

# RNA靶向系统CRISPR/Cas13的研究进展及应用

刘 园<sup>1,2</sup> 谢庆强<sup>1</sup> 李雪峰<sup>1,2\*</sup>

1. 广州医科大学附属第六医院; 广东 511518

广州医科大学基础医学院, 中法霍夫曼免疫研究所;

呼吸疾病国家重点实验室, 广东 511436

2. 深圳市罗湖区人民医院, 深圳大学附属第三医院, 广东 518001

**摘要:** 成簇的规则间隔的短回文重复序列 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats, CRISPR) 和CRISPR相关蛋白 (CRISPR-associated, Cas) 系统是大多数细菌体内抵抗噬菌体入侵的获得性免疫系统, 经改造后, 被开发成一种高效的基因编辑工具。不同于DNA靶向的CRISPR相关酶 (如Cas9和Cpf1), 靶向RNA的CRISPR相关酶Cas13被发现是一种具有“附带切割”活性的新型核酸酶, 其在切割靶标RNA后继续切割其他的非靶标RNA。此外, 突变导致的无核酸酶活性的Cas13 (dCas13) 能够结合目标RNA但无法切割。基于Cas13的这些特性, Cas13蛋白已被应用于多种类型的RNA研究, 如RNA定点编辑、RNA敲低、RNA检测和RNA成像。本文主要对CRISPR/Cas13系统在近年来的研究进展和应用进行综述。

**关键词:** CRISPR/Cas13; 附带切割; 核酸酶; RNA研究

## 一、CRISPR/Cas13 系统的简要概述

CRISPR/Cas系统由成簇的规则间隔的短回文重复序列 (CRISPR) 和与CRISPR相关的Cas蛋白组成, 是细菌和古细菌抵抗病毒和噬菌体入侵的重要免疫防御系统<sup>[1]</sup>。近年来有研究表明, 细菌和古细菌的CRISPR/Cas系统表现出显著的蛋白质组成多样性、效应体结构的复杂性<sup>[2]</sup>。目前已经发现多种Cas蛋白, 根据Cas蛋白的组成和效应复合物的性质, CRISPR/Cas系统可分为两大类和六种不同类型 (type I-VI)<sup>[3]</sup>。第一类主要是多个Cas蛋白 (具有一个或多个内切酶活性组分) 与crRNA紧密结合的效应复合物, 主要包括I型、III型和IV型CRISPR/Cas系统, 第二类是单个多结构域Cas蛋白, 主要包括II型的Cas9蛋白、V型的Cas12蛋白和VI型的Cas13蛋白<sup>[4-6]</sup>。其中, 人们所熟悉的II型CRISPR/Cas9系统在基因组DNA敲除和敲入以及基因组标记等多方面得到了广泛地应用, 为基因操作和基因组研究带来了革命性的改变<sup>[7]</sup>。然而, CRISPR/Cas系统当时在RNA靶向中的应用还处于起步阶段。随着科学的进步, 科学家们于2016年发现了一种靶向RNA的CRISPR相关酶Cas13。Cas13蛋白在CRISPR RNA (crRNA) 的引导下与靶标RNA特定位点结合, 形成的RNA靶向效应复合物具有RNase活性, 能够切割特定的RNA序列<sup>[8]</sup>。科学家利用这种核糖核酸酶 (RNase) 活性实现了可识别RNA的强大工具。Cas13是CRISPR/Cas13系统中的效应蛋白, 该系统是向导RNA介导的RNA靶向的内切酶系统, 主要有四个亚型: VI-A (Cas13a/C2c2), VI-B (Cas13b), VI-C (Cas13c) 和VI-D (Cas13d)<sup>[9]</sup>。目前对Cas13c的研究还比较少, 而Cas13a、Cas13b和Cas13d均被证实可以在哺乳动物细胞系中干扰RNA, 从而实现基因沉默。CRISPR/Cas13系统具有重要的应用价值, 已经应用于RNA的敲低, RNA定点编辑, RNA检测以及RNA标记等方面。

## 二、CRISPR/Cas13 的结构特征

Cas13是目前第二类CRISPR/Cas系统发现的唯一能够降解RNA的蛋白 (Cas9, Cpf1, C2c1均是RNA介导的DNA核酸内切酶), 具有两种RNase活性, 分别催化crRNA成熟和ssRNA降解<sup>[10]</sup>。这与其自身的结构有着密不可分地联

**\*通讯作者:** 李雪峰, 1989年2月, 男, 汉族, 山东烟台人, 就职于广州医科大学基础医学院, 教授, 博士研究生学历。研究方向: 感染免疫, 肿瘤免疫。

**基金项目:** 本工作受中国国家自然科学基金 (81972204, 81702327); 广东省自然科学基金 (2019A1515011097); 深圳市科技计划项目 (JCYJ20180508165208399); 中国博士后科学基金 (2018M640834, 2019T120756); 广州市科技计划项目 (201904010089); 呼吸疾病国家重点实验室自主课题 (SKLRD-Z-202002); 中国教育部111计划项目 (D18010) 资助。

系。2017年,有研究报道了毛螺科菌(Lachnospiraceae bacterium)来源的(LbaCas13a)与crRNA结合后的2.0Å晶体结构<sup>[11]</sup>。来自中科院生物物理研究所的王艳丽课题组解析了Leptotrichia shahii(Lsh)细菌Cas13a与crRNA结合后的二元复合物3.2Å的电镜结构,Cas13a与crRNA(CRISPR-RNA)及其靶RNA三元复合物3.08Å的晶体结构以及Cas13a蛋白的晶体结构,Cas13a由一个crRNA识别叶(REC)和一个核酸酶叶(NUC)组成。同时,REC叶片具有NTD结构域(N-terminal domain)和Helical-1结构域,NUC叶片具有两个较高的真核生物和原核生物核苷酸结合结构域HEPN、Helical-2结构域以及连接两个HEPN结构域的连接结构<sup>[12, 13]</sup>。Helical-1和HEPN结构域具有负责切割前体crRNA和靶标RNA的作用,同时Cas13a蛋白与crRNA的结合后会导致Cas13a蛋白发生构象变化(图1)<sup>[13]</sup>。这项研究揭示了LshCas13a主要是由两个独立的活性结构域来发挥其两种不同的RNA酶切活性的,这为研究Cas13蛋白发挥RNA酶活性的分子机制提供了重要的结构生物学基础。Cas13蛋白家族的其他蛋白结构也随后被分析了。例如,PbuCas13b(即颊普雷沃菌(Prevotella buccae) Cas13b)与crRNA结合为1.65Å晶体结构<sup>[14]</sup>。动物溃疡伯格菌(Bergeyella zoohelcum) Cas13b(BzCas13b)与CrRNA二元复合物呈现2.79 Å晶体结构,BzCas13b的多结构域以L型crRNA为中心环绕分布,整体呈现出三角形空间结构<sup>[15]</sup>。Cas13d是Cas13家族中分子量最小的蛋白,Cas13d与VI型其他成员类似,具有两个HEPN结构域,蛋白自身可以加工pre-crRNA成为成熟的crRNA,结合靶RNA可以激活其RNase活性<sup>[16]</sup>。

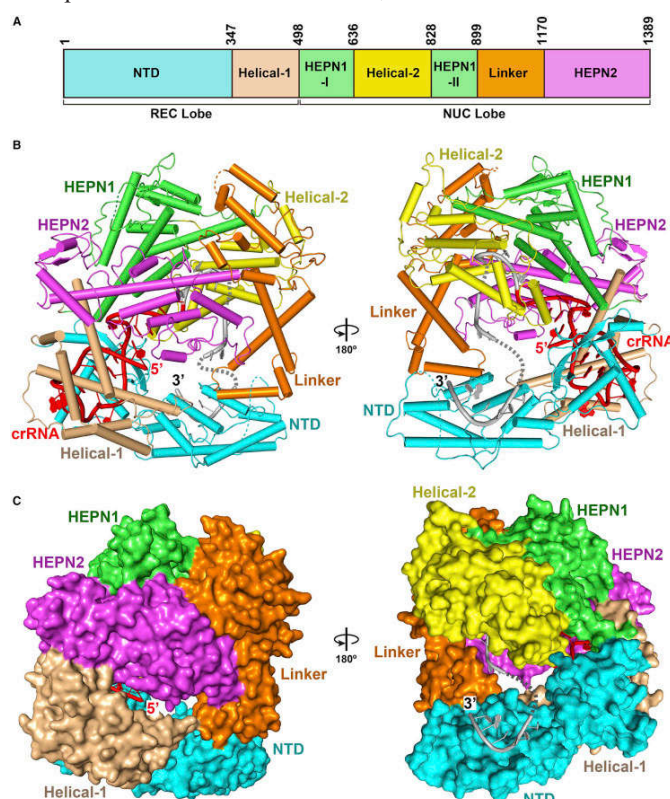
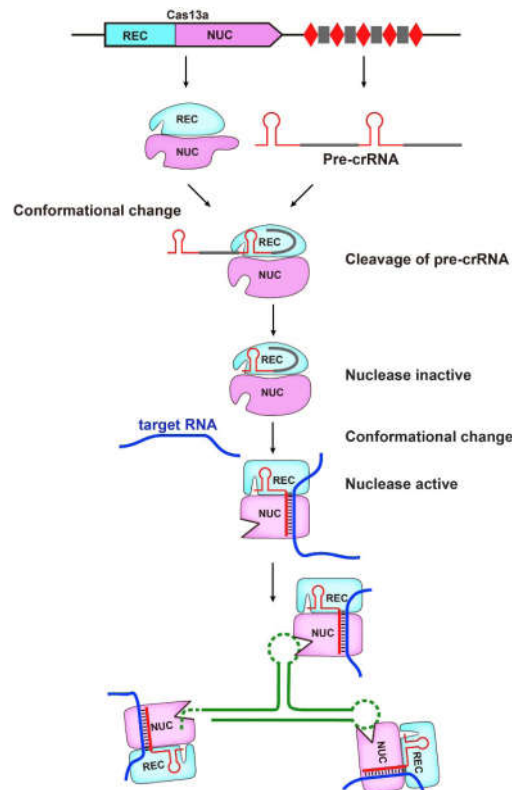


图1 LshCas13a-crRNA二元复合体的晶体结构<sup>[13]</sup>

A:LshCas13a的结构域组织,Cas13a包含一个crRNA识别的叶片即REC叶片,和一个核酸酶叶片即NUC叶片。REC叶片包含NTD结构域(N-terminal domain)和Helical-1结构域,NUC叶片包含了两个HEPN结构域、Helical-2结构域以及连接两个HEPN结构域的连接结构域;B,C:晶体结构LshCas13a与crRNA复合体的表征。

### 三、CRISPR/Cas13切割RNA的机制

早期有研究表明,靶RNA可能在Cas13的激活中发挥作用,但是如何激活Cas13以及Cas13如何裂解靶标RNA和侧链RNA等问题尚未明确<sup>[8]</sup>。为了理解Cas13是如何被激活和切割靶RNA,2017年7月,中科院生物物理所王艳丽和章新政课题组在结构上进一步深入研究,揭示了来自口腔纤毛菌(Leptotrichia buccalis)的Cas13a(称为LbuCas13a)与crRNA以及靶RNA结合的晶体结构,以及LbuCas13a-crRNA二元复合物的冷冻电镜结构<sup>[17]</sup>。这些结构和结合后的功能研究揭示了Cas13a识别目标RNA和RNA裂解的机制(图2)<sup>[17]</sup>。

图2 CRISPR/Cas13切割RNA的机制<sup>[17]</sup>

由REC叶和一个NUC叶组成的Cas13a蛋白裂解产生crRNA引导的监视复合体的前体crRNA；负责切割前体crRNA的Helical-1和HEPN2结构域发生构象变化，催化pre-crRNA加工生成成熟的crRNA，此时形成的crRNA-Cas13a复合物，处于无酶切活性的状态<sup>[12]</sup>。在靶ssRNA存在的情况下，crRNA将会在LbuCas13a中的正电荷中心通道的核酸酶叶（nuclease lobe，NUC）内与靶RNA结合，这种crRNA-靶RNA双链形成促发LbuCas13a的HEPN1结构域向HEPN2结构域移动，从而激活LbuCas13a的HEPN催化位点。LbuCas13a就会在crRNA的引导下以一种非特异性的方式切割单链靶RNA和侧链RNA<sup>[17, 18]</sup>。这些发现不仅揭示出VI型CRISPR/Cas系统的Cas13a抵抗RNA噬菌体的作用机制，而且为其作为RNA操作工具的发展奠定了基础。

#### 四、CRISPR/Cas13 系统的应用

##### （一）基于CRISPR/Cas13系统的RNA编辑

目前，基于CRISPR相关核酸酶Cas9或Cpf1的编辑工具已被广泛用于介导靶向DNA裂解并取得了巨大的成功<sup>[19, 20]</sup>。Cas13的发现也为CRISPR在RNA编辑方面的应用提供了重要的工具。Cas13的HEPN结构域中的活性位点通过点突变后，产生的无核酸酶活性的dCas13是一种可编程的RNA结合蛋白，其可以特异性结合RNA，但无法切割。科研人员首次利用无核酸酶活性的dCas13a与人源的RNA腺嘌呤脱氨酶催化结构域（hADAR2d）融合，将腺苷脱氨酶的活性引入到裂殖酵母中；然后通过设计RNA编辑所需的指导RNA，实现了对内源RNA精确定点编辑<sup>[21]</sup>。

为了在Cas13家族成员中鉴定出一款可靠的且更强大的RNA编辑工具，研究人员在21种Cas13a同源物、15种Cas13b同源物和7种Cas13c同源物中筛选出了来自普氏菌属的Cas13b（PspCas13b），并将失活的PspCas13b（dPspCas13b）与RNA腺苷脱氨酶结构域（ADAR2DD）融合，作用于RNA（ADAR）家族的腺苷脱氨酶通过腺苷到肌苷的水解脱氨作用，将腺苷转化成肌苷（它在结构上与鸟苷非常接近），实现了对内源RNA精确定点A→I（G）编辑，该编辑系统被命名为“REPAIR”[RNA editing for programmable A to I（G）replacement]<sup>[22]</sup>。为了增加A→G的编辑，科研人员采用了极度活跃的ADAR突变体，如ADAR2DD（E488Q），并调整向导RNA（gRNA）的结构，发现间隔区长度在30~84个核苷酸时，PspCas13b-ADAR2DD（E488Q）表现出稳定编辑，并将此系统命名为REPAIRv1，该系统在50个核苷酸间隔区的编辑效率比较高，但也增加了脱靶编辑<sup>[22]</sup>。

Cox等人进一步研究发现脱靶是由ADAR2DD介导的,于是通过突变实验改造ADAR2DD,他们发现ADAR2DD(E488Q/T375G)有着最高的靶向效率和最低的脱靶效应,然后将dPspCas13b与ADAR2DD(E488Q/T375G)融合,并称为REPAIRv2。为了验证REPAIR在哺乳动物细胞RNA编辑方面的广泛适用性,研究人员将其应用于G-A突变相关的两种疾病:X-连锁肾源性尿崩症相关的AVPR2基因和范可尼贫血(Fanconi anemia)相关的FANCC基因,他们将REPAIR引入到HEK293FT细胞中,结果证实REPAIR可以在RNA水平上修复致病突变<sup>[22]</sup>。REPAIR是第一个能够实现精确RNA编辑的CRISPR系统,具有安全性和灵活性。Cas13作为RNA编辑工具的新发现,开启了在RNA水平研究,以及利用RNA定点编辑修复疾病组织的突变基因的新时代,为改变基因功能和调控表达提供了新的方法和思路。

### 1. 基于CRISPR/Cas13的基因编辑功能在疾病治疗中的潜在应用

精确的核酸编辑技术是研究细胞功能和新型治疗手段的重要手段。基于Cas13强大的基因编辑功能,给疾病的治疗带来了潜在的应用价值。作为一种新型的CRISPR/Cas效应体,Cas13能够在单一的CRISPR-RNA(crRNA)的引导下,特异性的下调哺乳动物细胞中mRNA的表达<sup>[23]</sup>。KRAS突变体是一种已知的胰腺癌致癌基因,CRISPR/Cas13a介导的KRAS-G12D mRNA表达下调在体外可有效诱导细胞凋亡,使小鼠的肿瘤显著缩小,利用CRISPR/Cas13a系统可以用于胰腺癌突变KRAS的靶向治疗<sup>[24]</sup>。P2RY2增强子RNA(P2RY2e)在膀胱癌组织和雌激素处理的细胞中上调,通过CRISPR/Cas13a敲除P2RY2e可抑制细胞增殖、侵袭和迁移,促进细胞凋亡<sup>[25]</sup>。

近年来,有科研人员设计了一种基于合成分子生物学技术与CRISPR/Cas13a的新型光诱导Cas13a蛋白表达的光传感器,以转移性肺腺癌转录本1(MALAT1)lncRNA作为功能靶点,可以抑制膀胱癌5637细胞和T24细胞中(MALAT1)lncRNA的表达,增强绿色荧光蛋白的荧光活性,该系统可用于肿瘤细胞的RNA敲除和结合,为研究RNA在基因网络中的功能和精确治疗肿瘤提供了一种新技术<sup>[26]</sup>。基于CRISPR/Cas13a系统开发的一种多功能的脂质体系统,能够将CRISPR/Cas13a基因回路导入膀胱癌细胞,靶向膀胱癌细胞中高表达的hVEGFR2,利用三个crRNA串联序列构建质粒,实现多重靶向和更广泛地治疗效果,为基于CRISPR/Cas13a的膀胱癌基因治疗提供了一种多功能的策略<sup>[27]</sup>。EGFRvIII是胶质瘤中唯一的EGFR突变亚型,通过慢病毒在EGFRvIII过表达的胶质瘤细胞中过表达LwCas13a,crRNA-EGFP敲除EGFP表达细胞中的靶基因后会产生“附带效应”的同时,CRISPR/Cas13a可以抑制小鼠颅内胶质瘤的形成,这些结果都显示了CRISPR-Cas13a系统在癌细胞中的附带效应和该系统强大的肿瘤清除潜力<sup>[28]</sup>。CRISPR相关酶(Cas13a)可以通过目标识别后的附带效应选择性地破坏肿瘤细胞,在癌症治疗中具有广阔的应用前景。然而,这些附带效应并不专门针对肿瘤细胞,可能会导致安全问题。

为了解决这个问题,南开大学刘阳教授等科学家将CRISPR/Cas13a系统(质粒DNA、pDNA)包裹在一种具有核壳结构的双锁定纳米颗粒(DLNP)的核内,增强了DLNP在血液循环或正常组织中的稳定性,促进了CRISPR/Cas13a系统的细胞内化,并激活了进入肿瘤组织的基因编辑,同时可以限制CRISPR/Cas13a对肿瘤组织的激活<sup>[29]</sup>。在仔细筛选和优化以程序性死亡配体1(PD-L1)为靶点的CRISPR RNA(crRNA)序列后,DLNP显示了对B16F10荷瘤小鼠T细胞介导的抗肿瘤免疫的有效激活和免疫抑制肿瘤微环境(TME)的重塑,从而显著抑制了肿瘤的生长,提高了荷瘤小鼠的生存率<sup>[29]</sup>。通过DLNP对CRISPR/Cas13a活化的精确控制,首次实现了CRISPR/Cas13a系统在肿瘤免疫治疗中的应用。

### 2. 基于CRISPR/Cas13的新型基因编辑工具与RNAi的异同性

在CRISPR出现之前,RNAi是RNA编辑方面应用最为普遍的方法,也是调节基因表达的理想方法,但它容易产生脱靶效应<sup>[30]</sup>。RNAi技术利用的是小干扰RNA(siRNA)或短双链RNA(shRNA)触发具有互补序列的靶mRNA(即使信使RNA)降解,因而抑制细胞中的特定基因表达<sup>[31]</sup>,由于siRNA/shRNA缺乏活性,产生的脱靶效应会引起假阴性结果<sup>[32]</sup>。相反,基于Cas13a的RNA编辑技术具有更多的优越性。有研究在KRAS、CXCR4和PI3K基因的敲除试验中证明了Cas13a敲除的效率可与RNAi敲除效率相媲美,但在特异性方面,Cas13a系统明显优于RNAi<sup>[33]</sup>。基于Cas13的RNA编辑技术更加精确,应用更广泛。

RNAi技术的一个局限是难以靶向核转录本,CRISPR/Cas13介导的操作并不局限于靶向胞质转录本,其可以通过在C端或N端、双侧核输出序列或核定位序列(NLS)上简单地添加一个核定位信号msfGFP来靶向非编码的核转录本和pre mRNA<sup>[33]</sup>。然而基于CRISPR/Cas13的RNA编辑技术和RNAi的作用机制之间的一个共同点是,两者都是由小的非编码RNA(ncRNA)介导的,它们与核糖核酸复合物一起促进了预期的细胞RNA靶点的瞬时序列特异性敲除<sup>[34]</sup>;这两

种技术都具有在转录后水平敲除基因的能力，而不是在基因组DNA水平敲除基因的能力<sup>[8]</sup>；两者均可对基因表达产生显著的转录后抑制<sup>[35]</sup>；都能显示出非常高的效率来降低转录水平；两者在体外细胞培养实验中具有相当的传递效率，但也都有相同的限制，用于成功的体内应用的传递策略<sup>[36]</sup>。

(二) 基于CRISPR/Cas13系统在RNA水平上的基因敲除

CRISPR/Cas13系统被证明可以裂解单链RNA，从而抵御入侵的RNA噬菌体。经设计改造后，CRISPR/Cas13系统可以介导RNA转录本的特异性敲除。Cas13的RNA敲除技术目前已经被应用到许多领域。LshCas13a首次在大肠杆菌中用于RNA敲除<sup>[8]</sup>。有研究利用CRISPR/Cas13a选择性地干扰芜菁花叶中TuMV RNA病毒分子的不同基因组区域，能够减少叶片中TuMV-GFP RNA基因组的积累减少<sup>[37, 38]</sup>，以及靶向敲除马铃薯植株中的病毒PVY RNA<sup>[39]</sup>，这些都证实了CRISPR/Cas13a可以对植物RNA病毒分子的敲除。LwaCas13a也被用于RNA引导的哺乳动物细胞RNA敲除。张峰团队利用LwaCas13a在不同细胞中敲除MALAT1和XIST，以及在HEK293FT细胞中对三种内源性基因：KRAS、CXCR4和PIIB进行敲除试验，结果表明了CRISPR/Cas13a能成功地敲除这些基因<sup>[33]</sup>。Cas13b蛋白也实现了哺乳动物细胞的RNA敲除，且在哺乳动物细胞中不依赖PFS序列和侧链RNase活性，其敲除的效率和特异性都高于Cas13a<sup>[22]</sup>。

最近，Cas13d，一个RNA靶向CRISPR效应子家族，被证明可以在体外完成对哺乳动物细胞中RNA的下调，在Cas13d的亚型中，CasRx (RfxCas13d)在HEK293T细胞中表现出最强的RNA敲除效率<sup>[40]</sup>。Cas13d家族蛋白CasRx的一个显著优势是体积小，易于包装到AAV病毒中。为了验证Cas13d在体内的靶RNA向活性，研究者利用AAV将CasRx系统导入到小鼠肝脏中，能够有效敲除与代谢功能相关的基因，包括Pten、Pcsk9和lncLstr，从而降低了小鼠血液中的胆固醇水平，并没有观察到明显的肝损伤，说明Cas13d系统在体内应用时具有一定的安全性<sup>[41]</sup>。Cas13d家族蛋白CasRx由于体积小，效率高，脱靶率低的优势，目前被认为是在未来的应用中最具有优势的Cas13蛋白。

(三) 基于CRISPR/Cas13系统的单分子核酸技术

1. 基于CRISPR/Cas13系统的单分子核酸检测工具：SHERLOCK

Cas13是一种RNA引导的核糖核酸酶，它由crRNA引导识别并结合与crRNA序列互补配对的靶RNA（例如塞卡病毒的单链RNA），由此激活了Cas13蛋白的RNase活性，并特异性地切割靶RNA，crRNA提供了Cas13切割靶RNA的特异性，并通过Cas13的侧链切割活性增加信号放大的敏感性。具有RNA酶活性的Cas13蛋白在剪切靶RNA后还能保持活性继续切割非特性的RNA，这种现象被称为“附属切割”（collateral cleavage）<sup>[42]</sup>。利用Cas13蛋白的附属切割活性，科学家开发出了RNA检测工具。虽然Cas13具有强大的RNase活性，一个靶RNA激活的Cas13可切割数以千计的RNA探针，但无法满足许多研究和诊断所需的灵敏度要求<sup>[10]</sup>。

为提高检测的灵敏性，布罗德研究所成员Feng Zhang、Jim Collins、Deb Hung、Aviv Regev和Pardis Sabeti等研究人员采用了一种“等温扩增”（Recombinase polymerase amplification, RPA）技术来提高待测样品中的DNA或RNA水平，检测信号得到了初级放大，再利用第二个扩增步骤（T7体外转录）将DNA转化为RNA，实现了对信号的二次放大，从而使得这种RNA靶向的CRISPR工具的灵敏度增加了一百万倍，可以准确检测到单个核酸分子，这种Cas13蛋白与RPA技术结合的分子检测平台被命名为“神探夏洛克”（specific high-sensitivity enzymatic reporter unlocking, SHERLOCK）（图3）<sup>[42]</sup>。

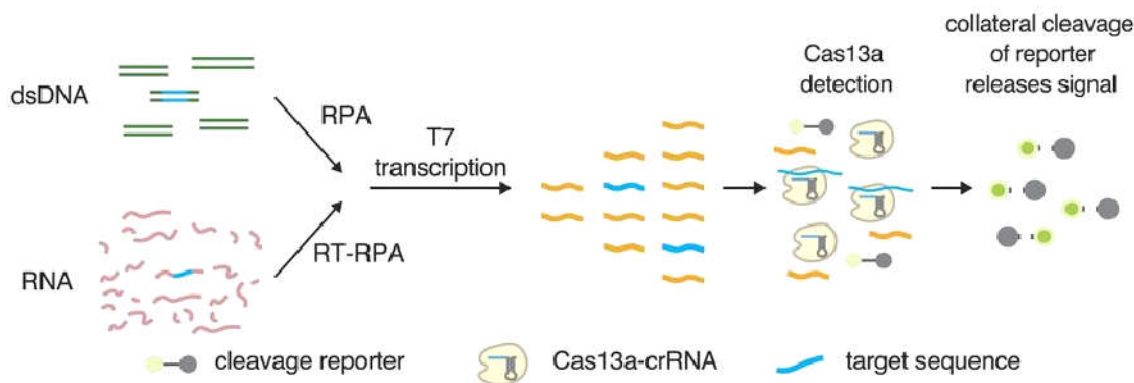


图3 单分子核酸检测平台-SHERLOCK<sup>[42]</sup>

该检测系统还包括一种RNA荧光报告分子,未激活的Cas13a不能切割该报告分子,因此无荧光信号发出。当Cas13检测到靶RNA序列时,Cas13的RNA酶活性被激活,并切割靶RNA,同时切割这种非特异性的RNA荧光报告分子,从而释放可检测到的荧光信号<sup>[8, 42]</sup>。SHERLOCK提供了一种便宜、易于使用、灵敏的核酸诊断工具。

鉴于这种工具能够设计作为一种基于试纸条的测试方法(试剂可在常温储存),可以在资源匮乏的区域对传染病暴发进行即时诊断,但一次只能检测一种核酸序列<sup>[42]</sup>。同年,张峰团队又对SHERLOCK进行了升级(SHERLOCK v2)。SHERLOCK v2使用了Cas13和Cas12a能够在单一反应中检测出是否一个样本含有寨卡病毒或登革热病毒核酸,实现了一次检测多个靶标的功能<sup>[43]</sup>。除了检测目标数量的升级,SHERLOCK v2通过联合使用CRISPR相关酶(Csm6)来放大其检测信号,灵敏度在SHERLOCK的初级版本上又提高了100倍,因此能够检测到肺癌患者血液样本中的游离肿瘤DNA<sup>[43]</sup>,SHERLOCK v2实现了更加快速、精准地检测样本中的基因特征,包括病原体 and 肿瘤DNA。

## 2. CRISPR/Cas13在疾病诊断中的应用价值

基于CRISPR/Cas13a开发的最为重要的SHERLOCK技术被发现具有多功能性。该技术能够在数小时内检测病人血液或尿液样品中Zika病毒的存在;区分非洲和美国Zika病毒株的基因序列;识别特定的细菌类型,如大肠杆菌;检测抗生素耐药性基因;鉴定不含细胞的DNA片段中的致癌性突变;快速从唾液样品中读取人遗传信息,如心脏病风险<sup>[42]</sup>。同时,基于CRISPR/Cas13a结合RPA技术在猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV)<sup>[44]</sup>,禽流感病毒(H7N9)<sup>[45]</sup>以及埃博拉病毒<sup>[46]</sup>等病原体中实现了快速核酸检测,且具有高灵敏性和高特异性。此外CRISPR/LbuCas13a直接检测miRNA也实现了较好的可靠性和敏感性,为miRNA相关疾病的早期诊断带来了巨大的潜力<sup>[47]</sup>。CRISPR/Cas13a具有能够精确地识别单碱基突变的核酸分子的特点,科学家们利用这种优势设计了一种系统检测N1-甲基腺苷(m1A)诱导的错配,提供了一种简单快速,高灵敏度和单碱基特异性快速检测m1A的方法<sup>[48]</sup>。

基于CRISPR/Cas13a开发的高灵敏度,高特异性且多功能性的SHERLOCK技术问世后,越来越多的科研人员利用CRISPR/Cas13a系统的独特性优势,开发出了功能强大的其他检测体系,并表现出了潜在的应用价值。例如,核酸变构探针和CRISPR/Cas13a的组合检测系统被称为“APC-Cas”,该系统可以识别小鼠血清中少量的肠杆菌细胞,从而将早期和晚期感染的小鼠与未感染的小鼠区分开来,对病原体的早期诊断具有潜在的临床应用价值<sup>[49]</sup>。基于CRISPR/Cas13a开发的微流体,集成电化学生物传感器用于现场检测微小RNA,无须任何核酸扩增即可实现潜在肿瘤标志物microRNA miR-19b和miR-20a的定量<sup>[50]</sup>。同时,CRISPR/Cas13a与酶联免疫吸附试验(ELISA)的结合过程被称为CRISPR/Cas13a信号放大连锁免疫吸附试验(CLISA),能够检测到超低浓度的炎症因子、人类白细胞介素-6、肿瘤标志物和人类血管内皮生长因子(VEGF)<sup>[51]</sup>。

此外,有研究还提出了一种基于CRISPR/Cas系统的比色基因传感平台的新设计,结合Cas12a/crRNA可编程识别DNA、Cas13a/crRNA以互补靶点识别RNA的优势,使裸眼基因检测能够在1小时内完成,并具有现场检测能力强、灵敏度高等特点<sup>[52]</sup>。基于CRISPR/Cas13a开发的快速、高效且高灵敏度的体外核酸检测工具,给基础研究和疾病诊断带来了革命性影响。

### (四) dCas13与功能性蛋白融合的应用

无核酸酶活性的Cas13(dCas13)保留了可编程的RNA结合能力,其作为RNA结合蛋白(RBPs)与RNA腺苷脱氨酶(ADAR)的结合实现了RNA的编辑,与蛋白标签融合,可以生成用于目标RNA可视化的探针,应用于RNA的跟踪。dCas13由crRNA引导来结合特定的RNA,分析与目标RNA相关的RNA和蛋白质。dLwCas13a与FP标签蛋白融合产生dLwCas13a-FP表达细胞系,引入不同的crRNAs可以检测不同的RNA目标;dLwaCas13a与生物素融合被用于RNA免疫沉淀;dLwaCas13a与负反馈(NF)融合的系统可以在活细胞中转录产物的特异性成像,而且还降低未结合蛋白引起的背景噪声<sup>[33]</sup>。Cas13d亚型CasRx的HEPN结构突变产生的dCasRx与hnRNPa1结合产生融合蛋白(dCasRx-hnRNPa1),并在crRNA的引导下调控目标mRNA的剪切,这一过程使dCas13d能够通过腺相关病毒(adeno-associated virus, AAV)载体将含有dCasRx和CRISPR编码基因的单个载体导入诱导神经元<sup>[53]</sup>。

近期有研究为了筛选出标记能力更好的CRISPR-Cas13蛋白,对来源于VI-A(Cas13a/C2c2),VI-B(Cas13b)和VI-D(Cas13d)三个亚型的8个蛋白进行酶活突变,并对它们的RNA标记能力进行了比较后发现无论是对于细胞核的长非编码RNA NEAT1还是对于细胞浆的mRNA MUC4来说,来源于VI-B(Cas13b)的dPspCas13b和dPguCas13b都具有较好的标记能力,dPspCas13b和dPguCas13b蛋白的联合实现了对活细胞内不同RNA的双色标记,实现了对活细胞RNA

的成像<sup>[54]</sup>。此外,联合CRISPR-dCas13系统与CRISPR-dCas9系统,研究人员也实现了对基因转录的RNA和基因位点的同时标记,为研究RNA转录和RNA与基因位点的关系,提供了一个简单和便利的新手段<sup>[54]</sup>。

### 五、总结与展望

Cas13蛋白是一种具有RNA介导的RNA酶切活性的新型核酸酶。新型核酸酶Cas13的发现为RNA病毒的检测, RNA编辑以及RNA敲除等RNA研究领域提供了新的思路。基于CRISPR/Cas13a系统开发的一种快速、廉价的和高度灵敏的新型诊断工具不依赖昂贵的仪器,能检测出单个目标核酸分子,且在流行病爆发且资源匮乏的情况下也有着重要的应用价值。CRISPR/Cas13作为一种转录靶向和切割的基因编辑工具, Cas13a是第一个被用于靶向RNA切割的效应蛋白,实现了在哺乳动物和植物体内特异性地敲低RNA,不影响细胞基因组的稳定性。

但CRISPR/Cas13a系统仍存在着不足之处, Cas13a酶本质上是一种相对较大的蛋白质,因此很难被包装到靶组织中; Cas蛋白来源于细菌,长期临床应用易产生免疫原性,给基因编辑的基础研究应用和临床治疗带来了挑战;对靶标RNA的编辑能力有限;敲除靶基因RNA仍存在着脱靶效应。由美国芝加哥大学的Bryan C.Dickinson研究团队研发了一个完全由人类蛋白成分合成的、可设计的、模块化的、RNA指导的RNA靶向效应器的CIRTS (CRISPR-Cas-inspired RNA targeting system)系统克服了CRISPR/Cas13a系统的大分子量和免疫原性的局限性<sup>[55]</sup>。来自Cas13蛋白家族的Cas13b和Cas13d也弥补了CRISPR/Cas13a系统存在的一些不足点。

Cas13b和Cas13d的序列虽然与Cas13a并不相似,但与Cas13a一样,都具有两个HEPN结构域,因此功能相似,可以特异性靶向敲除哺乳动物细胞的RNA,且脱靶率都低于Cas13a,其中Cas13d的脱靶率最低。无核酸酶活性的dCas13与ADAR腺苷脱氨酶融合产生的REPAIR是第一个能够实现精确RNA编辑的CRISPR系统。将dCas13b与胞苷脱氨酶(如APOBEC1)相融合以实现新的RNA编辑工具是未来的研究方向。Cas13d是Cas13蛋白中最小的,长度仅约930个氨基酸,与病毒的传递系统兼容,更容易包装到容量较小的病毒载体中,是一种有希望的RNA靶向平台。由于Cas13可以在体内高特异性、高效率的敲除单个或一组mRNA,利用该系统的优势来发现药物的靶点也是未来值得研究的方向。

### 参考文献:

- [1]Barrangou R: The roles of CRISPR-Cas systems in adaptive immunity and beyond. *Curr Opin Immunol* 2015, 32:36-41.
- [2]Koonin EV, Makarova KS, Zhang F: Diversity, classification and evolution of CRISPR-Cas systems. *Curr Opin Microbiol* 2017, 37:67-78.
- [3]Mohanraju P, Makarova KS, Zetsche B, Zhang F, Koonin EV, van der Oost J: Diverse evolutionary roots and mechanistic variations of the CRISPR-Cas systems. *Science* 2016, 353(6299):aad5147
- [4]Makarova KS, Haft Dh Fau - Barrangou R, Barrangou R Fau - Brouns SJJ, Brouns Sj Fau - Charpentier E, Charpentier E Fau - Horvath P, Horvath P Fau - Moineau S, Moineau S Fau - Mojica FJM, Mojica Fj Fau - Wolf YI, Wolf Yi Fau - Yakunin AF, Yakunin Af Fau - van der Oost J et al: Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol* 2011, 9(6):467-477.
- [5]Makarova KS, Zhang F, Koonin EV: SnapShot: Class 1 CRISPR-Cas Systems. *Cell* 2017, 168(5):946-946.e941.
- [6]Makarova KS, Zhang F, Koonin EV: SnapShot: Class 2 CRISPR-Cas Systems. *Cell* 2017, 168(1-2):328-328.e321.
- [7]Jacinto FV, Link W, Ferreira BI: CRISPR/Cas9-mediated genome editing: From basic research to translational medicine. *J Cell Mol Med* 2020:10.1111/jcmm.14916.
- [8]Abudayyeh OO, Gootenberg JS, Konermann S, Joung J, Slaymaker IM, Cox DBT, Shmakov S, Makarova KS, Semenova E, Minakhin L et al: C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector. *Science* 2016, 353(6299):aaf5573-aaf5573.
- [9]Shmakov S, Abudayyeh OO, Makarova KS, Wolf YI, Gootenberg JS, Semenova E, Minakhin L, Joung J, Konermann S, Severinov K et al: Discovery and Functional Characterization of Diverse Class 2 CRISPR-Cas Systems. *Molecular cell* 2015, 60(3):385-397.
- [10]East-Seletsky A, O'Connell MR, Knight SC, Burstein D, Cate JHD, Tjian R, Doudna JA: Two distinct RNase activities of CRISPR-C2c2 enable guide-RNA processing and RNA detection. *Nature* 2016, 538(7624):270-273.

- [11]Knott GJ, East-Seletsky A, Cofsky JC, Holton JM, Charles E, O'Connell MR, Doudna JA: Guide-bound structures of an RNA-targeting A-cleaving CRISPR-Cas13a enzyme. *Nat Struct Mol Biol* 2017, 24(10):825-833.
- [12]East-Seletsky A, O'Connell MR, Burstein D, Knott GJ, Doudna JA: RNA Targeting by Functionally Orthogonal Type VI-A CRISPR-Cas Enzymes. *Molecular cell* 2017, 66(3):373-383.e373.
- [13]Liu L, Li X, Wang J, Wang M, Chen P, Yin M, Li J, Sheng G, Wang Y: Two Distant Catalytic Sites Are Responsible for C2c2 RNase Activities. *Cell* 2017 Jan 12, 168(1-2):121-134.e112.
- [14]Slaymaker IM, Mesa P, Kellner MJ, Kannan S, Brignole E, Koob J, Feliciano PR, Stella S, Abudayyeh OO, Gootenberg JS et al: High-Resolution Structure of Cas13b and Biochemical Characterization of RNA Targeting and Cleavage. *Cell Rep* 2019 Mar 26, 26(13):3741-3751.e3745. .
- [15]Zhang B, Ye W, Ye Y, Zhou H, Saeed A, Chen J, Lin J, Perčulija V, Chen Q, Chen CJ et al: Structural insights into Cas13b-guided CRISPR RNA maturation and recognition. *Cell Res* 2018 Dec, 28(12):1198-1201.
- [16]Zhang BA-O, Ye Y, Ye W, Perčulija V, Jiang H, Chen Y, Li Y, Chen J, Lin J, Wang S et al: Two HEPN domains dictate CRISPR RNA maturation and target cleavage in Cas13d. *Nat Commun* 2019 Jun 11, 10(1):2544.
- [17]Liu L, Li X, Ma J, Li Z, You L, Wang J, Wang M, Zhang X, Wang Y: The Molecular Architecture for RNA-Guided RNA Cleavage by Cas13a. *Cell* 2017, 170(4):714-726.e710.
- [18]Liu L, Li X, Wang J, Wang M, Chen P, Yin M, Li J, Sheng G, Wang Y: Two Distant Catalytic Sites Are Responsible for C2c2 RNase Activities. *Cell* 2017, 168(1-2):121-134.e112.
- [19]Hsu PD, Lander ES, Zhang F: Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell* 2014, 157(6):1262-1278.
- [20]Komor AC, Badran AH, Liu DR: CRISPR-Based Technologies for the Manipulation of Eukaryotic Genomes. *Cell* 2017, 168(1-2):20-36.
- [21]Jing X, Xie B, Chen L, Zhang N, Jiang Y, Qin H, Wang H, Hao P, Yang S, Li X: Implementation of the CRISPR-Cas13a system in fission yeast and its repurposing for precise RNA editing. *Nucleic Acids Res* 2018 Sep 6, 46(15):e90.
- [22]Cox DA-O, Gootenberg JA-O, Abudayyeh OA-O, Franklin BA-O, Kellner MA-O, Joung J, Zhang FA-O: RNA editing with CRISPR-Cas13. *Science* 2017 Nov 24, 358(6366):1019-1027.
- [23]Cox DBT, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Franklin B, Kellner MJ, Joung J, Zhang F: RNA editing with CRISPR-Cas13. *Science* 2017, 358(6366):1019-1027.
- [24]Zhao X, Liu L, Lang J, Cheng K, Wang Y, Li X, Shi J, Wang Y, Nie G: A CRISPR-Cas13a system for efficient and specific therapeutic targeting of mutant KRAS for pancreatic cancer treatment. *Cancer Lett* 2018, 431:171-181.
- [25]Ding M, Zhan H, Liao X, Li A, Zhong Y, Gao Q, Liu Y, Huang W, Cai Z: Enhancer RNA - P2RY2e induced by estrogen promotes malignant behaviors of bladder cancer. *Int J Biol Sci* 2018 Jul 27, 14(10):1268-1276.
- [26]Qi F, Tan B, Ma F, Zhu B, Zhang L, Liu X, Li H, Yang J, Cheng B: A Synthetic Light-switchable System based on CRISPR Cas13a Regulates the Expression of LncRNA MALAT1 and Affects the Malignant Phenotype of Bladder Cancer Cells. *Int J Biol Sci* 2019, 15(8):1630-1636.
- [27]Fan J, Liu Y, Liu L, Huang Y, Li X, Huang W: A Multifunction Lipid-Based CRISPR-Cas13a Genetic Circuit Delivery System for Bladder Cancer Gene Therapy. *ACS Synth Biol* 2020:10.1021/acssynbio.1029b00349.
- [28]Wang Q, Liu X, Zhou J, Yang C, Wang G, Tan Y, Wu Y, Zhang S, Yi K, Kang C: The CRISPR-Cas13a Gene-Editing System Induces Collateral Cleavage of RNA in Glioma Cells. *Adv Sci (Weinh)* 2019, 6(20):1901299-1901299.
- [29]Zhang Z, Wang Q, Liu Q, Zheng Y, Zheng C, Yi K, Zhao Y, Gu Y, Wang Y, Wang C et al: Dual-Locking Nanoparticles Disrupt the PD-1/PD-L1 Pathway for Efficient Cancer Immunotherapy. *Adv Mater* 2019 Dec, 31(51):e1905751.
- [30]Jackson AL, Bartz SR, Schelter J, Kobayashi SV, Burchard J, Mao M, Li B, Cavet G, Linsley PS: Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nat Biotechnol* 2003, 21(6):635-637.
- [31]Rao DD, Vorhies JS, Senzer N, Nemunaitis J: siRNA vs. shRNA: similarities and differences. *Adv Drug Deliv Rev*



2009, 61(9):746-759.

[32]Boettcher M, McManus MT: Choosing the Right Tool for the Job: RNAi, TALEN, or CRISPR. *Molecular cell* 2015, 58(4):575-585.

[33]Abudayyeh OO, Gootenberg JS, Essletzbichler P, Han S, Joung J, Belanto JJ, Verdine V, Cox DBT, Kellner MJ, Regev A et al: RNA targeting with CRISPR-Cas13. *Nature* 2017, 550(7675):280-284.

[34]Wilson RC, Doudna JA: Molecular mechanisms of RNA interference. *Annu Rev Biophys* 2013, 42:217-239.

[35]Unniyampurath U, Pilankatta R, Krishnan MN: RNA Interference in the Age of CRISPR: Will CRISPR Interfere with RNAi? *Int J Mol Sci* 2016, 17(3):291-291.

[36]Granados-Riveron JT, Aquino-Jarquín G: CRISPR-Cas13 Precision Transcriptome Engineering in Cancer. *Cancer research* 2018, 78(15):4107-4113.

[37]Aman R, Ali Z, Butt H, Mahas A, Aljedaani F, Khan MZ, Ding S, Mahfouz M: RNA virus interference via CRISPR/Cas13a system in plants. *Genome Biol* 2018, 19(1):1-1.

[38]Aman R, Mahas A, Butt H, Aljedaani FA-OX, Mahfouz M: Engineering RNA Virus Interference via the CRISPR/Cas13 Machinery in Arabidopsis. LID - 10.3390/v10120732 [doi] LID - 732. *Viruses* 2018 Dec 19, 10(12):732.

[39]Zhan X, Zhang F, Zhong Z, Chen R, Wang Y, Chang L, Bock RA-O, Nie B, Zhang JA-O: Generation of virus-resistant potato plants by RNA genome targeting. *Plant Biotechnol J* 2019 Sep, 17(9):1814-1822.

[40]Koneremann S, Lotfy P, Brideau NJ, Oki J, Shokhirev MN, Hsu PD: Transcriptome Engineering with RNA-Targeting Type VI-D CRISPR Effectors. *Cell* 2018 Apr 19, 173(3):665-676.e614.

[41]He B, Peng W, Huang J, Zhang H, Zhou Y, Yang X, Liu J, Li Z, Xu C, Xue M et al: Modulation of metabolic functions through Cas13d-mediated gene knockdown in liver. *Protein Cell* 2020 Mar 18:1-7.

[42]Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Lee JW, Essletzbichler P, Dy AJ, Joung J, Verdine V, Donghia N, Daringer NM, Freije CA et al: Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2. *Science* 2017, 356(6336):438-442.

[43]Gootenberg JA-O, Abudayyeh OA-O, Kellner MA-O, Joung J, Collins JJ, Zhang FA-O: Multiplexed and portable nucleic acid detection platform with Cas13, Cas12a, and Csm6. *science* 2018 Apr 27, 360(6387):439-444.

[44]Chang Y, Deng Y, Li T, Wang J, Wang T, Tan F, Li X, Tian K: Visual detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus using CRISPR-Cas13a. *Transbound Emerg Dis* 2019:10.1111/tbed.13368.

[45]Liu Y, Xu H, Liu C, Peng L, Khan H, Cui L, Huang R, Wu C, Shen S, Wang S et al: CRISPR-Cas13a Nanomachine Based Simple Technology for Avian Influenza A (H7N9) Virus On-Site Detection. *J Biomed Nanotechnol* 2019, 15(4):790-798.

[46]Qin P, Park M, Alfson KJ, Tamhankar M, Carrion R, Patterson JL, Griffiths A, He Q, Yildiz A, Mathies R et al: Rapid and Fully Microfluidic Ebola Virus Detection with CRISPR-Cas13a. *ACS Sens* 2019, 4(4):1048-1054.

[47]Shan Y, Zhou X, Huang R, Xing D: High-Fidelity and Rapid Quantification of miRNA Combining crRNA Programmability and CRISPR/Cas13a trans-Cleavage Activity. *Anal Chem* 2019, 91(8):5278-5285.

[48]Chen Y, Yang S, Peng S, Li W, Wu F, Yao Q, Wang F, Weng X, Zhou X: N1-Methyladenosine detection with CRISPR-Cas13a/C2c2. *Chem Sci* 2019, 10(10):2975-2979.

[49]Shen J, Zhou X, Shan Y, Yue H, Huang R, Hu JA-O, Xing D: Sensitive detection of a bacterial pathogen using allosteric probe-initiated catalysis and CRISPR-Cas13a amplification reaction. *Nat Commun* 2020 Jan 14, 11(1):267.

[50]Bruch R, Baaske J, Chatelle C, Meirich M, Madlener S, Weber W, Dincer C, Urban GA: CRISPR/Cas13a-Powered Electrochemical Microfluidic Biosensor for Nucleic Acid Amplification-Free miRNA Diagnostics. *Advanced materials (Deerfield Beach, Fla)* 2019, 31(51):e1905311-e1905311.

[51]Chen Q, Tian T, Xiong E, Wang P, Zhou X: CRISPR/Cas13a Signal Amplification Linked Immunosorbent Assay for Femtomolar Protein Detection. *Anal Chem* 2020, 92(1):573-577.

[52]Yuan C, Tian T, Sun J, Hu M, Wang X, Xiong E, Cheng M, Bao Y, Lin W, Jiang J et al: Universal and Naked-Eye Gene Detection Platform Based on CRISPR/Cas12a/13a System. *Anal Chem* 2020:10.1021/acs.analchem.1029b05597.

[53]Koneremann S, Lotfy P, Brideau NJ, Oki J, Shokhirev MN, Hsu PD: Transcriptome Engineering with RNA-Targeting Type VI-D CRISPR Effectors. Cell 2018 Apr 19, 173(3):665-676.e614. .

[54]Yang LZ, Wang Y, Li SQ, Yao RW, Luan PF, Wu H, Carmichael GG, Chen LL: Dynamic Imaging of RNA in Living Cells by CRISPR-Cas13 Systems. Mol Cell 2019 Dec 19, 76(6):981-997.e987.

[55]Rauch S, He E, Srien M, Zhou H, Zhang Z, Dickinson BC: Programmable RNA-Guided RNA Effector Proteins Built from Human Parts. Cell 2019, 178(1):122-134.e112.