

王飞,李文强,刘洋,等.原核 Argonaute 的应用研究进展[J].华中农业大学学报,2024,43(4):82-93.  
DOI:10.13300/j.cnki.hnlkxb.2024.04.010

## 原核 Argonaute 的应用研究进展

王飞,李文强,刘洋,王珑瑜,陈晚苹,崔佳凯,马立新

省部共建生物催化与酶工程国家重点实验室/工业生物技术湖北省重点实验室/  
湖北大学生命科学学院,武汉 430062

**摘要** 原核生物 Argonautes (pAgos) 是参与细胞防御外来 DNA 入侵的可编程核酸酶。在体外, pAgos 可以结合小的单链核酸 (ssDNA/ssRNA) 向导来识别和切割互补 DNA/RNA。在体内, pAgos 优先靶向多拷贝遗传元件、噬菌体和质粒, 从而抑制入侵核酸的扩增和噬菌体感染。pAgos 作为一类新兴的可编程核酸酶, 比目前应用最为广泛的 CRISPR-Cas 系统更具灵活性, 在生物技术方面展现出巨大的潜力。早期的研究聚焦于嗜热的 pAgo, 目前基于嗜热 pAgos 的主要应用包括分子诊断和体外 DNA 组装。为了推进基于 Ago 的体内生物技术, 如基因编辑的应用, 研究人员的焦点逐渐转移到中温生物来源的 pAgos, 虽然目前 pAgos 还未实现基因组编辑, 但是随着越来越多的 pAgo 被发掘以及研究人员对 pAgos 催化机制的深入研究, 有望开发基于 pAgos 的下一代基因编辑技术。本文总结了已知代表性 pAgos 和基于 pAgos 发展的生物技术, 并简要分析了 pAgos 在原核生物和真核生物体内应用面临的挑战和可能的应对策略。

**关键词** 可编程核酸酶; 原核 Argonaute; 基因编辑; 分子诊断; DNA 组装

**中图分类号** Q78 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2024)04-0082-12

现代生物技术的核心是由多种 DNA 内切酶推动的, 这些酶使我们能够操纵 DNA 以实现各种应用, 包括重组蛋白质的大规模生产<sup>[1-2]</sup>、动植物分子育种<sup>[3]</sup>和绿色能源的开发<sup>[4]</sup>。最早用于 DNA 操作的酶是细菌用来防御外源入侵 DNA 的限制性内切酶<sup>[5]</sup>。此类酶在特定 DNA 序列 (限制性位点) 内或附近切割 DNA, 是基因工程的关键工具, 在重组 DNA 技术、基因组定位和 DNA 测序等领域被广泛应用<sup>[6]</sup>。限制性内切酶识别基因组中常见短序列 (约 6 个核苷酸) 的这种特性限制了它们在精确基因组编辑中的应用。之后的巨核酸酶和具有独特靶点 (约 20 个核苷酸) 的可编程核酸酶, 可以精确地修饰目标基因, 有助于我们理解基因功能, 进行菌株改良, 并治疗遗传疾病<sup>[7]</sup>。这些酶包括大范围核酸内切酶 (如 P I -Sce I)、锌指核酸酶 (ZFNs)、转录激活因子样效应核酸酶 (TALENs) 和 Cas 核酸酶, 在识别和切割靶 DNA 方面具有不同的特异性<sup>[8]</sup>。然而, 这些酶有些具有固定的基序, 限制了目标选择; 有些需要复杂的

蛋白质工程来重新编程<sup>[9-12]</sup>。即使是可以通过 RNA 引导容易重新编程的 Cas 核酸酶, 也必须依赖原间隔序列邻近基序 (PAM) 序列 (通常为 2~7 个核苷酸) 识别和切割双链 DNA (dsDNA)<sup>[12]</sup>。因此, 寻找高度特异性的可编程 DNA 内切酶, 以更灵活地选择 DNA 靶标, 例如不依赖 PAM 的 Cas 核酸酶, 成为亟需解决的问题<sup>[12-13]</sup>。

为此, 人们对细菌和古细菌中的原核生物 (pAgo) 越来越关注, 因为它们具有识别和切割靶 RNA 和/或 DNA 的潜力<sup>[14-15]</sup>。类似于 Cas 核酸酶, 这些酶在短单链 (ss) 核酸引导下能够靶向互补的核酸。由于没有 PAM 序列的限制, 它们比 Cas 核酸酶更加灵活, 因此为处理没有或稀少 PAMs 的 DNA 提供了新的选择。在递送方面, pAgos 还有一个额外优势: 多数 pAgos 使用 ssDNA 作为向导, 相比之下, Cas 核酸酶使用 RNA 作为向导<sup>[14]</sup>。DNA 比 RNA 更稳定且成本更低, 有可能提高蛋白-核酸复合物的递送效率。此外, pAgos 的分子质量比 Cas9 小, 有助于突破

收稿日期: 2024-06-05

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2021YFC2100100); 湖北省自然科学基金杰出青年项目 (2024AFA101); 中国博士后科学基金面上项目 (2023M741100)

王飞, E-mail: wangfei@hubu.edu.cn

通信作者: 马立新, E-mail: malixing@hubu.edu.cn

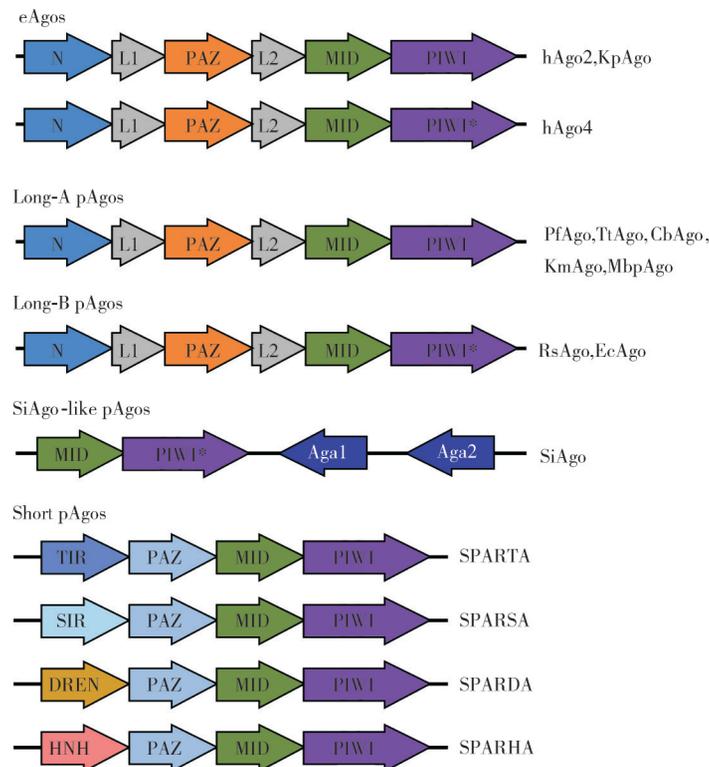
病毒载体包装能力的限制<sup>[16]</sup>。因此,pAgo正在快速被研究和应用于生物技术。本文总结了已表征的典型pAgo蛋白的特性以及基于pAgo的合成生物学应用研究进展。

## 1 Argonaute 的结构特征及功能

### 1.1 Argonaute 的结构特征

Ago蛋白根据其来源可分为2类:真核生物中的Ago蛋白(eAgo)和原核生物(包括细菌和古细菌)中的Ago蛋白(pAgo)<sup>[17]</sup>。eAgo分为2个主要系统发育分支,广泛存在于不同的真核生物谱系中:Ago(eAgo)和PIWI(ePIWI)分支(图1)。相比之下,pAgo的序列和结构域保守性较低<sup>[14,17]</sup>,因此被分为3个主要支系:long A、long B和short pAgo<sup>[14,18]</sup>。大多数Ago都依赖于一种保守的机制:使用小的(14~35个核苷酸)单链核酸作为向导,结合互补的核酸靶

标<sup>[19-28]</sup>。不同进化支系的Ago依赖不同类型的向导核酸(ssDNA或ssRNA),并引导不同的生物学途径。Ago蛋白和向导与靶标的互补性决定了靶标被裂解或是招募和/或激活辅助蛋白<sup>[19,21-22,29-34]</sup>。eAgo和long pAgo具有保守的4个功能域和2个连接器(L):N-L1-PAZ-L2-MID-PIWI(图1)<sup>[17,24,27-28,35]</sup>。N端结构域的保守性最低,其功能尚未完全明确。在一些eAgo中,N结构域在向导加载过程中解开RNA双链<sup>[22]</sup>,而在某些pAgo中,N端结构域有助于稳定向导/靶核酸双链<sup>[23]</sup>。MID和PAZ结构域分别锚定向导核酸的5'-端和3'-端,PIWI结构域则负责靶核酸的结合或裂解。在大多数具有靶裂解功能的Ago中,PIWI结构域通常包含1个“DEDX”催化四联体(其中X可以是D、H或K)<sup>[12,19]</sup>。与eAgo和long pAgo相比,short pAgo仅由MID和PIWI结构域组成,缺乏完整的“DEDX”



eAgo和pAgo主要结构域组成的示意图。N:N-端结构域;L1和L2:连接片段1和2;PAZ:PIWI-Argonaute-Zwille结构域;MID:中间结构域;PIWI:PIWI结构域包含催化DEDX四联体(X可以是D、H或K);PIWI\*:具有不完整DEDX四联体的PIWI结构域。Schematic representation of the phylogenetic tree and domain composition corresponding to the main clades of eAgo and pAgo. N: N-terminal domain; L1 and L2: Linker segments 1 and 2; PAZ: PIWI-Argonaute-Zwille domain; MID: Middle domain; PIWI: P element-induced wimpy testis domain containing the catalytic DEDX tetrad (where X can be H, D, or K) required for target cleavage. PIWI\*: PIWI domain with an incomplete DEDX tetrad.

图1 Argonaute 的结构特征

Fig.1 The structural features of Argonaute proteins

四联体,通常需要与辅助蛋白形成复合物来发挥功能(图1)。

## 1.2 pAgos蛋白质的功能

eAgo通过结合小的单链RNA分子形成RNA诱导的沉默复合物,是RNA干扰(RNAi)过程中的关键组分,参与转录调控和病毒防御<sup>[36]</sup>。pAgo蛋白可能在细胞防御病毒入侵中发挥重要作用,生物信息学分析结果显示,Ago基因通常与宿主防御相关蛋白的编码基因(如限制性内切酶)位于相同的操纵子上<sup>[37]</sup>。还有一些pAgos的编码序列附近包含细菌抗噬菌体防御机制的元件,包括沉默信息调节器2(SIR2)或白细胞介素-1受体(toll and interleukin-1 receptor-like, TIR)结构域等<sup>[18,37-39]</sup>。最近的研究表明,long pAgos参与细菌抵御噬菌体入侵,例如CbAgo(来自*Clostridium butyricum*)<sup>[32]</sup>;TtAgo(来自*Thermus thermophilus*)、PfAgo(来自*Pyrococcus furiosus*)<sup>[31]</sup>和RsAgo(来自*Rhodobacter sphaeroides*)<sup>[23]</sup>能够以不同的方式影响外源质粒的转化效率。此外,pAgos还可以执行其他功能,例如,TtAgo能够与DNA复制末端的DNA片段结合,并招募DNA复制相关蛋白,从而调控DNA复制<sup>[24]</sup>。

TtAgo和PfAgo是目前研究得较为透彻的2种嗜热微生物来源的pAgos。TtAgo通过DNA引导的DNA干扰机制,在体内通常与13~25 nt的小干扰DNA(siDNA)向导分子结合,形成TtAgo-siDNA复合物,能在DNA水平实现外源核酸的切割<sup>[40]</sup>。在某些情况下,TtAgo结合成对的单链DNA向导可使双链DNA断裂<sup>[22]</sup>。TtAgo在体内能以此种方式降解入侵的DNA,降低外源核酸在宿主细胞中的含量。在体外实验中,TtAgo以5'-磷酸化的单链DNA(ssDNA)作为向导,不依赖于PAM序列结合互补的靶DNA,从5'端的第10和第11个碱基之间切割靶核酸。除了靶向切割DNA,TtAgo还表现出微弱的RNA切割活性,在宿主体内可能参与降解入侵DNA转录产生的RNA,但这种功能仍需进一步验证。

PfAgo是目前体外应用研究最为广泛的pAgo,比TtAgo具有更高的反应温度(87~99.9℃)。与其他原核来源的Agos类似,PfAgo同样能降低宿主菌的质粒转化效率,这表明PfAgo也参与抵御外源核酸入侵<sup>[31]</sup>。体外生化性质分析表明,PfAgo在高温下以大于14 nt的5'-磷酸化gDNA为向导,特异性裂解互补的单链DNA。Enghiad等<sup>[41]</sup>在高温条件下利用PfAgo和成对的gDNA实现对双链DNA(dsD-

NA)靶的特异性切割,产生人工设计的黏性末端,因此可作为人工限制性内切酶使用,且具有极高的灵活性。

近年来,研究人员陆续报道了其他来源的long pAgos,包括*Archaeoglobus fulgidus*来源的AfAgo、*Aquifex aeolicus*来源的AaAgo、*Kurthia massiliensis*来源的KmAgo、*Marinitoga piezophila*来源的MpAgo、*Mucilagibacter paludis*来源的MbpAgo、*Marinitoga hydrogenitolerans*来源的MhAgo以及*Thermotoga profunda*来源的TpAgo。其中,AfAgo倾向于以ssDNA作为向导靶向DNA切割,而AaAgo以ssDNA作为向导靶向RNA切割<sup>[37]</sup>。编码MpAgo和TpAgo的基因附近通常也存在CRISPR-Cas酶的基因,表明它们在功能上可能关联<sup>[42]</sup>。大多数pAgos使用5'-磷酸化gDNA切割ssDNA,而MpAgo和TpAgo在向导分子的生成和结合机制上与其他long pAgos有所不同,偏爱使用5'-羟基化gRNA(5'-OH gRNA)切割互补的ssDNA和ssRNA<sup>[42]</sup>。MhAgo和KmAgo是目前已知裂解活性最丰富的2个pAgos,能够利用gDNA和/或gRNA靶向裂解互补的DNA和/或RNA,可能是pAgos向eAgos进化的中间体<sup>[43-44]</sup>。MbpAgo是第1个从耐冷菌中发现的偏爱以gDNA裂解RNA的pAgo,在30~55℃范围内具有活性,这提示耐冷或嗜冷菌也可作为中高温生物活性酶的重要来源<sup>[45]</sup>。通过对pAgos宿主的基因组进行分析,研究人员发现,一些long pAgos的编码基因与Schlafen样ATP酶的基因位于同一表达盒,也有一些pAgos编码基因附近伴随着Cas4样、Mrr、Sir2或磷脂酶D核酸酶的基因<sup>[18]</sup>,这些酶可能在pAgo向导的形成、靶核酸的解链或降解等过程发挥功能。随着对pAgos研究的深入,越来越多不同类型的pAgos的功能和性质被表征,为基于pAgos的生物技术的发展奠定了基础<sup>[22,31,38,42-49]</sup>(表1)。

## 2 pAgos的体外应用研究

pAgos能够利用短的单链DNA(ssDNA)或RNA作为向导,靶向并在特定位点裂解互补的靶核酸,这一特性为基于pAgos的生物技术的发展奠定了基础。近年来,研究人员以pAgos为核心开发了多种新型核酸检测技术和DNA组装技术。

### 2.1 基于pAgos的核酸检测技术

目前,基于pAgos的核酸检测技术主要是基于极端嗜热的PfAgo和嗜热的TtAgo。本文对基于这2

表1 具有催化活性的原核 Ago 催化性质

Table 1 Characteristic of pAgos with catalytic activity

| 名称<br>Name | 宿主<br>Host                           | 向导<br>Guide | 靶标<br>Target | 二价离子<br>Divalent ions   | 反应温度/°C<br>Temperature | 参考文献<br>Reference |
|------------|--------------------------------------|-------------|--------------|---|------------------------|-------------------|
| CbAgo      | <i>Clostridium butyricum</i>         | P-DNA       | DNA          | Mg <sup>2+</sup> , Mn <sup>2+</sup> , Co <sup>2+</sup>                    | 30~55                  | [38-39]           |
| CpAgo      | <i>Clostridium perfringens</i>       | P-DNA       | DNA          | Mg <sup>2+</sup> , Mn <sup>2+</sup>                                       | 37~50                  | [46]              |
| IbAgo      | <i>Intestinibacter bartlettii</i>    | P-DNA       | DNA          | Mg <sup>2+</sup> , Mn <sup>2+</sup>                                       | 37~70                  | [46]              |
| KmAgo      | <i>Kurthia massiliensis</i>          | OH-DNA      |              |   |                        |                   |
|            |                                      | P-DNA       | DNA          | Mn <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> , Co <sup>2+</sup>                    | 37~55                  | [44]              |
|            |                                      | OH-DNA      | RNA          |   |                        |                   |
| LrAgo      | <i>Limothrix rosea</i>               | P-RNA       |              |   |                        |                   |
|            |                                      | P-DNA       | DNA          | Mn <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> , Co <sup>2+</sup>                    | 50~54                  | [38]              |
| MbpAgo     | <i>Mucilaginibacter paludis</i>      | P-DNA       | RNA          | Mn <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup>                                       | 30~55                  | [45]              |
|            |                                      | OH-DNA      |              |   |                        |                   |
|            |                                      | OH-DNA      |              |   |                        |                   |
| MhAgo      | <i>Marinitoga hydrogenitolerans</i>  | P-DNA       | DNA          | Mn <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> , Co <sup>2+</sup> , Ni <sup>2+</sup> | 30~75                  | [43]              |
|            |                                      | P-RNA       | RNA          |   |                        |                   |
|            |                                      | OH-RNA      |              |   |                        |                   |
| MfAgo      | <i>Methanocaldococcus fervens</i>    | OH-DNA      | DNA          | Mn <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> , Co <sup>2+</sup>                    | 80~90                  | [47]              |
|            |                                      | P-RNA       |              |   |                        |                   |
| MjAgo      | <i>Methanocaldococcus jamaeschii</i> | P-DNA       | DNA          | Mg <sup>2+</sup>  | 85~95                  | [48]              |
|            |                                      | OH-DNA      |              |   |                        |                   |
|            |                                      | OH-RNA      |              |   |                        |                   |
| MpAgo      | <i>Marinitoga piezophila</i>         | OH-DNA      | DNA          | Mn <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> , Ni <sup>2+</sup>                    | 60                     | [42]              |
|            |                                      | P-DNA       | RNA          |   |                        |                   |
| PfAgo      | <i>Pyrococcus furiosus</i>           | P-DNA       | DNA          | Mn <sup>2+</sup> , Co <sup>2+</sup>                                       | 90.0~99.9              | [31]              |
| TceAgo     | <i>Thermobrachium celere</i>         | P-DNA       | DNA          | Mn <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> , Co <sup>2+</sup> , Ca <sup>2+</sup> | 40~60                  | [49]              |
|            |                                      | OH-DNA      |              |   |                        |                   |
| TtAgo      | <i>Thermus thermophilus</i>          | P-DNA       | DNA          | Mn <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup>                                       | 50~75                  | [22]              |
|            |                                      |             | RNA          |   |                        |                   |

种 long pAgos 的核酸检测技术进行了总结与分析(表2)。

1) 基于 TtAgo 的核酸检测技术。TtAgo 是目前催化机制与结构信息最为清晰的 pAgo<sup>[22]</sup>, Song

等<sup>[50]</sup>利用 TtAgo 的单碱基专一性发展了名为 NIVI-GATER(nucleic acid enrichment via DNA guided Argonaute from *Thermus thermophilus*)的低丰度核酸富集/检测技术(图 2A)。用 TtAgo 特异性切割检测体

表2 基于 long pAgos 的核酸检测技术比较

Table 2 Comparison of different long pAgo-based diagnosis platforms

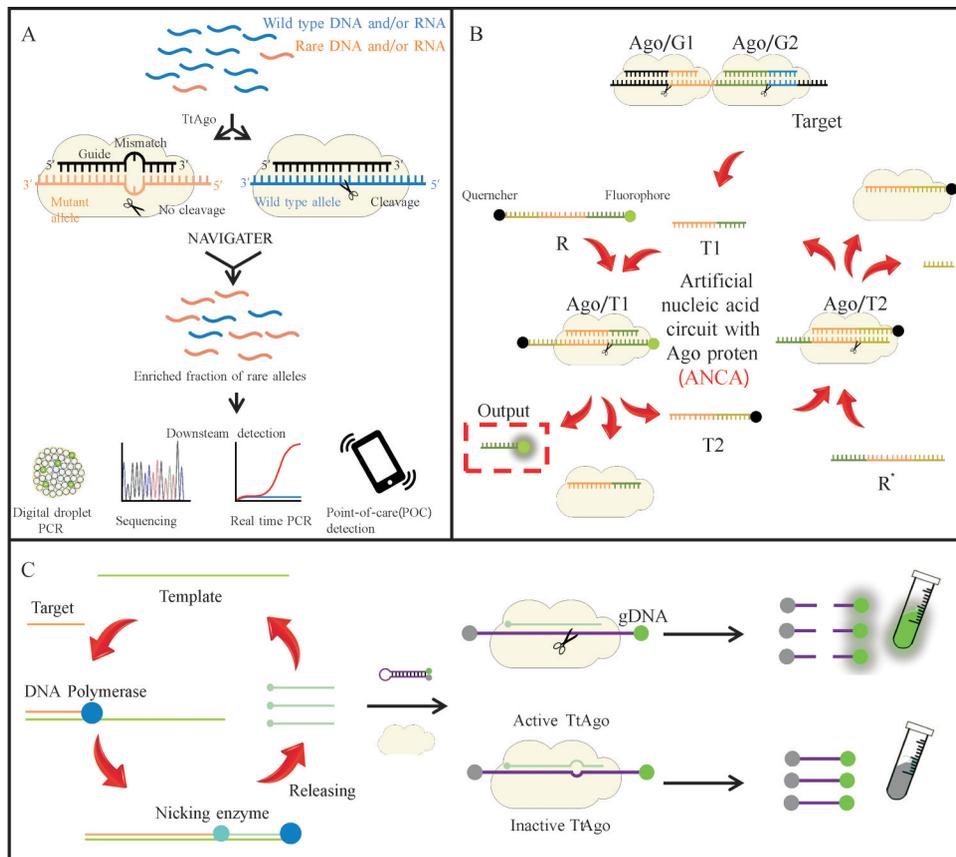
| 检测技术<br>Diagnosis techniques | Ago   | 灵敏度<br>Sensitivity           | 优点<br>Advantages            | 缺点<br>Shortcomings         |
|------------------------------|-------|------------------------------|-----------------------------|----------------------------|
| NAVAGITER                    | TtAgo | 0.01% 突变                     | 多重检测、灵敏度高                   | 基因组 DNA 富集效率低              |
| TEAM                         | TtAgo | 1.0×10 <sup>-18</sup> mol/L  | 多重检测、速度快、灵敏度高               | 开盖操作有污染风险、反应体系复杂、产物量易受模板影响 |
| ANCA                         | TtAgo | 1.44×10 <sup>-16</sup> mol/L | 无需对靶进行与扩增                   | 耗时长、灵敏度偏低                  |
| PAND                         | PfAgo | 1 拷贝/反应                      | 多重检测、单碱基专一性、高灵敏度、qPCR 仪利用率高 | 开盖操作有污染风险                  |
| PLCR                         | PfAgo | 1.0×10 <sup>-17</sup> mol/L  | 多重检测、单碱基专一性、准确度高            | 耗时长、灵敏度偏低                  |
| USPCRP                       | PfAgo | 1.0×10 <sup>-17</sup> mol/L  | 可检测极短靶、多通道检测、单碱基专一性、准确度高    | 耗时长、灵敏度偏低                  |
| A-Star                       | PfAgo | 0.01% 突变                     | 高效富集突变体、灵敏度高                | 需要专门的仪器和操作人员               |
| MULAN                        | PfAgo | 5 拷贝/反应                      | 一管法检测、灵敏度高、多重检测             | LAMP 扩增易产生气溶胶污染            |

系中野生型核酸,从而对突变型起到富集作用,该技术可将癌症标志物 KRAS G12D 富集 60 倍,将肽核酸(PNA)和异核酸(XNA)检测灵敏度提高约 100 倍,能够从胰腺癌患者的血液样本中实现低频(< 0.01%, 突变等位基因约 1 拷贝)的检测。

分析 microRNA(miRNA)的表达水平不仅能为癌症的生理和病理研究提供重要的生物学信息,而且能够应用于肿瘤的早期筛查、监测和预后, Lin 等<sup>[51]</sup>开发了基于 TtAgo 的肿瘤多重 miRNA 检测平台——TEAM (*Thermus thermophilus* Argonaute-assisted exponential isothermal amplification for multiplex detection)。TEAM 方法利用 EXPAR 产生的大量扩增子作为 gDNA,指导 TtAgo 高效、精准地剪切

分子信标,从而实现双重信号放大检测 miRNA(图 2B)。该方法在  $10^{-1} \sim 10^{-8}$  mol/L 浓度范围内具有良好的线性关系,双重信号放大策略使其检测灵敏度达到  $1.0 \times 10^{-18}$  mol/L。通过设计不同通道的分子信标,TEAM 可实现四重 miRNA 的同步检测和高度同源性的 miRNA 家族成员的精准分型。

Jang 等<sup>[52]</sup>通过引入人工核酸电路和连续的 Ago 自催化反应实现一步式、非扩增的等温 DNA 检测 ANCA (artificial nucleic acid circuit with Ago protein, ANCA),利用该技术成功检测了产碳青酶烯类肺炎克雷伯杆菌 (carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*, CPKP),该方法可实现 CPKP 的简单、快速、准确诊断,有助于预防感染(图 2C)。



A: NAVIGATER<sup>[50]</sup>; B: TEAM<sup>[51]</sup>; C: ANCA<sup>[52]</sup>.

图 2 基于 TtAgo 的核酸检测方法

Fig.2 TtAgo-based nucleic acid detection method

2) 基于 PfAgo 的核酸检测方法。PfAgo 是另外一种生化性质和结构研究较为明确且被广泛使用的 pAgo。He 等<sup>[53]</sup>发现, PfAgo 能够在大于 14 nt 的 gDNA 介导下特异性切割 dsDNA 中的 1 条链, 释放出新的 5'-磷酸末端 ssDNA, 这些新生 5'-磷酸末端 ssDNA 与反应体系中空 PfAgo 蛋白结合靶向互补

的 DNA, 启动第二轮切割, 裂解体系中互补的荧光探针, 产生荧光信号, 通过荧光信号指示目标核酸的存在。基于这一“传递切割”原理, 结合 PCR 扩增技术, He 等<sup>[53]</sup>首次将 pAgo 蛋白应用于核酸检测领域, 开发了 PAND (PfAgo mediated nucleic acid detection, PAND) 检测技术(图 3A)。该技术可实现 HPV 多亚

型检测,并区分单碱基突变。在新冠疫情暴发后,Wang等<sup>[54]</sup>优化了PAND技术,只需1条gDNA即可检测目标核酸,并建立了能够高灵敏度、高准确度、快速多通道检测SARS-COV2的方法——SARS-COV2-PAND(图3B)。Ye等<sup>[55]</sup>将环介导等温扩增(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)与PfAgo联用,建立了新型多重快速核酸检测平台——MULAN(multiplex argonaute-based nucleic acid detection, MULAN),实现了对新冠及流感病毒样本的高灵敏度、高特异性和快速便携式检测。

研究表明,当向导核酸的长度低于14 nt时,无法介导PfAgo对靶核酸进行有效切割,Wang等<sup>[56]</sup>基于这一特性,结合连接酶链式反应,开发了PLCR核酸检测技术(pfago coupled with modified ligase chain reaction for nucleic acid detection, PLCR)。在该方法中,利用连接酶以待测靶核酸为模板,将2条短于14 nt的ssDNA(其中1条具有5'-P修饰)连接起来,作为PfAgo的gDNA,靶向裂解体系中的分子信标(图3C)<sup>[56]</sup>。He等<sup>[57]</sup>利用PfAgo对gDNA长度的限制,将极短PCR(ultrashort PCR, usPCR)扩增与PfAgo结合,开发了USPCR检测技术(nucleic acid detection via combination of ultrashort PCR and pyrococcus furiosus Argonaute, USPCR)。该方法将2条短于14 nt的ssDNA(其中1条具有5'-P修饰)通过极短PCR进行延伸和扩增,其中带有5'-P修饰的DNA产物作为gDNA,靶向裂解荧光探针(图3D)<sup>[57]</sup>。USPCR的检测灵敏度为10 amol/L并能区分单碱基的差异,He等<sup>[57]</sup>利用该技术实现了对SARS-CoV-2、MERS-CoV和SARS-CoV的准确检测。

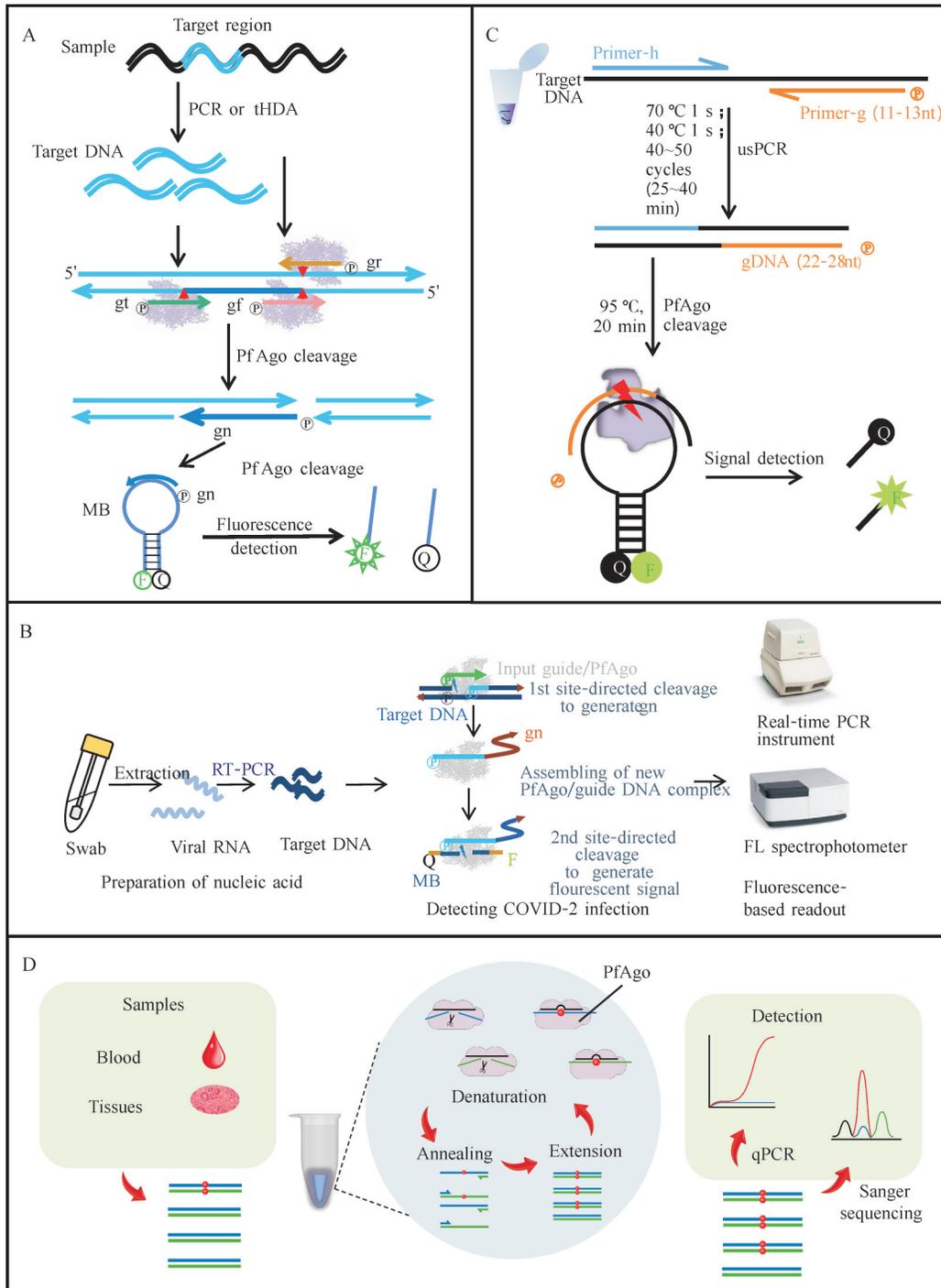
PfAgo的切割活性受到gDNA与靶核酸配对的影响,gDNA与靶核酸某些位点的错配会导致PfAgo无法对靶核酸进行切割。Liu等<sup>[58]</sup>基于此特性发展了“一管式”多重核酸富集和检测的技术:A-Star(ago-directed specific target enrichment and detection),实现了血液等样本中低丰度突变基因的高效、多重富集和检测(图3E)。A-Star能够检测和定量0.01%的稀有突变,富集效率高达5 500倍。与传统方法相比,A-Star大大提高了稀有变异等位基因的检测灵敏度,在基因诊断及遗传疾病治疗等领域具有广阔的应用前景。与基于CRISPR/Cas系统的检测技术相比,基于pAgo的检测技术具有不依赖PAM序列,可以检测任意靶标、以DNA为向导,更高稳定、成本更低,以及仅用1种Ago就能实现多重检测的优

点,具有发展为“下一代”检测技术的潜力<sup>[59]</sup>。

3)基于Short Ago的核酸检测方法。目前核酸检测领域应用的TtAgo和PfAgo都属于long pAgo,short Ago也有发展为核酸检测工具的潜力。Koopal等<sup>[21]</sup>发现了1种新的short pAgo-TIR-APAZ(SPARTA)。SPARTA由不具有催化活性的短pAgo和TIR-APAZ蛋白共同形成异二聚体复合物,其中短的pAgo作为“传感器”,在gRNA的引导下结合互补的ssDNA靶,在与靶DNA结合后,激活TIR-APAZ“效应体”的NAD(P)酶活性。在体内,SPARTA靶向入侵的质粒DNA,导致细胞NAD<sup>+</sup>和NADP<sup>+</sup>的耗竭,进而导致细胞死亡。研究人员利用这一特性开发了新的检测方法,在SPARTA检测ssDNA的体系中,通过引入与靶ssDNA互补的gRNA,以及 $\epsilon$ -NAD(NAD<sup>+</sup>的类似物),当靶ssDNA存在时,SPARTA被激活,随后将 $\epsilon$ -NAD转化为荧光 $\epsilon$ -ADPR。SPARTA也可以改造成检测dsDNA,可以通过靶扩增提高灵敏度(图4A)<sup>[21]</sup>。Lu等<sup>[60]</sup>也发展了基于另外一种来源于*Thermocrispum municipal*的short Ago(TmuREAgo)及其相关蛋白DUF4365-APAZ的核酸检测技术(图4B)。虽然short Ago的检测方法仍处于概念阶段,但它们也有发展为新型即时检测(POCT)技术的潜力。

## 2.2 基于pAgos的DNA装配技术

DNA组装是基础研究、基因工程和合成生物学的基础技术<sup>[61]</sup>。通常需要对多个DNA模块进行精确切割和组装,用以在宿主细胞中构建新的代谢途径。传统的限制性内切酶切割和连接酶连接方法依赖于DNA片段中的特定序列,既费时又昂贵。而且,在处理大DNA片段或高通量DNA组装时,难以找到独特的限制性内切酶识别位点。pAgos通过目标DNA与向导RNA或DNA的碱基配对来切割DNA链,因此能够识别和切割任意感兴趣的DNA序列。2017年,Enghiad等<sup>[41]</sup>开发了基于PfAgo的人工限制性内切酶(AREs),利用5'-P-gDNA将PfAgo引导到目标位点,并在高温下(>87 °C)进行精确切割。这些AREs能够识别和切割任意序列的DNA,并产生确定长度的黏性末端,从而更容易组装和克隆大分子DNA。2022年,Enghiad等<sup>[62]</sup>进一步开发了PlasmidMaker平台用于大片段DNA的组装。该平台包括:基于PfAgo或其变体的人工限制性内切酶的DNA组装方法、用于质粒设计的用户友好界面,以及简化工作流程并与机器人系统集成的终端(图



A: PAND<sup>[53]</sup>; B: SARS-COV2-PAND<sup>[54]</sup>; C: USPCR<sup>[57]</sup>; D: A-Star<sup>[58]</sup>.

图3 基于PfAgo的核酸检测方法

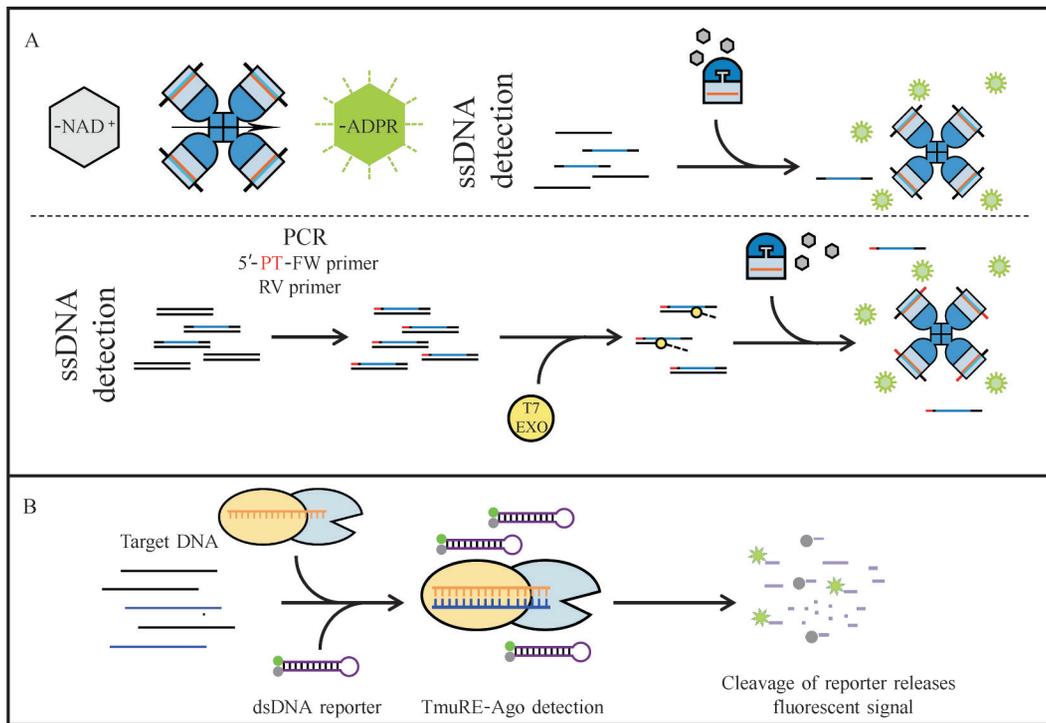
Fig.3 PfAgo-based detection of nucleic acids

5)。利用该平台,研究人员构建了6个不同模式生物的101个质粒,大小为5~18 kb。

### 2.3 基于pAgo的基因编辑技术

过去10年,基因组编辑已经成为一种变革性的生物技术,广泛应用于包括基因治疗、动植物育种、工业菌株构建等领域,推动了合成生物学的快速发

展<sup>[63]</sup>。pAgo作为一种核酸引导的可编程核酸酶,具有发展为新型基因编辑工具的潜力。2016年,Gao等(韩春雨团队)报道了1种基于NgAgo-gDNA的基因组编辑技术<sup>[64]</sup>。他们证明来自*N. gregoryi*的NgAgo是一种DNA引导的可编程核酸酶,可用于编辑哺乳动物细胞的基因组DNA。NgAgo用于基因



A: SPARTA [21]; B: TmuREAgO [60].

图4 基于 short pAgo 的核酸检测方法

Fig.4 Nucleic acid detection method based on short pAgo

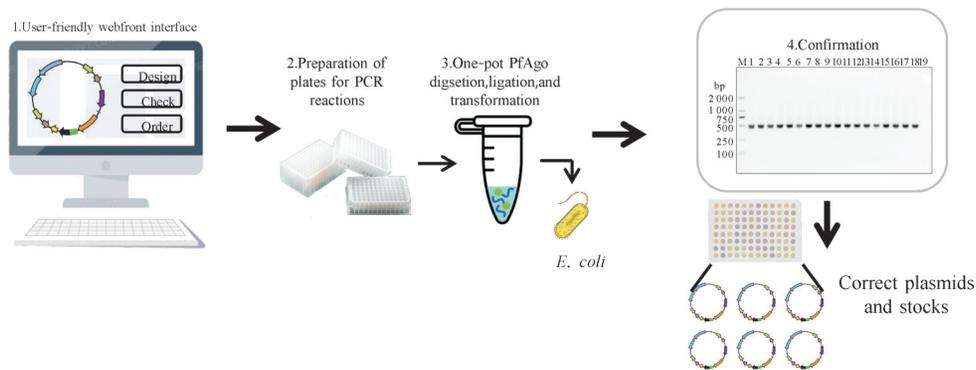


图5 基于 PfAgo 的 PlasmidMaker DNA 组装平台

Fig 5 PlasmidMaker DNA assembly platform based on PfAgo

组编辑的优点在于该系统不受 PAM (protospacer adjacent motif) 序列的限制,理论上可对基因组任意位点进行编辑。此外,NgAgo 对向导和靶核酸之间的错配具有低耐受性,且能高效编辑富含 GC 的基因组区域。该技术报道后受到国内外研究人员的广泛关注,然而许多实验室无法再现该研究的结果,韩春雨团队也因此撤回相关论文。随后, Qi 等 [65] 发现 NgAgo 能通过 gDNA 介导斑马鱼的特定基因表达水平的下调,由于无催化活性的 NgAgo 突变体 (DEDX 四联体突变) 也能引起基因表达水平的下调,研究人员推测这种下调是 NgAgo-gDNA 复合物结合靶

DNA 诱导转录沉默的结果,同时该研究也没有发现 NgAgo 具有基因编辑的能力。此外, Wu 等 [66] 证明 NgAgo-gDNA 能诱导前基因组 RNA (pregenomic RNA) 的加速降解,从而在细胞水平上抑制乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 的复制。2019 年, Fu 等 [67] 发现 pAgos (包括 NgAgo、TtAgo、PfAgo 和 AaAgo) 能够增强巴斯德氏菌和大肠杆菌中依赖于同源重组的基因插入或缺失的效率,并且这种增强不依赖于 pAgos 的核酸切割活性,该机制的发现揭示了 1 种用于增强细菌同源序列引导基因编辑的新系统。2021 年, Qu 等 [68] 报道了 NgAgo-gDNA 在体内

的基因编辑效应,并探究了其切割RNA的位点。Esyunina等<sup>[69]</sup>发现CbAgo能结合质粒衍生的gDNA,靶向宿主的染色体,并能增强质粒与染色体DNA的重组,并且这种增强依赖于CbAgo的催化活性。这些研究表明pAgos蛋白质具备基因编辑方面的潜力,然而将其发展为成熟的基因组编辑工具仍然需要对pAgos蛋白质的催化机制进行深入研究。

### 3 展望

相比于CRISPR/Cas系统,pAgos在生物技术方面具有巨大的潜力,尤其在目标选择的灵活性、细胞传递效率和知识产权方面具有潜在的竞争优势。这些优势使得嗜热pAgos广泛应用于体外分子诊断和DNA组装领域<sup>[63,70-71]</sup>。为了充分发挥pAgos的潜力,特别是在细胞内的应用,需要发掘在中温条件下具有高活性的pAgos,并阐明其功能关键细节,如底物拓扑偏好、DNA/RNA序列偏好以及最佳操作温度等。真核生物中缺乏pAgos活性的报道,可能是因为体内难以形成有效的pAgo-guide复合物。通过对pAgo或guide进行工程化设计可能解决这一问题。此外,该领域的另一个关键挑战是如何有效递送或生成pAgo靶向的ssDNA向导,这对于将pAgo技术扩展到基因组规模的文库至关重要。一旦克服这些障碍,pAgos将不仅用于简单的DNA体外切割,还可以发展出丰富的体内应用技术。与基于Cas的干扰和激活一样,失去切割活性的pAgos也可以用于基因表达调控、表观基因组编辑和体内成像等<sup>[72-74]</sup>。与CRISPR-Cas不同,pAgos不受PAM序列限制,能够更灵活、精确地结合靶核酸,从而更有效地调控细胞表型。通过pAgo切割事件介导的基因编辑将为这一领域提供一个强大的替代方案,可能在癌症研究、疾病治疗、动物模型构建和动植物育种等多个领域产生重大科学影响。

#### 参考文献 References

- [1] DINGERMAN T. Recombinant therapeutic proteins: production platforms and challenges[J]. *Biotechnology journal*, 2008, 3(1):90-97.
- [2] REICHERT J M, ROSENSWEIG C J, FADEN L B, et al. Monoclonal antibody successes in the clinic[J]. *Nature biotechnology*, 2005, 23(9):1073-1078.
- [3] TOENNIESSEN G H, O' TOOLE J C, DEVRIES J. Advances in plant biotechnology and its adoption in developing countries[J]. *Current opinion in plant biology*, 2003, 6(2):191-198.
- [4] LYND L R, LASER M S, BRANSBY D, et al. How biotech can transform biofuels[J]. *Nature biotechnology*, 2008, 26(2):169-172.
- [5] DANNA K, NATHANS D. Specific cleavage of simian virus 40 DNA by restriction endonuclease of *Hemophilus influenzae* [J]. *PNAS*, 1971, 68(12):2913-2917.
- [6] ROBERTS R J. How restriction enzymes became the workhorses of molecular biology[J]. *PNAS*, 2005, 102(17):5905-5908.
- [7] LI H Y, YANG Y, HONG W Q, et al. Applications of genome editing technology in the targeted therapy of human diseases: mechanisms, advances and prospects[J/OL]. *Signal transduction and targeted therapy*, 2020, 5(1):1 [2024-06-05]. <https://doi.org/10.1038/s41392-019-0089-y>.
- [8] GUHA T K, WAI A, HAUSNER G. Programmable genome editing tools and their regulation for efficient genome engineering[J]. *Computational and structural biotechnology journal*, 2017, 15:146-160.
- [9] CARROLL D. Genome engineering with zinc-finger nucleases[J]. *Genetics*, 2011, 188(4):773-782.
- [10] NEMUDRYI A A, VALETIDINOVA K R, MEDVEDEV S P, et al. TALEN and CRISPR/Cas genome editing systems: tools of discovery[J]. *Acta naturae*, 2014, 6(3):19-40.
- [11] GIMBLE F S, WANG J. Substrate recognition and induced DNA distortion by the *PI-SceI* endonuclease, an enzyme generated by protein splicing[J]. *Journal of molecular biology*, 1996, 263(2):163-180.
- [12] COLLIAS D, BEISEL C L. CRISPR technologies and the search for the PAM-free nuclease[J/OL]. *Nature communications*, 2021, 12(1):555 [2024-06-05]. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20755-1>.
- [13] LI Y R, LIAO D, KOU J, et al. Comparison of CRISPR/Cas and Argonaute for nucleic acid tests[J]. *Trends in biotechnology*, 2023, 41(5):595-599.
- [14] RYAZANSKY S, KULBACHINSKIY A, ARAVIN A A. The expanded universe of prokaryotic argonaute proteins[J/OL]. *mBio*, 2018, 9(6):e01935-18 [2024-06-05]. <https://doi.org/10.1128/mBio.01935-18>.
- [15] HEGGE J W, SWARTS D C, VAN DER OOST J. Prokaryotic Argonaute proteins: novel genome-editing tools? [J]. *Nature reviews microbiology*, 2018, 16(1):5-11.
- [16] CHEW W L, TABEBORDBAR M, CHENG J K W, et al. A multifunctional AAV-CRISPR-Cas9 and its host response[J]. *Nature methods*, 2016, 13(10):868-874.
- [17] SWARTS D C, MAKAROVA K, WANG Y L, et al. The evolutionary journey of Argonaute proteins[J]. *Nature structural & molecular biology*, 2014, 21(9):743-753.
- [18] MAKAROVA K S, WOLF Y I, VAN DER OOST J, et al. Prokaryotic homologs of Argonaute proteins are predicted to function as key components of a novel system of defense

- against mobile genetic elements[J/OL]. *Biology direct*, 2009, 4: 29 [2024-06-05]. <https://doi.org/10.1186/1745-6150-4-29>.
- [19] OZATA D M, GAINETDINOV I, ZOCH A, et al. PIWI-interacting RNAs: small RNAs with big functions[J]. *Nature reviews genetics*, 2019, 20: 89-108.
- [20] PARK M S, SIM G, KEHLING A C, et al. Human Argonaute 2 and Argonaute 3 are catalytically activated by different lengths of guide RNA [J]. *PNAS*, 2020, 117 (46) : 28576-28578.
- [21] KOOPAL B, POTOCHNIK A, MUTTE S K, et al. Short prokaryotic Argonaute systems trigger cell death upon detection of invading DNA[J]. *Cell*, 2022, 185(9): 1471-1486.
- [22] SWARTS D C, JORE M M, WESTRA E R, et al. DNA-guided DNA interference by a prokaryotic Argonaute[J]. *Nature*, 2014, 507(7491): 258-261.
- [23] OLOVNIKOV I, CHAN K, SACHIDANANDAM R, et al. Bacterial argonaute samples the transcriptome to identify foreign DNA[J]. *Molecular cell*, 2013, 51(5): 594-605.
- [24] WANG Y L, SHENG G, JURANEK S, et al. Structure of the guide-strand-containing argonaute silencing complex [J]. *Nature*, 2008, 456(7219): 209-213.
- [25] WANG Y L, JURANEK S, LI H T, et al. Nucleation, propagation and cleavage of target RNAs in Ago silencing complexes[J]. *Nature*, 2009, 461(7265): 754-761.
- [26] WANG Y L, JURANEK S, LI H T, et al. Structure of an argonaute silencing complex with a seed-containing guide DNA and target RNA duplex[J]. *Nature*, 2008, 456(7224): 921-926.
- [27] NAKANISHI K, WEINBERG D E, BARTEL D P, et al. Structure of yeast Argonaute with guide RNA [J]. *Nature*, 2012, 486(7403): 368-374.
- [28] SCHIRLE N T, MACRAE I J. The crystal structure of human Argonaute 2[J]. *Science*, 2012, 336(6084): 1037-1040.
- [29] ZAREMBA M, DAKINEVICIENE D, GOLOVINAS E, et al. Short prokaryotic Argonautes provide defence against incoming mobile genetic elements through NAD<sup>+</sup> depletion[J]. *Nature microbiology*, 2022, 7: 1857-1869.
- [30] ZENG Z F, CHEN Y, PINILLA-REDONDO R, et al. A short prokaryotic Argonaute activates membrane effector to confer antiviral defense[J]. *Cell host & microbe*, 2022, 30(7): 930-943.
- [31] SWARTS D C, HEGGE J W, HINOJO I, et al. Argonaute of the archaeon *Pyrococcus furiosus* is a DNA-guided nuclease that targets cognate DNA[J]. *Nucleic acids research*, 2015, 43(10): 5120-5129.
- [32] KUZMENKO A, OGUIENKO A, ESYUNINA D, et al. DNA targeting and interference by a bacterial Argonaute nuclease[J]. *Nature*, 2020, 587(7835): 632-637.
- [33] WILSON R C, DOUDNA J A. Molecular mechanisms of RNA interference[J]. *Annual review of biophysics*, 2013, 42: 217-239.
- [34] SHENG G, ZHAO H T, WANG J Y, et al. Structure-based cleavage mechanism of *Thermus thermophilus* Argonaute DNA guide strand-mediated DNA target cleavage[J]. *PNAS*, 2014, 111(2): 652-657.
- [35] KOOPAL B, MUTTE S K, SWARTS D C. A long look at short prokaryotic Argonautes[J]. *Trends in cell biology*, 2023, 33(7): 605-618.
- [36] WU J E, YANG J, CHO W C, et al. Argonaute proteins: structural features, functions and emerging roles [J]. *Journal of advanced research*, 2020, 24: 317-324.
- [37] YUAN Y R, PEI Y, MA J B, et al. Crystal structure of *A. aeolicus* argonaute, a site-specific DNA-guided endoribonuclease, provides insights into RISC-mediated mRNA cleavage [J]. *Molecular cell*, 2005, 19(3): 405-419.
- [38] KUZMENKO A, YUDIN D, RYAZANSKY S, et al. Programmable DNA cleavage by Ago nucleases from mesophilic bacteria *Clostridium butyricum* and *Limothrix rosea* [J]. *Nucleic acids research*, 2019, 47(11): 5822-5836.
- [39] HEGGE J W, SWARTS D C, CHANDRADOSS S D, et al. DNA-guided DNA cleavage at moderate temperatures by *Clostridium butyricum* Argonaute [J]. *Nucleic acids research*, 2019, 47(11): 5809-5821.
- [40] SWARTS D C, KOEHORST J J, WESTRA E R, et al. Effects of argonaute on gene expression in *Thermus thermophilus* [J/OL]. *PLoS One*, 2015, 10(4) : e0124880 [2024-06-05]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0124880>.
- [41] ENGHAD B, ZHAO H M. Programmable DNA-guided artificial restriction enzymes [J]. *ACS synthetic biology*, 2017, 6(5): 752-757.
- [42] KAYA E, DOXZEN K W, KNOLL K R, et al. A bacterial Argonaute with noncanonical guide RNA specificity [J]. *PNAS*, 2016, 113(15): 4057-4062.
- [43] WANG L Y, XIE X C, LV B, et al. A bacterial Argonaute with efficient DNA and RNA cleavage activity guided by small DNA and RNA [J/OL]. *Cell reports*, 2022, 41(4) : 111533 [2024-06-05]. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.111533>.
- [44] LIU Y, LI W Q, JIANG X M, et al. A programmable omnipotent Argonaute nuclease from mesophilic bacteria *Kurthia mas-siliensis* [J]. *Nucleic acids research*, 2021, 49(3): 1597-1608.
- [45] LI W Q, LIU Y, HE R Y, et al. A programmable pAgo nuclease with RNA target preference from the psychrotolerant bacterium *Mucilaginibacter paludis* [J]. *Nucleic acids research*, 2022, 50(9): 5226-5238.
- [46] CAO Y W, SUN W, WANG J F, et al. Argonaute proteins from human gastrointestinal bacteria catalyze DNA-guided cleavage of single- and double-stranded DNA at 37 °C [J/OL]. *Cell discovery*, 2019, 5: 38 [2024-06-05]. <https://doi.org/10.1038/s41421-019-0117-1>.

- [47] CHONG Y S, LIU Q, HUANG F, et al. Characterization of a recombinant thermotolerant argonaute protein as an endonuclease by broad guide utilization[J/OL]. *Bioresources and bioprocessing*, 2019, 6 (1) : 21 [2024-06-05]. <https://doi.org/10.1186/s40643-019-0242-1>.
- [48] WILLKOMM S, OELLIG C A, ZANDER A, et al. Structural and mechanistic insights into an archaeal DNA-guided Argonaute protein [J/OL]. *Nature microbiology*, 2017, 2: 17035 [2024-06-05]. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2017.35>.
- [49] PANTELEEV V, KROPOCHEVA E, ESYUNINA D, et al. Strong temperature effects on the fidelity of target DNA recognition by a thermophilic PAgo nuclease [J]. *Biochimie*, 2023, 209:142-149.
- [50] SONG J Z, HEGGE J W, MAUK M G, et al. Highly specific enrichment of rare nucleic acid fractions using *Thermus thermophilus* argonaute with applications in cancer diagnostics [J/OL]. *Nucleic acids research*, 2020, 48 (4) : e19 [2024-06-05]. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa127>.
- [51] LIN Q Y, HAN G B, FANG X E, et al. Programmable analysis of microRNAs by *Thermus thermophilus* argonaute-assisted exponential isothermal amplification for multiplex detection (TEAM) [J]. *Analytical chemistry*, 2022, 94 (32) : 11290-11297.
- [52] JANG H, SONG J, KIM S, et al. ANCA: artificial nucleic acid circuit with argonaute protein for one-step isothermal detection of antibiotic-resistant bacteria [J/OL]. *Nature communications*, 2023, 14 (1) : 8033 [2024-06-05]. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-08456-1>.
- [53] HE R Y, WANG L Y, WANG F, et al. *Pyrococcus furiosus* Argonaute-mediated nucleic acid detection [J]. *Chemical communications*, 2019, 55(88) : 13219-13222.
- [54] WANG F, YANG J, HE R Y, et al. PfAgo-based detection of SARS-CoV-2 [J/OL]. *Biosensors and bioelectronics*, 2021, 177: 112932 [2024-06-05]. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2021.112932>.
- [55] YE X Y, ZHOU H W, GUO X, et al. Argonaute-integrated isothermal amplification for rapid, portable, multiplex detection of SARS-CoV-2 and influenza viruses [J/OL]. *Biosensors and bioelectronics*, 2022, 207: 114169 [2024-06-05]. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2022.114169>.
- [56] WANG L Y, HE R Y, LV B, et al. *Pyrococcus furiosus* Argonaute coupled with modified ligase chain reaction for detection of SARS-CoV-2 and HPV [J/OL]. *Talanta*, 2021, 227: 122154 [2024-06-05]. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.122154>.
- [57] HE R Y, WANG L Y, WANG F, et al. Combination of ultra-short PCR and *Pyrococcus furiosus* Argonaute for DNA detection [J]. *The analyst*, 2021, 147(1):35-39.
- [58] LIU Q, GUO X, XUN G H, et al. Argonaute integrated single-tube PCR system enables supersensitive detection of rare mutations [J/OL]. *Nucleic acids research*, 2021, 49 (13) : e75 [2024-06-05]. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab400>.
- [59] YIN L J, MAN S L, YE S Y, et al. CRISPR-Cas based virus detection: recent advances and perspectives [J/OL]. *Biosensors and bioelectronics*, 2021, 193: 113541 [2024-06-05]. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2021.113541>.
- [60] LU X L, XIAO J, WANG L F, et al. The nuclease-associated short prokaryotic Argonaute system nonspecifically degrades DNA upon activation by target recognition [J]. *Nucleic acids research*, 2024, 52(2):844-855.
- [61] KEASLING J D. Synthetic biology and the development of tools for metabolic engineering [J]. *Metabolic engineering*, 2012, 14(3):189-195.
- [62] ENGHIAI B, XUE P, SINGH N, et al. PlasmidMaker is a versatile, automated, and high throughput end-to-end platform for plasmid construction [J/OL]. *Nature communications*, 2022, 13 (1) : 2697 [2024-06-05]. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-22892-3>.
- [63] PACESA M, PELEA O, JINEK M. Past, present, and future of CRISPR genome editing technologies [J]. *Cell*, 2024, 187 (5):1076-1100.
- [64] GAO F, SHEN X Z, JIANG F, et al. DNA-guided genome editing using the *Natronobacterium gregoryi* Argonaute [J]. *Nature biotechnology*, 2016, 34(7):768-773.
- [65] QI J L, DONG Z J, SHI Y W, et al. NgAgo-based fabp11a gene knockdown causes eye developmental defects in zebrafish [J]. *Cell research*, 2016, 26(12):1349-1352.
- [66] WU Z C, TAN S Y, XU L Q, et al. NgAgo-gDNA system efficiently suppresses hepatitis B virus replication through accelerating decay of pregenomic RNA [J]. *Antiviral research*, 2017, 145:20-23.
- [67] FU L, XIE C Y, JIN Z H, et al. The prokaryotic Argonaute proteins enhance homology sequence-directed recombination in bacteria [J]. *Nucleic acids research*, 2019, 47(7):3568-3579.
- [68] QU J Y, XIE Y L, GUO Z Y, et al. Identification of a novel cleavage site and confirmation of the effectiveness of NgAgo gene editing on RNA targets [J]. *Molecular biotechnology*, 2021, 63(12):1183-1191.
- [69] ESYUNINA D, OKHTIENKO A, OLINA A, et al. Specific targeting of plasmids with Argonaute enables genome editing [J]. *Nucleic acids research*, 2023, 51(8):4086-4099.
- [70] 刘妍, 孙凯, 田春雨, 等. 基于Argonaute的病毒核酸检测技术研究进展 [J]. *病毒学报*, 2023, 39(5) : 1414-1424. LIU Y, SUN K, TIAN C Y, et al. Research progress on argonaute-based virus nucleic acid detection technology [J]. *Chinese journal of virology*, 2023, 39(5) : 1414-1424 (in Chinese with English abstract).
- [71] QIN Y Q, LI Y J, HU Y G. Emerging Argonaute-based nucleic acid biosensors [J]. *Trends in biotechnology*, 2022, 40 (8) : 910-914.

- [72] LARSON M H, GILBERT L A, WANG X W, et al. CRISPR interference (CRISPRi) for sequence-specific control of gene expression[J]. *Nature protocols*, 2013, 8(11): 2180-2196.
- [73] SCHULTENKÄMPER K, BRITO L F, WENDISCH V F. Impact of CRISPR interference on strain development in biotechnology[J]. *Biotechnology and applied biochemistry*, 2020, 67(1): 7-21.
- [74] WU Y K, LI Y, JIN K, et al. CRISPR-dCas12a-mediated genetic circuit cascades for multiplexed pathway optimization[J]. *Nature chemical biology*, 2023, 19(3): 367-377.

## Progress on application of prokaryotic Argonaute

WANG Fei, LI Wenqiang, LIU Yang, WANG Longyu, CHEN Wanping, CUI Jiakai, MA Lixin

*National Key Laboratory of Biocatalysis and Enzyme Engineering/Hubei Province Key Laboratory of Industrial Biotechnology/College of Life Sciences, Hubei University, Wuhan 430062, China*

**Abstract** Prokaryotic Argonautes (pAgos) are programmable nucleases involved in cellular defense against foreign DNA invasion. *In vitro*, pAgos can bind to small single stranded guide nucleic acid (ssDNA/ssRNA) to recognize and cleave complementary DNA/RNA. *In vivo*, pAgos preferentially target multiple copies of genetic elements, bacteriophages, and plasmids, thereby inhibiting the propagation of invading nucleic acids and bacteriophage infections. Prokaryotic Argonautes (pAgos), as an emerging class of programmable nucleases, are more flexible than the most widely used CRISPR Cas system and has shown great potential in biotechnology. Previous studies were primarily focused on the thermophilic pAgos. Nowadays, the main applications based on thermophilic pAgos include molecular diagnosis and DNA assembly *in vitro*. Researchers have gradually shifted their focus to pAgos from mesophilic biological sources to promote the application of Ago-based biotechnology *in vivo*, such as gene editing. Although genome editing has not yet been achieved by pAgos, it's possible to develop the next generation techniques for genome-editing based on pAgos with more and more pAgos being discovered and researchers studying the catalytic mechanism of pAgos in depth. This article summarized the known representative pAgos and biotechnologies based on the development of pAgos. The challenges and potential strategies faced by the application of pAgos in prokaryotic and eukaryotic organisms were briefly analyzed.

**Keywords** programmable nucleases; prokaryotic Argonaute; gene editing; molecular diagnostics; DNA assembly

(责任编辑: 张志钰)