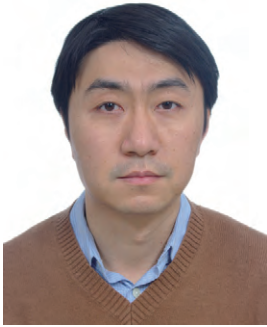


DOI: 10.13376/j.cblls/2015003

文章编号: 1004-0374(2015)01-0012-08



王皓毅, 博士, 中国科学院动物研究所研究员, 计划生育生殖生物学国家重点实验室基因工程技术研究组组长, 美国杰克逊实验室杰出访问教授。长期从事基因工程技术的开发与应用, 对于转座子编辑、传统基因打靶技术、ZFN、TALEN 和 CRISPR 等技术体系积累了大量的研究经验, 并获得多项研究成果: 包括率先利用 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敲除和敲入操作; 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/Cas 系统建立了在胚胎干细胞中进行多基因敲除的方法, 并通过受精卵注射一步获得多基因敲除的小鼠, 在进一步的工作中通过受精卵注射 CRISPR/Cas 系统的同时提供 DNA 单链和双链供体, 从而一步得到基因原位敲入小鼠和条件性敲除小鼠。2014 年, 王皓毅研究员全职回国, 在中国科学院动物研究所组建实验室, 实验室的研究方向主要有: 1) 进一步研究 TALEN 和 CRISPR 基因编辑技术的特性, 提高其效率和特异性; 2) 应用基因编辑技术开发新的疾病治疗方法。3) 全新基因编辑和表观遗传修饰技术的开发。

## 靶向核酸酶介导基因编辑技术的发展

项光海, 王皓毅\*

(中国科学院动物研究所计划生育生物学国家重点实验室, 北京 100190)

**摘要:** 对目标基因组位点进行靶向修饰一直是基因工程研究的重点。靶向基因编辑技术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, 并具有治疗遗传疾病的重大潜力。近年来靶向核酸酶技术取得了重大的进展, 逐渐成为基因编辑的主流工具。综述了锌指核酸酶 (ZFN)、类转录激活样效应因子核酸酶 (TALEN)、规律成簇间隔短回文重复序列 (CRISPR/Cas) 这三大靶向基因编辑系统的原理和研究进展, 并讨论了其局限性和未来的发展方向。

**关键词:** 基因编辑; 锌指核酸酶; TALEN; CRISPR/Cas

**中图分类号:** Q789      **文献标志码:** A

### Programmable site-specific DNA endonucleases: powerful tools for genome engineering

XIANG Guang-Hai, WANG Hao-Yi\*

(State Key Laboratory of Reproductive Biology, Institute of Zoology,  
Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China)

**Abstract:** Genome engineering technologies are invaluable tools for understanding the function of genes in health 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

收稿日期: 2014-12-05

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(31471215)

\*通信作者: E-mail: wanghaoyi@ioz.ac.cn

palindromic repeat (CRISPR) system, have gained tremendous popularity and become widely used for genome engineering in cell lines and animal species ranging from *Drosophila* to primates. Here, we reviewed the principle, progress, limitation and prospect of ZFN, TALEN and CRISPR/Cas systems for genome engineering.

**Key words:** gene editing; ZFN; TALEN; CRISPR/Cas

对目标基因组位点进行靶向修饰一直是基因工程研究的重点。靶向基因编辑技术能够有效地应用于建立动物和细胞疾病模型、培育动植物新品种,并具有治疗遗传疾病的重大潜力。基因打靶技术(gene targeting)是最为成熟的一类基因编辑技术,最初由 Mario Capecchi 在 20 世纪 80 年代提出<sup>[1]</sup>。他利用细胞内在的同源重组机制,将含有同源序列的外源 DNA 片段导入细胞,使其定点整合到基因组的特异位点,从而改变某个具体基因的功能、表达,或修复基因突变。基因打靶技术与胚胎干细胞技术的结合使得建立具有精确基因修饰的动物模型成为现实,这一伟大突破被广泛应用于基因敲除小鼠的建立,而为发展这一技术做出重大贡献的三位科学家: Mario Capecchi、Martin Evans 和 Oliver Smithies 也于 2007 年获得诺贝尔生理学或医学奖。靶向基因编辑技术的建立促进了基础研究,也给生物医学、个体治疗带来了曙光。但是基因打靶技术主要依赖自然发生的同源重组,这一过程在大多数物种和细胞类型中发生频率极低,使得这项技术的应用受到限制。二十世纪 90 年代,有研究报道 DNA 分子发生双链断裂(double-strand break)时,能够引发 DNA 以同源重组(homologous recombination, HR)或者非同源末端连接(non-homology end joining, NHEJ)方式修复受损的 DNA<sup>[2]</sup>,同时引入碱基突变、缺失或者插入。因此,利用各种方法在基因组特定位点诱导 DNA 双链断裂,从而引发 DNA 修复活动,使得基因靶向编辑效率大大提高。近年来,多种新型高效的 DNA 靶向内切酶被发现并投入应用,其中应用最为广泛的为锌指核酸酶(zinc finger nucleases, ZFN)、类转录激活样效应因子核酸酶(transcription activator-like effector nucleases, TALEN)、规律成簇间隔短回文重复序列(clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR/Cas)系统。这三大系统主要通过目标位点造成 DNA 双链断裂,从而介导以同源重组或非同源末端连接方式修复受损 DNA,实现对基因的定点敲除(Knock-Out)<sup>[3-9]</sup>、敲入(Knock-In)<sup>[10-11]</sup>,基因修正(gene correction)<sup>[12-13]</sup>等多种修饰。此外,这些系统也可以被应用于对基

因表达水平的调控(transcription regulation)<sup>[14-18]</sup>和表观遗传修饰的编辑<sup>[19-22]</sup>等,本文将只介绍靶向核酸酶基因编辑方面的应用。接下来,我们将详细介绍基因打靶技术和这三大靶向核酸酶系统的发展与应用,并对其局限和未来发展方向做简单的分析。

## 1 基因打靶技术(gene targeting)

传统的基因打靶技术在小鼠中得到最为广泛的应用,它是基于小鼠胚胎干细胞的获取和同源重组能够引入外源 DNA 这两个概念和技术上的突破而建立的。

胚胎干细胞是从早期胚胎中分离出来具有无限分裂能力并可分化为各种成熟细胞类型的一类细胞。Evans 和 Kaufman<sup>[23]</sup>,以及 Martin 等<sup>[24]</sup>于 1981 年最早报道了从体外培养的小鼠囊胚中分离出胚胎干细胞(ES cell),并证明 ES 细胞具有与畸胎瘤细胞(EC)一样的核型。Bradley 等<sup>[25]</sup>随后又证明 ES 细胞通过显微注射到囊胚中,能够整合到生殖系细胞中,遗传到下一代,最终获得基因修饰的动物。

早期研究报道外源遗传物质通过磷酸钙共沉淀的方法能够引入到哺乳动物基因组。但是在正常情况下,同源重组方式介导基因整合的频率极低( $10^{-8}$ ~ $10^{-9}$ )<sup>[1]</sup>,外源 DNA 往往通过随机整合方式插入到染色体某一位点。Mario Capecchi 在 1986 年报道了外源 DNA 能以较高频率( $10^{-3}$ )通过同源重组的方式整合到哺乳动物基因组中,他建立了一株潮霉素 Neo 筛选标记缺陷的细胞系,然后通过引入外源 DNA 修复 Neo 筛选标记,从而证明了外源 DNA 和哺乳动物染色体间能够发生同源重组。同一时期,Smithies 等<sup>[26]</sup>也报道了在体外培养的人类细胞中外源 DNA 以极高频率通过同源重组方式整合到  $\beta$ -globin 位点,第一次实现了外源 DNA 定点插入到基因组中。随后,Thomas 和 Capecchi<sup>[27]</sup>报道了在小鼠胚胎干细胞中进行基因打靶的实验,成功突变了基因 *HPRT*,并插入了 Neo 筛选标记。

以上两项技术的协同使用,奠定了基因打靶技术的基础,但是该项技术依赖于:(1)胚胎干细胞

的建立和胚胎干细胞在注射到早期胚胎中形成嵌合动物生殖细胞的能力；(2)同源重组在胚胎干细胞中具有较高的效率。这两点使得基因打靶技术一直局限于小鼠的几个特定品系中，而最近随着大鼠胚胎干细胞培养体系的进步才成功应用于大鼠<sup>[28-29]</sup>。对于其他重要的哺乳动物，如猪、牛、和非人灵长类等其胚胎干细胞的分离和培养条件依然在努力优化中。此外，在人类胚胎干细胞和诱导多能性干细胞中，同源重组的效率很低，极大限制了该方法的应用。因此，传统的基因打靶技术的应用比较有限，但是其在理论和原理上的突破依然具有重要意义。

## 2 锌指核酸酶(ZFN)

### 2.1 ZFN的构造和原理

锌指蛋白最早报道见于1985年，Miller等<sup>[30]</sup>发现细菌5S RNA的体外转录需要一个40 kDa的结合蛋白参与，对这个蛋白质分析表明其含有9个串联的相似的功能单位，每个单位有近30个氨基酸且含有Cys-Cys-His-His的保守结构域。后续研究表明，每个锌指蛋白含有 $\beta\beta\alpha$ 状的保守构象，表面某些氨基酸能够识别DNA双链上的3个连续的核苷酸。人工串联3~6个锌指蛋白能够特异识别9~18个核苷酸，18个核苷酸长度的序列有 $4^{18}$ 种组合，串联起来大约 $6.8 \times 10^9$  bp DNA长度，能够覆盖几乎所有生物的基因组，因此，足以保证与靶点结合的特异性。

将锌指蛋白同II型限制性内切酶Fok I的切割结构域串联形成人工锌指核酸酶<sup>[31]</sup>，由于Fok I需要二聚化才能发挥功能<sup>[32]</sup>，因此，需要设计两个互补的ZFN分子，与靶位点特异结合后，两个ZFN分子间隔距离合适时，Fok I二聚化发挥切割功能，造成靶位点断裂，启动体内的DNA损伤修复机制。在没有外源DNA模板时，细胞主要通过非同源末端连接修复方式，引入碱基的缺失和插入(Indels)、突变，达到基因敲除的目的；如果存在与靶位点具有同源序列的修复模板，细胞可通过同源重组修复方式实现靶基因的精确修复或在此位点插入基因，如筛选标记、荧光蛋白等。目前，锌指核酸酶的构造主要采取模块组装(modular assembly)的方法<sup>[33]</sup>，即根据实验验证的锌指蛋白同三联核苷酸的对应关系，通过建立能够识别所有3个串联核苷酸类型的锌指蛋白库，共64种三联核苷酸组合，当选定打靶位点后，只要将相应的锌指蛋白挑选并偶联即可。但由于不同锌指在连接后常常无法维持各自原有的

特异性，因此，合成一段识别18个碱基的锌指链往往需要进行锌指文库的大规模筛选。同时，并非所有的目标序列都能找到高效特异的锌指蛋白，因此，在目标位点的选择上有一定限制。

### 2.2 ZFN的研究进展

锌指核酸酶是第一个大规模应用于基因编辑领域的工具，目前已经在体外培养的哺乳动物细胞<sup>[34-36]</sup>和斑马鱼<sup>[3-4]</sup>、小鼠<sup>[12]</sup>、大鼠<sup>[37]</sup>、拟南芥<sup>[38]</sup>等多种模式生物中成功实现了基因敲除或修饰。美国的Sangamo公司在锌指核酸酶应用研发领域处在领先地位。2005年，Sangamo公司成功利用ZFN在人类细胞中实现了对一个与免疫缺陷相关的突变基因*IL2R $\gamma$* 的修复<sup>[34]</sup>；2008年，Sangamo公司又通过造成HIV的共同受体CCR5基因的突变，大大提高了T淋巴细胞对于HIV病毒的抗感染能力<sup>[35]</sup>；2010年，Holt等<sup>[36]</sup>报道了突变人类造血干细胞中的CCR5基因，并将造血干细胞移植到免疫缺陷小鼠中，发现小鼠对HIV病毒具有免疫排斥；2014年，Genovese等<sup>[39]</sup>报道了利用ZFN在造血干细胞中精确修饰并插入*IL2RG*基因的cDNA，然后将造血干细胞移植到免疫缺陷小鼠模型中，能够重建小鼠的造血系统。此外，Sangamo公司治疗HIV的ZFN药物已经进入二期临床试验。另外，学术界的大量科学家也在不断地推动ZFN技术的发展和运用，比较突出的有Keith Joung、Daniel Voytas和Dana Carroll等。

### 2.3 ZFN的局限和未来研究方向

作为最先应用的靶向核酸酶之一，科学家们应用人工锌指核酸酶，探索了多种靶向基因编辑技术的实验策略和应用方向，并进行了临床应用的尝试。这些研究也为后来的TALEN和CRISPR/Cas系统研究提供了重要借鉴；但ZFN的构建耗时耗力，且构建费用较高，而且现在尚不能针对任意靶点设计相应的ZFN实现特异切割<sup>[40]</sup>。另外，ZFN存在一定的脱靶效应，也限制了ZFN的广泛应用。

ZFN经过十几年的发展和应用，前期积累了大量的临床数据，因此对临床基因治疗和细胞治疗具有巨大的意义。未来的方向是努力提高特异性ZFN的设计和生产效率，降低ZFN诱导的脱靶效率。

## 3 TALEN技术

### 3.1 TALEN的构造和原理

TALE蛋白最早报道于1989年<sup>[41]</sup>，但是直到2009年，才有两个研究小组同时在*Science*杂志上报道了TALE蛋白能特异性地识别DNA序列，并

破译了 TALE 蛋白与 DNA 碱基识别的密码<sup>[42-43]</sup>。2010 年, Christian 等<sup>[44]</sup>首次报道了 TALE 与 Fok I 偶合形成 TALEN, 并证明了其靶向切割能力。2012 年, TALE 蛋白特异识别 DNA 序列的晶体结构又获得解析<sup>[45]</sup>。

不同的 TALE 蛋白其 DNA 结构域由高度保守的重复单元组成, 每个重复单元含有 33~35 个氨基酸, 除了 12 和 13 位两个氨基酸不同外, 其他氨基酸在不同 TALE 中是高度保守的。这两个氨基酸被称为重复序列可变的双氨基酸残基 (repeat variable diresidues, RVD), 参与对 DNA 双链上的碱基识别, 每一个 RVD 识别 4 种碱基中的一种或几种。虽然不同的 TALE 蛋白具有多种 RVD, 但目前最为广泛使用的为以下 5 种 RVD(表 1)。

表1 TALE蛋白识别DNA碱基密码表

氨基酸对(RVD)	识别碱基
组氨酸-天冬氨酸 (HD)	C
天冬酰胺-异亮氨酸 (NI)	A
天冬酰胺-天冬酰胺 (NN)	G或A
天冬酰胺-甘氨酸 (NG)	T
天冬酰胺-组氨酸 (NH)	G

TALE 核酸酶 (TALE nuclease, TALEN) 的构造类似于 ZFN, 即将 TALE 蛋白的 DNA 结合结构域与 Fok I 内切酶连接, 从而实现在基因组特定位点实现靶向切割, 诱导 DNA 修复。目前, TALEN 的构建也有多种方法, 最常用的是 Cermak 等<sup>[46]</sup>发表的“Goldengate Assembly”。其他的 TALEN 构建方法多遵循同一个思路: 首先将 4 种碱基对应的 TALE 的 DNA 结构域序列连接到载体上, 然后通过酶切连接将不同的单体 TALE 组成一个阵列, 最后连到含有 Fok I 和核定位序列 (nucleic locus sequence, NLS) 的质粒中即完成了 TALEN 的构建。

### 3.2 TALEN的研究进展

同 ZFN 一样, TALEN 一经发现便被广泛应用并成功在体外培养的哺乳动物细胞<sup>[5]</sup>和果蝇<sup>[47]</sup>、小鼠<sup>[6]</sup>、水稻<sup>[48]</sup>等模式生物中实现了基因敲除或修饰; 此外, 还在大动物, 如猪<sup>[5,10]</sup>、猴<sup>[49]</sup>等中实现了基因定点修饰。2011 年, Jaenisch 研究组率先利用 TALEN 技术在人类胚胎干细胞和诱导性多能干细胞中建立了高效率的基因精确修饰的方法<sup>[50]</sup>。传统基因打靶技术在小鼠 Y 染色体上进行基因修饰

非常困难。2013 年, Wang 等<sup>[51]</sup>在成功利用 TALEN 实现了 Y 染色体上性别相关基因 *Sry* 和 *Uty* 的突变, 并且成功获得了基因修饰的动物。2013 年, Carlson 等<sup>[5]</sup>和 Tan 等<sup>[10]</sup>在猪中实现了基因的敲除和敲入。2014 年, Liu 等<sup>[49]</sup>报道了利用 TALEN 获得了 Rett 综合征和孤独症相关的基因 *Mecp2* 突变的基因修饰猴。

### 3.3 TALEN的局限和未来研究方向

TALEN 技术较 ZFN 技术有巨大的进步。首先, 在构建上, TALEN 要远远简单于 ZFN, 在一般的分子生物学实验室即可完成; 其次, TALEN 识别位点选择范围更加广, 唯一的限制是在识别位点前的第一个碱基必须是“T”; 但是, TALEN 的应用也存在一定局限。TALEN 同 ZFN 一样, 也存在脱靶效应, 这在临床基因治疗上是一个重要的参考因素。与 ZFN 类似, 进一步提高基因精确修饰效率和降低脱靶效应也是 TALEN 的未来研究方向。由于 TALEN 蛋白的编码序列比 ZFN 要长的多, 因此, 如何有效地将 TALEN 表达载体输送到疾病相关细胞中也是 TALEN 在疾病治疗应用方面需要解决的重要问题。

## 4 CRISPR/Cas系统

### 4.1 CRISPR/Cas系统的构造和原理

CRISPR 的重复序列特征在 1987 年被发现<sup>[53]</sup>, 2002 年被重新定义<sup>[54]</sup>。CRISPR 的基因结构非常稳定, 广泛存在于原核生物基因组中, 主要由高度保守的同向重复序列 (repeat) 和间隔序列 (spacer) 构成, 重复序列长度在 25~50 bp 之间, 具有回文序列, 能与 tracrRNA 形成发夹结构。2007 年和 2010 年, CRISPR/Cas 系统被发现原核生物中表现出某种获得性免疫功能, 能使宿主获得抵抗噬菌体、质粒等外来 DNA 入侵的免疫能力<sup>[55-56]</sup>。

CRISPR/Cas 系统的作用机制大体分为 3 个阶段<sup>[57]</sup>: 噬菌体入侵的起始阶段, Cas 蛋白复合物靶向并裂解噬菌体基因组中的原型间隔序列 (protospacer), 原型间隔序列被整合到宿主基因组的 CRISPR 位点的 5' 端; 然后, 这些短的掺入的序列被转录成 crRNA; 最后, 当噬菌体再次入侵时, crRNA 会与 Cas 蛋白的核酸酶结构域连同 tracrRNA 共同对与 crRNA 互补的双链 DNA 进行切割, 从而使细菌具有对抗同类噬菌体再次入侵的能力。

现在发现的 CRISPR/Cas 系统大致分为 3 类: 其中 I 型和 III 型系统较为复杂, 由多种蛋白质的

复合体执行功能,应用比较困难;II型系统较为简单,主要执行功能的成分只有3种:Cas9蛋白、crRNA和tracrRNA。当外源DNA进入细胞,crRNA在RNase III催化下加工成熟,和tracrRNA互作形成双链RNA结构,介导Cas9蛋白定向切割与crRNA互补的靶位点。Cas9蛋白的HNH核酸酶结构域剪切互补链,而RuvC结构域剪切非互补链,从而造成目标DNA分子的双链断裂<sup>[58]</sup>。

## 4.2 CRISPR/Cas系统的研究进展

CRISPR/Cas系统因其简单的组成成分和设计上的简单,一经发现便受到了极大关注。目前已经在体外培养的细胞和多种模式动物,包括猪、猴子等大动物中实现了靶向基因修饰。2012年,Doudna和Charpentier研究小组在*Science*上率先报道了利用人工设计的crRNA和来源于*Streptococcus pyogenes*的Cas9蛋白对体外DNA进行精确切割,并通过结合crRNA和tracrRNA人工设计了sgRNA(single-guide RNA)作为单一RNA分子发挥引导Cas9的功能,同时还发现对Cas9两个不同核酸酶结构域的突变,能够实现对DNA单链的精确切割<sup>[58]</sup>。2013年,Church实验室<sup>[8]</sup>和Zhang实验室<sup>[7]</sup>同时在*Science*杂志上报道,利用来自*Streptococcus pyogenes*的CRISPR/Cas9系统在体外培养的人类细胞中也能实现特定基因位点的靶向修饰。随后,Wang和Yang等<sup>[9,11]</sup>在*Cell*杂志上报道利用该系统在小鼠ES细胞内实现了同时对5个基因进行修饰以及通过该系统在小鼠体内实现多基因敲除、插入点突变、GFP和loxP位点等,并且一步获得了基因修饰的小鼠。具有一个核酸酶结构域突变的Cas9 nickase蛋白只能切割DNA双链中的一条。根据ZFN和TALEN二聚化的原理,利用两条sgRNA,Cas9 nickase在目标DNA位点造成双链断裂,有助于提高切割特异性<sup>[14,59]</sup>。还有研究报道,突变Cas9蛋白的两个核酸酶结构域,并连上转录激活因子,能调控细胞内源基因的表达<sup>[17,60-61]</sup>,以及利用Cas9结合sgRNA文库进行全基因组规模的功能基因筛选<sup>[62-63]</sup>。CRISPR/Cas9系统在治疗上也有很多报道,如来自上海生科院的李劲松组在*Cell Stem Cell*上报道利用该系统修复与白内障相关的基因*Crygc*的单碱基突变,并获得了正常健康的小鼠<sup>[13]</sup>。2014年,Niu等<sup>[52]</sup>在*Cell*杂志上报道利用CRISPR/Cas9系统在猴子中实现多个基因的敲除。鉴于该系统识别序列较短,可能会引发较高的脱靶效应,很多研究小组相继报道了研究脱靶效应的结果,结果不一,

但总体说来该系统的脱靶效应与ZFN和TALEN系统类似<sup>[64]</sup>。最近,Zhang实验室又报道了利用多种病毒载体包装CRISPR系统,在多种细胞系中实现了基因敲除,并构建了Cas9敲入小鼠模型和*p53*、*KRAS*、*LKB13*个主要肺癌基因缺失小鼠肺癌模型<sup>[65]</sup>。

## 4.3 CRISPR/Cas系统的局限和未来发展方向

首先,在Cas9系统中切割位点必须含有PAM(proto-spacer adjacent motif),限制了Cas9系统对任意序列进行切割。其次,20bp的识别位点的特异性有限,可能造成较高的脱靶效应。最后,来源于原核生物的靶向核酸酶系统在真核生物中不同基因位点作用的差别还有待进一步研究,目前有证据表明表观遗传修饰可能对Cas9的切割效率有影响。

未来CRISPR系统研究重点在于降低脱靶效率。目前的解决策略有将dCas9同Fok I核酸内切酶偶合<sup>[66-67]</sup>,增强识别特异性;CRISPR系统广泛存在与原核生物中,不同物种中的CRISPR系统具有不同的PAM识别序列和活性。因此,开发、比较和优化不同CRISPR系统可以进一步提高基因修饰的自由度和效率。同时,不同表观遗传修饰和目标序列组成对于CRISPR功能的影响也需要进一步的研究,从而使我们可以设计更加有效的靶向基因修饰方案。在治疗方面的应用,由于Cas9蛋白的编码长度较长,在载体方面需要进一步的选择和优化,从而达到有效地输送到目标细胞类型进行靶向基因修饰。

## 5 展望

随着越来越多物种的基因组测序完成,生物研究进入后基因组时代。基因组学的研究借助新一代测序技术和生物信息学手段预测了越来越多与人类生理和疾病相关的基因和基因型,而是否特定基因型导致了疾病或生理表型则需要通过实验去进一步验证。而研究基因的功能往往需要获得该基因功能缺失或具有特定突变的细胞系或动物模型,因此,快速、高效的基因编辑技术是建立这些模型的最佳选择。ZFN的发现和打开利用靶向核酸酶进行精确基因编辑的大门,但是ZFN对DNA序列识别规则复杂,位点设计选择少,构建费时费力且难度大,使得其应用受到了限制。TALEN的出现一定程度上弥补了ZFN的不足,TALE蛋白与DNA序列的识别更加严格,规则更加简单。但是TALEN构建也相对耗时,使其在全基因组规模的构建和应用受到限制。相比之下,CRISPR/Cas在

设计上极为简单, 且造成 DNA 双链断裂的效率与 ZFN 和 TALEN 类似, 此外在多个位点上同时进行基因修饰非常便利。

这三大系统共同的发展方向除了进一步提高效率和特异性, 还需要提高其在静息细胞中的精确修饰效率。因为同源重组发生在 S/G2 期, 而静息细胞(如终端分化神经元)基本不进行分裂, 因此, 自然状态下发生同源重组的机率极低。在临床治疗方面, 靶向核酸酶蛋白表达载体要进一步优化, 以及针对具体疾病治疗的临床给药方式也有待进一步发展。总之, 这三种基因编辑工具都大大提高了基因编辑的效率, 使得快速获得靶向基因修饰的细胞和动物模型成为现实, 也为多种疾病的治疗带来无限希望。

### [参 考 文 献]

- [1] Thomas KR, Folger KR, Capecchi MR. High frequency targeting of genes to specific sites in the mammalian genome. *Cell*, 1986, 44(3): 419-28
- [2] Smih F, Rouet P, Romanienko PJ, et al. Double-strand breaks at the target locus stimulate gene targeting in embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res*, 1995, 23(24): 5012-9
- [3] Doyon Y, McCammon JM, Miller JC, et al. Heritable targeted gene disruption in zebrafish using designed zinc-finger nucleases. *Nat Biotechnol*, 2008, 26(6): 702-8
- [4] Meng X, Noyes MB, Zhu LJ, et al. Targeted gene inactivation in zebrafish using engineered zinc-finger nucleases. *Nat Biotechnol*, 2008, 26(6): 695-701
- [5] Carlson DF, Tan W, Lillico SG, et al. Efficient TALEN-mediated gene knockout in livestock. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(43): 17382-7
- [6] Bedell VM, Wang Y, Campbell JM, et al. *In vivo* genome editing using a high-efficiency TALEN system. *Nature*, 2012, 491(7422): 114-8
- [7] Cong L, Ran FA, Cox D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 2013, 339(6121): 819-23
- [8] Mali P, Yang L, Esvelt KM, et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*, 2013, 339(6121): 823-6
- [9] Wang H, Yang H, Shivalila CS, et al. One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell*, 2013, 153(4): 910-8
- [10] Tan W, Carlson DF, Lancto CA, et al. Efficient nonmeiotic allele introgression in livestock using custom endonucleases. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(41): 16526-31
- [11] Yang H, Wang H, Shivalila CS, et al. One-step generation of mice carrying reporter and conditional alleles by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell*, 2013, 154(6): 1370-9
- [12] Li H, Haurigot V, Doyon Y, et al. *In vivo* genome editing restores haemostasis in a mouse model of haemophilia. *Nature*, 2011, 475(7355): 217-21
- [13] 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(6): 659-62
- [14] Mali P, Aach J, Stranges PB, et al. CAS9 transcriptional activators for target specificity screening and paired nickases for cooperative genome engineering. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(9): 833-8
- [15] Gilbert LA, Larson MH, Morsut L, et al. CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes. *Cell*, 2013, 154(2): 442-51
- [16] Qi LS, Larson MH, Gilbert LA, et al. Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. *Cell*, 2013, 152(5): 1173-83
- [17] Cheng AW, Wang H, Yang H, et al. Multiplexed activation of endogenous genes by CRISPR-on, an RNA-guided transcriptional activator system. *Cell Res*, 2013, 23(10): 1163-71
- [18] Gilbert LA, Horlbeck MA, Adamson B, et al. Genome-scale CRISPR-mediated control of gene repression and activation. *Cell*, 2014, 159(3): 647-61
- [19] Mendenhall EM, Williamson KE, Reyon D, et al. Locus-specific editing of histone modifications at endogenous enhancers. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(12): 1133-6
- [20] Maeder ML, Angstman JF, Richardson ME, et al. Targeted DNA demethylation and activation of endogenous genes using programmable TALE-TET1 fusion proteins. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(12): 1137-42
- [21] Gregory DJ, Mikhaylova L, Fedulov AV. Selective DNA demethylation by fusion of TDG with a sequence-specific DNA-binding domain. *Epigenetics*, 2012, 7(4): 344-9
- [22] Konermann S, Brigham MD, Trevino AE, et al. Optical control of mammalian endogenous transcription and epigenetic states. *Nature*, 2013, 500(7463): 472-6
- [23] Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 1981, 292(5819): 154-6
- [24] Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1981, 78(12): 7634-8
- [25] Bradley A, Evans M, Kaufman MH, et al. Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. *Nature*, 1984, 309(5965): 255-6
- [26] Smithies O, Gregg RG, Boggs SS, et al. Insertion of DNA sequences into the human chromosomal  $\beta$ -globin locus by homologous recombination. *Nature*, 1985, 317(6034): 230-4
- [27] Thomas KR, Capecchi MR. Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell*, 1987, 51(3): 503-12
- [28] Li P, Tong C, Mehrian-Shai R, et al. Germline competent embryonic stem cells derived from rat blastocysts. *Cell*, 2008, 135(7): 1299-310
- [29] Buehr M, Meek S, Blair K, et al. Capture of authentic

- embryonic stem cells from rat blastocysts. *Cell*, 2008, 135(7): 1287-98
- [30] Miller J, McLachlan AD, Klug A. Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from *Xenopus* oocytes. *EMBO J*, 1985, 4(6): 1609-14
- [31] Kim YG, Cha J, Chandrasegaran S. Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(3): 1156-60
- [32] Vanamee ES, Santagata S, Aggarwal AK. FokI requires two specific DNA sites for cleavage. *J Mol Biol*, 2001, 309(1): 69-78
- [33] Segal DJ, Beerli RR, Blancafort P, et al. Evaluation of a modular strategy for the construction of novel polydactyl zinc finger DNA-binding proteins. *Biochemistry*, 2003, 42(7): 2137-48
- [34] Urnov FD, Miller JC, Lee YL, et al. Highly efficient endogenous human gene correction using designed zinc-finger nucleases. *Nature*, 2005, 435(7042): 646-51
- [35] Perez EE, Wang JB, Miller JC, et al. Establishment of HIV-1 resistance in CD4(+) T cells by genome editing using zinc-finger nucleases. *Nat Biotechnol*, 2008, 26(7): 808-16
- [36] Holt N, Wang J, Kim K, et al. Human hematopoietic stem/progenitor cells modified by zinc-finger nucleases targeted to CCR5 control HIV-1 *in vivo*. *Nat Biotechnol*, 2010, 28(8): 839-47
- [37] Geurts AM, Cost GJ, Freyvert Y, et al. Knockout rats via embryo microinjection of zinc-finger nucleases. *Science*, 2009, 325(5939): 433
- [38] Lloyd A, Plaisier CL, Carroll D, et al. Targeted mutagenesis using zinc-finger nucleases in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(6): 2232-7
- [39] Genovese P, Schirotti G, Escobar G, et al. Targeted genome editing in human repopulating haematopoietic stem cells. *Nature*, 2014, 510(7504): 235-40
- [40] Urnov FD, Rebar EJ, Holmes MC, et al. Genome editing with engineered zinc finger nucleases. *Nat Rev Genet*, 2010, 11(9): 636-46
- [41] Bonas U, Stall RE, Staskawicz B. Genetic and structural characterization of the avirulence gene *avrBs3* from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Mol Gen Genet*, 1989, 218(1): 127-36
- [42] Moscou MJ, Bogdanove AJ. A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors. *Science*, 2009, 326(5959): 1501
- [43] Boch J, Scholze H, Schornack S, et al. Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science*, 2009, 326(5959): 1509-12
- [44] Christian M, Cermak T, Doyle EL, et al. Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. *Genetics*, 2010, 186(2): 757-61
- [45] Deng D, Yan C, Pan X, et al. Structural basis for sequence-specific recognition of DNA by TAL effectors. *Science*, 2012, 335(6069): 720-3
- [46] Cermak T, Doyle EL, Christian M, 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
- [47] Katsuyama T, Akhmedov A, Seimiya M, et al. An efficient strategy for TALEN-mediated genome engineering in *Drosophila*. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41(17): e163
- [48] Li T, Liu B, Spalding MH, et al. High-efficiency TALEN-based gene editing produces disease-resistant rice. *Nat Biotechnol*, 2012, 30(5): 390-2
- [49] Liu H, Chen Y, Niu Y, et al. TALEN-mediated gene mutagenesis in rhesus and cynomolgus monkeys. *Cell Stem Cell*, 2014, 14(3): 323-8
- [50] Hockemeyer D, Wang H, Kiani S, et al. Genetic engineering of human pluripotent cells using TALE nucleases. *Nat Biotechnol*, 2011, 29(8): 731-4
- [51] Wang H, Hu YC, Markoulaki S, et al. TALEN-mediated editing of the mouse Y chromosome. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(6): 530-2
- [52] Niu Y, Shen B, Cui Y, et al. Generation of gene-modified cynomolgus monkey via Cas9/RNA-mediated gene targeting in one-cell embryos. *Cell*, 2014, 156(4): 836-43
- [53] Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, et al. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J Bacteriol*, 1987, 169(12): 5429-33
- [54] Jansen R, Embden JD, Gastra W, et al. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Mol Microbiol*, 2002, 43(6): 1565-75
- [55] Garneau JE, Dupuis ME, Villion M, et al. The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature*, 2010, 468(7320): 67-71
- [56] Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*, 2007, 315(5819): 1709-12
- [57] Hsu PD, Lander ES, Zhang F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell*, 2014, 157(6): 1262-78
- [58] Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 2012, 337(6096): 816-21
- [59] Ran FA, Hsu PD, Lin CY, et al. Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell*, 2013, 154(6): 1380-9
- [60] Perez-Pinera P, Kocak DD, Vockley CM, et al. RNA-guided gene activation by CRISPR-Cas9-based transcription factors. *Nat Methods*, 2013, 10(10): 973-6
- [61] Maeder ML, Linder SJ, Cascio VM, et al. CRISPR RNA-guided activation of endogenous human genes. *Nat Methods*, 2013, 10(10): 977-9
- [62] Wang T, Wei JJ, Sabatini DM, et al. Genetic screens in human cells using the CRISPR-Cas9 system. *Science*, 2014, 343(6166): 80-4
- [63] Shalem O, Sanjana NE, Hartenian E, et al. Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells. *Science*, 2014, 343(6166): 84-7
- [64] Pattanayak V, Lin S, Guilinger JP, et al. High-throughput profiling of off-target DNA cleavage reveals RNA-

- programmed Cas9 nuclease specificity. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(9): 839-43
- [65] Platt RJ, Chen S, Zhou Y, et al. CRISPR-Cas9 knockin mice for genome editing and cancer modeling. *Cell*, 2014, 159(2): 440-55
- [66] Tsai SQ, Wyvekens N, Khayter C, et al. Dimeric CRISPR RNA-guided FokI nucleases for highly specific genome editing. *Nat Biotechnol*, 2014, 32(6): 569-76
- [67] Guilinger JP, Thompson DB, Liu DR. Fusion of catalytically inactive Cas9 to FokI nuclease improves the specificity of genome modification. *Nat Biotechnol* 2014, 32(6): 577-82