

CRISPR-Cas9 介导在 HeLa 细胞上对 HPV18 致病基因的靶向敲除

姓名
查史君

指导小组成员

朱焕章 教授

目 录

摘要	1
Abstract	2
前言	3
材料与方法	6
结果	13
讨论	21
参考文献	25
致谢	32

摘 要

人乳头状瘤病毒（HPV）是许多人类疾病甚至癌症的诱因，HPV18 是其中一种高危亚型且其感染极易诱发宫颈癌，该病毒已经成为人类健康的一大威胁，而现在临床还没有针对该病毒感染及相关病症的有效治疗手段。CRISPR-Cas9 基因编辑系统以其优势为 HPV 的基因治疗提供了新思路。基于此，本课题以 HPV18 的致癌基因 E6 和 E7 为靶点，设计构建了针对这两个基因的 Cas9 载体 pX260-E6 和 pX260-E7，再将携带靶点的载体转染到天然被感染并且整合有 HPV18 基因组的宫颈癌细胞株 HeLa。观察结果显示转入 E6、E7 靶向的 Cas9 载体一定程度抑制了 HeLa 细胞的增殖，流式细胞术的检测也显示双靶点的共同作用影响了 HeLa 细胞的细胞周期，使停留在 S 期的细胞比例增加了一倍，将近 15%，并诱导了这些细胞的凋亡。然而，PCR 扩增靶点位置序列后酶切和测序还没有检测到相应的重组突变和基因大片段缺失。因此，靶向癌基因的 Cas9 核酸酶一定程度起到了治疗 HPV18 感染和抑癌的效果，虽然其具体机制还有待验证，治疗效率还有待提高，但本课题的研究已经揭示了这种新型基因编辑工具用于基因治疗 HPV 病毒及其相关疾病的可能。

关键词：

HPV18，CRISPR-Cas9，基因治疗，宫颈癌，癌基因，HeLa

Abstract

Human papillomavirus (HPV) is the cause of many human diseases even cancers. HPV18 is one of the high-risk subtypes and its infection is prone to end in cervical cancer. This virus has become a huge threat to human health but effective therapy for its infection and associated diseases is still vacant. The clustered, regularly interspaced, short palindromic repeats associated nuclease (CRISPR-Cas9) system as a newly emerging gene editing tool provides an alternative for curing HPV with its advantages. In this case, oncogenes E6 and E7 were chosen as the targets and the vectors, pX260-E6 and pX260-E7, containing each of those targets and the Cas9 system were designed and constructed. These vectors were transfected into HeLa cells which are derived from a cervical cancer sample and naturally infected and integrated by HPV18. Much slower proliferation of the cancer cells was observed in groups with Cas9 targeting oncogenes compared to others. The results of flow cytometry showed that cotransfection of the two vectors doubled the proportion of cells in S phase, which was increased by 15%, and led those cells to apoptosis. However, neither the digestion after genome PCR nor the sequencing detected the expected mutations or large-range deletion in the target regions. In conclusion, CRISPR-Cas9 targeting oncogenes cured the HPV18 and suppressed the cancer development to an extent. Although the mechanism still needs making out and the efficiency requires improving, this original exploration has unveiled the probability and feasibility of applying CRISPR-Cas9 in gene therapy for HPV and its associated diseases.

Keywords,

HPV18, CRISPR-Cas9, Gene Therapy, Cervical Cancer, Oncogene, HeLa

前言

人乳头状瘤病毒，简称 HPV，是无包膜的二十面体环状双链 DNA 病毒，感染复层上皮细胞覆盖的表皮和粘膜^[1]。它有超过 200 种亚型，亚型 16、18 为感染中最为普遍的高危亚型^[2, 3]。对于一些个体，感染 HPV 只会在皮肤等一些部位产生良性的赘生物——疣，而对于一些个体，感染 HPV 会增加癌前期病变的风险，并最终导致癌症^[4, 5]。HPV 的致癌性源于其病毒基因组中的致癌基因 E6 和 E7，E7 表达的蛋白能够与细胞内 RB 蛋白结合使之降解，激活转录调控因子 E2F，促使细胞周期不断前进，脱离细胞周期蛋白复合物 (Cyclin/Cdk) 的调控和抑制，增强细胞的增殖活性；而 E6 表达的蛋白能介导抑癌的 p53 蛋白的降解，解除其对 E7 引起的细胞周期改变的抑制，使恶性增殖的细胞摆脱凋亡途径，进而发展为肿瘤^[3-9]。研究表明，至少 99.7% 的宫颈癌病例由 HPV 导致^[10]，而每年全球范围预计有 50 万例罹患宫颈癌的病例发生，并导致每年 28 万例因病死亡^[4, 11]。同时 HPV 的感染也会诱发其他阴道肿瘤以及食管癌、头颈癌、扁桃体癌等上皮组织的癌症^[1]。现在世界范围每年新增报道的 HPV 感染病例达到 550 万例^[9]，使该病毒成为威胁人类健康的一大杀手，急需有效的防治手段。

现阶段应对 HPV 感染，已经用于临床的治疗手段基本没有^[11]，仍然以预防为主。早期的筛查是主要的预防手段之一^[12]，临床采用巴氏涂片法^[13]或液基细胞学方法^[14]来检测可能发展为肿瘤的非正常细胞，这样的筛查针对性小效率低，只有很少部分的患者能够被及时检查出并加以预防，多数感染者或者是发现时就已经是感染的晚期，或者就没有机会和条件进行这样的筛查。另外一种比较有效的预防措施是接种 HPV 疫苗，发展上市比较成熟的疫苗有 Cervarix^[15]和 Gardasil^[16]，它们已经被应用于临床并且证明能够一定程度有效地预防由 HPV16 或 18 亚型引发的癌症风险^[17-19]。这样的疫苗设计是基于病毒衣壳蛋白的保守性制造的假病毒颗粒^[1, 17]，但它依然不能保证完全有效预防，需要多次重复注射且仅是对于年轻还没有接触过 HPV 的女性有效^[11]。该疫苗在广大发展中国家并不普及，且没有治疗意义。

对于宫颈癌等由 HPV 所引发的癌症，临床主要还是以对待一般肿瘤的方法进行治疗，如放疗、化疗、免疫治疗等^[5]。这些方法有很多副作用，对于机体的

损伤较大，难以有效抗癌，属于治标不治本的方法。因此高效特异地治疗 HPV 急需被实现^[20]。由于 HPV 的致癌性取决于其 E6 和 E7 基因的作用，有研究利用蛋白酶体和组蛋白去乙酰化酶抑制剂来特异性治疗 HPV 引发的肿瘤^[21]，其设计是基于阻断两个致癌基因的下游通路，但这不能从根本上解决问题。更多研究者利用 RNAi 技术靶向 HPV16 或 18 的启动子和癌基因以降低 E6、E7 基因的表达^[22-33]，取得了一定的效果，但由于基因沉默效率不高、RNAi 又容易产生脱靶等诸多问题^[34, 35]，这种方法也难以向临床治疗发展。

靶向的基因编辑技术能够高效特异地实现 DNA 双链的切割^[36, 37]，锌指结构核酸内切酶（ZFNs）和转录激活样效应物核酸内切酶（TALENs）^[38]是其中的代表，两者已经被广泛应用于各种研究领域^[39, 40]甚至投入临床基因治疗的研究中^[41]。因此，利用 ZFNs 或 TALENs 靶向 HPV 的致癌基因就可能取得较好的基因治疗的效果^[42]，有课题组就利用 ZFNs 靶向 HPV18 的复制起始区，在体外抑制了 HPV18 基因组的复制^[43]。然而这两种基因编辑工具是蛋白介导的 DNA 特异性序列识别，其效率和特异性势必会受到 DNA 表观修饰和序列结构本身的影响，而且这两种核酸酶的构建过程都比较复杂，尽管不断有构建方法的优化^[44-46]，但依然是费时费力的工作。

成簇有规律间隔的短回文重复结构及其相关核酸酶组成的基因编辑系统（CRISPR-Cas）是一种 RNA 介导的核酸酶，它广泛存在于细菌中作为其获得性免疫功能的一部分^[47-51]，其中较为简单的一种 CRISPR-Cas9 系统被证明在原核和真核细胞中都有活性^[52-54]，Cas9-RNA 复合体与特定的 DNA 序列（PAM）识别，而后其先导 RNA 部分与靶点 DNA 形成碱基互补配对的牢固结合，激活 Cas9 核酸酶活性，在 PAM 上游 2~3 bp 位置实现 DNA 双链的切割^[55-58]。该系统构建简单、切割高效特异^[59]、较少受到 DNA 结构和修饰影响^[60-62]，已经被广泛应用于酵母^[63]、果蝇^[64, 65]、线虫^[66]、斑马鱼^[67-71]、鼠^[71-79]、兔^[80]、猪^[81]甚至猴^[82]等多种模式生物的基因编辑研究，并且拓展应用到基因筛选^[83-86]、转录调控^[87-93]、基因标记^[60, 94]和 enCHIP^[95]，也已经在细胞和小鼠上证实了用于基因治疗的可行性^[96-98]。由于 CRISPR-Cas9 的优势，它可以高效特异实现 DNA 的双链断裂（DSB），形成基因突变功能性敲除或大片段的基因缺失，将其靶向 HPV 的致癌基因，可以削弱 HPV 的致病性，消除病毒和感染细胞，甚至起到治疗相关肿瘤的效果。

本论文选择 HPV18 病毒天然感染并整合的宫颈癌细胞株 HeLa^[99-101]作为研究对象,通过构建靶向癌基因的 CRISPR-Cas9 载体 pX260,转染 HeLa 细胞并实现其在细胞中的表达,对 HeLa 细胞中 HPV18 的致癌基因 E6 和 E7 的特定位点进行切割,造成双链断裂(DSB),诱发存在错误修复的非同源末端连接^[102, 103],实现对癌基因的功能突变敲除或基因缺失,伴随致癌基因 E6、E7 的失活和基因组损伤,被病毒感染的 HeLa 细胞会发生凋亡,实现治疗效果。在基因组 DNA 水平利用 PCR 技术检测 CRISPR-Cas9 是否切割和引发基因突变重组,在细胞水平检测细胞增殖活性的变化,利用流式细胞术检测细胞周期的变化以及细胞是否发生凋亡。虽然在基因组上并没有探测到预期位置的突变和重组,但引入 Cas9 系统却一定程度抑制了 HeLa 细胞的生长,尤其是双靶点共同作用时,影响到了其细胞周期并促使其发生了凋亡。

材料与方法

1 材料

1.1 细胞

HeLa 细胞，实验室保种。

1.2 载体与宿主菌

1.2.1 载体

1.2.1.1 pX260-U6-DR-BB-DR-Cbh-NLS-hSpCas9-NLS-H1-shorttracr-
-PGK-puro 载体，购自 Addgene。

1.2.1.2 pMD18-T 载体，购自 TaKaRa。

1.2.2 宿主菌

DH5 α 感受态大肠杆菌，实验室自制。

2 试剂

2.1 LB 培养基

组成	LB 液体培养基 (1 L)	LB 固体培养基 (1 L)
Tryptone	10 g	10 g
Yeast Extract	5 g	5 g
NaCl	10 g	10 g
Agar	—	15 g
加水定容至	1000 mL	1000 mL

灭菌条件：121 $^{\circ}\text{C}$ ，高压湿热，20 min。

氨苄抗性培养基在灭菌后加入氨苄青霉素混匀至浓度为 0.1%

2.2 50 $\times$ TAE 凝胶电泳缓冲液

组成	
Tris	242 g
Na ₂ EDTA 2H ₂ O	37.2 g
冰醋酸	57.1 mL
加水定容至	1000 mL

调节 pH 至 8.0

2.3 琼脂糖 DNA 电泳凝胶

组成	1% 琼脂糖凝胶
----	----------

琼脂糖	1 g
1×TAE 缓冲液	100 mL
热熔 2 min 后加入 5 μL 溴化乙锭 (EB) 混匀	

2.4 HeLa 细胞培养液

组成	体积配比
DMEM high-glucose (HyClone)	96.5%
胎牛血清 FBS (HyClone)	2.5%
100 U/mL 青霉素	1%
100 μg/mL 链霉素	1%

2.5 PBS 缓冲液

组成	
NaCl	8 g
KCl	0.2 g
Na ₂ HPO ₄	1.44 g
KH ₂ PO ₄	0.24 g
加水定容至	1000 mL

调节 pH 至 7.4

灭菌条件: 121℃, 高压湿热, 20 min。

2.6 转染试剂

2.6.1 OptiMEM (GIBCO)

2.6.2 聚乙烯亚胺溶液 (PEI), 实验室配制, pH 6.5~7.43

2.7 普通质粒小提试剂盒 (TIANGEN)

2.8 血液/细胞/组织基因组 DNA 提取试剂盒 (TIANGEN)

2.9 琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒 (TIANGEN)

2.10 Annexin V ,FITC 细胞凋亡检测试剂盒 (DOJINDO)

2.11 细胞周期检测试剂

2.11.1 碘化丙啶 (PI) 50 mg/μL (BIOTIUM)

2.11.2 RNase A 10 mg/μL (TIANGEN)

3 实验仪器

3.1 peqSTAR PCR 仪 (peQLab)

3.2 琼脂糖凝胶电泳仪 (TANON)

3.3 荧光显微镜 (Nikon)

3.4 FACS Calibur 流式细胞仪 (BD)

4 实验软件

4.1 Vector NTI Advance 11.5.1 软件组合

4.2 流式细胞仪数据分析软件

4.3 NCBI BLAST 在线程序 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)

5 实验方法

5.1 CRISPR-Cas9 靶点的选择

5.1.1 依照文献报道, 长度为 20 bp 的先导 RNA 即能有效特异地介导 Cas9 蛋白的作用^[104]。因此, 在 HPV18 的 E6、E7 基因的正义链和反义链上寻找 Cas9 蛋白识别位点 (PAM) 的序列 NGG, 并取紧挨着 PAM 序列 5'端的 20 个核苷酸, 连同 NGG 全长 23 bp, 作为备选靶点库。

5.1.2 将所有 23 bp 的靶点核苷酸序列输入 NCBI 的 BLAST 软件, 在线与人体基因组比对, 如果其 3'端连同 NGG 的 9~15 bp 序列与人体基因组同源性高, 就剔除这样的靶点。因为根据研究, 这样的靶点容易在人体基因组上发生脱靶^[61, 62, 105, 106], 即产生非特异的结合和切割。在余下靶点中选取与人体基因组同源性低、不产生二级结构的靶点序列, E6 和 E7 基因上各一个, 取其不含 NGG 的 20 bp 作为构建载体所需的序列。

5.2 携带靶点的 pX260 质粒构建

5.2.1 pX260 空载体质粒酶切, 体系置于 37 °C 维持 4~6 小时。

pX260	1 µg
10×NEB Buffer 2	2 µL
<i>Bbs</i> I	0.5 µL
ddH ₂ O	X µL
总计	20 µL

5.2.2 酶切体系全部上样琼脂糖凝胶电泳, 切胶回收被消化过的 pX260 载体骨架。(使用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒)

5.2.3 合成 20 bp 的靶点寡核苷酸链且带有合适的粘性末端序列。(由生物工程公司合成, 大写字母为靶点序列)

E6 正链: 5' – aaacCTGCTGGATTCAACGGTTTCgt – 3'

E6 负链: 3' – GACGACCTAAGTTGCCAAAGcaaaat – 5'

E7 正链: 5' – aaacCACAACATTGTGTGACGTTGgt – 3'

E7 负链: 3' – GTGTTGTAACACACTGCAACcaaaat – 5'

5.2.4 E6、E7 靶点寡核苷酸链退火

正链	1 μ L
负链	1 μ L
10 $\times$ T4 Ligation Buffer	1 μ L
T4 PNK	0.5 μ L
ddH ₂ O	6.5 μ L
总计	10 μ L

体系置于 PCR 仪进行如下程序:

37 $^{\circ}$ C	30 min
95 $^{\circ}$ C	5 min
每分钟下降 1 $^{\circ}$ C 直到 25 $^{\circ}$ C	
25 $^{\circ}$ C	维持

5.2.5 寡核苷酸链靶点连接 pX260 载体

插入片段	2 μ L
pX260 载体骨架	2.5 μ L
10 $\times$ T4 Ligation Buffer	1 μ L
T4 Ligase	0.5 μ L
ddH ₂ O	4 μ L
总计	10 μ L

体系于室温放置 2~4 小时。

5.2.6 连接体系转化 DH5 α 感受态大肠杆菌, 涂板于氨苄青霉素抗性的平板, 于 37 $^{\circ}$ C 过夜培养。

5.2.7 挑取大肠杆菌单克隆菌落于氨苄青霉素抗性的液体培养基, 于 37 $^{\circ}$ C 摇菌过夜, 扩大培养。

5.2.8 收集获得的菌液, 小提质粒 pX260-E6、pX260-E7。(使用普通质粒小提试剂盒)

5.2.9 酶切质粒鉴定插入片段, 并且测序鉴定所构建的质粒。(由生工生物工程公司测序)

5.3 细胞培养

用 HeLa 细胞培养液培养 HeLa 细胞于 37 °C、5% CO₂ 培养箱，2~3 天传代一次。

5.4 转染

5.4.1 转染前一天种 HeLa 细胞于 24 孔板，密度为每孔 4×10^4 个。

5.4.2 转染时每孔加入 1.2 μ L 转染试剂 PEI 和 800 ng DNA。

5.4.3 分别将 PEI 和 DNA 与一定量 OptiMEM 混匀放置 5 分钟。

5.4.4 再将两者混匀放置 20 分钟。

5.4.5 将 24 孔板中的培养基换为无血清培养基后，加入 PEI 和 DNA 的 OptiMEM 混合液。

5.4.6 将 24 孔板置于细胞培养箱孵育 4~6 小时，之后再将培养液换为正常 HeLa 细胞培养液。

5.4.7 转染时，针对每一种检测方法的每一个时相点，均设置 Mock 组（即不转染的阴性对照组）、空载体 pX260 组、pX260-E6 组、pX260-E7 组、pX260-E6+E7 组（即两种质粒共转染）和 Fugw 绿色荧光表达质粒组，转染效率通过 Fugw 组绿色荧光表达量来体现。

5.4.8 转染后 24 小时、48 小时、72 小时均用荧光显微镜观察各组细胞的数目和形态，初步评估转染效率以及细胞增殖和凋亡的情况。

5.5 基因组 PCR 和 T7E1 酶切鉴定

5.5.1 分别在转染后 24 小时、48 小时、72 小时收取各组细胞，并提取基因组，冻存备用。

5.5.2 设计并合成引物，扩增 E6E7 基因包括靶点位置。（由生工生物工程公司合成）

上游引物 F3: 5' – ATGGCGCGCTTTGAGGATCC – 3'

下游引物 R3: 5' – TGCACACCACGGACACACAA – 3'

扩增片段长度为 791 bp。

5.5.3 PCR 扩增各组目的片段并用 DNA 凝胶电泳成像查看扩增结果。

5.5.4 割胶回收扩增得到的目的片段（使用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒）。

5.5.5 对胶回收的扩增片段进行 T7E1 酶切鉴定。

胶回收片段	9.7 μL (> 100 ng)
10 $\times$ NEB Buffer 2	1.1 μL
体系于 PCR 仪进行退火程序	
95 $^{\circ}\text{C}$	10 min
每秒下降 1 $^{\circ}\text{C}$ 至 85 $^{\circ}\text{C}$	
每秒下降 0.1 $^{\circ}\text{C}$ 至 25 $^{\circ}\text{C}$	
维持在 25 $^{\circ}\text{C}$	
加入 T7E1	0.2 μL
恒温水浴	
37 $^{\circ}\text{C}$	30 min
总计	11 μL

酶切体系用 DNA 凝胶电泳成像查看结果。

5.6 测序和测序结果分析

5.6.1 胶回收产物连接 pMD18-T 载体

胶回收片段	4.5 μL
pMD18-T	0.5 μL
Solution I	5 μL
总计	10 μL

5.6.2 连接体系转化 DH5 α 感受态大肠杆菌，涂板于氨苄青霉素抗性的平板，于 37 $^{\circ}\text{C}$ 过夜培养。

5.6.3 挑取大肠杆菌单克隆菌落于氨苄青霉素抗性的液体培养基，于 37 $^{\circ}\text{C}$ 摇菌过夜，菌液送生工生物工程公司抽质粒测序。

5.6.4 测序结果用 Vector NTI 和 AlignX 软件分析。将扩增片段的测序结果和野生型进行比对。

5.7 细胞凋亡检测（使用 Annexin V ,FITC 细胞凋亡检测试剂盒）

5.7.1 分别在转染后 24 小时、48 小时、72 小时和 96 小时收取各组细胞，依照试剂盒的说明操作，用 1 $\times$ Annexin V Binding Solution 制成每毫升 1×10^6 个细胞的细胞悬液。

5.7.2 取 100 μL 细胞悬液，加入 5 μL Annexin V ,FITC 和 5 μL PI Solution。

5.7.3 样品室温避光孵育 15 分钟后，加入 400 μL 1 $\times$ Annexin V Binding Solution 结束孵育。

5.7.4 加样到流式细胞仪进行检测。Annexin V (+) 且 PI (-) 的细胞认为是早期凋亡的细胞, Annexin V (+) 且 PI (+) 的细胞认为是已死亡细胞, 两者的数目都被用作统计比较。

5.8 细胞周期和亚二倍体检测

5.8.1 分别在转染后 24 小时、48 小时、72 小时和 96 小时收取各组细胞, 用 PBS 缓冲液清洗 2 遍。

5.8.2 用 1 mL 预冷的 70%乙醇重悬细胞, 置于 4 °C 固定 12 小时以上。

5.8.3 用 PBS 缓冲液清洗除去乙醇, 并重悬细胞于 500 μ L PBS 缓冲液中。

5.8.4 向细胞悬液样品中加入 PI 和 RNase A 至终浓度为 50 ng/ μ L。

5.8.5 样品避光于 37 °C 孵育 30 分钟。

5.8.6 加样到流式细胞仪进行检测。通道值小于 200 (即 2 倍体峰位置) 的信号是亚二倍体信号, 可以被认为是发生凋亡细胞的信号, 其数目被用作统计比较。

5.8.7 利用流式细胞分析软件分析测得的数据和峰图, 拟合计算处于不同细胞周期的细胞比例, 其数值被用于统计比较。

结果

1 HPV18 基因组上 CRISPR-Cas9 靶点的确定

为了选择高效安全的靶点,根据 CRISPR-Cas9 的作用特点利用软件程序进行筛选,得到两个特异性比较高的作用靶点,分别位于 E6、E7 两个基因的反义链上。

分别是: E6: CTGCTGGATTCAACGGTTTC TGG

E7: CACAACATTGTGTGACGTTG TGG

如图 1 所示,两个靶点切割位置相距 327 bp。

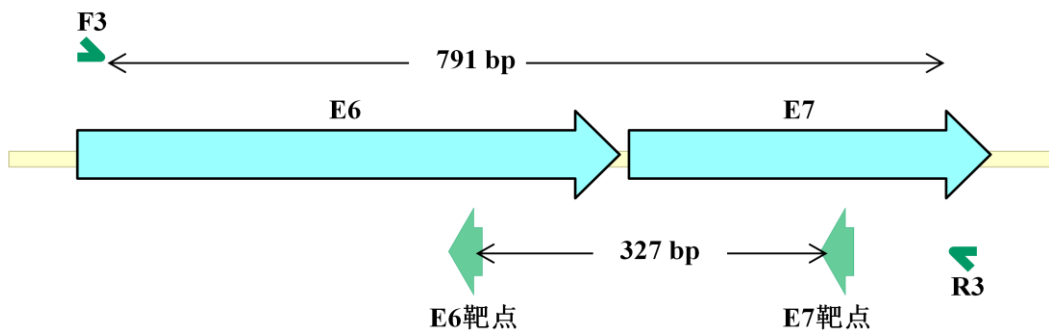


图 1. CRISPR-Cas9 靶点在 E6、E7 基因上的位置。E6、E7 基因和针对 E6、E7 基因的靶点均如图所示。F3 为上游引物, R3 为下游引物。

2 携带靶点的 pX260 载体质粒构建

为了实现 CRISPR-Cas9 系统在人体细胞中的切割,将靶点寡核苷酸片段连接到可以真核表达 CRISPR-Cas9 系统的 pX260 载体骨架上,获得了 pX260-E6、pX260-E7 两个携带靶点的质粒,如图 2 所示。

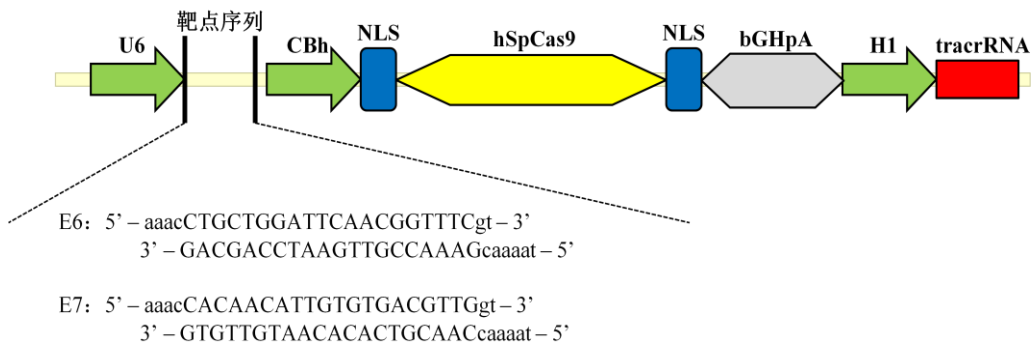


图 2. 携带靶点的 pX260 质粒构建。pX260 载体上 CRISPR-Cas9 系统各部分的组成如图所示。靶点序列中大写字母为具体靶点。

3 靶向 E6、E7 的 CRISPR-Cas9 有效地抑制了 HeLa 细胞的增殖

为了观察携带靶点的 CRISPR-Cas9 对 HeLa 细胞生长情况的影响，在转染后的 24、48 和 72 小时均在荧光显微镜下，对各实验组随机选取视野拍照。如图 3A 所示，转染效率在 30~60%。对比实验组、空载体组和阴性对照，如图 3B 所示，含靶点的 CRISPR-Cas9 的引入比较明显地阻碍了 HeLa 细胞的增殖，不论是双靶点还是单一靶点。在 24 小时的时候组间细胞数目的差别还不明显，但到 72 小时，所有三个实验组中的细胞数目均明显少于空载体和阴性对照，表示细胞的正常增殖受到了抑制。

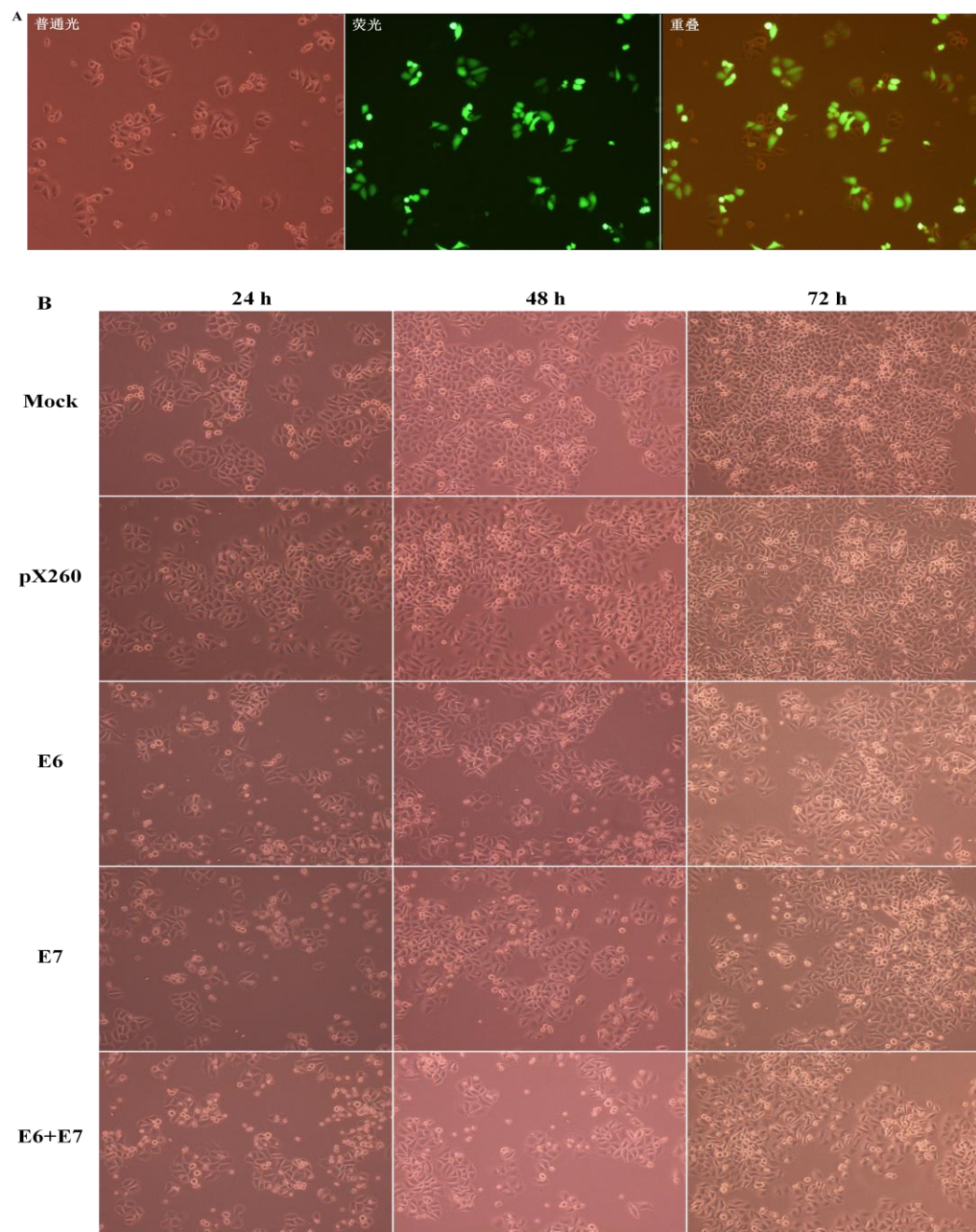
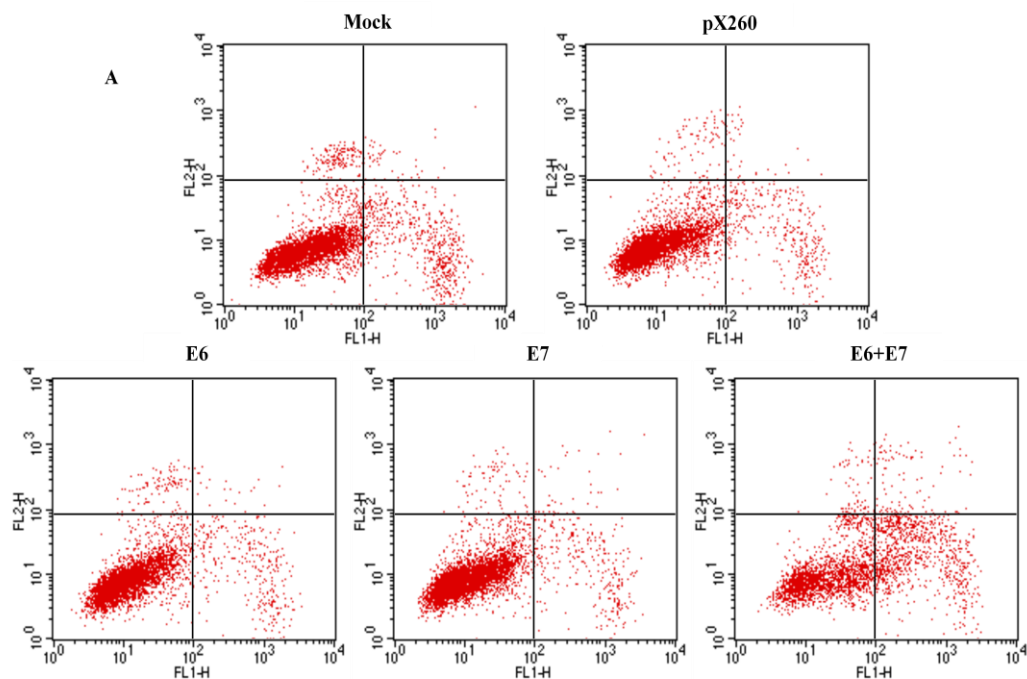


图 3. 靶向 E6、E7 的 CRISPR-Cas9 抑制了 HeLa 细胞的生长。 A. Fugw 组转染后 24 小时 40 倍镜下随机选取视野拍摄的 HeLa 细胞的生长情况，以荧光细胞数比总细胞数代表转染效率。B. 转染后各时相点在 40 倍镜下随机选取视野拍摄的各组 HeLa 细胞的生长情况。

4 同时靶向 E6、E7 的 CRISPR-Cas9 促进了 HeLa 细胞的凋亡

为了探究靶向 E6、E7 的 CRISPR-Cas9 对于 HeLa 细胞生长的抑制是不是由于诱导细胞凋亡所致，即可能的由 CRISPR-Cas9 造成的特异性基因组损伤是否诱导了 HeLa 细胞凋亡。分别在转染后 24、48、72、96 小时收集各组细胞，凋亡检测试剂盒染色后进行流式细胞仪检测，流式细胞仪实验结果见图 4A。以早期凋亡细胞比例的高低代表是否有明显被诱导凋亡的现象。如图 4B 所示，在 24 和 48 小时，各组的早期凋亡细胞比例均没有明显差异，而到了 72 和 96 小时，双靶点组的早期凋亡比例要比其他组明显多出许多，尤其是转染后第 4 天，其他组的早期凋亡比例均没有超过 15%，而 E6、E7 双靶点组的早期凋亡比例已经要达到 30%，是其他组别的 2 倍还要多。由此认为，双靶点同时针对 E6、E7 的 CRISPR-Cas9 的作用，即引发 E6、E7 基因的大片段缺失，可能有效地抑制了 E6、E7 癌基因的活性，其造成的基因损伤一定程度地诱导了 HeLa 细胞的凋亡，而单一靶点的作用没有明显地诱导癌细胞的凋亡。



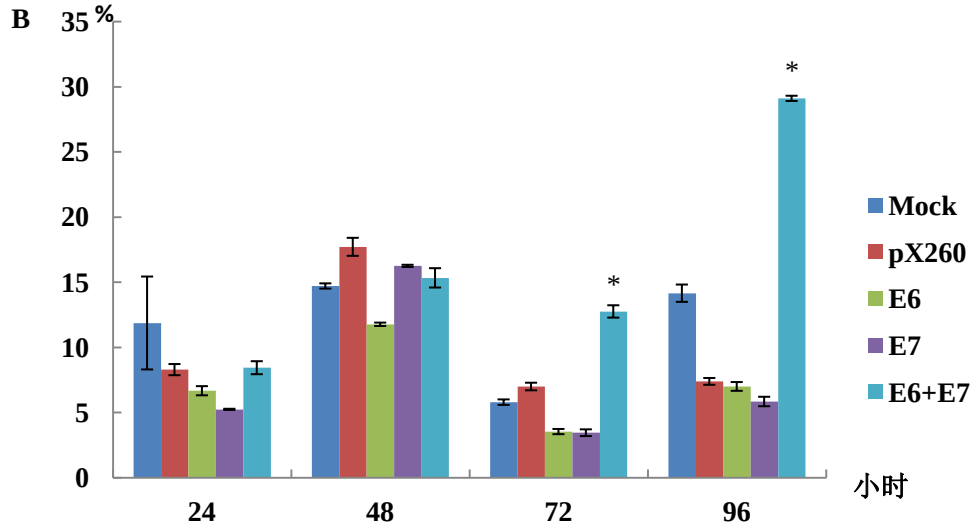
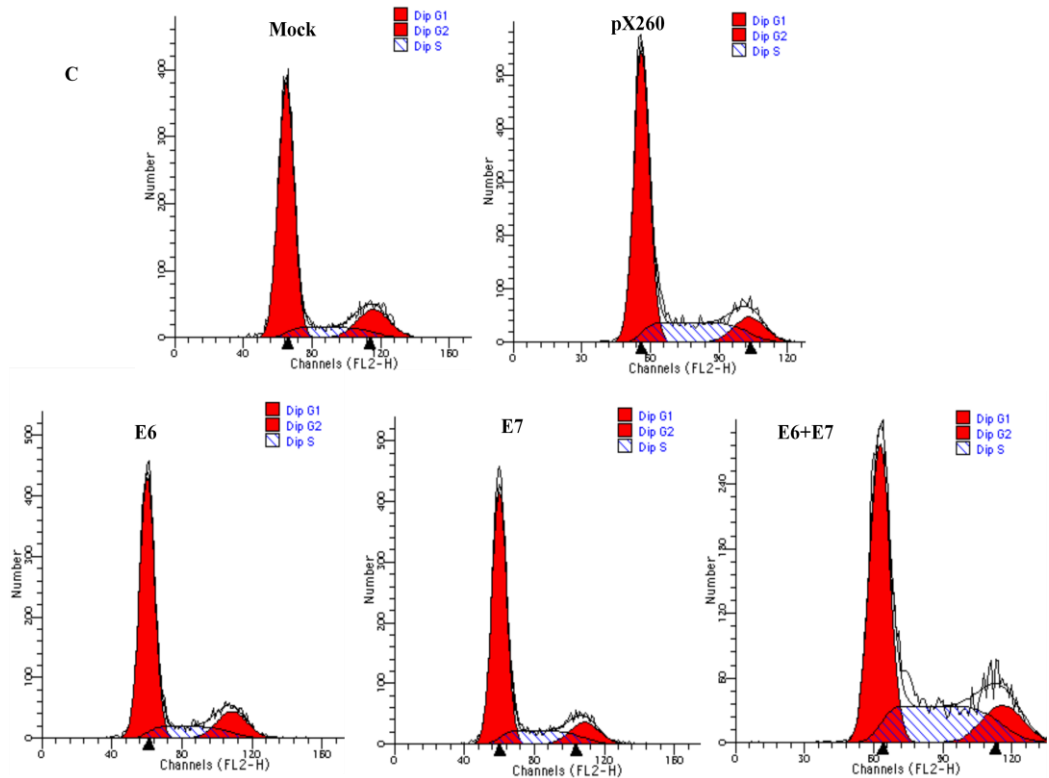
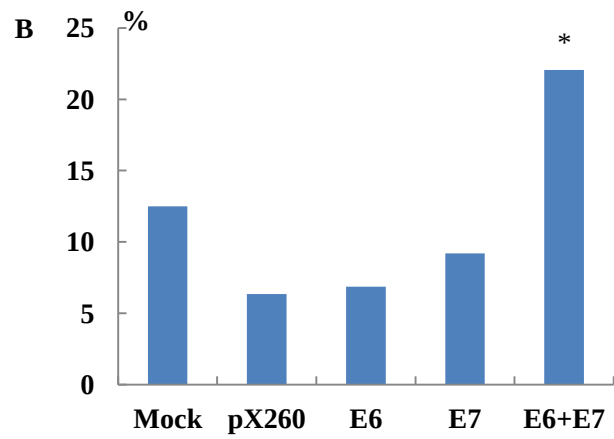
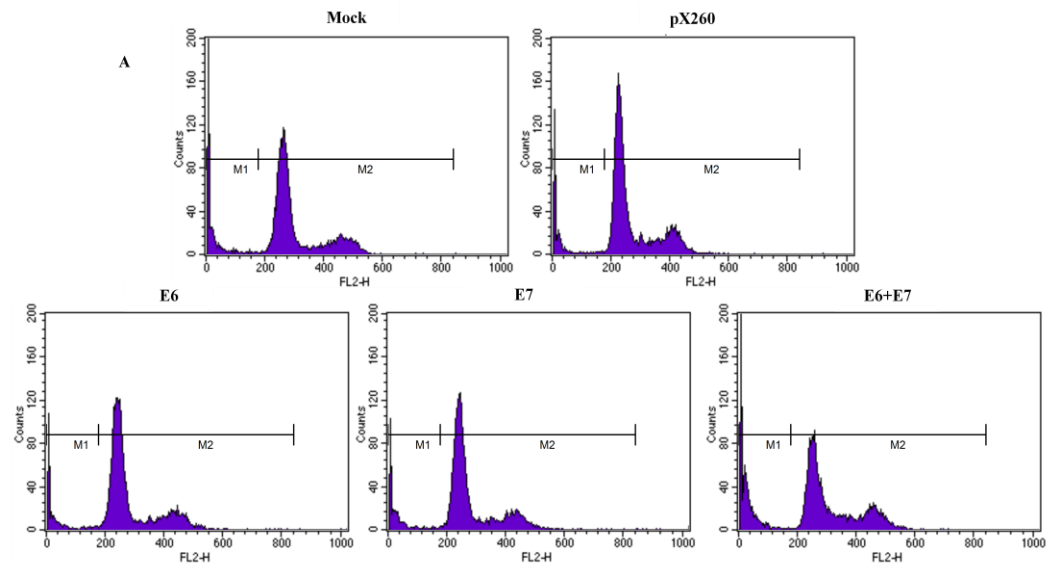


图 4. 靶向 E6、E7 的 CRISPR-Cas9 诱导 HeLa 细胞凋亡的流式细胞术检测结果。A. 转染后 96 小时各组细胞凋亡试剂盒染色后的流式细胞仪检测结果图。左下区为正常生长细胞；上半区为死亡细胞；右下区为发生早期凋亡的细胞。B. 转染后各时相点各组细胞凋亡染色流式细胞仪检测结果中发生早期凋亡的细胞所占比例的柱形图。*代表该数据与同组别其他有显著性差异， $p < 0.05$ 。

5 同时靶向 E6、E7 的 CRISPR-Cas9 影响了 HeLa 细胞的细胞周期

为了进一步验证 CRISPR-Cas9 在双靶点介导时能够诱导 HeLa 细胞的凋亡，同时探究其中的原因，在转染细胞后 96 小时收集细胞乙醇固定后进行 PI 染色，通过流式细胞仪检测细胞周期。如图 5A 所示，亚二倍体的部分可以表示破碎的染色体，即包含了凋亡细胞的信号。如图 5B，可以发现，对照组和单靶点组亚二倍体峰信号所占的比例均在 10% 左右，而双靶点组亚二倍体峰信号的比例则超过了 20%，远高于其他组别，这个结果和凋亡试剂盒的检测结果一致，说明了双靶点组的 CRISPR-Cas9 诱导了 HeLa 细胞凋亡。用流式细胞分析软件分析峰图，拟合计算得到各组处于不同细胞周期的细胞比例，如图 5C 所示。比较各组的细胞周期数据，如图 5D，可以发现各组细胞 G2 期的比例相近，而双靶点组相对于其他 4 组有更多的细胞处在 S 期而不是 G1 期，其 S 期的细胞比例几乎是其他组的 2 倍，高出了 15%。这与细胞凋亡检测反映的比例结果一致，双靶点组与其他组别间存在显著性差异。所以，同时针对 E6、E7 的 CRISPR-Cas9 不仅诱导了 HeLa 的凋亡，也影响了其细胞周期，使更多的细胞停留在了 S 期，而单一靶点的作用似乎没有影响。



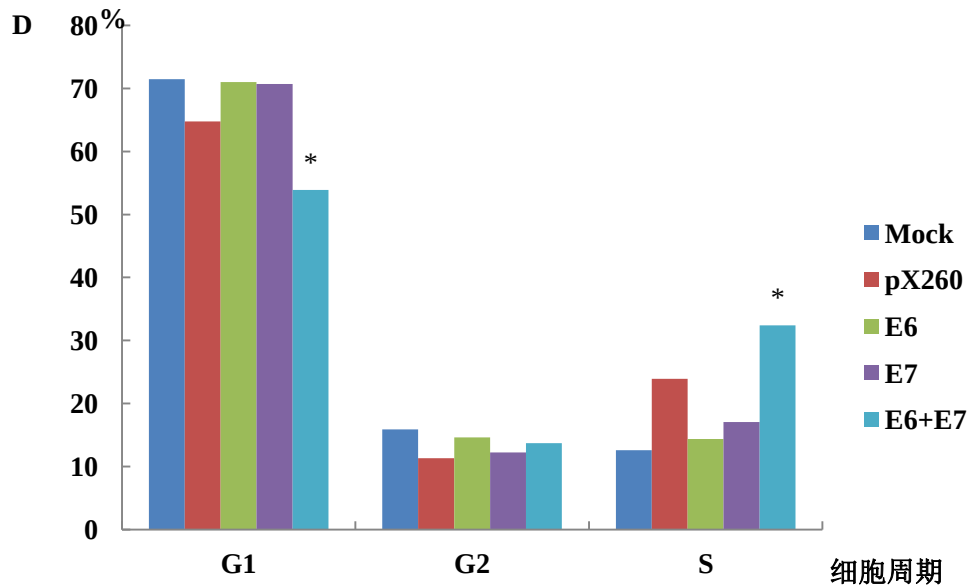


图 5. 靶向 E6、E7 的 CRISPR-Cas9 对 HeLa 细胞细胞周期的影响。A. 转染后 96 小时各组细胞 PI 染色后的流式细胞仪检测结果图。M1 区为亚二倍体信号，M2 区为处在正常细胞周期中的染色体的倍体信号。B. 流式细胞仪检测结果中各组亚二倍体区信号所占比例的柱形图。C. 软件计算拟合的各组细胞的细胞周期峰图。从左向右第一个峰代表 G1 期信号，中间平台代表 S 期信号，第二个峰代表 G2 期信号。D. 软件拟合结果中处在各个细胞周期的各组细胞比例分布的柱形图。*代表该数据与同组别其他有显著性差异， $p < 0.05$ 。

6 没有检测到靶向 E6、E7 的 CRISPR-Cas9 引起的基因突变和大片段基因敲除

6.1 为了检测 CRISPR-Cas9 在 HeLa 细胞中对靶点位置的切割，在细胞被转入含靶点的 CRISPR-Cas9 系统 2 天后，提取了细胞的基因组，利用 PCR 技术扩增了靶点位置，如图 6.1 所示。可以看出，各组中 791 bp 的目标片段均被有效地扩增了，而双靶点组如果存在高效的同时切割，将从目的基因上切除一段约为 327 bp 的 DNA 片段，因而能够扩增出稍短的 464 bp 的条带，然而从电泳图上并没有看到这条带。

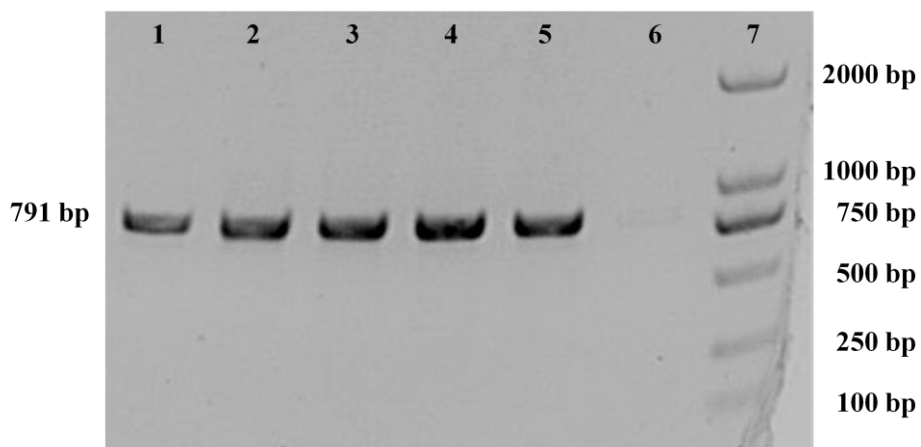


图 6.1. 各组细胞 E6、E7 基因的 PCR 扩增结果的琼脂糖凝胶电泳分析。泳道 1，Mock 组；泳道 2，空载体 pX260 组；泳道 3，E6 靶点组；泳道 4，E7 靶点组；泳道 5，E6+E7 双靶点组；泳道 6，阴性对照组水；泳道 7，DNA Marker，各条带大小如图所示。

6.2 将 PCR 产物，即含有 E6、E7 基因的目的片段割胶回收后，进行 T7E1 的酶切鉴定。如果 E6、E7 基因中发生了重组突变，T7E1 酶能够在重组突变的位置切割，从而将原有的单一长片段切断，得到 2 条较短的小片段，且两者大小之和接近原来的片段长度。如图 6.2 所示，酶切后的电泳图只呈现了非特异切割造成的弥散条带，并没有出现预期的特异切割产生的较短条带。

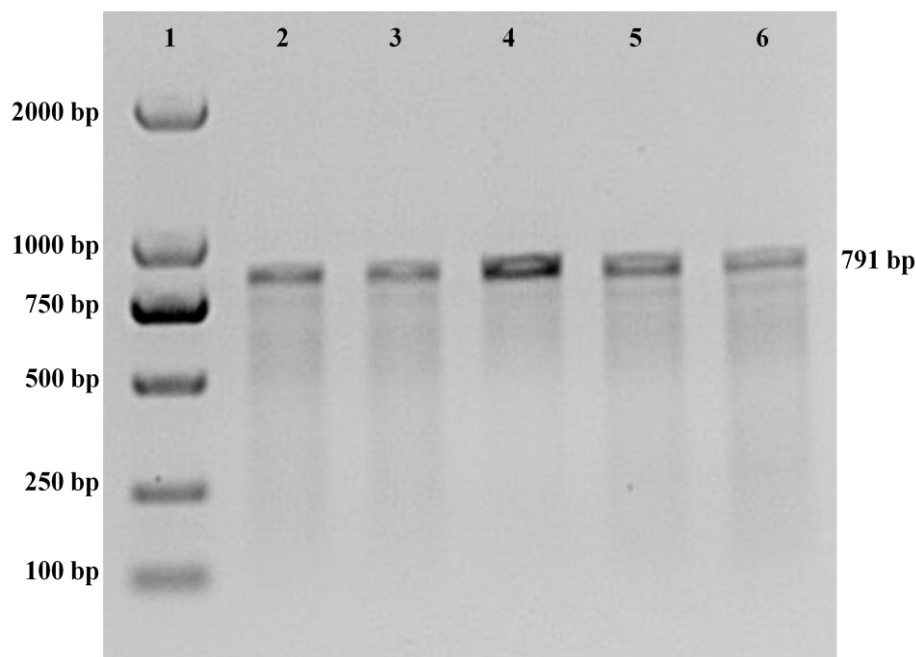


图 6.2. 各组 E6、E7 基因扩增回收后由 T7E1 酶切结果的琼脂糖凝胶电泳分析。泳道 1，DNA Marker，各条带大小如图所示；泳道 2，Mock 组；泳道 3，空载体 pX260 组；泳道 4，E6 靶点组；泳道 5，E7 靶点组；泳道 6，E6+E7 双靶点组。

6.3 将割胶回收的目的片段连接 T 载体，构建被转染的 HeLa 细胞 E6、E7 基因的克隆文库。从克隆文库中随机挑选单克隆的基因序列进行测序，单靶点和双靶点组均各挑取了 4 个克隆，而 pX260 对照组挑取了 2 个克隆。测序结果如图 6.3 所示，除去测序不成功和没有连接到目的基因的空载体，所有基因序列均和野生型的 E6、E7 基因一致，虽有个别位点呈现多态性，但也不影响 E6、E7 编码的蛋白的表达。而设计的靶点位置，没有出现预期的突变和重组，双靶点组也没有出现基因切除导致的大片段缺失。

A		(477)	477	490	500	510	520
E6E7	(310)	AGGTGCCTGCGGTG	CCAGAA	ACCGTTGA	ATCCAGCAG	AAAAACTTAGACACCT	
pMD-T-pX260-1 rc	(476)	AGGTGCCTGCGGTG	CCAGAA	ACCGTTGA	ATCCAGCAG	AAAAACTTAGACACCT	
pMD-T-pX260-2 rc rc	(352)	AGGTGCCTGCGGTG	CCAGAA	ACCGTTGA	ATCCAGCAG	AAAAACTTAGACACCT	
pMD-T-E6-2 rc	(476)	AGGTGCCTGCGGTG	CCAGAA	ACCGTTGA	ATCCAGCAG	AAAAACTTAGACACCT	
pMD-T-E6-4	(361)	AGGTGCCTGCGGTG	CCAGAA	ACCGTTGA	ATCCAGCAG	AAAAACTTAGACACCT	
pMD-T-E7-2	(352)	AGGTGCCTGCGGTG	CCAGAA	ACCGTTGA	ATCCAGCAG	AAAAACTTAGACACCT	
pMD-T-E7-3	(352)	AGGTGCCTGCGGTG	CCAGAA	ACCGTTGA	ATCCAGCAG	AAAAACTTAGACACCT	
pMD-T-E7-4	(352)	AGGTGCCTGCGGTG	CCAGAA	ACCGTTGA	ATCCAGCAG	AAAAACTTAGACACCT	
pMD-T-E6+E7-1	(334)	AGGTGCCTGCGGTG	CCAGAA	ACCGTTGA	ATCCAGCAG	AAAAACTTAGACACCT	
E6-t5-cas9#2	(1)	-----	CCAGAA	ACCGTTGA	ATCCAGCAG	-----	
Consensus	(477)	AGGTGCCTGCGGTG	CCAGAA	ACCGTTGA	ATCCAGCAG	AAAAACTTAGACACCT	

B		(804)	804	810	820	830	840	850
E6E7	(637)	CCCGACGAGCTGAA	CCACAACGTCACACAATGTTGTG	TATGTGTTGTAAGTGTG				
pMD-T-pX260-1 rc	(803)	CCCGACGAGCTGAA	CCACAACGTCACACAATGTTGTG	TATGTGTTGTAAGTGTG				
pMD-T-pX260-2 rc rc	(679)	CCCGACGAGCTGAA	CCACAACGTCACACAATGTTGTG	TATGTGTTGTAAGTGTG				
pMD-T-E6-2 rc	(803)	CCCGACGAGCTGAA	CCACAACGTCACACAATGTTGTG	TATGTGTTGTAAGTGTG				
pMD-T-E6-4	(688)	CCCGACGAGCTGAA	CCACAACGTCACACAATGTTGTG	TATGTGTTGTAAGTGTG				
pMD-T-E7-2	(679)	CCCGACGAGCTGAA	CCACAACGTCACACAATGTTGTG	TATGTGTTGTAAGTGTG				
pMD-T-E7-3	(679)	CCCGACGAGCTGAA	CCACAACGTCACACAATGTTGTG	TATGTGTTGTAAGTGTG				
pMD-T-E7-4	(679)	CCCGACGAGCTGAA	CCACAACGTCACACAATGTTGTG	TATGTGTTGTAAGTGTG				
pMD-T-E6+E7-1	(661)	CCCGACGAGCTGAA	CCACAACGTCACACAATGTTGTG	TATGTGTTGTAAGTGTG				
E7-t2-cas9#2	(1)	-----	CCACAACGTCACACAATGTTGTG	-----				
Consensus	(804)	CCCGACGAGCTGAA	CCACAACGTCACACAATGTTGTG	TATGTGTTGTAAGTGTG				

图 6.3. 各组 E6、E7 基因的测序结果。 A. E6 靶点位置的测序结果；B. E7 靶点位置的测序结果。由上而下各行依此是：1. 野生型基因；2-3. 空载体 pX260 组；4-5. E6 靶点组；6-8. E7 靶点组；9. E6+E7 双靶点组；10. A. E6 靶点序列，B. E7 靶点序列。

讨论

本课题将 CRISPR-Cas9 这个特异性的核酸内切酶工具引入了 HPV18 病毒整合的宫颈癌细胞株 HeLa，靶向 HPV18 的致癌基因 E6、E7，虽然在基因组层面上没有检测到 DNA 被切割造成的突变重组甚至大片段的基因缺失，但是对细胞生长表型的观察和流式细胞仪的检测结果显示携带靶点的 CRISPR-Cas9 一定程度上起到了抑制 HeLa 细胞生长的作用。单独靶向 E6 或者 E7 基因并没有取得很好的抑癌效果，但同时转入这两个靶点能够影响 HeLa 的细胞周期，使更多的细胞停留在 S 期，并诱导其凋亡，从而起到一定的治疗效果。

之前的研究者使用 RNAi 的技术下调 HeLa 中 E6、E7 基因的表达，也起到了类似的抑癌效果，并诱导了细胞的凋亡^[24, 26, 31]，与本实验中的结果一致，这表明了使用特异性核酸内切酶靶向致癌基因进行基因治疗的可行性。然而本实验中并没有在基因组上检测到预期的突变，可能是受制于转染效率和切割效率，在实验组中野生型的背景依然很大，难以有效扩增到突变型，而且发生切割导致基因重组突变的 HeLa 细胞会进入凋亡程序，基因组破碎，因此更加难以检测到发生突变的基因型。相反，表型上的不同会比较容易直观地得到。由于 CRISPR-Cas9 本身已是一种高效的基因切割工具，进一步的验证可能需要更高效的转染方式，或者增加转入的 Cas9 核酸酶的表达量，以提高突变型的比例。此外，HPV18 的基因在 HeLa 细胞中是随机整合的，且有多拷贝^[99, 101]，单一较少的突变会很容易被野生型的基因以同源重组（HR）的方式完美修复，因此较难检测到。

HPV18 基因的多拷贝随机整合也一定程度上解释了单一靶点可能没有效果的原因，因为简单的 E6 或 E7 单基因的突变可以在野生型广泛存在的背景下被比较容易地完美修复，虽然 CRISPR-Cas9 具有很高的切割活性和效率，但多个拷贝的修复几率会大大降低其最终影响，而且，就算有个别突变未被修复，只要还有没有被切割的野生型拷贝存在，癌基因就依然能够正常发挥其活性。这个和 RNAi 的原理不同，由于 RNAi 下调的是整个细胞中的转录水平，所以不受拷贝数的影响，而本实验中对于基因组 DNA 的打击效率可能就受制于拷贝数。不仅如此，单一靶点的切割引发的重组突变并不一定会导致癌基因失活，在不引入终止子的情况下，E6、E7 编码的突变型蛋白依然会被表达出来，虽然 DNA 水平

基因有变化,但可能不影响蛋白的正常结构功能,即使突变确实一定程度改变了蛋白的构型,但如果没有影响到有活性的结构域或关键的基序,就依然不能遏制癌基因的作用,因此单一靶点的作用难以发挥抑癌的功效。

从实验结果中可以发现,当两个靶点同时作用时,CRISPR-Cas9 确是起到了抑制癌细胞生长并诱导其凋亡的治疗效果。一方面,两个靶点同时切割,能够从基因组中切除一段 DNA,这样大片段的基因缺失难以被正确修复,虽然没有检测到,但可以预见其存在,而且这样的缺失极大地影响了 E6、E7 基因的正确表达,使两者各自缺少了一部分。由于之前这两个癌基因的作用会推动细胞周期不断越过检查点进入 S 期,开始 DNA 的复制,从而不断分裂以满足癌细胞增殖的目的,现在 E6、E7 的表达减少使得细胞中的 p53 蛋白和 p21 蛋白水平得以恢复, p21 与细胞周期相关蛋白复合物 Cyclin E/Cdk 结合使之失活,从而中止了细胞周期前进^[3,5],因此在检测细胞周期时,双靶点组会呈现 S 期增多的现象。进一步, p53 蛋白增多会介导这些细胞周期异常的细胞进入凋亡程序,促使被双靶点作用的 HeLa 细胞发生凋亡,实现治疗效果。另一方面,双靶点带来的 E6、E7 基因损伤,也会激活细胞内部正常的损伤修复机制,在难以完成正确修复的情况下使细胞进入凋亡程序,这样的过程只会发生在被 HPV18 感染或整合的细胞中,不会影响正常不含有 HPV18 基因组的健康细胞,因此起到特异性治疗病症的作用。

对于 CRISPR-Cas9 靶向介导被 HPV18 感染或整合的细胞凋亡的具体机制,还需要更多的后续验证,不仅要求更高效的基因组水平检测方法,以探测基因被切割后发生重组突变的情况,也需要更多地检测与中间过程相关的蛋白表达水平的变化。其中,检测被诱导凋亡的细胞中的 p53 蛋白和 p21 蛋白水平是一种可行的方法,如果 E6、E7 基因的缺失是以本实验所预计的方式影响到细胞周期并促使了细胞凋亡,那么相对于对照组,实验组的 HeLa 细胞中的 p53 蛋白和 p21 蛋白的量会在 CRISPR-Cas9 作用后显著增加,这将部分证明对于同时靶向 E6、E7 基因的 CRISPR-Cas9 特异性诱导 HeLa 凋亡机制的猜想。

本实验选取的针对 HPV18 的靶点,是根据 CRISPR-Cas9 的作用原理,一定程度上排除脱靶可能性后随机选取的,因而具有一定的偶然性。由于研究者发现,CRISPR-Cas9 的切割效率会受到具体靶点序列差异的影响^[72],即使是针对同一基因,不同靶点也存在效率差异。因此,本实验中选择的靶点也可能不是较高效

的靶点，所以单靶点作用没有效果，而双靶点的切割效率也不高。随机广泛地选取更多可行的靶点，比较它们之间的切割效率，可能可以找出效率更高更适用于进一步研究和治疗使用的靶点，使检测突变更为容易，而且抑制癌细胞增殖和诱导凋亡的效果更为显著。现有的研究显示 CRISPR-Cas9 也存在一定脱靶的可能^[61, 105-107]，但只要合理选择设计靶点，就能有效规避脱靶的风险^[59]，实现高效特异地切割，本实验中的靶点选择时就经过软件预测减小了脱靶的可能性，由于靶点本身的切割效率就不高，可能的脱靶位点发生脱靶切割的可能性就更加微乎其微，因此没有再对可能的脱靶位点进行扩增测序，检测是否发生脱靶。鉴于靶点的特异性，可以预计应该没有可检测到的脱靶情况发生。

本实验在 CRISPR-Cas9 用于基因治疗 HPV18 方面进行了初步的探索，在此条件下，当 E6、E7 两个基因同时被切割时取得了一定的成效，但效率很低难以继续深入探究。要让此高效的基因编辑工具发挥作用，甚至开展进一步的治疗 HPV 的研究，需要更高效的载体和导入机制。本实验中使用 PEI 作为转染试剂，虽然对细胞毒性较小，比较符合治疗的标准，但转染效率也不高，一般在 30%~40% 左右，不能满足有效抑制肿瘤细胞生长和杀灭病毒的需要，因为多数没有转入 CRISPR-Cas9 的 HeLa 细胞会迅速生长弥补小部分被诱导凋亡带来的空缺，造成结果检测上的困难。因此为了提高效率，可能需要更加高效而低毒的转染试剂，甚至需要多次转染才能体现较好的效果^[108]。除了转染方式的改进，CRISPR-Cas9 的载体选择也可以提高，为了提高切割效率且避免重复转染，可以用整合有先导 RNA 和 Cas9 序列的病毒载体感染靶细胞^[83-85]，实现持续表达切割，但这样做要避免病毒载体本身随机整合进入正常细胞带来的安全风险。除此之外，为了进一步减少潜在的脱靶可能，可以组合使用突变后只能切割单链的 Cas9 核酸酶^[104, 109, 110]或者失去自身内切酶活性但融合了 Fok I 结构域的 Cas9^[111, 112]，模拟 ZFNs 和 TALENs 构成特殊的异源二聚体组合进行切割，以提高准确性和特异性。

相较于使用 RNAi 沉默 E6、E7 基因的研究，使用 CRISPR-Cas9 核酸酶系统有更多的优势，可以向临床基因治疗研究方向发展。首先，CRISPR-Cas9 核酸酶直接作用于基因组 DNA，能够彻底有效地治疗和修复问题基因，且效率更高；其次，这个核酸内切酶系统特异性更高，保证了用于治疗需要的安全性，相比之下，RNAi 则有较高的脱靶风险；第三，靶向性的 CRISPR-Cas9 的设计和构建更

加简便，不仅优于 RNAi，作为 RNA 介导的核酸酶，更比蛋白介导的 ZFNs、TALENs 的构建简便许多，不仅可以容纳多靶点同时作用，并且能够在研究过程中容许靶点的筛选和比较，省时省力，作为特异性的核酸内切酶具有很高的可变度和适应性。因此，可以将它拓展到更多基因治疗的研究领域。本实验仅是在 HPV18 感染的宫颈癌细胞模型 HeLa 上进行的初步的探索，如果要进一步进行基因治疗 HPV18 可行性的探究，还需要在感染 HPV18 的原代上皮组织细胞以及小鼠模型上进行体内的实验，而且也可以选择 HPV 病毒间更加保守的序列作为靶点，就可同时适用于不同亚型的病毒感染。

综上所述，本实验利用 CRISPR-Cas9 系统同时靶向 HPV18 的 E6、E7 致癌基因，取得了部分的抑癌效果，抑制了癌细胞增殖并诱导了其凋亡，揭示了 Cas9 核酸酶系统用于基因治疗 HPV18 感染及相关疾病甚至癌症的可能，但进一步的探索仍需要大量的后续工作，才能充分验证其可行性和有效性。

参考文献

1. Buck, C. B., Trus, B. L. The papillomavirus virion: a machine built to hide molecular Achilles' heels. *Adv Exp Med Biol.* (2012) 726, 403-422.
2. de Villiers, E. M., Fauquet, C., Broker, T. R., Bernard, H. U., zur Hausen, H. Classification of papillomaviruses. *Virology.* (2004) 324, 17-27.
3. Doorbar, J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin Sci (Lond).* (2006) 110, 525-541.
4. Fehrman, F., Laimins, L. A. Human papillomaviruses: targeting differentiating epithelial cells for malignant transformation. *Oncogene.* (2003) 22, 5201-5207.
5. zur Hausen, H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer.* (2002) 2, 342-350.
6. Munger, K. *et al.* Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. *J Virol.* (2004) 78, 11451-11460.
7. zur Hausen, H. Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst.* (2000) 92, 690-698.
8. Huibregtse, J. M., Scheffner, M., Howley, P. M. A cellular protein mediates association of p53 with the E6 oncoprotein of human papillomavirus types 16 or 18. *EMBO J.* (1991) 10, 4129-4135.
9. Kajitani, N., Satsuka, A., Kawate, A., Sakai, H. Productive Lifecycle of Human Papillomaviruses that Depends Upon Squamous Epithelial Differentiation. *Front Microbiol.* (2012) 3, 152.
10. Walboomers, J. *et al.* Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol.* (1999) 189, 12-19.
11. Carter, J. R., Ding, Z., Rose, B. R. HPV infection and cervical disease: a review. *Aust N Z J Obstet Gynaecol.* (2011) 51, 103-108.
12. Peralta-Zaragoza, O. *et al.* HPV-Based Screening, Triage, Treatment, and Followup Strategies in the Management of Cervical Intraepithelial Neoplasia. *Obstet Gynecol Int.* (2013) 2013, 912780.
13. Goldie, S. J., Kuntz, K. M., Weinstein, M. C., Freedberg, K. A., Palefsky, J. M. Cost-effectiveness of screening for anal squamous intraepithelial lesions and anal cancer in human immunodeficiency virus-negative homosexual and bisexual men. *Am J Med.* (2000) 108, 634-641.
14. Syrjanen, S. Current concepts on human papillomavirus infections in children. *APMIS.* (2010) 118, 494-509.
15. Monie, A., Hung, C. F., Roden, R., Wu, T. C. Cervarix: a vaccine for the prevention of HPV 16, 18-associated cervical cancer. *Biologics.* (2008) 2, 97-105.
16. Lexchin, J., Arya, N., Singh, S. Gardasil® - The New HPV Vaccine: The Right Product, the Right Time? A Commentary. *Healthc Policy.* (2010) 5, 26-36.
17. Kawana, K., Yasugi, T., Taketani, Y. Human papillomavirus vaccines: current issues & future. *Indian J Med Res.* (2009) 130, 341-347.
18. Roden, R., Wu, T. C. How will HPV vaccines affect cervical cancer? *Nat Rev*

- Cancer*. (2006) 6, 753-763.
19. Schiller, J. T., Lowy, D. R. Understanding and learning from the success of prophylactic human papillomavirus vaccines. *Nat Rev Microbiol.* (2012) 10, 681-692.
 20. Peralta-Zaragoza, O. *et al.* Targeted treatments for cervical cancer: a review. *Onco Targets Ther.* (2012) 5, 315-328.
 21. Lin, Z. *et al.* Combination of proteasome and HDAC inhibitors for uterine cervical cancer treatment. *Clin Cancer Res.* (2009) 15, 570-577.
 22. Zhou, J. *et al.* Inhibition of cervical cancer cell growth in vitro and in vivo by lentiviral-vector mediated shRNA targeting the common promoter of HPV16 E6 and E7 oncogenes. *Antiviral Res.* (2013) 98, 305-313.
 23. Sima, N. *et al.* RNA interference against HPV16 E7 oncogene leads to viral E6 and E7 suppression in cervical cancer cells and apoptosis via upregulation of Rb and p53. *Apoptosis.* (2008) 13, 273-281.
 24. Qi, Z. *et al.* Effect of simultaneous silencing of HPV-18 E6 and E7 on inducing apoptosis in HeLa cells. *Biochem Cell Biol.* (2010) 88, 697-704.
 25. Hong, D., Lu, W., Ye, F., Hu, Y., Xie, X. Gene silencing of HPV16 E6/E7 induced by promoter-targeting siRNA in SiHa cells. *Br J Cancer.* (2009) 101, 1798-1804.
 26. Chang, J. T. *et al.* Highly potent and specific siRNAs against E6 or E7 genes of HPV16- or HPV18-infected cervical cancers. *Cancer Gene Ther.* (2010) 17, 827-836.
 27. Yamato, K. *et al.* New highly potent and specific E6 and E7 siRNAs for treatment of HPV16 positive cervical cancer. *Cancer Gene Ther.* (2008) 15, 140-153.
 28. Li, X. *et al.* Plasmid-based E6-specific siRNA and co-expression of wild-type p53 suppresses the growth of cervical cancer in vitro and in vivo. *Cancer Lett.* (2013) 335, 242-250.
 29. Zhou, J. *et al.* Transcriptional gene silencing of HPV16 E6/E7 induces growth inhibition via apoptosis in vitro and in vivo. *Gynecol Oncol.* (2012) 124, 296-302.
 30. Hall, A. H., Alexander, K. A. RNA interference of human papillomavirus type 18 E6 and E7 induces senescence in HeLa cells. *J Virol.* (2003) 77, 6066-6069.
 31. Butz, K. *et al.* siRNA targeting of the viral E6 oncogene efficiently kills human papillomavirus-positive cancer cells. *Oncogene.* (2003) 22, 5938-5945.
 32. Jiang, M., Milner, J. Selective silencing of viral gene expression in HPV-positive human cervical carcinoma cells treated with siRNA, a primer of RNA interference. *Oncogene.* (2002) 21, 6041-6048.
 33. Cun, B. *et al.* Cell growth inhibition in HPV 18 positive uveal melanoma cells by E6/E7 siRNA. *Tumour Biol.* (2013) 34, 1801-1806.
 34. Jackson, A. L. *et al.* Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nat Biotechnol.* (2003) 21, 635-637.
 35. Lin, X. *et al.* siRNA-mediated off-target gene silencing triggered by a 7 nt complementation. *Nucleic Acids Res.* (2005) 33, 4527-4535.
 36. Sakuma, T., Woltjen, K. Nuclease-mediated genome editing: At the front-line of functional genomics technology. *Dev Growth Differ.* (2014) 56, 2-13.
 37. Gaj, T., Gersbach, C. A., Barbas, C. F., 3rd ZFN, TALEN, and

- CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends Biotechnol.* (2013) 31, 397-405.
38. Cermak, T. *et al.* Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting. *Nucleic Acids Res.* (2011) 39, e82.
 39. Urnov, F. D., Rebar, E. J., Holmes, M. C., Zhang, H. S., Gregory, P. D. Genome editing with engineered zinc finger nucleases. *Nat Rev Genet.* (2010) 11, 636-646.
 40. Joung, J. K., Sander, J. D. TALENs: a widely applicable technology for targeted genome editing. *Nat Rev Mol Cell Biol.* (2013) 14, 49-55.
 41. Tebas, P. *et al.* Gene editing of CCR5 in autologous CD4 T cells of persons infected with HIV. *N Engl J Med.* (2014) 370, 901-910.
 42. Wayengera, M. Zinc finger arrays binding human papillomavirus types 16 and 18 genomic DNA: precursors of gene-therapeutics for in-situ reversal of associated cervical neoplasia. *Theor Biol Med Model.* (2012) 9, 30.
 43. Mino, T., Mori, T., Aoyama, Y., Sera, T. Gene- and protein-delivered zinc finger-staphylococcal nuclease hybrid for inhibition of DNA replication of human papillomavirus. *PLoS One.* (2013) 8, e56633.
 44. Zhang, Z. *et al.* A simple and efficient method for assembling TALE protein based on plasmid library. *PLoS One.* (2013) 8, e66459.
 45. Zhang, Z., Zhang, S., Huang, X., Orwig, K. E., Sheng, Y. Rapid assembly of customized TALENs into multiple delivery systems. *PLoS One.* (2013) 8, e80281.
 46. Liang, J., Chao, R., Abil, Z., Bao, Z., Zhao, H. FairyTALE: A High-Throughput TAL Effector Synthesis Platform. *ACS Synth Biol.* (2013),
 47. Terns, M. P., Terns, R. M. CRISPR-based adaptive immune systems. *Curr Opin Microbiol.* (2011) 14, 321-327.
 48. Sampson, T. R., Saroj, S. D., Llewellyn, A. C., Tzeng, Y. L., Weiss, D. S. A CRISPR/Cas system mediates bacterial innate immune evasion and virulence. *Nature.* (2013) 497, 254-257.
 49. Wiedenheft, B., Sternberg, S. H., Doudna, J. A. RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea. *Nature.* (2012) 482, 331-338.
 50. Horvath, P., Barrangou, R. CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. *Science.* (2010) 327, 167-170.
 51. van der Oost, J., Jore, M. M., Westra, E. R., Lundgren, M., Brouns, S. J. CRISPR-based adaptive and heritable immunity in prokaryotes. *Trends Biochem Sci.* (2009) 34, 401-407.
 52. Cho, S. W., Kim, S., Kim, J. M., Kim, J. S. Targeted genome engineering in human cells with the Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nat Biotechnol.* (2013) 31, 230-232.
 53. Cong, L. *et al.* Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science.* (2013) 339, 819-823.
 54. Mali, P. *et al.* RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science.* (2013) 339, 823-826.
 55. Sternberg, S. H., Redding, S., Jinek, M., Greene, E. C., Doudna, J. A. DNA

- interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9. *Nature*. (2014) 507, 62-67.
56. Gasiunas, G., Barrangou, R., Horvath, P., Siksnys, V. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A*. (2012) 109, E2579-2586.
 57. Karvelis, T. *et al.* crRNA and tracrRNA guide Cas9-mediated DNA interference in *Streptococcus thermophilus*. *RNA Biol*. (2013) 10, 841-851.
 58. Jinek, M. *et al.* A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*. (2012) 337, 816-821.
 59. Fu, Y., Sander, J. D., Reyon, D., Cascio, V. M., Joung, J. K. Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs. *Nat Biotechnol*. (2014) 32, 279-284.
 60. Chen, B. *et al.* Dynamic imaging of genomic loci in living human cells by an optimized CRISPR/Cas system. *Cell*. (2013) 155, 1479-1491.
 61. Hsu, P. D. *et al.* DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nat Biotechnol*. (2013) 31, 827-832.
 62. Wu, X. *et al.* Genome-wide binding of the CRISPR endonuclease Cas9 in mammalian cells. *Nat Biotechnol*. (2014),
 63. DiCarlo, J. E. *et al.* Genome engineering in *Saccharomyces cerevisiae* using CRISPR-Cas systems. *Nucleic Acids Res*. (2013) 41, 4336-4343.
 64. Bassett, A. R., Tibbit, C., Ponting, C. P., Liu, J. L. Highly efficient targeted mutagenesis of *Drosophila* with the CRISPR/Cas9 system. *Cell Rep*. (2013) 4, 220-228.
 65. Gratz, S. J. *et al.* Genome engineering of *Drosophila* with the CRISPR RNA-guided Cas9 nuclease. *Genetics*. (2013) 194, 1029-1035.
 66. Friedland, A. E. *et al.* Heritable genome editing in *C. elegans* via a CRISPR-Cas9 system. *Nat Methods*. (2013) 10, 741-743.
 67. Chang, N. *et al.* Genome editing with RNA-guided Cas9 nuclease in zebrafish embryos. *Cell Res*. (2013) 23, 465-472.
 68. Auer, T. O., Durore, K., De Cian, A., Concordet, J. P., Del Bene, F. Highly efficient CRISPR/Cas9-mediated knock-in in zebrafish by homology-independent DNA repair. *Genome Res*. (2014) 24, 142-153.
 69. Hwang, W. Y. *et al.* Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. *Nat Biotechnol*. (2013) 31, 227-229.
 70. Hruscha, A. *et al.* Efficient CRISPR/Cas9 genome editing with low off-target effects in zebrafish. *Development*. (2013) 140, 4982-4987.
 71. Sung, Y. H. *et al.* Highly efficient gene knockout in mice and zebrafish with RNA-guided endonucleases. *Genome Res*. (2014) 24, 125-131.
 72. Wang, H. *et al.* One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell*. (2013) 153, 910-918.
 73. Yang, H. *et al.* One-step generation of mice carrying reporter and conditional alleles by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell*. (2013) 154, 1370-1379.
 74. Ma, Y. *et al.* Generating rats with conditional alleles using CRISPR/Cas9. *Cell*

- Res.* (2014) 24, 122-125.
75. Shen, B. *et al.* Generation of gene-modified mice via Cas9/RNA-mediated gene targeting. *Cell Res.* (2013) 23, 720-723.
 76. Zhou, J. *et al.* One-step generation of different immunodeficient mice with multiple gene modifications by CRISPR/Cas9 mediated genome engineering. *Int J Biochem Cell Biol.* (2014) 46, 49-55.
 77. Li, D. *et al.* Heritable gene targeting in the mouse and rat using a CRISPR-Cas system. *Nat Biotechnol.* (2013) 31, 681-683.
 78. Li, W., Teng, F., Li, T., Zhou, Q. Simultaneous generation and germline transmission of multiple gene mutations in rat using CRISPR-Cas systems. *Nat Biotechnol.* (2013) 31, 684-686.
 79. Mashiko, D. *et al.* Feasibility for a large scale mouse mutagenesis by injecting CRISPR/Cas plasmid into zygotes. *Dev Growth Differ.* (2014) 56, 122-129.
 80. Yang, D. *et al.* Effective gene targeting in rabbits using RNA-guided Cas9 nucleases. *J Mol Cell Biol.* (2014) 6, 97-99.
 81. Hai, T., Teng, F., Guo, R., Li, W., Zhou, Q. One-step generation of knockout pigs by zygote injection of CRISPR/Cas system. *Cell Res.* (2014) 24, 372-375.
 82. Niu, Y. *et al.* Generation of gene-modified cynomolgus monkey via Cas9/RNA-mediated gene targeting in one-cell embryos. *Cell.* (2014) 156, 836-843.
 83. Koike-Yusa, H., Li, Y., Tan, E. P., Velasco-Herrera Mdel, C., Yusa, K. Genome-wide recessive genetic screening in mammalian cells with a lentiviral CRISPR-guide RNA library. *Nat Biotechnol.* (2014) 32, 267-273.
 84. Shalem, O. *et al.* Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells. *Science.* (2014) 343, 84-87.
 85. Wang, T., Wei, J. J., Sabatini, D. M., Lander, E. S. Genetic screens in human cells using the CRISPR-Cas9 system. *Science.* (2014) 343, 80-84.
 86. Zhou, Y. *et al.* High-throughput screening of a CRISPR/Cas9 library for functional genomics in human cells. *Nature.* (2014),
 87. Gilbert, L. A. *et al.* CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes. *Cell.* (2013) 154, 442-451.
 88. Qi, L. S. *et al.* Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. *Cell.* (2013) 152, 1173-1183.
 89. Cheng, A. W. *et al.* Multiplexed activation of endogenous genes by CRISPR-on, an RNA-guided transcriptional activator system. *Cell Res.* (2013) 23, 1163-1171.
 90. Mali, P. *et al.* CAS9 transcriptional activators for target specificity screening and paired nickases for cooperative genome engineering. *Nat Biotechnol.* (2013) 31, 833-838.
 91. Maeder, M. L. *et al.* CRISPR RNA-guided activation of endogenous human genes. *Nat Methods.* (2013) 10, 977-979.
 92. Perez-Pinera, P. *et al.* RNA-guided gene activation by CRISPR-Cas9-based transcription factors. *Nat Methods.* (2013) 10, 973-976.
 93. Kearns, N. A. *et al.* Cas9 effector-mediated regulation of transcription and differentiation in human pluripotent stem cells. *Development.* (2014) 141,

- 219-223.
94. Anton, T., Bultmann, S., Leonhardt, H., Markaki, Y. Visualization of specific DNA sequences in living mouse embryonic stem cells with a programmable fluorescent CRISPR/Cas system. *Nucleus*. (2014) 5,
 95. Fujita, T., Fujii, H. Efficient isolation of specific genomic regions and identification of associated proteins by engineered DNA-binding molecule-mediated chromatin immunoprecipitation (enChIP) using CRISPR. *Biochem Biophys Res Commun*. (2013) 439, 132-136.
 96. Schwank, G. *et al*. Functional repair of CFTR by CRISPR/Cas9 in intestinal stem cell organoids of cystic fibrosis patients. *Cell Stem Cell*. (2013) 13, 653-658.
 97. Wu, Y. *et al*. Correction of a genetic disease in mouse via use of CRISPR-Cas9. *Cell Stem Cell*. (2013) 13, 659-662.
 98. Yin, H. *et al*. Genome editing with Cas9 in adult mice corrects a disease mutation and phenotype. *Nat Biotechnol*. (2014),
 99. Landry, J. J. *et al*. The genomic and transcriptomic landscape of a HeLa cell line. *G3 (Bethesda)*. (2013) 3, 1213-1224.
 100. Spence, R. P., Murray, A., Banks, L., Kelland, L. R., Crawford, L. Analysis of human papillomavirus sequences in cell lines recently derived from cervical cancers. *Cancer Res*. (1988) 48, 324-328.
 101. Meissner, J. Nucleotide sequences and further characterization of human papillomavirus DNA present in the CaSki, SiHa and HeLa cervical carcinoma cell lines. *J Gen Virol*. (1999) 80, 1725-1733.
 102. Shibata, A., Jeggo, P. A. DNA Double-strand Break Repair in a Cellular Context. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*. (2014) 26, 243-249.
 103. Davis, A. J., Chen, D. J. DNA double strand break repair via non-homologous end-joining. *Transl Cancer Res*. (2013) 2, 130-143.
 104. Ran, F. A. *et al*. Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell*. (2013) 154, 1380-1389.
 105. Fu, Y. *et al*. High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. *Nat Biotechnol*. (2013) 31, 822-826.
 106. Pattanayak, V. *et al*. High-throughput profiling of off-target DNA cleavage reveals RNA-programmed Cas9 nuclease specificity. *Nat Biotechnol*. (2013) 31, 839-843.
 107. Cradick, T. J., Fine, E. J., Antico, C. J., Bao, G. CRISPR/Cas9 systems targeting beta-globin and CCR5 genes have substantial off-target activity. *Nucleic Acids Res*. (2013) 41, 9584-9592.
 108. Ebina, H., Misawa, N., Kanemura, Y., Koyanagi, Y. Harnessing the CRISPR/Cas9 system to disrupt latent HIV-1 provirus. *Sci Rep*. (2013) 3, 2510.
 109. Cho, S. W. *et al*. Analysis of off-target effects of CRISPR/Cas-derived RNA-guided endonucleases and nickases. *Genome Res*. (2014) 24, 132-141.
 110. Shen, B. *et al*. Efficient genome modification by CRISPR-Cas9 nickase with minimal off-target effects. *Nat Methods*. (2014) 11, 399-402.
 111. Guilinger, J. P., Thompson, D. B., Liu, D. R. Fusion of catalytically inactive Cas9 to FokI nuclease improves the specificity of genome modification. *Nat Biotechnol*.

- (2014),
112. Tsai, S. Q. *et al.* Dimeric CRISPR RNA-guided FokI nucleases for highly specific genome editing. *Nat Biotechnol.* (2014),

致谢

本文作者向复旦大学生命科学学院朱焕章教授表达感谢,感谢他的悉心培养和指导;同时向复旦大学遗传工程国家重点实验室朱焕章课题组的全体成员表示感谢,感谢他们不懈的帮助和指导;同时也感谢复旦大学生命科学学院公共实验平台的老师给予的帮助,感谢复旦大学本科生学术研究资助计划菀政项目对本课题的建议和支持。