



CRISPR/Cas9介导的HDR型基因驱动技术在蚊虫遗传防控中的研究进展

洪俊峰^{1,2,3†}, 杨小林^{1,2,3†}, 向凯^{1,2,3}, 邱品品^{1,2,3}, 刘燕^{1,2,3}, 何正波^{1,2,3}, 闫振天^{1,2,3}, 陈斌^{1,2,3*}, 乔梁^{1,2,3*}

1. 媒介昆虫重庆市重点实验室, 重庆 401331;

2. 重庆师范大学昆虫与分子生物学研究所, 重庆 401331;

3. 重庆师范大学生命科学学院, 重庆 401331

† 共同第一作者

* 联系人, E-mail: qiaoliangswu@163.com; bin.chen@cqnu.edu.cn

收稿日期: 2022-03-28; 接受日期: 2022-08-01; 网络版发表日期: 2022-09-26

国家自然科学基金(批准号: 31772527, 31872262)、重庆市自然科学基金(批准号: CSTC2017JCYJAX0023)、重庆市“巴渝学者”资助计划(批准号: YS2019027)、重庆市教委科技项目(批准号: KJZD-K202200507, KJQN201900523)、家蚕基因组生物学国家重点实验室开放课题(批准号: SKLSGB-ORP202113)和重庆师范大学青年拔尖人才培养计划(重师发[2014]197号)资助

摘要 基因驱动(gene drive)是指特定基因或遗传元件以超孟德尔遗传(super-Mendelian inheritance)的形式由亲代传递给子代的现象. 近年来, 基于基因驱动的遗传特点及其分子机制方面的理论基础, 在CRISPR/Cas9基因编辑系统的支持下, 基因驱动型遗传控制技术成为了蚊虫基础生物学与防治领域的前沿研究热点, 并涌现出一些切实有效, 且兼顾生态稳定的重要成果. 本文就基因驱动的基本原理、CRISPR/Cas9介导的HDR型基因驱动技术策略、减少驱动抵抗和潜在风险的改进策略以及基因驱动的模拟分析等几方面的研究进行了综述, 以期高效与安全的驱动型蚊虫遗传防控技术体系的开发提供参考.

关键词 蚊虫, CRISPR/Cas9基因编辑, 基因驱动, 遗传防控, 策略改进, 同源定向修复(HDR)

蚊虫分布范围广, 且生物量大, 而其中致病性的种类能够传播如疟疾、登革热、黄热病等多种烈性传染病, 会对人类健康和社会经济发展带来不利影响, 故须针对传病蚊种的泛滥采取相应的防控措施. 病媒蚊虫的防控须建立在对蚊虫生存和繁衍过程中重要性状特征与生理现象的深入解析之基础上. 目前, 随着多种病媒蚊虫基因组图谱的测定^[1], 参与传病蚊种生存或繁

衍等生理过程中的若干重要基因已被挖掘, 并进行了详细的功能解析^[2]. 立足于蚊虫功能基因研究的丰硕成果, 研究人员可通过分子遗传操作手段来修改其基因组, 以培育携带缺陷基因或获得特定抗病基因的遗传改造型蚊虫. 这类蚊虫如被引入自然群体, 则可通过影响种群数量或个体的病原携带能力来减弱疾病的传播^[3]. 例如: 通过释放大量不育雄蚊或携带显性致死

引用格式: 洪俊峰, 杨小林, 向凯, 等. CRISPR/Cas9介导的HDR型基因驱动技术在蚊虫遗传防控中的研究进展. 中国科学: 生命科学, 2022, 52: 1522–1532
Hong J F, Yang X L, Xiang K, et al. Research progress of CRISPR/Cas9-mediated and HDR-type gene drive technology in mosquito genetic control (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2022, 52: 1522–1532, doi: 10.1360/SSV-2022-0053

基因的蚊虫个体来抑制种群^[4,5]; 或者通过释放能表达恶性疟原虫抗体的转基因蚊虫个体来抑制蚊虫传疟能力^[6]. 现今, 尽管蚊虫的遗传防控研究已受到广泛的关注, 但大多数技术策略背后的遗传规律仍遵循孟德尔分离和自由组合定律, 这使得被改造(破坏或导入)的遗传元件并不具备主动传播的能力, 而不易抵抗随机漂变或高选择系数, 并最终可能在较短世代内丢失或被淘汰, 进而难以高效地控制蚊虫数量及疾病传播^[7].

最近, 基因驱动(gene drive)这种超孟德尔式遗传(super-Mendelian inheritance)方式因其可使特定遗传元件快速地以高频率(可达95%以上)^[8]稳定于群体的特点而被蚊虫防治领域所高度关注. 在分子操作层面, 藉由CRISPR/Cas9基因编辑系统切割后的同源定向修复(homology-directed repair, HDR), 驱动型遗传元件可在短世代内(一般为15个世代以内)^[9]极为迅速地在蚊虫群体中散播, 直至固定. 目前, 在冈比亚按蚊(*Anopheles gambiae*)等多种蚊虫中已报道了数个通过基因驱动来修饰群体遗传结构的顶尖研究成果^[8,10,11]. 这表明CRISPR/Cas9介导的HDR型基因驱动系统的可操作性及其在蚊虫遗传防治中强大的应用潜力. 综合当前的代表性研究进展, 本文就基因驱动的基本原理、CRISPR/Cas9介导的HDR型基因驱动技术策略、减少驱动抵抗和潜在风险的改进策略, 以及基因驱动的模拟分析等几方面进行了全面的综述, 以飨对该领域感兴趣的研究人员, 并以期为兼顾高效率与安全性的驱动型蚊虫遗传防控技术体系的研发提供参考.

1 基因驱动原理

以二倍体生物的有性生殖为例, 在经典的孟德尔遗传模式下, 双亲的等位基因传递给后代的概率均为50%. 而基因驱动则可使特定的遗传元件偏向性地遗传至后代中. 在此模式下, 遗传元件经由亲本传递给子代的概率就会大大增加, 从而显著提升它们在种群中的频率^[12,13].

在原理层面上, 基因驱动的实现主要可分为两类. 一类涉及自然选择, 即通过使携带特定遗传元件个体的适合度增加, 或使不携带特定遗传元件个体的适合度降低, 来达到偏向性遗传(图1A). 例如, 在赤拟谷盗(*Tribolium castaneum*)中, 子代若不继承名为母体效应显性胚胎发育停滞因子的遗传元件(maternal-effect

dominant embryonic arrest, Medea), 则导致其会在胚胎期死亡^[14]; 以及在发生染色体易位的黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*)中, 后代杂合子适合度低于纯合子适合度的显性不足效应(underdominance)^[15]等. 这类基于选择的基因驱动现象从遗传模式上看仍为孟德尔遗传(Mendelian inheritance), 故难以使种群中特定遗传元件的频率在短世代内到达高峰值. 此外, 由于受正选择青睐的遗传元件的来源及其在物种间通用性等方面的限制, 并不容易通过分子操作来实现此类基因驱动^[16].

另一类驱动方式涉及特定遗传元件在基因组中的主动插入并整合. 即基因组指定区域在被归巢核酸内切酶(homing endonuclease)或CRISPR/Cas9基因编辑系统切割后, 如果特定供体遗传元件的两端序列与切割位点的两端序列同源, 则其可作为模板, 在HDR修复方式下, 使修复后的基因组“获得”该遗传元件的拷贝^[17,18]. 若此过程发生于生殖系细胞中, 则会令几乎全部的后代都携带特定遗传元件(图1B), 从而使其在短世代内到达高频且固定下来. 另外, 着眼于定向切割基因组靶位点并进行HDR修复的手段, 更容易通过遗传操作技术实现^[19]. 因此, 这类基因驱动形式是当下蚊虫遗传防控领域中研究得最为深入的方向, 也是本综述的主要论述内容.

2 实现HDR型基因驱动的技术策略

相较归巢核酸内切酶只能识别极少数特异序列的局限性^[17], CRISPR/Cas9基因编辑系统理论上则可通过gRNA-Cas9 RNP复合物来靶向任何存在5'-NGG-3'序列特征的PAM(protospacer adjacent motif)位点并切割基因组^[20]. 由于在基因组中可选择位点的丰富性, 这促进了驱动型蚊虫遗传防控技术体系的建立和完善. 这类技术的实际遗传操作主要分为三个部分. 首先, 是驱动表达盒的构建. 一般模式下的驱动表达盒包含Cas9核酸内切酶编码基因序列, 限定Cas9在生殖系细胞中特异(或优势)表达的启动子序列, 报告基因系统, 引导RNA(gRNA)序列, 以及与切割位点上下游区域(约1 kb)同源的两臂序列^[18]. 其次, 是利用胚胎显微注射, 将驱动表达盒和相关的Cas9蛋白、mRNA投递至雌蚊卵中. 经由gRNA-Cas9 RNP复合物的切割和HDR修复, 驱动表达盒将被定点整合到蚊虫基因组中. 随后, 在G₀代杂合驱动型个体的生殖系细胞中, 驱动表

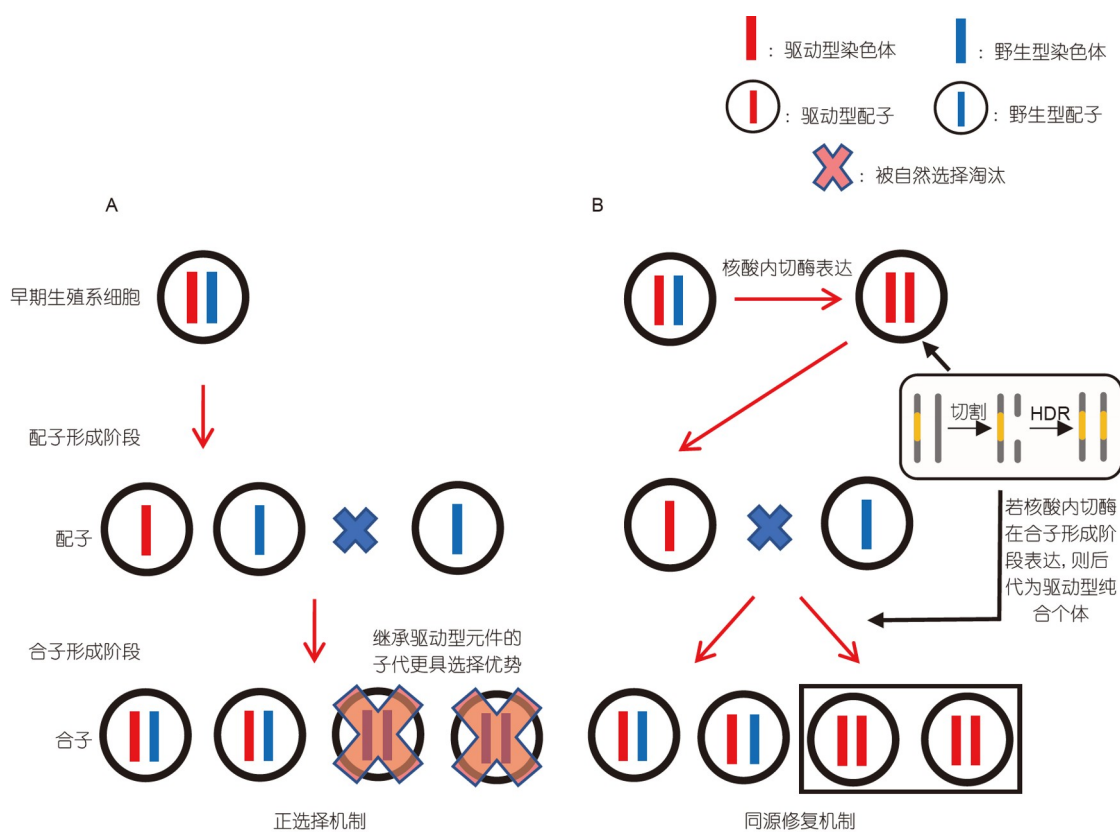


图 1 两种基因驱动机制示意图. A: 在正选择机制下, 杂合亲本产生的配子遵循分离定律(驱动型配子和野生型配子的概率皆为50%). 不继承驱动型染色体的后代易被自然选择淘汰, 从而驱动特定遗传元件. B: 在同源修复机制下, 若核酸内切酶在生殖系细胞中表达, 杂合亲本产生的配子皆为驱动型配子, 后代皆为驱动型杂合或纯合个体

Figure 1 Schematic diagram of two kinds of gene drive mechanism. A: Under the mechanism of positive selection, the gametes produced by heterozygous parents follow the law of segregation (the probability of both driver gametes and wild type gametes is 50%). Offspring that do not inherit driven-type chromosomes are easily eliminated by natural selection, thereby driving specific genetic elements. B: Under the homology-directed repair mechanism, if the endonuclease is expressed in the germline cells, the gametes produced by the heterozygous parents are all driver gametes, and the offspring are all driven heterozygous or homozygous individuals

达盒所表达的gRNA-Cas9 RNP复合物会切割选定的基因组靶位点, 并以自身为模板, 通过胞内的HDR修复将其“复制”到野生型等位点中, 继而使形成的配子都继承驱动表达盒. 所以, 杂合驱动型个体与野生型个体交配后的子代在理论上应全为驱动型杂合或纯合个体(这与gRNA-Cas9 RNP复合物在生殖系细胞中的存在时限相关). 在不产生突变的Wright-Fisher(随机交配)或non-Wright-Fisher(非随机交配)种群遗传模型中, 群体里驱动型子代的比例会于短期世代内大幅提高, 从而显著地增加驱动表达盒在种群中的频率^[21](图2).

利用CRISPR/Cas9介导的HDR型基因驱动技术体系, 研究人员可通过限制蚊虫传病能力或控制蚊虫种群数量来抑制蚊媒疾病的传播. 一方面, 驱动表达盒所包含的外源基因, 可使蚊虫种群获得抗病性状, 从而限

制蚊虫传病能力. 例如, 在斯氏按蚊(*Anopheles stephensi*)中引入的包含抗疟原虫基因的驱动表达盒可在短世代内于群体中迅速扩散并固定, 从而使整个种群获得抗性性状而不会再携带疟原虫^[22]. 另一方面, 当驱动表达盒靶向蚊虫生存或繁衍中的重要基因, 或者生存优势基因时, 会给蚊虫施加一定的适合度代价(fitness cost), 若此适合度代价不超过驱动表达盒本身的超孟德尔遗传优势, 驱动表达盒便能扩散至种群中, 并起到抑制种群的作用^[23]. 例如, 在果蝇中引入的靶向抗杀虫剂基因的驱动表达盒, 能在种群中快速扩散的同时将更具生存优势的抗性群体回复为野生型群体^[24]. 另外, 在基本的驱动技术体系框架下, 若进一步兼顾驱动表达盒的扩散速度与稳定性, 则能够更有效地提高驱动型蚊虫遗传防控策略的效率与安全性.

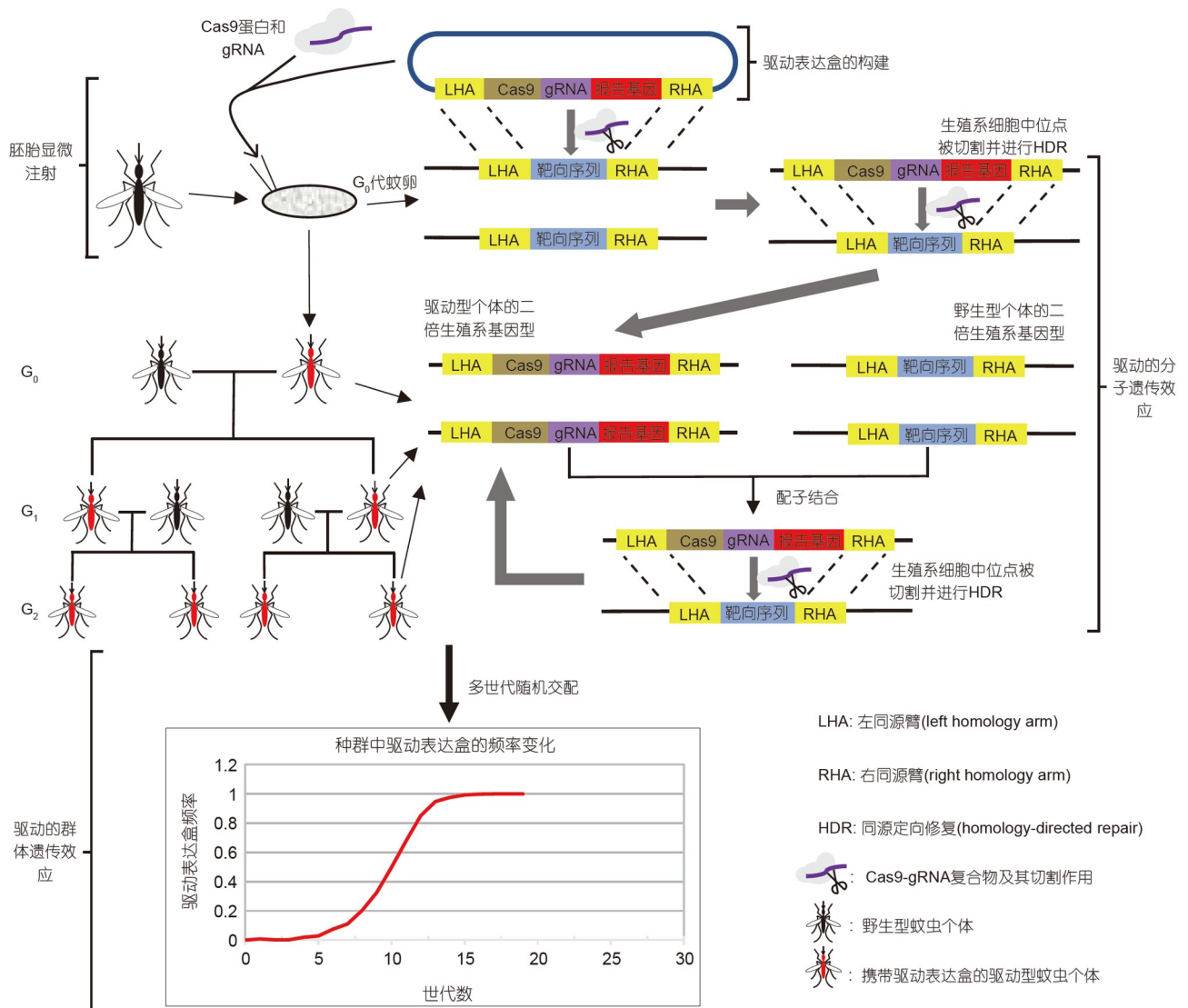


图 2 CRISPR/Cas9介导的HDR型基因驱动技术体系模式图。首先需构建驱动表达盒，典型的驱动表达盒包括同源臂序列、Cas9序列、gRNA序列、报告基因系统等元件；其次是利用胚胎显微注射，将驱动表达盒定点整合到蚊虫基因组中；随后，在生殖系细胞内，表达的gRNA-Cas9 RNP复合物会切割靶向序列，藉由HDR修复机制可使产生的后代皆为携带驱动表达盒的驱动型蚊虫个体；最后，无论是基于Wright-Fisher还是non-Wright-Fisher种群遗传模型，随着世代数的增加，驱动表达盒的频率均会逐渐升高，直至固定

Figure 2 Schematic diagram of CRISPR/Cas9-mediated and HDR-type gene drive technology system. Firstly, a gene-driven expression cassette needs to be constructed, and typical gene-driven expression cassette include homology arm sequence, Cas9 sequence, gRNA sequence, reporter gene system and other elements; secondly, embryo microinjection is used to integrate the gene-driven expression cassette into the mosquito genome; thirdly, the expressed gRNA-Cas9 RNP complex cleaves the targeting sequence in germline cells, and under the HDR mechanism, the offspring will be all driven mosquito individuals carrying the gene-driven expression cassette; finally, whether based on Wright-Fisher or the non-Wright-Fisher population genetic model, with the increase in the number of generations, the frequency of the gene-driven expression cassette will gradually increase until it is fixed

3 影响HDR型基因驱动技术效率的驱动抵抗及其规避策略

3.1 驱动抵抗的产生及其影响

当驱动表达盒不能经由CRISPR/Cas9介导的HDR

型基因驱动系统被定点整合到基因组中时，会导致种群中的驱动表达盒频率无法提高并固定，此种现象被称为驱动抵抗(resistance)^[25]。引起驱动抵抗的原因主要包括3类：第一，切割靶点的多态性或CRISPR/Cas9基因编辑系统本身的脱靶效应所导致的靶位点不被切

割; 第二, gRNA-Cas9 RNP复合物没有在生殖系细胞中表达, 导致靶位点没有在特定时相、组织中被切割; 第三, 靶位点被切割后经由非同源末端连接(non-homologous end-joining, NHEJ)或微同源介导的末端连接(microhomology-mediated end-joining, MMEJ)方式(而非HDR)进行修复, 亦或虽经HDR途径, 但并未完全修复成功, 均使得靶位点区域不仅没有被植入驱动表达盒, 还会因该位点附近随机发生的碱基插入缺失(indels), 进而形成无法再被gRNA-Cas9 RNP复合物靶向切割的抵抗位点^[3,26,27]。由于在细胞中的修复并不能完全依照HDR途径来执行, 这导致抵抗位点会伴随着修复而产生, 故难以避免。这也是造成驱动抵抗的最主要原因。有报道显示, 在按蚊属(*Anopheles*)中, 由于抵抗位点的产生, 引入的驱动表达盒频率在大约6代以后便由高于80%而逐渐降低至20%左右^[28,29]。这说明抵抗位点会严重阻碍驱动表达盒的传播, 甚至当抵抗位点较驱动表达盒有更高的适合度时, 会抑制其在种群中的频率。

3.2 减少驱动抵抗的改进策略

针对gRNA-Cas9 RNP复合物不切割(或不在特定时相、组织中切割)靶点的情况, 可以在驱动表达盒的构建中使用合适的DNA元件, 例如, 选择*nos* (*nanos*)和*zpg* (*zero population growth*)这类在生殖系细胞中高量表达基因的启动子作为Cas9表达的调控序列; 使用切割效率更高的Cas9内切酶编码序列; 以及选择在个体间不存在DNA多态性的基因组区域作为设计gRNA的靶向位点^[30-33]等, 以提高gRNA-Cas9 RNP复合物在生殖系细胞中定向切割靶位点的概率。

针对出现抵抗位点的情况, 一方面可通过在目标基因组区域内设计多个尽可能靶向相邻位点(约100 bp的区间内)的gRNA来改进^[34](网络版附图1A)。因为, 在多个位点被切割的情况下, 只有所有位点都选择末端连接修复时才会产生抵抗位点, 故在理论上可将产生抵抗位点的概率 ρ 降低至 ρ^n (n 为使用gRNA的个数)^[35]。所使用gRNA位点的最佳个数跟驱动系统的特点有关。Champer等人^[34]和Marshall等人^[35]在non-Wright-Fisher种群遗传模型和离散种群遗传模型的推算下得出, 抑制蚊虫种群数量的驱动系统宜使用4~6个gRNA, 抑制的种群越大, 所需使用的gRNA个数越多; 而修饰蚊虫种群遗传结构的驱动系统则宜使用3个gRNA。

另一方面, 也可通过靶向维持蚊虫正常生理活动所必需的基因来减少驱动抵抗。因为, 在多个gRNA靶向必需基因时, 由于每处DNA断裂缺口都有发生错义突变的可能性, 未完成HDR修复而生成的抵抗位点大概率是无基因功能的, 易被自然选择淘汰^[34]。但必需基因位点在经由HDR植入驱动表达盒后也会出现功能缺失, 施加的高适合度代价会使驱动表达盒同样被自然选择淘汰。因此, 研究人员需在淘汰抵抗位点的同时保证植入驱动表达盒后个体的适合度, 其间的平衡关系是影响驱动效率的重要因素。基于此, 抑制种群和修饰种群遗传结构的策略也须进一步调整、完善。在抑制种群时, 可选择性别特异型必需基因作为靶点(网络版附图1B)(例如, 冈比亚按蚊中的*doublesex* (*Agdsex*)基因^[10,36]或雌性生殖基因^[29]), 以将特定缺陷表型限制在某一性别中, 而另一性别不受影响, 从而兼顾驱动表达盒的遗传。在修饰种群遗传结构时, 可在驱动表达盒中连上该必需基因的重编码或同功能序列(网络版附图1C)(例如, 果蝇中的单倍剂量不足(haploinsufficiency)基因*RpL35A*^[37]和单倍充足(haplosufficiency)基因*PolG2*^[38]), 以减少个体基因组整合驱动表达盒所产生的适合度代价, 从而在不影响种群数量的同时修饰其遗传结构。

4 HDR型基因驱动技术的安全问题及其改进策略

4.1 基因驱动的潜在风险

尽管CRISPR/Cas9介导的HDR型基因驱动系统可以高效地散播、固定特定遗传元件, 但实验室中携带驱动表达盒的驱动型个体若被意外释放, 则可能会通过改变野外种群的基因池来破坏其群体稳定性, 从而对当地生物链与生态多样性造成不利影响^[39]。再者, 少数驱动型个体通过迁移可能会将驱动表达盒散播到预期的地理区域之外, 使得驱动效应的影响范围难以控制。这将有悖于研究人员的实验需求或其他地域的政策法规, 甚至会影响其生态安全^[40-42]。因此, 基因驱动技术具有一定的潜在风险, 需针对其安全性问题来采取改进措施。

4.2 驱动安全性的改进策略

针对驱动型个体可能会被意外释放的问题, 首先,

需要在实验室及饲养室内建立有效的物理隔离屏障^[43-45];其次,可以采用只能在特定饲育方式(如喂食四环素及其类似物)下存活的条件致死品系进行室内实验分析^[46];再次,为了减小实验室意外释放所产生的危害,可将驱动元件(*Cas9*表达框与gRNA表达框)分散整合到多个不连锁的基因组位点中.值得一提的是,在这种分散的元件结构下,携带gRNA的改造型个体只有与*Cas9*转基因品系个体交配才能促发驱动效应,因而可有效避免意外释放所导致的驱动型遗传元件的快速散播^[40,47,48].例如,将驱动元件分散到双基因组位点的分离驱动系统(split drive)^[11,37,38,49](网络版附图2A)和将驱动元件分散到三基因组位点的雏菊驱动系统(daisy drive)(网络版附图2B)^[50,51].

针对驱动效应影响范围的可控性问题,前述中所提及的分离驱动系统可将驱动效应限制在一定区域范围内.因为,不同于整个驱动表达盒植入到一个位点的驱动系统,分离驱动系统具有阈值依赖性(threshold-dependent),即需要引入野生种群中*Cas9*表达框的频率和含gRNA的驱动表达盒的频率达到一定阈值(不低于野生种群的20%^[21,38,49],且由于具适合度代价的驱动表达盒易被自然选择淘汰,*Cas9*表达框的引入阈值应随着该适合度代价的升高而增加^[52,53]),才可保证两种遗传改造型个体能够相遇、交配,并产生驱动效应.基于分离驱动系统所创制的改造型蚊虫被释放后,由于*Cas9*表达框不被驱动,在越远离释放中心的区域内,种群中的*Cas9*的基因频率会越低.当此频率低于20%后,该边界以外的区域便不能保证两种表达框相遇的概率,从而将驱动效应限制在一定范围内^[23,54].

此外,分离驱动系统需保证理想驱动范围内*Cas9*的基因频率,以维持该区域内正常的驱动效应.目前除了依赖于*Cas9*品系个体的持续大量释放外^[21],研究人员还可在驱动表达盒的构建中融入Medea原理、显性不足效应等基因驱动的正选择原理,做到在保证分离驱动系统阈值依赖性的同时驱动种群中*Cas9*的基因频率.例如,破坏-拯救驱动系统(killer-rescue drive)通过将*Cas9*表达框和驱动表达盒设计为双基因组位点的显性不足元件(网络版附图2C),使得只有同时继承两种表达框的个体才可存活,在阈值释放下(不低于野生种群的30%)便可使种群中的*Cas9*表达框和驱动表达盒相互驱动^[55].又如,系留归巢驱动系统(tethered homing drive)通过将*Cas9*表达框设计为Medea元件或

单/双基因组位点的显性不足元件(网络版附图2D和E),令不继承*Cas9*表达框的个体死亡,在*Cas9*品系的阈值释放下(Medea元件为野生种群的5%~15%^[56],单/双基因组位点的显性不足元件为不低于野生种群的30%^[57])可驱动种群中*Cas9*的基因频率.

5 基因驱动的模拟研究

要切实评估驱动系统在蚊虫种群控制的效率与安全性方面的可行性,需将驱动系统投入到特定生态环境中,并在多世代演化下,对整个大种群的遗传结构和特征进行评估.但是,此过程耗时且复杂,而且由于驱动个体存在潜在风险,目前尚不能进行田间释放^[58].因此,研究人员可在清楚驱动表达盒遗传模式、明晰种群遗传规律的情况下,以实验初期笼中少数几个世代的研究数据为参数,通过计算机特定软件模拟驱动表达盒在动态种群中的驱动效应,来预测特定驱动系统在多世代、大种群中的表现形式^[59,60](图3).此外,通过设计不同的遗传模式、种群遗传模型和空间环境,驱动模拟还可用于检验预构建的驱动表达盒在特定场景下是否具有驱动效应;或者通过调试不同的遗传、环境等参数,以研究抵抗位点、驱动表达盒的适合度代价、种群动态变化、生态环境等因素对特定驱动系统的驱动效率和潜在风险之影响,从而指导兼顾高效率和安全性的驱动表达盒的构建或改良^[32,59,61,62].故而,驱动模拟对驱动技术的深入研究起着重要的推动作用,是整个基因驱动实验的重要一环.

根据驱动实验不同层面的需求差异,可以选择不同侧重的软件来编写脚本.在实验的布局或开展阶段,可优先选择能灵活设计遗传模式和种群动态的软件.如Champer等人^[53]利用可模拟包括基因驱动在内的各种演化模型的SLiM^[63],在理论上证明了新型驱动表达盒的驱动可行性,推动了基因驱动的深入研究.或者选择能加入特定物种的生活史参数的软件,以进行更有针对性的驱动模拟.如Marshall团队^[8,11,21]利用融入了蚊虫生活史生态学的R语言程序包MGDrivE(Mosquito Gene Drive Explorer)^[64],预测了分离驱动、携带重编码基因的归巢驱动和tGD(transcomplementing gene drive)等多类基因驱动系统在连续世代的蚊虫种群中的表现形式,补充和印证了笼内实验.而在实地释放的预测中,则可在数学建模工具(Mathematic, C++, MA-

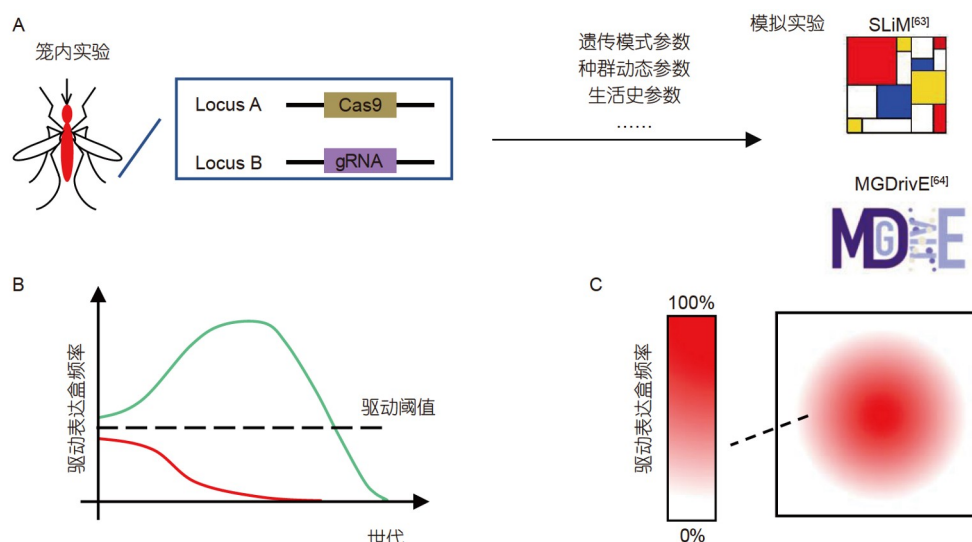


图3 基因驱动的模拟研究,以分离驱动系统为例。A:以笼内少世代的实验数据为参数,模拟分离驱动系统在多世代、大种群中的驱动效应。B:分离驱动系统在多世代中的表现形式:初始释放需达到一定阈值才可具有驱动效应,且在一定世代后,驱动效应会由于种群中Cas9频率的下降而减弱。C:分离驱动系统在种群中的影响范围:驱动表达盒的频率会随着释放中心的远离而降低

Figure 3 The simulation study of gene drive, take the split drive system as an example. A: Using the experimental data of the few generations in the cage as parameters to simulate the driving effect of the split drive system in multi-generation and large populations. B: The manifestation of the split drive system over multiple generations: the drive system only works while the initial drive frequency reaches a certain threshold. And the driving effect will be weakened due to a decrease in the frequency of Cas9. C: Range of influence of the split drive system in populations: the frequency of gene-driven expression cassette will decrease as the release center is farther away

TLAB等)的框架下,写入特定区域的气候、地形、生态等空间环境参数,以更符合真实场景。例如Burt团队^[59]在使用C++模拟驱动型蚊虫于非洲特定地点的释放中,融入了当地的地形及季节性气候变化。模拟结果表明,基因驱动技术在理论上能够抑制疟疾在非洲的肆虐,为该技术从笼内试验向田间释放的应用转化提供了参考。

6 小结与展望

基因驱动技术因其快速、稳定散播遗传元件的优势,可高效安全地抑制蚊虫种群或修饰其群体遗传结构。目前在冈比亚按蚊、斯氏按蚊、埃及伊蚊(*Aedes aegypti*)^[21]三种蚊虫及少数其他几种物种中已开发出多类CRISPR/Cas9介导的HDR型基因驱动系统(网络版附表1),表明该技术在蚊虫遗传防控方面的可行性及巨大潜力。当然,随着蚊虫在内各生物功能基因组的解析,越来越多的基因元件将被发现并阐明,基因驱动技术不仅可在蚊虫遗传防控中进一步应用,如正

在库蚊(*Culex*)中开发的基因驱动技术体系^[65];同时还可用于防控其他有害生物,或者用于农业上的纯合育种等领域,如近年来基因驱动技术体系已在模式物种小鼠(*Mus musculus*)^[66]中建立,为该技术在其他物种中的深入应用奠定了基础。

基因驱动技术具有强大的种群遗传结构改造能力,但是可能会产生驱动抵抗和潜在风险。如何构建兼顾高效率和安全性的驱动表达盒,是当前蚊虫基因驱动研究的焦点。其中,针对基因驱动影响范围的不可控性,现今主要通过构建具阈值依赖性的驱动表达盒来改进。而遗传改造型个体的大量释放不仅费时费力,削弱了基因驱动本身的优势,还可能会超出当地的最大环境容纳量,带来生态压力^[67]。对此,我们认为有以下替代方案:一来,在深入解析物种功能基因组的背景之下,可挖掘出不同种群中的一些独特的功能基因或序列片段,若能以此类分子为靶标,便能将驱动效应限制在某一种群中;二来,研究显示蚊虫节律、温度、光照等条件能够影响个体交配等重要的生理行为^[68],说明生态环境不仅是遗传改造型蚊虫释放中的

重要考虑因素, 其背后的分子基础(如时钟基因(clock gene)^[68]和温度敏感型突变(temperature-sensitive mutation)^[69])也可用于建立具条件依赖性的基因驱动系统, 从而将驱动效应限制在特定地域或季节内。

参考文献

- 1 Ruzzante L, Reijnders M J M F, Waterhouse R M. Of genes and genomes: mosquito evolution and diversity. *Trends Parasitol*, 2019, 35: 32–51
- 2 Severson D W, Behura S K. Mosquito genomics: progress and challenges. *Annu Rev Entomol*, 2011, 57: 143–166
- 3 Wang G H, Gamez S, Raban R R, et al. Combating mosquito-borne diseases using genetic control technologies. *Nat Commun*, 2021, 12: 4388
- 4 Dunn D W, Follett P A. The sterile insect technique (SIT)—an introduction. *Entomol Exp Appl*, 2017, 164: 151–154
- 5 Thomas D D, Donnelly C A, Wood R J, et al. Insect population control using a dominant, repressible, lethal genetic system. *Science*, 2000, 287: 2474–2476
- 6 Isaacs A T, Jasinskiene N, Tretiakov M, et al. Transgenic *Anopheles stephensi* coexpressing single-chain antibodies resist *Plasmodium falciparum* development. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109: E1922–E1930
- 7 Noble C, Olejars J, Esvelt K M, et al. Evolutionary dynamics of CRISPR gene drives. *Sci Adv*, 2017, 3: e1601964
- 8 Adolphi A, Gantz V M, Jasinskiene N, et al. Efficient population modification gene-drive rescue system in the malaria mosquito *Anopheles stephensi*. *Nat Commun*, 2020, 11: 5553
- 9 Bier E. Gene drives gaining speed. *Nat Rev Genet*, 2022, 23: 5–22
- 10 Simoni A, Hammond A M, Beaghton A K, et al. A male-biased sex-distorter gene drive for the human malaria vector *Anopheles gambiae*. *Nat Biotechnol*, 2020, 38: 1054–1060
- 11 López Del Amo V, Bishop A L, Sánchez C. H M, et al. A transcomplementing gene drive provides a flexible platform for laboratory investigation and potential field deployment. *Nat Commun*, 2020, 11: 352
- 12 Alphey L S, Crisanti A, Randazzo F F, et al. Standardizing the definition of gene drive. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2020, 117: 30864–30867
- 13 Xu X J, He W Y, Yang J, et al. Research and applications of genetics-based methods for pest control (in Chinese). *Sci Sin-Vitae*, 2019, 49: 938–950 [徐雪娇, 何玮毅, 杨婕, 等. 害虫遗传防控技术的研究与应用. 中国科学: 生命科学, 2019, 49: 938–950]
- 14 Beeman R W, Friesen K S, Denell R E. Maternal-effect selfish genes in flour beetles. *Science*, 1992, 256: 89–92
- 15 Buchman A B, Ivy T, Marshall J M, et al. Engineered reciprocal chromosome translocations drive high threshold, reversible population replacement in *Drosophila*. *ACS Synth Biol*, 2018, 7: 1359–1370
- 16 Champer J, Champer S E, Kim I K, et al. Design and analysis of CRISPR-based underdominance toxin-antidote gene drives. *Evolary Appl*, 2021, 14: 1052–1069
- 17 Burt A, Koufopanou V. Homing endonuclease genes: the rise and fall and rise again of a selfish element. *Curr Opin Genet Dev*, 2004, 14: 609–615
- 18 Gantz V M, Bier E. The mutagenic chain reaction: a method for converting heterozygous to homozygous mutations. *Science*, 2015, 348: 442–444
- 19 Burt A. Site-specific selfish genes as tools for the control and genetic engineering of natural populations. *Proc R Soc Lond B*, 2003, 270: 921–928
- 20 Mengstie M A, Wondimu B Z. Mechanism and applications of CRISPR/Cas-9-mediated genome editing. *Biol Targets Ther*, 2021, 15: 353–361
- 21 Li M, Yang T, Kandul N P, et al. Development of a confinable gene drive system in the human disease vector *Aedes aegypti*. *eLife*, 2020, 9: e51701
- 22 Gantz V M, Jasinskiene N, Tatarenkova O, et al. Highly efficient Cas9-mediated gene drive for population modification of the malaria vector mosquito *Anopheles stephensi*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112: E6736–E6743
- 23 Backus G A, Delborne J A. Threshold-dependent gene drives in the wild: spread, controllability, and ecological uncertainty. *BioScience*, 2019, 69: 900–907
- 24 Kaduskar B, Kushwah R B S, Auradkar A, et al. Reversing insecticide resistance with allelic-drive in *Drosophila melanogaster*. *Nat Commun*, 2022, 13: 291
- 25 Reed F A. CRISPR/Cas9 gene drive: growing pains for a new technology. *Genetics*, 2017, 205: 1037–1039
- 26 Kanaar R, Hoeijmakers J H J, van Gent D C. Molecular mechanisms of DNA double-strand break repair. *Trends Cell Biol*, 1998, 8: 483–489
- 27 Guirouilh-Barbat J Â, Lambert S, Bertrand P, et al. Is homologous recombination really an error-free process? *Front Genet*, 2014, 5: 175

- 28 Hammond A M, Kyrou K, Bruttini M, et al. The creation and selection of mutations resistant to a gene drive over multiple generations in the malaria mosquito. [PLoS Genet](#), 2017, 13: e1007039
- 29 Hammond A, Galizi R, Kyrou K, et al. A CRISPR-Cas9 gene drive system targeting female reproduction in the malaria mosquito vector *Anopheles gambiae*. [Nat Biotechnol](#), 2016, 34: 78–83
- 30 Hammond A, Kyrou K, Gribble M, et al. Improved CRISPR-based suppression gene drives mitigate resistance and impose a large reproductive load on laboratory-contained mosquito populations. [bioRxiv](#): 10.1101/360339
- 31 López Del Amo V, Juste S S, Gantz V M. A nickase Cas9 gene-drive system promotes super-Mendelian inheritance in *Drosophila*. [Cell Rep](#), 2022, 39: 110843
- 32 Fuchs S, Garrood W T, Beber A, et al. Resistance to a CRISPR-based gene drive at an evolutionarily conserved site is revealed by mimicking genotype fixation. [PLoS Genet](#), 2021, 17: e1009740
- 33 Garrood W T, Kranjc N, Petri K, et al. Analysis of off-target effects in CRISPR-based gene drives in the human malaria mosquito. [Proc Natl Acad Sci USA](#), 2021, 118: e2004838117
- 34 Champer S E, Oh S Y, Liu C, et al. Computational and experimental performance of CRISPR homing gene drive strategies with multiplexed gRNAs. [Sci Adv](#), 2020, 6: eaaz0525
- 35 Marshall J M, Buchman A, Sánchez C. H M, et al. Overcoming evolved resistance to population-suppressing homing-based gene drives. [Sci Rep](#), 2017, 7: 3776
- 36 Kyrou K, Hammond A M, Galizi R, et al. A CRISPR-Cas9 gene drive targeting *doublesex* causes complete population suppression in caged *Anopheles gambiae* mosquitoes. [Nat Biotechnol](#), 2018, 36: 1062–1066
- 37 Champer J, Yang E, Lee E, et al. A CRISPR homing gene drive targeting a haplolethal gene removes resistance alleles and successfully spreads through a cage population. [Proc Natl Acad Sci USA](#), 2020, 117: 24377–24383
- 38 Kandul N P, Liu J, Bennett J B, et al. A confinable home-and-rescue gene drive for population modification. [eLife](#), 2021, 10: e65939
- 39 Oye K A, Esvelt K, Appleton E, et al. Regulating gene drives. [Science](#), 2014, 345: 626–628
- 40 Esvelt K M, Smidler A L, Catteruccia F, et al. Concerning RNA-guided gene drives for the alteration of wild populations. [eLife](#), 2014, 3: e03401
- 41 Heitman E, Sawyer K, Collins J P. Gene drives on the horizon. [Appl Biosaf](#), 2016, 21: 173–176
- 42 Noble C, Adlam B, Church G M, et al. Current CRISPR gene drive systems are likely to be highly invasive in wild populations. [eLife](#), 2018, 7: e33423
- 43 American Committee of Medical Entomology, American Society of Tropical Medicine and Hygiene. Containment practices for arthropods modified with engineered transgenes capable of gene drive addendum 1 to the arthropod containment guidelines, Version 3.2. [Vector-Borne Zoonotic Dis](#), 2021, 22: 3–17
- 44 Guissou C, Quinlan M M, Sanou R, et al. Preparing an insectary in burkina faso to support research in genetic technologies for malaria control. [Vector-Borne Zoonotic Dis](#), 2022, 22: 18–28
- 45 Lanzaro G C, Campos M, Crepeau M, et al. Selection of sites for field trials of genetically engineered mosquitoes with gene drive. [Evol Appl](#), 2021, 14: 2147–2161
- 46 Zhao Y, Schetelig M F, Handler A M. Genetic breakdown of a Tet-off conditional lethality system for insect population control. [Nat Commun](#), 2020, 11: 3095
- 47 Akbari O S, Bellen H J, Bier E, et al. Safeguarding gene drive experiments in the laboratory. [Science](#), 2015, 349: 927–929
- 48 Champer J, Chung J, Lee Y L, et al. Molecular safeguarding of CRISPR gene drive experiments. [eLife](#), 2019, 8: e41439
- 49 Terradas G, Buchman A B, Bennett J B, et al. Inherently confinable split-drive systems in *Drosophila*. [Nat Commun](#), 2021, 12: 1480
- 50 Noble C, Min J, Olejarz J, et al. Daisy-chain gene drives for the alteration of local populations. [Proc Natl Acad Sci USA](#), 2019, 116: 8275–8282
- 51 Min J, Noble C, Najjar D, et al. Daisy quorum drives for the genetic restoration of wild populations. [BioRxiv](#), 2017: 115618
- 52 Dhole S, Vella M R, Lloyd A L, et al. Invasion and migration of spatially self-limiting gene drives: a comparative analysis. [Evol Appl](#), 2018, 11: 794–808
- 53 Champer J, Kim I K, Champer S E, et al. Performance analysis of novel toxin-antidote CRISPR gene drive systems. [BMC Biol](#), 2020, 18: 27
- 54 Marshall J M, Akbari O S. Can CRISPR-based gene drive be confined in the wild? A question for molecular and population biology. [ACS Chem Biol](#), 2018, 13: 424–430
- 55 Edgington M P, Harvey-Samuel T, Alphey L. Split drive killer-rescue provides a novel threshold-dependent gene drive. [Sci Rep](#), 2020, 10: 20520

- 56 Metzloff M, Yang E, Dhole S, et al. Experimental demonstration of tethered gene drive systems for confined population modification or suppression. *BMC Biol*, 2022, 20: 119
- 57 Hay B A, Oberhofer G, Guo M. Engineering the composition and fate of wild populations with gene drive. *Annu Rev Entomol*, 2021, 66: 407–434
- 58 Long K C, Alphey L, Annas G J, et al. Core commitments for field trials of gene drive organisms. *Science*, 2020, 370: 1417–1419
- 59 North A R, Burt A, Godfray H C J. Modelling the suppression of a malaria vector using a CRISPR-Cas9 gene drive to reduce female fertility. *BMC Biol*, 2020, 18: 98
- 60 Champer S E, Oakes N, Sharma R, et al. Modeling CRISPR gene drives for suppression of invasive rodents using a supervised machine learning framework. *PLoS Comput Biol*, 2021, 17: e1009660
- 61 Faber N R, Meiborg A B, Mcfarlane G R, et al. A gene drive does not spread easily in populations of the honey bee parasite *Varroa destructor*. *Apidologie*, 2021, 52: 1112–1127
- 62 Champer J, Kim I K, Champer S E, et al. Suppression gene drive in continuous space can result in unstable persistence of both drive and wild-type alleles. *Mol Ecol*, 2021, 30: 1086–1101
- 63 Haller B C, Messer P W. Evolutionary modeling in SLiM 3 for beginners. *Mol Biol Evol*, 2019, 36: 1101–1109
- 64 Sánchez C H M, Wu S L, Bennett J B, et al. MGDriVE: a modular simulation framework for the spread of gene drives through spatially explicit mosquito populations. *Methods Ecol Evol*, 2020, 11: 229–239
- 65 Feng X, López Del Amo V, Mameli E, et al. Optimized CRISPR tools and site-directed transgenesis towards gene drive development in *Culex quinquefasciatus* mosquitoes. *Nat Commun*, 2021, 12: 2960
- 66 Grunwald H A, Gantz V M, Poplawski G, et al. Super-Mendelian inheritance mediated by CRISPR-Cas9 in the female mouse germline. *Nature*, 2019, 566: 105–109
- 67 Wilke A B B, Beier J C, Benelli G. Transgenic mosquitoes—fact or fiction? *Trends Parasitol*, 2018, 34: 456–465
- 68 Wang G, Vega-Rodríguez J, Diabate A, et al. Clock genes and environmental cues coordinate *Anopheles* pheromone synthesis, swarming, and mating. *Science*, 2021, 371: 411–415
- 69 Oberhofer G, Ivy T, Hay B A. Gene drive that results in addiction to a temperature-sensitive version of an essential gene triggers population collapse in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2021, 118: e2107413118

Research progress of CRISPR/Cas9-mediated and HDR-type gene drive technology in mosquito genetic control

HONG JunFeng^{1,2,3}, YANG XiaoLin^{1,2,3}, XIANG Kai^{1,2,3}, QIU PinPin^{1,2,3}, LIU Yan^{1,2,3},
HE ZhengBo^{1,2,3}, YAN ZhenTian^{1,2,3}, CHEN Bin^{1,2,3} & QIAO Liang^{1,2,3}

1 Chongqing Key Laboratory of Vector Insects, Chongqing 401331, China;

2 Institute of Entomology and Molecular Biology, Chongqing Normal University, Chongqing 401331, China;

3 College of Life Sciences, Chongqing Normal University, Chongqing 401331, China

Gene drive refers to the phenomenon that specific genes or genetic elements are passed from parent to offspring in the form of super-Mendelian inheritance. In recent years, based on the genetic characteristics of gene drive and the theoretical basis of their molecular mechanisms, and supported by CRISPR/Cas9 gene-editing system, gene-driven genetic control technology has become an advanced research hotspot in the field of basic mosquito biology and genetic control. And there have emerged some practical and effective achievements that take into account ecological stability. This paper reviews the basic principles of gene drive, CRISPR/Cas9-mediated and HDR-type drive technology strategies, improved strategies to reduce gene-driven resistance and potential risks, and simulation analysis of gene drive. It is hoped to provide a reference for the development of a gene-driven mosquito genetic control technology system that takes both high efficiency and safety into consideration.

mosquitoes, CRISPR/Cas9 gene editing, gene drive, genetic control, strategy improvement, homology-directed repair (HDR)

doi: [10.1360/SSV-2022-0053](https://doi.org/10.1360/SSV-2022-0053)