



诺贝尔化学奖授予CRISPR-Cas9基因编辑研究*

尤李兰^{1,2)} 孙伟¹⁾ 杨晓琪^{1,2)} 王艳丽^{1)**}

(1) 中国科学院生物物理研究所, 中国科学院核酸生物学重点实验室, 北京 100101; (2) 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要 2020年, 诺贝尔化学奖授予现就职于德国马普感染生物学研究所的法国科学家Emmanuelle Charpentier和美国加州大学伯克利分校的Jennifer Doudna, 表彰她们发明CRISPR基因编辑方法. 她们揭示了Cas9具有RNA介导的DNA核酸内切酶活性, 可以切断任意DNA双链, 产生双链断裂. 她们指出CRISPR具有在活细胞中修改基因的作用, 利用CRISPR-Cas9编辑工具, 可以精确改变细胞中的DNA. 由于简单、高效、廉价等特征, CRISPR已经成为最为流行的基因编辑技术, 被称为基因编辑“魔剪”. 本文介绍了两位诺贝尔化学奖得主的研究成果, 概述了CRISPR系统的发现历程, 以及CRISPR-Cas9的功能和应用.

关键词 诺贝尔化学奖, CRISPR-Cas9, 基因编辑

中图分类号 Q5, Q7

DOI: 10.16476/j.pibb.2020.0395

2020年, 诺贝尔化学奖授予法国科学家Emmanuelle Charpentier和美国科学家Jennifer Doudna以表彰她们开发CRISPR基因编辑方法的贡献. 基因编辑是对基因组指定目标进行修饰的一种基因工程技术, 包括基因敲除、基因插入或替换等. 生命的遗传信息保存在DNA中, 改变DNA序列可以改变遗传物质, 引起遗传性状的变化. 此前, 使用DNA重组技术, 可以在体外定点剪切和拼接DNA片段, 通过载体向受体细胞转入新的基因, 影响细胞的功能, 但DNA重组技术难以在胞内定点改造基因. 而基因编辑技术, 通过识别和断裂特定基因位点, 引发DNA修复机制, 可以在体内定点突变基因, 重写生命代码.

二十世纪八九十年代, 美国科学家Maria Jasin和James Haber对DNA修复的多年研究发现, DNA的双链断裂(DNA double-strand breaks, DSB)可引发两种修复机制: 非同源末端连接(non-homologous end joining, NHEJ)和基于同源DNA片段的重组修复(homology-directed repair, HDR)^[1]. NHEJ通过连接DNA双链断口的两端实现修复, 这一过程中可能会产生核苷酸的插入或删除. HDR以与DNA断裂位点两端互补的同源片段为模板修复双链DNA, 通过同源片段的设计可增

删、替换核苷酸或插入新的基因. 有效的基因编辑需要靶向目标基因, 产生DNA双链断裂. 在CRISPR-Cas9发现以前, 有3种DNA结合蛋白应用于基因编辑: 大范围核酸酶(meganuclease)、锌指核酸酶(zinc-finger nucleases, ZFNs)和转录激活因子样效应因子核酸酶(transcription activator-like effectors nucleases, TALENs). 三者都是通过蛋白质与DNA的相互作用识别目标序列, 但大范围核酸酶无法序列特异性识别DNA, ZFNs和TALENs只能识别特定核酸序列, 皆难以广泛应用至各个基因^[2-3]. 如何精确产生目标位点的DNA断裂成为基因编辑领域最大的难点. 而CRISPR-Cas9核酸酶通过RNA与DNA的碱基互补配对识别DNA, 在特定位点切割DNA产生DSB, 引导基因编辑, 兼具特异性和广谱性, 是最锋利的基因操作工具之一.

1 CRISPR-Cas系统的发现

成簇而规律的间隔短回文重复序列

* 国家自然科学基金重点项目(31930065)和中国科学院前沿科学重点研究项目(QYZDY-SSW-SMC021)资助.

** 通讯联系人.

Tel: 010-64881316, E-mail: ylwang@ibp.ac.cn

收稿日期: 2020-10-30, 接受日期: 2020-11-09

(clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPRs) 最早于1987年被日本科学家报道^[4]. 当时, 他们对大肠杆菌的碱性磷酸酶相关基因*iap*以及两侧DNA测序, 发现在该基因上游有一段间隔重复序列, 由多个29个核苷酸的重复序列与32个核苷酸的间隔序列成簇排列而成, 彼时这些序列的生物学功能并不清楚. 这种类型的序列引起了西班牙科学家Francisco Mojica的注意, 他在

地中海富盐菌中发现成簇排列的重复片段^[5]. 经过多年生物信息学分析, 他发现在已发表的基因组中高于40%的细菌基因组和高于90%的古菌基因组都有类似的片段^[6]. 2002年, Mojica和Leo Schouls依据序列特征正式将之命名为CRISPR^[7]. Leo Schouls等还在CRISPR基因附近发现与CRISPR相关的编码基因 (CRISPR associated, *cas*), 他们将这些基因编码的蛋白质命名为Cas蛋白 (图1).

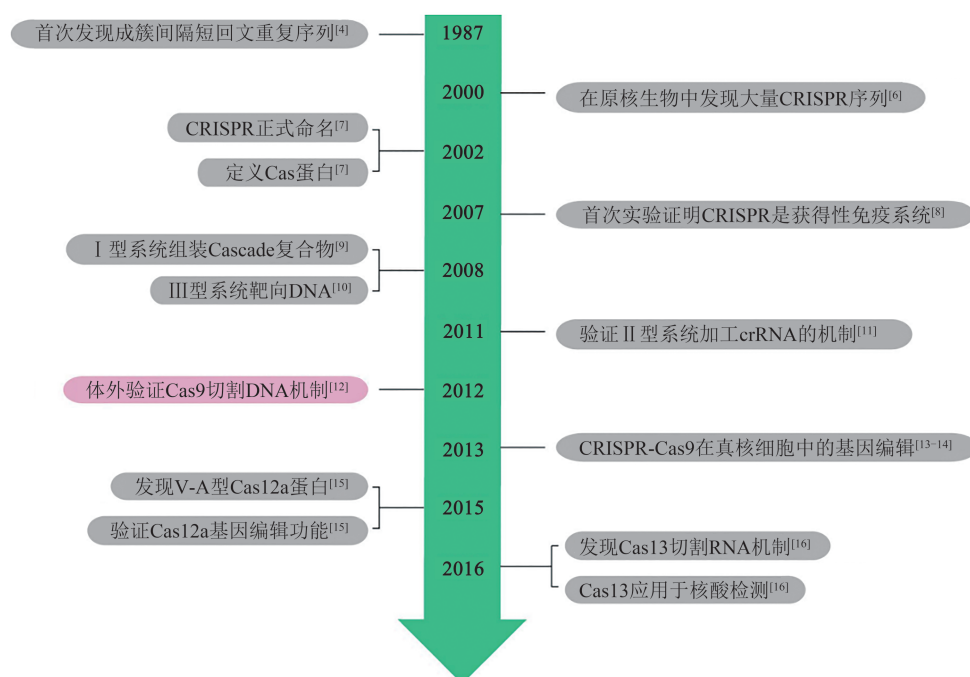


Fig. 1 Timeline of CRISPR-Cas research

图1 CRISPR-Cas领域关键研究成果

更多的基因组测序结果和生物信息学分析表明超过90%的古细菌和约50%的细菌中都有CRISPR-Cas系统. 典型的CRISPR序列是由一段引导序列 (leader) 开始, 引导序列中含有转录CRISPR序列所需的启动子. 在引导序列之后是多

个高度重复序列 (repeat) 和将这些重复序列隔开的长短不一的间隔序列 (spacer) (图2). CRISPR序列中repeat序列具有种属特异性, 而spacer序列与某些病毒或质粒的序列同源^[17-18], 表明这些spacer序列可能来自外源入侵的核酸.

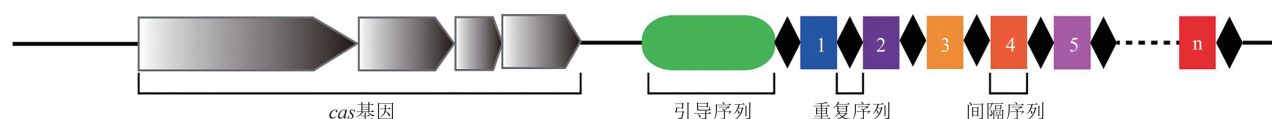


Fig. 2 The diagram of CRISPR-Cas genome

图2 经典的CRISPR-Cas系统基因序列示意图

2 CRISPR是原核生物体内的获得性免疫系统

与外源核酸同源的间隔序列的发现引发科学家们的猜想: CRISPR-Cas可能是一种通过RNA抵御噬菌体或其他外源核酸入侵的免疫系统. 为了验证这一观点, Philippe Horvath等^[8]将病毒基因信息编辑到嗜热链球菌CRISPR间隔序列中, 发现含有病毒基因信息的细菌可以特异性地免疫相应病毒, 证明CRISPR-Cas是原核生物体内的一种获得性免疫系统.

CRISPR-Cas系统作为目前原核生物中唯一已知的获得性免疫系统, 激发了广大科学家尤其是RNA领域科学家的兴趣. 科学家对CRISPR系统的研究发现, Cas蛋白与CRISPR基因转录和加工的产物CRISPR RNA (crRNA) 结合, 形成蛋白质与RNA的复合物, 靶向与crRNA互补的DNA或RNA^[9-10, 19], 实现对外源核酸的干扰. CRISPR-Cas系统抵抗噬菌体或质粒入侵的过程分为3个阶段: a. 获取阶段, 在这个阶段CRISPR-Cas系统中普遍存在的Cas1和Cas2蛋白从外源核酸中选择一段DNA, 将其整合到CRISPR位点中的第一个重复序列后, 形成新的间隔序列, 从而记录曾经入侵的外源核酸信息^[20]; b. 表达阶段, CRISPR基因被转录为前体crRNA (pre-crRNA), Cas蛋白或其他RNA酶识别重复序列部分并切割pre-crRNA产生成熟的crRNA; c. 干扰阶段, Cas蛋白结合crRNA组装成效应复合物, 通过crRNA互补配对的方式识别外源核酸, 切割或招募其他Cas核酸酶切割目的核酸, 从而抵御外源核酸入侵.

3 CRISPR-Cas系统的分类

CRISPR-Cas系统极具多样性, 科学家根据Cas蛋白的种类对CRISPR-Cas系统进行分类. 在2011年, CRISPR-Cas系统被分为I、II与III型; 随着更多系统被发现, CRISPR-Cas系统被重新分为2大类: Class 1与Class 2. 每一大类进一步分为3种类型, 每一种类型又分为多种亚型^[21]. 第一类CRISPR-Cas系统 (Class 1) 包括I型、III型和IV型系统, 而第二类CRISPR-Cas系统 (Class 2) 包括II型、V型和VI型. 不同类型CRISPR-Cas系统对间隔序列的获取过程相对保守, 但其干扰阶段识别和降解入侵核酸的机理不同^[21]. 第一类CRISPR-Cas系统在干扰阶段使用大的、多亚基效应复合物

对外源核酸进行监测和切割; 而第二类CRISPR-Cas系统主要通过单个效应蛋白 (Cas9、Cas12、Cas13) 实现对外源核酸的降解.

不同类型的CRISPR-Cas系统具有不同的特征蛋白质. 第一类I型系统包含由多个Cas蛋白与crRNA组成的Cascade复合物, 在识别目的DNA后招募Cas3核酸酶对入侵核酸进行降解. III型CRISPR系统在干扰阶段组装Csm或Cmr复合物, 序列特异性识别和切割外源RNA, 外源RNA的结合进一步激活效应复合物中的最大亚基Cas10非特异性切割单链DNA以及合成cOA (第二信使环状寡聚核苷酸) 的两种酶活性, cOA激活下游的Csx1或Csm6 RNA酶, 非特异性切割胞内RNA. IV型CRISPR-Cas系统的免疫机制尚不清楚. 第二类II型系统的特征蛋白是Cas9, Cas9可在两种RNA介导下切割DNA. V型系统表达Cas12家族蛋白, 与RNA组装成二元复合物, 识别和切割DNA. VI型CRISPR-Cas系统含Cas13家族蛋白, Cas13与crRNA形成复合物识别RNA, 并在RNA底物的激活下非特异性切割单链RNA.

4 II型CRISPR-Cas9的发现

II型CRISPR-Cas系统是第二大类的典型代表, 其效应蛋白是Cas9核酸酶. 早在2005年, Cas9的基因通过生物信息学手段被鉴定出来, 最开始称为Csn1或Cas5^[22]. 由于其具有核酸酶样结构域, 研究人员推测Cas9可能有核酸酶的活性. 2007年, 研究人员利用噬菌体侵染嗜热链球菌 (*Streptococcus thermophiles*, Sth), 发现敲除cas9基因后细菌丧失了防御噬菌体的功能, 证明Cas9参与了CRISPR介导的干扰过程^[8].

2010年, 加拿大科学家Sylvain Moineau等^[23]用病毒侵染或质粒转化含II-A型CRISPR系统的嗜热链球菌, 对病毒基因组或质粒进行分析, 发现转染后的DNA都产生了固定长度的断口, 意味着II-A型CRISPR系统可以切割双链DNA产生双链断裂. 嗜热链球菌的CRISPR系统也引起了立陶宛科学家Virginijus Siksnys的注意. Siksnys团队^[24]将含有嗜热链球菌II-A型CRISPR位点的质粒转化到大肠杆菌中, 该CRISPR间隔片段序列与相应的噬菌体或质粒的相同, 转化后的大肠杆菌获得了免疫相应噬菌体或质粒的能力, 这证明CRISPR系统可以在外源细菌中重建. 他们随后在大肠杆菌中共表达了SthCas9与RNA, 并纯化得到了SthCas9-RNA复

合物,发现该复合物可在特定位点切割与 crRNA 互补的 dsDNA.他们还发现 CRISPR-Cas9 结合和切割 DNA 需要识别外源 DNA 原型间隔序列 (protospacer) 附近的特征 PAM 序列 (protospacer adjacent motif),例如 SthCas9 识别 5'-TGGTG-3' PAM 序列^[25].这些研究成果是 CRISPR 领域内的重要突破,也为 CRISPR-Cas9 作为基因编辑工具提供了重要依据.

同一时期,Charpentier 和 Doudna 对酿脓链球菌 (*Streptococcus pyogenes*, Spy) CRISPR-Cas9 进行了研究. Charpentier 团队通过 pre-crRNA 切割实验,发现 II -A 型 CRISPR-Cas 系统 pre-crRNA 的重复序列区域与 tracrRNA (*trans*-activating CRISPR RNA) 互补,两种 RNA 都与 Cas9 蛋白结合,介导 RNA 水解酶 (RNase) III 对 pre-crRNA 的加工^[11].她们在大肠杆菌中表达 SpyCas9,并成功纯化 Cas9,通过体外实验验证了 CRISPR-Cas9 依赖于 crRNA 与 tracrRNA,识别和切割外源核酸的机制,表明 Cas9 可作为基因编辑工具改写基因信息.这一发现开启了分子生物学的新篇章^[12].

Cas9 是所有 II 型 CRISPR-Cas 系统的特征性蛋白,是一种大型多结构域和多功能的 DNA 核酸内切酶.根据所包含 *cas* 基因的不同,II 型系统分为 II-A, II-B 和 II-C 3 种亚型^[21]. SthCas9 和 SpyCas9 都属于 II-A 型系统效应复合物.不同物种来源的 Cas9 识别的 PAM 序列不同,且对 crRNA-DNA 错配的容忍度和 DNA 酶切活性都有差异,这些差异为 CRISPR-Cas9 的应用提供了不同的选项.对多种 Cas9 的研究大大扩展了 CRISPR-Cas9 基因编辑工具包: II-A 型 SpyCas9、SthCas9、SauCas9 等; II-B 型 FnCas9 等; II-C 型 NmeCas9、CjeCas9、GeoCas9、HpaCas9 等.

5 CRISPR-Cas9 实现基因编辑功能的分子机制

2012 年,Charpentier 与 Doudna 团队首次在体外组装具有基因编辑功能的 Cas9,并鉴定 Cas9 可在 RNA 的介导下定点切割 dsDNA.她们发现 SpyCas9 发挥免疫活性需要 crRNA 和 tracrRNA. Cas9 与 crRNA 和 tracrRNA 结合,组装成效应复合物切割 DNA.在 Charpentier 团队发现 tracrRNA 的基础上,Charpentier 与 Doudna 设计了一系列不同长度的 crRNA 和 tracrRNA,比较这些 RNA 对 DNA 切割活性的影响,不仅发现必须同时存在两种

RNA, Cas9 才能发挥切割活性,而且维持 Cas9 切割最高活性,至少需要 42 个核苷酸长度的 crRNA 和 96 个核苷酸长度的 tracrRNA,其中 crRNA 含 20 nt 来源于间隔区的序列和 22 nt 重复区序列.在此基础上,她们连接 crRNA 3'端和 tracrRNA 5'端,组成一条嵌合的 sgRNA 链 (single-guide RNA),发现 Cas9-sgRNA 对 DNA 的切割活性并没有减弱.这一发现对设计向导 RNA 具有非常重要的指导作用,并且极大地增强了 Cas9 作为基因组编辑工具的可操作性.

Cas9-sgRNA 通过互补配对识别靶 dsDNA, crRNA 与 dsDNA TS 链 (target strand) 互补配对是切割 DNA 的必要条件,错配会降低 Cas9 切割 DNA 的活性. crRNA 含与 dsDNA 互补的 20 nt spacer 区域,其中 crRNA spacer 1~10 位核苷酸的错配对活性影响很大,被定义为“种子区域”. SpyCas9-sgRNA 二元复合物结构中 crRNA 的“种子区域”发生预排序,使靶标 dsDNA 的结合在热力学上变得有利.比较不同状态 Cas9 的结构,研究人员发现“种子区域”对于 R-loop 的形成至关重要^[26-28]. Cas9 整体呈现二裂片的形状, Apo-Cas9 的二裂片结构相对松散,当结合 sgRNA 之后, Cas9 发生明显构象变化,二裂片的结构变得紧凑,表明 sgRNA 的结合有利于 Cas9 的稳定性.识别 PAM 序列后,双链打开, crRNA : TS 杂合双链体从“种子区域”开始向 PAM 远端延伸形成 20 bp (base-pairs) 的杂合双链. crRNA : TS 杂合双链紧密结合在 α 螺旋识别叶 (REC lobe) 和核酸酶叶 (NUC lobe) 之间的通道内,在 dsDNA 结合后, HNH 结构域运动到杂合双链中 TS 上的切割位点附近对其进行切割,而 NTS 链位于 NUC lobe 的通道内,稳定 R-loop 结构^[29].

Cas9 的 HNH 和 RuvC 核酸酶结构域分别负责切割 dsDNA 的 TS 链和 NTS (non-target strand) 链.突变 HNH 活性位点, TS 链切割受到抑制,而 NTS 链的切割因 RuvC 的突变而受到抑制.结构生物学的发现解释了 Cas9 两种核酸酶结构域分别切割 dsDNA 两条链的分子机制. Cas9 由 NUC lobe 和 REC lobe 组成二裂片的结构,含多个正电荷氨基酸富集的核酸结合通道.在 Cas9-sgRNA-DNA 的结构中,可以观察到 sgRNA 与 DNA 形成一个“R-loop”的结构. crRNA 与 TS 互补配对,形成 crRNA : TS 杂合双链体.结合在 REC lobe 和 NUC lobe 形成的中间通道内, HNH 结构域在杂合双链

中TS上的切割位点附近对其进行切割, 而NTS沿着另一条位于NUC lobe的核酸结构通道伸入RuvC

结构域的活性口袋附近被切割(图3)。

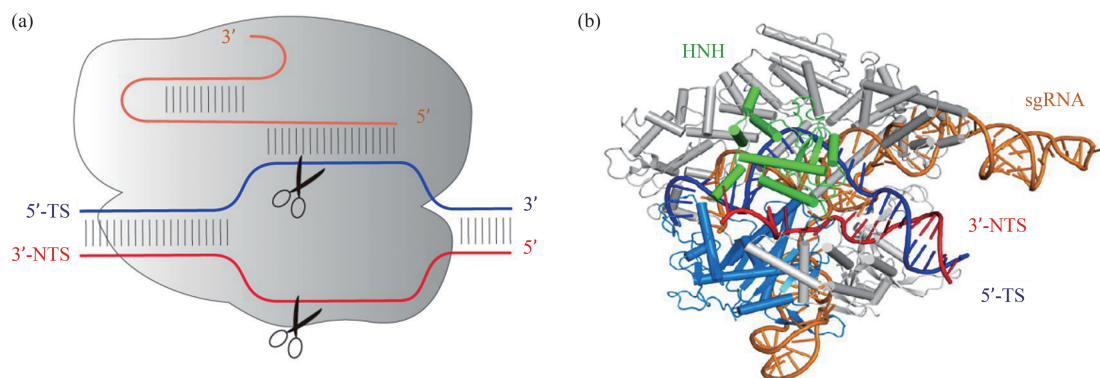


Fig. 3 The gene editing tool, Cas9

图3 基因编辑工具Cas9

(a) Cas9-sgRNA切割DNA的模型; (b) Cas-sgRNA-dsDNA结构 (PDB ID: 5F9R)。

PAM序列对于Cas9识别和切割靶标DNA至关重要。Charpentier与Doudna验证dsDNA protospacer附近的序列对DNA结合和切割的影响, 发现protospacer下游5'-NGG-3' PAM序列是SpyCas9识别DNA的必要条件。当突变PAM序列, SpyCas9结合dsDNA的亲和力大幅度减弱, 切割DNA的活性也随之降低。Cas9的C端含有PI结构域, 它特异性读取位于NTS上的PAM序列, 这影响dsDNA的稳定性促使其解链, 并促进向导RNA与互补DNA杂合形成R-loop结构。通过PI结构域氨基酸与PAM位点核苷酸碱基的特异性相互作用, 不同的Cas9识别不同类型的PAM序列。CRISPR位点的spacer附近无PAM序列, 而外源核酸protospacer附近含PAM特征序列, 因此PAM序列的识别是CRISPR-Cas9区分“自我”和“非我”的关键因素。Cas9通过PAM区分自身与异己dsDNA, crRNA:TS互补配对形成R-loop, 实现对靶DNA的精准切割, 为基因编辑提供可靠的剪刀。基于Cas9的结构, 还可对PI结构域与dsDNA结合的氨基酸进行改造, 识别不同的PAM序列, 扩大基因编辑工具包^[30]。

6 CRISPR-Cas9在基因编辑领域的应用

CRISPR-Cas9基因编辑技术迅速引起了全球科学家的注意, 目前已应用于大部分常用细胞系和模式生物中。2013年2月, 美国麻省理工学院的张锋和哈佛大学的George Church^[13-14]率先将CRISPR-Cas9基因编辑技术应用于真核生物细胞。张锋团队

将Cas9基因、含目的基因片段的crRNA基因和tracrRNA基因转化到哺乳动物细胞中, 成功检测到Cas9切割位点附近核苷酸的增删, 实现对目的基因的敲除。Church团队将Cas9基因、GFP与sgRNA的融合基因转化到人源细胞中, 通过重组修复成功将GFP基因插入至指定位点, 实现了新基因的插入。这两项研究向人们展示了Cas9作为真核细胞基因编辑工具的巨大潜力。

从2013年开始, CRISPR-Cas9被广泛应用于基础研究中, 其中比较成熟的是利用CRISPR-Cas9基因敲除技术研究特定基因的功能。CRISPR-Cas9基因敲除试剂盒已经商业化: 先寻找目的基因上的PAM序列选择剪切目标, 接着设计与目标基因互补的sgRNA序列, 然后利用Cas9-sgRNA复合物切割靶标产生DNA双链断裂, 从而引发碱基错位实现基因敲除。CRISPR-Cas9基因敲除比RNAi基因沉默更高效, 专一性更高。另外, CRISPR-Cas9也被用于高通量遗传筛选。Cas9和sgRNA文库被递送到细胞里, 然后研究人员筛选被处理的细胞, 寻找感兴趣的表型, 再根据表型研究基因。利用这种方法鉴定出了参与免疫反应、药物耐药性、癌症发展等过程的多个基因。值得一提的是, Cas9的核酸酶结构域失活会产生所谓“死”Cas9 (dCas9)。dCas9丧失了切割活性, 但仍具有靶向DNA的能力。基于该特性, dCas9被用于生物成像和基因表达调控领域。简单来讲, dCas9-sgRNA与荧光蛋白融合后可定位基因, dCas9-sgRNA与阻遏蛋白融合可高效沉默基因的转录, dCas9与转录激活因子融

合, 靶向启动子或增强子区域可激活转录过程, 上调基因的表达.

除了带动基础研究的发展外, CRISPR 正掀起一场新的生物技术革命, 将深刻影响人们的生活. 作为一种基因剪刀, CRISPR-Cas9 正改变着生物产业的方方面面: a. 作物育种. 将 CRISPR-Cas9 基因编辑技术应用于植物基因工程, 通过敲除、改造基因或添加新的基因, 快速而精准地培育新的优良性状品种, 可大大缩短育种研究周期^[31], 目前已在小麦、水稻、玉米等多种经济作物中应用 CRISPR-Cas9 筛选优良基因. b. 遗传病治疗. CRISPR-Cas9 应用于基因疾病的治疗, 通过修复突变基因或敲除有害基因从根本上治愈疾病. 如镰刀型细胞贫血症, 应用 CRISPR-Cas9 基因编辑技术, 已在小鼠中修复血红蛋白相关基因, 成功在小鼠中治愈这种单基因遗传病^[32]. 临床上镰刀型细胞贫血症的 CRISPR-Cas9 治疗方法正在试验中. c. 癌症治疗. CRISPR-Cas9 用于治疗癌症的研究也在如火如荼地展开. 2016 年, 中国科学家卢铀首次将 CRISPR-Cas9 基因编辑技术应用于临床. 卢铀团队在体外编辑 T 细胞 PD-1 编码基因, PD-1 可以帮助癌细胞逃逸免疫, 敲除 PD-1 编码基因可激活 T 细胞对癌细胞的识别. 他们在体外培养扩增 T 细胞, 再输回非小细胞肺癌受试者体内, 完成了 12 例三线及以上治疗失败的晚期肺癌患者的基因编辑细胞治疗^[33-34].

CRISPR-Cas9 拥有广阔的应用前景, 但现阶段仍存在诸多不足. 其中最主要的问题是 CRISPR-Cas9 的脱靶效应, 即 CRISPR-Cas9 靶向非目标位点, 引起非靶位点的基因编辑. 在临床上, 由 CRISPR-Cas9 脱靶效应引发的“意外突变”可能会引发新的疾病. 因此, 在 CRISPR-Cas9 技术从实验室走向实际应用过程中, 必须要反复试验, 评估风险, 规避基因组非目标位点的编辑. 而如何改造 Cas9, 提高其特异性, 最大限度地降低脱靶效应, 是目前 CRISPR-Cas9 基因编辑领域的重要研究内容之一. 此外, CRISPR-Cas9 基因编辑技术引发的伦理问题也是我们必须考虑的问题, 对生殖细胞的基因编辑需要拟定边界, 达成全人类的共识.

7 Cas12 与 Cas13 的应用

除 Cas9 之外, 第二大类中其他核酸酶也可用作 DNA 或 RNA 操作工具, 如 V 型 Cas12a 和 Cas12b DNA 酶, 以及 VI 型 Cas13 RNA 酶. 与 Cas9

功能类似, Cas12a 也具有定点切割双链 DNA 的能力. Cas12a 只有一个 RuvC 核酸酶结构域, 且切割 dsDNA 产生粘性末端切口, 而 Cas9 则需要 HNH 和 RuvC 两个结构域发挥活性, 产生平末端切口^[15]; 在 TS 链的激活下, Cas12a 还有反式切割非特异性 ssDNA 的能力, Cas9 则没有这种活性. 现在 CRISPR-Cas12a 基因编辑技术已应用于多种细胞系和斑马鱼、小鼠等模式生物. 与 Cas9 相比, Cas12a 产生的粘性末端切口倾向于引发目的位点附近更大范围的突变^[35]. 近年来, 越来越多的 Cas12 家族蛋白被发现, 这些蛋白质都具有精准切割 DNA 的功能, 其中 Cas12a 和 Cas12b 已应用于真核细胞的基因编辑, 是对 Cas9 基因剪刀的很好补充.

与 Cas9 和 Cas12 不同, Cas13 是一种由 RNA 介导的 RNA 酶, 它将 pre-crRNA 加工为成熟的 crRNA, 并与之形成二元效应复合物, 目标 RNA 与 crRNA 的 spacer 区互补配对, 激活 Cas13 非特异性切割单链 RNA 的活性^[16, 36]. 根据 Cas13 非特异性切割 RNA 的特点, 2017 年张锋等开发出了高灵敏的核酸检测工具 SHERLOCK (specific high-sensitivity enzymatic reporter unlocking). SHERLOCK 通过 PCR 放大待检测的核酸底物信号, 利用 T7 RNA 聚合酶转录 RNA, 在 Cas13a 特异性识别目标 RNA 后, 开始非特异性切割包含荧光猝灭基团的单链 RNA, 从而释放荧光信号^[37]. 2020 年 8 月, 研究人员应用 SHERLOCK 检测 SARS-CoV-2 病毒^[38], 可在数小时内检测出结果. 除核酸检测外, Cas13 还在抗 RNA 病毒、RNA 编辑、表观遗传调控、抗肿瘤、RNA 的定位和成像等方面有着广泛的应用前景.

随着 CRISPR 系统爆炸性的发现和应用, 除了目前应用最多的 SpyCas9, 已有越来越多新的 DNA 或 RNA 操作工具被发现和研究, 扩展了 CRISPR 工具包. 继续不断扩展、丰富这些工具包将会极大地便利分子生物学研究, 并带动生物产业的发展. 目前, 改造已有工具克服脱靶效应, 发现新的核酸操作工具以及拓展工具酶的应用范围等, 均是 CRISPR 领域内重要的研究内容, 为此科研工作者需要继续努力.

参 考 文 献

- [1] Hsu P D, Lander E S, Zhang F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell*, 2014, **157**(6): 1262-1278
- [2] Urnov F D, Rebar E J, Holmes M C, *et al.* Genome editing with

- engineered zinc finger nucleases. *Nature Reviews Genetics*, 2010, **11**(9): 636-646
- [3] Joung J K, Sander J D. TALENs: a widely applicable technology for targeted genome editing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2013, **14**(1): 49-55
 - [4] Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, *et al.* Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *Journal of Bacteriology*, 1987, **169**(12): 5429-5433
 - [5] Mojica F J, Juez G, Rodriguez-Valera F. Transcription at different salinities of *Haloferax mediterranei* sequences adjacent to partially modified PstI sites. *Molecular Microbiology*, 1993, **9**(3): 613-621
 - [6] Mojica F J, Diez-Villasenor C, SORIA E, *et al.* Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria. *Molecular Microbiology*, 2000, **36**(1): 244-246
 - [7] Jansen R, Embden J D, Gaastra W, *et al.* Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Molecular Microbiology*, 2002, **43**(6): 1565-1575
 - [8] Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, *et al.* CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*, 2007, **315**(5819): 1709-1712
 - [9] Brouns S J, Jore M M, Lundgren M, *et al.* Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes. *Science*, 2008, **321**(5891): 960-964
 - [10] Marraffini L A, Sontheimer E J. CRISPR interference limits horizontal gene transfer in staphylococci by targeting DNA. *Science*, 2008, **322**(5909): 1843-1845
 - [11] Deltcheva E, Chylinski K, Sharma C M, *et al.* CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature*, 2011, **471**(7340): 602-607
 - [12] Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, *et al.* A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 2012, **337**(6096): 816-821
 - [13] Cong L, Ran F A, Cox D, *et al.* Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 2013, **339**(6121): 819-823
 - [14] Mali P, Yang L, Esvelt K M, *et al.* RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*, 2013, **339**(6121): 823-826
 - [15] Zetsche B, Gootenberg J S, Abudayyeh O O, *et al.* Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system. *Cell*, 2015, **163**(3): 759-771
 - [16] Abudayyeh O O, Gootenberg J S, Konermann S, *et al.* C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector. *Science*, 2016, **353**(6299): aaf5573
 - [17] Bolotin A, Quinquis B, Sorokin A, *et al.* Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology*, 2005, **151**(Pt 8): 2551-2561
 - [18] Mojica F J, Diez-Villasenor C, Garcia-Martinez J, *et al.* Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *Journal of Molecular Evolution*, 2005, **60**(2): 174-182
 - [19] Hale C R, Zhao P, Olson S, *et al.* RNA-guided RNA cleavage by a CRISPR RNA-Cas protein complex. *Cell*, 2009, **139**(5): 945-956
 - [20] Yang J, Li J, Wang J, *et al.* Crystal structure of Cas1 in complex with branched DNA. *Science China Life Sciences*, 2020, **63**(4): 516-528
 - [21] Makarova K S, Wolf Y I, Iranzo J, *et al.* Evolutionary classification of CRISPR-Cas systems: a burst of class 2 and derived variants. *Nature Reviews Microbiology*, 2020, **18**(2): 67-83
 - [22] Haft D H, Selengut J, Mongodin E F, *et al.* A guild of 45 CRISPR-associated (Cas) protein families and multiple CRISPR/Cas subtypes exist in prokaryotic genomes. *PLoS Computational Biology*, 2005, **1**(6): e60
 - [23] Garneau J E, Dupuis M E, Villion M, *et al.* The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature*, 2010, **468**(7320): 67-71
 - [24] Sapranaukas R, Gasiunas G, Fremaux C, *et al.* The *Streptococcus thermophilus* CRISPR/Cas system provides immunity in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Research*, 2011, **39**(21): 9275-9282
 - [25] Gasiunas G, Barrangou R, Horvath P, *et al.* Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, **109**(39): E2579-E2586
 - [26] Jinek M, Jiang F, Taylor D W, *et al.* Structures of Cas9 endonucleases reveal RNA-mediated conformational activation. *Science*, 2014, **343**(6176): 1247997
 - [27] Jiang F, Taylor D W, Chen J S, *et al.* Structures of a CRISPR-Cas9 R-loop complex primed for DNA cleavage. *Science*, 2016, **351**(6275): 867-871
 - [28] Jiang F, Zhou K, Ma L, *et al.* STRUCTURAL BIOLOGY. A Cas9-guide RNA complex preorganized for target DNA recognition. *Science*, 2015, **348**(6242): 1477-1481
 - [29] Sun W, Yang J, Cheng Z, *et al.* Structures of neisseria meningitidis Cas9 complexes in catalytically poised and anti-CRISPR-inhibited states. *Molecular Cell*, 2019, **76**(6): 938-952 e5
 - [30] Hirano H, Gootenberg J S, Horii T, *et al.* Structure and engineering of *francisella novicida* Cas9. *Cell*, 2016, **164**(5): 950-961
 - [31] Zhu H, Li C, Gao C. Applications of CRISPR-Cas in agriculture and plant biotechnology. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2020, **21**: 661-677
 - [32] Doudna J A. The promise and challenge of therapeutic genome editing. *Nature*, 2020, **578**(7794): 229-236
 - [33] Cyranoski D. CRISPR gene-editing tested in a person for the first time. *Nature*, 2016, **539**(7630): 479
 - [34] Lu Y, Xue J, Deng T, *et al.* Safety and feasibility of CRISPR-edited T cells in patients with refractory non-small-cell lung cancer. *Nature Medicine*, 2020, **26**(5): 732-740
 - [35] Swarts D C, Jinek M. Cas9 versus Cas12a/Cpf1: structure-function comparisons and implications for genome editing. *Wiley Interdisciplinary Reviews RNA*, **2018**: e1481
 - [36] Liu L, Li X, Wang J, *et al.* Two distant catalytic sites are responsible for C2c2 RNase activities. *Cell*, 2017, **168**(1-2): 121-134 e12
 - [37] Gootenberg J S, Abudayyeh O O, Lee J W, *et al.* Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2. *Science*, 2017, **356**(6336): 438-442
 - [38] Patchsung M, Jantarug K, Pattama A, *et al.* Clinical validation of a Cas13-based assay for the detection of SARS-CoV-2 RNA. *Nature Biomedical Engineering*, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41551-020-00603-x>

Chemistry Nobel Honors CRISPR–Cas9*

YOU Li-Lan^{1,2)}, SUN Wei¹⁾, YANG Xiao-Qi^{1,2)}, WANG Yan-Li¹⁾**

¹⁾*Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China;*

²⁾*University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)*

Abstract The Nobel Prize in Chemistry 2020 was awarded jointly to Emmanuelle Charpentier and Jennifer A. Doudna “for the development of CRISPR genome editing tool”. They have discovered the sharpest tools for gene editing: the CRISPR/Cas9 genetic scissors, which have revolutionary impact on life sciences. The CRISPR system is an adaptive immune system in prokaryotes. Cas9, an effector protein of type II CRISPR-Cas system, functions as a dual-RNA-guided DNA endonuclease, which is able to cleave any dsDNA generating dsDNA break. The CRISPR-Cas9 has been widely used in gene editing, due to its simplicity, high efficiency and low price. This paper introduces the research findings of 2020 Chemistry Nobel Prize winners, summarizes the discovery process of CRISPR system and the activity and application of CRISPR-Cas9.

Key words Nobel Prize in Chemistry, CRISPR-Cas9, gene-editing

DOI: 10.16476/j.pibb.2020.0395

* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (31930065) and the Chinese Academy of Sciences (QYZDY-SSW-SMC021).

** Corresponding author.

Tel: 86-10-64881316, E-mail: ylwang@ibp.ac.cn

Received: October 30, 2020 Accepted: November 9, 2020