

## CRISPR/Cas9 技术及其应用于基因敲除研究进展

张家翔<sup>1</sup>, 韩佃刚<sup>2</sup>, 杨云庆<sup>2</sup>, 周思佳<sup>1</sup>, 杨妮<sup>1</sup>, 信吉阁<sup>1\*</sup>

(1. 云南农业大学动物医学院, 云南昆明 650201; 2. 昆明海关技术中心, 云南昆明 650200)

**摘要** CRISPR/Cas9 是一种高效率、简单操作、低成本的基因编辑工具, 近年来广泛应用于动物、植物和微生物基因敲除研究, 为深层次地应用于医学研究奠定了基础。概述 CRISPR/Cas9 技术在动物、植物和微生物的基因敲除中的研究进展, 并对其深入研究进行展望。

**关键词** CRISPR/Cas9; 基因敲除; 基因编辑; 应用

中图分类号 Q78 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2022)03-0016-03

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2022.03.004

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



### CRISPR/Cas9 Technology and Research Progress in Gene Knockout

ZHANG Jia-xiang<sup>1</sup>, HAN Dian-gang<sup>2</sup>, YANG Yun-qing<sup>2</sup> et al (1. College of Veterinary Medicine, Yunnan Agricultural University, Kunming, Yunnan 650201; 2. Technology Center of Kunming Customs, Kunming, Yunnan 650200)

**Abstract** CRISPR/Cas9 is a gene editing technology with high editing efficiency, simple operation and low cost. In recent years, this technology has been widely used in the study of gene knockout in animals, plants and microorganisms, which has laid a foundation for medical research in the future. This paper summarized the research progress of CRISPR/Cas9 technology in gene knockout in animals, plants and microorganisms, and forecasted its in-depth research.

**Key words** CRISPR/Cas9; Gene knockout; Gene editing; Application

近年来, CRISPR/Cas9 (成簇有规律间隔的短回文重复序列及其相关蛋白) 技术因在生物技术领域的主要应用而被广泛认可。CRISPR/Cas9 是细菌和古细菌在长期演化过程中形成的一种适应性免疫防御, 可用来对抗入侵的病毒及外源 DNA<sup>[1]</sup>。CRISPR 的序列最早是由日本分子生物学家石野良纯 (Yoshizumi Ishino) 于 1987 年在大肠杆菌中偶然发现的, 2003 年西班牙微生物学家弗朗西斯科·莫伊卡 (Francisco Mojica) 进一步发现 CRISPR 中独特的非重复的序列与各种病毒的遗传密码相匹配。随着研究的不断深入, 研究人员确定了 CRISPR 是一种源自细菌的适应性免疫系统<sup>[2-3]</sup>。

CRISPR/Cas9 技术被认为是第三代基因编辑技术<sup>[4]</sup>, 其是一种非常具有目标性的工具, 几乎可以靶向任何基因, 且操作较为简便、敲除效率较高<sup>[5-7]</sup>。CRISPR/Cas 技术改变了基因组学、基因编辑、基因治疗和基因组成像等领域, 同时这一技术的广泛应用为理解和操纵遗传或表观遗传元素拓展了巨大的范围。该技术在体系完成对靶标基因的遗传编辑后, 可在后代配子形成过程中随着染色体的分离而去除, 在编辑后代中无转基因的痕迹, 无需引用外源基因, 因此生物安全性高<sup>[8]</sup>。CRISPR/Cas9 技术是一种流行的工具, 目前已经广泛用于动物、植物以及微生物基因组编辑<sup>[9]</sup>。

## 1 原理

CRISPR/Cas9 系统的工作原理是以 crRNA (CRISPR-derived RNA) 通过碱基的互补配对, 与 tracrRNA (trans-activating RNA) 结合形成 tracrRNA/crRNA 复合物, 然后通过这

个过程所形成的复合物来引导核酸酶 Cas9 蛋白, 再与 crRNA 配对的序列靶位点剪切双链 DNA。通过人为设计这 2 种 RNA, 可以改造形成具有引导作用的 sgRNA (single-guide RNA), 引导 Cas9 对 DNA 的定点切割<sup>[10]</sup>, 工作原理<sup>[11]</sup>见图 1。

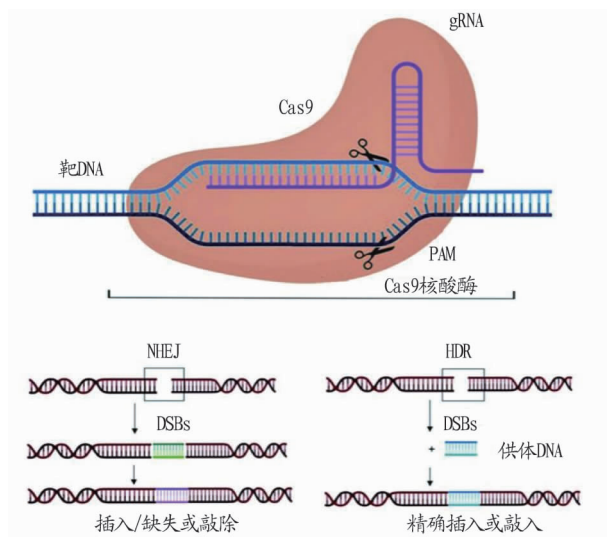


图 1 CRISPR/Cas9 系统工作原理

Fig. 1 CRISPR/Cas9 system working principle

## 2 应用

**2.1 在动物上的应用** CRISPR/Cas9 基因组编辑技术目前正在改变广泛动物模型中的遗传学研究。CRISPR/Cas9 技术在动物上的应用主要是利用基因敲除技术和胚胎干细胞技术制备的某一特定位置基因缺失的动物, 从而得到一些动物模型, 能够更好地获得一些信息以及得到实际生产应用<sup>[12]</sup>。

现已经利用 CRISPR/Cas9 技术诱导猪胎儿成纤维细胞 (pig fetal fibroblasts, PFF) 发生非同源性末端接合 (non-ho-

**基金项目** 国家自然科学基金项目 (31960658, 31360532); 云南省科技计划项目 (2013FB041); 国家质检总局科技计划项目 (2012IK025)。

**作者简介** 张家翔 (1996—), 男, 重庆人, 硕士研究生, 研究方向: 兽医公共卫生。\* 通信作者, 副教授, 博士, 从事兽医公共卫生研究。

**收稿日期** 2021-04-21

mologous end joining, NHEJ), 通过体细胞核移植 (somatic cell nuclear transfer, SCNT) 技术和胚胎移植 (embryo transfer, ET) 技术获得了 MSTN 双等位基因敲除猪 (knockout, KO)<sup>[13]</sup>。张婷婷等<sup>[14]</sup>利用电转染法把 CRISPR/Cas9、sgRNA 和目的载体共同转入巴马猪 PFF, 筛选单细胞克隆, 合成了 hHBB 突变体, 共制备出 15 株有 hHBB 突变体定点敲入细胞系。许金蔓等<sup>[15]</sup>根据猪的 *PFKM* 基因序列结构特点, 设计出了 sgRNA 序列, 同时构建 CRISPR/Cas9 基因敲除质粒, 试验结果表明, 在已经转染了的 CRISPR/Cas9 基因敲除质粒筛选到的单细胞克隆中, 有 2 株细胞 *PFKM* 基因序列发生了基因突变, 其中 1 个克隆为碱基插入, 另 1 个为碱基插入、替换及缺失, 再通过 qRT-PCR 定量检测后, 筛选到 1 株细胞 *PFKM* mRNA 表达量下降 89.41%, 差异极显著。曹兴林等<sup>[16]</sup>利用 CRISPR/Cas9 系统成功构建敲除了 *IFN-β1* 编码序列的 MDCK 单细胞克隆。该克隆生长旺盛、病毒增殖能力维持较高水平, 为禽流感病毒抗原的规模增殖及相关机理研究奠定了试验基础。李忠慧<sup>[17]</sup>运用 CRISPR/Cas9 对羊毛生长性状相关的功能基因进行修饰, 以获得基因编辑绵羊。

随着技术不断更新, CRISPR/Cas9 基因敲除技术日趋成熟, 利用该技术已经成功改良了一些家畜的产肉产毛量, 改善了家畜的健康状况等, 为之后更多的动物领域研究提供了便利。

**2.2 在植物上的应用** 传统的改良作物性状的育种方法是利用一系列的回交和选择, 将一个有益性状导入优良种质中, 是比较耗费时间和资源的。CRISPR/Cas9 系统是一种先进的用于植物基因功能研究和作物改良的通用工具, 近年来该系统在植物上的研究也越来越广泛, 在主要粮食及经济作物的精准育种方面发挥了重要作用<sup>[18]</sup>。

张宗飞等<sup>[19]</sup>、李孟珠等<sup>[20]</sup>都将 CRISPR/Cas9 技术运用在了水稻上, 张宗飞团队成功创建了 2 个已鉴定的水稻 OsFRK 家族基因的敲除突变体, 获得 28 株 OsFRK1 的 T0 代转基因植株<sup>[19]</sup>; 李孟珠团队则是构建了水稻的 OsSUT4 缺失突变体, 通过进一步分析 OsSUT4 在水稻蔗糖源端装载以及籽粒库端卸载等生理过程发挥重要作用<sup>[20]</sup>。李星坤等<sup>[21]</sup>以拟南芥糖基转移酶同工酶基因 *UGT84A1* 和 *UGT84A2* 为靶向基因, 构建了 CRISPR/Cas9 双突变体表达载体, 并将其转化到农杆菌浸染拟南芥, 同时定向敲除靶向基因成功构建了 *UGT84A1/UGT84A2* 双突变体。李鹏<sup>[22]</sup>也利用 CRISPR/Cas9 系统, 成功完成对拟南芥 *AtILR3* 编辑靶位点的筛选及载体构建。Badhan Sapna 等<sup>[23]</sup>首次在鹰嘴豆原生质体中利用 CRISPR/Cas9 进行 DNA 基因编辑抗旱相关基因, 成功培育出抗旱植株。

CRISPR/Cas9 系统作为一个快速、经济、精确的作物改良工具, 不涉及相关伦理问题, 同时在植物上表现的脱靶效应较小, 因此, 该技术在植物上的应用越来越广泛, 也为后续研究提供了便利。

**2.3 在微生物上的应用** 虽然细菌的 CRISPR/CAS 系统已经衍生出多种技术, 但遗憾的是, 这些技术在细菌中的应用

还远不如在真核生物中的应用广泛, 也偶见报道<sup>[24]</sup>。大多数 CRISPR/Cas9 基因编辑系统在微生物上的应用, 主要是获得基因缺失菌株以及构建系统, 为进一步的研究提供技术基础和理论依据<sup>[25]</sup>。

有学者在研究中分别将 CRISPR/Cas9 基因编辑技术运用在了酵母菌上。刘磊等<sup>[26]</sup>利用 CRISPR/Cas9 敲除 *gpd2*, 构建了适用于酿酒酵母的基因敲除系统; 李梦琦等<sup>[27]</sup>成功地在 Lager 酵母中构建了基因敲除系统; 胡婧等<sup>[28]</sup>采用整合型 CRISPR/Cas9 系统, 将 sgRNA 克隆到 pV1093 质粒中, 通过醋酸锂法转化白念珠菌野生型菌株 SN148 和 PCR 验证基因型, 成功构建了 MTQ2 纯合子缺失菌株; Huang 等<sup>[29]</sup>在杜邦嗜热菌中开发了嗜温和嗜热 2 个 CRISPR/Cas9 系统, 并表征了热内酯生物合成和真菌适应中的关键基因功能。

基因操纵微生物的能力对于理解微生物的生物学和新陈代谢至关重要。该技术的出现为各种微生物的基因功能、代谢调控等研究提供了简单、快速和高效的方法。随着日后 CRISPR/Cas9 技术的改进和完善, 其在微生物上的应用也将越来越广泛。

### 3 小结与展望

以 CRISPR/Cas9 系统的基因组编辑是一种高效、有潜力的技术, 其可以替代传统的基因组编辑方法, 同时由于这项技术有着快速、灵活和高效的特性, 使其能够广泛应用于植物、动物以及微生物等许多领域。近年来新兴起了锌指核酸酶技术 (ZFNs)、转录激活子样效应因子核酸酶技术 (TALENs) 及 CRISPR/Cas9 技术等多种基因高效靶向修饰和调控技术。CRISPR/Cas9 相比于 ZFNs 和 TALENs, 其最显著的优势是特异性更高, 但该特性取决于 sgRNA 的识别序列<sup>[30]</sup>。自 2012 年首次证明了 CRISPR/Cas9 可以在体外进行 DNA 切割试验以来, CRISPR 技术逐渐在基因编辑研究中获得了迅速的发展, 除了应用于基因编辑领域之外, 它在基因表达调控、基因成像、基因分析等方面也展现出了巨大的应用潜力<sup>[31]</sup>。

CRISPR/Cas9 系统目前已经为基因组编辑提供了前所未有的可能性, 但是, 也存在着一些局限性, 包括实现高效的一步多基因组目标, 以节省成本、时间, 并确保高质量。同时 CRISPR/Cas9 基因编辑技术虽然存在着脱靶、工具质粒不稳定、Cas9 蛋白毒性作用等问题, 但因有着简单、高效等优势, 使其在目前广泛应用于多个领域 (微生物、动物、植物等), 尤其在哺乳动物和人类的多种疾病治疗、药物以及作物培育研究等方面的应用越来越成熟<sup>[32]</sup>。同时对 CRISPR/Cas9 技术潜在应用的进一步研究将有助于克服这些难关, 相信随着 CRISPR 系统的不断改进, 该技术不仅能为研究人员提供基因的操纵和改变及功能研究, 促进研究人员对疾病分子基础的认识和新的靶向治疗方法的开发, 而且在今后的生物学、农学和医学领域将具有更为广阔的应用前景。

### 参考文献

- [1] 刘成, 司振书, 郭晶, 等. CRISPR/Cas9 基因编辑技术在禽病毒病研究中的应用[J]. 中国预防兽医学报, 2021, 43(10): 1124-1129.
- [2] 汪铭. CRISPR/Cas9 技术: 基因魔剪[J]. 科学通报, 2020, 65(36): 4168-

- 4170.
- [3] 蒋艳红, 吴宇轩. CRISPR/Cas9 系统: 开启基因编辑新时代——2020 年诺贝尔化学奖简介[J]. 自然杂志, 2020, 42(6): 456-462.
- [4] 常雯茹, 段利芳, 杨乐, 等. 伪狂犬病病毒在 NF- $\kappa$ B 家族 p65 基因敲除细胞系的复制规律研究[J]. 中国畜牧兽医, 2021, 48(1): 83-92.
- [5] 朱奕骋. CRISPR/Cas9 技术的研究进展及其在肺癌研究中的应用[J]. 科技传播, 2020, 12(14): 172-174.
- [6] TANG Y D, GUO J C, WANG T Y, et al. CRISPR/Cas9-mediated 2-sgRNA cleavage facilitates pseudorabies virus editing[J]. FASEB journal, 2018, 32(8): 4293-4301.
- [7] ALTAVILLA D, SAIITTA A, SQUADRITO G, et al. Evidence for a role of nuclear factor- $\kappa$ B in acute hypovolemic hemorrhagic shock[J]. Surgery, 2002, 131(1): 50-58.
- [8] 欧阳乐军, 李莉梅, 马铭赛, 等. CRISPR/Cas9 技术发展及其应用进展[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2019, 47(10): 34-40.
- [9] ZHANG Y, SHOWALTER A M. CRISPR/Cas9 genome editing technology: A valuable tool for understanding plant cell wall biosynthesis and function[J]. Frontiers in plant science, 2020, 11: 1-14.
- [10] 李晓开, 龙科任, 麦苗苗, 等. CRISPR-Cas9 技术的原理及其在猪研究中的应用[J]. 生命科学, 2018, 30(6): 690-700.
- [11] MANGHWAR H, LINDSEY K, ZHANG X L, et al. CRISPR/cas system: Recent advances and future prospects for genome editing[J]. Trends in plant science, 2019, 24(12): 1102-1125.
- [12] 白祥慧. CRISPR/Cas9 基因敲除研究进展[J]. 现代畜牧兽医, 2021(1): 90-92.
- [13] WANG K K, OUYANG H S, XIE Z, et al. Efficient generation of myostatin mutations in pigs using the CRISPR/Cas9 system[J]. Scientific reports, 2015, 5: 1-11.
- [14] 张婷婷, 杨漫漫, 魏强, 等. CRISPR/Cas9 介导人 HBB 基因突变体在猪成纤维细胞的靶向敲入[J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(6): 779-787.
- [15] 许金蔓, 徐磊, 彭明晗, 等. 利用 CRISPR/Cas9 系统构建猪 PFKM 基因定点突变细胞株[J]. 扬州大学学报(农业与生命科学版), 2020, 41(4): 36-39.
- [16] 曹兴林, 恽君雯, 陈丽, 等. 基于 CRISPR/Cas9 系统的 MDCK 细胞 IFN- $\beta$ 1 编码序列的敲除[J]. 江苏农业科学, 2020, 48(7): 59-65.
- [17] 李忠慧. CRISPR/cas9 基因编辑技术在羊毛品质改良中的应用[J]. 饲料博览, 2020(11): 32-34.
- [18] 陈赢男, 陆静. CRISPR/Cas9 系统在林木基因编辑中的应用[J]. 遗传, 2020, 42(7): 657-668.
- [19] 张宗飞, 刘媛媛, 欧阳解秀, 等. 水稻 OsFRK1 与 OsFRK2 基因 CRISPR 敲除突变体的构建[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2020, 46(6): 679-685, 741.
- [20] 李孟珠, 王高鹏, 巫月, 等. 水稻蔗糖转运蛋白 OsSUT4 参与蔗糖转运的功能研究[J]. 中国水稻科学, 2020, 34(6): 491-498.
- [21] 李星坤, 潘慧, 李攀, 等. 基于 CRISPR/Cas9 系统的拟南芥 *ugt84a1/ugt84a2* 双突变体制作及突变位点分析[J]. 江苏农业科学, 2020, 48(20): 49-55.
- [22] 李鹏. 利用 CRISPR/Cas9 系统编辑拟南芥 *ILR3* 基因及功能验证[J]. 江苏农业科学, 2020, 48(14): 78-82.
- [23] BADHNA S, BALL A S, MANTRI N. First report of CRISPR/Cas9 mediated DNA-free editing of and *4CL* and *RVE7* genes in chickpea protoplasts[J]. International journal of molecular sciences, 2021, 22(1): 1-15.
- [24] 张昆, 陈景超, 李祎, 等. CRISPR/Cas9 技术在微生物研究中的应用进展[J]. 微生物学通报, 2018, 45(2): 451-464.
- [25] 富国文, 单春兰, 敖平星, 等. 应用 CRISPR/Cas9 系统构建大肠埃希氏菌 *irp2* 基因缺失株[J]. 动物医学进展, 2021, 42(1): 50-55.
- [26] 刘磊, 李娜, 姜雪雍, 等. CRISPR/Cas9 技术敲除酿酒酵母 *gpd2* 基因对产 2,3-丁二醇的影响[J]. 中国农学通报, 2020, 36(29): 69-77.
- [27] 李梦琦, 张可心, 郑飞云, 等. Lager 酵母中 CRISPR-Cas9 基因敲除系统的构建[J]. 东北农业大学学报, 2020, 51(3): 36-44, 96.
- [28] 胡婧, 冯金荣. 整合型 CRISPR/Cas9 系统构建白念珠菌 *MTQ2* 基因缺失株及其表型分析[J]. 中国病原生物学杂志, 2020, 15(9): 993-996, 1004.
- [29] HUANG W P, DU Y J, YANG Y, et al. Two CRISPR/Cas9 systems developed in *Thermomyces dupontii* and characterization of key gene functions in thermolide biosynthesis and fungal adaptation[J/OL]. Applied and environmental microbiology, 2020, 86(20) [2020-11-17]. <https://doi.org/10.1128/AEM.101486-20>.
- [30] 李凤丽, 石素华, 李爱芹, 等. CRISPR/Cas9 基因编辑技术研究进展[J]. 山东农业科学, 2020, 52(4): 164-172.
- [31] 田甜, 周小明. 基于 CRISPR/Cas9 的基因分析方法研究进展[J]. 激光生物学报, 2020, 29(1): 18-25.
- [32] 信欣, 陈雨杰, 薛闯. CRISPR-Cas9 技术在细菌中的研究进展及应用[J]. 微生物学杂志, 2018, 38(6): 97-102.

## (上接第 11 页)

- [50] ISHII M. Partial elimination of virus from doubly infected orchids by meristem explant culture[J]. Acta horticulturae, 1974, 36: 229-234.
- [51] 朱根发, 王怀宇, 陈明莉, 等. 文心兰脱毒快繁技术研究[J]. 广东农业科学, 1997(4): 27-28.
- [52] 朱根发, 王怀宇, 陈明莉, 等. 大花蕙兰的脱毒快繁技术研究[C]//侯喜林, 常有宏. 园艺学进展(第 2 辑). 南京: 东南大学出版社, 1998: 727-730.
- [53] 王素英, 宋锡全, 聂璐, 等. 金钗石斛茎尖培养脱毒和检测[J]. 种子, 2007, 26(5): 1-3.
- [54] 贺嘉. 蝴蝶兰(*Phalaenopsis*) 脱毒快繁关键技术及其生理基础的研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2010.
- [55] 靖晶. 蝴蝶兰组织培养与脱除病毒技术研究[D]. 北京: 北京林业大学, 2011.
- [56] 丁兰, 郭艳, 董刚, 等. 国产蝴蝶兰种苗携带建兰花叶病毒(CymMV)和齿兰环斑病毒(ORSV)的调查及脱毒的初步研究[J]. 北方园艺, 2012(2): 137-140.
- [57] 景维杰, 黄容清, 蒋明殿, 等. 蝴蝶兰茎尖培养脱病毒技术初步研究[J]. 中国园艺文摘, 2013, 29(4): 13-16.
- [58] CHIEN K W, AGRAWAL D C, TSAY H S, et al. Elimination of mixed 'Odontoglossum ringspot' and 'Cymbidium mosaic' viruses from *Phalaenopsis* hybrid 'V3' through shoot-tip culture and protocorm-like body selection[J]. Crop protection, 2015, 67: 1-6.
- [59] PRADHAN S, REGMI T, RANJIT M, et al. Production of virus-free orchid *Cymbidium aloifolium* (L.) Sw. by various tissue culture techniques[J/OL]. Heliyon, 2016, 2(10) [2021-04-21]. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2016.e00176>.
- [60] 朱娇, 马蕾, 刘芳, 等. 蝴蝶兰茎尖脱毒再生体系建立与优化[J]. 山东农业科学, 2017, 49(6): 60-63.
- [61] ALBOUY J, FLOUZAT C, KUSIAK C, et al. Eradication of orchid viruses by chemotherapy from *in-vitro* cultures of *Cymbidium* [J]. Acta horticulturae, 1988, 234: 413-420.
- [62] 许传俊, 黄碧梅, 曾碧玉, 等. 病毒唑对大花蕙兰 CyMV 及 ORSV 脱毒效果初探[J]. 亚热带植物科学, 2012, 41(1): 7-9.
- [63] 李正民. 蝴蝶兰无毒苗组培快繁技术研究[D]. 海口: 海南大学, 2013.
- [64] LIM S T, WONG S M, GOH C J. Elimination of *Cymbidium mosaic virus* and *Odontoglossum ringspot virus* from orchids by meristem culture and thin section culture with chemotherapy[J]. Annals of applied biology, 1993, 122(2): 289-297.
- [65] PORTER K G, KUEHNLE A R. Using dithiouracil and ribavirin to eliminate *Cymbidium mosaic virus* during micropropagation of 'Uniwai Mist' dendrobium orchid[J]. HortTechnology, 1997, 7(2): 161-164.
- [66] STONE O M. The elimination of four viruses from *Ullucus tuberosa* by meristem-tip culture and chemotherapy[J]. Annals of applied biology, 1982, 101(1): 79-83.
- [67] 刘福秀, 王安石, 韩玉春, 等. 文心兰 2 种主要病毒的快速检测及其组培脱毒方法[J]. 热带作物学报, 2014, 35(1): 147-151.
- [68] 李涵, 陆琳, 瞿素萍, 等. 杂交兰种苗超低温脱毒技术研究[J]. 中国农业科技导报, 2018, 20(1): 147-153.
- [69] 王玉英, 王琴, 李枝林, 等. 虎舌兰玻璃化超低温脱毒技术的研究[J]. 北方园艺, 2020(5): 61-66.
- [70] 王仁睿, 汤玲莉, 苏仕林, 等. 小滴玻璃化法脱除蝴蝶兰种苗建兰花叶病毒的研究[J]. 植物研究, 2021, 41(4): 514-521.
- [71] 明艳林, 郑金龙, 郑国华, 等. 兰花抗病毒基因工程研究进展[J]. 亚热带植物科学, 2010, 39(1): 92-96.