



CRISPR/Cas9技术在生物医学领域的非病毒及病毒载体

何治尧¹, 秦舟¹, 门可², 杨阳², 徐珽^{1*}, 魏于全²

1. 四川大学华西医院临床药学部(药剂科), 成都 610041;

2. 四川大学华西医院肿瘤中心, 成都 610041

* 联系人, E-mail: tingx2009@163.com

收稿日期: 2017-09-20; 接受日期: 2017-10-10; 网络版发表日期: 2017-11-15

国家自然科学基金(批准号: 81602699, 81502677, 81402302)资助

摘要 规律成簇的间隔短回文重复序列(CRISPR)及CRISPR相关蛋白9(CRISPR/Cas9)系统是一种新型基因组编辑技术,能够靶向干扰或修复基因组的特定基因.来自细菌或人工改造的CRISPR/Cas9系统已经由生物学家发现或构建,Cas9核酸酶及单链导向RNA (sgRNA)是CRISPR/Cas9系统的主要组成成分.该系统被广泛应用于疾病治疗新靶点的发掘,基因功能的鉴定,动物模型的建立以及基因治疗药物的开发.CRISPR/Cas9系统已经通过突变或修正疾病相关基因来部分缓解或彻底治愈某些病症.然而,如何有效递送CRISPR/Cas9至目标细胞及靶器官仍然是运用该技术所面临的挑战之一,这影响着该系统稳定和精准的基因编辑能力.本文主要综述Cas9 mRNA, Cas9 蛋白或编码Cas9基因及相应sgRNA载体的递送系统.递送Cas9蛋白的非病毒载体能够维持Cas9的靶向作用,减少脱靶效应;递送sgRNA和供体模板的病毒载体能够改进基因编辑及同源修复效率.安全、有效及可规模化生产的递送载体将会推进CRISPR/Cas9技术在人类基因治疗领域中的应用.

关键词 基因组编辑, 规律成簇的间隔短回文重复序列, 规律成簇的间隔短回文重复序列相关蛋白9, 病毒载体, 非病毒载体, 基因治疗

靶向基因组编辑技术能够用于遗传性敲除或校正特定的基因位点^[1-3].基因编辑疗法的靶点是基因组基因,而不是针对激酶抑制剂的激酶(蛋白),也不是特定抗体的抗原^[4-7].因此,基于基因组编辑技术的治疗是直接针对诸多疾病的根源进行治疗(图1)^[8-10].并且,许多以前看似不能成药的靶点现在也可以通过基因编辑技术进行药物设计,进一步体现了基因编辑技术在靶向治疗领域的重要性^[10,11].规律成簇的间隔短回文重复

序列及相关蛋白9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats sequences-Cas9, CRISPR/Cas9)系统在细菌的免疫反应中被发现,最近的研究表明,经人工修饰后的CRISPR/Cas9系统在哺乳动物的细胞中也能够发挥其稳健、精准的基因编辑能力^[11,12].因此,CRISPR/Cas9系统具有治疗人类很多疾病的潜在能力,包括遗传性疾病、心脑血管疾病、代谢性疾病、退行性疾病、癌症和传染病等^[11,13-17].最近,中国及美国

引用格式: 何治尧, 秦舟, 门可, 等. CRISPR/Cas9技术在生物医学领域的非病毒及病毒载体. 中国科学: 生命科学, 2017, 47: 1141-1150, doi: [10.1360/N052017-00202](https://doi.org/10.1360/N052017-00202)

英文版见: He Z Y, Men K, Qin Z, et al. Non-viral and viral delivery systems for CRISPR/Cas9 technology in the biomedical field. Sci China Life Sci, 2017, 60: 458-467, doi: [10.1007/s11427-017-9033-0](https://doi.org/10.1007/s11427-017-9033-0)

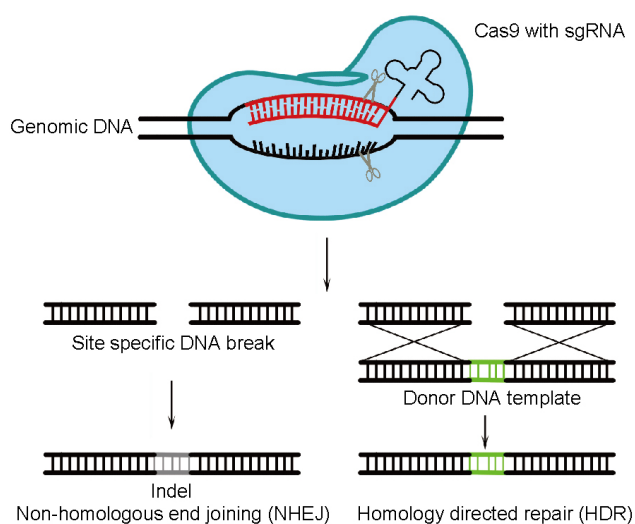


图1 CRISPR/Cas9介导的基因组编辑示意图
(网络版彩图)

Cas9蛋白在sgRNA的引导下识别并切割相应的基因位点产生双链DNA断裂(double strand break, DSB), DSB可以通过非同源末端连接(non-homologous end joining, NHEJ)产生随机插入或缺失突变实现基因突变, 或者在供体DNA模板存在的条件下通过同源重组介导(homology directed repair, HDR)的方式进行修复, 从而将特定序列精准整合入靶基因

的相关机构已经公开表明, 将开展基于CRISPR/Cas9技术的肿瘤治疗临床试验^[18-20]。目前, 已经有很多商业化及合成的试剂能够将该系统导入细胞来实现高效的体外靶向基因组编辑, 但是科研人员仍然需要寻找将该系统导入动物或人体内靶器官的方法^[11]。值得注意的是, 该系统的命中率及脱靶率与递送载体也有较大关系^[21,22]。因此, 递送系统对于基于CRISPR/Cas9技术药品的最终商业化至关重要。本文综述了体内外各类将CRISPR/Cas9工具导入细胞及动物的方法。

1 CRISPR/Cas9系统直接导入

1.1 Cas9与sgRNAs共显微注射

Niu等人^[23]将酿脓链球菌SpCas9 mRNA与靶向Ppar- γ 等5个基因的sgRNA同时(共)显微注射入单细胞胚胎后, 在猕猴(*Macaca mulatta*)上成功实现了精准基因靶向。而且, 在注射后的15个胚胎中, 有6个都检测到了两个靶向基因(Ppar- γ 和Rag1)的突变, 说明CRISPR/Cas9系统经显微注射能够在猕猴胚胎发挥基

因编辑功能。在非洲青鳉鱼(*Oryzias latipes*)模型中, 研究者基于胚胎共显微注射nCas9n蛋白/mRNA, sgRNA或单链DNA模板的平台, 实现了通过NHEJ方式敲掉基因或通过HDR方式插入等位基因的目的。这种基因工程技术经处理的短寿非洲青鳉鱼为研究脊椎动物的衰老及相关疾病提供了强有力的遗传工具^[24,25]。Zhang等人^[26]在维生素D受体(VDR)基因的保守序列中选择了两个靶点(VDR1和VDR2)并设计了相应的sgRNA, 然后共显微注射SpCas9 mRNA和sgRNA进入C57BL/6小鼠(*Mus musculus*)单细胞胚胎中, 通过T7E1检测和DNA测序, 结果表明有12只小鼠的VDR基因被干扰, 其中有8只是等位基因敲除。这些都说明了能够通过共显微注射Cas9 mRNA和sgRNA进入单细胞胚胎的方式来实现CRISPR/Cas9系统介导的基因敲除。但是, 相比于单细胞胚胎注射, 体外注射斑马鱼(*Danio rerio*)的卵细胞更能够提高基因编辑的效率并增加产生遗传突变的比例, 尤其是在低靶向效率的sgRNA存在时更明显。在基因敲除和敲入试验中, 斑马鱼卵细胞注射了SpCas9 mRNA, sgRNAs和/或供体DNA片段。卵细胞注射组基因的敲入率提高到了49.6%, 而单细胞胚胎注射组只有26%。对于mc4r, mpv17, mstna, mc3r和mrp2b这5个基因来说, 单细胞胚胎注射组的基因敲除效率分别是86.7%, 18.9%, 32.2%, 33.3%和40.7%, 而体外卵细胞注射组基因敲除率分别增加至94.4%, 88.9%, 91.1%, 90.0%和93.3%。而且, 携带mc4r和mpv17突变的子代占97.7%和91%, 高于常规单细胞胚胎注射的70%和35.2%^[27]。因此, 体外卵细胞注射应该是改进单细胞胚胎注射基因编辑效率的备选途径。

1.2 Cas9与sgRNAs的兰斯阵列纳米注射

兰斯阵列纳米注射(lance array nanoinjection)是利用微加工的硅芯片通过物理和电导的方式向大量的靶细胞直接输送遗传材料(SpCas9和sgRNA)。Sessions等人^[28]将增强绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein, EGFP)的编码序列克隆到质粒pCDNA5/FRT中, 然后在重组酶作用下将其转入HeLa/FRT细胞, 最终得到了单拷贝EGFP的同源细胞系, 经潮霉素筛选后的HeLa/FRT细胞EGFP表达率高达99%, 定义为GFP+/FRT细胞。然后, 研究者构建含有靶向N端EGFP基因sgRNA的CRISPR-SpCas9系统, 通过兰斯阵列纳米注射进入GFP+/FRT细胞敲除EGFP。在4.5 mA电流

条件下,经3次注射后,*EGFP*基因的平均敲除率高达93.77%。由此可见,兰斯阵列纳米注射是CRISPR/Cas9基因组编辑技术在非病毒和病毒递送系统之外可以选择的实现基因编辑的途径之一。

1.3 Cas9与sgRNAs的电转导入

CDK11 sgRNA导向的SpCas9质粒能够通过电转的方式有效沉默骨肉瘤细胞系中内源性*CDK11*基因。在电转导入SpCas9质粒后,KHOS细胞中的*CDK11*在48 h后表达降低了83%~91.6%,在72 h后降低了87.5%~91.6%;U-2OS细胞中的*CDK11*在48 h后表达出现了65%~82.5%,72 h后抑制达到85.7%~93.3%。癌细胞的增殖能力、生存能力、迁移性和侵袭性都随着CRISPR/Cas9介导的*CDK11*敲除而显著降低^[29]。Su等人通过电转的方式将编码sgRNA与SpCas9的质粒导入人原代T细胞,敲除了目的基因*PD-1* (programmed death-1)。突变位点在-86到+52区间变化,sg1敲除率为61.9%,sg2为52.6%,sg3为40%,sg1+sg2为47.6%,sg3+sg4为38.9%。实验结果发现,*PD-1*的表达显著降低,并伴随IFN- γ 的上调和对癌细胞毒性的增加。作者认为这是首次报道非病毒载体可以通过干扰*PD-1*基因来重编程人原代T细胞^[30]。类似地,另一位研究者也采用相同方法将SpCas9蛋白,sgRNA和HDR模板导入至人的原代T细胞,并且在T细胞中*CXCR4*和*PD-1*的修复效率达到了20% (HDR模板浓度为50 pmol时为22%,100 pmol时为18%),因此增强了T细胞效应子功能^[31]。Tanihara等人^[32]为了培育转基因猪,将SpCas9蛋白和sgRNA体外导入了猪(*Sus domesticus*)的受精卵。该基因编辑技术的效率达到了90%,非常有利于转基因猪的培育。

经改进后的电穿孔核转染技术不仅能够将CRISPR/Cas9/sgRNA底物导入细胞质,而且能够穿过核膜进入细胞核。所以,很多研究者采用这种技术来递送CRISPR/Cas9系统。利用核转染试剂Nucleofector Kit V与编码靶向*ASXL1*的sgRNA SpCas9质粒及单链DNA模板结合,然后体外将这种三元复合物导入白血病细胞KBM5来校正其*ASXL1*的基因,结果显示有0.46%~2%的KBM5细胞中的*ASXL1*片段经过CRISPR/Cas9基因组编辑后完成修复。而且,白血病细胞小鼠移植瘤模型试验显示,接种基因修复后细胞的荷瘤小鼠比接种未经修复细胞的生存期更长^[33]。人原代CD4⁺ T细胞

及CD34⁺造血干细胞原代细胞(hematopoietic stem and progenitor cells, HSPCs)用细胞专属性核转染试剂导入*CCR5*或*B2M*靶向的gRNA/SpCas9。结果显示,有34%的CD4⁺ T细胞*B2M*基因被敲除,42%的CD34⁺ HSPCs细胞*CCR5*被敲除,且具有最小的脱靶突变^[34]。4D核转染试剂Nucleofector X Kit将SpCas9、转录crRNA以及转录激活crRNA导入白血病细胞K562中,以分析CRISPR/Cas9衍生的RNA介导的内切酶和切口酶所引起的脱靶效应^[35]。实验中的核转染试剂采用的是针对SE细胞系列Lonza 4D核转染试剂中的DN-100。将含有替换氨基酸的SpCas9质粒和sgRNA质粒共转染进入细胞来筛选高保真的SpCas9 (SpCas9-HF1),新SpCas9-HF1的脱靶事件用目前的方法并不能检测到,并且维持了SpCas9的中靶率^[36]。SpCas9蛋白/转录sgRNA和编码SpCas9-sgRNA共表达质粒胞分别用相应的核转染试剂转染纤维母细胞和多能干细胞。SpCas9蛋白分解染色体DNA的效率高达79%,然后迅速在细胞内降解。研究表明,相比于Cas9基因,Cas9蛋白可以阻止其对基因组的持续作用,从而降低脱靶效应^[37]。因此,电转技术是CRISPR/Cas9系统十分有效的导入方式并且被广泛应用于体外基因组编辑的研究中。

1.4 Cas9与sgRNAs的尾静脉高压注射

Lin等人^[38]将编码靶向乙肝病毒(hepatitis B virus, HBV)的sgRNA/SpCas9共表达质粒以尾静脉高压注射方式注入小鼠体内,T7E1检测表明肝内HBV基因组有5%发生突变,克隆测序表明有27%发生突变。肝内HBV基因组因此被干扰和消除,最终降低乙肝病毒持续表达模型小鼠血清HBV表面抗原的水平。Xue等人^[39]将CRISPR/Cas9质粒以尾静脉高压注射方式注入成年小鼠体内,直接干扰肿瘤抑制基因并引起致癌基因点突变,在小鼠肝脏诱导足以使肿瘤发生的*Pten*和*p53*低频突变。将SpCas9-sgRNA与单链DNA模板通过尾静脉高压注射进入乙酰水解酶(*Fah*)基因敲除的小鼠体内,1/250的肝细胞表达了野生型*Fah*蛋白。Yin等人^[40]的研究表明,SpCas9能够介导校正人遗传疾病酪氨酸血症小鼠模型肝细胞中的*Fah*基因。通过尾静脉高压注射能够实现CRISPR/Cas9体系的体内基因组编辑。

2 CRISPR/Cas9系统的非病毒载体

2.1 脂质体

sgRNA能够克隆至Cas9表达质粒中(pX260, pX330, pX458, pX459等), HDR模板也可以构建至质粒载体中。为了得到-45位超级增强子蛋白(*Nanog*)敲除的胚胎干细胞(embryonic stem cell, ESC)克隆体, 商品化的Lipofectamine 2000用以将靶向-45增强子SpCas9/sgRNA质粒和HDR模板转染进入ESCs。结果表明, -45位的增强子拥有调节最近两种相邻基因的功能, 如*Nanog*, *Dppa3*^[41]。Lipofectamine 2000能将pSpCas9s和靶向*hBAX*, *p21*基因的sgRNA还有钙黏素基因转染进入膀胱癌细胞。CRISPR/Cas9系统通过体外激活膀胱癌抑制因子来抑制肿瘤增殖, 促进肿瘤凋亡以及降低癌细胞活性^[42]。为了筛选特定的增强型SpCas9 (eSpCas9)或葡萄球菌中的Cas9 (SaCas9, eSaCas9), 利用Lipofectamine 2000转染含点突变的Cas9质粒和sgRNA质粒进入细胞。筛选获得的eSpCas9或eSaCas9减少脱靶效应而且依然维持了稳健的中靶率^[43]。用Lipofectamine 2000将连接内含肽的SpCas9与野生型的SpCas9作比较, 研究分析小分子激发的SpCas9蛋白特异性。在人细胞中, 4-羟基基莫昔芬能够条件性地激活SpCas9对靶基因进行修复, 与野生型相比特异性增加高达25倍^[44]。针对HBV的SpCas9及sgRNA与Lipofectamine 3000复合物能够显著降低Huh-7细胞中乙肝病毒的核和表面抗原蛋白的增殖^[38]。Lipofectamine LTX被用来递送同时靶向多个HBV结构域的SpCas9-sgRNAs工具以失活HBV^[45]。通过将SpCas9或SpCas9-D10A切口酶表达质粒及拼接sgRNA质粒导入细胞, Lipofectamine LTX被用来评估该系统的中靶率及脱靶率。此外, Lipofectamine LTX还可以评估ssDNA HDR模板的插入效率。拼接sgRNA在不降低命中率的情况下还可以降低脱靶位点不必要的突变。进一步而言, 拼接sgRNA也可通过引入成对SpCas9来降低脱靶效应^[46]。脂质体制剂包含Lipofectamine RNAiMAX, Lipofectamine 2000, Lipofectamine LTX以及SAINT-Red (一种含有吡啶的合成阳离子脂质)是多个SpCas9版本的功能性导入药剂, 比阳离子脂质DOTAP和EZ-PLEX (基于肽的核酸试剂)的转染效果要好很多。相比于递送质粒来说, 野生型SpCas9/sgRNA脂质体系统对修饰的基因组更有

针对性。而且, 这种技术也可以在体内有效递送Cre重组酶和SpCas9/sgRNA复合物至内耳, 使小鼠毛发细胞中Cre介导的重组率达到90%, SpCas9介导的基因修饰能达到20%^[47]。

2.2 纳米粒

FuGene6和HPV-18 E6或E7靶向SpCas9-sgRNA的质粒复合后, 体外共转染HeLa细胞, 从而引起HPV基因组产生DNA断裂, 并将失活的插入或缺失突变引入E6和E7基因。敲除E6或E7可抑制宫颈癌肿瘤细胞生长, 逆转恶性表型^[48]。FuGene HD与sgRNA质粒和(或)SpCas9质粒转染细胞, T7E1检测表明根据sgRNA GC含量的不同, 有27%~35%的插入或缺失突变被引入基因组^[49]。

阳离子聚合材料(CBA-ABOL)浓缩复合质粒dCas9-VP64 (SpCas9的D10A和H840A催化残基被突变, 然后在C端遗传性地融合了VP64酸性转化激活域)与4条sgRNA表达质粒, 可以体外激活编码细胞命运的关键调控性内源基因^[50,51]。为了增加牛痘病毒在溶瘤病毒治疗中对癌细胞的选择性, CRISPR/Cas9被用于删除牛痘病毒基因组中胸苷激酶的基因片段。用Effectene转染试剂将sgRNA质粒同SpCas9共转染进入CV-1 (猴肾成纤维细胞), 然后将一对供体模板也转染进入相同细胞。有90%胸苷激酶基因被红色荧光蛋白(RFP)基因替换^[52,53]。

另外也有相似的研究, 聚乙烯亚胺与单纯疱疹病毒靶向的sgRNA/SpCas9和pCIneo-CD8质粒(表达人CD8A用于细胞分选)复合, 转染HEK293T细胞。流式分选转染后感染HSV-1的CD8阳性细胞。用于修复或敲入的供体模板用聚乙烯亚胺材料再次转染以产生回复或敲入病毒。结果证明, 该方法不仅使有超过50%的HSV基因被损坏而且有约10%的基因敲入了HSV^[54]。

多胺转染试剂(TransIT-LT1)将野生型SpCas9或人密码子优化的质粒Fok I-dCas9, 表达sgRNA的质粒和表达tdTomato荧光蛋白的质粒转入HEK293细胞, 分析NHEJ介导产生的相关突变。有75%~90%的目标基因被Cas9系统干扰, 而且, Fok I-Cas9融合蛋白与野生型SpCas9相比效率更高且特异性更好, 而且脱靶突变效应也更少甚至检测不到^[55]。

一种多组分DNA转染试剂X-tremGENE HP, 能够与SpCas9变体质粒, sgRNA或供体质粒形成复合物,

转入细胞后分析SpCas9变体的靶向效率. 转染后的细胞中能够检测到23%的插入或缺失突变, 结果表明CRISPR/Cas9系统能够有效地编辑细胞^[56].

阳离子聚合物转染试剂TurboFect将AsCpfI (来自氨基酸球菌), LbCpfI (来自毛螺科菌), StI Cas9 (来自嗜热链球菌LMD-9)质粒序列与SpCas9或SaCas9以同源crRANs包裹结合后, 转入Neuro-2a小鼠成神经瘤细胞以诱导HDR. 结果显示, AsCpfI或LbCpfI能够有效地形成DSB然后诱导24%或15%的HDR, 而常用的SaCas9是13%, StI Cas9是9%^[57].

2.3 穿膜肽介导的SpCas9蛋白与sgRNA递送

Ramakrishna等人^[58]和Suresh等人^[59]推测如果在SpCas9蛋白中引入穿膜肽(cell-penetrating peptide, CPP)则能将SpCas9蛋白直接导入细胞. 通过基因工程融合SpCas9和由4个甘氨酸(Gly)、9个精氨酸(Arg)和4个亮氨酸(Leu)组成的CPP蛋白, 难以在合适的条件下纯化得到. 因此, 在SpCas9的C端引入半胱氨酸残基来简化修饰步骤, 在CPP的氨基端引入马来酰亚胺基团, 巯基与马来酰亚胺基通过加成反应生成硫醚键连接CPP与SpCas9 (CPP-SpCas9). CPP与sgRNA按一定比例混合后形成带正电纳米复合物. 将CPP-SpCas9与sgRNA复合物序贯或同时转入以下人源细胞: 胚胎干细胞、上皮成纤维细胞、HEK293T细胞、HeLa细胞以及胚胎肿瘤细胞. 检测结果发现, CPP介导的CRISPR/Cas9递送干扰了8.7%~14%的靶基因, 同时降低了脱靶效应. 由此可见, CPP能够促进CRISPR/Cas9系统进入细胞发挥基因编辑功能.

总而言之, 合成或商业化的阳离子材料可以与CRISPR/Cas9形成阳离子/Cas9纳米复合物, 将Cas9基因编辑工具高效递入细胞后可以在目标位点诱发基因突变或HDR. 一般来说, 非病毒载体/Cas9纳米复合物多用于体外基因编辑研究, 用于体内研究的非病毒载体/Cas9纳米复合物则有待进一步的改进.

3 CRISPR/Cas9体系的病毒载体

3.1 逆转录病毒

编码SpCas9的逆转录病毒感染HeLa细胞, 得到SpCas9的稳定表达株^[60]. 表达SpCas9和sgRNA的逆转录病毒感染小鼠原代B细胞, 在体外抗CD40抗体

和白介4的激活条件下, 诱导该细胞高水平的级联重组. CRISPR/Cas9逆转录病毒载体能够将IgM型AID缺陷B细胞调节至IgG1型^[12]. *Katnal2* (Katanin P60 subunit A-like 2)是一种仍在研究中的孤独症相关基因, 已通过全外显子组测序证实微管切断ATP酶的突变与自闭症有关. Fricano-Kugler等人^[61]和Williams等人^[62]设计构建了一个表达GFP, SpCas9和两条sgRNA的逆转录病毒, 位于起始密码子旁的sgRNAs主要功能是敲除小鼠*Katnal2*表达中1型, 2型和4型突变体. 这种逆转录病毒可以在近93%的N2A细胞克隆基因组中sgRNA1和sgRNA2附近引入插入或缺失突变. 逆转录病毒敲除了小鼠的*Katnal2*基因, 降低发育神经元的树突生长. 总之, 逆转录病毒是CRISPR/Cas9技术的良好载体.

3.2 腺病毒

Xu等人^[63]将表达SpCas9的腺病毒和sgRNA导入mdx小鼠体内用来纠正DMD基因. 肌内注射该病毒后可纠正DMD基因突变, 在mdx小鼠体内重塑肌营养不良蛋白的表达. 编码SpCas9和sgRNA的腺病毒导入细胞来诱导基因干扰. 此外, 结果显示不同类型细胞(包括正在分裂和静止期细胞)的基因干扰率能达到18%~65%^[64]. 包装E1/E3删除的SpCas9及靶向人/鼠*Pten*基因的sgRNA共表达的腺病毒Ad.sgPten, 在感染小鼠细胞(KP)及人细胞(HEK293T)后均检测到Ad.sgPten诱导的*Pten*基因突变. Ad.sgPten能将基因编辑系统导入小鼠肝细胞发挥基因编辑作用, 两只小鼠的基因突变率检测结果分别为14.8%和22.8%^[65]. 因此, 腺病毒是CRISPR/Cas9系统实现体内递送的一种行之有效的载体.

3.3 慢病毒

慢病毒载体被用于转导HBV特异性的sgRNAs与SpCas9进入慢性HBV感染和从头HBV感染两种细胞模型, 有约76%的突变在被转导的样品中被发现. 针对HBV的Cas9/sgRNA系统使总HBV病毒DNA水平降低到了千分之一, 其cccDNA水平减少到了十分之一, 并突变灭活了大部分残留的病毒DNA^[66]. 为了向被转导细胞引入特定的DNA片段, Maruyama等人^[67]将SpCas9和sgRNA分开载入两种慢病毒中, 然后, 被转导的细胞用供体质粒进行转染. 实验结果表明, 慢病毒CRISPR/Cas9系统能够实现精准而有效的基因编辑

效果;当用NEHJ抑制剂处理时,HDR介导的基因编辑率能够达到59.3%。用于修饰特定基因位点的sgRNAs与SpCas9慢病毒表达载体提供了一种在基因组水平评价基因功能的新方法。Shalem等人^[68]报道一个慢病毒GeCKO文库(genome-scale CRISPR/Cas9 knock-out, CRISPR/Cas9介导的基因组范围的敲除),它有64751条特异性的sgRNAs,能够靶向18080个基因位点。经过筛选成功产生了排位靠前的几个理想候选基因,其中包含之前验证过的2个基因以及4个新基因。另一个慢病毒文库每6条sgRNA对应一个基因位点,能够靶向19502个基因,试验结果显示经转导的HeLa细胞稳定表达核酸内切酶Cas9^[60]。采用慢病毒CRISPR/Cas9系统来敲除伯基特淋巴瘤细胞中的*MCL-1*基因,引起伯基特淋巴瘤细胞凋亡率达到80%。而且,在人伯基特淋巴瘤移植瘤模型中,通过慢病毒平台转导CRISPR/Cas9进入体内,该系统表达的sgRNA引起肿瘤急剧消退或生长抑制^[69,70]。

3.4 腺相关病毒

腺相关病毒载体(adeno-associated virus, AAV)是一种基因治疗很有前景的载体,具有高感染效率,低免疫原性,减少因病毒基因组整合进入宿主基因组诱发的成瘤风险以及广泛的血清型等性质^[56,71]。AAV可以包载SpCas9(约4.2 kb),sgRNA及一个启动子(约0.3 kb)在一个载体中,但是由于病毒包载能力有限(排除病毒本身反向重复序列,只能包载约4.5 kb),这样留给设计表达的序列和调控元件就只有一个很小的空间^[71]。Truong等人^[56]基于SpCas9的蛋白结构设计合成了分裂内含肽介导的分裂Cas9反式拼接系统,这样就可以让Cas9的编码序列分布于两个AAV载体中,在翻译后被重组为Cas9蛋白。这种系统编码的Cas9的基因编辑能力与野生型的Cas9相似,这类改构手法非常适合于SpCas9^{D10A}切口酶。而且双AAV系统能够增加HDR的效率。内含肽介导的分裂反式拼接系统可以通过AAV包装递入细胞,并且Cas9蛋白的活性在细胞中能够被恢复。也有研究者尝试去掉SpCas9编码序列中看似冗余的序列,SpCas9编码序列从4.2 kb减少到4.0 kb,但是删减后的SpCas9活性也随之下降^[72]。虽然St1Cas9的大小约为3.4 kb,其PAM序列(NNAGAAW)比较复杂,因而基因靶向范围较窄,用AAV递送St1Cas9进行基因治疗的研究较少^[73,74]。SaCas9的大小只有3.2 kb,基因插

入和敲除的能力却并不比SpCas9差。因此,利用更短的SaCas9和对应的sgRNA可以包载进入多种AAV载体,如AAV8,靶向小鼠肝脏中的胆固醇调节基因*Pcsk9*。尾静脉注射一周后,Ran等人^[71]发现有大于40%的基因已被敲除,血清中*Pcsk9*及总胆固醇的水平都有明显减少。结果表明,AAV-SaCas9基因编辑系统在体内能够达到有效、特异性编辑基因的目的。有研究者将重组体AAV9用于传递SpCas9或SaCas9与其相应sgRNA来靶向*mdx*小鼠肌肉组织中的*DMD*(肌营养不良基因)基因。实验结果显示,这些*mdx*模型小鼠的*DMD*基因序列都能被有效编辑,肌营养不良蛋白在肌营养不良小鼠模型中部分恢复表达^[75-77]。研究者将SpCas9与sgRNA分开包载在双AAV系统中,随后立体注入成年小鼠脑中。这种双AAV体系在体内能够编辑单基因(*Mecp2*),也能够编辑多基因(*DnmtCas9l, 3a, 3b*)^[78,79]。因此,AAV是用于递送基于CRISPR/Cas9技术的人类基因治疗药物最有潜力的载体。

4 非病毒载体和病毒载体的联用

非病毒载体递送的Cas9(Cas9蛋白、mRNA或质粒等)具有短期表达和被机体全部清除的特点,可以避免机体免疫反应和长期表达后引起的脱靶效应(图2)^[80]。

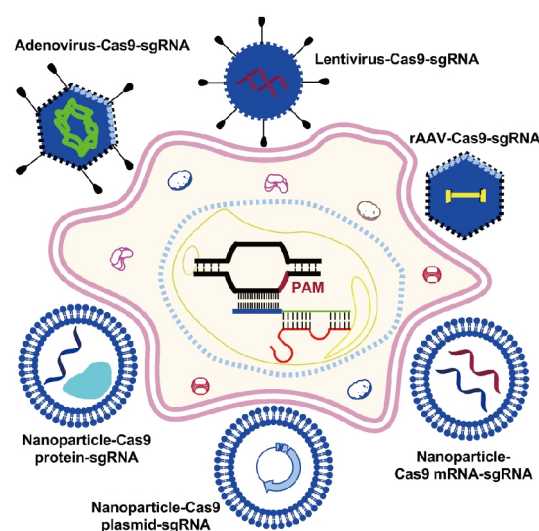


图2 CRISPR/Cas9的载体系统种类(网络版彩图)

人密码子优化的Cas9与sgRNA序列包装进入病毒载体(包括腺病毒、重组腺相关病毒载体、慢病毒)用于基因组编辑。Cas9蛋白与Cas9的mRNA和sgRNA或编码Cas9与sgRNA的质粒包载在非病毒纳米粒中形成纳米粒-Cas9的复合物

脂质材料C12-200/cholesterol/C14PEG2000/DOPE/花生四烯酸包裹SpCas9/mRNA (约4.5 kb)后形成非病毒载体纳米粒(NanoCas9). 一种装载U6-sgRNA及HDR模板的AAV2/8结构的病毒(AAV-sgRNA-HDR), 用来靶向修复*Fah^{mut/mut}*小鼠肝细胞中*Fah*片段. 将这两种载体通过尾静脉的方式导入8~10周龄的*Fah^{mut/mut}*小鼠. 这种病毒和非病毒联合递送CRISPR/Cas9体系通过纠正*Fah*拼接突变产生了*Fah*阳性的肝细胞, 缓解了小鼠体重减轻和肝损伤等疾病症状. 不仅如此, 体内非病毒及病毒载体的结合还会使Cas9的脱靶率降低. 单次给药后的肝细胞基因纠正率大于6%, 表明联合非病毒及病毒载体的递送方式可以应用于更多疾病的基因编辑治疗^[21].

5 总结与展望

在生物医药领域涉及的CRISPR/Cas9载体的特点及应用均总结在表1中^[81,82]. 商业化常见的非病毒载

体能够将CRISPR/Cas9系统体外转入细胞中, 靶向编辑基因组的特定位点. 非病毒载体引入的Cas9蛋白或Cas9瞬时表达工具能够减小病毒载体持续表达Cas9所带来的体内免疫反应及脱靶效应. 与非病毒载体相比, 病毒载体能更有效地将CRISPR/Cas9转导进入体内靶组织, 而且促使目标位点DNA双链断裂, 通过NHEJ引入点突变或通过HDR进行基因修复. 相比于非病毒载体, 病毒载体在基因敲除和基因敲入方面都呈现了显著的优势. 然而, 病毒载体持续表达Cas9会引起免疫反应和脱靶效应, 在这一方面病毒载体还有待进一步改进. sgRNA和(或) DNA供体模板构建入病毒载体中使其持续表达; 而瞬时表达的Cas9用非病毒载体多次给药的方式递入生物体内. sgRNA和DNA供体模板的持续表达有助于基因编辑效率的提高, Cas9瞬时表达避免了潜在的免疫反应和脱靶效应. 因此, 非病毒与病毒载体的联合递送可能是实现CRISPR/Cas9系统精准治疗的最佳途径.

表 1 CRISPR/Cas9系统的非病毒载体和病毒载体在生物医药领域的应用

递送方式	优势	劣势	应用
微注射	体外效率高	低通量	卵细胞和胚胎细胞基因编辑; 建立模式动物
电转	体外转染效率高	毒性大, 体内应用困难	多种细胞的体外基因编辑
尾静脉高压注射	适用于小动物的体内基因编辑	效率低, 临床应用困难	体内基因功能的研究
穿膜肽	脱靶效率低	效率低, 体内应用困难	体外细胞基因编辑
阳离子载体	易于生产, 装载容量大	效率低	各类细胞的体外基因编辑; 癌症、HBV及遗传病等疾病的基因治疗
逆转录病毒	体内效率高, 整合靶基因进入宿主细胞基因组	插入突变, 原癌基因激活	癌症、遗传病等疾病的基因治疗
慢病毒	高效率, 高通量	易重排包载基因, 易转基因沉默	体内体外的基因筛选和基因功能研究
腺病毒	体内高效率, 高装载量	免疫原性, 大规模生产困难	遗传病的基因治疗
腺相关病毒	体内效率高, 不致病	装载量有限, 成本高	遗传病的基因治疗

参考文献

- 1 Urnov F D, Rebar E J, Holmes M C, et al. Genome editing with engineered zinc finger nucleases. *Nat Rev Genet*, 2010, 11: 636–646
- 2 Joung J K, Sander J D. TALENs: a widely applicable technology for targeted genome editing. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2013, 14: 49–55
- 3 陈易雨, 王志平, 倪汉文, 等. 单碱基编辑技术创制抗除草剂拟南芥种质. *中国科学: 生命科学*, 2017, 60: 1196–1199
- 4 Topalian S L, Hodi F S, Brahmer J R, et al. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med*, 2012, 366: 2443–2454
- 5 He Z Y, Deng F, Wei X W, et al. Ovarian cancer treatment with a tumor-targeting and gene expression-controllable lipoplex. *Sci Rep*, 2016, 6:

- 23764
- 6 Li H, Eishengdrelo A, Kongsamut S, et al. G-protein-coupled receptors mediate 14-3-3 signal transduction. [Sig Transduct Target Ther](#), 2016, 1: 16018
- 7 Osakabe Y, Watanabe T, Sugano S S, et al. Optimization of CRISPR/Cas9 genome editing to modify abiotic stress responses in plants. [Sci Rep](#), 2016, 6: 26685
- 8 Gaj T, Gersbach C A, Barbas Iii C F. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. [Trends Biotech](#), 2013, 31: 397–405
- 9 Hille F, Charpentier E. CRISPR-Cas: biology, mechanisms and relevance. [Phil Trans R Soc B](#), 2016, 371: 20150496
- 10 Savić N, Schwank G. Advances in therapeutic CRISPR/Cas9 genome editing. [Transl Res](#), 2016, 168: 15–21
- 11 Cox D B T, Platt R J, Zhang F. Therapeutic genome editing: prospects and challenges. [Nat Med](#), 2015, 21: 121–131
- 12 Cheong T C, Compagno M, Chiarle R. Editing of mouse and human immunoglobulin genes by CRISPR/Cas9 system. [Nat Commun](#), 2016, 7: 10934
- 13 Croce C M, Zhang K, Wei Y. Announcing signal transduction and targeted therapy. [Sig Transduct Target Ther](#), 2016, 1: 15006
- 14 Munshi N V. CRISPR (clustered regularly interspaced palindromic repeat)/Cas9 system: a revolutionary disease-modifying technology. [Circulation](#), 2016, 134: 777–779
- 15 Yang Y, Wang L, Bell P, et al. A dual AAV system enables the Cas9-mediated correction of a metabolic liver disease in newborn mice. [Nat Biotechnol](#), 2016, 34: 334–338
- 16 Jiang C, Mei M, Li B, et al. A non-viral CRISPR/Cas9 delivery system for therapeutically targeting HBV DNA and pcsk9 *in vivo*. [Cell Res](#), 2017, 27: 440–443
- 17 Zhang X, Wang S. From the first human gene-editing to the birth of three-parent baby. [Sci China Life Sci](#), 2016, 59: 1341–1342
- 18 Cyranoski D. Chinese scientists to pioneer first human CRISPR trial. [Nature](#), 2016, 535: 476–477
- 19 Deng H, Li W, Wei Y. Translational Medicine Center of West China Hospital. [Sci China Life Sci](#), 2016, 59: 1055–1056
- 20 Reardon S. First CRISPR clinical trial gets green light from US panel. [Nature](#), 2016, doi:10.1038/nature.2016.20137
- 21 Yin H, Song C Q, Dorkin J R, et al. Therapeutic genome editing by combined viral and non-viral delivery of CRISPR system components *in vivo*. [Nat Biotechnol](#), 2016, 34: 328–333
- 22 Zhang D, Li J F. DNA-guided genome editing tool. [Sci China Life Sci](#), 2016, 59: 740–741
- 23 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: 836–843
- 24 Jao L E, Wente S R, Chen W. Efficient multiplex biallelic zebrafish genome editing using a CRISPR nuclease system. [Proc Natl Acad Sci USA](#), 2013, 110: 13904–13909
- 25 Harel I, Valenzano D R, Brunet A. Efficient genome engineering approaches for the short-lived African turquoise killifish. [Nat Protoc](#), 2016, 11: 2010–2028
- 26 Zhang T, Yin Y, Liu H, et al. Generation of VDR knock-out mice via zygote injection of CRISPR/Cas9 system. [PLoS ONE](#), 2016, 11: e0163551
- 27 Xie S L, Bian W P, Wang C, et al. A novel technique based on *in vitro* oocyte injection to improve CRISPR/Cas9 gene editing in zebrafish. [Sci Rep](#), 2016, 6: 34555
- 28 Sessions J W, Skousen C S, Price K D, et al. CRISPR/Cas9 directed knock-out of a constitutively expressed gene using lance array nanoinjection. [Springerplus](#), 2016, 5: 1521
- 29 Feng Y, Sassi S, Shen J K, et al. Targeting Cdk11 in osteosarcoma cells using the CRISPR/Cas9 system. [J Orthop Res](#), 2015, 33: 199–207
- 30 Su S, Hu B, Shao J, et al. CRISPR/Cas9 mediated efficient PD-1 disruption on human primary T cells from cancer patients. [Sci Rep](#), 2016, 6: 20070
- 31 Schumann K, Lin S, Boyer E, et al. Generation of knock-in primary human T cells using Cas9 ribonucleoproteins. [Proc Natl Acad Sci USA](#), 2015, 112: 10437–10442
- 32 Tanihara F, Takemoto T, Kitagawa E, et al. Somatic cell reprogramming-free generation of genetically modified pigs. [Sci Adv](#), 2016, 2: e1600803–e1600803
- 33 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. [Oncotarget](#), 2015, 6: 44061–44071
- 34 Mandal P K, Ferreira L M R, Collins R, et al. Efficient ablation of genes in human hematopoietic stem and effector cells using CRISPR/Cas9. [Cell Stem Cell](#), 2014, 15: 643–652
- 35 Cho S W, Kim S, Kim Y, et al. Analysis of off-target effects of CRISPR/Cas-derived RNA-guided endonucleases and nickases. [Genome Res](#), 2014, 24: 132–141

- 36 Kleinstiver B P, Pattanayak V, Prew M S, et al. High-fidelity CRISPR/Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects. *Nature*, 2016, 529: 490–495
- 37 Kim S, Kim D, Cho S W, et al. Highly efficient RNA-guided genome editing in human cells via delivery of purified Cas9 ribonucleoproteins. *Genome Res*, 2014, 24: 1012–1019
- 38 Lin S R, Yang H C, Kuo Y T, et al. The CRISPR/Cas9 system facilitates clearance of the intrahepatic HBV templates *in vivo*. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2014, 3: e186
- 39 Xue W, Chen S, Yin H, et al. CRISPR-mediated direct mutation of cancer genes in the mouse liver. *Nature*, 2014, 514: 380–384
- 40 Yin H, Xue W, Chen S, et al. Genome editing with Cas9 in adult mice corrects a disease mutation and phenotype. *Nat Biotechnol*, 2014, 32: 551–553
- 41 Blinka S, Reimer Jr. M H, Pulakanti K, et al. Super-enhancers at the nanog locus differentially regulate neighboring pluripotency-associated genes. *Cell Rep*, 2016, 17: 19–28
- 42 Liu Y, Zeng Y, Liu L, et al. Synthesizing AND gate genetic circuits based on CRISPR/Cas9 for identification of bladder cancer cells. *Nat Commun*, 2014, 5: 5393
- 43 Slaymaker I M, Gao L, Zetsche B, et al. Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity. *Science*, 2016, 351: 84–88
- 44 Davis K M, Pattanayak V, Thompson D B, et al. Small molecule-triggered Cas9 protein with improved genome-editing specificity. *Nat Chem Biol*, 2015, 11: 316–318
- 45 Sakuma T, Masaki K, Abe-Chayama H, et al. Highly multiplexed CRISPR/Cas9-nuclease and Cas9-nickase vectors for inactivation of hepatitis B virus. *Genes Cells*, 2016, 21: 1253–1262
- 46 Fu Y, Sander J D, Reyon D, et al. Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs. *Nat Biotechnol*, 2014, 32: 279–284
- 47 Zuris J A, Thompson D B, Shu Y, et al. Cationic lipid-mediated delivery of proteins enables efficient protein-based genome editing *in vitro* and *in vivo*. *Nat Biotechnol*, 2015, 33: 73–80
- 48 Kennedy E M, Kornepati A V R, Goldstein M, et al. Inactivation of the human papillomavirus E6 or E7 gene in cervical carcinoma cells by using a bacterial CRISPR/Cas RNA-guided endonuclease. *J Virol*, 2014, 88: 11965–11972
- 49 Lin Y, Cradick T J, Brown M T, et al. CRISPR/Cas9 systems have off-target activity with insertions or deletions between target DNA and guide RNA sequences. *Nucleic Acids Res*, 2014, 42: 7473–7485
- 50 Adler A F, Grigsby C L, Kulangara K, et al. Nonviral direct conversion of primary mouse embryonic fibroblasts to neuronal cells. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2012, 1: e32
- 51 Perez-Pinera P, Kocak D D, Vockley C M, et al. RNA-guided gene activation by CRISPR/Cas9-based transcription factors. *Nat Meth*, 2013, 10: 973–976
- 52 Yuan M, Gao X, Chard L S, et al. A marker-free system for highly efficient construction of vaccinia virus vectors using CRISPR Cas9. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 2015, 2: 15035
- 53 Yuan M, Zhang W, Wang J, et al. Efficiently editing the vaccinia virus genome by using the CRISPR/Cas9 system. *J Virol*, 2015, 89: 5176–5179
- 54 Suenaga T, Kohyama M, Hirayasu K, et al. Engineering large viral DNA genomes using the CRISPR/Cas9 system. *Microbiol Immunol*, 2014, 58: 513–522
- 55 Tsai S Q, Wyvekens N, Khayter C, et al. Dimeric CRISPR RNA-guided *Fok I* nucleases for highly specific genome editing. *Nat Biotechnol*, 2014, 32: 569–576
- 56 Truong D J J, Kühner K, Kühn R, et al. Development of an intein-mediated split-Cas9 system for gene therapy. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43: 6450–6458
- 57 Tóth E, Weinhardt N, Bencsura P, et al. Cpf1 nucleases demonstrate robust activity to induce DNA modification by exploiting homology directed repair pathways in mammalian cells. *Biol Direct*, 2016, 11: 46
- 58 Ramakrishna S, Kwaku Dad A B, Beloor J, et al. Gene disruption by cell-penetrating peptide-mediated delivery of Cas9 protein and guide RNA. *Genome Res*, 2014, 24: 1020–1027
- 59 Suresh B, Ramakrishna S, Kim H. Cell-penetrating peptide-mediated delivery of Cas9 protein and guide RNA for genome editing. *Methods Mol Biol*, 2017, 1507: 81–94
- 60 Tao L, Zhang J, Meraner P, et al. Frizzled proteins are colonic epithelial receptors for *C. difficile* toxin B. *Nature*, 2016, 538: 350–355
- 61 Fricano-Kugler C J, Williams M R, Salinaro J R, et al. Designing, packaging, and delivery of high titer CRISPR retro and lentiviruses via stereotaxic injection. *JoVE*, 2016, doi: 10.3791/53783
- 62 Williams M R, Fricano-Kugler C J, Getz S A, et al. A retroviral CRISPR/Cas9 system for cellular autism-associated phenotype discovery in developing neurons. *Sci Rep*, 2016, 6: 25611

- 63 Xu L, Park K H, Zhao L, et al. CRISPR-mediated genome editing restores dystrophin expression and function in *mdx* mice. *Mol Ther*, 2016, 24: 564–569
- 64 Maggio I, Holkers M, Liu J, et al. Adenoviral vector delivery of RNA-guided CRISPR/Cas9 nuclease complexes induces targeted mutagenesis in a diverse array of human cells. *Sci Rep*, 2014, 4: 5105
- 65 Wang D, Mou H, Li S, et al. Adenovirus-mediated somatic genome editing of *Pten* by CRISPR/Cas9 in mouse liver in spite of Cas9-specific immune responses. *Hum Gene Ther*, 2015, 26: 432–442
- 66 Kennedy E M, Bassit L C, Mueller H, et al. Suppression of hepatitis B virus DNA accumulation in chronically infected cells using a bacterial CRISPR/Cas RNA-guided DNA endonuclease. *Virology*, 2015, 476: 196–205
- 67 Maruyama T, Dougan S K, Truttmann M C, et al. Increasing the efficiency of precise genome editing with CRISPR/Cas9 by inhibition of non-homologous end joining. *Nat Biotechnol*, 2015, 33: 538–542
- 68 Shalem O, Sanjana N E, Hartenian E, et al. Genome-scale CRISPR/Cas9 knockout screening in human cells. *Science*, 2014, 343: 84–87
- 69 Aubrey B J, Kelly G L, Kueh A J, et al. An inducible lentiviral guide RNA platform enables the identification of tumor-essential genes and tumor-promoting mutations *in vivo*. *Cell Rep*, 2015, 10: 1422–1432
- 70 Yi L, Li J. CRISPR/Cas9 therapeutics in cancer: promising strategies and present challenges. *Biochim Biophys Acta*, 2016, 1866: 197–207
- 71 Ran F A, Cong L, Yan W X, et al. *In vivo* genome editing using *Staphylococcus aureus* Cas9. *Nature*, 2015, 520: 186–191
- 72 Nishimasu H, Ran F A, Hsu P D, et al. Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA. *Cell*, 2014, 156: 935–949
- 73 Garneau J E, Dupuis M È, Villion M, et al. The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature*, 2010, 468: 67–71
- 74 Cong L, Ran F A, Cox D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 2013, 339: 819–823
- 75 Long C, Amoasii L, Mireault A A, et al. Postnatal genome editing partially restores dystrophin expression in a mouse model of muscular dystrophy. *Science*, 2016, 351: 400–403
- 76 Nelson C E, Hakim C H, Ousterout D G, et al. *In vivo* genome editing improves muscle function in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Science*, 2016, 351: 403–407
- 77 Tabebordbar M, Zhu K, Cheng J K W, et al. *In vivo* gene editing in dystrophic mouse muscle and muscle stem cells. *Science*, 2016, 351: 407–411
- 78 Swiech L, Heidenreich M, Banerjee A, et al. *In vivo* interrogation of gene function in the mammalian brain using CRISPR/Cas9. *Nat Biotechnol*, 2015, 33: 102–106
- 79 Mentis A F. Epigenomic engineering for Down syndrome. *Neurosci Biobehav Rev*, 2016, 71: 323–327
- 80 Yao S, He Z, Chen C. CRISPR/Cas9-mediated genome editing of epigenetic factors for cancer therapy. *Hum Gene Ther*, 2015, 26: 463–471
- 81 Liu J, Shui S L. Delivery methods for site-specific nucleases: achieving the full potential of therapeutic gene editing. *J Control Release*, 2016, 244: 83–97
- 82 Wang L, Li F, Dang L, et al. *In vivo* delivery systems for therapeutic genome editing. *Int J Mol Sci*, 2016, 17: 626