

CRISPR/Cas技术的研究展望

乌仁嘎^{1*}, 孙 瑀², 尤慧琳², 张琛佳², 李 鑫², 王美婷², 于景丽^{2#}, 吴路瑶², 郭 妍², 希尼尼根^{3#}

¹内蒙古农业大学继续教育学院, 内蒙古 呼和浩特

²内蒙古大学生态与环境学院, 内蒙古 呼和浩特

³内蒙古农业大学兽医学院, 内蒙古 呼和浩特

收稿日期: 2023年6月29日; 录用日期: 2023年9月15日; 发布日期: 2023年9月26日

摘 要

CRISPR/Cas系统是多数细菌及古菌在环境胁迫下长期进化形成的由RNA引导降解入侵病毒或噬菌体DNA的适应性免疫系统, 包括Cas蛋白与单链引导RNAs (Single guide RNAs, sgRNAs)两个核心元件。近些年来, 由CRISPR/Cas系统发展形成的新型基因编辑技术(CRISPR/Cas技术)广泛应用于动物、植物、微生物的基因组编辑和调控, 其原理是Cas蛋白受sgRNA指引将靶向DNA进行基因改造, 进而定向引导基因突变并通过测序技术筛选有效的基因突变。CRISPR/Cas技术能同时对多个位点进行编辑, 对靶向DNA有相当高的亲和力和特异性, 具有耗时短、编辑高效等优点。本文综述了CRISPR/Cas技术在临床治疗、植物基因编辑、微生物基因改造等多个领域的应用进展, 并对CRISPR/Cas技术目前存在的问题进行了深入讨论及展望, 为今后探究CRISPR/Cas技术在生态环境领域的应用提供了科学思路与研究方向。

关键词

CRISPR/Cas技术, 临床治疗, 植物基因组编辑, 微生物基因改造

Research Progress of CRISPR/Cas Technology

Wurenga^{1*}, Yu Sun², Huilin You², Chenjia Zhang², Xin Li², Meiting Wang², Jingli Yu^{2#}, Luyao Wu², Yan Guo², Xininigen^{3#}

¹College of Continuing Education, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot Inner Mongolia

²School of Ecology and Environment, Inner Mongolia University, Hohhot Inner Mongolia

³College of Veterinary Medicine, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot Inner Mongolia

*第一作者。

#通讯作者。

文章引用: 乌仁嘎, 孙瑀, 尤慧琳, 张琛佳, 李鑫, 王美婷, 于景丽, 吴路瑶, 郭妍, 希尼尼根. CRISPR/Cas 技术的研究展望[J]. 微生物前沿, 2023, 12(3): 110-120. DOI: 10.12677/amb.2023.123013

Abstract

The clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR) in many bacteria and archaea evolves into adaptive immune system under environmental stress in the long term. Actually, CRISPR is guided by RNA to degrade viruses or phage DNA invading host bacteria and archaea. The core elements of CRISPR/Cas system include Cas protein and single guide RNAs (sgRNAs). In recent years, CRISPR/Cas technology as the novel gene editing technology developed by CRISPR/Cas system has been widely used in editing and regulating genomes in animals, plants and microorganisms. The principle of CRISPR/Cas technology is that Cas protein is guided by sgRNA, genetically modified to target DNA, and then guide to target gene mutation so as to screen effective gene mutation by sequencing technology. CRISPR/Cas technology can edit multiple sites at the same time, which has high affinity and specificity for targeted DNA from animals, plants and microorganisms. It has the advantages of short time and high editing efficiency. This paper reviewed the application progress of CRISPR/Cas technology in clinical treatment, plant gene edition, microbial gene modification and other fields. Meanwhile, this study discussed and prospected the present problems of CRISPR/Cas technology. This paper can help readers to understand CRISPR/Cas technology in depth. It provides scientific ideas and research directions for exploring the application of CRISPR/Cas technology in the field of ecological environment in future.

Keywords

CRISPR/Cas Technology, Clinical Treatment, Plant Genome Editing, Microbial Gene Modification

Copyright © 2023 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 概述

常间回文重复序列丛集(Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats, CRISPR)及其关联蛋白(CRISPR-associated proteins, Cas)系统作为一类新型基因组编辑技术,相对于成本较高的锌指核酸酶(Zinc Finger Nucleases, ZFNs)技术和操作周期较长、编辑效率较低的转录激活子样效应因子核酸酶(Transcription Activator-Like Effector Nucleases, TALENs)技术,具有经济效益高、编辑简便、缩短操作时间等优点[1]。更为重要的是,CRISPR/Cas系统因缺乏稳定的整合,降低了其随机插入宿主基因组引起意外突变的可能性[2]。相比于ZFNs和TALENs基因编辑技术,CRISPR/Cas技术可以敲除多倍体植物中的等位基因从而产生更显著的表型效应[3][4]。具体而言,CRISPR/Cas技术的优势可以归纳为三个方面。

(1) 精准性: CRISPR/Cas技术使用可编辑的RNA序列引导Cas蛋白对目标基因进行切割,从而实现靶标基因的敲除。这种高度精准的靶向性使得CRISPR/Cas技术可以选择性地敲除特定的等位基因,且不会对其他基因造成影响。这种精准性有助于产生更明显的表型变化;(2) 高效性: CRISPR/Cas技术能够在短时间内同时对多个基因进行编辑,实现基因的快速敲除和高效基因编辑,能快速观察到表型变化;(3) 灵活性: CRISPR/Cas技术可通过引入外源DNA片段来恢复被敲除的等位基因,即等位基因的敲除过程是可逆的,这使得CRISPR/Cas技术更加灵活。因此,CRISPR/Cas系统成为当今基因编辑和纠正基

因突变的主流技术。

CRISPR/Cas 系统的发现为人类重大遗传疾病的基因组治疗及抗逆品种培育和微生物基因组改造带来了曙光。CRISPR/Cas 技术的发展历程大致经历六个阶段[5]。第一阶段为 CRISPR/Cas 系统萌芽期：上个世纪 50 年代 DNA 双螺旋的提出为微生物遗传学即生物化学的发展奠定了基础。该阶段代表性人物包括莱德伯格、科恩伯格、桑格三位大师级科学家；第二阶段为 CRISPR/Cas 系统发展初期：上个世纪 70 年代末桑格测序为细菌 CRISPR/Cas 系统的测序提供了技术支撑；第三阶段为 CRISPR/Cas 系统缓慢发展期：21 世纪初发现多种微生物存在特异性 CRISPR 序列及其附近的多个编码区相关 Cas；第四阶段为 CRISPR/Cas 系统转折期：2005 年首次证实 CRISPR/Cas 是细菌获得性免疫系统，2008 年发现 CRISPR 序列可转录加工非编码 RNA 并介导外源核酸的干扰；第五阶段为 CRISPR/Cas 系统快速发展期：2012 年 CRISPR/Cas9 系统实现靶向 DNA 双链剪切从而达到基因编辑的目的；第六阶段为 CRISPR/Cas 系统的广泛应用期。详见图 1。

2. CRISPR/Cas 系统机理

CRISPR/Cas 系统是多数细菌及古菌等原核生物为抵御外来的核酸长期进化形成的由 crRNA 引导的 Cas 蛋白效应复合物以裂解外来入侵的核酸形成适应性免疫系统[6] [7]。即 CRISPR 是多数古菌和细菌在环境胁迫下后天获得的一套能够识别和抵御噬菌体侵染的防御系统——获得性免疫系统[6] [7]。当噬菌体攻击宿主细胞时，CRISPR 利用宿主细胞的识别功能形成干扰噬菌体的特异性蛋白，再利用宿主特异性蛋白识别对噬菌体 DNA 片段敏感的 Cas 蛋白，最终将所识别的外源 DNA 进行切割分离[6]。CRISPR/Cas 系统包括 Cas 蛋白与单链引导 RNAs (single guide RNAs, sgRNAs)两个核心元件[6]。其中 Cas 蛋白元件受特异性的单链引导 RNA (gRNAs)元件指引靶向 DNA 位点；再利用作为“剪刀”的 Cas 蛋白切割分离外源靶向的核酸序列[6]。详见图 2。

CRISPR/Cas 系统主要由 CRISPR 序列和 Cas 蛋白组成。CRISPR 序列是由细菌和古菌等原核生物基因组内抵御噬菌体侵染产生的一段重复序列。Cas 蛋白是一种核酸内切酶，通过 sgRNA 指引到前间隔序列邻近基序(Protospacer-Adjacent Motifs, PAM)序列，切割特定的 DNA 双链形成间隔(spacer)序列[8]。详见图 3。

基于 CRISPR-Cas 基因座差异、是否出现 Cas 基因签名、保守 Cas 蛋白的系统发育分析及序列相似性，将 CRISPR-Cas 系统分为 6 种类型[9]。I、III 型 CRISPR-Cas 系统具有一种称为 CRISPR 相关抗病毒防御复合物的多重效应复合物，而 II、V、VI 型 CRISPR-Cas 系统具有单个多结构域效应 Cas 蛋白[10]。CRISPR/Cas 系统中常用的 Cas 蛋白主要有 Cas3、Cas10、Cas9、Cas12a、Cas12b 与 Cas13 等[10]。其中 Cas3、Cas9、Cas12 用于编辑 DNA，Cas13 用于编辑 RNA，Cas10 既可编辑 DNA 也可编辑 RNA[10]。Cas 蛋白中最常用的是 Cas9 与 Cas12a，CRISPR/Cas9 系统作为最常用的 Cas 核酸酶用于识别富含 GC 的位点，通过限制 PAM 不能识别富含 AT 非编码区[11]。CRISPR/Cas12a(又被称为 CRISPR/Cpf1)能够识别由单个 CRISPR RNA(crRNA)引导的富含 AT 的 PAM 序列[12]。与 CRISPR/Cas9 相比，CRISPR/Cas12a 往往具有更高的特异性、可操作性，因为 Cas12a 只需一个 RNA 分子(crRNA)而 Cas9 需两个 RNA 分子(tracrRNA 和 crRNA) [12]。此外，Cas12a 正在成为另一个强大的基因编辑工具，在核酸检测、疾病建模、基因治疗等方面发挥着重要作用[12]。Cas12a 的 RNase 活性可特异性处理 crRNA 阵列[13] [14]。因此，Cas12a 有望成为多基因编辑的最佳候选者广泛应用于各种动植物及微生物领域[12]。Cas13 专门识别和切割单链 RNA、其裂解由真核生物和原核生物的两个核苷酸结构域介导的[15]。Mahas 等和 Wada 等先后发现 CRISPR/Cas13 系统切割病毒 RNA 能增强植物对 RNA 病毒的免疫力[16] [10]。CRISPR-Cas 系统的类型及其应用特性见表 1。

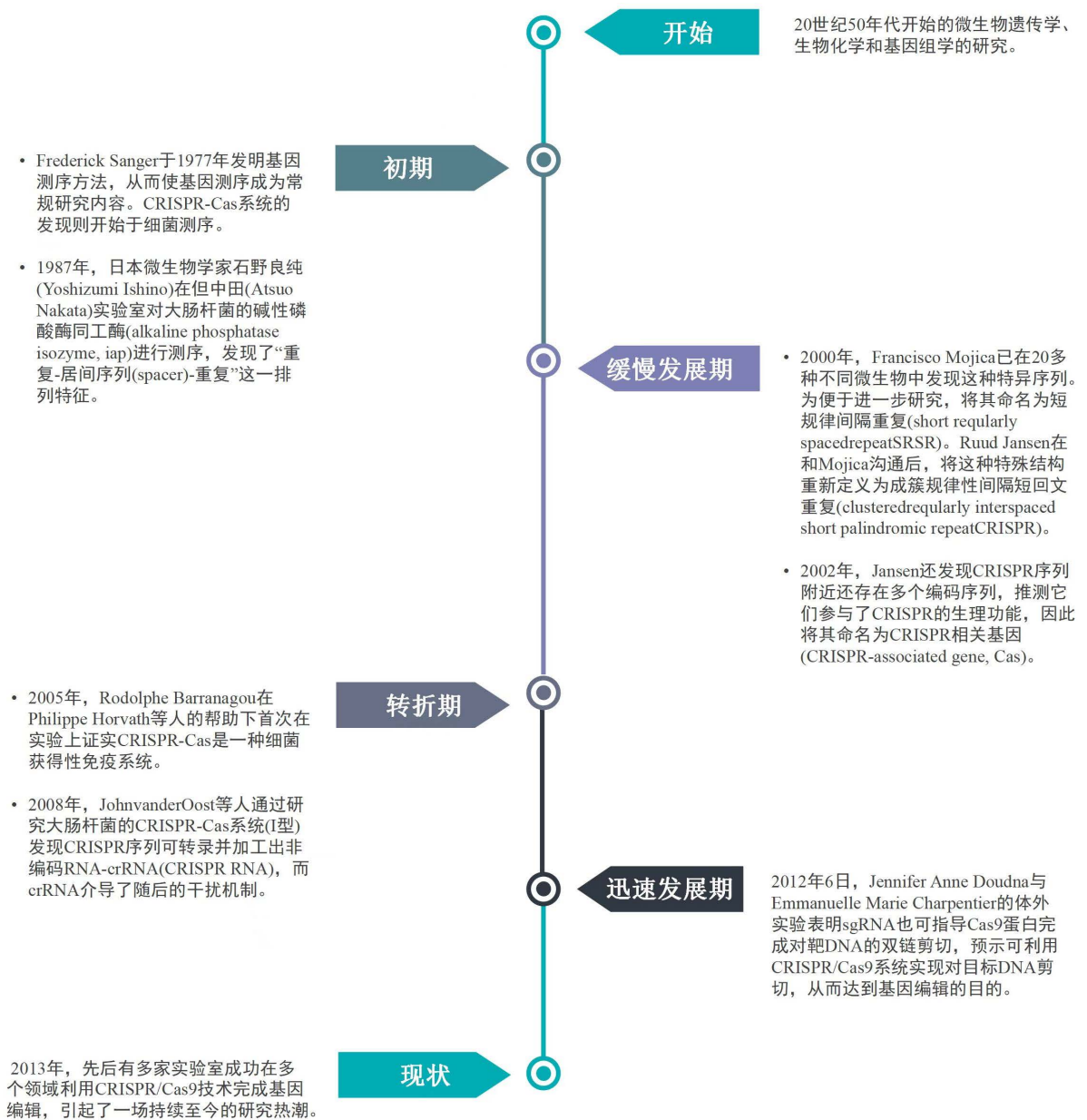


Figure 1. The development history of CRISPR/Cas technology
图 1. CRISPR/Cas 技术的发展历程[7]

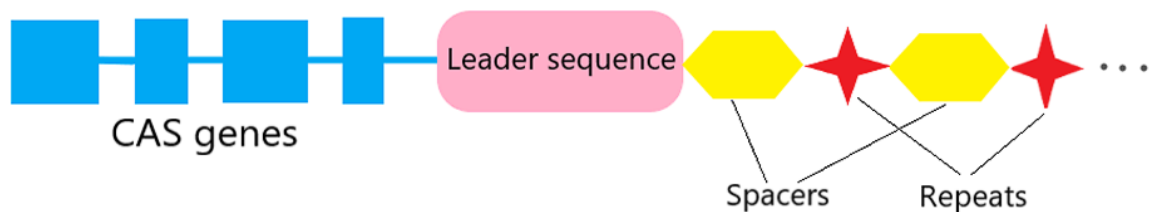


Figure 2. CRISPR site structure [5]
图 2. CRISPR 位点结构[5]

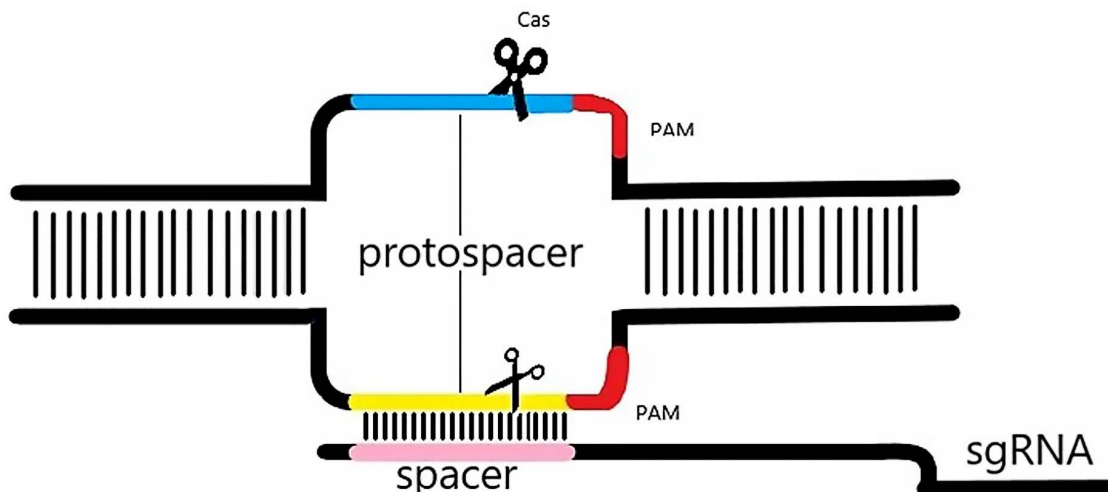


Figure 3. Principle of CRISPR/Cas-mediated genome edition [8]

图 3. CRISPR/Cas 介导的基因组编辑原理[8]

Table 1. Application characteristics and types of CRISPR/Cas system [9] [10]

表 1. CRISPR/Cas 系统的类型及其应用特性[9] [10]

类别 Type	签名基因 Signature Gene	靶标 Target	向导核酸 crRNA	特征及应用 Characteristics/Application
I	Cas3	DNA	Single crRNA	人类细胞的转录控制和基因组编辑，尚未应用于植物细胞。
II	Cas9	DNA	tracrRNA:crRNA	受限于前间隔序列邻近基序(Protospacer-Adjacent Motifs, PAM)靶点的特异性、比其他 Cas 蛋白分子量大等。
III	Cas10	DNA/RNA	Single crRNA	在人类和植物细胞中诱导双向的长片段缺失和小片段插入。
V	Cas12	DNA	Single crRNA/ tracrRNA:crRNA	向导核酸不同，Cas12b 需要 crRNA 和 tracrRNA；Cas12a 只需要 crRNA，不需要 tracrRNA。且酶切方式与核酸酶结构域也各不相同。
VI	Cas13	RNA	Single crRNA	可以靶向 RNA，已被用于敲除表达的靶基因，并在植物中用于干扰 RNA 病毒的活性。

注：crRNA: CRISPR RNA，常间回文重复序列丛集 RNA；tracrRNA: transactivating crRNA，反转录激活常间回文重复序列丛集 RNA。

适配体作为重要的靶向剂在 CRISPR/Cas 系统进行靶向识别的过程中扮演重要角色。其作用机制是通过识别结合、切割两个阶段帮助 Cas 蛋白进行靶向识别。在识别结合阶段，适配体通过与靶标基因进行高度特异性互补配对形成稳定的复合物，即适配体能够准确地识别并结合到靶标基因上。一旦适配体与靶标基因结合，Cas 蛋白就会被引导到结合位点，发挥其核酸酶活性来切割靶标基因导致 DNA 断裂，促使细胞启动自身修复机制，从而实现基因组的编辑或修复。与抗体相比，适配体拥有更好的耐热性，具有操作简单、防止过度免疫、容易改良、作用效果温和等优点，有利于适配体的大规模制备。最新的研究表明，富集适配体可提升 CRISPR/Cas 系统中传感器的功效[17]。目前筛选适配体是基于指数富集适配体的系统进化(Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment, SELEX)过程进行正向选择和

负向选择。筛选适配体主要包括四个步骤。第一步将含有靶向分子的大量随机寡核苷酸库进行孵育，第二步通过洗脱将未与特定靶向分子结合的序列淘汰；第三步通过聚合酶链式反应(Polymerase Chain Reaction, PCR)扩增与特定靶向分子结合的序列；第四步通过反向靶标分子筛选与靶标分子特异性结合。以上四步骤反复多次(最多 15 次)直至筛选出高亲和力、高度特异性的适配体。详见图 4。

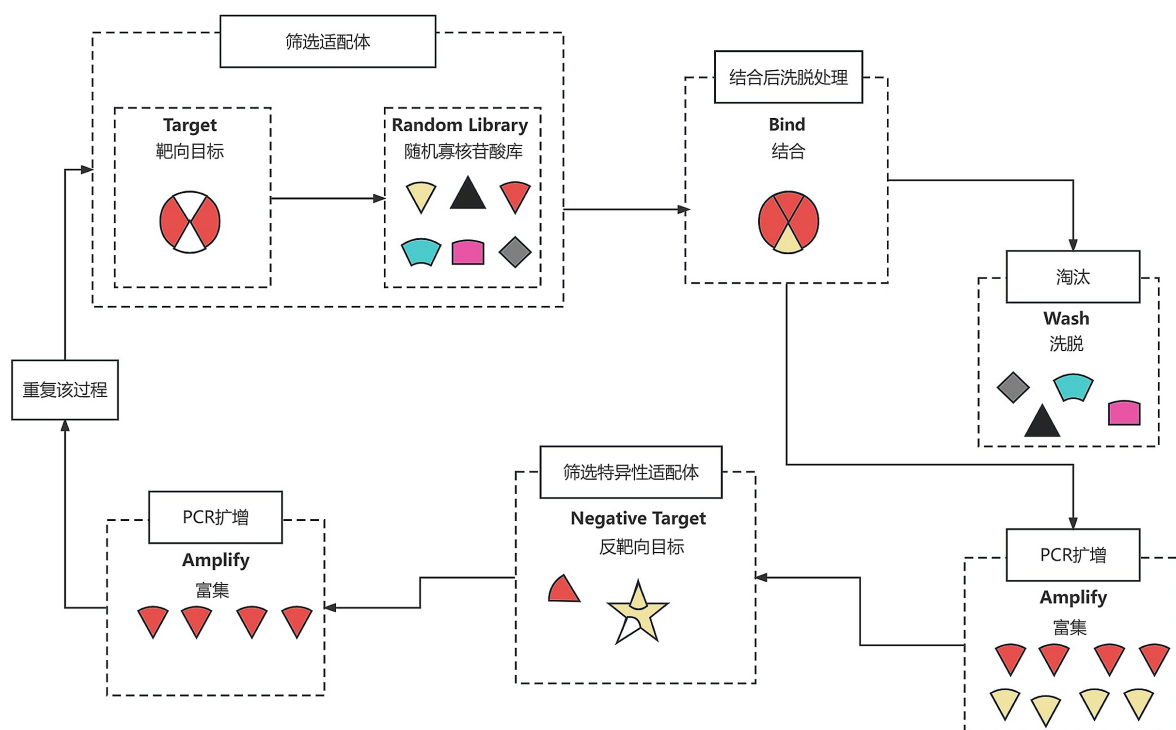


Figure 4. The process of Systematic Evolution of Ligands by exponential enrichment [18]
图 4. 指数富集适配体的系统进化过程[18]

3. CRISPR/Cas 系统的研究进展与应用

CRISPR/Cas 系统作为基因编辑工具在治疗人类遗传疾病方面已经取得了重要进展,多种基因药物已投入到临床试验中[18]。随着 CRISPR/Cas 技术的快速发展,基因组编辑技术开始广泛运用于植物育种等相关研究中[20]。研究人员通过 CRISPR/Cas 技术对植物基因组片段定点插入替换、基因表达调控和表观基因组修饰等使植物获得抗病性、抗虫性等性状[19]。此外,CRISPR/Cas 技术也广泛应用于微生物领域[20]。例如研究人员通过 CRISPR/Cas 系统对微生物进行基因编辑,将微生物底盘细胞进行改造,或者通过研发新的底盘细胞,将微生物与特定生物功能绑定[20]。

3.1. CRISPR/Cas 技术在临床治疗中的应用

自 2019 年新型冠状病毒(SARS-CoV-2)席卷全球以来, SARS-CoV-2 给全球人民带来了伤痛与恐慌。相比于 SARS-CoV, SARS-CoV-2 种 S-蛋白的 Furin 酶切位点其感染性显著增强[21]。尽管过去几年的时间新冠病毒一直在突变进化,但 Furin 酶切位点却一直保留,成为病毒大流行的一大特征。为快速检测 SARS-CoV-2, CRISPR/Cas 技术在病毒检测方面取得进展[21]。例如, Azhar 等基于 CRISPR-Cas9 系统开发了一种 FnCas9 (一种 Cas9 的同源物)编辑检测 SARS-CoV-2 的方法,即 FELUDA 法[21]。FELUDA 无需对报告分子进行反式裂解,直接使用 Cas9 的消化来检测 SARS-CoV-2 核酸,其特异性和敏感性分别高

达 98% 和 96%，且能更准确地检测致病性单核苷酸变异[21]。Yoshimi 等基于 Cas3 的附带单链 DNA 裂解活性开发了一种快速(40 分钟内)、低成本、无需仪器的 SARS-CoV-2 检测方法，名为 CONAN 方法[22]。CONAN 不仅能检测临床样本中的 SARS-CoV-2，还能特异性地检测 A 型流感病毒的单碱基对突变。Chan 等基于 Cas12 与 Cas13 研发了 CRISPR Dx 工作系统。该系统通过 RNA 提取、逆转录、靶点扩增、Cas 分析和侧支裂解活性检测，对拭子、唾液等样本中提取的 RNA 进行检测[23]。Chen 等将光学传感技术-表面等离子体共振(SPR)与 CRISPR 技术相结合，提升了不同毒株检测的灵敏性和特异性，大大缩短了样品检测时间，有利于无症状感染者与病毒携带者的早期检测[24]。

CRISPR-Cas 系统作为一种抗病毒剂在抗击 COVID-19 新冠肺炎中发挥了关键作用。Wang 等提出了两种潜在的治疗方案[25]。方案一是在感染 SARS-CoV-2 的早期阶段用 CRISPR-Cas13a 根除病毒基因组，同时附带裂解活性的 Cas13a 可引起感染细胞凋亡[25]。方案二是在感染 SARS-CoV-2 后期用 CRISPR-Cas13a 减少病毒蛋白的合成，但对宿主细胞没有细胞毒性作用[26]。CRISPR-Cas 系统作为一种抗病毒剂，首先需要在活体细胞中进行病毒的检测[25]。第二必须建立一种安全有效的 CRISPR-Cas 体内传送系统(例如 AAV、脂质纳米颗粒、化学聚合物、两亲多肽和脂质体)将其安全传递到人类靶标上皮细胞[26]。第三必须优化传送的剂量和时间以确保 CRISPR-Cas 系统在宿主细胞中充分表达[23]。最后，CRISPR-Cas 系统在动物模型中确保安全后方可进行临床试验[25]。

CRISPR/Cas 作为靶向治疗的关键技术，为许多疾病的治疗提供了可靠有效的解决方案。Chen 等[26]通过 CRISPR/Cas13 靶向单链 RNA 分子和介导 RNA 切割，开发了 CRISPR/Cas 系统用以抵御胞内寨卡病毒感染，发现该系统对 Zika 感染高度敏感[26]。该系统运用 Cas13b-GFP 融合表达载体，将 CRISPR 基因在 293T-DC-SCGN(树突状细胞特异性细胞间粘附分子-3 抓取非整合素的 293T 细胞系)细胞质中表达，能够对 Zika 的感染进行靶向抑制[26]。

此外，CRISPR/Cas 已在治疗顽固性疾病方面取得新的突破。Park 等将 CRISPR/Cas9 系统通过磁力引导至心脏中开发了治疗心肌梗死的 CRISPR/Cas9 磁质体，对心脏中的靶向 miR34a 基因进行编辑，从而改善了心脏功能，提升了心脏的自我修复与再生能力[27]。CRISPR/Cas9 磁质体为预防心肌梗死和治疗心力衰竭等疾病提供了全新的科学方案。

3.2. CRISPR/Cas 技术在植物基因编辑中的应用

CRISPR/Cas 技术已在植物抗旱、抗盐等方面取得新的进展。Kim 等运用 CRISPR/Cas 技术对小麦脱水响应元件 TaDREB2 和 TaERF3 进行编辑，提高了小麦的抗旱性[28]。Tran 等研究发现番茄杂交富脯氨酸蛋白 1(HyPRP1)是盐胁迫的负向调控因子，并开发了基于 CRISPR/Cas9 精确编辑 HyPRP1 蛋白结构域的系统，该系统可通过靶向消除 SIHyPRP1 负向响应域(s)以提高萌发和营养阶段的番茄对高盐的耐受性[29]。Kieu 等基于 CRISPR/Cas9 创建了 S 基因敲除和诱导隐性抗性方法，通过观察 7 个马铃薯损伤大小、感染叶片的百分比和幼苗形态来评估四等位基因缺失突变体的抗性，发现该系统能够提高马铃薯对大肠杆菌的抗性[30]。Schubert 等于 2007 年发现易突变的马铃薯病毒(PVY)是对马铃薯最具破坏性的病毒病原体[31]。Zhan 等通过敲除病毒 RNA 转录本成功获取多种 PVY 抗性菌株，证实 CRISPR/Cas 系统可提高马铃薯的耐受性[32]。

CRISPR/Cas 技术在调节植物基因表达和修复环境方面也发挥作用。特别是 CRISPR/Cas9 介导的精确基因组编辑技术在开发植物新品种方面展示出巨大的潜力。Li 等利用 CRISPR/Cas 介导的同源定向修复(homology-directed repair, HDR)将具有亲缘关系的其他作物的优良基因作为目标基因进行靶向替换，优化了作物品种[33]。An 等利用 CRISPR/Cas12a 系统对植物 PDS 基因的多个靶点进行靶向敲除，培养出稳定的目标性状，可抵抗诸多环境胁迫[34]。Khumsupan 等选择拟南芥作为模式生物，结合现已开发的

CRISPR/Cas 系统提高了作物的光合作用[35]。可见, 基于 CRISPR/Cas 系统的植物编辑技术不仅为培育优质的环境修复植物提供了可行方案, 又对改善环境具有重大意义。

3.3. CRISPR/Cas 技术在微生物基因改造中的应用

人类大多数疾病都与微生物的参与密切相关。Ghosh 等利用 CRISPR/Cas 技术将特异基因位点整合到病原菌中[17], 通过靶向编辑干扰病原菌生物膜的形成, 最终干扰病原菌产生耐药性[36]。

药物的生产也离不开微生物的参与。Liu 等利用细菌菌株 ATCC 25795 胞内 CRISPR/Cas12a 高效精准的基因编辑系统开发了一种甾体类药物[37]。该系统通过 CRISPR-Cas12a 与自杀质粒介导的传递系统相结合, 再利用双质粒系统成功将目标基因整合到目标基因组位点上, 最终通过靶向清除实现靶向基因组突变, 从而获得更高的药效。

自然界中许多植物与病原微生物存在密切关系。Mu 等开发了一种基于 CRISPR/Cas12a 的新型基因检测方法, 可将小麦镰刀菌与其他病原真菌进行有效区分, 其原理是利用目标基因特异性 PCR 扩增和 gRNA 杂交的双重识别过程先将样本中放大, 再将放大的目标基因与 CRISPR/Cas 系统中的探针配对, 最终通过是否发生特定的 Cas 蛋白剪切来判断是否存在小麦镰刀菌。该法用时 4 天即可实现小麦中镰刀菌(*Fusarium graminearum*)的快速诊断, 为及早防治镰刀菌感染引起的小麦镰刀枯萎病提供了有效的分子诊断技术[38]。

4. CRISPR/Cas 系统的缺陷

4.1. 脱靶问题

尽管 CRISPR/Cas 技术在人类疾病治疗、植物抗逆品种培育、微生物基因组改造等方面发挥巨大作用, 但 CRISPR/Cas 技术仍存在脱靶的风险[7] [39]。尽管效应复合物可以有效识别靶基因组序列, 但仍存在不完全匹配的序列—脱靶。高通量测序技术发现, 单链引导 sgRNA 一旦出现脱靶问题, 基因组内会出现不可控的突变[7] [39]。CRISPR/Cas 技术在治疗人类疾病过程中脱靶问题将会引起人类关键功能基因丢失重排甚至表达障碍, 编辑后的基因组就会出现无法探知的风险, 给人类健康带来巨大的安全隐患。因此脱靶问题大大限制了 CRISPR/Cas 技术的广泛应用。为此, Handelmann 等针对 Cas9 可能出现的脱靶效应, 进行了基因编辑器错配核小体抑制试验(GEMINI-seq), 发现 Cas9 对核小体中的靶向序列和错配序列具有不同的亲和力[40]。这为进一步解决 Cas9 脱靶问题提供了研究方向。

4.2. 缺乏载体

CRISPR/Cas 系统因缺乏稳定的载体极大限制了 CRISPR/Cas 系统的正常功能。开发稳定的载体成为当前亟待解决的问题。Wang 等开发了 MnO₂ 纳米载体, 并将 CRISPR/Cas12a 系统的全部组件加载到 MnO₂ 纳米载体上[41]。细胞中 CRISPR/Cas12a 系统的快速释放时分解产生的 Mn²⁺ 作为促进剂, 促进细胞内生物传感基因的递送和表达, 规避 CRISPR/Cas 系统缺乏稳定载体问题。因此 MnO₂ 纳米载体作为新型材料给开发升级 CRISPR/Cas 系统带来新的希望。

5. 总结与展望

CRISPR/Cas 系统的作用机理是 Cas 系列蛋白在单链向导 RNA 的指引下, 通过 PAM 序列对靶向 DNA 进行基因改造, 进而定向引导基因突变, 通过测序技术筛选有效的基因突变。尽管 CRISPR/Cas 技术存在脱靶和缺乏载体等问题, 但最新的研究为开发升级 CRISPR/Cas 系统带来希望的曙光。本文综述 CRISPR/Cas 技术在临床治疗、植物基因编辑与微生物基因改造等主要领域的最新进展和应用。

CRISPR/Cas 技术在环境微生物领域的研究尚在起步阶段。作为基因组的高效工具, CRISPR/Cas 技术在许多领域具有巨大的开发潜力。相信在未来, 在研究人员们的通力合作下, CRISPR/Cas 技术的瓶颈问题会被突破。CRISPR/Cas 技术有望在未来用于环境微生物基因组改造, 对三废污染物进行生物降解和资源化回收利用并生产合成可降解的微生物塑料、单细胞蛋白、微生物肥料、微生物燃料和能源等高附加值生态友好型产品。CRISPR/Cas 技术有望在缓解能源危机和资源短缺及农业、工业、医药、环保等领域发挥意想不到的作用。

基金项目

国家自然科学基金地区项目“高通量测序解析乳房-肠道-环境菌群与奶牛乳房炎关联性”(31660724); 内蒙古自然科学基金项目“草畜系统食源性菌群调控牛乳菌群的分子生态机制研究”(2021MS03005); 鄂尔多斯市科技重大专项基金项目“基于组织相容性抗原(MHC)的多态性对牛羊副结核病防控技术的开发和应用”(2022EEDSKJZDZX025)。

参考文献

- [1] 廖鹏飞, 聂旺, 余雅心, 等. ZFNs、TALENs 和 CRISPR-Cas 基因组靶向编辑技术及其在植物中的应用[J]. 基因组学与应用生物学, 2016, 35(2): 442-451.
- [2] Gong, Z., Cheng, M. and Botella, J.R. (2021) Non-GM Genome Editing Approaches in Crops. *Frontiers in Genome Editing*, 3, Article 817279. <https://doi.org/10.3389/fgeed.2021.817279>
- [3] Guo, Q., Liu, Q., Smith, N.A., Liang, G.L. and Wang, M.B. (2016) RNA Silencing in Plants: Mechanisms, Technologies and Applications in Horticultural Crops. *Current Genomics*, 17, 476-489. <https://doi.org/10.2174/1389202917666160520103117>
- [4] Wilson, F.M., Harrison, K., Armitage, A.D., Simkin, A.J. and Harrison, R.J. (2019) CRISPR/Cas9-Mediated Mutagenesis of Phytoene Desaturase in Diploid and Octoploid Strawberry. *Plant Methods*, 15, Article No. 45. <https://doi.org/10.1186/s13007-019-0428-6>
- [5] 郭晓强. CRISPR-Cas9 技术发展史: 25 年的科学历程[J]. 自然杂志, 2016, 38(4): 278-286.
- [6] Horvath, P. and Barrangou, R. (2010) CRISPR/Cas, the Immune System of Bacteria and Archaea. *Science*, 327, 167-170. <https://doi.org/10.1126/science.1179555>
- [7] Rutkauskas, M., Songailiene, I.P., Kemmerich, F.E., et al. (2022) A Quantitative Model for the Dynamics of Target Recognition and off-Target Rejection by the CRISPR-Cas Cascade Complex. *Nature Communications*, 13, Article No. 7460. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-35116-5>
- [8] Cui, Y.B., Xu, J.M., Chen, M.X., Liao, X.K. and Peng, S.L. (2018) Review of CRISPR/Cas9 sgRNA Design Tools. *Interdisciplinary Sciences: Computational Life*, 10, 455-465. <https://doi.org/10.1007/s12539-018-0298-z>
- [9] Makarova, K.S., Wolf, Y.I., Iranzo, J., et al. (2020) Evolutionary Classification of CRISPR-Cas Systems: A Burst of Class 2 and Derived Variants. *Nature Reviews Microbiology*, 18, 67-83. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0299-x>
- [10] Naoki, W., Keishi, O. and Yuriko, O. (2022) Expanding the Plant Genome Editing Toolbox with Recently Developed CRISPR-Cas Systems. *Plant Physiology*, 188, 1825-1837. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiac027>
- [11] Kleinstiver, B.P., Prew, M.S., Tsai, S.Q., et al. (2015) Engineered CRISPR-Cas9 Nucleases with Altered PAM Specificities. *Nature*, 523, 481-485. <https://doi.org/10.1038/nature14592>
- [12] Duan, N.N., Tang, S.Q., Zeng, B., et al. (2021) An Episomal CRISPR/Cas12a System for Mediating Efficient Gene Editing. *Life*, 11, Article 1262. <https://doi.org/10.3390/life11111262>
- [13] Zhang, Y., Malzahn, A.A., Sretenovic, S. and Qi, Y.P. (2019) The Emerging and Uncultivated Potential of CRISPR Technology in Plant Science. *Nature Plants*, 5, 778-794. <https://doi.org/10.1038/s41477-019-0461-5>
- [14] Zhang, Y., Ren, Q., Tang, X., et al. (2021) Expanding the Scope of Plant Genome Engineering with Cas12a Orthologs and Highly Multiplexable Editing Systems. *Nature Communications*, 12, Article No. 1944. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22330-w>
- [15] Wolter, F. and Puchta, H. (2018) The CRISPR/Cas Revolution Reaches the RNA World: Cas13, A New Swiss Army Knife for Plant Biologists. *Plant Journal*, 94, 767-775. <https://doi.org/10.1111/tpj.13899>
- [16] Mahas, A., Aman, R. and Mahfouz, M. (2019) CRISPR/Cas13d Mediates Robust RNA Virus Interference in Plants.

- Genome Biology*, **20**, Article No. 263. <https://doi.org/10.1186/s13059-019-1881-2>
- [17] Roueifar, M., Templeton, H.N., Sheng, J.A. and Hong, K.L. (2022) An Update of Nucleic Acids Aptamers Theranostic Integration with CRISPR/Cas Technology. *Molecules*, **27**, Article 1114. <https://doi.org/10.3390/molecules27031114>
- [18] 胡思惠, 刘倩宜, 谢冬纯, 等. CRISPR/Cas 基因编辑技术治疗人类遗传性疾病的临床研究进展[J]. *生命科学*, 2020, 34(10): 1250-1263.
- [19] 刘耀光, 李构思, 张雅玲, 等. CRISPR/Cas 植物基因组编辑技术研究进展[J]. *华南农业大学学报*, 2019, 40(5): 38-49.
- [20] 李洋, 申晓林, 孙新晓, 等. CRISPR 基因编辑技术在微生物合成生物学领域的研究进展[J]. *合成生物学*, 2021, 2(1): 106-120.
- [21] Azhar, M., Phutela, R., Kumar, M., *et al.* (2021) Rapid and Accurate Nucleobase Detection Using FnCas9 and Its Application in COVID-19 Diagnosis. *Biosensors and Bioelectronics*, **183**, Article ID: 113207. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2021.113207>
- [22] Yoshimi, K., Takeshita, K., Yamayoshi, S., *et al.* (2022) CRISPR-Cas3-Based Diagnostics for SARS-CoV-2 and Influenza Virus. *iScience*, **25**, Article ID: 103830. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.103830>
- [23] Chan, K.G., Ang, G.Y., Yu, C.Y. and Yean, C.Y. (2021) Harnessing CRISPR-Cas to Combat COVID-19: From Diagnostics to Therapeutics. *Life*, **11**, Article 1210. <https://doi.org/10.3390/life11111210>
- [24] Chen, Z., Li, J., Li, T., *et al.* (2022) A CRISPR/Cas12a-Empowered Surface Plasmon Resonance Platform for Rapid and Specific Diagnosis of the Omicron Variant of SARS-CoV-2. *National Science Review*, **9**, nwac104. <https://doi.org/10.1093/nsr/nwac104>
- [25] Wang, L., Zhou, J.H., Wang, Q., Wang, Y.F. and Kang, C.S. (2021) Rapid Design and Development of CRISPR-Cas13a Targeting SARS-CoV-2 Spike Protein. *Theranostics*, **11**, 649-664. <https://doi.org/10.7150/thno.51479>
- [26] Chen, P., Chen, M., Chen, Y., *et al.* (2022) Targeted Inhibition of Zika Virus Infection in Human Cells by CRISPR-Cas13b. *Virus Research*, **312**, Article ID: 198707. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2022.198707>
- [27] Park, H., Kim, D., Cho, B., *et al.* (2022) *In vivo* Therapeutic Genome Editing via CRISPR/Cas9 Magnetoplexes for Myocardial Infarction. *Biomaterials*, **281**, Article ID: 121327. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2021.121327>
- [28] Kim, D., Alptekin, B. and Budak, H. (2018) CRISPR/Cas9 Genome Editing in Wheat. *Functional and Integrative Genomics*, **18**, 31-41.
- [29] Tran, M.T., Doan, D.T.H., Kim, J., *et al.* (2021) CRISPR/Cas9-Based Precise Excision of SlHyPRP1 Domain(s) to Obtain Salt Stress-Tolerant Tomato. *Plant Cell Reports*, **40**, 999-1011. <https://doi.org/10.1007/s00299-020-02622-z>
- [30] Kieu, N.P., Lenman, M., Wang, E.S., Petersen, B.L. and Andreasson, E. (2021) Mutations Introduced in Susceptibility Genes through CRISPR/Cas9 Genome Editing Confer Increased Late Blight Resistance in Potatoes. *Scientific Reports*, **11**, Article No. 4487. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-83972-w>
- [31] Schubert, J., Fomitcheva, V. and Sztangret-Wisniewska, J. (2007) Differentiation of Potato Virus Y Strains Using Improved Sets of Diagnostic PCR-Primers. *Journal of Virological Methods*, **140**, 66-74. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2006.10.017>
- [32] Zhan, X., Zhang, F., Zhong, Z., *et al.* (2019) Generation of Virus-Resistant Potato Plants by RNA Genome Targeting. *Plant Biotechnology Journal*, **17**, 1814-1822. <https://doi.org/10.1111/pbi.13102>
- [33] Li, S., Zhang, C., Li, J., *et al.* (2021) Present and Future Prospects of Wheat Improvement through Genome Editing and Advanced Technologies. *Plant Communications*, **2**, Article ID: 100211. <https://doi.org/10.1016/j.xplc.2021.100211>
- [34] An, Y., Geng, Y., Yao, J., *et al.* (2020) Efficient Genome Editing in Populus Using CRISPR/Cas12a. *Frontiers in Plant Science*, **11**, Article 593938. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.593938>
- [35] Khumsupan, P., Donovan, S. and McCormick, A.J. (2019) CRISPR/Cas in *Arabidopsis*: Overcoming Challenges to Accelerate Improvements in Crop Photosynthetic Efficiencies. *Physiologia Plantarum*, **166**, 428-437. <https://doi.org/10.1111/ppl.12937>
- [36] Ghosh, S., Lahiri, D., Nag, M., *et al.* (2022) Precision Targeting of Food Biofilm-Forming Genes by Microbial Scissors: CRISPR-Cas as An Effective Modulator. *Frontiers in Microbiology*, **13**, Article 964848. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.964848>
- [37] Liu, K., Gao, Y., Li, Z.H., *et al.* (2022) CRISPR-Cas12a Assisted Precise Genome Editing of *Aycolicibacterium-Neoaurum*. *New Biotechnology*, **66**, 61-69. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2021.10.003>
- [38] Mu, K., Ren, X., Yang, H., *et al.* (2022) CRISPR-Cas12a-Based Diagnostics of Wheat Fungal Diseases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **70**, 7240-7247. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c08391>
- [39] Cui, Y., Liao, X., Peng, S., *et al.* (2020) OffScan: A Universal and Fast CRISPR off-Target Sites Detection Tool. *BMC Genomics*, **21**, Article No. 872. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-6241-9>

- [40] Handelman, C.R., Tsompana, M., Buck, M.J. and Samudrala, R. (2023) The Impact of Nucleosome Structure on CRISPR/Cas9 Fidelity. *Nucleic Acids Research*, **51**, 2333-2344. <https://doi.org/10.1093/nar/gkad021>
- [41] Wang, D.X., Wang, Y.X., Wang, J., *et al.* (2022) MnO₂ Nanosheets as a Carrier and Accelerator for Improved Live-Cell Biosensing Application of CRISPR/Cas12a. *Chemical Science*, **13**, 4364-4371. <https://doi.org/10.1039/D1SC06383A>