综 述

DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.001111

CRISPR/Cas9基因剪辑技术在乙型肝炎病毒感染治疗中的应用

罗英英，黄爱龙，胡接力

（重庆医科大学感染性疾病分子生物学教育部重点实验室，重庆 400016）

【摘 要】CRISPR/Cas9 基因剪辑技术源于细菌及古细菌 CRISPR 介导的后天获得性免疫系统，通过引导 RNA 与靶 DNA PAM 序列特异性识别，引发 Cas9 核酸酶定点切割互补双链 DNA，在基因剪辑方面具有制备简单、剪辑位点特异性高及易于同时剪辑多个基因位点等优势，已被广泛应用于哺乳动物细胞基因剪辑。本文主要从 CRISPR/Cas9 技术作用原理和其抗乙型肝炎病毒感染作用及机制等方面进行综述。

【关键词】CRISPR；基因剪辑；乙型肝炎病毒；共价闭合环状 DNA

【中图分类号】R512.62 【文献标志码】A 【收稿日期】2016-02-07

Application of CRISPR/Cas9 technology in hepatitis B virus infection

Luo Yingying, Huang Ailong, Hu Jieli

(*Key Laboratory of Molecular Biology on Infectious Diseases, Ministry Education, Chongqing Medical University*)

【Abstract】The clustered regularly interspaced short palindromic repeats(CRISPR)/CRISPR-associated(Cas) 9 system is an adaptive immune system. The sgRNA guides the Cas9 protein to specifically cut target DNA sequence by recognizing the protospacer-adjacent motif(PAM) sequence in target DNA. CRISPR/Cas9 offers several potential advantages, including the ease of customization, higher targeting efficiency and the ability to facilitate multiplex genome editing. Due to these advantages, it has been used in gene editing in several kinds of mammalian cells. In this review, we discuss the mechanism of CRISPR/Cas9, application of CRISPR/Cas9 in hepatitis B virus infection and relevant mechanism.

【Key words】clustered regularly interspaced short palindromic repeats; gene editing; hepatitis B virus; cccDNA

作者介绍：罗英英，luoyingying89@163.com，
研究方向：乙肝的基因治疗。

通信作者：胡接力，hujieli1977@163.com。

基金项目：国家自然科学基金资助项目（编号：81000732）；重庆市研究生科研创新资助项目（编号：CYB15099）。

优先出版：http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20161215.1615.088.html (2016-12-15)

py on cardiovascular risk markers[J]. Bri Hematol, 2004, 124(6): 802-808.

[18] Teede HJ, Liang YL, Kotsopoulos D, et al. Placebo-controlled trial of transdermal estrogen therapy alone in postmenopausal women: effects on arterial compliance and endothelial function[J]. Climacteric, 2002, 5(2): 160-169.

[19] Zegura B, Guzic-Salobir B, Sebestjen M, et al. Effect of oral and transdermal estrogen replacement therapy on makers of coagulation, fibrinolysis, inflammation and serum lipids and lipoproteins in postmenopausal women[J]. Thromb Haemost, 2001, 85(4): 619-625.

[20] Zacharieva S, Kirilov G, Kalinov K, et al. Effect of different hormone replacement therapy regimens on circadian blood pressure profile and active renin in postmenopausal women[J]. Gynecol Endocrinol, 2002, 16(6): 461-467.

[21] Zegura B, Keber I, Sebestjen M, et al. Double blind, randomized study of estradiol replacement therapy on makers of inflammation, coagulation and fibrinolysis[J]. Atherosclerosis, 2003, 168(1): 123-129.

[22] Campagnoli C, Colombo P, De Aloysio D, et al. Positive effects on cardiovascular and transdermal estradiol and norethisterone acetate[J]. Maturitas, 2002, 41(4): 299-311.

[23] del Agua AR, Aurrekoetxea I, Elorriaga MA, et al. Involvement of G-463AMPO gene polymorphism in the response of postmenopausal women to hormone therapy[J]. Menopause, 2011, 18(5): 575-581.

[24] Strandberg TE, Ylikorkala O, Tikkanen MJ. Differing effects of oral and transdermal hormone replacement therapy on cardiovascular risk factors in healthy postmenopausal women[J]. American Cardiol, 2003, 92(2): 212-214.

[25] Adami S, Rossini M, Zamberlan N, et al. Long-term effects of transdermal and oral estrogens on serum lipids and lipoproteins in postmenopausal women[J]. Maturitas, 1993, 17(3): 191-196.

[26] 禹 莉，章 尧，陈昌杰. 同型半胱氨酸致心血管疾病机制研究进展[J]. 内科，2007，2(1)：68-71.

[27] 韦晓昱，杨 欣. 激素替代疗法与心血管疾病预防的关系[J]. 中国妇产科临床杂志，2010，11(1)：74-76.

（责任编辑：张辉洁）

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus,HBV)感染是一个全球重大公共卫生问题。全球有 3.5 亿~4 亿 HBV 感染者,其中 10%为慢性 HBV 感染(chronic HBV infection,CHB)[1]。全球每年有约 78 万人死于 HBV 感染相关肝脏疾病[2]。目前主要治疗药物包括干扰素和核苷(酸)类似物[1,3],但在抗病毒治疗中断后病毒量常常出现回弹导致治疗失败。这是因为现有抗 HBV 治疗手段不能有效清除受感染细胞内 HBV 共价闭合环状 DNA(covalently closed circular DNA,cccDNA)。目前尚无有效手段清除受感染肝细胞内 HBV cccDNA,cccDNA 成为 HBV 感染治疗难点。

理论上讲,特异性破坏 HBV 基因组可能清除 HBV cccDNA,从而治愈 CHB。已有 2 种基因剪辑技术——锌指核酶技术(zinc finger nuclease,ZFN)和转录激活样效应核酶技术(transcription activator-like effector nuclease,TALEN)被用于体外和体内特异性位点切割 HBV 基因组及宿主基因组中整合的 HBV 基因组,从而特异性降解 HBV 基因组的研究观察[4-6]。这 2 种基因剪辑技术均是基于蛋白的剪辑技术,将序列特异性 DNA 结合到非特异性 DNA 切割元件上进行剪辑。但是这 2 种技术识别靶向位点非常有限,并且识别模块构建也非常复杂。

2013 年,一种新兴基因剪辑技术——clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated proteins (CRISPR/Cas)引起研究者高度关注。CRISPR/Cas9 作用原理不同于 ZFN 和 TALEN,该系统通过 RNA 与靶 DNA 识别,引导 Cas9 核酸酶切割互补双链 DNA[7],具有制备简单、成本低廉、特异性高等优点,开发后获得快速发展[8-9]。本文主要综述 CRISPR/Cas9 技术作用原理、对 HBV 复制抑制作用及抑制作用机制等。

1 CRISPR/Cas9 技术原理

CRISPR/Cas 系统是一种后天获得性免疫系统,存在于大多数古生菌与细菌中,用于抵御外来遗传物质(如质粒、噬菌体),并在自身基因座中留下外来基因片段作为“记忆”以抵御其再次入侵[10-12]。CRISPR/Cas 分 3 种类型[7],本文介绍的 CRISPR/Cas9 是第 2 型。

2007 年,Barrangou 等[13]首次证实细菌可利用 CRISPR/Cas 抵抗噬菌体入侵并形成记忆阻止再次入侵，从而证实CRISPR/Cas 是细菌的一种免疫防御机制,之后研究人员很快发现 CRISPR/Cas 在发酵工业及医学中的潜在应用价值，从此 CRISPR成为研究热点。直到 2012 年 Emmanuelle Charpentier 和 Jennifer A. Doudna 课题组发现一种比较简单的 CRISPR/Cas 系统防御机制,即本文所介绍的 CRISPR/Cas9 系统[14],CRISPR/Cas9 成为基因剪辑有力工具。

CRISPR/Cas9 组成简单,包括 Cas9 核酸酶、编码向导 RNA(guide RNA,gRNA)的 CRISPR RNA(crRNA)序列以及辅助 crRNA 分裂为独立单元的 trans-encoded small RNA (tracrRNA)[15]。每个 crRNA 都包含 20bp gRNA 序列,可与靶 DNA 序列互补识别并引导 Cas9 核酸酶对靶 DNA 进行剪辑[14,16]。Cas9 是一个大分子量多功能蛋白,是切割靶 DNA 过程中唯一必要的酶[13,15]。Cas9 蛋白在 gRNA 引导下基于RNA-DNA 互补识别对靶 DNA 进行定点切割。Cas9 蛋白的 2 个核酸酶结构域，靠近氨基端的 RuvC 样结构域及位于蛋白中部的 HNH 样结构域,分别切割 DNA 的两条链[17-19]。其中,HNH 结构域负责切割与 sgRNA 互补的一条靶 DNA 链,RuvC 结构域负责切割靶 DNA 另外一条链[14,20]。这样就产生了 DNA 双链缺口(double-strand DNA break,DSB)。在 DNA 修复过程中,主要通过非同源末端连接或者同源直接修复对 DSB 进行修复,从而引入基因插入或缺失,引起移码突变或提早产生终止子。在实际应用中,可将 crRNA-tracrRNA 连接成一个嵌合体,这样只需要 Cas9 蛋白和 1 个引导 RNA 就能进行基因编辑[14]。

后来,研究者根据人源密码子对 Cas9 蛋白表达进行优化,使 Cas9 蛋白可以在哺乳动物中稳定表达,在 Cas9 蛋白 C 端融合表达核定位序列,使 Cas9 蛋白能够进入细胞核内进行切割[21-22]。利用 Double-nicking 方法进一步提高 CRISPR/Cas9 切割特异性。突变 Cas9 蛋白酶 1 个核酸酶活性,使其成为切口酶，通过 1 对 sgRNA 将 Cas9 切口酶引导至特异 DNA 位点进行切割,这样就大大降低脱靶率[23-24]。

该技术可用于对 1 个或多个靶基因进行定点敲除,从而建立 1 个或多个基因敲除动物模型[24],可对人类致病基因进行敲除来治疗基因疾病[25],也可用于抗药靶点筛选、生态载体控制(使蚊子体内携带病毒灭活)、病毒基因毁坏、农作物基因改善等。目前 CRISPR/Cas9 系统经由遗传工程改造已应用于人源细胞[26]、小鼠[25,27]、大鼠[28]、斑马鱼[29]、果蝇[30-32]、酵母菌[33]、线虫[34-35]及农作物[36]等。本文主要介绍应用 CRISPR/Cas9 技术在阻断 HBV 合成中的应用。

2 CRISPR/Cas9 技术在抗 HBV 中的应用

很多研究尝试使用该技术对 HBV 基因组进行剪辑,以观察 CRISPR/Cas9 是否能够直接毁损 HBV 复制模板 cccDNA,以及与传统治疗药物是否有协同作用。

2.1 CRISPR/Cas9 技术在抗 HBV 治疗中的尝试

HBV 现有治疗策略主要包括干扰素和核苷酸类似物 2 大类,干扰素主要提高机体免疫力,而核苷酸类似物主要针对病毒逆转录环节,这 2 类药物均不能清除受感染细胞内持续存在的 HBV 复制模板——cccDNA。CRISPR/Cas9 是新兴基因靶向修饰工具,很多研究尝试使用该技术对 HBV 基因组进行剪辑。目前,已有文献报道 CRISPR/Cas9 可剪辑 HBV DNA 并抑制 HBV DNA 复制、cccDNA 合成及核心蛋白和表面蛋白等多种蛋白合成及分泌。

对于该研究结果，多个研究小组分别已在 HepG2[37-40]、HepaRG[41]、HepG2.2.15[38,40-42]、HepAD38[37,41,43]及 HuH7[42-44]等多种人源肝细胞系及人源肝癌细胞系上做验证。多种细胞系研究结果相似，提示 CRISPR/Cas9 对 HBV 基因组剪辑不具有细胞特异性，CRISPR/Cas9 在多种细胞系中具有稳定剪辑 HBV 能力，以及 CRISPR/Cas9 对整合在宿主基因组上的HBV 及外源性 HBV 质粒均有剪辑作用。

根据 HBV 基因组序列差异可将 HBV 分为 A-J[45-50]共 10 个基因型，临床数据显示不同基因型对传统治疗药物敏感性不尽相同。CRISPR/Cas9 对 HBV 基因组的剪辑是否存在基因型特异性？理论上，CRISPR/Cas9 直接作用于 HBV 基因组，基于 RNA 与 DNA 互补配对原则进行识别，应该不存在基因型特异性。针对这一问题，有研究特别针对 HBV 多种基因型保守序列设计 sgRNA[39,42,44]，以鉴定 CRISPR/Cas9 对 HBV 不同基因型是否均能成功进行剪辑。结果证实在将这些针对保守区域 sgRNA 应用于 CRISPR/Cas9 系统时，可引起不同基因型 HBV 均发生基因突变且不同基因型 HBV 复制水平均有所下降，Western blot 鉴定细胞内 HBsAg 表达量下降 20%~95%。CRISPR/Cas9 系统中同一 sgRNA 对于不同基因型 HBV 均有剪辑作用且作用程度类似，说明 CRISPR/Cas9在对 HBV 基因组进行剪辑时的确是通过互补配对原则进行识别的，具有识别稳定性，在应用于临床、针对感染不同基因型 HBV 临床患者时，可设计针对不同基因型 HBV 保守序列的 sgRNA，从而对感染不同基因型 HBV 临床患者均能产生治疗作用，为 CRISPR/Cas9 在临床广泛应用打下良好基础。

动物实验结果与体外实验结果相似。Lin 等[44]将 HBV 质粒及 CRISPR/Cas9 系统通过尾静脉高压注射方法运输至小鼠体内，小鼠血清中 HBsAg 水平下降 20%~30%，肝细胞内 HBV 表达质粒量减少 60%~80%。Zhen 等通过免疫组化检测发现 CRISPR/Cas9 可显著减少 HBV 转基因小鼠肝脏 HBsAg 阳性率[38]。Liu 等通过 qPCR 及 ELISA 检测到 CRISPR/Cas9对转染 HBV 小鼠血清中 HBV DNA、HBsAg 和 HBeAg 抑制率均高达 90%[39]。Dong 等也发现类似结果[42]。

总之，CRISPR/Cas9 可切割 HBV 基因组并使其发生突变，抑制 HBV 复制及蛋白表达。

2.2 CRISPR/Cas9 抗 HBV 作用机制

CRISPR/Cas9 抗病毒效应机制可能包括以下途径。第一，HBV 表达质粒中 HBV 基因突变失活。体外实验通过 T7E1 检测发现 CRISPR/Cas9 可使 HBV 表达质粒中 HBV 基因突变失活[38,44]。同样，小鼠体内实验 T7E1 检测也发现 CRISPR/Cas9 可使 HBV 表达质粒中 HBV 基因发生突变[38-39,44]，提示 CRISPR/Cas9 可以游离 HBV 表达质粒中 HBV 基因为靶标并对 HBV 基因进行定点突变并促进 HBV 复制模板清除。第二，cccDNA 发生突变失活。持续和稳定的 cccDNA 是长期维持 HBV 慢性感染的关键因素，也是治疗中难以清除病毒的主要原因。CRISPR/Cas9 可切割新合成的 cccDNA，切割后的 cccDNA 以非同源末端连接机制进行修复引入插入或缺失突变，导致 cccDNA 合成水平下降。非同源末端连接的结果是多数 cccDNA 发生单核苷酸插入/缺失突变，最长达 2.3kb 基因片段缺失突变，突变率 30%~50%，从而使 HBV 逆转录模板失活，抑制 HBV 复制[37-38,42]。第三，促进 cccDNA 降解。ETV 阻断 HBV 逆转录过程从而降低 HBV DNA 复制水平，但对 cccDNA 稳定性并无影响。在 CRISPR/Cas9 系统中添加或者不添加 ETV，其 HBV DNA 水平下降程度不同，添加 ETV后 HBV DNA 几乎完全被抑制（上清中抑制高达 96%，细胞内抑制高达 80%）[41]。ETV 对 cccDNA 无影响，提示添加 ETV 后 HBV DNA 几乎被完全抑制可能因为 CRISPR/Cas9 直接作用于 cccDNA，促进 cccDNA 降解。

2.3 提高 CRISPR/Cas9 抗病毒效应策略

提高 CRISPR/Cas9 抗 HBV 效应策略包括以下几个方面。

首先，多个 sgRNA 在同一 CRISPR/Cas9 系统中联合使用，可提高 CRISPR/Cas9 对 HBV 切割效率。在 HuH7 细胞中分别单独或联合共转染有效引导序列 sgRNA P1、sgRNA XCp（sgRNA P1 与 sgRNA XCp 分别是针对 HBV 基因组不同位点的引导序列）与 HBV 表达质粒，联合转染两种引导序列对细胞内 HBsAg 及 HBeAg 抑制率明显强于单独转染一种引导序列。进一步使用 T7E1 酶对 CRISPR/Cas9 突变率进行检测，发现联合转染两种引导序列其 HBV 突变率显著高于单独转染一种引导序列。其中，单独转染 sgRNA P1 时 HBV 基因组突变率为 13.6%，单独转染 sgRNA XCp 时 HBV 基因组突变率为 9.3%，联合转染两种引导序列时 HBV 基因组突变率为 25.6%且突变片段更长[43-44]，说明联合使用多种 sgRNA 可提高 CRISPR/Cas9 对 HBV 基因组剪辑效率。

其次，增加 sgRNA 及相应 Cas9 用量。Dong 等发现sgRNA 及相应 Cas9 的量与其抗病毒效应呈剂量依赖关系[42]。将 sgRNA 与 Cas9 在 HuH7 细胞中共表达，提高转染质粒质量 4 倍，相应 HBsAg 下降 30%~50%[42]，提示增加 sgRNA 及相应 Cas9 用量可以提高 CRISPR/Cas9 抗 HBV 效应。

再次，抗病毒药物对 CRISPR/Cas9 抗病毒作用有累加效应。无论是 HepG2.2.15 还是 HepAD38 均证实抗病毒药物，包括病毒包装抑制剂 HAP12 及逆转录酶抑制剂 TDF、ETV、3TC 等对 CRISPR/Cas9 抗病毒活性具有显著增强作用[41]。

最后，IFN-α 对 CRISPR/Cas9 抗病毒作用未见明显累加效应。无论是 HBcAg 还是 cccDNA 合成及突变率方面，均未见 IFN-α 对 CRISPR/Cas9 抑制作用有明显增强[37]。

2.4 CRISPR/Cas9 在治疗 HBV 感染中的应用

Ramanan 等[40]利用从稳定支持HBV复制细胞系HepG2.2.15 中收集的 HBV 病毒液感染支持 HBV 病毒感染细胞系 HepG2/NTCP，同时，共表达 Cas9 蛋白及 HBV sgRNA，发现 HBsAg、HBV DNA、3.5kb RNA、cccDNA 水平均显著下降。进一步用从 CHB 患者血清中提取的 HBV 病毒重复上述实验，

也有类似结果。提示 CRISPR/Cas9 可对患者血清中HBV 病毒株进行编辑，并抑制其复制，为 CRISPR/Cas9 在临床应用提供有力证据。

3 治疗展望

CRISPR/Cas9 技术是清除持续存在 HBV 基因组的一种潜在策略，该方法在转化临床应用之前，仍有几个问题需要进一步研究阐明。第一，确定针对 cccDNA 的最优 sgRNA。尽可能全地找出 Cas9 在 cccDNA 的靶标位置设计 sgRNA，并根据 sgRNA 对 cccDNA 的亲和性及结合性能选择最优 sgRNA。第二，提高导入效率。使用临床应用中更为有效的质粒导入载体来介导 CRISPR/Cas9 系统进入细胞，比如腺病毒或腺病毒相关病毒载体。腺病毒相关载体可产生高达 1 014/mL 病毒颗粒，对肝脏细胞也有高度趋向性，很有希望解决质粒导入效率问题。第三，该系统用于基因剪辑时可能出现脱靶效应。Cas9 核酸酶最多可承受 PAM 5'端 7 个错配碱基[14]，因此，设计 gRNA 时应尽可能选择特异靶点并尽量降低脱靶效应。第四，该系统可能会影响患者基因组稳定性。CHB 患者体内可检测到 HBV 整合到患者基因组上，而 CRISPR/Cas9对整合的 HBV 也可进行识别切割，这样是否会对宿主基因组稳定性产生影响，目前尚不清楚。

上述综述了瞬时转染及慢病毒导入 CRISPR/Cas9 系统后，可定点切割修饰游离及整合的不同基因型 HBV 基因组 DNA，从而抑制 HBV 复制，其抑制机制可能是通过 CRISPR/Cas9 对 HBV 基因组及 HBV 复制模板 cccDNA 等进行特异性剪辑使其突变失活、促进其发生降解等途径，提示CRISPR/Cas9 是治疗 HBV 感染，甚至 DNA 病毒潜在有力工具。

参 考 文 献

[1] European Association For The Study of The Liver. EASL clinical practice guidelines: management of chronic hepatitis B virus infection [J]. J Hepatol, 2012, 57(1): 167-185.

[2] Lozano R, Naghavi M, Foreman K, et al. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010 [J]. Lancet, 2012, 380(9859): 2095-2128.

[3] Seeger C, Mason WS. Molecular biology of hepatitis B virus infection[J]. Virology, 2015, 479-480: 672-686.

[4] Cradick TJ, Keck K, Bradshaw S, et al. Zinc-finger nucleases as a novel therapeutic strategy for targeting hepatitis B virus DNAs[J]. Mol Ther, 2010, 18(5): 947-954.

[5] Bloom K, Ely A, Mussolino C, et al. Inactivation of hepatitis B virus replication in cultured cells and in vivo with engineered transcription activator-like effector nucleases [J]. Mol Ther, 2013, 21 (10): 1889-1897.

[6] Chen J, Zhang W, Lin J, et al. An efficient antiviral strategy for targeting hepatitis B virus genome using transcription activator-like effector nucleases[J]. Mol Ther, 2014, 22(2): 303-311.

[7] Makarova KS, Haft DH, Barrangou R, et al. Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems[J]. Nat Rev Microbiol, 2011, 9(6): 467-477.

[8] Xu A, Qin C, Lang Y, et al. A simple and rapid approach to manipulate pseudorabies virus genome by CRISPR/Cas9 system[J]. Biote-chnol Lett, 2015, 37(6): 1265-1272.

[9] Yuan M, Zhang W, Wang J, et al. Efficiently editing the vaccinia virus genome by using the CRISPR-Cas9 system[J]. J Virol, 2015, 89 (9): 5176-5179.

[10] Deveau H, Garneau JE, Moineau S. CRISPR/Cas system and its role in phage-bacteria interactions[J]. Annu Rev Microbiol, 2010, 64: 475-493.

[11] Al-Attar S, Westra ER, van der Oost J, et al. Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPRs): the hallmark of an ingenious antiviral defense mechanism in prokaryotes[J]. Biol Chem, 2011, 392(4): 277-289.

[12] Wiedenheft B, Sternberg SH, Doudna JA. RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea[J]. Nature, 2012, 482(7385): 331-338.

[13] Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes[J]. Science, 2007, 315 (5819): 1709-1712.

[14] Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity[J]. Science, 2012, 337(6096): 816-821.

[15] Deltcheva E, Chylinski K, Sharma CM, et al. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase Ⅲ[J]. Nature, 2011, 471(7340): 602-607.

[16] Brouns SJ, Jore MM, Lundgren M, et al. Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes[J]. Science, 2008, 321(5891): 960-964.

[17] Bolotin A, Quinquis B, Sorokin A, et al. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin[J]. Microbiology, 2005, 151(Pt 8): 2551-2561.

[18] Haft DH, Selengut J, Mongodin EF, et al. A guild of 45 CRISPR-associated (Cas) protein families and multiple CRISPR/Cas subtypes exist in prokaryotic genomes[J]. PLoS Comput Biol, 2005, 1(6): e60.

[19] Makarova KS, Grishin NV, Shabalina SA, et al. A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action[J]. Biol Direct, 2006, 1: 7.

[20] Gasiunas G, Barrangou R, Horvath P, et al. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2012, 109(39): E2579-E2586.

[21] Mali P, Yang L, Esvelt KM, et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9[J]. Science, 2013, 339(6121): 823-826.

[22] Jinek M, East A, Cheng A, et al. RNA-programmed genome editing in human cells[J]. Elife, 2013, 2: e471.

[23] Ran FA, Hsu PD, Wright J, et al. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system[J]. Nat Protoc, 2013, 8(11): 2281-2308.

[24] Cong L, Ran FA, Cox D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems[J]. Science, 2013, 339(6121): 819-823.

[25] Wu Y, Liang D, Wang Y, et al. Correction of a genetic disease in mouse via use of CRISPR-Cas9[J]. Cell Stem Cell, 2013, 13(6): 659-662.

[26] Cho SW, Kim S, Kim JM, et al. Targeted genome engineering in human cells with the Cas9 RNA-guided endonuclease[J]. Nat Biotechnol, 2013, 31(3): 230-232.

[27] Wu Y, Zhou H, Fan X, et al. Correction of a genetic disease by CRISPR-Cas9-mediated gene editing in mouse spermatogonial stem cells[J]. Cell Res, 2015, 25(1): 67-79.

[28] Li W, Teng F, Li T, et al. Simultaneous generation and germline transmission of multiple gene mutations in rat using CRISPR-Cas systems[J]. Nat Biotechnol, 2013, 31(8): 684-686.

[29] Chang N, Sun C, Gao L, et al. Genome editing with RNA-guided Cas9 nuclease in zebrafish embryos[J]. Cell Res, 2013, 23(4): 465-472.

[30] Bassett AR, Tibbit C, Ponting CP, et al. Highly efficient targeted mutagenesis of Drosophila with the CRISPR/Cas9 system[J]. Cell Rep, 2013, 4(1): 220-228.

[31] Bassett AR, Liu JL. CRISPR/Cas9 and genome editing in Drosophila [J]. J Genet Genomics, 2014, 41(1): 7-19.

[32] Gratz SJ, Ukken FP, Rubinstein CD, et al. Highly specific and efficient CRISPR/Cas9-catalyzed homology-directed repair in Drosophila [J]. Genetics, 2014, 196(4): 961-971.

[33] Sapranauskas R, Gasiunas G, Fremaux C, et al. The Streptococcus thermophilus CRISPR/Cas system provides immunity in Escherichia coli[J]. Nucleic Acids Res, 2011, 39(21): 9275-9282.

[34] Dickinson DJ, Ward JD, Reiner DJ, et al. Engineering the Caenorhabditis elegans genome using Cas9-triggered homologous recombination[J]. Nat Methods, 2013, 10(10): 1028-1034.

[35] Friedland AE, Tzur YB, Esvelt KM, et al. Heritable genome editing in C. elegans via a CRISPR-Cas9 system[J]. Nat Methods, 2013, 10(8): 741-743.

[36] Zhang H, Zhang J, Wei P, et al. The CRISPR/Cas9 system produces specific and homozygous targeted gene editing in rice in one generation [J]. Plant Biotechnol J, 2014, 12(6): 797-807.

[37] Seeger C, Sohn JA. Targeting hepatitis B virus with CRISPR/Cas9 [J]. Mol Ther Nucleic Acids, 2014, 3: e216.

[38] Zhen S, Hua L, Liu YH, et al. Harnessing the clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR)/CRISPR-associated Cas9 system to disrupt the hepatitis B virus[J]. Gene Ther, 2015, 22(5): 404-412.

[39] Liu X, Hao R, Chen S, et al. Inhibition of hepatitis B virus by the CRISPR/Cas9 system via targeting the conserved regions of the viral genome[J]. J Gen Virol, 2015, 96(8): 2252-2261.

[40] Ramanan V, Shlomai A, Cox DB, et al. CRISPR/Cas9 cleavage of viral DNA efficiently suppresses hepatitis B virus[J]. Sci Rep, 2015, 5: 10833.

[41] Kennedy EM, Bassit LC, Mueller H, et al. Suppression of hepatitis B virus DNA accumulation in chronically infected cells using a bacterial CRISPR/Cas RNA-guided DNA endonuclease[J]. Virology, 2015, 476: 196-205.

[42] Dong C, Qu L, Wang H, et al. Targeting hepatitis B virus cccDNA by CRISPR/Cas9 nuclease efficiently inhibits viral replication[J]. Antiviral Res, 2015, 118(3): 110-117.

[43] Wang J, Xu ZW, Liu S, et al. Dual gRNAs guided CRISPR/Cas9 system inhibits hepatitis B virus replication[J]. World J Gastroenterol, 2015, 21(32): 9554-9565.

[44] Lin SR, Yang HC, Kuo YT, et al. The CRISPR/Cas9 system facilitates clearance of the intrahepatic HBV templates in vivo[J]. Mol Ther Nucleic Acids, 2014, 3(10): e186.

[45] Okamoto H, Tsuda F, Sakugawa H, et al. Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: comparison of surface antigen subtypes[J]. J Gen Virol, 1988, 69(Pt 10): 2575-2583.

[46] Norder H, Hammas B, Löfdahl S, et al. Comparison of the amino acid sequences of nine different serotypes of hepatitis B surface antigen and genomic classification of the corresponding hepatitis B virus strains [J]. J Gen Virol, 1992, 73(Pt 5): 1201-1208.

[47] Stuyver L, De Gendt S, Van Geyt C, et al. A new genotype of hepatitis B virus: complete genome and phylogenetic relatedness[J]. J Gen Virol, 2000, 81(Pt 1): 67-74.

[48] Arauz-Ruiz P, Norder H, Robertson BH, et al. Genotype H: a new Amerindian genotype of hepatitis B virus revealed in Central America [J]. J Gen Virol, 2002, 83(Pt 8): 2059-2073.

[49] Tran TT, Trinh TN, Abe K. New complex recombinant genotype of hepatitis B virus identified in Vietnam[J]. J Virol, 2008, 82(11): 5657-5663.

[50] Tatematsu K, Tanaka Y, Kurbanov F, et al. A genetic variant of hepatitis B virus divergent from known human and ape genotypes isolated from a Japanese patient and provisionally assigned to new genotype J[J]. J Virol, 2009, 83(20): 10538-10547.

（责任编辑：冉明会）