

# CRISPR/Cas9 的原理及其在疾病治疗中的研究进展

王亮 赵同标 (中国科学院动物研究所 干细胞与生殖生物学国家重点实验室, 北京 100101)

规律成簇间隔短回文重复序列 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR) 及其相关 Cas9 蛋白介导的新一代基因编辑技术具有操作容易、成本低廉的优势, 可实现精确高效的基因编辑功能, 包括定点插入、定点敲除及定点突变等, 已广泛用于多种动植物的基因编辑。近年来, CRISPR 技术迅速发展, 应用范围已拓展到基因调控、表观修饰、基因成像等领域。其在疾病治疗方面更是显示出广阔的应用前景。本文首先介绍 CRISPR 的作用机制、工作模型, 进而就其研究历史及最新进展进行阐述, 并对其在疾病治疗方面的应用进行归纳举例。

## 1 CRISPR/Cas 系统概述

随着 DNA 双螺旋结构的解析及中心法则的确立, 分子生物学技术获得迅猛发展, DNA 重组技术的出现更是开启了生命科学的新纪元, 为实现基因组定点编辑提供了理论基础与技术保障。长期以来, 科学家一直致力于如何精准、高效地对基因组进行操作, 以实现对其功能的解析及遗传性状的修饰。由此, 相继发展出了 ZFN (zinc finger nucleases)、TALEN (transcription activator-like effector nucleases) 及 CRISPR 等基因编辑技术。这 3 种基因编辑技术都基于同一原理, 即通过特定的 DNA 结合结构域识别并结合到特异性的目标 DNA 序列上, 引导序列特异性的内切酶在目标序列附

近进行切割, 造成 DNA 双链断裂 (double-stranded break, DSB), 进而激活体内的 DNA 修复系统, 包括非同源末端连接 (non-homologous end joining, NHEJ) 和 / 或同源重组修复 (homology-directed repair, HDR)。通过这两种修复途径, 可以实现对基因组改造的目的, 即基因敲除、引入特异突变和基因插入等。

ZFN 和 TALEN 都是以蛋白质介导的, 通过特异的结合蛋白与 DNA 目标位点结合, 在非特异性的核酸酶 Fok I 的作用下进行切割<sup>[1-2]</sup>; 而 CRISPR/Cas9 则是以 RNA 介导的, 以碱基互补配对结合目标 DNA 序列, 这样针对每个位点只需简单变换引导 RNA 序列即可, 不必像前者一样每次合成和组装不同的 DNA 识别蛋白; 此外, CRISPR 还可同时编辑 1 个细胞中的多个位点<sup>[3]</sup>, 位点选择也更加多样和灵活。因此, CRISPR 操作容易, 成本低, 而且准确、高效, 很快便得到了广泛应用。

## 2 CRISPR/Cas 系统的结构、作用机制及工作模型

### 2.1 CRISPR/Cas 系统的结构及作用机制

CRISPR/Cas 系统由 CRISPR 基因簇和 Cas 蛋白共同组成, 是细菌和古细菌抵抗噬菌体侵染的一种适应性免疫机制<sup>[4]</sup>。CRISPR 基因簇由多个重复序列 (repeat) 及与外源基因元件一致的非重复间隔序列 (spacer) 组成 R-S 结构。噬菌体初次侵染宿主细胞时, CRISPR 系统可通过 R-S 结构识别入侵核酸, 并

基金项目: 科技部973计划 (2013CB966901); 国家自然科学基金青年基金 (31400831); 国家自然科学基金面上基金 (31570995)

通讯作者: 赵同标 (Email: tbzhao@ioz.ac.cn)

通过扫描外源DNA序列上潜在的PAM(protospacer adjacent motif)获取邻近的一小段DNA序列,将其加工后重组到两个重复序列之间形成新的非重复间隔序列,获得针对该噬菌体的免疫能力<sup>[5]</sup>;当噬菌体再次侵袭时,CRISPR系统即可根据新获得的非重复间隔序列转录加工出引导RNA(guide RNA, gRNA),引导Cas蛋白识别并切割目标DNA<sup>[6]</sup>,从而达到免疫防御的效果。

CRISPR/Cas系统可分为I、II、III型,其中在产脓链球菌中发现的II型系统由于只需1个Cas蛋白(即Cas9)即可发挥核酸内切酶活性,相对比较简单且操作容易,因而研究最为广泛,被改造成为现今高效的基因编辑工具CRISPR/Cas9。

改造后的CRISPR/Cas9将原本独立的crRNA(CRISPR RNA)及tracrRNA(trans-acting CRISPR RNA)融合为一条单链引导RNA(single-stranded guide RNA, sgRNA)<sup>[4]</sup>。CRISPR基因座首先转录出前体crRNA及tracrRNA,两者通过碱基互补配对形成异二聚体,然后在Cas9的帮助下,前体crRNA被核酸内切酶RNase III剪切为成熟crRNA<sup>[7]</sup>。成熟crRNA含有可与目标DNA互补配对的非重复间隔序列,即人工设计的20 nt的gRNA,可引导Cas9蛋白实现对目标DNA序列的切割,使得CRISPR/Cas9系统更加简化,并被广泛应用于基因编辑领域。

Cas9蛋白含有多种同源物,包括Sp Cas9、Sa Cas9及Ana Cas9等,其中广泛应用于基因编辑领域的是Sp Cas9。Sp Cas9由 $\alpha$ 螺旋状的识别瓣叶(recognition lobe, REC)和核酸酶瓣叶(nuclease lobe, NUC)组成。REC可识别并结合sgRNA和目标DNA的复合体。NUC包含HNH核酸酶结构域、RuvC-样核酸酶结构域、PAM相互作用区(PAM-interacting domain, PI)及楔形域(wedge domain, WED)。HNH与RuvC可分别切割目标DNA上与crRNA互补及非互补的DNA链。PI负责与目标DNA的PAM区相互作用,促进Cas9蛋白切割的特异性。对于Sp Cas9蛋白而言,PAM为目标DNA的5'-NGG-3'序列,它的PI结构域的两个精

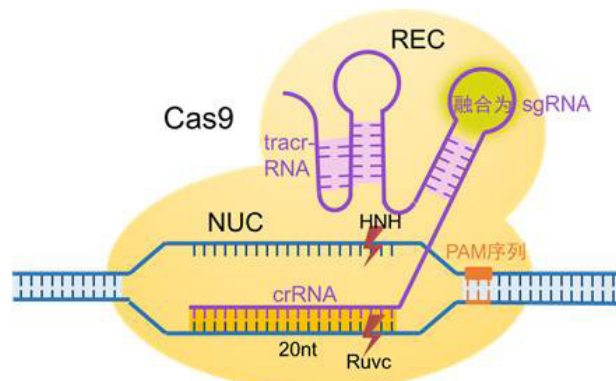
氨酸残基(Arg1333和Arg1335)可以通过氢键与非目标链PAM的GG二核苷酸结合<sup>[8]</sup>,从而区别于其他类型的Cas9蛋白(如Sa Cas9识别的是5'-NNGRRT-3' PAM)。此外,Sp Cas9也可识别5'-NAG-3'序列,但切割效率明显降低。WED则可与REC共同识别crRNA-tracrRNA二聚体的互补配对区及目标DNA的PAM区<sup>[9]</sup>。

CRISPR/Cas9系统的组成结构及功能见表1。Cas9蛋白对目标DNA序列的切割见图1。

表1 CRISPR/Cas9系统的组成结构及功能

组分及结构单元	功能
sgRNA	
crRNA	识别目标DNA约20 bp的片段并互补配对,引导Cas蛋白进行切割
tracrRNA	与crRNA形成异二聚体
Cas9蛋白	
REC	识别并结合sgRNA和目标DNA的复合体
NUC	
核酸酶HNH	切割与crRNA互补的目标DNA链
核酸酶RuvC	切割非目标DNA链
PI	与目标DNA的PAM区相互作用
WED	识别sgRNA以及目标DNA的PAM

注: sgRNA: 单链引导RNA(single-stranded guide RNA); crRNA: CRISPR RNA; tracrRNA: trans-acting CRISPR RNA; REC: 识别瓣叶(recognition lobe); NUC: 核酸酶瓣叶(nuclease lobe); PAM: protospacer adjacent motif; PI: PAM相互作用区(PAM-interacting domain); WED: 楔形域(wedge domain)



注: REC: 识别瓣叶(recognition lobe); tracrRNA: trans-acting CRISPR RNA; sgRNA: 单链引导RNA(single-stranded guide RNA); NUC: 核酸酶瓣叶(nuclease lobe); PAM: protospacer adjacent motif; crRNA: CRISPR RNA

图1 Cas9蛋白切割目标DNA示意图

## 2.2 CRISPR/Cas9 切割目标 DNA 的工作模型<sup>[10]</sup>

**及修复机制** 在这个模型中, Cas9 蛋白在未激活时处于自身抑制的状态, 其 HNH 由于与 RuvC 结合而无法显示切割活性<sup>[11]</sup>。只有当 sgRNA 结合上之后才能使其构象发生改变, 在两个瓣叶之间形成可容纳 DNA 的通道<sup>[9]</sup>, 从而使得 Cas9 蛋白展示出 DNA 识别结构<sup>[12]</sup>。随后, Cas9-sgRNA 复合体通过 PI 结构域结合到目标 DNA 的 PAM 基序上, 起始 PAM 附近的 DNA 双链打开, 促进 sgRNA-DNA 异源二聚体形成<sup>[8]</sup>。只有当 sgRNA-DNA 碱基对显著匹配后, DNA 双链才能完全打开, 形成 sgRNA-DNA 异源二聚体。这里应当注意, 异源二聚体的形成并不要求与 gRNA 的 20 个碱基全部配对, 成熟 crRNA 末端含有一段称为“种子区”的序列, 其对目标 DNA 的严格匹配仅限于紧随 PAM 的 7 个核苷酸<sup>[13]</sup>; 而 PAM 远端的区域可以容许少数错配。有研究表明, 10 nt 以上的 gRNA 结合即可启动 HNH 构象改变<sup>[12]</sup>, 虽然效率低于全部匹配的情况<sup>[14]</sup>。最终, Cas9-sgRNA-DNA 三元复合物的形成使 HNH 构象发生改变, HNH 和 RuvC 通过核酸内切酶活性切割目标 DNA 链: HNH 切割与 crRNA 互补配对的模板链, 切割位点位于 PAM 的 5' 端的第 3 个碱基外侧; RuvC 对另一条链进行切割, 切割位点位于 PAM 上游的 3 ~ 8 碱基之间<sup>[15]</sup>。结果造成 DSB, 机体随之启动修复机制。

修复机制包括 NHEJ 及 HDR 两种类型, 见图 2。NHEJ 是一种易错修复, 能够在 DSB 位点造成随机插入或删除, 当发生移码突变或重要结构破坏时可实现基因敲除<sup>[16]</sup>; HDR 则可通过导入 donor DNA 的方法, 以同源重组的方式在 DSB 处生成所需的序列替换, 实现基因定点删除、插入、突变或基因矫正<sup>[17]</sup>。然而, 在细胞内, NHEJ 发生频率远高于 HDR。为提高同源重组介导的精确修复就需要提高 HDR 发生的频率。Lin 等<sup>[18]</sup>发现在同步化的 M 期细胞导入 Cas9-sgRNA 复合体可以将 HDR 的比率从 9% 提高到 33%; Yu 等<sup>[19]</sup>通过大规模小分子筛选发现 L75507 和 brefeldin A 能提高 HDR 比率。此外, 通过添加抑制剂 Scr7<sup>[20]</sup> 阻断 NHEJ 途

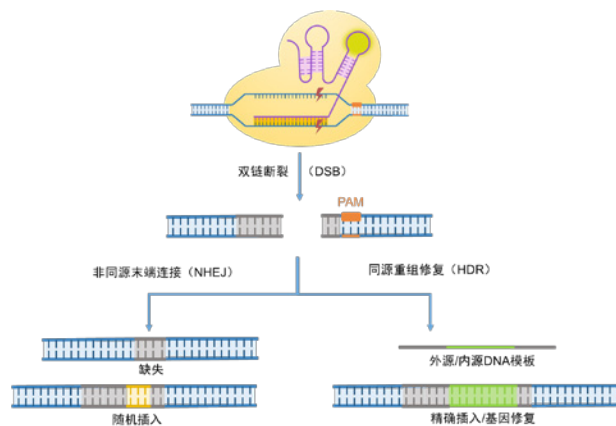


图2 CRISPR/Cas9介导的非同源末端连接 (NHEJ) 与同源重组修复 (HDR)

径中关键的 DNA 连接酶 IV 或敲降编码该酶的基因<sup>[21]</sup>, 也能间接达到提高 HDR 比率的目的。

## 3 CRISPR/Cas9 的研究历程与最新进展

### 3.1 CRISPR/Cas9 研究历程中的重要事件

从 1987 年首次发现 CRISPR 重复序列, 到如今 CRISPR/Cas9 技术获得广泛应用, 仅仅经历了短短的 30 年时间, 其间包含了一个又一个里程碑式的发现, 促成了 CRISPR 技术的广泛应用。其中, Doudna J、Charpentier E 和 华人科学家张锋率先将 CRISPR 从细菌免疫防御系统开发为实用的基因编辑工具<sup>[3-4]</sup>, 奠定了 CRISPR 技术在基因编辑领域的重要地位。研究历程的重要事件见表 2。

### 3.2 CRISPR/Cas9 研究的最新进展

CRISPR/Cas9 技术的问世, 极大地推动了生物学研究进程。其不仅在基因编辑领域展现出无与伦比的优势与应用价值, 同时也可通过改造应用于基因调控、表观修饰、基因成像等方面。接下来对近年来这些方面取得的进展进行汇总。

**3.2.1 CRISPR/Cas9 与基因编辑** 近来发现 CRISPR II 型系统的另一核酸内切酶 Cpf1 蛋白能够不依赖于 tracrRNA, 只通过 crRNA 对目标 DNA 进行切割, 且其切割效率及特异性均类似于 Cas9 蛋白<sup>[33-35]</sup>。同样来源于 CRISPR II 型系统的 C2c2 蛋白则包含两个高等真核生物和原核生物与 RNA 酶相关的核苷酸结合域, 可以靶向 RNA 切割, 删除特定序列, 降低相应蛋白的表达水平<sup>[36-37]</sup>。这些发



表2 CRISPR/Cas9研究历程中的重要事件

研究者	发表时间	重要事件
Ishino等 <sup>[22]</sup>	1987年	在大肠杆菌中首次发现CRISPR重复序列
Mojica等 <sup>[23]</sup>	2000年	发现CRISPR家族普遍存在于原核生物
Jansen等 <sup>[24]</sup>	2002年	科学家正式为CRISPR命名,以反映该类结构的重复特点
Mojica等 <sup>[25]</sup> Pourcel等 <sup>[26]</sup> Bolotin等 <sup>[27]</sup>	2005年	发现非重复间隔序列来源于感染的噬菌体,据此提出适应性免疫的假说;定义了PAM序列
Barrangou等 <sup>[28]</sup>	2007年	首次通过实验证实了CRISPR介导的适应性免疫功能
Marraffini和 Sontheimer <sup>[29]</sup>	2008年	发现CRISPR也能阻止外源质粒转移,以及Cas蛋白的靶点是DNA
Garneau等 <sup>[5]</sup>	2010年	非重复间隔序列可引导Cas9蛋白切割目标DNA,造成DSB
Deltcheva等 <sup>[7]</sup>	2011年	揭示了crRNA可与tracrRNA形成二聚体,介导Cas9靶向DNA; Cas9切割依赖于HNH和RuvC两个核酸酶结构域
Jinek等 <sup>[4]</sup> Gasiunas等 <sup>[30]</sup>	2012年	体外描述Cas9靶向切割DNA; 将crRNA与tracrRNA融合为sgRNA,推动了CRISPR技术的发展
Cong等 <sup>[3]</sup>	2013年	哺乳动物细胞中首次进行Cas9基因编辑
Jinek等 <sup>[11]</sup> Nishimasu等 <sup>[31]</sup>	2014年	揭示了apo-Cas9、Cas9-gRNA-DNA复合体的晶体结构; CRISPR/Cas9系统应用于多个物种
文献 [32-78]	2014年至 2016年	CRISPR/Cas9系统广泛应用于包括基因编辑在内的多个领域
Suzuki等 <sup>[32]</sup>	2016年	首次实现将DNA插入非分裂细胞中; 开展临床试验

现都有助于拓展 CRISPR 系统在基因编辑领域的应用范围。

通过针对一系列基因,设计数以千计的 sgRNA,可以构建基因筛选文库,方便快捷地进行系统性筛选,如对抗癌药物<sup>[38]</sup>、非编码元件<sup>[39]</sup>、增强子<sup>[40]</sup>、基因表型<sup>[41]</sup>等的筛选。有研究表明,在基因筛选方面,CRISPR 敲除系统比 shRNA 和 CRISPR 干扰(CRISPR-interference, CRISPRi)系统更具优势<sup>[42]</sup>。特别地,近年发展出一种称为 CRISPR EATING (everything available turned into new guides) 的 sgRNA 文库构建方法,能够廉价产生靶向全基因组的大量 sgRNA<sup>[43]</sup>。利用新发展出的一种称为 GESTALT (genome editing of synthetic target arrays for lineage tracing) 的方法<sup>[44]</sup>,CRISPR/Cas9 技术也可用于谱系示踪。该方法在一系列 DNA 条码(DNA barcodes)内通过 CRISPR/Cas9 基因编辑产生组合多样性的突变,这些突变会在细胞分裂过程中积累,结合深度测序,即可根据编辑后的条码模式推测出细胞之间的谱系关系。Mikuni 等<sup>[45]</sup>利用子宫电穿孔技术将 CRISPR/Cas9 系统导

入到发育期的胎儿脑细胞中,并利用 HDR 整合荧光蛋白用于基因成像,称为 SLENDR (single-cell labeling of endogenous proteins by CRISPR-Cas9-mediated homology-directed repair) 技术。SLENDR 提供了一个脑细胞中对内源蛋白高通量亚细胞定位的平台,分辨率可达到微米到纳米级。最近, Frieda 等<sup>[46]</sup>将单细胞成像与 CRISPR 技术结合,开发出一种称为 MEMOIR (memory by engineered mutagenesis with optical in situ readout) 的技术,也可用于谱系示踪,且可实现原位读出信息,有助于理解动物发育及肿瘤细胞的异常发育。

近来发现,将 nCas9 与胞苷脱氨酶融合后,能够直接将 C 替换成 T (或 G 替换成 A)<sup>[47-48]</sup>,对于点突变造成的遗传疾病的治疗有重要意义。dCas9 虽无切割活性,但可在 sgRNA 介导下精确定位到 DNA 序列上,通过自身或融合其他蛋白质发挥基因调控、表观修饰、基因成像等作用。

2016 年,CRISPR 技术又迎来一次重大突破,首次实现了将 DNA 插入非分裂细胞中<sup>[32]</sup>,为细胞治疗提供了新的可能。研究者采用一种称为同源

非依赖性靶向整合(homology-independent targeted integration, HITI)的技术,可使DNA插入分裂及不分裂的细胞中,并且在大鼠色素性视网膜炎模型中进行了证实。

3.2.2 CRISPR/Cas9与基因调控 在细菌中,dCas9蛋白与DNA序列结合后可将自身作为障碍物,通过阻碍RNA聚合酶转录活性来抑制基因功能<sup>[49]</sup>,称为CRISPRi。2016年,Peters等<sup>[50]</sup>通过该方法对维持细菌生存的重要基因进行筛选,对于高通量基因功能研究、基因网络的理解等具有借鉴意义。真核细胞中,将dCas9蛋白与转录效应蛋白结合,可以行使转录激活或抑制功能<sup>[51]</sup>,也可用于构建基因筛选文库<sup>[52-54]</sup>。使用CRISPRi可以避免某些基因敲除的致死性,并且能够实现可调的、定点的基因抑制,而不是使整个基因功能抑制<sup>[55]</sup>。sgRNA也可被改造为一类支架RNA(scaffold RNAs, scRNAs),可以直接招募转录效应因子而不需要蛋白融合,以行使更复杂的调控功能<sup>[56]</sup>。

3.2.3 CRISPR/Cas9与表观修饰 dCas9蛋白与表观修饰酶融合后可以发挥表观调控的作用。将dCas9与人乙酰转移酶p300的核心催化域(p300core)融合,可以使组蛋白H3K27乙酰化,通过结合近端或远端增强子上调基因表达<sup>[57]</sup>;将dCas9与赖氨酸去甲基化酶1融合,可使增强子失活,减少H3K27的乙酰化水平<sup>[58]</sup>;将dCas9与KRAB抑制子融合,可以高度特异性地诱导H3K9三甲基化(H3K9me3),降低了染色质对增强子和启动子的可及性<sup>[59]</sup>;将dCas9与DNA甲基转移酶DNMT3A融合提高了目标位点的CpG甲基化水平<sup>[60]</sup>。

3.2.4 CRISPR/Cas9与基因成像 利用CRISPR技术精确定位的优势,将dCas9蛋白与荧光蛋白融合后可以成为研究基因组时空变化的有力工具<sup>[61]</sup>。近年发展出一种称为“Cas9介导的荧光原位杂交”技术(Cas9-mediated fluorescence in situ hybridization, CASFISH)<sup>[62]</sup>,将dCas9与荧光原位杂交(fluorescence in situ hybridization, FISH)结合了起来,避免了FISH使用加热和损伤性化学试剂造成的细胞核天然结构扭曲的问题。近来还建立

了一种活细胞超分辨率成像的技术。当前对活细胞超分辨率荧光检测依赖于过表达目的蛋白,容易导致异位亚细胞定位、形成错误蛋白复合体等人为假象,而利用CRISPR/Cas9将荧光素标记到内源性基因后,可检测到相当于内源的表达水平<sup>[63]</sup>。此外,小片段的自补分离荧光蛋白GFP11(green fluorescent protein 11)和sfCherry11(super-folder Cherry 11)可以借助CRISPR技术轻易插入基因位点,通过串联分析可检测到增强的荧光信号<sup>[64]</sup>。

除了对DNA成像外,dCas9蛋白也可实现对活细胞中的内源性RNA进行成像。在该方法中,核定位的dCas9能够转出到细胞质中,跟踪并结合mRNA,展示其分布状态<sup>[65]</sup>。

3.2.5 提高CRISPR/Cas9特异性的策略 脱靶问题是制约CRISPR/Cas9技术广泛应用的重要因素,因此也成为研究的热点之一。在提高CRISPR/Cas9系统的特异性方面,近来已发展出多种策略。①减少Cas9蛋白在细胞内的存留时间,使其只能在有限时间内优先切割目标DNA序列。如向细胞内转导表达瞬时活性的Cas9-sgRNA核糖核蛋白复合物取代质粒系统<sup>[18,66]</sup>。②降低Cas9蛋白的浓度。高浓度的Cas9蛋白更容易切割目标DNA以外的序列,适量降低Cas9蛋白浓度可提高切割特异性<sup>[67]</sup>。③通过外源因素如小分子<sup>[68-69]</sup>、光<sup>[70-72]</sup>等在特定时间诱导激活Cas9。④将Cas9蛋白的1个核酸酶结构域HNH或RuvC突变后,能将其改造为切口酶(ncas9),只能切割DNA的1条链。通过应用1对ncas9,从目标DNA序列的正反两条链分别切割,可以将特异性提高50~1000倍<sup>[73]</sup>。此外,将HNH和RuvC都突变后,可以产生无核酸酶活性的Cas9蛋白(dCas9)<sup>[49]</sup>,其与内切酶Fok I融合后<sup>[74-75]</sup>,借助Fok I只有二聚化才能启动切割活性的特点,可以大大提高特异性。⑤中和Cas9蛋白与DNA骨架的静电相互作用。Cas9蛋白的HNH、RuvC及PI区的正电荷可与DNA非特异结合,起到稳定复合体构象的作用。通过引入3~4个突变<sup>[76-77]</sup>可以减弱这种静电作用,促使Cas9-sgRNA复合体更大程度上依赖碱基互补配对方式

结合 DNA,从而减少脱靶几率。⑥设计短于 20 个碱基的 sgRNA (17 ~ 18 个)可以降低脱靶效率。可能的原因是 20 个碱基的 sgRNA 提供了过多的亲和力,截短后对于错配变得更加敏感<sup>[78]</sup>。

#### 4 CRISPR/Cas9 在疾病治疗中的应用

CRISPR/Cas9 技术凭借其强大的基因定点编辑能力很快便得到广大科研工作者的青睐,在生物医药、生物工程、农业、环境研究等领域展现出前所未有的应用潜力。特别是在疾病治疗方面显示出诱人的前景。下面举例介绍 CRISPR 技术在基因治疗方面的应用。

**4.1 构建动物疾病模型** 动物疾病模型是理解人类疾病发生发展、进行药物筛选和有效治疗的重要工具。CRISPR 技术为构建疾病模型提供了一个强有力的技术支撑。Wang 等<sup>[79]</sup>利用 CRISPR/Cas9 发展出一种快速高效的、在小鼠胚胎干细胞中同时敲除多个基因的方法,也可将 Cas9 mRNA 和 sgRNA 直接注射到受精卵中产生一个或多个基因突变。这种方法使得在受精卵中同时引入报告基因、修饰基因等成为可能,可用于构建多突变的小鼠疾病模型。Weber 等<sup>[80]</sup>通过基于 CRISPR/Cas9 的体细胞多重突变(somatic multiplex mutagenesis)在小鼠中诱导出肝癌和肝内胆管癌,该方法能够高通量地分析癌症基因组并对其进行功能注释。除小鼠外,CRISPR/Cas9 也用于在其他物种中构建转基因模型,如斑马鱼<sup>[81]</sup>、大鼠<sup>[82]</sup>、兔<sup>[83]</sup>、猴<sup>[84]</sup>、绵羊<sup>[85]</sup>、山羊<sup>[86]</sup>、猪<sup>[87]</sup>等。大动物模型,尤其是灵长类,在遗传及生理结构上与人类更加相似,因此对于人类疾病的治疗有着更大的借鉴意义。其中,周琪院士、黄行许教授、季唯智教授、沙家豪教授等对食蟹猴胚胎的基因编辑<sup>[84,88-89]</sup>做出了重要贡献。

**4.2 修复突变基因** CRISPR/Cas9 技术可通过导入外源 DNA 模板,利用生物体内 HDR 机制来修复突变基因,对于单基因甚至多基因突变造成的遗传病显示出治疗效果。并且可作用于受精卵或出生后个体,修复成体及后代的基因突变。Yin 等<sup>[90]</sup>率先利用 CRISPR/Cas9 介导的基因编辑技术成功纠正疾病模型小鼠的 I 型酪氨酸血症。

I 型酪氨酸血症是由于延胡索酰乙酰乙酸盐水解酶(fumarylacetoacetate hydrolase, FAH)缺陷造成肝细胞毒性代谢物质累积及死亡的一种遗传性疾病。Yin 等<sup>[90]</sup>将编码 Cas9 蛋白的载体、sgRNA 及用于 HDR 的 DNA 模板通过尾静脉注射的方式递送到小鼠肝细胞中,纠正了突变的 FAH,降低了肝细胞毒性,使小鼠体重得以恢复。Wu 等<sup>[91]</sup>将 Cas9 mRNA、sgRNA 及用于修复 Crygc 基因突变的外源 DNA 模板转入小鼠受精卵中,修复了 Crygc 基因突变造成的白内障,产生表型正常的后代。2016 年,DeWitt 等<sup>[92]</sup>使用 CRISPR 技术成功修复了镰刀细胞病患者造血干细胞的突变基因,并在小鼠实验中证明这种修复后的干细胞移植后可至少存活 16 周,为这一治疗手段走向临床迈出重要的一步。

癌症一直是困扰医学界的难题。癌症基因组中往往积累了多种遗传或表观遗传方面的改变,这些改变能够激活原癌基因、使肿瘤抑制子失活、产生耐受性等等,诱发癌症且难以治愈。利用 CRISPR/Cas9 技术可以激活突变的肿瘤抑制子。肿瘤抑制子 ASXL1 突变会诱发慢性髓细胞白血病(chronic myeloid leukemia, CML),通过在 CML 细胞系 KBM5 中对 ASXL1 进行修复,显著抑制了细胞生长并促进髓样分化,提高了 CML 小鼠的存活能力<sup>[93]</sup>。此外,免疫疗法是如今癌症治疗领域的突破性成果之一,特别是新发展的 CAR-T 技术,即嵌合抗原受体(chimeric antigen receptor, CAR)修饰的 T 细胞治疗,对多种非实体瘤有显著的治疗效果。然而,目前显示 CAR-T 细胞回输到患者体内后,倾向于进入耗竭状态,伴随程序性死亡受体 1(programmed death 1, PD-1)蛋白的持续表达。利用 CRISPR 技术敲除 PD-1 蛋白的增强子 ChAR 后,降低了 PD-1 的异常表达<sup>[94]</sup>,有望让 CAR-T 治疗更加持久。CARSPR 与 CAR-T 的结合必将推动该疗法的进一步发展。

**4.3 敲除致病基因** CRISPR/Cas9 技术可借助 NHEJ 的修复方式敲除某个基因或基因上的某一片段,从而干扰入侵细菌、病毒的基因组复制,阻止某些蛋白表达,以及直接修复突变的基因等等。



通过靶向病毒基因组, CRISPR/Cas9 技术可用于人类免疫缺陷病毒( human immunodeficiency virus, HIV )等多种病毒的治疗。Hu 等<sup>[95]</sup>利用 CRISPR/Cas9 系统靶向 HIV-1 LTR U3 区域,抑制了神经小胶质细胞、前单核细胞及 T 细胞中 HIV 病毒基因组的表达和复制,且没有造成细胞毒性或脱靶效应,有望成为治疗艾滋病的有效方法。此外,也可通过敲除宿主细胞的 HIV 辅助受体 CCR5 的基因来治疗 HIV<sup>[96]</sup>。CCR5 基因突变的人往往具有抵抗 HIV 入侵的能力。

CRISPR/Cas9 也可通过敲除部分序列直接修复突变的基因。杜兴氏肌肉营养不良症( Duchenne muscular dystrophy, DMD )是由于抗肌萎缩蛋白( dystrophin )发生基因突变,导致肌肉萎缩和破坏,造成患者全身肌肉无力。通过移除突变的转录本可以获得截短但功能正常的抗肌萎缩蛋白。Long 等<sup>[97]</sup>、Nelson 等<sup>[98]</sup>、Tabebordbar 等<sup>[99]</sup>分别利用腺相关病毒载体( adeno-associated virus, AAV )将 CRISPR/Cas9 组分导入到 mdx 小鼠模型中,删除突变的外显子 23,从而恢复 Dmd 读码框,增强了肌肉功能。

**4.4 诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs)与基因治疗** 2006年, Takahashi 和 Yamanaka<sup>[100]</sup>将 OSKM 的 4 个转录因子导入小鼠胚胎成纤维细胞(mouse embryo fibroblasts, MEFs)中,成功将其诱导为 iPSCs。iPSCs 具有类似于胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)的自我更新和多向分化的潜能。iPSCs 的优势体现在可以从体外对基因进行修复,鉴定出基因型正常的克隆,避免脱靶效应;并且理论上几乎可以诱导分化为任何成体细胞。2014 年即首次报道了利用 iPSCs 结合 CRISPR/Cas9 进行基因治疗的探索。 $\beta$  地中海贫血症是由于血红蛋白  $\beta$  基因发生突变,导致血红蛋白减少造成贫血。Xie 等<sup>[101]</sup>将靶向突变位点的 CRISPR/Cas9 载体及用于 HDR 的 DNA 模板导入患者来源的 iPSCs 中,并将修复后的 iPSCs 诱导分化为功能性的红细胞前体,有望用于移植治疗。2016 年, Paquet 等<sup>[102]</sup>建立了一种称

为 CORRECT (consecutive re-guide or re-Cas steps to erase CRISPR/Cas-blocked targets) 的基因组无痕编辑技术,可以精确高效地选择性引入单/双等位基因序列改变,并利用人的 iPSCs 成功构建出淀粉样蛋白前体[ APP (Swe) ]和 presenilin 1 [ PSEN1 (M146V) ]致病突变造成的杂合和纯合显性的早发性阿尔茨海默症模型,推动了人类遗传性疾病的研究。

## 5 展望

近几年来,“魔剪”CRISPR 飞速发展,在基因编辑等领域大展身手,成为全球科学家争先研究的热点之一。通过一系列的探索与改进,CRISPR 的脱靶问题得到有效改善,应用范围也不断拓展,特别是在基因治疗方面展现出广阔的应用前景。根据 *Nature* 杂志最新报道,四川大学华西医院已开启全球首个 CRISPR 技术的人体试验<sup>[103]</sup>。该试验针对非小细胞肺癌,计划从患者体内分离出 T 细胞后,应用 CRISPR 技术将抑制免疫功能的 PD-1 基因在体外进行敲除,之后扩增并回输患者体内,以达到抗肿瘤的效果。除此之外,多家实验室也竞相计划开展临床试验。虽然 CRISPR 技术目前在脱靶率及安全性等方面仍存在一些问题,但随着研究逐步深入,取得的进展越来越多,无论是改造后用于基因超分辨率成像,还是直接对非分裂细胞进行基因编辑,都大大拓展了 CRISPR 的应用范围。其中,基因成像有助于更直观地理解细胞发育中的精确调控,以及疾病的发生发展;而对非分裂体细胞的编辑打破了只能从受精卵起始编辑的局限,使得对疾病原发部位的直接修复成为可能。这些都预示着 CRISPR 系统在临床治疗方面必将扮演更加重要的角色。

## 参考文献

- [ 1 ] Kim YG, 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.
- [ 2 ] Miller JC, Tan S, Qiao G, et al. A TALE nuclease architecture for efficient genome editing [ J ]. Nat Biotechnol, 2011, 29(2): 143-148.
- [ 3 ] Cong L, Ran FA, Cox D, et al. Multiplex genome engineering

- using CRISPR/Cas systems [ J ]. *Science*, 2013, 339(6121): 819-823.
- [ 4 ] 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.
- [ 5 ] Garneau JE, Dupuis MÈ, Villion M, et al. The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA [ J ]. *Nature*, 2010, 468(7320): 67-71.
- [ 6 ] Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes [ J ]. *Science*, 2007, 315(5819): 1709-1712.
- [ 7 ] Deltcheva E, Chylinski K, Sharma CM, et al. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III [ J ]. *Nature*, 2011, 471(7340): 602-607.
- [ 8 ] Anders C, Niewoehner O, Duerst A, et al. Structural basis of PAM-dependent target DNA recognition by the Cas9 endonuclease [ J ]. *Nature*, 2014, 513(7519): 569-573.
- [ 9 ] Nishimasu H, Cong L, Yan WX, et al. Crystal structure of staphylococcus aureus Cas9 [ J ]. *Cell*, 2015, 162(5): 1113-1126.
- [ 10 ] Wang H, La Russa M, Qi LS. CRISPR/Cas9 in genome editing and beyond [ J ]. *Annu Rev Biochem*, 2016, 85: 227-264.
- [ 11 ] Jinek M, Jiang F, Taylor DW, et al. Structures of Cas9 endonucleases reveal RNA-mediated conformational activation [ J ]. *Science*, 2014, 343(6176): 1247997.
- [ 12 ] Jiang F, Zhou K, Ma L, et al. A Cas9-guide RNA complex preorganized for target DNA recognition [ J ]. *Science*, 2015, 348(6242): 1477-1481.
- [ 13 ] Semenova E, Jore MM, Datsenko KA, et al. Interference by clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR) RNA is governed by a seed sequence [ J ]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108(25): 10098-10103.
- [ 14 ] Sternberg SH, LaFrance B, Kaplan M, et al. Conformational control of DNA target cleavage by CRISPR-Cas9 [ J ]. *Nature*, 2015, 527(7576): 110-113.
- [ 15 ] Friedland AE, Tzur YB, Esvelt KM, et al. Heritable genome editing in *C. elegans* via a CRISPR-Cas9 system [ J ]. *Nat Methods*, 2013, 10(8): 741-743.
- [ 16 ] Lieber MR. The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway [ J ]. *Annu Rev Biochem*, 2010, 79: 181-211.
- [ 17 ] Rudin N, Sugarman E, Haber JE. Genetic and physical analysis of double-strand break repair and recombination in *Saccharomyces cerevisiae* [ J ]. *Genetics*, 1989, 122(3): 519-534.
- [ 18 ] Lin S, Staahl BT, Alla RK, et al. Enhanced homology-directed human genome engineering by controlled timing of CRISPR/Cas9 delivery [ J ]. *Elife*, 2014, 3: e04766.
- [ 19 ] Yu C, Liu Y, Ma T, et al. Small molecules enhance CRISPR genome editing in pluripotent stem cells [ J ]. *Cell Stem Cell*, 2015, 16(2): 142-147.
- [ 20 ] Maruyama T, Dougan SK, Truttmann MC, 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.
- [ 21 ] Chu VT, 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.
- [ 22 ] 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 ]. *J Bacteriol*, 1987, 169(12): 5429-5433.
- [ 23 ] Mojica FJ, Diez-Villasenor C, Soria E, et al. Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria [ J ]. *Mol Microbiol*, 2000, 36(1): 244-246.
- [ 24 ] Jansen R, Embden JD, Gaastra W, et al. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes [ J ]. *Mol Microbiol*, 2002, 43(6): 1565-575.
- [ 25 ] Mojica FJ, Diez-Villasenor C, Garcia-Martinez J, et al. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements [ J ]. *J Mol Evol*, 2005, 60(2): 174-182.
- [ 26 ] Pourcel C, Salvignol G, Vergnaud G. CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies [ J ]. *Microbiology*, 2005, 151(Pt 3): 653-663.
- [ 27 ] Bolotin A, Quinquis B, Sorokin A, et al. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin [ J ]. *Microbiology*, 2005, 151(Pt 8): 2551-2561.
- [ 28 ] Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes [ J ]. *Science*, 2007, 315(5819): 1709-1712.
- [ 29 ] Marraffini LA, Sontheimer EJ. CRISPR interference limits horizontal gene transfer in staphylococci by targeting DNA [ J ]. *Science*, 2008, 322(5909): 1843-1845.
- [ 30 ] Gasiunas G, Barrangou R, Horvath P, et al. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria [ J ]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012, 109(39): E2579-2586.
- [ 31 ] Nishimasu H, Ran FA, Hsu PD, et al. Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA [ J ]. *Cell*, 2014, 156(5): 935-949.
- [ 32 ] Suzuki K, Tsunekawa Y, Hernandez-Benitez R, et al. In vivo genome editing via CRISPR/Cas9 mediated homology-independent targeted integration [ J ]. *Nature*, 2016, 540(7631):144-149.
- [ 33 ] Zetsche B, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, et al. Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system [ J ]. *Cell*, 2015, 163(3): 759-771.
- [ 34 ] Dong D, Ren K, Qiu X, et al. The crystal structure of Cpf1 in complex with CRISPR RNA [ J ]. *Nature*, 2016, 532(7600): 522-526.
- [ 35 ] Fonfara I, Richter H, Bratovič M, et al. The CRISPR-associated DNA-cleaving enzyme Cpf1 also processes precursor CRISPR RNA [ J ]. *Nature*, 2016, 532(7600): 517-521.
- [ 36 ] Abudayyeh OO, Gootenberg JS, Konermann S, et al. C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector [ J ]. *Science*, 2016, 353(6299): aaf5573.



- [ 37 ] East-Seletsky A, O'Connell MR, Knight SC, et al. Two distinct RNase activities of CRISPR-C2c2 enable guide-RNA processing and RNA detection [ J ]. *Nature*, 2016, 538(7624): 270-273.
- [ 38 ] Shi J, Wang E, Milazzo JP, et al. Discovery of cancer drug targets by CRISPR-Cas9 screening of protein domains [ J ]. *Nat Biotechnol*, 2015, 33(6): 661-667.
- [ 39 ] Sanjana NE, Wright J, Zheng K, et al. High-resolution interrogation of functional elements in the noncoding genome [ J ]. *Science*, 2016, 353(6307): 1545-1549.
- [ 40 ] Korkmaz G, Lopes R, Ugalde AP, et al. Functional genetic screens for enhancer elements in the human genome using CRISPR-Cas9 [ J ]. *Nat Biotechnol*, 2016, 34(2): 192-198.
- [ 41 ] 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.
- [ 42 ] Evers B, Jastrzebski K, Heijmans JP, et al. CRISPR knockout screening outperforms shRNA and CRISPRi in identifying essential genes [ J ]. *Nat Biotechnol*, 2016, 34(6): 631-633.
- [ 43 ] Lane AB, Strzelecka M, Ettinger A, et al. Enzymatically generated CRISPR libraries for genome labeling and screening [ J ]. *Dev Cell*, 2015, 34(3): 373-378.
- [ 44 ] McKenna A, Findlay GM, Gagnon JA, et al. Whole-organism lineage tracing by combinatorial and cumulative genome editing [ J ]. *Science*, 2016, 353(6298): aaf7907.
- [ 45 ] Mikuni T, Nishiyama J, Sun Y, et al. High-throughput, high-resolution mapping of protein localization in mammalian brain by in vivo genome editing [ J ]. *Cell*, 2016, 165(7): 1803-1817.
- [ 46 ] Frieda KL, Linton JM, Hormoz S, et al. Synthetic recording and in situ readout of lineage information in single cells [ J ]. *Nature*, 2017, 541(7635): 107-111.
- [ 47 ] Komor AC, Kim YB, Packer MS, et al. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage [ J ]. *Nature*, 2016, 533(7603): 420-424.
- [ 48 ] Nishida K, Arazoe T, Yachie N, et al. Targeted nucleotide editing using hybrid prokaryotic and vertebrate adaptive immune systems [ J ]. *Science*, 2016, 353(6305) : aaf8729.
- [ 49 ] Qi LS, Larson MH, Gilbert LA, et al. Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression [ J ]. *Cell*, 2013, 152(5): 1173-1183.
- [ 50 ] Peters JM, Colavin A, Shi H, et al. A comprehensive, CRISPR-based functional analysis of essential genes in bacteria [ J ]. *Cell*, 2016, 165(6): 1493-1506.
- [ 51 ] Gilbert LA, Larson MH, Morsut L, et al. CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes [ J ]. *Cell*, 2013, 154(2): 442-451.
- [ 52 ] Gilbert LA, Horlbeck MA, Adamson B, et al. Genome-scale CRISPR-mediated control of gene repression and activation [ J ]. *Cell*, 2014, 159(3): 647-661.
- [ 53 ] Konermann S, Brigham MD, Trevino AE, et al. Genome-scale transcriptional activation by an engineered CRISPR-Cas9 complex [ J ]. *Nature*, 2015, 517(7536): 583-588.
- [ 54 ] Fulco CP, Munschauer M, Anyoha R, et al. Systematic mapping of functional enhancer-promoter connections with CRISPR interference [ J ]. *Science*, 2016, 354(6313): 769-773.
- [ 55 ] Wang F, Qi LS. Applications of CRISPR genome engineering in cell biology [ J ]. *Trends Cell Biol*, 2016, 26(11): 875-888.
- [ 56 ] Zalatan JG, Lee ME, Almeida R, et al. Engineering complex synthetic transcriptional programs with CRISPR RNA scaffolds [ J ]. *Cell*, 2015, 160(1-2): 339-350.
- [ 57 ] Hilton IB, D'Ippolito AM, Vockley CM, et al. Epigenome editing by a CRISPR-Cas9-based acetyltransferase activates genes from promoters and enhancers [ J ]. *Nat Biotechnol*, 2015, 33(5): 510-517.
- [ 58 ] Kearns NA, Pham H, Tabak B, et al. Functional annotation of native enhancers with a Cas9-histone demethylase fusion [ J ]. *Nat Methods*, 2015, 12(5): 401-403.
- [ 59 ] Thakore PI, D'Ippolito AM, Song L, et al. Highly specific epigenome editing by CRISPR-Cas9 repressors for silencing of distal regulatory elements [ J ]. *Nat Methods*, 2015, 12(12): 1143-1149.
- [ 60 ] Vojta A, Dobrinic P, Tadic V, et al. Repurposing the CRISPR-Cas9 system for targeted DNA methylation [ J ]. *Nucleic Acids Res*, 2016, 44(12): 5615-5628.
- [ 61 ] Chen B, Gilbert LA, Cimini BA, et al. Dynamic imaging of genomic loci in living human cells by an optimized CRISPR/Cas system [ J ]. *Cell*, 2013, 155(7): 1479-1491.
- [ 62 ] Deng W, Shi X, Tjian R, et al. CASFISH: CRISPR/Cas9-mediated in situ labeling of genomic loci in fixed cells [ J ]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015, 112(38): 11870-11875.
- [ 63 ] Ratz M, Testa I, Hell SW, et al. CRISPR/Cas9-mediated endogenous protein tagging for RESOLFT super-resolution microscopy of living human cells [ J ]. *Sci Rep*, 2015, 5: 9592.
- [ 64 ] Kamiyama D, Sekine S, Barsi-Rhynne B, et al. Versatile protein tagging in cells with split fluorescent protein [ J ]. *Nat Commun*, 2016, 7: 11046.
- [ 65 ] Nelles DA, Fang MY, O'Connell MR, et al. Programmable RNA tracking in live cells with CRISPR/Cas9 [ J ]. *Cell*, 2016, 165(2): 488-496.
- [ 66 ] Kim S, Kim D, Cho SW, et al. Highly efficient RNA-guided genome editing in human cells via delivery of purified Cas9 ribonucleoproteins [ J ]. *Genome Res*, 2014, 24(6): 1012-1019.
- [ 67 ] Hsu PD, Scott DA, Weinstein JA, et al. DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases [ J ]. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(9): 827-832.
- [ 68 ] Davis KM, Pattanayak V, Thompson DB, et al. Small molecule-triggered Cas9 protein with improved genome-editing specificity [ J ]. *Nat Chem Biol*, 2015, 11(5): 316-318.
- [ 69 ] Dow LE, Fisher J, O'Rourke KP, et al. Inducible in vivo genome editing with CRISPR-Cas9 [ J ]. *Nat Biotechnol*, 2015, 33(4): 390-394.
- [ 70 ] Nihongaki Y, Yamamoto S, Kawano F, et al. CRISPR-Cas9-based photoactivatable transcription system [ J ]. *Chem Biol*, 2015, 22(2): 169-174.
- [ 71 ] Hemphill J, Borchardt EK, Brown K, et al. Optical control of CRISPR/Cas9 gene editing [ J ]. *J Am Chem Soc*, 2015, 137(17): 5642-5645.

- [ 72 ] Jain PK, Ramanan V, Schepers AG, et al. Development of light-activated CRISPR using guide RNAs with photocleavable protectors [ J ]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2016, 55(40): 12440-12444.
- [ 73 ] Ran FA, Hsu PD, Lin CY, et al. Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity [ J ]. *Cell*, 2013, 154(6): 1380-1389.
- [ 74 ] Guilinger JP, Thompson DB, Liu DR. Fusion of catalytically inactive Cas9 to FokI nuclease improves the specificity of genome modification [ J ]. *Nat Biotechnol*, 2014, 32(6): 577-582.
- [ 75 ] Tsai SQ, Wyvekens N, Khayter C, et al. Dimeric CRISPR RNA-guided FokI nucleases for highly specific genome editing [ J ]. *Nat Biotechnol*, 2014, 32(6): 569-576.
- [ 76 ] Slaymaker IM, Gao L, Zetsche B, et al. Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity [ J ]. *Science*, 2016, 351(6268): 84-88.
- [ 77 ] Kleinstiver BP, Pattanayak V, Prew MS, et al. High-fidelity CRISPR-Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects [ J ]. *Nature*, 2016, 529(7587): 490-495.
- [ 78 ] Fu Y, Sander JD, Reyon D, et al. Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs [ J ]. *Nat Biotechnol*, 2014, 32(3): 279-284.
- [ 79 ] Wang H, Yang H, Shivalila CS, 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.
- [ 80 ] Weber J, Öllinger R, Friedrich M, et al. CRISPR/Cas9 somatic multiplex-mutagenesis for high-throughput functional cancer genomics in mice [ J ]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015, 112(45): 13982-13987.
- [ 81 ] 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.
- [ 82 ] 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.
- [ 83 ] Yan Q, Zhang Q, Yang H, et al. Generation of multi-gene knockout rabbits using the Cas9/gRNA system [ J ]. *Cell Regen (Lond)*, 2014, 3(1): 12.
- [ 84 ] Niu Y, Shen B, Cui Y, et al. Generation of gene-modified cynomolgus monkey via Cas9/RNA-mediated gene targeting in one-cell embryos [ J ]. *Cell*, 2014, 156(4): 836-843.
- [ 85 ] Crispo M, Mulet AP, Tesson L, et al. Efficient generation of myostatin knock-out sheep using CRISPR/Cas9 technology and microinjection into zygotes [ J ]. *PLoS One*, 2015, 10(8): e0136690.
- [ 86 ] Wang X, Yu H, Lei A, et al. Generation of gene-modified goats targeting MSTN and FGF5 via zygote injection of CRISPR/Cas9 system [ J ]. *Sci Rep*, 2015, 5: 13878.
- [ 87 ] Wang K, Ouyang H, Xie Z, et al. Efficient generation of myostatin mutations in pigs using the CRISPR/Cas9 system [ J ]. *Sci Rep*, 2015, 5: 16623.
- [ 88 ] Wan H, Feng C, Teng F, et al. One-step generation of p53 gene biallelic mutant Cynomolgus monkey via the CRISPR/Cas system [ J ]. *Cell Res*, 2015, 25(2): 258-261.
- [ 89 ] Kang Y, Zheng B, Shen B, et al. CRISPR/Cas9-mediated Dax1 knockout in the monkey recapitulates human AHC-HH [ J ]. *Hum Mol Genet*, 2015, 24(25): 7255-7264.
- [ 90 ] Yin H, Xue W, Chen S, et al. Genome editing with Cas9 in adult mice corrects a disease mutation and phenotype [ J ]. *Nat Biotechnol*, 2014, 32(6): 551-553.
- [ 91 ] Wu Y, Liang D, Wang Y, et al. Correction of a genetic disease in mouse via use of CRISPR-Cas9 [ J ]. *Cell Stem Cell*, 2013, 13(6): 659-662.
- [ 92 ] DeWitt MA, Magis W, Bray NL, et al. Selection-free genome editing of the sickle mutation in human adult hematopoietic stem/progenitor cells [ J ]. *Sci Transl Med*, 2016, 8(360): 360ra134.
- [ 93 ] Valletta S, Dolatshad H, Bartenstein M, et al. ASXL1 mutation correction by CRISPR/Cas9 restores gene function in leukemia cells and increases survival in mouse xenografts [ J ]. *Oncotarget*, 2015, 6(42): 44061-44071.
- [ 94 ] Sen DR, Kaminski J, Barnitz RA, et al. The epigenetic landscape of T cell exhaustion [ J ]. *Science*, 2016, 354(6316): 1165-1169.
- [ 95 ] Hu W, Kaminski R, Yang F, et al. RNA-directed gene editing specifically eradicates latent and prevents new HIV-1 infection [ J ]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, 111(31): 11461-11466.
- [ 96 ] Mandal PK, Ferreira LM, Collins R, et al. Efficient ablation of genes in human hematopoietic stem and effector cells using CRISPR/Cas9 [ J ]. *Cell Stem Cell*, 2014, 15(5): 643-652.
- [ 97 ] Long C, Amoasii L, Mireault AA, et al. Postnatal genome editing partially restores dystrophin expression in a mouse model of muscular dystrophy [ J ]. *Science*, 2016, 351(6271): 400-403.
- [ 98 ] Nelson CE, Hakim CH, Ousterout DG, et al. In vivo genome editing improves muscle function in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy [ J ]. *Science*, 2016, 351(6271): 403-407.
- [ 99 ] Tabebordbar M, Zhu K, Cheng JK, et al. In vivo gene editing in dystrophic mouse muscle and muscle stem cells [ J ]. *Science*, 2016, 351(6271): 407-411.
- [ 100 ] Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors [ J ]. *Cell*, 2006, 126(4): 663-676.
- [ 101 ] Xie F, Ye L, Chang JC, et al. Seamless gene correction of  $\beta$ -thalassemia mutations in patient-specific iPSCs using CRISPR/Cas9 and piggyBac [ J ]. *Genome Res*, 2014, 24(9): 1526-1533.
- [ 102 ] Paquet D, Kwart D, Chen A, et al. Efficient introduction of specific homozygous and heterozygous mutations using CRISPR/Cas9 [ J ]. *Nature*, 2016, 533(7601): 125-129.
- [ 103 ] Cyranoski D. CRISPR gene-editing tested in a person for the first time [ J ]. *Nature*, 2016, 539(7630): 479.

(收稿日期: 2016-12-01)

(本文编辑: 李醒)