

成簇的规律间隔的短回文重复序列 (CRISPR) 基因组编辑技术研究进展

李浩, 邱少富*, 宋宏彬*

中国人民解放军疾病预防控制中心, 北京 100071

摘要: 细菌和古细菌在与噬菌体的生存斗争中, 进化出了获得性免疫系统——成簇的规律间隔的短回文重复序列 (Clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR), 该结构能够通过其转录出的 mRNA 又称 crRNA (CRISPR RNA) 及 CRISPR 相关蛋白 (CRISPR-associated, Cas) 对外来某一特定单链或双链 DNA 实施高特异性地沉默或降解。近年来, 这个存在于原核生物中的免疫系统成为了研究热点, 并有着极为广泛的应用前景。特别是最近, 研究人员又根据 crRNA 的特性和功能, 利用人为改造后的 sgRNA (small guide RNA) 及 Cas9 蛋白, 实现了对细菌乃至真核生物某一特定基因的精确敲除或沉默, 这无疑会使基因组编辑技术进入一个更加方便而精确的新时代。

关键词: CRISPR, CRISPR-Cas 系统, Cas9 蛋白, 基因编辑

中图分类号: Q93-3 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2013)10-1025-06

在细菌和噬菌体的生存斗争中, 细菌为应对噬菌体的威胁, 进化了多种免疫机制^[1], 在这些免疫机制中, 有被动适应, 也有主动防御策略, 借此阻止噬菌体 DNA 进入细胞, 同时裂解入侵的 DNA, 或以宿主细胞死亡的方式来阻止噬菌体扩散。目前已阐明的细菌免疫机制主要包括: 限制修饰系统、流产感染系统和毒素抗毒素系统^[2]。近年来, 研究人员发现了细菌基因组具有一类成簇的规律间隔的短回文重复序列 (Clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPRs)^[3], 该结构与一些功能相关的蛋白 (CRISPR-associated, Cas) 合称 CRISPR-CAS 系统。经证实, 该系统能在细菌中具有获得性免疫的功能^[4]。最近, 在对 CRISPR 的相

关研究中, 研究人员创立了一种新的基因组编辑技术: Mali 等^[1]利用来自酿脓链球菌 (*Streptococcus pyogenes*) 和嗜热链球菌 (*Streptococcus thermophilus*) 中的 CRISPR 相关蛋白 Cas9, 在一段人为重组的 sgRNA (small-guide RNA) 的引导下, 针对小鼠和人类基因组的特定基因片段实现了精确的剪切。这种通过可编程 RNA 进行 DNA 改造的技术为基因组编辑开创了一条新的途径。

1 细菌的 CRISPR-CAS 系统

1.1 CRISPR-CAS 系统概述

CRISPR-CAS 系统自 2002 年首次被 Utrecht 大

基金项目: 国家“十二五”科技重大传染病专项 (2013ZX10004607, 2012ZX10004215)

* 通信作者。邱少富, Tel: +86-10-66948434, Fax: +86-10-66948475, E-mail: qiuhsf0613@hotmail.com; 宋宏彬, Tel: +86-10-66948475, E-mail: hongbinsong@263.net

作者简介: 李浩 (1989–), 男, 陕西西安人, 硕士研究生, 研究方向为感染免疫机制与免疫治疗。E-mail: lihao88663239@126.com

收稿日期: 2013-04-22; **修回日期:** 2013-07-08

学的 Jansen 等定义以来^[5],受到了各国科学家们的共同关注。CRISPR-CAS 系统的组成主要包括:由不连续的重复序列 R (repeat) 与长度相似的间区序列 S (spacers) 间隔排列而成的 CRISPR 簇,前导序列 L (leader) 以及一系列 CRISPR 相关蛋白基因 *cas* (CRISPR-ASSOCIATED, *cas*)^[6]。CRISPR 系统广泛分布于原核生物中,其中,已测序的约 50% 细菌和 85% 古菌基因组中至少存在 1 个 CRISPR 位点^[30],而古菌詹氏甲烷球菌 (*Methanocaldococcus jannaschii*) 中存在高达 18 个 CRISPR 位点^[4]。目前的研究普遍显示,水平基因转移是导致 CRISPR 系统在细菌和古菌中广泛分布的重要进化机制之一^[7]。CRISPR 位点通常定位于原核细胞染色体上,个别出现在质粒中。其中 *cas* 基因多达 45 个家族^[7],根据其序列同源性、组成情况和功能可将 CRISPR 系统分为 8 个亚型: *Ecoli*、*Upest*、*Nmeni*、*Dvulg*、*Tneap*、*Hmari*、*Apern* 和 *Mtube* 等^[4]。此外,CRISPR 的间区序列 (S) 也具有极其丰富的多样性^[9]。

1.2 CRISPR-CAS 系统作用机理

此前,研究人员对 CRISPR 发挥其生物学功能的机制提出了许多假设,如参与复制子分离、DNA 修复和校正、染色体重排等^[3],但近几年的研究发现 CRISPR 的间区序列与噬菌体或质粒序列存在同源性,甚至有一些间区序列与噬菌体基因序列同源性为 100%^[11],研究人员认为 CRISPR-CAS 系统可能通过类似于 RNA 干扰的机制 (又称 CRISPRi) 参与细菌的获得性免疫防御^[3-6]。其主要作用机制如下:在噬菌体入侵宿主细胞后,CRISPR 系统会从外来的噬菌体序列中选取一段序列加工成新的 R-S 序列后重组到 CRISPR 簇内,使得宿主获得抵抗相应噬菌体再次入侵的能力^[12]。当该噬菌体再次入侵细菌时,CRISPR 簇首先转录为长的 crRNA (CRISPR RNA) 前体,然后逐步被加工成小的成熟的 crRNA^[13]。crRNA 结合相关的 Cas 蛋白后,形成 crRNA-Cas 蛋白复合物,通过碱基互补配对精确地与目标 DNA (target DNA) 相结合,随后 Cas 蛋白对目标 DNA 进行断裂和降解^[14]。

Makarova 等^[15]根据作用机制中 *cas* 基因的差异性将 CRISPR 系统分为 3 种类型: I 型 CRISPR 系统,主要作用单元为 *cas3* 基因^[16],在表达阶段,由多个 *cas* 基因编码所产生 Cascade (CRISPR-associated

complex for antiviral defense) 复合体加工并结合 crRNA,并与 Cas3 蛋白共同作用于靶标 DNA 并将其降解; II 型 CRISPR 系统,其干扰过程是在 Cas9 蛋白存在的情况下催化进行的^[17],Cas9 蛋白在 crRNA 的成熟和靶标 DNA 的剪切中发挥重要作用,并且反式编码小 RNA (trans-encoded small RNA, tracrRNA) 在其中扮演了导向的角色,crRNA 可以通过碱基对来连接 tracrRNA 来形成二元 RNA 结构。这种二元 RNA 结构分子可以指导 Cas9 蛋白质来在特定位点引入双链 DNA 的断裂; III 型 CRISPR 系统,主要以 Cas6 为核心加工 crRNA,加工过后的 crRNA 被传递到特殊的 Cas 剪切复合物 (Csm 复合物或 Cmr 复合物) 中发挥向导作用^[18]。

2 CRISPRs 基因编辑技术

在发现细菌这一基因水平的免疫机制后,研究人员看到了利用 CRISPR-CAS 系统精确降解或沉默目标 DNA 这一技术的应用前景,并对其展开了深入的研究。2012 年劳伦斯伯克利国家实验室 (Berkeley Lab) 的研究人员,在 II 型 CRISPR 系统中发现了一种双链 RNA,并将这种双链 RNA 改造为一种能指导 Cas9 蛋白对几乎所有 DNA 序列进行剪切的工具,即一种全新的基因组编辑技术——CRISPRs 技术。而该技术主要利用 sgRNA-Cas9 复合物作为基因编辑工具^[19]。

2.1 sgRNA-Cas9 的结构

sgRNA-Cas9 结构主要由两部分组成: (1) 具有核酸内切酶作用的 Cas9 蛋白, (2) sgRNA 嵌合体。其中 sgRNA 嵌合体又由三部分组成: 即一段回文序列形成的发卡结构 (为 Cas9 蛋白的结合位点,由 crRNA-tracrRNA 改造而成), 一段长度约为 12 - 20bp 的可以与目标 DNA 互补的 RNA 单链序列 (base-pairing region) 以及一段终止序列 (terminator)^[19]。

2.2 sgRNA-Cas9 进行基因编辑的过程概述

Matthew 等^[19]的研究表明,sgRNA-Cas9 进行基因编辑大致的作用过程主要为:野生的化脓性链球菌中的 Cas9 蛋白与 sgRNA 相结合,组成蛋白质 RNA 复合物,该复合物特异性地与目标基因 (target DNA) 配对 (目标基因前尚需存在一个序列为 NGG 的原间区毗邻序列 PAM (protospacer adjacent motif)), 随后 Cas9 蛋白则通过其具有的两个作用

域 (RUVF 和 HNH) 分别将该段 DNA 的双链切断降

解 (见图 1)。

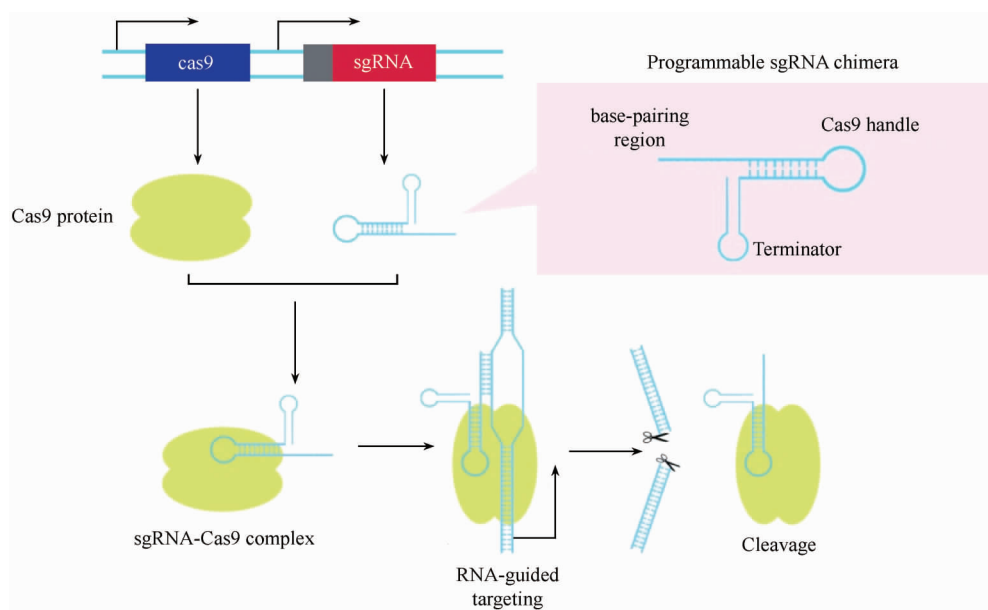


图 1. sgRNA-Cas9 特异性剪切目标 DNA

Figure 1. the target DNA cleaved by sgRNA-Cas9.

2.3 sgRNA-Cas9 进行基因编辑的影响因素

Matthew 等^[19] 通过一系列实验证实, 运用 sgRNA-Cas9 进行基因编辑需要注意多种因素的影响。例如, 在设计 sgRNA 时, 当 sgRNA 与目标序列的非编码链互补时, 其抑制作用远高于将其编码链作为其互补序列; 另外, 当目标序列位于启动子附近区域时, 其实现基因敲除或表达抑制的效率也远高于将目标序列定位于其他区域; 除此之外, 诸如目标序列的长度、错配的碱基个数及由目标序列前 7 个碱基的组成的 “seed region” 都会对其作用效率产生影响。

2.4 CRISPRs 基因编辑的优势

2.4.1 更高效的基因编辑效率: 与其它基因组工程技术如锌指核酸酶 (ZFNs) 或类转录激活因子样效应物核酸酶 (TALENs) 相比, CRISPRs 技术具有更高效的基因编辑效率。研究人员在实验过程中, 设置了许多不同的与目标配对的 sgRNA, 结果发现, 没有一个出现错配和遗漏现象^[20], 此外, 研究人员利用两种方法 (TALENs and CRISPRs) 对同一细胞的同一个基因位点进行对比分析发现, CRISPRs 方法进行基因敲入的效率为 51% - 79%, 相比之下, TALENs 的效率仅为 0% - 34%, 并且 CRISPRs 基因编辑方法也比 TALENs 方法敲入克隆效率高近 10 倍^[21]。

2.4.2 更广的可编辑基因范围: CRISPRs 基因编辑技

术在识别目标基因时需要 PAM 的参与, 但由于 PAM 为仅由 3 个碱基对 (NGG 或 CCN) 组成的序列^[22], 其产生率更高, 因此, 相比之前的基因编辑技术, 利用 CRISPRs 方法进行基因编辑的适用范围更广。

2.4.3 更好的可诱导性和可逆性: 不同于其它基因敲除技术, CRISPRs 技术具有可逆性。人工诱导出的灭活型 Cas9 蛋白 (dCas9) 可以抑制基因的表达而不改变目标序列的原有结构, Matthew 等^[19] 在基因表达抑制试验中发现, 插入大肠杆菌中的荧光基因在抑制试验开始后的 420 min 后, 又恢复到了原来的水平, 这说明 dCas9-sgRNA 在基因沉默过程中同样具有可逆性。

2.4.4 更多位点的同源基因研究: Le Cong 等研究证实^[23], 相比较 ZFNs 和 TALENs 两个基因编辑技术, RNA-Cas9 还可以同时针对同一细胞中的多个位点进行编辑, 该功能在研究基因表达过程中的复杂调控机制中将发挥重要的作用。此外, 这项技术也为我们对多基因疾病的研究提供了一种更加简单便利的方法。

2.4.5 能够实现对真核细胞的基因编辑: 比起在原核生物中进行的基因编辑, 真核细胞中的基因编辑显得更有前景, 近来, 研究人员发现 CRISPR 基因编辑技术在真核生物中同样能实现其功能^[8]。Woong 等^[24] 证实了 CRISPR 在斑马鱼的基因编辑修饰中

能够发挥作用。Prashant 等^[20]也成功利用 CRISPRs 技术在人类细胞中针对内生性的腺病毒相关病毒基因位点(AAVS1 locus)实施靶向插入和删除,其中在 293T 细胞的成功率为 10% - 25%,在 K562 细胞的为 8% - 13%。最近,Ding 等^[21]又利用 CRISPRs 技术进行人多能干细胞的基因组编辑。

此外,相比传统的基因编辑技术,该技术还有诸多优点,例如:sgRNA 具有低成本高效率的优势,据了解,利用 ZFNs 技术进行基因编辑的成本达到每次 6000 美元;而 TALEN 的效率只有 CRISPRs 技术的十分之一^[21]。同时,由于 Cas9 有两个不同的域(RUVC 和 HNH),可以分别剪切一条特定的 DNA 链,因此该技术能实现对目标基因两条链的同时编辑^[23]。

3 新型基因编辑技术的前景与展望

CRISPRs 技术为未来的基因组编辑创造了条件。通过结合其他的基因工程技术,这种新型基因编辑技术在生物、农业、环境研究及医学领域有极其广泛的应用前景^[19]。例如在临床治疗方面,相比蛋白质水平的治疗方式,基因治疗显得更加简便、直接和高效。目前,新型的基因编辑技术在多个方面展现出了其特有的优势,将会加速相关领域的发展。

3.1 医疗技术的革新

3.1.1 干细胞的基因编辑:最近研究表明,CRISPRs 基因编辑技术可以应用在干细胞诱导和体外器官人工合成等前沿领域,如 Ding 等最近运用 CRISPR 技术对 hPSC 细胞系基因组进行了编辑,并取得了巨大成功^[21]。此外,研究人员还可以利用这一基因编辑技术,非常系统地引入单个突变,使干细胞分化为神经元或心肌细胞,从而观察这些突变对细胞生物学的影响。

3.1.2 “肿瘤”、“艾滋病”等的治疗:研究人员还可以运用该技术将存在缺陷或者变异的基因替换为正常的基因拷贝。在一家名为 Sangamo Biosciences 的临床生物制药公司的研究中,感染艾滋病毒的患者在接受了特定基因的替换之后(研究人员从 HIV 患者处获取淋巴细胞,突变其 CCR5 受体,然后再将细胞回输到患者体内,这样的细胞将能够抵御感染),显示出了抗艾滋病的效果^[25]。同时,基因治疗相对于目前医学治疗方法尚未能解决的诸如癌症以及由单个遗传变异引起的疾病,如亨廷顿氏舞蹈病等,目

前尚无有效治愈方法的疾病,也有望会起到可观的效果。在药品生产方面,新的基因编辑技术也将使得针对多种疾病的基因药物的研发变得更加方便和高效^[26]。

3.1.3 重大传染病的基因治疗:传染病一直以来都是威胁人民群众生命和财产安全的头号公敌,在针对传染病的治疗中,由于病原微生物基因的高突变率和进而产生的高耐药性,使得现行的诸多治疗方法都很难起到有效的作用。而新的基因编辑技术或许能通过基因编辑的手段实现分子靶向治疗。通过特异性降解病原微生物基因组中的毒力或是必需基因,抑制其毒力表达或是导致病原菌的死亡,从而实现基因水平的抗菌治疗,这样既能克服病原微生物产生耐药性带来的治疗不便,又为高特异性的基因抗菌药物的快速研制提供了可能。

3.2 生物工程中的巨大潜力

新型的基因编辑技术结合生物工程技术,在农业、养殖业、考古学以及环境学上都将发挥重要作用。利用该项基因编辑技术,研究人员将能在很大程度和范围上进行基因改造,甚至实现合成生物的创造,这也就意味着很多已经灭绝的生物如华南虎、猛犸象以及斑驴等^[27]都可能会通过基因编辑技术出现在我们的现实生活中。另外,在环境严重受到威胁和能源极度短缺的当今社会,这种新的基因编辑技术或许能帮助我们合成出能分解垃圾而产生能源的“超级细菌”^[28]。

在过去,限制性酶和耐热聚合酶等^[29]细菌系统的发现及应用,彻底改变了分子生物学技术。而现在,CRISPRs 基因组编辑技术的出现与发展,为我们提供了编辑基因组的一个更加方便的工具,可能在生物科技领域具有里程碑的意义。从模糊的细菌免疫系统到一项极具潜力的技术,这种 CRISPR 基因编辑技术将改变研究和操纵各种真核生物的方式,也再次从哲学和进化的层面上向我们证实了地球上各种生物的同源性。

截至目前,本课题组已对沙门、志贺等病原菌种的 400 余株菌进行了 CRISPR 结构的筛检与确认,并在沙门氏菌和志贺氏菌的基因组中均发现了相关的 *cas* 基因(后经对 *cas* 基因类型的分析,证实存在于沙门、志贺中的 CRISPR 均属 I 型 CRISPR 结构)。我们设想是否能在沙门和志贺菌中发现一种同样能在真核生物中发挥作用、功能类似 Cas9 蛋白的一种新的 Cas 蛋白,或是一种能参与提高基因编

辑效率和准确性的 Cas 蛋白复合体,从而改进这一意义重大的基因编辑技术。本课题组同时也试图在沙门氏菌和志贺氏菌中运用这种新型的 CRISPRs 基因编辑技术,进而验证某些未知基因的功能和相关的调控机制。

尽管该项技术取得了许多突破,但仍有诸多的有待解决的问题,比如,这种新的剪切工具是否能在编辑效率和准确度上超越现有的 ZFN 和 TALEN 方法?该技术在运用过程中存在的诸多限制因素是通过何种机制影响其编辑效率的?然而,任何此类发现都有很长的路要走。该项新型基因编辑技术的发展也需要研究人员们的长期不懈的努力和探索,最终才能真正造福人类。

参考文献

- [1] Sturino JM, Klaenhammer TR. Engineered bacteriophage-defence systems in bioprocessing. *Nature Reviews Microbiology*, 2006, 4(5): 395-404.
- [2] Li T. Analysis of bacterial immune system. *Acta Microbiologica Sinica*, 2011, 51(10): 1298-1303. (in Chinese)
李铁民. 解析细菌免疫系统. 微生物学报, 2011, 51(10): 1298-1303.
- [3] Rotem Sorek, Victor Kunin, Philip Hugenholtz. CRISPR-a widespread system that provides acquired resistance against phages in bacteria and archaea. *Microbiology*, 2008, 3(6): 181-186.
- [4] Marraffini LA, Sontheimer EJ. CRISPR interference: RNA-directed adaptive immunity in bacteria and archaea. *Nature Reviews Genetics*, 2010, 11(3): 181-190.
- [5] Westra ER, Pul Ü, Heidrich N, Jore MM, Lundgren M, Stratmann T, Wurm R, Raine A, Mescher M, Van Heereveld L. H - NS - mediated repression of CRISPR - based immunity in Escherichia coli K12 can be relieved by the transcription activator LeuO. *Molecular Microbiology*, 2010, 77(6): 1380-1393.
- [6] Wang L, He J, Wang J. Advances in clustered regularly interspaced short palindromic repeats. *Acta Microbiologica Sinica*, 2011, 51(8): 1007-1013. (in Chinese)
王丽丽, 何进, 王阶平. 成簇的规律间隔的短回文重复序列 CRISPR 的研究进展. 微生物学报, 2011, 51(8): 1007-1013.
- [7] Haft DH, Selengut J, Mongodin EF, Nelson KE. A guild of 45 CRISPR-associated (Cas) protein families and multiple CRISPR/Cas subtypes exist in prokaryotic genomes. *PLoS Computational Biology*, 2005, 1(6): e60.
- [8] Jinek M, East A, Cheng A, Lin S, Ma E, Doudna J. RNA-programmed genome editing in human cells. *eLife*, 2013, 2: e00471.
- [9] Escobar-Paramo P, Giudicelli C, Parsot C, Denamur E. The evolutionary history of *Shigella* and enteroinvasive *Escherichia coli* revised. *Journal of Molecular Evolution*, 2003, 57(2): 140-148.
- [11] Pourcel C, Salvignol G, Vergnaud G. CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies. *Microbiology*, 2005, 151(3): 653-663.
- [12] Garneau JE, Dupuis ME, Villion M, Romero DA, Barrangou R, Boyaval P, Fremaux C, Horvath P, Magadan AH, Moineau S. The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature*, 2010, 468(7320): 67-71.
- [13] Li T. CRISPR-Cas system and coevolution of bacteria and phages. *Hereditas*, 2011, 33(3): 213-218. (in Chinese)
李铁民. CRISPR-Cas 系统与细菌和噬菌体的共进化. 遗传, 2011, 33(3): 213-218.
- [14] Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, Boyaval P, Moineau S, Romero DA, Horvath P. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*, 2007, 315(5819): 1709-1712.
- [15] Makarova KS, Haft DH, Barrangou R, Brouns SJ, Charpentier E, Horvath P, Moineau S, Mojica FJ, Wolf YI, Yakunin AF. Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. *Nature Reviews Microbiology*, 2011, 9(6): 467-477.
- [16] Sinkunas T, Gasiunas G, Fremaux C, Barrangou R, Horvath P, Siksnys V. Cas3 is a single-stranded DNA nuclease and ATP-dependent helicase in the CRISPR/Cas immune system. *The EMBO Journal*, 2011, 30(7): 1335-1342.
- [17] Deltcheva E, Chylinski K, Sharma CM, Gonzales K, Chao Y, Pirzada ZA, Eckert MR, Vogel J, Charpentier E. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature*, 2011, 471(7340): 602-607.
- [18] Wang R, Preamplume G, Terns MP, Terns RM, Li H. Interaction of the Cas6 ribonuclease with CRISPR RNAs: recognition and cleavage. *Structure*, 2011, 19(2): 257-264.
- [19] Qi LS, Larson MH, Gilbert LA, Doudna JA, Weissman JS, Arkin AP, Lim WA. Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. *Cell*, 2013, 152(5): 1173-1183.
- [20] Mali P, Yang L, Esvelt KM, Aach J, Guell M, DiCarlo JE, Norville JE, Church GM. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*, 2013, 339(6121): 823-826.

- [21] Ding Q, Regan SN, Xia Y, Oostrom LA, Cowan CA, Musunuru K. Enhanced efficiency of human pluripotent stem cell genome editing through replacing TALENs with CRISPRs. *Cell Stem Cell*, 2013, 12(4): 393-394.
- [22] Brouns SJ, Jore MM, Lundgren M, Westra ER, Slijkhuys RJ, Snijders AP, Dickman MJ, Makarova KS, Koonin EV, van der Oost J. Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes. *Science*, 2008, 321(5891): 960-964.
- [23] Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, Hsu PD, Wu X, Jiang W, Marraffini LA, Zhang F. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 2013, 339(6121): 819-823.
- [24] Hwang WY, Fu Y, Reyon D, Maeder ML, Tsai SQ, Sander JD, Peterson RT, Yeh JR, Joung JK. Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. *Nature Biotechnology*, 2013, 31(3): 227-229.
- [25] Symonds GP, Johnstone HA, Millington ML, Boyd MP, Burke BP, Breton LR. The use of cell-delivered gene therapy for the treatment of HIV/AIDS. *Immunologic Research*, 2010, 48(1-3): 84-98.
- [26] Unsin CE-M. The role of genetic engineering in natural product-based anticancer drug discovery//Unsin CE-M, Rajski SR, Shen B. *Natural Products and Cancer Drug Discovery*. New York: Springer, 2013: 175-191.
- [27] Huynen L, Millar CD, Lambert DM. Resurrecting ancient animal genomes: The extinct moa and more. *BioEssays*, 34: 661-669. doi: 10.1002/bies.201200040
- [28] Zhang C, Ma Q. MT genetic engineering bacteria for treatment of Cd, Ni in waste water. *Journal of Chemical Industry and Engineering*. 2012, 63(7): 2241-2245. (in Chinese)
张弛, 马青兰. MT 基因工程菌去除污水中 Cd, Ni. *化工学报*, 2012, 63(7): 2241-2245.
- [29] Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 2012, 337(6096): 816-821
- [30] Grissa I, Vergnaud G, Pourcel C. The CRISPRdb database and tools to display CRISPRs and to generate dictionaries of spacers and repeats. *BMC Bioinformatics*, 2007, 8: 172.

Progress of genome engineering technology via Clustered regularly interspaced short palindromic repeats—A review

Hao Li, Shaofu Qiu^{*}, Hongbin Song^{*}

Institute of Disease Control and Prevention of People's Liberation Army, Beijing 100071, China

Abstract: In survival competition with phage, bacteria and archaea gradually evolved the acquired immune system - Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR), presenting the trait of transcribing the crRNA and the CRISPR-associated protein (Cas) to silence or cleaving the foreign double-stranded DNA specifically. In recent years, strong interest arises in prokaryotes primitive immune system and many in-depth researches are going on. Recently, researchers successfully repurposed CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific gene expression, which provides a simple approach for selectively perturbing gene expression on a genome-wide scale. It will undoubtedly bring genome engineering into a more convenient and accurate new era.

Keywords: Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR), CRISPR-Cas system, Cas9 protein, genome engineering

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Major Scientific and Technological Special Project for Infectious Diseases during the 12th Five-year Plan Period (2013ZX10004607, 2012ZX10004215)

* Corresponding authors. Shaofu Qiu, Tel: +86-10-66948475, Fax: +86-10-66948475, E-mail: qiushf0613@hotmail.com; Hongbin Song, hongbinsong@263.net

Received: 22 April 2013/Revised: 8 July 2013