

CRISPR/Cas9 技术： 重写生命编码的重要工具

作者：姜建伟；Email: jianwei_124@163.com

CRISPR/Cas9 技术自问世以来，因其在基因编辑领域的革命性潜力而备受瞩目。2020 年，这一技术荣获诺贝尔化学奖，以表彰其开发者——法国生物化学家埃玛纽埃尔·沙尔庞捷(Emmanuelle Charpentier) 和美国化学家珍妮弗·杜德纳(Jennifer A. Doudna) 的杰出贡献。在众多基因编辑工具中，CRISPR/Cas9 系统以其前所未有的精确性、便捷性和高效性，引发了一场科学界的革命。CRISPR，即 Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats，最初在细菌中被发现，是一种古老的免疫机制，用于保护细菌免受病毒的侵害。而 Cas9 蛋白，作为 CRISPR 相关蛋白，能够借助 RNA 分子指导、精确识别并切割目标 DNA 序列，进而实现基因的定向修改。CRISPR/Cas9 技术的诞生，标志着我们对生命密码的编辑能力达到了分子层面的精准操控。然而，CRISPR/Cas9 技术的应用并非毫无争议。技术的快速发展带来了伦理、法律以及社会接受度等多重挑战。基因编辑的长期影响、潜在的“脱靶”风险以及对人类基因池可能产生的影响等问题，都要求我们在推进技术应用的同时，必须审慎考虑

其对人类社会的影响^[1-14]。

本文将综合介绍 CRISPR/Cas9 技术的发展历程、科学原理、应用实例以及面临的挑战和未来发展，旨在为读者提供一个全面且深入的技术概览，并对如何在确保伦理和安全的前提下，合理利用这一革命性技术提出思考。

1. CRISPR/Cas9 技术的发展历史

以 1987 年(CRISPR 的发现年)和 2020 年(CRISPR/Cas9 获得诺贝尔奖年)作为两个时间节点，CRISPR/Cas9 技术的发展历史可以概括为以下几个重要阶段：

1) 早期发现与命名(1987-2002)：1987 年，Nakata 研究组在大肠杆菌中偶然发现了呈规律重复的 DNA 序列，但当时未阐明其生物学意义。随后的几年里，类似序列在多种细菌中被发现。2000 年，Mojica 等将其命名为 SRSRs，2002 年，Jansen 实验室正式将其命名为 CRISPR，同时还发现了 Cas 基因。

2) 功能揭示与机制研究 (2005-2012): 2005 年, 研究组发现 CRISPR 间隔序列与噬菌体 DNA 相匹配, 进而提出其参与细菌免疫功能的假说。2007 年, Horvath 研究组首次证实了 CRISPR 在细菌免疫功能中的作用。2008 年, Oost 实验室揭示了 CRISPR 间隔序列在 Cas 蛋白协助下发挥抗病毒作用的机制。

3) CRISPR/Cas9 作为基因编辑工具的诞生 (2012-2020): 2012 年, Doudna 和 Charpentier 发现 Cas9 蛋白可利用 RNA 分子作为引导, 识别并切割特定 DNA 序列, 展现出了 CRISPR/Cas9 在基因编辑方面的巨大潜力。

4) 技术的快速发展与应用拓展 (2020- 现今): 2020 年, CRISPR/Cas9 技术荣获诺贝尔化学奖 (图 1)。2021 年, Church、张锋和 Qi 等研究组成功将 CRISPR/Cas9 系统成功应用到哺乳动物细胞中。随后, CRISPR/Cas9 技术被广泛应用于基因功能研究、遗传病治疗、农业生物技术改良等领域。

5) 新兴技术与未来展望: 近年来, CRISPR 技术不断发展, 涌现出了高保真 CRISPR 系统、碱基编辑技术、先导编辑技术等新兴技术。未来, CRISPR 技术有望在治疗遗传性疾病、提高农业生产^[1]、应对气候生态挑战等领域发挥更大作用。

2. CRISPR/Cas9 技术的原理

CRISPR/Cas9 是一种革命性的基因编辑技术, 它使科学家能够以前所未有的精确度修改 DNA 序列。CRISPR 是 “Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats” 的缩写, 而 Cas9 是一种与 CRISPR 相关的核酸酶。下面我们先介绍一些 CRISPR/Cas9 技术中的专业名词, 再介绍其步骤流程。

2.1 CRISPR/Cas9 技术专业名词

图 2 即为一个 CRISPR/Cas9 技术在编辑基因时



① 【图 1】2020 年诺贝尔化学奖得主 (图片来源于新华社)

的原理图。我们以图 2 为例, 分别介绍: CRISPR 序列、Cas9 酶、导向 RNA (gRNA)、目标识别、DNA 切割、DNA 修复。

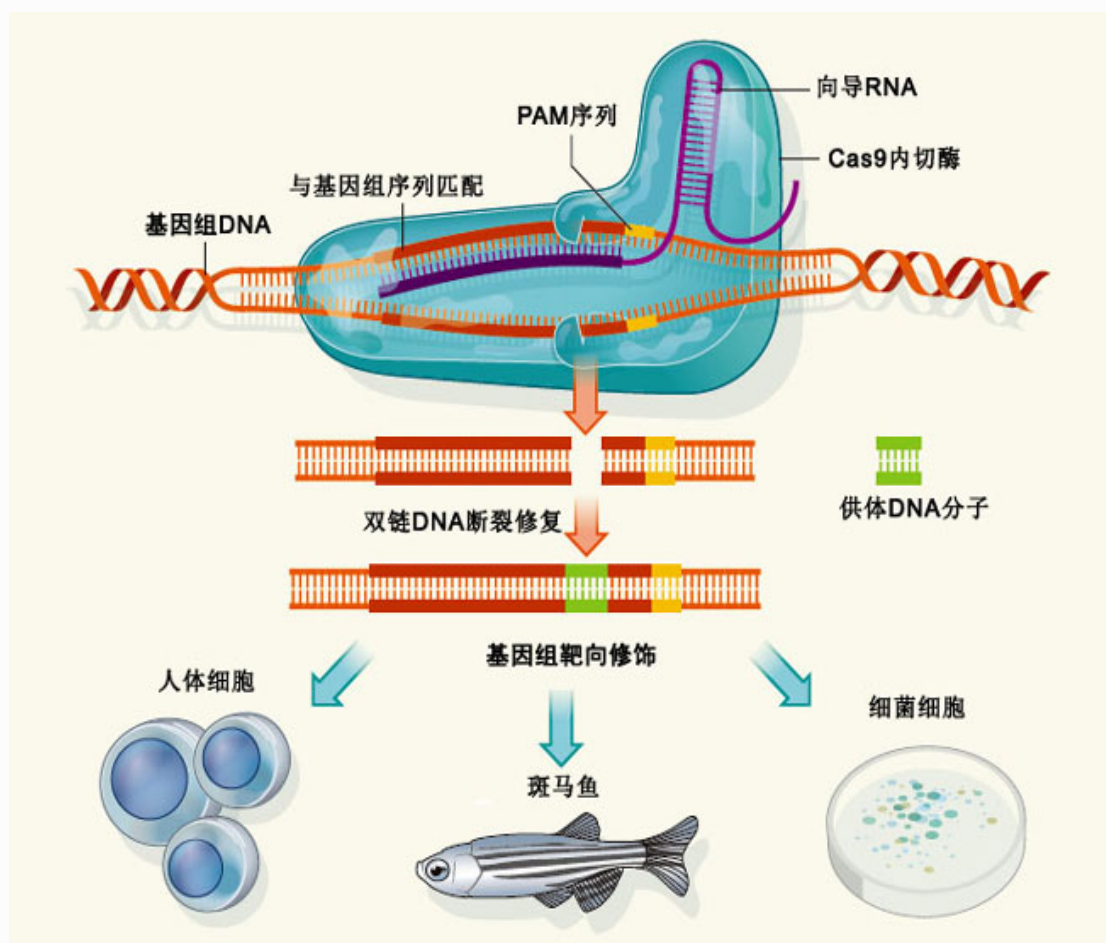
CRISPR 序列: CRISPR 是细菌基因组中的一种特殊 DNA 序列, 由重复的短序列构成, 这些序列之间被间隔区 (spacers) 分隔。这些间隔区通常来源于入侵细菌的病毒 DNA, 是细菌的一种免疫记忆。

Cas9 酶: Cas9 是一种核酸酶, 它能够切割 DNA。在 CRISPR/Cas9 系统中, Cas9 酶被用于识别并切割特定的 DNA 序列。

导向 RNA (gRNA): CRISPR/Cas9 系统中使用的小 RNA 分子, 它由 CRISPR RNA (crRNA) 和转录激活样效应 RNA (tracrRNA) 组成。gRNA 通过碱基配对的方式引导 Cas9 酶识别目标 DNA 序列。

目标识别: gRNA 的一段序列与目标 DNA 序列互补配对, 另一端与 Cas9 酶结合。当 gRNA 与 Cas9 结合后, 二者形成一个复合体, 可以识别并结合到目标 DNA 上。

DNA 切割: 一旦 Cas9-gRNA 复合体识别并结合到目标 DNA, Cas9 酶就会在特定的位点切割双链



❶ 【图 2】 CRISPR/Cas9 技术进行编辑基因时原理图^[2]

DNA，产生一个双链断裂（DSB）。

DNA 修复：细胞具备几种机制来修复这种双链断裂，包括非同源末端连接（NHEJ）和同源定向修复（HDR）。通过设计特定的修复模板，科学家可以利用这些机制来插入、删除或替换特定的基因序列。

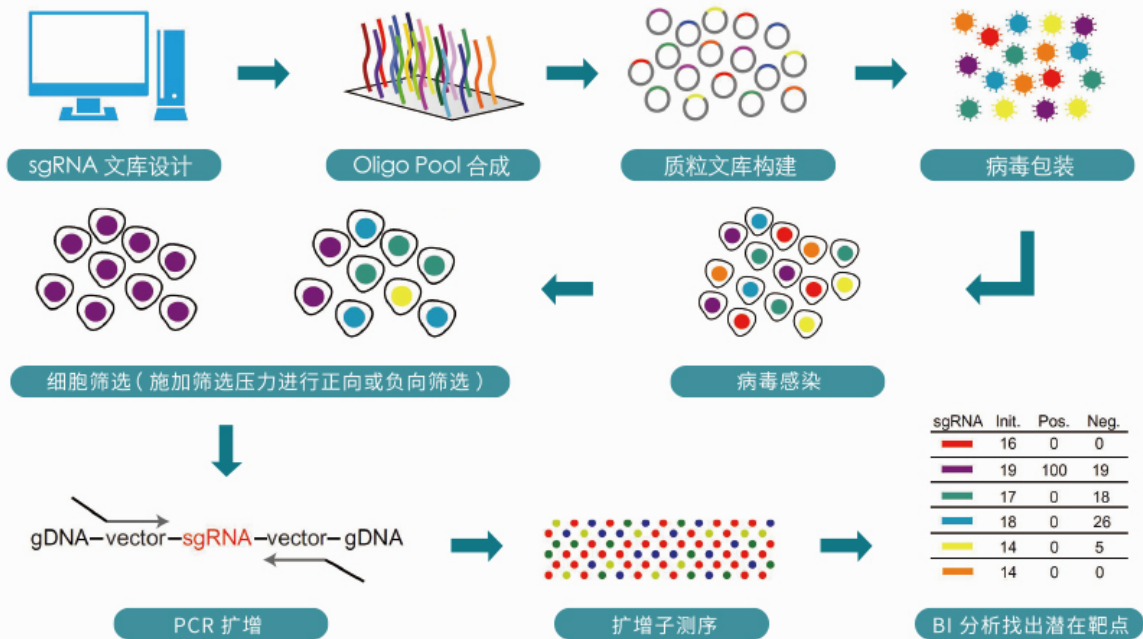
2.2 CRISPR/Cas9 技术步骤

CRISPR/Cas9 技术因其高效、简便和成本低廉的特点，已然成为生物医学研究和基因工程领域的重要工具（图 3）。然而，这项技术也引发了伦理和安全性的讨论，特别是在人类基因编辑方面。CRISPR/Cas9 技术是一种革命性的基因编辑工具，其原理基于细菌的自然免疫机制，如图 2 所示，具体包括以下几

个关键步骤：sgRNA 文库设计、Oligo Pool 合成、智利文库构建、病毒包装、细胞筛选、病毒感染、PCR 扩增及测序等^[11]。

3. CRISPR/Cas9 技术的应用

CRISPR/Cas9 技术作为一种革命性的基因编辑工具，具有广泛的应用前景。本文主要介绍 CRISPR/Cas9 技术在医学治疗、分子生物学和农业生产三大领域的应用。这些应用彰显了 CRISPR/Cas9 技术在不同领域的潜力，但同时也面临着挑战，如脱靶效应、编辑效率和特异性的优化，以及在某些细胞类型和组织中的递送问题。随着技术的进步和挑战的克服，CRISPR/Cas9 技术有望在未来发挥更大的作用。



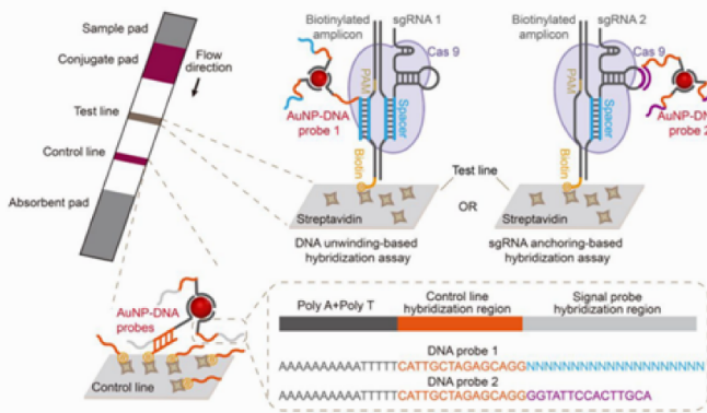
【图 3】CRISPR/Cas9 技术流程步骤^[3]

3.1 医学研究与治疗

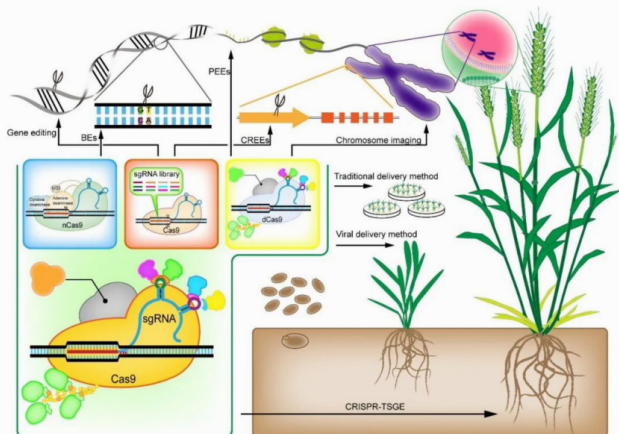
CRISPR/Cas9 技术在医学领域的应用涵盖了遗传性疾病、癌症以及传染病的治疗。通过修复或改变致病基因，CRISPR/Cas9 为这些疾病的治疗提供了新的希望。例如，它已被应用于研究和治疗 β -地中海贫血、囊性纤维化和杜氏肌营养不良症等遗传性疾病（图 4）^[7]。

3.2 农业生产

在农业领域，CRISPR/Cas9 技术被用于改良作物的性状，比如提高产量、抗病虫害和耐逆境能力^[1]。通过编辑特定基因，研究人员已经培育出具有更高抗旱性和抗病性的新品种，有望缓解全球粮食供应问题。CRISPR/Cas9 技术在农业领域的应用十分广泛，其通过精确的基因编辑来助力提高作物的产量和质量。



【图 4】CRISPR/Cas9 技术在医学研究应用^[7]



【图 5】CRISPR/Cas9 技术在农业生产应用^[8]

作物抗性提升：借助 CRISPR/Cas9 技术，研究人员可以敲除或修改与作物疾病抗性相关的基因，进而提高作物对特定病原体的抵抗力。例如，有研究通过敲除小麦中的 TaQ 基因来改变其形态发生，提高谷物的脱粒性。CRISPR/Cas9 技术可以用于改变作物营养成分的组成，比如通过定向基因插入来增加水稻中类胡萝卜素的含量^[2]。

提高作物产量：通过敲除某些影响作物生长结构的基因，可以改善作物的植株结构（图 5）^[8]，从而提高产量。例如，油菜中两个 Bna MAX 1 同源基因的敲除，通过 CRISPR/Cas9 定向突变改善了植物结构并增加了产量。同时 CRISPR/Cas9 技术也被用于提高作物的耐旱性^[3]。例如，研究人员利用 CRISPR/Cas9 技术编辑了水稻中的 AFP1 基因，以提高其对逆境的耐受性。CRISPR/Cas9 技术同样可以用于提高作物的抗虫性，通过敲除对害虫吸引或营养有关的基因，遭受害虫损害的情况^[4]。

3.3 分子生物学

CRISPR/Cas9 技术在基础研究领域发挥着重要作用，用于研究基因功能、基因表达调控、遗传疾病机制等方面^[5-12]。它使科学家能够在各种实验模型

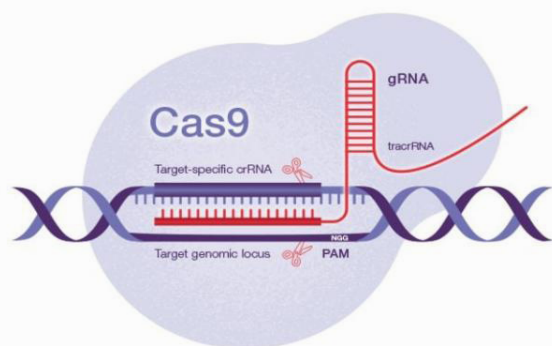
中模拟致病突变，创建大规模的全基因组筛查方法，并且开发合成基因记录设备，以此来研究正常发育和疾病进展情况。CRISPR/Cas9 技术在生物技术领域的应用包括微生物工程、合成生物学等方面（图 6）^[9]。借助精确编辑微生物的基因组，能够提高它们在生产生物燃料、药物和其他化学品过程中的效率和产品质量。

4. CRISPR/Cas9 技术面临的伦理、法律挑战

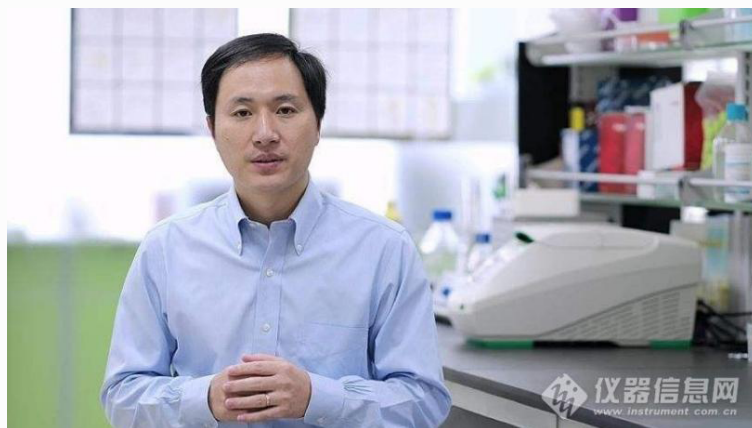
CRISPR/Cas9 技术作为一种革命性的基因编辑工具，尽管在医学、农业、生物技术等领域具有广泛的应用前景，但其发展也伴随着伦理和法律的挑战。

4.1 伦理挑战

基因编辑技术在人类胚胎上的应用引发了众多伦理问题。例如，贺建奎案例中，其团队通过 CRISPR/Cas9 技术修改了人类胚胎的 CCR5 基因，期望使婴儿天生具备抵抗艾滋病的能力。这一行为引发了全球科学界和伦理学者的广泛谴责（图 7）。该事件之所以引发争议，不仅是因为技术上的不成熟以及存在未知风险，更是由于其可能对人类基因池造成影响，还侵犯了个体自主权。基因编辑研究需要



❶ 【图 6】CRISPR/Cas9 技术在分子生物学应用^[9]



❶ 【图 7】“基因编辑婴儿事件”贺建奎接受采访照片（图片来源于新华社）

通过严格的伦理审查，确保研究的合法性、合理性以及对参与者的保护。贺建奎案例中涉及的伦理审查问题，诸如伪造伦理审查材料等，进一步凸显了伦理审查在科学研究中的重要性。

4.2 法律挑战

我国一直很重视基因编辑技术的伦理问题，相

继出台了一系列法律措施（表 1）。CRISPR/Cas9 技术的应用需要在严格的法律法规框架内进行。贺建奎因违反了中国关于人类辅助生殖技术的相关规定，最终被法院以非法行医罪判处有期徒刑 3 年，并处罚金 300 万元。此案例凸显了科学家在进行创新研究时必须遵守的法律红线。

表 1：国内对基因编辑技术的伦理规范及态度声明

时间与主体	文件名称	规定和态度表明
2003 年 科技部和原卫生部	《人胚胎干细胞研究伦理指导原则》	利用体外受精、体细胞核移植、单性复制技术或遗传修饰获得的囊胚，其体外培养期限自受精或核移植开始不得超过 14 d
2016 年 12 月 1 日 原卫生部	《涉及人的生物医学研究伦理审查办法》	涉及人的生物医学研究应当符合知情同意、控制风险等伦理原则。涉及人的生物医学研究的医疗卫生机构是涉及人的生物医学研究伦理审查工作的管理责任主体，应当设立伦理委员会，并采取有效措施保障伦理委员会独立开展伦理审查工作
2017 年 科技部	《生物技术研究开发安全管理办法》	中国禁止以生殖为目的对人类配子、合子和胚胎进行基因操作
2018 年 11 月 30 日 中国工程院	《THE LANCET》	对基因编辑婴儿事件，从伦理与道德方面，在严重缺乏科学评估验证，安全性存在不可预知风险的情况下，贸然开展以生殖为目的的人类生殖细胞基因编辑临床操作，严重违背了基本伦理规范和科学道德
2018 年 11 月 30 日 中国医学科学院	《THE LANCET》	生殖细胞或早期胚胎的基因组编辑仍处于基础研究阶段，其安全性和有效性尚需全面评估。因此，科研机构 and 科研人员不应以生殖为目的，开展人体生殖细胞基因组编辑的临床操作，也不应资助相关研究
2018 年 11 月 30 日 中国艾滋病研究中心	《THE LANCET》	坚决反对以生殖和预防艾滋病为目的开展针对人类健康生殖细胞和胚胎基因编辑的研究，呼吁相关政策和监管部门彻底调查此次事件，充分保护受试婴儿和家庭的个人隐私和合法权益

5. 结论

CRISPR/Cas9 技术是一种革命性的基因编辑工具，它使科学家能够以前所未有的精确度和效率对 DNA 序列进行修改。CRISPR/Cas9 技术提供了一种简便、快速且成本效益高的基因编辑方法，它基于细菌的免疫系统，特别是 Cas9 酶，可以精确地切割和修改目标 DNA 序列。CRISPR/Cas9 技术能够精确地定位到基因组中的特定位置，实现对单个基因的修改，这种精确性是传统基因编辑技术难以达到的。CRISPR/Cas9 技术在多个领域都有应用，涵盖但不限于医学研究、遗传病治疗、农业生物技术以及生物制药领域。尽管 CRISPR/Cas9 技术具有巨大的潜力，但它也引发了伦理和安全性的讨论，特别是在基因编辑可能影响后代的生殖细胞时。CRISPR/Cas9 技术的未来前景广阔，它有望为治疗遗传性疾病、提高作物产量和抗性以及开发新的生物制品提供新的途径。监管和法规：随着 CRISPR/Cas9 技术的发展，相关的监管和法规也在不断完善，以确保技术的安全和伦理使用。

名词解释附录

CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats):

CRISPR 是细菌和古菌中发现的一种免疫系统，能够识别并切割外来的 DNA (如病毒 DNA)，保护细胞免受外来遗传物质的侵害。它由一系列短的、重复的 DNA 序列组成，这些序列之间由非重复的间隔序列隔开，这些间隔序列通常来源于之前入侵的病毒。

Cas9 (CRISPR-associated protein 9):

Cas9 是一种核酸酶，是 CRISPR 系统中的关键蛋白，能够识别特定的 DNA 序列并进行切割。Cas9 蛋白与 sgRNA 结合后，可以精确地定位到目标 DNA 序列并进行切割。

sgRNA (Single Guide RNA):

sgRNA 是一段人工设计的 RNA 分子，它与目标 DNA 序列互补，并且包含一个 Cas9 识别的序列。sgRNA 指导 Cas9 酶到达并切割特定的 DNA 位点。

PAM (Protospacer Adjacent Motif):

PAM 是 Cas9 识别并结合 DNA 的必要序列，通常位于目标 DNA 序列的附近。PAM 序列的存在决定了 Cas9 能否有效识别并切割特定的 DNA 位点。

HDR (Homology-Directed Repair):

HDR 是一种 DNA 修复机制，它利用同源序列来修复 DNA 双链断裂。在 CRISPR/Cas9 技术中，HDR 可以用来将特定的 DNA 序列插入到基因组中，通过提供含有同源序列的修复模板。

NHEJ (Non-Homologous End Joining):

NHEJ 是另一种 DNA 修复机制，它不依赖于同源序列，而是直接将 DNA 双链断裂的两端连接起来。这种修复方式常常导致插入或缺失突变，因此在 CRISPR/Cas9 技术中，科学家们通常希望减少 NHEJ 的发生，以提高基因编辑的精确性。

ZFNs (Zinc Finger Nucleases):

ZFNs 是一种基因编辑技术，通过设计特定的锌指蛋白来识别和结合 DNA 上的特定序列，然后通过连接的核酸酶切割 DNA。CRISPR/Cas9 技术因其简单性和高效性，在很多方面取代了 ZFNs。

TALENs (Transcription Activator-Like Effector Nucleases):

TALENs 是另一种基因编辑技术，利用转录激活因子样效应蛋白 (TALEs) 来识别 DNA 序列，并通过连接的核酸酶切割 DNA。与 ZFNs 类似，CRISPR/Cas9 技术因其更高的灵活性和效率，逐渐取代了

TALENs。

Gene Drive:

基因驱动是一种遗传机制，可以促进特定基因在种群中快速传播。通过 CRISPR/Cas9 技术，可以设计基因驱动系统，使得特定的基因编辑效果在种群中迅速扩散。

Off-Target Effects:

非目标效应是指 CRISPR/Cas9 在编辑基因时可能发生的非特异性切割，即在目标位点以外的 DNA 序列上造成切割。这可能导致意外的基因突变，因此科学家们在进行基因编辑时需要仔细评估和减少非目标效应。

参考文献

- [1] 林萌萌, 李春娟. CRISPR/Cas9基因编辑技术在作物中的应用[J]. 核农学报, 2021, 35(6): 1329-1339.
- [2] 刘早利, 陈亚红, 王春台. 稻瘟病新抗性基因Pi39候选基因CRISPR/Cas9敲除载体的构建[J]. 中国农学通报, 2016, 32(6): 91-95.
- [3] 赵山山, 邸一桓, 郝光飞. CRISPR-Cas9基因编辑技术在基因功能和作物育种中的研究进展[J]. 分子植物育种, 2019, 17(21): 7087-7093.
- [4] 耿敏, 王婷婷, 陶英瑜, 等. 利用CRISPR基因编辑技术构建水稻OsSLR1敲除突变体[J]. 分子植物育种, 2022, 20(24): 8122-8128.
- [5] Zheng M, Zhang L, Wu L, et al. Knockout of two Bna MAX 1 homologs by CRISPR/Cas9-targeted mutagenesis improves plant architecture and increases yield in rapeseed (*Brassica napus* L.)[J]. Plant Biotechnol J, 2020, 18(3): 644-654.
- [6] Lu Y, Wang J Y, Xue L, et al. A donor-DNA-free CRISPR/Cas-based approach to gene knock-up in rice[J]. Nat Plants, 2021, 7(11): 1445-1452.
- [7] Dong O X, Yu S, Jain R, et al. Marker-free carotenoid-enriched rice generated through targeted gene insertion using CRISPR-Cas9[J]. Nat Commun, 2020, 11: 1178.
- [8] Schmidt C, Edward J, Smissh L, et al. Efficient induction of heritable inversions in plant genomes using the CRISPR/Cas system[J]. Plant J, 2019, 98(4): 577-589.
- [9] Peng B, Kong H, Li Y, et al. OsAAP6 functions as an important regulator of grain protein content and nutritional quality in rice[J]. Nat Commun, 2014, 5: 4847.
- [10] Wang S Y, Yang Y H, Guo M, et al. Targeted mutagenesis of amino acid transporter genes for rice quality improvement using the CRISPR/Cas9 system[J]. The Crop J, 2020, 8(3): 457-464.
- [11] 徐鹏, 王宏, 涂燃冉, 等. 利用CRISPR/Cas9系统定向改良水稻稻瘟病抗性[J]. 中国水稻科学, 2019, 33(4): 313-322.
- [12] Yuan M, Chu Z, Li X, et al. The bacterial pathogen *Xanthomonas oryzae* overcomes rice defenses by regulating host copper redistribution[J]. Plant Cell, 2010, 22(9): 3164-3176.
- [13] Shen L, Dong G J, Zhang Y, et al. Rapid creation of new photoperiod-/thermo-sensitive genic male-sterile rice materials by CRISPR/Cas9 system[J]. Rice Sci, 2019, 26(2): 129-132.
- [14] Svitashv S, Young J K. Targeted mutagenesis, precise gene editing, and site-specific gene insertion in maize using Cas9 and guide RNA[J]. Plant Physiol, 2015, 169(2): 931-945.