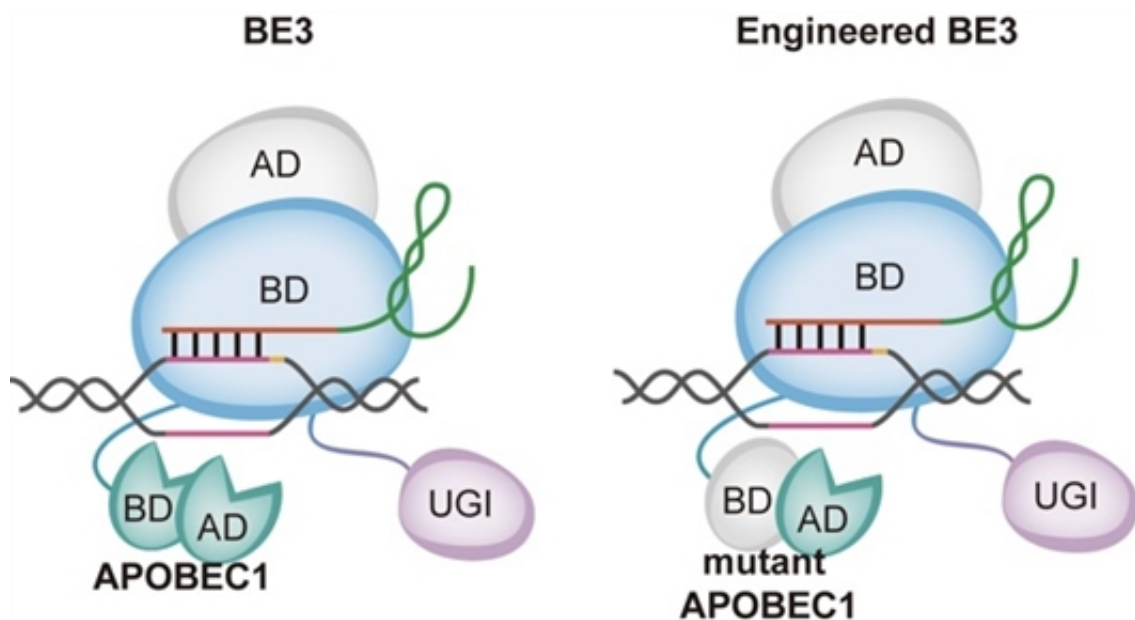


新的单碱基编辑工具高效又安全

作者：writer 来源：爱科学

本文原地址：<https://www.iikx.com/news/progress/9697.html>

本文仅供学习交流之用，版权归原作者所有，请勿用于商业用途！



经典的单碱基编辑工具脱氨酶具有ssDNA结合区域BD和催化活性区域AD（左图）。YE1-BE3-FNLS单碱基编辑工具的脱氨酶丢失了ssDNA结合区域BD，保留了催化活性区域AD（右图）。受访者供图

5月18日，《自然—方法》（Nature Methods）在线发表中国农科院深圳基因组研究所、中科院神经科学研究所与中科院马普计算生物学研究所等合作的最新成果。

他们根据蛋白结构预测了基因编辑过程中决定脱靶效应的重要氨基酸，并在不影响催化活性的情况下，突变相应氨基酸，最终得到了显著降低基因编辑脱靶效应的单碱基编辑工具。

2019年3月，该团队曾在《科学》杂志发布用于检测基因编辑技术脱靶率的GOTI技术。论文共同通讯作者、中国农科院深圳基因组研究所研究员左二伟告诉《中国科学报》，这项最新成果即为基于GOTI深入探索解决单碱基编辑器脱靶效应的方法。

DNA单碱基编辑的脱靶困境

镰刀型贫血症是典型的由于基因点突变引起的遗传疾病，目前全球有300多万患者，另有4000多万人具有镰刀型贫血症表征。截至2013年，此疾病已造成全球17.6万人死亡。

全世界有约3亿名罕见病患者。在已知的7000多种罕见病中有80%是单基因遗传病，50%发生在儿童时期。预计2022年有40种基因治疗新药上市。

基因编辑技术是当今生物学研究领域最为重要的颠覆性技术之一，以CRISPR/Cas9系统为核心的基因编辑工具被广泛应用于造血干细胞、神经细胞等医学研究领域。

传统的CRISPR/Cas9系统要切断DNA双链，这给基因编辑结果带来了一定不确定性。左二伟说，其衍生工具——单碱基编辑技术可以在不切断DNA双链的情况下实现单核苷酸的定向突变。这为治疗单碱基突变引起的遗传性疾病带来了希望。

基于CRISPR/Cas9系统，2016年，哈佛大学教授David Liu课题组首次报道了可作用于单个碱基的新型基因编辑工具——胞嘧啶脱氨酶单碱基编辑技术（简称CBE），立刻受到广泛关注。

该系统利用具有催化活性的胞嘧啶脱氨酶，在sgRNA的引导下，靶向结合到基因组特定位点，将胞嘧啶C转换成胸腺嘧啶T。同理还可实现鸟嘌呤G到腺嘌呤A的转换。

2017年，David

Liu课题组又开发出腺嘌呤单碱基编辑工具——ABE系统，可实现高效的T转换为C，A转换为G。

然而，2019年，单碱基编辑工具的安全性受到了质疑。杨辉、高彩霞、Keith Joung、David Liu等国内外多个研究团队发文报道了单碱基编辑器存在严重的DNA和RNA脱靶效应。

虽然此前的研究通过引入突变的方式显著降低了RNA的脱靶，但是胞嘧啶单碱基编辑器的DNA脱靶依然没有得到解决。

改造脱靶效应的罪魁祸首

GOTI技术是全新一代基因编辑脱靶检测技术，该技术在灵敏性、准确性和适用范围上远超之前的脱靶检测技术。

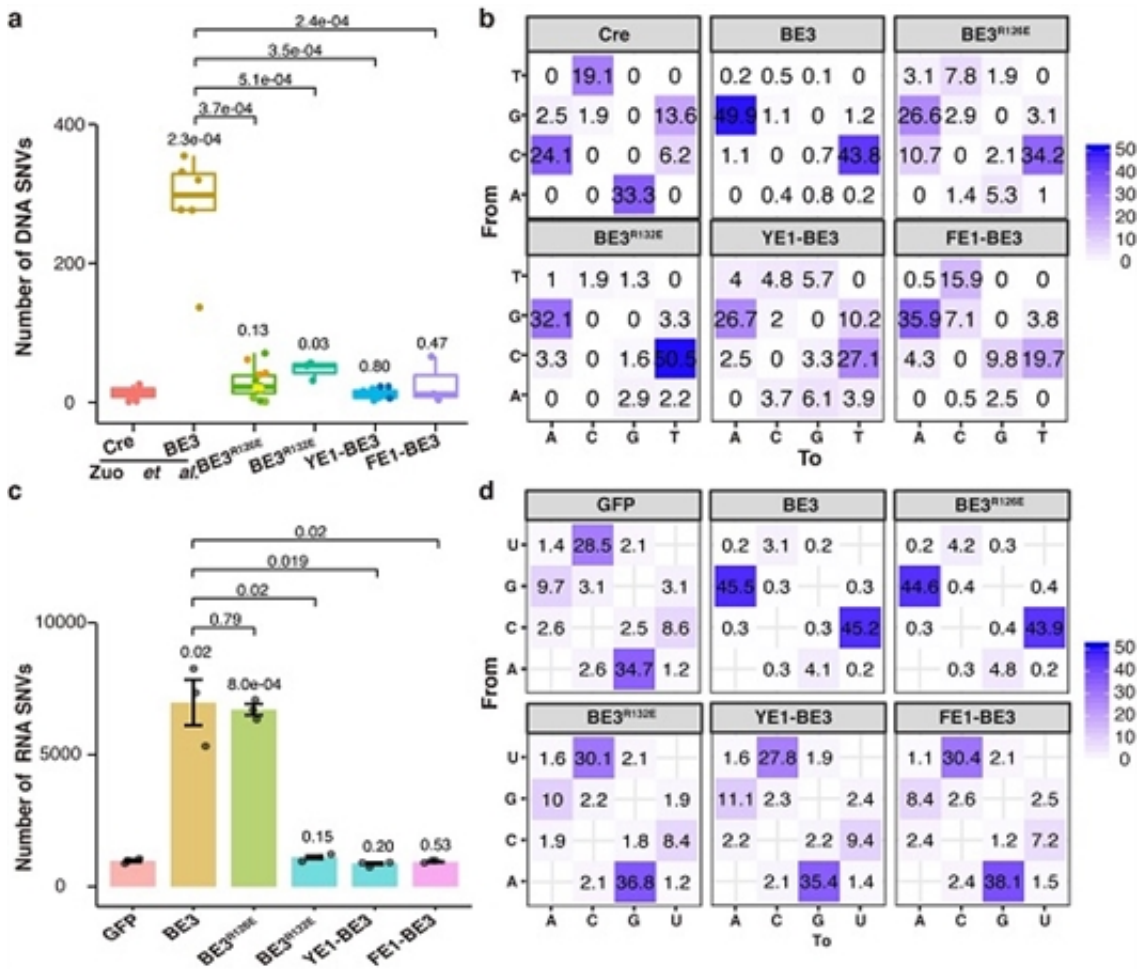
有了GOTI技术以后才能准确评价基因编辑技术的安全性。论文共同通讯作者、中科院上海神经所研究员杨辉告诉《中国科学报》，在此基础上才能有目的地去改进已有的单碱基编辑工具或开发新的编辑工具。

单碱基编辑工具是人类根据蛋白工程设计，以氨基酸序列构成的蛋白质分子，该系统由脱氨酶和nCas9等组件构成融合蛋白发挥功能。左二伟介绍，利用GOTI技术，他们发现，CBE的脱靶是由胞嘧啶脱氨酶造成的。

脱氨酶在编辑工具中扮演着催化的角色。它本来应该在sgRNA带领下，按照碱基配对规律，带领Cas9蛋白结合到基因组相应位置，对单碱基进行转化。但脱氨酶本身具有ssDNA和RNA结合能力，它会带着Cas9蛋白在任意‘喜欢’的位点引发碱基突变。左二伟说，这一类型的碱基突变不是在sgRNA指导下，也没有在设计的位置发生，是一种完全随机无法预测的脱靶效应。

找到了CBE脱靶的原因，该团队即开始着手于改进单碱基编辑工具。

论文共同通讯作者、中科院马普计算生物学研究所研究员李亦学在接受《中国科学报》采访时说，在脱靶效应检测中，计算生物学能提供详细的计算方法和模式，从而通过分析实验数据快速获得结论，分析脱靶的程度和危害。



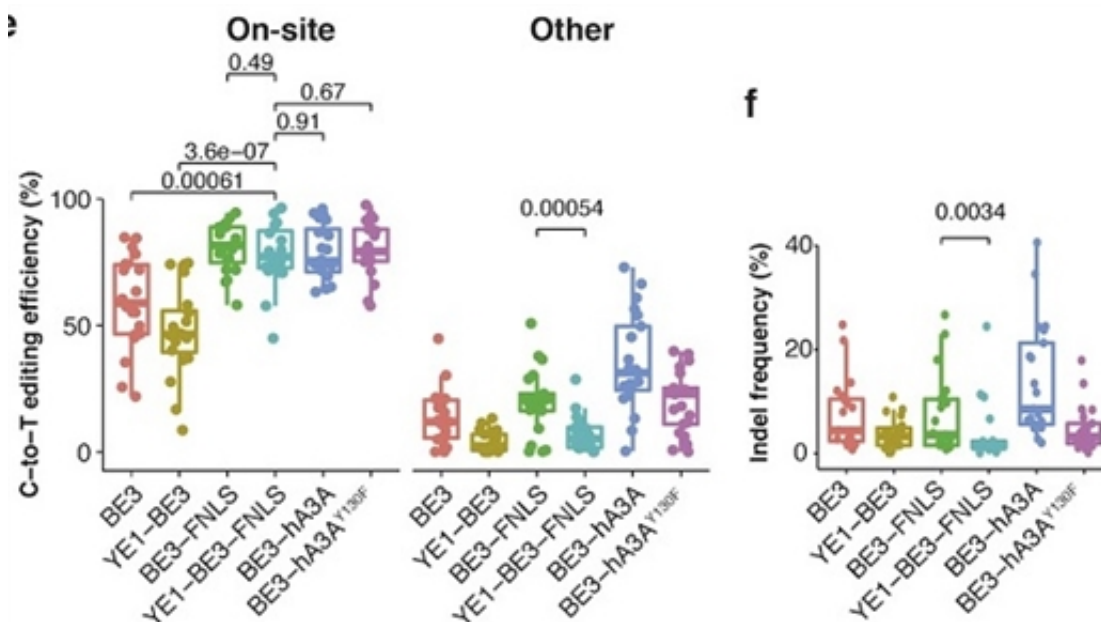
CBE突变体的DNA和RNA脱靶评估 受访者供图

而在改进单碱基编辑工具时，计算生物学则发挥了强大的运算能力：利用高通量的生物信息学手段来筛选脱氨酶改造的目的位点。这对今后的研究有很大的启示作用。

我们利用同源序列比对的方法，预测了结构未知的脱氨酶与ssDNA或RNA结合的区域，并在这个区域的重要氨基酸上引入了特定的突变。通过改变蛋白构象，消除了脱氨酶与ssDNA或RNA的结合能力。论文共同第一作者、中科院分子细胞卓越创新中心博士孙怡迪告诉《中国科学报》。

他们一共构建了23个CBE突变体，并全面检测突变体是否存在全基因范围内的脱靶。其中4个突变体既不会影响基因编辑效率，还能够降低随机脱靶效应。

我们优化了上述CBE突变体，增加标签和核定位序列，在高保真的情况下，显著提高了基因编辑效率，从而成为既安全又高效的新的基因编辑工具YE1-BE3-FNLS。杨辉说，这一新工具有望应用于遗传疾病基因治疗，推动基因编辑临床化应用。



YE1-BE3-FNLS表现出最高的目的位点编辑效率、最低的by-stander编辑和最低的indel频率。受访者供图

离商业化还有很长的一段路

上述研究结果和David Liu团队今年2月10日发表在《自然—生物技术》的研究结论一致。两篇文章都报道YE1在保持较高的编辑效率的同时降低了DNA和RNA上的脱靶。

但杨辉团队基于GOTI的方法是不受限制的，不仅可以检测单碱基编辑器，还可用于其它基于融合蛋白的基因编辑工具的安全性检测和改进。

我们希望GOTI技术能成为用于检测基因编辑脱靶的金标准。杨辉说，无论基因编辑技术的科学研究，还是遗传病的基因疗法，都应该用高效准确的检测方法去评估其安全性，也就是脱靶效应。

在实验室阶段还是比较容易实现GOTI技术的。但如果应用于临床，则还有很多需要优化和降低成本的工作。从提出思路和方向到真正实现商业化，还有很长的一段路要走。李亦学说。

左二伟认为，新的单碱基编辑工具对于基因治疗中常用的载体腺相关病毒来说，体积有点大。这是他们未来需要改进的地方。

这项技术需要直接消化掉整个小鼠的发育良好的胚胎，这种操做很难用在人的身上。孙怡迪说，新的基因编辑技术如何实现无创伤检测风险，是一件值得思考的事。

杨辉则强调，目前对脱靶效应的检测、对单碱基编辑工具的改进等，都是在实验室完成的，我们已经解决了基因编辑技术的安全性和有效性。而基因治疗的安全性和有效性尚待动物试验和临床试验进一步地验证。

实际上，中外科学家已经分别启动了基于传统基因编辑技术的镰刀型贫血症基因疗法的临床申请。目前还没有单碱基编辑工具的基因疗法。我们还在努力。杨辉说。（来源：中国科学报李晨）

相关论文信息：<https://doi.org/10.1038/s41592-020-0832-x>

版权声明：凡本网注明来源：中国科学报、科学网、科学新闻杂志的所有作品，网站转载，请在正文上方注明来源和作者，且不得对内容作实质性改动；微信公众号、头条号等新媒体平台，转载请联系授权。邮箱：shouquan@stimes.cn。

作者：左二伟等 来源：《自然—方法》

更多 科学进展 请访问 <https://www.iikx.com/news/progress/>

本文版权归原作者所有，请勿用于商业用途，[爱科学iikx.com](https://www.iikx.com)转发