

李 莉,任红艳,毕延震,等. 基因编辑技术的新进展及展望[J]. 江苏农业科学,2018,46(23):5-10.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.23.002

基因编辑技术的新进展及展望

李 莉,任红艳,毕延震,华文君,华再东,张立革,郑新民

(湖北省农业科学院畜牧兽医研究所/动物胚胎工程及分子育种湖北省重点实验室,湖北武汉 430064)

摘要:随着生物技术的不断发展,传统的转基因技术由于其不能定点整合、遗传不稳定等难以解决基因定点改良与改造问题,所以科研工作者一直致力于寻找简单、高效率、低成本、精准定位等优势的新型转基因技术,掀起了一股基因编辑技术研究的热潮,新的基因编辑技术不断涌现。本文从成簇有规律间隔的短回文重复序列及相关蛋白(CRISPR/Cas)的技术改进与新应用以及一些新出现的技术,如 NgAgo 技术、结构引导的核酸内切酶(SGN)、腺苷脱氨酶(ADAR)、肽核酸(PNA)、5'末端突出的复合物 DNA(TD)等方面,阐述基因编辑技术的新进展,并展望基因技术的应用前景,希望能够为相关研究者提供参考

关键词:基因编辑技术;CRISPR/Cas;NgAgo;SGN;ADAR;PNA;TD

中图分类号: Q78 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)23-0005-06

基因编辑技术可以让科学工作者对特定基因进行编辑改造,如进行突变、敲除,或进行基因的定点整合等,为分子生物学技术进行基因功能研究、物种改良与改造提供了机遇和条件。基因编辑技术经过初期的同源重组,历经锌指核酸酶

(ZFN)、转录激活因子样效应物核酸酶(TALEN)技术,发展到现在广泛使用的规律成簇间隔短回文重复(CRISPR)及其相关蛋白(Cas)技术,使得任意物种、任意细胞的基因编辑成为可能。因此,基因编辑技术的应用更为广泛,其影响力也更为强劲,已经在畜牧业中应用于多种动物的基因改造和改良^[1],甚至应用于人类细胞基因的编辑和基因治疗等。然而,目前广泛应用的 CRISPR/Cas9 技术由于其固有的缺陷,使其更为精确的基因编辑和任意基因的编辑受到阻碍。因此,科学工作者需要寻找新的、更为可靠的基因编辑技术。本文就对基因编辑技术的最新进展加以介绍,并对未来的基因编辑技术加以展望。

收稿日期:2017-07-26

基金项目:国家自然科学基金(编号:31772577);转基因生物新品种培育重大专项(编号:2016ZX08010003-006);湖北省农业科技创新计划(编号:2018-620-004-001);湖北省农业科学院竞争性项目(编号:2016jzjxh013);东南大学生物电子学国家重点实验室开放研究基金。

作者简介:李 莉(1972—),女,湖北红安人,副研究员,主要从事动物生物技术研究。E-mail:136286125@qq.com。

通信作者:郑新民,研究员,主要从事动物生物技术研究。E-mail:anbit20@163.com。

1489.

[20] Desquilbet M, Bullock D S. On the proportionality of EU spatial ex ante coexistence regulations: a comment[J]. Food Policy, 2010, 35(1): 87-90.

[21] 马 琳. 转基因食品标识与信息的政策效应研究:基于中国消费者的实验经济学实证分析[M]. 北京:中国社会科学出版社,2014.

[22] Silva J F, Rubio N. Brazil agricultural biotechnology annual:2017 [EB/OL]. (2017-12-28) [2018-02-20]. https://gain.fas.usda.gov/Recent%20GAIN%20Publications/Agricultural%20Biotechnology%20Annual_Brasilia_Brazil_12-28-2017.pdf.

[23] 郑庆伟. 巴西多措并举推动转基因作物发展[J]. 农药市场信息, 2016(16):44.

[24] 詹 琳. 全球转基因作物商业化进展情况及有关问题的分析[D]. 北京:中国农业科学院,2015.

[25] 祁潇哲,贺晓云,黄昆伦. 中国和巴西转基因生物安全管理比较[J]. 农业生物技术学报,2013,21(12):1498-1503.

[26] de Sousa G D, de Melo M A, Kido E A, et al. The Brazilian GMO regulatory scenario and the adoption of agricultural biotechnology [R]. The World of Food Science, 2013.

[27] 徐琳杰,刘培磊,熊 鹏,等. 国际上主要国家和地区农业转基因产品的标识制度[J]. 生物安全学报,2014,23(4):301-304.

[28] 孙 静. 美日欧转基因食品安全管理对我国的借鉴[J]. 蚌埠学院学报,2014,3(1):100-103.

[29] 王 灿. 中国是怎么进行农业转基因生物安全管理的[EB/OL]. (2017-05-08) [2018-10-08]. <http://news.163.com/17/0505/19/CJMQ4D45000187VE.html>.

[30] 农业部农业转基因生物安全管理办公室. 农业转基因生物安全管理条例(2017年10月7日修订版)[EB/OL]. (2017-12-22) [2018-10-08]. http://www.moa.gov.cn/ztzl/zjyqwgz/zcfg/201007/t20100717_1601306.htm.

[31] 芦 骞. 我国转基因主粮产业化的困难[J]. 中国粮食经济, 2012(6):25-27.

[32] 薛达元. 转基因生物安全离不开公众参与[J]. 中国改革, 2010(4):82-83.

[33] 谭 涛,陈 超. 我国转基因农产品生产、加工与经营环节安全监管:政策影响与战略取向[J]. 南京农业大学学报(社会科学版),2011,11(3):132-137.

[34] 秦向东. 消费者行为实验经济学研究:以转基因食品为例[M]. 上海:上海交通大学出版社,2011.

1 CRISPR/Cas 技术的改进与新应用

CRISPR/Cas 系统是细菌的免疫系统,可对抗入侵的病毒。细菌 CRISPR 能识别入侵的病毒序列,引导 Cas 蛋白对病毒基因进行切割。CRISPR/Cas 系统包含 3 类,最常用的是二类的 CRISPR/Cas9^[2-3]。科学工作者对 CRISPR/Cas9 系统进行了改良,使它适用于各种生物细胞。CRISPR/Cas9 仅利用一小段 RNA (称为 gRNA) 识别并引导 Cas9 对目标基因组特定序列切割,经过细胞自身的基因修复 (包括同源重组和非同源末端连接),最终产生插入、切除等突变。该技术简单易用,已经广泛应用于从细菌到人的基因编辑^[1,4-5]。美国哈佛大学科学家采用 CRISPR/Cas9 技术,破坏了猪细胞基因组中的 62 个潜在的有害 PERV (猪内源逆转录病毒) 位点序列,这极大地促进了猪作为异体移植器官的应用研究,使人们不再担心猪病毒序列对人类的危害^[6]。但是 CRISPR/Cas9 存在一些限制因素,如切割的基因识别 3' 末端部位必须含有 NGG 这种初始间隔区临近序列 (PAM)、存在脱靶现象即不在目标序列进行切割等^[7-8],限制了该技术的进一步应用。科学工作者就针对这些问题进行了研究和改进,并发展了该技术的一些新应用。

为了减少 CRISPR/Cas9 的脱靶效应,双切口技术是一个进步双切开技术,可以使 Cas9 在靶序列的两端同时切割,使切割部位有所限制。Ran 等发明了双切口技术^[8]。该技术在目标序列的上下各设计 1 个 gRNA,成为 1 对 gRNA。成对的 gRNA 引导 Cas9 产生双切口,从而增强 CRISPR/Cas9 的切割效率、减少脱靶效应。目前的 CRISPR/Cas9 技术已经普遍采用双切口设计。

双切开技术虽然提高了靶位点的编辑效率,但是依然无法完全解决 CRISPR/Cas9 技术的脱靶问题。那么,就需要针对该系统进行改良,如对切割酶的改进、对引导序列的改进等。科学家努力进行 Cas9 的改良或者寻找新的切割蛋白,以改进 CRISPR/Cas 系统的特异性和适用性。Kleinstiver 等突变了原始的酿脓链球菌 (*Streptococcus pyogenes*) Cas9 (SpCas9),使其成为具有较高特异性的突变体,得到的 D1135E SpCas9 突变体可以改进 Cas9 的特异性,同时还改变了其 PAM 序列要求,可以切割具有 NAG 和 NGA PAM 的序列^[9-10]。进一步对 SpCas9 进行改良,获得了 eSpCas9 和 SpCas9 - HF 突变体。这些突变体能够降低突变体蛋白与目标 DNA 之间的非特异结合。与野生型比较,在单个 gRNA 的引导下,超过 85% 的 SpCas9 - HF1 可以保持在目标序列部位。采用标准的 sgRNA 靶定非重复序列,Cas9 - HF1 几乎可以排除任何脱靶事件^[10]。Cas9 - HF1 如果能够被普遍应用的话,就可以大大提高研究者对目标基因的编辑能力,而且能够降低脱靶效应。然而,目前 Cas9 - HF1 尚在部分实验室进行研究,并未大面积推广。人们也要考虑 Cas9 - HF1 是不是在不同物种的不同类型细胞中都有如此之高的工作效率,也许还要进一步的改进。

对 Cas9 的改造还有改变其切割能力等,例如使其成为 DNA 单链切割酶,或仅利用其作为结合目标部位的蛋白而与其他 DNA 切割酶重组。一些研究者就使 Cas9 突变成切口酶 Cas9n^[4,8,11],这种酶仅在 DNA 上产生一个单链的切口,而

不是双链断裂。这些突变体是 RuvC 或 HNH 突变体,在成对的 gRNA 引导下,通过成对的单链切口,产生同源重组或非同源的末端连接,产生基因的突变,其同源重组效率与原始的 Cas9 相同,但脱靶效应降低了 50 ~ 1 500 倍,用 4 个 gRNA,针对基因区域上下各 1 对,Cas9n 在 HEK 293FT 细胞中可引起 6 kb 的基因去除^[8,11]。也有科研人员使失去切割活性的 Cas9 (dCas9) 与其他 DNA 切割酶如 Fok I 结合,构成融合的重组酶 dCas9 - Fok I,称为 RNA 引导的 Fok I 核酸酶 (RFN)^[12-14]。Fok I 是非特异性的核酸内切酶,已经在锌指核酸酶 (ZFN) 和 TALEN 中得到应用^[1]。这是利用 dCas9 在 gRNA 引导下与目标位点结合,从而用 Fok I 进行切割,该方法与 Cas9n 相比较,特异性稍强^[13]。这只是改进,但脱靶问题依然存在。

CRISPR/Cas9 系统中的 Cas9 识别具有 NGG 的 PAM 位点。但在某些情况下,基因组特定部位缺乏该 PAM,就使得 Cas9 无法应用。因此,需要新的 Cas 蛋白,使科研人员对任意基因组序列能够进行编辑。一种方法就是 Cas9 基因突变,另一种方法就是寻找新的替代蛋白。经过基因工程改良,现在已经有识别多种 PAM 的改进型 Cas9 蛋白^[15-17],如 VRQR - SpCas9、VRER - SpCas9、EQR - SpCas9 来源于原始的 SpCas9,分别识别 NGA、NGCG 和 NGAG 位点。在不同细菌中存在的 Cas9 具有不同的识别位点特异性。科学家发现一些细菌的 Cas9^[15-16],如嗜热链球菌 (*Streptococcus thermophilus*) Cas9 (StCas9) - CRISPR1 识别 N2AGAAW (W = A/T),SthCas9 - CRISPR3 识别 NGGNG;金黄色酿脓葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 的 SaCas9 识别 N2GRRT (R = A/G),SaCas9 的突变体 KKH - SaCas9 识别 N2NRRT (R = A/G);脑膜炎奈瑟氏菌 (*Neisseria meningitidis*) 的 NmCas9 识别 N4GMTT (M = A/C);侧孢芽孢杆菌 (*Brevibacillus laterosporus*) Cas9 (BlatCas9) 识别 N4CND (D = A/G/T);新凶手弗氏菌 (*Francisella novicida*) 的 FnCas9 识别 NGG,其 RHA 突变体识别 YG (Y = C/T);氨基酸球菌 *Acidaminococcus* sp. BV3L6 和毛螺菌 *Lachnospiraceae bacterium* ND206 的 Cpfl (AsCpfl 和 LbCpfl) 识别 TTTN^[17]。利用 AsCpfl 和 LbCpfl 已经在人和小鼠细胞中进行了基因编辑,并且已经获得了基因编辑的小鼠^[18-19],其脱靶率低于 Cas9,但编辑效率也略低于 Cas9。通过原有 Cas9 的改进和新的 Cas 蛋白使得 CRISPR 技术中识别位点的限制得到部分改善,人们可以有一定的随机性来选择靶位点。但是,同一个 Cas 蛋白只能识别一个 PAM 位点,针对不同位点需要不同的 Cas 蛋白。这依然不能做到对任意基因序列的编辑,科学工作者还要不断探索,寻求新的基因编辑工具。

除了改变 Cas9 蛋白外,改进向导 RNA (gRNA) 的序列和结构也是改善 CRISPR/Cas 系统的途径^[20]。目前,gRNA 含有约 20 个碱基目标序列的 crRNA (CRISPR RNA) 和 tracrRNA,可组成 1 个单链 RNA (sgRNA),易于设计与合成。不同的核酸酶需要不同的 sgRNA^[16,21]。sgRNA 可以在体外由 RNA 聚合酶合成,也可以在 U6 RNA 聚合酶 III 启动子的驱动下,在细胞内合成。不同的 sgRNA 引导的基因编辑效率不同,一些 sgRNA 甚至难以奏效。Liu 等测试了 218 个 sgRNA,但其中 89 个没有作用。引起脱靶的原因包括染色质结构、向

导 RNA 的核酸组成及其长度等^[22]。Nowak 等介绍了对 sgRNA 的一些修饰,包括对前后序列、茎环、间隔序列等的增加、减少和改变^[21]。Xu 等对 sgRNA 的脱靶效应进行了物理学研究,认为 Cas9 的切割与 sgRNA 的折叠有关,并且发展了一个新的预测 sgRNA 脱靶效应的工具^[23]。研究者可以利用该网站进行预测,选择特异性强、效率高的 sgRNA,促进基因编辑工作。

研究者还对 CRISPR/Cas9 系统的应用手段或者方法进行了改进,以促进该系统的编辑效率。利用 CRISPR/Cas9 系统时,最初的方法是 Cas9 和 sgRNA 进行共注射。人们把 Cas9 质粒或体外合成的 mRNA 或者重组的蛋白质,与体外转录的 sgRNA 或 sgRNA 质粒一起注射或转入细胞或者胚胎。但是,Ablain 等设计了一个更为巧妙的质粒^[24]。在这个质粒中,有 U6 启动子驱动 sgRNA 合成,有组织特异启动子驱动 Cas9 表达,有广泛表达的报告基因 *gfp*。只要改变载体中的目标基因的 sgRNA 序列及组织特异启动子序列,就可以在任何组织细胞中特异性地进行基因编辑。Miller 等报导了一种新材料,即两性离子氨基酸脂类(ZALs),可以同时输送长片段 RNA,如 Cas9 mRNA 和 sgRNA;ZAL 的纳米颗粒(ZNP)可以向细胞输送低浓度的 sgRNA(15 nm)而减少 90% 以上的蛋白质表达;ZNP 介导的低浓度(体外 < 600 pmol/L、体内 1 mg/kg)的 mRNA 转移,却引起蛋白质的大量表达;采用静脉注射,利用 ZNP 介导 Cas9 mRNA 和 sgLoxP,在 floxed *tdTomato* 转基因小鼠的肝、肾和肺中实现了报告基因 *tdTomato* 的表达^[25]。这使得采用 CRISPR 技术进行基因治疗更为方便。

CRISPR/Cas 系统不仅可以用于单基因的编辑和改变,还可以同时进行多个基因的修饰和编辑。Yan 等报导了一个新的基因编辑策略,建立了一个质粒,使多个基因的 sgRNA 和 shRNA 在 U6 启动子驱动下在细胞内表达^[26]。细胞中的核糖核酸酶 III Droscha 可以把 sgRNA - shRNA 剪切开来,sgRNA 引导 Cas9 进行 DNA 双链切割,shRNA 干扰其 mRNA。他们对 3 个基因同时编辑的效率是 9%。引入 DNA 连接酶 IV (LIG4)的 shRNA 后,以同源修复(HDR)为基础的精确基因编辑效率提高了 2 倍。哈佛大学学者采用 CRISPR 编辑方法,在细胞中同时破坏了猪细胞基因组中的 62 个 PERV(猪内源逆转录病毒)序列,这些位点对用猪进行人体器官移植具有潜在的危害^[6]。该技术的成功为用猪做人体器官移植的异源供体扫清了一个障碍,大大节省了进行多个基因编辑时的时间和人工成本,提高了 CRISPR/Cas 系统的工作效率。

除了基因编辑,CRISPR/Cas 系统还可以应用于基因转录调控、RNA 编辑、单核苷酸的改变(SNP)研究等,大大促进了 CRISPR/Cas 的应用范围。

基因转录水平的调控就是使基因表达增强或降低。科学工作者使 Cas9 失去核酸酶活性 dCas9,但可以识别和结合 sgRNA。在 gRNA 的引导下,dCas9 与基因结合,不切割 DNA,但却能阻止 RNA 聚合酶的转录,抑制基因表达。或者,在 dCas9 上连接转录激活蛋白如 VP64,当识别并结合 gRNA 后,就会促进 RNA 聚合酶与基因的结合与转录,增强基因表达^[4]。

Cas9 可以作为 RNA 编辑的工具。参照 sgRNA - Cas9 的

基因组编辑,科学家设计了 1 个较短的 DNA 双链,作为 sgRNA 结合的辅助物,而 sgRNA 的目标序列与目标 RNA 相匹配。同时把 sgRNA、DNA 短链和 Cas9 引入细胞,Cas9 就可以在 sgRNA 引导下,切割单链 RNA。O'Connell 等用这种方法,在 Hela 细胞中进行了 GAPDH mRNA 的剪切^[27]。Shmakov 等把发现的 53 个 CRISPR - Cas 蛋白分为 3 组,分别是 C2c1、C2c2 和 C2c3^[28]。其中,C2c2 很独特,其目标不是双链 DNA,而是单链 RNA,可以用于基因敲降。有研究利用纤毛菌(*Leptotrichia shahii*)的 C2c2(LshC2c2),在细菌中进行报告基因 RFP mRNA 的敲降,证实了 C2c2 的 RNA 编辑能力和基因表达调控能力^[29]。C2c2 还含有另一个 RNase 活性,可以产生成熟的 crRNAs。C2c2 可以从一个单一的转录本里面,产生多个 crRNAs,进行 RNA 的编辑。那么,利用 C2c2 就可以进行高通量的基因转录水平的筛选和功能研究。

利用 CRISPR 技术,还可以进行单核苷酸的编辑。细胞中存在一些核苷脱氨酶,如胞苷脱氨酶等。胞苷脱氨酶包括活化诱导脱氨酶(AID,海鳗 PmCDA1)、载脂蛋白 B mRNA 编辑酶(APOBEC)等,可以使胞嘧啶(C)脱氨成为尿嘧啶(U),尿嘧啶在细胞 DNA 修复时就会变成胸腺嘧啶(T);这样基因序列就从 C:G 变为 T:A^[30-33]。作用于 RNA 的腺苷脱氨酶(ADARs)使腺苷(A)脱氨成为肌酐(I),肌酐类似于鸟苷(G)与胞苷(C)配对;经过 1 次基因组复制,就会使 DNA 序列从 A:T 变为 G:C^[34]。Nishida 等把失去核酸酶活性的 Cas9 与 PmCDA1 重组融合蛋白,在 sgRNA 的引导下,使距离 PAM 18 个碱基位置上下的碱基发生了 C 到 T 的点突变^[32]。Komor 等重组了 APOBEC1 - dCas9,在人和小鼠细胞中实现了非结构改变的 C > T 点突变^[31]。Yang 等把脱氨酶与转录激活样效应子(TALE)或者锌指蛋白(ZF)重组,同样在人细胞或大肠杆菌中实现了 C 到 T 的点突变,人细胞中的突变率为 2.5%;但是,他们发现在靶位点的上游 150 bp 有脱靶的脱氨作用,甚至在全基因组发现了内源性的 C、T 突变^[33]。基因组中存在许多的 SNP,不同的 SNP 具有不同的基因活性,甚至与遗传病都有联系。那么,利用这些脱氨酶与 Cas 蛋白的结合,就能够促进 SNP 的研究,进而促进遗传病等的研究。但是,脱靶效应却大大阻碍了该技术的应用。因此,需要进一步研究该技术,使其只能在目标位点发生定点突变,而不是全基因组的改变。

在科学工作者的努力下,CRISPR 技术功能不断被挖掘,其应用也不断扩大。CRISPR 技术甚至已经应用于人类胚胎和人体基因的编辑^[35-37]。Liang 等进行了人类 3 原核受精卵的基因编辑,CRISPR/Cas9 有效编辑了人内源的 β 球蛋白基因(HBB),但同源重组修复效率比较低,脱靶效应明显^[35]。美国食品药品监督管理局(FDA)批准了一个人体基因编辑的研究计划^[36]。该计划希望能够用 CRISPR 来编辑人体的免疫细胞 T 细胞,将基因修饰后的 T 细胞灌注回病人体内,进而治疗人类癌症、骨髓瘤、黑色素瘤和肉瘤。2017 年,美、韩、中科学家合作,对人 iPS 细胞和人类胚胎进行了 MYBPC3 基因修正工作^[37]。CRISPR/Cas9 方法在合子中的修正效率达到 72%^[37]。该报道未见明显的脱靶效应,但是依然存在 NHEJ 现象,该研究对脱靶效应的分析也不是很全面、彻底。如果 CRISPR/Cas 技术完全克服了未知的脱靶效应,对于人

类遗传病的治疗当然是非常好的。但是,脱靶效应使得该技术不能应用于临床,因为不可预期的脱靶效应可能会引起其他基因的改变,从而产生未能控制的效果,那就是解决了一个基因的问题而引起了其他基因的改变。从伦理学上来讲,现在大家还没有形成一个共识,许多人还不支持对人类胚胎进行基因的改变。虽然对人类遗传病的根治看见了曙光,但是由于伦理原因和脱靶效应等技术原因,目前还不能进入临床应用研究。人们可以期待在该技术成熟以及伦理共识达成以后,对人类生活的改变和疾病的治疗。

2 NgAgo 技术

一个新的基因编辑工具, DNA 介导的 NgAgo 曾被发表^[38]。目前,该论文已经被撤稿^[39],但由于其引起的轰动效应,有必要在这里进行介绍,使人们进一步思考基因编辑工具的挖掘以及科研工作。正如撤稿声明中所说的,“发表论文不是研究工作的结束,而是研究工作的开始”。NgAgo 是一种耐热古细菌 *Natronobacterium gregoryi* 的 Argonaute (Ago) 蛋白的简称。Makarova 等报导了原核生物的 Ago 同源蛋白可以作为细菌防御外来入侵的基因工具^[40]。原核 Ago 具有核酸酶活性,可以在 RNA 或 DNA 的引导下,切割外来的基因或质粒。Olovnikov 等发现球形红细菌 (*Rhodobacter sphaeroides*) 的 Ago (RsAgo) 在 RNA 引导下,可以干扰质粒 DNA^[41]。Swarts 等发现嗜热栖热菌 [*Thermus thermophilus* Ago (TtAgo)] 可以在 5'磷酸化的单链 DNA (ssDNA, 称为干涉 DNA - siDNA) 的引导下,切割单链 DNA (ssDNA) 和双链 DNA (dsDNA)^[42]; Swarts 等还发现嗜热古细菌 *Pyrococcus furiosus* 的 Ago (PfAgo) 也只可以在 siDNA 的引导下,切割 ssDNA 和 dsDNA^[43]。但是, TtAgo 和 PfAgo 只能在高温下工作, TtAgo 切割 ssDNA 的温度 ≥ 20 °C, 切割质粒 DNA 的温度 ≥ 65 °C。除特殊的耐热细菌等生物外,一般的生物细胞的生理温度都比较低,人细胞的生理温度为 37 °C。因此, TtAgo 和 PfAgo 不能应用于一般生物细胞的基因编辑,不能成为广泛使用的基因编辑工具。

论文中报道 NgAgo 可以在 37 °C 下的培养细胞中表达; NgAgo 可以与 24 个碱基的 5'磷酸化的单链 DNA (gDNA) 结合,并在其引导下切割基因组双链 DNA,引起插入或切除等突变^[38]。研究还宣称, NgAgo - gDNA 系统不需要 PAM 序列,允许引导 - 目标的碱基错配,并且对高 (G + C) 含量的基因组序列都可以高效编辑,是一个新的基因编辑工具^[38]。如果像该文所报道的那样, NgAgo 就可以完全取代 CRISPR/Cas9 技术,成为理想的基因编辑工具,使人们自由编辑任意基因片段。因此,该文引起了轰动和广泛关注。

全世界科学家争相进行重复研究,但许多实验室宣告失败,无法重复该结果。随后,该文引起质疑与讨论。不同的科学家团队先后在 Protein and Cells^[44]、Nature Biotechnology^[45] 和 Plos One^[46] 发表论文,认为 NgAgo 在哺乳动物细胞中不能进行 DNA 编辑,认为此研究不可重复。

Qi 等在斑马鱼中进行了试验^[47]。他们把体外合成的 NgAgo mRNA 与针对目标基因 *fabp11a* 的 gDNA 一起注射受精卵,结果引起斑马鱼眼睛不能正常发育。但是, *fabp11a* 的基因组序列并没有任何改变,而是 *fabp11a* 的 mRNA 水平下降,即 NgAgo - gDNA 干扰了基因的表达。他们还进行了其他

几个基因如 *ta*、*kdr1*、*lama1* 和 *flt1* 的试验,结果都能引起基因表达的下降。这些结果说明, NgAgo 不能进行基因组编辑,但可能是一个很方便的基因敲降工具。Sungheok 等研究证明, NgAgo 和其他原核生物 Ago 蛋白不同,不能切割 DNA 但能切割 RNA^[48]。NgAgo 能在 DNA 引导下,作为核酸内切酶切割 RNA。NgAgo 的向导 DNA 可以是 5'羟基化的或 5'磷酸化的寡脱氧核糖核苷酸片段 (ODNs)。Sungheok 等的研究解决了 NgAgo 进行基因敲降的机制问题,也解释了其他学者能够重复细胞中 GFP 表达量的减少而观察不到基因插入或切除现象的问题。

因此, NgAgo - gDNA 可以作为基因敲降工具进行使用。那么,对 NgAgo 的研究就结束了吗? 可能未必,也许对 NgAgo、TtAgo 和 PfAgo 的改进可以使 Ago 蛋白真能实现在普通生物中的基因编辑功能,但这需要一个艰苦的探索过程和一段较长的时间。该报道也提示科学工作者利用自然资源,进行基因编辑工具的进一步挖掘,向自然学习,进而改造自然。

3 其他基因编辑技术

除了 Ago 蛋白外,众多科学家都在寻找新的基因编辑工具。Xu 等开创性地把翘尾核酸内切酶 1 (flap endonuclease - 1, FEN - 1) 与 TALEN 中使用的 Fok I 的切割结构域 (Fn 1) 结合成为重组核酸内切酶^[49]。FEN - 1 可以识别末端不匹配的翘尾结构, Fn 1 可以对 DNA 进行切割,他们称这个重组酶为结构引导的核酸内切酶 (structure - guided endonuclease, SGN)。SGN 需要一个向导 DNA (gDNA) 与目标 DNA 配对,但其 3'末端不与目标 DNA 配对,形成翘尾结构。SGN 可以识别 gDNA 的翘尾结构,并由二聚体化的 Fn1 对 DNA 双链进行切割,因此 SGN 及 gDNA 需要成对使用。SGN 对 gDNA 尾部碱基没有要求,但需要 20 个碱基以上,才能在离翘尾 9 ~ 10 个碱基左右的位点进行切割。体内试验表明, SGN 的靶标 DNA 需要一个 32 ~ 50 bp 的间隔区。Xu 等用 SGN 对斑马鱼 *znf703* 和 *cyp26b1* 进行了编辑,其效率为 1% (*znf703*) ~ 10% (*cyp26b1*),但却移除了 *znf703* 基因的 754 bp 和下游的 11 bp,移除了 *cyp26b1* 基因的 2 610 bp^[49]。可见, SGN 的编辑效率较 CRISPR/Cas9 低,且编辑去除的序列长度不受控制。工具是要能够被控制的,不受控制的基因序列切除使其不能成为可靠信赖的基因编辑工具。因此,该技术还需要进一步的研究和完善,发现其工作过程中的机制及可控制性。在该技术可控以后,才能成为新的广泛使用的基因编辑工具。

Zheng 等报导利用 ADAR 对基因组进行编辑的技术^[34]。人有 2 个 ADAR, 分别是 ADAR1 和 ADAR2。ADAR 蛋白含有一个双链 RNA 结合结构域 (dsRBDs) 和 C 端的脱氨酶结构域。ADAR 可以在 RNA 二聚体时,将 A 转变为 I。Zheng 等发现 ADAR 在 DNA/RNA 杂合体时,可以使 DNA 的 dA 脱氨成为 dI,从而实现 dA 到 dG 的转变^[34]。他们用 ADAR1 和 ADAR2 都实现了 DNA/RNA 杂合体中 DNA 的突变,然后,成功实现了 24 nt gRNAs 引导下的 M13 噬菌体单链 DNA 的突变。今后,有可能使用 ADAR 的脱氨酶结构域或者全序列作为基因编辑工具,在真核细胞中实现 gRNA 引导下的 dA 到 dG 的定点突变。

Bentin 等发现了肽核酸 (peptide nucleic acid, 简称 PNA), 可以侵入双链 DNA^[50]。近几年科研者也相继发现了肽核酸可以作为基因编辑工具, Komiyama 等发明了一个人工限制性 DNA 剪刀 (artificial restriction DNA cutter, 简称 ARCUT)^[51]。ARCUT 是化学合成的伪互补 (pseudo-complementary) PNA (pcPNA) 和 Ce(IV)/EDTA 复合物, 可以引起 DNA 双链断裂 (DSB)。Bahal 等用纳米颗粒把 g 替代的尾夹 (g-substituted tail-clamp) PNA (gtcPNA) 输送到培养的细胞或小鼠中, 引起了基因编辑^[52]。

Suzuki 等发现 5' 末端突出的复合物 DNA (TD) 可以引起目标基因的改变, 他们把一个已切开或没有切开的质粒和针对质粒靶标的 TD, 采用脂质体转染试剂共同转入 Hela 细胞, 结果发现目的位置发生了改变, 质粒的切割增加了 7 倍的序列转变效率^[53]。这表明后期如果引入 TD 的同时引入核酸酶, 可以增强基因编辑的效率。该研究为基因编辑技术的改进提供了一个新的思路。

4 基因编辑技术的展望

基因编辑技术使得人们可以针对性地改变生物细胞的基因, 从而改变细胞中该基因的表达。基因编辑技术有广阔的应用前景, 可以应用于基因功能研究、发育生物学研究、动植物甚至于微生物的基因改造及分子育种、基因治疗、癌症治疗等多个方面^[54]。因此, 基因编辑技术的研究成为了一个热点生物学问题。世界各国科学家争相进行新基因编辑工具的寻找或改造, 以期获得编辑效率高、特异性强、不脱靶、易用性好、序列要求低的基因编辑工具。随着科学工作者的不断努力, 新的基因编辑工具和编辑手段将不断涌现。科学家终将获得理想的基因编辑工具。在这个不断进步的过程当中, 科学家要向自然学习, 从微生物到高等生物的蛋白质库中寻找合适的工具蛋白; 科学家也可以对找到的这些工具蛋白进行改造, 包括突变、组合等多种途径; 不同学科、不同国度的科学家也要通力合作, 开发新的工具或辅助工具。让我们期待理想基因编辑工具到来的那一天。

参考文献:

- [1] 李莉, 毕延震, 华再东, 等. 基因编辑技术及其在畜牧业中的应用研究进展[J]. 基因组学与应用生物学, 2016, 35(12): 3410-3418.
- [2] Karginov F V, Hannon G J. The CRISPR system: small RNA-guided defense in bacteria and archaea[J]. Molecular Cell, 2010, 37(1): 7-19.
- [3] Wiedenheft B, Sternberg S H, Doudna J A. RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea[J]. Nature, 2012, 482(7385): 331-338.
- [4] Wang X, Huang X, Fang X, et al. CRISPR-Cas9 system as a versatile tool for genome engineering in human cells[J]. Molecular Therapy Nucleic Acids, 2016, 5(11): e388.
- [5] Nan P, Han W, Li Y, et al. Genetic technologies for extremely thermophilic microorganisms of *Sulfolobus*, the only genetically tractable genus of crenarchaea[J]. Science China(Life Sciences), 2017, 60(4): 1-16.
- [6] Yang L, Güell M, Niu D, et al. Genome-wide inactivation of porcine

- endogenous retroviruses (PERVs) [J]. Science, 2015, 350(6264): 1101-1104.
- [7] Pattanayak V, Lin S, Guilinger J P, et al. High-throughput profiling of off-target DNA cleavage reveals RNA-programmed Cas9 nuclease specificity[J]. Nature Biotechnology, 2013, 31(9): 839-843.
- [8] Ran F A, Hsu P D, Lin C Y, et al. Double nicking by RNA-guided CRISPR-Cas9 for enhanced genome editing specificity[J]. Cell, 2013, 154(6): 1380-1389.
- [9] Kleinstiver B P, Prew M S, Tsai S Q, et al. Engineered CRISPR-Cas9 nucleases with altered specificities[J]. Nature, 2015, 523(7561): 481-485.
- [10] Kleinstiver B P, Pattanayak V, Prew M S, et al. High-fidelity CRISPR-Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects[J]. Nature, 2016, 529(7587): 490-495.
- [11] Mali P, Aach J, Stranges P B, et al. CAS9 transcriptional activators for target specificity screening and paired nickases for cooperative genome engineering[J]. Nature Biotechnology, 2013, 31(9): 833-838.
- [12] Guilinger J P, Thompson D B, Liu D R. Fusion of catalytically inactive Cas9 to FokI nuclease improves the specificity of genome modification[J]. Nature Biotechnology, 2014, 32(6): 577-582.
- [13] Tsai S Q, Wyvekens N, Khayter C, et al. Dimeric CRISPR RNA-guided FokI nucleases for highly specific genome editing[J]. Nature Biotechnology, 2014, 32(6): 569-576.
- [14] Wyvekens N, Topkar V V, Khayter C, et al. Dimeric CRISPR RNA-guided foki-decas9 nucleases directed by truncated gRNAs for highly specific genome editing[J]. Human Gene Therapy, 2015, 26(7): 425-431.
- [15] Nakade S, Yamamoto T, Sakuma T. Cas9, Cpf1 and C2c1/2/3—What's next? [J]. Bioengineered, 2017, 8(3): 265-273.
- [16] Haeussler M, Concordet J P. Genome editing with CRISPR-Cas9: can it get any better? [J]. Journal of Genetics and Genomics, 2016, 43(5): 239-250.
- [17] Zetsche B, Gootenberg J S, Abudayyeh O O, et al. Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system[J]. Cell, 2015, 163(3): 759-771.
- [18] Kim Y, Cheong S A, Lee J G, et al. Generation of knockout mice by Cpf1-mediated gene targeting[J]. Nature Biotechnology, 2016, 34(8): 808-810.
- [19] Hur J K, Kim K, Been K W, et al. Targeted mutagenesis in mice by electroporation of Cpf1 ribonucleoproteins[J]. Nature Biotechnology, 2016, 34(8): 807-808.
- [20] Fu Y, Sander J D, Reyon D, et al. Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs[J]. Nature Biotechnology, 2014, 32(2): 279-284.
- [21] Nowak C M, Lawson S, Zerez M, et al. Guide RNA engineering for versatile Cas9 functionality[J]. Nucleic Acids Research, 2016, 44(20): 9555-9564.
- [22] Liu X, Homma A, Sayadi J, et al. Sequence features associated with the cleavage efficiency of CRISPR/Cas9 system[J]. Scientific Reports, 2016(6): 19675.
- [23] Xu X, Duan D, Chen S J. CRISPR-Cas9 cleavage efficiency correlates strongly with target-sgRNA folding stability: from physical mechanism to off-target assessment[J]. Scientific

- Reports,2017,7(1):143.
- [24] Ablain J, Durand E M, Yang S, et al. A CRISPR/Cas9 vector system for tissue – specific gene disruption in zebrafish[J]. Developmental Cell,2015,32(6):756 – 764.
- [25] Miller J B, Zhang S, Kos P, et al. Non – viral CRISPR/Cas gene editing *in vitro* and *in vivo* enabled by synthetic nanoparticle co – delivery of Cas9 mRNA and sgRNA[J]. Angewandte Chemie, 2017,129(4):1079 – 1083.
- [26] Yan Q, Xu K, Xing J, et al. Multiplex CRISPR/Cas9 – based genome engineering enhanced by drosha – mediated sgRNA – shRNA structure[J]. Scientific Reports,2016(6):38970.
- [27] O'Connell M R, Oakes B L, Sternberg S H, et al. Programmable RNA recognition and cleavage by CRISPR/Cas9[J]. Nature,2014, 516(7530):263 – 266.
- [28] Shmakov S, Abudayyeh O O, Makarova K S, et al. Discovery and functional characterization of diverse class 2 CRISPR – Cas systems [J]. Molecular Cell,2015,60(3):385 – 397.
- [29] Abudayyeh O O, Gootenberg J S, Konermann S, et al. C2c2 is a single – component programmable RNA – guided RNA – targeting CRISPR effector[J]. Science,2016,353(6299):aaf5573.
- [30] Lada A G, Dhar A, Boissy R J, et al. AID/APOBEC cytosine deaminase induces genome – wide kataegis [J]. Biology Direct, 2012,7:47.
- [31] Komor A C, Kim Y B, Packer M S, et al. Programable editing of a target base in genomic DNA without double – stranded DNA cleavage [J]. Nature,2016,533(7603):420 – 424.
- [32] Nishida K, Arazoe T, Yachie N, et al. Targeted nucleotide editing using hybrid prokaryotic and vertebrate adaptive immune systems [J]. Science,2016,353(6305):aaf8729.
- [33] Yang L, Briggs A W, Chew W L, et al. Engineering and optimising deaminase fusions for genome editing[J]. Nature Communications, 2016,7:13330.
- [34] Zheng Y, Lorenzo C, Beal P A. DNA editing in DNA/RNA hybrids by adenosine deaminases that act on RNA [J]. Nucleic Acids Research,2017,45(6):3369 – 3377.
- [35] Liang P, Xu Y, Zhang X, et al. CRISPR/Cas9 – mediated gene editing in human trippronuclear zygotes[J]. Protein & Cell,2015,6(5):363 – 372.
- [36] Sara R. First CRISPR clinical trial gets green light from US panel [EB/OL]. (2016 – 06 – 22) [2017 – 07 – 26]. <https://www.nature.com/news/first – crispr – clinical – trial – gets – green – light – from – us – panel – 1.20137>.
- [37] Ma H, Marti – Gutierrez N, Park S W, et al. Correction of a pathogenic gene mutation in human embryos[J]. Nature,2017,548(7668):413 – 419.
- [38] Gao F, Shen X Z, Jiang F, et al. DNA – guided genome editing using the *Natronobacterium gregoryi* Argonaute[J]. Nature biotechnology, 2016,34(7):768 – 773.
- [39] Time for the data to speak [EB/OL]. (2017 – 08 – 02) [2017 – 08 – 23]. <https://www.nature.com/articles/nbt.3938?foxtrotcallback=true>.
- [40] Makarova K S, Wolf Y I, van der Oost J, et al. Prokaryotic homologs of Argonaute proteins are predicted to function as key components of a novel system of defense against mobile genetic elements [J]. Biology Direct,2009,4:29.
- [41] Olovnikov I, Chan K, Sachidanandam R, et al. Bacterial argonaute samples the transcriptome to identify foreign DNA [J]. Molecular cell,2013,51(5):594 – 605.
- [42] Swarts D C, Jore M M, Westra E R, et al. DNA – guided DNA interference by a prokaryotic Argonaute [J]. Nature,2014, 507(7491):258 – 261.
- [43] Swarts D C, Hegge J W, Hinojo I, et al. Argonaute of the archaeon *Pyrococcus furiosus* is a DNA – guided nuclease that targets cognate DNA[J]. Nucleic acids research,2015,43(10):5120 – 5129.
- [44] Burgess S, Cheng L, Gu F, et al. Questions about NgAgo [J]. Protein Cell,2016,7(12):913 – 915.
- [45] Lee S H, Turchiano G, Ata H, et al. Failure to detect DNA – guided genome editing using *Natronobacterium gregoryi* Argonaute [J]. Nature Biotechnology,2017,35(1):17 – 18.
- [46] Javidi – Parsijani P, Niu G, Davis M, et al. No evidence of genome editing activity from *Natronobacterium gregoryi* Argonaute (NgAgo) in human cells[J]. Plos One,2017,12(5):e0177444.
- [47] Qi J, Dong Z, Shi Y, et al. NgAgo – based *fabp11a* gene knockdown causes eye developmental defects in zebrafish [J]. Cell Research, 2016,26(12):1349 – 1352.
- [48] Sunghyeok Y, Taegeun B, Kyoungmin K, et al. DNA – dependent RNA cleavage by the *Natronobacterium gregoryi* Argonaute [EB/OL]. (2017 – 01 – 20) [2017 – 07 – 26]. <https://www.biorxiv.org/content/early/2017/01/20/101923>.
- [49] Xu S, Cao S, Zou B, et al. An alternative novel tool for DNA editing without target sequence limitation: the structure – guided nuclease [J]. Genome Biology,2016,17(1):186.
- [50] Bentin T, Larsen H J, Nielsen P E. Combined triplex/duplex invasion of double – stranded DNA by “tail – clamp” peptide nucleic acid[J]. Biochemistry,2003,42(47):13987 – 13995.
- [51] Komiyama M. Cut – and – paste of DNA using an artificial restriction DNA cutter [J]. International Journal of Molecular Sciences,2013,14(2):3343 – 3357.
- [52] Bahal R, McNeer N A, Quijano E, et al. *In vivo* correction of anaemia in β – thalassemic mice by γ PNA – mediated gene editing with nanoparticle delivery[J]. Nature Communications,2016,7:13304.
- [53] Suzuki T, Imada T, Nishigaki N, et al. Cleavage of target DNA promotes sequence conversion with a tailed duplex[J]. Biological & Pharmaceutical Bulletin,2016,39(8):1392 – 1395.
- [54] 赵盼盼, 王 丽, 袁园园, 等. 提高 CRISPR/Cas9 系统靶向编辑效率方法的研究进展[J]. 江苏农业科学,2017,45(1):12 – 15.