

CAS9 还是 CAS12?

ers
GENOMICS

您与CRISPR/Cas9
的连接

为你的研究选择合适的CRISPR系统

CRISPR基因编辑技术的应用范围不断扩大。快速搜索提及CRISPR的最新文献，可以发现其在植物基因组工程、生物传感、基因组筛查、治疗遗传疾病和诊断感染方面的应用。

CRISPR系统的许多功能来自CRISPR相关蛋白或Cas蛋白，这是一种识别和切割特定DNA片段的分子剪刀。

自从CRISPR被首次发现以来，已经鉴定出六种主要的Cas蛋白类型和超过22个亚型。

最著名的可能是Cas9——最初的基因编辑酶，其变革性的可编程能力于2012年由Emmanuelle Charpentier和Jennifer Doudna首次描述。Cas12是CRISPR家族的最新补充，因其在诊断中的潜在用途而引起了特别的兴趣。

但是Cas9和Cas12之间的主要区别是什么？你如何决定哪一个适合你的研究？

Cas9介绍：最初的CRISPR系统

Cas9蛋白存在于包括化脓性链球菌在内的几种细菌中，其中双RNA引导的DNA内切酶最初进化为切割入侵的外源DNA。

在自然界中，Cas9需要两种RNA来识别和切割其靶点——一种称为CRISPR RNA (crRNA) 的靶向RNA，它是靶DNA的副本，另一种是称为反式激活CRISPR RNA (tracrRNA) 的结构成分，它与crRNA形成与Cas9正确组装和结合所需的复合物。

在他们具有里程碑意义的论文中，Charpentier和Doudna的团队将这两种RNA组合成一种单一的引导RNA，可以引导Cas9在DNA中进行序列特异性切割。

他们还表明，引导RNA的核苷酸序列可以编程为针对任何DNA序列进行切割，从而形成基因编辑系统的基础，该系统后来为他们赢得了2020年的诺贝尔奖。

当它到达目标时，Cas9会在DNA中产生一个双链切割，从而能够插入、删除或修改附近DNA的特定区域。

自2012年发现Cas9以来，已经取得了许多进一步的进展，包括更精确的变异型。例如，Cas9-HF1 (或“HiFi”) 设计用于减少非特异性切割，报告的目标切割准确率高于99.9%。还进行了尺寸优化，2015年在金黄色葡萄球菌中发现了更小版本的Cas9。比化脓性链球菌的原Cas9小1 kb以上，这种较小的Cas9可以包装到单个腺相关病毒 (AAV) 载体中，在大小重要的应用中可能是一种有用的替代方案。

Cas9提供了高保真的基因组编辑，这对研究和商业应用尤其有用。这项技术已经在世界各地的实验室投入使用，产生了近2万份发表的科学文献，并促进了从基因修饰作物和牲畜到食品添加剂和美容产品等新产品的开发。

Cas12 : CRISPR家族的新成员

然而，Cas9并不是唯一的Cas：2015年，Cas12被发现存在于酸性氨基球菌科和乳酸菌科细菌中。这种新的Cas受到了广泛的吹捧，但它与Cas9有何不同呢？

Cas12是一种单一RNA引导的核酸内切酶，这意味着它处理自己的引导RNA，因此只需要crRNA作为靶向，使其整体包装比Cas9更小。为Cas9或Cas12设计靶向crRNA的方法非常简单，是这些系统在基因组编辑中简便性和广泛使用的关键。

据广泛文献报道，Cas9的切割效率略高于Cas12，但在切割效率方面，两者通常都会超过其他基因组编辑系统，如TALEN和锌指核酶。Cas9留下了一个平末端切口，而Cas12留下了一个5'粘末端切口，但这似乎不会对可以完成的编辑类型产生有意义的影响。

一个重要的区别是Cas9和Cas12识别不同的PAM序列——位于所需切割位点旁边的短段靶向DNA——对每个系统的整体效用有着广泛的影响。Cas9只需要一个与其目标相邻的“GG”序列，而最初的Cas12需要序列“TTTV”（其中V是A、C或G），而较新的Cas12衍生物只需要“TT”。

然而，大多数哺乳动物基因富含GC，这意味着不难找到将Cas9靶向特定位置所需的GG。相比之下，典型的富含Cas12 TT的PAM在细菌基因组中更丰富，因此在哺乳动物基因组中的靶向能力更有限。仅基于此，许多研究人员发现Cas9在哺乳动物系统中的使用更灵活

然而，研究人员发现了Cas12的一个独特特性，这一特性有助于基因组编辑之外的另一个应用：单链DNA的非特异性切割。通过检测病毒和癌细胞等来源的少量DNA，这种能力已成为DNA诊断的有力工具。

虽然Cas12可能在诊断等特定应用中具有更大的潜力，但相比Cas9它仍在开发的早期阶段，可能缺乏精确基因组编辑所需的一些准确性。

作为最初发现和最广泛了解的CRISPR核酸酶，Cas9具有更长的研究历史、文献记录和更大的各方投入。因此，Cas9非常适合“开箱即用”，更适合于需要精确性和可靠性的商业和研究应用，尤其是在哺乳动物应用中。

Cas9 与Cas12 - 差别在哪里？

	Cas9	Cas12 (或称为 Cas12a 或Cpf1)
发现时间	2012	2015
Cas家族类型	Type II	Type V
大小	1,000 -1,600 amino acids	1,100 – 1,300 amino acids
PAM序列	G-rich	T-rich
切割类型	Blunt, 3 bp upstream of PAM	Staggered, 18 – 23 bp downstream of PAM
需要的RNA	crRNA + tracrRNA (or single-guide RNA)	crRNA
主要应用领域	哺乳动物基因编辑	非哺乳动物应用和诊断
发表文献数量	大约20,000	大约1,000

理清Cas9和Cas12专利情况

作为一项专利技术，CRISPR的任何商业用途——从内部研发到推向市场——都需要获得专利持有人的许可。这里有点让人迷惑。

CRISPR不仅因为其科学潜力而迅速突出，而且在Charpentier、维也纳大学和加利福尼亚大学（通常被简称为CVC）与麻省理工学院的Broad Institute之间的各种专利争议中，受到了媒体的广泛关注。这两个团体都拥有各种CRISPR技术的知识产权（IP），这些技术必须获得许可才能用于商业用途。

美国在2022年2月做出的最新裁决支持Broad拥有在真核细胞中具体使用单导向CRISPR/Cas9系统的优先权。这引发了引人注目的头条新闻和社交媒体上的讨论，可能会导致一些人错误地认为CVC不再拥有CRISPR/Cas9技术的任何专利权。

事实上，这项最新裁决对CVC被授予美国的任何核心专利没有影响，这些专利涵盖CRISPR/Cas9在所有环境中的成分和用途，包括其在欧盟、中国、日本和其他80多个国家持有的真核细胞。

CVC拥有超过40项美国专利的权利，涵盖一系列用于CRISPR/Cas9基因编辑的成分和方法，并拥有CRISPR/Cas9 DNA修饰方法的欧洲专利，涵盖在细菌、植物、动物和包括人类在内的脊椎动物细胞中的使用。

因此，CRISPR/Cas9的大多数商业研究和应用可能需要从CVC专利授权开始，具体取决于地理区域和具体情况，也可能需要Broad的单独的专利授权。

相比之下，尽管最近围绕Cas9的专利权引发了轩然大波，但Cas12的专利授权和专利前景更加复杂和不明朗。截至2020年，Cas12在全球899个专利家族中拥有专利权，其使用许可情况仍存在争议，完全不清晰。

有几个团体公开宣称创造了Cas12衍生品，且这些衍生品没有任何限制，但考虑到与Cas12在结构上的相似性，以及在该领域申请专利的数量不断增加，以期从知识产权蛋糕中分得一杯羹，这些说法是非常可疑的。

CRISPR技术彻底改变了生命科学，为有助于改变世界的新技术开辟了新的可能性。因此，这也引发了从灵活的生物技术初创企业到规模更大的成熟组织等公司的商业兴趣，这是可以预见的。选择正确的系统并获得适当的专利授权是探索这个充满机遇的新世界的重要第一步。

作为CRISPR/Cas9的全球授权领导者，ERS Genomics是您使用CRISPR/Cas9开发商业或研究应用的第一站，无论您是一家新的生物技术初创企业还是一家成熟的生命科学组织。

我们已经在众多生命科学领域完成了100多项许可协议，并在80多个国家获得了专利权，这是CRISPR/Cas9专利权的最全面组合。

联系我们

今天与我们讨论您的许可需求，让我们经验丰富的团队帮助您利用CRISPR/Cas9的强大功能。