



中国农业科学院
CHINESE ACADEMY OF AGRICULTURAL SCIENCES



Improvement & application of Genome editing

汇报人：夏沈评

组 员：胡冬秀

罗晨曦

水稻所研究所

2022.12.4



目录

1. 课题组介绍
2. 基因编辑介绍
3. 无融合生殖应用
4. 课程感悟

课题组介绍



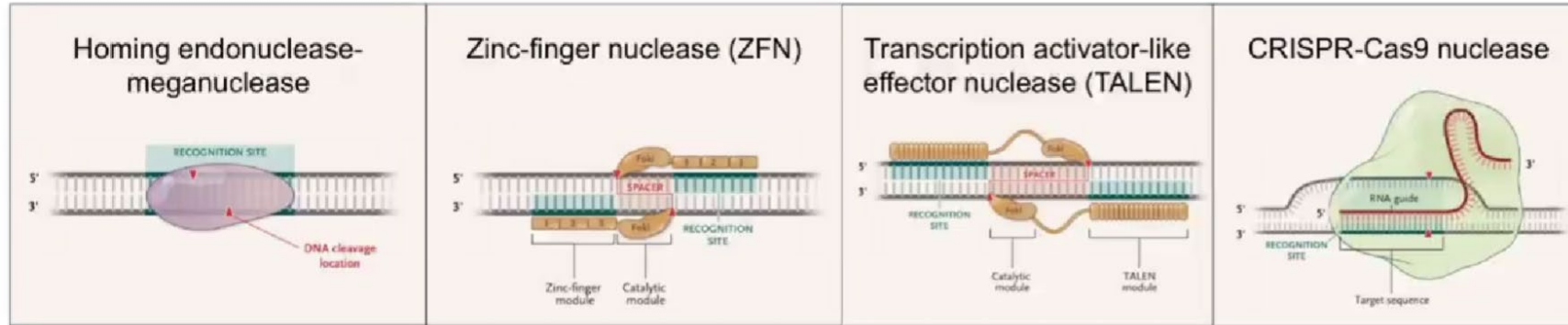
王克剑

研究员、博士生导师、课题组长

本团队开展生物育种前沿技术研发及应用研究，主要包括：

1. 无融合生殖固定杂种优势研究；
2. 基因编辑技术研发及应用；
3. 高通量分子鉴定技术研发及应用。

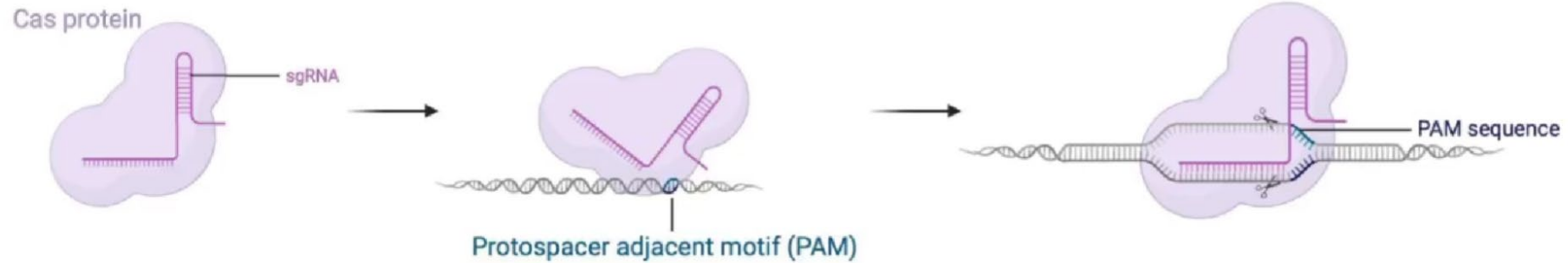
基因组编辑介绍



1. Encode Cas protein with sgRNA

2. PAM search

3. RNA-DNA hybridization



Jinek*, Chylinski*, Fonfara, Hauer, Doudna and Charpentier. *Science*. 2019
Porteus, *NEJM*. 2019

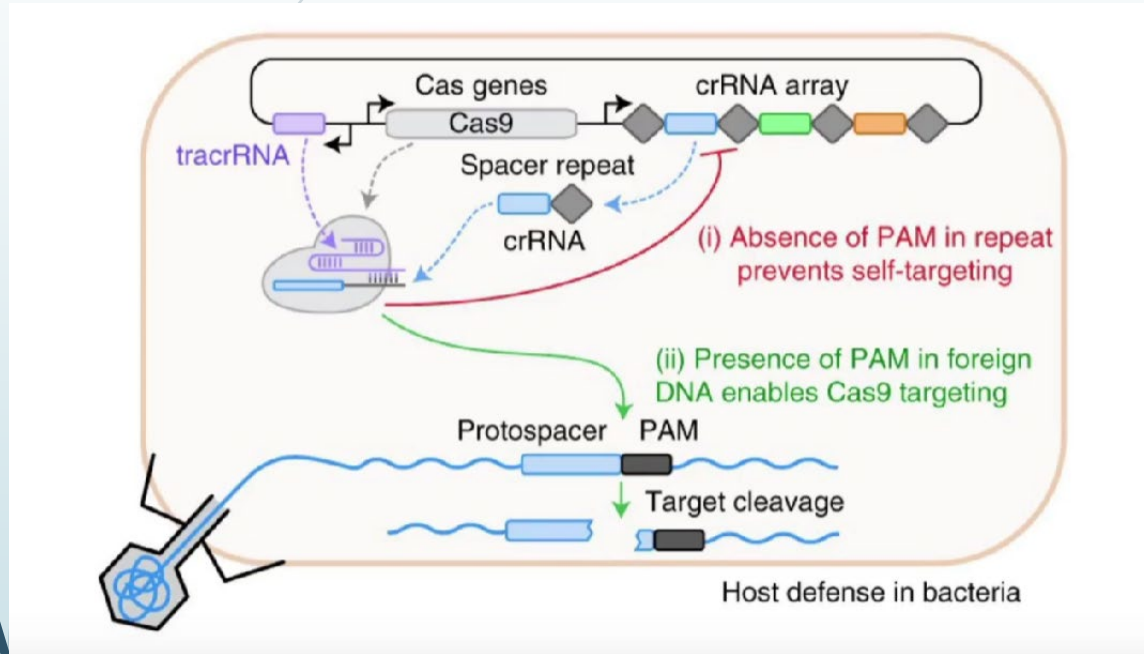
CRISPR/Cas9, 简单、高效, 低成本

CRISPR/Cas系统发现

CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) / Cas (CRISPR-associated gene)

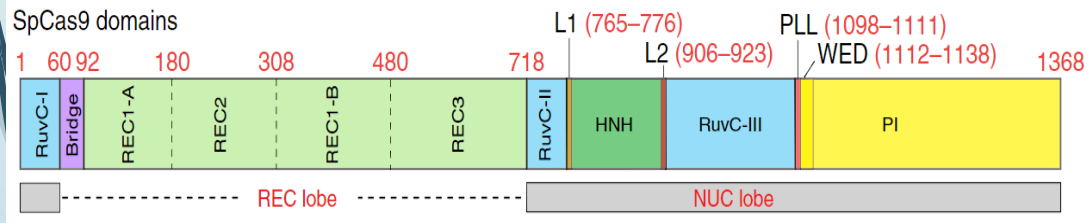
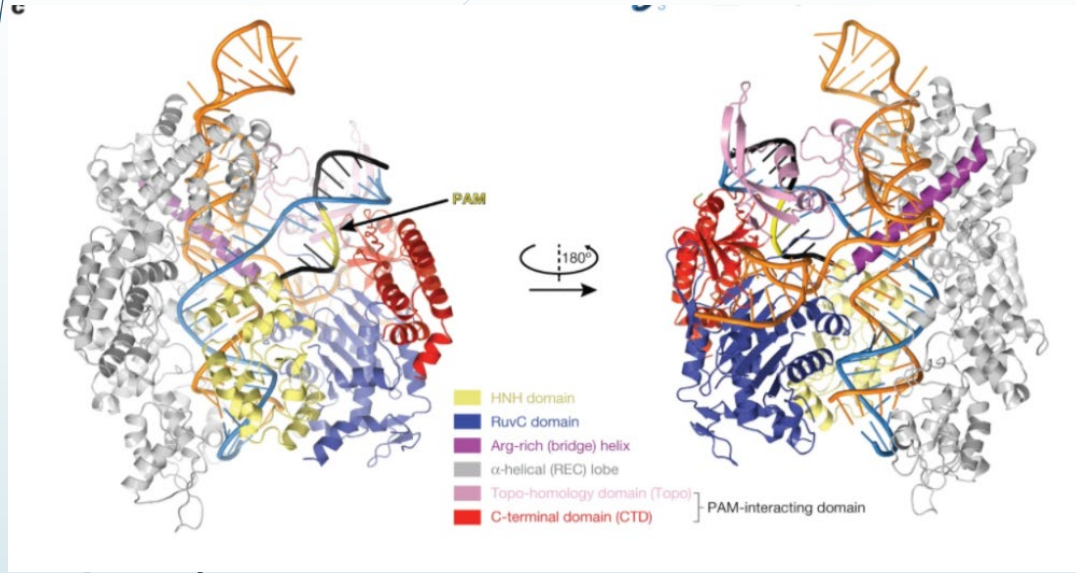
规律间隔成簇短回文重复序列

CRISPR 相关基因

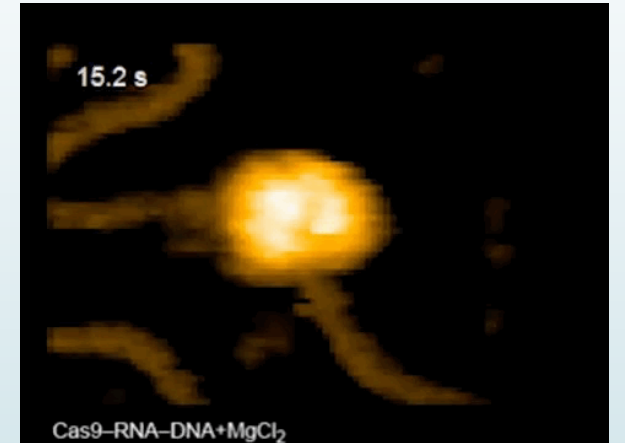
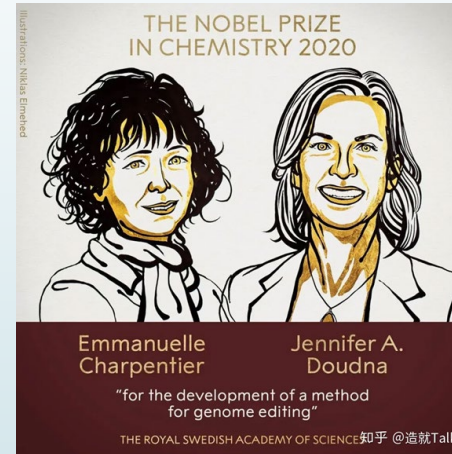


CRISPR/Cas系统是一种来源于细菌降解入侵病毒的DNA或其他外源DNA的免疫机制，主要由CRISPR元件与Cas基因组成。该免疫系统在工作时，CRISPR序列转录形成CRISPR RNA (crRNA)，与另一种转录形成的tracrRNA部分区域配对形成二元复合体，然后该二元复合体引导具有核酸酶活性的Cas蛋白切割与crRNA匹配的DNA序列，再整合进入基因组中。当外源DNA再次入侵时，核酸酶切割活性被激活，以实现对外源DNA的切割。

CRISPR/Cas9系统原理



Cas9蛋白结构域分为REC结构域、Ruvc结构域、HNH结构域、PI结构域



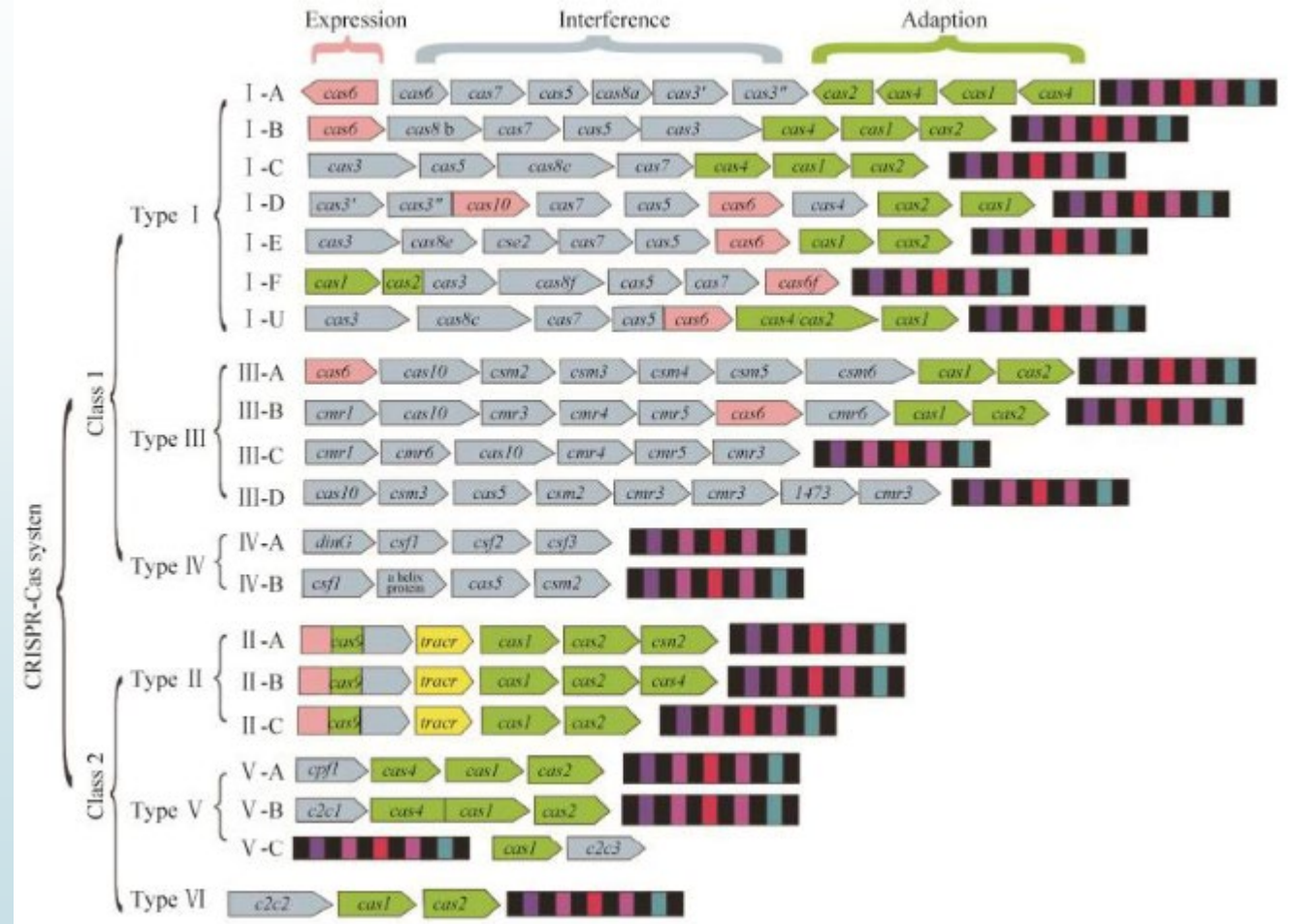
使用超高速原子力显微镜 (HS-AFM) 观察Cas9/sgrNA复合物切断DNA, 注意看蓝色箭头指示的位置 (Shibata et al., 2017)。

CRISPR/Cas9系统分类

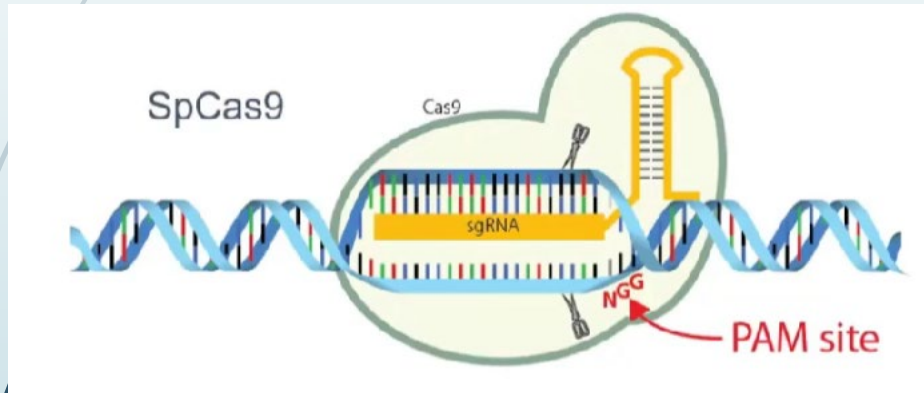
依据Cas蛋白在细菌免疫防御过程中参与的角色，目前将CRISPR-Cas系统分为两大类。

第一大类：它们切割外源核酸的效应因子为多个Cas蛋白形成的复合物，包括I型、III型和IV型。

第二大类：它们的作用因子是比较单一的Cas蛋白，比如II型的Cas9蛋白和V型的Cpf蛋白



PAM序列的限制



PAM (Protospacer adjacent motif) 前间区序列邻近基序

PAM序列区是CRISPR/Cas9系统行使切割功能的基本条件。如果靶序列3端没有PAM序列，即使靶序列与sgRNA序列完全匹配，Cas9蛋白也不会切割该序列位点。PAM序列主要影响CRISPR/Cas9的DNA切割效率。在细胞水平上，NGG介导的切割效率是最高的。



序列广适性的CPRIPR/Cas9系统开发

1. Cas9 同源蛋白的开发

表1 主要 Cas9 工程化变体、直系同源及其特性

Table 1 Main Cas9 variants and orthologues as well as their features

变体及直系同源	改造位点或方式	PAM	特性	参考文献
SpCas9	原生酿脓链球菌 Cas9	NGG	1368 个氨基酸	[61]
StCas9	原生嗜热链球菌 Cas9	NNAGAAW	1121 个氨基酸	[55]
NmCas9	原生脑膜炎奈瑟菌 Cas9	NNNNGATT	1082 个氨基酸	[56]
SaCas9	原生金黄色葡萄球菌 Cas9	NNGRRT	1053 个氨基酸;基因组编辑效率与 SpCas9 相当	[59]
CjCas9	原生曲状杆菌 Cas9	NNNVR YM	984 个氨基酸	[60]

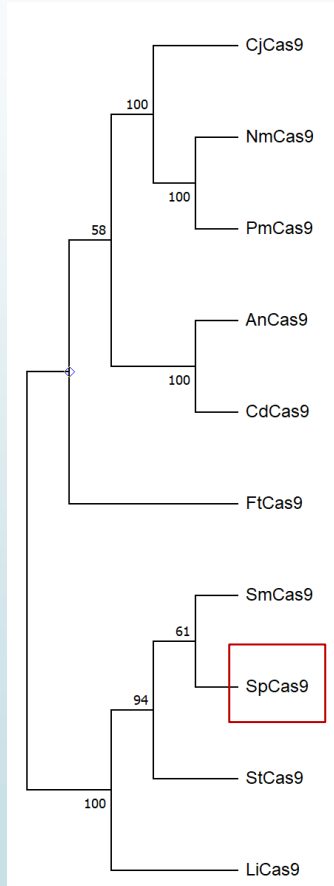
注: ¹V 代表 A、C 或 G. ²R 代表 A 或 G. ³Y 代表 C 或 T. ⁴M 代表 A 或 C.

不同物种间的cas9同源蛋白拥有着不同PAM序列和编辑效率。

Cas9 家族蛋白比对分析

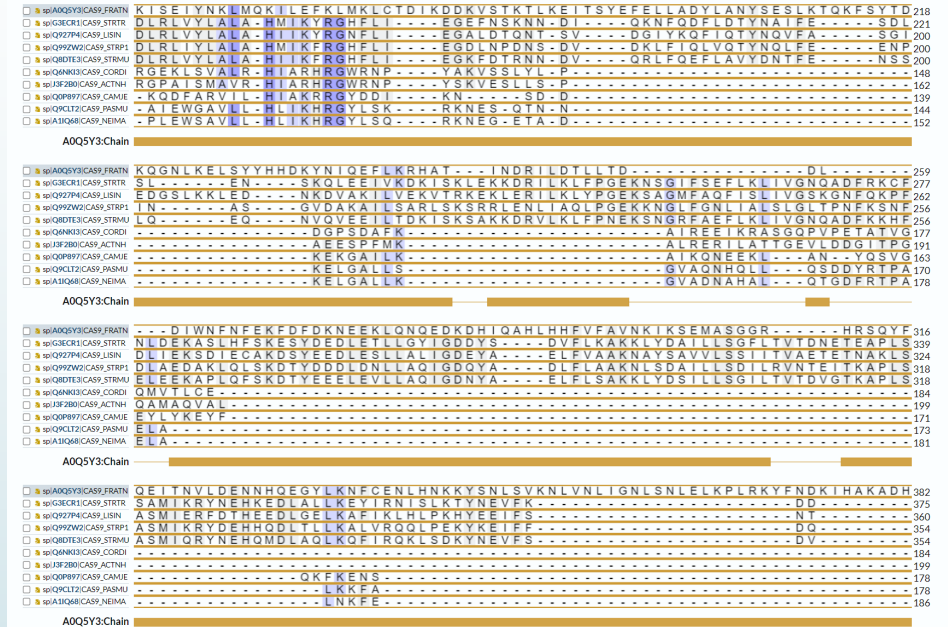
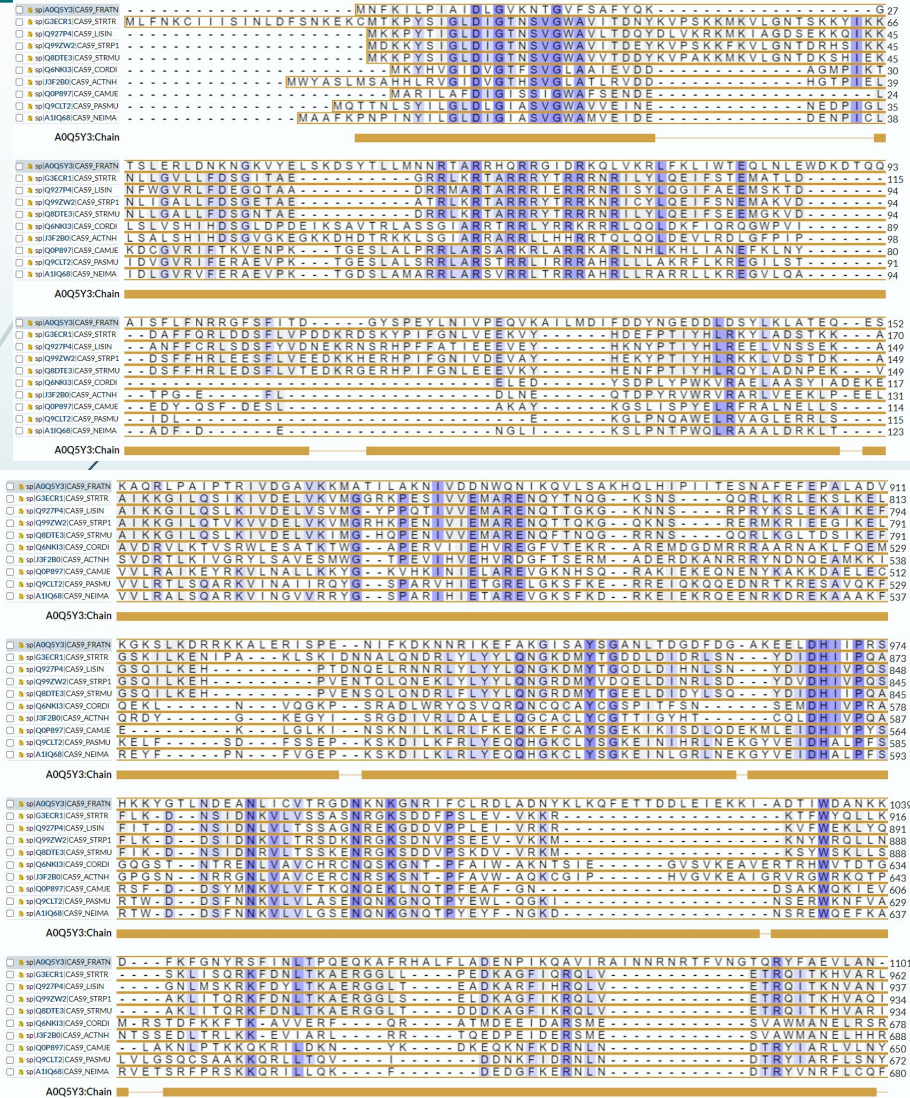
Percent Identity Matrix

<input type="checkbox"/> sp A0Q5Y3 CAS9_FRATN	100.00%	20.00%	17.73%	17.12%	18.84%	13.25%	11.87%	15.30%	15.47%	16.31%
<input type="checkbox"/> sp G3ECR1 CAS9_STRTR	20.00%	100.00%	52.49%	59.35%	63.32%	16.37%	16.55%	19.03%	18.74%	19.65%
<input type="checkbox"/> sp Q927P4 CAS9_LISIN	17.73%	52.49%	100.00%	54.04%	58.78%	16.37%	15.81%	19.57%	19.59%	19.63%
<input type="checkbox"/> sp Q99ZW2 CAS9_STRP1	17.12%	59.35%	54.04%	100.00%	64.45%	16.20%	15.98%	20.22%	19.56%	21.15%
<input type="checkbox"/> sp Q8DTE3 CAS9_STRMU	18.84%	63.32%	58.78%	64.45%	100.00%	16.12%	16.43%	19.84%	18.99%	20.64%
<input type="checkbox"/> sp Q6NKI3 CAS9_CORDI	13.25%	16.37%	16.37%	16.20%	16.12%	100.00%	45.18%	18.78%	20.53%	20.33%
<input type="checkbox"/> sp J3F2B0 CAS9_ACTNH	11.87%	16.55%	15.81%	15.98%	16.43%	45.18%	100.00%	18.07%	19.15%	20.10%
<input type="checkbox"/> sp Q0P897 CAS9_CAMJE	15.30%	19.03%	19.57%	20.22%	19.84%	18.78%	18.07%	100.00%	35.33%	35.13%
<input type="checkbox"/> sp Q9CLT2 CAS9_PASMU	15.47%	18.74%	19.59%	19.56%	18.99%	20.53%	19.15%	35.33%	100.00%	64.45%
<input type="checkbox"/> sp A1IQ68 CAS9_NEIMA	16.31%	19.65%	19.63%	21.15%	20.64%	20.33%	20.10%	35.13%	64.45%	100.00%



和SpCas9 亲缘关系最近的是**SmCas9**和**StCas9**，分别有64.45%和52.49%的序列相似性

Cas9 家族蛋白比对分析



其蛋白序列比对分析发现，有较多的保守结构域。

改造Cas9 变体

表1 主要 Cas9 工程化变体、直系同源及其特性

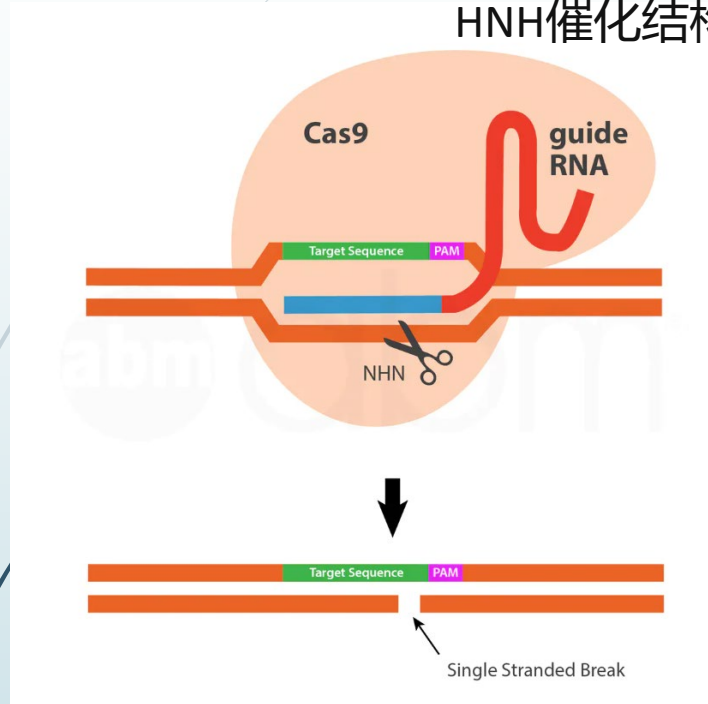
Table 1 Main Cas9 variants and orthologues as well as their features

变体及直系同源	改造位点或方式	PAM	特性	参考文献
SpCas9	原生酿脓链球菌 Cas9	NGG	1368 个氨基酸	[61]
dCas9	D10A, H840A	NGG	核酸酶活性失活	[61]
nCas9(D10A)	D10A	NGG	切口酶, 非靶向链切割活性失活	[62]
nCas9(H840A)	H840A	NGG	切口酶, 靶向链切割活性失活	[62]
SpCas9NG	R1335V, L1111R, D1135V, G1218R, E1219F, A1322R, T1337R	NG	PAM 改变; 通过 Cas9 理性设计获得	[63]
VRERSpCas9	D1135A, G1218R, R1335E, T1337R	NGCG	PAM 改变; 通过细菌选择性定向进化获得	[20]
VQRSpCas9	D1135V, R1335Q, T1337R	NGAN, NGNG	PAM 改变; 通过细菌选择性定向进化获得	[20]
EQRSpCas9	D1335E, R1335Q, T1337R	NGAG	PAM 改变; 通过细菌选择性定向进化获得	[20]
xCas9	A262T, R324L, S409I, E480K, E543D, M694I, E1219V	NG, GAA, GAT	PAM 改变; 通过噬菌体辅助持续进化获得	[21]
SpG	D1135L, S1136W, G1218K, E1219Q, R1335Q, T1337R	NGN	PAM 改变; 通过 SpCas9 理性设计获得	[47]
SpRY	SpG, A61R, L1111R, A1322R, N1317R, R1333P	NRN, NYN	PAM 改变; 通过对 SpG 进一步理性设计获得	[47]
evoCas9	M495V, Y515N, K526E, R661Q	NGG	保真性提高, 编辑效率接近原生 SpCas9	[52]
fCas9	SpdCas9 与 FokI 融合	NGG	保真性提高; 通过将 FokI 核酸酶与 dCas9 融合获得	[48]

对Cas9蛋白进行一系列工程化改造, 获得多个不同的变体, 分别有扩宽PAM序列、提高保真性等一系列功能。

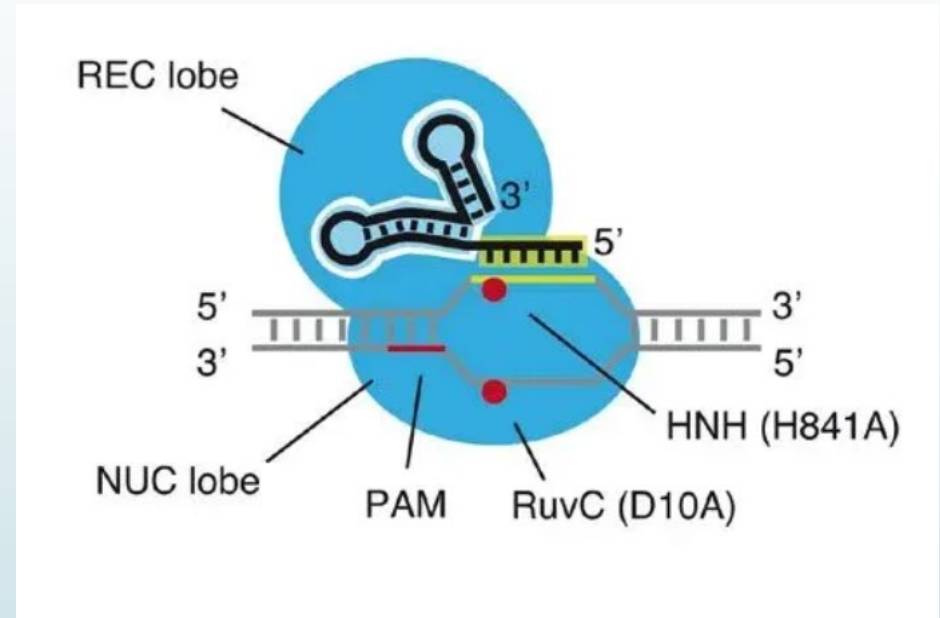
改造Cas9 变体

RuvC催化结构域的第10位天冬氨酸突变为丙氨酸 (D10A)
HNH催化结构域的第840位组氨酸突变为丙氨酸 (H840A)



Cas9 Nickase

这种突变形式导致在目标位点产生单链刻痕而不是双链断裂，因此Cas9 Nickase可将脱靶效应最小化。



dCas9

在两个活性切割位点均突变，使Cas9蛋白没有切割活性，但仍然可以在gRNA的引导下与特定的DNA序列结合。

CRISPR/Cas9系统的发展：碱基编辑

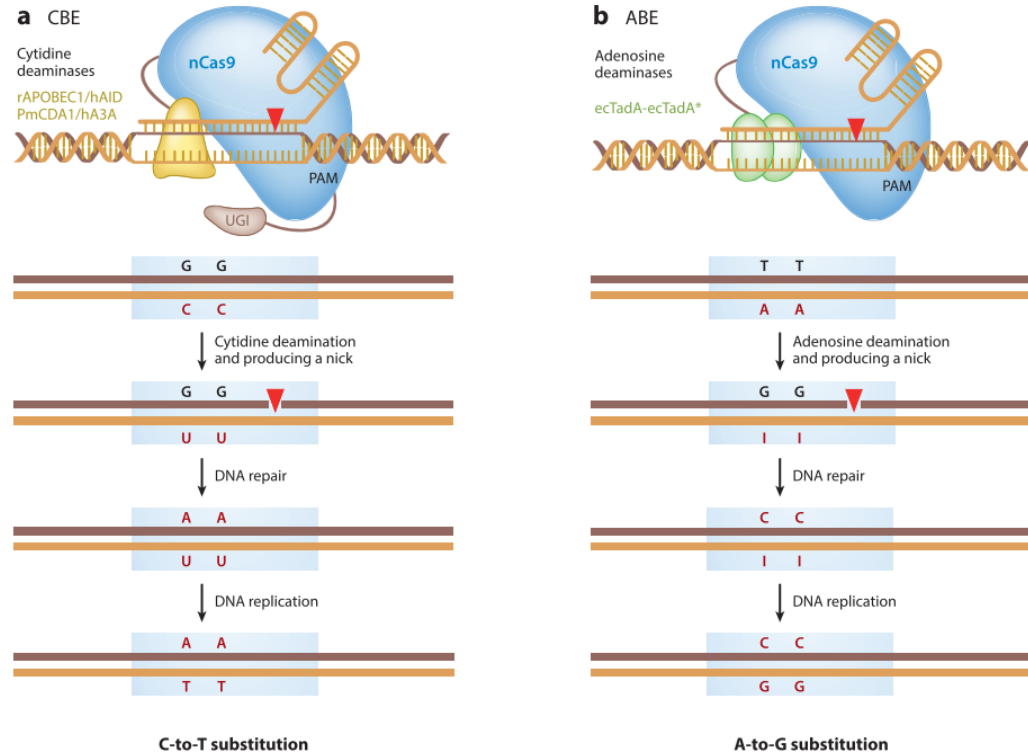
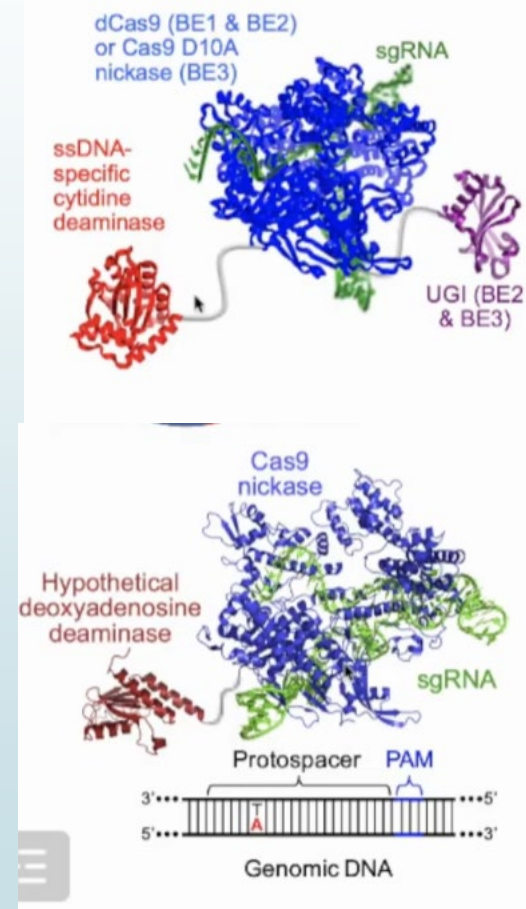


Figure 3

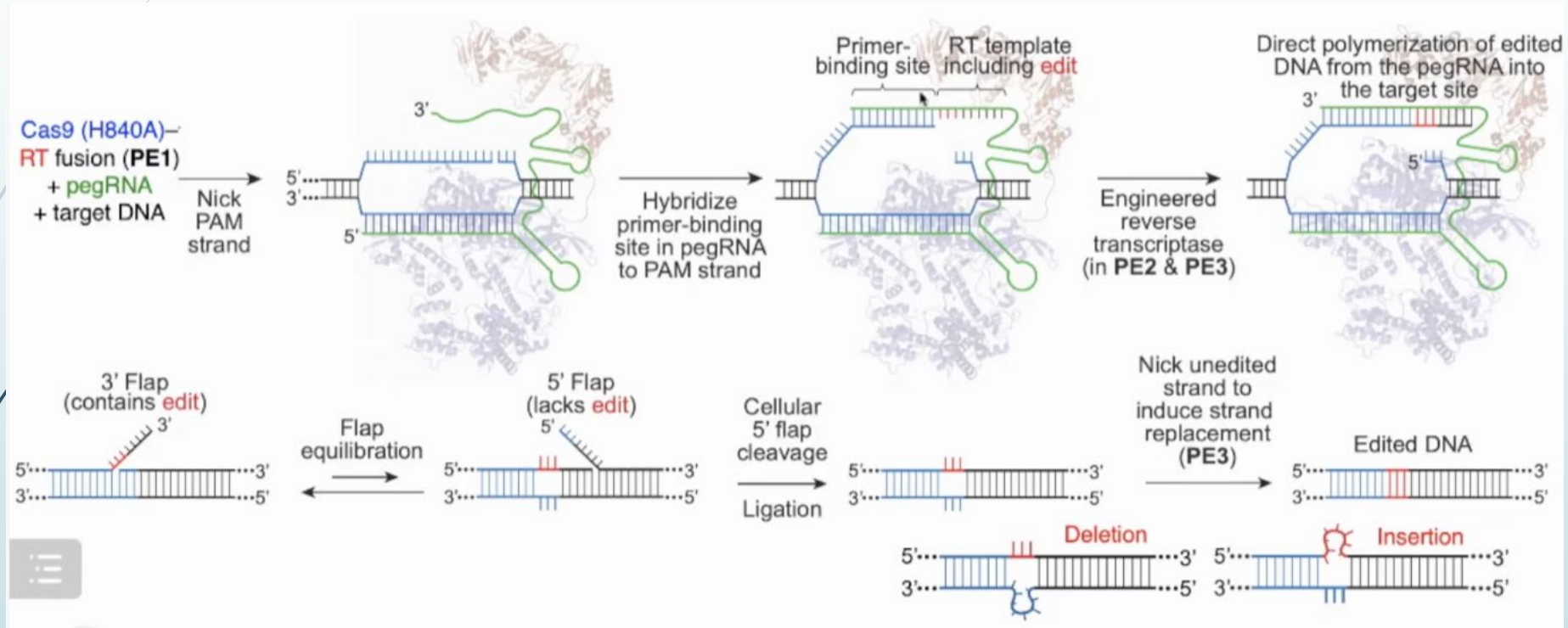
Mechanisms of base editing. (a) CBE-mediated C-to-T base-editing strategy. The deaminases include rAPOBEC1, hAID, PmCDA1, and hA3A. (b) ABE-mediated A-to-G base-editing strategy. The deaminase is the fusion protein ecTadA-ecTadA*. Abbreviations: ABE, adenine base editor; CBE, cytosine base editor; hAID, human activation-induced cytidine deaminase; nCas9, a DNA nickase; PAM, protospacer-adjacent motif; UGI, uracil glycosylase inhibitor.



单碱基编辑系统主要由sgRNA和融合蛋白（nCas9，胞嘧啶脱氨酶，尿嘧啶糖基化酶抑制剂）两部分组成。

CBE: C/G→T/A
ABE: A/T→G/C

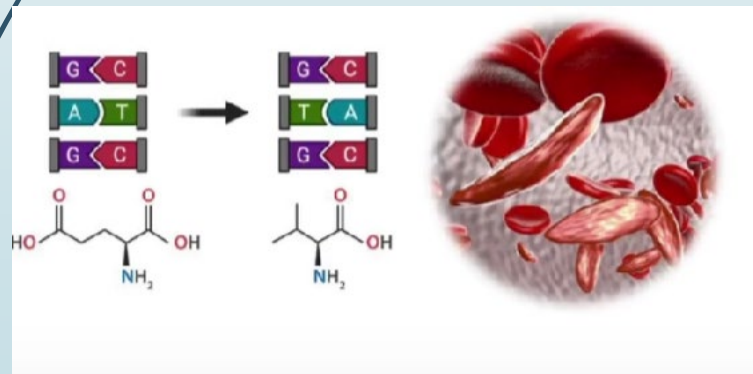
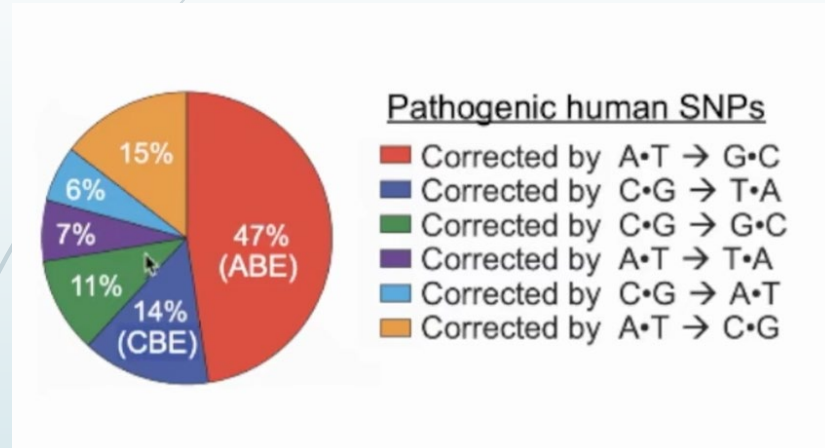
CRISPR/Cas9系统的发展：引导编辑



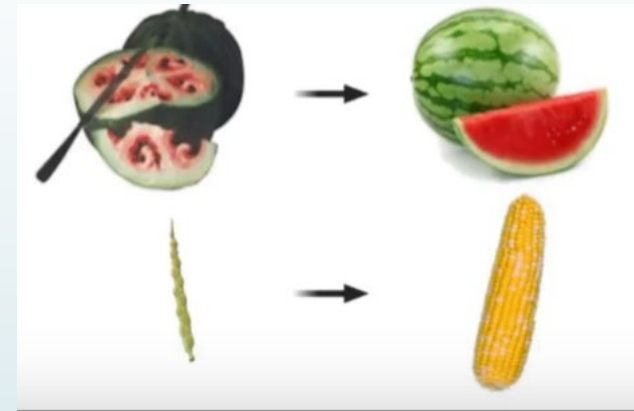
pegRNA (PBS+RTtemplate)
融合蛋白 (nCas9 + M-MLV逆转录酶)

CRISPR/Cas9系统的应用

➤ 疾病治疗



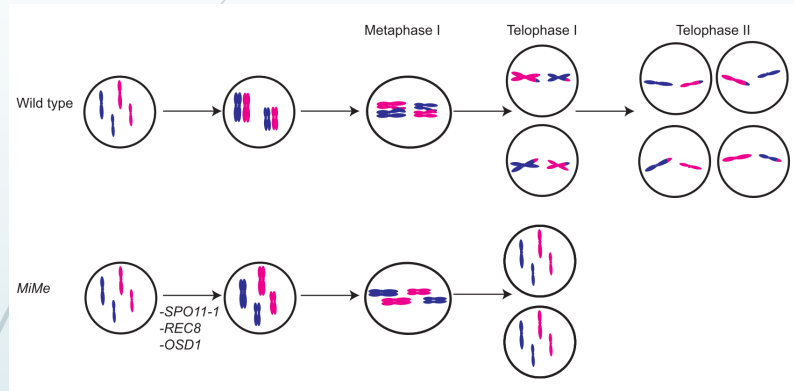
➤ 作物育种



➤ 分子诊断

目前CRISPR的基因组筛选功能应用于筛选对表型有调节作用的相关基因，如对化疗药物或者毒素产生抑制的基因、影响肿瘤迁移的基因以及构建病毒筛选文库对潜在基因进行大范围筛选等。

无融合生殖进展

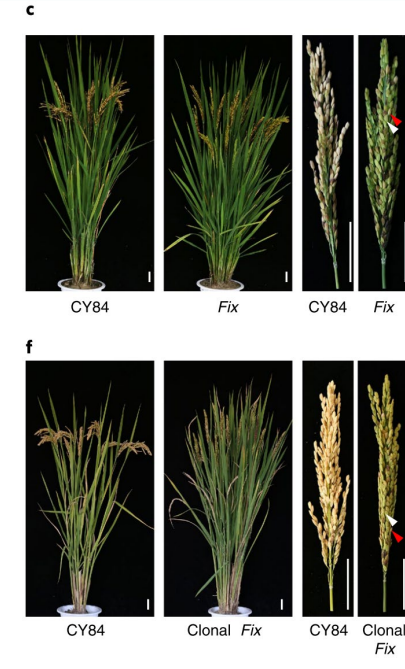


MiMe(mitosis instead of meiosis)



CY84 MiMe

MTL敲除



Gene	OsMATL	BABY BOOM
annotation	花粉特异性磷脂酶	编码一个AP2/ERF转录因子
Function	能诱导水稻形成单倍体	调控胚胎发生的起始
Phenotype of mutant	能诱导单倍体产生, 但结实率下降	卵细胞异位表达可不经受精诱导胚胎形成, 即孤雌生殖。



课程学习感悟

- 通过《实用生物信息技术》这门课的学习，我们对NCBI有了进一步的探索，更全面的了解了NCBI的功能。以及学了PDB和Uniprot数据库的用法等，更系统的了解了生物信息学的内容。
- 本门课程的教学网站ABC为我们研究提供了有力的工具，ABC网站中也有很多好的资源等待进一步的学习。总之，课程结束并不意味着我们的学习也终止，我们在以后的工作中还要进一步的学习和掌握。



中国农业科学院
CHINESE ACADEMY OF AGRICULTURAL SCIENCES



谢谢!