



生命学院孙博课题组与合作者在解析Cas9 蛋白分子机制方面取得重要进展

ON 2019-11-14 文章来源 生命科学与技术学院 CATEGORY 新闻

我校生命学院孙博教授课题组与南京医科大学沈彬教授课题组合作，使用单分子光镊技术揭示Cas9蛋白与目标DNA之间相互作用的重要结合位点，并阐明这些位点在该蛋白与DNA结合、解离等过程中的重要调控作用。北京时间2019年11月14日，相关成果以“The post-PAM Interaction of RNA-guided spCas9 with DNA dictates its target binding and dissociation”为题，在知名学术期刊《科学-进展》(Science Advances)杂志上在线发表。

CRISPR-Cas系统是细菌和古菌在长期演化过程中形成的免疫防御系统，用以对抗入侵的病毒及外源DNA，同时该系统为细菌和古菌提供了获得性免疫。该系统可以识别出外源DNA，并将其切断，从而沉默外源基因的表达。在该系统中，核酸内切酶Cas蛋白识别基因组特定结构前间区序列临近基序(protospacer adjacent motif, PAM)，在指导RNA(guide RNA,gRNA)的指引下匹配目标DNA后激活蛋白的酶切活性。正是由于这种精准的靶向功能，CRISPR/Cas系统已被广泛应用于基因编辑、体内定位成像和疾病模型构建等领域。但是，Cas蛋白存在脱靶效应，随之带来的随机性基因突变会对生命体造成无法预测的影响，这对其未来的应用造成了限制。因此，深入了解Cas蛋白的工作机制并揭示其更为细节的分子机制，对提高其编辑的效率和准确率将会产生积极影响。

研究人员利用单分子DNA解链技术，以近单碱基的空间分辨率检测了来源于酿脓链球菌(*Streptococcus pyogenes*)的II类CRISPR-Cas系统中的spCas9蛋白与目标DNA之间的结合位点及强度(图1)。出人意料的是，在spCas9的20碱基对识别区之外PAM下游存在一个重要的结合位点——后PAM互作(post-PAM interaction)。通过单分子分析和生物化学实验，作者进一步检测后PAM互作对Cas9与DNA之间的结合和酶切的影响，证明后PAM互作对于Cas9蛋白与目标DNA的结合、切割、解离等均有着关键的调节作用。该工作为进一步优化Cas9活性、减少脱靶提供了重要的分子基础及新思路。

本论文中，孙博教授课题组2017级博士生张倩、温丰彩为共同第一作者，孙博教授和沈彬教授为共同通讯作者，上科大为第一完成单位。该研究工作得到了科技部、上海市科委以及上科大科研启动基金的支持。

文章链接:<https://advances.sciencemag.org/content/5/11/eaaw9807>

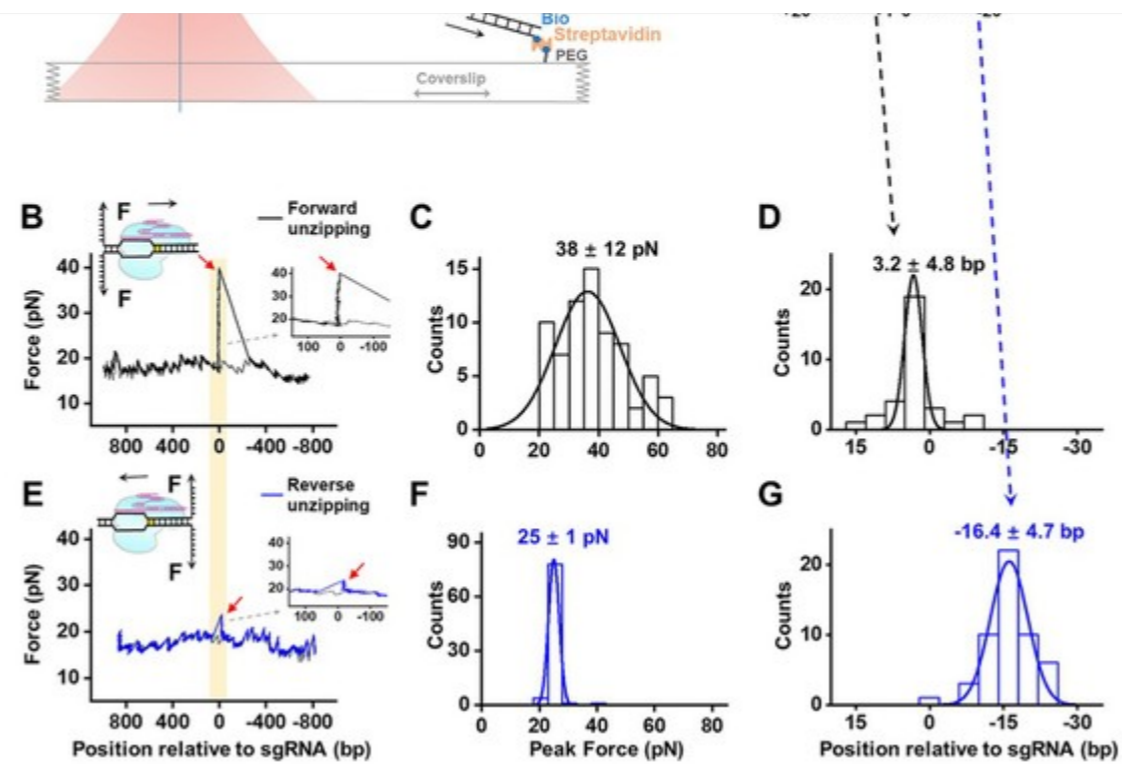


图1: A, Cas9单分子光镊实验示意图; B-G,Cas9/sgRNA/DNA结合位点及强度。

分享到