



生物育种专业·基因编辑技术课程

第一章：基因工程与基因编辑史话

徐坤 副教授 QQ: 564737724 Tel:17792639752



西北农林科技大学



目录

01 基因工程基础

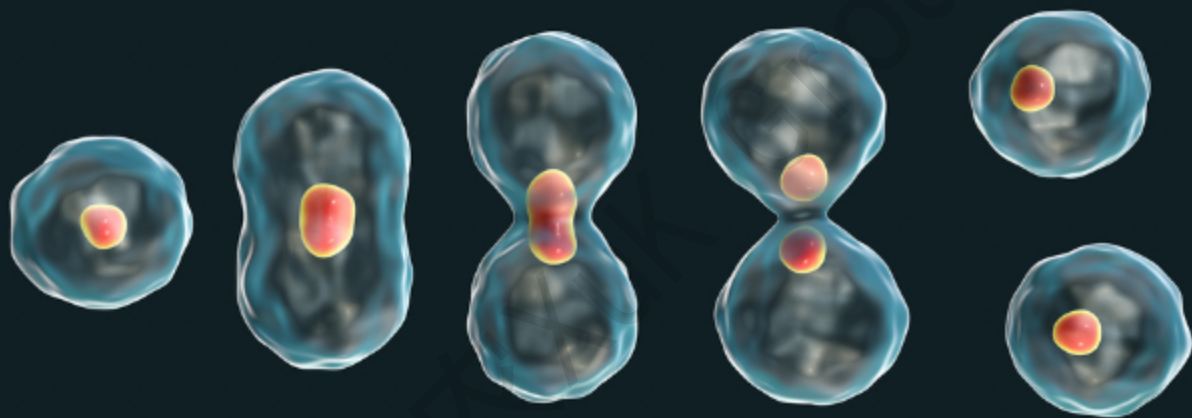
02 早期的基因工程

03 转基因和基因打靶

04 基因剪刀手与基因编辑



细胞学说



DNA

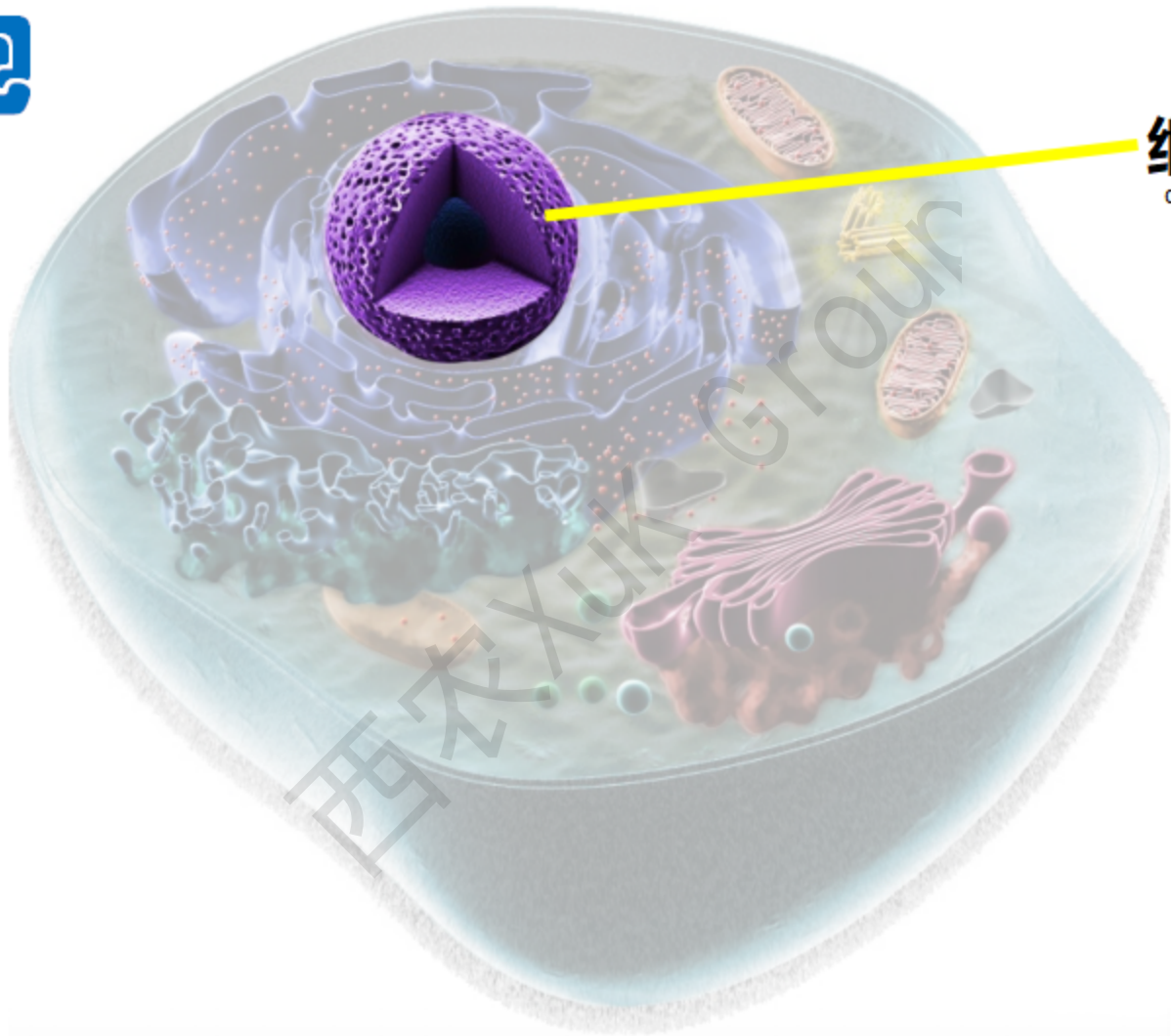
RNA

蛋白质

细胞学说：一切动植物由细胞构成，新细胞由旧的细胞分裂而来。

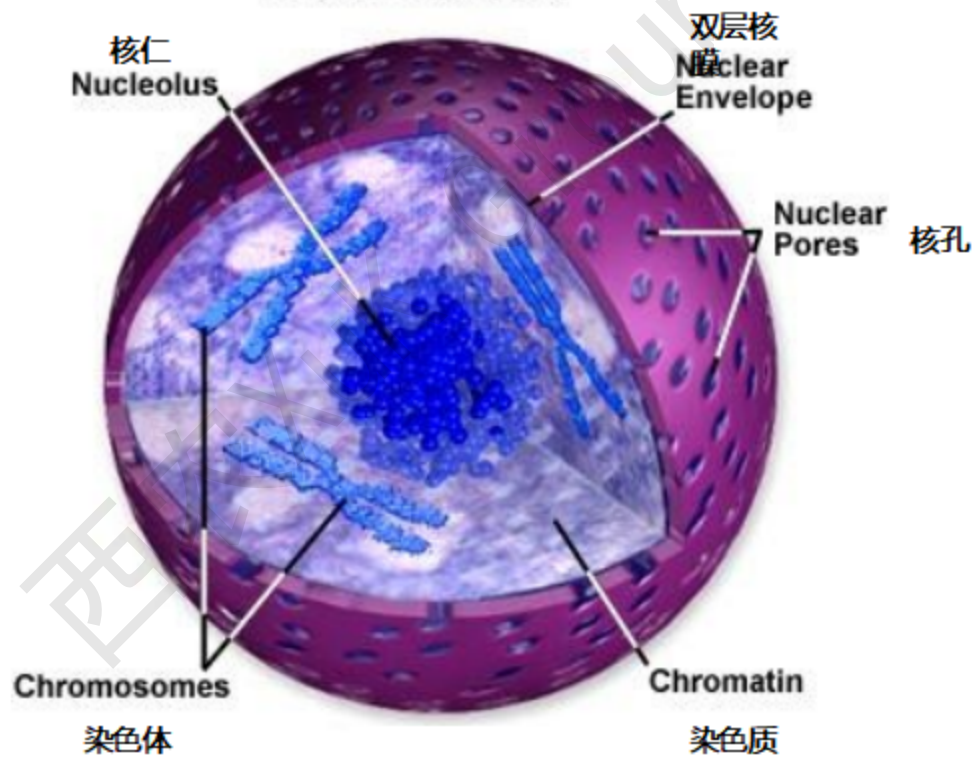
细胞

Cell



细胞核
cell nucleus,

The Cell Nucleus



DNA



deoxyribonucleic acid

基因工程基础



1950, Franklin

1953, Watson&Crick

1958, Crick

1961, Jacob&Monod

1966, Nirenberg等,

1970, Temin & Baltimore 逆转录作用

X-ray衍射图

DNA双螺旋结构模型

(1962, 诺贝尔化学奖)

中心法则

操纵子学说

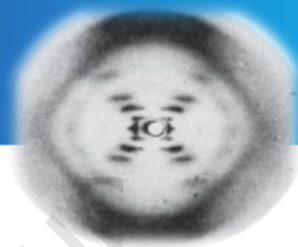
(1965, 诺贝尔生理学 and 医学奖)

遗传密码

(1968, 诺贝尔化学奖)

逆转录作用

(1975, 诺贝尔生理学 and 医学奖)



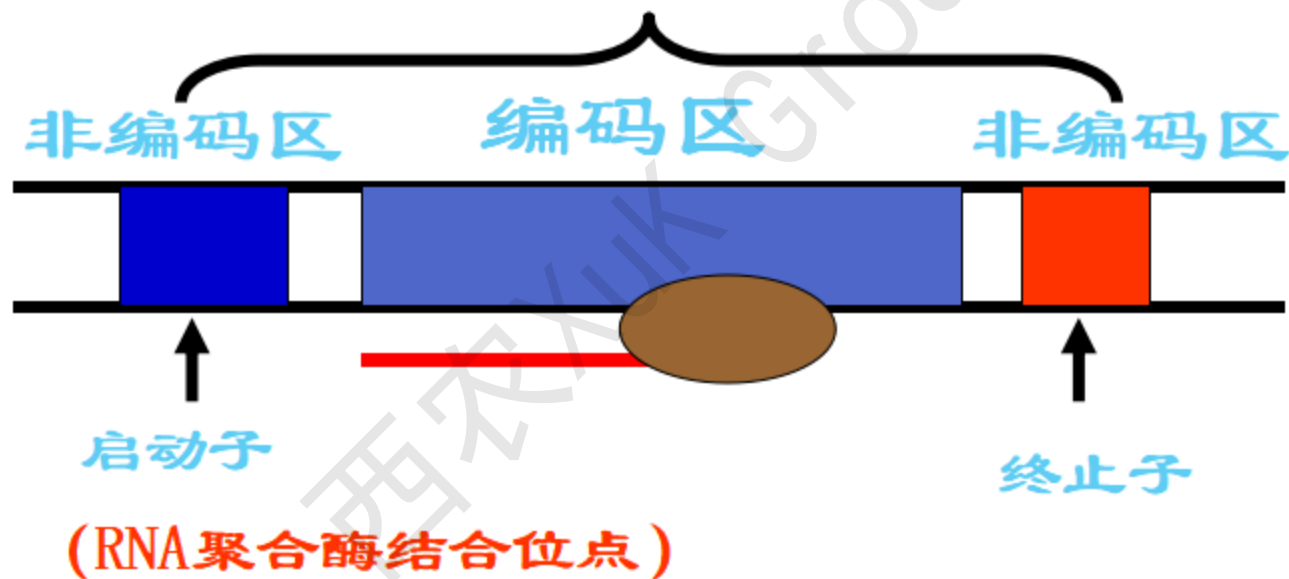
威尔金斯
Maurice Wilkins
(1916-2004)

弗兰克林
Rosalind Franklin
(1920-1958)

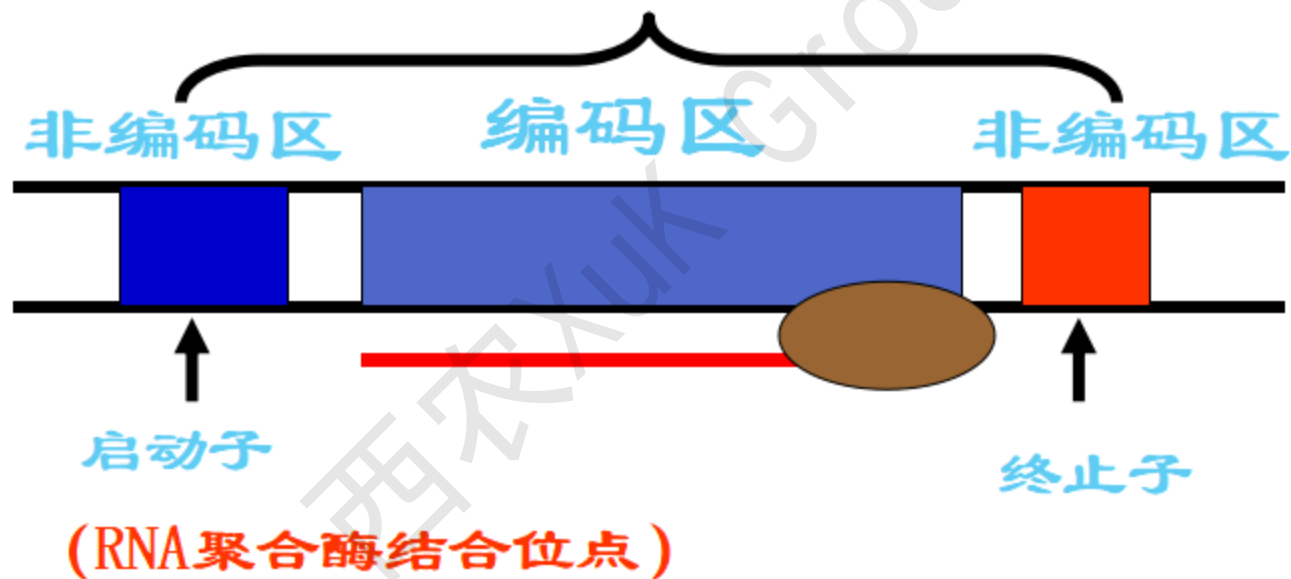


西北农林科技大学

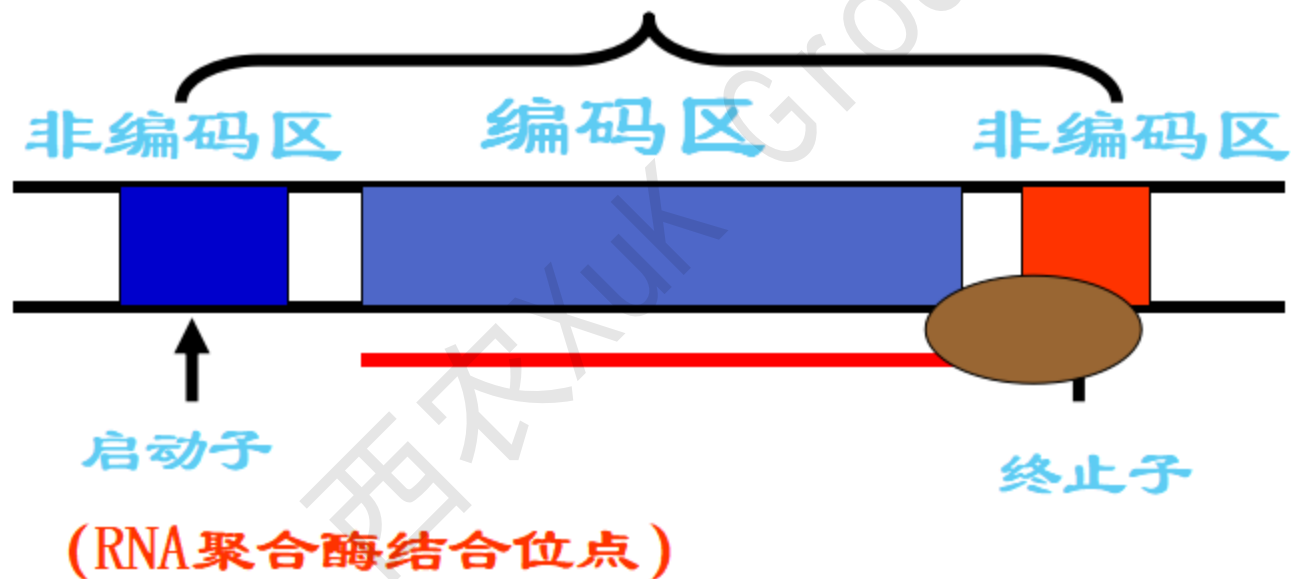
基因



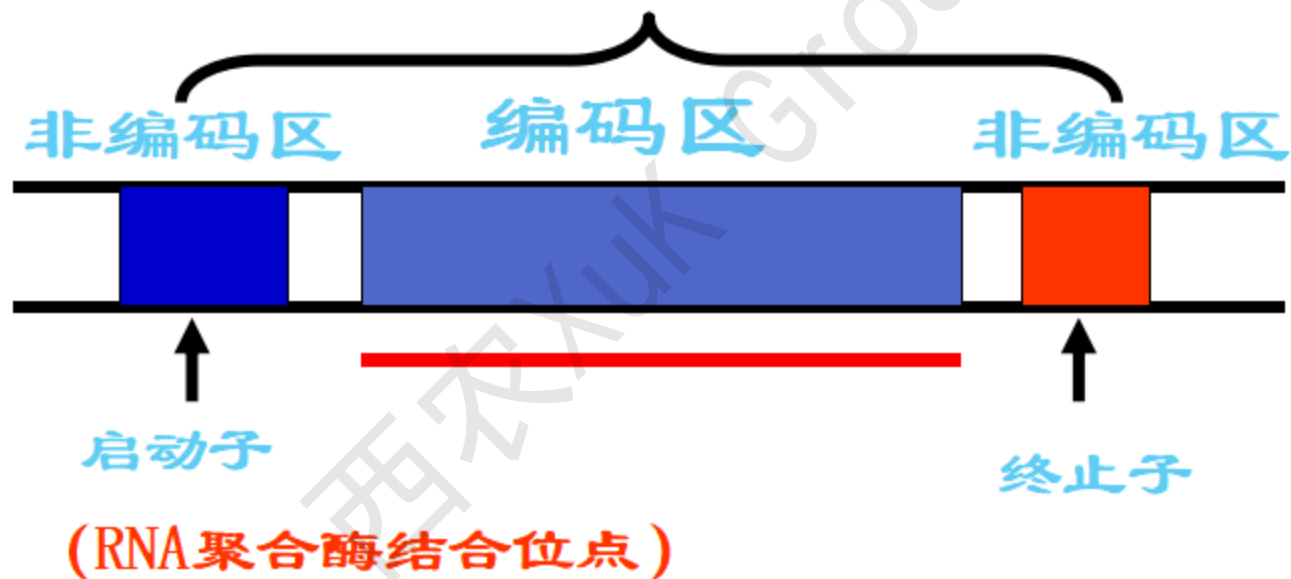
基因



基因



基因

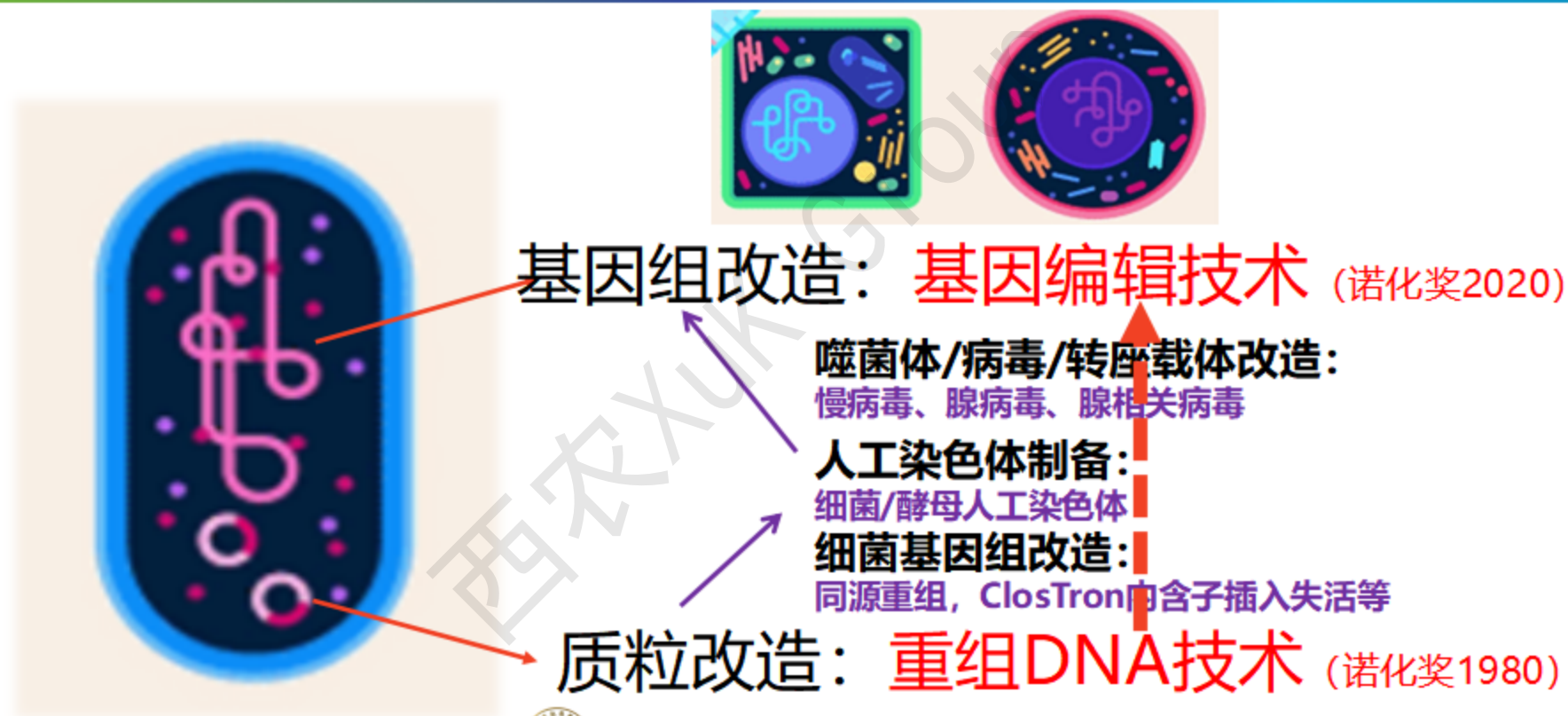


基因工程基础

- 20世纪70年代, 重组DNA技术兴起
- 1972, Berg, 第一个DNA体外重组体
- 1975, Sanger等, DNA测序技术
(Berg, Sanger, Gilbert, 1982, 诺贝尔化学奖)
- 20世纪80年代, 转基因技术兴起
- 1974, Schell&Montagu, T-DNA/土壤农杆菌
- 1983, McClintock, 跳跃基因(转座子), 诺贝尔生理学或医学奖
- 2001, 中、美、日、德、法、英等6国联合公布人类基因组图谱
- 2007, Capecchi等, 基因打靶, 诺贝尔生理学或医学奖
- 2012年, CRISPR/Cas9技术的诞生开启了基因编辑时代
- 2020, Charpentier&Doudna, 基因编辑—CRISPR/Cas9, 诺贝尔化学奖



基因工程：始于玩质粒，但不止玩质粒....



目录

01 基因工程基础

02 早期的基因工程

03 转基因和基因打靶

04 基因剪刀手与基因编辑



改造基因的早期方法



基因诱变

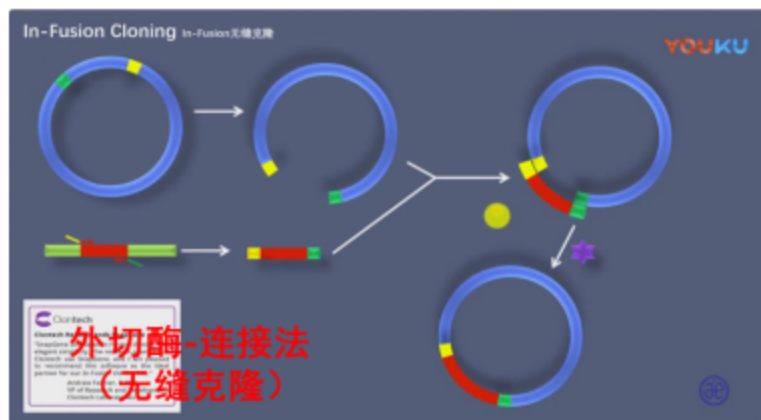
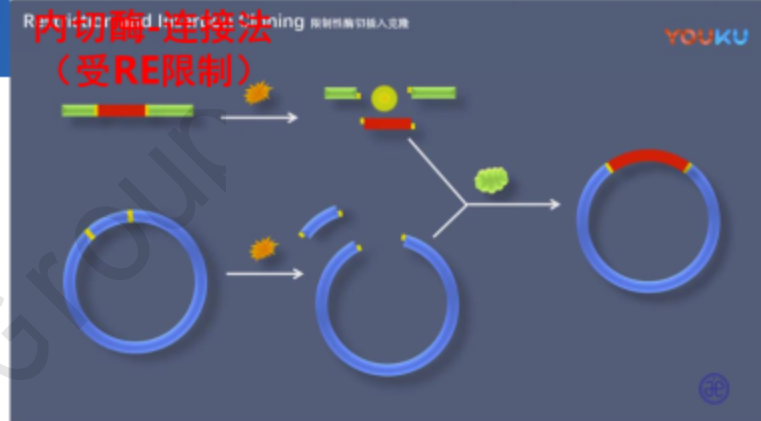
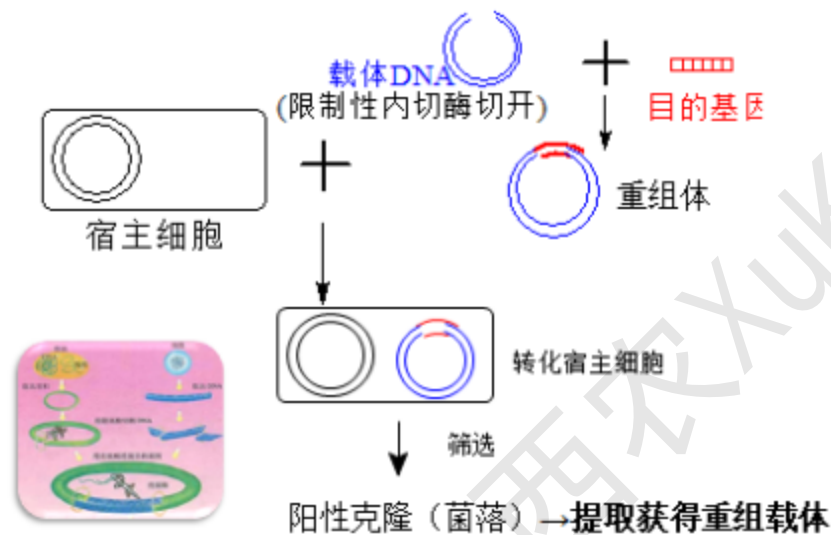


玩质粒



基因工程1.0-重组DNA技术

重组DNA技术的一般步骤

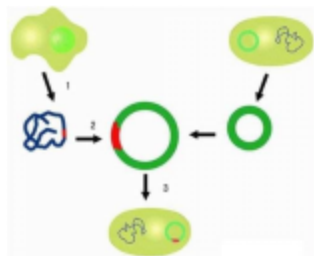
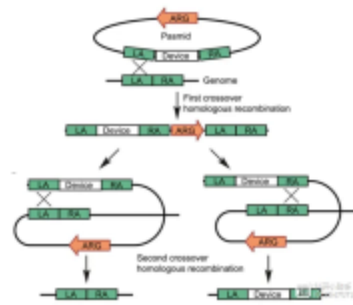
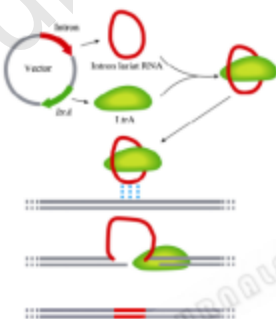


基因工程2.0：微生物基因工程→发酵工程



玩基因组

玩质粒



基因工程3.0：动植物细胞基因工程



在70年代，科学家插入的DNA片段进细菌，植物和动物

玩质粒：瞬时转染→稳定转染

常用的工程细胞：

昆虫细胞

中国仓鼠卵巢细胞

CHO(Chinese Hamster Ovary cells)



目录

01 基因工程基础

02 早期的基因工程

03 转基因和基因打靶

04 基因剪刀手与基因编辑



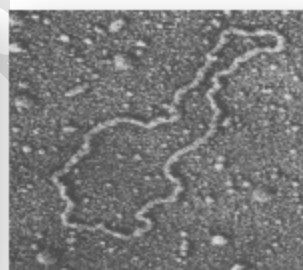
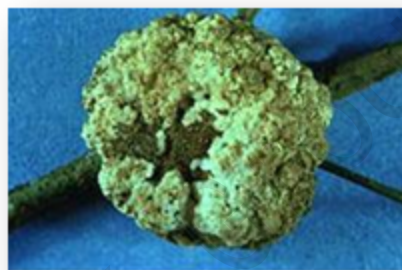
基因工程4.0: 转基因 (植物)



Jeff Schell



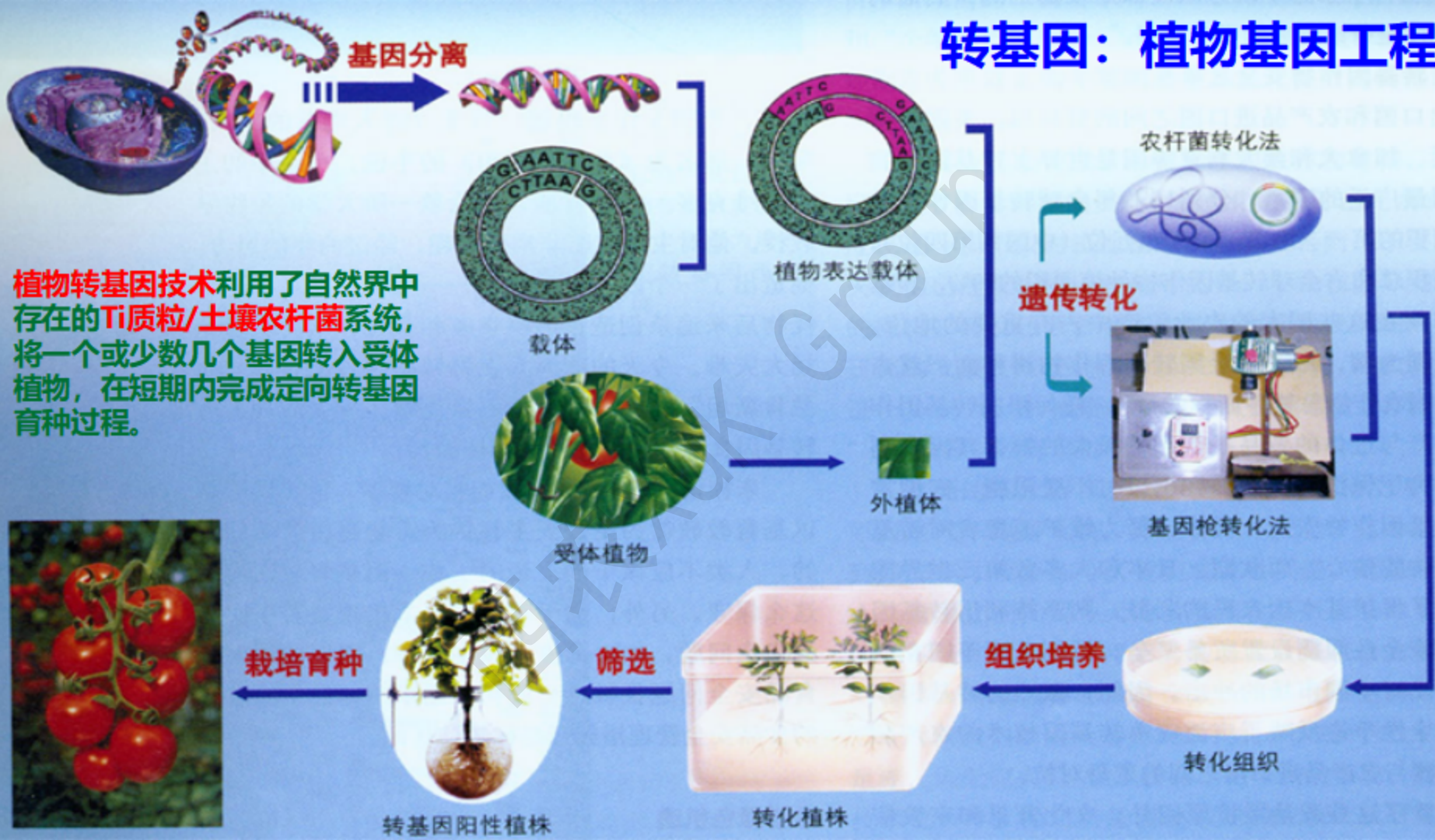
Marc Van Montagu



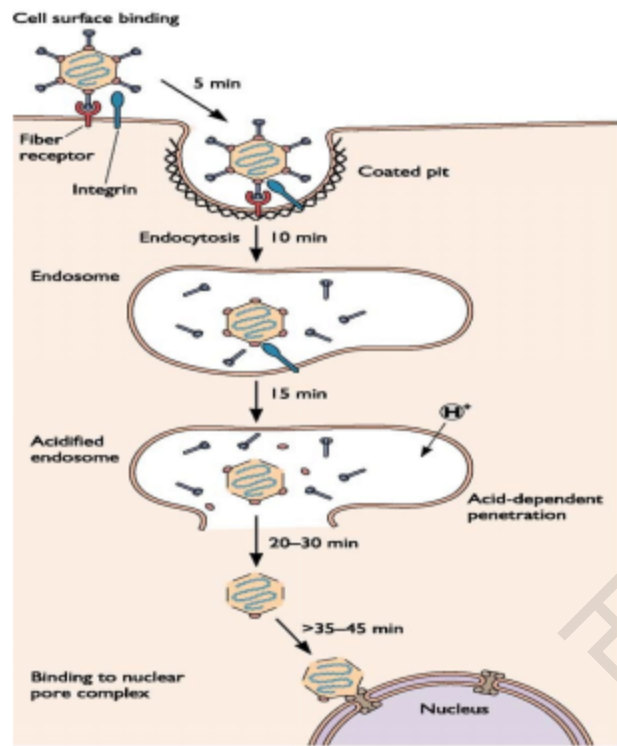
Ti 质粒

1974年, 科学家发现根癌农杆菌含有一巨大的质粒, 其T-DNA区域可重组到宿主DNA中去, 并进一步发现它和植物肿瘤的形成有直接关系(可产生生长素和细胞分裂素)。这一质粒也因此而被称为 **Ti 质粒 (Tumor-inducing plasmid)**。

转基因：植物基因工程



病毒载体介导的转基因



Lentivirus vectors

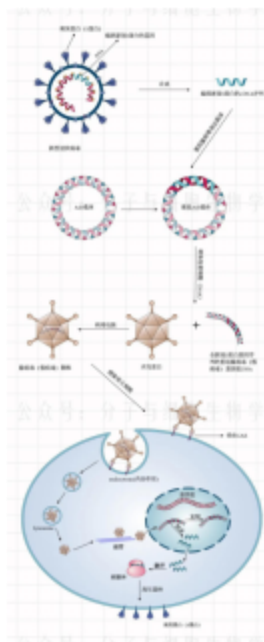
- ✓ Integration (转基因)
- ✓ Non-Integration (提高转染效率)

Adenoviral vectors

(提高转染效率、腺病毒疫苗)

Adeno-associated viral vectors

(活体递送、基因治疗)



转座等系统介导的转基因



转座子 **Sleeping Beauty (SB)** 和 **PiggyBac (PB)**



Sleeping Beauty

PiggyBac



麦克林托克 **McClintock** (美)



50年代初发现;

1983诺贝尔生理学或医学奖



西北农林科技大学

典型的转基因产品

Top 10 Genetically Modified Foods



Corn



Soy



Cotton



Papaya



Rice



Rapeseed
(Canola)



Potatoes



Tomatoes



Dairy products



Peas



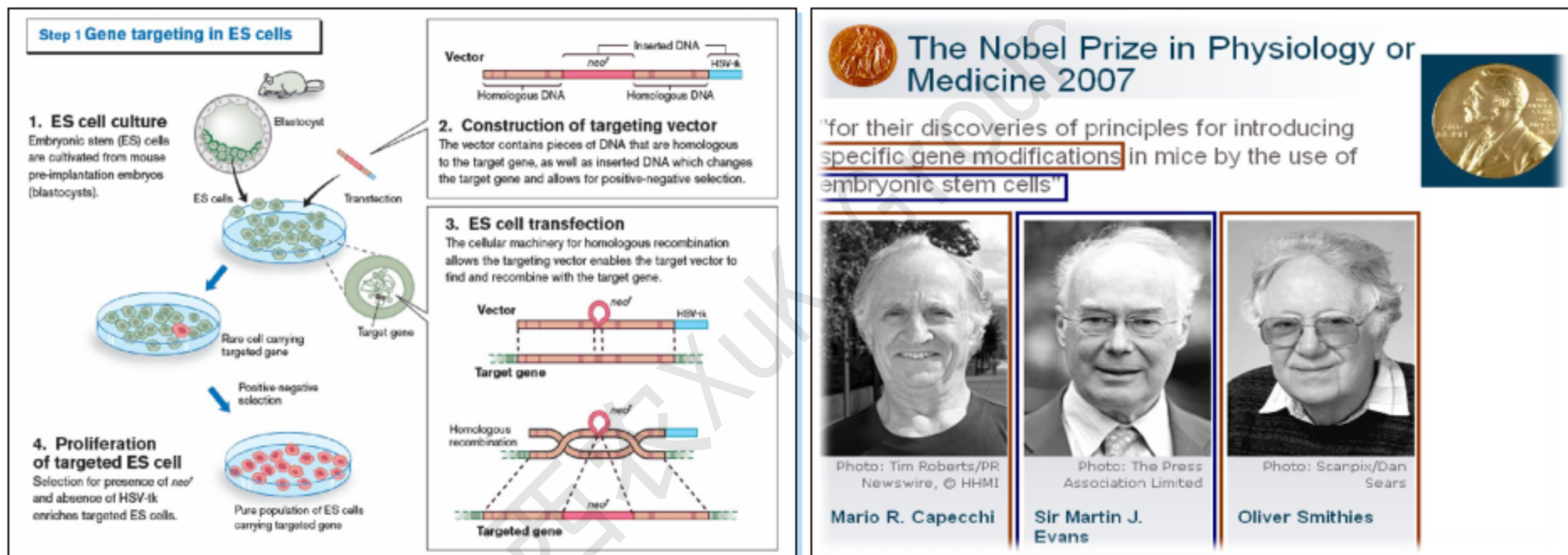
GM salmon
Length: 24ins
Weight: 6.6lb

Farm salmon
Length: 13ins
Weight: 2.8lb

*Both fish are 18 months



基因工程5.0: 基因打靶



通过“打靶载体”的同源重组效应，在小鼠ES细胞中实现了**定点“转基因”**，并通过囊胚嵌合、胚胎移植等获得“转基因”小鼠。但是，细胞中极低的同源重组效率，限制了该技术在大动物转基因研究中的应用。



目录

01 基因工程基础

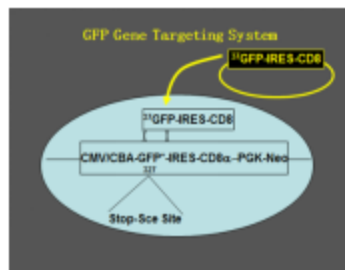
02 早期的基因工程

03 转基因和基因打靶

04 基因剪刀手与基因编辑

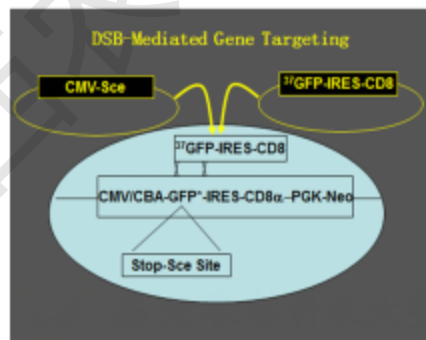


DNA双链断裂提高基因打靶效率



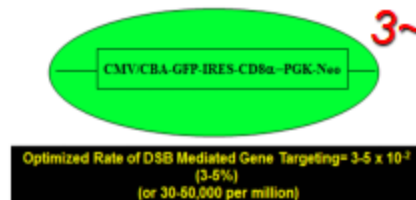
$10^{-7} \sim 10^{-6}$

依赖于自然的同源重组，效率很低



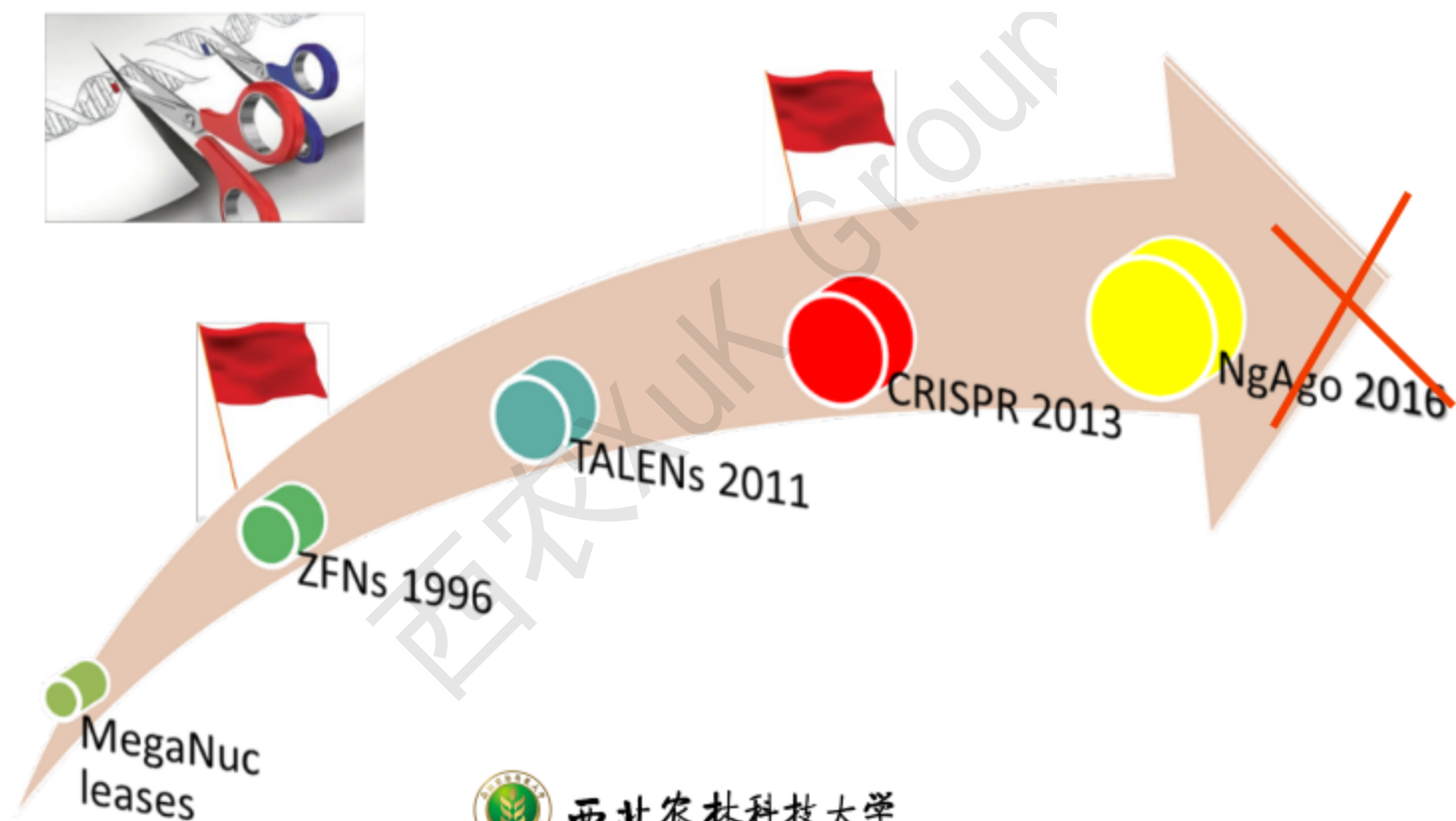
效率显著提高

DSB-Induced Gene Targeting



3~5%

基因的“爱德华剪刀手” --人工特异性核酸酶技术



西北农林科技大学

CRISPR/Cas9—改变世界的技术



西北农林科技大学

CRISPR/Cas9—开启了“基因编辑”黄金时代

应用广泛：家畜、作物、昆虫、微生物、猛犸象再生？

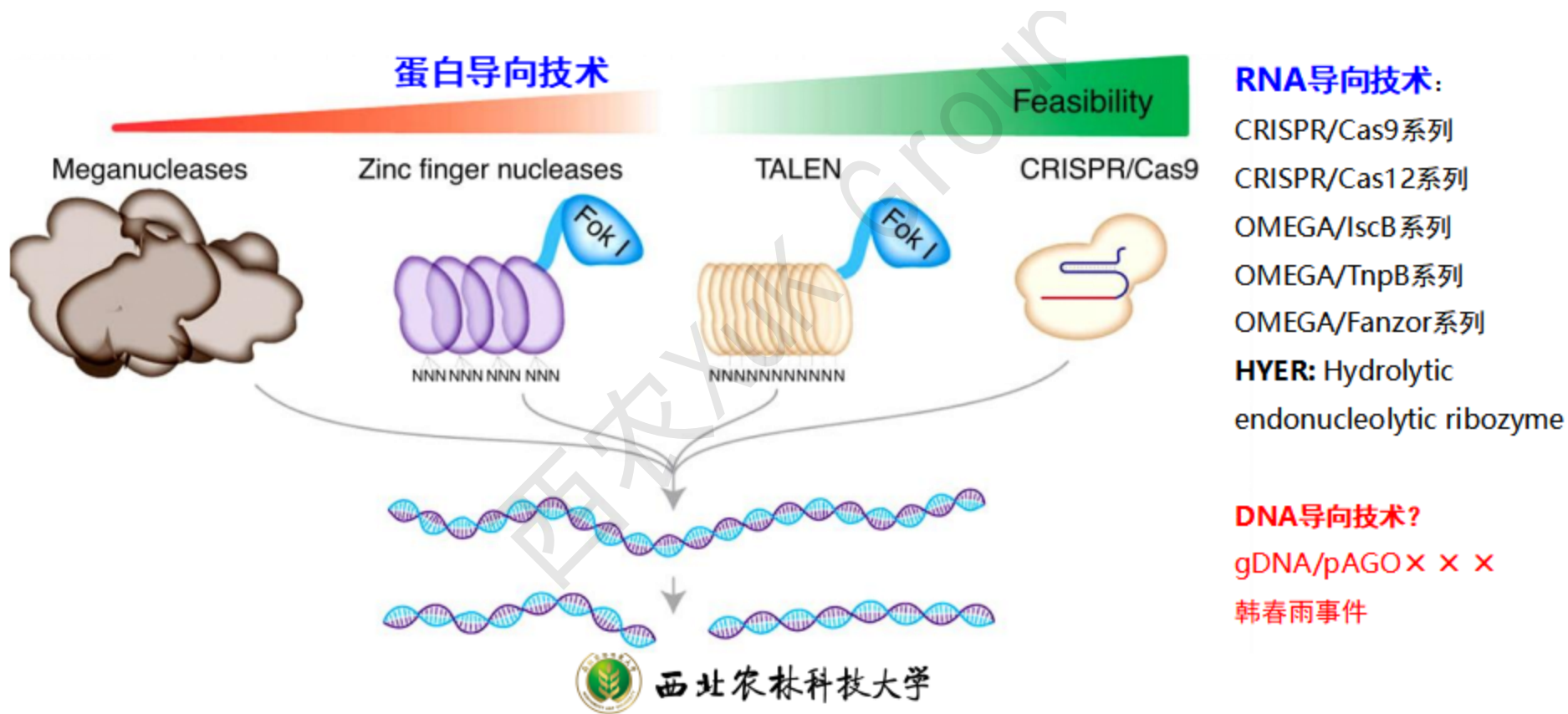
价格低廉：传统基因修饰技术的1%。

简便快捷：七周得到阳性小鼠，新手也可操作。



西北农林科技大学

基因的“爱德华剪刀手” --人工特异性核酸酶技术



各式各样的基因“剪刀手”

CRISPR:

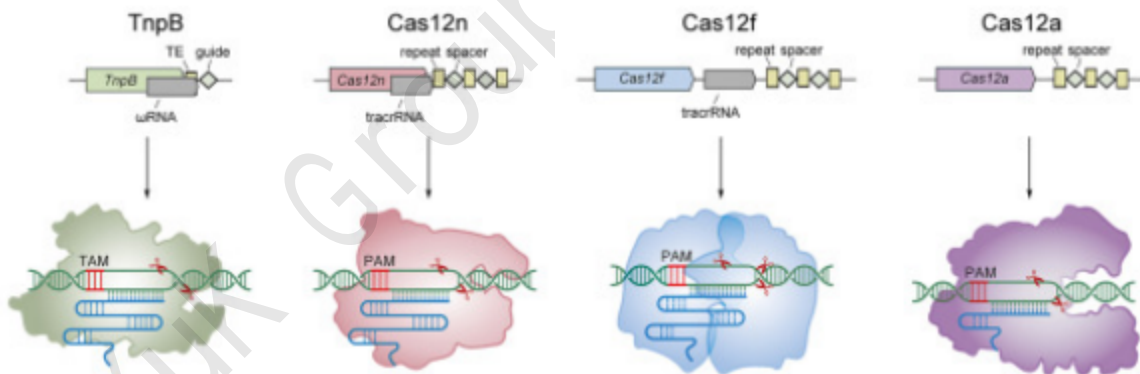
Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats

规律间隔成簇短回文重复序列

OMEGA :

obligate mobile element
guided activity

具有导向活性的指定移动元件



System	IS200/IS605 and IS607
Protein	~400 aa (monomer)
Guide RNA	ωRNA
gRNA region	Located in protein ORF
dsDNA target	5'TAM and target
TAM/PAM	5'-TTGAT / 5'-TCAN

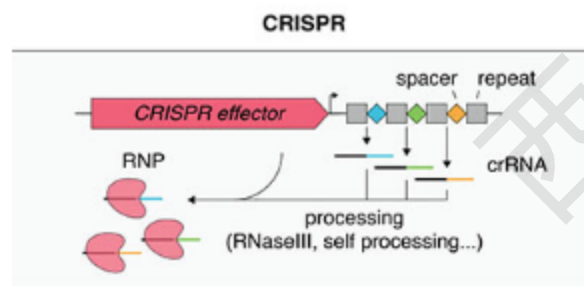
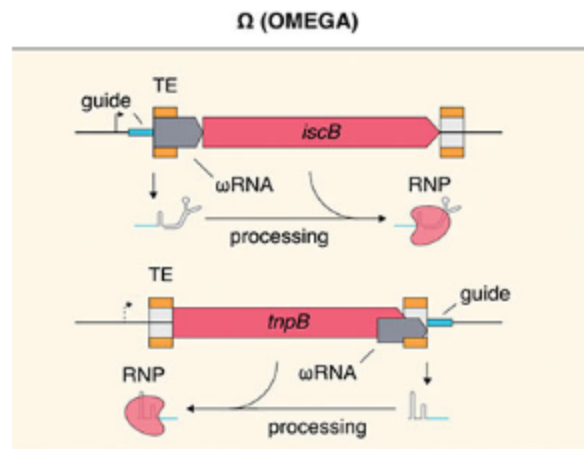
System	CRISPR-Cas
Protein	400-700 aa (likely monomer)
Guide RNA	crRNA and tracrRNA
gRNA region	Located in protein ORF
dsDNA target	5'PAM and target
TAM/PAM	5'-NAAN

System	CRISPR-Cas
Protein	400-700 aa (dimer)
Guide RNA	crRNA and tracrRNA
gRNA region	Exist alone
dsDNA target	5'PAM and target
TAM/PAM	5' T-rich PAM

System	CRISPR-Cas
Protein	1000-1500 aa (monomer)
Guide RNA	crRNA
gRNA region	Exist alone
dsDNA target	5'PAM and target
TAM/PAM	5' T-rich PAM

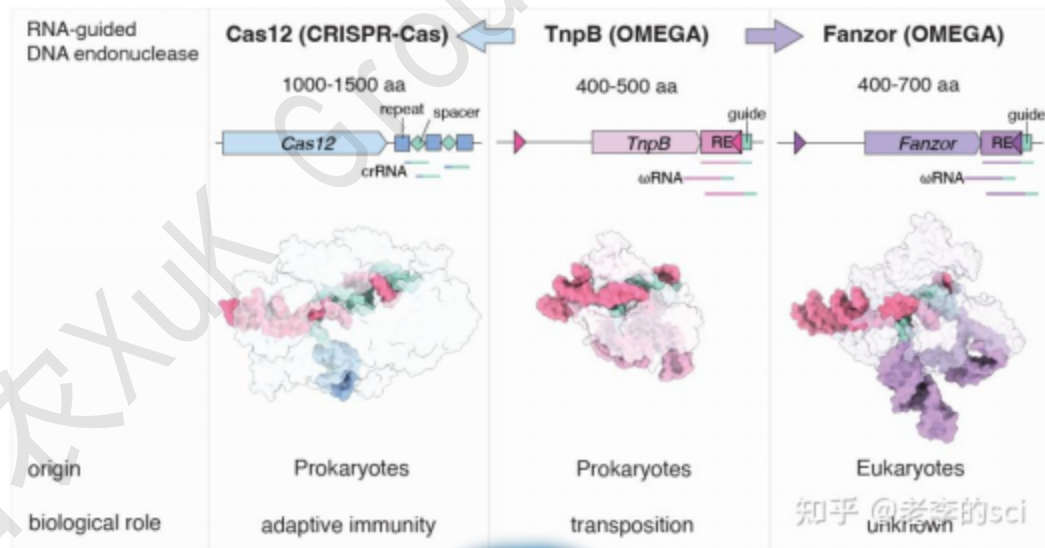


“剪刀手”的进化



IscB → Cas9

TnpB → Cas12, Fanzor



张锋



**Cas9、Cas12、IscB、
TnpB、Fanzor
CRISPR筛选、检测等**

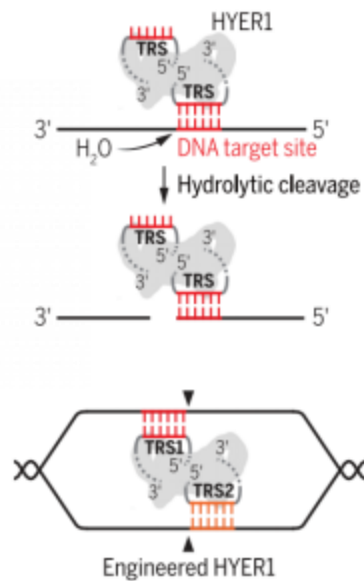
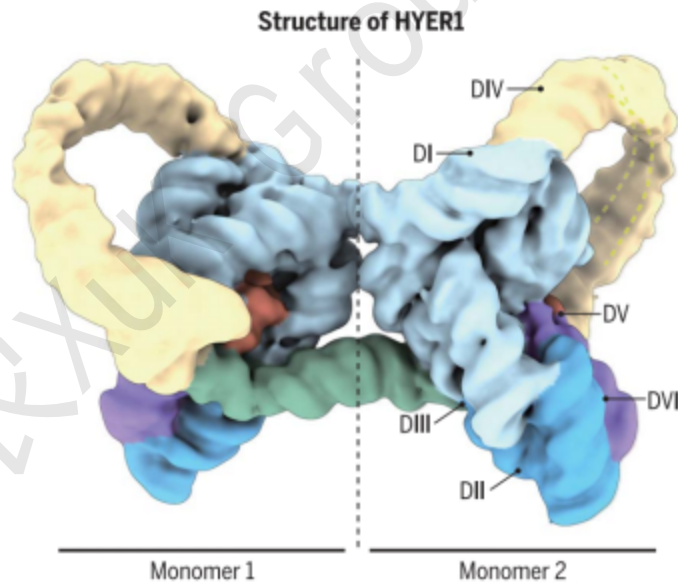


西北农林科技大学

知乎 @老李的sci

RNA “剪刀手”

- Hydrolytic endonucleolytic ribozyme (**HYER**), 仅靠RNA序列就能实现对靶序列的识别和切割
- 清华大学刘俊杰团队于2024年2月最新报道, 有望为基因编辑领域带来新的革命



Liu Z, et al. **Science**. 2024



西北农林科技大学

基因工程6.0：基因编辑

基因编辑 (Gene Editing)：针对目标基因的特异性定点的特异性改造或修饰，即“编辑”。

目标基因**敲除** (Knock-out, **KO**)

特定基因**敲入** (Knock-in, **KI**)

基因替换 (**Replacement**)

小片段的插入和缺失(**s-Indels**)

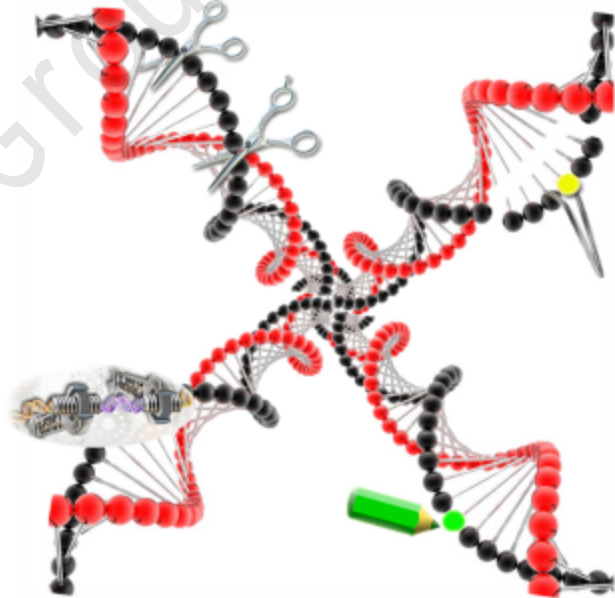
大片段的插入或删除 (**l-Indels**)

点突变/点编辑/精准编辑 (Point Mutation/Precise Editing)

碱基编辑 (Base editing, **BE**)

引导编辑 (Prime editing, **PE**)

DNA 编辑和**RNA编辑**：遗传vs表观遗传



拓展思考

剪刀? → 分子水平编辑? → 基因编辑动物?



基因敲除 (KO)



基因敲入 (KI)



基因编辑婴儿： 伦理之殇





西北农林科技大学
NORTHWEST A&F UNIVERSITY



Yeast Gene Editor



Animal Gene Editor



NWAUFU-GEST