



小型二类Cas效应蛋白研究进展

刘博, 黄诗晴, 郑巍巍*

福建师范大学生命科学学院, 福州 350117

* 联系人, Email: vivizheng@fjnu.edu.cn

收稿日期: 2025-04-06; 接受日期: 2025-07-16; 网络版发表日期: 2025-10-23

国家自然科学基金(批准号: 82172287)和福建省自然科学基金(批准号: 2022J01638)资助

摘要 基于CRISPR-Cas的基因组编辑技术开创了一个新时代, 然而目前最常用的基因组编辑工具Cas9由于其体积较大而在递送过程中存在局限, 因此发掘更多的小型Cas效应蛋白以丰富基因编辑工具库具有重要意义. 与Cas9同属第二大类的II型、V型、VI型CRISPR-Cas系统成员众多, 其中许多效应蛋白体积较小, 同时具有不亚于大型Cas效应蛋白的基因编辑能力. 本综述回顾第二大类II型、V型、VI型的小型Cas效应蛋白(此处定义为小于1000 aa)的功能与作用机制, 并对其应用开发进展进行总结, 同时分析这些小型Cas效应蛋白应用于基因编辑面临的问题, 并对未来更多小型基因编辑工具的开发进行探讨与展望.

关键词 CRISPR-Cas, 小型Cas效应蛋白, 基因编辑

CRISPR-Cas系统由成簇的规律间隔的短回文重复序列(clustered regularly interspaced short palindromic repeat, CRISPR)与其相关蛋白(CRISPR associated proteins, Cas)组成^[1-4], 最初是在1987年于大肠杆菌中发现的, 是细菌和古细菌的一种适应性免疫机制, 用以抵抗噬菌体或外来遗传物质入侵^[4-8]. CRISPR-Cas系统发挥适应性免疫作用可分为三个阶段: 适应、crRNA成熟与干扰. 如图1所示, 在适应阶段, Cas1和Cas2效应蛋白形成复合体, 从外源DNA中剪切一段靶标DNA(即原间隔序列, protospacer), 并整合在自身基因组中, 插入两个重复序列(repeat)之间, 形成新的间隔序列(spacer), 最终形成repeat和spacer交替排布的CRISPR阵列分布. 外源基因原间隔序列的两端往往存在特殊的原间隔序列临近基序(protospacer adjacent motif,

PAM)或原间隔序列侧翼位点(protospacer flanking site, PFS), 作为外源基因的“身份证”, 防止自身免疫的出现. 在crRNA成熟阶段, CRISPR序列转录产生crRNA的前体, 即pre-crRNA, 并最终加工成为成熟的、只包含一个repeat序列与一个spacer序列的crRNA. 这一成熟过程可由单个Cas蛋白进行加工, 也可能需要RNase III、反向作用RNA(trans-acting RNA, tracrRNA)等其他元件的辅助. 成熟的crRNA与Cas效应蛋白形成蛋白-RNA复合物, 处于“待命”状态. 在干扰阶段, 当外源基因再次入侵时, Cas-crRNA复合物识别外源基因上的PAM或PFS, crRNA与靶标核酸通过碱基互补配对的方式进行识别, 进而激活Cas效应蛋白的核酸酶活性从而完成对外源核酸的切割.

自2013年CRISPR-Cas9系统首次在哺乳动物细胞

引用格式: 刘博, 黄诗晴, 郑巍巍. 小型二类Cas效应蛋白研究进展. 中国科学: 生命科学, 2025, 55: 2580-2597

Liu B, Huang S Q, Zheng W W. Research progress of compact Class 2 Cas effector proteins (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2025, 55: 2580-2597, doi: 10.1360/SSV-2025-0095

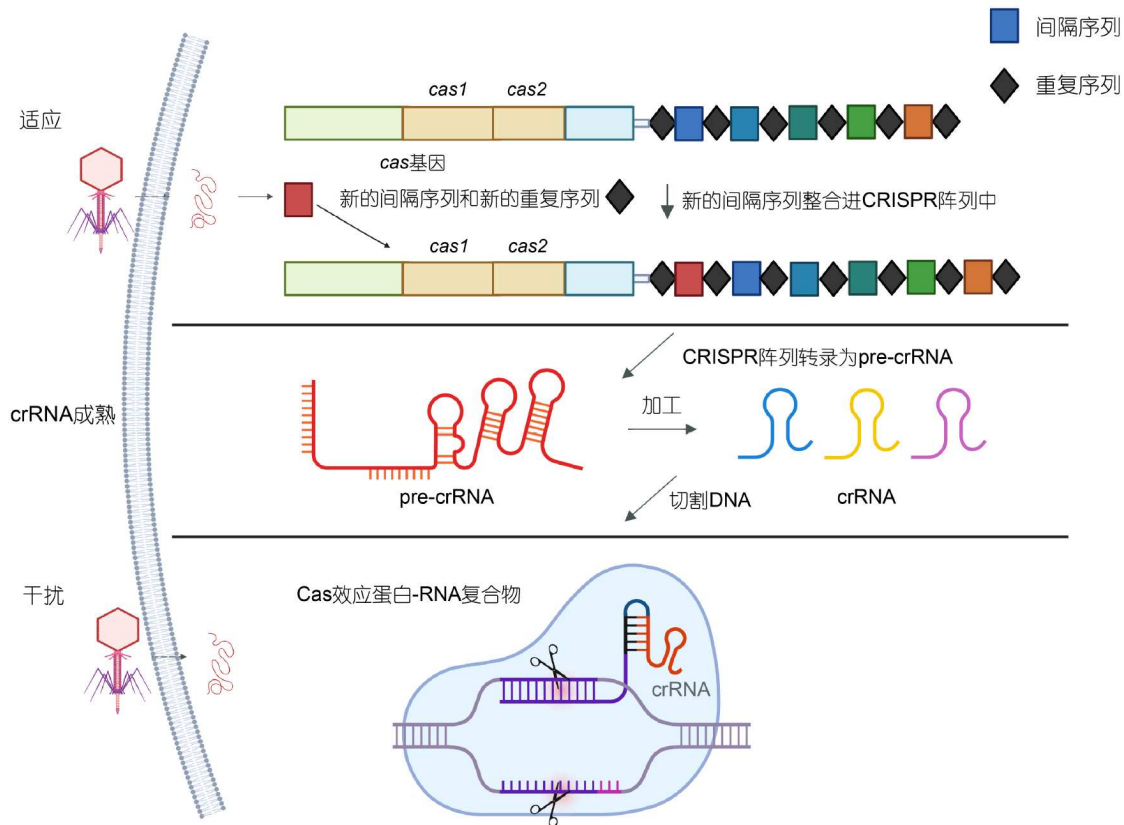


图 1 CRISPR-Cas系统适应性免疫阶段

Figure 1 The phases of the CRISPR-Cas adaptive immune systems

中实现基因组编辑以来, 基于CRISPR的技术已广泛应用于基因组编辑、基因转录调控、表观遗传工程和许多其他领域^[9]. 如Lebek等人^[10]通过CRISPR-Cas9介导的碱基编辑治疗心脏病; Gencay等人^[11]开发出基于CRISPR-Cas系统的口服药物, 用于防治细菌感染; Girish等人^[12]用CRISPR-Cas系统消除癌细胞中多余的染色体, 抑制肿瘤生长. 目前CRISPR-Cas系统应用于基因组编辑面临的一个挑战是, Cas9作为最常用的基因组编辑工具, 因其较大的体积(约1300 aa)已接近腺相关病毒载体(adeno-associated viral, AAV)的包装上限(4.7 kb), 故在递送CRISPR-Cas系统之外难以同时递送其他编辑元件. 因此, 研究者们一直在努力寻找较小的Cas效应蛋白, 丰富CRISPR-Cas的工具库. 随着研究的深入, 不断有新型小体积Cas效应蛋白被发现(图2), 本文就近年发现的小型Cas效应蛋白(在此定义为小于1000 aa的Cas效应蛋白)的功能、结构与应用进行综述.

1 II型CRISPR-Cas系统

II型CRISPR-Cas系统(其效应蛋白为Cas9)为应用最为广泛的CRISPR-Cas基因编辑工具, 其中来自链球菌的SpCas9的应用最为广泛. Cas9具有经典的双叶颚状结构, 具有2个核酸酶结构域, 分别为HNH结构域, 负责切割靶标链(target strand, TS); 以及RuvC样结构域, 负责切割非靶标链(nontarget strand, NTS). Cas9蛋白体积较大, 普遍大于1000 aa, 可进一步分为II-A至II-D四个亚型, 其中SpCas9即属于II-A型. 随着对于II型CRISPR-Cas系统的研究, 陆续发现一系列体积小于1000 aa的小体积Cas9.

1.1 CjCas9

2014年, Fonfara等人^[13]鉴定了最小的Cas9直系同源物之一CjCas9, 它由984 aa组成. 2017年, Kim等人^[14]通过体外实验确定来自空肠弯曲杆菌的Cas9-

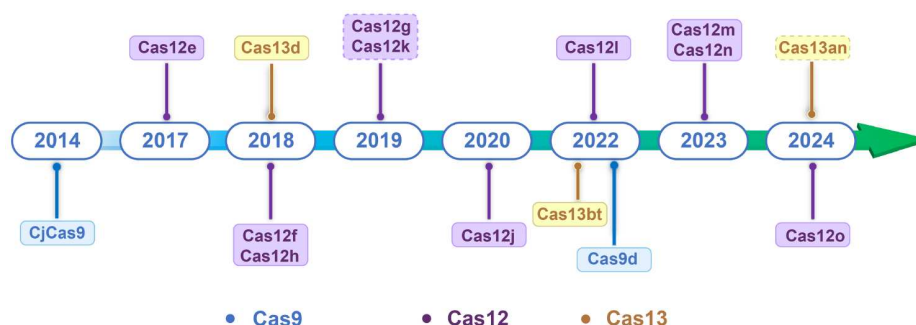


图2 第二大类小型Cas效应蛋白发现过程。图中蓝色方框代表Ⅱ型Cas效应蛋白, 紫色方框代表Ⅴ型Cas效应蛋白, 黄色方框代表Ⅵ型Cas效应蛋白。方框的实线代表已在人类细胞中证实编辑活性, 虚线代表尚未在人类细胞中验证编辑活性

Figure 2 The timeline of the discovery of the compact Class 2 Cas effectors. In this figure, the blue, purple, and yellow boxes represent the type II, type V, and type VI Cas effectors, respectively. The boxes with solid-line borders indicate Cas effectors with experimentally verified activity in human cells, while dashed-line borders indicate those whose activity in human cells remains unverified

CjCas9识别5'-NNNNACAC-3'或5'-NNNNRYAC-3' PAM (R和Y分别代表嘌呤和嘧啶)。Yamada等人将CjCas9识别的PAM归类为5'-NNNVRYM-3'PAM, 并且解析CjCas9-sgRNA-靶DNA复合物的晶体结构(图3), 他们发现, 与其他Cas9直系同源物的tracrRNA不同, CjCas9的tracrRNA具有特殊的三螺旋结构^[15~18]。此外, CjCas9识别靶标和非靶标DNA链上的PAM核苷酸, 而其他Cas9直系同源物识别非靶标DNA链上的PAM核苷酸^[16~18]。2022年, Chen等人^[19]鉴定两个小型的Cje-Cas9直系同源物, 命名为Cje2Cas9和Cje3Cas9, 它们的PAM与Cje1Cas9的不同, 为5'-NNNNCYA-3'PAM。

1.2 Cas9d

2022年, Aliaga Goltsman等人^[20]从宏基因组学数据库确定未表征的RNA引导的紧凑核酸酶家族Cas9d (600~1050 aa), 它是一种新的CRISPR Ⅱ型亚型(Ⅱ-D型), 含锌指基序并且富含精氨酸, 天然Cas9d酶能够以超过90%的效率在哺乳动物细胞中进行基因组编辑。2025年, Yang等人解析Cas9家族中已知最小的成员(747 aa)Cas9d的二元复合物(Cas9d-sgRNA)和三元复合物(Cas9d-sgRNA-靶DNA)的晶体结构(图3), 发现其REC结构域较其他Cas9蛋白相比体积较小, 而sgRNA则稍大于其他Cas9的sgRNA, 其功能除了与其他Cas9-sgRNA相同的作为蛋白质与靶标之间连接的适配体以外, 还可以通过与REC结构域互作提供结构支撑与功能调控, 形成靶标识别模块, 该模块的构象重排可推动异源双链延伸并激活核酸酶活性, 使Cas9d的错配耐受度显著低于SpyCas9^[21~23]。

2 V型CRISPR-Cas系统

根据CRISPR-Cas系统中效应蛋白的数量和基因分型, CRISPR-Cas系统可分为2个大类7种类型, 每个类型又能进一步分为多个亚型。第一大类是由多个效应蛋白组成的效应复合体, 包括Ⅰ型、Ⅲ型、Ⅳ和Ⅶ型; 第二大类包括Ⅱ型、Ⅴ型和Ⅵ型, 仅依赖一个效应蛋白实现识别、降解核酸的功能, 因此第二大类中许多效应蛋白已被开发成基因编辑工具^[24]。在第二大类中, Ⅱ型CRISPR-Cas系统(其效应蛋白即为Cas9)识别并切割DNA, Ⅵ型CRISPR-Cas系统识别并切割RNA, 而Ⅴ型CRISPR-Cas系统则包括十几种亚型, 这些亚型蛋白质大小差异较大, 识别与切割的底物不一, 识别的PAM序列也有差异, 是一个很好的新型基因编辑工具库^[25]。虽然Ⅴ型Cas效应蛋白多种多样, 它们的结构与功能都具有相似性。

Ⅴ型Cas效应蛋白通常以Cas12x来命名, 其中Cas12a是第一个鉴定出的Ⅴ型效应蛋白, 其结构与功能在Ⅴ型效应蛋白中具有代表性。Cas12a具有DNA酶活性, 在向导RNA的引导下识别靶DNA后对其进行切割, 产生一个黏性末端。Cas12a识别富含胸腺嘧啶的PAM序列(5'-TTTN-3'), 与广泛使用的Cas9不同(5'-NGG-3'), 从而扩大靶标选择的范围。除了DNA酶的活性, Cas12a还具有RNA酶的活性, 可将pre-crRNA加工成为成熟的crRNA而不需要其他因素的参与^[26]。除了对识别的底物进行切割以外, Cas12a还具有附带切割活性, 也称为反式切割: Cas12a识别到特定底物后, 除了对底物进行切割, 还能附带对环境中的单链DNA进

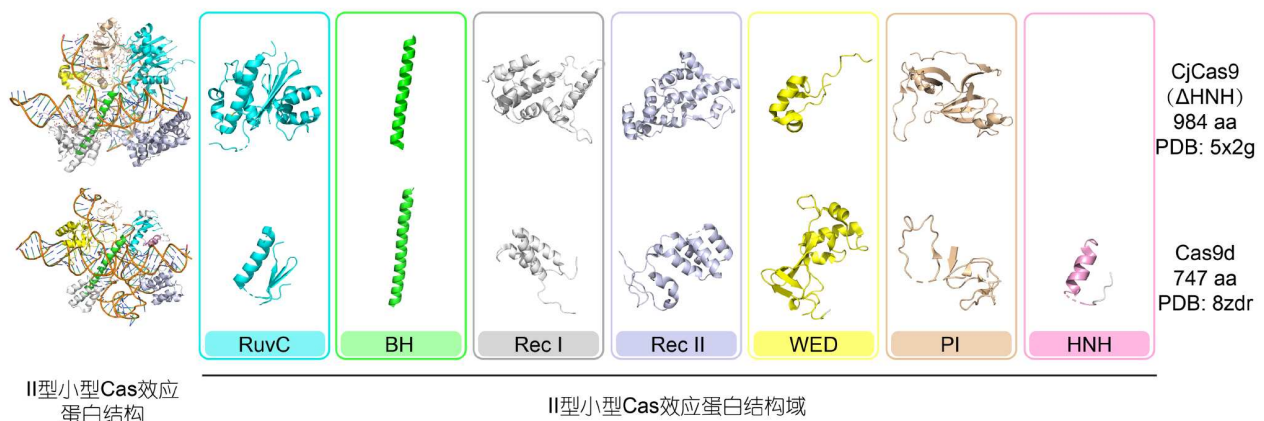


图 3 小型 II 型 Cas 效应蛋白结构. 在 PDB 数据库里选取 Cas9 蛋白-sgRNA-靶 DNA 三元复合体的结构, 左图三元复合体整体结构, 右图为蛋白结构域, 颜色与左图一致. CjCas9 (PDB ID: 5x2g, 此处为删除 HNH 结构域的 CjCas9 变体)、Cas9d (PDB ID: 8zdr)

Figure 3 The structure organization of compact II Cas effectors. The structures of the Cas9-sgRNA-target DNA ternary complexes were selected from the Protein Data Bank (PDB) database. The complex architectures are shown in the left, while the corresponding domain organizations are displayed in the right, with the same color depictions as the ternary complex. CjCas9 (PDB ID: 5x2g, the CjCas9-ΔHNH variant) and Cas9d (PDB ID: 8zdr)

行随机切割. Cas12a 具有典型的双叶型结构, 分别为 REC 叶和 NUC 叶, REC 叶与 crRNA 加工、底物识别过程有关, NUC 叶则与底物切割有关^[26,27]. 与 Cas9 一样, Cas12a 也可以进行基因组编辑, 并已在人类、动物和植物领域得到应用. 但 Cas12a 效应蛋白较大 (1100~1300 aa), 接近腺相关病毒载体的装载上限, 难以添加其他模块^[28]. 因此, 许多研究者致力于从 V 型 Cas 效应蛋白中寻找与 Cas12a 相似的小型 Cas 效应蛋白, 并将其开发为基因编辑工具.

2.1 Cas12e

2017 年, BURSTEIN 等首次鉴定出 CasX, 后面归类为 Cas12e. Cas12e 大小约为 930 aa^[29], 识别 5'-TTCN-3' PAM 序列^[30]. Cas12e 需要 tracrRNA 与 crRNA 共同引导, 因此通常将 crRNA 与 tracrRNA 人为结合成一条单引导 RNA (single guide RNA, sgRNA), 与 Cas12e 结合, 引导其发挥对靶 DNA 进行切割^[31], Cas12e 的切割效率随 sgRNA 靶标以及长度和 PAM 序列的不同而发生改变, 当 sgRNA 长度都在 17~23 nt 之间时, 其切割效率最高^[32]. Cas12e 的结构也呈现出双叶状结构, 其结构域组成也与其他 V 型 Cas 效应蛋白相似. Cas12e 有一个特殊的结构域——非靶标链结合 (nontarget strand binding, NTSB) 结构域, 与靶 DNA 解旋有关, 并可能阻挡 RuvC 结构域接触到反式切割的底物. 此外, Cas12e 还存在一个靶标链装载 (target strand loading, TSL) 结构域, 类似

于其他 V 型 Cas 效应蛋白的“Nuc”结构域. TSL 结构域包含两个 CXXC 基序, 形成锌指基序^[31], 其功能是引导靶标链 (target strand, TS) 进入 RuvC 结构域进行切割^[33,34].

2.2 Cas12f

2018 年, Harrington 等人^[35]报道一个小型 Cas 效应蛋白 (仅 400~700 aa), 并命名为 Cas14a. Cas14a 需要 tracrRNA 和 crRNA 共同引导来完成靶标的切割. 最初认为其靶标是单链 DNA, 并且没有 PAM 序列的限制; 此外, Cas14a 也具有附带切割活性. 随着研究的深入, 研究者们将 Cas14 重新归类于 Cas12f, 同时发现, 在识别 5'-TTTN-3' PAM 序列的前提下, Cas12f 也可以识别并切割双链 DNA^[36]. 不同 Cas12f 蛋白识别的 PAM 序列有所不同, 如 CnCas12f 识别 5'-NCCD-3' PAM 序列, 与大多数 Cas12 效应蛋白识别的富含胸腺嘧啶的 PAM 序列不同, 这进一步拓宽靶标底物的选择范围^[36]. 为研究如此紧凑的 Cas12f 是如何发挥底物识别与切割功能的, Takeda 等人^[37]解析 Cas12f-sgRNA-dsDNA 三元复合体的结构, 发现 Cas12f 是以同源二聚体的形式, 结合 sgRNA 后发挥功能的, 这与其他 Cas12 效应蛋白有显著区别.

2.3 Cas12h

2018 年, Yan 等人^[38]在基因组和宏基因挖掘中发

现Cas12h。2025年, Zheng等人^[39]首次证明Cas12h1 (870~924 aa)识别广谱的5'-DHR-3'的PAM序列, 并且在真核细胞中具有高效编辑活性。与其他Cas效应蛋白不同, Cas12h1在细胞内仅高效切割底物的非靶标链, 即表现出切口酶的活性。Cas12h1还具有反式切割活性, 具有开发为新型核酸检测工具的潜力。对Cas12h1进行机制分析发现, Cas12h1具有独特的激活机制: 其盖子模体(lid motif)在激活过程中经历由灵活至稳定的转变, 并且在激活后“锁住”底物促进切割^[39]。

2.4 Cas12j

2020年, Al-shayeb等人^[40]在噬菌体发现Cas12j, 这也是首个发现存在于噬菌体中的Cas效应蛋白。同年Pausch等人^[41]鉴定Cas12j, 发现其大小为700~800 aa, 仅为Cas9和Cas12a的一半。为研究Cas12j是如何识别和切割双链DNA, Pausch等人^[42]在2021年解析Cas12j2三元复合物的结构, 发现其R环结构可以稳定的与DNA结合, 同时发现Cas12j的helix $\alpha 7$ 通过减缓靶DNA的切割速度来提高对靶标切割的准确性。Carabias等人^[43]在Cas12j-3中的研究结果进一步支持这一观点。

2.5 Cas12l

2022年, Urbaitis等人^[44]确定新的紧凑型核酸酶——Cas12l (~860 aa), 发现其识别富含胞嘧啶的PAM序列, 并在此基础上切割dsDNA。几乎同时, Al-shayeb等人^[45]从噬菌体或类噬菌体基因组中发现大量、多类型CRISPR-Cas系统, 其中许多Cas效应蛋白的体积较小, 提示噬菌体是紧凑型Cas效应蛋白的重要来源。进而他们从中鉴定新的Cas蛋白——Cas λ , 并将其归类为V-L型(即Cas12L)。Cas λ 具有crRNA加工活性, 其成熟的crRNA具有较大的发卡结构。Cas λ 识别并切割dsDNA, 同时其反式切割活性在V型CRISPR-Cas系统中相对较弱。此外, 2023年, Sun等人^[46]鉴定Cas π , 也命名为Cas12l, 并解析其复合物的结构, 发现Cas π 识别5'-CCN-3'PAM, 并且只能在识别5'-CCC-3'或5'-CCT-3'的PAM后才能稳定地切割dsDNA靶标。此外, 与Cas9或者其他Cas12效应蛋白整体呈现的“双叶”结构不同, Cas π 呈现出包裹核酸底物的“手环”结构。Cas π 有一个特殊的富含脯氨酸的结构域(proline rich string, PRS), 这个结构域与锁定-捕获结构域(lock-catch, LC)形成

“手环”, 包裹核酸底物, 锁定靶标。PRS结构域能够增强Cas π 与底物的结合, 并将其他结构域、sgRNA和靶标DNA整合在一起; LC结构域不仅可以稳定PRS的构象, 还可以与sgRNA相互作用。

2.6 Cas12m

2023年, Wu等人^[47]发现新的小型Cas效应蛋白——Cas12m, 其大小仅为596 aa, 它可以处理pre-crRNA, 并识别5'-TTN PAM。但与其他Cas效应蛋白不同, Cas12m可结合靶标DNA而不能切割DNA, 它通过结合特定靶标DNA而阻碍质粒复制起始或阻止必需的基因转录来介导质粒干扰。Omura等人^[48]进一步分析Cas12m2的作用机制, 发现其Rec I结构域富含精氨酸, 增强与核酸底物的相互作用, 从而提高Cas12m2结合底物的能力。此外, 与Cas12a类似, Cas12m2通过Rec II结构域与PAM远端的异源双链相互作用, 这对于激活Cas12m的免疫保护作用非常重要。与其他Cas12蛋白的D-E-D催化三联体不同, Cas12m的酶活性中心为H-D-D三联体, 但将其突变为D-E-D三联体无法恢复其DNA切割活性, 提示还有其他机制参与Cas12m酶切活性的缺失过程。2024年, Bigelyte等人^[49]解析Go-Cas12m三元复合物的结构, 并阐明类似的分子机制。

2.7 Cas12n

2023年, Chen等人^[50]报道一个新的小型蛋白, Cas12n, 其大小约为400~700 aa。通过序列比对, 他们发现Cas12n与Cas12效应蛋白的祖先TnpB最为相近, 推测Cas12n在进化处于TnpB和其他大型V型Cas效应蛋白的中间时期。同时, Cas12n识别一个特殊的PAM, 即5'-AAN-3', 这个富含腺嘌呤的PAM识别要求, 也扩大V型CRISPR-Cas核酸酶靶向范围。

2.8 Cas12o

2024年, Duan等人^[51]通过搜索整合的微生物基因组和宏基因组, 发现新的Cas蛋白家族: CRISPR-Cas12o。其中Cas12o1大小约为908 aa, 切割靶标dsDNA时表现出非对称切割的特征, 非靶标链(nontarget strand, NTS)的切割效率更高。此外, 当Cas12o1被互补的ssDNA/dsDNA激活时, 表现出非特异性的ssDNA/ssRNA切割能力, 具有成为核酸检测诊断工具的潜力。

2.9 V型CRISPR-Cas效应蛋白的核心结构

对V型CRISPR-Cas系统效应蛋白结构的综合分析(图4)揭示Cas12效应蛋白发挥功能的核心区域. Cas12效应蛋白的标志为依赖RuvC结构域进行底物切割, 因此RuvC结构域是Cas12效应蛋白的特征结构域, 具有典型的RNaseH的折叠形式; WED结构域具有典型的寡核苷酸结合结构域的结构特征, 因此也被称为OBD结构域(oligonucleotide binding domain, OBD), 其功能与crRNA的识别与加工有关; Nuc结构域的形态较为多样, 主要功能为辅助底物切割; Helical结构域由 α -螺旋构成, 参与底物识别, 故又称为Rec结构域(recognition, Rec). 小型Cas12效应蛋白往往仅保留关键结构域的核心结构以实现基本功能; 而较大体积的Cas12蛋白中, 除核心的RuvC, WED结构域的体积有所增大以外, 还增强底物识别的部分, 如增加与crRNA-TS DNA异源双链互作的Helical 2结构域、与底物PAM区域互作的PI (PAM interacting, PI)结构域等, 以满足精准识别、切割靶标的需要. 在蛋白体积方面, 除了Cas12f以外, 其他Cas12效应蛋白的体积均在500 aa以上; 而Cas12f则以同源二聚体的形式与sgRNA形成复合物, 即其效应复合体的大小约为800~900 aa. 因此, 目前天然Cas12效应蛋白可进行有效基因编辑的体积下限约为500 aa.

3 VI型CRISPR-Cas系统

VI型系统是第二大类中唯一由RNA引导, 识别并切割RNA底物的亚型, 其效应蛋白通常以Cas13x命名, 依赖高等真核生物和原核生物核苷酸结合域(higher eukaryotes and prokaryotes nucleotide-binding, HEPN)执行对底物的切割. Cas13a是第一个鉴定出的VI型效应蛋白, 它是双叶状球蛋白, 由REC叶和NUC叶构成. REC由N末端域(N-terminal domain, NTD)和Helical-1组成, 负责固定crRNA 5'端; NUC叶则由具有RNA酶活性HEPN1, Helical-2, Helical-3和HEPN2结构域组成. 当crRNA与靶RNA形成双链, 进入NUC叶上的活性位点时, Cas13a中的HEPN1结构域向HEPN2结构域移动, 发生构象变化, 从而激活Cas13a^[52]. Cas13a可将pre-crRNA加工成为成熟crRNA, 同时还具有双重核酸酶活性, 一种用于切割RNA靶标(顺式切割), 另一种非特异性地切割环境中的其他ssRNA(附带切割). Cas13a可以

被重新编程并应用于真核生物, 以对抗致病性RNA病毒或调节基因表达; 也可以被用于体内RNA修饰, 包括可编程调节选择性剪接^[53]; 也可以被开发为RNAi介导敲除的特异性替代品^[54]. 但与Cas9, Cas12a类似, Cas13a体积较大(约1250 aa), 限制其应用. 因此科学家在致力于通过基于R-XXXX-H基序特征及crRNA相关特征, 利用生信手段挖掘新的VI型效应蛋白.

3.1 Cas13d

2018年, Konermann等人^[55]鉴定一个未表征的假定2类CRISPR-Cas系统家族, 并将该效应蛋白鉴定为VI-D型, 也称Cas13d. Cas13d大小约为930 aa, 可以将pre-crRNA加工为成熟crRNA, 同时不受PFS的限制. Cas13d的切割ssRNA的活性受crRNA的重复序列的影响, 而Mg²⁺对于维持重复序列的稳定性非常重要^[56-58]. 为了从结构上了解Cas13的功能, Zhang等人^[59]解析Cas13d三元复合物的结构, 阐明HEPN1和HEPN2结构域可以促进RNA水解的详细分子机制.

3.2 Cas13bt

2022年, Kannan等人^[60]根据系统发育分析在Cas13b亚型中发现一个独特的分支, 命名为Cas13bt, 大小仅为775~804 aa. Cas13bt在crRNA的引导下可以切割ssRNA, 并且不需要与PFS, 其在人类细胞中的RNA敲除能力也已被证实. 2021年, Xu等人^[61]发现Cas13X家族和Cas13Y家族, 后被归类为Cas13bt家族. Cas13X约775 aa, Cas13Y约为790 aa, 并且其切割ssRNA不受PFS影响. 为探究紧凑型Cas13bt3 (即Cas13X.1)的作用机制, 2022年, Nakagawa等人^[62]解析Cas13bt3-crRNA, Cas13bt3-crRNA-target RNA三元复合物的结构, 发现Cas13bt3不参与pre-crRNA加工, 并且当与靶RNA结合时, 其HEPN结构域会发生重排, 这与Cas13a和Cas13d不同. 此外, 靶RNA暴露于溶剂当中, 这使得Cas13bt3更易于结合靶RNA.

3.3 VI型CRISPR-Cas系统效应蛋白的核心结构

Cas13效应蛋白之间的序列保守程度较低, 其特征为依赖2个HEPN结构域进行底物切割. HEPN结构域在原核生物至真核生物中均广泛存在, 其特征为4个 α -螺旋组成的四螺旋束, 其催化的保守基序R-XXXX-H

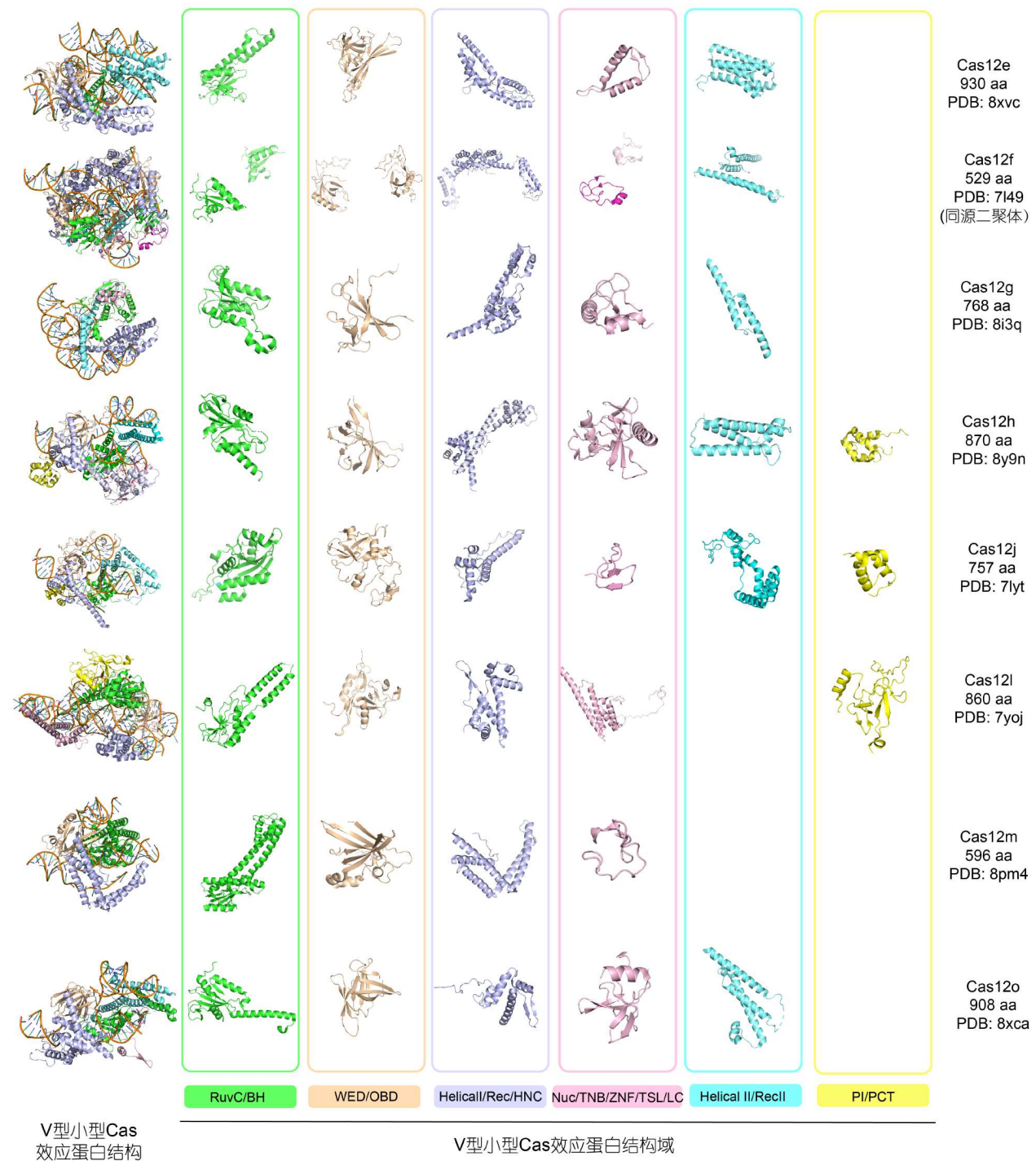


图 4 小型 V 型Cas效应蛋白结构. 在PDB数据库里选取Cas12蛋白-crRNA-靶DNA三元复合体的结构, 左图三元复合体整体结构, 右图为蛋白结构域, 颜色与左图一致. Cas12e (PDB ID: 8xvc), Cas12f (PDB ID: 7l49), Cas12g (PDB ID: 8i3q), Cas12h (PDB ID: 8y9n), Cas12j (PDB ID: 7lyt), Cas12l (PDB ID: 7yoj), Cas12m (PDB ID: 8pm4), Cas12o (PDB ID: 8xca)

Figure 4 The structure organization of compact V Cas effectors. The structures of the Cas12-sgRNA/crRNA-target DNA ternary complexes were selected from the PDB database. The complex architectures are shown in the left, while the corresponding domain organizations are displayed in the right, with the same color depictions as the ternary complex. Cas12e (PDB ID: 8xvc), Cas12f (PDB ID: 7l49), Cas12g (PDB ID: 8i3q), Cas12h (PDB ID: 8y9n), Cas12j (PDB ID: 7lyt), Cas12l (PDB ID: 7yoj), Cas12m (PDB ID: 8pm4), Cas12o (PDB ID: 8xca)

位于 $\alpha 3$ 螺旋. 与经典的HEPN结构域排布方式($\alpha 1$ - $\alpha 2$ - $\alpha 3$ - $\alpha 4$)不同, Cas13蛋白的HEPN结构域采用 $\alpha 2$ - $\alpha 3$ - $\alpha 4$ - $\alpha 1$ 的非经典排序方式, 在 $\alpha 2$ 和 $\alpha 3$ 之间可能存在额外的二级结构共同参与HEPN结构域功能^[63](图5). 不同亚型Cas13效应蛋白的HEPN结构域在一级结构的排布方式有所不同: Cas13b与Cas13bt的两个HEPN结构域分布在蛋白的两端, 其间为其他结构域(如Helical)负责crRNA与靶RNA的识别; Cas13a和Cas13d的N端为N端结构域(N terminal domain, NTD), 且HEPN1结构域插入Helical1结构域而被分为两个部分. 除了核心的2个HEPN结构域以外, Cas13蛋白还具有2个Helical结构域, 负责crRNA的识别与结合; 同时还参与稳定crRNA: 靶RNA双链. 而pre-crRNA加工的功能, 在Cas13a/d中由NTD结构域完成, 在Cas13b中由盖子结构域(Lid, 也叫RRI结构域, repeat region interacting)完成. 与小型Cas13效应蛋白(如Cas13bt3)相比, 较大体积Cas13蛋白(如Cas13a和Cas13b)的Helical结构域更大, 与crRNA: 靶RNA双链的相互作用更强, 因此可能增强靶标的识别.

4 小型Cas效应蛋白的应用及优化

目前已有许多小型Cas效应蛋白在人类、动植物中实现基因组编辑. 但现有的编辑效率仍有较大的提

高空间, 因此许多研究者聚焦于Cas效应蛋白的改造, 期望通过理性改造获得具有高效编辑效率的新工具. 下文将分别对这些效应蛋白的结构优化与应用现状进行详细表述.

4.1 II型CRISPR-Cas系统

2017年, Kim等人^[14]对CjCas9的sgRNA进行优化, 确定当sgRNA的spacer长度为22时, 活性最好. 他们重点关注两个涉及老年性黄斑变性(age-related macular degeneration, AMD)的基因, 一个是常见的AMD治疗靶标血管内皮生长因子A (vascular endothelial growth factor A, *VEGFA*), 另一个是激活*VEGF*转录的缺氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor-1 α , *HIF1A*). 结果表明输送到视网膜的CjCas9可以使*VEGFA*与*HIF1A*失活, 从而减少脉络膜新生血管的面积. 2019年, Jo等人^[64]评估通过AAV介导的CjCas9递送破坏靶基因在体内的长期影响. 通过组织学和视网膜电图分析表明, 靶向*HIF1A*的CjCas9不会在视网膜中诱导任何明确的毒性, 在注射后14个月, 在预测的脱靶位点未检测到插入缺失, 提示CjCas9的长期表达不会加剧脱靶效应. 这些结果表明, 通过AAV向玻璃体内注射CjCas9及其靶向*HIF1A*的sgRNA可有效诱导和维持视网膜组织靶向突变1年以上, 并且不影响视网膜组织学完整性或功能. 2022年, Chen等人^[19]发现在小鼠受精卵中通过显微注

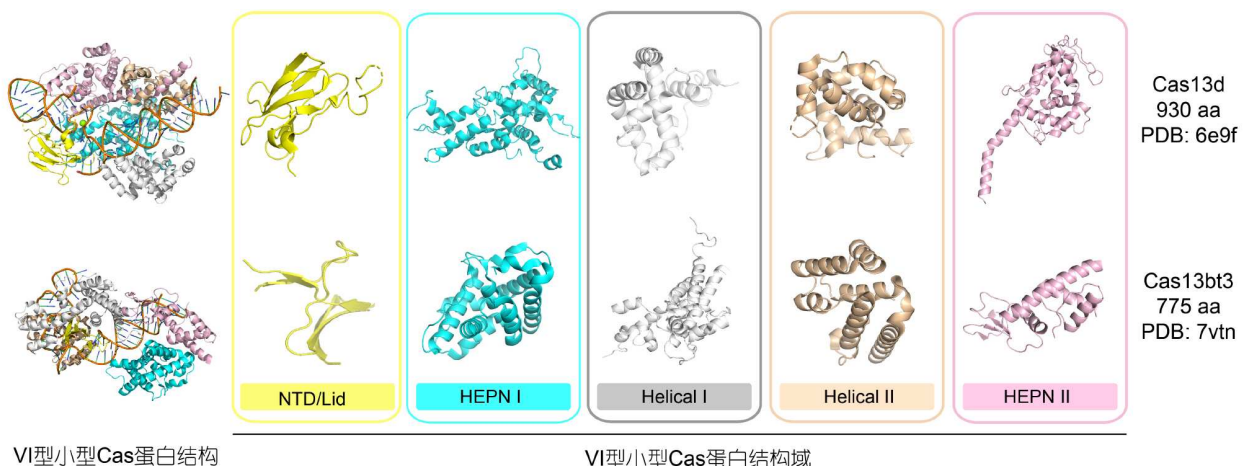


图 5 小型VI型Cas效应蛋白结构. 在PDB数据库里选取Cas13蛋白-crRNA-靶RNA三元复合体的结构, 左图复合体整体结构, 右图为蛋白结构域, 颜色与左图一致. Cas13d (PDB ID: 6e9f), Cas13bt3 (PDB ID: 7vtn)

Figure 5 Compact VI Cas effector protein structure. The structures of the Cas13- crRNA-target DNA ternary complexes were selected from the PDB database. The complex architectures are shown in the left, while the corresponding domain organizations are displayed in the right, with the same color depictions as the ternary complex. Cas13d (PDB ID: 6e9f), Cas13bt3 (PDB ID: 7vtn)

射Cje3Cas9可破坏酪氨酸酶(tyrosinase, *Tyr*)基因, 还可以通过一体化AAV递送载体在8周龄小鼠肝脏中破坏前蛋白转化酶枯草溶菌素9 (proprotein convertase subtilisin/kexin type 9, *Pcsk9*)基因. 接下来建立基于Cje3-Cas9的腺嘌呤碱基编辑器8e-nCje3-ABE, 其能够与相关sgRNA包装到单AAV载体中, 对成年小鼠肝脏中进行基因组编辑, 其效率高达12%. 2024年, Chen等人^[65]通过理性改造设计CjCas9-LDE-dCjCas9 (L146R/D392R/E790R), 该CjCas9变体对靶DNA具有更高的亲和力, 从而提升编辑效率. 接下来作者开发了基于CjCas9变体的转录激活剂(LDE-CjCas9-VPR)和碱基编辑器(LDE-CjABE和LDE-CjCBE). LDE-CjABE可在人和小鼠细胞中进行基因组编辑; 并且通过AAV递送, 在小鼠视网膜中表现出更高的编辑效率, 并且未检测到脱靶编辑^[65].

2022年, Goltsman等人^[20]设计Cas9d-MG34-1突变体, 破坏RuvC-I结构域的核酸酶活使其成为切口酶, 接下来将这个工程化变体与腺苷脱氨酶腺和胞嘧啶脱氨酶相结合开发出嘌呤碱基编辑器和胞嘧啶碱基编辑器, 在所测试的三个不同基因组靶标当中, 其编辑效率达20%.

4.2 Cas12e

2019年, Liu等人^[31]对PlmCas12e的功能进行全面研究, 发现Cas12e在哺乳动物细胞内具有高效的编辑活性, 最高可达50%, 表明Cas12e具有作为基因组编辑工具的巨大的应用潜力. 2022年, Tsuchida等人^[66]基于结构对PlmCas12e效应蛋白与sgRNA均进行理性改造, 显著提升其编辑效率, 可达50%以上.

2023年, Liu等人^[67]优化Cas12e的启动子并使用低拷贝质粒调整其切割活性, 设计出CRISPR-Cas12e-GET, 这提高Cas12e转化和编辑的效率. 在此基础上他们敲除苜蓿中华根瘤菌(*Sinorhizobium*, SM)320中介导非同源末端连接的*Ku*基因, 增强CRISPR-Cas12eGET的准确性. 这一进展有助于SM320的代谢工程和基础研究.

4.3 Cas12f

由于Cas12f体积较小, 因此有大量研究探索Cas12f作为基因组编辑工具的可行性. 2022年, Wang等人^[68]将AsCas12f应用于炭疽杆菌中, 其目的基因的

编辑效率最高可接近100%, 并且编辑效率与DNA同源臂的长度有密切关系. 2023年, Sukegawa等人^[69]评估SpCas12f在水稻基因组中的编辑能力, 发现SpCas12f可以对水稻基因组进行编辑, 并且没有观测到显著脱靶效应, 其突变的植株不仅可以从突变愈伤组织中再生, 还可以遗传给下一代. 这些结果证明SpCas12f是水稻基因组编辑的一种有用的工具. 链霉菌在工业与临床上非常重要, 开发可应用于链霉菌基因组编辑的工具对于开发针对链霉菌的新药物尤为重要. 然而常用的基因组编辑工具如Cas9对于链霉菌具有较高毒性. Hua等人^[70]成功将AsCas12f应用于链霉菌的基因组编辑, 在降低编辑毒性的同时得到接近100%的单基因编辑效率和40%以上的双基因编辑效率. Wang等人^[71]利用Un1Cas12f1开发一个强大的微型Cas转录激活或沉默系统, 可以使得基因得到数百倍的激活, 同时也可以抑制70%基因表达. 总的来说, Cas12f不管是在细菌、植物, 或者哺乳动物当中, 都已经得到充分的应用. 除了直接进行基因编辑以外, Cas12f也被开发成研究工具. Schmitt等人^[72]利用Cas12f设计DNA编辑定量测序(DNA editing quantification sequencing, DEQSeq), 能够对多个靶位点上的DNA编辑酶变体进行表征, 表明DEQSeq是加速酶发现和推进基因组编辑研究的强大工具. 2024年, Sharar等人^[73]开发基于A11Cas12f1的腺相关病毒基因编辑疗法, 并在多种细胞系、患者成纤维细胞和原代肝细胞中进行编辑和脱靶分析, 这个结果促进了CRISPR体内不同基因序列和器官的编辑应用.

研究者进一步对Cas12f进行改造以获得更高的基因组编辑效率. 为提高Un1Cas12f1及其变体在真核细胞中的活性, 2022年, Kim等人^[74]重新设计Un1-Cas12f1的sgRNA, 这使插入缺失频率提高了867倍, 优化的Un1Cas12f1系统可在人类细胞中实现高效、特异性的基因组编辑. 2023年, 基于促进蛋白质和靶DNA的相互作用的策略, Kong等人^[75]同时对Os-Cas12f1和RhCas12f1及其相应的sgRNA进行理性设计, 最终获得高效的编辑工具——enOsCas12f1和en-RhCas12f1. enOsCas12f1在哺乳动物细胞中的基因组编辑效率可高达90%以上, 并具有高特异性. 这项研究为CRISPR治疗应用带来巨大的希望. 同年, Wu等人对AsCas12f的氨基酸进行理性改造, 增加AsCas12f对核酸的亲和力, 从而提高DNA靶向和切割活性. 他们将

该变体命名为enAsCas12f, 并将其成功应用于人类基因组的敲除, 敲除效率是野生型的4.5倍. 同时他们将AsCas12f的sgRNA进行截短, 产生新的sgRNA, 新的sgRNA在体外表现出与全长sgRNA相当的DNA切割活性, 并且可以在HEK293T细胞中进行基因编辑. 在U6启动子的驱动下, 新sgRNA表达量比全长sgRNA高约4倍. 这开启CRISPR基因编辑的新领域^[75,76].

4.4 Cas12h

2025年, Zheng等人^[39]发现Cas12h在人类细胞内以切口酶的形式发挥作用, 并通过理性改造, 得到了对单碱基错配更敏感的Cas12h^{hf}, 保留原有的检测速度外还具备单碱基分辨率. Cas12h^{hf}能够不同正痘病毒中区分出与其他病毒(如牛痘病毒)仅有一个碱基差异的猴痘病毒, 是一种具有单碱基分辨率的高特异性核酸检测器. 同年, Xiang等人^[77]利用Cas12h做为切口酶不引起dsDNA断裂的特点, 将Cas12h与腺嘌呤脱氨酶融合构建腺嘌呤碱基编辑器(ABE-Cas12h), 并在细菌内实现碱基编辑. 他们发现温度、融合顺序和连接子长度显著影响ABE-Cas12h的碱基编辑效率, 与Cas12h-ABE 相比, ABE-Cas12h表现出更高的编辑效率, 最佳连接子的长度为32 aa, 最佳编辑温度为30°C.

4.5 Cas12j

2023年, Wang等人^[78]评估Cas12j-8在临床中的应用前景. 由于其简单的PAM要求(5'-TTN-3'), Cas12j-8在ClinVar和dbSNP数据库中的可编辑位点数量大约是UnlCas12f1的两倍. 因此, Cas12j-8具有较好的临床治疗前景. 2024年, Gong等人^[79]利用双子病毒复制子系统评估Cas12j-2在植物中的编辑效率, 发现Cas12j-2可以使用双病毒载体进行基因组编辑, 虽然编辑效率仍低于SpCas9, 但它们仍显示在植物中的非转基因的基因组进行编辑的巨大潜力.

4.6 Cas12m

2022年, Wu等人^[47]利用Cas12m能够在大肠杆菌体内实现稳健的基因沉默, 并且不会切割 dsDNA这个特点, 将胞苷碱基编辑器(CBE)与dCas12m相结合, 构建Cas12m胞苷碱基编辑器dCas12m-CBE, 它可以在大肠杆菌实现单核苷酸C到T的颠换. 与Cas9和Cas12a介导的碱基编辑器不同的是, dCas12m具有两个碱基编

辑窗口, 分别位于PAM近端(位置2~5)和PAM远端(位置13~19)区域^[47,80,81]. 2024年, Bigelyte等人^[49]将Go-Cas12m与腺氨酸脱氨酶结合, 开发出新的突变体GoABE. 该突变体可以有效地在大肠杆菌以及人类细胞进行A-G编辑, 并且人类基因组的内源性的A-G编辑高达20%, 这一结果扩展了紧凑型基因编辑的应用范围. 2024年, Yang等人^[82]将计算建模与CRISPR干扰(CRISPR interference, CRISPRi)相结合, 以优化基因改造微生物(genetically modified microorganisms, GMM)的代谢稳健性. 该团队通过集成建模实现高通量的计算筛选, 识别对表达变化敏感的酶靶点, 并在此基础上开发功能性CRISPRi, 它可以通过多重基因敲低来提升适应性控制. 接下来通过改进隔离子gRNA结构, 增强控制小型Cas12m的关停电路, 最终设计出逃逸频率低于美国国立卫生研究院(National Institutes of Health, NIH)标准的理性工程菌株.

4.7 Cas12n

2023年, Chen等人^[50]证明AcCas12n在细菌中强大的基因组编辑能力, 发现其可以介导肺炎克雷伯菌中基因的缺失, 并在人类细胞中设计一种高效的CRISPR-Cas12n, 其编辑效率高达73%. 他们进一步通过修饰sgRNA的crRNA-tracrRNA互补区, 设计出Cas12n变体——Cas12Pro. 发现Cas12Pro在人类细胞中表现出高效的基因组编辑, 基因编辑效率高达80%, 与常用的Cas9n和Cas12a相当, 并且具有高保真性. 同时他们还开发基于Cas12n碱基编辑器, 实现对人细胞的碱基编辑^[50].

4.8 Cas13d

AMD是50岁以上成年人视力下降的主要原因, 2020年, Zhou等人^[83]使用激光诱导的AMD小鼠模型研究Cas13d系统在体内基因治疗中的潜在应用. 结果表明, 通过AAV递送Cas13d可以有效地敲低VEGFA的mRNA并抑制致病性脉络膜新生血管(choroidal neovascularization, CNV)的发育, 其纠正作用长达两年. 2024年, 为优化T细胞疗法, Tieu等人^[84]利用CRISPR-Cas13d开发多重效应引导阵列(multiplexed effector guide arrays, MEGA), 这是一个对T细胞转录组进行编程和扩展调控的平台. MEGA能够在人原代T细胞中进行定量、可逆和大规模多重基因敲除并且无需靶向

或切割基因组DNA。此外, MEGA还可以减少抑制性受体的上调。与此同时MEGA还能破坏免疫调节代谢途径, 以增强CAR-T (嵌合抗原受体T细胞)细胞的适应性和体内外的抗肿瘤活性。

2023年, Tong等人^[85]设计一个双荧光报告系统, 该系统可以用于检测哺乳动物细胞中的附带效应和筛选Cas13变体。其筛选的高保真Cas13变体, 保留较高的靶RNA切割活性, 并且显示出最小的附带切割活性, 在转基因动物和体细胞中也没有发现附带损伤。Yang等人^[86]对Cas13d进行理性设计, 获得一种高精度的Cas13d变体, 该突变体可以识别并切割杂合单核苷酸变异的肌节基因, 证明了其在治疗遗传性心脏病方面具有巨大潜力。

4.9 Cas13bt

2022年, Xiao等人^[87]建立了基于Cas13bt3的碱基编辑系统, 并在肌球蛋白VI(*Myo6*^{C442Y/+})突变小鼠模型中实现高效的A-G编辑效率并且脱靶效应极低, 减轻突变导致的听力损失。2022年, 为解决AAV包装体局限性的问题, Kannan等人^[60]利用腺苷和胞嘧啶脱氨酶结构域对Cas13bt进行功能化改造, 设计出新的紧凑型变体。该变体可以对错配的靶标进行编辑, 还可以进行单个AAV的包装。

2023年, Yan等人^[88]利用通过理性改造获得的高保真变体hfCas13bt3在小鼠模型中敲减视紫红质(*rhodopsin*, *RHO*)基因, 在*RHO-P23H* (*Pro23His*)过表达诱导模型和*hRHO*^{P23H/WT}人源化小鼠模型中, hfCas13bt3均可以缓解常染色体显性遗传性视网膜色素变性(*autosomal dominant retinitis pigmentosa*, *adRP*)的产生。这些结果表明hfCas13bt3在治疗遗传突变中具有巨大的潜力。表1对目前已开展应用的第二大类小型Cas效应蛋白进行概述。

5 总结与展望

本文简要综述第二大类CRISPR-Cas系统近期新发现的小型Cas效应蛋白在功能、机制与应用方面的研究进展。与ZFN, TALEN等前一代基因组编辑工具相比, 基于CRISPR-Cas系统的基因组编辑工具无需针对靶标进行复杂的引导序列设计, 仅需改变sgRNA的序列, 使其与靶标核酸互补即可引导Cas核酸酶抵达

目标位置, 操作更为便捷。此外, 相对于引导蛋白, 引导RNA的体积更小(一个靶标碱基仅需一个sgRNA碱基识别, 而需要约30 aa进行识别), 在递送方面更具优势, 同时也使CRISPR-Cas系统不局限于基于dsDNA断裂的基因组编辑, 还可与其他如碱基编辑器、逆转录蛋白、转录增强元件等其他基因编辑或转录调控工具联用, 如与脱氨酶等串联使用形成碱基编辑器(*base editor*, *BE*)、与逆转录酶等联合使用形成前导编辑编辑器(*prime editing*, *PE*)、与转录增强子或抑制子联合使用达成转录调控(*CRISPRa/CRISPRi*)等, 实现形式丰富的基因组编辑与转录调控。相对于广泛使用的基因编辑工具Cas9, 小型Cas蛋白进一步放大小体积基因编辑系统在递送等方面的优势, 也提升多种形式基因组编辑的可行性。此外, V型和VI型CRISPR-Cas系统与常用的II型系统具有不同功能, 极大程度丰富了基因组编辑工具库。如V型Cas12效应蛋白在切割底物时产生黏性末端, 这使其在基因组编辑时具有更高的特异性, 具有潜在优势^[91,92]。又如VI型的Cas13效应蛋白靶向RNA切割而不改变基因组, 避免基因组被切割而不稳定的风险。虽然小型Cas效应蛋白具有良好的前景, 但目前其应用于基因编辑仍面临挑战:

首先, 小型Cas效应蛋白的编辑效率仍需进一步提高。尽管许多研究报道这些小型Cas蛋白具有较高的编辑效率, 但整体而言, 小型Cas蛋白的编辑效率仍然稍低于广泛使用的Cas9。此外, 大部分对于小型Cas蛋白编辑效率的研究仍处于细胞水平; 这些小型Cas蛋白在体内能否保持较高的编辑效率还需要进一步验证。已有许多研究致力于提高小型Cas效应蛋白的编辑效率, 通过随机突变或理性改造的方式, 对Cas效应蛋白进行改造; 结合对于sgRNA的理性设计, 经过改造后的CRISPR-Cas系统编辑效率显著高于野生型。基于这些改造思路, 可获得更多的高效基因编辑工具。

其次, 小型Cas效应蛋白进行基因编辑的准确性需要进一步验证。尽管目前暂时未观测到小型Cas效应蛋白的脱靶效应, 然而对于这些新型工具应用于基因组编辑的安全性仍然缺乏系统分析。尤其对于VI型CRISPR-Cas系统, 由于其附带切割效应, 对细胞中的RNA进行无差别切割, 可能扰乱细胞转录组而造成毒性。在哺乳动物细胞中VI型系统是否存在附带切割效应, 长期存在争议; 但已有研究发现在小鼠模型中使用RfxCas13d敲降基因, 由于其附带切割效应而导致

表 1 小型Cas效应蛋白应用情况

Table 1 Current application of compact Cas effectors

Cas蛋白	大小(aa)	PAM/PFS	靶标	结构功能特点	应用优势	应用劣势	可能应用方向	应用现状
CjCas9	984	NNNVRYM	DNA	tracrRNA独特的 的三螺旋结构	切割活性强; 靶向范围广	体积偏大	基于RNA引导的 转录调控	诱导和维持小鼠视 网膜组织突变 ^[64] ; 小鼠肝脏的基因组 编辑 ^[87]
Cas9d	600~1050	NGG	DNA	REC结构域互成 靶标识别模块	错配耐受度低	靶向范围窄	体内基因组编辑	大肠杆菌的碱基 编辑 ^[20]
Cas12e	818~986	TTCN	DNA	NTSB结构域促 进DNA解旋从而 提升切割效率	编辑活性较高	体积偏大	基于HDR或 NHEJ的基因编辑	敲除SM320中参与 NHEJ修复的Ku基 因 ^[67] ; 炭疽杆菌的基因组 编辑 ^[68] ; 在水稻中实现靶向 诱变 ^[69] ; 通过AAV颗粒包装, 对多个细胞系、患 者成纤维细胞和原 代肝细胞进行编 辑 ^[73]
Cas12f	400~700	NTTN NCCN	DNA	以二聚体的 形式发挥作用	体积较小方便 添加其他基因 编辑工具;	需在体内 正确组装成 二聚体	基于HDR或 NHEJ的基因编辑 碱基编辑 转录调控	利用双病毒载体 进行植物基因组 编辑 ^[79] ; 链霉菌中的基因 编辑 ^[89] ; 水稻中的基因 编辑 ^[90]
Cas12j	700~800	TTN	DNA	螺旋 $\alpha 7$ 调节切割 速率与精度的平 衡	体积较小 PAM范围较广	效率相对 较低	基于HDR或 NHEJ的基因编辑 (尤其在特定物种 中)	在大肠杆菌中实现 单核苷酸C-T突变, 在人类基因组的内 源性靶点上,有高达 20%的A-to-G编 辑 ^[49] ; 优化基因改造微生 物 ^[82]
Cas12h	870~924	DHR	DNA	缺乏TS DNA装 载能力而以切口 酶形式作用	识别广谱PAM;	缺乏切割双链 DNA能力	前导编辑 碱基编辑	大肠杆菌中进行 碱基编辑 ^[77] ;
Cas12m	596	TTN	DNA	活性中性为非 经典的“HDD” 三联体; 结合但不切割 靶标	抑制特定 基因转录	缺乏DNA 酶活性	碱基编辑 转录调控	在大肠杆菌中实现 单核苷酸C-T突变, 在人类基因组的内 源性靶点上,有高达 20%的A-to-G编 辑 ^[49] ; 优化基因改造微生 物 ^[82]
Cas12n	400~700	AAN	DNA	独特的PAM序列	独特的PAM 序列; 较高的编辑活 性	碱基编辑 效率较低	基于HDR或 NHEJ的基因编辑 碱基编辑 转录调控	细菌的基因组编辑, 人类细胞的碱基编 辑 ^[50] ;
Cas13d	930~1014	无	RNA	不受PFS限制	编辑活性较高	附带切割活性 体积偏大	基因敲降 RNA碱基编辑	防止年龄相关性黄 斑变性小鼠模型的 脉络膜新生血管形 成 ^[83] ; 人原代T细胞中定 量、可逆和大量多 重基因敲低 ^[90]
Cas13bt	775~804	D(A/G/T)	RNA	独特的激活机制	体积较小	附带切割活性	基因敲降 RNA碱基编辑	减轻了(<i>Myo6</i> ^{C442Y/+}) 突变小鼠由突变导 致的听力损失 ^[87] 治疗 <i>RHO-P23H</i> 突变 引起的常染色体显 性视网膜色素变 性 ^[88]

小鼠死亡^[93]。因此附带切割效应的存在限制Cas13效应蛋白的应用, 目前主要使用酶活失活的dCas13蛋白进行基因编辑。为解决附带切割活性带来的毒性问题, 目前已有研究基于Cas13蛋白的结构, 通过理性设计获得最小化附带切割活性的Cas13变体^[85]。这些变体有望进一步提升Cas13蛋白作为基因编辑工具的安全性。与之相似, V型CRISPR-Cas蛋白也具有附带切割效应, 这是否影响生物安全仍需要进一步研究。未来将开发更多最小化附带切割效应的高保真基因编辑工具, 以满足实际应用的需要。

最后, 小型Cas蛋白靶标选择的范围需要进一步拓宽。Cas9和Cas12蛋白在选择靶标的时候受到PAM序列的限制, 如SpCas9的靶标位点其3'端的序列为5'-NGG-3'; 大部分Cas12效应的靶标位点为其5'端的序列为5'-TTN-3'序列, 少部分Cas12效应蛋白识别5'-CCN-3'或5'-AAN-3'等不同的PAM序列。整体而言, 对PAM序列的要求限制靶标位点的选择, 尤其在需要进行精准编辑的时候, 待编辑位点附近是否存在PAM序列直接关系到基因组编辑的可行性。针对PAM序列的限制, 目前已有一系列研究开发出扩大PAM识别范围的Cas9变体^[94,95]; 然而在小型Cas效应蛋白中, 针对PAM识别而进行改造的研究仍然少见。对于VI型CRISPR-Cas系统, 对靶标选择受PFS的影响。虽然PFS对靶点选择的限制相对较小, 但仍限制靶标的选择。开发出可任意选择靶位点的新型基因编辑工具, 是后续需要努力的方向之一。

此外, 小型Cas蛋白的在不同物种内的蛋白质稳定性与编辑效率需要进一步明确。一般而言, 蛋白质在进化过程中趋向于增大体积, 以获得更高的蛋白质稳定性与功能。目前发现的小体积Cas蛋白在进化上更多处于早期阶段, 其结构稳定性是否与SpCas9等编辑工具相当, 尚不确定。目前缺乏对于Cas-crRNA复合体在不同物种细胞内半衰期的系统研究, 而后者直接关系到编辑效率与准确率, 半衰期过短可能降低编辑效率, 半衰期过长则可能提高脱靶风险。而且同一个Cas蛋白在不同物种中的半衰期是否存在差异、编辑效率与脱靶效应是否存在不同, 目前也不明确。因此, 明确小型Cas蛋白在不同物种内的半衰期、效率与准确性的差异, 同时明确对于特定物种的最优Cas编辑工具, 对于其进一步开发应用具有重要的参考意义。

未来如何开发更多新的小型基因编辑工具, 可以

参照以下策略:

第一, 优化生物信息学搜索策略。Yoon等人^[96]结合机器学习快速搜索与传统结构比对两种方式, 开发出一套自动化结构搜索流程, 通过寻找具有特征性的HEPN结构域, 发现一系列早期CRISPR-Cas13系统。其中Cas13an被认为是早期Cas13蛋白之一, 大小仅为449 aa, 并表现出RNA依赖的RNA酶活与反式切割活性。Altae-Tran等人^[97]研究开发了基于快速局部敏感哈希聚类算法(fast locality-sensitive hashing-based clustering, FLSHclust), 利用它识别出188种新型CRISPR系统, 并对其中4个系统进行详细表征, 这些新系统可能被用来编辑哺乳动物细胞。该团队继而整合FLSHclust算法与DALI结构相似性分析, 发现一系列包含单个或多个HEPN结构域的蛋白, 并对Cas13家族蛋白进行溯源, 发现其源于III型毒素-抗毒素系统蛋白AbiF^[98]。利用生物信息学技术, 研究者们还发现其他的RNA引导的核酸酶系统, 如TIGR-Tas (tandem interspaced guide RNA (TIGR)—TIGR-associated (Tas))系统^[99]。不同于CRISPR的单链互补, 其向导RNA的两个短间隔区分别锁定DNA双链, 形成伪对称靶点, 这可以提升特异性, 也规避CRISPR依赖的PAM序列限制; 其效应蛋白TasR成对称二聚体结构, 这与传统的Cas效应蛋白不同^[99]。这些新型系统的发现也为新编辑工具的开发提供基础。

第二, 寻找现有Cas效应蛋白的祖先蛋白以及同源蛋白。根据RNA世界假说, 在进化过程中, RNA在生命过程中发挥的作用逐步减少, 部分功能(如酶)由蛋白质取而代之。蛋白质在进化过程中体积逐步增大以获得更全面的功能。对于第二大类CRISPR-Cas系统效应蛋白的溯源表明, Cas效应蛋白来源于体积更小的早期蛋白, 如Cas9的祖先被认为是转座子系统的IscB家族蛋白^[100], Cas12蛋白则来源于转座子系统的TnpB家族^[101], Cas13来源于毒素-抗毒素系统的AbiF^[102]。这些蛋白都具有较小体积(小于500 aa), 并往往拥有RNA引导的核酸酶活性, 具有开发为新型基因编辑工具的潜能; 目前已有一系列研究通过对这些Cas祖先蛋白进行优化而获得新型小体积基因编辑工具。此外, Cas效应蛋白在真核生物中存在同源蛋白, 如真核来源的Fanzor蛋白与Cas12蛋白被认为均来源于TnpB, 并且已被证明在人类细胞中具有基因编辑活性^[102]。

第三, 对现有Cas效应蛋白进行改造以获得更小的

体积. 通过对Cas效应蛋白的结构功能分析, Cas效应蛋白的核心结构域(如核酸酶功能相关的RuvC, HEPN)在不同体积的Cas效应蛋白中相对保守; 其增大的部分主要参与底物的相互作用(如Helical结构域)以增强底物的识别, 这可能降低对于错配底物的耐受性, 提高底物切割的精确性, 符合适应性免疫系统的进化方向. 而研究者则可通过保留核心结构域, 删除部分参与底物识别部分的蛋白, 以达成减小体积的目的. 如Zhang等人^[59]通过截短RfxCas13d中Helical2结构域部分非保守序列, 获得更小体积的CasRx, 其编辑效率与野生型相当. 此外, 对于碱基编辑的应用方向, 其核酸酶活性并不是必需的, 因此, 可删除核酸酶相关的结构域后连接碱基编辑蛋白. 如Cas13bt中, 其HEPN结构域不参与crRNA的识别与结合, 因此研究者删除Cas13bt3中的HEPN结构域, 并连接ADAR编辑蛋白, 这些新型的碱基编辑工具不仅具有更小的体积, 还表现出更高的编辑效率^[61]. 这些减少的蛋白质的策略, 结合增强Cas效应蛋白活性、扩宽PAM识别范围的改造策略, 有望帮助研究者们通过理性改造获得更多小型、高效的Cas蛋白变体以应用于基因编辑.

我们可以期待小型基因编辑新工具的广泛应用.

通过深入挖掘新型CRISPR-Cas系统、不断改进和优化已发现CRISPR-Cas系统, 获得高效率、高保真、靶标广谱的新型基因编辑工具. 结合脂质体等多种新型递送载体, 小型Cas效应蛋白的应用可实现从基础研究到实际应用的全方位覆盖. 在基础研究方面, 基于小型CRISPR-Cas系统的基因编辑工具可应用于基因功能与转录调控研究、模式动物构建等方面; 在检测方面, 基于CRISPR-Cas的检测体系已将检测靶标从核酸扩展至ATP, NAD⁺等代谢小分子以及毒素, 同时不需要大型仪器设备, 做到现场即时检测(point-of-care test, POCT), 在临床检验、环境污染、食品安全方面均有广泛的应用场景; 在临床治疗方面, 小型Cas效应蛋白可与碱基编辑、逆转录、DNA聚合酶等多种蛋白有机组合, 实现单核苷酸替换、碱基插入与片段替换等多种形式的基因编辑; 在作物育种方面, 小型Cas效应蛋白可应用于重要粮食与经济作物的关键基因的编辑, 提升抗病虫害与产量等性能; 在工业发酵方面, 小型Cas效应蛋白可应用于工业微生物的基因编辑, 提升产率并降低培养成本. 更多小型Cas效应蛋白的开发与完善, 将满足更多精准医学和生命科学研究的需求, 开创基因编辑的新时代.

参考文献

- 1 Zakrzewska M, Burmistrz M. Mechanisms regulating the CRISPR-Cas systems. *Front Microbiol*, 2023, 14: 1060337
- 2 Mengstie M A, Wondimu B Z. Mechanism and applications of CRISPR/Cas-9-mediated genome editing. *BTT*, 2021, Volume 15: 353–361
- 3 Bharathkumar N, Sunil A, Meera P, et al. CRISPR/Cas-based modifications for therapeutic applications: a review. *Mol Biotechnol*, 2022, 64: 355–372
- 4 Nussenzweig P M, Marraffini L A. Molecular mechanisms of CRISPR-Cas immunity in Bacteria. *Annu Rev Genet*, 2020, 54: 93–120
- 5 Perez Rojo F, Nyman R K M, Johnson A A T, et al. CRISPR-Cas systems: ushering in the new genome editing era. *Bioengineered*, 2018, 9: 214–221
- 6 Alkhnbashi O S, Meier T, Mitrofanov A, et al. CRISPR-Cas bioinformatics. *Methods*, 2020, 172: 3–11
- 7 Hidalgo-Cantabrana C, Barrangou R. Characterization and applications of Type I CRISPR-Cas systems. *Biochem Soc Trans*, 2020, 48: 15–23
- 8 Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, et al. Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J Bacteriol*, 1987, 169: 5429–5433
- 9 Leung R K K, Cheng Q X, Wu Z L, et al. CRISPR-Cas12-based nucleic acids detection systems. *Methods*, 2022, 203: 276–281
- 10 Lebek S, Chemello F, Caravia X M, et al. Ablation of CaMKII δ oxidation by CRISPR-Cas9 base editing as a therapy for cardiac disease. *Science*, 2023, 379: 179–185
- 11 Gencay Y E, Jasinskytė D, Robert C, et al. Engineered phage with antibacterial CRISPR-Cas selectively reduce *E. coli* burden in mice. *Nat Biotechnol*, 2024, 42: 265–274
- 12 Girish V, Lakhani A A, Thompson S L, et al. Oncogene-like addiction to aneuploidy in human cancers. *Science*, 2023, 381: eadg4521
- 13 Fonfara I, Le Rhun A, Chylinski K, et al. Phylogeny of Cas9 determines functional exchangeability of dual-RNA and Cas9 among orthologous type II CRISPR-Cas systems. *Nucleic Acids Res*, 2014, 42: 2577–2590

- 14 Kim E, Koo T, Park S W, et al. *In vivo* genome editing with a small Cas9 orthologue derived from *Campylobacter jejuni*. *Nat Commun*, 2017, 8: 14500
- 15 Nishimasu H, Ran F A, Hsu P D, et al. Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA. *Cell*, 2014, 156: 935–949
- 16 Nishimasu H, Cong L, Yan W X, et al. Crystal structure of *Staphylococcus aureus* Cas9. *Cell*, 2015, 162: 1113–1126
- 17 Hirano H, Gootenberg J S, Horii T, et al. Structure and engineering of *Francisella novicida* Cas9. *Cell*, 2016, 164: 950–961
- 18 Yamada M, Watanabe Y, Gootenberg J S, et al. Crystal structure of the minimal Cas9 from *Campylobacter jejuni* reveals the molecular diversity in the CRISPR-Cas9 systems. *Mol Cell*, 2017, 65: 1109–1121.e3
- 19 Chen S, Liu Z, Xie W, et al. Compact Cje3Cas9 for efficient *in vivo* genome editing and adenine base editing. *CRISPR J*, 2022, 5: 472–486
- 20 Aliaga Goltsman D S, Alexander L M, Lin J L, et al. Compact Cas9d and HEARO enzymes for genome editing discovered from uncultivated microbes. *Nat Commun*, 2022, 13: 7602
- 21 Yang J, Wang T, Huang Y, et al. Insights into the compact CRISPR-Cas9d system. *Nat Commun*, 2025, 16: 2462
- 22 Bravo J P K, Liu M S, Hibshman G N, et al. Structural basis for mismatch surveillance by CRISPR-Cas9. *Nature*, 2022, 603: 343–347
- 23 Pacesa M, Lin C H, Cléry A, et al. Structural basis for Cas9 off-target activity. *Cell*, 2022, 185: 4067–4081.e21
- 24 Yang J, Li X, He Q, et al. Structural basis for the activity of the type VII CRISPR-Cas system. *Nature*, 2024, 633: 465–472
- 25 Manghwar H, Lindsey K, Zhang X, et al. CRISPR/Cas system: recent advances and future prospects for genome editing. *Trends Plant Sci*, 2019, 24: 1102–1125
- 26 Swarts D C, van der Oost J, Jinek M. Structural basis for guide RNA processing and seed-dependent DNA targeting by CRISPR-Cas12a. *Mol Cell*, 2017, 66: 221–233.e4
- 27 Stella S, Alcón P, Montoya G. Structure of the Cpf1 endonuclease R-loop complex after target DNA cleavage. *Nature*, 2017, 546: 559–563
- 28 Zetsche B, Heidenreich M, Mohanraju P, et al. Multiplex gene editing by CRISPR-Cpf1 using a single crRNA array. *Nat Biotechnol*, 2017, 35: 31–34
- 29 Burstein D, Harrington L B, Strutt S C, et al. New CRISPR-Cas systems from uncultivated microbes. *Nature*, 2017, 542: 237–241
- 30 Selkova P, Vasileva A, Pobegalov G, et al. Position of Deltaproteobacteria Cas12e nuclease cleavage sites depends on spacer length of guide RNA. *RNA Biol*, 2020, 17: 1472–1479
- 31 Liu J J, Orlova N, Oakes B L, et al. CasX enzymes comprise a distinct family of RNA-guided genome editors. *Nature*, 2019, 566: 218–223
- 32 Armstrong D A, Hudson T R, Hodge C A, et al. CAS12e (CASX2) Cleavage of CCR5: impact of guide rna length and pam sequence on cleavage activity. *bioRxiv*, 2023
- 33 Liu J, Zhu L. PlmCas12e utilizes Glu662 to prevent cleavage site occupation by positively charged residues before target strand cleavage. *Molecules*, 2024, 29: 5036
- 34 Xing W, Li D, Wang W, et al. Conformational dynamics of CasX (Cas12e) in mediating DNA cleavage revealed by single-molecule FRET. *Nucleic Acids Res*, 2024, 52: 9014–9027
- 35 Harrington L B, Burstein D, Chen J S, et al. Programmed DNA destruction by miniature CRISPR-Cas14 enzymes. *Science*, 2018, 362: 839–842
- 36 Karvelis T, Bigelyte G, Young J K, et al. PAM recognition by miniature CRISPR-Cas12f nucleases triggers programmable double-stranded DNA target cleavage. *Nucleic Acids Res*, 2020, 48: 5016–5023
- 37 Takeda S N, Nakagawa R, Okazaki S, et al. Structure of the miniature type V-F CRISPR-Cas effector enzyme. *Mol Cell*, 2021, 81: 558–570.e3
- 38 Yan W X, Hunnewell P, Alfonse L E, et al. Functionally diverse type V CRISPR-Cas systems. *Science*, 2019, 363: 88–91
- 39 Zheng W, Li H, Liu M, et al. Molecular insights and rational engineering of a compact CRISPR-Cas effector Cas12h1 with a broad-spectrum PAM. *Sig Transduct Target Ther*, 2025, 10: 66
- 40 Al-Shayeb B, Sachdeva R, Chen L X, et al. Clades of huge phages from across Earth's ecosystems. *Nature*, 2020, 578: 425–431
- 41 Pausch P, Al-Shayeb B, Bisom-Rapp E, et al. CRISPR-CasΦ from huge phages is a hypercompact genome editor. *Science*, 2020, 369: 333–337
- 42 Pausch P, Soczek K M, Herbst D A, et al. DNA interference states of the hypercompact CRISPR-CasΦ effector. *Nat Struct Mol Biol*, 2021, 28: 652–661
- 43 Carabias A, Fuglsang A, Temperini P, et al. Structure of the mini-RNA-guided endonuclease CRISPR-Cas12j3. *Nat Commun*, 2021, 12: 4476
- 44 Urbaitis T, Gasiunas G, Young J K, et al. A new family of CRISPR-type V nucleases with C-rich PAM recognition. *EMBO Rep*, 2022, 23: e55481
- 45 Al-Shayeb B, Skopintsev P, Soczek K M, et al. Diverse virus-encoded CRISPR-Cas systems include streamlined genome editors. *Cell*, 2022,

- 185: 4574–4586.e16
- 46 Sun A, Li C P, Chen Z, et al. The compact Cas π (Cas12I) ‘bracelet’ provides a unique structural platform for DNA manipulation. *Cell Res*, 2023, 33: 229–244
 - 47 Wu W Y, Mohanraju P, Liao C, et al. The miniature CRISPR-Cas12m effector binds DNA to block transcription. *Mol Cell*, 2022, 82: 4487–4502.e7
 - 48 Omura S N, Nakagawa R, Südfeld C, et al. Mechanistic and evolutionary insights into a type V-M CRISPR-Cas effector enzyme. *Nat Struct Mol Biol*, 2023, 30: 1172–1182
 - 49 Bigelyte G, Duchovska B, Zedaveinyte R, et al. Innate programmable DNA binding by CRISPR-Cas12m effectors enable efficient base editing. *Nucleic Acids Res*, 2024, 52: 3234–3248
 - 50 Chen W, Ma J, Wu Z, et al. Cas12n nucleases, early evolutionary intermediates of type V CRISPR, comprise a distinct family of miniature genome editors. *Mol Cell*, 2023, 83: 2768–2780.e6
 - 51 Duan Z, Zhang X, Zhang J T, et al. Structure and genome editing activity of the novel CRISPR-Cas12o1 effector. *Cell Res*, 2025, 35: 145–148
 - 52 Liu L, Li X, Ma J, et al. The molecular architecture for RNA-guided RNA cleavage by Cas13a. *Cell*, 2017, 170: 714–726.e10
 - 53 Kordys M, Sen R, Warkocki Z. Applications of the versatile^{CRISPR-Cas13 RNA} targeting system. *WIREs RNA*, 2022, 13: e1694
 - 54 Smith I, Greenside P G, Natoli T, et al. Evaluation of RNAi and CRISPR technologies by large-scale gene expression profiling in the Connectivity Map. *PLoS Biol*, 2017, 15: e2003213
 - 55 Konermann S, Lotfy P, Brideau N J, et al. Transcriptome engineering with RNA-targeting type VI-D CRISPR effectors. *Cell*, 2018, 173: 665–676.e14
 - 56 Yan W X, Chong S, Zhang H, et al. Cas13d is a compact RNA-targeting type VI CRISPR effector positively modulated by a WYL-domain-containing accessory protein. *Mol Cell*, 2018, 70: 327–339.e5
 - 57 Hajizadeh Dastjerdi A, Newman A, Burgio G. The expanding class 2 CRISPR toolbox: diversity, applicability, and targeting drawbacks. *BioDrugs*, 2019, 33: 503–513
 - 58 Zhang B, Ye Y, Ye W, et al. Two HEPN domains dictate CRISPR RNA maturation and target cleavage in Cas13d. *Nat Commun*, 2019, 10: 2544
 - 59 Zhang C, Konermann S, Brideau N J, et al. Structural basis for the RNA-guided ribonuclease activity of CRISPR-Cas13d. *Cell*, 2018, 175: 212–223.e17
 - 60 Kannan S, Altae-Tran H, Jin X, et al. Compact RNA editors with small Cas13 proteins. *Nat Biotechnol*, 2022, 40: 194–197
 - 61 Xu C, Zhou Y, Xiao Q, et al. Programmable RNA editing with compact CRISPR-Cas13 systems from uncultivated microbes. *Nat Methods*, 2021, 18: 499–506
 - 62 Nakagawa R, Kannan S, Altae-Tran H, et al. Structure and engineering of the minimal type VI CRISPR-Cas13bt3. *Mol Cell*, 2022, 82: 3178–3192.e5
 - 63 Pillon M C, Gordon J, Frazier M N, et al. HEPN RNases—an emerging class of functionally distinct RNA processing and degradation enzymes. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2021, 56: 88–108
 - 64 Jo D H, Koo T, Cho C S, et al. Long-term effects of *in vivo* genome editing in the mouse retina using *Campylobacter jejuni* Cas9 expressed via Adeno-Associated virus. *Mol Ther*, 2019, 27: 130–136
 - 65 Chen Y, Kang R, Jiang Y, et al. Rationally designed *Campylobacter jejuni* Cas9 enables efficient gene activation and base editing. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2024, 35: 102366
 - 66 Tsuchida C A, Zhang S, Doost M S, et al. Chimeric CRISPR-CasX enzymes and guide RNAs for improved genome editing activity. *Mol Cell*, 2022, 82: 1199–1209.e6
 - 67 Liu G, Wang H, Tong B, et al. An efficient CRISPR/Cas12e system for genome editing in *Sinorhizobium meliloti*. *ACS Synth Biol*, 2023, 12: 898–903
 - 68 Wang Y, Sang S, Zhang X, et al. Efficient genome editing by a miniature CRISPR-AsCas12f1 nuclease in *Bacillus anthracis*. *Front Bioeng Biotechnol*, 2021, 9: 825493
 - 69 Sukegawa S, Nureki O, Toki S, et al. Genome editing in rice mediated by miniature size Cas nuclease SpCas12f. *Front Genome Ed*, 2023, 5: 1138843
 - 70 Hua H M, Xu J F, Huang X S, et al. Low-toxicity and high-efficiency *Streptomyces* genome editing tool based on the miniature type V-F CRISPR/Cas nuclease AsCas12f1. *J Agric Food Chem*, 2024, 72: 5358–5367

- 71 Wang X, Li L, Guo L, et al. Robust miniature Cas-based transcriptional modulation by engineering UnlCas12f1 and tethering Sso7d. *Mol Ther*, 2024, 32: 910–919
- 72 Schmitt L T, Schneider A, Posorski J, et al. Quantification of evolved DNA-editing enzymes at scale with DEQSeq. *Genome Biol*, 2023, 24: 254
- 73 Sharrar A, Meacham Z, Staples-Ager J, et al. Viral delivery of compact CRISPR-Cas12f for gene editing applications. *CRISPR J*, 2024, 7: 150–155
- 74 Kim D Y, Lee J M, Moon S B, et al. Efficient CRISPR editing with a hypercompact Cas12f1 and engineered guide RNAs delivered by adeno-associated virus. *Nat Biotechnol*, 2022, 40: 94–102
- 75 Kong X, Zhang H, Li G, et al. Engineered CRISPR-OsCas12f1 and RhCas12f1 with robust activities and expanded target range for genome editing. *Nat Commun*, 2023, 14: 2046
- 76 Wu T, Liu C, Zou S, et al. An engineered hypercompact CRISPR-Cas12f system with boosted gene-editing activity. *Nat Chem Biol*, 2023, 19: 1384–1393
- 77 Xiang W, Lin X, Yang Y, et al. Cas12h is a crRNA-guided DNA nickase that can be utilized for precise gene editing. *Cell Rep*, 2025, 44: 115718
- 78 Wang Y, Qi T, Liu J, et al. A highly specific CRISPR-Cas12j nuclease enables allele-specific genome editing. *Sci Adv*, 2023, 9: eabo6405
- 79 Gong Z, Previtera D A, Wang Y, et al. Geminiviral-induced genome editing using miniature CRISPR/Cas12j (CasΦ) and Cas12f variants in plants. *Plant Cell Rep*, 2024, 43: 71
- 80 Komor A C, Kim Y B, Packer M S, et al. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature*, 2016, 533: 420–424
- 81 Li X, Wang Y, Liu Y, et al. Base editing with a Cpf1-cytidine deaminase fusion. *Nat Biotechnol*, 2018, 36: 324–327
- 82 Yang B, Wu C, Teng Y, et al. Tailoring microbial fitness through computational steering and CRISPRi-driven robustness regulation. *Cell Syst*, 2024, 15: 1133–1147.e4
- 83 Zhou C, Hu X, Tang C, et al. CasRx-mediated RNA targeting prevents choroidal neovascularization in a mouse model of age-related macular degeneration. *Natl Sci Rev*, 2020, 7: 835–837
- 84 Tieu V, Sotillo E, Bjelajac J R, et al. A versatile CRISPR-Cas13d platform for multiplexed transcriptomic regulation and metabolic engineering in primary human T cells. *Cell*, 2024, 187: 1278–1295.e20
- 85 Tong H, Huang J, Xiao Q, et al. High-fidelity Cas13 variants for targeted RNA degradation with minimal collateral effects. *Nat Biotechnol*, 2023, 41: 108–119
- 86 Yang P, Lou Y, Geng Z, et al. Allele-specific suppression of variant MHC with high-precision RNA nuclease CRISPR-Cas13d prevents hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation*, 2024, 150: 283–298
- 87 Xiao Q, Xu Z, Xue Y, et al. Rescue of autosomal dominant hearing loss by *in vivo* delivery of mini dCas13X-derived RNA base editor. *Sci Transl Med*, 2022, 14: eabn0449
- 88 Yan Z, Yao Y, Li L, et al. Treatment of autosomal dominant retinitis pigmentosa caused by RHO-P23H mutation with high-fidelity Cas13X in mice. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2023, 33: 750–761
- 89 Tan L L, Heng E, Leong C Y, et al. Application of Cas12j for streptomyces editing. *Biomolecules*, 2024, 14
- 90 Duan Z, Zhang X, Zhang J T, et al. Molecular basis for DNA cleavage by the hypercompact Cas12j-SF05. *Cell Discov*, 2023, 9: 117
- 91 Deltcheva E, Chylinski K, Sharma C M, et al. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature*, 2011, 471: 602–607
- 92 Hille F, Richter H, Wong S P, et al. The biology of CRISPR-Cas: backward and forward. *Cell*, 2018, 172: 1239–1259
- 93 Li Y, Xu J, Guo X, et al. The collateral activity of RfxCas13d can induce lethality in a RfxCas13d knock-in mouse model. *Genome Biol*, 2023, 24: 20
- 94 Koseki S, Hong L, Yudistyra V, et al. PAM-flexible genome editing with an engineered chimeric Cas9. *Res Sq*, 2023
- 95 Kleinstiver B P, Prew M S, Tsai S Q, et al. Engineered CRISPR-Cas9 nucleases with altered PAM specificities. *Nature*, 2015, 523: 481–485
- 96 Yoon P H, Zhang Z, Loi K J, et al. Structure-guided discovery of ancestral CRISPR-Cas13 ribonucleases. *Science*, 2024, 385: 538–543
- 97 Altae-Tran H, Kannan S, Suberski A J, et al. Uncovering the functional diversity of rare CRISPR-Cas systems with deep terascale clustering. *Science*, 2023, 382: eadi1910
- 98 Ding H, Yang D, Ding S, et al. Reprogrammable flexible piezoelectric actuator arrays with a high degree of freedom for shape morphing and

- locomotion. *Soft Robotics*, 2025, 12: 436–444
- 99 Faure G, Saito M, Wilkinson M E, et al. TIGR-Tas: a family of modular RNA-guided DNA-targeting systems in prokaryotes and their viruses. *Science*, 2025, 388: eadv9789
- 100 Altae-Tran H, Kannan S, Demircioglu F E, et al. The widespread IS200/IS605 transposon family encodes diverse programmable RNA-guided endonucleases. *Science*, 2021, 374: 57–65
- 101 Karvelis T, Druteika G, Bigelyte G, et al. Transposon-associated TnpB is a programmable RNA-guided DNA endonuclease. *Nature*, 2021, 599: 692–696
- 102 Saito M, Xu P, Faure G, et al. Fanzor is a eukaryotic programmable RNA-guided endonuclease. *Nature*, 2023, 620: 660–668

Research progress of compact Class 2 Cas effector proteins

LIU Bo, HUANG ShiQing & ZHENG WeiWei*

College of Life Sciences, Fujian Normal University, Fuzhou 350117, China

* Corresponding author; E-mail: vivizheng@fjnu.edu.cn

CRISPR-Cas-based genome editing technology has ushered in a new era. However, Cas9, the most commonly used genome editing tool, is limited in delivery due to its large size. Type II, type V, and type VI CRISPR-Cas systems, which belong to the second largest class with Cas9, have a large number of members. Many of these effector proteins are compact and have gene editing ability that is not inferior to that of large Cas effector proteins. This review reviews the functions and mechanisms of the second major class of compact Cas effectors (type II, type V, and type VI, defined here as less than 1000 aa), summarizes their application development progress, and analyzes the problems facing the application of these compact Cas effectors in genome editing. In addition, the future development of more compact genome editing tools is discussed.

CRISPR-Cas, compact Cas effectors, genome editing

doi: [10.1360/SSV-2025-0095](https://doi.org/10.1360/SSV-2025-0095)