综述

可编辑核酸酶介导的哺乳动物基因敲入技术最新进展

张敏杰¹ 孙 玲¹ 刘 真² 蔡毅君² 孙 强² 杨宇丰¹ 陈文锋^{1*} (¹福州大学生命科学研究所,福州 350108; ²中国科学院上海生命科学研究院神经科学研究所,上海 200031)

摘要 实验哺乳动物模型是研究基础生物学及人类疾病的重要工具,对实现转基因操作,尤 其是基因敲入(knock-in, KI),具有重大意义。锌指核酸酶(zinc-finger nucleases, ZFN)、类转录激活 因子效应物核酸酶(transcription activator-like effector nucleases, TALEN)和RNA介导的、基于成簇 的规律间隔的短回文重复序列和Cas9蛋白的DNA核酸内切酶[clustered regulatory interspaced short palindromic repeat (CRISPR)/Cas9-based RNA-guided DNA endonucleases, CRISPR/Cas9]等的出现, 为科研工作者提供了革命性的转基因操作工具。这些可编辑核酸酶通过在靶标序列位置产生双链 断裂缺口(double strand breaks, DSBs),并在同源修复模板存在的情况下发生同源重组,进而实现精 确的基因敲入。该文主要综述了这些技术的原理及其在哺乳动物KI中取得的最新进展、提高KI效 率以及降低脱靶效应的举措等,将有助于KI技术在未来转基因实践中的广泛应用。

关键词 基因敲入; 锌指核酸酶; 类转录因子效应物核酸酶; CRISPR/Cas9; 哺乳动物

Latest Progress of Gene Knock-in Mediated by Programmable Nucleases in Mammals

Zhang Minjie¹, Sun Ling¹, Liu Zhen², Cai Yijun², Sun Qiang², Yang Yufeng¹, Chen Wenfeng¹* (¹Institute of Life Sciences, Fuzhou University, Fuzhou 350108, China; ²Institute of Neuroscience, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

Abstract Mammalian model animals have contributed significantly to the exploration of basic biology and human diseases. The feasibility to achieve genome engineering in mammals, especially targeted gene knockin (KI) is critical in this course. Zinc-finger nucleases (ZFN), transcription activator-like effector nucleases (TALEN) and clustered regulatory interspaced short palindromic repeat (CRISPR)/Cas9-based RNA-guided DNA endonucleases (CRISPR/Cas9) are sparking a new revolution in biological research. These programmable nucleases enable relatively efficient and precise KI by inducing targeted DNA double-strand breaks (DSBs) that stimulate homologous recombination (HR) at the presence of homologous repair templates. Here, we review the principles of these technologies and their applications for gene KI in mammals. We also discuss latest strategies to

收稿日期: 2015-08-12 接受日期: 2015-10-14

福州大学校人才启动基金(批准号: XRC1463)、福州大学科技创新基金(批准号: XJJ1201、XJ1202)、国家科技支撑计划(批准号: 2014BAI03B00)和上海市科学技术委员会项目(批准号: 14140900100)资助的课题

^{*}通讯作者。Tel: 0591-22865096, E-mail: chenwenfeng@fzu.edu.cn

Received: August 12, 2015 Accepted: October 14, 2015

This work was supported by the Startup Funds from Fuzhou University (Grant No.XRC1463), the Technology Innovation Funds from Fuzhou University (Grant No.XJJ1201, XJ1202), the National Key Technology R&D Program of China (Grant No.2014BAI03B00) and Shanghai City Committee of Science and Technology project (Grant No.14140900100)

^{*}Corresponding author. Tel: +86-591-22865096, E-mail: chenwenfeng@fzu.edu.cn

网络出版时间: 2016-01-08 14:52:32 URL: http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20160108.1452.004.html

elevate KI efficiency and reduce off-target ratio, which will enhance the overall performance of future transgenic practice.

Keywords knock-in; zinc-finger nucleases; transcription activator-like effector nucleases; CRISPR/Cas9; mammalian

随着新测序技术的发展及一些大的基因注解 工程的实施与实现,研究人员对基因组革命更有信 心。研究者相信,基因组革命将会加快基础科学的 研究进程,辅助逐步实现"精确医疗",包括实现个性 化医疗。然而其面临的主要问题是:如何将测序得 到的海量数据转化成可以指导科研或临床应用的信 息。通过功能基因的研究,即基因型如何影响表型, 可为我们提供部分解题思路。这要求研究者能够对 基因组进行精确操作。

真核生物(尤其是哺乳动物)的基因组包含有成 千上万的基因,且较难进行操作。基因组操作的突 破之一就是同源重组介导的基因打靶。所谓同源重 组(homologous recombination, HR)就是含有同源序 列的DNA分子之间或分子之内的重新组合。HR介 导的基因打靶被应用于各种模式生物的基因敲入 (knock-in, KI)和敲除(knock-out, KO),大大推动许多 生物领域的研究。然而,自然情况下同源重组发生 的概率极低,约每10⁶~10⁹个细胞才发生一次,阻碍了 该技术在基因打靶实验中的大规模应用。哺乳动物 作为重要的模式生物,对特定基因实现KI具有重要 的应用。尽管研究人员们为此付出很多努力,然而 哺乳动物的KI受HR效率低等的限制,早期基于HR 的KI仅在大鼠和小鼠上获得广泛的应用。 面对这些挑战,近几年来发展出一系列以可编 辑的核酸酶为基础的基因组编辑技术,能较有效地进 行基因打靶。Plessis等^[1]和Rouet等^[2]的一系列研究表 明,目标DNA的双链断裂(DNA double-strand breaks, DSBs)能够促进同源重组介导的基因组编辑。随后, Bibikova等^[3-4]证明,锌指蛋白能够进行高效的位点特 异的同源重组。此外,也有研究显示,在DSBs处没有 提供修复模板的条件下,可能会通过非同源末端连 接修复(nonhomologous end-joining, NHEJ)途径进行 修复。NHEJ途径因缺乏精确性而导致修复的同时引 入插入突变或者删除突变^[5](图1)。这些早期的研究 建立了通过DSB诱导的HR和NHEJ进行基因组编辑。 本文主要回顾以往位点特异的核酸酶技术的发展,并 讨论这些技术在哺乳动物转基因敲入中的应用以及 介绍一些提高敲入效率的方法。

1 可编辑的核酸酶

通过可编辑核酸酶引入DNA特异位点的DSBs 可促进同源重组进行KI。目前主要有三种可编辑 的DNA结合蛋白核酸酶:基于真核生物转录因子的 锌指核酸酶(zinc-finger nuclease, ZFN)^[7]、来自植 物病原菌黄单胞菌(*Xanthomonas*)的类转录激活因 子效应物核酸酶(transcription activator-like effector



Fig.1 The NHEJ or HR repair mechanism induced by DSBs (modified from reference [6])



A: ZFN的结构示意图; B: TALEN的结构示意图; C: Cas9的结构示意图。

A: structural representations of ZFN; B: structural representations of TALEN; C: structural representations of Cas9.

图2 ZFN、TALEN、Cas9的结构示意图(根据参考文献[12]修改)



nuclease, TALEN)^[8-9]和最近在细菌适应性免疫系统CRISPR中发现的RNA引导的DNA核酸内切酶Cas9^[10-11](图2)。

1.1 锌指核酸酶(ZFN)

ZFN由两个结构域组成:具有DNA结合功能的 锌指蛋白(zinc finger proteins, ZFPs)和具有DNA切割 功能的核酸酶Fok 1。ZFPs是一种具有序列特异性, 且可以灵活组装的真核细胞转录因子。ZFPs一般 由3~6个Cys2-His2锌指重复单位串联而成,每个ZFP 由约30个氨基酸组成,可识别3个连续的碱基。ZFP-DNA共结晶的结果表明,每个ZFP和DNA之间的相 互作用很大程度上是功能自主的^[13]。于是就有人提 出"积木组装"的概念,即将几个不同ZFPs组装成能 够识别特定的靶标序列的多肽^[14],并与核酸酶Fok I 形成融合蛋白以实现基因组特异性切割的目的。因 为Fok I只有其二聚体才具有核酸内切酶活性,所以 需要设计识别相邻序列的两个ZFNs才能实现对目 的DNA的切割。研究表明,当锌指蛋白识别目标序 列后,Fok I更容易形成二聚体,两个结合位点之间相 隔4~7 bp效率较高^[3]。随着能够识别大部分三联体 碱基的ZFPs的设计,这种方法已经被运用到更高级 的真核细胞中进行基因编辑^[15],然而由于价格昂贵、 切割效率低限制了其应用。

1.2 类转录激活因子效应物核酸酶(TALEN)

TALEN在结构和作用原理上和ZFN类似,同样 是由DNA结合蛋白和核酸酶Fok I构成,同样是结合

Table 1 Comparison of ZETA, TALEN and CKIST K				
内容	锌指核酸酶	类转录激活因子效应物核酸酶	Cas9核酸酶	
Contents	ZFN	TALEN	Cas9	
Gene target way	DNA binding protein recognition	DNA binding protein recognition	RNA-DNAbase complementarity	
Design	Difficult	Laborious	Easy	
KI efficiency	Low	High	High	
Targeting sequence	Limited by ZFN modules	Unlimited	Limited by PAM sequence	
Off-target effects ^[23]	Yes	Yes	Yes	
High throughput targeting ^[23]	No	Limited	Yes	

表1 ZFN、TALEN和Cas9方法比较 Table 1 Comparison of ZFN. TALEN and CRISPR

到相邻的两个目标序列区域, Fok I二聚体进行切割。 主要的不同是DNA结合蛋白TALEs, TALEs发现于 一种植物致病菌黄单胞杆菌中^[8]。TALEs蛋白由三 个结构域组成: DNA结合结构域、核定位信号和激 活基因转录结构域。TALE蛋白的DNA结合结构域 由12~30个重复单元串联构成,每个重复单位能够识 别1个DNA碱基。每个重复单元由34个氨基酸残基 组成,其中第12、13位氨基酸残基是高度可变的,因 此被称为重复可变双残基(repeat variable diresidue, RVD)^[16]。每个重复单位的RVD负责识别1个DNA 碱基,不同的RVD能够特异地识别4种碱基中的1种 或多种。大部分研究中采用的RVDs用于识别不同 碱基,主要是:Asn和Ile(NI)用于识别A碱基,Asn和 Gly(NG)用于识别T碱基, Asn和Lys(NK)或者Asn和 His(NH)用于识别G碱基, His和Asp(HD)用于识别C 碱基。和ZFN一样,将不同的TALE重复单元串联起 来,设计出能够识别靶标序列的TALE。

需要注意的是, TALEs识别的序列必须以T碱基 开始, 有研究表明, 这会影响TALEN的结合效率^[17]。 虽然TALE重复单位识别的是单个碱基相对于ZFPs 识别三个碱基具有更大的灵活性, 但因重复序列多 而导致的分子克隆和构建载体困难是其一大缺点。 为了规避这个缺点有几种快速合成方案可供选择, 包括Golden Gate分子克隆方法^[18]、固相合成的高 通量方法^[19]和长黏末端的LIC(ligation-independent cloning)组装方法^[20]等。目前, TALEN技术已应用于 植物、酵母、动物以及人类细胞等。

1.3 CRISPR/Cas9系统

CRISPR/CAS系统是一种细菌和古细菌的适应 性免疫防御机制,能够降解外源遗传物质。研究人员 将自然界的CRISPR/CAS系统进行改造,得到一些比 较简单的人工CRISPR/Cas9系统。Cas9系统包括两 种组分: Cas9核酸酶和单链引导RNA(sgRNA)。Cas9 蛋白是一种内切酶,包含有RuvC和HNH两个酶活中 心。Cas9蛋白N-端的RuvC的酶活中心切割非互补链, HNH结构域则是切割互补链。sgRNA主要包括三个 区域:能够与基因组结合起到定位作用的20 nt的互 补区、模拟tracrRNA-crRNA复合物发夹结构约40 nt 的Cas9蛋白结合区和约40 nt的转录终止子。Cas9系 统能够识别的位点必须要有上游的前间隔相邻基序 (proto-spacer adjacent motifs, PAM)。PAM和PAM前 20 nt序列决定了Cas9系统的特异性^[21]。Cas9系统的 作用原理如下:在外源的sgRNA的指引下,Cas9蛋白 和sgRNA复合物结合到目标位置并切割DNA双链 产生DSBs,进而激活NHEJ或者HR修复介导的基因 组编辑^[10-11]。

在基于CRISPR/CAS系统几十年的研究中发 现,该系统中的Type II相对简单,只要有Cas9、内源 的Rnase III和crRNA-tracrRNA这三种组分就能够实 现对核酸的位点特异的切割。Siksnys等^[22]首先证 明了type II CRISPR系统是可移植的, 他们将嗜热链 球菌(Streptococcus thermophilus)的type II CRISPR 位点转移到大肠杆菌(Escherichia coli)中也仍能保 持活性。2012年,美国Lawrence Berkeley国家实 验室的Doudna课题组以及瑞典Umea University的 Charpentier课题组将crRNA-tracrRNA的双链RNA 复合体改造为单链嵌合体结构,将其命名单链引导 RNA(sgRNA)^[21]。他们在细胞中验证后发现, sgRNA 同样能够指导Cas9蛋白对外源DNA进行切割,并且 这一过程并不需要外源的RNase III。麻省理工学院 的Zhang研究组和哈佛大学的Church课题组后续报 道了利用type II CRISPR系统在哺乳动物细胞中实 现了基因编辑[10-11]。随后这一操作系统被用于一系 列的模式动物的基因编辑实验,并获得了成功。

与ZFN和TALEN相比, CRISPR/Cas9系统采用 DNA-RNA结合的方式代替DNA与蛋白质的结合方 式,令该系统设计简洁、效率更高,使得哺乳动物基因编辑的成功率大大提升(表1)。

2 可编辑的核酸酶用于哺乳动物KI

可编辑的核酸酶在靶标位点产生DSBs, 会引起 细胞的NHEJ和HR两种DNA修复机制。如果在产生 DSBs的同时, 在靶标位置引入一个人工合成的同源 修复模板, 那么细胞就会以一定的概率通过HR的途 径修复, 将目标序列整合到染色体中。同源修复模 板主要是以质粒形式存在, 称之为"donor质粒"。为 了保证donor质粒能够和靶标序列进行重组, 一般需 要两边有同源臂序列, 同源序列长度通常几百到上 千碱基, 这就是基因编辑中KI的主要原理(图1)。利 用这一技术, 一方面, 可以在同源臂之间连接上一些 外加的元件, 比如报告基因、抗生素抗性基因和标 签序列等; 另一方面, 还可以替换内源的碱基序列, 修复基因突变或形成新的突变, 应用于临床前研究 的模式动物构建等(表2)。

2.1 ZFN用于哺乳动物KI

2003年, Bibikova等^[4]第一个利用ZFN技术成功 地进行KI,他们将果蝇中突变的yellow基因成功地 替换成野生型的yellow。接着,在人的干细胞、大 鼠细胞等哺乳动物细胞也成功运用了ZFN技术。实 现这些的关键是,利用合适的启动子驱动ZFN在靶 细胞中表达。由于ZFN切割效率低、对于细胞、果 蝇、线虫等一些可以大量培养且成本不高的体系可 通过筛选大量的后代得到阳性结果,但这样的情况 却不适合哺乳动物。传统的方法是,通过ZFN改造 哺乳动物的体细胞或ES细胞(embryonic stem cell), 然后将改造成功细胞的细胞核移植到卵细胞中,最 后得到转基因品系[24]。然而,这样的流程却是十分 的繁琐。直到2008年,有研究发现,注射ZFN mRNA 和donor DNA可以提高同源重组和非同源重组事 件的概率^[6]。2010年, Meyer等^[25]将ZFN mRNA和 donor DNA注射到小鼠胚胎中,成功地将报告基因 β-Galactosidase和Venus整合到Rosa26。Cui等^[26]也 在小鼠和大鼠中成功地实现KI。

2.2 TALENs用于哺乳动物KI

Miller等^[9]在人类细胞中利用TALEN技术改造 了*NTF3*和CCR5两个基因。该技术在人类细胞系、 大鼠、小鼠、牛、羊、猪和猴子等哺乳动物中的应 用也纷纷被报道。

有研究报道,在TALEN技术的帮助下打靶了小 鼠ES细胞的Sry和Uty基因,并将GFP插入到这些基 因当中,通过核移植技术得到了KI小鼠^[27]。除了基 因打靶ES细胞,也有研究报道了注射TALEN mRNAs 到受精卵中,直接产生KI的后代小鼠。Wefers等^[28] 就第一个报道了利用TALEN技术直接在受精卵中 基因打靶成功构建KI小鼠。但是, 和典型的基因打 靶不同,他们采用一段144 bp的小单链寡脱氧核苷 酸替代了原来的donor质粒作为修复模板。这些小 的单链寡脱氧核苷酸适用于对基因组进行小范围的 改变,如精确地引入单碱基位点的突变,从而建立疾 病模型。然而,当需要对基因组进行较大的改变时, 还是需要donor质粒。Sommer等^[29]提出TALEN诱导 产生的DSBs是否能够整合大片段的同源修复模板 质粒的问题,并报道了通过注射TALEN mRNAs和 donor质粒,将14.4 Kb片段整合到小鼠的Satb1位点 上。2014年, Hummler等^[30]在大鼠中实现了对Nr3c1 基因的KI。

不仅在鼠类实现了KI,在猪、羊和牛等也 实现了KI。Cui等^[31]利用TALEN将人乳铁蛋白 (human lactoferrin, *hLF*)替换了羊的β乳球蛋白 (β-lactoglobulin, *BLG*),提高了羊奶的营养价值。同 时,他们也将小鼠的SP110基因敲入到牛的基因组 中,最终得到对牛肺结核病有抗性的转基因牛^[32]。 这些结果表明,TALENs能够被应用于牛羊育种,推 动畜牧业的发展。2014年,云南省灵长类生物医学 重点实验室、同济大学医学院等处的研究人员,通 过TALENs技术,获得了出生就携带MECP2基因突 变的雌性食蟹猴,这是采用TALENs技术成功构建 的首个非人灵长类动物模型^[33]。然而,猴子的KI至 今仍然没有人报道。猴子作为与人最接近的非人 灵长类动物,实现猴子的KI对基础科研有重要的意 义。

2.3 CRISPR/Cas9用于哺乳动物KI

2013年3月, 麻省理工学院和哈佛大学的研究 团队分别利用产脓链球菌和嗜热链球菌中的type II CRISPR系统, 首次在小鼠和人类细胞中实现基因组 编辑^[10-11]。他们的研究结果发表于同一期《Science》 杂志上。随后, 一系列的模式动物的基因编辑实验 也得到了大量的报道。2013年末, CRISPR/Cas9基 因编辑技术被美国科学杂志评选为2013年年度十大 突破之一, 同时, 英国《自然方法》(Nature Methods)

核酸酶	物种	基因	参考文献
Nucleases	Organism	Gene	References
ZFN	Human cells	CCR5, F9, AAVS1	[39-40]
	Mouse	Rosa26, Mdr1a	[25-26]
	Rat	Mdr1a, PXR	[26]
TALEN	Human cells	NTF3, CCR5	[9]
	Mouse	Rab38, Sry, Uty, Satb1	[27-29]
	Rat	Nr3c1	[30]
	Goat	BLG	[31]
	Cattle	SP110	[32]
CRISPR/Cas9	Human cells	AAVSI	[11]
	Mouse	Nanog, Sox2, Oct4, Mecp2 🗸	[34]
	Rat	Dnmt3a, Dnmt3b	[35]
	Monkey ES cells	HPRT	[37]
	Humanzygotes	HBB	[38]

	表2	基因组编辑核酸酶在哺乳动物KI中应用简短列表
Table 2	A short list o	f the genome editing nucleases used for KI applications in mammals

杂志也将CRISPR/Cas9基因编辑技术评选为2013年 年度最受关注、影响广泛的技术成果之一。

CRISPR/Cas9系统的发展之快令人咋舌, 在短 短3年间,关于该系统的报道如雨后春笋。一方面, 由于该系统本身具有设计方便、切割效率高等优 势;另一方面,得益于多年来可编辑的核酸酶在基因 编辑中应用的研究。于是,在Zhang课题组文章发表 几个月后, Rudolf课题组在老鼠胚胎中注射了Cas9 mRNA、sgRNA和修复模板(单链寡脱氧核苷酸或 者donor质粒),分别在Nanog、Sox2和Oct4三个基因 中敲入了标签或荧光蛋白^[34]。同时,在Mecp2基因 中敲入了两个loxp位点,成功构建了可以条件敲除 的小鼠。随后也有报道在大鼠Dnmt3a和Dnmt3b基 因中敲入了两个loxp位点[35]。有些课题组报道,利 用CRISPR/Cas9系统对猪、山羊、猴子[36]等大型 哺乳动物进行基因敲除,然而对这些大型哺乳动物 的基因敲入还没有报道。同时,已有课题组报道对 猴子ES细胞的KI^[37],但是不管是利用核移植或者是 早期胚胎ES细胞移植实现猴子的KI都存在很大的 技术挑战,尤其是后者。利用直接注射Cas9来实现 猴子的KI实际上是很困难的,主要有两点原因:一 是直接注射Cas9的KI效率低;二是很大一部分细胞 没有实现KI而是通过NHEJ途径产生突变,这影响 了F0代的表型分析以及F1代的阳性率。值得一提 的是,中山大学黄军就课题组利用CRISPR/Cas9基 因组编辑技术首次对"不能存活"的人类胚胎实行 了基因改造,将胚胎中地中海贫血疾病的致病基因 HBB(hemoglobin beta-chain)改造成健康基因^[38]。然 而,这篇文章引起了科学界对于这类工作伦理问题

的激烈讨论。

3 改进KI效率一些措施总结分析

与KO相比, KI方法为基因功能研究提供了更 广泛的应用,包括:在基因组原始的背景下对基因进 行精确的修改(包括点突变)、为基因的调节或者生 理事件产生可视化的报告以及驱动转基因的表达 等。然而,影响KI方法效率的主要原因是当利用核 酸酶诱发产生DSBs时,诱发的DNA修复反应主要以 NHEJ为主。这会带来基因组的不稳定,包括在DSBs 附近局部产生indels, 如随机的缺失、重排等^[41]。即 使在有同源序列目标存在的条件下,虽然有部分反 应可以通过HR途径介导进行重组修复实现KI,但是 indels的产生也可能在同源重组修复中引入不可预测 的突变。如果这些突变是致死的,那么会进一步降 低KI的效率。为了克服这个问题可通过以下几种方 法解决。(1)利用生殖细胞特异的顺式调控元件将可 编辑的核酸酶限制在生殖细胞中表达[42-43]。该方法 不仅可以将核酸酶限制在特定细胞中,防止在其他 重要细胞中产生突变,导致的生物个体死亡;也可以 让核酸酶在生殖细胞表达时间延长,可遗传率增高。 (2)选择产生致死突变可能性较低的区域,如在内含 子序列中进行KI,只要在敲入序列中加入合适的拼 接信号就能产生有功能的基因融合表达[44]。(3)降 低NHEJ的效率。例如,可以通过添加抑制连接酶lig4 的小分子药物SCR7(C18H14N4OS)或者利用RNAi下调 NHEJ途径中关键的蛋白机器来实现[45]。此外,有文 献报道通过体外培养的细胞高通量筛选4 000个已 知生物活性的小分子化合物,鉴定出β3肾上腺素受 体激动剂和胞内蛋白内质网转移高尔基体抑制剂两种小分子化合物可能通过抑制NHEJ从而提高HR修复的比例^[46]。(4)通过调控细胞周期改变NHEJ和HR 发生比例。鉴于HR主要发生在细胞周期中的S后期 到G₂期之间,有研究发现,用药物控制细胞周期可提 高HR发生的比例^[47]。(5)直接提高HR的效率。我们 实验室发现,在大鼠、小鼠等哺乳动物中过表达影 响HR途径的重要因子,可大幅度提高KI的效率(待 发表)。

此外,可编辑核酸酶的导入方法也会影响KI 的效率。一般来说,导入编码核酸酶基因到细胞 中主要是通过质粒载体、病毒载体和体外转录的 mRNA。然而,这些途径都存在一定的局限性。如 DNA质粒或者mRNA通过电转或者脂质体转染进 入细胞,只能局限在一些细胞类型,且这些试剂存 在一定的毒性,再加上表达时间上的延迟和表达时 间短的问题,最终导致效率低下。而病毒载体的方 法不仅操作困难,且容易引入一些突变。于是,有 人提出导入纯化的核酸酶蛋白质的方法^[48],这种方 法产生off-target的概率更低、毒性更低,而且不受 细胞类型的限制。此外,还有人提出将Cas9整合到 基因组中,用生殖腺特异的或者泛表达的promoter 驱动,这种方法可提高Cas9的表达量,KI的效率更 高^[42]。

4 改进KI精确性一些措施总结分析

哺乳动物的基因组具有复杂性,经常包含一些 多拷贝的序列,这些序列可能与靶标序列相似或者 具有很高的同源性,这就会导致一定程度上的脱靶 效应(off-target)和细胞毒性。然而,可编辑的核酸 酶在基因分析和临床医学的应用中,要求它们必须 具有严格的特异性。为了解决这一问题,蛋白结构 改造[7]和筛选[49]已经被用来优化ZFN和TALEN切割 的特异性。将核酸酶改造成切口酶也可以降低offtarget的概率,因为缺口只存在于DNA的单链中仍有 完整互补链的存在,染色体不稳定性发生的概率较 低,即使脱靶也不会产生突变[50]。当然,设计靶标序 列时,尽量选择基因组中同源碱基较少的序列,也 会降低off-target的概率,目前,一些计算机算法已被 开发出来解决这个问题^[51]。同时,有证据表明, offtarget有一定的浓度依赖性,核酸酶浓度越高产生 off-target的概率就越高[52]。因此,核酸酶的浓度必

须综合考虑KI效率和off-target概率的影响。

5 结语与展望

ZFN、TALEN和CRISPR/Cas9系统作为定点基 因编辑的工具,对于推动生命科学的研究与个性化 医疗的发展具有革命性的意义。特别是最近发展起 来的CRISPR/Cas9系统,因其操作门槛较低、效率 高而受到科研工作者的青睐。这些技术的出现提升 了生物学家对模式生物进行转基因操作的能力,并 且在临床上可能被应用于治疗众多基因突变导致的 疾病。当然,这个领域也面临了诸多技术瓶颈以及 社会伦理问题,比如如何提高效率与特异性、如何 严格保障生物安全性、在治疗应用中如何进行有效 地靶向导入等。随着研究的深入,相信在不久的将 来,这些问题都将得到优化或解决。

致谢----

感谢实验室同事林晶晶对本文的文字编辑以 及校正工作。

参考文献 (References)

- Plessis A, Perrin A, Haber JE, Dujon B. Site-specific recombination determined by I-SceI, a mitochondrial group I intron-encoded endonuclease expressed in the yeast nucleus. Genetics 1992; 130(3): 451-60.
- 2 Rouet P, Smih F, Jasin M. Introduction of double-strand breaks into the genome of mouse cells by expression of a rare-cutting endonuclease. Mol Cell Biol 1994; 14(12): 8096-106.
- 3 Bibikova M, Carroll D, Segal DJ, Trautman JK, Smith J, Kim YG, et al. Stimulation of homologous recombination through targeted cleavage by chimeric nucleases. Mol Cell Biol 2001; 21(1): 289-97.
- 4 Bibikova M, Beumer K, Trautman JK, Carroll D. Enhancing gene targeting with designed zinc finger nucleases. Science 2003; 300(5620): 764.
- 5 Bibikova M, Golic M, Golic KG, Carroll D. Targeted chromosomal cleavage and mutagenesis in *Drosophila* using zinc-finger nucleases. Genetics 2002; 161(3): 1169-75.
- 6 Beumer KJ, Trautman JK, Bozas A, Liu JL, Rutter J, Gall JG, et al. Efficient gene targeting in *Drosophila* by direct embryo injection with zinc-finger nucleases. Proc Natl Acad Sci USA 2008; 105(50): 19821-6.
- 7 Miller JC, Holmes MC, Wang J, Guschin DY, Lee YL, Rupniewski I, *et al*. An improved zinc-finger nuclease architecture for highly specific genome editing. Nat Biotechnol 2007; 25(7): 778-85.
- 8 Moscou MJ, Bogdanove AJ. A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors. Science 2009; 326(5959): 1501.
- 9 Miller JC, Tan S, Qiao G, Barlow KA, Wang J, Xia DF, et al. A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. Nat Biotechnol 2011; 29(2): 143-8.
- 10 Cong L, Ran FA, Cox D, Lin SL, Barretto R, Habib N, et al.

Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. Science 2013; 339(6121): 819-23.

- 11 Mali P, Yang L, Esvelt KM, Aach J, Guell M, DiCarlo JE, et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9. Science 2013; 339(6121): 823-6.
- 12 Pattanayak V, Guilinger JP, Liu DR. Determining the specificities of TALENs, Cas9, and other genome-editing enzymes. Methods Enzymol 2014; 546: 47-78.
- 13 Pavletich NP, Pabo CO. Zinc finger-DNA recognition: Crystal structure of a Zif268-DNA complex at 2.1 A. Science 1991; 252(5007): 809-17.
- 14 Segal DJ, Beerli RR, Blancafort P, Dreier B, Effertz K, Huber A, *et al.* Evaluation of a modular strategy for the construction of novel polydactyl zinc finger DNA-binding proteins. Biochemistry 2003; 42(7): 2137-48.
- 15 Urnov FD, Rebar EJ, Holmes MC, Zhang HS, Gregory PD. Genome editing with engineered zinc finger nucleases. Nat Rev Genet 2010; 11(9): 636-46.
- 16 Mak AN, Bradley P, Cernadas RA, Bogdanove AJ, Stoddard BL. The crystal structure of TAL effector PthXo1 bound to its DNA target. Science 2012; 335(6069): 716-9.
- 17 Kim Y, Kweon J, Kim A, Chon JK, Yoo JY, Kim HJ, et al. A library of TAL effector nucleases spanning the human genome. Nat Biotechnol 2013; 31(3): 251-8.
- 18 Cermak T, Doyle EL, Christian M, Wang L, Zhang Y, Schmidt C, et al. Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting. Nucleic Acids Res 2011; 39(12): e82.
- 19 Reyon D, Tsai SQ, Khayter C, Foden JA, Sander JD, Joung JK. FLASH assembly of TALENs for high-throughput genome editing. Nat Biotechnol 2012; 30(5): 460-5.
- 20 Schmid-Burgk JL, Schmidt T, Kaiser V, Honing K, Hornung V. A ligation-independent cloning technique for high-throughput assembly of transcription activator-like effector genes. Nat Biotechnol 2013; 31(1): 76-81.
- 21 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.
- 22 Sapranauskas R, Gasiunas G, Fremaux C, Barrangou R, Horvath P, Siksnys V. The *Streptococcus thermophilus* CRISPR/Cas system provides immunity in *Escherichia coli*. Nucleic Acids Res 2011; 39(21): 9275-82.
- 23 Gilles AF, Averof M. Functional genetics for all: Engineered nucleases, CRISPR and the gene editing revolution. Evodevo 2014; 5: 43.
- 24 Kawamata M, Ochiya T. Generation of genetically modified rats from embryonic stem cells. Proc Natl Acad Sci USA 2010; 107(32): 14223-8.
- 25 Meyer M, de Angelis MH, Wurst W, Kuhn R. Gene targeting by homologous recombination in mouse zygotes mediated by zincfinger nucleases. Proc Natl Acad Sci USA 2010; 107(34): 15022-6.
- 26 Cui X, Ji D, Fisher DA, Wu Y, Briner DM, Weinstein EJ. Targeted integration in rat and mouse embryos with zinc-finger nucleases. Nat Biotechnol 2011; 29(1): 64-7.
- Wang H, Hu YC, Markoulaki S, Welstead GG, Cheng AW, Shivalila CS, *et al.* TALEN-mediated editing of the mouse Y chromosome. Nat Biotechnol 2013; 31(6): 530-2.

- 28 Wefers B, Meyer M, Ortiz O, Hrabe de Angelis M, Hansen J, Wurst W, et al. Direct production of mouse disease models by embryo microinjection of TALENs and oligodeoxynucleotides. Proc Natl Acad Sci USA 2013; 110(10): 3782-7.
- 29 Sommer D, Peters A, Wirtz T, Mai M, Ackermann J, Thabet Y, et al. Efficient genome engineering by targeted homologous recombination in mouse embryos using transcription activator-like effector nucleases. Nat Commun 2014; 5: 3045.
- 30 Ponce de Leon V, Merillat AM, Tesson L, Anegon I, Hummler E. Generation of TALEN-mediated GRdim knock-in rats by homologous recombination. PLoS One 2014; 9(2): e88146.
- 31 Cui C, Song Y, Liu J, Ge H, Li Q, Huang H, *et al.* Gene targeting by TALEN-induced homologous recombination in goats directs production of beta-lactoglobulin-free, high-human lactoferrin milk. Sci Rep 2015; 5: 10482.
- 32 Wu H, Wang Y, Zhang Y, Yang M, Lv J, Liu J, et al. TALE nickasemediated SP110 knockin endows cattle with increased resistance to tuberculosis. Proc Natl Acad Sci USA 2015; 112 (13): E1530-9.
- 33 Liu H, Chen Y, Niu Y, Zhang K, Kang Y, Ge W, *et al.* TALENmediated gene mutagenesis in rhesus and cynomolgus monkeys. Cell Stem Cell 2014; 14(3): 323-8.
- 34 Yang H, Wang H, Shivalila CS, Cheng AW, Shi L, Jaenisch R. Onestep generation of mice carrying reporter and conditional alleles by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. Cell 2013; 154(6): 1370-9.
- 35 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.
- 36 陈永昌, 牛昱宇, 季维智. 通过CRISPR/Cas9和TALENs介导的基因打靶技术获得基因修饰的猴模型. 中国细胞生物学报(Chen Yongchang, Niu Yuyu, Ji Weizhi. Chinses Journal of Cell Biology) 2014; 36(5): 557-60.
- 37 Zhu SY, Rong ZL, Lu XF, Xu Y, Fu XM. Gene targeting through homologous recombination in monkey embryonic stem cells using CRISPR/Cas9 system. Stem Cells Dev 2015; 24(10): 1147-49.
- 38 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.
- 39 Lombardo A, Cesana D, Genovese P, Di Stefano B, Provasi E, Colombo DF, *et al.* Site-specific integration and tailoring of cassette design for sustainable gene transfer. Nat Methods 2011; 8(10): 861-9.
- 40 Li H, Haurigot V, Doyon Y, Li T, Wong SY, Bhagwat AS, *et al.* In vivo genome editing restores haemostasis in a mouse model of haemophilia. Nature 2011; 475(7355): 217-21.
- 41 Lo AWI, Sprung CN, Fouladi B, Pedram M, Sabatier L, Ricoul M, et al. Chromosome instability as a result of double-strand breaks near telomeres in mouse embryonic stem cells. Mol Cell Biol 2002; 22(13): 4836-50.
- 42 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.
- 43 Ren X, Sun J, Housden BE, Hu Y, Roesel C, Lin S, *et al.* Optimized gene editing technology for *Drosophila* melanogaster using germ line-specific Cas9. Proc Natl Acad Sci USA 2013; 110(47): 19012-7.
- 44 Venken KJT, Schulze KL, Haelterman NA, Pan HL, He YC, Evans-Holm M, *et al.* MiMIC: A highly versatile transposon insertion

Methods 2011; 8(9): 737-U80.

- Maruyama T, Dougan SK, Truttmann MC, Bilate AM, Ingram JR, 45 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.
- 46 Yu C, Liu Y, Ma T, Liu K, Xu S, Zhang Y, et al. Small molecules enhance CRISPR genome editing in pluripotent stem cells. Cell Stem Cell 2015; 16(2): 142-7.
- Lin S, Staahl BT, Alla RK, Doudna JA. Enhanced homology-47 directed human genome engineering by controlled timing of CRISPR/Cas9 delivery. eLife 2014; 3: e04766.
- 48 Aida T, Chiyo K, Usami T, Ishikubo H, Imahashi R, Wada Y, et al. Cloning-free CRISPR/Cas system facilitates functional cassette

knock-in in mice. Genome Biol 2015; 16(1): 87.

- 49 Guo J, Gaj T, Barbas CF, 3rd. Directed evolution of an enhanced and highly efficient FokI cleavage domain for zinc finger nucleases. J Mol Biol 2010; 400(1): 96-107.
- 50 Wu Y, Gao TL, Wang XL, Hu YJ, Hu XY, Hu ZQ, et al. TALE nickase mediates high efficient targeted transgene integration at the human multi-copy ribosomal DNA locus. Biochem Biophys Res Commun 2014; 446(1): 261-6.
- 51 Sander JD, Dahlborg EJ, Goodwin MJ, Cade L, Zhang F, Cifuentes D, et al. Selection-free zinc-finger-nuclease engineering by contextdependent assembly (CoDA). Nat Methods 2011; 8(1): 67-9.
- Pattanayak V, Ramirez CL, Joung JK, Liu DR. Revealing off-target 52 cleavage specificities of zinc-finger nucleases by in vitro selection. Nat Methods 2011; 8(9): 765-70.

resource for engineering Drosophila melanogaster genes. Nat