

中国科学院学部 科学与技术前沿论坛简报 第 67 次

学部工作局学术与文化处
《中国科学》杂志社 编报

2018 年 1 月 3 日

“基因编辑”科学与技术前沿论坛综述

基因编辑一直是基因工程研究的重点。靶向基因编辑技术能够有效地应用于人类疾病的动物模型建立、动植物新品种的培育、遗传疾病的基因治疗等领域。Mario Capecchi 在 20 世纪 80 年代利用细胞内在的同源重组机制，将含有同源序列的外源 DNA 片段导入细胞，使其定点整合到基因组的特异位点，开启了靶向基因编辑之门。靶向基因编辑技术与胚胎干细胞技术的结合，催生了基因敲除动物模型的建立，极大地促进了生命科学基础研究的发展，也给生物医学、个体治疗带来了曙光。为发展这一技术作出重大贡献的三位科学家 Mario Capecchi、Martin Evans 和 Oliver Smithies 获得了 2007 年诺贝尔生理学或医学奖。

传统的基因编辑技术主要依赖自然发生的同源重组，这一过程在大多数物种和细胞类型中发生频率极低，极大地限制了基因编辑技术的应用。20 世纪 90 年代，研究发现，DNA 双链断裂能够引发 DNA 的修复活动，这使得基因靶向编辑效率大大提高，催生了核酸酶技术。目前应用最为广泛的核酸酶有锌指核酸酶（zinc finger nucleases，

ZFN)、类转录激活样效应因子核酸酶 (transcription activator-like effector nucleases, TALEN)、规律成簇间隔短回文重复序列 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR/Cas) 系统。

ZFN 是最先应用的靶向核酸酶之一, 科学家们应用其进行了多种实验策略和应用方向的探索, 并进行了临床应用的尝试, 这为后来出现的 TALEN 和 CRISPR/Cas 系统研究提供了重要借鉴。但是, ZFN 的构建耗时耗力, 构建费用较高, 不能针对任意靶点设计, 且存在一定的脱靶效应, 限制了 ZFN 的应用。

TALEN 技术较 ZFN 技术有巨大的进步。有系统的载体构建方案, 在一般的分子生物学实验室即可完成。而且, TALEN 识别位点选择范围非常广, 唯一的限制是在识别位点前的第一个碱基必须是“T”。TALEN 介导的基因编辑技术目前已经广泛应用于植物遗传育种及在体基因治疗, 对生物医疗产生了广泛而深入的影响。但是 TALEN 也有局限性, 存在一定的脱靶效应。由于 TALEN 蛋白的编码序列较长, 因此如何有效地将 TALEN 表达载体输送到疾病相关细胞中也是 TALEN 在疾病治疗应用方面需要解决的重要问题。

CRISPR/Cas 系统因其简单的组成成分和设计, 一经发现便受到了极大关注。目前已经在体外培养的细胞以及多种模式动物, 包括猪、猴子等大动物中实现了靶向基因修饰。CRISPR/Cas 系统也存在一定的弊端: 首先, 其切割位点必须含有 PAM (protospacer adjacent motif), 限制了 Cas9 系统对任意序列进行切割; 其次, 20 bp 的识别位点的特异性有限, 可能造成较高的脱靶效应。

近年来, 基因组编辑领域连续取得突破性进展, 尤其 CRISPR 的问世大大降低了基因组编辑技术的门槛, 迅速地给生命科学基础研究、疾病治疗、微生物改造、动植物遗传改良及育种技术等方面带来了一场颠覆性的革命, 生命科学的研究已从“基因组时代”向“基因组编辑时代”迈进。

一、论坛简介及背景

2017年9月24日，由中国科学院学部和中国遗传学会基因组编辑分会主办、以“基因编辑”为主题的第67次科学与技术前沿论坛暨中国遗传学会基因组编辑分会成立大会在北京举办。本次活动由中国科学院院士、中国遗传学会名誉理事长李家洋担任大会主席，中国科学院院士、中国科学院动物研究所所长周琪和中国科学院遗传与发育生物学研究所研究员高彩霞共同担任大会执行主席。会上，李家洋院士和周琪院士分别致辞，李家洋院士宣布中国遗传学会基因组编辑分会成立。高彩霞研究员、周琪院士、昆明理工大学季维智教授、北京大学魏文胜教授分别主持了论坛4个阶段的报告，周琪院士主持了专家组讨论。论坛围绕“技术研发及基础研究”、“医药及动物应用”、“植物应用及其他”三个方面的议题展开报告和讨论。包括美国科学院院士 Dana Carroll、朱健康在内的14位中外专家作了报告，来自国内90余家院校、研究机构 and 企业的500余位专家学者和研究生参加了本次大会。

近年来，我国已经在基因编辑研究和应用方面取得了一系列重要进展，为解决基础研究、工农业生产和人口健康的重大需求奠定了良好的基础。然而总体来看，我国基因编辑研究与美国相比仍有较大差距，尤其是在基因编辑源头技术的开发上比较薄弱，导致我国核心技术专利持有不足，未来可能会限制相关的转化应用。同时，鉴于美国和欧洲发达国家在基因编辑研究方面的长期积累和巨大投入，新一轮的激烈竞争已经开始。我们需要探讨国家应该如何政策引导和科技布局方面对基因编辑研究进行大力支持，从而充分发挥基因编辑研究在国家安全、人口健康和生物产业升级中的重要作用。

本次举办以“基因编辑”主题的科学和技术前沿论坛，旨在推动我国基因编辑技术的研发及其在生命科学基础研究、农业畜牧业育种以及基因治疗等领域的应用，防范基因编辑研究可能带来的生物安全

风险和伦理争议，推动我国在基因编辑技术应用和监管方面的政策规范制定，提升我国在基因编辑相关科学前沿、重大应用及下游产业化等领域的国际竞争力。

二、论坛报告概述

（一）Dana Carroll（犹他大学医学院）：以可设计核酸酶进行基因组编辑

尽管人类利用靶向核酸酶进行基因组编辑的历史相对比较短暂，但仍取得了令人震惊的进展。报告简要回顾了 ZFN、TALEN 以及 CRISPR 技术发展的历史。这些技术均基于对基因组 DNA 实施靶向双链断裂。随后出现的非同源末端连接（NHEJ）造成的突变、同源指导修复（HDR）导致的序列替代，以及更为复杂的结果，则取决于细胞活性以及人们对此的驾驭能力。报告还阐述了基因组编辑技术在人类疾病治疗中的潜在应用，并探讨了该技术可能引发的一些社会问题。

（二）季维智（昆明理工大学灵长类转化医学研究院）：灵长类基因编辑与人类疾病研究

人类面临很多复杂疾病的困扰，其中一个重要原因是缺乏理想的动物模型帮助研究人员对疾病机制进行深入理解。由于遗传背景与人类高度相似，非人灵长类被认为是复杂疾病的理想动物模型。靶向基因编辑技术大大提高了灵长类动物基因修饰的效率。我国率先实现了灵长类动物的靶向基因编辑，并进一步证实基因编辑灵长类动物与人类有十分相似的疾病表型，这些研究为探讨致病机制和治疗奠定了良好的基础。然而，灵长类靶向基因编辑仍面临改进技术以提高效率的问题。另外，靶向基因编辑技术已在人类胚胎进行了尝试。但是，由于理论和技术的限制，利用基因编辑技术治疗人类疾病仍面临安全性和有效性的检验。因此，靶向基因编辑灵长类动物将发挥重要的桥梁作用。

（三）魏文胜（北京大学生命科学学院）：生物学研究中的功能大数据

课题组在前期工作中利用 CRISPR/Cas9 系统开发了高通量筛选法，这一方法已被广泛应用于编码基因的功能研究；利用慢病毒 paired-guide RNA (pgRNA) 库建立了首个高通量筛选策略，用于长链非编码 RNA (lncRNAs) 的功能研究。最近，开发了一个用于在基因组范围内筛选 lncRNAs 的新方法，这一高通量方法可用于研究拓扑相关结构域和活性染色质中心的功能，以及快速绘制癌症药物靶位图。在未来的研究（尤其是与癌症相关的研究）中，这些高通量策略将帮助人们准确、快速地识别功能基因组元件。

（四）黄行许（上海科技大学生命科学与技术学院）：向在体精准基因组编辑迈进

建立基因靶向动物模型的传统方法是，对全能胚胎干细胞进行同源重组，然后显微注射入囊胚。这种方法费时、费力、成本高，而且受制于胚胎干细胞系，仅适用于大鼠和小鼠。利用 ZFN、TALEN 和 CRISPR/Cas9，可通过原核显微注射对动物基因组进行打靶操作。课题组利用 CRISPR/Cas9，通过对单细胞期胚胎共注射 Cas9 mRNA 和 sgRNAs，在小鼠、大鼠、猪、山羊和猴子中实现了高效的基因靶向操作。同时，还研发了 Cas9-切口酶/双 sgRNAs 策略，以最大限度地减少在动物模型建立过程中出现的脱靶突变。目前，正在研究将 Cas9 扩展应用于 T 细胞和人类胚胎。

（五）王艳丽（中国科学院生物物理研究所）：C2c2 在 crRNA 引导的 RNA 切割中的研究

CRISPR/Cas 系统是由 RNA 引导的、原核细胞的适应性免疫系统。其中由 RNA 引导的 DNA 内切核酸酶 Cas9、Cpf1 和 C2c1 已成为良好的基因组编辑工具。相比之下，C2c2 蛋白缺乏与任何已知 DNA 核酸酶结构域的同源性，却带有两个 HEPN 结构域。此外，C2c2 具有

两种不同的 RNase 活性,可调节 crRNA 成熟和由 crRNA 引导的 RNA 切割。为了揭示 crRNA 前体处理以及 crRNA 引导的 C2c2 切割单链 RNA 的作用机理,课题组解析了 C2c2 与 crRNA 复合体的晶体结构,以及未结合 RNA 的 LshC2c2 结构。结果显示,C2c2 中的 REC 单元具有一个 Helical-1 结构域,NUC 单元具有两个 HEPN 结构域。进一步研究发现,crRNA 和靶点 RNA 配对可以激活 HEPN 的 RNA 酶活性。这些结果不仅可更好地理解序列特异 RNA 识别与 RNA 引导的 Cas13a 非特异切割之间的基本分子关联,还阐明了 VI 型 CRISPR/Cas 系统中的 Cas13a 如何抵抗 RNA 噬菌体,从而有助于将其开发成为 RNA 操作工具。

(六) 黄志伟 (哈尔滨工业大学生命科学与技术学院): 以抗 CRISPR 蛋白抑制 CRISPR-SpyCas9 活性的机制

CRISPR/Cas 系统对于古细菌和诸多细菌抵抗噬菌体感染具有重要作用。前人的研究将 SpyCas9 (一种应用最广泛的 Cas9) 与一种合成的 single-guide RNA (sgRNA) 组合,形成双组分可设计系统,用于在多种有机体中对基因组进行操作。为了研究 AcrIIA4 直接抑制 SpyCas9 活性的分子机制,课题组纯化出了 SpyCas9-sgRNA-AcrIIA4 复合物。研究发现,AcrIIA4 通过模拟 PAM 占领 PI 区域中的 PAM 结合位点,阻断了 dsDNA 底物的 SpyCas9 识别,进而拮抗 SpyCas9 的活性。此外,AcrIIA4 与 RuvC 活性位点的接触也加强了 AcrIIA4 对 SpyCas9 的抑制作用。研究揭示了 AcrIIA4 抑制 SpyCas9 活性的作用机理,为设计时间、空间特异性或条件性精确控制 SpyCas9 基因编辑活性的工具提供了结构基础。

(七) 李劲松 (中国科学院上海生命科学研究院,生物化学与细胞生物学研究所): 生殖干细胞介导的基因编辑

哺乳动物生殖干细胞和 CRISPR/Cas9 技术的建立为生命科学研究提供了新的工具。已有的生殖干细胞有两类:一是能代替精子使用

的孤雄单倍体胚胎干细胞；二是精原干细胞。2012年，研究建立了只携带精子来源遗传物质的小鼠孤雄单倍体胚胎干细胞，并证明这一细胞可代替精子在注入卵母细胞后能支持胚胎发育产生健康的半克隆小鼠，即半克隆技术。然而，单倍体细胞的“受精”能力随着细胞的传代逐渐丢失，特别是经过基因编辑后，这些细胞再注入卵子中很难获得健康半克隆小鼠。近期，通过将调控雄性印记基因 *H19* 和 *Gtl2* 表达的 H19-DMR 和 IG-DMR 敲除后获得了能稳定产生半克隆小鼠的“人造精子”。与 CRISPR-Cas9 技术结合，“人造精子”介导的半克隆技术可以实现：（1）一步获得携带多基因突变的杂合小鼠模型，用于模拟人类多基因介导的复杂疾病；（2）快速获得携带人类疾病相关点突变小鼠用于研究疾病发生的分子机制；（3）一步获得针对不同基因的突变小鼠，实现小鼠个体水平的遗传筛选，便于从大量候选基因中快速筛选出重要基因进行深入研究；（4）建立携带蛋白标签敲入的“人造精子”，进而获得携带蛋白标签的小鼠，为实现全基因组蛋白标签计划（genome tagging project, GTP）提供技术保障。精原干细胞已经在小鼠等物种中建系，并能在体外长期稳定传代且具有产生配子的能力。与 CRISPR/Cas9 技术结合，精原干细胞可以用于：（1）治疗雄性遗传疾病，使得后代完全不携带遗传缺陷；（2）开展减数分裂与精子发生的研究。

（八）李伟（中国科学院动物研究所）：基因编辑在生殖和发育生物学研究中的应用

除了作为一个革命性的工具之外，基因编辑技术另一个重要意义是对改造基因组的理念带来了革命性变化。如果可以轻易地改变包括人类在内的众多物种的若干基因，是否可以对基因组进行更大范围的改造？改造后的基因组将在何种程度上影响和改变生命表型？将给人类带来哪些应用？同时，基因编辑技术的便捷性使其可以轻易地与干细胞技术、克隆技术等结合来实现对生命体的改造，甚至创造出新

的高等生命个体。这一切，会拓展对生命的认知，加深对生命本质的理解。报告介绍了利用基因编辑技术开展不同物种生殖发育研究的工作经历，以及结合基因编辑技术和干细胞技术解析基因组印迹功能、实现小鼠“同性”生殖，建立和应用融合了不同物种的基因组的新型胚胎干细胞等研究，探讨基因编辑和基因组改造在生殖发育研究中的应用。

（九）李大力（华东师范大学）：基因编辑-模型构建与疾病治疗的新策略

目前全球已知罕见病超过 7000 种，虽然患者人群相对不大，但 95%的病种都没有有效的治疗方案。这些罕见病中 80%以上与基因突变直接相关，超过一半的患者在未成年时期即发病，严重影响患者健康和生命，也给家庭和社会带来沉重负担。基因治疗是治疗遗传疾病的希望，在近几年取得了令人振奋的进展，但是通过外源过表达野生型基因以替代突变基因的传统方法仍然存在一些问题。目前常用的用于基因治疗的载体主要是重组逆转录病毒和腺相关病毒。前者由于在宿主细胞中随机整合，虽然表达时效高但是存在产生肿瘤的风险。后者虽然安全性更高，但是大多数病毒以游离基因的形式存在，在分裂细胞中很容易丢失失去治疗效果。如何在基因组中定点整合实现突变基因的修复或者外源正常基因的稳定表达，一直是基因治疗研究的重点和难点。基因编辑技术的出现使高效基因组精确改造成为可能。利用 TALEN 和 CRISPR/Cas9 体系，快速构建多种模拟人类遗传疾病致病突变的小鼠和大鼠模型，继而采用基因编辑方法，通过病毒导入 Cas9/sgRNA 和重组修复模板，在活体小鼠中实现原位修复基因突变，治愈多种遗传疾病。然而基因编辑用于疾病治疗还存在很多技术和实际操作问题，例如 AAV 病毒导入效率有限、重组修复效率较低，更重要的是编辑工具存在较高的脱靶风险。虽然基因编辑应用于遗传疾病的临床治疗还有很长的路要走，但近年的研究已经让人们看到基因

编辑技术不但能够快速构建遗传疾病模型，验证致病突变，而且通过定点整合可以安全、稳定表达功能基因，为实现一次治疗终身治愈疾病带来了希望。

(十) 刘光慧 (中国科学院生物物理研究所): 利用干细胞及基因编辑技术研究和治疗衰老相关疾病

儿童早衰症 (HGPS) 和沃纳综合征 (WS) 是人类两种早老性疾病。关于遗传改变如何导致细胞和机体早老化表型的研究，将为阐明生理性衰老的分子机制提供线索，并有助于理解健康型衰老的分子通路。课题组从 HGPS、帕金森氏病 (PD)、肌萎缩侧索硬化症 (ALS)、范科尼贫血 (FA) 和着色性干皮病 (XP) 患者的成纤维细胞生成诱导多能干细胞 (iPSCs)，利用靶向基因修正技术，成功修正了 HGPS-iPSCs 中突变的 *LMNA*，PD-iPSCs 中突变的 *LRRK2*，FA-iPSCs 中突变的 *FANCA*，以及 ALS-iPSCs 中突变的 *SOD1* 和 *FUS*。通过靶向“敲除”和“敲入”技术，生成了 WS、FA、PD 和 GBM (多形性胶质母细胞瘤) 特异的、带有相关致病突变的人干细胞。当这些疾病特异多能干细胞分化为特异体细胞类型时，后者再现了与老化/疾病相关及组织特异的表型缺陷。这些工作为研究老化/疾病机制和开发新疗法提供了重要平台。

(十一) Jens Boch (汉诺威莱布尼兹大学植物遗传学研究所): 类转录激活因子样效应物的天才故事

TALE 是来源于植物病原菌——黄单胞杆菌的 DNA 结合蛋白，其结合域通常由包含 34 个氨基酸残基的重复模块串联而成。TALE 具有简单和模块化的结构，可以很轻松地实现其重复序列的重排，从而产生具有任意 DNA 结合特异性的人工蛋白。TALEN 已成功地应用于许多有机体的基因组编辑，以及精准切割给定的 DNA 序列。在自然界，存在少量不是 34 个氨基酸长度的 TALE 重复序列。这些序列可以被插入或者剔除重复阵列，从而实现靶盒结合，大大提高 TALE 功

能的灵活性。人们利用大多数天然 TALE 对靶序列插入和剔除的敏感性，通过 TALEN 编辑，使水稻作物对黄单胞杆菌感染产生抗性。这一思路在生产广谱抗黄单胞杆菌作物、保护主要粮食作物中，扮演着重要角色。

（十二）高彩霞（中国科学院遗传与发育生物学研究所）：利用基因组编辑技术对植物进行精准育种操作

基因组编辑技术通过直接引入精准、可预见的修饰来加速植物育种，其中 CRISPR/Cas9 系统和 TALEN 已成功应用于靶向基因组修饰，包括突变、插入、替换和染色体重排。课题组研发了简单、高效的基因组编辑方法，通过瞬时表达 CRISPR/Cas9 的 DNA、RNA 或者 RNP 的方式，实现了小麦植株从愈伤组织的再生。这三种方法在生成 T₀ 代特异靶向非转基因突变中十分有效，已通过 6 个不同的小麦基因得到了验证。最近，课题组建立了一个植物碱基编辑操作流程，适用于在小麦、水稻、玉米基因组中引入靶向点突变。这些方法可在基因组编辑的农作物生产中广泛应用，并且具有良好的商业前景。

（十三）朱健康（中国科学院上海植物逆境生物学研究中心）：基因编辑技术在植物功能基因组学研究和精准分子育种中的应用

基因编辑技术依赖于核酸内切酶在靶位点产生双链断裂（DSB）。在细胞中，双链断裂的修复通过容易产生异常的非同源末端连接（NHEJ）和同源指导修复（HDR）通路完成，分别导致突变和序列替换。在广泛应用的 CRISPR/Cas9 系统中，内切核酸酶 Cas9 在 CRISPR 小 RNA 的引导下，对兴趣 DNA 序列进行打靶。报告重点介绍了在植物功能基因组学研究中，如何利用 CRISPR/Cas9 和 CRISPR/Cpf1 产生突变等位基因。同时指出，基于 CRISPR/Cas9 的碱基编辑和基因打靶，可作为作物精准分子育种的强大工具。

（十四）刘耀光（华南农业大学生命科学学院）：高效的植物基因组编辑技术工具箱及其在水稻基因功能和遗传改良的应用

基因组编辑技术对作物基因功能研究和遗传改良具有重要的作用。**CRISPR/Cas9** 基因组编辑系统具有操作简单和效率高等优点。通过研究，开发出一套高效的 **CRISPR/Cas9** 植物多靶点编辑载体系统，可以对单子叶和双子叶植物的多个基因同时进行高效的定点突变。此外还开发出一个“一站式”基因编辑设计和突变分析的在线软件工具包 **CRISPR-GE** (<http://skl.scau.edu.cn/home/>)，大大方便对目标靶点的设计筛选、脱靶效应评估、引物设计，以及靶点突变序列的测序分析。这些载体和软件工具已得到国内外的广泛利用。利用这套工具对水稻的许多功能基因开展研究，阐明了多个水稻育性基因的功能，以及对水稻的多种重要性状进行了遗传改良。

三、交流和研讨

基因编辑技术如何快速落地并转化为生产力，如何在农业生产及健康医疗等领域惠及于民，是既具现实性又具前瞻性的问题，与会专家对该议题展开了广泛而深入的讨论。

在农业生产方面，与会专家对如何推进基因编辑在农作物遗传性状改良中的应用，提出了切实可行的方案，如“一站式”基因编辑工具包的开发。专家们表示，在农业生产方面，基因编辑不涉及伦理问题，也不存在脱靶的安全隐患问题，因此在技术层面不存在生产转化的壁垒。目前农业部针对基因编辑的相关法律法规还在进一步完善，国家在该领域态度积极，在不久的将来将出台详细的农业生产相关基因编辑技术的法律法规，届时将迅速推进基因编辑农产品的市场化。

针对医疗健康领域中基因编辑的应用，与会专家深入讨论了伦理问题及安全性问题。专家们指出，医疗革新正在逐渐展开，基因治疗任重道远，急需国家出台一系列的政策、法规和条例来规范和引导，使得基因编辑在中国实现可持续健康发展。此外，与会专家针对学术风气及科学文化培养等方面进行了讨论，指出科学是严谨的，中国需要在国际上表明自己的态度。

在基础科研方面，与会专家提出了利用基因编辑开展基因调控组及 RNA 编辑研究的建议；对如何减少 CRISPR 系统的脱靶效应，提出了许多可行的建设性意见，如抑制蛋白的开发等工作；对如何快速有效制备人类疾病的动物模型，尤其是非人灵长类动物模型，提出了明确的方案。在临床转化方面，与会专家前瞻性地对基因编辑及在体基因治疗的前景进行了展望，对在体基因治疗设计的伦理及安全性等问题进行了深入讨论，此外，如何将基因编辑应用于免疫系统疾病、辅助生殖以及抗衰老等领域，也是极具挑战性的，与会专家对此也提出了新的对策。

专家们指出，总体来看，我国基因编辑研究在源头技术开发等方面仍然存在诸多不足，亟需更多的科研支持与投入，建议国家加大对基因编辑研究的投入，支持基因编辑技术以及相关领域的原创性研究，鼓励对国家迫切需求的相关技术的攻关，推动相关领域技术的最终应用和实践。同样，基因编辑技术研究应以国家长远发展和需求为基础，以实际应用为导向，充分利用我国包括多样的微生物和灵长类动物等在内的基础研究资源，团结基因编辑相关的各个研究领域，以前期的转基因研究为借鉴，在基因编辑的源头进行大量原创性的研究，建立更高通量的平台及数据库，保证基因编辑的安全性、有效性和精准性，在人类重大疾病治疗和植物性状的改良上做出长足有效的成绩。与会专家一致认为，中国遗传学会基因组编辑分会的成立为广大基因组编辑工作者建立了一个学术交流平台，将有力地推动我国基因组编辑研究的有序健康发展。

（作者：王加强，博士后，中国科学院动物研究所，干细胞与生殖生物学国家重点实验室；万海峰，助理研究员，中国科学院动物研究所，干细胞与生殖生物学国家重点实验室；周琪，中国科学院院士，中国科学院动物研究所，干细胞与生殖生物学国家重点实验室）