

基于 CRISPR-Cas9 技术的基因治疗研究进展

詹长生, 夏小雨

上海交通大学 医学院, 上海 200025

詹长生, 夏小雨. 基于 CRISPR-Cas9 技术的基因治疗研究进展. 生物工程学报, 2016, 32(7): 861–869.

Zhan CS, Xia XY. Research progress of CRISPR-Cas9 system for gene therapy. Chin J Biotech, 2016, 32(7): 861–869.

摘 要: CRISPR-Cas9 系统是细菌在与噬菌体抗争的进化过程中产生的一种抵御外源 DNA 入侵的机制, 能有效识别并剪切外源 DNA。基于其识别切除外源 DNA 的原理, CRISPR-Cas9 系统被开发成为新一代基因编辑工具。与 ES 打靶、ZFN、TALEN 等技术途径相比, CRISPR-Cas9 系统操作简便、效率高、成本低, 有着极其广阔的应用前景。本文整理了近年内有关 CRISPR-Cas9 系统的最新文献报道, 对该系统工作原理以及针对基因治疗的研究进展进行综述。

关键词: CRISPR-Cas9 技术, 基因编辑, 疾病模型, 基因治疗, 个性化医疗

Research progress of CRISPR-Cas9 system for gene therapy

Changsheng Zhan, and Xiaoyu Xia

School of Medicine, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200025, China

Abstract: The clustered regulatory interspaced short palindromic repeat-Cas9 (CRISPR-Cas9) system is the part of the prokaryotic immune system, which could recognize and delete the exogenous sequences originated from virus or plasmid. Based on its mechanism, CRISPR-Cas9 system was developed into the new generation of gene editing tool. Compared to the existed technologies such as ES targeting, ZFN or TALEN, CRISPR-Cas9 system is a more efficient, economical and promising approach to manipulate the genome. In this review, we summarize the research progress about CRISPR-Cas9 technology, especially the latest applications in gene therapy studies of human diseases.

Keywords: CRISPR-Cas9 technology, gene editing, disease model, gene therapy, personalized medicine

Received: December 22, 2015; **Accepted:** March 3, 2016

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 81501308), Shanghai Municipal Bureau of Health (No. 20134Y169).

Corresponding author: Xiaoyu Xia. Tel: +86-21-63846590-776692; E-mail: zpxiaxy@shsmu.edu.cn

国家自然科学基金 (No. 81501308), 上海市卫生局科研项目 (No. 20134Y169) 资助。

网络出版时间: 2016-04-14

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20160414.1436.001.html>

经典的基因打靶技术是基于 DNA 同源重组原理, 用设计的同源基因片段替代靶基因片段^[1], 但是这种打靶技术在体细胞中的成功率极低^[2]。之后发展出的 ZFN (Zinc finger nucleases)、TALEN (Transcription activator-like effector nucleases) 等技术, 是基于 DNA 双链断裂 (Double strand broken, DSB) 修复的非同源末端连接机制 (Non homologous end-joining, NHEJ), 通过蛋白-DNA 相互作用识别特定 DNA 序列, 在修复过程中引入外源 DNA 从而引起移码突变^[3], 但是此类技术的局限性在于构建融合蛋白的工作量大、成本高^[4]。2013 年, *Cell*、*Science*、*Nature Biotechnology* 等杂志几乎同时报道了一种新型的基因组编辑手段——CRISPR-Cas9 技术 (Clustered regularly interspaced short palindromic repeats—CRISPR associated system)。与传统的基因编辑技术相比, 该系统具有良好的靶向性、构建简单、可同时操作多条基因等优点。自该技术问世以后, 迅速成为生物学领域的前沿热点, 并引发新一轮的基因治疗研究热潮。本文整理了最新文献报道, 从 CRISPR-Cas9 的技术原理与研究进展、用于基因治疗的可行性等多个方面进行综述。

1 CRISPR-Cas9 系统工作原理

1.1 CRISPR-Cas 系统基本原理

在很多细菌中, CRISPR 系统作为获得性免疫系统对抗外源病毒或质粒 DNA 的入侵^[5-6], 其序列由 CRISPR 序列和 CRISPR 相关蛋白 (CRISPR-associated system, Cas) 的编码基因组成^[7]。其中, Cas 基因在 CRISPR 序列的上游, 表达产物为核酸酶、聚合酶、解旋酶等^[5]。

CRISPR 序列由前导区 (Leader)、重复序列区 (Repeat) 和间区 (Spacer) 组成^[6]。前导区被认为是 CRISPR 序列的启动子; 重复序列区是由 21–48 bp 的高度保守的重复序列组成, 相邻重复序列之间由间区分隔开; 间区长度 26–72 bp, 可能是来自进化过程中所俘获的外源入侵 DNA 片段^[6,8]。CRISPR 序列的转录加工产物称为 crRNA, 它与另一种非编码的反式激活 CRISPR RNA (Trans-activating CRISPR RNA, tracrRNA) 通过碱基配对形成双链 RNA 结构, 并进一步与 Cas 蛋白结合形成靶向切割复合体, 对外源 DNA 进行特异性识别和切割^[9]。需要指出的是, 在间区形成过程中, 对外源 DNA 片段的捕获并非随机进行, 在被捕获序列的下游常有一段序列保守的特殊结构, 被称为“前间区邻近基序” (Proto-spacer adjacent motifs, PAM)。PAM 位点的存在可能是 CRISPR 系统区分自身 DNA 与外源 DNA、避免发生自身免疫的机制之一^[10]。而对于 CRISPR-Cas 复合体来说, PAM 位于与 crRNA 互补识别的靶基因片段的上游。有研究指出, CRISPR-Cas 系统介导的切割功能并不受 DNA 位点甲基化的影响^[11]。

目前, 从化脓性链球菌中发展出来的 II 型 CRISPR 系统应用最为广泛, 因为其系统组分最为简单, 切割 DNA 双链仅需 Cas9 这一种蛋白。CRISPR-Cas9 系统的一大改进是, 将 crRNA: tracrRNA 所组成的双链 RNA 结构改造成为发夹样的单链导向 RNA (Single-guide RNA, sgRNA/gRNA)。其中, gRNA 5'端的前 20 个核苷酸相当于 crRNA 序列, 可以与靶基因片段互补结合, gRNA 同样能够指导 Cas9 蛋白特异切割双链 DNA, 进一步简化了 CRISPR-Cas9 系统的操作环节^[12]。在 Cas9 蛋白切割所造成的 DSB

修复的过程中,即可以引入新的基因突变^[13]。更重要的是,CRISPR-Cas9 系统可以同时多条基因进行操作^[14]。目前,CRISPR-Cas9 系统已成功应用于包括灵长类在内的许多物种,例如细菌、酵母、烟草、拟南芥、高粱、水稻、线虫、果蝇、斑马鱼、非洲爪蟾、小鼠、大鼠、家兔、猪、食蟹猴等,以及包括肿瘤细胞系和多能干细胞系在内的各种人类细胞^[15]。

1.2 CRISPR-Cas9 系统研究进展

CRISPR-Cas9 系统应用的最大瓶颈在于其脱靶 (off-target) 效应,影响脱靶效应的主要因素有 PAM 的碱基组成^[16]、gRNA 的长度^[17]、细胞类型^[18]等。针对脱靶效应,许多研究组提出了各自的改进方案。例如,Cho 等在设计的 gRNA 的 5'端额外增加两个鸟嘌呤核苷酸,可以显著提高 CRISPR-Cas9 系统的特异性^[19]。Ran 等所建立的双切口策略 (Double-nicking strategy) 从改造 Cas9 蛋白入手,所得到的突变性 Cas9n 只能切割 DNA 单链,只有在成对尾端配对的 gRNA 的指导下,才会将靶位点切割为 DNA 双链断裂,而其余脱靶位点处只能造成单链缺口,无法形成 DSB 引入突变^[20]。Tsai 等和 Guilinger 等所开发的 fCas9 系统 (Fok I -dCas9) 将 Cas9 改造失去催化活性,然后将改造后的 dCas9 与 Fok I 核酸酶形成融合蛋白 (Fok I -dCas9),Fok I 核酸酶以二聚体形式发挥酶切作用,只有在成对 gRNA 的指引下,两个 Fok I -dCas9 融合蛋白单体彼此靠近形成二聚体时才会发生 DNA 双链断裂^[21-22]。

还有一些研究组致力于提高 CRISPR-Cas9 系统的效率,或者开发 CRISPR-Cas9 系统的其它用途。目前,对人类端粒酶逆转录酶基因

(Telomerase reverse transcriptase, TERT) 的编辑效率很低,Xi 等开发了一种“pop-in/pop out”两步法 CRISPR-Cas9 技术,可以单碱基为单位精确的编辑 TERT 基因位点,此项研究提供了一种将 CRISPR-Cas9 技术应用于低靶向效率的基因位点的新方法^[23]。Arbab 等发展出一种新技术——自我克隆性 CRISPR-Cas9 系统 (Self-cloning CRISPR-Cas9, scCRISPR),利用 scCRISPR 技术,可以在短短几个小时内完成对基因组靶位点的突变编辑或转基因敲入,scCRISPR 系统的突变效率高达 88%,而费用降低至原来的 1/6,大大拓展了 CRISPR-Cas9 技术的应用前景^[24]。Kleinstiver 等基于生物信息学设计改造编码 Cas9 蛋白的基因,从而巧妙调控其对 PAM 序列的识别,使 CRISPR-Cas9 系统可以应用于更多的物种甚至特定细胞类型,并进一步降低脱靶效应^[25]。Friedland 等鉴定、开发了金黄色葡萄球菌中的 *S. aureus* Cas9 蛋白,与源自链球菌的 *S. pyogenes* Cas9 蛋白不同,*S. aureus* Cas9 蛋白可以识别额外的 PAM 序列,并且因其编码序列简短,可与多条 gRNA 一同包装在单个腺病毒相关病毒 (Adeno-associated virus, AAV) 载体中,简化了 CRISPR-Cas9 系统的操作^[26]。最近,Richardson 等深入研究了 Cas9 蛋白与 DNA 靶片段之间的相互作用,他们发现,切割完成后,Cas9 蛋白大约经过 6 h 方从 DNA 靶片段上解离,而这一渐进过程首先会释放出切口处的 3'末端,因此,他们针对这一现象开发了可以进行同源重组修复 (Homology-directed repair, HDR) 的工具系统;此外,甚至在切割并未发生的情况下,Cas9 蛋白的结合也可以引发特定位点的同源重组修复,这一有趣的发现拓展了

我们对基因组行为的认识^[27]。

除了基因组编辑, CRISPR-Cas9 系统还可以用于调控转录。其大致原理是, 构建核酸酶活性缺陷的 Cas9 基因 (dCas9), 再将其与一个转录抑制或者转录激活调节的结构域融合表达, 表达的融合蛋白可以在 gRNA 的引导下特异性识别和结合靶基因的启动子区域, 并招募相关转录因子, 从而抑制或激活靶基因的表达, 这种技术手段称为 CRISPRi (CRISPR interference)^[28-29], 或者 CRISPR-ON 系统^[30], 同样可以同时操作一条以上的基因。一方面, 这一操作并不涉及基因序列的改变; 另一方面, 与 RNAi 技术相比, CRISPR 系统作用于转录阶段, 因此调控基因表达的效率更高。

2 CRISPR-Cas9 技术应用于基因治疗的研究思路

CRISPR-Cas9 提供了一种简便、高效、多样化的基因组编辑方式, 在基因功能研究、动植物育种等方面都有着广阔的应用前景。而其中最具有吸引力的, 当属对人类疾病基因治疗的研究, 包括高通量筛选致病基因、致病基因功能研究、构建疾病的细胞/动物模型、基因治疗遗传性疾病与病毒感染性疾病等。在下文中, 我们将对 CRISPR-Cas9 技术应用于基因治疗的研究思路进行归纳。

2.1 CRISPR-Cas9 技术在治疗遗传性疾病方面的应用

目前, 已有 CRISPR-Cas9 技术应用于地中海贫血^[31-32]、镰状细胞性贫血^[33]、杜氏肌营养不良^[34-35]、*Crygc* 基因突变引发的白内障^[36-37]、囊性纤维化^[38]、 α 1-抗胰蛋白酶缺乏症^[39]、遗传酪

氨酸血症 I 型^[40]等遗传性疾病的研究报道。在动物水平的研究中, 研究者们可以通过 CRISPR-Cas9 技术编辑合子或早期胚胎中的基因组, 构建基因修饰的新个体^[36]; 或者改造生殖干细胞中的基因组, 从而稳定遗传至子代^[34,37]。然而, 上述策略如果应用于人类, 势必会引发伦理争议。CRISPR-Cas9 技术未来的临床应用, 更有可能是与人类诱导多能干细胞技术 (Human induced pluripotent stem cell, hiPSC) 相结合^[31-32,35], 采用基于患者定制的个性化治疗方案。

目前, 人类诱导多能干细胞的建系技术已相当成熟, 制约其应用的主要因素在于定向诱导分化步骤。其中, 向造血系细胞分化的研究最为深入, 技术平台相对稳定。因此, 以 hiPSC 为材料, CRISPR-Cas9 技术应用于遗传性疾病的研究也是从血液类疾病开始的。Song 等报道了通过 CRISPR-Cas9 技术治疗 β -地中海贫血 (Beta-thalassemia, β -Thal), 首先将患者来源的皮肤细胞诱导分化为诱导性多功能干细胞 (β -Thal-iPSCs), 再用 CRISPR-Cas9 技术修复血红蛋白 β -球蛋白 (Hemoglobin beta, HBB) 基因。结果显示, 基因修正后的细胞核型正常, 在向造血细胞分化的过程中, 可以高比例的生成各类造血祖细胞, 并表达正常的 β -球蛋白^[31]。而在另一项研究中, Huang 等用 CRISPR-Cas9 系统对镰状细胞性贫血 (Sickle-cell anemia) 患者的 iPSCs 细胞进行基因编辑, 基因修正后的 iPSCs 可以成功地分化至网织红细胞阶段, 并表达正常的 β -球蛋白^[33]。

而对于血液系统之外的其他器官系统, 在受累于基因突变所引发的疾病时, 可以将 CRISPR-Cas9 技术应用于改造成体组织干细胞、

或者具有增殖活性的细胞,从而达到功能上的部分或全部的修复,这是基因治疗的另一种可行途径。例如,杜氏肌营养不良综合征(Duchenne muscular dystrophy, DMD)源于 *DMD* 基因的突变,突变使肌细胞中的抗肌萎缩蛋白(Dystrophin)表达缺失。目前已有多项研究报道将 CRISPR-Cas9 技术应用于 DMD 的治疗。例如,在 Ousterout 等的研究中,他们通过 CRISPR-Cas9 技术成功地纠正了 DMD 患者成肌细胞(Myoblast)中的 *DMD* 基因突变,基因编辑后的成肌细胞可以在体外及体内条件下表达正常的抗肌萎缩蛋白^[41]。

更进一步的,Long 等利用腺病毒相关病毒(AAV9)在新生 DMD 小鼠模型的心肌或骨骼肌细胞中特异性表达 CRISPR-Cas9 系统组分,从而成功阻断了 DMD 的进展^[42]。这项研究成果证明,如果侧重于功能重建而非基因纠正,CRISPR-Cas9 系统同样可以应用于特定的分化终末的体细胞类型,从而大大拓展了该系统的临床应用前景。或许在不久的将来,CRISPR-Cas9 技术就能用于重建 DMD 病人的肌肉功能,改善很大一部分病人的生存状况。

2.2 CRISPR-Cas9 技术在癌症研究方面的应用

对于致病基因已知(或部分已知)的癌症,可以运用 CRISPR-Cas9 技术构建相应的基因突变的细胞或动物水平模型,以便进行癌症进展机制、治疗手段及效果方面的研究^[43-44]。例如,在一项对肺腺癌的研究中,Platt 等采用 CRISPR-Cas9 系统分别构建了 *Kras*、*p53*、*Lkb1* 基因突变的小鼠模型,模型鼠发展出了肉眼可见的肺腺癌病理表征^[45]。这项研究支持了 *Kras*、

p53、*Lkb1* 基因在肺腺癌发生发展中的重要作用。

而对于致病机制尚不清楚的癌症类型,则可以通过 CRISPR-Cas9 技术研究特定基因在疾病进程中的作用,明确新的原癌基因或抑癌基因。例如,骨肉瘤是骨骼系统最恶性也最常见的肿瘤之一,目前,对于转移性骨肉瘤和复发性骨肉瘤缺乏理想的治疗手段。有研究认为,*CDK11* 基因产物对于骨肉瘤细胞的生存是必需的。因此,Feng 等利用 CRISPR-Cas9 系统对骨肉瘤细胞系 KHOS 和 U-2OS 中的 *CDK11* 基因进行了有效地沉默。结果发现,*CDK11* 基因沉默的骨肉瘤细胞生存和增殖能力都显著减弱,迁移性和侵袭性均显著降低^[46]。类似的,Kawamura 等通过 CRISPR-Cas9 技术突变了前列腺癌细胞系 DU145 中的 *NANOG* 和 *NANOG8* 基因,结果发现,突变后的细胞系成瘤性大大降低,表明 *NANOG/NANOG8* 基因在前列腺癌发生中具有重要作用^[47]。上述两项研究也为骨肉瘤及前列腺癌治疗提供了新的分子靶标。

2.3 CRISPR-Cas9 技术在治疗病毒感染性疾病方面的应用

对于病毒感染性疾病,其基因治疗大致可分为两种思路:或者改造病毒宿主细胞使其免于感染;或者靶向病毒使其不能完成复制和传播。以 HIV 病毒所致 AIDS 的研究为例,HIV 感染 CD34⁺ 的淋巴细胞需要通过表面受体 CCR5 (Chemokine (C-C motif) receptor 5) 或 CXCR4 (Chemokine (C-X-C motif) receptor 4) 的介导。因此,可以将 HIV 感染者的骨髓干细胞分离出来,通过 CRISPR-Cas9 技术在体外将骨髓干细胞的 *CCR5* 或 *CXCR4* 受体基因失活,再将受体基因失活后的骨髓干细胞回输给该患

者,重建其免疫功能^[48]。例如,有研究显示,*CCR5* 基因发生 32 bp 的删除 (*CCR5*Δ32) 可导致细胞对 HIV-1 感染的抗性。Ye 等用 CRISPR-Cas9 技术对正常 hiPSCs 进行了 *CCR5*Δ32 突变,结果显示,33%的细胞发生了双等位基因的定向突变,在将突变后的 hiPSCs 诱导分化为单核/巨噬细胞后,这些细胞显示出对 HIV 感染的抗性^[49]。这项研究提供了一种可行的抗 HIV-1 感染的基因治疗方案。

在靶向病毒 DNA、使其失去原致病力的思路下,Hu 等利用 CRISPR/Cas9 技术构建靶向 HIV-1 的 *LTR U3* 区的 gRNA,该 gRNA 可以引导 Cas9 核酸酶识别并切除已经整合到 HIV-1 感染者基因组中的病毒前基因组 DNA,从而成功地抑制了 HIV-1 病毒在小神经胶质细胞、幼单核细胞和 T 淋巴细胞中的扩增^[50]。

同样的,对 EB 病毒、人类乳头瘤病毒 (HPV) 等病毒感染所致疾病的基因治疗也不断取得新进展。例如,EB 病毒感染可致伯奇氏淋巴瘤 (Burkitt's lymphoma),Wang 等用 CRISPR-Cas9 技术对伯奇氏淋巴瘤细胞株中的 EB 病毒基因组进行靶向编辑,可使细胞增殖阻滞、病毒载量大大降低^[51]。HPV 与宫颈癌的相关性早已成为共识,Zhen 等用 CRISPR-Cas9 系统靶向高致癌性的 HPV-16 病毒的 E6/E7 启动子区,显著抑制了 HPV-16 阳性的宫颈癌 SiHa 细胞系的增殖与成瘤能力^[52]。在针对病毒设计基因编辑的靶标时,应选取与人类基因组同源性低的片段,从而减少脱靶突变的机率。

采取类似思路,已有多个研究组在乙型肝炎病毒 (HBV) 感染的细胞系中靶向切割 HBV 的共价闭合环状 DNA (cccDNA),成功地抑制了

HBV 在细胞内的复制^[53]。鉴于目前中国仍有大量的乙肝病毒携带者,乙肝的传播流行仍旧是中国公共卫生管理中的严峻挑战,CRISPR-Cas9 技术的发展给以乙肝为代表的病毒感染性疾病的治疗带来了新的机遇。

2.4 CRISPR-Cas9 技术的其他应用

PCSK9 (Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9) 是一种肝脏细胞表达的蛋白质,作为低密度脂蛋白受体 (Low density lipoprotein receptor, LDLR) 拮抗物,其过表达可引起高胆固醇血症,并促进动脉粥样硬化的发生。有临床研究发现,对于 PCSK9 蛋白功能性突变的个体,其血液中低密度脂蛋白水平比正常人群低 30%–80%,成为此类个体免患心血管疾病的保护性因素。受此启发,Ding 等用 CRISPR-Cas9 系统定向突变小鼠肝脏细胞中的 *Pcsk 9* 基因,结果发现,突变小鼠血浆中的胆固醇水平降低了 35%–40%^[54]。这项研究结果提示,CRISPR-Cas9 技术不仅可以应用于疾病的治疗,还可以应用于“治未病”,即疾病的预防。

3 CRISPR-Cas9 技术应用前景

CRISPR-Cas9 技术在基因编辑方面有着巨大的潜力。但是,在其用于临床之前,必须确保 CRISPR-Cas9 作用的位点特异性和高效性,因此需要慎重的选择靶标位点、并在全基因组中搜索可能的脱靶位点,在此基础上对 gRNA 进行精妙设计。

此外,对人类胚胎基因组的编辑引发了广泛的伦理讨论^[55-56],美国国立卫生研究院 (NIH) 重申了其关于涉及人类胚胎基因编辑研究的禁令。因此,怎样回避胚胎或生殖细胞操作,而

将 CRISPR-Cas9 系统成功高效地运用于在体条件下的各种体细胞类型, 将是这一领域的集中发展方向。

CRISPR-Cas9 技术无疑是生命科学研究领域中的里程碑事件, 正经历着日新月异的飞速发展。相信随着此技术自身的不断完善、以及相关法律法规的制定实施, CRISPR-Cas9 技术必将在物种基因改造与人类疾病基因治疗中发挥巨大作用。

REFERENCES

- [1] Vasquez KM, Marburger K, Intody Z, et al. Manipulating the mammalian genome by homologous recombination. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(15): 8403–8410.
- [2] Iizumi S, Kurosawa A, So S, et al. Impact of non-homologous end-joining deficiency on random and targeted DNA integration: implications for gene targeting. *Nucleic Acids Res*, 2008, 36(19): 6333–6342.
- [3] Weterings E, Chen DJ. The endless tale of non-homologous end-joining. *Cell Res*, 2008, 18(1): 114–124.
- [4] Wood AJ, Lo TW, Zeitler B, et al. Targeted genome editing across species using ZFNs and TALENs. *Science*, 2011, 333(6040): 307.
- [5] Wiedenheft B. In defense of phage: viral suppressors of CRISPR-mediated adaptive immunity in bacteria. *RNA Biol*, 2013, 10(5): 886–890.
- [6] Haft DH, Selengut J, Mongodin EF, et al. A guild of 45 CRISPR-associated (Cas) protein families and multiple CRISPR/Cas subtypes exist in prokaryotic genomes. *PLoS Comput Biol*, 2005, 1(6): e60.
- [7] Grissa I, Vergnaud G, Pourcel C. The CRISPRdb database and tools to display CRISPRs and to generate dictionaries of spacers and repeats. *BMC Bioinform*, 2007, 8(1): 172.
- [8] Karginov FV, Hannon GJ. The CRISPR system: small RNA-guided defense in bacteria and archaea. *Mol Cell*, 2010, 37(1): 7–19.
- [9] 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): 602–607.
- [10] Mojica FJ, Díez-Villaseñor C, García-Martínez J, et al. Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system. *Microbiology*, 2009, 155(Pt 3): 733–740.
- [11] Hsu PD, Scott DA, Weinstein JA, et al. DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(9): 827–832.
- [12] Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 2012, 337(6096): 816–821.
- [13] Li W, Teng F, Li TD, et al. Simultaneous generation and germline transmission of multiple gene mutations in rat using CRISPR-Cas systems. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(8): 684–686.
- [14] Wang HY, 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): 910–918.
- [15] Mali P, Yang LH, Esvelt KM, et al. RNA-guided human genome engineering *via* Cas9. *Science*, 2013, 339(6121): 823–826.
- [16] Sternberg SH, Redding S, Jinek M, et al. DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9. *Nature*, 2014, 507(7490): 62–67.
- [17] Fu YF, Sander JD, Reyon D, et al. Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs. *Nat Biotechnol*, 2014, 32(3): 279–284.
- [18] Duan JZ, Lu GQ, Xie Z, et al. Genome-wide identification of CRISPR/Cas9 off-targets in human genome. *Cell Res*, 2014, 24(8): 1009–1012.
- [19] Cho SW, Kim S, Kim Y, et al. Analysis of off-target effects of CRISPR/Cas-derived RNA-guided endonucleases and nickases. *Genome Res*, 2014, 24(1): 132–141.
- [20] Ran FA, Hsu PD, Lin CY, et al. Double nicking by

- RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell*, 2013, 154(6): 1380–1389.
- [21] Tsai SQ, Wyvekens N, Khayter C, et al. Dimeric CRISPR RNA-guided FokI nucleases for highly specific genome editing. *Nat Biotechnol*, 2014, 32(6): 569–576.
- [22] Guilinger JP, Thompson DB, Liu DR. Fusion of catalytically inactive Cas9 to FokI nuclease improves the specificity of genome modification. *Nat Biotechnol*, 2014, 32(6): 577–582.
- [23] Xi LH, Schmidt JC, Zaug AJ, et al. A novel two-step genome editing strategy with CRISPR-Cas9 provides new insights into telomerase action and *TERT* gene expression. *Genome Biol*, 2015, 16: 231.
- [24] Arbab M, Srinivasan S, Hashimoto T, et al. Cloning-free CRISPR. *Stem Cell Rep*, 2015, 5(5): 908–917.
- [25] Kleinstiver BP, Prew MS, Tsai SQ, et al. Engineered CRISPR-Cas9 nucleases with altered PAM specificities. *Nature*, 2015, 523(7561): 481–485.
- [26] Friedland AE, Baral R, Singhal P, et al. Characterization of *Staphylococcus aureus* Cas9: a smaller Cas9 for all-in-one adeno-associated virus delivery and paired nickase applications. *Genome Biol*, 2015, 16: 257.
- [27] Richardson CD, Ray GJ, DeWitt MA, et al. Enhancing homology-directed genome editing by catalytically active and inactive CRISPR-Cas9 using asymmetric donor DNA. *Nat Biotechnol*, 2016, 34(3): 339–344.
- [28] 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(5): 1173–1183.
- [29] Gilbert LA, Larson MH, Morsut L, et al. CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes. *Cell*, 2013, 154(2): 442–451.
- [30] Cheng AW, Wang HY, Yang H, et al. Multiplexed activation of endogenous genes by CRISPR-on, an RNA-guided transcriptional activator system. *Cell Res*, 2013, 23(10): 1163–1171.
- [31] Song B, Fan Y, He WY, et al. Improved hematopoietic differentiation efficiency of gene-corrected beta-thalassemia induced pluripotent stem cells by CRISPR/Cas9 system. *Stem Cells Dev*, 2015, 24(9): 1053–1065.
- [32] Xie F, Ye L, Chang JC, et al. Seamless gene correction of β -thalassemia mutations in patient-specific iPSCs using CRISPR/Cas9 and *piggyBac*. *Genome Res*, 2014, 24(9): 1526–1533.
- [33] Huang X, Wang Y, Yan W, et al. Production of gene-corrected adult beta globin protein in human erythrocytes differentiated from patient iPSCs after genome editing of the sickle point mutation. *Stem Cells*, 2015, 33(5): 1470–1479.
- [34] Long CZ, McAnally JR, Shelton JM, et al. Prevention of muscular dystrophy in mice by CRISPR/Cas9-mediated editing of germline DNA. *Science*, 2014, 345(6201): 1184–1188.
- [35] Li HL, Fujimoto N, Sasakawa N, et al. Precise correction of the dystrophin gene in duchenne muscular dystrophy patient induced pluripotent stem cells by TALEN and CRISPR-Cas9. *Stem Cell Rep*, 2015, 4(1): 143–154.
- [36] Wu YX, Liang D, Wang YH, et al. Correction of a genetic disease in mouse *via* use of CRISPR-Cas9. *Cell Stem Cell*, 2013, 13(6): 659–662.
- [37] Wu YX, Zhou H, Fan XY, et al. Correction of a genetic disease by CRISPR-Cas9-mediated gene editing in mouse spermatogonial stem cells. *Cell Res*, 2015, 25(1): 67–79.
- [38] Schwank G, Koo BK, Sasselli V, et al. Functional repair of CFTR by CRISPR/Cas9 in intestinal stem cell organoids of cystic fibrosis patients. *Cell Stem Cell*, 2013, 13(6): 653–658.
- [39] Smith C, Abalde-Atristain L, He CX, et al. Efficient and allele-specific genome editing of disease loci in human iPSCs. *Mol Ther*, 2015, 23(3): 570–577.
- [40] Yin H, Xue W, Chen SD, et al. Genome editing with Cas9 in adult mice corrects a disease mutation and phenotype. *Nat Biotechnol*, 2014, 32(6): 551–553.
- [41] Ousterout DG, Kabadi AM, Thakore PI, et al. Multiplex CRISPR/Cas9-based genome editing for correction of dystrophin mutations that cause

- Duchenne muscular dystrophy. *Nat Commun*, 2015, 6: 6244.
- [42] Long CZ, Amoasii L, Mireault AA, et al. Postnatal genome editing partially restores dystrophin expression in a mouse model of muscular dystrophy. *Science*, 2016, 351(6271): 400–403.
- [43] Sánchez-Rivera FJ, Jacks T. Applications of the CRISPR-Cas9 system in cancer biology. *Nat Rev Cancer*, 2015, 15(7): 387–395.
- [44] Sachdeva M, Sachdeva N, Pal M, et al. CRISPR/Cas9: molecular tool for gene therapy to target genome and epigenome in the treatment of lung cancer. *Cancer Gene Ther*, 2015, 22(11): 509–517.
- [45] Platt RJ, Chen SD, Zhou Y, et al. CRISPR-Cas9 knockin mice for genome editing and cancer modeling. *Cell*, 2014, 159(2): 440–455.
- [46] Feng Y, Sassi S, Shen JK, et al. Targeting CDK11 in osteosarcoma cells using the CRISPR-cas9 system. *J Orthop Res*, 2015, 33(2): 199–207.
- [47] Kawamura N, Nimura K, Nagano H, et al. CRISPR/Cas9-mediated gene knockout of NANOG and NANOGP8 decreases the malignant potential of prostate cancer cells. *Oncotarget*, 2015, 6(26): 22361–22374.
- [48] Manjunath N, Yi GH, Dang Y, et al. Newer gene editing technologies toward HIV gene therapy. *Viruses*, 2013, 5(11): 2748–2766.
- [49] Ye L, Wang JM, Beyer AI, et al. Seamless modification of wild-type induced pluripotent stem cells to the natural CCR5Δ32 mutation confers resistance to HIV infection. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111(26): 9591–9596.
- [50] Hu WH, Kaminski R, Yang F, et al. RNA-directed gene editing specifically eradicates latent and prevents new HIV-1 infection. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111(31): 11461–11466.
- [51] Wang JB, Quake SR. RNA-guided endonuclease provides a therapeutic strategy to cure latent herpesviridae infection. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111(36): 13157–13162.
- [52] Zhen S, Hua L, Takahashi Y, et al. *In vitro* and *in vivo* growth suppression of human papillomavirus 16-positive cervical cancer cells by CRISPR/Cas9. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 450(4): 1422–1426.
- [53] Dong CS, Qu L, Wang HY, et al. Targeting hepatitis B virus cccDNA by CRISPR/Cas9 nuclease efficiently inhibits viral replication. *Antiviral Res*, 2015, 118: 110–117.
- [54] Ding Q, Strong A, Patel KM, et al. Permanent alteration of PCSK9 with *in vivo* CRISPR-Cas9 genome editing. *Circ Res*, 2014, 115(5): 488–492.
- [55] Liang PP, Xu YW, Zhang XY, et al. CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human tripronuclear zygotes. *Protein Cell*, 2015, 6(5): 363–372.
- [56] Lanphier E, Urnov F, Haecker SE, et al. Don't edit the human germ line. *Nature*, 2015, 519(7544): 410–411.

(本文责编 郝丽芳)