



# CRISPR/Cas9 基因编辑技术简介及应用实例

潘倩

2019.06.16

# ➤ 关于基因编辑的那些事儿



NCBI Resources How To

PubMed.gov

US National Library of Medicine  
National Institutes of Health

PubMed

CRISPR

Create RSS Create alert Advanced

## Article types

Clinical Trial  
Review  
Customize ...

## Text availability

Abstract

Format: Summary Sort by: Most Recent Per page: 20

Send to

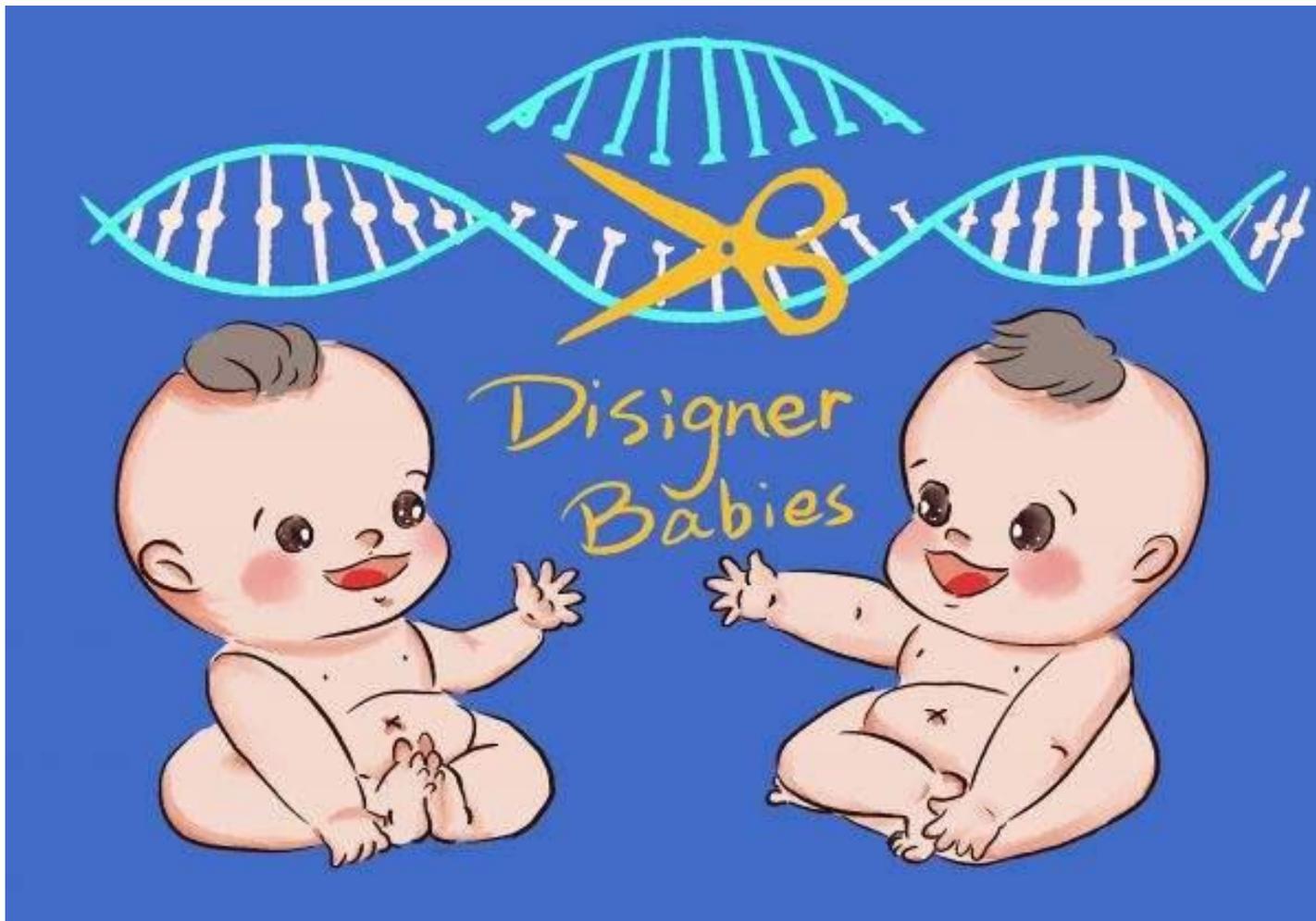
## Search results

Items: 1 to 20 of 14347

<< First < Prev Page 1 of 718 Next > Last >>

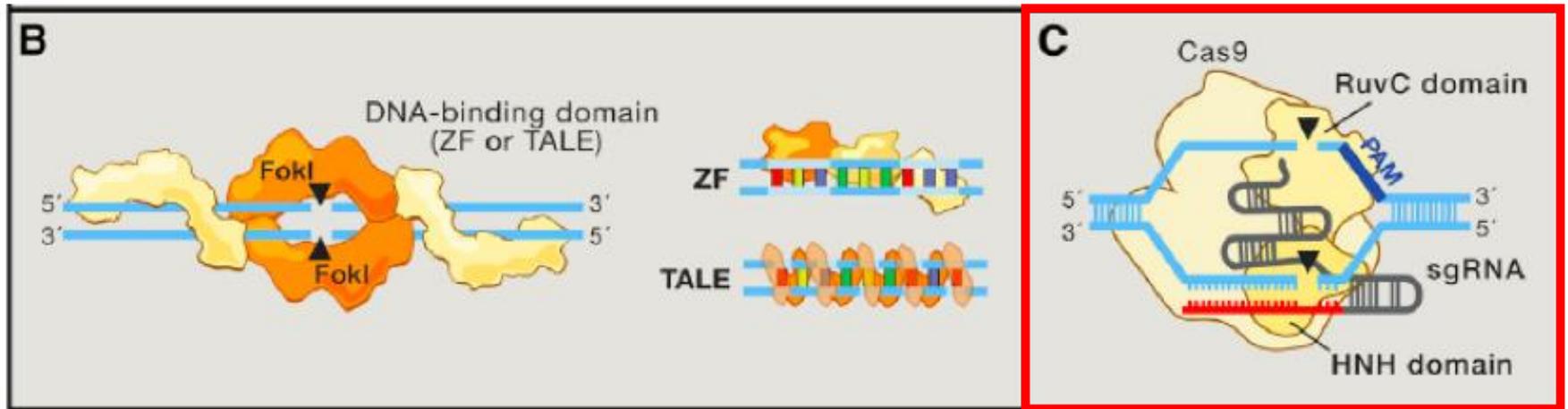


## ➤ 贺建奎事件



## ➤ 什么是基因编辑技术？

基因编辑 (Gene editing) 是指特异性改变基因序列，利用酶，特别是核酸酶来对DNA链 (DNA strand) 进行剪切，移除已有的DNA，或者插入代替的DNA。



## ➤ 我历史学得不好...

- CRISPR/Cas9系统最早发现于1987年，日本研究者首次在大肠杆菌的基因组位于碱性磷酸酶基因的附近发现了短的串联间隔重复序列。
- 接下来的十多年来，科学家又陆续在不同的细菌和古细菌菌株的基因组中发现更多的重复序列。
- 2000年，科学家根据测序结果发现高达40%的细菌和90%的古细菌中都含有这些间隔重复序列，并对此进行了分类。
- 2002年，嗜热链球菌的全基因组信息获得解码，Jansen等科学家第一次提出了CRISPR概念，即成簇规律间隔短回文重复序列，并提出该系统可能发挥着细菌免疫作用的猜想。
- 2005年，科学家证实CRISPR中的大部分短序列来自于外来质粒或噬菌体，而非自身的基因组序列，并证明相关的Cas基因具有核酸酶的切割活性，进一步证明了最初对该系统发挥细菌免疫作用的猜想。

## ➤ 我历史学得不好...

- 2007年，Horvath和他的同事们第一次证明了CRISPR在细菌中发挥着抵御噬菌体入侵的获得性免疫作用——Cas基因具有DNA解旋和切割的作用，产生小的DNA片段从而整合进入CRISPR基因座，当序列相似的核酸再次进入细菌时，就可以通过整合的外源DNA行使记忆功能，发挥获得性免疫的作用。
- 2008年，通过一系列研究揭示了CRISPR系统的免疫功能之后，科学家们进一步发现三种CRISPR系统的适应性免疫功能。通过研究大肠杆菌中的I型CRISPR系统，Vander Oost和他的同事发现CRISPR序列能被转录出来，并切割成短的包含间隔序列的RNA，此类RNA具有招募Cas核酸酶的功能<sup>[24]</sup>。
- 2010年，研究者发现在II型CRISPR/Cas9系统中，Cas9被间隔序列引导，并通过在DNA上引入双链断裂切割DNA。

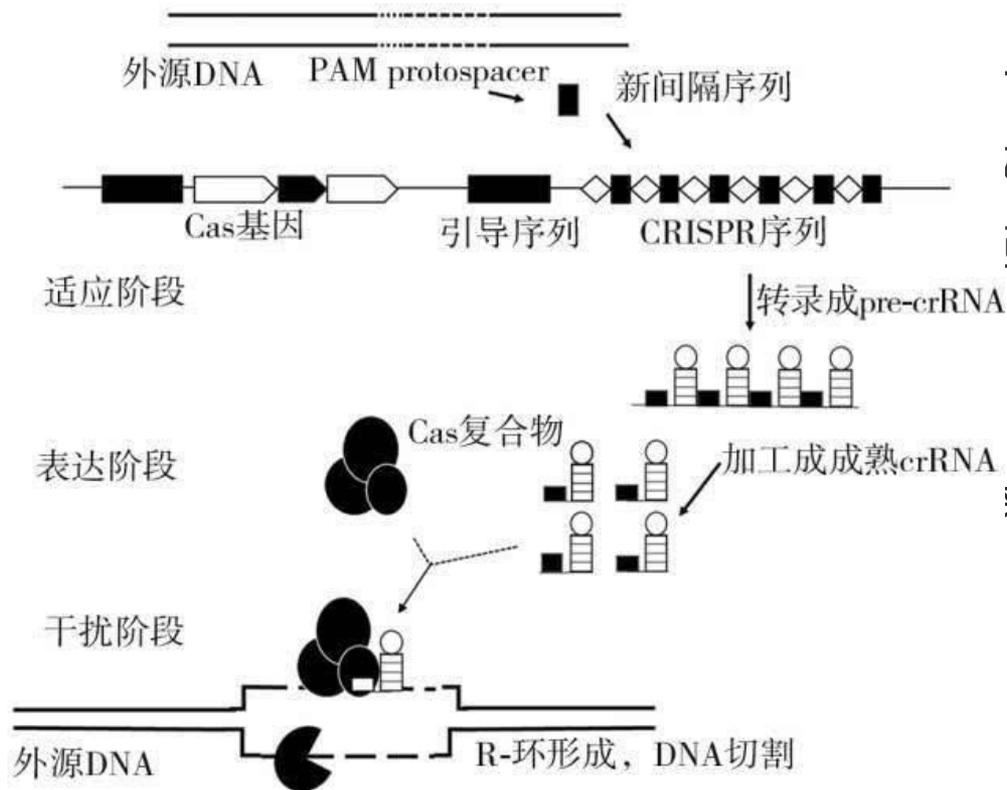
## ➤ 我历史学得不好...

- 2011年，研究者报道的研究结果表明CRISPR系统可以根据各元件的功能进行模块化，并可以在其他物种中外源表达。
- 2012年，科学家再次取得突破。他们证实了II型CRISPR/Cas9系统中具有解旋和切割DNA功能的Cas9蛋白能与CRISPR的tracrRNA和crRNA结合，在体外靶向双链DNA的切割，这为实现基因编辑技术提供了可能。
- 2013年，科学家通过II型的CRISPR/Cas9系统成功地在高等哺乳动物细胞系中完成了单基因和多基因的编辑，同时证明了该系统具有高特异性低脱靶率，从而完成了高效的基因敲除，为CRISPR/Cas系统用于基因组定点编辑奠定了基础。
- 2014年，更多的CRISPR系统的机制研究取得了突破，研究者解析了Cas9的蛋白结构，揭示了该系统发挥功能的详细过程，并建立了基因组水平的基于基因敲除的高通量功能性筛选策略。

# ➤ 什么是CRISPR/Cas9?

CRISPR是Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats的缩写，意为成簇的规律间隔的短回文重复序列，广泛存在于细菌和古细菌的基因组中，是一种细菌降解入侵的病毒DNA或其他外源DNA的免疫机制。

- ✓ 当有病毒或噬菌体入侵时，细菌会将其DNA片段整合到CRISPR/Cas9系统中，作为“记忆”。
- ✓ 就是这样一套系统，使得细菌在下次遇到相同的病毒时，能够迅速识别并摧毁它们。
- ✓ CRISPR-Cas9系统具有可编程性，简化了基因编辑过程。

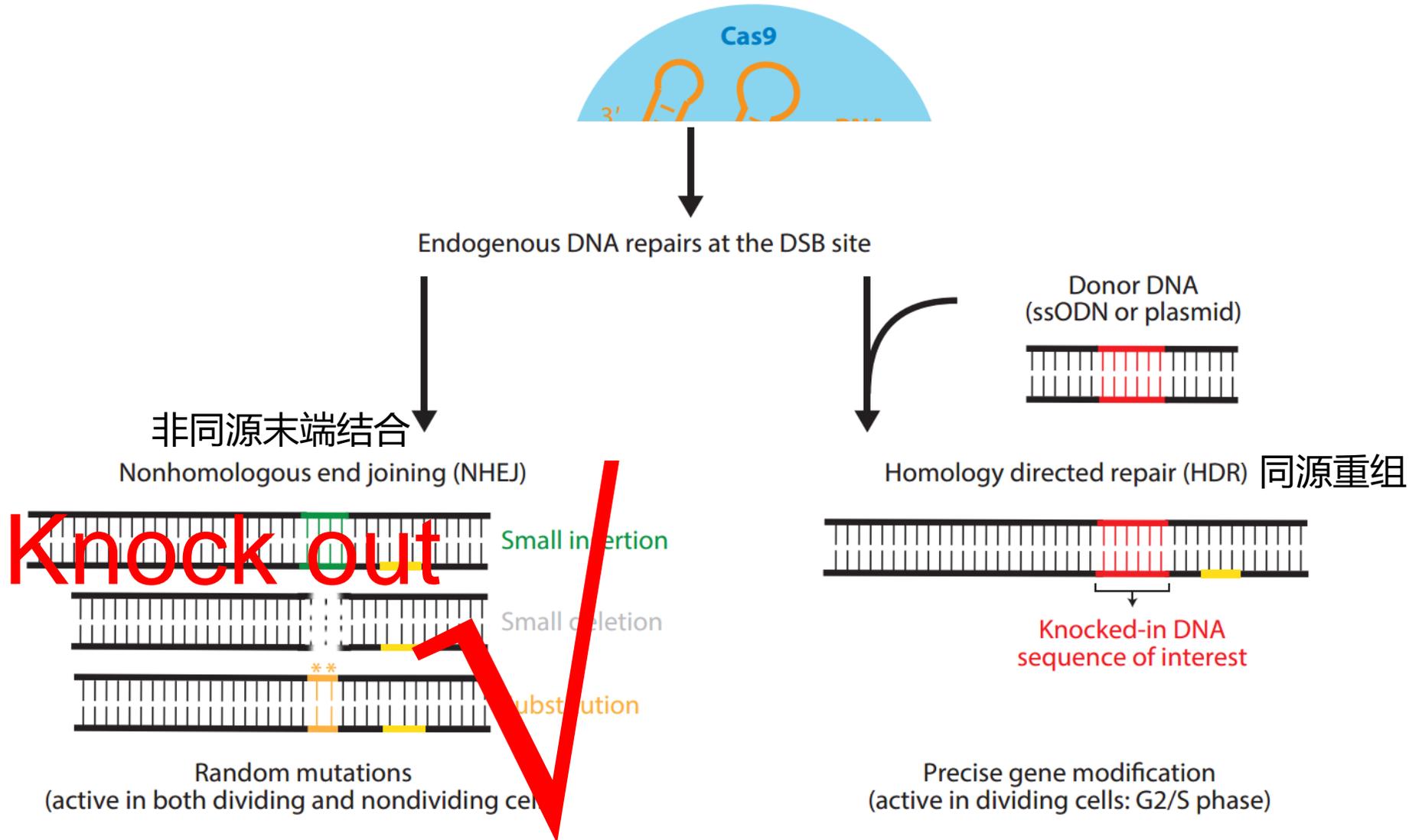


一段带有入侵者身份的DNA片段，在再次来犯时，能够起着向导作用，来指导核酸酶活性，降解入侵的DNA。

➤ 请记住这个简单的公式

gRNA+Cas9=?  
体外导入

# ➤ CRISPR/Cas9如何工作的?





# ➤ Cas9的前綴...

BLAST Align Download Add to basket Columns Share
1 to 10 of 10 Show 25

Retrieve Q99ZW2 ✕

BLAST Align Download Add to basket Columns Share
◀ 1 to 25 of 176 ▶ Show 25

Restrict range of length  
Retrieve Q99ZW2 ✕

Entry	Entry name		Protein names	Gene names	Organism	Length
<input type="checkbox"/> G3ECR1	CAS9_STRTR		<b>CRISPR-associated endonuclease Cas9</b>	cas9 csn1	Streptococcus thermophilus	1,409
<input type="checkbox"/> A0A448AG88	A0A448AG88_STRAP		<b>CRISPR-associated endonuclease Cas9</b>	cas9 NCTC10713_00245	Streptococcus anginosus	1,396
<input type="checkbox"/> A0A428G1J3	A0A428G1J3_STROR		<b>CRISPR-associated endonuclease Cas9</b>	cas9 D8801_07660	Streptococcus oralis	1,393
<input type="checkbox"/> A0A1X1KW87	A0A1X1KW87_STRMT		<b>CRISPR-associated endonuclease Cas9</b>	cas9 B7693_04035	Streptococcus mitis	1,392
<input type="checkbox"/> A0A081Q742	A0A081Q742_STRMT		<b>CRISPR-associated endonuclease Cas9</b>	cas9 SK629_0170	Streptococcus mitis	1,392
<input type="checkbox"/> A0A2I1TYJ5	A0A2I1TYJ5_STRMT		<b>CRISPR-associated endonuclease Cas9</b>	cas9 CYK19_05880	Streptococcus mitis	1,392

# ➤ 说说 SpCas9

## UniProtKB - Q99ZW2 (CAS9\_STRP1)

### Display

[BLAST](#)[Align](#)[Format](#)[Add to basket](#)[History](#)[Entry](#)[Publications](#)[Feature viewer](#)[Feature table](#)

**Protein** | **CRISPR-associated endonuclease Cas9/Csn1**

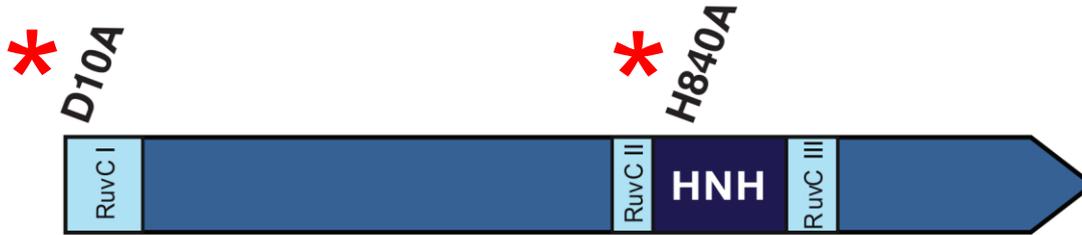
**Gene** | **cas9**

**Organism** | *Streptococcus pyogenes serotype M1*

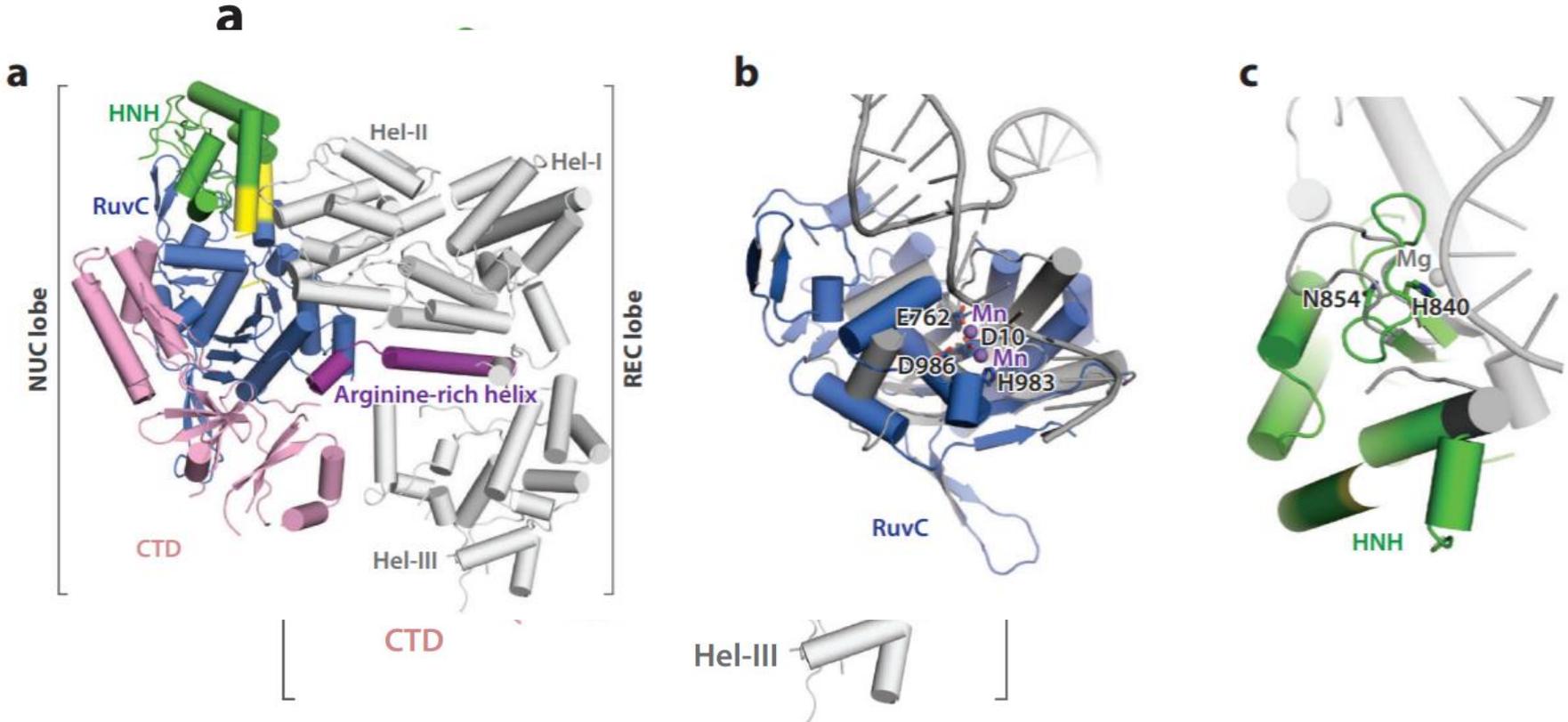
**Status** |  **Reviewed** - Annotation score:  - Experimental evidence at protein level<sup>1</sup>

Entry	Entry name		Protein names	Gene names	Organism	Length	
Q99ZW2	CAS9_STRP1		<b>CRISPR-associated endonuclease Cas9...</b>	<b>cas9</b> csn1, SPy_1046	<i>Streptococcus pyogenes serotype M1</i>	1,368	

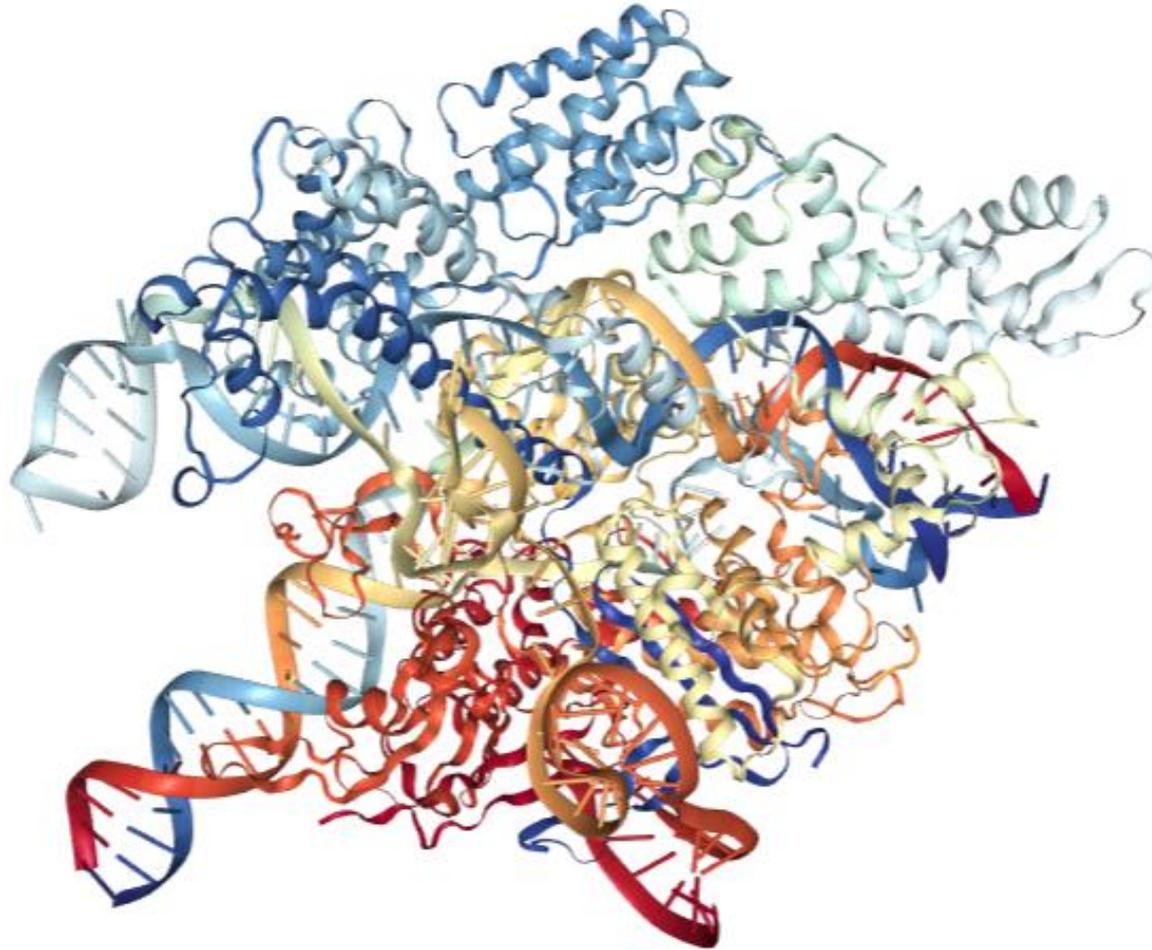
# ➤ SpCas9的结构



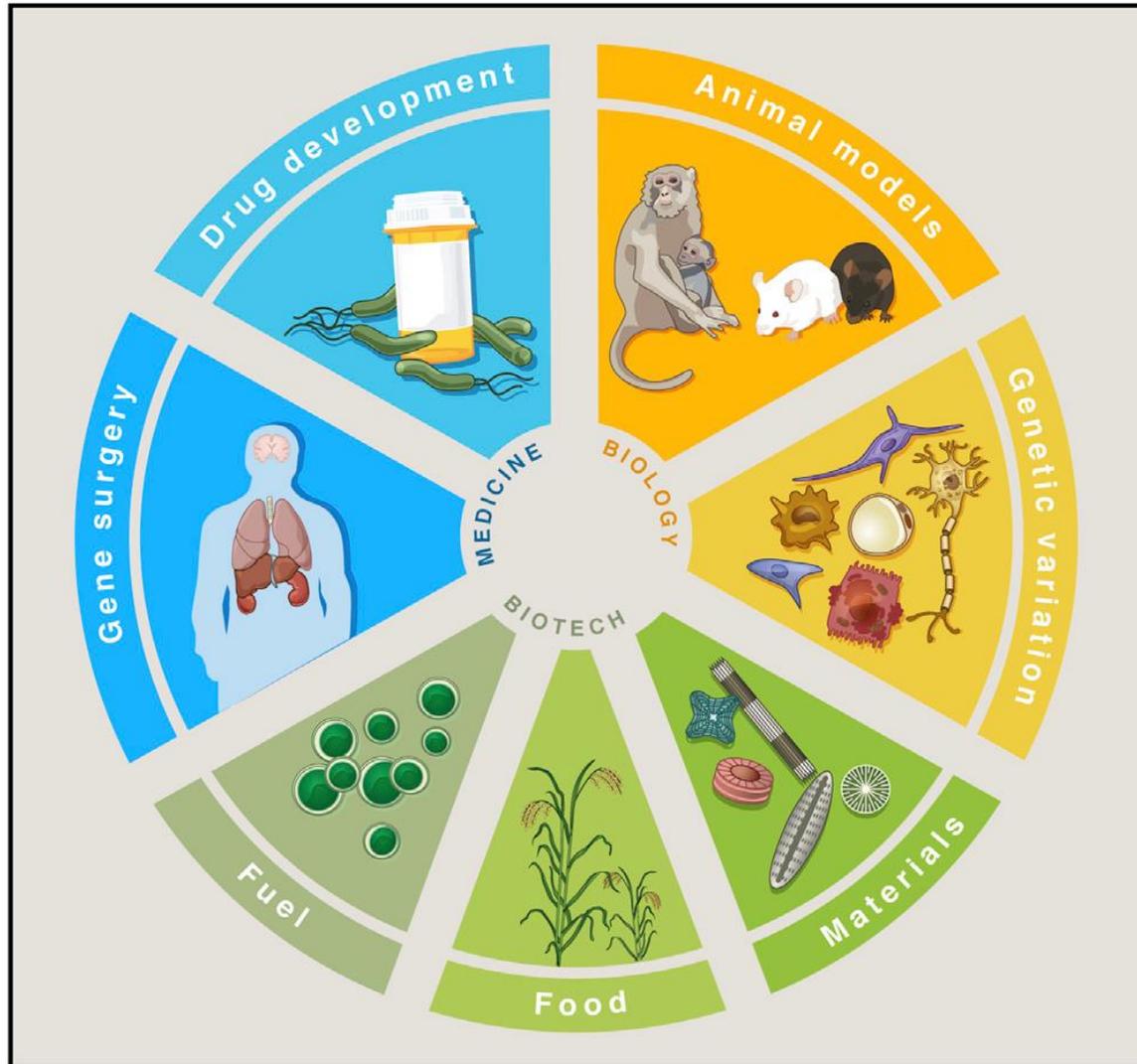
Martin Jinek *et al.*, *Science*, 2012



## ➤ *Sp*Cas9-gRNA-DNA三元复合物



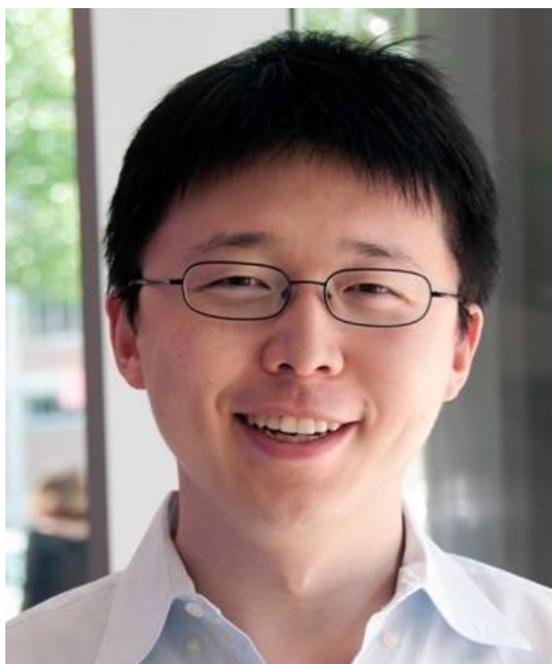
# ➤ CRISPR/Cas9的应用



## ➤ 说说那些名角儿



Jennifer Doudna

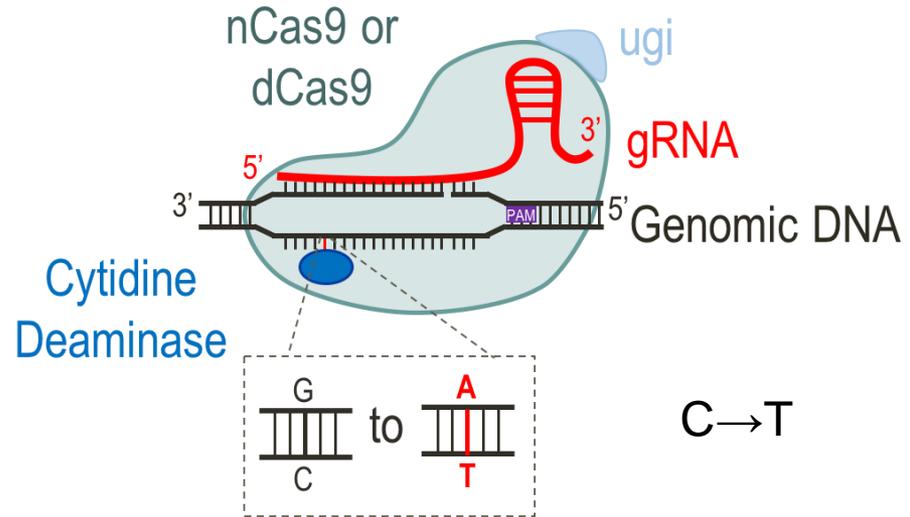
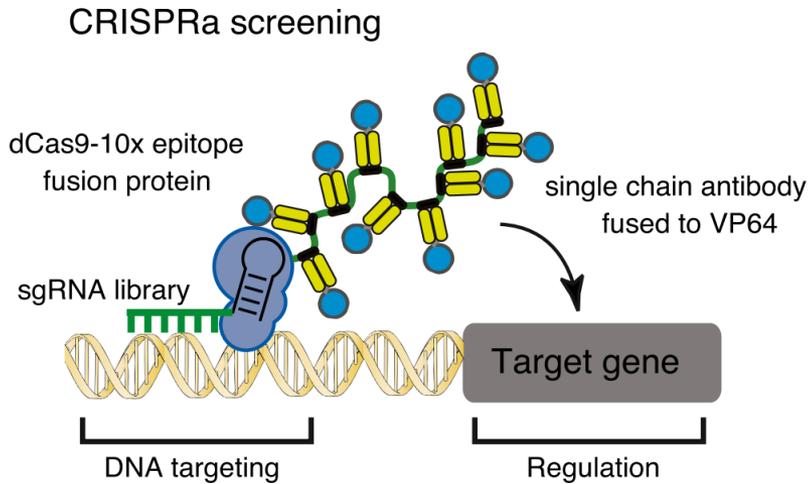


Feng Zhang



David R. Liu

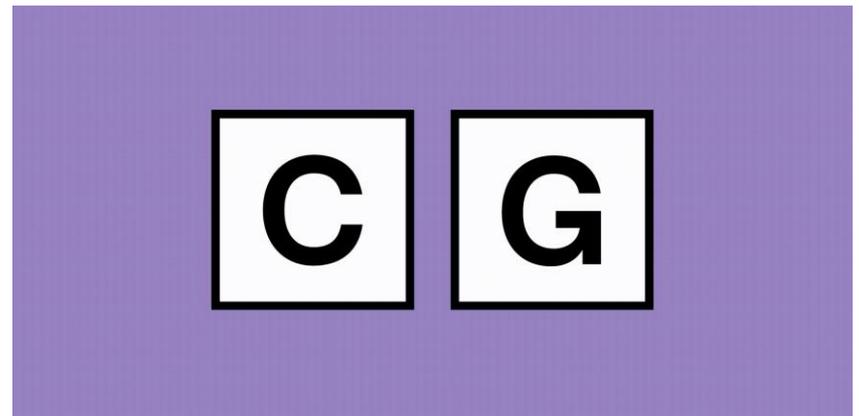
# ➤ 一样的基因编辑，不一样的烟火



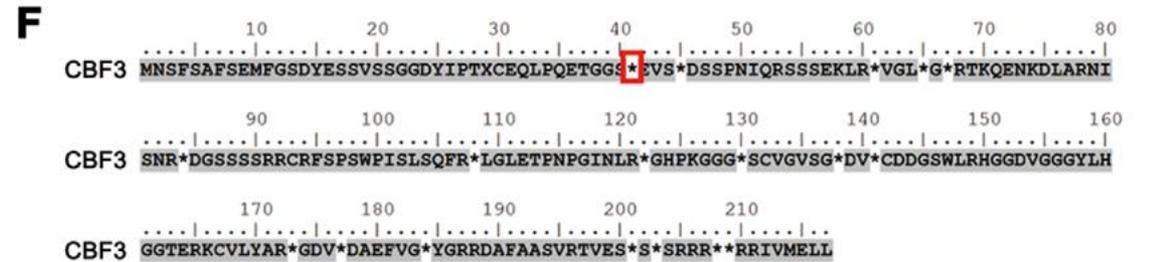
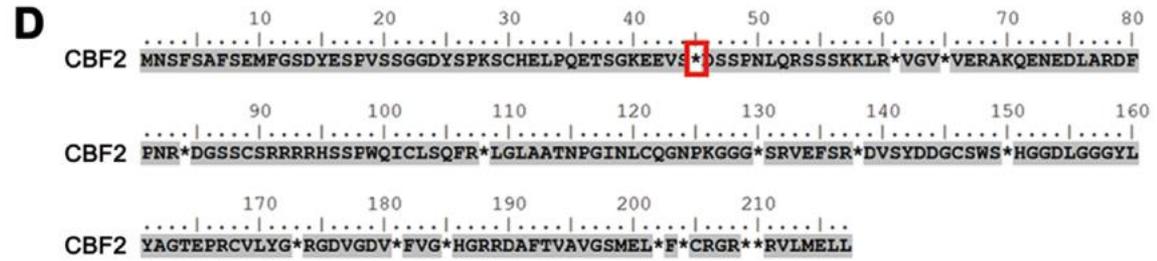
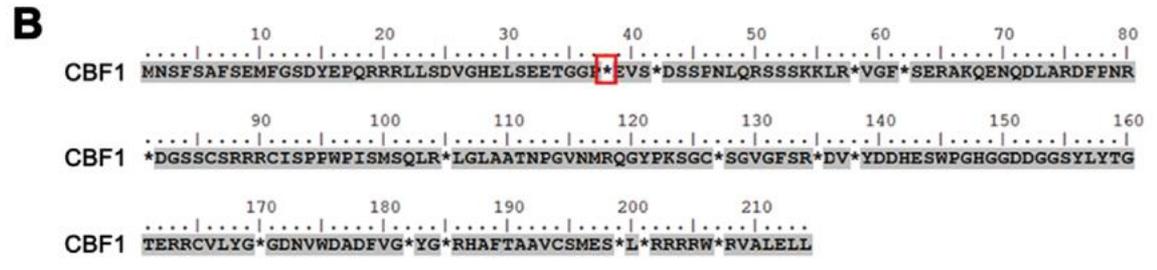
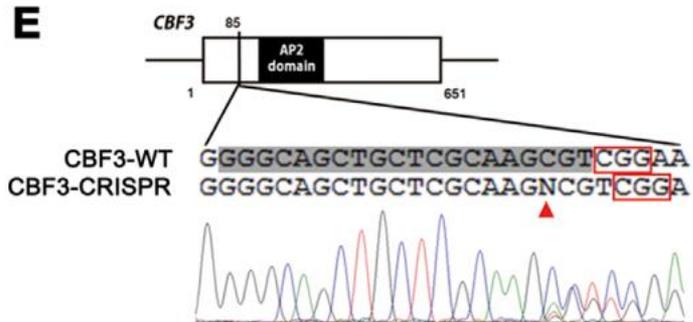
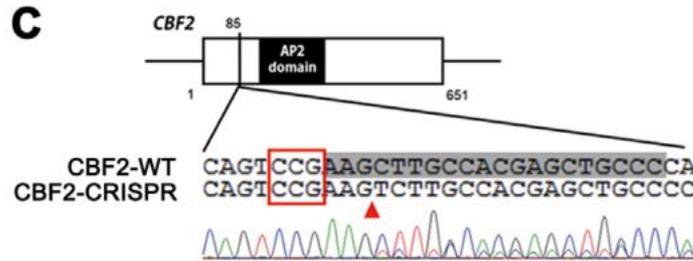
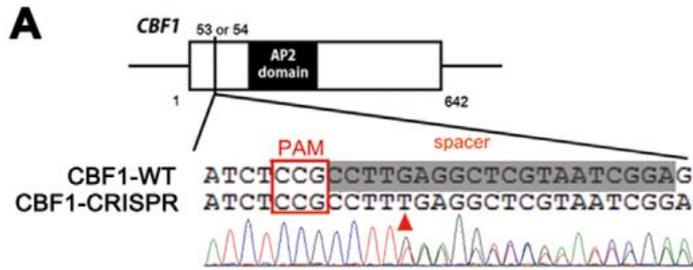
```

GCAIATGAGCGTGCAGACGGC
CTGTTTATGCGATTACGATCGA
ATGCAGCGAGCTGAGCTCGA
GATCGAGCGCGATATGCGC
ACGAGTCAGCGATCTATTTCA
GCTATTTCGAGATTTTCGACGA
TAACTACGAATTGATAGAGCC
AGAGAAAGAGACTGCATAACC
TCGAGCGTAGCTATCGAGGA
ACGCATATCGACTCGAAGCC
TACTATTACGGAGCTTGAGC
CGTAGGATGAGAGTCTGGG
    
```

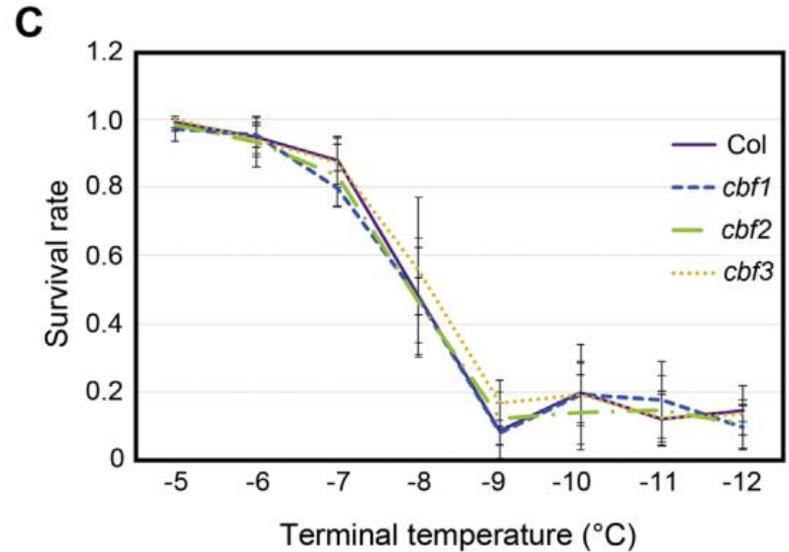
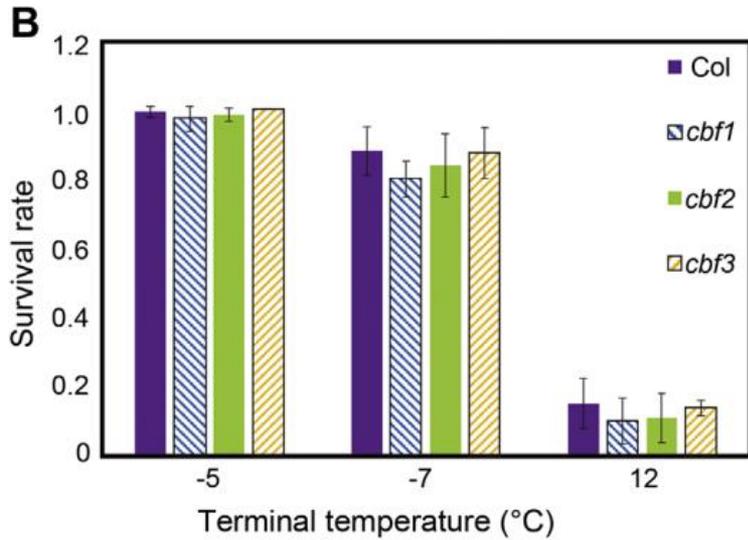
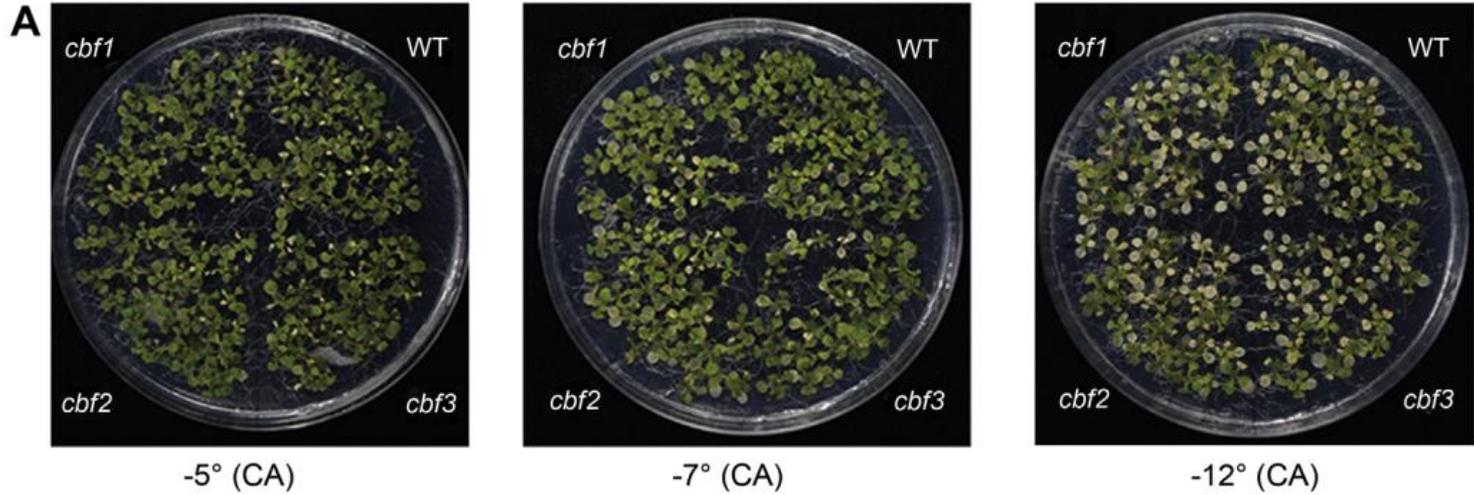
A→G



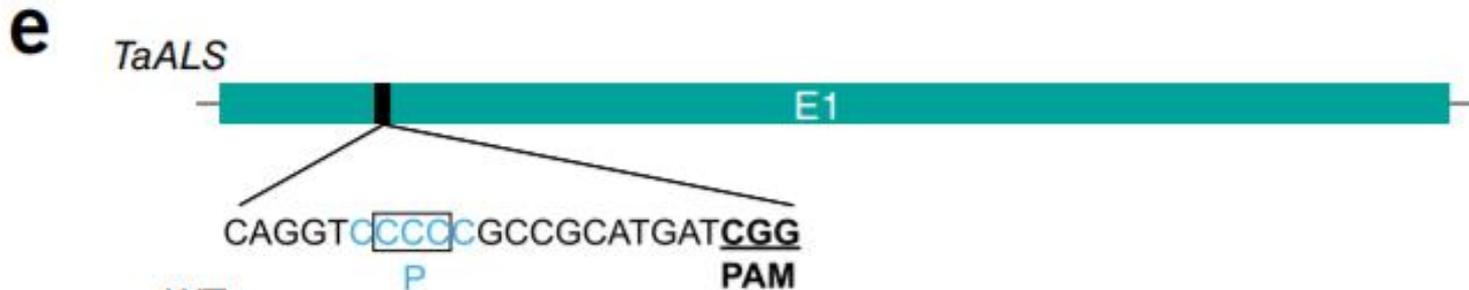
# ➤ CRISPR/Cas9的应用——CBF



# ➤ CRISPR/Cas9的应用——CBF



# ➤ CRISPR/Cas9的应用——植物单碱基编辑



WT-  
A1/B1/D1: 5'-GGCCAGGTC[CCCG]CGCCGCATGATCGGCACG-3'  
G Q V P R R M I G T

T0-7-A1: 5'-GGCCAGGTTTTTTCGCCGCATGATCGGCACG-3'  
G Q V F C R M I G T

5'-GGCCAGGTTTTTTCGCCGCATGATCGGCACG-3'  
G Q V F C R M I G T

T0-7-B1: 5'-GGCCAGGTTTTTTCGCCGCATGATCGGCACG-3'  
G Q V F C R M I G T

5'-GGCCAGGTTTTTTCGCCGCATGATCGGCACG-3'  
G Q V F C R M I G T

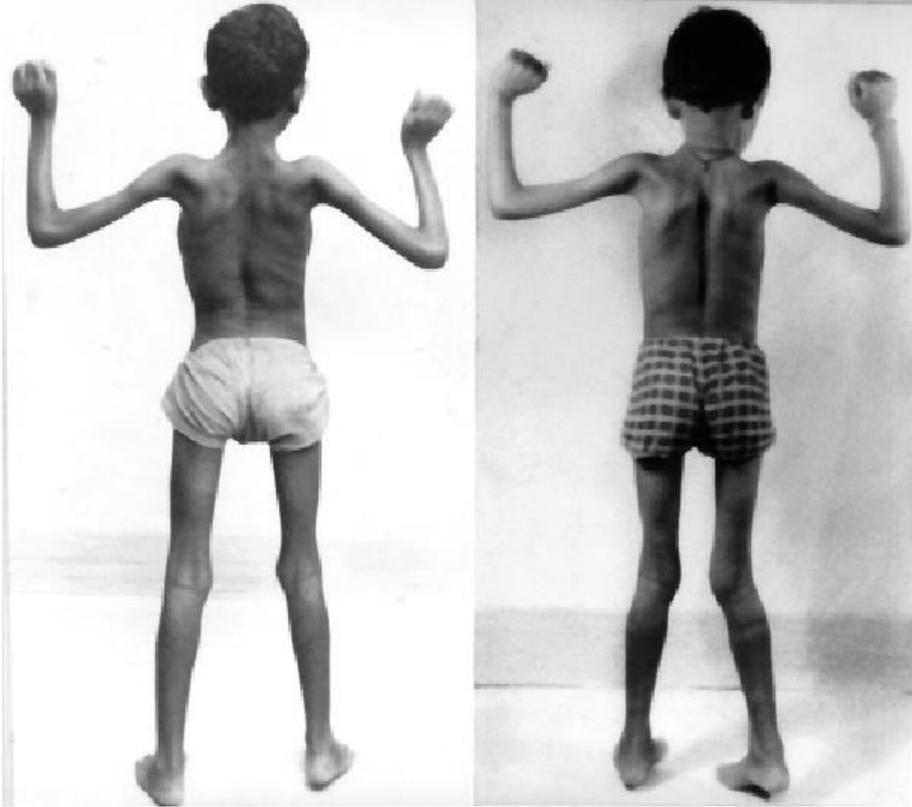
T0-7-D1: 5'-GGCCAGGTTTTTTCGCCGCATGATCGGCACG-3'  
G Q V F C R M I G T

5'-GGCCAGGTTTTTTCGCCGCATGATCGGCACG-3'  
G Q V F R R M I G T



T0-7 (aabbdd)  
medium supplemented with  
nicosulfuron

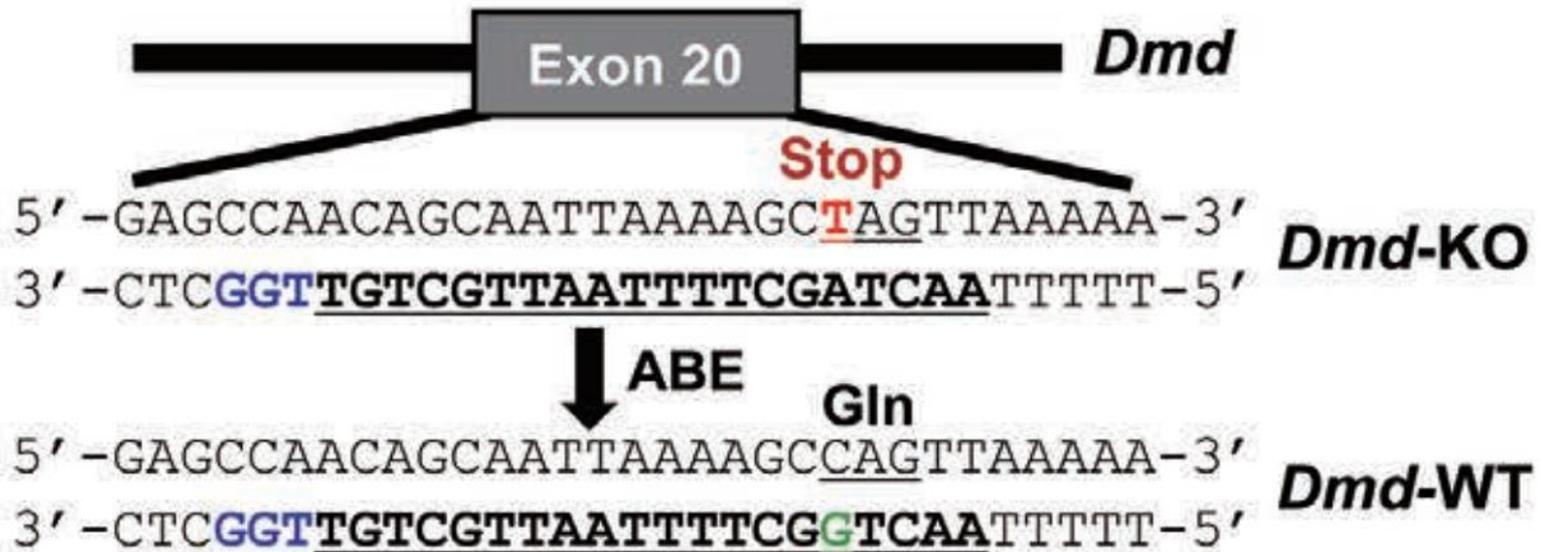
## ➤ CRISPR/Cas9的应用——DMD



Duchenne Muscular Dystrophy(DMD) is a type of muscular dystrophy is recessive genetic disorder causing the fast deterioration of muscles.

# ➤ Applications of CRISPR/Cas9——DMD

a



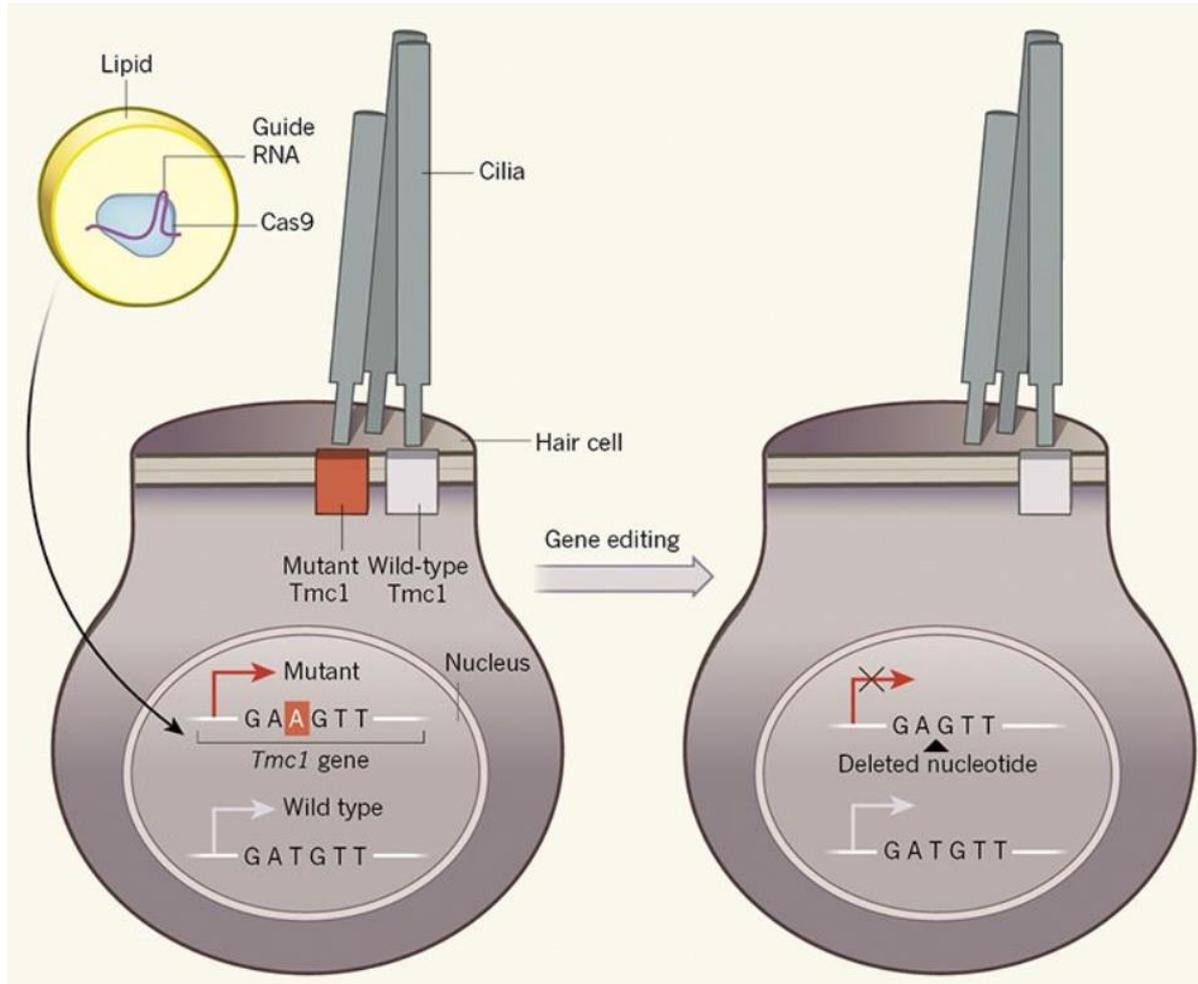
# ➤ Applications of CRISPR/Cas9——Hearing Loss



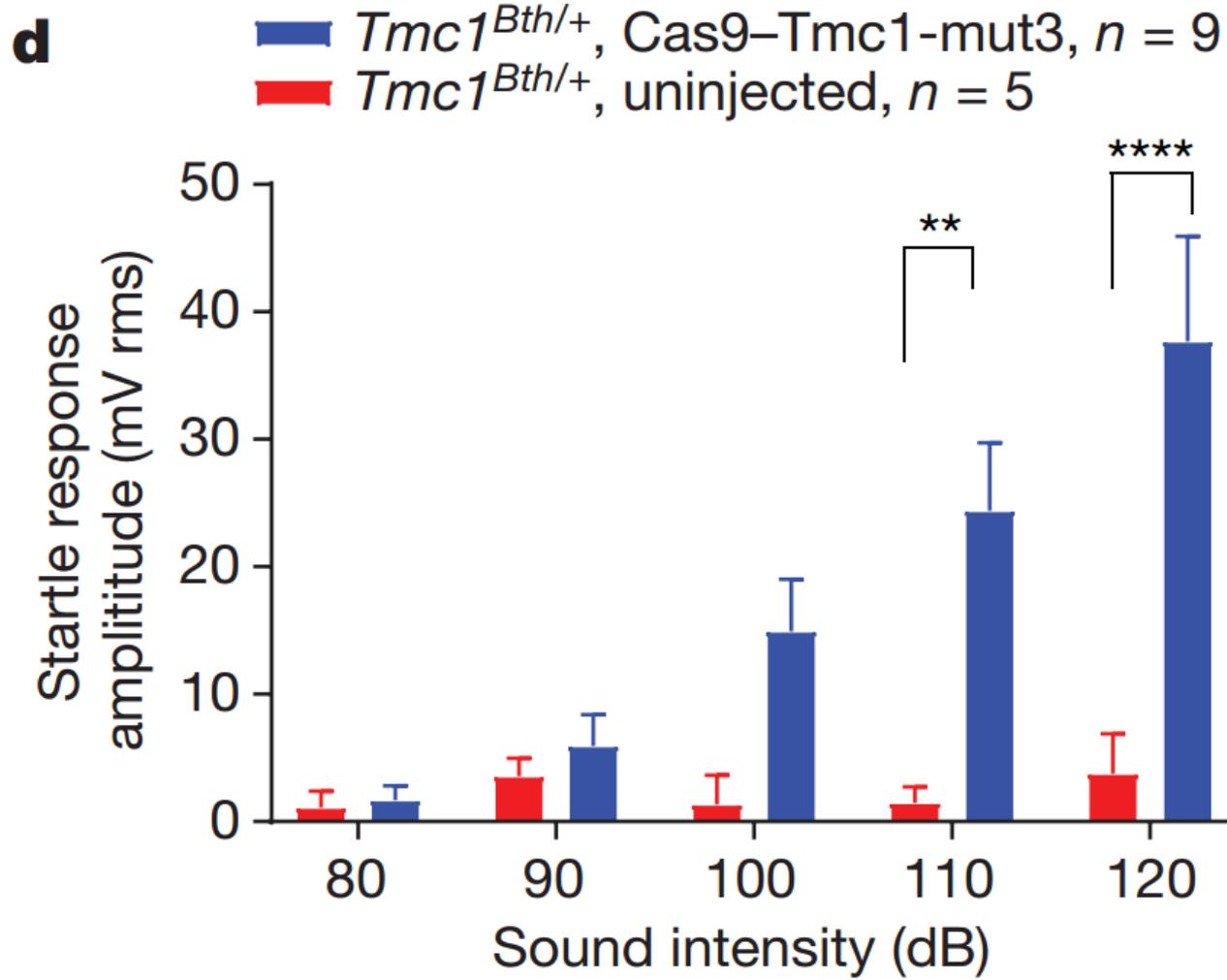
Ludwig van Beethoven  
(1770.12-1827.03)



# ➤ Applications of CRISPR/Cas9——Hearing Loss



# ➤ Applications of CRISPR/Cas9——Hearing Loss



# Thank you

Merci

Xièxiè

ありがとう

谢谢

고마워.

tibi gratias ago