



基因编辑

GENE EDITING

主 编 / 李 凯 沈钧康 卢光明



人民卫生出版社
PEOPLE'S MEDICAL PUBLISHING HOUSE

基因编辑

主 编 李 凯 沈钧康 卢光明

人民卫生出版社

图书在版编目(CIP)数据

基因编辑 / 李凯, 沈钧康, 卢光明主编. —北京: 人民卫生出版社, 2015

ISBN 978-7-117-21674-6

I. ①基… II. ①李…②沈…③卢… III. ①基因工程 IV. ①Q78

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2015)第 260608 号

人卫社官网	www.pmph.com	出版物查询, 在线购书
人卫医学网	www.ipmph.com	医学考试辅导, 医学数据库服务, 医学教育资源, 大众健康资讯

版权所有, 侵权必究!

基 因 编 辑

主 编: 李 凯 沈钧康 卢光明

出版发行: 人民卫生出版社(中继线 010-59780011)

地 址: 北京市朝阳区潘家园南里 19 号

邮 编: 100021

E - mail: pmph@pmph.com

购书热线: 010-59787592 010-59787584 010-65264830

印 刷: 北京汇林印务有限公司

经 销: 新华书店

开 本: 850 × 1168 1/32 印张: 7.5

字 数: 194 千字

版 次: 2016 年 1 月第 1 版 2016 年 1 月第 1 版第 1 次印刷

标准书号: ISBN 978-7-117-21674-6/R · 21675

定 价: 58.00 元

打击盗版举报电话: 010-59787491 E-mail: WQ@pmph.com

(凡属印装质量问题请与本社市场营销中心联系退换)

编 委 (以姓氏笔画为序)

- 王 晗 (苏州大学)
卢光明 (南京军区总医院)
刘 彬 (苏州大学)
庄峰锋 (北京唯尚立德生物科技有限公司)
李 凯 (苏州大学)
肖 莉 (苏州大学附属第二医院)
沈钧康 (苏州大学附属第二医院)
张 佳 (苏州大学)
张智英 (西北农林科技大学)
周国华 (南京大学, 南京军区总医院)
焦仁杰 (中国科学院生物物理研究所)

编者 (以姓氏笔画为序)

- 王 昕 (西北农林科技大学)
孙爱娟 (苏州大学)
李 文 (苏州大学)
李 娟 (北京唯尚立德生物科技有限公司)
张 旭 (苏州大学)
汤丽梦 (南华大学)
易 春 (苏州佳章生物科技有限公司)
周 林 (苏州大学)
陈 燕 (苏州大学)
陈菡青 (中国科学院生物物理研究所)
陆 妍 (南京大学, 南京军区总医院)
钟英斌 (苏州大学附属第二医院)
徐 澍 (南京大学, 南京军区总医院)
徐惠芬 (苏州大学)
席建忠 (北京唯尚立德生物科技有限公司)
盛 楠 (南京大学, 南京军区总医院)
黄国栋 (苏州大学)
潘韵芝 (苏州大学)
魏超刚 (苏州大学附属第二医院)
魏泽辉 (西北农林科技大学)

近代分子生物技术和基因工程技术的发展,使生物酶的改造,甚至是从头制造类别全新的生物活性酶成为可能。

锌指核酸酶 ZFNs、反因子核酶 TALENs 和 CRISPR 系统即为三类具有基因编辑功能的全新核酶。ZFNs 为锌指蛋白与限制性外切酶 Fok I 的酶解中心所构成的融合蛋白,由于多种制约因素,如 ZFNs 不能识别 TTN 序列和锌指蛋白串联长度只能在 3~4 之间才具有较高活性等,使 ZFNs 的生物医学应用进展缓慢。而 2009 年由 Boch 和 Moscou 等破解了黄单胞菌转录活性样效应子(transcription activator-like effector, 本书采用反因子命名)与寄主靶基因 DNA 特异性识别的分子密码,通过采用与构建与 ZFNs 相似的策略,反因子核酶 TALENs (TAL effector nucleases) 得以研发成功并迅速在生物医学领域获得广泛应用。新近研发的 CRISPA 系统具有灵活简单的优势,但脱靶效应较强,可能影响其在人类基因治疗中的应用。

反因子核酶(TALENs)在物种基因改造、基因治疗等方面具有其他工程酶如锌指蛋白酶和归巢核酸酶难以比拟的优势。在基因治疗领域也较 CRISPR 体系更为安全。目前,我国在反因子核酸酶的克隆和组装领域的部分成果已经处于国际领先地位,若应用领域加强力量,可以预期,后基因时代这一新的 TALENs 生物技术,将促进我国生物制药、基因治疗、个体化医学以及物种基因改造等多个领域的发展,使我国在相关领域占据国际领先地位。

就基因治疗而言,除肿瘤外,迄今已查明的基因突变造成的非肿瘤性疾病已有两千多种,其中仅少数基因突变为染色体重组的大片段突变,高达80%的基因突变为单碱基替换、小片段缺失和小片段插入。理论上,ZFNs、TALENs和CRISPR/Cas9的基因编辑功能,对上述三类主要的基因异常具有高特异性定点剪辑,依据基因治疗靶基因突变的不同情形,基因工程核酸酶介导的基因治疗可使基因失活或敲除基因、激活基因及修复突变。反因子核酶及其他基因工程核酶的出现,为肿瘤和非肿瘤性基因异常相关疾病的防治展现了广阔的基因治疗应用前景。

当基因编辑与高敏感的基因诊断和干细胞技术相结合,则有理由可以展望在不久的将来,基因治疗研究和应用会从体细胞基因治疗向生殖细胞或早期胚胎干细胞基因治疗转化。这一转化对体外受精领域纠正一些单基因遗传病具有十分诱人的前景。

本书编者之一李凯教授为我们湘雅学子,毕业于1982年。从1983年开始从事医学科研以来,在基因诊断和基因治疗的广泛领域进行了多年研究,主要贡献为描述了基因突变规律,推测了保守氨基酸进化的可能机制,研发了高保真DNA聚合酶介导的突变敏感性分子开关。同时,李凯还较早向国内介绍了内皮细胞依赖性血管舒张因子。本书由国内外一批从事基因研究的中青年专家撰写,向国内学术界和生物医药行业较详细地介绍了反因子核酶及其部分相关应用。

我很高兴这一反映基因治疗新进展的书籍出版,乐以为序。希望《基因编辑》的出版,能对我国基因治疗的研究和应用有一定的促进作用。

姚开泰
2014-11-27

序 二

人类基因组测序计划的完成，使人类进入了后基因组时代。随着人们对基因和基因组生理功能及其在疾病中病理作用认识的加深，个体化医药学已渐渐从概念过渡到初步的临床实践。近年出现的基因工程核酸酶，因其高效的基因剪辑作用，对个体化医药学具有革命性影响。传统医药学长期以来对多种疾病是几乎千人一药、千人一量的状态。虽然有时可以改变药物的组合或调整药物的剂量，但对目前确认的数以万计的不同基因突变，常规的小分子药物研发不可能做到针对特定患者特定基因突变研发相应的特异性药物。

近年来，大分子药物的研发已有长足的进步，一些大分子药物如替代性激素制品、反义核苷酸类药物和单克隆抗体类药物，均在临床上占有比较突出甚至是至少在目前尚无法替代的地位。然而，无论是反义核苷酸类药物还是单克隆抗体类药物，皆因研发周期长、研发费用大，仅可用于控制症状性质的治标。从药品层面上看，个体化用药迄今并无实质性进展。与目前个体化医学中的外科手术可以在一定程度上因人而异制订独特方案相比，现有的小分子药物研发乃至反义核苷酸类和单克隆抗体类大分子药物，在实际情形上不可能出现个体化的独特性治疗药物。

与现有的大分子药物不同，基因工程核酸酶在大分子药物研发中具有诸多优势。其中，反因子核酶是人类认识大分子相互作用中第一个达到一个氨基酸识别一个碱基这种严格一一对

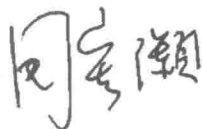
应的生物分子。反因子的典型结构含有高度重复的 34 个氨基酸，其中 12 位和 13 位为可变区，负责识别特异碱基：12 位氨基酸低变，负责反因子构象，而 13 位氨基酸高变，实际负责对碱基的识别。这一特征为反因子核酶的设计和研发提供了便利，为其临床应用的高度特异性在分子识别层面提供了保障。反因子核酶作为未来大分子药物的高度特异性，更在于其反因子可在反因子核酶中串联长达几十次而仍具有酶活性，这样，作为药物，可以达到对待剪切基因靶点识别的唯一性。而多种现有小分子药物，除作用于治疗靶点之外，常常还对一个或多个其他靶点发生相互作用，导致毒副作用。另外，无论是体细胞基因治疗还是干细胞基因治疗，作为特殊药物的反因子核酶作用机制为治本性治疗，有别于单克隆抗体类药物的治标性治疗，后者需要多次长期给药；而反因子核酶无需长期给药，可避免免疫排斥所导致的不良反应。

与反因子核酸酶的高效率相似，最近研发成功的 CRISPR/Cas9 系统，同样在反向基因组学中得到了广泛的应用，以用于多种细胞核物种基因组的改造，在基因治疗领域可能具有潜在的应用价值。

基因工程核酸酶的上述优势，使个体化药学，即针对特定个体或特定基因异常研发相应的具有治疗作用的基因工程核酸酶成为可能。人类基因组测序计划所提供的人类基因组参考序列，为基因多态性和基因突变分析提供了比对标准。针对目前发现的数以万计的导致人类疾病的基因突变，传统的小分子药物显得无能为力，而反因子核酶以及其他基因工程酶包括锌指核酸酶和 CRISPR/Cas9 系统则为研发与突变基因靶点一一对应的个体化药物提供了高效、廉价和实际可行的平台。

可实际应用的基因编辑历史仅短短数年，其在基因治疗和物种改造中已有较广泛应用。作为大分子药物和个体化药学发展的平台，基因工程核酸酶在药物研发中将发挥重大作用。这一点，《基因编辑》一书未来有待加强。《基因编辑》一书，较详

介绍了基因编辑的分子生物学基础,描述了在多个物种改造中的应用和作为基于治疗用于肿瘤研究中的实际运用。对药理学、分子生物学、遗传学和制药领域等多个方向涉及基因剪辑的研究者,《基因编辑》一书具有指导价值。



2014年11月

前 言

2011年,我们曾申报一个反向基因治疗艾滋病的自然科学基金面上项目,三位盲审专家的结论分别是优先资助、优先资助和资助。因为国家自然科学基金委员会一审盲审专家的一致好评,使我们相信反向基因治疗的确是后基因组时代个体化医药学的一个重要方向,所以组织国内相关专家编写了这本《基因编辑》。

该书的编写得到了苏州大学同事们的大力支持,得到了博士研究生肖莉和硕士研究生刘彬的帮助。感谢各位编者为本书的成书所做的贡献。

在此,我们对夏家辉院士、王红阳院士和刘筠院士在我们开展反向基因治疗之初提供的支持表示由衷感谢。

我在湘雅学习时的两位老师姚开泰院士和周宏灏院士,在百忙之中为本书撰写了序言,肯定了本书的意义并指出了不足之处,不胜感激。

本书的编写,主要取材于已经发表的文献资料。对书中内容的相关参考文献,限于出版社对于篇幅限制的要求而未能一一列出,这里一并表示我们的感谢。

限于编者的学识与水平,加之时间仓促,在各篇及各章之间的关联等方面,难免存在不足之处,恳请读者批评指正。

编者

2015年10月

目 录

第一篇 酶学篇

第一章 基因工程核酸酶简介	2
第一节 基因工程核酸酶概况	2
第二节 基因工程核酸酶	2
一、锌指核酸酶	2
二、归巢核酸酶	6
三、TALE 核酸酶	7
四、CRISPR/Cas	13
五、三种核酸酶在基因治疗领域的比较	18
第二章 归巢内切酶	21
第一节 归巢内切酶概况	21
第二节 归巢内切酶	22
一、归巢内切酶家族	22
二、归巢内切酶剪切机制	23
三、归巢内切酶克隆与组装	25
四、归巢内切酶在基因操作和重组中的应用研究	27
第三章 利用锌指核酸酶技术的基因治疗研究进展	30
第一节 锌指核酸酶概况	30
第二节 ZFN 作用原理	31

第三节 ZFN 的应用和限制	33
第四节 ZFN 构建的技术改进	36
一、ZFP 结合域技术改进	37
二、报告、筛选系统改进	40
三、Fok I 切割结构域技术改进	41
四、ZFN 定点修饰技术改进	42
五、ZFN 转染细胞技术改进	43
六、脱靶位点检测改进	44
第四章 TALE 文库构建与 TALENs 相关基因治疗	
研究	48
第一节 TALENs 简介及研究背景	48
一、TALENs 简介	48
二、TALENs 的基因治疗作用	50
三、TALENs 的应用价值	53
第二节 国内外研究现状和发展趋势	54
一、遗传病基因治疗的现状和发展趋势	54
二、基因剪辑的现状和发展趋势	57
三、TALENs 克隆及基因剪辑效率和特异性研究 现状与发展趋势	59
四、TALENs 的应用研究进展和趋势	60
第五章 反因子核酸酶的设计与组装	63
第一节 TALE 密码、晶体结构与应用	64
一、TALE 密码	64
二、TALE 晶体结构	66
三、TALE 的应用	66
第二节 TALENs 靶点的设计和合成方法	67
一、TALENs 靶点的设计	67
二、TALENs 组装构建方法	70

第六章 反因子核酸酶活性检测	81
第一节 luciferase SSA 法	81
第二节 细胞内源基因突变率检测法	86
一、非配对内切酶法-T7E1 法或 Cel I 法	86
二、限制性内切酶法	88
第三节 融合荧光法	89
第四节 原核蓝/白与白/蓝系统法	90
第七章 高通量测序技术在反因子核酸酶活性与 脱靶效应检测中的应用	93
第一节 反因子核酸酶概况	93
第二节 反因子核酸酶活性与脱靶效应检测	94
一、反因子核酸酶的构建与表达	94
二、反因子核酸酶作用后的突变分析	94
三、高通量测序技术在反因子核酸酶活性与 脱靶效应检测中的优越性	101

第二篇 技术篇

第八章 反向遗传学在斑马鱼研究中的应用	104
第一节 反向遗传学在斑马鱼研究中的技术概况	104
第二节 靶基因的筛选	105
第三节 MO 基因敲降	106
第四节 反向遗传工具的基因组大范围筛选	108
一、反转录病毒插入	108
二、TILLING	108
第五节 ZFN	109
第六节 TALEN——最具前景的反向遗传学工具	110
一、TALE 的组成	111
二、TALEN 靶位点的选择	112

三、人工构建 TALE 重复序列的策略	114
四、TALEN 诱变的检测方法	116
五、TALEN 技术的应用	118
六、TALEN 技术的待解决问题	120
第七节 CRISPR/Cas9 系统	121
一、CRISPR/Cas9 的起源	121
二、CRISPR/Cas9 系统的工作原理	121
三、CRISPR/Cas9 系统的优点	123
四、设计 CRISPR/Cas9 系统的原则以及操作事项	124
五、CRISPR/Cas9 系统的应用	124
第八节 总结与展望	125
第九章 反因子核酸酶 (TALENs) 在果蝇基因组修饰中的应用	130
第一节 修饰果蝇基因组的常见技术	130
一、转座元件介导的基因组突变	130
二、同源重组介导的基因打靶	132
三、phiC31 定点整合酶介导的多重基因打靶	134
四、锌指核酸酶介导的基因组修饰	135
第二节 转录激活因子样效应蛋白的生物学性质	136
第三节 TALENs 介导的基因组操作技术在果蝇中的 工作原理	137
一、构建 TALEs	137
二、构建 TALENs 及其体外转录获得 mRNAs	139
三、可遗传突变的获得和插入缺失突变的分析	140
第四节 TALENs 在果蝇中的应用案例分析	141
第五节 TALENs 在果蝇中应用的优势和展望	143
第十章 反因子核酸酶用于人类疾病模型的建立	148
第一节 人类疾病模型简介	148

第二节	应用反因子核酸酶建立人类疾病模型的优势···	151
第三节	应用反因子核酸酶建立人类疾病模型的 实例(研究进展)·····	153

第三篇 应用篇

第十一章	基因治疗·····	158
第一节	基因治疗的适应证·····	158
一、	遗传性疾病·····	158
二、	肿瘤·····	159
三、	病毒性感染疾病·····	160
第二节	基因转移的基本方法·····	160
一、	质粒体 DNA 直接注射法·····	161
二、	脂质体介导的基因转移·····	162
三、	腺病毒与腺相关病毒作为基因转移的载体·····	163
四、	其他病毒载体·····	165
第十二章	反因子核酸酶靶向编辑 HER-2 基因的 可行性评价·····	166
第一节	研究背景·····	166
一、	乳腺癌基因治疗研究的独特社会和 生物学价值·····	166
二、	HER-2 作为乳腺癌基因治疗的生物靶标·····	167
三、	新型基因剪辑技术靶向剪切目标序列应用于 乳腺癌基因治疗的可行性·····	169
第二节	研究内容·····	172
第三节	项目的特色与创新之处·····	174
一、	基因技术·····	174
二、	肿瘤治疗·····	174
第四节	技术路线图·····	174

第十三章	多模态成像监测 EGFR 基因特异性 TALENs 治疗非小细胞肺癌可行性研究	178
第一节	肺癌治疗现状	178
第二节	TALENs 靶向 EGFR 基因治疗肺癌的实验方案	179
第十四章	基因编辑技术敲除雄激素受体治疗前列腺癌的多模态成像评价	189
第一节	前列腺癌治疗现状	189
第二节	TALENs 靶向雄激素受体基因治疗前列腺癌的实验方案	192
第十五章	TALENs 基于抗肌萎缩蛋白基因 44 号外显子缺失的基因治疗策略	199
第一节	工程核酸酶 TALENs 在基因治疗中的潜力	199
第二节	治疗障碍及 DMD 的临床特征	202
第三节	多基因治疗策略: 从 DMD 转变为 BMD 的可能性	204
第十六章	反向基因治疗优势	211
第一节	基因失活的价值	212
第二节	未来的期望——治愈部分疾病	213
第三节	反向基因组学与基因治疗	214
附录一	CCR5 与艾滋病的防治	216
附件二	相关英文文献	219