

DOI: 10.13376/j.cblls/2018081

文章编号: 1004-0374(2018)06-0690-11

· 技术与应用 ·

CRISPR-Cas9技术的原理及其在猪研究中的应用

李晓开^{1,2}, 龙科任^{1,2}, 麦苗苗^{1,2}, 王 讯^{1,2*}

(1 四川农业大学动物科技学院动物遗传育种研究所, 成都 611130;
2 畜禽遗传资源发掘与创新利用四川省重点实验室, 成都 611130)

摘要: 成簇的规律间隔的短回文重复序列 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR) 及其相关蛋白 (CRISPR-associated proteins, Cas) 是细菌和古生菌中抵抗外源病毒或质粒入侵的获得性免疫系统, 目前已经被广泛应用于动物基因组编辑。现回顾 CRISPR-Cas9 系统的发展历程并比较其与锌指核酸酶 (ZFNs)、类转录激活因子效应物核酸酶 (TALENs) 技术的优势, 详细介绍了 CRISPR-Cas9 系统的组成成分和各组分的功能以及其编辑基因组的原理, 着重梳理了 CRISPR-Cas9 系统在猪生产性能、抗病育种、人类模式动物构建和异种器官移植方面的最新研究进展, 以期 CRISPR-Cas9 系统的进一步应用提供参考。

关键词: CRISPR-Cas9; 基因组编辑; 原理; 猪

中图分类号: Q819; S828 **文献标志码:** A

The principle of CRISPR-Cas9 technology and its application in pig research

LI Xiao-Kai^{1,2}, LONG Ke-Ren^{1,2}, MAI Miao-Miao^{1,2}, WANG Xun^{1,2*}

(1 Institute of Animal Genetics and Breeding, College of Animal Science and Technology, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China; 2 Farm Animal Genetic Resources Exploration and Innovation Key Laboratory of Sichuan Province, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China)

Abstract: CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats)-Cas (CRISPR-associated proteins) is an acquired immune system found in bacteria and archaea that fights against the invasion of viruses or plasmids. It has been widely used in animal genome editing. In this review, we summarized the development of the CRISPR-Cas9 system and compared its advantages with zinc-finger nucleases (ZFNs) and transcription activator-like effector nucleases (TALENs) technology, and introduced in detail the composition of the CRISPR-Cas9 system and the function of each component, as well as the principle of editing of genome. We focused on the recent research progress of the CRISPR-Cas9 system in pig production performance, disease-resistant breeding, construction of human-mode animal and xenotransplantation. This review may provide a reference for the research on the CRISPR-Cas9 system in pigs.

Key words: CRISPR-Cas9; genome editing; principle; pig

基因组编辑 (genome editing) 是指通过人为操作引起基因组特定碱基插入、缺失或替换等, 对基因组进行精确修饰和定向编辑的一种技术。早在 20 世纪 80 年代, Thomas 等^[1]首次将外源 DNA 片段

整合到哺乳动物基因组的特定位点, 并成功地修复碱基突变和删除的 DNA 序列, 由此开启了人工修饰生物体基因组的大门。如今, 基因组编辑技术已发展成为研究生命科学领域的一种重要工具。

收稿日期: 2018-01-25; 修回日期: 2018-03-16

基金项目: 国家自然科学基金项目(31472081, 31772576, 31522055); 四川省青年科技创新研究团队(2015TD0012); 四川省省院省校科技合作研发项目(2017JZ0025); 四川省科技厅应用基础项目(2016JY0167)

*通信作者: E-mail: xunwang@sicau.edu.cn

传统的基因组编辑主要是依赖机体自发同源重组修复机制对基因组进行敲除、替换或修饰, 其效率极低(约 10^{-7}), 而且还发生许多随机整合^[2], 其应用受到极大的限制。然而, 人工核酸内切酶(engineered endonuclease, EEN) 的出现极大地改变了这一现状。目前有3种常用的EEN: 锌指核酸酶(zinc-finger nucleases, ZFNs)^[3-4]、类转录激活因子效应物核酸酶(transcription activator-like effector nucleases, TALENs)^[5-6]和成簇的规律间隔的短回文重复序列(clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR)及其相关蛋白(CRISPR-associated proteins, Cas)^[7-8]。尤其是以CRISPR-Cas9为基础的基因组编辑技术, 因其设计和构建简单、切割效率高和成本低等特点被迅速广泛应用于基因组编辑领域, 成为第三代基因组编辑技术。猪作为一种重要的农业经济动物和大型模式动物, 对其进行基因组编辑不仅能提高生产性能、加速新品种的培育、疫病防控, 而且还能为人类疾病研究和异种器官移植做出重要贡献。本文简要回顾CRISPR-Cas9系统的发展及其优势, 详细介绍CRISPR-Cas9系统的组成成分和各组分的功能以及其基因组编辑的原理, 并就CRISPR-Cas9技术在猪生产性能、抗病育种、人类模式动物构建和异种器官移植等方面的最新研究进行了综述。

1 CRISPR-Cas9基因组编辑系统概述

1.1 CRISPR-Cas9系统的发现历程

CRISPR-Cas系统是细菌和古生菌长期进化形成的抵抗外源病毒或噬菌体入侵的一种适应性免疫

系统^[9]。自1987年首次在大肠杆菌(*E. coli*)基因组中发现间隔重复序列以来, 经过30年的发展, CRISPR-Cas9技术不断地被完善, 目前已经被广泛应用(图1)。

1987年, Ishino等^[10]研究*E. coli*碱性磷酸酶基因序列和功能时, 发现其3'端下游有5个高度同源的29 nt重复序列, 且被32 nt序列间隔。随后在细菌基因组测序中证实, 这种串联的间隔重复序列广泛存在于40%细菌和90%古生菌中, 并将这些间隔重复序列命名为“成簇的规律间隔的短回文重复序列”^[11-12]。研究人员通过对间隔重复序列进行系统分析, 发现间隔序列与噬菌体或质粒等外源核酸具有高度的同源性, 并推测这可能与细菌免疫记忆和防御机制有关^[13-15]。2007年, Barrangou等^[16]首次通过实验证实天然II型CRISPR系统是一种原核生物适应性免疫系统, 间隔序列决定DNA靶向的特异性, Cas基因控制间隔序列的获取。Garneau等^[17]和Gasiunas等^[18]进一步研究发现, Cas9基因编码的Cas9蛋白能够造成双链DNA断裂(double-strand break, DSB), 并且这种DSB是在CRISPR RNA(crRNA)引导下特异性完成的; 随后, Jinek等^[9]对天然的CRISPR-Cas9系统进行改造, 将crRNA和反式激活crRNA(trans-activating crRNA, tracrRNA)嵌合到一起, 形成一条单链向导RNA(single-guide RNA, sgRNA)。

直到2013年, CRISPR-Cas9系统才成功地被张锋团队首次运用到哺乳动物细胞基因组编辑中, 这开启了CRISPR-Cas9技术在哺乳动物基因组编辑中的应用^[7]。同年, 该团队对天然酿脓链球菌

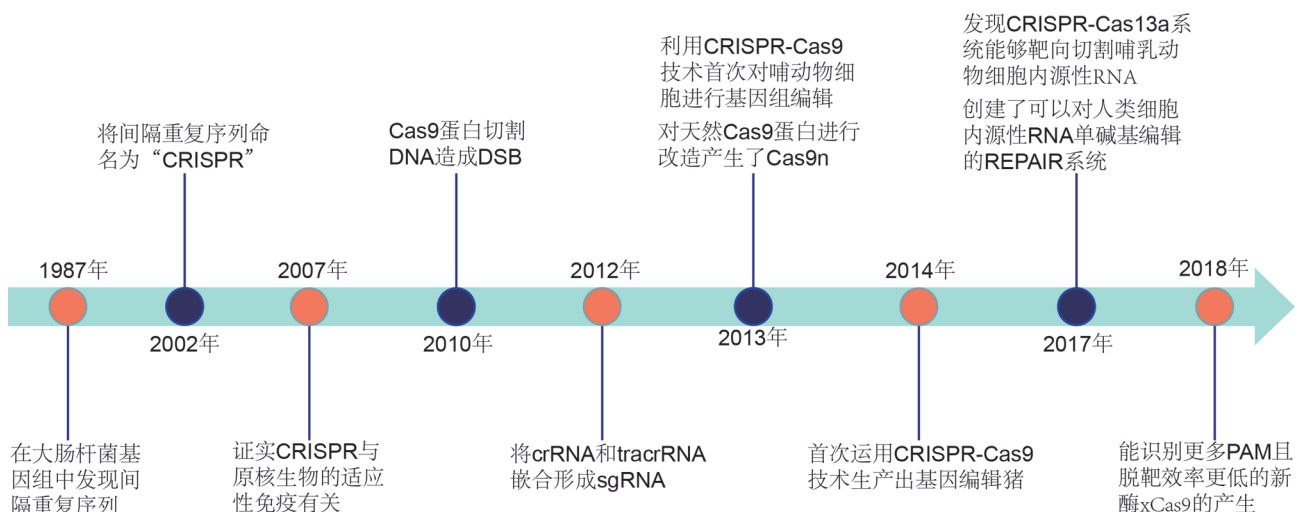


图1 CRISPR-Cas研究历程中的重要事件

(*Streptococcus pyogenes*) Cas9 (SpCas9) 蛋白进行改造, 产生 Cas9 切口酶 (Cas9-nickase, Cas9n); 研究表明, 运用成对 Cas9n 对细胞进行基因组编辑时, 脱靶率显著降低, 并且不影响基因敲除效率^[19]。2014年, Whitworth 等^[20]首次使用 CRISPR-Cas9 技术对猪细胞进行基因组编辑, 生产出敲除 *CD163* 基因编辑猪。2017年10月, 张锋研究团队在 *Nature* 杂志上发表研究论文, 发现 CRISPR-Cas13a 能够靶向切割 RNA, 降低动物细胞内源性 RNA 水平^[21]; 一个月后, 他又带领团队在 *Science* 上发表最新成果, 在 CRISPR-Cas13 系统基础之上创建了一种可编辑人类细胞 RNA 单个碱基的全新基因编辑系统——REPAIR (RNA editing for programmable A to I replacement)^[22]。2018年, 哈佛大学 David Liu 研究团队对天然 SpCas9 蛋白进行改造, 生产出一种新酶——xCas9, 它比 SpCas9 蛋白识别更多的前间区序列邻近基序 (protospacer adjacent motifs, PAM), 并且特异性更高^[23]。随着对 CRISPR-Cas9 系统不断地深入研究, 越来越多高效和高特异性的 Cas9 蛋白变体被开发出来, 这极大地优化和完善了 CRISPR-Cas9 系统, 加速了基因组编辑技术的发展。

1.2 CRISPR-Cas9 基因组编辑系统的优势和不足

与 ZFNs 和 TALENs 基因组编辑技术相比, CRISPR-Cas9 系统有其巨大的优势 (表 1)。(1) CRISPR-Cas9 系统构建原理更为简单。CRISPR-Cas9 系统是通过核酸之间碱基互补配对来识别并结合靶序列, 与 ZFNs 或 TALENs 系统的蛋白与 DNA 识别结合方式相比, 这种结合靶位点的方式更为简单。(2) CRISPR-Cas9 系统设计更为方便。对于不

同靶基因的敲除仅需要改变 sgRNA 的识别序列即可, 而且可以设计多个 sgRNA 对多个或者单个基因进行同时敲除。(3) CRISPR-Cas9 系统应用广泛、切割效率高。研究表明, CRISPR-Cas9 能对动物、植物以及病原微生物细胞基因组进行高效的切割^[24-26]。(4) CRISPR-Cas9 成本低、应用方便。运用 CRISPR-Cas9 时, 仅需要一个能够在目标细胞内稳定表达 Cas9 蛋白和特异性作用的 sgRNA 载体即可, 因此, 一般能满足普通分子生物学操作和细胞培养的实验室都可以进行基因组编辑。

目前最新研究表明, 以 CRISPR-Cas9 系统为基础开发的 CRISPR-Cas13 系统和 REPAIR 系统能够靶向敲低细胞内 RNA 表达水平和对 RNA 进行单碱基的编辑^[21-22]。同时, 对 Cas9 蛋白进行适当的改造可以产生不同用途的 CRISPR-Cas9 系统, 如 Cas9n、xCas9, 以及特异性激活或抑制基因表达的 Cas9 系统。这些系统丰富了 CRISPR-Cas9 的用途, 极大地发挥了 CRISPR-Cas9 的优势, 使 CRISPR-Cas9 系统不仅能作为基因组编辑工具, 而且还可以作为一种多用途的技术手段。

然而, 目前 CRISPR-Cas9 系统存在一些不足。首先, CRISPR-Cas9 系统存在一定的脱靶效应。决定 CRISPR-Cas9 系统脱靶有两个因素, 一是 sgRNA 20 nt 左右的识别序列; 另一个是靶向序列 3' 末端的 PAM。由于基因组极为复杂, sgRNA 可能与其他非靶向序列局部匹配, 导致非预期的基因组位点突变, 造成脱靶效应; Cas9 蛋白对靶向序列的识别主要依赖于 PAM, 而 PAM 具有多样性 (表 2), Cas9 蛋白不仅能识别标准的 PAM (5'-NGG), 也有

表1 三种人工核酸内切酶的特征比较

人工核酸内切酶的类型	DNA 结合元件	DNA 切割元件	载体和质粒的构建	靶向效率	靶向特异性	应用成本	编辑基因数目	细胞毒性
ZFNs	锌指基序	<i>Fok I</i> 核酸内切酶	简单	低	低	高	单位点编辑	大
TALENs	串联重复单位	<i>Fok I</i> 核酸内切酶	复杂	高	高	高	单位点编辑	较小
CRISPR-Cas9	sgRNA	Cas9 蛋白质	非常简单	高	有待确定	低	多位点编辑	小

表2 不同细菌的PAM结构

Cas9 的来源	PAM 结构 (5'→3')
酿脓链球菌 (<i>Sp</i>)	NGG
金黄色酿脓葡萄球菌 (<i>Sa</i>)	NGRRT 或者 NGRRN
脑膜炎奈瑟氏球菌 (<i>Nm</i>)	NNNGATT
嗜热链球菌 (<i>St</i>)	NNAGAAW
齿垢密螺旋体 (<i>Td</i>)	NAAAAC
另外 20 多种 Cas9 的来源	PAM 结构可能不具有特征性

可能识别非标准的 PAM (5'-NAG), 这就增加了脱靶的风险。其次, Cas9 蛋白作为一种细菌蛋白, 应用于真核生物基因组编辑中是否会带来一定的免疫原性还尚未定论, 有待进一步深入的研究。此外, 虽然 CRISPR-Cas9 系统能够通过同源重组的方式对 DNA 进行精确敲入和敲除以及修复, 但其频率较低, 因此, 在一定程度上阻碍了其在基因组编辑

上应用。

1.3 CRISPR-Cas9系统的组成及其功能

天然 CRISPR-Cas9 系统主要由 3 个部分组成, 分别是 crRNA、tracrRNA 和 Cas9 蛋白。其中 Cas9 蛋白尤为重要, Cas9 蛋白是由识别瓣叶 (recognition lobe, REC) 和核酸酶瓣叶 (nuclease lobe, NUC) 组成^[27-28]。REC 主要的作用是识别、结合 sgRNA 和靶向 DNA。NUC 包含 4 个功能域: HNH 核酸酶结构域、RuvC 核酸酶结构域、PAM 相互作用区 (PAM-interacting domain, PI) 和楔形域 (wedge domain, WED)^[27]。其中, HNH 核酸酶结构域负责剪切与 crRNA 互补的 DNA 链, 而 RuvC 核酸酶结构域负责剪切与 crRNA 非互补的 DNA 链^[9](表 3)。

1.4 CRISPR-Cas9基因组编辑技术的原理

1.4.1 CRISPR-Cas9靶向切割DNA序列的原理

天然 CRISPR-Cas9 系统存在于原核细胞中, 其免疫外源病毒或质粒入侵过程可以分为以下 4 步 (图 2)。(1) 噬菌体侵染细菌。噬菌体通过自己的遗传物质侵染细菌。(2) Spacer 获取。噬菌体侵染细菌后, 细菌 Cas 基因表达的 Cas1 和 Cas2 蛋白质会从噬菌体 DNA 上获取一段原间隔序列 (protospacer), 并且插入到 5' 端两个 Repeats 之间形成 Spacer。(3) crRNA 生物合成和加工。细菌转录产生 pre-crRNA 和 tracrRNA, 在内切酶 RNaseIII 作用下形成 crRNA-tracrRNA。(4) 靶向 DNA 序列 DSB。crRNA-tracrRNA 与 Cas9 蛋白形成复合物, 并在 crRNA 的引导下与噬菌体靶向 DNA 序列碱基互补配对, 只有在 PAM 存在的情况下, Cas9 蛋白才会与靶向 DNA 序列结合并在 PAM 位点上游 3 个碱基外侧处断裂 DNA 双链。

后来, 科研人员对天然的 CRISPR-Cas9 系统进行改造, 产生了适用于真核细胞的基因组编辑系统; 其原理与细菌抵抗外源噬菌体入侵类似, 并且切割和打靶效率没有发生变化, 更便于人工设计和操作 (图 3)。

1.4.2 CRISPR-Cas9介导DNA序列修复的机制

CRISPR-Cas9 引起 DNA 特定位点 DSB 后能激活细胞的修复机制, 产生两种不同的修复途径, 即非同源末端连接 (non-homologous end joining, NHEJ) 和同源介导修复 (homology-directed repair, HDR)(图 4)。NHEJ 是一种随机的易错修复, 能高效地在 DNA 的 DSB 位点造成碱基的随机插入或缺失, 导致基因移码突变或基因组重要结构破坏, 从而实现基因敲除或者基因组元件的失效^[32]。HDR 是一种精确的修复, 可以通过导入外源 DNA 模板 (donor DNA) 的方法, 以同源重组的方式在 DSB 处对基因组进行定点的插入、删除、突变^[33]。不同于 NHEJ, HDR 修复效率取决于细胞类型和细胞状态, 以及基因位点和修复模板^[34]。然而, 在细胞内, NHEJ 发生频率远高于 HDR, 为提高同源重组介导的精确修复就需要提高 HDR 发生的频率。

2 CRISPR-Cas9基因组编辑技术在猪研究中的应用

猪 (*Sus scrofa*) 作为一种重要的农业经济动物, 是人类获取肉食性蛋白质的主要来源之一, 因其在基因组、解剖、生理代谢和疾病特征以及器官大小和功能上与人类十分相似, 被认为是非常理想的大动物模型^[35]。2017 年, 赖良学课题组首次构建新型条件性表达 Cas9 基因工具猪模型, 率先实现直接对成体大动物进行体内基因编辑^[36]; 利用此猪模型, 可高效地对猪体内细胞单基因、多基因、超大大片段基因进行编辑, 这一研究成果将极大地推动基因编辑猪的生产, 并加快在畜牧业和生物医学领域有重要应用价值的基因修饰猪模型的建立, 对于畜牧业发展和生物医学研究都有重要的价值。这里重点详细介绍 CRISPR-Cas9 技术在猪上的研究进展。

2.1 利用CRISPR-Cas9技术改善猪生产性能

肌肉生长抑制素 (myostatin, MSTN) 是一种分泌蛋白, 是骨骼肌生长发育的负调控因子; 它可以

表3 CRISPR-Cas9系统的组成结构和功能

组分	结构单元	功能
sgRNA	crRNA	识别并结合靶向DNA序列, 引导Cas蛋白进行切割
	tracrRNA	与crRNA形成异二聚体
Cas9	REC	识别并结合sgRNA和靶向DNA的复合体
	HNH	切割与crRNA互补的靶向DNA链
	RuvC	切割与crRNA非互补DNA链
	PI	与靶向DNA的PAM区相互作用
	WED	识别sgRNA以及靶向DNA的PAM

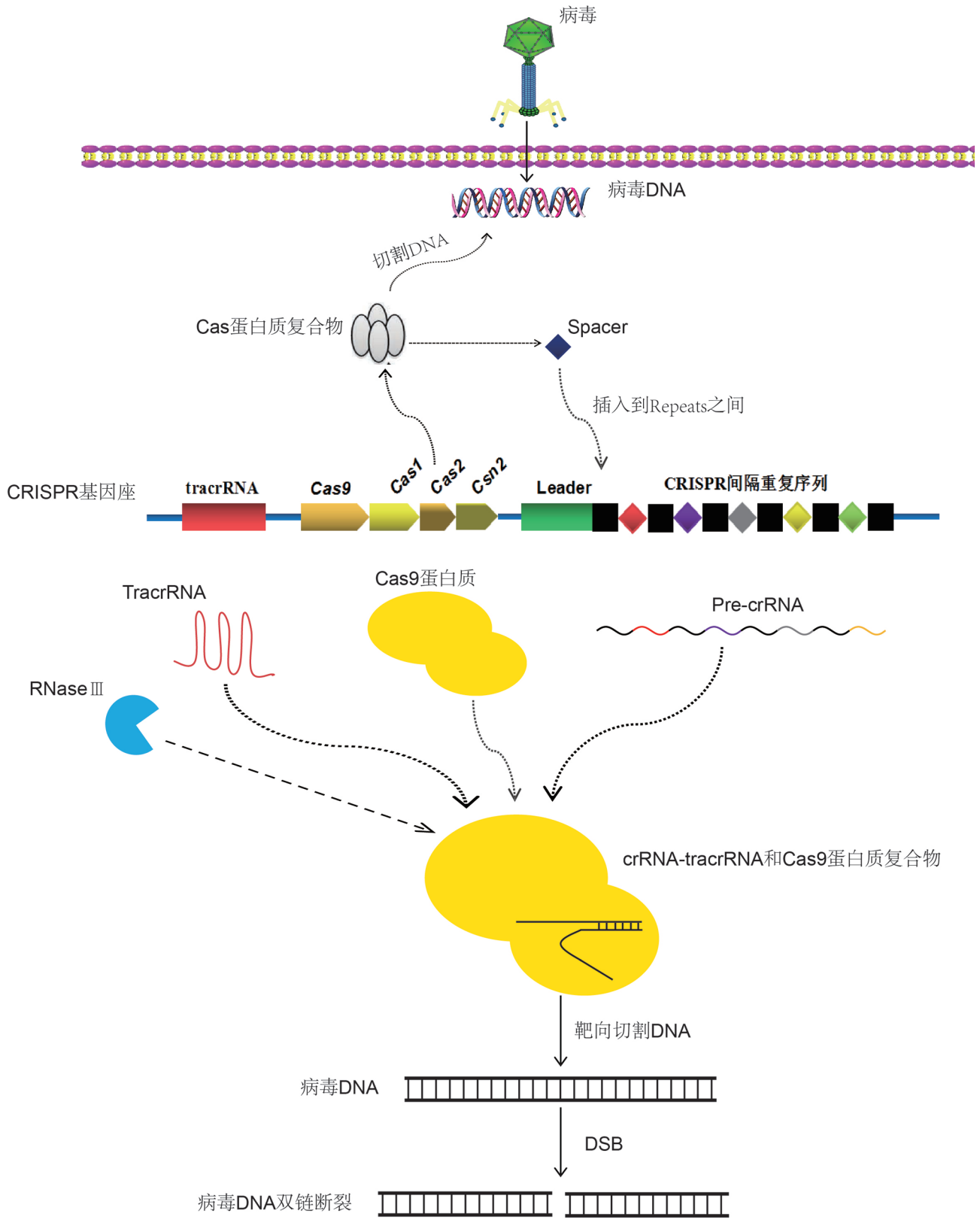


图2 细菌中II型CRISPR-Cas9的免疫机制示意图(修改自[29-31])

抑制骨骼肌细胞的增殖与分化，决定肌纤维的数量，影响动物体肌肉发育和瘦肉率。吉林大学逢大欣团队利用 CRISPR-Cas9 技术诱导猪胎儿成纤维细胞

(pig fetal fibroblasts, PFF) 发生 NHEJ，通过体细胞核移植 (somatic cell nuclear transfer, SCNT) 技术和胚胎移植 (embryo transfer, ET) 技术获得了 *MSTN* 双

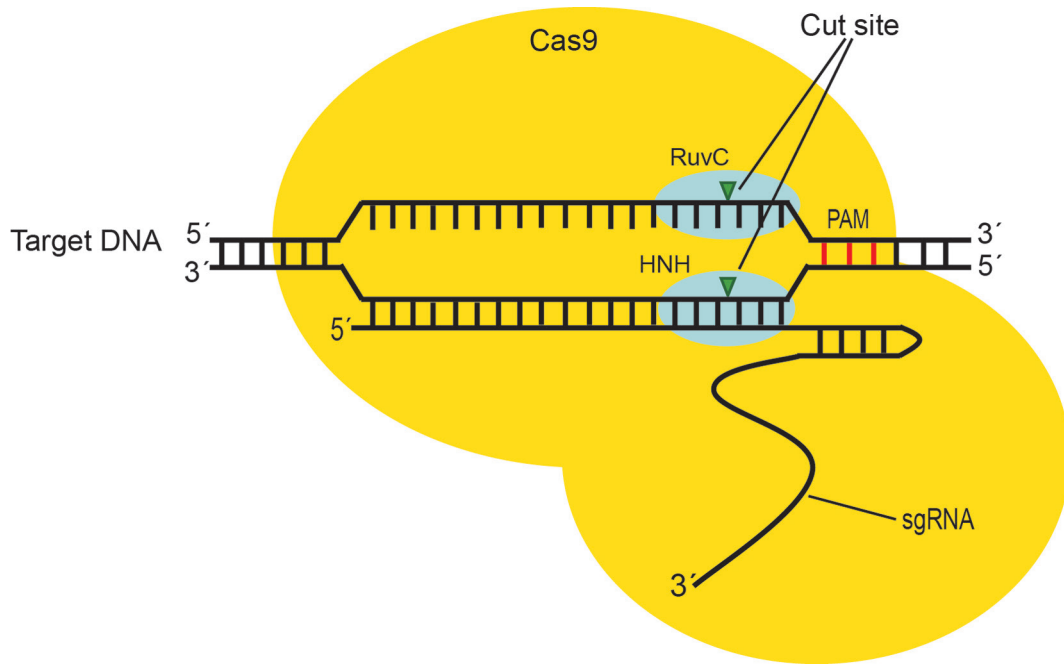


图3 人工改造的CRISPR-Cas9切割目标DNA序列示意图

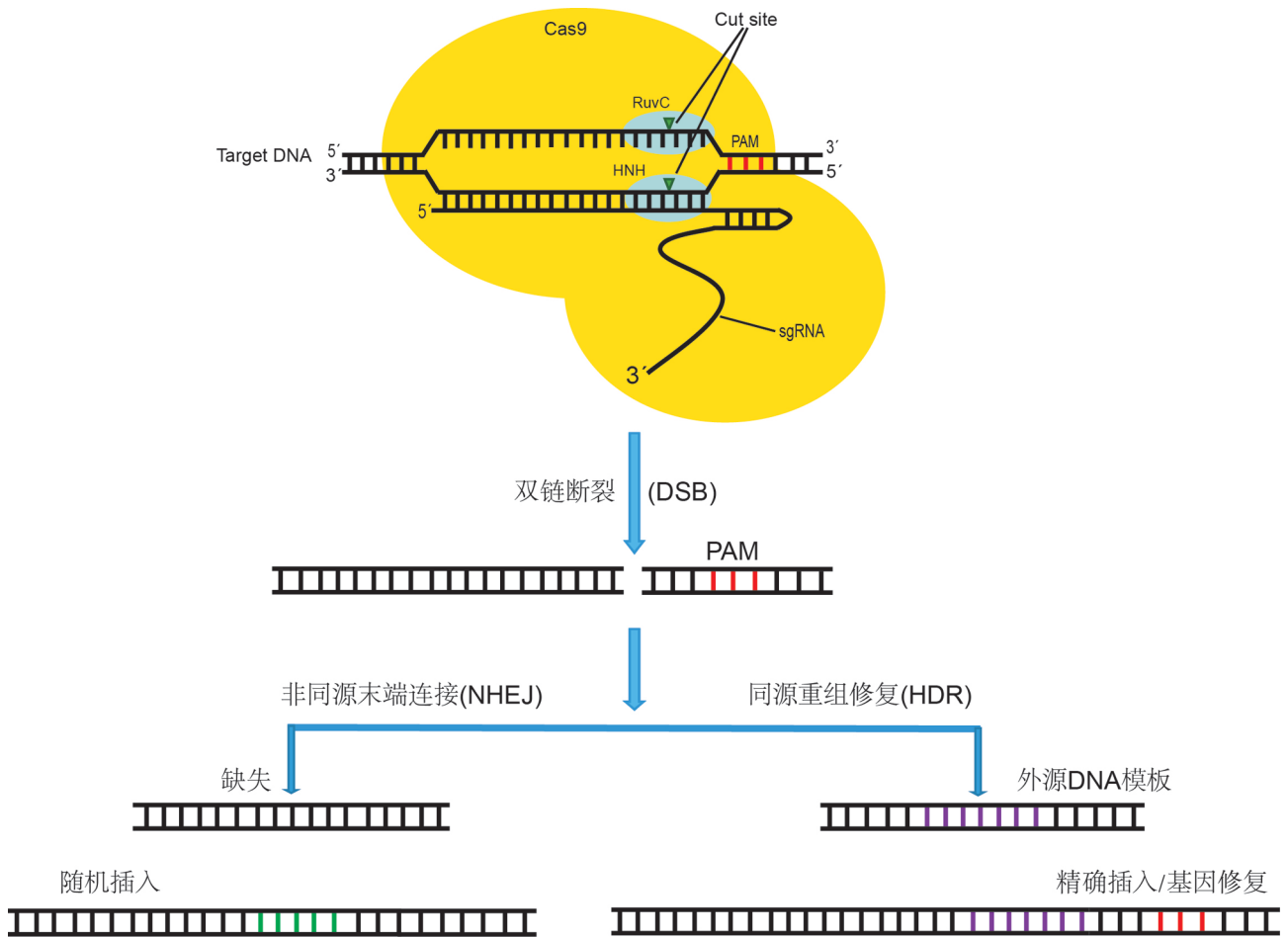


图4 CRISPR-Cas9介导的NHEJ和HDR

等位基因敲除 (knockout, KO) 的猪^[37]。通过表型测定发现, 双敲 *MSTN* 基因猪的骨骼肌纤维增多、瘦肉率提升, 并且表现出“双肌”表型。湖北省农科院郑新民团队和河南科技大学董发明教授课题组合作, 运用 CRISPR-Cas9 和 Cre-LoxP 重组酶技术敲除猪初生细胞中 *MSTN* 的一个等位基因, 制备了无选择标记 *MSTN* 基因 KO 克隆猪^[38]。免疫印迹显示, 克隆猪的 *MSTN* 蛋白表达量降至约野生型的 50%, 肌原性基因在肌肉中的表达增加; 组织学检查显示, 肌纤维数量增加, 但是肌纤维大小保持不变; 超声波检测显示, 最长肌大小增加, 背脂肪厚度降低。无选择标记 *MSTN* 基因 KO 克隆猪的构建为家畜良种生产提供了一种安全、可靠, 并且减少潜在生物安全风险的策略。上述研究构建出 *MSTN* 基因 KO 猪, 这对于研究 *MSTN* 基因对肌肉生长发育和产肉性能的影响具有重要意义, 为改善家畜生长性能带来了巨大的希望。

中国农业科学院李奎团队利用 CRISPR-Cas9 和 SCNT 技术首次获得位点特异性基因敲入 (knockin, KI) 猪模型, 发现基因组上的一个“安全港”位点, 并命名为 *pH11*^[39]; 这个“安全港”能够在猪 PFF、胚胎和体内稳定表达外源基因, 且不影响其他基因的表达。通过 CRISPR-Cas9 技术成功地对该位点进行大于 9 kb 基因片段的插入, 实现了基因稳定高效表达。这项研究证实, 在育种过程中可以通过人为地在 *pH11* 位点导入与生产性状相关基因的方式来快速得到某一表型, 提高动物生产性能, 加快育种进展。解偶联蛋白 1 (uncoupling protein 1, UCP1) 是棕色脂肪产热和代谢调节系统的必要条件和关键组分。在进化过程中, 现代家猪祖先在 2 000 万年前丢失了 *UCP1* 基因, 缺少棕色脂肪, 这可能是新生仔猪对寒冷环境极其敏感的原因之一。中国科学院动物所赵建国团队利用 CRISPR-Cas9 介导的非同源重组整合外源片段的方式, 通过 SCNT 技术和 ET 技术构建出 *UCP1* 基因定点 KI 的猪, 实现小鼠 *UCP1* 基因在猪白色脂肪组织的特异表达^[40]。该研究揭示了 *UCP1* 基因对猪脂肪代谢的影响机制, 实现了 *UCP1* 基因在猪的白色脂肪中正常表达, 并且减少猪脂肪沉积, 增加瘦肉率, 同时提高猪的抗寒能力。生产性能测定结果显示, *UCP1* 基因编辑猪脂肪率显著降低 (减少 4.89%), 背膘厚度显著降低 (减少 2.4 mm), 瘦肉率显著增加 (增加 3.38%)。 *UCP1* 基因 KI 基因编辑猪的产生是一个具有极大价值的资源, 不仅可以提高仔猪

的福利, 而且还能减少寒冷给猪生产带来的经济损失; 此外, 增加了饲料报酬, 降低了猪生产的成本, 为人类提供了健康优质的猪肉。以上研究为猪的育种提供了一个新的思路, 开辟了一个新的途径, 极大地推动了猪抗寒育种的研究。

2.2 CRISPR-Cas9技术在抗病育种中的应用

猪蓝耳病, 又称猪繁殖与呼吸综合征 (porcine reproductive and respiratory syndrome, PRRS), 是由猪繁殖与呼吸综合征病毒 (porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV) 引起的一种猪高度接触性传染病, 并且是养猪业危害最大的传染病之一。分化簇 163 (cluster of differentiation 163, CD163) 被认为是 PRRSV 的受体基因。Whitworth 等^[20] 利用 CRISPR-Cas9 技术, 通过显微注射 Cas9 mRNA 和 sgRNA 及 SCNT 获得敲除 *CD163* 基因的编辑猪; 经蓝耳病毒株攻毒后发现, *CD163* 双等位基因 KO 猪未表现出临床症状, 具有良好的抗蓝耳病能力。此外, 用这种方法生产的基因编辑猪没有导入任何外源的基因序列, 因此不存在转基因生物安全风险。上述的研究为研究 PRRS 提供了模型, 并且为防治 PRRS 提供了一个可行的思路。

猪伪狂犬病是由伪狂犬病病毒 (pseudorabies virus, PRV) 引起的猪急性传染病, 每年给猪养殖产业造成了巨大经济损失。伪狂犬病毒是 α -疱疹病毒属成员, 由 150 kb 左右的 DNA 双链构成。Xu 等^[41] 通过共转染纯化的 PRV 基因组和 Cas9-sgRNA 到 PK15 细胞, 实现了 100% 破坏病毒基因的效率。干扰素 (interferon, IFN) 是哺乳动物先天抗病毒反应的主要执行者, 延长起始因子 4E 结合蛋白 (elongation initiation factor 4E binding proteins, 4E-BPs) 是干扰素调节因子 7 (interferon regulatory factor 7, IRF-7) 的转录调控因子, 而 IRF-7 能调控 IFN 的表达。Ramírez 等^[42] 利用 CRISPR-Cas9 技术敲除猪肾脏细胞 (swine kidney cells, SK-6) 中 4E-BPs 基因, 发现敲除 4E-BPs 基因的 SK-6 中 IFN α 和 β 的表达升高, 干扰素刺激基因的表达也升高。体外攻毒实验发现, 敲除 4E-BPs 基因的 SK-6 中水泡性口炎病毒滴度比野生型 SK-6 显著降低。此外, Whitworth 等^[43] 通过在猪受精卵中共同注射 Cas9 mRNA 和特异 sgRNA 的方式, 产生靶向敲除 *TMPRSS2* 基因猪; 研究发现, *TMPRSS2* 基因 KO 猪有一定抵抗流感病毒的能力。抗病基因编辑猪的制备不仅能为研究猪发病的机制提供重要的模型, 而且能减少因疾病引起养猪业的经济损失, 推动养猪业的健康

快速发展。

2.3 以猪为模式动物, 利用CRISPR-Cas9技术建立人类疾病模型

与模式生物小鼠相比, 猪在器官生理、结构、大小、功能及生理代谢、免疫系统等方面与人类非常接近。因此, 猪相比小鼠更适合作为人类疾病和生物医学的模型。近几年, 科学家运用 CRISPR-Cas9 技术对猪基因组进行有目的的改造, 生产出大量用于人类疾病和生物医学研究的模型。血管性血友病 (von willebrand disease, vWD) 是仅次于血友病的常见遗传性出血性疾病, 由血管性血友病因子 (von willebrand factor, vWF) 基因缺陷所造成。中国科学院 Hai 等^[44] 将体外转录出的 Cas9 mRNA 和靶向 *vWF* 基因的 sgRNA 通过显微注射到巴马小型猪的受精卵中, 经过 ET 获得 KO *vWF* 双等位基因的巴马小型猪。该团队发现, 突变 *vWF* 基因后, 巴马小型猪出现了严重的凝血功能障碍, 与血管性血友病患者的临床表现相似, 这为人类临床 I 型和 II 型血管性血友病的研究与治疗提供了重要的模型支持。2015 年, Zhou 等^[45] 利用 CRISPR-Cas9 技术, 在猪 PFF 中注射表达 Cas9 mRNA 和特异性 sgRNA 的载体, 通过 SCNT 获得 15 头酪氨酸酶 (tyrosinase, TYR) 双等位基因 KO 的猪和 20 头 *PARK2* 和 *PINK1* 双等位基因 KO 的猪, 成功建立了人类白化病猪模型, 为人类研究白化病发病机制及治疗提供了重要的模型。

帕金森病 (Parkinson's disease, PD) 是老年人最常见的神经退行性运动障碍。为研究 PD 生理病理学和开发新的治疗方法, 中国科学院赵建国团队使用 CRISPR-Cas9 技术通过一步法双敲与帕金森病相关的 3 个隐形基因 (*DJ-1*、*parkin* 和 *PINK1*), 通过 ET 技术产生出基因编辑猪, 为人类研究帕金森病提供了宝贵的医学模型^[46]。先天性甲状腺激素功能低下症 (甲减) 是由甲状腺激素分泌不足导致的最常见的内分泌紊乱之一。在临床中, 20%~60% 甲减患者表现贫血或免疫缺陷等症状。该团队运用 CRISPR-Cas9 技术和 ET 技术生产出 *DUOX2* 基因 KO 的猪, 首次构建了人甲减贫血和免疫缺陷的猪模型^[47]。Chen 等^[48] 利用靶向作用 *IgM* 基因的 Cas9 质粒, 通过 SCNT 技术获得双敲 *IgM* 基因的 B 细胞缺陷的猪; 经后续实验发现, *IgM* 基因缺失的猪 *IgM* 蛋白的表达量显著减少, 并且 *IgM* 重链蛋白不能被检测到, B 细胞缺陷猪的生产为研究哺乳动物免疫细胞缺陷疾病提供了重要的模型。Lei

等^[49] 利用 CRISPR-Cas9 技术快速生产出双基因 *RAG2/IL2RG* KO 的猪, 这种基因编辑猪缺失 B 细胞、T 细胞和自然杀伤细胞, 为研究人诺如病毒 (human noroviruses, HuNoVs) 免疫缺陷提供了很好的模型。2016 年, 上海科技大学 Yu 等^[50] 通过 CRISPR-Cas9 技术 KO 滇南小型猪受精卵中的 *DMD* 基因, 成功地构建出人类杜氏肌营养不良症 (Duchenne muscular dystrophy, DMD) 疾病的模型。2016 年, 第三军医大学 Zhou 等^[51] 利用 CRISPR-Cas9 诱导的同源重组修复定点突变猪受精卵中的 *Sox10* 基因, 生产出了 *Sox10* 基因突变的猪, 为人类研究瓦登伯革氏症候群提供了珍贵的医学模型。目前, 科学家运用 CRISPR-Cas9 技术已经在猪上构建了多种人类重要疾病模型, 这些疾病模型的建立将给人类疾病研究提供重要的模型支持, 对人类疾病治疗方法的研究起到推动作用。

2.4 CRISPR-Cas9在异种器官移植上的研究

尽管猪被认为是人体异种器官移植的首选动物, 但由于免疫排斥和内源性逆转录病毒的原因使得猪的器官移植成为障碍。 α -1,3- 半乳糖基转移酶 (*GGT1*) 基因与异种器官移植后的超急性免疫排斥反应显著相关。Sato 等^[52] 通过往猪 PFF 中共转染表达 Cas9 和特异性 sgRNA 载体, 成功地敲除 α -1,3- 半乳糖基转移酶基因 (*GGT1*), 获得了双等位基因 KO 猪的 PFF。Li 等^[53] 针对 3 个与免疫排斥相关基因, 即 α -1,3- 半乳糖基转移酶基因、胞苷单磷酸 N-乙酰神经氨酸羟化酶 (*CMAH*) 和异红细胞糖苷合成酶 (*iGb3S*) 基因, 运用 CRISPR-Cas9 技术向肝细胞内转染靶向作用于 3 个基因的 Cas9-PX330 质粒, 通过 SCNT 技术获得 KO 单个基因及同时 KO 2 个或 3 个基因的仔猪。Chuang 等^[54] 通过原核显微操作往猪胚胎细胞中注射靶向作用 *GGT1* 基因的 Cas9-sgRNA 质粒, 生产出 *GGT1* 基因缺失的猪, 研究发现这些基因编辑的性状可以通过生殖细胞稳定遗传给后代, 因此可以对基因编辑猪进行大规模的繁育和保种, 为人类研究异种器官移植提供大量动物模型, 并为以后器官移植提供大量的供体。

猪内源性逆转录病毒 (porcine endogenous retroviruses, PERVs) 是嵌在猪细胞基因组的病毒, 在猪体内不会有毒性, 但当猪细胞和人细胞接触时, 这种病毒就会从猪基因组“跳”到人基因组中。因此, 猪基因组的内源性逆转录病毒成为人体移植利用猪器官面临的一个重大医疗风险问题。哈佛医学院杨璐菡等^[55] 利用 CRISPR-Cas9 技术对猪肾细胞系

(PK15)中所有62个拷贝的 *PERVs pol* (多聚酶) 基因进行敲除, 使猪内源性病毒传递给人的风险下降到至少以前的 1/1 000。两年以后, 杨璐菡及其导师 Church 教授团队与云南农业大学魏红江教授课题组合作^[56], 证实猪细胞内的 PERVs 与人类细胞共同培养时可传播给后者。他们通过分析猪 PFF 基因组, 发现 25 个 *PERVs* 基因拷贝, 并且利用 CRISPR-Cas9 使 25 个 *PERVs* 基因失活; 通过 SCNT 技术成功克隆诞生世界首批内源性逆转录病毒灭活猪, 突破了动物移植器官两大关键技术之一。

人猪嵌合体是指把人类体细胞诱导而来的多功能干细胞注入到猪胚胎中, 并使人嵌合体猪胚胎在代孕母猪内发育成为一个完整的个体。人猪嵌合体的生产有助在动物体内培育出可供移植的人类器官, 从而解决移植器官来源严重不足的难题。2017年, Wu 等^[57]运用 CRISPR-Cas9 技术删除猪胚胎内形成器官的关键基因, 创造遗传“空位”, 把人类诱导的多能干细胞注入到猪胚胎内, 首次成功地培育出人猪嵌合体胚胎, 并使之在猪体内发育至 3~4 周。人猪嵌合体胚胎的生产有助于人们模拟认识许多人类遗传疾病的早期发病过程, 并实施药物测试, 同时将会给人类带来大量可供移植的器官。更重要的是, 诱导多能干细胞是直接取自需要器官移植的患者, 生产出的器官移植后将会大幅降低免疫排斥的风险, 但由于目前人猪嵌合体的研究面临巨大的伦理争议, 因此, 猪嵌合体器官的实际应用还需要经历很长一段时间。不管怎样, 上述研究为猪作为异种器官移植的供体提供了巨大的可能性, 推动了整个异种器官移植领域的研究, 同时提高了人们把猪作为器官移植供体的信心, 给全世界千千万万需要器官移植的患者带来了生存的希望。

3 展望

自 2013 年 CRISPR-Cas9 基因组编辑技术第一次被运用到哺乳动物细胞以来, 短短的 4 年多时间里其飞速发展, 极大地推动畜牧业和生物学领域各个方面的研究, 成为当今应用最广泛的基因组编辑技术。

相比传统的选择育种, CRISPR-Cas9 技术有其独特的优势, 其对特定基因的编辑不仅可以在短时间内得到人们想要的性状, 提高生产性能, 而且还能缩短育种年限, 加快育种速度; 但由于猪大多数的经济性状是由微效多基因控制的复杂性状, 很难通过某一基因的改变显著地改变其表型, 因此,

CRISPR-Cas9 技术的应用受到一定的限制。此外, 由于大众对基因编辑动物认识还不够充分, 对基因编辑还有一定的误解和担忧, 这也在一定程度上阻碍和影响了基因编辑动物实际的应用和推广。相对于人类疾病模型和异种器官移植的研究, 猪抗病育种的研究就略显不足。猪疾病对于养猪业是一个重大的挑战, 如果能加大 CRISPR-Cas9 技术在猪抗病育种上的研究, 并将培育出的抗病基因编辑猪运用于实际的生产过程中, 那么必将会促进养猪产业进一步迅速蓬勃的发展。猪作为人类模式动物越来越受到人们的重视, 特别在人类疾病模型和器官移植等领域。据报道, 中国将启动一项雄心勃勃的研究项目——国际模式猪计划 (pig model project, PMP) (<http://www.pigmodel.org>)。这一项目将逐步对猪基因组几乎所有 2 万个基因进行敲除研究, 建立完整的基因敲除猪表型品系, 实现猪的模式动物化。这一项目的实施将有助于进一步阐明生命表型的形成规律和调节方式, 认识人类和动物生命活动规律、重大疾病的发生发展规律, 并为功能基因研究、异种器官移植和动物遗传育种提供理论和技术支持。总之, 随着 CRISPR-Cas9 基因组编辑技术的不断完善和发展, 运用 CRISPR-Cas9 技术对猪基因组进行编辑一定会给畜牧业和生物医学产生深远的影响。

[参 考 文 献]

- [1] Thomas KR, Folger KR, Capecchi MR. High frequency targeting of genes to specific sites in the mammalian genome. *Cell*, 1986, 44: 419-28
- [2] Capecchi MR. Gene targeting in mice: functional analysis of the mammalian genome for the twenty-first century. *Nat Rev Genet*, 2005, 6: 507-12
- [3] Urnov FD, Miller JC, Lee YL, et al. Highly efficient endogenous human gene correction using designed zinc-finger nucleases. *Nature*, 2005, 435: 646-51
- [4] Miller JC, Holmes MC, Wang J, et al. An improved zinc-finger nuclease architecture for highly specific genome editing. *Nat Biotechnol*, 2007, 25: 778-85
- [5] Christian M, Cermak T, Doyle EL, et al. Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. *Genetics*, 2010, 186: 757-61
- [6] Moscou MJ, Bogdanove AJ. A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors. *Science*, 2009, 326: 1501
- [7] Cong L, Ran FA, Cox D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 2013, 339: 819-23
- [8] Mali P, Yang L, Esvelt KM, et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*, 2013, 339: 823-6
- [9] Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial

- Immunity. Science, 2012, 337: 816-21
- [10] 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
- [11] Mojica FJ, Díezvillaseñor C, Soria E, et al. Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria. Mol Microbiol, 2000, 36: 244-6
- [12] Jansen R, Embden JD, Gaastra W, et al. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. Mol Microbiol, 2002, 43: 1565-75
- [13] Mojica FJ, Díez-Villaseñor Cs, García-Martínez J, et al. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. J Mol Evol, 2005, 60: 174-82
- [14] 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: 653-3
- [15] Bolotin A, Quinquis B, Sorokin A, et al. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. Microbiology, 2005, 151: 2551-61
- [16] Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. Science, 2007, 315: 1709-12
- [17] Garneau JE, Dupuis MÈ, Villion M, et al. The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. Nature, 2010, 468: 67-71
- [18] Gasiunas G, Barrangou R, Horvath P, et al. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. Proc Natl Acad Sci USA, 2012, 109: 2579-86
- [19] Ran FA, Hsu PD, Lin CY, et al. Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. Cell, 2013, 154: 1380-9
- [20] Whitworth KM, Lee K, 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: 78
- [21] Abudayyeh OO, Gootenberg JS, Essletzbichler P, et al. RNA targeting with CRISPR-Cas13. Nature, 2017, 550: 280-4
- [22] Cox D, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, et al. RNA editing with CRISPR-Cas13. Science, 2017, 358: 1019-27
- [23] Hu J, Miller SM, Geurts MH, et al. Evolved Cas9 variants with broad PAM compatibility and high DNA specificity. Nature, 2018, 556: 57-63
- [24] Bassett AR, Tibbit C, Ponting CP, et al. Highly efficient targeted mutagenesis of *Drosophila* with the CRISPR/Cas9 System. Cell Rep, 2013, 4: 220-8
- [25] Ma X, Zhang Q, Zhu Q, et al. A robust CRISPR/Cas9 system for convenient, high-efficiency multiplex genome editing in monocot and dicot plants. Mol Plant, 2015, 8: 1274-84
- [26] Shen B, Brown KM, Lee TD, et al. Efficient gene disruption in diverse strains of *Toxoplasma gondii* using CRISPR/CAS9. MBio, 2014, 5: 01114
- [27] Nishimasu H, Ran FA, Hsu PD, et al. Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA. Cell, 2014, 156: 935-49
- [28] Jinek M, Jiang F, Taylor DW, et al. Structures of Cas9 endonucleases reveal RNA-mediated conformational activation. Science, 2014, 343: 1247997
- [29] Lander ES. The heroes of CRISPR. Cell, 2016, 164: 18-28
- [30] Church GM, Esvelt KM, Mali P. Cas9 as a versatile tool for engineering biology. Nat Methods, 2013, 10: 957-63
- [31] Hsu PD, Lander ES, Zhang F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. Cell, 2014, 157: 1262-78
- [32] Lieber MR. The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway. Annu Rev Biochem, 2010, 79: 181-211
- [33] Rudin N, Sugarman E, Haber JE. Genetic and physical analysis of double-strand break repair and recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. Genetics, 1989, 122: 519-34
- [34] Salehgohari N, Helleday T. Conservative homologous recombination preferentially repairs DNA double-strand breaks in the S phase of the cell cycle in human cells. Nucleic Acids Res, 2004, 32: 3683-8
- [35] Swindle MM, Hughes R. Swine in the laboratory: surgery, anesthesia, imaging, and experimental techniques. Minerva Med, 2007, 65: 3645-7
- [36] Wang K, Jin Q, Ruan D, et al. Cre-dependent Cas9-expressing pigs enable efficient *in vivo* genome editing. Genome Res, 2017, 27: 2061-71
- [37] Wang K, Ouyang H, Xie Z, et al. Efficient generation of myostatin mutations in pigs using the CRISPR/Cas9 system. Sci Rep, 2015, 5: 16623
- [38] Bi Y, Hua Z, Liu X, et al. Isozygous and selectable marker-free MSTN knockout cloned pigs generated by the combined use of CRISPR/Cas9 and Cre/LoxP. Sci Rep, 2016, 6: 31729
- [39] Ruan J, Li H, Xu K, et al. Highly efficient CRISPR/Cas9-mediated transgene knockin at the H11 locus in pigs. Sci Rep, 2015, 5: 14253
- [40] Zheng Q, Lin J, Huang J, et al. Reconstitution of *UCPI* using CRISPR/Cas9 in the white adipose tissue of pigs decreases fat deposition and improves thermogenic capacity. Proc Natl Acad Sci USA, 2017, 114: E9474-82
- [41] Xu A, Qin C, Lang Y, et al. A simple and rapid approach to manipulate pseudorabies virus genome by CRISPR/Cas9 system. Biotechnol Lett, 2015, 37: 1265-72
- [42] Ramírez-Carvajal L, Singh N, de los Santos T, et al. Depletion of elongation initiation factor 4E binding proteins by CRISPR/Cas9 enhances the antiviral response in porcine cells. Antiviral Res, 2015, 125: 8-13
- [43] Whitworth KM, Benne JA, Spate LD, et al. Zygote injection of CRISPR/Cas9 RNA successfully modifies the target gene without delaying blastocyst development or altering the sex ratio in pigs. Transgenic Res, 2016, 26: 97-107
- [44] Hai T, Teng F, Guo R, et al. One-step generation of knock-

- out pigs by zygote injection of CRISPR/Cas system. *Cell Res*, 2014, 24: 372-5
- [45] 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*, 2015, 72: 1175-84
- [46] Wang X, Cao C, Huang J, et al. One-step generation of triple gene-targeted pigs using CRISPR/Cas9 system. *Sci Rep*, 2016, 6: 20620
- [47] Zhang Y, Xue Y, Cao C, et al. Thyroid hormone regulates hematopoiesis via the TR-KLF9 axis. *Blood*, 2017, 130: 2167-70
- [48] Chen F, Wang Y, Yuan Y, et al. Generation of B cell-deficient pigs by highly efficient CRISPR/Cas9-mediated gene targeting. *J Genet Genomics*, 2015, 42: 437-44
- [49] Lei S, Ryu J, Wen K, et al. Increased and prolonged human norovirus infection in RAG2/IL2RG deficient gnotobiotic pigs with severe combined immunodeficiency. *Sci Rep*, 2016, 6: 25222
- [50] Yu HH, Zhao H, Qing YB, et al. Porcine zygote Injection with Cas9/sgRNA results in *DMD*-modified pig with muscle dystrophy. *Int J Mol Sci*, 2016, 17: 1668
- [51] Zhou X, Wang L, Du Y, et al. Efficient generation of gene-modified pigs harboring precise orthologous human mutation via CRISPR/Cas9-induced homology-directed repair in zygotes. *Human Mut*, 2016, 37: 110-8
- [52] Sato M, Miyoshi K, Nagao Y, et al. The combinational use of CRISPR/Cas9-based gene editing and targeted toxin technology enables efficient biallelic knockout of the α -1,3-galactosyltransferase gene in porcine embryonic fibroblasts. *Xenotransplantation*, 2014, 21: 291-300
- [53] Li P, Estrada JL, Burlak C, et al. Efficient generation of genetically distinct pigs in a single pregnancy using multiplexed single-guide RNA and carbohydrate selection. *Xenotransplantation*, 2014, 22: 20-31
- [54] Chuang CK, Chen CH, Huang CL, et al. Generation of GGTA1 mutant pigs by direct pronuclear microinjection of CRISPR/Cas9 plasmid vectors. *Anim Biotechnol*, 2017, 28: 174-81
- [55] Yang L, Güell M, Niu D, et al. Genome-wide inactivation of porcine endogenous retroviruses (PERVs). *Science*, 2015, 350: 1101-3
- [56] Niu D, Wei HJ, Lin L, et al. Inactivation of porcine endogenous retrovirus in pigs using CRISPR-Cas9. *Science*, 2017, 357: 1303-7
- [57] Wu J, Platero-Luengo A, Sakurai M, et al. Interspecies chimerism with mammalian pluripotent stem Cells. *Cell*, 2017, 168: 473-86