

•综述•

DOI: 10.13865/j.cnki.cjbmb.2018.03.06

基因编辑技术

胡小丹^{1) 2)}, 游敏¹⁾, 罗文新¹⁾*

¹⁾ 厦门大学分子疫苗学和分子诊断学国家重点实验室 福建 厦门 361102;

²⁾ 厦门大学生命科学学院生物学系 福建 厦门 361102)

摘要 基因编辑是指通过核酸酶对靶基因进行定点改造,实现特定 DNA 的定点敲除、敲入以及突变等,最终下调或上调基因的表达,以使细胞获得新表型的一种新型技术。基因编辑技术已被广泛运用于基因结构与功能的研究和多种细胞的基因工程改造,为疾病模型的建立、动植物新品种的培育及基因治疗等的研究提供新的手段。基因编辑技术主要包括锌指核酸酶技术(ZFN)、转录激活子样效应因子技术(TALEN)和成簇的规律间隔的短回文重复序列/CRISPR 相关蛋白(CRISPR/Cas)系统等。本文将对3种基因编辑技术的原理、运用及其最新进展进行综述,以期为相关技术及其运用的研究提供参考。

关键词 基因编辑; 锌指核酸酶技术; 转录激活子样效应因子技术; 成簇规律间隔短回文重复系统中图分类号 Q78

Gene Editing Technology

HU Xiao-Dan^{1) 2)}, YOU Min¹⁾, LUO Wen-Xin¹⁾*

¹⁾ State Key Laboratory of Molecular Vaccinology and Molecular Diagnostics, Xiamen University, Xiamen 361102, Fujian, China;

²⁾ Department of Biology, School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361102, Fujian, China)

Abstract Gene editing is a new type of genetic engineering technology, in which DNA at the desired position is inserted, deleted or mutated by nuclease. As a result, the expression of targeted gene is regulated and led to new phenotypes. Widely used in the study of gene structure and function, and gene modifications in various kinds of species, gene editing technologies provide a new tool for disease models establishment, animal and plant breeding and the study of gene therapy. Gene editing tools mainly include zinc finger nuclease (ZFN), transcription activator-like effector nuclease (TALEN) and cluster regulatory interspaced short palindromic repeat/CRISPR associated proteins (CRISPR/Cas). This review will focus on the mechanisms and the latest progresses on the three gene editing technologies.

Key words gene editing; zinc finger nuclease (ZFN); transcription activator-like effector nuclease (TALEN); cluster regulatory interspaced short palindromic repeat/CRISPR associated proteins (CRISPR/Cas)

20世纪90年代,科学家们发现了DNA双链断裂触发基因组DNA损伤修复的现象。基因组DNA损伤是以同源重组或非同源末端链接两种方式进行修复。在此过程中,可以定点引入碱基突变、片段替换、插入或缺失等,实现基因的定点编辑。近年来,基于多种高效靶向核酸酶的发现,发展了高效的靶向基因编辑技术:锌指核酸酶技术(zinc finger nuclease, ZFN)、转录激活因子样效应物核酸酶技术(transcription activator-like effector nuclease, TALEN)和成簇的规律间隔的短回文重复序列(clustered regularly interspaced short palindromic

收稿日期:2017-08-14; 修回日期:2017-09-26; 接受日期:2017-10-19
国家自然科学基金项目(No.30471975, No.31600748)和福建省自然科学基金(No.2017J01066)资助

* 通讯作者 Tel: 0592-2183111; E-mail: wxluo@xmu.edu.cn

Received: August 14, 2017; Revised: September 26, 2017; Accepted: October 19, 2017

Supported by National Natural Science Foundation of China (No. 30471975, No. 31600748) and National Natural Science Foundation of Fujian Province (No. 2017J01066)

* Corresponding author Tel: 0592-2183111;

E-mail: wxluo@xmu.edu.cn

repeats, CRISPR) / CRISPR 相关蛋白 (CRISPR-associated proteins, Cas) 系统。

这 3 种基因编辑技术都包括用于切割碱基序列的核酸内切酶和靶向区域识别结构。前者使 DNA 靶向区域产生双链的断裂,通过非同源末端连接 (non-homologous end joining, NHEJ)^[1] 和同源介导修复 (homology-directed repair, HDR)^[2] 来修复双链的断裂;后者使核酸内切酶定位至靶标位置。ZFN 和 TALEN 用氨基酸来识别 DNA 序列,而 CRISPR/Cas 是 RNA 序列通过碱基互补配对原则来识别靶 DNA 序列。这 3 种技术均极大程度地提高了基因编辑的靶向性和效率。本文旨在综述基因损伤修复的原理、3 种基因编辑技术 ZFN、TALEN、CRISPR/Cas 的结构、作用机制及其应用。

1 基因编辑与 DNA 的损伤修复

细胞代谢产生的过氧化物、酸、碱、外界的紫外线和射线等都会使 DNA 产生双链断裂 (double-strand break, DSB) 或者单链断裂 (single-strand break, SSB)^[3]; 而通过基因编辑工具如 ZFN、TALEN 和 CRISPR/Cas 系统可使基因组在特定的位点产生 DSB (如图 1 所示)。为保证细胞基因的完整性, DNA 损伤修复机制会立刻开始工作,主要以非同源末端连接或同源介导修复方式。

在细胞 DNA 的双链断裂修复中,非同源末端连接 (NHEJ) 是主要的修复方式^[4];但 NHEJ 是一种具有错误倾向的修复方式,断裂的 DNA 末端直接连接,会导致 DNA 序列插入、缺失或者染色体易位和倒位^[5,6],使基因组产生移码突变,阅读框发生变化,也能使相应的 mRNA 转录提前终止。在细胞中,另一种修复 DNA 损伤的方式为同源重组修复,是一种无错倾向的修复机制。基因编辑技术一般利用细胞同源介导修复的修复方式。如图 1 所示,构建含有同源臂的外源片段如 ssDNA 或 dsDNA,转入到细胞内,在同源修复模板存在的情况下,细胞以该 DNA 为模板进行修复,可将目的基因替换成其他基因、插入基因片段、敲除部分基因片段或全部基因等,利用 DNA 的损伤修复实现基因的定点编辑。

2 锌指核酸酶技术

1984 年,科学家们在非洲爪蟾的转录因子中发现锌指蛋白^[7],后来经过人工改造并连接上核酸内切酶后,发展为基因工程编辑工具:锌指核酸酶技术。

2.1 ZFN 的结构及作用机制

ZFN 由两部分组成:一部分是重复的锌指蛋白 (zinc finger protein, ZFP),用于识别和结合特定的基因序列;另一部分是 *Fok I* 核酸内切酶,可以通过二聚体化特异性地切割目的基因,并且可以切割真核基因组的任何识别序列^[8,9]。Fig. 2 中展示了 ZFN 的结构。每个锌指 (zinc finger, ZF) 由 3~4 个锌指蛋白组成,可识别 9~12 个碱基,也可以由 4~6 个锌指蛋白构成识别 12~18 个碱基的序列,可高度特异地识别人类基因组的任何基因序列^[10]。每一个锌指蛋白的识别区域由重复的 Cys2-His2 序列串联组成,每个锌指蛋白有 30 个氨基酸^[11],形成 α - β 二级结构,其中 DNA 大沟的 3 个核苷酸可以与 α 螺旋表面的几个氨基酸结合。 α 螺旋中的 -1~+6 位的氨基酸决定了该锌指蛋白特异识别的三联子的序列,+4 位的氨基酸一般是亮氨酸。

Fok I 是来源于海床黄杆菌 (*Flavobacterium okeanokoites*) 的一种限制性内切核酸酶^[12],通过连接区连接到 ZFN 的 ZF (DNA 识别结合区域) 的 C 端。一般使用的 *Fok I* 限制性内切核酸酶是 II S 型^[9],由于 ZFP 与 DNA 的结合力不强,所以必须通过二聚体的形式才能发挥核酸内切酶的活性,使目的基因位点产生双链断裂^[13,14]。并且 2 个 ZFP 分别识别目的片段两侧的核苷酸序列,并且距离 5~7 nt 的间隔区,才能保证 ZFN 有最适合的作用空间。由于 *Fok I* 需要二聚体化才能起作用,产生 DNA 的双链断裂,所以显著降低了由于脱靶造成的细胞毒性,但要防止由于锌指核酸酶同侧识别造成的“左-左”或“右-右”的 *Fok I* 二聚体的非特异性切割,异二聚体化提高了锌指核酸酶的特异性^[13,15]。

将 ZFN 质粒共同转化到细胞中,表达的融合蛋白将分别与靶位点结合,*Fok I* 二聚体化对目的基因进行切割产生 DNA 的双链断裂,细胞内的 DNA 修复机制随即开启。细胞通过 NHEJ 或 HDR 的方式进行修复,可发生碱基或基因片段缺失、替换或增加,从而实现基因编辑的目的。

2.2 ZFN 的局限性及其改进

2.2.1 上下文依赖效应 锌指中各个锌指蛋白 (ZFP) 可以相互作用,影响识别和结合特定核苷酸序列,即锌指核酸酶存在上下文依赖效应^[16-18],限制了该技术的应用。现在有多种构建 ZFN 的方法。目前开发的 ZFP 能识别 64 种三联子,通过模块化组装,可从构建好的 ZFP 中选择需要的模块再串联到一起,这种方法需要利用细菌双杂交技术 (B2H)

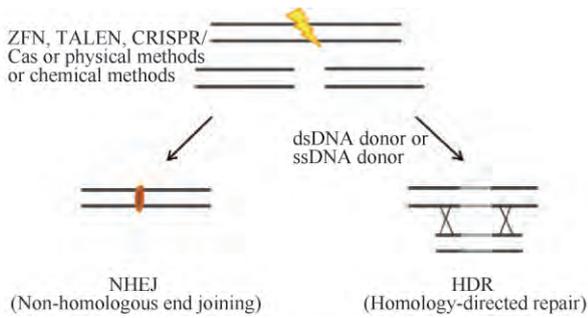


Fig. 1 DNA damage repair Genome editing tools, physical or chemical methods can break DNA and make double-strand breaks in DNA. The DSB can be repaired by non-homologous end joining (NHEJ) or homology-directed repair (HDR). NHEJ and HDR can be applied separately to gene knock-out and knock-in in specific site

筛选活性模块^[19]，通过检测报告基因产物来比较各个模块的亲水性，将具有较高亲水性的模块组装到一起，再次检测整体锌指的亲水性^[20-21]。还可以通过锌指蛋白构建平台来构建 ZFN。目前，有两个主要的平台，一个平台是由 Sangamo Bioscience 和 Sigma 公司合作开发的 Composer 平台^[22]，通过预定购买所需的 ZFN，省去了研究人员的设计和构建时间，同时该 ZFN 也已经过亲和性测试，有较高的亲和性。另一个平台是由锌指技术协会向所有研究者开放的免费平台-OPEN(oligomerized pool engineering)^[23-24]，平台里模块化的锌指库和相关试剂都是免费的。但仍需通过细菌双杂交技术对 ZFP 进行活性筛选^[19]。

2.2.2 其他局限性及其改进 ZFN 还具有其他的限制：在人类的基因组中，至少每隔 500 bp 才能结

合一个 ZFN 靶向限制，由模块组建的 ZFN 不能切割染色体^[25]，ZFN 的脱靶切割会导致细胞毒性等，以上问题对 ZFN 的应用推广也产生了一定的阻碍。

现在，对 ZFN 已经做了大量的改进和研究。ZFN-切口酶的构建，可以使核酸酶产生 DNA 双链断裂，在细胞中通过 HDR 高保真地修复，而不经 NHEJ 通路，从而降低了错误率和脱靶效应^[26-27]。用低温短暂处理的培养基培养表达 ZFN，可以增加其核酸内切酶活性^[28]。与位点特异性酶及末端加工酶共转入细胞^[29]，可通过载体上的荧光基因表达，从而筛选和富集目的细胞^[26]。转入 ZFN 所编码的 mRNA 进入细胞中，将会产生不可预估的副作用，并且效率比较低，直接转入纯化的锌指核酸酶蛋白，能明显降低其脱靶效应^[30]。ZFN 的应用非常有价值。因其分子质量比较小，能以 DNA、RNA 或者其他的方式运载到细胞内^[31]。2017 年，Nishio 等通过核酸适配体将锌指核酸酶与 GFP 基因相连，将其注入到纳米管中，并将这种纳米管插入到 HEK293 细胞内。进入细胞后，纳米管中的 ZFN 被释放，对目的基因进行编辑，获得了更高效的基因编辑^[32]。

2.3 ZFN 的应用

ZFN 应用的历史较久，其技术的发展相对成熟，已高效用于多种生物细胞的基因定点修饰，包括黑长尾猴、小鼠、大鼠、中国仓鼠、非洲爪蟾卵细胞、线虫、斑马鱼、果蝇、家兔、拟南芥、大豆、烟草和玉米等生物的细胞。

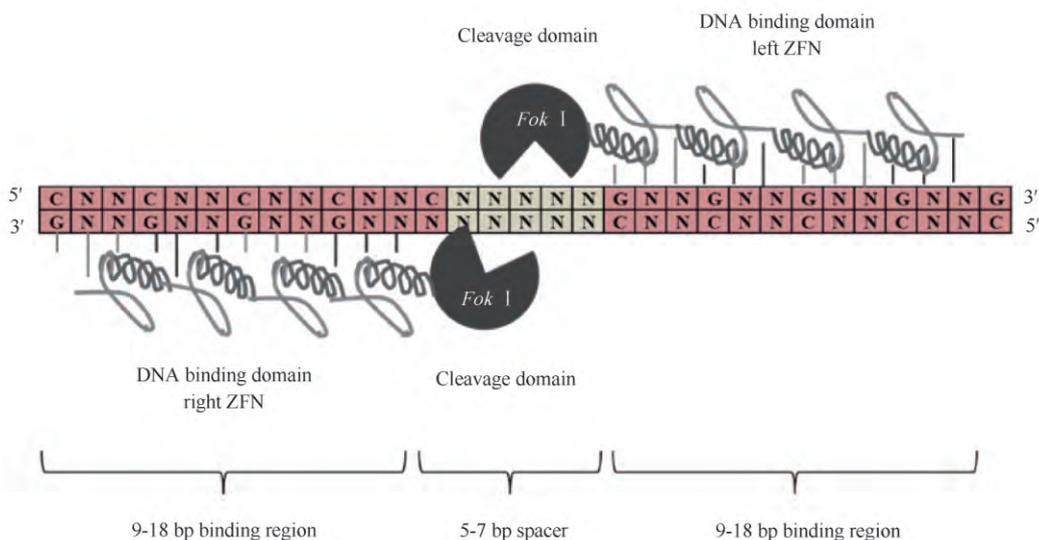


Fig.2 Principle of ZFNs Zinc-finger molecules consist of a zinc finger DNA binding domain and Fok I nuclease. One ZFP (zinc finger protein) can recognize three nucleotides. Two ZFNs bind to the target domain in tail to tail direction and two Fok I nuclease generate DSB

2.3.1 ZFN 在转基因动物研究中的应用 ZFN 在转基因动物的研究中有成功的运用。例如: Geurts 等以外源绿色荧光蛋白基因 (green fluorescent protein)、内源 IgM 和 *Rab38* 基因作为靶点,将编码的 ZFN 的 DNA 或 mRNA 通过原核注射或胞浆内注射的方法转入大鼠胚胎细胞中,获得稳定遗传的敲除目的基因的转基因大鼠^[33]; Whyte 等利用 ZFN 技术,设计可敲除增强型绿色荧光蛋白基因 (enhanced green fluorescent protein, eGFP) 的 ZFN,并转入带有该基因的转基因猪的成纤维细胞,成功地敲除 *eGFP* 基因,并且得到不能发出荧光的后代,成功建立大动物基因敲除模型^[34]。

2.3.2 ZFN 在疾病研究中的应用 目前,已有大量文献报道 ZFN 运用于多种疾病的研究,如:细菌耐药性、血液疾病、皮肤疾病和病毒性疾病等。Shahbazi 等发现,某些细菌具有氨苄西林抗性基因可以抵抗氨苄西林,设计靶向氨苄西林基因的 ZFN,将细菌内源性的氨苄西林抗性基因敲除,使细菌的抗生素抗性下降,这一方法为缓解细菌耐药性问题提供了新的思路^[35]。在血液疾病方面, Li 等利用小鼠模型来研究血友病的有效治疗方法。他们通过 ZFN 技术,将体内功能异常的基因 *hF9* 替换,使患有人乙型血友病的小鼠恢复到与正常的血液凝集功能相近的程度^[36]。在皮肤疾病方面, Hoher 等证明, ZFN 的基因治疗技术可以让导致皮肤起疱的缺陷性蛋白质失活,利用 ZFN 在体外成功地关闭人皮肤干细胞内导致皮肤起疱的致病基因。为进一步验证方法的可行性,他们利用基因工程手段使皮肤干细胞携带绿色荧光蛋白基因,并用设计的 ZFN 进行处理,结果 1/5 的细胞成功地关闭绿色荧光,即便使用高剂量 ZFN 处理,皮肤干细胞仍能保持其稳态的维持、自我更新与分化能力^[37]。在病毒导致的疾病方面, De Silva Feelixge 等用 ZFN 技术敲除逆转录病毒的整合酶,或者逆转录酶的基因,使病毒致病基因不能插入到基因组中,或阻止致病基因的正常表达^[38],为病毒感染导致的疾病提供治疗方向。

3 转录激活子样效应物技术

2007 年,德国科学家在植物黄单胞菌 (*Xanthomonas*) 中发现一种特殊的分泌蛋白质——转录激活因子样效应物 (transcription activator-like effector, TALE),该蛋白质可以结合植物宿主基因组并激活转录^[39-41]。2009 年,TALE 结合 DNA 的机制被阐明^[42-43]。随后在 2012 年,转录激活因子样

效应物技术出现,并逐渐取代了锌指核酸酶技术^[44]。

3.1 TALEN 的结构及其作用机制

与锌指核酸酶技术相似,TALEN 也由两部分组成,一部分是 DNA 的特异性识别和结合区域——TALE,另一部分是与 ZFN 相同的 II S 型的 *Fok I* 核酸酶,通过二聚体化使目的片段产生双链的断裂^[9,45-46]。通过激活细胞内的修复机制,利用 NHEJ 通路修复损伤,也可引入修复的 DNA 模板,通过高保真的同源重组修复,来修复 DNA 的双链损伤,也可在靶位点引入其他的基因或者沉默靶基因。

TALE 由 N 端转运信号、C 端核定位信号、转录激活结构域和 DNA 特异性识别结合结构域组成^[4,18,47],如 Fig. 3 所示。其中,DNA 特异性识别结合结构域由高度保守的同源重复序列组成,每个重复序列对应识别 1 个碱基,共有 33~35 个氨基酸,其中第 12 和 13 位的氨基酸为重复序列可变的氨基酸残基 (repeat variable diresidues, RVD)^[47-49]。TALE 能识别不同的氨基酸,是由不同的 RVD 决定的,NI 识别腺嘌呤,NH 识别鸟嘌呤,HD 识别胞嘧啶,NN 识别腺嘌呤或者鸟嘌呤,NG 识别胸腺嘧啶,NS 对 4 种碱基都可以识别^[47]。*Fok I* 核酸酶与 TALE 的 C 端相连。在 TALEN 的实际应用中,与 ZFN 相似,要设计 1 对 TALEN,在靶标序列的两侧相隔 14~20 bp 处结合 TALE,使 *Fok I* 核酸酶拥有一定的间隔区空间,同时距离又不会太远,足以发挥核酸酶的作用^[50]。

3.2 TALEN 的局限性及其改进

早期,TALE 蛋白的识别位点必须以“T”胸腺嘧啶开始,金门分子克隆技术 (golden gate molecular cloning techniques) 解决了这个问题。金门分子克隆技术是一种不需要连接,可以高通量固态组装的技术^[51-53]。现在,已经建立 TALEN 文库,该文库可以靶向 18 740 个人类的编码蛋白质的基因^[54,55]。人们只需从文库中选取靶向目的片段的 TALEN 编码基因,也可以任意搭配,组装出想要的 TALEN 蛋白。另外,已有商业化的 TALEN 文库可供选择。

还有很多构建 TALEN 的方法,以及由 TALEN 衍生出的其他基因工程工具^[55]。与 ZFN 切口酶构建相似,TALEN 也可以将 *Fok I* 核酸酶换成其他功能的酶或者保真度更高的酶,降低由于脱靶效应造成的细胞毒性,也可以是转录因子^[56,57]或位点特异性重组酶^[58]等。在 TALE 上可连接重组酶或者位点特异性转座酶,这些酶可以自动完成对基因组的

切割和连接。并能作用于任何细胞,使TALEN技术在没有NHEJ和HDR修复通路的细胞中也能产生作用,扩大了TALEN的使用范围。但是,这些酶脱靶效应也较明显^[59-60]。TALE-TF(transcription activator-like effector-transcriptional factor)是由TALEN改造衍生而来的一种基因工程工具。它可将特异性识别结合区域TALE与转录激活因子结合,转入细胞后,TALE可结合到要调控的目的基因的启动子附近,与其相连的转录激活因子可以与启动子还有聚合酶相互作用,激活目的基因的转录,从而达到上调基因表达的功能^[61-62]。

3.3 TALEN的应用

TALEN自发现至今仅有5年时间,但已被广泛运用于各种生物的基因组编辑,包括病毒、酵母、鸡、小鼠、大鼠、斑马鱼和大米等,并且实现了基因组的定点突变。

3.3.1 TALEN在育种中的应用 在工农业生产中,结合基因工程来改善或改变所需物种的特性,使其更利于增产并获得品质更高的产物。Ye等利用TALEN技术,靶向酿酒酵母的乙醇脱氢酶基因(alcohol dehydrogenase gene)和潮霉素抗性基因(hygromycin-resistant gene),通过qPCR和测序,证明17 bp长的靶基因的基因敲除靶向率达到了80%,实验提高了酿酒酵母中目标基因的效率 and 特异性,从而通过代谢工程促进酿酒酵母对生物乙醇的生产,获得高产的酿酒酵母^[63]。

3.3.2 TALEN在基因功能研究中的应用 TALEN的脱靶效率较低,在多种基因的研究中有广泛的运用。为研究原癌基因,Hu等利用TALEN在人类HPV阳性细胞系中敲除E6和E7蛋白的原癌基因,有效抑制细胞快速增长和癌变的趋势,且使p53基因和RB基因得到功能修复^[64]。Yang等也利用TALEN系统,以斑马鱼为模型,研究细胞内Foxl2基因的作用。Foxl2基因是哺乳动物维持卵巢功能的必需基因,通过TALEN技术分别获得foxl2a基因突变(foxl2a-/-)和foxl2b基因突变(foxl2b-/-)的纯合子斑马鱼。发现这两种基因敲除个体卵巢的初始发育均为正常,但是当生长到一定阶段,会出现卵巢早衰和部分性逆转。并发现foxl2a和foxl2b基因是共同协作来调节卵巢的发育和维持,且与foxl2a相比,foxl2b在防止卵巢分化为睾丸方面起主导作用^[65]。Chen等运用反向遗传学得到瘦素受体敲除的肥胖SD大鼠。利用定点突变Sprague Dawley(SD)大鼠的瘦素受体,将编码一对TALEN的

mRNA直接注射到SD大鼠的受精卵中,用于研究瘦素受体的突变对大鼠的影响^[66]。Taylor等使用TALEN技术敲除鸡生殖细胞(primordial germ cells)的DDX4(vasa)基因,发现DDX4基因敲除的细胞,最初能形成生殖细胞,但在卵巢发育过程的减数分裂中丢失,导致成年雌性不育^[67]。

3.3.3 TALEN在医学中的应用 为研究母系遗传疾病,Bacman等将TALEN技术应用于线粒体基因的编辑。通过敲除多种源于患者线粒体的缺陷DNA,为治疗母系遗传的线粒体疾病提供治疗的方向^[68]。Shi等在HIV疾病方面,设计了28种针对CCR5基因的TALE,这些区域对HIV-1病毒进入人体细胞十分重要。结果表明,CCR5-talens是具有高度功能性的核酸酶,可以对人类CCR5进行特异性编辑,可用于CD4 T细胞和CD34造血干细胞(HSCs)的改造,促使免疫系统抵抗HIV-1感染^[69]。Wang等同样也利用TALEN系统研究HIV疾病,设计可以靶向CD4 T细胞的TRIM5alpha基因的TALEN分子,使40%的TRIM5alpha的基因发生突变。结果表明,rhTRIM5alpha的突变增加了HIV-1感染的可能性^[70]。

4 CRISPR/Cas核酸酶技术

1987年在大肠杆菌中发现29个核苷酸长度的重复序列中间被32个核苷酸长度的非重复序列间隔^[71]。在此后15年里,人们不断在其他的古生菌和细菌中发现类似的重复序列。2002年,Jansen等将这种微生物基因组中发现的重复序列正式命名为CRISPR(clustered regularly interspaced short palindromic repeats)^[72]。2012年Jinek等证实,将分开作用的crRNA和tracrRNA通过一段接头连接在一起,形成一条单一指导RNA(single-guide RNA, sgRNA),这种RNA仍然能高效地介导Cas9蛋白对DNA的定点切割,从而将CRISPR/Cas系统简化为Cas9/sgRNA系统^[73]。

4.1 CRISPR/Cas核酸酶技术的结构及作用机制

CRISPR/Cas是一种RNA-蛋白质的复合物,可用于基因编辑。现在的研究表明,至少有11种不同的CRISPR/Cas系统存在,可以被划分为3种主要的类型^[74]。其中I型和III型的Cas核酸酶都是多亚基的蛋白质与Cr-RNA结合促进靶向识别或者摧毁目的序列^[75]。相比前两者,II型系统中的Cas核酸酶是单亚基^[76-77],更容易构建,目前对II型系统的研究相对较多,并经过人工改造构建成一种相对

序列^[91],使 Cas 蛋白能够识别更多的 PAM 序列^[92-93]或者减弱 PAM 序列对 Cas9 蛋白结合靶位点的限制,则能拓宽 CRISPR/Cas 系统应用的范围。

4.2.2 嵌合体现象 CRISPR/Cas 系统同时也具有嵌合体现象。嵌合体是指在对多细胞生物的受精卵进行基因编辑时,由于受精卵的不断分裂,形成卵裂球。不同的卵裂球由于编辑能力不同或者基因修复的保真度不同,所产生的细胞不完全一样或者有的细胞未被编辑,从而产生嵌合体的现象。

4.2.3 CRISPR/Cas 系统的脱靶现象及其改造

CRISPR/Cas 是依赖 sgRNA 来识别和靶向目的序列。由于基因组庞大,sgRNA 也会产生突变,从而非特异性地与非目的位点进行局部匹配,导致脱靶现象的出现。为了缓解 CRISPR/Cas 系统的脱靶现象,科学家们对 CRISPR/Cas 系统进行了很多改进。例如:使 Cas 蛋白的 HNH 结构域保持活性,而使 RuvC 结构域失活,只能断裂与 gRNA 配对的 DNA 单链。设计 1 对从 DNA 两条链上互补的 gRNA,分别造成各自配对单链的断裂,从而形成错开的双链断裂^[94-95]。也可使 Cas 蛋白完全失活,连接与 ZFN 还有 TALEN 相同的 Fok I 核酸内切酶^[96]。Fu 等发现,17 和 18 个核苷酸长度的 tru-gRNA (truncated guide RNAs) 和 20 nt 的 gRNA 的基因编辑效率几乎相同,但是在某些脱靶位点的突变率降低了 5 000 倍左右^[97]。Ran 等将 Cas9 蛋白突变转化为切口酶,使突变的 Cas9 蛋白只能切割单链,研究证明,这种方法可降低 50 到 1 500 倍的脱靶率,同时不影响打靶效率^[98]。2016 年, Pawluk 等发现 CRISPR/Cas9 的“活性开关”蛋白质,这些抗 CRISPR 的蛋白质具有阻断 Cas9 切割 DNA 的能力^[99]。最早发现来自于 *Listeria monocytogenes* 前噬菌体的基因 *AcrIIA* 等能抑制 SpyCas9 的活性。2017 年,黄志伟教授在 Nature 发表论文揭示该分子作用机制^[100],帮助科学家减少基因编辑的脱靶效率。

4.3 CRISPR 相关系统

Cas9 蛋白的应用受到了一定的限制。人们发现某些具有较好科研和应用前景的类似的蛋白质。腺相关病毒载体 (Adeno-associated virus, AAV) 因免疫原性低而常被用于基因的体内导入。但 AAV 只能容纳约 4.5 kb,这对使用 Cas9 导入产生了限制。人们在细菌 *Streptococcus thermophiles* 和 *Staphylococcus aureus* 里发现 2 个较小的 Cas9 直系同源蛋白 St1Cas9^[101] 和 SaCas9^[102],并可以很容易地被包装入腺相关病毒中,使 CRISPR 能在体内工

作,而不是简单地在体外。Zetsche 等人发现的 Cpf1 蛋白^[103]与 Cas9 相比具有更多优势。Cas9 蛋白剪切 DNA 需要 2 个 sgRNA 分子,而 Cpf1 只需要 1 个。Cas9 剪切 DNA 分子的双链形成的是平末端,而 Cpf1 剪切后形成的是黏性末端,平末端通常不如粘性末端容易处理^[104]。Cpf1 剪切位点相聚识别位点远^[104],使人们对编辑位置有了更多的选择。Nishida 等将一种无核酸酶活性 Cas9,或仅产生单链切口的 Cas9 与来自 sea lamprey 免疫系统的胞苷脱氨酶 (activation-induced cytidine deaminase) 融合在一起,可特异性地进行单个碱基的突变^[105]。2013 年, Gilbert 等在 CRISPR 技术基础上改造获得 CRISPR 干扰 (CRISPR interference, CRISPRi) 技术,通过突变 Cas9 上的 2 个活性位点 (dCas9),使其不能切割双链的 DNA,且引入转录抑制因子,与其相连的 sgRNA 识别目的基因后抑制该基因的表达^[85,106]。与 CRISPRi 技术相似,CRISPR 激活 (CRISPR activation, CRISPRa) 将转录抑制因子换成转录激活因子,可以对靶向的目的基因进行转录激活^[85,106]。

4.4 CRISPR/Cas 核酸酶技术的应用

4.4.1 CRISPR/Cas 核酸酶技术在医学研究中的应用 CRISPR/Cas 作为高效的基因编辑工具,在医学研究方面的应用颇为广泛,为多种疾病的治疗提供新的参考。在 HIV 治疗方面,Putatunda 等人利用 CRISPR/Cas9 系统建立 3 种不同的动物模型,包括人源化的小鼠模型和感染病毒的小鼠模型等,成功敲除了感染小鼠基因组中的 *HIV-1* 基因,同时避免 HIV-1 逃逸^[107]。这项研究为该领域提供永久性治疗 HIV 的新思路。在遗传疾病方面,Hong 等人利用 CRISPR/Cas9 系统敲除亨丁顿舞蹈病小鼠模型的 *mHTT* 基因,发现小鼠的运动能力得到改善,但仍未恢复到正常状态,为治疗舞蹈病打开新的途径^[108]。在癌症治疗方面,Manguso 等人利用 CRISPR/Cas 系统在小鼠模型中分别测试不同的致癌基因,从而改进 PD-1 癌症免疫疗法^[109]。在血液疾病方面,Wienert 和 Martyn 等通过 CRISPR/Cas 系统,在血细胞中引入可以生成胎儿血红蛋白的基因,为治疗镰刀型贫血症和其他血液疾病提供治疗的可能性^[110]。在眼部疾病方面,Kemaladewi 等利用 CRISPR 在小鼠体内进行试验,并且成功地治疗先天性肌营养不良 1A 型 (congenital muscular dystrophy type 1A) 罕见的疾病,帮助恢复肌肉的功能^[111]。

4.4.2 CRISPR/Cas 核酸酶技术在基因结构与功能研究中的应用 CRISPR/Cas 技术也为基因的结构与功能研究提供了新的研究方法。2016 年, Huang 等发现了新的 CRISPR 效应酶 C2c2, 这种酶在 gRNA 的引导下能结合并切割单链 RNA 的靶位点^[112]。研究证明, 这种技术可以降解 *E. coli* 中一种特定的 mRNA, 另外发现, 与 C2c2 垂直同源基因中的大约有 16 种, 可用于活细胞中追踪 RNA。2017 年, Peiwu 等对 CRISPR/Cas 基因编辑工具进行改造, 用于追踪活细胞的基因表达, 首先用荧光蛋白对特定的基因组进行标记, 然后利用 CRISPR 对染色体成像, 可以通过长时间观察染色体中基因的变化, 并且能根据需要开启或者关闭目的基因的表达^[113]。这项技术克服了基因成像技术的限制。李劲松研究组同样也通过改造 CRISPR/Cas 系统, 开发一种基于嵌合体的可用于快速分析致死基因, 并在不同细胞中发挥不同功能的新方法^[114]。研究者利用能够产生基因编辑和抑制 CRISPR-Cas9 的工具箱, 开展高通量单细胞 RNA 测序, 并把这种新技术

命名为 Perturb-seq^[115-117]。

5 问题与展望

ZFN、TALEN 和 CRISPR/Cas 都是重要的基因编辑工具, 均可以通过靶向目的基因, 从而高效特异地改造基因组的序列, 在生命科学、医学和农业育种等多个方面都有成功的应用。而 3 种基因编辑技术各有优缺点, 具体如 Table 1 所示。TALEN 可能比 ZFN 和 CRISPR/Cas9 具有更小的细胞毒性。而 TALEN 的 DNA 结合区域对 DNA 的耐受程度比 ZFN 小很多^[118], 并且 TALEN 可以识别 30 ~ 36 bp 的 DNA 序列, 降低了错误识别靶向的可能性^[119]。由 PubMed 数据库的发文量显示, 基于 CRISPR/Cas 技术的发文量远多于 ZFN 和 TALEN 的文章, CRISPR/Cas9 已经成为体外基因组编辑最常用的系统。近年来, MIT 张峰教授团队及其多位科学家不断对 CRISPR/Cas 技术进行改进和升级, 可以预见 CRISPR/Cas 系统将在技术和运用等方面获得更广阔的发展。

Table 1 Comparison of three genome editing tools

	ZFN	TALEN	CRISPR/Cas9
Advantages	Efficient and specific	Efficient and specific Can target any DNA sequence	More efficient and specific Easy to assemble Multiple loci can be edited simultaneously
Disadvantages	Have context-dependent effect ^[38, 39] and the off-target effect ^[54] Expensive to construct	Construct the delivery plasmid for target site, TALEN is 3-4 times longer than ZFNs ^[14, 77] Time consuming and difficult to construct Homologous recombination is prone to occur, because there is lots of duplicated fragments ^[14, 77]	Sequence-recognizing limitation from PAM Low precision repair Unavoidable mosaicism Have the off-target effect

参考文献(References)

- [1] Lieber MR. The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway[J]. *Annu Rev Biochem*, 2010, **79**: 181-211
- [2] Chiruvella KK, Liang Z, Wilson TE. Repair of double-strand breaks by end joining[J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2013, **5**(5): a012757
- [3] Brooks PJ. DNA repair in neural cells: basic science and clinical implications[J]. *Mutat Res*, 2002, **509**(1-2): 93-108
- [4] Pellagatti A, Dolatshad H, Yip BH, et al. Application of genome editing technologies to the study and treatment of hematological disease[J]. *Adv Biol Regul*, 2016, **60**: 122-134
- [5] Heidenreich E, Novotny R, Kneidinger B, et al. Non-homologous end joining as an important mutagenic process in cell cycle-arrested cells[J]. *EMBO J*, 2003, **22**(9): 2274-2283
- [6] Lieber MR. NHEJ and its backup pathways in chromosomal translocations[J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2010, **17**(4): 393-395
- [7] Mani M, Kandavelou K, Dy FJ, et al. Design, engineering, and characterization of zinc finger nucleases[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, **335**(2): 447-457
- [8] Carroll D. Genome engineering with zinc-finger nucleases[J]. *Genetics*, 2011, **188**(4): 773-782
- [9] Kim YG, Cha J, Chandrasegaran S. Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to *Fok I* cleavage domain[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996, **93**(3): 1156-1160
- [10] Bhakta MS, Henry IM, Ousterout DG, et al. Highly active zinc-finger nucleases by extended modular assembly[J]. *Genome Res*, 2013, **23**(3): 530-538
- [11] Beerli RR, Barbas CF, 3rd. Engineering polydactyl zinc-finger transcription factors[J]. *Nat Biotechnol*, 2002, **20**(2): 135-141
- [12] Palpant NJ, Dudzinski D. Zinc finger nucleases: looking toward translation[J]. *Gene Ther*, 2013, **20**(2): 121-127
- [13] Miller JC, Holmes MC, Wang J, et al. An improved zinc-finger nuclease architecture for highly specific genome editing[J]. *Nat Biotechnol*, 2007, **25**(7): 778-785
- [14] Doyon Y, Vo TD, Mendel MC, et al. Enhancing zinc-finger-nuclease activity with improved obligate heterodimeric architectures[J]. *Nat Methods*, 2011, **8**(1): 74-79
- [15] Szczepek M, Brondani V, Buchel J, et al. Structure-based redesign of the dimerization interface reduces the toxicity of zinc-finger nucleases[J]. *Nat Biotechnol*, 2007, **25**(7): 786-793

- [16] Ramirez CL, Foley JE, Wright DA, *et al.* Unexpected failure rates for modular assembly of engineered zinc fingers [J]. *Nat Methods*, 2008, **5**(5): 374-375
- [17] Lam KN, van Bakel H, Cote AG, *et al.* Sequence specificity is obtained from the majority of modular C2H2 zinc-finger arrays [J]. *Nucleic Acids Res*, 2011, **39**(11): 4680-4690
- [18] Ul Ain Q, Chung JY, Kim YH. Current and future delivery systems for engineered nucleases: ZFN, TALEN and RGEN [J]. *J Control Release*, 2015, **205**: 120-127
- [19] Prueitt-Miller SM, Connelly JP, Maeder ML, *et al.* Comparison of zinc finger nucleases for use in gene targeting in mammalian cells [J]. *Mol Ther*, 2008, **16**(4): 707-717
- [20] Segal DJ, Beerli RR, Blancafort P, *et al.* Evaluation of a modular strategy for the construction of novel polydactyl zinc finger DNA-binding proteins [J]. *Biochemistry*, 2003, **42**(7): 2137-2148
- [21] Zhu C, Smith T, McNulty J, *et al.* Evaluation and application of modularly assembled zinc-finger nucleases in zebrafish [J]. *Development*, 2011, **138**(20): 4555-4564
- [22] Kamihara T, Murakami M, Noda Y, *et al.* COMPOZER-based longitudinal cross-polarization via dipolar coupling under MAS [J]. *J Magn Reson*, 2014, **245**: 94-97
- [23] Maeder ML, Thibodeau-Beganny S, Sander JD, *et al.* Oligomerized pool engineering (OPEN): an 'open-source' protocol for making customized zinc-finger arrays [J]. *Nat Protoc*, 2009, **4**(10): 1471-1501
- [24] Maeder ML, Thibodeau-Beganny S, Osiak A, *et al.* Rapid "open-source" engineering of customized zinc-finger nucleases for highly efficient gene modification [J]. *Mol Cell*, 2008, **31**(2): 294-301
- [25] Kim JS, Lee HJ, Carroll D. Genome editing with modularly assembled zinc-finger nucleases [J]. *Nat Methods*, 2010, **7**(2): 91; author reply 91-92
- [26] Kim E, Kim S, Kim DH, *et al.* Precision genome engineering with programmable DNA-nicking enzymes [J]. *Genome Res*, 2012, **22**(7): 1327-1333
- [27] Ramirez CL, Certo MT, Mussolino C, *et al.* Engineered zinc finger nickases induce homology-directed repair with reduced mutagenic effects [J]. *Nucleic Acids Res*, 2012, **40**(12): 5560-5568
- [28] Doyon Y, Choi VM, Xia DF, *et al.* Transient cold shock enhances zinc-finger nuclease-mediated gene disruption [J]. *Nat Methods*, 2010, **7**(6): 459-460
- [29] Certo MT, Gwiazda KS, Kuhar R, *et al.* Coupling endonucleases with DNA end-processing enzymes to drive gene disruption [J]. *Nat Methods*, 2012, **9**(10): 973-975
- [30] Gaj T, Guo J, Kato Y, *et al.* Targeted gene knockout by direct delivery of zinc-finger nuclease proteins [J]. *Nat Methods*, 2012, **9**(8): 805-807
- [31] Osborn MJ, Belanto JJ, Tolar J, *et al.* Gene editing and its application for hematological diseases [J]. *Int J Hematol*, 2016, **104**(1): 18-28
- [32] Nishio M, Matsumoto D, Kato Y, *et al.* DNA aptamers against *FokI* nuclease domain for genome editing applications [J]. *Biosens Bioelectron*, 2017, **93**: 26-31
- [33] Geurts AM, Cost GJ, Freyvert Y, *et al.* Knockout rats via embryo microinjection of zinc-finger nucleases [J]. *Science*, 2009, **325**(5939): 433
- [34] Whyte JJ, Zhao J, Wells KD, *et al.* Gene targeting with zinc finger nucleases to produce cloned eGFP knock-out pigs [J]. *Mol Reprod Dev*, 2011, **78**(1): 2
- [35] Shahbazi Dastjerdeh M, Kouhpayeh S, Sabzehei F, *et al.* Zinc Finger Nuclease: A New Approach to Overcome Beta-Lactam Antibiotic Resistance [J]. *Jundishapur J Microbiol*, 2016, **9**(1): e29384
- [36] Li H, Haurigot V, Doyon Y, *et al.* In vivo genome editing restores haemostasis in a mouse model of haemophilia [J]. *Nature*, 2011, **475**(7355): 217-221
- [37] Hoher T, Wallace L, Khan K, *et al.* Highly efficient zinc-finger nuclease-mediated disruption of an eGFP transgene in keratinocyte stem cells without impairment of stem cell properties [J]. *Stem Cell Rev*, 2012, **8**(2): 426-434
- [38] De Silva Felixge HS, Stone D, Pietz HL, *et al.* Detection of treatment-resistant infectious HIV after genome-directed antiviral endonuclease therapy [J]. *Antiviral Res*, 2016, **126**: 90-98
- [39] Bai J, Choi SH, Ponciano G, *et al.* Xanthomonas oryzae pv. oryzae avirulence genes contribute differently and specifically to pathogen aggressiveness [J]. *Mol Plant Microbe Interact*, 2000, **13**(12): 1322-1329
- [40] Kay S, Hahn S, Marois E, *et al.* A bacterial effector acts as a plant transcription factor and induces a cell size regulator [J]. *Science*, 2007, **318**(5850): 648-651
- [41] Sugio A, Yang B, Zhu T, *et al.* Two type III effector genes of Xanthomonas oryzae pv. oryzae control the induction of the host genes OsTFIIA γ and OsTFX1 during bacterial blight of rice [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, **104**(25): 10720-10725
- [42] Boch J, Scholze H, Schornack S, *et al.* Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors [J]. *Science*, 2009, **326**(5959): 1509-1512
- [43] Moscou MJ, Bogdanove AJ. A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors [J]. *Science*, 2009, **326**(5959): 1501
- [44] Bedell VM, Wang Y, Campbell JM, *et al.* In vivo genome editing using a high-efficiency TALEN system [J]. *Nature*, 2012, **491**(7422): 114-118
- [45] Tan WS, Carlson DF, Walton MW, *et al.* Precision editing of large animal genomes [J]. *Adv Genet*, 2012, **80**: 37-97
- [46] Joung JK, Sander JD. TALENs: a widely applicable technology for targeted genome editing [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2013, **14**(1): 49-55
- [47] Deng D, Yan C, Pan X, *et al.* Structural basis for sequence-specific recognition of DNA by TAL effectors [J]. *Science*, 2012, **335**(6069): 720-723
- [48] Osborn MJ, Starker CG, McElroy AN, *et al.* TALEN-based gene correction for epidermolysis bullosa [J]. *Mol Ther*, 2013, **21**(6): 1151-1159
- [49] Mak AN, Bradley P, Cernadas RA, *et al.* The crystal structure of TAL effector PthXol bound to its DNA target [J]. *Science*, 2012, **335**(6069): 716-719
- [50] Lee HB, Sundberg BN, Sigafos AN, *et al.* Genome Engineering with TALE and CRISPR Systems in Neuroscience [J]. *Front Genet*, 2016, **7**: 47
- [51] Engler C, Gruetzner R, Kandzia R, *et al.* Golden gate shuffling: a one-pot DNA shuffling method based on type IIs restriction enzymes [J]. *PLoS One*, 2009, **4**(5): e5553
- [52] Agmon N, Mitchell LA, Cai Y, *et al.* Yeast Golden Gate (yGG) for the Efficient Assembly of *S. cerevisiae* Transcription Units [J]. *ACS Synth Biol*, 2015, **4**(7): 853-859
- [53] Marillonnet S, Werner S. Assembly of Multigene Constructs Using Golden Gate Cloning [J]. *Methods Mol Biol*, 2015, **1321**: 269-284
- [54] Kim Y, Kweon J, Kim A, *et al.* A library of TAL effector nucleases spanning the human genome [J]. *Nat Biotechnol*, 2013, **31**(3): 251-258
- [55] Gaj T, Gersbach CA, Barbas CF, 3rd. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering [J]. *Trends Biotechnol*, 2013, **31**(7): 397-405
- [56] Miller JC, Tan S, Qiao G, *et al.* A TALE nuclease architecture for efficient genome editing [J]. *Nat Biotechnol*, 2011, **29**(2): 143-148
- [57] Zhang F, Cong L, Lodato S, *et al.* Efficient construction of sequence-specific TAL effectors for modulating mammalian transcription [J]. *Nat Biotechnol*, 2011, **29**(2): 149-153
- [58] Mercer AC, Gaj T, Fuller RP, *et al.* Chimeric TALE recombinases with programmable DNA sequence specificity [J]. *Nucleic Acids Res*, 2012, **40**(21): 11163-11172
- [59] Gaj T, Mercer AC, Sirk SJ, *et al.* A comprehensive approach to zinc-finger recombinase customization enables genomic targeting

- in human cells [J]. *Nucleic Acids Res*, 2013, **41**(6): 3937-3946
- [60] Owens JB, Urschitz J, Stoytchev I, *et al.* Chimeric piggyBac transposases for genomic targeting in human cells [J]. *Nucleic Acids Res*, 2012, **40**(14): 6978-6991
- [61] Cong L, Ran FA, Cox D, *et al.* Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems [J]. *Science*, 2013, **339**(6121): 819-823
- [62] Fonfara I, Le Rhun A, Chylinski K, *et al.* Phylogeny of Cas9 determines functional exchangeability of dual-RNA and Cas9 among orthologous type II CRISPR-Cas systems [J]. *Nucleic Acids Res*, 2014, **42**(4): 2577-2590
- [63] Ye W, Zhang W, Liu T, *et al.* Improvement of Ethanol Production in *Saccharomyces cerevisiae* by High-Efficient Disruption of the ADH2 Gene Using a Novel Recombinant TALEN Vector [J]. *Front Microbiol*, 2016, **7**: 1067
- [64] Hu Z, Ding W, Zhu D, *et al.* TALEN-mediated targeting of HPV oncogenes ameliorates HPV-related cervical malignancy [J]. *J Clin Invest*, 2015, **125**(1): 425-436
- [65] Yang YJ, Wang Y, Li Z, *et al.* Sequential, Divergent, and cooperative requirements of Foxl2a and Foxl2b in ovary development and maintenance of zebrafish [J]. *Genetics*, 2017, **205**(4): 1551-1572
- [66] Chen Y, Lu W, Gao N, *et al.* Generation of obese rat model by transcription activator-like effector nucleases targeting the leptin receptor gene [J]. *Sci China Life Sci*, 2017, **60**(2): 152-157
- [67] Taylor L, Carlson DF, Nandi S, *et al.* Efficient TALEN-mediated gene targeting of chicken primordial germ cells [J]. *Development*, 2017, **144**(5): 928-934
- [68] Bacman SR, Williams SL, Pinto M, *et al.* Specific elimination of mutant mitochondrial genomes in patient-derived cells by mitoTALENs [J]. *Nat Med*, 2013, **19**(9): 1111-1113
- [69] Shi B, Li J, Shi X, *et al.* TALEN-mediated knockout of CCR5 confers protection against infection of human immunodeficiency virus [J]. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 2017, **74**(2): 229-241
- [70] Wang X, Yu Q, Yuan Y, *et al.* Targeting the rhesus macaque TRIM5alpha gene to enhance the susceptibility of CD4+ T cells to HIV-1 infection [J]. *Arch Virol*, 2017, **162**(3): 793-798
- [71] 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]. *J Bacteriol*, 1987, **169**(12): 5429-5433
- [72] Jansen R, Embden JD, Gaastra W, *et al.* Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes [J]. *Mol Microbiol*, 2002, **43**(6): 1565-1575
- [73] Gasiunas G, Barrangou R, Horvath P, *et al.* Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012, **109**(39): E2579-2586
- [74] Makarova KS, Haft DH, Barrangou R, *et al.* Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2011, **9**(6): 467-477
- [75] Li Y, Pan S, Zhang Y, *et al.* Harnessing Type I and Type III CRISPR-Cas systems for genome editing [J]. *Nucleic Acids Res*, 2016, **44**(4): e34
- [76] Fernandes H, Pastor M, Bochtler M. Type II and type V CRISPR effector nucleases from a structural biologist's perspective [J]. *Postepy Biochem*, 2016, **62**(3): 315-326
- [77] Lier C, Baticle E, Horvath P, *et al.* Analysis of the type II-A CRISPR-Cas system of *Streptococcus agalactiae* reveals distinctive features according to genetic lineages [J]. *Front Genet*, 2015, **6**: 214
- [78] Makarova KS, Grishin NV, Shabalina SA, *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 [J]. *Biol Direct*, 2006, **1**: 7
- [79] Sorek R, Kunin V, Hugenholtz P. CRISPR—a widespread system that provides acquired resistance against phages in bacteria and archaea [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2008, **6**(3): 181-186
- [80] Hsu PD, Lander ES, Zhang F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering [J]. *Cell*, 2014, **157**(6): 1262-1278
- [81] Friedland AE, Tzur YB, Esvelt KM, *et al.* Heritable genome editing in *C. elegans* via a CRISPR-Cas9 system [J]. *Nat Methods*, 2013, **10**(8): 741-743
- [82] Cencic R, Miura H, Malina A, *et al.* Protospacer adjacent motif (PAM)-distal sequences engage CRISPR Cas9 DNA target cleavage [J]. *PLoS One*, 2014, **9**(10): e109213
- [83] Hirano S, Nishimasu H, Ishitani R, *et al.* Structural basis for the altered PAM specificities of engineered CRISPR-Cas9 [J]. *Mol Cell*, 2016, **61**(6): 886-894
- [84] Sternberg SH, Redding S, Jinek M, *et al.* DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9 [J]. *Nature*, 2014, **507**(7490): 62-67
- [85] 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
- [86] Grainger S, Lonquich B, Oon CH, *et al.* CRISPR guide RNA validation in vitro [J]. *Zebrafish*, 2016, **14**(4): 383-386
- [87] Nowak CM, Lawson S, Zerez M, *et al.* Guide RNA engineering for versatile Cas9 functionality [J]. *Nucleic Acids Res*, 2016, **44**(20): 9555-9564
- [88] Hsu PD, Scott DA, Weinstein JA, *et al.* DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases [J]. *Nat Biotechnol*, 2013, **31**(9): 827-832
- [89] Pattanayak V, Lin S, Guilinger JP, *et al.* High-throughput profiling of off-target DNA cleavage reveals RNA-programmed Cas9 nuclease specificity [J]. *Nat Biotechnol*, 2013, **31**(9): 839-843
- [90] Fu Y, Foden JA, Khayter C, *et al.* High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells [J]. *Nat Biotechnol*, 2013, **31**(9): 822-826
- [91] Esvelt KM, Mali P, Braff JL, *et al.* Orthogonal Cas9 proteins for RNA-guided gene regulation and editing [J]. *Nat Methods*, 2013, **10**(11): 1116-1121
- [92] Nishimasu H, Ran FA, Hsu PD, *et al.* Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA [J]. *Cell*, 2014, **156**(5): 935-949
- [93] Kleinstiver BP, Pattanayak V, Prew MS, *et al.* High-fidelity CRISPR-Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects [J]. *Nature*, 2016, **529**(7587): 490-495
- [94] Shen B, Zhang W, Zhang J, *et al.* Efficient genome modification by CRISPR-Cas9 nickase with minimal off-target effects [J]. *Nat Methods*, 2014, **11**(4): 399-402
- [95] Xiao Z, Hiramatsu H, Ueda S, *et al.* Narrow bandgap in beta-BaZn(2)As(2) and its chemical origins [J]. *J Am Chem Soc*, 2014, **136**(42): 14959-14965
- [96] Guilinger JP, Thompson DB, Liu DR. Fusion of catalytically inactive Cas9 to *FokI* nuclease improves the specificity of genome modification [J]. *Nat Biotechnol*, 2014, **32**(6): 577-582
- [97] Fu Y, Sander JD, Reyon D, *et al.* Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs [J]. *Nat Biotechnol*, 2014, **32**(3): 279-284
- [98] Ran FA, Hsu PD, Lin CY, *et al.* Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity [J]. *Cell*, 2013, **154**(6): 1380-1389
- [99] Pawluk A, Amrani N, Zhang Y, *et al.* Naturally occurring off-Switches for CRISPR-Cas9 [J]. *Cell*, 2016, **167**(7): 1829-1838 e1829
- [100] Dong, Guo M, Wang S, *et al.* Structural basis of CRISPR-SpyCas9 inhibition by an anti-CRISPR protein [J]. *Nature*, 2017, **546**(7658): 436-439
- [101] Glenzaite M, Balciunaite E, Karvelis T, *et al.* Targeted gene editing by transfection of in vitro reconstituted *Streptococcus thermophilus* Cas9 nuclease complex [J]. *RNA Biol*, 2015, **12**(1): 1-4

- [102] Ran FA , Cong L , Yan WX , *et al.* In vivo genome editing using *Staphylococcus aureus* Cas9 [J]. *Nature* , 2015 , **520** (7546) : 186-191
- [103] Zetsche B , Gootenberg JS , Abudayyeh OO , *et al.* Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system [J]. *Cell* , 2015 , **163** (3) : 759-771
- [104] 杨帆 李寅 ,等. 新一代基因组编辑系统 CRISPR/Cpf1 [J]. 中国生物化学与分子生物学报(Yang Fan , Li Yin , *et al.* The new generation tool for CRISPR genome editing: CRISPR/Cpf1 [J]. *Chin J Biochem Mol Biol*) , 2017 , **33** (3) : 361-371
- [105] Nishida K , Arazoe T , Yachie N , *et al.* Targeted nucleotide editing using hybrid prokaryotic and vertebrate adaptive immune systems [J]. *Science* , 2016 , **353** (6305) . pii: aaf8729
- [106] 刘海玲 王旭俊 李旦 ,等. CRISPR/Cas9 高通量筛选技术与肿瘤治疗 [J]. 中国生物化学与分子生物学报(Liu Hai-Ling , Wang Xu-Jun , Li Dan , *et al.* Application of CRISPR/Cas9 high-throughput screening technology for identifying new target in tumor therapy [J]. *Chin J Biochem Mol Biol*) , 2016 , **32** (2) : 133-139
- [107] Yin C , Zhang T , Qu X , *et al.* In vivo excision of HIV-1 provirus by saCas9 and multiplex single-guide RNAs in animal models [J]. *Mol Ther* , 2017 , **25** (5) : 1168-1186
- [108] Yang S , Chang R , Yang H , *et al.* CRISPR/Cas9-mediated gene editing ameliorates neurotoxicity in mouse model of Huntington's disease [J]. *J Clin Invest* , 2017 , **127** (7) : 2719-2724
- [109] Manguso RT , Pope HW , Zimmer MD , *et al.* In vivo CRISPR screening identifies Ptpn2 as a cancer immunotherapy target [J]. *Nature* , 2017 , **547** (7664) : 413-418
- [110] Wienert B , Martyn GE , Kurita R , *et al.* KLF1 drives the expression of fetal hemoglobin in British HPFH [J]. *Blood* , 2017
- [111] Kemaladewi DU , Maino E , Hyatt E , *et al.* Correction of a splicing defect in a mouse model of congenital muscular dystrophy type 1A using a homology-directed-repair-independent mechanism [J]. *Nat Med* , 2017 , **23** (8) : 984-989
- [112] Abudayyeh OO , Gootenberg JS , Konermann S , *et al.* C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector [J]. *Science* , 2016 , **353** (6299) : aaf5573
- [113] Qin P , Parlak M , Kescu C , *et al.* Live cell imaging of low- and non-repetitive chromosome loci using CRISPR-Cas9 [J]. *Nat Commun* , 2017 , **8** : 14725
- [114] Wang L , Li MY , Qu C , *et al.* CRISPR-Cas9-mediated genome editing in one blastomere of two-cell embryos reveals a novel Tet3 function in regulating neocortical development [J]. *Cell Res* , 2017 , **27** (6) : 815-829
- [115] Dixit A , Parnas O , Li B , *et al.* Perturb-Seq: dissecting molecular circuits with scalable single-cell RNA profiling of pooled genetic screens [J]. *Cell* , 2016 , **167** (7) : 1853-1866 e1817
- [116] Adamson B , Norman TM , Jost M , *et al.* A Multiplexed single-cell CRISPR screening platform enables systematic dissection of the unfolded protein response [J]. *Cell* , 2016 , **167** (7) : 1867-1882 e1821
- [117] Jaitin DA , Weiner A , Yofe I , *et al.* Dissecting immune circuits by linking CRISPR-Pooled screens with single-cell RNA-Seq [J]. *Cell* , 2016 , **167** (7) : 1883-1896 e1815
- [118] Frock RL , Hu J , Meyers RM , *et al.* Genome-wide detection of DNA double-stranded breaks induced by engineered nucleases [J]. *Nat Biotechnol* , 2015 , **33** (2) : 179-186
- [119] Merkert S , Martin U. Targeted genome engineering using designer nucleases: State of the art and practical guidance for application in human pluripotent stem cells [J]. *Stem Cell Res* , 2016 , **16** (2) : 377-386