Q：简述基因编辑在神经生物学中的应用(10个例子，开放题，大家可以结合自己的研究领域说，不要写的太一样)

知网上有：《CRISPR/Cas9 基因编辑技术在脑科学中的应用策略》这篇文章，从原理到应用都有讲述，感兴趣的可以看看。

CRISPR/Cas9技术在脑科学中应用已涉及脑基 因功能分析、基因敲入小鼠构建以及神经系统疾病研 究等多个方面.

1. 神经科学基础研究

研究蛋白脑内分布的传统方法为免疫染色或者 过表达带标签的内源性蛋白. 这些传统方法通常会 面临一些现实问题, 如免疫染色有非特异性交叉反 应, 或者缺少特异性抗体; 过表达则可能改变原蛋白 分布. 即使采用传统的基因敲入小鼠方法, 也常常会 因标记的阳性细胞过密而缺乏亚细胞分辨率. Mikuni 等人[20]将内源性蛋白基因与标签蛋白基因融合, 再 通过子宫内电穿孔法将CRISPR/Cas9介导的基因敲入, 建立了一个高分辨率、高反差观察内源性蛋白分 布的方法. 这种技术可以观察定位于细胞核、胞浆、 胞膜、细胞骨架、囊泡的各种蛋白质, 可通过调整胚 胎电穿孔的时机与脑区将技术升级至观察不同脑区、 不同类型神经细胞, 可与电子显微镜相结合获得纳 米级的分辨率, 还可利用CRISPR/Cas9技术可多基因 编辑的特点同时观察多个蛋白. 总之, 这种基于 CRISPR/Cas9技术的新方法, 可以将内源性蛋白脑内 分布的研究提升至一个前所未有的水准. CRISPR/ Cas9技术如与光遗传学等技术结合, 在神经系统实 现可诱导的、时空特异性的基因编辑, 可应用于脑神 经环路的解析研究.

1. 构建基因敲除/敲入小鼠

用传统技术制备各种基因工程小鼠模型一般费 时较长, 其中某些技术(如Cre/LoxP技术)在实际应用 中十分繁琐. 用CRISPR/Cas9技术实施基因敲除/敲 入绕开了一些常见的限制,

根据不同的研究目的, 大致分为3类基因编辑方案, 即基因敲除、基因敲入和 条件性基因敲除。

1.基因敲除

在受精卵期, 用CRISPR/Cas9技术产生基因敲除 小鼠是以NHEJ机制为主. 目前对于这种途径实现基 因敲除的实际效果仍然存有一些不足, 例如敲除效 率低或差异巨大, 突变种类复杂多样, 仅一部分细胞 发生突变等. 受精卵单细胞期快速导入有活性的 CRISPR/Cas9系统是一种改进措施, 可减少嵌合体形 成. 在局部组织层面, 用小鼠海马AAV病毒注射[16]、 胚胎脑电转染质粒[21]实施CRISPR/Cas9介导的基因 敲除通常可获得较高的敲除效率; 在脑片组织上甚 至实现了完全的双等位基因敲除[22]. 这些研究结果 显示局部脑组织可达到较高的基因敲除效率, 推测 是因为gRNA/Cas9在分化后神经元中持久表达, 对 靶基因进行了充分的编辑.

2.基因敲入

应用CRISPR/Cas9系统制备基因敲入小鼠是基 于HDR机制, 有方便、快捷的优点, 构建时间从常规 方法的1~2年大大缩短至3~6月. 另外, 利用Cas9酶 可以结合不同gRNA的特性, 可以设计同时敲入多个基因[23]. CRISPR/Cas9技术也可与其他技术手段结合起来.

3.可诱导性(如四环素或他莫昔芬)或组织特异性(如Cre依赖性)基因敲除/敲入.

剑桥大学Andersson-Rolf等人[24]将CRISPR/Cas9技术与可翻转 的打靶载体FLIP相结合, 通过共同导入CRISPR/Cas9 系统与普适的条件性内含子盒, 建立了CRISPR- FLIP一步法, 用于细胞层面可诱导性基因敲除实验, 并可升级至制备条件性基因敲除/敲入小鼠。

1. 神经系统疾病研究

由于CRISPR/Cas9技术有高效、普适的特点, 已被尝试用于编辑某些遗传性或病毒性疾病的致病基因.

1.脆性X综合征是由于X染色体上FMR1基因突变 所致的遗传性疾病, 表现为智力低下等症状. FMR1 基因的典型突变为5-UTR区的CGG序列重复次数过多(如200次以上), 终使FMR1基因启动子上游序 列异常甲基化, FMR1基因失活. Park等人[25]用CGG 重复区上游17~15位GGG序列作为PAM设计了 gRNA, 并将此gRNA/Cas9质粒转染至脆性X综合征 患者来源的iPS细胞, 虽然只获得2%~3%的编辑效率, 但阳性克隆完全删除了FMR1基因的CGG重复序 列, 伴随该基因启动子上游CpG岛显著的脱甲基化, FMR1基因转录功能恢复. 跟踪研究还发现, 被Cas9 编辑校正的iPS细胞在诱导为成熟神经元之后, FMR1 基因依然持续表达.

2.亨廷顿病(HD)的致病相关基因HTT位于4号 常染色体的短臂, 其编码区CAG串联重复序列异常 扩展至40个以上将导致疾病. 有细胞水平的研究报 道, 在CAG重复区内由ZFN或CRISPR/Cas9产生 DNA双链断裂都引起CAG重复数量继发增减双向变 化; nCas9切口酶主要减缩CAG重复数量, 但此效应 依赖于DNA损伤反应激酶, 而与单链断裂修补机制 无关[26].

3.CRISPR/Cas9技术已用于在体水平的治疗尝试.

美国加利福尼亚州Cedars-Sinai医学中心王少梅实验 室[27]在视网膜色素变性模型S334ter-3大鼠上试验了 CRISPR/Cas9介导的在体基因编辑疗效. S334ter转基 因大鼠携带了视紫红质基因的一种显性突变S334ter (RhoS334), 包括334位丝氨酸密码被一个终止密码子 替代和羧基端15个氨基酸密码的缺失, 模型鼠表现 为出生后视网膜外核层感光受体进行性丧失, 视觉 功能严重下降. 在模型大鼠出生当天, 一次性向单侧 视网膜下区注射靶向RhoS334的gRNA-Cas9质粒加电 转染, 便可成功失活RhoS334突变基因, 阻遏后期的视 网膜退化, 改善视觉灵敏度.

4.美国Emory大学李晓江 实验室[28]在亨廷顿病小鼠模型上试验了CRISPR/ Cas9基因编辑对该病的疗效. HD140Q基因敲入小鼠 在对应的第一个外显子中插入了含140个CAG重复 的人HTT基因, 纹状体神经元核内mHTT突变蛋白在 4~6月龄时开始上升, 9~10月龄时形成明显的聚集. 此研究设计了两个串联的gRNA分别靶向CAG重复 的两端侧翼区, 与Cas9分别包装在两个AAV病毒载体中, 病毒混合物注射到3或9月龄的纯合子模型小 鼠单侧纹状体. 结果显示, 用CRISPR/Cas9方法治疗 可以持久抑制纹状体神经元mHTT突变蛋白表达, 排 空突变蛋白聚集, 减轻早期神经病理表现, 改善模型 小鼠的运动功能. 实际上, 蛋白异常聚集是多种神经 退行性疾病的一类共同病理特征, 例如在帕金森病 和Lewy痴呆患者脑中-synuclein蛋白聚集, 阿尔茨 海默病和额颞叶痴呆患者脑中tau蛋白聚集. 采用 CRISPR/Cas9技术去除此类异常蛋白的表达, 能否延缓相关神经退行性疾病的进展, 将是未来的研究焦点之一.

**结束语** 目前的CRISPR/Cas9基因编辑技术较报道初期 在多个方面已有了显著的改进和扩展, 在神经科学 领域也得到了一些初步应用. 未来, 将CRISPR/Cas9 技术与光遗传学、药物遗传学、多光子成像、在体神经活动记录等先进技术相结合, 会进一步提升神经 科学工作者研究复杂脑环路与脑疾病的能力. 随着逐步建立高效可控的脑靶向输送系统, CRISPR/Cas9 技术尚有应用于某些神经系统疾病治疗的良好潜力.