

DOI: 10.13376/j.cblls/2018119

文章编号: 1004-0374(2018)09-0994-09



刘光慧, 中国科学院生物物理研究所研究员、国家杰出青年科学基金获得者, 干细胞国家重大科学研究计划(973)项目首席科学家。中国细胞生物学会衰老细胞生物学分会会长、中国生物物理学会衰老生物学分会副理事长、中国细胞生物学学会再生细胞生物学分会副会长、*Protein Cell* 杂志副主编、*Stem Cell Res Ther* 副主编。近年来在人类衰老和再生医学领域取得了系列原创性研究成果, 以通讯作者在 *Nature*、*Science*、*Cell*、*Cell Stem Cell*、*Nat Commun* 和 *Cell Res* 等刊物发表系列研究论文, 获首届老年医学杰出贡献奖和树兰医学青年奖等奖项。

CRISPR/Cas9全基因组筛选在生命科学中的应用

荆耀彬^{1,2#}, 汪 伟^{1,2#}, 张维琦^{1,2,3*}, 刘光慧^{1,2,3*}

(1 中国科学院生物物理研究所生物大分子国家重点实验室, 北京 100101;

2 中国科学院大学, 北京 100049; 3 中国科学院干细胞与再生创新研究院, 北京 100101)

摘要: 全基因组筛选是系统性分析基因组的有力工具, 可在全基因组范围内发现具有特定生物学功能的基因或 DNA 元件。基于 CRISPR/Cas9 基因编辑技术的全基因组筛选具有高通量和高效率的特点, 已被广泛应用于疾病机理和药物开发等研究, 为临床治疗提供科学用药依据。同时, CRISPR/Cas9 筛选可靶向启动子、增强子和长链非编码 RNA 等序列, 解析其调控基因表达的功能。此外, 将全基因组筛选与单细胞测序技术结合, 可揭示细胞转录组差异, 剖析基因功能关系。

关键词: 全基因组筛选; CRISPR/Cas9 技术; 疾病机制; 非编码序列; 增强子; 单细胞测序

中图分类号: Q78

文献标志码: A

Genome-scale CRISPR/Cas9 screen: a powerful tool for life science studies

JING Yao-Bin^{1,2#}, WANG Wei^{1,2#}, ZHANG Wei-Qi^{1,2,3*}, LIU Guang-Hui^{1,2,3*}

(1 National Laboratory of Biomacromolecules, Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences,

Beijing 100101, China; 2 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China;

3 Institute of Stem Cell and Regeneration, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China;)

Abstract: Whole-genome screen is a powerful tool for genetic studies and can be used to identify novel genes that contribute to special biological phenotypes. Recently, a high-throughput and efficient screen based on CRISPR/Cas9 genome-editing has been applied to study the mechanisms underlying human diseases and discover new potential drug targets. Meanwhile, CRISPR/Cas9 screen can specifically target promoters, enhancers and long non-coding

收稿日期: 2018-05-21

基金项目: 中国科学院战略性先导科技专项(XDA16010100); 科技部重点研发项目(2015CB964800, 2017YFA0103304, 2017YFA0102802, 2014CB910503, 2014CB964600, 2018YFA0107203); 国家自然科学基金项目(91749202, 31471394, 31671429, 91749123, 81625009, 81330008, 81371342, 81471414, 81422017, 81601233, 81671377, 31601109, 31601158, 81771515, 81701388, 31571533, 31621004)

*通信作者: E-mail: weiqizhang@aliyun.com (张维琦); E-mail: ghliu@ibp.ac.cn (刘光慧); Tel: 86-10-64889970

#共同第一作者

RNAs to uncover new class of *cis*-regulatory factors or non-protein coding genes. In addition, a combination of CRISPR/Cas9 screen and single cell RNA sequencing allows us to capture transcriptome variation and genetic interactions in detail.

Key words: genome-scale screen; CRISPR/Cas9; disease mechanisms; non-coding sequence; enhancer; single cell sequencing

2003年, 人类基因组计划完成, 科学家发现约 20 000 个编码基因及众多功能不明的非编码序列, 揭示这些 DNA 序列的功能和调控机制成为后基因组时代的目标。如果说反向遗传学开启了人们认知基因功能的大门, 那么全基因组筛选则是揭开基因组神秘面纱的“快速列车”^[1-3]。

此前, 常用的全基因组筛选方法由 RNA 干扰 (RNA interfere, RNAi) 和过表达 cDNA 文库介导, 结合高通量测序分析, 获得目的基因。RNAi 是指体外合成的短链 RNA, 如 shRNA (short hairpin RNA)^[4]、siRNA (small interfere RNA)^[5] 通过碱基互补配对识别、降解 mRNA, 抑制基因翻译, 导致基因功能性缺失 (loss-of-function)^[6-9], 该方法已被广泛应用于基因功能研究^[10-11]。但是, RNAi 无法完全抑制基因的转录或翻译, 并且容易脱靶导致假阳性或假阴性结果^[6,12]。过表达 cDNA 是指将编码基因的 cDNA 序列导入细胞内, 提高蛋白质的翻译水平, 产生功能激活 (gain-of-function) 效应。然而, 真核生物基因转录后存在可变剪接, 一个基因具有多种转录本, cDNA 文库难以完全覆盖, 只能揭示基因的部分功能^[13-14]。近年来, 随着 CRISPR/Cas9 (clustered regularly interspersed short palindromic repeats) 基因编辑技术的兴起, 基于 CRISPR/Cas9 的全基因组筛选更有“后来者居上”之势, 开启了全基因组筛选的 2.0 时代。本文主要就 CRISPR/Cas9 全基因组筛选在生物学中的应用进行简要综述。

1 CRISPR/Cas9系统及其全基因组筛选的原理

CRISPR 是细菌用于抵抗外来遗传物质入侵的一种获得性免疫机制^[15]。2012年, 研究人员首次报道利用 CRISPR/Cas9 技术在哺乳动物细胞中实现基因编辑^[16-17]。CRISPR/Cas9 作为新一代高效、便捷的基因编辑技术, 迅速席卷生物学研究各个领域, 已成功对酵母^[18]、果蝇^[19]、小鼠^[20]等多种模式生物进行基因改造^[21-22]。CRISPR/Cas9 基因编辑系统由一个具有核酸内切酶功能的 Cas9 蛋白 (或其他同源蛋白) 和一条单链向导 RNA (single guide, sgRNA) 组成。sgRNA 与 Cas9 蛋白结合靶向到基因组特定

位点, Cas9 切割产生双链断裂 (double strand breaks, DSB), 经过细胞自主性的非同源末端连接 (non-homologous end joining, NHEJ) 或同源重组 (homology-directed repair, HR) 进行修复, 引入突变。NHEJ 是一种错配的修复机制, Ku70/80 招募 DNA 连接酶 IV 到 DSB 位点, DNA 连接时产生碱基插入或缺失突变。HR 是指有同源臂供体存在的情况下, 供体中的外源基因片段通过同源重组整合到靶位点, 利用这一方法可以实现基因的原位矫正^[23]和遗传增强^[24]。已有研究表明, 在细胞分裂的各个时期中, 细胞自主发生 NHEJ 的频率高于 HR^[25], 所以 CRISPR/Cas9 基因编辑常在靶位点产生碱基插入或缺失, 导致基因功能失活。

对 Cas9 蛋白进行改造使其失去核酸内切酶的活性, 但仍保留结合 sgRNA、靶向基因组的能力。核酸内切酶失活的 Cas9 (nuclease-dead mutants of Cas9, dCas9) 融合或招募转录因子, 作用在基因转录起始位点 (transcription start sites, TSS), 调控基因转录。将 dCas9 与转录抑制因子 KRAB (Krüppel-associated box) 融合, 特异性地抑制基因表达 (CRISPR interference, CRISPRi)^[26-27], 干扰效率远高于 RNAi。

同样, dCas9 可以将转录激活因子招募到 TSS 位点, 促进基因转录激活 (CRISPR activation, CRISPRa)^[28]。常见的基于 CRISPR 的转录激活系统有以下几种: ① VPR 系统, 将 dCas9 与 VP64、p65 激活结构域 (NF- κ B 的亚基) 和 Rta (Epstein-Barr 病毒 R 反式激活因子) 融合表达, 共同作用在 TSS 位点, 促进基因转录^[29]; ② Sun-Tag 系统, dCas9 融合 10 个串联 GCN4 抗原, 识别并结合 scFv-sfGFP-VP64 复合物, 当 VP64 被招募到 TSS 位点时, 基因转录被激活^[30-31]; ③ SAM 系统 (synergistic activation mediator), 该系统由两部分组成, 一部分表达 dCas9-VP64 复合物, 并且转录 sgRNA-MS2-hairpin (hairpin 可识别并结合 MS2), 另一部分表达 MS2-p65-HSF1 (MPH v2, HSF1: human heat-shock factor 1) 复合物, 该复合物被 MS2-hairpin 招募到 TSS 位点, 与 VP64 组成协同激活中间体 (SAM), 促进基因转录^[32]。

当 sgRNA 靶向单基因时, CRISPR 可视为一

种高效的基因编辑工具。但当 sgRNA 靶向全基因组序列时，CRISPR 便升级为一种全基因组筛选的工具。基于 CRISPR/Cas9 筛选的一般流程如下(图1):①构建靶向全基因组的基因敲除文库 (genome-scale CRISPR-Cas9 knockout, GeCKO) 或激活基因 sgRNA 文库;②包装慢病毒文库;③以低 MOI (multiplicity of infection, 通常为 0.3) 感染细胞,使 sgRNA 整合到细胞基因组上,随基因组 DNA 的复制而复制;④用抗生素筛选出感染病毒的细胞;⑤根据表型(耐药性、增殖能力、存活能力、标记基因等)选择细胞;⑥提取细胞核基因组;⑦建库,进行二代测序(next-generation sequencing, NGS);⑧利用生物信息学分析获得目的基因^[33-34]。CRISPR/Cas9 全基因组筛选体系更加稳定,覆盖度高并且脱靶率低,已逐渐成为全基因组功能分析的强力工具^[35](表1)。

目前,CRISPR/Cas9 全基因组筛选主要用于疾病机理和药物开发研究、非编码序列功能研究以及结合单细胞测序技术剖析基因功能关系,下面进行简要介绍。

2 CRISPR/Cas9全基因组筛选在疾病研究中的应用

随着分子生物学和高通量测序技术的发展,人们对疾病的认识逐渐深入到基因层面。利用 CRISPR/

Cas9 全基因组筛选体系发现疾病相关基因,为临床治疗提供新的药物靶点和治疗策略^[57,60,62-63]。

肿瘤是一种高发病率的疾病,具有组织浸润、转移扩散、无限增殖、逃避免疫反应等特征。研究人员利用 CRISPR/Cas9 全基因组筛选在小鼠急性髓系白血病(AML)细胞系中获得目的基因,结合已有数据库分析,缩小基因范围,在小鼠体内进行二次筛选,获得与 AML 细胞存活能力相关性更高的基因——DCPS。DCPS (mRNA 3' 端的帽子水解酶基因)通过影响 pre-mRNA 成熟,维持 AML 细胞存活。而 DCPS 的抑制剂 RG3039 诱导 pre-mRNA 发生错误剪接,细胞周期受阻,诱发凋亡,并且此抑制剂只针对 AML 细胞,对正常血细胞没有毒性^[57]。

抑制肿瘤在体内转移是临床治疗的一大难题。体内外微环境的差异会影响肿瘤细胞的迁移、增殖等活动。全基因组体内筛选一直受病毒感染滴度、细胞转移、细胞相互作用等多种因素干扰。2015年,研究人员首次在小鼠体内进行 CRISPR-Cas9 的全基因组筛选,发现肿瘤转移相关基因。研究人员从非小细胞肺癌(non-small-cell lung cancer, NSCLC)小鼠体内获得 Cas9-EGFP 稳定表达的非转移型肿瘤细胞系,该细胞系在免疫缺陷小鼠体内可以诱导肿瘤发生。将感染 sgRNA 库的 Cas9-EGFP 细胞注射到小鼠体内,根据荧光蛋白进行定位,对发生迁移

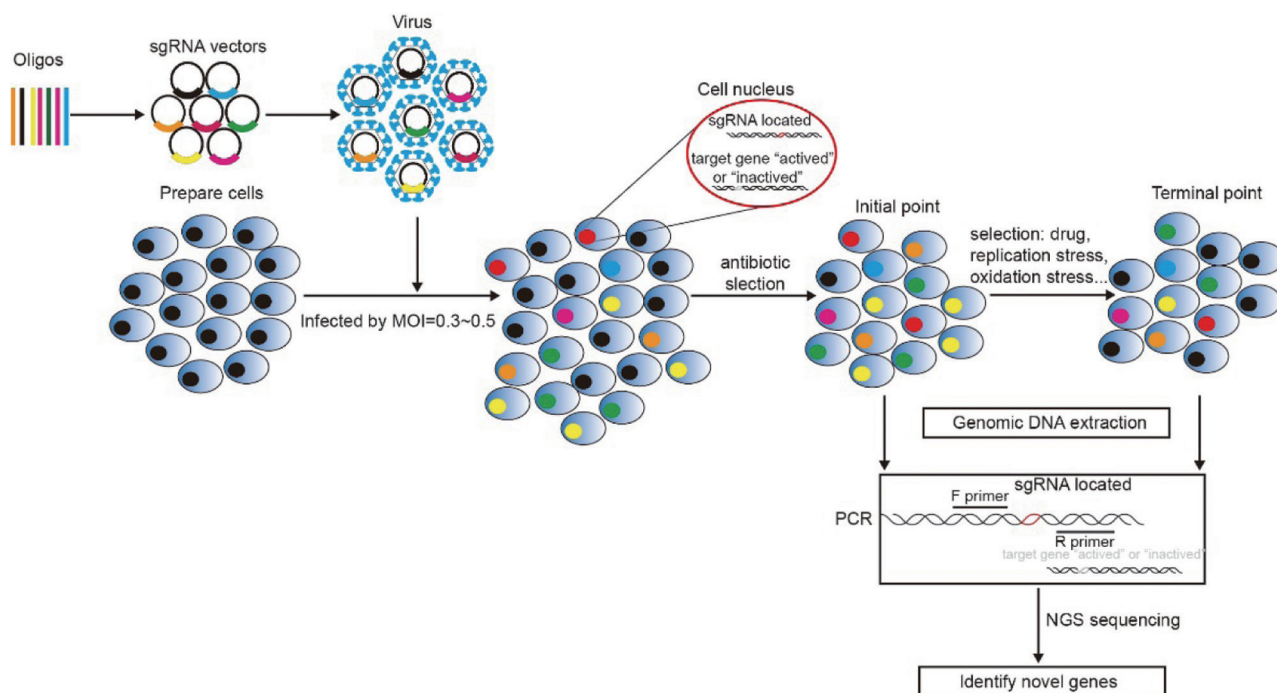


图1 CRISPR/Cas9全基因组筛选原理示意图

表1 利用CRISPR/Cas9筛选的研究进展

| 筛选方式 | 细胞类型 | 体内/体外 | 筛选表型 | 物种 | Cas9蛋白(变体) | 文献出处 |
|------------|--------------------------|-------|--------------|------------|---------------------|-------------|
| 基因敲除 | A375 | 体外 | 耐受性(药物) | 人 | Cas9 | [33] |
| | KBM7、HL60 | 体外 | 耐受性(药物) | 人 | Cas9 | [36] |
| | mESC | 体外 | 耐受性(药物) | 小鼠 | Cas9 | [37] |
| | HeLa | 体外 | 耐受性(病毒) | 人 | Cas9 | [38] |
| | E14、MOLM13/NB4/TF1 | 体外 | 表面受体标记 | 小鼠、人 | Cas9 | [39] |
| | NSCLC | 体内 | 肿瘤增殖 | 小鼠 | Cas9 | [40] |
| | RN2 | 体外 | 荧光标记 | 小鼠 | Cas9 | [41] |
| | dendritic cells | 体外 | 标记基因 | 小鼠 | Cas9 | [42] |
| | HUDEP-2 | 体外 | 标记基因 | 人 | Cas9 | [43] |
| | KBM7 | 体外 | 增殖/存活 | 人 | Cas9 | [44] |
| | BJ、MCF-7、T47D、MDA-MB-231 | 体外 | 细胞凋亡 | 人 | Cas9 | [45] |
| | H1 | 体外 | 标记基因 | 人 | Cas9 | [46] |
| | OVCAR8-ADR | 体外 | 增殖 | 人 | Cas9 | [47] |
| | A375、HEK293T、BV2 | 体外 | 耐受性(药物) | 人 | Cas9 | [39] |
| | K562 | 体外 | 存活能力 | 人 | Cas9 | [48] |
| | Huh7.5.1 | 体外 | 耐受性(病毒) | 人 | Cas9 | [49] |
| | HEK293T | 体外 | 耐受性(病毒) | 人 | Cas9 | [50] |
| | HT29 | 体外 | 耐受性 | 人 | Cas9 | [51] |
| | BV2 | 体外 | 耐受性(病毒) | 小鼠 | Cas9 | [52] |
| | A375 | 体外 | 耐受性(药物) | 人 | Cas9 | [53] |
| | K562 | 体外 | 耐受性(药物) | 人 | Cas9 | [54] |
| | K56 | 体外 | 耐受性(药物)/增殖 | 人 | dCas9/dCas9-KRAB | [30] |
| | K562 | 体外 | 增殖 | 人 | dCas9-KRAB | [55] |
| | Jurkat T | 体外 | 耐受性(药物)/标记基因 | 人 | Cas9 | [56] |
| | AML | 体外+体内 | 存活 | 小鼠 | Cas9 | [57] |
| | 基因转录激活 | K562 | 体外 | 耐受性(药物)/增殖 | 人 | SunTag-VP64 |
| A375 | | 体外 | 耐受性(药物) | 人 | dCas9-VP64/P65/HSF1 | [32] |
| K562 | | 体外 | 耐受性(药物) | 人 | sunCas9-VP64 | [58] |
| A375 | | 体外 | 耐受性(药物) | 人 | SAM | [59] |
| A549 | | 体外 | 耐受性(病毒) | 人 | SAM | [60] |
| Jurkat T细胞 | | 体外 | 标记基因 | 人 | dCas9-VP64 | [61] |

注: A375: 黑色素瘤细胞; KBM7: 慢性粒细胞性白血病细胞; HL60: 白血病细胞; mESC: 鼠胚胎干细胞; HeLa: 腺癌细胞; E14: 鼠胸腺细胞; MOLM13/NB4/TF1: 人急性白血病细胞; NSCLC: 非小细胞肺癌细胞; RN2: 小鼠急性骨髓白血病细胞; dendritic cells: 树突细胞; HUDEP-2: 红系祖细胞; BJ: 人成纤维细胞; MCF-7、T47D、MDA-MB-231: 人乳腺癌细胞; H1: 人胚胎干细胞; OVCAR8-ADR: 卵巢癌细胞; BV2: 小鼠小胶质细胞; AML: 小鼠急性髓性白血病细胞; K562: 白血病细胞; Huh7.5.1: 人肝细胞; HEK293T: 人胚肾细胞; HT29: 人结肠癌细胞; sunCas9-VP64: sun-Tag激活表达系统; SAM: SAM激活表达系统。

的肿瘤细胞进行高通量测序和生物信息学分析, 发现 624 个基因与肿瘤转移密切相关^[40]。

病毒是一种比真菌和细菌都小的病原微生物, 必须依托活细胞进行复制。病毒吸附在细胞表面, 将遗传物质注入宿主细胞并整合到宿主基因组上, 经转录、翻译后产生病毒各个组分, 组装成熟后释放到细胞外。研究人员利用 CRISPR/Cas9 全基因组筛选探究病毒入侵、导致细胞死亡的机制, 发现 9

个宿主基因与虫媒病毒(西尼罗河病毒、登革热病毒、黄病毒等)感染能力相关, 其中包含特异性地依赖内质网相关信号肽复合体 1 (SPCS1)。当宿主细胞缺失 SPCS1 时会影响蛋白质的剪接折叠, 因此无法合成有生物学功能的蛋白, 从而抑制病毒感染^[50]。针对西尼罗河病毒, 研究人员通过筛选发现 7 个内质网相关蛋白降解通路 (ERAD) 基因与病毒感染导致的细胞死亡密切相关^[64]。该研究结果涵盖

了此前 siRNA 筛选的结果，但 CRISPR 筛选表型更加明显。此外，研究人员首次利用 CRISPR/Cas9 激活筛选发现，细胞内一种修饰唾液酸的糖基转移酶 (B4GALNT2) 可以有效抑制多种甲型流感病毒 (influenza A virus, IAV) 感染^[60]。

氧化磷酸化 (oxidative phosphorylation, OXPHOS) 是人体产生 ATP 的主要途径，组成 OXPHOS 系统的蛋白由细胞核基因和线粒体基因共同编码，并且受到辅助因子的调节^[65]。当细胞缺失 OXPHOS 蛋白时，无法在半乳糖环境中存活。研究人员建立 CRISPR/Cas9 “死亡”筛选体系，在半乳糖培养条件下富集死亡细胞，高通量测序发现 191 个与 OXPHOS 相关的重要基因，其中 72 个基因已知与 OXPHOS 疾病密切相关，5 个基因通过直接相互作用调控线粒体内的 16S rRNA 水平和蛋白质翻译水平，调节细胞 OXPHOS^[54]。

3 CRISPR/Cas9全基因组筛选在非编码序列中的应用

非编码 DNA 序列约占人类基因组序列的 98%，包括非编码 RNA、顺式 (*cis*-) 和反式 (*trans*-) 调控元件、内含子、假基因 (pseudogenes)、端粒和重复序列等。近年来，对非编码序列的功能研究快速发展。现有研究表明，非编码序列在基因表达调控、肿瘤发生、免疫调节、个体发育等生物学过程中具有非常重要的功能。然而，人们对非编码序列功能认知是不全面的，利用全基因组筛选研究未知非编码 DNA 序列对深入理解基因调控、疾病和生物进化等具有重要意义^[45-66]。

在人类基因组上，有一类被称之为顺式调控元件 (*cis*-regulation elements) 的非编码元件，包括启动子 (promoter)、增强子 (enhancer) 和超级增强子 (super-enhancer) 等。此前，研究人员通过构建质粒、检测报告基因信号强度鉴定增强子，该方法不仅工作量大，而且无法还原增强子在细胞内调控方式，而 CRISPR/Cas9 筛选可以直接在细胞内发现特定基因的增强子序列，工作量小并且具有系统性^[55,67-69]。

识别原癌基因的增强子可为肿瘤的诊断和治疗提供靶点。P53 和 ER α 在肿瘤发生和疾病发展中扮演着重要角色。P53 作为基因组的“金牌护卫”，在肿瘤发生时，阻碍细胞周期，使细胞发生凋亡。这一过程被称为原癌基因诱导的细胞衰老 (oncogene-induced senescence, OIS)^[70]。研究人员针对 P53 结合位点构建 sgRNA 文库，利用 CRISPR/Cas9 全基

因组筛选发现在 P21 上游 10 kb 范围内存在两个 P53 增强子。进一步研究证明 P53 招募 CEBPB 到远端的增强子，或直接结合在近端的增强子，激活下游 P21 的表达，诱导肿瘤细胞凋亡。ER α 是一类受雌激素激活的转录因子，在乳腺癌细胞中促进有丝分裂。运用同样的方法发现，ER α 的一个增强子存在于原癌基因 CCND1 (cyclin D1) 的启动子区域内，并且在雌激素存在的情况下，CCND1 的表达上调，表明 ER α 通过该增强子调控 CCND1，导致癌症发生^[45]。

此外，免疫系统的稳态也受到增强子序列的调控。自身免疫 (autoimmunity) 是机体对自身细胞或自身成分发生的免疫应答反应，这种应答反应会导致组织损伤，诱发自身免疫疾病 (autoimmunity disorders, AID)^[71]。高亲和性白细胞介素 -2 受体 (interleukin-2 receptor, IL2-R α) 由 *IL2ra* 编码，决定 T 细胞启动炎症反应或进行免疫抑制，调节人体免疫系统稳态。研究人员利用 CRISPRa 筛选发现 *IL2ra* 的增强子，当该增强子突变时，细胞难以抑制炎症反应，最终导致 AID^[61]。

长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA) 是 DNA 转录产生的不少于 200 bp 的非编码 RNA，与基因转录表达、细胞增殖等生物学过程息息相关。研究人员在黑色素瘤细胞中首次利用 CRISPR/Cas9 全基因组激活表达系统筛选出 11 个 lncRNA 位点，通过招募激活剂，调节对 BRAF 抑制剂的耐药性。深度分析发现多数 lncRNA 通过调节相邻基因发挥功能，其中 *EMICERI* 转录激活后，导致 4 个相邻的蛋白编码基因剂量依赖性激活^[59]。

对 lncRNA 进行单碱基突变仍能表现出生物学活性。因此，lncRNA 的功能缺失需要在 lncRNA 的基因组序列两端各设计 1 个 sgRNA，致使整个 lncRNA 区段或大部分片段序列缺失，实现 lncRNA 的敲除。2016 年，北京大学与哈佛大学研究人员共同提出利用 pgRNA (paired sgRNA) 对 lncRNA 进行高通量的全基因组筛选。在人源肝癌细胞系中成功对近 700 个癌症或其他疾病相关 lncRNA 的基因进行了功能筛选，发现敲除 LINC01087 可导致一些肝癌基因表达上调，促进癌细胞增殖的存活^[72]。

4 CRISPR/Cas9全基因组筛选技术的延伸

CRISPR/Cas9 全基因组筛选技术已在细胞生物学各领域得到充分的应用，但是筛选的表型局限于细胞增殖、存活能力、耐药性和报告基因表达等，

无法揭示细胞内更复杂的生物学调控网络(如转录组、基因互作等)^[73-74]。

尽管生物体最初都是由同一个细胞(受精卵)发育而来,但细胞在经历分裂、分化和外界的环境变化时,基因组逐渐积累不同程度的基因突变,细胞间产生差异性。单细胞测序(single-cell RNA sequencing)可从单细胞水平揭示转录组表达情况,但弊端是细胞数少,不足以涵盖全基因组范围的基因表达^[75-76]。

2016年,加州大学旧金山分校(UCSF)和Broad研究所合作将CRISPR/Cas9全基因组筛选和单细胞测序技术结合——Perturb-seq。该技术采用了细胞条形码策略,准确捕获sgRNA表达的同时,测量细胞内基因转录水平变化,再根据MIMOSCA计算模型解析大量数据,描绘复杂的基因网络。相比常规的全基因组筛选,这一技术可直观描述复杂的生物学整体过程,增大细胞量的同时,缩短实验进程^[73,77]。

研究人员通过该方法在树突状细胞中发现应答脂多糖(LPS)的调控通路。利用CRISPR干扰基因表达之后,通过Perturb-seq技术准确识别目的基因,发现免疫激活过程中调节细胞分化、抗病毒感染和线粒体稳定的调控因子^[73]。

哺乳动物未折叠蛋白应答(unfolded protein response, UPR)是一种内质网应激通路。当蛋白折叠能力、钙稳态或膜完整性发生改变,三种ER跨膜应激蛋白(IRE1 α 、ATF6和PERK)激活转录因子XBP1表达,维持细胞存活^[78]。UCSF的研究人员在癌细胞系中同时抑制了上述三个基因表达,通过CRISPR/Cas9全基因组筛选发现UPR诱导基因,再利用单细胞测序技术结合基因间协方差分析揭示易位子(translocon)与IRE1 α 的反馈调节机制^[77]。

以色列威茨曼研究所采用新方法CRISP-seq研究先天免疫的调控通路。该研究描绘了单核细胞分化过程的基因表达网络,发现Cebpb和Irf8在单核巨噬细胞系和树突状细胞系中具有相反的作用^[74]。该技术还可在特定的动物模型体内探究免疫细胞调节的过程。

针对肿瘤治疗,联合用药不仅可以缩短治疗时间,还能有效降低肿瘤复发率,临床尚没有一份肿瘤联合用药的配药指南。药物筛选是指采用一定的方法,对药物的生物学活性、药理作用及药用价值进行评估。直接通过细胞表型筛选不仅步骤繁琐,而且费时费力^[79]。2017年,研究人员利用CRISPR/

Cas9全基因组筛选描绘基因互作图谱,针对这些具有协同作用的基因,选取对应药物进行联和用药。该研究针对20000多个药物靶基因设计paired-sgRNA文库,该sgRNA可同时靶向2个基因,根据肿瘤细胞的增殖能力变化进行筛选。该研究获得迄今为止最大的哺乳动物细胞基因互作图谱,根据此图谱,研究人员发现多种联合用药组合,为肿瘤的个性化治疗提供多种用药选择^[80]。

5 总结与展望

CRISPR/Cas9全基因组筛选已经在揭示肿瘤、病毒感染等疾病相关基因和分子机制中得到了广泛应用,展现出精准、高效的特点。未来,结合成熟的CRISPR/Cas9基因编辑技术和便捷的测序技术,全基因组筛选将推动精准医疗飞速发展。届时,根据病症在全基因组范围内筛选出致病基因,利用基因编辑技术矫正突变基因来治愈疾病将成为现实。

干细胞是一类具有自我更新能力和定向分化潜能的细胞,体外诱导后可分化成多种细胞和组织,成为再生医学的宠儿。近期有研究人员利用CRISPR/Cas9全基因组筛选,在人单倍体多能干细胞(haploid human pluripotent stem cells, hPSCs)中发现两类干细胞生长相关基因。一部分转录因子与细胞周期、DNA损伤相关,维持干细胞正常增殖,其中包含常染色体隐性遗传病(autosomal-recessive disorders, AR)的突变基因。另一部分是生长抑制基因,与肿瘤、P53信号通路相关性很强,进一步探究发现P53突变导致IGF1/mTOR抑制细胞凋亡的能力下降,促进细胞增殖(肿瘤发生)^[81]。

诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs)是成体细胞在体外重编程获得的多能干细胞。与胚胎干细胞类似,可以无限增殖并有潜力分化成为人体任何类型的细胞。利用患者特异的iPSCs构建细胞疾病模型,探究疾病发生的机制,已得到广泛应用^[82-83]。未来,将CRISPR全基因组筛选与iPSCs技术相结合,有望成为探索发病机制、寻找临床治疗药物的新策略。

目前,人口老龄化是全球面临的一个重大社会问题。如何延缓衰老、降低老年病的发病率成为生物医学领域的热点话题。机体的衰老伴随着体内干细胞库的耗竭,延长干细胞的存活时间,保持干细胞稳态对延缓衰老具有重要意义^[84]。目前已有部分研究证明单个基因可在维持间充质干细胞稳态的过程中发挥关键作用^[85-86]。利用全基因组筛选系统性

地发现延缓细胞衰老的相关基因，构建衰老调控网络，探究细胞衰老的生物学过程和衰老相关疾病的分子机制，有助于进一步开发延缓衰老、抗老年病药物，实现健康衰老。

[参 考 文 献]

- [1] Boutros M, Ahringer J. The art and design of genetic screens: RNA interference. *Nat Rev Genet*, 2008, 9: 554-66
- [2] Echeverri CJ, Perrimon N. High-throughput RNAi screening in cultured cells: a user's guide. *Nat Rev Genet*, 2006, 7: 373-84
- [3] Shalem O, Sanjana NE, Zhang F. High-throughput functional genomics using CRISPR-Cas9. *Nat Rev Genet*, 2015, 16: 299-311
- [4] Root DE, Hacohen N, Hahn WC, et al. Genome-scale loss-of-function screening with a lentiviral RNAi library. *Nat Methods*, 2006, 3: 715-9
- [5] Mcmanus MT, Sharp PA. Gene silencing in mammals by small interfering RNAs. *Nat Rev Genet*, 2002, 3: 737-47
- [6] Kaelin WG Jr. Molecular Biology. Use and abuse of RNAi to study mammalian gene function. *Science*, 2012, 337: 421-2
- [7] Li Y, Lu J, Han Y, et al. RNA interference functions as an antiviral immunity mechanism in mammals. *Science*, 2013, 342: 231-4
- [8] Maillard PV, Ciaudo C, Marchais A, et al. Antiviral RNA interference in mammalian cells. *Science*, 2013, 342: 235-8
- [9] Pan Q, van der Laan LJ, Janssen HL, et al. A dynamic perspective of RNAi library development. *Trends Biotechnol*, 2012, 30: 206-15
- [10] Paddison PJ, Silva JM, Conklin DS, et al. A resource for large-scale RNA-interference-based screens in mammals. *Nature*, 2004, 428: 427-31
- [11] Kubben N, Zhang W, Wang L, et al. Repression of the antioxidant NRF2 pathway in premature aging. *Cell*, 2016, 165: 1361-74
- [12] Jackson AL, Bartz SR, Schelter J, et al. Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nat Biotechnol*, 2003, 21: 635-7
- [13] Yang X, Boehm JS, Yang X, et al. A public genome-scale lentiviral expression library of human ORFs. *Nat Methods*, 2011, 8: 659-61
- [14] Berger AH, Brooks AN, Wu X, et al. High-throughput phenotyping of lung cancer somatic mutations. *Cancer Cell*, 2016, 30: 214-28
- [15] Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*, 2007, 315: 1709-12
- [16] Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 2012, 337: 816-21
- [17] Cong L, Ran FA, Cox D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 2013, 339: 819-23
- [18] Dicarlo JE, Norville JE, Mali P, et al. Genome engineering in *Saccharomyces cerevisiae* using CRISPR-Cas systems. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41: 4336-43
- [19] Yu Z, Ren M, Wang Z, et al. Highly efficient genome modifications mediated by CRISPR/Cas9 in *Drosophila*. *Genetics*, 2013, 195: 289-91
- [20] 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: 910-8
- [21] 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: 659-62
- [22] Xue W, Chen S, Yin H, et al. CRISPR-mediated direct mutation of cancer genes in the mouse liver. *Nature*, 2014, 514: 380-4
- [23] Wang L, Fei Y, Fu L, et al. CRISPR/Cas9-mediated targeted gene correction in amyotrophic lateral sclerosis patient iPSCs. *Protein Cell*, 2017, 8: 365-78
- [24] Yang J, Li J, Suzuki K, et al. Genetic enhancement in cultured human adult stem cells conferred by a single nucleotide recoding. *Cell Res*, 2017, 27: 1178-81
- [25] Mao Z, Bozzella M, Seluanov A, et al. DNA repair by nonhomologous end joining and homologous recombination during cell cycle in human cells. *Cell Cycle*, 2008, 7: 2902-6
- [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] Margolin JF, Friedman JR, Vissing H, et al. Kruppel-associated boxes are potent transcriptional repression domains. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91: 4509-13
- [28] Stranges PB, Esvelt KM, Moosburner M. CAS9 transcriptional activators for target specificity screening and paired nickases for cooperative genome engineering. *Nat Biotechnol*, 2013, 31: 833-8
- [29] Chavez A, Scheiman J, Vora S, et al. Highly efficient Cas9-mediated transcriptional programming. *Nat Methods*, 2015, 12: 326-8
- [30] Gilbert LA, Horlbeck MA, Adamson B, et al. Genome-scale CRISPR-mediated control of gene repression and activation. *Cell*, 2014, 159: 647-61
- [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] Konermann S, Brigham MD, Trevino AE, et al. Genome-scale transcriptional activation by an engineered CRISPR-Cas9 complex. *Nature*, 2015, 517: 583-8
- [33] Shalem O, Sanjana NE, Hartenian E, et al. Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells. *Science*, 2014, 343: 84-7
- [34] Joung J, Konermann S, Gootenberg JS, et al. Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout and transcriptional activation screening. *Nat Protoc*, 2017, 12: 828-63
- [35] Morgens DW, Deans RM, Li A, et al. Systematic comparison of CRISPR-Cas9 and RNAi screens for essential genes. *Nat Biotechnol*, 2016, 34: 634-6
- [36] Wang T, Wei JJ, Sabatini DM, et al. Genetic screens in

- human cells using the CRISPR-Cas9 system. *Science*, 2014, 343: 80-4
- [37] Koike Y, 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: 267-73
- [38] Zhou Y, Zhu S, Cai C, et al. High-throughput screening of a CRISPR/Cas9 library for functional genomics in human cells. *Nature*, 2014, 509: 487-91
- [39] Doench JG, Hartenian E, Graham DB, et al. Rational design of highly active sgRNAs for CRISPR-Cas9-mediated gene inactivation. *Nat Biotechnol*, 2014, 32: 1262-7
- [40] Chen S, Sanjana NE, Zheng K, et al. Genome-wide CRISPR screen in a mouse model of tumor growth and metastasis. *Cell*, 2015, 160: 1246-60
- [41] Shi J, Wang E, Milazzo JP, et al. Discovery of cancer drug targets by CRISPR-Cas9 screening of protein domains. *Nat Biotechnol*, 2015, 33: 661-7
- [42] Parnas O, Jovanovic M, Eisenhaure TM, et al. A genome-wide CRISPR screen in primary immune cells to dissect regulatory networks. *Cell*, 2015, 162: 675-86
- [43] Canver MC, Smith EC, Sher F, et al. BCL11A enhancer dissection by Cas9-mediated *in situ* saturating mutagenesis. *Nature*, 2015, 527: 192-7
- [44] Wang T, Birsoy K, Hughes NW, et al. Identification and characterization of essential genes in the human genome. *Science*, 2015, 350: 1096-101
- [45] Korkmaz G, Lopes R, Ugalde AP, et al. Functional genetic screens for enhancer elements in the human genome using CRISPR-Cas9. *Nat Biotechnol*, 2016, 34: 192-8
- [46] Diao Y, Li B, Meng Z, et al. A new class of temporarily phenotypic enhancers identified by CRISPR/Cas9 mediated genetic screening. *Genome Res*, 2016, 26: 397-405
- [47] Wong AS, Choi GC, Cui CH, et al. Multiplexed barcoded CRISPR-Cas9 screening enabled by CombiGEM. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113: 2544-9
- [48] Jain IH, Zazzeron L, Goli R, et al. Hypoxia as a therapy for mitochondrial disease. *Science*, 2016, 352: 54-61
- [49] Marceau CD, Puschnik AS, Majzoub K, et al. Genetic dissection of Flaviviridae host factors through genome-scale CRISPR screens. *Nature*, 2016, 535: 159-63
- [50] Zhang R, Miner JJ, Gorman MJ, et al. A CRISPR screen defines a signal peptide processing pathway required by flaviviruses. *Nature*, 2016, 535: 164-8
- [51] Blondel CJ, Park JS, Hubbard TP, et al. CRISPR/Cas9 screens reveal requirements for host cell sulfation and fucosylation in bacterial type III secretion system-mediated cytotoxicity. *Cell Host Microbe*, 2016, 20: 226-37
- [52] Orchard RC, Wilen CB, Doench JG, et al. Discovery of a proteinaceous cellular receptor for a norovirus. *Science*, 2016, 353: 933-6
- [53] Sanjana NE, Wright J, Zheng K, et al. High-resolution interrogation of functional elements in the noncoding genome. *Science*, 2016, 353: 1545-9
- [54] Arroyo JD, Jourdain AA, Calvo SE, et al. A genome-wide CRISPR death screen identifies genes essential for oxidative phosphorylation. *Cell Metab*, 2016, 24: 875-85
- [55] Fulco CP, Munschauer M, Anyoha R, et al. Systematic mapping of functional enhancer-promoter connections with CRISPR interference. *Science*, 2016, 354: 769-73
- [56] Shang W, Jiang Y, Boettcher M, et al. Genome-wide CRISPR screen identifies FAM49B as a key regulator of actin dynamics and T cell activation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2018, 115: E4051-E60
- [57] Yamauchi T, Masuda T, Canver MC, et al. Genome-wide CRISPR-Cas9 screen identifies leukemia-specific dependence on a pre-mRNA metabolic pathway regulated by DCPS. *Cancer Cell*, 2018, 33: 386-400
- [58] Jost M, Chen Y, Gilbert L A, et al. Combined CRISPRi/a-based chemical genetic screens reveal that rigosertib is a microtubule-destabilizing agent. *Mol Cell*, 2017, 68: 210-23
- [59] Joung J, Engreitz JM, Konermann S, et al. Genome-scale activation screen identifies a lncRNA locus regulating a gene neighbourhood. *Nature*, 2017, 548: 343-6
- [60] Heaton BE, Kennedy EM, Dumm RE, et al. A CRISPR activation screen identifies a pan-avian influenza virus inhibitory host factor. *Cell Rep*, 2017, 20: 1503-12
- [61] Simeonov DR, Gowen BG, Boontanart M, et al. Discovery of stimulation-responsive immune enhancers with CRISPR activation. *Nature*, 2017, 549: 111-5
- [62] Manguso RT, Pope HW, Zimmer MD, et al. *In vivo* CRISPR screening identifies Ptpn2 as a cancer immunotherapy target. *Nature*, 2017, 547: 413-4
- [63] Wang L, Leite de Oliveira R, Wang C, et al. High-throughput functional genetic and compound screens identify targets for senescence induction in cancer. *Cell Rep*, 2017, 21: 773-83
- [64] Ma H, Dang Y, Wu Y, et al. A CRISPR-based screen identifies genes essential for West Nile virus-induced cell death. *Cell Rep*, 2015, 12: 673-83
- [65] Diaz F, Kotarsky H, Fellman V, et al. Mitochondrial disorders caused by mutations in respiratory chain assembly factors. *Semin Fetal Neonatal Med*, 2011, 16: 197-204
- [66] Maurano MT, Humbert R, Rynes E, et al. Systematic localization of common disease-associated variation in regulatory DNA. *Science*, 2012, 337: 1190-5
- [67] Liu SJ, Horlbeck MA, Cho SW, et al. CRISPRi-based genome-scale identification of functional long noncoding RNA loci in human cells. *Science*, 2016, 355: aah7111
- [68] Klann TS, Black JB, Chellappan M, et al. CRISPR-Cas9 epigenome editing enables high-throughput screening for functional regulatory elements in the human genome. *Nat Biotechnol*, 2017, 35: 561-8
- [69] Covarrubias S, Robinson EK, Shapleigh B, et al. CRISPR/Cas-based screening of long non-coding RNAs (lncRNAs) in macrophages with an NF- κ B reporter. *J Biol Chem*, 2017, 292: 20911-20
- [70] Schmitt CA, Fridman JS, Yang M, et al. A senescence program controlled by p53 and p16INK4a contributes to the outcome of cancer therapy. *Cell*, 2002, 109: 335-46

- [71] Farh KK, Marson A, Zhu J, et al. Genetic and epigenetic fine-mapping of causal autoimmune disease variants. *Nature*, 2014, 518: 337-43
- [72] Zhu S, Wei L, Liu J, et al. Genome-scale deletion screening of human long non-coding RNAs using a paired-guide RNA CRISPR library. *Nat Biotechnol*, 2016, 34: 1279-86
- [73] Dixit A, Parnas O, Li B, et al. Perturb-Seq: dissecting molecular circuits with scalable single-cell RNA profiling of pooled genetic screens. *Cell*, 2016, 167: 1853-66
- [74] Jaitin DA, Weiner A, Yofe I, et al. Dissecting immune circuits by linking CRISPR-pooled screens with single-cell RNA-Seq. *Cell*, 2016, 167: 1883-96
- [75] Klein A, Mazutis L, Akartuna I, et al. Droplet barcoding for single-cell transcriptomics applied to embryonic stem cells. *Cell*, 2015, 161: 1187-21
- [76] Macosko EZ, Basu A, Satija R, et al. Highly parallel genome-wide expression profiling of individual cells using nanoliter droplets. *Cell*, 2015, 161: 1202-14
- [77] Adamson B, Norman TM, Jost M, et al. A multiplexed single-cell CRISPR screening platform enables systematic dissection of the unfolded protein response. *Cell*, 2016, 167: 1867-82
- [78] Walter P, Ron D. The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science*, 2011, 334: 1081-6
- [79] Sun X, Vilar S, Tatonetti NP. High-throughput methods for combinatorial drug discovery. *Sci Transl Med*, 2013, 5: 205rv1
- [80] Han K, Jeng EE, Hess GT, et al. Synergistic drug combinations for cancer identified in a CRISPR screen for pairwise genetic interactions. *Nat Biotechnol*, 2017, 35: 463-74
- [81] Yilmaz A, Peretz M, Aharony A, et al. Defining essential genes for human pluripotent stem cells by CRISPR-Cas9 screening in haploid cells. *Nat Cell Biol*, 2018, 20: 610-9
- [82] Wang C, Najm R, Xu Q, et al. Gain of toxic apolipoprotein E4 effects in human iPSC-derived neurons is ameliorated by a small-molecule structure corrector. *Nat Med*, 2018, 24: 647-57
- [83] Panopoulos AD, D'Antonio M, Benaglio P, et al. iPSCORE: a resource of 222 iPSC lines enabling functional characterization of genetic variation across a variety of cell types. *Stem Cell Rep*, 2017, 8: 1086-100
- [84] Lópezotín C, Blasco MA, Partridge L, et al. The hallmarks of aging. *Cell*, 2013, 153: 1194-217
- [85] Zhang W, Li J, Suzuki K, et al. A Werner syndrome stem cell model unveils heterochromatin alterations as a driver of human aging. *Science*, 2015, 348: 1160-3
- [86] Pan H, Di G, Liu X, et al. SIRT6 safeguards human mesenchymal stem cells from oxidative stress by coactivating NRF2. *Cell Res*, 2016, 26: 190-205