

# 第三款CRISPR基因剪刀来袭

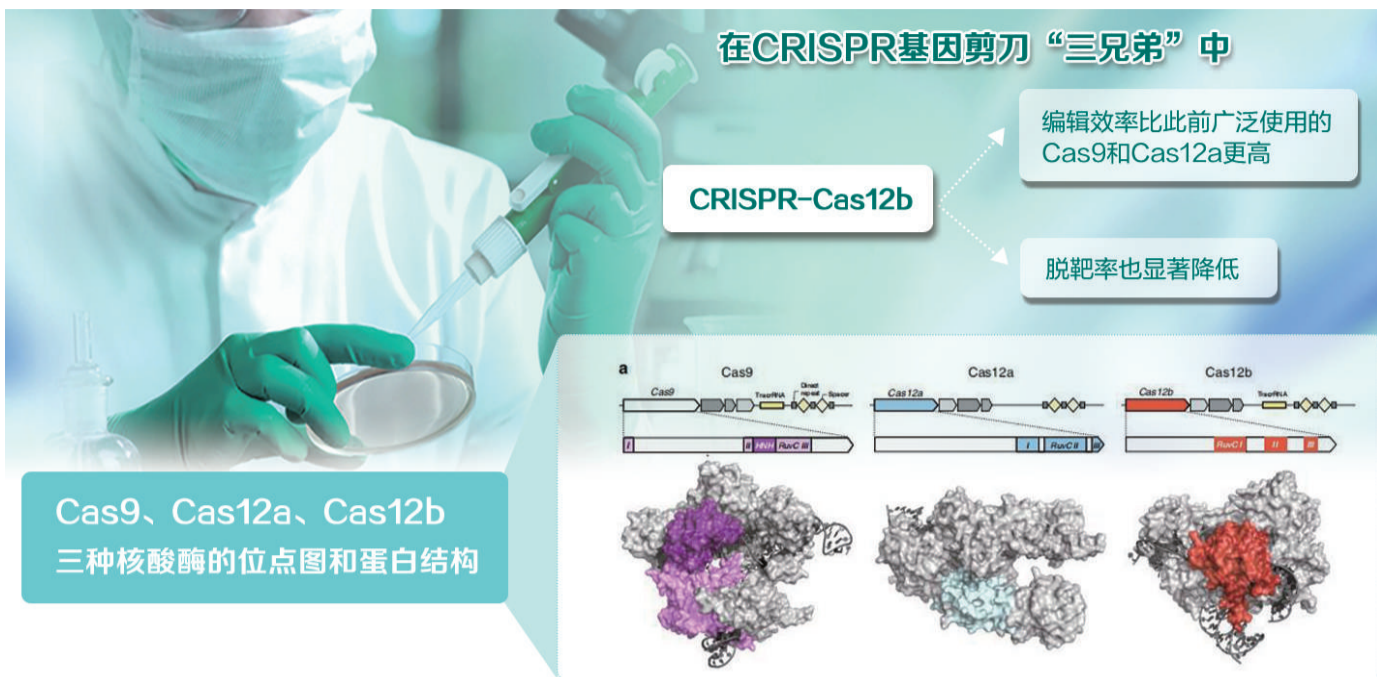
经济日报·中国经济网记者 余惠敏

## 走近核燃料再循环

石磊 刘洪军

### 热点追踪

近日,顶级期刊《自然—通讯》发表论文报道了第三款CRISPR基因剪刀——CRISPR-Cas12b,这种新工具是第三个可以编辑人类细胞基因组的CRISPR-Cas系统,并很可能是更好的基因剪刀,将会带给研究人员更多选择与施展空间



第三款CRISPR基因剪刀论文作者是美国麻省理工学院—哈佛大学博德研究所教授张锋,他也是CRISPR-Cas基因编辑系统的先驱者之一。此前,他已成功参与开发出Cas9系统、Cas12a系统,如今成功凑齐Cas12b——CRISPR基因剪刀的第三个潜在基因组编辑系统。

### 基因剪刀三兄弟

CRISPR-Cas9是目前科学家们最常用的多功能基因组编辑工具,但除此之外,Cas蛋白家族中的Cas12a和Cas12b也具备成为基因剪刀的潜力

此前,科学家们在实验室最常用的多功能基因组编辑工具是CRISPR-Cas9,这是一种RNA导向的核酸酶,可以切割DNA。

Cas9系统最初由美国加州大学伯克利分校、瑞典于默奥大学和美国麻省理工学院—哈佛大学博德研究所张锋等实验室在2012年和2013年报道。该系统有效实现了哺乳动物基因组的编辑,并带动了基因编辑领域迅猛发展,将基因编辑技术成功拓展到基因转录表达调控、表观遗传修饰、全基因组功能筛选、碱基编辑、基因组成像和细胞谱系追踪等多种生物学应用。它能使基因组更有效地产生变化或突变,效率比既往基因编辑技术更高,这让CRISPR成为“生物科学领域的游戏规则改变者”,如今发展成为该领域最热门的研究工具之一。

然而,Cas9并非Cas蛋白家族中唯一一种RNA导向的核酸酶,除了Cas9之外,研究人员还发现Cas12a和Cas12b也具备成为基因剪刀的潜力。

其中,Cas12a已经被开发成基因组编辑工具。张锋等人在2015年发现并改造的Cas12a(又称为Cpf1)系统能实现哺乳动物等多个物种的基因组编辑。而且与Cas9相比,Cas12a具有一项优势:它比标准的Cas9要小,更容易进入组织和细胞;它剪切时识别位点很远,这帮助研究人员在编辑位置的选择上有了更多施展空间。

于是,在CRISPR基因剪刀的潜力者哥仁中,就剩下Cas12b(又称为C2c1)仍未开发成功。这种蛋白比Cas9和Cas12a

更小,更容易通过病毒载体实现细胞间递送,所以很可能是更好的基因剪刀。

### 张锋团队的研究

Cas12b的最佳活性“工作环境”需要达到48℃,为此,张锋团队对Cas12b重新进行了设计,不但增强它在人体体温37℃下的活性,甚至在编辑效率和低脱靶率上更为优异

理想丰满,现实骨感。由于Cas12b具有嗜高温特性,很难开发成好用的基因编辑工具。作为DNA裂解酶,Cas12b来自一种嗜酸耐热菌,它的最佳活性“工作环境”需要达到48℃。这种温度对于普通哺乳动物来说,实在难以承受。而一旦达不到温度要求,Cas12b的酶活性就不能发挥,会选择罢工。

对此,张锋团队对Cas12b开展了研究。他们先在Cas12b蛋白家族中寻找一种喜欢常温的成员,并鉴定出在37℃时仍能保持核酸酶活性的BhCas12b。但实验发现,原始结构的野生型BhCas12b会切割双链DNA中的非靶标单链,且温度越低、错误越多,导致编辑效率降低。

为解决这一问题,张锋团队对Cas12b重新进行了设计,以增强它在人体体温37℃下的活性。根据蛋白质晶体结构的线索,研究人员通过4个点位突变,让酶的活性点位更容易和DNA靶序列接近,从而得到重新设计的新款Cas12b。

与Cas9相比,重新设计的Cas12b在细胞培养实验中对于靶序列具有更高的特异性。而目标特异性,是指基因剪刀只瞄准那些为它们设定的目标基因,特异性越高则意味着更高的精确性——这对一款功能强大的基因编辑工具来说非常重要。毕竟,脱靶效应是CRISPR技术最大的隐患之一;Cas9酶有时会在靶点以外的地方进行切割,而这种切割有可能引起肿瘤的发生,危害健康。

对此,张锋团队在细胞培养实验中,针对多个基因的多个靶序列,考察了新款基因剪刀的编辑效率。实验结果显示,新款Cas12b的编辑效率与Cas9、Cas12a相当,甚至更高;而且,新款Cas12b导致的

错误插入缺失比常用的Cas9少得多,脱靶率显著降低。

### 李伟团队的研究

中国科学院的李伟团队是Cas12b基因剪刀研究领域的首发者,针对这项新技术,他们已于一年前提交了专利申请,并开始开发该技术在基因治疗中的应用

不过,张锋团队的这款Cas12b基因剪刀还不能算首发。

2018年11月27日,《细胞发现》发表了中国科学院动物研究所研究员李伟团队的类似研究成果。该研究团队通过系统挖掘,成功鉴定出若干能在人体生理温度下工作的Cas12b酶。经过系统改造,有两种Cas12b酶被成功开发成哺乳动物基因组编辑工具,能够编辑人类细胞基因组,并应用于制备动物疾病模型。他们开发的来自酸嗜性脂酸芽孢杆菌(AaCas12b)的

Cas12b,可以在31℃至59℃温度范围内对哺乳动物基因组进行编辑。

在那篇论文中,研究者展示了这一工具的三大优点:一是Cas12b比应用最为广泛的SpCas9和Cas12a要更小,因此更容易用于需要在体递送的临床基因治疗;二是Cas12b能够在宽广的温度范围和pH范围保持更高的酶活性,有望适用于具有不同生理温度的多个物种。同时与SpCas9相比,Cas12b核糖核酸酶(RNP)在血浆中更稳定;三是Cas12b很难耐受向导RNA与靶DNA之间的碱基错配,因此比SpCas9和Cas12a/Cpf1的脱靶效应更小,这意味着它在进行基因组编辑时更加安全。

针对这项新技术,该研究团队已于一年前提交了专利申请,并已开始开发这项技术在基因治疗中的应用。

当然,就像当初Cas9那款基因剪刀的打磨不是由一个团队完成的那样,想要将Cas12b改造成和Cas9一样应用广泛的工具,仍有很多工作要做。但第三个潜在基因组编辑系统的出现,显然将会带给研究人员更多选择。

### 链接

## CRISPR 专利大战

此前,CRISPR基因编辑技术因其巨大的商业价值曾引发专利大战。其中最引人注目的是张锋所在的博德研究所与加州大学伯克利分校之间的专利之争。由于这两家机构的专利范围广,对CRISPR-Cas9的大多数商业应用至关重要。

其中,加州大学伯克利分校提出的专利是不限于任何环境的CRISPR-Cas9系统,博德研究所的专利主要为真核生物环境中的CRISPR-Cas9系统。

美国专利商标局专利审判和上诉委员会曾于2017年作出关键裁决:麻省理工学院—哈佛大学—博德研究所的专利,与加州大学伯克利分校的发现并不“冲突”,博德研究所可以保留其在真核生物中使用CRISPR-Cas9的专利。之后,加州大学伯克利分校提起上诉,2018年,联邦巡回上诉法院维持判决。

博德研究所的胜利,是因专利提出的一个关键区别:专利指定了CRISPR在真核细胞中的特殊应用,而伯克利的专利却没有。这就是为什么美国专利商标局裁定博德研究所的专利不会干扰伯克利的专利,因此可以保留。法官们认为,在张锋之前没有研究人员能够绝对确认CRISPR能用于真核细胞(人类细胞等)。因此,张锋研究团队的发明并非简单的扩展,而真核细胞的基因编辑领域是CRISPR最有“钱”途的应用。例如,可以通过基因编辑产生新的农作物,或是将基因编辑用于人类疾病治疗。

值得一提的是,专利判决并不会影响CRISPR-Cas9技术在科研领域的应用。博德研究所方面称,全世界的科研人员都可以使用该技术开展学术研究,但厂商必须付费使用。

### 延伸阅读

日前,中经合集团宣布:其早期投资的公司“博雅基因”完成Pre-B+轮融资7000万元融资,与此同时,拥有丰富临床经验的李云博士加盟任临床研发部副总裁。博雅基因是一家专注于基因组编辑技术的生物科技公司,致力于使用基因组编辑技术为传统疗法难以治愈的疾病开发新疗法,以及为新药研发提供创新方案。近年来,基因编辑已成为投资热点——2018年10月,中经合投资的另一家硅谷基因编辑公司也获得1.1亿美元的融资,用以助力全球化市场开拓。

基因治疗技术究竟是什么?其发展前景如何?专业人士和资本市场又是如何看待的?

经济日报记者在采访中了解到,除了一些外源性损伤(物理或化学损伤)和细菌性感染外,人类大多数疾病的发生都与基因有关,比如RPE65基因突变会造成先天性黑蒙症,21染色体的增加造成唐氏综合征等。癌症也是典型的基因病,比如一旦抑癌基因BRCA1发生遗传性突变,会导致女性罹患乳腺癌和卵巢癌的概率高达70%。另外,心血管疾病、神经系统疾病以及病毒感染(如乙肝、艾滋病)等复

## 基因编辑为何成为投资“新贵”

本报记者 钱菁璇

杂疾病,都与基因有着密不可分的关系。既然如此众多的疾病都与基因有关,那修复基因不就可以从根源上治愈或者预防疾病吗?这就是基因疗法的逻辑和概念。

基因疗法是以核酸(脱氧核糖核酸DNA或核糖核酸RNA)为治疗物质,通过特定的基因转移技术将治疗性核酸输送到患者细胞中(体内或者体外),然后利用这些外源核酸治疗由于基因缺失、突变、扩增或异常表达引起的遗传相关疾病,如恶性肿瘤、心血管病和传染病等的治疗方法。这些外源核酸通过替代或原位修复缺陷基因,或通过其产物干预致病基因的功能,从而在源头上根除疾病发生的原因,或通过其产物改变细胞的生物学特性来帮助治疗疾病。

在业内看来,2017年可以说是基因治疗元年——FDA(美国食品药品监督管理局)除了批准两款基于细胞的基因治疗药物外,还批准了首款经典的基因疗法Luxturna。于2017年12月获批上市的创新基因疗法Luxturna,主要用于治疗患有特定遗传性眼疾的成人患者和儿童,是首款在美国获批的基于靶向特定基因突

变的“直接给药型”基因疗法。

预计未来5年,罕见病处方药市场将迎来高速发展,在2024年达到2620亿美元,占整个处方药市场的20%。这主要受益于基因治疗和细胞治疗等先进生物技术疗法的突破。在不久的将来,还会有一系列基因疗法获得批准上市。

北京大学药学院天然药物与仿生药物国家重点实验室博士后李帅表示:“对于因基因失活造成的疾病,我们可以利用基因疗法为细胞补充相应基因,以实现治疗,这是过去大多采用的治疗方法。然而,还有很多疾病是由于基因突变而导致的,显然不适用‘缺什么补什么’的策略。”对此,最理想的基因治疗是对突变基因进行精准修复——这就要利用基因编辑技术。

简单来说,CRISPR-Cas9是目前为止最强大的基因编辑技术,可以对DNA进行永久性操作,能够广泛应用于临床、科研、农业、工业发酵等领域。而最让人期待的,就是它在医学领域的应用。利用基因编辑技术的基因疗法给予人类无限想象空间,有可能助力癌症治疗,让人体增强等成为现实,甚至连古人梦寐以求的长生不老也不是遥不可及。当然,现阶段

这些仍属想象,每一种技术都不完美——CRISPR-Cas9仍面临着效率和脱靶的问题,并且远非如我们理解的像编辑文字一样精确。

既然基因编辑技术具有广阔前景和市场,目前哪些技术优势值得重点关注呢?中经合集团董事长刘宇环表示:“基因治疗具有两个核心,载体和治疗性基因。其中,治疗性基因以CRISPR系统为主。目前,国内的重点关注方向将是对这个系统在垂直疾病领域的深度应用开发。”他同时指出,基因载体的安全性和靶向性也是非常重要的研究方向。随着相关技术发展,甚至可以将离体的基因治疗转变为在体的基因治疗,大大增强疗法的可及性。此外,基因载体规模化生产的质量控制,以及药物商业化等也是决定公司能否快速发展的关键因素。

“基因编辑技术还可以赋能现有疗法,比如优化CAR-T、异种移植、干细胞等技术。目前,通用型CAR-T疗法仍面临着免疫排斥和移植物抗宿主病的风险,而结合基因编辑技术开展研发,也是未来发展的重要方向。”中经合集团全球医疗合伙人约翰·林强调。

### 眼动追踪技术——

## 缔造“人机交互”下一步

本报讯 记者陈颀报道:一直以来,键盘和鼠标都是电脑操作的常用工具。随着移动设备兴起,触摸屏和语音识别技术也逐渐成为流行的人机交互方式。而作为人机交互的下一步,越来越多的设备还可以通过追踪用户目光来预测其意图。

欧司朗光电半导体(OSRAM)近日发布两款新型红外LED。该产品结合现代摄像传感器和强大的电脑芯片,使原本复杂的眼动追踪系统能够在日常电子消费品中得以应用,开启人机交互全新体验。

人类主要通过视觉来感知周围环境。因此,通过追踪用户的眼睛,该产品可以判断出他们正在关注的内容,以及如何作出反应,并能够记录目光焦点和眼动轨迹。此外,基于最新技术,该产品可应用于用户近距离使用的设备,并可在低功率场景下充分运作。

眼动追踪很早就已投入专项系统的使用,如瘫痪患者能够通过目光的移动操控轮椅和通信工具。但最能体现眼动追踪技术优势的还是游戏和AR(增强现实)一类的应用场景——该系统的响应速度和感官交互可大幅提高用户体验,打造出沉浸式虚拟盛宴。

### 全球新增绿化四分之一来自中国



本版编辑 邱冰  
联系邮箱 jrbxzh@163.com