比较三种基因编辑技术

## 一、基因编辑的概念

**基因编辑**是指对基因组进行定点修饰的一项新技术。利用该技术，可以精确地定位到基因组的某一位点上， 在这位点上剪断靶标 DNA 片段并插入新的基因片段。此过程既模拟了基因的自然突变， 又修改并编辑了原有的基因组， 真正达成了“编辑基因” 。目前主要有 3 种基因编辑技术， 分别为： a)人工核酸酶介导的锌指核酸酶(zinc- finger nucleases，ZFN)技术；b) 转录激活因子样效应物核酸酶(transcription activator- like effector nucleases，TALEN)技术；c) RNA 引导的 CRISPR- Cas 核酸酶技术(clustered regulatory interspaced short palindromic repeat /Cas-based RNA-guided DNA endonucleases，CRISPR/Cas )。

## 二、 三种基因编辑技术的介绍

#### 1.ZFN基因编辑技术

ZFN 技术是第一代基因组编辑技术，其功能的实现是基于具有独特的DNA序列识别的锌指蛋白发展起来的。ZFN 由特异性识别序列的锌指蛋白(ZFP)和 FokⅠ核酸内切酶组成。其中，由 ZFP 构成的 DNA 识别域能识别特异位点并与之结合，而由FokⅠ构成的切割域能执行剪切功能，两者结合可使靶位点的双链DNA 断裂(DSB)。于是， 细胞可以通过同源重组(HR)修复机制和非同源末端连接(NHEJ)修复机制来修复 DNA。HR 修复有可能会对靶标位点进行恢复修饰或者插入修饰，而 NHEJ 修复极易发生插入突变或缺失突变。两者都可造成移码突变，因此达到基因敲除的目的。

#### 2.TALEN基因编辑技术

TALE（Transcription activator -like effectors）:一种源于植物致病菌*Xanthomonas* sp.的靶向基因操作技术。 TALENs 包含两个 TALEN 蛋白, 每个 TALEN 都是由 TALE array 与 FokⅠ融合而成. 其中一个 TALEN 靶向正义链上靶标位点, 另一个则靶向反义链上的靶标位点. 然后 FokⅠ形成二聚体, 在靶向序列中间的 spacer 处切割 DNA, 造成双链 DNA 断裂, 随后细胞启动 DNA 损伤修复机制. 针对不同的TALEN 骨架, 其最适宜的spacer长度不同, 其长度范围一般为12~20 bp. 实验结果表明, TALENs在靶向DNA时, 第一个碱基为 T 时其结合效果更佳。

#### 3. CRISPR /Cas9 基因组编辑技术

CRISPR/Cas 系统由 Cas9 核酸内切酶与sgRNA构成. 转录的 sgRNA 折叠成特定的三维结构后与 Cas9 蛋白形成复合体, 指导 Cas9 核酸内切酶识别特定靶标位点, 在 PAM 序列上游处切割 DNA 造成双链 DNA 断裂, 并启动 DNA 损伤修复机制. 从不同菌种中分离的 CRISPR/Cas 系统, 其 CrRNA(或者是人工构建的sgRNA)靶向序列的长度不同, PAM 序列也可能不同。最新报道，CRISPR-C2c2系统能够根据靶向序列特异地编辑单链RNA。

## 三、 三种编辑技术的比较

#### 1.共同点

结构的相似性：无论是ZFN、TALEN还是CRISPR /Cas9，都是由DNA识别域和核酸内切酶两部分组成。其中ZFN技术具有锌指结构域能够识别靶点DNA，而TALEN的DNA识别区域是重复可变双残基的重复，DNA剪切区域都是一种名为Fokl的核酸内切酶结构域。CRISPR的DNA识别区域是crRNA或向导RNA，Cas9蛋白负责DNA的剪切。当DNA结合域识别靶点DNA序列后，核酸内切酶或Cas9蛋白将DNA剪切，靶DNA双链断裂，再启动DNA损伤修复机制，实现基因敲除、插入等。

作用过程的相似性：通过ＤＮＡ识别模块对特异性的ＤＮＡ位点识别并结合，然后在相关核酸内切酶的作用下完成特定位点的剪切，从而借助于细胞内固有的HDR（同源定向修复）或NHEJ（非同源末端连接）途径修复过程完成特定序列的插入、删除及基因融合。

#### 2.不同点

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 三种基因编辑技术的差异 | | | |
|  | ZFN | TALEN | CRISRP系统 |
| 识别模式 | 蛋白质—DNA | 蛋白质—DNA | RNA—DNA |
| 靶向元件 | ZF array蛋白 | TALE array蛋白 | sgRNA蛋白 |
| 切割元件 | *Fok* I蛋白 | *Fok* I蛋白 | *Cas*9蛋白 |
| 识别长度 | （3-6）x 3 x 2 bp | (12-20) x 2 bp | 20 bp |
| 识别序列特点 | 以3 bp 为单位 | 5‘前一位为T | 3‘序列为NGC |
| 优点 | 平台成熟、效率高于被动同源重组 | 设计较ZFN简单、特异性高 | 靶向精确、脱靶率低、细胞毒性低、廉价 |
| 缺点 | 设计依赖上下游序列、脱靶率高、具有细胞毒性 | 细胞毒性、模块组装过程繁琐、需要大量测序工作、一般大型公司才有能力开展、成本高 | 靶区前无PAM则不能切割、特异性不高、NHEJ依然会产生随机毒性 |
| 能否编辑RNA | 不可以 | 不可以 | 可以 |