

综述

利用CRISPR-Cas9技术构建基因修饰哺乳动物模型的进展

何 笛¹ 祝献民^{1,2} 徐书旻¹ 薛志刚² 范国平^{3*}¹同济大学生命科学与技术学院系, 上海 200092; ²同济大学医学院再生医学系, 上海 200092;³加州大学洛杉矶分校人类遗传学系, 洛杉矶 90095, 美国)

摘要 基因修饰动物模型(genetically modified animal models)是研究个体发育过程和疾病中特定基因功能的一种重要工具, 在研究人类疾病发生机制、病理生理和评估新药物、新治疗方法方面有重要应用。哺乳动物因其与人类的相似性而常被用来进行人类疾病研究和药物筛选。然而, 传统构建基因修饰动物模型的同源重组等方法不仅需要培养的哺乳动物胚胎干细胞系, 而且费时费力。近年来新出现的CRISPR-Cas9基因编辑系统可以在哺乳动物中实现快速、准确的基因定点修饰。该文将介绍CRISPR-Cas9系统在构建基因修饰哺乳动物模型中的应用。

关键词 CRISPR-Cas9; 基因编辑; 哺乳动物模型

Recent Advancement in the Generation of Genetically Modified Mammalian Models via CRISPR-Cas9

He Di¹, Zhu Xianmin^{1,2}, Xu Shuyang¹, Xue Zhigang², Fan Guoping^{3*}¹School of Life Sciences and Technology, Tongji University, Shanghai 200092, China;²Department of Regenerative Medicine, Tongji University School of Medicine, Shanghai 200092, China;³Department of Human Genetics, University of California Los Angeles, CA 90095, USA)

Abstract Genetically modified animal models are important tools for understanding the gene function in development and disease. They have been widely used for modeling human pathophysiology, drug screening, efficacy evaluation and novel therapy development. However, the conventional technologies via homologous recombination in embryonic stem cell lines are time-consuming and labor-intensive to generate genetically modified mammalian animal models. Recently, the emergence of CRISPR-Cas9 genome editing technology provides a much quick, precise, and site-specific method in the modification of mammalian genomes. This review will focus on the applications of CRISPR-Cas9 in the generation of a variety of genetically modified mammals.

Keywords CRISPR-Cas9; gene editing; mammalian models

收稿日期: 2015-05-12 接受日期: 2015-06-12

国家重点基础研究发展规划(973计划)(批准号: 2015CB964702、2015CB964601)、海外及港澳学者合作研究基金(批准号: 31428016)、国家自然科学基金(重点项目)(批准号: 81430026)、上海市科委实验动物研究专项(批准号: 15140903900)、教育部留学回国人员科研启动基金(祝献民)、上海市卫生和计划生育委员会科研课题(批准号: XBR2013094)和江苏省科技计划项目(批准号: BM2014052)资助的课题

*通讯作者。Tel: 021-65982417, E-mail: guoping.fan@gmail.com

Received: May 12, 2015 Accepted: June 12, 2015

This work was supported by the National Program on Key Basic Research Project (973 Program) (Grant No.2015CB964702, 2015CB964601), the Joint Research Fund for Overseas Chinese, Hong Kong and Macao Young Scholars (Grant No.31428016), the National Natural Science Foundation of China (Key Program) (Grant No.81430026), the Experimental Animal Research Fund, Science and Technology Commission of Shanghai Municipality (Grant No.15140903900), the Scientific Research Foundation for the Returned Overseas Chinese Scholars, State Education Ministry (Zhu Xianmin), Shanghai Municipal Commission of Health and Family Planning (Grant No.XBR2013094) and Science and Technology Planning Project of Jiangsu Province (Grant No.BM2014052)

*Corresponding author. Tel: +86-21-65982417, E-mail: guoping.fan@gmail.com

网络出版时间: 2015-09-09 16:14:50 URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20150909.1614.004.html>

基因修饰动物模型是帮助我们了解基因在生物体内的功能、人类疾病发生机制和筛选新药物的重要工具。其中,基因修饰的小鼠模型是实验室最常用的研究基因功能、模拟人类疾病的一种哺乳动物模型。目前,世界上已建立了数千种与发育和疾病相关的基因修饰小鼠,这不仅加深了人们对特定基因在发育中的调控作用以及疾病产生和发展机制的认识,而且为新药物的开发提供了新的研究手段和技术平台。传统构建基因修饰小鼠模型主要有插入突变和基因打靶两种方法。插入突变是通过病毒或者转座子在目的基因中插入一段序列,从而使基因失去功能。而基因打靶则是通过同源重组造成内源基因序列的改变,包括基因敲除和敲入^[1-2]。但小鼠在解剖学、组织学和病理学分析上存在一定的局限性,并且小鼠比起灵长类或其他哺乳动物(大鼠、兔子等)与人的遗传背景相差较远,因此作为模拟人类疾病的模型有局限。另外,采用同源重组方法建立非小鼠哺乳动物模型存在缺乏相应胚胎干细胞系的瓶颈。新近,CRISPR-Cas9基因编辑技术的诞生为建立多种基因修饰的哺乳动物模型提供了简单、快速和高效的方法。

1 CRISPR-Cas9系统

以往建立基因修饰动物模型的方法包括同源重组(homologous recombination)技术、锌指核酸酶(Zinc-finger nuclease)技术和转录激活样效应因子核酸酶(transcription activator-like effector nuclease,TALEN)技术等。但是,哺乳动物成熟胚胎干细胞系的缺乏和以蛋白为导向的核酸酶系统在设计上的复杂性为这些技术的应用,特别是实现多基因同时编辑造成了困难。最近研发的成簇的、规律间隔的短回文重复序列(clustered regularly interspaced short palindromic repeats,CRISPR)-Cas9(CRISPR-associated)系统是一种在原核生物中发现的由RNA介导的核酸内切酶系统,它可以实现快速、方便地对哺乳动物的基因组进行定向修饰。

CRISPR系统是存在于细菌和古生菌基因组中的一些短的间隔重复序列,是这些原核生物用来抵抗病毒或质粒等外源DNA入侵的一种“获得性免疫防御系统”^[3]。CRISPR系统主要分为三个类型,其中II型CRISPR系统结构比较简单,被改造后广泛用于真核生物基因编辑。酿脓链球菌(*Streptoco-*

ccus pyogenes)中的II型CRISPR-Cas9系统含有以下几个主要功能位点:编码Cas9内切酶在内的四个基因(*Cas9*、*Cas1*、*Cas2*和*Csn1*);两个CRISPR非编码RNA(crRNAs)的位点,分别是反式调控激活crRNA(trans-activating CRISPR RNA, tracrRNA)位点和由间隔序列(spacer)和短重复序列(direct repeats, DR)互相间隔形成的前体crRNA(pre-crRNA)位点。这些前体crRNA位点与某些病毒和质粒的DNA序列(protospacer)同源。当外源DNA入侵时,Cas蛋白复合物能够靶向裂解外源DNA,并将它们整合在宿主细菌CRISPR位点的5'端;当外源DNA再次入侵时,这些前体crRNA序列能够复制出crRNAs,这些crRNAs因为与外源DNA同源从而能够通过碱基互补配对识别外源DNA,并且通过结合tracrRNA和Cas9蛋白,达到特异性识别和切割外源DNA^[3-7]。

Jinek等^[5]发现,Cas9蛋白发挥核酸内切酶的作用需要与crRNA和tracrRNA形成的二聚体相结合,而根据此二聚体设计的复合RNA结构——引导RNA(single guide RNA, sgRNA)可以介导Cas9识别靶位点。此外,Cas9还需要识别靶位点中一段由NGG组成的PAM(protospacer adjacent motif)序列,如果没有PAM序列的存在,即使crRNA与靶位点互补,Cas9蛋白也不能对靶位点进行切割^[4-5]。张锋实验室在2013年将酿脓链球菌中的II型CRISPR系统进行了密码子优化和改造,构建了能在真核细胞中表达CRISPR系统的载体。他们在Cas9编码序列两端各添加了一个核定位信号,用U6启动子驱动表达sgRNA,使CRISPR系统可以有效地应用于真核生物的基因编辑^[8]。在构建CRISPR-Cas9系统时,需要在靶位点中寻找PAM序列,并将PAM上游20 bp的DNA序列插入载体从而形成sgRNA编码序列;在细胞中转染载体后,表达的sgRNA能够介导Cas9蛋白在PAM序列上游约3 bp的位点切割DNA底物^[5]。

Cas9蛋白在sgRNA的介导下与基因组上的靶位点结合后可以发挥核酸酶的作用,切割靶位点导致DNA双链断裂(double-stranded breaks, DSBs)。断裂的双链DNA在生物体内可以进行非同源末端连接(non-homologous end-joining, NHEJ)或者同源指导修复(homologous directed repair, HDR)^[9],在NHEJ过程中会造成碱基随机地插入或缺失(indels),如果断裂位点在基因的编码区内则可能会导致相应的蛋白质不表达或者蛋白质功能丧失。当存在同源序列

时, 断裂的DNA则会以该同源序列为模板进行同源修复, 利用HDR途径可以实现对基因组DNA的精确修饰或者外源基因的敲入^[10-11]。

Cas9核酸酶包含两个具有切割活性的结构域, HNH结构域和RuvC结构域。HNH结构域切割与crRNA互补的DNA链, 而RuvC结构域切割非互补链^[4-5]。因此, 对Cas9蛋白其中一个结构域突变得到的Cas9切口酶(Cas9 nickase)可以只对DNA单链进行切割; 同时突变两个结构域可以得到对DNA只有结合活性而没有切割活性的dCas9蛋白。实验设计中可以通过两个Cas9 nickase的组合减少脱靶现象^[12]。而将dCas9蛋白与转录激活或抑制因子构建成融合蛋白, 则能够调控dCas9结合位点后相应基因的表达^[13-14]。

2 CRISPR-Cas9系统在构建哺乳动物基因修饰模型中的应用

2.1 早期胚胎细胞(受精卵)基因编辑

目前, 用CRISPR-Cas9系统对哺乳动物基因组进行编辑一般是通过向动物受精卵中注射体外转录的sgRNA和Cas9 mRNA或纯化后的Cas9蛋白, 将显微注射后的受精卵移回假孕动物体内从而得到基因修饰的哺乳动物模型的F0代(founder)(表1)。2013年, 南京大学的研究人员用CRISPR系统在基因组内整合了EGFP基因的杂合子小鼠中敲除了EGFP基因, 首次将CRISPR系统应用在哺乳动物的基因编辑中^[15]。随后, Rudolf Jaenisch实验室在小鼠基因组中同时敲除了Tet1和Tet2基因, 这是首次利用CRISPR系统对哺乳动物同时进行多个内源基因的敲除, 且同时敲除的效率高达80%, 证明了CRISPR系统在哺乳动物基因编辑方面的应用价值^[16]。李大力研究组在2013年分别构建了Th、Rheb、Uhrf2基因敲除的小鼠模型以及Mc3R和Mc4R双基因敲除的大鼠模型, 首次将CRISPR技术应用在小鼠以外的哺乳动物中。在2014年, 他们又在大鼠中同时敲除了Il2rg和Fah两个基因, 并且通过注射与小鼠Tgr5基因片段同源且带有外源基因的寡核苷酸链模板而实现了EcoRI和LoxP两个外源基因片段的敲入^[17-18]。中国科学院动物研究所周琪研究组利用CRISPR系统在大鼠中同时敲除了Tet1、Tet2和Tet3基因, 并且用Tet1、Tet2双敲除的大鼠精子与野生型母鼠的卵子进行体外受精, 产生的子代大鼠中也有与亲本相同的基因突变, 验证了突变基因可以由第一代基因敲除大鼠成功传递

给子代大鼠, 证明了CRISPR基因编辑的可遗传性^[19]。此外, CRISPR系统还成功在其他哺乳动物(如兔子、食蟹猴、猪等)上实现了基因敲除^[20-24]。

CRISPR系统不仅在由NHEJ介导的动物全基因组基因敲除上有广泛应用, 而且通过与sgRNA和Cas9一起注射单链或双链的同源模板, 还可以实现由HDR介导的精确的基因点突变、外源基因敲入或者条件敲除。2013年, Rudolf Jaenisch实验室通过注射与Tet1、Tet2同源的双碱基突变的单链寡聚DNA实现了对这两个基因的精确突变。同年, 他们在小鼠基因组的Nanog、Sox2和Oct4三个位点插入了标签和荧光报告基因, 并且在小鼠Mecp2基因第二个外显子两端插入了LoxP序列, 构建了Mecp2基因条件敲除的小鼠模型, 且通过在Mecp2基因的两个位点分别设计sgRNA引入两个DSB, 造成了该基因700 bp碱基的大片段缺失, 证明了CRISPR系统可以应用在条件基因敲除和大片段基因敲除中^[16,25]。利用CRISPR系统在动物模型上引入Cre-LoxP系统可以实现组织特异和可诱导的条件敲除。马元武等^[26]用两端带有LoxP序列的靶位点同源序列替换相应的靶位点序列, 通过这种方法他们构建了Cre重组酶诱导的Dnmt1、Dnmt3a和Dnmt3b敲除的大鼠模型。李劲松研究组通过在Crygc显性基因突变的白内障小鼠受精卵中注射Cas9 mRNA、sgRNA及单碱基突变的同源修复模板成功修正了该突变基因, 并且验证了修正后的基因可以传递给子代, 首次实现了用CRISPR系统治疗基因突变导致的疾病^[27]。他们还发现, 有的杂合子小鼠受精卵内没有注射外源同源修复模板, 但由于Cas9切割的靶位点能够以正常的内源等位基因为模板, 所以同样可以得到突变基因被修复后的正常小鼠。

2.2 体细胞基因编辑

利用CRISPR系统进行组织特异的基因编辑可以在成体动物模型上模拟许多人类疾病的发病机制。通过病毒载体和蛋白质转导可以将CRISPR系统引入体细胞中, 对体细胞基因进行编辑, 这种方法常被用来建立癌症动物模型。例如, Sanchez-Rivera等^[28]在依赖Cre表达Kras基因的肺癌小鼠模型中, 利用表达sgRNA、Cas9蛋白和Cre重组酶的载体来敲除在人类肺癌病人中发现的可能的抑癌基因Pten、NKx2-1和Apc, 研究这些基因与原癌基因Kras对肺癌形成和发展的协同影响。他们发现, 在这些抑癌

基因敲除的肺癌小鼠模型中肿瘤的发展更快。Xue等^[29]将携带编码Cas9蛋白和sgRNA基因的质粒载体通过小鼠尾静脉注射经门静脉进入肝脏, 在小鼠的肝脏中特异性地敲除了抑癌基因*Pten*和*p53*, 首次利用CRISPR-Cas9系统在小鼠中构建了体细胞癌症(somatic cancer)模型。利用病毒载体将CRISPR系统注射进动物组织内, 也可以实现组织特异地基因敲除。例如, Maddalo等^[30]用携带有编码Cas9蛋白和sgRNA基因的腺病毒载体灌注小鼠的气管, 通过使*Eml4*和*Alk*基因位点发生DSB, 介导了小鼠*Eml4*和*Alk*基因的重排, 成功建立了模拟人ALK⁺的非小细胞肺癌(non-small cell lung cancers, NSCLC)小鼠模型。张锋实验室通过向小鼠海马区齿回注射腺相关病毒(AAV)双载体系统, 在成年小鼠的神经元细胞中敲除了*Mecp2*基因, 构建了记忆形成障碍的Rett综合征小鼠模型。他们还在小鼠的*Rosa26*位点插入了Cas9蛋白表达组件, 构建了依赖Cre表达Cas9蛋白的小鼠模型, 他们在这种小鼠的脑和肺组织中注射携带Cre和sgRNA编码基因的AAV载体, 造成了小鼠脑和肺部特异的基因敲除^[31-32]。

此外, 应用CRISPR系统通过HDR途径可以修正疾病动物模型中原本突变的基因。Yin等^[33]通过向小鼠尾静脉注射表达Cas9和sgRNA的载体和单链修复模板成功纠正了*Fah*基因突变的小鼠, 在小鼠体内产生了FAH⁺的肝细胞, 减轻了*Fah*基因突变造成的肝损伤。Long等^[34]在单碱基突变引发的杜氏肌营养不良(Duchenne muscular dystrophy, DMD)小鼠模型(Mdx)中, 通过注射CRISPR系统和修复模板, 使得Mdx小鼠的肌纤维产生了正常的肌萎缩蛋白(Dystrophin), 纠正了肌营养不良小鼠的表型。

3 提高HDR途径效率的新研究

HDR途径可以实现动物基因组精确的基因编辑和外源基因的插入, 这为我们在动物体内更加准确地模拟人类疾病提供了可能。Liang等^[35]发现, 在人的三核受精卵中倾向于利用内源的同源模板而不是注射的外源模板通过HDR途径修复断裂基因。然而, HDR的效率只有大约0.5%~20%, 远远比不上NHEJ的效率(20%~60%)^[9]。所以, 如何进一步提高HDR的效率成了近期CRISPR技术的研究热点之一。Maruyama等^[36]发现, 在NHEJ缺陷的细胞株中HDR的效率会升高, 他们利用在NHEJ过程中参与DNA修

复的DNA连接酶IV(DNA Ligase IV)的小分子抑制剂——Scr7来抑制NHEJ的作用, 通过向CRISPR系统中添加Scr7, 细胞中HDR的效率可提高19倍, 而在小鼠模型HDR的效率也提高了两倍以上(从28.6%到58.3%)。Chu等^[9]也发现, 在引入CRISPR系统时注射短发卡RNA(short hairpin RNA, shRNA)、小分子抑制剂Scr7或者4型腺病毒的E1B55K和E4orf6蛋白, 能够通过抑制参与NHEJ过程的KU70、KU80和DNA连接酶IV, 在细胞系中将HDR效率提高8倍。这些对于提高同源修复途径效率的研究使得CRISPR技术能够更加高效地对动物基因组进行精确编辑, 对于构建模拟人类疾病的动物模型有重要意义。

4 关于CRISPR脱靶效应的研究

因为基因组编辑是对动物基因永久性的修饰, 所以基因编辑工具的特异性对于构建动物模型来说非常重要。在sgRNA识别靶位点的过程中, 可能容忍错配从而与基因组上和靶位点序列相似的其他位点结合, 引起对其他序列的修饰。Fu等^[37]用分别在引导RNA第1~19个碱基的位置上有错配碱基的sgRNA来识别人U2OS.EGFP细胞中的EGFP基因。他们发现, 如果sgRNA有一到两个碱基与靶位点不匹配也仍然能够识别靶位点, 使细胞不能表达绿色荧光蛋白, 证明sgRNA的靶向并不是高度特异的。并且对于不同的靶位点序列, sgRNA对错配的容忍性也有差异。此外, sgRNA的3'端10~12个碱基属于特异性识别的“种子”区域(seed region), 即如果这个区域与靶位点之间有错配出现很可能会影响sgRNA与目的片段的结合。但这些规律也不是绝对的, CRISPR系统有时候也会容忍sgRNA 3'端的错配, 所以CRISPR系统脱靶的规律很难预测。检测CRISPR脱靶位点的方法主要是通过比对分析生物基因组上与靶位点相似的序列来预测可能的脱靶位点进行酶切检测或者通过Sanger测序、全基因组测序(whole genome sequencing)和转录组分析(transcriptome profiling)直接检测脱靶效应^[8,37-38]。目前, 避免CRISPR系统脱靶效应的方法主要包括: 选择sgRNA时, 尽量在目的基因上选择与基因组上其他序列相差较大的序列作为靶位点; 降低Cas9蛋白的浓度以减少脱靶效应的产生, 当然, 这样也同时会降低Cas9对靶位点的切割效率; 此外, 将Cas9蛋白两个切割结构域中的一个突变掉, 使之变为只能切割DNA双链中一条链

的nickase, 将这样不同结构域突变的两个nickase结合起来, 用针对两条链的sgRNA来靶向目的基因片段也可以减少脱靶效应的产生^[12,37]。

5 各类哺乳动物模型比较

相比其他哺乳动物而言, 小鼠模型已经成为实验室应用最普遍的一种哺乳动物模型。然而, 小鼠模型在研究人类疾病的病理生理、模拟人类某些疾病特征或是药理、毒理实验方面不如其他一些哺乳动物, 因此, 建立不同种类的哺乳动物模型在研究基因功能和人类疾病发病机制和筛选治疗药物等方面有着重要意义。小鼠模型的优点是遗传信息明确、体型小便于操作、饲养成本低、寿命较短及便于观测表型, 其缺点是与人的差异性较大, 在病理生理、药理、毒理实验许多方面不能很好地模拟人类。与小鼠模型相比, 大鼠模型更多地应用在病理、药理和毒理的实验中, 但是大鼠遗传信息不如小鼠明确,

品系也不如小鼠丰富^[39]。相比于小鼠和大鼠模型, 兔子模型在生理学、解剖学和遗传学上与人类更加相似, 是模拟人类心血管和代谢类疾病的理想模型^[20]。此外, 灵长类动物如猕猴、食蟹猴等动物模型由于与人类更加相似, 常被用来研究人类的神经系统疾病、衰老相关疾病和药物代谢, 但是其繁殖周期长、饲养成本大等缺点也阻碍了灵长类动物模型的应用^[22,40]。如表1所陈列, CRISPR-Cas9技术的出现, 使得在不同种类的哺乳动物中进行基因编辑变成现实。从大鼠到猪、猴及人类三原核异常受精卵, CRISPR-Cas9都成功地导致特定基因编辑。

6 结语和展望

CRISPR作为一种新的基因编辑技术, 因其在设计上的简单性、应用上的快速和高效性而广泛、迅速地被应用于各种基因修饰动物模型的构建过程中。基因修饰哺乳动物模型的建立为我们更进一步

表1 利用CRISPR-Cas9系统构建基因修饰哺乳动物模型

Table 1 Using CRISPR-Cas9 to generate genetically modified mammalian models

物种 Species	受精卵细胞或体细胞基因编辑 Fertilized eggs or somatic gene editing	Cas9种类 Cas9 type	修饰基因 Modified gene	参考文献 References
Mouse	Germline	SpCas9	<i>EGFP</i>	[15]
	Germline	SpCas9	<i>Tet1, Tet2</i>	[16]
	Germline	SpCas9	<i>Th, Rheb, Uhrf2</i>	[17]
	Germline	SpCas9	<i>Crygc</i>	[27]
	Liver	D10ACas9	<i>Cebpa</i>	[44]
	Primary hematopoietic stem and progenitor cells	SpCas9	<i>Tet2, Runx1, Dnmt3a, Ezh2, Nf1, Smc3, p53, Asxl1</i>	[45]
	Liver	SpCas9	<i>Pten, P53</i>	[29]
	Neuron	SpCas9	<i>Dnmt1, Dnmt3a, Dnmt3b, Mecp2</i>	[31]
	Cre dependent & lung specific	SpCas9	<i>Pten, NKx2-1, Apc</i>	[28]
	Cre dependent	SpCas9	<i>NeuN, p53, Lkb1, Kras</i>	[32]
	Lung	SpCas9	<i>Eml4, Alk</i>	[30]
	Germline	SpCas9	<i>Dmd</i>	[34]
	Hepatocytes	SpCas9	<i>Fah</i>	[33]
	Germline	SpCas9	<i>Laf4, Eph, Pax3</i>	[46]
	Drug induced	D10ACas9	<i>CR8, Apc, p53</i>	[47]
Rat	Germline	SpCas9	<i>Dip2a, LacZ (knockin)</i>	[48]
	Germline	SpCas9	<i>Mc3R, Mc4R</i>	[17]
	Germline	SpCas9	<i>Tet1, Tet2, Tet3</i>	[19]
	Cre dependent	SpCas9	<i>Dnmt3a, Dnmt3b, Dnmt1</i>	[26]
Rabbit	Spermatogonial stem cells	SpCas9	<i>Epstil, Erbb3</i>	[49]
	Germline	SpCas9	<i>Il2rg, Rag1</i>	[20]
Monkey	Germline	SpCas9	<i>Ppar-g, Rag1</i>	[21]
	Germline	SpCas9	<i>p53</i>	[22]
Pig	Germline	SpCas9	<i>EGFP, CD163, CD1D</i>	[23]
	Germline	SpCas9	<i>vWF</i>	[24]
Human	Tripronuclear zygote	SpCas9	<i>HBB</i>	[35]

地了解基因在发育和疾病过程中的调控机制以及研究筛选新药物和新治疗方法都提供了有力的工具。目前, CRISPR技术也有了越来越多的新应用, 比如将针对大量基因的sgRNA克隆到慢病毒载体中, 建立一个慢病毒文库, 通过对慢病毒感染后的细胞进行筛选, 可以筛选出有特定功能的基因^[41]。此外, Cas9蛋白可以被突变为只有结合活性而没有切割活性的dCas9蛋白, 将荧光蛋白、转录调控蛋白与dCas9融合表达, 可以实现对特定基因的监测或是启动/沉默基因表达^[36]。O'connell等^[42]甚至发现, Cas9也可以以RNA为底物进行特异性的切割。最近, 张峰实验室还发现了与SpCas9蛋白具有相似活性但是分子量远小于SpCas9(~4.2 Kb)的SaCas9(~3.2 Kb), 可以实现将编码Cas9蛋白和sgRNA的基因整合进同一个腺相关病毒(AAV)载体中, 使得组织特异的基因编辑变得更加高效^[43]。

然而, 构建基因修饰的哺乳动物模型需要得到能够稳定遗传的纯合品系才能有真正的研究和应用价值。此前, 在许多利用CRISPR系统建立动物模型报道中都未提及得到的第一代基因修饰动物的等位基因纯化问题, 特别是利用CRISPR-Cas9系统同时敲除多基因时, 如何快速得到纯合子是建立动物模型的关键。利用CRISPR-Cas9系统构建能够模拟人类疾病的哺乳动物模型还面临诸多问题, 最近, 中山大学的研究人员用辅助生殖中废弃的三核受精卵检测了CRISPR系统编辑 β 球蛋白时的脱靶现象和HDR的低效率, 这对CRISPR系统应用在人类基因编辑中的伦理和安全问题提出了挑战^[35]。CRISPR-Cas9这个崭新的基因编辑工具虽然还有许多需要解决的问题, 但相信随着对CRISPR-Cas9系统研究的不断深入, 该技术可以帮我们更好地研究基因功能, 了解甚至治疗人类相关疾病。

参考文献 (References)

- Copeland NG, Jenkins NA. Harnessing transposons for cancer gene discovery. *Nat Rev Cancer* 2010; 10(10): 696-706.
- Capecchi MR. Gene targeting in mice: Functional analysis of the mammalian genome for the twenty-first century. *Nat Rev Genet* 2005; 6(6): 507-12.
- Jansen R, Embden JD, Gaastra W, Schouls LM. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Mol Microbiol* 2002; 43(6): 1565-75.
- Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, Boyaval P, Moineau S, *et al.* CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science* 2007; 315(5819): 1709-12.
- Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 2012; 337(6096): 816-21.
- Anders C, Niewoehner O, Duerst A, Jinek M. Structural basis of PAM-dependent target DNA recognition by the Cas9 endonuclease. *Nature* 2014; 513(7519): 569-73.
- Wiedenheft B, Sternberg SH, Doudna JA. RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea. *Nature* 2012; 482(7385): 331-8.
- Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, *et al.* Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* 2013; 339(6121): 819-23.
- Chu VT, Weber T, Wefers B, Wurst W, Sander S, Rajewsky K, *et al.* Increasing the efficiency of homology-directed repair for CRISPR-Cas9-induced precise gene editing in mammalian cells. *Nat Biotechnol* 2015; 33(5): 543-8.
- Heyer WD, Ehmsen KT, Liu J. Regulation of homologous recombination in eukaryotes. *Annu Rev Genet* 2010; 44: 113-39.
- Meyer M, De Angelis MH, Wurst W, Kuhn R. Gene targeting by homologous recombination in mouse zygotes mediated by zinc-finger nucleases. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107(34): 15022-6.
- Shen B, Zhang W, Zhang J, Zhou J, Wang J, Chen L, *et al.* Efficient genome modification by CRISPR-Cas9 nickase with minimal off-target effects. *Nat Methods* 2014; 11(4): 399-402.
- Konermann S, Brigham MD, Trevino AE, Joung J, Abudayyeh OO, Barcena C, *et al.* Genome-scale transcriptional activation by an engineered CRISPR-Cas9 complex. *Nature* 2015; 517(7536): 583-8.
- Gilbert LA, Larson MH, Morsut L, Liu Z, Brar GA, Torres SE, *et al.* CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes. *Cell* 2013; 154(2): 442-51.
- Shen B, Zhang J, Wu H, Wang J, Ma K, Li Z, *et al.* Generation of gene-modified mice via Cas9/RNA-mediated gene targeting. *Cell Res* 2013; 23(5): 720-3.
- Wang H, Yang H, Shivalila CS, Dawlaty MM, Cheng AW, Zhang F, *et al.* One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell* 2013; 153(4): 910-8.
- Li D, Qiu Z, Shao Y, Chen Y, Guan Y, Liu M, *et al.* Heritable gene targeting in the mouse and rat using a CRISPR-Cas system. *Nat Biotechnol* 2013; 31(8): 681-3.
- Shao Y, Guan Y, Wang L, Qiu Z, Liu M, Chen Y, *et al.* CRISPR/Cas-mediated genome editing in the rat via direct injection of one-cell embryos. *Nat Protoc* 2014; 9(10): 2493-512.
- Li W, Teng F, Li T, Zhou Q. Simultaneous generation and germline transmission of multiple gene mutations in rat using CRISPR-Cas systems. *Nat Biotechnol* 2013; 31(8): 684-6.
- Yan Q, Zhang Q, Yang H, Zou Q, Tang C, Fan N, *et al.* Generation of multi-gene knockout rabbits using the Cas9/gRNA system. *Cell Regen (Lond)* 2014; 3(1): 12.
- Niu Y, Shen B, Cui Y, Chen Y, Wang J, Wang L, *et al.* Generation of gene-modified cynomolgus monkey via Cas9/RNA-mediated gene targeting in one-cell embryos. *Cell* 2014; 156(4): 836-43.
- Wan H, Feng C, Teng F, Yang S, Hu B, Niu Y, *et al.* One-step generation of p53 gene biallelic mutant Cynomolgus monkey via the CRISPR/Cas system. *Cell Res* 2015; 25(2): 258-61.
- Whitworth KM, Lee K, Benne JA, Beaton BP, Spate LD, Murphy SL, *et al.* Use of the CRISPR/Cas9 system to produce genetically

- engineered pigs from *in vitro*-derived oocytes and embryos. *Biol Reprod* 2014; 91(3): 78.
- 24 Hai T, Teng F, Guo R, Li W, Zhou Q. One-step generation of knockout pigs by zygote injection of CRISPR/Cas system. *Cell Res* 2014; 24(3): 372-5.
- 25 Yang H, Wang H, Jaenisch R. Generating genetically modified mice using CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Nat Protoc* 2014; 9(8): 1956-68.
- 26 Ma Y, Zhang X, Shen B, Lu Y, Chen W, Ma J, *et al.* Generating rats with conditional alleles using CRISPR/Cas9. *Cell Res* 2014; 24(1): 122-5.
- 27 Wu Y, Liang D, Wang Y, Bai M, Tang W, Bao S, *et al.* Correction of a genetic disease in mouse via use of CRISPR-Cas9. *Cell Stem Cell* 2013; 13(6): 659-62.
- 28 Sanchez-Rivera FJ, Papagiannakopoulos T, Romero R, Tammela T, Bauer MR, Bhutkar A, *et al.* Rapid modelling of cooperating genetic events in cancer through somatic genome editing. *Nature* 2014; 516(7531): 428-31.
- 29 Xue W, Chen S, Yin H, Tammela T, Papagiannakopoulos T, Joshi NS, *et al.* CRISPR-mediated direct mutation of cancer genes in the mouse liver. *Nature* 2014; 514(7522): 380-4.
- 30 Maddalo D, Manchado E, Concepcion CP, Bonetti C, Vidigal JA, Han YC, *et al.* *In vivo* engineering of oncogenic chromosomal rearrangements with the CRISPR/Cas9 system. *Nature* 2014; 516(7531): 423-7.
- 31 Swiech L, Heidenreich M, Banerjee A, Habib N, Li Y, Trombetta J, *et al.* *In vivo* interrogation of gene function in the mammalian brain using CRISPR-Cas9. *Nat Biotechnol* 2015; 33(1): 102-6.
- 32 Platt RJ, Chen S, Zhou Y, Yim MJ, Swiech L, Kempton HR, *et al.* CRISPR-Cas9 knockin mice for genome editing and cancer modeling. *Cell* 2014; 159(2): 440-55.
- 33 Yin H, Xue W, Chen S, Bogorad RL, Benedetti E, Grompe M, *et al.* Genome editing with Cas9 in adult mice corrects a disease mutation and phenotype. *Nat Biotechnol* 2014; 32(6): 551-3.
- 34 Long C, Mcanally JR, Shelton JM, Mireault AA, Bassel-Duby R, Olson EN. Prevention of muscular dystrophy in mice by CRISPR/Cas9-mediated editing of germline DNA. *Science* 2014; 345(6201): 1184-8.
- 35 Liang P, Xu Y, Zhang X, Ding C, Huang R, Zhang Z, *et al.* CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human tripronuclear zygotes. *Protein Cell* 2015; 6(5): 363-72.
- 36 Maruyama T, Dougan SK, Truttmann MC, Bilate AM, Ingram JR, Ploegh HL. Increasing the efficiency of precise genome editing with CRISPR-Cas9 by inhibition of nonhomologous end joining. *Nat Biotechnol* 2015; 33(5): 538-42.
- 37 Fu Y, Foden JA, Khayter C, Maeder ML, Reyon D, Joung JK, *et al.* High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. *Nat Biotechnol* 2013; 31(9): 822-6.
- 38 Wu X, Kriz AJ, Sharp PA. Target specificity of the CRISPR-Cas9 system. *Quant Biol* 2014; 2(2): 59-70.
- 39 Jacob HJ. Functional genomics and rat models. *Genome Res* 1999; 9(11): 1013-6.
- 40 Sasaki E. Prospects for genetically modified non-human primate models, including the common marmoset. *Neurosci Res* 2015; 93: 110-5.
- 41 Sanjana NE, Shalem O, Zhang F. Improved vectors and genome-wide libraries for CRISPR screening. *Nat Methods* 2014; 11(8): 783-4.
- 42 O'connell MR, Oakes BL, Sternberg SH, East-Seletsky A, Kaplan M, Doudna JA. Programmable RNA recognition and cleavage by CRISPR/Cas9. *Nature* 2014; 516(7530): 263-6.
- 43 Ran FA, Cong L, Yan WX, Scott DA, Gootenberg JS, Kriz AJ, *et al.* *In vivo* genome editing using *Staphylococcus aureus* Cas9. *Nature* 2015; 520(7546): 186-91.
- 44 Cheng R, Peng J, Yan Y, Cao P, Wang J, Qiu C, *et al.* Efficient gene editing in adult mouse livers via adenoviral delivery of CRISPR/Cas9. *FEBS Lett* 2014; 588(21): 3954-8.
- 45 Heckl D, Kowalczyk MS, Yudovich D, Belizaire R, Puram RV, Mcconkey ME, *et al.* Generation of mouse models of myeloid malignancy with combinatorial genetic lesions using CRISPR-Cas9 genome editing. *Nat Biotechnol* 2014; 32(9): 941-6.
- 46 Kraft K, Geuer S, Will AJ, Chan WL, Paliou C, Borschiwer M, *et al.* Deletions, inversions, duplications: Engineering of structural variants using CRISPR/Cas in mice. *Cell Rep* 2015; 10(5): 833-9.
- 47 Dow LE, Fisher J, O'rourke KP, Muley A, Kasthuber ER, Livshits G, *et al.* Inducible *in vivo* genome editing with CRISPR-Cas9. *Nat Biotechnol* 2015; 33(4): 390-4.
- 48 Zhang L, Jia R, Palange NJ, Satheka AC, Togo J, An Y, *et al.* Large genomic fragment deletions and insertions in mouse using CRISPR/Cas9. *PLoS One* 2015; 10(3): e0120396.
- 49 Chapman KM, Medrano GA, Jaichander P, Chaudhary J, Waits AE, Nobrega MA, *et al.* Targeted germline modifications in rats using CRISPR/Cas9 and spermatogonial stem cells. *Cell Rep* 2015; 10(11): 1828-35.