

DOI: 10.13376/j.cblls/2015010

文章编号: 1004-0374(2015)01-0056-08



赖良学, 博士, 中国科学院广州生物医药与健康研究院研究员。长期致力于人和动物胚胎干细胞的分离培养、基因修饰动物的建立及动物克隆等研究。在动物克隆和基因打靶方面, 赖良学博士多次在世界上率先取得突破性成功, 并由此树立起了其在国际上的学术优势地位, 在此基础上成功地建立了 20 余种在生物医药和农业领域具有重要用途的基因修饰克隆猪。赖良学博士是国家高技术研究发展计划 (“863” 计划) 重点项目主持人, 国家重大基础研究发展计划 (“973” 计划) 项目首席科学家, 中国海外杰出青年基金获得者。以第一作者或通讯作者在 SCI 杂志包括 *Science*、*Nature Biotechnology*、*PNAS*、*Human Molecular Genetics* 和 *Cell Research* 等发表论文 70 余篇。论文被引用次数达到 2 600 多次, 单篇文章被引用达 800 余次。

## 基于体细胞克隆的猪基因打靶技术研究进展

颜泉梅, 赖良学\*

(中国科学院广州生物医药与健康研究院中国科学院再生生物学重点实验室, 广州 510530)

**摘要:** 基因打靶猪在农业和生物医药领域均有广泛用途。由于猪的能参与生殖系嵌合体的多能性干细胞尚未建立成功, 基因打靶猪的培育主要是通过体细胞克隆技术来实现。最初, 人们在体细胞上通过传统的同源重组技术成功地建立了基因敲除克隆猪, 但体细胞在体外的增殖能力有限, 传统同源重组在体细胞的打靶效率极低。虽经十多年的发展, 但在世界范围内获得的基因打靶猪屈指可数。最近, 三种工程核酸酶介导的基因编辑技术 (ZFN、TALEN 和 CRISPR/Cas9) 的出现, 使体细胞的基因打靶效率大大提高。多个实验室将其用于猪, 实现了高效基因打靶, 并在很短的一段时间里, 获得了一系列基因打靶猪。就传统同源重组技术以及近几年发展起来的新兴基因编辑技术在基因修饰猪的应用研究进展进行了综述。

**关键词:** 体细胞克隆; 同源重组; ZFN; TALEN; CRISPR/Cas9

**中图分类号:** Q789; Q819      **文献标志码:** A

## Gene-targeted pigs based on somatic cell cloning approaches

YAN Quan-Mei, LAI Liang-Xue\*

(Key Laboratory of Regenerative Biology, Guangzhou Institutes of Biomedicine and Health,  
Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510530, China)

**Abstract:** Gene-targeted pigs have wide applications in agriculture and biomedicine. Due to unavailability of germ line competent pluripotent cells, the production of gene-targeted pigs is mainly through somatic cell cloning. Initially, homologous recombination technology was used to target the genome in pigs. However, the efficiency of gene targeting in somatic cells is extremely low because of their low proliferative capacity *in vitro*. As a result, only a few gene-targeted pigs have been reported in last decade. With the three newly emerging gene editing technologies (ZFN, TALEN and CRISPR/CAS9) coming into use, the efficiency of gene targeting in somatic cells has

收稿日期: 2015-01-20

\*通信作者: E-mail: lai\_liangxue@gibh.ac.cn

significantly been improved. These three technologies have been successfully applied to pigs with a very high efficiency and many gene-targeted pigs have been generated. In this review, we discussed the progress of gene-targeted pigs with traditional homologous recombination and newly emerging gene editing technologies.

**Key words:** somatic cell cloning; homologous recombination; ZFN; TALEN; CRISPR/Cas9

基因修饰猪可用于培育在农业和生物医药领域有重要应用价值的新品系。体细胞克隆技术出现之前, 受精卵 DNA 原核注射、精子载体法以及病毒载体法是对大动物基因组进行修饰的主要方法, 这些方法可用于制备表达外源基因的转基因动物。但是, 这些方法导入的外源 DNA 在宿主基因组上的整合位点是随机的, 由于受上下游基因的影响, 其表达量不确定或不表达。另外, 这种随机插入的基因还有可能扰乱宿主基因组的表达。体细胞克隆技术的出现, 使得大动物基因组的定点修饰成为可能, 人们可以对体细胞进行基因定点修饰, 获得的打靶体细胞用体细胞克隆, 即可制作基因打靶大动物。猪的第一例体细胞克隆在 2000 年获得成功后<sup>[1]</sup>, 猪核移植技术不断完善, 虽然用于繁殖生产的效率尚需进一步提高, 但用于基因修饰猪的培育已不是主要问题。体细胞克隆途径的基因打靶猪的培育的真正障碍在于基因修饰细胞系的建立。由于体细胞在体外的增殖能力有限, 在体外培养一定时间后会很快衰老, 对其进行的打靶效率极低。因而, 如何高效获得基因打靶体细胞系就成为基于体细胞克隆技术的基因打靶大动物培育的关键。

## 1 传统的同源重组技术

传统的同源重组技术 (homologous recombination, HR), 是利用指外源 DNA 片段与宿主基因组 DNA 存在的同源关系, 在外源基因导入宿主基因组后, 与宿主基因片段发生交换、重组, 从而使外源 DNA 整合到基因组上的特定位置上, 实现对 DNA 进行靶向修饰, 最终改造生物遗传特性的技术<sup>[2]</sup>。20 世纪 70 年代, 同源重组技术最早是在酵母细胞中发展起来的<sup>[3]</sup>, 随后在哺乳动物细胞也得以实现<sup>[4-5]</sup>。利用传统的同源重组技术进行细胞的基因打靶流程包括如下 3 个关键步骤。第一步是同源重组载体的构建。同源重组载体主要包括 5' 和 3' 侧的同源序列和两者间的外源序列, 根据外源序列的类型, 可以锚定其靶基因组上插入的位置, 从而达到基因敲除 (破坏内源基因的表达)、基因敲入 (外源基因在宿主细胞特定位置表达功能蛋白) 和基因定点突变 (纠正宿主突变的致病基因) 的目的。第

第二步是同源重组载体的细胞转染。电穿孔转染法、脂质体转染、病毒感染等 3 种方法均可有效地将外源基因转入体细胞。第三步是阳性细胞克隆的筛选和鉴定。常用的是正负双向筛选法和启动子捕获法。正负筛选法是利用载体携带的正负选择基因, 或位于两侧同源区内的正选择基因 (neo 或者 puro 基因等), 前者在随机整合和同源重组中均可正常表达; 而位于两侧同源区之外的负选择基因 (多为 HSV-tk 基因) 可以排除随机整合的细胞克隆<sup>[6]</sup>。启动子捕获法是在同源序列中插入一个正向的选择标记基因, 该标记基因缺少自身启动的启动子序列, 只有定点整合, 才能表达。对于筛选的细胞克隆的鉴定, 一般是先采用 PCR 法, 其中一条引物位于打靶载体上的外源序列区, 另一条引物位于基因组上同源序列的外侧, 然后再通过 Southern blot 方法进一步确定是否发生了同源重组。

同源重组是否能够高效发生受多因素影响, 包括: 1) 打靶载体的同源序列与宿主细胞基因组序列的同源性, 同源性越高则打靶效率越高。因此, 一般在构建打靶载体时, 都采用高保真的 DNA 聚合酶来扩增同源序列, 以提高其同源性。2) 打靶载体同源序列的长度。Thomas 等<sup>[5]</sup>发现当同源序列的长度由 4 kb 增加到 9 kb 时, 其同源重组效率可以增加 10 倍。但同源序列过长会增加 PCR 方法鉴定的难度, 权衡打靶效率和 PCR 鉴定难度, 目前打靶载体的同源序列一般在 4~8 kb。3) 外源 DNA 导入的效率。理论上效率越高, 同源重组的效率也会越高。4) 靶基因的位置。同源重组效率在不同基因和同一个基因不同位置的靶位点的选择存在差异。一般来说, 转录活性高的基因有利于基因同源重组的发生<sup>[7]</sup>。

在自然情况下, 同源重组的发生概率极其低下, 大约在百万分之一, 对哺乳动物而言, 通过受精卵或生殖细胞途径直接建立基因打靶动物是不可能的。1981 年, 能参与生殖系嵌合体形成的小鼠胚胎干细胞 (embryonic stem cell, ESC) 的建立才使动物水平上的基因打靶成为可能<sup>[8]</sup>。利用同源重组技术对小鼠 ES 细胞进行基因打靶, 然后将基因打靶细胞制作嵌合体小鼠, 再将后者进行回交即可获得基因

打靶小鼠。1989年,第一例利用同源重组技术结合小鼠胚胎干细胞的基因敲除小鼠诞生。随后的几十年里,小鼠同源重组技术在研究基因功能方面发挥了极大的作用。但是,包括猪在内的大动物都没有建立真正的具有生殖系嵌合能力的ESC或诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cell, iPSC),所以同源重组技术在大动物上一直未能实现。直到1997年,体细胞核移植技术(somatic cell nuclear transfer, SCNT)的出现,使得大动物的基因打靶有了可能性<sup>[9]</sup>。SCNT是指将一个体细胞的核移植到一个去核的卵母细胞中,得到与供体细胞基因组相同的新个体的技术。在核移植之前,对体细胞进行基因定向打靶,经筛选、鉴定和扩增,然后将其作为供体核,获得的克隆动物即为基因打靶动物。

2000年,首例利用体细胞克隆技术获得的基因打靶动物在绵羊上获得成功<sup>[10]</sup>。2002年,首例基因打靶猪诞生—— $\alpha$ -1,3-半乳糖苷酶基因敲除克隆猪,为异种器官移植的研究提供了理想的实验动物模型<sup>[11]</sup>。随后的十年,很多实验室进行了大量的尝试,但到目前为止利用该技术培育出的基因打靶猪数量极其有限,公开报道只有敲除CFTR基因<sup>[12]</sup>、免疫球蛋白 $\kappa$ 链基因<sup>[13]</sup>、免疫球蛋白重链J区基因<sup>[14]</sup>、SMN基因<sup>[15]</sup>和FAH基因<sup>[16]</sup>几例。而在猪定点基因敲入方面,仅见猪ROSA26位点定点敲入可用Cre/Loxp调控的双荧光报告系统<sup>[17]</sup>以及对猪CFTR基因的定点突变<sup>[18]</sup>两篇报道。其原因在于自然状态下发生同源重组的概率为 $10^{-6}$ ,而由于体细胞的增殖能力有限,其同源重组的效率比在ESC中低大约2个数量级,即使使用筛选基因,往往在数百甚至上千个克隆中才能挑到所需的阳性克隆,因此,工作量十分庞大,成功与否,带有偶然性。此外,利用该技术在体细胞上进行的基因打靶,一般只能得到单等位基因的打靶,需要通过育种或二次基因打靶得到双等位基因的打靶猪,由于猪的性成熟时间(5~7个月)和妊娠期(115天)均很长,因此要获得纯合子基因打靶猪所需时间较长,一般需2~3年。

科学家们一直在寻求更高效的基因打靶技术来取代传统的同源重组技术,使大动物能够像小鼠一样可随心所欲地对其基因组进行定向改造。最近几年新兴的工程核酸酶介导基因编辑技术的出现使这一梦想得以实现。

人们在寻找新的基因打靶技术时,也基本是沿着同源重组的思路进行的。在自然条件下,细胞的

基因组经常会发生双链断裂(double strand break, DSB),但细胞有能够自身修复的能力。修复的方式主要有两种:一种途径是同源重组方式(homology-directed repair, HDR),以同源序列(如同源姐妹染色单体DNA)为模板进行精确的修复;另一种途径为非同源末端重组(non-homologous end-joining, NHEJ),通过简单的末端连接将断裂的DNA末端连接起来,通常会导致小的局部缺失或者插入,或者一个断裂末端也可能会连接到一个完全无关联的位置而导致染色体异位<sup>[19]</sup>。但在自然情况下,细胞内自然发生DSB的机率非常低,约为 $10^{-6}$ ,这也是同源重组为什么效率极其低下的原因。科学家们发现,人为增加一个DSB,同源重组的效率可以提高1000倍以上<sup>[20-21]</sup>,并进一步设想,如果能够在打靶位点处提高DSB出现的机率,DSB刺激细胞启动修复机制,NHEJ高频率发生,错误修复的几率会大大提高,基因的错误修复则会导致基因的功能失活,从而实现高效率的基因敲除;更进一步,如果同时引入一个带有同源臂的DNA模板,通过HDR就可以实现高效率的外源基因的定点整合。最近出现的3种基因修饰技术,ZFN、TALEN和CRISPR/Cas9正是基于提高细胞内特定基因的DSB发生的概率而先后开发出来的。应用这类技术,理论上可以对任意细胞类型的任意基因进行定点改造,因而被称为基因组编辑技术(genome editing)。这3种技术有其共同点,均主要由识别特异序列位点的识别域和切割基因组的核酸酶组成<sup>[22]</sup>。这些新兴的基因组编辑技术可以绕过同源重组这一低概率的过程而达到高效基因敲除的目的,完全克服了利用传统的同源重组技术介导基因敲除的低效率的困境。

## 2 锌指核酸酶技术

锌指核酸酶技术(zinc-finger nucleases, ZFNs)技术是最早开发出来的一种核酸酶介导的基因打靶技术,由一对锌指核酸酶组成。每个锌指核酸酶是由DNA结合域和Fok I核酸内切酶的剪切结构域组成的融合蛋白,这一对锌指核酸酶上的两个DNA结合域分别与DNA的两条链结合后,两个Fok I核酸内切酶形成二聚体从而对DNA双链进行切割产生DSB<sup>[23-24]</sup>。DNA结合域具有良好的可塑性,可根据需求进行设计拼接,决定切割位置的特异性,它是由一系列Cys2-His2锌指蛋白(zinc finger protein, ZFP)串联组成,每个锌指蛋白特异性识别并结合



DNA 双螺旋中某一条单链上 3 个连续的核苷酸——三联子。一个锌指蛋白大概含有 30 个氨基酸, 形成一个  $\alpha$  螺旋和反向平行的两个  $\beta$  片层 ( $\alpha$ - $\beta$ - $\beta$ ) 结构, 其中  $\alpha$  螺旋中 -1、+3 和 +6 位的氨基酸残基直接与三联子的碱基相互作用, 这就决定了该锌指蛋白的特异性<sup>[25]</sup>。多个锌指蛋白串联起来形成一个锌指蛋白组就可以识别一段特异的碱基序列。Fok I 核酸内切酶来源于一种 IIS 型限制性内切酶, 同 ZFN 的 C 端融合。当形成二聚体时, Fok I 核酸内切酶通常在两个结合位点的间隔区约 5~7 bp 处切割, 产生的 DSB 切口细胞可通过 NHEJ 或 HR 方式进行修复 DSB, 从而引起基因敲除或是基因敲入<sup>[26]</sup>。

利用 ZFNs 介导基因发生同源重组的基本流程如下: 1) 根据实验需要, 在目标序列上选择合适的靶位点并合成相应的 ZFN, 以及体外检测 ZFN 的切割活性。2) 在 ZFNs 切割位置附近设计同源打靶载体。传统的同源重组载体的同源序列一般都在 6~7 kb, 而利用 ZFNs 介导的同源重组载体的同源序列在 500~1 500 bp, 甚至 50 bp 即可发生同源重组<sup>[27]</sup>。3) 一对 ZFN 和其同源重组打靶载体共同转染细胞, 然后进行细胞的筛选及鉴定。此过程基本类似于传统的同源重组技术。

利用 ZFN 技术已在多个物种中实现高效的基因敲除, ZFN 技术介导同源重组的研究最早追溯到 2001 年, 研究人员在非洲爪蟾受精卵中直接注射 ZFN mRNA, 发现同源重组的效率高达 46%。2005 年, Urnov 等<sup>[28]</sup> 对人细胞中 IL2RG 基因缺陷进行定点修复, 发现在不筛选的情况下, 基因修复的效率高达 18%, 并且其中有 7% 的细胞发生了双等位位点的基因修复。ZFNs 在果蝇、小鼠细胞和个体内、人的细胞系中都实现了基因打靶。猪是最早利用 ZFN 技术实现基因打靶的大动物。2010 年, Watanabe 等<sup>[29]</sup> 利用 ZFN 技术对绿色荧光猪细胞的外源 GFP 基因实现了高效敲除。2011 年, Whyte 等<sup>[30]</sup> 用同样的方法和技术路线, 在获得 GFP 基因敲除猪成纤维细胞后进行核移植, 培育了 ZFN 介导的 GFP 基因敲除猪; 同年, 我们实验室利用 ZFN 技术敲除了猪的 PPAR $\gamma$  基因<sup>[31]</sup>, 第一次实现了猪内源基因的敲除; 同样在 2011 年, Hauschild 等<sup>[32]</sup> 应用 ZFN 技术又进一步实现了猪双等位基因的敲除。这证明 ZFN 技术不仅可以用于猪内、外源基因的敲除, 还可以只经一代核移植就可获得双等位基因敲除的纯合子猪。但随后的两三年里, ZFN 介导的基因敲除猪并没有大量的报道; 并且,

到目前为止, 利用该技术获得基因敲入猪的报道也没有出现。其原因在于 ZFN 的合成比较复杂繁琐, 其制备技术专利掌握在少数实验室中, 一对 ZFN 的售价昂贵, 在 20 万人民币左右, 这在很大程度上阻碍了 ZFN 的推广应用。随后, 新的更高效的基因编辑技术的出现, 使 ZFN 的局限性更加突出。

### 3 类转录激活因子效应物核酸酶技术

类转录激活因子效应物核酸酶 (transcription activator-like effector nucleases, TALENs) 技术是继 ZFN 技术之后新发展的又一种基因定点修饰工具。类似 ZFN 技术, TALENs 是由特异识别并结合 DNA 序列的 TALE 蛋白与 Fok I 核酸内切酶融合组成的。

早在 1989 年, 科学家们发现了来自于植物病原微生物 *Xanthomonas* 的菌体蛋白转录激活子样效应因子 (transcription activator like effectors, TALEs) 的一段氨基酸序列能特异性识别并结合 DNA 序列<sup>[33]</sup>。TALE 蛋白的核心是多个串联的重复片段, 每个片段由 33~35 个氨基酸残基组成。这些重复片段高度保守, 只在第 12 位和第 13 位氨基酸存在差异, 这两位的氨基酸被称为重复可变双残基 (repeat variable di-residue, RVD), RVD 与碱基有恒定的对应关系, 即 HD 识别 C 碱基、NI 识别 A 碱基、NG 识别 T 碱基、NN 识别 A 或 G 碱基以及 NS 识别 4 种碱基<sup>[34-35]</sup>。这些重复单元可以任意组合, 相应地就可以识别任意的 DNA 序列。2011 年, Cermak 等<sup>[36]</sup> 将 TALE 蛋白与 Fok I 核酸内切酶融合在一起组成 TALEN, 并证明了 TALEN 技术可以对靶序列进行定点修饰。利用 TALEN 技术介导基因同源重组的流程虽然类似于 ZFN 技术, 但相比于 ZFN 技术, TALEN 的构建要简单的多。

目前, 构建 TALEN 的方法有以下四种: 1) Gateway 组装法<sup>[37]</sup>。这是构建 TALENs 的最早方法, 即把 TALE 序列通过常规的酶切连接反应将 TALE 模块连接, 最后再克隆到表达载体中。该方法费时费力, 而且成功率较低。2) Golden Gate 组装法。Zhang 等<sup>[38]</sup> 利用 PCR 方法扩增处含有酶切位点的 TALE 单元, 然后把所有的 TALE 单元置于一个体系中实现所有的酶切酶促反应。该方法把构建周期缩短在一周之内。3) Toolbox 组装方法。类似于 Golden Gate 方法, 通过 PCR 方法引入同尾酶的酶切位点, 然后与 6 个单元先组合, 再把 3 个这样的组合连接到一起, 最后克隆到 TALEN 的骨架载体

中<sup>[39]</sup>。4)FLASH 组装法。该方法是将生物素化的 TALE 单元与磁珠相连,通过磁珠的引力固定 TALE 单元,然后在自动化仪器中快速完成 TALEN 的构建<sup>[40]</sup>。

TALEN 技术不止在受精卵中通过注射 mRNA 实现了多个物种的基因打靶,而且在细胞系以及体细胞中通过转染 DNA 质粒也实现了多个物种的高效基因打靶。在大动物上结合体细胞克隆技术,Carlson 等<sup>[41]</sup>于 2012 年利用 TALENs 在牛和猪上实现了多个基因的敲除。我们实验室利用 TALEN 技术介导的同源重组技术结合体细胞克隆技术,获得了 RAG 基因敲除的免疫缺陷性猪。在 27 头克隆猪中,有 10 头为 RAG2 单等位碱基缺失,9 头为 RAG1 双等位碱基缺失,3 头为 RAG2 双等位碱基缺失,这些碱基缺失都导致了外显子读码框移码。RAG1/2 双等位敲除猪表现出了典型的重症联合免疫缺陷疾病,该猪模型将在生物医药和转化医学中发挥重要作用<sup>[42]</sup>。另外,我们利用 TALEN 技术,在猪中实现了基因的定点敲入。我们成功地在猪 ROSA26 位点处敲入 Cre 重组酶报告系统<sup>[43]</sup>,该模型将在猪体内世系追踪各类干细胞的分化和再生,为揭示和人类干细胞相关的疾病机理和实施干细胞治疗提供宝贵的大动物实验依据。在此基础上,我们实验室在 ROSA26 位点引入一对异源 loxp 位点,经重组酶介导的基因交换,成功将 EGFP 基因替换为红色荧光蛋白 tdTomato 基因,由此又获得了世界上第一个重组酶介导的基因交换大动物模型。利用该模型,研究人员可以将任意基因通过重组酶介导的基因交换插入到 ROSA26 位点,实现目的基因在大动物所有组织中的无差异表达。同时,由于重组酶介导的基因交换无需药物筛选即可获得,从而使获得的转基因猪不携带外源的药物抗性基因,可消除转基因猪农产品的生物安全和食品安全隐患。在猪基因改造领域,这算得上是一个里程碑式的成果,在新的基因编辑技术出现之前,其实现是不可想象的。例如,我们实验室在用传统的同源重组技术方法对 CRE 酶基因的敲入尝试中,共筛选了 425 个克隆,但没有得到基因敲除的阳性克隆。随后利用 TALEN 技术,在获得 96 个转染环状同源打靶载体的细胞克隆中,其中有 14 个细胞克隆发生了基因敲入,同源重组率提高到 14.6%;在获得的 96 个转染线性化的同源打靶载体的细胞克隆中,有 46 个细胞克隆发生了基因的敲入,同源重组率高达 47.9%。

目前,我们实验室利用 TALEN 技术已在猪体细胞上实现了多个基因的定点敲入,甚至是点突变,其中同源打靶载体的选择既可以是双链 DNA 还可以是单链寡核苷酸,基因敲入平均效率在 10% 左右。

## 4 CRISPR/Cas9 技术

CRISPR/Cas9 技术是继 ZFN 和 TALEN 技术之后最新的一种更高效实现基因定点修饰的基因编辑技术。在被外来的病毒或是噬菌体入侵时,细菌能通过一种叫做成簇的有规律间隔的短回文重复序列 (CRISPR) 或与之相关 (Cas) 的序列,在 RNA 的介导下来剪切外来基因,从而抵御这些病毒及噬菌体对自身的破坏<sup>[44-46]</sup>。一个 CRISPR/Cas 基因座由重复回文序列和间隔在这些 CRISPR 之间的特异间隔序列 (重复 - 间隔) 串联组成的。这些 CRISPR 序列一般是和编码具有核酸酶、解旋酶、整合酶和聚合酶等活性蛋白质的 CRISPR-associated (Cas) 基因相关联,而这些间隔序列可以特异性地识别外源核酸<sup>[47-48]</sup>。

CRISPR/Cas 系统根据 Cas 蛋白和序列的不同分为 I、II、III 3 种类型,研究比较深入并且应用广泛的是第 II 类型。在第 II 类型中,参与的蛋白质是 Cas9 蛋白,该蛋白既能加工 crRNA,同时又能切割外源 DNA<sup>[49]</sup>。当外源 DNA 入侵细菌时,CRISPR 被转录为长的 RNA 前体 (pre-CRISPR RNA, pre-crRNA),之后由 Cas9 蛋白加工成一系列短的含有保守重复序列和间隔区的成熟 crRNA;在 pre-crRNA 转录的同时,与其重复序列互补的反式激活 crRNA (trans-activating crRNA, tracrRNA) 也被转录出来。在加工完成后,成熟 crRNA 和 tracrRNA 以及 Cas9 蛋白组成复合体,识别并结合与 crRNA 互补的 DNA 序列,并对其进行切割<sup>[50]</sup>。因为这一过程是由成熟的 crRNA 参与识别结合 DNA 后引导 Cas9 蛋白发生切割作用,所以又称为 CRISPR/Cas9 系统。CRISPR/Cas9 系统切割的位置位于 crRNA 互补序列下游邻近的 PAM 区 (protospacer-adjacent motif),PAM 区的序列为 NGG。自然界的野生型 gRNA/Cas9 系统中的 crRNA 和 tracrRNA 是在 Cas9 的加工过程中才产生的彼此独立的个体。科研人员在体外把 crRNA 和 tracrRNA 2 个序列通过一个 4 碱基的连接环连接起来,构成一个新的单链引导 RNA (single guide RNA, sgRNA),模拟体内 crRNA 和 tracrRNA 形成的二聚体结构来结合 Cas9 蛋白,从而具有剪切 DNA 的功能,所以该系统也称为



gRNA/Cas9 系统<sup>[51-52]</sup>。在此基础上,把这个 sgRNA 构建成表达载体,由 U6 或 T7 来启动 sgRNA 的表达,与表达 Cas9 蛋白的质粒共同导入到细胞或受精卵中,即可发挥基因打靶的功能<sup>[51,53-54]</sup>。

相比于 ZFN 和 TALEN 技术,其设计合成更为简单,整个载体的构建在一周内即可完成,并且打靶效率更高。2013 年,科学家首次报道了利用该技术成功在人细胞中进行基因敲除。短短一年多时间,CRISPR/Cas9 系统已在多个物种上验证了其基因敲除的高效率,并同时证实,CRISPR/Cas9 系统还有另一个独特的优势,即可以在一个细胞内同时高效实现多个基因的靶向修饰,该技术已在多个物种的胚胎、细胞以及个体上实现了多个基因的同时敲除<sup>[53,55]</sup>。目前,CRISPR/Cas9 系统已经成为很多实验室进行基因打靶的主流技术,该技术不仅具有比 TALENs 更高的基因打靶效率,而且倾向于介导双等位基因定点修饰<sup>[56]</sup>。2014 年,Hai 等<sup>[57]</sup>首次利用 CRISPR/Cas9 技术结合受精卵显微注射获得 vWF 基因敲除猪,但这种基因打靶动物一般都是嵌合体,需要进一步繁殖来获得基因打靶动物纯合体,这比通过体细胞核移植技术获得基因打靶动物纯合体耗时更长,尤其对猪等大动物来说,其繁殖周期长,要获得纯合子打靶猪,需要的时间过长(2~3 年)。同年,美国 Prather 实验室利用该技术结合体细胞移植技术或受精卵显微注射都成功获得了 CD163 和 CD1D 基因敲除猪<sup>[58]</sup>。我们实验室在 2014 年利用 CRISPR/Cas9 基因敲除技术成功地培育出两种基因敲除克隆小型猪,即酪氨酸酶基因敲除猪和 PARK2 与 PINK1 双基因敲除猪,建立了人类白化病和帕金森综合征两种猪模型<sup>[59]</sup>。针对猪的酪氨酸酶、PARK2 与 PINK1 基因的外显子分别设计 gRNAs,将 gRNA 和 Cas9 质粒分别转染版纳小型猪的胎儿成纤维细胞和巴马小型猪的胎儿成纤维细胞后,获得了纯合的酪氨酸酶基因敲除以及 PARK2 与 PINK1 双基因敲除的细胞系。将细胞系用于体细胞核移植后,获得 15 头酪氨酸酶基因敲除克隆猪,20 头 PARK2 与 PINK1 双基因敲除克隆猪。酪氨酸酶基因敲除后,本为黑色的版纳小型猪,变成了白猪,表现出了典型的白化病特征;而缺失 PARK2 与 PINK1 双基因的敲除克隆猪可以作为帕金森症大动物模型,用于研究其发生机制和评估相关治疗药物的有效性和安全性。CRISPR/Cas9 技术与体细胞克隆相结合,不仅使猪基因打靶效率更高、更为精确,而且在一个世代内首次实现了大动物双基因

的等位敲除。该技术路线的建立将大大加速多基因修饰猪的制备。

CRISPR/Cas9 技术除了广泛用于基因敲除的研究,其还在多个细胞系和个体上成功进行了基因的定点敲入<sup>[55,60-61]</sup>,如 Auer 等<sup>[62]</sup>在斑马鱼的胚胎和细胞内通过同源重组介导长达 5.7 kb 的基因的定点敲入,其最高效率可达 66%。此外,CRISPR/Cas9 技术结合单链寡核苷酸链在靶位点处引入两个 lox 位点即可达到条件性基因敲除的目的<sup>[61,63]</sup>。我们实验室利用该技术结合同源重组载体,获得了多个基因的定点敲入猪和利用寡核苷酸链介导的基因定点突变猪,平均效率在 15% 以上,且能够得到双等位基因的打靶(数据未发表)。CRISPR/Cas9 系统的出现是基因打靶技术史上又一次革命性的飞跃。

## 5 问题和展望

在大规模应用之前,ZFN、TALEN 和 CRISPR/Cas9 技术还有一些问题需要解决,最令人关切的是潜在的脱靶问题。这 3 种技术都存在潜在的脱靶问题,其中 ZFN 系统的打靶效率最低、脱靶率最低,而 CRISPR/Cas9 系统与其相反,打靶效率最高,但脱靶问题也最高。在实际应用中,如何克服该技术的脱靶效应将是一个关键问题。在实践中,我们实验室采用了如下两种方法来克服潜在脱靶问题,一是在设计和构建载体时,靶位点选择应尽量规避那些具有潜在脱靶效应的位点,具体做法是利用 E-CRISPR 网站(<http://www.e-crisp.org/E-CRISP/design-crispr.html>)来筛选某个基因的所有合适靶位点,再结合 NCBI 的 BLAST 功能一一比对这些靶位点与该物种基因组的匹配程度,舍弃那些有超过 14 个碱基与基因组序列匹配的靶位点,并且尽量选择与基因组匹配程度最低的靶位点,但即使在理论上选择了最适的靶位点,也不能完全克服脱靶问题。二是在筛选出基因打靶细胞系后,通过把不同的阳性细胞克隆混合在一起,然后将混合的细胞进行核移植,这样将有不同类型突变的克隆胚移植到同一代孕母猪中。这种方法是行之有效的,因为脱靶是随机发生的,不良脱靶在不同的细胞系出现也是随机的。由于在制备克隆猪时,移植的胚胎一般在 100 枚以上,只有那些没有发生有害脱靶的胚胎才能活下来并发育到期,这样就可以增加获得正常基因打靶猪的概率。

总之,ZFN、TALEN 和 CRISPR/Cas9 技术是生物学和生物医药等研究领域中的革命性工具,几

乎可以对任意物种的基因组进行靶向修饰,使得对于基因的功能研究、疾病模型的建立等可以应用到猪等与人类亲缘关系更接近的大动物上,也有望成为基因治疗的重要手段。这些技术的不断完善,将极大地推动基因修饰猪在农业和生物医药领域的广泛应用。

### [参 考 文 献]

- [1] Polejaeva IA, Chen SH, Vaught TD, et al. Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature*, 2000, 407(6800): 86-90
- [2] Capecchi MR. Altering the genome by homologous recombination. *Science*, 1989, 244(4910): 1288-92
- [3] Hinnen A, Hicks JB, Fink GR. Transformation of yeast. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1978, 75(4): 1929-33
- [4] 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
- [5] Thomas KR, Capecchi MR. Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell*, 1987, 51(3): 503-12
- [6] Sedivy JM, Sharp PA. Positive genetic selection for gene disruption in mammalian cells by homologous recombination. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, 86(1): 227-31
- [7] Frohman MA, Martin GR. Cut, paste, and save: new approaches to altering specific genes in mice. *Cell*, 1989, 56(2): 145-7
- [8] Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 1981, 292(5819): 154-6
- [9] Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, et al. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, 1997, 385(6619): 810-3
- [10] McCreath KJ, Howcroft J, Campbell KH, et al. Production of gene-targeted sheep by nuclear transfer from cultured somatic cells. *Nature*, 2000, 405(6790): 1066-9
- [11] Lai L, Kolber-Simonds D, Park KW, et al. Production of  $\alpha$ -1,3-galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning. *Science*, 2002, 295(5557): 1089-92
- [12] Rogers CS, Stoltz DA, Meyerholz DK, et al. Disruption of the CFTR gene produces a model of cystic fibrosis in newborn pigs. *Science*, 2008, 321(5897): 1837-41
- [13] Ramsoondar J, Mendicino M, Phelps C, et al. Targeted disruption of the porcine immunoglobulin  $\kappa$  light chain locus. *Transgenic Res*, 2011, 20(3): 643-53
- [14] Mendicino M, Ramsoondar J, Phelps C, et al. Generation of antibody- and B cell-deficient pigs by targeted disruption of the J-region gene segment of the heavy chain locus. *Transgenic Res*, 2011, 20(3): 625-41
- [15] Lorson MA, Spate LD, Samuel MS, et al. Disruption of the Survival Motor Neuron (SMN) gene in pigs using ssDNA. *Transgenic Res*, 2011, 20(6): 1293-304
- [16] Hickey RD, Lillegard JB, Fisher JE, et al. Efficient production of Fah-null heterozygote pigs by chimeric adenovirus-mediated gene knockout and somatic cell nuclear transfer. *Hepatology*, 2011, 54(4): 1351-9
- [17] Li S, Flisikowska T, Kurome M, et al. Dual fluorescent reporter pig for Cre recombination: transgene placement at the ROSA26 locus. *PLoS One*, 2014, 9(7): e102455
- [18] Rogers CS, Hao Y, Rokhlina T, et al. Production of CFTR-null and CFTR- $\Delta$ F508 heterozygous pigs by adenovirus-mediated gene targeting and somatic cell nuclear transfer. *J Clin Invest*, 2008, 118(4): 1571-7
- [19] Wyman C, Kanaar R. DNA double-strand break repair: all's well that ends well. *Annu Rev Genet*, 2006, 40: 363-83
- [20] 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
- [21] Choulika A, Perrin A, Dujon B, et al. Induction of homologous recombination in mammalian chromosomes by using the I-SceI system of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, 1995, 15(4): 1968-73
- [22] Gaj T, Gersbach CA, Barbas CF 3rd. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends Biotechnol*, 2013, 31(7): 397-405
- [23] 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
- [24] Klug A. The discovery of zinc fingers and their development for practical applications in gene regulation and genome manipulation. *Q Rev Biophys*, 2010, 43(1): 1-21
- [25] Pabo CO, Peisach E, Grant RA. Design and selection of novel Cys2His2 zinc finger proteins. *Annu Rev Biochem*, 2001, 70: 313-40
- [26] Porteus MH, Carroll D. Gene targeting using zinc finger nucleases. *Nat Biotechnol*, 2005, 23(8): 967-73
- [27] Orlando SJ, Santiago Y, DeKolver RC, et al. Zinc-finger nuclease-driven targeted integration into mammalian genomes using donors with limited chromosomal homology. *Nucleic Acids Res*, 2010, 38(15): e152
- [28] Urnov FD, Miller JC, Lee YL, et al. Highly efficient endogenous human gene correction using designed zinc-finger nucleases. *Nature*, 2005, 435(7042): 646-51
- [29] Watanabe M, Umeyama K, Matsunari H, et al. Knockout of exogenous EGFP gene in porcine somatic cells using zinc-finger nucleases. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 402(1): 14-8
- [30] Whyte JJ, Prather RS. Cell Biology Symposium: zinc finger nucleases to create custom-designed modifications in the swine (*Sus scrofa*) genome. *J Anim Sci*, 2012, 90(4): 1111-7
- [31] Yang D, Yang H, Li W, et al. Generation of PPAR $\gamma$  mono-allelic knockout pigs via zinc-finger nucleases and nuclear transfer cloning. *Cell Res*, 2011, 21(6): 979-82
- [32] Hauschild J, Petersen B, Santiago Y, et al. Efficient generation of a biallelic knockout in pigs using zinc-finger nucleases. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(29): 12013-7
- [33] Boch J, Bonas U. *Xanthomonas* AvrBs3 Family-Type III

- Effectors: discovery and function. *Annu Rev Phytopathol*, 2010, 48: 419-36
- [34] Boch J, Scholze H, Schornack S, et al. Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science*, 2009, 326(5959): 1509-12
- [35] Moscou MJ, Bogdanove AJ. A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors. *Science*, 2009, 326(5959): 1501
- [36] 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
- [37] Mahfouz MM, Li L, Shamimuzzaman M, et al. *De novo*-engineered transcription activator-like effector (TALE) hybrid nuclease with novel DNA binding specificity creates double-strand breaks. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(6): 2623-8
- [38] 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
- [39] Sanjana NE, Cong L, Zhou Y, et al. A transcription activator-like effector toolbox for genome engineering. *Nat Protoc*, 2012, 7(1): 171-92
- [40] Reyon D, Tsai SQ, Khayter C, et al. FLASH assembly of TALENs for high-throughput genome editing. *Nat Biotechnol*, 2012, 30(5): 460-5
- [41] Carlson DF, Tan W, Lillico SG, et al. Efficient TALEN-mediated gene knockout in livestock. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(43): 17382-7
- [42] Huang J, Guo X, Fan N, et al. RAG1/2 knockout pigs with severe combined immunodeficiency. *J Immunol*, 2014, 193(3): 1496-503
- [43] Li X, Yang Y, Bu L, et al. Rosa26-targeted swine models for stable gene over-expression and Cre-mediated lineage tracing. *Cell Res*, 2014, 24(4): 501-4
- [44] Wiedenheft B, Sternberg SH, Doudna JA. RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea. *Nature*, 2012, 482(7385): 331-8
- [45] Horvath P, Barrangou R. CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. *Science*, 2010, 327(5962): 167-70
- [46] Terns MP, Terns RM. CRISPR-based adaptive immune systems. *Curr Opin Microbiol*, 2011, 14(3): 321-7
- [47] Jansen R, van Embden JDA, Gastra W, et al. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Mol Microbiol*, 2002, 43(6): 1565-75
- [48] Makarova KS, Aravind L, Grishin NV, et al. A DNA repair system specific for thermophilic Archaea and bacteria predicted by genomic context analysis. *Nucleic Acids Res*, 2002, 30(2): 482-96
- [49] Garneau JE, Dupuis ME, Villion M, et al. The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature*, 2010, 468(7320): 67-71
- [50] 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
- [51] Hwang WY, Fu Y, Reyon D, et al. Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(3): 227-9
- [52] Jinek M, East A, Cheng A, et al. RNA-programmed genome editing in human cells. *Elife*, 2013, 2: e00471
- [53] Cong L, Ran FA, Cox D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 2013, 339(6121): 819-23
- [54] Mali P, Yang L, Esvelt KM, et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*, 2013, 339(6121): 823-6
- [55] 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
- [56] Ding Q, Regan SN, Xia Y, et al. Enhanced efficiency of human pluripotent stem cell genome editing through replacing TALENs with CRISPRs. *Cell Stem Cell*, 2013, 12(4): 393-4
- [57] Hai T, Teng F, Guo R, et al. One-step generation of knockout pigs by zygote injection of CRISPR/Cas system. *Cell Res*, 2014, 24(3): 372-5
- [58] Whitworth KM, Kiho L, Benne JA, et al. Use of the CRISPR/Cas9 system to produce genetically engineered pigs from *in vitro*-derived oocytes and embryos. *Biol Reprod*, 2014, 91(3): 78
- [59] 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]
- [60] Yoshimi K, Kaneko T, Voigt B, et al. Allele-specific genome editing and correction of disease-associated phenotypes in rats using the CRISPR-Cas platform. *Nat Commun*, 2014, 5: 4240
- [61] Yang H, Wang H, Shivalila CS, et al. One-step generation of mice carrying reporter and conditional alleles by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell*, 2013, 154(6): 1370-9
- [62] Auer TO, Duroure K, De Cian A, et al. Highly efficient CRISPR/Cas9-mediated knock-in in zebrafish by homology-independent DNA repair. *Genome Res*, 2014, 24(1): 142-53
- [63] Hwang WY, Fu Y, Reyon D, et al. Heritable and precise zebrafish genome editing using a CRISPR-Cas system. *PLoS One*, 2013, 8(7): e68708