

CRISPR 家族新成员: CRISPR-Cpf1*

周晨晨 刘写写 谢海华 谷峰**

(温州医科大学眼视光学院 眼视光学和视觉科学国家重点实验室, 温州 325027)

摘要 近年来, 基因组编辑技术得到了飞速发展, 该技术正在基础生物学研究、医学、生物技术等多个领域引起一场新的变革。Cpf1, 作为 CRISPR 系统的新成员, 极大地扩展了基因编辑靶位点的选择范围, 同时其介导的多基因编辑具有明显的优势。另外, 较短的 crRNA 序列也使 Cpf1 更容易产业化。本文将从 Cpf1 的结构和编辑特点、应用进展、目前面临的问题及展望等方面进行介绍和总结。

关键词 基因组编辑技术, 成簇规律间隔短回文重复 (clustered regulatory interspaced short palindromic repeats, CRISPRs), CRISPR-Cpf1

学科分类号 Q812, Q3-3

DOI: 10.16476/j.pibb.2018.0146

基因组编辑技术是指在细胞基因组靶位点引入核酸序列变化的一类技术, 包括碱基的插入、缺失、替换等, 进而达到编辑基因的目的^[1-2]。为此, 以锌指核酸酶 (zinc-finger nucleases, ZFNs)、转录激活子样效应因子核酸酶 (transcription activator-like effector nucleases, TALENs) 和成簇规律间隔短回文重复 (clustered regulatory interspaced short palindromic repeats, CRISPRs) 系统为代表的基因组编辑工具应运而生, 并在动植物和微生物基因组改造、表观遗传、疾病治疗等领域中得到广泛应用^[3-4]。其中, CRISPR-Cas 系统是部分细菌和古细菌中的一种免疫防御系统, 而 CRISPR-Cas9 基因组编辑工具自诞生以来因便捷的设计、高效的基因组编辑活性、较低的成本, 成为生命科学领域最有前景的技术。随着 CRISPR-Cas9 系统不断被改进, 对应序列的选择和保真性都得到不同程度提高, 但是全基因组测序结果显示脱靶问题仍存在^[5-7]。这一特点的两面性体现为: 在跟进病毒进化和加强防御功能方面, Cas9 的脱靶现象优势明显(即能够识别并切割与靶 DNA 序列相似的位点); 而在对人类疾病进行基因治疗时, 脱靶问题则影响甚大, 极大地限制了基因组编辑技术在人类中的应用^[8]。

2015 年 9 月, 张锋团队^[9]为 CRISPR 家族增添

一个新成员——Cpf1, 属于 CRISPR-Cas 系统 2 类 V 型。该系统不仅拥有较好的靶向切割 DNA 活性, 同时还展现出显著区别于 CRISPR-Cas9 的编辑特点^[9-15]。国际上广泛使用的是氨基酸球菌属 Cpf1 (*Acidaminococcus* Cpf1, AsCpf1) 和毛螺菌科 Cpf1 (*Lachnospiraceae* Cpf1, LbCpf1), 但是由于它们识别 5'-TTTN-3' 的前间区序列邻近基序 (protospacer adjacent motif, PAM) 的灵活性不足, 限制了其在基因编辑领域的应用^[9, 16-21]。笔者团队^[22]则首次提出新凶手弗兰西斯菌来源的 Cpf1 (*Francisella novicida* Cpf1, FnCpf1) 在人类细胞中存在颇为可观的切割效率, 并系统测定了相关参数, 确定 PAM 的序列扩展为 5'-KYTV-3' (K 指代 T、G; Y 指代 C、T; V 指代 A、C、G)。因此, Cpf1 将作为“新型基因组编辑工具”与 Cas9 家族一起为科学研究和疾病治疗的开展提供更为广阔的发展空间^[15, 21, 23-30]。本文将从 Cpf1 的结构、作用原理和

* 国家自然科学基金(81201181)和浙江省科技计划(2017C37176)资助项目。

** 通讯联系人。

Tel: 0577-88831367, E-mail: gufenguw@gmail.com

收稿日期: 2018-04-27, 接受日期: 2018-05-14

编辑特点、应用进展、目前面临的问题及展望等方面进行详细阐述。

1 Cpf1 系统结构、作用原理和编辑特点

1.1 CRISPR-Cpf1 系统结构和作用原理

研究表明, CRISPR-Cpf1 不仅对 DNA 具有活性, 而且对 RNA 同样有较高的活性^[9, 22, 31-32]。相比于最常用的 CRISPR-SpCas9(*Streptococcus pyogenes* Cas9), Cpf1 分子质量较小, 仅约 1 200~1 300 个

氨基酸^[9]。同时, 其构成也与最常用的 CRISPR-SpCas9 不一样。区别在于 Cpf1 系统包括 Cpf1 蛋白和 CRISPR RNA(crRNA), 而不含有反式激活 CRISPR RNA (trans activating CRISPR RNA, tracrRNA) 序列, 从而省去了 tracrRNA 催化 CRISPR RNA 前体(pre-crRNA)成熟的步骤^[33-36]。因此, CRISPR-Cpf1 与 CRISPR-Cas9 系统在很多方面都有所不同(表 1, 这里以最常用的 CRISPR-SpCas9 为代表进行比较)。

Table 1 The comparison between Cpf1 and SpCas9
表 1 Cpf1 和 SpCas9 的比较

	Cpf1	SpCas9
编辑效率	低	高
脱靶率	低	高
蛋白质分子质量	小	大
酶活性	DNA 和 RNA 内切酶活性	DNA 内切酶活性
切割后形成末端	黏性末端	平末端
pre-crRNA 加工方式	Cpf1 蛋白加工	RNase III 加工
PAM	5'-TTTN-3'或 5'-KYTV-3'	5'-NGG-3'
剪切位置	PAM 下游靶 DNA 链 23 位和非靶链 18 位	PAM 上游 3 位核苷酸外侧
多基因编辑效率	高	低

Cpf1 含有切割非靶向 DNA 链的 RuvC 核酸酶结构域, 并以 Nuc 结构域代替了 Cas9 切割靶向 DNA 链的 HNH 核酸酶结构域^[14, 34-35]。研究人员指出, RuvC 剪切非靶向 DNA 链是 Nuc 剪切靶向 DNA 链的先决条件。CRISPR-Cpf1 系统是目前发现的最简单的细菌免疫系统。Cpf1 可以对 CRISPR DNA 转录形成的 pre-crRNA 进行剪切, 使之成熟为功能性的 crRNA, 随后 Cpf1 由 crRNA 引导, 与

特定 PAM 附近的 DNA 靶序列相结合, 催化 DNA 双链断裂(double strand breaks, DSBs), (图 1, 该图参考 SpCas9 和 FnCpf1 的结构图^[14, 35]), 激活细胞内的非同源末端连接 (non-homologous end joining, NHEJ) 或同源重组 (homologous recombination, HR)修复机制, 实现基因的敲除、插入、替换等编辑操作^[14, 16, 21-22, 35, 37-38]。

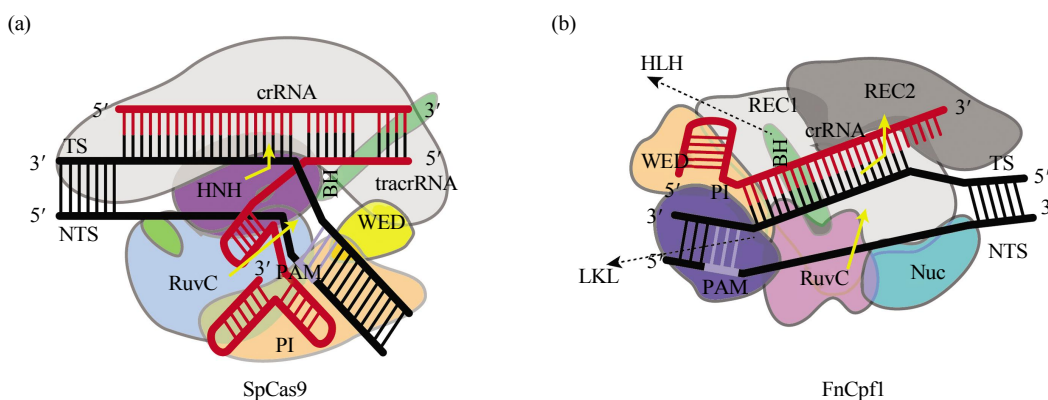


Fig. 1 Comparison of the structures and domains between SpCas9(a) and FnCpf1(b)

图 1 SpCas9(a)和 FnCpf1 (b)结构组成和核酸酶结构域比较示意图

SpCas9 和 FnCpf1 都含有切割非靶向 DNA 链的核酸酶结构域 RuvC。(a) SpCas9 切割靶向 DNA 链的核酸酶结构域为 HNH, 成熟的 crRNA 由 tracrRNA 催化 pre-crRNA 形成。(b) FnCpf1 切割靶向 DNA 链的核酸酶结构域为 Nuc, 成熟的 crRNA 由 Cpf1 蛋白直接催化 pre-crRNA 形成。

为了进一步探究 Cpf1 识别和剪切 RNA 以及 DNA 的作用原理, 研究人员从相关的结构水平对其进行解析, 并比较其与 Cas9 作用机制的异同. 黄志伟团队^[34]解析了 LbCpf1-crRNA 二元复合物的晶体结构, 指出该复合物为二裂片结构, 外观呈三角形, 复合物中心有一带正电荷的通道. 与 sgRNA 以伸展的构象和 Cas9 结合的方式不同, crRNA 是一种高度扭曲的构象, 一旦被 Cpf1 蛋白中部的寡聚核苷酸结合结构域 (oligonucleotide binding domain, OBD) 识别, 即可诱导构象松散的 Cpf1 呈现紧凑的三角形结构. 此时, 蛋白质中心的正电荷通道能够接受 crRNA 和靶序列形成的异源双链, 从而推进下一步反应. 研究人员推测来自 OBD 的环状螺旋域 (looped-out helical domain, LHD) 结构域与识别双链 DNA 底物的 PAM 序列有关. 多个团队在对 AsCpf1-crRNA-DNA 三元复合物晶体结构的解析中进一步发现, crRNA 上游靠近 PAM 序列的“种子序列” (seed sequence) 可能与 Cpf1 的脱靶相关^[31, 35]. 在 Cpf1 结合靶 DNA 的过程中, 种子序列经历了从无序到“A型”结构的构象变化. 在该过程中, PAM 互作结构域发生“开→关”的构象改变, 以容纳有序的 A 型种子序列和靶 DNA, 并在正电荷通道内形成异源双链核酸分子. Montoya 团队^[44]则利用一种被称为 X 射线衍射晶体分析技术成功地可视化观察和描述了 FnCpf1 的工作方式, 并确定了 FnCpf1 在对靶向 DNA 切割之后形成的三链 R-loop (“R”型茎环) 结构, 这些结构的解析对理解 FnCpf1 精准地识别靶 DNA 序列的分子机制具有重要意义.

最近, 相关研究人员发表了 Cpf1 系统进行有效基因组编辑的实验流程(protocol), 并说明了如何能够设计工程化的 CRISPR-Cpf1 组件, 包括引导核酸内切酶的 crRNA 和表达 Cpf1 蛋白的 mRNAs, 还描述了使用 T7 核酸内切酶 I (T7 endonuclease I, T7E I) 和靶向深度测序去量化在人细胞系中的基因组编辑活性和脱靶效应^[39].

1.2 CRISPR-Cpf1 编辑特点

Cpf1 与 Cas9 不同的作用机制和结构特点令其在进行基因编辑时不仅具有较好的切割活性和较高的特异性, 更使得 Cpf1 在多基因编辑方面具有明显的优势.

1.2.1 CRISPR-Cpf1 切割靶标 DNA 的位点

不同于 Cas9 利用 RuvC 和 HNH 结构域在种子区域进行平末端(blunt ends)切割, Cpf1 使用 RuvC

和 Nuc 结构域在种子区域外靶 DNA 互补链的 23 位和非互补链的 18 位, 产生交错切割的产物即产生黏性末端(sticky ends)^[34]. 赵国屏团队^[40]补充了 Cpf1 的切割特点, 除了切割靶标 DNA 互补链的 23 位, Cpf1 能在非互补链的 14 位到 18 位, 形成多个切割位点. 除此之外, 该研究还发现 Cpf1 的切割位点受到间隔区(spacer)序列长度的影响. 当 spacer 序列长度大于等于 20 的时候, 除了切割靶标 DNA 互补链的 23 位外, Cpf1 倾向于切割非互补链的 18 位, 而当 spacer 序列长度小于 20 的时候, Cpf1 倾向于切割非互补链的 14 位. 这一特性便于新 DNA 序列的插入并且使得 Cpf1 能够更高效地激活 HR^[38].

1.2.2 CRISPR-Cpf1 对 PAM 的选择范围

大多数 Cas9 蛋白偏好于富含 G 的 PAM 序列, 而 5'-NGG-3' 的 PAM 对 CRISPR-Cas 的靶序列的选择产生了很大的限制. 相比之下, 16 种 Cpf1 家族蛋白质均显示出对富含胸腺嘧啶的 PAM 选择性^[9, 41-42], 笔者团队^[22]报道 FnCpf1 识别的 PAM 序列可扩展为 5'-KYTV-3', 因此 Cpf1 的加入无疑扩展了基因组编辑的选择范围, 有助于研究人员对富含嘧啶的 PAM 的靶位点进行编辑. 最近 David R. Liu 团队^[6]设计出一种称为 xCas9 的新酶进一步扩展了靶位点的可选区域, 若能进行两者在活性和特异性上的平行比较实验, 将极大丰富对 Cpf1 的全面认识.

1.2.3 CRISPR-Cpf1 的特异性

Cpf1 不仅具有良好的切割活性, 还表现出高度的特异性. 在体外实验中, Jin-Soo Kim 团队^[43]利用 Digenome-seq 技术, 对经不同的基因编辑酶作用后的全基因组进行分析时得出结论: 对于同一个 crRNA, LbCpf1 和 AsCpf1 分别有 6 个、12 个脱靶位点, 其数量远少于 Cas9 造成的脱靶(> 90 个). 对 crRNA 的 3'端 4~6 个碱基, Cpf1 可以接受 1~2 个碱基与靶序列不匹配; 对其余区域的碱基替换, 则是零容忍. J. Keith Joung 等^[44]利用 GUIDE-seq 分析比较了 AsCpf1 和 LbCpf1 与 SpCas9 在体内的脱靶情况. Cpf1 在绝大多数脱靶位点中, 发生插入缺失(Indel)的频率低于 0.1%. 可以说, 与 SpCas9 相比, Cpf1 几乎没有脱靶, 这对基因组编辑尤其是基因治疗是巨大的福音^[21, 44-45]. 同样地, 通过在人类全基因组范围内寻找潜在的脱靶位点并进行脱靶检测, 笔者团队^[22]发现 FnCpf1 在对人类基因组编辑的过程中有较高的保真性.

1.2.4 CRISPR-Cpf1 多基因编辑

Cpf1 丰富了 CRISPR 家族, 独特的编辑特性也使 Cpf1 被认为是对目前的 Cas9 技术特别重要的补充. 在基因组功能研究、遗传育种等过程中, 通常需要多基因突变体, 因此利用 CRISPR 技术进行多基因编辑显得十分重要. 虽然也有利用 Cas9 进行多基因编辑的报道, 如 RNase III 和 Cas9 共表达策略以及转运 RNA(tRNA)和导向 RNA 结合的策略^[46-48], 但是这些策略无论是在设计还是成本方面仍然不方便或者不经济, 大大限制了 Cas9 在多基因编辑方面的应用. 而 Cpf1 弥补了 Cas9 在多基因编辑上的缺点. Cpf1 只需要 crRNA 就可以完成基因组编辑, 且 Cpf1 能够独立介导 pre-crRNA 加工而不需要其他分子的介入, 并且加工 RNA 的能力独立于 DNA 剪切的功能^[9]. 利用 Cpf1 这种独特的特性, 张峰团队定制了 CRISPR 阵列, 在 HEK-293T 细胞中实现了同时编辑 *DNMT1*, *EMX1*, *VEGFA*, *GRIN2b* 等 4 个基因, 在小鼠大脑中同时编辑 *DRD1*, *MECP2* 和 *NLGN33* 等 3 个基因^[15]. 笔者团队利用 FnCpf1 在人类细胞中实现了多达 5 个基因的编辑(稿件已被接收). 由于单个 crRNA 可靶向编辑多个基因, 而且 crRNA 较短, 在工业化合成方面具有明显的优势, 这为 Cpf1 今后介导大规模基因组编辑奠定了基础.

2 CRISPR-Cpf1 应用进展

尽管 CRISPR/Cas9 已经在遗传育种、基因治疗等领域得到了广泛应用, 但是 Cpf1 诸多不同的基因编辑特点有望成为与 Cas9 功能互补的新型基因编辑工具. 研究人员利用 Cpf1 在微生物、植物、哺乳动物方面做了大量探索.

2.1 Cpf1 在微生物中的应用

谷氨酸棒杆菌是目前广泛应用的氨基酸生产菌株, 其生产氨基酸的种类和数量由培养基中的碳氮比决定, 但却很难通过基因工程来控制^[49-50]. 杨晟团队^[27]结合单链重组系统, 利用 FnCpf1 建立了抗 L-脯氨酸反馈抑制的高产菌株, 菌株改造效率最高达到 100%. 利用该重组系统, 研究人员将原先每周的基因组编辑操作缩短到 3 天. 同时, 研究人员发现最为常用的 SpCas9 表现出对谷氨酸棒杆菌的毒性, 而 FnCpf1 与谷氨酸棒杆菌适配. Himadri B. Pakrasi 团队^[51]在对蓝细菌的基因编辑研究中也发现了 FnCpf1 的毒性低. 以往的相关实验显示, 对蓝细菌的基因编辑主要依靠自发性的

HR, 机制单一、效率低下^[52-55]. 而 Himadri B. Pakrasi 团队^[51]利用 FnCpf1 对鱼腥藻等多种不同类型的蓝细菌基因组成功地进行了基因的敲除、插入和点突变. 这为 FnCpf1 基因组编辑系统在未来工程菌的改造提供了很好的借鉴意义.

2.2 Cpf1 在植物中的应用

为了证实 Cpf1 能够在植物中起到基因编辑的作用, Sang-Gyu Kim 团队^[56]以核糖核蛋白复合物(ribonucleoprotein complex, RNP)的形式利用 AsCpf1 和 LbCpf1 对大豆的 *FAD2* 基因和烟草的 *AOC* 基因进行编辑. Cpf1 不仅产生更加丰富的缺失类型, 还表现出更加精准的靶向特异性, 即在各个潜在的脱靶位点都检测不到明显的脱靶现象. 朱健康团队^[57]在水稻的 3 个基因中选取了 6 个位点对 FnCpf1 和 LbCpf1 的活性进行比较, 发现两种 Cpf1 都能在水稻中引起有效的突变, 且 LbCpf1 的活性高于 FnCpf1. 该团队进一步针对 *OsRLK* 和 *OsBEL* 基因分别设计了 4 个 crRNA 单元组成的 crRNA 矩阵序列, 各位点的敲除效率均在 40%~75%之间. 王克剑团队^[58]也利用 Cpf1 系统多基因编辑的优点成功对水稻进行了多基因的编辑. Cpf1 系统在水稻中简单、高效地多基因定点编辑, 拓展了 CRISPR 系统在植物中的应用, 为水稻基因组定点编辑提供了一个新利器.

2.3 Cpf1 在哺乳动物中的应用

在哺乳动物方面, Young Hoon Sung 团队^[59]分别利用电穿孔和显微注射的策略递送 Cpf1 至小鼠受精卵的细胞质中, 最后成功在小鼠胚胎中实现 7.7%的敲除效率, 且在 17 个潜在脱靶位点处并没有发现脱靶现象. Eric N.Olson 团队^[15]首次报道了利用 CRISPR-Cpf1 在人类细胞和疾病模型小鼠中实现高效的基因修复. 研究人员选择了杜氏肌营养不良(Duchenne muscular dystrophy, DMD)小鼠模型及 DMD 患者来源的多能诱导干细胞(iPSCs)作为研究对象, 将 Cpf1 mRNA 及靶向 *MDX* 基因的 crRNA 显微注射入小鼠受精卵, 同时导入能够介导同源重组修复的单链 DNA 模板(ssDNA). 结果显示, 利用 Cpf1 介导的同源重组修复效率最高可达 50%, 突变基因被修复的小鼠均未出现肌肉萎缩症相关病症, 且检测发现其均可正常表达 mdx 蛋白. J Keith Joung 团队^[60]则利用 Cpf1 系统具有多基因编辑的优点, 将其改造成能同时转录激活多个靶位点的转录调节工具. 相比于对照组, 研究人员在转入 Cpf1 的 U2OS 细胞中观察到 *HBB* 和

NPY1R 基因的高表达。

最近, 赖良学团队^[61]在线发表了应用 Cpf1 系统获得新的基因编辑研究成果, 开创性地利用哺乳动物转运 RNA(tRNA)内源剪切机制, 对 Cpf1 系统的 crRNA 进行了改造, 极大地提高了 Cpf1 在细胞系和动物胚胎中的基因编辑效率。在这项研究中, 研究人员应用经改造的新型 Cpf1 基因编辑系统, 对家兔的 *WRN* 基因进行了编辑, 获得了世界首例家兔成年早衰模型, 还通过 Cpf1 介导的体细胞基因编辑与细胞核移植技术, 成功获得了经点突变 *PLN* 基因导致的扩张型心肌病猪模型以及 *DMD* 基因敲除形成的杜氏肌营养不良症猪模型, 为研发相应疾病的治疗手段提供了理想的大动物模型。

2.4 基于 CRISPR-Cpf1 的新型检测工具

2018 年 2 月, Jennifer A. Doudna 团队^[24]开发了基于 Cpf1 的新型核酸突变检测技术。研究团队发现竟然 LbCpf1 也具有类似于 Cas13a 的“collateral effect”效应^[62]: LbCpf1 与 crRNA 结合之后, 在切割目标双链 DNA 同时, 它还会对单链 DNA(ssDNA)任意切割。基于这一特性, 他们结合了等温扩增技术将极低浓度的目的片段常温扩增至较高水平^[62], 开发出被称为“DETECTR”(DNA endonuclease targeted CRISPR trans reporter)的诊断系统, 可对血液、唾液、尿液等样本中的少量 DNA 进行快速、简便地即时分析。研究人员对包含人乳头瘤病毒(human papilloma virus, HPV)的患者样本运用 DETECTR 进行了测试。结果显示, 可在感染多种不同 HPV 类型的样本中准确测定出高风险的 HPV 类型: HPV16 和 HPV18, 确定了 DETECTR 在诊断方面具有相当高的灵敏度和非常大的实际应用价值。

张锋教授团队在原 SHERLOCK(specific high sensitivity enzymatic reporter unlocking)技术的基础上推出了 SHERLOCKv2, 打造出以 Cas13/Csm6 和 Cas12a(Cpf1)/Csm6 为代表的具有更多种检测并行、更低底物检测浓度、更强灵敏度和更简单操作应用四大优势的超级检测系统^[63]。

虽然已有报道将部分失活的 Cas 核酸酶与载脂蛋白 B mRNA 编辑酶催化多肽(apolipoprotein B mRNA-editing enzymecatalytic-polypeptide, APOBEC)、活化诱导胞嘧啶脱氨酶(activation-induced cytidine deaminase, AID)或 ecTadA(*Escherichia coli* TadA)融合构建出的碱基编辑器能够实现 G•C → A•T 或 A•T → G•C 的碱基转换, 但是其使用范围受到

PAM 序列的限制^[64-68]。陈佳团队^[69]借鉴已有的 CRISPR 基因编辑技术, 开发出新型单碱基编辑系统(Cpf1-BE), 该系统能够在 Cas9 难以识别的 A/T 富集 PAM 区域进行单碱基编辑。这两项技术相辅相成, 有效地扩大了单碱基编辑技术的功能区域, 展现出基因编辑更广阔的前景。

3 CRISPR-Cpf1 的缺陷与展望

CRISPR-Cpf1 的 PAM 虽然区别于大多数的 CRISPR-Cas9, 呈 5'端的富含 T 序列, 但是相对固定的 PAM 序列要求同样限制了 Cpf1 在实际应用中的靶标选择, 某些基因的某些位点会成为阻碍其发挥效应的“盲点”。借鉴前人对 SpCas9 和 SaCas9 PI(PAM-interacting)结构域的改造, 科学家可以在已有晶体结构的基础上对 Cpf1 蛋白进行改造、突变, 以此发掘出可兼容多类型 PAM 的 Cpf1 蛋白变体, 而目前已经有相关 AsCpf1 突变体的报道^[70]。

在将 Cpf1 推向临床应用的过程中, 有许许多多的问题需要解决, 而脱靶问题就是其中最重要的问题。虽然有报道 Cpf1 保真性好, 但这并不代表 Cpf1 不存在脱靶。在基因治疗的过程中, 任何一个脱靶基因编辑都有可能造成临床副作用。科研工作者能否参考改进 SpCas9 的手段通过生物工程方法来提高 FnCpf1 的保真性? 笔者实验室最新的结果显示, 目前 FnCpf1 的活性与 SaCas9、SpCas9 相比仍然不高^[71], 是否有方法提高其活性, 如何更加精确地检测脱靶仍有待研究。

参 考 文 献

- [1] Chamberlain J R, Schwarze U, Wang P R, *et al.* Gene targeting in stem cells from individuals with osteogenesis imperfecta. *Science*, 2004, **303**(5661): 1198-1201
- [2] Fruman D A, O'brien S. Cancer: a targeted treatment with off-target risks. *Nature*, 2017, **542**(7642): 424-425
- [3] Gaj T, Ojala D S, Ekman F K, *et al.* *In vivo* genome editing improves motor function and extends survival in a mouse model of ALS. *Sci Adv*, 2017, **3**(12): eaar3952
- [4] Chandrasegaran S. Recent advances in the use of ZFN-mediated gene editing for human gene therapy. *Cell & Gene Therapy Insights*, 2017, **3**(1): 33-41
- [5] Shen B, Zhang W, Zhang J, *et al.* Efficient genome modification by CRISPR-Cas9 nickase with minimal off-target effects. *Nature Methods*, 2014, **11**(4): 399-402
- [6] Hu J H, Miller S M, Geurts M H, *et al.* Evolved Cas9 variants with broad PAM compatibility and high DNA specificity. *Nature*, 2018, **556**(7699): 57-63

- [7] Casini A, Olivieri M, Petris G, *et al.* A highly specific SpCas9 variant is identified by *in vivo* screening in yeast. *Nature Biotechnology*, 2018, **36**(3): 265–271
- [8] Klein M, Eslami-Mossallam B, Arroyo D G, *et al.* Hybridization kinetics explains CRISPR-Cas off-targeting rules. *Cell Reports*, 2018, **22**(6): 1413–1423
- [9] 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
- [10] Bayat H, Modarresi M H, Rahimpour A. The conspicuity of CRISPR-Cpf1 system as a significant breakthrough in genome editing. *Current Microbiology*, 2018, **75**(1): 107–115
- [11] Kim H K, Min S, Song M, *et al.* Deep learning improves prediction of CRISPR-Cpf1 guide RNA activity. *Nature Biotechnology*, 2018, **36**(3): 239–241
- [12] Kweon J, Jang A H, Kim D E, *et al.* Fusion guide RNAs for orthogonal gene manipulation with Cas9 and Cpf1. *Nature Communications*, 2017, **8**(1): 1723
- [13] Park J, Bae S. Cpf1-database: web-based genome-wide guide RNA library design for gene knockout screens using CRISPR-Cpf1. *Bioinformatics*, 2018, **34**(6): 1077–1079
- [14] Stella S, Alcon P, Montoya G. Structure of the Cpf1 endonuclease R-loop complex after target DNA cleavage. *Nature*, 2017, **546**(7659): 559–563
- [15] Zetsche B, Heidenreich M, Mohanraju P, *et al.* Multiplex gene editing by CRISPR-Cpf1 using a single crRNA array. *Nature Biotechnology*, 2017, **35**(1): 31–34
- [16] Tang X, Lowder L G, Zhang T, *et al.* A CRISPR-Cpf1 system for efficient genome editing and transcriptional repression in plants. *Nat Plants*, 2017, **3**: 17018
- [17] Endo A, Masafumi M, Kaya H, *et al.* Efficient targeted mutagenesis of rice and tobacco genomes using Cpf1 from *Francisella novicida*. *Scientific Reports*, 2016, **6**: 38169
- [18] Nishimasu H, Yamano T, Gao L, *et al.* Structural basis for the altered PAM recognition by engineered CRISPR-Cpf1. *Molecular Cell*, 2017, **67**(1): 139–147.e2
- [19] Gao L, Cox D B T, Yan W X, *et al.* Engineered Cpf1 variants with altered PAM specificities. *Nature Biotechnology*, 2017, **35** (8): 789–792
- [20] Ma X, Chen X, Jin Y, *et al.* Small molecules promote CRISPR-Cpf1-mediated genome editing in human pluripotent stem cells. *Nature Communications*, 2018, **9**(1): 1303
- [21] Moreno-Mateos M A, Fernandez J P, Rouet R, *et al.* CRISPR-Cpf1 mediates efficient homology-directed repair and temperature-controlled genome editing. *Nature Communications*, 2017, **8** (1): 2024
- [22] Tu M, Lin L, Cheng Y, *et al.* A 'new lease of life': FnCpf1 possesses DNA cleavage activity for genome editing in human cells. *Nucleic Acids Research*, 2017, **45**(19): 11295–11304
- [23] Ding D, Chen K, Chen Y, *et al.* Engineering introns to express RNA guides for Cas9- and Cpf1-mediated multiplex genome editing. *Molecular Plant*, 2018, **11**(4): 542–552
- [24] Chen J S, Ma E, Harrington L B, *et al.* CRISPR-Cas12a target binding unleashes indiscriminate single-stranded DNase activity. *Science*, 2018, **360**(6387): 436–439
- [25] Wang M, Mao Y, Lu Y, *et al.* Multiplex gene editing in rice with simplified CRISPR-Cpf1 and CRISPR-Cas9 systems. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2018 [Epub ahead of print] (DOI: 10.1111/jipb.12667)
- [26] Zhong G, Wang H, Li Y, *et al.* Cpf1 proteins excise CRISPR RNAs from mRNA transcripts in mammalian cells. *Nature Chemical Biology*, 2017, **13**(8): 839–841
- [27] Jiang Y, Qian F, Yang J, *et al.* CRISPR-Cpf1 assisted genome editing of *Corynebacterium glutamicum*. *Nature Communications*, 2017, **8**: 15179–15189
- [28] Verwaal R, Buiting-Wiessenhaan N, Dalhuijsen S, *et al.* CRISPR/Cpf1 enables fast and simple genome editing of *Saccharomyces Cerevisiae*. *Yeast*, 2018, **35**(2): 201–211
- [29] Zaidi S S-E A, Mahfouz M M, Mansoor S. CRISPR-Cpf1: a new tool for plant genome editing. *Trends Plant Sci*, 2017, **22** (7): 550–553
- [30] Hur J K, Kim K, Been K W, *et al.* Targeted mutagenesis in mice by electroporation of Cpf1 ribonucleoproteins. *Nature Biotechnology*, 2016, **34**(8): 807–808
- [31] Gao P, Yang H, Rajashankar K R, *et al.* Type V CRISPR-Cas Cpf1 endonuclease employs a unique mechanism for crRNA-mediated target DNA recognition. *Cell Res*, 2016, **26**(8): 901–913
- [32] Fonfara I, Richter H, Bratovic M, *et al.* The CRISPR-associated DNA-cleaving enzyme Cpf1 also processes precursor CRISPR RNA. *Nature*, 2016, **532**(7600): 517–521
- [33] Alcon P, Montoya G, Stella S. Assembly of *Francisella novicida* Cpf1 endonuclease in complex with guide RNA and target DNA. *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun*, 2017, **73**(Pt7): 409–415
- [34] Dong D, Ren K, Qiu X, *et al.* The crystal structure of Cpf1 in complex with CRISPR RNA. *Nature*, 2016, **532**(7600): 522–526
- [35] Yamano T, Nishimasu H, Zetsche B, *et al.* Crystal structure of Cpf1 in complex with guide RNA and target DNA. *Cell*, 2016, **165**(4): 949–962
- [36] Yamano T, Zetsche B, Ishitani R, *et al.* Structural basis for the canonical and non-canonical PAM recognition by CRISPR-Cpf1. *Molecular Cell*, 2017, **67**(4): 633–645.e3
- [37] Song M, Ramakrishna S. Genome editing in stem cells for disease therapeutics. *Molecular Biotechnology*, 2018, **60**(4): 329–338
- [38] Toth E, Weinhardt N, Bencsura P, *et al.* Cpf1 nucleases demonstrate robust activity to induce DNA modification by exploiting homology directed repair pathways in mammalian cells. *Biol Direct*, 2016, **11**: 46–59
- [39] Li B, Zeng C, Dong Y. Design and assessment of engineered CRISPR-Cpf1 and its use for genome editing. *Nature Protocols*, 2018, **13**(5): 899–914
- [40] Lei C, Li S Y, Liu J K, *et al.* The CCTL (Cpf1-assisted Cutting and Taq DNA ligase-assisted Ligation) method for efficient editing of large DNA constructs *in vitro*. *Nucleic Acids Research*, 2017, **45**(9): e74

- [41] Kim H K, Song M, Lee J, *et al.* *In vivo* high-throughput profiling of CRISPR-Cpf1 activity. *Nature Methods*, 2017, **14**(2): 153–159
- [42] Fagerlund R D, Staals R H, Fineran P C. The Cpf1 CRISPR-Cas protein expands genome-editing tools. *Genome Biology*, 2015, **16**: 251
- [43] Kim D, Kim J, Hur J K, *et al.* Genome-wide analysis reveals specificities of Cpf1 endonucleases in human cells. *Nature Biotechnology*, 2016, **34**(8): 863–868
- [44] Kleinstiver B P, Tsai S Q, Prew M S, *et al.* Genome-wide specificities of CRISPR-Cas Cpf1 nucleases in human cells. *Nature Biotechnology*, 2016, **34**(8): 869–874
- [45] Liu Y, Han J, Chen Z, *et al.* Engineering cell signaling using tunable CRISPR-Cpf1-based transcription factors. *Nature Communications*, 2017, **8**(1): 2095
- [46] Liu X, Zhang Y, Cheng C, *et al.* CRISPR-Cas9-mediated multiplex gene editing in CAR-T cells. *Cell Res*, 2017, **27**(1): 154–157
- [47] Ma S, Chang J, Wang X, *et al.* CRISPR/Cas9 mediated multiplex genome editing and heritable mutagenesis of *BmKu70* in *Bombyx mori*. *Scientific Reports*, 2014, **4**: 4489
- [48] Xing H L, Dong L, Wang Z P, *et al.* A CRISPR/Cas9 toolkit for multiplex genome editing in plants. *BMC Plant Biology*, 2014, **14**: 327
- [49] Okino S, Noburyu R, Suda M, *et al.* An efficient succinic acid production process in a metabolically engineered *Corynebacterium glutamicum* strain. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2008, **81**(3): 459–464
- [50] Vertes A A, Inui M, Yukawa H. Postgenomic approaches to using corynebacteria as biocatalysts. *Annual Review of Microbiology*, 2012, **66**: 521–550
- [51] Ungerer J, Pakrasi H B. Cpf1 is a versatile tool for CRISPR genome editing across diverse species of cyanobacteria. *Scientific Reports*, 2016, **6**: 39681
- [52] Zhou J, Zhu T, Cai Z, *et al.* From cyanochemicals to cyanofactories: a review and perspective. *Microbial Cell Factories*, 2016, **15**: 2
- [53] Zhou J, Zhang F, Meng H, *et al.* Introducing extra NADPH consumption ability significantly increases the photosynthetic efficiency and biomass production of cyanobacteria. *Metabolic Engineering*, 2016, **38**: 217–227
- [54] Li Y, Lin Z, Huang C, *et al.* Metabolic engineering of *Escherichia coli* using CRISPR-Cas9 mediated genome editing. *Metabolic Engineering*, 2015, **31**: 13–21
- [55] Horwitz A A, Walter J M, Schubert M G, *et al.* Efficient multiplexed integration of synergistic alleles and metabolic pathways in yeasts *via* CRISPR-Cas. *Cell Systems*, 2015, **1**(1): 88–96
- [56] Kim H, Kim S T, Ryu J, *et al.* CRISPR/Cpf1-mediated DNA-free plant genome editing. *Nature Communications*, 2017, **8**: 14406
- [57] Wang M, Mao Y, Lu Y, *et al.* Multiplex gene editing in rice using the CRISPR-Cpf1 system. *Molecular Plant*, 2017, **10**(7): 1011–1013
- [58] Hu X, Wang C, Liu Q, *et al.* Targeted mutagenesis in rice using CRISPR-Cpf1 system. *Journal of Genetics and Genomics*, 2017, **44**(1): 71–73
- [59] Kim Y, Cheong S A, Lee J G, *et al.* Generation of knockout mice by Cpf1-mediated gene targeting. *Nature Biotechnology*, 2016, **34**(8): 808–810
- [60] Tak Y E, Kleinstiver B P, Nunez J K, *et al.* Inducible and multiplex gene regulation using CRISPR-Cpf1-based transcription factors. *Nature Methods*, 2017, **14**(12): 1163–1166
- [61] Wu H, Liu Q, Shi H, *et al.* Engineering CRISPR/Cpf1 with tRNA promotes genome editing capability in mammalian systems. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, 2018
- [62] Gootenberg J S, Abudayyeh O O, Lee J W, *et al.* Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2. *Science*, 2017, **356**(6336): 438–442
- [63] Gootenberg J S, Abudayyeh O O, Kellner M J, *et al.* Multiplexed and portable nucleic acid detection platform with Cas13, Cas12a, and Csm6. *Science*, 2018, **360**(6387): 439–444
- [64] 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. *Nature*, 2017, **551**(7681): 464–471
- [65] 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. *Sci Adv*, 2017, **3**(8): eaao4774
- [66] Kim Y B, Komor A C, Levy J M, *et al.* Increasing the genome-targeting scope and precision of base editing with engineered Cas9-cytidine deaminase fusions. *Nature Biotechnology*, 2017, **35**(4): 371–376
- [67] Billon P, Bryant E E, Joseph S A, *et al.* CRISPR-mediated base editing enables efficient disruption of eukaryotic genes through induction of STOP codons. *Molecular Cell*, 2017, **67**(6): 1068–1079.e4
- [68] Qiao Q, Wang L, Meng F L, *et al.* AID recognizes structured DNA for class switch recombination. *Molecular Cell*, 2017, **67**(3): 361–373.e4
- [69] Li X, Wang Y, Liu Y, *et al.* Base editing with a Cpf1-cytidine deaminase fusion. *Nature Biotechnology*, 2018, **36**(4): 324–327
- [70] Li B, Zhao W, Luo X, *et al.* Engineering CRISPR-Cpf1 crRNAs and mRNAs to maximize genome editing efficiency. *Nature Biomedical Engineering*, 2017, **1**(5): 0066
- [71] Xie H, Tang L, He X, *et al.* SaCas9 requires 5'-NNGRRT-3' PAM for sufficient cleavage and possesses higher cleavage activity than SpCas9 or FnCpf1 in human cells. *Biotechnology Journal*, 2018, **13**(4): e1700561

The New Member of CRISPR Family, CRISPR-Cpf1*

ZHOU Chen-Chen, LIU Xie-Xie, XIE Hai-Hua, GU Feng**

(State Key Laboratory of Ophthalmology and Optometry, School of Ophthalmology and Optometry,
Wenzhou Medical University, Wenzhou 325027, China)

Abstract In recent years, genome editing technology has been well developed, which have major implications for basic biology research, medicine, and biotechnology. As a new member of CRISPR system, Cpf1 greatly expands the choice of target sites for genome editing and has significant advantages in multiple gene editing. In addition, its shorter RNA sequences (crRNAs) make it closer for the application *via* industrial direct synthesis. Here we summarized the structure, gene editing characteristics, application progress, current limitations and future prospects of Cpf1 system.

Key words genome editing technology, clustered regulatory interspaced short palindromic repeats (CRISPRs), CRISPR-Cpf1

DOI: 10.16476/j.pibb.2018.0146

* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (81201181), Science and Technology Project of Zhejiang Province (2017C37176).

**Corresponding author.

Tel: 86-577-88831367, E-mail: gufenguw@gmail.com

Received: April 27, 2018 Accepted: May 14, 2018