



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



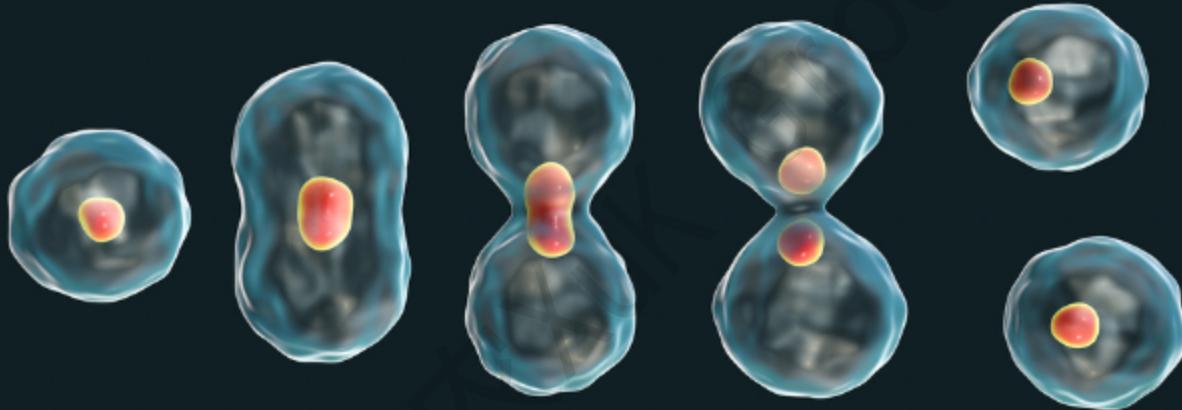
目录

- 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**



西北农林科技大学

细胞学说

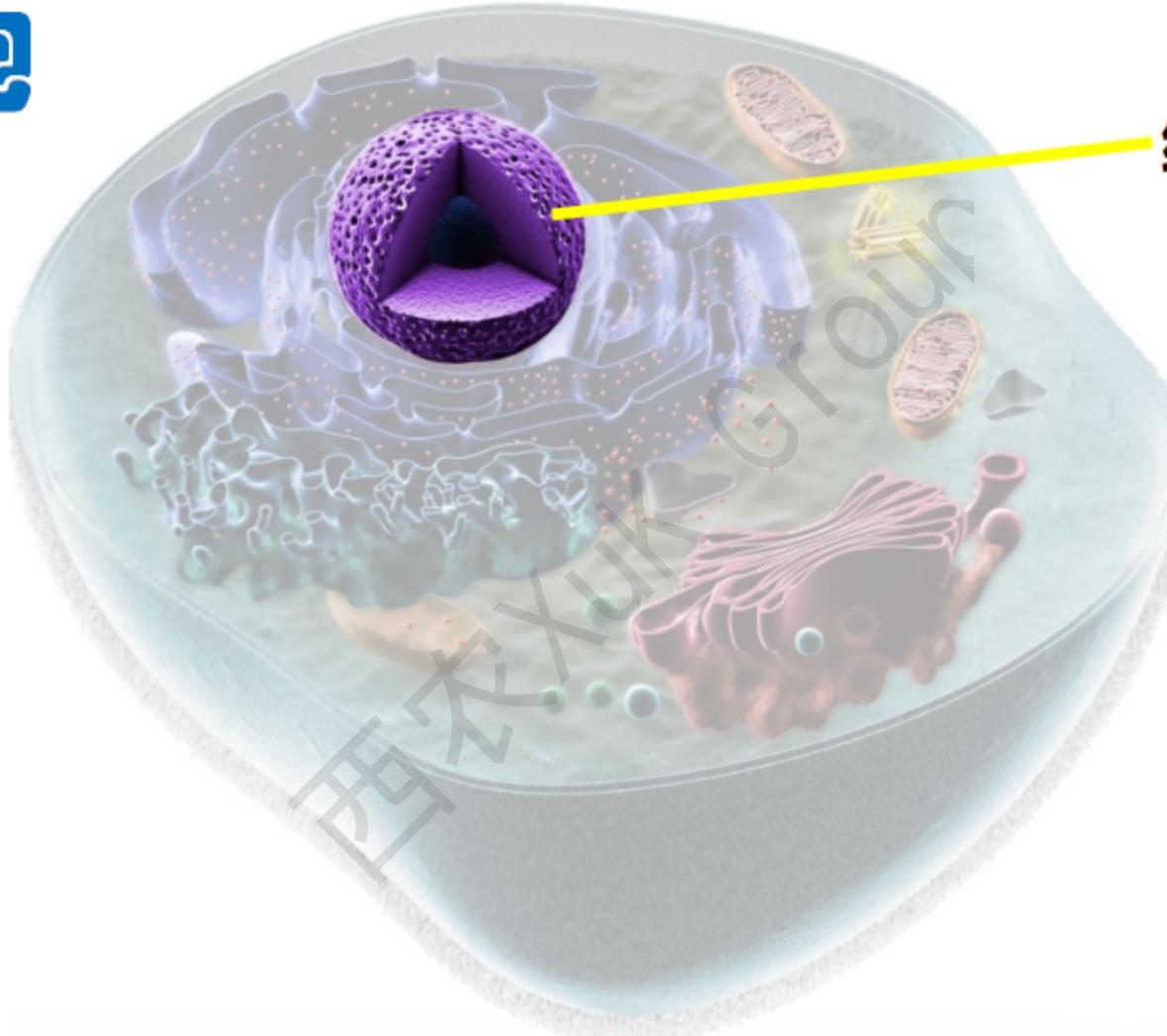


{ DNA
RNA
蛋白质

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。

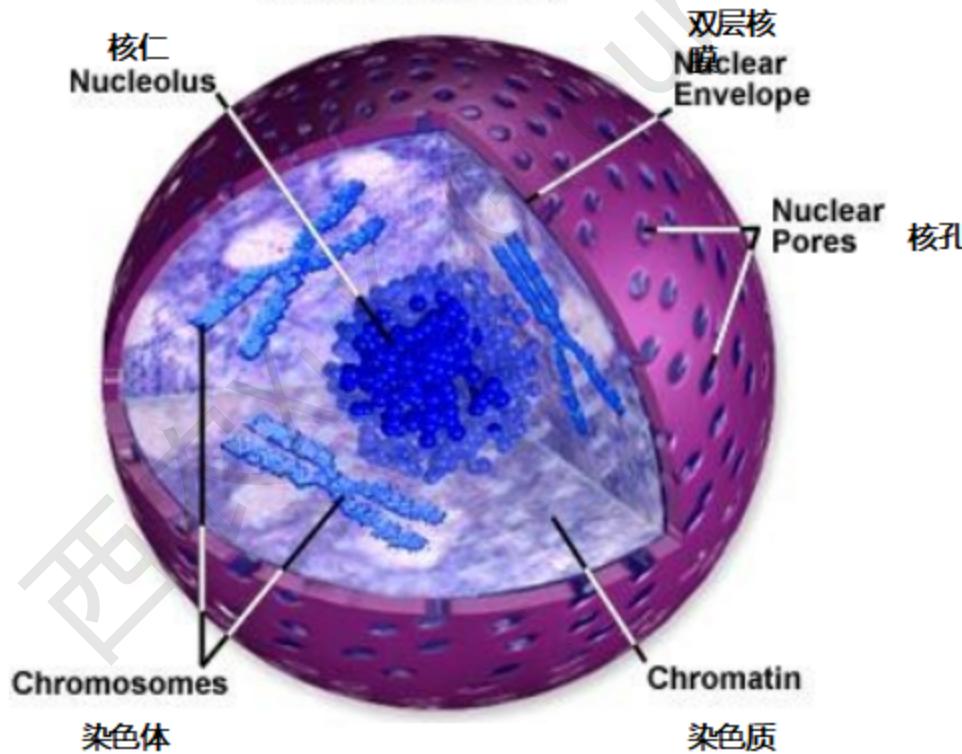
细胞

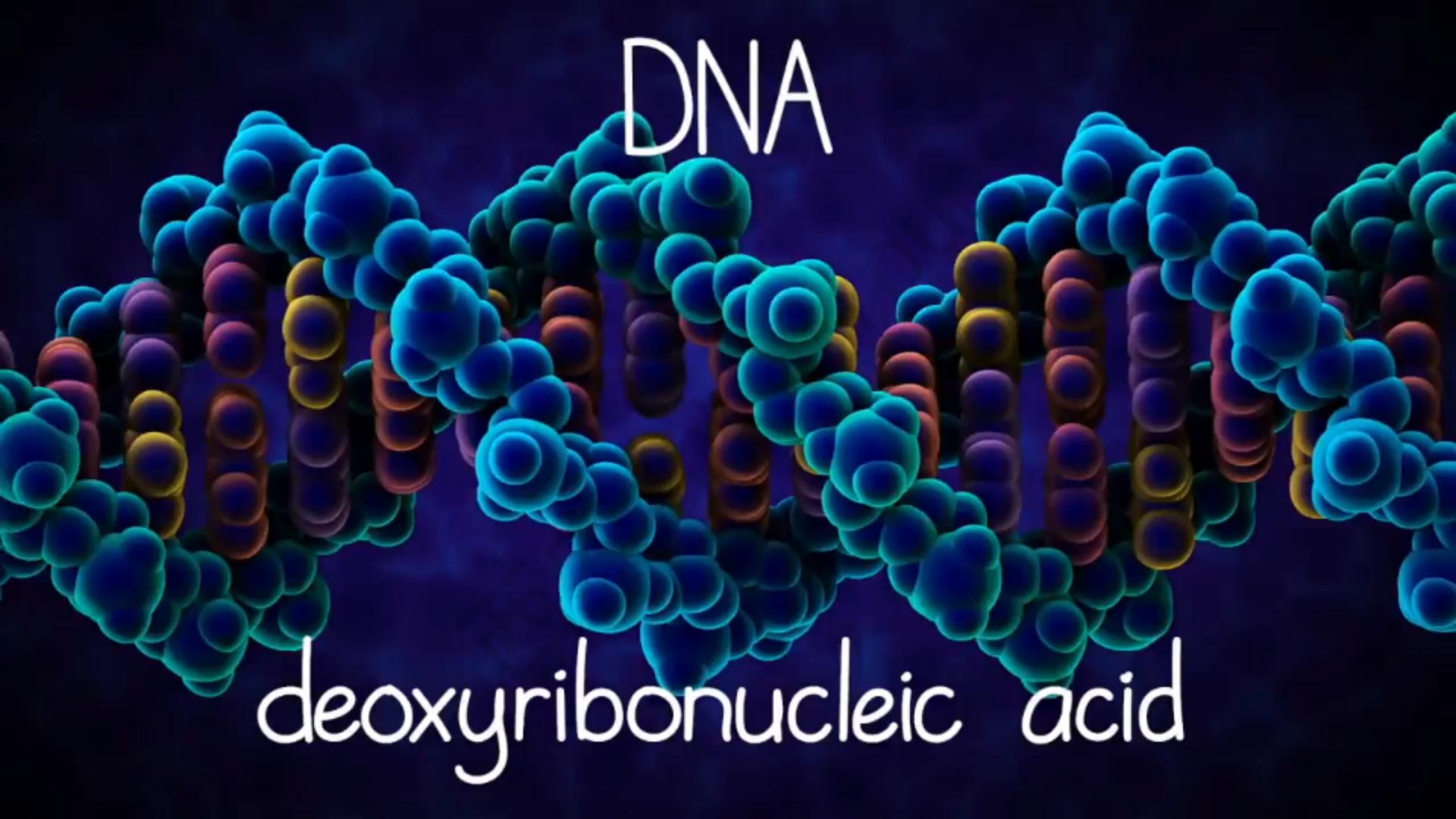
Cell



细胞核
cell nucleus,

The Cell Nucleus



A 3D molecular model of a DNA double helix is shown against a dark blue background. The model consists of two interlocking spiral chains, each composed of alternating light blue and yellowish-orange spherical units. The text "DNA" is positioned above the top chain, and "deoxyribonucleic acid" is positioned below the bottom chain.

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

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

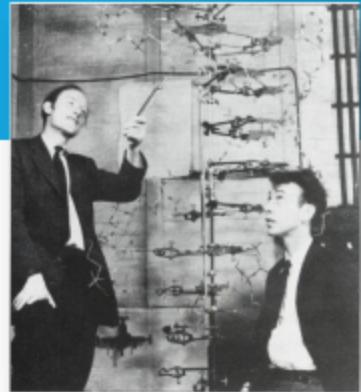
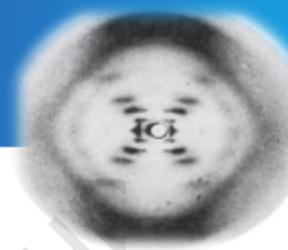
(1965, 诺贝尔生理学和医学奖)

遗传密码

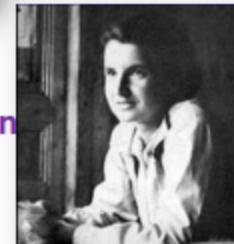
(1968, 诺贝尔化学奖)

逆转录作用

(1975, 诺贝尔生理学和医学奖)



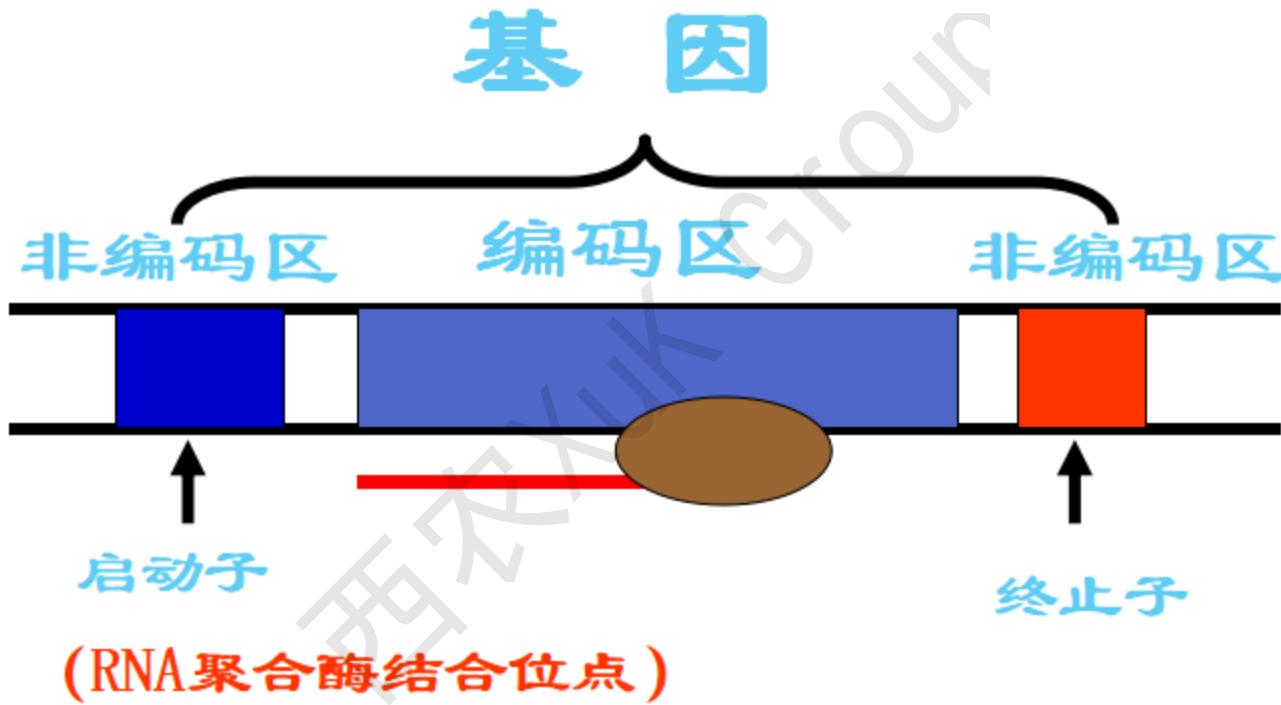
威尔金斯
Maurice Wilkins
(1916-2004)



弗兰克林
Rosalind Franklin
(1920-1958)

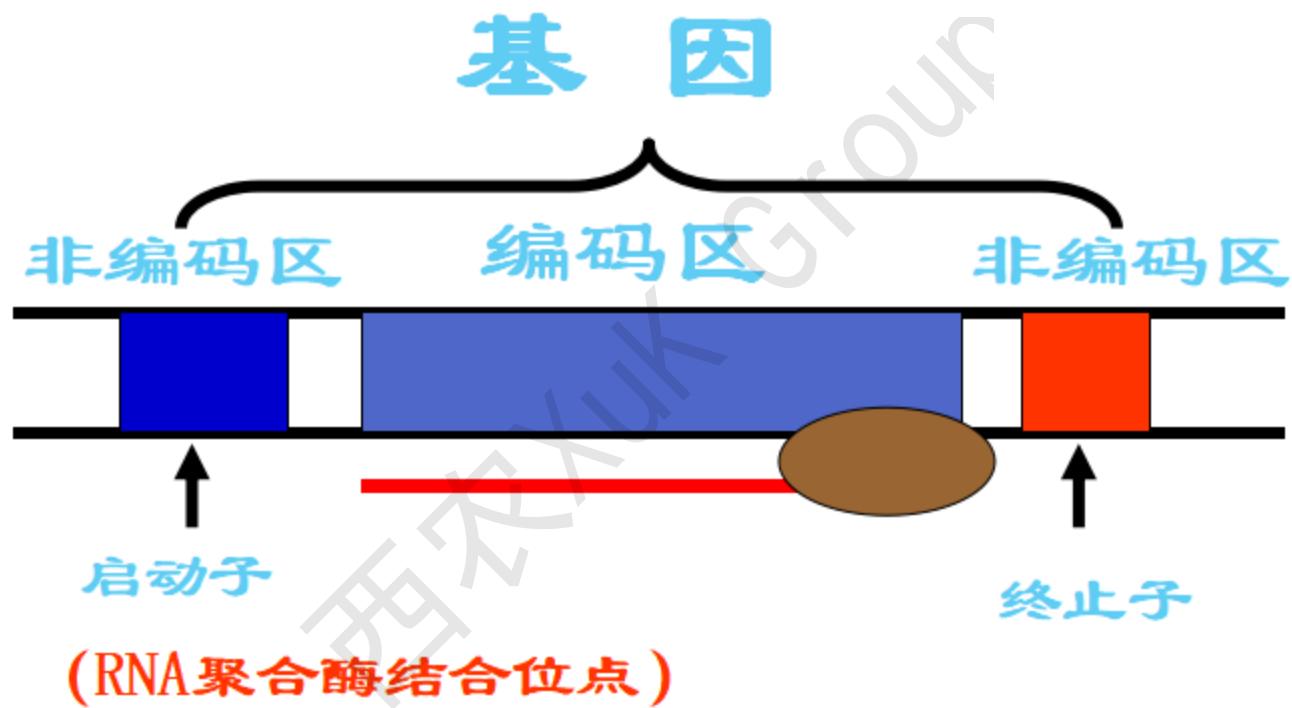


基因工程基础



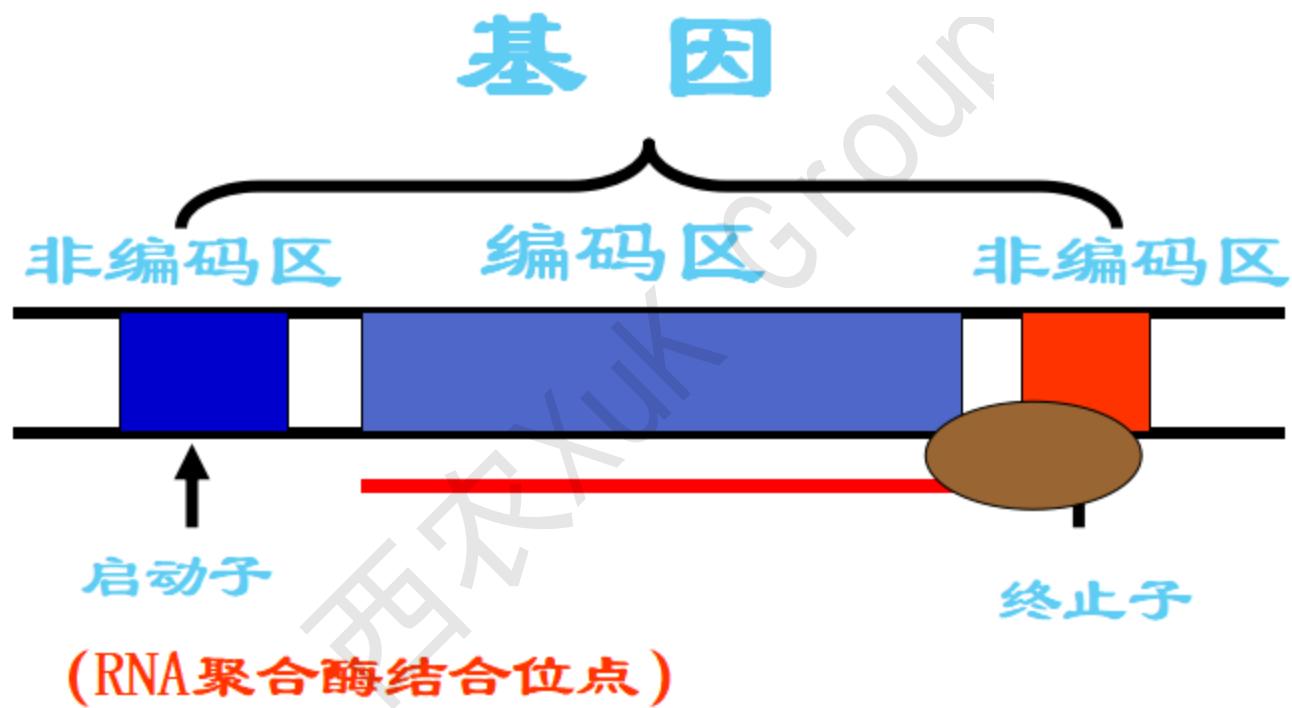
西北农林科技大学

基因工程基础



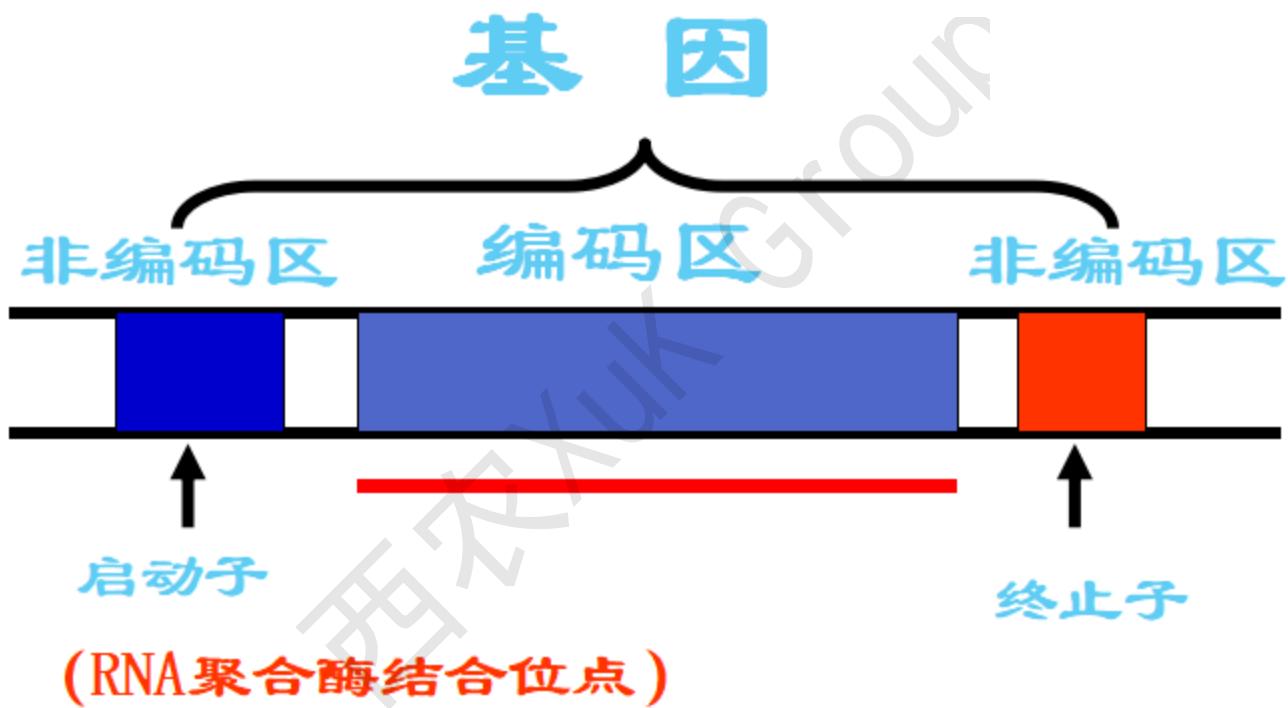
西北农林科技大学

基因工程基础



西北农林科技大学

基因工程基础



西北农林科技大学

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**



西北农林科技大学

基因工程：始于玩质粒，但不止玩质粒....



基因组改造：**基因编辑技术** (诺化奖2020)

噬菌体/病毒/转座载体改造：
慢病毒、腺病毒、腺相关病毒

人工染色体制备：
细菌/酵母人工染色体

细菌基因组改造：
同源重组, ClosTron内含子插入失活等

质粒改造：**重组DNA技术** (诺化奖1980)



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



西北农林科技大学

改造基因的早期方法



基因诱变



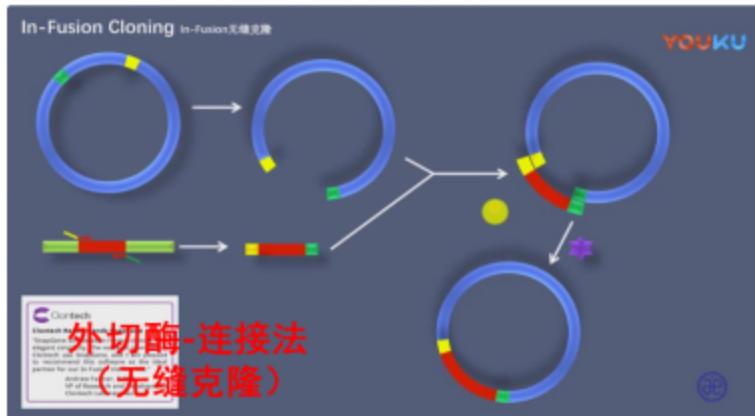
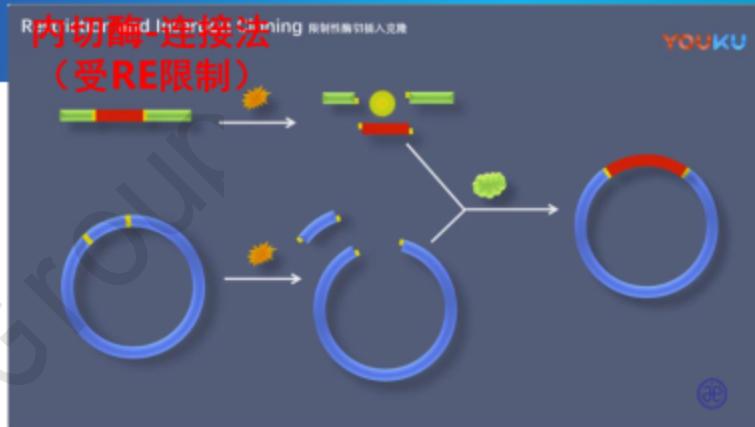
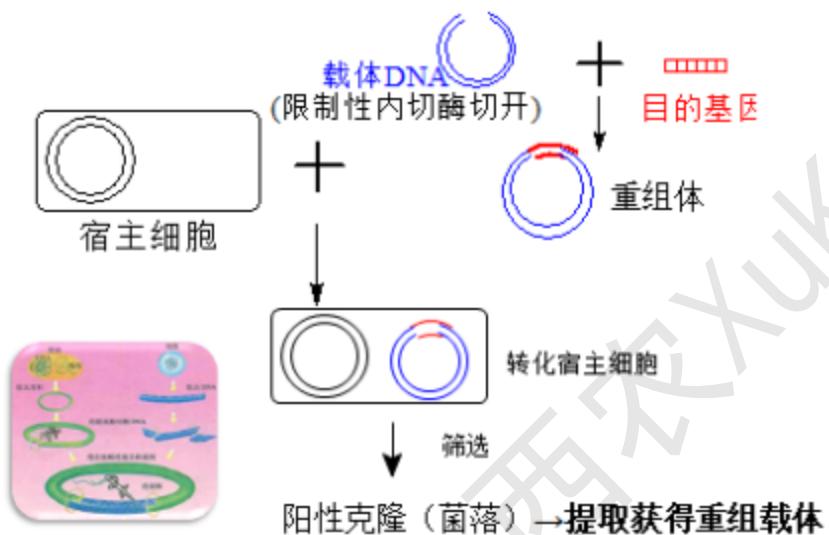
玩质粒



西北农林科技大学

基因工程1.0-重组DNA技术

重组DNA技术的一般步骤



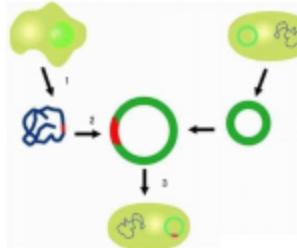
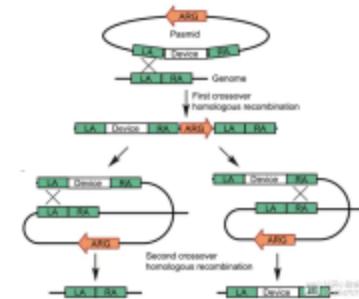
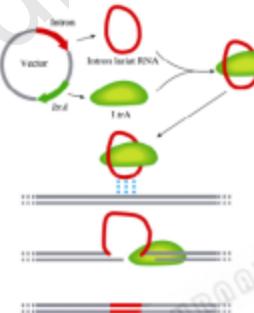
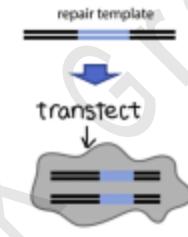
西北农林科技大学

基因工程2.0：微生物基因工程→发酵工程



玩基因组

玩质粒

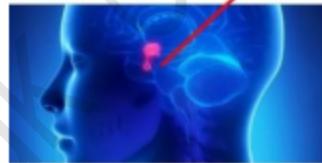


微生物基因工程应用的典型案例

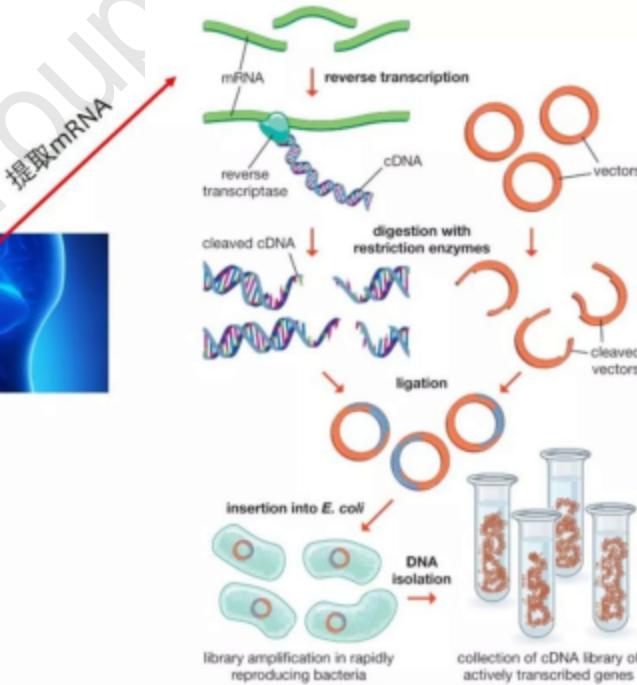
1977年，科学家第一次用重组大肠杆菌生产出有活性的人脑激素



1982年，美国食品药品监督管理局（FDA）批准利用重组大肠杆菌生产的人胰岛素上市，是世界首例商业化应用的基因工程（转基因）药品



常用的工程菌：
细菌—大肠杆菌
真菌—酵母菌



西北农林科技大学

基因工程3.0：动植物细胞基因工程



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



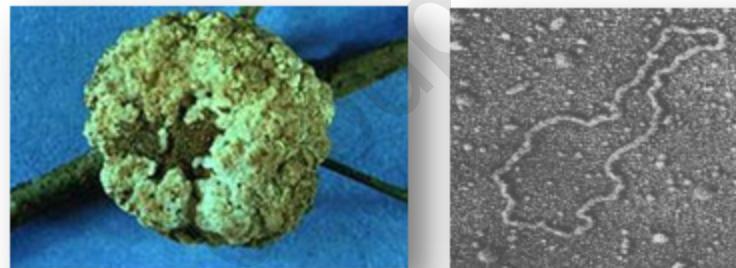
基因工程4.0：转基因（植物）



Jeff Schell



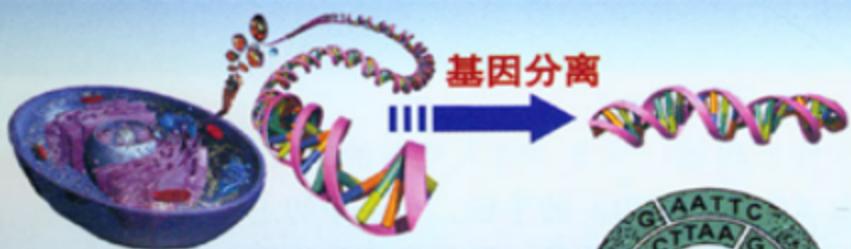
Marc Van Montagu



Ti 质粒

1974年，科学家发现根瘤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)**。

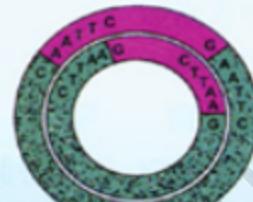
转基因：植物基因工程



植物转基因技术利用了自然界中存在的Ti质粒/土壤农杆菌系统，将一个或少数几个基因转入受体植物，在短期内完成定向转基因育种过程。



受体植物



农杆菌转化法



遗传转化



基因枪转化法



外植体

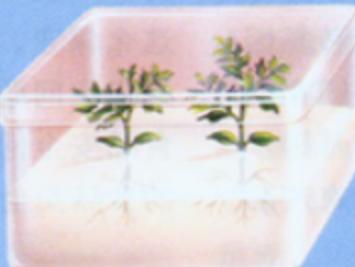


栽培育种



转基因阳性植株

筛选



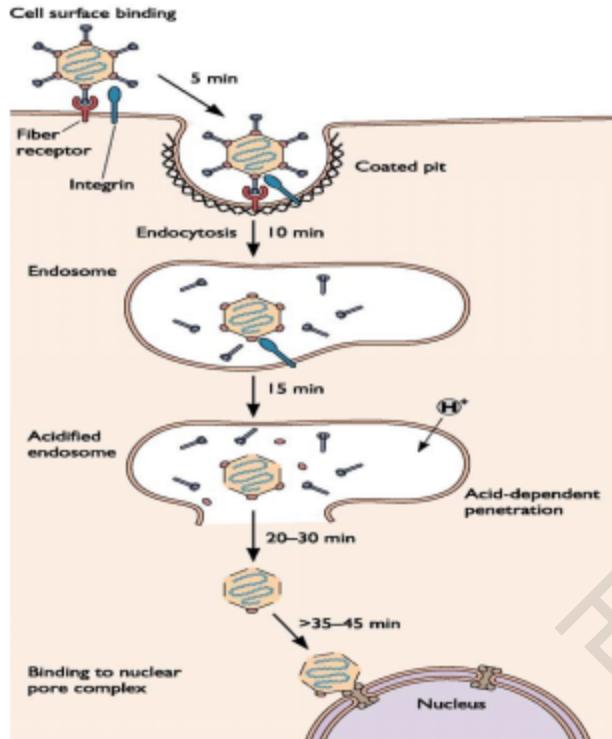
转化植株

组织培养



转化组织

病毒载体介导的转基因



Lentivirus vectors

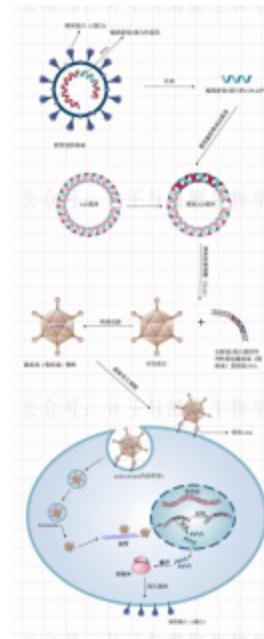
- ✓ Integration (转基因)
- ✓ Non-Integration (提高转染效率)

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)



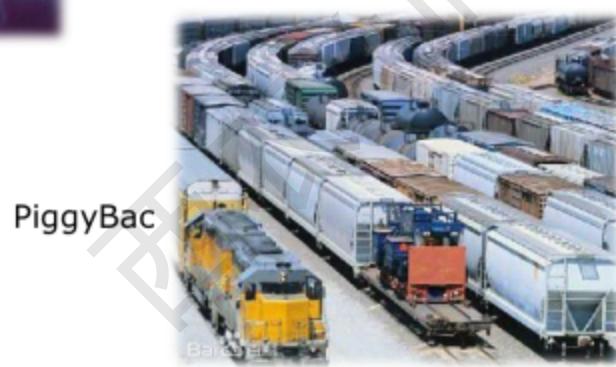
转座等系统介导的转基因



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



Sleeping Beauty



PiggyBac

麦克林托克 McClintock (美)



百度百科

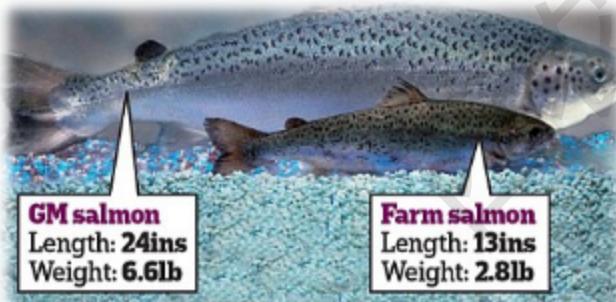
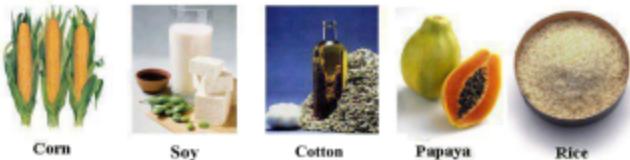
50年代初发现;
1983诺贝尔生理学或医学奖



西北农林科技大学

典型的转基因产品

Top 10 Genetically Modified Foods

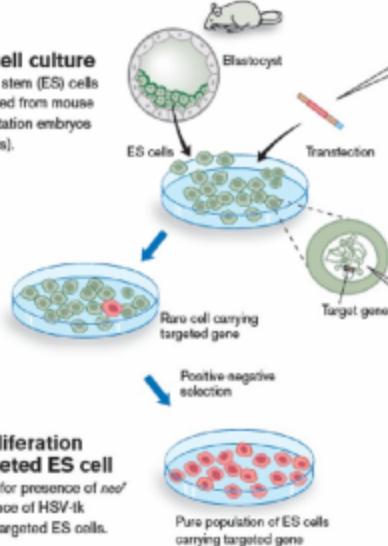


西北农林科技大学

基因工程5.0：基因打靶

Step 1 Gene targeting in ES cells

1. ES cell culture
Embryonic stem (ES) cells are cultivated from mouse pre-implantation embryos (blastocysts).

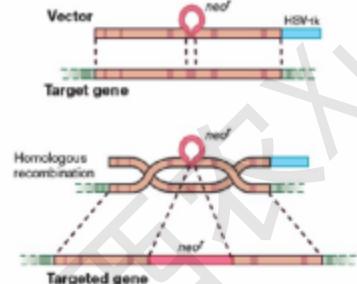


2. Construction of targeting vector

The vector contains pieces of DNA that are homologous to the target gene, as well as inserted DNA which changes the target gene and allows for positive-negative selection.

3. ES cell transfection

The cellular machinery for homologous recombination allows the targeting vector to find and recombine with the target gene.



The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2007



The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2007

'for their discoveries of principles for introducing specific gene modifications in mice by the use of embryonic stem cells'

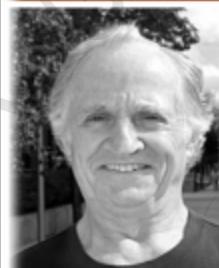


Photo: Tim Roberts/PR Newswire, © HHMI

Mario R. Capecchi



Photo: The Press Association Limited

Sir Martin J. Evans



Photo: Scarpix/Dan Sears

Oliver Smithies

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。



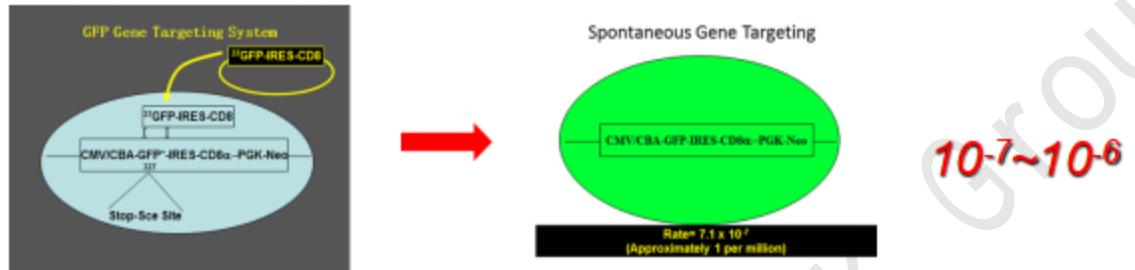
目录

- 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

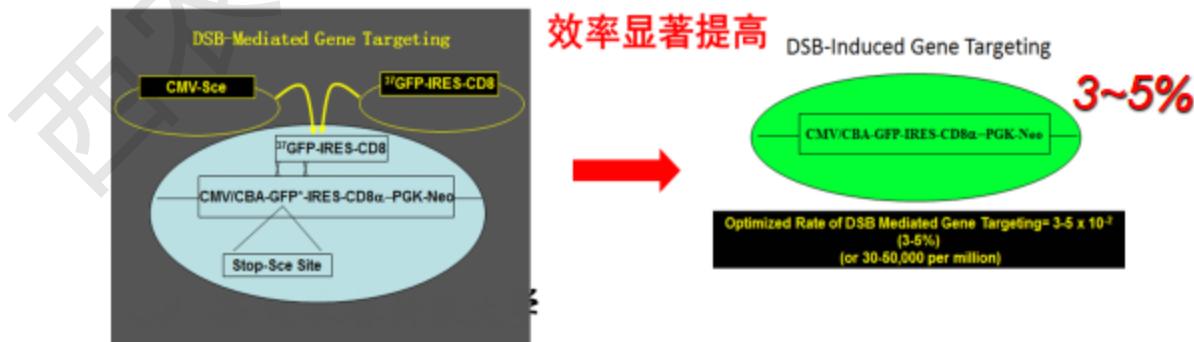


西北农林科技大学

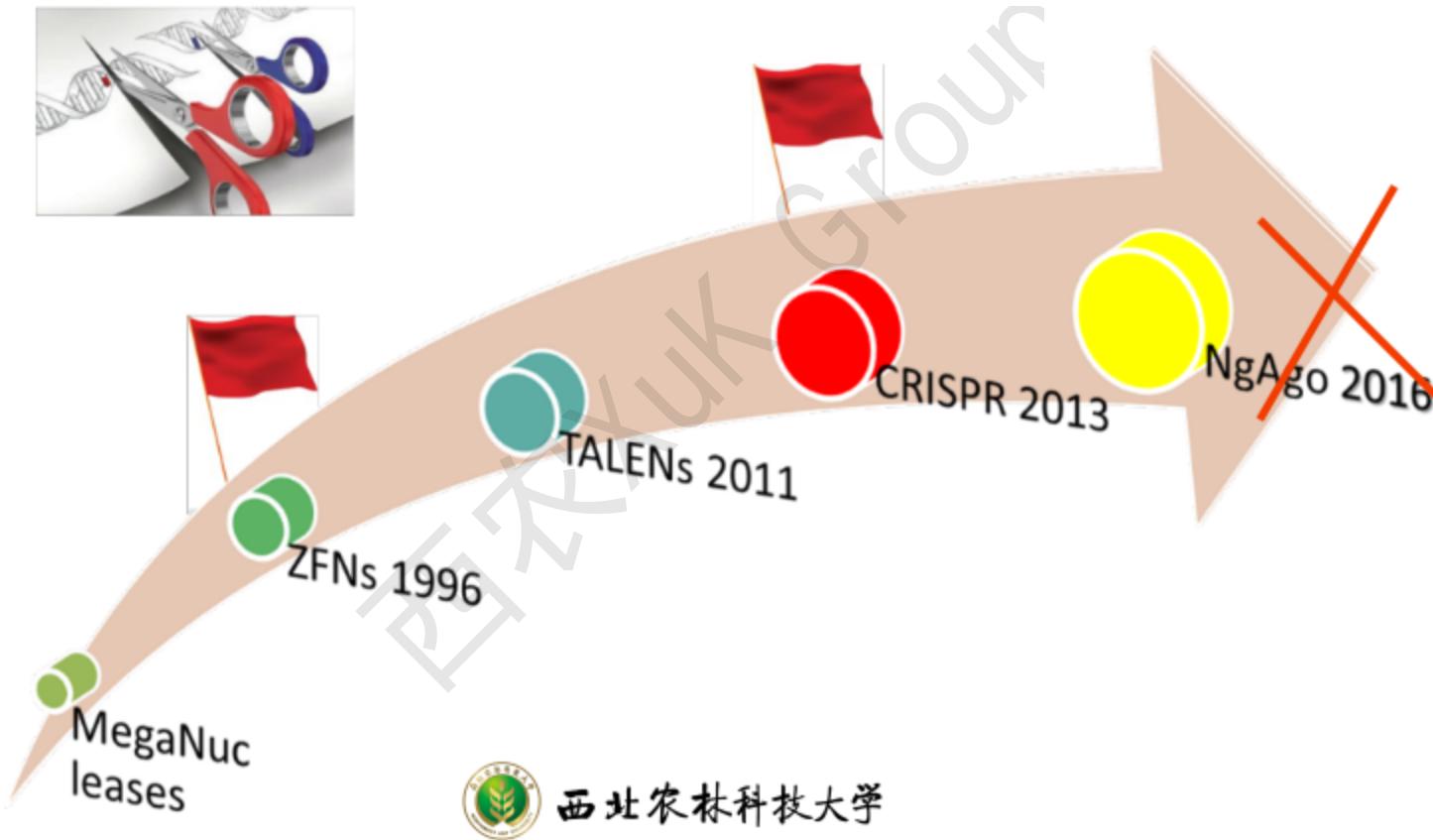
DNA双链断裂提高基因打靶效率



依赖于自然的同源重组，效率很低

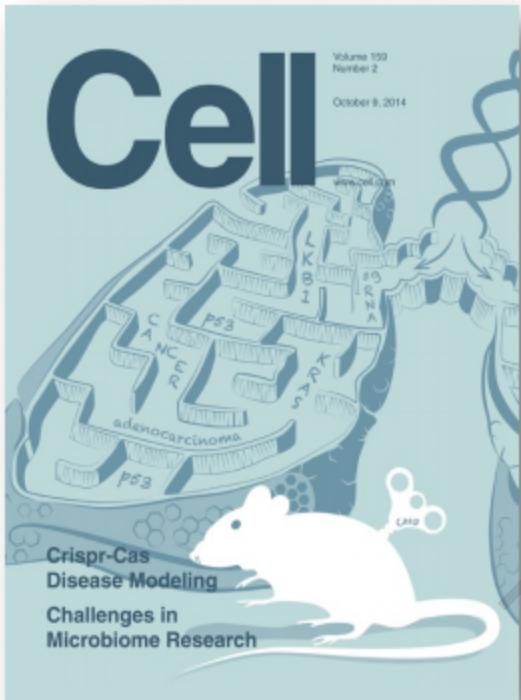


基因的“爱德华剪刀手” --人工特异性核酸酶技术



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？

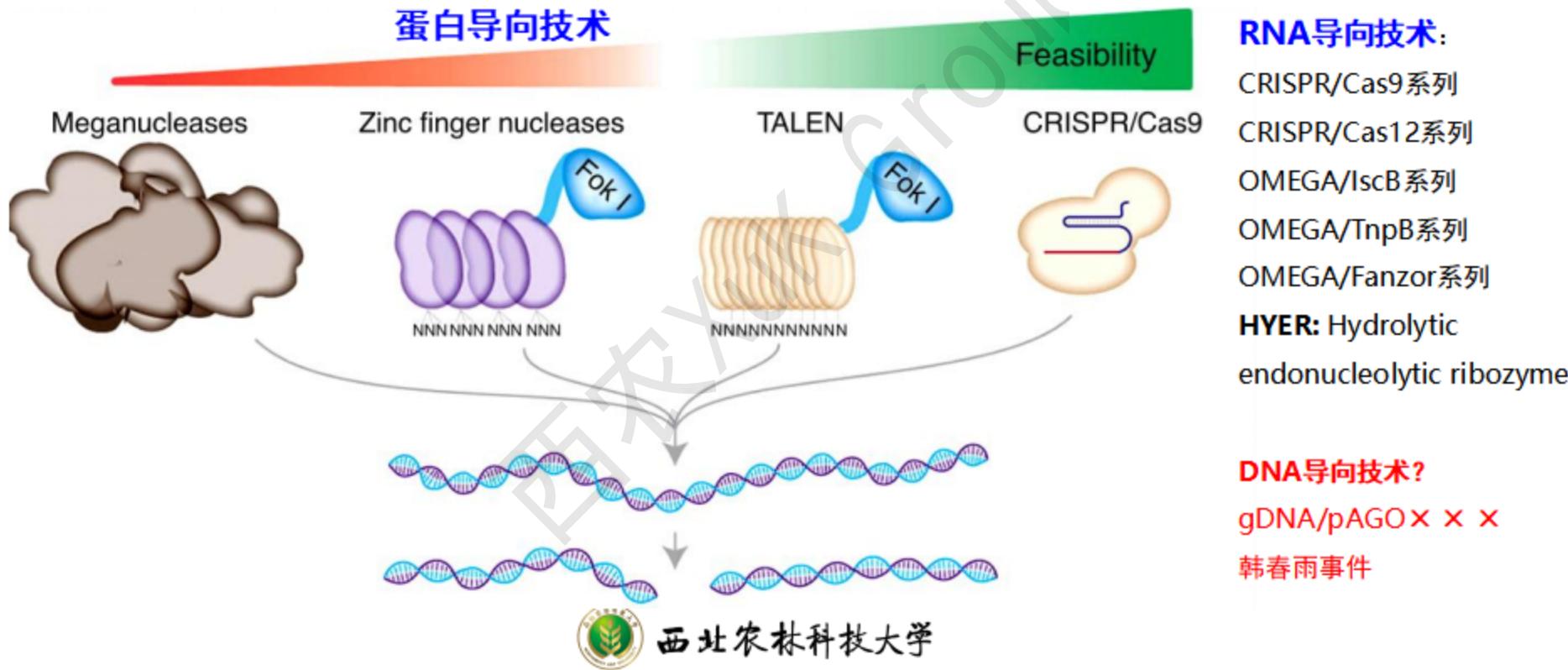
价格低廉：传统基因修饰技术的1%。

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

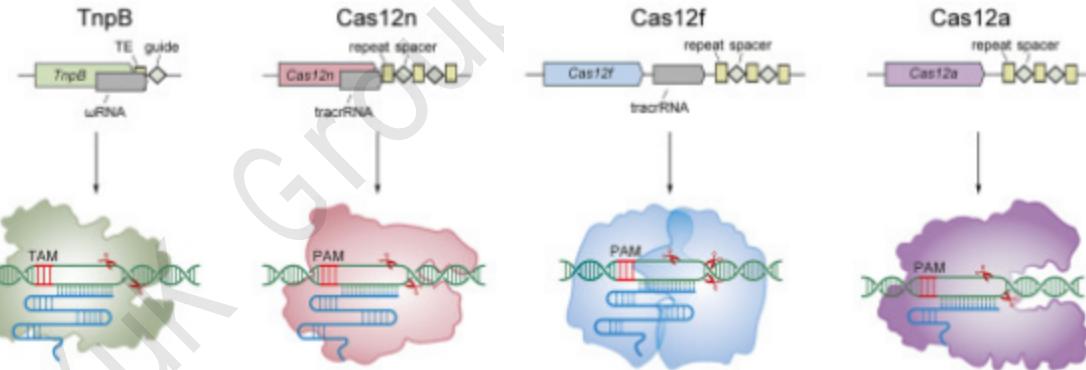


各式各样的基因“剪刀手”

CRISPR:

Clustered Regularly
Interspaced Short
Palindromic Repeats

规律间隔成簇短回文重复序列



OMEGA :

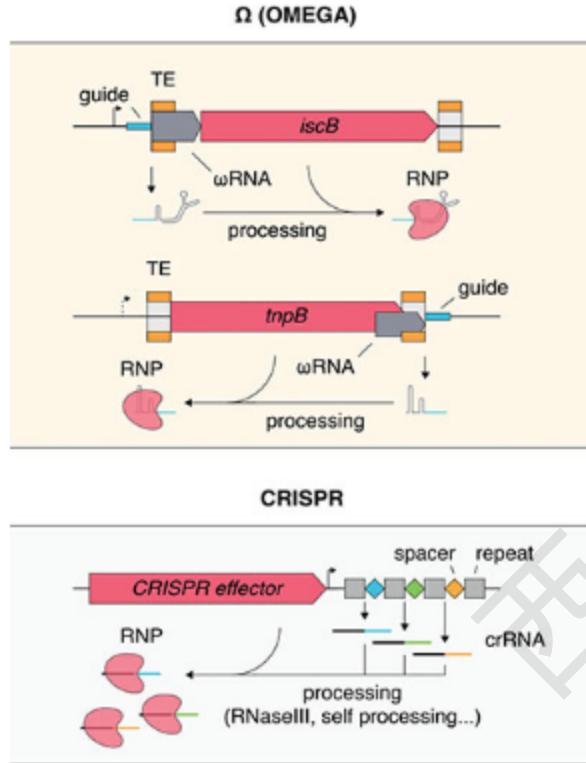
obligate mobile element
guided activity

具有导向活性的指定移动元件

System	IS200/IS605 and IS607	CRISPR-Cas	CRISPR-Cas	CRISPR-Cas
Protein	~400 aa (monomer)	400-700 aa (likely monomer)	400-700 aa (dimer)	1000-1500 aa (monomer)
Guide RNA	ωRNA	crRNA and tracrRNA	crRNA and tracrRNA	crRNA
gRNA region	Located in protein ORF	Located in protein ORF	Exist alone	Exist alone
dsDNA target	5'TAM and target	5'PAM and target	5'PAM and target	5' T-rich PAM
TAM/PAM	5'-TTGAT / 5'-TCAN	5'-NAAN	5' T-rich PAM	5' T-rich PAM



“剪刀手”的进化

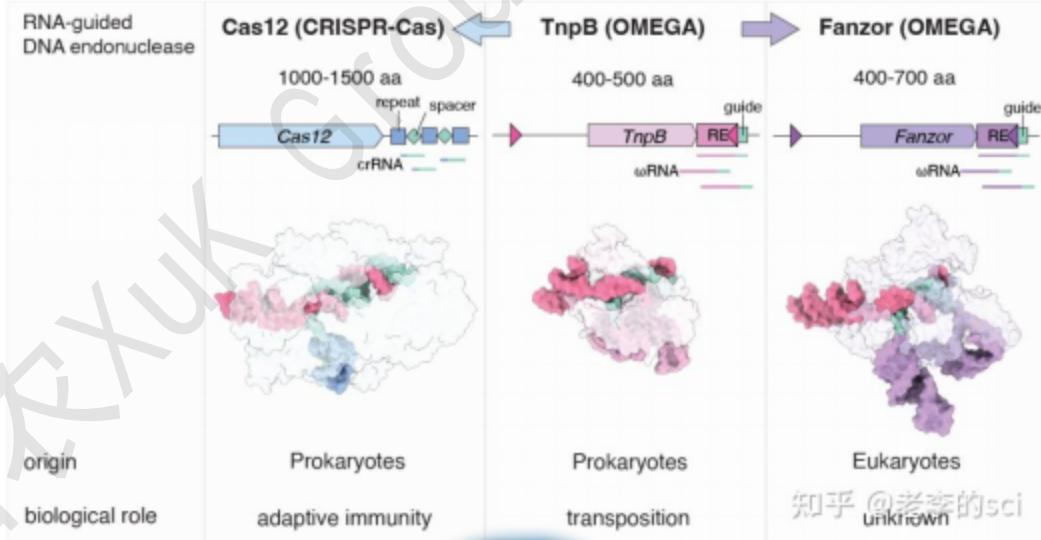


IscB→Cas9



西北农林科技大学

TnpB→Cas12, Fanzor



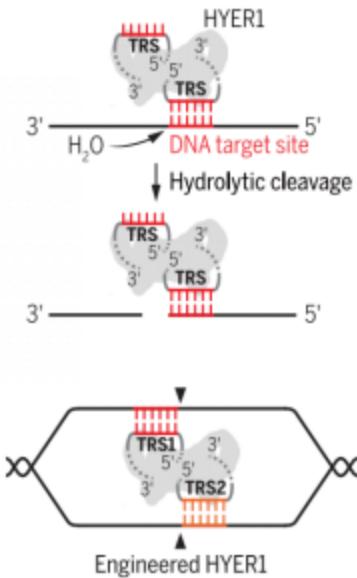
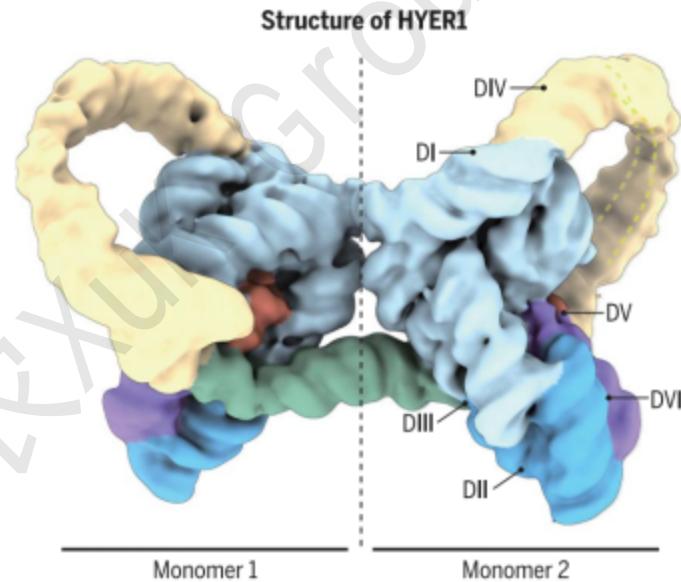
张锋



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

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)

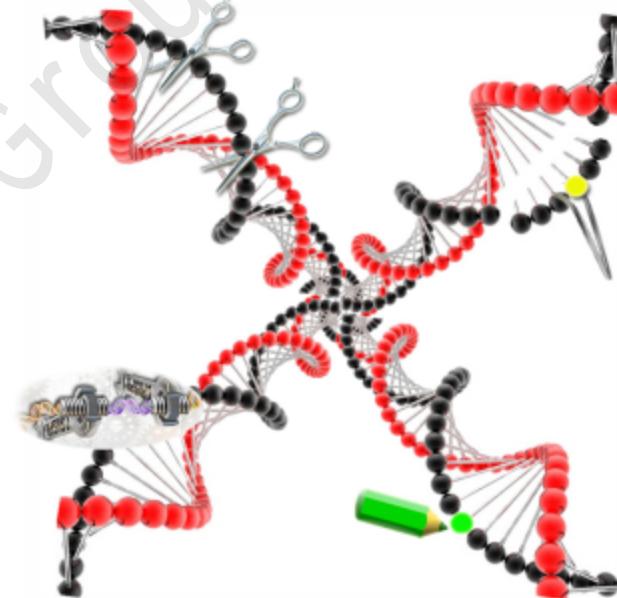
大片段的插入或删除 (l-Indels)

点突变/点编辑/精准编辑 (Point Mutation/Precie 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



NWAFU-GEST