

Development and Prospect of gene editing technology based on Crisper cas9

Lili Qin

Inner Mongolia Medical University, Hohhot, Inner Mongolia, 010050, China

Abstract

Since 2013, a new gene editing technology, clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) / cas9, has attracted great attention and become the hottest gene editing system. Its emergence promotes the development of gene editing technology and shows a broad application prospect. With the continuous emergence of new and improved gene editing technologies based on the CRISPR/Cas system, genes can be easily recombined or single bases can be freely replaced or deleted without cutting DNA. Compared with the CRISPR/Cas system, these improved alternative technologies are more flexible, providing a brand-new program for genetic engineering and therapy, and also providing a powerful technical support for the comprehensive research of genes. At present, the technology has carried out precise gene modification in the genome of embryonic stem cells, bacteria, zebrafish and mice. Therefore, it has become a cost-effective and convenient tool for a variety of genome editing purposes, including gene therapy research. We believe that the continuous innovation of gene editing technology based on CRISPR / CAS system will play a more important role in the field of biological research in the future. Therefore, the paper systematically introduces CRISPR/cas9 gene editing technology in order to have a deeper understanding of gene editing technology.

Keywords

CRISPR / cas9; gene editing; clustering

基于 Crisper cas9 基因编辑技术的发展及前景

秦丽丽

内蒙古医科大学, 中国·内蒙古 呼和浩特 010050

摘要

自2013年以来,一种新的基因编辑技术——规律成簇的间隔短回文重复序列(Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats, CRISPR) / cas9,受到人们的高度重视,成为目前最热的基因编辑系统。它的出现推动了基因编辑技术的发展,展现出了令人期待的广阔应用前景。随着基于CRISPR/Cas系统新的、改良的基因编辑技术不断涌现,可以在不切割DNA的前提下,轻易地对基因进行重组或者对单碱基进行自由替换、删除。与CRISPR/Cas系统相比而言,这些改良后的替代技术显得更加灵活,为基因工程和治疗提供了全新的方案,也为基因的全面研究提供了强大的技术支持。目前,该技术已经在胚胎干细胞、细菌、斑马鱼、小鼠的基因组进行了精确的基因修饰。因此,它已经成为各种基因组编辑目的(包括基因治疗研究)的一种成本有效且方便的工具。我们相信,基于CRISPR/Cas系统不断革新的基因编辑技术会在未来的生物研究领域发挥更加重要的作用。在此,论文系统地介绍CRISPR/cas9基因编辑技术,以便对基因编辑技术有更深入地理解。

关键词

CRISPR)/cas9; 基因编辑; 成簇

1 引言

成簇的规则间隔的短回文重复序列(CRISPR)-CRISPR相关蛋白9(Cas9)系统,是自然界中抵抗噬菌体感染和质粒转移的细菌防御机制^[1]。广泛存在于众多原核生物基因中,其中II型为CRISPR/Cas免疫系统依赖Cas9内切酶家族靶向和剪切外源DNA。自2002年首

次被人们所定义以来,CRISPR一直以其奇特的结构与特殊的功能吸引着各国科学家们的共同关注。在建立诸如CRISPR/Cas9的RNA引导工程核酸酶之前,可编程的DNA结合核酸酶如锌指核酸酶(ZNFs)和转录激活因子样效应核酸酶(TALENs)被用于编辑DNA。然而,工程化这种序列特异性DNA结合蛋白是耗时且具有挑战性的,这极大地阻碍了这些技术的广泛使用^[1]。由于设计CRISPR引导的核酸酶的容易性和速度,CRISPR/Cas9

【作者简介】秦丽丽(1994-),女,内蒙古医科大学研究生,专业为呼吸内科,从事慢阻肺研究。

系统快速解决了最常用的脱氧核糖核酸编辑工具，并在包括哺乳动物和灵长类动物在内的各种生物中促进了大量的基因编辑研究。

中国基因测序市场处在成长阶段。未来，在技术进步、政策培育等因素推动下，基因测序工程会给人类健康预防与疾病治疗带来革命性的变化。一方面，基因测序行业拥有巨大的应用前景，包括肿瘤、心脑血管疾病个体化用药、遗传性疾病早期筛查、产前筛查等；另一方面，基因测序在 CTC（即“循环肿瘤细胞”）、ctDNA（即“肿瘤基因组的 DNA 片段”）的应用上还有待突破。这也将是未来精准医疗的发展方向之一，对生命科学研究方向，以及靶向药物的开发，将有直接的推动作用。基因编辑领域也迎来了重大技术突破。2012 年，科学家发现，细菌用以对抗病毒的 CRISPR-Cas9 系统，可以作为简单、灵活的基因组编辑工具。过去的基因修改技术，需要制造大量的人工蛋白，并且只能一个一个地修改基因。而 CRISPR 的优势在于，它是通过对细胞 DNA 进行精确地靶向修饰来发挥作用，能实现批量地修改基因，且编写能力更加高效精准。

2 CRISPR/Cas 系统的结构和功能

CRISPR/Cas 系统的功能根据 Cas 蛋白序列和结构的不同分为三类。i 型和 iii 型 CRISPR/Cas 系统的免疫机制相当复杂，没有应用于基因组工程^[4]。CRISPR/Cas 系统中最简单的是 ii 型，它只需要一个单一的多功能 Cas9 就能干扰入侵的遗传元件^[2]。大量的 Cas9 蛋白只存在于不同的细菌 ii 型 CRISPR 系统中^[5,6]。这些 Cas9 核酸酶的范围从大约 900 到 1600 个氨基酸（AA），分为三个亚类：ii-A 型、ii-B 型和 ii-C 型，基因组工程中最常用的 Cas9 是由化脓性链球菌（Sp）的 ii-A CRISPR 系统改造而来的^[2]。在这种免疫反应过程中，入侵的 DNA 首先被切成小块，并整合到 CRISPR 基因座。然后该基因座被转录为单一的非编码前体 CRISPR RNA（前 crRNA），进一步加工成短段成熟的 crRNA。与第二种非编码 RNA，反式激活 CRISPR RNA（TracrRNA）一起，crRNA 最终与核酸内切酶 Cas9 形成核糖核蛋白复合物，Cas9 识别并切割入侵的 DNA^[3]。为了简化该系统，2012 年，通过将 CRISPR RNA 与 TracrRNA 融合，他们产生了单

个指导 RNA（sgRNA）^[3-5,7]。与大多数已知的 DNA 结合蛋白不同，Cas9 是一种 RNA 引导的核酸酶，其序列特异性主要来自其引导 RNA 和靶 DNA 位点之间的沃森-克里克碱基配对以及 Cas9 和 DNA 的短原空间相邻基序（PAM）之间的直接相互作用^[2]。CRISPR/Cas9 的特异性很大程度上由 PAM 和 gRNAs 5' 端 17-20nt 序列决定^[8]。Cas9 产生的位点特异性 DNA 双链断裂诱导内源性细胞 DNA 修复过程，可用于工程基因组。DSB 通常通过两种途径修复，同源定向修复（HDR，如果同源模板可用）或非同源末端连接（NHEJ）^[9]。NHEJ 是一个容易出错的过程，可以快速连接断裂的末端，但在目标位点产生小的插入和缺失，这通常导致目标基因的功能被破坏或取消。DSB 也可以通过 HDR 修复，它能够重组外源 DNA，并可用于引入转基因或精确的基因组编辑^[3,7]。

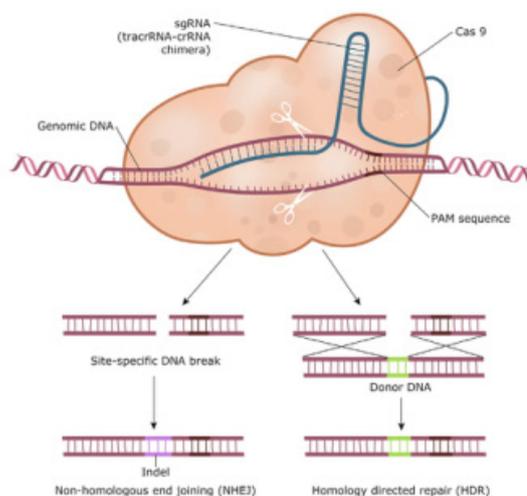


图 1 目标 DNA 是由嵌合单导 RNA（sgRNA）介导的

图 1 是 Cas9 招募到目标 DNA 是由嵌合单导 RNA（sgRNA）介导的。它包含一个识别目标序列的原间隔基序（PAM）。cas9 诱导的 DSBs 可以通过 NHEJ 引起 indel 突变或 HDR 修复，HDR 使用一个合成供体 DNA 模板，从而引入所需的序列变化。

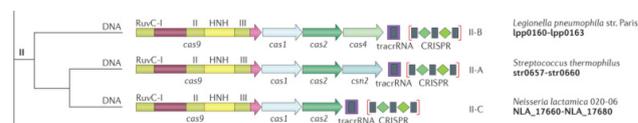


图 2 II 类 CRISPR Cas 系统分类方案

3 CRISPR/Cas9 系统的优点

虽然 Cas9 已经被广泛用作研究工具，但一个特别令

人兴奋的未来方向是 Cas9 作为治疗遗传性疾病的治疗技术的发展。对于由功能缺失突变引起的单基因隐性疾病（如囊性纤维化、镰状细胞性贫血），Cas9 可用于纠正致病突变。与传统的通过病毒载体介导的过表达来传递功能性基因拷贝的基因扩增方法相比有许多优势，特别是新的功能性基因是在其自然环境中表达的。对于等位基因特异性靶向，可以设计能够区分目标基因中单核苷酸多态性（SNP）变异的导向 RNA。例如当 SNP 属于 PAM 序列时^[5]。

以前，基因组功能丧失筛选依赖于 RNA 干扰（RNAi）方法，该方法在 RNA 水平上抑制基因表达，而不影响 DNA 序列。RNAi 可能只会导致部分基因抑制，并具有不可预测的偏离目标的影响。此外，抑制是暂时的，因此限制了其在临床实践中的应用。因此，当针对相同的基因时，CRISPR/Cas9 技术可以产生或宣告基因类型，这可以使相关基因的鉴定更容易。就靶向的局限性而言，CRISPR/Cas9 方法只能靶向作用与 NGG PAM 相邻的序列，并且不是所有外显子都包含这样的可靶向序列。除了修复遗传疾病的突变之外，Cas9 介导的基因组编辑还可以用来在体细胞组织中引入保护性突变，以对抗非遗传或复杂的疾病。虽然这些目标基因也可以通过 siRNA 介导的蛋白质敲除来解决，但 NHEJ 介导的基因失活的一个独特优势是能够获得永久的治疗益处，而不需要继续治疗^[5]。

CRISPR-Cas9 系统最重要的优势之一是它不依赖于蛋白质工程（如 ZFNs、巨核酸酶和 TALE 核酸酶），而是依赖于要识别的 sgRNA 和目标 DNA 之间的沃森-克里克碱基配对。此外，CRISPR-Cas9 易于使用，因为只需合成一小块新的 20nt RNA 片段就可以靶向新的位点，从而避免了基于 ZFN 和 TALEN 的方法中费力耗时的设计和克隆完整蛋白质结构域。

4 CRISPR/Cas9 系统的限制性

CRISPR-Cas9 基因编辑显示明显的脱靶效应以及低效率。CRISPR/Cas9 脱靶效应可能在癌细胞系中更普遍。即使小核糖核酸和目标脱氧核糖核酸之间存在一些错配，也可能发生 DSB，这可能导致与靶基因无关的基因发生改变。CRISPR-Cas9 编辑的低效率是一个限制，特别是对于体内应用，由于基因编辑是序列特异性的，因此对于不同的靶目标和递送方法，效率会有很大差异。CRIS-

PR-Cas9 的一个限制是由 PAM 基序决定的——一位点必须包含 NGG PAM 序列才能进行基因编辑，这些扩展了 CRISPR 作为基因编辑工具的精确性和适用性。

5 CRISPR/Cas9 系统面临的挑战

Cas9 作为基因组编辑工具的快速发展，在从临床治疗到农业生产到携带疾病的昆虫物种的种群控制的应用中具有变革性的潜力。Cas9 技术的快速进步给管理其安全、可靠和符合道德规范的应用的监管带来了挑战。科学家、生物伦理学家、政策制定者和公众对如何以道德和负责任的方式使用基因编辑技术而不妨碍有益的科学发现和有很多争论。这项技术应该用于人类胚胎吗？如果这些问题的答案是肯定的，在哪些情况下适用？除了编辑人类基因组的能力，Cas9 还提供了通过编辑植物和动物基因组来彻底改变生态系统的可能性。通过编辑作物和牲畜的基因组，有可能大大提高粮食产量。基于 cas9 的基因组编辑技术也被认为是控制疾病传播人群的一种可能方法，如传播疟疾的蚊子。这可以通过使用基因驱动技术来实现，这种技术促进了儿童群体中基因突变的快速传播。尽管使用基于 Cas9 的基因驱动有很大的潜力，但关于如何或是否应该使用这项技术仍有很多争论。随着生物发现的快速发展，有必要进行讨论，以确保以安全和负责任的方式使用基因组编辑技术。

6 结论

尽管我们还没有充分利用 CRISPR/Cas9 的潜力，但这项技术已经给基因组研究带来了革命性的变化。展望未来，我们可以预见 CRISPR/Cas9 技术将为基础生物科学研究人员和临床医生带来的进步。基础科学家已经利用 CRISPR/Cas9 技术在操纵生物学方面取得了长足的进步。尽管迄今为止大多数研究都集中在第二类 Cas9 蛋白上，但从其他不同种类的细菌和古细菌中发现更广泛的 CRISPR 系统还有很多有待发现的地方。新的 CRISPR 系统隐藏在我们周围生物的基因组中，未来可能会继续给我们带来惊喜，提供强大的突破性技术。

参考文献

- [1] JIANG F, DOUDNA J A. CRISPR-Cas9 Structures and Mechanisms[J]. Annual review of biophysics, 2017(01): 505-529.

- [2] HRYHOROWICZ M, LIPÍŃSKI D, ZEYLAND J, et al. CRISPR/Cas9 Immune System as a Tool for Genome Engineering[J]. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 2016(03): 233–240.
- [3] HSU P D, LANDER E S, ZHANG F. Development and Applications of CRISPR–Cas9 for Genome Engineering[J]. *Cell*, 2014(06): 1262–1278.
- [4] ZHANG C, QUAN R, WANG J. Development and application of CRISPR/Cas9 technologies in genomic editing[J]. *Human Molecular Genetics*, 2018(R2): 79–88.
- [5] HRYHOROWICZ M, LIPÍŃSKI D, ZEYLAND J, et al. CRISPR/Cas9 Immune System as a Tool for Genome Engineering[J]. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 2016(03): 233–240.
- [6] LIANG P, XU Y, ZHANG X, et al. CRISPR/Cas9–mediated gene editing in human tripronuclear zygotes[J]. *Protein & Cell*, 2015(05): 363–372.
- [7] REDMAN M, KING A, WATSON C, et al. What is CRISPR/Cas9?[J]. *Archives of disease in childhood – Education & practice edition*, 2016(04): 213–215.
- [8] TORRES–RUIZ R, RODRIGUEZ–PERALES S. CRISPR–Cas9 technology: applications and human disease modelling[J]. *Brief Funct Genomics*, 2017(01): 4–12.
- [9] KARLGREN M, SIMOFF I, KEISER M, et al. CRISPR–Cas9: A New Addition to the Drug Metabolism and Disposition Tool Box[J]. *Drug Metab Dispos*, 2018(11): 1776–1786.