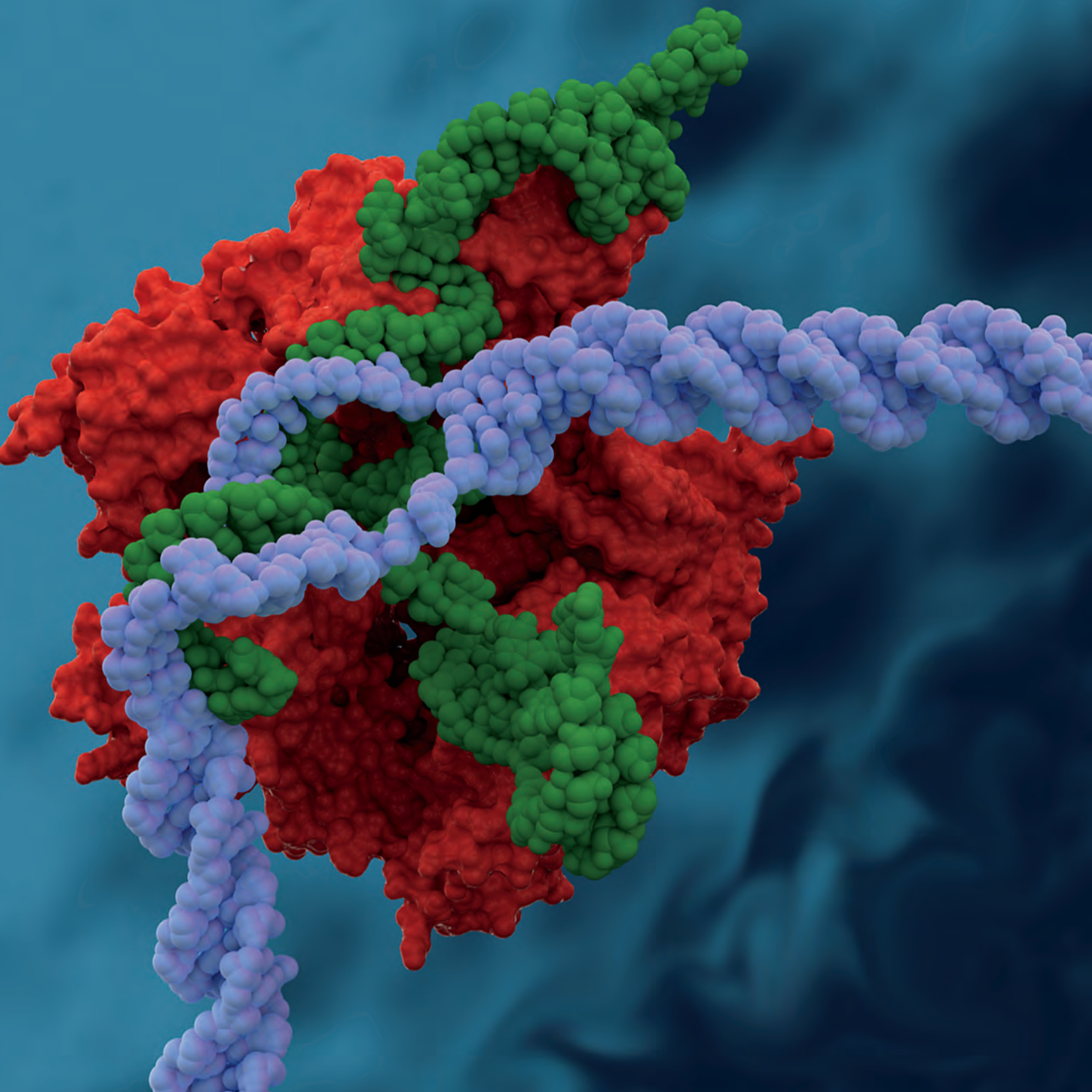


# 基因编辑研究综述

近期以 Illumina® 技术为特色的基因编辑研究文献综述





# 目录

- 4 简介**
  - CRISPR 位点以及 CRISPR-Cas9 技术的机制
- 7 CRISPR-Cas9 技术的应用**
  - 研究
  - 在医学领域的应用
  - 农业和环境科学
- 13 工作流程和特异性**
  - 操作过程概览
  - 脱靶效应
  - 特异性：它意味着什么，为何如此重要
  - 方法开发
  - CRISPR-Cas9 技术在研究流程中的整合
- 24 参考文献**

本文档突出了近期发表的一些文献，它们证明了 Illumina 技术在单细胞研究中的应用。若有意深入了解本文档中提到的一些平台和分析方法，请访问 [www.illumina.com](http://www.illumina.com)。

# 简介

规律间隔成簇短回文重复序列 (CRISPR)-Cas 技术是一种革命性的基因编辑方法，它利用可编程的 RNA 来指导核酸酶寻找基因组中的特定目标位置。这种简单的方法取代了之前那些繁琐又昂贵的 DNA 编辑技术，如基于蛋白质的锌指核酸酶 (ZFN) 或转录激活样效应因子核酸酶 (TALEN)。自从最初几篇介绍 CRISPR-Cas 技术在原核<sup>1,2</sup>和真核<sup>3,4</sup>细胞中的基因组编辑应用的文献发表以来，这种技术在全球实验室的应用呈指数级增长。<sup>5</sup>潜在的应用领域包括基础研究、治疗、农业和环境研究。2016 年，也就是基因编辑首次引入人体试验两年后，<sup>6</sup>美国国立卫生研究院 (NIH) 首次批准了 CRISPR-Cas9 技术在人体试验中的应用。<sup>7,8</sup> 这项决策有望通过细胞替换，在未来实现罕见遗传病、人类免疫缺陷病毒 (HIV) 感染和恶性血液病的治疗。

CRISPR-Cas9 系统来源于原核生物适应性免疫系统，它靶定并切割噬菌体或质粒的入侵遗传元件。<sup>9-15</sup>

任何 DNA 编辑工具的效果和安全性都高度取决于特异性。一些研究发现，CRISPR-Cas9 的使用可能导致意外的脱靶效应。<sup>16-28</sup> 基于这个原因，一些研究小组正在开发检测<sup>29-32</sup>和降低<sup>33-45</sup>脱靶效应的方法。

## CRISPR 位点以及 CRISPR-Cas9 技术的机制

细菌和古细菌在适应性免疫中使用 CRISPR-Cas9 系统。CRISPR 位点由短回文重复序列组成，它们被称为“间隔序列”的非重复短序列隔开。间隔序列来源于入侵的 DNA，如噬菌体，在感染发生时它们复制并掺入 CRISPR 位点。在这个位点附近，另一个位点则包含一套编码 CRISPR 相关的内切核酸酶 (Cas) 的基因，这种酶在基因组中引入切口。当相同的入侵 DNA 重复感染时，RNA 分子 (CRISPR RNA 或 crRNA) 将与 Cas 和反式激活 crRNA (tracrRNA) 形成复合物，指导核酸酶抵达外源序列所在之处。Cas-RNA 复合物将识别与 crRNA 互补并与特定的三核苷酸位点 (前间区序列邻近基序或 PAM) 相邻的 DNA 目标。然后，复合物将切割并使入侵的 DNA 失活 (图 1)。

1. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA and Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*. 2012;337:816-821.
2. Gasiunas G, Barrangou R, Horvath P and Siksnys V. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109:E2579-2586.
3. Cong L, Ran FA, Cox D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*. 2013;339:819-823.
4. Mali P, Yang L, Esvelt KM, et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*. 2013;339:823-826.
5. Dow LE. Modeling Disease In Vivo With CRISPR/Cas9. *Trends Mol Med*. 2015;21:609-621.
6. Tebas P, Stein D, Tang WW, et al. Gene editing of CCR5 in autologous CD4 T cells of persons infected with HIV. *N Engl J Med*. 2014;370:901-910.
7. Reardon S. First CRISPR clinical trial gets green light from US panel. *Nature News*. 2016;
8. Cyranoski D. CRISPR gene-editing tested in a person for the first time. *Nature News*. 2016;
9. Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, Amemura M and Nakata A. Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J Bacteriol*. 1987;169:5429-5433.
10. Mojica FJ, Diez-Villasenor C, Soria E and Juez G. Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria. *Mol Microbiol*. 2000;36:244-246.
11. Jansen R, Embden JD, Gaastra W and Schouls LM. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Mol Microbiol*. 2002;43:1565-1575.
12. Mojica FJ, Diez-Villasenor C, Garcia-Martinez J and Soria E. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *J Mol Evol*. 2005;60:174-182.
13. Pourcel C, Salvignol G and Vergnaud G. CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies. *Microbiology*. 2005;151:653-663.
14. Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*. 2007;315:1709-1712.
15. Brouns SJ, Jore MM, Lundgren M, et al. Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes. *Science*. 2008;321:960-964.
16. Marraffini LA and Sontheimer EJ. CRISPR interference limits horizontal gene transfer in staphylococci by targeting DNA. *Science*. 2008;322:1843-1845.
17. Garneau JE, Dupuis ME, Villion M, et al. The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature*. 2010;468:67-71.

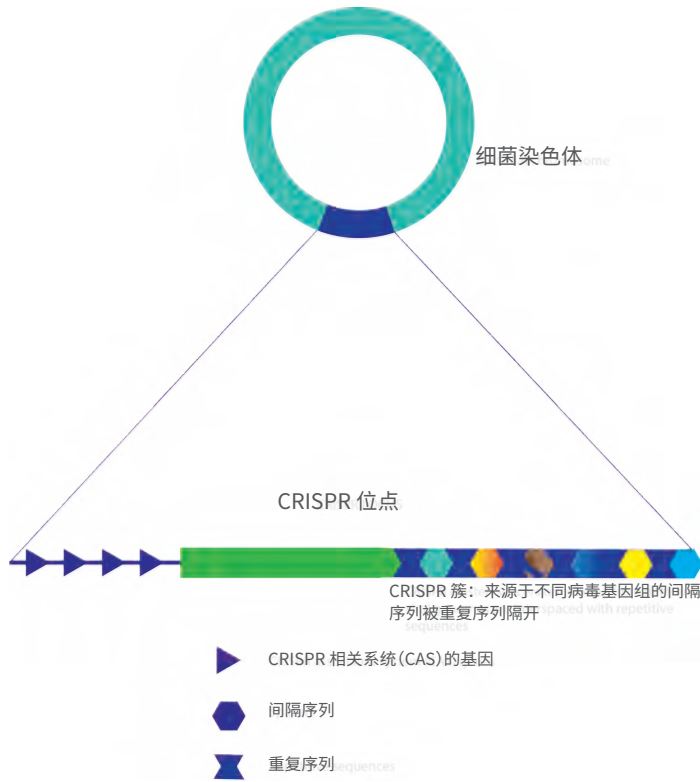


图 1. CRISPR 位点由短回文重复序列组成，它们被称为“间隔序列”的非重复短序列隔开。间隔序列来源于入侵的 DNA，如噬菌体，在感染发生时它们复制并掺入 CRISPR 位点。在这个位点附近，另一个位点则包含一套编码 Cas 内切核酸酶的基因，这种酶在基因组中引入切口。

尽管不同细菌内与 CRISPR 活性相关的核酸酶不同，但本综述中的大部分话题都围绕着化脓性链球菌 (*Streptococcus pyogenes*)，它依赖内切核酸酶 Cas9。基于这个原因，本文主要指的是 CRISPR-Cas9 技术。

CRISPR-Cas9 系统需要两种 RNA 分子：crRNA（从 DNA 间隔序列转录而来）和 tracrRNA（它与 crRNA 的相互作用是招募 Cas9 所必需的结构）（图 2）。在一项里程碑研究中<sup>46</sup>，这两种 RNA 分子杂交形成单链向导 RNA (sgRNA)。这种简化的 Cas9-sgRNA 系统证明了基因编辑的特性。

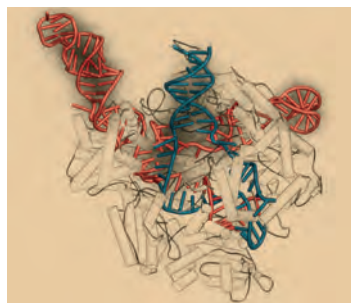


图 2. 动画显示 Cas9（透明）和 sgRNA（红色）与 DNA（蓝色）相互作用的分子结构。

18. Deltcheva E, Chylinski K, Sharma CM, et al. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature*. 2011;471:602-607.
19. Sapranaukas R, Gasiunas G, Fremaux C, Barrangou R, Horvath P and Siksnys V. The *Streptococcus thermophilus* CRISPR/Cas system provides immunity in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res*. 2011;39:9275-9282.
20. Yang H, Wang H, Shivavilla CS, Cheng AW, Shi L and Jaenisch R. One-step generation of mice carrying reporter and conditional alleles by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell*. 2013;154:1370-1379.
21. 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;24:132-141.
22. Liang X, Potter J, Kumar S, et al. Rapid and highly efficient mammalian cell engineering via Cas9 protein transfection. *J Biotechnol*. 2015;208:44-53.
23. Pattanayak V, Lin S, Gullinger JP, Ma E, Doudna JA and Liu DR. High-throughput profiling of off-target DNA cleavage reveals RNA-programmed Cas9 nuclease specificity. *Nat Biotechnol*. 2013;31:839-843.
24. Fu Y, Foden JA, Khayter C, et al. High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. *Nat Biotechnol*. 2013;31:822-826.
25. Hsu PD, Scott DA, Weinstein JA, et al. DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nat Biotechnol*. 2013;31:827-832.
26. Cradick TJ, Fine EJ, Antico CJ and Bao G. CRISPR/Cas9 systems targeting beta-globin and CCR5 genes have substantial off-target activity. *Nucleic Acids Res*. 2013;41:9584-9592.
27. Lin Y, Cradick TJ, Brown MT, et al. CRISPR/Cas9 systems have off-target activity with insertions or deletions between target DNA and guide RNA sequences. *Nucleic Acids Res*. 2014;42:7473-7485.
28. Zhang H, Zhang J, Wei P, et al. The CRISPR/Cas9 system produces specific and homozygous targeted gene editing in rice in one generation. *Plant Biotechnol J*. 2014;12:797-807.
29. Tsai SQ, Zheng Z, Nguyen NT, et al. GUIDE-seq enables genome-wide profiling of off-target cleavage by CRISPR-Cas nucleases. *Nat Biotechnol*. 2015;33:187-197.
30. Frock RL, Hu J, Meyers RM, Ho YJ, Kii E and Alt FW. Genome-wide detection of DNA double-stranded breaks induced by engineered nucleases. *Nat Biotechnol*. 2015;33:179-186.
31. Crosetto N, Mitra A, Silva MJ, et al. Nucleotide-resolution DNA double-strand break mapping by next-generation sequencing. *Nat Methods*. 2013;10:361-365.
32. Kim D, Bae S, Park J, et al. Digenome-seq: genome-wide profiling of CRISPR-Cas9 off-target effects in human cells. *Nat Methods*. 2015;12:237-243, 231 p following 243.
33. Fu Y, Sander JD, Reyon D, Cascio VM and Joung JK. Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs. *Nat Biotechnol*. 2014;32:279-284.
34. Ran FA, Hsu PD, Lin CY, et al. Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell*. 2013;154:1380-1389.

在哺乳动物细胞中<sup>47,48</sup>，Cas9 引入核酸酶诱导的双链断裂（DSB），它们可通过两种竞争性的修复机制中的一种来修复（图 3）。第一种是非同源末端连接（NHEJ），它更常见但容易出错，这种修复带来插入和缺失突变（indel）。第二种是同源介导的修复（HDR），在供体 DNA 模板存在时，这种修复可实现精确的基因校正或插入。

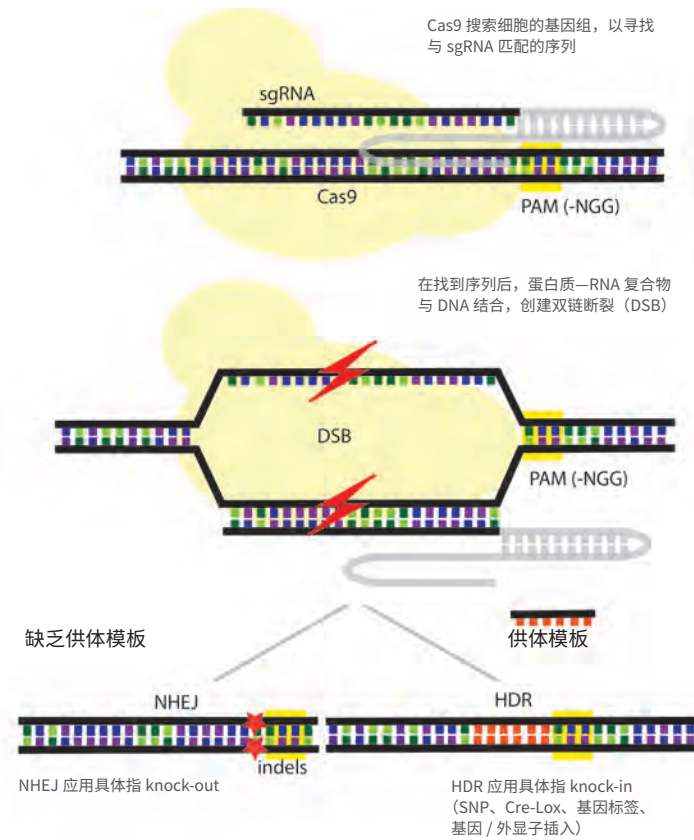


图 3. CRISPR-Cas9 机制的示意图。Cas9 搜索细胞的基因组内与 20 bp 的 sgRNA 匹配的序列。一旦发现，Cas9 在匹配的序列中引入 DSB。此时，两种通路将竞争性地修复引入的断裂：1) NHEJ 以一种容易出错的机制修复末端，不需要同源模板，可产生小的插入和缺失。2) HDR 机制需要同源序列来指导修复，可将供体模板插入序列中。

## 综述

Dow L. E. Modeling Disease In Vivo With CRISPR/Cas9. *Trends Mol Med.* 2015;21: 609-621

Lander E. S. The Heroes of CRISPR. *Cell.* 2016;164: 18-28

Ledford H. The unsung heroes of CRISPR. *Nature.* 2016;535: 342-344

Tsai S. Q. and Joung J. K. Defining and improving the genome-wide specificities of CRISPR-Cas9 nucleases. *Nat Rev Genet.* 2016;17: 300-312

Ledford H. CRISPR, the disruptor. *Nature.* 2015;522: 20-24

35. Mali P, Aach J, Stranges PB, et al. CAS9 transcriptional activators for target specificity screening and paired nickases for cooperative genome engineering. *Nat Biotechnol.* 2013;31:833-838.
36. Tsai SQ, Wyvekens N, Khayter C, et al. Dimeric CRISPR RNA-guided FokI nucleases for highly specific genome editing. *Nat Biotechnol.* 2014;32:569-576.
37. Guilinger JP, Thompson DB and Liu DR. Fusion of catalytically inactive Cas9 to FokI nuclease improves the specificity of genome modification. *Nat Biotechnol.* 2014;32:577-582.
38. Kleinstiver BP, Tsai SQ, Prew MS, et al. Genome-wide specificities of CRISPR-Cas Cpf1 nucleases in human cells. *Nat Biotechnol.* 2016;34:869-874.
39. Kleinstiver BP, Pattanayak V, Prew MS, et al. High-fidelity CRISPR-Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects. *Nature.* 2016;529:490-495.
40. Kim S, Kim D, Cho SW, Kim J and Kim JS. Highly efficient RNA-guided genome editing in human cells via delivery of purified Cas9 ribonucleoproteins. *Genome Res.* 2014;24:1012-1019.
41. Zuris JA, Thompson DB, Shu Y, et al. Cationic lipid-mediated delivery of proteins enables efficient protein-based genome editing in vitro and in vivo. *Nat Biotechnol.* 2015;33:73-80.
42. Wright AV, Sternberg SH, Taylor DW, et al. Rational design of a split-Cas9 enzyme complex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015;112:2984-2989.
43. Zetsche B, Volz SE and Zhang F. A split-Cas9 architecture for inducible genome editing and transcription modulation. *Nat Biotechnol.* 2015;33:139-142.
44. Nihongaki Y, Kawano F, Nakajima T and Sato M. Photoactivatable CRISPR-Cas9 for optogenetic genome editing. *Nat Biotechnol.* 2015;33:755-760.
45. Davis KM, Pattanayak V, Thompson DB, Zuris JA and Liu DR. Small molecule-triggered Cas9 protein with improved genome-editing specificity. *Nat Chem Biol.* 2015;11:316-318.
46. Jinek M, Chylinski K, Fontana I, Hauer M, Doudna JA and Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science.* 2012;337:816-821.
47. Cong L, Ran FA, Cox D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science.* 2013;339:819-823.
48. Mali P, Yang L, Esvelt KM, et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science.* 2013;339:823-826.

# CRISPR-Cas9 技术的应用

过去几年，提及“CRISPR”以及“基因编辑”的文献数量呈指数级增长，这足以证明使用 CRISPR-Cas9 技术的基因编辑为基因组学研究人员带来了一种强大的新工具（图 4）。尽管相当一部分研究涉及到方法学本身的技术层面，但这个系统是多功能的，目前已应用在大量生物系统中（表 1）。

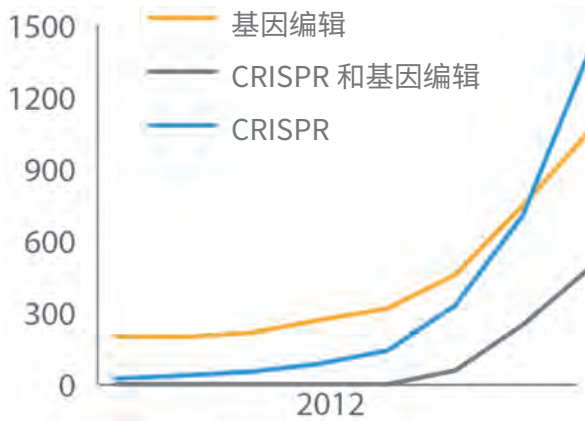


图 4. 根据 PubMed 搜索结果，CRISPR-Cas9 及相关的关键词在科学文献摘要中的出现频率不断增加。

CRISPR-Cas9 系统这种在活细胞中轻松准确地插入或删除 DNA 序列的能力，一直是研究人员长期以来的梦想。此系统能够删除和插入遗传元件（如启动子和调控序列）和同线区域，以检测这些元件对表型或疾病的影响。

CRISPR-Cas9 技术的成功和快速采用在某种程度上归功于新一代测序 (NGS) 的普及。NGS 可用于检测基因组中的目标区域，验证目标的准确修饰，并检测任何脱靶效应。基因的表达和功能随后可通过新一代 RNA 测序 (RNA-Seq) 和染色质免疫沉淀测序 (ChIP-Seq) 来追踪。这些方法也能指导 CRISPR-Cas9 系统的优化和其他基因编辑系统的发现。

高效、易用和多功能让 CRISPR-Cas9 和类似的基因编辑系统成为基因组研究中不可或缺的部分。与聚合酶链式反应 (PCR) 类似, 这项技术有望整合到每个分子生物学实验室。

表 1. CRISPR 基因编辑系统的近期应用示例

领域	应用	参考文献
研究	方法开发	49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57
	高通量基因组筛选	58, 59, 60, 61, 62, 63, 64
	有研究或医学价值的非模式物种的编辑	65
医学	1 期临床试验	66, 67
农业	作物和动物的编辑	68, 69
环境	基因驱动和疾病预防	70, 71, 72

## 研究

CRISPR-Cas9 基因组编辑实现了快速、精确的基因组操作, 可在体外或体内筛选多个突变。自从八十年代首次建立基因敲除的小鼠模型以来, 转基因细胞和动物一直是分子生物学中的重要工具。<sup>73</sup> 如今, CRISPR-Cas9 技术的出现让研究人员能够轻松且精确地突变、沉默、诱导或替换遗传元件, 以研究基因功能和疾病生物学。

全基因组关联分析 (GWAS) 已经鉴定出与复杂性状相关联的多个基因位点, 其中大部分有着较低的外显率。<sup>74,75,76</sup> CRISPR-Cas9 系统可用来筛选这些多态性对表型表达的影响, 这要归功于其精确性和实用性。此外, 它还允许研究人员平行编辑多个位点, 以便对复杂的表型建模。<sup>77</sup>

49. Tsai SQ, Zheng Z, Nguyen NT, et al. GUIDE-seq enables genome-wide profiling of off-target cleavage by CRISPR-Cas nucleases. *Nat Biotechnol.* 2015;33:187-197.
50. Frock RL, Hu J, Meyers RM, Ho YJ, Kii E and Alt FW. Genome-wide detection of DNA double-stranded breaks induced by engineered nucleases. *Nat Biotechnol.* 2015;33:179-186.
51. Kim D, Bae S, Park J, et al. Digenome-seq: genome-wide profiling of CRISPR-Cas9 off-target effects in human cells. *Nat Methods.* 2015;12:237-243, 231 p following 243.
52. Tsai SQ and Joung JK. Defining and improving the genome-wide specificities of CRISPR-Cas9 nucleases. *Nat Rev Genet.* 2016;17:300-312.
53. Kim D, Kim S, Kim S, Park J and Kim JS. Genome-wide target specificities of CRISPR-Cas9 nucleases revealed by multiplex Digenome-seq. *Genome Res.* 2016;26:406-415.
54. Kleinstiver BP, Tsai SQ, Prew MS, et al. Genome-wide specificities of CRISPR-Cas Cpf1 nucleases in human cells. *Nat Biotechnol.* 2016;34:869-874.
55. Kleinstiver BP, Pattanayak V, Prew MS, et al. High-fidelity CRISPR-Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects. *Nature.* 2016;529:490-495.
56. Komor AC, Kim YB, Packer MS, Zuris JA and Liu DR. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature.* 2016;533:420-424.
57. Nishida K, Arzoo T, Yachie N, et al. Targeted nucleotide editing using hybrid prokaryotic and vertebrate adaptive immune systems. *Science.* 2016;
58. Shalem O, Sanjana NE and Zhang F. High-throughput functional genomics using CRISPR-Cas9. *Nat Rev Genet.* 2015;16:299-311.
59. Maresch R, Mueller S, Veltkamp C, et al. Multiplexed pancreatic genome engineering and cancer induction by transfection-based CRISPR/Cas9 delivery in mice. *Nat Commun.* 2016;7:10770.
60. Korkmaz G, Lopes R, Ugalde AP, et al. Functional genetic screens for enhancer elements in the human genome using CRISPR-Cas9. *Nat Biotechnol.* 2016;34:192-198.
61. Weber J, Ollinger R, Friedrich M, et al. CRISPR/Cas9 somatic multiplex-mutagenesis for high-throughput functional cancer genomics in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015;112:13982-13987.
62. Swiech L, Heidenreich M, Banerjee A, et al. In vivo interrogation of gene function in the mammalian brain using CRISPR-Cas9. *Nat Biotechnol.* 2015;33:102-106.
63. Chen S, Sanjana NE, Zheng K, et al. Genome-wide CRISPR screen in a mouse model of tumor growth and metastasis. *Cell.* 2015;160:1246-1260.
64. Parnas O, Jovanovic M, Eisenhaure TM, et al. A Genome-wide CRISPR Screen in Primary Immune Cells to Dissect Regulatory Networks. *Cell.* 2015;162:675-686.
65. Yang L, Guell M, Niu D, et al. Genome-wide inactivation of porcine endogenous retroviruses (PERVs). *Science.* 2015;350:1101-1104.



CRISPR-Cas9 系统也为产生新的动物模型打开了大门，包括过去因操作困难而放弃的物种（比如，白色念珠菌 *Candida albicans* 因缺乏减数分裂和质粒而为传统的编辑方法带来挑战）。<sup>78</sup> 它还让过去无法实现的研究成为可能，比如猪器官的人源化，这些研究曾因人类免疫系统排斥以及猪基因组中包埋的逆转录病毒感染而被放弃。<sup>79,80</sup>

**Chen S., Sanjana N. E., Zheng K., Shalem O., Lee K., et al. Genome-wide CRISPR screen in a mouse model of tumor growth and metastasis. *Cell*. 2015;160: 1246-1260.**

在这项研究中，作者利用 CRISPR-Cas9 技术对肿瘤的生长和转移进行全基因组功能缺失筛选。利用带有 67,405 个 sgRNA 的基因组规模文库，他们诱变了一个非转移性的小鼠癌细胞系。一旦诱变，在移植到免疫缺陷的小鼠后，突变的细胞池迅速生成转移瘤。富集在肺转移和晚期原发性肿瘤中的 sgRNA 靶向一小组基因，这表明肿瘤生长和转移是受一组特定的功能缺失突变调控的。之后，研究人员通过单个 sgRNA 或一小组 sgRNA 来靶定初次筛选时鉴定出的高分基因，发现这明显加速了转移瘤的形成。这项研究证明了基于 Cas9 的系统筛选在研究体内的癌症进化上的作用。

illumina 的技术：MiSeq® 测序仪、HiSeq® 2000 测序仪，和 HiSeq® 2500 测序仪

**Korkmaz G., Lopes R., Ugalde A. P., Nevedomskaya E., Han R., et al. Functional genetic screens for enhancer elements in the human genome using CRISPR-Cas9. *Nat Biotechnol*. 2016;34: 192-198.**

为了鉴定非编码调控元件，作者将 CRISPR-Cas9 基因编辑应用在细胞系上，以编辑 p53 和 E $\alpha$  增强子区域的转录因子结合位点。他们鉴定出一些功能上的增强子元件，并确定了其中两个元件在调控基因表达上的作用。他们还证明，CRISPR-Cas9 tiling 筛选能够定位增强子元件中的功能域。这项工作证明了体外 CRISPR-Cas9 编辑在研究基因组非编码区域中的作用。

illumina 的技术：TruSeq® Small RNA Kit、TruSeq RNA Library Prep Kit、HiSeq 2500 测序仪

**Maresch R., Mueller S., Veltkamp C., Ollinger R., Friedrich M., et al. Multiplexed pancreatic genome engineering and cancer induction by transfection-based CRISPR/Cas9 delivery in mice. *Nat Commun*. 2016;7: 10770.**

胰腺导管腺癌（PDAC）是最致命的癌症之一，治疗机会很有限。之前的遗传关联研究已经建立了参与 PDAC 发展的基因目录，但仍有很多需要了解。在这项研究中，作者开发并应用了一种基于电穿孔的载体导入方法，可将多个 CRISPR-Cas9 载体导入成年小鼠的胰腺，以便同时编辑多个基因。他们能够诱导胰腺肿瘤，并证明这种方法在关键应用中有用，如基因-网络组合分析、体内合成致死筛选和染色体改造。他们还证明了负向选择筛选的可行性，这为解决生物相关的问题提供了机会。此外，他们还模拟了染色体缺失和染色体间易位的靶向编辑，以分析在胰腺癌中起重要作用的复杂结构变异。

illumina 的技术：MiSeq 测序仪

**Parnas O., Jovanovic M., Eisenhaure T. M., Herbst R. H., Dixit A., et al. A Genome-wide CRISPR Screen in Primary Immune Cells to Dissect Regulatory Networks. *Cell*. 2015;162: 675-686.**

在这项研究中，作者将全基因组范围 CRISPR-Cas9 混合文库引入树突状细胞（DC）中，以检测那些通过细菌脂多糖（LPS）控制肿瘤坏死因子（Tnf）诱导的基因。这是宿主反应中的重要过程，由 Tlr4 通路介导。通过 RNA 测序，他们鉴定出 Tlr4 信号通路的许多调控因子，以及许多以前未知的候选物。根据已知或候选基因缺陷的树突状细胞的蛋白质和 mRNA，他们将基因分成三个功能模块，它们对 LPS 的标准应答有不同影响，这突出了 PAF 复合物和寡糖基转移酶（OST）复合物的功能。

illumina 的技术：Nextera® XT DNA Sample Preparation Kit、HiSeq 2500 系统

66. Kaisler J. First proposed human test of CRISPR passes initial safety review. *Science*. 2016;
67. Reardon S. First CRISPR clinical trial gets green light from US panel. *Nature News*. 2016;
68. Khatodia S, Bhatotia K, Passricha N, Khurana SM and Tuteja N. The CRISPR/Cas Genome-Editing Tool: Application in Improvement of Crops. *Front Plant Sci*. 2016;7:506.
69. Guo R, Wan Y, Xu D, et al. Generation and evaluation of Myostatin knock-out rabbits and goats using CRISPR/Cas9 system. *Sci Rep*. 2016;6:29855.
70. Ledford HC, E. 'Gene drive' mosquitoes engineered to fight malaria. 2015;
71. Champer J, Buchman A and Akbari OS. Cheating evolution: engineering gene drives to manipulate the fate of wild populations. *Nat Rev Genet*. 2016;17:146-159.
72. Kistler KE, Voshall LB and Matthews BJ. Genome engineering with CRISPR-Cas9 in the mosquito *Aedes aegypti*. *Cell Rep*. 2015;11:51-60.
73. Thomas KR and Capecchi MR. Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell*. 1987;51:503-512.
74. Wellcome Trust Case Control C. Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature*. 2007;447:661-678.
75. Johnson AD and O'Donnell CJ. An open access database of genome-wide association results. *BMC Med Genet*. 2009;10:6.
76. Hibar DP, Stein JL, Renteria ME, et al. Common genetic variants influence human subcortical brain structures. *Nature*. 2015;520:224-229.
77. Shalem O, Sanjana NE and Zhang F. High-throughput functional genomics using CRISPR-Cas9. *Nat Rev Genet*. 2015;16:299-311.
78. Vyas VK, Barrasa MI and Fink GR. A *Candida albicans* CRISPR system permits genetic engineering of essential genes and gene families. *Sci Adv*. 2015;1:e1500248.
79. Reardon S. Gene-editing record smashed in pigs. *Nature*. 2015;
80. Yang L, Guell M, Niu D, et al. Genome-wide inactivation of porcine endogenous retroviruses (PERVs). *Science*. 2015;350:1101-1104.

Swiech L., Heidenreich M., Banerjee A., Habib N., Li Y., et al. In vivo interrogation of gene function in the mammalian brain using CRISPR-Cas9. *Nat Biotechnol.* 2015;33: 102-106.

作者利用腺相关病毒 (AAV) 载体将 SpCas9 和向导 RNA 导入成年小鼠的大脑, 这些向导 RNA 靶定单个基因 (*Mecp2*) 或多个基因 (*Dnmt1*、*Dnmt3a* 和 *Dnmt3b*)。然后, 他们利用行为学、电生理学、生物化学和遗传学的方法来鉴定这些基因组编辑对有丝分裂后的神经元的影响。这项研究证明了 AAV 介导的 SpCas9 基因组编辑能够在小鼠大脑中实现逆向功能研究。

Illumina 的技术: Nextera XT DNA Sample Preparation Kit、MiSeq 测序仪

Weber J., Ollinger R., Friedrich M., Ehmer U., Barenboim M., et al. CRISPR/Cas9 somatic multiplex-mutagenesis for high-throughput functional cancer genomics in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015;112: 13982-13987.

在这项工作中, 作者利用 sgRNA 和 CRISPR-Cas9 的肝脏导入来诱导靶向的体细胞多重突变。他们能够诱导产生肝细胞癌 (HCC) 和肝内胆管细胞癌 (ICC)。他们观察到靶基因的达尔文选择, 这抑制了相应细胞或组织背景下的肿瘤发生。通过这项研究, 他们证明了多重 CRISPR-Cas9 在小鼠的隐性遗传筛选或高通量癌症验证中的作用。

Illumina 的技术: MiSeq 测序仪

Yang L., Guell M., Niu D., George H., Leshia E., et al. Genome-wide inactivation of porcine endogenous retroviruses (PERVs). *Science.* 2015;350: 1101-1104.

猪的器官有望用于人类移植。然而, 在过去的应用中, 人们担心猪内源性逆转录病毒 (PERV) 会传播给人类。在估计 PERV 的总数为 62 之后, 这项研究的作者清除了猪肾脏上皮细胞系 (PK15) 中的所有 PERV。他们利用 CRISPR-Cas9 来破坏 PERV pol 基因的所有拷贝, 并证明 PERV 向人类细胞的传播降低 1,000 倍以上。

Illumina 的技术: MiSeq 测序仪

- 
81. Lanphier E. Don't edit the human germ line. *Nature.* 2015;519:410-411.
  82. Cyranoski D and Reardon S. Embryo editing sparks epic debate. *Nature.* 2015;520:593-594.
  83. Baltimore D, Berg P, Botchan M, et al. Biotechnology. A prudent path forward for genomic engineering and germline gene modification. *Science.* 2015;348:36-38.
  84. Cyranoski D. CRISPR gene-editing tested in a person for the first time. *Nature News.* 2016;
  85. Cyranoski D. CRISPR gene-editing tested in a person for the first time. *Nature News.* 2016;
  86. Kaisler J. First proposed human test of CRISPR passes initial safety review. *Science.* 2016;
  87. Reardon S. First CRISPR clinical trial gets green light from US panel. *Nature News.* 2016;
- 

## 在医学领域的应用

CRISPR-Cas9 基因编辑在疾病治疗上大有希望。与其他物种相同, 基因编辑在人类细胞上的应用也包括生殖细胞和体细胞的层面。然而, 生殖细胞的编辑引发安全和伦理方面的考虑。应科学界本身的要求, 它已经暂停了。<sup>81,82,83</sup>

最近在中国获批的 1 期临床试验是首次将改造过的免疫细胞注射到转移性非小细胞肺癌的患者中, 这些患者对化疗或放疗都没有响应。<sup>84</sup> 这项研究将从 10 名参与者的血液中提取 T 细胞, 并利用 CRISPR-Cas9 系统来敲除编码程序性死亡蛋白 1 (PD-1) 的基因, 这是免疫反应中的一个检查点。编辑后的细胞随后经过培养、扩增, 并重新注入这些个体的血管中。<sup>85</sup> 在美国, NIH 重组 DNA 咨询委员会 (RAC) 批准了一项类似的提案。这项研究将重点关注骨髓瘤、肉瘤和黑色素瘤的晚期患者, 他们对标准疗法没有响应。除了敲除 PD-1, 研究人员也将插入编码 NY-ESO-1 受体的基因, 此蛋白往往 (只) 在癌细胞上表达。研究团队还将敲除 2 个基因片段, 以增强 NY-ESO-1 的特异性, 这些片段编码主要 T 细胞受体的不同部分。<sup>86,87</sup>

由于设计新颖，这两个试验的重点都放在安全性上（1期），将局限于少数患者。重要的是，这两种程序在将改造后的细胞重新注入患者之前，都将筛选脱靶编辑。

在鼠肝细胞上开展的体细胞基因编辑，首次证明了成年哺乳动物的体细胞编辑。在这项研究中，研究人员利用 CRISPR-Cas9 来校正与遗传性酪氨酸血症相关的突变，<sup>88</sup> 这代表了 CRISPR-Cas9 体细胞编辑在医学上的原理证明。然而，这项研究也强调了改善导入方法的必要性，以便提高基因校正的比例，并将转基因导入其他组织。基于这些理由，以及编辑效率和特异性的考虑，科学家建议谨慎将这种技术应用于医学领域。<sup>89</sup>

**Kataoka K., Shiraishi Y., Takeda Y., Sakata S., Matsumoto M., et al. Aberrant PD-L1 expression through 3'-UTR disruption in multiple cancers. *Nature*. 2016;534: 402-406.**

PD-1/PD-L1 介导的免疫逃逸是癌症发展的一个重要机制。通过 49 例成人 T 细胞淋巴瘤 (ATL) 的全基因组测序，作者证明了免疫逃逸在部分程度上是通过破坏 PD-L1 编码基因 3' 端的结构变异来介导的。RNA-Seq 表明，这些变异与异常 PD-L1 转录本的增加有关，后者因被截短而稳定。他们利用 CRISPR-Cas9 技术，表明小鼠 PD-L1 基因 3' 未翻译区 (3'-UTR) 的破坏导致肿瘤细胞的免疫逃逸。这些结果证明 PD-1 的表达存在一种新的调控机制，并且表明 3'-UTR 可作为遗传标记，来检测通过 PD-L1 过表达而逃避肿瘤免疫力的癌症。

illumina 的技术: HiSeq 2000/2500 测序仪

**Yin H., Song C. Q., Dorkin J. R., Zhu L. J., Li Y., et al. Therapeutic genome editing by combined viral and non-viral delivery of CRISPR system components in vivo. *Nat Biotechnol*. 2016;34: 328-333.**

在这项研究中，作者利用脂质纳米颗粒导入 Cas9 mRNA，并结合使用编码 sgRNA 和修复模板的腺相关病毒 (AAV)，其目的是在人遗传性酪氨酸血症的小鼠模型中诱导基因的修复。他们表明，通过校正致病性的剪接突变，该治疗产生了延胡索酰乙酰乙酸水解酶 (Fah) 阳性的肝细胞。他们通过测序 (GUIDE-Seq) 对培养的肝细胞中的 DSB 进行基因组范围的无偏向鉴定，并结合靶向深度测序来监控脱靶效应，最终发现体内的脱靶率低。

illumina 的技术: Nextera XT、NextSeq® 500 测序仪、MiSeq 测序仪

## 农业和环境科学

CRISPR-Cas9 在农业、食品科学和环境科学上也拥有巨大潜力。过去，作物和动物的基因编辑只适用于玉米和大豆等大宗商品。这种限制来自于转基因作物获批所必需的技术和监管上的障碍。CRISPR-Cas9 技术的简单和低成本让科学家能够将其应用在不同物种上，如六倍体面包小麦<sup>90</sup>、迷你猪<sup>91</sup>和蘑菇。重要的是，一些经过改造的物种将不被现有的监管过程所覆盖。例如，最近改造的双孢蘑菇 (*Agaricus bisporus*) 不含外源基因，因此不需要受到美国农业部的监管。<sup>92</sup>

- 
88. Yin H, Xue W, Chen S, et al. Genome editing with Cas9 in adult mice corrects a disease mutation and phenotype. *Nat Biotechnol*. 2014;32:551-553.
  89. Ledford H. The unsung heroes of CRISPR. *Nature*. 2016;535:342-344.
  90. Wang Y, Cheng X, Shan Q, et al. Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew. *Nat Biotechnol*. 2014;32:947-951.
  91. Ainsworth C. Agriculture: A new breed of edits. *Nature*. 2015;528:S15-16.
  92. Waltz E. Gene-edited CRISPR mushroom escapes US regulation. *Nature*. 2016;532:293.
-

CRISPR-Cas9 技术也有望应用在环境科学中，特别是在基因驱动技术中——通过此过程让编辑后的基因在群体中传播，从而消除疾病。一些研究表明，基因驱动和 CRISPR 的结合使用可消除携带疾病的蚊子或蝗虫。<sup>93-96</sup> 然而，与人类生殖细胞编辑一样，这种方法已经被搁置，以便评估不可逆转或意想不到的潜在风险，并制定适当的法规。<sup>97</sup>

**Kistler K. E., Vosshall L. B. and Matthews B. J. Genome engineering with CRISPR-Cas9 in the mosquito *Aedes aegypti*. *Cell Rep.* 2015;11: 51-60.**

在这项研究中，作者利用 CRISPR-Cas9 系统来编辑埃及伊蚊 (*Aedes aegypti*) 的基因组。通过 RNA-DNA 配对，此系统实现了高效的编辑，并获得了高存活率。作者利用深度测序来验证编辑的存在，且他们能够将单链和双链供体整合到基因组中。这些编辑实现了稳定的生殖细胞传递，让突变的等位基因从一代传到下一代。

illumina 的技术: MiSeq 测序仪

**Guo R., Wan Y., Xu D., Cui L., Deng M., et al. Generation and evaluation of Myostatin knock-out rabbits and goats using CRISPR/Cas9 system. *Sci Rep.* 2016;6: 29855.**

为了研究牲畜中编码肌肉生长抑制素 (Mstn) 基因的破坏是否可改善肉质，作者应用 CRISPR-Cas9 技术来生成 Mstn 敲除的兔子和山羊。在 24 只 Mstn 敲除的兔子中，作者观察到形态的变化和严重的健康问题，如死产和早期死亡。4 只山羊中只有 1 只在早期生长中优于对照。作者建议，在应用基因编辑来改变动物繁殖之前，需考虑对动物健康的潜在影响。

illumina 的技术: MiSeq 测序仪

## 综述

Champer J., Buchman A. and Akbari O. S. Cheating evolution: engineering gene drives to manipulate the fate of wild populations. *Nat Rev Genet.* 2016;17: 146-159

Dominguez A. A., Lim W. A. and Qi L. S. Beyond editing: repurposing CRISPR-Cas9 for precision genome regulation and interrogation. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2016;17: 5-15

Dow L. E. Modeling Disease In Vivo With CRISPR/Cas9. *Trends Mol Med.* 2015;21: 609-621

Khatodia S., Bhatotia K., Passricha N., Khurana S. M. and Tuteja N. The CRISPR/Cas Genome-Editing Tool: Application in Improvement of Crops. *Front Plant Sci.* 2016;7: 506

Ledford H. CRISPR, the disruptor. *Nature.* 2015;522: 20-24

Ledford H. C., E. 'Gene drive' mosquitoes engineered to fight malaria. 2015;

Selle K. and Barrangou R. CRISPR-Based Technologies and the Future of Food Science. *J Food Sci.* 2015;80: R2367-2372

Shalem O., Sanjana N. E. and Zhang F. High-throughput functional genomics using CRISPR-Cas9. *Nat Rev Genet.* 2015;16: 299-311

Torres-Ruiz R. and Rodriguez-Perales S. CRISPR-Cas9: A Revolutionary Tool for Cancer Modelling. *Int J Mol Sci.* 2015;16: 22151-22168

Tschaharganeh D. F., Lowe S. W., Garippa R. J. and Livshits G. Using CRISPR/Cas to study gene function and model disease in vivo. *FEBS J.* 2016;

93. Kistler KE, Vosshall LB and Matthews BJ. Genome engineering with CRISPR-Cas9 in the mosquito *Aedes aegypti*. *Cell Rep.* 2015;11:51-60.

94. Hammond A, Galizi R, Kyrou K, et al. A CRISPR-Cas9 gene drive system targeting female reproduction in the malaria mosquito vector *Anopheles gambiae*. *Nat Biotechnol.* 2016;34:78-83.

95. Gantz VM and Bier E. Genome editing. The mutagenic chain reaction: a method for converting heterozygous to homozygous mutations. *Science.* 2015;348:442-444.

96. Gantz VM, Jasinskiene N, Tatarenkova O, et al. Highly efficient Cas9-mediated gene drive for population modification of the malaria vector mosquito *Anopheles stephensi*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015;112:E6736-6743.

97. Baltimore D, Berg P, Botchan M, et al. Biotechnology. A prudent path forward for genomic engineering and germline gene modification. *Science.* 2015;348:36-38.

## 工作流程和特异性

CRISPR-Cas9 基因组编辑的工作流程相对简单。科学家能够在 1-2 周内实现修饰，并在 2-3 周内获得修饰后的克隆细胞系。<sup>98</sup> 本章节将简要介绍基因组编辑实验的步骤，检查其效率和特异性的现有工具，以及测序的应用。

### 操作过程概览

若有意查看 CRISPR-Cas9 基因编辑实验方案的详细解释，请参阅相关科学文献。<sup>99</sup> 简单地说，操作过程分成以下几步（图 5）：

1. *sgRNA* 的目标选择以及试剂的设计
2. 试剂的构建
3. *sgRNA* 和 Cas 酶导入目标细胞
4. 修复模板的设计：这是一个可选步骤，它利用 HDR 通路而不是 NHEJ，带来更精确的编辑。若需要在指定位置插入特定编辑，必须采用这一步。
5. 修饰后的细胞系的克隆分离和扩增
6. 功能检测和验证
7. 目标细胞的克隆扩增

- 
98. Ran FAH, P.D.; Wright, J.; Agarwala, V.; Scott, D. A.; Zhang, F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protocols*. 2013;8:2281-2308.
  99. Ran FAH, P.D.; Wright, J.; Agarwala, V.; Scott, D. A.; Zhang, F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protocols*. 2013;8:2281-2308.
-

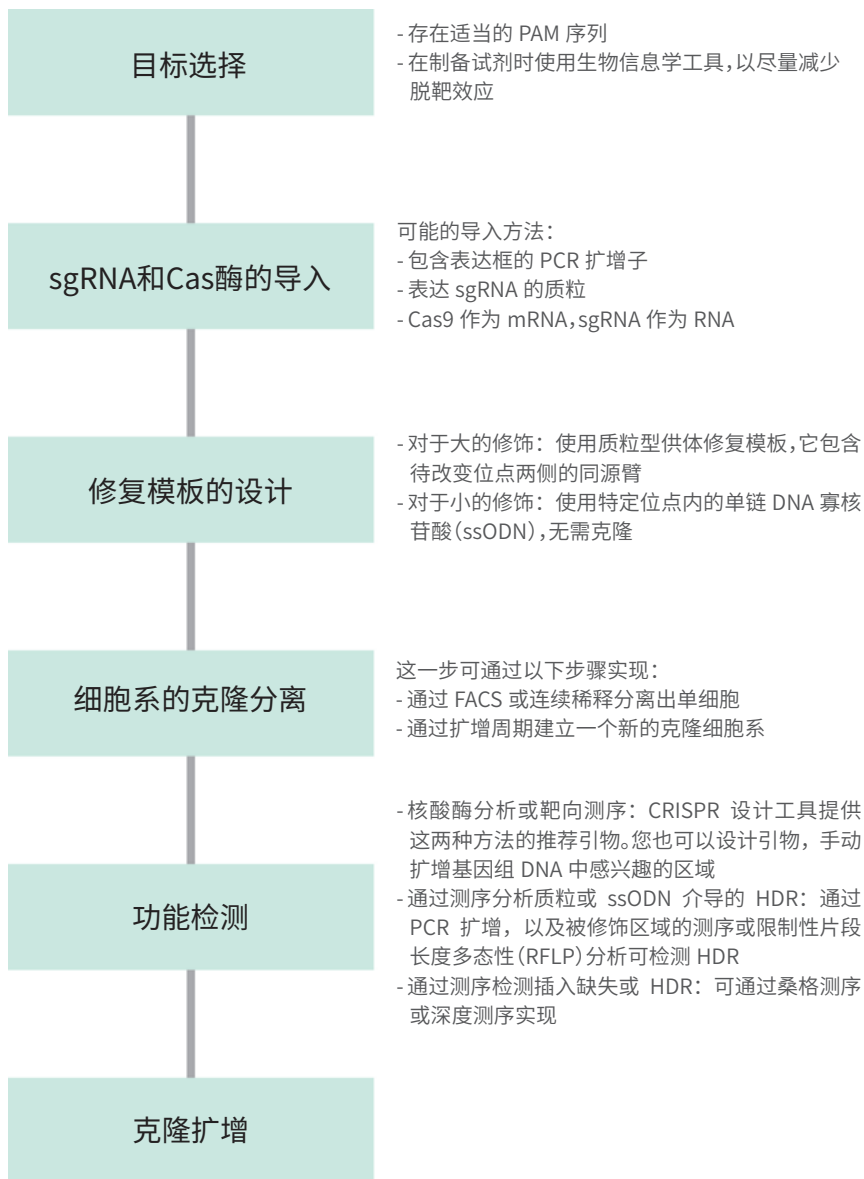


图 5. 利用 CRISPR-Cas9 系统开展基因组编辑的工作流程

## 脱靶效应

基因组编辑实验将产生混合的细胞群。一些细胞不携带预期突变，一些携带纯合突变，而另一些则携带等位基因频率不同的杂合突变。此外，细胞本身倾向于不太精确的 NHEJ 通路，而不是 HDR，因此大多数编辑后的细胞将包含小的插入缺失。基于这个原因，编辑实验后的第一步是检测预期突变存在的细胞并分离它们，在编辑允许扩增时，扩增这个克隆。在核苷酸水平评估编辑的方法因编辑和细胞系而异，不过常用的方法如表 2 所示。<sup>100</sup>

错配切割分析利用对错配敏感的核酸酶来检测单个错配和插入缺失。简单地说，首先利用 PCR 来扩增突变和对照野生型细胞中感兴趣的区域。初步扩增之后，将感兴趣的 DNA 变性并重新退火，形成突变位点上含有错配的异源双链核酸分子。这些错配随后被对错配敏感的核酸酶识别并消化。SURVEYOR™ 分析<sup>101</sup>就是采用这种方法。尽管简单又经济，但这种方法对频率低于 5% 的突变不敏感，通量低，并且不能提供序列数据。<sup>102</sup>

PCR 扩增结合限制性片段长度多态性 (RFLP) 分析对分析 HDR 插入十分有用，而利用针对缺失区域两侧的引物来开展 PCR 分析能够快速检测缺失。这些方法都很经济，且流程简单，但它们通量不高，也不能提供序列数据。<sup>103</sup> 桑格测序提供了准确的序列数据，适用于任何类型的编辑；但它很昂贵，流程冗长，通量也不高。<sup>104</sup>

NGS 能够以定性和定量的方式评估所有这些编辑。<sup>105</sup> 在样本数量大，且需要验证在靶 (on-target) 和脱靶 (off-target) 效应时，这种方法特别有用。<sup>106</sup>

100. CRISPR 101: Validating Your Genome Edit. Addgene. <http://blog.addgene.org/crispr-101-validating-your-genome-edit>. Accessed January 4, 2016.
101. Qiu P, Shandilya H, D'Alessio JM, O'Connor K, Durocher J and Gerard GF. Mutation detection using Surveyor nuclease. *Biotechniques*. 2004;36:702-707.
102. CRISPR Genotyping. Deskgen. <https://www.deskgen.com/landing/blog/high-throughput-crispr-genotyping>. Accessed January 4, 2016.
103. CRISPR Genotyping. Deskgen. <https://www.deskgen.com/landing/blog/high-throughput-crispr-genotyping>. Accessed January 4, 2016.
104. CRISPR Genotyping. Deskgen. <https://www.deskgen.com/landing/blog/high-throughput-crispr-genotyping>. Accessed January 4, 2016.
105. CRISPR 101: Validating Your Genome Edit. Addgene. <http://blog.addgene.org/crispr-101-validating-your-genome-edit>. Accessed January 4, 2016.
106. Ran FAH, P.D.; Wright, J.; Agarwala, V.; Scott, D. A.; Zhang, F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protocols*. 2013;8:2281-2308.

表 2. 检查编辑效率的现有方法

实验分析方法	鉴定的变异类型	结果
切割分析	单个错配和插入缺失	定性、半定量
PCR和靶向测序	HDR 插入	定性
PCR和RFLP	HDR 插入	定量
PCR	缺失	定性
NGS	所有编辑、全基因组的脱靶效应	定性 + 定量

## 特异性：它意味着什么，为何如此重要

在靶效率 (on-target efficacy) 是评估 sgRNA 修饰预期基因靶点的效果的一项指标，而脱靶效应 (off-target effects) 是对遗传元件和整体细胞应答的意外扰动。<sup>107</sup>

总的来说，基因编辑方法的特异性定义为在不必要时避免修饰的能力。它与脱靶效应的数量成反比。

脱靶效应取决于下列因素：

- 位置——向导序列的 3' 端比 5' 端更无法容忍错配。
- 数量——细胞存在无法忍受的最大数量的脱靶效应，具体取决于细胞和编辑。
- 向导序列——某些向导更无法容忍错配。
- 脱靶切割——它对试剂的比例敏感。
- 核酸酶——某些核酸酶更加特异。

关于每一点的细节，请参阅原始文献。<sup>108,109</sup>

CRISPR-Cas9 基因组编辑的常规使用须包含成功检测和降低脱靶效应的策略。<sup>110</sup>

### 评估向导特异性的最佳实践

人们已采用一些方法来预测和评估向导 RNA 的特异性和脱靶效应 (表 3)。<sup>111,112</sup>

最广泛采用的脱靶效应检测方法是使用预测这些位点可能存在于何处的计算方法，再结合错配切割分析或靶向测序。<sup>113,114,115</sup> 生物信息学方法可能利用序列相似性分析或基于其他参数的评分系统来预测潜在的脱靶切割位点。<sup>116,117,118</sup> 目前公开可用的程序如表 3 所示。关于每种方法的细节，请参阅原始文献。

107. Shalem O, Sanjana NE and Zhang F. High-throughput functional genomics using CRISPR-Cas9. *Nat Rev Genet.* 2015;16:299-311.
108. Hsu PD, Scott DA, Weinstein JA, et al. DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nat Biotechnol.* 2013;31:827-832.
109. Ran FAH, P.D.; Wright, J.; Agarwala, V.; Scott, D. A.; Zhang, F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protocols.* 2013;8:2281-2308.
110. Ran FAH, P.D.; Wright, J.; Agarwala, V.; Scott, D. A.; Zhang, F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protocols.* 2013;8:2281-2308.
111. Tsai SQ and Joung JK. Defining and improving the genome-wide specificities of CRISPR-Cas9 nucleases. *Nat Rev Genet.* 2016;17:300-312.
112. Tycko J, Myer VE and Hsu PD. Methods for Optimizing CRISPR-Cas9 Genome Editing Specificity. *Mol Cell.* 2016;63:355-370.
113. Fu Y, Foden JA, Khayter C, et al. High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. *Nat Biotechnol.* 2013;31:822-826.
114. Hsu PD, Scott DA, Weinstein JA, et al. DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nat Biotechnol.* 2013;31:827-832.
115. Tycko J, Myer VE and Hsu PD. Methods for Optimizing CRISPR-Cas9 Genome Editing Specificity. *Mol Cell.* 2016;63:355-370.
116. Fu Y, Foden JA, Khayter C, et al. High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. *Nat Biotechnol.* 2013;31:822-826.
117. Hsu PD, Scott DA, Weinstein JA, et al. DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nat Biotechnol.* 2013;31:827-832.
118. Tycko J, Myer VE and Hsu PD. Methods for Optimizing CRISPR-Cas9 Genome Editing Specificity. *Mol Cell.* 2016;63:355-370.
119. Hsu PD, Scott DA, Weinstein JA, et al. DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nat Biotechnol.* 2013;31:827-832.
120. Doench JG, Fusi N, Sullender M, et al. Optimized sgRNA design to maximize activity and minimize off-target effects of CRISPR-Cas9. *Nat Biotechnol.* 2016;34:184-191.
121. Bae S, Park J and Kim JS. Cas-OFFinder: a fast and versatile algorithm that searches for potential off-target sites of Cas9 RNA-guided endonucleases. *Bioinformatics.* 2014;30:1473-1475.
122. Hsu PD, Scott DA, Weinstein JA, et al. DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nat Biotechnol.* 2013;31:827-832.
123. Hsu PD, Scott DA, Weinstein JA, et al. DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nat Biotechnol.* 2013;31:827-832.
124. Cong L, Ran FA, Cox D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science.* 2013;339:819-823.
125. Ran FA, Hsu PD, Lin CY, et al. Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell.* 2013;154:1380-1389.
126. Heigwer F, Kerr G and Boutros M. E-CRISP: fast CRISPR target site identification. *Nat Methods.* 2014;11:122-123.



表 3. 预测脱靶效应的公开可用软件

实验分析方法	网站	参考文献
Benchling	<a href="https://benchling.com/">https://benchling.com/</a>	119, 120
Cas-OFFinder	<a href="http://www.rgenome.net/cas-offinder/">http://www.rgenome.net/cas-offinder/</a>	121
MIT CRISPR Design Tool	<a href="http://crispr.mit.edu/">http://crispr.mit.edu/</a>	122
Deskgen	<a href="https://www.deskgen.com/landing/">https://www.deskgen.com/landing/</a>	123
DNA 2.0 CRISPR gRNA Design Tool	<a href="https://www.dna20.com/products/crispr#4">https://www.dna20.com/products/crispr#4</a>	124, 125
E-CRISP	<a href="http://www.e-crisp.org/E-CRISP/">http://www.e-crisp.org/E-CRISP/</a>	126
EuPaGDT	<a href="http://grna.ctegd.uga.edu/">http://grna.ctegd.uga.edu/</a>	127
GenScript gRNA Design Tool	<a href="http://www.genscript.com/gRNA-design-tool.html">http://www.genscript.com/gRNA-design-tool.html</a>	128
ZiFiT	<a href="http://zifit.partners.org/ZiFiT/">http://zifit.partners.org/ZiFiT/</a>	129, 130
Broad GPP Portal	<a href="http://portals.broadinstitute.org/gpp/public/">http://portals.broadinstitute.org/gpp/public/</a>	131
CROP-IT	<a href="http://cheetah.bioch.virginia.edu/AdliLab/CROP-IT/homepage.html">http://cheetah.bioch.virginia.edu/AdliLab/CROP-IT/homepage.html</a>	132

靶向方法还包括根据部分简并寡核苷酸的环化反应，对部分随机的目标位点文库进行体外拷问，随后开展滚环扩增，SpCas9 的体外切割，接头连接，以及高通量测序。<sup>133</sup> 这种方法的优点在于能够检查许多组目标位点相似的测序文库。缺点在于许多随机的目标位点可能不存在于感兴趣的基因组中。机器学习算法的使用在某种程度上突破了这种限制。<sup>134</sup>

靶向方法会因必要的预先假设而产生偏向。发现那些可能被预测算法忽视的脱靶切割位点则需要全基因组的方法。<sup>135</sup> 这些方法通常分为细胞方法<sup>136-143</sup> 和体外方法<sup>144,145</sup> (表 4)<sup>146,147</sup>。

127. Doench JG, Fusi N, Sullender M, et al. Optimized sgRNA design to maximize activity and minimize off-target effects of CRISPR-Cas9. *Nat Biotechnol.* 2016;34:184-191.
128. Hsu PD, Scott DA, Weinstein JA, et al. DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nat Biotechnol.* 2013;31:827-832.
129. Hwang WY, Fu Y, Reyon D, et al. Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. *Nat Biotechnol.* 2013;31:227-229.
130. Mali P, Yang L, Esvelt KM, et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science.* 2013;339:823-826.
131. Doench JG, Fusi N, Sullender M, et al. Optimized sgRNA design to maximize activity and minimize off-target effects of CRISPR-Cas9. *Nat Biotechnol.* 2016;34:184-191.
132. Singh R, Kuscu C, Quinlan A, Qi Y and Adli M. Cas9-chromatin binding information enables more accurate CRISPR off-target prediction. *Nucleic Acids Res.* 2015;43:e118.
133. Pattanayak V, Lin S, Guillinger JP, Ma E, Doudna JA and Liu DR. High-throughput profiling of off-target DNA cleavage reveals RNA-programmed Cas9 nuclease specificity. *Nat Biotechnol.* 2013;31:839-843.
134. Tsai SQ and Joung JK. Defining and improving the genome-wide specificities of CRISPR-Cas9 nucleases. *Nat Rev Genet.* 2016;17:300-312.
135. Tsai SQ and Joung JK. Defining and improving the genome-wide specificities of CRISPR-Cas9 nucleases. *Nat Rev Genet.* 2016;17:300-312.
136. Gabriel R, Lombardo A, Arens A, et al. An unbiased genome-wide analysis of zinc-finger nuclease specificity. *Nat Biotechnol.* 2011;29:816-823.
137. Osborn MJ, Webber BR, Knipping F, et al. Evaluation of TCR Gene Editing Achieved by TALENs, CRISPR/Cas9, and megaTAL Nucleases. *Mol Ther.* 2016;24:570-581.
138. Wang X, Wang Y, Wu X, et al. Unbiased detection of off-target cleavage by CRISPR-Cas9 and TALENs using integrase-defective lentiviral vectors. *Nat Biotechnol.* 2015;33:175-178.
139. Tsai SQ, Zheng Z, Nguyen NT, et al. GUIDE-seq enables genome-wide profiling of off-target cleavage by CRISPR-Cas nucleases. *Nat Biotechnol.* 2015;33:187-197.
140. Tsai SQ, Topkar VV, Joung JK and Aryee MJ. Open-source guideseq software for analysis of GUIDE-seq data. *Nat Biotechnol.* 2016;34:483.
141. Chiarle R, Zhang Y, Frock RL, et al. Genome-wide translocation sequencing reveals mechanisms of chromosome breaks and rearrangements in B cells. *Cell.* 2011;147:107-119.
142. Frock RL, Hu J, Meyers RM, Ho YJ, Kii E and Alt FW. Genome-wide detection of DNA double-stranded breaks induced by engineered nucleases. *Nat Biotechnol.* 2015;33:179-186.
143. Crosetto N, Mitra A, Silva MJ, et al. Nucleotide-resolution DNA double-strand break mapping by next-generation sequencing. *Nat Methods.* 2013;10:361-365.
144. Kim D, Bae S, Park J, et al. Digenome-seq: genome-wide profiling of CRISPR-Cas9 off-target effects in human cells. *Nat Methods.* 2015;12:237-243, 231 p following 243.

表 4. 检测脱靶效应的无偏向方法<sup>148,149</sup>

方法	类型	描述	优点	局限	参考文献
整合酶缺陷的慢病毒载体 (IDLV) 捕获	细胞型 (活细胞)	将带有选择标记的 IDLV 整合到 DSB 位点, 再通过 LAM-PCR 回收整合位点, 然后是高通量测序	可检测活细胞中的 DSB	相对而言不灵敏	150, 151, 152
通过测序实现无偏向的全基因组 DSB 鉴定 (GUIDE-Seq)	细胞型 (活细胞)	将末端保护的 dsODN 整合到活细胞中的 DSB 位点, 开展标签特异的扩增和高通量测序	简单、高效且精确, 操作直观, 可利用开源软件进行数据分析	dsODN 的高效导入可能对细胞有害, 并且未经过活体检验	153, 154
高通量的全基因组易位测序 (HGTST)	细胞型 (活细胞)	通过表达 2 个核酸酶产生猎物和诱饵 DSB, 使用针对诱饵 DSB 接头的生物素化引物, 开展 LAM-PCR 回收猎物和诱饵之间的易位, 再通过链霉亲和素富集, 并开展高通量测序	只需要导入编辑复合物, 有望应用于活体	核酸酶诱导的易位很罕见, 往往发生于同一染色体的位点之间	155, 156
断裂标记、链霉亲和素富集和新一代测序 (BLESS)	细胞型 (固定细胞)	分离和固定处理后的细胞, 分离和透化完整的核酸, 再将接头与核酸酶瞬时诱导的 DSB 原位连接, 富集, 并开展高通量测序	已经用于体内导入 Cas9 的组织, 独立于内源的 DNA 修复机制	技术上颇有挑战, 只能鉴定特定时刻存在的 DSB, 无法在透化前检测 DSB	157
消化后的基因组测序 (Digenome-Seq)	体外	从体外经过处理的细胞中分离基因组 DNA, 连接测序接头, 开展全基因组测序	不存在细胞因素的限制	测序效率低, 背景噪音高	158, 159

**Frock R. L., Hu J., Meyers R. M., Ho Y. J., Kii E., et al. Genome-wide detection of DNA double-stranded breaks induced by engineered nucleases. *Nat Biotechnol.* 2015;33: 179-186.**

在这项研究中, 作者利用一种之前介绍过的乳液 PCR 方法来开展高通量的全基因组易位测序 (HTGTS), 以检测核酸酶在人类基因组上产生的 DNA DSB。这种方法是基于核酸酶诱导的 DSB 与脱靶 DSB 之间易位的鉴定。HTGTS 的应用揭示了特定核酸酶的脱靶热点数量, 从零个或几个到几十个甚至更多, 对于某些之前鉴定过的核酸酶, 它也将已知脱靶位点的数量扩大了十倍以上。作者首次检测到同源染色体上核酸酶靶点之间的易位。

illumina 的技术: MiSeq 测序仪



图 6. HTGTS 的示意图。

**Tsai S. Q., Zheng Z., Nguyen N. T., Liebers M., Topkar V. V., et al. GUIDE-seq enables genome-wide profiling of off-target cleavage by CRISPR-Cas nucleases. *Nat Biotechnol.* 2015;33: 187-197.**

作者介绍了一种称为 GUIDE-Seq 的方法, 此方法是对基因组范围内 CRISPR RNA 指导的核酸酶 (RGN) 所引入的 DNA DSB 进行鉴定。在第一阶段, 它利用末端连接过程, 通过插入 dsODN 来标记人类细胞中 RGN 诱导的 DSB。第二阶段利用无偏向的扩增和 NGS 来定位 dsODN 的整合位点。他们将 GUIDE-Seq 应用于人类细胞系的 13 个 RGN 中, 发现 RGN 脱靶活性变化很大, 其中大部分无法通过现有的方法鉴定。GUIDE-Seq 还鉴定出与 RGN 无关的基因组断裂热点。最后, 作者还观察到被截短的向导 RNA 导致 RGN 诱导的脱靶 DSB 数量减少。

illumina 的技术: MiSeq 测序仪

145. Kim D, Kim S, Kim S, Park J and Kim JS. Genome-wide target specificities of CRISPR-Cas9 nucleases revealed by multiplex Digenome-seq. *Genome Res.* 2016;26: 406-415.

146. Tsai SQ and Joung JK. Defining and improving the genome-wide specificities of CRISPR-Cas9 nucleases. *Nat Rev Genet.* 2016;17:300-312.

147. Tycko J, Myer VE and Hsu PD. Methods for Optimizing CRISPR-Cas9 Genome Editing Specificity. *Mol Cell.* 2016;63:355-370.

148. Tsai SQ and Joung JK. Defining and improving the genome-wide specificities of CRISPR-Cas9 nucleases. *Nat Rev Genet.* 2016;17:300-312.

149. Tycko J, Myer VE and Hsu PD. Methods for Optimizing CRISPR-Cas9 Genome Editing Specificity. *Mol Cell.* 2016;63:355-370.

150. Gabriel R, Lombardo A, Arens A, et al. An unbiased genome-wide analysis of zinc-finger nuclease specificity. *Nat Biotechnol.* 2011;29:816-823.

151. Osborn MJ, Webber BR, Knipping F, et al. Evaluation of TCR Gene Editing Achieved by TALENs, CRISPR/Cas9, and megaTAL Nucleases. *Mol Ther.* 2016;24:570-581.

152. Wang X, Wang Y, Wu X, et al. Unbiased detection of off-target cleavage by CRISPR-Cas9 and TALENs using integrase-defective lentiviral vectors. *Nat Biotechnol.* 2015;33:175-178.

Tsai S. Q., Topkar V. V., Joung J. K. and Aryee M. J. Open-source guide-seq software for analysis of GUIDE-seq data. *Nat Biotechnol.* 2016;34: 483.

作者开发了 guide-seq，这个 Python 软件包能够分析 GUIDE-Seq 实验所产生的数据。简单地说，该程序先将混合的多样本运行分离成样本特异的序列文件，为比对做好准备。然后它通过序列比对、位点鉴定、假阳性检测和报告鉴定出脱靶效应。guide-seq 软件包是开源的，可点击此处下载 <http://github.com/aryeelab/guide-seq>。

illumina 的技术：MiSeq 测序仪



图 7. GUIDE-Seq 的示意图。

Kim D., Bae S., Park J., Kim E., Kim S., et al. Digenome-seq: genome-wide profiling of CRISPR-Cas9 off-target effects in human cells. *Nat Methods.* 2015;12: 237-243, 231 p following 243.

作者开发出消化后的基因组测序 (Digenome-Seq)，这种体外的方法可分析人类细胞中全基因组范围的 Cas9 脱靶效应。具体过程是在体外用纯化的 Cas9-gRNA 核糖核蛋白 (RNP) 复合物消化基因组 DNA，然后开展深度测序。然后通过富集起始或末端映射位置相同的序列来检测位点，从而区分 Cas9 诱导的切割和 DNA 随机断裂。作者在 CRISPR-Cas9 改造的 HAP1 细胞上验证了这种方法，检测到以低于 0.1% 的频率引入插入或缺失的脱靶位点，这几乎达到靶向深度测序的检测极限。他们随后证明，利用修饰过的 sgRNA 可避免 Cas9 的脱靶效应。

illumina 的技术：HiSeq X Ten 系统

Kim D., Kim S., Kim S., Park J. and Kim J. S. Genome-wide target specificities of CRISPR-Cas9 nucleases revealed by multiplex Digenome-seq. *Genome Res.* 2016;26: 406-415.

作者开发出多重 Digenome-Seq 来同时分析多达 11 种 CRISPR-Cas9 核酸酶的特异性，同时开发出一种新的 DNA 切割评分体系。他们利用多个 sgRNA 和 Cas9 来消化无细胞的人类基因组 DNA，开展全基因组测序，并利用新的体系来检测切割模式以及在靶和脱靶位点。他们观察到，尽管从寡核苷酸双链转录的 sgRNA 切割了假阳性的凸起型脱靶位点，但对于那些从质粒模板转录的 sgRNA，结果却并非如此。他们还观察到，多重 Digenome-Seq 可以检测到其他全基因组方法遗漏的一些真正的脱靶效应。在分析了 964 个切割位点之后，他们最终给出了如何选择靶位点以便尽量减少脱靶效应的指南。

illumina 的技术：TruSeq DNA Sample Prep Kit、HiSeq X Ten 系统



图 8. Digenome-Seq 的示意图。

Osborn M. J., Webber B. R., Knipping F., Lonetree C. L., Tennis N., et al. Evaluation of TCR Gene Editing Achieved by TALENs, CRISPR/Cas9, and megaTAL Nucleases. *Mol Ther.* 2016;24: 570-581.

作者开发出一种方法，利用 DNA 双链断裂 (DSB) 的偏好，通过非同源末端连接机制融合双链的整合缺陷型慢病毒载体 (IDLV)。然后他们利用 CRISPR-Cas9 和 TALEN 分析来编辑 HEK293T 细胞系中的两个区域，检验了这种方法。在 sgRNA 与其基因组靶点之间存在单碱基凸起或多达 13 个错配的区域，他们发现了频繁的脱靶效应。

illumina 的技术：MiSeq 测序仪

153. Tsai SQ, Zheng Z, Nguyen NT, et al. GUIDE-seq enables genome-wide profiling of off-target cleavage by CRISPR-Cas nucleases. *Nat Biotechnol.* 2015;33:187-197.

154. Tsai SQ, Topkar VV, Joung JK and Aryee MJ. Open-source guide-seq software for analysis of GUIDE-seq data. *Nat Biotechnol.* 2016;34:483.

155. Chiarle R, Zhang Y, Frock RL, et al. Genome-wide translocation sequencing reveals mechanisms of chromosome breaks and rearrangements in B cells. *Cell.* 2011;147: 107-119.

156. Frock RL, Hu J, Meyers RM, Ho YJ, Kii E and Alt FW. Genome-wide detection of DNA double-stranded breaks induced by engineered nucleases. *Nat Biotechnol.* 2015;33:179-186.

157. Crosetto N, Mitra A, Silva MJ, et al. Nucleotide-resolution DNA double-strand break mapping by next-generation sequencing. *Nat Methods.* 2013;10:361-365.

158. Kim D, Kim S, Kim S, Park J and Kim JS. Genome-wide target specificities of CRISPR-Cas9 nucleases revealed by multiplex Digenome-seq. *Genome Res.* 2016;26: 406-415.

159. Kim D, Bae S, Park J, et al. Digenome-seq: genome-wide profiling of CRISPR-Cas9 off-target effects in human cells. *Nat Methods.* 2015;12:237-243, 231 p following 243.

Wang X., Wang Y., Wu X., Wang J., Wang Y., et al. Unbiased detection of off-target cleavage by CRISPR-Cas9 and TALENs using integrase-defective lentiviral vectors. *Nat Biotechnol.* 2015;33: 175-178.

在这项研究中，作者利用三种针对 TCR- $\alpha$  的不同核酸酶来破坏人原代 T 细胞的 T 细胞受体，并利用整合缺陷型的慢病毒载体 (IDLV) 方法来检验脱靶效应。他们发现，megaTAL 和 CRISPR-Cas9 试剂有着最高的破坏效率以及较低的毒性和脱靶效应。随后他们提出了一种生产过程，可产生安全的细胞底物，适用于新一代的免疫疗法。

Illumina 的技术: MiSeq 测序仪

## 方法开发

作为一种基因编辑工具，CRISPR-Cas9 技术有着广泛的应用。CRISPR 可应用在细胞系和动物模型中，适用于体细胞和生殖细胞的编辑。不过，考虑到脱靶效应的问题，人们仍需要努力开发提高特异性的方法，并寻找替代性的编辑技术。<sup>160,161</sup>

总的来说，这些旨在降低 CRISPR 脱靶效应的研究主要集中在 2 种方法：

- 提高核酸酶切割的特异性，要么改造 Cas9，要么将其替换成另一种酶。<sup>162-165</sup>
- 降低核酸酶表达的持续时间，限制脱靶突变的积累。<sup>166,167</sup>

随着人们深入了解这个过程机制功能，提高特异性的新策略将很快面世。

Abudayyeh O. O., Gootenberg J. S., Konermann S., Joung J., Slaymaker I. M., et al. C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector. *Science.* 2016;353: aaf5573.

作者从沙氏纤毛菌 (*Leptotrichia shahii*) 中鉴定出第二类的 IV 型 CRISPR-Cas 效应蛋白 C2c2，这种蛋白在体内保护细菌不被 RNA 噬菌体感染。通过体外开展的生物化学分析，他们证明了利用单个 CRISPR RNA 向导，C2c2 经过编程可切割单链 RNA 目标。这种切割是由高等真核生物和原核生物的 2 个保守的核苷酸结合 (HEPN) 结构域中的催化残基介导的。这些结构域的定向突变产生了催化失活的 RNA 结合蛋白。

Illumina 的技术: MiSeq 测序仪

Davis K. M., Pattanayak V., Thompson D. B., Zuris J. A. and Liu D. R. Small molecule-triggered Cas9 protein with improved genome-editing specificity. *Nat Chem Biol.* 2015;11: 316-318.

作者通过在 Cas9 的特定位置插入 4-羟甲基莫昔芬 (4-HT) 响应性的内含肽，开发出可被小分子激活的 Cas9 酶。他们随后在人类细胞中检验了这种方法，并利用深度测序来监测其性能。他们证明，条件激活的 Cas9 也具有编辑活性，其特异性比野生型的 Cas9 高出 25 倍。

Illumina 的技术: MiSeq 测序仪

Kim D., Kim J., Hur J. K., Been K. W., Yoon S. H., et al. Genome-wide analysis reveals specificities of Cpf1 endonucleases in human cells. *Nat Biotechnol.* 2016;34: 863-868.

为了检验 CRISPR-Cpf1 是否能取代 CRISPR-Cas9 以改善基因编辑的精确性，作者使用了一种错配的 crRNA。他们发现，Cpf1 能够容忍 3'-PAM 远端区域中的一个或两个错配，但不能容忍 5'-PAM 近端区域中的错配。之后，他们利用 Digenome-Seq 对 8 种 Cpf1 核酸酶的切割位点进行全基因组分析。其中，毛螺科菌 (*Lachnospiraceae bacterium*) 的 Cpf1 (LbCpf1) 和氨基酸球菌属 (*Acidaminococcus sp*) 的 Cpf1 (AsCpf1) 切割人类基因组中的 6 个和 12 个位点，而 Cas9 核酸酶通常切割 90 多个位点。大多数鉴定出的 Cpf1 切割位点不在细胞中产生突变。

Illumina 的技术: TruSeq DNA Sample Prep Kit、HiSeq X Ten 系统

160. Ledford H. Beyond CRISPR: A guide to the many other ways to edit a genome. *Nature News.* 2016;
161. Gao F, Shen XZ, Jiang F, Wu Y and Han C. DNA-guided genome editing using the *Natronobacterium gregoryi* Argonaute. *Nat Biotechnol.* 2016;34:768-773.
162. Kim D, Kim J, Hur JK, Been KW, Yoon SH and Kim JS. Genome-wide analysis reveals specificities of Cpf1 endonucleases in human cells. *Nat Biotechnol.* 2016;34:863-868.
163. Kleinstiver BP, Tsai SQ, Prew MS, et al. Genome-wide specificities of CRISPR-Cas Cpf1 nucleases in human cells. *Nat Biotechnol.* 2016;34:869-874.
164. Abudayyeh OO, Gootenberg JS, Konermann S, et al. C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector. *Science.* 2016;353:aaf5573.
165. Slaymaker IM, Gao L, Zetsche B, Scott DA, Yan WX and Zhang F. Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity. *Science.* 2016;351:84-88.
166. Komor AC, Kim YB, Packer MS, Zuris JA and Liu DR. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature.* 2016;533:420-424.
167. Nishida K, Arazoe T, Yachie N, et al. Targeted nucleotide editing using hybrid prokaryotic and vertebrate adaptive immune systems. *Science.* 2016;

Kleinstiver B. P., Tsai S. Q., Prew M. S., Nguyen N. T., Welch M. M., et al. Genome-wide specificities of CRISPR-Cas Cpf1 nucleases in human cells. *Nat Biotechnol.* 2016;34: 869-874.

作者发现, AsCpf1 和 LbCpf1 编辑人类细胞时的在靶编辑准确性与化脓性链球菌 (*Streptococcus pyogenes*) 的 Cas9 相当。通过两种核酸酶的 GUIDE-Seq 和靶向深度测序分析, 他们发现所使用的大多数 crRNA 没有脱靶效应。这些结果表明, AsCpf1 和 LbCpf1 在人类细胞中是高度特异的。

Illumina 的技术: MiSeq 测序仪

Komor A. C., Kim Y. B., Packer M. S., Zuris J. A. and Liu D. R. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature.* 2016;533: 420-424.

CRISPR-Cas9 基因组编辑依赖定向 DSB 的产生以及 2 种修复机制中的 1 种: NHEJ 或同源模板存在时的 HDR。在需要纠正点突变时, 正如许多遗传病中的那些, 这些机制存在限制。在这项研究中, 作者开发出一种方法, 能够以一种可编程的方式将 DNA 目标碱基直接转换成另一个, 而不需要 DSB 或供体模板。为了实现这一点, 他们将 CRISPR-Cas9 与胞苷脱氨酶融合, 介导胞嘧啶直接转换成尿嘧啶, 从而实现 C → T (或 G → A) 替换。

Illumina 的技术: MiSeq 测序仪

Nishida K., Arazoe T., Yachie N., Banno S., Kakimoto M., et al. Targeted nucleotide editing using hybrid prokaryotic and vertebrate adaptive immune systems. *Science.* 2016; .

在这项研究中, 作者改造了核酸酶缺陷的 II 型 CRISPR-Cas9 以及活化诱导的胞苷脱氨酶 (AID) 同源物胞苷脱氨酶, 以形成一种合成的复合物 (Target-AID)。他们利用它来证明定向的 DNA 单核苷酸替换。他们利用深度测序证明了 Target-AID 在定向诱变时的高特异性。Target-AID 在 5 个碱基的目标范围内主要诱导胞嘧啶的特异性点突变。作者又利用尿嘧啶 DNA 糖基化酶抑制剂 (UGI) 来抑制插入缺失的形成, 进一步提高了效率。

Illumina 的技术: MiSeq 测序仪

Slaymaker I. M., Gao L., Zetsche B., Scott D. A., Yan W. X., et al. Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity. *Science.* 2016;351: 84-88.

作者利用结构指导的改造来提高化脓性链球菌 (*Streptococcus pyogenes*) Cas9 的特异性。他们在 Cas9 酶的非目标链凹槽的 31 个带正电荷的残基中插入单个丙氨酸替代物。之后, 他们利用靶向和全基因组深度测序 (断裂标记、链霉素亲和素富集和 NGS, 或 BLESS) 来评估在靶的活性和特异性。研究表明, 他们构建的“特异性增强的” eSpCas9 变体能够编辑人类细胞的基因组, 同时维持可靠的在靶活性。

Illumina 的技术: TruSeq Nano LT Kit

Zetsche B., Volz S. E. and Zhang F. A split-Cas9 architecture for inducible genome editing and transcription modulation. *Nat Biotechnol.* 2015;33: 139-142.

使用无催化活性的 Cas9, 这种策略有助于指导蛋白质到达适当的靶点并调控转录。在这项研究中, 作者构建了经拆分的 Cas9 系统, 其中 2 个片段经过化学诱导可二聚化, 并在雷帕霉素存在下激活。他们随后在 HEK293 细胞中检验此系统, 当整合型的低拷贝慢病毒载体表达这种拆分的酶时, 他们发现它能够降低脱靶效应。

Illumina 的技术: MiSeq 测序仪

## 综述

Kim J. S. Genome editing comes of age. *Nat Protoc.* 2016;11: 1573-1578

Tsai S. Q. and Joung J. K. Defining and improving the genome-wide specificities of CRISPR-Cas9 nucleases. *Nat Rev Genet.* 2016;17: 300-312

Tycko J., Myer V. E. and Hsu P. D. Methods for Optimizing CRISPR-Cas9 Genome Editing Specificity. *Mol Cell.* 2016;63: 355-370

Shalem O., Sanjana N. E. and Zhang F. High-throughput functional genomics using CRISPR-Cas9. *Nat Rev Genet.* 2015;16: 299-311

## CRISPR-Cas9 技术在研究流程中的整合

CRISPR-Cas9 基因组编辑技术如今让科学家能够快速方便地开展精确的基因组操作，以便在体外和体内筛选多个突变。研究人员随后可利用大量的测序方法来确定编辑过的序列对基因结构和功能的影响。例如，ChIP-Seq<sup>168</sup> 可确定突变对 DNA- 蛋白结合的影响。若蛋白质是转录因子，则研究人员可研究对表达 (RNA-Seq)<sup>169,170,171</sup>、RNA 结构 (RNA 结构的化学诱导测序 /CIRS-Seq)<sup>172</sup>、蛋白结合 (RNA 免疫沉淀测序 /RIP-Seq; 交联免疫沉淀测序 /CLIP-Seq)<sup>173,174</sup>，以及修饰或剪接 (RNA 介导的寡核苷酸退火、选择和连接及测序 /RSL-Seq)<sup>175</sup> 的影响。或者，研究人员可以系统地编辑蛋白编码区域，以便确定所编码的蛋白质的结构和功能。例如，如果蛋白质是一个甲基化因子，则甲基化变化的下游影响可以通过全基因组亚硫酸氢盐测序 (BS-Seq) 来直接测定。<sup>176</sup> 此外，科学家还可以研究它对蛋白质结合 (ChIP-Seq) 或染色质构象 (Hi-C) 的影响。<sup>177</sup> 这种快速精确地改变基因组以及精心测定其对基因及最终细胞功能的影响的能力，将深刻改变基因组的研究方式。

Flavahan W. A., Drier Y., Liu B. B., Gillespie S. M., Venteicher A. S., et al. Insulator dysfunction and oncogene activation in IDH mutant gliomas. *Nature*. 2016;529: 110-114.

在这项研究中，作者利用 ChIP-Seq 和 BS-Seq 来证明人 IDH 突变型胶质瘤在黏连蛋白和 CCCTC 结合因子 (CTCF) 的结合位点上表现出超甲基化，这破坏了它的结合能力。他们随后利用高通量的染色质捕获图谱来检测结构和调控的结构域，并利用 RNA-Seq 来证明同一结构域中的基因相互关联，而由边界分开的基因则表现出较少的相关性。他们证明，结构域边界的 CTCF 损失造成组成型增强子与受体酪氨酸激酶基因 *PDGFRA* 发生异常的相互作用，后者是一种主要的神经胶质瘤癌基因。通过染色体构象捕获，作者证明，结构域边界的 CTCF 损失造成组成型增强子与 *PDGFRA* 发生异常的相互作用。他们还利用 CRISPR-Cas9 技术表明，IDH 野生型胶质瘤中 CTCF 基序的破坏上调了 *PDGFRA* 并促进了增殖。

Illumina 的技术: NextSeq 500 测序仪

168. Solomon MJ, Larsen PL and Varshavsky A. Mapping protein-DNA interactions in vivo with formaldehyde: evidence that histone H4 is retained on a highly transcribed gene. *Cell*. 1988;53:937-947.
169. Bentley DR, Balasubramanian S, Swerdlow HP, et al. Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. *Nature*. 2008;456:53-59.
170. Lim JS, Kim WI, Kang HC, et al. Brain somatic mutations in MTOR cause focal cortical dysplasia type II leading to intractable epilepsy. *Nat Med*. 2015;21:395-400.
171. Lister R, O'Malley RC, Tonti-Filippini J, et al. Highly integrated single-base resolution maps of the epigenome in Arabidopsis. *Cell*. 2008;133:523-536.
172. Incarnato D, Neri F, Anselmi F and Oliviero S. Genome-wide profiling of mouse RNA secondary structures reveals key features of the mammalian transcriptome. *Genome Biol*. 2014;15:491.
173. Zhao J, Ohsumi TK, Kung JT, et al. Genome-wide identification of polycomb-associated RNAs by RIP-seq. *Mol Cell*. 2010;40: 939-953.
174. Chi SW, Zang JB, Mele A and Darnell RB. Argonaute HITS-CLIP decodes microRNA-mRNA interaction maps. *Nature*. 2009;460:479-486.
175. Li H, Qiu J and Fu XD. RASL-seq for massively parallel and quantitative analysis of gene expression. *Curr Protoc Mol Biol*. 2012; Chapter 4:Unit 4 13 11-19.
176. Feil R, Charlton J, Bird AP, Walter J and Reik W. Methylation analysis on individual chromosomes: improved protocol for bisulphite genomic sequencing. *Nucleic Acids Res*. 1994;22:695-696.
177. Lieberman-Aiden E, van Berkum NL, Williams L, et al. Comprehensive mapping of long-range interactions reveals folding principles of the human genome. *Science*. 2009;326:289-293.

Wu J., Huang B., Chen H., Yin Q., Liu Y., et al. The landscape of accessible chromatin in mammalian preimplantation embryos. *Nature*. 2016;534: 652-657.

在这项研究中，作者重建了小鼠发育过程中的时空染色质构型。他们将 ATAC-Seq（利用测序分析转座酶可接近的染色质区域）和 CRISPR-Cas9 辅助的线粒体 DNA 去除相结合。他们还利用 RNA 模板 5' 末端的转换机制（Smart-Seq）来验证 RNA-Seq 和 ChIP-Seq 的每个阶段，以研究组蛋白修饰。尽管 DNA 甲基化组存在广泛的亲本不对称性，但是作者观察到在主要的合子基因组活化（ZGA）之后，亲本基因组之间的染色质可接近性在总体上是相当的。早期胚胎中可接近的染色质被转座因子广泛地塑造，并与推定的顺式调控序列广泛地重叠。他们在活性基因的转录末端位点附近也发现可接近的染色质。他们将顺式调控元件的图谱和单细胞转录组相整合，构建了早期发育的调控网络。作者还观察到，顺式调控元件的活性及其相关的开放染色质相对主要 ZGA 之前减少。

Illumina 的技术：HiSeq 1500 测序仪、HiSeq 2500 测序仪

Dixit A., Parnas O., Li B., Chen J., Fulco C. P., et al. Perturb-Seq: Dissecting Molecular Circuits with Scalable Single-Cell RNA Profiling of Pooled Genetic Screens. *Cell*. 2016;167: 1853-1866 e1817.

作者开发出 Perturb-seq，它将单细胞 RNA-Seq（scRNA-Seq）和基于 CRISPR 的扰动相结合来开展遗传筛选，以推断哺乳动物细胞库中复杂表型的基因功能。简单地说，此方法利用编码 sgRNA 的慢病毒载体库来感染细胞。这些慢病毒载体也通过表达的向导条形码（GBC）来报告所表达的 sgRNA 的身份。感染后的细胞经过生长、分化和 / 或刺激。随后利用 scRNA-Seq 在每个细胞的 RNA 上标记独特的细胞条形码（CBC），它将细胞的转录图谱与 GBC 编码的遗传扰动相关联。接着，作者在 20 万个免疫细胞或细胞系上应用 Perturb-Seq，其重点是研究那些调控树突状细胞对脂多糖反应的转录因子。他们能够检测到受单个遗传扰动及其上位效应影响的单个基因目标、基因特征和细胞状态，证明了 Perturb-Seq 能够提高基因组混合分析的范围。

Illumina 的技术：MiSeq 测序仪、NextSeq 测序仪

Adamson B., Norman T. M., Jost M., Cho M. Y., Nunez J. K., et al. A Multiplexed Single-Cell CRISPR Screening Platform Enables Systematic Dissection of the Unfolded Protein Response. *Cell*. 2016;167: 1867-1882 e1821.

Perturb-Seq 方法通过导入和检测最多三种 CRISPR 扰动对单细胞进行平行的表型筛选。作者使用 Perturb-Seq 来开展全基因组筛选，利用单个和组合的 CRISPR 扰动来解析哺乳动物的未折叠蛋白反应（UPR）。他们开展了两次基因组范围的 CRISPR 干扰筛选，检测到一些基因，其抑制扰动了 ER 稳态。大约 100 个 hits 的 Perturb-Seq 实现了高精度的基因功能聚类，这为三种 ER 稳态传感器如何应对不同类型的压力提供见解。这项研究突出了 Perturb-Seq 解析复杂表型的能力。

Illumina 的技术：MiSeq 测序仪、NextSeq 测序仪

## 参考文献

- Ainsworth C. Agriculture: A new breed of edits. *Nature*. 2015;528:S15-16.
- Bae S, Park J and Kim JS. Cas-OFFinder: a fast and versatile algorithm that searches for potential off-target sites of Cas9 RNA-guided endonucleases. *Bioinformatics*. 2014;30:1473-1475.
- Baltimore D, Berg P, Botchan M, et al. Biotechnology. A prudent path forward for genomic engineering and germline gene modification. *Science*. 2015;348:36-38.
- Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*. 2007;315:1709-1712.
- Brouns SJ, Jore MM, Lundgren M, et al. Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes. *Science*. 2008;321:960-964.
- Champer J, Buchman A and Akbari OS. Cheating evolution: engineering gene drives to manipulate the fate of wild populations. *Nat Rev Genet*. 2016;17:146-159.
- Chen S, Sanjana NE, Zheng K, et al. Genome-wide CRISPR screen in a mouse model of tumor growth and metastasis. *Cell*. 2015;160:1246-1260.
- Chiarle R, Zhang Y, Frock RL, et al. Genome-wide translocation sequencing reveals mechanisms of chromosome breaks and rearrangements in B cells. *Cell*. 2011;147:107-119.
- 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;24:132-141.
- Cong L, Ran FA, Cox D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*. 2013;339:819-823.
- Cradick TJ, Fine EJ, Antico CJ and Bao G. CRISPR/Cas9 systems targeting beta-globin and CCR5 genes have substantial off-target activity. *Nucleic Acids Res*. 2013;41:9584-9592.
- Crosetto N, Mitra A, Silva MJ, et al. Nucleotide-resolution DNA double-strand break mapping by next-generation sequencing. *Nat Methods*. 2013;10:361-365.
- Cyranoski D and Reardon S. Embryo editing sparks epic debate. *Nature*. 2015;520:593-594.
- Cyranoski D. CRISPR gene-editing tested in a person for the first time. *Nature News*. 2016;
- Davis KM, Pattanayak V, Thompson DB, Zuris JA and Liu DR. Small molecule-triggered Cas9 protein with improved genome-editing specificity. *Nat Chem Biol*. 2015;11:316-318.
- Deltcheva E, Chylinski K, Sharma CM, et al. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature*. 2011;471:602-607.
- Doench JG, Fusi N, Sullender M, et al. Optimized sgRNA design to maximize activity and minimize off-target effects of CRISPR-Cas9. *Nat Biotechnol*. 2016;34:184-191.
- Dominguez AA, Lim WA and Qi LS. Beyond editing: repurposing CRISPR-Cas9 for precision genome regulation and interrogation. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2016;17:5-15.
- Dow LE. Modeling Disease In Vivo With CRISPR/Cas9. *Trends Mol Med*. 2015;21:609-621.
- Frock RL, Hu J, Meyers RM, Ho YJ, Kii E and Alt FW. Genome-wide detection of DNA double-stranded breaks induced by engineered nucleases. *Nat Biotechnol*. 2015;33:179-186.
- Fu Y, Foden JA, Khayter C, et al. High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. *Nat Biotechnol*. 2013;31:822-826.
- Fu Y, Sander JD, Reyon D, Cascio VM and Joung JK. Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs. *Nat Biotechnol*. 2014;32:279-284.
- Gabriel R, Lombardo A, Arens A, et al. An unbiased genome-wide analysis of zinc-finger nuclease specificity. *Nat Biotechnol*. 2011;29:816-823.
- Gantz VM and Bier E. Genome editing. The mutagenic chain reaction: a method for converting heterozygous to homozygous mutations. *Science*. 2015;348:442-444.
- Gantz VM, Jasinskiene N, Tatarenkova O, et al. Highly efficient Cas9-mediated gene drive for population modification of the malaria vector mosquito *Anopheles stephensi*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112:E6736-6743.
- Garneau JE, Dupuis ME, Villion M, et al. The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature*. 2010;468:67-71.
- Gasiunas G, Barrangou R, Horvath P and Siksnys V. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109:E2579-2586.
- Gullinger JP, Thompson DB and Liu DR. Fusion of catalytically inactive Cas9 to FokI nuclease improves the specificity of genome modification. *Nat Biotechnol*. 2014;32:577-582.
- Guo R, Wan Y, Xu D, et al. Generation and evaluation of Myostatin knock-out rabbits and goats using CRISPR/Cas9 system. *Sci Rep*. 2016;6:29855.
- Hammond A, Galizi R, Kyrou K, et al. A CRISPR-Cas9 gene drive system targeting female reproduction in the malaria mosquito vector *Anopheles gambiae*. *Nat Biotechnol*. 2016;34:78-83.
- Heigwer F, Kerr G and Boutros M. E-CRISP: fast CRISPR target site identification. *Nat Methods*. 2014;11:122-123.
- Hibar DP, Stein JL, Renteria ME, et al. Common genetic variants influence human subcortical brain structures. *Nature*. 2015;520:224-229.
- Hsu PD, Scott DA, Weinstein JA, et al. DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nat Biotechnol*. 2013;31:827-832.
- Hwang WY, Fu Y, Reyon D, et al. Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. *Nat Biotechnol*. 2013;31:227-229.



- Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, Amemura M and Nakata A. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J Bacteriol.* 1987;169:5429-5433.
- Jansen R, Embden JD, Gaastra W and Schouls LM. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Mol Microbiol.* 2002;43:1565-1575.
- Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA and Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science.* 2012;337:816-821.
- Johnson AD and O'Donnell CJ. An open access database of genome-wide association results. *BMC Med Genet.* 2009;10:6.
- Kaisler J. First proposed human test of CRISPR passes initial safety review. *Science.* 2016;
- Kataoka K, Shiraishi Y, Takeda Y, et al. Aberrant PD-L1 expression through 3'-UTR disruption in multiple cancers. *Nature.* 2016;534:402-406.
- Khatodia S, Bhatotia K, Passricha N, Khurana SM and Tuteja N. The CRISPR/Cas Genome-Editing Tool: Application in Improvement of Crops. *Front Plant Sci.* 2016;7:506.
- Kim D, Bae S, Park J, et al. Digenome-seq: genome-wide profiling of CRISPR-Cas9 off-target effects in human cells. *Nat Methods.* 2015;12:237-243, 231 p following 243.
- Kim D, Kim S, Kim S, Park J and Kim JS. Genome-wide target specificities of CRISPR-Cas9 nucleases revealed by multiplex Digenome-seq. *Genome Res.* 2016;26:406-415.
- Kim S, Kim D, Cho SW, Kim J and Kim JS. Highly efficient RNA-guided genome editing in human cells via delivery of purified Cas9 ribonucleoproteins. *Genome Res.* 2014;24:1012-1019.
- Kistler KE, Vosshall LB and Matthews BJ. Genome engineering with CRISPR-Cas9 in the mosquito *Aedes aegypti*. *Cell Rep.* 2015;11:51-60.
- Kleinstiver BP, Pattanayak V, Prew MS, et al. High-fidelity CRISPR-Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects. *Nature.* 2016;529:490-495.
- Kleinstiver BP, Tsai SQ, Prew MS, et al. Genome-wide specificities of CRISPR-Cas Cpf1 nucleases in human cells. *Nat Biotechnol.* 2016;34:869-874.
- Komor AC, Kim YB, Packer MS, Zuris JA and Liu DR. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature.* 2016;533:420-424.
- Korkmaz G, Lopes R, Ugalde AP, et al. Functional genetic screens for enhancer elements in the human genome using CRISPR-Cas9. *Nat Biotechnol.* 2016;34:192-198.
- Lander ES. The Heroes of CRISPR. *Cell.* 2016;164:18-28.
- Lanphier E. Don't edit the human germ line. *Nature.* 2015;519:410-411.
- Ledford H. CRISPR, the disruptor. *Nature.* 2015;522:20-24.
- Ledford H. The unsung heroes of CRISPR. *Nature.* 2016;535:342-344.
- Ledford HC, E. 'Gene drive' mosquitoes engineered to fight malaria. 2015;
- Liang X, Potter J, Kumar S, et al. Rapid and highly efficient mammalian cell engineering via Cas9 protein transfection. *J Biotechnol.* 2015;208:44-53.
- Lin Y, Cradick TJ, Brown MT, et al. CRISPR/Cas9 systems have off-target activity with insertions or deletions between target DNA and guide RNA sequences. *Nucleic Acids Res.* 2014;42:7473-7485.
- Mali P, Aach J, Stranges PB, et al. CAS9 transcriptional activators for target specificity screening and paired nickases for cooperative genome engineering. *Nat Biotechnol.* 2013;31:833-838.
- Mali P, Yang L, Esvelt KM, et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science.* 2013;339:823-826.
- Maresch R, Mueller S, Veltkamp C, et al. Multiplexed pancreatic genome engineering and cancer induction by transfection-based CRISPR/Cas9 delivery in mice. *Nat Commun.* 2016;7:10770.
- Marraffini LA and Sontheimer EJ. CRISPR interference limits horizontal gene transfer in staphylococci by targeting DNA. *Science.* 2008;322:1843-1845.
- Mojica FJ, Diez-Villasenor C, Soria E and Juez G. Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria. *Mol Microbiol.* 2000;36:244-246.
- Mojica FJ, Diez-Villasenor C, Garcia-Martinez J and Soria E. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *J Mol Evol.* 2005;60:174-182.
- Nihongaki Y, Kawano F, Nakajima T and Sato M. Photoactivatable CRISPR-Cas9 for optogenetic genome editing. *Nat Biotechnol.* 2015;33:755-760.
- Nishida K, Arazoe T, Yachie N, et al. Targeted nucleotide editing using hybrid prokaryotic and vertebrate adaptive immune systems. *Science.* 2016;
- Osborn MJ, Webber BR, Knipping F, et al. Evaluation of TCR Gene Editing Achieved by TALENs, CRISPR/Cas9, and megaTAL Nucleases. *Mol Ther.* 2016;24:570-581.
- Parnas O, Jovanovic M, Eisenhaure TM, et al. A Genome-wide CRISPR Screen in Primary Immune Cells to Dissect Regulatory Networks. *Cell.* 2015;162:675-686.
- Pattanayak V, Lin S, Guillinger JP, Ma E, Doudna JA and Liu DR. High-throughput profiling of off-target DNA cleavage reveals RNA-programmed Cas9 nuclease specificity. *Nat Biotechnol.* 2013;31:839-843.
- Pourcel C, Salvignol G and Vergnaud G. CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies. *Microbiology.* 2005;151:653-663.
- Qiu P, Shandilya H, D'Alessio JM, O'Connor K, Durocher J and Gerard GF. Mutation detection using Surveyor nuclease. *Biotechniques.* 2004;36:702-707.
- Ran FA, Hsu PD, Lin CY, et al. Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell.* 2013;154:1380-1389.
- Ran FAH, P.D.; Wright, J.; Agarwala, V.; Scott, D. A.; Zhang, F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protocols.* 2013;8:2281-2308.
- Reardon S. Gene-editing record smashed in pigs. *Nature.* 2015;
- Reardon S. First CRISPR clinical trial gets green light from US panel. *Nature News.* 2016;

- Sapranaukas R, Gasiunas G, Fremaux C, Barrangou R, Horvath P and Siksnys V. The *Streptococcus thermophilus* CRISPR/Cas system provides immunity in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* 2011;39:9275-9282.
- Selle K and Barrangou R. CRISPR-Based Technologies and the Future of Food Science. *J Food Sci.* 2015;80:R2367-2372.
- Shalem O, Sanjana NE and Zhang F. High-throughput functional genomics using CRISPR-Cas9. *Nat Rev Genet.* 2015;16:299-311.
- Singh R, Kuscu C, Quinlan A, Qi Y and Adli M. Cas9-chromatin binding information enables more accurate CRISPR off-target prediction. *Nucleic Acids Res.* 2015;43:e118.
- Swiech L, Heidenreich M, Banerjee A, et al. In vivo interrogation of gene function in the mammalian brain using CRISPR-Cas9. *Nat Biotechnol.* 2015;33:102-106.
- Tebas P, Stein D, Tang WW, et al. Gene editing of CCR5 in autologous CD4 T cells of persons infected with HIV. *N Engl J Med.* 2014;370:901-910.
- Thomas KR and Capecchi MR. Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell.* 1987;51:503-512.
- Torres-Ruiz R and Rodriguez-Perales S. CRISPR-Cas9: A Revolutionary Tool for Cancer Modelling. *Int J Mol Sci.* 2015;16:22151-22168.
- Tsai SQ, Wyvekens N, Khayter C, et al. Dimeric CRISPR RNA-guided FokI nucleases for highly specific genome editing. *Nat Biotechnol.* 2014;32:569-576.
- Tsai SQ, Zheng Z, Nguyen NT, et al. GUIDE-seq enables genome-wide profiling of off-target cleavage by CRISPR-Cas nucleases. *Nat Biotechnol.* 2015;33:187-197.
- Tsai SQ and Joung JK. Defining and improving the genome-wide specificities of CRISPR-Cas9 nucleases. *Nat Rev Genet.* 2016;17:300-312.
- Tsai SQ, Topkar VV, Joung JK and Aryee MJ. Open-source guideseq software for analysis of GUIDE-seq data. *Nat Biotechnol.* 2016;34:483.
- Tschaharganeh DF, Lowe SW, Garippa RJ and Livshits G. Using CRISPR/Cas to study gene function and model disease *in vivo*. *FEBS J.* 2016;
- Tycko J, Myer VE and Hsu PD. Methods for Optimizing CRISPR-Cas9 Genome Editing Specificity. *Mol Cell.* 2016;63:355-370.
- Vyas VK, Barrasa MI and Fink GR. A *Candida albicans* CRISPR system permits genetic engineering of essential genes and gene families. *Sci Adv.* 2015;1:e1500248.
- Waltz E. Gene-edited CRISPR mushroom escapes US regulation. *Nature.* 2016;532:293.
- Wang X, Wang Y, Wu X, et al. Unbiased detection of off-target cleavage by CRISPR-Cas9 and TALENs using integrase-defective lentiviral vectors. *Nat Biotechnol.* 2015;33:175-178.
- Wang Y, Cheng X, Shan Q, et al. Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew. *Nat Biotechnol.* 2014;32:947-951.
- Weber J, Ollinger R, Friedrich M, et al. CRISPR/Cas9 somatic multiplex-mutagenesis for high-throughput functional cancer genomics in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015;112:13982-13987.
- Wellcome Trust Case Control C. Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature.* 2007;447:661-678.
- Wright AV, Sternberg SH, Taylor DW, et al. Rational design of a split-Cas9 enzyme complex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015;112:2984-2989.
- Yang H, Wang H, Shivalila CS, Cheng AW, Shi L and Jaenisch R. One-step generation of mice carrying reporter and conditional alleles by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell.* 2013;154:1370-1379.
- Yang L, Guell M, Niu D, et al. Genome-wide inactivation of porcine endogenous retroviruses (PERVs). *Science.* 2015;350:1101-1104.
- Yin H, Xue W, Chen S, et al. Genome editing with Cas9 in adult mice corrects a disease mutation and phenotype. *Nat Biotechnol.* 2014;32:551-553.
- Yin H, Song CQ, Dorkin JR, et al. Therapeutic genome editing by combined viral and non-viral delivery of CRISPR system components *in vivo*. *Nat Biotechnol.* 2016;34:328-333.
- Zetsche B, Volz SE and Zhang F. A split-Cas9 architecture for inducible genome editing and transcription modulation. *Nat Biotechnol.* 2015;33:139-142.
- Zhang H, Zhang J, Wei P, et al. The CRISPR/Cas9 system produces specific and homozygous targeted gene editing in rice in one generation. *Plant Biotechnol J.* 2014;12:797-807.
- Zuris JA, Thompson DB, Shu Y, et al. Cationic lipid-mediated delivery of proteins enables efficient protein-based genome editing *in vitro* and *in vivo*. *Nat Biotechnol.* 2015;33:73-80.

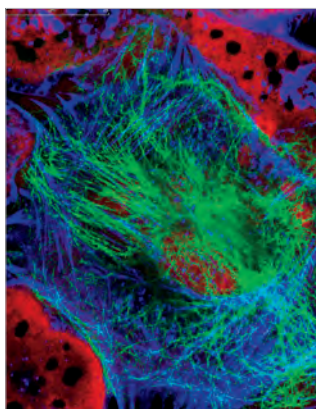


更多科学文献综述，请访问  
[www.illumina.com/pubreviews](http://www.illumina.com/pubreviews)



### 细胞生物学和复杂疾病研究的基因组学方案

复杂疾病是多个遗传和环境因素共同作用的结果。它们与孟德尔性状（或简单性状）的不同之处在于，它们不遵循特定的遗传模式，在人群中往往更常见。尽管其中一些疾病是高度遗传的，但是目前已知的遗传变异只能解释一部分的遗传性。这篇综述概括了基因组技术和 NGS 如何助力复杂疾病的研究。



### 单细胞研究

单细胞组织测序的主要动力来源于癌症，但单细胞方法也在增进我们对其他复杂的生物学系统的了解，包括中枢神经系统、免疫系统和哺乳动物发育。单细胞测序也是一种有效的方法，可鉴定在体外难以培养的生物体。这篇综述着重突出了近期发表的文献，展示了 Illumina 技术如何用于单细胞测序应用和技术。

本科学文献综述由 Illumina 公司出品。

## Illumina 中国

上海办公室 · 电话 (021) 6032-1066 · 传真 (021) 6090-6279  
北京办公室 · 电话 (010) 8455-4866 · 传真 (010) 8455-4855  
技术支持热线 400-066-5835 · [techsupport@illumina.com](mailto:techsupport@illumina.com) · [www.illumina.com.cn](http://www.illumina.com.cn)  
仅供研究使用。不得用于诊断。

© 2018 Illumina, Inc. 保留所有权利。Illumina, IlluminaDx, BaseSpace, BeadArray, BeadXpress, cBot, CSPRO, DASL, DesignStudio, Eco, GAIIX, Genetic Energy, Genome Analyzer, GenomeStudio, GoldenGate, HiScan, HiSeq, Infinium, iSelect, MiSeq, Nextera, NuPCR, SeqMonitor, Solexa, TruSeq, TruSight, VeraCode, VeriSeq PGS, 24sure®, Karyomapping 和南瓜橙色是 Illumina, Inc. 的商标或注册商标。本文档包含的所有其他品牌和名称均为其各自所有者的财产。  
Pub.No. 070-2017-005 Current as of 29 December 2017



@illumina\_china



@illumina

**illumina**<sup>®</sup>