠品系。

2014 年 Hai 等^[10]首次利用 CRISPR/Cas9 技术高效地获得了双等位 vWF 基因突变的基因敲除猪, 从而建立了血管性血友病的小型猪模型。2016 年 Yuan 等^[11]利用 CRISPR/Cas9 技术靶向修饰兔体基因组的 CRYAA 基因及 GJA8 基因, 成功构建了具有典型白内障表型的模型兔。CRISPR-Cas9 系统应用于高效地构建疾病模型, 对于深入研究疾病基础病理学、揭示疾病发展机制和抗病药物筛选等具有重要的意义。

3.4 CRISPR/Cas9 应用于抗病毒策略研究

由于基因组编辑技术是在 DNA 水平上对基因组序列进行定点改造和修饰, 因此理论上所有 DNA 病毒和存在 DNA 状态的病毒都可以通过基因组编辑技术实现病毒特定基因片段的靶向编辑和表达沉默。在 CRISPR/Cas9 系统出现之前, ZFN

和 TALEN 技术都曾用于病毒感染疾病的治疗,但由于两者构建复杂、靶位受限,CRISPR/Cas9 系统的出现为病毒感染疾病的 EEN 疗法开辟了新途径。

2014 年 Hu 等^[12]通过构建靶向编辑人类免疫缺陷病毒 (Human immunodeficiency virus, HIV) LTR U3 启动子的 gRNA-Cas9 质粒,转染实验证实 Cas9 能够实现整合的 HIV 原病毒基因组的定点清除。Lin 等^[13]通过构建靶向乙型肝炎病毒 (Hepatitis B virus, HBV) 基因组的 gRNA-Cas9 质粒,体外实验证实 CRISPR/Cas9 系统可明显降低 HBV 核心蛋白和表面蛋白的表达量。Wang 等^[14]针对 Epstein-Barr 病毒 (Epstein-Barr virus, EBV) 基因组的 6 个不同的功能位点构建了 7 个 gRNA-Cas9 质粒,核转染实验发现导入 Cas9-gRNA 的细胞恢复了正常的凋亡途径,显著增低了 EBV 致癌效应。

同 ZFN 和 TALEN 技术一样,CRISPR/Cas9 系统的脱靶效应 (Off-target effects) 也会导致细胞毒性,因此如何提高 CRISPR/Cas9 系统的特异性而不降低打靶效率是实现精准疗法的技术关键。

3.5 CRISPR/Cas9 系统应用于功能基因组学研究

2014 年 Shalem 等利用慢病毒载体介导 64 751 条 sgRNA 构建了靶向沉默几乎覆盖人类基因组全部 18 080 个基因的全基因组 CRISPR-Cas9 敲除文库 (Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout Library, GeCKO),结合高通量测序技术快速筛选出了黑色素瘤抗药性的相关基因。Zhou 等^[15]利用 GeCKO 文库结合高通量测序技术,筛选并鉴定出了白喉毒素和炭疽毒素的细胞表面受体,为进一步研究病原菌与宿主相互作用和信号通路奠定了基础。由于高通量测序筛选数据的分析难度较大,Li 等开发出了新的统计学算法——基于模型的全基因组 CRISPR/Cas9 敲除分析法 (the Model-based Analysis of Genome-wide CRISPR/Cas9 Knockout method, MAGeCK),能够同时进行阳性和阴性选择筛选,具有较高的灵敏度和筛选效率。

目前已有商品化的用于高通量敲除特定基因的 CRISPR sgRNA 文库,基于基因敲除实现的功能缺失型筛选能够用于深入研究特定基因功能、筛选信

号转导通路相关基因以及研制新型靶向药物等方向。

4 CRISPR/Cas9 与其他基因编辑技术的对比

同为 RNA 介导的基因筛选方法,CRISPR/Cas9 和 RNAi 有着诸多不同:RNAi 属于基因下调 (Gene knockdown) 方法,并不能完全抑制基因的表达,而 CRISPR/Cas9 属于基因敲除 (Gene knockout) 方法,可使基因完全失活;RNAi 属于 RNA 水平的转录后基因表达调控,CRISPR 系统可以实现 DNA 水平和 RNA 水平的基因沉默;RNAi 抗病毒策略以降解细胞浆内增殖的 RNA 病毒为主,CRISPR/Cas9 系统目前多用于细胞核内增殖的 DNA 病毒或存在 DNA 阶段的 RNA 病毒;RNAi 一般特异性的降解与之序列相应的单个内源基因的 mRNA,CRISPRi 可同时用于研究多个基因的表达、激活或抑制;RNAi 具有 ATP 依赖性,CRISPR/Cas9 对靶序列的识别具有 PAM 限制;RNAi 作用有一定的时效性、一般不可遗传,CRISPR/Cas9 可以产生稳定、高效的遗传改变。作为重要的反向遗传学研究工具,RNAi 和 CRISPR/Cas9 都是通过功能缺失表型来进行基因筛选,而且二者的脱靶效应同样不可忽视。

同为新兴的基因组编辑技术,gDNA 引导的 NgAgo 系统 (NgAgo-gDNA) 与 RNA 导向的 CRISPR/Cas9 系统亦有许多不同:NgAgo-gDNA 系统以 5' 磷酸化的 ssDNA 为介导,无靶序列的 PAM 识别限制,特异性和编辑效率高,单碱基的错配就会导致基因编辑效率的明显降低 (CRISPR/Cas9 系统容许 5 个碱基的错配),因此基因编辑位点识别较为严谨,具有较低的脱靶效应。但目前此项技术引起的争议主要是重复性问题,能否改进为新一代的基因组编辑工具还有待于进一步验证,应用前景并不明朗。

同为 gDNA 引导的 DNA 编辑技术,SGN 系统 (Structure-guided endonuclease system) 与 NgAgo 系统相比不再受到靶序列的限制,依赖识别 3' flap 结构的内切酶功能实现外源报告基因和内源基因 DNA 特定位点的编辑,主要倾向于产生大片段的

基因删除。目前此项技术推广应用的主要障碍是相对较低的内源基因编辑效率,这可能与识别机制或位点特异性有关,因此仍然需要大量的后续研究工作不断优化和探索。

5 结语与展望

CRISPR/Cas9 系统是目前为止靶向基因组编辑最高效的反向遗传学工具,在植物遗传育种研究、动物基因组遗传修饰、人类疾病模型构建、抗病毒策略研究和功能基因组学研究等多个领域取得了重要进展。但作为一项崭新的基因组编辑技术,如何降低 CRISPR/Cas9 系统的脱靶效应成为亟须解决的问题。

目前已经有多个研究小组就提高 CRISPR/Cas9 系统进行了有益的实践,如双切口酶系统、dCas9-FokI 系统等,都能不同程度的降低 CRISPR/Cas9 系统的脱靶效应。随着对 CRISPR/Cas 系统结构与功能研究的不断深入,我们有理由相信 CRISPR/Cas9 介导的基因编辑技术具有极大的应用潜力和发展前景。

参考文献:

- [1] Rodolphe B, John van der O. CRISPR-Cas Systems: RNA-mediated adaptive immunity in bacteria and archaea[M]. Berlin: Springer Press, 2013: 1-32.
- [2] Makarova K S, Haft D H, Barrangou R, et al. Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems[J]. Nat Rev Microbiol, 2011, 9 (6): 467-477.
- [3] Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, et al. A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity[J]. Science, 2012, 337 (6096): 816-821.
- [4] Wiedenheft B, Sternberg S H, Doudna J A. RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea[J]. Nature, 2012, 482 (7385): 331-338.
- [5] Mao Y, Zhang H, Xu N, et al. Application of the CRISPR-Cas system for efficient genome engineering in plants[J]. Molecular Plant, 2013, 6: 2008-2011.
- [6] Wang Y P, Cheng X, Shan Q W, et al. Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew[J]. Nature Biotechnology, 2014, 32: 947-951.
- [7] Cong L, Ran F A, Cox D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems[J]. Science, 2013, 339 (6121): 819-823.
- [8] Mali P, Yang L H, Esvelt K M, et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9[J]. Science, 2013, 339 (6121): 823-826.
- [9] Wang H Y, Yang H, Shivalila C S, et al. One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering[J]. Cell, 2013, 153 (4): 910-918.
- [10] Hai T, Teng F, Guo R, et al. One-step generation of knockout pigs by zygote injection of CRISPR/Cas system[J]. Cell Res, 2014, 24 (3): 372-375.
- [11] Yuan L, Sui T T, Chen M, et al. CRISPR/Cas9-mediated GJA8 knockout in rabbits recapitulates human congenital cataracts[J]. Scientific Reports, 2016, 6: 22024.
- [12] Hu W H, Kaminski R, et al. RNA-directed gene editing specifically eradicates latent and prevents new HIV-1 infection[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2014, 111 (31): 11461-11466.
- [13] Lin S R, Yang H C, Kuo Y T, et al. The CRISPR/Cas9 system facilitates clearance of the intrahepatic HBV templates in vivo[J]. Mol Ther Nucleic Acids, 2014, 3 (8): e186.
- [14] Wang J B, Quake S R. RNA-guided endonuclease provides a therapeutic strategy to cure latent herpesviridae infection[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2014, 111 (36): 13157-13162.
- [15] Zhou Y X, Zhu S Y, Cai C Z, et al. High-throughput screening of a CRISPR/Cas9 library for functional genomics in human cells[J]. Nature, 2014, 509 (7501): 487-491.

(责任编辑:朱迪国)