

CRISPR/Cas9 技术的脱靶效应及优化策略*

郭全娟 韩秋菊 张 建**

(山东大学药学院免疫药物学研究所, 济南 250012)

摘要 近年, CRISPR/Cas9 系统已经迅速成为医学领域最具潜力的基因编辑工具, 它是继锌指核酸内切酶(zinc-finger nucleases, ZFNs)和转录激活因子样效应因子核酸酶(transcription activator-like effectors nucleases, TALENs)之后的第三代人工改造的核酸内切酶, 被喻为“基因魔剪”。该基因编辑系统最大优势在于只需要设计一个靶向目标序列的 sgRNA(single-guide RNA)就能引导 Cas9 核酸酶结合到特定的基因序列, 并指导 Cas9 核酸酶切割相应的结合位点, 进而完成对靶基因的编辑。由于其设计简单、实施快捷、成本低廉, 突变效率高等优点, 这一系统在基因组功能鉴定、抗病毒、抗肿瘤、免疫治疗等众多领域已广泛研究。虽然 CRISPR/Cas9 系统具有如此多的优点, 但是其可能存在的脱靶风险影响了该基因编辑技术的深入研究, 增加了用于疾病治疗的风险, 阻碍了临床的进一步应用。如何保证 CRISPR/Cas9 基因编辑技术高编辑效率, 同时也能降低脱靶效应, 这将是未来科学研究者深入研究 CRISPR/Cas9 技术并开拓其临床应用亟待解决的问题。为此我们在文章中对 CRISPR/Cas9 系统组成、作用机制及应用进展进行简要综述, 着重介绍目前这一领域广受关注的脱靶效应, 并归纳优化策略, 以期更多的研究者提供参考。

关键词 基因编辑, CRISPR/Cas9, 脱靶效应, 向导 RNA

学科分类号 Q7, Q939.91

DOI: 10.16476/j.pibb.2018.0013

CRISPR/Cas 系统由成簇间隔的短回文重复序列(clustered regularly interspaced short palindrome repeat sequences)和 Cas 基因(CRISPR-associated genes)组成, 特异性地存在于大多数细菌(60%)和古生菌(90%)基因组中, 能够抵抗噬菌体对细菌的破坏, 被认为是细菌的适应性免疫系统^[1]。2013 年, CRISPR/Cas9 技术首次应用到哺乳动物细胞中, 之后被《科学》(*Science*)杂志评为“2015 年度十大科技突破”之首。

CRISPR/Cas9 系统只需要设计一个靶向目标序列的 sgRNA(single-guide RNA)就能引导 Cas9 核酸酶结合到特定的基因序列, 并指导 Cas9 核酸酶切割相应的结合位点^[2]。与锌指核酸内切酶(zinc-finger nucleases, ZFNs)和转录激活因子样效应因子核酸酶(transcription activator-like effectors nucleases, TALENs)基因编辑技术相同, CRISPR/Cas9 系统造成基因组靶位点形成双链断裂, 通过同源重组或非同源末端连接的途径进行 DNA 修复^[3]。CRISPR/Cas9 技术具有操作简单、实施快捷的特点, 迅速

超越上一代的 ZFNs 及 TALENs 等技术, 在多种生物的基因组定点编辑中得到广泛应用, 如人类细胞^[4]、大鼠^[5]、小鼠^[6]、果蝇^[7]、斑马鱼^[8]、酵母^[9]、细菌^[10]、植物^[11]等。然而, Fu 等^[12]早在 2013 年即发现针对不同基因的 sgRNA 均可以导致不同程度的脱靶效应, 潜在脱靶位点的平均脱靶效率在 40%左右, 此系统的安全性和靶向性也引起人们越来越多的关注。

1 CRISPR/Cas9 系统组成、作用机制

1.1 CRISPR/Cas9 系统组成

CRISPR/Cas 系统是存在于细菌及古生菌中的一种有效的抵御外来噬菌体或质粒侵袭的获得性免

* 国家自然科学基金(81373222, 81172789), 山东省重点研发计划(2017GSF18159)和山东省自然科学基金博士基金(ZR2017BH029)资助项目。

** 通讯联系人。

Tel: 0531-88383781, E-mail: zhangj65@sdu.edu.cn

收稿日期: 2018-05-08, 接受日期: 2018-05-30

疫系统, 主要由前导序列、多段高度保守的重复片段和间隔片段串联序列、CRISPR 相关蛋白基因(Cas genes)组成。根据其基因序列及核心要素的不同, 将不同物种中的 CRISPR/Cas 系统分成 3 种类型: I 型、II 型和 III 型, 其中 I 型又可根据不同的物种分为 6 种亚型, II 型根据是否含有 *csn2* 或 *csn4* 基因分为 2 种亚型, III 型根据是否含有 *csm2* 或 *cmr5* 基因分为 2 种亚型。I 型的标记基因是 *Cas3*, II 型的标记基因是 *Cas9*, III 型的标记基因是 *Cas10*。其中, I 型和 III 型具有相似性, 需要特定的 Cas 蛋白内切酶剪切 CRISPR 转录出的长 RNA 前体(pre-CRISPR RNA), 然后加工成一系列短的含有保守重复序列和间隔序列的成熟 crRNA (CRISPR-derived RNA)。crRNA 与 Cas 蛋白聚合成多重蛋白质复合体, 识别并剪切与 crRNA 互补的外源核酸序列^[13-14]。而 II 型 CRISPR/Cas 系统结构相对简单, pre-crRNA 的加工由 Cas 家族中的 *Cas9* 单独参与, 被认为是最小的 CRISPR/Cas 系统, 其包括 CRISPR 重复间隔基序和 4 个(但通常为 3 个)cas 基因(*cas9*、*cas1*、*cas2*、*cas4* 或者 *csn2*)^[15]。在上述三大类型 CRISPR/Cas 系统中, 不同种类 Cas 蛋白的功能决定了其降解外源 DNA 的不同机制。基于结构简单、易于设计和实施的特点, 目前研究使用的主要为 II 型 CRISPR/Cas9 系统, 用于对靶细胞中特定基因的删除、添加、激活、抑制等修饰。

1.2 CRISPR/Cas9 的作用原理

pre-crRNA 转录的同时, 与其重复序列互补的反式激活 crRNA(trans-activating crRNA, tracrRNA)也被转录出来。*Cas9* 蛋白含有 2 个活跃的酶切位点, 包括氨基末端的 *RuvC* 和蛋白质中部的 *HNH* 位点, 其中 *RuvC* 负责非互补链的切割, *HNH* 负责互补链的切割^[16]。tracrRNA 协同 *Cas9* 蛋白可以产生成熟 crRNA。crRNA、tracrRNA 和 *Cas9* 组成复合体, 识别并结合于 crRNA 互补的外源 DNA, 然后解开 DNA 双链, 形成 R 环结构, 使 crRNA 与互补链杂交, 另一条链保持游离的单链状态, 然后由 *Cas9* 2 个酶切位点分别对 DNA 双链进行切割, 最终导致 DNA 双链断裂。tracrRNA 和 crRNA 可以融合成为一个向导 RNA(single-guideRNA, sgRNA)^[17]。

Cas9 蛋白具有细胞核定位信号(nuclear localization signal, NLS), 能够与 sgRNA 结合并组装成 sgRNA-*Cas9* 复合体, 对 PAM 区(proto spacer

adjacent motif)上游的 17~20 bp 靶序列进行定点编辑, 引起 DNA 双链断裂。PAM 区由 NGG 序列构成, N 为 A、G、C、T 中任一碱基。当 DNA 双链发生断裂时, 细胞通过同源介导的双链 DNA 修复(homology directed repair, HDR)和非同源末端连接(non-homologous end joining, NHEJ)的方式进行自我修复。HDR 会以另外一条同源染色体为模板, 进行基因修复, HDR 通常不会引起突变。但是, NHEJ 的修复方式具有易错倾向, 容易在断裂位点发生碱基插入或缺失, 造成移码突变, 引起目标基因的功能缺失^[18]。目前 CRISPR/Cas9 技术正是主要利用这一特点实现对特定 DNA 片段的敲除。由于人类基因组中存在丰富的 NGG 序列, 因此该系统几乎可以靶向编辑人类基因组中的任何一种基因。

2 CRISPR/Cas9 系统在医学研究领域的应用

CRISPR/Cas9 技术展示了其特有的优势, 开创了基因编辑的新时代, 这种新型基因组编辑技术已经在生物工程、医学领域、农业、环境领域的研究中得到了广泛应用。在临床治疗中, 与蛋白质水平的治疗方式相比, 基因治疗具有更加直接高效、成本低廉的特点。目前 CRISPR/Cas9 技术在医学相关领域的应用主要包括基因组功能研究、病毒疾病治疗、肿瘤基因敲除、免疫治疗等, 随着研究的深入, 有可能通过该技术对人类突变基因定位来治愈疾病。

2.1 基因组功能鉴定

慢病毒载体构建的 sgRNA 文库可用于筛选与肿瘤发生相关的基因。有研究者^[19]利用约 123 000 个 sgRNA 组成的 CRISPR/Cas9 基因组文库对黑色素瘤细胞中的靶基因进行编辑突变, 然后通过检测 T 细胞对这些肿瘤细胞杀伤的敏感性, 从中筛选出导致肿瘤细胞产生免疫耐受的突变基因。该研究发现, APLNR(apelin 受体)基因功能缺失突变会引起患者产生免疫治疗敏感性降低; 进一步研究证明, APLNR 与 JAK1 相互作用调节肿瘤细胞中的干扰素 γ 应答。同时, 小鼠模型中 APLNR 功能缺失, 会降低过继免疫细胞治疗和免疫“卡控点”阻断治疗的效果^[20]。目前利用构建 sgRNA 文库, CRISPR/Cas9 系统已经筛选鉴定出与癌细胞增殖^[21-22]、耐药性^[23-24]和转移^[25]相关的关键基因。此外, 通过进一步改造 CRISPR/Cas9 系统, 建立了 CRISPR 激活(CRISPRa)和 CRISPR 抑制(CRISPRi)技术, 即将

Cas9 带到特定的基因组位点, 通过启动或终止转录来调控靶基因的表达, 该技术特别适合分析非编码 RNA 的功能^[26]. 目前 Bester 等^[27]建立了 CRISPRa 平台, 用于筛选与化疗药物抵抗相关的功能性长链非编码 RNA.

2.2 抗病毒

CRISPR/Cas9 作为一种新的基因组编辑技术已经在诸多病毒感染性疾病研究中发挥重要作用. 乙型肝炎病毒(HBV)是一种嗜肝性 DNA 病毒, HBV 基因组 DNA 进入细胞核后, 转化成共价闭合环状 DNA (covalently closed circular DNA, cccDNA), 它是病毒转录的模板, 其形成意味着 HBV 感染的成功. 由于一般的抗病毒药物难以入核, 因而 cccDNA 难被清除, 这也形成了 HBV 无法彻底根治的分子基础. Lin 等^[28]发现, CRISPR/Cas9 技术可以在体内、体外对 HBV 基因组 DNA 进行有效切割, 显著抑制 HBV 核心蛋白和表面蛋白的表达. 与传统的治疗方法相比, 这种新型的基因编辑技术可以破坏 cccDNA, 达到清除 HBV 的目的. 此外, 目前抗逆转录病毒的药物治疗只能在一定程度上抑制人类免疫缺陷病毒(HIV)感染的复制, 但并不能消除潜伏感染的 HIV. 利用 CRISPR/Cas9 技术可以靶向敲除潜伏感染的 HIV-1 基因组, 基因突变的效率可达到 90%^[29], 因而该技术可能具有彻底治愈艾滋病的潜力. 此外, 利用该系统靶向 HCV^[30]、HPV^[31]、EBV^[32]等病毒的研究, 均显示可以减少病毒复制, 达到减少病毒产生甚至清除病毒的疗效.

2.3 抗肿瘤研究

在肿瘤的形成过程中, 原癌基因的激活和抑癌基因的失活发挥重要的作用. CRISPR/Cas9 系统不仅可以靶向敲除致癌基因, 而且在外源性 DNA 模板的作用下可以对突变的抑癌基因进行修复. 例如, CRISPR/Cas9 靶向切割非小细胞肺癌相关的癌基因 EGFR, 能够有效抑制非小细胞肺癌细胞的增殖及异体移植肿瘤在小鼠体内的生长, 延长小鼠生存期^[33]. 在原癌基因 KRAS 活化突变的胰导管腺癌模型中, 利用该技术敲除 KRAS 基因后, 细胞形态发生改变, 细胞活力、克隆形成能力和成瘤率降低^[34]. 此外, 利用 CRISPR/Cas9 系统特异性纠正慢性髓性白血病细胞中突变的抑癌基因 ASXL1 (additional sex combs like 1), 能够进一步促进细胞分化, 抑制细胞的增殖速率, 延长荷瘤小鼠的生存期^[35]. 本课题组在前期工作中建立了可以同时沉默原癌基因 Stat3 和 HBV 基因组 CRISPR/Cas9 系统, 结果发现 HepG2.2.15 细胞基因组 STAT3 蛋白表达受到干扰, 且 HBV 基因组靶位点突变显著增加, 有效抑制了 HBV 的复制和细胞生长(未发表). 这些研究提示, CRISPR/Cas9 技术在肿瘤治疗中具有非常大的潜力. 目前, CRISPR/Cas9 系统已被用于非小细胞肺癌^[33]、肝癌^[36]、结直肠癌^[4]、乳腺癌^[37]等多种肿瘤模型, 在寻找肿瘤基因治疗方面发挥着重要作用. 美国临床试验数据库(clinical trials)显示, 多个基于 CRISPR/Cas9 基因编辑技术的肿瘤治疗方案正在开展临床研究(表 1), 这项技术在肿

Table 1 CRISPR/Cas9 gene editing technique in clinical development for treatment of cancer

表 1 利用 CRISPR/Cas9 系统肿瘤治疗的临床研究进展

靶点	疾病类型	研究阶段	干预措施	国家
敲除 PD-1 基因的外周血淋巴细胞中	IV 期胃癌、IV 期鼻咽癌、IV 期 T 细胞淋巴瘤、IV 期成人霍奇金淋巴瘤、IV 期弥漫性大 B 细胞淋巴瘤	I / II 期临床试验 正在进行	联合氟达拉滨、环磷酰胺、白介素 12	中国
敲除 PD-1 的基因工程 T 细胞	转移性非小细胞肺癌	I 期临床试验 正在进行	联合环磷酰胺	中国
敲除 PD-1 的基因工程 T 细胞	晚期食管癌	II 期临床试验 正在进行	PD-1 敲除 T 细胞	中国
敲除内源性 TCR 的 CD19 特异性 CART 细胞(UCART019 细胞)	B 细胞白血病、B 细胞淋巴瘤	I / II 期临床试验 正在进行	UCART019 细胞	中国
敲除 CCR5 基因的 CD34+ 造血干/祖细胞	HIV-1 感染的血液肿瘤	I 期临床试验 正在进行	CCR5 基因修饰	中国
修复异常血红蛋白 S(HbS)基因	镰状细胞贫血病	I 期临床试验 正在进行	异常血红蛋白 S (HbS)基因编辑	美国
敲除内源性 TCR 和 PD-1 基因的 T 细胞(NYCE T 细胞)	多发性骨髓瘤、黑色素瘤、滑膜肉瘤、粘液样 / 圆形脂肪肉瘤	I 期临床试验 正在进行	联合氟达拉滨、环磷酰胺、	美国

瘤基因治疗领域具有非常大的发展前景, 为未来个体化靶向治疗提供了有力的支持.

2.4 免疫治疗

近年来, 免疫治疗在肿瘤等疾病治疗中发展迅速, 例如嵌合抗原受体 T 细胞(chimeric antibody receptor engineered T cell, CAR-T)技术可以再定向和重编程 T 细胞, 使之表达特异性肿瘤抗原受体, CAR-T 细胞经纯化扩增后输入患者体内进行抗肿瘤治疗^[36]. 目前, 最成功的是针对 CD19 的 CAR-T 细胞, 对化疗难治性或复发性 B 细胞恶性肿瘤患者可以达到完全缓解的治疗效果^[36]. 但是, 由于 CAR-T 淋巴细胞回输入患者体内后可通过自身具有的 TCR 识别宿主抗原, 造成移植物抗宿主病, 导致患者多器官功能衰竭. 有研究利用 CRISPR/Cas9 基因敲除的特性, 将靶向 CD19 的 CAR 基因定向插入到患者 T 细胞受体 α 链(TRAC)基因座, 这样产生的 CAR-T 细胞不仅可以避免引起患者体内“细胞因子风暴”, 消除移植物抗宿主反应, 而且能够提高患者外周血 T 细胞中 CAR 表达的均匀性, 增强 CAR-T 细胞的效能, 延缓效应性 T 细胞的耗竭^[38]. 基因修改的 T 细胞受体(gene modified TCR, TCR-T)和 CAR-T 技术统称为“T 细胞受体重新定向”技术. 有研究者将 CRISPR/Cas9 技术成功地与 TCR 替换技术联合使用, 即利用 CRISPR/Cas9 敲除该 T 细胞内源性的 TCR- β 链的恒定区, 同时利用识别肿瘤抗原的 $\gamma\delta$ TCR 表达载体转染 T 细胞. 这种技术联合使用不仅使 T 细胞对肿瘤抗原的识别能力比单纯 TCR 转染提高 5 000 倍, 而且对多种淋巴和髓系来源的血液恶性肿瘤细胞的杀伤活性明显增强^[39]. 这些研究展示出 CRISPR/Cas9 基因组编辑技术推动免疫治疗发展的巨大潜力.

3 CRISPR/Cas9 系统脱靶效应及优化策略

3.1 CRISPR/Cas9 系统脱靶效应

CRISPR/Cas9 系统的特异性主要取决于 sgRNA 的识别序列. 由于设计的 sgRNA 可能会与非靶点 DNA 序列形成错配, 导致非预期的基因突变, 该效应称为脱靶效应(off-target effects). sgRNA 在非靶位点形成局部错配的形式分为两种情况: a. sgRNA 与非靶 DNA 序列长度相等, 只存在碱基错配; b. sgRNA 与非靶 DNA 序列长度不等, 通过形成 DNA 凸起或 RNA 凸起与其他碱基的错配^[40-41].

脱靶突变可能会导致基因组不稳定, 并破坏其他正常基因的功能. 早期利用 CRISPR/Cas9 对斑马鱼基因组进行编辑时发现, 有效突变可达到 86%并且可以遗传给子代, 同时约有 1.1%~2.5% 潜在靶外位点突变效率^[42]. 在植物拟南芥中引起的脱靶效应, 在其子代中表现更加明显^[43]. 随着基因测序技术及体外寻找脱靶位点的生物化学方法的发展, 如 CIRCLE-seq^[44]、GUIDE-seq^[45]和 ChIP-seq, 提高了检测脱靶位点的敏感性, 人们得以简便、快速、全面地对 CRISPR/Cas9 的脱靶突变进行鉴定, 从而降低脱靶效应, 进一步促进 CRISPR/Cas9 基因编辑系统的研究及应用.

3.2 引起脱靶效应的因素

3.2.1 sgRNA 对脱靶的影响

多项研究认为, sgRNA 的序列可能会引起脱靶效应. Kuscu 等^[41]利用染色质免疫沉淀-高通量测序(ChIP-seq)技术, 在 HEK293T 细胞中利用无催化活性的 Cas9(dCas9)结合 12 种不同的 sgRNA, 绘制出全基因组结合位点图谱, 由 dCas9 结合的脱靶位点数量从 10 到超过 1 000 不等, 而这些都取决于 sgRNA 的序列. Pattanayak 等^[46]对细胞进行体外基因编辑时报道, sgRNA 序列同 PAM 结合区可以有多达 7 个碱基的错配. 同先前的报道一致, 利用基因组测序对 Cas9 核酸酶诱导的脱靶序列进行分析发现, 这些 sgRNA 序列同 PAM 结合区存在多达 6 个碱基的错配^[45].

3.2.2 PAM 对脱靶的影响

sgRNA 引导 Cas9 蛋白结合到靶 DNA 位点时, 要求其下游必须有 2~5nt 的 PAM 序列. Pattanayak 等^[46]利用体外选择和高通量测序方法对 sgRNA 的特异性进行了验证, 发现 sgRNA-Cas9 复合物的特异性依赖于 sgRNA 中临近 PAM 的 7~12 个碱基序列与靶基因的互补配对. 非经典的 PAM 序列, 包括 NAG、NGA、NAA、NGT、NGC 和 NCG 等, 可以在 gRNA/PAM 结合界面处形成 1 bp “隆起型”错配. 虽然 PAM 区错配往往发生在目标序列的 5'端, 但也可以在 3'端发生, 因而不能够基于位置来预测脱靶效应^[45]. 与该研究不同的是, Zhang 等^[47]发现脱靶效应与靶 DNA 的结合序列无关, 而是与所设计的 sgRNA 序列和 Cas9 核酸酶的类型相关. 作者利用 gRNA 与 3 种不同的 Cas9 组合对突变的靶序列进行基因编辑, 比较引起靶点 DNA 双链断裂(DSB)的效率. 他们发现, 靶 DNA 序列突变并不影响 gRNA 和 Cas9 的切割活性, 而

是 gRNA 和 Cas9 共同决定了双链 DNA 切割的特异性。此外,不同的 PAM 序列,脱靶效应也不尽相同,sgRNA 识别酿脓链球菌的 NGG PAM 序列及 NAG PAM 序列需要 8 个核苷酸,而识别嗜热链球菌的 NGGNG PAM 及 NNAGAAW PAM 序列分别需要 32 及 256 个核苷酸。因此,对 PAM 的依赖性增加了 CRISPR/Cas9 系统的特异性,需要的核苷酸越多,脱靶效应则越低。

3.2.3 Cas9 和其他因素的影响

紧邻 PAM 序列的 DNA-RNA 双链错配会损害 Cas9 活性。Hsu 等^[48]在 HEK293T 和 HEK293FT 细胞系中对 700 多种 sgRNA 和对应的脱靶位点进行了评估。结果显示,Cas9 核酸酶对错配碱基的耐受能力与错配碱基数量、位置及分布有关。根据与 PAM 的距离,可将 sgRNA 序列划分为 PAM 近端种子区和 PAM 远端非种子区。与作用于 PAM 近端区域的 Cas9 核酸酶相比,在 PAM 远端区域的 Cas9 核酸酶对单碱基错配表现出更大程度的耐受性。通常单核苷酸的错配不影响 Cas9 活性,而在距离 PAM 的不同位点发生两个或更多碱基的错配,则会不同程度降低 Cas9 活性^[40, 46, 49-50]。此外,研究还发现,Cas9 核酸酶切割靶基因组不受甲基化影响,这意味着切割在多个位点是有效的。

4 脱靶效应的优化策略

4.1 提高 sgRNA 特异性

通常将 sgRNA 靠近 PAM 的 10~12 bp 的碱基对称为种子区,它决定 sgRNA 与靶点识别的特异性,其余序列在不同程度上影响脱靶效应。Ren 等^[51]发现 sgRNA 的基因编辑效率同 sgRNA 种子区 GC 含量成正比,并且 sgRNA 种子区序列与脱靶位点 DNA 序列存在 3 个或更多碱基错配时,脱靶效应降低甚至消失。因而在设计 sgRNA 序列时,可选择 GC 含量在 40%~60%,与靶基因序列之外的基因组 DNA 同源性低的 sgRNA 序列来提高 sgRNA 的特异性。PAM 远端的 sgRNA 序列可引起 Cas9 构象改变,促使靶点 DNA 断裂。当 PAM 远端第 15 个碱基为胞嘧啶时,可增加 sgRNA 的特异性,降低脱靶^[52-53]。但是,在设计 PAM 近端 sgRNA 序列时,种子区第一个碱基优选鸟嘌呤,避免选择胞嘧啶,这是由于鸟嘌呤富集的 sgRNA 更易折叠,形成更加稳定的结构,降低脱靶效应。

sgRNA 的长度也和特异性密切相关,采用缩短的 sgRNA 序列,即少于 20 个核苷酸序列,可以

有效地降低脱靶效应而不影响基因编辑效果^[49, 54]。

然而,Kleinstiver 等^[55]发现缩短 sgRNA 序列不能增加特异性,并且可能降低基因编辑效率。因此,通过缩短 sgRNA 长度来降低脱靶效应的策略仍有待进一步验证。另一种增加 sgRNA 特异性的简单修饰,被称为“GG20”策略,即在设计 sgRNA 时在 5'端增加 2 个鸟嘌呤(称为 ggX20 sgRNAs)取代相应的 GX19 sgRNAs,能够极大降低脱靶效应,增加特异性^[56]。

此外,利用在线提供 sgRNA 设计和 off-Target 评估网站,如 CRISPR design tool(<http://crispr.mit.edu>)、ZiFiT (<http://zifit.partners.org/ZiFiT/>)、Cas9 design (<http://cas9.cbi.pku.edu.cn/>)、E-CRISPR (<http://www.e-crisp.org/>)、Cas-offinder (<http://www.rgenome.net/cas-offinder/>)、CHOPCHOP (<https://chopchop.rc.fas.harvard.edu/index.php>)^[57],同时利用本地下载安装的设计 sgRNA 和评估潜在脱靶位点的软件工具(如 CasOT^[58]),根据需要设定参数,就可以在任意给定的基因组或者序列里设计 sgRNA 序列或者寻找潜在的脱靶位点。

4.2 控制 Cas9-sgRNA 用量

控制 Cas9-sgRNA 复合物的浓度是一种具有降低脱靶效应潜力的策略,即通过控制 Cas9 蛋白或 sgRNA 的表达量来减少脱靶效应。Pattanayak 等^[46]通过对 HEK293T 细胞的基因组进行切割,对 5 个潜在的脱靶位点进行高通量测序检测发现,序列较短、活性低的 sgRNA 比序列长、活性高的 sgRNA 更具有特异性,而高浓度的 sgRNA-Cas9 复合物可以切割 PAM 序列附近或内部位点,形成脱靶效应。Shalme 等^[23]利用慢病毒载体将 Cas9 蛋白和 sgRNA 转染到黑色素瘤细胞中,当 Cas9 蛋白稳定表达 7~14 d 时,1 个含有 3 个碱基错配的脱靶位点的突变率由 40%增加到 50%。该研究提示,细胞持续表达 Cas9 将增加脱靶风险,因而可以通过 Cas9 蛋白的封闭抗体或抑制剂来降低 Cas9 活性,降低脱靶效应。尽管通过调节 sgRNA 和 Cas9 核酸酶的浓度可降低脱靶风险,但浓度降低后,相应的基因组编辑能力也会减弱^[48],因此必须考虑基因编辑效率与脱靶效应之间的平衡。现有研究认为,当 gRNA : Cas9 复合物比值为 2 : 1 或者 3 : 1 时,靶基因敲除效率较高,且可以有效降低脱靶效应。

4.3 改造 Cas9

通过对野生型 Cas9 进行改造提高 CRISPR/Cas9 系统的特异性。一种策略是,将 Cas9 中的一

个酶切位点失活, 得到突变型 D10A Cas9 切口酶和 H840A Cas9 切口酶. 由于突变型 Cas9 只能对单链进行切割, 因而需要 2 条 sgRNA 同时引导, 在 DNA 不同的链产生 2 个临近的切口, 才能引起双链 DNA 断裂. 所以, 只有 2 条 sgRNA 均发生错配时才会发生脱靶, 这极大降低了脱靶效应. 利用 Cas9 单切口酶和 “paired-gRNAs” 进行基因组编辑, 这一策略能有效提高基因敲除效率, 显著降低细胞系中的脱靶效应(约 50~1 500 倍), 且该方法适用于人类细胞、动物、植物、细菌等多种生物体模型的基因组编辑^[59-60].

另一种与上述策略相似, 是将 Cas9 蛋白的核酸酶结构域进行突变, 产生灭活的 dCas9, 然后与 Fok I 核酸酶结合形成融合蛋白质(Cas9-Fok I), 当 2 个 sgRNA 引导 Cas9-Fok I 结合到相距 15~20 bp 的靶 DNA 区域, Fok I 蛋白发生二聚化而激活, 对中间的 DNA 进行切割, 形成双链末端断裂^[61]. 应用这种核酸酶可以诱导人类细胞产生高效的基因编辑, 并且极大地降低脱靶突变水平. 目前已开发出 Cas9 蛋白的高度特异性的突变体, 可以避免野生型 Cas9 诱导的绝大多数脱靶突变. 例如增强型突变体 eSpCas9^[62]、高保真突变体 SpCas9-HF1^[55]、高精度突变体 HypaCas9^[63]等. 因此, 研究者可以通过选择优化的 Cas9 核酸酶来降低脱靶效应.

4.4 选择合适的递送载体

目前 Cas9 可以通过 DNA 质粒、mRNA 和蛋白质三种方式传递到靶细胞中, 其中直接递送 Cas9 mRNA 和蛋白质这两种方式可显著降低脱靶效应^[64-65]. CRISPR/Cas9 递送方式主要包括物理方法(显微注射、脂质体转染、电转、高压尾静脉注射等)和病毒载体(慢病毒、腺病毒、腺相关病毒等). 已有的研究表明, 利用 Cas9/sgRNA 核糖核蛋白(ribonucleoproteins, RNPs)递送系统不会在被编辑的细胞基因组中插入外源 DNA 序列, 可有效减少脱靶效应^[66]. 在对 11 个脱靶位点进行评估时发现, 与质粒 DNA 转染方式相比, 阳离子脂质体包裹的 RNPs 递送系统将 SpCas9 蛋白的特异性提高近 10 倍^[67]. 在一项类似的研究中, RNPs 递送系统将两种 sgRNA 的在靶与脱靶效率的比值提高了约 3 倍^[68]. Cas9 mRNA 或 Cas9 蛋白和 2'-O-甲基 3'-硫代磷酸酯(MS)修饰的 sgRNA 利用 RNPs 系统共转运时, 能够显著提高 3 种靶向不同基因的 sgRNA 在靶与脱靶效率的比值^[69]. 此外, 纳米金粒子与阳离子聚合物复合而成的递送载体

(CRISPR-Gold)可以将 Cas9 核糖核蛋白及供体 DNA(donor DNA)递送至不同细胞中, 纠正导致 Duchenne 型肌营养不良小鼠突变 DNA, 降低脱靶效应^[70]. 利用其他的递送系统, 如活性 P22-Cas9 纳米载体的程序化自组装系统, 即将 Cas9 和 sgRNA 包装在噬菌体 P22 的病毒样颗粒(VLP)内, 也可以实现 Cas9 核酸酶对 dsDNA 靶序列特异性切割, 降低脱靶效率, 这项工作展示了开发 P22 作为 Cas9 细胞特异性靶向载体的潜力^[71]. 因此, 利用 CRISPR/Cas9 系统进行基因编辑时, 可选择 RNPs、阳离子脂质体、纳米金粒子等递送载体, 增加 Cas9 核酸酶的特异性, 降低脱靶效应.

4.5 运用 Cas9 酶的“关闭开关”

Pawluk 等^[72]首次发现了 CRISPR/Cas9 的“关闭开关”, 该研究小组鉴定出 3 个天然存在的、能够抑制 Cas9 酶的蛋白质家族, 这些抗 CRISPR 的蛋白质能够特异性阻断脑膜炎奈瑟菌 Cas9 酶切割 DNA 的能力. Rauch 等^[73]在李斯特菌中发现了多种称为抗 CRISPRs 的抑制剂, 其中 AcrIIA2 和 AcrIIA4 2 个抑制剂能够阻断来自酿脓链球菌的 Cas9 酶或 SpyCas9 酶活性. 随后, 黄志伟课题组^[74]针对“关闭开关”如何抑制 CRISPR/Cas9 系统的问题进行了研究. 通过比较 SpyCas9:sgRNA 复合物与 AcrIIA4 结合的晶体结构发现, AcrIIA4 竞争性结合在 PAM 相互作用位点, 阻断了 SpyCas9 对双链 DNA 底物的识别, 并且 AcrIIA4 通过封闭 RuvC 活性位点进一步抑制 SpyCas9 的核酸内切酶活性. 近年来, Doudna 团队^[75]发现广谱的 CRISPR/Cas9 抑制剂 AcrIIC1 和 AcrIIC3 分别通过不同的策略抑制 Cas9 核酸酶. AcrIIC1 通过直接结合到 Cas9 酶保守的 HNH 催化域, 从而阻止多种同源 Cas9 对 DNA 双链的切割, AcrIIC3 能阻断单个 Cas9 的活性, 通过诱导 Cas9 的二聚化阻止其与 DNA 双链的结合. 因此, 为避免 Cas9 蛋白在细胞中的持续表达, 可利用上述抑制剂降低脱靶效应.

除以上方法外, 对 sgRNA 进行化学修饰也可以有效降低脱靶效应. 例如, 通过 2-氟核糖^[76]、2'-O-甲基 3'-硫代磷酸酯(MS)^[69]、2', 4'-BNA^{NC}[N-Me]桥式核酸和 LAN 锁核酸^[77]化学修饰 crRNA, 能够提高 sgRNA 的稳定性, 增加 Cas9 核酸内切酶的特异性; 也可以利用 DNA 核苷酸替换 crRNA 5' 和 3' 端的部分 RNA 核苷酸的策略, 以形成的 DNA-RNA 嵌合体引导 Cas9 核酸酶^[78], 降低 Cas9 核酸酶在人类基因组编辑的脱靶效应. 另外, 优化

检测脱靶效应的方法为保证基因操作的准确性起到重要推动作用,如应用整合酶缺陷的慢病毒载体(IDLV)检测 CRISPR/Cas9 的脱靶效应,该方法最低可检测 1% 的脱靶频率^[79].

5 结 语

CRISPR/Cas9 系统作为一种新型的基因靶向编辑技术,因其操作简单、高效等优势,已发展成为最具前景的基因组定点修饰技术,将会在基因组筛查、药物靶点的鉴定以及肿瘤治疗等临床应用推广方面大放异彩.在体内外试验中,CRISPR/Cas9 系统在肿瘤治疗方面显示出巨大潜力,多项基于 CRISPR/Cas9 技术的药物或者免疫治疗方案也已进入临床前研究.围绕 Cas9 特异性的科学态势正在迅速发展,近期在导向 RNA 选择、导向 RNA 工程,以及脱靶检测方法等方面取得了显著进步.目前,CRISPR/Cas9 技术除具有基因敲除功能外,对于基因亦具有增强和矫正功能,利用这些特点科学家们已经对诸如自身免疫病以及基因异常相关的疾病开展深入研究.然而在利用 CRISPR/Cas9 技术进行基因治疗过程中,仍有众多问题需要谨慎对待,治疗靶点选择是否得当?治疗过程能否可控?治疗疾病范围和输送载体是否合理?这些都需要科学工作者去不断钻研和克服.诚然,在基因治疗过程中消除脱靶效应,确保临床应用的安全性是非常关键的.相信在不久的将来,CRISPR/Cas9 技术终将成为精准医疗的方式应用于临床,造福人类.

参 考 文 献

- [1] Mali P, Yang L, Esvelt K M, *et al.* RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*, 2013, **339**(6121): 823–826
- [2] Pennisi E. The CRISPR craze. *Science*, 2013, **341**(6148): 833–836
- [3] Wang H, Yang H, Shivalila C S, *et al.* One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell*, 2013, **153**(4): 910–918
- [4] Drost J, Van Boxtel R, Blokzijl F, *et al.* Use of CRISPR-modified human stem cell organoids to study the origin of mutational signatures in cancer. *Science*, 2017, **358**(6360): 234–238
- [5] Smalley E. CRISPR mouse model boom, rat model renaissance. *Nature Biotechnology*, 2016, **34**(9): 893–894
- [6] Manguso R T, Pope H W, Zimmer M D, *et al.* *In vivo* CRISPR screening identifies Ptpn2 as a cancer immunotherapy target. *Nature*, 2017, **547**(7664): 413–418
- [7] Port F, Bullock S L. Augmenting CRISPR applications in *Drosophila* with tRNA-flanked sgRNAs. *Nature Methods*, 2016, **13**(10): 852–854
- [8] Spanjaard B, Hu B, Mitic N, *et al.* Simultaneous lineage tracing and cell-type identification using CRISPR-Cas9-induced genetic scars. *Nature Biotechnology*, 2018, **36**(5): 469–473
- [9] Sadhu M J, Bloom J S, Day L, *et al.* Highly parallel genome variant engineering with CRISPR-Cas9. *Nature Genetics*, 2018, **50** (4): 510–514
- [10] Cho S, Shin J, Cho B K. Applications of CRISPR/Cas system to bacterial metabolic engineering. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, **19**(4): 1089
- [11] Ledford H. Fixing the tomato: CRISPR edits correct plant-breeding snafu. *Nature*, 2017, **545**(7655): 394–395
- [12] Fu Y, Foden J A, Khayter C, *et al.* High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. *Nature Biotechnology*, 2013, **31**(9): 822–826
- [13] Hatoum-Aslan A, Maniv I, Samai P, *et al.* Genetic characterization of antiplasmid immunity through a type III-A CRISPR-Cas system. *Journal of Bacteriology*, 2014, **196**(2): 310–317
- [14] Reeks J, Naismith J H, White M F. CRISPR interference: a structural perspective. *The Biochemical Journal*, 2013, **453** (2): 155–166
- [15] Chylinski K, Makarova K S, Charpentier E, *et al.* Classification and evolution of type II CRISPR-Cas systems. *Nucleic Acids Research*, 2014, **42**(10): 6091–6105
- [16] Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, *et al.* A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 2012, **337**(6096): 816–821
- [17] Deltcheva E, Chylinski K, Sharma C M, *et al.* CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature*, 2011, **471**(7340): 602–607
- [18] Cong L, Ran F A, Cox D, *et al.* Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 2013, **339**(6121): 819–823
- [19] Sanjana N E, Shalem O, Zhang F. Improved vectors and genome-wide libraries for CRISPR screening. *Nature Methods*, 2014, **11**(8): 783–784
- [20] Patel S J, Sanjana N E, Kishton R J, *et al.* Identification of essential genes for cancer immunotherapy. *Nature*, 2017, **548** (7669): 537–542
- [21] Wang T, Birsoy K, Hughes N W, *et al.* Identification and characterization of essential genes in the human genome. *Science*, 2015, **350**(6264): 1096–1101
- [22] Hart T, Chandrasekhar M, Aregger M, *et al.* High-resolution CRISPR screens reveal fitness genes and genotype-specific cancer liabilities. *Cell*, 2015, **163**(6): 1515–1526
- [23] Shalem O, Sanjana N E, Hartenian E, *et al.* Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells. *Science*, 2014, **343**(6166): 84–87
- [24] Wang T, Wei J J, Sabatini D M, *et al.* Genetic screens in human cells using the CRISPR-Cas9 system. *Science*, 2014, **343** (6166): 80–84
- [25] Chen S, Sanjana N E, Zheng K, *et al.* Genome-wide CRISPR screen in a mouse model of tumor growth and metastasis. *Cell*, 2015, **160**(6): 1246–1260
- [26] Liu S J, Horlbeck M A, Cho S W, *et al.* CRISPRi-based

- genome-scale identification of functional long noncoding RNA loci in human cells. *Science*, 2017, **355**(6320): aah7111
- [27] Bester A C, Lee J D, Chavez A, *et al.* An integrated genome-wide CRISPRa approach to functionalize lncRNAs in drug resistance. *Cell*, 2018, **173**(3): 649–664.e20
- [28] Lin S R, Yang H C, Kuo Y T, *et al.* The CRISPR/Cas9 system facilitates clearance of the intrahepatic HBV templates *in vivo*. *Molecular Therapy Nucleic Acids*, 2014, **3**(8): e186
- [29] Liao H K, Gu Y, Diaz A, *et al.* Use of the CRISPR/Cas9 system as an intracellular defense against HIV-1 infection in human cells. *Nature Communications*, 2015, **6**(1): e6413
- [30] Price A A, Sampson T R, Ratner H K, *et al.* Cas9-mediated targeting of viral RNA in eukaryotic cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, **112**(19): 6164–6169
- [31] Kennedy E M, Kornepati A V, Goldstein M, *et al.* Inactivation of the human papillomavirus E6 or E7 gene in cervical carcinoma cells by using a bacterial CRISPR/Cas RNA-guided endonuclease. *Journal of Virology*, 2014, **88**(20): 11965–11972
- [32] Bi Y, Sun L, Gao D, *et al.* High-efficiency targeted editing of large viral genomes by RNA-guided nucleases. *Plos Pathogens*, 2014, **10**(5): e1004090
- [33] Koo T, Yoon A R, Cho H Y, *et al.* Selective disruption of an oncogenic mutant allele by CRISPR/Cas9 induces efficient tumor regression. *Nucleic Acids Research*, 2017, **45**(13): 7897–7908
- [34] Muzumdar M D, Chen P Y, Dorans K J, *et al.* Survival of pancreatic cancer cells lacking KRAS function. *Nature Communications*, 2017, **8**(1): e1090
- [35] Valletta S, Dolatshad H, Bartenstein M, *et al.* ASXL1 mutation correction by CRISPR/Cas9 restores gene function in leukemia cells and increases survival in mouse xenografts. *Oncotarget*, 2015, **6**(42): 44061–44071
- [36] Wangenstein K J, Wang Y J, Dou Z, *et al.* Combinatorial genetics in liver repopulation and carcinogenesis with a novel *in vivo* CRISPR activation platform. *Hepatology*, 2017, doi: 101002/hep29626
- [37] Merino D, Whittle J R, Vaillant F, *et al.* Synergistic action of the MCL-1 inhibitor S63845 with current therapies in preclinical models of triple-negative and HER2-amplified breast cancer. *Science Translational Medicine*, 2017, **9**(401): eaam7049
- [38] Eyquem J, Mansilla-Soto J, Giavridis T, *et al.* Targeting a CAR to the TRAC locus with CRISPR/Cas9 enhances tumour rejection. *Nature*, 2017, **543**(7643): 113–117
- [39] Legut M, Dolton G, Mian A A, *et al.* CRISPR-mediated TCR replacement generates superior anticancer transgenic T-cells. *Blood*, 2018, **131**(3): 311–322
- [40] Lin Y, Cradick T J, Brown M T, *et al.* CRISPR/Cas9 systems have off-target activity with insertions or deletions between target DNA and guide RNA sequences. *Nucleic Acids Research*, 2014, **42**(11): 7473–7485
- [41] Kescu C, Arslan S, Singh R, *et al.* Genome-wide analysis reveals characteristics of off-target sites bound by the Cas9 endonuclease. *Nature Biotechnology*, 2014, **32**(7): 677–683
- [42] Hruscha A, Krawitz P, Rechenberg A, *et al.* Efficient CRISPR/Cas9 genome editing with low off-target effects in zebrafish. *Development*, 2013, **140**(24): 4982–4987
- [43] Zhang Q, Xing H L, Wang Z P, *et al.* Potential high-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR/Cas9 in *Arabidopsis* and its prevention. *Plant Molecular Biology*, 2018, **96**(4–5): 445–456
- [44] Tsai S Q, Nguyen N T, Malagon-Lopez J, *et al.* CIRCLE-seq: a highly sensitive *in vitro* screen for genome-wide CRISPR-Cas9 nuclease off-targets. *Nature Methods*, 2017, **14**(6): 607–614
- [45] Tsai S Q, Zheng Z, Nguyen N T, *et al.* GUIDE-seq enables genome-wide profiling of off-target cleavage by CRISPR-Cas nucleases. *Nature Biotechnology*, 2015, **33**(2): 187–197
- [46] Pattanayak V, Lin S, Guilinger J P, *et al.* High-throughput profiling of off-target DNA cleavage reveals RNA-programmed Cas9 nuclease specificity. *Nature Biotechnology*, 2013, **31**(9): 839–843
- [47] Zhang J H, Pandey M, Kahler J F, *et al.* Improving the specificity and efficacy of CRISPR/CAS9 and gRNA through target specific DNA reporter. *Journal of Biotechnology*, 2014, **189**(1): 1–8
- [48] Hsu P D, Scott D A, Weinstein J A, *et al.* DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nature Biotechnology*, 2013, **31**(9): 827–832
- [49] Fu Y, Sander J D, Reyon D, *et al.* Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs. *Nature Biotechnology*, 2014, **32**(3): 279–284
- [50] Mali P, Aach J, Stranges P B, *et al.* CAS9 transcriptional activators for target specificity screening and paired nickases for cooperative genome engineering. *Nature Biotechnology*, 2013, **31**(9): 833–838
- [51] Ren X, Yang Z, Xu J, *et al.* Enhanced specificity and efficiency of the CRISPR/Cas9 system with optimized sgRNA parameters in *Drosophila*. *Cell Reports*, 2014, **9**(3): 1151–1162
- [52] Labuhn M, Adams F F, Ng M, *et al.* Refined sgRNA efficacy prediction improves large- and small-scale CRISPR-Cas9 applications. *Nucleic Acids Research*, 2018, **46**(3): 1375–1385
- [53] Cencic R, Miura H, Malina A, *et al.* Protospacer adjacent motif (PAM)-distal sequences engage CRISPR Cas9 DNA target cleavage. *Plos One*, 2014, **9**(10): e109213
- [54] Singh K, Evens H, Nair N, *et al.* Efficient *in vivo* liver-directed gene editing using CRISPR/Cas9. *Molecular Therapy*, 2018, **26**(5): 1241–1254
- [55] Kleinstiver B P, Pattanayak V, Prew M S, *et al.* High-fidelity CRISPR-Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects. *Nature*, 2016, **529**(7587): 490–495
- [56] Kim D, Kim S, Kim S, *et al.* Genome-wide target specificities of CRISPR-Cas9 nucleases revealed by multiplex Digenome-seq. *Genome Research*, 2016, **26**(3): 406–415
- [57] Labun K, Montague T G, Gagnon J A, *et al.* CHOPCHOP v2: a web tool for the next generation of CRISPR genome engineering. *Nucleic Acids Research*, 2016, **44**(W1): W272–276
- [58] Xiao A, Cheng Z, Kong L, *et al.* CasOT: a genome-wide Cas9/gRNA off-target searching tool. *Bioinformatics*, 2014, **30**(8): 1180–1182
- [59] Shen B, Zhang W, Zhang J, *et al.* Efficient genome modification by

- CRISPR-Cas9 nickase with minimal off-target effects. *Nature Methods*, 2014, **11**(4): 399–402
- [60] Ran F A, Hsu P D, Lin C Y, *et al.* Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell*, 2013, **154**(6): 1380–1389
- [61] Tsai S Q, Wyvekens N, Khayter C, *et al.* Dimeric CRISPR RNA-guided FokI nucleases for highly specific genome editing. *Nature Biotechnology*, 2014, **32**(6): 569–576
- [62] Slaymaker I M, Gao L, Zetsche B, *et al.* Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity. *Science*, 2016, **351** (6268): 84–88
- [63] Chen J S, Dagdas Y S, Kleinstiver B P, *et al.* Enhanced proofreading governs CRISPR-Cas9 targeting accuracy. *Nature*, 2017, **550**(7676): 407–410
- [64] Carlson-Stevermer J, Abdeen A A, Kohlenberg L, *et al.* Assembly of CRISPR ribonucleoproteins with biotinylated oligonucleotides *via* an RNA aptamer for precise gene editing. *Nature Communications*, 2017, **8**(1): e1711
- [65] Yin H, Song C Q, Dorkin J R, *et al.* Therapeutic genome editing by combined viral and non-viral delivery of CRISPR system components *in vivo*. *Nature Biotechnology*, 2016, **34**(3): 328–333
- [66] Brunetti L, Gundry M C, Kitano A, *et al.* Highly efficient gene disruption of murine and human hematopoietic progenitor cells by CRISPR/Cas9. *Journal of Visualized Experiments*, 2018 (134): e57278
- [67] Zuris J A, Thompson D B, Shu Y, *et al.* Cationic lipid-mediated delivery of proteins enables efficient protein-based genome editing *in vitro* and *in vivo*. *Nature Biotechnology*, 2015, **33**(1): 73–80
- [68] Kim S, Kim D, Cho S W, *et al.* Highly efficient RNA-guided genome editing in human cells *via* delivery of purified Cas9 ribonucleoproteins. *Genome Research*, 2014, **24**(6): 1012–1019
- [69] Hendel A, Bak R O, Clark J T, *et al.* Chemically modified guide RNAs enhance CRISPR-Cas genome editing in human primary cells. *Nature Biotechnology*, 2015, **33**(9): 985–989
- [70] Lee K, Conboy M, Park H M, *et al.* Nanoparticle delivery of Cas9 ribonucleoprotein and donor DNA *in vivo* induces homology-directed DNA repair. *Nature Biomedical Engineering*, 2017, **1**(11): 889–901
- [71] Qazi S, Miettinen H M, Wilkinson R A, *et al.* Programmed self-assembly of an active p22-Cas9 nanocarrier system. *Molecular Pharmaceutics*, 2016, **13**(3): 1191–1196
- [72] Pawluk A, Amrani N, Zhang Y, *et al.* Naturally occurring off-switches for CRISPR-Cas9. *Cell*, 2016, **167**(7): 1829–1838e1829
- [73] Rauch B J, Silvis M R, Hultquist J F, *et al.* Inhibition of CRISPR-Cas9 with bacteriophage proteins. *Cell*, 2017, **168**(1–2): 150–158e110
- [74] Dong, Guo M, Wang S, *et al.* Structural basis of CRISPR-SpyCas9 inhibition by an anti-CRISPR protein. *Nature*, 2017, **546** (7658): 436–439
- [75] Harrington L B, Doxzen K W, Ma E, *et al.* A broad-spectrum inhibitor of CRISPR-Cas9. *Cell*, 2017, **170**(6): 1224–1233e15
- [76] Rahdar M, McMahon M A, Prakash T P, *et al.* Synthetic CRISPR RNA-Cas9-guided genome editing in human cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, **112**(51): E7110–7117
- [77] Cromwell C R, Sung K, Park J, *et al.* Incorporation of bridged nucleic acids into CRISPR RNAs improves Cas9 endonuclease specificity. *Nature Communications*, 2018, **9**(1): e1448
- [78] Yin H, Song C Q, Suresh S, *et al.* Partial DNA-guided Cas9 enables genome editing with reduced off-target activity. *Nature Chemical Biology*, 2018, **14**(3): 311–316
- [79] Wang X, Wang Y, Wu X, *et al.* Unbiased detection of off-target cleavage by CRISPR-Cas9 and TALENs using integrase-defective lentiviral vectors. *Nature Biotechnology*, 2015, **33**(2): 175–178

Off-target Effect of CRISPR/Cas9 and Optimization*

GUO Quan-Juan, HAN Qiu-Ju, ZHANG Jian**

(*Institute of Immunopharmacology & Immunotherapy, Shandong University, Jinan 250012, China*)

Abstract In recent years, CRISPR/Cas9 system has rapidly become the most revolutionary gene editing tool in the field of medicine. It is the third-generation artificial endonuclease after Zinc-finger nucleases (ZFNs) and transcription activator-like effectors nucleases (TALENs), and is known as "gene scissors". CRISPR/Cas9 system relies on a synthetic single guided RNA (sg RNA) to direct Cas9 nuclease to cleave the target DNA sequence, so that it can complete genomic site editing. Based on the simplicity of design, rapid implementation, low cost and high efficiency, CRISPR/Cas9 system has been extensively studied in the fields of gene functional identification, antiviral therapy, anti-tumor therapy and immunotherapy. Although CRISPR/Cas9 system displays several obvious advantages, the risk of off-target would increase the therapeutic risks, hinder research and clinical application, which should not be ignored. How to reduce the off-target effects and increase mutation efficiency simultaneously as we use CRISPR/Cas9 gene editing technology? This will be an urgent problem for scientists to explore CRISPR/Cas9 technology and expand its clinical application in the future. Here, we briefly introduce the composition, mechanism and application of CRISPR/Cas9 system, and give a comprehensive introduction of the off-target effect which is widely concerned in this field at present, and summarize the optimization strategies to provide references for researchers.

Key words gene editing, CRISPR/Cas9, off-target effects, single-guide RNA

DOI: 10.16476/j.pibb.2018.0013

* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (81373222, 81172789), Shandong Provincial Key Research and Development Program(2017GSF18159) and Shandong Provincial Natural Science Foundation, China(ZR2017BH029).

**Corresponding author.

Tel: 86-531-88383781, E-mail: zhangj65@sdu.edu.cn

Received: May 8, 2018 Accepted: May 30, 2018