

主題：新世代基因編輯－CRISPR/Cas9 探討

(1) CRISPR是指什麼，其功能為何？

回答：CRISPR 是存在細菌中的一種基因，該類基因組中含有曾經攻擊過該細菌的病毒的基因片段。細菌透過這些基因片段來偵測並抵抗相同病毒的攻擊，並摧毀其 DNA。這類基因組是細菌免疫系統的關鍵組成部分。透過這些基因組，人類可以準確且有效地編輯生命體內的部分基因，也就是 CRISPR/Cas9 基因編輯技術。

(2) Cas9是指什麼，其功能為何？

回答：Cas9 是一種 160 道爾頓的蛋白質，在某些細菌對 DNA 病毒和質粒的免疫防禦中起著至關重要的作用，並在基因工程應用中得到了廣泛利用。它的主要功能是切割 DNA，從而改變細胞的基因組。

(3) 試簡述化膿鏈球菌抵抗病毒的免疫系統CRISPR/Cas9。

回答：CRISPR/Cas 系統，為目前發現存在於多數細菌與絕大多數的古菌中的一種後天免疫系統，以消滅外來的質粒或者噬菌體，並在自身基因組中留下外來基因片段作為「記憶」。

(4) 化膿鏈球菌的免疫系統CRISPR/Cas9，其可應用在基因編輯工程上的原理為何呢？實務上，要如何操作？試簡述之。

回答：細菌會用舊病毒的 DNA 片段 (Spacer) 當模板，打造一條互補的引導 RNA。引導 RNA 再利用這種互補關係，比對新病毒 DNA 片段，如果可以互補，表示新舊病毒相同。然後，一種可以切割 DNA 的酵素 Cas9，會抓著這段引導 RNA，前去盤查新病毒的 DNA，看看有沒有跟引導 RNA 互補的段落。一旦找到了，Cas9 立刻剪開「被認出」的 DNA 片段。

實務上的操作方法：先將 Cas9 做好、放入冰箱，想要剪某段 DNA，就訂做一條互補的引導 RNA。然後將 Cas9 解凍、與引導 RNA 結合，再用電擊的方式進入細胞，讓它去剪下錯誤的基因。因為細胞天生會自動修補受損的 DNA，只要把正確的基因送進細胞核，就有機會被細胞拿來修補 Cas9 剪下的斷口，完成基因編輯。

(5) 在基因編輯工程，CRISPR/Cas9辨識目標DNA的方式與鋅指核酸酶（ZFN）及類轉錄活化因子核酸酶（TALEN）有何不同？

回答：

一、TALEN：通過 DNA 識別模塊將 TALEN 元件靶向特異性的 DNA 位點並結合，然後在 FokI 核

酸酶的作用下完成特定位點的剪切，並藉助於細胞內固有的同源定向修復（HDR）或非同源末端連接途徑（NHEJ）修復過程完成特定序列的插入（或倒置）、刪失及基因融合。

二、ZFN：由負責特異性識別序列的鋅指 DNA 結合域和進行非特異性限制性內切酶切割的 DNA 切割域兩部分組成。其中鋅指 DNA 結合域部分一般包含 3 個獨立的鋅指重複結構，每個鋅指結構能夠識別 3 個鹼基，因而一個鋅指 DNA 結合域可以識別 9bp 長度的特異性序列（而 ZFN 二聚體，則包含 6 個鋅指，可以識別 18bp 長度的特異性序列）。增加鋅指的數量可以擴大 ZFN 特異性識別 DNA 序列的長度，從而獲得更強的序列特異性。

三、CRISPR/Cas：作為原核生物中普遍存在的一種系統，最初的功能就是識別外源性入侵的核酸序列，並對其進行特異性降解，以達到抗病毒的作用。這一過程分兩步進行——crRNA 的合成及在 crRNA 引導下的 RNA 結合與剪切。

crRNA 的生物學合成

CRISPR 區域第一個重複序列上游有一段 CRISPR 的前導序列，該序列作為啟動子來啟動後續 CRISPR 序列的轉錄，轉錄生成的 RNA 被命名為 CRISPRRNA（crRNA）。

RNA 的結合與剪切

CRISPR/Cas 系統中 crRNA 與 tracrRNA（反式激活的 crRNA）形成嵌合 RNA 分子，即單嚮導 RNA。sgRNA 可以介導 Cas9 蛋白在特定序列處進行切割，形成 DNA 雙鏈斷裂，完成基因定向編輯等的各類操作。

總結：CRISPR/Cas9 系統改造的第 3 代人工核酸內切酶，與鋅指核酸內切酶(ZFN)以及類轉錄激活因子效應物核酸酶(TALEN)相比，具有構建方法簡單快捷、突變效率高、成本低廉、適用範圍廣等許多優點，已成為一種熱門的基因組編輯工具。

(6) 對於CRISPR/Cas9基因編輯工程之應用，試舉一個實例。

回答：該技術已成功應用於細菌、人類細胞、斑馬魚、小鼠、豬、食蟹猴以及多種植物的基因組精確修飾，是最具有臨床與應用前景的基因治療技術之一。但是 CRISPR/Cas9 系統目前也面臨著脫靶率高、特異性差的難題，這無疑是 CRISPR/Cas9 系統應用於基礎研究和臨床治療的最大的挑戰。

(7) 假如你是一個從事基因編輯研究的生化科學家，你最想將CRISPR/Cas9做什麼應用？

回答：利用基因編輯治療免疫疾病或是修正先天上的基因缺陷，但對於目前的技術而言，CRISPR/Cas9 系統目前也面臨著脫靶率高、特異性差的缺點，使得現今技術無法保證百分之百的辨認出缺陷基因。假若剪錯基因，可能會造成其他更嚴重的後遺症。所以假如我是一個從事基因編輯

研究的生化科學家，最先的研究會是「找尋如何改善 CRISPR/Cas9 的缺點」，再來才是研究出如何有效利用基因編輯準確的將缺陷基因切下並且更換上完整的基因。

NCTU 高中數學資優研習課程