

# VI型CRISPR-Cas系统在生物医学中的应用进展

郑晨露 张泽辰 郑巍巍\*

(福建师范大学生命科学学院, 病原微生物感染机理与干预福建省高校重点实验室, 福州 350100)

**摘要** CRISPR-Cas系统是原核生物在进化过程中形成的适应性免疫系统, 通过RNA引导核酸酶特异性切割外源遗传物质实现防御, 已被开发为重要的基因编辑工具。其中, VI型CRISPR-Cas系统(CRISPR-Cas13)依赖单一效应蛋白实现对RNA的特异性靶向切割, 可在不改变基因组的前提下实现基因编辑, 具有更高安全性, 为生物医学研究和临床治疗提供了新策略。该文系统概述了CRISPR-Cas13系统的分类及不同亚类的结构特征, 回顾了其在核酸检测、基因编辑、基础科研方面的应用, 并总结了CRISPR-Cas13系统的优化策略。此外, 该文还探讨了其应用存在的局限和面临的挑战, 并提出了未来的发展方向, 为其临床转化与技术升级提供了参考。

**关键词** CRISPR-Cas13系统; 生物医学; RNA编辑; 分子检测

## Application Progress of the Type VI CRISPR-Cas System in Biomedicine

ZHENG Chenlu, ZHANG Zechen, ZHENG Weiwei\*

(Key Laboratory of Pathogenic Microorganism Infection Mechanism and Intervention of Fujian Province Universities,  
School of Life Sciences, Fujian Normal University, Fuzhou 350100, China)

**Abstract** The CRISPR-Cas systems are adaptive immune mechanisms that evolved in prokaryotes. They employ RNA-guided nucleases to cleave specific foreign genetic material to achieve defense, and have been developed as important gene editing tools. Among them, the CRISPR-Cas13 (type VI CRISPR-Cas system) which relies on a single effector protein for RNA-specific cleavage, enables gene editing without genomic alteration. With this higher safety profile, it provides a new strategy for biomedical research and clinical treatment. This article systematically summarizes the classification of the CRISPR-Cas13 system and the structural characteristics of different subtypes, reviews the applications of the CRISPR-Cas13 system in nucleic acid detection, gene editing and basic scientific research, and summarizes optimization strategies for the CRISPR-Cas13 system. Additionally, the review discusses current limitations and challenges of its application, and proposes future development directions, thereby offering insights to guide clinical translation and further technological development.

**Keywords** CRISPR-Cas13 system; biomedicine; RNA editing; molecular detection

成簇的规律间隔的短回文重复序列 (clustered regularly interspaced short palindromic repeat, CRISPR) 与CRISPR相关蛋白 (CRISPR-associated protein, Cas) 系统是细菌及古细菌中的适应性免疫机制。CRISPR-Cas系统通过捕获既往入侵的移动遗传元件片段

构建免疫记忆库, 并借助RNA引导的核酸内切酶对外源核酸进行特异性降解, 从而提供适应性免疫保护。依据效应模块的cas基因组成、核心效应蛋白特性及基因座结构特征, 可将CRISPR-Cas系统划分为两大类, 并进一步细分为I至VII型共七种亚型<sup>[1-3]</sup>。其

收稿日期: 2025-11-09

接受日期: 2026-01-20

国家自然科学基金(批准号: 82172287)资助的课题

\*通信作者。Tel: 0591-22868199, E-mail: vivizheng@fjnu.edu.cn

Received: November 9, 2025

Accepted: January 20, 2026

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.82172287)

\*Corresponding author. Tel: +86-591-22868199, E-mail: vivizheng@fjnu.edu.cn

中, I类系统(包含I型、III型、IV型与VII型)的效应复合体由多个亚基协同组成<sup>[4]</sup>; 2类系统(包含II型、V型与VI型)则通过单一Cas效应蛋白完成外源核酸切割过程<sup>[5]</sup>。由于单效应蛋白更易于应用, 2类CRISPR-Cas系统已被广泛应用于基因组及转录组编辑等研究领域<sup>[6]</sup>。

VI型CRISPR-Cas系统(即CRISPR-Cas13系统)属于第2类系统, 可识别并降解外源RNA。其适应性免疫包括3个阶段: 适应、crRNA(CRISPR RNA)成熟与干扰。在适应阶段, Cas1、Cas2获取入侵的可移动遗传元件片段, 并将其整合为新的间隔序列(spacer), 插入CRISPR阵列以形成免疫记忆。目前发现的大部分CRISPR-Cas13系统中缺乏*cas1*、*cas2*基因, 因此CRISPR-Cas13系统常与其他CRISPR-Cas系统共存, 借助其他系统的适应模块获取新的间隔序列<sup>[7]</sup>。在crRNA成熟阶段, CRISPR阵列被转录为前体crRNA(pre-crRNA), 随后pre-crRNA被Cas13加工为成熟的crRNA, 每条crRNA包括1个重复序列(repeat)与1个间隔序列, 其排序方式在不同亚型之间存在差异。成熟crRNA与其效应蛋白Cas13组装成监视复合体。在干扰阶段, crRNA识别与其间隔序列互补的RNA片段, 激活Cas13的核酸酶活性并特异降解靶标RNA。同时Cas13还具有附带切割(collateral cleavage)活性, 即激活的Cas13可同时对周围任意RNA进行切割, 诱导细胞进入休眠状态<sup>[8]</sup>。

相较于广泛应用于基因组编辑的II型CRISPR-Cas系统(即CRISPR-Cas9系统), CRISPR-Cas13系统的核心特征在于其能够靶向切割RNA。这一特性赋予其区别于DNA编辑工具的显著优势。理论上, Cas13通过特异性降解目标RNA实现基因沉默, 该过程不改变基因组DNA序列, 因此具有可逆性特征, 这使得Cas13系统被认为在基因治疗中具有更高的生物安全性。同时, RNA编辑可通过调节剂量实

现对靶标RNA的动态调控, 从而优化治疗效果。此外, Cas13具有附带切割活性, 因此已被开发为操作简便、灵敏度高的核酸检测工具<sup>[9]</sup>。目前, CRISPR-Cas13系统已在多个生物医学领域展现出重要应用价值。因此, 本文将重点探讨Cas13发挥功能的结构基础及CRISPR-Cas13系统的主要应用进展, 系统综述其在生物医学领域的具体应用、当前面临的技术挑战及已开展的优化策略。

## 1 CRISPR-Cas13系统的分类

CRISPR-Cas13系统的效应酶为Cas13, 为RNA引导的核酸内切酶, 可在crRNA的引导下特异性识别并切割目标RNA序列。目前已鉴定的Cas13家族包含多个同源蛋白亚型, 包括Cas13a<sup>[10-12]</sup>、Cas13b<sup>[13]</sup>、Cas13c<sup>[6]</sup>、Cas13d<sup>[14]</sup>、Cas13e、Cas13f、Cas13g、Cas13h<sup>[15]</sup>、Cas13i<sup>[16]</sup>、Cas13j<sup>[17]</sup>、Cas13bt、Cas13ct<sup>[18]</sup>、Cas13X及Cas13Y<sup>[19]</sup>等。这些蛋白在进化过程中分为了两支家族, 一支是Cas13a/d家族, 包括Cas13a、Cas13c与Cas13d亚型; 另一支是Cas13b家族, 可进一步分为2个分支: 一个为Cas13b分支(包括Cas13e至Cas13j亚型), 另一个为Cas13bt分支(包括Cas13X、Cas13Y等小体积蛋白)(表1)<sup>[20]</sup>。

## 2 Cas13蛋白的结构特征

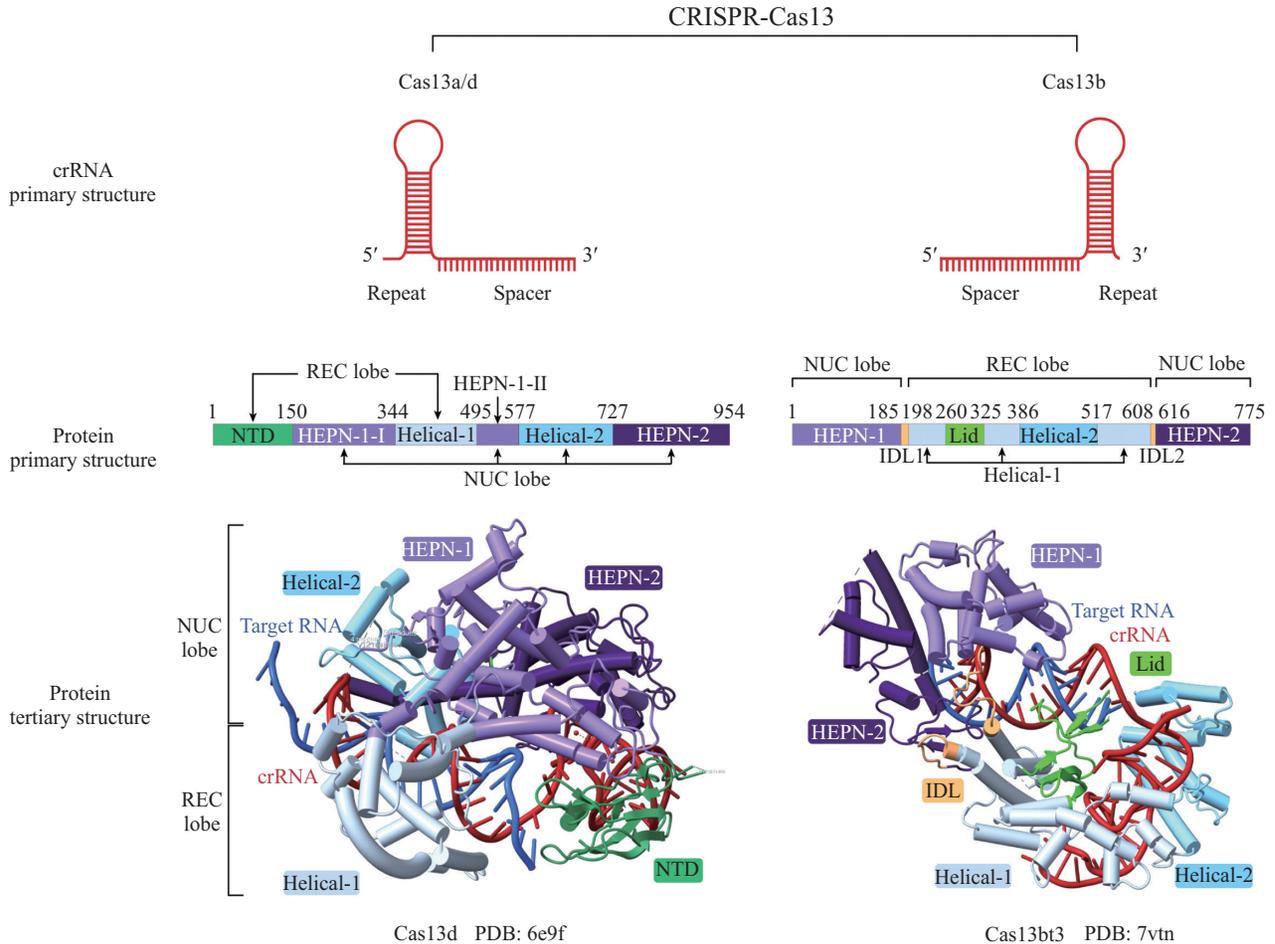
不同Cas13蛋白的序列相似性较低, 但其三维结构具有较高的相似性。Cas13蛋白均呈现典型的双叶结构, 由识别(recognition, REC)叶与核酸酶(nuclease, NUC)叶组成。所有Cas13家族成员都具有2个螺旋结构域(Helical-1、Helical-2)和2个高等真核生物和原核生物核苷酸结合(higher eukaryotes and prokaryotes nucleotide-binding, HEPN)结构域(HEPN-1和HEPN-2)。Helical结构域由 $\alpha$ -螺旋构成, 其功能与crRNA以及底物的识别相关。HEPN结构域是执行

表1 不同Cas13蛋白亚型的特性  
Table 1 Characteristics of different Cas13 protein isoforms

特性 Characteristics	Cas13a	Cas13b	Cas13bt	Cas13d
Size of protein (aa)	900-1 500	400-1 500	775-900	800-1 200
PFS requirements	3'-H	5'-D and 3'-NAN/NNA	5'-D	No
Whether there is collateral cleavage activity	Yes	Yes	Yes	Yes
Main applications	Nucleic acid testing	Nucleic acid testing, gene editing (less)	Gene editing	Gene editing

aa: 氨基酸; PFS: 前间隔序列侧翼序列。

aa: amino acids; PFS: protospacer flanking sequence.



NTD: N-端结构域; REC: 识别; HEPN: 高等真核生物和原核生物核苷酸结合结构域; NUC: 核酸酶; IDL: 结构域间连接器; PDB: 蛋白质结构数据库。  
 NTD: N-terminal domain; REC: recognition; HEPN: higher eukaryotes and prokaryotes nucleotide-binding domain; NUC: nuclease; IDL: interdomain linker; PDB: Protein Data Bank.

图1 CRISPR-Cas13d系统及CRISPR-Cas13bt3系统的结构特征

Fig.1 Structural characteristics of the CRISPR-Cas13d system and the CRISPR-Cas13bt3 system

靶标 RNA 切割的核心功能模块<sup>[21]</sup>, 具有保守的四螺旋束结构。与典型的 HEPN 结构域中  $\alpha 1-\alpha 2-\alpha 3-\alpha 4$  的螺旋排序不同, Cas13 蛋白的 HEPN 结构域重排为  $\alpha 2-\alpha 3-\alpha 4-\alpha 1$ ,  $\alpha 3$  螺旋上具有保守的 RxxxxH 基序, 为活性位点。当 Cas13 被激活时, 2 个 HEPN 结构域相互靠近形成二聚体, 这是 Cas13 降解 RNA 的必要步骤。

Cas13 家族 2 个分支在一级结构的排布方式上存在显著差异 (图 1)。Cas13a/Cas13d 的 N-端具有 N-端结构域 (N-terminal domain, NTD), 其与 crRNA 茎环结构的识别相关; HEPN-1 结构域则被 Helical-1 结构域分为 2 个部分。在 Cas13b/Cas13bt 分支中, 2 个 HEPN 结构域分别位于 N-端与 C-端, NTD 被 Lid 结构域取代, Lid 结构域承担 crRNA 识别的功能; Helical-1 结构域则被分隔成为 3 个部分。2 个分支的 crRNA 的排布也存在差异, Cas13a/d 的 crRNA 的茎环结构位于

5'端 (5'-repeat-spacer-3'), 而 Cas13b 家族 crRNA 的茎环结构则位于 3'端 (5'-spacer-repeat-3')。在高级结构上, Cas13a/d 分支蛋白的 REC 叶由 NTD 与 Helical-1 结构域构成, NUC 叶由 HEPN-1、HEPN-2 和 Helical-2 结构域构成; Cas13b 分支蛋白的 REC 叶由 Helical-1、Helical-2 和 Lid 结构域构成, NUC 叶由 HEPN-1、HEPN-2 结构域构成。Cas13 蛋白与 crRNA 的差异表明, Cas13b 分支经历了区别于 Cas13a/d 的独立演化进程<sup>[20]</sup>。

### 3 CRISPR-Cas13系统在核酸检测中的应用

#### 3.1 病原检测

Cas13 蛋白的附带切割活性是 CRISPR-Cas13 系统应用于核酸检测的关键机制。基于此活性, 研究者在检测体系中加入两端带有特定基团的单链

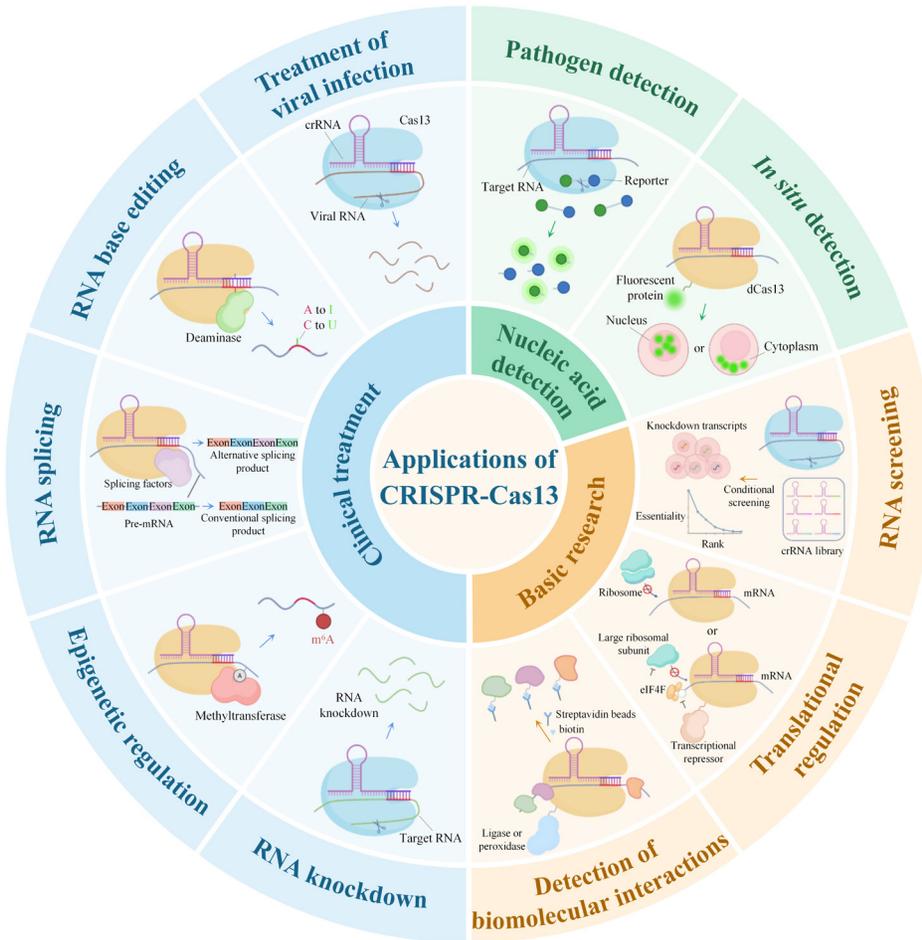


图2 CRISPR-Cas13系统的生物医学应用

Fig.2 Biomedical applications of CRISPR-Cas13 system

RNA(single-stranded ribonucleic acid, ssRNA)作为探针,当crRNA与靶标RNA互补结合时,Cas13被激活并切割荧光探针,从而释放可检测的荧光信号(图2)。

ZHANG等<sup>[9]</sup>于2017年首次构建了基于CRISPR-Cas13的SHERLOCK(specific high-sensitivity enzymatic reporter unlocking)系统。该系统整合了重组酶聚合酶扩增(recombinase polymerase amplification, RPA)与T7转录技术,凭借单碱基分辨能力、高灵敏度、低成本及操作便捷性,为CRISPR-Cas13的核酸检测应用奠定了基础。该团队于2018年优化SHERLOCK系统,开发出SHERLOCKv2系统<sup>[22]</sup>,该系统通过四通道设计实现单反应多靶标检测,并结合辅助酶Csm6,将信号灵敏度提升3.5倍,可检测靶标丰度低至2 amol/L的样本。同年,该团队进一步开发了HUDSON(heating uniformly for detection using SHERLOCK outputs)系统<sup>[23]</sup>,该系统可直接从体液

中提取并检测病毒,样本处理简单,对设备需求低,可用于现场病毒诊断。

2020年,COVID-19大流行推动了快速、灵敏且低成本诊断方法的研发。ARIZTI-SANZ等<sup>[24]</sup>开发了SHINE(SHERLOCK and HUDSON integrated nucleic acid evaluation)系统,通过整合SHERLOCK与HUDSON技术优化SARS-CoV-2检测流程。在50例患者的鼻咽样本中,SHINE的灵敏度达90%、特异性达100%,检测时间仅为50 min,显著提升了诊断效能。此外,基于CRISPR-Cas13a的核酸检测技术还被应用于乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)<sup>[25]</sup>、人乳头状瘤病毒(human papilloma virus, HPV)<sup>[26]</sup>、埃博拉病毒<sup>[27]</sup>、甲型禽流感病毒<sup>[28]</sup>及犬细小病毒<sup>[29]</sup>等病原体检测。ACKERMAN等<sup>[30]</sup>构建了CARMEN-Cas13(combinatorial arrayed reactions for multiplexed evaluation of nucleic acids combined with Cas13)系统,该系统结合Cas13和微孔阵列芯片,可实现169种人

类相关病毒及10种以上基因组序列的同步检测,为病毒快速筛查提供了新工具。KAMINSKI等<sup>[31]</sup>还开发了一种基于CRISPR-Cas13的器官移植排斥监测方法,该方法可同步检测患者血液或尿液样本BK多瘤病毒DNA、巨细胞病毒DNA及趋化因子CXC配体9(C-X-C motif chemokine ligands 9, CXCL9) mRNA水平的变化,并以可视化手段实现移植后感染与排斥反应的即时监测。

目前基于CRISPR-Cas13系统的核酸检测体系的商业化发展最为顺利。研究人员已开发了针对SARS-CoV-2、人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)、丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)、埃博拉病毒等一系列病原快速检测试剂盒;还将检测范围扩大至肿瘤检测领域,从血液样本中快速鉴定急性淋巴细胞白血病等疾病的特征性融合基因<sup>[32]</sup>。此外,结合便携手持式设备,基于CRISPR-Cas13的检测系统可一次性检测10个病原体,可用于现场快速生物监测,以应对生物安全威胁<sup>[33]</sup>。

### 3.2 原位检测

实现RNA在活细胞内的亚细胞定位可视化是解析其生物学功能的关键前提。失活型Cas13蛋白(deactivated Cas13, dCas13)与荧光分子的协同应用可实现活细胞内RNA的可视化成像(图2)。WANG等<sup>[34]</sup>开发了基于CRISPR-Cas13系统的活细胞荧光原位杂交技术(live-cell fluorescent *in situ* hybridization, LiveFISH)。该技术通过设计荧光标记的寡核苷酸探针,实现了对多种类型细胞转录组的动态追踪,该技术还能实现染色体疾病的准确检测与T淋巴细胞多位点的追踪。在此基础上,YANG等<sup>[35]</sup>进一步拓展了RNA成像的技术维度,将dCas13与不同荧光蛋白进行偶联,开发出了适用于单细胞水平的双色RNA成像系统,可特异性标记多种功能RNA,为研究疾病相关转录本的时空动态特征提供了有效工具。XU等<sup>[36]</sup>将CRISPR-Cas13介导的RNA标记技术与可放大信号的单链可变区片段抗体系统(SunTag)相结合,在活细胞内成功实现了对端粒重复序列RNA的动态追踪,为深入解析其在基因组完整性维持中的分子机制提供了重要技术支撑。这些基于CRISPR-dCas13的新型原位检测技术不仅为分析RNA动态变化提供了有力的实验工具,也为进一步开发新型RNA临床检测方法奠定了基础。

### 3.3 基于CRISPR-Cas13的核酸检测体系的不足与挑战

基于CRISPR-Cas13的检测体系的最大优势是操作简便,可作为现场检测的工具,其灵敏度与特异性高于抗原检测等现有的现场检测工具。但其灵敏度与核酸检测的金标准——qPCR相比,尚有差距<sup>[37]</sup>。虽然Cas13可区分不同类型病毒,但其检测特异性尚达不到单碱基分辨率,仍存在提升空间。此外,Cas13蛋白在体外制备成本较高、稳定性较差,这也限制了CRISPR-Cas13检测体系的进一步应用。

## 4 CRISPR-Cas13系统在临床治疗中的应用前景

### 4.1 抗病毒感染

CRISPR-Cas系统在原核生物中可抵御外来核酸入侵,这一天然抗病毒活性为其在哺乳动物中发挥抗病毒作用提供了理论基础。传统抗病毒药物的研发依赖蛋白分子筛选、抗体制备及病毒生物学特性解析,相较于此,CRISPR-Cas13系统仅需基于病毒序列设计特异性crRNA即可实现对病毒的靶向抑制(图2),为病毒治疗开辟了全新技术路径。

FREIJE等<sup>[38]</sup>开发的CARVER(Cas13-assisted restriction of viral expression and readout)系统利用Cas13蛋白同时实现病毒RNA的检测与破坏,为多类型ssRNA病毒的检测及靶向治疗提供了通用平台。针对呼吸道病毒,ABBOTT等<sup>[39]</sup>证实CRISPR-Cas13系统可有效降解SARS-CoV-2及人肺上皮细胞中的甲型流感病毒(influenza A virus, IAV)核酸。BLANCHARD等<sup>[40]</sup>利用Cas13a在小鼠与仓鼠模型中显著减轻了IAV与SARS-CoV-2的感染症状,验证了其在动物体内的抗病毒疗效。在登革热病毒(dengue virus, DENV)治疗方面,BASU等<sup>[41]</sup>通过脂质纳米颗粒(lipid nanoparticle, LNP)递送crRNA与编码Cas13a的mRNA,在感染登革热病毒2型(DENV-2)和3型(DENV-3)的小鼠模型中,该策略显著降低了血清病毒滴度,并延长了小鼠存活时间,从而为临床转化提供了实验依据。

CRISPR-Cas13系统不仅可直接作用于RNA病毒,还可通过靶向DNA病毒转录的RNA实现对病毒扩增的间接抑制。YIN等<sup>[42]</sup>利用Cas13a靶向HIV-1病毒RNA,显著减少了病毒基因表达,从而抑制了HIV病毒的复制。MCCOULLOUGH等<sup>[43]</sup>使用Cas13b

靶向HBV病毒RNA,使HepG2细胞分泌的HBeAg与HBsAg蛋白水平降低95%;在小鼠模型中,该策略可使血清HBsAg水平降低50%。

## 4.2 RNA编辑

基于靶向识别与切割RNA的特性,CRISPR-Cas13系统能够被重编程改造,从而广泛应用于多种RNA编辑技术(图2)。具体而言,活性Cas13主要用于RNA敲低,而失活型Cas13则可介导RNA剪接调控、碱基序列编辑及表观转录组修饰。

**4.2.1 RNA敲低** CRISPR-Cas13系统介导的RNA敲低技术在遗传性疾病治疗中展现出了极大的潜力。2022年,ZHENG等<sup>[44]</sup>通过CRISPR-RfxCas13d系统靶向*Tmc1*<sup>B<sup>h</sup></sup>转录本,成功预防了*Bth*小鼠常染色体显性遗传性听力损失。2023年,LI等<sup>[45]</sup>利用高保真CRISPR-Cas13X(hfCas13X.1)系统靶向父系*Ube3a-ATS* RNA,使*Ube3a*表达水平恢复至与小鼠神经元中母系*Ube3a*相当的水平,有效改善了快乐木偶综合征症状。该团队还通过CasRx(RfxCas13d)靶向敲低*VEGFA* mRNA,抑制了致病性脉络膜新生血管(choroidal neovascularization, CNV)的形成,实现了年龄相关性黄斑变性(age-related macular degeneration, AMD)的有效干预<sup>[46]</sup>。

在肿瘤治疗领域,CRISPR-Cas13介导的RNA敲低技术亦取得重要进展。ZHAO等<sup>[47]</sup>利用优化的CRISPR-Cas13a系统敲低*KRAS-G12D* mRNA,在胰腺癌模型小鼠中实现了肿瘤体积的显著缩小。TIEU等<sup>[48]</sup>开发了MEGA(multiplexed effector guide arrays)系统,该技术可对T细胞转录组进行可编程的调控,在人原代T细胞中实现了定量、可逆且大规模的多重基因敲低,为癌症免疫治疗提供了创新方法。

CRISPR-Cas13面临着反义核酸这个强劲的竞争对手<sup>[49]</sup>。反义核酸具有易于递送(仅递送小RNA片段,无需递送核糖核蛋白)、成本低廉、免疫原性低等优点。与之相比,CRISPR-Cas13主要有以下优势:第一,CRISPR-Cas13在特异性方面具有优势,如Cas13X蛋白对单碱基错配靶标底物的切割效率显著降低<sup>[19]</sup>;第二,由于CRISPR-Cas13降解RNA时自身并不会被消耗,因此理论上具有更长的半衰期;第三,不同于反义核酸需要借助细胞内的核酸酶,CRISPR-Cas13自身具有核酸酶,因此受到靶细胞内部环境的影响较小。此外,CRISPR-Cas13最大的优势在于其功能并不局限于RNA敲降,还可进行RNA

编辑。

**4.2.2 RNA碱基编辑** 通过将dCas13系统与碱基编辑模块融合,可实现转录组水平的精准碱基编辑。目前,多种类型的RNA碱基编辑器已被成功开发、优化并应用于功能研究与疾病治疗。

2017年,张锋团队<sup>[50]</sup>首次构建了REPAIR(RNA editing for programmable A to I replacement)系统,通过dCas13使腺苷脱氨酶ADAR2靶向结合到哺乳动物细胞转录组,实现了A至I的碱基编辑。该系统进一步升级为REPAIRv2系统,其编辑特异性提升了919倍,且体积缩小,更利于体内的递送<sup>[50]</sup>。2020年,LIU等<sup>[51]</sup>开发了REPAIRx系统,采用CasRx作为骨架,该系统编辑效率与特异性均更优,且脱靶概率显著降低。张锋团队<sup>[52]</sup>还通过将dCas13与ADAR2(属于胞苷脱氨酶)融合,构建了可实现C至U编辑的RESCUE(RNA editing for specific C to U exchange)系统。该系统可同时介导C至U以及A至I的多重编辑。HUANG等<sup>[53]</sup>开发的CURE(C to U RNA editor)编辑器则将APOBEC3A(apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic polypeptide-like 3A)与dCas13融合,仅保留了胞苷脱氨活性,避免了腺苷脱氨副反应,显著减少了错义突变的产生。

此外,杨辉团队<sup>[54]</sup>提出了基于mini-dCas13X的RNA腺嘌呤碱基编辑(mini-dCas13X-mediated RNA adenine base editing, mxABE)策略,并成功将其应用于杜氏肌营养不良症人源化小鼠模型,恢复了抗肌萎缩蛋白的表达。他们进一步研发出通过腺病毒相关病毒(adeno-associated virus, AAV)变体递送的增强型mini-dCas13X RNA碱基编辑器(enhanced mini-dCas13X RNA base editor, emxABE),并将其用于治疗与*Otof*<sup>Q829X</sup>突变相关的听力损失,在小鼠模型中实现了约80%的腺苷至肌苷转化效率,为该疾病提供了有效的干预手段<sup>[55]</sup>。

**4.2.3 RNA剪接** mRNA选择性剪接受控于前体mRNA(pre-mRNA)中的顺式作用元件与正调控或负调控反式作用剪接因子的相互作用,可决定外显子的保留或剔除。通过将dCas13与顺式元件或反式作用剪接因子融合,并结合特异性crRNA,可实现人工编程的RNA剪接调控。KONERMANN等<sup>[14]</sup>将dCasRx与剪接元件融合并靶向剪接报告基因,成功介导了报告基因外显子的剪接调控,为转录组工程提供了新型技术平台。在此基础上,DU

等<sup>[56]</sup>开发了基于CRISPR-Cas13的人工剪接因子(CASFx),该系统可同时诱导不同外显子的包含或剔除,在脊髓性肌萎缩症患者成纤维细胞中成功激活了SMN2外显子7的剪接,展现出了良好的应用潜力。FIFLIS等<sup>[57]</sup>开发了CRAFT(CRISPR assisted mRNA fragment *trans*-splicing)系统,可将外源性RNA片段反式剪接成内源性pre-mRNA,在多种哺乳动物细胞中改善了对内源性mRNA大片的编辑,该系统可用于蛋白质标签连接、非翻译区修饰及mRNA转录本大片段替换等领域。

**4.2.4 表观转录组调控** *N*<sup>6</sup>-甲基腺苷(*N*<sup>6</sup>-methyladenosine, m<sup>6</sup>A)是哺乳动物RNA转录本中最常见的内源性化学修饰之一。对单个RNA位点的m<sup>6</sup>A修饰进行人为干预存在技术挑战。WILSON等<sup>[58]</sup>通过将dCas13与甲基转移酶结构域融合,实现了对特定mRNA位点的靶向m<sup>6</sup>A修饰,为单一位点m<sup>6</sup>A功能研究奠定了基础。LI等<sup>[59]</sup>开发了基于dCas13b的去甲基化工具,该工具可精准去除靶向mRNA的m<sup>6</sup>A修饰,通过对表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, *EGFR*)转录本和*MYC*基因的去甲基化抑制癌细胞增殖。XIA等<sup>[60]</sup>将dRfxCas13d分别与甲基转移酶或去甲基化酶融合,开发出可在细胞核或细胞质内选择性引入或去除m<sup>6</sup>A修饰的双向表观转录组编辑平台。XU等<sup>[61]</sup>进一步设计了可调控的m<sup>6</sup>A编辑平台(FKBP\*-dCas13b-ALK),通过Shield-1分子的添加或去除实现了m<sup>6</sup>A修饰的动态调控。

5-甲基胞嘧啶(5-methylcytosine, m<sup>5</sup>C)是广泛分布于RNA中的重要修饰类型,在RNA功能调控与基因表达中发挥关键作用。ZHANG等<sup>[62]</sup>开发了基于dRfxCas13d的重组m<sup>5</sup>C修饰系统(reengineered m<sup>5</sup>C modification system, RCMS),可针对特定转录本实现m<sup>5</sup>C甲基化或去甲基化修饰的精准调控,为解析单个RNA位点m<sup>5</sup>C修饰的生物学功能提供了新型技术手段。

*N*<sup>1</sup>-甲基腺苷(*N*<sup>1</sup>-methyladenosine, m<sup>1</sup>A)是一类普遍存在且可逆的RNA修饰。XIE等<sup>[63]</sup>构建了REMOVER(reengineered m<sup>1</sup>A modification valid eraser)系统,利用dCas13d特异性去除转录本m<sup>1</sup>A修饰,该系统显著提高了致病基因*MALAT1*和*PRUNE1* RNA的稳定性。XIE等<sup>[64]</sup>进一步开发了由脱落酸(abscisic acid, ABA)诱导的可逆m<sup>1</sup>A去甲基化系统,通过化学诱导临近技术整合dCas13b与m<sup>1</sup>A去

甲基化酶ALKBH3,实现了各种类型RNA的m<sup>1</sup>A修饰去除,并通过靶向线粒体ATP合酶亚基*ATP5D*的mRNA,促进了ATP5D蛋白表达,增强了肿瘤细胞的糖酵解活性。此外,他们还将去甲基化酶替换成甲基转移酶,将该系统改造成甲基化工具。通过甲基化与去甲基化编辑,其可实现对特定蛋白质的翻译调控。

### 4.3 CRISPR-Cas13系统临床应用的挑战

虽然CRISPR-Cas13系统在抗病毒感染、转录调控、RNA编辑等方面均有良好应用前景,但相关研究大多处于动物模型或细胞水平,目前仅有2项研究进入临床试验阶段:针对新生血管性年龄相关性黄斑变性(neovascular age-related macular degeneration, nAMD)的RNA编辑治疗(HG202,目前处于临床I期)和针对*MECP2*基因重复综合征(*MECP2* duplication syndrome, MDS)的RNA编辑治疗[HG204,目前处于新药临床试验申请(investigational new drug, IND)阶段]。此外,用于治疗*OTOX*(Otoferlin)基因中Q829X突变相关的儿童听力损失的RNA编辑疗法获FDA儿科罕见病药物资格(rare pediatric disease designation, RPDD)与孤儿药资格(orphan drug designation, ODD)双重认定。导致CRISPR-Cas13系统临床转化进度缓慢的原因有以下几个方面。

第一是系统递送方面。目前应用于基因治疗的递送体系主要有AAV、LNP、病毒样颗粒(virus-like particle, VLP)。LNP的优势在于生产简单、成本低、免疫原性低、可装载范围较大,但目前应用于体内编辑时其器官靶向性不足,主要递送至肝脏<sup>[65]</sup>。VLP的优势在于可直接包裹核糖核蛋白(ribonucleoprotein, RNP)、递送效率高、可通过工程化修饰提升器官靶向性<sup>[66]</sup>,但VLP的制备流程较复杂、成本高,仍处于早期开发阶段,距离临床应用尚有距离。此外,LNP和VLP均属于瞬时递送,而Cas13针对RNA,并非永久性编辑,因此载体在体内留存时间将直接影响Cas13的治疗效果。与LNP和VLP相比,AAV因其安全、长效表达的特性,被认为是CRISPR-Cas13系统递送更合适的载体<sup>[67]</sup>;同时,可利用不同血清型AAV的器官偏好差异解决靶向递送的问题<sup>[68]</sup>。AAV递送的最大挑战在于其包装尺寸受限制,上限为4.7 Kb,而常用的Cas13蛋白体积较大,不利于通过单个AAV进行体内递送,这制约了CRISPR-Cas13系统在体内直接

进行基因编辑。已有许多研究着力于寻找更多小体积Cas13蛋白,通过对宏基因组数据进行深入挖掘,结合新型算法,发现了更多小体积新成员<sup>[16-19]</sup>。

第二是生物安全风险。Cas13蛋白具有附带切割活性,因此在切割靶标的同时还会切割细胞中的其他RNA造成脱靶,导致生物毒性<sup>[69]</sup>,因此目前更多使用dCas13与其他蛋白结合进行RNA编辑,以避免附带切割活性带来的风险。

第三是长期系统性安全评价不足。不同于Cas9的“彻底根治”,Cas13需要定期、反复给药以维持治疗效果。这种治疗方案在具有可逆转优势的同时,也带来新的问题,如多次注射是否会提升Cas13的免疫原性,Cas13的半衰期、编辑效率、脱靶效应等方面是否出现变化,目前针对这些问题的长期观测数据仍较为匮乏。

## 5 CRISPR-Cas13系统在基础研究中的应用

### 5.1 检测生物大分子间相互作用

在活细胞内动态解析RNA-蛋白质互作网络是分子生物学研究领域的一个重要挑战。ZHANG等<sup>[70]</sup>开发了CRUIS(CRISPR-based RNA-United Interacting System)技术,通过整合CRISPR-Cas13系统与新型邻近靶向技术,将邻位标记酶PafA与dCas13a融合表达,并利用PafA对靶RNA进行标记,鉴定出了几种新的DNA损伤激活非编码RNA(noncoding RNA activated by DNA damage, NORAD)结合蛋白。HAN等<sup>[71]</sup>开发了基于CRISPR-Cas13的抗坏血酸过氧化物酶2(ascorbate peroxidase 2, APEX2)标记策略,可在活细胞中对特定RNA的相互作用蛋白质进行邻近标记。通过靶向人类端粒酶RNA(human telomerase RNA, hTR),该团队鉴定了十几种与hTR作用的蛋白质,证实了hTR的修饰调控可影响端粒酶复合物的组装与活性。

CRISPR-Cas13系统还被应用于RNA相互作用的研究。DIAO等<sup>[72]</sup>创建了sarID(sgRNA scaffold assisted RNA-RNA interaction detection)方法,通过整合dCas13及邻近RNA编辑策略,实现了对长链非编码RNA(long non-coding RNA, lncRNA)与其他RNA分子互作的高效检测,该技术适用于多种特异性RNA互作研究。

### 5.2 RNA筛选

lncRNA在哺乳动物基因组中占据重要地位,然而由于技术的限制,仍难以建立lncRNA与观测表

型之间的明确因果关系。鉴于此,LIANG等<sup>[73]</sup>基于CRISPR-Cas13筛选技术,系统探究了约6 200个lncRNA缺失对5种人类细胞系适应性的影响,成功鉴定出了778个必需的lncRNA分子,验证了在肿瘤中表达、与生存相关的lncRNA,这些lncRNA可作为新的肿瘤标志物或潜在的治疗靶点。WANG等<sup>[74]</sup>在乳腺细胞中进行了Cas13d介导的混合敲低筛选,重点分析了844个与乳腺癌相关且能够影响细胞增殖的lncRNA,并据此进一步开展了功能验证研究。这些研究表明了CRISPR-Cas13系统在lncRNA功能筛选研究中具有巨大潜力。

此外,ZHANG等<sup>[75]</sup>对CRISPR-Cas13d系统进行了改良,优化crRNA,使用重复序列长度为24 nt的crRNA与Cas13d进行高通量环状RNA(circular RNA, circRNA)功能筛选,成功筛选出了与索拉非尼耐药性相关的circRNA。该研究证明了CRISPR-Cas13系统是高通量研究circRNA功能的有效方法。

### 5.3 翻译调控

在转录后水平精准调控蛋白质表达对研究细胞内分子信号网络的动态平衡至关重要,然而目前靶向调节蛋白质翻译速率的工具仍较为有限。OTOUPAL等<sup>[76]</sup>通过将dCasRx与翻译起始因子IF3融合,构建了dCasRx-IF3系统,以实现特定mRNA的靶向翻译激活。dCasRx-IF3系统可以使外源红色荧光蛋白mRNA的表达水平提升21.3倍,还可以激活内源LacZ基因表达,使其表达水平上调2.6倍;而当该系统靶向mRNA的核糖体结合位点时则会抑制翻译起始过程。CAO等<sup>[77]</sup>开发了CRISPR-dCasRx-SIN-EB2技术,该方法能够靶向特定调控元件,从而提升多种蛋白的表达水平,其中,外源蛋白的表达水平可提升近70%,内源蛋白的激活效率可提高数倍,并且该技术能显著降低脱靶效应。APOSTOLOPOULOS等<sup>[78]</sup>开发CRISPR $\delta$ 技术,这是一种基于dCas13的翻译沉默技术,在翻译起始阶段,dCas13通过结合mRNA靶位点形成物理屏障,阻碍核糖体的扫描过程,从而阻滞翻译起始,将翻译阻遏蛋白与dCas13融合,可进一步提升翻译抑制效率。该技术为真核生物中基于翻译抑制的基因沉默研究提供了新思路。

## 6 CRISPR-Cas13系统的优化

Cas13蛋白具备由crRNA介导的靶向切割特定RNA的核酸酶活性。然而,其在实际应用中受靶向

切割效率偏低、存在脱靶现象及不易递送等的限制,因此需通过对CRISPR-Cas13系统的优化以提升其靶向切割效能。

### 6.1 crRNA的优化

crRNA的工程化改造是提高Cas13靶向切割效率的有效方法。YANG等<sup>[79]</sup>通过设计不同长度的crRNA并在其3'或5'端增加不同数量的尿嘧啶,提高Cas13a的切割活性,优化后的CRISPR-Cas13a系统对SARS-CoV-2的*N*(nucleocapsid)基因和*Orf1ab*基因敲降效率分别提升了6.88倍和3.44倍。

crRNA在胞质中的丰度直接影响其与Cas13蛋白的结合效率及切割活性。CHENG等<sup>[80]</sup>通过改造启动子元件,将无Sm位点的*UI*启动子用于crRNA表达,提高了胞质Cas13蛋白与crRNA的结合效率,进而增强了对靶基因的抑制效果。GRUBER等<sup>[81]</sup>设计并开发了一种核质转运Cas13d(nucleocytoplasmic shuttling Cas13d, Cas13d-NCS)系统,通过核质穿梭Cas13d蛋白将crRNA转运出细胞核,实现对胞质RNA的高效靶向。

### 6.2 Cas13蛋白的优化

大多数Cas13蛋白具有较大的分子量,不利于通过AAV、LNP等载体进行有效包装,这限制了Cas13的体内递送。开发结构紧凑的Cas13蛋白突变体是突破这一限制的核心策略。ZHAO等<sup>[82]</sup>建立了一种兼顾蛋白质的相互作用、动力学变化与保守结构域的策略,被称为IDC(interaction, dynamics and conservation)策略。他们将该策略与AlphaFold2结构预测技术结合,成功设计出了5种结构紧凑且保留完整RNA结合与切割活性的Cas13突变体,验证了基于结构预测构建小型化CRISPR-Cas13系统的可行性。

Cas13具有附带切割活性,会使环境底物RNA非特异性降解,这限制了其在体内的应用。通过突变筛选低附带切割活性的突变体是目前最主要的策略。TONG等<sup>[83]</sup>通过工程改造,开发出了高保真Cas13突变体hfCas13d与hfCas13X.1。实验证明,这些Cas13变体在保留与野生型Cas13相当的靶标RNA敲降活性的同时,其附带切割活性显著降低,并且在转基因小鼠模型和体细胞靶向实验中均未引发可检测的附带切割损伤。YANG等<sup>[84]</sup>开发了一种具有单核苷酸分辨能力且低附带切割活性的高精度Cas13d变体hpCas13d,其在肥厚型心肌病小鼠模型中抑制了致病等位基因的表达,有效预防了心脏肥大的发

生,且无明显不良反应。

## 7 总结与展望

近年来,有关CRISPR-Cas13系统的研究取得了显著进展:已系统表征了由Cas13a至Cas13j的多个亚型,并在Cas13蛋白的起源与进化研究中取得重要突破;解析了多个Cas13蛋白加工pre-crRNA、识别并切割靶标的详细分子机制。通过优化crRNA与Cas13蛋白,CRISPR-Cas13已成为核酸检测、基因编辑和RNA互作研究的有力工具。

作为核酸检测工具,检测系统将向更高灵敏度与分辨率、更简单操作、更短检测时间方向发展。由于通过预扩增步骤提升灵敏度的方法<sup>[9]</sup>增加了样品污染的风险并延长了操作时间,因此无需预扩增的一步法检测是基于CRISPR-Cas13系统的检测体系日后的发展方向<sup>[85]</sup>。可以采用人工智能辅助的蛋白质理性设计、crRNA修饰、引入级联反应放大信号等方式全方位提升CRISPR-Cas13检测体系的灵敏度、分辨率与稳定性。同时,结合微流控等技术以及数据智能分析系统,可以提升CRISPR-Cas13检测体系的检测通量<sup>[86]</sup>,使其适用于大规模现场检测筛选,在短时间内达到“样本进-结果出”的效果。此外参照CRISPR-Cas12检测体系,也可将CRISPR-Cas13检测体系的靶标扩展至核酸以外的小分子<sup>[87]</sup>。

作为基因编辑工具,CRISPR-Cas13系统需要克服递送、生物安全性等方面的困难。结合新型算法和宏基因组数据,寻找新的小型CRISPR-Cas13系统是重要的研究方向,这不仅有助于解决AAV递送体系的体积限制问题,更重要的是能够确保相关系统的核心知识产权自主可控,以推进后续的商业化。此外,结合人工智能<sup>[88]</sup>,通过机器学习设计类似于Cas13的全新蛋白质,也为开发新型基因编辑工具提供了一条重要途径。对于已有的CRISPR-Cas13系统,可通过对Cas13蛋白与crRNA的理性设计与改造,提升其在编辑效率、准确性、体内半衰期等方面的性能。此外,在评估性能时,还应重点关注其在长期、反复给药情景下的治疗效果与生物安全性,完善临床转化前的数据累积。

总体而言,CRISPR-Cas13系统相关技术持续优化,应用前景不断扩展,未来有望在基础研究与临床转化中发挥更关键的作用。

## 参考文献 (References)

- [1] MAKAROVA K S, HAFT D H, BARRANGOU R, et al. Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2011, 9(6): 467-77.
- [2] MAKAROVA K S, WOLF Y I, IRANZO J, et al. Evolutionary classification of CRISPR-Cas systems: a burst of class 2 and derived variants [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2020, 18(2): 67-83.
- [3] ALTAE-TRAN H, KANNAN S, SUBERSKI A J, et al. Uncovering the functional diversity of rare CRISPR-Cas systems with deep terascale clustering [J]. *Science*, 2023, 382(6673): eadi1910.
- [4] MAKAROVA K S, SHMAKOV S A, WOLF Y I, et al. An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems including rare variants [J]. *Nat Microbiol*, 2025, 10(12): 3346-61.
- [5] MAKAROVA K S, ZHANG F, KOONIN E V. SnapShot: class 2 CRISPR-Cas systems [J]. *Cell*, 2017, doi: 10.1016/j.cell.2016.12.038.
- [6] SHMAKOV S, SMARGON A, SCOTT D, et al. Diversity and evolution of class 2 CRISPR-Cas systems [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2017, 15(3): 169-82.
- [7] HOIKKALA V, RAVANTTI J, DÍEZ-VILLASEÑOR C, et al. Cooperation between different CRISPR-Cas types enables adaptation in an RNA-targeting system [J]. *mBio*, 2021, 12(2): e03338-20.
- [8] VAN BELJOUW S P B, SANDERS J, RODRÍGUEZ-MOLINA A, et al. RNA-targeting CRISPR-Cas systems [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2023, 21(1): 21-34.
- [9] GOOTENBERG J S, ABUDAYYEH O O, LEE J W, et al. Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2 [J]. *Science*, 2017, 356(6336): 438-42.
- [10] SHMAKOV S, ABUDAYYEH O O, MAKAROVA K S, et al. Discovery and functional characterization of diverse class 2 CRISPR-Cas systems [J]. *Mol Cell*, 2015, 60(3): 385-97.
- [11] LIU L, LI X, MA J, et al. The molecular architecture for RNA-guided RNA cleavage by Cas13a [J]. *Cell*, 2017, 170(4): 714-26, e10.
- [12] ABUDAYYEH O O, GOOTENBERG J S, ESSLETZBICHLER P, et al. RNA targeting with CRISPR-Cas13 [J]. *Nature*, 2017, 550(7675): 280-4.
- [13] SMARGON A A, COX D B T, PYZOSCHAK N K, et al. Cas13b is a type VI-B CRISPR-associated RNA-guided RNase differentially regulated by accessory proteins Csx27 and Csx28 [J]. *Mol Cell*, 2017, 65(4): 618-30, e7.
- [14] KONERMANN S, LOTFY P, BRIDEAU N J, et al. Transcriptome engineering with RNA-targeting type VI-D CRISPR effectors [J]. *Cell*, 2018, 173(3): 665-76, e14.
- [15] CHEN F, ZHANG C, XUE J, et al. Molecular mechanism for target RNA recognition and cleavage of Cas13h [J]. *Nucleic Acids Res*, 2024, 52(12): 7279-91.
- [16] HU Y, CHEN Y, XU J, et al. Metagenomic discovery of novel CRISPR-Cas13 systems [J]. *Cell Discov*, 2022, 8(1): 107.
- [17] LI G, CHENG Y, YU J, et al. Compact RNA editors with natural miniature Cas13j nucleases [J]. *Nat Chem Biol*, 2025, 21(2): 280-90.
- [18] KANNAN S, ALTAE-TRAN H, JIN X, et al. Compact RNA editors with small Cas13 proteins [J]. *Nat Biotechnol*, 2022, 40(2): 194-7.
- [19] XU C, ZHOU Y, XIAO Q, et al. Programmable RNA editing with compact CRISPR-Cas13 systems from uncultivated microbes [J]. *Nat Methods*, 2021, 18(5): 499-506.
- [20] ZILBERZWIGE-TAL S, ALTAE-TRAN H, KANNAN S, et al. Reprogrammable RNA-targeting CRISPR systems evolved from RNA toxin-antitoxins [J]. *Cell*, 2025, 188(7): 1925-40, e20.
- [21] PERČULIJA V, LIN J, ZHANG B, et al. Functional features and current applications of the RNA-targeting type VI CRISPR-Cas systems [J]. *Adv Sci*, 2021, 8(13): 2004685.
- [22] GOOTENBERG J S, ABUDAYYEH O O, KELLNER M J, et al. Multiplexed and portable nucleic acid detection platform with Cas13, Cas12a, and Csm6 [J]. *Science*, 2018, 360(6387): 439-44.
- [23] MYHRVOLD C, FREIJE C A, GOOTENBERG J S, et al. Field-deployable viral diagnostics using CRISPR-Cas13 [J]. *Science*, 2018, 360(6387): 444-8.
- [24] ARIZTI-SANZ J, FREIJE C A, STANTON A C, et al. Streamlined inactivation, amplification, and Cas13-based detection of SARS-CoV-2 [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 5921.
- [25] WANG S, LI H, KOU Z, et al. Highly sensitive and specific detection of hepatitis B virus DNA and drug resistance mutations utilizing the PCR-based CRISPR-Cas13a system [J]. *Clin Microbiol Infect*, 2021, 27(3): 443-50.
- [26] ZHANG K, LI Q, WANG K, et al. RPA-CRISPR-Cas-mediated dual lateral flow assay for the point-of-care testing of HPV16 and HPV18 [J]. *Bioconjug Chem*, 2024, 35(11): 1797-804.
- [27] QIN P, PARK M, ALFSON K J, et al. Rapid and fully microfluidic Ebola virus detection with CRISPR-Cas13a [J]. *ACS Sens*, 2019, 4(4): 1048-54.
- [28] LIU Y, XU H, LIU C, et al. CRISPR-Cas13a nanomachine based simple technology for avian influenza A (H7N9) virus on-site detection [J]. *J Biomed Nanotechnol*, 2019, 15(4): 790-8.
- [29] KHAN H, KHAN A, LIU Y, et al. CRISPR-Cas13a mediated nanosystem for attomolar detection of canine parvovirus type 2 [J]. *Chin Chem Lett*, 2019, 30(12): 2201-4.
- [30] ACKERMAN C M, MYHRVOLD C, THAKKU S G, et al. Massively multiplexed nucleic acid detection with Cas13 [J]. *Nature*, 2020, 582(7811): 277-82.
- [31] KAMINSKI M M, ALCANTAR M A, LAPE I T, et al. A CRISPR-based assay for the detection of opportunistic infections post-transplantation and for the monitoring of transplant rejection [J]. *Nat Biomed Eng*, 2020, 4(6): 601-9.
- [32] VEDULA R S, KARP H Q, KOOB J, et al. CRISPR-based rapid molecular diagnostic tests for fusion-driven leukemias [J]. *Blood*, 2024, 144(12): 1290-9.
- [33] LIU T Y, KNOTT G J, SMOCK D C J, et al. Accelerated RNA detection using tandem CRISPR nucleases [J]. *Nat Chem Biol*, 2021, 17(9): 982-8.
- [34] WANG H, NAKAMURA M, ABBOTT T R, et al. CRISPR-mediated live imaging of genome editing and transcription [J]. *Science*, 2019, 365(6459): 1301-5.
- [35] YANG L Z, WANG Y, LI S Q, et al. Dynamic imaging of RNA in living cells by CRISPR-Cas13 systems [J]. *Mol Cell*, 2019, 76(6): 981-97, e7.
- [36] XU M, CHIGUMIRA T, CHEN Z, et al. CRISPR Cas13-based tools to track and manipulate endogenous telomeric repeat-containing RNAs in live cells [J]. *Front Mol Biosci*, 2021, 8: 785160.
- [37] FOZOUNI P, SON S, DÍAZ DE LEÓN DERBY M, et al. Amplification-free detection of SARS-CoV-2 with CRISPR-Cas13a

- and mobile phone microscopy [J]. *Cell*, 2021, 184(2): 323-33,e9.
- [38] FREIJE C A, MYHRVOLD C, BOEHM C K, et al. Programmable inhibition and detection of RNA viruses using Cas13 [J]. *Mol Cell*, 2019, 76(5): 826-37,e11.
- [39] ABBOTT T R, DHAMDHARE G, LIU Y, et al. Development of CRISPR as an antiviral strategy to combat SARS-CoV-2 and influenza [J]. *Cell*, 2020, 181(4): 865-76,e12.
- [40] BLANCHARD E L, VANOVER D, BAWAGE S S, et al. Treatment of influenza and SARS-CoV-2 infections via mRNA-encoded Cas13a in rodents [J]. *Nat Biotechnol*, 2021, 39(6): 717-26.
- [41] BASU M, ZURLA C, AURONI T T, et al. mRNA-encoded Cas13 can be used to treat dengue infections in mice [J]. *Nat Microbiol*, 2024, 9(8): 2160-72.
- [42] YIN L, ZHAO F, SUN H, et al. CRISPR-Cas13a inhibits HIV-1 infection [J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2020, 21: 147-55.
- [43] MCCOULLOUGH L C, FAREH M, HU W, et al. CRISPR-Cas13b-mediated suppression of HBV replication and protein expression [J]. *J Hepatol*, 2024, 81(5): 794-805.
- [44] ZHENG Z, LI G, CUI C, et al. Preventing autosomal-dominant hearing loss in Bth mice with CRISPR/CasRx-based RNA editing [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2022, 7(1): 79.
- [45] LI J, SHEN Z, LIU Y, et al. A high-fidelity RNA-targeting Cas13 restores paternal Ube3a expression and improves motor functions in Angelman syndrome mice [J]. *Mol Ther*, 2023, 31(7): 2286-95.
- [46] ZHOU C, HU X, TANG C, et al. CasRx-mediated RNA targeting prevents choroidal neovascularization in a mouse model of age-related macular degeneration [J]. *Natl Sci Rev*, 2020, 7(5): 835-7.
- [47] ZHAO X, LIU L, LANG J, et al. A CRISPR-Cas13a system for efficient and specific therapeutic targeting of mutant KRAS for pancreatic cancer treatment [J]. *Cancer Lett*, 2018, 431: 171-81.
- [48] 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 [J]. *Cell*, 2024, 187(5): 1278-95,e20.
- [49] ANDROSAVICH J R. Frameworks for transformational breakthroughs in RNA-based medicines [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2024, 23(6): 421-44.
- [50] COX D B T, GOOTENBERG J S, ABUDAYYEH O O, et al. RNA editing with CRISPR-Cas13 [J]. *Science*, 2017, 358(6366): 1019-27.
- [51] LIU Y, MAO S, HUANG S, et al. REPAIRx, a specific yet highly efficient programmable A > I RNA base editor [J]. *EMBO J*, 2020, 39(22): e104748.
- [52] ABUDAYYEH O O, GOOTENBERG J S, FRANKLIN B, et al. A cytosine deaminase for programmable single-base RNA editing [J]. *Science*, 2019, 365(6451): 382-6.
- [53] HUANG X, LÜ J, LI Y, et al. Programmable C-to-U RNA editing using the human APOBEC3A deaminase [J]. *EMBO J*, 2020, 39(22): e104741.
- [54] LI G, JIN M, LI Z, et al. Mini-dCas13X-mediated RNA editing restores dystrophin expression in a humanized mouse model of Duchenne muscular dystrophy [J]. *J Clin Invest*, 2023, 133(3): e162809.
- [55] XUE Y, TAO Y, WANG X, et al. RNA base editing therapy cures hearing loss induced by OTOF gene mutation [J]. *Mol Ther*, 2023, 31(12): 3520-30.
- [56] DU M, JILLETTE N, ZHU J J, et al. CRISPR artificial splicing factors [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 2973.
- [57] FIFLIS D N, REY N A, VENUGOPAL-LAVANYA H, et al. Repurposing CRISPR-Cas13 systems for robust mRNA trans-splicing [J]. *Nat Commun*, 2024, 15(1): 2325.
- [58] WILSON C, CHEN P J, MIAO Z, et al. Programmable m<sup>6</sup>A modification of cellular RNAs with a Cas13-directed methyltransferase [J]. *Nat Biotechnol*, 2020, 38(12): 1431-40.
- [59] LI J, CHEN Z, CHEN F, et al. Targeted mRNA demethylation using an engineered dCas13b-ALKBH5 fusion protein [J]. *Nucleic Acids Res*, 2020, 48(10): 5684-94.
- [60] XIA Z, TANG M, MA J, et al. Epitranscriptomic editing of the RNA N<sup>6</sup>-methyladenosine modification by dCasRx conjugated methyltransferase and demethylase [J]. *Nucleic Acids Res*, 2021, 49(13): 7361-74.
- [61] XU Y, WANG Y, LIANG F S. Site-specific m<sup>6</sup>A erasing via conditionally stabilized CRISPR-Cas13b editor [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2023, 62(43): e202309291.
- [62] ZHANG T, ZHAO F, LI J, et al. Programmable RNA 5-methylcytosine (m<sup>5</sup>C) modification of cellular RNAs by dCasRx conjugated methyltransferase and demethylase [J]. *Nucleic Acids Res*, 2024, 52(6): 2776-91.
- [63] XIE S, JIN H, YANG F, et al. Programmable RNA N<sup>6</sup>-methyladenosine demethylation by a Cas13d-directed demethylase [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2021, 60(36): 19592-7.
- [64] XIE G, LU Y, HE J, et al. Small molecule-inducible and photoactivatable cellular RNA N<sup>6</sup>-methyladenosine editing [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2024, 63(26): e202320029.
- [65] PADILLA M S, MRKSICH K, WANG Y, et al. Branched endosomal disruptor (BEND) lipids mediate delivery of mRNA and CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein complex for hepatic gene editing and T cell engineering [J]. *Nat Commun*, 2025, 16(1): 996.
- [66] BANSKOTA S, RAGURAM A, SUH S, et al. Engineered virus-like particles for efficient *in vivo* delivery of therapeutic proteins [J]. *Cell*, 2022, 185(2): 250-65,e16.
- [67] ZHANG F, CHOW R D, HE E, et al. Multiplexed inhibition of immunosuppressive genes with Cas13d for combinatorial cancer immunotherapy [J]. *Nat Biotechnol*, 2025, 43(12): 2054-67.
- [68] NASO M F, TOMKOWICZ B, PERRY W L, 3RD, et al. Adeno-associated virus (AAV) as a vector for gene therapy [J]. *BioDrugs*, 2017, 31(4): 317-34.
- [69] LI Y, XU J, GUO X, et al. The collateral activity of RfxCas13d can induce lethality in a RfxCas13d knock-in mouse model [J]. *Genome Biol*, 2023, 24(1): 20.
- [70] ZHANG Z, SUN W, SHI T, et al. Capturing RNA-protein interaction via CRUIS [J]. *Nucleic Acids Res*, 2020, 48(9): e52.
- [71] HAN S, ZHAO B S, MYERS S A, et al. RNA-protein interaction mapping via MS2- or Cas13-based APEX targeting [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2020, 117(36): 22068-79.
- [72] DIAO L T, XIE S J, XU W Y, et al. CRISPR/Cas13 sgRNA-mediated RNA-RNA interaction mapping in live cells with APOBEC RNA editing [J]. *Adv Sci*, 2024, 11(45): e2409004.
- [73] LIANG W W, MÜLLER S, HART S K, et al. Transcriptome-scale RNA-targeting CRISPR screens reveal essential lncRNAs in human cells [J]. *Cell*, 2024, 187(26): 7637-54,e29.
- [74] WANG L, BITAR M, LU X, et al. CRISPR-Cas13d screens iden-

- tify KILR, a breast cancer risk-associated lncRNA that regulates DNA replication and repair [J]. *Mol Cancer*, 2024, 23(1): 101.
- [75] ZHANG Y, NGUYEN T M, ZHANG X O, et al. Optimized RNA-targeting CRISPR/Cas13d technology outperforms shRNA in identifying functional circRNAs [J]. *Genome Biol*, 2021, 22(1): 41.
- [76] OTOUPAL P B, CRESS B F, DOUDNA J A, et al. CRISPR-RNAa: targeted activation of translation using dCas13 fusions to translation initiation factors [J]. *Nucleic Acids Res*, 2022, 50(15): 8986-98.
- [77] CAO C, LI A, XU C, et al. Enhancement of protein translation by CRISPR/dCasRx coupled with SINEB2 repeat of noncoding RNAs [J]. *Nucleic Acids Res*, 2023, 51(6): e33.
- [78] APOSTOLOPOULOS A, KAWAMOTO N, CHOW S Y A, et al. dCas13-mediated translational repression for accurate gene silencing in mammalian cells [J]. *Nat Commun*, 2024, 15(1): 2205.
- [79] YANG Y, SUN L, ZHAO J, et al. Improving trans-cleavage activity of CRISPR-Cas13a using engineered crRNA with a uridylate-rich 5'-overhang [J]. *Biosens Bioelectron*, 2024, 255: 116239.
- [80] CHENG E C K, LAM J K C, KWON S C. Cytosolic CRISPR RNAs for efficient application of RNA-targeting CRISPR-Cas systems [J]. *EMBO Rep*, 2025, 26(7): 1891-912.
- [81] GRUBER C, KRAUTNER L, BERGANT V, et al. Engineered, nucleocytoplasmic shuttling Cas13d enables highly efficient cytosolic RNA targeting [J]. *Cell Discov*, 2024, 10(1): 42.
- [82] ZHAO F, ZHANG T, SUN X, et al. A strategy for Cas13 miniaturization based on the structure and AlphaFold [J]. *Nat Commun*, 2023, 14(1): 5545.
- [83] TONG H, HUANG J, XIAO Q, et al. High-fidelity Cas13 variants for targeted RNA degradation with minimal collateral effects [J]. *Nat Biotechnol*, 2023, 41(1): 108-19.
- [84] YANG P, LOU Y, GENG Z, et al. Allele-specific suppression of variant MHC with high-precision RNA nuclease CRISPR-Cas13d prevents hypertrophic cardiomyopathy [J]. *Circulation*, 2024, 150(4): 283-98.
- [85] WANG T, BAI L, WANG G, et al. SATCAS: a CRISPR/Cas13a-based simultaneous amplification and testing platform for one-pot RNA detection and SNPs distinguish in clinical diagnosis [J]. *Biosens Bioelectron*, 2024, 263: 116636.
- [86] SHANG Y, XING G, LIN J, et al. Multiplex bacteria detection using one-pot CRISPR/Cas13a-based droplet microfluidics [J]. *Biosens Bioelectron*, 2024, 243: 115771.
- [87] ZHUANG S, HU T, ZHOU H, et al. CRISPR-HOLMES-based NAD<sup>+</sup> detection [J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2024, 12: 1355640.
- [88] RUFFOLO J A, NAYFACH S, GALLAGHER J, et al. Design of highly functional genome editors by modelling CRISPR-Cas sequences [J]. *Nature*, 2025, 645(8080): 518-25.