

# 系统与合成生物学文献汇报

## CRISPR decade

张子栋 颜旭 宋俊亮 曹相洲

华中农业大学  
信息学院

2023 年 3 月 27 日



华中农业大学  
HUAZHONG AGRICULTURAL UNIVERSITY

# 目录

- 1 CRISPR 原理
- 2 CRISPR 技术的发展
  - CRISPR 诱导基因敲除
  - CRISPR screen
  - 同步多位点编辑
  - 碱基编辑
- 3 CRISPR 面临的挑战
  - 提高编辑准确性
  - 体内外编辑器的递送
- 4 CRISPR 当前和未来的应用方向

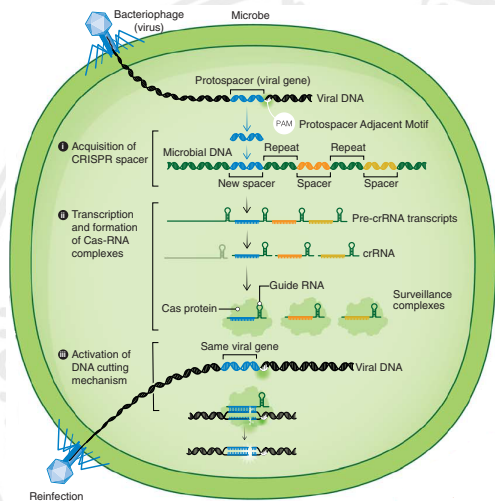
- 1 CRISPR 原理
- 2 CRISPR 技术的发展
- 3 CRISPR 面临的挑战
- 4 CRISPR 当前和未来的应用方向



# CRISPR 原理

细菌/古菌中的免疫系统

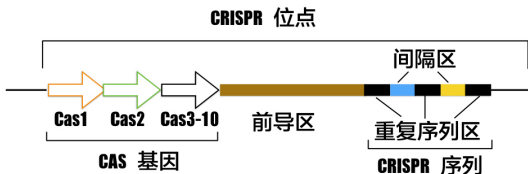
- CRISPR 系统是目前发现存在于多数细菌/古菌中的一种后天免疫系统。
- 微生物中的 CRISPR 免疫系统靶定 DNA/RNA.



# CRISPR 原理

## CRISPR 位点结构

- Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats  
成簇规律间隔短回文重复序列
  - 重复序列区 Repeat
    - 短而保守的重复序列
    - 有回文序列，可以形成发卡结构
  - 间隔区 Spacer
    - 是被细菌俘获活的外源 DNA 序列
- CRISPR 关联基因 (CRISPR associated, Cas)。
  - 该基因编码的蛋白均可与 CRISPR 序列区域共同发生作用。



# CRISPR 原理

## 外源 DNA 的俘获

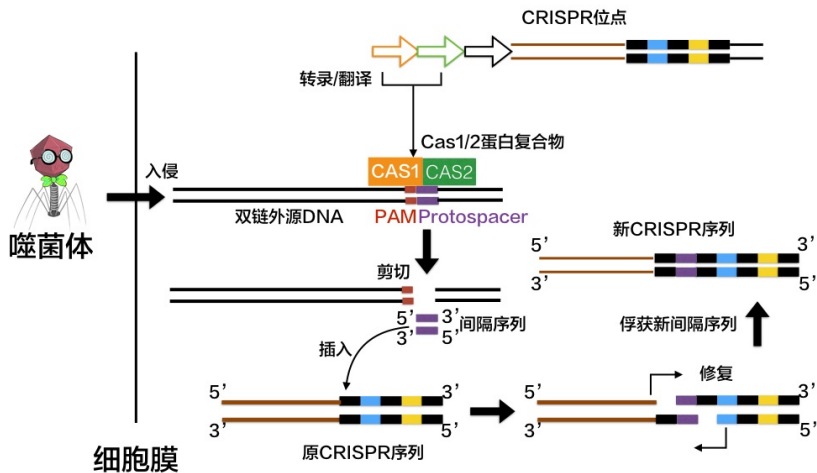


图: 1. 外源 DNA 俘获

# CRISPR 原理

## CRISPR 基因座的表达

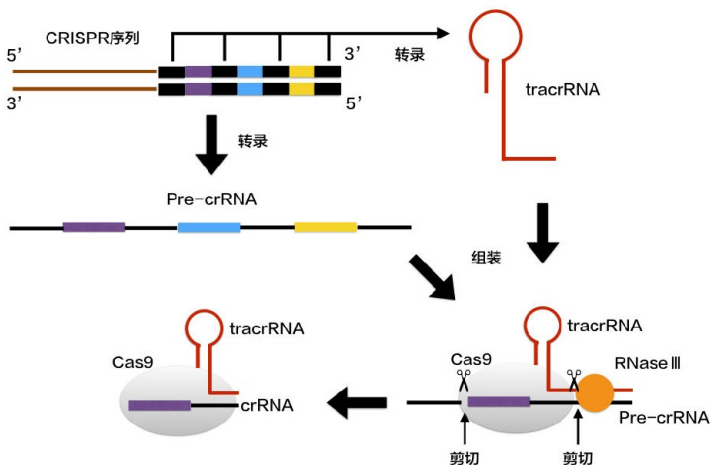


图: 2. crRNA(CRISPR RNA) 合成

# CRISPR 原理

## CRISPR/Cas 系统的靶向干扰

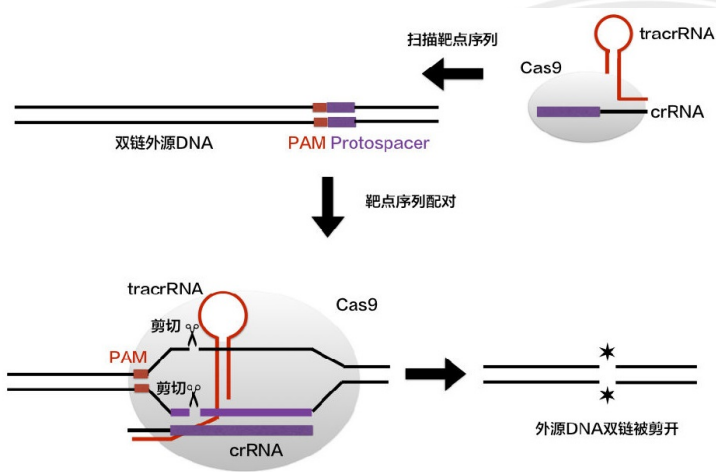


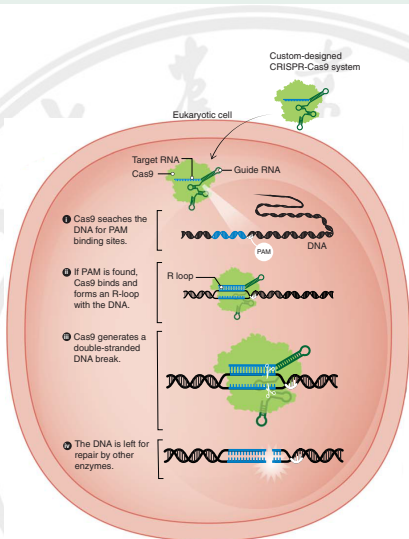
图: 3. 靶向干扰



# CRISPR 原理

## 应用

- CRISPR-Cas9 是常用的 RNA 介导的基因编辑工具。
  - Cas9 识别并结合 PAM 序列
  - 切割产生 DSB
  - DNA 修复机制
- 最早应用于转录抑制或激活以沉默或增强特定基因。



## 1 CRISPR 原理

## 2 CRISPR 技术的发展

- CRISPR 诱导基因敲除
- CRISPR screen
- 同步多位点编辑
- 碱基编辑

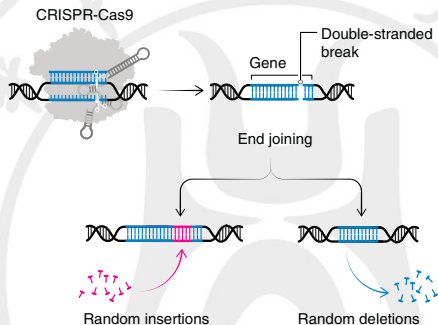
## 3 CRISPR 面临的挑战

## 4 CRISPR 当前和未来的应用方向

# CRISPR 技术的发展

## CRISPR 诱导基因敲除

- CRISPR-Cas9 核糖核蛋白
  - Cas9 核酸酶
  - 单引导 RNA 分子 (sgRNA)
- sgRNA 将 Cas9 导向靶点, 产生 DSB
- 内源性修复途径修复
  - 非同源末端连接 (NHEJ)
  - 微同源介导的末端连接途径
  - 使用修复模板的更精确的同源定向修复 (HDR) 途径



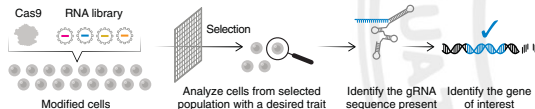
## 应用

可用于胚胎细胞编辑和体细胞编辑、快速建立动物模型用于疾病治疗。

# CRISPR 技术的发展

## CRISPR screen

- CRISPR screen 用于筛选突变细胞的群体，发现与特定表型相关的基因。
- 通过引入基因突变，使其失去功能。
- 一般步骤：
  - 构建 sgRNA 敲除文库
  - 结合特定的筛选方案
  - NGS 测序和生信分析
  - 预测出符合条件的候选基因

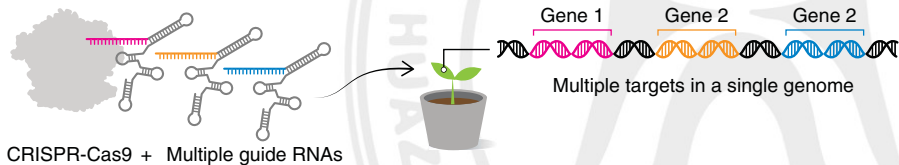


- CRISPR KO, dCas9 结合 FokI 核酸酶，切断基因的 DNA，实现基因的完全敲除。
- CRISPRi, dCas9 结合 KRAB 抑制子，抑制基因的转录起始，实现基因的部分敲降
- CRISPRa, dCas9 结合 VP64 激活子，激活基因的转录起始，实现基因的过表达。

# CRISPR 技术的发展

## 同步多位点编辑

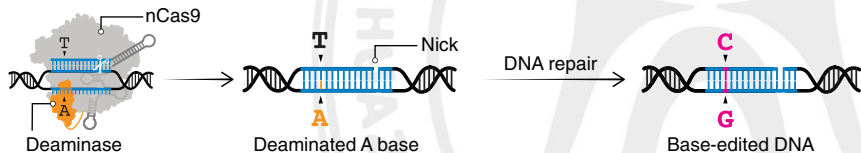
- 利用多个 gRNA 和一种 Cas 蛋白同时对基因组的不同靶标进行修  
改。
- 可以实现多重基因编辑，例如基因中断、基因整合、碱基编辑等。
- 原理
  - 利用 CRISPR-Cas 系统识别和切割特定的 DNA 序列
  - 通过同源重组或非同源末端连接等机制修复切割位点
  - 实现基因组的增加、删除或替换



# CRISPR 技术的发展

## 碱基编辑

- Cas 蛋白与碱基脱氨酶或逆转录酶融合，实现 DNA 或 RNA 中碱基的定向替换，而不引入双链断裂。
- 这种技术的作用是可以精准地修复或引入单碱基突变，从而改变基因的功能或表达。
- 利用 CRISPR-Cas 系统识别和切割特定的 DNA 或 RNA 序列，然后通过碱基脱氨酶或逆转录酶催化碱基的转化，从而实现  $C \rightarrow T$  或  $A \rightarrow G$  的编辑。



- 1 CRISPR 原理
- 2 CRISPR 技术的发展
- 3 CRISPR 面临的挑战
  - 提高编辑准确性
  - 体内外编辑器的递送
- 4 CRISPR 当前和未来的应用方向

# CRISPR 面临的挑战

## 提高编辑准确性

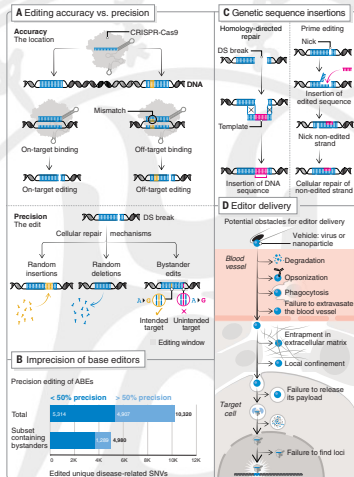
- 基因编辑的特异性（只在靶点进行基因编辑）
  - 优化 sgRNA 的设计，提高其特异性和稳定性
  - 利用深度学习等人工智能方法，预测和评估 CRISPR 编辑的效率和脱靶风险
  - 使用更精确的碱基编辑技术，避免引入双链断裂
  - 使用高通量测序等方法，验证编辑的结果和精度
- 编辑的精确度（在靶点产生预先确定的编辑结果）
  - 使用 RNP 复合物直接传递到靶细胞，提高 HDR 的效率



# CRISPR 面临的挑战

## 体内编辑器的递送

- 使用靶向脂质纳米颗粒 (LNP) 递送将 CRISPR 系统体内递送至肝脏进行转甲状腺素蛋白淀粉样变性的治疗。
- 含有 RNA 引导酶的腺相关病毒载体直接注射到眼睛中对 Leber 先天性黑 10 型进行治疗。
- 递送方法
  - 物理方法仅限于体外递送，存在低包装容量、免疫原性等问题
  - 合成材料也具有材料体积大和离子性质的限制
  - 细胞外囊泡和病毒样颗粒 (VLP)，有可能实现基于病毒策略的高递送效率
  - 使用不同的包膜糖蛋白可以编辑 VLP 的细胞向性以靶向特定细胞类型



- 1 CRISPR 原理
- 2 CRISPR 技术的发展
- 3 CRISPR 面临的挑战
- 4 CRISPR 当前和未来的应用方向



# CRISPR 当前和未来的应用方向

- 临床应用
  - 至少有 8 项 FDA 批准的基于 CRISPR 的镰状细胞病和相关血液疗法的临床实验正在进行或即将开展。
- 农业畜牧业
  - 经过编辑的营养价值更高的番茄和鱼已获批在日本销售。
  - 通过多重编辑敲除和激活不同基因在小麦种引入抗病性并提高产量。
- 与其他技术交叉
  - 机器学习
  - 活细胞成像
  - DNA 测序

CRISPR 作为一项由好奇心驱动的研究、创新和技术突破间联系的成功例子，鼓励我们继续探索自然世界，将可能发现更多无法想象的事物，并将其用于解决现实世界中的难题。

# 总结

- 本综述介绍了基于 CRISPR 的基因组编辑的起源和成功，并讨论了最紧迫的挑战，包括提高编辑的准确性和精确性，实施精确可编程的遗传序列插入策略，改善 CRISPR 编辑器的靶向递送，以及降低其价格增加可及性，并提出了这项技术的未来路线图。
- 基因编辑技术的伦理方面的问题。

# Q&A

谢谢!

请老师批评指正!