
Genome Biology : CRISPR-Cas核酸酶介导的植物基因组编辑脱靶效应评价及应对策略

作者：writer 来源：科学网

本文原地址：<https://www.iikx.com/news/progress/1207.html>

本文仅供学习交流之用，版权归原作者所有，请勿用于商业用途！

CRISPR-Cas9、CRISPR-

Cpf1(Cas12a)等核酸酶由于可以针对特定基因组DNA序列实现可编程定向剪切 [1-4]，并能以前所未有的精准度和便捷度进行基因组编辑，被广泛应用于动、植物及微生物的基因功能解析、新种质创制、基因治疗等基础研究及应用实践工作中，被认为是21世纪生物技术领域的重大突破。

CRISPR-Cas基因组编辑系统由Cas核酸酶蛋白和向导RNA两部分组成，其中向导RNA与基因组目标位点DNA序列互补配对，并引导Cas核酸酶蛋白对基因组DNA双链进行定向剪切。

但研究发现，向导RNA引导的Cas核酸酶定向剪切活性实际上存在一定程度的容错概率，即Cas核酸酶在目标位点序列相似的基因组区域存在潜在的非特异剪切活性，也就是通常所说的脱靶。这种源于CRISPR-Cas非特异剪切活性产生的脱靶会对编辑对象产生不确定的生物学效应，严重影响基于CRISPR-Cas核酸酶的基因组编辑技术在基础研究、应用实践中的有效性及可靠性。

2017年，刊登在Nature Methods的Unexpected mutations after CRISPR-Cas9 editing in vivo的通讯文章，报道了CRISPR-Cas9编辑小鼠基因组中超过1500个单核苷酸突变及上百个大片段缺失、插入位点，认为CRISPR-Cas9基因组编辑技术可以诱导产生大量脱靶变异 [5]。该研究结果的发布，即刻引发了学界及公众对CRISPR-Cas9基因组编辑技术在基础研究中可靠性、实践应用中安全性的激烈讨论及广泛关注。

然而经过了数月的争论与探讨，期刊最终对该文进行撤稿 [6]，同时发表5篇背靠背论文和1篇编者按，分析了该文在实验设计、数据分析等方面的严重缺陷，说明该文数据不足以支撑CRISPR-Cas9基因组编辑系统引发广泛脱靶效应的结论。2018年05月21日，同一期刊再度刊文，对CRISPR-Cas9编辑大鼠、小鼠体内的脱靶效应进行全面分析，明确支持基于CRISPR-Cas9的基因组编辑技术的可靠性 [7]。同时，Nature Methods呼吁研究者设计更多可靠的全基因组测序实验，更全面、更准确的评价CRISPR-Cas9基因组编辑系统的脱靶效应。

尽管CRISPR-Cas介导的植物基因组编辑事件的脱靶效应相对其在基因治疗领域存在的潜在负面影响相对不明显，但脱靶效应对基于基因组编辑策略的植物功能基因组研究及分子育种实践的不利影响同样不容忽视。同时，尽管CRISPR-Cas9核酸酶保真版本可以提高编辑可靠性、降低脱靶效应但CRISPR-Cas9核酸酶保真版本的编辑效率普遍有所降低 [8]。

在植物基因组编辑中，特别是针对一些基因组编辑实施相对困难的材料中，通过牺牲编辑效率来补偿脱靶效应的策略是否可行值得商榷。因此，如何明确、可靠地评价CRISPR-Cas核酸酶在植物基因组编辑中的脱靶效应，进而有针对性地进行优化，是在保障编辑效率的前提下最大限度消除脱靶效应负面影响的基础，也是CRISPR-Cas基因组编辑技术在多种应用渠道，例如植物功能基因组研究以及分子育种中的基石。

以往研究中，植物基因组编辑脱靶效应评价主要采用与向导RNA高相似度位点基因分型及碱基错配向导RNA介导的目标位点编辑效率评价两种策略 [9, 10]，但实际应用中，这两种策略都存在十分明显的局限性，难以全面、可靠评价CRISPR-Cas核酸酶在植物基因组编辑实际应用中的脱靶效应。

过去一些高通量全基因组测序研究结果 [11, 12]针对CRISPR-Cas9介导的植物基因组编辑可靠性得出了积极结论，但并没有具体分析全基因组测序过程中检测到的数千个变异位点的具体来源及潜在效应，加之对照材料、基因组编辑材料在数量及类型设置上的有限性，在一定程度上影响了对分析结果的有效解读，也影响了对其积极结论可靠性的支持。

针对植物基因组编辑基础研究及应用实践中如何有效进行CRISPR-Cas核酸酶脱靶效应评价的科学问题，在充分借鉴前期相关工作实验设计、实施策略、研究结果的基础上，电子科技大学张勇实验室、扬州大学张韬实验室及马里兰大学YiPing Qi实验室，以水稻为模型，基于全基因组测序+大数据分析策略，针对CRISPR-Cas9、CRISPR-Cpf1(Cas12a)介导的植物基因组编辑脱靶效应进行有效解读，于2018年7月4日在Genome Biology在线发表题为A large-scale whole-genome sequencing analysis reveals highly specific genome editing by both Cas9 and Cpf1 (Cas12a) nucleases in rice的研究论文，这个工作有以下值得借鉴的地方：

1. 在细致分析前期动、植物全基因组测序实验设计策略后，该研究工作提出基因组编辑脱靶效应的可靠评价需要建立在有生物学说服力且数量足够的对照材料、高质量大数据、可行分析策略的基础上。这一研究选择了多种类型的非编辑水稻对照材料，其中包括：水稻组培再生苗、农杆菌侵染再生苗、Cas9骨架载体再生苗、Cpf1骨架载体再生苗各2个独立单株作为营养生殖再生苗诱导突变对照;连续3年的12株实生苗材料(每年4株)作为有性生殖实生苗自发突变对照。

水稻编辑材料包括：12个sgRNA编辑位点的10个CRISPR-Cas9表达载体(其中2个表达载体含2个sgRNA编辑位点)水稻T0代编辑材料各2个独立单株;3个CRISPR-Cpf1表达载体(每个表达载体含1个crRNA编辑位点)水稻T0代编辑材料各2个独立单株。同时，针对选取的CRISPR-Cas9、CRISPR-Cpf1水稻T0代相关编辑材料，进一步选择2-5株对应T1代独立单株。研究工作中，样本的平均测序深度为70X(45X-105X)，覆盖率大于96%，完全满足全基因组测序有效分析的质量要求。采用4种基因组变异位点分析软件严格筛选各测序样本SNV、InDel变异位点，结果表明，相对水稻再生对照材料，Cas9、Cpf1基因组编辑水稻材料的全基因组变异位点绝对数量未显示明显差异，且变异位点基因组分布特征也与对照材料一致;

2. 多种类型水稻对照材料SNV、InDel变异位点分析表明，相对水稻实生苗测序单株，水稻再生苗对照材料基因组变异位点显著增加，但不同再生苗对照材料间基因组变异位点并无显著差异。特别是，Cas9、Cpf1骨架载体转化T0代再生苗对照材料全基因组SNV、InDel突变位点绝对数量、基因组分布特征与水稻组培及农杆菌侵染T0代再生苗相比无显著差异，说明Cas9、Cpf1核酸酶的表达没有诱导水稻基因组产生新的变异;

3. 针对12个sgRNA编辑位点的Cas9及3个crRNA编辑位点的Cpf1水稻T0代编辑材料与Cas9、Cpf1骨架载体转化再生苗对照材料全基因组SNV、InDel变异位点对比分析表明，在水稻T0代编辑材料中，Cas9、Cpf1核酸酶及对应sgRNA、crRNA的表达并没有增加SNV、InDel突变数量的增加。同时，不同CRISPR-Cas表达载体t-DNA插入拷贝数目及单sgRNA、双sgRNA表达载体转化水稻T0代编辑材料间，WGS检出的全基因组SNV、InDel突变位点绝对数量、分布特征没有显著差异。

特别需要指出的是，尽管实验材料中不同sgRNA及crRNA编辑位点的编辑效率显著不同(15%-100%)，但这种Cas9、Cpf1核酸酶编辑效率(或剪切活性)的不同并不与具体T0代编辑材料基因组变异的产生存在相关性；

4. 这一研究工作应用多重生物计算方法，查询水稻基因组与测序样本sgRNA、crRNA具1-10bp错配的潜在脱靶位点，将其与对应水稻T0代编辑材料检出的SNV、InDel变异位点进行双向比对，以期查明水稻T0代编辑材料基因组变异位点的具体来源。分析结果表明，与sgRNA存在1-2bp错配位点的Cas9-J水稻T0代编辑材料中，在8个基因组错配位点处检出了明确的脱靶变异。

值得强调的是，这8个检出的变异位点均为InDel，且在2个Cas9-J水稻T0代编辑材料独立测序单株中均为不同的变异基因型，这些变异细节均符合Cas9核酸酶介导的基因组编辑事件发生的特征，进一步明确了Cas9-J水稻T0代编辑材料中这8个InDel变异属于Cas9脱靶效应。在其余11个Cas9及3个Cpf1编辑材料中，因为对应sgRNA、crRNA设计时采用了严谨标准，最大限度减少了水稻基因组中1bp及以上的错配可能，与之对应，没有在水稻T0编辑材料中检出脱靶效应。

此类结果提示了如能提升gRNA错配严谨性设计将有可能有效消除目标基因组编辑事件中脱靶效应的潜在影响。

5. 该研究工作进一步针对自交获得的水稻T1代编辑材料实生苗独立单株基因组变异进行分析，结果表明水稻T1代编辑材料实生苗在有效固定了T0代编辑材料中的目标位点编辑事件外，同样也固定了其他源于遗传转化的T0代再生苗的SNV、InDel变异位点。同时，水稻T1代编辑材料实生苗基因组中也检测到了新SNV、InDel变异，但这些新变异位点的绝对数量、分布特征对比野生型材料实生苗世代传递产生的基因组自发变异未显示差异。需要指出的是，实验检测的T1代编辑材料实生苗还包括CRISPR-Cas核酸酶表达载体是否分离的同一T0代编辑材料实生传代的不同单株，但CRISPR-Cas核酸酶表达载体的有无并没有影响检测单株基因组变异位点的绝对数量及分布特征。

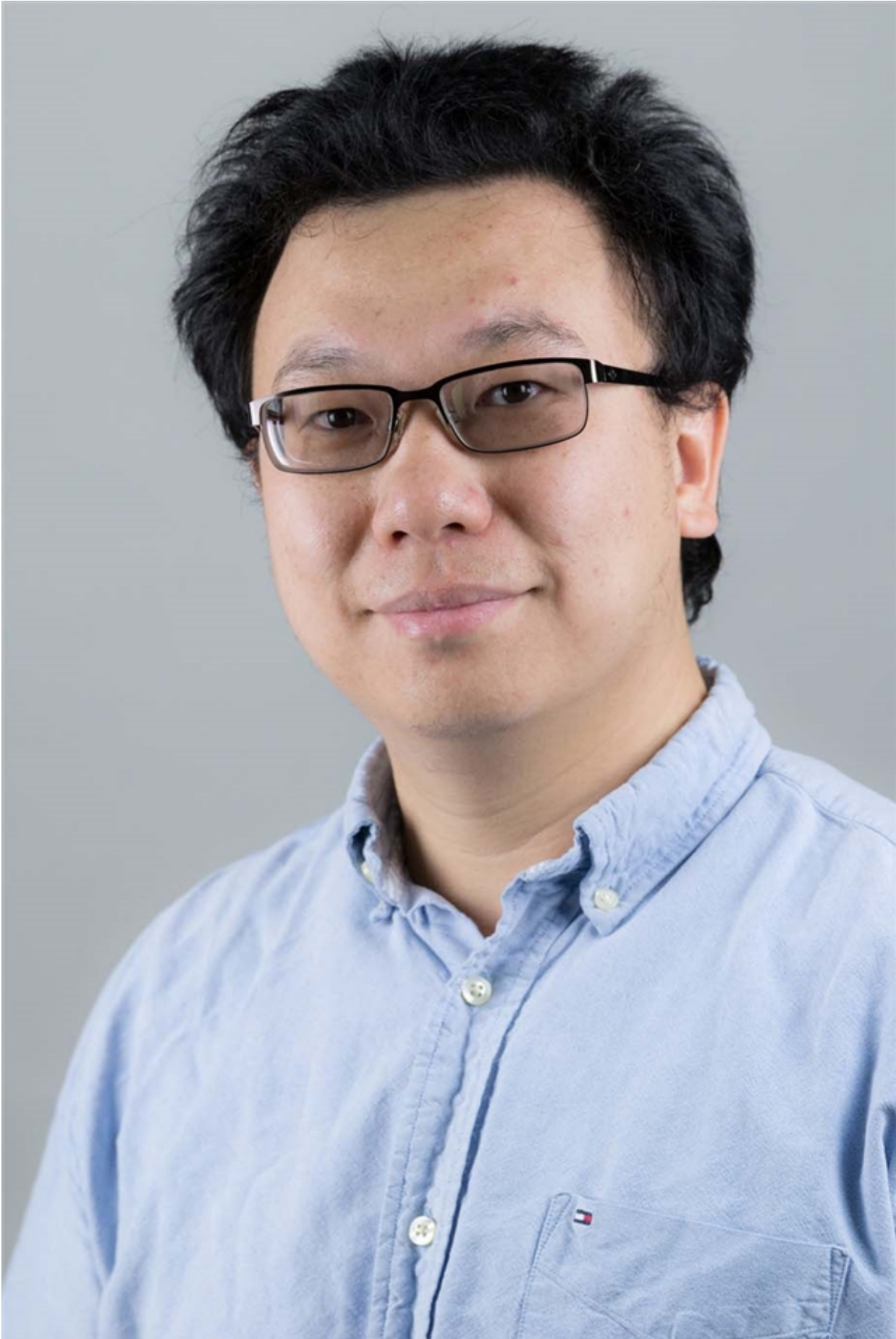
文末结论指出基于WGS大数据分析策略，针对水稻CRISPR-Cas9、CRISPR-Cpf1(Ca12a)编辑材料进行了深度测序，明确界定了Cas9、Cpf1核酸酶介导的水稻编辑事件引起的基因组变异主要源于遗传转化再生过程；在向导RNA严谨度得到有效保证前提下，Cas9、Cpf1核酸酶诱导植物基因组编辑事件中的脱靶效应为小概率事件，且与遗传转化过程及实生苗世代传递过程产生的基因组变异相较，可以忽略不计；通过提升sgRNA、crRNA设计严谨度，有效避免目标基因组中与向导RNA存在3bp以下碱基错配的相似位点，可以在确保野生型Cas9、Cpf1核酸酶高效编辑活性前提下，有效消除与向导RNA存在序列同源性位点处的潜在脱靶效应。

这一研究工作以详实的全基因组大数据证据，定量界定了植物基因组编辑中Cas9、Cpf1核酸酶的脱靶效应，提出了如何最大程度消除脱靶效应的可行策略，为近期处于焦点讨论的CRISPR脱靶效应议题给出了植物版本的可靠解读，也为CRISPR-Cas基因组编辑技术在植物功能基因组研究及分子育种实践中的可行应用提供有效消息，更为进一步推动CRISPR-Cas基因组编辑技术发展

、打消公众对基因组编辑植物的疑虑及相关产业政策的制定提供了确实科学证据及重要参考依据。

该研究论文于2018年7月4日在线发表于Genome Biology期刊上，电子科技大学张勇博士、扬州大学张韬博士及马里兰大学YiPing Qi博士为共同通讯作者，张勇实验室博士生唐旭、周建平副教授及张韬实验室博士生刘冠卿为共同第一作者。该项工作得到了国家自然科学基金、国家转基因重大专项、四川省青年科学基金、江苏特聘教授启动基金、江苏高校优势学科建设工程项目、马里兰大学启动资金的资助。

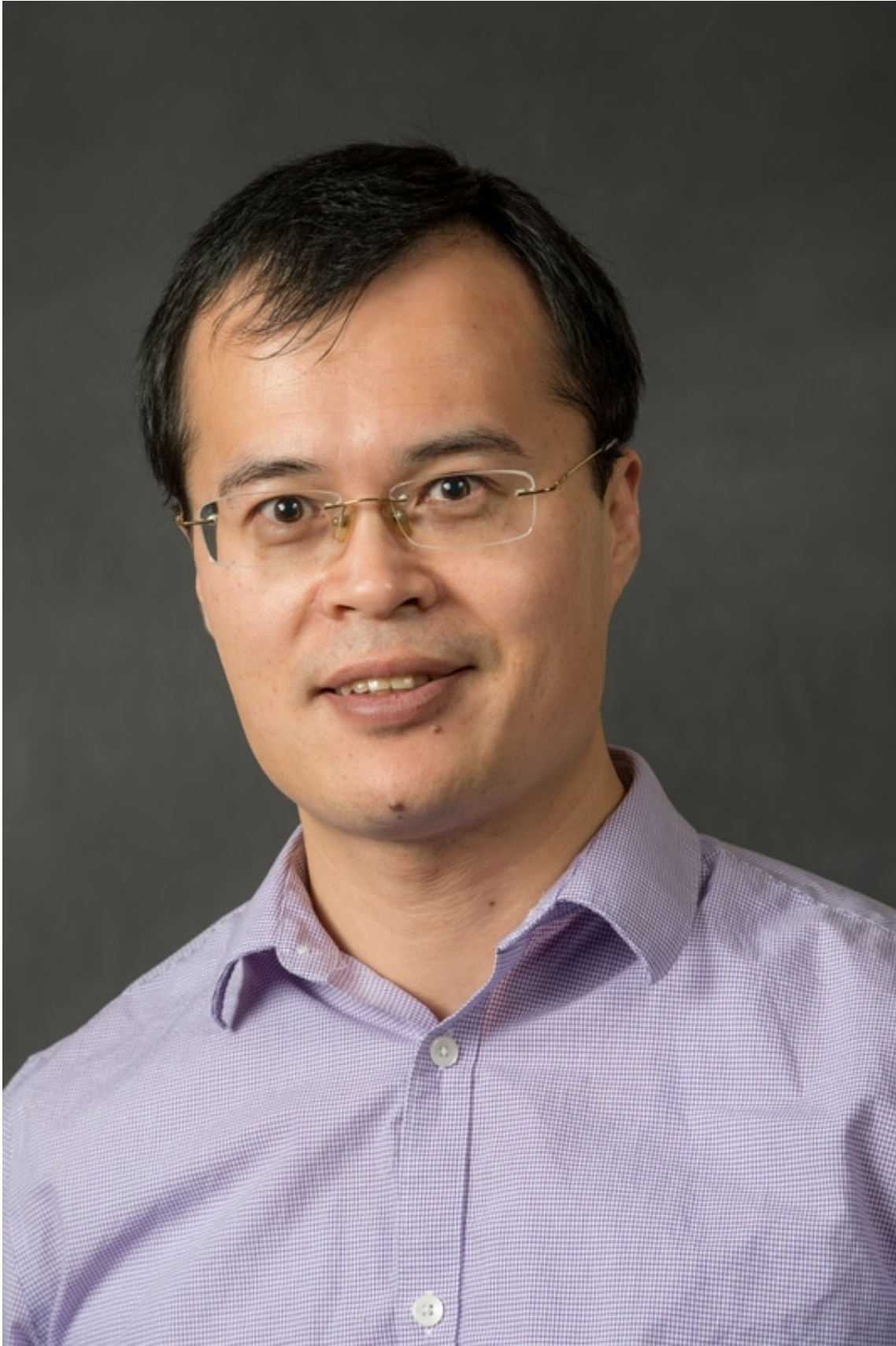
通讯作者简介



张勇，博士，电子科技大学生命科学与技术学院教授。2006年毕业于南开大学生命科学学院，获博士学位，同年加入电子科技大学生命科学与技术学院，先后于四川农业大学农学院(2007-2010)、明尼苏达大学医学院(2010-2012)进行博士后研究工作。目前研究方向主要为植物基因组编辑及合成生物学，相关成果发表于Nature Plants、Genome Research、Plant Physiology、Molecular Plant等期刊，4篇论文入选ESI高被引论文。



张韬，博士，扬州大学农学院教授。2013年毕业于电子科技大学生命科学与技术学院，获博士学位。2010-2016年，先后作为联合培养博士生、实习研究员、博士后在美国威斯康辛大学麦迪逊分校进行合作研究工作，从事生物信息学、表观遗传学及基因组学研究。研究成果先后发表在P NAS、Plant Cell、Nucleic Acids Research、Plant Physiology等期刊上。



YiPing Qi, 博士，美国马里兰大学助理教授。2000年获得南开大学学士学位，2003获得上海交通大学硕士学位，2009获得美国明尼苏达大学博士学位。从2013年开始先后在美国东卡罗莱纳大学

和马里兰大学担任助理教授。从2009年起，一直从事于植物基因组编辑工具的开发和利用，其成果已发表于Nature Methods, Nature Plants、Genome Research、Plant Physiology、Molecular Plant等期刊。现在研究方向主要为植物基因组编辑和转录调控，植物抗病机理以及植物合成生物学。(来源：科学网)

更多 科学进展 请访问 <https://www.iikx.com/news/progress/>

本文版权归原作者所有，请勿用于商业用途，[爱科学iikx.com](http://www.iikx.com)转发