

## 知識物件上傳表

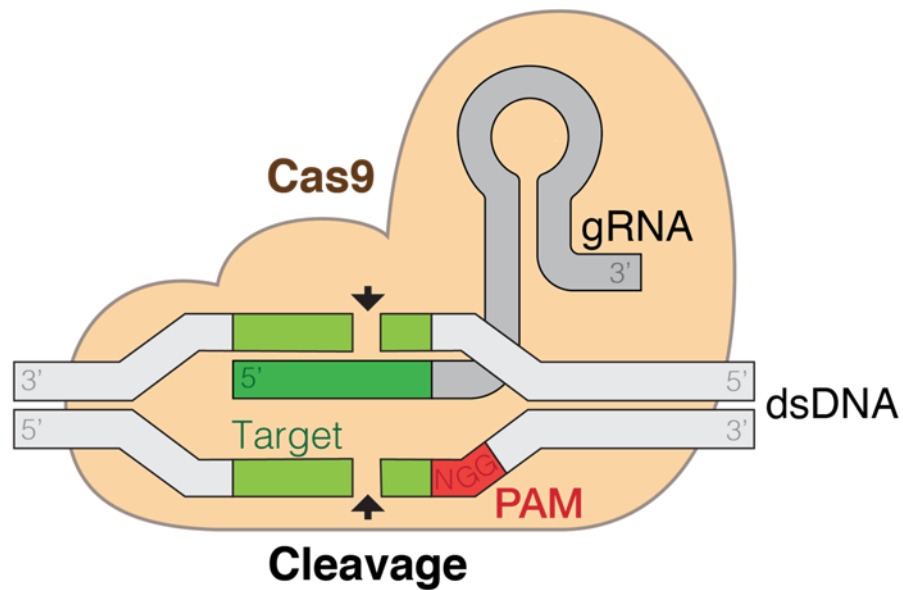
計畫名稱：分散式生質廢棄物能源關鍵技術研發計畫(2/2)

上傳主題：基因編輯--CRISPR/Cas9技術

提報機構：工業技術研究院 綠能與環境研究所

提報時間：107年3月6日

與計畫相關	<input checked="" type="checkbox"/> 1.是 <input type="checkbox"/> 2. 否
國別	<input type="checkbox"/> 1.國內 <input checked="" type="checkbox"/> 2. 國外：(歐美)
能源領域	<input type="checkbox"/> 1.政策與法規 <input type="checkbox"/> 2. 環境衝擊與調適 <input type="checkbox"/> 3. 經濟及產業 <input checked="" type="checkbox"/> 4. 科技 <input type="checkbox"/> 5. 統計資訊
能源業務	<input type="checkbox"/> 1.總體能源 <input type="checkbox"/> 2.化石能源... <input type="checkbox"/> 3.電力 <input type="checkbox"/> 4. 核能 <input checked="" type="checkbox"/> 4.新及再生能源 <input type="checkbox"/> 5.節約能源
決策知識類別	<input type="checkbox"/> 1.建言(策略、政策、措施、法規) <input checked="" type="checkbox"/> 2.評析(先進技術或方法、策略、政策、措施、法規) <input type="checkbox"/> 3.標竿及統計數據：技術或方法、產業、市場等趨勢分析 <input type="checkbox"/> 4.其他：
重點摘述	<p><input checked="" type="checkbox"/>2007發現了 CRISPR(Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) 系統。在 2013 研究人員開始陸續將 CRISPR 進行改造，讓此工具可以有效辨識與剪切特定的 DNA 序列，並成功將此技術應用於多種生物中進行基因組編輯工作。</p> <p><input checked="" type="checkbox"/>CRISPR 技術無物種限制，載體構築簡單快速，基因編輯靶位點設計容易，可以直接作用於 DNA 上，讓基因默化更容易，將可漸漸取代 RNA(RNAi) 或 Morpholino 等基因干擾技術。</p> <p><input checked="" type="checkbox"/>在 1980 年末，開發了一種透過同源互換 (Homologous recombination, HR) 方式將特定基因突變或定點刪除 DNA 的技術，可與 CRISPR 技術搭配使。</p>
詳細說明	<p>一、什麼是 CRISPR/Cas9 技術？</p> <p>CRISPR/Cas9是一個自細菌中所發現的免疫系統，將造成基因組編輯工具產生翻天覆地的大躍進。在遭受如病毒或噬菌體的感染後，其實原核生物例如細菌也是會生病。這個問題對於食物工業產生的衝擊是很大的，例如嗜熱鏈球菌 (<i>Streptococcus thermophilus</i>) 是主要是用來產生優酪乳或起士。當嗜熱鏈球菌受到噬菌體的感染將嚴重減少優酪乳與起士的產量。</p> <p>因此，在 2007 年杜邦公司 (DuPont) 發現了一種方法來解決嗜熱鏈球菌受噬菌體感染的問題，也就是 CRISPR(Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) 系統。在 2013 年2月開始，研究人員陸續將 CRISPR 進行改造，讓此工具可以有效辨識與剪切特定的 DNA 序列，並成功將此技術應用於細胞、小鼠、大鼠、斑馬魚、細菌、果蠅、酵母菌、線蟲或農作物中進行基因組編輯工作。</p>



圖一、CRISPR 作用機制示意圖。(Wikipedia)

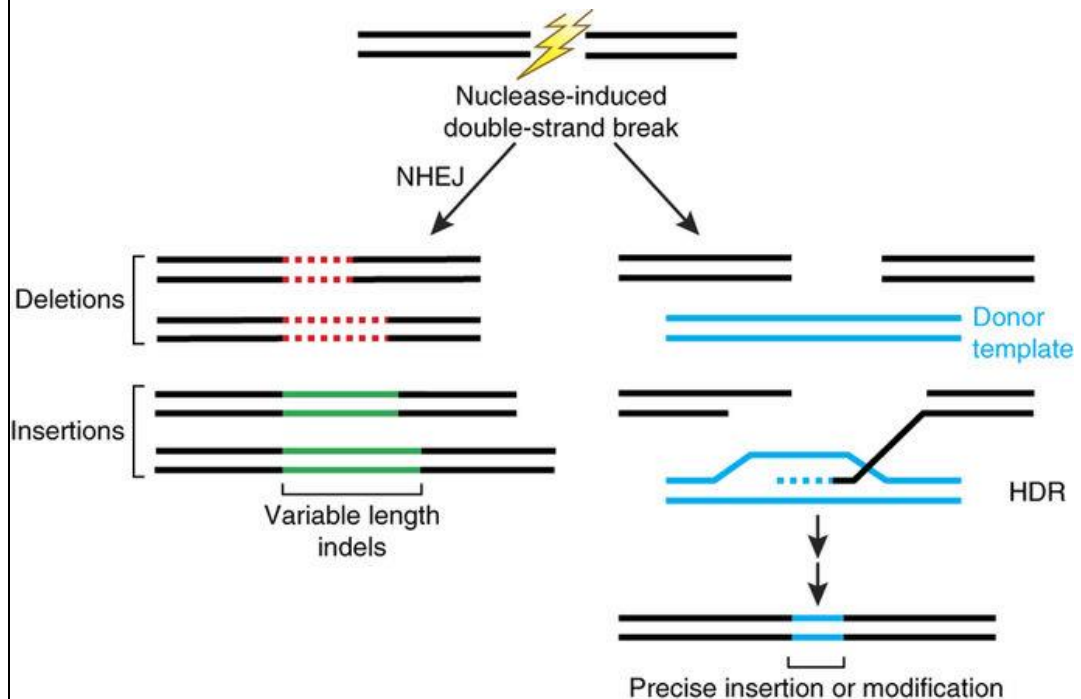
## 二、CRISPR/Cas9 的優點為何？

1. 無物種限制，可在動物、植物、細菌等生物中進行基因打靶。
2. 載體構築簡單快速，幾天內即可完成構築，失敗率低。
3. 靶位點設計容易，PAM 位點 (NGG) 於 128 bp 隨機 DNA 序列中就會出現一次，並且正反兩股皆可設計。
4. Cas9 辨識 DNA 序列效率高，新開發的 Cas9 D10A 可有效降低脫靶效應，增加打靶準確性。
5. 基因打靶成功率較 ZFN 或 TALEN 高，還可同時放入兩個以上的 sgRNA 來進行多個基因同時剔除的目的。
6. 雙合一或三合一載體簡化細胞轉染的難度。搭配多種報導基因，如螢光蛋白或抗生素篩選基因，可使實驗設計更有彈性。
7. 可以直接作用於 DNA 上，讓基因默化更容易，將可漸漸取代 RNA(RNAi) 或 Morpholino 等基因干擾技術。

## 三、如何靈活運用 CRISPR/Cas9 基因剔除技術？

在 1980 年末，開發一種透過同源互換 (Homologous recombination, HR) 方式將特定基因突變或定點刪除 DNA 的技術。這個技術主要是透過設計一段相似的 DNA 片段來置換染色體上的一段 DNA。然而，在自然狀況下，體細胞要發生同源互換的機率其實是非常低的，通常低於  $1 \times 10^{-6}$ 。這樣的技術較適合應用於幹細胞或胚幹細胞，但是對於胚幹細胞尚未開發成功的物種而言，想要利用同源互換方式進行基因剔除卻是非常困難的事情。但是隨著時代的進步，漸漸地衍生出 RNAi 或 Morpholino 基因干擾技術，但是還是無法滿足研究或臨床的需要。所以在特定 DNA 位點上進行 DSB 是研究人員一直想要達成的目標。近年來，分子生物技術的成熟，漸漸開發出許多新的技術，如：Cre/LoxP、ZFN、TALEN 與最新的 CRISPR 系統可以在定點進行 DNA 編輯。目前許多研究人員對於這個沒有物種限制的 CRISPR/Cas9 技術感到興趣，只要能成功將 Cas9 mRNA/sgRNA 或

CRISPR/Cas9 多合一載體送入細胞或胚胎中，即可進行基因剔除實驗。在細胞中，Cas9 蛋白與 sgRNA 形成複合體，並且對於 DNA 序列進行辨認並解開雙股 DNA 結構。因此，crRNA 與 DNA 單股進行雜交並且透過 Cas9 蛋白 N 端的 RuvC 與蛋白中部的 HNH 這兩個活性區作用將 DNA 雙股切斷而形成雙股 DNA 斷裂 (Double strandbreak, DSB)。當細胞察覺到 DSB 時，啟動非同源互換型 DNA 修復機制 (Non-homologous end joining, NHEJ) 或進行同源互換 DNA 修復機制，這個過程往往造成部分 DNA 缺失或插入讓基因編碼產生位移，最後造成基因破壞。在技術上的演進，CRISPR/Cas9 更可能衍生出更多的實驗策略。



圖二、DNA 斷裂後修補機制(同源互換與非同源修補) (Jeffrey D Sander & Keith Joung, Nature Biotechnology, 2014)

#### 四、參考資料

- ◆ Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, Boyaval P, et al.(2007) CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. Science 315: 1709-1712.
- ◆ Richter H, Randau L, Plagens A (2013) Exploiting CRISPR/Cas:interference mechanisms and applications. Int J Mol Sci 14: 14518-14531.
- ◆ Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, et al. (2012) A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. Science 337: 816-821.
- ◆ Hwang WY, Fu Y, Reyon D, Maeder ML, Tsai SQ, et al. (2013) Efficient

	<p>genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. Nat Biotechnol 31: 227-229.</p> <p>◆ Sander, J. D., &amp; Joung, J. K. (2014). CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. Nature biotechnology, 32(4), 347.</p> <p>◆ Wikipedia</p> <p>◆ ZGENEBIO BIOTECH INC.</p>
--	--

註：1.請計畫執行單位上傳提供較具策略性的知識物件，不限計畫執行有關內容。

2.請計畫執行單位每季更新與上傳一次，另有新增政策建議可隨時上傳。

3.文字精要具體，量化數據盡量輔以圖表說明。