

基因组编辑技术的原理及应用*

贺飞燕^{1,2} 闫建俊^{2,3} 冯瑞云² 张爱萍⁴ 张维锋² 白云凤^{2,3**}

¹山西大学生物工程学院 太原 030006

²山西省农业科学院作物科学研究所 太原 030006

³农业部黄土高原作物基因资源与种质创制重点实验室 太原 030031

⁴新疆生产建设兵团第6师农业科学研究所 五家渠 831300

摘要 阐明基因功能和改良生物现状是生物学重点研究内容之一。近年来利用的基因打靶和转基因技术存在效率低、耗时长、易引起人们的安全性疑虑等问题。新近发现的以多种新型高效的DNA靶向内切酶为基础而建立的基因组编辑技术,主要包括ZFN、TALEN和CRISPR/Cas三种。本文首先综述这3种技术的原理,即均基于“DNA断裂/DNA损伤修复”来实现编辑功能,可以在不同物种中对目标基因进行定点敲除、单核苷酸或多核苷酸片段的置换、添加等基因组靶向修饰,具有简单、快速、高效、准确等优点。然后比较3种技术在构成、靶点识别模式、编辑特点、技术难度以及脱靶效应等方面的异同;归纳该技术在作物遗传育种、家畜改良以及基因治疗等方面的应用现状和前景,并指出该技术尚存在的脱靶、构建等问题以及解决的途径,重点突出ZFN、TALEN和CRISPR/Cas在模式植物以及粮食作物中的应用。最后提出建立基于病毒载体的基因组无痕编辑技术平台,将使基因组编辑用于植物遗传改良更为简约和安全。(表2参65)

关键词 基因组编辑; ZFN; TALEN; CRISPR/Cas; 原理; 分子育种
CLC S336

Principle and application of the genome editing technology*

HE Feiyan^{1,2}, YAN Jianjun^{2,3}, FENG Ruiyun², ZHANG Aiping⁴, ZHANG Weifeng² & BAI Yunfeng^{2,3**}

¹College of Bioengineering, Shanxi University, Taiyuan 030006, China

²Institute of Crop Science, Shanxi Academy of Agricultural Sciences, Taiyuan 030006, China

³China Key Laboratory of Loess Plateau Crop Gene Resources and Germplasm Creation, Ministry of Agriculture, Taiyuan 030031, China

⁴Institute of Agricultural Sciences of the Sixth Agricultural Division, Production and Construction Corps in Xinjiang, Wujiaqu, 831300, China

Abstract Elucidating gene function and improving biological status is one of the key research contents of biology. The use of gene targeting and transgenic technology is accompanied with problems including low efficiency, long time, safety doubts and others. New genome editing techniques based on novel and efficient DNA targets include ZFN, TALEN and CRISPR/Cas. In this paper, we first review the three technology principles, which all based on DNA/DNA damage repair to achieve editing function, can perform target gene deletion, single nucleotide or polynucleotide fragments replacement, and target gene modification in different species of the target gene. The new technology is simple, rapid, efficient and accurate. Then we compare the three techniques in terms of composition, target recognition mode, editing features, technical difficulty and off-target effect. We also summarize the status and prospects of the application of this technology in crop genetics and breeding, livestock improvement and gene therapy. The review points out the shortcomings of the technology including off-target effect and construction problems, and provides with possible solutions. The application of ZFN, TALEN and CRISPR/Cas in the model plant and grain crops is emphasized. At the end of this paper, we also introduce the present research situation and our research ideology concerning the technology, proposing the establishment of the technology platform of genome editing based on viral vector, which will make simpler and safer application of genome editing for plant genetic improvement.

Keywords genome editing; ZFN; TALEN; CRISPR/Cas; principle; molecular breeding

收稿日期 Received: 2015-08-21 接受日期 Accepted: 2015-09-18

*国家自然科学基金项目(30971838)、山西省科技攻关项目(201303110015-1)和山西省回国留学人员基金项目(2013-146) Supported by the National Natural Science Foundation of China (30971838), the Key Sci-tech Project of Shanxi Province (201303110015-1) and the Project for Returned Overseas Students of Shanxi Province (2013-146)

**通讯作者 Corresponding author (E-mail: byfok@126.com.)

19世纪,达尔文的进化论和孟德尔的三大遗传定律是生命科学发展的重大进步;20世纪,沃森和克里克的DNA双螺旋结构模型以及DNA重组技术的诞生从分子水平上揭开了“生命之谜”;21世纪“人类基因组计划”的完成是又一个生命科学的里程碑,从此人们进入了基因组时代。

在高等生物中,一套染色体的完整的DNA序列称之为基因组(Genome)。对生物体基因组的结构、功能及表达产物的研究属于基因组学的范畴。过去,生物学上研究基因的功能是从逻辑上来验证的,即根据该基因表达时呈现了某种功能,该基因被敲除时呈现了相应功能的消失或下降,该基因恢复表达时功能也随之得到恢复。近几年出现的定点改造基因的技术——基因组编辑技术可以快速、简单、准确地实现基因组上特定基因的定点修饰,比如基因敲除、基因敲入、基因标签、替换启动子等等,受到广大研究者的青睐,在植物、动物的基因功能研究和遗传改良以及基因治疗等方面得到了广泛的应用^[1-3]。

1 基因组编辑的原理和类型

基因组编辑(Genome editing)是在基因组水平上对DNA序列进行定点改造修饰的遗传操作技术^[1]。该技术被誉为“后基因组时代生命科学研究的助力器”。其原理是通过构建一个人工内切酶,在靶位点切断DNA,产生DNA双链断裂(Double-strand break, DSB),进而诱导细胞内的DNA修复系统进行非同源末端连接(Nonhomologous end joining, NHEJ)和同源重组修复(Homologous recombination, HR)。通过这两种修复途径,基因组编辑技术可以实现定点基因敲除、特异突变引入和定点修饰。基因组编辑可分为3类,即锌指核酸酶(Zinc-finger nuclease, ZFN)技术、类转录激活因子核酸酶(Transcription activator-like effector nuclease, TALEN)技术和成簇规律间隔短回文重复(Clustered regulatory interspaced short palindromic repeat, CRISPR)技术。

1.1 锌指核酸酶技术(ZFN技术)

ZFNs技术是通过锌指蛋白(ZFP)和核酸内切酶FokI两部分发挥作用。ZFP通过与特定的靶序列结合发挥重要的转录调控作用,人类基因组含有上百个ZFP结构的基因,每个ZFP结构域可识别一段9-12 bp的碱基序列。不同的ZFP具有类似的Cys2、His2或Cys4结构框架,ZFP结合DNA的特异性与框架外特定氨基酸的变异有关。FokI是一种非特异性的核酸内切酶,仅在二聚体状态下才具备核酸酶活性。将人工构建的锌指蛋白与改造后的FokI限制性内切酶融合,就得到ZFNs,它能靶向切割特定序列,产生DSB。每对ZFNs的结合序列的间隔区域通常为5-7 bp,以确保FokI二聚体的形成^[2]。构建ZFNs的方法有模块组装法和寡聚体库工程化筛选构建法,ZFNs的构建通常需要数月时间并且工作量大,目前只有少数实验室掌握这一技术平台。

1.2 类转录激活因子核酸酶技术(TALEN技术)

TALEN的构成与ZFN相似,通过TALE蛋白DNA结合域和FokI核酸酶发挥作用。前者负责靶序列的特异性识别,后者负责靶位点的切割。TALE是植物病原体黄单胞菌分泌的一类效应蛋白因子,能够特异的结合DNA,此结合域有一段

高度保守的重复单元,该单元中仅第12和13位的氨基酸不同。由于每个TALE单体只靶向1个核苷酸,针对每一个靶位点的上下游各设计一个TALEN,用二聚体状态下FokI去切割^[4]。TALENs技术很好地解决了ZFNs技术存在的构建困难、成本高以及周期长等问题。但是TALEN技术也并非完美无缺,由于针对不同靶点,每次都需构建新的TALE array,工作繁琐。

1.3 成簇规律间隔短回文重复和Cas系统(CRISPR/Cas系统)

CRISPR是一种RNA诱导的获得性免疫系统,发现于细菌和古生菌中。该系统由成簇间隔的短回文重复序列(CRISPR)和位于其侧翼的Cas基因组成。2008年,Marraffini等人率先证明了CRISPR/Cas系统切割DNA的能力。CRISPR/Cas系统分为3种,其中Ⅱ型最为简单,研究的也较多。它只由Cas9蛋白与sgRNA(Single-guide RNA)构成,通过sgRNA与靶序列DNA的碱基配对,然后用Cas9蛋白来切割DNA双链,产生DSB。与sgRNA碱基配对的前20个碱基以及3'端Cas9识别的三核苷酸NGG的PAM(Protospacer adjacent motif)序列构成对切割DNA非常重要,Cas9切割位点位于PAM上游3 nt处^[5]。

1.4 3种类型的比较

ZFNs技术、TALENs技术与CRISPR/Cas都是高效的基因组编辑技术,3种技术都是基于“DNA断裂/DNA损伤修复”而实现基因组编辑的。由于DNA损伤修复机制在不同物种中普遍存在,因而3种技术理论上在不同物种中通用并各具优势。ZFNs与TALENs技术有较好的可扩展性。只要将FokI核酸内切酶换成其他效应蛋白,则立即可以获得一种全新的具有靶向特异性的新技术。现在开发出的新的效应蛋白有转录激活因子、转录抑制因子、同源重组酶和DNA修饰酶等为ZFNs技术与TALENs技术的发展注入新的活力。尽管有设计上的难度,ZFNs与TALENs仍是效果更可靠、特异性更高、符合成本效益的基因组编辑工具。有文献报道,将转录激活因子与Cas9蛋白融合,也能够实现对特定基因的转录激活。尽管脱靶率高于ZFNs与TALENs,但CRISPR/Cas9在设计灵活性、简便性以及高通量实验上仍有明显的优势。

2 基因组编辑技术的应用

2.1 基因组编辑技术在植物研究中的作用

基因组编辑技术不仅应用于植物功能基因组研究,还应用于农作物的品种改良,帮助育种工作者更加快速、准确地定向改造作物品种。目前,利用不同的基因组编辑系统,已经在模式作物拟南芥、烟草以及粮食作物水稻、玉米、小麦和马铃薯等多种植物中实现了靶基因的敲除和敲入(表2)。

2.1.1 ZFNs在植物中的应用 2005年,Lloyd等首先在拟南芥中利用ZFN诱导染色体基因产生定点突变,后代的突变率高达20%以上,其中10%的突变可以稳定遗传到下一代^[6]。2009年,ZFNs也被成功用于敲除玉米内源抗除草剂基因ZmIPK1^[7],获得了抗除草剂特性的玉米,也有研究人员利用ZFNs获得抗除草剂特性的烟草。之后,科学家利用ZFNs对拟南芥中的ADH1、TT4、ABI4基因实现了定点突变^[8-9]。

表1 3种技术的比较
Table 1 Comparison among ZFN, TALEN and CRISPR/Cas

类别 Category	ZFN	TALEN	CRISPR/Cas
构成 Structure	ZFP + <i>FokI</i>	TALE蛋白+ <i>FokI</i> TALE protein + <i>FokI</i>	Cas9 + sgRNA
来源 Source	存在于植物、动物和微生物中 Existing in plants, animals and microorganisms	来自植物病原体黄单胞菌属 From a plant pathogen <i>Xanthomonas</i>	来自细菌和古生菌针对外源DNA的适应性免疫系统 From bacteria and archaea adaptive immune system against exogenous DNA
靶点识别模式 Target recognition mode	蛋白质-DNA识别 Protein-DNA recognition	蛋白质-DNA识别 Protein-DNA recognition	RNA-DNA识别 RNA-DNA recognition
编辑特点 Editing features	单位点编辑 Single point editor	单位点编辑 Unit point editor	多位点编辑 Multi point editing
技术难度 Technical difficulty	困难 Difficult	较容易 Easier	较容易 Easier
脱靶效应 Off-target effects	较轻 Lighter	较轻 Lighter	较严重 More serious
优点 Advantage	无基因、序列、细胞、物种限制，通过二聚体起作用 No gene, sequence, cell, species restrictions, by acting dimer	无基因、序列、细胞、物种限制，实验设计简单准确，而且周期短，特异性高 No gene sequences, cells, species restrictions, experimental design simple and accurate, and short-cycle, high specificity	序列、细胞、物种限制少，实验设计灵活简便，而且周期短，适用于高通量实验，无需构建融合蛋白 Sequences, cells, species less restrictive, simple experimental design flexibility and short cycle, suitable for high-throughput experiments, without having to build a fusion protein
限制 Restrictions	部分三联碱基对尚未发现对应锌指，依赖性强，影响特异性，需大量时间及成本进行优化和筛选 Part of the triple base pairs not found a corresponding zinc finger, dependent, affecting specificity, it requires a lot of time and cost optimization and screening	需重复构建融合蛋白，识别受染色体结构序列甲基化敏感 Construction of the fusion protein to be repeated, the recognition sequence by chromosomal methylation-sensitive	识别受染色体结构、SNP及拷贝数影响，脱靶严重，并非靶向任意序列 Identification of chromosome structure, SNP and copy number affected by serious off-target, not targeting any of the sequences

Marton等于是2010年在矮牵牛中用病毒表达载体TRV瞬时表达ZFN基因来代替稳定整合^[29]。2011年，Curtin 等利用ZFNs对大豆基因组中高度重复序列进行定点敲除获得成功，这也是首次在大豆上用ZFN敲除重复基因，并且用发根农杆菌快速检测ZFN切割活性^[10]。2012年Sizova等在衣藻中实现了用ZFN敲除内源基因。此外，ZFNs也可同时对两个基因组位点进行靶向切割，产生到位、易位以及重复。例如，Qi等人利用ZFNs技术在拟南芥上进行了实验，结果确实观察到了染色体片段倒位及重复的发生^[11]。由于有些基因的敲除是致死的，因此利用基因组编辑进行点突变和基因置换成为科学家追求的目标。该目标只是在烟草和拟南芥的原生质体中获得成功^[12]，在植株水平上还未见报道。可见，利用ZFNs定点切割编辑DNA序列，实现靶基因的敲除/敲入，可以显著提高基因定点整合和置换效率。

2.1.2 TALENs在植物中的应用 自2009年TALEN技术面世后，就迅速应用到各种生物中。植物中首先在拟南芥的原生质体中实现了内源靶基因的敲除^[13]。2012年，Li等利用TALENs使得水稻感病基因OsSWEET14启动子发生突变，进而提高了水稻对白叶枯病的抗性^[14]。2013年，Shan等通过构建了一系列TALENs，成功敲除了水稻中与产量有关的一系列基因如*OsDEP1*、*OsBADH1*、*OsCKX2*、*OsSD1*基因等，同年，Shan等人用Golden Gate构建TALEN高效敲除了短柄草中的一系列基因^[15]。2014年，Haun等在大豆中利用TALENs对脂肪酸脱氢酶基因*FAD2-1A/1B*基因进行了定点编辑，大大提高了大豆作为粮食作物的品质特性^[16]。同年，Liang等利用

TALENs也成功地敲除玉米中的*ZmPDS*、*ZmIPK1A*、*ZmIPK*、*ZmMRP4*基因，突变率也较高^[17]。Wang等利用TALENs成功获得对小麦*MLO*基因在A、B和D基因组上的3个拷贝的定点突变，使得小麦抗性增强持久，产生的突变可以稳定遗传到后代并符合孟德尔遗传规律^[18]。利用基因组编辑技术还实现了小麦基因组的定点插入。小麦是异源六倍体，遗传操作较为困难，基因组编辑技术的出现可谓是小麦育种家的福音，大大解决了这一难题。

2.1.3 CRISPR/Cas在植物中的应用 2013年CRISPR/Cas技术在植物中得到了快速而广泛的应用。2013年，Li等利用CRISPR/Cas在拟南芥和烟草原生质体中产生的突变率显著高于利用农杆菌介导的烟草遗传转化^[19]。同年，Shan等利用CRISPR/Cas系统定点敲除水稻的*PDS*基因，产生的突变要比转基因水稻中基因突变效率高^[20]。此后研究家们利用CRISPR/Cas系统在水稻、番茄、等植物中诱导产生许多具有优异性状的突变体^[21-22]。CRISPR/Cas系统也可以用于基因敲除，但随着靶向基因数量的增加，该技术受到一定限制。当下研究者通过利用tRNA-gRNA串联排列高效表达多个gRNA，有效地提高了对植物基因敲除的效率^[23-24]。另外有资料显示，将不具有酶切活性的Cas9与转录和表达水平有关的调节因子相融合，可以调控靶基因的转录水平及表达^[25-26]。

2.2 基因组编辑技术在动物研究中的应用 基因组编辑技术经过20余年的发展，已经逐渐趋于成熟。目前ZFNs，ALENs和CRISPR/Cas技术已经在多种昆虫中测试成功。2002年，Bibikova等利用ZFNs使果蝇*yellow*基因发

表2 植物中ZFN/TALEN/CRISPR/Cas实现的基因组编辑

Table 2 Genome editing of ZFN/TALEN/CRISPR/Cas in plants

DNA修饰的类型 DNA modification type	类型 Type	传送方法 Delivery method	物种 Species	靶序列 Target sequence	参考文献 Reference
性状叠加 Characters superimposed	ZFN	基因枪转化 Bombardment	玉米 corn	转基因 Transgenic	[27]
		稳定整合 Stable integration	拟南芥 Arabidopsis	<i>ADHI, TT4, ABI4, MPK8</i> , Transgenic	[8, 9, 11, 28]
			大豆 Soybean	<i>DCLI, DCL4, RDR6, HENI</i> , Transgenic	[10]
	ZFN	RNA病毒 RNA viruses	烟草、矮牵牛 Tobacco; petunia	转基因 Transgenic	[29]
		稳定整合、根癌农杆菌 T-DNA(瞬时)	拟南芥、烟草 Arabidopsis; tobacco	转基因 Transgenic	[30]
			大麦 Barley	转基因 Transgenic	[31]
			拟南芥 Arabidopsis	<i>ADHI, TT4, MAPKKK1, DSK2B, NATA2, GLL22</i>	[32]
		稳定整合 Stable integration	大豆 Soybean	<i>FAD2-1A/B</i>	[16]
			大麦 Barley	<i>PAPhy_a</i>	[33]
			根癌农杆菌T-DNA(瞬时) Agrobacterium tumefaciens T-DNA (instantaneous)	水稻 Rice	<i>SWEET14</i>
	TALEN		拟南芥、烟草 Arabidopsis; tobacco	<i>AtTT4, AtADH, NbSurB</i>	[13]
		原生质体 Protoplasts	水稻、短柄草属 Rice, <i>Brachypodium</i>	<i>OsDEP1, OsBADH2, SPL, SBP</i>	[15]
		基因枪转化 Bombardment	小麦 Wheat	<i>MLO</i>	[18]
		原生质体、稳定整合 Protoplasts, Stable integration	玉米 Corn	<i>PDS, IPK1A, IPK, MRP4</i>	[17]
			拟南芥 Arabidopsis	<i>RTEL1, TT4, GAI, BRII, JAZI, CHLI, API, ADHI; TT4</i> , Transgenic	[34, 35, 36]
基因敲除 Knockout	CRISPR/Cas	稳定整合 Stable integration	水稻 Rice	<i>SWEET11/13/1a/1b, PDS, PMS3, EPSPS, DERF1, MSH1, MYB5, MYB1, ROC5, SPP, YSA</i>	[37, 38]
			拟南芥、水稻 Arabidopsis; Rice	<i>AtBRII, AtJAZI, AtGAI, OsROC5, OsSPP, OsYSA</i>	[39]
		原生质体、基因枪转化 Protoplasts, Bombardment	水稻、普通小麦 Rice; Common wheat	<i>OsPDS, OsBADH2, Os02g23823, OsMPK2, TaMLO</i>	[15]
	CRISPR/Cas	原生质体、根癌农杆菌 T-DNA(瞬时) Protoplasts, Agrobacterium tumefaciens T-DNA (instantaneous)	拟南芥、烟草、高粱、水稻 Arabidopsis, tobacco, sorghum, rice	<i>AtPDS3, AtRACK1c, NbPDS3, OsSWEET14</i> , Transgenic	[19, 26]
		根癌农杆菌T-DNA(瞬时) Agrobacterium tumefaciens T-DNA (instantaneous)	拟南芥 Arabidopsis	Transgenic, <i>PPO</i>	[40, 41]
			烟草(悬浮培养细胞) Tobacco (suspension culture cells)	<i>CHN50</i> , Transgenic	[12]
	ZFN	DNA复制子 DNA replicon	烟草 Tobacco	转基因 Transgenic	[42]
			拟南芥 Arabidopsis	<i>ADHI</i>	[11]
		原生质体 Protoplasts	烟草 Tobacco	Transgenic, <i>Sura, Surb</i>	[43]
	基因置换 Gene replacement	TALEN	原生质体 Protoplasts	烟草 Tobacco	<i>Sura, Surb</i>
			水稻	<i>PDS</i>	[20]
CRISPR/Cas		原生质体 Protoplasts	烟草 Tobacco	<i>PDS</i>	[19]
		稳定整合 Stable integration	拟南芥 Arabidopsis	<i>ADHI</i>	[44]

续表2 Table 2, continued

DNA修饰的类型 DNA modification type	类型 Type	传送方法 Delivery method	物种 Species	靶序列 Target sequence	参考文献 Reference
控制基因表达 Control of gene expression	ZFN	稳定整合 Stable integration	油菜 Cole	<i>KasII</i>	[45]
		稳定整合 Stable integration	拟南芥 Arabidopsis	<i>RD29A</i> , Transgenic	[46]
	TALEN	根癌农杆菌T-DNA(瞬时) Agrobacterium tumefaciens T-DNA (instantaneous)	烟草 Tobacco	转基因 Transgenic	[47]
		根癌农杆菌T-DNA(瞬时) Agrobacterium tumefaciens T-DNA (instantaneous)	烟草 Tobacco	<i>PDS</i> , Transgenic	[48]
	CRISPR/Cas	根癌农杆菌T-DNA(瞬时) Agrobacterium tumefaciens T-DNA (instantaneous)			

生定点突变^[49]。2010年, Takasu等利用ZFNs使家蚕的*BmBLOS2*基因发生定点突变, 而且这种个体的突变表型变异可以稳定地遗传到下一代^[50]。2012年, Ma等使用TALENs成功破坏家蚕的*BmBLOS2*基因, 突变个体表现出油蚕表型^[51]; 另外, 通过使用两组TALENs切割靶序列的两个位点, 造成了两个位点的中间片段的缺失。同年, Watanabe等使用ZFNs和TALENs两项技术的融合, 定点敲除了蟋蟀 (*Gryllus bimaculatus*) 的*Lac2*基因^[52]; 2012年, Liu等使用TALENs成功敲除了果蝇的*yellow*基因^[53]。2013年, Gratz等使用CRISPR/Cas技术定点敲除了果蝇*yellow*及*rosy*基因, 还成功地实施了多位点编辑, 片段删除, 以及基于同源重组的修复^[54]。2014年, 张圣根等利用TALEN介导的成功敲除家蚕的*BmBlos2*基因, 个体也表现突变性状, 将突变个体提取基因组并进行测序分析, 可观察到缺失、插入突变、单碱基突变等多种突变类型^[55]。以上的相关研究表明ZFN、TALENs和CRISPR/Cas9技术是研究昆虫分子遗传发育的强大武器, 这些技术正在逐步走向成熟, 未来必将大放异彩。

基因组编辑技术也已经用于家畜的改良。2011年, Yu等在牛中利用ZFN敲除了 β 乳球蛋白(*BLG*)基因^[56]。同年, Hauschild等在猪中利用ZFN完成了 $\alpha 1,3$ -半乳糖基因的敲除, 验证了锌指核酸酶技术在家畜中的应用能力^[57]。2012年, Carlsson等在牛和猪的原代细胞中实现了TALEN介导的基因敲除, 可见TALEN在家畜改良中能够发挥作用^[58]。而CRISPR/Cas9在多种模式动物以及人类细胞基因组的研究上都发挥了重大作用。基因组编辑技术可以预期将被应用在各个方面来改良家畜, 比如在生长性状改良、肉质改良以及抗病改良等方面^[9]。

2.3 基因组编辑技术在基因治疗中的应用

由于经典的基因治疗存在一定的安全隐患, ZFNs、TALENs和CRISPR/Cas等工具的出现, 实现了对hESC、iPSC等多种细胞系AAVS1位点和CCR5位点的定点双链断裂DSB和基因敲入^[59-64]。例如: ZFNs被用来修复色素性视网膜炎的视紫红质基因以及修复帕金森病相关基因*SNCA*; 利用TALENs定点修饰VII型胶原蛋白基因*COL7A1*, 治疗大疱性表皮松解症(RDEB); 利用CRISPR/Cas技术靶向小鼠*Cryge*基因3号外显子, 通过正常的基因供体修复突变序列, 治疗小鼠*Cryge*基因突变引起的显性白内障。除了直接敲除或敲入某一基因以外, 基因组编辑技术还可以替换失活的基因, 从而恢复原有基因的功能。在性染色体疾病比如B型血友病、镰刀型细胞贫血病等的基因治疗中发挥举足轻重的作用。此外, 基因组编辑技术在生物制药领域也有应用, 比如在新药研发与筛选细胞模型的建立、细胞水平的糖基化工程、工程细胞的改造与优化等方面。

3 展望

巧夺天工的基因组编辑技术自出现以来就受到广泛关注, 已用于生命科学研究各个领域, 成为功能基因组学以及基因治疗的重要工具。基因组编辑技术与传统的遗传操作技术相比有很大的优势, 但要真正大规模地应用还存在着一些问题: (1) 利用基因组编辑获得的植物材料与与常规方法一样也是使基因组中出现部分的碱基的添加、缺失或替换, 因此, 分子检测无法分辨基因组编辑获得的植物突变体与常规突变体; (2) 基因组编辑技术也有可能产生脱靶效应; (3) ZFNs构建时间长、TALE蛋白的编码序列过长, CRISPR/Cas系统对PAM序列的依赖性大等问题。然而, 更多的工作需要做的是简化基因组编辑, 使其应用发展范围更广泛^[65]。因此, 进一步改进人工核酸酶和供体DNA传递的方法, 提高在特定的细胞类型和位点的核酸酶活性, 增加核酸酶的特异性和降低毒性, 这都是需要亟待解决的问题。

尽管基因组编辑技术目前还存在着种种不足, 但随着分子生物学的不断发展及新的实验方法的不断涌现, 这些新技术将不断发展与成熟, 如可以通过靶位点选择、优化*FokI*切割结构域、改造sgRNA和优化核酸酶的表达水平等方式来减少脱靶效应, 由单臂TALE识别蛋白融合归巢核酸酶I-TevI或二聚化*FokI*酶组成新型的TALEN解决载体量大的问题。基因组编辑技术在不断发展和完善, 应用也愈来愈广, 如通过定点敲入/敲除基因将实现对益虫的利用和害虫的防治以及动、植物产量和品质的改良; 通过对基因组特定序列的编辑, 将为基因治疗带来新希望; 将基因组编辑技术与iPS等干细胞技术相结合, 将使医学发生新变化。

与转基因技术相比, 植物基因组编辑技术对基因组特定靶位点的原位编辑, 精准性和安全性更高, 但是该技术需要将sgRNA基因和RNA靶向内切酶CRISPR-Cas9基因导入植物细胞。在基因组编辑完成后, 这两个基因就成为多余, 并可能影响植物细胞的正常代谢并易引发转基因安全性问题。利用有性繁殖过程中的遗传分离或利用同源重组删除系统剔除基因比较费时、费力, 对于无性繁殖植物更是难以实现。作者所在实验室正在构建侵染性植物病毒克隆, 将sgRNA基因和RNA靶向内切酶CRISPR-Cas9基因整合到病毒载体上, 通过人工接种使重组病毒携带的基因在植物细胞中表达, 实现对基因组特定靶位点的编辑。编辑完成之后剔除病毒, 也将同时剔除其所载的基因, 建立一种新型的基因组无痕编辑技术平台, 使基因组编辑用于植物遗传改良更为简约和安全。

参考文献 [References]

- 1 谢科, 饶力群, 李红伟, 安学丽, 方才臣, 万向元. 基因组编辑技术在植物中的研究进展与应用前景[J]. 中国生物工程杂志, 2013, **33** (6): 99-104 [Xie K, Rao LQ, Li HW, An XL, Fang CC, Wan XY. Research progress and application prospect of genome editing technology in plants [J]. *Chin J Biol Eng*, 2013, **33** (6): 99-104]
- 2 程曦, 王文义, 邱金龙. 基因组编辑: 植物生物技术的机遇与挑战[J]. 生物技术通报, 2015, **31** (4): 25-33 [Cheng X, Wang WY, Qiu JL. Genome editing: opportunities and challenges in plant biotechnology [J]. 2015, **31** (4): 25-33]
- 3 魏景亮, 吴添文, 阮进学, 牟玉莲. 基因组编辑技术改良家畜的研究进展[J]. 中国农业科技导报, 2014, **16** (1): 32-38 [Wei JL, Wu, TW, Ruan JX, Mou, YL. Research progress of improving livestock by genome editing technology [J]. 2014, **16** (1): 32-38]
- 4 Moscou MJ, Bogdanove AJ. A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors [J]. *Science*, 2009, **326** (5959): 1501-1501
- 5 Sapranas R, Gasiunas G, Fremaux C, Barrangou R, Horvath P, Siksnys V. The *Streptococcus thermophilus* CRISPR/Cas system provides immunity in *Escherichia coli* [J]. *Nucleic Acids Res*, 2011, **39** (21): 9275-9282
- 6 Lloyd A, Plaisier CL, Carroll D, Drews GN. Targeted mutagenesis using zinc-finger nucleases in *Arabidopsis* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, **102**: 2232-2237
- 7 Shukla VK, Doyon Y, Miller JC, DeKolver RC. Precise genome modification in the crop species *Zea mays* using zinc-finger nucleases[J]. *Nature*, 2009, **459** (7245): 437-441
- 8 Zhang F, Maeder ML, Unger-Wallace E, Hoshaw JP, Reyon D, Christian M, Li X, Pierick CJ, Dobbs D, Peterson T, Joung JK, Voytas DF. High frequency targeted mutagenesis in *Arabidopsis thaliana* using zinc finger nucleases [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, **107**: 12028-12033
- 9 Osakabe K, Osakabe Y, Toki S. Site-directed mutagenesis in *Arabidopsis* using custom-designed zinc finger nucleases [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, **107** (26): 12034-12039
- 10 Curtin SJ, Zhang F, Sander JD, Haun WJ, Starker C, Baltes N, Reyon D, Dahlborg EJ, Goodwin MJ, Coffman AP, Dobbs D, Joung JK, Voytas DF, Stupar RM. Targeted mutagenesis of duplicated genes in soybean with zinc-finger nucleases [J]. *Plant Physiol*, 2011, **156** (2): 466-473
- 11 Qi YP, Li XH, Zhang Y, Starker CG, Baltes NJ, Zhang F, Sander JD, Reyon D, Joung JK, Voytas DF. Targeted deletion and inversion of tandemly arrayed genes in *Arabidopsis thaliana* using zinc finger nucleases [J]. *G3(Bethesda)*, 2013, **3** (10): 1707-1715.
- 12 Cai CQ, Doyon Y, Ainley WM, Miller JC, Dekelver RC, Moehle EA. Targeted transgene integration in plant cells using designed zinc finger nucleases [J]. *Plant Mol Biol*, 2009, **69** (6): 699-709
- 13 张金脉, 任兆瑞. TALENs: 一种新的基因定点修饰技术[J]. 生命科学, 2013, **25** (12): 126-132 [Zhang JM, Ren ZR. TALENs: a novel gene site directed modification technique [J]. *Life Sci*, 2013, **25** (12): 126-132]
- 14 Li T, Liu B, Spalding MH, Weeks DP, Yang B. High-efficiency TALEN-based gene editing produces disease-resistant rice [J]. *Nat Biotechnol*, 2012, **30**: 390-392
- 15 Shan QW, Wang YP, Chen KL, Liang Z, Li J, Zhang Y, Zhang K, Liu JX, Voytas DF, Zheng XL, Zhang Y, Gao CX. Rapid and efficient gene modification in rice and *Brachypodium* using TALENs [J]. *Mol Plant*, 2013, **6** (4): 1365-1368
- 16 Haun W, Coffman A, Clasen BM, Demorest ZL, Lowy A, Ray E, Retterath A, Stoddard T, Juillerat A, Cedrone F, Mathis L, Voytas DF, Zhang F. Improved soybean oil quality by targeted mutagenesis of the fatty acid desaturase 2 gene family [J]. *Plant Biotechnol J*, 2014, **12** (7): 934-940
- 17 Liang Z, Zhang K, Chen K, Gao C. Targeted mutagenesis in *Zea mays* using TALENs and the CRISPR/Cas system [J]. *J Genet Genom*, 2014, **41** (2): 63-68
- 18 Wang Y, Cheng X, Shan Q, Zhang Y, Liu J, Gao C, Qiu J. Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew [J]. *Nat Biotechnol*, 2014, **32** (9): 947-951
- 19 Li JF, Norville JE, Aach J, McCormack M, Zhang D, Bush J, Church GM, Sheen J. Multiplex and homologous recombination-mediated genome editing in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana* using guide RNA and Cas9 [J]. *Nat Biotechnol*, 2013, **31** (8): 688-691
- 20 Shan Q, Wang Y, Li J, Zhang Y, Chen KL, Liang Z, Zhang K, Liu JX, Xi JJ, Qiu JL, Gao CX. Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system [J]. *Nat Biotechnol*, 2013, **31** (8): 686-688
- 21 Mao Y, Zhang H, Xu N, Zhang B, Gou F, Zhu JK. Application of the CRISPR-Cas system for efficient genome engineering in plants [J]. *Mol Plant*, 2013, **6** (6): 2008-2011
- 22 Brooks C, Nekrasov V, Lippman ZB, Van Eck J. Efficient gene editing in tomato in the first generation using the clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated9 system [J]. *Plant Physiol*, 2014, **166** (3): 1292-1297
- 23 Sugano SS, Shirakawa M, Takagi J, Matsuda Y, Shimada T, Hara-Nishimura I, Kohchi T. CRISPR/Cas9 mediated targeted mutagenesis in the liverwort *Marchantia polymorpha* L. [J]. *Plant Cell Physiol*, 2014, **55** (3): 475-481
- 24 Xing HL, Dong L, Wang ZP, Zhang HY, Han CY, Liu B, Chen QJ. A CRISPR/Cas9 toolkit for multiplex genome editing in plants [J]. *BMC Plant Biol*, 2014, **14**: 327
- 25 Xie K, Minkenberg B, Yang Y. Boosting CRISPR/Cas9 multiplex editing capability with the endogenous tRNA-processing system [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, **112** (11): 3570-3575
- 26 Liu W, Rudis MR, Peng Y, Mazarei M, Millwood RJ, Yang JP, Xu W. Synthetic TAL effectors for targeted enhancement of transgene expression in plants [J]. *Plant Biotechnol J*, 2013, **12** (4): 436-446
- 27 Ainley WM, Sastry-Dent L, Welter ME, Murray MG, Petolino JF. Trait stacking via targeted genome editing. [J]. *Plant Biotechnol J*, 2013, **11** (9): 1126-1134
- 28 Even-Faitelson L, Samach A, Melamed-Bessudo C, Avivi-Ragolsk N, Levy A. Localized egg-cell expression of effector proteins for targeted modification of the *Arabidopsis* genome [J]. *Plant J*, 2011, **68** (5): 929-937
- 29 Marton I, Zuker A, Shklarman E, Zeevi V, Tovkach A, Roffe S, Ovadis M, Tzfira T, Vainstein A. Nontransgenic genome modification in plant cells [J]. *Plant Physiol*, 2010, **154** (3): 1079-1087
- 30 Tovkach A, Zeevi V, Tzfira T, Tzfira T, Univ Michigan, Dept Mol Cellular, Dev Biol. A toolbox and procedural notes for characterizing novel zinc finger nucleases for genome editing in plant cells [J]. *Plant J*, 2009, **57** (4): 747-757
- 31 Gurushidze M, Hensel G, Hiekel S, Schedel S, Valkov V, Kumlehn J. True-breeding targeted gene knock-out in barley using designer TALE-nuclease in haploid cells [J]. *PLoS ONE*, 2014, **9** (3): e92046
- 32 Christian M, Qi Y, Zhang Y, Voytas DF. Targeted mutagenesis of *Arabidopsis thaliana* using engineered TAL effector nucleases [J]. *G3 (Bethesda)*, 2013, **3** (10): 1697-1705
- 33 Wendt T, Holm P, Starker CG, Christian M, Voytas DF, Holme I. TAL effector nucleases induce mutations at a pre-selected location in the genome of primary barley transformants [J]. *Plant Mol Biol*, 2013, **83** (3): 279-285
- 34 Feng Z, Mao Y, Xu N, Zhang BT, Wei PL, Yang DL, Wang Z, Zhang ZJ, Zheng R, Yang L, Zeng L, Liu XD, Zhu JK. Multigeneration analysis

- reveals the inheritance, specificity, and patterns of CRISPR/Cas-induced gene modifications in *Arabidopsis* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, **111** (12): 4632-4637
- 35 Fauser F, Schml S, Puchta H. Both CRISPR/Cas-based nucleases and nickases can be used efficiently for genome engineering in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant J*, 2014, **79** (2): 348-359
 - 36 Jiang W, Yang B, Weeks DP. Efficient CRISPR/Cas9-mediated gene editing in *Arabidopsis thaliana* and inheritance of modified genes in the T2 and T3 generations [J]. *PLoS ONE*, 2014, 9: e99225
 - 37 Zhou H, Liu B, Weeks DP, Spalding MH, Yang B. Large chromosomal deletions and heritable small genetic changes induced by CRISPR/Cas9 in rice [J]. *Nucleic Acids Res*, 2014, **42** (17): 10903-10914
 - 38 Zhang H, Zhang J, Wei P, Zhang B, Gou F, Feng Z, Mao Y, Yang L, Zhang H, Xu N, Zhu J. The CRISPR/Cas9 system produces specific and homozygous targeted gene editing in rice in one generation [J]. *Plant Biotechnol J*, 2014, **12** (6): 797-807
 - 39 Feng Z, Zhang B, Ding W, Liu X, Yang D, Wei P, Cao F, Zhu S, Zhang F, Mao Y, Zhu J. Efficient genome editing in plants using a CRISPR/Cas system [J]. *Cell Res*, 2013, **23** (10): 1229-1232
 - 40 De Pater S, Neuteboom LW, Pinas JE. ZFN-induced mutagenesis and gene-targeting in *Arabidopsis* through *Agrobacterium*-mediated floral dip transformation [J]. *Plant Biotechnol J*, 2009, **7** (8): 821-835
 - 41 De Pater S, Pinas JE, Hooykaas PJ, van der Zaai BJ. ZFN-mediated gene targeting of the *Arabidopsis* protoporphyrinogen oxidase gene through *Agrobacterium*-mediated floral dip transformation [J]. *Plant Biotechnol J*, 2013, **11** (4): 510-515
 - 42 Baltes NJ, Gil-Humanes J, Cermak T, Atkins PA, Voytas DF. DNA replicons for plant genome engineering [J]. *Plant Cell*, 2015, **26** (1): 151-163
 - 43 Wright DA, Townsend JA, Winfrey RJ, Irwin PA, Rajagopal J, Lonosky P. High-frequency homologous recombination in plants mediated by zinc-finger nucleases [J]. *Plant J*, 2005, **44** (4): 693-705
 - 44 Schiml S, Fauer F, Holger P. The CRISPR/Cas system can be used as nuclease for in planta gene targeting and as paired nickases for directed mutagenesis in *Arabidopsis* resulting in heritable progeny [J]. *Plant J*, 2014, **80** (6): 1139-1150
 - 45 Gupta M, Dekelver RC, Palta A, Clifford C, Gopalan S, Miller JC, Novak S, Desloover D, Gachotte D, Connell J, Flook J, Patterson T, Robbins K, Rebar EJ, Gregory PD, Urnov FD, Petolino JF. Transcriptional activation of *Brassica napus* b-ketoacyl-ACP synthase II with an engineered zinc finger protein transcription factor [J]. *Plant Biotechnol J*, 2012, **10** (7): 783-791
 - 46 Mahfouz MM, Li L, Piatek M, Fang XY, Mansour H, Bangarusamy DK, Zhu JK. Targeted transcriptional repression using a chimeric TALE-SRDX repressor protein [J]. *Plant Mol Biol*, 2012, **78** (3): 311-321
 - 47 Geissler R, Scholze H, Hahn S, Streubel J, Bonas U, Behrens SE, Boch J. Transcriptional activators of human genes with programmable DNA-specificity [J]. *PLoS ONE*, 2011, **6** (5): e19509
 - 48 Piatek A, Ali Z, Baazim H, Baazim H, Li L, Abulfaraj A, Shareef SA, Aouida M. RNA - guided transcriptional regulation in planta via synthetic dCas9 - based transcription factors [J]. *Plant Biotechnol J*, 2014, **13** (4): 578-589
 - 49 Bibikova M, Golic M, Golic KG. Targeted chromosomal cleavage and mutagenesis in *Drosophila* using zinc-finger nucleases [J]. *Genetics*, 2002, **161**: 1169-1175
 - 50 Takasu Y, Kobayashi I, Beumer K, Uchino K, Sezutsu H, Sajwan S, Carroll D, Tamura T, Zurovec M. Targeted mutagenesis in the silkworm *Bombyx mori* using zinc finger nuclease mRNA injection [J]. *Insect Biochem Mol Biol*, 2010, **40**: 759-765
 - 51 Ma SY, Zhang SL, Wang F, Liu YY, Xu HF, Liu C, Lin Y, Zhao P, Xia QY. Highly efficient and specific genome editing in silkworm using custom TALENs [J]. *PLoS ONE*, 2012, **7**: e45035
 - 52 Watanabe T, Ochiai H, Sakuma T, Horsch HW, Hamaguchi N, Nakamura T, Bando T, Mito, T. Non-transgenic genome modifications in a hemimetabolous insect using zinc-finger and TAL effector nucleases [J]. *Nat Commun*, 2012, **3**: 1017
 - 53 Liu J, Li C, Yu Z, Huang P, Wu H, Wei C, Zhu N, Shen Y, Chen Y, Zhang B, Deng W. Efficient and specific modifications of the *Drosophila* genome by means of an easy TALEN strategy [J]. *J Genet Genomics*, 2012, **39**: 209-215
 - 54 Gratz SJ, Cummings AM, Nguyen JN, Hamm DC, Donohu Lk. Genome engineering of *Drosophila* with the CRISPR RNA-guided Cas9 nuclease [J]. *Genetics*, 2013, **194**: 1029-1035
 - 55 张圣禄. TALEN介导的家蚕基因组编辑研究[D]. 重庆: 西南大学, 2015 [Zhang SL. Study on TALEN mediated genome editing in silkworm [D]. Chongqing, Southwestern University, 2015]
 - 56 Yu S, Luo J, Song Z, Ding F, Dai Y, Li N. Highly efficient modification of beta-lactoglobulin (*BLG*) gene via zinc-finger nuclease in cattle [J]. *Cell Res*, 2011, **21** (11): 1638-1640
 - 57 Hauschild J, Petersen B, Santiago Y, Queisser AL, Carnwath JW, Hahn AL, Zhang L, Meng X, Gregory PD, Schwinzer R, Cost GJ, Niemann H. Efficient generation of a biallelic knockout in pigs using zinc-finger nucleases [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, **108** (29): 12013-12017
 - 58 Carlson DF, Tan W, Lillico SG. Efficient TALEN-mediated gene knockout in livestock [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, **109** (43): 17382-17387
 - 59 Perez EE, Wang J, Miller JC, Jouvenot Y, Kim KA, Liu O, Wang N, Lee G, Bartsevich VV, Lee YL, Guschin DY, Rupniewski I, Waite AJ, Carpenito C, Carroll RG, Orange JS, Urnov FD, Rebar EJ, Ando D, Gregory PD, Riley JL, Holmes MC, June CH. Establishment of HIV-1 resistance in CD4 T cell by genome editing using zinc-finger nucleases [J]. *Nat Biotechnol*, 2008, **26** (7): 808-816
 - 60 Holt N, Wang J, Kim K, Hriedman G, Wang X, Taupin V, Cannon PM. Human hematopoietic stem/progenitor cells modified by zinc-finger nucleases targeted to CCR5 control HIV-1 in viro [J]. *Nat Biotechnol*, 2010, **28** (8): 839-847
 - 61 Mussolino C, Morbizer R, Lutge F, Dannemann N, Lahaye T, Cathomen T. A novel TALE nuclease scaffold enables high genome editing activity in combination with low toxicity [J]. *Nat Methods*, 2012, **9** (8): 805-807
 - 62 Sebastiano V, Maeder ML, Angstman JF, Haddad B, Khayter C, Yeo DT, Goodwin MJ, Hawkins J, Ramirez CL, Batista LFZ, Artandi SE, Wernig M, Joung JK. In situ genetic correction of the sickle cell anemia mutation in human induced pluripotent stem cells using engineered zinc finger nucleases [J]. *Stem Cells*, 2011, **29** (11): 1717-1726
 - 63 An MC, Zhang N, Scott G, Montoro D, Wittkop T, Mooney S, Melov S, Ellerby LM. Genetic correction of huntingtons disease phenotypes in induced pluripotent stem cells [J]. *Stem Cells*, 2012, **11** (2): 253-263
 - 64 Greenwald DL, Cashm an SM, Kumar-Singh R. Engineered zinc finger nuclease-mediated homologous recombination of the human rhodopsin gene [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2010, **51** (12): 6374-6380
 - 65 张然, 田滋, 高向东, 姚文兵. 新一代基因组编辑技术在基因治疗及生物制药领域中的应用[J]. 中国药科大学学报, 2014, **45** (3): 501-510 [Zhang R, Tian H, Gao XD, Yao WB. Application of new generation genome editing technology in gene therapy and biological pharmacy [J]. *J China Med Univ*, 2014, **45** (3): 501-510]