

# 基因组编辑工具的新晋“黑马”：FnCpf1 在人类细胞内具备有效基因组编辑活性

谷峰



谷峰 教授

温州医科大学附属眼视光医院, 眼视光学与视觉科学国家重点实验室, 温州 325027

基因组编辑技术作为 21 世纪生命科学中新的技术, 正在引起一场生命科学领域的革命。目前, 基因组编辑工具主要包括锌指核酸酶(zinc-finger nuclease, ZFN)、转录激活子样效应因子核酸酶(transcription activator-like effector nuclease, TALEN)和最新发现的规律成簇间隔短回文重复和 Cas 蛋白的 DNA 核酸内切酶系统[clustered regulatory interspaced short palindromic repeat (CRISPR)/Cas-based RNA-guided DNA endonucleases]。这些技术的研发成功让人类几乎能够对任何目标基因进行“编辑”, 实现了对特定 DNA 序列(靶序列)的敲入、敲除、替换和对基因表达的调节等。其中 CRISPR-Cas9 技术凭借其强大的功能及便捷性, 迅速席卷了整个生命科学研究领域, 为各种各样的微生物、植物、动物甚至人类胚胎等靶向基因组编辑带来了前所未有的机遇与革新。

作为细菌和古细菌在长期演化过程中形成的一种适应性免疫防御体系, CRISPR-Cas9 系统通过将入侵者 DNA 作为间隔片段整合到 CRISPR 序列中形成免疫记忆, 并利用相应的 CRISPR RNAs (crRNAs) 来指导同源序列的降解以进行免疫“防护”。经过研究人员的相关改造, 由向导 RNA(包括 tracrRNA 和 crRNA)以及 Cas 蛋白所组成的 CRISPR 系统即可实现对基因组进行有效的编辑。

2015 年 9 月, 美国麻省理工学院的张锋教授及

其团队公布了一项振奋人心的新发现——CRISPR 家族新成员(Cpf1)。这是一种新型导向的 RNA:DNA 内切酶复合物, 有显著区别于 CRISPR-Cas9 的基因组编辑特点。Cpf1 蛋白结构简单, 分子量较小, 其介导的基因组编辑仅需要一个较短的单链 crRNA 协助(无需 tracrRNA); crRNA 由 19 nt(加工成熟后长度)direct repeat 序列、23~25 nt(普遍使用的长度)间隔序列组成。切割的具体过程包括: Cpf1 蛋白的 WEB 区识别并结合 direct repeat, 间隔序列段则牵引 Cpf1 蛋白: RNA 复合物靶向目标序列, 在有效的 protospacer adjacent motifs(PAM)与 Cpf1 蛋白的 PI 区相互作用以后, Cpf1 最终在远离种子序列(seed sequence)端实现“错位型”剪切。值得注意的是, Cpf1 识别的 PAM 序列为 3'端 T 富含区域(最常用的基因组编辑工具:SpCas9 对应 PAM 序列为 5'-NGG-3')。此外, 已有的报道显示在人类细胞全基因组范围内, Cpf1 具有高度特异性、几乎没有脱靶效应; Cpf1 不仅拥有 DNA 切割功能, 还能对自身 crRNA 进行识别加工并获得成熟 crRNA 这使其可以完成多基因的同时编辑。

张锋教授团队曾选取两个靶位点(*DNMT1* 和 *EMX1*)测试了不同 Cpf1 家族蛋白对人类细胞内源性基因的编辑活性, 结果显示仅有 AsCpf1 和 LbCpf1 能够在人类细胞内实现较高效率的切割。鉴于此, Cpf1 相关参数与机制基础研究以及疾病的基因治疗

应用研究基本围绕 AsCpf1 和 LbCpf1 展开。2016 年 8 月, *Nature Biotechnology* 同时发表了两篇利用 AsCpf1 和 LbCpf1 蛋白获得基因敲除小鼠的文章; 2017 年 4 月, *Science Advance* 首次报道了利用 AsCpf1 和 LbCpf1 在人类细胞和疾病模型小鼠中实现高效的基因修复。

笔者实验室一直关注着 Cpf1 研究, 考虑到当前国际上广泛采用的 AsCpf1 和 LbCpf1 对 PAM 序列有较为苛刻的要求(5'-TTTN-3'), 极大程度上限制了 Cpf1 在实际应用中的靶位点的选择, 并致使某些靶点成为 Cpf1 无法发挥效应的“盲点”, 而从理论上讲, 若是 PAM 序列的要求长度变短, 基因组中可供编辑靶序列的出现频率即会增加。为了“解放”Cpf1 的应用空间, 笔者试图寻找一种既能实现人类基因组编辑又具备较为简便的 PAM 序列的 Cpf1 家族蛋白。于是研究团队将目光锁定在 FnCpf1——其识别的 PAM 序列更加灵活(5'-TTN-3')。在前人研究成果的基础上, 笔者最开始的想法是希望对 FnCpf1 进行工程化改造, 以使 FnCpf1 能够用于人类细胞基因组编辑。

笔者所在研究团队前期建立了一套快速评价人类基因组编辑效率的系统。首先利用这个系统检测了 FnCpf1 对人类细胞内的基因对应的编辑效果。研究意外的发现: FnCpf1 居然能够极为有效地实现人类基因组编辑。这个结果后来在多个其他基因上得到了验证(图 1)。但是为什么与文献结论不一致, 为了回答这个问题, 笔者所在研究团队重复了张锋教授研究团队曾选取的位于 *DNMT1* 和 *EMX1* 的两个靶位点。实验结果与该研究报道的结果部分一致, FnCpf1 在这两个位点仅能展现出极低活性和无活性。但是不知道为什么, 在该两个位点 AsCpf1 和 LbCpf1 也没有表现出类似文献里有效的切割活性。为了进一步探索其切割活性, 笔者所在研究团队在以上两

个基因座及另外六个基因座内分别选取了多个靶位点, 并通过多项检测手段(CAPS 分析、T7E1、基因测序)确定了 FnCpf1 在人类细胞里的确存在有效基因组编辑活性。这样, 领域内大家广泛接收的观点“FnCpf1 在人类细胞中无编辑活性”需要“修改”。

除了回答“FnCpf1 这把‘基因剪刀’能否切得动”外, 笔者所在研究团队还探讨了“这把基因剪刀如何切得更好”的问题。为了达到该研究目的, 首先利用携带绿色荧光蛋白基因的人类细胞系来全面定量地分析相关参数对 CRISPR-Cpf1 的影响, 同时本研究也利用了新开发的另一套基因组编辑评价系统(loxP-STOP-loxP/FnCpf1)。最终确定, 能够实现 FnCpf1 最高编辑效率的间隔序列长度是 21 nt, 而不是普遍使用的 23~25 nt; FnCpf1 对不同 Cpf1 家族蛋白同源的 direct repeat 序列具有一定程度的兼容性; 其 PAM 序列扩展为 5'-KYTV-3'(K 指代 T、G; Y 指代 C、T; V 指代 A、C、G)。此外, 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, 研究发现 FnCpf1 在对人类全基因组编辑的过程中具有较高的保真性。

本研究修正了张锋教授团队关于 CRISPR-Cpf1 研究的部分结果结论, 提出了 FnCpf1 在人类细胞中存在颇为可观的基因组编辑效率。其 PAM 序列的灵活性亦将使之成为基因治疗和人类功能基因组研究领域中的新晋“黑马”。同时, 对 FnCpf1 相关参数的系统性研究, 为其在人类基因组编辑的基础研究和基因治疗的应用研究“拨清迷雾”。当然, 本研究也为后续研发更好的 FnCpf1 奠定了基础。该项研究成果以“A new lease of life: FnCpf1 possesses DNA cleavage activity for genome editing in human cells”为题于 2017 年 9 月 7 日发表于 *Nucleic Acids Research*(doi:10.1093/nar/gkx783)。

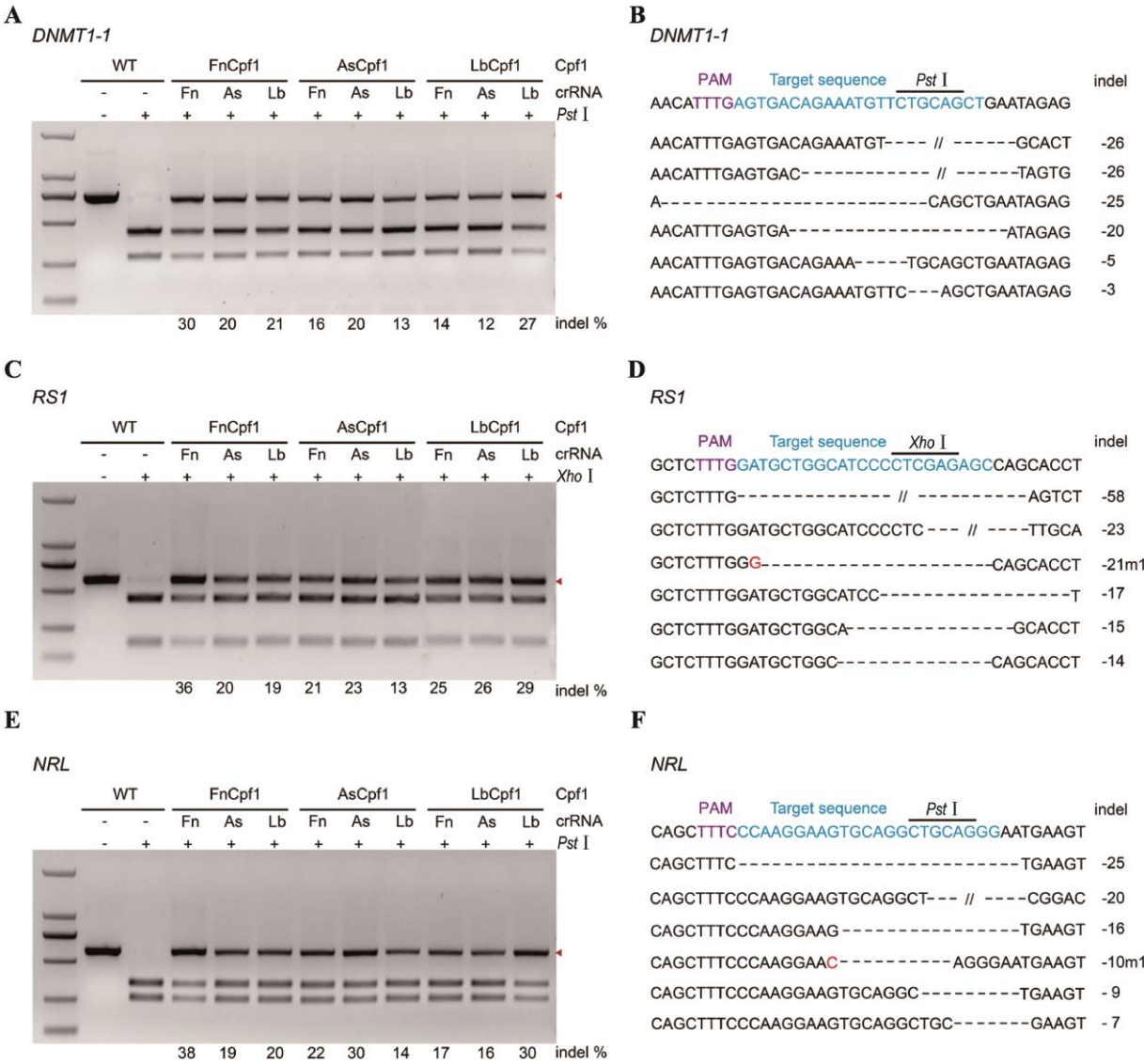


图 1 FnCpf1 诱导有效的内源性基因编辑

Fig. 1 FnCpf1 induced indel mutations at endogenous loci

选择了 3 个人类基因(*DNMT1-1*、*RS1* 和 *NRL*)进行切割实验。A、C 和 E 分别为切割后结果(利用 cleaved amplified polymorphic sequences, CAPS 方法); B、D 和 F 分别是 FnCpf1 切割后发现的缺失/插入突变。结果提示, FnCpf1 可以实现人类基因组的有效切割, 同时提示 FnCpf1 活性在这些位点可能比 AsCpf1 和 LbCpf1 活性高。另外, 也提示 FnCpf1、AsCpf1 和 LbCpf1 之间的 direct repeat 序列是可以交换的, 当然, 利用自身的 direct repeat 序列活性还是最高的。