

特约评述

DOI: 10.12211/2096-8280.2022-040

靶向DNA的II类CRISPR/Cas系统的蛋白工程化改造

梁丽亚, 刘嵘明

(大连理工大学生物工程学院, 辽宁 大连 116024)

摘要: Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/CRISPR-associated (Cas) protein 是细菌或古细菌特有的一种获得性免疫系统, 自从研究人员将其改造为基因编辑工具之后, CRISPR/Cas 系统高效的基因编辑能力对生命科学、生物工程、生物医药、食品及农业科学等多个领域引发了革命性的影响。然而, 研究者们发现 CRISPR/Cas 系统存在脱靶效应、PAM 位点识别范围有限等问题, 限制了 CRISPR/Cas 的应用。为了解决这些问题, 针对 Cas 蛋白进行工程化改造已经成为了优化及开发 CRISPR/Cas 系统的重要策略。本文以 II 类 CRISPR/Cas 系统中靶向 DNA 的 CRISPR/Cas9 以及 CRISPR/Cas12a 为例, 聚焦近年来针对 Cas9 和 Cas12a 蛋白的优化改造方法及相关进展进行系统阐述总结, 包括 Cas 蛋白的工程化改造提升基因编辑特异性及改变 PAM 识别能力, 以 CRISPR/Cas 系统作为基因定位工具开发新功能, 结合外源蛋白调控 CRISPR/Cas 系统功能。这些工作开发了系列高特异性、高精度的 CRISPR/Cas 系统, 极大地扩展了 CRISPR/Cas 系统的功能及适用范围, 为 CRISPR/Cas 系统的多领域应用做出了重要贡献。

关键词: CRISPR; Cas9; Cas12a; Cas 蛋白质工程; 基因编辑

中图分类号: Q812 **文献标志码:** A

Protein engineering of DNA targeting type II CRISPR/Cas systems

LIANG Liya, LIU Rongming

(School of Bioengineering, Dalian University of Technology, Dalian 116024, Liaoning, China)

Abstract: With different types of nucleases, genome editing technologies have opened up the possibility for targeting and modifying specific gene sequences, which show potential applications in basic and applied aspects of biotechnology research. Zinc-finger nucleases (ZFNs) and transcription activator-like effector nucleases (TALENs) are artificial proteins generated by fusing a specific DNA-binding domain with a restriction enzyme FokI DNA-cleavage domain, which arise from their ability to customize the DNA-binding domain for recognition of targeting sequences and cleaving them by the FokI domain. However, the design and construction of such a system are time consuming, laborious and costly. Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/CRISPR associated (Cas) protein is a unique acquired immune system of bacteria or archaea. Since researchers constructed the CRISPR/Cas

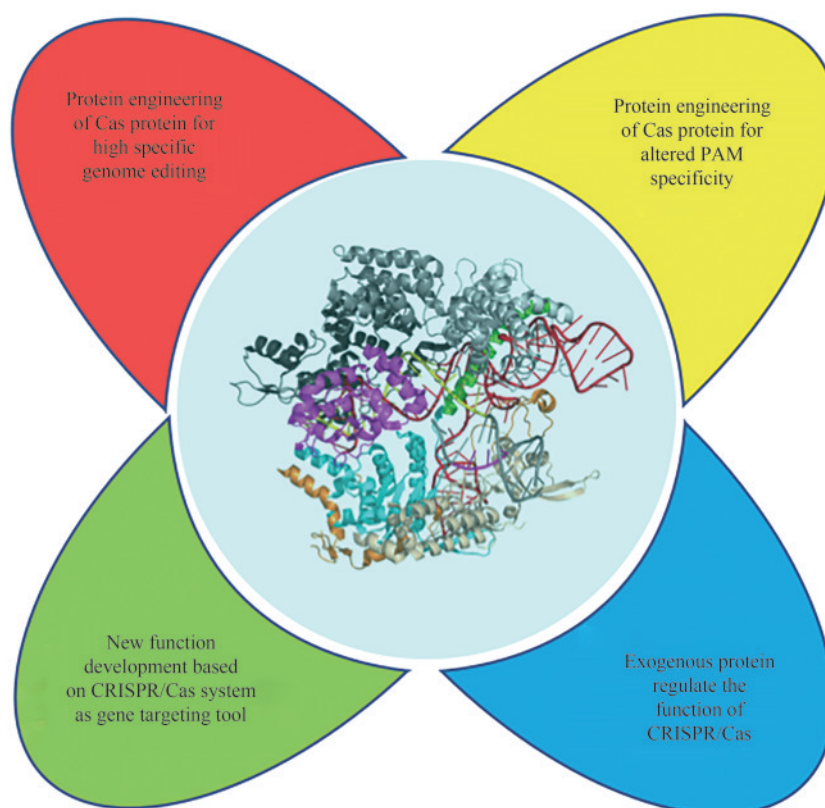
收稿日期: 2022-07-18 修回日期: 2022-09-28

基金项目: 国家自然科学基金 (22278058, 22208044); 大连理工大学基本科研业务费 (DUT22RC(3)012, DUT22RC(3)013)

引用本文: 梁丽亚, 刘嵘明. 靶向DNA的II类CRISPR/Cas系统的蛋白工程化改造[J]. 合成生物学, 2023, 4(1): 86-101

Citation: LIANG Liya, LIU Rongming. Protein engineering of DNA targeting type II CRISPR/Cas systems[J]. Synthetic Biology Journal, 2023, 4(1): 86-101

system for gene editing, its high efficiency has revolutionized a variety of fields such as life sciences, bioengineering, biomedicine, food, and agricultural sciences. However, the CRISPR/Cas system still has some challenges, such as off-target effect and limited PAM site recognition range, which limit its further applications. In order to solve these problems, molecular engineering of Cas proteins has become an important strategy for developing and optimizing CRISPR/Cas systems. In this study, with CRISPR/Cas9 and CRISPR/Cas12a selected as representative examples for DNA-targeting Class II CRISPR/Cas systems, we focus on the optimization and modification methods, and progress of Cas9 and Cas12a proteins achieved within recent years, such as Cas protein engineering for improved on-target specificity and expanded PAM scopes, developing new functions using CRISPR/Cas systems as gene targeting tools, and introducing exogenous protein domains to regulate CRISPR/Cas functions. These studies have generated a series of high-specificity and high-precision CRISPR/Cas systems, which have greatly expanded their functions and scopes, and made important contributions to the wide-range applications of CRISPR/Cas systems.



Keywords: CRISPR; Cas9; Cas12a; Cas protein engineering; gene editing

开发精确、高效、通用的基因信息定制及操作技术是生物科学和生物技术的重要目标。以核酸酶为基础的基因编辑技术是一种新兴的能够精确地对生物体基因组靶向位点进行修饰的基因工程技术，与传统的基于同源重组的基因编辑工具相比，基因靶向率提高上万倍。基因编辑核酸酶主要分为4类：巨型核酸酶（meganuclease）^[1]、锌

指核酸酶（ZFNs）^[2]、转录激活样效应因子核酸酶（TALEN）^[3]、成簇的规律间隔的短回文重复（CRISPR）和相关蛋白（Cas）^[4]。其中，巨型核酸酶只能靶向识别特定的DNA序列（可达12~40 bp），但特定序列限制了巨型核酸酶的靶向范围^[5]。ZFNs和TALEN都是由DNA结合结构域和DNA切割结构域两部分组成^[6]，通过模块化设计组装

DNA结合结构域,可以定制化对靶向位点进行识别、剪切,但是这两种工具的制备成本较高,合成时间相对较长^[6]。与基于蛋白结合特定DNA序列的核酸酶ZFNs、TALEN相比,CRISPR/Cas系统使用短RNA序列作为特异性识别元件,不仅具备了设计简单、成本低廉、靶向范围广等优势,在微生物、植物、动物(包括人体)等生物体内也表现出了较高的通用性^[6]。正是基于这种独特的功能机制,CRISPR/Cas系统迅速发展成为了新一代的基因编辑工具,目前被广泛应用于基因编辑^[7-8]、基因转录调控^[9-11]、碱基编辑^[12-13]、基因成像^[14-15]和表观遗传^[16-17]等领域。由于CRISPR/Cas系统对生物科学和生物技术发展的推动作用,2020年度的诺贝尔化学奖颁发给了基于CRISPR/Cas系统的基因编辑工具发明人Jennifer A. Doudna教授和Emmanuelle Charpentier教授。

在过去几年中,科研人员对CRISPR/Cas系统进行了深入的研究。在细菌和古细菌中发现了许多新的CRISPR/Cas系统,这些系统中Cas蛋白的结构和功能正在被阐明。CRISPR/Cas系统分为I类和II类,I类系统代表CRISPR-Cas基因座的约90%,并且存在于不同的细菌和古菌门中。但是,由于I类CRISPR/Cas系统是多蛋白复合体,由4~7个Cas蛋白亚基组成,因此不利于在不同宿主中进行高精度基因编辑。II类CRISPR/Cas系统是多功能域组成的单蛋白,与I类系统相比,II类CRISPR/Cas系统更易于改造。此外,II类CRISPR/Cas系统能够通过DNA双链断裂(DNA double-strand breaks, DSBs)的方式切割核酸序列。因此,基于II类CRISPR/Cas系统的基因编辑工具开发更为广泛,包括Cas9、Cas12a/b/c、Cas13a/b/c、CasΦ及Cas12k等^[18-21]。其中II类CRISPR/Cas系统中靶向DNA的代表性核酸酶是Cas9和Cas12a,它们都是由nuclease(NUC)和recognition(REC)lobes组成的两叶结构(图1)。其中与PAM位点识别相关的结构域(PI、WED等)主要位于NUC lobe,与基因编辑特异性相关的结构域(REC3等)主要位于REC lobe(图1)。这两种核酸酶皆可作为单个Cas蛋白起到DNA识别、结合和切割的作用,通过合理设计或定向进化产生的Cas蛋白变体可以进一步提高Cas蛋白的

高保真性能^[22-23]。此外,Cas蛋白的蛋白质工程通常被用来改善CRISPR作为一种基因定位的工具。根据对Cas9及Cas12a核酸酶结构上的认知,通过对Cas蛋白关键位点进行定点突变,使Cas蛋白失去DNA剪切能力,而失活的Cas蛋白(dCas9和dCas12a)仍然能够靶向结合目标位点,如果融合其他功能结构域,可扩展CRISPR/Cas系统的功能^[9-11, 24-25]。而这些针对Cas蛋白的设计与改造,主要是以Cas9和Cas12a蛋白为目标进行研究,使研究者们对这些Cas蛋白的结构(图1)以及作用机制有了进一步的了解^[27-30]。本文聚焦近年来针对II类靶向DNA的Cas蛋白(Cas9和Cas12a)的优化改造方法及相关进展进行系统的阐述总结,包括:Cas蛋白的工程化改造提升基因编辑特异性及改变PAM识别能力;以CRISPR/Cas系统作为基因定位工具开发新功能;结合外源蛋白调控CRISPR/Cas系统功能。这些研究工作显著提升了对Cas蛋白结构及功能上的认知,提高了CRISPR/Cas系统的效率并扩展了其应用范围。

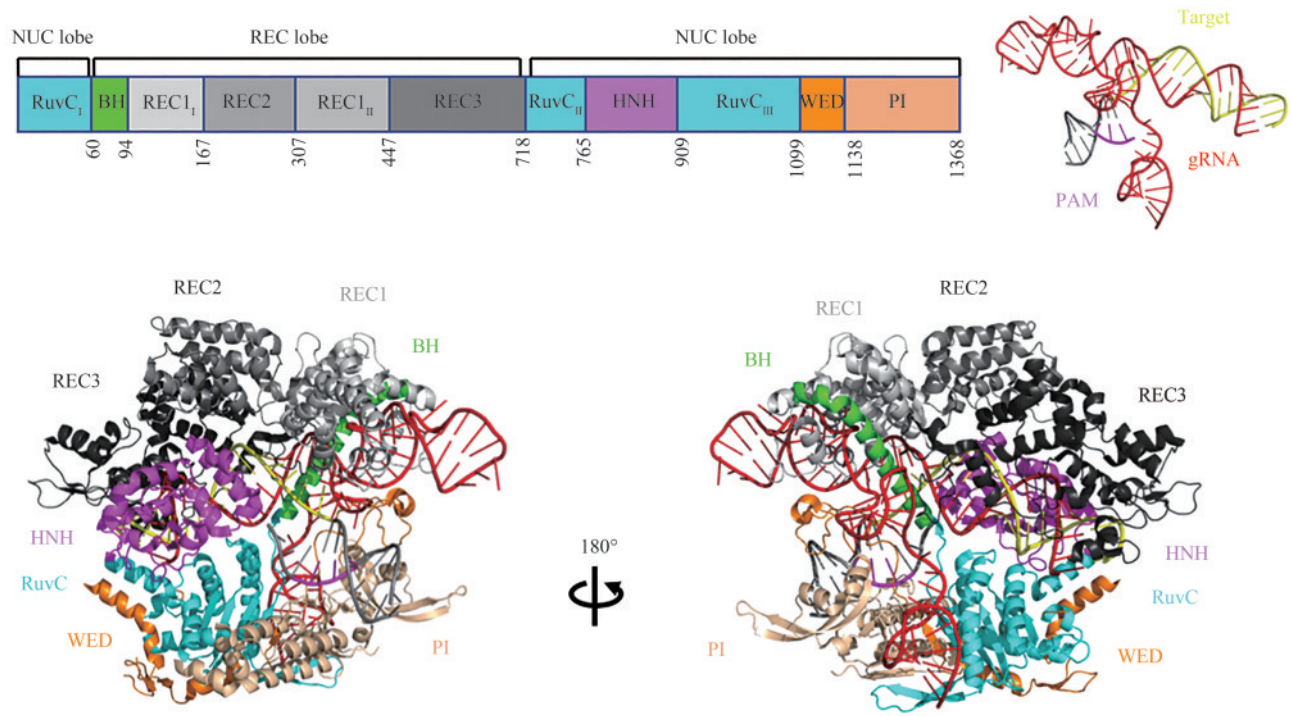
1 工程化改造Cas蛋白实现高精度基因编辑

1.1 Cas蛋白工程化改造提高基因编辑特异性

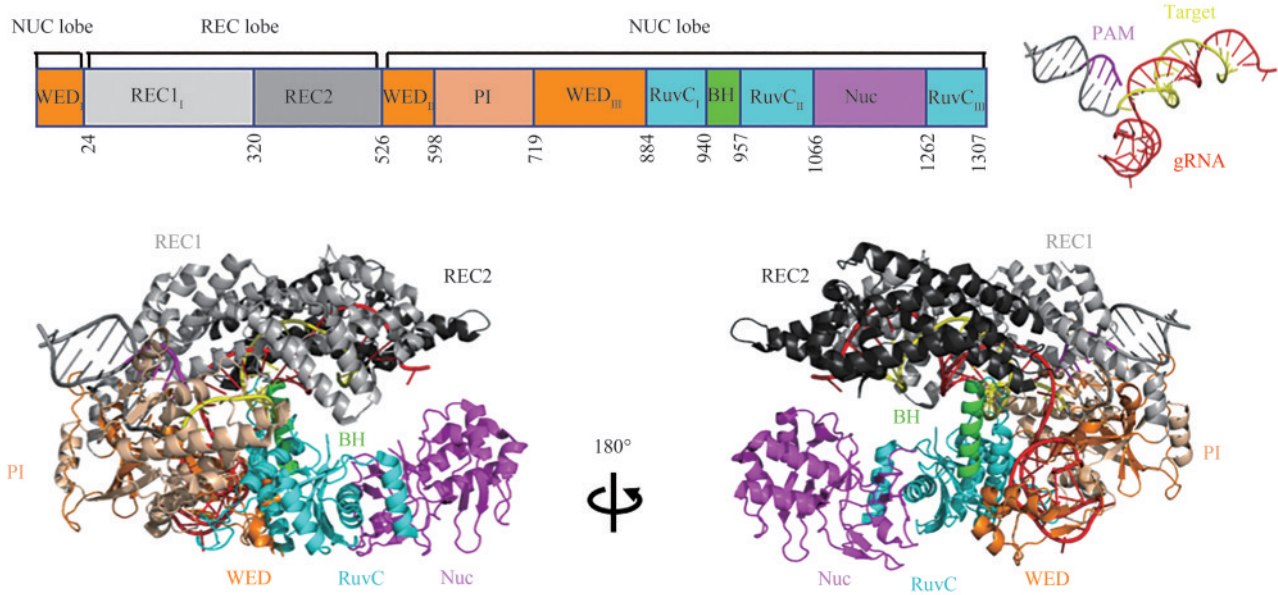
高精度的基因编辑是实现CRISPR/Cas系统广泛应用的前提,尤其是针对基因治疗方向的应用,高精度的基因编辑是从实验室走向临床的必要前提。然而,CRISPR/Cas系统在基因编辑时有一定概率会与非靶点DNA序列错配结合,引起非预期的基因突变,即脱靶效应(off-target),从而造成不可预测的风险。因此,通过工程化改造Cas蛋白以提高靶向特异性成为了研究热点之一。这部分的研究工作可根据研究方法的不同,大体上分为两种方式。

第一种是基于Cas蛋白的晶体结构的理性或半理性设计及改造方法(表1)。

基于Cas9或Cas12a蛋白的晶体结构,挖掘其与靶向及非靶向DNA相互作用的位点,使用丙氨酸扫描(alanine scanning)、饱和突变等方法进行定点突变,结合on-target及off-target效率检测,进



(a) SpCas9和gRNA结构
(a) The structure of SpCas9 and gRNA



(b) AsCas12a和gRNA结构
(b) The structure of AsCas12a and gRNA

图1 *Streptococcus pyogenes* Cas9与crRNA和靶DNA复合物的晶体结构 (PDB: 4008) 和 *Acidaminococcus* sp. Cas12a与crRNA和靶DNA复合物的晶体结构 (PDB: 5B43)^[26]

Fig. 1 Crystal structures of the complexes of *Streptococcus pyogenes* Cas9 (PDB: 4008) and *Acidaminococcus* sp. Cas12a (PDB: 5B43) with guide RNA and target DNA^[26]

表1 基于蛋白结构的理性或半理性设计提高 Cas 蛋白特异性

Table 1 Engineering Cas proteins for improved on-target specificity using rational/semi-rational design based on protein crystal structures

名称	突变	改造的结构域	PAM	精度最高提升倍数	参考文献
<i>SpCas9</i> -HF1	N497A/R661A/Q695A/Q926A	REC3, RuvC3	NGG	19	[31]
<i>eSpCas9</i> (1.1)	K848A/K1003A/R1060A	HNH, RuvC3 (nt-groove)	NGG	19	[32-33]
HypaCas9	N692A/M694A/Q695A/H698A	REC3	NGG	19	[33]
SuperFi-Cas9	Y1010D/Y1013D/Y1016D/V1018D/ R1019D/Q1027D/K1031D	RuvC	NGG	4.06 ^②	[34]
<i>hscCas9</i> -v1.2	N14A/R765A/R447A/S845D	REC1, RuvC, HNH	NGG	1.67	[35]
<i>SaCas9</i> -HF	R245A/N413A/N419A/R654A	REC, RuvC3	NNGRRT	2	[36]
<i>enAsCas12a</i> -HF1	N282A ^①	REC1	TTYN, VTTV, TRTV	1.89	[23]

① *enAsCas12a* also contains the E174R/S542R/K548R mutations, which can expand PAM compatibility

② the improvement of the ratio of amplitudes for on-target and off-target product formed using SuperFi-Cas9 and *SpCas9*.

而筛选出高特异性 Cas 蛋白。研究人员通过分析 Cas 蛋白的晶体结构发现 gRNA 识别与 REC 结构域和 WED 结构域存在直接关系^[26-29]，因此，涉及上述结构域的定向改造较多。以 *SpCas9* 蛋白为例，J. Keith Joung 团队通过研究 *SpCas9*-sgRNA-target DNA 复合体空间结构，针对 Cas 蛋白与 DNA 直接作用的 REC 结构域的关键位点，利用丙氨酸扫描的方法，构建了高特异性核酸酶变体 *SpCas9*-HF1 (N497A/R661A/Q695A/Q926A)，在保持了高于 70% 的 on-target 效率的同时，使用基因组层面的 off-target 扫描方法 (GUIDE-seq) 并未发现明显的 off-target 现象^[31]。Tan Yuanyan 等针对 *SaCas9* 蛋白与靶向 DNA 相互作用的氨基酸残基进行定点突变，进而提高 *SaCas9* 基因编辑特异性，结果表明 *SaCas9*-HF 在测试的 15 个位点中，9 个位点无脱靶，6 个位点脱靶率明显降低^[36]。通过分析 *SpCas9* 蛋白的晶体结构，发现在 NUC 叶中有一个带正电的凹槽 (nt-groove)，这个区域相关的蛋白结构域与非靶向 DNA 链存在相互作用^[32]。而非靶向链会间接影响 *SpCas9*-sgRNA-target DNA 复合体的稳定性，因此，nt-groove 周边的蛋白结构域也会影响基因编辑的特异性^[32]。2016 年，Zhang Feng 团队^[32]通过分析 *SpCas9* 的蛋白结构，对 nt-groove 区域中的 31 种氨基酸进行了 Alanine Scanning 突变，并将其中的多个有效突变进行组合，获得了 *eSpCas9*(1.0)[*SpCas9* (K810A/K1003A/R1060A)] 和 *eSpCas9* (1.1)[*SpCas9* (K848A/

K1003A/R1060A)]。其中，*eSpCas9* (1.1) 与野生型 *SpCas9* 在绝大多数靶向位点的基因编辑效率相当，同时 off-target 的效率明显降低。之后，Jennifer A. Doudna 团队^[33]在分析 *SpCas9*-HF1 和 *eSpCas9* (1.1) 靶向位点后，在 REC3 区域设计突变并构建了 HypaCas9 (N692A/M694A/Q695A/H698A)，并利用 GUIDE-seq 方法将 HypaCas9 与 *SpCas9*-HF1 和 *eSpCas9* (1.1) 比较，结果表明这三者的基因编辑的特异性相当。2022 年，Liu Jin 团队^[35]根据 DNA 剪切时的 Cas9 蛋白结构，靶向 Cas9 蛋白多个结构域，设计了 10 个含组合突变的 Cas9 变体，最终筛选获得的 Cas9 变体 *hscCas9*-v1.2 (HSC1.2) 可明显降低 off-target。同年，David W. Taylor 团队^[34]根据冷冻电镜解析 *SpCas9* 蛋白的结构，突变了 RuvC 结构域与 spacer 上 18~20 碱基错配相关的 7 个氨基酸，获得的 SuperFi-Cas9 与原始 *SpCas9* 相比，可在保证编辑效率不变的情况下，on-target/off-target 的振幅比提高了 4.06 倍。

第二类方法是针对大肠杆菌^[37-40]和酵母菌^[22]这些模式菌株构建高效的筛选方法，可以对特定结构域进行饱和突变或整个蛋白随机突变进行快速筛选，将产生 off-target 的突变体分离或去除，从而获得高编辑效率、高特异性的 Cas 蛋白突变体 (表 2)。

Antonio Casini 等^[22]构建了酵母报告菌株 (yeast reporter strain)，其原理是在酵母菌基因组的 *TRP1* 和 *ADE2* 基因上构建了 on-target 和 off-target 靶

表2 基于模式菌株的高效筛选方法提高 Cas 蛋白特异性

Table 2 Engineering Cas protein for improved on-target specificity based on efficient selection in model strains

名称	突变	改造的结构域	PAM	精度最高提升倍数	参考文献
evoCas9	M495V/Y515N/K526E/H698Q	REC3	NGG	9	[22]
HiFi Cas9	R691A	REC3	NGG	2.46	[39]
xCas9-3.7	A262T/R324L/S409I/E480K/ E543D/M694I/E1219V ^①	REC1, REC2, REC3, PI	NG, NNG, GAA, GAT and CAA	0.29	[41-42]
Sniper-Cas9	F539S/M763I/K890N	REC3, RuvC2, HNH	NGG	8.47	[37]
Opti-SpCas9	R661A/K1003H	REC3, RuvC3	NGG	5	[43]
AsCas12a-K949A	K949A	BH	TTTV	0.23	[44]
M44	TX_Cas12a 的 REC1 结构域替换	REC1	TTTN	24	[40]

① E1219V in xCas9-3.7 is one of the mutations for the expanded PAM compatibility.

向位点，在对 Cas9 蛋白的 REC3 区域进行了随机突变之后，使用 Cas 蛋白突变体文库对酵母菌基因组的 *TRP1* 基因进行靶向改造，无编辑能力的 Cas9 蛋白突变株无法在选择性培养基中存活；*TRP1* 和 *ADE2* 基因都发生基因编辑，菌株显白色，表明突变株存在 off-target；仅有 *TRP1* 基因发生基因编辑，菌株显红色，表明突变株在保持特异性的基因编辑的同时，并没有脱靶现象的存在，这种 Cas9 蛋白突变体便是潜在的特异性高的 Cas 蛋白。通过筛选并进一步组合突变获得的 evoCas9 蛋白，与原始 Cas9 蛋白相比，在保持 90% 的 on-target 效率的同时，基因编辑特异性也提高了 79 倍。而通过这种文库构建筛选获得的 Cas 蛋白如 HiFi-Cas9、Sniper-Cas9、Opti-SpCas9、xCas9-3.7 等都在 REC3 结构域及其他结构域存在突变（表 2）。与第一类改造方法的结果类似，这些突变会导致 Cas 蛋白与靶向 DNA 的结合稳定性降低，在靶向序列与 gRNA 不能完全匹配时，这些突变就不能稳定地与靶向 DNA 结合，导致 Cas 蛋白的空间结构仍处在非剪切状态，最终消除 off-target 的现象^[33, 41, 45]。因此，这些突变并没有改变 Cas 蛋白与靶向 DNA 的结合效率及频率，从而保证 Cas 蛋白在保持较高的 on-target 效率的同时，也能够降低 off-target 的效率。

1.2 Cas 蛋白工程化改造改变 PAM 位点识别能力

每个天然 Cas 蛋白的 PAM 位点是固定的^[46-47]，以 *SpCas9* 为例，*SpCas9* 蛋白的 PAM 序列是

“NGG”，然而不同的生物系统中“NGG”的含量是不同的。在针对一些 AT-rich 的生物系统以及一些特殊的靶向位点时，除了选用不同 Cas 蛋白的策略，也可以通过工程化改造 Cas 蛋白来改变 PAM 位点的识别能力，包括改变 PAM 位点的碱基组成（表 3）以及增加或减少 PAM 位点的碱基数量（表 4）。

从 Cas-gRNA-target DNA 的复合体结构中可以发现，PAM 序列的识别与 PI 结构域和 WED 结构域有着直接关系^[26]。与改造 Cas 蛋白的基因编辑特异性类似，针对 PAM 位点识别能力的改造也是在模式菌株中构建高效的筛选方法，首先针对 PI、WED 结构域或者整个 Cas 蛋白进行随机突变，使用不同 PAM 位点设计的 gRNA 筛选识别 Cas 蛋白突变文库中的正向突变，然后通过组合突变以进一步优化 PAM 位点的识别能力^[41, 44, 49, 53, 61]。David R. Liu 团队^[62]利用噬菌体辅助连续进化（PACE）的方法鉴定了三种能够识别非 G PAM 序列的新 *SpCas9* 蛋白变体。这些 *SpCas9* 蛋白的变体能够进一步提高 CRISPR/Cas 系统的靶向范围，在人类基因组上的靶向位点增加了 1.4 倍。Johnny H. Hu 等^[41]使用 PACE 方法构建了 Cas9 蛋白变体文库（XCas9s），通过筛选获得的正向突变不仅可扩展 PAM 的识别范围，同时降低了 off-target 的效率。Zhang Feng 团队^[44]在大肠杆菌中构建了负向筛选的方法，以含有氨苄青霉素（Amp）抗性质粒为靶向目标，通过饱和突变 *AsCas12a* 中所有接近 PAM 的 60 个氨基酸，使用扩增子测序比较空白对照与 *AsCas12a* 变体之间在含有 Amp 抗性平板上的区

表3 工程化改造 Cas 蛋白改变 PAM 位点的碱基组成

Table 3 Engineering Cas proteins to change the nucleotide sequences of PAM

名称	突变	改造的结构域	PAM 范围变化	参考文献
<i>SpCas9</i> ^①			NGG	[48]
<i>xCas9-3.7</i>	A262T/R324L/S409I/E480K/E543D/M694I/E1219V	REC1, REC2, REC3, PI	NG, NNG, GAA, GAT and CAA	[41]
<i>SaCas9</i> ^①			NNGRRT ^②	[8]
<i>SaCas9</i> KKH	E782K/N968K/R1015H	PI	NNNRRT	[49]
v42-wt	<i>SaCas9</i> 上 PI 结构域的 13 个保守氨基酸序列被替换	PI	NNVRRN ^②	[50]
<i>AsCas12a/LbCas12a</i> ^①			TTTV	[51]
<i>AsCas12a</i>	S542R/K607R	WED, PI	TYCV ^②	[44, 52]
<i>AsCas12a</i>	S542R/K548V/N552R	WED, PI	TATV	[44]
<i>LbCas12a</i>	G532R/K595R	WED, PI	TYCV	[44, 52]
<i>LbCas12a</i>	G532R/K538V/Y542R	WED, PI	TATV	[44]

① The original PAM is shown for the wild-type Cas9 and Cas12a from each organism

② R=A/G, V=G/A/C, Y=C/T.

表4 工程化改造 Cas 蛋白增加或减少 PAM 位点的碱基数量

Table 4 Engineering Cas proteins to increase or decrease the nucleotide number of PAM

名称	突变	改造的结构域	PAM 范围变化	参考文献
<i>SpCas9</i> ^①			NGG	[48]
<i>SpCas9</i> VQR	D1135V/R1335Q/T1337R	WED, PI	NGAN NGCG	[53-55]
<i>SpCas9</i> EQR	D1135E/R1335Q/T1337R	WED, PI	NGAG	[53-54]
<i>SpCas9</i> VRER	D1135V/G1218R/R1335E/T1337R	WED, PI	NGCG	[53-54]
<i>Sp-St3Cas9</i>	<i>SpCas9</i> 与 <i>St3Cas9</i> 的 PI 结构域替换	PI	NGGNG	[56]
<i>SpCas9-NG</i>	R1335V/L1111R/D1135V/G1218R/E1219F/A1322R/T1337R	WED, PI	NG	[57]
<i>SpG</i>	D1135L/S1136W/G1218K/E1219Q/R1335Q/T1337R	WED, PI	NGN	[58]
<i>SpRY</i>	SpG(A61R/L1111R/A1322R/ /N1317R/ R1333P)	BH, WED, PI	NRN	[58]
<i>FnCas9</i> ^①			NGG	[59]
RHA <i>FnCas9</i>	E1369R/E1449H/R1556A	WED, PI	YG ^②	[60]

① The original PAM is shown for the wild-type Cas9 and Cas12a.

② Y=C/T.

别, 从而获得潜在的正向突变, 并通过组合突变最终获得了 *AsCas12a* (S542R/K607R) 和 *AsCas12a* (S542R/K548V/N552R) 两个突变体, 分别可识别 TYCV 和 TATV 的 PAM 位点 (表 3)。J. Keith Joung 团队^[53-54] 在大肠杆菌中构建了一种正向筛选系统, 以诱导型的毒性基因作为 CRISPR/Cas 系统的靶点, 仅有识别新型 PAM 位点的 Cas 蛋白变体能够去除毒性基因所在质粒, 因此在筛选培养基中存活下来的皆为含有 Cas 蛋白正向变体的菌株, 而筛选获得的 *SpCas9* VQR、*SpCas9* EQR 及 *SpCas9* VRER 变体都能够识别新的 PAM 位点且 PAM 位点的碱基数目增加 (表 4)。

PI 结构域与 PAM 序列有着直接的相互作用关系, Zhang Feng 和 Osamu Nureki 团队^[56] 将 *St3Cas9* 和 *SpCas9* 的 PI 结构域进行互换, 含有 *St3Cas9* PI 结构域的 *SpCas9* 变体可以识别 *St3Cas9* 的 PAM 位点 (表 4)。谢震团队^[50] 通过查找 *SaCas9* 的同源蛋白, 并将 *SaCas9* 的 PI 结构域中的保守关键区域与同源 Cas9 蛋白的相关保守区域序列进行替换, 构建了多个嵌合 Cas9 变体。而新构建的 Cas9 变体的 PAM 识别范围也发生了改变, 与 *SaCas9* 相比, PAM 的识别范围最多提高了 16 倍 (表 3)。此外, 通过改造与 PAM 序列直接作用的氨基酸位点也是改变 PAM 位点识别能力的方法之一, 尤其是在减

少PAM位点序列长度以及扩展CRISPR/Cas系统靶向范围上有着重要作用^[26, 57-58]。*SpCas9*的R1335与NGG PAM中的第三个G直接相互作用,通过构建*SpCas9*-NG突变体,可使*SpCas9*-NG的PAM序列变为NG^[57](表4)。与之类似,Hisato Hirano等^[60]通过*FnCas9*蛋白结构发现,R1556与NGG PAM中的第三个G是直接相互作用的氨基酸位点,通过构建RHA *FnCas9*突变体(E1369R/E1449H/R1556A),可使RHA *FnCas9*的PAM序列变为YG(表4)。

2 以CRISPR/Cas系统作为基因定位工具开发新功能

2.1 *FokI*-dCas9实现特异性基因编辑

CRISPR/Cas系统具备高效DNA结合及剪切能力,然而脱靶现象的存在限制了CRISPR/Cas系统的进一步应用。为提高基因编辑的特异性以减少脱靶对基因编辑的影响,J. Keith Joung团队^[45]参考ZENs及TALENs结构,将*FokI*核酸酶与失活的Cas9蛋白(dCas9)结合形成*FokI*-dCas9(fdCas9),dCas9与gRNA形成的复合体实现基因的定位,*FokI*核酸酶实现DNA单链剪切,与ZENs及TALENs类似,DNA双链断裂(DSB)也需要两个单元的fdCas9才能实现。由于单个fdCas9不具备DSB能力,在特定距离范围内的两个fdCas9单元同时发生off-target的可能性较低,因此可实现具有很高特异性的基因编辑。

两个fdCas9单元的间隔序列(spacer)之间的距离并非是固定的,这与*FokI*核酸酶和dCas9之间的结合方式密切相关。*FokI*核酸酶与dCas9蛋白的N端结合会形成具有较高基因编辑效率的fdCas9,与dCas9蛋白的C端结合时则很难具备较高的基因编辑效率^[45, 63]。在N端以GGGGS为融合蛋白接头(linker),spacer的间距可在13~18 bp之间进行设计^[45]。而以XTEN为linker,spacer的间距可在15~39 bp之间进行设计^[64]。但是两个fdCas9单元对相邻的gRNA设计^[65]以及单元递送^[66]都提出了更高的要求。到目前为止,对fdCas9单元的递送主要以mRNA形式进行,并未发现以核糖核蛋白

(ribonucleoprotein, RNP)复合物形式递送实现有效基因编辑的报道,而RNP复合物与mRNA相比,可进一步提高基因编辑的效率^[7]。然而,如果以RNP复合物作为fdCas9的递送形式,这需要对Cas9蛋白进行进一步的改造,比如使用分裂dCas9(splitting dCas9)^[67]、更小的dCas9(dSaCas9)^[68]等。

2.2 CRISPRa和CRISPRi系统

CRISPR激活(CRISPRa)和CRISPR干扰(CRISPRi)是利用dCas9与转录激活因子(如VP64)^[69-70]或阻遏结构域(如KRAB-MeCP2)^[71]融合,通过这些外源蛋白与靶向基因启动子区域的结合来实现基因的转录上调或下调。除了人体或哺乳类细胞,CRISPRa和CRISPRi也被广泛应用于不同的生物系统中。Zhao Huimin团队^[72]利用酵母的抑制蛋白RD2、RD5和RD11构建的CRISPRi系统,抑制番茄红素代谢途径中*ERG9*和*MNN9*基因转录,明显提高了番茄红素的产量。Dong Chen等^[11]使用大肠杆菌的转录激活因子SoxS_R93A构建的CRISPRa对外源乙醇合成途径进行调控,实现了乙醇的富集。此外,在蓝藻^[73]和放线菌^[74]中也成功实现了基于CRISPR系统的基因转录调节。

由于CRISPRa和CRISPRi系统的唯一可变单元是在gRNA上的spacer系列,因此,可以设计并合成gRNA文库从而扩展至基因组层面进行高通量的转录调控。邢新会团队^[10]在大肠杆菌中构建了全基因组范围的sgRNA文库,结合CRISPRi技术在大肠杆菌全基因组范围内筛选糠醛和异丁醇耐受性基因位点,为菌株的进一步工程化改造提供了研究基础。Alex Marson团队利用CRISPRa和CRISPRi技术对人类T细胞中的近2万个基因进行了筛选,发现了上百个对细胞因子起到调节作用的基因,为T细胞以及CAR-T细胞功能调节提供了靶向基础^[75]。

2.3 基于CRISPR/Cas系统的碱基编辑器和先导编辑

CRISPR/Cas系统能够切割基因组形成DSB。然而,在使用过程中发现由于DSB会导致基因

组出现 DNA 片段的缺失、易位等基因序列的大幅度改变。为此, David R. Liu 团队^[76]开发了胞嘧啶碱基编辑器 (cytosine base editor, CBE), 以 CRISPR/Cas 系统进行基因定位, 但不依赖 DSB 的方式将 C·G 修改为 T·A, 同时不引起 DNA 片段的缺失、易位。在第一代至第三代碱基编辑器 (BE1, BE2, BE3) 进化过程中, 与胞苷脱氨酶 (cytidine deaminase) 相连的 dCas9 转变成了 nCas9 (nickase Cas9, D10A), 同时在 Cas 蛋白的 C 端融合 UGI (uracil DNA glycosylase inhibitor), 防止修改产生的 U 被宿主碱基错配修复, 进一步提高了编辑效率^[76]。之后, David R. Liu 团队^[77]对 BE3 linker 蛋白以及 UGI 数量进行了优化, 得到的 BE4 具有更高的编辑效率, 且 indel 的概率进一步降低。在构建更高效的 CBE 的过程中, David R. Liu 团队^[24]又开发了腺嘌呤碱基编辑器 (adenosine base editor, ABE), 可以将 T·A 修改为 C·G, 这对于大部分单碱基遗传病的基因治疗提供了潜在工具。与 CBE 不同, ABE 不需要 UGI 来干扰宿主碱基错配, 而 ABE 的迭代进化主要集中在与 nCas9 相连的 TadA 蛋白, 利用抗生素筛选方法对 ABE 进行了连续七轮进化, 最终获得的 ABE7.10 碱基编辑效率可达 50%^[24]。2020 年张学礼和毕昌昊团队^[78]合作开发 C-to-A、C-to-G 碱基颠换的单碱基编辑工具 (CGBE)。之后, David R. Liu、Britt Adamson 及 Jonathan S. Weissman 团队^[79]合作利用高通量 CRISPRi 筛选, 识别影响 C-to-G 编辑效率的基因并开发多个新的 CGBEs, 在此基础上, 使用深度学习的方法开发了 CGBE-Hive 模型, 可成功预测 CGBE 编辑效率。

David R. Liu 团队^[80]基于 nCas9 (H840A) 和逆转录酶构建融合蛋白, 以及改造的向导 RNA (pegRNA) 构建了第一代先导编辑策略 (prime editing, PE)。PE 可实现多碱基的精准插入与删除, 与 CRISPR/Cas 系统相比, PE 无需 DSB 即可实现编辑, 因此也具备了较高的安全性^[80]。为提高基因编辑效率, PE 工具也在进一步优化。通过优化逆转录酶, 使用一对 nCas9 及引导 RNA 剪切模板链、非模板链, 结构优化 pegRNA 的 3' 端区域

等方法, 在 PE 的 off-target 不变的基础上, 使基因编辑效率提高了 3~4 倍^[80-81]。之后, David R. Liu 团队发现 DNA 错配修复 (MMR) 会降低 PE 效率并提高 indel 的生成。为此, 该团队在使用 PE 进行基因编辑时, 利用瞬时表达的 MMR 抑制蛋白减少 MMR 对 PE 的影响, 基因编辑效率提高 7 倍^[82]。国内外研究人员也在对 PE 进行系统优化, 其中高彩霞团队与李家洋团队^[83]在多个水稻内源位点测试, 发现当 Primer binding site (PBS) 的 T_m 值为 30 °C 时, 基因编辑效率最高。使用双 pegRNA (Dual-pegRNA) 策略比单 pegRNA 基因编辑效率提高了 3 倍, 并开发了植物 pegRNA 设计网站 PlantPegDesigner, 为使用者提供最优设计方案。基于 T_m 值的 PBS 序列设计和双 pegRNA 策略, 研究人员进一步开发了植物 pegRNA 设计网站 PlantPegDesigner。该网站可以为使用者提供完整的 pegRNA 选择、设计与推荐方案, 方便使用者快速设计高活性 pegRNA^[83]。Jay Shendure 团队^[84]开发了 PRIME-Del 方法, 该方法使用一对 pegRNA 靶向模板链与非模板链, 可实现长达 10 kb 的 DNA 缺失, 编辑效率最高可至 30%。与 Dual-pegRNA 方法相比, PRIME-Del 在长片段缺失突变类型上效率更高^[85]。2022 年, David R. Liu 团队^[85]开发双先导编辑 (twin prime editing, twinPE), 可与位点特异性的丝氨酸重组酶组合 (site-specific serine recombinase), 在人体细胞基因组成功整合 5.6 kb 的质粒 DNA 或者实现 40 kb 的 DNA 倒位。PE 与 Base editor 都可以在不依赖 DSB 的情况下完成基因编辑, 这对于在人体细胞中进行高精度的基因编辑是有十分有利的, 虽然仍受限于编辑效率、脱靶、递送、编辑窗口限制等问题, 但依然是很具前景的遗传病治疗方法^[25, 86-87] (表 5)。

3 结合外源蛋白调控 CRISPR/Cas 系统功能

3.1 结合 Anti-CRISPR 蛋白调节 CRISPR/Cas 功能

CRISPR/Cas 系统是古细菌及多数细菌抵御噬

表5 CRISPR/Cas系统与Base editor、PE的比较
Table 5 Comparison among CRISPR/Cas, base editor, and PE

名称	CRISPR/Cas	Base editor	PE
Class/Type	Type II	Type II	Type II
靶向序列长度/bp	19~23	15~20	8~15
DNA编辑方式	有DSB的HDR	无DSB的碱基替换	无DSB的HDR
On-target	高	较高	低
Off-target	较低	低	低
多位点编辑	可达9位点 ^[88]	可达31位点 ^[89]	可达3位点 ^[89]
应用范围	人体、动物、植物、微生物	人体、动物、植物、微生物	人体、动物、植物、微生物

菌体及外源DNA入侵的防御系统，而Anti-CRISPR便是噬菌体与细菌长期共同进化中形成的反制手段^[90]。针对不同的CRISPR/Cas系统，Anti-CRISPR蛋白可以通过不同方式抑制CRISPR/Cas功能^[91-92]。Anti-CRISPR蛋白Acr II A1可以直接结合Cas9蛋白的HNH结构域，从而抑制Cas9的DNA剪切能力，同时Acr II A1可以在胞内诱导Cas9蛋白的降解^[93]。Acr II A2通过与PI结构域识别PAM的关键位点形成氢键从而阻断PAM位点识别，并通过占据DNA结合位点以及与HNH结构域相互作用来抑制DNA与CRISPR/Cas的结合，多方面抑制CRISPR/Cas功能^[94]。Acr II A4与Acr II A2功能类似，Acr II A4蛋白在胞内通过占据识别PAM关键位点，并与RuvC结构域相互作用抑制Cas9蛋白的基因编辑活性^[95]。此外，Acr II A13、Acr II A14和Acr II A15也能够明显降低Cas9蛋白的DNA剪切能力^[96]。其中，Acr II A13抑制CRISPR/Cas系统与靶向DNA的结合，Acr II A14可以诱导Cas9蛋白形成二聚体从而丧失活性，Acr II A15可以抑制Cas9与gRNA形成二聚体^[96]。Jennifer A. Doudna团队^[97]和Joseph Bondy-Denomy团队^[98]发现了三个Anti-CRISPR蛋白（AcrVA1、AcrVA4、AcrVA5），可以在哺乳动物细胞中抑制Cas12a的活性。其中，AcrVA1能够剪切与Cas12a结合的crRNA中的spacer序列^[99]，而AcrVA4能够与LbCas12a、crRNA形成的二元复合物以及LbCas12a、crRNA和dsDNA形成的三元复合物结合，多方面干扰crRNA与靶向DNA互补配对，从而抑制CRISPR/Cas系统编辑功能^[100]。AcrVA5通过对Cas12a蛋白进行乙酰化修饰来影响PAM的识别，从而抑制CRISPR/Cas与靶向DNA的结合^[101]。

利用众多的Anti-CRISPR蛋白与CRISPR/Cas系统结合可用于调节CRISPR/Cas的功能。①降低off-target。在人体细胞中通过定时递送Acr II A4蛋白可以在不降低CRISPR/Cas的on-target效率的同时减少off-target的发生^[102]。Acr II A5可以明显降低胞嘧啶碱基编辑器BE3和腺嘌呤碱基编辑器ABE7.10的off-target^[103]。②降低CRISPR/Cas系统的细胞毒性。在人体细胞中通过定时递送Acr II 2和Acr II A4蛋白，可在不影响CRISPR/Cas9基因编辑效率的同时，降低其对人类造血干细胞产生的毒性作用，提高移植成功率^[104]。③调节基于dCas9的工具。CRISPRa和CRISPRi系统已经被广泛应用于细菌及真菌的基因转录调节，其中，Mario A. Marchisio团队^[105]通过将Anti-CRISPR蛋白与CRISPRi系统整合构建生物传感器，利用dSpCas9蛋白融合转录抑制蛋白MXI1形成的CRISPRi系统，可有效抑制荧光蛋白的表达。当使用激素诱导表达Acr II A2和Acr II A4时，CRISPRi系统失效，荧光蛋白表达量提高，通过检测荧光蛋白表达水平可检测胞内是否存在雌二醇^[105]。此外，Anti-CRISPR蛋白还可以应用到调节基于CRISPR/Cas的基因驱动^[106]、调节基因成像^[107]、检测CRISPR/Cas复合体^[108]等工作。

3.2 分裂Cas蛋白调节CRISPR/Cas功能

Cas12a与Cas9同属于II型Cas蛋白，二者都包含一个识别叶（REC）和一个核酸酶叶（NUC）（图1），通过进一步的分解可分为不同的结构域^[56, 109]。Yuta Nihongaki等^[110]设计了一种分裂的Cas12a蛋白，该蛋白由N末端和C末端片段组成，这种分裂Cas12a蛋白可以通过化学诱导二聚化结

构域以及光诱导二聚化结构域来实现 Cas12a 的激活。叶海峰团队^[111]设计并构建了一种远红光激活的基因编辑工具 FAST (a far-red light-activated split-Cas9) 系统, 可利用远红光调控分裂的 Cas9 基因编辑系统, 在体外培养的多种哺乳动物细胞中实现了基因的光控基因编辑。

较大的 Cas9 蛋白在涉及通过重组腺相关病毒 (rAAVs) 传递的基因治疗应用中可能会受到限制, 通过删除特定结构域的方式, 可以减小 Cas9 蛋白的尺寸, 然而 *SpCas9* Δ REC2 以及 *SpCas9* Δ REC3 突变体, 与原始的 *SpCas9* 相比活性大幅下降^[33, 112]。清华大学谢震团队^[67]将分裂或删除特定结构域的方法相结合, 对 *SaCas9* 蛋白的 HNH 和 REC 结构域进行删减, 并结合分裂 *SaCas9* 及融合蛋白的方式缩小作用单元, 当与 *Fok I* 蛋白融合表达时可成功实现 DNA 的靶向剪切, 当与转录调控蛋白结构域融合时, 可利用单个 AAV 病毒载体进行转运递送及基因的转录调节。

4 总结与展望

本文通过对 II 类靶向 DNA 的 Cas 蛋白 (Cas9 和 Cas12a) 的工程化改造进行梳理分类, 描述了近年来 II 类靶向 DNA 的 CRISPR/Cas 基因编辑系统的进展, 其中包括 Cas 蛋白的工程化改造提升基因编辑特异性及改变 PAM 识别能力; 以 CRISPR/Cas 系统作为基因定位工具开发新功能; 结合外源蛋白调控 CRISPR/Cas 系统功能。这些进展表明了 Cas 蛋白结构域的修饰、添加或分离能够实现 CRISPR/Cas 系统活性、特异性以及功能的改变, 也表达了人们对高效率、高精度、广用途基因编辑工具的需求。在基因治疗领域, 根据弗若斯特沙利文的数据显示, 2025 年我国基因治疗市场规模将达到 179 亿元左右, 若保持增速, 2027 年我国基因治疗市场规模可达到 500 亿元左右。而 CRISPR-Cas 系统将会在这个过程中起到更重要的作用, 2020 年世界首例 CRISPR/Cas9 系统编辑人体细胞的临床试验结果出炉^[113], 此次临床试验针对转移性非小细胞肺癌患者, 评估了 CRISPR/Cas9 敲除 PD-1 基因的不良反​​应和毒性以及对 T 细胞治疗转移性非小细胞肺癌的有效性, 初步证实了

CRISPR/Cas9 体外编辑 T 细胞的安全性 (脱靶率为 0.05%, 远小于基因编辑效率 1.69%)。这对于进一步开展基于 CRISPR 的体内及体外治疗提供了有力支撑, 未来会出现更多使用 CRISPR 技术的临床试验。而基于 CRISPR 的基因组编辑技术的特异性、效率和安全性将成为决定性因素。近期, 林瑛和荣知立团队^[114]通过融合 Cas9 和睡美人转座酶 (sleeping beauty transposase, SB) 的 DNA 结合域 PAI 构建 Cas9-N57, 可实现单向以及特定位点插入 12 kb 的 DNA 片段, 并应用于 CAR-T 细胞的构建。此外, 在 Cas9-N57 中替换 Cas9 蛋白为 *AsCpf1* (*AsCas12a*) 和 *CjCas9* 形成的新型的核酸酶也具备类似的功能。胡家志团队^[115]将核酸外切酶 TREX2 与 Cas9 融合构建 Cas9TX 并应用于 CAR-T 细胞制备, 在不影响 CAR-T 效靶比的情况下, Cas9TX 可明显抑制基因编辑过程中染色体易位的问题。这些研究工作表明, CRISPR/Cas 系统的改造将会更加深入, 从而进一步开发基于 CRISPR/Cas 系统的细胞治疗产品。

基于 CRISPR/Cas 系统的基因编辑工具的开发及优化仍在继续, Base editor、PE 等工具虽然具有很高的应用前景, 然而 off-target 的存在以及较低的基因编辑效率仍然需要研究者们对基因编辑工具进一步改进^[80-81, 116]。其次, CRISPR/Cas 系统中针对 gRNA 的工程化改造也已经取得了很多成果。已有研究成果表明, gRNA 的序列优化^[117-118]以及可控的作用方式^[45]可明显提高基因编辑效率以及转化效率。Dewran D. Kocak 等^[118]通过延长 gRNA 序列, 使 gRNA 折叠回来并与它自身的末端结合形成 hairpin-sgRNA, 并利用 gRNA 与靶向序列的特异性结合作为解除 hairpin 的钥匙, 从而提升 *spCas9*、*SaCas9*、*SaCas9*-KKH、*LbCas12a* 和 *AsCas12a* 这五种不同的 Cas 蛋白的基因编辑能力, 使这些 Cas 蛋白的基因编辑特异性提升了 55 倍。此外, 通过优化 Cas 蛋白和 gRNA 向靶细胞的传递, 也可以提高编辑效率和靶外活性^[37]。Cas9 及其变体 Sniper-Cas9 通过不同的递送方式对人体细胞的不同靶向位点进行改造, 结果表明 RNP 的递送方式可明显减小 off-target 的效率^[37]。这些研究表明 CRISPR/Cas 系统的进化是一个叠加的过程, 鉴于多种改造方法、改造方式的快速发展, 未来

将多种方法整合并采用系统性的改造策略将会进一步提升 CRISPR/Cas 系统特异性、效率和安全性。此外, PE 和基因驱动等基于 CRISPR/Cas 系统的新型工具的开发及优化; 非模式生物系统的 CRISPR/Cas 系统的开发也会是未来重要的发展方向。总而言之, CRISPR/Cas 系统的发现以及功能性开发, 是基因编辑、合成生物学等领域的革命性突破, 进一步加快了我们对生命底层代码的研究速度, 促进了生命科学、医学以及其他相关学科的快速发展。随着新型 CRISPR/Cas 工具的开发及优化, 将会从不同角度创新性地改变人类的经济、社会和生活。

参 考 文 献

- [1] ZEKONYTE U, BACMAN S R, SMITH J, et al. Mitochondrial targeted meganuclease as a platform to eliminate mutant mtDNA *in vivo*[J]. *Nature Communications*, 2021, 12: 3210.
- [2] CARROLL D. Genome engineering with zinc-finger nucleases[J]. *Genetics*, 2011, 188(4): 773-782.
- [3] NEMUDRYI A A, VALETIDINOVA K R, MEDVEDEV S P, et al. TALEN and CRISPR/Cas genome editing systems: tools of discovery[J]. *Acta Naturae*, 2014, 6(3): 19-40.
- [4] RAN F A, HSU P D, WRIGHT J, et al. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system[J]. *Nature Protocols*, 2013, 8(11): 2281-2308.
- [5] EPINAT J C, ARNOULD S, CHAMES P, et al. A novel engineered meganuclease induces homologous recombination in yeast and mammalian cells[J]. *Nucleic Acids Research*, 2003, 31(11): 2952-2962.
- [6] GAJ T, GERSBACH C A, BARBARS C F III, et al. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering[J]. *Trends in Biotechnology*, 2013, 31(7): 397-405.
- [7] WANG H X, LI M Q, LEE C M, et al. CRISPR/Cas9-based genome editing for disease modeling and therapy: challenges and opportunities for nonviral delivery[J]. *Chemical Reviews*, 2017, 117(15): 9874-9906.
- [8] JIANG W Y, BIKARD D, COX D, et al. RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems[J]. *Nature Biotechnology*, 2013, 31(3): 233-239.
- [9] LIU X, GALLAY C, KJOS M, et al. High-throughput CRISPRi phenotyping identifies new essential genes in *Streptococcus pneumoniae*[J]. *Molecular Systems Biology*, 2017, 13(5): 931.
- [10] WANG T M, GUAN C G, GUO J H, et al. Pooled CRISPR interference screening enables genome-scale functional genomics study in bacteria with superior performance[J]. *Nature Communications*, 2018, 9: 2475.
- [11] DONG C, FONTANA J, PATEL A, et al. Synthetic CRISPR-Cas gene activators for transcriptional reprogramming in bacteria[J]. *Nature Communications*, 2018, 9: 2489.
- [12] ANZALONE A V, KOBLAN L W, LIU D R. Genome editing with CRISPR-Cas nucleases, base editors, transposases and prime editors[J]. *Nature Biotechnology*, 2020, 38(7): 824-844.
- [13] CHO S I, LEE S H, MOK Y G, et al. Targeted A-to-G base editing in human mitochondrial DNA with programmable deaminases[J]. *Cell*, 2022, 185(10): 1764-1776.e12.
- [14] DREISSIG S, SCHIML S, SCHINDELE P, et al. Live-cell CRISPR imaging in plants reveals dynamic telomere movements[J]. *The Plant Journal*, 2017, 91(4): 565-573.
- [15] MAASS P G, BARUTCU A R, SHECHNER D M, et al. Spatiotemporal allele organization by allele-specific CRISPR live-cell imaging (SNP-CLING)[J]. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2018, 25(2): 176-184.
- [16] LIU X S, WU H, KRZISCH M, et al. Rescue of fragile X syndrome neurons by DNA methylation editing of the *FMR1* gene[J]. *Cell*, 2018, 172(5): 979-992.e6.
- [17] KANG J G, PARK J S, KO J H, et al. Regulation of gene expression by altered promoter methylation using a CRISPR/Cas9-mediated epigenetic editing system[J]. *Scientific Reports*, 2019, 9: 11960.
- [18] SHMAKOV S, SMARGON A, SCOTT D, et al. Diversity and evolution of class 2 CRISPR-Cas systems[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2017, 15(3): 169-182.
- [19] BARRANGOU R, GERSBACH C A. Expanding the CRISPR toolbox: targeting RNA with Cas13b[J]. *Molecular Cell*, 2017, 65(4): 582-584.
- [20] PAUSCH P, AL-SHAYEB B, BISOM-RAPP E, et al. CRISPR-Cas Φ from huge phages is a hypercompact genome editor[J]. *Science*, 2020, 369(6501): 333-337.
- [21] STRECKER J, LADHA A, GARDNER Z, et al. RNA-guided DNA insertion with CRISPR-associated transposases[J]. *Science*, 2019, 365(6448): 48-53.
- [22] CASINI A, OLIVIERI M, PETRIS G, et al. A highly specific SpCas9 variant is identified by *in vivo* screening in yeast[J]. *Nature Biotechnology*, 2018, 36(3): 265-271.
- [23] KLEINSTIVER B P, SOUSA A A, WALTON R T, et al. Engineered CRISPR-Cas12a variants with increased activities and improved targeting ranges for gene, epigenetic and base editing[J]. *Nature Biotechnology*, 2019, 37(3): 276-282.
- [24] GAUDELLI N M, KOMOR A C, REES H A, et al. Programmable base editing of A•T to G•C in genomic DNA without DNA cleavage[J]. *Nature*, 2017, 551(7681): 464-471.
- [25] HUANG T P, NEWBY G A, LIU D R. Precision genome editing using cytosine and adenine base editors in mammalian cells[J]. *Nature Protocols*, 2021, 16(2): 1089-1128.

- [26] LIU R M, LIANG L Y, FREED E F, et al. Directed evolution of CRISPR/cas systems for precise gene editing[J]. Trends in Biotechnology, 2021, 39(3): 262-273.
- [27] HIRANO S, ABUDAYYEH O O, GOOTENBERG J S, et al. Structural basis for the promiscuous PAM recognition by *Corynebacterium diphtheriae* Cas9[J]. Nature Communications, 2019, 10: 1968.
- [28] SWARTS D C, JINEK M. Cas9 versus Cas12a/Cpf1: structure-function comparisons and implications for genome editing[J]. Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA, 2018, 9(5): e1481.
- [29] ANDERS C, NIEWOEHNER O, DUERST A, et al. Structural basis of PAM-dependent target DNA recognition by the Cas9 endonuclease[J]. Nature, 2014, 513(7519): 569-573.
- [30] SWARTS D C, VAN DER OOST J, JINEK M. Structural basis for guide RNA processing and seed-dependent DNA targeting by CRISPR-Cas12a[J]. Molecular Cell, 2017, 66(2): 221-233.e4.
- [31] KLEINSTIVER B P, PATTANAYAK V, PREW M S, et al. High-fidelity CRISPR-Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects[J]. Nature, 2016, 529(7587): 490-495.
- [32] SLAYMAKER I M, GAO L Y, ZETSCHKE B, et al. Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity[J]. Science, 2016, 351(6268): 84-88.
- [33] CHEN J S, DAGDAS Y S, KLEINSTIVER B P, et al. Enhanced proofreading governs CRISPR-Cas9 targeting accuracy[J]. Nature, 2017, 550(7676): 407-410.
- [34] BRAVO J P K, LIU M S, HIBSHMAN G N, et al. Structural basis for mismatch surveillance by CRISPR-Cas9[J]. Nature, 2022, 603(7900): 343-347.
- [35] ZUO Z C, BABU K, GANGULY C, et al. Rational engineering of CRISPR-Cas9 nuclease to attenuate position-dependent off-target effects[J]. The CRISPR Journal, 2022, 5(2): 329-340.
- [36] TAN Y Y, CHU A H Y, BAO S Y, et al. Rationally engineered *Staphylococcus aureus* Cas9 nucleases with high genome-wide specificity[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2019, 116(42): 20969-20976.
- [37] LEE J K, JEONG E, LEE J, et al. Directed evolution of CRISPR-Cas9 to increase its specificity[J]. Nature Communications, 2018, 9: 3048.
- [38] SINGH D, WANG Y B, MALLON J, et al. Mechanisms of improved specificity of engineered Cas9s revealed by single-molecule FRET analysis[J]. Nature Structural & Molecular Biology, 2018, 25(4): 347-354.
- [39] VAKULSKAS C A, DEVER D P, RETTIG G R, et al. A high-fidelity Cas9 mutant delivered as a ribonucleoprotein complex enables efficient gene editing in human hematopoietic stem and progenitor cells[J]. Nature Medicine, 2018, 24(8): 1216-1224.
- [40] LIU R M, LIANG L L, FREED E, et al. Synthetic chimeric nucleases function for efficient genome editing[J]. Nature Communications, 2019, 10: 5524.
- [41] HU J H, MILLER S M, GEURTS M H, et al. Evolved Cas9 variants with broad PAM compatibility and high DNA specificity[J]. Nature, 2018, 556(7699): 57-63.
- [42] GUO M H, REN K, ZHU Y W, et al. Structural insights into a high fidelity variant of SpCas9[J]. Cell Research, 2019, 29(3): 183-192.
- [43] CHOI G C G, ZHOU P, YUEN C T L, et al. Combinatorial mutagenesis en masse optimizes the genome editing activities of SpCas9[J]. Nature Methods, 2019, 16(8): 722-730.
- [44] GAO L Y, COX D B T, YAN W X, et al. Engineered Cpf1 variants with altered PAM specificities[J]. Nature Biotechnology, 2017, 35(8): 789-792.
- [45] TSAI S Q, WYVEKENS N, KHAYTER C, et al. Dimeric CRISPR RNA-guided FokI nucleases for highly specific genome editing[J]. Nature Biotechnology, 2014, 32(6): 569-576.
- [46] CHATTERJEE P, JAKIMO N, JACOBSON J M. Minimal PAM specificity of a highly similar SpCas9 ortholog[J]. Science Advances, 2018, 4(10): eaau0766.
- [47] TÓTH E, CZENE B C, KULCSÁR P I, et al. Mb- and FnCpf1 nucleases are active in mammalian cells: activities and PAM preferences of four wild-type Cpf1 nucleases and of their altered PAM specificity variants[J]. Nucleic Acids Research, 2018, 46(19): 10272-10285.
- [48] CONG L, RAN F A, COX D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems[J]. Science, 2013, 339(6121): 819-823.
- [49] KLEINSTIVER B P, PREW M S, TSAI S Q, et al. Broadening the targeting range of *Staphylococcus aureus* CRISPR-Cas9 by modifying PAM recognition[J]. Nature Biotechnology, 2015, 33(12): 1293-1298.
- [50] MA D C, XU Z M, ZHANG Z Y, et al. Engineer chimeric Cas9 to expand PAM recognition based on evolutionary information[J]. Nature Communications, 2019, 10: 560.
- [51] ZETSCHKE B, GOOTENBERG J S, ABUDAYYEH O O, et al. Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system[J]. Cell, 2015, 163(3): 759-771.
- [52] VILLIGER L, GRISCH-CHAN H M, LINDSAY H, et al. Treatment of a metabolic liver disease by *in vivo* genome base editing in adult mice[J]. Nature Medicine, 2018, 24(10): 1519-1525.
- [53] KLEINSTIVER B P, PREW M S, TSAI S Q, et al. Engineered CRISPR-Cas9 nucleases with altered PAM specificities[J]. Nature, 2015, 523(7561): 481-485.
- [54] HIRANO S, NISHIMASU H, ISHITANI R, et al. Structural basis for the altered PAM specificities of engineered CRISPR-

- Cas9[J]. *Molecular Cell*, 2016, 61(6): 886-894.
- [55] HU X X, MENG X B, LIU Q, et al. Increasing the efficiency of CRISPR-Cas9-VQR precise genome editing in rice[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2018, 16(1): 292-297.
- [56] NISHIMAS U H, RAN F A, HSU P D, et al. Crystal structure of Casg in complex with guide RNA and target DNA[J]. *Cell*, 2014, 156(5): 935-949.
- [57] NISHIMASU H, SHI X, ISHIGURO S, et al. Engineered CRISPR-Cas9 nuclease with expanded targeting space[J]. *Science*, 2018, 361(6408): 1259-1262.
- [58] WALTON R T, CHRISTIE K A, WHITTAKER M N, et al. Unconstrained genome targeting with near-PAMless engineered CRISPR-Cas9 variants[J]. *Science*, 2020, 368(6488): 290-296.
- [59] HSU P D, LANDER E S, ZHANG F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering[J]. *Cell*, 2014, 157(6): 1262-1278.
- [60] HIRANO H, GOOTENBERG J S, HORII T, et al. Structure and engineering of *Francisella novicida* Cas9[J]. *Cell*, 2016, 164(5): 950-961.
- [61] YAMAMOTO A, ISHIDA T, YOSHIMURA M, et al. Developing heritable mutations in *Arabidopsis thaliana* using a modified CRISPR/Cas9 toolkit comprising PAM-altered Cas9 variants and gRNAs[J]. *Plant and Cell Physiology*, 2019, 60(10): 2255-2262.
- [62] MILLER S M, WANG T N, RANDOLPH P B, et al. Continuous evolution of SpCas9 variants compatible with non-G PAMs[J]. *Nature Biotechnology*, 2020, 38(4): 471-481.
- [63] GUILINGER J P, THOMPSON D B, LIU D R. Fusion of catalytically inactive Cas9 to FokI nuclease improves the specificity of genome modification[J]. *Nature Biotechnology*, 2014, 32(6): 577-582.
- [64] AOUIDA M, EID A, ALI Z, et al. Efficient fdCas9 synthetic endonuclease with improved specificity for precise genome engineering[J]. *PLoS One*, 2015, 10(7): e0133373.
- [65] WYVEKENS N, TOPKAR V V, KHAYTER C, et al. Dimeric CRISPR RNA-guided FokI-dCas9 nucleases directed by truncated gRNAs for highly specific genome editing[J]. *Human Gene Therapy*, 2015, 26(7): 425-431.
- [66] TERAO M, TAMANO M, HARA S, et al. Utilization of the CRISPR/Cas9 system for the efficient production of mutant mice using crRNA/tracrRNA with Cas9 nickase and FokI-dCas9[J]. *Experimental Animals*, 2016, 65(3): 275-283.
- [67] MA D C, PENG S G, HUANG W R, et al. Rational design of mini-Cas9 for transcriptional activation[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2018, 7(4): 978-985.
- [68] HAVLICEK S, SHEN Y, ALPAGU Y, et al. Re-engineered RNA-guided FokI-nucleases for improved genome editing in human cells[J]. *Molecular Therapy*, 2017, 25(2): 342-355.
- [69] KONERMANN S, BRIGHAM M D, TREVINO A E, et al. Genome-scale transcriptional activation by an engineered CRISPR-Cas9 complex[J]. *Nature*, 2015, 517(7536): 583-588.
- [70] PEREZ-PINERA P, KOCAK D D, VOCKLEY C M, et al. RNA-guided gene activation by CRISPR-Cas9-based transcription factors[J]. *Nature Methods*, 2013, 10(10): 973-976.
- [71] YEO N C, CHAVEZ A, LANCE-BYRNE A, et al. An enhanced CRISPR repressor for targeted mammalian gene regulation[J]. *Nature Methods*, 2018, 15(8): 611-616.
- [72] LIAN J Z, HAMEDIRAD M, HU S M, et al. Combinatorial metabolic engineering using an orthogonal tri-functional CRISPR system[J]. *Nature Communications*, 2017, 8: 1688.
- [73] BEHLER J, VIJAY D, HESS W R. CRISPR-based technologies for metabolic engineering in cyanobacteria[J]. *Trends in Biotechnology*, 2018, 36(10): 996-1010.
- [74] TONG Y J, CHARUSANTI P, ZHANG L X, et al. CRISPR-Cas9 based engineering of actinomycetal genomes[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2015, 4(9): 1020-1029.
- [75] SCHMIDT R, STEINHART Z, LAYEGHI M, et al. CRISPR activation and interference screens decode stimulation responses in primary human T cells[J]. *Science*, 2022, 375(6580): eabj4008.
- [76] KOMOR A C, KIM Y B, PACKER M S, et al. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage[J]. *Nature*, 2016, 533(7603): 420-424.
- [77] KOMOR A C, ZHAO K T, PACKER M S, et al. Improved base excision repair inhibition and bacteriophage Mu Gam protein yields C: G-to-T: A base editors with higher efficiency and product purity[J]. *Science Advances*, 2017, 3(8): eao4774.
- [78] ZHAO D D, LI J, LI S W, et al. Glycosylase base editors enable C-to-A and C-to-G base changes[J]. *Nature Biotechnology*, 2021, 39(1): 35-40.
- [79] KOBLAN L W, ARBAB M, SHEN M W, et al. Efficient C•G-to-G•C base editors developed using CRISPRi screens, target-library analysis, and machine learning[J]. *Nature Biotechnology*, 2021, 39(11): 1414-1425.
- [80] ANZALONE A V, RANDOLPH P B, DAVIS J R, et al. Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA[J]. *Nature*, 2019, 576(7785): 149-157.
- [81] NELSON J W, RANDOLPH P B, SHEN S P, et al. Engineered pegRNAs improve prime editing efficiency[J]. *Nature Biotechnology*, 2022, 40(3): 402-410.
- [82] CHEN P J, HUSSMANN J A, YAN J, et al. Enhanced prime editing systems by manipulating cellular determinants of editing outcomes[J]. *Cell*, 2021, 184(22): 5635-5652.e29.
- [83] LIN Q P, JIN S, ZONG Y, et al. High-efficiency prime editing with optimized, paired pegRNAs in plants[J]. *Nature Biotechnology*, 2021, 39(8): 923-927.

- [84] CHOI J, CHEN W, SUITER C C, et al. Precise genomic deletions using paired prime editing[J]. *Nature Biotechnology*, 2022, 40(2): 218-226.
- [85] ANZALONE A V, GAO X D, PODRACKY C J, et al. Programmable deletion, replacement, integration and inversion of large DNA sequences with twin prime editing[J]. *Nature Biotechnology*, 2022, 40(5): 731-740.
- [86] KOBLAN L W, DOMAN J L, WILSON C, et al. Improving cytidine and adenine base editors by expression optimization and ancestral reconstruction[J]. *Nature Biotechnology*, 2018, 36(9): 843-846.
- [87] ARBAB M, SHEN M W, MOK B, et al. Determinants of base editing outcomes from target library analysis and machine learning[J]. *Cell*, 2020, 182(2): 463-480.e30.
- [88] WIJSMAN M, ŚWIAT M A, MARQUES W L, et al. A toolkit for rapid CRISPR-SpCas9 assisted construction of hexose-transport-deficient *Saccharomyces cerevisiae* strains[J]. *FEMS Yeast Research*, 2018, 19(1): foy107.
- [89] YUAN Q C, GAO X. Multiplex base- and prime-editing with drive-and-process CRISPR arrays[J]. *Nature Communications*, 2022, 13: 2771.
- [90] RAUCH B J, SILVIS M R, HULTQUIST J F, et al. Inhibition of CRISPR-Cas9 with bacteriophage proteins[J]. *Cell*, 2017, 168(1/2): 150-158.e10.
- [91] HE F, BHOOBALAN-CHITTY Y, VAN L B, et al. Anti-CRISPR proteins encoded by archaeal lytic viruses inhibit subtype I-D immunity[J]. *Nature Microbiology*, 2018, 3(4): 461-469.
- [92] STANLEY S Y, MAXWELL K L. Phage-encoded anti-CRISPR defenses[J]. *Annual Review of Genetics*, 2018, 52: 445-464.
- [93] OSUNA B A, KARAMBELKAR S, MAHENDRA C, et al. *Listeria* phages induce Cas9 degradation to protect lysogenic genomes[J]. *Cell Host & Microbe*, 2020, 28(1): 31-40.e9.
- [94] LIU L, YIN M L, WANG M, et al. Phage AcrIIA2 DNA mimicry: Structural basis of the CRISPR and anti-CRISPR arms race[J]. *Molecular Cell*, 2019, 73(3): 611-620.e3.
- [95] YANG H, PATEL D J. Inhibition mechanism of an anti-CRISPR suppressor AcrIIA4 targeting SpyCas9[J]. *Molecular Cell*, 2017, 67(1): 117-127.e5.
- [96] WATTERS K E, SHIVRAM H, FELLMANN C, et al. Potent CRISPR-Cas9 inhibitors from *Staphylococcus* genomes[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2020, 117(12): 6531-6539.
- [97] WATTERS K E, FELLMANN C, BAI H B, et al. Systematic discovery of natural CRISPR-Cas12a inhibitors[J]. *Science*, 2018, 362(6411): 236-239.
- [98] MARINO N D, ZHANG J Y, BORGES A L, et al. Discovery of widespread type I and type V CRISPR-Cas inhibitors[J]. *Science*, 2018, 362(6411): 240-242.
- [99] KNOTT G J, THORNTON B W, LOBBA M J, et al. Broad-spectrum enzymatic inhibition of CRISPR-Cas12a[J]. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2019, 26(4): 315-321.
- [100] PENG R C, LI Z T, XU Y, et al. Structural insight into multi-stage inhibition of CRISPR-Cas12a by AcrVA4[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2019, 116(38): 18928-18936.
- [101] DONG L Y, GUAN X Y, LI N N, et al. An anti-CRISPR protein disables type V Cas12a by acetylation[J]. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2019, 26(4): 308-314.
- [102] SHIN J, JIANG F G, LIU J J, et al. Disabling Cas9 by an anti-CRISPR DNA mimic[J]. *Science Advances*, 2017, 3(7): e1701620.
- [103] LIANG M M, SUI T T, LIU Z Q, et al. AcrIIA5 suppresses base editors and reduces their off-target effects[J]. *Cells*, 2020, 9(8): 1786.
- [104] LI C, PSATHA N, GIL S, et al. HDAd5/35⁺ adenovirus vector expressing anti-CRISPR peptides decreases CRISPR/Cas9 toxicity in human hematopoietic stem cells[J]. *Molecular Therapy-Methods & Clinical Development*, 2018, 9: 390-401.
- [105] LI J, XU Z L, CHUPALOV A, et al. Anti-CRISPR-based biosensors in the yeast *S. cerevisiae*[J]. *Journal of Biological Engineering*, 2018, 12: 11.
- [106] BASGALL E M, GOETTING S C, GOECKEL M E, et al. Gene drive inhibition by the anti-CRISPR proteins AcrIIA2 and AcrIIA4 in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Microbiology*, 2018, 164(4): 464-474.
- [107] BUBECK F, HOFFMANN M D, HARTEVELD Z, et al. Engineered anti-CRISPR proteins for optogenetic control of CRISPR-Cas9[J]. *Nature Methods*, 2018, 15(11): 924-927.
- [108] JOHNSTON R K, SEAMON K J, SAADA E A, et al. Use of anti-CRISPR protein AcrIIA4 as a capture ligand for CRISPR/Cas9 detection[J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2019, 141: 111361.
- [109] JIANG F G, DOUDNA J A. CRISPR-cas9 structures and mechanisms[J]. *Annual Review of Biophysics*, 2017, 46: 505-529.
- [110] NIHONGAKI Y, OTABE T, UEDA Y, et al. A split CRISPR-CpfI platform for inducible genome editing and gene activation[J]. *Nature Chemical Biology*, 2019, 15(9): 882-888.
- [111] YU Y H, WU X, GUAN N Z, et al. Engineering a far-red light-activated split-Cas9 system for remote-controlled genome editing of internal organs and tumors[J]. *Science Advances*, 2020, 6(28): eabb1777.
- [112] SUNG K, PARK J, KIM Y, et al. Target specificity of Cas9 nuclease via DNA rearrangement regulated by the REC2 domain[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2018, 140(25): 7778-7781.
- [113] LU Y, XUE J X, DENG T, et al. Safety and feasibility of CRISPR-edited T cells in patients with refractory non-small-cell

- lung cancer[J]. *Nature Medicine*, 2020, 26(5): 732-740.
- [114] MA S F, WANG X L, HU Y F, et al. Enhancing site-specific DNA integration by a Cas9 nuclease fused with a DNA donor-binding domain[J]. *Nucleic Acids Research*, 2020, 48(18): 10590-10601.
- [115] YIN J H, LU R S, XIN C C, et al. Cas9 exo-endonuclease eliminates chromosomal translocations during genome editing[J]. *Nature Communications*, 2022, 13: 1204.
- [116] ZUO E W, SUN Y D, WEI W, et al. Cytosine base editor generates substantial off-target single-nucleotide variants in mouse embryos[J]. *Science*, 2019, 364(6437): 289-292.
- [117] YIN H, SONG C Q, SURESH S, et al. Partial DNA-guided Cas9 enables genome editing with reduced off-target activity[J]. *Nature Chemical Biology*, 2018, 14(3): 311-316.
- [118] KOCAK D D, JOSEPHS E A, BHANDARKAR V, et al. Increasing the specificity of CRISPR systems with engineered RNA secondary structures[J]. *Nature Biotechnology*, 2019, 37(6): 657-666.



通讯作者: 刘嵘明(1985—),男,博士,教授。研究方向为:(1)高精度CRISPR基因编辑核酸酶的开发与应用;(2)高通量CRISPR基因组编辑工程策略开发与应用;(3)细胞工厂的功能预测与智能化设计;(4)构建细胞工厂合成生物基化学品、生物燃料以及高附加值产品。
E-mail: rongming_liu@dlut.edu.cn



第一作者: 梁丽亚(1987—),女,博士,副教授。研究方向为:基因编辑、合成生物学、代谢工程。
E-mail: liya_liang@dlut.edu.cn