

CRISPR/Cas9 介导的基因组定点编辑技术*

方锐 畅飞 孙照霖 李宁 孟庆勇**

(中国农业大学农业生物技术国家重点, 北京 100193)

摘要 Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/CRISPR-associated (Cas)9 系统成功被改造为第三代人工核酸内切酶, 与锌指核酸内切酶(zinc finger endonuclease, ZFN)和类转录激活因子效应物核酸酶(transcription activator-like effector nuclease, TALEN)一样可用于各种复杂基因组的编辑. 目前该技术成功应用于人类细胞、斑马鱼和小鼠以及细菌的基因组精确修饰, 修饰类型包括基因定点 InDel 突变、基因定点敲入、两位点同时突变和小片段的缺失. 由于其突变效率高、制作简单及成本低的特点, 被认为是一种具有广阔应用前景的基因组定点改造分子工具. 本文从 CRISPR/Cas 的研究历史、分类、作用机理以及基因定点修饰应用等方面进行简单介绍, 希望能够为在这一领域的科研工作者提供参考.

关键词 人工核酸内切酶, 基因编辑, CRISPR, 基因打靶, CRISPR/Cas

学科分类号 Q7

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2013.00215

基因定点修饰是研究基因功能的重要手段之一, 也可被用于人类遗传性疾病的治疗, 因此这类技术成为现代分子生物学的研究热点. 早期仅基于同源重组的基因打靶技术效率极低, 应用受到限制. 直到人工核酸内切酶(engineered endonuclease, EEN)出现, 将这一现状彻底改变.

锌指核酸内切酶(zinc finger endonuclease, ZFN)是第一代人工核酸内切酶. 锌指是一类能够结合 DNA 的蛋白质, 人类细胞的转录因子中大约有一半含有锌指结构, ZFN 是将锌指蛋白与核酸内切酶 *Fok I* 融合形成的核酸内切酶^[1], 利用它可以在各种复杂基因组的特定位置制造 DNA 的双链切口. 到目前为止, ZFN 已经成功应用于黑长尾猴、大鼠、小鼠、中国仓鼠、斑马鱼、果蝇、海胆、家蚕、拟南芥、烟草、玉米、猪、牛、人类 iPS 细胞^[2]. 更令人振奋的是已经有用于治疗 HIV 的 ZFN(破坏人 *CCR* 基因表达)药物进入二期临床试验^[3]. 但是, ZFN 制备复杂, 成本昂贵, 而且其技术专利被少数几家商业公司控制. 很快, 第二代人工核酸酶——类转录激活因子效应物核酸酶(transcription activator-like effector nuclease, TALEN)的出现在很大程度上替代了 ZFN. 2009 年, 科学家将一种水稻的致病菌(*Xanthomonas*)编码

的类转录激活因子效应物(transcription activator-like effector, TALE)与 DNA 的碱基对应关系解密^[4-6].

2010 年, 首次报道 TALEN 蛋白在酵母中应用成功^[7], 之后, 在植物、人类细胞、小鼠、斑马鱼、猪、牛中得到迅速的应用^[8]. TALEN 可以和 ZFN 一样对复杂的基因组进行精细的修饰, 同时其构建较为简单, 特异性更高, 因此受到了科研工作者的青睐. 2012 年, TALEN 被《科学》(*Science*)杂志评为十大科学突破之一^[9]. 无论是 ZFN 还是 TALEN, 这两种人工核酸酶的原理是一样的, 都是由 DNA 结合蛋白与核酸内切酶 *Fok I* 融合而成. 2013 年初, 一种全新的人工核酸内切酶 clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/CRISPR-associated(Cas)9 出现, 它主要是基于细菌的一种获得性免疫系统改造而成, 其特点是制作简单、成本低、作用高效^[10]. 本文主要从 CRISPR 研究历史、作用机理以及 CRISPR/Cas 在定点修饰中的应用等方面介绍 CRISPR/Cas9 的研究进展.

* 现代农业产业技术体系建设专项资助项目 (CARS-37).

** 通讯联系人.

Tel: 010-62731142, E-mail: qingyong.meng@gmail.com

收稿日期: 2013-05-19, 接受日期: 2013-07-29

1 CRISPR/Cas 的基因座结构

CRISPR/Cas 的基因座结构相对简单(图 1). 以产脓链球菌(*Streptococcus pyogenes* SF370)的典型 Type II CRISPR/Cas 为例, 其基因座结构可分别三

部分, 5' 端为 *tracrRNA* 基因, 中间为一系列 Cas 蛋白编码基因, 包括 *Cas9*、*Cas1*、*Cas2* 和 *Csn2*, 3' 端为 CRISPR 基因座, 由启动子区域和众多的间隔序列(spacers)和重复序列(direct repeats)顺序排列组成.

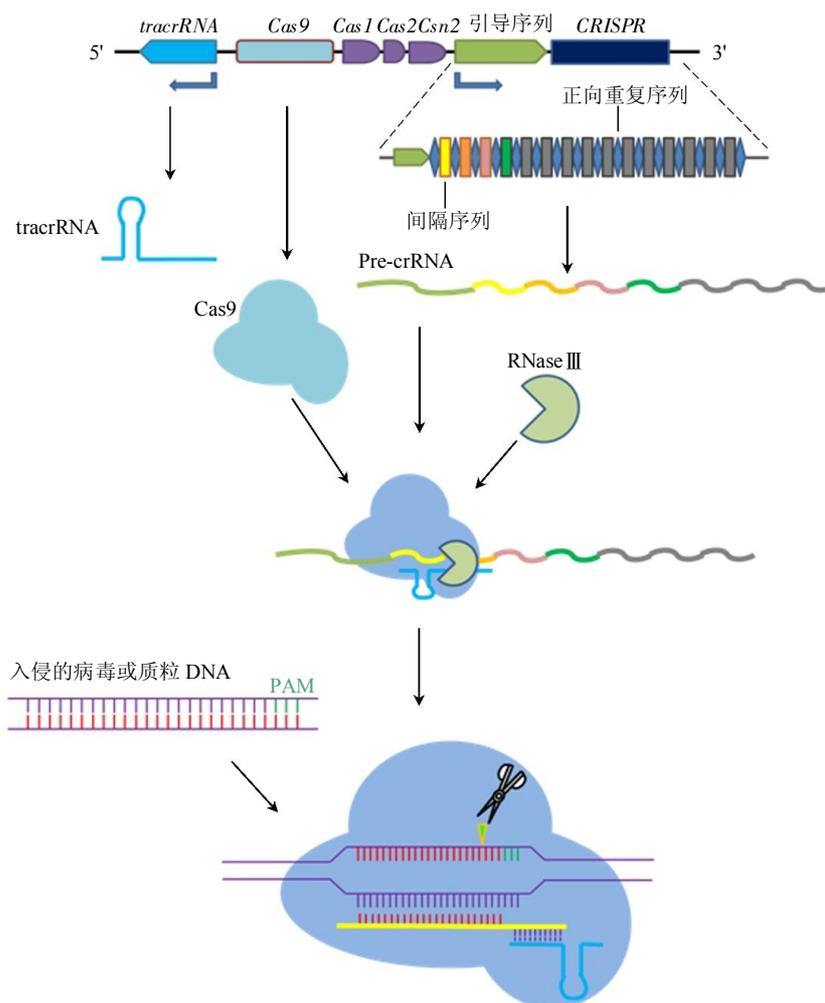


Fig. 1 Schematic of CRISPR/Cas9 mediated DNA double-strand break

图 1 产脓链球菌 CRISPR/Cas9 干扰噬菌体或外源质粒入侵示意图

TracrRNA、RNase III 和 Cas9 介导前体 pre-RNA 成熟; TracrRNA、crRNA 和 Cas9 形成的核糖核蛋白复合物介导外源遗传物质切割。

2 CRISPR 研究历史

1987 年, 日本课题组在 K12 大肠杆菌的碱性磷酸酶基因附近发现串联间隔重复序列^[1], 随后的研究发现这种间隔重复序列广泛存在于细菌和古细菌的基因组中, 2002 年, 科学家将其正式命名为 clustered regularly interspaced short palindromic repeats(CRISPR)^[12-14]. 因为缺乏病毒和质粒的序列

信息, 初期对 CRISPR 的研究进展缓慢, 其行使的确切功能一直未能阐明. 2005 年, 三个研究小组均发现 CRISPR 的间隔序列(spacer)与宿主菌的染色体外的遗传物质高度同源, 推测其功能可能与细菌抵抗外源遗传物质入侵的免疫系统有关^[15-17]. 2006 年, 美国研究小组通过生物信息分析预测, CRISPR 系统可能以类似于真核生物的 RNAi 方式

行使其免疫功能^[18]。但这些都只是假设。2007年, Barrangou 等^[19]首次发现并证明细菌可能利用 CRISPR 系统对抵抗噬菌体入侵。2008年, Marraffini 等^[20]又发现细菌 CRISPR 系统能阻止外源质粒的转移, 首次利用实验验证了 CRISPR 系统的功能, 由此科学家们揭开了研究 CRISPR 系统作用机制的序幕。之后研究人员很快发现 CRISPR 系统在食品发酵工业和医学中的潜在价值, 使其成为研究的热点。

3 CRISPR 的分布与分类

CRISPRdb 和 CRISPI 是两个专门收录 CRISPR 信息的数据库, CRISPRdb 中包括一些识别和分析 CRISPR 的软件工具, 数据库由巴黎大学维护(<http://crispr.upsud.fr>)^[21-22]。CRISPI 中含有 Cas 蛋白和 CRISPRs 的数据, 补充了 CRISPRdb 的数据(<http://crispi.geneouest.org/>)。通过对数据库中的 CRISPR 序列信息分析发现, 接近 90% 的古细菌和 40% 的细菌的基因组或是质粒中至少存在一个 CRISPR 基因座^[23]。CRISPR 中的高度可变间隔序列主要来源于噬菌体或是质粒, 长度范围在 21~72 bp, 不同的 CRISPR 基因座包含的间隔序列的数量差异很大, 从几个到几百个不等。目前发现间隔序列数量最多的 CRISPR 存在于一种黏液细菌(*Haliangium ochraceum* DSM 14365)中, 包含 587 个间隔序列^[24]。CRISPR 中的重复序列长度范围在 21~48 bp, 序列并非严格保守, 甚至在同一个细菌内的不同 CRISPR 基因座的重复序列也有不同, 但它的 5' 端和 3' 端部分为保守序列, 分别为 GTTT/g 和 GAAAC。重复序列里还包含部分回文结构, 转录出的 RNA 能形成稳定且保守的二级结构, 可能在与 Cas 蛋白结合形成核糖核蛋白复合物的过程中发挥重要作用^[14, 24-26]。通常在临近 CRISPR 基因座的区域还包含一组保守的蛋白编码基因, 被称为 Cas 基因, 它们编码的蛋白包含核酸酶、聚合酶、解旋酶以及与核糖核酸结合的结构域^[27]。这些 Cas 蛋白与 CRISPR 转录出的 RNA 结合形成核糖核蛋白复合物协同行使 CRISPR/Cas 系统的免疫功能。一般认为临近区域有 Cas 基因的 CRISPR 基因座是有活性的, 反之被认为是无活性的 CRISPR 基因座。但这种现象并不是绝对的, 如果同一个细菌基因组中有多个 CRISPR 基因座, 即使部分 CRISPR 基因座附近不包含有 Cas 基因, 它也能够被转录并与基因组其他位点的 Cas 基因编码蛋白结合, 所以

依然可以发挥功能^[26, 28-29]。

因为 Cas 基因多样性异常丰富, 简单的分类很难区分那些同源但功能并不相关的 Cas 蛋白^[30]。多个研究小组共同提议, 考虑多个因素, 包括保守性的 Cas 蛋白之间的进化关系及 Cas 基因操纵子的组成方式等, 将 CRISPR/Cas 的免疫机制分为相对独立的层次: 第一个层次主要是对外来信息的处理和加工, 形成免疫记忆, 也就是新的间隔序列的获得, 主要由通用的核心蛋白 Cas1 和 Cas2 参与完成; 第二个层次主要为初级 CRISPR RNA 成熟以及识别和降解入侵的外源遗传物质。按照该分类标准可以将 CRISPR/Cas 系统分为: Type I、Type II、Type III 三种不同类型。

Type I 系统是 CRISPR/Cas 系统中 Cas 蛋白最多和最复杂的系统, 包含 6 个蛋白, 其中有特征性的 Cas3 蛋白, 该蛋白具有解旋酶和核酸酶功能^[31]。多个 Cas 蛋白与成熟的 crRNA 共同结合形成 CRISPR 相关病毒防御复合物 CASCAD (CRISPR associated complex for antiviral defense), CASCAD 与入侵的外源 DNA 结合, 促使 CASCAD 内的 crRNA 与外源 DNA 的互补链配对形成 R 环结构, Cas3 的核酸酶识别 R 环结构后先将互补链切开, 随后在 Cas3 的解旋酶和核酸酶作用下再将非互补链切开^[32-34]。

Type II 系统的主要特征是包含一个标志性的 Cas9 蛋白(分子量很大的多功能蛋白)参与 crRNA 的成熟以及降解入侵的噬菌体 DNA 或是外源质粒^[35]。Cas9 蛋白包含两个功能结构域, 一个在 N 端, 有类似于 Ruc 核酸酶的活性, 一个在中部有类似 HNH 核酸酶的活性。嗜热性链球菌具有典型的 Type II CRISPR/Cas 系统, 它的 CRISPR/Cas 系统编码 tracrRNA (trans-activating crRNA), 其指导 RNase III 和 Cas9 完成前体 crRNA 的成熟。随后 tracrRNA 还能与成熟的 crRNA 的重复序列配对形成 RNA 二聚体, 进而和 Cas9 蛋白结合成核糖核蛋白复合体, 发挥识别和降解入侵的外源 DNA 功能^[36]。

Type III 系统包含特征性的 Cas10 蛋白, 其具有 RNA 酶活性和类似于 Type I 的 CASCAD 功能^[37]。Cas10 主要参与 crRNA 的成熟和剪切入侵外源 DNA。目前发现 Type III 有两种亚型: Type III A 和 Type III B。激烈热球菌的 CRISPR/Cas 系统属于 Type III A 型, 它干扰的靶标是 mRNA^[38]; 表皮葡萄球菌 CRISPR/Cas 系统属于 Type III B 型, 它的

靶标与 Type I 和 II CRISPR/Cas 系统相同，是 DNA^[20]。这也反映了自然界中的 CRISPR/Cas 系统的多态性。

三种类型的 CRISPR/Cas 系统的分布有所不同。Type I 系统在细菌和古细菌中都有发现；Type II 系统仅存在于细菌中；Type III 型大多存在于古细菌中，只有少数的细菌是 Type III 型^[39]。20 世纪 90 年代末期测序技术开始飞速发展，越来越多的细菌和古细菌的基因组信息被解密，科学家们发现一些特殊的菌株中同时存在多种类型的 CRISPR/Cas 系统，推测基因的水平转移可能是导致这一现象的主要原因，例如一些包含有 CRISPR/Cas 系统的质粒、转座子元件，在不同的菌株之间的转移^[24, 28-29, 40]。

4 CRISPR/Cas 作用机制

对于 CRISPR/Cas 的作用机理可以分为三个阶段来理解，第一是 CRISPR 的高度可变的间隔区的获得，第二是 CRISPR 基因座的表达(包括转录和转录后的成熟加工)，第三是 CRISPR/Cas 系统活性的发挥或者是对外源遗传物质的干扰。

CRISPR 的高度可变的间隔区(spacer)获得，其实就是指外来入侵的噬菌体或是质粒 DNA 的一小段 DNA 序列被整合到宿主菌的基因组，整合的位置位于 CRRSPR 的 5' 端的两个重复序列之间(repeats)。因此，CRISPR 基因座中的间隔序列从 5' 到 3' 的排列也记录了外源遗传物质入侵的时间顺序。噬菌体或是质粒上与间隔序列对应的序列被称为 protospacer，通常 protospacer 的 5' 或是 3' 端延伸几个碱基序列很保守，被称为 PAM (protospacer adjacent motifs)，它的长度一般为 2~5 碱基，一般与 protospacer 相隔 1~4 碱基^[41]。新闻隔序列的获得可能分为三步：首先识别入侵的核酸和扫描外源 DNA 潜在的 PAM，将临近 PAM 的序列作为候选 protospacer；然后在 CRISPR 基因座的 5' 端合成重复序列；最后新的间隔序列整合到两个重复序列之间(图 2)。目前只有第一个步骤被证实，Cas1 和 Cas2 蛋白是负责新闻隔序列获得的核心蛋白^[19, 42]。另外研究发现 Type II 型 CRISPR/Cas 系统中 Csn2 蛋白对于新的间隔序列的获得也是必需的^[19, 43]。

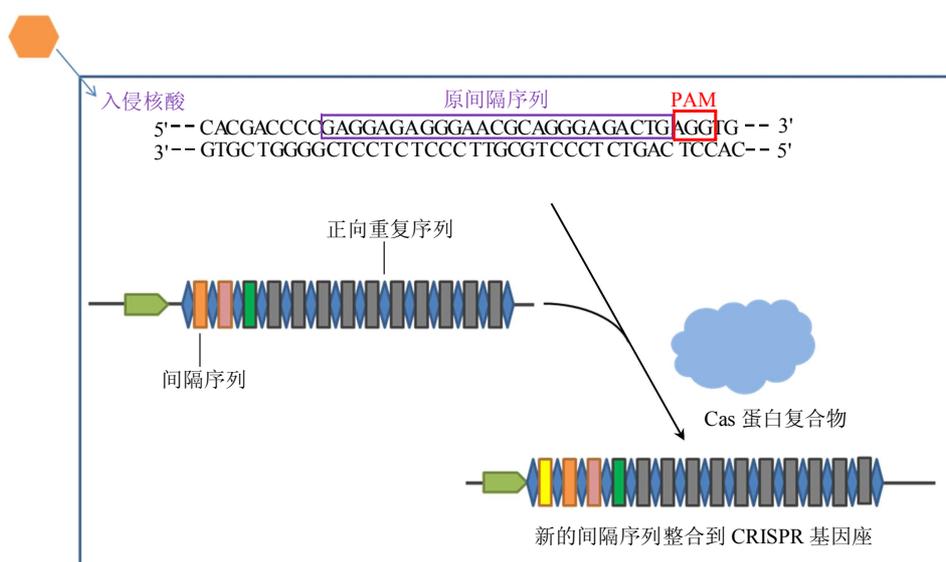


Fig. 2 New spacer of CRISPR acquisition

图 2 CRISPR 获得新闻隔序列示意图

多个研究表明 CRISPR 基因座首先被转录成前体 CRISPR RNA(pre-crRNA)，然后在 Cas 蛋白或是核酸内切酶的作用下被剪切成一些小的 RNA 单元，这些小 RNA 即为成熟 crRNA，由一个间隔序列和部分重复序列组成^[43-48]。Type II 型 CRISPR/Cas

系统 crRNA 的成熟除了需要 Cas9 和 RNase III 参与以外，还需要 tracrRNA 的指导^[36]。CRISPR 基因座在没有受到外界压力的情况下表达水平很低^[44, 49]。当外源的质粒或是噬菌体入侵宿主菌时 CRISPR 的表达很快被诱导上调^[45-46, 48, 50-51]。

干扰是 CRISPR/Cas 发挥抵御外源遗传物质入侵最关键的步骤, 成熟的 crRNA 与特异的 Cas 蛋白形成核糖核蛋白复合物, 再与外源 DNA 结合并扫描到外源 DNA, 寻找其上的靶序列, crRNA 的间隔序列与靶序列互补配对, 外源 DNA 在配对的特定位置被核糖核蛋白复合物切割. 早期研究认为 crRNA 的间隔序列(spacer)与外源 DNA 的靶位点完全互补配对对于切割是必需的^[19, 52], 但是后来的研究证明 spacer 与 protospacer 部分互补配对时切割也可以发生^[34-35, 53].

5 CRISPR 系统如何避免自身免疫的发生

在研究 CRISPR/Cas 系统的过程中有一个很重要的问题. 宿主菌利用 crRNA 与靶序列配对结合介导外源 DNA 切割, 而 crRNA 本身是由宿主菌的基因组为模板转录出的 pre-crRNA 经加工后形成的, 这就是说相同的靶序列也存在于宿主的基因组中, 那么 CRISPR/Cas 系统应该有一套机制将自身序列和外源的靶序列区分开. 最近表皮葡萄球菌里的一项研究发现了 CRISPR 系统区分靶点和自身基因组的方法. 在表皮葡萄球菌里面成熟的 crRNA 除了 spacer 以外在其 5' 端和 3' 端包含有部分 repeat 序列. 当外源 DNA 入侵宿主菌时, crRNA 扫描到外源 DNA 上的靶序列(proto-spacer)并与之配对结合, 但靶位点两端的序列不能发生配对, 对于宿主菌基因组中相同序列的“protospacer”来说, crRNA 除了能与“protospacer”配对外, 两端的 repeat 序列也能与“protospacer”两侧的基因组 DNA 完全配对, 实际上只有不完全的配对才允许核糖核蛋白复合物发挥切割活性, 通过这样的机制 CRISPR/Cas 系统避免自我免疫^[54]. 另外, 在研究稻白叶枯黄杆菌中的 CRRISP/Cas 系统时发现, 虽然在宿主菌的 CRISPR 中的 spacer 序列能够与噬菌体 Xop411 一段靶序列完全配对, 但宿主菌对噬菌体 Xop411 依旧不抵抗, 分析发现是噬菌体 protospacer 临近的 PAM (proto-spacer adjacent motifs)突变引起, 这说明外源 DNA 的 protospacer 序列临近的 PAM 对 CRISPR/Cas 系统识别外源 DNA 的必要性^[55]. 宿主菌的 CRISPR 基因座位的间隔序列(spacer)临近位置不存在 PAM, 这也是 CRISPR 系统能够区分自身 DNA 和外源 DNA 避免发生自身免疫的原因之一.

6 CRISPR/Cas 系统的应用

虽然 CRISPR/Cas 的研究还处于初始阶段, 但是其已经被应用在工业和学术领域. 较为成功的应用是在奶制品的发酵中利用 CRISPR/Cas 系统增强发酵菌株对噬菌体的防御能力. CRISPR 的特性也被用于菌株的分类, 以及防止一些携带致病或是抗性基因的质粒的扩散^[55].

CRISPR/Cas 系统的作用特性与限制性核酸内切酶相似, 它对序列的特异性切割主要依赖于 crRNA 与 Cas 蛋白形成的核糖核蛋白复合物识别靶序列上的 PAM 以及 protospacer. 根据 CRISPR/Cas 系统这一特性, 将其用于设计人工的核酸内切酶(engineered endonuclease, EEN), 用来对我们感兴趣的基因位点进行修饰. 三类 CRISPR/Cas 系统中 Type II 型系统的核糖核蛋白复合物相对简单, 除 crRNA 和 tracrRNA 外, 只有 Cas9 一个蛋白. 目前, 产脓链球菌(*Streptococcus pyogenes* SF370)的 Type II 型系统是被改造的最为成功的人工核酸内切酶, 已经在人类细胞、小鼠、斑马鱼中成功实现了基因组定点修饰^[56-58]. 在将它应用于 ENN 之前, Martin 等对于 Type II 型 CRISPR/Cas9 的改造做出了重大贡献, 为进一步的应用打下坚实的基础^[59-60]. 他们发现 tracrRNA 对靶点的识别和切割是必需的, tracrRNA 的 5' 端与成熟的 crRNA 3' 端有部分序列(约 13 bp)能够配对进而形成茎环结构, 对维持 crRNA 与靶点的配对可能十分重要. 根据 tracrRNA 与 crRNA 的结构特性, 他们将 tracrRNA 和 crRNA 表达为一条嵌合的向导 RNA (guide RNA, gRNA), 并在体外证明 gRNA 可以发挥 tracrRNA 和 crRNA 的功能(图 3). 此外, 他们还证明 Cas9 蛋白 N 端的类似于 RuvC 的结构负责非互补链的切割, 而中部类似于 HNH 的结构负责互补链的切割, 将 RuvC 或是 HNH 活性突变后 Cas9 只有单链切割活性, 类似于切口酶, 互补链切割的位点位于 PAM 的 5' 端的第三个碱基外侧, 非互补链切割的结果是在 PAM 上游的 3~8 碱基之间.

2013 年初, MIT 的 Zhang 研究组首次报道利用 CRISPR/Cas9 系统对人 293T 细胞的 *EMX1* 和 *PVALB* 基因以及小鼠 Nero2A 细胞的 *Th* 基因实现了定点突变^[58]. 该论文同时报道哺乳细胞内 crRNA 的成熟不需要细菌的 RNase III. 同一期的《科学》

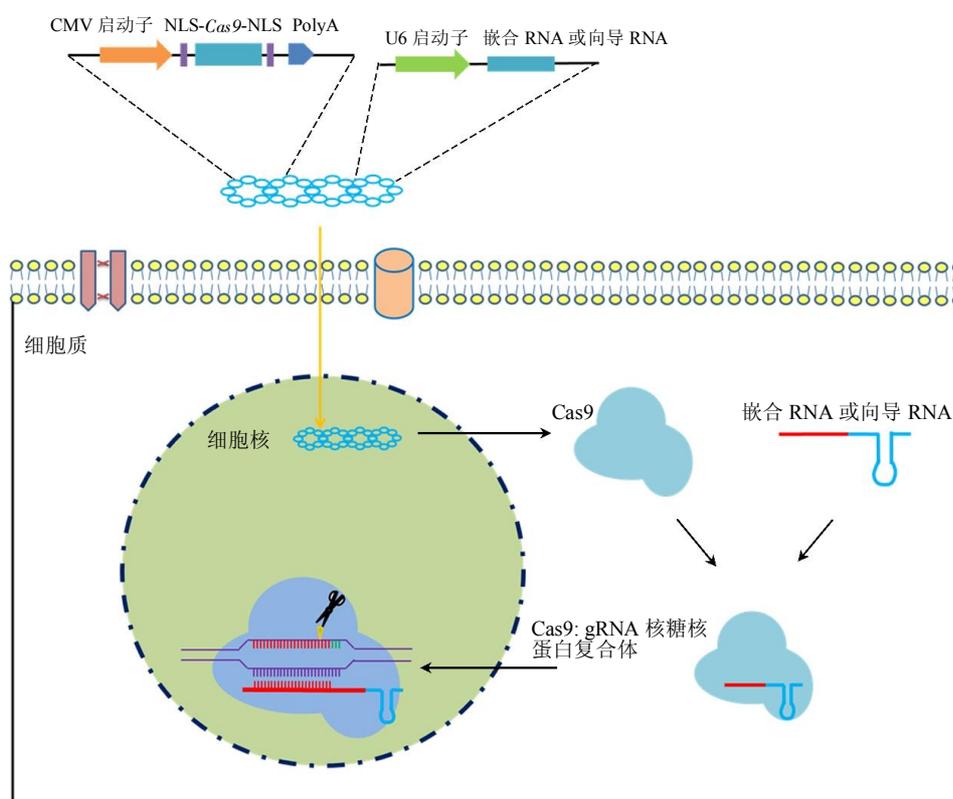


Fig. 3 Schematic of gRNA (chimeric RNA) guide Cas9 site-specific cleavage in animal genome

图3 哺乳动物细胞中 gRNA (chimericRNA) 介导 Cas9 基因定点编辑

(*Science*) 杂志发表了 Mali^[57] 另一篇关于改造的 CRISPR/Cas9 系统用于人类细胞基因组编辑的研究。该论文报道, 利用 CRISPR/Cas9 可以在人 293T 细胞和 K652 细胞基因的靶位点形成双链或是单链的切口, 从而激活细胞的 DNA 修复机制(包括非同源重组的末端链接修复和精确的同源重组机制), 高效地介导外源基因的定点插入。该论文与 Zhang 的结果相比, 不同之处在于, Zhang 的结果证明 gRNA 效率低于 crRNA 和 tracrRNA 的分开表达模式, 而 Mali 等的实验结果表明, 使用 crRNA 与 tracrRNA 融合的 gRNA 能够获得比较高的切割效率。随后在 *Nature Biotechnology* 以及 *Cell Research* 上同期发表的两篇相关研究论文使用的都是与 Mali 相同的 gRNA, 也能获得不错的打靶效率^[56, 61]。Mali 等的 gRNA 的 3' 端保留更完整的 tracrRNA 序列, 结构上更加接近天然的 crRNA:tracrRNA 结构。似乎是使用 3' 端完整的 gRNA 效率会更高, 因为它们的打靶位点并非针对同一种细胞的同一位点, 这一点有待证明。以前的研究证明

打靶位点的甲基化会明显降低 ZFN 和 TALEN 的打靶效率^[62-64], 不同的细胞系同一个位点之间或同一个细胞系不同的位点之间由于表观状态的不同会导致打靶效率的差异, CRISPR/Cas9 系统在真核生物中的打靶效率也可能受到靶位点染色体的表观状态影响。如果该位点的状态适合 CRISPR/Cas9 打靶, 无论使用 crRNA:tracrRNA 或 gRNA 打靶效率都会很高。当然这只是推测, 是否完整 gRNA 就会比精简的 gRNA 效率高, 还需要系统的实验验证。目前来看, 使用完整 gRNA 更加保险。

Cas9 蛋白来源于细菌, 因此要让 Cas9 蛋白高效地转运到哺乳动物细胞核内, 需要在 Cas9 蛋白的 N 端或是 C 端加上真核细胞的核定位信号。Zhang 的论文指出在 Cas9 蛋白的两端各加一个 NLS 能够使 Cas9 蛋白高效地转运到细胞核内^[58]。但是从 Mali 等的研究结果来看, 只需在 Cas9 的 C 端加上核定位信号, 即可使 CRISPR/Cas9 系统在真核细胞高效地发挥功能^[57]。但 Shen^[65] 的研究结果表明, 在 Cas9 的 N 端加三个或是在 N 端和 C 端

均加核定位信号都不能有效地将 Cas9 转运到人细胞核内, 只有在 N 端添加核定位信号并且在核定位信号和 Cas9 蛋白之间加上 32 个氨基酸残基的接头才能发挥功能. 可能原因是 Cas9 蛋白在折叠过程中对临近的 NLS 功能有一定“遮蔽”作用, 因此需要间隔一定距离才能消除这种影响. 从目前发表的论文来看, 在 Cas9 蛋白的 C 端添加核定位信号, 似乎是提高 Cas9 蛋白的核转运最有效的方法.

6.1 CRISPR/Cas9 在基因治疗中的应用

与 ZFN 和 TALEN 这两种人工核酸酶相比, CRISPR/Cas9 有一个极大的优势. 那就是 CRISPR/Cas9 可以改造成为切口酶, 在 DNA 的特定位置制造单链切口, 这样基本不会引起非同源末端连接(NHEJ), 但可以激活细胞的同源重组(HR)机制. 实验证明, 同一种细胞同一位点的单链切口和双链切口诱发的同源重组效率基本相同^[57], 但是发生 NHEJ 的概率大为不同. 因此, 利用 Cas9 作为切口酶可以高效地介导基因定点敲入或是对基因组的点突变, 大大降低了 NHEJ 风险和脱靶事件导致的基因组其他位置产生未知的突变. Ding 等^[66]在 *Cell Stem Cell* 上的论文报道, 在人 iPS 细胞中, 在细胞相同、载体结构相似和位点相同的情况下, CRISPR/Cas9 的定点突变效率至少是 TALEN 的 2 倍以上, 并且诱发双等位基因的效率更高. 人的 iPS 细胞在治疗一些人类的遗传疾病方面很有前景^[67-70]. 例如用 iPS 细胞治疗人类的镰刀型贫血症, 可以将病人的皮肤细胞诱导成 iPS 细胞, 然后利用 CRISPR/Cas9 突变型的切口酶来介导同源重组修复突变的血红蛋白基因, 再将修复的 iPS 细胞定向诱导分化为造血干细胞移植到病人体内. 这种方法既能提高同源重组效率, 又能避免使用 ZFN、TALEN 和 CRISPR/Cas9 时的脱靶效应造成的潜在危险. CRISPR/Cas9 与人 iPS 细胞的结合应用必然会对人类遗传性疾病的治疗产生巨大的影响.

6.2 CRISPR/Cas9 在家畜育种中的应用

1997 年, 体细胞克隆羊“多利”出生以后, 大型家畜的转基因应用在很多方面取得了突破性的进展. 特别是在利用转基因奶牛、羊乳腺生物反应器生产药用蛋白以及动物疾病模型方面都取得了重大的成果. 但是对于猪、牛、羊等大型家畜, 转基因育种方面进展缓慢, 主要有两个方面的原因: 一是目前转基因大多采用外源基因随机整合的方式, 转基因表达的可控性差, 很难获得稳定且表型良好

的种畜; 二是外源基因的随机整合让转基因动物在生物安全评估中受阻, 也难以让消费者接受转基因动物食品. 因此科研工作者迫切需要发展大动物的精细基因编辑技术, 但是传统的同源重组基因打靶技术效率非常低($<10^{-7}$), 在实际生产中应用困难. 近些年出现的 ZFN 和 TALEN 以及 CRISPR/Cas9 介导的基因组编辑技术, 有可能改变这一局面. 已有多篇研究报道了 ZFN 和 TALEN 对家畜基因组进行高效编辑^[71-74], 目前也有研究小组正在研究利用 CRISPR/Cas9 系统对猪的基因组定点修饰.

家畜基因的单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)显著影响家畜的生产性能, 例如猪的 IFG2 内含子 2 的 SNP 可以调节 *IGF2* 在猪肌肉组织中的表达, 显著提高猪的瘦肉率^[75], 特塞尔绵羊 *MSTN* 基因 3' 端非翻译区的 SNP 导致 *MSTN* 在肌肉中的表达下降, 显著促进绵羊肌肉的增长^[76]. 随着分子标记技术的发展, 越来越多的功能性 SNP 将会被发现. 怎样快速将这些 SNP 集中到优势的种畜基因组中提高它们的生产性能, 将成为大型家畜育种研究新方向. 利用传统的杂交育种方式引入这种优势 SNP 的同时可能会引入一些不理想的基因, 影响到其他性能, 需要经过多个世代的选育才能达到育种的目标. 但是, 精确的基因编辑技术可以在不改变基因组组成情况下, 只在特定的位点引入我们所需要的 SNP, 一般只要一个世代就能达到育种目标, 大大缩短育种时间, 降低了不稳定性. ZFN、TALEN 和 CRISPR/Cas9 都具有高效的基因编辑效率, 但 CRISPR/Cas9 在大家畜的点突变修饰方面有独特优势. 主要表现在以下四个方面: 第一, CRISPR/Cas9 的靶点在基因组中分布频率很高, 几乎是每 8 bp 就有一个靶点, TALEN 的靶点在基因组的分布频率大概是 1/125 bp, 而 ZFN 每 500 bp 才有一个合适的靶点^[77], CRISPR/Cas9 系统更容易在需要突变的点附近筛选到高效的靶点. 第二, CRISPR/Cas9 在引入定点插入时比 ZFN 和 TALEN 具有更精确的优势, 这是由于 Cas9 切割 DNA 两条链的功能分别属于两个功能域, 通过突变其中的一个功能域使 Cas9 变成只切割一条链的切口酶, 同时引入修复模板, 这样大大降低了天然 Cas9 切割双链引入随机突变的概率. 第三, ZFN 和 TALEN 以及 CRISPR/Cas9 对靶点都不是 100% 的特异, 尤其是在靶点只有一个碱基的差异时, 它们可能无法区分模板 DNA 和基因组 DNA, 统统将它们当成自己的靶点切割. 因此,

在利用 ZFN 和 TALEN 来对基因组做点突变的时候, 一般使用单链 DNA 作为模板, 且突变位点要位于 ZFN 和 TALEN 与 DNA 的结合区, 尽量减少 ZFN 和 TALEN 对突变后基因组的继续切割. 但 CRISPR/Cas9 对靶点的识别需要 PAM (NGG) 和靠近 PAM 的 11 bp 的种子序列完全保守, 14 bp (PAM+种子序列) 序列中的任何一个碱基突变之后 CRISPR/Cas9 的切割效率基本降至零. 所以靶点选择时可以将突变位点设定在这 14 bp 之内, 完全可以使用双链 DNA 作为模板对基因组进行点突变, 不需要担心 CRISPR/Cas9 是否会对突变后的基因继续切割. 第四, 在人体细胞实验中证明 CRISPR/Cas9 可以简便高效地实现多个位点(多于一个位点)切割^[78], 因此可以实现一次将多个 SNP 同时引入到种畜基因组中, 这样就会大大缩短育种所需的时间. ZNF 和 TALEN 要实现一次多个位点的切割就必须同时制备多对 ZFN 和 TALEN, 而且目前体外合成的单链 DNA 长度有限, 很难在一个模板中同时包含多个突变位点.

另外, ZFN 和 TALEN 除了能介导基因组的定点突变技术之外, 还可以将它们的 DNA 结合区与其他的转录调控蛋白(如 VP16 和 KRAB)融合, 来激活或者抑制靶基因的表达^[79-81]. Qi 等^[82]将 CRISPR/Cas9 改造成为转录调节因子, 下调基因的表达. 突变的 Cas9 蛋白丢失 DNA 切割活性, 但其与 gRNA 形成的核糖核蛋白复合物保留了与靶点特异性结合能力. 该复合物与基因结合后形成的空间位阻可以抑制转录的延伸或抑制 RNA 聚合酶以及转录调控因子的结合, 从而在转录水平抑制基因的表达, 这种干扰基因转录的方法不仅简单而且能够同时干扰多个基因, 在细菌和哺乳动物细胞体内都有不错的效果, 尤其是在细菌体内几乎可以达到 100% 的干扰能力. 根据这一思路, 我们也可以考虑在 Cas9 蛋白的末端添加其他的功能蛋白, 例如 VP16 等转录激活因子以及甲基化酶等, 用于激活靶基因表达或是调控靶位点的甲基化水平, 但 Cas9 蛋白分子质量大、空间结构较复杂, 改造后是否能像 ZFN 和 TALEN 的改造蛋白那样发挥功能还有待研究.

7 人工构建 CRISPR/Cas9 的方法以及突变效率的检测

ZFN 和 TALEN 对靶点的识别主要依赖于 DNA 结合蛋白对核酸的识别. ZFN 中一个锌指蛋

白(结构单元)识别三个碱基序列, 而 TALEN 的一个 RVD 识别一个碱基, 为了保证特异性, 通常靶点长度在 10bp 以上. 因此, 在构建 ZFN 或是 TALEN 时需要根据靶点的序列来将锌指蛋白单元或是 RVD 排列组合起来, 操作繁琐、制备周期长、需要耗费大量的劳动和费用.

CRISPR/Cas9 系统是一个由核酸和蛋白质组成的核糖核蛋白复合物, 它对靶点的识别依赖于核酸对核酸的识别, 通过碱基的互补配对完成. 打靶一个位点只需要在原有载体的基础上替换 20~30 bp 的核苷酸, 相当于合成一对引物, 构建过程相对于 ZFN 和 TALEN 更加简单、快捷, 适合规模化、高通量的组装.

ZFN、TALEN、CRISPR/Cas9 打靶基因后引入突变的方式基本一致, 都是 NHEJ 或是 HR. 在 CRISPR/Cas9 的应用中, 活性检测或是突变效率的检测可以参照 ZFN 和 TALEN 方法. 主要包括: 靶位点直接 PCR 后 TA 克隆测序、限制性内切酶法和基于可以识别错配双链的错配内切酶检测法(主要采用 *Cel I* 内切酶和 T7E1 两种酶).

8 结语与展望

从 CRISPR 发现至今 25 年已经过去了, CRISPR 的功能逐步被解密. CRISPR 作为细菌和古细菌的一种免疫系统与哺乳动物后天免疫系统有类似之处, 不同的是 CRISPR 的免疫记忆能够遗传给后代. 获得免疫能力的细菌或是古细菌能够生存下来并能将免疫能力传递给下一代, 非常完美地验证了拉马克的获得性遗传理论^[83]. 除了免疫能力以外, 最新的研究发现致病菌的 CRISPR 还可以通过调节内源基因表达帮助它躲避宿主的免疫系统同时增强其毒力^[84]. 越来越多的研究表明 CRISPR 还可能更多其他的功能^[85], 它作为一种保护装置能够帮助细菌和古细菌更好地适应外界不断变化的环境压力. 虽然我们已经了解了 CRISPR/Cas 的免疫原理并加以应用, 但关于这个系统的一些疑问仍值得研究. 首先, CRISPR 既然具有如此重要的功能, 为何大部分细菌都丢失了 CRISPR 系统? 还有, CRISPR 是怎样选择 spacer 以及又是通过何种机制将 spacer 整合到 CRISPR 基因座的 5' 端?

CRISPR/Cas9 作为最简单的 Type II CRISPR 系统被成功地改造成为类似于 ZFN 和 TALEN 的 ENN. 相对于 ZFN 和 TALEN 它的优势主要体现在其构建更加方便简单. 不同的物种、不同的细胞

或是不同的靶点对于同一种 ENN 效率都有很大差异, 很难轻易下结论哪种 ENN 对基因组的编辑效率会更高. CRISPR/Cas9 独特之处是既可以作为双链的内切酶也可被改造成为切口酶, 另外靶点的唯一限制是 3' 端必须有 PAM 序列(NGG), 所以它的靶点在基因中出现的频率远高于 TALEN 和 ZFN. CRISPR/Cas9 的主要缺点可能是它的脱靶效应, 它对靶点的识别取决 14 bp 序列(PAM 和它 3' 端的 11 bp), 这种长度的序列在基因组中很容易重复出现. 但是从当前的研究结果来看, 并没有发现 CRISPR/Cas9 的脱靶效应高于 ZFN 和 TALEN^[66, 78]. CRISPR/Cas9 对靶点的识别依赖于核酸与核酸的配对, 那么它对靶点的甲基化等表观修饰的敏感程度是否低于 ZFN 或是 TALEN? Cas9 蛋白除了核酸酶的活性外还具有解旋酶的功能, 这是否意味着靶点所处的染色体的开放程度对 CRISPR/Cas9 影响比 ZFN 或是 TALEN 小? CRISPR/Cas9 来源于细菌, 它是否会对哺乳动物细胞或个体产生毒性或是否会诱发哺乳动物细胞或个体的免疫反应? 还有, 能否通过筛选突变体的方法获得更加特异的 Cas9 蛋白? 这些问题都有待进一步研究.

CRISPR/Cas9 作为第三代人工核酸酶成为目前研究的热点, 相对于 ZFN 和 TALEN 有其独特的优势: a. 构建简单方便快捷, 适用于任何分子生物实验室; b. 用于基因组的点突变编辑优于 ZFN 或 TALEN; c. CRISPR/Cas9 精确的切口酶活性用于基因治疗安全性高于 ZFN 或 TZLEN. 可以预见, CRISPR/Cas9 在基础理论研究、临床治疗和农牧渔业等领域必将有越来越有广阔的应用前景, 并且产生深远的影响.

参 考 文 献

- [1] Kim Y G, 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
- [2] Urnov F D, Rebar E J, Holmes M C, *et al.* Genome editing with engineered zinc finger nucleases. Nat Rev Genet, 2010, **11** (9): 636-646
- [3] Perez E E, Wang J, Miller J C, *et al.* Establishment of HIV-1 resistance in CD4+ T cells by genome editing using zinc-finger nucleases. Nat Biotechnol, 2008, **26**(7): 808-816
- [4] Moscou M J, Bogdanove A J. A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors. Science, 2009, **326**(5959): 1501
- [5] Boch J, Scholze H, Schornack S, *et al.* Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. Science, 2009, **326**(5959): 1509-1512
- [6] Boch J, Bonas U. Xanthomonas AvrBs3 family-type III effectors: discovery and function. Annu Rev Phytopathol, 2010, **48**: 419-436
- [7] Li T, Huang S, Zhao X, *et al.* Modularly assembled designer TAL effector nucleases for targeted gene knockout and gene replacement in eukaryotes. Nucleic acids Res, 2011, **39**(14): 6315-6325
- [8] Joung J K, Sander J D. TALENs: a widely applicable technology for targeted genome editing. Nat Rev Mol Cell Biol, 2013, **14** (1): 49-55
- [9] Breakthrough of the year. The runners-up. Science, 2012, **338**(6114): 1525-1532
- [10] Mussolino C, Cathomen T. RNA guides genome engineering. Nat Biotechnol, 2013, **31**(3): 208-209
- [11] Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, *et al.* 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
- [12] Jansen R, van Embden J D, Gaastra W, *et al.* Identification of a novel family of sequence repeats among prokaryotes. Omics: a Journal of Integrative Biology, 2002, **6**(1): 23-33
- [13] Mojica F J, Ferrer C, Juez G, *et al.* Long stretches of short tandem repeats are present in the largest replicons of the archaea *Haloferax mediterranei* and *Haloferax volcanii* and could be involved in replicon partitioning. Mol Microbiol, 1995, **17**(1): 85-93
- [14] Jansen R, Embden J D, Gaastra W, *et al.* Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. Mol Microbiol, 2002, **43**(6): 1565-1575
- [15] Bolotin A, Quinquis B, Sorokin A, *et al.* Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. Microbiology, 2005, **151** (Pt 8): 2551-2561
- [16] Mojica F J, Diez-Villasenor C, Garcia-Martinez J, *et al.* Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. J Mol Evol, 2005, **60**(2): 174-182
- [17] 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**(Pt 3): 653-663
- [18] Makarova K S, Grishin N V, Shabalina S A, *et al.* A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action. Biol Direct, 2006, **1**: 7
- [19] Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, *et al.* CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. Science, 2007, **315**(5819): 1709-1712
- [20] Marraffini L A, Sontheimer E J. CRISPR interference limits horizontal gene transfer in staphylococci by targeting DNA. Science, 2008, **322**(5909): 1843-1845
- [21] Grissa I, Vergnaud G, Pourcel C. CRISPRFinder: a web tool to identify clustered regularly interspaced short palindromic repeats. Nucl Acids Res, 2007, **35**(Web Server issue): W52-57

- [22] Rousseau C, Gonnet M, Le Romancer M, *et al.* CRISPI: a CRISPR interactive database. *Bioinformatics*, 2009, **25**(24): 3317–3318
- [23] Grissa I, Vergnaud G, Pourcel C. The CRISPRdb database and tools to display CRISPRs and to generate dictionaries of spacers and repeats. *BMC Bioinformatics*, 2007, **8**: 172
- [24] Godde J S, Bickerton A. The repetitive DNA elements called CRISPRs and their associated genes: evidence of horizontal transfer among prokaryotes. *J Mol Evol*, 2006, **62**(6):718–729
- [25] Deveau H, Gameau JE, Moineau S. CRISPR/Cas system and its role in phage-bacteria interactions. *Annu Rev Microbiol*, 2010, **64**: 475–493
- [26] Kunin V, Sorek R, Hugenholtz P. Evolutionary conservation of sequence and secondary structures in CRISPR repeats. *Genome Biol*, 2007, **8**(4): R61
- [27] Makarova K S, Aravind L, Grishin N V, *et al.* A DNA repair system specific for thermophilic Archaea and bacteria predicted by genomic context analysis. *Nucleic Acids Res*, 2002, **30**(2):482–496
- [28] Heidelberg J F, Nelson W C, Schoenfeld T, *et al.* Germ warfare in a microbial mat community: CRISPRs provide insights into the co-evolution of host and viral genomes. *PLoS One*, 2009, **4**(1): e4169
- [29] Horvath P, Coute-Monvoisin A C, Romero D A, *et al.* Comparative analysis of CRISPR loci in lactic acid bacteria genomes. *Int J Food Microbiol*, 2009, **131**(1): 62–70
- [30] Haft D H, Selengut J, Mongodin E F, *et al.* A guild of 45 CRISPR-associated (Cas) protein families and multiple CRISPR/Cas subtypes exist in prokaryotic genomes. *PLOS Comput Biol*, 2005, **1**(6): e60
- [31] Sinkunas T, Gasiunas G, Fremaux C, *et al.* Cas3 is a single-stranded DNA nuclease and ATP-dependent helicase in the CRISPR/Cas immune system. *EMBO J*, 2011, **30**(7): 1335–1342
- [32] Haurwitz R E, Jinek M, Wiedenheft B, *et al.* Sequence- and structure-specific RNA processing by a CRISPR endonuclease. *Science*, 2010, **329**(5997): 1355–1358
- [33] Wiedenheft B, Zhou K, Jinek M, *et al.* Structural basis for DNase activity of a conserved protein implicated in CRISPR-mediated genome defense. *Structure*, 2009, **17**(6): 904–912
- [34] Wiedenheft B, van Duijn E, Bultema J B, *et al.* 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
- [35] Garneau J E, Dupuis M E, Villion M, *et al.* The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature*, 2010, **468**(7320): 67–71
- [36] Deltcheva E, Chylinski K, Sharma C M, *et al.* CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature*, 2011, **471**(7340): 602–607
- [37] Anantharaman V, Iyer L M, Aravind L. Presence of a classical RRM-fold palm domain in Thg1-type 3'-5' nucleic acid polymerases and the origin of the GGDEF and CRISPR polymerase domains. *Biol Direct*, 2010, **5**: 43
- [38] Hale C R, Zhao P, Olson S, *et al.* RNA-guided RNA cleavage by a CRISPR RNA-Cas protein complex. *Cell*, 2009, **139**(5): 945–956
- [39] Terns M P, Terns R M. CRISPR-based adaptive immune systems. *Curr Opin Microbiol*, 2011, **14**(3): 321–327
- [40] Portillo M C, Gonzalez J M. CRISPR elements in the Thermococcales: evidence for associated horizontal gene transfer in *Pyrococcus furiosus*. *J Appl Genet*, 2009, **50**(4):421–430
- [41] Mojica F J, Diez-Villasenor C, Garcia-Martinez J, *et al.* Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system. *Microbiol*, 2009, **155**(Pt 3): 733–740
- [42] Beloglazova N, Brown G, Zimmerman M D, *et al.* A novel family of sequence-specific endoribonucleases associated with the clustered regularly interspaced short palindromic repeats. *J Biol Chem*, 2008, **283**(29): 20361–20371
- [43] Brouns S J, Jore M M, Lundgren M, *et al.* Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes. *Science*, 2008, **321**(5891): 960–964
- [44] Pougach K, Semenova E, Bogdanova E, *et al.* Transcription, processing and function of CRISPR cassettes in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, 2010, **77**(6): 1367–1379
- [45] Pul U, Wurm R, Arslan Z, *et al.* Identification and characterization of E. coli CRISPR-cas promoters and their silencing by H-NS. *Mol Microbiol*, 2010, **75**(6): 1495–1512
- [46] Agari Y, Sakamoto K, Tamakoshi M, *et al.* Transcription profile of *Thermus thermophilus* CRISPR systems after phage infection. *J Mol Biol*, 2010, **395**(2): 270–281
- [47] Hale C, Kleppe K, Terns R M, *et al.* Prokaryotic silencing (ψ) RNAs in *Pyrococcus furiosus*. *Rna*, 2008, **14**(12): 2572–2579
- [48] Lillestol R K, Shah S A, Brugger K, *et al.* CRISPR families of the crenarchaeal genus *Sulfolobus*: bidirectional transcription and dynamic properties. *Molecular Microbiology*, 2009, **72**(1): 259–272
- [49] Phok K, Moisan A, Rinaldi D, *et al.* Identification of CRISPR and riboswitch related RNAs among novel noncoding RNAs of the euryarchaeon *Pyrococcus abyssi*. *BMC Genomics*, 2011, **12**: 312
- [50] Lillestol R K, Redder P, Garrett R A, *et al.* A putative viral defence mechanism in archaeal cells. *Archaea*, 2006, **2**(1): 59–72
- [51] Shinkai A, Kira S, Nakagawa N, *et al.* Transcription activation mediated by a cyclic AMP receptor protein from *Thermus thermophilus* HB8. *J Bacteriol*, 2007, **189**(10):3891–3901
- [52] Deveau H, Barrangou R, Gameau J E, *et al.* Phage response to CRISPR-encoded resistance in *Streptococcus thermophilus*. *J Bacteriol*, 2008, **190**(4): 1390–1400
- [53] Semenova E, Nagornykh M, Pyatnitskiy M, *et al.* Analysis of CRISPR system function in plant pathogen *Xanthomonas oryzae*. *FEMS Microbiology Letters*, 2009, **296**(1): 110–116
- [54] Marraffini L A, Sontheimer E J. Self versus non-self discrimination during CRISPR RNA-directed immunity. *Nature*, 2010, **463**(7280): 568–571
- [55] Barrangou R, Horvath P. CRISPR: new horizons in phage resistance and strain identification. *Annu Rev Food Sci Technol*, 2012, **3**: 143–162
- [56] Hwang W Y, Fu Y, Reyon D, *et al.* Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. *Nat Biotechnol*, 2013, **31**(3):

- 227–229
- [57] Mali P, Yang L, Esvelt K M, *et al.* RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*, 2013, **339**(6121): 823–826
- [58] Cong L, Ran F A, Cox D, *et al.* Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 2013, **339**(6121): 819–823
- [59] Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, *et al.* A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 2012, **337**(6096): 816–821
- [60] Gasiunas G, Barrangou R, Horvath P, *et al.* Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, **109**(39): E2579–2586
- [61] Chang N, Sun C, Gao L, *et al.* Genome editing with RNA-guided Cas9 nuclease in zebrafish embryos. *Cell Res*, 2013, **23**(4):465–472
- [62] Kim Y, Kweon J, Kim A, *et al.* A library of TAL effector nucleases spanning the human genome. *Nat Biotechnol*, 2013, **31**(3):251–258
- [63] Bultmann S, Morbitzer R, Schmidt C S, *et al.* Targeted transcriptional activation of silent oct4 pluripotency gene by combining designer TALEs and inhibition of epigenetic modifiers. *Nucleic Acids Res*, 2012, **40**(12): 5368–5377
- [64] Chen S, Oikonomou G, Chiu C N, *et al.* A large-scale *in vivo* analysis reveals that TALENs are significantly more mutagenic than ZFNs generated using context-dependent assembly. *Nucleic Acids Res*, 2013, **41**(4): 2769–2778
- [65] Shen B, Zhang J, Wu H, *et al.* Generation of gene-modified mice via Cas9/RNA-mediated gene targeting. *Cell Res*, 2013, **23** (5): 720–723
- [66] Ding Q, Regan S N, Xia Y, *et al.* Enhanced efficiency of human pluripotent stem cell genome editing through replacing TALENs with CRISPRs. *Cell Stem Cell*, 2013, **12**(4): 393–394
- [67] Liu G H, Suzuki K, Qu J, *et al.* Targeted gene correction of laminopathy-associated LMNA mutations in patient-specific iPSCs. *Cell Stem Cell*, 2011, **8**(6): 688–694
- [68] Wang Y, Zheng C G, Jiang Y, *et al.* Genetic correction of beta-thalassemia patient-specific iPS cells and its use in improving hemoglobin production in irradiated SCID mice. *Cell Res*, 2012, **22**(4): 637–648
- [69] Kazuki Y, Hiratsuka M, Takiguchi M, *et al.* Complete genetic correction of ips cells from Duchenne muscular dystrophy. *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy*, 2010, **18**(2): 386–393
- [70] Sun N, Longaker M T, Wu J C. Human iPS cell-based therapy: considerations before clinical applications. *Cell Cycle*, 2010, **9**(5): 880–885
- [71] Carlson D F, Tan W, Lillico S G, *et al.* Efficient TALEN-mediated gene knockout in livestock. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, **109**(43): 17382–17387
- [72] Yu S, Luo J, Song Z, *et al.* Highly efficient modification of beta-lactoglobulin (BLG) gene via zinc-finger nucleases in cattle. *Cell Res*, 2011, **21**(11): 1638–1640
- [73] Yang D, Yang H, Li W, *et al.* Generation of PPARgamma mono-allelic knockout pigs via zinc-finger nucleases and nuclear transfer cloning. *Cell Res*, 2011, **21**(6): 979–982
- [74] Hauschild J, Petersen B, Santiago Y, *et al.* Efficient generation of a biallelic knockout in pigs using zinc-finger nucleases. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, **108**(29): 12013–12017
- [75] Van Laere A S, Nguyen M, Braunschweig M, *et al.* A regulatory mutation in IGF2 causes a major QTL effect on muscle growth in the pig. *Nature*, 2003, **425**(6960): 832–836
- [76] Clop A, Marcq F, Takeda H, *et al.* A mutation creating a potential illegitimate microRNA target site in the myostatin gene affects muscularity in sheep. *Nat Genet*, 2006, **38**(7): 813–818
- [77] Tan W S, Carlson D F, Walton M W, *et al.* Precision editing of large animal genomes. *Adv Genet*, 2012, **80**: 37–97
- [78] Wang H, Yang H, Shivalila C S, *et al.* One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell*, 2013
- [79] Miller J C, Tan S, Qiao G, *et al.* A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. *Nat Biotechnol*, 2011, **29**(2):143–148
- [80] Zhang F, Cong L, Lodato S, *et al.* Efficient construction of sequence-specific TAL effectors for modulating mammalian transcription. *Nat Biotechnol*, 2011, **29**(2): 149–153
- [81] Morbitzer R, Romer P, Boch J, *et al.* Regulation of selected genome loci using de novo-engineered transcription activator-like effector (TALE)-type transcription factors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, **107**(50): 21617–21622
- [82] Qi L S, Larson M H, Gilbert L A, *et al.* Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. *Cell*, 2013, **152**(5): 1173–1183
- [83] Koonin E V, Wolf Y I. Is evolution Darwinian or/and Lamarckian? *Biol Direct*, 2009, **4**: 42
- [84] Sampson T R, Saroj S D, Llewellyn A C, *et al.* A CRISPR/Cas system mediates bacterial innate immune evasion and virulence. *Nature*, 2013, **497**(7448): 254–257
- [85] Horvath P, Barrangou R. CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. *Science*, 2010, **327**(5962): 167–170

New Method of Genome Editing Derived From CRISPR/Cas9*

FANG Rui, CHANG Fei, Sun Zhao-Lin, LI Ning, MENG Qing-Yong**

(State Key Laboratory of Agrobiotechnology, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

Abstract The type II clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/CRISPR-associated (Cas)9 system has been used as a gene-targeting technology as ZFN and TALEN to mediate multiple genome editing. Unlike ZFN and TALEN directly binding to the specific DNA sequence to generate a double-strands break, the engineered CRISPR/Cas9 system has been demonstrated that Cas9 nuclease was directed by short RNAs to induce site-specific cleavage in complex genome. The advantage of CRISPR/Cas9 system is easy to be constructed and low cost compared with ZFN and TALEN. So, it is considered that it will replace existing technique. Here we review the CRISPR/Cas development history, classification, mechanism, progress and application of this new genome editing technology. This review will provide a useful reference for researchers who are interested in applying this new technique in their studies.

Key words CRISPR/Cas9, gene targeting, genome editing technology, engineered endonuclease

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2013.00215

* This work was supported by grants from Earmarked Fund for Modern Agro-industry Technology Research Systems of China (CARAS-37).

**Corresponding author.

Tel: 86-10-62731142, E-mail: qingyong.meng@gmail.com

Received: May 19, 2013 Accepted: July 29, 2013