

吴兆韡 未来三年研究计划

项目名称

微型基因编辑核酸酶的演化与调控机制研究及其应用

研究目标

本研究计划拟深入探究微型基因编辑核酸酶的分子演化规律与功能调控机制，并以此为指导，着力开发新一代小尺寸、高效且精准的基因编辑工具。未来三年将聚焦于三个方面：一、系统性地溯源微型核酸酶的演化轨迹，补完 CRISPR 系统的分子演化理论图谱；二、精准解析微型核酸酶在动态过程中实现高效编辑活性与高保真性的关键调控机制；三、工程化改造微型缺刻酶，并整合逆转录酶功能，构建可在单 AAV 载体中递送的小尺寸高效精准“先导编辑器”（nanoPE），最终实现基因编辑工具在分子尺寸与编辑精度上的双重提升，为遗传疾病治疗提供变革性的底层技术解决方案。

研究背景

CRISPR-Cas 基因编辑技术已成为生命科学研究的革命性工具，但当前广泛使用的 Cas9/Cas12a 等大型核酸酶面临分子尺寸过大(>1300 aa)难以通过单 AAV 载体高效递送、脱靶率高、细胞毒性强以及编辑精度有限等关键瓶颈。我们前期研究通过挖掘并系统表征了分子尺寸仅为 Cas9 约 1/3 的微型 Cas12f 核酸酶家族，证实其可在哺乳动物细胞中实现完整基因编辑功能，突破了“尺寸与活性正相关”的传统认知。通过冷冻电镜解析，揭示了其独特的同源二聚体工作机制及蛋白/RNA 结构功能补偿现象。然而，该领域仍存在三大关键科学问题阻碍微型核酸酶走向更广阔应用：一、CRISPR 系统的完整分子演化路径尚不明晰，缺乏跨越关键演化节点的代表性样本，制约了理性设计与改造；二、尽管催化核心保守，不同微型核酸酶在哺乳动物细胞中的活性差异巨大，其活性与保真性的动态调控机制不清，静态结构分析难以捕获切割过程中的关键动态构象变化；三、目前能实现精准编辑的“先导编辑器”严重依赖大型 nCas9 缺刻酶（尺寸大），传统观点认为仅含单一催化核心的 Cas12 家族微型核酸酶难以有效改造成高效缺刻

酶，导致兼具小尺寸和高精度的下一代工具缺失。

研究内容

1. 溯源微型核酸酶关键演化中间体，阐明 CRISPR 系统的分子演化规律

本项目拟采用“以结构检索结构”的演化中间体挖掘策略，提取代表性微型核酸酶的核心功能结构作为检索对象，利用 Foldseek 和 DALI 在 AFDB50 数据库中进行筛选和比对分析。针对检索获得的候选蛋白，根据分子尺寸、核心结构组成、拓扑关系、缺失/插入结构特征、活性中心结构等信息对候选蛋白进行多维度聚类分析。同时提取潜在的引导 RNA 序列，利用 AlphaFold3 预测核酸酶/RNA/DNA 三元复合体结构，并与已知结构的比对评估候选核酸酶是否具有分子演化代表性。通过核酸酶功能发现和定量表征平台，评估候选核酸酶的功能特征，据此迭代 AlphaFold3 预测。针对存在代表性的候选演化中间体，利用冷冻电镜技术解析其真实复合体分子结构，为阐明 CRISPR 系统的演化路径提供更加详实的直接证据链。

2. 解析微型核酸酶功能动态过程，揭示催化活性与保真性调控关键机制

前期工作发现 Cas12n 核酸酶能够在未经任何工程改造的情况下体现出了与 Cas9/Cas12a 相近的基因编辑活性和更优的保真性，暗示 Cas12n 核酸酶可能具有独特的活性与保真性调控机制。本项目拟通过冷冻电镜技术解析了 Cas12n/sgRNA/DNA 的三元效应复合物结构，通过结构比较分析，鉴定 Cas12n 中具有活性与保真性调控功能的关键结构。拟利用单分子方法解析 Cas12n 核酸酶中 Lid 结构域在 DNA 识别、结合和切割的动态过程。建立“动态构象/功能活性”模型，阐明 Lid 结构域调控活性和保真性的分子机制。

3. 开发微型缺刻酶，构建下一代小尺寸、高效和精准的先导编辑器

本项目拟通过筛选 Cas12 核酸酶催化中心突变体，构建高活性 Cas12 非靶链缺刻酶。通过先导编辑器表征平台，筛选不同逆转录酶融合方式与 pegRNA 分子设计，构建 nanoPE 先导编辑器，并在微生物中测试其功能活性。进一步拟采用引入核酸互作增强突变、融合微型 DNA/RNA 结合蛋白、优化 pegRNA 中的

Scaffold 结构稳定性、引入 pegRNA 化学修饰和筛选高效逆转录酶等优化策略，构建小尺寸、高效和精准的下一代先导编辑器，实现基因编辑工具在尺寸与精度上的双重提升，为遗传病治疗提供变革性解决方案。

预期成果

1. 挖掘多种新型 CRISPR 系统演化中间体分子并解析其效应复合体结构，阐明 CRISPR 分子演化机理。
2. 鉴定微型 Cas12 核酸酶中的活性与保真性调节结构元件，解析其在 DNA 识别、激活和切割过程中的动态构象变化轨迹。
3. 开发小尺寸、高效和精准的下一代先导编辑器。实现基因编辑工具在尺寸与精度上的双重提升，为遗传病治疗提供变革性解决方案。
4. 发表高水平 SCI 论文 2~3 篇，申请专利 2~3 项。