

· 综述 ·

## CRISPR/Cas9 技术及其在药物研发中的应用

陆 娣, 李 莉, 邓贤明\*

(厦门大学生命科学学院, 天然产物源靶向药物国家地方联合工程实验室, 福建 厦门 361102)

**摘要:** CRISPR/Cas9 系统是在细菌和古细菌中发现的一种为抵御病毒和质粒的不断攻击而演化来的获得性免疫防御机制, 由规律成簇的间隔短回文重复 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR) 和 Cas (CRISPR-associated) 蛋白组成。通过改造最简单的 II 型 CRISPR 系统, 将特殊小向导 RNA (small guide RNA, sgRNA) 和 Cas9 核酸内切酶导入细胞内, 即可在双链 DNA 特定位置上进行切割并实现基因敲除或敲入。CRISPR/Cas9 系统因其高效基因编辑功能, 已被应用于多种生物和多项科研领域。本文综合论述了 CRISPR/Cas9 技术在药物研发中的应用, 如功能基因的筛选和定点编辑、药物靶点筛选和验证、动物模型构建和遗传疾病治疗等, 总结了 CRISPR/Cas9 技术目前所存在的缺陷与改善的方向。

**关键词:** CRISPR/Cas9 系统; 基因组编辑; 耐药性突变; 靶点验证; 药物研发

中图分类号: R915

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2018) 01-0011-10

## CRISPR/Cas9 and its application in drugs development

LU Di, LI Li, DENG Xian-ming\*

(State-Province Joint Engineering Laboratory of Targeted Drugs from Natural Products, School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361102, China)

**Abstract:** CRISPR/Cas9 system, consisting of clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) and CRISPR-associated (Cas) proteins, is a prokaryotic immune system that confers resistance to foreign genetic elements such as those present within plasmids and phages. A simple version of the CRISPR/Cas system, type II CRISPR, has been modified to edit genomes. By delivering the Cas9 nuclease together with a synthetic guide RNA (sgRNA) into cells, genome can be edited at desired loci site. CRISPR/Cas genome editing techniques have been widely implemented in various species and research areas. In this review, we summarize the several applications of CRISPR/Cas9 in the field of drug discovery and development, which include target gene screening and editing, drug target screening and validation, generation of animal models and treatment of genetic disease, etc. The defects and improvements of CRISPR/Cas9 technology is discussed as well.

**Key words:** CRISPR/Cas9 system; genome editing; drug-resistant mutation; target validation; drug development

近年来, 基因编辑领域取得了飞速的发展, 锌指核酸酶 (zinc finger nucleases, ZFNs)<sup>[1]</sup>、转录激

活因子样效应物核酸酶 (transcription activator-like effector nucleases, TALENs)<sup>[2,3]</sup>和 CRISPR/Cas (clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated) 系统大大改变了科研人员在哺乳动物系统中研究基因及其功能的方式。相较于 ZFN 和 TALEN 采用蛋白质作为靶标识别物, CRISPR/Cas9 采用特殊小向导 RNA (small guide RNA, sgRNA)

收稿日期: 2017-07-02; 修回日期: 2017-08-09.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81422045, 81603131).

\*通讯作者 Tel: 86-592-2184180, Fax: 86-592-2181722,

E-mail: xmdeng@xmu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2017-0644

靶向目标基因, 操作简单快捷, 成本低廉, 脱靶效应较低<sup>[4]</sup>, 已经成为基因功能研究领域强有力的武器。在新药研发过程中, 高效的靶点筛选和验证是极其关键的步骤。CRISPR/Cas9 技术的出现实现了对靶基因的定点编辑, 使得构建动物模型或细胞系模型更加便捷, 极大地加速了药物靶点的筛选验证及新药的研发。

### 1 CRISPR/Cas9 系统的发现历史和作用机制

基因编辑技术 CRISPR/Cas9 被《科学》杂志列为 2013 年年度十大科技进展之一, 被称为“魔剪”和“上帝之手”, 它的迅速崛起引发了生物医学研究的革命。CRISPR 是规律间隔性成簇短回文重复序列的简称, Cas 是 CRISPR 相关蛋白的简称<sup>[5]</sup>。早在 1987 年, 日本科学家在对 K12 大肠杆菌碱性磷酸酶基因编码区进行研究时发现附近有串联间隔重复序列<sup>[6]</sup>, 但功能尚不清楚。后来的研究发现, 这种重复序列广泛存在于细菌和古细菌中, 并于 2002 年正式命名<sup>[7]</sup>。随着测序技术和生物信息学的发展, 2005 年, 3 个研究组同时发现间隔序列和感染细菌的病毒或噬菌体基因序列高度同源<sup>[8-10]</sup>, 从而推测这一系统可能是细菌抵御病毒和质粒入侵的一种方式。2007 年, DANISCO 公司的科学家通过增加和敲除 CRISPR 位点中间的重复序列调节了嗜热链球菌 (*Streptococcus thermophilus*) 对噬菌体的敏感性<sup>[11]</sup>。2008 年, Marraffini 等<sup>[12]</sup>发现细菌 CRISPR 系统能阻止外源质粒的转移, 首次用实验验证了该系统的功能。

基于重复序列结构和 Cas 蛋白亚类, CRISPR/Cas 系统可以分为 3 类<sup>[13]</sup>: I 型、II 型和 III 型。相较 I 型和 III 型系统, II 型 CRISPR/Cas 系统 (即 CRISPR/Cas9 系统) 成分最简单, 已经被改造成为理想的基因编辑工具。2012 年, Wiedenheft 等<sup>[14]</sup>阐明了 II 型系统的机制。CRISPR/Cas9 系统包含 3 个关键性组分: CRISPR RNA (crRNA)、反式激活 crRNA (transactivating crRNA, tracrRNA) 及 Cas9 核酸内切酶。crRNA 的一部分序列可与 tracrRNA 通过碱基互补配对, 结合形成嵌合 RNA (tracrRNA/crRNA), 另一部分则可与靶标 DNA 位点进行碱基互补配对。这种嵌合 RNA 能够识别特定的 NGG 序列, 即 PAM 位点, 并引导 Cas 蛋白复合物结合到这个特定的位点上对 DNA 双链进行切割<sup>[15]</sup>。通过对 tracrRNA/crRNA 进行改造, 可以构建成一个具有引导作用的 sgRNA, 从而将 Cas9 系统进一步简化为 Cas9 核酸内切酶和 sgRNA 两个组分。

当 Cas9 对靶标 DNA 进行切割时, 会造成 DNA 双链断裂 (double strand break, DSB), 随即细胞启动 DNA 修复机制。在非同源末端连接 (non-homologous end joining, NHEJ) 修复机制下能够形成随机的多个碱基插入或缺失, 使编码蛋白的基因发生移码和错义等严重突变, 阻碍蛋白行使正常功能<sup>[16, 17]</sup>; 而在同源重组 (homologous recombination, HR) 修复机制下则可以实现精确的基因敲入遗传修饰, 如点突变、插入和表位标记等<sup>[18]</sup>。因此, 通过这两种修复机制, CRISPR/Cas9 技术即可实现基因敲除和基因敲入的基因组改造<sup>[19]</sup> (图 1)。

### 2 CRISPR/Cas9 技术的基本流程

CRISPR/Cas9 技术主要包含引物设计、sgRNA 表达质粒的构建、靶细胞转染、混合 pool 的筛选与鉴定和单克隆的分离与验证几大步骤, 大致流程如图 2。

首先需确定待敲除基因的靶位点, 找到该基因 CDS (coding sequence) 区, 明确外显子部分。一般来说, 尽量选择靠前的外显子。对于蛋白编码基因, 若该蛋白具有重要结构功能域, 可以将基因敲除位点设计在编码该结构域的外显子上。如果不能明确基因产物的性质, 可以选择将待敲除位点设计在起始密码子 (ATG) 后的外显子上。确定靶位点之后, 即可选择一段 23 ~ 250 bp 的外显子序列输入在线设计软件中, 自动输出 sgRNA 序列, 也可手动进行选择。将 sgRNA 序列克隆到 sgRNA scaffold backbone (BB) 质粒上, 与表达 Cas9 蛋白的质粒共同转染到靶细胞中, 通过单克隆分选、扩增和检测, 便可得到稳定的基因敲除或特定点突变的细胞系。

若是为了实现准确的基因敲入, 则需要将一个同源重组修复模板与 sgRNA、Cas9 蛋白同时转入细胞中以介导同源重组修复。这个同源重组修复模板可以是质粒模板 (plasmid donor template)、双链线性 DNA 模板 (double-stranded DNA template) 或单链寡核苷酸链 (single-stranded donor oligonucleotides)。同源重组修复模板的设计应遵循以下原则: 左右两端同源臂长度至少 40 bp, 以 90 bp 为最佳; 链的方向应与滞后链 (lagging strand) 结合为最好; 突变位点距切割位点越近越好, 且最好在 PAM 位置的 5' 端。以 *BTK*<sup>C481S</sup> 点突变为例, 在包含点突变的 sgRNA 序列两端各加上 90 bp 的同源臂, 得到一段 203 bp 的序列, 并在 sgRNA 序列中引入同义突变以插入一个 *Bam*HI 酶切位点, 即可通过酶切验证阳性, 如图 3 所示。

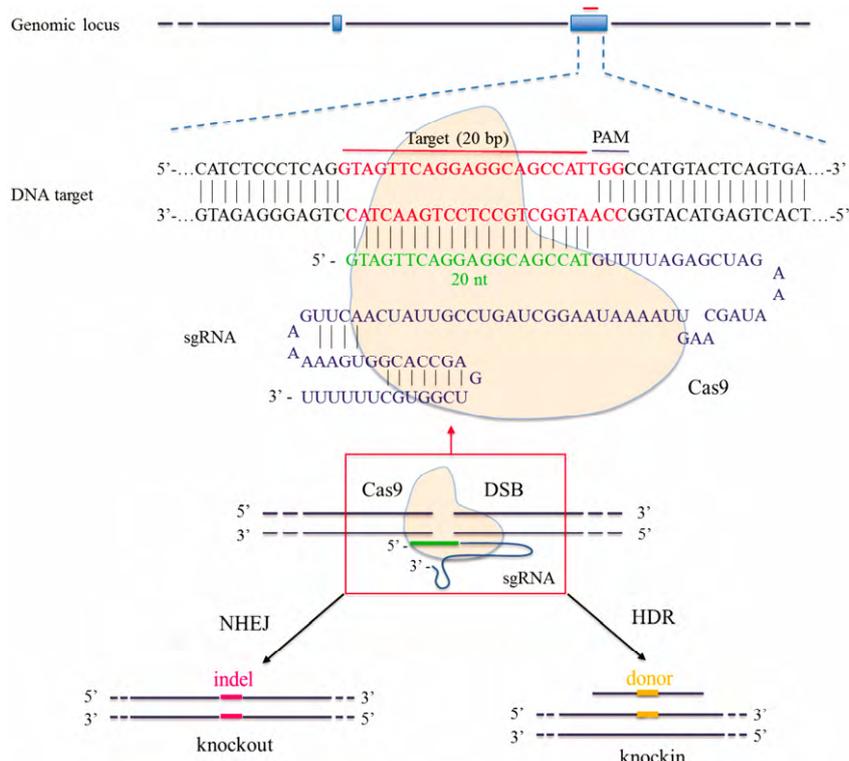


Figure 1 Schematic of the RNA-guided Cas9 nuclease and two types of double strand break (DSB)-induced repair mechanism

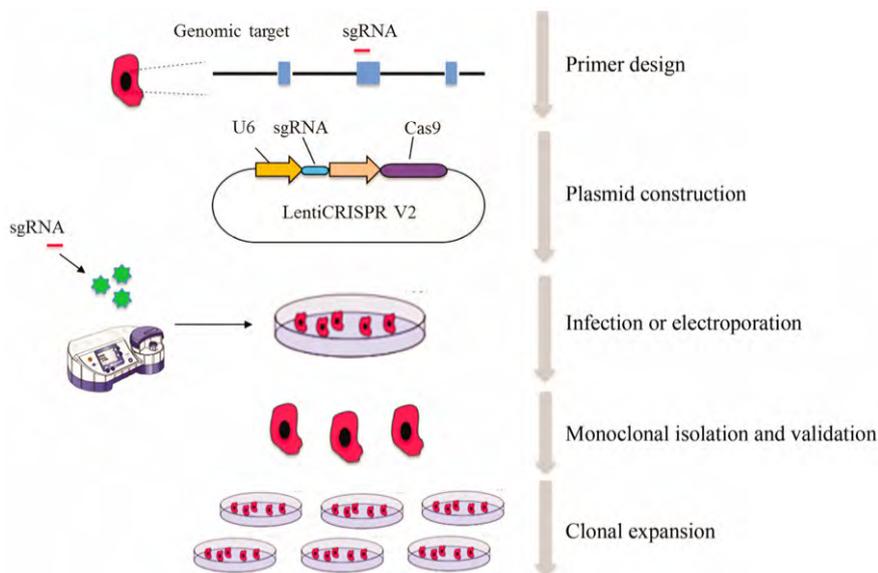


Figure 2 Overview of experiments

### 3 CRISPR/Cas9 技术在药物研发中的应用

药物靶点的筛选和鉴定是 新药研发中的关键一环，也是耗资巨大的过程。因此，药物开发需要一个良好的药物靶点的发现与验证的平台。早期，这个平台一直建立在“基因敲除”(genetic knockout)的模式动物上，这项技术虽然能够对染色体上的单个基因进行敲除，但是不能进行“剂量效应”(dose-response effects)的研究，也不能敲除对胚胎发育至关重要或

者致死的基因，且周期长、价格高，极大限制了药物研发进程。RNA 干扰技术 (RNAi) 的出现大大缩短了筛选药物靶标和先导化合物的时间，利用这项技术可以有效且高选择性地靶向到靶基因的 mRNA，抑制靶基因表达。但 RNAi 技术存在重现性差和脱靶效应较严重等问题，有时甚至会导致完全错误的结果。CRISPR/Cas9 因其强大的基因编辑功能，已被用于功能基因的筛选和编辑、药物靶点的筛选与验证、动物

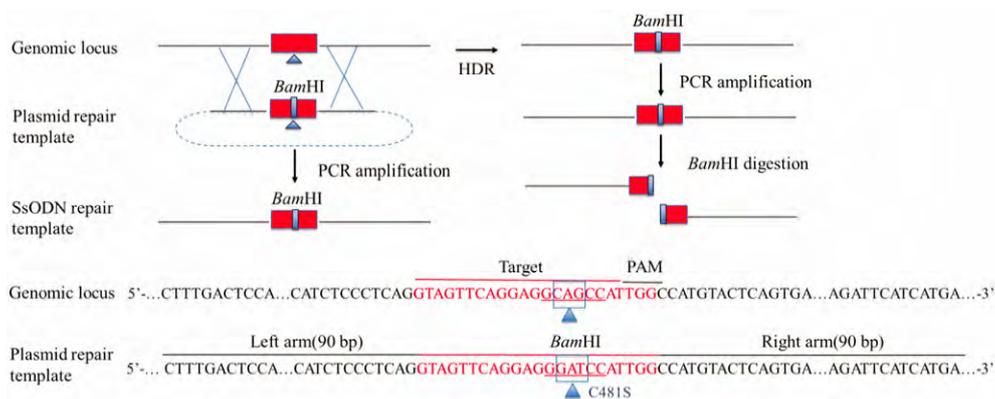


Figure 3 HDR donor-induced *BTK*<sup>C481S</sup> mutation

模型的构建等多项领域, 为新型药物研发或先导化合物的开发奠定了良好的基础。

**3.1 CRISPR/Cas9 技术在功能基因筛选中的应用**  
人类基因组的功能尚未完全揭示, 许多疾病尚未找到合适的药用靶点。基因组的不方便操作性极大地制约了疾病机制的揭示及药物靶点的筛选研究。CRISPR/Cas9 基因编辑技术只需要通过建立一个 sgRNAs 文库导入细胞中, 再通过相关表型的评估, 即可实现对基因组的大规模定点编辑, 进而揭示基因的生理功能, 为新药研发提供可靠的靶标。2013 年, 来自英国桑格研究所的科学家们创建了一个可以靶向小鼠基因组内全部基因的 sgRNAs 文库, 利用慢病毒将这些 sgRNAs 引入组成型表达 Cas9 蛋白的

小鼠胚胎干细胞中以创造出突变的干细胞库, 并用梭状芽胞杆菌细菌毒素  $\alpha$  对这个突变的干细胞库进行遗传筛选, 从中发现 27 个已知的抗性基因和 4 个未被报道的抗性基因<sup>[20]</sup>。

对于转录非编码 RNA 的基因来说, 仅有插入或缺失突变很可能对转录产物的表型没有显著影响, 因此筛选起来较为困难。2014 年, 北京大学的魏文胜研究组<sup>[21]</sup>开发了一种基于 CRISPR/Cas9 系统的慢病毒聚焦型人源细胞文库和功能性基因筛选平台 (图 4), 并结合深度测序技术, 成功鉴定出了对炭疽和白喉毒素毒性至关重要的宿主基因, 这将为新型抗菌药物的研发提供靶点。此外, 他们联合哈佛大学的刘小乐教授<sup>[22]</sup>, 采用基于配对向导 RNA (pgRNA) 的方

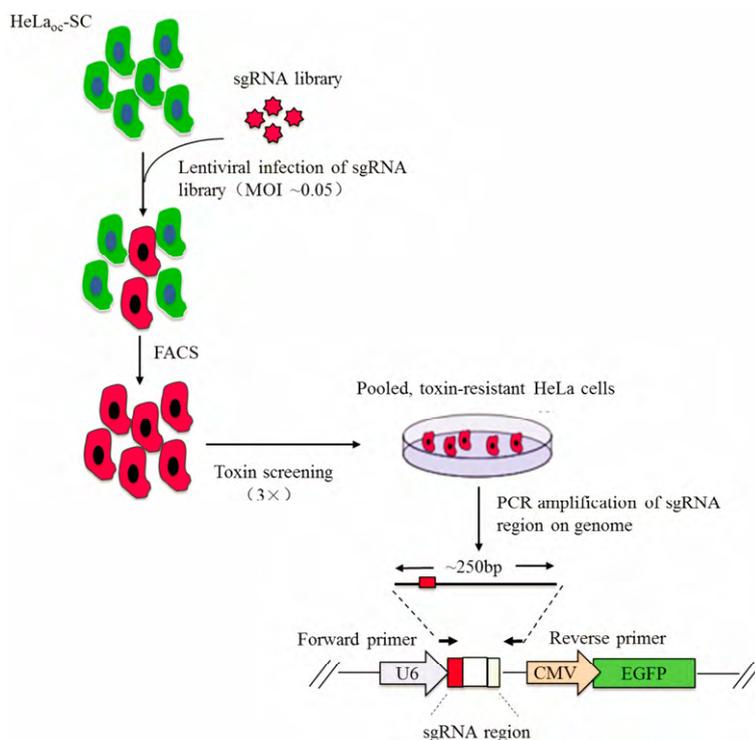


Figure 4 Schematic of lentiviral-delivered sgRNA library construction and functional screening<sup>[21]</sup>

式,以慢病毒为载体构建出 pgRNA 库(图 5),在全基因组范围内对人源肝癌细胞系 Huh7.5OC 中的近 700 个与癌症或其他疾病相关的长链非编码 RNA(lncRNA)进行了功能筛选。这种方法是利用 CRISPR/Cas9 系统在两种分别靶向目标基因不同位点的 sgRNA 组合成的 pgRNA 指导下,对同一基因造成两处 DNA 双链断裂,两个断裂点之间的基因片段可能会被 DNA 修复过程“遗漏”,最终不会出现在修复完毕的基因中。其基本策略可被用于对其他非编码 RNA 功能的分析中,具有巨大的潜在应用场景。

2016 年底, Fulco 等<sup>[23]</sup>分别证明了基于 CRISPR/Cas 技术可以用于识别疾病相关基因的关键调控元件。前者利用包含 98 000 个 sgRNA 序列的文库分析了 *MYC* 和 *GATA1* 基因周围 1.29 MB 序列,他们利用失活形式的 Cas9 与 KRAB 蛋白相互融合从而沉默靶基因,在上百个调控元件中发现了 2 个调控 *GATA1* 基因的增强子元件和 7 个调控 *MYC* 表达的增强子元件。后者则采用包含 18 000 个 sgRNA 序列的文库分析了 vemurafenib 耐药性相关基因 (*CUL3*、*NF1* 和 *NF2*) 周围 100 个碱基范围,发现了影响黑色素瘤患者耐药性基因的非编码调控元件<sup>[24]</sup>。这两项研究延伸了 CRISPR/Cas9 技术在非编码基因组研究中的应用。

**3.2 CRISPR/Cas9 技术在药物靶点筛选与验证中的应用** 在新药研发中,药物与靶点之间相互作用的验证是必不可少的。找到耐药性突变可谓是确定靶点的黄金准则,而在野生型背景的细胞中引入耐药性突变则是靶点验证最后的关键一步<sup>[25]</sup>,如 rapamycin-TOR1 这对重要的药物靶点组合的发现<sup>[26]</sup>。将 CRISPR/Cas9 技术与全基因组测序及耐药性突变筛选结合,能够使得靶点验证更加高效<sup>[27]</sup>。

2014 年, Wang 等<sup>[28]</sup>利用包含 73 000 个 sgRNA 序列的文库对 HL60 和 KBM7 两株细胞进行筛选,验证

了靶基因 *MSH2*、*MSH6*、*MLH1* 和 *PMS2* 能修复 6-TG 引起的 DNA 损伤,及靶基因 *TOP2A* 能抵抗依托泊苷(etoposide)的毒性。随后, Shalem 等<sup>[29]</sup>建立了靶向 18 080 个基因的包含 64 751 个 sgRNA 序列的全基因组范围的 CRISPR/Cas9 敲除(GeCKO)文库,该文库能在人类细胞中进行正向和负向选择性筛选。他们利用 GeCKO 文库鉴定了对癌细胞和多能干细胞细胞活力必不可少的基因,并在 A375 黑色素瘤模型中筛选出了与维罗非尼耐药性有关的基因,如先前发现的 *NF1* 和 *MED12*,及未被发现的 *NF2*、*CUL3*、*TADA2B* 和 *TADA1*。同年,剑桥大学的 Smurnyy 等<sup>[25]</sup>通过 CRISPR/Cas9 基因编辑技术和耐药性克隆测序技术验证了 6-TG-HPRT1 和 triptolide-ERCC3 这两对药物靶标的配对关系,他们将 CRISPR/Cas9 技术应用于单倍体细胞模型 KBM7 细胞中,表明这项技术对显性耐药性基因和隐性耐药性基因的验证都有效。Neggers 等<sup>[30]</sup>则利用 CRISPR/Cas9 剪切之后的同源重组修复(homology-directed repair, HDR)机制在急性 T 细胞白血病细胞 Jurkat 中精确地引入了 *XPO1*<sup>C528S</sup> 点突变,证实 selinexor (KPT-330) 能够靶向并阻断核输出蛋白受体 XPO1。2017 年 4 月发表的一项研究中,研究人员组合使用 CRISPR/Cas9 技术和 iPSC 技术构建出特定的巨噬细胞模型,证明免疫系统中的 *IRF5* 基因和 *IL-10RA* 基因在抵抗衣原体感染中起到关键性作用,这为治疗由衣原体引起的疾病鉴定出了新的药物靶标<sup>[31]</sup>。

目前,利用 CRISPR/Cas9 技术进行筛选的策略主要是靶向诱导候选基因(candidate genes)的 5' 外显子产生突变,这种方法的缺陷在于容易产生保留部分功能的框内突变体(in-frame variants),即使存在很强的遗传相关性也可能观察不到显著的表现型差异。为了克服这个问题,美国冷泉港实验室的研究人员<sup>[32]</sup>针对性地突变编码蛋白功能域的外显子,导致

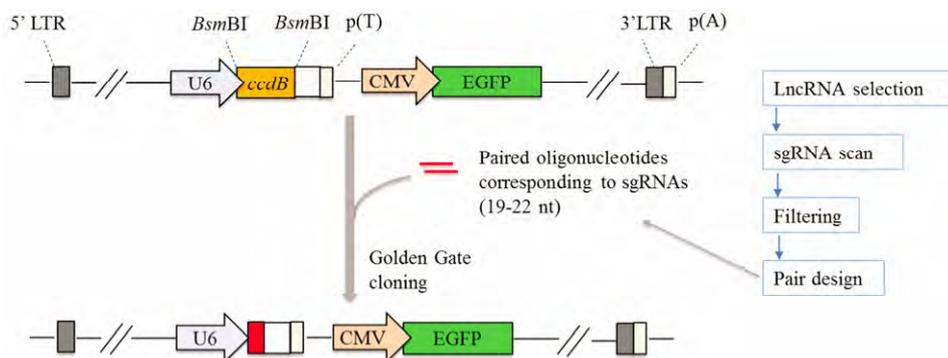


Figure 5 pgRNA library design<sup>[22]</sup>

更多的无效突变 (null mutation), 从而大幅提高了阴性选择的效率。在这项研究中, 他们筛选了小鼠 MLL-AF9/Nras<sup>G12D</sup> 急性髓系白血病细胞的 192 个染色质调节性区域, 结果找到了 6 个已知的药物作用靶点及 19 个潜在的靶点, 表明 CRISPR/Cas9 技术在癌症药物靶点的筛选与验证上还有很大的优化空间。

**3.3 CRISPR/Cas9 技术在动物模型构建和疾病治疗中的应用** 传统小鼠模型的建立主要依赖于同源重组和抗生素的筛选, 通常需要采用胚胎干细胞作为过渡, 过程繁琐且耗时, 而 CRISPR/Cas9 技术大大缩减了构建动物模型的时间和经费。李大力和刘明耀课题组<sup>[33]</sup>利用 RNA 注射法将 CRISPR/Cas9 系统导入小鼠受精卵中, 相比 DNA 注射, 该方法能更为有效地在小鼠胚胎中产生定点突变, 并且不受小鼠遗传品系的限制。迄今为止, 研究者已利用 CRISPR/Cas9 系统构建出人肝癌、肺腺癌等小鼠癌症模型<sup>[34]</sup>及 B 型血友病、心脏衰竭等小鼠疾病模型。利用 CRISPR/Cas9 系统, 研究者可以清除小鼠模型中潜伏感染的病毒基因组, 如乙型肝炎病毒; 也可以修复遗传基因缺陷, 如囊性纤维化等。2015 年 12 月, 《科学》杂志发表了 3 项关于 CRISPR/Cas9 技术在小鼠模型中的实验<sup>[35-37]</sup>。在这 3 篇文章中, 研究者均通过非致病性腺相关病毒 (adeno-associated virus, AAV) 成功移除杜氏肌营养不良症 (Duchenne's muscular dystrophy, DMD) 模型小鼠的肌萎缩蛋白基因第 23 号外显子, 从而改善了其肌肉的生化特性, 使其骨骼肌和心肌萎缩蛋白的功能得到部分恢复。这些突破增长了研究者攻克其他危害人类健康的疾病及难治愈癌症的信心。

2015 年 3 月, 美国加州拉西瑞亚大学的研究人员通过设计针对人类免疫缺陷病毒 (human immunodeficiency virus, HIV) 的 sgRNA 序列, 引导 Cas9 蛋白在特定位置上对 HIV 病毒的 DNA 双链进行剪切, 使得人体 18% ~ 72% 感染细胞内的 HIV 病毒失活<sup>[38]</sup>。同年 12 月, 美国杜克大学的研究者利用 CRISPR/Cas9 技术构建特定的转录激活子, 诱导感染 HIV 的人类细胞表达所缺乏的限制因子 APOBEC3G 和 APOBEC3B, 从而阻断细胞内 Vif 缺陷型 HIV-1 的复制, 并部分抑制野生型 HIV-1 的传染性<sup>[39]</sup>。2016 年 3 月, Kaminski 等<sup>[40]</sup>则利用一种特定的 CRISPR/Cas9 系统, 特异性地靶向 HIV-1 前病毒 DNA, 有效且安全地将 HIV 病毒从体外培养的人 CD4<sup>+</sup> T 细胞中清除, 这些根除 HIV-1 DNA 的 T 细胞可以正常地生长和发挥功能。这些研究成果有望应用于 HIV 感染的临床治疗中。

除了艾滋病, CRISPR/Cas9 系统对治疗其他疾病也有巨大的潜力。2015 年 9 月, Canver 等<sup>[41]</sup>利用 CRISPR/Cas9 技术移除了控制人类造血干细胞中分子开关 *BCL11A* 的红系增强子, 使造血干细胞成熟后胎儿型血红蛋白 (HbF) 明显增加, 成人型血红蛋白 (HbA) 相对减少, 而 HbF 能够对抗镰状细胞突变效应。2016 年 11 月 15 日, Cyranoski<sup>[42]</sup>报道了由四川大学华西医院卢铀教授所主持的全球首个 CRISPR 技术的人体应用, 卢铀教授研究团队通过 CRISPR/Cas9 技术敲除 T 细胞中抑制免疫功能的 *PD-1* 基因, 并在体外进行 T 细胞扩增, 当细胞达到一定数量后, 再回输至非小细胞肺癌患者体内进行肿瘤治疗。10 月 28 日, 首名患者接受了该项治疗。此后, 四川大学的科研人员<sup>[43]</sup>采用多功能高分子 RGD-R8-PEG-HA 对人工病毒进行修饰, 将一种安全性较高的靶向乳腺癌中 *MTH1* 基因的 CRISPR/Cas9 系统 RRPHC/Cas9-hMTH1 输送至小鼠肿瘤模型中, 并有效地抑制了肿瘤的生长, 这项研究提供了一种崭新的体内导入 CRISPR/Cas9 质粒的方式。这些研究表明, 利用 CRISPR/Cas9 技术靶向癌症或其他疾病的药物靶标, 将为人类疾病的治疗带来巨大的帮助。

#### 4 CRISPR/Cas9 技术的缺陷与改进

虽然 CRISPR/Cas9 技术十分高效且应用广泛, 但它也存在一定的限制性, 只有当目标位点附近存在 PAM 序列时, Cas9 蛋白才能进行准确切割<sup>[44, 45]</sup>, 而它的脱靶效应可能会使目标基因以外的其他基因产生变化。这些问题的存在深深影响着该技术在治疗应用中的安全性和有效性, 因此仍需不断完善。目前, 减轻 CRISPR/Cas9 脱靶效应的常规方式包括改变 sgRNA 的二级结构<sup>[46]</sup>, 缩短 sgRNA 序列的长度<sup>[47]</sup>, 利用 FokI-Cas9 融合核酸酶、纯化的 Cas9 核糖核蛋白、配对的催化突变 Cas9 切口酶等<sup>[48]</sup>, 这些方法能实现较低的脱靶率, 但也在一定程度上降低打靶效率。自 CRISPR/Cas9 技术诞生以来, 科学家们为它的改进和完善做出了不断的探索, 并取得了显著的成果。

许多人类遗传疾病都是由点突变引起, 而当前的基因组编辑方法不能高效地校正细胞中的突变, 而且会发生随机的核苷酸插入或删除 (indel)。CRISPR/Cas9 技术的基因编辑作用基于 sgRNA 介导的 Cas9 酶切割造成的双链断裂, 能校正单核苷酸突变的同源重组修复发生率很低, 只有 0.5% ~ 20%, 且只发生在细胞周期的 S 期和 G<sub>2</sub> 期<sup>[49-51]</sup>。为了提高修正点突变的效率, 同时减少 indel 的频率, 哈佛大学的 Komor 等<sup>[52]</sup>让 Cas9 部分失活, 使它不能切割 DNA

双链,但仍能结合到目标 DNA 序列上。同时,通过将 Cas9 与胞苷脱氨酶(鼠源 APOBEC1)偶联在一起,直接将胞嘧啶(C)转换成尿嘧啶(U)。因此,在细胞基因组靶位点上会产生一对错配的碱基对,即一条链上新产生的 U 与另一条链上的初始碱基 G 错配,从而引发错配修复,最终正确的碱基校正率可达到 15%~75%,同时只有 1%以下的序列发生 indel。

2016 年 4 月,美国格拉斯通研究所的研究人员<sup>[53]</sup>将 CRISPR/Cas9 技术应用于诱导性多能干细胞(iPSCs),将编码 dCas9 的基因和编码 KRAB 抑制结构域的基因融合在一起,形成 dCas9-KRAB 融合基因并将其导入 AAV 病毒载体中,再转导 iPSCs 和源自 iPSCs 的心肌细胞,从而在宿主细胞中表达这种融合蛋白,结果表明这种 CRISPRi (CRISPR interference) 系统比 CRISPR/Cas9 系统更加高效。剑桥大学和惠康基金会桑格研究所的研究人员<sup>[54]</sup>则将一种一体化的 Cas9 D10A 切口酶载体与荧光激活的细胞分选富集后相结合,基于高通量基因型和表型单克隆筛选,在满足低脱靶率的同时实现了高效率的基因敲除和敲入。此外,科学家们还将四环素诱导系统和 CRISPR/Cas9 技术结合,建立了一种高效可控的基因编辑平台 sOPTiKO/sOPTiKD,可以在细胞发育任何阶段的任何细胞类型中精密调控基因表达水平<sup>[55]</sup>。

RNAi 技术部分抑制基因表达,CRISPR/Cas9 技术可以完全抑制基因表达。当涉及药物开发时,这两者的区别变得非常重要,因为对任何一种药物而言,实现对靶标 100% 的抑制是非常罕见的。将 CRISPR 与 RNAi 结合起来验证靶标可能会是一种较为理想的方法。2015 年,哈佛医学院的一个研究小组<sup>[56]</sup>结合 CRISPR/Cas9 技术及 RNAi 技术,鉴定出了 3 个对肿瘤生长十分重要的基因 mRNA-cap、Pitsre 和 CycT (对应人源 *RNGTT*、*CDK11* 和 *CCNT1*)。他们利用 CRISPR/Cas9 技术建立了 TSC1 或 TSC2 缺陷的突变果蝇细胞系,再用 RNAi 方法筛查其所有的激酶和磷酸酶,结果发现这 3 个基因的敲低会引起 TSC1/TSC2 缺陷型细胞生长速度减慢,而对野生型细胞没有影响。随后,研究人员在哺乳动物 TSC2 缺陷型细胞系中敲低这些基因,也发生了类似的生长抑制现象,这也说明这种跨物种的筛选策略可用于药物靶点的鉴定。2017 年, Liu 等<sup>[57]</sup>开发出一种 CRISPRi 平台,也可以实现基因的部分抑制。他们靶向 7 种不同细胞系中的 16 401 个 lncRNA 位点,并鉴定出其中 499 个 lncRNA 位点是细胞生长所需要的,而很多 lncRNA 位点在细胞增殖中发挥重要作用,这可能最终对靶

向癌症治疗产生影响。

CRISPR 技术还有许多奥秘尚待挖掘。2016 年, Pawluk 等<sup>[58]</sup>发现了 CRISPR/Cas9 的“关闭开关”(off-switches),鉴定出了 3 个天然存在的、能够抑制 Cas9 活性的蛋白质家族,从而可以实现对 CRISPR/Cas9 的自由关闭。科学家们还鉴定出了一种能够靶向和降解 RNA 的 RNA 导向酶 (RNA-guided enzyme) C2c2, CRISPR/C2c2 系统可以实现细胞基因组短暂的改变,并且能够帮助细菌对抗病毒感染<sup>[59]</sup>。近期,关于 CRISPR/C2c2 系统的最新研究表明, C2c2 对双链 DNA 的切割会产生 7 nt 的黏性末端,这是目前所有用于基因组编辑的 CRISPR/Cas 系统中所能产生的最长黏性末端<sup>[60]</sup>。此外,研究人员还找到了 Cas9 的一种潜在替代者——Cpf1 酶。CRISPR/Cpf1 也能在 crRNA 的引导下在人类细胞中剪切目标 DNA,而且还能对 RNA 进行加工<sup>[61]</sup>。随后, CRISPR/Cpf1 的晶体结构也被解析<sup>[62]</sup>。同时, Burstein 等<sup>[63]</sup>通过对不同地点采集到的微生物进行宏基因组分析,发现了两种新型的 II 型 CRISPR/Cas9 系统,包括在古细菌中发现的一种 Cas9 酶和在细菌中发现的两种小 Cas 酶 (CasX 和 CasY)。将 CRISPR/CasX 或 CRISPR/CasY 引入大肠杆菌中都可以阻止遗传物质进入细胞,但其是否具有基因组编辑功能还有待于进一步研究。这些新的发现也表明寻找新形式的 CRISPR 还有巨大的可能性。

## 5 结语与展望

CRISPR 技术已成为基因编辑最有效的手段之一,它在发现和验证药物靶标方面具有巨大潜力,也为癌症及其他疾病的治疗提供了新思路。利用 CRISPR/Cas9 技术靶向编码蛋白功能结构域的外显子造成突变,可对维持癌细胞生长存活及发育等过程具有重要作用的蛋白或结构域进行大规模筛选,这对寻找合适的药物作用靶点及开发癌症治疗药物具有重要意义。本课题组已利用 CRISPR/Cas9 技术在特定癌症细胞系中构建激酶的点突变,作为药物靶点筛选与验证的细胞模型。CRISPR/Cas9 技术不仅在基础研究中发挥重要作用,在制药业也渐渐崭露头角。如福泰制药 (Vertex) 与 CRISPR 技术公司 CRISPR Therapeutics 签约 4 年合作开发针对已经有明确人类基因靶点的 CRISPR/Cas9 药物,主要针对囊性肺纤维化和镰刀型贫血症。

CRISPR/Cas9 系统在广受推崇的同时,它在人类生殖细胞或胚胎上的使用也引发了全球持续性争议。如英国伦敦弗朗西斯克里克机构的研究团队已获

得英国人类受精与胚胎管理局 (HEFA) 审核通过, 即将开始编辑体外受精 (IVF) 的胚胎基因, 该研究很可能制造出第一个基因改造的人类胚胎, 而这也使得关于基因编辑的伦理争论更加激烈。

一方面, 随着 CRISPR/Cas9 技术的不断完善, 它势必得到更广泛的应用, 对人类健康领域做出重大贡献; 另一方面, 对于基因编辑技术, 研究者最为需要的是认真思考, 制定出合理的规范, 使其发挥出最积极的效用。

## References

- [1] Porteus MH, Carroll D. Gene targeting using zinc finger nucleases [J]. *Nat Biotechnol*, 2005, 23: 967–973.
- [2] Joung JK, Sander JD. TALENs: a widely applicable technology for targeted genome editing [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2013, 14: 49–55.
- [3] Gaj T, Gersbach CA, Barbas CF 3rd. ZFN, TALEN and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering [J]. *Trends Biotechnol*, 2013, 31: 397–405.
- [4] Pauwels K, Podevin N, Breyer D, et al. Engineering nucleases for gene targeting: safety and regulatory considerations [J]. *N Biotechnol*, 2014, 31: 18–27.
- [5] Cong L, Ran FA, Cox D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems [J]. *Science*, 2013, 339: 819–823.
- [6] 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: 5429–5433.
- [7] Jansen R, Embden JD, Gastra W, et al. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes [J]. *Mol Microbiol*, 2002, 43: 1565–1575.
- [8] Bolotin A, Quinquis B, Sorokin A, et al. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin [J]. *Microbiology*, 2005, 151: 2551–2561.
- [9] Mojica FJ, Díez-Villaseñor C, García-Martínez J, et al. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements [J]. *J Mol Evol*, 2005, 60: 174–182.
- [10] Pourcel C, Salvignol G, Vergnaud G, et al. CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies [J]. *Microbiology*, 2005, 151: 653–663.
- [11] Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes [J]. *Science*, 2007, 315: 1709–1712.
- [12] Marraffini LA, Sontheimer EJ. CRISPR interference limits horizontal gene transfer in staphylococci by targeting DNA [J]. *Science*, 2008, 322: 1843–1845.
- [13] Makarova KS, Haft DH, Barrangou R, et al. Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2011, 9: 467–477.
- [14] Wiedenheft B, Sternberg SH, Doudna JA. RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea [J]. *Nature*, 2012, 482: 331–338.
- [15] Deltcheva E, Chylinski K, Sharma CM, et al. CRISPR RNA maturation by *trans*-encoded small RNA and host factor RNase III [J]. *Nature*, 2011, 471: 602–607.
- [16] Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity [J]. *Science*, 2012, 337: 816–821.
- [17] Mali P, Yang L, Esvelt KM, et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9 [J]. *Science*, 2013, 339: 823–826.
- [18] Sung P, Klein H. Mechanism of homologous recombination: mediators and helicases take on regulatory functions [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2006, 7: 739–750.
- [19] Ran FA, Hsu PD, Wright J, et al. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system [J]. *Nat Protoc*, 2013, 8: 2281–2308.
- [20] Koike Y, Li Y, Tan EP, et al. Genome-wide recessive genetic screening in mammalian cells with a lentiviral CRISPR-guide RNA library [J]. *Nat Biotechnol*, 2014, 32: 267–273.
- [21] Zhou Y, Zhu S, Cai C, et al. High-throughput screening of a CRISPR/Cas9 library for functional genomics in human cells [J]. *Nature*, 2014, 509: 487–491.
- [22] Zhu S, Li W, Liu J, et al. Genome-scale deletion screening of human long non-coding RNAs using a paired-guide RNA CRISPR-Cas9 library [J]. *Nat Biotechnol*, 2016, 34: 1279–1286.
- [23] Fulco CP, Munschauer M, Anyoha R, et al. Systematic mapping of functional enhancer-promoter connections with CRISPR interference [J]. *Science*, 2016, 354: 769–773.
- [24] Sanjana NE, Wright J, Zheng K, et al. High-resolution interrogation of functional elements in the noncoding genome [J]. *Science*, 2016, 353: 1545–1549.
- [25] Smurny Y, Cai M, Wu H, et al. DNA sequencing and CRISPR-Cas9 gene editing for target validation in mammalian cells [J]. *Nat Chem Biol*, 2014, 10: 623–625.
- [26] Huang J, Dibble CC, Matsuzaki M, et al. The TSC1-TSC2 complex is required for proper activation of mTOR complex 2 [J]. *Mol Cell Biol*, 2008, 28: 4104–4115.
- [27] Kasap C, Elemento O, Kapoor TM. DrugTargetSeqR: a

- genomics- and CRISPR/Cas9-based method to analyze drug targets [J]. *Nat Chem Biol*, 2014, 10: 626–628.
- [28] Wang T, Wei JJ, Sabatini DM, et al. Genetic screens in human cells using the CRISPR-Cas9 system [J]. *Science*, 2014, 43: 80–84.
- [29] Shalem O, Sanjana NE, Hartenian E, et al. Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells [J]. *Science*, 2014, 343: 84–87.
- [30] Neggers JE, Vercruyse T, Jacquemyn M, et al. Identifying drug-target selectivity of small-molecule CRM1/XPO1 inhibitors by CRISPR/Cas9 genome editing [J]. *Chem Biol*, 2015, 22: 107–116.
- [31] Yeung ATY, Hale C, Lee AH, et al. Exploiting induced pluripotent stem cell-derived macrophages to unravel host factors influencing *Chlamydia trachomatis* pathogenesis [J]. *Nat Commun*, 2017, 8: 15013.
- [32] Shi J, Wang E, Milazzo JP, et al. Discovery of cancer drug targets by CRISPR-Cas9 screening of protein domains [J]. *Nat Biotechnol*, 2015, 33: 661–667.
- [33] Li D, Qiu Z, Shao Y, et al. Heritable gene targeting in the mouse and rat using a CRISPR-Cas system [J]. *Nat Biotechnol*, 2013, 31: 681–683.
- [34] Platt RJ, Chen S, Zhou Y, et al. CRISPR-Cas9 knockin mice for genome editing and cancer modeling [J]. *Cell*, 2014, 159: 440–455.
- [35] Nelson CE, Hakim CH, Ousterout DG, et al. *In vivo* genome editing improves muscle function in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy [J]. *Science*, 2016, 351: 403–407.
- [36] Tabebordbar M, Zhu K, Cheng JK, et al. *In vivo* gene editing in dystrophic mouse muscle and muscle stem cells [J]. *Science*, 2016, 351: 407–411.
- [37] Long C, Amoasii L, Mireault AA, et al. Postnatal genome editing partially restores dystrophin expression in a mouse model of muscular dystrophy [J]. *Science*, 2016, 351: 400–403.
- [38] Liao HK, Gu Y, Diaz A, et al. Use of the CRISPR/Cas9 system as an intracellular defense against HIV-1 infection in human cells [J]. *Nat Commun*, 2015, 6: 6413.
- [39] Bogerd HP, Kornepati AV, Marshall JB, et al. Specific induction of endogenous viral restriction factors using CRISPR/Cas-derived transcriptional activators [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015, 112: E7249–E7256.
- [40] Kaminski R, Chen Y, Fischer T, et al. Elimination of HIV-1 genomes from human T-lymphoid cells by CRISPR/Cas9 gene editing [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 22555.
- [41] Canver MC, Smith EC, Sher F, et al. BCL11A enhancer dissection by Cas9-mediated in situ saturating mutagenesis [J]. *Nature*, 2015, 527: 192–197.
- [42] Cyranoski D. CRISPR gene-editing tested in a person for the first time [J]. *Nature*, 2016, 539: 479.
- [43] Li L, Song L, Liu X, et al. Artificial virus delivers CRISPR-Cas9 system for genome editing of cells in mice [J]. *ACS Nano*, 2017, 11: 95–111.
- [44] 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: 839–843.
- [45] Duan J, Lu G, Xie Z, et al. Genome-wide identification of CRISPR/Cas9 off-targets in human genome [J]. *Cell Res*, 2014, 24: 1009–1012.
- [46] Dang Y, Jia G, Choi J, et al. Optimizing sgRNA structure to improve CRISPR-Cas9 knockout efficiency [J]. *Genome Biol*, 2015, 16: 280.
- [47] Fu Y, Sander JD, Reyon D, et al. Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs [J]. *Nat Biotechnol*, 2014, 32: 279–284.
- [48] Slaymaker IM, Gao L, Zetsche B, et al. Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity [J]. *Science*, 2016, 351: 84–88.
- [49] Yang H, Wang H, Shivalila CS, et al. One-step generation of mice carrying reporter and conditional alleles by CRISPR/Cas-mediated genome engineering [J]. *Cell*, 2013, 154: 1370–1379.
- [50] Wang H, Yang H, Shivalila CS, et al. One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering [J]. *Cell*, 2013, 153: 910–918.
- [51] 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: E2579–E2586.
- [52] Komor AC, Kim YB, Packer MS, et al. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage [J]. *Nature*, 2016, 533: 420–424.
- [53] Mandegar MA, Huebsch N, Frolov EB, et al. CRISPR interference efficiently induces specific and reversible gene silencing in human iPSCs [J]. *Cell Stem Cell*, 2016, 18: 541–553.
- [54] Chiang TW, le Sage C, Larrieu D, et al. CRISPR-Cas9 (D10A) nickase-based genotypic and phenotypic screening to enhance genome editing [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 24356.
- [55] Bertero A, Pawlowski M, Ortmann D, et al. Optimized inducible shRNA and CRISPR/Cas9 platforms for *in vitro*

- studies of human development using hPSCs [J]. *Development*, 2016, 143: 4405–4418.
- [56] Housden BE, Valvezan AJ, Kelley C, et al. Identification of potential drug targets for tuberous sclerosis complex by synthetic screens combining CRISPR-based knockouts with RNAi [J]. *Sci Signal*, 2015, 8: rs9.
- [57] Liu SJ, Horlbeck MA, Cho SW, et al. CRISPRi-based genome-scale identification of functional long noncoding RNA loci in human cells [J]. *Science*, 2017. DOI: 10.1126/science.aah7111.
- [58] Pawluk A, Amrani N, Zhang Y, et al. Naturally occurring off-switches for CRISPR-Cas9 [J]. *Cell*, 2016, 167: 1829–1838.
- [59] Abudayyeh OO, Gootenberg JS, Konermann S, et al. C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector [J]. *Science*, 2016, 353: aaf5573.
- [60] Yang H, Gao P, Rajashankar KR, et al. PAM-dependent target DNA recognition and cleavage by C2c1 CRISPR-Cas endonuclease [J]. *Cell*, 2016, 67: 1814–1828.
- [61] Fonfara I, Richter H, Bratovič M, et al. The CRISPR-associated DNA-cleaving enzyme Cpf1 also processes precursor CRISPR RNA [J]. *Nature*, 2016, 532: 517–521.
- [62] Dong D, Ren K, Qiu X, et al. The crystal structure of Cpf1 in complex with CRISPR RNA [J]. *Nature*, 2016, 532: 522–526.
- [63] Burstein D, Harrington LB, Strutt SC, et al. New CRISPR-Cas systems from uncultivated microbes [J]. *Nature*, 2017, 542: 237–241.