

张雅玲, 王铎和, 李构思, 等. 新型 DNA 碱基编辑器的研究进展 [J]. 华南农业大学学报, 2022, 43(6): 1-16.
ZHANG Yaling, WANG Xinhe, LI Gousi, et al. Research advances in novel DNA base editors[J]. Journal of South China Agricultural University, 2022, 43(6): 1-16.



新型 DNA 碱基编辑器的研究进展

张雅玲[†], 王铎和[†], 李构思, 曾栋昌, 祝钦泷, 陈乐天, 刘耀光
(亚热带农业生物资源保护与利用国家重点实验室/岭南现代农业科学与技术广东省实验室/
华南农业大学 生命科学学院, 广东 广州 510642)

摘要: DNA 碱基编辑技术是由 CRISPR/Cas 系统发展而来, 能对基因组碱基进行精准编辑。目前已开发的 DNA 碱基编辑器包括介导 C•G 至 T•A 转换的胞嘧啶单碱基编辑器、介导 A•T 至 G•C 转换的腺嘌呤单碱基编辑器、介导 C•G 至 G•C 颠换的糖基化酶单碱基编辑器、介导 C•G 至 T•A 和 A•T 至 G•C 同时转换的双碱基编辑器、介导任意碱基之间转换的引导编辑器以及线粒体 DNA 编辑器。本文系统总结了上述 6 种 DNA 编辑器的原理、优化历程及最新研究进展, 着重介绍了应用到植物研究中的碱基编辑工具及其在作物遗传改良中的应用, 并对碱基编辑技术今后的发展进行了展望。

关键词: CRISPR/Cas9; 碱基编辑技术; DNA 碱基编辑器; 线粒体 DNA; 作物改良
中图分类号: Q789; S33 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-411X(2022)06-0001-16

Research advances in novel DNA base editors

ZHANG Yaling[†], WANG Xinhe[†], LI Gousi, ZENG Dongchang, ZHU Qinlong, CHEN Letian, LIU Yaoguang
(State Key Laboratory for Conservation and Utilization of Subtropical Agro-Bioresources/Guangdong
Laboratory for Lingnan Modern Agriculture/College of Life Sciences, South China
Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: The base editing technology is developed from the CRISPR/Cas gene editing systems, which can perform accurate base or gene editing at the DNA level. Recent years, six types of novel DNA base editors have been developed for the editing of nuclear and organellar genomes, including the cytosine base editor (CBE), the adenine base editor (ABE), the glycosylase base editor (GBE), the adenine and cytosine dual base editor (DBE), the prime editor (PE) and the mitochondrial genome editor. In this review, we summarize the principles, optimization processes and current advances of the above six DNA editors and focus on their application in crop genetic improvement. Finally, the future development of base editing technology is prospected.

Key words: CRISPR/Cas9; Base editing technology; DNA base editor; Mitochondrial DNA; Crop improvement

收稿日期: 2022-08-12 网络首发时间: 2022-09-06 11:00:35
网络首发地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/44.1110.S.20220905.1630.004.html>
作者简介: 张雅玲, 博士后, 博士, 主要从事作物重要性状分子机制研究和植物基因编辑系统应用, E-mail: zdling26@qq.com;
王铎和, 硕士研究生, 主要从事作物育性分子机制研究, E-mail: 335668621@qq.com; [†]同等贡献; 通信作者:
陈乐天, 教授, 博士, 主要从事作物育性分子机制与杂种优势利用研究, E-mail: lotichen@scau.edu.cn; 刘耀光,
研究员, 中国科学院院士, 博士, 主要从事植物育性发育分子遗传学和基因工程研究, E-mail: ygliu@scau.edu.cn
基金项目: 中国博士后科学基金 (2020M682722); 广东省基础与应用基础研究区域联合基金青年项目 (2020A151511101)

基因编辑技术是指能够对特定染色体区段或基因进行核苷酸碱基的定点重组、敲除和定点插入/替换的技术。作为 21 世纪生命科学领域最重要的突破性、革命性技术之一,基因编辑技术的开发与应用被迅速地推广至包括人类在内的动植物基因功能、遗传改良和疾病治疗等领域,极大地推动了生物学各个学科的发展,使生物基础科学和应用科学进入了前所未有的广度和深度。基因编辑技术的发展始于序列特异识别元件与核酸酶的融合,历经 3 个发展阶段且越来越简洁高效:第 1 代是锌指核酸酶 (Zinc finger nucleases, ZFNs) 基因编辑系统,它由负责识别特定序列的锌指蛋白和负责切割的核酸内切酶 *Fok I* 组成,其中,锌指蛋白包含多个串联的、能识别 3 个特异连续碱基对的锌指结构^[1-4];第 2 代是类转录激活因子效应物核酸酶 (Transcription activator-like effector nucleases, TALENs) 基因编辑系统,它由识别单个碱基对的转录激活因子类效应子 (Transcription activator-like effector, TALE) 基序串联形成序列识别模块,融合核酸内切酶 *Fok I* 后对特异片段进行定向切割^[5-7];第 3 代是由成簇的规则间隔短回文重复序列 (Clustered regularly interspaced short palindromic repeat, CRISPR) 及 CRISPR 相关核酸酶蛋白 (CRISPR-associated protein, Cas) 组成的新型基因编辑系统,CRISPR/Cas 系统主要包含单链引导 RNA (Signal guide RNA, sgRNA) 和 Cas 核酸酶组成,Cas 核酸酶能在 sgRNA 的引导下定向切割双链 DNA^[8]。以 CRISPR/Cas9 为代表的 CRISPR/Cas 系统载体构建简单,编辑效率高,成本低且能实现同时多靶点编辑,因此成为目前使用最为广泛的基因编辑工具^[9-11]。核酸酶 *Fok I* 或 Cas 蛋白都能切割 DNA 序列产生双链断裂 (Double-stranded break, DSB),生物体内的 DNA 发生 DSB 后会启动内源修复,其中,最主要的修复方式是非同源末端连接 (Non-homologous end joining, NHEJ) 修复^[12-13]。当存在同源 DNA 模板时,该 DSB 也能被同源定向修复途径 (Homology-directed repair, HDR) 修复。NHEJ 介导的修复响应迅速高效但容易出错,大概率会在切割位点附近产生碱基的随机插入或缺失突变 (Insertions and deletions, Indels),并破坏靶基因功能;同源重组途径可以产生精准的修复,但是效率低,目前尚难以广泛使用^[12-13]。因此,CRISPR/Cas 系统对目标片段的编辑具有不可控的随机性,可以破坏基因功能,但不能对单个碱基进行精准替换编辑。然而,许多

人类疾病的发生或作物重要农艺性状的改变是由单碱基变异引起的^[14-15],开发高效、精准的单碱基替换编辑系统对基因治疗或作物育种研究非常重要。为了更加精准地编辑特定片段或碱基,DNA 碱基编辑系统应运而生。目前已有多种 DNA 碱基编辑器被开发,包括能将 C•G 至 T•A 转换的胞嘧啶单碱基编辑器 (Cytosine base editors, CBEs)、能将 A•T 至 G•C 转换的腺嘌呤单碱基编辑器 (Adenine base editors, ABEs)、C•G 至 G•C 颠换的糖基化酶单碱基编辑器 (Glycosylase base editors, GBEs)、能同时实现同一位点的 C•G 至 T•A 和 A•T 至 G•C 转换的双碱基编辑器 (Dual base editors, DBEs)、适应所有碱基之间转换的引导编辑器 (Prime editors, PEs) 以及线粒体 DNA 编辑器。DNA 碱基编辑器的开发为植物基因组功能解析和作物精准育种提供了强有力的技术支撑,本文着重总结上述 DNA 编辑器最新研究进展及优化历程,介绍它们在作物遗传改良中的应用,并对碱基编辑技术今后的发展进行了展望。

1 DNA 碱基编辑器

1.1 胞嘧啶单碱基编辑器 (CBEs)

1.1.1 CBEs 的建立 单碱基编辑系统是基于 CRISPR/Cas9 系统开发的更为精准的碱基替换系统。CRISPR/Cas9 系统工作时,sgRNA 和 Cas9 核酸酶蛋白形成复合体,Cas9 蛋白在 sgRNA 的引导下,找到编辑受体基因组的目标靶点位置并与之结合形成三元复合体,随后 Cas9 核酸酶的 2 个核酸酶结构域 HNH 和 RuvC-like 分别在前间区序列邻近基序 (Protospacer adjacent motif, PAM) 上游 3 nt 的位置对互补链和非互补链进行单链切割,形成了平末端 DSB 位点。为避免 Cas9 核酸酶介导的双链切割,哈佛大学 David Liu 团队将 Cas9 蛋白的第 10 位 (天冬氨酸 Asp→丙氨酸 Ala, D10A) 和第 840 位氨基酸 (组氨酸 His→丙氨酸 Ala, H840A) 进行点突变,获得了能被 sgRNA 引导并结合 DNA 但核酸酶功能丧失的 dCas9 (Catalytically dead Cas9),开创性地将 dCas9 与仅作用于单链 DNA 的高活性大鼠胞苷脱氨酶 rAPOBEC1 融合表达,首次开发出了不依赖 DNA 双链断裂且无需同源模板就能够实现定向转换 C•G 至 T•A 的胞嘧啶碱基编辑器 BE1,编辑窗口是 PAM 上游-17~-13 位之间约 5 nt 的区段^[16]。BE1 的基本工作原理是 dCas9-rAPOBEC1 融合蛋白在 sgRNA 的引导下结合至靶

点位置, rAPOBEC1 将编辑窗口区内胞嘧啶 C 脱氨基转换成尿嘧啶 U, 在后续的 DNA 复制或修复过程中, U 被识别为胸腺嘧啶 T, 互补链中相应位置的鸟嘌呤 G 也被转换为腺嘌呤 A, 因此产生了 C•G 至 A•T 的定向转换。Komor 等^[16] 研究发现 BE1 在人源 H293T 细胞中编辑效率仅为 0.8%~7.7%, 远远低于体外试验 (25%~40%), 猜测是体内尿嘧啶 DNA 糖基化酶 (Uracil DNA glycosylase, UDG) 会识别错配的 U•G, 催化去除 U 后启动碱基切除修复 (Base-excision repair, BER) 过程, 将 U•G 恢复为 C•G。基于这一猜测, 该团队将尿嘧啶 DNA 糖基化酶抑制蛋白 (Uracil DNA glycosylase inhibitor, UGI) 融合到 BE1, 开发出第 2 代碱基编辑器 BE2, 成功将细胞内 C•G 至 T•A 编辑效率提高至 20%。真核生物的错配修复机制 (Eukaryotic mismatch repair, MMR) 可以利用新合成 DNA 链上的切口识别错误碱基并进行切除和重新合成, 为了进一步操纵 DNA 碱基修复过程, 该团队尝试恢复 dCas9 蛋白的 HNH 核酸酶结构域的切割活性, Cas9 缺刻酶 (Nickase Cas9, nCas9) 能在互补链上产生单链切口, 从而诱导激活 MMR 或 BER 途径, 使错配的 U•G 被优先修复为 U•A, 进而获得目标突变 T•A, 这一方式构建的编辑系统即为第 3 代碱基编辑器 BE3(图 1a)。与 BE2 相比, BE3 在人类细胞中的 C-T 编辑效率 (约 37%) 提高了 2~6 倍, 编辑窗口仍为 PAM 上游-17~-13 位^[16]。这一系列极具创新的研究成果迅速点燃了生物科学领域科研工作者的研究热情, 基于 BE3 进行优化或改进的单碱基编辑器版本层出不穷, 编辑对象由人类细胞推广至各类动植物和微生物。

1.1.2 CBEs 的优化 CBE 系统的优化和改造主要涉及以下 5 个方面: 1) 优化 UGI 的拷贝数、增加游离的 UGI 分子或利用胞嘧啶脱氨酶对底物序列的偏好性, 降低非目的编辑产物。Komor 等^[17] 通过在 BE3 系统中融入第 2 份 UGI 构建了第 4 代碱基编辑器 BE4, 该系统的 C•G 至 T•A 转换效率增加了约 50%, 且减少了一半的非 C 至 T 副产物。Komor 等^[17] 将 BE4 与 DSB 末端保护蛋白 Gam 融合, 成功构建了与 BE4 相比 C•G 至 T•A 编辑能力不变而 Indels 发生频率大幅减少的 BE4-Gam 系统。Wang 等^[18] 通过共表达 BE3 系统和游离的 UGI 分子获得了增强型碱基编辑器 (Enhanced base editor, eBE), 该系统在抑制非目的 Indels 和替换编辑的同时, 有效提高了 BE3 的编辑准确度。

Geheke 等^[19] 和 Zhang 等^[20] 通过改造人类胞嘧啶脱氨酶 hAPOBEC3A 创建了 eA3A-BE3, 强化了其对 TC 序列的偏好性, 能高效引起 TC 模块中 C 的突变而不编辑其他 C, 在减少了非目的编辑的同时缩小了编辑窗口。

2) 优化碱基编辑器的表达、融合其他功能性分子, 提高 CBE 编辑活性。在 BE4 的表达核两端融入核定位信号后, 新系统 BE4max 编辑效率较 BE4 提升了 1.3 倍, 通过优化祖先序列的密码子增强表达构建的 AncBE4max 展现出比 BE4max 更优越的编辑能力^[21]。Zafra 等^[22] 通过优化 BE3、BE4-Gam 和 xBE3 的密码子和增加额外的核定位信号, 开发 FNLS 系列 CBE, 进一步大幅提高了编辑效率, 编辑窗口内的 C•G 至 T•A 转换率提升了 15~150 倍。Zhang 等^[20] 将 DNA 修复相关蛋白 Rad51 的单链 DNA 结合结构域融合到 nCas9 和脱氨酶之间, 构建了具有超高编辑活性、更宽编辑窗口的 CBE 系统 hyBE4max、hyA3A-BE4max 和 hyeA3A-BE4max。

3) 筛选高特异性 Cas9 蛋白和胞嘧啶脱氨酶变体, 降低 sgRNA 依赖/非依赖性脱靶效应。Rees 等^[23] 通过对 Cas9 核酸酶已知功能位点的突变, 增强其 DNA 特异性, 创建了脱靶效应降低的高保真型 BE3 系统 (High-fidelity BE3, HF-BE3)。Lee 等^[24] 在大肠埃希菌中建立了定向进化技术, 筛选获得了对靶序列具有高特异性的 Sniper-Cas9, 降低了脱靶效应。Wang 等^[25] 利用胞嘧啶脱氨酶的抑制序列结构域 (Deoxycytidine deaminase inhibitor, dCDI) 开发可抑制脱靶位点编辑的变形式碱基编辑系统 tBEs, 降低了识别基因组特定 DNA 序列定位的定位器产生的 Cas9/sgRNA 依赖性脱靶效应和对该特定基因组 DNA 序列进行编辑的效应器产生的 Cas9/sgRNA 非依赖性单链 DNA 脱靶效应。

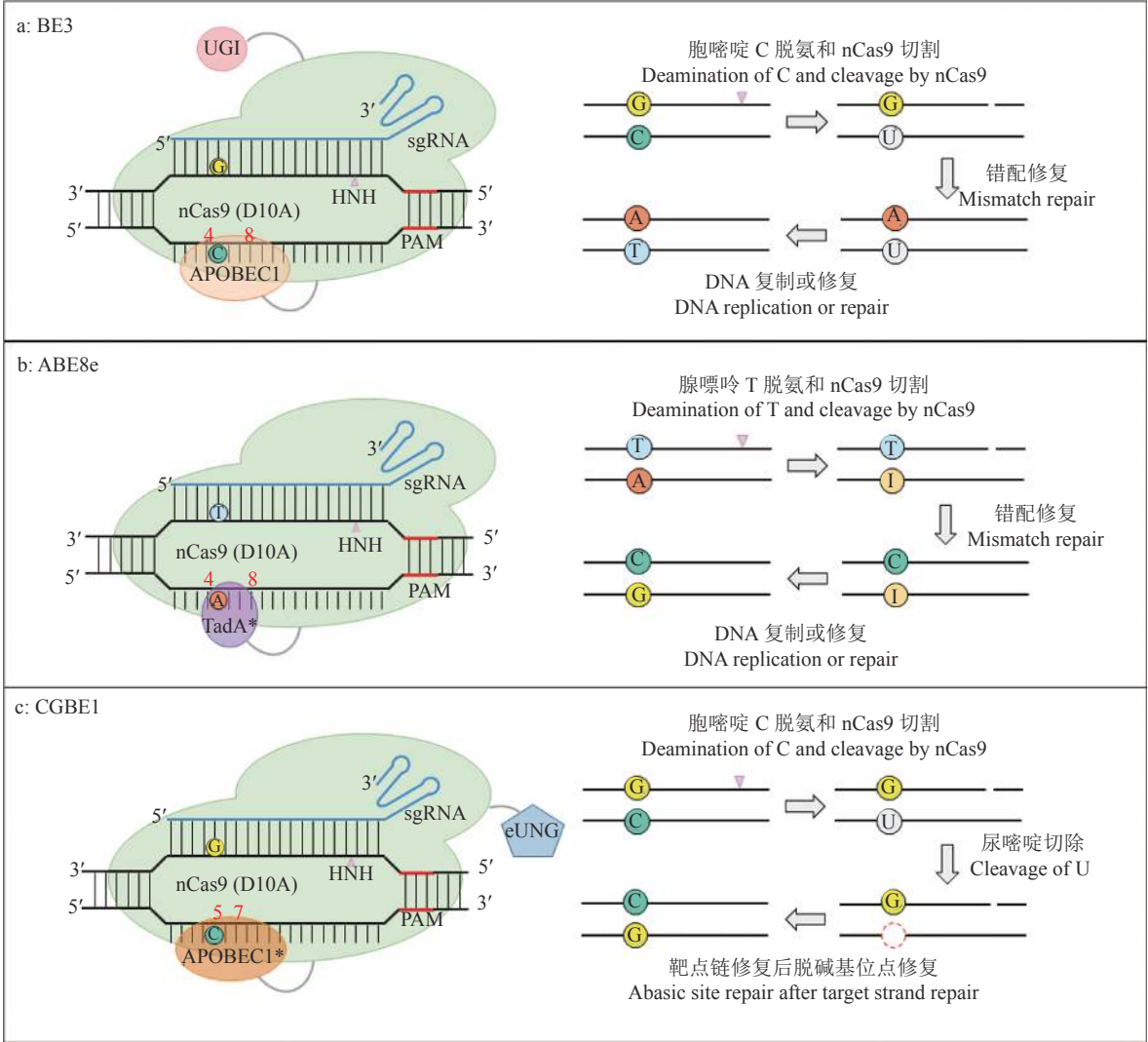
4) 改造或更换胞嘧啶脱氨酶, 扩大或缩小编辑窗口。Kim 等^[26] 构建了 CBE 新系统 YE1-BE3、YE2-BE3、EE-BE3 和 YEE-BE3, 将 BE3 的编辑窗口核苷酸从 5 个缩小至 1~2 个, 证实了胞嘧啶脱氨酶结构域的突变会强烈影响编辑窗口大小。通过循环排列 nCas9 策略构建的 CP-CBEmax 将编辑窗口核苷酸从 4~5 个扩大到 8~9 个, 并减少了副产物的生成^[27]。Nishida 等^[28] 利用七鳃鳗激活诱导胞苷脱氨酶 (Activation-induced cytidine deaminase, AID) 同源蛋白 PmCDA1 创建了新的 CBE 系统 Target-AID, 编辑窗口为 PAM 上游第 18 位碱基附

近 3~5 个碱基 (集中在第 16~20 位)。Ma 等^[29] 则在单碱基编辑系统 TAM(Targeted AID-mediated mutagenesis) 中融合了人类 AID 变体 hAIDx(Haid P182X), 编辑活性窗口为 PAM 上游-16~-12 位碱基。美国斯坦福大学 Michael Bassik 团队开发的 CRISPR-X 系统可以实现 PAM 下游+20~+40 位窗口内平均突变效率为 20.6%。

5) 筛选识别不同 PAM 序列的 Cas 蛋白, 拓宽 CBE 靶向序列范围。Kim 等^[26] 构建了识别 PAM 序列为 NNGRRT 的 SaBE3、识别 NGA 的 SpVQR-Cas9、识别 NGAG 的 SpEQR-Cas9、识别 NGCG 的 SpVRER-Cas9 和识别 NNNRRT 的 SaKKH-Cas9, 使 CBE 系统能编辑的靶序列范围扩增了 2.5 倍; 该团队还创建了可以识别包括 NG、GAA 和 GAT 在

内的多种 PAM 序列 SpCas9 变体 (xCas9)^[30]。Nishimasu 等^[31] 创建了识别 NG PAM 位点的 SpCas9-NG。Li 等^[32] 构建了特异识别 PAM 序列 TTTV(V 为 A/C/G) 的 dCpf1-BE, 编辑窗口为 PAM 序列下游第 8~13 位 (PAM 位点计为 1)。

1.1.3 在植物中开发的高效胞嘧啶碱基编辑器 CBE 在动物细胞被成功开发后, 在植物中也得到了广泛测试和改良。早期的 BE3 系统在植物中编辑效率 (0~40%) 较低^[33-34]; BE4 在植物中的编辑效率 (0~60%) 得到一定的提升, 但总体偏低且不稳定^[35-36]; BE4max 使得 CBE 在植物中的编辑效率提高至 0~80%^[37]。Target-AID 在植物中实现了编辑效率 4%~90% 的高效编辑, 编辑窗口 (C2~C12) 也得到拓展^[38-39]。BE3、BE4 和 BE4max 中使用的是



a: CBE 系统, 以 BE3 为例; b: ABE 系统, 以 ABE8e 为例; c: GBE 系统, 以 CGBE1 为例; 染色体单链上红色数字表示该脱氨酶的编辑窗口
a: CBE system taking BE3 as an example; b: ABE system taking ABE8e as an example; c: GBE system taking CGBE1 as an example; The numbers in red indicate deamination windows

图 1 CBE、ABE 和 GBE 碱基编辑器原理
Fig. 1 Schematic diagrams of CBE, ABE and GBE systems

rAPOBEC1 或 pamCDA1 脱氨酶, 它们对靶点序列环境有较强的偏好性, 不能实现稳定编辑, 在植物的较多靶点中存在编辑效率为 0 的情况。

Zong 等^[40] 将人源胞嘧啶脱氨酶 hA3A 替换成 rAPOBEC1 后, 实现了不受靶点序列环境影响的高编辑效率 (6%~80%)。Wang 等^[41] 通过增加核定位信号拷贝数 (F4NLS) 提高了 rAPOBEC1 在植物中的编辑效率; 该团队还建立了一种基于靶向差异 sgRNAs 的代理报告系统 (Discriminated sgRNAs based SurroGate system, DisSUGs), 编辑效率比常规编辑方法提高了 3~5 倍^[42]。华南农业大学刘耀光团队根据水稻密码子偏好优化 evoAPOBEC1、evoFERNY、evoCDA1 和 hA3A 的核酸序列, 并将它们与 Cas9n-NG(识别 NGN-PAM 靶点) 变体融合, 开发出一套植物高效广靶向胞嘧啶碱基编辑器 PhieCBEs; 与 BE4 对照相比, PhieCBEs 的平均编辑效率提高了 3~8 倍, 消除了碱基序列环境的偏好性, 展现出稳定的编辑能力^[43]。

1.2 腺嘌呤碱基编辑器 (ABEs)

1.2.1 ABEs 的建立 人类致病性的 SNPs 中需要被纠正的 A•T 至 G•C 类型占总数的 48%, CBEs 碱基编辑器虽然可以实现 C•G 至 T•A 的碱基编辑, 但可替换的碱基类型非常有限, 限制了碱基编辑器的应用范围。Gaudelli 等^[44] 在 2017 年开发了可以实现 A•T 至 G•C 转换的 ABEs, 扩大了碱基编辑的范围; 研究发现自然界中存在的腺嘌呤脱氨酶只在游离腺嘌呤、游离腺苷、RNA 中的腺苷或错配的 RNA-DNA 异源双链中脱氨, 不能以双链 DNA 或单链 DNA 作为底物对 A 碱基脱氨, 因此不能将自然界中存在的腺嘌呤脱氨酶直接运用于碱基编辑系统中。由于大肠埃希菌 RNA 腺苷脱氨酶 TadA 不需要小分子激活且作用于多核苷酸, 该团队以 TadA 作为改造对象进行人工驯化, 通过易错 PCR、DNA 重排等策略对野生型 TadA 的氨基酸位点进行随机突变, 经过 7 轮的改造成功开发出可以作用于单链 DNA 的 ABE 系统 ABE1.2 至 ABE7.10; 在哺乳动物细胞中, A•T 至 G•C 的平均编辑效率由 ABE1.2 的 3% 提高至 ABE7.10 的 58%^[44]。ABE 开发的过程实现了重大突破, 对获得和利用特定功能酶有重要的借鉴意义。

1.2.2 ABEs 的优化 由于自然界中缺乏可以直接作用于 DNA 的腺嘌呤脱氨酶, 优化策略主要是在 TadA7.10 的基础上进行, 如优化密码子、更换核定位信号、更换识别不同 PAM 的 Cas 核酸酶等。

Koblan 等^[21] 通过使用 GenScript 公司优化的密码子序列, 将 SV40 NLS 换成 bipartite NLS(bpNLS), 并在 TadA7.10 的 N 端增加 bpNLS, 优化出编辑效率比 ABE7.10 进一步稳定提高的 ABEmax。Huang 等^[27] 将预测结构比 SpCas9 更接近 R-loop ssDNA 的 4 个 SpCas9 变体 CP1012、CP1028、CP1041 和 CP1249 分别融入 ABEmax 系统, 扩大了 ABE 系统的编辑窗口; 将识别不同 PAM 序列的 SpCas9 变体 VRQR(PAM: NGA)、VRER(PAM: NGCG)、xCas9(PAM: NG) 和 Cas9NG(PAM: NG) 融入 ABEmax 系统, 拓展了 ABEmax 在基因组的可编辑范围。此外, 利用不同菌株来源的 Cas9 蛋白, 如 SaCas9(PAM: NNGRRT)、SaCas9-KKH(PAM: NNNRRT) 和 ScCas9(PAM: NNGN) 等在 ABE7.10 或 ABEmax 的基础上试验, 拓展了基因组的编辑范围^[45-46]。

前期对 ABE 的改良主要是在 ABE7.10 的基础上进行, 包括替换核定位信号、优化 ABE7.10 的密码子以及使用不同 Cas9 变体拓展 PAM 的靶向范围, 这些均没有实质性提高 TadA 脱氨酶的活性。2020 年, Richter 等^[47] 通过噬菌体辅助连续进化系统 (PACE) 筛选到在 ABE7.10 的基础上增加 8 个新突变位点的突变体 TadA8e, 其脱氨活性及与 Cas 蛋白的兼容性均大幅提高; 与 ABE7.10 相比, 利用 TadA8e 构建的 ABE8e(图 1b) 碱基编辑活性增加了 590 倍。Lapinaite 等^[48] 对 ABE8e 的超高分辨率冷冻电镜结构分析结果显示, ABE8e 催化 DNA 脱氨的速度比早期的 ABE7.10 和 miniABEmax 快约 1 100 倍, 超高的脱氨速度增强了 ABE 碱基编辑的有效性和适用性, 扩大了 ABE 的应用范围。

1.2.3 在植物中开发的高效腺嘌呤碱基编辑器工具 在水稻、拟南芥、小麦、油菜等植物中, ABE 系统也得到了广泛测试和改良。Li 等^[49] 在 ABE7.10 的基础上通过优化脱氨酶密码子、调整脱氨酶和 NLS 的位置、使用不同的 NLS 个数等策略优化组合, 最终获得植物腺嘌呤碱基编辑器 PABE-7, 其在小麦和水稻中的编辑效率比 ABE7.10 提高了 1.1 倍。中国科学院上海植物逆境生物学研究中心朱健康团队开发了 ABE-P1(ABE7.10)、ABE-P1S(只含 TadA*)、ABE-P2(ABE-SaCas9)、ABE-P3(VQR-ABE)、ABE-P4(VRER-ABE)、ABE-P5(SaKKH-ABE)、ABE-P6(xCas9 3.6)、ABE-P7(xCas9 3.7)、ABE-NG(Cas9-NG)、ABE-NG-S(只含单个 TadA*7.10)、ABEmax-nCas9/nCas9-NG(ABEmax)

等,在一定程度上提高了植物编辑效率、拓展了靶向范围^[37, 50-53]。Zeng 等^[35]在水稻中对 Cas9n-ABE、xCas9n-ABE、Cas9n-NG-ABE 和 eCas9n-NG-ABE 测试后发现, ABE7.10 的编辑效率较低。在拟南芥中使用 pRPS5A 启动子驱动 ABE7.10 可以实现有效编辑,而使用 p35S 和 pYAO 启动子的未发现有效编辑^[54]; ABE-xCas9、ABE-nCas9-NG 也在拟南芥中实现了有效编辑,但效率均不高^[55]。可见,植物中 ABE 系统 ABE7.10 的编辑活性并不高,这也证明了 TadA*7.10 的脱氨活性较低。

高效腺嘌呤碱基编辑器 ABE8e 在动物细胞中报道后,植物科研工作者对 ABE8e 也开展了广泛的研究。Tan 等^[56]根据水稻密码子偏好性优化 TadA8e、单链 DNA 结合 DBD 的核苷酸序列,并将它们分别与 2 种识别 NGN-PAM(PAM-less) 的 SpCas9n 变体编码基因 *SpCas9n-NG* 和 *SpGn* 以及一种识别 NNN-PAM(PAM-free) 的 SpCas9n 变体编码基因 *SpRYn* 融合,开发了一套植物高效广靶向的腺嘌呤单碱基编辑器 PhieABEs(hyABE8e-NG、hyABE8e-SpG 和 hyABE8e-SpRY),平均编辑效率分别为 67.8%、73.9% 和 78.5%,比对照组 ABE7.10(2.6%) 提高了 26~30 倍。Yan 等^[57]将 TadA8e、TadA9(TadA8e+V82S+Q154R) 分别融合不同的 Cas9 变体(包括 SpCas9n、SpCas9n-NG、SpRYn 和 ScCas9n),这些 Cas9 变体兼容性非常高,特别是 TadA9 整合 SurroGate 系统,多个测试靶位点的碱基编辑效率超过 90%。与 Cas9 变体融合的 TadA8e 均表现出 A•T 至 G•C 的高编辑效率^[58-60]。

1.3 糖基化酶碱基编辑器 (GBEs)

CBE 或 ABE 介导的碱基编辑器主要实现同类碱基间的转换编辑(嘌呤至嘌呤、嘧啶至嘧啶)。如何开发可实现碱基颠换编辑的新型碱基编辑器成了相关领域专家共同思考的问题。2020 年 7 月,美国哈佛医学院 Kurt 等^[61]和中国科学院天津工业生物技术研究所 Zhao 等^[62]以背靠背的形式分别在《Nature Biotechnology》在线发表了能有效介导 C-G 及 C-A 碱基颠换的新型单碱基编辑器 GBEs,2 项研究遵循了类似的研究思路,在 CBE 系统的基础上去除 UGI,同时增加 UDG 以期获得更高的 C-G 颠换率,GBE 的创建填补了碱基编辑器功能空缺。Kurt 等^[61]开发了 2 种碱基颠换编辑器 CGBE1(图 1c)和 miniCGBE1,前者基于 BE4max 系统改造,由 RNA 引导的 nCas9、rAPOBEC1(R33A) 及大肠埃希菌来源的尿嘧啶 DNA N-糖基化酶 eUNG 组成,其中, rAPOBEC1(R33A) 有利于减少 RNA 脱靶、增

强 DNA 编辑活性,后者在 CGBE1 的基础上去除了 eUNG;这 2 种碱基编辑器都可以有效介导目标序列 C-G 碱基颠换,并减少非目的 C-W(W 为 A/T) 和 indels 产生;CGBE1 在 HEK293T 细胞中的 C-G 颠换效率平均为 14.4%,miniCGBE1 则降低了 indels 产生的频率且伴随编辑效率(13%)小幅降低。Zhao 等^[62]则创建了能在大肠埃希菌中实现 C-A 颠换的 AID-nCas9-Ung(即 GBE),该系统的平均编辑特异性是 93.8%、编辑效率为 24.1%;开发了能在哺乳动物细胞中实现 C-G 颠换的单碱基编辑器 APOBEC-nCas9-Ung,对靶序列第 6 位的 C(PAM 序列记为 21~23) 有较高的编辑特异性,C-G 颠换效率为 5.3%~53.0%。新加坡科技研究局基因组研究所开发了 nCas9 融合脱氨酶及不同碱基切除修复蛋白的系列 CGBE 系统,其中, rAPOBEC-nCas9-rXRCC1 的编辑效率(15.4%) 最高,编辑产物纯度高达 90%^[63-64]。

Yuan 等^[65]通过改变 Ung 和脱氨酶的种类和相关位置,结合密码子优化,开发了 OPTI-CGBEs。Koblan 等^[66]针对 DNA 修复基因的 CRISPRi 筛选,确定了影响 C•G 至 G•C 编辑结果的因素,开发了与机器学习模型配套的系列工程化 CGBE,实现了更高效、特异的 C•G 至 G•C 颠换编辑,并通过靶点文库分析和机器学习创建了能够准确预测 CGBE 编辑结果的 CGBE-Hive。Chen 等^[67]利用 SpRY Cas9 变体进一步拓宽了 CGBE 的基因组靶向范围。Sun 等^[63]对 GBE 系统进行了升级,将人类 Ung 换成了酿酒酵母源的 Ung,融入 Rad51 蛋白的单链 DNA 结合结构域,并在 APOBEC1 中引入 R33A 突变,最终构建了 GBE2.0,编辑效率达 30.88%、C•G 至 G•C 颠换编辑产物纯度为 35.57%~92.92%。目前,GBE 系统已经被应用到拟南芥、水稻、番茄、白杨等植物的碱基编辑中^[68-71]。

1.4 双重碱基编辑器 (DBEs)

2020 年 Li 等^[72]开发的双重碱基编辑器——饱和靶向内源基因突变碱基编辑器 STEME (Saturated targeted endogenous mutagenesis editors),实现了植物基因的定向进化和功能筛选,揭开了双重碱基编辑器 DBE 研究的序幕。该团队在 nCas9 的 N 端同时融合了 2 种脱氨酶(胞嘧啶脱氨酶 APOBEC3A 和腺嘌呤脱氨酶 ecTadA-ecTadA7.10),并在 nCas9 的 C 端融合 1 个 UGI 拷贝或自由表达 2 个 UGI 拷贝,创建的 STEME-1~STEME-4 和 Cas-NG 版本的 STEME-5 可以在单个 sgRNA 的引导下诱导靶位点同时产生 C•G 至

T•A 和 A•T 至 G•C 的突变; STEME-1(图 2a)在水稻原生质体中 C•G 至 T•A 编辑效率高达 61.61%, 而 C•G 至 T•A 和 A•T 至 G•C 同时突变的效率也高达 15.50%; 在 20 个 sgRNA 的引导下, STEME-NG 能对水稻乙酰辅酶 A 羧化酶 OsACC 编码的 56 个氨基酸产生接近饱和的突变, 编辑效率达 73.21%, 并获得了抗除草剂的水稻材料^[72]。随后,《Nature Biotechnology》发表了 3 款构建方案和功能类似的双碱基编辑器^[73-75]。Zhang 等^[73]将胞嘧啶脱氨酶 rAPOBEC1、腺嘌呤脱氨酶 TadA 与 nCas9 进行不同形式的组装融合, 用具有更高诱导突变活性的 hAID 替换 rAPOBEC1, 并辅以密码子优化、NLS 优化、UGI 串联形式优化和 linker 序列优化等调整, 获得了双碱基编辑器 A&C-BEmax; 与单碱基编辑器 ABEmax 和 AID-BE4max 相比, A&C-BEmax 对腺嘌呤的活性略有降低、编辑窗口一致, 但对胞嘧啶的活性有所提高、编辑窗口从 C3~C13 扩大至 C2~C17 且 RNA 脱靶活性大幅降低。Sakata 等^[74]开发的 Target-ACEmax 选择 CBE 系统 Target-AID 作为双碱基编辑器融合基础, 融合了 ABE7.10。Grünwald 等^[75]开发的 SPACE 则融合了 Target-AID 和体量更小的 miniABEmaxV82G。与同时表达 2 个单碱基编辑器相比, SPACE 在目标位点具有更高效的双重编辑活性, Target-ACEmax 的双重编辑效率与原有的单碱基编辑器编辑效率相当。

2021 年, Xu 等^[76]开发了适用于植物的双碱基编辑器 pDuBE1, 利用日本七鳃鳗胞嘧啶脱氨酶同源物 CDA1L-4 构建了在 C1~C12 有较高编辑效率的 C 端胞嘧啶碱基编辑器 CT-CBE, 并在 CT-CBE 的 N 端融合了 TadA-8e, 开发出 pDuBE1, 编辑效率可达 87.6%, 在稳定转化的植物细胞中 C•G 至 T•A 和 A•T 至 G•C 的同时转换频率高达 49.7%。Xiong 等^[77]报道了包括多种双碱基编辑器 CBE-ABE 在内的植物碱基编辑工具箱, 融合了 AID10、nCas9 和 ABE8e, 能够对靶序列 4~8 位的 A 或不同区域的 C 进行同时编辑, 丰富了编码基因和非编码基因的功能研究工具。Liang 等^[78]将 ABE 与 CGBE 融合, 开发出多功能双碱基编辑器 AGBE, 可以在单个 sgRNA 的引导下诱导同一靶位点发生 A-G、C-G、C-T 和 C-A 4 种碱基转换, 大幅增加了编辑产物的多样性, 有利于饱和突变文库的构建; 通过全基因组和转录组测序分析, 确认 AGBE 没有引起明显的 DNA 或 RNA 水平的脱靶效应, 是高效、安全的碱基编辑工具。

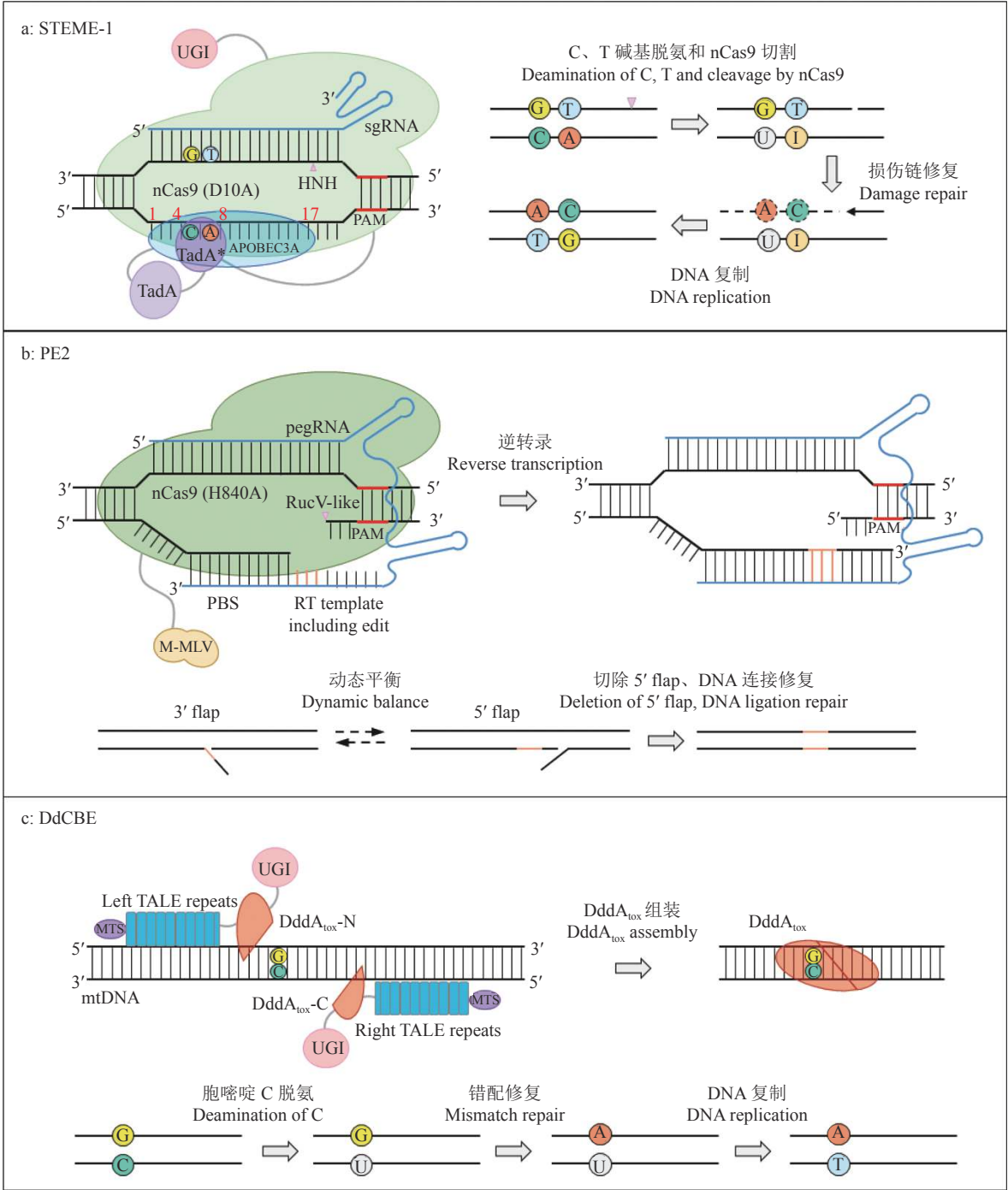
1.5 引导基因编辑器 (PEs)

单碱基编辑器始终有其特定的适用范围, 普适性编辑靶序列是当前的技术热点。2019 年 Anzalone 等^[79]报道了一种通用的、能精确编辑基因组的引导编辑器 PE1~PE3, 可以在不产生 DSB 和不需要 DNA 供体的情况下, 通过“搜索和替代”介导人类细胞中的小片段靶向插入、删除以及所有 12 种可能的碱基转/颠换。相比于 CBE 或 ABE, PE1 系统主要在 sgRNA 和 Cas9 蛋白 2 个方面进行了重点改造: 1) 在 sgRNA 的 3'末端增加了一段 RNA 序列 (该序列由与目标 DNA 链互补的引物结合位点 PBS 和携带编辑后模板信息的逆转录模板序列 RT template 组成), 改造后的 sgRNA 被命名为 pegRNA; 2) 将切割非互补链的 nCas9(H840A) 与 M-MLV 逆转录酶融合。PE 的工作原理是: pegRNA 引导 nCas9(H840A) 在靶序列的非互补链上进行切割 (即切割 PAM 识别链 PAM 上游 3 nt 处); 随后, pegRNA 的 PBS 序列与非互补链识别配对, M-MLV 逆转录酶以携带编辑后模板信息的 RT template 为模板合成编辑后的新序列, 新序列在切口附近形成动态平衡中的 5' flap 和 3' flap 结构; 在修复过程中, 不携带突变的 5' flap 会被结构特异性内切酶优先切除, 携带目的编辑序列的 3' flap 得以保留, 插入或删除后不能匹配的 DNA 双链会通过错配修复机制修复互补链, 最终保留突变序列。PE1 在 293T 细胞中的编辑效率并不高, 点突变率 0.7%~5.5%、indels 突变率 4%~17%。该团队优化了 M-MLV 逆转录酶部分氨基酸序位点创建了 PE2(图 2b), 改善了热稳定性、DNA/RNA 杂交紧密性、逆转录连续性, 使 PE1 的 indels 编辑效率提升了 2 倍以上; 在 pegRNA 下游增加了可介导互补链切割的 sgRNA, 获得了 PE3, 编辑效率 (约 55%) 提升了 1.5~4.2 倍, 并在 PE3 的基础上开发了降低 indels 突变率的 PE3b 版本^[79]。这项研究受到了广泛关注, PE 系统也被迅速应用到植物研究中。

2020 年, Lin 等^[80]将 PE2、PE3、PE3b 进行密码子、启动子和编辑条件的优化, 获得了适用于植物的引导编辑系统 (Plant prime editor systems, PPEs)PPE2、PPE3 和 PPE3b, 并成功在水稻和小麦原生质体中实现了靶位点的点突变、插入和缺失精准编辑, 编辑效率 0.2%~8.0%; 与 26℃ 相比, 37℃ 高温培养原生质体可以显著提升 PPE 的编辑效率。随后, 多个团队在水稻中开展了 PE 的应用试验^[81-85]。Li 等^[81]精准编辑了水稻外源突变基因 *hptII* 和内源基因 *OsEPSPS*, 获得了精准编辑纯合和

杂合植株，编辑效率分别为 9.38% 和 2.22%。Xu 等^[82]在水稻细胞中实现了精准编辑，但编辑效率仅为 0.05%~1.55%；测试了不同 PBS 长度、RT 长度、编辑事件类型、nsgRNA 等因素对 PE 编辑效率的影响。Tang 等^[83]在水稻稳定转化系中引入多个目标位点的精准编辑，但编辑效率不稳定。Hua 等^[84]改造的 sp-PE2 和 sp-PE3 均可以高效介导外源基

因 *GFP* 失活位点的编辑，但对内源靶点效率很低。Butt 等^[85]成功在水稻愈伤组织中精准编辑了乙酰乳酸合成酶编码基因 *OsALS*，创制了除草剂抗性的水稻材料，编辑效率为 0.26%~2.00%；对株型调控基因 *OsIPA* 和 *OsTBI* 编辑后获得了相应表型。Lu 等^[86]在双子叶植物番茄中进行了 PE 编辑尝试，在再生嫩芽不同位点的编辑效率为 0.002 5%~1.660 0%，



a: DBE 系统，以 STEME-1 为例；染色体单链上红色数字表示脱氨酶的编辑窗口，其中，APOBEC3A 的编辑窗口为 C1~C17，TadA 的编辑窗口为 A4~A8；b: PE 系统，以 PE2 为例；c: 线粒体碱基编辑系统，以 DdCBE 为例

a: DBE system taking STEME-1 as an example, the numbers in red indicate deamination windows which are C1~C17 in APOBEC3A and A4~A8 in TadA;
b: PE system taking PE2 as an example; c: Mitochondrial base editing system taking DdCBE as an example

图 2 DBE、PE、线粒体碱基编辑器原理
Fig. 2 Schematic diagrams of DBE, PE and mitochondrial base editors

后代稳定植株中编辑效率为 3.4%~6.7%。以上研究针对 PE 编辑器的各个元件都进行了优化尝试, 但始终未在编辑效率上获得大的突破, 在植物系统中 PE3、PPE3b 的编辑效率并没有比 PE2 的高, 说明在植物系统中互补链切口的引入不能提升编辑效率。Nelson 等^[87]发现 pegRNA 包含 PBS 和 RT template 的 3'端, 容易降解, 影响了 PE 系统的编辑效率; 在 PE 系统的 pegRNA 3'端融合了结构化的 RNA 模块 (epegRNA), 在不增加脱靶效应的情况下, 编辑效率提升了 3~4 倍。

为了突破 PE 系统在植物中的编辑效率限制, 科研人员做了诸多尝试。Jiang 等^[88]增强了 pegRNA 的表达, 在玉米中获得了更高的编辑效率, 2 个位点分别获得了 53.2% 和 6.5% 的精准点突变。Lin 等^[89]发现当 PBS 的熔解温度为 30 ℃ 左右时, PE 系统在水稻多数位点的编辑效率最高; 与单个 pegRNA 相比, dual-pegRNA 策略 (设计 2 个 pegRNA 分别靶向靶序列的 2 条链) 将编辑效率提升了 3 倍; 上述 2 种方法叠加使 PE 效率提高至 17.4 倍。此外, 建立了基于 Tm 值指导的 PBS 序列设计, 开发了植物 pegRNA 设计网站 PlantPegDesigner (<http://www.plantgenomeediting.net>), 方便研究人员快速设计适合特定靶序列的高活性 pegRNA。Jin 等^[90]通过全基因组重测序对 PPE 系统的脱靶效应进行了全面评估, 确认了 PPE 系统在全基因组水平上具有高特异性。Xu 等^[91]在人类细胞、水稻愈伤组织和稳定系中测试发现, 在反转录模板中引入同义错配碱基能提高该靶位点的编辑效率; 将 M-MLV 融合在 nCas9(H840A)的 N 端 (其他植物 PEs 沿用了 M-MLV 融合在 nCas9 C 端的方式) 能有效提高编辑效率; 引入同义错配碱基和 N 端融合时, 构建的 PE-P3-RT-M 编辑效率具有倍增协同效应, 在玉米和水稻上的编辑效率提高了 3 倍, 在原始低效靶点处的编辑效率提高了 10 倍以上。Zong 等^[92]针对 PE 系统的蛋白组分进行优化, 建立了对植物更高效、适用性更广泛的 ePPE(Engineered plant prime editor) 系统, 改进策略包括删除影响 RNA/DNA 结合稳定性的 M-MLV RT 的 RNase H 结构域、在 M-MLV RT 的 N 端融合 M-MLV RT 的辅助因子病毒核衣壳蛋白 (Nucleocapsid, NC), 使碱基替换、片段插入和删除的效率比 PPE 提高了 5.8 倍; ePPE 系统与 dual-pegRNA、epegRNA 策略相结合可以提高编辑效率, 利用 ePPE 系统获得了甲咪唑烟酸和烟嘧磺隆除草剂抗性水稻新材料。Li 等^[93]创制了能筛选 PE 编辑阳性植株的 3 个代理引导编辑器, 即基于 Hygromycin^{Y46*}

的代理引导基因编辑器 (PE3-HS)、基于 OsALS^{S627I} 的代理引导基因编辑器 (PE3-AS) 以及基于 Hygromycin^{Y46*}和 OsALS^{S627I} 的双代理引导基因编辑器 (PE3-DS), 精准编辑了水稻内源基因 *OsSPL14*、*OsDHDP5* 和 *OsNR2*。Zou 等^[94]在 PPE3 的基础上优化 pegRNA 3'末端, 建立了编辑效率更高的 PPE3-evopreQ1 和 PPE3-mpknot 系统, 并对水稻内源基因 *OsCDC48*、*OsALS*、*OsDEP1*、*OsEPSPS* 和 *OsROC5* 精准编辑。

早期的 PE 系统在小片段 DNA 精确插入或删除方面已有良好的表现, 实现了最长 44 bp 的精准插入和 80 bp 的精准删除^[79]。与 CRISPR/Cas 系统相比, PE 系统对大片段的操控还不够成熟。2021 年《Nature Biotechnology》发表了精确删除大片段 DNA 的方法 PRDAR(PE-Cas9-based deletion and repair)^[95]和 PRIME-Del^[96], 这 2 种方法都用了类似的双 pegRNA 策略。PEDAR 系统用功能齐全的 Cas9 替换了 nCas9, 双 pegRNA 在预切除 DNA 片段的两端产生 DSB 切口后, 逆转录酶发挥功能, 在两侧合成短的互补延伸序列, 最终通过修复机制完成精准删除, 在细胞系中实现了以最高 60 bp 序列精准替换 1~10 kb 的基因组片段, 并在小鼠模型中去除 *Fah* 基因中 1.38 kb 的致病性插入并恢复了 *Fah* 在肝脏中的表达^[95]。PRIME-Del 则沿用 nCas9 设计了 2 个 pegRNA, 分别在预删除 DNA 片段上形成对侧缺口, 实现 10 kb 以内任意片段大小的精准删除, 并能在删除片段的同时引入短插入 (最长 30 bp) 而不会显著影响效率或精度, 编辑效率为 1%~30%, 显著高于 CRISPR/Cas9 系统; PRIME-Del 的删除和插入效率较高且错误率低, 还能同时实现多重删除^[96]。Anzalone 等^[97]开发的双引导编辑系统 TwinPE(Twin prime editing) 融合能切除、倒位和整合 DNA 大片段序列的位点特异性重组酶, 实现人类基因组大片段的删除、替换和倒位; 5.6 kb 片段的插入编辑效率为 1.4%~6.8%, 40 kb 片段的倒位效率约 9%。Wang 等^[98]开发的 GRAND 中, 2 个 pegRNA 的逆转录模板区与目标位点不同源但相互互补, 可通过逆转录过程高效靶向插入 20~1 000 bp 的 DNA 片段, 150 bp 片段插入的编辑效率高达 60%, 250 bp 片段的插入效率达 30%。Tao 等^[99]证明了将 nick sgRNA 定位在 pegRNA 的模板序列附近有助于针对性地删除大片段, 将 2 个 sgRNA 都改造为 pegRNA 以实现双向 prime 编辑 (Bi-PE), 编辑效率提高了 16 倍、编辑产物的准确性提高了 60 倍。这些新技术比 CRISPR/Cas 系统更适用于精准、灵活的基因大片段删除和整合。

1.6 线粒体 DNA 编辑器

线粒体作为真核生物最重要的细胞器之一，既是细胞的能量代谢中心，也是细胞内离子稳态调节、氧化还原稳态调节、细胞凋亡调控等重要生理过程的信号枢纽^[100]。线粒体携带环形的具有半自主复制能力的线粒体 DNA(Mitochondrial DNA, mtDNA)，mtDNA 突变或线粒体功能异常被认为与上百种人类疾病相关，如阿尔茨海默病和帕金森氏病等神经退行性疾病、心血管氧化应激损伤等^[101]。如何将 sgRNA 转运至线粒体一直是 CRISPR/Cas 系统应用于线粒体碱基编辑器开发的瓶颈问题，目前尚无较好的解决方案。早期线粒体编辑器依赖于无 RNA 介导的核酸酶 ZFNs^[102] 和 TALENs^[103-105] 与线粒体靶向信号的融合，从而诱导 mtDNA 双链断裂，线性化的 mtDNA 被迅速降解。这些方法不能在 mtDNA 中引入特定的核苷酸突变，当应用在同质 mtDNA 时，会因为破坏所有 mtDNA 拷贝而损害生物体；当应用在异质 mtDNA 中时，野生型 mtDNA 被降解，突变型 mtDNA 形成比例优势产生表型漂变，可用于线粒体基因功能研究或疾病治疗研究^[106-107]。伯克氏菌编码的脱氨酶 DddA 是一种由细胞间蛋白传递系统 T6SS 介导运输的细菌毒素，DddA 的毒性结构域 DddA_{tox} 与 APOBEC 酶结构接近，能催化双链 DNA 序列的胞嘧啶突变为尿嘧啶。Mok 等^[107] 将 DddA_{tox} 与 TALE、MTS 融合，开发了不依赖 sgRNA 的新型线粒体编辑器 DdCBE (图 2c)，能催化 mtDNA 中目的序列 G•C 至 A•T 的精准编辑，在 HEK293T 细胞中的编辑效率为 4.6%~49.0%；为避免 DddA_{tox} 的毒性，将其分为 2 个 DddA_{tox} 半体 (DddA_{tox}-N 和 DddA_{tox}-C)，分别导入线粒体后在靶标位点重组为活性脱氨酶；DdCBE 对底物序列有严格的偏好性，主要编辑 T-C 转换至 T-T。针对这一缺陷，该团队利用噬菌体辅助连续进化 (PACE) 和噬菌体辅助非连续进化 (PANCE) 技术对 DdCBE 进行了升级，创建了编辑更高效、靶向更广泛的线粒体编辑器新版本 DddA6 和 DddA11，将 MTS 置换成 NLS 后，也可以作为核 DNA 的碱基编辑器，大大提高了 DdCBE 的有效性和适用性^[108]。Cho 等^[109] 融合 MTS、TALE、腺嘌呤脱氨酶 TadA8e 和 DddA_{tox}，构建了线粒体嘌呤编辑器转录激活因子效应物相关脱氨酶 (Transcription activator-like effector-linked deaminase, TALEd)，DddA_{tox} 帮助 TadA8e 接近 mtDNA，使其更容易实现对线粒体基因组的 A-G 碱基转换编辑；TALED 在人类细胞中编辑能力高效稳定、无细胞

毒性、极少线粒体或基因组脱靶效应，该技术突破了线粒体基因组 A-G 的碱基转换技术难关；通过调整 TALEd 的组成部分，开发出可同时实现 C-T 和 A-G 碱基转换的工具。

Kang 等^[110] 基于 DdCBE 系统组装了针对线粒体和叶绿体基因的碱基编辑系统，在生菜或油菜籽愈伤组织的线粒体中碱基编辑效率高达 25%、在叶绿体中高达 38%。Li 等^[111] 改造了 DdCBEs 系统并将其应用至叶绿体基因编辑，使用水稻黄单胞菌中的 TALE 融合叶绿体信号肽 CTP、UGI 以及 2 个 DddA_{tox} 半体，对光系统 I 中叶绿素 a 的保守叶绿体基因 *psaA* 进行碱基编辑，编辑效率达 64%。

2 碱基编辑器在作物遗传改良中的应用

基因编辑技术发展至今，已被广泛应用于植物基因功能研究及作物遗传改良，其中大部分是基于 NHEJ 修复途径引起的基因敲除。然而，在实际生产应用中，控制作物性状的等位基因间往往仅存在一个或多个碱基的变异，此时便无法通过基因敲除达到创建优良等位基因的目的。碱基编辑器则能在不破坏基因功能的基础上，通过改变编码区或表达调控区的单个碱基实现等位基因间的精准替换和基因表达的精细调节，扩大了基因编辑技术在作物遗传改良中的应用范围。如在已发现的调控水稻关键农艺性状的基因变异位点当中，超过一半为单核苷酸多态性 (Single nucleotide polymorphism, SNP) 位点，这些位点的 58% 为 C-T/A-G 的碱基转换，可由 CBE/ABE 编辑器实现精准编辑^[112]。GBE、PE 等编辑系统理论上能与 CBE/ABE 编辑器互为补充，实现对所有单碱基的任意转换/颠换编辑。此外，碱基编辑器还能在编码序列人为创建终止密码子，实现基因敲除的效果。

目前，利用碱基编辑器改良作物性状的研究主要集中于水稻，并逐渐拓展到小麦、玉米、油菜、番茄、土豆、西瓜等作物^[113-114]。通过改造已知的功能基因有效提高了作物的产量和抗逆性、改良了作物品质。例如，通过编辑氮转运相关基因 *NRT1.1B* 提高氮利用效率，实现了作物增产^[34,49,115]；通过编辑株型控制基因 *SPL14*^[50,84,115-116]、穗型控制基因 *DEP1*^[36,49] 和粒型控制基因 *GRF3/4*^[117] 等增加单株穗粒数和千粒质量；对在不同物种中保守存在的基因 *ALS* 进行编辑能够提高多个作物对除草剂的抗性^[39-40,49,82,84,118-124]；编辑抗性基因 *Pi-d2* 增强了水稻的稻瘟病抗性^[118]；对水稻 *SLR1* 进行改造则能降低株高^[34,84]，从而提高作物抗倒伏能力。在作物品质改良方面的工作目

前主要围绕谷粒食味优化和营养强化展开, 如通过编辑基因 *Waxy* 调节稻米直链淀粉含量^[35, 117, 125], 编辑番茄红素脱氢酶基因 *PDS* 丰富大米营养成分^[32, 126]。

3 存在的问题与展望

3.1 新型 DNA 碱基编辑器的脱靶效应及解决策略

单碱基编辑器作为研究由单碱基变异引起的遗传性状的重要工具, 其靶向特异性或脱靶效应受到广泛关注。宗媛等^[127]将碱基系统的脱靶分为传统的可预测脱靶、全基因组范围内不可预测脱靶和转录水平脱靶。研究表明, 单碱基编辑器会导致大量无法预测的脱靶突变^[128-129]。Jin 等^[128]发现 BE3 和 HF-BE3 会诱导水稻的全基因组产生不依赖于 sgRNA 的 C-T 转换突变, 这些突变主要富集在转录的基因区域且无法预测; ABE 脱靶效应则不明显, 表明脱靶效应可能与胞苷脱氨酶或 UGI 等组分有关。Zuo 等^[129]建立了新型脱靶检测技术 GOTI(Genome-wide off-target analysis by two-cell embryo injection), 并对小鼠受精卵转化系进行全基因组测序分析, 确认了 BE3 存在严重的脱靶效应且部分靶点出现在抑癌基因上, 带来了临床安全隐患。Grünwald 等^[130]发现, 单碱基编辑器在编辑 DNA 后还会造成大量的 RNA 突变。Zhou 等^[131]的研究也证实了相关结论, 他们以人类细胞系为模型发现, BE3、ABE7.1 都显著提升了 mRNA 的突变率。Li 等^[132]的研究表明, 用高效腺嘌呤脱氨酶 TadA8 和 TadA9 组装的 ABE 系统同样也会引起 DNA 和 RNA 的随机脱靶突变。这些研究为单碱基编辑器的开发和应用带来更多的思考, 开发的版本主要采用蛋白质生物工程技术筛选保留胞嘧啶脱氨酶的催化活性、降低 DNA 和 RNA 脱靶效应^[133-135]。2022 年赖良学团队将脱氨酶与 Cas9 蛋白的引导系统分离, 创制了脱氨酶与转录激活因子类效应子 (TALE) 融合、Cas9 蛋白与 sgRNA 融合的新型碱基编辑系统 TaC9-ABE/CBE, 可以完全消除 Cas9 依赖性脱靶而不影响靶向编辑效率^[136-137]。Jin 等^[135, 138]开发了基于水稻原生质体和突变体植株的高通量碱基编辑器特异性评价方法; Kim 等^[139]开发了鉴别人类细胞中碱基编辑脱靶位点的改良版 Digenome-seq。相比于动物基因功能研究或人类疾病治疗研究, 碱基编辑的脱靶效应对植物应用研究的影响小一些, 这是因为: 1) 脱靶是否引起了突变表型可以通过后代的分离分析来确认, 很大程度上可以锁定研究基因与突变表型的关系; 2) 脱靶效应若带来了负向影响, 在育种过程中将被自然或人为

淘汰, 若带来正向影响, 也能帮助基础研究或推进育种^[140-141]。

Wei 等^[142]通过 GOTI 分析发现, 线粒体编辑器 DdCBE 在小鼠胚胎的核基因组上产生了大量的单核苷酸变异脱靶位点, 原因是线粒体定位信号不能完全正确靶向线粒体, 对细胞核也有一定的靶向效应。Lei 等^[143]的研究成果也证实了这一结论, 该团队在人类 HEK29T 细胞系中评估发现, 部分核基因组脱靶效应依赖于单侧 TALE 序列, 部分则不依赖于 TALE 序列但与维持细胞三维结构的 CTCF 结合基序存在某种关联; 利用融入核输出信号、抑制核内 DdCBE 编辑活性等优化策略改造了 DdCBE, 降低了核基因组的脱靶水平。

3.2 结论与展望

碱基编辑技术能实现基因修正或变异, 在生物学基础研究、疾病研究和作物遗传改良应用上前景广阔, 因而核酸编辑器的研究持续火爆, 越来越多功能明确的优化版本被开发、应用到全新的科学领域。PE 系统在植物或人类细胞系中的脱靶编辑效应都非常低, 几乎不引起 pegRNA 非依赖型的全基因组范围内脱靶, 而 pegRNA 依赖型的脱靶效应可通过优化引物设计避免^[90, 92, 98, 144]。PE 系统与其他编辑系统相比, 适用范围更广、脱靶效应更低。因此, 开发具有更高编辑效率、更强编辑能力 (长序列编辑) 的 PE 系统, 有望进一步挖掘基因编辑工具在基因治疗、功能研究上的潜能, 建立更安全高效、功能强大的编辑工具。

新型碱基编辑器的开发充满着机遇与挑战, 如何进一步提升碱基编辑器的编辑效率、产物纯度、特异性, 平衡编辑范围与编辑窗口大小, 开发更安全高效、适用性更广泛的编辑工具, 是该领域亟待解决的技术问题。目前, CBE 和 ABE 的开发还不够完善, 编辑效率和范围还未达到理想的程度。除了 PE 编辑器, 所有其他种类的单碱基编辑器都受靶点位置、编辑窗口、碱基转换关系等因素的影响, 难以实现任意位点、任意设计碱基的精准 (无副产物碱基) 编辑。因此, 开发高效率长序列编辑的 PE 编辑器和高效的同源重组基因编辑技术, 将是今后继续努力的主要目标, 为进一步推动人类疾病治疗、作物遗传改良以及基础科学研究的发展做出积极贡献。

参考文献:

[1] SMITH J, BIBIKOVA M, WHITBY F G, et al. Requirements for double-strand cleavage by chimeric restriction enzymes with zinc finger DNA-recognition do-

- mains[J]. *Nucleic Acids Research*, 2000, 28(17): 3361-3369.
- [2] BIBIKOVA M, GOLIC M, GOLIC K G, et al. Targeted chromosomal cleavage and mutagenesis in *Drosophila* using zinc-finger nucleases[J]. *Genetics*, 2002, 161(3): 1169-1175.
 - [3] LLOYD A, PLAISIER C L, CARROLL D, et al. Targeted mutagenesis using zinc-finger nucleases in *Arabidopsis*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102(6): 2232-2237.
 - [4] PETOLINO J F. Genome editing in plants via designed zinc finger nucleases[J]. *In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant*, 2015, 51(1): 1-8.
 - [5] BOCH J, SCHOLZE H, SCHORNACK S, et al. Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors[J]. *Science*, 2009, 326(5959): 1509-1512.
 - [6] MOSCOU M J, BOGDANOVE A J. A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors[J]. *Science*, 2009, 326(5959): 1501.
 - [7] LI T, HUANG S, JIANG W Z, et al. TAL nucleases (TALNs): Hybrid proteins composed of TAL effectors and FokI DNA-cleavage domain[J]. *Nucleic Acids Research*, 2011, 39(1): 359-372.
 - [8] LEDFORD H. CRISPR, the disruptor[J]. *Nature*, 2015, 522(7554): 20-24.
 - [9] GAO C. Genome engineering for crop improvement and future agriculture[J]. *Cell*, 2021, 184(6): 1621-1635.
 - [10] HSU P D, LANDER E S, ZHANG F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering [J]. *Cell*, 2014, 157(6): 1262-1278.
 - [11] MA X, ZHU Q, CHEN Y, et al. CRISPR/Cas9 platforms for genome editing in plants: Developments and applications[J]. *Molecular Plant*, 2016, 9(7): 961-974.
 - [12] REES H A, LIU D R. Base editing: Precision chemistry on the genome and transcriptome of living cells[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2018, 19(12): 770-788.
 - [13] HESS G T, TYCKO J, YAO D, et al. Methods and applications of CRISPR-mediated base editing in eukaryotic genomes[J]. *Molecular Cell*, 2017, 68(1): 26-43.
 - [14] ZHAO K, TUNG C W, EIZENGA G C, et al. Genome-wide association mapping reveals a rich genetic architecture of complex traits in *Oryza sativa*[J]. *Nature Communications*, 2011, 2: 467.
 - [15] LANDRUM M J, LEE J M, BENSON M, et al. ClinVar: Public archive of interpretations of clinically relevant variants[J]. *Nucleic Acids Research*, 2016, 44(D1): 862-868.
 - [16] KOMOR A C, KIM Y B, PACKER M S, et al. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage[J]. *Nature*, 2016, 533(7603): 420-424.
 - [17] KOMOR A C, ZHAO K T, PACKER M S, et al. Improved base excision repair inhibition and bacteriophage Mu Gam protein yields C: G-to-T: A base editors with higher efficiency and product purity[J]. *Science Advances*, 2017, 3(8): eaao4774.
 - [18] WANG L, XUE W, YAN L, et al. Enhanced base editing by co-expression of free uracil DNA glycosylase inhibitor[J]. *Cell Research*, 2017, 27(10): 1289-1292.
 - [19] GEHRKE J M, CERVANTES O, CLEMENT M K, et al. An APOBEC3A-Cas9 base editor with minimized bystander and off-target activities[J]. *Nature Biotechnology*, 2018, 36(10): 977-982.
 - [20] ZHANG X, CHEN L, ZHU B, et al. Increasing the efficiency and targeting range of cytidine base editors through fusion of a single-stranded DNA-binding protein domain[J]. *Nature Cell Biology*, 2020, 22(6): 740-750.
 - [21] KOBLAN L W, DOMAN J L, WILSON C, et al. Improving cytidine and adenine base editors by expression optimization and ancestral reconstruction[J]. *Nature Biotechnology*, 2018, 36(9): 843-846.
 - [22] ZAFRA M P, SCHATOFF E M, KATTI A, et al. Optimized base editors enable efficient editing in cells, organoids and mice[J]. *Nature Biotechnology*, 2018, 36(9): 888-893.
 - [23] REES H A, KOMOR A C, YEH W, et al. Improving the DNA specificity and applicability of base editing through protein engineering and protein delivery[J]. *Nature Communications*, 2017, 8: 15790.
 - [24] LEE J K, JEONG E, LEE J, et al. Directed evolution of CRISPR-Cas9 to increase its specificity[J]. *Nature Communications*, 2018, 9: 3048.
 - [25] WANG L, XUE W, ZHANG H, et al. Eliminating base-editor-induced genome-wide and transcriptome-wide off-target mutations[J]. *Nature Cell Biology*, 2021, 23(5): 552-563.
 - [26] KIM Y B, KOMOR A C, LEVY J M, et al. Increasing the genome-targeting scope and precision of base editing with engineered Cas9-cytidine deaminase fusions[J]. *Nature Biotechnology*, 2017, 35(4): 371-376.
 - [27] HUANG T P, ZHAO K T, MILLER S M, et al. Circularly permuted and PAM-modified Cas9 variants broaden the targeting scope of base editors[J]. *Nature Biotechnology*, 2019, 37(6): 626-631.
 - [28] NISHIDA K, ARAZOE T, YACHIE N, et al. Targeted nucleotide editing using hybrid prokaryotic and vertebrate adaptive immune systems[J]. *Science*, 2016, 353(6305): aaf8729.
 - [29] MA Y, ZHANG J, YIN W, et al. Targeted AID-mediated mutagenesis (TAM) enables efficient genomic diversification in mammalian cells[J]. *Nature Methods*, 2016, 13(12): 1029-1035.
 - [30] HU J H, MILLER S M, GEURTS M H, et al. Evolved Cas9 variants with broad PAM compatibility and high DNA specificity[J]. *Nature*, 2018, 556(7699): 57-63.
 - [31] NISHIMASU H, SHI X, ISHIGURO S, et al. Engineered CRISPR-Cas9 nuclease with expanded targeting space[J]. *Science*, 2018, 361(6408): 1259-1262.

- [32] LI X, WANG Y, LIU Y, et al. Base editing with a Cpf1-cytidine deaminase fusion[J]. *Nature Biotechnology*, 2018, 36(4): 324-327.
- [33] LI J, SUN Y, DU J, et al. Generation of targeted point mutations in rice by a modified CRISPR/Cas9 system[J]. *Molecular Plant*, 2017, 10(3): 526-529.
- [34] LU Y, ZHU J K. Precise editing of a target base in the rice genome using a modified CRISPR/Cas9 system[J]. *Molecular Plant*, 2017, 10(3): 523-525.
- [35] ZENG D, LI X, HUANG J, et al. Engineered Cas9 variant tools expand targeting scope of genome and base editing in rice[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2020, 18(6): 1348-1350.
- [36] ZHONG Z, SRETENOVIC S, REN Q, et al. Improving plant genome editing with high-fidelity xCas9 and non-canonical PAM-targeting Cas9-NG[J]. *Molecular Plant*, 2019, 12(7): 1027-1036.
- [37] WANG M, WANG Z, MAO Y, et al. Optimizing base editors for improved efficiency and expanded editing scope in rice[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2019, 17(9): 1697-1699.
- [38] WU Y, XU W, WANG F, et al. Increasing cytosine base editing scope and efficiency with engineered Cas9-PmCDA1 fusions and the modified sgRNA in rice[J]. *Frontiers in Genetics*, 2019, 10: 379.
- [39] SHIMATANI Z, KASHOJIYA S, TAKAYAMA M, et al. Targeted base editing in rice and tomato using a CRISPR-Cas9 cytidine deaminase fusion[J]. *Nature Biotechnology*, 2017, 35(5): 441-443.
- [40] ZONG Y, SONG Q, LI C, et al. Efficient C-to-T base editing in plants using a fusion of nCas9 and human APOBEC3A[J]. *Nature Biotechnology*, 2018, 36(10): 950-953.
- [41] WANG F, ZHANG C, XU W, et al. Developing high-efficiency base editors by combining optimized synergistic core components with new types of nuclear localization signal peptide[J]. *Crop Journal*, 2020, 8(3): 408-417.
- [42] XU W, YANG Y, LIU Y, et al. Discriminated sgRNAs-based SurroGate system greatly enhances the screening efficiency of plant base-edited cells[J]. *Molecular Plant*, 2020, 13(1): 169-180.
- [43] ZENG D, LIU T, TAN J, et al. PhieCBEs: Plant high-efficiency cytidine base editors with expanded target range[J]. *Molecular Plant*, 2020, 13(12): 1666-1669.
- [44] GAUDELLI N M, KOMOR A C, REES H A, et al. Programmable base editing of A · T to G · C in genomic DNA without DNA cleavage[J]. *Nature*, 2017, 551(7681): 464-471.
- [45] YANG L, ZHANG X, WANG L, et al. Increasing targeting scope of adenosine base editors in mouse and rat embryos through fusion of TadA deaminase with Cas9 variants[J]. *Protein & Cell*, 2018, 9(9): 814-819.
- [46] CHATTERJEE P, JAKIMO N, JACOBSON J M. Minimal PAM specificity of a highly similar SpCas9 ortholog[J]. *Science Advances*, 2018, 4(10): u766.
- [47] RICHTER M F, ZHAO K T, ETON E, et al. Phage-assisted evolution of an adenine base editor with improved Cas domain compatibility and activity[J]. *Nature Biotechnology*, 2020, 38(7): 883-891.
- [48] LAPINAITE A, KNOTT G J, PALUMBO C M, et al. DNA capture by a CRISPR-Cas9-guided adenine base editor[J]. *Science*, 2020, 369(6503): 566-571.
- [49] LI C, ZONG Y, WANG Y, et al. Expanded base editing in rice and wheat using a Cas9-adenosine deaminase fusion[J]. *Genome Biology*, 2018, 19: 59.
- [50] HUA K, TAO X, ZHU J. Expanding the base editing scope in rice by using Cas9 variants[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2019, 17(2): 499-504.
- [51] HUA K, TAO X, YUAN F, et al. Precise A · T to G · C base editing in the rice genome[J]. *Molecular Plant*, 2018, 11(4): 627-630.
- [52] HUA K, TAO X, HAN P, et al. Genome engineering in rice using Cas9 variants that recognize NG PAM sequences[J]. *Molecular Plant*, 2019, 12(7): 1003-1014.
- [53] HUA K, TAO X, LIANG W, et al. Simplified adenine base editors improve adenine base editing efficiency in rice[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2020, 18(3): 770-778.
- [54] KANG B, YUN J, KIM S, et al. Precision genome engineering through adenine base editing in plants[J]. *Nature Plants*, 2018, 4(7): 427-431.
- [55] GE Z, ZHENG L, ZHAO Y, et al. Engineered xCas9 and SpCas9-NG variants broaden PAM recognition sites to generate mutations in *Arabidopsis* plants[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2019, 17(10): 1865-1867.
- [56] TAN J, ZENG D, ZHAO Y, et al. PhieABEs: A PAM-less/free high-efficiency adenine base editor toolbox with wide target scope in plants[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2022, 20(5): 934-943.
- [57] YAN D, REN B, LIU L, et al. High-efficiency and multiplex adenine base editing in plants using new TadA variants[J]. *Molecular Plant*, 2021, 14(5): 722-731.
- [58] WEI C, WANG C, JIA M, et al. Efficient generation of homozygous substitutions in rice in one generation utilizing an rABE8e base editor[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2021, 63(9): 1595-1599.
- [59] REN Q, SRETENOVIC S, LIU S, et al. PAM-less plant genome editing using a CRISPR-SpRY toolbox[J]. *Nature Plants*, 2021, 7(1): 25-33.
- [60] LI J, XU R, QIN R, et al. Genome editing mediated by SpCas9 variants with broad non-canonical PAM compatibility in plants[J]. *Molecular Plant*, 2021, 14(2): 352-360.
- [61] KURT I C, ZHOU R, IYER S, et al. CRISPR C-to-G base editors for inducing targeted DNA transversions in human cells[J]. *Nature Biotechnology*, 2021, 39(1): 41-46.
- [62] ZHAO D, LI J, LI S, et al. Glycosylase base editors enable C-to-A and C-to-G base changes[J]. *Nature Bio-*

- technology, 2021, 39(1): 35-40.
- [63] SUN N, ZHAO D, LI S, et al. Reconstructed glycosylase base editors GBE2.0 with enhanced C-to-G base editing efficiency and purity[J]. *Molecular Therapy*, 2022, 30(7): 2452-2463.
- [64] CHEN L, PARK J E, PAA P, et al. Programmable C:G to G:C genome editing with CRISPR-Cas9-directed base excision repair proteins[J]. *Nature Communications*, 2021, 12(1): 1384.
- [65] YUAN T, YAN N, FEI T, et al. Optimization of C-to-G base editors with sequence context preference predictable by machine learning methods[J]. *Nature Communications*, 2021, 12(1): 4902.
- [66] KOBLAN L W, ARBAB M, SHEN M W, et al. Efficient C · G-to-G · C base editors developed using CRISPRi screens, target-library analysis, and machine learning[J]. *Nature Biotechnology*, 2021, 39(11): 1414-1425.
- [67] CHEN S, LIU Z, LAI L, et al. Efficient C-to-G base editing with improved target compatibility using engineered deaminase-nCas9 fusions[J]. *CRISPR Journal*, 2022, 5(3): 389-396.
- [68] PARK M, YUN J, KIM H U. C-to-G base editing enhances oleic acid production by generating novel alleles of *FATTY ACID DESATURASE 2* in plants[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2021, 12: 748529.
- [69] SRETENOVIC S, LIU S, LI G, et al. Exploring C-to-G base editing in rice, tomato, and poplar[J]. *Frontiers in Genome Editing*, 2021, 3: 756766.
- [70] TIAN Y, SHEN R, LI Z, et al. Efficient C-to-G editing in rice using an optimized base editor[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2022, 20(7): 1238-1240.
- [71] ZENG D, ZHENG Z, LIU Y, et al. Exploring C-to-G and A-to-Y base editing in rice by using new vector tools[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(14): 7990.
- [72] LI C, ZHANG R, MENG X, et al. Targeted, random mutagenesis of plant genes with dual cytosine and adenine base editors[J]. *Nature Biotechnology*, 2020, 38(7): 875-882.
- [73] ZHANG X, ZHU B, CHEN L, et al. Dual base editor catalyzes both cytosine and adenine base conversions in human cells[J]. *Nature Biotechnology*, 2020, 38(7): 856-860.
- [74] SAKATA R C, ISHIGURO S, MORI H, et al. Base editors for simultaneous introduction of C-to-T and A-to-G mutations[J]. *Nature Biotechnology*, 2020, 38(7): 865-869.
- [75] GRÜNEWALD J, ZHOU R, LAREAU C A, et al. A dual-deaminase CRISPR base editor enables concurrent adenine and cytosine editing[J]. *Nature Biotechnology*, 2020, 38(7): 861-864.
- [76] XU R, KONG F, QIN R, et al. Development of an efficient plant dual cytosine and adenine editor[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2021, 63(9): 1600-1605.
- [77] XIONG X, LI Z, LIANG J, et al. A cytosine base editor toolkit with varying activity windows and target scopes for versatile gene manipulation in plants[J]. *Nucleic Acids Research*, 2022, 50(6): 3565-3580.
- [78] LIANG Y, XIE J, ZHANG Q, et al. AGBE: A dual deaminase-mediated base editor by fusing CGBE with ABE for creating a saturated mutant population with multiple editing patterns[J]. *Nucleic Acids Research*, 2022, 50(9): 5384-5399.
- [79] ANZALONE A V, RANDOLPH P B, DAVIS J R, et al. Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA[J]. *Nature*, 2019, 576(7785): 149-157.
- [80] LIN Q, ZONG Y, XUE C, et al. Prime genome editing in rice and wheat[J]. *Nature Biotechnology*, 2020, 38(5): 582-585.
- [81] LI H, LI J, CHEN J, et al. Precise modifications of both exogenous and endogenous genes in rice by prime editing[J]. *Molecular Plant*, 2020, 13(5): 671-674.
- [82] XU W, ZHANG C, YANG Y, et al. Versatile nucleotides substitution in plant using an improved prime editing system[J]. *Molecular Plant*, 2020, 13(5): 675-678.
- [83] TANG X, SRETENOVIC S, REN Q, et al. Plant prime editors enable precise gene editing in rice cells[J]. *Molecular Plant*, 2020, 13(5): 667-670.
- [84] HUA K, JIANG Y, TAO X, et al. Precision genome engineering in rice using prime editing system[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2020, 18(11): 2167-2169.
- [85] BUTT H, RAO G S, SEDEEK K, et al. Engineering herbicide resistance via prime editing in rice[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2020, 18(12): 2370-2372.
- [86] LU Y, TIAN Y, SHEN R, et al. Precise genome modification in tomato using an improved prime editing system[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2021, 19(3): 415-417.
- [87] NELSON J W, RANDOLPH P B, SHEN S P, et al. Engineered pegRNAs improve prime editing efficiency[J]. *Nature Biotechnology*, 2022, 40(3): 402-410.
- [88] JIANG Y, CHAI Y, LU M, et al. Prime editing efficiently generates W542L and S621I double mutations in two *ALS* genes in maize[J]. *Genome Biology*, 2020, 21(1): 257.
- [89] LIN Q, JIN S, ZONG Y, et al. High-efficiency prime editing with optimized, paired pegRNAs in plants[J]. *Nature Biotechnology*, 2021, 39(8): 923-927.
- [90] JIN S, LIN Q, LUO Y, et al. Genome-wide specificity of prime editors in plants[J]. *Nature Biotechnology*, 2021, 39(10): 1292-1299.
- [91] XU W, YANG Y, YANG B, et al. A design optimized prime editor with expanded scope and capability in plants[J]. *Nature Plants*, 2022, 8(1): 45-52.
- [92] ZONG Y, LIU Y, XUE C, et al. An engineered prime editor with enhanced editing efficiency in plants[J/OL]. *Nature Biotechnology*, (2022-03-24)[2022-08-10]. <https://doi.org/10.1038/s41587-022-01254-w>.

- [93] LI H, ZHU Z, LI S, et al. Multiplex precision gene editing by a surrogate prime editor in rice[J]. *Molecular Plant*, 2022, 15(7): 1077-1080.
- [94] ZOU J, MENG X, LIU Q, et al. Improving the efficiency of prime editing with epegRNAs and high-temperature treatment in rice[J/OL]. *Science China: Life Science*, (2022-06-23)[2022-08-10]. <https://doi.org/10.1007/s11427-022-2147-2>.
- [95] JIANG T, ZHANG X, WENG Z, et al. Deletion and replacement of long genomic sequences using prime editing[J]. *Nature Biotechnology*, 2022, 40(2): 227-234.
- [96] CHOI J, CHEN W, SUITER C C, et al. Precise genomic deletions using paired prime editing[J]. *Nature Biotechnology*, 2022, 40(2): 218-226.
- [97] ANZALONE A V, GAO X D, PODRACKY C J, et al. Programmable deletion, replacement, integration and inversion of large DNA sequences with twin prime editing[J]. *Nature Biotechnology*, 2022, 40(5): 731-740.
- [98] WANG J, HE Z, WANG G, et al. Efficient targeted insertion of large DNA fragments without DNA donors[J]. *Nature Methods*, 2022, 19(3): 331-340.
- [99] TAO R, WANG Y, JIAO Y, et al. Bi-PE: Bi-directional priming improves CRISPR/Cas9 prime editing in mammalian cells[J]. *Nucleic Acids Research*, 2022, 50(11): 6423-6434.
- [100] WALLACE D C. A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: A dawn for evolutionary medicine[J]. *Annual Review of Genetics*, 2005, 39: 359-407.
- [101] VAFAI S B, MOOTHA V K. Mitochondrial disorders as windows into an ancient organelle[J]. *Nature*, 2012, 491(7424): 374-383.
- [102] GAMMAGE P A, RORBACH J, VINCENT A I, et al. Mitochondrially targeted ZFNs for selective degradation of pathogenic mitochondrial genomes bearing large-scale deletions or point mutations[J]. *EMBO Molecular Medicine*, 2014, 6(4): 458-466.
- [103] BACMAN S R, KAUPPILA J H K, PEREIRA C V, et al. MitoTALEN reduces mutant mtDNA load and restores tRNA Ala levels in a mouse model of heteroplasmic mtDNA mutation[J]. *Nature Medicine*, 2018, 24(11): 1696-1700.
- [104] BACMAN S R, WILLIAMS S L, PINTO M, et al. Specific elimination of mutant mitochondrial genomes in patient-derived cells by mitoTALENs[J]. *Nature Medicine*, 2013, 19(9): 1111-1113.
- [105] FORNER J, KLEINSCHMIDT D, MEYER E H, et al. Targeted introduction of heritable point mutations into the plant mitochondrial genome[J]. *Nature Plants*, 2022, 8(3): 245-256.
- [106] KAZAMA T, OKUNO M, WATARI Y, et al. Curing cytoplasmic male sterility via TALEN-mediated mitochondrial genome editing[J]. *Nature Plants*, 2019, 5(7): 722-730.
- [107] MOK B Y, DE MORAES M H, ZENG J, et al. A bacterial cytidine deaminase toxin enables CRISPR-free mitochondrial base editing[J]. *Nature*, 2020, 583(7817): 631-637.
- [108] MOK B Y, KOTRYA A V, RAGURAM A, et al. CRISPR-free base editors with enhanced activity and expanded targeting scope in mitochondrial and nuclear DNA[J]. *Nature Biotechnology*, 2022, 40(9): 1378-1387.
- [109] CHO S, LEE S, MOK Y G, et al. Targeted A-to-G base editing in human mitochondrial DNA with programmable deaminases[J]. *Cell*, 2022, 185(10): 1764-1776.
- [110] KANG B, BAE S, LEE S, et al. Chloroplast and mitochondrial DNA editing in plants[J]. *Nature Plants*, 2021, 7(7): 899-905.
- [111] LI R, CHAR S N, LIU B, et al. High-efficiency plastome base editing in rice with TAL cytosine deaminase[J]. *Molecular Plant*, 2021, 14(9): 1412-1414.
- [112] HUA K, HAN P, ZHU J. Improvement of base editors and prime editors advances precision genome engineering in plants[J]. *Plant Physiology*, 2022, 188(4): 1795-1810.
- [113] BHARAT S S, LI S, LI J, et al. Base editing in plants: Current status and challenges[J]. *Crop Journal*, 2020, 8(3): 384-395.
- [114] 李国斌, 艾国, 韦静, 等. 碱基编辑技术及其在作物遗传改良中的应用综述[J]. *园艺学报*, 2021, 48(4): 719-732.
- [115] ZONG Y, WANG Y, LI C, et al. Precise base editing in rice, wheat and maize with a Cas9-cytidine deaminase fusion[J]. *Nature Biotechnology*, 2017, 35(5): 438-440.
- [116] ZAFAR K, SEDEEK K E M, RAO G S, et al. Genome editing technologies for rice improvement: Progress, prospects, and safety concerns[J]. *Frontiers in Genome Editing*, 2020, 2: 5.
- [117] LI H, QIN R Y, LIU X S, et al. CRISPR/Cas9-mediated adenine base editing in rice genome[J]. *Rice Science*, 2019, 26(2): 125-128.
- [118] TIAN S, JIANG L, CUI X, et al. Engineering herbicide-resistant watermelon variety through CRISPR/Cas9-mediated base-editing[J]. *Plant Cell Reports*, 2018, 37(9): 1353-1356.
- [119] VEILLET F, PERROT L, CHAUVIN L, et al. Transgene-free genome editing in tomato and potato plants using *Agrobacterium*-mediated delivery of a CRISPR/Cas9 cytidine base editor[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(2): 402.
- [120] ZHANG R, LIU J, CHAI Z, et al. Generation of herbicide tolerance traits and a new selectable marker in wheat using base editing[J]. *Nature Plants*, 2019, 5(5): 480-485.
- [121] KUANG Y, LI S, REN B, et al. Base-editing-mediated artificial evolution of *OsALS1* in planta to develop novel herbicide-tolerant rice germplasms[J]. *Molecular Plant*, 2020, 13(4): 565-572.
- [122] WU J, CHEN C, XIAN G, et al. Engineering herbicide-

- resistant oilseed rape by CRISPR/Cas9-mediated cytosine base-editing[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2020, 18(9): 1857-1859.
- [123] VEILLET F, PERROT L, GUYON-DEBAST A, et al. Expanding the CRISPR toolbox in *P. patens* using Sp-Cas9-NG variant and application for gene and base editing in *Solanaceae* crops[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(3): 1024.
- [124] REN B, YAN F, KUANG Y, et al. Improved base editor for efficiently inducing genetic variations in rice with CRISPR/Cas9-guided hyperactive hAID mutant[J]. *Molecular Plant*, 2018, 11(4): 623-626.
- [125] XU Y, LIN Q, LI X, et al. Fine - tuning the amylose content of rice by precise base editing of the *Wx* gene[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2021, 19(1): 11-13.
- [126] XU R, LI J, LIU X, et al. Development of plant prime-editing systems for precise genome editing[J]. *Plant Communications*, 2020, 1(3): 100043.
- [127] 宗媛, 高彩霞. 碱基编辑系统研究进展[J]. *遗传*, 2019, 41(9): 777-800.
- [128] JIN S, ZONG Y, GAO Q, et al. Cytosine, but not adenine, base editors induce genome-wide off-target mutations in rice[J]. *Science*, 2019, 364(6437): 292-295.
- [129] ZUO E, SUN Y, WEI W, et al. Cytosine base editor generates substantial off-target single-nucleotide variants in mouse embryos[J]. *Science*, 2019, 364(6437): 289-292.
- [130] GRÜNEWALD J, ZHOU R, GARCIA S P, et al. Transcriptome-wide off-target RNA editing induced by CRISPR-guided DNA base editors[J]. *Nature*, 2019, 569(7756): 433-437.
- [131] ZHOU C, SUN Y, YAN R, et al. Off-target RNA mutation induced by DNA base editing and its elimination by mutagenesis[J]. *Nature*, 2019, 571(7764): 275-278.
- [132] LI S, LIU L, SUN W, et al. A large-scale genome and transcriptome sequencing analysis reveals the mutation landscapes induced by high-activity adenine base editors in plants[J]. *Genome Biology*, 2022, 23(1): 51.
- [133] ZUO E, SUN Y, YUAN T, et al. A rationally engineered cytosine base editor retains high on-target activity while reducing both DNA and RNA off-target effects[J]. *Nature Methods*, 2020, 17(6): 600-604.
- [134] DOMAN J L, RAGURAM A, NEWBY G A, et al. Evaluation and minimization of Cas9-independent off-target DNA editing by cytosine base editors[J]. *Nature Biotechnology*, 2020, 38(5): 620-628.
- [135] JIN S, FEI H, ZHU Z, et al. Rationally designed APOBEC3B cytosine base editors with improved specificity[J]. *Molecular Cell*, 2020, 79(5): 728-740.
- [136] LIU Y, ZHOU J, LAN T, et al. Elimination of Cas9-dependent off-targeting of adenine base editor by using TALE to separately guide deaminase to target sites[J]. *Cell Discovery*, 2022, 8(1): 28.
- [137] ZHOU J, LIU Y, WEI Y, et al. Eliminating predictable DNA off-target effects of cytosine base editor by using dual guiders including sgRNA and TALE[J]. *Molecular Therapy*, 2022, 30(7): 2443-2451.
- [138] JIN S, GAO Q, GAO C. An unbiased method for evaluating the genome-wide specificity of base editors in rice[J]. *Nature Protocols*, 2021, 16(1): 431-457.
- [139] KIM D, KIM D, LEE G, et al. Genome-wide target specificity of CRISPR RNA-guided adenine base editors[J]. *Nature Biotechnology*, 2019, 37(4): 430-435.
- [140] MAO Y, BOTELLA J R, LIU Y, et al. Gene editing in plants: Progress and challenges[J]. *National Science Review*, 2019, 6(3): 421-437.
- [141] TANG J, CHEN L, LIU Y G. Off-target effects and the solution[J]. *Nature Plants*, 2019, 5(4): 341-342.
- [142] WEI Y, LI Z, XU K, et al. Mitochondrial base editor DdCBE causes substantial DNA off-target editing in nuclear genome of embryos[J]. *Cell Discovery*, 2022, 8(1): 27.
- [143] LEI Z, MENG H, LIU L, et al. Mitochondrial base editor induces substantial nuclear off-target mutations[J]. *Nature*, 2022, 606(7915): 804-811.
- [144] ZHUANG Y, LIU J, WU H, et al. Increasing the efficiency and precision of prime editing with guide RNA pairs[J]. *Nature Chemical Biology*, 2022, 18(1): 29-37.



刘耀光, 中国科学院院士, 华南农业大学研究员, 现任亚热带农业生物资源保护与利用国家重点实验室副主任。1981年毕业于华南农业大学, 1988年获日本香川大学硕士学位, 1991年获日本京都大学博士学位。1997年获“国家杰出青年科学基金”, 2002年受聘教育部“长江学者”特聘教授, 2004年获“全国五一劳动奖章”, 2014年获“全国优秀科技工作者”等称号, 2017年当选中国科学院院士。主要从事植物育性发育分子遗传学和基因工程研究。在水稻细胞质雄性不育与恢复性、杂种不育与亲和性、光温敏不育性等遗传系统的基因克隆和分子作用机理方面取得了系统性、创新性研究成果, 开发了多项生物技术。荣获2011年广东省科学技术奖一等奖、2015和2017年大北农业科技奖一等奖以及2018年国家自然科学奖二等奖。在《Nature Genetics》《Annual Review of Plant Biology》《Cell Research》《Nature Communications》《Molecular Plant》《PNAS》和《Plant Cell》等刊物发表论文140余篇, 论文被引用6000余次。