CRISPR/Cas工具的开发和应用

方凯伦, 杨辉*

中国科学院上海生命科学研究院神经科学研究所, 神经科学国家重点实验室, 中国科学院灵长类神经生物学重点实验室, 中国科学院脑科学卓越创新中心, 上海脑科学与类脑研究中心, 上海 200031

* 联系人, E-mail: huiyang@ion.ac.cn

2019-12-06 收稿, 2020-01-31 修回, 2020-01-31 接受, 2020-02-11 网络版发表

国家自然科学基金(31871502)资助

摘要 CRISPR/Cas系统是细菌、古菌抵抗外源DNA或RNA入侵的免疫系统, 细菌和古菌通过crRNA和Cas蛋白识别靶标DNA或RNA, 并切割这些外源入侵核酸。目前, CRISPR/Cas系统已广泛应用于基因编辑领域, 多种Cas蛋白的发现拓宽了CRISPR/Cas编辑基因的范围。如Cas9和Cas12可在基因组上靶向插入或删除DNA序列; Cas13和RCas9可靶向切割RNA。另外, 多种Cas衍生工具的开发让CRISPR/Cas系统发挥更多的功能。如基因编辑方面, 通过base editor可进行DNA单碱基编辑, 通过prime editor可进行DNA单碱基编辑和小片段插入缺失; 如基因表达调控方面, 通过CRISPRa和CRISPRi可以激活或抑制基因RNA表达。同时, CRISPR/Cas系统还广泛应用于功能基因遗传筛选、基因检测、活体成像、细胞谱系示踪等多个领域。随着CRISPR/Cas基因编辑工具的不断开发, 将不断促进科学研究进展, 并有望通过CRISPR/Cas介导的基因治疗为患者带来福音。

关键词 基因编辑, 基因治疗, CRISPR/Cas, Cas9

基因编辑是研究基因功能的重要手段。通过基因编辑使某个基因过表达或失活, 影响细胞状态, 由此研究基因功能。自1971年Danna和Nathans^[1]第一次使用核酸内切酶(endonuclease) R切割SV40 DNA以来, 基因编辑已有近50年历史, 大量工具酶被开发应用于基因编辑, 如巨核酸酶^[2](meganuclease)、1996年开发的ZFNs^[3](zinc finger nucleases, 锌指核糖核酸酶)、2010年开发的TALENs^[4](transcription activator-like effector nucleases, 转录激活因子样效应物核酸酶)和2012年开发的CRISPR/Cas系统^[5,6](clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated genes, 规律间隔成簇短回文重复序列及相关基因)。巨核酸酶识别的DNA序列极为有限, 应用范围小。ZFNs和TALENs利用蛋白质模块识别DNA序列并进行切割, 然而构建识别DNA序列的蛋白质模块耗时耗力, 操作难度较大,

切割效率又低, 限制了ZFNs和TALENs的广泛应用。CRISPR/Cas技术基于核苷酸的碱基互补识别DNA或RNA进行切割^[7], 实验操作简便, 成为目前使用最广泛的基因编辑技术。

CRISPR/Cas系统是细菌、古菌抵抗外源DNA或RNA入侵的获得性免疫系统。外源基因入侵细菌时, 细菌抓取外源基因, 切割成一定长度的spacer插入到自身基因组的CRISPR array中, 形成对入侵者的记忆。CRISPR array转录出带有spacer序列的crRNA(CRISPR RNA), 这些crRNA与Cas组成复合体, 像侦察兵一样寻找是否有和自己匹配的入侵者序列。一旦外源基因再次入侵, crRNA/Cas蛋白复合体匹配到入侵基因上进行切割, 消除外源基因^[8]。

CRISPR/Cas的切割系统包含两部分, crRNA和效应蛋白内切酶Cas。crRNA通过碱基互补配对识别靶标

引用格式: 方凯伦, 杨辉. CRISPR/Cas工具的开发和应用. 科学通报, 2020, 65: 973-990

Fang K L, Yang H. Advances and applications of CRISPR/Cas toolbox (in Chinese). Chin Sci Bull, 2020, 65: 973-990, doi: [10.1360/TB-2019-0806](https://doi.org/10.1360/TB-2019-0806)

DNA/RNA, 效应蛋白Cas切割靶标序列. 只要提供这两部分, 就能完成特定序列基因切割.

根据效应蛋白数量的不同, CRISPR/Cas系统被分为两大类. Class I包括多个效应蛋白, Class II包含单个效应蛋白^[9]. 由于单个效应蛋白更适合应用, 目前常用Class II CRISPR/Cas系统进行基因编辑工具开发和改造, 由此衍生出大量CRISPR/Cas基因编辑工具酶. 本文将对Class II各类型CRISPR/Cas常用基因编辑工具酶及其应用进行介绍.

1 CRISPR/Cas系统常用基因编辑工具酶

1.1 CRISPR/Cas9系统

Cas9属于Class II Type II CRISPR/Cas系统, 是目前最常用的基因编辑工具. 其中*Streptococcus pyogenes* Cas9(SpCas9)是第一个应用于哺乳动物基因编辑的Cas蛋白^[10,11]. 以SpCas9介导的DNA切割为例, SpCas9、crRNA和tracrRNA(trans-acting CRISPR RNA, 反式作用CRISPR RNA)三者构成蛋白复合体. 首先识别基因组上的5'-NGG PAM序列, 当PAM序列5'上游有20 nt的靶标DNA与crRNA碱基互补结合后, SpCas9改变构象, 利用RuvC和HNH结构域切割PAM序列5'上游3个碱基处的dsDNA(double strand DNA, 双链DNA), 产生平末端的DNA双链断裂(double strand Breaks, DSBs)^[12,13]. CRISPR/SpCas9系统改造为基因编辑工具后, 将crRNA和tracrRNA融合在一条gRNA(guide RNA)上, 利用gRNA识别靶标DNA(图1). 为了提升Cas9在基因编辑的应用价值, 做了如下优化.

(i) 扩大Cas9可靶向序列的范围. 由于5'-NGG的PAM序列限制, SpCas9只能对1/16的基因区域进行编辑. 为了扩大基因编辑区域, 多个研究组通过SpCas9同源序列比对, 在不同物种中找到识别不同PAM序列的Cas9蛋白. 如*Streptococcus thermophilus* Cas9(StCas9)识别PAM序列为5'-NNAGAAW的靶向DNA^[14]; *Neisseria meningitidis* Cas9(NmCas9)识别PAM序列为5'-NNNGATT的靶向DNA^[15,16]; *Staphylococcus aureus* Cas9(SaCas9)识别PAM序列为5'-NNGRRT的靶向DNA^[17]. 多种类型Cas9的发现, 扩大了Cas9可靶向切割的序列范围. 同时, Kleinstiver等人^[18]利用SpCas9的蛋白结构和蛋白定向进化, 开发出VQR、EQR和VRER三个突变版本的SpCas9, 可以分别识别带有5'-NGA、NGAG和NGCG PAM序列的靶DNA. Nishimasu等人^[19]

根据蛋白结构对SpCas9进行7个氨基酸突变, 开发出SpCas9-NG, 可以识别带有5'-NG的靶标DNA. Hu等人^[20]通过蛋白进化将SpCas9突变为xCas9, 可以识别带有5'-NG、5'-GAA和5'-GAT PAM序列的靶DNA, 编辑更多类型的基因序列.

(ii) 减少脱靶. 为了减少Cas9脱靶, 目前开发了多种Cas9突变体. Cas9突变体的开发方法主要有两种. 一种基于蛋白结构改造Cas9. 由于Cas9的HNH/RuvC结构域凹槽处带正电氨基酸与非靶标DNA链(non-target strand)带负电的磷酸骨架非特异结合, 导致Cas9结合并切割非特异DNA. Slaymaker等人^[21]突变了HNH/RuvC凹槽处多个氨基酸, 降低Cas9与非靶标DNA单链的结合力, 开发出eSpCas9. Kleinstiver等人^[22]突变SpCas9的N497A/R661A/Q695A/Q926A, 降低了Cas9与靶标DNA链(target strand)磷酸骨架的非特异结合力, 开发出SpCas9-HF1. Kulcsár等人^[23]对eSpCas9和SpCas9-HF1的氨基酸突变组合优化, 开发出HeFSpCas9. Chen等人^[24,25]突变了REC3结构域的4个氨基酸(N692A/M694A/Q695A/H698A), 使Cas9的HNH结构域遇到非特异结合DNA时无法变构切割, 减少Cas9脱靶效应, 开发出HypaCas9.

同时, 另一些研究通过蛋白定向进化, 筛选出低脱靶效应的Cas9. 如Casini等人^[26]通过酵母的遗传筛选, 得到REC3结构域带有4个点突变的evoCas9, evoCas9的脱靶效应比eSpCas9和SpCas9-HF1更低. Hu等人^[20]通过噬菌体介导的连续进化(phage-assisted continuous evolution, PACE), 得到带有7个点突变的高保真xCas9(3.7). 也有研究向大肠杆菌转入带突变的SpCas9文库, 筛选到低脱靶的SniperCas9^[27]和HiFi Cas9^[28]. 除了改变Cas9外, 改变gRNA的骨架序列, 也能减弱gRNA和非特异性DNA的结合力, 以此减少Cas9脱靶^[29]. 这些高保真Cas9-gRNA系统降低了脱靶效应, 使Cas9在应用时更精准有效.

除了对Cas9进行突变外, Cas9单切口酶(Cas9 nickase, nCas9)的组合应用也能进一步降低脱靶. 两个sgRNA引导nCas9在dsDNA的两条DNA上各产生一个切口, 可以产生DNA双链断裂. 一条sgRNA只能特异识别20碱基的DNA序列, 一对sgRNA可特异识别40碱基的序列, 使用一对sgRNA引导nCas9进行切割, 使Cas9的脱靶效应大大降低^[30].

(iii) 减少Cas9大小. 由于使用CRISPR/Cas进行基因治疗时, 往往通过AAV(adeno-associated virus)包装

图 1 (网络版彩色)CRISPR/Cas相关工具的类型及应用
Figure 1 (Color online) Types and applications of CRISPR/Cas-based tools

Cas9和gRNA, 将CRISPR/Cas系统递送到细胞中. AAV可装载的DNA片段大小有限, 装载量只有4.5 kb左右, SpCas9的DNA约4.2 kb, 无法和gRNA同时包装入一个AAV^[31], 为此需要寻找更小的Cas9. 目前, 通过同源序列比对找到了SaCas9(1053aa)^[17]、CjCas9(984aa)^[32]等Cas9, 它们更适合和gRNA包装进一个AAV, 有助于Cas9广泛应用于医疗领域.

另外, 内含肽介导的Cas9系统也可以解决Cas9太大无法包装入AAV的问题. 可将Cas9分成两个AAV包装, 每个AAV只表达一部分Cas9. 每部分Cas9上有内含肽, 两个AAV在细胞共表达时, 通过内含肽介导的反式剪接, 将各部分Cas9重新连接为一个完整的Cas9发挥功能^[33]. 另一种思路叫作分离型Cas9(split-Cas9), 将Cas9的核酸内切酶活性区域和 α -helix区域分别表达成两个蛋白, 通过sgRNA将两部分连在一起, 拼成Cas9发挥功能^[34].

以上不同类型Cas9基因编辑工具特性, 已列举在表1.

1.2 CRISPR/Cas12系统

(i) AsCas12a(AsCpf1). Cas12a属于Class II Type

V CRISPR/Cas系统. *Acidaminococcus* spp. Cas12a(As-Cas12a)在crRNA或gRNA引导下, 利用RuvC和Nuc结构域切割5'-TTTV下游靶标DNA序列(图1), 产生带有黏性末端的DNA双链断裂^[35]. 为了扩大Cas12a可靶向序列的范围, 提高结合切割效率, Kleinstiver等人^[36]开发出enAsCas12a(enhanced AsCas12a), 它的PAM序列扩大到5'-VTTV、5'-TTTT、5'-TTCN和5'-TATV, 可编辑的基因序列范围更广.

(ii) Cas12b(C2c1). 同家族的Cas12b, 也具有DNA切割活性, 但在37°C时切割活性有限. 如*Alicyclobacillus acidoterrestris* Cas12b(AacCas12b), 最适切割温度是48°C, 不适合哺乳动物细胞的基因编辑^[37]. 最近发现的*Bacillus hisashii* Cas12b(BhCas12b)具有37°C的DNA切割活性, 但更倾向于非特异切割dsDNA并造成单切口. 通过结构分析改造, 去除BhCas12b的非特异dsDNA单切口酶活性后, BhCas12b目前可在37°C时特异切割靶标dsDNA^[38].

1.3 CRISPR/Cas13系统

(i) Cas13a(C2c2). Cas13a属于Class II Type VI

表1 各类Cas9系统的特性

Table 1 Characteristics of various types of CRISPR/Cas9 systems

Cas9改造目标	Cas9名称	Cas9蛋白背景	PAM序列	改造方案	文献
原版SpCas9	SpCas9	<i>Streptococcus pyogenes</i> Cas9	NGG	原版SpCas9	[5,6]
改变PAM序列	VQR-SpCas9	<i>Streptococcus pyogenes</i> Cas9	NGA	D1135V/R1335Q/T1337R	[18]
改变PAM序列	EQR-SpCas9	<i>Streptococcus pyogenes</i> Cas9	NGAG	D1135E/R1335Q/T1337R	[18]
改变PAM序列	VRER-SpCas9	<i>Streptococcus pyogenes</i> Cas9	NGCG	D1135V/G1218R/R1335E/T1337R	[18]
改变PAM序列	xCas9(3.7)	<i>Streptococcus pyogenes</i> Cas9	NG/GAA/GAT	A262T/R324L/S409I/E480K/E543D/M694I/E1219V	[20]
改变PAM序列	SpCas9-NG	<i>Streptococcus pyogenes</i> Cas9	NG	R1335A/L1111R/D1135V/G1218R/E1219F/A1322R/T1337R	[19]
改变PAM序列	StCas9	<i>Streptococcus thermophiles</i> Cas9	NNAGAAW	原版StCas9	[14]
改变PAM序列	NmCas9	<i>Neisseria meningitidis</i> Cas9	NNNNGMTT	原版NmCas9	[15,16]
减少DNA脱靶效应	SpCas9-HF1	<i>Streptococcus pyogenes</i> Cas9	NGG	N497A/R661A/Q695A/Q926A	[22]
减少DNA脱靶效应	eSpCas9	<i>Streptococcus pyogenes</i> Cas9	NGG	K848A/K1003A/R1060A	[21]
减少DNA脱靶效应	HeFSpCas9	<i>Streptococcus pyogenes</i> Cas9	NGG	N497A/R661A/Q695A/K848A/Q926A/K1003A/R1060A	[23]
减少DNA脱靶效应	EvoSpCas9	<i>Streptococcus pyogenes</i> Cas9	NGG	M495V/Y515N/K526E/R661Q	[26]
减少DNA脱靶效应	HypaCas9	<i>Streptococcus pyogenes</i> Cas9	NGG	N692A/M694A/Q695A/H698A	[24]
减少DNA脱靶效应	Sniper-Cas9	<i>Streptococcus pyogenes</i> Cas9	NGG	F539S/M763I/K890N	[27]
缩小蛋白大小	CjCas9	<i>Campylobacter jejuni</i> Cas9	NNNNRYAC	原版CjCas9	[32]
缩小蛋白大小	SaCas9	<i>Staphylococcus aureus</i> Cas9	NNGRRT	原版SaCas9	[17]
缩小蛋白大小	SaKKHCas9	<i>Staphylococcus aureus</i> Cas9	NNNRRT	E782K/N968K/R1015H	[18]

CRISPR/Cas系统, Cas13a识别3'-H的PFS(protospacer flanking site)序列后切割ssRNA(图1)。但部分Cas13, 如 *Leptotrichia wadei* Cas13a(LwCas13a)不需要识别PFS序列即可切割ssRNA^[39,40]。同时, Cas13a在gRNA帮助下结合靶标ssRNA后蛋白构象变化, 不仅会切割靶标ssRNA, 也会非特异性切割蛋白附近所有ssRNA, 该特性被应用于ssRNA的基因检测^[41]。

(ii) Cas13b. Cas13b识别3'-NAN/NNNA或5'-D的PFS序列后, 也可以切割ssRNA^[42]。但部分Cas13b, 如 *Prevotella* sp. Cas13b(PspCas13b)不需要识别PFS序列即可切割ssRNA^[43], 有更广泛的应用价值。

(iii) Cas13d(CasRx). Cas13d无需PFS序列, 并具有激活后非特异切割ssRNA的活性^[44,45]。

1.4 RCas9系统

SpCas9和gRNA只能切割dsDNA, 然而给SpCas9提供一段含有PAM序列的寡核苷酸(PAMmer), SpCas9能结合并切割RNA, 这类可切割RNA的Cas9叫作RCas9^[46]。Cas9家族的一些同源蛋白, 如SaCas9和CjCas9, 除了能切割DNA外, 也能不依赖PAMmer切割ssRNA^[47]。

2 通过CRISPR/Cas系统进行基因编辑和相关应用

2.1 NHEJ介导的基因敲除和相关应用

非同源末端连接(non-homologous end joining, NHEJ)是细胞产生DNA双链断裂后, 在不依赖DNA同源性的情况下, 将两个DNA断端连接在一起的DNA修复机制^[48]。细胞中大部分DNA双链断裂都利用NHEJ进行修复^[49]。使用CRISPR/Cas系统切割基因外显子产生DNA双链断裂后, 通过NHEJ修复拼接DNA末端时, 极易发生小片段插入或缺失(small insertions or deletions, indels), 导致基因外显子移码突变, 提前产生终止密码子, 无法翻译出正常蛋白质, 由此敲除基因^[48]。

(i) 大片段敲除. 在同一染色体上使用多个gRNA切割时, 会通过NHEJ拼接相隔较远的DNA末端导致DNA大片段缺失。通过该思路可敲除染色质某个区域, 由此研究某一染色体区段功能^[50]; 或是通过多个gRNA切除整条染色体, 对染色体非整倍体患者有潜在的基因治疗价值^[51,52]。

(ii) 染色质易位. 在不同染色体上使用两个gRNA

切割产生两个DSBs后, 通过NHEJ拼接DNA末端会导致染色质易位^[53]。很多癌症由染色质易位的原癌融合基因诱发产生, 通过CRISPR/Cas产生染色质易位, 可以研究这类癌症的发生机制并提供治疗策略。如Torres等人^[54]在EWSR1第7个外显子后和FLI1的第5个外显子前分别设计2个gRNA进行切割, 染色质易位后产生EWSR1/FLI1融合蛋白, EWSR1/FLI1融合蛋白极易导致尤文氏肉瘤。或是在RUNX1第5个外显子后和ETO第2个外显子前分别设计2个gRNA进行切割, 染色质易位后产生RUNX1/ETO融合蛋白, 该蛋白是急性髓细胞白血病的成因之一。由此构建2个染色质易位导致癌症的细胞模型用于进一步研究。

(iii) 高通量基因敲除的遗传筛选. 在CRISPR/Cas系统发现之前, RNA干扰是进行高通量基因筛选的常用方法。然而RNA干扰只能敲低基因表达量, 很多基因表达敲低后仍能发挥功能, 无法被RNA干扰筛选到。通过CRISPR/Cas系统彻底敲除基因能有效进行遗传筛选。譬如, Shalem等人^[55]将18000个基因的3~4个gRNA构建到慢病毒质粒中, 形成CRISPR/Cas9介导的慢病毒文库。病毒感染后, gRNA和标签序列通过慢病毒插入到细胞基因组, 敲除对应基因, 根据基因敲除后细胞的变化可进行基因功能筛选。除了敲除编码基因外, CRISPR/Cas系统也可用于基因调控元件的研究。如为了研究Bcl11a增强子区域对Bcl11a表达的调控, Canver等人^[56]针对10 kb的增强子区域设计gRNA文库, 通过Cas9切割在增强子区域产生不同种类的indel, 由此研究增强子上哪些区域影响Bcl11a表达。

(iv) 细胞谱系示踪. CRISPR/Cas系统不仅可用于基因敲除的遗传筛选, 也可用于细胞谱系示踪。CRISPR/Cas系统切割DNA产生DSBs后, 通过NHEJ修复产生indel, 不同indel突变序列随细胞分裂传递到后代细胞, 成为谱系示踪的条形码。根据DNA突变类型可将不同细胞追溯到同一祖先。譬如, McKenna等人^[57]向斑马鱼一细胞胚胎注射Cas9 mRNA和10个gRNA后, 根据10个gRNA切割靶标DNA条形码产生的不同突变状态, 可以追踪200000个细胞的分裂和分化来源。

(v) 基因检测. Cas12a在gRNA引导下切割靶标dsDNA后被激活, 能够非特异切割ssDNA(single strand DNA, 单链DNA)。利用Cas12a这一特性, 开发出利用Cas12a检测DNA序列的报告系统DETECTR^[58]和HOLMES^[59]。一旦Cas12a检测到并切割靶标DNA序列后, Cas12a非特异切割所有ssDNA。报告ssDNA两头分

别带有荧光标记和荧光抑制分子,自然条件下不发光;被Cas12a切割后,带荧光标记的ssDNA发光,由此证明附近含有靶标DNA序列. Cas13a结合靶标ssRNA后,会非特异切割ssRNA. 基于该特性, Gootenberg等人^[41]发明了SHERLOCK系统,利用Cas13a和gRNA识别并结合寨卡或登革热病毒的ssRNA. Cas13a激活后,切断带荧光标记的ssRNA,产生荧光,由此检测病毒RNA^[60].

2.2 HDR或NHEJ介导的基因插入

(i) HDR介导的基因插入. 同源介导的DNA修复(homology directed repair, HDR)是细胞产生DNA双链断裂后利用同源序列作为模板进行修复的过程^[61]. 使用CRISPR/Cas系统切割产生DNA双链断裂后,可通过提供同源序列模板进行外源片段的插入. 然而,由于细胞中HDR发生率很低,且主要发生在细胞周期的S期和G2期^[62],通过HDR进行基因插入的效率并不高.

目前,有研究组通过抑制NHEJ通路,来提高利用HDR精确插入基因的效率. 如Maruyama等人^[63]在向细胞转入SpCas9、gRNA和ssDNA同源模板的同时,加入NHEJ途径ligase IV的抑制剂Scr7,使HDR精确修复的效率最多可提高19倍. 如Li等人^[64]进行HDR介导的基因插入时,向成纤维细胞加入NHEJ途径Ku蛋白的siRNA,使HDR效率最多可提高3倍. 也有研究组通过提高HDR途径相关蛋白工作效率来提升HDR介导的基因插入. 如Pinder等人^[65]通过化合物筛选,发现RS-1能够稳定ssDNA和单链DNA结合蛋白Rad51的结合,由此将Cas9介导的HDR基因插入效率提升3~6倍. 同样,通过化合物筛选, Yu等人^[66]筛选到2个小分子化合物L755507和Brefeldin A,可将HDR介导的基因插入提升2~3倍.

(ii) NHEJ介导的基因插入. 由于细胞内发生NHEJ概率更高,通过NHEJ也可以产生较高的基因插入效率. Suzuki等人^[67]建立了HITI(homology-independent targeted integration, 非同源介导的靶向整合)技术,在DNA产生双链断裂的同时,向细胞转入带有同样gRNA切割序列的质粒,质粒在细胞内发生切割,产生线性化双链DNA片段. 4个DNA平末端通过NHEJ进行连接,从而介导外源片段插入.

(iii) MMEJ或HMEJ介导的基因插入. 目前,也有研究组通过MMEJ(microhomology-mediated end joining, 微同源介导的末端连接)进行修复. CRISPR/Cas切割产生的2个DNA双链断裂平末端间如果有少量同源序列,

拼接时微同源末端链侵入,可精确切除这部分同源序列达到精确修复的效果. 如Iyer等人^[68]在基因组上找到一些CRISPR/Cas切割位点,切口前后是两个4~36 bp的微同源序列,经MMEJ修复后两个微同源序列丢失一个,从而达到精确切除片段的效果. Yao等人^[69]结合HDR和MMEJ的修复原理,设计了含微同源序列的同源臂进行修复,基因插入效率比传统HDR更高.

3 CRISPR/Cas的衍生工具

除了利用CRISPR/Cas系统编辑DNA或RNA外, Cas9和gRNA也可作为识别DNA序列的模块融合不同蛋白产生多种衍生工具. 例如,对SpCas9的RuvC结构域进行D10A突变,对HNH结构域进行H840A突变后, Cas9失去DNA双链切割活性成为dCas9(nuclease-deficient Cas9, 酶活缺失的Cas9)^[6]. dCas9在gRNA的帮助下结合靶标DNA, dCas9上融合不同蛋白在靶标DNA序列上发挥功能. 如dCas9可融合胞嘧啶脱氨酶成为单碱基编辑器,融合转录激活或抑制因子调控基因表达,或融合荧光蛋白进行细胞内活体成像. 下面对这些CRISPR/Cas衍生工具的应用进行具体介绍.

3.1 通过单碱基编辑工具进行基因编辑

一半以上的遗传疾病都来自于单碱基突变^[70],通过Cas9和同源臂模板可进行HDR介导的单碱基编辑,将突变碱基修复回来. 然而,由于细胞中HDR发生概率低,利用HDR进行单碱基编辑的效率并不高^[49]. 同时,由于Cas9产生的DNA双链断裂平末端更容易通过NHEJ修复产生indel,这使精准进行单碱基修复变得非常困难. 为了解决单碱基修复问题, David Liu实验室等将dCas9或Cas9单切口酶与胞嘧啶脱氨酶^[71]或腺嘌呤脱氨酶^[72]融合,构建了单碱基编辑器(base editor, BE).

Komor等人^[71]将dCas9和胞嘧啶脱氨酶(如大鼠APOBEC1)融合产生胞嘧啶碱基编辑器(BE1),通过gRNA将BE1靶向到目标DNA附近, APOBEC1将目标DNA的C转变为U,再转变为T,由此完成C到T(G到A)的单碱基编辑(图1). 除了使用APOBEC1进行胞嘧啶脱氨外,也有研究组利用其他胞嘧啶脱氨酶构建胞嘧啶单碱基编辑器(cytosine base editors, CBE). 如Nishida等人^[73]利用七鳃鳗的胞嘧啶脱氨酶PmCDA1,构建出Targeted-AID(activation-induced cytidine deaminase, 激活诱导的胞嘧啶脱氨酶),该胞嘧啶编辑器可在酵母和哺乳动物细胞中实现C到T的转换. Ma等人^[74]利用

人的胞嘧啶脱氨酶hAID, 构建了胞嘧啶编辑器dCas9-AIDx.

基于CBE类似的思路, 目前同样开发了腺嘌呤单碱基编辑器(adenosine base editor, ABE). ABE包含突变的腺嘌呤脱氨酶TadA, nCas9和gRNA(图1), 能将目标DNA的A转变为I, DNA复制时转化为G, 由此完成A到G(T到C)的单碱基编辑^[75]. 为了提升单碱基编辑器的应用价值, 做了如下优化.

(i) 提高碱基编辑效率. 为了提高碱基编辑效率, 目前建立了多个版本的CBE. 如通过在BE1基础上增加尿嘧啶DNA糖基化酶抑制因子(uracil DNA glycosylase inhibitor, UGI), 防止细胞内的尿嘧啶DNA糖基化酶(uracil DNA glycosylase, UDG)把U重新修复成C, 由此构建出BE2. 将dCas9替换成nCas9(D10A), 将C:G碱基对中含G的非编辑链切断, C变为U后, 非编辑链被切断无法作为模板使U修复成C, 由此产生BE3^[71]. 在BE3上融合2个UGI, 并融合Gam蛋白保护切口末端, 减少indel产生, 由此产生BE4^[76]. 或是在BE3上融合4个UGI开发eBE-S3, 能进一步提高胞嘧啶编辑效率^[77].

除了融合多种蛋白提升碱基编辑效率外, 提升CBE在哺乳动物细胞核表达也是一种提高效率的策略. 如Koblan等人^[75]在BE4的基础上增加多个核定位信号(nuclear localization signal, NLS), 并对其进行密码子优化, 开发出BE4max和AncBE4max, 可在哺乳动物细胞核中进行高效编辑. Zafra等人^[78]在BE3基础上, 通过改变NLS位置, 优化密码子, 开发出FNLS-BE3, 对胞嘧啶的单碱基编辑效率比原版CBE3提升15倍. Ren等人^[79]在hAID碱基编辑器的基础上, 加入NLS, 优化密码子, 开发的eAID-BE4max也大大提升了其在哺乳动物细胞核中的表达量, 提高碱基编辑效率. 同样, 为了提升ABE的基因编辑效率, 通过加入NLS和密码子优化, 目前也开发出ABEmax等版本的腺嘌呤编辑器^[75].

(ii) 扩大单碱基编辑器可靶向序列的范围. 由于SpCas9骨架限制, CBE或ABE只能对下游含5'-NGG PAM序列的DNA进行编辑. 将SpCas9骨架更换成多种Cas蛋白, 如VQR-SpCas9、EQR-SpCas9、VRER-SpCas9、SaCas9、SaKKHCas9^[75]、xCas9^[20]、SpCas9-NG^[19]、LbCas12a^[80]、enAsCas12a^[36]等, 让BE识别更多PAM序列, 可以扩大BE在基因组上的应用范围.

(iii) 改变单碱基编辑器的编辑活性窗口范围和位置. BE3对gRNA对应的第4~8个碱基(PAM序列上游13~17个碱基)进行碱基编辑. 5个碱基的编辑窗口范围

太宽, 如果该窗口内存在多个C, 会全部被编辑为T, 无法做到精确编辑^[71]. 为了让碱基编辑窗口更小, 编辑更精确, Kim等人^[81]根据蛋白结构突变大鼠APOBEC1上与DNA互作的氨基酸, 开发出YE1-BE3、YE2-BE3、EE-BE3和YEE-BE3, 将碱基编辑窗口从5 nt缩小到1~2 nt, 但碱基编辑活性有所降低. Tan等人^[82]改变大鼠APOBEC1和Cas9的距离, 开发出BE3-PAPAPAP, 或者缩短PmCDA1的C端序列, 开发出nCDA1-BE3, 将碱基编辑窗口缩小到1~2 nt的同时, 仍能保持原有的碱基编辑效率.

除了将碱基编辑窗口缩小外, 有些情况下需要将碱基编辑窗口放大, 同时突变多个C. 如Huang等人^[83]将SpCas9截成两段后重排, 构建一系列CP-Cas9(circularly permuted SpCas9), 由此开发出的CP-CBEmax编辑窗口从原先4~8个碱基扩大到4~11个碱基. Jiang等人^[84]将SpCas9-10xGCN4和scFv-APOBEC-UGI-GB1分开表达, 通过GCN4招募scFv-APOBEC-UGI-GB1到靶标DNA进行胞嘧啶单碱基编辑, 开发出BE-PLUS系统, 编辑窗口扩大到4~16个碱基.

另外, 原版BE3只能将4~8位的C转变为T, 编辑活性窗口位置固定, 有很大局限. 使用不同物种的胞嘧啶脱氨酶, 能有效改变单碱基编辑器的编辑窗口的位置, 扩大单碱基编辑器的应用范围. Cheng等人^[85]比较了不同物种胞嘧啶脱氨酶构建的CBE的编辑窗口变化范围, 为胞嘧啶单碱基编辑提供更多选择.

(iv) 减少单碱基编辑器的脱靶. 单碱基编辑器虽然可在目标DNA序列上高效编辑碱基, 但也存在不容忽视的脱靶问题. 一部分的脱靶问题由SpCas9本身脱靶导致. 设计更特异的gRNA, 或将SpCas9替换成高保真的HF1-nCas9或HF2-dCas9, 开发出HF-BE3^[86]或HF2-BE2^[87]可降低脱靶效应. 然而, 除了gRNA和SpCas9导致的脱靶问题外, CBE和ABE还存在全基因组范围的脱靶问题. 如胞嘧啶编辑器BE3, 在小鼠^[88]和水稻^[89]中均发现存在对非目标DNA的碱基编辑, 即便将BE3替换为高保真版本的HF1-BE3, 在水稻中仍会编辑非目标DNA^[89]. 进一步研究发现, 胞嘧啶编辑器BE3不仅将DNA上的C编辑成T, 还将RNA上的C编辑成U, 造成RNA脱靶^[90,91]. 腺嘌呤编辑器ABE7.10也会造成RNA脱靶问题, 大量将RNA的A编辑成I^[91,92]. 根据蛋白结构进行氨基酸突变, 或进行蛋白定向进化, 可以降低CBE和ABE在DNA或RNA上的脱靶效应^[90-92]. 以上不同版本CBE和ABE的特性已分别列举于表2和3.

表2 各类CBE系统的特性

Table 2 Characteristics of various types of cytosine base editors

CBE改造目标	CBE名称	Cas9	胞嘧啶脱氨酶	PAM	编辑窗口	改造方案	文献
原版CBE	BE1	dCas9	rAPOBEC1	NGG	4~8	加上NLS	[71]
改变胞嘧啶脱氨酶	Target-AID	nCas9	PmCDA1	NGG	2~8	rAPOBEC1替换为PmCDA1	[73]
改变胞嘧啶脱氨酶	CRISPR-X	dCas9	hAIDΔ-MS2	NGG	-50~50	rAPOBEC1替换为hAID	[74]
提高编辑效率	BE2	dCas9	rAPOBEC1	NGG	4~8	加上UGI	[71]
提高编辑效率	BE3	nCas9	rAPOBEC1	NGG	4~8	dCas9替换为nCas9(D10A)	[71]
提高编辑效率	BE4	nCas9	rAPOBEC1	NGG	4~8	加上2个UGI	[76]
提高编辑效率	BE4-Gam	nCas9	rAPOBEC1	NGG	4~8	加上2个UGI和1个Gam	[76]
提高编辑效率	SaBE4	nSaCas9	rAPOBEC1	NNGRRT	3~12	加上2个UGI	[76]
提高编辑效率	SaBE4-Gam	nSaCas9	rAPOBEC1	NNGRRT	3~12	加上2个UGI和1个Gam	[76]
提高编辑效率	eBE-S3	nCas9	rAPOBEC1	NGG	4~8	加上4个UGI	[77]
提高表达量	BE4max	nCas9	rAPOBEC1	NGG	4~8	加上2个NLS	[75]
提高表达量	AncBE4max	nCas9	rAPOBEC1	NGG	4~8	加上2个NLS, 密码子优化	[75]
提高表达量	FNLS-BE3	nCas9	rAPOBEC1	NGG	3~8	加上2个NLS, 密码子优化	[78]
提高表达量	eAID-BE4max	nCas9	hAID	NGG	4~8	加上2个NLS, 密码子优化	[79]
改变PAM序列	VQR-BE3	nVQRCas9	rAPOBEC1	NGA	4~11	SpCas9替换为VQRCas9	[81]
改变PAM序列	EQR-BE3	nEQRCas9	rAPOBEC1	NGAG	4~11	SpCas9替换为EQRCas9	[81]
改变PAM序列	VRER-BE3	nVRERCas9	rAPOBEC1	NGCG	3~10	SpCas9替换为VRERCas9	[81]
改变PAM序列	SaBE3	nSaCas9	rAPOBEC1	NNGRRT	3~12	SpCas9替换为SaCas9	[81]
改变PAM序列	SaKKH-BE3	nSaKKHCas9	rAPOBEC1	NNNRRT	3~12	SpCas9替换为SaKKHCas9	[81]
改变PAM序列	xBE3	nxCas9	rAPOBEC1	NG	4~8	SpCas9替换为xCas9	[20]
改变PAM序列	BE3-NG	nSpCas9-NG	rAPOBEC1	NG	4~8	SpCas9替换为SpCas9-NG	[19]
改变PAM序列	Target-AID-NG	nSpCas9-NG	PmCDA1	NG	2~8	SpCas9替换为SpCas9-NG	[19]
改变PAM序列	dCpf1-eBE	dLbCas12a	rAPOBEC1	TTTV	8~13	SpCas9替换为LbCas12a	[80]
改变PAM序列	enAsBE1.1-1.4	denAsCas12a	rAPOBEC1	TTTV	-5~25	SpCas9替换为enAsCas12a	[36]
缩小碱基编辑窗口	YE1-BE3	nCas9	rAPOBEC1-YE1	NGG	4~7	rAPOBEC1氨基酸突变	[81]
缩小碱基编辑窗口	YE2-BE3	nCas9	rAPOBEC1-YE2	NGG	5~6	rAPOBEC1氨基酸突变	[81]
缩小碱基编辑窗口	EE-BE3	nCas9	rAPOBEC1-EE	NGG	5~6	rAPOBEC1氨基酸突变	[81]
缩小碱基编辑窗口	YEE-BE3	nCas9	rAPOBEC1-YEE	NGG	5~6	rAPOBEC1氨基酸突变	[81]
缩小碱基编辑窗口	BE3-PAPAPAP	nCas9	rAPOBEC1	NGG	5~6	rAPOBEC1和Cas9的linker替换	[82]
缩小碱基编辑窗口	nCDA1-BE3	nCas9	PmCDA1Δ	NGG	3~4	PmCDA1的C端截短	[82]
扩大碱基编辑窗口	CP-CBEmax	CP-nCas9	rAPOBEC1	NGG	4~11	Cas9氨基酸重排	[83]
扩大碱基编辑窗口	BE-PLUS	nCas9	rAPOBEC1-scFV	NGG	4~16	nCas9和rAPOBEC1-scFV分开表达	[84]
减少DNA脱靶效应	HF2-BE2	HF2-dCas9	rAPOBEC1	NGG	4~8	SpCas9替换为高保真的HF2-SpCas9	[87]
减少DNA脱靶效应	HF-BE3	HF1-nCas9	rAPOBEC1	NGG	4~8	SpCas9替换为高保真的HF1-SpCas9	[86]
减少RNA脱靶效应	BE3-R33A	nCas9	rAPOBEC1-R33A	NGG	5~7	rAPOBEC1氨基酸点突变	[90]
减少RNA脱靶效应	BE3-R33A/K34A	nCas9	rAPOBEC1-R33A/K34A	NGG	5~6	rAPOBEC1氨基酸点突变	[90]
减少RNA脱靶效应	hA3AR128A	nCas9	hAPOBEC3A-R128A	NGG	3~9	hAPOBEC3A氨基酸点突变	[91]
减少RNA脱靶效应	hA3AY130F	nCas9	hAPOBEC3A-R128A	NGG	3~9	hAPOBEC3A氨基酸点突变	[91]

表 3 各类ABE系统的特性

Table 3 Characteristics of various types of adenine base editors

ABE改造目标	ABE名称	Cas9	腺嘌呤脱氨酶	PAM	编辑窗口	改造方案	参考文献
原版ABE	ABE7.10	nCas9	TadA-TadA*	NGG	4~7	加上NLS, TadA经过进化为TadA*	[72]
提高表达量	ABEmax	nCas9	TadA-TadA*	NGG	4~7	加上2个NLS, 密码子优化	[75]
改变PAM序列	NG-ABEmax	nSpCas9-NG	TadA-TadA*	NG	4~8	SpCas9替换为SpCas9-NG	[19]
改变PAM序列	VQR-ABEmax	nVQRCas9	TadA-TadA*	NGA	4~8	SpCas9替换为VQRCas9	[83]
改变PAM序列	VRER-ABEmax	nVRERCas9	TadA-TadA*	NGCG	4~8	SpCas9替换为VRERCas9	[83]
改变PAM序列	VRQR-ABEmax	nVRQRCas9	TadA-TadA*	NGA	4~8	SpCas9替换为VRQRCas9	[83]
改变PAM序列	SaABEmax	nSaCas9	TadA-TadA*	NNRRRT	4~14	SpCas9替换为SaCas9	[83]
改变PAM序列	SaKKH-ABEmax	nSaKKHCas9	TadA-TadA*	NNNRRT	4~14	SpCas9替换为SaKKHCas9	[83]
改变PAM序列	xABEmax	nxCas9	TadA-TadA*	NG	4~8	SpCas9替换为xCas9	[83]
减少RNA脱靶效应	ABEmaxAW	nCas9	TadA-E59A-TadA*-V106W	NGG	4~8	TadA和TadA*氨基酸突变	[92]
减少RNA脱靶效应	ABEmaxQW	nCas9	TadA-E59Q-TadA*-V106W	NGG	4~8	TadA和TadA*氨基酸突变	[92]
减少RNA脱靶效应	ABE7.10F148A	nCas9	TadA-F148A-TadA*-F148A	NGG	5	TadA和TadA*氨基酸突变	[91]

3.2 通过prime editor进行基因编辑

CBE或ABE虽然能完成C到T或A到G的转换,但对于其他类型的单碱基突变无能为力。精确的碱基插入缺失只能通过HDR实现,但由于HDR效率低下,仍缺乏高效的基因编辑工具。2019年,Anzalone等人^[93]开发了新的基因编辑工具PE(prime editors)(图1),无需DNA模板便可实现所有单碱基的转换,并且还能实现多碱基的精准插入缺失(最多可插入44 bp核苷酸,可删除80 bp核苷酸)。

PE系统将nCas9(H840A)与逆转录酶M-MLV融合,在gRNA介导下结合到靶标DNA,在目标DNA链(target strand)上产生DNA单切口。同时在gRNA的3'端引入一段RNA序列, gRNA序列一部分和DNA切口的3'端互补,含单切口的DNA作为引物和gRNA配对,以gRNA序列作为模板,在M-MLV作用下反转录成DNA。新合成的DNA替代原来断裂的DNA完成修复,同时在新DNA上引入gRNA带有的单碱基突变或多碱基的插入缺失。与单碱基编辑器相比,PE系统能完成所有单碱基的替换^[1],与传统的HDR相比,PE系统编辑效率更高,有更广泛的应用前景。

3.3 通过CRISPRa或CRISPRi激活或抑制基因表达

除了将dCas9或nCas9构建为单碱基编辑器外,Cas9和gRNA也可作为识别DNA序列的工具与转录激

活或抑制因子融合,将这些效应蛋白带到靶标DNA或RNA位置,实现基因的精确调控(图1)。

(i) CRISPRa(CRISPR activation, CRISPR激活)。将dCas9结合转录激活结构域VP64, gRNA将dCas9-VP64靶向到基因启动子,激活细胞内源基因表达^[94-97]。譬如,将VP64-dCas9-VP64靶向到Pou3f2、Ascl1和Myt1l的启动子区激活基因表达后,可将小鼠成纤维细胞转分化为神经元^[98]。

(ii) CRISPRi(CRISPR interference, CRISPR抑制)。在原核细胞中, dCas9结合到靶标DNA区域,本身能抑制RNA聚合酶转录^[99]。然而, dCas9的转录抑制在真核细胞中作用不强,为此将dCas9蛋白融合转录抑制的KRAB(Krüppel-associated box)结构域, gRNA将dCas9-KRAB靶向到基因的启动子、5'-UTR区或增强子区域,抑制基因表达^[95]。

(iii) CRISPR/Cas改变表观修饰。除了利用dCas9-VP64或dCas9-KRAB激活抑制基因表达,也可将dCas9与组蛋白或DNA的表观修饰酶融合,通过表观修饰标记变化,影响基因表达。如将dCas9与组蛋白乙酰化酶P300融合,产生dCas9-P300可稳定激活基因表达^[100],将dCas9与DNA羟甲基化酶TET1的酶活结构域融合,去除靶向DNA的甲基化,稳定激活基因表达^[101]。

3.4 通过dCas9进行染色质特定区域的活体成像

识别特定序列所在的染色质区域,有助于认识染

色质结构. 之前往往使用原位杂交, 将带荧光标记的核苷酸分子与染色质特定序列互补配对, 标注特定染色质的位置. 但由于该方法需要将细胞固定, 无法进行活细胞成像. 为此, 可通过融合蛋白dCas9-GFP, 将荧光蛋白GFP靶向到染色质特定序列进行成像^[102]. 同样的思路也应用在识别特定RNA上, 可通过融合蛋白dCas13-GFP(图1), 将GFP靶向到特定RNA进行成像^[103].

3.5 通过dCas9纯化染色质特定区域

为了解某一部分特定序列的基因组上结合哪些蛋白, 可将dCas9-gRNA靶向到目标DNA, 利用抗体或标签抗体将dCas9和靶向DNA附近的蛋白沉淀下来, 通过质谱鉴定包含哪些蛋白, 该方法也叫作enChIP^[104,105] (engineered DNA binding molecule-mediated chromatin immunoprecipitation). 另一种方法用到了dCas9-APEX2(图1). APEX2可将生物素标记到附近的蛋白上, 通过gRNA将dCas9-APEX2靶向到特定序列, 在附近蛋白加上生物素, 再通过质谱鉴定是哪些蛋白^[106,107].

4 CRISPR/Cas在医疗上的应用

CRISPR/Cas系统介导的基因编辑或基因调控, 除了在基础科学研究中发挥作用外, 目前也逐渐应用于医学研究、医学检测和临床基因治疗. 目前, CRISPR/Cas进入临床治疗的应用主要包括: (1) 使用嵌合抗原受体T细胞免疫疗法(chimeric antigen receptor T-cell immunotherapy, CAR-T)治疗多种癌症时, 可以通过CRISPR/Cas敲除免疫抑制因子(如PD-1等), 加强CAR-T免疫强度. 或通过CRISPR/Cas敲除T细胞免疫相关受体(如内源T细胞受体等), 减少异体CAR-T的免疫原性. (2) 临床治疗 β -血红蛋白疾病(地中海贫血症和镰刀贫血症)时, 通过CRISPR/Cas敲除基因调控元件, 使胎儿的血红蛋白在成年继续表达, 代替成年血红蛋白发挥运输氧气的功能. (3) 临床治疗莱伯氏先天性黑蒙症10型时, 通过CRISPR/Cas切除Cep290第26个内含子的突变c.2991+1655A>G, 使Cep290转录不会提前终止, 从而产生正常的CEP290蛋白^[108]. 表4列举了目前美国政府已批准的临床试验中与CRISPR/Cas相关的项目. 此外尚未走上临床的基因治疗科学研究, 也已涉及肌肉、眼、耳、神经和血液等多种器官相关疾病的方方面面, 如杜氏肌营养不良^[109]、湿性视网膜黄斑变性^[110-112]、囊性纤维症^[113]等.

目前, 基因治疗可看作两种形式: 第一种将正确的

基因导入细胞, 纠正突变基因带来的负面影响; 第二种通过基因编辑直接修复突变基因. 下面以 β -血红蛋白疾病的基因治疗为例, 可看到利用CRISPR/Cas进行基因治疗的优势.

β -血红蛋白疾病由 β -血红蛋白(hemoglobin subunit beta, Hbb)基因突变造成. Hbb突变后使成人血红蛋白携氧能力降低, 造成地中海贫血症和镰刀贫血症. 1981年, Wade等人^[114]提出设想, 可通过向造血干细胞导入一个有功能的Hbb治疗 β -血红蛋白疾病. 经过近20年的努力, 多个研究组稳定建立了造血干细胞的分离、体外操作和移植系统, 确定使用慢病毒进行Hbb的造血干细胞基因递送, 使用Hbb自身启动子和3'增强子表达Hbb, 组合优化加入Hbb自身调控区(locus control region, LCR)的转录增强子HS4、3、2^[115,116], 构建了有望在红细胞高表达Hbb的慢病毒载体. 通过地中海贫血小鼠模型验证, 该慢病毒载体确实在红细胞中高表达Hbb, 能够缓解症状^[117,118]. 2010年, Cavazzana-Calvo等人^[119]使用慢病毒向造血干细胞基因组插入Hbb, 完成了第一例地中海贫血症的基因治疗. 此次治疗中, 慢病毒插入在Hmga2基因位点, 在红细胞高表达HBB蛋白, 缓解了地中海贫血症, 但同时在红细胞中高表达截短的Hmga mRNA. 这暗示使用慢病毒进行基因插入时, 可能影响插入位置原本基因的表达状态, 有一定风险.

由于野生型Hbb基因插入所涉及的载体优化和基因递送过程过于复杂, 基因插入后对其他基因有影响, 很多研究组尝试使用CRISPR/Cas基因编辑治疗 β -血红蛋白疾病. Dever等人^[120]向镰刀贫血症患者(Hbb-E6V突变)的造血干细胞导入Cas9和gRNA的RNA结合蛋白复合物, 对特定位点进行切割. 同时利用腺相关病毒rAAV6递送含Hbb基因、筛选标记基因和同源臂的DNA供体, 通过HDR将Hbb和标记基因插入到特定位点. 经标记基因筛选后, 90%以上的造血干细胞中整合插入了Hbb基因, 分化出的红细胞能高效表达Hbb. 然而, 由于成体治疗时不能向细胞插入额外的标记基因, DeWitt等人^[121]和Hoban等人^[122]分别通过HDR向造血干细胞插入无筛选标记的Hbb DNA片段, 由于未经过标记基因筛选, 成功插入Hbb的造血干细胞比率较低.

考虑到通过HDR精确修复基因的效率很低, 一些研究组将基因治疗的目光转到Hbg1和Hbg2(Hemoglobin subunit gamma)上. Hbg1和Hbg2是胎儿表达的血红蛋白基因(hemoglobin fetal, HbF), 成年中表达量极低, 通过CRISPR/Cas系统敲除抑制Hbg表达的基因调控元

表4 NIH通过的CRISPR/Cas相关的临床项目

Table 4 Clinical trials related to CRISPR/Cas approved by NIH

NCT号	目的	CRISPR/Cas应用方向	CRISPR/Cas具体应用内容	临床
NCT03166878	治疗	CART治疗CD19 ⁺ 的B细胞白血病、B细胞淋巴瘤	异体T细胞转入特异识别CD19的CAR, 并利用CRISPR/Cas敲除内源TCR和B2M, 治疗CD19 ⁺ 的B细胞白血病、B细胞淋巴瘤	临床1期、2期
NCT04035434	治疗	CART治疗CD19 ⁺ 的B细胞淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤	CRISPR/Cas基因编辑后的异体T细胞, 可靶向CD19 ⁺ 的B细胞淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤	临床1期、2期
NCT04037566	治疗	CART治疗CD19 ⁺ 的急性淋巴细胞白血病和B细胞淋巴瘤	自体T细胞转入特异识别CD19的CAR, 并利用CRISPR/Cas敲除内源HPK1, 联合环磷酰胺和氟达拉滨治疗CD19 ⁺ 的急性淋巴细胞白血病和B细胞淋巴瘤	临床1期
NCT03398967	治疗	CART治疗CD19 ⁺ 、CD20 ⁺ 或CD22 ⁺ 的B细胞白血病、B细胞淋巴瘤	异体T细胞转入特异识别CD19、CD20或CD22的CAR, 并利用CRISPR/Cas敲除内源TCR等, 治疗B细胞白血病、B细胞淋巴瘤	临床1期、2期
NCT03690011	治疗	CART治疗CD7 ⁺ 的T细胞白血病、T细胞淋巴瘤	自体T细胞转入CD28, 转入特异识别CD7的CAR, 通过CRISPR/Cas去除CD7, 联合环磷酰胺和氟达拉滨可靶向治疗CD7 ⁺ 的T细胞白血病、T细胞淋巴瘤	临床1期
NCT03044743	治疗	CART治疗EBV ⁺ 的胃癌、鼻咽癌、T细胞淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤、弥漫性大B细胞淋巴瘤	自体T细胞转入特异识别EB病毒的CAR, 并利用CRISPR/Cas敲除PD-1, 联合环磷酰胺、氟达拉滨和白介素2治疗EBV ⁺ 的胃癌、鼻咽癌、T细胞淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤、弥漫性大B细胞淋巴瘤	临床1期、2期
NCT03399448	治疗	CART治疗NY-ESO-1 ⁺ 的多发性骨髓瘤、黑色素瘤、滑膜肉瘤、圆细胞脂肪肉瘤	自体T细胞转入特异识别NY-ESO-1的CAR, 并利用CRISPR/Cas敲除内源TCR和PD-1, 联合环磷酰胺和氟达拉滨治疗多发性骨髓瘤、黑色素瘤、滑膜肉瘤、圆细胞脂肪肉瘤	临床1期
NCT03545815	治疗	CART治疗间皮素表达的实体瘤	利用CRISPR/Cas敲除T细胞内源TCR和PD-1, 治疗间皮素表达的实体瘤	临床1期
NCT03747965	治疗	CART治疗间皮素表达的实体瘤	利用CRISPR/Cas敲除T细胞PD-1, 配合紫杉醇和环磷酰胺治疗间皮素表达的实体瘤	临床1期
NCT03538613	治疗	TIL治疗肠胃上皮肿瘤	利用CRISPR/Cas敲除自体肿瘤浸润T淋巴细胞(TILs)的抑制因子CISH, 联合环磷酰胺、氟达拉滨和阿地白介素治疗肠胃上皮肿瘤	临床1期、2期
NCT02863913	治疗	CART治疗膀胱癌	自体T细胞通过CRISPR/Cas敲除PD-1, 联合环磷酰胺和白介素2治疗膀胱癌	临床1期
NCT02867332	治疗	CART治疗肾细胞癌	自体T细胞通过CRISPR/Cas敲除PD-1, 联合环磷酰胺和白介素2治疗肾细胞癌	临床1期
NCT02793856	治疗	CART治疗非小细胞肺癌	自体T细胞通过CRISPR/Cas敲除PD-1, 联合环磷酰胺治疗非小细胞肺癌	临床1期
NCT02867345	治疗	CART治疗前列腺癌	自体T细胞通过CRISPR/Cas敲除PD-1, 联合环磷酰胺和白介素2治疗前列腺癌	临床1期
NCT03745287	治疗	镰刀贫血症	利用CRISPR/Cas敲除CD34 ⁺ 造血干细胞Bcl11a基因上游增强子, 敲低Bcl11a表达, 使Hbg高表达代偿Hbb运输氧气, 治疗镰刀贫血症	临床1期、2期
NCT03655678	治疗	地中海贫血症	利用CRISPR/Cas敲除CD34 ⁺ 造血干细胞Bcl11a基因上游增强子, 敲低Bcl11a表达, 使Hbg高表达代偿Hbb运输氧气, 治疗地中海贫血症	临床1期、2期
NCT03728322	治疗	地中海贫血症	利用CRISPR/Cas治疗地中海贫血症	临床1期
NCT03872479	治疗	先天性黑蒙症10型	利用CRISPR/Cas敲除CEP290内含子26的突变位点, 产生正常表达的CEP290, 治疗先天性黑蒙症	临床1期、2期
NCT03057912	治疗	宫颈上皮内瘤样病变	CRISPR/Cas9质粒包裹在凝胶中递送, 切割HPV16 E6/E7T1或HPV18 E6/E7T2基因组	临床1期
NCT04074369	检测	肺结核病人的病原检测	利用CRISPR检测系统, 检测疑似肺结核病人唾液或支气管肺泡灌洗液中是否含有结核杆菌	
NCT04178382	检测	肺炎与重症脓毒症的病原检测	利用PCR和CRISPR/Cas12a, 检测并确定脓毒症患者受感染的病原菌类型	
NCT03606486	检测	卵巢癌检测	子宫腔微创灌洗获得样本, 利用Crispr-Duplex检测TP53突变, 判断患者是否有卵巢癌	
NCT03164135	研究	艾滋病	利用CRISPR/Cas9敲除CD34 ⁺ 造血干细胞的CCR5, 敲除CCR5的CD34 ⁺ 细胞移植入艾滋病患者体内, 观察进行或不进行抗病毒治疗时HIV-1含量的变化	
NCT03855631	研究	歌舞伎综合征1	将歌舞伎综合征患者的成纤维细胞重编程为间充质干细胞, 构建歌舞伎综合征细胞模型, 利用CRISPR/Cas尝试恢复患者细胞内KMT2D表达	
NCT03167450	研究	镰刀贫血症	检测动物和人源细胞实验中多种CRISPR/Cas治疗镰刀贫血症的方案在病人中的效果	
NCT03081715	研究	CART治疗食道癌	自体T细胞利用CRISPR/Cas敲除T细胞PD-1, 输回体内治疗食道癌	

件,可以促进Hbg表达,部分代替Hbb行使功能.例如,有研究组模仿持续性表达Hbg的HPFH(hereditary persistence of hemoglobin fetal)患者的基因,通过CRISPR/Cas敲除从Hbb到Hbd(hemoglobin subunit delta)约13.6 kb的基因区段,从而敲除该区域中的Hbg抑制元件,使Hbg持续表达,可以缓解镰刀贫血症或地中海贫血症症状^[123,124].另外,Traxler等人^[125]同样模仿另一类HPFH病人的基因突变,关注到Hbg启动子区域上游100 bp左右存在表达抑制区,通过CRISPR/Cas删除镰刀贫血症患者造血干细胞基因组中13 bp的Hbg表达抑制元件后,造血干细胞在体外分化产生的红细胞可高表达Hbg,部分缓解了镰刀贫血症症状.Li等人^[126]在转基因小鼠中利用CRISPR/Cas删除该调控区后,将造血干细胞移植回小鼠体内,产生的红细胞确实小鼠体内能产生Hbg.

另外,Bcl11a是HbF表达的抑制基因,敲除Bcl11a^[127]或使用siRNA敲低Bcl11a^[128]后,红细胞的HbF表达量明显上升,显示该基因是治疗镰刀贫血症或地中海贫血症的潜在靶点.但由于Bcl11a在多类造血细胞中都有作用,敲除或敲低Bcl11a会导致白血病或淋巴瘤,因此只能在红细胞中特异敲低Bcl11a.为了研究是否存在红细胞中特异的Bcl11a调控元件,Canver等人^[56]针对Bcl11a约10 kb的增强子区域设计gRNA文库,通过Cas9在增强子区域切割产生不同种类的indel,由此找到特异在红细胞中影响Bcl11a表达的增强子.利用Cas9和gRNA的RNA结合蛋白复合体敲除病人造血干细胞中的Bcl11a增强子后,分化得到的红细胞Bcl11a表达降低,HbF表达升高,有望以此治疗 β -血红蛋白疾病^[129].

在 β -血红蛋白疾病基因治疗方案开发的过程中可以看到,CRISPR/Cas加快推动该疾病的医学研究和临床开发.随着CRISPR/Cas基因编辑工具的开发,将不断促进科学研究发展,并有望通过CRISPR/Cas介导的基因治疗为更多遗传病患者带来福音.

5 总结与展望

自2012年CRISPR/Cas系统被开发为基因编辑工具以来,目前已发现多种Cas系统,如Cas9、Cas12和

Cas13家族.根据不同Cas家族开发出多种衍生工具,在基因敲除和插入、单碱基或多碱基精确编辑、染色质易位、功能基因遗传筛选、细胞谱系示踪、基因检测、基因表达调控、活体成像和纯化染色质特定区域蛋白中发挥重要作用,促进了生物科研的发展.同时,CRISPR/Cas逐渐应用于医学研究和临床基因治疗,为遗传病患者带来更多治疗可能.然而,目前CRISPR/Cas仍面临一些问题,如需要增加编辑效率、扩大在基因组上可编辑序列的种类、减少脱靶效应、缩小各元件大小等.根据本文叙述的内容可以看到,针对这些问题目前已做了非常多CRISPR/Cas工具的开发和优化,之后也会进一步解决这些问题,开发出更多更好的CRISPR/Cas工具.

然而,除了优化工具外,CRISPR/Cas在细胞及成体的应用中还有很多其他问题,譬如怎样将CRISPR/Cas递送入细胞及成体.CRISPR/Cas向细胞或成体递送有4种形式:质粒、RNA、核糖核蛋白(ribonucleoprotein, RNP)或包装入病毒.向细胞或体内递送含CRISPR/Cas的质粒或病毒,基因编辑工具在细胞内表达更持久,但持续表达会增加基因编辑的脱靶风险.递送sgRNA和Cas的mRNA,可减少基因编辑工具在细胞内表达时间,减少脱靶机率^[130],但RNA稳定性差,递送难度较大.将Cas蛋白和sgRNA组装为RNP送入细胞,可进一步减少Cas蛋白在体内的存在时间,降低脱靶风险^[131],但SpCas9和SaCas9蛋白在部分人体内会引发获得性免疫反应^[132],如何包裹RNP使其在体内递送时不被免疫系统识别是个问题.由于含CRISPR/Cas的质粒、RNA及RNA结合蛋白均含有带负电荷的磷酸基团,可用带正电荷的纳米颗粒中和电性后递送入细胞或体内.如正电荷脂质体^[133]、PEI微囊体^[134]、正电荷多肽^[135]、DNA纳米线团^[136]和纳米金颗粒^[137]包裹CRISPR/Cas工具后,提高它们在体液或血液内的稳定性,并降低它们在体内的免疫原性.另外,将CRISPR/Cas装载到AAV中,可通过病毒感染递送到体内细胞,也是目前常用的递送策略^[31].这些方法各有优劣,如何进一步提高递送效率,降低免疫原性,仍是CRISPR/Cas基因治疗未来需要解决的问题.

参考文献

- 1 Danna K, Nathans D. Specific cleavage of simian virus 40 DNA by restriction endonuclease of *Hemophilus influenzae*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1971, 68: 2913–2917
- 2 Pâques F, Duchateau P. Meganucleases and DNA double-strand break-induced recombination: Perspectives for gene therapy. *Curr Gene Therapy*,

- 2007, 7: 49–66
- 3 Kim Y G, Cha J, Chandrasegaran S. Hybrid restriction enzymes: Zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93: 1156–1160
 - 4 Christian M, Cermak T, Doyle E L, et al. Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. *Genetics*, 2010, 186: 757–761
 - 5 Gasiunas G, Barrangou R, Horvath P, et al. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109: E2579–E2586
 - 6 Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 2012, 337: 816–821
 - 7 Doudna J A, Charpentier E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, 2014, 346: 1258096
 - 8 Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*, 2007, 315: 1709–1712
 - 9 Hille F, Richter H, Wong S P, et al. The biology of CRISPR-Cas: Backward and forward. *Cell*, 2018, 172: 1239–1259
 - 10 Cong L, Ran F A, Cox D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 2013, 339: 819–823
 - 11 Mali P, Yang L, Esvelt K M, et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*, 2013, 339: 823–826
 - 12 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
 - 13 Mojica F J M, Díez-Villaseñor C, García-Martínez J, et al. Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system. *Microbiology*, 2009, 155: 733–740
 - 14 Deveau H, Barrangou R, Garneau J E, et al. Phage response to CRISPR-encoded resistance in *Streptococcus thermophilus*. *J Bacteriol*, 2008, 190: 1390–1400
 - 15 Zhang Y, Heidrich N, Ampattu B J, et al. Processing-independent CRISPR RNAs limit natural transformation in *Neisseria meningitidis*. *Mol Cell*, 2013, 50: 488–503
 - 16 Hou Z, Zhang Y, Propson N E, et al. Efficient genome engineering in human pluripotent stem cells using Cas9 from *Neisseria meningitidis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110: 15644–15649
 - 17 Ran F A, Cong L, Yan W X, et al. *In vivo* genome editing using *Staphylococcus aureus* Cas9. *Nature*, 2015, 520: 186–191
 - 18 Kleinstiver B P, Prew M S, Tsai S Q, et al. Engineered CRISPR-Cas9 nucleases with altered PAM specificities. *Nature*, 2015, 523: 481–485
 - 19 Nishimasu H, Shi X, Ishiguro S, et al. Engineered CRISPR-Cas9 nuclease with expanded targeting space. *Science*, 2018, 361: 1259–1262
 - 20 Hu J H, Miller S M, Geurts M H, et al. Evolved Cas9 variants with broad PAM compatibility and high DNA specificity. *Nature*, 2018, 556: 57–63
 - 21 Slaymaker I M, Gao L, Zetsche B, et al. Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity. *Science*, 2016, 351: 84–88
 - 22 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
 - 23 Kulcsár P I, Tálas A, Huszár K, et al. Crossing enhanced and high fidelity SpCas9 nucleases to optimize specificity and cleavage. *Genome Biol*, 2017, 18: 190
 - 24 Chen J S, Dagdas Y S, Kleinstiver B P, et al. Enhanced proofreading governs CRISPR-Cas9 targeting accuracy. *Nature*, 2017, 550: 407–410
 - 25 Dagdas Y S, Chen J S, Sternberg S H, et al. A conformational checkpoint between DNA binding and cleavage by CRISPR-Cas9. *Sci Adv*, 2017, 3: eaao0027
 - 26 Casini A, Olivieri M, Petris G, et al. A highly specific SpCas9 variant is identified by *in vivo* screening in yeast. *Nat Biotechnol*, 2018, 36: 265–271
 - 27 Lee J K, Jeong E, Lee J, et al. Directed evolution of CRISPR-Cas9 to increase its specificity. *Nat Commun*, 2018, 9: 3048
 - 28 Vakulskas C A, Dever D P, Rettig G R, et al. A high-fidelity Cas9 mutant delivered as a ribonucleoprotein complex enables efficient gene editing in human hematopoietic stem and progenitor cells. *Nat Med*, 2018, 24: 1216–1224
 - 29 Kocak D D, Josephs E A, Bhandarkar V, et al. Increasing the specificity of CRISPR systems with engineered RNA secondary structures. *Nat Biotechnol*, 2019, 37: 657–666
 - 30 Ran F A, Hsu P D, Lin C Y, et al. Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell*, 2013, 154: 1380–1389
 - 31 Senís E, Fatouros C, Große S, et al. CRISPR/Cas9-mediated genome engineering: An adeno-associated viral (AAV) vector toolbox. *Biotech J*, 2014, 9: 1402–1412
 - 32 Yamada M, Watanabe Y, Gootenberg J S, et al. Crystal structure of the minimal Cas9 from *Campylobacter jejuni* reveals the molecular diversity in the CRISPR-Cas9 systems. *Mol Cell*, 2017, 65: 1109–1121.e3
 - 33 Truong D J J, Kühner K, Kühn R, et al. Development of an intein-mediated split-Cas9 system for gene therapy. *Nucl Acids Res*, 2015, 43: 6450–6458
 - 34 Wright A V, Sternberg S H, Taylor D W, et al. Rational design of a split-Cas9 enzyme complex. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112: 2984–2989

- 35 Zetsche B, Gootenberg J S, Abudayyeh O O, et al. Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system. *Cell*, 2015, 163: 759–771
- 36 Kleinstiver B P, Sousa A A, Walton R T, et al. Engineered CRISPR-Cas12a variants with increased activities and improved targeting ranges for gene, epigenetic and base editing. *Nat Biotechnol*, 2019, 37: 276–282
- 37 Shmakov S, Abudayyeh O O, Makarova K S, et al. Discovery and functional characterization of diverse class 2 CRISPR-Cas systems. *Mol Cell*, 2015, 60: 385–397
- 38 Strecker J, Jones S, Koopal B, et al. Engineering of CRISPR-Cas12b for human genome editing. *Nat Commun*, 2019, 10: 212
- 39 Abudayyeh O O, Gootenberg J S, Essletzbichler P, et al. RNA targeting with CRISPR-Cas13. *Nature*, 2017, 550: 280–284
- 40 Abudayyeh O O, Gootenberg J S, Konermann S, et al. C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector. *Science*, 2016, 353: aaf5573
- 41 Gootenberg J S, Abudayyeh O O, Lee J W, et al. Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2. *Science*, 2017, 356: 438–442
- 42 Smargon A A, Cox D B T, Pyzocha N K, et al. Cas13b Is a type VI-B CRISPR-associated RNA-guided RNase differentially regulated by accessory proteins Csx27 and Csx28. *Mol Cell*, 2017, 65: 618–630.e7
- 43 Cox D B T, Gootenberg J S, Abudayyeh O O, et al. RNA editing with CRISPR-Cas13. *Science*, 2017, 358: 1019–1027
- 44 Konermann S, Lotfy P, Brideau N J, et al. Transcriptome engineering with RNA-targeting type VI-D CRISPR effectors. *Cell*, 2018, 173: 665–676.e14
- 45 Yan W X, Chong S, Zhang H, et al. Cas13d is a compact RNA-targeting type VI CRISPR effector positively modulated by a WYL-domain-containing accessory protein. *Mol Cell*, 2018, 70: 327–339.e5
- 46 O’Connell M R, Oakes B L, Sternberg S H, et al. Programmable RNA recognition and cleavage by CRISPR/Cas9. *Nature*, 2014, 516: 263–266
- 47 Strutt S C, Torrez R M, Kaya E, et al. RNA-dependent RNA targeting by CRISPR-Cas9. *Elife*, 2018, 7: e32724
- 48 Chang H H Y, Pannunzio N R, Adachi N, et al. Non-homologous DNA end joining and alternative pathways to double-strand break repair. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2017, 18: 495–506
- 49 Mao Z, Bozzella M, Seluanov A, et al. Comparison of nonhomologous end joining and homologous recombination in human cells. *DNA Repair*, 2008, 7: 1765–1771
- 50 Essletzbichler P, Konopka T, Santoro F, et al. Megabase-scale deletion using CRISPR/Cas9 to generate a fully haploid human cell line. *Genome Res*, 2014, 24: 2059–2065
- 51 Zuo E, Huo X, Yao X, et al. CRISPR/Cas9-mediated targeted chromosome elimination. *Genome Biol*, 2017, 18: 224
- 52 Adikusuma F, Williams N, Grutzner F, et al. Targeted deletion of an entire chromosome using CRISPR/Cas9. *Mol Ther*, 2017, 25: 1736–1738
- 53 Choi P S, Meyerson M. Targeted genomic rearrangements using CRISPR/Cas technology. *Nat Commun*, 2014, 5: 3728
- 54 Torres R, Martin M C, Garcia A, et al. Engineering human tumour-associated chromosomal translocations with the RNA-guided CRISPR-Cas9 system. *Nat Commun*, 2014, 5: 3964
- 55 Shalem O, Sanjana N E, Hartenian E, et al. Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells. *Science*, 2014, 343: 84–87
- 56 Canver M C, Smith E C, Sher F, et al. BCL11A enhancer dissection by Cas9-mediated *in situ* saturating mutagenesis. *Nature*, 2015, 527: 192–197
- 57 McKenna A, Findlay G M, Gagnon J A, et al. Whole-organism lineage tracing by combinatorial and cumulative genome editing. *Science*, 2016, 353: aaf7907
- 58 Chen J S, Ma E, Harrington L B, et al. CRISPR-Cas12a target binding unleashes indiscriminate single-stranded DNase activity. *Science*, 2018, 360: 436–439
- 59 Li S Y, Cheng Q X, Wang J M, et al. CRISPR-Cas12a-assisted nucleic acid detection. *Cell Discov*, 2018, 4: 20
- 60 Kellner M J, Koob J G, Gootenberg J S, et al. SHERLOCK: Nucleic acid detection with CRISPR nucleases. *Nat Protoc*, 2019, 14: 2986–3012
- 61 Heyer W D, Ehmsen K T, Liu J. Regulation of homologous recombination in eukaryotes. *Annu Rev Genet*, 2010, 44: 113–139
- 62 Karanam K, Kafri R, Loewer A, et al. Quantitative live cell imaging reveals a gradual shift between DNA repair mechanisms and a maximal use of HR in mid S phase. *Mol Cell*, 2012, 47: 320–329
- 63 Maruyama T, Dougan S K, Truttmann M C, et al. Increasing the efficiency of precise genome editing with CRISPR-Cas9 by inhibition of nonhomologous end joining. *Nat Biotechnol*, 2015, 33: 538–542
- 64 Li G, Liu D, Zhang X, et al. Suppressing Ku70/Ku80 expression elevates homology-directed repair efficiency in primary fibroblasts. *Int J Biochem Cell Biol*, 2018, 99: 154–160
- 65 Pinder J, Salsman J, Dellaire G. Nuclear domain ‘knock-in’ screen for the evaluation and identification of small molecule enhancers of CRISPR-based genome editing. *Nucl Acids Res*, 2015, 43: 9379–9392
- 66 Yu C, Liu Y, Ma T, et al. Small molecules enhance CRISPR genome editing in pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*, 2015, 16: 142–147
- 67 Suzuki K, Tsunekawa Y, Hernandez-Benitez R, et al. *In vivo* genome editing via CRISPR/Cas9 mediated homology-independent targeted integration. *Nature*, 2016, 540: 144–149

- 68 Iyer S, Suresh S, Guo D, et al. Precise therapeutic gene correction by a simple nuclease-induced double-stranded break. *Nature*, 2019, 568: 561–565
- 69 Yao X, Wang X, Hu X, et al. Homology-mediated end joining-based targeted integration using CRISPR/Cas9. *Cell Res*, 2017, 27: 801–814
- 70 Landrum M J, Lee J M, Benson M, et al. ClinVar: Public archive of interpretations of clinically relevant variants. *Nucl Acids Res*, 2016, 44: D862–D868
- 71 Komor A C, Kim Y B, Packer M S, et al. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature*, 2016, 533: 420–424
- 72 Gaudelli N M, Komor A C, Rees H A, et al. Programmable base editing of A•T to G•C in genomic DNA without DNA cleavage. *Nature*, 2017, 551: 464–471
- 73 Nishida K, Arazoe T, Yachie N, et al. Targeted nucleotide editing using hybrid prokaryotic and vertebrate adaptive immune systems. *Science*, 2016, 353: aaf8729
- 74 Ma Y, Zhang J, Yin W, et al. Targeted AID-mediated mutagenesis (TAM) enables efficient genomic diversification in mammalian cells. *Nat Methods*, 2016, 13: 1029–1035
- 75 Koblan L W, Doman J L, Wilson C, et al. Improving cytidine and adenine base editors by expression optimization and ancestral reconstruction. *Nat Biotechnol*, 2018, 36: 843–846
- 76 Komor A C, Zhao K T, Packer M S, et al. Improved base excision repair inhibition and bacteriophage Mu Gam protein yields C:G-to-T:A base editors with higher efficiency and product purity. *Sci Adv*, 2017, 3: eaao4774
- 77 Wang L, Xue W, Yan L, et al. Enhanced base editing by co-expression of free uracil DNA glycosylase inhibitor. *Cell Res*, 2017, 27: 1289–1292
- 78 Zafra M P, Schatoff E M, Katti A, et al. Optimized base editors enable efficient editing in cells, organoids and mice. *Nat Biotechnol*, 2018, 36: 888–893
- 79 Ren B, Yan F, Kuang Y, et al. Improved base editor for efficiently inducing genetic variations in rice with CRISPR/Cas9-guided hyperactive hAID mutant. *Mol Plant*, 2018, 11: 623–626
- 80 Li X, Wang Y, Liu Y, et al. Base editing with a Cpf1-cytidine deaminase fusion. *Nat Biotechnol*, 2018, 36: 324–327
- 81 Kim Y B, Komor A C, Levy J M, et al. Increasing the genome-targeting scope and precision of base editing with engineered Cas9-cytidine deaminase fusions. *Nat Biotechnol*, 2017, 35: 371–376
- 82 Tan J, Zhang F, Karcher D, et al. Engineering of high-precision base editors for site-specific single nucleotide replacement. *Nat Commun*, 2019, 10: 439
- 83 Huang T P, Zhao K T, Miller S M, et al. Circularly permuted and PAM-modified Cas9 variants broaden the targeting scope of base editors. *Nat Biotechnol*, 2019, 37: 626–631
- 84 Jiang W, Feng S, Huang S, et al. BE-PLUS: A new base editing tool with broadened editing window and enhanced fidelity. *Cell Res*, 2018, 28: 855–861
- 85 Cheng T L, Li S, Yuan B, et al. Expanding C-T base editing toolkit with diversified cytidine deaminases. *Nat Commun*, 2019, 10: 3612
- 86 Rees H A, Komor A C, Yeh W H, et al. Improving the DNA specificity and applicability of base editing through protein engineering and protein delivery. *Nat Commun*, 2017, 8: 15790
- 87 Liang P, Sun H, Sun Y, et al. Effective gene editing by high-fidelity base editor 2 in mouse zygotes. *Protein Cell*, 2017, 8: 601–611
- 88 Zuo E, Sun Y, Wei W, et al. Cytosine base editor generates substantial off-target single-nucleotide variants in mouse embryos. *Science*, 2019, 364, 6437: 289–292
- 89 Jin S, Zong Y, Gao Q, et al. Cytosine, but not adenine, base editors induce genome-wide off-target mutations in rice. *Science*, 2019, 364, 6437: 292–295
- 90 Grünwald J, Zhou R, Garcia S P, et al. Transcriptome-wide off-target RNA editing induced by CRISPR-guided DNA base editors. *Nature*, 2019, 569: 433–437
- 91 Zhou C, Sun Y, Yan R, et al. Off-target RNA mutation induced by DNA base editing and its elimination by mutagenesis. *Nature*, 2019, 571: 275–278
- 92 Rees H A, Wilson C, Doman J L, et al. Analysis and minimization of cellular RNA editing by DNA adenine base editors. *Sci Adv*, 2019, 5: eaax5717
- 93 Anzalone A V, Randolph P B, Davis J R, et al. Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA. *Nature*, 2019, 576: 149–157
- 94 Farzadfard F, Perli S D, Lu T K. Tunable and multifunctional eukaryotic transcription factors based on CRISPR/Cas. *ACS Synth Biol*, 2013, 2: 604–613
- 95 Gilbert L A, Larson M H, Morsut L, et al. CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes. *Cell*, 2013, 154: 442–451

- 96 Maeder M L, Linder S J, Cascio V M, et al. CRISPR RNA-guided activation of endogenous human genes. *Nat Methods*, 2013, 10: 977–979
- 97 Perez-Pinera P, Kocak D D, Vockley C M, et al. RNA-guided gene activation by CRISPR-Cas9-based transcription factors. *Nat Methods*, 2013, 10: 973–976
- 98 Black J B, Adler A F, Wang H G, et al. Targeted epigenetic remodeling of endogenous loci by CRISPR/Cas9-based transcriptional activators directly converts fibroblasts to neuronal cells. *Cell Stem Cell*, 2016, 19: 406–414
- 99 Qi L S, Larson M H, Gilbert L A, et al. Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. *Cell*, 2013, 152: 1173–1183
- 100 Hilton I B, D'Ippolito A M, Vockley C M, et al. Epigenome editing by a CRISPR-Cas9-based acetyltransferase activates genes from promoters and enhancers. *Nat Biotechnol*, 2015, 33: 510–517
- 101 Liu X S, Wu H, Krzisch M, et al. Rescue of fragile X syndrome neurons by DNA methylation editing of the FMR1 gene. *Cell*, 2018, 172: 979–992.e6
- 102 Chen B, Gilbert L A, Cimini B A, et al. Dynamic imaging of genomic loci in living human cells by an optimized CRISPR/Cas system. *Cell*, 2013, 155: 1479–1491
- 103 Yang L Z, Wang Y, Li S Q, et al. Dynamic imaging of RNA in living cells by CRISPR-Cas13 systems. *Mol Cell*, 2019, 76: 981–997.e7
- 104 Fujita T, Fujii H. Efficient isolation of specific genomic regions and identification of associated proteins by engineered DNA-binding molecule-mediated chromatin immunoprecipitation (enChIP) using CRISPR. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 439: 132–136
- 105 Fujita T, Fujii H. Identification of proteins associated with an IFN γ -responsive promoter by a retroviral expression system for enChIP using CRISPR. *PLoS One*, 2014, 9: e103084
- 106 Lam S S, Martell J D, Kamer K J, et al. Directed evolution of APEX2 for electron microscopy and proximity labeling. *Nat Methods*, 2015, 12: 51–54
- 107 Myers S A, Wright J, Peckner R, et al. Discovery of proteins associated with a predefined genomic locus via dCas9-APEX-mediated proximity labeling. *Nat Methods*, 2018, 15: 437–439
- 108 Maeder M L, Stefanidakis M, Wilson C J, et al. Development of a gene-editing approach to restore vision loss in Leber congenital amaurosis type 10. *Nat Med*, 2019, 25: 229–233
- 109 Min Y L, Bassel-Duby R, Olson E N. CRISPR correction of duchenne muscular dystrophy. *Annu Rev Med*, 2019, 70: 239–255
- 110 Huang X, Zhou G, Wu W, et al. Genome editing abrogates angiogenesis *in vivo*. *Nat Commun*, 2017, 8: 112
- 111 Kim E, Koo T, Park S W, et al. *In vivo* genome editing with a small Cas9 orthologue derived from *Campylobacter jejuni*. *Nat Commun*, 2017, 8: 14500
- 112 Koo T, Park S W, Jo D H, et al. CRISPR-LbCpf1 prevents choroidal neovascularization in a mouse model of age-related macular degeneration. *Nat Commun*, 2018, 9: 1855
- 113 Schneider-Futschik E K. Beyond cystic fibrosis transmembrane conductance regulator therapy: A perspective on gene therapy and small molecule treatment for cystic fibrosis. *Gene Ther*, 2019, 26: 354–362
- 114 Wade N. Gene therapy caught in more entanglements. *Science*, 1981, 212: 24–25
- 115 Kang S H L, Levings P P, Andersen F, et al. Locus control region elements HS2 and HS3 in combination with chromatin boundaries confer high-level expression of a human β -globin transgene in a centromeric region. *Genes Cells*, 2004, 9: 1043–1053
- 116 Molete J M, Petrykowska H, Bouhassira E E, et al. Sequences flanking hypersensitive sites of the β -globin locus control region are required for synergistic enhancement. *Mol Cellular Biol*, 2001, 21: 2969–2980
- 117 May C, Rivella S, Callegari J, et al. Therapeutic haemoglobin synthesis in β -thalassaemic mice expressing lentivirus-encoded human β -globin. *Nature*, 2000, 406: 82–86
- 118 May C, Rivella S, Chadburn A, et al. Successful treatment of murine β -thalassaemia intermedia by transfer of the human β -globin gene. *Blood*, 2002, 99: 1902–1908
- 119 Cavazzana-Calvo M, Payen E, Negre O, et al. Transfusion independence and HMGA2 activation after gene therapy of human β -thalassaemia. *Nature*, 2010, 467: 318–322
- 120 Dever D P, Bak R O, Reinisch A, et al. CRISPR/Cas9 β -globin gene targeting in human haematopoietic stem cells. *Nature*, 2016, 539: 384–389
- 121 DeWitt M A, Magis W, Bray N L, et al. Selection-free genome editing of the sickle mutation in human adult hematopoietic stem/progenitor cells. *Sci Transl Med*, 2016, 8: 360ra134
- 122 Hoban M D, Lumaquin D, Kuo C Y, et al. CRISPR/Cas9-mediated correction of the sickle mutation in human CD34⁺ cells. *Mol Ther*, 2016, 24: 1561–1569
- 123 Antoniani C, Meneghini V, Lattanzi A, et al. Induction of fetal hemoglobin synthesis by CRISPR/Cas9-mediated editing of the human β -globin locus. *Blood*, 2018, 131: 1960–1973
- 124 Ye L, Wang J, Tan Y, et al. Genome editing using CRISPR-Cas9 to create the HPFH genotype in HSPCs: An approach for treating sickle cell

- disease and β -thalassemia. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113: 10661–10665
- 125 Traxler E A, Yao Y, Wang Y D, et al. A genome-editing strategy to treat β -hemoglobinopathies that recapitulates a mutation associated with a benign genetic condition. *Nat Med*, 2016, 22: 987–990
- 126 Li C, Psatha N, Sova P, et al. Reactivation of γ -globin in adult β -YAC mice after *ex vivo* and *in vivo* hematopoietic stem cell genome editing. *Blood*, 2018, 131: 2915–2928
- 127 Tsang J C, Yu Y, Burke S, et al. Single-cell transcriptomic reconstruction reveals cell cycle and multi-lineage differentiation defects in Bcl11a-deficient hematopoietic stem cells. *Genome Biol*, 2015, 16: 178
- 128 Brendel C, Guda S, Renella R, et al. Lineage-specific BCL11A knockdown circumvents toxicities and reverses sickle phenotype. *J Clin Invest*, 2016, 126: 3868–3878
- 129 Wu Y, Zeng J, Roscoe B P, et al. Highly efficient therapeutic gene editing of human hematopoietic stem cells. *Nat Med*, 2019, 25: 776–783
- 130 Sahin U, Karikó K, Türeci Ö. mRNA-based therapeutics—Developing a new class of drugs. *Nat Rev Drug Discov*, 2014, 13: 759–780
- 131 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
- 132 Charlesworth C T, Deshpande P S, Dever D P, et al. Identification of preexisting adaptive immunity to Cas9 proteins in humans. *Nat Med*, 2019, 25: 249–254
- 133 Burke B A, Carroll M. BCR-ABL: A multi-faceted promoter of DNA mutation in chronic myelogenous leukemia. *Leukemia*, 2010, 24: 1105–1112
- 134 Liang C, Li F, Wang L, et al. Tumor cell-targeted delivery of CRISPR/Cas9 by aptamer-functionalized lipopolymer for therapeutic genome editing of VEGFA in osteosarcoma. *Biomaterials*, 2017, 147: 68–85
- 135 Wang P, Zhang L, Zheng W, et al. Thermo-triggered release of CRISPR-Cas9 system by lipid-encapsulated gold nanoparticles for tumor therapy. *Angew Chem Int Ed*, 2018, 57: 1491–1496
- 136 Sun W, Ji W, Hall J M, et al. Self-assembled DNA nanoclews for the efficient delivery of CRISPR-Cas9 for genome editing. *Angew Chem Int Ed*, 2015, 54: 12029–12033
- 137 Lee K, Conboy M, Park H M, et al. Nanoparticle delivery of Cas9 ribonucleoprotein and donor DNA *in vivo* induces homology-directed DNA repair. *Nat Biomed Eng*, 2017, 1: 889–901

Summary for “CRISPR/Cas工具的开发和应用”

Advances and applications of CRISPR/Cas toolbox

Kailun Fang & Hui Yang*

Institute of Neuroscience, State Key Laboratory of Neuroscience, Key Laboratory of Primate Neurobiology, CAS Center for Excellence in Brain Science and Intelligence Technology, Shanghai Research Center for Brain Science and Brain-Inspired Intelligence, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China

* Corresponding author, E-mail: huiyang@ion.ac.cn

CRISPR/Cas (clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated genes) is an adaptive immune system in bacteria or archaea that responds to the invasion of foreign DNA or RNA. It detects and destroys target invasive nucleic acid through crRNA and Cas protein. The CRISPR/Cas system has been modified to a variety of gene-editing tools, and due to its accessibility and ease of use, it has rapidly become the most popular approach for genome engineering. The discovery of different classes of Cas proteins has broadened the applications of CRISPR/Cas for gene-editing. For example, Cas9 and Cas12 can be applied to recognize and edit target DNA sequence, while Cas13 and RCas9 can be applied to recognize and edit target RNA sequence. To make the CRISPR/Cas system more useful for gene editing, many efforts have been undertaken to increase its on-target editing efficiency, decrease the off-target effects, and reduce the size of Cas proteins for easy delivery to tissues and cells. Furthermore, nuclease-deficient Cas9 (dCas) proteins have been fused to different types of effector proteins to perform more functions. For example, for precise gene editing, the base editor (dCas fused to deaminase) can be used for single-base DNA editing, cytosine base editors achieving C to T (G to A) substitutions and adenine base editors achieving A to G (T to C) substitutions; and the prime editor (dCas fused to reverse transcriptase) can be used for single-base DNA editing or small DNA insertion and deletion. For regulating gene expression, CRISPRa and CRISPRi (dCas fused to a transcriptional activation or repression motif) can be used to activate or inhibit gene expression. In addition, CRISPR/Cas has also been applied for functional genetic screening, target DNA or RNA detection, DNA or RNA live imaging, and cell lineage tracing. The CRISPR/Cas-based tools improve our understanding of biological mechanisms and have also been applied for gene therapy in some clinical trials, such as editing genes or gene regulatory elements for curing thalassemia, sickle cell disease and Leber congenital amaurosis 10, and transforming antigens or deleting negative regulators genes for T-cell immunotherapy. In this review, we discuss the different types of CRISPR/Cas systems, the development and improvement of CRISPR/Cas based gene editing tools and the applications of these tools in scientific research. We also discuss the applications of CRISPR/Cas in clinical therapy and use β -hemoglobin diseases as an example to show the advantages and accessibility of CRISPR/Cas based gene therapy. Taking above, the CRISPR/Cas toolbox could be a key to the scientific research and the next generation of gene therapies.

genome editing, gene therapy, CRISPR/Cas, Cas9

doi: [10.1360/TB-2019-0806](https://doi.org/10.1360/TB-2019-0806)