

DOI: 10.13376/j.cblls/2016115

文章编号: 1004-0374(2016)08-0867-04



王皓毅, 研究员, 中国科学院动物研究所基因工程技术研究组组长、科技部“863”课题负责人、“青年千人计划”入选者。主要研究方向为基因工程技术和表观遗传修饰技术的开发和应用。率先利用 TALEN 系统对人类胚胎干细胞和诱导性干细胞进行了精确高效的基因编辑; 利用 TALEN 系统建立了世界上第一只 Y 染色体上的基因敲除和敲入小鼠; 率先利用 CRISPR-Cas9 系统建立了一步获得多基因敲除细胞和小鼠的方法, 及一步获得原位基因敲入和条件性敲除小鼠的方法; 建立人类 naïve 胚胎干细胞培养条件; 基于 CRISPR-Cas9 系统建立原位基因表达调控技术 CRISPR-on 和 Casillio 系统; 首次利用电转的方法, 将 CRISPR-Cas9 系统导入小鼠受精卵, 并产生有特定基因突变的小鼠模型。相关研究成果发表在 *Cell*、*Nature Biotechnology*、*Cell Stem Cell* 等杂志上。

基于CRISPR-Cas9新型基因编辑技术研究

王皓毅^{1*}, 李劲松², 李 伟¹

(1 中国科学院动物研究所, 干细胞与生殖生物学国家重点实验室, 北京 100190;

2 中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所, 上海 200031)

摘要: 高效、特异的目标基因组位点修饰一直是基因工程研究的重点和挑战。靶向基因编辑技术不仅能够有效地用于建立动物和细胞疾病模型、培育动植物新品种, 并具有治疗诸多疾病的重大潜力。近年来靶向核酸酶技术的研究取得了重大进展, 且逐渐成为基因编辑的主流工具, 特别是规律成簇间隔短回文重复序列 (CRISPR-Cas9) 技术因其靶向编辑目的基因的特异性、高效性和设计的简便性等诸多优点, 得到更为广泛的应用。在中国科学院干细胞先导专项的支持下, 基因编辑技术攻关团队在进一步改造和应用 CRISPR-Cas9 技术方面取得了一系列成果, 就此进行全方面的总结。

关键词: 基因编辑; CRISPR-Cas9; 动物模型; 单倍体干细胞

中图分类号: Q78 文献标志码: A

Application and improvement of CRISPR-Cas9 system for genome editing

WANG Hao-Yi^{1*}, LI Jin-Song², LI Wei¹

(1 Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China; 2 Institute of Biochemistry and Cell Biology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

Abstract: Genome editing technologies are invaluable tools for understanding the function of genes in development and disease. In recent years, the programmable site-specific DNA endonucleases, including zinc finger nucleases (ZFNs), transcription activator-like effector nucleases (TALENs) and the clustered, regularly interspaced short palindromic-repeat (CRISPR) system, have gained tremendous popularity and become widely used. In particular due to its simplicity and robustness, the CRISPR-Cas9 systems has swiftly become the most commonly used tool

收稿日期: 2016-04-20

基金项目: 中国科学院“干细胞与再生医学研究”战略性先导科技专项(XDA01010409)

*通信作者: E-mail: wanghaoyi@ioz.ac.cn

for efficient genome editing of bacteria, plants, cell lines, primary cells and animal species ranging from *Drosophila* to primates. Supported by “Strategic Priority Research Program” of the Chinese Academy of Sciences (CAS), research teams at CAS have made a series of breakthroughs in the application and improvement of CRISPR-Cas9 system. Here we review these progresses.

Key words: genome editing; CRISPR-Cas9; animal model; haploid stem cell

基因编辑技术是对基因组中的特定 DNA 序列进行靶向性修改的技术, 该技术包括 20 世纪 80 年代建立的基因打靶技术和近年来发展建立的多种新型高效的 DNA 靶向内切酶技术, 如锌指核酸酶 (zinc finger nucleases) 技术^[1]、类转录激活样效应因子核酸酶 (transcription activator-like effector nucleases) 技术^[2]、规律成簇间隔短回文重复序列 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR-Cas9) 系统技术^[3-4]等。DNA 靶向内切酶技术主要通过基因组目标位点造成 DNA 双链断裂, 促进以同源重组或非同源末端连接方式修复受损 DNA, 从而对目标位点实现基因的定点敲除、敲入以及基因修正等多种修饰。其中最新的 CRISPR-Cas9 技术基于在细菌和古菌中发现的免疫系统改造建立, 通过 RNA 介导 Cas9 蛋白进行目标 DNA 序列识别并造成 DNA 双链断裂, 因其简单高效的特点得到了最为广泛的应用。

1 应用CRISPR-Cas9技术建立新型疾病动物模型

基因编辑技术通过改变基因组的序列, 包括基因插入、删除、突变、倒位和易位等形式控制基因的功能或表达调控模式, 从而改变或建立相应的生物学表型, 是研究基因功能和制备疾病动物模型的一种重要手段。通过基因修饰可以将基因型和表型直接关联, 便于发病机制研究, 也使得动物模型可以通过繁殖大量扩群, 因而在疾病动物模型的制备中使用越来越广泛。CRISPR-Cas9 系统作为最新一代基因编辑技术, 能够简便高效地实现基因组精确修饰, 是制备哺乳动物疾病模型的重要工具。在先导专项的支持下, 基因编辑技术攻关团队的科学家利用 CRISPR-Cas9 技术在动物模型, 如小鼠、大鼠、猪和猴等研制方面做出一系列重要工作。现总结如下。

近年来, CRISPR-Cas9 系统因其高效精确的特性被广泛应用于基因编辑领域的研究中, 为建立人类疾病模型提供了有效的技术平台。2013 年, 王皓毅研究员带领的科学家团队将 CRISPR-Cas9 系统导入受精卵, 可以一步得到具有精确基因敲除和敲入

的小鼠, 并且可以进行多基因操作。大鼠在认知和行为分析等方面要优于小鼠模型, 同时大鼠体型较大, 在采样和一些实验检测上如血液采集等, 更加便于操作和研究。然而由于基因修饰技术在大鼠中发展滞后, 严重阻碍了大鼠基因修饰模型的广泛应用。通过早期胚胎直接注射 CRISPR-Cas9 系统, 李伟研究组首次一步获得了多基因同时敲除的大鼠模型, 并证明可以传递到下一代^[5]。

除了小型实验动物, 猪无论是在基因组水平, 还是器官形态上, 都与人类极为相似, 因此一直被认为是较为理想的人类疾病的研究模型。而进化上与人亲缘关系最近的非人灵长类, 是研究人类疾病发生最佳的动物模型。利用受精卵注射 CRISPR-Cas9 的方法, 海棠等研究人员首次建立了 vWF 基因敲除的血管性血友病的小型猪模型^[6], 而万海峰等研究人员直接获得 *p53* 基因纯合突变食蟹猴, 可以直接应用于后续疾病和表型研究^[7]。

相比传统基于 ES 细胞制备嵌合动物, 随后通过杂交获得纯合突变模型或通过体细胞中进行基因敲除, 早期胚胎直接注射“一步法”更加快速和方便, 能够在 founder 代直接获得双等位基因敲除模型, 可以直接应用于后续表型研究和进一步繁殖, 使得动物模型的制备时间和成本大大缩减, 将极大地推动基因突变动物模型在生物医学研究中的应用^[6]。由于许多疾病往往由复杂而非单一的遗传因素导致, 因此多基因修饰动物在疾病研究中具有重要价值, 然而依赖于传统基因打靶技术获得多基因敲除动物往往需要几年甚至十几年的时间, 尤其是妊娠期长或单胎的动物。李伟研究组证实可以在短短几个月内获得多个基因敲除的大鼠, 为快速制备多基因同时敲除的动物模型提供了新方法^[5]。

虽然利用早期胚胎直接注射法制备基因修饰动物模型具有生产周期短、成本低等优点, 但因其显微注射设备精密昂贵、技术操作需长时间练习等特点, 这一方法的广泛推广受到了一定限制。王皓毅研究员带领的科学家团队利用电转的方法将 CRISPR-Cas9 系统导入小鼠受精卵, 成功获得了有特定基因突变的小鼠模型, 并获得近乎 100% 的基

因靶向突变效率, 极大地降低了基因编辑小鼠模型制备的难度和成本, 有望被广泛应用^[8]。

2 应用CRISPR-Cas9技术建立治疗遗传疾病新方法

作为一种简便高效的基因编辑技术, CRISPR-Cas9 技术自问世以来就被认为具有治疗遗传疾病的巨大潜力。为了验证 CRISPR-Cas9 是否能有效用于治疗遗传疾病, 李劲松研究组选择小鼠白内障遗传疾病模型进行研究。对携带显性突变引发晶状体混浊的 *Crygc* 基因进行定点修正。研究人员针对突变 *Crygc* 基因设计并筛选出高效 sgRNA, 随后直接将 sgRNA 和 Cas9 注入杂合子的受精卵中, 发现有 1/3 的新生小鼠 (24 只) 白内障症状被治愈, 并通过生殖细胞将修复的 *Crygc* 基因传递到下一代, 证明白内障遗传疾病得到了根治^[9]。

将 CRISPR-Cas9 系统直接注入携带遗传缺陷的受精卵胚胎中治愈小鼠的策略存在两个问题: 一是新生小鼠被治愈的机率较低, 约为 30%; 二是存有少量实验脱靶现象。为更好地解决这些问题, 李劲松研究组从白内障小鼠的睾丸中获取了携带纯和遗传突变的精原干细胞, 并将 CRISPR-Cas9 转入精原干细胞系中, 通过单细胞扩增的方式建立了一系列来自单个精原干细胞的细胞系。随后, 对这些细胞系进行了深入分析, 选择满足以下三个条件的细胞系进行移植实验: (1) 通过基因型分析确定两个突变位点均已修复; (2) 通过预测脱靶位点测序或者全基因组测序确定不存在脱靶问题; (3) 通过特定印记基因甲基化鉴定或者全基因组甲基化测序, 确定修复的精原干细胞维持正常的表观遗传特性。最后, 将这些“优质”细胞移植到去除了生殖细胞的受体小鼠睾丸内后, 获得了 100% 完全健康的小鼠。CRISPR-Cas9 技术介导的生殖细胞遗传修复为人类基因治疗提供了一条新的思路, 今后的研究需要验证这一技术路线在人类生殖细胞中实施的可行性^[10]。

3 CRISPR-Cas9在单倍体干细胞中的应用

单倍体胚胎干细胞只含有一套染色体, 不存在等位基因在基因功能上的补偿作用, 因此是研究基因功能的理想模型。通过将 CRISPR-Cas9 技术和单倍体胚胎干细胞体系相结合, 先导攻关团队获得了一系列国际领先的研究成果。李伟研究组证实, 利用 CRISPR-Cas9 技术能够快速高效地在大鼠单倍体

干细胞上进行多个基因的快速敲除, 从而快速制备多个基因敲除胚胎干细胞系。通过将雄性单倍体胚胎干细胞注射到卵细胞可以形成健康大鼠, 并将干细胞中携带的基因修饰传递给下一代, 这一方法为建立具有特定基因修饰的大鼠模型提供了强有力的新工具^[11]。

李劲松研究组通过在小鼠单倍体干细胞中敲除 H19-DMR 和 IG-DMR 获得了 DKO-AG-haESCs, 将这些细胞注入卵母细胞后, 发现半克隆小鼠出生率达到 22%。“类精子细胞”单倍体细胞系的建立使得利用这一细胞快速制备遗传编辑小鼠模型成为可能。为此, 研究人员先后在 H19-DMR 和 IG-DMR 敲除的单倍体细胞中进行了多基因的敲除和敲入, 建立了携带 Tet1/Tet2/Tet3、P56/P63/P73 三基因敲除以及 Tet1-EGFP/Tet2-mCherry/Tet3-ECFP 三基因敲入的细胞系, 并证明这些细胞能稳定高效地支持半克隆小鼠的产生。重要的是, CRISPR-Cas9 文库被应用到人和小鼠的细胞中进行了全基因组水平的遗传筛选。研究人员进一步证实, 如果 H19-DMR 和 IG-DMR 敲除的单倍体干细胞能够携带 CRISPR-Cas9 文库, 通过注入卵子中则可以批量产生携带不同突变基因的半克隆小鼠, 从而使得小鼠个体水平的遗传筛选成为可能, 填补了哺乳动物在个体水平进行遗传筛选的技术空白^[12]。

4 CRISPR-Cas9技术的优化及功能拓展

目前, 虽然 CRISPR-Cas9 技术可以高效特异地靶向编辑目的基因, 但该技术仍存在一些缺陷, 如特异性不高造成的脱靶效应等, 给临床应用带来风险。另外, 除了基因编辑方面的应用, Cas9 蛋白也可以通过融合不同的功能结构域起到调控基因表达的作用。

为了更好地控制 CRISPR-Cas9 系统的表达特异性, 降低脱靶效应带来的风险, 提高 CRISPR-Cas9 技术未来在临床应用的安全性, 周琪研究组通过改造 sgRNA 结构, 使得 sgRNA 的表达受到组织特异性启动子的调控, 进而实现了利用 CRISPR-Cas9 技术进行细胞类型特异性的基因敲除^[13]。

将 Cas9 蛋白的核酸结构域进行突变可以产生 dCas9(defective Cas9)。失去 DNA 双链断裂功能的 dCas9 仍然保留结合在特定基因组位点的功能, 因此, dCas9 融合不同的效应蛋白所形成的复合体可以进行基因表达调控或者标记染色体上的特定位置, 是研究基因表达及染色体结构的有效工具。然

而,这种复合体由于技术原因往往只能融合单一的效应蛋白,利用 MS2 等 RNA 适配子也很难招募到三个及以上的效应蛋白,这使得相关研究存在很大的局限性。王皓毅研究组通过组合 CRISPR-Cas9 和 Pumilio RNA 结合蛋白建立了 Casilio 系统。该系统利用保守的 PUF RNA 结合域可以识别并结合特异性 RNA 序列 (PBS) 的特性,通过设计带有多种不同 PBS 的 sgRNA,结合不同的 PUF 来招募多种效应蛋白。这一模型主要具有如下应用:(1)可以同时引入不同的 Casilio 模块作用于不同位点,呈现多基因的同时调控或标记;(2)同一个 Casilio 模块可以招募多个同种效应蛋白,使其效应增强;(3)同一个 Casilio 模块可以招募不同的效应蛋白,利用这些蛋白的协同作用调节基因表达。综上所述,Casilio 系统将为基因表达调控和染色体结构等研究领域提供强大的技术支持^[14]。该成果于 2016 年发表在 *Cell Research* 杂志上。

5 结语

如上所述,在中国科学院干细胞先导专项的支持下,基因编辑技术攻关团队的研究组在进一步改造和应用 CRISPR-Cas9 技术方面取得了一系列成果,包括构建新型的小鼠、大鼠以及大动物模型,建立新型遗传疾病治疗方法,在单倍体干细胞中进行遗传筛选,以及进一步拓展其基因编辑以外的广泛应用。这些工作为基因编辑技术更好地应用于基础研究及医学领域奠定了坚实的基础。相关成果已有数十篇文章发表在国际知名杂志,如 *Nature Biotechnology*、*Cell Stem Cell*、*Cell Research*、*Genetics* 等。

[参 考 文 献]

[1] Urnov FD, Rebar EJ, Holmes MC, et al. Genome editing

- with engineered zinc finger nucleases. *Nat Rev Genet*, 2010, 11: 636-46
- [2] Bogdanove AJ, Voytas DF. TAL effectors: customizable proteins for DNA targeting. *Science*, 2011, 333: 1843-6
- [3] Hsu PD, Lander ES, Zhang F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell*, 2014, 157: 1262-78
- [4] Doudna JA, Charpentier E. Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, 2014, 346: 1258096
- [5] Li W, Teng F, Li T, et al. Simultaneous generation and germline transmission of multiple gene mutations in rat using CRISPR-Cas systems. *Nat Biotechnol*, 2013, 31: 684-6
- [6] Hai T, Teng F, Guo R, et al. One-step generation of knockout pigs by zygote injection of CRISPR/Cas system. *Cell Res*, 2014, 24: 372-5
- [7] Wan H, Feng C, Teng F, et al. One-step generation of *p53* gene biallelic mutant *Cynomolgus* monkey via the CRISPR/Cas system. *Cell Res*, 2015, 25: 258-61
- [8] Qin W, Dion SL, Kutny PM, et al. Efficient CRISPR/Cas9-mediated genome editing in mice by zygote electroporation of nuclease. *Genetics*, 2015, 200: 423-30
- [9] Wu Y, Liang D, Wang Y, et al. Correction of a genetic disease in mouse via use of CRISPR-Cas9. *Cell Stem Cell*, 2013, 13: 659-62
- [10] Wu Y, Zhou H, Fan X, et al. Correction of a genetic disease by CRISPR-Cas9-mediated gene editing in mouse spermatogonial stem cells. *Cell Res*, 2015, 25: 67-79
- [11] Li W, Li X, Li T, et al. Genetic modification and screening in rat using haploid embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*, 2014, 14: 404-14
- [12] Zhong C, Yin Q, Xie Z, et al. CRISPR-Cas9-mediated genetic screening in mice with haploid embryonic stem cells carrying a guide RNA library. *Cell Stem Cell*, 2015, 17: 221-32
- [13] Wang J, Li X, Zhao Y, et al. Generation of cell-type-specific gene mutations by expressing the sgRNA of the CRISPR system from the RNA polymerase II promoters. *Protein Cell*, 2015, 6: 689-92
- [14] Cheng AW, Jillette N, Lee P, et al. Casilio: a versatile CRISPR-Cas9-Pumilio hybrid for gene regulation and genomic labeling. *Cell Res*, 2016, 26: 254-7