

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2017.08.001

· 专家论坛 ·

基因编辑技术的原理及其在癌症研究中的应用

谢一方, 王永明(复旦大学生命科学院, 上海 200438)

[摘要] 基因编辑技术能够对基因组序列进行准确、稳定的遗传改造, 给生命科学和临床治疗带来革命性的变革。CRISPR/Cas9技术是基因编辑领域一个突破性进展, 它操作简单、编辑效率高, 极大地扩展了科学家对基因的操控能力。本文中, 笔者将介绍基因编辑技术的分类、CRISPR/Cas9技术的应用(基因敲除、基因敲入、CRISPR/Cas9导入细胞的方法、提高CRISPR/Cas9特异性和调控CRISPR/Cas9系统)、CRISPR/cas9系统的其他应用(碱基转换、表观遗传调控、内源基因的转录调控及全基因组范围内的遗传筛选)及CRISPR/Cas9系统在癌症研究中的应用(建立癌症的小鼠模型、建立染色体重排的癌症模型、高通量筛查与肿瘤细胞转移相关的基因和癌症治疗), 着重介绍其在癌症领域的应用和发展状况, 使读者对该技术有一个总体的把握。

[关键词] 基因编辑; CRISPR/Cas9; 癌症

[中图分类号] Q81; R73-3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2017)08-0815-13

Principles and applications of genome-editing technologies in cancer research

XIE Yifang, WANG Yongming (College of Life Science, Fudan University, Shanghai 200438, China)

[Abstract] Genome-editing technologies that enable precise and stable modification of the genome are sparking a revolution in life science research and disease management. The discovery of the CRISPR/Cas9 technology represents a huge breakthrough in the field of genome editing due to its easy operation and high efficiency, empowering scientists to manipulate genome editing to a broader extension. In this review, the classification of genome-editing technologies, the potential applications of the CRISPR/Cas9 system (including gene knockout, knock-in, methods of delivering CRISPR/Cas9 into cells, enhancing specificity of the CRISPR/Cas9, and accurate regulation of the CRISPR/Cas9) as well as broader applications of the CRISPR/Cas9 system (including base replacement, epigenetic regulation, regulation of endogenous gene expression, and genome-wide genetic screening) will be elaborated, respectively. Moreover, CRISPR/Cas9 in the field of cancer research, including generation of mouse models of cancer, generation of cancer models of chromosome rearrangement, high-throughput screening of genes associated with tumor metastasis, as well as treatment of cancer will also be illustrated, providing readers with a general understanding of the CRISPR/Cas9 technology.

[Key words] genome-editing; CRISPR/Cas9; cancer

[Chin J Cancer Biother, 2017, 24(8): 815-827. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2017.08.001]



王永明 复旦大学生命科学院研究员, 博士生导师, 国家青年千人入选者, 主要从事基因编辑技术研发和心肌再生研究。2005-2010年在德国马克斯-德尔布吕克分子医学中心(MDC)做博士生研究, 并获得柏林自由大学博士学位; 2010-2013年在斯坦福大学医学院从事博士后研究。2012年率先将基因

编辑技术引入心血管领域, 实现对心肌细胞的分子影像学分析, 2014年通过基因编辑技术率先制作出长QT综合征的干细胞模型。回国后, 利用附着体载体表达Cas9和gRNA, 开发出高效的附着体CRISPR技术。近5年以第一或通信作者身份在 *Nucleic Acids Res*, *J Am Coll Cardiol*, *Sci Rep* 和 *PLoS Genetics* 等杂志上发表多篇论文。

利用细胞系或者模式生物研究基因功能时, 经常需要在基因上引入突变。真核生物基因组含有数十亿个碱基对, 在基因编辑技术出现之前, 定点改变

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 81370302)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No.81370302)

[作者简介] 谢一方(1992-), 女, 博士生, 主要从事干细胞基因编辑以及心肌分化方面的基础研究, E-mail: yifang1203@126.com

[通信作者] 王永明(WANG Yongming, corresponding author), E-mail: ymw@fudan.edu.cn

[优先发表] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20170731.1054.012.html>

某个位置的碱基序列无疑是一个巨大的挑战。美国遗传学家 Capecchi 等^[1]通过基因打靶技术首次实现了对基因组的定点修饰,他们将精心设计的外源基因载体导入到小鼠胚胎干细胞中,通过同源重组定点整合到基因组中。这种方法只适用于小鼠的胚胎干细胞,在其他类型的细胞中重组频率非常低^[2]。Rouet 等^[3]发现,在要修饰的 DNA 位点产生一个 DNA 双链断裂(double-strand break, DSB)可以提高同源重组效率。至此,科学家开始研究在基因组定点产生 DNA DSB 的方法,最终发明了基因编辑(genome-editing)技术。基因编辑技术是一种通过程序化的人工核酸酶对基因组 DNA 序列进行改造的遗传操作技术,它给生命科学研究领域带来了革命性的变化。人工核酸内切酶能够识别并切断靶 DNA 序列,产生 DSB,细胞主要通过两种修复途径修复 DSB,分别是非同源末端连接(non-homologous end joining, NHEJ)和同源重组(homologous recombination, HR)^[4]。通过 NHEJ 修复 DSB 时,参与修复的蛋白经常会在 DNA 末端插入或删除几个碱基(indel),然后将 DNA 连接到一起;修复后的基因由于含有突变而导致功能丧失,称为基因敲除(knock-out)。通过 HR 修复 DSB 时,需要在转染细胞时提供一个与靶 DNA 两侧同源的供体模板(双链质粒或是单链 DNA)^[5-6],供体模板上携带想要引入的突变或者转基因,修复系统会将供体模板的信息拷贝到 DSB 处;这种方法可以在基因组中精确地引入点突变,或者插入目的基因,称为基因敲入(knock-in)(图 1)。需要强调的是 NHEJ 和 HR 竞争修复 DSB,而 NHEJ 的效率远远高于 HR,发生 HR 的细胞一般需要通过标记基因才能筛选出来,笔者曾经通过 HR 和随后的筛选方法将转基因高效的整合到了人基因组的 AAVS1“安全港”位点^[7-8]。本文着重介绍规律成簇间隔短回文重复(clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR)/Cas9 技术在癌症领域的应用和发展状况,使科研工作者更好的应用该技术。

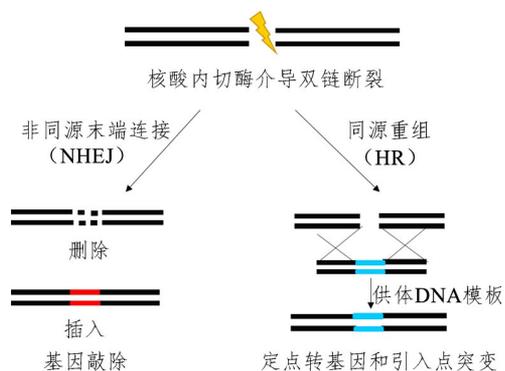


图 1 基因编辑技术原理

1 基因编辑技术的分类

基因编辑技术主要分为 3 类,分别是锌指核酸酶(zinc-finger nuclease, ZFN)技术、转录激活因子样效应物核酸酶(transcription activator-like effector nuclease, TALEN)技术以及近几年发展迅猛的 CRISPR/Cas9 技术。在本综述中,笔者对 ZFN 和 TALEN 技术只做简单的介绍,对 CRISPR/Cas9 技术做详细的介绍。

1.1 ZFN 技术原理

最早出现的基因编辑技术是 ZFN 技术,ZFN 由锌指蛋白(zinc finger protein, ZFP)和 *Fok I* 核酸内切酶两部分构成。锌指蛋白是真核生物中最丰富的一类 DNA 识别蛋白^[9],Pavletich 等^[10]解析了 ZFP 中 DNA 结合结构域,为设计新的 DNA 序列特异性结合蛋白提供了重要的基础。Sugisaki 等^[11]在细菌中发现了 *Fok I* 核酸内切酶,Li 等^[12]发现 *Fok I* 由 DNA 结合结构域和 DNA 切割结构域两部分组成。Chandrasegaran 等^[13]用 ZFP 代替 *Fok I* 核酸酶的 DNA 结合结构域,新产生的核酸酶称为 ZFN,它可以切割特异性的靶位点。ZFN 的 DNA 识别结构域是由 3~4 个 Cys2-His2 锌指蛋白串联组成,每个锌指蛋白识别一个特异的三联体碱基。多个锌指蛋白串联起来形成一个锌指蛋白组,识别一段在基因组中特异的碱基序列(9~12 bp),一个锌指蛋白组和一个 *Fok I* 核酸酶相连构成一个 ZFN。*Fok I* 核酸酶在二聚体状态下才有切割活性^[14],因此需要在恰当的位置(识别位点相距 5~7 bp)设计两个单体的 ZFN 才能切割 DNA(图 2)^[15]。ZFN 技术的优点是锌指蛋白小,编码一对 ZFN 只需要大约 2 000 bp,这样的蛋白容易通过 AAV 病毒载体导入体内进行基因治疗(表 1)。但是 ZFN 技术存在很明显的缺点,它需要一个很大的锌指蛋白库才能做到靶向不同的基因序列,将锌指蛋白连接在一起时,它们之间会相互干扰,影响靶向结合 DNA 的特异性,导致 ZFN 容易脱靶。因此,要想制备出高效特异的 ZFN,需要大量的筛选工作,极大地阻碍了它的推广应用。设计 ZFN 的方法请参考 OPEN 和 CoDA 法^[16-17]。

1.2 TALEN 技术原理

2007 年, Moscou 等^[18]和 Boch 等^[19]发现了植物黄单胞菌(*xanthomonassp*)通过转录激活样效应因子(transcription activator-like effector, TALE)促进自身增殖的机制。黄单胞菌通过分泌系统将 TALE 注入到植物细胞中,TALE 能够靶向到启动子区

域的特异DNA序列增强基因表达,这种表达反过来会促进细菌的增殖。该两团队破译了TALE识别特异DNA序列的机制,TALE依靠34个氨基酸的重复序列识别DNA序列;其中第12、13位点氨基酸为可变序列,且与碱基A、G、C和T有恒定的对应关系,即NG识别T、HD识别C、NI识别A、NN识别G。把这4种TALE模块组装起来就可以识别特异的基因组DNA序列。

Cermak等^[20]把TALE模块和Fok I核酸酶的切割结构域连接起来,组装成新的核酸酶叫作TALEN(图3)。TALEN的组装相对简单,活性和特异性较好(表1)。设计TALEN推荐使用Daniel Voytas实验室发明的Golden Gate组装方法^[20]。这种方法比较简单,一般的分子生物学实验室均能组装,大约需要1周的时间,用到的组装质粒可以从Addgene上获得。

表1 三种基因编辑技术的比较

比较的项目	ZFN	TALEN	CRISPR/Cas9
DNA识别结构域	锌指蛋白	TALE	sgRNA/Cas9
DNA切割结构域	Fok I	Fok I	Cas9
靶位点长度	18~36 bp	30~40 bp	20 bp+NGG
靶位点限制	富含G的区域	倾向于T开头A结尾的序列	NGG或者NAG结尾
操作难易程度	难	中等	容易
脱靶程度	取决于靶向位点	低	取决于靶向位点
细胞毒性	相对较高	低	低
同时靶向多位点	难	难	容易

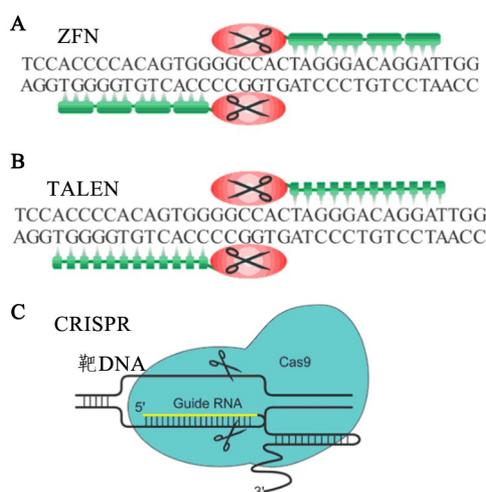


图2 ZFN、TALEN和CRISPR/Cas9结构示意图

1.3 CRISPR/Cas9技术原理

CRISPR系统分为3类(I~III), I和III类的CRISPR系统在细菌和古生菌中均有发现,含有多个Cas蛋白;II类CRISPR系统仅在细菌中存在,只包括一个Cas蛋白^[21]。1987年日本大阪大学的科学家^[22]在研究大肠杆菌中的碱性磷酸酶基因时,发现该基因下游存在29 bp的简单重复序列,这些重复序列被32 nt的间隔序列(protospacer)分开。接下来的十多年里,在越来越多的微生物和古生菌中发现了类似的重复结构。2002年Jansen等^[23]把这种间隔重复序列命名为CRISPR,2007年才证明CRISPR系统是细菌的一种适应性免疫系统^[24]。

II类CRISPR系统组成最简单,除了一个Cas蛋白和crRNA(重复序列+间隔序列)外,还包括一个非

编码RNA,被称为tracrRNA,它协助细菌将串联的crRNA加工成单个的crRNA,并和crRNA的重复序列互补配对后形成向导RNA,引导Cas核酸酶靶向切割外源DNA^[25-26]。有研究^[26]显示,酿脓链球菌中tracrRNA、crRNA和SpCas9蛋白(酿脓链球菌中的Cas称为SpCas9)3个元件在体外可以靶向切割DNA,为实现基因编辑迈出了关键的一步。相继有研究团队^[27-28]将酿脓链球菌的CRISPR/Cas9系统开发成为一种可以在哺乳动物细胞中进行基因编辑的工具,成为目前应用最广泛的基因编辑技术。CRISPR/Cas9已经实现了对于多个物种以及细胞系的基因编辑,如细菌、酵母、人类的癌细胞系和胚胎干细胞系、果蝇、斑马鱼、青蛙、小鼠、大鼠、兔、烟草、水稻等^[27, 29-38]。

CRISPR/Cas9系统作为基因编辑工具时,crRNA和tracrRNA被融合为一条向导RNA(single-guide RNA,sgRNA)表达,所以该系统只包含sgRNA和Cas9核酸内切酶两个元件^[26]。sgRNA 5'端20 bp序列是与靶序列互补配对的序列,如果编辑某个靶位点,只需要改变这20 bp的序列就可以实现。sgRNA一般是通过人的RNA聚合酶III启动子U6起始表达的,这个启动子起始转录的第一碱基必须是G。如果sgRNA序列第一个碱基不是G,就需要在序列前加上一个G,或者把sgRNA的第一个碱基替换成G,这样才能被U6启动子表达。这样表达的sgRNA与靶序列之间会有一个碱基不配对,但是不会影响编辑效率^[27-28]。CRISPR/Cas9技术的一个优点是在一个细胞中表达多个sgRNA,同时编辑多个靶位点,这是ZFN和TALEN

无法企及的(表1)。有报道^[39-40]称CRISPR/Cas9系统在小鼠和斑马鱼中可以同时编辑5个基因,在大鼠细胞中可以同时编辑3个基因。

CRISPR/Cas9系统识别的位点受DNA序列的限制,不是所有的位点都可以被识别。SpCas9识别的靶序列后面必须是NGG序列,被称为PAM(proto-spacer-adjacent motif)序列(表2),因此,SpCas9识别的序列可以写成 $N_{20}NGG$,其中 N_{20} 是与sgRNA互补配对的序列,NGG是PAM序列。在人基因组中,平均每8~12 bp就有一个GG序列^[41]。Cas蛋白不同,需要的PAM序列也不同^[42-47]。如果需要精确切割某个基因组位点,可以根据基因组序列选用合适的CRISPR/Cas系统。目前被开发成基因编辑工具的CRISPR/Cas系统及其PAM序列见表2。

2 CRISPR/Cas9技术在基因工程中的应用

2.1 基因敲除

基因编辑在利用CRISPR/Cas9做基因敲除时,sgRNA的选择至关重要。要破坏一个基因的功能,理

想的情况是在基因编码重要功能域的位点设计sgRNA,但是大多数情况下研究者不知道此段基因编码了哪些重要功能域。在编码区的最前端接近起始密码子ATG的区域设计sgRNA进行编辑,移码突变会造成整个基因无法表达。但是有些情况下,这个基因会从后面的ATG开始表达,表达出来的蛋白依然能够行使功能。如果编辑的位点过于靠近编码区的后端,前面很长的蛋白会被表达,可能依然保留了功能。Doench等^[48]通过对多个基因分析发现,在编码区起始位点长度的5%~65%区域内设计sgRNA可以最大可能的敲除基因。有些基因包括多个转录本,要把sgRNA设计在它们共同的区域,才能敲除所有的转录本,注意不要把sgRNA设计在基因的内含子区,要根据编码区进行设计。编码区是多个外显子拼接在一起的序列,sgRNA不要跨在两个外显子上,因为研究者最终编辑的是基因组DNA,两个外显子在基因组上是被内含子分开的,跨在两个外显子的sgRNA序列在基因组中是不存在的。

表2 识别不同PAM序列的CRISPR核酸酶

核酸酶	长度(bp)	PAM序列以及切割位点
SpCas9 ^[27-28]	4 104	
LbCpf1/AsCpf1 ^[43]	3 684/3 921	
SaCas9 ^[46]	3 159	
St1Cas9 ^[47]	3 363	
St3Cas9 ^[46]	4 227	
NmCas9 ^[44]	3 246	
VQR SpCas9 ^[47]	4 104	
EQRSpCas9 ^[47]	4 104	
VRERSpCas9 ^[47]	4 104	
KKHSaCas9 ^[46]	4 104	

确定好编辑的区域后,在所选区域会有很多靶位点可以选择,需要选择一个最优的位点设计sgRNA。sgRNA序列与编辑的效率和特异性紧密相

关^[49]。科学家通过大量的数据分析,已经找到了sgRNA序列与编辑效率之间的关系,为设计高活性的sgRNA提供了依据^[48]。除了sgRNA的活性问题外,还

需要考虑脱靶问题。脱靶切割是基因编辑领域共同关心的一个问题,它会在基因组中引入额外的突变,影响实验结果的可靠性。sgRNA的序列与脱靶紧密相关,如果在基因组中存在与sgRNA序列相似的序列,这些位点可能也会被编辑。有研究^[50-53]显示,靠近PAM序列的8~12 bp对于Cas9识别至关重要,这一区域的序列被称之为种子序列。种子序列与sgRNA序列不匹配会严重影响Cas9核酸酶的切割;相比之下,5'端也就是远离PAM的序列具有更强的错配耐受性,即使这一区域有两三个碱基不匹配,sgRNA也有可能引导Cas9核酸酶进行切割。此外,PAM序列变成NAG,Cas9也会对其进行切割,因此在检测脱靶的时候,PAM序列为NAG的相似序列也需要被考虑成潜在的脱靶序列^[30, 53]。

脱靶问题已经成为做基因编辑时必须要考虑的问题。CRISPR/Cas9技术刚出现的时候,有课题组^[49]为了研究改进特异性的方法,选择了特异性差的sgRNA研究,这就造成了CRISPR/Cas9脱靶严重的印象。而后来的研究结果^[54-55]表明,如果sgRNA序列特异,脱靶可能性是极其低的,甚至检测不到。基因组中只有2%的序列是编码区,即使脱靶,切割到这些区域的可能性也是极其低的,切割到这些区域而且又恰好影响到实验结果的可能性就更低了,所以大多数基因编辑领域的学者认为做基础研究时不用过分担心脱靶的问题。将来如果把CRISPR/Cas9技术用于临床治疗,脱靶问题还是需要慎重考虑的。现在有很多软件可以在线设计sgRNA,笔者推荐使用Doench等^[48]设计的网站(<http://portals.broadinstitute.org/gpp/public/analysis-tools/sgrna-design>),这个网站综合考虑了sgRNA的活性和特异性,使用人员可以提供DNA序列进行设计,也可以输入基因ID进行设计,非常方便。

2.2 基因敲入

基因敲入是经常需要用到的一项重要技术,比如要研究患者携带的基因突变是否具有致病性,就需要将这个点突变引入到细胞或动物中制作模型;要研究一个基因在哪个组织中表达,就需要在这个基因上面连上GFP报告基因。在做基因敲入时,需要将一个与编辑位点同源的DNA供体和CRISPR/Cas9共同转染到细胞中,细胞内的修复系统修复DNA双链断裂时,会将供体上携带的点突变或者转基因拷贝到双链断裂处。这个供体模板可以是质粒DNA,也可以是单链的Oligo DNA。利用质粒DNA做供体时,敲入的效率比较低,需要在供体上加入标记基因,标记基因与点突变一同被引入到基因组上,通过药物筛选或者流式分选的方法将敲入的细胞筛选出来,这

样效率就大大提高了^[7]。编辑完成后,标记基因需要移除以免影响基因表达。移除的方法是设计时在标记基因的两端加上LoxP位点,在细胞中瞬时表达Cre重组酶就可以去除标记基因了。去除后,基因组中会留下一个34 bp的LoxP位点,所以设计的时候需要把标记基因及LoxP位点放在内含子区。因为转染效率的问题,不是所有的细胞都会去除标记基因。所以一般都用嘌呤霉素(puromycin)抗性基因和单纯疱疹病毒胸苷激酶(HSV-tk)融合的基因作为标记基因,嘌呤霉素抗性基因用作正向筛选,HSV-tk在去除标记基因时用作负向筛选,加上更昔洛韦就可以杀死含有标记基因的细胞。用质粒DNA作为供体的优点是可以将大片段的转基因敲入到细胞中,经过筛选后效率很高,缺点是构建载体比较麻烦,而且需要两步(敲入和去除标记基因)才能得到细胞系。

单链DNA也可以作为基因敲入的供体。单链DNA供体在DSB两边的同源臂长度40~50 bp为佳。利用单链DNA可以把点突变和短的DNA序列整合到基因组中,但它无法将较大的基因敲入到基因组,因为目前Oligo合成的长度一般少于150 bp。单链DNA比较短,容易大量地转入细胞中,在一些实验中取得了较高的敲入效率,最高可达60%^[57]。单链DNA合成成本低,速度快,编辑完成后不需要去除标记基因,但这种方法也有明显的局限,突变的敲入效率受CRISPR/Cas9切割位点的影响,单链DNA上的突变位点与切割位点小于10 bp才能实现有效的敲入^[58],很多情况下找不到理想的切割位点。敲入效率也受细胞类型的影响,很多情况下效率太低难以筛到阳性克隆。有研究^[59-60]表明,加入DNA连接酶IV的抑制剂Scr7可以提高同源重组的效率,DNA连接酶IV是NHEJ途径的关键酶,抑制了NHEJ途径就会促进HR途径,但每种细胞对Scr7浓度的耐受程度不同,提高效率也相差很大,从二三倍至十几倍,需要花时间摸索最佳的条件,所以很少有人使用。另外,NHEJ途径被Scr7抑制后是否会增加基因组的突变需要进一步的研究。无论用单链DNA还是用质粒DNA做基因敲入时,都需要在供体上CRISPR/Cas9识别的位置加上几个同义的碱基突变,以免敲入成功后又被CRISPR/Cas9破坏了。

除了上述两种常用的基因敲入方法,还有其他几种方法值得借鉴。有研究^[61]发现,通过NHEJ的方法可以有效地将外源基因定点整合到基因组。利用NHEJ途径插入外源基因时,需要在供体质粒上引入编辑位点,基因组和供体质粒同时被切断,供体质粒DNA会被连接到基因组上,但是这种连接有正反两个方向。细胞中除了经常提及的NHEJ和HR修复途径,

还有一个微同源性末端连接(MMEJ)修复途径,它依靠5~25 bp的同源序列将DNA两端融合在一起。有研究者^[62]在供体质粒上设计了两个20 bp的同源臂,基因编辑技术同时切断基因组DNA和供体质粒,供体质粒会通过MMEJ定向整合到基因组。但是这两种方法效率都不高,最近有两个课题组^[63-64]发现,把同源臂增加到600~800 bp可以显著提高敲入效率。随着研究的深入,更多的新方法会被发明出来。

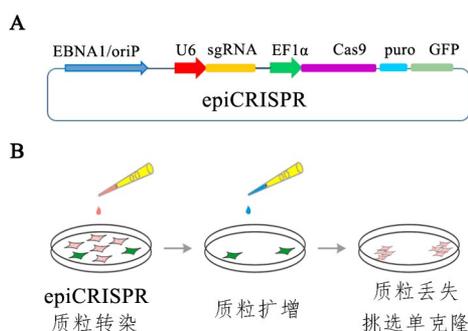
2.3 CRISPR/Cas9导入细胞

CRISPR/Cas9可以对体外培养的细胞系或者原代细胞进行编辑,也可以对受精卵和体内细胞进行编辑。编辑不同的对象需要采取不同的方法将CRISPR/Cas9导入到细胞中。编辑体外培养的细胞时,有很多种方法可以将CRISPR/Cas9质粒导入到细胞中,常用的方法是Lipofactamine、PEI和电转的方法^[65]。Lipofactamine和PEI方法简单廉价,是首选方法;电转成本比较贵,但是效率高。这几种方法都是瞬时转染,细胞培养1周后质粒就会丢失。某些类型的细胞只有用病毒的方法才能转进去,常用的病毒载体包括逆转录病毒(retrovirus)、慢病毒(lentivirus)、腺病毒(adenovirus)和腺相关病毒(adenovirus-associated virus, AAV)^[66]。其中逆转录病毒和慢病毒会整合到基因组,可以长期表达转基因,优点是可以提高编辑效率,缺点是整合过程中可能会导致额外的基因突变,长期表达CRISPR/Cas9也会增加脱靶的效率。AAV主要以非整合形式表达转基因,但是会有少量整合的情况发生^[67]。AAV载体在机体中产生的免疫排斥小,是基因治疗的理想载体。有研究^[68]发现,一个较小的Cas9蛋白可以包装在AAV病毒中,这给基于CRISPR/Cas9的基因治疗带来了曙光。腺病毒不会整合到基因组,对某些类型的细胞转染效率较高。每种方法都有各自的优缺点,需要研究人员根据实验需要选择合适的方法。

建立单克隆细胞系一般都采用瞬时表达sgRNA和Cas9的方法,质粒导入到细胞中2~4 d后,将细胞稀释成单细胞重新种到培养皿中培养,形成克隆后鉴定编辑是否发生了。有的细胞不能形成克隆,需要将单细胞种到96孔板中培养。有些细胞转染效率低,需要在质粒上同时表达GFP,通过流式细胞仪分选出转染成功的细胞会提高编辑效率。最常用的CRISPR/Cas9质粒比如PX458(同时表达GFP)、PX459(同时表达puromycin抗性基因)等,均可以从Addgene公司购买^[41]。

利用CRISPR/Cas9敲除基因时,瞬时表达的方法编辑时间短,编辑效率一般为3%~30%^[49];利用病毒的方法可以长期提高编辑效率,但是病毒整合到基因组上就无法去除了。理想的方法是编辑时间可

控,编辑后细胞不再含有CRISPR/Cas9等外源基因。本课题组发明了高效的基因编辑技术,笔者利用附着体载体表达Cas9、sgRNA和嘌呤霉素抗性基因,称为附着体CRISPR(epiCRISPR)技术(图3A)。附着体载体不整合到基因组,但可以随着细胞的复制而复制,就像普通质粒可以在细菌中复制一样。在嘌呤霉素的筛选作用下附着体载体一直保留在细胞中,外源基因长期稳定的表达,可以长期编辑细胞。嘌呤霉素筛选还可以富集转染成功的细胞,即使转染效率很低的细胞也能够实现高效的编辑;编辑完成后,去除筛选药物,附着体载体会在1周内迅速丢失,细胞中不再表达外源基因(图3B)。附着体CRISPR的编辑效率一般在80%以上,附着体CRISPR还可以实现高效的多基因敲除和基因组片段敲除^[55]。



A: epiCRISPR质粒流程图; B: epiCRISPR系统基因编辑图

图3 epiCRISPR质粒的结构及其工作流程

如果编辑的目的是制作动物模型,则需要对动物的受精卵进行编辑。受精卵中储备了大量的mRNA,很少有新的基因转录发生,因此不能使用DNA质粒表达Cas9和sgRNA,需要将sgRNA和Cas9在体外转录成mRNA,通过显微注射的方法导入细胞中。制作基因编辑的小鼠和斑马鱼请参考Jaenisch和Burgess实验室的方法^[69]。

2.4 提高CRISPR/Cas9的特异性

提高CRISPR/Cas9特异性的方法除了选择特异的sgRNA序列外,还有其它方法。5'末端截短的sgRNA(Tru-sgRNA)也可以提高Cas9的特异性^[70]。Tru-sgRNA一般只有17或18 bp和靶向序列互补配对,短的sgRNA可能无法和错配的DNA序列结合,因而能够提高特异性。在sgRNA的5'端额外加入两个G,即5'GG+sgRNA(20 bp),也可以提高靶向特异性^[70],但这两种方法有时候会严重降低靶向切割效率。

双切口(double-nicking)技术是最早报道的提高特异性的方法^[49]。Cas9蛋白具有两个核酸酶结构域,分别是RuvC和HNH,每个结构域分别负责切断一

条DNA单链,一个结构域突变后不影响另外一个结构域的切割功能,在RuvC结构域引入D10A突变后,Cas9只能切断单链DNA(single-strand break,SSB)。如果在DNA上设计两个sgRNA,引导Cas9分别切断两条单链DNA,就会形成双链断裂,因为识别的DNA序列变长了,特异性就提高了^[49]。单个sgRNA脱靶后只能切割产生单链DNA断裂,被修复后一般不会产生突变^[72]。有两个课题组^[73-74]将RuvC、HNH突变后,Cas9完全失去了切割功能,但是保留了靶向结合DNA的功能,被称为dCas9(dead Cas9)。将dCas9和Fok I融合为核酸酶,类似于前面介绍的ZFN和TALEN,单个dCas9-Fok I脱靶后不会切割DNA,从而进一步提高了特异性。但是这两种方法都有其局限性,它们需要两个sgRNA活性都高才能有效的发挥作用,且后者对两个sgRNA距离有严格的条件要求,Fok I酶才能形成二聚体发挥作用,这样的位点在基因组中非常少,因此这些方法没有得到广泛应用。

2015年,张锋^[75]和Keith实验室^[45]通过对Sp-

Cas9蛋白的改造提高特异性,两个实验室采用了不同的策略,都达到了提高特异性的目的。SpCas9与DNA结合时,它上面的正电荷氨基酸形成一个凹槽,与负电荷的DNA结合,这种结合是非特异性的。张锋实验室在凹槽区域用中性电荷氨基酸来代替正电荷的氨基酸,得到的SpCas9叫做eSpCas9,它与DNA非特异性的结合力减弱,脱靶效应被降低。与此同时,Keith实验室采取另外一种原理降低脱靶效应。当SpCas9核酸酶与DNA结合时,SpCas9上的一些氨基酸会和DNA的磷酸骨架之间形成氢键,增加SpCas9和DNA之间的非特异性结合力。如果将形成氢键的氨基酸替换为不能形成氢键的氨基酸,得到的Sp-Cas9称为SpCas9-HF1,它与DNA非特异性的结合力减弱,从而降低脱靶效应^[45]。这两种方法虽然降低了脱靶效应,但是有时也会降低靶向切割的效率。高特异性Cas9可能会在临床应用方面发挥重要作用,关于各种提高特异性方法的总结见表3。

表3 提高CRISPR/Cas9特异性的方法

方 法	优 点	缺 点
tru-gRNAs ^[70]	容易操作,特异性(+)	靶向效率某种程度上会降低,特异性弱的sgRNA脱靶效率反而增加
GG+sgRNA(20bp) ^[71]	易操作,特异性(+)	只有部分sgRNA可以用这种修饰,靶向效率有时候会显著降低
double-nicking ^[49]	特异性(++)	单链切口也可能会引起变异,靶点的可选择范围变窄
dcas9-FokI ^[73-74]	特异性(###)	靶向切割效率可能会降低,可选择的靶点很少
eSpCas9 ^[75]	特异性(###)	靶向切割的效率可能会降低
SpCas9-HF1 ^[45]	特异性(###)	靶向切割的效率可能会降低

2.5 调控CRISPR/Cas9系统

在研究中有时需要对Cas9的表达进行精确调控,从而阐明特定时间内的基因在生物体中的功能;有时还需要能够在特定的组织或者器官中表达Cas9,来阐释组织特异性的基因在个体发育中的功能。基于上述的需求,科学家们开发出了多西环素(doxycycline)诱导的CRISPR/Cas9系统,在小鼠以及人类胚胎干细胞(hES)中实现了对Cas9表达的时间控制^[76-77]。有研究者^[78]将Cas9蛋白分成两个失活的片段,并且分别连接上光控蛋白,当蓝光照射时,两个光控蛋白连接到一起,Cas9核酸酶功能也随之恢复,停止光照,Cas9蛋白会再度分开,这样就可以通过光照从时间和空间上对内源基因的表达进行调控。

3 CRISPR/cas9技术在基因工程中的其他应用

3.1 碱基转换

人类的大多数疾病都是由基因的点突变引起的。改造后的CRISPR/Cas9系统可以实现碱基转换,虽然基因敲入的方法可以用来制作点突变的细胞模型或者动物模型,但是敲入效率不高,基因敲入的方法更难以纠正体内的基因突变。有研究者^[79]将dCas9和胞嘧啶脱氨酶(AID)偶联在一起,可以定点地将胞嘧啶和鸟嘌呤随机地向其他3个碱基转变。如果在细胞培养液中加入尿嘧啶DNA糖基化酶抑制剂,dCas9-AID可以将胞嘧啶单一地向胸腺嘧啶转换。有研究者^[80]首次运用dCas9-AID对ABL基因进行了耐药突变筛选,伊马替尼(imatinib)能够抑制ABL的激酶活性,是治疗慢性粒细胞白血病(ABL)的常规药物,运用dCas9-AID和一组sgRNA对ABL基因的第六号外显子进行突变筛选,找到了抗伊马替尼的新突变。

3.2 表观遗传调控

改造后的CRISPR/Cas9系统可以用于表观遗传

调控研究。DNA的甲基化和组蛋白的甲基化/乙酰化在表观遗传学中发挥非常重要的作用,对基因组特定位点进行表观遗传修饰,有助于了解这些位点的表观遗传是否调控了相关基因的表达。在CRISPR/Cas9技术之前,科学家们运用TALE和羟化酶的催化结构域(TET1)结合,实现了定点去DNA甲基化修饰^[81];运用TALE和赖氨酸特异性去甲基酶(LSD1)融合,实现了对组蛋白H3K4和H3K9的去甲基化修饰^[82]。Hilton等^[83]将dCas9和乙酰化转移酶P300的催化结构域结合,在基因组中实现了对组蛋白H3(Lys27)定点乙酰化修饰;Kearns等^[84]人将dCas9和赖氨酸特异性去甲基酶(LSD1)融合,实现了定点去除组蛋白H3 K4和H3 K9甲基化的修饰。

3.3 内源基因的转录调控

改造后的CRISPR/Cas9系统可以用于调控基因的表达。有研究^[85-86]显示,在大肠杆菌和哺乳动物细胞中,dCas9靶向结合到基因的启动子区会阻碍转录因子/RNA聚合酶结合到启动子上,从而抑制了基因的转录。单纯的dCas9抑制基因转录的效率较低,而将dCas9与具有转录抑制功能的KRAB或者是SID效应蛋白连接在一起,会提高抑制效果^[83];同理,把dCas9和VP64或者P65转录激活功能域相融合,能够激活内源基因的表达。一般情况下通过单个sgRNA上调基因表达的作用较小,通过多个sgRNA同时靶向

一个启动子区域会显著增加基因表达^[89-91]。

3.4 全基因组范围内的遗传筛选

人类基因组计划完成后,接下来的工作是要研究所有注释基因的功能。对基因组内所有基因进行高通量的功能筛选可以快速找到想要的基因。运用CRISPR/Cas9技术能够实现全基因组范围内的筛选,筛选原理是对每个基因设计3~10条sgRNA,利用芯片一次合成数万条覆盖整个基因组sgRNA库,把这些sgRNA连接到慢病毒载体上,包病毒、感染细胞、控制滴度使得一个细胞只得到一条sgRNA,也就是只敲除一个基因,在适当的筛选条件下测试筛选前后sgRNA的丰度变化,进而找出感兴趣的基因^[4, 92-95](图4)。在CRISPR/Cas9技术出现之前,科学家们运用RNAi或者shRNA技术进行全基因组范围内高通量的功能筛查,但是这两种方法只能敲低基因的表达,而不能敲除,没有CRISPR/Cas9技术筛选灵敏^[95]。除了可以对基因进行高通量的筛选,Zhu等^[96]运用DNA片段敲除技术成功地对癌细胞中的长非编码RNA(lncRNA)进行了高通量的功能筛选。随后有研究者^[97-98]把dCas9与转录激活因子(VP64和p65)或抑制因子KRAB连接,开发出了覆盖全基因组的转录抑制(CRISPRi)和转录激活(CRISPRa)文库,实现了对人类所有基因表达的调控筛选。

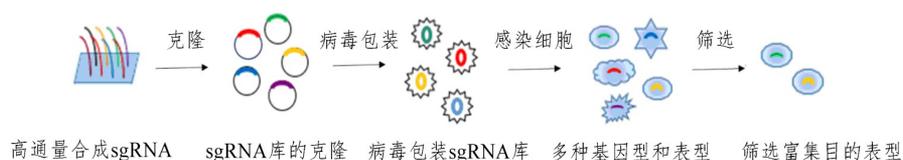


图4 全基因组范围内的遗传筛选流程

4 CRISPR/Cas9技术在癌症研究中的应用

癌症是危害人类健康的主要疾病之一。癌细胞的基因组非常复杂,含有多种基因突变,包括点突变、染色体重排、染色体增加或者减少等,最终导致了原癌基因激活或者抑癌基因失活,细胞生长失去控制。CRISPR/Cas9技术出现后,科学家们获得了强大的改造基因组的能力,可以用它制作各种基因突变的癌症模型,研究癌症发生的机制,筛选治疗药物;也可以直接用它编辑致癌基因或者致癌病毒,治疗癌症;还可以用它编辑免疫细胞,通过免疫细胞治疗癌症。

4.1 建立癌症的小鼠模型

小鼠是癌症研究中最常用到的动物模型。传统制作小鼠模型的方法是在小鼠胚胎干细胞中引入突

变,然后将干细胞注射到胚囊中形成嵌合体小鼠,再经过一代才能获得纯合突变的小鼠。CRISPR/Cas9技术有效地提高了制作小鼠模型的效率。Jaenisch课题组^[35]用CRISPR/Cas9在小鼠胚胎干细胞中同时敲除了5个基因,随后他们将Cas9 mRNA和靶向Tet1和Tet2的sgRNA注射到小鼠受精卵中,建立了同时敲除2个基因的小鼠。

除了在小鼠胚胎干细胞和生殖细胞中实现了同时编辑多个基因,CRISPR/Cas9技术在小鼠体细胞中的编辑能力也毫不逊色。Ebert课题组^[99]用病毒介导的CRISPR/Cas9系统对小鼠的原代造血干细胞的多个基因进行编辑,成功建立了急性髓性白血病(AML)模型。有研究者^[100]在表达Kras^{G12D}基因的肺癌小鼠模型中,利用CRISPR/Cas9对一系列在人类肺癌患者可能的抑癌基因进行了功能筛查,研究这些

基因与原癌基因 *Kras*^{G12D} 在肺癌发生和发展中的协同作用。2014年, Jacks 课题组^[101] 通过尾静脉注射 CRISPR/Cas9 质粒, 在小鼠肝脏中破坏肿瘤抑制基因 *Pten* 和 *p53*, 制作出了产生肝脏肿瘤的小鼠模型, 该技术产生的癌症小鼠和传统的 Cre-loxp 技术构建的小鼠具有相似的癌症表型。

在作体内编辑时, 编码 SpCas9 和 sgRNA 的 DNA 太大, 用病毒包装效率很低。为了解决这个问题, 张锋课题组^[102] 将 SpCas9 整合到了 Rosa26 位点构建出了诱导型表达 SpCas9 的小鼠, SpCas9 和 CAG 启动子之间有一段 loxP-stop (33 polyA signal)-loxP 序列阻止了 SpCas9 的表达, 再用组织特异性的启动子表达 Cre 重组酶, 就可以去除干扰序列起始 SpCas9 表达。有研究者^[102] 用 AAV 病毒将靶向 *KRAS*、*p53* 和 *LKB1* 基因的 sgRNA 的转导到 SpCas9 小鼠的肺中, 成功建立了小鼠肺癌模型。至此, 科研工作者可以利用诱导表达 SpCas9 的小鼠进行遗传操控, 快速在体内建立癌症模型。

4.2 建立染色体重排的癌症模型

染色体重排指的是染色体片段位置的改变, 包括染色体缺失、重复、倒位和异位。染色体重排有可能诱发细胞癌变, 人类淋巴瘤和白血病的形成就是由于染色体重排引起的^[103-104]。运用传统的方法制作染色体重排的癌症模型, 需要在两个重排位点加上 loxP 序列, 通过 Cre-loxP 重组制作染色体重排。运用 CRISPR/Cas9 技术产生染色体重排非常简单, 只需要靶向切割两个重排位点就可以了。人类 2 号染色体重排会导致 *EML4-ALK* 融合表达, 引发非小细胞肺癌。有研究者^[105-106] 使用病毒介导的 CRISPR/Cas9 技术对成年小鼠体细胞进行编辑重排, 快速地建立了 *EML4-ALK* 融合基因肺癌小鼠模型。随后又有研究者^[107] 使用相似的技术制作了急性髓性白血病和尤文氏肉瘤染色体重排的癌症小鼠模型。这些模型为科学家深入研究癌症的发生机制以及在动物水平筛选抗肿瘤药物等提供了有效的平台。

4.3 高通量筛查与肿瘤细胞转移相关的基因

肿瘤发生是多个基因突变协同作用的结果, 研究癌症面临的主要挑战是如何找出引发癌症的关键突变。2015年, 张峰实验室和 Sharp 团队合作, 运用 CRISPR/Cas9 文库对一个不具备转移能力的肺癌细胞系进行了高通量的单基因随机敲除, 然后移植到免疫缺陷的小鼠中, 其中一些细胞离开了原有的位置随着血管迁移形成了高转移性的肿瘤; 通过对转移性肿瘤的 sgRNA 测序, 筛查到了与癌症生成和转移相关的多个基因以及微小 RNA (microRNA)^[92]。因此, CRISPR/Cas9 文库技术为筛查引发癌细胞迁移的关键基因提供了新的思路。

4.4 癌症治疗

CRISPR/Cas9 有两种方式用于治疗癌症, 一种是直接攻击癌细胞中的关键基因, 另一种是用于编辑免疫细胞, 通过免疫细胞攻击癌细胞。我国科学家^[108] 在膀胱癌细胞中制作了逻辑门控制的膀胱癌特异表达的 Cas9 和 sgRNA 系统, 同时构建了 *Lac I* 抑制蛋白控制表达的抑癌基因 *p21*、*E-cadherin* 和 *hBax* 的表达系统。在膀胱癌细胞中 CRISPR/Cas9 将 *Lac I* 敲除, 抑癌基因得以表达, 从而抑制了癌细胞的增殖和迁移, 并导致了癌细胞凋亡。MCL1 是一个抗凋亡蛋白, 对人 Burkitt 淋巴瘤 (BL) 生存是必须的。Aubrey 课题组^[109] 用 CRISPR/Cas9 技术敲除了 MCL1 基因, 导致了淋巴瘤细胞大量凋亡。一些病毒是导致癌症的罪魁祸首, 例如 Epstein-Barr 病毒 (EBV) 感染会导致 Burkitt 淋巴瘤。利用 CRISPR/Cas9 敲除 EBV 可以显著地抑制肿瘤的增殖^[110]。CRISPR/Cas9 在癌症治疗中最吸引人的一个应用是编辑 CAR-T 细胞, CAR-T 细胞可以攻击肿瘤细胞。TALEN 技术已经被用于编辑 CAR-T 细胞, 消除 HLA 不匹配引发的免疫排斥。在 NIH 临床试验注册官网 www.clinicaltrials.gov 上搜索 CRISPR, 有 10 项与 CRISPR/Cas9 相关的临床试验, 其中 7 项与治疗癌症相关。值得一提的是, 我国四川大学附属华西医院开展了全球第一例应用 CRISPR/Cas9 技术的治疗肺癌的人体临床试验^[111]; 中山医科大学附属第一医院开展了全球第一例应用 CRISPR/Cas9 技术清除体内 HPV 病毒, 预防性治疗 HPV 诱发宫颈癌的临床试验 (见 NIH 临床试验注册官网)。

5 结 语

从 2013 年第一次实现对哺乳动物细胞的编辑到现在, 短短 4 年时间, CRISPR/Cas9 技术已经在生物学的很多领域大放异彩。ZFN 技术和 TALEN 技术也有各自的优点, 它们将和 CRISPR/Cas9 技术长期共存、互为补充。随着各种基因编辑技术的发展和完善, 科研人员将具备更加有效的工具开展基础生命科学和人类疾病的研究, 在不久的将来, 基因编辑技术将在治疗癌症和遗传疾病方面带来革命性的变化。

[参 考 文 献]

- [1] MANSOUR S L, THOMAS K R, CAPECCHI M R. Disruption of the proto-oncogene int-2 in mouse embryo-derived stem cells: a general strategy for targeting mutations to non-selectable genes[J]. *Nature*, 1988, 336(6197): 348-352. DOI:10.1038/336348a0.
- [2] CAPECCHIMR. Altering the genome by homologous recombination [J]. *Science*, 1989, 244(4910): 1288-1292.
- [3] ROUET P, SMIH F, JASIN M. Expression of a site-specific endonuclease stimulates homologous recombination in mammalian cells [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994, 91(13):6064-6068.

- [4] KIM H, KIM J S. A guide to genome engineering with programmable nucleases[J]. *Nat Rev Genet*, 2014, 15(5): 321-334. DOI: 10.1038/nrg3686.
- [5] UMOV F D, MILLER J C, LEE Y L, et al. Highly efficient endogenous human gene correction using designed zinc-finger nucleases [J]. *Nature*, 2005, 435(7042): 646-651. DOI: 10.1038/nature03556.
- [6] CHEN F, PRUETT-MILLER S M, HUANG Y, et al. High-frequency genome editing using ssDNA oligonucleotides with zinc-finger nucleases[J]. *Nat Methods*, 2011, 8(9): 753-755. DOI: 10.1038/nmeth.1653.
- [7] WANG Y, LIANG P, LAN F, et al. Genome editing of isogenic human induced pluripotent stem cells recapitulates long QT phenotype for drug testing[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2014, 64(5): 451-459. DOI: 10.1016/j.jacc.2014.04.057
- [8] WANG Y, ZHANG WY, HU S, et al. Genome editing of human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells with zinc finger nucleases for cellular imaging[J]. *Circ Res*, 2012, 111(12): 1494-1503. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.112.274969.
- [9] MILLER J, MCLACHLAN AD, KLUG A. Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor III A from xenopus oocytes[J]. *EMBO J*, 1985, 4(6): 1609-1614.
- [10] PAVLETICH NP, PABO CO. Zinc finger-DNA recognition: crystal structure of a Zif268-DNA complex at 2.1 Å[J]. *Science*, 1991, 252(5007): 809-817.
- [11] SUGISAKI H, KANAZAWA S. New restriction endonucleases from flavobacterium okeanokoites (Fok I) and micrococcus luteus [J]. *Gene*, 1981, 16(1/3): 73-78.
- [12] LI L, WU L P, CHANDRASEGARAN S. Functional domains in Fok I restriction endonuclease[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992, 89(10): 4275-4279.
- [13] KIM Y G, 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.
- [14] BITINAITE J, WAH D A, AGGARWAL A K, et al. Fok I dimerization is required for DNA cleavage[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998, 95(18): 10570-10575.
- [15] DEKELVER R C, CHOI V M, MOEHLE E A, et al. Functional genomics, proteomics, and regulatory DNA analysis in isogenic settings using zinc finger nuclease-driven transgenesis into a safe harbor locus in the human genome[J]. *Genome Res*, 2010, 20(8): 1133-1142. DOI: 10.1101/gr.106773.110.
- [16] MAEDER M L, 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. DOI: 10.1016/j.molcel.2008.06.016.
- [17] SANDER J D, DAHLBORG E J, GOODWIN M J, et al. Selection-free zinc-finger-nuclease engineering by context-dependent assembly (CoDA) [J]. *Nat Methods*, 2011, 8(1): 67-69. DOI: 10.1038/nmeth.1542.
- [18] MOSCOU M J, BOGDANOVA A J. A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors[J]. *Science*, 326(5959): 1501-1507. DOI: 10.1126/science.1178817.
- [19] 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. DOI: 10.1126/science.1178811.
- [20] CERMAK T, DOYLE E L, CHRISTIAN M, et al. Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting[J]. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39(12): 82-89. DOI: 10.1093/nar/gkr218.
- [21] CHYLINSKI K, LERHUN A, CHARPENTIER E. The tracrRNA and Cas9 families of type II CRISPR-Cas immunity systems[J]. *RNA Biol*, 2013, 10(5): 726-737. DOI: 10.4161/rna.24321.
- [22] SHINO 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.
- [23] JANSEN R, EMBDEN J D, GAASTRA W, et al. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes[J]. *Mol Microbiol*, 2002, 43(6): 1565-1575.
- [24] BARRANGOU R, FREMAUX C, DEVEAU H, et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes[J]. *Science*, 2007, 315(5819): 1709-1712. DOI: 10.1126/science.1138140.
- [25] DELTCHEVA E, CHYLINSKI K, SHARMA C M, et al. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III[J]. *Nature*, 2011, 471(7340): 602-607. DOI: 10.1038/nature09886.
- [26] 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. DOI: 10.1126/science.1225829.
- [27] CONG L, RAN F A, COX D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems[J]. *Science*, 2013, 339(6121): 819-823. DOI: 10.1126/science.1231143.
- [28] MALI P, YANG L, ESVELT KM, et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9[J]. *Science*, 2013, 339(6121): 823-826. DOI: 10.1126/science.1232033.
- [29] SHAN Q, WANG Y, LI J, et al. Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system[J]. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(8): 686-688. DOI: 10.1038/nbt.2650.
- [30] JIANG W, BIKARD D, COX D, et al. RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems[J]. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(3): 233-239. DOI: 10.1038/nbt.2508.
- [31] DICARLO J E, NORVILLE J E, MALI P, et al. Genome engineering in *Saccharomyces cerevisiae* using CRISPR-Cas systems[J]. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41(7): 4336-4343.
- [32] YU Z, REN M, WANG Z, et al. Highly efficient genome modifications mediated by CRISPR/Cas9 in *Drosophila*[J]. *Genetics*, 2013, 195(1): 289-291. DOI: 10.1534/genetics.113.153825.
- [33] HWANG WY, FU Y, REYON D, et al. Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system[J]. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(3): 227-229. DOI: 10.1038/nbt.2501.
- [34] NAKAYAMA T, FISH M B, FISHER M, et al. Simple and efficient CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis in xenopus tropicalis [J]. *Genesis*, 2013, 51(12): 835-843. DOI: 10.1002/dvg.22720.
- [35] WANG H, YANG H, SHIVALILA C S, et al. One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering[J]. *Cell*, 2013, 153(4): 910-918. DOI: 10.1016/j.cell.2013.04.025.
- [36] 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

- (8): 681-683. DOI:10.1038/nbt.2661.
- [37] LI J F, NORVILLE J E, AACH J, et al. Multiplex and homologous recombination-mediated genome editing in Arabidopsis and Nicotiana benthamiana using guide RNA and Cas9[J]. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(8): 688-691. DOI: 10.1038/nbt.2654.
- [38] YANG D, XU J, ZHU T, et al. Effective gene targeting in rabbits using RNA-guided Cas9 nucleases[J]. *J Mol Cell Biol*, 2014, 6(1): 97-99. DOI:10.1093/jmcb/mjt047.
- [39] JAO L E, WENTE S R, CHEN W. Efficient multiplex biallelic zebrafish genome editing using a CRISPR nuclease system[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110(34): 13904-13909. DOI:10.1073/pnas.1308335110.
- [40] LI W, TENG F, LI T, et al. Simultaneous generation and germline transmission of multiple gene mutations in rat using CRISPR-Cas systems[J]. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(8): 684-686. DOI:10.1038/nbt.2652.
- [41] RAN F A, HSU P D, WRIGHT J, et al. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system[J]. *Nat Protoc*, 2013, 8(11): 2281-2288. DOI:10.1038/nprot.2013.143.
- [42] GASUNAS G, BARRANGOU R, HORVATH P, et al. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria[J/OL]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012, 109(39): e2579- e2586[2017-06-15]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3465414/>. DOI:10.1073/pnas.1208507109.
- [43] ZETSCHE B, GOOTENBERG J S, ABUDAYYEH O O, et al. Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system[J]. *Cell*, 2015, 163(3): 759-771. DOI:10.1016/j.cell.2015.09.038.
- [44] ESVELT K M, MALI P, BRAFF J L, et al. Orthogonal Cas9 proteins for RNA-guided gene regulation and editing[J]. *Nat Methods*, 2013, 10(11): 1116-1121. DOI: 10.1038/nmeth.2681.
- [45] KLEINSTIVER B P, PATTANAYAK V, PREW M S, et al. High-fidelity CRISPR-Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects[J]. *Nature*, 2016, 529(7587): 490-495. DOI:10.1038/nature16526.
- [46] RAN F A, CONG L, YAN W X, et al. In vivo genome editing using Staphylococcus aureus Cas9[J]. *Nature*, 2015, 520(7546): 186-191. DOI: 10.1038/nature14299.
- [47] KLEINSTIVER B P, PREW M S, TSAI S Q, et al. Engineered CRISPR-Cas9 nucleases with altered PAM specificities[J]. *Nature*, 2015, 523(7561): 481-485. DOI: 10.1038/nature14592.
- [48] DOENCH J G, FUSI N, SULLENDER M, et al. Optimized sgRNA design to maximize activity and minimize off-target effects of CRISPR-Cas9[J]. *Nat Biotechnol*, 2016, 34(2): 184-191. DOI: 10.1038/nbt.3437.
- [49] RAN F A, HSU P D, LIN C Y, et al. Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity[J]. *Cell*, 2013, 154(6): 1380-1389. DOI: 10.1016/j.cell.2013.08.021.
- [50] QI L S, LARSON M H, GILBERT L A, et al. Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression[J]. *Cell*, 2013, 152(5): 1173-1183. DOI: 10.1016/j.cell.2013.02.022.
- [51] PATTANAYAK V, LIN S, GUILINGER J P, et al. High-throughput profiling of off-target DNA cleavage reveals RNA-programmed Cas9 nuclease specificity[J]. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(9): 839-843. DOI: 10.1038/nbt.2673.
- [52] FU Y, FODEN J A, 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. DOI: 10.1038/nbt.2623.
- [53] HSU P D, SCOTT D A, WEINSTEIN J A, et al. DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases[J]. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(9): 827-832. DOI: 10.1038/nbt.2647.
- [54] VERES A, GOSIS B S, DING Q, et al. Low incidence of off-target mutations in individual CRISPR-Cas9 and TALEN targeted human stem cell clones detected by whole-genome sequencing[J]. *Cell Stem Cell*, 2014, 15(1): 27-30. DOI: 10.1016/j.stem.2014.04.020.
- [55] XIE Y, WANG D, LAN F, et al. An episomal vector-based CRISPR/Cas9 system for highly efficient gene knockout in human pluripotent stem cells[J/OL]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 2320[2017-06-20]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC28539611/>. DOI:10.1038/s41598-017-02456-y.
- [56] YUSA K. Seamless genome editing in human pluripotent stem cells using custom endonuclease-based gene targeting and the piggyBac transposon[J]. *Nat Protoc*, 2013, 8(10): 2061-2078. DOI: 10.1038/nprot.2013.126.
- [57] RICHARDSON C D, RAY G J, DEWITT M A, et al. Enhancing homology-directed genome editing by catalytically active and inactive CRISPR-Cas9 using asymmetric donor DNA[J]. *Nat Biotechnol*, 2016, 34(3): 339-344. DOI: 10.1038/nbt.3481.
- [58] PAQUET D, KWAT D, CHEN A, et al. Efficient introduction of specific homozygous and heterozygous mutations using CRISPR/Cas9[J]. *Nature*, 2016, 533(7601): 535-539. DOI: 10.1038/nature17664.
- [59] CHU V T, WEBER T, WEFERS B, et al. Increasing the efficiency of homology-directed repair for CRISPR-Cas9-induced precise gene editing in mammalian cells[J]. *Nat Biotechnol*, 2015, 33(5): 543-548. DOI: 10.1038/nbt.3198.
- [60] MARUYAMA T, DOUGAN S K, TRUTTMANN M C, et al. Increasing the efficiency of precise genome editing with CRISPR-Cas9 by inhibition of nonhomologous end joining[J]. *Nat Biotechnol*, 2015, 33(5): 538-542. DOI: 10.1038/nbt.3190.
- [61] MARESCA M, LIN V G, GUO N, et al. Obligate ligation-gated recombination (ObLiGaRe): custom-designed nuclease-mediated targeted integration through nonhomologous end joining[J]. *Genome Res*, 2013, 23(3): 539-546. DOI: 10.1101/gr.145441.112.
- [62] DUTTA A, ECKELMANN B, ADHIKARI, et al. Microhomology-mediated end joining is activated in irradiated human cells due to phosphorylation-dependent formation of the XRCC1 repair complex[J]. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45(5): 2585-2599. DOI: 10.1093/nar/gkw1262.
- [63] ZHANG J P, LI X L, LI G H, et al. Efficient precise knockin with a double cut HDR donor after CRISPR/Cas9-mediated double-stranded DNA cleavage[J/OL]. *Genome Biol*, 2017, 18(1): 35. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC28219395/>. DOI: 10.1186/s13059-017-1164-8.
- [64] YAO X, WANG X, HU X, et al. Homology-mediated end joining-based targeted integration using CRISPR/Cas9[J]. *Cell Res*, 2017, 27(6): 801-814. DOI: 10.1038/cr.2017.76.
- [65] STEWART M P, SHAREI A, DING X, et al. In vitro and ex vivo strategies for intracellular delivery[J]. *Nature*, 2016, 538(7624):

- 183-192. DOI:10.1038/nature19764.
- [66] KAY M A, GLORIOSO J C, NALDINI L. Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics[J]. *Nat Med*, 2001, 7(1): 33-40. DOI: 10.1038/83324
- [67] NAKAI H, MONTINI E, FUESS S, et al. AAV serotype 2 vectors preferentially integrate into active genes in mice[J]. *Nat Genet*, 2003, 34(3): 297-302. DOI:10.1038/ng1179.
- [68] RAN F A, CONG L, YAN W X, et al. In vivo genome editing using staphylococcus aureus Cas9[J]. *Nature*, 2015, 520(7546): 186-191. DOI: 10.1038/nature14299.
- [69] YANG H, WANG H, JAENISCH R. Generating genetically modified mice using CRISPR/Cas-mediated genome engineering[J]. *Nat Protoc*, 2014, 9(8):1956-1968. DOI:10.1038/nprot.2014.134.
- [70] FU Y, SANDER J D, REYON D, et al. Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs[J]. *Nat Biotechnol*, 2014, 32(3): 279-284. DOI: 10.1038/nbt.2808.
- [71] HSU P D, LANDER E S, ZHANG F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering[J]. *Cell*, 2014, 157(6): 1262-1278. DOI:10.1016/j.cell.2014.05.010.
- [72] DIANOV G L, HUBSCHER U. Mammalian base excision repair: the forgotten archangel[J].*Nucleic Acids Res*, 2013, 41(6): 3483-3490. DOI:10.1093/nar/gkt076.
- [73] TSAI S Q, WYVEKENS N, KHAYTER C, et al. Dimeric CRISPR RNA-guided Fok I nucleases for highly specific genome editing [J]. *Nat Biotechnol*, 2014, 32(6): 569-576. DOI: 10.1038/nbt.2908.
- [74] GUILINGER J P, THOMPSON D B, LIU D R. Fusion of catalytically inactive Cas9 to Fok I nuclease improves the specificity of genome modification[J]. *Nat Biotechnol*, 2014, 32(6): 577- 582. DOI:10.1038/nbt.2909.
- [75] SLAYMAKER I M, GAO L, ZETSCHKE B, et al. Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity[J].*Science*, 2016, 351(6268): 84-88. DOI:10.1126/science.aad5227.
- [76] DOW L E, FISHER J, O'ROURKE K P, et al. Inducible in vivo genome editing with CRISPR-Cas9[J]. *Nat Biotechnol*, 2015, 33(4): 390-394. DOI:10.1038/nbt.3155.
- [77] GONZALEZ F, ZHU Z, SHI Z D, et al. An iCRISPR platform for rapid, multiplexable, and inducible genome editing in human pluripotent stem cells[J]. *Cell Stem Cell*, 2014, 15(2): 215- 226. DOI: 10.1016/j.stem.2014.05.018.
- [78] NIHONGAKI Y, YAMAMOTO S, KAWANO F, et al. CRISPR-Cas9-based photoactivatable transcription system[J]. *Chem Biol*, 2015, 22(2): 169-174. DOI:10.1016/j.chembiol.2014.12.011.
- [79] KOMOR A C , KIM Y B, PACKER M S, et al. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage[J]. *Nature*, 2016, 533(7603): 420- 424. DOI:10.1038/nature17946.
- [80] MA Y, ZHANG J, YIN W, et al. Targeted AID-mediated mutagenesis (TAM) enables efficient genomic diversification in mammalian cells[J]. *Nat Methods*, 2016, 13(12): 1029- 1035. DOI:10.1038/nmeth.4027.
- [81] MAEDER M L, ANGSTMANN J F, RICHARDSON M E, et al. Targeted DNA demethylation and activation of endogenous genes using programmable TALE-TET1 fusion proteins[J]. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(12): 1137-1142. DOI:10.1038/nbt.2726.
- [82] MENDENHALL E M, WILLIAMSON K E, REYON D, et al. Locus-specific editing of histone modifications at endogenous enhancers[J]. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(12): 1133- 1136. DOI:10.1038/nbt.2701.
- [83] HILTON I B, D'IPPOLITO A M, VOCKLEY C M, et al. Epigenome editing by a CRISPR-Cas9-based acetyltransferase activates genes from promoters and enhancers[J]. *Nat Biotechnol*, 2015, 33(5): 510-517. DOI:10.1038/nbt.3199.
- [84] KEARNS N A, PHAM H, TABAK B, et al. Functional annotation of native enhancers with a Cas9-histone demethylase fusion[J]. *Nat Methods*, 2015,12(5):401-413. DOI:10.1038/nmeth.3325.
- [85] BIKARD D, JIANG W, SAMAI P, et al. Programmable repression and activation of bacterial gene expression using an engineered CRISPR- Cas system[J]. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41(15): 7429-7437. DOI:10.1093/nar/gkt520.
- [86] QI L S, LARSON M H, GILBERT L A, et al. Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression[J]. *Cell*, 2013, 152(5): 1173- 1183. DOI:10.1016/j.cell.2013.02.022.
- [87] GILBERT L A, LARSON M H, MORSUT L, et al. CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes [J]. *Cell*, 2013, 154(2): 442-451. DOI:10.1016/j.cell.2013.06.044.
- [88] KONERMANN S, BRIGHAM M D, TREVINO A E, et al. Optical control of mammalian endogenous transcription and epigenetic states [J]. *Nature*, 2013, 500(7463): 472-476. DOI:10.1038/nature12466.
- [89] PEREZ-PINERA P, KOCAK D D, VOCKLEY C M, et al. RNA-guided gene activation by CRISPR-Cas9-based transcription factors [J]. *Nat Methods*, 2013, 10(10): 973- 976. DOI:10.1038/nmeth.2600.
- [90] MAEDER M L, LINDER S J, CASCIO V M, et al. CRISPR RNA-guided activation of endogenous human genes[J]. *Nat Methods*, 2013, 10(10): 977-979. DOI: 10.1038/nmeth.2598.
- [91] MALI P, AACH J, STRANGES P B, et al. CAS9 transcriptional activators for target specificity screening and paired nickases for cooperative genome engineering[J]. *Nat Biotechnol*, 2013, 1(9): 833-838. DOI:10.1038/nbt.2675.
- [92] CHEN S, SANJANA NE, ZHENG K, et al. Genome-wide CRISPR screen in a mouse model of tumor growth and metastasis[J]. *Cell*, 2015, 160(6): 1246-1260. DOI: 10.1016/j.cell.2015.02.038.
- [93] KOIKE-YUSA H, LI Y, TAN E P, et al. Genome-wide recessive genetic screening in mammalian cells with a lentiviral CRISPR-guide RNA library[J]. *Nat Biotechnol*, 2014, 32(3): 267- 273. DOI:10.1038/nbt.2800.
- [94] WANG T, WEI JJ, SABATINI DM, et al. Genetic screens in human cells using the CRISPR-Cas9 system[J]. *Science*, 2014,343(6166): 80-84. DOI:10.1126/science.1246981.
- [95] SHALEM O, SANJANA N E, HARTENIAN E, et al. Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells[J]. *Science*, 2014, 343(6166): 84-87. DOI:10.1126/science.1247005.
- [96] 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(12): 1279- 1286. DOI: 10.1038/nbt.3715.
- [97] KONERMANN S, BRIGHAM M D, TREVINO A E, et al. Genome-scale transcriptional activation by an engineered CRISPR-Cas9 complex[J]. *Nature*, 2015, 517(7536): 583-588. DOI:10.1038/nature14136.
- [98] GILBERT L A, HORLBECK M A, ADAMSON B, et al. Genome-

- scale CRISPR-mediated control of gene repression and activation [J]. *Cell*, 2014, 159(3): 647-661. DOI:10.1016/j.cell.2014.09.029.
- [99] HECKL D, KOWALCZYK M S, YUDOVICH D, et al. Generation of mouse models of myeloid malignancy with combinatorial genetic lesions using CRISPR-Cas9 genome editing[J]. *Nat Biotechnol*, 2014, 32(9): 941-946. DOI:10.1038/nbt.2951.
- [100] SANCHEZ-RIVERA F J, PAPAGIANNAKOPOULOS T, ROMERO R, et al. Rapid modelling of cooperating genetic events in cancer through somatic genome editing[J]. *Nature*, 2014, 516(7531): 428-431. DOI:10.1038/nature13906.
- [101] XUE W, CHEN S, YIN H, et al. CRISPR-mediated direct mutation of cancer genes in the mouse liver[J]. *Nature*, 2014, 514(7522): 380-384. DOI: 10.1038/nature13589.
- [102] PLATT R J, CHEN S, ZHOU Y, et al. CRISPR-Cas9 knockin mice for genome editing and cancer modeling[J]. *Cell*, 2014, 159(2): 440-455. DOI: 10.1016/j.cell.2014.09.014.
- [103] GOSTISSA M, ALT F W, CHIARLE R. Mechanisms that promote and suppress chromosomal translocations in lymphocytes[J]. *Annu Rev Immunol*, 2011, 29(6): 319-340. DOI:10.1146/annurev-immunol-031210-101329.
- [104] HAKIM O, RESCH W, YAMANE A, et al. DNA damage defines sites of recurrent chromosomal translocations in B lymphocytes[J]. *Nature*, 2012, 484(7392): 69-74. DOI: 10.1038/nature10909.
- [105] MADDALO D, MANCHADO E, CONCEPCION C P, et al. In vivo engineering of oncogenic chromosomal rearrangements with the CRISPR/Cas9 system[J]. *Nature*, 2014, 516(7531): 423-427. DOI:10.1038/nature13902.
- [106] BLASCO R B, KARACA E, AMBROGIO C, et al. Simple and rapid in vivo generation of chromosomal rearrangements using CRISPR/Cas9 technology[J]. *Cell Rep*, 2014, 9(4): 1219-1227. DOI: 10.1016/j.celrep.2014.10.051.
- [107] TORRES R, MARTIN M C, GARCIA A, et al. Engineering human tumour-associated chromosomal translocations with the RNA-guided CRISPR-Cas9 system[J/OL]. *Nat Commun*, 2014,5:e3964 [2017-06-22]. <https://www.nature.com/articles/ncomms4964>. DOI: 10.1038/ncomms4964.
- [108] LIU Y, ZENG Y, LIU L, et al. Synthesizing and gate genetic circuits based on CRISPR-Cas9 for identification of bladder cancer cells[J/OL]. *Nat Commun*, 2014, 5: e5393. <https://www.nature.com/articles/ncomms6393>. DOI:0.1038/ncomms6393.
- [109] KELLY G L, GRABOW S, GLASER S P, et al. Targeting of MCL-1 kills MYC-driven mouse and human lymphomas even when they bear mutations in p53[J]. *Genes Dev*, 2014, 28(1): 58-70. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3894413/>. DOI:10.1101/gad.232009.113.
- [110] WANG J, QUAKE S R. RNA-guided endonuclease provides a therapeutic strategy to cure latent herpesviridae infection[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, 111(36): 13157-13162. DOI:10.1073/pnas.1410785111.
- [111] CYRANOSKI D. Chinese scientists to pioneer first human CRISPR trial[J]. *Nature*, 2016, 535(7613): 476-487. DOI: 10.1038/nature.2016.20302.

[收稿日期] 2017-06-26

[修回日期] 2017-07-15

[本文编辑] 王映红

· 读者·作者·编者·

《中国肿瘤生物治疗杂志》关于抵制学术不端行为的声明

中国广大科技工作者坚持严谨求实、刻苦钻研、勇于创新的科学精神,取得了举世瞩目的科技成果,代表了中国科技工作者的主流。然而,近年来少数科技人员出现了抄袭剽窃、伪造数据、篡改数据、虚假署名、一稿多投等学术不端行为,影响了科技期刊的正常出版工作,给作者及其所在单位甚至我们国家带来非常负面的影响。《中国肿瘤生物治疗杂志》是中国肿瘤生物治疗领域惟一的高级学术刊物,一贯坚持“学术至上,质量第一”的原则,坚决抵制学术不端行为,努力维护学术纯洁性。为维护学术道德、保证期刊质量和学术声誉,本刊特作以下声明:

1. 作者投稿时须作出稿件无学术不端行为的声明。

2. 稿件审查过程中,本刊编辑部将采用“学术不端文献检测系统”,通过大量国内外学术文献的全文比对,对稿件进行学术不端行为的检查。

3. 本刊已加入“《中国学术文献网络出版总库》删除学术不端文献系统”,该系统协助本刊对已发表论文的学术不端行为进行全面复核。

4. 已发表的论文一经查实有学术不端行为,本刊将立即删除,第一时间刊登撤销声明,终止该论文在各相关数据库、文摘库中的传播,尽快消除不良影响。同时,视情节轻重给该文作者以下处理:书面警告,通知作者所在单位,在本领域相关期刊间通报,2年内本刊不刊登有其署名的稿件,相关学术责任人(通信作者)署名的其他稿件延缓审稿和刊登等。

(本刊编辑部)