

基于 CRISPR/Cas 系统的 DNA 碱基编辑技术及其在生物医学和农业中的应用

余传照¹, 莫健新², 赵鑫¹, 李国玲¹, 张献伟²

1 华南农业大学 动物科学学院 国家生猪种业工程技术研究中心, 广东 广州 510642

2 温氏食品集团股份有限公司, 广东 新兴 527439

余传照, 莫健新, 赵鑫, 等. 基于 CRISPR/Cas 系统的 DNA 碱基编辑技术及其在生物医学和农业中的应用. 生物工程学报, 2021, 37(9): 3071-3087.

Yu CZ, Mo JX, Zhao X, et al. CRISPR/Cas-mediated DNA base editing technology and its application in biomedicine and agriculture. Chin J Biotech, 2021, 37(9): 3071-3087.

摘 要: 近年来, 基于成簇的规律间隔短回文重复序列及其相关系统 (Clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated protein, CRISPR/Cas) 的基因编辑技术飞速发展, 该系统可以利用同源定向重组 (Homology directed repair, HDR) 来完成其介导的精准编辑, 但效率极低, 限制了其在农业和生物医学等领域上的推广应用。基于 CRISPR/Cas 系统的 DNA 碱基编辑技术作为一种新兴的基因组编辑技术, 能在不产生双链断裂的情况下实现碱基的定向突变, 相对于 CRISPR/Cas 介导的 HDR 编辑具有更高的编辑效率和特异性。目前, 已开发出了可将 C 碱基突变为 T 碱基的胞嘧啶碱基编辑器 (Cytidine base editors, CBE), 将 A 碱基突变为 G 碱基的腺嘌呤碱基编辑器 (Adenine base editors, ABE), 以及可实现碱基任意变换和小片段精准插入和缺失的 Prime 编辑器 (Prime editors, PE)。另外, 能实现 C 到 G 颠换的糖基化酶碱基编辑器 (Glycosylase base editors, GBE) 以及能同时编辑 A 和 C 两种底物的双碱基编辑器也已被开发出来。文中主要综述了几种 DNA 碱基编辑器的开发历程、研究进展及各自优点和局限性; 介绍了 DNA 碱基编辑技术在生物医学以及农业中的成功应用案例, 以期 DNA 碱基编辑器的进一步优化和选择应用提供借鉴。

关键词: CRISPR/Cas, 碱基编辑, 胞嘧啶碱基编辑器, 腺嘌呤碱基编辑器, Prime 编辑器

Received: October 27, 2020; **Accepted:** February 5, 2021

Supported by: Local Innovative and Research Teams Project of Guangdong Pearl River Talents Program, China (No. 2019BT02N630).

Corresponding author: Xianwei Zhang. Tel/Fax: +86-766-2986345; E-mail: zxianw@163.com

广东省“珠江人才计划”本土创新科研团队项目 (No. 2019BT02N630) 资助。

网络出版时间: 2021-02-22

网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20210222.1556.003.html>

CRISPR/Cas-mediated DNA base editing technology and its application in biomedicine and agriculture

Chuanzhao Yu¹, Jianxin Mo², Xin Zhao¹, Guoling Li¹, and Xianwei Zhang²

¹ National Engineering Research Center for Swine Breeding Industry, College of Animal Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, Guangdong, China

² Wens Foodstuff Co., Ltd., Xinxing 527439, Guangdong, China

Abstract: In recent years, the genome editing technologies based on the clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated protein (CRISPR/Cas) have developed rapidly. The system can use homologous directed recombination (HDR) to achieve precise editing that it mediated, but the efficiency is extremely low, which limits its application in agriculture and biomedical fields. As an emerging genome editing technology, the CRISPR/Cas-mediated DNA base editing technologies can achieve targeted mutations of bases without generating double-strand breaks, and has higher editing efficiency and specificity compared with CRISPR/Cas-mediated HDR editing. At present, cytidine base editors (CBEs) that can mutate C to T, adenine base editors (ABEs) that can mutate A to G, and prime editors (PEs) that enable arbitrary base conversion and precise insertion and deletion of small fragments, have been developed. In addition, glycosylase base editors (GBEs) capable of transitioning from C to G and double base editors capable of editing both A and C simultaneously, have been developed. This review summarizes the development, advances, advantages and limitations of several DNA base editors. The successful applications of DNA base editing technology in biomedicine and agriculture, together with the prospects for further optimization and selection of DNA base editors, are discussed.

Keywords: CRISPR/Cas, base editing, cytidine base editors, adenine base editors, prime editors

成簇的规律间隔短回文重复序列及其相关系统 (Clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated protein, CRISPR/Cas) 是细菌和古菌抵抗外源病毒和噬菌体入侵的一种适应性免疫机制, 通过靶向切割外源入侵核酸发挥免疫防御作用^[1]。基于该系统, 研究者构建了 CRISPR/Cas 基因编辑工具, 并在基础研究中广泛应用^[2]。CRISPR/Cas 基因编辑系统的工作原理为: 在单链向导 RNA (Single guide RNA, sgRNA) 引导下, Cas 蛋白在靶位点引起双链断裂 (Double-stranded DNA break, DSB), DSB 激活细胞内源的非同源末端链接 (Non-homologous end joining, NHEJ) 通路或者同源定向重组 (Homology-directed repair, HDR) 通路修复 DSB 缺口, 从而实现对靶位点的编辑, NHEJ 通路容易引入插入/缺失 (Insertions/deletions, Indels) 突变, HDR 通路可介导目标位点的精准编辑^[3-4]。在自然条件下, NHEJ 通路在 DSB 缺口引入 Indels

具有随机性, 无法实现定向编辑, 而 HDR 介导的精确编辑效率极低, 筛选基因编辑细胞系的难度较大^[5-6]。基于 CRISPR/Cas 系统的 DNA 碱基编辑技术, 将灭活的或有单链切割活性的 Cas 蛋白与碱基脱氨酶或者逆转录酶融合, 可在不引入 DSB 的情况下实现碱基的定向编辑, 突破了传统 CRISPR/Cas 基因编辑系统的限制, 极大地提高了精准基因编辑效率和编辑特异性, 是加速动植物遗传改良进程和推动基因治疗临床应用的强大工具^[7-10]。目前能实现 DNA 碱基编辑的编辑器主要有 3 种, 分别是胞嘧啶碱基编辑器 (Cytidine base editors, CBEs)、腺嘌呤碱基编辑器 (Adenine base editors, ABEs) 和 Prime 编辑器 (Prime editors, PEs), 它们分别可以实现 C 到 T (G 到 A)、A 到 G (T 到 C) 以及任意碱基的替换^[7-8,10]。最近, 在 CBEs 和 ABEs 的基础上, 研究者们开发出了能同时编辑 A 和 C 两种底物的双碱基编辑器 (SPACE、Target-ACEmax、A&C-BEmax); 另外, 在 CBEs

的基础上,研究者们开发出了能实现 C 到 G 颠换的糖基化酶碱基编辑器 (GBE、CGBE1),进一步丰富了 DNA 碱基编辑工具包^[11-16]。DNA 碱基编辑器发挥作用时不会产生 DSB,限制了随机的 Indels 产生,在生物医学以及农业育种领域显示出巨大的应用前景,然而,脱靶编辑、原间隔序列邻近基序 (Protospacer adjacent motif, PAM) 兼容性、编辑窗口内副产物的产生以及安全性问题限制了 DNA 碱基编辑器的推广应用。文中就 DNA 碱基编辑技术的最新研究进展进行了综述,以期对 DNA 碱基编辑技术的进一步优化及其在生物医学和农业领域的推广应用提供借鉴。

1 基于 CRISPR/Cas 系统 DNA 碱基编辑器的开发

1.1 CBEs 的开发

CBEs 是最先被开发出基于 CRISPR/Cas 系统的 DNA 碱基编辑器,2016 年,由 Komor 等^[7]将鼠源的胞嘧啶脱氨酶 (Apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like, APOBEC1) 融合到 CRISPR/Cas9 系统构建所得。CBEs 的编辑原理为:sgRNA 与靶位点的互补链结合发挥定位功能, APOBEC1 以靶位点上 sgRNA 的非互补链为底物在 PAM 序列上游 13–17 bp 区域内催化 C 碱基突变为尿嘧啶 (U),在 DNA 复制过程中 U 被识别为 A,使目标碱基 C 突变成 A,从而实现 C→A 的定向突变。

Komor 等^[7]通过 16 个氨基酸残基的 XTEN 连接肽把 APOBEC1 融合到失去内切核酸酶活性的 Cas9 蛋白 (dCas9) N 末端,构建得到第一代 CBE,并将其命名为 BE1。BE1 的编辑效率极低,在人 H293T 细胞中的编辑效率仅有 0.8%–7.7%。Komor 等^[7]推测, BE1 编辑活性低可能与细胞内的 DNA 修复机制有关,目标碱基 C 突变为 U 后容易激活细胞内的 DNA 切除修复通路,导致 U 碱基被尿嘧啶 DNA 糖苷酶 (Uracil DNA glycosylases,

UDGs) 切除^[17]。据此, Komor 团队将尿嘧啶 DNA 糖苷酶抑制因子 (Uracil DNA glycosylase inhibitor, UGI) 融合在 BE1 中 dCas9 的 C 末端,形成了第二代 CBEs,并命名为 BE2。UGI 有效抑制了 UDG 的活性,使编辑效率提高了 3 倍^[17]。为了进一步提高编辑效率,他们将 BE2 中的 dCas9 替换成了具有单链切割活性的 nCas9, nCas9 可在非编辑链引入切刻,创造了一个以编辑链为模板修复非编辑链的环境,开发出了第三代 CBEs (BE3)^[7] (图 1A)。BE3 的编辑活性较 BE2 大幅提高,在人 H293T 细胞中的编辑效率达到了 37%^[17]。几乎同时, Nishida 等^[9]也单独开发出一种名叫 Target-AID 的 CBE,并且能够在酵母细胞和哺乳动物细胞中实现有效的编辑。Target-AID 与 BE3 有所不同, Target-AID 所用的胞嘧啶脱氨酶来自七鳃鳗,并且 UGI 和七鳃鳗来源的脱氨酶 (PmCDA1) 都连接在 dCas9 或 nCas9 的 C 末端。BE3 和 Target-AID 这两种最初的胞嘧啶碱基编辑器被开发出来后,研究者们通过更换新型 Cas 蛋白和脱氨酶、优化 Cas 蛋白与脱氨酶间的连接子、添加多个拷贝的 UGI 等方式先后开发出了各种不同的 CBEs^[18-19]。尽管各种 CBEs 分别在编辑效率、可编辑范围以及脱靶编辑等方面得到了不同程度的改善,但其只能介导 C 到 T 的替换,这限制了 CBEs 的应用范围。

1.2 ABEs 的开发

在人类致病点突变中由碱基对 A-T 到 G-C 突变的只有 14%,而碱基对 C-G 到 T-A 突变的有 48%,所以能将碱基对 A-T 定向突变为 G-C 的 ABEs 相对于 CBEs 更具应用前景^[8]。2017 年, Gaudelli 等^[8]将腺嘌呤脱氨酶融合到 CRISPR/Cas9 系统中,研发得到 ABEs,实现了碱基对 A-T 到 G-C 的定向突变。ABEs 的工作原理与 CBEs 相似,在 CRISPR/Cas9 系统的引导下,腺嘌呤脱氨酶将目标碱基 A 突变为肌苷 (I),在 DNA 复制过程中 I 被识别为 G 并与 C 配对,从而使碱基对 A-T 突变为 G-C。

目前在自然界中只发现作用于游离腺嘌呤、游离腺苷酸、RNA 中的腺苷酸、以及 RNA 与 DNA 异源二聚体中的腺苷酸脱氨酶, 没有发现作用于 DNA 上腺嘌呤的脱氨酶, 因此相较于 CBEs, ABEs 的开发更为复杂^[20]。Gaudelli 等^[8]以大肠杆菌源的 tRNA 腺苷酸脱氨酶 *ecTadA* 作为改造对象, 将 *ecTadA* 与 *nCas9* 融合, 接着在 *ecTadA* 中引入随机突变构建突变体库, 利用突变体库矫正氯霉素抗性基因 *Cam^R* 上的灭活突变, 以筛选作用于 DNA 上 A 碱基的 *ecTadA* 变异体。结果发现, 在 *TadA* 上携带 A106V 和 D108N 突变的大肠杆菌在氯霉素筛选培养基中大量富集。通过序列比对分析发现, 氨基酸残基 D108 与其底物 tRNA 的目标碱基 A 上游的尿嘧啶 U 形成氢键, D108N 突变破坏了该氢键, 使 *TadA* 易于与 DNA 结合。将突变 A106V 和 D108N 引入 *ecTadA-nCas9* 中, 构建得到了第一代 ABEs (*TadA*-XTEN-nCas9-NSL*, ABE1.2), 但 ABE1.2 在 HEK293T 细胞中的平均编辑效率仅为 3.2%。为了提高编辑活性, 他们对 ABE1.2 进行了一系列的改造优化, 最终经过 7 轮的改造他们得到了具有较高编辑效率的 ABE7.10 (图 1B)。与 ABE1.2 相比, ABE7.10 的编辑活性得到了极大的改善, 尤其对多腺嘌呤位点具有较优表现, ABE7.10 在人细胞中编辑效率达到 58%, 产物纯度达 99%, 脱靶效率低于 0.1%, 具有较高的编辑效率和较好的特异性^[8]。

ABEs 的开发为治疗由 C-G 到 T-A 突变引起的遗传病提供了可能, 然而, ABEs 在基因组中有限的可编辑位点、编辑效率低和脱靶编辑等问题限制了其应用。针对这些问题许多研究者在前人的基础上对 ABEs 进行了改造优化开发出了各种不同的 ABEs。CRISPR/Cas 系统与靶位点结合需要 PAM 序列的存在, 目前广泛使用的 *SpCas9* 识别的 PAM 序列为 NGG, 然而, 只有约 1/4 的致病性点突变在适当的位置含有 NGG 序列, 这给相关遗传病的治疗带来了困难^[21]。研究者们为了

解决这一问题用不同的 *Cas9* 或 *Cas9* 变体替换 *SpCas9* 开发出了能识别不同 PAM 序列的 ABEs, 例如, 能识别 NG 的 NG-ABE, 能识别 NG/NAA/NAT 的 *xCas9-ABE* 以及能识别 NNG 的 *ScCas9-ABE*^[22-23]。虽然基于各种不同 *Cas9* 的 ABEs 能识别不同的 PAM 序列, 但 ABE 与 *SpCas9* 以外的任何其他来源的 *Cas9* 都显示出有限的兼容性, 这使其编辑效率降低。Richter 等^[24]利用噬菌体辅助的连续和非连续进化 (PACE 和 PANCE) 方法, 将脱氧腺苷脱氨酶的催化速率提高了 590 倍 (与 ABE7.10 相比), 开发出了下一代 ABEs, 称为 ABE8e, ABE8e 与 *SpCas9* 以外的一些 *Cas9* 也显示出较好的兼容性。另外, ABEs 存在的脱靶问题特别是非 sgRNA 依赖的 RNA 脱氨问题也是限制 ABEs 应用的主要因素。因为 ABE7.10 和 ABEmax 中包含的 *wtTadA* 是对 RNA 起作用的, 这可能是造成 ABE 介导的不依赖 sgRNA 的 RNA 脱氨的因素。Rees 等^[25]将 ABEmax 中 *wtTadA* 催化位点沉默 (*wtTadA-E59A*) 并进一步工程化 *eTadA** (*eTadAV106W*) 构建得到的 ABEmax-AW 表现出的 RNA 脱氨活性明显低于 ABEmax, 此外, Richter 等^[24]向 ABE8e 中引入相同的突变 (V106W) 同样也减少了 RNA 脱氨作用。

1.3 双碱基编辑器的开发

CBEs 和 ABEs 这两种 DNA 碱基编辑器虽然能实现精确的基因组编辑, 但是, 它们都只能催化单一类型的核苷酸转变, 产物相对单一。最近, 有 3 项研究介绍了一种能同时编辑 C 和 A 两种碱基的双碱基编辑器, 这种双碱基编辑系统都是由 *nCas9* 与胞嘧啶脱氨酶和腺嘌呤脱氨酶融合而成, 能同时使 C-G 和 A-T 转变为 T-A 和 G-C^[12-14]。双碱基编辑器的开发进一步拓宽了碱基编辑器的功能。

首先, Grünwald 等^[13]将先前描述的腺嘌呤碱基编辑器 miniABEmax-V82G 中的腺嘌呤脱氨酶和胞嘧啶碱基编辑器 Target-AID 中的胞嘧啶脱

氨酶分别融合到 nCas9 的 N 端和 C 端,并融入两个拷贝的 UGI,开发出了一种双碱基编辑器 SPACE (图 1C)。在 HEK293T 细胞中,SPACE 保留了碱基编辑器的碱基编辑功能,在目标位点很少产生意外的 Indels,并且脱靶率也相对较低,重点是与同时表达 miniABEmax-V82G 和 Target-AID 相比,SPACE 实现了更高效的双重编辑。在另一项研究中,Zhang 等^[12]也开发出一种名叫 A&C-BEmax 的双碱基编辑器,他们在 ABE7.10 的 N 端添加胞嘧啶脱氨酶 hAID 得到融合体 ABE7.10-N-AID,然后对其进行密码子优化并添加 2 分子核定位信号 (NLS) 生成了 ABE7.10-N-AIDmax,最后在 ABE7.10-N-AIDmax 中添加 2 个拷贝的 UGI 得到了 A&C-BEmax。A&C-BEmax 与 ABEmax 相比 A 到 G 的编辑效率相似或略有降低,而与 AID-BE4max 相比 C 到 T 的编辑效率则有所提高,另外,与同时表达 ABEmax 和 AID-BE4max 相比 A&C-BEmax 的双重编辑率明显更高^[12]。除了 SPACE 和 A&C-BEmax 之外,Sakata 等^[14]将胞嘧啶脱氨酶 PmCDA1 和腺嘌呤脱氨酶 TadA 与 nCas9 融合同样得到了双碱基编辑器 Target-ACEmax。Target-ACEmax 在 47 个被测试的基因组靶点上同样显示出较高的同时编辑碱基 C 和 A 的编辑活性^[14]。

双碱基编辑器的开发解决了同时表达两个单碱基编辑器编辑效率低的问题,能实现更加复杂的碱基编辑,在校正疾病相关等位基因、遗传筛查和谱系追踪等方面有着一系列的潜在应用^[26]。

1.4 GBE 的开发

虽然碱基对 A-T 到 G-C 以及 C-G 到 T-A 的替换能纠正大部分的点突变遗传疾病,但是仍有一部分点突变遗传疾病是由碱基颠换造成的,如 G-C 到 C-G 的颠换占到了人类疾病相关点突变的 11%^[8],因此能催化 C 到 G 颠换的碱基编辑器的开发同样有着重要意义,最近,这种能催化 C 到 G 颠换的碱基编辑器也已被开发出来^[15-16]。

在前期一些研究中,研究者们发现 CBEs 在碱基编辑过程中碱基 C 会随机突变为其他碱基而不是碱基 T^[9,27-28]。基于此,如果正确地利用和控制此过程,C 可能会特异地转换为任意碱基。Zhao 等^[16]研究发现,在大肠杆菌 8 种不同的位点 CBE (nCAs9-AID) 可高效地诱导 C 到 A 的颠换,并且证实该颠换是由大肠杆菌中尿嘧啶 DNA 糖基化酶 (Uracil DNA N-glycosylase, UNG) 介导的 DNA 修复产生的。基于该思路,研究者对 CBE 进行改造,他们将原有的 UGI 删除掉并添加 UNG 构建得到 GBE 系统 APOBEC-nCas9-Ung^[16] (图 1D)。APOBEC-nCas9-Ung 可在哺乳动物细胞中目标区域的 C6 位点高效地诱导 C 到 G 的颠换,并且该 GBE 系统诱导的 Indel 以及脱靶风险均与相关的 CBE 系统相近^[16]。另外,Kurt 等^[15]通过相似的策略对 CBE 进行改造同样也获得了能诱导 C 到 G 颠换的碱基编辑器 CGBE1,CGBE1 由 nCas9 和大鼠 APOBEC1 胞嘧啶脱氨酶变体 (R33A) 以及来源于大肠杆菌的尿嘧啶 DNA 糖基化酶 (*Escherichia coli*-derived uracil DNA N-glycosylase, eUNG) 构成。CGBE1 在人类细胞中,尤其是在富含 AT 的序列中能有效地诱导 C 到 G 的颠换,并且很少会造成非预期的 C 到 W (W=A+T) 的编辑和 Indel 突变^[15]。此外,研究人员删除了 CGBE1 中的 eUNG 得到了一种名叫 miniCGBE1 的编辑器,该编辑器降低了 Indel 的产生频率,但是略微降低了编辑效率^[15]。

GBE/CGBE 的开发使碱基编辑工具包又添加了新成员,进一步完善了碱基编辑系统,同时也为那些由 G 到 C 突变而引起的人类遗传疾病治疗带来了曙光。

1.5 PEs 的开发

CBEs 和 ABEs 的编辑产物纯度容易受编辑窗口内目标碱基数影响,当编辑窗口存在多个目标碱基时,容易产生副产物^[7-8,29]。另外,CBEs 和 ABEs 只实现了 4 种碱基替换 (C→T、G→A、

A→G 和 T→C), 无法实现碱基的任意颠换 (C→A, C→T, C→G; G→A, G→T, G→C; A→T; A→C; A→G; T→A, T→G, T→C)。为了克服这些问题, Anzalone 等^[10]把逆转录酶与 nCas9 融合, 并在 sgRNA 的 3'端添加逆转录模板, 研发得到的 prime 编辑器 (PEs), 实现了碱基的随意转换和片段的精准插入和缺失。PEs 系统由逆转录酶、nCas9 和 pegRNA (Prime editing extended guide RNA) 构成, 其中 pegRNA 通过在 gRNA 序列 3'末端添加一个 5–6 nt 的反转录引物结合位点 (Prime binding sites, PBS) 和一个 7–22 nt 包含编辑信息的逆转录模板构建得到 (图 1E)。PEs 的工作原理为: nCas9 在靶位点引入切刻, 切刻的 3'末端与 pegRNA 上的 PBS 结合并在逆转录酶的作用下将 pegRNA 上逆转录模板的编辑信息复制到 DNA 链上, 接着切刻处 5'尾巴被细胞内的核酸内切酶 (例如 FEN1) 或者 5'核酸外切酶 (例如 EXO1) 切除, 3'尾巴在 DNA 连接酶的作用下整合到 DNA 双链上, 形成由编辑链和非编辑链构成的异源 DNA 双链, nCas9 在非编辑链上引入第二切刻, 诱导细胞以编辑链为模板对非编辑链进行修复, 从而实现靶位点的精准编辑。

Anzalone 研究团队将莫洛尼鼠白血病病毒逆转录酶 (Moloney murine leukaemia virus reverse transcriptase, M-MLV RT) 融合到 nCas9 的 C 末端构建得到了第一代 prime 编辑器 PE1^[10]。将 PE1 编码质粒转染到 HEK293T 细胞对其编辑活性进行检测发现, PE1 介导靶位点目标碱基颠换的效率仅为 0.7%–5.5%, 靶位点 Indels 突变效率为 4%–17%。为了提高 PEs 的编辑活性, 该研究团队首先对各种工程化的 M-MLV RT 进行测试筛选, 最终他们得到了 1 种五突变的 M-MLV RT (D200N、L603W、T330P、T306K 和 W313F), 该变体具有更好的热稳定性和酶活性并且更容易和底物结合, 他们将其引入 PE1 中构建得到了 PE2。进一步, 研究者尝试在非编辑链引入第二切刻,

诱导细胞通过同源重组通路以编辑链为模板对非编辑链进行修复。据此构建得到了第三代 prime 编辑器 PE3, PE3 在 HEK293T 细胞中的编辑效率较 PE2 提高了 1.5–4.2 倍, 最高可达到 55%。另外, 为降低引入 Indels 的风险, 研究者将引导第二切刻的 sgRNA 靶向编辑后产生的 DNA 新链, 使第二切刻在第一切刻修复后产生, 构建得到编辑器 PE3b。PE3b 的编辑特异性比 PE3 提高了 13 倍, 靶位点 Indels 突变效率仅为 0.74%。

目前, PEs 已经被应用于多种哺乳动物细胞系以及水稻和小麦等重要农业植物的基因组编辑, 并且还成功应用于小鼠模型的构建^[10,30–35]。但值得注意的是, PEs 的编辑效率普遍比较低并且存在不稳定的现象, PEs 的编辑效率受到细胞类型、Cas9 活性以及 pegRNA 等多种因素的影响^[36–39]。优化 pegRNA 能有效地提高 PEs 的编辑效率, 因为在 pegRNA 的 3'端含有 PBS 和 RT, 因此其设计更为复杂, 需要考虑多个参数^[38,40]。目前, 已经有相关工具被开发出来用于 pegRNA 的设计, 例如, Chow 等^[40]开发的名为 pegFinder (<http://pegfinder.sidichenlab.org>) 的网络设计工具, 该工具可以根据目标 DNA 序列快速设计 pegRNA, pegFinder 可以预测 sgRNA 的靶向评分和脱靶评分并将评分纳入其排名系统, 重要的是 pegFinder 还支持靶向范围扩大的 Cas9 变体的 pegRNA 设计。最近, Kim 等^[39]利用 54 836 对 pegRNA 及其靶序列对 PE2 在人类细胞中的编辑活性进行了高通量评估, 在此基础上他们开发出了 3 种计算模型及在线 pegRNA 设计工具 deepcrispr (<http://deepcrispr.info/DeepPE>) 可用于 pegRNA 的设计和编辑效率的预测。除了优化 pegRNA 的设计, 在未来的研究中还可以通过选用更合适的逆转录酶、筛选活性更高的 Cas9 蛋白以及优化编辑器的表达来提高 PEs 的编辑效率^[36–38]。相信随着研究的深入, PEs 的可用性将会得到极大提高。

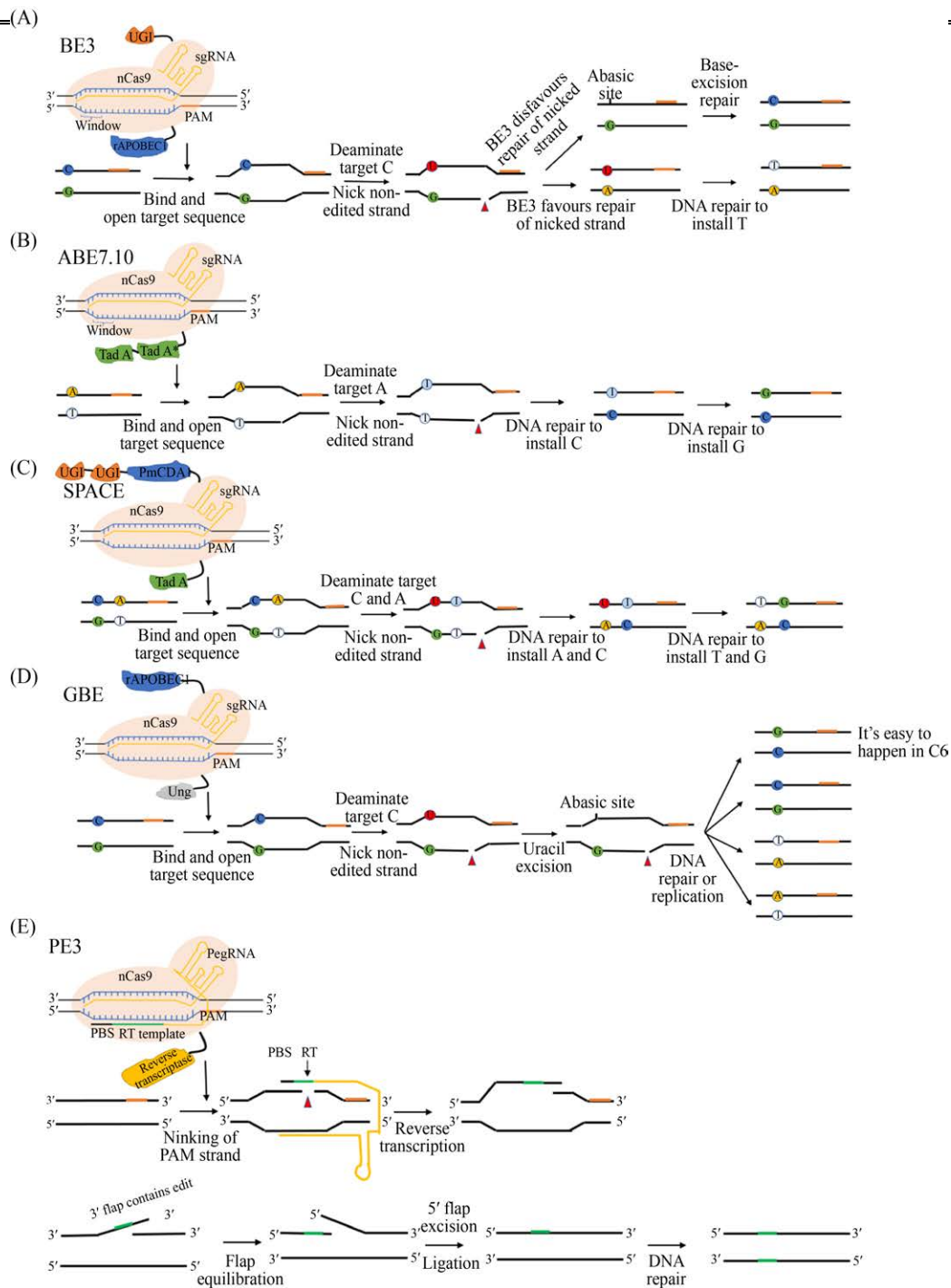


图 1 BE3^[7]、ABE7.10^[8]、SPACE^[13]、GBE^[16]和 PE3^[10]的工作原理图

Fig. 1 Mechanisms of BE3^[7], ABE7.10^[8], SPACE^[13], GBE^[16] and PE3^[10]. (A) Under the action of cytosine deaminase and UGI, the BE3 system deaminates the C in the active window at the target site into U, and achieve C to T mutation after DNA repair. (B) Under the action of adenine deaminase, the ABE7.10 system deaminates A in the active window at the target site into I, and mutates A to G after DNA repair. (C) Under the action of adenine deaminase, cytosine deaminase and UGI, SPACE system simultaneously deaminates C into U and A into U in the active window at the target site, and achieve mutations of C to T and A to G simultaneously after DNA repair. (D) Under the action of cytosine deaminase and UNG, the GBE system deaminates the C in the active window at the target site into U, and achieve C to G mutation after DNA repair. (E) The PE3 system, under the action of reverse enzyme, install the base sequence in the reverse transcription template into the target site, and achieve arbitrary base conversion and precise insertion and deletion of small fragments after DNA repair.

2 基于 CRISPR/Cas 系统 DNA 碱基编辑器的优化

2.1 提高编辑效率

碱基编辑器编辑效率同时受到细胞内的修复机制、编辑器的表达水平、细胞内 DNA 的修饰等因素的影响。为了提高碱基编辑器的编辑效率,研究人员做了许多的探索,至今,已有多种高编辑效率的碱基编辑器被开发出来。细胞内 UDG 介导的碱基切除修复 (Base-excision repair, BER) 机制是影响 CBEs 编辑效率的主要因素,通过增加 UGI 的表达量来进一步抑制碱基的切除修复能有效地提高 CBEs 的编辑效率。例如, Komor 等^[41]将另一个 UGI 融合到 BE3 中开发出的含有两分子 UGI 的 BE4 有效地提高了碱基编辑效率; Wang 等^[42]通过共表达 BE3 和游离的 UGI 也有效地提高了碱基编辑效率。另外,研究表明增加碱基编辑器在细胞内的表达量能有效地提高编辑效率,添加核定位信号 (Nuclear localization signal, NLS)、密码子优化以及祖先序列重建能有效地增加编辑器在细胞内的表达^[43]。Koblan 等^[43]在 BE4 系统的 C 末端和 N 末端分别融合了一分子的 NLS 信号序列,使 BE4 的编辑效率提高 1.3 倍;在此基础上,他们通过密码子优化提高脱氨酶 APOBEC1 和 nCas9 的表达量,开发出了 BE4max,使编辑效率又提高了 1.8 倍;为了进一步提高 BE4max 的编辑效率,他们对胞嘧啶脱氨酶进行祖先序列重建,在 BE4max 的基础上开发出了 AncBE4max。针对 ABE7.10 他们用密码子优化的方式构建得到的 ABEmax 同样也提高了碱基编辑效率^[43]。另外, DNA 的修饰也可能影响碱基编辑效率, Wang 等^[44]通过调节局部 DNA 甲基化表明 CpG 甲基化确实对 BE3 介导的 C 到 T 的编辑效率产生负面影响。他们通过筛选多种 APOBEC 和 AID 脱氨酶发现,含有人类 APOBEC3A 脱氨酶的 CBEs (hA3A-BE3) 在高甲基化水平和 GpC 二核苷酸含量高的区域有着更高的编辑效率,在

hA3A-BE3 基础上融合 3 个拷贝数的 UGI 构建得到的 hA3A-eBE 进一步提高了碱基编辑效率^[44]。Zhang 等^[45]研究发现在 CBEs 中添加单链 DNA 结合结构域 (Single-stranded DNA-binding domain, ssDBD) 能增加脱氨酶的编辑活性及其与单链 DNA 的亲和力,基于此,他们在 nCas9 和脱氨酶之间插入 Rad51 蛋白的非序列特异性 ssDBD 构建得到的一些 hyCBEs,成功提高了碱基编辑效率。Richter 等^[24]使用噬菌体辅助的非连续和连续进化的方法进化了 ABE7.10 的脱氨酶成分并获得了脱氨作用更好的 ABE8e,因为 ABE8e 的脱氨作用更好,所以编辑器 SpABE8e 在 HEK293T 细胞的编辑效率比 SpABE7.10 高 3–11 倍。针对植物基因组, Hua 等^[46]利用 ecTadA*7.10-nSpCas9 (D10A) 融合体构建得到了简化的植物碱基编辑器 ABE-P1S,因为 ABE-P1S 结构更简单,所以其更容易在细胞中表达。相对于由 ecTadA-ecTadA*7.10-nSpCas9 (D10A) 融合体构成的植物编辑器 ABE-P1, ABE-P1S 在细胞中的蛋白表达量更高,对应的编辑效率也更高。

2.2 扩大编辑范围

碱基编辑器的编辑范围由 CRISPR/Cas 系统决定, CRISPR/Cas 系统与靶位点结合需要 PAM 序列的存在, PAM 极大地限制了基因组可编辑位点,这样就阻碍了碱基编辑器的广泛应用^[47]。为了打破该限制,研究者们用 Cas9 直系同源物或经过工程设计改造的 Cas9 变体构建了多种碱基编辑器,以供使用者根据编辑需要选择适宜的编辑器。例如,用来自金黄色葡萄球菌的 SaCas9 及其变体 KKH-SaCas9 替代 SpCas9 产生的 CBEs,识别的 PAM 序列分别为 NNGRRT 和 NNNRRT (R=A+G);用来自耳形葡萄球菌的 SauriCas9 替代 SpCas9 产生的 SauriBE4max 和 SauriABEmax 则可以识别序列为 NNGG 的 PAM^[47-48]。将 Cpf1 与胞嘧啶脱氨酶融合设计的基于 CRISPR/Cpf1 的碱基编辑器,该系统可识别富含 T 的 PAM (TTTV,

V=A+C+G) 序列^[49]。另外,把传统 SpyCas9 的 PAM 相互作用区域替换为新发现的猕猴链球菌 Cas9 (SmaCas9) 的 PAM 相互作用区域产生的 Spy-mac BE4max 和 Spy-mac ABEmax 可以识别 NAA 的 PAM 序列,但只有 PAM 序列是 TAAA 时有较高效率^[50]。通过对 SpCas9 进行工程改造, Kim 等^[47]开发出了 VQR-BE3、EQR-BE3 和 VRER-BE3,它们识别的 PAM 序列分别为 NGA、NGAG 和 NGCG。Nishimasu 等^[51]将 Target-AID 中 SpCas9 替换为他们设计改造的 SpCas9-NG 能针对 PAM 为 NG 位点实现有效碱基编辑。Hu 等^[52]利用噬菌体辅助连续进化法筛选得到 SpCas9 的变异体 xCas9,xCas9 可以识别 NG、GAA 和 GAT 等 PAM 序列,他们基于 xCas9 开发得到了 xCas9(3.7)-BE3 和 xCas9(3.7)-ABE。最近, Miller 等^[53]引入了几个新的 SpCas9 变体,它们分别识别 NRRH、NRTN 和 NRCH 的 PAM 序列,从而使碱基编辑器能够对具有 NR PAM 序列的目标进行操作; Walton 等^[54]开发的另一个名为 spry 的 SpCas9 变体显示了对 NRN 和 NYN (Y=C+T) 的 PAM 序列的偏好,但是偏好程度不明显,这种变体几乎可以针对基因组中所有位点进行编辑。

2.3 降低脱靶率

脱靶编辑是限制碱基编辑技术推广应用的主要问题。脱靶编辑是指编辑器在目标位点之外引入非预期突变。对于碱基编辑器有两种情况会造成脱靶,一种是因为 Cas9 与非靶位点非特异性结合造成的脱靶也就是 Cas9 依赖的脱靶,另一种是非 Cas9 依赖的脱氨酶与非靶位点结合而造成的脱靶^[55-57]。一个减少 Cas9 依赖的脱靶编辑的有效方法就是在 CBEs 和 ABEs 中使用高保真的 SpCas9 变体。野生型的 SpCas9 与 DNA 靶链的磷酸骨架存在非特异性的相互作用,这种非特异性的相互作用增加了碱基编辑器的脱靶风险,而高保真的 SpCas9 变体能减少这种非特异性的相互作用^[58]。目前,已有多项研究利用 SpCas9 变体

成功提高了碱基编辑器的特异性,例如,研究人员利用 xCas9、HF-Cas9 和 Sniper-Cas9 等高保真的 SpCas9 变体构建得到的 xCas(3.7)-BE3、HF-BE3 和 Sniper-BE3 都能有效地减少脱靶编辑^[52,58-59]。另外, Gehrke 等^[60]将高保真 SpCas9 变异体 SpCas9-HF1 和 HypaCas9 引入 eA3A-BE3 中同样也减少了脱靶的碱基编辑。另外,改变碱基编辑器的递送方式也可以有效地降低脱靶编辑率^[58,61-62]。目前,多数研究都是通过转染质粒或病毒载体这些基于 DNA 的构建体来实现碱基编辑,质粒载体可以利用电穿孔或阳离子脂质纳米颗粒等方法转染细胞,而病毒载体则可以利用慢病毒、腺病毒或腺相关病毒转染细胞^[63-65]。虽然基于 DNA 的构建体能在细胞中高效地表达并且实现有效编辑,但其在细胞中的长期表达会增加脱靶风险^[66]。因为 mRNA 和核糖核蛋白 (Ribonucleoprotein, RNP) 在细胞中会很快被降解,这样脱靶编辑的可能性就会降低。为了降低脱靶风险,许多研究者将碱基编辑器以 mRNA 或 RNP 的形式导入细胞来实现碱基编辑。Kim 等^[61]利用显微注射或电穿孔的方法将 BE3 的 mRNA 或 RNP 导入小鼠胚胎中,实现了有效碱基编辑同时有着很高的特异性。Rees 等^[58]以 RNP 的形式将 BE3 导入哺乳动物细胞,同时他们还将特异性更好的 HF-BE3 以质粒转染的方式导入细胞,结果发现, BE3 的 RNP 传递具有更高的特异性。关于非 Cas9 依赖的脱氨酶引起的脱靶, Zuo 等^[56]分别将 BE3 和 ABE7.10 注射到小鼠二细胞期胚胎其中一个卵裂球, E14.5 时分选编辑细胞和非编辑细胞,通过全基因组测序分析 BE3 和 ABE7.10 的脱靶效应。发现在每个胚胎中 BE3 注射组的单核苷酸变异 (Single nucleotide variants, SNVs) 个数为 283 个,较对照组多了 200 倍, ABE7.10 注射组的 SNVs 数量为 10 个,与 SNVs 的自然发生率相近^[56]。进一步分析发现, BE3 组 90% 突变源于 APOBEC1 导致的 G→A 或者 C→T 突变,与

sgRNA 的脱靶位点关系不大^[56]。CBEs 全基因组非 Cas9 依赖的脱靶主要是因为胞嘧啶脱氨酶域的内在 DNA 亲和力, 因此降低胞嘧啶脱氨酶域与 DNA 之间的亲和力可能是提高 CBEs 编辑器特异性的有效方法, 基于此 Doman 等^[67]开发的 YE1-BE4 及 YE1-BE4 变体有效地减少了非 Cas9 依赖的脱靶编辑。对于 ABEs, 由于腺嘌呤脱氨酶 TadA 对底物 DNA 的结合力本身较弱, 所以 ABEs 在全基因组范围内有着更好的特异性。值得注意的是, DNA 碱基编辑器还会引起 RNA 水平的脱靶^[25,57,68]。针对 RNA 的脱氨, 可以通过改造脱氨酶与 RNA 的活性结合位点来降低脱氨酶与 RNA 之间的相互作用从而减少脱靶的 RNA 编辑^[18]。例如, Grünwald 等^[57]发现在 BE3 中将突变引入 rAPOBEC1 (rAPOBEC1-R33A 和 rAPOBEC1-R33A/K34A), 产生的 SECURE-BE3, 减少了非 Cas9 依赖的 RNA 脱氨作用。他们还发现当脱氨酶是 eA3A 时, RNA 的脱氨效果很低^[69]。此外, Zhou 等^[68]开发的 ABE7.10^{F148A} 能够完全避免 ABEs 在 RNA 范围的脱靶编辑。

与 CBEs 和 ABEs 不同, PEs 本身没有碱基脱氨功能, 其脱靶编辑主要发生于 sgRNA 的脱靶位点。在 HEK293T 细胞中, 利用已知脱靶位点的 sgRNA 对 PE2 和 PE3 的编辑特异性检测^[70-71]。发现在 16 个已知的脱靶位点中, 仅在 3 个位点中检测到脱靶编辑, 并且只有 1 个位点的脱靶编辑效率达到 1%, 远低于 CRISPR/Cas9 系统的脱靶编辑效率 (最高为 60%), 证明 PEs 系统具有较高的编辑特异性^[10]。

2.4 缩小和扩大编辑窗口

碱基编辑器在靶位点上的可编辑范围称为编辑窗口, CBEs 和 ABEs 的编辑窗口位于 PAM 序列远端 2–6 bp 或 4–8 bp 区域的 5 bp 范围内, PEs 没有具体的编辑窗口, 理论上可在第一切割 3' 末端后引入任意编辑^[7-10]。CBEs 和 ABEs 编辑窗口中存在多个 C 碱基和 A 碱基时可能会有副产物的

生成, 这限制了它们在编辑要求比较高的领域中的应用。缩小编辑窗口能有效地减少副产物的生成, 目前, 已有研究者对碱基编辑器进行了优化, 成功缩小了编辑窗口。Kim 等^[47]通过改造 APOBEC1 的结构域研发得到的 YE1-BE3、YE2-BE3、EE-BE3 和 YEE-BE3, 成功缩小了 CBEs 的编辑窗口; Wang 等^[44]通过替换 APOBEC1 底物识别结构域 hA3A 中的氨基酸, 开发出了 hA3A-BE3-Y130F 和 hA3A-BE3-Y132D, 也缩小编辑窗口; Tan 等^[72]通过截短七鳃鳗胞苷脱氨酶 (PmCDA1) 的 C 末端和改变 PmCDA1 和 nCas9 之间刚性连接子的长度同样也缩小了编辑器的编辑窗口。

虽然缩小编辑窗口能提高碱基编辑的精确性, 但减少了全基因组范围的可编辑位点, 而扩大编辑窗口能增加全基因组范围的可编辑范围。对于扩大编辑窗口, 也有研究者做了一些探索。Jiang 等^[73]利用 SunTag 信号放大系统创建了一个名叫 BE-PLUS 的碱基编辑器能将编辑窗口扩大到 14 bp。Huang^[22]等使用环化排列的 Cas9 变体替代编辑器的 Cas9 蛋白, 使窗口扩展到 8–9 bp。

2.5 改变序列偏好

目标碱基上下游碱基的种类是影响碱基编辑器编辑效率的重要因素。以 BE3 为例, 当目标碱基 C 的上游碱基是 T 时, 编辑效率较高, 上游碱基是 G 时, 编辑效率较低^[7,29]。研究表明, 碱基编辑器的序列偏好性决定于脱氨酶^[41]。据此, Komor 等^[41]分别用胞嘧啶脱氨酶 CDA1 和 AID 替换了 BE3 中的 APOBEC1, 构建了 CDA1-BE3 和 AID-BE3, 使编辑器在 GC 位点具有更高的编辑效率。Gehrke 等^[60]利用人为修饰的人源 APOBEC3A 构建了 eA3A-BE3, 使其偏好于 TC 位点。另外, Thuronyi 等^[74]利用 PACE 技术对 CBEs 中 APOBEC1 进行优化得到了序列兼容性更强的 evoAPOBEC1-BE4max 和 evoCDA1-BE4max, evoAPOBEC1-BE4max 对 GC 位点的编辑效率是

野生型 APOBEC1 的 26 倍。

3 基于 CRISPR/Cas 系统 DNA 碱基编辑技术在生物医学中的应用

3.1 纠正致病突变

在人类遗传病中,半数以上是由单个碱基突变引起的,碱基编辑技术的高效编辑能力为研发人类遗传病的基因疗法提供了方便^[29]。利用碱基编辑技术矫正人类致病突变已有了初步的尝试,目前,CBEs 和 ABEs 已经被用来纠正癌症、 β -地中海贫血、杜氏肌营养不良症以及 I 型遗传性酪氨酸血症等疾病相关的突变^[75]。Komor 等^[7]首次开发出 BE3 时就测试了其在哺乳动物细胞中纠正疾病相关的突变的潜力,他们将编码 BE3 的核转染 DNA 和合适的 sgRNA 转进永生化的小鼠星形胶质细胞中,目的是将 *APOE4* 基因中 Arg158 突变成 Cys158。转染 2 d 后,他们测序发现有 58%–75% 的 Arg158 转化为 Cys158,该突变能有效地减少得阿尔茨海默症的风险^[7]。同样的,Gaudelli 等^[8]首次开发 ABE7.10 时也对其纠正疾病相关突变的能力进行了测试。遗传性血色沉积 (Hereditary haemochromatosis, HHC) 通常由人类 HFE 基因中第 845 位核苷酸的 G 到 A 突变引起的 HFE 蛋白中的 Cys282 转换为 Tyr282 所造成。Gaudelli 等^[8]将编码 ABE7.10 的核转染 DNA 和 sgRNA 转染进永生化的淋巴母细胞系中,转染后分离成功转染的细胞并对其基因组 DNA 进行高通量测序,结果观察到在转染细胞的 28% 测序读取中 Tyr282 密码子向 Cys282 转化。此研究证明了 ABEs 在人类细胞中纠正疾病相关突变的巨大潜力。 β -地中海贫血是一个全球性的健康问题,由 *HBB* 基因突变引起,在中国和东南亚的 β -地中海贫血患者中,*HBB*-28 (A>G) 突变是 3 种最常见的突变之一。Liang 等^[76]利用 BE3 纠正了由患者外周血中的淋巴细胞构建的克隆胚胎中 *HBB*-28 (A>G) 的致病突变。首先他们在含有 *HBB*-28 (A>G)

突变片段的 HEK293T 细胞中证实了纠正人细胞中 *HBB*-28 (A>G) 突变的可行性,接着他们将 BE3 mRNA 和 sgRNA 注射进由患者外周血中的淋巴细胞与体外成熟的卵母细胞融合形成的胚胎中,结果有 45.4% (10/22) 的 G-28 被转化为 A 或 C。其中一个胚胎中 G-28 被转化为 C,在其他 9 个胚胎中 G-28 被转化为 A^[76]。该研究证实利用碱基编辑技术在人类胚胎中修复致病突变的可行性。另外,Zeng 等^[77]利用 A3A(N57Q)-BE3 对 *BCL11A* 基因增强子进行编辑,不但达到了预防镰刀状细胞病的目的,而且防止了源于 β -地中海贫血患者造血干/祖细胞 (Hematopoietic stem and progenitor cells, HSPCs) 诱导的血红蛋白链的失衡。

3.2 构建疾病模型

人类疾病动物模型是现代生物医学研究疾病致病机理和研发疾病治疗方法的有效工具,快速有效地制备人类疾病模型可促进生物医学领域的发展,而碱基编辑技术的迅猛发展为疾病模型的制备提供了极大的便利 (图 2)。小鼠是最常见的模式动物,在疾病研究中被广泛应用。Kim 等^[61]在小鼠受精卵中利用 BE3 在 *DMD* 和 *Tyr* 两个基因的蛋白编码区提前引入终止密码子,成功获得 *DMD* 和 *Tyr* 基因敲除小鼠模型,证明了利用碱基编辑器制备基因编辑动物的可行性。Liu 等^[78]在小鼠受精卵中利用 ABEs 在雄激素不敏感综合征相关基因 *Ar* 和并指畸形有关基因 *hoxd13* 中引入致病突变,成功制备得到表现出这两种疾病临床症状的小鼠模型。另外,Liu 等^[32]利用 PE3 成功构建了并指畸形相关基因 *hoxd13* 单个碱基突变的小鼠模型。除了小鼠模型外,Liu 等^[79]利用 BE3、ABE7.10 和 BE4-GAM 制备了多种与人类多种疾病相关的兔模型。在大动物模型中,Yuan 等^[80]利用 BE4-Gam 制备了 β -1,4-乙酰半乳糖基转移酶 2、 α -1,3-半乳糖基转移酶和胞苷单磷酸-N-乙酰神经氨酸羟化酶缺陷的猪模型,证明碱基编辑器同样适用于大动物疾病模型制备。另外,针对非哺

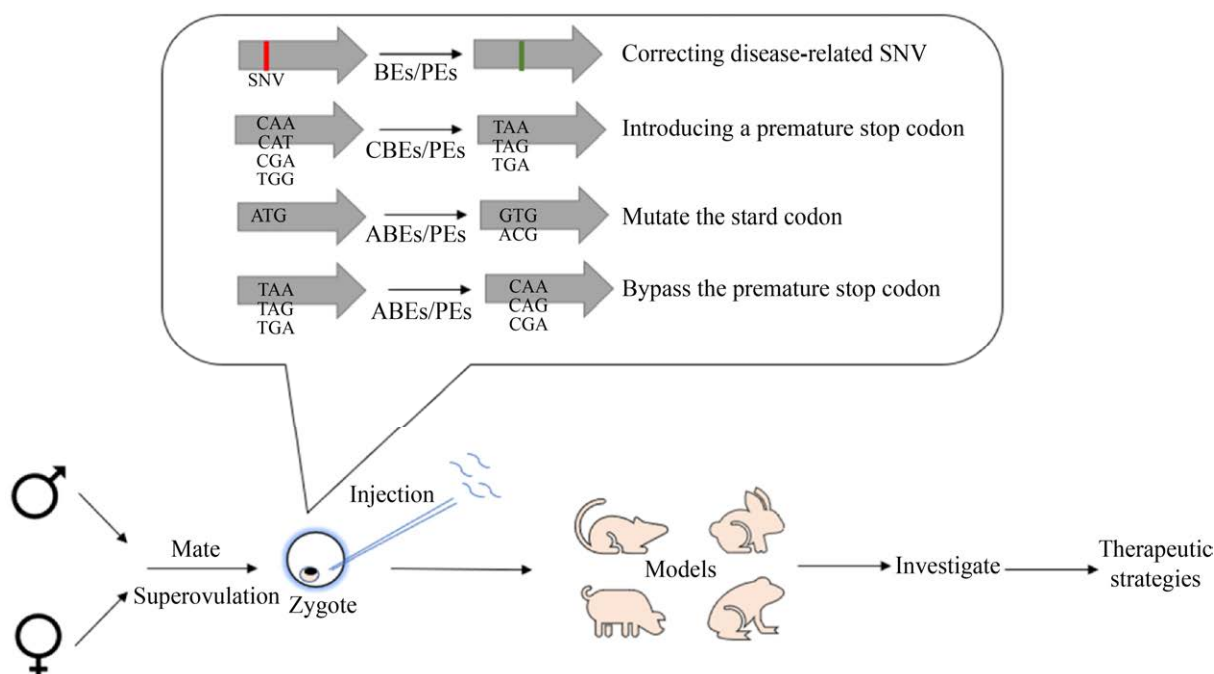


图2 DNA碱基编辑器在构建动物模型中的应用

Fig. 2 Application of DNA base editors in animal model construction. SNV: single-nucleotide variant.

乳动物，也有研究人员利用碱基编辑技术构建了斑马鱼和非洲爪蟾模型^[81-82]。例如，Zhang等^[81]针对人类眼皮肤白发病构建的斑马鱼模型；Park等^[82]针对眼皮肤白发病构建的非洲爪蟾模型。利用碱基编辑器建立致病基因点突变动物模型为进一步真正进行临床疾病治疗奠定了坚实的基础^[18]。

3.3 筛选耐药突变

利用化学药物杀死癌细胞是目前治疗癌症最有效的手段之一，但是癌细胞的耐药突变抑制了药物的治疗效果。利用单碱基编辑技术鉴定癌细胞的耐药突变，可为癌症治疗提供有效的用药依据。Ma等^[27]利用他们开发的dCas9-AIDx碱基编辑器在慢性粒细胞白血病细胞中编辑*BCR-ABL*，成功鉴定了慢性髓细胞样白血病细胞中对伊马替尼(Imatinib)的抗性突变。基于同样的策略，Hess等^[28]利用他们研发的CRISPR-X碱基编辑器成功鉴定出了引发波替单抗(Bortezomib)耐药性的突变。

4 基于CRISPR/Cas系统DNA碱基编辑技术在农业中的应用

利用传统的育种手段，如杂交育种，培育优良畜禽和作物品种需要很长的周期，耗费大量的财力和物力，且无法突破种源的限制，极大地减缓了动植物育种的进程。碱基编辑技术可在DNA水平对动植物的遗传信息进行定向改造，直接对目标性状进行改良或者赋予动植物新的遗传性状，相较于传统育种手段具有更直接的育种效果。目前，碱基编辑技术已被成功应用于动植物遗传育种研究，在改善经济性状、提高抗病能力以及增强作物耐药能力等方面取得了可喜进展^[83]。

在动物育种中，Zhou等^[84]把BE3的编码mRNA和sgRNA注射到绵羊受精卵中，成功对细胞因子信号抑制物2基因(Suppressor cytokine signaling 2, *SOCS2*)实现了精确编辑，获得的基因编辑羔羊的生长性能明显优于野生型羔羊。Li等^[85]通过显微注射技术将BE3质粒和靶向多个

位点的混合 sgRNA 导入到山羊单细胞胚胎中,对成纤维细胞生长因子 5 (FGF5) 编码基因实现高效编辑,基因编辑山羊的纤维显著长于野生山羊,毛囊显著多于野生型山羊。除了畜禽育种外, Liu 等^[79]利用 BE3 编辑兔 *Mstn* 基因使其在外显子 1 处发生 C 到 T 突变,从而提前产生终止密码子使基因失活,最终他们得到的突变型兔显示出了双肌表型。另外, Li 等^[86]还证明 BE3 系统在家蚕的胚胎细胞和 BmE 细胞中也能进行有效编辑。综上所述,碱基编辑技术是加速农业动物育种进程的有效方法。

随着基因组学的深入研究,越来越多的与作物重要经济性状相关的功能 SNPs 被发掘出来。利用碱基编辑技术将这些 SNPs 引入到作物品种中,可加快作物的育种进程。例如, Chao 等^[87]利用腺嘌呤碱基编辑器成功获得了对除草剂氟乐灵 (Haloxypol-P-methyl) 有抗性的水稻植株。Shimatani 等^[88]利用胞嘧啶碱基编辑器成功获得了抗除草剂咪唑啉酮 (Imidazolidinone, IMZ) 的水稻植株。另外, Zong 等^[89]通过农杆菌介导法将碱基编辑器编码质粒导入未成熟植物胚中,获得了 *OsCDC48* 编辑水稻、*TaLOX2* 编辑小麦和 *ZmCENH3* 编辑玉米; Ren 等^[90]利用他们开发出的胞嘧啶碱基编辑器 rBE9 诱导水稻基因 (*ALS*、*FTIP1e*、*OsAOS1*、*OsJAR1*、*OsJAR2* 和 *OsCOI2*) 的碱基编辑; Kang 等^[91]利用植物亲和性 ABE7.10 (pcABE7.10) 诱变了拟南芥的 4 个基因 (*AtALS*、*AtPDS*、*AtFT*、*AtLFY*) 和 2 个油菜基因 (*BnALS* 和 *BnPDS*)。此外,关于 PEs 在植物中的应用也有了多篇报道,例如, Lin 等^[31]将改造优化的适用于植物的编辑器 PPE3 通过农杆菌介导法导入水稻愈伤组织并成功诱导 *OsALS-T2* 基因发生单碱基突变 (G-to-T)。最近, Jiang 等^[92]利用 PEs 对玉米中 2 个乙酰乳酸合酶基因 *ZmALS1* 和 *ZmALS2* 进行编辑,结果发现这两个基因中共有 53.2%

(33/62) 的 S621I 突变和 6.5% (4/62) 的 W542L 突变,其中 S621I 和 W542L 双重突变频率有 4.8% (3/62)。总之,碱基编辑技术的应用为农作物育种带来了极大便利,解决了传统诱变育种的随机性强和效率低的问题。

5 总结与展望

毫无疑问, DNA 碱基编辑器的开发对于基因编辑领域的影响是巨大的。相对于 CRISPR/Cas 介导的 HDR 编辑,碱基编辑器的最大优势就是可以在不产生 DSB 的情况下实现高效精准的编辑。自 2016 年基于 CRISPR/Cas 系统的 DNA 碱基编辑器首次开发至今,目前,已有各种在编辑效率、编辑范围和编辑特异性等方面得到优化的 DNA 碱基编辑器被开发,另外,双碱基编辑器、糖基化酶碱基编辑器以及 prime 编辑器的问世更是为碱基编辑提供了更多的选择。虽然通过对 DNA 碱基编辑器的优化改良使其在编辑效率、编辑特异性和编辑范围等方面取得了不错进展,但在不产生任何副产物的情况下依然不能对任意细胞中任何位点实现高效的编辑。想要进一步推广 DNA 碱基编辑器在生物医学以及农业领域中的应用必须对其作更多的改进。沿着前人的研究思路,在今后的研究中继续去探索发现更多具有不同特点的脱氨酶和 Cas 蛋白,将它们引入 DNA 碱基编辑器中以提高 DNA 碱基编辑器的编辑精准度、编辑效率和编辑范围;此外,优化 sgRNA 设计、编辑器在细胞中的表达以及编辑器的递送载体等都是提高 DNA 碱基编辑器可应用性的有效方法。DNA 碱基编辑技术已经在人类遗传疾病研究及其相关动物模型制备、药物开发、动植物育种等方面显现出巨大潜力。DNA 碱基编辑技术还在不断完善成熟中,该技术的进步将推动我国及全世界在生物医药和农业生产等领域的快速发展。

REFERENCES

- [1] Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 2012, 337(6096): 816-821.
- [2] Cong L, Ran FA, Cox D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 2013, 339(6121): 819-823.
- [3] Komor AC, Badran AH, Liu DR. CRISPR-based technologies for the manipulation of eukaryotic genomes. *Cell*, 2017, 168(1/2): 20-36.
- [4] Song F, Stieger K. Optimizing the DNA donor template for homology-directed repair of double-strand breaks. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2017, 7: 53-60.
- [5] Bollen Y, Post J, Koo BK, et al. How to create state-of-the-art genetic model systems: strategies for optimal CRISPR-mediated genome editing. *Nucleic Acids Res*, 2018, 46(13): 6435-6454.
- [6] Hess GT, Tycko J, Yao D, et al. Methods and applications of CRISPR-mediated base editing in eukaryotic genomes. *Mol Cell*, 2017, 68(1): 26-43.
- [7] Komor AC, Kim YB, Packer MS, et al. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature*, 2016, 533(7603): 420-424.
- [8] Gaudelli NM, Komor AC, Rees HA, et al. Programmable base editing of A·T to G·C in genomic DNA without DNA cleavage. *Nature*, 2017, 551(7681): 464-471.
- [9] Nishida K, Arazoe T, Yachie N, et al. Targeted nucleotide editing using hybrid prokaryotic and vertebrate adaptive immune systems. *Science*, 2016, 353(6305): aaf8729.
- [10] Anzalone AV, Randolph PB, Davis JR, et al. Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA. *Nature*, 2019, 576(7785): 149-157.
- [11] 张晓辉. 碱基编辑器的优化与应用[D]. 上海: 华东师范大学, 2020.
Zhang XH. The optimization and application of base editing technology[D]. Shanghai: East China Normal University, 2020 (in Chinese).
- [12] Zhang XH, Zhu BY, Chen L, et al. Dual base editor catalyzes both cytosine and adenine base conversions in human cells. *Nat Biotechnol*, 2020, 38(7): 856-860.
- [13] Grünewald J, Zhou RH, Lareau CA, et al. A dual-deaminase CRISPR base editor enables concurrent adenine and cytosine editing. *Nat Biotechnol*, 2020, 38(7): 861-864.
- [14] Sakata RC, Ishiguro S, Mori H, et al. Base editors for simultaneous introduction of C-to-T and A-to-G mutations. *Nat Biotechnol*, 2020, 38(7): 865-869.
- [15] Kurt IC, Zhou RH, Iyer S, et al. CRISPR C-to-G base editors for inducing targeted DNA transversions in human cells. *Nat Biotechnol*, 2020, 39: 41-46.
- [16] Zhao DD, Li J, Li SW, et al. Glycosylase base editors enable C-to-A and C-to-G base changes. *Nat Biotechnol*, 2020, 39: 35-40.
- [17] Pardo B, Gómez-González B, Aguilera A. DNA repair in mammalian cells: DNA double-strand break repair: how to fix a broken relationship. *Cell Mol Life Sci*, 2009, 66(6): 1039-1056.
- [18] 宗媛, 高彩霞. 碱基编辑系统研究进展. *遗传*, 2019, 41(9): 777-800.
Zong Y, Gao CX. Progress on base editing systems. *Hereditas (Beijing)*, 2019, 41(9): 777-800 (in Chinese).
- [19] 方凯伦, 杨辉. CRISPR/Cas 工具的开发和应用. *科学通报*, 2020, 65(11): 973-990.
Fang KL, Yang H. Advances and applications of CRISPR/Cas toolbox. *Chin Sci Bull*, 2020, 65(11): 973-990 (in Chinese).
- [20] Zheng YX, Lorenzo C, Beal PA. DNA editing in DNA/RNA hybrids by adenosine deaminases that act on RNA. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45(6): 3369-3377.
- [21] Kantor A, McClements ME, MacLaren RE. CRISPR-Cas9 DNA base-editing and prime-editing. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(17): 6240.
- [22] Huang TP, Zhao KT, Miller SM, et al. Circularly permuted and PAM-modified Cas9 variants broaden the targeting scope of base editors. *Nat Biotechnol*, 2019, 37(6): 626-631.
- [23] Chatterjee P, Jakimo N, Jacobson JM. Minimal PAM specificity of a highly similar SpCas9 ortholog. *Sci Adv*, 2018, 4(10): eaau0766.

- [24] Richter MF, Zhao KT, Eton E, et al. Phage-assisted evolution of an adenine base editor with improved Cas domain compatibility and activity. *Nat Biotechnol*, 2020, 38(7): 883-891.
- [25] Rees HA, Wilson C, Doman JL, et al. Analysis and minimization of cellular RNA editing by DNA adenine base editors. *Sci Adv*, 2019, 5(5): eaax5717.
- [26] Burgess DJ. Multitasking for base editors. *Nat Rev Genet*, 2020, 21(8): 445.
- [27] Ma YQ, Zhang JY, Yin WJ, et al. Targeted AID-mediated mutagenesis (TAM) enables efficient genomic diversification in mammalian cells. *Nat Methods*, 2016, 13(12): 1029-1035.
- [28] Hess GT, Frésard L, Han K, et al. Directed evolution using dCas9-targeted somatic hypermutation in mammalian cells. *Nat Methods*, 2016, 13(12): 1036-1042.
- [29] Rees HA, Liu DR. Base editing: precision chemistry on the genome and transcriptome of living cells. *Nat Rev Genet*, 2018, 19(12): 770-788.
- [30] Tang X, Sretenovic S, Ren QR, et al. Plant prime editors enable precise gene editing in rice cells. *Mol Plant*, 2020, 13(5): 667-670.
- [31] Lin QP, Zong Y, Xue CX, et al. Prime genome editing in rice and wheat. *Nat Biotechnol*, 2020, 38(5): 582-585.
- [32] Liu Y, Li XY, He ST, et al. Efficient generation of mouse models with the prime editing system. *Cell Discov*, 2020, 6: 27.
- [33] Li HY, Li JY, Chen JL, et al. Precise modifications of both exogenous and endogenous genes in rice by prime editing. *Mol Plant*, 2020, 13(5): 671-674.
- [34] Hua K, Jiang YW, Tao XP, et al. Precision genome engineering in rice using prime editing system. *Plant Biotechnol J*, 2020, 18(11): 2167-2169.
- [35] Sürin D, Schneider A, Mircetic J, et al. Efficient generation and correction of mutations in human iPS cells utilizing mRNAs of CRISPR base editors and prime editors. *Genes (Basel)*, 2020, 11(5): 511.
- [36] 秦瑞英, 魏鹏程. Prime editing 引导植物基因组精确编辑新局面. *遗传*, 2020, 42(6): 519-523.
- Qin RY, Wei PC. Prime editing creates a novel dimension of plant precise genome editing. *Hereditas (Beijing)*, 2020, 42(6): 519-523 (in Chinese).
- [37] Li JY, Li HY, Chen JL, et al. Toward precision genome editing in crop plants. *Mol Plant*, 2020, 13(6): 811-813.
- [38] Anzalone AV, Koblan LW, Liu DR. Genome editing with CRISPR-Cas nucleases, base editors, transposases and prime editors. *Nat Biotechnol*, 2020, 38(7): 824-844.
- [39] Kim HK, Yu G, Park J, et al. Predicting the efficiency of prime editing guide RNAs in human cells. *Nat Hazards*, 2020, DOI: 10.1038/s41587-020-0677-y.
- [40] Chow RD, Chen JS, Shen J, et al. A web tool for the design of prime-editing guide RNAs. *Nat Biomed Eng*, 2020, DOI: 10.1038/s41551-020-00622-8.
- [41] Komor AC, Zhao KT, Packer MS, 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. *Sci Adv*, 2017, 3(8): eaao4774.
- [42] Wang LJ, Xue W, Yan L, et al. Enhanced base editing by co-expression of free uracil DNA glycosylase inhibitor. *Cell Res*, 2017, 27(10): 1289-1292.
- [43] Koblan LW, Doman JL, Wilson C, et al. Improving cytidine and adenine base editors by expression optimization and ancestral reconstruction. *Nat Biotechnol*, 2018, 36(9): 843-846.
- [44] Wang X, Li JN, Wang Y, et al. Efficient base editing in methylated regions with a human APOBEC3A-Cas9 fusion. *Nat Biotechnol*, 2018, 36(10): 946-949.
- [45] Zhang XH, Chen L, Zhu BY, et al. Increasing the efficiency and targeting range of cytidine base editors through fusion of a single-stranded DNA-binding protein domain. *Nat Cell Biol*, 2020, 22(6): 740-750.
- [46] Hua K, Tao XP, Liang WY, et al. Simplified adenine base editors improve adenine base editing efficiency in rice. *Plant Biotechnol J*, 2020, 18(3): 770-778.
- [47] Kim YB, Komor AC, Levy JM, et al. Increasing the genome-targeting scope and precision of base editing with engineered Cas9-cytidine deaminase fusions. *Nat Biotechnol*, 2017, 35(4): 371-376.
- [48] Hu ZY, Wang S, Zhang CD, et al. A compact Cas9

- ortholog from *Staphylococcus Auricularis* (SauriCas9) expands the DNA targeting scope. PLoS Biol, 2020, 18(3): e3000686.
- [49] Li XS, Wang Y, Liu YJ, et al. Base editing with a Cpf1-cytidine deaminase fusion. Nat Biotechnol, 2018, 36(4): 324-327.
- [50] Liu ZQ, Shan HH, Chen SY, et al. Efficient base editing with expanded targeting scope using an engineered Spy-mac Cas9 variant. Cell Discov, 2019, 5: 58.
- [51] Nishimasu H, Shi X, Ishiguro S, et al. Engineered CRISPR-Cas9 nuclease with expanded targeting space. Science, 2018, 361(6408): 1259-1262.
- [52] Hu JH, Miller SM, Geurts MH, et al. Evolved Cas9 variants with broad PAM compatibility and high DNA specificity. Nature, 2018, 556(7699): 57-63.
- [53] Miller SM, Wang TN, Randolph PB, et al. Continuous evolution of SpCas9 variants compatible with non-G PAMs. Nat Biotechnol, 2020, 38(4): 471-481.
- [54] Walton RT, Christie KA, Whittaker MN, et al. Unconstrained genome targeting with near-PAMless engineered CRISPR-Cas9 variants. Science, 2020, 368(6488): 290-296.
- [55] Kim D, Lim K, Kim ST, et al. Genome-wide target specificities of CRISPR RNA-guided programmable deaminases. Nat Biotechnol, 2017, 35(5): 475-480.
- [56] Zuo EW, Sun YD, Wei W, et al. Cytosine base editor generates substantial off-target single-nucleotide variants in mouse embryos. Science, 2019, 364(6437): 289-292.
- [57] Grünwald J, Zhou RH, Garcia SP, et al. Transcriptome-wide off-target RNA editing induced by CRISPR-guided DNA base editors. Nature, 2019, 569(7756): 433-437.
- [58] Rees HA, Komor AC, Yeh WH, et al. Improving the DNA specificity and applicability of base editing through protein engineering and protein delivery. Nat Commun, 2017, 8: 15790.
- [59] Lee JK, Jeong E, Lee J, et al. Directed evolution of CRISPR-Cas9 to increase its specificity. Nat Commun, 2018, 9(1): 3048.
- [60] Gehrke JM, Cervantes O, Clement MK, et al. An APOBEC3A-Cas9 base editor with minimized bystander and off-target activities. Nat Biotechnol, 2018, 36(10): 977-982.
- [61] Kim K, Ryu SM, Kim ST, et al. Highly efficient RNA-guided base editing in mouse embryos. Nat Biotechnol, 2017, 35(5): 435-437.
- [62] Yeh WH, Chiang H, Rees HA, et al. *In vivo* base editing of post-mitotic sensory cells. Nat Commun, 2018, 9(1): 2184.
- [63] Zafra MP, Schatoff EM, Katti A, et al. Optimized base editors enable efficient editing in cells, organoids and mice. Nat Biotechnol, 2018, 36(9): 888-893.
- [64] Villiger L, Grisch-Chan HM, Lindsay H, et al. Treatment of a metabolic liver disease by *in vivo* genome base editing in adult mice. Nat Med, 2018, 24(10): 1519-1525.
- [65] Levy JM, Yeh WH, Pendse N, et al. Cytosine and adenine base editing of the brain, liver, retina, heart and skeletal muscle of mice via adeno-associated viruses. Nat Biomed Eng, 2020, 4(1): 97-110.
- [66] Kim S, Kim D, Cho SW, et al. Highly efficient RNA-guided genome editing in human cells via delivery of purified Cas9 ribonucleoproteins. Genome Res, 2014, 24(6): 1012-1019.
- [67] Doman JL, Raguram A, Newby GA, et al. Evaluation and minimization of Cas9-independent off-target DNA editing by cytosine base editors. Nat Biotechnol, 2020, 38(5): 620-628.
- [68] Zhou CY, Sun YD, Yan R, et al. Off-target RNA mutation induced by DNA base editing and its elimination by mutagenesis. Nature, 2019, 571(7764): 275-278.
- [69] Grünwald J, Zhou RH, Iyer S, et al. CRISPR DNA base editors with reduced RNA off-target and self-editing activities. Nat Biotechnol, 2019, 37(9): 1041-1048.
- [70] Tsai SQ, Zheng ZL, Nguyen NT, et al. GUIDE-seq enables genome-wide profiling of off-target cleavage by CRISPR-Cas nucleases. Nat Biotechnol, 2015, 33(2): 187-197.
- [71] Kleinstiver BP, Pattanayak V, Prew MS, et al. High-fidelity CRISPR-Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects. Nature, 2016, 529(7587): 490-495.
- [72] Tan JJ, Zhang F, Karcher D, et al. Engineering of high-precision base editors for site-specific single

- nucleotide replacement. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 439.
- [73] Jiang W, Feng SJ, Huang SS, et al. BE-PLUS: a new base editing tool with broadened editing window and enhanced fidelity. *Cell Res*, 2018, 28(8): 855-861.
- [74] Thuronyi BW, Koblan LW, Levy JM, et al. Continuous evolution of base editors with expanded target compatibility and improved activity. *Nat Biotechnol*, 2019, 37(9): 1070-1079.
- [75] Jeong YK, Song B, Bae S. Current status and challenges of DNA base editing tools. *Mol Ther*, 2020, 28(9): 1938-1952.
- [76] Liang PP, Ding CH, Sun HW, et al. Correction of β -thalassemia mutant by base editor in human embryos. *Prot Cell*, 2017, 8(11): 811-822.
- [77] Zeng J, Wu YX, Ren CY, et al. Therapeutic base editing of human hematopoietic stem cells. *Nat Med*, 2020, 26(4): 535-541.
- [78] Liu Z, Lu ZY, Yang G, et al. Efficient generation of mouse models of human diseases via ABE- and BE-mediated base editing. *Nat Commun*, 2018, 9: 2338.
- [79] Liu Z, Chen M, Chen S, et al. Highly efficient RNA-guided base editing in rabbit. *Nat Commun*, 2018, 9: 2717.
- [80] Yuan HM, Yu TT, Wang LY, et al. Efficient base editing by RNA-guided cytidine base editors (CBEs) in pigs. *Cell Mol Life Sci*, 2020, 77(4): 719-733.
- [81] Zhang YH, Qin W, Lu XC, et al. Programmable base editing of zebrafish genome using a modified CRISPR-Cas9 system. *Nat Commun*, 2017, 8(1): 118.
- [82] Park DS, Yoon M, Kweon J, et al. Targeted base editing via RNA-guided cytidine deaminases in *Xenopus laevis* embryos. *Mol Cells*, 2017, 40(11): 823-827.
- [83] Molla KA, Yang YR. CRISPR/Cas-mediated base editing: technical considerations and practical applications. *Trends Biotechnol*, 2019, 37(10): 1121-1142.
- [84] Zhou SW, Cai B, He C, et al. Programmable base editing of the sheep genome revealed no genome-wide off-target mutations. *Front Genet*, 2019, 10: 215.
- [85] Li GW, Zhou SW, Li C, et al. Base pair editing in goat: nonsense codon introgression into FGF5 results in longer hair. *FEBS J*, 2019, 286(23): 4675-4692.
- [86] Li YF, Ma SY, Sun L, et al. Programmable single and multiplex base-editing in *Bombyx mori* using RNA-guided cytidine deaminases. *G3 (Bethesda)*, 2018, 8(5): 1701-1709.
- [87] Chao L, Yuan Z, Wang YP, et al. Expanded base editing in rice and wheat using a Cas9-adenosine deaminase fusion. *Genome Biol*, 2018, 19(1): 59.
- [88] Shimatani Z, Kashojiya S, Takayama M, et al. Targeted base editing in rice and tomato using a CRISPR-Cas9 cytidine deaminase fusion. *Nat Biotechnol*, 2017, 35(5): 441-443.
- [89] Zong Y, Wang YP, Li C, et al. Precise base editing in rice, wheat and maize with a Cas9-cytidine deaminase fusion. *Nat Biotechnol*, 2017, 35(5): 438-440.
- [90] Ren B, Yan F, Kuang YJ, et al. Improved base editor for efficiently inducing genetic variations in rice with CRISPR/Cas9-guided hyperactive hAID mutant. *Mol Plant*, 2018, 11(4): 623-626.
- [91] Kang BC, Yun JY, Kim ST, et al. Precision genome engineering through adenine base editing in plants. *Nat Plants*, 2018, 4(7): 427-431.
- [92] Jiang YY, Chai YP, Lu MH, et al. Prime editing efficiently generates W542L and S621I double mutations in two ALS genes in maize. *Genome Biol*, 2020, 21: 257.

(本文责编 陈宏宇)