



# 基因组编辑在疾病建模和 细胞治疗中的应用



Essential  
Knowledge  
Briefings

 CURRENT  
PROTOCOLS  
A Wiley Brand

Sponsored by:

 STEMCELL™  
TECHNOLOGIES



## CUT UNCERTAINTY OUT OF GENOME EDITING

克服基因组编辑实验中的障碍，为您的科研突破争取更多的时间。我们提供验证过的CRISPR工具和标准流程，科学资源和技术支持，以帮助您更快的解答实验中遇到的问题。Scientists Helping Scientists。

了解更多，请访问[www.stemcell.com/ArciTect](http://www.stemcell.com/ArciTect)。

封面图：版权 © STEMCELL Technologies Inc.

EKB作者：Xin Tang

引言附图：Betsy Skrip

版权所有 © Wiley Periodicals, Inc. 保留所有权利。未经版权所有人书面许可，本文任何部分都不得以任何形式或通过任何方式进行复制、存储或传播。

# 目录

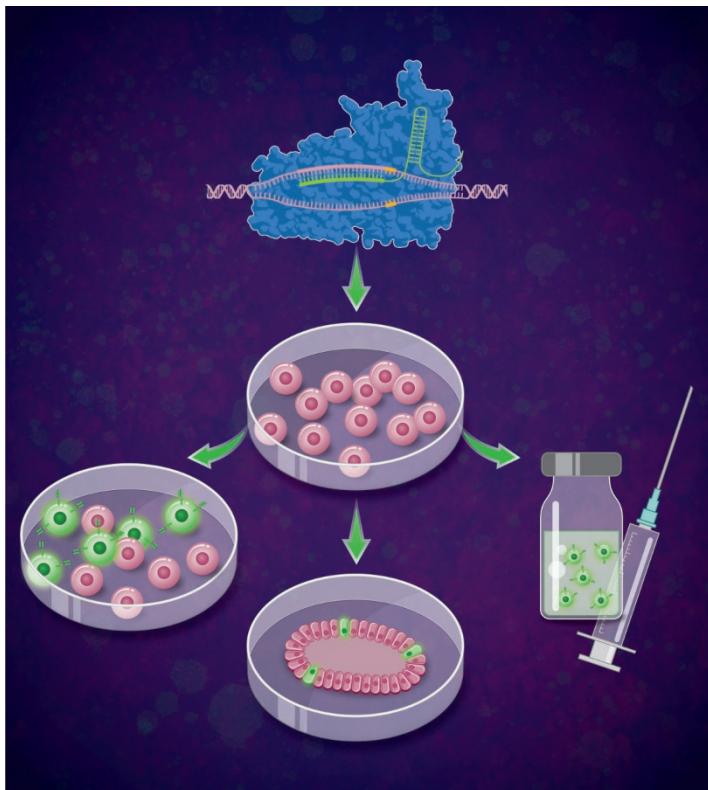
- 3 引言
- 5 精确基因组编辑技术简史
- 8 CRISPR的技术优势
- 17 CRISPR-Cas技术在培养体系中的应用
- 27 CRISPR技术未来的发展
- 31 延伸阅读

## 引言

DNA是编码RNA和蛋白质的生命蓝图，也是产生组成生物体的不同细胞类型的指令信息。基因组编辑，或有目的地修改生物体的DNA序列，是科学家们长久以来的一个目标。基因组编辑的相关工作可分为三大类：

1. 生成非特异性位点的非特异性突变。这通常是通过表型选择自然发生的遗传变异，或经辐射或化学诱导的随机突变来实现。
2. 将特定基因序列插入到非特异性基因位点。第一个转基因生物是通过将猿猴病毒40（SV40）注射到植入前的小鼠胚泡中获得的<sup>(1)</sup>。这种方法通过病毒DNA整合到基因组中的随机位点进行转基因表达，但无法精确地“编辑”特定的基因序列。
3. 特定位点的精确基因组编辑。天然核酸酶的发现使得精确基因组编辑成为了可能，而随后的蛋白质工程努力将这一发现应用于不同领域。精确的基因组编辑主要依赖于可控诱导产生的DNA双链断裂（DSB），以及随后的内源性DNA修复。

本书为读者介绍基因组编辑技术，特别聚焦CRISPR-Cas系统，它如何成功地被应用于人类细胞的基础和转化研究。我们讨论了该领域仍然存在的一些主要挑战，并提及克服这些问题的策略。最后，对这一令人兴奋且日新月异的领域，我们对其未来发展方向做了预测。



CRISPR-Cas9技术与应用：用CRISPR-Cas9系统编辑基因组已经彻底改变了生物医学研究。CRISPR-Cas9是由特定的RNA分子和蛋白质酶组成的复合物，可以在特定的序列中精确地编辑基因组DNA（上）。

该分子工具可在体外和体内修饰多种细胞类型（如免疫细胞，左侧培养皿）的功能，在复杂培养体系（如类器官，中间培养皿）中构建相关的疾病模型，或建立可应用于临床的新型细胞治疗（右侧培养皿）。

## 精确基因组编辑技术简史

限制性内切酶是最早发现的可诱导位点特异性DSB的蛋白质类型之一，其应用为体外重组DNA技术开辟了一个新时代。这些酶通常来源于细菌，识别并结合到一组被称为“限制性位点”的特定短DNA序列，切割附近的DNA。虽然限制酶已长久都被用于DNA质粒的分子克隆操作，但其识别序列（通常为6-8 bp）的频繁出现，使其难以作为序列特异性基因组编辑工具用于全基因组中。

为提高基因组编辑的序列特异性，科研人员开发了Designer核酸酶。这些精心设计的蛋白质，包括锌指核酸酶（ZFNs）和类转录激活因子效应物核酸酶（TALENs），它们是由与序列特异性DNA结合域融合的非特异性核酸酶组成。DNA结合域为邻近序列中依赖核酸酶进行的DSBs生成提供了靶特异性。锌指结构域识别三核苷酸DNA序列，使科学家能够将非特异性DNA内切酶的切割域（如Fok I<sup>(2)</sup>）与不同的基团进行结合和融合，以得到目标DSB。随后，TALEN加入了基因组编辑工具行列，通过单核苷酸识别提供了额外的序列特异性<sup>(3)</sup>。ZFNs和TALENs均通过与特定DNA序列（通常为12-20 bp）结合，以介导DSB的精确生成和随后的基因组编辑。然而，由于ZFNs和TALENs设计复杂，效率相对较低，严重限制了它们在基因组编辑实验中的广泛应用。

CRISPR（成簇规律间隔短回文重复序列）的快速发现和再利用极大推动了精确基因组编辑的发展。CRISPR系统使用RNA“向导”来指引CRISPR相关蛋白的位点特异性结合，从而介导DNA或RNA的切割。Cas9是第一个也是最广泛应用的CRISPR相关变体，一旦与向导RNA（gRNA）配对，Cas9需要两个条件来识别和切割特定的DNA序列：1) 一个20核苷酸（nt）的靶向序列，也称为前间区序列，它是CRISPR RNA（crRNA）的一部分，并与反式crRNA（tracrRNA）一起形成完整的gRNA，以及2) 一个前间区序列邻近基序（PAM），该序列位于靶向crRNA/前间区序列的3'端（图1）。一旦这两个前提条件

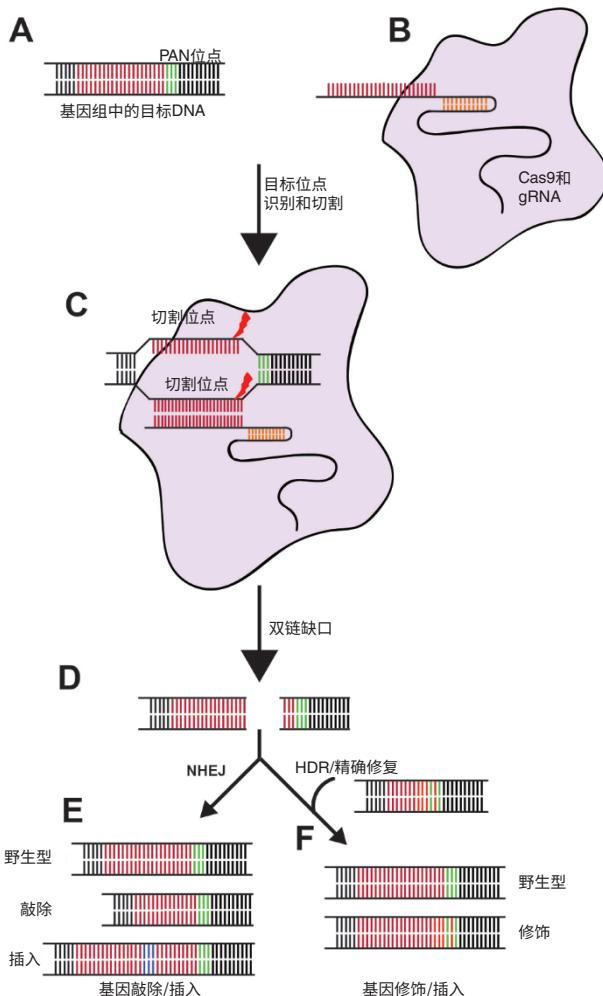


图1：CRISPR/Cas9系统靶向性DNA编辑。

靶DNA序列（A）和带有gRNA的Cas9（B）。CRISPR-Cas9基因组编辑系统由约100核苷酸的向导RNA（gRNA）与Cas9蛋白的复合物组成。Cas9在基因组中搜索与gRNA中~20 nt前间区序列/crRNA序列互补的序列下游的前间区序列邻近基序（PAM）位点，然后Cas9将引起一个双链断裂（DSB）（C和D）。Cas9诱导的DSB随后可通过非同源末端连接（NHEJ）（E）或同源定向修复（HDR）途径修复，由此决定编辑结果（F）。NHEJ引入的错误会产生各种插入和缺失（INDEL），从而导致功能性基因敲除。如果同时引入了一个DNA供体模板，细胞可以使用这些模板通过HDR途径精确地修复Cas9介导的断裂（摘自参考文献116）。

满足, Cas9将结合与crRNA互补的DNA序列, 并诱导PAM序列5'端产生3-4 nt的DSB。随后内源性DNA DSB修复机制将修复该断裂。其中最常见的两条途径是: 1) 非同源末端连接 (NHEJ), 这是大多数哺乳动物细胞的主要修复途径; 2) 同源重组修复 (HDR)。虽然这两种途径都能以高保真度修复DNA, 但NHEJ过程中的DNA末端处理会导致切割位点附近的小插入或缺失 (INDEL) 突变。这些INDEL可能造成移码突变, 产生截短和/或无功能蛋白。在正常情况下, HDR作用于DNA复制后, 其中第二姐妹染色单体可以作为模板进行修复。在基因组编辑中, 研究人员可以提供一个与内源目标基因位点高度同源的DNA模板, 该模板包含期望的遗传变化。由于HDR介导的基因插入效率明显低于NHEJ介导的INDEL形成, 基因组编辑的这一极其强大的功能具有一定挑战性<sup>(4)</sup>, 而编辑结果是这两种主要修复途径相互作用的结果。由于DNA修复与细胞周期有内在联系<sup>(2)</sup>, 细胞类型不同, 其特异的细胞周期动力学也会影响编辑结果。

## CRISPR的优势

与前几代的基因组编辑工具（如ZFN和TALEN）相比，CRISPR-Cas系统的几个突出的特性使其成为现代分子生物学实验室中强大的工具：

### 灵活

不断扩展的CRISPR工具箱包括天然和工程产生的Cas变体，可支持多种基因编辑，包括精确基因组编辑、单碱基编辑、转录激活/抑制、以及表观基因组编辑。已被广泛用于基因组编辑的三种主要类型的CRISPR系统（II、V和VI型系统）对PAM序列有不同的要求；具有扩展PAM特异性的工程Cas变体能够编辑广泛的遗传位点。

### 易得

CRISPR简化了设计和产生必要的靶向目标基因组序列的gRNA，使研究人员能够进行精确的基因组编辑。现有的CRISPR工具种类繁多，使得精确修改目标细胞的遗传或表观遗传特征的成本效益高，设计简单。

### 高效

CRISPR在速度和效率上优于传统的基因组编辑技术，使得研究人员能够快速得到转基因细胞或有机体。例如，具有除疾病相关目标基因以外完全相同遗传信息的“同基因”细胞系，以及离体编辑人体细胞用于治疗。CRISPR还可以通过合成和组装大量的gRNA库来进行多重高通量的功能筛选试验，这些库可用于系统性敲除或调节基因表达。

CRISPR-Cas系统的优点使它成为基因组编辑的宝贵工具，并且，尽管才发现不久，该系统已经使科学家能够解决一些基础的生物学问

题，在基因和细胞治疗中取得重大进展。

## CRISPR-Cas技术发展里程碑

西班牙阿利坎特大学（University of Alicante）的微生物学家 Francisco Mojica 博士提出 CRISPR 这个术语，当时他发现了一个由短序列隔开重复序列组成的细菌遗传位点，这些短序列与噬菌体基因组相匹配<sup>(5)</sup>。通过这一发现，他提出假设认为细菌可获得并储存外部噬菌体序列，作为其适应性免疫系统的一部分以对抗后续的入侵。Mojica 的适应性免疫假说在 2007 年被成功证实<sup>(6)</sup>，但 CRISPR 系统灭活入侵噬菌体的机制和参与这一过程的效应蛋白尚不清楚。

在 2008 年至 2010 年间，研究发现 CRISPR 的机制涉及在 CRISPR 基因位点内编码 DNA 裂解酶的 *Cas* 基因<sup>(7,8)</sup>。随后由 Virginijus Šikšnys 博士主导的研究发现，通过改变引导 CRISPR RNA (crRNA) 序列，可以对纯化的 Cas9 进行程序重调，使其靶向和切割选定的基因组位点<sup>(9,10)</sup>。同年，Jennifer Doudna 和 Emmanuelle Charpentier 同样也发现 Cas9 是介导 CRISPR 系统 DNA 切割能力的关键因子<sup>(11)</sup>。在这篇论文中，这两位研究者描述了 CRISPR 系统的两个基本 RNA 组分，即 crRNA 和 tracrRNA，它们可以合并成一条单链向导 RNA (sgRNA)，以简化 CRISPR 系统的设计和使用。以上这些结果证明了 CRISPR-Cas9 的卓越特性，可作为一种不需要辅助性因子的自给型 RNA 引导的 DNA 内切酶。这些发现为此新型系统在广泛细胞类型和生物体中实现精确基因组编辑奠定了理论基础。

张锋博士的实验室在 2013 年研发了 PX330 系列 CRISPR-Cas9 质粒，用于对真核细胞进行基因靶向，这是 CRISPR 技术的应用取得的一个重大进展<sup>(12)</sup>。这些工具使 CRISPR 工具的应用迅速席卷众多领域，包括第一个 CRISPR 介导的人类干细胞基因组编辑<sup>(12)</sup> 和 CRISPR 编辑的第一组不同品系的小鼠<sup>(13,14)</sup>。从此 CRISPR 的应用发展势头迅猛，经常有令人兴奋的发现，并且 CRISPR 相关工具发展迅速，不断有新工具加入。

我们将在本书后续部分讨论一些最流行的CRISPR工具及其应用。

最近, CRISPR工具已经发展到用于支持治疗。Vertex Pharmaceuticals, Inc.与CRISPR Therapeutics于2018年8月启动了第一个基于CRISPR的临床试验, 旨在将其应用于治疗 $\beta$ -地中海贫血。在这一试验中, 首先从患者体内抽出血细胞, 离体编辑以降低胎儿血红蛋白抑制因子*BCL11A*的表达, 然后将其移植回供体患者体内。美国食品和药物管理局于2018年11月批准了首次体内CRISPR药物测试。在这一正在进行的临床试验中, Editas Medicine和Allergan的科学家正在与医疗团队合作, 以纠正视网膜中*CEP290*基因的IVS26点突变, 该突变导致Leber先天性黑蒙10型, 是遗传性儿童失明最常见的形式。

### 为您的研究选择合适的CRISPR系统

无论是用天然的还是从蛋白质工程获得的CRISPR-Cas, 研究人员能为其特定的基因组编辑应用选择最合适的工具(图2)。Cas9是第一个、也是特性最清楚的单蛋白CRISPR效应器。Cas9酶含有两个保守的核酸酶结构域RuvC和HNH, 其共同在PAM序列附近形成一个平末端DSB<sup>(8)</sup>。由Cas9诱导的DSB随后由NHEJ或HDR修复。NHEJ可以引起INDEL的形成和可能的功能缺失突变。或者是, 当细胞使用HDR时, 可通过同时导入的包含同源臂的DNA供体模板作为细胞修复的模板, 引起精确的基因改变。II型CRISPR-Cas9系统总体上具有较高的靶向性基因组编辑效率, 但相对较短的gRNA靶向序列(20 nt)可能在非预期基因组位点脱靶切割。

为了减少野生型Cas9的潜在脱靶突变, 研究人员生成了该蛋白的多种突变体, 灭活其中一个核酸酶结构域催化残基(RuvC中的D10A或Hnh中的H840A), 使该蛋白只能切割一条DNA链<sup>(15)</sup>。单链断裂(SSB)的修复比DSB具有更高的保真度<sup>(16)</sup>, 而这些Cas9切口酶(Cas9n)的脱靶活性确实低于它们的野生型<sup>(15)</sup>。然而, 这种策略因效率降低和实验设计更复杂, 阻碍了其广泛应用。

V型CRISPR系统（Cpf1, Cas12a）使用具有更长gRNA序列（通常>23 nt）的紧凑而高效的酶，可以在TTTN PAM序列附近切出带有一个5 nt突出末端的交错切口，使得这些切口非常适合于富含AT的区域的基因组编辑<sup>(17)</sup>。Cas12a通过酸碱催化来切割和加工它自己的向导RNA，这一特性有助于从单个RNA转录中分离出多个gRNA，用于多

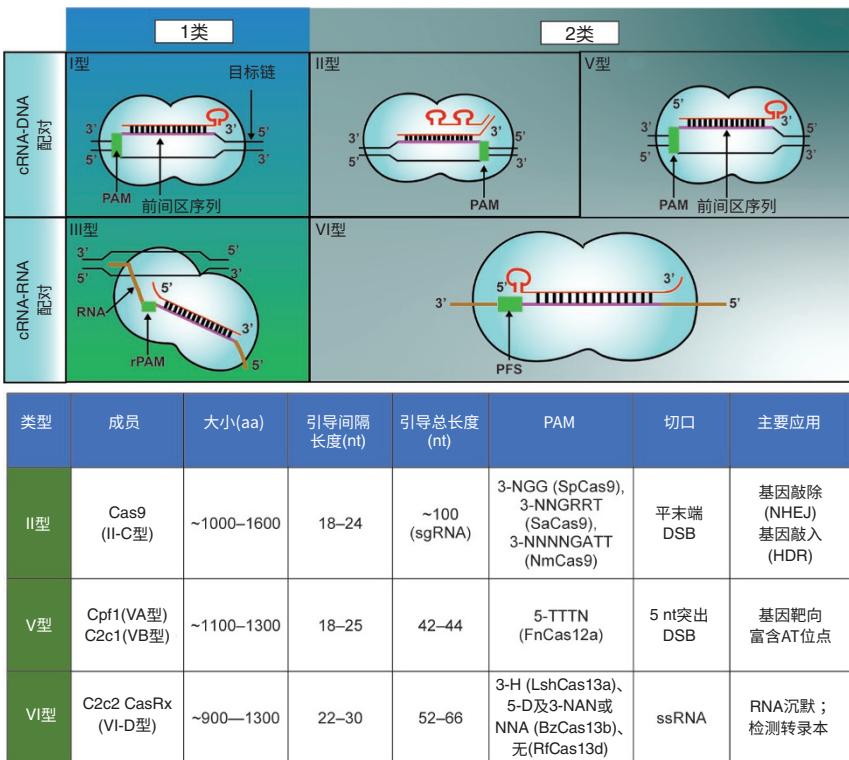


图2：CRISPR-Cas9系统的类型和类别。

第一类CRISPR系统需要多种Cas蛋白，而第二类CRISPR系统只需一种Cas蛋白（改编自117）。

CRISPR-Cas9：成簇规律间隔短回文重复序列 (CRISPR) -CRISPR相关蛋白9；crRNA：CRISPR RNA；PAM：前间区序列邻近基序。

重基因组编辑。一旦Cas12a结合了一个与其间区序列相匹配的目标单链DNA分子，它就会激活并不加区别地在初始结合位点附近切割所有的单链DNA。这一特性使Cas12a成为检测混合物中微量目标DNA的有力工具，并被用于开发称为DNA内切酶靶向的CRISPR反式报告检测系统（DETECTR）<sup>(18)</sup>。

VI型CRISPR系统（Cas13）形成一个包含30 nt长的crRNA的复合物，当它与互补的单链RNA（ssRNA）序列结合时，它会在最初的ssRNA结合位点附近触发非特异性的RNase活性<sup>(19)</sup>。这种独特的混杂RNase活性已被用于体外精确诊断中，以检测微量的特定RNA转录，这种技术被称为特异性高灵敏度酶促解锁（SHERLOCK）<sup>(20)</sup>。以RNA转录本为靶标的编辑系统不会导致基因组DNA序列的永久改变，因此，与修改DNA的编辑系统相比，这些系统的编辑更短暂，理论上也会更安全。研究表明，在sgRNA引导下使用Cas13实现的基因沉默比传统的小发夹RNA（shRNA）方法具有更高的特异性<sup>(19)</sup>。因此，Cas13系统可以作为一种具有临床应用前景的基因治疗方案，以减少突变RNA转录本的表达。

除了已用于DNA和RNA编辑的II、V和VI型CRISPR系统外，还有具有不同DNA结合和基因组编辑特性的其他类型的CRISPR系统，包括I型<sup>(21)</sup>和IV型CRISPR/Cas系统<sup>(22)</sup>。这些CRISPR系统在进化上是相似的，但使用多种Cas蛋白与crRNA形成复合物，从而引导DNase活性。III型CRISPR-Cas系统同时具有RNase和RNA激活的DNase活性<sup>(23)</sup>。

通过系统地研究不同物种中自然进化的CRISPR-Cas系统，可能会发现更好的基因组编辑工具。例如，在最近的研究中，对六个较小的Cas9同源物进行鉴定时发现了金黄色葡萄球菌Cas9（SaCas9）同源物，其效率和特异性可与常用的产脓链球菌Cas9（SpCas9）相当，但体积要小得多，从而提高了递送到细胞中的效率<sup>(24)</sup>。

Cas核酸酶的蛋白质工程变体也已被开发出来，用于不需要DNA或RNA切割，而是依赖于通过保留DNA结合能力的催化死亡的Cas9

(dCas9) 变体，将蛋白质招募到特定的基因组位置<sup>(25)</sup>。这些用途包括调控基因表达、标记特定的基因组位点或RNA转录本 (图3) (综述请参考26)。最近，Cas酶被修改用于碱基编辑，以诱导目标C到T或A到G的转换突变<sup>(27-29)</sup>。早期碱基编辑器是通过将自然发生的或工程化的

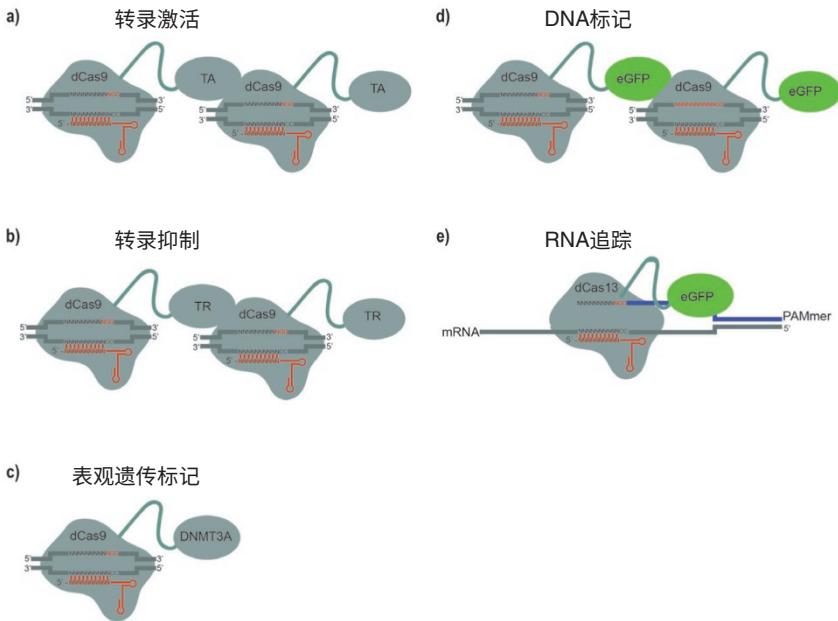


图3：CRISPR-Cas在基因组编辑之外的应用。

(a) 通过dCas9与VP16/VP64或p65激活结构域等转录激活子 (TA) 的融合，可以将CRISPR-Cas9转化为位点特异的转录激活子。用这些位点特异的转录装置进行全基因组平铺可以调节基因的表达。(b) CRISPR-Cas9可通过dCas9与KRAB或SID等转录抑制因子 (TR) 的融合转化为位点特异性转录抑制因子，从而促进表观遗传沉默。用这些位点特异的转录抑制因子进行全基因组平铺可以调节基因表达的抑制。(c) CRISPR-Cas9可通过dCas9与DNA甲基化酶 (如DNMT3A)、DNA去甲基酶或组蛋白乙酰化酶/脱乙酰基酶的融合，转化为位点特异性表观遗传修饰因子。(d) dCas9与荧光基团或荧光蛋白 (如eGFP) 的融合实现DNA位点的成像。(e) 除提供PAM序列的小寡核苷酸外，可通过将dCas13与荧光载体或荧光蛋白 (如eGFP) 融合对转录本进行成像 (改编自118)。

脱氨酶与催化死亡的Cas9或Cas12a融合而开发的，而下一代碱基编辑器则利用与碱基修复抑制物融合的切口酶突变体。这些巧妙的蛋白质工程示例展示了基础生化研究的能力，并突出了CRISPR-Cas系统在多种形式基因操作中的广泛应用。

CRISPR-Cas系统的发现催生了一个完整的研究领域，致力于识别和表征可以用于基因组编辑的自然产生的CRISPR-Cas系统，并以巧妙的方法来修改这些系统以进行多种多样的基因修改。通过努力这个领域进展迅速，而野生型Cas9仍然是最广泛用于基因组编辑的。在接下来的部分中，我们将重点介绍CRISPR-Cas9系统，不过许多概念也适用于其他CRISPR-Cas系统。

## gRNA设计策略

CRISPR-Cas9 gRNA包含一个20-nt的特异性crRNA靶向序列（前间区序列），其邻近一个76-nt的主干序列，该主干序列包含一个充当Cas9与gRNA序列相互作用支架的tracrRNA。Cas9-gRNA复合物将扫描整个基因组，并结合与crRNA/前间区序列互补、并携带一个3'-PAM的位点。一旦复合物与DNA结合，Cas9就会精确地在PAM位点上游3~4 bp诱导产生一个DSB，编辑结果由随后的DNA修复途径决定。

用于基因靶向的gRNA序列可以用CRISPOR<sup>(30)</sup>、E-CRISPR<sup>(31)</sup>、COSMID<sup>(32)</sup>等在线工具设计。这些工具可以在输入的目标基因组序列中搜索潜在的gRNA目标序列（通常分布于目标位置周围30-50 bp内），并提供每个gRNA的预测“中靶”活性和潜在“脱靶”活性的信息（见“当前挑战”一节中的“CRISPR-Cas的脱靶效应”小节）。虽然这些工具在对目标区域附近的特异性和活性潜力gRNA进行排序时非常有用，但必须对gRNA进行经验性测试，以确定其有效性，因为人们对定义“最佳”gRNA序列的参数的了解有限<sup>(33,34)</sup>。由于编辑效率取决于切割到突变的距离<sup>(35)</sup>，因此应该仔细考虑gRNA定向切割的位置，特别是当编辑结果较罕见时（如产生精确的敲入）。

## CRISPR-Cas的表达和递送系统

CRISPR系统可以通过几种不同的方法在靶细胞中表达，包括表达质粒、病毒载体、体外转录的mRNA或与gRNA预结合的纯化蛋白（也称核糖核蛋白（RNP）复合体）（表1）。如果需要基因敲入，可以提供供体DNA模板，并与CRISPR-Cas组分同时或顺序以裸DNA形式或封装在病毒载体（如腺病毒）中导入细胞。遗传改变的程度将决定供体模板的类型：ssODN的大小通常在50-200 nt之间，它们只能介导小的基因组变化，而长的ssDNA最多可用于生成几千碱基（kb），AAV载体可用于插入长达4 kb的转基因器件<sup>(36)</sup>。

根据选择的CRISPR-Cas9表达系统，可从多个来源获得完整的gRNAs（表1）。当使用基于质粒的表达时，可立即将crRNA/前间区序列克隆到Cas9表达质粒上的gRNA主干序列的5'端，例如使用PX 330系列质粒<sup>(12)</sup>。这些质粒被设计成表达Cas9和一个可选择的标记，例如抗生素耐药性或荧光蛋白，以促进转染细胞的富集。除了质粒介导的sgRNA表达外，体外转录（IVT）sgRNA可以与Cas9 mRNA或纯化的Cas9蛋白一起进行纯化和递送。最后，化学合成的gRNA（rRNA）

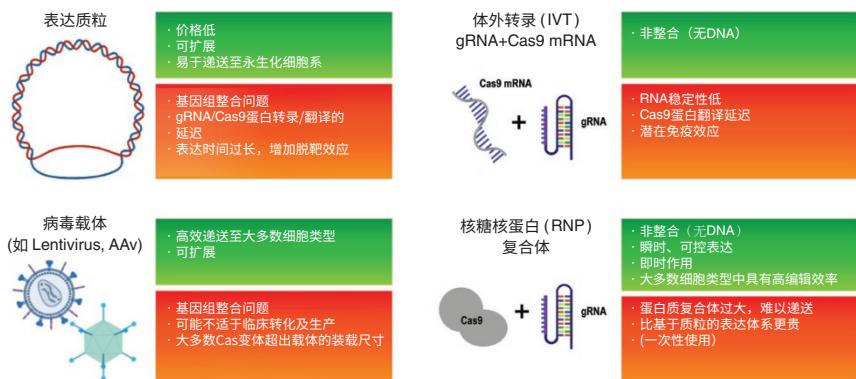


表1：CRISPR-Cas9和gRNA表达和递送系统的比较。

和tracrRNA, 或sgRNA) 可与纯化的Cas9蛋白偶联, 形成核糖核蛋白(RNP) 复合体。对合成的gRNA进行化学修饰可以提高编辑效率, 这可能是由于内切酶降解造成的<sup>(37)</sup>。

无论CRISPR-Cas9组件是如何表达的, 高效率基因组编辑的最大挑战之一在于将其跨细胞膜转运。目前已有很多种病毒和非病毒的方法可成功递送这些组件。电穿孔和化学转染是最常用、将必要CRISPR系统导入培养细胞的非病毒方法。这些方法相对的价格较低、直接, 并且对大多数干细胞和初级细胞基因组编辑有效。在选择表达和递送系统之前, 对目标细胞类型的考虑是很重要的, 因为干细胞和许多原代细胞类型对操作十分敏感。应进行预试验以测试候选CRISPR-Cas在靶细胞或组织中的递送和表达方法的有效性。在需要编辑有限数量的细胞的实验中, 例如在为了开发转基因动物而进行的卵母细胞操作中, 通常首选的是编码Cas9或RNP复合体的mRNA, 因其可直接注射到目标细胞中, 绕过Cas9和sgRNA转录, 从而提高表达速度和基因组编辑效率。

基于病毒载体的方法递送CRISPR系统组件通常比其他方法更有效, 因此为细胞培养和体内应用提供了强大的基因组编辑工具。这种方法的挑战在于, Cas蛋白通常由较大的基因编码; 高滴度病毒的制备是这一方法成功的关键, 但通常不存在能同时编码CRISPR效应器和gRNA的合适病毒载体。在细胞系或动物等实验模型中, 另一种Cas9递送方法是将可诱导的Cas9转基因导入靶细胞的基因组中。基因组编辑所需的其他组件, 如sgRNA和DNA修复模板, 相对要小得多, 可以封装在病毒中, 并且以高滴度生产, 以便高效地递送至Cas9表达细胞中。

## CRISPR-Cas技术在培养体系中的应用

基因组编辑已经成功地应用于许多细胞系中。许多早期的真核生物基因组编辑研究都使用了永生化细胞，这些细胞易于培养、操作和克隆，而编辑更复杂的细胞类型，如干细胞和原代细胞类型，则最具科学价值和临床应用前景。然而，干细胞和原代细胞基因组编辑的发展阻碍在于CRISPR系统在高效递送和表达方面的挑战、克隆原性和细胞毒性。在接下来的章节中，我们将重点介绍在最难操作的细胞中实现高效率编辑的关键里程碑，并提供案例研究示例，强调CRISPR-Cas基因组编辑在应用于细胞培养系统时的通用性和效能，特别是用于疾病建模和细胞治疗的开发。

### 基于CRISPR-Cas的下一代疾病建模

CRISPR-Cas技术最令人兴奋的应用之一是它在包括胚胎干细胞(ES)和诱导多能干细胞(iPSCs)在内的多能干细胞(PSCs)中的应用。PSCs具有通过克隆单个细胞进行扩展的独特能力，使研究人员能够通过单细胞克隆扩展来捕捉相对罕见的基因组编辑活动。由于可以从病人或健康人的体细胞中提取，诱导多能干细胞(iPSC)的用途尤其广泛。然而，iPSC细胞系之间的高度变异性给利用这些细胞研究基因功能和/或疾病相关的表型带来了重大挑战，这至少部分是个体遗传变异所致。基因组编辑可以通过产生仅在目的基因组位点不同、但含有相同遗传背景的同基因克隆来避免这一问题。利用二维和/或三维培养系统可以将同基因iPSCs分化为多种细胞类型，从而建立强大的体外疾病模型。

通过将CRISPR和干细胞技术相结合，引入或纠正具有潜在致病性的基因突变，可以利用野生型和突变型细胞的并行比较来直接研究某些基因变异对疾病相关表型的影响。这些方法消除了由来自不同个体的iPSC或ES细胞系中固有的遗传背景变异引起的潜在混淆因素，

并显著促进了疾病模型研究的进展。

人PSCs尤其适用于对无法获取源细胞类型或组织的疾病进行建模，如神经和心血管疾病。经基因组编辑的人干细胞在体外已成功地分化为多种细胞类型的内胚层、中胚层和外胚层，如心肌细胞<sup>(38)</sup>和所有主要脑细胞类型，包括神经元<sup>(39)</sup>、星形胶质细胞<sup>(40)</sup>、少突胶质细胞<sup>(41)</sup>和小胶质细胞<sup>(42)</sup>。这些人类细胞使研究人员能够通过研究疾病相关基因的表达，以及由基因突变直接引起的形态和功能表型来了解疾病机制（详见综述<sup>43</sup>）。经基因组编辑的人PSC衍生细胞也可以通过高通量的表型或分子靶向药物筛选平台来发现潜在的治疗方法。

除了二维细胞培养模型外，CRISPR编辑的干细胞的另一个重要应用是开发用于疾病建模的三维（3D）类器官培养系统。类器官是一种三维结构，通常包含自我更新的干细胞群，并分化为多种组织特异性细胞类型，表现出与其所代表的器官相似的空间组织。类器官可以来源于成体干细胞（ASCs）或定向分化的PSCs，并能模拟其所代表器官的关键功能。这些特点使类器官成为一个用于研究正常和疾病生理学的生理相关的培养系统，并作为诊断工具应用于精确医学。

有一类被称为“脑类器官”的类器官引人注目，它由神经元、星形胶质细胞和循环祖细胞组成，这些细胞模仿了人类皮层发育的特征<sup>(44,45)</sup>。重要的是，敲除人脑类器官中的小头畸形相关基因CDK5RAP2可显示这种疾病的典型表型，包括Cdk5rap2基因敲除小鼠模型未能展现的几个关键特征<sup>(46)</sup>。最近的一项将CRISPR基因组编辑技术和类器官技术结合的工作使研究人员能够在培养皿中模拟人类大脑发育的特定方面，其方法是在人iPSC衍生的类器官中敲除PTEN基因，从而导致类器官尺寸的扩大和表面褶皱结构的发展<sup>(47)</sup>。一项类似的工作利用来自经基因组编辑的iPSC细胞系的大脑类器官在3D环境中建立胶质母细胞瘤形成的模型<sup>(48)</sup>。CRISPR-Cas对癌基因/抑癌基因的操作启动了大脑类器官中的肿瘤发生，从而可以在3D人脑组织中对肿瘤的发生进行显微观察。

除了大脑, CRISPR、干细胞和类器官技术的结合已经应用于其他器官的疾病研究上。肾类器官来源于人PSC衍生的GSK3 $\beta$ 抑制表皮小体<sup>(49)</sup>。作者发现, CRISPR介导的多囊肾疾病基因PKD1或PKD2的敲除可诱导肾类器官的肾小管中形成囊肿, 从而证明类器官可为研究多囊肾疾病的发病过程提供模型。最近, 同一课题组证明CRISPR编辑的PSC来源的肾脏类器官可以用于多维表型筛选<sup>(50)</sup>。他们建立了一条装有液体处理机和高精度成像仪的机器人管道, 用于在微孔阵列中制造和分析肾脏类器官。这种高通量的系统为药物的发现和精确医学的发展提供了一个非常强大的平台。

成体干细胞(ASC)也可以用CRISPR-Cas系统进行编辑, 并衍生类器官。其中一个例子是用CRISPR-Cas9校正囊性纤维化患者肠干细胞类器官中的突变型CFTR基因<sup>(51)</sup>。类似的ASC衍生类器官被用来模拟结肠癌组织中细胞与细胞的相互作用<sup>(52,53)</sup>。用于培养原代人类气道上皮细胞的先进的培养系统最近也被报道<sup>(54)</sup>, 这种细胞以其难以进行长期培养而闻名。这些方法使基因组编辑和随后在气液界面上的细胞增殖和培养成为可能, 为研究与气道功能障碍和疾病有关的基因提供了一个很好的系统。

使用CRISPR-Cas系统能够相对容易地对人类细胞进行基因操作, 从而大大推动了疾病建模的发展。结合新型的培养方法, 如稳健的分化系统和类器官技术, 我们现在有能力在简单的培养皿中制作强大的、与生理相关的人类疾病模型, 以进一步了解正常发育和疾病的发病机制。

## CRISPR-Cas技术在治疗中的应用

CRISPR-Cas基因组编辑技术除用于疾病建模外, 还可用于人体PSC或多能原代细胞, 如免疫细胞或造血干祖细胞(HSPC)的离体编辑, 为临床相关细胞治疗提供自体细胞来源。成功的细胞治疗需要对细胞进行基因改造, 使其具有有利特征, 例如靶标定位能力或纠正致

病突变，随后将这些细胞输送到受体体内。这就需要有适当匹配的供体，且由于细胞操作方面的挑战以及潜在免疫并发症而受到阻碍。**CRISPR-Cas**可以在精确的位点插入单拷贝治疗基因，克服了病毒载体随机整合而可能破坏基因的安全限制。此外，使用**CRISPR-Cas**进行基因组编辑可以在治疗相关位点和其他位点同时进行编辑，以防止免疫排斥，这一策略正在迅速被纳入到下一代细胞治疗的开发中。

在再生医学领域，**CRISPR**技术最有前景的应用之一是产生异基因或人类白细胞抗原（HLA）相匹配的人PSC用于细胞治疗。I类 HLA基因多态性导致移植的PSC源细胞在异基因受体中的排斥率较高。在最近的一份报告<sup>(55)</sup>中，一个AAV介导的**CRISPR-Cas**递送系统被用来将一个多态性极低的HLA-E基因敲入到  $\beta$ -2微球蛋白（B2M）表面抗原基因位点。经编辑的HLA-E-B2M融合蛋白表达细胞可以逃避免疫检测和自然杀伤（NK）细胞介导的裂解，为移植应用提供了潜在的通用供体细胞来源。

然而，原代细胞的基因组编辑流程带来多层复杂性，因为它们的增殖能力有限，克隆性低，操作困难，以及对外源DNA和/或未经修饰的gRNA敏感。早期尝试将**CRISPR-Cas9**基因组编辑应用于使用病毒载体或质粒表达系统的原代细胞类型，但成效有限。随后的研究发现，先天免疫系统有时可检测到未经修饰的外源核酸，从而导致细胞毒性和编辑效率降低<sup>(56-58)</sup>。最近，使用RNP复合体对循环原代细胞的电穿孔在多个靶点上取得了很好的效果<sup>(36,37,59-62)</sup>。然而，原代细胞类型的有限增殖性使得克隆传代具有极大的挑战性。因此，在这些细胞类型中获得高的编辑效率是至关重要的。为了克服这些困难，人们已经探索了各种方法，包括促进细胞周期激活的培养操作，以及采用递送和表达**CRISPR-Cas**体系的新型策略以避免免疫激活。

新近出现的嵌合抗原受体（CAR）-T细胞治疗是一种极具前景的肿瘤治疗方法。**CAR-T**细胞是经过基因程序重调的免疫细胞，专门被设计用来靶向和杀死癌细胞。目前，可以使用病毒和非病毒方法将

工程CAR导入T细胞基因组<sup>(63)</sup>。虽然病毒载体随机整合到基因组中会引发对安全性担忧,但CRISPR-Cas系统能够在精确的基因组位置进行CAR整合<sup>(64)</sup>。对*TRAC*、*B2M*和*PD-1*基因的多重基因组编辑以用于在异种移植小鼠模型中产生具有免疫原性极低且能进行抑制性PD-1信号传导的敲除T细胞<sup>(65)</sup>。这一策略最近通过非病毒基因组靶向的长ssDNA供体模板用于CAR整合而取得进展<sup>(66)</sup>,可以结合删除抑制基因和/或纠正致病性突变来构建具有更强治疗性能的原代人类免疫细胞。CRISPR-Cas和CAR-T这两项革命性技术的协同作用正在加速新的免疫疗法的发展,并可能为癌症治疗提供一个低免疫原性和高疗效的细胞来源<sup>(67)</sup>。

最近的一项研究显示了CRISPR-Cas9系统的多重作用潜力<sup>(68)</sup>,其在原代人T细胞中通过全基因组的CRISPR基因敲除筛选识别免疫细胞功能的调节因子。该方法被称为“Cas9蛋白电穿孔的单向导RNA(sgRNA)慢病毒感染”(SLICE),确定了刺激T细胞活化和体外肿瘤细胞杀伤的候选靶点<sup>(68)</sup>。这项研究提供了一个很有希望的例子,说明了CRISPR-Cas技术是如何帮助解决基础的生物学问题,从而极大促进未来细胞治疗的发展。

除了T细胞工程之外,CRISPR-Cas应用的另一个令人兴奋的治疗相关领域是HSPC的离体基因组编辑,其被用于治疗血液系统恶性肿瘤和血红蛋白病。例如, Mandal等人<sup>(69)</sup>首次报告了关于CRISPR-Cas9在CD 34<sup>+</sup> HSPC中的应用,他们使用近端双重gRNA靶向方法敲除临床相关基因(*CCR5*)。随后的研究表明,使用基于RNP的表达系统可以降低HSPC的细胞毒性和提高编辑效率<sup>(37,70)</sup>。

虽然HSPC的基因敲除相对直接,但HSPC长期造血干细胞(LTH-SC)的再生细胞群显示出低HDR频率和缓慢的细胞周期<sup>(36,71)</sup>。这是以治疗为目的HSPC插入编辑中的一个主要障碍。为了克服这一限制,Porteus研究组一直致力于寻找改进的基因组编辑方法,并优化培养条件以使HSPC旺盛生长,以实现高效率的依赖于HDR的敲入式编辑<sup>(72-74)</sup>。

这些方法包括在细胞因子富集的培养基中进行培养,以支持循环祖细胞的扩增,以及使用AAV6封装和递送DNA供体模板。在一项研究中,一个封装于AAV6的修复模板被用于纠正 $\beta$ -血红蛋白(*HBB*)基因上一个致病性镰状细胞贫血Glu6Val突变<sup>(72)</sup>。通过插入GFP报告组件,作者能够成功地富集HDR编辑的细胞。重要的是,靶向*HBB*基因的HSPC在免疫缺陷小鼠中表现出长期和多系重组。AAV6以外的其他供体DNA模板,包括长ssDNA或短ssODN,在HSPC编辑中也被证明可能是有用的。虽然ssODNs能在HSPC中介导高效的HDR<sup>(73)</sup>,但它们的长度不足以编码一个选择标记盒,因此不适用于上述浓富集方案。然而,最近的一项研究发现基因组编辑伴随着一种短暂的p53依赖性DNA损伤反应,并且AAV6(而非ssODN)的共同导入加剧了这种损伤反应<sup>(71)</sup>。这加剧并维持了p53依赖性DNA损伤反应,其与增殖能力降低和功能损伤有关,而这种损伤可以通过暂时性的p53抑制来克服。

在将CRISPR-Cas编辑系统应用于临床相关细胞群体方面已经取得了重大进展。随着更安全、更有效的精确基因组编辑方法在原代和干细胞中的不断发展,我们确信这一技术在未来几年中将会成功地转化至临床应用中。

### 当前挑战和应对措施

尽管在将基因组编辑应用于先进细胞模型和治疗方面取得了进展,但在充分发挥这些工具和技术的潜力之前,仍有许多大障碍要克服。接下来的章节将概述解决CRISPR实验问题的一些技巧,讨论有待解决的挑战,介绍克服这些挑战的方法。

### 获得高效的基因组编辑

基因组编辑的主要挑战是高效率地产生靶向的DNA修改,例如在经编辑的整个细胞群中获得高百分比的携带预期突变的细胞。影响基因组编辑效率的因素有很多,包括gRNA效率、细胞类型依赖的NHEJ

与HDR修复效率差异（已在“精确基因组编辑技术简史”一节中进行讨论）、影响细胞活力和功能的细胞培养条件，以及在不同细胞类型中可能以不同效率工作的不同CRISPR组件表达和递送系统。

要解决CRISPR实验中出现的问题，首先要确定基因靶向质粒或合成RNA的设计和序列。对于基于NHEJ的基因敲除实验，如果单个gRNA不能有效地诱导对目标位点的编辑，则考虑使用多个gRNAs在100~200 bp的距离内靶向多个基因组位点，以提高基因破坏的概率。对于HDR依赖性精确基因组编辑，所设计的sgRNAs必须能够切割未经编辑的基因组DNA序列，而不是修复模板或成功编辑的基因位点。如有必要，应引入沉默突变，以破坏修复模板上的PAM或sgRNA序列。此外，DNA模板与HDR结合的效率取决于其切割位点与突变位点的距离<sup>(35)</sup>。应该仔细考虑gRNA引导的DNA断裂的位置，以产生精确的敲入编辑。

CRISPR组件的转染效率，尤其是Cas蛋白在目标细胞类型中的表达，决定了基因组编辑实验的成功率。递送CRISPR-Cas组件的候选方法应在目标细胞类型/组织中进行并行检测，以确定后续实验的最佳方法（参见“CRISPR-Cas9的表达和递送系统”一节）。如果采用抗生素耐药性或基于流式细胞术（FACS）的筛选来富集转染细胞群，则需要检测目标细胞对不同剂量抗生素的反应，或优化FACS的门控策略，以验证富集策略的敏感性和有效性。

为了准确地检测基因组编辑事件，基因分型策略的特异性和敏感性必须在实际的基因靶向实验之前进行测试和优化。一种通用的PCR基因分型策略是通过设计引物来扩增相对较小（200~500 bp）的DNA片段，这些片段位于靶位点两侧和/或跨越插入基因与编辑的基因组序列之间（图4A）。要避免在基因组DNA中设计具有两个引物的较大扩增子（>1 kb），因为从基因组DNA中扩增长片段的PCR效率相对较低，可能导致假阴性结果。在通过基因组编辑引入突变时，一种可能的基因分型策略是设计供体模板以插入预期的突变或潜在的其他沉默突

变位点，以在预期的突变点或其附近引入或破坏限制性酶位点。这种设计可以使用限制性内切酶对从编辑细胞和未编辑细胞中获得的靶区PCR扩增产物进行基因分型。为了证实已在目标位点敲入了较大的序列，可以设计长距离PCR和/或南方墨点法来检测目标细胞群体中转基因整合事件的数量（图4B）。

### 确保为下游试验提供高质量编辑细胞

在处理和操作干细胞和祖细胞时，维持细胞身份对于试验尤其重要。长期培养可导致细胞自发分化和潜能的丧失。此外，基因组编辑流程对细胞造成较大压力，并导致较高程度的选择压力，这一点在编辑后的生存过程中尤为显著。由于基因组编辑通常依赖于诱导产生DNA DSB，在大多数细胞类型中，p53依赖性DNA损伤反应将在此过程中被激活，从而诱导细胞周期停滞或细胞凋亡。在人PSC<sup>(75-77)</sup>和HSPC<sup>(71)</sup>中都已观察到了这一现象。人们对细胞对基因组编辑的反应了解甚少，但这些反应可能会对干细胞和原代细胞的关键特性产生负面影响，如存活、增殖能力、分化潜能和下游功能。因此，在基因组编辑之后、下游实验使用之前对细胞健康的这些方面进行监测很重要。优化编辑前和编辑后的培养条件可以将实验的可变性最小化，从而支持生成具有充分功能和活力的编辑细胞。

除p53外，其它的凋亡通路因子也可能在编辑后限制人PSC的存活。例如，抗凋亡蛋白BCL-XL的过表达大大提高了编辑效率<sup>(78)</sup>。这一发现十分重要，因为长期培养人PSCs与获得遗传异常相关，包括显性阴性p53突变<sup>(79)</sup>和20q11.21（含BCL-XL基因的基因组区）的扩增<sup>(80,81)</sup>。为了避免细胞中不必要的基因突变，在长期培养过程中和基因组编辑后，对人PSC基因组稳定性进行持续监测是必要的。

CRISPR实验在培养细胞中的另一个挑战，是在基因组编辑导致低存活率和细胞增殖能力丧失的条件下如何生成克隆细胞系。由于特定编辑事件的效率从未达到100%，编辑后会得到基因混杂的细胞群。

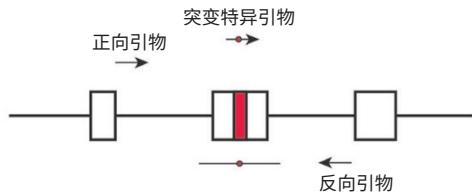
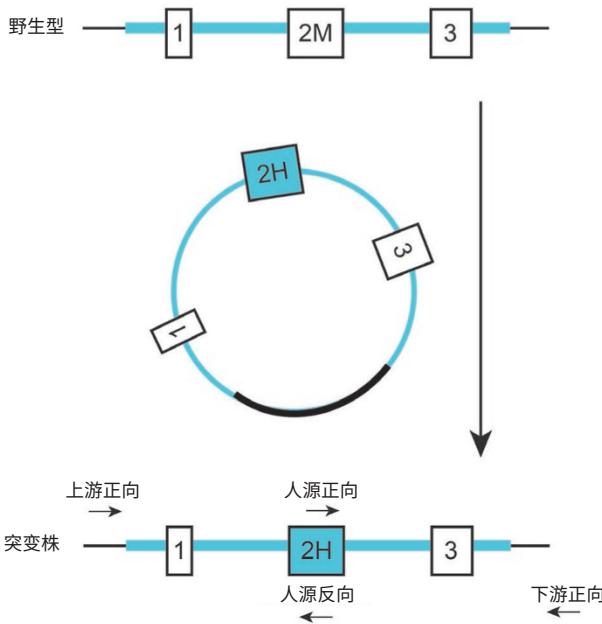
**A. 常规PCR****B. 长片段PCR**

图4：验证基因组编辑成功的基因分型策略。

(A) 常规PCR基因分型。用gRNA结合位点两侧的引物对靶区进行扩增。T7内切酶I或Surveyor核酸酶测定等分析方法可用来评估所生成INDEL的比例，即切割效率。对于基因敲入，可以通过设计突变特异性引物实现仅扩增突变的等位基因。

(B) 用长片段PCR进行基因分型。对于长片段的敲入，可以通过引物设计对突变体进行基因分型，这些引物分别靶向同源臂以外、转入基因/敲入序列以内的位点（改编自119）。

在这种情况下，我们可以通过分离单个细胞，并以非常低的密度接种细胞以得到基因统一的细胞群。但是，此方法仅适用于易于克隆的细胞类型。优化编辑前和编辑后的培养条件可以将实验的可变性最小化，从而促进生成具有充分功能和活力的编辑细胞。

### CRISPR-Cas技术的脱靶效应

基因组编辑可能诱导脱靶效应，这些效应既可以依赖也可以不依赖于序列，包括激活免疫和/或DNA损伤反应（如上文所述），以及基因组中非预期位置的突变。Cas9能耐受gRNA-DNA序列中~1-2 bp的错配<sup>(82)</sup>。研究发现，顺着gRNA的方向，PAM-近端错配的耐受性低于PAM-远端错配<sup>(83,84)</sup>。大多数gRNA设计工具在对特定靶序列的潜在gRNAs排序时考虑了这一点，但重要的是，使用无偏倚或靶向基因组分析来评估潜在的序列依赖的脱靶效应，从而确保基因组编辑的特异性。不依赖序列的脱靶效应更难被识别，而这种脱靶效应有可能对细胞的活力和功能产生负面影响。

在通过初步基因型筛选的细胞克隆中，PCR扩增目标基因组位点并进行DNA测序，可用于验证中靶基因组编辑（包括突变和/或转基因插入）的准确性。为了排除基因编辑细胞中CRISPR-Cas引起的脱靶突变事件，对gRNA设计程序预测的潜在脱靶位点的PCR扩增和测序是识别脱靶编辑存在的最有效方法。目前已有利用全基因组测序来检测潜在的脱靶突变的更系统且无偏倚的方法，包括测序法无偏倚全基因组双链断裂鉴别（GUIDE-seq）<sup>(85)</sup>、高通量全基因组易位测序（HTGTS）<sup>(86)</sup>、直接原位断裂标记，在链霉亲和素上富集和下一代测序（BLESS）<sup>(87)</sup>来识别双链断裂。有可能的话，建议从一轮或多轮基因靶向编辑中生成多个独立克隆，以便进一步鉴定。除了在DNA水平上进行基因分型外，也建议研究人员验证基因编辑的细胞中观察到的表型是否与预期的基因型相匹配。

## CRISPR技术未来的发展

### 拓展工具箱

CRISPR-Cas基因组编辑的脱靶效应一直是基础和转化研究领域研究的主要问题和改进方向。非特异性DNA切割是RNA引导与靶位点不完全相似的DNA序列相互作用的结果。这种与非靶DNA的相互作用是通过位于Cas9的HNH、RuvC和PAM相互作用域之间的残基来稳定的<sup>(88)</sup>。

为了提高用于基因组编辑应用的CRISPR工具的效率、特异性和靶向范围，研究人员已经通过结构信息指导的蛋白质工程、基于细菌选择的定向进化和组合设计等方法开发了数种性能强化的Cas蛋白<sup>(89-92)</sup>。这包括一种高保真度Cas9蛋白（SpCas9-HF1），它具有几乎无法检测到的脱靶编辑<sup>(89)</sup>，以及一种“增强的特异性”SpCas9（eSpCas9）变体，它减少了脱靶编辑，同时保持中靶切割<sup>(90)</sup>。Doudna课题组认为，增强校对是这些新的Cas9变体提高基因靶向准确性的机制，而通过对结构的深入研究开发了一种高精度Cas9变体（HypaCas9），它在不影响中靶活性的前提下展现出高的全基因组特异性<sup>(91)</sup>。蛋白质工程也致力于增强PAM的特异性，因为使用Cas9编辑基因组的能力仅限于包含5'-NGG-3'的区域。Kleinewetter等人<sup>(93)</sup>通过随机诱变Cas9的PAM-相互作用域，识别了PAM特异性从典型的PAM序列变为5'-NGA-3'、5'-NGAG-3'和5'-NGCG-3'的突变体，从而拓宽了Cas9的靶向范围。通过一种类似于上述的结构导向蛋白质工程方法，研究人员还开发了一种从5'-NGG-3'到5'-YG-3'的限制性较低的改良的新凶手弗朗西丝氏菌Cas9（FnCas9）<sup>(94)</sup>。最近，Liu课题组设计了一种名为“xCas9”的Cas9变体，其具有高特异性，以及迄今最广泛的PAM兼容性<sup>(95)</sup>。类似的方法最近被应用于来自其他物种的Cas12a和Cas9蛋白<sup>(96)</sup>，表明这些方法可以用来构建一系列具有增强性能的Cas酶。

在努力提高保真度和扩大基因组编辑范围的同时，研究人员对

HDR依赖性敲入编辑同样付出了巨大的努力<sup>(97)</sup>。为了克服HDR的低效率,一些课题组使用小分子抑制剂和/或激活剂来促进HDR和抑制NHEJ<sup>(98-103)</sup>,或同步细胞周期<sup>(104)</sup>。最近,供体DNA模板和CRISPR-Cas组件的物理耦合显示HDR发生频率增加<sup>(105-108)</sup>,从而避免了可能与药物操作相关的毒性。同时,其他科研人员选择通过标记基因的阳性/阴性选择来具有更高HDR编辑活性的细胞<sup>(36,109,110)</sup>。最近一项研究在HSPC中采用了这种策略,研究人员使用基于RNP的CRISPR-Cas9递送,并使用AAV6封装供体DNA模板以包含GFP报告基因<sup>(36)</sup>。通过这种方法,精确编辑的细胞可以使用荧光激活的流式(FACS)进行富集。在人PSC中也采用了类似的策略来进行精确的基因组编辑<sup>(110)</sup>。

一些新开发的CRISPR工具则尝试在不切割基因组DNA的情况下调控基因表达,如影响靶RNA稳定性的Cas13蛋白<sup>(19)</sup>和某些碱基编辑酶等,作为基因组编辑和基因治疗应用的新途径也引起了人们的关注。

### 改进递送和表达系统

尽管基因组编辑工具取得了重大进展,最大的挑战之一是如何成功地在目标细胞或组织中地递送和表达编辑系统。体内递送尤其具有挑战性,在合适的细胞中精细地调节Cas9的持续时间和剂量对于得到期望的治疗效果和尽量减少副作用至关重要<sup>(111)</sup>。

递送系统并不能广泛适用于基因组编辑的应用。例如,电穿孔是构建体外细胞模型的一种相对有效的递送方法,但它不能用于在体内递送这些组件;AAV载体在体外和体内都取得了成功,但其封装限制和制作的挑战阻碍了其广泛的临床应用。运载工具能够以高特异性和高效率靶向目标细胞至关重要。最近将RNP与细胞类型特异性摄入表面受体的结合具有一定的前景,显示了不依赖转染递送的可能性<sup>(112)</sup>。虽然这种方法最终可能实现在体内靶向地递送基因组编辑组件,目前的制约因素是摄取后复合物的内体/溶酶体降解<sup>(112)</sup>。

近年来,将纯化的Cas9蛋白与体外转录或合成的gRNAs复合得到

的RNP复合体得到了广泛应用。RNP复合体作用迅速，表达短暂，并且不含DNA。这些特征降低了脱靶效应的风险，包括Cas9介导的非靶点损伤和质粒DNA的随机整合<sup>(113,114)</sup>。构建可诱导的Cas9系统是限制Cas9暴露于目标基因组的另一种策略。该方法的一个例子是将Cas9分两个无活性的片段，而在加入雷帕霉素后这两个片段可被重组成具有催化活性的Cas9蛋白<sup>(115)</sup>。自发现以来，用于基因组编辑的CRISPR-Cas系统的开发进展迅速，目前研究人员正努力通过提高基因组编辑效率和特异性来扩大研究和治疗应用的范围。在未来的几年里，新的精确基因组编辑方式、优化的递送方法以及增强的基因组编辑工具，这些将有助于这一令人振奋的技术从实验室转向临床应用，甚至更远。

## 展望未来

自2013年推出以来，CRISPR基因组编辑技术以多种方式推进了基础生物学和生物医学研究。CRISPR技术使得我们可以编辑细胞和生物体中的疾病相关基因从而构建疾病模型，在HSPC或T细胞等原代细胞中进行离体基因编辑用于细胞治疗，在体内细胞基因疗法方面其应用潜力巨大。这些应用还仅仅是这一新兴技术可能实现的小部分，而在充分发挥其潜力之前，研究人员还必须首先解决几个挑战。尽管有挑战，这项旨在利用大自然中的CRISPR-Cas系统的力量改变生命代码的全球性工作才刚刚开始，在今后几年内预计将取得更加惊人的成果。

随着CRISPR技术的不断进步和成功，对于在人类生殖细胞基因组编辑技术中的应用，我们必须极其谨慎并严加规范。这与体外培养的人干细胞基因组编辑、人体细胞的离体操作、乃至针对人体细胞的体内基因疗法有极大不同。以体细胞为靶标的基因组编辑在时空精度上更精确，这是现代基因治疗的基础。而另一方面，以生殖细胞为靶标不仅缺乏临床依据（对体外受精胚胎的筛选便可选出无基因突变风险的健康婴儿），而且不可避免地会导致在该个体整个生命期间所有细胞

中造成中靶及脱靶编辑。此外，这些修改将传递给某个后代，并进入人类基因库。目前尚无法确定其潜在影响，应通过科学、伦理和法律讨论加以解决。

## 延伸阅读

1. R. Jaenisch, B. Mintz, Simian virus 40 DNA sequences in DNA of healthy adult mice derived from preimplantation blastocysts injected with viral DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **71**, 1250-1254 (1974).
2. Y. G. Kim, J. Cha, S. Chandrasegaran, Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 1156-1160 (1996).
3. M. Christian, T. Cermak, E. L. Doyle, C. Schmidt, F. Zhang, A. Hummel, A. J. Bogdanove, D. F. Voytas, Targeting DNA doublestrand breaks with TAL effector nucleases. *Genetics* **186**, 757-761 (2010).
4. W. D. Heyer, K. T. Ehmsen, J. Liu, Regulation of homologous recombination in eukaryotes. *Annu Rev Genet* **44**, 113-139 (2010).
5. F. J. Mojica, C. Diez-Villasenor, J. Garcia-Martinez, E. Soria, Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *J Mol Evol* **60**, 174-182 (2005).
6. R. Barrangou, C. Fremaux, H. Deveau, M. Richards, P. Boyaval, S. Moineau, D. A. Romero, P. Horvath, CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science* **315**, 1709-1712 (2007).
7. L. A. Marraffini, E. J. Sontheimer, CRISPR interference limits horizontal gene transfer in staphylococci by targeting DNA. *Science* **322**, 1843-1845 (2008).
8. J. E. Garneau, M. E. Dupuis, M. Villion, D. A. Romero, R. Barrangou, P. Boyaval, C. Fremaux, P. Horvath, A. H. Magadan, S. Moineau, The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature* **468**, 67-71 (2010).
9. R. Jaenisch, B. Mintz, Simian virus 40 DNA sequences in DNA of healthy adult mice derived from preimplantation blastocysts injected with viral DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **71**, 1250-1254 (1974).
10. Y. G. Kim, J. Cha, S. Chandrasegaran, Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 1156-1160 (1996).
11. M. Christian, T. Cermak, E. L. Doyle, C. Schmidt, F. Zhang, A. Hummel, A. J. Bogdanove, D. F. Voytas, Targeting DNA doublestrand breaks with TAL effector nucleases. *Genetics* **186**, 757-761 (2010).
12. W. D. Heyer, K. T. Ehmsen, J. Liu, Regulation of homologous recombination in eukaryotes. *Annu Rev Genet* **44**, 113-139 (2010).

13. F. J. Mojica, C. Diez-Villasenor, J. Garcia-Martinez, E. Soria, Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *J Mol Evol* **60**, 174-182 (2005).
14. R. Barrangou, C. Fremaux, H. Deveau, M. Richards, P. Boyaval, S. Moineau, D. A. Romero, P. Horvath, CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science* **315**, 1709-1712 (2007).
15. L. A. Marraffini, E. J. Sontheimer, CRISPR interference limits horizontal gene transfer in staphylococci by targeting DNA. *Science* **322**, 1843-1845 (2008).
16. J. E. Garneau, M. E. Dupuis, M. Villion, D. A. Romero, R. Barrangou, P. Boyaval, C. Fremaux, P. Horvath, A. H. Magadan, S. Moineau, The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature* **468**, 67-71 (2010).
17. B. Zetsche, J. S. Gootenberg, O. O. Abudayyeh, I. M. Slaymaker, K. S. Makarova, P. Essletzbichler, S. E. Volz, J. Joung, J. van der Oost, A. Regev, E. V. Koonin, F. Zhang, Cpf1 Is a Single RNA-Guided Endonuclease of a Class 2 CRISPR-Cas System. *Cell* **163**, 759-771 (2015).
18. J. S. Chen, E. Ma, L. B. Harrington, M. Da Costa, X. Tian, J. M. Palefsky, J. A. Doudna, CRISPR-Cas12a target binding unleashes indiscriminate single-stranded DNase activity. *Science* **360**, 436-439 (2018).
19. D. B. T. Cox, J. S. Gootenberg, O. O. Abudayyeh, B. Franklin, M. J. Kellner, J. Joung, F. Zhang, RNA editing with CRISPR-Cas13. *Science* **358**, 1019-1027 (2017).
20. J. S. Gootenberg, O. O. Abudayyeh, J. W. Lee, P. Essletzbichler, A. J. Dy, J. Joung, V. Verdine, N. Donghia, N. M. Daringer, C. A. Freije, C. Myhrvold, R. P. Bhattacharyya, J. Livny, A. Regev, E. V. Koonin, D. T. Hung, P. C. Sabeti, J. J. Collins, F. Zhang, Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2. *Science* **356**, 438-442 (2017).
21. K. S. Makarova, Y. I. Wolf, O. S. Alkhnbashi, F. Costa, S. A. Shah, S. J. Saunders, R. Barrangou, S. J. Brouns, E. Charpentier, D. H. Haft, P. Horvath, S. Moineau, F. J. Mojica, R. M. Terns, M. P. Terns, M. F. White, A. F. Yakunin, R. A. Garrett, J. van der Oost, R. Backofen, E. V. Koonin, An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol* **13**, 722-736 (2015).

22. A. Ozcan, P. Pausch, A. Linden, A. Wulf, K. Schuhle, J. Heider, H. Urlaub, T. Heimerl, G. Bange, L. Randau, Type IV CRISPR RNA processing and effector complex formation in *Aromatoleum aromaticum*. *Nat Microbiol* **4**, 89-96 (2019).
23. G. Tamulaitis, C. Venclovas, V. Siksnys, Type III CRISPR-Cas Immunity: Major Differences Brushed Aside. *Trends Microbiol* **25**, 49-61 (2017).
24. F. A. Ran, L. Cong, W. X. Yan, D. A. Scott, J. S. Gootenberg, A. J. Kriz, B. Zetsche, O. Shalem, X. Wu, K. S. Makarova, E. V. Koonin, P. A. Sharp, F. Zhang, *In vivo* genome editing using *Staphylococcus aureus* Cas9. *Nature* **520**, 186-191 (2015).
25. L. S. Qi, M. H. Larson, L. A. Gilbert, J. A. Doudna, J. S. Weissman, A. P. Arkin, W. A. Lim, Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. *Cell* **152**, 1173-1183 (2013).
26. X. Xu, L. S. Qi, A CRISPR-dCas Toolbox for Genetic Engineering and Synthetic Biology. *J Mol Biol* **431**, 34-47 (2019).
27. A. C. Komor, Y. B. Kim, M. S. Packer, J. A. Zuris, D. R. Liu, Programmable editing of a target base in genomic DNA without doublestranded DNA cleavage. *Nature* **533**, 420-424 (2016).
28. N. M. Gaudelli, A. C. Komor, H. A. Rees, M. S. Packer, A. H. Badran, D. I. Bryson, D. R. Liu, Programmable base editing of A\*T to G\*C in genomic DNA without DNA cleavage. *Nature* **551**, 464-471 (2017).
29. X. Li, Y. Wang, Y. Liu, B. Yang, X. Wang, J. Wei, Z. Lu, Y. Zhang, J. Wu, X. Huang, L. Yang, J. Chen, Base editing with a Cpf1-cytidine deaminase fusion. *Nat Biotechnol* **36**, 324-327 (2018).
30. M. Haeussler, K. Schonig, H. Eckert, A. Eschstruth, J. Mianne, J. B. Renaud, S. Schneider-Maunoury, A. Shkumatava, L. Teboul, J. Kent, J. S. Joly, J. P. Concordet, Evaluation of off-target and ontarget scoring algorithms and integration into the guide RNA selection tool CRISPOR. *Genome Biology* **17**, (2016).
31. F. Heigwer, G. Kerr, M. Boutros, E-CRISP: fast CRISPR target site identification. *Nature Methods* **11**, 122-124 (2014).
32. T. J. Cradick, P. Qiu, C. M. Lee, E. J. Fine, G. Bao, COSMID: A Webbased Tool for Identifying and Validating CRISPR/Cas Off-target Sites. *Mol Ther Nucleic Acids* **3**, e214 (2014).

33. M. Labuhn, F. F. Adams, M. Ng, S. Knoess, A. Schambach, E. M. Charpentier, A. Schwarzer, J. L. Mateo, J. H. Klusmann, D. Heckl, Refined sgRNA efficacy prediction improves large- and smallscale CRISPR-Cas9 applications. *Nucleic Acids Res* **46**, 1375-1385 (2018).
34. L. O. W. Wilson, A. R. O'Brien, D. C. Bauer, The Current State and Future of CRISPR-Cas9 gRNA Design Tools. *Front Pharmacol* **9**, 749 (2018).
35. D. Paquet, D. Kwart, A. Chen, A. Sproul, S. Jacob, S. Teo, K. M. Olsen, A. Gregg, S. Noggle, M. Tessier-Lavigne, Efficient introduction of specific homozygous and heterozygous mutations using CRISPR/Cas9. *Nature* **533**, 125-129 (2016).
36. R. O. Bak, D. P. Dever, M. H. Porteus, CRISPR/Cas9 genome editing in human hematopoietic stem cells. *Nat Protoc* **13**, 358-376 (2018).
37. A. Hendel, R. O. Bak, J. T. Clark, A. B. Kennedy, D. E. Ryan, S. Roy, I. Steinfeld, B. D. Lunstad, R. J. Kaiser, A. B. Wilkens, R. Bacchetta, A. Tsalenko, D. Dellinger, L. Bruhn, M. H. Porteus, Chemically modified guide RNAs enhance CRISPR-Cas genome editing in human primary cells. *Nat Biotechnol* **33**, 985-989 (2015).
38. P. W. Burridge, E. Matsa, P. Shukla, Z. C. Lin, J. M. Churko, A. D. Ebert, F. Lan, S. Diecke, B. Huber, N. M. Mordwinkin, J. R. Plews, O. J. Abilez, B. Cui, J. D. Gold, J. C. Wu, Chemically defined generation of human cardiomyocytes. *Nat Methods* **11**, 855-860 (2014).
39. Z. Wen, H. N. Nguyen, Z. Guo, M. A. Lalli, X. Wang, Y. Su, N. S. Kim, K. J. Yoon, J. Shin, C. Zhang, G. Makri, D. Nauen, H. Yu, E. Guzman, C. H. Chiang, N. Yoritomo, K. Kaibuchi, J. Zou, K. M. Christian, L. Cheng, C. A. Ross, R. L. Margolis, G. Chen, K. S. Kosik, H. Song, G. L. Ming, Synaptic dysregulation in a human iPS cell model of mental disorders. *Nature* **515**, 414-418 (2014).
40. J. R. Jones, L. Kong, M. G. t. Hanna, B. Hoffman, R. Krencik, R. Bradley, T. Hagemann, J. Choi, M. Doers, M. Dubovis, M. A. Sherafat, A. Bhattacharyya, C. Kendzierski, A. Audhya, A. Messing, S. C. Zhang, Mutations in GFAP Disrupt the Distribution and Function of Organelles in Human Astrocytes. *Cell Rep* **25**, 947-958 e944 (2018).
41. A. M. Lager, O. G. Corradin, J. M. Cregg, M. S. Elitt, H. E. Shick, B. L. L. Clayton, K. C. Allan, H. E. Olsen, M. Madhavan, P. J.

- Tesar, Rapid functional genetics of the oligodendrocyte lineage using pluripotent stem cells. *Nat Commun* **9**, 3708 (2018).
42. C. Claes, J. Van Den Daele, R. Boon, S. Schouteden, A. Colombo, L. S. Monasor, M. Fiers, L. Ordovas, F. Nami, B. Bohrmann, S. Tahirovic, B. De Strooper, C. M. Verfaillie, Human stem cell-derived plaque clearance upon heterozygous or homozygous loss of TREM2. *Alzheimers Dement* **15**, 453-464 (2019).
43. F. Soldner, R. Jaenisch, Stem Cells, Genome Editing, and the Path to Translational Medicine. *Cell* **175**, 615-632 (2018).
44. M. A. Lancaster, M. Renner, C. A. Martin, D. Wenzel, L. S. Bicknell, M. E. Hurles, T. Homfray, J. M. Penninger, A. P. Jackson, J. A. Knoblich, Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. *Nature* **501**, 373-379 (2013).
45. M. A. Lancaster, J. A. Knoblich, Generation of cerebral organoids from human pluripotent stem cells. *Nat Protoc* **9**, 2329-2340 (2014).
46. J. A. Barrera, L. R. Kao, R. E. Hammer, J. Seemann, J. L. Fuchs, T. L. Megraw, *CDK5RAP2* regulates centriole engagement and cohesion in mice. *Dev Cell* **18**, 913-926 (2010).
47. Y. Li, J. Muffat, A. Omer, I. Bosch, M. A. Lancaster, M. Sur, L. Gehrke, J. A. Knoblich, R. Jaenisch, Induction of Expansion and Folding in Human Cerebral Organoids. *Cell Stem Cell* **20**, 385-396 e383 (2017).
48. J. Ogawa, G. M. Pao, M. N. Shokhirev, I. M. Verma, Glioblastoma Model Using Human Cerebral Organoids. *Cell Rep* **23**, 1220-1229 (2018).
49. B. S. Freedman, C. R. Brooks, A. Q. Lam, H. Fu, R. Morizane, V. Agrawal, A. F. Saad, M. K. Li, M. R. Hughes, R. V. Werff, D. T. Peters, J. Lu, A. Baccei, A. M. Siedlecki, M. T. Valerius, K. Musunuru, K. M. McNagny, T. I. Steinman, J. Zhou, P. H. Lerou, J. V. Bonventre, Modelling kidney disease with CRISPR-mutant kidney organoids derived from human pluripotent epiblast spheroids. *Nature Communications* **6**, 8715 (2015).
50. S. M. Czerniecki, N. M. Cruz, J. L. Harder, R. Menon, J. Annis, E. A. Otto, R. E. Gulieva, L. V. Islas, Y. K. Kim, L. M. Tran, T. J. Martins, J. W. Pippin, H. Fu, M. Kretzler, S. J. Shankland, J. Himmelfarb, R. T. Moon, N. Paragas, B. S. Freedman, High-Throughput Screening Enhances Kidney Organoid Differentiation from Human Pluripotent

- Stem Cells and Enables Automated Multidimensional Phenotyping. *Cell Stem Cell* **22**, 929-940 e924 (2018).
- 51. G. Schwank, B. K. Koo, V. Sasselli, J. F. Dekkers, I. Heo, T. Demircan, N. Sasaki, S. Boymans, E. Cuppen, C. K. van der Ent, E. E. Nieuwenhuis, J. M. Beekman, H. Clevers, Functional repair of CFTR by CRISPR/Cas9 in intestinal stem cell organoids of cystic fibrosis patients. *Cell Stem Cell* **13**, 653-658 (2013).
  - 52. M. Matano, S. Date, M. Shimokawa, A. Takano, M. Fujii, Y. Ohta, T. Watanabe, T. Kanai, T. Sato, Modeling colorectal cancer using CRISPR-Cas9-mediated engineering of human intestinal organoids. *Nature Medicine* **21**, 256-+ (2015).
  - 53. J. Drost, R. H. van Jaarsveld, B. Ponsioen, C. Zimberlin, R. van Boxtel, A. Buijs, N. Sachs, R. M. Overmeer, G. J. Offerhaus, H. Begthel, J. Korving, M. van de Wetering, G. Schwank, M. Logtenberg, E. Cuppen, H. J. Snippert, J. P. Medema, G. J. Kops, H. Clevers, Sequential cancer mutations in cultured human intestinal stem cells. *Nature* **521**, 43-47 (2015).
  - 54. J. L. Everman, C. Rios, M. A. Seibold, Primary Airway Epithelial Cell Gene Editing Using CRISPR-Cas9. *Methods Mol Biol* **1706**, 267-292 (2018).
  - 55. G. G. Gornalusse, R. K. Hirata, S. E. Funk, L. Riolobos, V. S. Lopes, G. Manske, D. Prunkard, A. G. Colunga, L. A. Hanafi, D. O. Clegg, C. Turtle, D. W. Russell, HLA-E-expressing pluripotent stem cells escape allogeneic responses and lysis by NK cells. *Nat Biotechnol* **35**, 765-772 (2017).
  - 56. M. S. Schubert, E. Cedrone, B. Neun, M. A. Behlke, M. A. Dobrovolskaia, Chemical Modification of CRISPR gRNAs Eliminate type I Interferon Responses in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells. *J Cytokine Biol* **3**, (2018).
  - 57. S. Kim, T. Koo, H. G. Jee, H. Y. Cho, G. Lee, D. G. Lim, H. S. Shin, J. S. Kim, CRISPR RNAs trigger innate immune responses in human cells. *Genome Res*, (2018).
  - 58. B. Wienert, J. Shin, E. Zelin, K. Pestal, J. E. Corn, *In vitro*-transcribed guide RNAs trigger an innate immune response via the RIG-I pathway. *PLoS Biol* **16**, e2005840 (2018).
  - 59. K. Schumann, S. Lin, E. Boyer, D. R. Simeonov, M. Subramaniam, R. E. Gate, G. E. Haliburton, C. J. Ye, J. A. Bluestone, J. A. Doudna,

- A. Marson, Generation of knock-in primary human T cells using Cas9 ribonucleoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**, 10437-10442 (2015).
60. D. Gomes-Silva, M. Srinivasan, S. Sharma, C. M. Lee, D. L. Wagner, T. H. Davis, R. H. Rouse, G. Bao, M. K. Brenner, M. Mamontkin, CD7-edited T cells expressing a CD7-specific CAR for the therapy of T-cell malignancies. *Blood* **130**, 285-296 (2017).
61. J. Ren, X. Zhang, X. Liu, C. Fang, S. Jiang, C. H. June, Y. Zhao, A versatile system for rapid multiplex genome-edited CAR T cell generation. *Oncotarget* **8**, 17002-17011 (2017).
62. L. J. Rupp, K. Schumann, K. T. Roybal, R. E. Gate, C. J. Ye, W. A. Lim, A. Marson, CRISPR/Cas9-mediated *PD-1* disruption enhances anti-tumor efficacy of human chimeric antigen receptor T cells. *Sci Rep* **7**, 737 (2017).
63. C. Zhang, J. Liu, J. F. Zhong, X. Zhang, Engineering CAR-T cells. *Biomark Res* **5**, 22 (2017).
64. J. Ren, Y. Zhao, Advancing chimeric antigen receptor T cell therapy with CRISPR/Cas9. *Protein Cell* **8**, 634-643 (2017).
65. X. Liu, Y. Zhang, C. Cheng, A. W. Cheng, X. Zhang, N. Li, C. Xia, X. Wei, X. Liu, H. Wang, CRISPR-Cas9-mediated multiplex gene editing in CAR-T cells. *Cell Res* **27**, 154-157 (2017).
66. T. L. Roth, C. Puig-Saus, R. Yu, E. Shifrut, J. Carnevale, P. J. Li, J. Hiatt, J. Saco, P. Krystofinski, H. Li, V. Tobin, D. N. Nguyen, M. R. Lee, A. L. Putnam, A. L. Ferris, J. W. Chen, J. N. Schickel, L. Pellerin, D. Carmody, G. Alkorta-Aranburu, D. Del Gaudio, H. Matsumoto, M. Morell, Y. Mao, M. Cho, R. M. Quadros, C. B. Gurumurthy, B. Smith, M. Haugwitz, S. H. Hughes, J. S. Weissman, K. Schumann, J. H. Esensten, A. P. May, A. Ashworth, G. M. Kupfer, S. A. W. Greeley, R. Bacchetta, E. Meffre, M. G. Roncarolo, N. Romberg, K. C. Herold, A. Ribas, M. D. Leonetti, A. Marson, Reprogramming human T cell function and specificity with non-viral genome targeting. *Nature* **559**, 405-409 (2018).
67. H. Mollanoori, H. Shahraki, Y. Rahmati, S. Teimourian, CRISPR/Cas9 and CAR-T cell, collaboration of two revolutionary technologies in cancer immunotherapy, an instruction for successful cancer treatment. *Hum Immunol* **79**, 876-882 (2018).

68. E. Shifrut, J. Carnevale, V. Tobin, T. L. Roth, J. M. Woo, C. T. Bui, P. J. Li, M. E. Diolaiti, A. Ashworth, A. Marson, Genome-wide CRISPR Screens in Primary Human T Cells Reveal Key Regulators of Immune Function. *Cell* **175**, 1958-1971 e1915 (2018).
69. P. K. Mandal, L. M. Ferreira, R. Collins, T. B. Meissner, C. L. Boutwell, M. Friesen, V. Vrbanac, B. S. Garrison, A. Stortchevoi, D. Bryder, K. Musunuru, H. Brand, A. M. Tager, T. M. Allen, M. E. Talkowski, D. J. Rossi, C. A. Cowan, Efficient ablation of genes in human hematopoietic stem and effector cells using CRISPR/Cas9. *Cell Stem Cell* **15**, 643-652 (2014).
70. M. C. Gundry, L. Brunetti, A. Lin, A. E. Mayle, A. Kitano, D. Wagner, J. I. Hsu, K. A. Hoegnauer, C. M. Rooney, M. A. Goodell, D. Nakada, Highly Efficient Genome Editing of Murine and Human Hematopoietic Progenitor Cells by CRISPR/Cas9. *Cell Rep* **17**, 1453-1461 (2016).
71. G. Schioli, A. Conti, S. Ferrari, L. Della Volpe, A. Jacob, L. Albano, S. Beretta, A. Calabria, V. Vavassori, P. Gasparini, E. Salataj, D. Ndiaye-Lobry, C. Brombin, J. Chaumeil, E. Montini, I. Merelli, P. Genovese, L. Naldini, R. Di Micco, Precise Gene Editing Preserves Hematopoietic Stem Cell Function following Transient p53-Mediated DNA Damage Response. *Cell Stem Cell* **24**, 551-565 e558 (2019).
72. D. P. Dever, R. O. Bak, A. Reinisch, J. Camarena, G. Washington, C. E. Nicolas, M. Pavel-Dinu, N. Saxena, A. B. Wilkens, S. Mantri, N. Uchida, A. Hendel, A. Narla, R. Majeti, K. I. Weinberg, M. H. Porteus, CRISPR/Cas9 beta-globin gene targeting in human haematopoietic stem cells. *Nature* **539**, 384-389 (2016).
73. M. A. DeWitt, W. Magis, N. L. Bray, T. Wang, J. R. Berman, F. Urbinati, S. J. Heo, T. Mitros, D. P. Munoz, D. Boffelli, D. B. Kohn, M. C. Walters, D. Carroll, D. I. Martin, J. E. Corn, Selection-free genome editing of the sickle mutation in human adult hematopoietic stem/progenitor cells. *Sci Transl Med* **8**, 360ra134 (2016).
74. C. T. Charlesworth, J. Camarena, M. K. Cromer, S. Vaidyanathan, R. O. Bak, J. M. Carte, J. Potter, D. P. Dever, M. H. Porteus, Priming Human Repopulating Hematopoietic Stem and Progenitor Cells for Cas9/sgRNA Gene Targeting. *Mol Ther Nucleic Acids* **12**, 89-104 (2018).

75. R. J. Ihry, K. A. Worninger, M. R. Salick, E. Frias, D. Ho, K. Theriault, S. Kommineni, J. Chen, M. Sondey, C. Ye, R. Randhawa, T. Kulkarni, Z. Yang, G. McAllister, C. Russ, J. Reece-Hoyes, W. Forrester, G. R. Hoffman, R. Dolmetsch, A. Kaykas, p53 inhibits CRISPR-Cas9 engineering in human pluripotent stem cells. *Nat Med* **24**, 939-946 (2018).
76. E. Haapaniemi, S. Botla, J. Persson, B. Schmierer, J. Taipale, CRISPR-Cas9 genome editing induces a p53-mediated DNA damage response. *Nat Med* **24**, 927-930 (2018).
77. A. Conti, R. Di Micco, p53 activation: a checkpoint for precision genome editing? *Genome Med* **10**, 66 (2018).
78. X. L. Li, G. H. Li, J. Fu, Y. W. Fu, L. Zhang, W. Q. Chen, C. Arakaki, J. P. Zhang, W. Wen, M. Zhao, W. V. Chen, G. D. Botimer, D. Baylink, L. Aranda, H. Choi, R. Bechar, P. Talbot, C. K. Sun, T. Cheng, X. B. Zhang, Highly efficient genome editing via CRISPR-Cas9 in human pluripotent stem cells is achieved by transient BCL-XL overexpression. *Nucleic Acids Research* **46**, 10195-10215 (2018).
79. F. T. Merkle, S. Ghosh, N. Kamitaki, J. Mitchell, Y. Avior, C. Mello, S. Kashin, S. Mekhoubad, D. Ilic, M. Charlton, G. Saphier, R. E. Handsaker, G. Genovese, S. Bar, N. Benvenisty, S. A. McCarroll, K. Eggan, Human pluripotent stem cells recurrently acquire and expand dominant negative P53 mutations. *Nature* **545**, 229-233 (2017).
80. S. Avery, A. J. Hirst, D. Baker, C. Y. Lim, S. Alagaratnam, R. I. Skotheim, R. A. Lothe, M. F. Pera, A. Colman, P. Robson, P. W. Andrews, B. B. Knowles, BCL-XL mediates the strong selective advantage of a 20q11.21 amplification commonly found in human embryonic stem cell cultures. *Stem Cell Reports* **1**, 379-386 (2013).
81. H. T. Nguyen, C. Markouli, M. Geens, L. Barbe, K. Sermon, C. Spits, Human embryonic stem cells show low-grade microsatellite instability. *Mol Hum Reprod* **20**, 981-989 (2014).
82. E. M. Anderson, A. Haupt, J. A. Schiel, E. Chou, H. B. Machado, Z. Strezoska, S. Lenger, S. McClelland, A. Birmingham, A. Vermeulen, A. Smith, Systematic analysis of CRISPR-Cas9 mismatch tolerance reveals low levels of off-target activity. *J Biotechnol* **211**, 56-65 (2015).
83. C. Kuscu, S. Arslan, R. Singh, J. Thorpe, M. Adli, Genome-wide analysis reveals characteristics of off-target sites bound by the Cas9 endonuclease. *Nat Biotechnol* **32**, 677-683 (2014).

84. X. Wu, A. J. Kriz, P. A. Sharp, Target specificity of the CRISPR-Cas9 system. *Quant Biol* **2**, 59-70 (2014).
85. S. Q. Tsai, Z. Zheng, N. T. Nguyen, M. Liebers, V. V. Topkar, V. Thapar, N. Wyvckens, C. Khayter, A. J. Iafrate, L. P. Le, M. J. Aryee, J. K. Joung, GUIDE-seq enables genome-wide profiling of offtarget cleavage by CRISPR-Cas nucleases. *Nat Biotechnol* **33**, 187-197 (2015).
86. R. L. Frock, J. Hu, R. M. Meyers, Y. J. Ho, E. Kii, F. W. Alt, Genomewide detection of DNA double-stranded breaks induced by engineered nucleases. *Nat Biotechnol* **33**, 179-186 (2015).
87. N. Crosetto, A. Mitra, M. J. Silva, M. Bienko, N. Dojer, Q. Wang, E. Karaca, R. Chiarle, M. Skrzypczak, K. Ginalski, P. Pasero, M. Rowicka, I. Dikic, Nucleotide-resolution DNA double-strand break mapping by next-generation sequencing. *Nat Methods* **10**, 361-365 (2013).
88. L. F. Ribeiro, L. F. C. Ribeiro, M. Q. Barreto, R. J. Ward, Protein Engineering Strategies to Expand CRISPR-Cas9 Applications. *Int J Genomics* **2018**, 1652567 (2018).
89. B. P. Kleinstiver, V. Pattanayak, M. S. Prew, S. Q. Tsai, N. T. Nguyen, Z. Zheng, J. K. Joung, High-fidelity CRISPR-Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects. *Nature* **529**, 490-495 (2016).
90. I. M. Slaymaker, L. Gao, B. Zetsche, D. A. Scott, W. X. Yan, F. Zhang, Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity. *Science* **351**, 84-88 (2016).
91. J. S. Chen, Y. S. Dagdas, B. P. Kleinstiver, M. M. Welch, A. A. Sousa, L. B. Harrington, S. H. Sternberg, J. K. Joung, A. Yildiz, J. A. Doudna, Enhanced proofreading governs CRISPR-Cas9 targeting accuracy. *Nature* **550**, 407-410 (2017).
92. A. Casini, M. Olivieri, G. Petris, C. Montagna, G. Reginato, G. Maule, F. Lorenzin, D. Prandi, A. Romanel, F. Demichelis, A. Inga, A. Cereseto, A highly specific SpCas9 variant is identified by in vivo screening in yeast. *Nature Biotechnology* **36**, 265 (2018).
93. B. P. Kleinstiver, M. S. Prew, S. Q. Tsai, V. V. Topkar, N. T. Nguyen, Z. Zheng, A. P. Gonzales, Z. Li, R. T. Peterson, J. R. Yeh, M. J. Aryee, J. K. Joung, Engineered CRISPR-Cas9 nucleases with altered PAM specificities. *Nature* **523**, 481-485 (2015).

94. H. Hirano, J. S. Gootenberg, T. Horii, O. O. Abudayyeh, M. Kimura, P. D. Hsu, T. Nakane, R. Ishitani, I. Hatada, F. Zhang, H. Nishimasu, O. Nureki, Structure and Engineering of *Francisella novicida* Cas9. *Cell* **164**, 950-961 (2016).
95. J. H. Hu, S. M. Miller, M. H. Geurts, W. Tang, L. Chen, N. Sun, C. M. Zeina, X. Gao, H. A. Rees, Z. Lin, D. R. Liu, Evolved Cas9 variants with broad PAM compatibility and high DNA specificity. *Nature* **556**, 57-63 (2018).
96. B. P. Kleinstiver, A. A. Sousa, R. T. Walton, Y. E. Tak, J. Y. Hsu, K. Clement, M. M. Welch, J. E. Horng, J. Malagon-Lopez, I. Scarfo, M. V. Maus, L. Pinello, M. J. Aryee, J. K. Joung, Engineered CRISPRCas12a variants with increased activities and improved targeting ranges for gene, epigenetic and base editing. *Nat Biotechnol* **37**, 276-282 (2019).
97. M. Liu, S. Rehman, X. Tang, K. Gu, Q. Fan, D. Chen, W. Ma, Methodologies for Improving HDR Efficiency. *Front Genet* **9**, 691 (2018).
98. V. T. Chu, T. Weber, B. Wefers, W. Wurst, S. Sander, K. Rajewsky, R. Kuhn, Increasing the efficiency of homology-directed repair for CRISPR-Cas9-induced precise gene editing in mammalian cells. *Nat Biotechnol* **33**, 543-548 (2015).
99. C. Yu, Y. Liu, T. Ma, K. Liu, S. Xu, Y. Zhang, H. Liu, M. La Russa, M. Xie, S. Ding, L. S. Qi, Small molecules enhance CRISPR genome editing in pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* **16**, 142-147 (2015).
100. F. Robert, M. Barbeau, S. Ethier, J. Dostie, J. Pelletier, Pharmacological inhibition of DNA-PK stimulates Cas9-mediated genome editing. *Genome Med* **7**, 93 (2015).
101. T. Maruyama, S. K. Dougan, M. C. Truttmann, A. M. Bilate, J. R. Ingram, H. L. Ploegh, Increasing the efficiency of precise genome editing with CRISPR-Cas9 by inhibition of nonhomologous end joining. *Nat Biotechnol* **33**, 538-542 (2015).
102. J. Pinder, J. Salsman, G. Dellaire, Nuclear domain ‘knock-in’ screen for the evaluation and identification of small molecule enhancers of CRISPR-based genome editing. *Nucleic Acids Res* **43**, 9379-9392 (2015).
103. S. Riesenbergs, T. Maricic, Targeting repair pathways with small molecules increases precise genome editing in pluripotent stem cells. *Nat Commun* **9**, 2164 (2018).

104. S. Lin, B. T. Staahl, R. K. Alla, J. A. Doudna, Enhanced homology-directed human genome engineering by controlled timing of CRISPR/Cas9 delivery. *Elife* **3**, e04766 (2014).
105. J. Carlson-Steevermer, A. A. Abdeen, L. Kohlenberg, M. Goedland, K. Molugu, M. Lou, K. Saha, Assembly of CRISPR ribonucleoproteins with biotinylated oligonucleotides via an RNA aptamer for precise gene editing. *Nat Commun* **8**, 1711 (2017).
106. M. Ma, F. Zhuang, X. Hu, B. Wang, X. Z. Wen, J. F. Ji, J. J. Xi, Efficient generation of mice carrying homozygous double-floxp alleles using the Cas9-Avidin/Biotin-donor DNA system. *Cell Res* **27**, 578-581 (2017).
107. N. Savic, F. C. Ringnalda, H. Lindsay, C. Berk, K. Bargsten, Y. Li, D. Neri, M. D. Robinson, C. Ciaudo, J. Hall, M. Jinek, G. Schwank, Covalent linkage of the DNA repair template to the CRISPR-Cas9 nuclease enhances homology-directed repair. *Elife* **7**, (2018).
108. E. J. Aird, K. N. Lovendahl, A. St Martin, R. S. Harris, W. R. Gordon, Increasing Cas9-mediated homology-directed repair efficiency through covalent tethering of DNA repair template. *Commun Biol* **1**, 54 (2018).
109. K. A. Mitzelfelt, C. McDermott-Roe, M. N. Grzybowski, M. Marquez, C. T. Kuo, M. Riedel, S. Lai, M. J. Choi, K. D. Kolander, D. Helbling, D. P. Dimmock, M. A. Battle, C. J. Jou, M. Tristani-Firouzi, J. W. Verbsky, I. J. Benjamin, A. M. Geurts, Efficient Precision Genome Editing in iPSCs via Genetic Co-targeting with Selection. *Stem Cell Reports* **8**, 491-499 (2017).
110. K. Ikeda, N. Uchida, T. Nishimura, J. White, R. M. Martin, H. Nakauchi, V. Sebastian, K. I. Weinberg, M. H. Porteus, Efficient scarless genome editing in human pluripotent stem cells. *Nat Methods* **15**, 1045-1047 (2018).
111. D. Asundani, M. Yusupova, P. Mali, Genome engineering via CRISPR-Cas systems: Inserting the ‘Precision’ in Precision Medicine. *The Journal of Precision Medicine*, (2017).
112. R. Rouet, B. A. Thuma, M. D. Roy, N. G. Lintner, D. M. Rubitski, J. E. Finley, H. M. Wisniewska, R. Mendonsa, A. Hirsh, L. de Onate, J. Compte Barron, T. J. McLellan, J. Bellenger, X. Feng, A. Varghese, B. A. Chrunyk, K. Borzilleri, K. D. Hesp, K. Zhou, N. Ma, M. Tu, R. Dullea, K. F. McClure, R. C. Wilson, S. Liras,

- V. Mascitti, J. A. Doudna, Receptor-Mediated Delivery of CRISPR-Cas9 Endonuclease for Cell-Type-Specific Gene Editing. *J Am Chem Soc* **140**, 6596-6603 (2018).
113. S. Kim, D. Kim, S. W. Cho, J. Kim, J. S. Kim, Highly efficient RNAguided genome editing in human cells via delivery of purified Cas9 ribonucleoproteins. *Genome Res* **24**, 1012-1019 (2014).
114. X. Liang, J. Potter, S. Kumar, N. Ravinder, J. D. Chesnut, Enhanced CRISPR/Cas9-mediated precise genome editing by improved design and delivery of gRNA, Cas9 nuclease, and donor DNA. *J Biotechnol* **241**, 136-146 (2017).
115. B. Zetsche, S. E. Volz, F. Zhang, A split-Cas9 architecture for inducible genome editing and transcription modulation. *Nature Biotechnology* **33**, 139-142 (2015).
116. Y. Veeranagouda, D. Debono-Lagneaux, H. Fournet, G. Thill, M. Didier, CRISPR-Cas9-Edited Site Sequencing (CRES-Seq): An Efficient and High-Throughput Method for the Selection of CRISPR-Cas9-Edited Clones. *Curr Protoc Mol Biol* **121**, 31 14 31-31 14 11 (2018).
117. S. Khadempar, S. Familghadakchi, R. A. Motlagh, N. Farahani, M. Dashtiahangar, H. Rezaei, S. M. Gheibi Hayat, CRISPR-Cas9 in genome editing: Its function and medical applications. *J Cell Physiol* **234**, 5751-5761 (2019).
118. S. Pelletier, CRISPR-Cas Systems for the Study of Immune Function. *eLS*. (2016).
119. W. Qin, P. M. Kutny, R. S. Maser, S. L. Dion, J. D. Lamont, Y. Zhang, G. A. Perry, H. Wang, Generating Mouse Models Using CRISPRCas9-Mediated Genome Editing. *Curr Protoc Mouse Biol* **6**, 39-66 (2016).

# **WILEY END USER LICENSE AGREEMENT**

Go to [www.wiley.com/go/eula](http://www.wiley.com/go/eula) to access Wiley's ebook EULA.



# LESS TROUBLESHOOTING. MORE EXPERIMENTING.

使用STEMCELL Technologies优化后的类器官培养基，尽早达成您的科研突破。  
我们提供高品质的类器官培养工具，培训，技术支持和科学资源。

我们的类器官培养基具有如下优势：

- 通过性能测试的质量认证，所有的原材料经过严苛的筛选
- 适用于不同的细胞系和供体样本
- 提供详细的实验流程和技术支持

了解更多，请访问[www.stemcell.com/GrowOrganoids](http://www.stemcell.com/GrowOrganoids)。

Photo Credit © STEMCELL Technologies Inc.



WILEY

Sponsored by:

