

## 国际著名学术期刊Nature Biotechnology发文 华东师大研发双碱基编辑工具助力基因治疗

2020年06月02日

作者：陶婷婷

基因编辑研究领域全球竞争激烈。6月1日，国际著名学术期刊Nature Biotechnology杂志同期发表了全球四个课题组在基因编辑工具研发领域的四个相近研究成果。

这四个相近成果来自国内外四个课题组（实验室），华东师范大学生命科学学院、上海市调控生物学重点实验室李大力和刘明耀课题组开发的基因编辑新工具（A&C-BEmax），美国麻省总医院基因编辑权威Keith Joung实验室开发的SPACE（Synchronous programmable adenine and cytosine editor），日本东京大学Nozomu Yachie实验室开发的Target-ACEmax以及中国科学院遗传与发育生物学研究所高彩霞、李家洋老师合作开发的STEME（saturated targeted endogenous mutagenesis editors）。这四个基因编辑工具虽然名称各异，但构建方案和功能类似，其中以李大力和刘明耀课题组开发的工具活性最高，编辑窗口更宽泛，具有优势。

该课题组继今年5月在国际著名学术期刊Nature Cell Biology发表论文报道超高活性的胞嘧啶碱基编辑器hyCBEmax后，于6月1日在Nature Biotechnology发表论文，展示又一款基因编辑新工具（A&C-BEmax）。该工具打破现有碱基编辑器作用底物的限制，创新性地开发了新型双功能碱基编辑器，为基础研究和遗传性疾病如 $\beta$ -地中海贫血的治疗提供了新的原创工具体系。

ClinVar数据显示，人类约58%的遗传疾病是由于碱基突变引起的。然而，现有的碱基编辑器只能催化单一类型碱基的转换，无法治疗由于两种碱基突变引起的遗传疾病；单一的产物类型也使其在分子进化、饱和突变筛选中等基础研究方面的应用受到很大的限制。因此，开发能高效地同时产生两类碱基转化的碱基编辑器，既是概念上的创新，也将极大地丰富碱基编辑工具，在基因治疗、物种改良和分子进化等方面都有重要意义。

“同期有国内外四个实验室做类似的工作，我们既感到竞争的激烈，也感到很荣耀，从事基因编辑研究是非常了不起的事情。虽然大家开发了类似的工具，但我们的性能更加优越，工作量也要大很多。”李大力说。

另辟蹊径，同时实现两种碱基高效转换

2018年David Liu实验室开发出ABE7.10碱基编辑器后，课题组通过融合识别不同PAM的Cas9变体，大幅提高了ABE在小鼠和大鼠胚胎中的编辑效率的同时大大地拓宽了可编辑的靶点范围（Protein Cell, 2018）。然而，无论是ABE还是CBE都只能催化单一碱基的转换，在研究ABE的同时，研究团队猜测如果将两种脱氨酶融合到Cas9n，是否能实现两种碱基高效的转换呢？因此，研究团队通过将人类来源的胞嘧啶脱氨酶hAID和人工进化的腺嘌呤脱氨酶ecTadA-ecTadA7.10在Cas9n两端融合，共构建了五种形式的双碱基编辑器，通过哺乳动物细胞测试，发现将胞嘧啶脱氨酶hAID和ABE7.10融合到nCas9(D10A)的N端，展现出A/C同时转换的特性，但此时效率偏低。

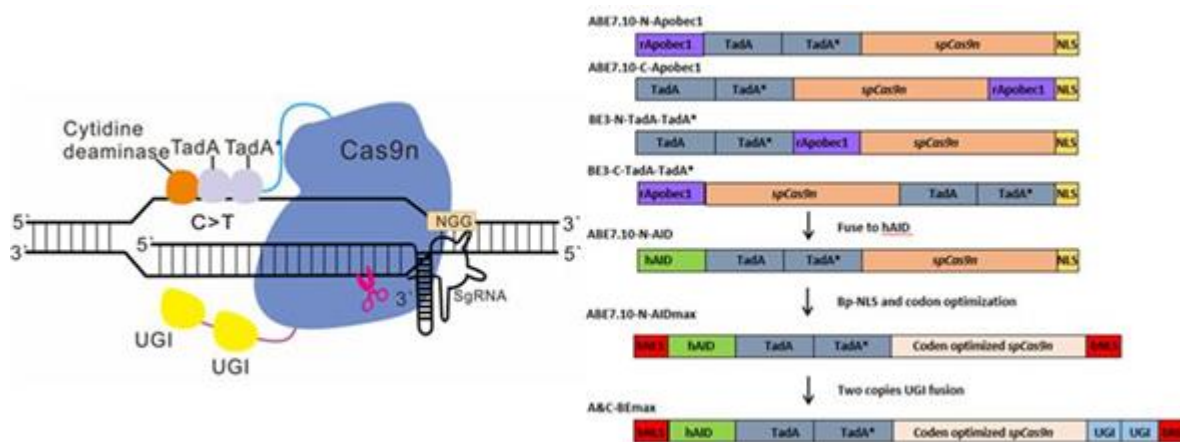


图1. 双碱基编辑器A&C-BEmax的构建和优化

不断优化方案，实现更高编辑效率

为了进一步提高效率，课题组通过密码子、核定位信号、linker序列以及抑制体内尿嘧啶糖基化酶UDG的活性的UGI以融合表达的形式置于nCas9 (D10A)的C端等多轮优化获得了一种高效的A/C同时转换的编辑器，并命名为：A&C-BEmax。为了广泛地评价A&C-BEmax的性能，科研人员在人的HEK293T细胞中测试了28个内源性靶点（其中4个靶点仅包含Cs或As）。测试显示，在同一靶点，A&

C-BE<sub>max</sub>的C>T编辑窗口从C3-C10位扩展到了C2-C17位，在C7-C17位的编辑活性提高了1.9-14倍，而A>G的编辑效率与原来相当或略有降低，但比原ABE在RNA上的脱靶率更低，产物纯度和A/C同时转换活性显著提高，同一等位基因的A和C同时突变效率最高达到30%。

将A&C-BE<sub>max</sub>递送到类红细胞前体细胞中(HUDEP-2)，结果表明，A&C-BE<sub>max</sub>能高效地破坏胎儿期血红蛋白基因HBG1/2启动子区域转录抑制因子BCL11A结合位点(-114C>T或-115C>T)并同时创建新的转录激活因子GATA1的结合位点(-113A>G)，而同时使用ABE和CBE无法在同一等位基因上实现这一改变。与周围单独产生C的编辑细胞相比，A/C同时突变后分化的HUDEP-2细胞中具有更高的HBG表达水平。该工作展示了A&C-BE<sub>max</sub>这一新型双碱基编辑系统对于精准治疗 $\beta$ -血红蛋白病的巨大潜力。通过筛选不同基因型的单克隆细胞的实验也证明A&C-BE<sub>max</sub>可以在单个碱基的维度分析DNA序列对于基因转录的影响。

大量数据表明，与CBE和ABE相比，A&C-BE<sub>max</sub>编辑效率、产物纯度、碱基突变的饱和度及突变类型和A/C同时转换活性显著提高，几乎不产生DNA脱靶，RNA水平的脱靶大幅降低，是一款非常高效、特异且安全的双功能碱基编辑工具，证明了新编辑工具在疾病模型制作、精准基因治疗、动植物遗传育种，耐药性筛选等领域光明的发展前景。


华东师大生命科学学院博士研究生张晓辉、朱碧云和硕士研究生陈亮为该研究的共同第一作者，华东师范大学为第一作者单位，李大力教授为本文通讯作者，刘明耀教授对本课题给予了悉心指导，中科院上海营养与健康研究所杨力研究员给予了计算生物学方面的大力支持。该研究受到了科技部重点研发计划、国家自然科学基金以及上海市教委重大项目等经费的支持。



完成工作的团队主要成员：左起（陈亮，张晓辉，李大力，朱碧云，洪梦佳）

编辑：liuchun 审核：liuchun

证件信息：沪ICP备10219502号 (<https://beian.miit.gov.cn>)

 沪公网安备 31010102006630号 (<http://www.beian.gov.cn/portal/registerSystemInfo?recordcode=31010102006630>)

中国互联网举报中心 (<https://www.12377.cn/>)

Copyright © 2009-2022

上海科技报社版权所有  
上海科荧多媒体发展有限公司技术支持



(//bszs.conac.cn/siteName?method=show&id=5480BDAB3ADF3E3BE053012819ACCD59)