

DOI: 10.13376/j.cblls/2015009

文章编号: 1004-0374(2015)01-0050-06



牛昱宇, 博士, 研究员, 现为云南中科灵长类生物医学重点实验室副主任, 昆明理工大学生命科学与技术学院教授。主要从事人类重大疾病动物模型和转基因研究, 研究方向包括着床前胚胎发育生物学、灵长类转基因动物、疾病动物模型和灵长类实验动物学。2007年中科院动物研究所毕业获动物学博士学位, 2006~2009年期间获德国马普协会和中科院资助赴德国柏林野生与笼养动物研究所(Leibniz Institute for Zoo and Wildlife Research)进行动物生殖生物学的访问研究。2010年成功报道我国首例灵长类转基因动物, 2014年报道全球首例基因定点修饰灵长类动物。云南省中青年学术和技术带头人后备人才。2008年获得云南省科学技术奖自然科学类二等奖, 2012年获中国科学院卢嘉锡青年人才奖, 昆明市青年科技奖。

## 灵长类动物基因编辑技术研究进展

康宇<sup>1,2</sup>, 陈永昌<sup>1,2</sup>, 牛昱宇<sup>1,2\*</sup>

(1 昆明理工大学生命科学与技术学院, 昆明 650500; 2 云南中科灵长类生物医学重点实验室, 昆明 650500)

**摘要:** 灵长类动物因与人类在遗传、生理和神经功能上的高度相似性而使其在生物医学研究领域占有非常重要的地位。构建人类疾病的灵长类动物模型, 是研究疾病发病机理和探索潜在治疗手段的重要途径, 而通过基因编辑的方法获得灵长类动物模型是研究一些遗传性疾病最可靠的方法。灵长类动物基因编辑技术先后经历了传统的转基因和精准基因打靶两个时代。对近年来灵长类动物基因编辑研究进行综述, 重点介绍最新的利用核酸酶技术进行精准基因编辑的研究进展。

**关键词:** 灵长类动物; 基因编辑; 核酸酶技术; CRISPR/Cas9; TALENs

**中图分类号:** Q789; Q819 **文献标志码:** A

## Research progress of genome editing in nonhuman primates

KANG Yu<sup>1,2</sup>, CHEN Yong-Chang<sup>1,2</sup>, NIU Yu-Yu<sup>1,2\*</sup>

(1 Faculty of Life Science and Technology, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500, China;  
2 Yunnan Key Laboratory of Primate Biomedical Research, Kunming 650500, China)

**Abstract:** Nonhuman primates (NHPs) play an important role in the biomedical field research, due to their similarities in genetics, physiological and neurological function to humans. A crucial way to study pathogenic mechanism and potential treatment is to establish animal models of human diseases, especially by gene editing technology. The research progress in genome editing of NHPs has gone through two periods: one is traditional transgenesis and the other is gene targeting. This article gives a brief review about the genome editing in NHPs and focuses on precise genome editing technology.

**Key words:** nonhuman primates; genome editing; nucleases; CRISPR/Cas9; TALENs

收稿日期: 2014-11-25

基金项目: 国家自然科学基金项目(U1302227); 国家高技术研究发展计划(“863”计划)(2012AA020701)

\*通信作者: E-mail: niuyy@lpbr.cn

利用动物构建人类疾病模型是现代生物医学领域研究疾病机理及治疗手段的重要方法。与小鼠、大鼠、兔、鸡、鱼、牛等动物不同,灵长类动物与人类在遗传背景上具有更高的相似性,它们与人类在大脑功能、解剖结构、行为和认知功能、代谢过程以及生殖方式等方面的接近程度是其他实验动物无法比拟的,因此,灵长类动物在人类疾病,尤其是神经系统疾病的研究中发挥着更为重要的作用<sup>[1-3]</sup>。利用猕猴、食蟹猴、狨猴、长尾猴、黑猩猩等灵长类动物构建人类疾病动物模型的研究已有诸多报道<sup>[4-8]</sup>。科学家们已经通过筛选自然突变、药物诱导以及借助基因工程遗传改造等方法获得了诸多人类疾病的灵长类动物模型,如帕金森氏症、老年痴呆等神经退行性疾病<sup>[3,9]</sup>。借此,研究者们得以探索疾病的致病机理,进行疾病诊断,研究新的治疗方法并最终造福于人类<sup>[2]</sup>。对于一些由基因缺陷导致的遗传性疾病,通过构建转基因灵长类动物模型加以研究是最直接有效的方法。灵长类动物基因编辑技术所采用的方法也多种多样<sup>[1-3]</sup>。但无论是利用逆转录病毒或慢病毒介导的基因修饰方法,或是利用RNA干扰技术、精子载体法等都存在较大的外源基因随机性插入以及不稳定表达等特性,而且可操作性不强。直到最近几年,借助一类新兴的人工核酸酶技术——转录激活因子样效应物核酸酶(transcription activator-like effector nucleases, TALENs)和系统及规律成簇的间隔短回文重复序列(clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR),研究者们终于得以实现对灵长类动物基因的定点修饰,其高效性和精确性其他方法所无法比拟的,本文也将重点对这一类方法进行阐述。

## 1 灵长类动物转基因研究进展

基因编辑即利用实验手段对基因组进行操作,传统的转基因技术是将外源基因整合到机体基因组内,而精准基因打靶则是对特定基因的敲除、定点敲入、激活或抑制。通过对发育初期的动物胚胎进行基因的改造,继而通过代孕过程并最终获得表达新的遗传性状的动物是转基因动物模型构建的基本方法。通过这一过程,科学家得以研究基因功能、致病机理或基因治疗的方法,相关研究已在发育生物学、遗传学以及医学领域中广泛开展<sup>[2,4-7]</sup>。

早在1980年,科学家就已经能够获得转基因小鼠<sup>[10]</sup>。虽然小鼠和人类的基因有非常高的相似性,也已经被广泛用于人类疾病治疗、药物代谢等领域

的研究,但两者基因表达却存在着巨大差异,包括蛋白质编码基因和非编码基因<sup>[11]</sup>,因此,在小鼠模型的使用上一直存在争议。直到2001年,世界上才出现第一只转基因灵长类动物<sup>[12]</sup>,这只名叫“安迪”(ANDi,意指inserted DNA,即DNA植入)的小猴是科学家运用逆转录病毒载体(retroviral vector)向猕猴胚胎中引入外源基因,进而通过胚胎移植使代孕母猴生出转基因小猴。转基因动物的研究从啮齿类动物到灵长类动物先后花费21年的时间,这主要受灵长类动物生殖周期长、生育数量少、生殖季节性且饲养条件苛刻等因素的限制<sup>[1-2]</sup>;同时,灵长类基因组更为复杂,使得实现灵长类动物的基因编辑更为困难。

传统转基因灵长类动物的方法主要利用逆转录病毒载体法和慢病毒载体法。继2001年ANDi诞生后,2008年美国科学家利用慢病毒载体(lentiviral vector)获得亨廷顿氏舞蹈症(Huntington's disease, HD)的转基因猕猴模型<sup>[13]</sup>,这是第一只转入了人类疾病致病基因的灵长类动物,不仅有助于研究HD的致病机理和探索相应的治疗方案,也使一些遗传性疾病,如帕金森氏症、老年痴呆症等在灵长类动物身上进行研究成为可能。2009年,日本科学家Sasaki同样采用慢病毒载体的方法,培育出携带“增强绿色荧光蛋白(EGFP)”的转基因狨猴<sup>[14]</sup>,其中两只狨猴转基因性状得以在其生殖系细胞中表达,并最终成功地将这种性状传递给下一代。该研究首次证实了在灵长类动物上转基因性状可实现生殖系遗传。2010年,中国科学家们成功运用猴源慢病毒载体(simian immunodeficiency virus, SIV)携带绿色荧光蛋白(GFP)基因,培育出国内首例转基因猕猴<sup>[15]</sup>,标志着国内灵长类动物转基因平台的建立。

然而,慢病毒载体法依然存在诸多缺陷,如随机插入的方法可能会影响靶位点基因表达或是引起突变;另外,插入片段的长度也会受到限制,通常慢病毒载体只能携带不大于10 kb的片段,因而也给研究带来诸多不确定性和使用限制。因此,科学家们一直在寻找更为精确高效的基因编辑手段。

## 2 精确基因编辑技术——核酸酶技术(ZFNs、CRISPR/Cas和TALENs)在灵长类动物中的研究进展

随着技术的日新月异,从2011年开始,一类名为“人工核酸酶”的技术已经成为对细胞和动物个体进行高效、精确基因编辑的一种有力工具。这

类核酸酶包含3种主要类型——锌指核酸酶(zinc finger nucleases, ZFNs)、TALENs和CRISPR系统。这3种技术都基于相似的工作原理:DNA结合蛋白的特异性定位,限制性核酸内切酶发挥剪切作用,以及细胞自身对DNA缺口的修复——包括非同源末端连接(non-homologous end joining, NHEJ)和同源重组(homologous recombination, HR)机制<sup>[16-20]</sup>。基于这些原理,理论上科学家们能在任何物种基因组的任何位置进行操作,从而能在内源序列中引入特异性修改。开发较早ZFNs技术在灵长类动物尚无成功应用的报道,且该技术存在设计难度大、成本较高以及严重的脱靶效应等缺点<sup>[16,20]</sup>,在应用中已经逐渐被新的技术所取代。因此,下面将着重介绍另外两类核酸酶技术。

## 2.1 TALENs技术开展灵长类动物基因编辑

TALENs是一种较新的靶向编辑技术,由于TALE蛋白的氨基酸序列与靶位点的核苷酸序列相互对应,通过组合可定制的各类模块,从而能够对任意核酸靶序列构建TALENs,在特定位点产生双链断裂,进而实现基因敲除、敲入和定点突变<sup>[16-18]</sup>(图1)。该方法克服了ZFNs技术设计难度大、成本高的缺点,正成为近年来研究基因编辑的有力工具。TALENs技术在小鼠身上成功应用并被证实能够实现生殖系遗传<sup>[21-22]</sup>。此外,在斑马鱼和蝾螈等动物的基因编辑研究中也有报道<sup>[23-24]</sup>。

2014年初,我们的研究组与国内学者合作运用TALENs技术获得了MECP2(甲基CpG结合蛋白2)基因突变的猕猴和食蟹猴<sup>[25]</sup>。同时,在对新生小猴和流产胎儿的数千份样品的检测分析结果均

证实了不存在脱靶效应,也没有TALEN质粒的整合,充分说明了利用TALENs系统对猕猴和食蟹猴的基因组进行定向改造是十分可行的。这是采用TALENs技术成功构建的首个人类疾病转基因灵长类动物模型。MECP2编码基因的突变会导致患者出现“Rett综合征”(一种严重影响女孩神经系统发育的疾病)。由于MECP2基因位于X染色体,在人类的案例中,该位点的突变通常导致雄性胎儿在妊娠中期发生死亡并流产,仅有雌性胎儿能够顺利出生并存活,但会在出生后6~18个月开始发病,表现自闭症特点的Rett综合征。我们的研究显示,灵长类动物也会在怀孕期间流产,而雌性猴出生后也已表现出明显的自闭症特点。此外,我国另外一个研究组也已经采用TALENs技术获得了一只MECP2突变的雄性食蟹猴,并且在出生后不久就夭折了<sup>[26]</sup>。两个报道的区别在于我们利用TALEN质粒,而另外的报道利用TALEN mRNA进行注射。这些研究表明,利用TALENs开展灵长类动物基因组精确编辑是可行的,未来有望能被更多地用于构建其他疾病的灵长类动物模型。

## 2.2 利用CRISPR系统开展灵长类动物基因编辑

“CRISPR”一词其实源于细菌对抗噬菌体的一种防御机制,它早在多年之前就被发现并报道<sup>[27-29]</sup>。但直至2013年,哈佛医学院Church的研究组才首次使用CRISPR技术完成RNA介导的人类基因组编辑<sup>[30]</sup>。之后,CRISPR技术在研究中不断被改进<sup>[31]</sup>。CRISPR系统包含两个部分:由CRISPR基因座转录出的RNA以及一个Cas蛋白,其中最为常见的是CRISPR/Cas9系统(图2)。相较ZFN和TALEN

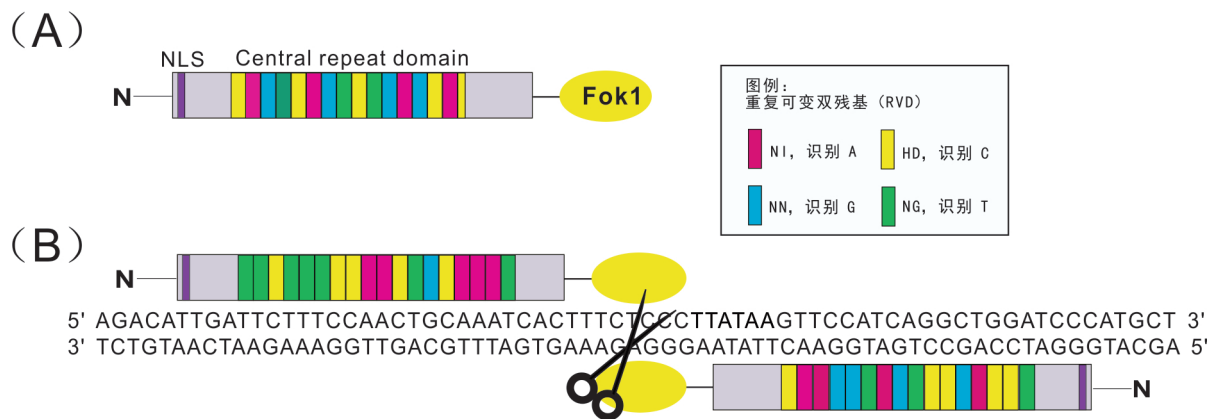
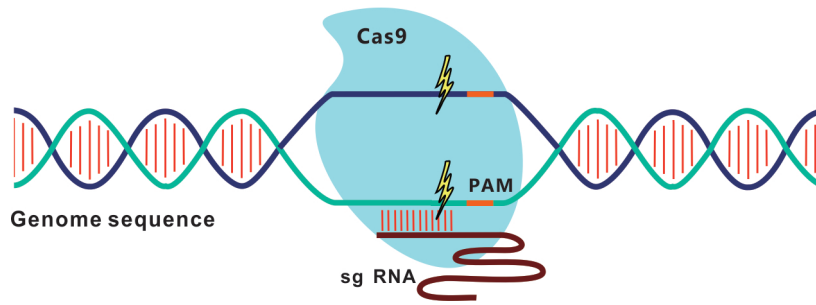


图1 TALEN结构和作用机制示意图(根据<sup>[18]</sup>修改)



Cas9复合体通过向导RNA识别目标序列并进行剪切; 同时, 需要识别位于目标序列之后的PAM序列以保证识别位点的特异性。

图2 RNA介导Cas9切割目的DNA示意图(根据<sup>[18]</sup>修改)

技术, CRISPR/Cas9 系统具有诸多优势: (1) 其靶位点在基因组中分布频率较高; (2) CRISPR/Cas9 的构建方便、快捷; (3) CRISPR/Cas9 在引入定点插入时更为精确、更具特异性; (4) 能够实现对多个位点(多于一个位点)的同时切割<sup>[32-34]</sup>。不仅在细胞水平, CRISPR/Cas9 技术在非洲爪蟾、斑马鱼, 小鼠和大鼠等动物上都有被成功进行基因修饰的报道<sup>[35-38]</sup>。

2014年初, 我们与合作者一起成功运用 CRISPR/Cas9 系统培育出了基因定点编辑的灵长类动物, 获得了一对多位点基因敲除的双胞胎食蟹猴<sup>[39]</sup>。这是 CRISPR 基因编辑技术在灵长类动物的首次应用。更为重要的是, 该项研究实现了在一个步骤中对两个目的基因的同时敲除。在对新生小猴的脐带、胎盘提取了 DNA 样本进行检测分析之后, 并没有发现脱靶现象的存在。这一研究的成功也意味着对一些由多基因控制的复杂疾病(例如帕金森氏症), 建立基于基因修饰的动物模型已成为可能。我们还对流产胎儿的生殖系细胞通过单细胞测序技术证实, 这些生殖细胞也实现了基因突变, 由此也首次

证明了由 CRISPR 技术介导的基因突变可以实现生殖系传递<sup>[40]</sup>。

### 3 结语与展望

灵长类动物在生物医学研究领域所扮演的角色是其他物种所无法比拟的, 灵长类基因编辑研究从最开始随机插入的荧光蛋白标志基因, 到真正造成人类遗传性疾病的致病基因, 从对单一位点的改造, 到多位点的定点突变, 先后经历十多年时间(图3)。在今天, 即使是 TALENs 和 CRISPR 技术, 也尚处在研究初级阶段, 有许多问题有待研究和改进, 如怎样在灵长类动物上实现外源基因的定点敲入, 或是进一步提高打靶效率以获得纯合的转基因后代。另一方面, 运用核移植(nuclear transfer, NT) 技术获得克隆的转基因动物是最为直接可靠的方法, 这在一些物种已经是十分成熟的技术<sup>[41]</sup>, 但在灵长类动物尚无成功的报道。随着诱导性多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs) 和一些细胞重编程方法的发展, 目前科学家已经能够获得灵长类动物的克隆胚胎干细胞系<sup>[42-43]</sup>, 灵长类 iPSC 细胞系也已经

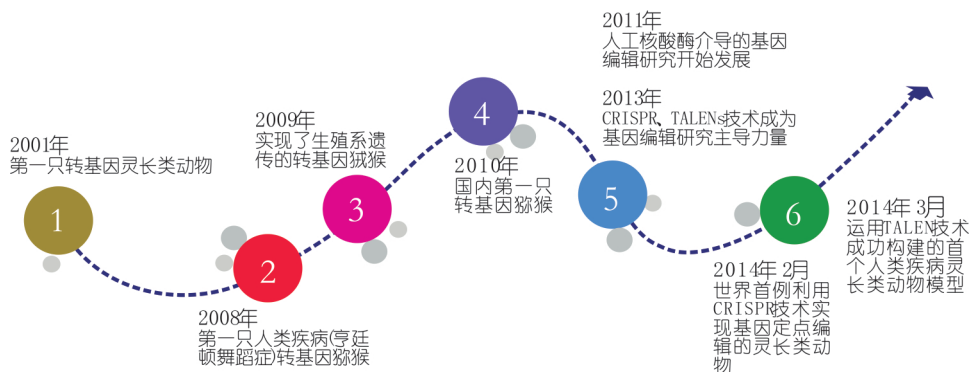


图3 灵长类动物基因编辑研究发展历程

被建立<sup>[44]</sup>。未来将基因定向编辑技术与核移植嵌合体等技术结合起来, 将有望更加高效地建立灵长类动物模型, 并逐步开展治疗性克隆等研究。同时, 随着技术的不断更新和改进, 人类疾病灵长类动物模型的建立终将为科学家们深入研究疾病机理和探索新的疾病治疗手段提供更多可能。

### [参 考 文 献]

- [1] Chen Y, Niu Y, Ji W. Transgenic nonhuman primate models for human diseases: approaches and contributing factors. *J Genet Genomics*, 2012, 39(6): 247-51
- [2] Chan AW. Progress and prospects for genetic modification of nonhuman primate models in biomedical research. *ILAR J*, 2013, 54(2): 211-23
- [3] Chan AW. Transgenic nonhuman primates for neurodegenerative diseases. *Reprod Biol Endocrinol*, 2004, 2: 39
- [4] Nelson M, Loveday M. Exploring the innate immunological response of an alternative nonhuman primate model of infectious disease; the common marmoset. *J Immunol Res*, 2014, 2014: 913632
- [5] Sui Y, Gordon S, Franchini G, et al. Nonhuman primate models for HIV/AIDS vaccine development. *Curr Protoc Immunol*, 2013, 102: Unit 12.14
- [6] O'Sullivan A, He X, McNiven EM, et al. Metabolomic phenotyping validates the infant rhesus monkey as a model of human infant metabolism. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2013, 56(4): 355-63
- [7] Jarvis P, Srivastav S, Vogelwedde E, et al. The cynomolgus monkey as a model for developmental toxicity studies: variability of pregnancy losses, statistical power estimates, and group size considerations. *Birth Defects Res B: Dev Reprod Toxicol*, 2010, 89: 175-87
- [8] Kundu MC, May MC, Chosich J, et al. Assessment of luteal function in the vervet monkey as a means to develop a model for obesity-related reproductive phenotype. *Syst Biol Reprod Med*, 2013, 59(2): 74-81
- [9] Forny GL, Lyra E, Silva NM, et al. Alzheimer's disease-like pathology induced by amyloid- $\beta$  oligomers in nonhuman primates. *J Neurosci*, 2014, 34(41): 13629-43
- [10] Gordon JW, Scangos GA, Plotkin DJ, et al. Genetic transformation of mouse embryos by micro-injection of purified DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1980, 77(12): 7380-4
- [11] Lin S, Lin Y, Nery JR, et al. Comparison of the transcriptional landscapes between human and mouse tissues. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111(48): 17224-9
- [12] Chan AW, Chonq KY, Martinovich C, et al. Transgenic monkeys produced by retroviral gene transfer into mature oocytes. *Science*, 2001, 291(5502): 309-12
- [13] Yang S, Cheng P, Banta H, et al. Towards a transgenic model of Huntington's disease in a non-human primate. *Nature*, 2008, 453(7197): 921-4
- [14] Sasaki E, Suemizu H, Shimada A, et al. Generation of transgenic non-human primates with germline transmission. *Nature*, 2009, 459(7246): 523-7
- [15] Niu Y, Yu Y, Bernat A, et al. Transgenic rhesus monkeys produced by gene transfer into early-cleavage-stage embryos using a simian immunodeficiency virus-based vector. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(41): 17663-7
- [16] Wood AJ, Lo TW, Zeitler B, et al. Targeted genome editing across species using ZFNs and TALENs. *Science*, 2011, 333(6040): 307
- [17] Moscou MJ, Bogdanove AJ. A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors. *Science*, 2009, 326(5959): 1501
- [18] Lo TW, Pickle CS, Lin S, et al. Precise and heritable genome editing in evolutionarily diverse nematodes using TALENs and CRISPR/Cas9 to engineer insertions and deletions. *Genetics*, 2013, 195(2): 331-48
- [19] 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
- [20] Gaj T, Gersbach CA, Barbas CF 3rd. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends Biotechnol*, 2013, 31(7): 397-405
- [21] Takada S, Sato T, Ito Y, et al. Targeted gene deletion of miRNAs in mice by TALEN system. *PLoS One*, 2013, 8(10): e76004
- [22] Qiu Z, Liu M, Chen Z, et al. High-efficiency and heritable gene targeting in mouse by transcription activator-like effector nucleases. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41(11): e120
- [23] Hisano Y, Ota S, Kawahara A. Genome editing using artificial site-specific nucleases in zebrafish. *Dev Growth Differ*, 2014, 56(1): 26-33
- [24] Hayashi T, Sakamoto K, Sakuma T, et al. Transcription activator-like effector nucleases efficiently disrupt the target gene in Iberian ribbed newts (*Pleurodeles waltl*), an experimental model animal for regeneration. *Dev Growth Differ*, 2014, 56(1): 115-21
- [25] Liu H, Chen Y, Niu Y, et al. TALEN-mediate gene mutagenesis in rhesus and cynomolgus monkeys. *Cell Stem Cell*, 2014, 14(3): 1-6
- [26] Liu Z, Zhou X, Zhu Y, et al. Generation of a monkey with MECP2 mutations by TALEN-based gene targeting. *Neurosci Bull*, 2014, 30(3): 381-6
- [27] Pourcel C, Salvignol G, Vergnaud G. CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies. *Microbiology*, 2005, 151(Pt 3): 653-63
- [28] Godde JS, Bickerton A. The repetitive DNA elements called CRISPRs and their associated genes: evidence of horizontal transfer among prokaryotes. *J Mol Evol*, 2006, 62(6): 718-29
- [29] Bolotin A, Quinquis B, Sorokin A, et al. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology*, 2005, 151(Pt 8): 2551-61
- [30] Mali P, Yang L, Esvelt KM, et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*, 2013, 339(6121):

- 823-6
- [31] Cong L, Ran FA, Cox D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 2013, 339(6121): 819-23
- [32] Shen B, Zhang J, Wu H, et al. Generation of gene-modified mice via Cas9/RNA-mediated gene targeting. *Cell Res*, 2013, 23(5): 720-3
- [33] Mali P, Yang L, Esvelt KM, et al. Cas9 as a versatile tool for engineering biology. *Nat Methods*, 2013, 10(10): 957-63
- [34] 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, 154(6): 1370-9
- [35] Nakayama T, Blitz IL, Fish MB, et al. Cas9-based genome editing in *Xenopus tropicalis*. *Methods Enzymol*, 2014, 546: 355-75
- [36] Guan Y, Shao Y, Li D, et al. Generation of site-specific mutations in the rat genome via CRISPR/Cas9. *Methods Enzymol*, 2014, 546: 297-317
- [37] Singh P, Schimenti JC, Bolcun-Filas E. A mouse geneticist's practical guide to CRISPR applications. *Genetics*, 2014, [Epub ahead of print]
- [38] Hruscha A, Krawitz P, Rechenberg A, et al. Efficient CRISPR/Cas9 genome editing with low off-target effects in zebrafish. *Development*, 2013, 140(24): 4982-7
- [39] Niu Y, Shen B, Cui Y, et al. Generation of gene-modified cynomolgus monkey via Cas9/RNA-mediated gene targeting in one-cell embryos. *Cell*, 2014, 156(4): 836-43
- [40] Chen Y, Cui Y, Shen B, et al. Cas9/RNA-mediated gene modifications contribute to monkey germline. *Cell Res*, (Accepted)
- [41] Zhou X, Xin J, Fan N, et al. Generation of CRISPR/Cas9-mediated gene-targeted pigs via somatic cell nuclear transfer. *Cell Mol Life Sci*, 2014, [Epub ahead of print]
- [42] Tachibana M, Amato P, Sparman M, et al. Human embryonic stem cells derived by somatic cell nuclear transfer. *Cell*, 2013, 153(6): 1228-38
- [43] Sparman ML, Tachibana M, Mitalipov SM. Cloning of non-human primates: the road "less traveled by". *Int J Dev Biol*, 2010, 54(11-12): 1671-8
- [44] Fang R, Liu K, Zhao Y, et al. Generation of naive induced pluripotent stem cells from rhesus monkey fibroblasts. *Cell Stem Cell*, 2014, 15(4): 488-96