

DOI: 10.13376/j.cbls/2017083

文章编号: 1004-0374(2017)06-0610-08

· 技术与应用 ·

CRISPR-Cas9技术在构建基因线路中的应用

谢海标^{1,2}, 刘宇辰¹, 黄卫人^{1*}

(1 深圳大学第一附属医院-深圳市第二人民医院医学合成生物学临床应用关键技术国家地方联合工程实验室, 深圳 518036; 2 汕头大学医学院临床医学系, 汕头 515041)

摘要: 随着合成生物学的发展, 基因线路在临床医学、生物制剂和化学品生产等多个领域展现出巨大的应用潜力。既往在构建基因线路的过程中往往面临着一个难题——缺乏一个有效的、可编辑的、靶向性高的转录调控因子。原核规律性重复短回文序列簇 (CRISPR) 基因编辑 / 修饰系统——一种由向导 RNA 诱导 Cas9 蛋白靶向目的基因的基因编辑工具, 具有高效、简单、可编辑等特性, 契合了构建基因线路的需要, 近来被广泛应用。现对合成基因线路的发展历程以及 CRISPR 系统如何改造构建基因线路作一回顾, 同时讨论了 CRISPR 介导的基因线路的最新进展、潜能和存在的挑战。

关键词: CRISPR-Cas9 工具; 合成基因线路; 转录调控因子

中图分类号: Q78 : Q812 **文献标志码:** A

The application of CRISPR-Cas9 tools in gene circuits construction

XIE Hai-Biao^{1,2}, LIU Yu-Chen¹, HUANG Wei-Ren^{1*}

(1 Department of Urology, State and Local Government Joint Engineering Laboratory of Synthetic Biology Medicine and Clinical Application of Key Technologies, Shenzhen Second Hospital, The First Affiliated Hospital of Shenzhen University, Shenzhen 518036, China;
2 Departments of Clinical Medicine, Shantou University Medical College, Shantou 515041, China)

Abstract: With the development of synthetic biology, synthetic gene circuits have showed great applied potentialities in medicine, biology and commodity chemicals. A fundamental challenge in building gene circuits is the shortage of effective, programmable and sequence-specific synthetic transcription factors (TFs). Clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR) system, a CRISPR-associated RNA-guided endonuclease Cas9 targeted genome editing tool, recently has been applied in engineering gene circuits for its pretty unique properties-operability, high efficiency and programmability. We review the evolvement of synthetic gene circuits and how CRISPR system can be used to build it, and discuss recent advances, prospective, underlying challenge in CRISPR-based gene circuits.

Key words: CRISPR-Cas9; synthetic gene circuits; transcription factors

1 合成基因线路概述

1.1 合成基因线路的概念与组成

1990年, 人类基因组计划正式启动, 基因测序进入崭新的时代。随着基因测序研究的深入, 短时间内通过整合基因表达的生物信息而获得的海量数据, 揭示了相关基因及其产物之间的逻辑关系, 阐明了基因表达调控不是孤立的、单一的, 而是相互制约、相互联系^[1]。其中, 启动子、基因编码序列、

终止子、转录调控因子、核糖体结合位点 (ribosome binding site, RBS) 等元件通过天然存在的逻辑关系构成了天然的基因线路 (gene circuit), 而各种基因线路又构成了复杂的基因调控网络。这里需要强调

收稿日期: 2017-02-05; 修回日期: 2017-03-13

基金项目: 国家重点基础研究发展计划 (“973” 计划) (2014CB745201)

*通信作者: E-mail: pony8980@163.com

的是, 基因线路与基因网络并没有严格意义上的区分。

近年来, “合成生物学”给生物信息技术产业带来了空前的变革, 其使用“问题导向”和“自下而上”的程序化设计思路, 通过构建并整合标准化的元件和模块, 从而改造已存在的天然系统, 使基因线路工程化编辑成为可能^[2]。伴随着技术的成熟, 合成基因线路在医学、生物以及化学品等领域展示了巨大潜力, 越来越受到科学家以及政府的重视, 已经成为合成生物学中的一个热门研究领域^[3]。

所谓基因线路, 是指具有确定的方向趋势和输入信号-输出反应的遗传装置或动态系统。经典的基因线路包括3个功能模块: 传感器(sensors)、处理器(processors)和执行器(actuators)(图1)^[4]。传感器通过检测环境或细胞的信息, 将信号传递给处理器, 处理器通过自身存在或已设计好的逻辑关系分析并修改信号, 最后执行器执行经修改的命令。功能模块具体来说是由多种元件形成的, 例如启动子、基因编码序列、终止子、转录调控因子、RBS、调控小RNA分子等。除了这些天然存在的元件, 随着科学技术的发展, 人们开发了许多新型的元件, 包括DNA位点标签、RNA配体、基因间序列元件等超过100种新型功能元件^[3]。

1.2 既往构建的线路及其挑战

随着合成生物学研究的深入以及更多功能元件的开发, 人们利用这些元件设计了各种具有人为设定功能的基因线路, 如逻辑门(logic gates)^[5]、模拟计算电路(analog computing circuits)^[6]、基因表达开关(gene expression switches)^[7]、振荡器(oscillators)^[8]、定时器(timer)^[9]、计数器和生物钟(counters and clocks)^[10]、图案检测器(pattern detectors)^[11]、带通滤波器(band-pass filters)^[12]、记忆存储器(memory devices)^[13]、传感器(sensors)^[14]和细胞间通信系统(intercellular communication systems)^[15]。这些人工开发的基因线路为基础研究提供了极大的便利, 甚至已经应用于生物燃料和工业化学品的制造^[3]。

然而, 合成基因线路发展同样也存在着一些问题与挑战。其中, 在基因线路构建中, 缺少一个能够在细胞中协作运行且无串话(crosstalk)的功能元件, 如何设计此类功能元件成为了合成基因线路过程中的基本挑战^[16]。针对这个问题, 既往构建的线路绝大多数都是应用转录调控因子进行调节, 因此, 构建复杂的基因线路依赖于合成一个有效的、可编程的、具有特定序列的转录调控因子。如今应用最多的可编程的转录调控因子编辑技术有3种, 包

括锌指核酶(zinc-finger nucleases, ZFNs)技术、转录激活因子样效应物核酸酶(transcription activator-like effectors nucleases, TALENs)技术以及近期发展迅速的CRISPR-Cas9技术。CRISPR-Cas9及其衍生技术由于相较于其他技术制作简单、高效、易控及成本低等优势, 被全世界各大实验室广泛应用^[4]。

2 CRISPR-Cas9技术

CRISPR-Cas9系统由成簇规律间隔短回文重复序列(clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR)及CRISPR相关蛋白(CRISPR-Cas9)组成, 是一种由向导RNA(single guide RNA, sgRNA)介导的新型基因编辑/修饰系统。1987年, 日本学者Ishino等^[17]在对K12大肠杆菌碱性磷酸酶同工酶(isozymes of alkaline phosphatase, IAP)基因的研究中, 首次发现了CRISPR序列的存在, 由于当时技术的局限, 这段日后令人瞩目的序列并没有引起重视。直到2012年, 伴随着基因测序技术的不断完善以及对CRISPR序列更深入的研究, 美国科学家Jinek等^[18]发现由成熟的CRISPR导出RNA(CRISPR-derived RNA, crRNA)和反式激活CRISPR RNA(transactivating CRISPR RNA, tracrRNA)结合的sgRNA可以靶向Cas9蛋白对目标基因进行切割, 并且能够在体外应用。至此, CRISPR-Cas9技术因其简单、可控、高效的特点被推上了历史舞台, 开创了基因编辑技术的新纪元。

2.1 基因编辑

CRISPR-Cas9系统由单链具有向导作用的sgRNA及具有核酸内切酶活性的Cas9蛋白组成^[19]。其中, sgRNA由crRNA和tracrRNA通过碱基配对形成。而Cas9蛋白由HNH核酸结构域和RuvC核酸结构域组成, HNH结构域主要剪切与crRNA互补的基因序列, 与之相对应, RuvC结构域则剪切非互补序列, 从而达到对靶基因双向剪切的目的^[20]。根据Cas蛋白的种类, CRISPR-Cas9系统可分为3型, 现在广泛使用的主要是II型CRISPR-Cas系统。

自然界中, CRISPR系统存在于细菌和古细菌中, 其主要作用是抵御外来DNA的入侵, 如病毒和质粒。当外来DNA入侵细菌时, 系统会识别外来DNA的原间隔序列邻近基序(proto-spacer adjacent motifs, PAM)^[20], 外源DNA会被整合到CRISPR系统的基因座里面形成间隔序列。在II型CRISPR-Cas系统中, 间隔序列因细菌的第二次入侵会被诱导生成未成熟的crRNA(pre-crRNA), 再与tracrRNA

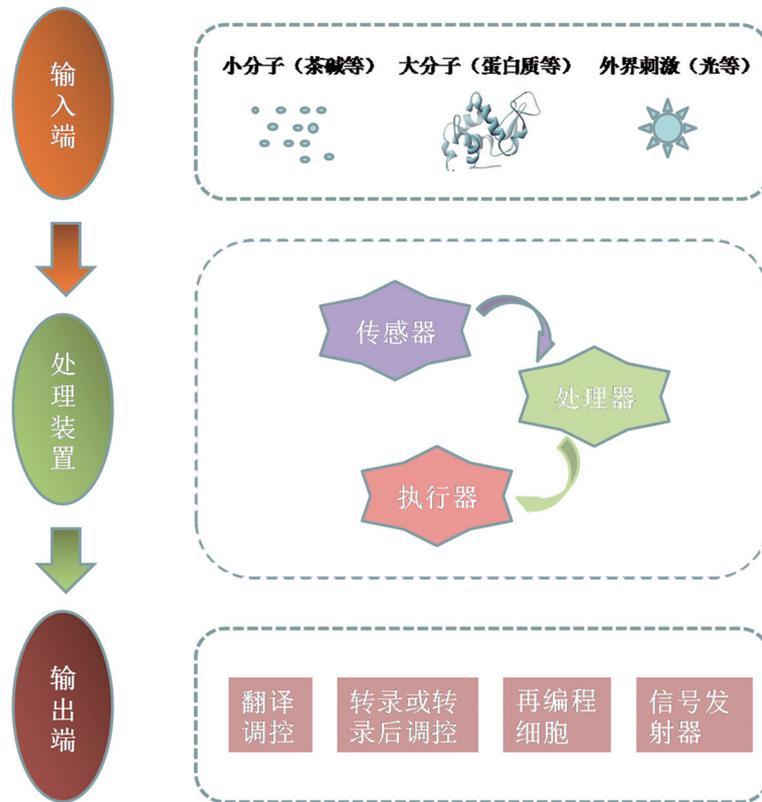


图1 经典基因线路的组成

在 RNase III 的作用下形成 tracrRNA-pre-crRNA-Cas9-RNase 复合物，经过加工形成成熟的 crRNA。成熟的 crRNA 与 tracrRNA 互补配对形成了 sgRNA，Cas9 在 sgRNA 作用下发生构象改变并且靶向靶基因，通过识别 PAM 与 crRNA 互补的序列，对靶基因进行切割^[21]。

相比于 CRISPR-Cas9 基因编辑技术，更早发现的 ZFNs 技术和 TALENs 技术同样具有定向靶向目标基因切割的能力，同时，由于 ZFNs 或 TALENs 靶向的序列比 CRISPR 技术中 sgRNA 靶向的序列更长，它们拥有更低的脱靶效应^[22]。但是它们的缺点也很明显，它们的设计和组装过程较 CRISPR 系统更为繁琐，需要大量测序工作，一般需要较为大型的公司才能开展，同时，这也意味着应用这两种技术需要较高的成本。除此之外，细胞毒性高、效率较低等缺点都限制了这两种技术的广泛应用^[22]。相对而言，CRISPR-Cas9 系统简单、价格低廉、易于编辑以及高效等特点令生命科学界兴奋无比，现已被广泛应用于动物模型制备、物种改造、疾病治疗及预防。尤其是在恶性肿瘤的诊断与干预上，CRISPR-Cas9 展示了巨大的潜力，已有文献显示

CRISPR 技术在膀胱癌^[23]、髓母细胞瘤^[24]、子宫颈癌^[25]等多种癌症的诊断以及靶向治疗上可能发挥重要作用。

以上是对 CRISPR-Cas9 系统构成、作用机制以及部分应用的概述，CRISPR-Cas9 编辑技术因其靶向编辑特定基因序列的特点被广泛应用，同时，科学家们也在探讨如何开发 CRISPR-Cas9 更多的功能。很快，dCas9 (deactivated Cas9) 应运而生。科学家们通过对 Cas9 基因的两个位点 (D10A 和 H841A) 进行点突变，使 Cas9 蛋白不再具备核酸内切酶活性，但保留了通过结合 sgRNA 整合到特定 DNA 序列的能力^[26]。同时，通过融合表达相关转录抑制或激活的功能域，dCas9 具备了抑制或激活靶基因表达的能力^[27-35]。因此，在讨论 dCas9 时常常会涉及到 CRISPR 干扰 (CRISPR interference, CRISPRi) 以及 CRISPR 激活 (CRISPR activation, CRISPRa)^[26, 33]。

2.2 转录抑制(transcriptional repression)

通过 dCas9 应用，科学家们实现了对基因转录的抑制。其中，在大肠杆菌中，科学家靶向 dCas9 于目标基因的启动子或编码区域，从而抑制 RNA 聚合酶 (RNAP) 的募集和进一步行动，其抑制效果

经验证达到了 99% 以上^[34]。同样的研究运用在酵母菌上, 科学家发现 dCas9 有着显著抑制表达的能力, 并发现融合 Mxi1 静止结构域后抑制效果更佳^[33]。然而, 在哺乳动物细胞中, 科学家发现单独运用 dCas9 并不能有效地抑制转录^[26]。于是更多的想法融入到了改造 dCas9 上面。其中, 美国科学家利用 dCas9 融合具有抑制作用的 KRAB 结构域后发现, dCas9 的抑制能力明显得到了提升^[29]。同时, 他们发现转录抑制程度与 dCas9-KRAB 在目标基因中的结合位点有关, 并且发现当 gRNA 在转录起始点 (transcription start site, TSS) 下游 50~100 bp 与基因结合时转录抑制作用最强 (90% 以上)^[29]。此外, 科学家们发现 dCas9 可以通过直接融合表观遗传修饰物发挥转录抑制作用^[36]。来自美国的研究团队通过构建“dCas9-DNA 甲基转移酶 3A” (dCas9-DNMT3A) 发现, 该载体不仅能够抑制基因的转录, 而且其抑制效果相对 dCas9-KRAB 具有持久性和遗传性, 这对于研究特定基因的修饰效果有着得天独厚的优势^[37]。

除了天然存在的细胞外, 在生命科学领域里同样热门的诱导多能干细胞 (induced pluripotent stem cells, iPSCs) 技术的应用上, dCas9 同样发挥着重要的作用^[38]。既往对 iPSCs 的重编程技术, 包括 ZFNs 和 TALENs 技术, 存在操作繁琐、成本昂贵以及比一般癌细胞更低效率等缺点, CRISPR-Cas9 技术的兴起因其诸多优势迅速带动了 iPSCs 重编程的发展^[38]。更进一步研究发现, 在 iPSCs 中, dCas9 介导的 CRISPRi 的效率不仅比原来的 CRISPR-Cas9 系统高的多, 而且拥有更低的脱靶效应, 能够更精确和有效地沉默基因表达^[39]。

2.3 转录激活(transcriptional activation)

同样, dCas9 也可以应用于转录激活, 可以通过以下几种方式增强基因的转录激活效率。

第一种, dCas9 可以通过融合特定的蛋白, 如 ω 蛋白 (omega protein)^[34], 使目标启动子与 RNAP 的结合更加稳定, 从而达到增强转录的目的。然而, 运用这种方法, dCas9 增强转录的效率并不是很高, 尽管国外有研究者曾发现最高有 23 倍的增强效率, 但大部分采用增强启动子结合稳定性的研究所发现的增强效率都低到 10%^[34]。

第二种, dCas9 融合转录激活因子。研究发现, VP64 是 VP16 的四倍体转录激活子, 可以通过募集基础转录复合物作用于靶启动子, 从而提高基因表达效率。Gilbert 等^[29] 在哺乳动物细胞中利用 dCas9 融合 VP64 去靶向靶基因, 发现 dCas9-VP64 确实

可以提高转录效率, 但是相比 ZFPs 以及 TALENs 在这方面的应用, 其效率还有待提高。大量研究表明, dCas9-VP64 需要通过增加拷贝数来实现转录激活的增强, 同时为了更有效地激活转录, 需要每个目标转录启动子有 3 个或更多的 gRNA 靶向激活^[28], 而多个 gRNA 靶向同一个转录启动子会限制其他基因的调控, 如何权衡是设计基因线路时需要考虑的问题。

第三种, 通过设计一个募集工具, 募集多个转录激活因子, 并将募集工具融合在 dCas9 上面, 实现靶向激活靶基因的目的^[27-28, 30-32]。最近, 有几个科研团队成功设计了类似的募集工具并使转录激活的效率显著提高。其中, 美国科学家 Tanenbaum 等^[31] 发现许多生物信号可以通过募集多拷贝的调节蛋白靶向一个点实现放大, 利用该原理, 他们设计了一个募集工具 SunTag, 其能募集多拷贝的 VP64, 并且只需要一个 sgRNA, 使转录激活变得简单、高效。研究中还发现许多类似的募集工具, 如 dCas9-VPR^[27]、蛋白质-RNA 相互作用模型 (protein-RNA interactions)^[32]、协同激活调节器 (synergistic activation mediator, SAM)^[30]、支架 RNA (scaffold RNA, scRNA)^[32]。以上几种募集工具相对 dCas9-VP64 转录激活效率要高的多, 为开展深入研究提供了极大的方便, 如干细胞重组^[27]、酿酒酵母的代谢合成^[32]。

第四种, dCas9 同样可以通过融合表观遗传修饰物激活转录^[36]。美国科学家 Hilton 等^[40] 通过构建 dCas9 和 P300 乙酰转移酶的催化结构域的过表达载体, 发现目的载体有明显的转录激活效应, 同时, 比此前的 dCas9-VP64 有着更好的效果。

综上, dCas9 有着很强的操作性, 这就意味着, 在设计实验时可以尝试多种策略, 获得更多的工具和手段。除了 dCas9, 最近的一些发现同样吸引着科学家的眼球。一直以来, 人们认为缩短的 sgRNA 序列不能诱导 Cas9 蛋白切割 DNA 是由于 Cas9 蛋白结合 DNA 的能力减弱, 但是来自美国的科学家 Kiani 等^[35] 却认为, 其中的原因应该是 Cas9 核酸内切酶活性减弱而不是结合 DNA 的能力减弱, 随后的实验验证了他们的想法。这是个有意思的发现, 意味着通过改变 sgRNA 的长度可以影响 Cas9 的酶切活性。Kiani 等^[35] 利用该原理设计了一个方法, 能够通过改变 sgRNA 实现同一个 Cas9 蛋白在同一个细胞内同时发挥转录激活或者抑制作用。这项工作作为更深层的科学研究、疾病治疗以及基因线路设计提供了很好的方法学以及策略。

3 CRISPR-Cas9技术在基因线路构建中的应用

CRISPR-Cas9 技术为构建基因线路提供了一种高效工具,极大丰富了元件设计和完善。

3.1 整合RNA和CRISPR-Cas9的基因编辑工具包(integrated RNA and CRISPR-Cas9 toolkit)

创建复杂遗传电路中的一个关键障碍是缺少可扩展的基因编辑工具备库(scalable device libraries)^[41]。而基于RNA的调节和CRISPR-Cas9转录调控因子(CRISPR-TF)因具有整合和调节基因网络的潜力,成为了基因工具备库的重要组成,但这种方法是有局限性的。在人类细胞中,CRISPR-TF的gRNA只能由RNA聚合酶III启动子启动表达,这就限制了其对条件基因的调节^[42]。Nissim等^[42]对此提出了新的策略,使RNA聚合酶II启动子表达功能性gRNAs以及单个转录本多重生产蛋白质和gRNAs成为可能。他们通过整合RNA和CRISPR-Cas9系统构建出一个多RNA介导的基因网络调控工具包,包括RNA三螺旋结构(RNA-triple-helix structures)、内含子(introns)、微小RNA(microRNAs)、核酶(ribozymes)、基于Cas9的CRISPR-TFs(Cas9-based CRISPR-TFs)和基于Cas6/Csy4的RNA处理器(Cas6/Csy4-based RNA processing)。通过使用这些工具,研究人员可以有效调控内源基因启动子并且更好地执行可调式合成线路,包括多级联(multistage cascades)和RNA依赖网络(RNA-dependent networks),并与Csy4连接,从而达到表达复杂行为的目的。这个工具包可以为生物学、治疗应用、合成生物学提供可编程、可扩展的基因线路器件。

3.2 逻辑门(logic gates)基因遗传回路

合成基因线路已经在构建细胞和动物疾病模型、基因治疗和智能治疗上展现了能够影响人类健康的潜力。尽管如此,大多数已发布的基因线路及系统依赖于使用一小组特定的因素,例如Lacl和Gal4,并不适合大规模网络的设计^[43]。因此,在宽动态范围内寻找能够调节基因系统网络的方法成为设计基因线路的关键,而逻辑门提供了解决的方法思路。既往的研究已经表明利用锌指核酶(ZFPs)技术可以构建包含逻辑门的基因线路^[43],以下介绍的是基于CRISPR-Cas9基因编辑技术构建的逻辑门基因遗传回路。

3.2.1 逻辑“非门”(NOT gate)

在细胞中,遗传电路需要许多调节部分去实现信号处理或执行算法。而CRISPR-Cas9基因编辑/

修饰系统的出现为研究人员提供了新的思维方式。美国科学家Nielsen和Voigt^[44]利用CRISPR-dCas9可以通过sgRNA抑制基因座的原理(根据碱基互补配对)构建了多个转录逻辑门,并将其连接使其能够在活细胞中执行逻辑计算。具体运用中,研究人员通过设计5个合成的大肠杆菌 $\sigma 70$ 启动子构建了一组“非门”,这些启动子被相应的sgRNA所抑制,并且让各部分元件之间的相互关系不会表现出串扰。结果发现,这些sgRNA表现出非常高的靶向抑制(50%~80%)和可忽略的靶外相互作用(<1.3倍)。此外,研究人员还对此线路进行了拓展,他们利用这些“非门”构建了更大的线路,包括布尔-完成“NOR门”(boolean-complete NOR gate)和由4个分层sgRNA组成的3门电路,并且利用能够靶向识别大肠杆菌转录调控因子(MalT)的输出sgRNA将此前设计好的基因合成线路连接到天然大肠杆菌调控网络中。通过这些方法,便能使合成线路的输出端转换成各种细胞表型的开关,如糖利用(sugar utilization)、趋化性(chemotaxis)、噬菌体抗性(phage resistance)。

3.2.2 逻辑“与门”(AND gate)

近几年来,我国同样重视合成生物学发展,其中,来自深圳的研究团队提出了“用合成生物器件来干预膀胱癌”的想法,他们基于CRISPR-Cas系统构建了可以靶向识别、调控膀胱癌表型的逻辑“与门”遗传回路^[23]。这一遗传回路整合了来自两个启动子(hTERT、hUPII)的细胞信号作为输入端,只有测试细胞中两个输入端均活化时才会激活输出信号。他们利用荧光素酶(luciferase)报告基因作为输出基因,发现相比于人类端粒酶逆转录酶(telomerase)-海肾荧光素酶,这个回路更能显著提高识别膀胱癌的敏感度以及荧光素酶的表达。为了测试这个回路的模块性,研究人员用表达其他细胞功能的基因来替代荧光素酶报告基因作为输出基因,如hBAX、p21和E-cadherin。结果表明,这些回路确实有效地抑制了膀胱癌细胞生长,可诱导凋亡并降低癌细胞的运动能力,为体外靶向识别、控制膀胱癌细胞提供了一个新的平台。

3.3 CRISPR-Cas9介导的信号传导器(signal conductors)

真核细胞的复杂表型由决策电路和信号通路控制^[45]。而在信号网络中实现人工连接的主要障碍是缺乏用于生物信号识别、处理及控制的合成装置。针对这一点,来自我国的研究团队通过延长sgRNA

用来包含可以识别特殊信号的人工 RNA 核酸适配体 (artificial aptamer), 从而构建了一个基于 CRISPR-Cas9 的信号传导器^[46]。这个信号传导器可以响应天然或人工设定的内外“兴趣”信号来调节内源基因的表达, 也就是可以将两个原本不相关的信号通路连接在一起, 实现对细胞内信号系统的重塑。此外, 更重要的是, 该方法可通过控制同时双向 (ON-OFF) 基因转录使肿瘤基因信号重新定向, 从而重新编程癌细胞的命运。研究者利用这一特性, 在肿瘤细胞和裸鼠皮下肿瘤生长实验中, 向肿瘤细胞中引入了这一系统, 系统通过感知肿瘤细胞内原有的促进癌细胞生长的信号, 来激活下游的抑癌基因, 启动细胞凋亡程序, 实现了对肿瘤细胞的特异性杀伤。这项工作的进一步延伸将有可能为癌症精准医疗提供新的思路。

4 总结和展望

随着后基因组时代基因线路对技术的要求越来越高, CRISPR-Cas9 基因编辑/修饰系统的出现恰恰契合了技术的需要, 其独有的靶向特异性以及可编辑改造的性质使它迅速进入科学家的视野。本文就“基于 CRISPR-Cas9 系统构建的基因线路”进行系统评价。通过对大量文献的系统阅读, 概述了基因线路、CRISPR-Cas9 系统的概念以及应用, 并且详细讲述了 CRISPR-Cas9 的改造系统 (CRISPR-dCas9) 的应用以及基于 CRISPR-Cas9 系统已构建的基因线路。传统合成基因线路存在着许多问题, 而其中之一便是缺乏一个具有高度特异性并且能靶向基因的转录调控因子, 科学家们针对这个问题, 利用、改造了近来十分热门的 CRISPR-Cas9 系统, 做出了一系列高效、高度靶向性的基于 CRISPR-Cas9 的转录调控因子。这些转录调控因子作为元件充实了基因线路的“工具库”, 同时, 应用并构建了更多的基因线路, 如逻辑门、信号传导器、时间记录仪^[47]等。

然而, 尽管关于 CRISPR-Cas9 构建的基因线路的研究进展令人震惊, 同样其也存在诸多不足之处。除了 CRISPR-Cas9 系统本身存在的缺陷, 如伦理、脱靶效应、毒性、长期监测等, 这套设计思路仍需要解决一系列问题。基因线路设计中遇到的最大挑战之一就是来自外界的干扰, 如何解决干扰问题同样是 CRISPR-Cas9 亟需攻克的难题^[16]。另外, 由于 Cas9 蛋白没有特异性, 当设计基因线路过程中出现多个 gRNA 时, 诱导特定的 Cas9 蛋白靶向

相应的 gRNA 是重点需要解决的问题^[48]。此外, 基于 CRISPR-Cas9 的转录调控因子常常会出现双面性, 即因其靶向的部位以及环境等因素出现激活、抑制两种反向调节的性质, 如何避免双面性出现同样是科学家面临的难题^[49-50]。除了上述问题, 诸如代谢负担^[31]、可扩展性^[30]、特异性^[51]等都是应用在医学、化学、能源等实践上面需要面临的挑战。问题与挑战是必然存在的, 但同时也推动着新技术、新思路的发展, 是促进科学技术进步的动力之一。

尽管基于 CRISPR-Cas9 的基因线路仍有一系列值得思考的问题, 但 CRISPR-Cas9 系统具有操作简易、可编辑改造、特异性高等得天独厚的优势, 这奠定了其短期内在合成基因线路“工具库”中不可替代的地位, 并且伴随着技术的成熟与改善, 相信目前所遇到的问题会得到有效的解决。已有研究对基于 CRISPR-Cas9 的基因线路中出现的干扰、诱导、效率等问题进行了研究, 并且提出了相应的解决方案^[33, 40, 52]。进一步延伸, 无论是关于 CRISPR-Cas9 系统还是基因线路的研究, 其宗旨都是服务于人类。最新研究表明, 基于 CRISPR-Cas9 系统的基因线路在新型抗生素研制^[53]、多基因遗传病治疗和生物能源^[54]等应用上展现了巨大的潜力。总的来说, CRISPR-Cas9 技术还是一项新兴的技术, 并且它的先进性以及可行性已经被业界所公认, 尽管其在发展中仍有诸多困难有待解决, 但随着科学技术的迅猛发展, 有理由相信 CRISPR-Cas9 编辑技术会在合成基因线路及网络的道路上越走越广。

[参 考 文 献]

- [1] Brophy JA, Voigt CA. Principles of genetic circuit design. *Nat Methods*, 2014, 11: 508-20
- [2] MacDonald IC, Deans TL. Tools and applications in synthetic biology. *Adv Drug Deliv Rev*, 2016, 105: 20-34
- [3] Lienert F, Lohmueller JJ, Garg A, et al. Synthetic biology in mammalian cells: next generation research tools and therapeutics. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014, 15: 95-107
- [4] Jusiak B, Cleto S, Perez-Pinera P, et al. Engineering synthetic gene circuits in living cells with CRISPR technology. *Trends Biotechnol*, 2016, 34: 535-47
- [5] Liu CC, Qi L, Lucks JB, et al. An adaptor from translational to transcriptional control enables predictable assembly of complex regulation. *Nat Methods*, 2012, 9: 1088-94
- [6] Daniel R, Rubens JR, Sarpeshkar R, et al. Synthetic analog computation in living cells. *Nature*, 2013, 497: 619-23
- [7] Gardner TS, Cantor CR, Collins JJ. Construction of a genetic toggle switch in *Escherichia coli*. *Nature*, 2000, 403: 339-42

- [8] Zamora-Chimal CG, Zeron ES. A simple model for Lutz and Bujard's controllable promoters and its application for analyzing a simple genetic oscillator. *In Silico Biol*, 2015, 12: 69-82
- [9] Ellis T, Wang X, Collins JJ. Diversity-based, model-guided construction of synthetic gene networks with predicted functions. *Nat Biotechnol*, 2009, 27: 465-71
- [10] Friedland AE, Lu TK, Wang X, et al. Synthetic gene networks that count. *Science*, 2009, 324: 1199-202
- [11] Tabor JJ, Salis HM, Simpson ZB, et al. A synthetic genetic edge detection program. *Cell*, 2009, 137: 1272-81
- [12] Basu S, Gerchman Y, Collins CH, et al. A synthetic multicellular system for programmed pattern formation. *Nature*, 2005, 434: 1130-4
- [13] Farzadfard F, Lu TK. Synthetic biology. Genomically encoded analog memory with precise *in vivo* DNA writing in living cell populations. *Science*, 2014, 346: 1256272
- [14] Auslander D, Eggerschwiler B, Kemmer C, et al. A designer cell-based histamine-specific human allergy profiler. *Nat Commun*, 2014, 5: 4408
- [15] You L, Cox RS 3rd, Weiss R, et al. Programmed population control by cell-cell communication and regulated killing. *Nature*, 2004, 428: 868-71
- [16] Wang B, Kitney RI, Joly N, et al. Engineering modular and orthogonal genetic logic gates for robust digital-like synthetic biology. *Nat Commun*, 2011, 2: 508
- [17] 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: 5429-33
- [18] Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 2012, 337: 816-21
- [19] 陈志聪, 刘宇辰, 黄卫人. CRISPR-Cas9技术在人类疾病治疗中的潜在应用. *医学分子生物学杂志*, 2016, 13: 35-41
- [20] Doudna JA, Charpentier E. Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, 2014, 346: 1258096
- [21] Deltcheva E, Chylinski K, Sharma CM, et al. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature*, 2011, 471: 602-7
- [22] Chandrasegaran S, Carroll D. Origins of programmable nucleases for genome engineering. *J Mol Biol*, 2016, 428: 963-89
- [23] Liu Y, Zeng Y, Liu L, et al. Synthesizing AND gate genetic circuits based on CRISPR-Cas9 for identification of bladder cancer cells. *Nat Commun*, 2014, 5: 5393
- [24] Zuckermann M, Hovestadt V, Knobbe-Thomsen CB, et al. Somatic CRISPR/Cas9-mediated tumour suppressor disruption enables versatile brain tumour modelling. *Nat Commun*, 2015, 6: 7391
- [25] Hu Z, Yu L, Zhu D, et al. Disruption of HPV16-E7 by CRISPR/Cas system induces apoptosis and growth inhibition in HPV16 positive human cervical cancer cells. *Biomed Res Int*, 2014, 2014: 612823
- [26] 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: 1173-83
- [27] Chavez A, Scheiman J, Vora S, et al. Highly efficient Cas9-mediated transcriptional programming. *Nat Methods*, 2015, 12: 326-8
- [28] Cheng AW, Wang H, Yang H, et al. Multiplexed activation of endogenous genes by CRISPR-on, an RNA-guided transcriptional activator system. *Cell Res*, 2013, 23: 1163-71
- [29] Gilbert LA, Horlbeck MA, Adamson B, et al. Genome-scale CRISPR-mediated control of gene repression and activation. *Cell*, 2014, 159: 647-61
- [30] Konermann S, Brigham MD, Trevino AE, et al. Genome-scale transcriptional activation by an engineered CRISPR-Cas9 complex. *Nature*, 2015, 517: 583-8
- [31] Tanenbaum ME, Gilbert LA, Qi LS, et al. A protein-tagging system for signal amplification in gene expression and fluorescence imaging. *Cell*, 2014, 159: 635-46
- [32] Zalatan JG, Lee ME, Almeida R, et al. Engineering complex synthetic transcriptional programs with CRISPR RNA scaffolds. *Cell*, 2015, 160: 339-50
- [33] Gilbert LA, Larson MH, Morsut L, et al. CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes. *Cell*, 2013, 154: 442-51
- [34] 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: 7429-37
- [35] Kiani S, Chavez A, Tuttle M, et al. Cas9 gRNA engineering for genome editing, activation and repression. *Nat Methods*, 2015, 12: 1051-4
- [36] Komor AC, Badran AH, Liu DR. CRISPR-based technologies for the manipulation of eukaryotic genomes. *Cell*, 2017, 168: 20-36
- [37] Liao J, Karnik R, Gu H, et al. Targeted disruption of DNMT1, DNMT3A and DNMT3B in human embryonic stem cells. *Nat Genet*, 2015, 47: 469-78
- [38] Hockemeyer D, Jaenisch R. Induced pluripotent stem cells meet genome editing. *Cell Stem Cell*, 2016, 18: 573-86
- [39] Mandegar MA, Huebsch N, Frolov EB, et al. CRISPR interference efficiently induces specific and reversible gene silencing in human iPSCs. *Cell Stem Cell*, 2016, 18: 541-53
- [40] Hilton IB, D'Ippolito AM, Vockley CM, et al. Epigenome editing by a CRISPR-Cas9-based acetyltransferase activates genes from promoters and enhancers. *Nat Biotechnol*, 2015, 33: 510-7
- [41] Kiani S, Beal J, Ebrahimkhani MR, et al. CRISPR transcriptional repression devices and layered circuits in mammalian cells. *Nat Methods*, 2014, 11: 723-6
- [42] Nissim L, Perli SD, Fridkin A, et al. Multiplexed and programmable regulation of gene networks with an integrated RNA and CRISPR/Cas toolkit in human cells. *Mol Cell*, 2014, 54: 698-710
- [43] Lohmueller JJ, Armel TZ, Silver PA. A tunable zinc finger-based framework for Boolean logic computation in

- mammalian cells. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40: 5180-7
- [44] Nielsen AA, Voigt CA. Multi-input CRISPR/Cas genetic circuits that interface host regulatory networks. *Mol Syst Biol*, 2014, 10: 763
- [45] Scott JD, Pawson T. Cell signaling in space and time: where proteins come together and when they're apart. *Science*, 2009, 326: 1220-4
- [46] Liu Y, Zhan Y, Chen Z, et al. Directing cellular information flow via CRISPR signal conductors. *Nat Methods*, 2016, 13: 938-944
- [47] Perli SD, Cui CH, Lu TK. Continuous genetic recording with self-targeting CRISPR-Cas in human cells. *Science*, 2016, 353: aag0511-11
- [48] Orioli A, Pascali C, Pagano A, et al. RNA polymerase III transcription control elements: themes and variations. *Gene*, 2012, 493: 185-94
- [49] Farzadfard F, Perli SD, Lu TK. Tunable and multifunctional eukaryotic transcription factors based on CRISPR/Cas. *ACS Synth Biol*, 2013, 2: 604-13
- [50] Shechner DM, Hacisuleyman E, Younger ST, et al. Multiplexable, locus-specific targeting of long RNAs with CRISPR-Display. *Nat Methods*, 2015, 12: 664-70
- [51] Fu Y, Foden JA, Khayter C, et al. High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. *Nat Biotechnol*, 2013, 31: 822-6
- [52] Esvelt KM, Mali P, Braff JL, et al. Orthogonal Cas9 proteins for RNA-guided gene regulation and editing. *Nat Methods*, 2013, 10: 1116-21
- [53] Citorik RJ, Mimee M, Lu TK. Sequence-specific antimicrobials using efficiently delivered RNA-guided nucleases. *Nat Biotechnol*, 2014, 32: 1141-5
- [54] Li H, Shen CR, Huang CH, et al. CRISPR-Cas9 for the genome engineering of cyanobacteria and succinate production. *Metab Eng*, 2016, 38: 293-302