

• 综述 •

## CRISPR-Cas9 基因编辑技术在秀丽线虫中的应用

孟曦男, 周恒达, 徐素宏

浙江大学医学院 基础医学院, 浙江 杭州 310058

孟曦男, 周恒达, 徐素宏. CRISPR-Cas9 基因编辑技术在秀丽线虫中的应用. 生物工程学报, 2017, 33(10): 1693-1699.  
Meng XN, Zhou HD, Xu SH. CRISPR-Cas9 mediated genome editing in *Caenorhabditis elegans*. Chin J Biotech, 2017, 33(10): 1693-1699.

**摘要:** 基于细菌基因组规律成簇的间隔短回文重复 (Clustered regularly interspaced short palindromic repeats) 发展而来的新型基因编辑方法 (CRISPR-Cas9) 对生物医学研究是一场划时代的革命。它几乎可用于大多数生物体的基因编辑。秀丽线虫是一种非常经典的遗传学模式生物, CRISPR-Cas9 基因编辑技术进一步加速了对其基因功能及各种生物学问题的研究。文中主要总结 CRISPR-Cas9 基因编辑系统在遗传学模式生物秀丽线虫中的发展和应用。

**关键词:** 基因编辑, CRISPR-Cas9, 非同源末端连接, 同源重组, 遗传筛选, 组织特异性

## CRISPR-Cas9 mediated genome editing in *Caenorhabditis elegans*

Xi'nan Meng, Hengda Zhou, and Suhong Xu

School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310058, Zhejiang, China

**Abstract:** The development of genome editing techniques based on CRISPR (Clustered regularly interspaced short palindromic repeats)-Cas9 system has revolutionized biomedical researches. It can be utilized to edit genome sequence in almost any organisms including *Caenorhabditis elegans*, one of the most convenient and classic genetic model animals. The application of CRISPR-Cas9 mediated genome editing in *C. elegans* promotes the functional analysis of gene and proteins under many physiological conditions. In this mini-review, we summarized the development of CRISPR-Cas9-based genome editing in *C. elegans*.

**Keywords:** genome editing, CRISPR-Cas9, NHEJ, homology recombination, genetic screening, tissue specific

生物学研究的一个重要目标是精确剖析基因在生物体生长发育和疾病中的功能。常用的技术手段是改变基因的表达以观察其对生物体的影响, 并进一步研究其发挥作用的分子细胞学机

**Received:** May 2, 2017; **Accepted:** July 31, 2017

**Supported by:** National Key R & D Projects of China (No. 2016YFC1100204), the Junior Thousand Talents Program of China.

**Corresponding author:** Suhong Xu. Tel: +86-571-88981770; E-mail: shxu@zju.edu.cn

国家重点研发计划 (No. 2016YFC1100204), 青年千人计划资助。

制。几十年来,多种技术手段被用于制造基因功能缺失,例如基因敲降技术 RNAi,基因敲除技术(包括时空特异性和组织特异性敲除),以及多种化学诱变剂诱导基因突变的手段等。这些技术构成了正向遗传和反向遗传学解决生物学问题的基础。另一种研究基因功能的方法是观察基因表达产物蛋白质在细胞内的动态运动,例如利用抗体染色或内源性荧光蛋白标记技术。这两种研究基因功能的策略是现代生物学的常规策略,在多种模式生物中的研究取得了巨大的成功。

秀丽线虫(*Caenorhabditis elegans*,以下简称线虫)是一种经典的遗传学模式生物,具有生命周期短、基因组小、基因数目多、便于遗传操作、通体透明易于显微观察等优势,被广泛用于发育生物学和神经生物学的研究。制造线虫基因突变的方法有化学诱变剂甲磺酸乙酯(Ethyl methane sulfonate, EMS)引起的基因突变,物理辐射引起的基因突变等,以及利用转座子 Tc1 和 Mos1 插入的方法改变基因组等多种手段<sup>[1-3]</sup>。近年来,锌指核糖核酸酶(Zinc finger nucleases, ZFNs)和转录激活样效应蛋白核酸酶(Transcription activator-like effector nucleases, TALENs)也被用于改造线虫的基因组<sup>[4-5]</sup>。但由于 ZFNs 和 TALENs 前期工具质粒构建较为繁琐和昂贵,并没有在线虫中被广泛应用。自 2013 年以来,从细菌免疫现象中发现和发展的 CRISPR-Cas9 基因编辑技术由于其构造简单、易于操控和改造以及价格低廉等优势,迅速成为基因编辑领域的主要研究技术<sup>[6-7]</sup>。该方法几乎在所有模式生物中得到了广泛应用,大力推动了反向遗传学解决生物学问题的研究<sup>[8]</sup>。关于 CRISPR-Cas9 在线虫中的应用,国内外期刊已有多篇详尽的综述论

文<sup>[9-11]</sup>。此论文主要针对中文读者以及线虫领域的一线研究人员,介绍 CRISPR-Cas9 基因编辑技术在线虫中的最新发展和应用。

## 1 基因编辑的原理

基因组在进行自我复制以及遭受环境压力下均会发生突变,其中大多数情况下能得到精确修复。整条基因组双链 DNA 断裂(Double strand break, DSB)的情况下,生物体内源性的修复机制启动并修复基因组序列。目前已知存在两种机制参与修复双链 DNA 断裂<sup>[6]</sup>,一种为非同源末端连接(Non-homologous end joining, NHEJ),修复结束后可能会造成 DNA 上碱基的随机缺失和插入,引起基因开放阅读框的突变;另一种为同源序列指导修复(Homology-directed repair, HDR),即基于模板存在情况下的同源重组,可以利用外源提供的同源序列实现精确修复。无论是 ZFNs、TALENs 还是 CRISPR-Cas9 系统,都以这两种修复机制为基础实现对特定基因的靶向编辑。

## 2 CRISPR-Cas9 系统

CRISPR-Cas9 系统最先于细菌中发现,是细菌抵御外界病毒感染的一种有效方式。CRISPR 重复序列间有不同的居间序列,表达出引导 RNA,可以通过碱基互补配对的方式指导 Cas 蛋白家族(现在主要是 SpCas9)特异地在病毒的基因组上进行切割从而阻断病毒基因组的复制从而达到抑制病毒生长的目的。这一工作模式最早被 Jennifer Doudna、Emmanuelle Charpentier 和张锋等科学家设计用来人工控制特异性地切割外源和内源 DNA<sup>[12-13]</sup>。CRISPR-Cas9 系统的核心组分为识别靶向 DNA 的引导 RNA (sgRNA)

和核酸酶 Cas9。这种简易而且高效的基因编辑方法迅速成为现代生物学研究重要的工具。

CRISPR-Cas9 基因编辑手段的优点在于其设计方便,利用碱基互补配对的原则理论上可以设计出任何基因特异性的 sgRNA,结合 Cas9 对特定位点处 DNA 造成双链断裂<sup>[7]</sup>。一直以来,在线虫中,外源 DNA 可以通过显微注射的方法注射到生殖腺中获得转基因<sup>[14]</sup>,对于 CRISPR-Cas9 系统,显微注射也是最方便和快捷的方式<sup>[8]</sup>。研究人员发现,注射体外纯化的 Cas9 核酸酶或表达 Cas9 核酸酶的质粒混合 sgRNA 质粒或体外转录的 sgRNA 都可以获得相应的突变体<sup>[15-18]</sup>(图 1A),这为后期改良系统奠定了基础。在考虑到经济成本和工作量的情况下,如今大多数线虫实验室都通过直接注射编码 Cas9 和 sgRNA 的质粒的方法来改造基因组(图 1)。现今 CRISPR-Cas9 基因编辑技术一个最为关键的问题是其脱靶率较高,但是通过全基因组测序及脱靶基因预测,该编辑技术在线虫中至今鲜有脱靶现象,这可能和线虫相对简单的基因组有关<sup>[8]</sup>。

为进一步提高 CRISPR-Cas9 基因编辑的效率,减少后续突变体筛选上的工作量以及力求更经济便捷的手段,研究人员利用线虫的遗传学优势,对 CRISPR-Cas9 在线虫上的应用做了诸多改良。CRISPR-Cas9 系统原理简单,关键影响因素取决于 Cas9 蛋白、sgRNA 和模板 DNA,研究人员通过对以下 5 个方面的改良,力求更高效地获得所需要的突变体。

## 2.1 Cas9 核酸酶的优化

现在大多实验室利用的都是 CRISPR-Cas9 系统进行基因编辑。通常情况下 Cas9 特异性识别的 PAM 序列是 5'-NGG-3'序列。在基因组上,

NGG 序列出现的概率较高,但是在特定情况下,例如需要做定点突变,可能很难寻找到合适的 sgRNA。最近,Andrew Fire 实验室针对性地将 Cas9 的 PAM 识别区域进行定点突变,发现可以改变 Cas9 对 PAM 序列的识别<sup>[19]</sup>。新型的 Cas9 突变(VQR 和 VRER 突变体 Cas9)在线虫基因组上可以分别识别 PAM 序列 5'-NGA-3'和 5'-NGCG-3',为研究人员提供了更多的 Cas9 可编辑位点的选择(图 1B)<sup>[19]</sup>。

## 2.2 sgRNA 的优化

CRISPR-Cas9 基因编辑系统最为关键的是寻找到合适的 sgRNA,一方面需要 sgRNA 非常特异,另一方面需要 sgRNA 和靶向 DNA 可以稳定结合。通过对众多已发表的 sgRNA 所作用的效率进行比较,研究人员发现 3'端为 GG 的 sgRNA 的基因编辑效果显著高于 3'端非 GG 的 sgRNA,即在紧邻 PAM 序列的 5'端还存在另一 GG 序列,即 5'-GGNGG-3'类型序列<sup>[20]</sup>。实验统计数据也表明这一 sgRNA 的设计可以显著提高基因编辑的成功率<sup>[20-21]</sup>。另外 sgRNA 改良型 sgRNA (F+E),其上延伸出一段缺少 PolIII 终止子与 Cas9 的结合域,亦能提高 CRISPR-Cas9 系统基因编辑的成功率<sup>[22-23]</sup>。此外,由于生物体内大量重复基因的存在,根据 DNA 序列的保守性,单条 sgRNA 即可在线虫基因组中实现多个同源基因的编辑<sup>[24]</sup>。

## 2.3 修复模板的载体优化

在外源模板存在的情况下,断裂的双链 DNA 可以通过同源重组的方式进行精确修复。这一 DNA 修复的机制在基因编辑上得到了极大的应用,例如用荧光蛋白标记目标蛋白质以观察其在细胞内的动态变化等。线虫里可以直接注射外源质粒 DNA 作为模板,同源序列长度大于

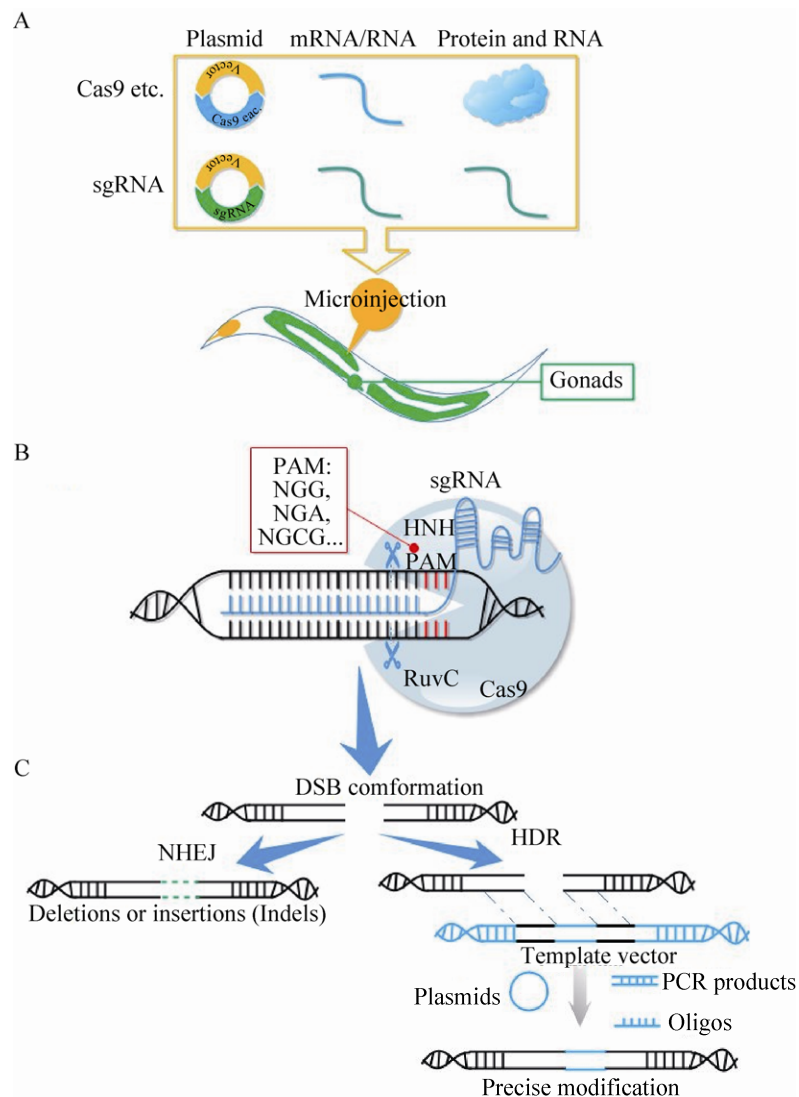


图1 CRISPR/Cas9在线虫中进行基因编辑的工作原理和流程图。(A) 共注射质粒或者mRNA或者蛋白到线虫的生殖腺中, 线虫的卵母细胞中发生CRISPR/Cas9的基因编辑。(B) Cas9核酸酶的两个活性域负责切割双链DNA, 其切割位置由PAM序列决定。一般来说, Cas9识别的PAM序列为NGG序列, 一些Cas9突变型可以识别以NGA和NGCG结尾的sgRNA。(C) DSB形成后基因组以NHEJ的方式修复发生各类突变或以寡核苷酸链、PCR产物或质粒为模板启动HDR修复进行特定转基因等编辑

Fig. 1 Diagram of the application of CRISPR-Cas9 mediated genome editing in *C. elegans*. (A) Cas9 (blue) and guided RNA (green) can be expressed in *C. elegans* germline by microinjection either the mixture of plasmids, mRNA or the combination of Cas9 protein and sgRNA mRNA. (B) Cas9 and sgRNA will be assembly as a complex at its dsDNA target site. Two nuclease domains RuvC and HNH cleave the DNA close to 5' of PAM (Red) sequence and generate DNA double-strand breaks (DSBs). Many PAM sequences have been found due to different type of Cas9 variants used. (C) The double strand break induced by the Cas9/sgRNA complex can be repaired by non-homologous end joining (NHEJ) or homology-directed repair (HDR). NHEJ can lead to the introduction of insertion/deletion mutations (indels) (green) of various lengths and HDR-mediated repair can introduce specific point mutation or insert/delete desired sequences (blue) with exogenously donor templates. In *C. elegans*, plasmid DNA, PCR products and synthesized oligos have all been used as HDR repair template.

500 bp 的质粒 DNA 都能发生有效的同源重组,但是同源重组的效率不同的基因有所不同<sup>[18]</sup>。最近的研究也发现, DNA 的 PCR 产物片段或者单链 DNA 也可以被用作同源重组的模板,并且同源臂的长度可短至 30 个核苷酸,且同源重组的效率并不受显著的影响<sup>[25-26]</sup>。由此所进行的修复模板改良,给以线虫为模型的研究人员提供了更多选择,同时节省了时间和成本,加速了实验的进程。

## 2.4 筛选手段的优化

线虫突变体传统的筛选方法是借助于表型观察和基于 PCR 方法的基因型鉴定。由于大多数基因的突变不会造成非常明显的表型,因此,PCR 鉴定成为了最重要的检测方法。为了减少 PCR 检测的工作量,利用线虫自身的遗传学优势,一些前期的筛选方法很快被改造出来,例如 co-CRISPR 和 co-Conversion 的方法<sup>[27-29]</sup>,其原理主要是筛选 Cas9 核酸酶有活性的突变体。此外,还有直接的筛选方法如药物筛选一些抗药基因,荧光观察直接插入荧光标记或缺失的基因等<sup>[18, 24]</sup>。其中药物筛选虽然有效,但也引入了更多的外源基因,为除去这些外源不必要的插入序列,一种基于 Cre/LoxP 或 Flp/FRT 重组酶系统的自我消除元件 (Self-excising cassette, SEC) 被设计出来<sup>[30]</sup>。这些筛选方法有效地减少了 PCR 筛选的工作量并提高了基因编辑的效率。

## 2.5 组织特异性敲除

基因表达的时序性和组织特异性为解析基因功能的多效性带来了很大难度,解决这一问题的方法主要是条件性突变或基因失活。目前,在线虫里已经有一些策略被用于条件性基因失活,例如基于定点重组酶系统的 Cre/LoxP 和 Flp/FRT 系统,组织、时空或温度特异性的 RNA

干扰系统和条件性 TALENs 系统等<sup>[5,18, 31-32]</sup>。这些方法极大地方便了对基因在不同组织中功能的解析,特别是对于一些早期胚胎致死基因的研究有非常大的贡献。清华大学欧光朔课题组首先利用 CRISPR-Cas9 系统开发出了更为简单而高效的条件性敲除系统。他们利用细胞和时空特异性表达的启动子表达 Cas9 核酸酶以及细胞核定位的 sgRNA,可以实现在特定细胞或特定期期敲除基因,确定其在不同生理条件下不同细胞以及不同时期的功能<sup>[11]</sup>。这一方法为研究发育过程中必需基因的功能创造了条件<sup>[33]</sup>。

## 3 总结与展望

现今主要运用于秀丽线虫中的基因编辑技术多依赖于 CRISPR 原理的 Cas 核酸酶系统,其强大的定点基因编辑能力进一步完善了在线虫中的相关研究手段,使得对线虫基因组的编辑在效率上得到极大提升。对 CRISPR 的基因编辑系统的不断改良也是科学研究的一个重要方向。比如全部核酸酶功能失活的 Cas9,即 dCas9 现在也被用于结合特定位点参与基因调控。且除了 Cas9 之外,还有许多新型 Cas 核酸酶仍在不断被发现和修饰,如 Cpf1,不需要 tracrRNA 即可发生识别和剪切<sup>[34]</sup>;新从地下水和土壤中发现的 CasX 和 CasY,质量更小<sup>[35]</sup>。虽然没有在线虫中采用过,但是其应用前景广泛。

从线虫的基因编辑技术的发展历程来看,起初利用化学诱变剂、物理高能辐射或者是自然转座随机性地制造点突变、基因插入或缺失,得到了很多突变体,为科学研究提供了大量的材料,帮助科学家解析这些基因的正常生理功能。现在利用 CRISPR-Cas9 高效并多能的基因编辑系统,

科学家可以实现对特定基因进行靶向编辑或标记,并能对单核苷酸进行精准编辑,大大有利于现代生物学对基因及其表达产物在生命体中生理功能的研究。线虫中 CRISPR-Cas9 系统的优化和改造,也为这一编辑技术在其他物种中的应用提供参考和借鉴。

## REFERENCES

- [1] Robert V, Bessereau JL. Targeted engineering of the *Caenorhabditis elegans* genome following *Mos1*-triggered chromosomal breaks. *EMBO J*, 2007, 26(1): 170–183.
- [2] Plasterk RHA, Groenen JTM. Targeted alterations of the *Caenorhabditis elegans* genome by transgene instructed DNA double strand break repair following TcL excision. *EMBO J*, 1992, 11(1): 287–290.
- [3] Gengyo-Ando K, Mitani S. Characterization of mutations induced by ethyl methanesulfonate, UV, and trimethylpsoralen in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 269(1): 64–69.
- [4] Wood AJ, Lo TW, Zeitler B, et al. Targeted genome editing across species using ZFNs and TALENs. *Science*, 2011, 333(6040): 307.
- [5] Cheng Z, Yi PS, Wang XM, et al. Conditional targeted genome editing using somatically expressed TALENs in *C. elegans*. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(10): 934–937.
- [6] Hsu PD, Lander ES, Zhang F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell*, 2014, 157(6): 1262–1278.
- [7] Doudna JA, Charpentier E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, 2014, 346(6213): 1258096.
- [8] Friedland AE, Tzur YB, Esvelt KM, et al. Heritable genome editing in *C. elegans* via a CRISPR-Cas9 system. *Nat Methods*, 2013, 10(8): 741–743.
- [9] Dickinson DJ, Goldstein B. CRISPR-based methods for *Caenorhabditis elegans* genome engineering. *Genetics*, 2016, 202(3): 885–901.
- [10] Xu SH. The application of CRISPR-Cas9 genome editing in *Caenorhabditis elegans*. *J Genet Genom*, 2015, 42(8): 413–421.
- [11] Li W, Ou GS. The application of somatic CRISPR-Cas9 to conditional genome editing in *Caenorhabditis elegans*. *Genesis*, 2016, 54(4): 170–181.
- [12] Cong L, Ran FA, Cox D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 2013, 339(6121): 819–823.
- [13] 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.
- [14] Berkowitz LA, Knight AL, Caldwell GA, et al. Generation of stable transgenic *C. elegans* using microinjection. *J Vis Exp*, 2008(18): 833.
- [15] Waaijers S, Portegijs V, Kerver J, et al. CRISPR/Cas9-targeted mutagenesis in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 2013, 195(3): 1187–1191.
- [16] Tzur YB, Friedland AE, Nadarajan S, et al. Heritable custom genomic modifications in *Caenorhabditis elegans* via a CRISPR-Cas9 system. *Genetics*, 2013, 195(3): 1181–1185.
- [17] Katic I, Grosshans H. Targeted heritable mutation and gene conversion by Cas9-CRISPR in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 2013, 195(3): 1173–1176.
- [18] Dickinson DJ, Ward JD, Reiner DJ, et al. Engineering the *Caenorhabditis elegans* genome using Cas9-triggered homologous recombination. *Nat Meth*, 2013, 10(10): 1028–1034.
- [19] Bell RT, Fu BX, Fire AZ, et al. Cas9 variants expand the target repertoire in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 2016, 202(2): 381–388.
- [20] Farboud B, Meyer BJ. Dramatic enhancement of genome editing by CRISPR/Cas9 through improved guide RNA design. *Genetics*, 2015, 199(4): 959–971.
- [21] Schwartz ML, Jorgensen EM. SapTrap, a toolkit for high-throughput CRISPR/Cas9 gene modification in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 2016, 202(4): 1277–1288.

- [22] Chen BH, Gilbert LA, Cimini BA, et al. Dynamic imaging of genomic loci in living human cells by an optimized CRISPR/Cas system. *Cell*, 2013, 155(7): 1479–1491.
- [23] Zhao P, Zhang Z, Lü XY, et al. One-step homozygosity in precise gene editing by an improved CRISPR/Cas9 system. *Cell Res*, 2016, 26(5): 633–636.
- [24] Xu S, Wang Z, Kim KW, et al. Targeted mutagenesis of duplicated genes in *Caenorhabditis elegans* using CRISPR-Cas9. *J Genet Genomics*, 2016, 43(2): 103–106.
- [25] Paix A, Wang YM, Smith HE, et al. Scalable and versatile genome editing using linear DNAs with microhomology to Cas9 sites in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 2014, 198(4): 1347–1356.
- [26] Paix A, Folkmann A, Seydoux G. Precision genome editing using CRISPR-Cas9 and linear repair templates in *C. elegans*. *Methods*, 2017, 121–122: 86–93.
- [27] Ward JD. Rapid and precise engineering of the *Caenorhabditis elegans* genome with lethal mutation co-conversion and inactivation of NHEJ repair. *Genetics*, 2015, 199(2): 363–377.
- [28] Kim H, Ishidate T, Ghanta KS, et al. A co-CRISPR strategy for efficient genome editing in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 2014, 197(4): 1069–1680.
- [29] Arribere JA, Bell RT, Fu BX, et al. Efficient marker-free recovery of custom genetic modifications with CRISPR/Cas9 in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 2014, 198(3): 837–846.
- [30] Dickinson DJ, Pani AM, Heppert JK, et al. Streamlined genome engineering with a self-excising drug selection cassette. *Genetics*, 2015, 200(4): 1035–1049.
- [31] Voutev R, Hubbard EJA. A "FLP-Out" system for controlled gene expression in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 2008, 180(1): 103–119.
- [32] Flavell SW, Pokala N, Macosko EZ, et al. Serotonin and the neuropeptide PDF initiate and extend opposing behavioral states in *C. elegans*. *Cell*, 2013, 154(5): 1023–1035.
- [33] Shen ZF, Zhang XL, Chai YP, et al. Conditional knockouts generated by engineered CRISPR-Cas9 endonuclease reveal the roles of coronin in *C. elegans* neural development. *Dev Cell*, 2014, 30(5): 625–636.
- [34] Zetsche B, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, et al. Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system. *Cell*, 2015, 163(3): 759–771.
- [35] Burstein D, Harrington LB, Strutt SC, et al. New CRISPR-cas systems from uncultivated microbes. *Nature*, 2017, 542(7640): 237–241.

(本文责编 陈宏宇)

**徐素宏** 博士，浙江大学医学院研究员，博士生导师。2009 年博士毕业于中国科学院遗传与发育生物学研究所。随后赴美国加州大学圣地亚哥分校开展博士后工作。2015 年入选国家青年“千人计划”并于同年 12 月加入浙江大学。主要研究机体的创伤修复和再生。实验室以秀丽线虫为模型，通过遗传学、细胞生物学手段以及活体影像、光遗传学、CRISPR-Cas9 基因组编辑等技术，研究皮肤损伤修复和的细胞分子生物学机理。研究成果发表在一些著名国际期刊，包括 *Current Biology*、*PLoS Biology*、*Developmental Cell* 等。目前兼任中国细胞学会发育生物学专业委员会委员、青年委员会委员和中国动物学会发育生物学分会委员。

