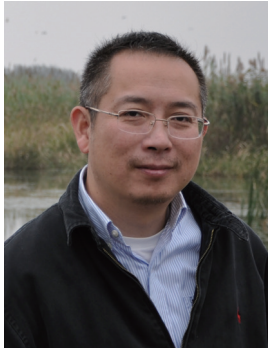


DOI: 10.13376/j.cblls/2015002

文章编号: 1004-0374(2015)01-0002-10

· 专刊: 基因组编辑技术 ·



高翔, 博士, 南京大学模式动物研究所创始人, 长江学者奖励计划特聘教授, 国家遗传工程小鼠资源库主任, 教育部模式动物与疾病模型重点实验室主任。实验室研究兴趣集中在利用基因组改造技术, 建立复杂疾病小鼠模型, 分析疾病表型的分子机理。实验室已建立了多种糖尿病/肥胖症模型、心脏病模型。这些模型证实了疾病相关基因的功能调控的多层次复杂性: 包括 BDNF 转录的远程调控、蛋白水平修饰 (Pax6 突变对 PC2 蛋白酶影响) 和蛋白磷酸化调控 (PP2A 基因剔除、c-Kit 突变) 等。非转录基因组保守序列的功能分析也是实验室的工作重点。

## 基因组编辑技术与模式动物

琚存祥<sup>1</sup>, 赵静<sup>1,2</sup>, 高翔<sup>1,2\*</sup>

(1 南京大学-南京生物医药研究院, 南京 210061; 2 南京大学模式动物研究所, 南京 210061)

**摘要:** 随着高通量测序技术的发展, 后基因组时代的研究重点已转移至如何阐明基因功能。以胚胎干细胞 (ES) 和同源重组为基础的基因打靶技术在生命科学及医学研究中做出了重要贡献, 但存在打靶效率低、耗时长、有物种限制等缺点。近年来, 锌指核酸酶 (ZFNs)、类转录激活因子核酸酶 (TALENs) 及 CRISPR/Cas9 等新的基因组编辑技术的兴起极大地推进了基因功能研究的进展。ZFNs 与 TALENs 包含两个结构域, 识别并结合核苷酸的 DNA 结合域和 Fok I 核酸内切酶, 两者的区别在其 DNA 识别结构域: ZFNs 识别的基本单位为 3 个连续碱基对, TALENs 则识别单个碱基。与 ZFNs 及 TALENs 不同, CRISPR/Cas9 以碱基互补配对机制识别并结合 DNA, 该技术设计简便, 在各物种中得到广泛应用。自 ES 细胞打靶技术至今, 研究者采用基因打靶技术已获得许多疾病相关模型, 这些模型在基因功能、人类疾病治疗及基因治疗等方面发挥着越来越重要的作用。将对各类基因组编辑技术的原理及应用情况进行总结, 同时介绍模式动物在生命科学及医学研究中的应用情况。

**关键词:** 基因组编辑; ZFNs; TALENs; CRISPR/Cas9; 模式动物

**中图分类号:** Q789; Q819 **文献标志码:** A

## Genome editing technologies and model animal

JU Cun-Xiang<sup>1</sup>, ZHAO Jing<sup>1,2</sup>, GAO Xiang<sup>1,2\*</sup>

(1 Nanjing Biomedical Research Institute of Nanjing University, Nanjing 210061, China; 2 Model Animal Research Center of Nanjing University, National Resource Center for Mutant Mice, Nanjing 210061, China)

**Abstract:** With the development of high-throughput sequencing in the post genome era, the researchers concentrate their efforts on elucidating the relationships between the gene and the corresponding physiological/pathological function. The gene targeting technology based on the embryonic stem cells (ES) and homologous recombination technique has made a great contribution to the life science and medical research, meanwhile has the disadvantage of low efficiency, long time consumption and species limitation. Recently, the grown-up of new genome editing technology including ZFN, TALEN and CRISPR/Cas9 accelerates the progress of gene function study. ZFNs and

收稿日期: 2015-01-04

\*通信作者: E-mail: gaoxiang@nju.edu.cn

TALENs both contain two domains: one executes the DNA recognition and binding function, the other is the Fok I endonuclease domain. The difference between their DNA binding domains is that ZFNs recognizes 3 successive bases as the basic unit while TALENs identifies the single base. Unlike ZFNs and TALENs, CRISPR/Cas9 recognizes and binds the target DNA based on the principle of complementary base pairing, which promotes the wide application of Cas9 in various species. Since the foundation of ES cell targeting technology, researchers have made many disease-related models using this technology, and these models play a more and more important role in human disease treatment, gene function study and gene therapy. Here, we summarized the principle and application of these genome editing technologies and introduced the application of animal model in the life science and medical research.

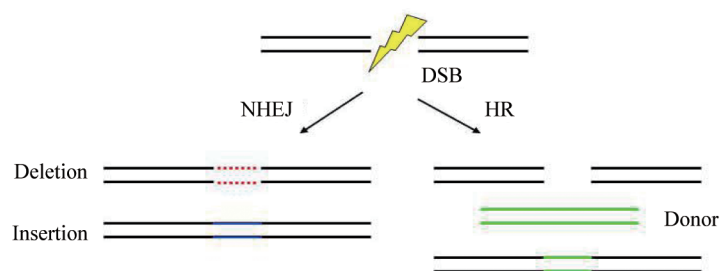
**Key words:** genome editing; ZFNs; TALENs; CRISPR/Cas; model animal

随着测序技术的不断完善, 完成基因组测序的物种不断增加。研究并获得每个基因的功能和遗传信息, 成为生物学的研究目标, 而基因组编辑技术是实现这个目标的主要手段<sup>[1]</sup>。锌指核酸酶 (zinc-finger nucleases, ZFNs)<sup>[2-4]</sup>、类转录激活因子核酸酶 (transcription activator-like effector nucleases, TALENs)<sup>[5-6]</sup> 及 CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats)/Cas9<sup>[7-8]</sup> 是继同源重组基因打靶后, 新发展起来的基因组定点编辑技术。与经典同源重组打靶不同, 这 3 种新技术本质是利用核酸内切酶在基因组产生 DNA 双链断口 (double strands breaks, DSBs), DSB 能激活宿主体内固有的非同源末端连接 (non-homologous end joining, NHEJ) 或同源重组 (homologous recombination, HR) 机制。NHEJ 通过 DNA 片段的插入和 / 或缺失 (indel), 造成基因移码突变<sup>[2]</sup>, 而在提供同源序列情况下, 机体亦可通过 HR 方式进行精确修复<sup>[9]</sup> (图 1)。经典同源重组需要采用胚胎干细胞 (embryonic stem cell, ES cell) 进行同源重组打靶, 该技术局限于有可嵌合遗传 ES 细胞的动物 (小鼠), 且打靶后基因组中残留外源性基因 (如 Cre 重组酶剔除抗性标记残留的 Loxp 序列)<sup>[10]</sup>。新的基因组编辑技术省去了 ES 细胞打靶

阶段, 可通过受精卵注射直接得到突变个体, 故可对更广泛的物种实现定向打靶, 同时不需要药物筛选, 无外源基因残留问题。目前, 3 种技术均在多个物种中成功应用, 例如小鼠、大鼠、斑马鱼、果蝇、线虫和家蚕<sup>[11-20]</sup>。

## 1 基于ES细胞同源重组的基因打靶技术

基因打靶技术是利用 DNA 同源重组和 ES 细胞, 在基因组某个位点引入特定突变, 获得基因型改变的模式动物, 以期研究基因功能的技术。1981 年, Evans 实验室成功从小鼠囊胚中分离到 ES 细胞, 在体外实现连续传代培养<sup>[21]</sup>, 并于 1984 年实现 ES 细胞顺利发育为嵌合小鼠的生殖细胞, 使得体外培养的 ES 细胞基因型得以遗传<sup>[22]</sup>。同源重组技术是 20 世纪 70 年代在酵母细胞中最先发展起来的。1985 年, Smithies 等<sup>[23]</sup>首次证明了同源重组在哺乳动物细胞中存在, Capecchi 实验室在基因打靶载体的设计中提出正负选择系统, 使同源重组的概率大大提高<sup>[24]</sup>, 并于 1989 年成功获得利用 ES 细胞打靶得到的基因敲除小鼠<sup>[25]</sup>。由于在基因打靶技术中的开创性贡献, Evans、Capecchi 和 Smithies 获得了 2007 年诺贝尔生理或医学奖。基因打靶技术的



机体或组织对 ZFNs、TALENs、CRISPR/Cas9 引起的 DSB 修复: 非同源末端连接 (NHEJ) 和同源重组 (HR)。以 NHEJ 修复时, 会产生插入/删除突变 (indel); 以 HR 修复时, 通过提供外源性打靶载体, 能实现定点突变或者标签序列插入等。

图1 机体对DSB损伤的修复机制

流程简述如下：首先构建基因打靶载体，载体中含与ES细胞中靶基因同源的序列，同源序列中插入标志基因（通常是Neo<sup>r</sup>），同源序列外侧为负筛标记，负筛一般为单纯疱疹病毒胸苷激酶（HSV-tk）或白喉的毒素A片段（Diphtheria toxin A）。基因打靶载体引入ES细胞后，通过DNA同源重组，正筛标志基因随同源序列进入ES细胞靶基因位点，负筛标记用于去除发生随机插入的ES细胞（图2）。正确打靶的ES细胞经囊胚注射后即可得到嵌合鼠，嵌合鼠与野生型回交得到杂合子，如有需要，杂合子兄妹交配可得到突变纯合子。基因打靶技术已不再局限于简单的基因敲除，目前已实现基因组中定点突变<sup>[26]</sup>和组织与发育阶段特异性的基因打靶<sup>[27]</sup>，同时可在特定基因位点实现定点插入，使目的基因的表达不受基因组位点影响，如小鼠6号染色体的Rosa26基因可在全身广泛表达，是定点插入的常用位点<sup>[28-30]</sup>。然而，ES细胞打靶技术存在明显缺陷：同源重组的效率低、耗时长、费用高，存在明显物种限制。因此，亟需能突破ES细胞物种限制的基因组编辑技术，以实现在多物种中的基因的编辑和修饰。

## 2 基于核酸内切酶的基因组编辑技术

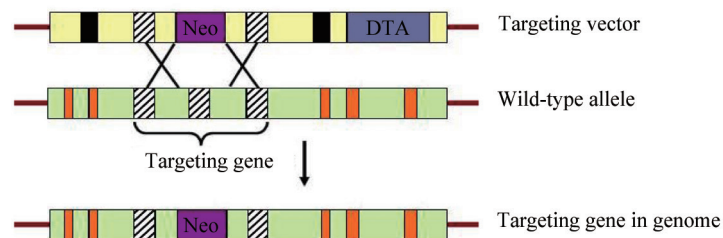
### 2.1 锌指核酸酶(zinc finger nucleases, ZFNs)

锌指核酸酶技术是将锌指蛋白(zinc finger protein, ZFP)与Fok I核酸内切酶融合而成的人工嵌合蛋白<sup>[31]</sup>。其中，ZFP能识别并结合特异DNA序列，Fok I则通过二聚化在靶序列附近产生DNA的DSB<sup>[31-34]</sup>。ZFP由链接序列(linker)串联3~6个Cys<sub>2</sub>-His<sub>2</sub>锌指组成，Cys<sub>2</sub>-His<sub>2</sub>锌指是真核生物中最广泛的DNA结合基序，能够介导蛋白质与核酸、小分子或其他蛋白质的相互作用，这类锌指由大约30个氨基酸组成，并折叠形成β-β-α结构，α-螺旋

的几个氨基酸可识别并结合DNA双链沟槽中的连续3个碱基<sup>[35]</sup>。含3~6个锌指的ZFP能特异性识别9~18 bp DNA序列<sup>[36]</sup>。对于基因组而言，18 bp的DNA序列即可保证靶位点的特异性。基于ZFP的序列识别特点，研究者利用该技术已实现基因组位点特异性修饰<sup>[37-38]</sup>。以含3个锌指的ZFP为例，3个锌指从N端到C端依次为F1(Finger 1)、F2(Finger 2)和F3(Finger 3)，它们在DNA链上沿3'至5'方向依次识别结合靶序列。两个ZFNs以相对方向分别结合DNA正反义链，两个Fok I结构域二聚化从而产生内切酶活性，但Fok I二聚化需要合适长度的间隔序列(spacer)方能实现<sup>[33,39]</sup>（图3A）。目前，人们尚未完全掌握锌指同DNA靶序列之间的对应关系，如果靶序列无现成可用的ZFP可供选择，针对每个特定靶点，研究者往往需要构建庞大的锌指表达文库，通过实验筛选出高效且特异的锌指蛋白；虽然有商业化公司，如Sangamo等可提供较高特异性的ZFN，但对一般研究者而言，获得有效的ZFNs仍是一个巨大的技术难题，这也是限制ZFN技术广泛应用的原因。迄今为止，研究者采用ZFNs技术已在大鼠、小鼠、斑马鱼和果蝇<sup>[40-45]</sup>等模式生物及体外培养的细胞系<sup>[46-48]</sup>中实现基因的定点突变，且基因突变可顺利遗传至F1代中。

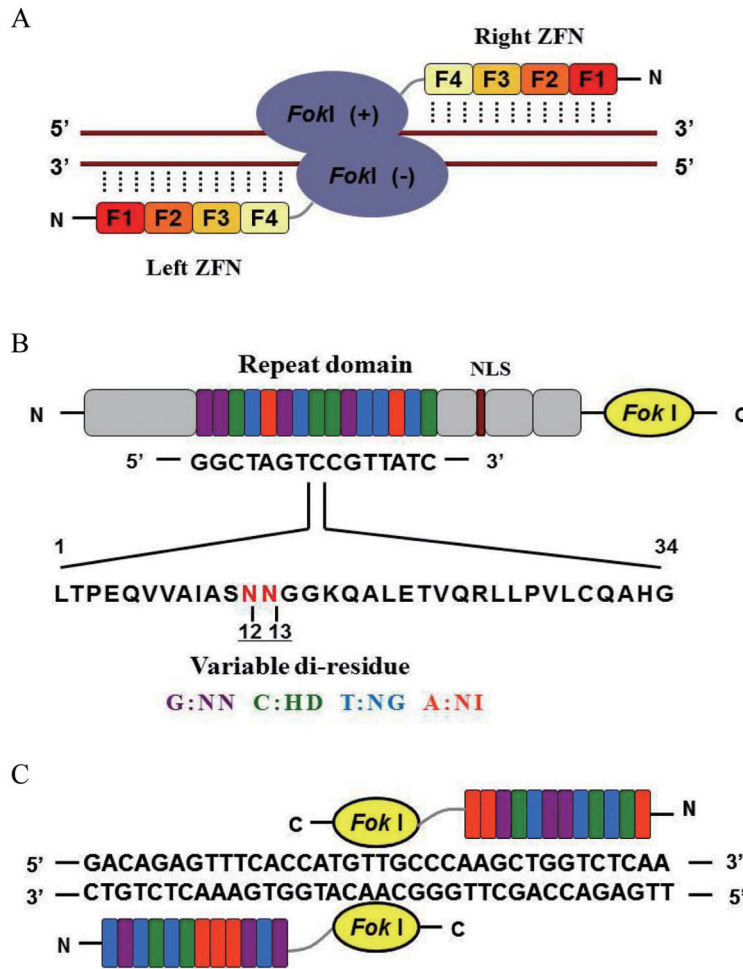
### 2.2 类转录激活因子效应物核酸酶(transcription activator-like effector nucleases, TALENs)

TALE蛋白来源于一种植物病原体黄单胞杆菌(*Xanthomonas* spp.)，该蛋白质通过识别宿主基因组特定DNA序列并调控宿主内源基因表达，以增加宿主对该病原体的易感性<sup>[49]</sup>。研究者分析TALE蛋白结构，发现其含3个结构域：N端的转运信号(translocation signal)、C端为具有核定位信号(nuclear localization signal, NLS)的转录激活结构域(activation domain, AD)及中部部分负责识别并结合DNA序列。



采用线性化的载体进行ES细胞打靶，正筛标记位于同源序列内部，通过同源重组进入靶基因并敲除目的序列，同源序列外侧的负筛标记DTA可去除发生随机插入的ES细胞。

图2 正负筛系统进行ES打靶示意图



(A)两个独立的ZFNs分别识别并结合靶基因正反义链, Fok I在间距合适情况下二聚化并产生核酸内切酶活性, 每个ZFN含4个锌指蛋白, 可识别连续的12个碱基。(B)TALEN由16~18个重复单元组成, 重复单元的12、13位氨基酸针对的4种核苷酸(A、T、G、C)不同, 具有4种类型, Fok I融合在TALE的C端。(C)两个TALENs分别在靶基因正反义链识别并结合DNA序列, Fok I二聚化后产生核酸内切酶活性。

图3 ZFNs、TALENs结构及作用机制示意图

DNA 识别结构域是 TALE 技术应用的关键, 由 1~33 个识别 DNA 碱基的重复单元串联后, 尾部融合一个含 20 个氨基酸的半重复单元组成<sup>[49]</sup>。重复单元含 33~35 个氨基酸, 除第 12、13 位氨基酸靶向识别 DNA 碱基, 针对不同碱基会发生变化外, 其他位置的氨基酸高度保守, 重复单元中高度变化的 12、13 位氨基酸被称为重复可变双残基 (repeat variable di-residue, RVD)。与 ZFP 中每个锌指识别 3 个连续碱基不同, TALE 重复单元特异性识别并结合单个碱基, 4 种不同碱基 A、T、C 和 G 对应的 RVD 分别是 NI (Asn Ile)、NG (Asn Gly)、HD (His Asp) 和 NN (Asn Asn)(图 3 B); 进一步研究发现, NH (Asn His) 作为一种新的 RVD 亦可高特异性识别碱基 G<sup>[50]</sup>。掌握 TALE 与碱基的识别机制后, 研究者

可对任意序列设计 TALE, 并获得高效切割活性的 TALENs。Yang 实验室将 Fok I 分别连至 TALE 结构域不同末端(N 端或 C 端) 构成 TALEN, 并比较两者的活性, 结果发现 Fok I 连接到 TALE 的 C 端时切割活性更高<sup>[51]</sup>, 故目前已有多种效应因子被融合至 TALE 的 C 端并取得明显效果, 如使用最广泛的核酸酶<sup>[52-54]</sup>、转录激活因子<sup>[55]</sup>等。因 Fok I 需要二聚化方能呈现活性, 与 ZFN 相似, DNA 靶点左、右两侧 TALE 识别序列的间距 (Spacer) 显著影响 Fok I 的活性, 间距处于 13~30 bp 时 Fok I 呈现明显活性, 且 15 bp 时切割活性最强<sup>[52]</sup>(图 3C)。当所含重复单元数为 9~24 时, TALE 可与靶序列有效结合, 以 16 和 18 个重复单元时效率最高; 重复单元与 Fok I 的间隔序列有效长度 (来自 TALE 蛋

白 C 端的肽段) 为 28~95 个氨基酸, 序列长度为 63 个氨基酸时效率最高<sup>[54]</sup>。虽然 TALE 是以单碱基方式识别 DNA, 为减少构建 TALE 模块的工作量, 研究者往往需构建可识别多碱基的(二、三、四碱基)的 TALE 模块文库, 并通过“Golden Gate”克隆、高通量固相组装<sup>[56-58]</sup>等高效的拼接技术实现高通量组装 TALE 模块。针对人类基因组中近两万个蛋白质编码基因设计的 TALEN 打靶文库的完成, 证实 TALE 重复单元可快速高效组装出研究者需要的序列<sup>[59]</sup>。

自 2011 年至今, TALEN 技术已被广泛应用于多种模式生物的基因组修饰, 如在酵母<sup>[52]</sup>、线虫<sup>[60]</sup>、果蝇<sup>[61]</sup>、斑马鱼<sup>[62]</sup>、小鼠<sup>[18,63]</sup>、大鼠<sup>[64]</sup>及哺乳动物细胞的中实现定点打靶<sup>[65-66]</sup>。研究者将 TALE 与转录激活因子(例如 VP16 或 VP64)或转录抑制因子融合, 实现了对靶基因转录的激活或抑制<sup>[54-55,67]</sup>。

### 2.3 RNA 引导的 DNA 核酸内切酶(CRISPR/Cas9)

1987 年, 日本大阪大学(Osaka University)学者 Ishino 研究大肠杆菌碱性磷酸酶基因时, 在该基因附近发现一段由简单重复序列组成的特异序列<sup>[68]</sup>。2002 年, 荷兰学者 Jansen 分析该序列发现: 它由长度不一(21~37 bp)的正向重复序列(repeats)与长度类似的间隔序列(spacers)间隔排列而成, 并将其命名为成簇的、规律间隔的短回文重复序列(clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPRs), 并在其附近发现 CRISPR 相关(CRISPR-associated, Cas)基因, 分析发现 Cas 基因表达产物与 DNA 解螺旋酶及核酸酶具有高度同源性<sup>[69]</sup>, 提示 Cas 蛋白具有 DNA 内切酶功能。进一步研究发现, CRISPR/Cas 系统间隔序列与一些噬菌体或质粒的序列存在高度同源性, 细菌利用该系统可特异性降解入侵的外源 DNA<sup>[70-71]</sup>。来自化脓链球菌(*Streptococcus pyogenes*)的 II 型 CRISPR 系统, 只需 Cas9 蛋白、CRISPR RNA (crRNA) 与 transactivating-CRISPR RNA (tracrRNA) 即可达到降解外源性 DNA 的效果<sup>[72]</sup>。CRISPR 上游的前导序列(leader sequence)启动 CRISPR 序列的转录<sup>[73]</sup>, 转录产物被加工为含入侵序列 crRNA<sup>[74]</sup>, crRNA 以碱基互补配对与 tracrRNA 结合为 RNA 复合物<sup>[72]</sup>, RNA 复合物与 Cas9 核酸酶形成 RNA-蛋白质复合物<sup>[75]</sup>, 由 crRNA 中的特异性序列引至紧挨前体间隔序列毗邻基序(proto-spacer adjacent motif, PAM)的 DNA 靶位点, crRNA 中的引导序列与靶点 DNA 以碱基互补配对结合并启动 Cas9 核酸酶切割 DNA 双链,

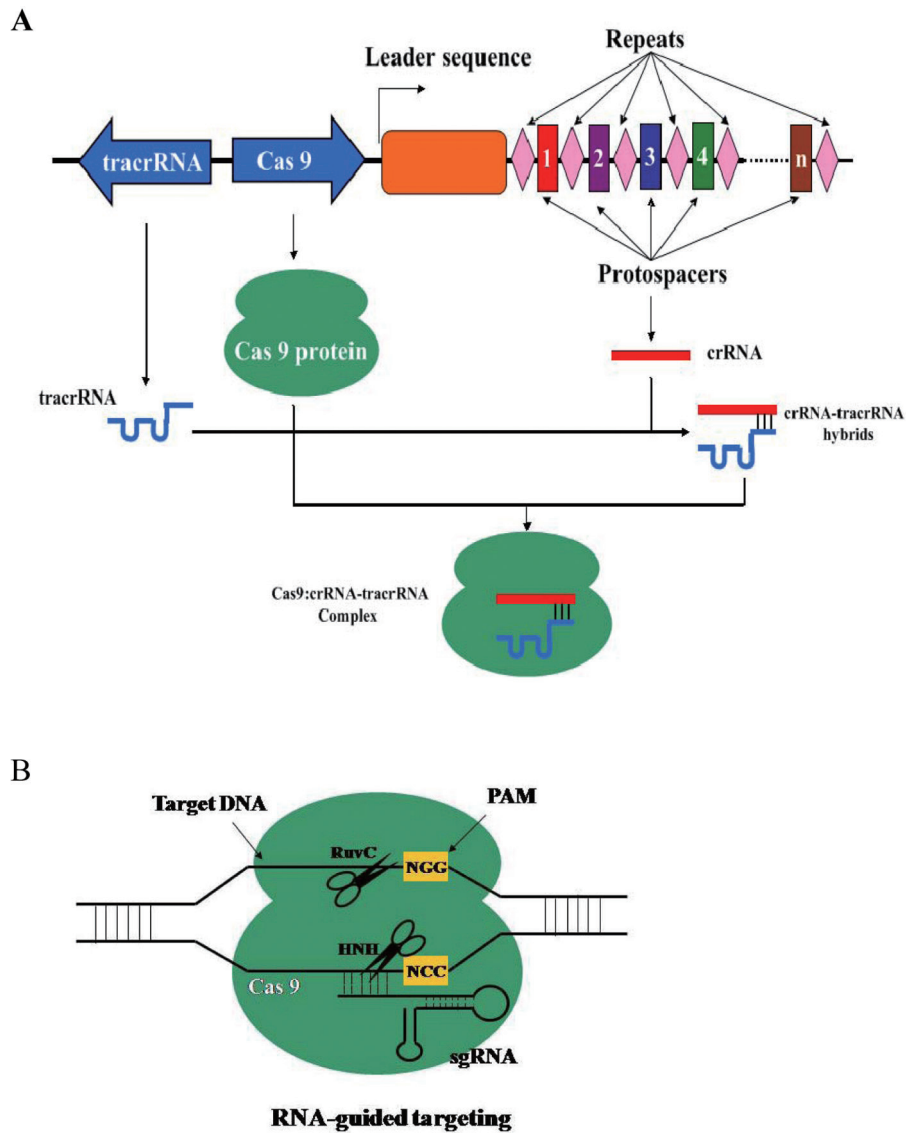
Cas9 蛋白的 HNH 核酸酶结构域剪切互补链, 而 Cas9 的 RuvCI 结构域剪切非互补链<sup>[75-76]</sup>, 从而在靶位点产生 DSB(图 4)。与 ZFNs 及 TALENs 相比, Cas9 技术的优势是可针对多个基因设计 sgRNA (single-guide RNA) 并在一次打靶中同时完成多基因突变<sup>[8,77-78]</sup>。根据 Cas9 可多位点同时打靶的特点, 在待删除片段两端设计 sgRNA, 一次打靶即可实现片段的定向删除, 此类特点可满足基因簇删除、多基因删除、调控区域删除、外源标记基因的大片段删除的需求<sup>[79-80]</sup>。sgRNA 载体设计的简易性使研究者可针对一个基因设计多个 sgRNA, 并可结合阵列实验构建 sgRNA 文库用于功能基因筛选。迄今为止, 研究者分别构建了容量约为 64 000 和 87 000 的 sgRNA 筛选文库, 采用该文库完成对人和鼠源细胞的筛选, 鉴定出某些表型相关基因<sup>[81-82]</sup>, 这提示在抗癌药物筛选、致癌基因筛选等方面, sgRNA 文库有很好的应用前景。

该技术首先在肺炎链球菌和大肠杆菌中实现定向打靶<sup>[83]</sup>, 随后在哺乳动物细胞系和多能干细胞中完成基因编辑<sup>[7-8,84]</sup>, 后续实验证实该技术在斑马鱼<sup>[19]</sup>、线虫<sup>[12]</sup>、果蝇<sup>[85]</sup>、小鼠<sup>[78]</sup>和大鼠<sup>[86]</sup>等模型生物同样有效。除用于基因组编辑外, 该技术也可用于基因表达调控: 细菌和人源细胞实验证实, 将突变型 Cas9(无核酸内切酶活性)引导至启动子区域, 能显著降低基因表达<sup>[87-88]</sup>; 将转录激活因子或转录抑制因子与突变型 Cas9 融合, 在 sgRNA 引导下可实现调控基因表达的效果<sup>[89-90]</sup>。此外, 绿色荧光蛋白(EGFP)与突变型 Cas9 融合表达, 可用于靶基因的空间定位, 如利用该技术成功定位端粒; 通过对 DNA 片段连续设计 sgRNA, 成功展示基因组结构的动态变化<sup>[91]</sup>。

## 3 基因组编辑技术在模式动物中的应用

### 3.1 研究基因功能

随着高通量测序技术的出现及完善, 后基因组时代的生命科学的研究热点已集中在如何阐释基因功能等方面。借助基因组靶向修饰技术建立相关动物模型, 显示出巨大的优势, 并已取得显著成效。例如, Zhao 等<sup>[92]</sup>靶向敲除小鼠 miRNA-1-2 基因后发现, 该基因在调节心脏形态发生、电传导和细胞周期控制方面起关键作用。Selman 等<sup>[93]</sup>定点敲除小鼠核糖体蛋白 S6 激酶 1 基因后, 意外发现该基因的敲除限制了小鼠热量的摄入, 实验鼠的寿命显著延长, 该研究为研发抑制衰老的药物提供了参考。



(A)前导序列(leader sequence)启动CRISPR 序列的转录后, CRISPR 重复序列单元的转录产物被加工为crRNA, crRNA以碱基互补配对与tracrRNA 结合为RNA复合体, RNA复合体与Cas9核酸酶形成RNA-蛋白复合体。(B) RNA-蛋白复合体由sgRNA的引导序列靶向至紧挨PAM的DNA靶点, 引导序列与靶点DNA以碱基互补配对结合并介导Cas9核酸酶切割DNA双链, Cas9 蛋白的HNH 核酸酶结构域剪切互补链, 而Cas9的RuvCI 结构域剪切非互补链。

**图4 CRISPR/Cas9基本结构及作用机制示意图**

### 3.2 建立人类疾病相关动物模型

人类疾病动物模型在探索发病机制、疾病诊断及药物筛选等方面发挥重要作用。采用基因组打靶技术至今, 研究者已制备许多重要的人类疾病动物模型。Zhang 等<sup>[94]</sup> 利用条件性基因敲除技术获得肝脏特异性葡萄糖激酶 (GK) 基因敲除小鼠, 表型分析发现小鼠 GK 基因敲除后血糖升高且对葡萄糖耐量降低, 此模型为糖尿病的药物筛选和治疗提供了帮助。Donehower 等<sup>[95]</sup> 采用基因打靶技术获得 p53 基因敲除小鼠, 发现 p53 基因突变可致多肿瘤发病

倾向, 该突变鼠为治疗 p53 突变引发的肿瘤提供了疾病模型。Mombaerts 等<sup>[96]</sup> 采用基因打靶技术获得 Rag-1 (recombination activating gene 1) 基因突变小鼠, 突变鼠丧失免疫球蛋白重链 V(D)J 重组能力, 淋巴器官发育较小, 缺失成熟的 B 细胞和 T 细胞, 小鼠表型与严重联合免疫缺陷 (SCID) 小鼠的症状相似, 该免疫缺陷小鼠为我们提供了肿瘤药物筛选的模型。Piedrahita 等<sup>[97]</sup> 敲除小鼠载脂蛋白 apolipoprotein E (Apo E) 基因后, 小鼠表现出高胆固醇和扩散性动脉粥样硬化症状, 证实载脂蛋白 Apo E

在脂蛋白代谢中起着重要的作用。另有一些疾病模型是由小鼠自发突变引起,如糖尿病和肥胖模型小鼠<sup>[98]</sup>,但借助基因组打靶及编辑技术,我们同样可在大鼠等其他模型动物中复制该疾病。

### 3.3 用于基因治疗

基因治疗是通过基因编辑技术将异常的致病基因纠正为正常基因,从而达到疾病治疗的目的。采用CRISPR/Cas9技术已在体外培养的细胞系、受精卵及动物成体中实现遗传疾病基因的纠正。Schwank等<sup>[99]</sup>利用该技术在人类干细胞中纠正了与囊性纤维化有关的CFTR(囊性纤维化跨膜转导受体)基因的突变;Wu等<sup>[100]</sup>通过受精卵注射Cas9相关成分修复了患遗传性白内障小鼠的基因突变,并消除了白内障症状。小鼠FAH基因突变导致酪氨酸血症I型,研究人员将靶向FAH基因的Cas9成分注射至成年鼠体内,约1/250的肝细胞的基因突变得到纠正,恢复正常的细胞逐渐取代病变细胞并最终占肝细胞总量三分之一,这足以治愈该病<sup>[101]</sup>。

疾病相关动物模型对医学和生命科学至关重要,自然或诱发产生的疾病模型数量已不能满足研究的需求。基因打靶技术及后续的基因组定点编辑技术可使研究者快速且高效地获得特定基因修饰的动物模型,通过对动物模型的深入研究,可阐明基因的功能及疾病的发病机制,最终促进人类相关疾病的诊断及治疗。

## 4 展望

ES细胞打靶技术发展至今已有近30年的历史,伴随着基因组定点编辑技术的出现,我们正处于基因编辑技术空前繁荣的阶段,这些技术使得各类模式生物的制备更简易且高效。ES细胞打靶技术与基因组定点编辑技术各有其优缺点,如何选择取决于研究者的实验需求、技术支撑和成本限制等。对于未来模式动物的研究,我们需优化当前的技术并致力于开发新技术,以便更高效地实现动物模型的制备,并实现安全可靠的基因治疗目标。

### [参 考 文 献]

- [1] Esvelt KM, Wang HH. Genome-scale engineering for systems and synthetic biology. *Mol Sys Biol*, 2013, 9: 641
- [2] Bibikova M, Golic M, Golic KG, et al. Targeted chromosomal cleavage and mutagenesis in *Drosophila* using zinc-finger nucleases. *Genetics*, 2002, 161(3): 1169-75
- [3] Bibikova M, Beumer K, Trautman JK, et al. Enhancing gene targeting with designed zinc finger nucleases. *Science*, 2003, 300(5620): 764
- [4] Ramalingam S, London V, Kandavelou K, et al. Generation and genetic engineering of human induced pluripotent stem cells using designed zinc finger nucleases. *Stem Cells Dev*, 2013, 22(4): 595-610
- [5] Shan Q, Wang Y, Chen K, et al. Rapid and efficient gene modification in rice and *Brachypodium* using TALENs. *Mol Plant*, 2013, 6(4): 1365-8
- [6] Hockemeyer D, Wang H, Kiani S, et al. Genetic engineering of human pluripotent cells using TALE nucleases. *Nat Biotechnol*, 2011, 29(8): 731-4
- [7] Mali P, Yang L, Esvelt KM, et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*, 2013, 339(6121): 823-6
- [8] Cong L, Ran FA, Cox D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 2013, 339(6121): 819-23
- [9] Rouet P, Smih F, Jasin M. Expression of a site-specific endonuclease stimulates homologous recombination in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91(13): 6064-8
- [10] Bouvier J, Cheng JG. Recombineering-based procedure for creating Cre/loxP conditional knockouts in the mouse. *Curr Protoc Mol Biol*, 2009, Chapter 23: Unit 23.13
- [11] Ma S, Chang J, Wang X, et al. CRISPR/Cas9 mediated multiplex genome editing and heritable mutagenesis of BmKu70 in *Bombyx mori*. *Sci Rep*, 2014, 4: 4489
- [12] Waijers S, Portegijs V, Kerver J, et al. CRISPR/Cas9-targeted mutagenesis in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 2013, 195(3): 1187-91
- [13] Bassett AR, Liu JL. CRISPR/Cas9 and genome editing in *Drosophila*. *J Genet Genomics*, 2014, 41(1): 7-19
- [14] Anguela XM, Sharma R, Doyon Y, et al. Robust ZFN-mediated genome editing in adult hemophilic mice. *Blood*, 2013, 122(19): 3283-7
- [15] Yu Z, Chen H, Liu J, et al. Various applications of TALEN- and CRISPR/Cas9-mediated homologous recombination to modify the *Drosophila* genome. *Biol Open*, 2014, 3(4): 271-80
- [16] Wefers B, Panda SK, Ortiz O, et al. Generation of targeted mouse mutants by embryo microinjection of TALEN mRNA. *Nat Protoc*, 2013, 8(12): 2355-79
- [17] Zu Y, Tong X, Wang Z, et al. TALEN-mediated precise genome modification by homologous recombination in zebrafish. *Nat Methods*, 2013, 10(4): 329-31
- [18] Sung YH, Baek IJ, Kim DH, et al. Knockout mice created by TALEN-mediated gene targeting. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(1): 23-4
- [19] Chang N, Sun C, Gao L, et al. Genome editing with RNA-guided Cas9 nuclease in zebrafish embryos. *Cell Res*, 2013, 23(4): 465-72
- [20] Li W, Teng F, Li T, et al. Simultaneous generation and germline transmission of multiple gene mutations in rat using CRISPR-Cas systems. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(8): 684-6
- [21] Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 1981,

- 292(5819): 154-6
- [22] Bradley A, Evans M, Kaufman MH, et al. Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. *Nature*, 1984, 309(5965): 255-6
- [23] Smithies O, Gregg RG, Boggs SS, et al. Insertion of DNA sequences into the human chromosomal  $\beta$ -globin locus by homologous recombination. *Nature*, 1985, 317(6034): 230-4
- [24] Mansour SL, Thomas KR, Capecchi MR. Disruption of the proto-oncogene int-2 in mouse embryo-derived stem cells: a general strategy for targeting mutations to non-selectable genes. *Nature*, 1988, 336(6197): 348-52
- [25] Capecchi MR. The new mouse genetics: altering the genome by gene targeting. *Trends Genet*, 1989, 5(3): 70-6
- [26] Wu H, Liu X, Jaenisch R. Double replacement: strategy for efficient introduction of subtle mutations into the murine Col1a-1 gene by homologous recombination in embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91(7): 2819-23
- [27] Gu H, Marth JD, Orban PC, et al. Deletion of a DNA polymerase  $\beta$  gene segment in T cells using cell type-specific gene targeting. *Science*, 1994, 265(5168): 103-6
- [28] Awatramani R, Soriano P, Mai JJ, et al. An Flp indicator mouse expressing alkaline phosphatase from the ROSA26 locus. *Nat Genet*, 2001, 29(3): 257-9
- [29] Casola S. Mouse models for miRNA expression: the ROSA26 locus. *Methods Mol Biol*, 2010, 667: 145-63
- [30] Friedrich G, Soriano P. Promoter traps in embryonic stem cells: a genetic screen to identify and mutate developmental genes in mice. *Genes Dev*, 1991, 5(9): 1513-23
- [31] Kim YG, Cha J, Chandrasegaran S. Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(3): 1156-60
- [32] Pavletich NP, Pabo CO. Zinc finger-DNA recognition: crystal structure of a Zif268-DNA complex at 2.1 Å. *Science*, 1991, 252(5007): 809-17
- [33] Urnov FD, Rebar EJ, Holmes MC, et al. Genome editing with engineered zinc finger nucleases. *Nat Rev Genet*, 2010, 11(9): 636-46
- [34] Wolfe SA, Neklodova L, Pabo CO. DNA recognition by Cys2His2 zinc finger proteins. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 2000, 29: 183-212
- [35] Beerli RR, Barbas CF 3rd. Engineering polydactyl zinc-finger transcription factors. *Nat Biotechnol*, 2002, 20(2): 135-41
- [36] Liu Q, Segal DJ, Ghiara JB, et al. Design of polydactyl zinc-finger proteins for unique addressing within complex genomes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(11): 5525-30
- [37] Beerli RR, Segal DJ, Dreier B, et al. Toward controlling gene expression at will: specific regulation of the erbB-2/HER-2 promoter by using polydactyl zinc finger proteins constructed from modular building blocks. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(25): 14628-33
- [38] Beerli RR, Dreier B, Barbas CF 3rd. Positive and negative regulation of endogenous genes by designed transcription factors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(4): 1495-500
- [39] Miller JC, Holmes MC, Wang J, et al. An improved zinc-finger nuclease architecture for highly specific genome editing. *Nat Biotechnol*, 2007, 25(7): 778-85
- [40] Zschemisch NH, Glage S, Wedekind D, et al. Zinc-finger nuclease mediated disruption of Rag1 in the LEW/Ztm rat. *BMC Immunol*, 2012, 13: 60
- [41] Meyer M, de Angelis MH, Wurst W, et al. Gene targeting by homologous recombination in mouse zygotes mediated by zinc-finger nucleases. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(34): 15022-6
- [42] Cui X, Ji D, Fisher DA, et al. Targeted integration in rat and mouse embryos with zinc-finger nucleases. *Nat Biotechnol*, 2011, 29(1): 64-7
- [43] Shen B, Zhang X, Du Y, et al. Efficient knockin mouse generation by ssDNA oligonucleotides and zinc-finger nuclease assisted homologous recombination in zygotes. *PLoS One*, 2013, 8(10): e77696
- [44] Doyon Y, McCammon JM, Miller JC, et al. Heritable targeted gene disruption in zebrafish using designed zinc-finger nucleases. *Nat Biotechnol*, 2008, 26(6): 702-8
- [45] Beumer KJ, Trautman JK, Bozas A, et al. Efficient gene targeting in *Drosophila* by direct embryo injection with zinc-finger nucleases. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(50): 19821-6
- [46] Hartley BJ, Fabb SA, Finnin BA, et al. Zinc-finger nuclease enhanced gene targeting in human embryonic stem cells. *J Vis Exp*, 2014, (90): e51764
- [47] Yuan J, Strack PR, Toniatti C, et al. A zinc finger nuclease assay to rapidly quantitate homologous recombination proficiency in human cell lines. *Anal Biochem*, 2013, 434(1): 96-8
- [48] Chang CJ, Bouhassira EE. Zinc-finger nuclease-mediated correction of  $\alpha$ -thalassemia in iPS cells. *Blood*, 2012, 120(19): 3906-14
- [49] Boch J, Bonas U. Xanthomonas AvrBs3 family-type III effectors: discovery and function. *Annu Rev Phytopathol*, 2010, 48: 419-36
- [50] Streubel J, Blucher C, Landgraf A, et al. TAL effector RVD specificities and efficiencies. *Nat Biotechnol*, 2012, 30(7): 593-5
- [51] Li T, Huang S, Jiang WZ, et al. TAL nucleases (TALNs): hybrid proteins composed of TAL effectors and FokI DNA-cleavage domain. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39(1): 359-72
- [52] Christian M, Cermak T, Doyle EL, et al. Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. *Genetics*, 2010, 186(2): 757-61
- [53] Mussolino C, Morbitzer R, Lutge F, et al. A novel TALE nuclease scaffold enables high genome editing activity in combination with low toxicity. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39(21): 9283-93
- [54] Miller JC, Tan S, Qiao G, et al. A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. *Nat Biotechnol*, 2011, 29(2): 143-8
- [55] Zhang F, Cong L, Lodato S, et al. Efficient construction of sequence-specific TAL effectors for modulating mammalian transcription. *Nat Biotechnol*, 2011, 29(2): 149-53
- [56] Cermak T, Doyle EL, Christian M, et al. Efficient design



- and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39(12): e82
- [57] Reyon D, Tsai SQ, Khayter C, et al. FLASH assembly of TALENs for high-throughput genome editing. *Nat Biotechnol*, 2012, 30(5): 460-5
- [58] Briggs AW, Rios X, Chari R, et al. Iterative capped assembly: rapid and scalable synthesis of repeat-module DNA such as TAL effectors from individual monomers. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40(15): e117
- [59] Kim Y, Kweon J, Kim A, et al. A library of TAL effector nucleases spanning the human genome. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(3): 251-8
- [60] Wood AJ, Lo TW, Zeitler B, et al. Targeted genome editing across species using ZFNs and TALENs. *Science*, 2011, 333(6040): 307
- [61] Liu J, Li C, Yu Z, et al. Efficient and specific modifications of the *Drosophila* genome by means of an easy TALEN strategy. *J Genet Genomics*, 2012, 39(5): 209-15
- [62] Sander JD, Cade L, Khayter C, et al. Targeted gene disruption in somatic zebrafish cells using engineered TALENs. *Nat Biotechnol*, 2011, 29(8): 697-8
- [63] Wefers B, Meyer M, Ortiz O, et al. Direct production of mouse disease models by embryo microinjection of TALENs and oligodeoxynucleotides. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(10): 3782-7
- [64] Tesson L, Usal C, Menoret S, et al. Knockout rats generated by embryo microinjection of TALENs. *Nat Biotechnol*, 2011, 29(8): 695-6
- [65] Ding Q, Lee YK, Schaefer EA, et al. A TALEN genome-editing system for generating human stem cell-based disease models. *Cell Stem Cell*, 2013, 12(2): 238-51
- [66] Frank S, Skryabin BV, Greber B. A modified TALEN-based system for robust generation of knock-out human pluripotent stem cell lines and disease models. *BMC Genomics*, 2013, 14: 773
- [67] Morbitzer R, Romer P, Boch J, et al. Regulation of selected genome loci using *de novo*-engineered transcription activator-like effector (TALE)-type transcription factors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(50): 21617-222
- [68] Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, et al. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J Bacteriol*, 1987, 169(12): 5429-33
- [69] Jansen R, Embden JD, Gastra W, et al. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Mol Microbiol*, 2002, 43(6): 1565-75
- [70] Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*, 2007, 315(5819): 1709-12
- [71] Horvath P, Barrangou R. CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. *Science*, 2010, 327(5962): 167-70
- [72] Deltcheva E, Chylinski K, Sharma CM, et al. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature*, 2011, 471(7340): 602-7
- [73] Lillestol RK, Redder P, Garrett RA, et al. A putative viral defence mechanism in archaeal cells. *Archaea*, 2006, 2(1): 59-72
- [74] Marraffini LA, Sontheimer EJ. CRISPR interference: RNA-directed adaptive immunity in bacteria and archaea. *Nat Rev Genet*, 2010, 11(3): 181-90
- [75] Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 2012, 337(6096): 816-21
- [76] Makarova KS, Haft DH, Barrangou R, et al. Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol*, 2011, 9(6): 467-77
- [77] Zhou J, Shen B, Zhang W, et al. One-step generation of different immunodeficient mice with multiple gene modifications by CRISPR/Cas9 mediated genome engineering. *Int J Biochem Cell Biol*, 2014, 46: 49-55
- [78] Wang H, Yang H, Shivalila CS, et al. One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell*, 2013, 153(4): 910-8
- [79] Han J, Zhang J, Chen L, et al. Efficient *in vivo* deletion of a large imprinted lncRNA by CRISPR/Cas9. *RNA Biol*, 2014, 11(7): 829-35
- [80] Canver MC, Bauer DE, Dass A, et al. Characterization of genomic deletion efficiency mediated by clustered regularly interspaced palindromic repeats (CRISPR)/Cas9 nuclease system in mammalian cells. *J Biol Chem*, 2014, 289(31): 21312-24
- [81] Shalem O, Sanjana NE, Hartenian E, et al. Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells. *Science*, 2014, 343(6166): 84-7
- [82] Koike-Yusa H, Li Y, Tan EP, et al. Genome-wide recessive genetic screening in mammalian cells with a lentiviral CRISPR-guide RNA library. *Nat Biotechnol*, 2014, 32(3): 267-73
- [83] Jiang W, Bikard D, Cox D, et al. RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(3): 233-9
- [84] Cho SW, Kim S, Kim JM, et al. Targeted genome engineering in human cells with the Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(3): 230-2
- [85] Bassett AR, Tibbit C, Ponting CP, et al. Highly efficient targeted mutagenesis of *Drosophila* with the CRISPR/Cas9 system. *Cell Rep*, 2013, 4(1): 220-8
- [86] Li D, Qiu Z, Shao Y, et al. Heritable gene targeting in the mouse and rat using a CRISPR-Cas system. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(8): 681-3
- [87] Qi LS, Larson MH, Gilbert LA, et al. Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. *Cell*, 2013, 152(5): 1173-83
- [88] Bikard D, Jiang W, Samai P, et al. Programmable repression and activation of bacterial gene expression using an engineered CRISPR-Cas system. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41(15): 7429-37
- [89] Maeder ML, Linder SJ, Cascio VM, et al. CRISPR RNA-guided activation of endogenous human genes. *Nat Methods*, 2013, 10(10): 977-9

- [90] Gilbert LA, Larson MH, Morsut L, et al. CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes. *Cell*, 2013, 154(2): 442-51
- [91] Chen B, Gilbert LA, Cimini BA, et al. Dynamic imaging of genomic loci in living human cells by an optimized CRISPR/Cas system. *Cell*, 2013, 155(7): 1479-91
- [92] Zhao Y, Ransom JF, Li A, et al. Dysregulation of cardiogenesis, cardiac conduction, and cell cycle in mice lacking miRNA-1-2. *Cell*, 2007, 129(2): 303-17
- [93] Selman C, Tullet JM, Wieser D, et al. Ribosomal protein S6 kinase 1 signaling regulates mammalian life span. *Science*, 2009, 326(5949): 140-4
- [94] Zhang YL, Tan XH, Xiao MF, et al. Establishment of liver specific glucokinase gene knockout mice: a new animal model for screening anti-diabetic drugs. *Acta Pharmacol Sin*, 2004, 25(12): 1659-65
- [95] Donehower LA, Harvey M, Slagle BL, et al. Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature*, 1992, 356(6366): 215-21
- [96] Mombaerts P, Iacomini J, Johnson RS, et al. RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes. *Cell*, 1992, 68(5): 869-77
- [97] Piedrahita JA, Zhang SH, Hageman JR, et al. Generation of mice carrying a mutant apolipoprotein E gene inactivated by gene targeting in embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89(10): 4471-5
- [98] Coleman DL. Obese and diabetes: two mutant genes causing diabetes-obesity syndromes in mice. *Diabetologia*, 1978, 14(3): 141-8
- [99] Schwank G, Koo BK, Sasselli V, et al. Functional repair of CFTR by CRISPR/Cas9 in intestinal stem cell organoids of cystic fibrosis patients. *Cell Stem Cell*, 2013, 13(6): 653-8
- [100] Wu Y, Liang D, Wang Y, et al. Correction of a genetic disease in mouse via use of CRISPR-Cas9. *Cell Stem Cell*, 2013, 13(6): 659-62
- [101] Yin H, Xue W, Chen S, et al. Genome editing with Cas9 in adult mice corrects a disease mutation and phenotype. *Nat Biotechnol*, 2014, 32(6): 551-3