

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2018.17.043

CRISPR-Cas 基因编辑技术的研究进展 *

赵 宁^{1,2,3} 李 斌¹ 史文珍¹ 史欢欢^{1,2,3} 陈 霞^{1,2,3} 高莉洁^{1,2,3} 何 芳¹

韩楠楠¹ 齐倩倩¹ 狄政莉³ 常明则¹ 张格娟¹ 田 晔^{1Δ}

(1 西安市第三医院神经内科 陕西 西安 710018; 2 延安大学医学院 陕西 延安 716000;

3 西安市中心医院 陕西 西安 710000)

摘要:对于研究基因功能和靶向修饰,基因靶向编辑技术已经成为最重要的基因工具。成簇规律间隔短回文重复序列-成簇规律间隔短回文重复序列关联蛋白(clustered regularly interspaced short palindromic repeats-CRISPR-associated proteins, CRISPR-Cas)系统是继锌指核酸内切酶(zinc finger nucleases, ZFNs)和转录激活因子样效应物核酸酶(transcription activator-like effector nucleases, TALENs)的第三代基因定点编辑技术。CRISPR-Cas 系统广泛存在于古生菌及细菌中,是机体长期进化形成的以 RNA 引导的降解入侵病毒或噬菌体 DNA 的适应性免疫系统。通过对原核生物 CRISPR-Cas 系统进行改造,形成了以 RNA 引导的对靶细胞中特定的基因序列进行定点修饰的新一代基因编辑技术。本文就该系统的发现、分型、结构、作用机制和应用等展开讨论。

关键词:成簇规律间隔短回文重复序列 / 成簇规律间隔短回文重复序列关联蛋白;基因编辑技术;锌指核酸内切酶;转录激活因子样效应物核酸酶

中图分类号:Q78;Q812;Q-33 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2018)17-3396-05

Research Advances on CRISPR-Cas Genome Editing Technology*

ZHAO Ning^{1,2,3}, LI Bin¹, SHI Wen-zhen¹, SHI Huan-huan^{1,2,3}, CHEN Xia^{1,2,3}, GAO Li-jie^{1,2,3}, HE Fang¹, HAN Nan-nan¹,

QI Qian-qian¹, DI Zheng-li³, CHANG Ming-ze¹, ZHANG Ge-juan¹, TIAN Ye^{1Δ}

(1 Neurology of XI'AN NO.3 Hospital, Xi'an, Shaanxi, 710018, China; 2 School of Medicine, Yan'an University, Yan'an, Shaanxi,

716000, China; 3 Xi'an Central Hospital, Xi'an, Shaanxi, 710000, China)

ABSTRACT: For the study of gene function and targeted modifications, gene-targeted editing technology has become the most important genetic tool. The clustered regularly interspaced short palindromic repeats-CRISPR-associated proteins (CRISPR-Cas) system is a third-generation genome site-specific editing technology for zinc finger nucleases (ZFNs) and transcription activator-like effector nucleases (TALENs). The CRISPR-Cas system is widely found in the archaea and bacteria, it is a long-term evolution of body's adaptive immune system by RNA-directed degradation of invasive virus or phage DNA. By modifying the prokaryotic CRISPR-Cas system, a new generation of gene editing technology that is guided by RNA and target for specific gene sequences in target cells was formed. Here, we discuss the discovery, classification, structure, mechanism and application of the system.

Key words: CRISPR-Cas; Genome editing technique; ZFNs; TALENs

Chinese Library Classification(CLC): Q78; Q812; Q-33 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2018)17-3396-05

前言

20 世纪 70 年代,重组 DNA 技术的发展标志着生物学一个新时代的开始,这使得研究基因并且利用它们发展新药物及生物技术成为可能。早期,人们利用同源重组(homologous recombination, HR)的技术对生殖干细胞进行基因编辑,生成基因敲入和基因敲除的动物模型;然而,由于效率低(10-6-10-9)并且在大部分物种中难以应用,因此大部分基因靶向实验面临

极大地挑战^[1,2];随后,出现的人工设计核酸酶基因编辑技术对多种真核生物进行精确靶向修饰。核酸酶能定点产生 DNA 双链断裂(DNA double-stranded break, DSB),DSB 可通过细胞 DNA 修复机制改变目的基因。DNA 修复途径^[3]包括两种:同源重组修复(homology-directed repair, HDR)和非同源末端连接(nonhomologous end-joining, NHEJ),HDR 是利用外源 DNA 修复模板与靶位点重组,从而引入特定的点突变或插入所需的序列,但在缺乏外源修复模板时,细胞会通过 NHEJ 途径进行

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81660210);陕西省科技攻关计划项目(2014K11-03-02-04);陕西省社会发展科技攻关项目(2016SF-173);西安市科技计划项目(2017114SF/YX008(3));西安市卫生和计划生育委员会科技项目(J201701002)

作者简介:赵宁(1992-),硕士研究生,主要研究方向:缺血性脑血管病的分子机制及其治疗,

E-mail: m18292897960@163.com, 电话:18292897960

Δ 通讯作者:田晔,硕士生导师,教授,主要研究方向:缺血性脑血管病的分子机制及其治疗,

E-mail: chhty@sina.com, 电话:13519131549

(收稿日期:2018-03-12 接受日期:2018-04-10)

DNA 修复。目前制造靶向 DSB 的方法主要有:归巢核酸内切酶(homing endonucleases, HEs)、ZFNs、TALENs 和 CRISPR。与真核生物中 RNA 干扰原理相似,CRISPR 是以一段 RNA 为引导,核酸酶识别外源核酸并切断,从而沉默外源基因表达。CRISPR 系统以设计操作简便、编辑高效以及通用性广,成为新一代最重要的基因编辑技术。本文主要从下面几个方面讨论该技术:

1 CRISPR-Cas 系统的发现

1987 年,Nakata 等在研究大肠杆菌碱性磷酸酶同工转化酶时发现一段特殊序列:在 iap 基因 3' 末端侧翼区存在长度为 29 nt 的 5 种高度同源的重复序列,并被间隔序列(长度为 32 nt)隔开^[4]。进一步研究发现这种序列存在于 90% 古生菌和超过 40% 的细菌^[5]中,为了统一描述间隔重复序列的微生物基因座,

Jansen^[6]等人将其命名为 CRISPR,但人们对其功能及生物学特征仍不确。最初,人们根据 Cas 蛋白结构推断:该特殊序列编码的蛋白构成了一个新的 DNA 修复系统。但后来观察到该序列的一些间隔序列与病毒或质粒基因组片段几乎相同,这使人们假设此 CRISPR-Cas 系统与抵抗外来元素有关^[7]。直到 2007 年,Barrangou 等人在研究酵母菌等抵御噬菌体感染时,首次用实验证明:原核生物已经进化形成以核苷酸为基础的免疫系统,其特异性来源于 CRISPR 间隔序列,而抵抗性归因于重复序列编码的 Cas 酶的作用^[8]。基于基因编辑中人工核酸酶(ZFNs、TALENs)越来越重要的作用,CRISPR 被推测可以成为以 RNA 为引导的、新的基因编辑技术。2013 年,Cong^[9]等首次阐明如何设计原核生物 CRISPR II 型系统对哺乳动物细胞完成基因编辑。自此,CRISPR 系统开辟了广阔的生物研究领域。

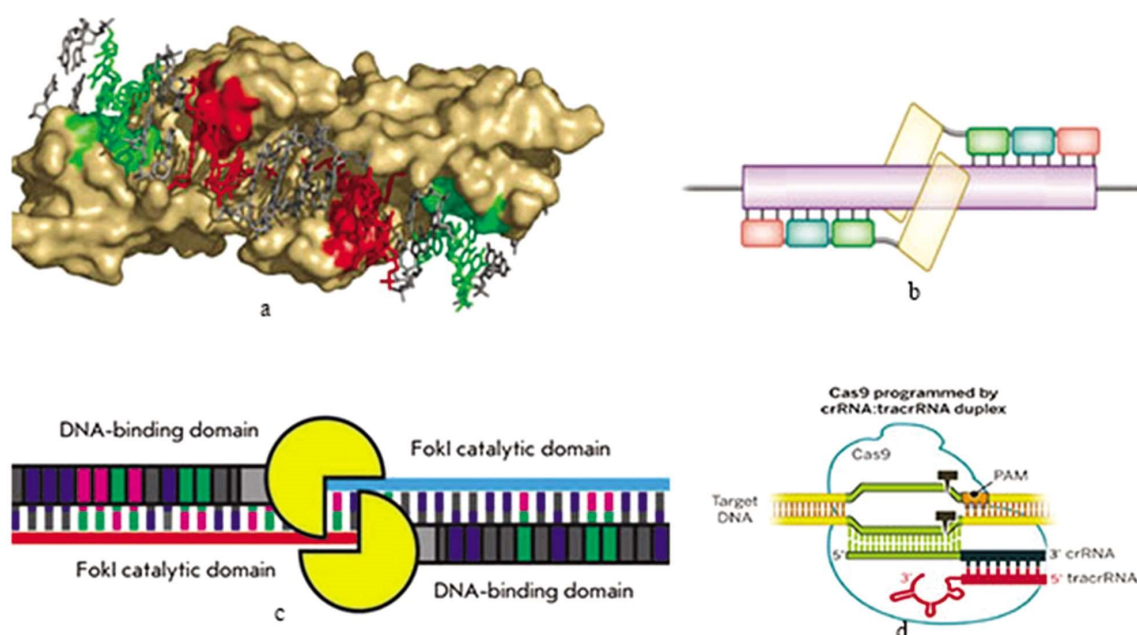


图 1 a 归巢核酸内切酶 b 锌指核酸内切酶
c 转录激活因子样效应物核酸酶 d 成簇规律间隔短回文重复序列

Fig.1 a HEs b ZFNs c TALENs d CRISPR

(上图原图 a 来源参考文献^[11],b、c、d 原图来源参考文献^[10])

2 CRISPR 与 HEs、ZFNs、TALENs 的比较

基因编辑的基础是 DNA 损伤后修复的能力^[3]。为获得有效的基因编辑,需要产生位点特异的 DSBs,目前存在 4 种 DNA 结合蛋白可被设计成核酸内切酶:来源微生物移动基因元素的 HEs、基于原核转录因子的 ZFNs、黄单胞菌的 TALENs 和原核生物的 CRISPR 系统^[10]。

HEs^[11]、锌指蛋白(zinc finger protein, ZFP)^[12]、转录激活样因子(transcription activator-like effector, TALE)^[13]都通过蛋白-DNA 结合的方式识别特异 DNA 序列(如图 1)。HEs 是将核酸酶和 DNA 结合域整合为一体,而 ZFNs 和 TALENs 由识别模块和核酸酶两部分构成,识别模块引导核酸酶靶向特定基因。一个 ZFP 模块可以识别 DNA 的 3 个核苷酸,而一个 TALE 模

块只能识别 DNA 的 1 个核苷酸。ZFP 和 TALE 组装到 Fok I 核酸酶上,对靶 DNA 实现定点切割,形成 DSBs 后进行 DNA 基因修复,完成基因编辑。然而,因 HEs 残基与其靶 DNA 缺乏明确的对应关系,导致 HEs 尚未被广泛应用于基因工程。另一方面,虽然 ZFP 和 TALE 与相应 DNA 有明确的匹配关系,但 ZFN 或 TALENs 每个模块需要设计并检测,这无疑费时费力。

作为第三代基因编辑技术 CRISPR 是由一段向导 RNA (Guide RNA, gRNA)引导,通过 Watson-Crick 碱基配对识别靶 DNA,再经 Cas 蛋白对特定 DNA 靶向切割。与 ZFP 和 TALEN 不同的是,Cas 蛋白可切割双链 DNA,而 ZFP 和 TALEN 只能产生单链断裂。有趣的是 gRNA 可被任何一段感兴趣的序列替换。因此,该技术设计的高效性及简易性使得 CRISPR 技术受到各个领域的关注。

3 CRISPR-Cas 的分型及结构

3.1 CRISPR-Cas 的分型

随着 CRISPR-Cas 系统研究的深入, Makarova[7]等人最初将其分为三型: Type I、Type II、Type III。Type I 分布于细菌和古生菌中, 标志性蛋白是 Cas3, 该酶具有解螺旋酶和核酸酶功能。Type I 的 Cas 蛋白形成 CRISPR 相关病毒防御复合物 (CRISPR associated complex for antiviral defense, Cascade), 参与 CRISPR RNAs (crRNAs) 的加工, 并为之形成核糖核蛋白复合体, 进而裂解靶基因; Type II 仅存在于细菌中, 是三型中结构最简单的, Cas9 是此型的标志性蛋白。Cas9 不但参与了 crRNA 的合成, 并且在降解外来核酸时发挥主要作用, 是一个多功能蛋白; Type III 主要见于古生菌中, 极少细菌中也有发现。Type III 被分为 Type IIIA 和 Type IIIB, Type IIIA 靶向的是 DNA, 而 Type IIIB 靶向的是 RNA。

但在 2015 年 Nature^[14]更新后的 CRISPR-Cas 分类系统中, 主要有两类: 一类包含了多亚基 crRNA 效应复合物 (例如 Type I、Type III); 二类是由单个亚单元 crRNA 效应模块构成 (例如 Type II)。由于二类 CRISPR-Cas 效应复合物结构简化, 成为研究基因编辑工具的新选择^[15]。Zhang Feng^[16]等人对二类核酸免疫系统进一步研究, 将二类从 4 个子型增至 10 个子型。

在当今基因编辑技术中, 发展最快的是来自适应性免疫系

统二类 CRISPR Type II 的 Cas9 核酸内切酶, 也是最普遍并且研究最多的酶。以下, 以 CRISPR-Cas9 为例。

3.2 CRISPR-Cas9 的结构

3.2.1 CRISPR-Cas9 基因结构 如图 2 示: CRISPR-Cas9 功能基因座包括编码 Cas 蛋白的基因操作组和编码 crRNA 的 CRISPR 重复 - 间隔序列^[17]。Cas 基因位于 CRISPR 重复 - 间隔位点附近, Cas 蛋白具有核酸酶、解旋酶、聚合酶和 RNA 结合蛋白等活性, 例如 Cas9 编码的蛋白涉及 crRNA 的生物合成及裂解靶 DNA^[7,18]。间隔序列通常来源于质粒或病毒等外来基因组元素, 这些外来基因组元素通常是邻近一短段的、保守的前间隔邻近基序 (protospacer adjacent motif, PAM)。重复序列往往是部分回文, 这是导致它形成回文的结构基础, 因其含有遭遇过外来入侵的记录被认为是种分子 "接种卡"^[19]。5' 端的反式激活 RNA (trans-activating crRNA, tracrRNA) 与 3' 端的 crRNA 通过碱基互补配对形成一个杂交分子, 该嵌合二聚体对 crRNA 的成熟是必不可少的, 并促进 Cas9 的靶向识别^[20]。现在的基因工具使用的都是将 crRNA 和 tracrRNA 融合到一体, 简称 sgRNA (single guide RNA)。前导序列主要由 300~500 bp 碱基组成, 该段序列为 AT 富集的区域, 并存在于 CRISPR 的 5' 端, 同时和第一个重复序列相连, 前导序列是新插入序列的识别位点, 也可作为启动 CRISPR 基因转录的启动子。

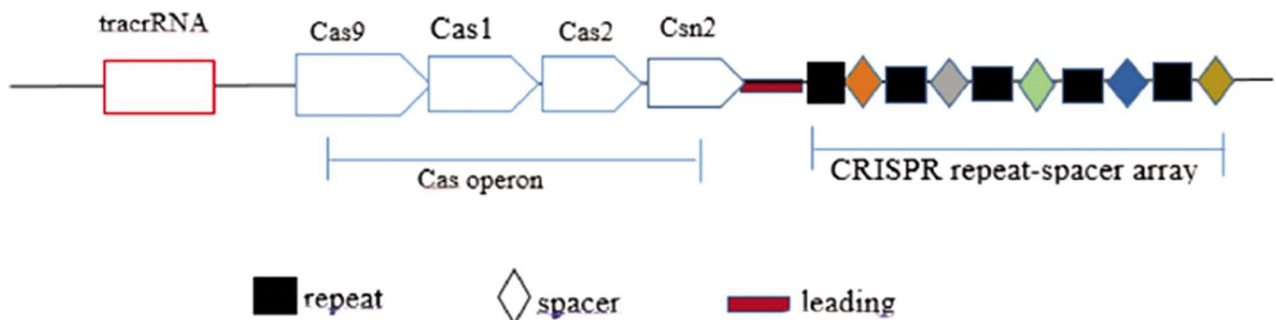


图 2 CRISPR 基因座结构

Fig.2 Genomic CRISPR locus

(上图原图来源于参考文献^[17], 已修改)

3.2.2 Cas9 晶体结构 Hiroshi Nishimasu^[21]等人发现了 Cas9 的晶体结构: 包括两叶 - 识别叶和核酸酶叶。前者对结合 sgRNA 和 DNA 是必需条件, 后者包括 RuvC、HNH、PAM 相互作用结构域, 其中 RuvC 与 HNH 是 Cas9 的两个结构域, Cas9 核酸酶是通过它的这两个结构域裂解 DNA。在 sgRNA 引导的情况下, 每个结构域都可切割靶 DNA 双链中的一条链产生粘性末端。

当这两个结构域其中一个突变时, Cas9-sgRNA 复合物只会切割一条链, 成为特异链的切口酶。D10A (Cas9NHN+/RuvC-) 是将 RuvC 结构域突变, 产生 5' 游离端 - 这是应用最普遍的 Cas9 切口酶 (Cas9n); 而 H840A (Cas9NHN-/RuvC+) 产生 3' 游离端, 已经被成功应用于大鼠模型中^[22]。Giedrius Gasiunas^[23]等人用 DNA 裂解分析证明: Cas9 的 RuvC 和 HNH 活性位点各自作用于 DNA 的 (-) 链和 (+) 链。当两个结构域都突变时, Cas9 会失去核酸内切酶的活性, 从而变成一个可设计 DNA 结

合蛋白 (dead Cas9 or dCas9), 将 dCas9 与 FokI 融合在一起形成的二聚体, 其作用类似 ZFN 和 TALEN^[14]。

4 CRISPR-Cas9 的作用机制

RNA 引导的 CRISPR-Cas9 免疫系统包括三个步骤^[4,8]: 适应、表达和干扰。

1. 适应阶段: 适应阶段是细菌第一次被感染时, 从质粒和病毒获得的外来 DNA 片段, 作为新的 spacer 整合到 CRISPR 序列上的过程。Spacer 提供序列记忆为定向抵御随后再次入侵的质粒和病毒。人们普遍认为, Cas1 和 Cas2 都参与了新 spacer 的获取, 最近报道, 新 spacer 合成和 repeat 都在插入到前导序列末端; 2. 表达: CRISPR 被转录成一段 pre-crRNA, 后者进行加工、成熟生成 crRNAs; 反义激活 CRISPR RNA (tracrRNA) 与 pre-crRNA 的 repeat 杂交形成一个嵌合体 RNA, 经过内源 RNase III 切割和加工生产成熟 crRNA。另有文献报道, crRNA

的成熟需要 tracrRNA-Cas9-RNaseIII 三聚体的共同参与;3.干扰:成熟 crRNA 装载到 Cas9 中,作为引导靶向互补的核苷酸,从而裂解再次入侵的 DNA。

5 CRISPR-Cas9 的应用

CRISPR-Cas9 系统的发展已经彻底改变了基因编辑,通过创造多数有机体和细胞的双链断裂来促进高效的基因组编辑。此外,CRISPR-Cas9 技术已成功用于多种目的,包括内源基因表达的调节、表观基因组修饰、活细胞染色体位点标记、单链 RNA 的编辑和高通量基因筛选。随着 CRISPR-Cas9 系统的普及,生成基于 CRISPR 的模型越来越多。

5.1 细胞和动物模型

将 sgRNAs 和编码 Cas9 蛋白的 mRNA 直接注射入单细胞胚胎中,已经成功被应用于大鼠、小鼠和猴子模型中,揭示了 CRISPR-Cas9 系统高效、快速修饰动物基因的潜力^[24-26];以腺体相关病毒作为载体,将 CRISPR-Cas9 系统直接转入编辑体内特定细胞,就表示可被应用于产生特定突变菌株、疾病模型和基因治疗^[27,28];来源于患者的诱导性多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs)经过认为培养分化,可用来研究体内疾病的发病机制,而 CRISPR-Cas9 可靶向发病基因为基因治疗提供有力的依据^[29]。

5.2 生物医学模型

5.2.1 肿瘤模型 越来越多的报道显示,CRISPR-Cas9 该系统可准确、快速地生成体内、体外肿瘤模型。例如:Maresch 等将 CRISPR-Cas9 系统转入成年小鼠胰腺中,对胰腺中多个基因同时编辑,造成复杂的染色体重排,成功地生成胰腺癌模型^[30];癌症是一个多步骤过程,涉及癌基因和抑癌基因的突变和其他改变。虽然基因组测序研究已经鉴定出人类癌症中的大量遗传改变。然而确定哪些突变与肿瘤发生有因果关系仍然是一个主要挑战。2014 年, Sanchez 等利用 CRISPR-Cas9 编辑 Kras(G12D)驱动的肺癌模型,对癌基因进行功能鉴定并快速生成肿瘤模型^[31]。

5.2.2 神经疾病模型 研究表明:编码电压门控 Na⁺ 通道 $\alpha 1$ 亚单位的基因 SCN1A 是与癫痫发病相关的最重要的基因之一。Liu 等应用 CRISPR-Cas9 介导的基因组编辑技术,建立 iPSC 疾病模型,探讨 SCN1A 功能缺失突变致癫痫的机制。CRISPR-Cas9 荧光标记 iPSC 衍生的 γ -氨基丁酸(GABA)能神经元发现:电压门控性钠通道亚型 NaV1.1 在 GABA 能神经元上表达,而在谷氨酸能神经元上几乎不表达^[32];Tabebordbar 等发展并检测了一种直接编辑小鼠体内肌肉基因组的方法,他们利用腺相关病毒输入 CRISPR-Cas9 系统,靶向 23 号外显子两端,导致突变的外显子缺失,这种治疗部分解决了肌肉功能缺陷^[33]。

5.2.3 心血管疾病模型 Carroll 等报道:心脏特异表达 Cas9 蛋白的转基因大鼠的模型成功被生成,Cas9 蛋白仅在该转基因大鼠心肌细胞中高表达,在其它组织细胞中未被检测。为了验证该模型是否有效,他们将靶向转基因大鼠心肌细胞特异的 Myh6 基因座 sgRNA 导入,造成这些大鼠重症心肌病和心衰,该实验提供了一种快速编辑心脏中感兴趣基因的方法^[34]。

5.2.4 传染病模型 Liao 等给人类免疫缺陷病毒(Human Immunodeficiency Virus, HIV)感染的细胞模型瞬时转染表达 CRISPR-Cas9 组件,不仅破坏了整合病毒基因组,而且为细胞

提供了长期的适应性免疫,包括新病毒感染、表达和复制^[35];Ramanan 等表明 CRISPR-Cas9 基因工程工具可以对慢性乙型肝炎病毒基因组中的保守区域进行靶向和切割,从而对病毒基因的表达和复制产生很强的抑制作用^[36]。

6 展望

在过去的 4 年里,CRISPR-Cas9 技术的巨大进步促进了基因研究的发展。最近的应用已经将 CRISPR-Cas9 系统变成了可靠和可编程的工具包。然而,在 CRISPR 应用程序中仍有一些限制有待解决。首先,如何预防脱靶效应仍是一大难题。虽然一对 Cas9 切口酶的应用已经使得脱靶有所下降,但是更进一步的提高仍是必须的。此外评估体内的脱靶效应也是困难的,但对治疗很有意义;其次,内源性细胞 DNA 修复更倾向于 NHEJ 途径。然而,与随机基因导入相比,HDR 途径对基因的精确校正具有更大的意义。因此,如何在去除非靶向基因的 NHEJ 途径,同时提高 HDR 效率,是实现基因治疗的关键。目前,由于大多数细胞系对 NHEJ 的化学抑制作用是无法耐受的,因此采用了一些策略,包括 Cas9 工程、优化实验程序和试剂;最后,Cas9-gRNA 结构的高效传递和表达将继续在不同的细胞株和生物体之间进行研究和优化。多种输入方法在小鼠模型和 iPSCs 中已被证明是有效的,但从实验到临床应用仍有很长的路要走,才能在人体内实现靶向基因校正。

参考文献(References)

- [1] Capecchi M R. Altering the genome by homologous recombination[J]. Science, 1989, 244(4910): 1288-1292
- [2] Sander J D, J K Joung. CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes[J]. Nature Biotechnology, 2014, 32(4): 347-355
- [3] Salsman J, G Delliare. Precision Genome Editing in the CRISPR Era [J]. Biochemistry & Cell Biology, 2017, 95
- [4] Ishino Y H, Shinagawa K, Makino, et al. Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in Escherichia coli, and identification of the gene product [J]. Journal of Bacteriology, 1988, 169(12): 5429-5433
- [5] Mojica F J M, E Soria, G Juez. Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria[J]. Molecular Microbiology, 2000, 36(1): 244
- [6] Jansen R, J D A V Embden, W Gastra, et al. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes [J]. Molecular Microbiology, 2002, 43(6): 1565-1575
- [7] K S M, H D H, B R, et al. Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems [J]. Nature Reviews Microbiology, 2011, 9(6): 467-477
- [8] R B, F C, D H, et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes[J]. Science, 2007, 315(5819): 1709-1712
- [9] Cong L, F A Ran, D Cox, et al. Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems[J]. Science, 2013, 339(6121): 819-823
- [10] Hsu P D, E S Lander, F Zhang. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering [J]. Cell, 2014, 157 (6): 1262-1278
- [11] Smith J, S Grizot, S Arnould, et al. A combinatorial approach to create artificial homing endonucleases cleaving chosen sequences [J]. Nucleic Acids Research, 2006, 34(22): e149

- [12] Chandrasegaran S. Recent advances in the use of ZFN-mediated gene editing for human gene therapy [J]. Cell Gene Ther Insights, 2017, 3 (1): 33-41
- [13] Zhang Z, W S Wu. Application of TALE-Based Approach for Dissecting Functional MicroRNA-302/367 in Cellular Reprogramming [J]. Methods Mol Biol, 2018, 1733: 255-263
- [14] Makarova K S, Y I Wolf, O S Alkhnbashi, et al. An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems[J]. Nature Reviews Microbiology, 2015, 13(11): 722-736
- [15] Hashemi A. CRISPR-Cas System as a Genome Engineering Platform: Applications in Biomedicine and Biotechnology [J]. Curr Gene Ther, 2018
- [16] Shmakov S, A Smargon, D Scott, et al. Diversity and evolution of class 2 CRISPR-Cas systems[J]. Nature Reviews Microbiology, 2017
- [17] Doudna J A, E Charpentier. Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9 [J]. Science, 2014, 346 (6213): 1258096
- [18] Barrangou R. CRISPR-Cas systems and RNA-guided interference[J]. Wiley Interdisciplinary Reviews Rna, 2013, 4(3): 267
- [19] Wiedenheft B, S H Sternberg, J A Doudna. RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea [J]. Nature, 2012, 482(7385): 331-338
- [20] Torres-Ruiz R, S Rodriguez-Perales. CRISPR-Cas9 technology: applications and human disease modelling [J]. Brief Funct Genomics, 2017, 16(1): 4-12
- [21] Nishimasu H, F A Ran, P H su, et al. Crystal Structure of Cas9 in Complex with Guide RNA and Target DNA [J]. Cell, 2014, 156(5): 935-949
- [22] Wiles M V, W Qin, A W Cheng, et al. CRISPR-Cas9-mediated genome editing and guide RNA design [J]. Mammalian Genome, 2015, 26(9): 501-510
- [23] Gasiunas G, R Barrangou, P Horvath, et al. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012, 109(39): 15539-15540
- [24] Shen B, J Zhang, H Wu, et al. Generation of gene-modified mice via Cas9/RNA-mediated gene targeting [J]. Cell Res, 2013, 23 (5): 720-723
- [25] Shao Y, Y Guan, L Wang, et al. CRISPR/Cas-mediated genome editing in the rat via direct injection of one-cell embryos [J]. Nat Protoc, 2014, 9(10): 2493-2512
- [26] Niu Y, B Shen, Y Cui, et al. Generation of gene-modified cynomolgus monkey via Cas9/RNA-mediated gene targeting in one-cell embryos [J]. Cell, 2014, 156(4): 836-843
- [27] Porteus M H. Towards a new era in medicine: therapeutic genome editing[J]. Genome Biol, 2015, 16: 286
- [28] Kotterman M A, D V Schaffer. Engineering adeno-associated viruses for clinical gene therapy[J]. Nat Rev Genet, 2014, 15(7): 445-451
- [29] Bartfeld S, H Clevers. Stem cell-derived organoids and their application for medical research and patient treatment [J]. J Mol Med (Berl), 2017, 95(7): 729-738
- [30] Maresch R, S Mueller, C Velkamp, et al. Multiplexed pancreatic genome engineering and cancer induction by transfection-based CRISPR/Cas9 delivery in mice[J]. Nat Commun, 2016, 7: 10770
- [31] Sanchez-Rivera FJ, T Papagiannakopoulos, R Romero, et al. Rapid modelling of cooperating genetic events in cancer through somatic genome editing[J]. Nature, 2014, 516(7531): 428-431
- [32] Liu J, C Gao, W Chen, et al. CRISPR/Cas9 facilitates investigation of neural circuit disease using human iPSCs: mechanism of epilepsy caused by an SCN1A loss-of-function mutation[J]. Transl Psychiatry, 2016, 6: e703
- [33] Tabebordbar M, K Zhu, J K W Cheng, et al. In vivo gene editing in dystrophic mouse muscle and muscle stem cells [J]. Science, 2016, 351(6271): 407-411
- [34] Carroll K J, C A Makarewich, J McAnally, et al. A mouse model for adult cardiac-specific gene deletion with CRISPR/Cas9 [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2016, 113(2): 338-343
- [35] Liao H K, Y Gu, A Diaz, et al. Use of the CRISPR/Cas9 system as an intracellular defense against HIV-1 infection in human cells [J]. Nat Commun, 2015, 6: 6413
- [36] Ramanan V, A Shlomai, D B Cox, et al. CRISPR/Cas9 cleavage of viral DNA efficiently suppresses hepatitis B virus [J]. Sci Rep, 2015, 5: 10833

(上接第 3381 页)

- [24] 于学娟,柳善刚,陈兆秋,等.3.0T 磁共振成像表观扩散系数与乳腺浸润性导管癌组织学分级及分子生物学特征的相关性[J].中华肿瘤杂志, 2014, 36(8): 606-611
Yu Xue-juan, Liu Shan-gang, Chen Zhao-qiu, et al. Correlations between MRI apparent diffusion coefficient and histological grade and molecular biology of breast invasive ductal carcinoma [J]. Chinese Journal of Oncology, 2014, 36(8): 606-611
- [25] Razek AA, Gaballa G, Denewer A, et al. Invasive ductal carcinoma: correlation of apparent diffusion coefficient value with pathological-prognostic factors[J]. NMR Biomed, 2010, 23(6): 619-623
- [26] Sahin C, Anbal E. The role of apparent diffusion coefficient values in the differential diagnosis of breast lesions in diffusion-weighted MRI [J]. Diagn Interv Radiol, 2013, 19(6): 457-462
- [27] Kato F, Kudo K, Yamashita H, et al. Differences in morphological features and minimum apparent diffusion coefficient values among-breast cancer subtypes using 3-tesla MRI [J]. Eur J Radiol, 2016, 85 (1): 96-102
- [28] 陈余,肖桂芳,李勇,等.乳腺浸润性导管癌组织中 AIB1 与 Ki67 的表达及临床意义[J].现代生物医学进展, 2016, 16(14): 2748-2750, 2659
Chen Yu, Xiao Gui-fang, Li Yong, et al. Expression of Ki67 and AIB1 in Breast Invasive Ductal Carcinoma Tissue and their Clinical Significance [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2016, 16 (14): 2748-2750, 2659
- [29] Mori N, Ota H, Mugikura S, et al. Luminal-type breast cancer: correlation of apparent diffusion coefficients with the Ki-67 labeling index [J]. Radiology, 2015, 274(1): 66-73
- [30] 谢宗玉,程流泉,杨镇,等.乳腺浸润性导管癌磁共振扩散加权成像表观扩散系数与预后因子表达的关联性分析[J].中国医学影像学杂志, 2015, 23(3): 183-187
Xie Zong-yu, Cheng Liu-quan, Yang Zhen, et al. Correlation Between Apparent Diffusion Coefficient Value on MR Diffusion-weighted Imaging and Prognostic Factors in Breast Invasive Ductal Carcinomas [J]. Chinese Journal of Medical Imaging, 2015, 23(3): 183-187