

# 基因编辑之“新宠”——单碱基基因组编辑系统

魏瑜, 张晓辉, 李大力

上海市调控生物学重点实验室, 华东师范大学生命科学学院, 上海 200241

**摘要:** 近年发展起来的人工核酸酶可通过引起特定定位点的 DNA 双链断裂实现对目的片段的有效编辑。为进一步提高碱基修改的效率和精确度, 2016 年研究者们利用 CRISPR/Cas9 识别特定 DNA 序列的功能, 结合胞嘧啶脱氨酶的生化活性发明了将胞嘧啶高效转换为胸腺嘧啶(C>T)的嘧啶单碱基编辑系统(base editor)。这一系统虽然能精准实现嘧啶直接转换, 大大提高精确基因编辑效率, 但美中不足的是无法对嘌呤进行修改。近期, *Nature* 报道了将细菌中的 tRNA 腺嘌呤脱氨酶定向进化形成具有催化 DNA 腺嘌呤底物的脱氨酶, 将其与 Cas9 系统融合发明了具有高效催化腺嘌呤转换为鸟嘌呤的新工具——腺嘌呤单碱基编辑系统(ABEs, adenine base editors)。本文总结了单碱基编辑工具的发展历程和最新研究进展, 着重介绍 ABEs 的研发过程, 并对单碱基编辑工具今后的应用方向和研发方向进行展望。

**关键词:** 单碱基编辑技术; 胞嘧啶脱氨酶; 腺苷脱氨酶

## The “new favorite” of gene editing technology—single base editors

Yu Wei, Xiaohui Zhang, Dali Li

Shanghai Key Laboratory of Regulatory Biology, School of Life Sciences, East China Normal University, Shanghai 200241, China

**Abstract:** Programmable nucleases are cutting edge genetic technology which edits targeted DNA sequences through generation of site-specific double-strand DNA breaks (DSBs). To improve the efficiency and precision of genetic modification, scientists have developed a single-base editing system (base editor) through combining of CRISPR/Cas9 system with cytosine deaminase. Compared with Cas9 system, this base editor can convert cytosine to thymine (C > T) at specific site more efficiently without inducing DSBs to avoid generation of indels. However, the base editor can only generate transition of pyrimidine but could not modify purines. Recently, *Nature* published a novel base editing system to convert adenine to guanine (ABEs, adenine base editors) through fusion of Cas9 nickase to a modified deaminase which is evolved through screening of random library based on tRNA adenine deaminase from *E. coli*. Here, we summarize the development of single-base editing tools and the latest research progress, especially the optimization process of ABEs, as well as the potential directions of the base editors.

**Keywords:** Single base editing technique; Cytosine deaminase; adenosine deaminase

收稿日期: 2017-11-27; 修回日期: 2017-12-08

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 81670470)资助[Supported by the Natural Science Foundation of China (No. 81670470)]

作者简介: 魏瑜, 本科在读, 专业方向: 生物科学。E-mail: 15802195836@163.com

通讯作者: 李大力, 博士, 教授, 研究方向: 基因编辑。E-mail: dlli@bio.ecnu.edu.cn

DOI: 10.16288/j.ycz.17-389

网络出版时间: 2017/12/11 9:24:28

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20171211.0924.002.html>

CRISPR/Cas (clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated proteins)系统是细菌或古细菌中利用特定 RNA 分子指导核酸内切酶消除外源 DNA 或 RNA 入侵的一种获得性免疫防御体系。经过改造的 CRISPR/Cas 系统被广泛应用于原核及真核生物基因组 DNA 的精确改造<sup>[1-3]</sup>, 凭其简便、快速、高效和经济等优势迅速在各个研究领域展开应用, 成为炙手可热的基因改造工具。其中 Cas9 系统通过一条与靶点 DNA 序列配对的单链导向 RNA (single guide RNA, sgRNA)与 Cas9 蛋白形成复合物, 精准地靶向紧邻 PAM(protospacer adjacent motif)的特异 DNA 位点, 产生双链断裂(double strand breaks, DSBs)。DSB 主要通过容易产生错误的非同源末端连接(non-homologous end-joining, NHEJ)的方式进行修复, 形成碱基丢失、插入或置换等小片段突变。在同源修复模板存在的情况下, DSB 也可激活同源重组修复(homology-directed repair, HDR)方式进行精确的基因修饰<sup>[4]</sup>。虽然 HDR 能引入精确的突变, 但是其效率较低, 约为 0.1%~5%<sup>[2,5]</sup>。同时由于 Cas9 介导的 HDR 依赖于 DSB 的产生, 不可避免的激活 NHEJ 修复方式, 出现较高频率的非预期的碱基改变, 也有可能产生脱靶切割。如何能在不引入双链断裂的情况下进行精确的基因修饰成为极具挑战的前沿技术难题。

针对上述问题, 美国哈佛大学 David Liu 实验室于 2016 年 4 月首次报道了基于胞嘧啶脱氨酶与 CRISPR/Cas9 融合形成的单碱基编辑技术(base editor, BE)。该技术将 spCas9 与胞嘧啶脱氨酶融合, 在一定的突变窗口内实现胞嘧啶(cytosine, C)到胸腺嘧啶(thymine, T)的单碱基转换。随后多个实验室也发表了类似的工具, 并在这些工具的基础上进行了深入的挖掘和优化。该系统在不引入 DNA 双链断裂也不需要重组修复模板的情况下可以实现更加安全、高效、精准的单碱基编辑, 而且其效率远远高于 DSB 引起的 HDR 修复方式<sup>[6]</sup>。近期, David Liu 实验室再一次取得重要突破, 建立了新的单碱基编辑系统, 实现腺嘌呤(adenine, A)到鸟嘌呤(guanine, G)的精确转换<sup>[7]</sup>。这两套单碱基编辑系统极大的丰富了精确基因修饰的工具箱, 成为基因编辑工具中的“新宠”, 将来一定会为基础研究和生产生活带来重要的改变。

## 1 嘧啶碱基转换工具 BE 的发展及优化

由胞嘧啶脱氨酶(APOBEC1)与 CRISPR/Cas9 融合形成的第一代单碱基编辑系统(BE1), 可以在靶基因 PAM 序列 NGG 上游 16~19 位实现胞嘧啶脱氨生成尿嘧啶, 尿嘧啶在 DNA 复制过程中会被识别成 T, 实现 C 到 T 的转换, 但效率不高, 其原因可能是尿嘧啶 DNA 糖苷酶催化切除 DNA 中的尿嘧啶, 启动碱基切除修复。因此进一步在 BE1 的基础上融合尿嘧啶糖苷酶抑制蛋白(uracil DNA glycosylase inhibitor, UGI)形成 BE2, 抑制细胞 DNA 链中尿嘧啶的切除修复, 通过 DNA 复制实现 C 到 T 的转换, 大大提高编辑效率(约 20%)。同时将 dCas9 突变为 Cas9n (D10A)使其只切割靶向链, 保持编辑链完整性, 进一步优化产生 BE3, 使编辑效率进一步提高至约 37%且脱靶效率显著下降<sup>[6]</sup>。随后 David Liu 实验室又通过在 BE3 基础上进一步优化连接(linker)序列同时增多一个拷贝的 UGI, 形成 BE4 系统, 将 C 到 T 的突变效率提高  $1.5 \pm 0.3$  倍, 同时非 C 到 T 的突变降低了  $2.3 \pm 0.3$  倍, 插入缺失突变降低了  $2.3 \pm 1.1$  倍<sup>[8]</sup>。另外, 上海科技大学陈佳研究组在 BE3 基础上通过自剪接多肽-2A 表达多个游离的 UGI, 开发了 eBE-S3, 也得到了与 David Liu 研究组类似的结果<sup>[9]</sup>。为突破 NGG 序列限制, 具有不同 PAM 识别能力的 Cas9(如 spCas9 和 saCas9)被引入进来, 扩充了 BE 系统的靶点选择范围。同时, 该课题组也通过突变 APOBEC1 特定的氨基酸形成不同的突变体, 其中 W90Y+R126E+R132E(YEE-BE3)的突变窗口缩小为 1~2 个, 使其靶向突变更为精确<sup>[10]</sup>。

除此之外, 日本科学家 Keiji Nishida 等<sup>[11]</sup>将来源于七鳃鳗的胞嘧啶脱氨酶与 CRISPR/Cas9 和 UGI 融合, 该系统可在哺乳动物细胞中实现 15%~55%靶向突变。中国科学院上海生命科学研究院/上海交通大学医学院健康科学研究所常兴课题组将人源胞嘧啶脱氨酶融合 dCas9 的 C 端(dCas9-AIDx)形成的 TAM(targeted AID-mediated mutagenesis)可通过诱变产生局部序列的多样化<sup>[12]</sup>。随后报道的 CRISPR-X 与 TAM 有相似作用, 它将来源于人的胞嘧啶脱氨酶突变体去除出核信号后融合到 MS2 蛋白上, 通过 MS2 RNA 的发夹结构招募到 sgRNA 的骨架中, CRISPR-X

可以在-50 到+50 bp 窗口内实现>20%的突变效率<sup>[13]</sup>。同时科学家也在积极探索利用 APOBEC1 与其他基因组编辑工具融合形成新型的不受 PAM 限制的单碱基编辑工具。Yang 等<sup>[14]</sup>将 TALE, Zinc-finger DNA 特异识别单元与来源于人的胞嘧啶脱氨酶进行融合, 经过优化后, 可在细菌和人的细胞中分别实现 13% 和 2.5% 的 C 到 T 的突变效率, 这可能是由于 TALE 和 Zinc-finger 无法打开双链 DNA, 影响了脱氨酶的效率。

## 2 嘌呤碱基转换的新工具—ABEs

BE 系统虽然能将突变窗口内的 C 精确转换成 T, 然而对于科学家来说还有一部分的任务是如何反过来使 T 突变成 C 或者 A 突变成 G。最近, David Liu 实验室又报道了可通过将腺苷脱氨酶与 CRISPR/Cas9 融合实现 A 到 G 转换的新型单碱基编辑系统 (adenine base editor, ABE)<sup>[7]</sup>。它可将 NGG 上游 12~17 位上的腺嘌呤脱氨基转变为肌苷, 肌苷可与胞嘧啶配对, 在 DNA 水平被当成鸟嘌呤进行读码与复制, 实现在突变窗口内 A 到 G 的突变。由于已知自然存

在的腺苷脱氨酶均不能直接以 DNA 为底物, 而且 David Liu 课题组也尝试将不同物种来源的针对 RNA 的腺苷脱氨酶与 Cas9n 融合, 但均没有编辑活性。与其他几种 RNA 脱氨酶相比, 考虑到 *E.coli* 来源的 RNA 腺苷脱氨酶 TadA 不需要小分子激活剂且底物是多核苷酸链, 作者针对与 dCas9 融合的 TadA 序列构建随机突变文库, 利用细菌的氯霉素抗性恢复筛选体系进行功能筛选。经 7 轮的进化与改造, 成功获得能够直接对 DNA 上腺嘌呤进行高效脱氨的 TadA 突变体, 并通过与 nCas9 (D10A) 融合构建能高效诱导 A>G 突变的 ABE 系统, 具体优化过程如图 1)。

首先, 作者通过在大肠杆菌的抗性基因关键位点引入突变使其失活。如果新的单碱基编辑体系能将 G:C 碱基对定点突变成 A:T 碱基对将使细菌获得抗性, 从而鉴定出有效的突变。利用该体系, 作者对 TadA-dCas9 中编码 TadA 的 DNA 序列构建随机突变文库并进行筛选, 获得能直接作用于 DNA 的突变体 TadA\* (D108N 和 A106V)。利用此突变体即可构建突变系统 ABE1.2 (TadA\*-XTEN-nCas9-NLS),

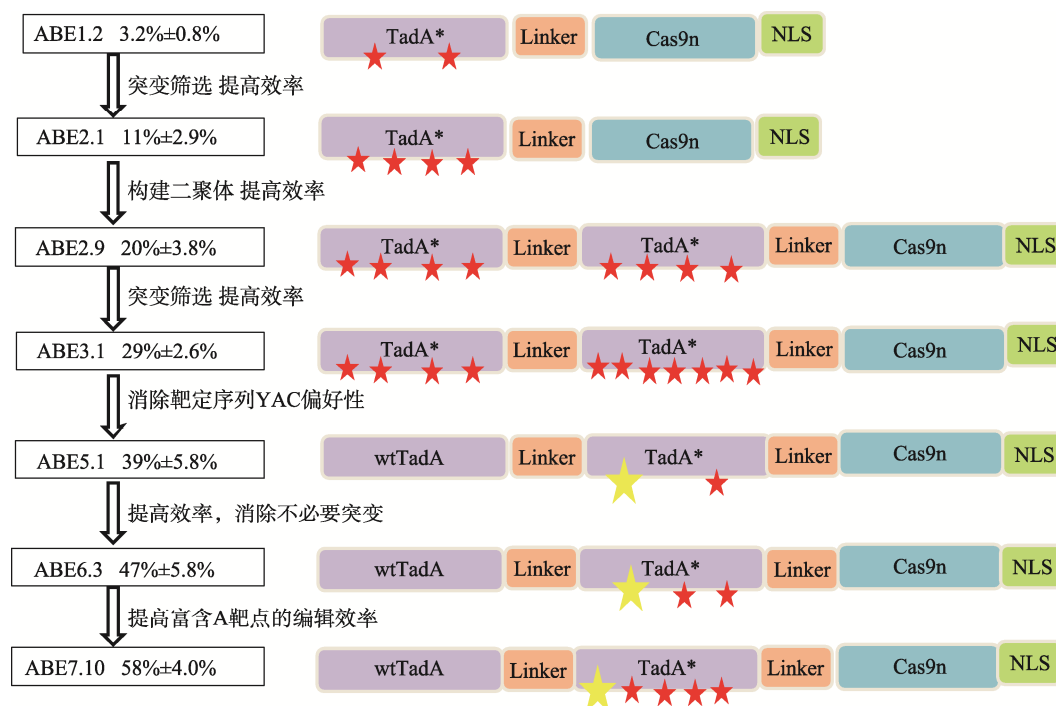


图 1 ABE 优化流程图

Fig. 1 Schematic diagram of the optimization of ABE system

★表示 10 个突变位点; ★表示一个位点突变。

在哺乳动物细胞中实现突变窗口内  $3.2\% \pm 0.88\%$  的 A:T 到 G:C 突变。为进一步提高突变效率,在 ABE1.2 基础上继续通过随机文库筛选新的突变位点,得到第二轮优化产物 ABE2.1(ABE1.2+D147Y+E155Y),效率提高到  $11\% \pm 2.9\%$ 。

然后,作者对 ABE2.1 进行了多方面蛋白改造尝试。将 TadA(2.1)\*融合于 nCas9 碳端,结果发现完全失去了脱氨功能;优化 TadA(2.1)\*和 nCas9 之间 linker 的长度,将效率提高至  $14\% \pm 2.4\%$ 。基于 BE 系统中 UGI 能提高精确编辑效率的经验,作者推测可通过抑制细胞内烷基腺嘌呤 DNA 糖苷酶(alkyl adenine DNA glycosylase, AAG)切除肌苷的效率能提高 ABE 活性。然而实验结果却证明 ABE2.1 中融合表达来源于人的失活 AAG 或来源于大肠杆菌的失活 Endo V 均不能有效提高突变效率。由此可推测,细胞内对于 I:G 配对的修复效率较低,在突变过程中不需要人为抑制这一过程。在自然情况下, TadA 以同源二聚体的形式发挥作用,其中一个 TadA 催化脱氨,另一个作为催化底物-tRNA 的停泊位点。基于此原理,作者在 ABE2.1 系统中融合表达 wtTadA 或 TadA(2.1)\*,分别构建 ABE2.9(TadA\*2.1-ABE1.2)和 ABE2.10(wtTadA-ABE1.2),实验结果证明 ABE2.9 能将效率有效提升至  $20\% \pm 3.8\%$ 。在此基础上进一步引入突变产生 ABE3.1(ABE2.9+L84F+H123Y+I157F),将效率提高至  $29\% \pm 2.6\%$ 。但 ABEs 在不同靶点间的编辑效率差异很大且在突变窗口内对 Y(Y 为 T 或 C)AC 序列有明显偏好性,如果 A 两侧不是 Y 和 C 效率显著下降。为突破这一限制,作者再次通过大肠杆菌抗性筛选体系进一步优化了 TadA 序列,得到 ABE5.1(ABE3.1+H36L+R51L+S146S+K157N)。然而,通过细菌抗性选择得到的体系在哺乳动物细胞编辑中的效果并不一致,ABE5.1 虽能使细菌产生高效定点突变,但是在哺乳动物细胞中的突变效率却降低了  $1.7 \pm 0.29$  倍。考虑到 ABE5.1 中累积的突变位点可能会影响氮端 TadA 非催化亚基的结构作用而影响催化亚基活性,作者将 ABE5.1 两个 TadA 亚基中氮端无催化功能的亚基替换为 wtTadA,构建 ABE5.3 编辑系统(wtTadA-TadA\*5.1-dCas9),能够将非 YAC 靶点的编辑效率提升至  $22\% \sim 33\%$ 。

由于前五代的优化过程中在 TadA 中引入了多

个位点的突变,第六代旨在通过已有突变的重新组合去除不必要的突变。经过突变筛选,获得了 ABE6.3(ABE5.3+P48S),突变效率达  $47\% \pm 5.8\%$ 。但如果靶位点腺苷酸周围存在多个腺嘌呤时,ABE6.3 的编辑效率会降低约  $20\% \sim 40\%$ 。为突破这一局限,作者继续引入突变,优化产生编辑效率为  $58\% \pm 4.0\%$  且在多腺嘌呤位点编辑效率显著提高的编辑系统(ABE7.10)。到此为止,经过 7 代筛选,作者构建了可在突变窗口内实现高效腺嘌呤到鸟嘌呤突变的 ABE7.10 编辑系统,在人类细胞中编辑效率约为  $50\%$ ,同时还可保证高精度度( $\geq 99.9\%$ )和较低的碱基插入或缺失突变( $\leq 0.1\%$ )。

### 3 单碱基基因组编辑技术的应用

BE 系统可以实现其突变窗口内 C 到 T 或者 G 到 A 的定点突变,很容易实现在开放阅读框内遗传密码子的改变(错义突变)或提前产生终止密码子。若使基因提前出现终止密码子(TAA、TGA 和 TAG),即可实现基因敲除<sup>[6,15]</sup>。Kuscu 等<sup>[16]</sup>首先通过实验对比了通过 BE 诱导产生终止密码子实现基因敲除和利用野生型 Cas9 进行基因敲除的安全性,结果表明后者要比前者产生更多的 DNA 损伤和细胞凋亡。特别对于多拷贝位点而言,Cas9 会产生多个 DSBs,造成染色体结构变化。因此,利用 BE 诱导产生终止密码子实现基因敲除要比同等条件利用下野生型 Cas9 进行基因敲除更加安全高效,可以作为优于 Cas9 的全基因组筛选体系。

BE 系统也为动植物的基因改造研究提供了新的高效工具。点突变的动物模型一般利用 Cas9 切割目的片段同时提供 ssODNA(single-strand oligonucleotide DNA, 单链寡核苷酸)为模板,通过 HDR 将所需突变精确引入,但是效率较低,一般低于  $10\%$ 。Jin- Soo Kim 研究组通过显微注射靶向 DMD 的 sgRNA 和 BE3 mRNA 到小鼠受精卵,出生小鼠中  $50\%$  左右发生无义突变,而通过注射靶向 Tyr 的 sgRNA 和 BE3 蛋白复合物则产生了高达  $100\%$  等位基因突变的 F<sub>0</sub> 小鼠<sup>[17]</sup>。同时,北京大学林硕研究组利用 BE3 及 VQR-BE3 均产生单个碱基替换的斑马鱼<sup>[18]</sup>。通过 HDR 精确改造植物基因组相比动物而言难度非常大,一直是领域内的技术瓶颈。Li 等<sup>[19]</sup>首先用

于靶向水稻基因的 3 个靶点(OsPDS 一个靶点, OsSBEIIb 两个靶点), 分别高效产生遗传修饰的水稻(23/52, 38/64, 88/99)。另外, 中国科学院遗传与发育生物学研究所高彩霞研究组也随后报道了可在原生质体、水稻、小麦和玉米中高效率地进行基因修饰(约 43.48%)。这些结果表明, BE 系统可高效地在植物中精确地产生胞嘧啶到胸腺嘧啶的突变<sup>[20]</sup>。

由于 BE 系统在不造成双链断裂的前提下能引入精确碱基转换, 避免了 DSB 造成的靶点和非靶点序列的缺失、插入等突变, 这对于基因治疗而言无疑是一个绝佳的工具。PCSK9 能促进低密度脂蛋白受体(LDLR)的降解而提高血浆低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)的水平, 是降低胆固醇水平和心血管疾病的重要靶点。之前有报道利用 Cas9 敲除肝脏中 PCSK9 可显著降低血液中低密度脂蛋白胆固醇水平<sup>[21]</sup>。最近, 利用 BE 实现在体敲除 PCSK9 基因, 结果表明在成年小鼠中可大幅度降低血浆中 PCSK9 蛋白表达水平(>50%), 同时可降低血浆中约 30%胆固醇水平, 并且未检测到脱靶突变<sup>[22]</sup>。

近期, *Protein Cell* 连续刊发 3 篇论文报导了 BE 系统在人类胚胎中进行精确基因编辑的研究。其中, 一个研究组将 BE 应用到人类胚胎中, 他们通过用 BE3 在人类三原核胚胎进行靶向编辑一个或同时两个基因, 结果发现单基因编辑及两个基因同时编辑的效率分别为 87.5%和 100%, 显示极低的脱靶突变及插入缺失突变<sup>[23]</sup>。同时另一研究组利用 BE3 及 SaKKH-BE3(PAM 为 NNNRRT)也在人类三原核胚胎针对不同基因(*HBB*、*FANCF* 和 *DNMT3B*)产生了 42%~100%的靶向突变效率且同时保持较低的脱靶突变<sup>[24]</sup>。特别值得关注的是中山大学黄军就团队利用 *HBB* 特定位点突变(A>G)的  $\beta$ -地中海贫血病人原代皮肤成纤维细胞, 通过核移植到体外成熟的卵子中构建突变胚胎。将 BE3 和靶点特异性 sgRNA 注射到重构的胚胎中, 在 23%胚胎中平均有 20%的卵裂球发生了突变位点的精确修复。这是第一个利用 BE 系统对遗传疾病突变位点进行精确修复的研究<sup>[25]</sup>。因此, 证实了单碱基基因组编辑技术用于临床治疗遗传病的可行性。

由上述可知, BE 系统能实现 C 到 T 单碱基的精确突变, 在动植物品种改良, 动物模型构建和疾

病治疗等方面有广泛的应用前景。同理, ABE 系统能实现 A:T 到 G:C 的转换, 和 BE 系统结合能实现任意碱基的转换, 极大的拓展了在各领域的应用范围。目前的 ABE 仅能通过识别 NGG 在其上游 14~17 bp 实现 A:T 到 G:C 的转换。在未来, ABE 将会经过优化实现能识别不同的 PAM(NGN, NNNRRT 等)的工作系统, 促进其在基因组内实现更广阔的靶向空间。同时, 关于 ABE 的应用也会相应展开, 如动物模型制作, 农作物品种改良, 基因治疗, 基因功能筛选, 新药筛选等领域。

#### 4 单碱基基因组编辑技术发展前景及面临的挑战

单碱基编辑的 BE 系统在开发出来后的短短一年多时间已经在各个研究领域充分展现了高效精准编辑的优势, 而随着最近 ABE 系统的开发, 现在不但可以实现 C:G 到 T:A 的转换, 还可以实现 A:T 到 G:C 的转换, 使其应用范围更加广阔。在基础研究方面, 除了可以利用其碱基转换的高效性来构建特定位点修饰的细胞株、动植物品系, 相较于野生型 Cas9 介导的同源重组, BE 的优势是对于位点修饰效率更高而且不会产生双链断裂而引起非预期的突变。在功能筛选方面, 单碱基编辑的 Cas9-AID 系统可以将特定位点的 C、G 突变成其他任意碱基, 大大增强了靶点序列的遗传多样性, 而且还可以得到功能增强(gain-of-function)突变。而野生型 Cas9 系统要通过 HDR 才能实现增强型突变, 要实现大范围的功能筛选几乎是不可能的。ABE 的出现弥补了之前 BE 系统不能实现 A>G 的局限, 在筛选过程中能够使目的基因产生更多的新的氨基酸突变, 是一个完美的补充。

在农作物和经济动物品种改良方面, 单碱基编辑系统也将发挥重要作用。一些特定位点的单碱基突变能有效提升作物品质, 但是从技术上而言, 植物中同源重组的效率极低, 较难引入单碱基突变。BE 和 ABE 这两种单碱基编辑工具的出现将能极大提高碱基置换的效率, 实现重要品质性状的改良。2016 年 4 月美国农业部(USDA)宣布不会对基因组编辑过的白蘑菇实施监控。这意味着没有外源 DNA 整合的基因组编辑食物有可能会与转基因食品区分

开来,使消费者早日受益。从政策监管角度而言,单碱基编辑系统甚至连重组模板 DNA 都不需要,只要 RNA 或者蛋白质就能进行碱基置换,增强基因功能,应该来说更接近于自然发生突变。

约 2/3 的人类遗传疾病都是由单碱基突变造成,因此通过遗传突变的修复进行基因治疗将是单碱基编辑系统重要应用之一。David Liu 预测人类有 900 多种因单个碱基突变引起的疾病有可能适用于 BE3 进行基因治疗<sup>[6]</sup>。随着 BE 的 PAM 的拓展,BE 将有望治疗更多单碱基突变引起的遗传病。ABE 系统的出现恰好弥补了 BE 无法修复的 A>G 突变的缺陷。另外,遗传疾病中有很多是由于基因提前出现终止密码子而失活,BE 系统无法改变终止密码子,而新开发的 ABE 系统则可以针对这一部分突变进行修复。因此可以预见,未来利用单碱基编辑技术进行基因治疗将成为一个热点领域。

虽然 ABE 的发明使单碱基编辑的工具箱中又多了一个法宝,但目前的单碱基编辑工具仍然存在一些不足:(1)靶点受 PAM 和突变窗口的限制。最简单的方案就是将多种不同种属来源的 Cas9 或者识别不同 PAM 的 Cas9 人工突变体构建成 BE,这可以大大增加靶点的覆盖率。但是除了 spCas9 和 saCas9,还没有尝试脱氨酶与其他 Cas9 或者 Cpf1 体系融合后的编辑效率和特性。有研究者尝试将脱氨酶与 Zinc-finger 或者 TALE 等元件结合,力图消除 PAM 的限制而实现全基因组覆盖,但相较 BE 系统而言效率非常低<sup>[26]</sup>。原因可能是由于脱氨酶主要以单链 DNA 为底物,Cas9 系统具有的解旋酶活性能将 DNA 双链打开,为脱氨酶提供 DNA 单链底物。但是 Zinc-finger 或者 TALE 识别 DNA 特定区域后仍以 DNA 双链形式存在,可能会降低脱氨酶的催化效率。如果能将 Zinc-finger 或者 TALE 修改成具有解开 DNA 双链的新工具,极有可能增加这些单碱基编辑体系的效率,使更多的序列成为靶点。(2)BE 系统可以容受一定的突变窗口,虽然不同位点突变效率有差别,但如果靶点窗口内的多个碱基都能被编辑,对于基因治疗来说仍存在一定风险。如何进一步缩小突变窗口,甚至做到只改变单一碱基而不影响周边的序列,将是今后研发的方向。(3)目前的单碱基编辑系统主要是通过脱氨酶实现碱基直接转换,如

何实现碱基的颠换还是一个非常有挑战性的问题。

(4)由于 BE 系统都是在 Cas9 的基础上融合多个片段,使其序列组成比较长。如果基因治疗必需使用腺相关病毒(AAV),那么其 4.7kb 的包装限制将无法把 BE 系统包装进去。虽然 Cas9 可以通过拆分,将 BE 包装成两个病毒,但是拆分后编辑效率会受到多大影响并不清楚。总之,ABE 和 BE 系统将会使基因组编辑技术进入一个精确编辑的新时代。它们具较高的安全性和高效性,经过不断的优化与改造,必将为人类的食品安全和健康等多个领域带来无限可能。

## 参考文献(References):

- [1] Mali P, Yang LH, Esvelt KM, Aach J, Guell M, DiCarlo JE, Norville JE, Church GM. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*, 2013, 339(6121): 823–826.
- [2] Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, Hsu PD, Wu XB, Jiang WY, Marraffini LA, Zhang F. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 2013, 339(6121): 819–823.
- [3] Li D, Qiu Z, Shao Y, Chen Y, Guan Y, Liu M, Li Y, Gao N, Wang L, Lu X. Heritable gene targeting in the mouse and rat using a CRISPR-Cas system. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(8): 681–683.
- [4] Cox DBT, Platt RJ, Zhang F. Therapeutic genome editing: prospects and challenges. *Nat Med*, 2015, 21(2): 121–131.
- [5] Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc*, 2013, 8(11): 2281–2308.
- [6] Komor AC, Kim YB, Packer MS, Zuris JA, Liu DR. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature*, 2016, 533(7603): 420–424.
- [7] Gaudelli NM, Komor AC, Rees HA, Packer MS, Badran AH, Komor AC, Bryson DI, Liu DR, Rees HA, Packer MS, Gaudelli NM. Programmable base editing of A•T to G•C in genomic DNA without DNA cleavage. *Nature*, 2017, 551(7681): 464–471.
- [8] Komor AC, Zhao KT, Packer MS, Gaudelli NM, Waterbury AL, Koblan LW, Kim YB, Badran AH, Liu DR. 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.
- [9] Wang LJ, Xue W, Yan L, Li X, Wei J, Chen MM, Wu J, Yang B, Yang L, Chen J. Enhanced base editing by co-expression of free uracil DNA glycosylase inhibitor. *Cell*

- Res*, 2017, 27(10): 1289–1292.
- [10] Kim YB, Komor AC, Levy JM, Packer MS, Zhao KT, Liu DR. Increasing the genome-targeting scope and precision of base editing with engineered Cas9-cytidine deaminase fusions. *Nat Biotechnol*, 2017, 35(4): 371–376.
- [11] Nishida K, Arazoe T, Yachie N, Banno S, Kakimoto M, Tabata M, Mochizuki M, Miyabe A, Araki M, Hara KY, Shimatani Z, Kondo A. Targeted nucleotide editing using hybrid prokaryotic and vertebrate adaptive immune systems. *Science*, 2016, 353(6305): aaf8729.
- [12] Ma YQ, Zhang JY, Yin WJ, Zhang ZC, Song Y, Chang X. Targeted AID-mediated mutagenesis (TAM) enables efficient genomic diversification in mammalian cells. *Nat Methods*, 2016, 13(12): 1029–1035.
- [13] Hess GT, Frésard L, Han K, Lee CH, Li A, Cimprich KA, Montgomery SB, Bassik MC. Directed evolution using dCas9-targeted somatic hypermutation in mammalian cells. *Nat Methods*, 2016, 13(12): 1036–1042.
- [14] Yang LH, Briggs AW, Chew WL, Mali P, Guell M, Aach J, Goodman DB, Cox D, Kan YN, Lesha E, Soundararajan V, Zhang F, Church G. Engineering and optimising deaminase fusions for genome editing. *Nat Commun*, 2017, 7: 13330.
- [15] Billon P, Bryant EE, Joseph SA, Nambiar TS, Hayward SB, Rothstein R, Ciccio A. CRISPR-Mediated Base Editing Enables Efficient Disruption of Eukaryotic Genes through Induction of STOP Codons. *Mol Cell*, 2017, 67(6): 1068–1079.
- [16] Kescu C, Parlak M, Tufan T, Yang JK, Szlachta K, Wei XL, Mammadov R, Adli M. CRISPR-STOP: gene silencing through base-editing-induced nonsense mutations. *Nat Methods*, 2017, 14(7): 710–712.
- [17] Kim K, Ryu S-M, Kim S-T, Baek G, Kim D, Lim K, Chung E, Kim S, Kim J-S. Highly efficient RNA-guided base editing in mouse embryos. *Nat Biotechnol*, 2017, 35(5): 435–437.
- [18] Zhang YH, Qin W, Lu XC, Xu J, Huang HG, Bai HP, Li S, Lin S. Programmable base editing of zebrafish genome using a modified CRISPR-Cas9 system. *Nat Commun*, 2017, 8(1): 118.
- [19] Li JY, Sun YP, Du J, Zhao YD, Xia LQ. Generation of targeted point mutations in rice by a modified CRISPR/Cas9 system. *Mol Plant*, 2017, 10(3): 526–529.
- [20] Zong Y, Wang YP, Li C, Zhang R, Chen KL, Ran YD, Qiu J-L, Wang DW, Gao CX. Precise base editing in rice, wheat and maize with a Cas9-cytidine deaminase fusion. *Nat Biotechnol*, 2017, 35(5): 438–440.
- [21] Ding QR, Strong A, Patel KM, Ng SL, Gosis BS, Regan SN, Cowan CA, Rader DJ, Musunuru K. Permanent alteration of PCSK9 with *in vivo* CRISPR-Cas9 genome editing. *Circ Res*, 2014, 115(5): 488–492.
- [22] Chadwick AC, Wang X, Musunuru K. *In vivo* base editing of PCSK9 (proprotein convertase subtilisin/kexin type 9) as a therapeutic alternative to genome editing. *Arterioscler, Thromb, Vasc Biol*, 2017, 37(9): 1741–1747.
- [23] Li GL, Liu YJ, Zeng YT, Li JN, Wang LJ, Yang G, Chen DJ, Shang XY, Chen J, Huang XX, Liu JQ. Highly efficient and precise base editing in discarded human triprenuclear embryos. *Protein Cell*, 2017, 8(10): 776–779.
- [24] Zhou CY, Zhang ML, Wei Y, Sun YD, Sun Y, Pan H, Yao N, Zhong WX, Li YX, Li WP, Yang WP, Chen ZJ. Highly efficient base editing in human triprenuclear zygotes. *Protein Cell*, 2017, 8(10): 772–775.
- [25] Liang PP, Ding CH, Sun HW, Xie XW, Xu YW, Zhang XY, Sun Y, Xiong YY, Ma WB, Liu YX, Wang YL, Fang JP, Liu D, Zhou SY, Zhou CQ, Huang JJ. Correction of  $\beta$ -thalassemia mutant by base editor in human embryos. *Protein Cell*, 2017, 8(11): 811–822.
- [26] Yang L, Briggs AW, Chew WL, Mali P, Guell M, Aach J, Goodman DB, Cox D, Kan Y, Lesha E. Engineering and optimising deaminase fusions for genome editing. *Nat Commun*, 2016, 7: 13330.

(责任编辑: 韩玉波)