

翻转课堂第3期：优秀案例



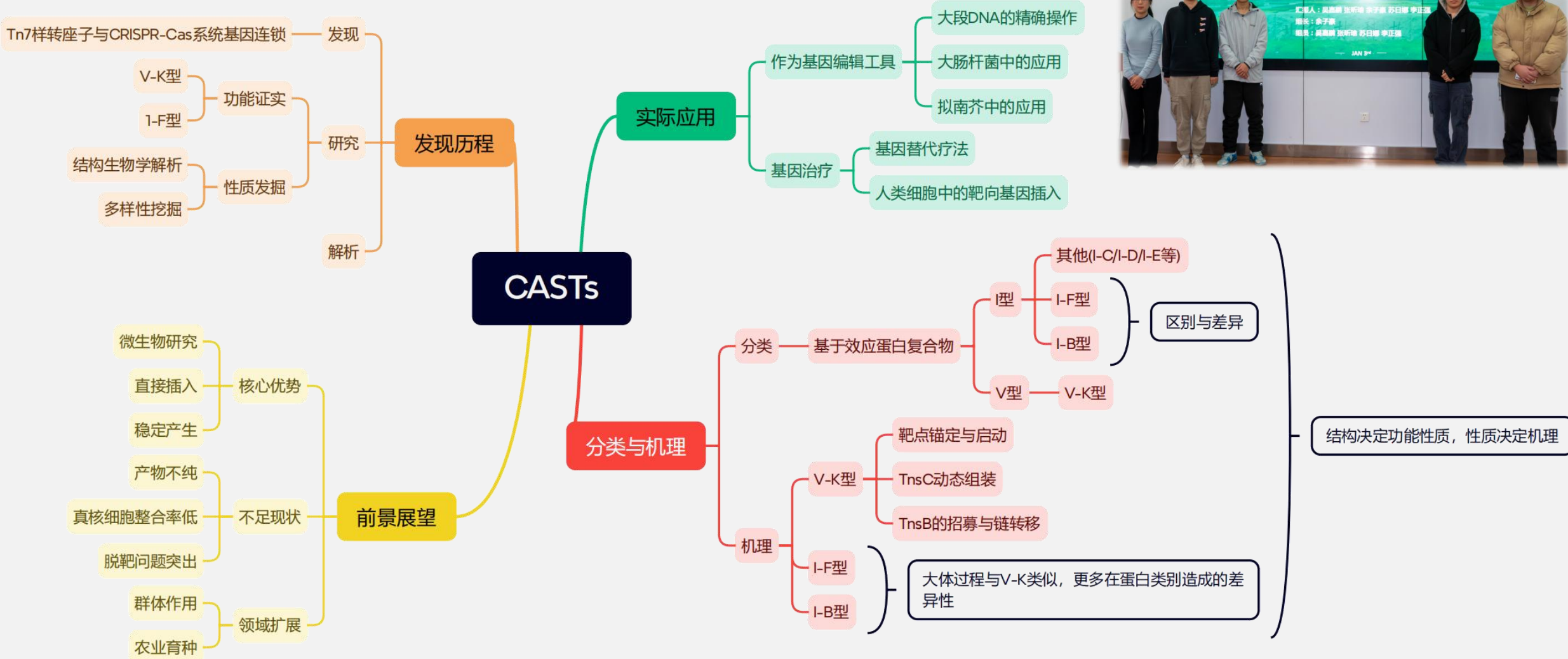
西北农林科技大学
NORTHWEST A&F UNIVERSITY

西北农林科技大学2023级农学院

CASTs系统的介绍

汇报人：吴嘉鹏 张昕瑜 余子豪 苏日娜 李正强
组长：余子豪
组员：吴嘉鹏 张昕瑜 苏日娜 李正强

思维导图



目录

CONTENTS

目前应用

CASTs的分类

作用机理机制

未来展望部分

CASTs的发现





Part 1

石破天惊—— CASTs的发现


- 1-1 理论预测
- 1-2 实验验证与机制探索
- 1-3 工具开发与机制探索

1-1 理论预测 (2017)

RESEARCH ARTICLE | MICROBIOLOGY | 

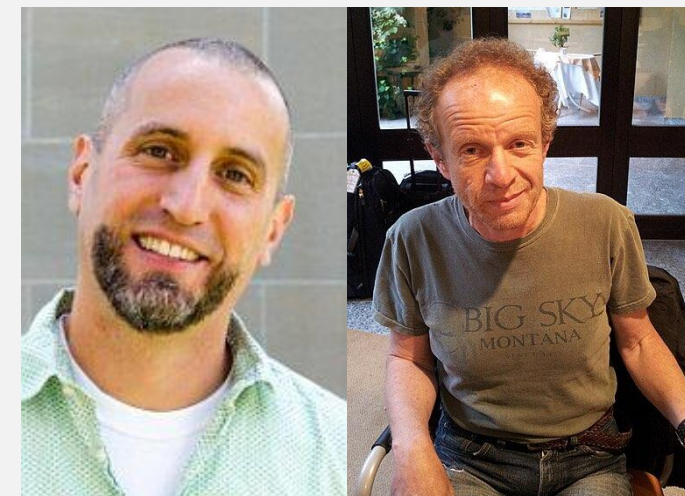


Recruitment of CRISPR-Cas systems by Tn7-like transposons

Joseph E. Peters , Kira S. Makarova, Sergey Shmakov, and Eugene V. Koonin   [Authors Info & Affiliations](#)

Contributed by Eugene V. Koonin, July 19, 2017 (sent for review June 1, 2017; reviewed by Nancy L. Craig, Jonathan Filee, and Blake Wiedenheft)

August 15, 2017 | 114 (35) E7358-E7366 | <https://doi.org/10.1073/pnas.1709035114>



通过生物信息学分析，首次发现Tn7样转座子与CRISPR-Cas系统在基因组上紧密关联，从理论上预言了自然界存在“RNA引导的DNA转座”机制。这为后续实验研究指明了方向。

1-2 实验验证与机制探索 (2019--2022)

Article | Published: 12 June 2019

Transposon-encoded CRISPR–Cas systems direct RNA-guided DNA integration

[Sanne E. Klompe](#), [Phuc L. H. Vo](#), [Tyler S. Halpin-Healy](#) & [Samuel H. Sternberg](#) 

Article | Published: 18 December 2019

Structural basis of DNA targeting by a transposon-encoded CRISPR–Cas system

[Tyler S. Halpin-Healy](#), [Sanne E. Klompe](#), [Samuel H. Sternberg](#)  & [Israel S. Fernández](#) 

ARTICLE · Volume 82, Issue 3, P616-628.E5, February 03, 2022 · [Open Archive](#)

 [Download Full Issue](#)

Evolutionary and mechanistic diversity of Type I-F CRISPR-associated transposons

[Sanne E. Klompe](#)¹ · [Nora Jaber](#)^{1,4} · [Leslie Y. Beh](#)^{1,5} · [Jason T. Mohabir](#)^{2,6} · [Aude Bernheim](#)³ · [Samuel H. Sternberg](#)^{1,7}  

[Affiliations & Notes](#)  [Article Info](#) 

1-2 实验验证与机制探索 (2019--2022)

[nature](#) > [articles](#) > article

Article | Published: 12 June 2019

Transposon-encoded CRISPR–Cas systems direct RNA-guided DNA integration

[Sanne E. Klompe](#), [Phuc L. H. Vo](#), [Tyler S. Halpin-Healy](#) & [Samuel H. Sternberg](#) 

[Nature](#) **571**, 219–225 (2019) | [Cite this article](#)

118k Accesses | **503** Citations | **620** Altmetric | [Metrics](#)



Samuel H. Sternberg

核心贡献：首次在实验上证实并解析了V-K型CAST系统（如ShCAST）的工作机制，演示了其可编程的、精确的DNA整合能力。

1-2 实验验证与机制探索 (2019--2022)

[nature](#) > [articles](#) > [article](#)

Article | Published: 18 December 2019

Structural basis of DNA targeting by a transposon-encoded CRISPR–Cas system

[Tyler S. Halpin-Healy](#), [Sanne E. Klompe](#), [Samuel H. Sternberg](#)  & [Israel S. Fernández](#) 

[Nature](#) **577**, 271–274 (2020) | [Cite this article](#)

22k Accesses | **94** Citations | **247** Altmetric | [Metrics](#)



Samuel H. Sternberg

核心贡献：通过冷冻电镜解析了CAST复合物的结构，揭示了其靶向DNA的分子基础。

1-2 实验验证与机制探索 (2019--2022)

ARTICLE · Volume 82, Issue 3, P616-628.E5, February 03, 2022 · [Open Archive](#)

[Download Full Issue](#)

Evolutionary and mechanistic diversity of Type I-F CRISPR-associated transposons

[Sanne E. Klompe](#)¹ · [Nora Jaber](#)^{1,4} · [Leslie Y. Beh](#)^{1,5} · [Jason T. Mohabir](#)^{2,6} · [Aude Bernheim](#)³ · [Samuel H. Sternberg](#)^{1,7}  

[Affiliations & Notes](#)  [Article Info](#) 

 [Download PDF](#)  [Cite](#)  [Share](#)  [Set Alert](#)  [Get Rights](#)  [Reprints](#)



Samuel H. Sternberg

核心贡献：系统研究了I-F型CAST系统的多样性，拓展了CAST的工具箱。

1-3 工具开发与机制探索 (2021至今)



Article | Published: 23 November 2020

CRISPR RNA-guided integrases for high-efficiency, multiplexed bacterial genome engineering

[Phuc Leo H. Vo](#), [Carlotta Ronda](#), [Sanne E. Klompe](#), [Ethan E. Chen](#), [Christopher Acree](#), [Harris H. Wang](#) & [Samuel H. Sternberg](#)

Article | Published: 29 March 2023

Targeted DNA integration in human cells without double-strand breaks using CRISPR-associated transposases

[George D. Lampe](#), [Rebeca T. King](#), [Tyler S. Halpin-Healy](#), [Sanne E. Klompe](#), [Marcus I. Hogan](#), [Phuc Leo H. Vo](#), [Stephen Tang](#), [Alejandro Chavez](#) & [Samuel H. Sternberg](#)

ARTICLE · Volume 84, Issue 12, P2353-2367.E5, June 20, 2024 · [Open Archive](#)

[Download Full Issue](#)

Conformational landscape of the type V-K CRISPR-associated transposon integration assembly

[Francisco Tenjo-Castaño](#)¹ · [Nicholas Sofos](#)¹ · [Luisa S. Stutzke](#)¹ · ... · [Tillmann Pape](#)^{1,2} · [Pablo Mesa](#)¹ · [Guillermo Montoya](#)^{1,3} ... [Show more](#)

1-3 工具开发与机制探索 (2021至今)

[nature](#) > [nature biotechnology](#) > [articles](#) > [article](#)

Article | Published: 23 November 2020

CRISPR RNA-guided integrases for high-efficiency, multiplexed bacterial genome engineering

[Phuc Leo H. Vo](#), [Carlotta Ronda](#), [Sanne E. Klompe](#), [Ethan E. Chen](#), [Christopher Acree](#), [Harris H. Wang](#) & [Samuel H. Sternberg](#) 

[Nature Biotechnology](#) **39**, 480–489 (2021) | [Cite this article](#)



Samuel H. Sternberg

核心贡献：建立了基于CAST的、高效率、多路复用的细菌基因组工程方法，使其成为实用的生物技术工具。

1-3 工具开发与机制探索 (2021至今)

[nature](#) > [nature biotechnology](#) > [articles](#) > [article](#)

Article | Published: 29 March 2023

Targeted DNA integration in human cells without double-strand breaks using CRISPR-associated transposases

[George D. Lampe](#), [Rebeca T. King](#), [Tyler S. Halpin-Healy](#), [Sanne E. Klompe](#), [Marcus I. Hogan](#), [Phuc Leo H. Vo](#), [Stephen Tang](#), [Alejandro Chavez](#) & [Samuel H. Sternberg](#) 

[Nature Biotechnology](#) **42**, 87–98 (2024) | [Cite this article](#)

31k Accesses | **106** Citations | **173** Altmetric | [Metrics](#)





Samuel H. Sternberg

核心贡献：首次在人类细胞中成功实现基于CAST的靶向DNA整合，且不依赖DNA双链断裂，标志着其向真核生物基因组编辑应用迈出关键一步。





1-3 工具开发与机制探索 (2021至今)

ARTICLE · Volume 84, Issue 12, P2353-2367.E5, June 20, 2024 · [Open Archive](#) [Download Full Issue](#)

Conformational landscape of the type V-K CRISPR-associated transposon integration assembly

[Francisco Tenjo-Castaño](#)¹ · [Nicholas Sofos](#)¹ · [Luisa S. Stutzke](#)¹ · ... · [Tillmann Pape](#)^{1,2} · [Pablo Mesa](#)¹ · [Guillermo Montoya](#)^{1,3}   ... [Show more](#)

[Affiliations & Notes](#) ∨ [Article Info](#) ∨ [Linked Articles \(1\)](#) ∨

 [Download PDF](#)  [Cite](#)  [Share](#)  [Set Alert](#)  [Get Rights](#)  [Reprints](#)



Guillermo Montoya

核心贡献：利用冷冻电镜解析了V-K型CAST整合复合物从组装到完成的全过程构象图谱，为理性改造系统、提高活性提供了详细蓝图。

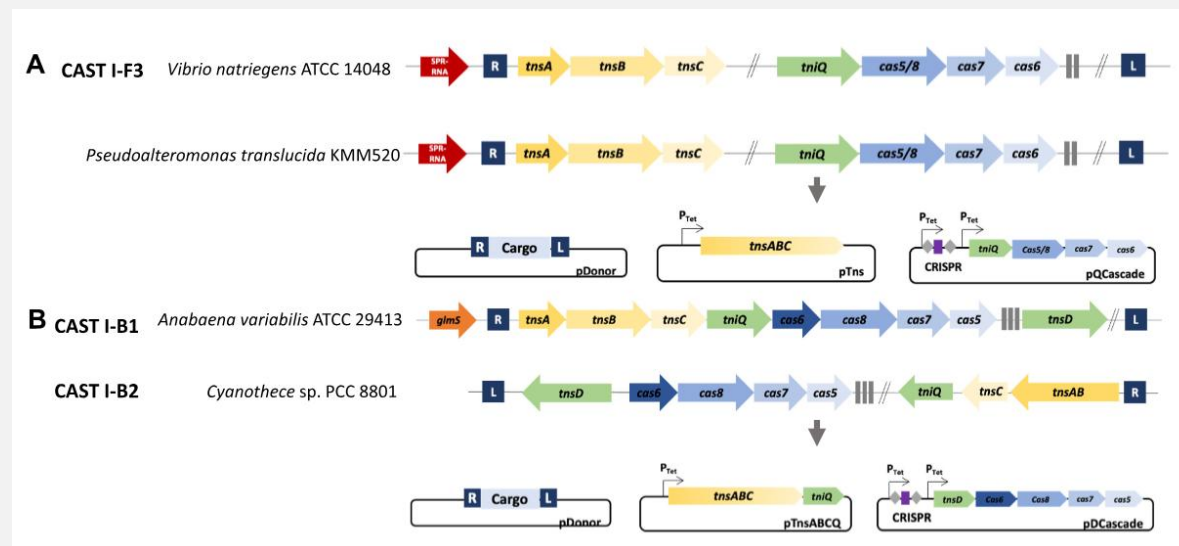
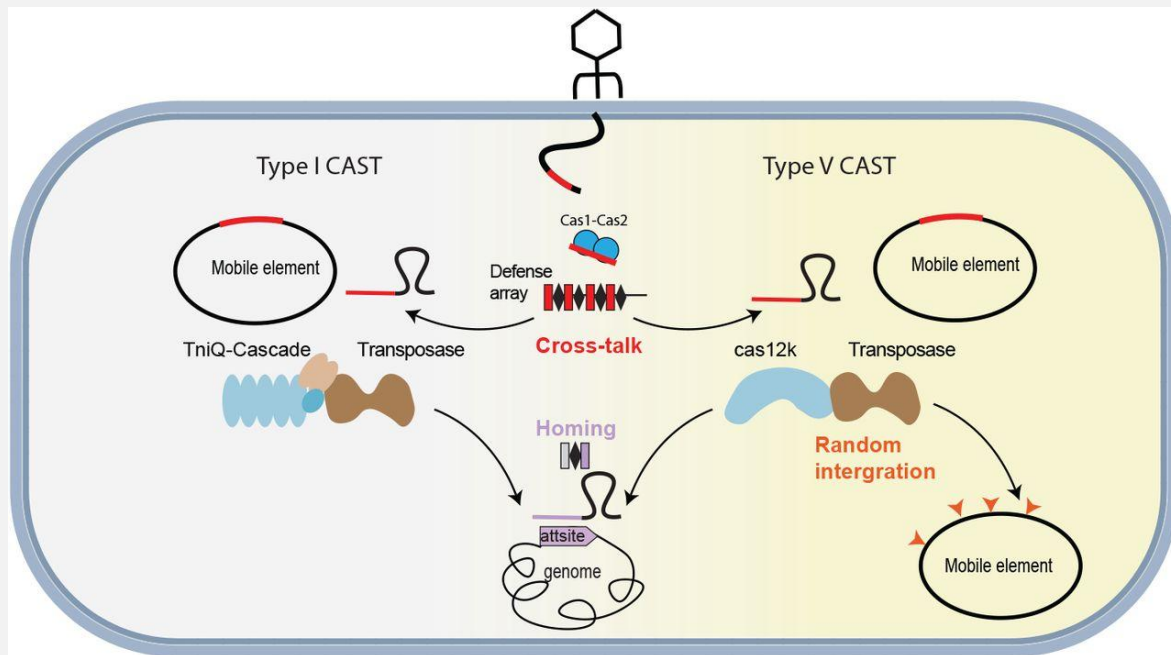


Part **2**

百花齐放—— CASTs的分类

- 2-1 I型CASTs
- 2-2 V型CASTs
- 2-3 三者区别
- 2-4 其他类型

2-1 I型CASTs (Type I CASTs)



采用基于效应蛋白复合物类型的分类方法，将已知的CASTs主要划分为两大类型：I型和V型。I型CASTs的特征是使用一个多亚基的蛋白质复合物，即Cascade复合物，作为其RNA引导的靶向模块。根据CRISPR-Cas亚型的不同，I型CASTs可进一步细分，其中最具代表性的是**I-F型**和**I-B型**。

2-1 I型CASTs (Type I CASTs)

I-F型CASTs

ARTICLE

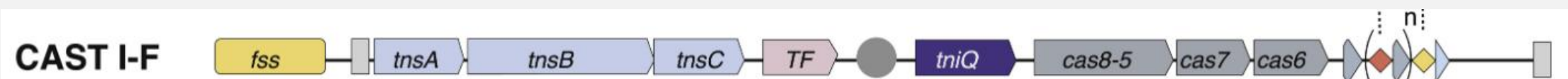
<https://doi.org/10.1038/s41586-019-1323-z>

Transposon-encoded CRISPR-Cas systems direct RNA-guided DNA integration

Sanne E. Klompe¹, Phuc L. H. Vo^{2,3}, Tyler S. Halpin-Healy^{1,3} & Samuel H. Sternberg^{1*}



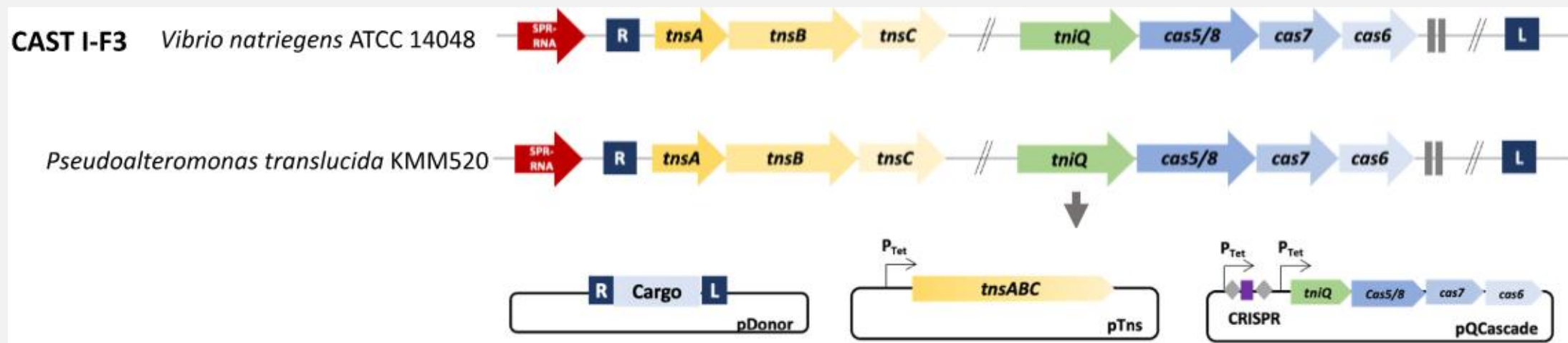
Samuel H. Sternberg



典型的I-F CAST包含两个核心模块：（1）转座酶模块：通常由**TnsA**，**TnsB**，**TnsC**蛋白组成。（2）靶向模块：即I-F型**Cascade复合物**，包含Cas8f（或Cas8/Cas5融合变体）、Cas7和Cas6等蛋白和一个关键衔接蛋白**TniQ**。

2-1 I型CASTs (Type I CASTs)

I-F型CASTs各蛋白功能



TnsA和TnsB: 形成异源二聚体，协同作用切除转座子。TnsA负责5'端切割，TnsB负责3'端切割和链转移整合。

TnsC: 一个ATP酶，在接收到靶向信号后组装成环状结构，招募TnsAB执行转座。

Cascade复合物: (1) Cas6f负责加工前体crRNA (2) Cas7f形成螺旋骨架结合crRNA (3) Cas8f/5f则负责识别PAM序列和靶标DNA。

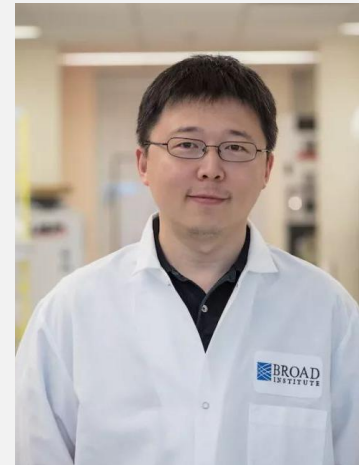
TniQ (Tn7系统中TnsD的同源物) 会与Cascade紧密结合，将靶向信号传递给TnsC。

2-1 I型CASTs (Type I CASTs)

I-B型CASTs



西北农林科技大学
NORTHWEST A&F UNIVERSITY



张锋



<https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.03.006>

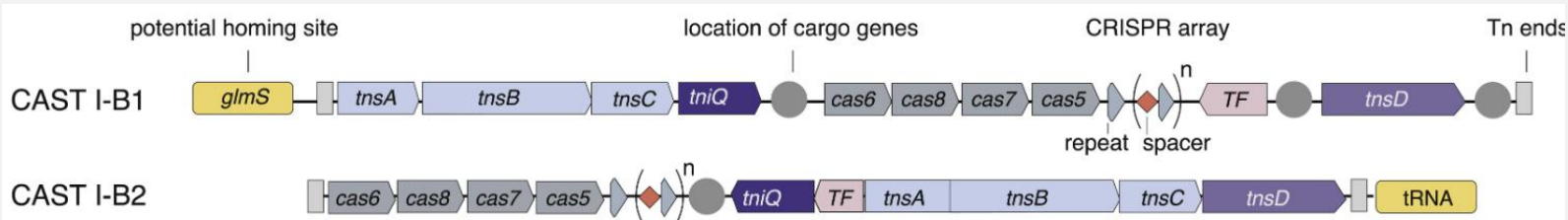
This journal Journals Publish News & events About Cell Press

ARTICLE · Volume 184, Issue 9, P2441-2453.E18, April 29, 2021 · [Open Archive](#) [Download Full Issue](#)

Dual modes of CRISPR-associated transposon homing

[Makoto Saito](#)^{1,2,3,4,5,6} · [Alim Ladha](#)^{1,2,3,4,5,6} · [Jonathan Strecker](#)^{1,2,3,4,5,6} · ... · [Han Altae-Tran](#)^{1,2,3,4,5} · [Rhiannon K. Macrae](#)^{1,2,3,4,5} · [Feng Zhang](#)^{1,2,3,4,5,7} [Show more](#)

[Affiliations & Notes](#) [Article Info](#)



I-B CASTs also utilize Cascade complex for targeting. But unlike some I-F systems that primarily rely on TniQ-Cascade, some I-B CASTs may have retained more mechanisms similar to the original Tn7 targeting mechanism, such as using TnsD-like proteins for vertical transmission (insertion at specific sites) and using TniQ-Cascade for horizontal transmission (RNA-guided random targeting).

2-2 V型CASTs (Type V CASTs)

V-K型CASTs

Science

RESEARCH ARTICLES

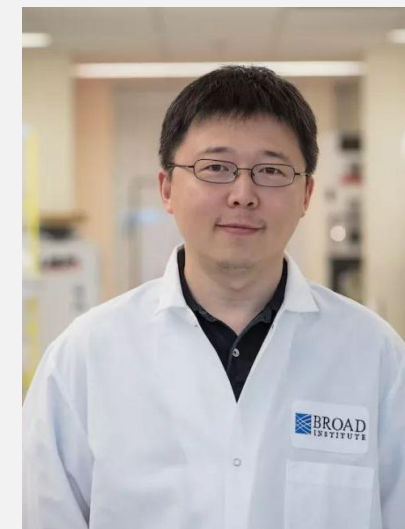
Cite as: J. Strecker *et al.*, *Science*
10.1126/science.aax9181 (2019).

RNA-guided DNA insertion with CRISPR-associated transposases

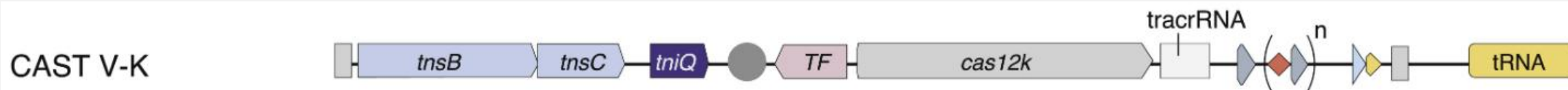
Jonathan Strecker^{1,2,3,4}, Alim Ladha^{1,2,3,4}, Zachary Gardner^{1,2,3,4}, Jonathan L. Schmid-Burgk^{1,2,3,4}, Kira S. Makarova⁵, Eugene V. Koonin⁵, Feng Zhang^{1,2,3,4*}

¹Broad Institute of MIT and Harvard, Cambridge, MA 02142, USA. ²McGovern Institute for Brain Research, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA 02139, USA. ³Department of Brain and Cognitive Sciences, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA 02139, USA. ⁴Department of Biological Engineering, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA 02139, USA. ⁵National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine, National Institutes of Health, Bethesda, MD 20894, USA.

*Corresponding author. Email: zhang@broadinstitute.org



张锋



V型CASTs最突出的特点是使用单个、多功能的效应蛋白——Cas12k 来执行靶向任务。在V型CASTs中，目前研究最多、也最受关注的是**V-K型**。

V-K CAST同样包含 (1) 转座酶模块：通常只有TnsB和TnsC，缺少TnsA，只能在供体片段的3'端发生切割，从而介导复制型转座而非I型CASTs中的剪切型转座。(2) 靶向模块：Cas12k和TniQ。

2-3 三者区别



分类比较总结

特征	I-F 型 CASTs	I-B 型 CASTs	V-K 型 CASTs
靶向效应子	多蛋白 Cascade (I-F)	多蛋白 Cascade (I-B)	单蛋白 Cas12k (V-K)
转座方式	切除-粘贴 (Cut-and-Paste)	切除-粘贴 (类似 I-F)	复制性 (Copy-and-Paste), 产生共整合体
关键缺失基因	完整	完整	缺乏 TnsA
系统紧凑性	大 (基因组较大)	中等	小 (基因组最紧凑)
主要优势	高准确性, 低 off-target	独特的双重机制 (RNA + Protein)	编码小, 易于递送 (如 AAV)
主要挑战	系统较大, 递送困难	机制复杂, 可能影响效率	准确性低, 产生随机插入和共整合体

2-4 其他类型

生物技术通报

BIOTECHNOLOGY BULLETIN

2023, 39(4):49-58

CRISPR 相关转座酶及其细菌基因组编辑应用

周晓杰^{1, 2} 杨思琪^{1, 2} 张译文³ 徐佳琪⁴ 杨晟¹

(1. 中国科学院分子植物科学卓越创新中心 中国科学院合成生物学重点实验室, 上海 200032; 2. 中国科学院大学, 北京 100049; 3. 中国科学院天津工业生物技术研究所, 天津 300308; 4. 浙江大学杭州国际科创中心, 杭州 311215)

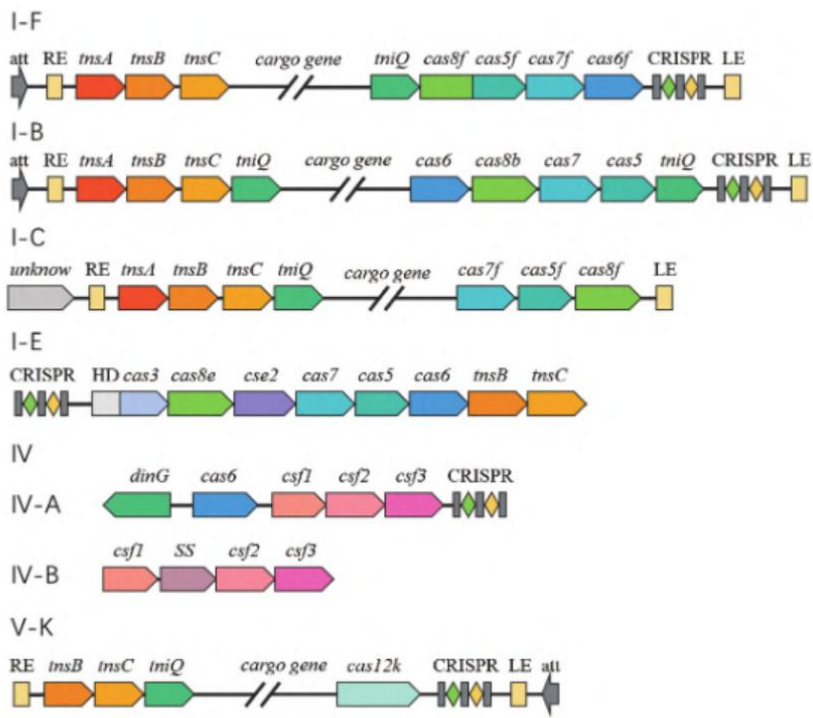


图 2 不同亚型 CASTs 的基因座结构

JOURNAL ARTICLE

Discovery and characterization of novel type I-D CRISPR-guided transposons identified among diverse Tn7-like elements in cyanobacteria

Shan-Chi Hsieh, Joseph E Peters

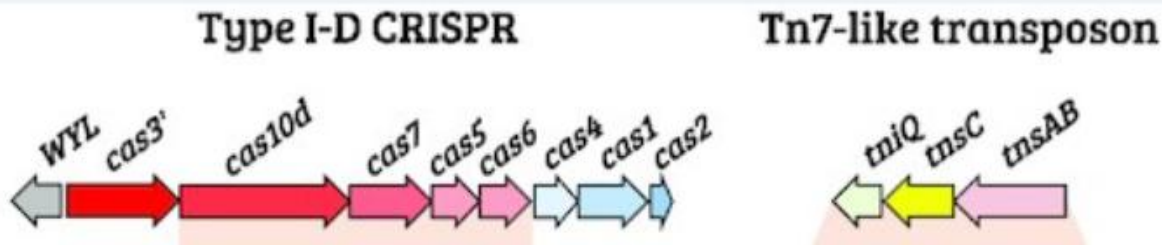
Nucleic Acids Research, Volume 51, Issue 2, 25 January 2023, Pages 765-782,

<https://doi.org/10.1093/nar/gkac1216>

Published: 20 December 2022 Article history



西北农林科技大学
NORTHWEST A&F UNIVERSITY



bioRxiv

THE PREPRINT SERVER FOR BIOLOGY

HOME | SUBMIT

New Results

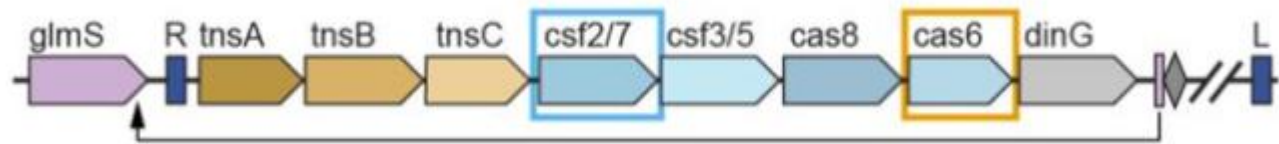
Follow this preprint

Metagenomic Discovery of CRISPR-Associated Transposons

James R. Rybarski, Kuang Hu, Alexis M. Hill, Claus O. Wilke, Ilya J. Finkelstein

doi: <https://doi.org/10.1101/2021.08.16.456562>

Now published in *Proceedings of the National Academy of Sciences* doi: 10.1073/pnas.2112279118





Part **3**

庖丁解牛—— CASTs的机制模型

3-1 V-K型CASTs机制解析

3-2 I-F型CASTs机制解析

3-3 I-B型CASTs机制解析

3-1 V-K型CASTs机制解析

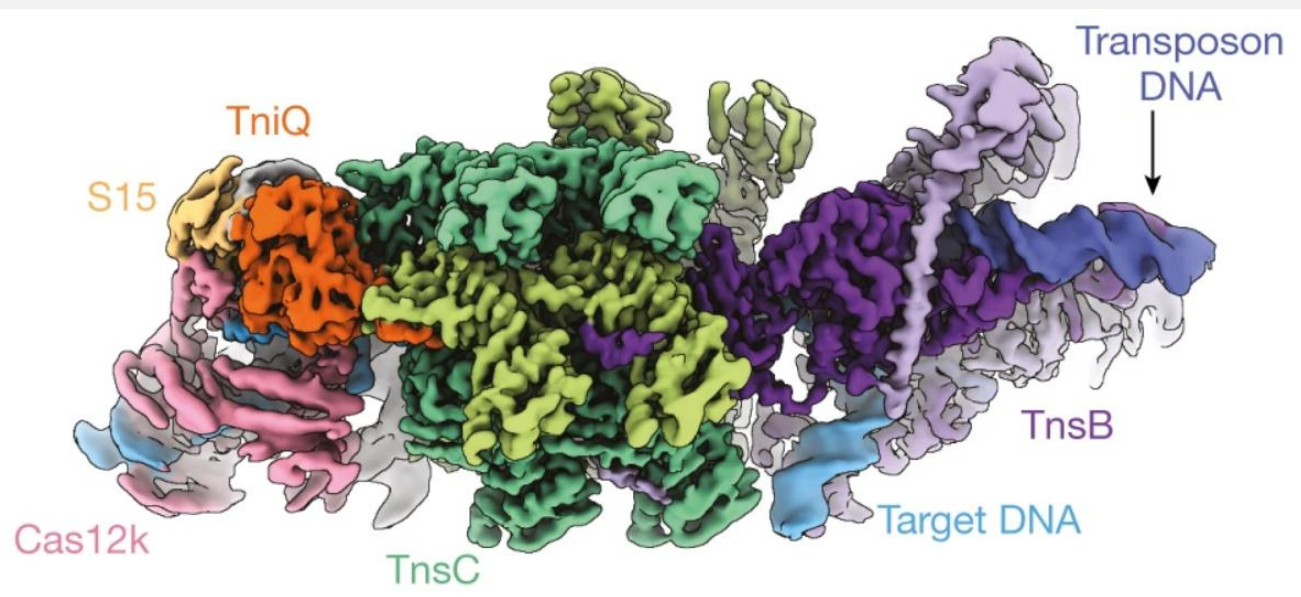
[nature](#) > [articles](#) > [article](#)

Article | [Open access](#) | Published: 28 November 2022

Structures of the holo CRISPR RNA-guided transposon integration complex

[Jung-Un Park](#), [Amy Wei-Lun Tsai](#), [Alexandrea N. Rizo](#), [Vinh H. Truong](#), [Tristan X. Wellner](#), [Richard D. Schargel](#) & [Elizabeth H. Kellogg](#) ✉

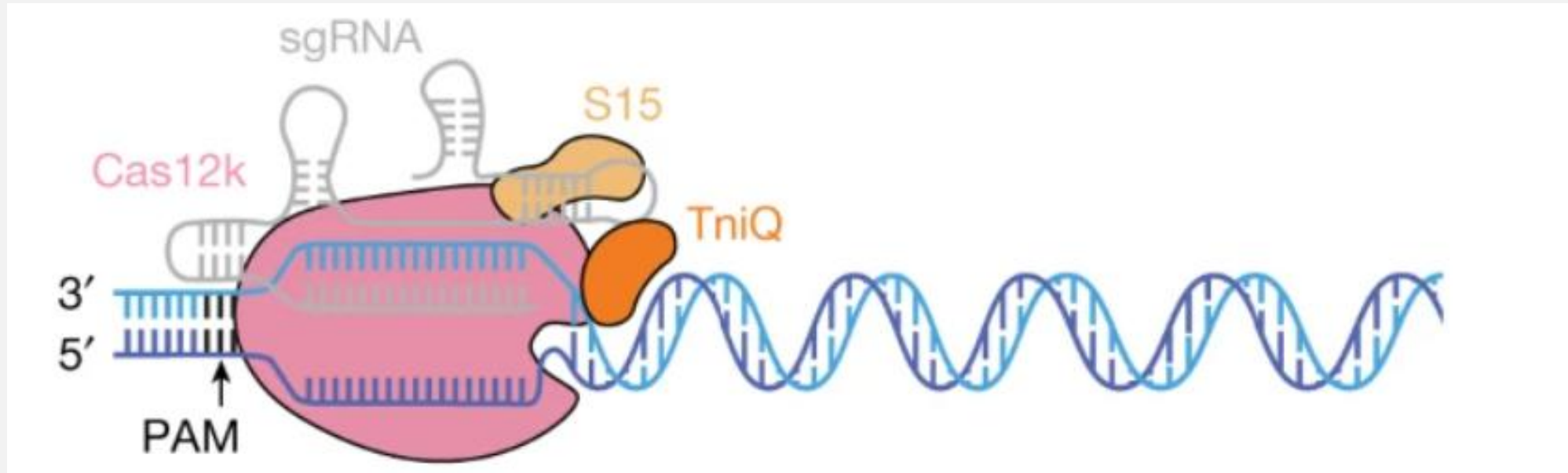
Nature **613**, 775–782 (2023) | [Cite this article](#)



Elizabeth H. Kellogg

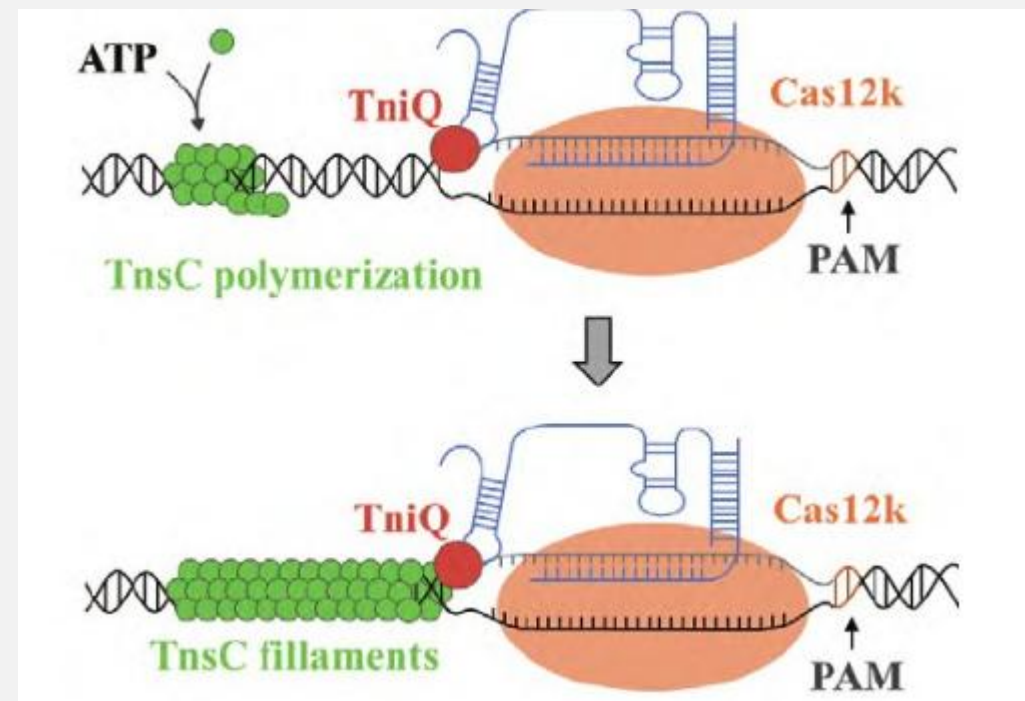
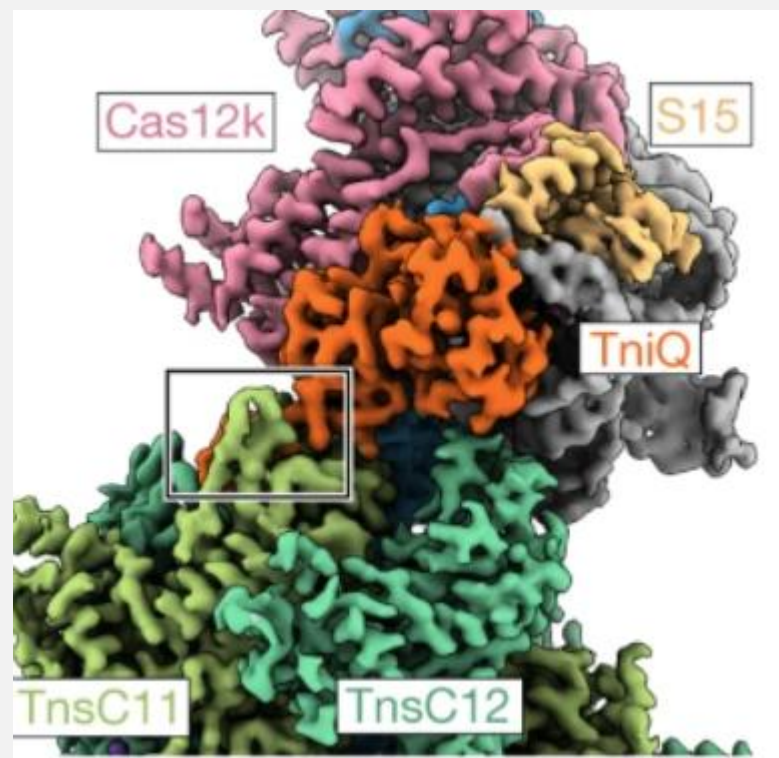
Elizabeth H. Kellogg团队从Scytonema hofmannii (ShCAST) 中重建了约1MDa型V-K型CAST转座体，并利用单颗粒冷电体显微镜确定其结构。

3-1 V-K型CASTs机制解析



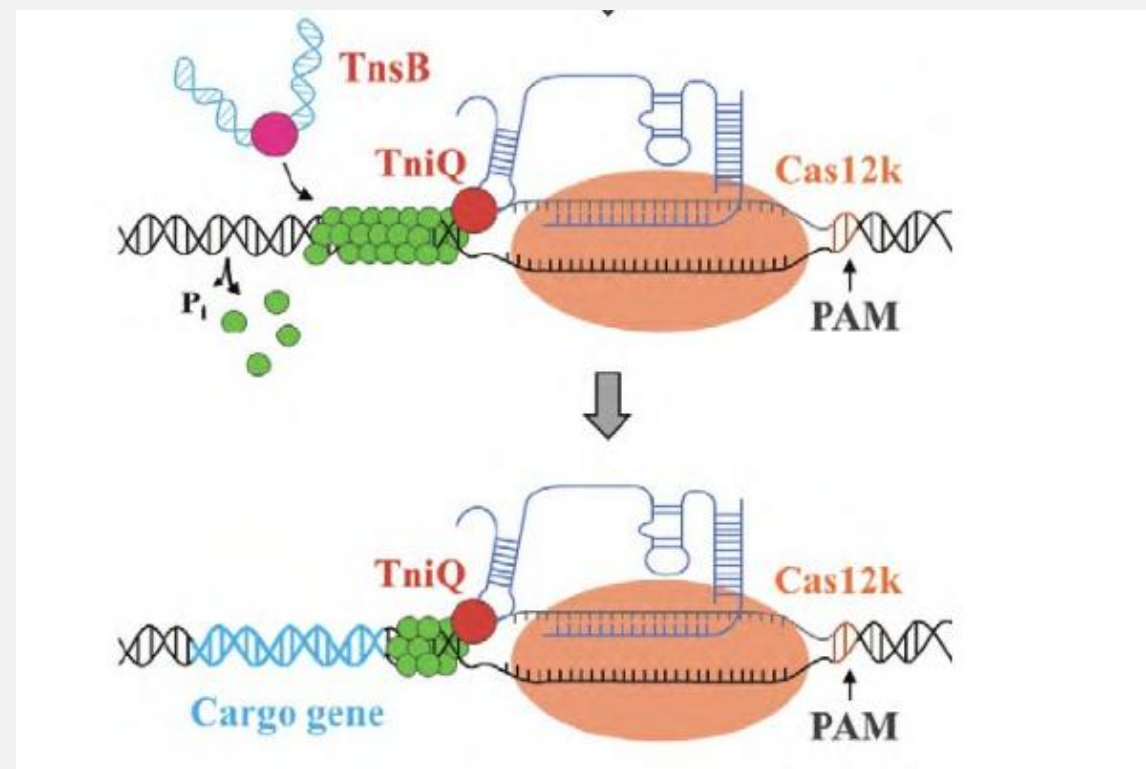
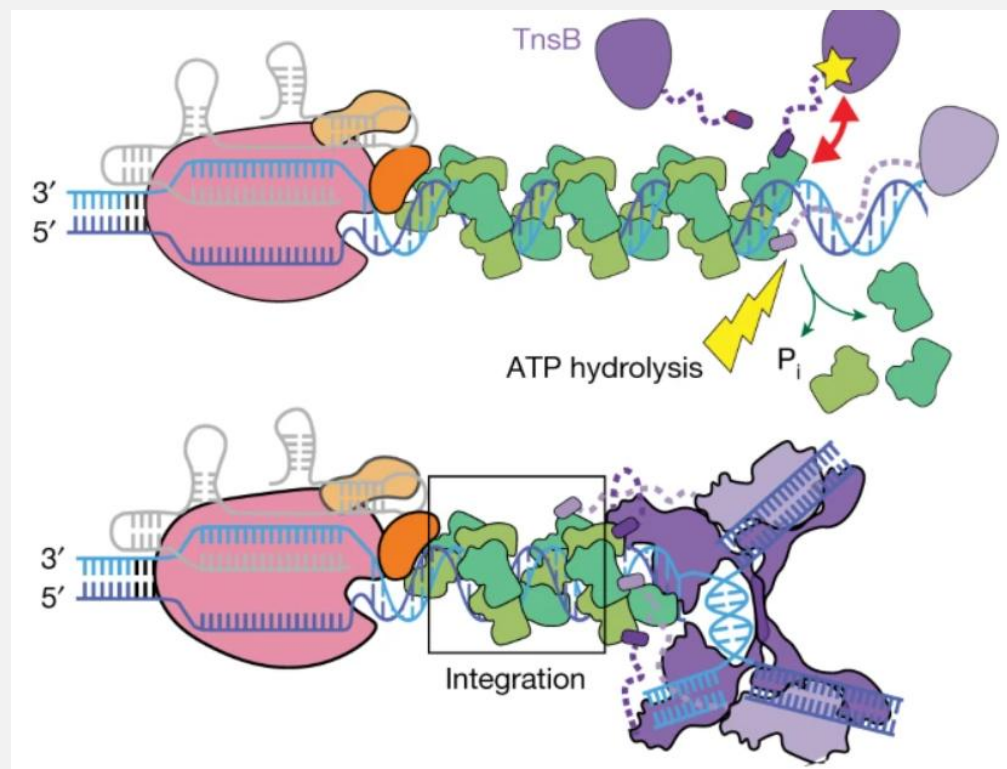
Cas12k-gRNA复合物识别靶DNA上的原型间隔区相邻基序（PAM），局部解链形成R-loop，使靶链稳定暴露，在基因组中无损地定位特定位点，并建立后续组装的唯一坐标原点。

3-1 V-K型CASTs机制解析



结合在Cas12k上的衔接蛋白 TniQ，作为特异的“码头”，招募细胞质中处于 ATP结合状态的TnsC单体。首个TnsC单体作为“种子”，后续TnsC-ATP单体不断加入，像铺轨车一样严格沿DNA向下游方向组装延伸。

3-1 V-K型CASTs机制解析



预结合了转座子DNA两端的TnsB二聚体，被精准招募至TnsC丝状体的特定位点。随后，TnsB催化转座子从供体链上脱离（剪切），并以其3'-OH末端攻击靶DNA上已测量好的位点，形成共价连接（粘贴）。TnsB会刺激邻近TnsC亚基加速水解ATP。TnsC-ADP构象剧变，导致整个丝状体迅速解聚，系统复位。

3-2 I-F型CASTs机制解析

[nature](#) > [cell research](#) > [letter to the editor](#) > [article](#)

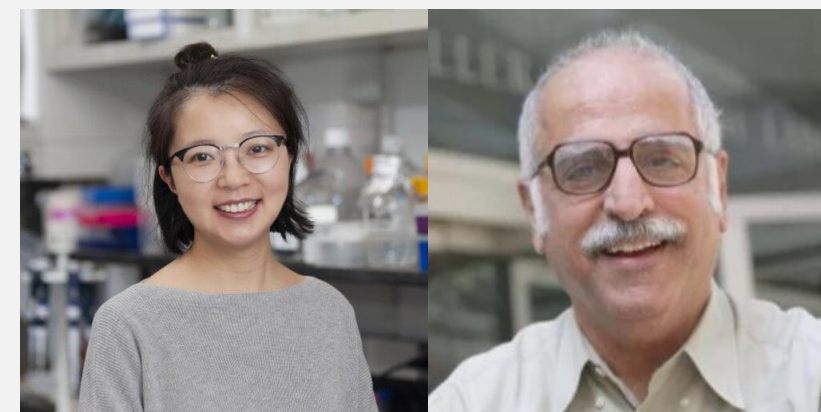
Letter to the Editor | [Open access](#) | Published: 10 January 2020

Structure–function insights into the initial step of DNA integration by a CRISPR–Cas–Transposon complex

[Ning Jia](#) , [Wei Xie](#), [M. Jason de la Cruz](#), [Edward T. Eng](#) & [Dinshaw J. Patel](#) 

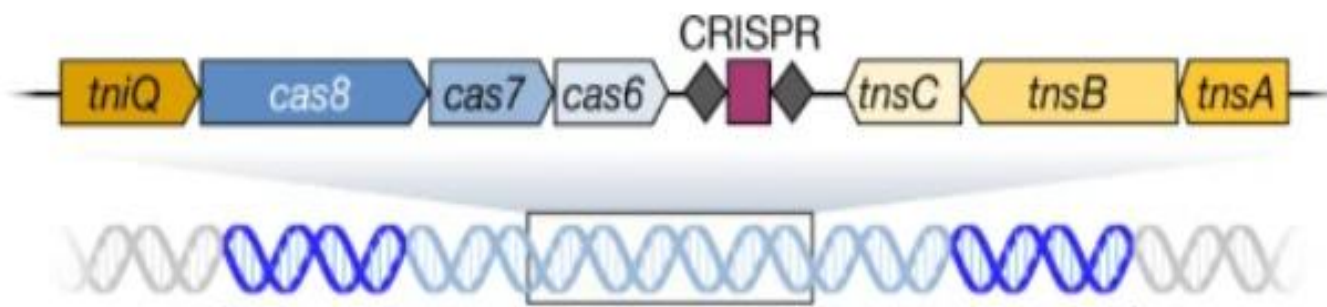
[Cell Research](#) **30**, 182–184 (2020) | [Cite this article](#)

6990 Accesses | 31 Citations | 11 Altmetric | [Metrics](#)



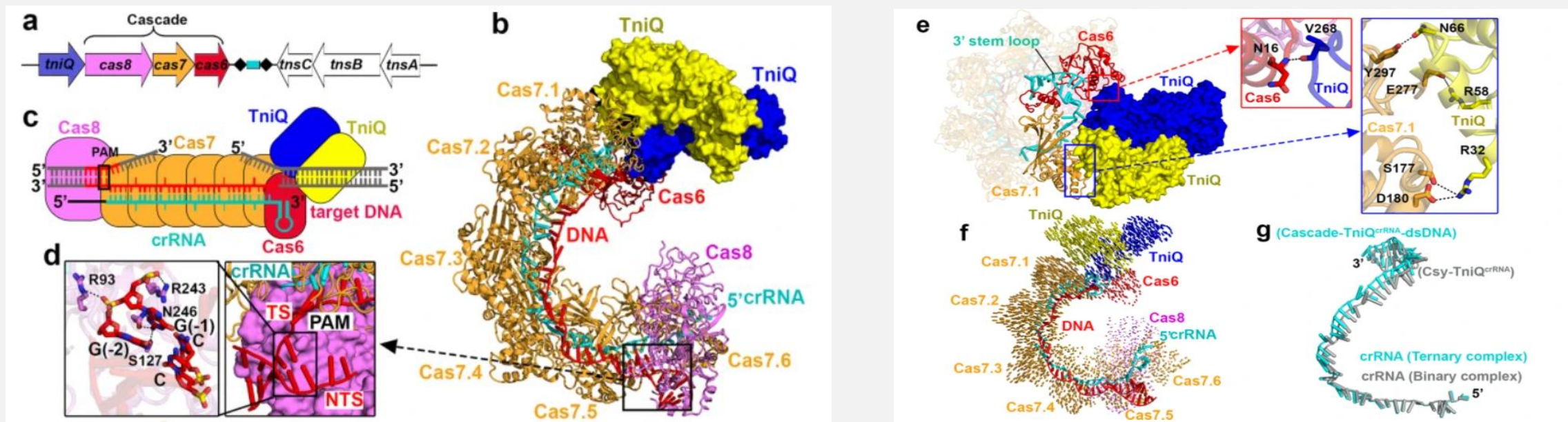
贾宁

Dinshaw J. Patel



贾宁等在对霍乱弧菌Tn6677多亚基I-F级联的结构研究中，对其运作机理进行了初步探究。

3-2 I-F型CASTs机制解析



与V-K型（先找靶点，再招募TniQ）不同，I-F型的TniQ是预先装载在Cascade上的。这意味着整个导航-信号转导单元是以一个整体去搜寻靶点，其组装逻辑更为前置。在接收到来自TniQ-Cascade的正确信号后，TnsC才会在正确位置组装并变构，暴露出招募TnsB的界面。TnsA与TnsB协作，精确切割转座子的另一端，确保转座子完整切除。

3-3 I-B型CASTs机制解析

ARTICLE · Volume 186, Issue 19, P4204-4215.E19, September 14, 2023 · [Open Archive](#)

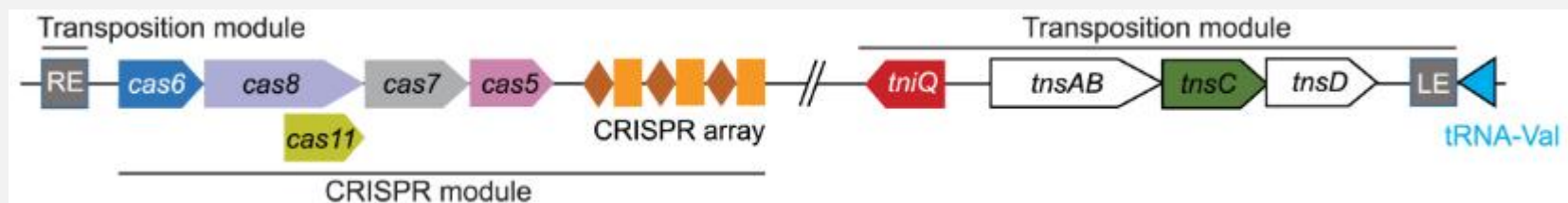
[Download Full Issue](#)

Molecular mechanism for Tn7-like transposon recruitment by a type I-B CRISPR effector

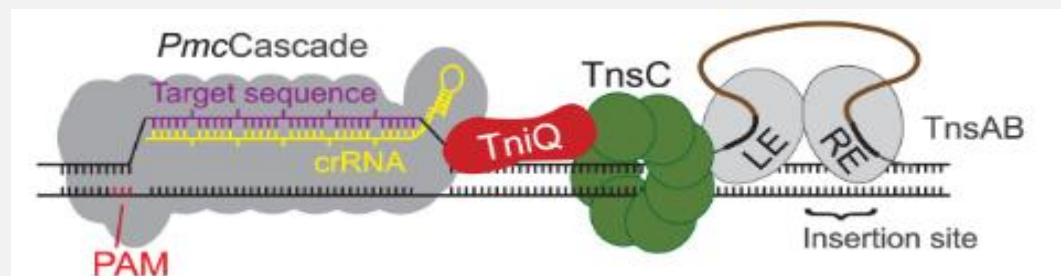
Shukun Wang¹ · Clinton Gabel¹ · Romana Siddique¹ · Thomas Klose¹ · Leifu Chang^{1,2,3} ✉

[Affiliations & Notes](#) ▾ [Article Info](#) ▾

[Download PDF](#) [Cite](#) [Share](#) [Set Alert](#) [Get Rights](#) [Reprints](#)

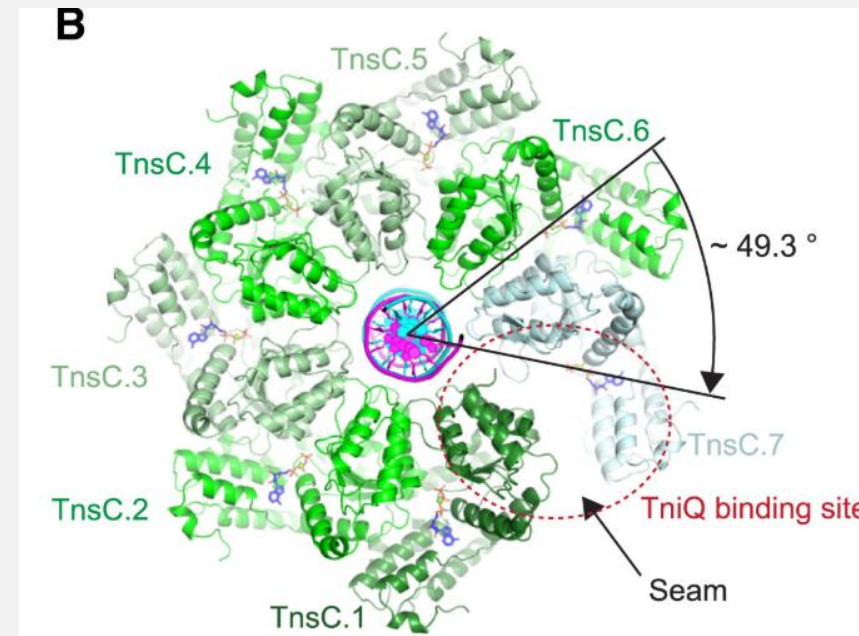
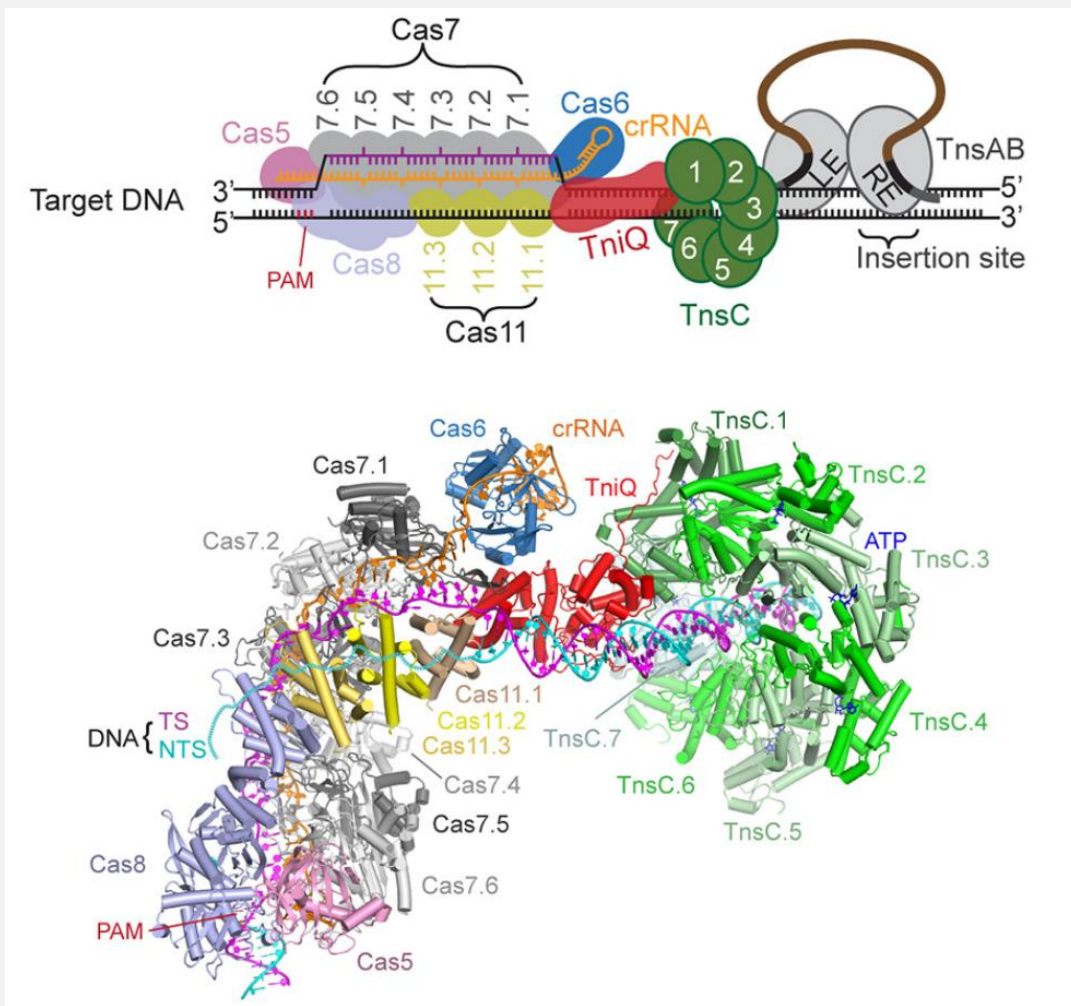


Leifu Chang



对I-B型CASTs的一个亚型（来自Peltigera membranacea cyanobiont 210A的亚型（PmcCAST）），对其机制进行了初步探究。

3-3 I-B型CASTs机制解析



Cascade先结合靶DNA，构象变化后招募TniQ，与V-K型类似。TnsC形成七聚体环，不形成长丝状体，与I-F型同为环状但细节有差异。



Part **4**

点石成金—— CASTs的目前应用

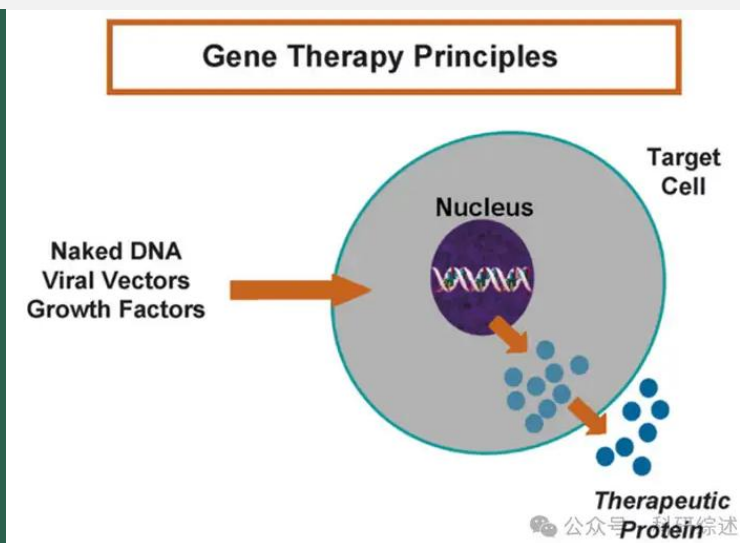
4-1 基因编辑工具

4-2 基因治疗

4 CASTs的目前应用



CASTs 在基因组工程、生物技术和医学研究中具有广泛的应用前景



基因编辑工具：CASTs 作为一种新型的基因编辑工具，能够实现大段 DNA 的精确插入、缺失和替换，解决了传统 CRISPR-Cas9 系统在处理大片段 DNA 时的局限性。

基因治疗：CASTs 在基因治疗中具有广阔的应用前景。CASTs 的高效性和安全性使其成为基因替代疗法的重要工具。

4-1 基因编辑工具

Science

RESEARCH ARTICLES

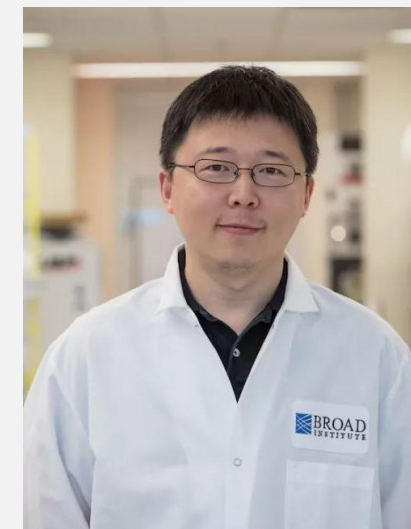
Cite as: J. Strecker *et al.*, *Science*
10.1126/science.aax9181 (2019).

RNA-guided DNA insertion with CRISPR-associated transposases

Jonathan Strecker^{1,2,3,4}, Alim Ladha^{1,2,3,4}, Zachary Gardner^{1,2,3,4}, Jonathan L. Schmid-Burgk^{1,2,3,4}, Kira S. Makarova⁵, Eugene V. Koonin⁵, Feng Zhang^{1,2,3,4*}

¹Broad Institute of MIT and Harvard, Cambridge, MA 02142, USA. ²McGovern Institute for Brain Research, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA 02139, USA. ³Department of Brain and Cognitive Sciences, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA 02139, USA. ⁴Department of Biological Engineering, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA 02139, USA. ⁵National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine, National Institutes of Health, Bethesda, MD 20894, USA.

*Corresponding author. Email: zhang@broadinstitute.org



张锋

CASTs 通过 RNA 引导的 DNA 插入机制，实现了高效的 DNA 插入。ShCAST (Scytonema hofmanni 的 CAST) 能够将 DNA 插入到大肠杆菌基因组中，插入效率高达 80%。

4-1 基因编辑工具

[nature](#) > [articles](#) > [article](#)

Article | [Open access](#) | Published: 26 June 2024

Transposase-assisted target-site integration for efficient plant genome engineering

[Peng Liu](#), [Kaushik Panda](#), [Seth A. Edwards](#), [Ryan Swanson](#), [Hochul Yi](#), [Pratheek Pandesha](#), [Yu-Hung Hung](#), [Gerald Klaas](#), [Xudong Ye](#), [Megan V. Collins](#), [Kaili N. Renken](#), [Larry A. Gilbertson](#), [Veena Veena](#), [C. Nathan Hancock](#) & [R. Keith Slotkin](#) 

[Nature](#) **631**, 593–600 (2024) | [Cite this article](#)

48k Accesses | **68** Citations | **340** Altmetric | [Metrics](#)



R. Keith Slotkin

CASTs还可以将序列特异性靶向插入拟南芥的基因组中

4-2 基因治疗

[nature](#) > [nature communications](#) > [articles](#) > [article](#)

Article | [Open access](#) | Published: 13 March 2025

Integration of therapeutic cargo into the human genome with programmable type V-K CAST

[Jason Liu](#), [Daniela S. Aliaga Goltsman](#), [Lisa M. Alexander](#), [Khak Khak Khayi](#), [Jennifer H. Hong](#), [Drew T. Dunham](#), [Christine A. Romano](#), [Morayma M. Temoche-Diaz](#), [Shailaja Chadha](#), [Rodrigo Fregoso Ocampo](#), [Jennifer Oki-O'Connell](#), [Owen P. Janson](#), [Keirstinne Turcios](#), [Liliana Gonzalez-Osorio](#), [Jared Muysson](#), [Jenat Rahman](#), [Sarah M. Laperriere](#), [Audra E. Devoto](#), [Cindy J. Castelle](#), [Cristina N. Butterfield](#), [Gregory J. Cost](#), [Christopher T. Brown](#)  & [Brian C. Thomas](#)

[Nature Communications](#) **16**, Article number: 2427 (2025) | [Cite this article](#)

13k Accesses | **7** Citations | **95** Altmetric | [Metrics](#)

CASTs 在基因治疗中具有广阔的应用前景。研究表明，CASTs 可以用于将治疗性基因整合到人类基因组中，特别是在人类细胞中实现靶向的基因插入。

2025 年的一项研究展示了基于 V-K 类型 CAST 的系统，能够将大型 DNA 负载整合到人类细胞的基因组中，具有高效率 and 低脱靶效应。

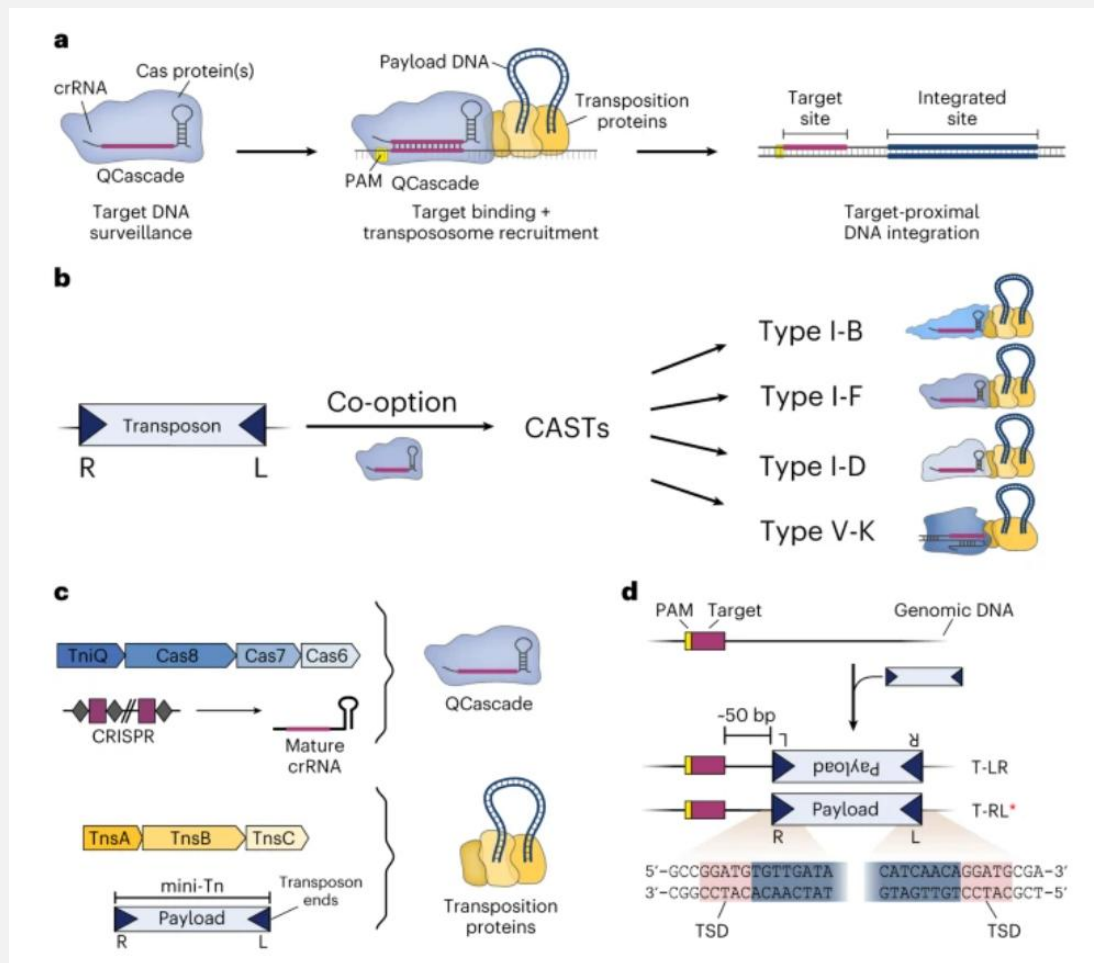


Part **5**

任重道远—— 未来展望部分

- 5-1 核心优势
- 5-2 不足现状
- 5-3 领域扩展

5-1 核心优势



[nature](#) > [nature protocols](#) > [protocols](#) > article

Protocol | Published: 12 January 2024

Bacterial genome engineering using CRISPR-associated transposases

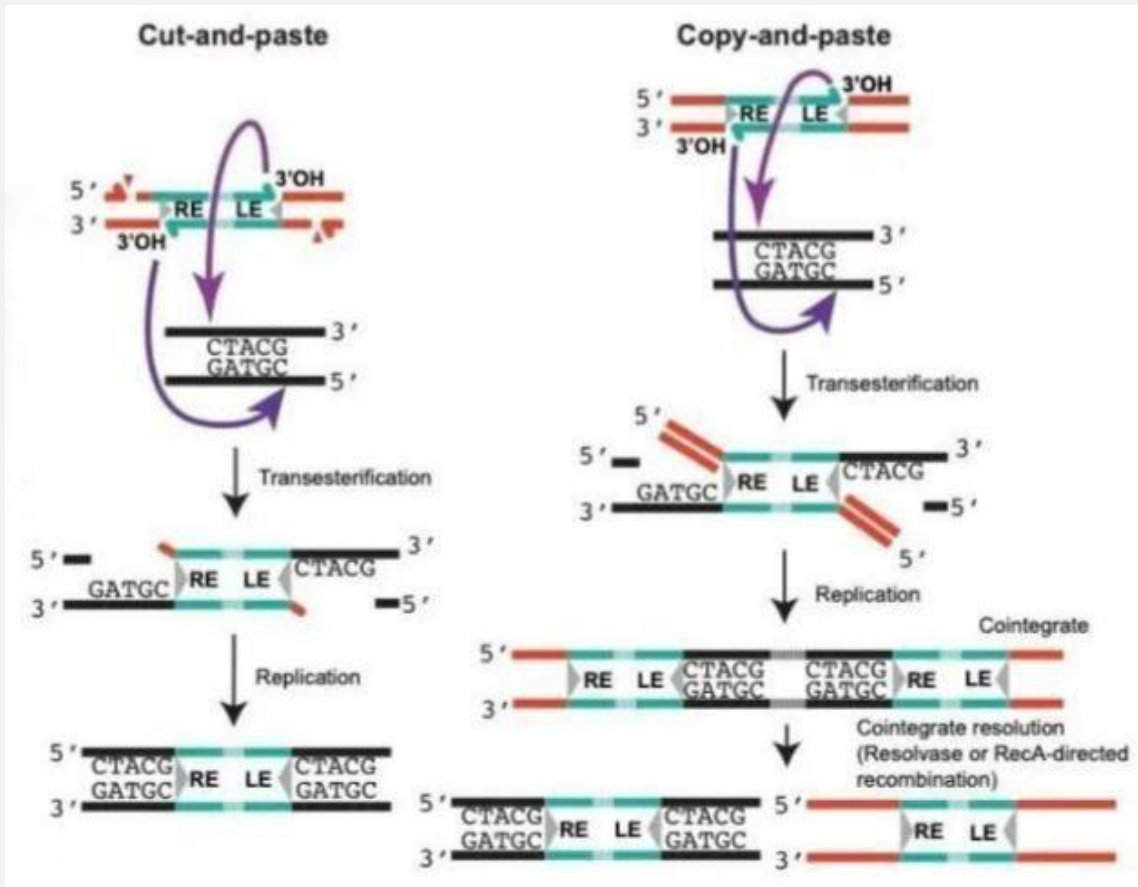
[Diego Rivera Gelsinger](#), [Phuc Leo H. Vo](#), [Sanne E. Klompe](#), [Carlotta Ronda](#), [Harris H. Wang](#) & [Samuel H. Sternberg](#) ✉

[Nature Protocols](#) **19**, 752–790 (2024) | [Cite this article](#)

14k Accesses | 36 Citations | 31 Altmetric | [Metrics](#)

利用CRISPR相关转座酶（CASTs）实现高度高效且针对性地整合大千基级载荷的DNA整合，将CAST系统应用于多种微生物物种的工程应用，结合了CRISPR–Cas系统的可编程性与转座酶带来的高效化学特性，允许靶向DNA插入，无需DNA双链断裂或重组机制。

5-2 不足现状



REVIEW · Volume 41, Issue 8, P660-677, August 2025

[Download Full Issue](#)

Unlocking the potential of CRISPR-associated transposons: from structural to functional insights

Francisco Tenjo-Castaño² · Sweta Suman Rout² · Sanjay Dey² · Guillermo Montoya¹ ✉

[Affiliations & Notes](#) ▾ [Article Info](#) ▾

[Download PDF](#) [Cite](#) [Share](#) [Set Alert](#) [Get Rights](#) [Reprints](#)

在V型CASTs, 缺少TnsA, 采用“复制-粘贴” (copy-and-paste)机制, 插入常伴随供体DNA复制, 易产生“cointegrate”产物。

如何减少非目标产物? 如何提升CAST特异性以减少离靶插入? 哪些分子机制调控宿主依赖性的特异性?



5-3 领域扩展



Unlocking the potential of CRISPR-associated transposons: from structural to functional insights

[Francisco Tenjo-Castaño](#)² · [Sweta Suman Rout](#)² · [Sanjay Dey](#)² · [Guillermo Montoya](#)  

Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)-associated transposons (CASTs) are emerging genome-editing tools that enable RNA-guided DNA integration without inducing double-strand breaks (DSBs). Unlike CRISPR-associated (Cas) nucleases, CASTs use transposon machinery to insert large DNA segments with high precision, potentially reducing off-target effects and bypassing DNA damage responses. CASTs are categorized into classes 1 and 2, each employing distinct mechanisms for DNA targeting and integration. Recent structural insights have elucidated how CASTs recognize target sites, recruit transposases, and mediate insertion. These advances position CASTs as promising tools for genome engineering in bacteria and possibly in mammalian cells. Key challenges remain in enhancing efficiency and specificity, particularly for therapeutic use. Ongoing research aims to evolve CAST systems for precise, large-scale genome editing in human cells.



Guillermo Montoya

如何提升效率和特异性方面仍面临关键挑战:

在治疗用途方面, 正在进行的研究旨在发展CASTs系统, 以实现人类细胞中精准、大规模的基因组编辑。

农业育种方面, CRISPR阵列一次性多重靶向基因敲除。实现了合成通路的多拷贝基因组整合, 产生比质粒表达更为稳健, 稳定产生具目的性状的改良品株。



西北农林科技大学
NORTHWEST A&F UNIVERSITY

西北农林科技大学2023级农学院

感谢老师批评指正!

汇报人：吴嘉鹏 张昕瑜 余子豪 苏日娜 李正强
组长：余子豪
组员：吴嘉鹏 张昕瑜 苏日娜 李正强

