

CRISPR/Cas9 技术

刘佳盼 17307130113

CRISPR/Cas 系统是目前发现存在于大多数细菌与所有的古菌中的一种获得性免疫系统，与哺乳动物的二次免疫应答类似，其以消灭外来的质体或者噬菌体并在自身基因组中留下外来基因片段作为“记忆”，来抵抗该种外源遗传物质的再次入侵。CRISPR/Cas 系统全名为常间回文重复序列丛集/常间回文重复序列丛集关联蛋白系统(clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated proteins)。目前已发现三种不同类型的 CRISPR/Cas 系统，存在于大约 40% 和 90% 已测序的细菌和古菌中。其中第二型的组成较为简单，以 Cas9 蛋白以及向导 RNA(gRNA)为核心的组成部分。由于其对 DNA 干扰(DNAi)的特性，目前被积极地应用于遗传工程中，作为基因体剪辑工具，与锌指核酸酶(ZFN)和类转录活化因子核酸酶(TALEN)同样利用非同源性末端接合(NHEJ)的机制，于基因体中产生去氧核糖核酸的双股断裂以利于剪辑。二型 CRISPR/Cas 并经由遗传工程的改造应用于哺乳类细胞及斑马鱼的基因体剪辑。其设计简单以及操作容易的特性为最大的优点，未来将可应用在各种不同的模式生物当中。

1. CRISPR/Cas9 技术原理与基因修饰

1.1 CRISPR/Cas9 技术原理



图 1: CRISPR/Cas9 序列

CRISPR/Cas9 技术的灵感来源于细菌的基因组上的 CRISPR/Cas 系统，该基因组片段存在着串联间隔排列的“重复序列”，这些重复序列相对保守，称之为 CRISPR 序列。如图 1 所示，菱形表示高度可变的“间隔序列”，正方形表示相对保守的重复序列。在病毒或外源质粒上，存在“原间隔序列”，“间隔序列”正是与它们互相对应。“原间隔序列”的选取并不是随机的，这些“原间隔序列”的两端向外延伸的几个碱基往往都很保守，称之为 PAM (Protospacer adjacent motifs, 原间隔序列临近基序)。当病毒或外源质粒 DNA 首次入侵到细菌体内时，细菌会对外源 DNA 潜在的 PAM 序列进行扫描识别，将临近 PAM 的序列作为候选的“原间隔序列”，将其整合到细菌基因组上 CRISPR 序列中的两个“重复序列”之间。这就是“间隔序列”产生的过程。当外源质粒或病毒再次入侵宿主菌时，会诱导 CRISPR 序列的表达。同时，在 CRISPR 序列附近还有一组保守的蛋白编码基因，称之为 Cas 基因。CRISPR 序列的转录产物 CRISPR RNA 和 Cas 基因的表达产物等一起合作，通过对 PAM 序列的识别，以及“间隔序列”与外源 DNA 的碱基互补配对，来找到外源 DNA 上的靶序列，并对其切割，降解外源 DNA。这也就实现了对病毒或外源质粒再次入侵的免疫应答，如图 2 所示。

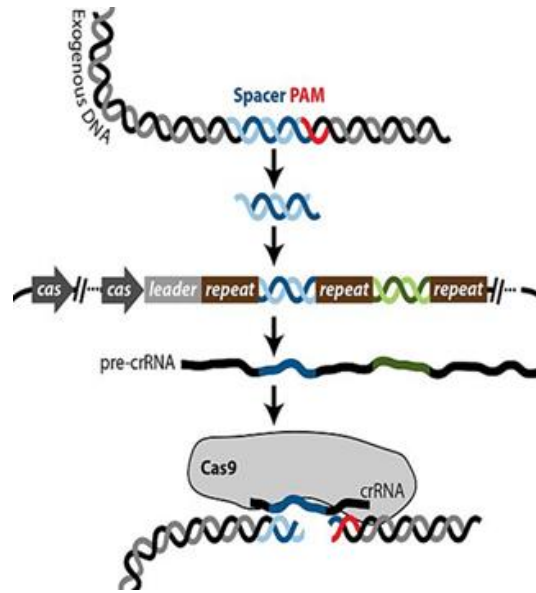


图 2: CRISPR/Cas 免疫过程

1.2 CRISPR/Cas9 与基因修饰

正是基于细菌的这种后天免疫防御机制，CRISPR/Cas9 技术应运而生，科学家们利用 RNA 引导 Cas9 核酸酶对多种细胞基因组的特定位点进行修饰。在 CRISPR/Cas9 技术中，把即将被编辑的细胞基因组 DNA 看作病毒或外源 DNA。基因编辑的实现只需要两个工具——向导 RNA 和 Cas9 蛋白。其中，向导 RNA 的设计并不是随机的，待编辑的区域附近需要存在相对保守的 PAM 序列，而且向导 RNA 要与 PAM 上游的序列碱基互补配对。

以基因敲除为例，在待敲除基因的上下游各设计一条向导 RNA，将其与含有 Cas9 蛋白编码基因的质粒一同转入细胞中，向导 RNA 通过碱基互补配对可以靶向 PAM 附近的目标序列，Cas9 蛋白会使该基因上下游的 DNA 双链断裂。对于 DNA 双链的断裂这一生物事件，生物体自身存在着 DNA 损伤修复的应答机制，会将断裂上下游两端的序列连接起来，从而实现了细胞中目标基因的敲除，如图 3 所示。

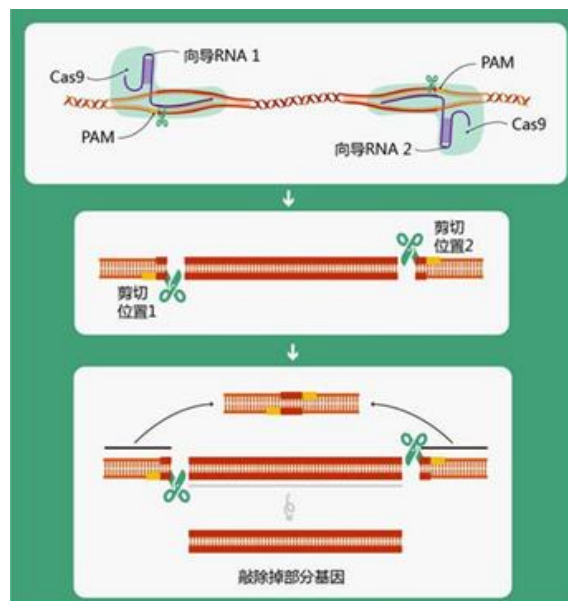


图 3: 基因敲除过程

2. CRISPR/Cas9 技术的运用

2.1 CRISPR/Cas 技术与基因敲除动物模型

基因敲除动物模型一直以来是在活体动物上开展基因功能研究、寻找合适药物作用靶标的重要工具。但是传统的基因敲除方法需要通过复杂的打靶载体构建、ES 细胞筛选和嵌合体小鼠选育等一系列步骤，不仅流程繁琐、对技术的要求很高，而且费用大，耗时较长，成功率受到多方面因素的限制。即使是技术比较成熟的实验室，利用传统技术构建基因敲除大、小鼠一般也需要一年以上时间。

而 CRISPR/Cas 技术运用于 DNA 片断的插入或定点突变的实现，只需在此基础上为细胞提供一个修复的模板质粒，这样细胞就会按照提供的模板在修复过程中引入片段插入或定点突变，对受精卵细胞进行基因编辑，并将其导入代孕母体中，可以实现基因编辑动物模型的构建，如图 4 所示。该技术将重新定义模式动物。

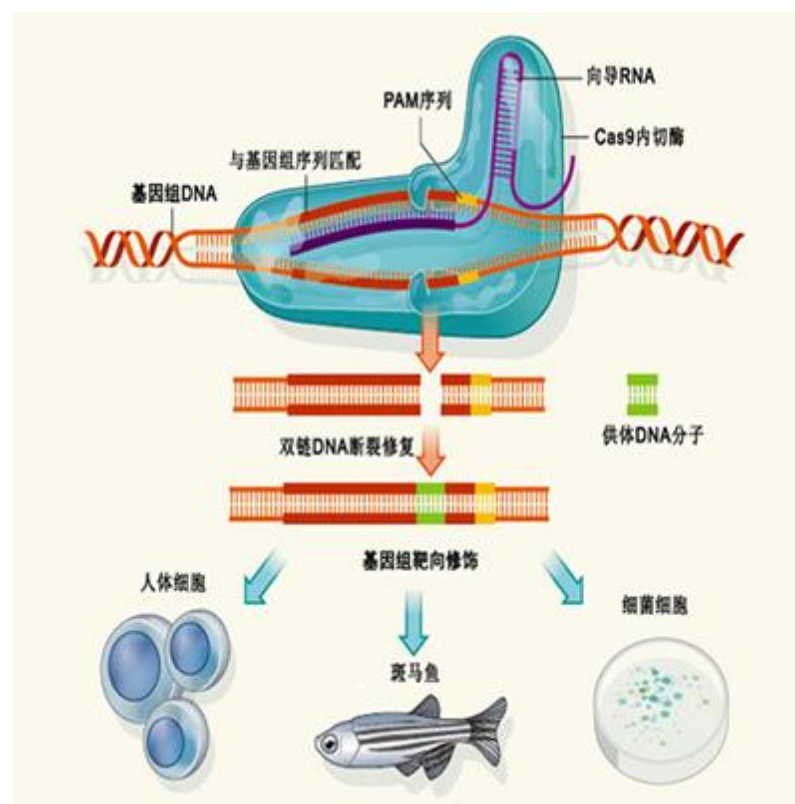


图 4：基因编辑动物模型的构建

2.2 CRISPR/Cas9 技术与生物医学

在医疗健康领域，用 iPS 细胞（诱导多能干细胞）治疗人类的镰刀形贫血症，可以将病人的皮肤细胞诱导成 iPS 细胞，利用 CRISPR/Cas9 技术介导同源重组来修复发生突变的血红蛋白基因，再将修复的 iPS 细胞定向诱导分化为造血干细胞移植到病人体内。此外，像使用 CRISPR 技术根除 HIV 病毒、诱导宫颈癌细胞自我毁灭、构建癌症模型等最新成果先后被 Nature 等著名杂志所报道。在奶制品的发酵中，利用 CRISPR/Cas9 增强发酵菌株对噬菌体的防御能力；在家畜育种方面，也正在利用基因编辑工具改良显著影响家畜生产性能的基因位点，实现猪、牛、羊等大型家畜生产性能的提高等。

3.技术优缺点

3.1CRISPR/Cas9 技术优点

使用方便，构建简单，可以覆盖大多数区域的基因编辑需求，成本低。利用其可以同时多个基因进行打靶的优势，可以逐条甚至批量检测人类或动物基因组中的基因表达和互作情况，以明确基因的功能及调控网络。

3.2CRISPR/Cas9 技术缺点

CRISPR/Cas9 技术面临严重的脱靶性，并且质粒仍然较大，转染难度相对较大。具有碱基识别偏好性，局限了基因编辑的运用范围，而且会导致不同基因位点编辑效率不同。筛选仍然需要较大工作量。