

多重基因组编辑中CRISPR-Cas9系统和CRISPR-Cpf1系统的应用和比较

郭婷 安新民*

(北京林业大学林木育种国家工程实验室, 林木花卉遗传育种教育部重点实验室,
北京林业大学生物科学与技术学院, 北京 100083)

摘要 基因编辑技术是指在基因靶位点引入核酸序列变化的一类技术, 已广泛应用于生物学、基础医学等多个领域。随着对CRISPR系统研究的不断深入, 利用Cas9蛋白进行的多重基因组编辑技术得到了飞速发展, 科学家们开发了多种依赖Cas9蛋白的多gRNA载体构建策略, 并且在多个物种中已经实现多重基因编辑。而CRISPR-Cpf1系统是基因编辑技术的新工具, 极大地丰富了CRISPR/Cas系统库, 该系统不仅进一步扩大了基因编辑靶位点的选择范围, 同时有效降低了脱靶效应。而且, Cpf1不同于Cas9蛋白的分子作用机制, 具有多重编辑的天然优势, 已广泛引起人们的关注。该文重点介绍了主要的4种CRISPR-Cas9多重编辑构建策略: Golden Gate Assembly、Multiplexed Lentiviral Expression Cassettes、Polycistronic-tRNA-gRNA Cassettes、Csy4-Cleavable Cassettes和CRISPR-Cpf1多重基因编辑新技术, 同时比较了CRISPR-Cas9和CRISPR-Cpf1两种多基因编辑技术的特点, 以期多重基因编辑技术在生物研究领域的应用提供参考。

关键词 多重基因编辑技术; CRISPR-Cas9; CRISPR-Cpf1

Application and Comparison of CRISPR-Cas9 System and CRISPR-Cpf1 System in Multigenome Editing

GUO Ting, AN Xinmin*

(National Engineering Laboratory for Tree Breeding, NDRC, Key Laboratory of Genetics and Breeding in Forest Trees and Ornamental Plants, MOE, College of Biological Sciences and Biotechnology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China)

Abstract Gene editing technology is a kind of technology that introduces nucleic acid sequence changes into gene target, which has been widely used in biology, basic medicine and other fields. With the deepening of the research on CRISPR system, the multiple gene editing technology using Cas9 protein has developed rapidly. Scientists have developed a variety of multiple gRNAs vector construction strategies relying on Cas9 protein, which has realized multiple gene editing in various species. CRISPR-Cpf1 system is a new tool of gene editing technology, which has greatly enriched the CRISPR/Cas system library. It not only further expands the selection range of gene editing target sites, and causes less off-target effects, but also its molecular mechanism of action different from

收稿日期: 2019-02-25 接受日期: 2019-05-27

转基因生物新品种培育重大专项(批准号: 2018ZX08020002-002-004)、国家自然科学基金(批准号: 31870652、31570661)和国家林业局科技发展中心项目(批准号: KJZXSA2018030)资助的课题

*通讯作者。Tel: 010-62336248, E-mail: anxinmin@bjfu.edu.cn

Received: February 25, 2019

Accepted: May 27, 2019

This work was supported by the National Key Program on Transgenic Research (Grant No.2018ZX08020002-002-004), the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31870652, 31570661) and the State Forestry Administration Science and Technology Development Center Project of China (Grant No.KJZXSA2018030)

*Corresponding author. Tel: +86-10-62336248, E-mail: anxinmin@bjfu.edu.cn

网络出版时间: 2019-12-11 11:23:59

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20191211.1123.030.html>

Cas9 protein confers it natural advantage in multiple gene editing, which has attracted extensive attention. In this paper, we mainly introduced four construction strategies of multiple gene editing based on CRISPR-Cas9 system, including Golden Gate Assembly, Multiplexed Lentiviral Expression Cassettes, Polycistronic-tRNA-Grna Cassettes, Csy4-cleavable Cassettes, and CRISPR-Cpf1 multi-gene editing technology. Meanwhile, we compare the characteristics of CRISPR-Cas9 system and the CRISPR - Cpf1 system, and expect to provide reference for the application of multiple gene editing technology in the field of biological research.

Keywords multiple gene editing technology; CRISPR-Cas9; CRISPR-Cpf1

近年来, 利用工程核酸酶来进行的基因组编辑已经发展成为一种有效的生物技术手段, 是在基因组的特定位置进行靶向编辑包括: 基因删除、插入、转录激活、甲基化调控等的工程方法^[1-2]。其中, 起关键性“剪刀”作用的是序列特异性核酸酶(sequence-specific nuclease, SSN), 它可在预设的基因组位点使DNA双链断裂, 为基于DNA修复的精确基因组编辑提供机会, 包括从上个世纪90年代发展起来的锌指核酸酶(zinc-finger nucleases, ZFNs)和TAL效应核酸酶(transcription activator-like effector nucleases, TALENs)工具^[1,3-4], 但这两种核酸酶与DNA的结合需要达到一定程度的特异性, 且构建过程较为复杂、耗时费力。2012年, 美国加州大学伯克利分校的Doudna和Charpentier研究组^[5]首次在体外证明了CRISPR/Cas9特异性切割靶标DNA的功能, 并将crRNA-tracrRNA改造为sgRNA(single guide RNA)。2013年, 张锋等^[1]首次报道了CRISPR(clustered regularly interspaced short palindromic repeats)/Cas系统在哺乳动物基因组编辑中的应用, 作为一种RNA引导的内切核酸酶系统, 它可以直接通过核苷酸碱基配对靶向DNA位点。因其具有靶点设计灵活、构建简单、编辑高效等特点, CRISPR/Cas已成为基因组编辑的首选。

自CRISPR-Cas9技术诞生以来, 科学家们对其不断进行改进, 主要目标是提高该系统的DNA靶向范围与保真性, 并已经取得了可观的进展。研究表明, 在哺乳动物细胞中有效发挥作用的天然或工程Cas9变异中, 蛋白靶向范围不再局限于NGG的PAM(protospacer adjacent motif)区。最近, 美国哈佛大学的Liu研究团队^[2]获得了可在哺乳细胞中识别包括NG、GAA和GAT的PAM序列的SpCas9变体(xCas9), 其在人类细胞中的应用包括靶向转录激活、核酸酶介导的基因破坏以及胞苷和腺嘌呤碱基编辑,

实验结果显示, xCas9具有比SpCas9更高的DNA特异性, 并且在全基因组范围所有测试的NGG靶位点上的脱靶活性更低。相关研究在水稻中也取得了进展, 王克剑课题组与李家洋课题组^[3]合作通过定点突变对水稻常用的SpCas9进行改造, 获得了xCas9 3.6和xCas9 3.7两个变体, 该研究有效拓展了基因组编辑的范围, 但编辑效率有待提高。科学家们进行深入探索后发现, 细菌王国中具有各类丰富的Cas蛋白, 不同的Cas蛋白具有各自的特性, 包括识别的PAM区序列、蛋白大小以及切割活性都各不相同, 这大大扩展了CRISPR/Cas系统的应用范围^[6-7]。Doudna团队^[8]在嗜热脂肪土芽孢杆菌中找到了一种GeoCas9蛋白, 可以在很宽的温度范围内催化RNA引导的DNA切割, 并且在人血浆中具有增强的蛋白质寿命。

2015年9月, 张峰团队^[4]发表在《细胞》杂志中的一项研究介绍了一种比Cas9蛋白更小更简单的核酸内切酶Cpf1, 仅1 200~1 300个氨基酸。它能够介导强烈的DNA干扰, 且具有与Cas9不同的生理特征。Cpf1蛋白属于II类type V-A CRISPR系统, 与Cas9一样, Cpf1可与目标基因组位点结合并产生双链断裂, 然后通过非同源末端连接(non-homologous end-joining, NHEJ)或同源定向修复(homology directed repair, HDR)(如果提供了外源模板)进行修复。相比于Cas9蛋白, Cpf1蛋白具有更低的脱靶效应, 在基因治疗应用中具有巨大的潜力。同时, CRISPR-Cpf1系统的应用范围更广, 例如在谷氨酸棒杆菌这一最重要的氨基酸生产菌株中, SpCas9难以适配应用, 中国科学院杨晟研究组^[9]建立了高效的谷氨酸棒杆菌CRISPR-Cpf1基因组编辑系统, 可对L-脯氨酸合成代谢关键酶 γ -谷氨酰激酶的149位甘氨酸实施原位饱和点突变, 成功筛选获得抗L-脯氨酸反馈抑制的高产菌株。CRISPR-Cpf1基因编辑系统的出现, 为蓬勃发展的基因组编辑工具再添一抹亮色。

1 CRISPR-Cas9多重编辑方法

随着对CRISPR-Cas系统研究的不断深入,科学家们已不满足于对单基因的编辑,同时靶向多个DNA序列、用于敲除多个基因或删除染色体片段的多重基因组编辑技术,已经引起了科学界的广泛关注并成为当今基因编辑技术的研究热点之一。在新的CRISPR-Cpf1方法出现之前,利用CRISPR技术进行多重基因编辑完全依赖于CRISPR-Cas9系统^[10],该系统主要通过提供单个Cas9酶和两个或多个靶向不同基因组位点的sgRNA来进行多靶点的编辑。目前,许多基于质粒的CRISPR/SpCas9表达系统已经构建完成,并且科学家们可以从非营利性的全球质粒库Addgene获得。但这些系统只适用于单个gRNA的转染,当靶向多个基因座时,由于拷贝数的差异,共转染可能导致表达水平有变化。这种情况的解决方案通常需要定制多个sgRNA克隆表达程序,并将其放入相同的载体中,但当实验需要许多sgRNA组合时,工作量巨大且耗时^[11]。随着科学家们不断探索和改进,目前用于在体内提供多种gRNA的方法包括使用多基因盒来表达几种gRNA,基于Csy4切除、crRNA阵列、核酶侧翼gRNA、gRNA的tRNA依赖性切割以及预先加载不同gRNA的Cas9蛋白的直接引入等^[12]。这里介

绍主要的4种多gRNA载体构建策略。

1.1 Golden Gate Assembly

Golden Gate Assembly是一种基于使用IIS型限制酶的DNA组装方法^[13],可实现将多种gRNA表达质粒快速组装成单个“阵列”质粒,达到将多个sgRNA表达盒的定制克隆程序置于同一载体的目标(图1)。其可用于不同水平的构建体装配:从基因片段到完整的基因编码序列、从基本遗传元件到完整转录单元、从转录单元到多基因构建体,构建的载体通过转染的方式进入细胞。Vad-Nielsen等^[11]使用该方法,在2周内完成了CRISPR gRNA表达阵列的构建,其含有多达30个gRNA表达盒,相关研究证明,使用人细胞中的多重gRNA表达阵列载体可以同时靶向10个基因组基因座或同时抑制多个基因。该方法的优点是时间成本低,且具有高效性和可编程性;缺点是每个gRNA需要自己的启动子,而有限的酶切位点和增加的插入物降低了制备构建体的效率,且由于该系统基于IIS型限制酶的使用,因此在设计CRISPR gRNA时必须排除存在*Bbs* I、*Bsa* I或*BsmB* I识别位点的靶位点^[11]。Golden Gate Assembly已被广泛用于合成生物学研究中, Larroude等^[14]利用该技术筛选表达的每个转录单位的最佳启动子-基因对,并

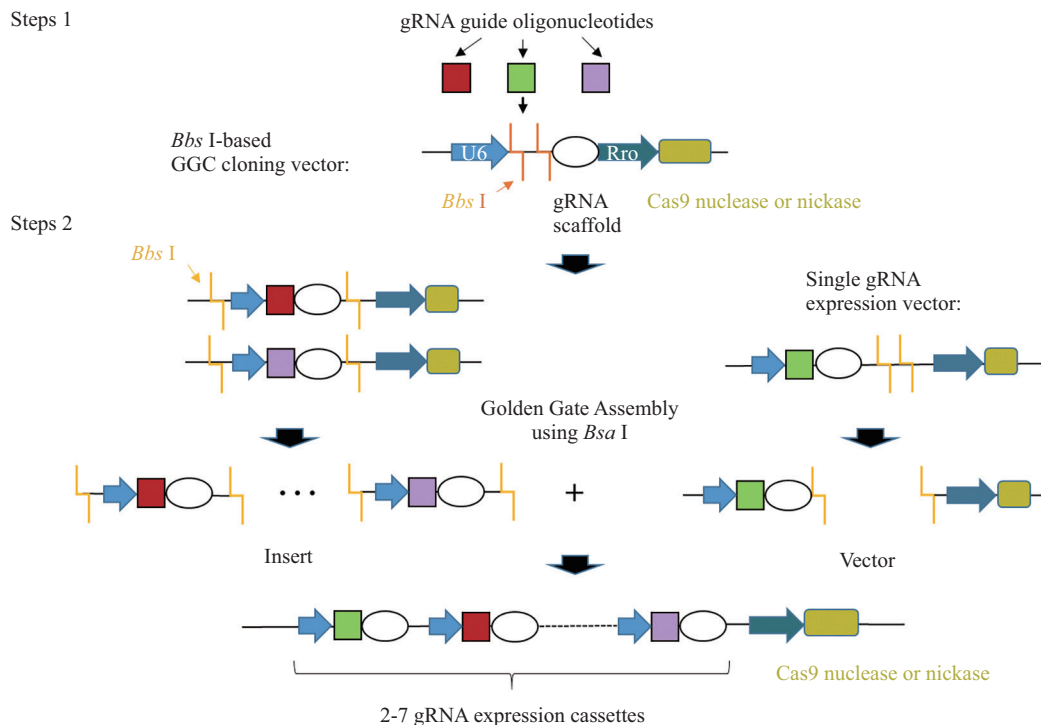


图1 用于同时靶向多个基因组基因座的CRISPR gRNA表达阵列的Golden Gate组装(根据参考文献[1,11]修改)

Fig.1 Golden Gate Assembly of CRISPR gRNA expression arrays for simultaneous targeting of multiple genomic loci (modified from references [1,11])

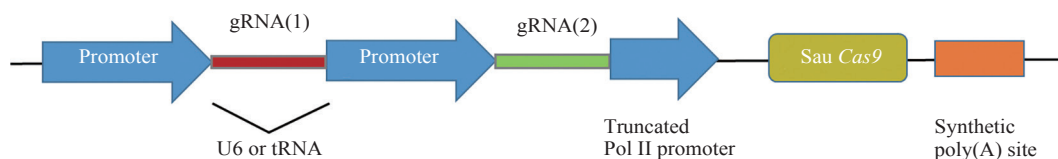


图2 MLEC多重基因组编辑系统(根据参考文献[15]修改)

Fig.2 MLEC multiplex genome editing system (modified from reference [15])

通过此策略获得了 β -胡萝卜素高产的解脂耶氏酵母菌株。

1.2 MLEC(Multiplexed Lentiviral Expression Cassettes)

利用MLEC技术构建的CRISPR-Cas系统(图2)主要应用于多种dsDNA病毒导致的疾病治疗, 其通过慢病毒转导的方式进入受体。该技术利用了一种特殊的载体——腺相关病毒(adenovirus associated virus, AAV)载体。AAV载体作为用于转导肝脏和肿瘤组织的理想病毒载体, 它解决了CRISPR/Cas系统在体内向感染细胞的有效递送问题。该技术的缺点是每个gRNA需要添加各自的启动子, 且AAV载体的包装大小是有限的, 所以常用的4.2 Kb大小的Spy Cas9基因显然太大而不能构建表达的重组AAV载体, 所以科学家们发现3.2 Kb的Sau Cas9基因较为适用于该系统的构建。2015年, Edward等^[15]在研究中完成了多重编辑能力的AAV载体骨架的设计和优化, 该系统由一个截短处理的CMV启动子/增强子驱动的金黄色葡萄球菌中的小型II型Cas9蛋白, 3'端的一个poly(A)添加信号, 以及两个由U6启动子或70 bp tRNA衍生的Pol III启动子驱动的双sgRNA表达盒组成。构建的双sgRNA的表达具有高编辑效率、高切割特异性, 脱靶率较低。多重sgRNA/Cas9 AAV载体的递送极大地扩展CRISPR/Cas系统在体内使用的潜力。Chung等^[16]也利用MLEC策略成功构建了多重sgRNA/Cas9 AAV载体, 极大地增强了干细胞基因治疗方法在治疗HIV/AIDS方面的功效。

1.3 Csy4-Cleavable Cassettes

Csy4-Cleavable Cassettes多基因编辑系统属于一种利用Csy4内切核糖核酸酶(endo-RNase)从合成的单个转录物表达多个gRNA的策略(图3)^[17]。其原理是首先构建具有串联排列的Csy4-cleavable RNA-gRNA结构的合成基因, 然后它会被有效且精确地加工成多个具有体内所需5'向序列的gRNA, 从而指导Cas9蛋白编辑多个染色体靶标, 实现由单个基因产生大量gRNA的目标^[18], 该技术构建的载体通过转染的方式导入体内, 但需要共转染Cas9蛋白。Csy4是一种21.4 kDa大小的RNA内切核糖核酸酶, 通过序列和结构特异性接触识别其RNA底物, 可识别短至18 bp(Cy18)的同源发夹序列^[19]。Ferreira等^[20]的研究表明, 经过Csy4处理的多组分gRNA达到了与单独表达特定gRNA时相同的转录调控水平, 所以它同时具有稳定性与高效性。Csy4的细菌来源也使其成为构建复杂的合成通路而不干扰宿主细胞内源性RNA机制的理想工具^[17]。该策略也有望应用于加速植物基因的功能发现和农作物基因改良^[12]。2018年10月, 高彩霞团队^[21]利用多靶点Csy4 multi-gRNA系统将理想株型、开花的光周期不敏感性、果实大小和成熟同步性等重要驯化性状一次性导入野生番茄, 实现了天然抗逆番茄品种的从头驯化, 提供了作物改良的新思路。

1.4 PTG(polycistronic-tRNA-gRNA) Cassettes

PTG Cassettes是指在一个构建体中快速组装多个sgRNA的策略。该系统原理是利用细胞中的内源

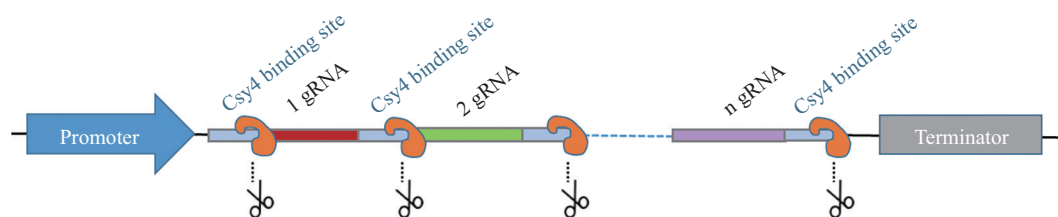


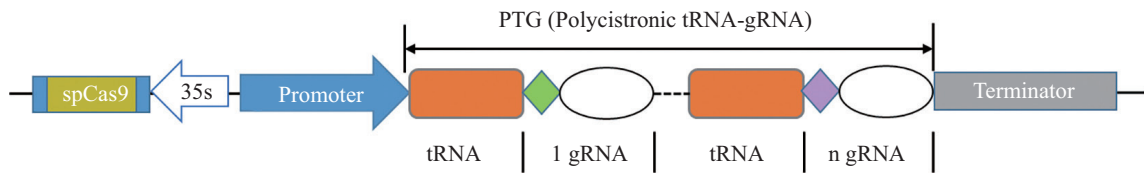
图3 Csy4-Cleavable Cassettes多重基因组编辑系统(根据参考文献[22]修改)

Fig.3 Csy4-Cleavable Cassettes multiplex genome editing system (modified from reference [22])

性tRNA加工系统^[18], 有效地表达仅使用一个Pol III启动子驱动的多个sgRNA, 达到多重编辑的效果。内源性酶RNases P和Z能够特异性识别tRNA并精确切割PTG以释放tRNA和gRNA, 在表达多种gRNA的同时, tRNA也可作为内部增强子或启动子, 所以该系统还可以增强Pol III启动子的转录效率^[23]。该系统通过转染的方式进入细胞, 同时也需要共转染Cas9蛋白。中国科学院华南植物园汪祖鹏等^[24]为了提高猕猴桃中的基因编辑效率, 构建了一种新的快速高效的成对sgRNA的Cas9双元表达载体, 仅需要合成两种含sgRNA的引物, 大幅度降低了成本, 且PTG/Cas9系统(图4)的诱变频率比CRISPR/Cas9系统的诱变频率高10倍。

CRISPR/Cas9多重编辑系统的不同构建策略已被用于修饰各种生物体中的多个基因, 例如结合几个Pol III启动子盒和sgRNA的多重系统^[25-26]、利用单个转录物表达多个gRNA的Csy4核糖核酸酶系统^[17]。4种构建策略各有优缺点(表1)。(1)Golden Gate Assembly构建策略适用于不同水平的构建体装配, 具有高效率及可编程性。但由于其依赖于IIS型限制酶,

所以需要从载体中消除Bsa I位点, 通常需要对扩增的序列以及其他entry clone进行测序以确认不存在PCR衍生的突变。研究表明, Bsa I位点具有6个碱基对识别序列, 因此对于GC含量为50%的基因组, Bsa I限制位点平均每4 Kb出现一次^[27]。所以在选择构建策略时, 需要考虑到实验对象生物体的基本成分来判断BsaI限制位点的频率。(2)MLEC构建策略的特点在于使用了病毒载体, AVV病毒载体可以解决CRISPR/Cas系统在体内对受感染细胞的有效传递问题。该策略能够将多重编辑技术与病毒载体结合起来, 极大地扩展CRISPR/Cas9系统在体内靶向肝脏、神经、肌肉和肿瘤组织的治疗潜力。但需要注意的是, 在使用过程中, 慢病毒载体可能会导致一系列生物安全性问题, 例如导致插入突变或产生具有复制能力的病毒等^[28]。(3)Csy4-Cleavable Cassettes策略通过一个多顺反子的转录本表达gRNA。Csy4的功能已在细菌, 古细菌和真核生物中得到证实^[29], 还具有靶向治疗HIV-1的潜力^[30], 适用于各种生物体的基因组编辑, 应用较为广泛。(4)PTG Cassettes策略也属于利用单个转录物表达多个gRNA的策略, 具有比



具有不同颜色的钻石代表sgRNA, 圆形代表sgRNA支架, 黄色圆矩形代表tRNA。
Diamonds with different colours represent sgRNA, round represent the sgRNA scaffold and red round rectangles represent tRNA.

图4 PTG/Cas9多重基因组编辑系统 (根据参考文献[22,24]修改)

Fig.4 PTG/Cas9 multiplex genome editing system (modified from references [22,24])

表1 CRISPR/Cas9多重编辑系统4种构建策略的比较

Table 1 Comparisons of 4 construction strategies of CRISPR/Cas9 multi-editing system

策略 Strategies	导入方法 Import methods	优点 Advantages	缺点 Disadvantages
Golden Gate Assembly	Transfection	Suitable for different levels of construction assembly Programmability Low time cost	Each gRNA needs its own promoter The design of sgRNA needs to consider the exclusion of specific target sites
Multiplexed Lentiviral Expression Cassettes	Lentiviral transfer	Effective delivery of CRISPR/Cas system to infected cells <i>in vivo</i>	Each gRNA needs its own promoter The package size of AAV carrier is limited biosecurity issues
Csy4-Cleavable Cassettes	Transfection	Stability and efficiency Using a single transcript to express multiple gRNAs	Need to co-transfect Cas9 protein
Polycistronic-tRNA-gRNA Cassettes	Transfection	Utilizing endogenous tRNA processing systems in cells Improve the transcription efficiency of promoter	Need to co-transfect Cas9 protein

Csy4-Cleavable Cassettes强大和精确的功能, 并适用于更复杂的Cas9应用, tRNA也可作为内部增强子或启动子来增强Pol III转录效率。与上述3种方法相比, PTG使用内源性tRNA处理系统, 而不引入可能对细胞有毒的其他成分, 以及tRNA(约70 bp)小于核酶(约200 bp)和Pol III启动子(通常为200~300 bp), 更方便进行载体包装, 所以PTG未来应用于CRISPR-Cas9系统在基因治疗中的限制较少^[23]。

2 CRISPR-Cpf1多基因编辑系统

2.1 CRISPR-Cpf1技术简介

自从2015年张峰团队^[4]首次证明了CRISPR-Cpf1系统在人类细胞中具有有效的基因组编辑活性, 为了探索Cpf1在基因组编辑应用中的适用性, 科学家们对来自不同细菌的16种Cpf1家族蛋白的DNA靶向性进行了表征, 并筛选出源于氨基酸球菌属(*Acidimicrobium*)和毛螺菌科(*Lachnospiraceae*)的2种酶: AsCpf1和LbCpf1。Cpf1系统CRISPR阵列包含一系列由36个核苷酸重复序列分隔的9个间隔序列, 研究表明, Cas9和Cpf1的核酸酶部分与不同的转座编码的TnpB蛋白组同源, 第一个包含RuvC和HNH核酸酶域, 第二个仅包含RuvC-like域^[31]。除了效应蛋白之间的区别之外, 基因编码的Cas1、Cas2和Cas4蛋白, 相比于I型和III型的同源蛋白, Cpf1系统与II型CRISPR系统的同源蛋白关系更加密切。根据CRISPR I型和II型系统差异, CRISPR-Cpf1被确定为2类V-A型CRISPR系统^[32], 在CRISPR免疫的背景下, V-A型是迄今为止描述的最简约的CRISPR-Cas系统。2016年, Fonfara等^[33]首次揭示Cpf1具有双重切割酶活性, 在镁离子或钙离子存在下, 它仅使用一种酶Cpf1来处理pre-crRNA, 之后Cpf1由crRNA引导, 识别富含胸腺嘧啶的原间隔子相邻基序(PAM), 产生DSB, 催化细胞开启修复机制。Cpf1具有的与Cas9不同的分子机制为序列特异性基因组工程、基因沉默和促进基因的多路复用开辟了新的途径, 也使该系统成为基因水平转移的理想选择。

CRISPR-Cpf1与CRISPR-Cas9系统在很多方面都有所不同^[34](表2, 这里以最常用的CRISPR-SpCas9为代表进行比较)。Cpf1与Cas9具有不同的作用机制和结构特点, CRISPR-Cpf1的优势主要体现在4个方面。(1)剪切方式不同。Cpf1剪切后形成交错切割的产物即黏性末端, 其相对于Cas9剪切后产生的

平末端通常更加容易进行修复处理。研究表明, 黏性末端结构对于促进非同源末端连接基因插入哺乳动物基因组尤其有利^[35], 如果能够对黏性末端的精确序列进行编程, 研究人员就可以设计出DNA插入物, 使其以正确的方向整合到基因组中。(2)剪切位置不同。Cpf1剪切时离PAM区识别位点很远, 使研究人员在编辑位置的选择上有了更多的选项, 并且Cpf1诱导的indels离靶区较远, 可为后续的Cpf1裂解保留indels。(3)Cpf1系统在目标位置的选择上提供了灵活性, 与Cas9相比, Cpf1复合物识别的PAM序列更加广泛。迄今为止, 所有特征哺乳动物基因组编辑蛋白都需要PAM区至少一个G的存在^[31,36], 因此Cpf1家族蛋白的T和T/C依赖性PAM区扩大了RNA-guided的基因组编辑核酸酶的靶向范围。(4)与Cas9蛋白的最大不同是在pre-crRNA的加工上, Cpf1系统不包括tracrRNA, 而是由其本身的RNase结构域完成整个加工过程, 随后利用加工获得的crRNA特异性地靶向和切割DNA。因为具有这种自我加工的能力, CRISPR/Cpf1系统不需要多个启动子来驱动crRNA表达, 或者添加一些方便加工的序列例如Csy4切割位点, 则Cpf1酶比标准的SpCas9要小, 使其更容易进入各组织和细胞。

作为基因编辑的新工具, CRISPR-Cpf1进一步扩大了基因编辑靶位点的选择范围, 同时脱靶效应低, 已广泛引起人们的关注。Cpf1可通过单个crRNA阵列同时进行多个基因的编辑, 使构建的crRNA表达载体更加简化、更加轻巧, 适用于多个表达平台。例如上述腺相关病毒的转导方面, 张峰团队^[10]将两种AAV以1:1的比例混合感染细胞, 其中一种表达Cpf1, 另一种表达crRNA阵列以及GFP标签。实验结果表明在感染后四周, 约75%的神经元被Cpf1和GFP共同转导, 在这些神经元中, 3个位点全部被编辑的神经元占15%, 说明Cpf1的编辑效率是可观的。

2.2 CRISPR-Cpf1系统的改良及应用

2.2.1 CRISPR-Cpf1系统的改良

CRISPR-Cpf1自被发现以来, 已经应用于动物^[37]、植物^[38-39]、微生物^[40]及人类细胞^[41]的相关研究中。虽然该系统相对于Cas9系统具有很大的优势, 但该系统出现时间较短, 还需进一步完善。目前科学家们主要针对其编辑效率、编辑范围以及编辑的精准性和稳定性进行研究。

表2 CRISPR- Cpf1和CRISPR-SpCas9的比较(根据参考文献[22]修改)

Table 2 The Comparisons between CRISPR-Cpf1 and CRISPR-SpCas9 (modified from reference [22])

项目 Item	CRISPR-Cpf1	CRISPR-SpCas9
Type	CRISPR-Cas IIV-A type	CRISPR-Cas II type
Structural domain	RuvC and HNH nuclease domain	RuvC-like domain
Protein size	1 200~1 300 amino acid	1 368 amino acid
Enzyme	DNA and RNA endonuclease activity	DNA endonuclease activity
Pre-crRNA processing	RNase structural domain	RNase III
Terminal	Cohesive terminus	Blunt-ended DNA
Shear position	PAM downstream target DNA strand 23 bits and non-target strand 18 bits	PAM upstream 3 nucleotide lateral
Off-target rate	Low	Relatively high
Characteristics	Wide range of applications, suitable for more difficult editing species, such as <i>Corynebacterium glutamate</i> Cpf1 enzyme is smaller, easier to package and facilitate the construction of vector Prefer the PAM sequence rich in T TracrRNA is not required	The research is relatively thorough and has been widely used in various fields Prefer PAM sequences rich in G Need tracrRNA

为了提高CRISPR系统的基因组编辑效率, 科学家们探索了多种方法。例如利用工程化crRNA提高系统对基因组的编辑效率^[42-43]; 设计并优化gRNA, 利用gRNA-tRNA系统可以提高CRISPR-Cpf1系统的靶向能力, 并且显示出比原始Cpf1-gRNA系统更显著的编辑效率^[44]; 以及利用植物内源内含子剪切系统和tRNA加工系统对gRNA进行改造的方法, 华中农业大学谢卡斌团队^[45]利用Cpf1所特有的crRNA加工活性简化了内含子表达sgRNA的方法, 与常规Cpf1载体相比, 含有Cpf1和内含子crRNA阵列的杂合基因编辑效率显著提高。2017年, 朱健康团队^[46]成功构建了一种简单、高效的能在水稻中实现的多基因定点编辑系统。他们发现, 将多个短的20~21 bp的直接重复序列(direct repeats, DR)与22~24 bp的靶位点识别序列的DR-guide单元直接串联, 只需要一个启动子驱动即可简单高效地实现多基因敲除, 敲除效率达到40%~75%, 显著提高了Cpf1的编辑效率, 该工作为水稻多基因定点编辑提供了一个简单高效的新工具。

解决脱靶问题是科学家们研究方向之一。一直以来, 科学家们从不同类型的细菌中搜寻了成百上千种的CRISPR系统, 不断补充和丰富系统库, 获得了很大的进展。例如, 一些系统具有体积较小的特性, 则适用于构建病毒载体靶向基因治疗。但不管该系统在设计、编辑效率等方面具有多大的优势, 脱靶

效应一直是重点的研究对象。2016年, Kim等^[47]利用Digenome-seq测序方法验证AsCpf1和LbCpf1蛋白的脱靶效应。结果显示, 与Cas9相比, Cpf1脱靶切割位点更少(LbCpf1为6个, AsCpf1为12个), 而Cas9能够切割人基因组上的90多个脱靶位点。并且在Cpf1体外脱靶切割位点实验中, 代表脱靶效应的核苷酸插入或删除发生率低于0.1%, 远低于对应的靶位点上的indel发生率, 表明这两种Cpf1蛋白脱靶效应极低。但若期待CRISPR-Cpf1在人类生产和临床疾病治疗方面得到推广应用, 对于系统的特异性以及相关检测手段的研究必不可少。CRISPR系统的核心在于核酸酶蛋白以及sgRNA, 就目前的研究进展, 提高系统的保真性主要有以下方法。(1)对于一段目标DNA序列, 设计两个Cpf1分子结合到其相对链上, 完成完全切割。虽然这种方法有效, 但它会给系统增加更多部件, 对于系统的构建及其导入都增加了复杂性, 目前较难实现, 且该方法在Cas9系统中有较多研究^[48-49]。(2)对gRNA进行设计。相对于为每一个新发现的CRISPR蛋白进行设计, 改良所有系统共用的gRNA显然更加容易。近日, Kocak等^[50]将gRNA5'末端设计延伸多20个核苷酸, 让其自身折叠, 变成原始导向RNA的“尾巴”, 形成发夹形状。通过调整二级结构的强度, R-环可以在靶位点处形成, 而在脱靶位点R-环形成受阻, 因此提高了编辑的特异性。使用这种方法, 靶向体外培养的细胞, 观察到AsCpf1和

LbCpf1活性都可以通过间隔二级结构调节, 并且可以通过调节二级结构的强度来减少脱靶活性而不改变靶向活性, 与未修饰的sgRNA相比, hp-sgRNA的特异性平均提高了55倍。

扩大Cpf1直系同源物AsCpf1和LbCpf1的靶向范围, 即拓展5'-TTTN-3'的PAM区结构域的识别范围也是科学家们对CRISPR-Cpf1系统的改良方向之一。目前, 科学家们主要通过创造和筛选突变体的方式进行优化, 例如张峰团队^[51]发现, AsCpf1突变S542R/K607R和S542R/K548V/N552R后可以分别识别PAM区为TYCV和TATV的DNA序列, 并且提高了蛋白活性。全基因组范围脱靶分析也表明, 这些突变体对蛋白的高特异性并没有影响, 且LbCpf1蛋白在同样的突变位点表现出相同的结果。中国农业科学院团队^[52]在植物中的相关研究也取得了一定的进展, 他们分别定点突变了LbCpf1蛋白的2个和3个关键氨基酸位点, 获得LbCpf1(RR)和LbCpf1(RVR)突变体, 并成功利用LbCpf1(RR)突变体实现对水稻基因组的编辑, 该研究拓展了Cpf1在植物基因组中的编辑范围。在人体细胞研究中, Cpf1核酸酶也是一种应用于多重基因编辑、表观遗传编辑、单碱基编辑和基因敲除重要的工具酶。Kleinstiver等^[41]研究开发出AsCpf1变体enAsCpf1, 显著扩展了编辑的靶向范围。科学家们使用structure-guided蛋白质工程设计了10个带有单个氨基酸取代的变体, 其中E174R/S542R/K548R变体可以靶向诸多PAM区, 例如TTYN(TTTN/TTCN)、VTTV(ATTV/CTTV/GTTV)和TRTV(TATV/TGTV)。与野生型AsCpf1相比, enAsCpf1在具有经典TTTV PAM的位点上表现出双倍高的基因组编辑活性, 该研究显著改善了Cpf1核酸酶的靶向范围, 靶向活性和保真性。

2.2.2 CRISPR-Cpf1系统在动物中的应用 研究表明, Cpf1在动物基因组编辑中是有效的, 并且Cpf1家族蛋白中编辑效率最高的AsCpf1和LbCpf1蛋白都显示出在人类细胞中的DNA切割活性^[53-55]。为了检测小鼠中Cpf1的基因靶向潜力, Kim等^[56]将AsCpf1与LbCpf1 mRNA和同源crRNA显微注射入C57BL/6J小鼠的原核阶段胚胎的细胞质中, 之后将胚胎转移到养母的输卵管中, 结果显示, 两种Cpf1核酸酶均可诱导小鼠胚胎中的突变, 并且诱导的突变足以产生突变小鼠。为了证实Cpf1在哺乳动物细胞和疾病动物模型中校正基因突变的潜在有用性, Zhang等^[57]利

用Cpf1酶体型较小, 更容易包装到病毒内以及更易进入肌细胞的特性, 使用了来自杜氏肌营养不良症(Duchenne muscular dystrophy, DMD)患者纤维细胞的诱导多能干细胞和DMD动物模型mdx小鼠, 利用CRISPR-Cpf1来破坏DMD外显子51中的早期终止密码子, 实验结果显示, 来自细胞的诱导多能干细胞和心肌细胞中的肌营养不良蛋白表达得到了修复, 心肌细胞的收缩力得到增强; 同样, 在mdx小鼠种系中, 通过Cpf1介导的编辑, 小鼠肌营养不良的病理生理特征得到了改善, 该研究对杜氏肌营养不良症的治疗有突破性意义。

2.2.3 CRISPR-Cpf1系统在植物中的应用 CRISPR-Cpf1是一种有前景的植物基因组编辑新工具, 该系统具有体积小、编辑效率高的特点。Tang等^[58]使用了一种双RNA聚合酶II启动子表达系统, 对水稻的3个基因(*OsPDS*、*OsDEP1*和*OsROC5*)中的6个位点进行编辑, 结果显示, LbCpf1能在水稻T0转基因植物中的4个独立位点以接近100%的效率产生双等位基因突变。同时, 作者又设计了AsCpf1和LbCpf1在拟南芥中的转录抑制实验, 发现miR159b转录水平减少了10倍以上, 说明该系统实现了有效的转录抑制。近年来, 针对转基因安全性问题, 无外源DNA导入的基因编辑技术开始发展起来。Kim等^[59]将重组Cpf1蛋白与体外转录或化学合成的靶特异性crRNA一起递送到大豆和野生烟草原生质体中, 深度测序分析表明, 在大豆中的*FAD2*旁系同源物和野生烟草中的*AOC*中该方法都成功诱导了突变, 并且在大豆基因组中潜在的脱靶位点未检测到显著突变。研究结果表明, Cpf1-crRNA复合物可用于不引入外来DNA序列的植物基因组编辑。CRISPR/Cpf1系统的发展为植物功能基因组研究和农作物改良提供了强有力的工具。

2.2.4 CRISPR-Cpf1系统在微生物中的应用 编辑效率是微生物基因组编辑结果的重要评估因素。为了探究Cpf1与SpCas9在酿酒酵母基因组中的编辑效率, Verwaal等^[60]选择3种Cpf1直系同源物: AsCpf1、LbCpf1和FnCpf1, 用于酿酒酵母的基因组编辑研究。实验结果显示, 这些基于Cpf1的系统能够使用基于双质粒和线性供体DNA的编辑方法, 高效精准地在基因组上导入供体DNA。其中LbCpf1和FnCpf1显示出与CRISPR/Cas9系统相当的编辑效率, 而AsCpf1编辑效率较低。进一步的实验发现, AsCpf1和LbCpf1

对其同源 crRNA 具有偏好性, 并且证明使用单个 LbCpf1-crRNA 阵列的多重基因组编辑在酵母中也具有功能。这项工作拓宽了可用于酿酒酵母的基因组编辑工具范围。基因编辑技术在动植物的基础理论研究方面已获得广泛利用, 但在一些特殊微生物中的低编辑效率问题一直困扰着科学家们, 例如靶向衣藻核基因编辑效率低下, 这种情况已经长达 10 年, 严重阻碍了其相关研究。为了检测莱茵衣藻中 LbCpf1 介导的基因组编辑效率, Ferenczi 等^[61]通过电穿孔将靶向 RNP (ribonucleoprotein) 递送到莱茵衣藻细胞, 靶向敲除 FK506 结合蛋白。结果显示, 使用 CRISPR-LbCpf1 RNP 和单链寡脱氧核苷酸 (ssODN) 作为 DNA 修复模板可以在莱茵衣藻中进行有效的同源性编辑, 并且通过用 ssODN 补充编辑比仅仅利用 RNP 编辑效率增强了约 500 倍, 在 4 个核基因座处, 无痕编辑效率为 0.1%~10.0%, 而有痕编辑发生频率高达 16%, 该研究为微生物核基因组编辑提供了新的思路。Cpf1 丰富了 CRISPR 家族, 独特的编辑特性也使 Cpf1 被认为是对 Cas9 技术重要的补充。

3 展望

虽说 Cpf1 系统自诞生以来, 就因其简便的设计、低成本和低脱靶率, 成功地吸引了全世界的目光。但 Cas9 系统的优势依旧很突出, 科学家们对其研究较深入, 对于靶向不同生物体中编辑策略的选择把握得也较准确。故若不是研究对象较为特别或是对于脱靶效应要求较高, Cas9 系统依旧会是科研工作者的第一选择。尽管研究表明, 同时表达两种 gRNA 的 Cas9-二聚体可以降低一定的脱靶风险^[5], 但脱靶问题依然是当前 Cas9 系统应用于多重基因编辑亟需攻克的难关, 极大地限制了其在医学方面的应用。而 Cpf1 具有独特的双重切割酶活性, 可作为与 Cas9 功能互补的多重基因编辑的理想工具。但考虑到该系统出现的时间较短, 科研工作者可以考虑借鉴 Cas9 系统的改进方案对 Cpf1 系统进行完善, 特别是突变体的构建及其筛选。例如借鉴 Cas9 蛋白 PI (PAM-interacting) 结构域的改造方法, 可以对 Cpf1 蛋白晶体结构进行改造, 也可以参考 Casini 等^[62]开发的一种利用筛选酵母报告菌株筛选法 SpCas9 突变体的方法。Cpf1 系统的低脱靶率意味着其将在人类临床疾病治疗方面具有极大的研究潜力和广阔的应用前景。但科学家们在将基因编辑系统推向临床应用之

前, 还需解决诸多问题, 例如脱靶问题、靶向基因治疗中的安全性评估问题以及伦理方面的法律法规也需进一步完善。

张峰团队^[63]已开发出第 3 个可用于人类基因组编辑的 CRISPR-Cas12b 系统, 克服了其特征家族成员的耐高温要求, 从 Hisashii 芽孢杆菌中获得并改造得到 bhcas12b 突变株, 并表现出比 Cas9 蛋白更高的特异性, 该系统的未来发展及应用值得期待。基因编辑技术发展日新月异, 例如, 最近发展迅猛的单碱基编辑技术^[64], 利用胞嘧啶单碱基编辑器 (cytosine base editor, CBE) 和腺嘌呤单碱基编辑器 (adenine base editors, ABE), 可以在不断裂 DNA 双链的情况下, 直接对靶向位点进行精准编辑, 实现在一定的活性窗口内对 DNA 中胞嘧啶 (C) 到胸腺嘧啶 (T) 或鸟嘌呤 (G) 到腺嘌呤 (A) 的单碱基转换。单碱基编辑技术的出现极大地促进了点突变基因编辑的有效性和使用范围, 但这项技术的脱靶效应引起了科学界广泛的讨论, 有待后续研究。又如, 最近高彩霞课题组和李家洋课题组^[65]合作的一项研究中, 使用的共编辑策略以及非外源的选择标记位点方法, 都能给后续相关研究提供借鉴与灵感。还有无外源 DNA 导入的基因编辑技术, 因其能靶向生物基因组进行精准改变, 而不会引入外来 DNA, 则可能绕过转基因安全法的限制, 笔者认为这将成为未来研究热点之一。相信随着科学家们对 CRISPR 系统不断进行完善以及社会体系的逐渐完备, 基因编辑技术将为生命科学领域带来革命性变化。

参考文献 (References)

- 1 Sakuma T, Nishikawa A, Kume S, Chayama K, Yamamoto T. Multiplex genome engineering in human cells using all-in-one CRISPR/Cas9 vector system. *Sci Rep* 2014; 4: 5400.
- 2 Hu JH, Miller SM, Geurts MH, Tang W, Chen L, Sun N, *et al.* Evolved Cas9 variants with broad PAM compatibility and high DNA specificity. *Nature* 2018; 556: 57.
- 3 Wang J, Meng X, Hu X, Sun T, Li J, Wang K, *et al.* xCas9 expands the scope of genome editing with reduced efficiency in rice. *Plant Biotechnol J* 2019; 17(4): 709-11.
- 4 Zetsche B, Gootenberg Jonathan S, Abudayyeh Omar O, Slaymaker Ian M, Makarova Kira S, Essletzbichler P, *et al.* Cpf1 is a single RNA-Guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system. *Cell* 2015; 163(3): 759-71.
- 5 Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable Dual-RNA-Guided DNA endo-nuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 2012; 337(6096): 816-21.
- 6 Chen JS, Ma E, Harrington LB, Da Costa M, Tian X, Palefsky JM,

- et al.* CRISPR-Cas12a target binding unleashes indis-criminate single-stranded DNase activity. *Science* 2018; 360(6387): 436.
- 7 Cox DBT, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Franklin B, Kellner MJ, Joung J, *et al.* RNA editing with CRISPR-Cas13. *Science* 2017; 358(6366): 1019.
- 8 Harrington LB, Paez-Espino D, Chen JS, Ma E, Staahl BT, Kyrpides NC, *et al.* A thermostable Cas9 with increased lifetime in human plasma. *Nat Commun* 2017: 138867.
- 9 Jiang Y, Qian F, Yang J, Liu Y, Dong F, Xu C, *et al.* CRISPR-Cpf1 assisted genome editing of *Corynebacterium glutamicum*. *Nat Commun* 2017; 8: 15179.
- 10 Zetsche B, Heidenreich M, Mohanraju P, Fedorova I, Kneppers J, DeGennaro EM, *et al.* Multiplex gene editing by CRISPR-Cpf1 using a single crRNA array. *Nature biotechnol* 2017; 35(1): 31.
- 11 Vad-Nielsen J, Lin L, Bolund L, Nielsen AL, Luo Y. Golden Gate Assembly of CRISPR gRNA expression array for simultaneously targeting multiple genes. *Cell Mol Life Sci* 2016; 73(22): 4315-25.
- 12 Minkenberg B, Wheatley M, Yang Y. Chapter Seven-CRISPR/Cas9-enabled multiplex genome editing and its application. In: Weeks DP, Yang B, editors. *Prog Mol Biol Transl* 2017; 149: 111-32.
- 13 Engler C, Youles M, Gruetzner R, Ehnert TM, Werner S, Jones JDG, *et al.* A Golden Gate modular cloning toolbox for plants. *ACS Synth Biol* 2014; 3(11): 839-43.
- 14 Larroude M, Celinska E, Back A, Thomas S, Nicaud JM, Ledesma-Amaro R. A synthetic biology approach to transform *Yarrowia lipolytica* into a competitive biotechnological producer of β -carotene. *Biotechnol Bioeng* 2018; 115(2): 464-72.
- 15 Kennedy EM, Kornepati AVR, Mefferd AL, Marshall JB, Tsai K, Bogerd HP, *et al.* Optimization of a multiplex CRISPR/Cas system for use as an antiviral therapeutic. *Methods* 2015; 91: 82-6.
- 16 Chung J, Scherer LJ, Gu A, Gardner AM, Torres-Coronado M, Epps EW, *et al.* Optimized lentiviral vectors for HIV gene therapy: multiplexed expression of Small RNAs and inclusion of MGM-TP140K drug resistance gene. *Mol Ther* 2014; 22(5): 952-63.
- 17 Nissim L, Perli SD, Fridkin A, Perez-Pinera P, Lu TK. Multiplexed and programmable regulation of gene networks with an integrated RNA and CRISPR/Cas toolkit in human cells. *Mol cell* 2014; 54(4): 698-710.
- 18 Xie K, Minkenberg B, Yang Y. Boosting CRISPR/Cas9 multiplex editing capability with the endogenous tRNA-processing system. *Proc Natl Acad Sci USA* 2015; 112(11): 3570-5.
- 19 Haurwitz RE, Sternberg SH, Doudna JA. Csy4 relies on an unusual catalytic dyad to position and cleave CRISPR RNA. *EMBO J* 2012; 31(12): 2824-32.
- 20 Ferreira R, Skrekas C, Nielsen J, David F. Multiplexed CRISPR/Cas9 genome editing and gene regulation using Csy4 in *Saccharomyces cerevisiae*. *ACS Synth Bio* 2017; 7(1): 10-5.
- 21 Li T, Yang X, Yu Y, Si X, Zhai X, Zhang H, *et al.* Domestication of wild tomato is accelerated by genome editing. *Nat Biotechnol* 2018; 36: 1160-3.
- 22 Chamberlain JR, Schwarze U, Wang PR, Hirata RK, Hankenson KD, Pace JM, *et al.* Gene targeting in stem cells from individuals with *Osteogenesis Imperfecta*. *Science* 2004; 303(5661): 1198.
- 23 Dong F, Xie K, Chen Y, Yang Y, Mao Y. Polycistronic tRNA and CRISPR guide-RNA enables highly efficient multiplexed genome engineering in human cells. *Biochem Biophl Res Co* 2017; 482(4): 889-95.
- 24 Wang Z, Wang S, Li D, Zhang Q, Li L, Zhong C, *et al.* Optimized paired-sgRNA/Cas9 cloning and expression cassette triggers high-efficiency multiplex genome editing in kiwifruit. *Plant Biotechnol J* 2018; 16(8): 1424-33.
- 25 Port F, Chen H-M, Lee T, Bullock SL. Optimized CRISPR/Cas tools for efficient germline and somatic genome engineering in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014; 111(29): E2967-76.
- 26 Maddalo D, Manchado E, Concepcion CP, Bonetti C, Vidigal JA, Han YC, *et al.* *In vivo* engineering of oncogenic chromosomal rearrangements with the CRISPR/Cas9 system. *Nature* 2014; 516(7531): 423.
- 27 Engler C, Kandzia R, Marillonnet S. A one pot, one step, precision cloning method with high throughput capability. *PLoS One* 2008; 3(11): e3647.
- 28 Katia P, Rik G, Jaan T, Axel S, Karen WG, Celine V, *et al.* State-of-the-Art lentiviral vectors for research use: risk assessment and biosafety recommendations. *Current Gene Therapy* 2009; 9(6): 459-74.
- 29 Qi L, Haurwitz RE, Shao W, Doudna JA, Arkin AP. RNA processing enables predictable programming of gene expression. *Nat Biotechnol* 2012; 30: 1002.
- 30 Guo R, Wang H, Cui J, Wang G, Li W, Hu JF. Inhibition of HIV-1 viral infection by an engineered CRISPR Csy4 RNA endoribonuclease. *PLoS One* 2015; 10(10): e0141335.
- 31 Jiang W, Marraffini LA. CRISPR-Cas: new tools for genetic manipulations from bacterial immunity systems. *Annu Rev Microbiol* 2015; 69(1): 209-28.
- 32 Makarova KS, Wolf YI, Alkhnbashi OS, Costa F, Shah SA, Saunders SJ, *et al.* An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol* 2015; 13: 722.
- 33 Fonfara I, Richter H, Bratovič M, Le Rhun A, Charpentier E. The CRISPR-associated DNA-cleaving enzyme Cpf1 also processes precursor CRISPR RNA. *Nature* 2016; 532: 517.
- 34 周晨晨, 刘写写, 谢海华, 谷峰. CRISPR家族新成员: CRISPR-Cpf1. *生物化学与生物物理进展*(Zhou Chenchen, Liu Xixie, Xie Guhua, Gu Feng. The new member of CRISPR family: CRISPR-Cpf1. *Prog Biochem Biophys*) 2018; 45(6): 585-92.
- 35 Maresca M, Lin VG, Guo N, Yang Y. Obligate ligation-gated recombination (ObLiGaRe): custom-designed nuclease-mediated targeted integration through nonhomologous end joining. *Genome Res* 2013; 23(3): 539-46.
- 36 Hsu PD, Scott DA, Weinstein JA, Ran FA, Konermann S, Agarwala V, *et al.* DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nat Biotechnol* 2013; 31: 827.
- 37 Teng F, Li J, Cui T, Xu K, Guo L, Gao Q, *et al.* Enhanced mammalian genome editing by new Cas12a orthologs with optimized crRNA scaffolds. *Genome Biol* 2019; 20(1): 15.
- 38 Yin X, Biswal AK, Dionora J, Perdigon KM, Balahadia CP, Mazumdar S, *et al.* CRISPR-Cas9 and CRISPR-Cpf1 mediated targeting of a stomatal developmental gene EPFL9 in rice. *Plant Cell Rep* 2017; 36(5): 745-57.
- 39 Jia H, Orbović V, Wang N. CRISPR-LbCas12a-mediated modification of citrus. *Plant Biotechnol J* 2019; 17(10): 1928-37.
- 40 Zhang J, Yang F, Yang Y, Jiang Y, Huo YX. Optimizing a CRISPR-Cpf1-based genome engineering system for *Corynebacterium glutamicum*. *Microb Cell Fact* 2019; 18(1): 60.

- 41 Kleinstiver BP, Sousa AA, Walton RT, Tak YE, Hsu JY, Clement K, *et al.* Engineered CRISPR-Cas12a variants with increased activities and improved targeting ranges for gene, epigenetic and base editing. *Nat Biotechnol* 2019; 37(3): 276-82.
- 42 Bin Moon S, Lee JM, Kang JG, Lee NE, Ha DI, Kim DY, *et al.* Highly efficient genome editing by CRISPR-Cpf1 using CRISPR RNA with a uridylate-rich 3'-overhang. *Nat Commun* 2018; 9(1): 3651.
- 43 Li B, Zhao W, Luo X, Zhang X, Li C, Zeng C, *et al.* Engineering CRISPR-Cpf1 crRNAs and mRNAs to maximize genome editing efficiency. *Nat Biomed Eng* 2017; 1(5): 0066.
- 44 Wu H, Liu Q, Shi H, Xie J, Zhang Q, Ouyang Z, *et al.* Engineering CRISPR/Cpf1 with tRNA promotes genome editing capability in mammalian systems. *Cell Mol Life Sci* 2018; 75(19): 3593-607.
- 45 Ding D, Chen K, Chen Y, Li H, Xie K. Engineering introns to express RNA guides for Cas9- and Cpf1-mediated multiplex genome editing. *Mol Plant* 2018; 11(4): 542-52.
- 46 Wang M, Mao Y, Lu Y, Tao X, Zhu JK. Multiplex gene editing in rice using the CRISPR-Cpf1 system. *Mol Plant* 2017; 10(7): 1011-3.
- 47 Kim D, Kim J, Hur JK, Been KW, Yoon SH, Kim JS. Genome-wide analysis reveals specificities of Cpf1 endonucleases in human cells. *Nat Biotechnol* 2016; 34(8): 863.
- 48 Tsai SQ, Wyvekens N, Khayter C, Foden JA, Thapar V, Reyon D, *et al.* Dimeric CRISPR RNA-guided FokI nucleases for highly specific genome editing. *Nat Biotechnol* 2014; 32: 569.
- 49 Shen B, Zhang W, Zhang J, Zhou J, Wang J, Chen L, *et al.* Efficient genome modification by CRISPR-Cas9 nickase with minimal off-target effects. *Nat Methods* 2014; 11: 399.
- 50 Kocak DD, Josephs EA, Bhandarkar V, Adkar SS, Kwon JB, Gersbach CA. Increasing the specificity of CRISPR systems with engineered RNA secondary structures. *Nat Biotechnol* 2019; 37(6): 657-66.
- 51 Gao L, Cox DBT, Yan WX, Manteiga JC, Schneider MW, Yamano T, *et al.* Engineered Cpf1 variants with altered PAM specificities. *Nat Biotechnol* 2017; 35: 789.
- 52 Zhong Z, Zhang Y, You Q, Tang X, Ren Q, Liu S, *et al.* Plant genome editing using FnCpf1 and LbCpf1 nucleases at redefined and altered PAM sites. *Mol Plant* 2018; 11(7): 999-1002.
- 53 Kim D, Kim J, Hur JK, Been KW, Yoon SH, Kim JS. Genome-wide analysis reveals specificities of Cpf1 endonucleases in human cells. *Nat Biotechnol* 2016; 34: 863.
- 54 Kleinstiver BP, Tsai SQ, Prew MS, Nguyen NT, Welch MM, Lopez JM, *et al.* Genome-wide specificities of CRISPR-Cas Cpf1 nucleases in human cells. *Nat Biotechnol* 2016; 34: 869.
- 55 Tóth E, Weinhardt N, Bencsura P, Huszár K, Kulcsár PI, Tálas A, *et al.* Cpf1 nucleases demonstrate robust activity to induce DNA modification by exploiting homology directed repair pathways in mammalian cells. *Biol Direct* 2016; 11(1): 46.
- 56 Kim Y, Cheong SA, Lee JG, Lee SW, Lee MS, Baek IJ, *et al.* Generation of knockout mice by Cpf1-mediated gene targeting. *Nat Biotechnol* 2016; 34: 808.
- 57 Zhang Y, Long C, Li H, McAnally JR, Baskin KK, Shelton JM, *et al.* CRISPR-Cpf1 correction of muscular dystrophy mutations in human cardiomyocytes and mice. *Sci Adv* 2017; 3(4): e1602814.
- 58 Tang X, Lowder LG, Zhang T, Malzahn AA, Zheng X, Voytas DF, *et al.* A CRISPR-Cpf1 system for efficient genome editing and transcriptional repression in plants. *Nat Plants* 2017; 3: 17018.
- 59 Kim H, Kim ST, Ryu J, Kang BC, Kim JS, Kim SG. CRISPR/Cpf1-mediated DNA-free plant genome editing. *Nat Commun* 2017; 8: 14406.
- 60 Verwaal R, Buiting-Wiessenhaan N, Dalhuijsen S, Roubos JA. CRISPR/Cpf1 enables fast and simple genome editing of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 2018; 35(2): 201-11.
- 61 Ferenczi A, Pyott DE, Xipnitou A, Molnar A. Efficient targeted DNA editing and replacement in *Chlamydomonas reinhardtii* using Cpf1 ribonucleoproteins and single-stranded DNA. *P Natl Acad Sci* 2017; 114(51): 13567-72.
- 62 Casini A, Olivieri M, Petris G, Montagna C, Reginato G, Maule G, *et al.* A highly specific SpCas9 variant is identified by *in vivo* screening in yeast. *Nat Biotechnol* 2018; 36: 265.
- 63 Strecker J, Jones S, Koopal B, Schmid-Burgk J, Zetsche B, Gao L, *et al.* Engineering of CRISPR-Cas12b for human genome editing. *Nat Commun* 2019; 10(1): 212.
- 64 Komor AC, Kim YB, Packer MS, Zuris JA, Liu DR. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature* 2016; 533: 420.
- 65 Zhang R, Liu J, Chai Z, Chen S, Bai Y, Zong Y, *et al.* Generation of herbicide tolerance traits and a new selectable marker in wheat using base editing. *Nat Plants* 2019; 5: 480-5.