

碱基编辑系统研究进展

宗媛, 高彩霞

中国科学院遗传与发育生物学研究所, 植物细胞与染色体工程国家重点实验室, 基因组编辑中心, 北京 100101

摘要: 碱基编辑技术(base editing)是基于 CRISPR/Cas 系统发展起来的新型靶基因修饰技术, 目前依据碱基修饰酶的不同可分为胞嘧啶碱基编辑器(cytosine base editor, CBE)和腺嘌呤碱基编辑器(adenine base editor, ABE)。这两类碱基编辑系统利用胞嘧啶脱氨酶或人工进化的腺嘌呤脱氨酶对靶位点进行精准的碱基编辑, 最终可以分别实现 C-T (G-A)或 A-G (T-C)的碱基替换。碱基编辑技术自 2016 年被开发以来, 因其高效、不依赖 DNA 双链断裂产生、无需供体 DNA 参与等优势, 已经成功应用在各种动物、植物及其他生物中, 为基因治疗及精准作物育种等领域提供了重要技术支撑。本文从碱基编辑技术的特点、开发过程、优化、应用、脱靶效应及改善策略等方面进行了系统介绍, 最后对未来需要迫切解决的一些问题进行了分析和展望, 以期对相关领域的科研人员进一步了解、使用及优化碱基编辑系统提供参考。

关键词: CRISPR/Cas; 碱基编辑技术; 胞嘧啶碱基编辑器(CBE); 腺嘌呤碱基编辑器(ABE)

Progress on base editing systems

Yuan Zong, Caixia Gao

State Key Laboratory of Plant Cell and Chromosome Engineering, Center for Genome Editing, Institute of Genetics and Developmental Biology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 10010, China

Abstract: Base editing is a newly developed precise genome editing technique based on the CRISPR/Cas system. According to different base modification enzymes, the current base editing systems can be divided into cytosine base editors (CBE) and adenine base editors (ABE). They use cytosine deaminases or artificially evolved adenine deaminases to perform single-base editing, and achieve C to T (G to A) or A to G (T to C) substitutions, respectively. Due to high efficiency, independence of DNA double-strand breaks, and no need for donor DNA, base editing systems have been successfully applied in diverse species including animals, plants and other organisms since the first report in 2016. Therefore, base editing systems will have a high prospect of providing important support for gene therapy and crop genetic improvement in the future. In this review, we describe the development and current applications of base editing systems for basic research and biotechnology, highlight the challenges, and discuss the directions for future research in this important field. The information presented may facilitate interested researchers to grasp the principles of base editing, to use relevant base

收稿日期: 2019-07-19; 修回日期: 2019-08-07

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 31788103)资助[Supported by the National Natural Science Foundation of China (No.31788103)]

作者简介: 宗媛, 博士, 研究方向: 遗传学。E-mail: zongyuan@genetics.ac.cn

通讯作者: 高彩霞, 博士, 研究员, 博士生导师, 研究方向: 植物基因组编辑。E-mail: cxgao@genetics.ac.cn

DOI: 10.16288/j.ycz.19-205

网络出版时间: 2019/8/21 10:05:03

URI: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20190821.1004.004.html>

editing tools in their own studies, or to innovate new versions of base editing in the future.

Keywords: CRISPR/Cas; base editing; cytosine base editor (CBE); adenine base editor (ABE)

如何精准、高效地对基因组进行修饰是生命科学领域研究的重要目标。近年来,基因组编辑技术尤其是 CRISPR/Cas9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR associated 9)介导的基因组编辑系统成为实现该目标的最强工具^[1~7]。CRISPR/Cas9 系统是在 sgRNA 引导下招募 Cas9 蛋白靶向基因组 DNA,从而在靶点处产生 DNA 双链断裂(double strand break, DSB),诱发细胞内非同源末端连接(non-homologous end joining, NHEJ)和同源重组(homologous recombination, HR)修复途径,进而实现对基因组 DNA 的定点敲除、替换、插入等精准修饰^[8]。其中, NHEJ 途径发生频率较高,但通常是一种不精确的修复方式,往往会在靶点处产生少量碱基的插入或缺失(insertions/deletions, Indels),是一种有效地创制基因敲除突变体的途径。HR 途径是一种更为精确的修复方式,需要人为提供与基因组 DNA 具有同源序列的供体 DNA,以供体 DNA 为模板进行重组修复,最终实现精准的基因定点替换或定点插入^[8]。

单核苷酸变异会导致约 2/3 人类疾病的发生^[9],也是许多作物重要农艺性状变异的遗传基础^[10],因此如何开发一种精准且高效实现碱基替换的技术尤为重要。理论上,HR 途径可实现任意碱基之间的改变,但该途径受细胞类型及细胞周期的限制,且如何将供体 DNA 高效递送到细胞中也是一大难题,这些弊端导致 HR 在动植物中的发生频率及应用范围均受到了一定的限制^[11]。另外, NHEJ 途径会与 HR 途径竞争发生,因此往往会造成靶点处不必要的编辑产物的产生。因此,DSB 引发的 HR 很难实现高效的、稳定的单碱基突变。

2016 年,碱基编辑系统(base editing)的开发将 CRISPR/Cas 系统从切割 DNA 的“剪刀”变为能改写特定碱基的“修正器”,打开了精准基因组编辑的大门。该系统目前已被广泛地应用于农业、基因治疗、作物育种等各个领域的研究^[12~17]。2017 年, *Science* 杂志将碱基编辑技术评为年度十大科学技术

突破之一。

1 碱基编辑系统的概况及特点

碱基编辑系统将失去催化活性的 Cas 蛋白(如 deactivated Cas, 简称 dCas)或只有切割一条链活性的 Cas 蛋白(如 nickase Cas, 简称 nCas)和可作用于单链 DNA (single-stranded DNA, ssDNA)的脱氨酶进行融合,从而实现靶点的碱基替换。目前碱基编辑系统依据融合的不同碱基修饰酶分为胞嘧啶碱基编辑器(cytosine base editors, CBE)和腺嘌呤碱基编辑器(adenine base editors, ABE)^[12]。这两种碱基编辑器能在不产生 DSB 的情况下,分别利用胞嘧啶脱氨酶或经过改造的腺嘌呤脱氨酶对靶位点上一定范围的胞嘧啶(C)或腺嘌呤(A)进行脱氨基反应,最终经 DNA 修复或复制,实现精准的 C-T 或 A-G 的替换(图 1)。该系统与传统的基于 HR 途径实现点突变的方法相比,主要优势如下(表 1):

(1)不依赖 DSB 的产生。HR 途径必须依赖 DSB 的产生才有可能实现基因定点替换,并且在该过程中会不可避免的激发 NHEJ 途径产生的非必要 Indels 产物。有效 DSB 的发生通常需要科研人员花费较大的精力去找寻并筛选出足够高活性的 sgRNA 或 Cas 核酸酶。另一方面,当细胞内产生大量甚至过量的 DSB 后会对细胞带来较大的毒性,从而会对生物体造成一定的影响。而碱基编辑系统由于利用失去切割活性的或只有一条链切割活性的 Cas 蛋白来实现靶位点处碱基的定点替换,因此不依赖 DSB 的产生。尽管有相关报道证明 CBE 系统会产生一定的 Indels,但效率远远低于其介导的单碱基替换效率^[12]。

(2)无需供体 DNA 的参与。HR 途径必须在提供外源供体 DNA 的前提下才能实现碱基的定点替换。供体 DNA 形式目前主要包括环形双链 DNA (double-stranded DNA, dsDNA)、线性 dsDNA 和单链 DNA (single-stranded DNA, ssDNA) 3 种形式。而

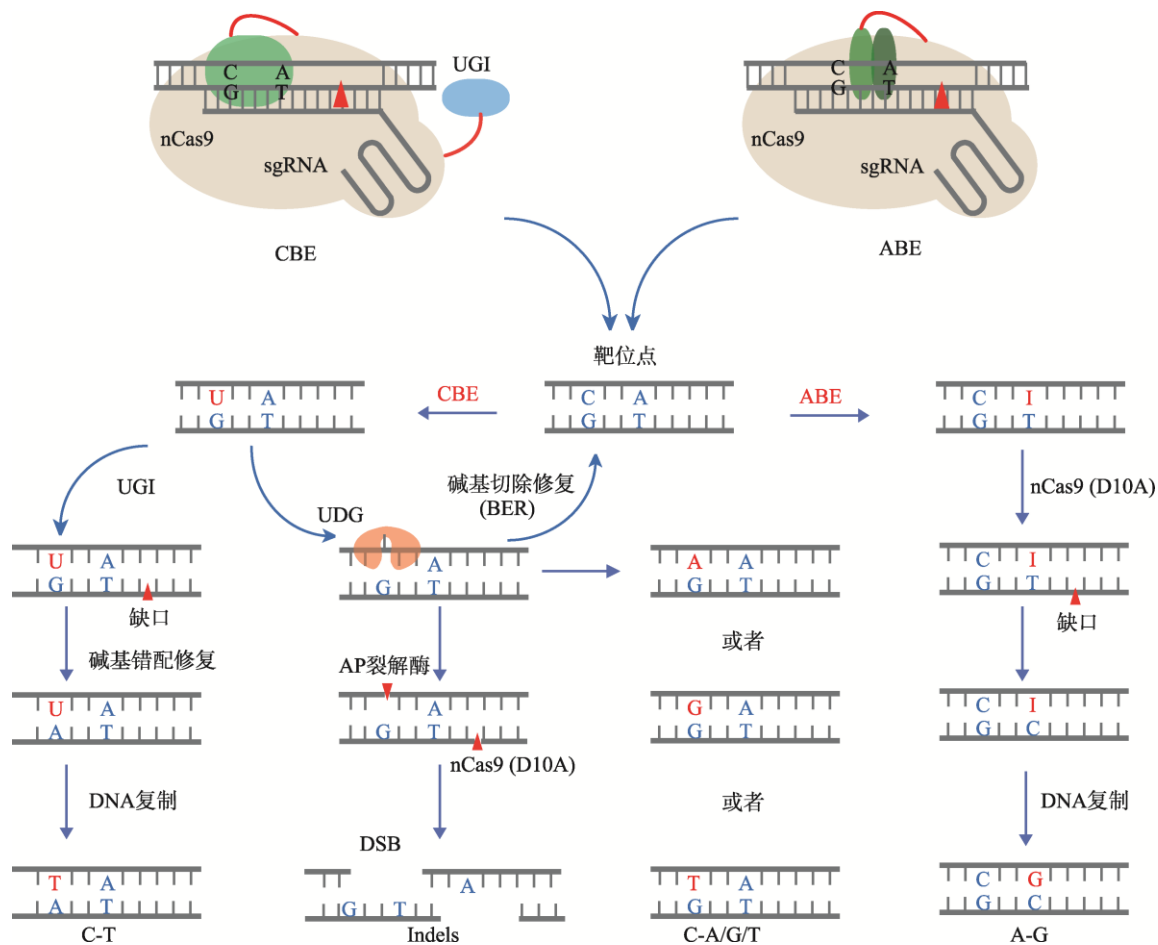


图 1 CBE 和 ABE 工作模式图

Fig. 1 Mechanisms of CBE and ABE

CBE 系统在胞嘧啶脱氨酶及 UGI 的作用下将靶位点处一定活性窗口内的 C 脱氨变为 U, 经 DNA 修复和复制后实现 C-T 的突变(左); CBE 系统经胞嘧啶脱氨酶、UDG、AP 裂解酶等作用下会产生非 C-T 或 Indels 的突变(中); ABE 系统在腺嘌呤脱氨酶的作用下将 A 脱氨变为 I, 经 DNA 修复和复制后实现 A-G 的突变(右)。

表 1 CBE、ABE 和 HR 的比较
Table 1 Comparison of CBE, ABE and HR

比较项目	CBE	ABE	HR
DNA 切割	SSB	SSB	DSB
编辑结果	C-T	A-G	任意
产物纯度	> 90%	> 99%	5%~50%
效率	高	高	低
供体 DNA	不需要	不需要	需要
细胞周期	不依赖	不依赖	依赖
基因组重排	否	否	是
全基因组脱靶	严重	否	否
RNA 水平脱靶	严重	严重	否

SSB 代表 DNA 单链断裂。

对于选择何种形式的供体 DNA 以及确定供体 DNA 形式后又应该设计多少长度的同源序列才能够达到最佳的同源重组效果, 这在不同的动物细胞系或不同的植物体中均不相同, 目前还没有明确的统一的方法^[4]。此外, 如何将足量的供体 DNA 有效地递送到细胞中也是目前的一大难题。碱基编辑系统无需提供供体 DNA, 有效地避免了上述各种不确定性。该系统借助于胞嘧啶脱氨酶或腺嘌呤脱氨酶的作用, 通过 sgRNA 的引导直接对靶标碱基进行脱氨, 从而高效地实现 C-T 或 A-G 的突变。

(3)高效性和广适性。HR 一般发生在分裂的细胞, 并且只能发生在细胞的 S 期和 G₂ 期^[11], 这使其在动植物中发生的频率较低, 尤其在植物中 HR 的

阳性筛选往往需要依赖除草剂抗性基因或靶标基因附近的抗生素基因来富集提高效率,因此大多数报道仅仅局限于对某些特殊的基因如 *ALS* 和 *EPSPS* 等的研究^[4,11],使其很难被广泛地应用。而碱基编辑系统介导的碱基替换在动植物中均表现出高效的优点,且已被广泛地应用于各种动物细胞系、人类胚胎、各种哺乳动物、非哺乳动物、单双子叶植物、细菌、真菌等中^[12,13,15,16]。

但是相比 HR,碱基编辑系统目前只能实现碱基之间的转换(transition)而不能实现碱基之间的颠换(transversion),并且其在全基因组范围和 RNA 水平存在较高的脱靶效应(下文将详细介绍)。但从整体来看,碱基编辑系统的开发及不断的优化发展为生命科学领域带来了新的曙光。

2 CBE 碱基编辑系统

2.1 CBE 系统的开发

CBE 一般由胞嘧啶脱氨酶、nCas9 或 dCas9 组成^[12,18]。具体工作原理是当 CBE 融合蛋白在 sgRNA 的引导下靶向基因组 DNA 时,胞嘧啶脱氨酶可结合到由 Cas9 蛋白、sgRNA 及基因组 DNA 形成的 R-loop 区的 ssDNA 处,将该 ssDNA 上一定范围内的胞嘧啶(C)脱氨为尿嘧啶(U),进而通过 DNA 修复或复制将 U 转变为胸腺嘧啶(T),最终实现 C 至 T (C-T)或 G 至 A (G-A)的直接替换^[18](图 1)。

自然界中存在的胞嘧啶脱氨酶大多数作用于 RNA,而 APOBEC (apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like)家族是目前报道的少数可作用于单链 DNA 的胞嘧啶脱氨酶,该类脱氨酶共同特点是都有一个能对碱基 C 进行脱氨的 CDA (cytidine deaminase)保守结构域,通过与 CRISPR 系统相结合,该类胞嘧啶脱氨酶由传统的“突变器”被开发为新型的“编辑器”^[18]。

2016 年,美国哈佛大学 David R. Liu 实验室率先建立了 3 种基于融合来源大鼠胞嘧啶脱氨酶 rAPOBEC1 的碱基编辑器(base editors, BE)^[18]。第一代碱基编辑器 BE1 (rAPOBEC1-XTEN-dCas9)由 rAPOBEC1 和完全失去切割活性的 dCas9 组成,可

在体外实现有效的 C-T 碱基的编辑(25%~40%),编辑的活性窗口可覆盖 sgRNA 的第 4~8 位(PAM 计为第 21~23 位),但该碱基编辑器在哺乳动物细胞内的编辑效率却大大下降(0.8%~7.7%)。这在很大程度上与细胞体内存在的尿嘧啶 DNA 糖基化酶(uracil DNA glycosylase, UDG)有关,UDG 可识别 U•G 错配,并切割尿嘧啶和脱氧核糖骨架之间的糖苷键,通过细胞内的碱基错配修复途径(base excision repair, BER)逆转由 BE1 产生的 U•G 中间产物返回到 C•G 碱基对(图 1)。为了抑制 UDG 的作用,David R. Liu 实验室在 BE1 基础上融合了来自噬菌体 PBS 的尿嘧啶 DNA 糖基化酶抑制剂(uracil DNA glycosylase inhibitor, UGI),开发了第二代碱基编辑器 BE2 (rAPOBEC1-XTEN-dCas9-UGI)。UGI 能够抑制人类和细菌中的 UDG 作用,在一定程度上增加 C-T 的编辑效率,经测试 BE2 比 BE1 编辑效率提高了 3 倍。随后,该实验室结合细胞的内源修复机制开发了第三代碱基编辑器 BE3 (rAPOBEC1-XTEN-nCas9-UGI)。BE3 将 BE2 中的 dCas9 替换为 nCas9 (D10A),可特异性的将非编辑链产生一个缺口,进而刺激细胞内碱基错配修复途径(mismatch repair, MMR)以含有 C 的编辑链作为模板进行修复,从而增加碱基编辑效率。研究表明,BE3 在人类细胞的 6 个位点中可实现平均约 37%的编辑效率,比 BE2 提高了 2~6 倍,其编辑窗口仍为第 4~8 位,该碱基编辑器也是目前使用较为广泛的 CBE 版本。

另外,日本神户大学 Akihiko Kondo 实验室采用上述类似策略将来源于七鳃鳗(*Lampetra japonicum*)的胞嘧啶脱氨酶 PmCDA1 用于开发新的碱基编辑器—Targeted-AID^[19]。研究人员通过该系统成功在酵母及哺乳动物细胞中实现了 C-T 的定点替换,效率分别高达 80% 及 10%,编辑窗口为 sgRNA 的第 5~9 位,相比 BE3 的编辑窗口略大。

同年,基于融合人类胞嘧啶脱氨酶 hAID 的碱基编辑系统也被建立^[20,21]。其中,中国科学院上海生命科学研究健康所常兴实验室开发的 TAM 系统融合了 dCas9 及 UGI^[20];美国斯坦福大学 Michael C. Bassik 实验室开发的 CRISPR-X 同样融合了 dCas9,不同的是该碱基编辑器未融合 UGI 并且通过 MS2 招募 hAID 脱氨酶^[21]。这两种系统在转入多

个 sgRNA 的情况下, 可以在哺乳动物细胞中实现较大范围(编辑范围宽达 100 nt)以及较多类型的碱基编辑。

另外, 美国哈佛大学 George M. Church 实验室开发了基于融合 ZF 或 TALE 特异性识别单元与 hAID 的碱基编辑系统^[22]。相比上述基于融合 Cas9 变体的碱基编辑系统, 这两种碱基编辑器无 PAM 的需求, 但在细菌及人类细胞中的编辑效率明显下降, 猜测原因是由于 ZF 或者 TALE 识别 DNA 特定区域后仍以 dsDNA 形式存在, 未能够提供胞嘧啶脱氨酶工作时所需要的 ssDNA 底物, 从而降低了脱氨酶的催化效率。

2.2 CBE 系统的限制及优化

2.2.1 编辑产物纯度

多项研究表明, 经 CBE 系统编辑后的编辑产物纯度并不高, 主要表现在两方面: (1) CBE 除将 C 编辑为 T 之外, 也有一定几率将 C 编辑为 G 或 A^[12]。这是由于 UDG 可将碱基 U 切除形成无嘧啶位点 (apyrimidinic site, AP), 经过跨损伤合成 (translesion synthesis, TLS) 聚合酶作用及 DNA 复制等, 也有一定的几率将该位置原始碱基 C 替换为其他碱基 (图 1); (2) 在编辑过程中会产生少量的 Indels^[12,18], 这是由于形成的 AP 位点会在 AP 裂解酶或自发断裂下产生一个缺口, 进而与 nCas9 在非编辑链产生的缺口刚好形成一个 DSB, 经过 NHEJ 修复途径后会产生非必要的 Indels 产物 (图 1)。David R. Liu 实验室在 BE3 的基础上融合了第二个拷贝的 UGI, 构建了第四代碱基编辑器 BE4。测试结果表明, BE4 不仅提高了碱基编辑效率, 并且非 C 至 T 的替换效率相比 BE3 降低了 2.3 倍^[23]。上海科技大学陈佳实验室采取类似策略, 通过优化 UGI 的表达量, 将 UGI 增至 4 个拷贝, 建立的 eBE-S3 在哺乳动物细胞中同样提高了编辑产物纯度^[24]。因此, 通过添加更多拷贝 UGI 的策略对提高编辑产物纯度具有重要作用。另外, David R. Liu 实验室进一步建立的 BE4-Gam 碱基编辑器可有效降低 Indels 的发生, 这是由于融合的来源于噬菌体 Mu 的 Gam 蛋白可结合于 DSB 的末端防止其降解, 进而阻止了 NHEJ 途径的发生^[23]。而基于融合环化的 Cas9 的 4 种 CP-CBEmax 编辑器也可

一定程度的降低副编辑产物的发生^[25]。

2.2.2 碱基编辑效率

研究发现, 细胞内碱基编辑器的表达水平是影响其编辑效率的一个重要因素。David R. Liu 实验室通过增加不同个数的核定位信号 (nuclear localization signal, NLS) 以及使用不同公司优化的密码子序列等方法构建了 BE4max 和 AncBE4max, 这两种碱基编辑器可在各种哺乳动物细胞进行高效编辑^[26]。Zafra 等^[27]通过增加 NLS 个数、改变 NLS 位置以及将 nCas9 密码子优化为哺乳动物细胞所偏好的密码子序列, 开发的 FNLS-BE3 的编辑效率相比 BE3 平均提高了 15 倍。另外, 本实验室开发的基于融合人类 APOBEC3A 胞嘧啶脱氨酶的 A3A-PBE 可在植物中实现比 BE3 平均高约 13 倍的碱基编辑效率^[28]。

2.2.3 碱基编辑范围

上述碱基编辑器均是融合 SpCas9, 因此只能靶向 NGG 序列的 PAM 形式, 大大限制了 CBE 在基因组中的靶向范围。为此, 研究人员将 SpCas9 替换为其他 Cas 蛋白或相应变体, 通过不同 Cas 蛋白识别不同 PAM, 进而扩大 CBE 系统在基因组中的编辑覆盖度。目前 SpCas9 的不同变体 (VQR、EQR 和 VRER)、SaCas9 和 ScCas9 的变体 SaKKH 与胞嘧啶脱氨酶的融合成功将 CBE 由 NGG 的 PAM 拓展为相应的 NGA、NGCG、NNGRRT 和 NNNRRT 等多种 PAM 形式^[29,30]。而 dCpf1 和 Sp-macCas9 的融合将 CBE 由识别富含 GC 序列拓宽至识别富含 AT 序列的 PAM 位点^[31~33]。值得一提的是, 基于融合 xCas9 及 SpCas9-NG 变体的两种碱基编辑器的开发使 CBE 系统可实现直接靶向 NG PAM 形式的位点^[34,35]。

2.2.4 碱基编辑活性窗口

不同类型的 CBE 的碱基编辑窗口有略微的不同, 依据不同的研究目的需要对编辑活性窗口做相应的改变。当被用于精准改变某个特定的碱基 C 时, 过大的脱氨化窗口会导致窗口内非靶标碱基 C 的编辑, 使得 CBE 系统被用于基因治疗等领域时存在一定风险。David R. Liu 实验室通过突变 rAPOBEC1 胞嘧啶脱氨酶上与 DNA 作用的关键酶活位点, 开发了

YE1-BE3、YE2-BE3、EE-BE3 和 YEE-BE3 碱基编辑器,进而可将脱氨窗口由 5 nt 缩小至 1~2 nt,但同时时靶标 C 的编辑效率有所降低^[29]。德国马普分子植物生理所 Ralph Bock 实验室开发的 BE3-PAPAPAP 以及通过缩短 PmCDA1 脱氨酶羧基端序列而建立的一系列 nCDA1-BE3 版本,能够在保证对靶标 C 编辑效率依然高效的同时,可有效将编辑的活性窗口缩小到 1~2 nt^[36]。但如何进一步缩小突变窗口,真正做到只改变单一碱基而不影响旁侧序列,将是碱基编辑系统今后重点攻克的方向。

另外,当 CBE 系统被用于基因功能筛选、大规模饱和突变、编辑调控元件、引入提前终止密码子或进行可变剪接等时,更大的编辑活性窗口是更为有利的。Jiang 等^[37]采取 SunTag 系统策略开发了 BE-PLUS 系统,从而将 BE3 的突变窗口由 5 nt (4~8) 拓宽至 13 nt (4~16)。基于融合 hA3A 胞嘧啶脱氨酶的碱基编辑器在人类细胞及植物中脱氨化的窗口可分别宽达 14 nt (2~13) 和 17 nt (1~17)^[28,38]。而 CP1020-CBEmax 和 CP1028-CBEmax 的编辑活性窗口可覆盖 sgRNA 的 8~9 nt^[25]。Liu 等^[39]通过改造开发的 DBE-A3A 和 DBE-AIDmono 可将突变窗口拓宽为 2~17 位,并且依赖 DBE 系统可在体外培养的细胞中实现抗体亲和成熟。

2.2.5 序列背景依赖性

基于融合 rAPOBEC1 的 BE3 具有强烈偏好 TC 序列,而对 GC 序列基本无编辑活性的特点^[18]。而基于融合 hAID、PmCDA1 和 hA3A 的碱基编辑系统均可在 GC 序列背景下有效地编辑^[23,28,40],且 hA3A-BE3 可对高甲基化区域有较强的编辑活性^[38]。而美国麻省总医院 Keith Joung 实验室通过加强碱基编辑效率依赖序列背景的特性,开发了 eA3A-BE3,该碱基编辑器在保证其偏好 TC 序列背景的前提下,对其他序列背景下 C 的编辑活性大大下降,也进一步降低了对邻近非靶标 C 的编辑^[41]。类似的,基于融合人类 hAPOBEC3G 的 hA3G-BE3 只特定的编辑 CC 序列的第二个 C 或 CCC 序列的后两个 C^[42]。

总之,针对胞嘧啶碱基编辑系统的各种不足之处,科研人员们不断开发和优化出新的碱基编辑器,极大地丰富了碱基编辑工具箱。上述各种碱基编辑

器具体构建及编辑特性见表 2。

2.3 CBE 系统的应用

胞嘧啶碱基编辑系统自开发以来,被迅速的广泛应用于各种动物细胞系、人类胚胎、动物、植物及细菌等基础体系的建立(图 2,表 3),其中包括酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、真菌、小鼠(*Mus musculus*)、斑马鱼(*Barchydanio rerio* var)、兔子(*Oryctolagus cuniculus*)、家蚕(*Bombyx mori* L.)、海胆(*Strongylocentrotus purpuratus*)、非洲爪蟾(*Xenopus laevis*)、猪(*Sus scrofa domestica* L.)、羊(*Capra hircus* L.)、水稻(*Oryza sativa* L.)、小麦(*Triticum aestivum* L.)、玉米(*Zea mays* L.)、番茄(*Lycopersicon esculentum* Mill.)、拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、马铃薯(*Solanum tuberosum* L.)、西瓜(*Citrullus lanatus* L.)、棉花(*Gossypium hirsutum* L.)和细菌等^[12,13,15,16,43~50]。除此之外,该系统也被用于基因治疗、动物疾病模型建立、植物重要农艺性状创制等方面^[12,13,15](图 2,表 3)。

2.3.1 基因治疗及动物疾病模型的建立

CBE 系统的开发为精准基因治疗提供了强有力的技术手段。通过 CBE 在各种细胞系水平上修正相应致病位点的研究已经很多,其中包括 Komor 等^[18]利用 BE3 在小鼠星形胶质细胞中修正了与阿尔兹海默症相关的 *APOE4* 基因的突变;Zara 等^[27]在小鼠肝脏细胞中通过递送密码子优化的 FNLS-BE3 纠正了与癌症相关的 *Ctnnb1* S45F 突变;Komor 等^[18]在人类乳腺癌细胞中纠正了 *p53* Y163C 突变;Koblan 等^[26]在来源于病人的原发性纤维细胞中实现了 *MPDUI*、*HBB* 等位基因的纠正等。而在哺乳动物体内及人类胚胎中实现致病基因的定向修正也有相关报道,如 Chadwick 等^[51]在成年小鼠中通过慢病毒递送 BE3,对 *PCSK9* 基因进行提前终止突变,可大幅度降低小鼠血浆中 *PCSK9* 蛋白表达水平及胆固醇水平;Yang 等^[52]对组蛋白相关基因进行点突修饰,探索了表观调控在小鼠胚胎发育中的重要性。Zeng 等^[53]在人类细胞和杂合子胚胎中纠正了马凡综合征致病性 *FBN1* 突变;中山大学黄军就实验室在重构的人类胚胎中修复了引起 β -地中海贫血病的 *HBB* 突变^[54];中国科学

表2 各种碱基编辑器(BE)的特点

Table 2 Base editors with various characteristics

BE 名称	脱氨酶	Cas 蛋白	PAM 类型	UGI 个数	NLS 个数	密码子 优化	编辑 活性窗口	参考 文献
BE1	rAPOBEC1	dCas9	NGG	—	1×	—	4~8	[18]
BE2	rAPOBEC1	dCas9	NGG	1×	1×	—	4~8	[18]
BE3	rAPOBEC1	nCas9	NGG	1×	1×	—	4~8	[18]
PBE	rAPOBEC1	nCas9	NGG	1×	3×	+	3~9	[82]
HF-BE3	rAPOBEC1	HF1-nCas9	NGG	1×	1×	—	4~8	[123]
HF2-BE2	rAPOBEC1	HF2-dCas9	NGG	1×	1×	—	4~8	[58]
BE4	rAPOBEC1	nCas9	NGG	2×	1×	—	4~8	[23]
BE4-Gam	rAPOBEC1	nCas9	NGG	2×	1×	—	4~8	[23]
BE4max	rAPOBEC1	nCas9	NGG	2×	2×	—	4~8	[26]
AncBE4max	rAPOBEC1	nCas9	NGG	2×	2×	+	4~8	[26]
eBE-S3	rAPOBEC1	nCas9	NGG	4×	1×	—	4~8	[24]
FNLS-BE3	rAPOBEC1	nCas9	NGG	1×	2×	+	3~8	[27]
VQR-BE3	rAPOBEC1	nVQRCas9	NGA	1×	1×	—	4~11	[29]
EQR-BE3	rAPOBEC1	nEQRCas9	NGAG	1×	1×	—	4~11	[29]
VRER-BE3	rAPOBEC1	nVRERCas9	NGCG	1×	1×	—	3~10	[29]
SaBE3	rAPOBEC1	nSaCas9	NNGRRT	1×	1×	—	3~12	[29]
SaBE4	rAPOBEC1	nSaCas9	NNGRRT	2×	1×	—	3~12	[23]
SaBE4-Gam	rAPOBEC1	nSaCas9	NNGRRT	2×	1×	—	3~12	[23]
SaKKH-BE3	rAPOBEC1	nSaKKHCas9	NNNRRT	1×	1×	—	3~12	[29]
Spy-macnCas9-BE3	rAPOBEC1	Spy-nmacCas9	NAA	1×	1×	—	4~8	[31]
dCpf1-eBE	rAPOBEC1	dCpf1	TTTV	4×	3×	—	8~13	[32]
enAsBE1.1-1.4	rAPOBEC1	denAsCas12a	TTTV	1×	1~4×	—	~5~25	[33]
xBE3	rAPOBEC1	nxCas9	NG	1×	1×	—	4~8	[34]
BE3-NG	rAPOBEC1	nSpCas9-NG	NG	1×	1×	—	4~8	[35]
YE1-BE3	rAPOBEC1-YE1	nCas9	NGG	1×	1×	—	4~7	[29]
YE2-BE3	rAPOBEC1-YE2	nCas9	NGG	1×	1×	—	5~6	[29]
EE-BE3	rAPOBEC1-EE	nCas9	NGG	1×	1×	—	5~6	[29]
YEE-BE3	rAPOBEC1-YEE	nCas9	NGG	1×	1×	—	5~6	[29]
BE3-PAPAPAP	rAPOBEC1	nCas9	NGG	1×	1×	—	5~6	[36]
BE3-R33A	rAPOBEC1-R33A	nCas9	NGG	1×	1×	—	5~7	[131]
BE3-R33A/K34A	rAPOBEC1-R33A/K34A	nCas9	NGG	1×	1×	—	5~6	[131]
BE-PLUS	rAPOBEC1-scFV	nCas9	NGG	1×	1×	—	4~16	[37]
CP-CBEmax	rAPOBEC1	CP-nCas9	NGG	2×	1×	—	4~11	[25]
eA3A-BE3	hAPOBEC3A-N57G	nCas9	NGG	1×	1×	—	4~8	[41]
eA3A-HF1-BE3-2xUGI	hAPOBEC3A-N57G	HF1-nCas9	NGG	2×	1×	—	4~8	[41]
eA3A-Hypa-BE3-2xUGI	hAPOBEC3A-N57G	nHypaCas9	NGG	2×	1×	—	4~8	[41]
hA3A-BE3	hAPOBEC3A	nCas9	NGG	1×	1×	—	2~13	[38]
hA3A-BE3-Y130F	hAPOBEC3A-Y130F	nCas9	NGG	1×	1×	—	3~8	[38]
A3A-PBE	hAPOBEC3A	nCas9	NGG	1×	2×	+	1~17	[28]

续表

BE 名称	脱氨酶	Cas 蛋白	PAM 类型	UGI 个数	NLS 个数	密码子 优化	编辑 活性窗口	参考 文献
DBE-A3A	hAPOBEC3A-MS2	nCas9	NGG	1×	1×	—	2~17	[39]
hA3A ^{R128A}	hAPOBEC3A-R128A	nCas9	NGG	1×	1×	—	3~9	[133]
A3G-BE4max	hAPOBEC3G-CTD	nCas9	NGG	2×	1×	—	4~10	[42]
Target-AID	PmCDA1	nCas9	NGG	1×	1×	—	2~8	[19]
Target-AID-NG	PmCDA1	nCas9	NG	1×	1×	—	2~8	[35]
nCDA1-BE3	PmCDA1Δ	nCas9	NGG	1×	1×	—	3~4	[36]
TAM	hAIDx	dCas9	NGG	1×	1×	—	4~10	[20]
CRISPR-X	hAIDΔ-MS2	dCas9	NGG	—	1×	—	~50~50	[21]
eAID-BE4max	hAID	nCas9	NGG	2×	2×	+	4~8	[40]
DBE-AIDmono	hAID-mono-MS2	nCas9	NGG	1×	1×	—	2~17	[39]
ZF-AID	hAID	ZF	—	1×	1×	—	—	[22]
TALE-AID	hAID	TALE	—	1×	1×	—	—	[22]
ABE7.9	TadA-TadA*	nCas9	NGG	1×	1×	—	4~9	[107]
ABE7.10	TadA-TadA*	nCas9	NGG	—	1×	—	4~7	[107]
PABE-7	TadA-TadA*	nCas9	NGG	—	1×	+	4~7	[108]
ABEmax	TadA-TadA*	nCas9	NGG	—	2×	+	4~7	[26]
VQR-ABE	TadA-TadA*	nVQRCas9	NGA	—	1×	+/-	4~8	[30,114]
VQR-ABEmax	TadA-TadA*	nVQRCas9	NGA	—	2×	+	4~8	[25]
VRER-ABE	TadA-TadA*	nVRERCas9	NGCG	—	1×	+	4~8	[30]
VRER-ABEmax	TadA-TadA*	nVRERCas9	NGCG	—	2×	+	4~8	[25]
VRQR-ABEmax	TadA-TadA*	nVRQRCas9	NGA	—	2×	+	4~8	[25]
ABEsa	TadA-TadA*	nSaCas9	NNGRRT	—	1×	+	6~12	[111]
SaABEmax	TadA-TadA*	nSaCas9	NNGRRT	—	2×	+	4~14	[25]
SaKKH-ABE	TadA-TadA*	nSaKKHCas9	NNNRRT	—	1×	+	8~13	[30,117]
SaKKH-ABEmax	TadA-TadA*	nSaKKHCas9	NNNRRT	—	2×	+	4~14	[25]
xABE	TadA-TadA*	nxCas9	NG	—	1×	—	4~7	[34]
xABEmax	TadA-TadA*	nxCas9	NG	—	2×	+	4~8	[25]
ABE-NG	TadA-TadA*	nSpCas9-NG	NG	—	1×	+	4~7	[74]
ABE-NG-S	TadA*	nSpCas9-NG	NG	—	1×	+	4~7	[74]
NG-ABEmax	TadA-TadA*	nSpCas9-NG	NG	—	2×	—	4~8	[35]
CP-ABEmax	TadA-TadA*	CP-nCas9	NGG	—	2×	+	4~12	[25]
ScCas9-ABE(7.10)	TadA-TadA*	nScCas9	NNGN	—	1×	—	4~7	[109]
ABEmaxAW	TadA-E59A-TadA*-V106W	nCas9	NGG	—	2×	+	4~8	[132]
ABEmaxQW	TadA-E59Q-TadA*-V106W	nCas9	NGG	—	2×	+	4~8	[132]
ABE7.10 ^{F148A}	TadA-F148A-TadA*-F148A	nCas9	NGG	—	1×	—	5	[133]

院上海生命科学研究院神经科学研究所杨辉实验室研究发现在人类胚胎的二细胞期注射 BE3 比在一细胞期注射时对基因的编辑效率更高, 这为研究人类胚胎发育中的基因功能提供了一种强有力的方法^[55]。

点突变动物模型的建立可通过 HR 实现, 但该途径效率低且周期长, 并不能被广泛的应用。目前通过 CBE 系统已在多种动物中建立了相应的疾病模型(图 2A, 表 3)。在小鼠中建立的疾病模型类型最

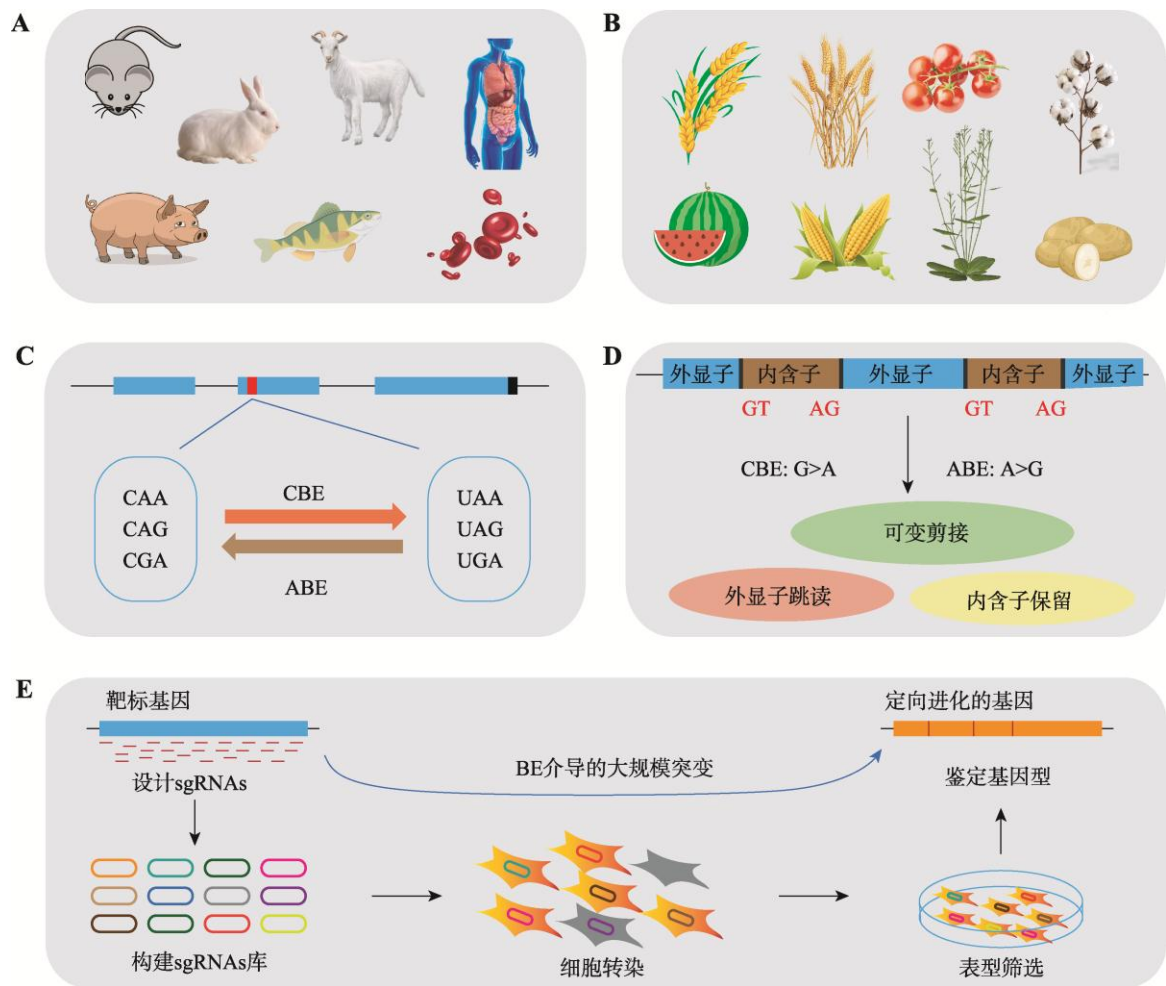


图 2 碱基编辑系统的应用

Fig. 2 The applications of base editing systems

A: 基因治疗及动物疾病模型建立; B: 植物中的应用; C: 提前终止密码子的引入及改变; D: mRNA 剪接; E: 蛋白定向进化。

表 3 碱基编辑系统在动物、植物和细菌中的应用

Table 3 Applications of base editing systems in animals, plants and bacteria

物种	BE 名称	靶基因	参考文献
小鼠(<i>Mus musculus</i>)	BE3	<i>Dmd</i> , <i>Tyr</i> , <i>Vista</i> , <i>Cd160</i> , <i>CTNNB1</i> , <i>Hist1H3</i> , <i>Hist2H3</i> , <i>Carm1</i> , <i>Pcsk9</i> , <i>Hpd</i> , <i>Psen1</i> , <i>Hoxd13</i> , <i>Ar</i> , <i>Gfap</i> , <i>Lmna</i> , <i>Mecp2</i> , <i>Tnni3</i> , <i>Abcd1</i> , <i>Atoh1</i> , <i>Otof</i> 和 <i>Slc26a5</i>	[48,51,52, 56,57,59]
小鼠(<i>Mus musculus</i>)	SaBE3	<i>Tyr</i>	[49]
小鼠(<i>Mus musculus</i>)	SaKKH-BE3	<i>Pah</i>	[60]
小鼠(<i>Mus musculus</i>)	HF2-BE2	<i>Tyr</i>	[58]
小鼠(<i>Mus musculus</i>)	Target-AID	<i>Psen1</i>	[59]
小鼠(<i>Mus musculus</i>)	VQR-BE3	<i>Psen1</i>	[59]
小鼠(<i>Mus musculus</i>)	hA3A-BE3-Y130F	<i>Tyr</i> , <i>Hoxd13</i> , <i>Ar</i> , <i>Gfap</i> , <i>Dmd</i> , <i>Lmna</i> , <i>Mecp2</i> , <i>Tnni3</i> 和 <i>Abcd1</i>	[61]
兔子(<i>Oryctolagus cuniculus</i>)	BE3	<i>Mstn</i> , <i>Dmd</i> , <i>Tia1</i> , <i>Tyr</i> 和 <i>Lmna</i>	[62]

续表

物种	BE 名称	靶基因	参考文献
兔子(<i>Oryctolagus cuniculus</i>)	BE4-Gam	<i>Dmd</i> 和 <i>Tia1</i>	[62]
兔子(<i>Oryctolagus cuniculus</i>)	hA3A-eBE	<i>Tyr</i>	[64]
兔子(<i>Oryctolagus cuniculus</i>)	hA3A-eBE-Y130F	<i>Tyr</i> 、 <i>Lmna</i> 和 <i>Mstn</i>	[64]
兔子(<i>Oryctolagus cuniculus</i>)	hA3A-eBE-N57G (eA3A-BE3)	<i>Tyr</i> 、 <i>Lmna</i> 和 <i>Mstn</i>	[64]
兔子(<i>Oryctolagus cuniculus</i>)	eAID-BE4max	<i>Tyr</i>	[65]
兔子(<i>Oryctolagus cuniculus</i>)	exBE4	<i>Tyr</i>	[63]
兔子(<i>Oryctolagus cuniculus</i>)	A3G-BE4max	<i>Dmd</i> 和 <i>Tyr</i>	[42]
猪(<i>Sus scrofa domestica</i> L.)	BE3	<i>Twist2</i> 、 <i>Tyr</i> 、 <i>TYR</i> 、 <i>LMNA</i> 、 <i>RAG1</i> 、 <i>RAG2</i> 、 <i>IL2RG</i> 和 <i>pol</i>	[66,67]
羊(<i>Capra hircus</i> L.)	BE3	<i>SOC2</i>	[68,69]
斑马鱼(<i>Barchydanio rerio</i> var)	BE3	<i>Twist2</i> 、 <i>Gdf6</i> 、 <i>Ntl</i> 和 <i>Tyr</i>	[70]
斑马鱼(<i>Barchydanio rerio</i> var)	VQR-BE3	<i>Twist2</i> 、 <i>Tial1</i> 和 <i>Urod</i>	[70]
斑马鱼(<i>Barchydanio rerio</i> var)	Targeted-AID	<i>chd</i> 和 <i>oep</i>	[71]
非洲爪蟾(<i>Xenopus laevis</i>)	BE3	<i>Tyr</i> 、 <i>tp53</i> 、 <i>tbx5</i> 、 <i>Apc</i> 、 <i>cyp1b1</i> 、 <i>tbx22</i> 、 <i>kcnj</i> 、 <i>hhex</i> 、 <i>sftpb</i> 和 <i>ptf1a/p48</i>	[72,73]
家蚕(<i>Bombyx mori</i> L.)	BE3	<i>BmGAPDH</i> 和 <i>BmV-ATPase B</i>	[43]
海胆(<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>)	CRISPR/Cas9-DA (Targeted-AID)	<i>SpAlx1</i> 、 <i>SpDsh</i> 和 <i>SpPKS</i>	[45]
水稻(<i>Oryza sativa</i> L.)	BE3 (PBE/CBE-P1)	<i>OsCDC48</i> 、 <i>OsNRT1.1B</i> 、 <i>OsSPL14</i> 、 <i>OsSLR1</i> 、 <i>OsPDS</i> 、 <i>OsSBE11b</i> 和 <i>OsSNB</i>	[75~77,82]
水稻(<i>Oryza sativa</i> L.)	Targeted-AID	<i>OsALS</i> 、 <i>OsWaxy</i> 和 <i>OsFTIP1e</i>	[87~89]
水稻(<i>Oryza sativa</i> L.)	BE3-ΔUGI	<i>OsNRT1.1B</i> 和 <i>OsSLR1</i>	[76]
水稻(<i>Oryza sativa</i> L.)	CBE-P3 (VQR-BE3)	<i>PMS3</i>	[30]
水稻(<i>Oryza sativa</i> L.)	A3A-PBE	<i>OsAAT</i> 、 <i>OsCDC48</i> 、 <i>OsDEP1</i> 、 <i>OsNRT1.1B</i> 、 <i>OsOD</i> 、 <i>OsEV</i> 和 <i>OsHPPD</i>	[28]
水稻(<i>Oryza sativa</i> L.)	rBE9 (hAID*Δ-XTEN-Cas9n-NLS)	<i>OsAOS1</i> 、 <i>OsJAR1</i> 、 <i>OsJAR2</i> 和 <i>OsCOI2</i>	[40]
水稻(<i>Oryza sativa</i> L.)	xBE3/xCas9(D10A)-PmCDA1	<i>OsGS3</i> 、 <i>OsDEP1</i> 、 <i>LF</i> 、 <i>IAA13</i> 、 <i>SPL7</i> 、 <i>SPL4</i> 和 <i>MADS57</i>	[74,78]
水稻(<i>Oryza sativa</i> L.)	CBE-NG/rBE22/nSpCas9-NGv1-AID/Cas9-NG(D10A)-PmCDA1-UGI	<i>OsDEP1</i> 、 <i>OsEPSPS</i> 、 <i>OsPDS</i> 、 <i>OsCERK1</i> 、 <i>GSK4</i> 、 <i>ETR2</i> 、 <i>MPK11</i> 、 <i>MPK7</i> 、 <i>MPK10</i> 、 <i>MPK8</i> 、 <i>SERK1</i> 、 <i>SERK2</i> 、 <i>RLCK185</i> 、 <i>BZR1</i> 、 <i>Os03g020040</i> 、 <i>LF</i> 、 <i>IAA13</i> 、 <i>SPL7</i> 、 <i>SNB</i> 和 <i>PMS3</i>	[74,77,78,92]
小麦(<i>Triticum aestivum</i> L.)	PBE	<i>TaLOX2</i>	[82]
小麦(<i>Triticum aestivum</i> L.)	A3A-PBE	<i>TaALS</i> 、 <i>TaMTL</i> 、 <i>TaLOX2</i> 、 <i>TaDEP1</i> 、 <i>TaHPPD</i> 、 <i>TaVRN1-A1</i> 和 <i>TaACC</i>	[28]
玉米(<i>Zea mays</i> L.)	PBE	<i>ZmCENH3</i>	[82]
马铃薯(<i>Solanum tuberosum</i> L.)	A3A-PBE	<i>StALS</i> 和 <i>StGBSS</i>	[28]
马铃薯(<i>Solanum tuberosum</i> L.)	BE3	<i>GBSS</i>	[82]
马铃薯(<i>Solanum tuberosum</i> L.)	Target-AID	<i>StALS</i>	[90]
番茄(<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill.)	Target-AID	<i>DELLA</i> 、 <i>ETR1</i> 和 <i>SLALS</i>	[87,90]

续表

物种	BE 名称	靶基因	参考文献
拟南芥(<i>Arabidopsis thaliana</i>)	BE3	<i>AtALS</i> 、 <i>AtHAB1</i> 、 <i>AtT30G6.16</i> 、 <i>AtRS31A</i> 和 <i>AtAct2</i>	[84,104]
西瓜(<i>Citrullus lanatus</i> L.)	BE3	<i>ALS</i>	[85]
棉花(<i>Gossypium hirsutum</i> L.)	BE3	<i>GhCLA</i> 和 <i>GhPEBP</i>	[86]
细菌(大肠杆菌, <i>Escherichia coli</i>)	Target-AID	<i>GalK</i> 、 <i>rpoB</i> 、 <i>xylB</i> 、 <i>manA</i> 、 <i>pta</i> 、 <i>adhE</i> 和 <i>tpiA</i>	[93]
细菌(大肠杆菌, <i>Escherichia coli</i>)	BE3	<i>tetA</i> 和 <i>rppH</i>	[94]
细菌(羊布鲁氏杆菌, <i>Brucella melitensis</i>)	BE3	<i>virB10</i>	[94]
细菌(金黄色葡萄球菌, <i>Staphylococcus aureus</i>)	BEC (BE3-ΔUGI)	<i>agrA</i> 、 <i>cntA</i> 和 <i>esaD</i>	[95]
细菌(假单胞杆菌, <i>Pseudomonas aeruginosa</i>)	BEC (BE3-ΔUGI)	<i>rhlR</i> 、 <i>rhlB</i> 、 <i>cadR</i> 、 <i>ompR</i> 、 <i>per</i> 、 <i>aspC</i> 、 <i>gacA</i> 和 <i>hrpL</i>	[96]
细菌(肺炎杆菌, <i>Klebsiella pneumoniae</i>)	BE3	<i>fosA</i> 、 <i>bhaK</i> 和 <i>bla</i>	[97]
真菌(黑曲霉丝状真菌, <i>Aspergillus niger</i>)	BEC (BE3)	<i>pyrG</i> 、 <i>fwnA</i> 和 <i>priT</i>	[47]
小鼠(<i>Mus musculus</i>)	ABE7.10	<i>Tyr</i> 、 <i>Dmd</i> 、 <i>AR</i> 、 <i>Hoxd13</i> 、 <i>Hbb-bs</i> 和 <i>Fah</i>	[49,111,113]
小鼠(<i>Mus musculus</i>)	VQR-ABE	<i>Hbb-bs</i>	[114]
小鼠(<i>Mus musculus</i>)	SaKKH-ABE	<i>Otc</i>	[114]
大鼠(<i>Rattus norvegicus</i>)	ABE7.10	<i>Gaa</i> 、 <i>Hemgn</i> 和 <i>Ndst4</i>	[114, 115]
兔子(<i>Oryctolagus cuniculus</i>)	ABE7.10	<i>Dmd</i> 、 <i>Otc</i> 和 <i>Sod1</i>	[62]
兔子(<i>Oryctolagus cuniculus</i>)	exABE	<i>Tyr</i> 、 <i>Dmd</i> 和 <i>APP</i>	[63]
斑马鱼(<i>Barchydanio rerio</i> var)	zABE7.10	<i>ddx17-g1</i> 、 <i>musk</i> 、 <i>rps14</i> 、 <i>atp5b</i> 和 <i>wu:fc01d11</i>	[116]
斑马鱼(<i>Barchydanio rerio</i> var)	zABE7.10max	<i>Musk</i> 、 <i>rps14</i> 、 <i>atp5b</i> 和 <i>wu:fc01d11</i>	[116]
斑马鱼(<i>Barchydanio rerio</i> var)	zABE7.10-GE	<i>Musk</i> 、 <i>rps14</i> 、 <i>atp5b</i> 和 <i>wu:fc01d11</i>	[116]
水稻(<i>Oryza sativa</i> L.)	ABE7.10	<i>OsSPL14</i> 、 <i>SLR1</i> 、 <i>OsSPL16</i> 、 <i>OsSPL18</i> 、 <i>LOC_Os02g24720</i> 、 <i>OsMPK6</i> 、 <i>OsMPK13</i> 、 <i>OsSERK2</i> 和 <i>OsWRKY45</i>	[117,118]
水稻(<i>Oryza sativa</i> L.)	PABE-7	<i>OsACC</i> 、 <i>OsALS</i> 、 <i>OsCDC48</i> 、 <i>OsAAT</i> 、 <i>OsEV</i> 、 <i>OsOD</i> 、 <i>OsDEP1</i> 和 <i>OsNRT1.1B</i>	[108]
水稻(<i>Oryza sativa</i> L.)	ABE-P2 (ABEsa)	<i>OsSPL14</i> 和 <i>OsSPL17</i>	[117]
水稻(<i>Oryza sativa</i> L.)	ABE-P3 (VQR-ABE)	<i>OsSPL14</i> 、 <i>OsSPL16</i> 、 <i>OsSPL17</i> 和 <i>OsSPL18</i>	[30]
水稻(<i>Oryza sativa</i> L.)	ABE-P4 (VRER-ABE)	<i>OsTOE1</i> 和 <i>OsIDS1</i>	[30]
水稻(<i>Oryza sativa</i> L.)	ABE-P5 (SaKKH-ABE)	<i>SNB</i>	[30]
水稻(<i>Oryza sativa</i> L.)	ABE-NG	<i>OsSPL14</i> 、 <i>LF1</i> 、 <i>OsIAA13</i> 和 <i>OsSPL7</i>	[74]
水稻(<i>Oryza sativa</i> L.)	ABE-NG-S	<i>OsSPL14</i> 、 <i>LF1</i> 、 <i>OsIAA13</i> 和 <i>OsSPL7</i>	[74]
小麦(<i>Triticum aestivum</i> L.)	PABE-7	<i>TaDEP1</i> 、 <i>TaEPSPS</i> 和 <i>TaGW2</i>	[108]
拟南芥(<i>Arabidopsis thaliana</i>)	ABE7.10	<i>AtALS</i> 、 <i>AtPDS</i> 、 <i>AtFT</i> 和 <i>AtLFY</i>	[119]
油菜(<i>Brassica campestris</i> L.)	ABE7.10	<i>BnALS</i> 和 <i>BnPDS</i>	[119]

多, 包括白化病、肌营养不良、肝病和雄性激素不敏感综合征等^[56], 其中韩国首尔国立大学 Jin-Soo Kim 实验室通过 BE3 mRNA 编辑小鼠胚胎基因 *Tyr*

和 *Dmd* 而建立了相应的小鼠白化病和肌营养不良疾病模型^[57]; 中山大学松阳洲实验室利用 HF2-BE2 也建立了小鼠白化病模型^[58]; Sasaguri 等^[59]利用 BE3

和 Targeted-AID 系统在小鼠中引入了与早衰症相关的 *Psen1* 基因的突变; Villiger 等^[60]在成年小鼠中利用 AAV 慢病毒载体递送分割的 BE3 系统, 修正了 *Pah* 突变, 治疗了代谢肝病; Li 等^[61]利用 hA3A-BE3-Y130F 编辑富含 GC 的区域, 获得了雄性激素不敏感综合征的小鼠。在大型哺乳动物如兔子、猪和羊中也有相关疾病模型的建立。兔子中, 利用 BE3、BE4-Gam、AID-nCas9 和 hA3A-eBE-N57G 等不同的 CBE 碱基编辑器建立了白化病、早衰症、双肌臀、X-连锁扩张性心肌病等疾病模型^[62~65]。在猪中, Li 等^[66]利用 BE3 在猪胚胎成纤维细胞中编辑 *Twist2* 基因和 *TYR* 基因, 而后通过体细胞核移植的方法建立了无脸巨口综合征和皮肤白化病的疾病模型; 而中国科学院广州生物医药与健康研究院赖良学实验室在猪中首次实现了多个基因靶点的同时 C-T 突变, 并建立了相应的疾病模型^[67]。在羊中, 利用 BE3 编辑 *SOC2* 和 *FGF5* 基因, 成功获得了体重、尺寸和毛长等生长指标增加的突变体羊^[68,69]。除了在哺乳动物中, 在非哺乳动物斑马鱼和非洲爪蟾中建立模拟人类疾病的模型也有相关报道, 其中 Zhang 等^[70]通过编辑斑马鱼胚胎的 *Tyr* 基因建立了模拟人类眼白化病的疾病模型; Tanaka 等^[71]利用 Targeted-AID 编辑了斑马鱼基因 *chd* 和 *oep*, 并观察到了相应突变体表型。在非洲爪蟾中, Park 等^[72]通过转化 BE3 的 RNP 形式建立了白化病疾病模型; Shi 等^[73]利用 BE3 建立了模拟人类 Holt-Oram 综合征和眼皮白化病 1A 型的疾病模型。上述致病基因的突变动物模型的建立为进一步真正进行临床疾病治疗提供了坚实的基础。

2.3.2 在植物中的应用

植物中许多重要农艺性状是由单个或少数几个碱基突变引起, 基于传统化学诱变的 TILLING (targeting induced local lesions in genomes) 可获得植物中的点突, 但该方法耗时、耗力、随机性强、突变效率低, 而 CBE 系统的开发为在植物中快速、高效且精准的创制突变体提供了有力的工具(图 2B, 表 3)。其中, 基于融合 rAPOBEC1 的 BE3 系统在植物中的应用最多。自 2016 年以来, 来自国内外的多个研究团队利用 BE3 及基于融合 SpCas9-VQR、SaKKH、

SpCas9-NG 和 xCas9 变体的 BE3 碱基编辑器在水稻中创制了多个基因的突变体^[30,74~81]。本实验室利用基于融合 rAPOBEC1 的 PBE 系统在水稻、小麦和玉米原生质体中实现了多个基因的编辑, 并获得了突变效率高达 45.8% 的相应突变体植株^[82]; 并利用 PBE 系统编辑小麦 *TaALS* 和 *TaACCcase* 基因, 创制了一系列抗除草剂小麦新种质, 为麦田杂草防控提供了育种新材料及技术路径^[83]。另外, 基于此本实验室还在小麦中建立了无外源选择标记、直接筛选碱基编辑事件的方法^[83]。Chen 等^[84]通过对 *ALS* 基因的碱基替换, 创制了抗除草剂拟南芥材料。Tian 等^[85]利用 BE3 获得了世界首例碱基编辑抗除草剂西瓜。另外, BE3 介导的碱基编辑也已成功用于四倍体棉花基因组中^[86]。

基于融合其他类型胞嘧啶脱氨酶的 CBE 系统在植物中的应用也有相关报道。基于融合 PmCDA1 脱氨酶的 Target-AID 系统已成功用于水稻、番茄和马铃薯相关基因的编辑, 并创制了抗咪唑类除草剂水稻材料^[87~90]。并且, 该系统后续被用于建立植物抵御 RNA 病毒的免疫系统^[91]。另外, SpCas9-NGv1 与 PmCDA1 的融合进一步拓宽了胞嘧啶碱基编辑系统在水稻基因组中的靶向范围^[78,92]。而本实验室利用基于融合人类 APOBEC3A 的 A3A-PBE 系统在水稻、小麦和马铃薯原生质体实现了非常高效的碱基编辑并且创制了抗除草剂小麦材料^[28]。基于融合 hAID 的碱基编辑系统在水稻中表现出能高效编辑 GC 序列背景的特点^[40]。

2.3.3 在细菌中的应用

CRISPR/Cas 系统来源于原核生物的免疫系统, 可被用于细菌的编辑, 同样 BE 系统已被测试也可用于细菌的碱基编辑(表 3)。Banno 等^[93]利用 Targeted-AID 编辑了大肠杆菌(*Escherichia coli*)等多个基因, 更重要的是该系统在只转入 4 个 sgRNA 的情况下可在多拷贝的转座子元件中诱导 41 个突变的发生。Zheng 等^[94]利用 BE3 对大肠杆菌 *rppH* 基因引入了提前终止密码子。除在大肠杆菌中, 科研人员利用 BE3 或者 BE3-ΔUGI 在羊布鲁氏杆菌(*Brucella melitensis*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、假单胞杆菌(*Pseudomonas aeruginosa*)和肺炎球菌(*Kle-*

bsiella pneumoniae)等中也成功实现了相关基因的碱基编辑^[94-97], 这表明碱基编辑系统可被广泛的应用于多种原核生物的编辑。

2.3.4 引入提前终止密码子

CBE 系统通过 C-T 或 G-A 突变可以将编码链的 CAA、CAG、CGA 以及 TGG 共 4 种密码子中的任意一种突变为终止密码子, 从而在不产生 DNA 双链断裂的情况下达到敲除基因的效果(图 2C)。Jin-Soo Kim 实验室率先利用 BE3 在 *Dmd* 基因中引入提前终止密码子, 建立了肌营养不良的小鼠疾病模型^[57]。随后报道的 CRISPR-Stop 和 iSTOP 方法利用同样的思路建立了大规模 BE3 介导的基因失活体系。其中, CRISPR-Stop 相关研究发现, 通过 BE3 产生的基因失活效率与 Cas9 介导的敲除效率相当, 并且 BE3 对细胞的死亡损伤明显降低^[98]。Billon 等^[99]建立的 iSTOP 可覆盖人类基因组读码框的 98.6% 以上, 并且该实验室提供了可免费设计人类、小鼠和拟南芥等 8 个物种 iSTOP sgRNA 的在线数据库。而当同时使用多个 sgRNA 时, 可显著增加 BE3 介导的 iSTOP 效率^[100]。

2.3.5 调控内源 mRNA 的可变剪接

mRNA 可变剪接是转录后基因调控的重要过程, 典型真核内含子连接有 5'-GT(供体序列)和 AG-3'(受体序列), 它们在剪接中起着重要作用^[101], 而碱基编辑系统的出现对特定 mRNA 剪接过程的功能研究提供了重要的技术工具(图 2D)。Gapinske 等^[102]率先利用 BE3 介导的 CRISPR-SKIP 剪接体系, 对小鼠和人类不同细胞系的 mRNA 的可变剪接位点进行了编辑, 导致外显子跳读。常兴实验室利用 TAM 系统在人类细胞中实现了目前存在的 4 种 mRNA 剪接形式的改变(外显子跳读、改变可变剪接位点的选择、调节互斥外显子的选择和诱导小的内含子的包含), 并且通过编辑 *Dmd* 基因的剪接位点, 实现了目标外显子的完全跳读, 在所有表达 TAM 的细胞中修复了心肌细胞的缺陷^[103]。植物中, 本实验室利用 BE3 在拟南芥中对位于内含子 5'端的剪接保守位点“GU”以及 *AtAct2* 基因 5' UTR 区的内含子剪接位点处进行突变, 结果发现利用该方法可高效的删除或改变

mRNA 特定剪接形式或组成型剪接形式^[104]。中山大学李剑峰实验室同样利用 BE3 在拟南芥和水稻中建立了有效的 mRNA 可变剪接体系^[105]。

2.3.6 蛋白定向进化

碱基编辑系统除可以进行单个氨基酸位点的基因编辑以外, 理论上还可以通过氨基酸位点的遗传筛选进行蛋白结构和功能的研究(图 2E)。常兴实验室利用 TAM 系统在慢性粒细胞白血病细胞中靶标 *BCR-ABL* 基因, 有效鉴定了赋予细胞伊马替尼抗性的已知突变和新突变, 这表明 CBE 系统可以在单碱基水平上筛选功能获得性变异^[20]。Michael C. Bassiks 实验室利用基于 MS2 招募 hAID 脱氨酶的 CRISPR-X 系统在哺乳动物细胞中突变了癌症治疗药物万珂(bortezomib)的靶标基因 *PSMB5*, 从中找到了引发 bortezomib 耐药性的已知和全新的突变^[21]。中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所李劲松实验室利用优化的 BE3 向小鼠“人造精子”中导入了一个靶向 *Dnd1* 基因的一个 sgRNA 慢病毒文库(含 77 个 sgRNA), 通过两轮的遗传筛选, 他们发现并验证 DND1 蛋白的 E59K、V60M、P76L 和 G82R 对 PGCs 的发育具有重要作用^[106]。该项研究是首次利用碱基编辑技术实现了个体水平蛋白质关键氨基酸功能位点的遗传筛选, 理论上可同样筛选人类疾病相关基因的功能位点。目前, 在植物中碱基编辑系统用于基因大规模突变并没有相关报道, 分析原因主要有 3 个方面: (1)由于组织培养产生的大量再生植物没有快速且高效的阳性筛选体系, 为鉴定突变体带来了很大的困扰; (2)缺乏高效的植物原生质体再生方法, 限制了突变类型的饱和度和; (3)将碱基编辑系统与多个 sgRNA 同时递送到植物细胞中是目前植物遗传转化的一大困难。因此, 在植物中利用碱基编辑系统实现蛋白功能定向进化是目前重要研究方向之一。

3 ABE 碱基编辑系统

3.1 ABE 系统的开发

2017 年, David R. Liu 实验室开创性地开发了

腺嘌呤碱基编辑系统(ABE),该系统由人工定向进化的腺嘌呤脱氨酶及 nCas9 组成,可实现 A 至 G (A-G) 或 T 至 C (T-C) 的替换^[107]。其作用原理与 CBE 系统类似,即腺嘌呤脱氨酶可将靶位点处一定范围的腺嘌呤(A)脱氨变为肌苷(I),肌苷在 DNA 水平会被当作鸟嘌呤(G)进行读码与复制,最终实现 A-G 的改变。ABE 的开发打破了之前碱基编辑系统仅能编辑 C 或 G 的限制,为碱基之间的相互转变提供了更多的可能性(图 1)。

由于目前已知的腺嘌呤脱氨酶不能以 DNA 为底物对碱基 A 进行脱氨,这导致 ABE 系统的开发比 CBE 系统更具有挑战性。David R. Liu 实验室最初也尝试将来自大肠杆菌 TadA、大鼠 ADA、人类 ADAR2 和人类 ADAT2 4 种腺嘌呤脱氨酶分别直接与 nCas9 融合,但均没有编辑活性,这表明必须将现有腺嘌呤脱氨酶进行定向改造,才有可能实现对碱基 A 的编辑^[107]。对此,该实验室选取大肠杆菌 TadA 为改造对象,将随机突变的 TadA 序列融合 dCas9 构建成随机突变文库,通过 ABE 恢复氯霉素、卡那霉素、壮观霉素等抗性基因的功能,结合易错 PCR、DNA 重排等定向进化策略,进行相应的抗生素筛选,先后经过 7 轮进化与改造后,成功筛选到了能直接作用于 ssDNA 的 ABE 系统。在人类细胞中建立了目前效率最高且应用最广的 ABE 版本 ABE7.10 (ecTadA-ecTadA*-nCas9)。ABE7.10 将 nCas9 与野生型腺嘌呤脱氨酶 ecTadA 和经过定向进化的腺嘌呤脱氨酶 ecTadA* (与野生型相比引入了 W23R、H36L、P48A、R51L、L84F、A106V、D108N、H123Y、S146C、D147Y、R152P、E155V、I156F 和 K157N 共 14 个位点的突变)二聚体相融合,在人类细胞中编辑效率约为 50%,编辑活性窗口可覆盖 sgRNA 的第 4~9 位^[107]。相比 CBE,ABE 不需要抑制烷基腺嘌呤 DNA 糖基化酶(alkyl adenine DNA glycosylase, AAG)的活性,这暗示着肌苷的损伤修复机制可能与 AAG 无关。

3.2 ABE 系统的优化

研究发现 ABE 无论在哺乳动物还是在植物等中的编辑,相比 CBE 系统可保证高精度的碱基替换和较低的 Indels 发生,因此科研人员对 ABE 系统

的优化主要表现在对碱基编辑效率的提高、扩大编辑活性窗口和碱基编辑范围方面^[12,13,15]。

对于碱基编辑效率的提高,本实验室率先通过优化密码子、调整腺嘌呤脱氨酶二聚体的位置 and NLS 的位置、增加 NLS 个数以及使用 3 种不同 sgRNA 形式等手段优化的 PABE-7 碱基编辑器相比原始的 ABE7.10 的编辑效率在小麦和水稻中提高了 1.1 倍^[108]。David R. Liu 实验室通过不同公司优化的密码子序列和增加 NLS 的个数而建立的 ABEmax 也提高了对碱基 A 的替换效率^[26]。另外,CP1012-ABEmax、CP1028-ABEmax、CP1041-ABEmax 和 CP1249-ABEmax 碱基编辑器在保证效率与 ABEmax 相当的情况下,可在一定程度上将 4~8 位的碱基编辑窗口拓展为 4~12 位^[25]。在扩大 PAM 选择范围方面,VQR-SpCas9 (PAM: NGA)、VRER-SpCas9 (PAM: NGCG)、VRQR-SpCas9 (PAM: NGA)、SaCas9 (PAM: NNGRRT)、SaKKH (PAM: NNNRRT)、ScCas9 (PAM: NNGN)、xCas9 (PAM: NG)和 SpCas9-NG (PAM: NG)的融合扩大了 ABE 在动植物基因组可编辑位点的范围^[25,30,74,109]。

3.3 ABE 系统的应用

ABE 系统的开发为创制更多的动植物突变体、治疗更多的点突引起的疾病以及创制优异的农作物性状等提供了更加全面有力的工具(表 3)。

在动物中,目前 ABE 系统已成功用于各种动物细胞系、人类胚胎、小鼠、大鼠、兔子和斑马鱼等中^[12,13,15,110]。ABE 可修改提前终止密码子突变,当靶向非编码链时可将编码链的 TAA、TAG 和 TGA 修改为 CAA、CAG 和 CGA (图 2C)。Jin-Soo Kim 实验室率先利用 ABE7.10 对小鼠 *Tyr* 基因引入了错义突变,并将 ABE7.10 包裹到双反式剪接的 AAV 病毒系统中,递送到 *Dmd* 小鼠模型中进行无义突变的校正,成功治疗了杜氏肌营养不良的小鼠疾病表型^[111]。上海科技大学黄行许实验室通过编辑 *AR* 和 *Hoxd13* 基因,建立了 ABE 介导的相关小鼠疾病模型,同时该研究使用不同的 Cas9 同源蛋白实现了 ABE 和 CBE 的同时编辑^[49]。另外,该实验室利用 ABEmax-NG 在动物细胞内实现了精准的 mRNA 剪接位点的编辑^[112]。Liang 等^[113]在小鼠中编辑了 *Tyr* 基因和 *Dmd*

基因的可变剪接位点,并在含有 *Dmd* 突变的小鼠中观察到了相应的杜氏肌营养不良的表型。Yang 等^[114]利用 ABE7.10 建立了由 *Fah* 突变引起的 I 型酪氨酸血症小鼠模型,并且该研究也证实 SaKKH-ABE 和 VQR-ABE 两种编辑器同样可在小鼠中产生有效的 A-G 的突变。在大鼠中, Yang 等^[114]和 Ma 等^[115]实现了大鼠基因的编辑,并且 Yang 等^[114]在被 ABE7.10 编辑的 *Gaa* D645G/ I646V F₁ 后代的大鼠多个组织中发现了充满糖原的大溶酶体异常积累,建立了庞贝氏症大鼠疾病模型。在兔子中, Liu 等^[62]利用 ABE7.10 高效地编辑了兔子中的 *Dmd*、*Otc* 和 *Sod1* 基因,并且 *Dmd* T279A 突变体表现出与人类家族性 X-连锁扩张型心肌病相似的典型临床症状。除了哺乳动物, Qin 等^[116]利用斑马鱼密码子优化的 zABE7.10 成功在斑马鱼 *musk*、*rps14*、*atp5b* 和 *wu:fc01d11* 中引入了突变,并且 *rps14* 突变体有着相应的表型,该实验室进一步将 zABE7.10max 成功用于斑马鱼基因的编辑。

在植物中, ABE 系统已成功被用于水稻、小麦、拟南芥和油菜(*Brassica campestris* L.)等相关基因突变体的创制及相应性状的创制(表 3)。中国科学院上海植物逆境生物学研究中心朱健康实验室利用 ABE-P1 (ABE7.10)和 ABE-P2 (ABEsA)编辑了水稻的 6 个基因,并在后续研究中实现了 ABE-P3 (VQR-ABE)、ABE-P4 (VRER-ABE)和 ABE-P5 (SaKKH-ABE)、ABE-NG 和 ABE-NG-S (只融合人工进化的 TadA 变体 TadA*)的进一步拓展,且在水稻中可同时实现 C-T 和 A-G 的同时编辑^[30,74,117]。Yan 等^[118]同样证明 ABE 在水稻中可高效工作。而本实验室利用经过多种元件优化后的 PABE-7 版本编辑了水稻和小麦的多个基因,并且获得了相应的小麦突变体和抗除草剂的水稻 *ACC* 基因突变材料^[108]。Jin-Soo Kim 实验室利用 RPS5A 启动子驱动 ABE,在双子叶拟南芥和油菜中实现了高效的编辑,并创制了拟南芥早花的 *ft* 突变体材料以及实现了油菜 *PDS* 基因 mRNA 的可变剪接^[119]。

4 碱基编辑系统的脱靶效应及改善策略

碱基编辑系统最重要的用途在于实现基因的碱

基替换,从而达到治疗疾病及作物改良的目的。因此,其编辑的特异性备受关注,也尤为重要。碱基编辑系统的脱靶分为 3 个方面(图 3):

第一、传统的可预测的脱靶。该类脱靶是指碱基编辑系统除了编辑靶位点以外,还可以编辑与靶位点相似性很高的其他位点,而这些位点往往与靶位点只有几个碱基的错配。这类的脱靶位点一般可用目前的软件预测(如 Cas-OFFinder、E-CRISP 和 CRISPR-P 等),后续结合分子生物学手段来判断是否存在脱靶效应。导致该类脱靶发生的原因主要有两方面:一是 sgRNA 序列的容错性,脱靶效应的高低与 sgRNA 和靶标 DNA 之间错配碱基的数目有关^[120,121];二是 Cas9 核酸酶自身的非特异性、脱氨酶与 Cas9 融合蛋白的高浓度及长时间持续表达都容易造成对非靶标位点的编辑。目前降低此类脱靶效应的策略主要有以下几种^[122]:(1) sgRNA 的修饰。利用缩短的 sgRNA (gX18 或 gX17)或延长的 sgRNA (gX20 或 ggX20)均可在保持 BE3 或 ABE 系统效率的前提下降低它们的脱靶效应^[120,121]; (2)使用高保真的 Cas9 核酸酶。利用工程化的 Cas9 变体可降低碱基编辑的脱靶情况。David R. Liu 实验室通过将 HF1-Cas9 与 BE3 融合,建立的 HF-BE3 可明显降低原始 BE3 对非靶标位点的编辑^[123]。Jin-Soo Kim 实验室通过将 Sniper Cas9 与 ABE 融合建立的 Sniper ABE7.10 对 ABE 系统的脱靶效应有明显的改善^[120]; (3)缩短脱氨酶与 Cas9 核酸酶融合蛋白在细胞中的作用时间。利用碱基编辑器与 sgRNA 形成的核糖核蛋白复合体(ribonucleoprotein, RNP)取代其 DNA 表达形式直接转化细胞,可以使碱基编辑器在细胞内快速降解,从而降低脱靶效应。研究表明,递送 BE3 RNP 和 ABE RNP 均可提高相应碱基编辑系统的特异性^[120,123]。

第二、全基因组范围内不可预测的脱靶。该类脱靶位点往往随机或有一定规律的分布在全基因组水平上,但通过目前的软件无法预测。体外优化的 Digenome-seq、EndoVIII 或 Endo V-seq 的脱靶评估手段并不能真实有效的反应体内环境下碱基编辑系统的特异性^[120,121,124]。由于脱氨酶需要结合在 ssDNA 处发挥作用,因此细胞内自身存在的 ssDNA、转录区域、复制区域等成为了碱基编辑系统在全基因组

水平的潜在脱靶对象。Lee 等^[125]发现在小鼠胚胎中

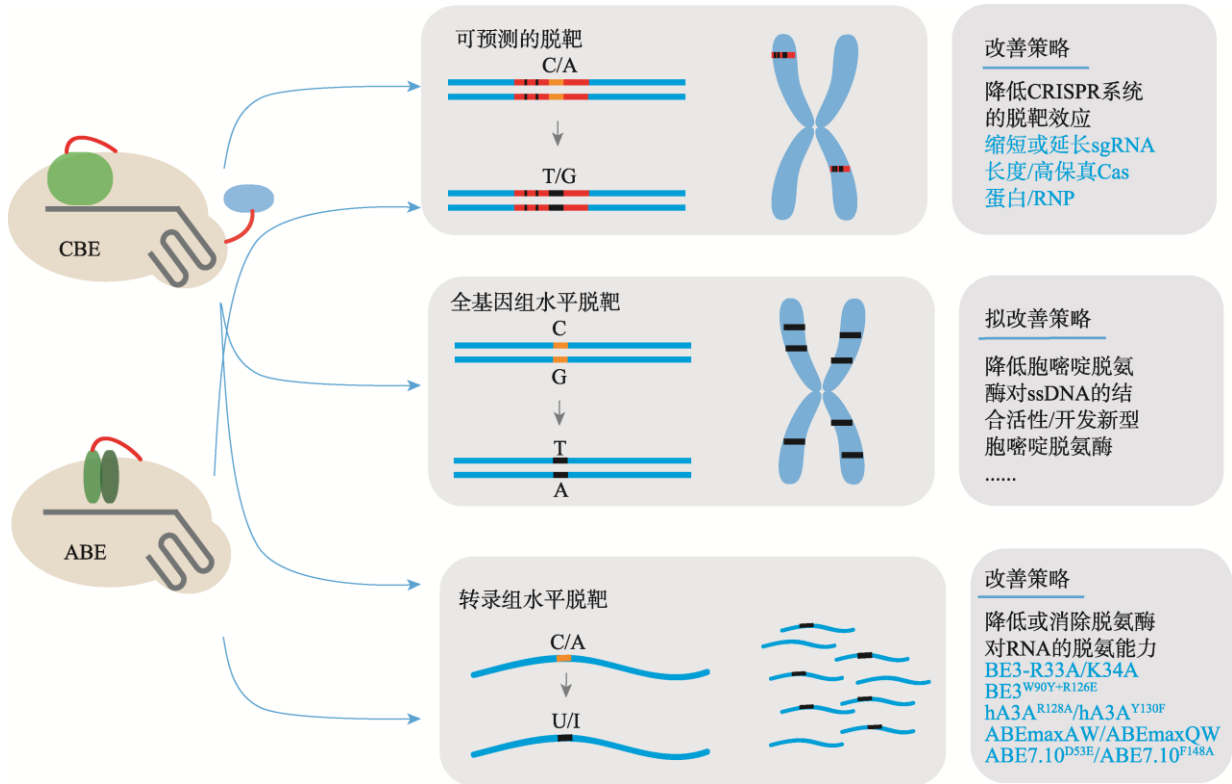


图 3 碱基编辑系统的脱靶效应及改善策略

Fig. 3 The off-target effects and improvement strategies of base editing systems

碱基编辑系统的脱靶效应分 3 个层次：传统的可预测的脱靶、全基因组水平的脱靶及转录组水平的脱靶。目前针对可预测的脱靶及转录组水平的脱靶已有较好的改善策略，而对于 CBE 系统在全基因组范围的脱靶只有初步的猜想。

BE3 在 sgRNA 前后 200 个碱基处的脱靶效应高于 ABE 系统。而在小鼠中，杨辉实验室利用建立的 GOT1 技术结合全基因组测序分析，发现 BE3 在小鼠体内能够引发比自发突变高 20 倍的 C-T 的单核苷酸变异(single nucleotide variations, SNVs)^[126]；同一时间，本实验室在植物中发现了类似的现象，即 BE3 和 HF1-BE3 能够引起水稻全基因组水平的 C-T SNVs 的增加^[127]，且这两项研究均表明这些 C-T SNVs 在染色体间均匀分布，但呈现出在转录活跃区富集的趋势^[126,127]。而对于融合其他类型胞嘧啶脱氨酶的 CBE 系统是否也存在该现象还需要进一步的评估。更早的研究发现，过表达不同胞嘧啶脱氨酶或 UGI 在酵母、大肠杆菌及人类细胞系中会导致基因组内 C-T SNVs 的增加^[128-130]。这些问题的发现一方面暗示着现阶段将碱基编辑系统于疾病治疗等精准改造方面有一定的风险，另一方面促使科研人员更深层

次的探索究竟是胞嘧啶脱氨酶、UGI 还是两个组分共同作用的结果造成了全基因组水平的脱靶，从而改进开发出更加精准安全的 CBE 系统。而相比之下，ABE 系统在全基因水平具有很高的特异性^[126,127]，这可能与 ABE 系统融合的腺嘌呤脱氨酶是经过人工定向进化以及 ABE 系统中并没有 UGI 组分有关。

第三、转录组水平的脱靶。无论是胞嘧啶脱氨酶还是腺嘌呤脱氨酶在之前的研究报道中都是能够作用于 RNA 或自身完全作用于 RNA 的脱氨酶，因此这就有可能导致碱基编辑系统在 RNA 水平产生脱靶。2019 年，Keith Joung 实验室通过转录组测序，率先证明了 BE3 和 ABE 系统在人类细胞系转录组水平存在严重的脱靶效应^[131]。其中，BE3 可在 38%~58% 的表达基因中以 0.07%~100% 的频率诱导成千上万的 C-U 的编辑；而 ABEmax 在 RNA 水平对碱基 A 的脱靶编辑也可高达 100%^[131]。随后，David R. Liu

实验室也证明 ABE 在哺乳动物细胞系中存在很低但能够检测到的 RNA 脱靶^[132]。杨辉实验室定量评价了 CBEs 和 ABEs 诱导的 RNA 单核苷酸变异, 结果发现胞嘧啶碱基编辑器 BE3 和腺嘌呤碱基编辑器 ABE7.10 都能产生成千上万的非靶向 RNA SNVs^[133]。对于碱基编辑系统在 RNA 水平的严重脱靶现象, 目前主要的解决方案是利用工程化的脱氨酶变体, 即一般通过改造脱氨酶与 RNA 的活性结合位点从而降低对 RNA 的编辑效率。依据此思路, Keith Joung 实验室开发的 BE3-R33A 和 BE3-R33A/K34A 的变体可将 BE3 对 RNA 的编辑分别降低 390 倍和 3800 倍。杨辉实验室开发的 BE3^{W90Y+R126E}、hA3A^{R128A} 和 hA3A^{Y130F} 可直接将 BE 脱靶降低到本底水平^[133]。对于 ABE 系统的改造, David R. Liu 实验室开发的 ABEmaxAW (TadA E59A, TadA* V106W) 和 ABEmaxQW (TadA E59Q, TadA* V106W) 可在保证一定 DNA 水平的编辑效率的同时, 降低其在 RNA 水平的编辑效率^[132]。而杨辉实验室也开发了两种 ABE 变体, ABE7.10^{D53E} 和 ABE7.10^{F148A}, 其中 ABE7.10^{F148A} 可直接消除 ABE 系统在转录组水平的脱靶效应^[133]。

总之, ABE 系统因其在 DNA 水平具有较高的特异性, 而在 RNA 水平的脱靶也有了很好的解决方案, 因此就目前研究结果来看 ABE 系统具有较高的安全性。而 CBE 系统在 DNA 水平的脱靶效应需要进一步的改善, 开发出更安全的 CBE 工具。

5 碱基编辑系统的发展前景

碱基编辑技术的开发为定向修正碱基突变和抑制基因组中的关键核苷酸变异提供了重要工具, 展现了其在遗传疾病治疗与动植物新品种培育等方面的重大应用价值。然而碱基编辑系统仍然存在一些不足之处。最为明显的是, CBE 及 ABE 系统只能实现嘧啶对嘧啶、嘌呤对嘌呤的改变, 即 C-T、T-C、G-A 和 A-G 的改变, 而不能实现碱基之间的颠换, 如 C-G、C-A、A-T 和 A-C 的转变。虽然目前有研究报道 CBE 系统可产生 C 至 G 或 A 的突变, 但其发生有很大的随机性并且效率很低。另外, 碱基编辑系统相比 HR 在全基因组及 RNA 水平的脱靶效应

更高, 安全性更低。受自身的编辑活性窗口及 PAM 的限制, 使碱基编辑系统在实际应用中并不能对所有的靶点都能有效编辑。因此, 碱基编辑系统在技术及应用层面等仍具有更深层次的开发潜力, 如新型碱基编辑系统的开发、全基因组水平的特异性的提高、碱基编辑材料递送形式的优化等。

(1) 开发新型碱基编辑系统。主要表现在碱基之间可进行颠换的碱基编辑系统的挖掘。以 C 变 G 为例, 目前已有关于其设计思路及相关专利的报道^[134]。当 C 被胞嘧啶脱氨酶脱氨之后会在 UDG 的作用下形成 AP 位点, 进而招募 TLS 聚合酶如 Rev1 等结合在此处进行修复, 该酶会在 AP 位点的对侧链偏向性的插入碱基 C, 留下一个可连接的缺口, 最终在 DNA 连接酶及 DNA 修复过程中实现 C-G 的改变。David R. Liu 实验室公开相关专利, 采用上述思路先后尝试了多种构建策略: rAPOBEC1-d/nCas9-UDG、rAPOBEC1-d/nCas9-UDG 变体 (UdgX、UdgX* 和 UdgX_On 等) 以及 rAPOBEC1-d/nCas9-UDG/(UDG 变体)+TLS 聚合酶 (Rev1、Kappa、Lota 和 Eta) 等, 经测试后发现只有胞嘧啶脱氨酶同时融合 UDG (或 UDG 变体) 和 TLS 聚合酶时编辑效果最佳, 但编辑效率并不理想。可能原因在于 UDG 只有在细胞处于 S 期才会将 U 切除形成 AP 位点, 并且 TLS 聚合酶必须在 ssDNA 缺口处才能复制。美国宾夕法尼亚大学科学家 Kiran S. Gajula 针对此问题提出了可能的改善策略, 即一方面可人工定向进化 Rev1, 理想的 Rev1 应具有 5' 至 3' 外切酶的活性, 同时具有自主打开缺口并牢牢结合在 AP 位点处的功能, 这样可大大增加其接触 ssDNA 的几率; 另一方面可融合 EvolvR 系统中的 enCas9 变体, 从而有可能提高 C-G 的效率^[134]。因而, 对于 C-G 及其他碱基之间相互转变的新型单碱基技术体系的开发需要不断的探索及优化。此外, 如何简单高效的实现 C-T 及 A-G 的同时编辑也值得探索。虽然目前在动植物中已有相关报道, 但均是采用直接融合不同 Cas9 变体的策略, 通过不同 Cas9 识别不同 PAM 的特点而实现。但该方案使用的表达载体过大, 编辑效率低且能靶向的位点局限性大。因此可尝试使用不同的适配体如 MS2、PP7 和 boxB 等招募不同的脱氨酶等方法, 快速而高效的实现不同碱基的同时突变。

(2)提高碱基编辑系统的特异性。主要表现为需要开发在全基因组范围具有更高特异性和更高安全性的 CBE 系统。具体的解决方案可尝试 YEE-BE3 等其他新近开发的 CBE 碱基编辑器,由于 YEE-BE3 与 DNA 的结合活性较弱,对降低全基因组水平的脱靶效应也许会有一定的帮助^[29];或者可人工进化脱氨酶找寻新的变体,在保证其正常编辑效率的同时能从本质上解决 CBE 在全基因组范围的脱靶。另外,可尝试优化胞嘧啶脱氨酶或 UGI 组分,如 Keith Joung 实验室在相关国际专利提出初步设想,即将胞嘧啶脱氨酶分割到两个载体中表达,一部分与 ZF 或 TALE 效应因子融合,另一部分与 nCas9 融合,只有当两部分同时靶向靶位点时,才能通过内含肽二聚化形成具有活性的胞嘧啶脱氨酶,从而有可能降低其在全基因组水平的脱靶风险。除了可改进脱氨酶组分之外,也可将 nCas9 组分替换为在全基因组水平更加特异的其他 Cas 蛋白,如 dSaCas9 或者 dCas12a。另外, RNP 相比 DNA 在细胞内更容易快速降解,因此猜测使用 CBE RNP 形式对降低 CBE 在全基因组脱靶会有一定的改善效果。

(3)碱基编辑材料的形式及递送方式方面。如何将碱基编辑材料有效且安全的递送到细胞内是目前碱基编辑系统需要继续改进及发展的重要方面。目前,碱基编辑系统介导的编辑材料包括质粒(DNA)、体外转录物(*in vitro* transcripts, IVTs)以及 RNP 3 种形式发挥作用。目前在动物相关研究中,这 3 种形式的碱基编辑均已成功报道,主要通过注射、电转、腺相关病毒(AAV)及阳离子脂质体介导的转化方法实现,其中以 mRNA 的形式居多^[12]。但如何缩小 BE 载体大小使其更容易装载入腺病毒载体、甚至开发出用于基因治疗的新型递送系统及可直接进行组织特异性的递送仍需进一步的探索。相比在哺乳动物细胞中的研究,碱基编辑材料的递送在植物中发展相对缓慢。对于质粒 DNA 介导的碱基编辑是目前最常用的形式,在植物中可通过基因枪轰击、农杆菌浸染及 PEG 介导的转化方法实现。但是当 DNA 整合到基因组中会带来因碱基编辑 DNA 元件持续表达导致的潜在脱靶效应的增加,且编辑的产品会引起公众的担忧。尽管本研究组采用瞬时表达碱基编辑系统的 DNA 方式可在一定程度上降低外源

DNA 的整合^[28,82,108],但不是根本的解决办法。以碱基编辑 IVTs 或 RNP 的形式作为基因组编辑材料可以更加有效避免外源 DNA 整合事件的发生,整个过程中不涉及任何外源 DNA,因而更有助于避免转基因的监管。本实验室率先利用 BE3 mRNA 形式在小麦中实现了 *TaALS* 基因的编辑^[83]。对于 RNPs 形式的编辑,同样是本实验室初步报道了 PEG 介导的转化方法在小麦原生质体中初步实现了 A3A-PBE-ΔUGI RNP 的编辑^[28],而对于 RNP 在植物个体中的碱基编辑并没有成功案例。因此,在植物中如何高效且安全地将碱基编辑 RNP 形式递送到植物细胞中从而获得 DNA-free 的突变植株,成为目前植物碱基编辑系统亟待解决的技术瓶颈。由于在植物遗传转化过程中对 RNP 递送数量及质量均有损失,因此需要摸索 RNP 各种遗传转化条件,如测试不同的纳米金颗粒包被 RNP 等。另外,可尝试一些新型基因组编辑材料递送方式,如磁纳米颗粒转化法、碳纳米管转化法、病毒载体转化法等。

总之,碱基编辑技术在人类疾病研究、动植物科学基础研究和育种等方面应用前景广阔,该技术的进一步优化及改造将推动农业生产,生物医药及生命科学等领域的快速发展。

致谢

感谢本实验室王延鹏青年研究员在图片制作和文章写作方面给予的帮助,感谢李超和靳帅博士研究生在文章写作方面给予的建议。

参考文献(References):

- [1] Li J, Zhang Y, Chen KL, Shan QW, Wang YP, Liang Z, Gao CX. CRISPR/Cas: a novel way of RNA-guided genome editing. *Hereditas (Beijing)*, 2013, 35(11): 1265–1273.
李君, 张毅, 陈坤玲, 单奇伟, 王延鹏, 梁振, 高彩霞. CRISPR/Cas 系统: RNA 靶向的基因组定向编辑新技术. *遗传*, 2013, 35(11): 1265–1273. [DOI]
- [2] Shan QW, Gao CX. Research progress of genome editing and derivative technologies in plants. *Hereditas (Beijing)*, 2015, 37(10): 953–973.
单奇伟, 高彩霞. 植物基因组编辑及衍生技术最新研

- 究进展. 遗传, 2015, 37(10): 953–973. [DOI]
- [3] Li DQ, Yang YP. Analysis on the international development trends of crop genome editing technology. *Sci Sin Vitae*, 2017, 49(2): 179–190.
李东巧, 杨艳萍. 作物基因组编辑技术国际发展态势分析. 中国科学: 生命科学, 2017, 49(2): 179–190. [DOI]
- [4] Zhang Y, Massel K, Godwin ID, Gao C. Applications and potential of genome editing in crop improvement. *Genome Biol*, 2018, 19(1): 210. [DOI]
- [5] Zhang F. Development of CRISPR-Cas systems for genome editing and beyond. *Q Rev Biophys*, 2019, 52, e6, 1–31, doi: 10.1017/S0033583519000052. [DOI]
- [6] Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 2012, 337(6096): 816–821. [DOI]
- [7] Jiao RJ, Gao CX. CRISPR/Cas9 can do anything? *Sci Sin Vitae*, 2017, 47(11): 1127–1129.
焦仁杰, 高彩霞. CRISPR/Cas9 无所不能? 中国科学: 生命科学, 2017, 47(11): 1127–1129. [DOI]
- [8] Symington LS, Gautier J. Double-strand break end resection and repair pathway choice. *Annu Rev Genet*, 2011, 45: 247–271. [DOI]
- [9] Landrum MJ, Lee JM, Benson M, Brown G, Chao C, Chitipiralla S, Gu B, Hart J, Hoffman D, Hoover J, Jang W, Katz K, Ovetsky M, Riley G, Sethi A, Tully R, Villamarin-Salomon R, Rubinstein W, Maglott DR. ClinVar: public archive of interpretations of clinically relevant variants. *Nucleic Acids Res*, 2016, 44(D1): D862–868. [DOI]
- [10] Zhao K, Tung CW, Eizenga GC, Wright MH, Ali ML, Price AH, Norton GJ, Islam MR, Reynolds A, Mezey J, McClung AM, Bustamante CD, McCouch SR. Genome-wide association mapping reveals a rich genetic architecture of complex traits in *Oryza sativa*. *Nat Commun*, 2011, 2: 467. [DOI]
- [11] Chen K, Wang Y, Zhang R, Zhang H, Gao, C. CRISPR/Cas genome editing and precision plant breeding in agriculture. *Annu Rev Plant Biol*, 2019, 70: 667–697. [DOI]
- [12] Rees HA, Liu DR. Base editing: precision chemistry on the genome and transcriptome of living cells. *Nat Rev Genet*, 2018, 19(12): 770–788. [DOI]
- [13] Molla KA, Yang Y. CRISPR/Cas-mediated base editing: technical considerations and practical applications. *Trends Biotechnol*, 2019, S0167-7799(19): 30053–30058. [DOI]
- [14] Wei Y, Zhang XH, Li DL. The "new favorite" of gene editing technology—single base editors. *Hereditas (Beijing)*, 2017, 39(12): 1115–1121.
魏瑜, 张晓辉, 李大力. 基因编辑之“新宠”—单碱基基因组编辑系统. 遗传, 2017, 39(12): 1115–1121. [DOI]
- [15] Yang B, Yang L, Chen J. Development and application of base editors. *CRISPR J*, 2019, 2: 91–104. [DOI]
- [16] Hess GT, Tycko J, Yao D, Bassik MC. Methods and applications of CRISPR-mediated base editing in eukaryotic genomes. *Mol Cell*, 2017, 68(1): 26–43. [DOI]
- [17] Liu JH, Liang PP, Shi G, Huang JJ. Research progress of base editing system. *World Sci-Tech R D*, 2017, 39(6): 457–462.
刘佳慧, 梁普平, 时光, 黄军就. 单碱基基因编辑系统的研究进展. 世界科技研究与发展, 2017, 39(6): 457–462. [DOI]
- [18] 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. [DOI]
- [19] 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. [DOI]
- [20] Hess GT, Fréard 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. [DOI]
- [21] Ma Y, Zhang J, Yin W, Zhang Z, Song Y, Chang X. Targeted AID-mediated mutagenesis (TAM) enables efficient genomic diversification in mammalian cells. *Nat Methods*, 2016, 13(12): 1029–1035. [DOI]
- [22] Yang L, Briggs AW, Chew WL, Mali P, Guell M, Aach J, Goodman DB, Cox D, Kan Y, Leshia E, Soundararajan V, Zhang F, Church G. Engineering and optimising deaminase fusions for genome editing. *Nat Commun*, 2016, 7: 13330. [DOI]
- [23] 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. [DOI]
- [24] Wang L, Xue W, Yan L, Li X, Wei J, Chen M, 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. [DOI]
- [25] Huang TP, Zhao KT, Miller SM, Gaudelli NM, Oakes BL, Fellmann C, Savage DF, Liu DR. Circularly permuted and PAM-modified Cas9 variants broaden the targeting scope of base editors. *Nat Biotechnol*, 2019, 37(6): 626–631. [DOI]

- [26] Koblan LW, Doman JL, Wilson C, Levy JM, Tay T, Newby GA, Maianti JP, Raguram A, Liu DR. Improving cytidine and adenine base editors by expression optimization and ancestral reconstruction. *Nat Biotechnol*, 2018, 36(9): 843–846. [DOI]
- [27] Zafra MP, Schatoff EM, Katti A, Foronda M, Breinig M, Schweitzer AY, Simon A, Han T, Goswami S, Montgomery E, Thibado J, Kastenhuber ER, Sánchez-Rivera FJ, Shi J, Vakoc CR, Lowe SW, Tschaharganeh DF, Dow LE. Optimized base editors enable efficient editing in cells, organoids and mice. *Nat Biotechnol*, 2018, 36(9): 888–893. [DOI]
- [28] Zong Y, Song Q, Li C, Jin S, Zhang D, Wang Y, Qiu JL, Gao C. Efficient C-to-T base editing in plants using a fusion of nCas9 and human APOBEC3A. *Nat Biotechnol*, 2018, 36(9): 950–953. [DOI]
- [29] 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. [DOI]
- [30] Hua K, Tao X, Zhu JK. Expanding the base editing scope in rice by using Cas9 variants. *Plant Biotechnol J*, 2018, 17(2): 499–504. [DOI]
- [31] Jakimo N, Chatterjee P, Nip L, Jacobson JM. A Cas9 with complete PAM recognition for adenine dinucleotides. *bioRxiv*, 2018, <http://dx.doi.org/10.1101/429654>. [DOI]
- [32] Li X, Wang Y, Liu Y, Yang B, Wang X, Wei J, Lu Z, Zhang Y, Wu J, Huang X, Yang L, Chen J. Base editing with a Cpf1-cytidine deaminase fusion. *Nat Biotechnol*, 2018, 36(4): 324–327. [DOI]
- [33] Kleinstiver BP, Sousa AA, Walton RT, Tak YE, Hsu JY, Clement K, Welch MM, Horng JE, Malagon-Lopez J, Scarfò I, Maus MV, Pinello L, Aryee MJ, Joung JK. Engineered CRISPR-Cas12a variants with increased activities and improved targeting ranges for gene, epigenetic and base editing. *Nat Biotechnol*, 2019, 37(3): 276–282. [DOI]
- [34] Hu JH, Miller SM, Geurts MH, Tang W, Chen L, Sun N, Zeina CM, Gao X, Rees HA, Lin Z, Liu DR. Evolved Cas9 variants with broad PAM compatibility and high DNA specificity. *Nature*, 2018, 556(7699): 57–63. [DOI]
- [35] Nishimasu H, Shi X, Ishiguro S, Gao L, Hirano S, Okazaki S, Noda T, Abudayyeh OO, Gootenberg JS, Mori H, Oura S, Holmes B, Tanaka M, Seki M, Hirano H, Aburatani H, Ishitani R, Ikawa M, Yachie N, Zhang F, Nureki O. Engineered CRISPR-Cas9 nuclease with expanded targeting space. *Science*, 2018, 361(6408): 1259–1262. [DOI]
- [36] Tan J, Zhang F, Karcher D, Bock R. Engineering of high-precision base editors for site-specific single nucleotide replacement. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 439. [DOI]
- [37] Jiang W, Feng S, Huang S, Yu W, Li G, Yang G, Liu Y, Zhang Y, Zhang L, Hou Y, Chen J, Huang X. BE-PLUS: a new base editing tool with broadened editing window and enhanced fidelity. *Cell Res*, 2018, 28(8): 855–861. [DOI]
- [38] Wang X, Li J, Wang Y, Yang B, Wei J, Wu J, Wang R, Huang X, Chen J, Yang L. Efficient base editing in methylated regions with a human APOBEC3A-Cas9 fusion. *Nat Biotechnol*, 2018, 36(10): 946–949. [DOI]
- [39] Liu LD, Huang M, Dai P, Liu T, Fan S, Cheng X, Zhao Y, Yeap LS, Meng FL. Intrinsic nucleotide preference of diversifying base editors guides antibody *ex vivo* affinity maturation. *Cell Rep*, 2018, 25(4): 884–892.e3. [DOI]
- [40] Ren B, Yan F, Kuang Y, Li N, Zhang D, Zhou X, Lin H, Zhou H. Improved base editor for efficiently inducing genetic variations in rice with CRISPR/Cas9-guided hyperactive hAID mutant. *Mol Plant*, 2018, 11(4): 623–626. [DOI]
- [41] Gehrke JM, Cervantes O, Clement MK, Wu Y, Zeng J, Bauer DE, Pinello L, Joung JK. An APOBEC3A-Cas9 base editor with minimized bystander and off-target activities. *Nat Biotechnol*, 2018, 36(10): 977–982. [DOI]
- [42] Liu Z, Chen S, Shan H, Chen M, Song Y, Lai L, Li Z. Highly precise base editing with CC context-specificity using engineered human APOBEC3G-nCas9 fusions. *bioRxiv*, 2019, <http://dx.doi.org/10.1101/658351>. [DOI]
- [43] Li Y, Ma S, Sun L, Zhang T, Chang J, Lu W, Chen X, Liu Y, Wang X, Shi R, Zhao P, Xia Q. Programmable single and multiplex base-editing in *Bombyx mori* using RNA-guided cytidine deaminases. *G3 (Bethesda)*, 2018, 8(5): 1701–1709. [DOI]
- [44] Li G, Liu Y, Zeng Y, Li J, Wang L, Yang G, Chen D, Shang X, Chen J, Huang X, Liu J. Highly efficient and precise base editing in discarded human triploid embryos. *Protein Cell*, 2017, 8(10): 776–779. [DOI]
- [45] Shevidi S, Uchida A, Schudrowitz N, Wessel GM, Yajima M. Single nucleotide editing without DNA cleavage using CRISPR/Cas9-deaminase in the *sea urchin* embryo. *Dev Dyn*, 2017, 246(12): 1036–1046. [DOI]
- [46] Chang YJ, Xu CL, Cui X, Bassuk AG, Mahajan VB, Tsai YT, Tsang SH. CRISPR base editing in induced pluripotent stem cells. *Methods Mol Biol*, 2019, doi: 10.1007/7651_2019_243. [DOI]
- [47] Huang L, Dong H, Zheng J, Wang B, Pan L. Highly efficient single base editing in *Aspergillus niger* with CRISPR/Cas9 cytidine deaminase fusion. *Microbiol Res*,

- 2019, 223–225: 44–50. [DOI]
- [48] Yang G, Zhu TY, Lu ZY, Li GL, Zhang H, Feng SJ, Liu YJ, Li JN, Zhang Y, Chen J, Guo XJ, Huang XX. Generation of isogenic single and multiplex gene knockout mice by base editing-induced STOP. *Sci Bull*, 2018, 63(17): 1101–1107. [DOI]
- [49] Liu Z, Lu Z, Yang G, Huang S, Li G, Feng S, Liu Y, Li J, Yu W, Zhang Y, Chen J, Sun Q, Huang X. Efficient generation of mouse models of human diseases via ABE- and BE-mediated base editing. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 2338. [DOI]
- [50] Tang J, Lee T, Sun T. Single-nucleotide editing: from principle, optimization to application. *Hum Mutat*, 2019, doi: 10.1002/humu.23819. [DOI]
- [51] 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. *Arterioscl Throm Vas*, 2017, 37(9): 1741–1747. [DOI]
- [52] Yang G, Zhou C, Wang R, Huang S, Wei Y, Yang X, Liu Y, Li J, Lu Z, Ying W, Li X, Jing N, Huang X, Yang H, Qiao Y. Base-editing-mediated R17H substitution in histone H3 reveals methylation-dependent regulation of Yap signaling and early mouse embryo development. *Cell Rep*, 2019, 26(2): 302–312.e4. [DOI]
- [53] Zeng Y, Li J, Li G, Huang S, Yu W, Zhang Y, Chen D, Chen J, Liu J, Huang X. Correction of the marfan syndrome pathogenic *FBNI* mutation by base editing in human cells and heterozygous embryos. *Mol Ther*, 2018, 26(11): 2631–2637. [DOI]
- [54] Liang P, Ding C, Sun H, Xie X, Xu Y, Zhang X, Sun Y, Xiong Y, Ma W, Liu Y, Wang Y, Fang J, Liu D, Songyang Z, Zhou C, Huang J. Correction of β -thalassemia mutant by base editor in human embryos. *Protein Cell*, 2017, 8(11): 811–822. [DOI]
- [55] Zhang M, Zhou C, Wei Y, Xu C, Pan H, Ying W, Sun Y, Sun Y, Xiao Q, Yao N, Zhong W, Li Y, Wu K, Yuan G, Mitalipov S, Chen ZJ, Yang H. Human cleaving embryos enable robust homozygotic nucleotide substitutions by base editors. *Genome Biol*, 2019, 20(1): 101. [DOI]
- [56] Zhang H, Pan H, Zhou C, Wei Y, Ying W, Li S, Wang G, Li C, Ren Y, Li G, Ding X, Sun Y, Li GL, Song L, Li Y, Yang H, Liu Z. Simultaneous zygotic inactivation of multiple genes in mouse through CRISPR/Cas9-mediated base editing. *Development*, 2018, 145(20): dev168906. [DOI]
- [57] Kim K, Ryu SM, Kim ST, Baek G, Kim D, Lim K, Chung E, Kim S, Kim JS. Highly efficient RNA-guided base editing in mouse embryos. *Nat Biotechnol*, 2017, 35(5): 435–437. [DOI]
- [58] Liang P, Sun H, Sun Y, Zhang X, Xie X, Zhang J, Zhang Z, Chen Y, Ding C, Xiong Y, Ma W, Liu D, Huang J, Songyang Z. Effective gene editing by high-fidelity base editor 2 in mouse zygotes. *Protein Cell*, 2017, 8(8): 601–611. [DOI]
- [59] Sasaguri H, Nagata K, Sekiguchi M, Fujioka R, Matsuba Y, Hashimoto S, Sato K, Kurup D, Yokota T, Saido TC. Introduction of pathogenic mutations into the mouse *Psen1* gene by base editor and Target-AID. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 2892. [DOI]
- [60] Villiger L, Grisch-Chan HM, Lindsay H, Ringnald F, Pogliano CB, Allegrì G, Fingerhut R, Häberle J, Matos J, Robinson MD, Thöny B, Schwank G. Treatment of a metabolic liver disease by *in vivo* genome base editing in adult mice. *Nat Med*, 2018, 24(10): 1519–1525. [DOI]
- [61] Li J, Liu Z, Huang S, Wang X, Li G, Xu Y, Yu W, Chen S, Zhang Y, Ma H, Ke Z, Chen J, Sun Q, Huang X. Efficient base editing in G/C-rich regions to model androgen insensitivity syndrome. *Cell Res*, 2019, 29(2): 174–176. [DOI]
- [62] Liu Z, Chen M, Chen S, Deng J, Song Y, Lai L, Li Z. Highly efficient RNA-guided base editing in rabbit. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 2717. [DOI]
- [63] Liu Z, Chen M, Shan H, Chen S, Xu Y, Song Y, Zhang Q, Yuan H, Ouyang H, Li Z, Lai L. Expanded targeting scope and enhanced base editing efficiency in rabbit using optimized xCas9(3.7). *Cell Mol Life Sci*, 2019, doi: 10.1007/s00018-019-03110-8. [DOI]
- [64] Liu Z, Chen S, Shan H, Zhang Q, Chen M, Lai L, Li Z. Efficient and precise base editing in rabbits using human APOBEC3A-nCas9 fusions. *Cell Discov*, 2019, 5: 31. [DOI]
- [65] Liu Z, Shan H, Chen S, Chen M, Zhang Q, Lai L, Li Z. Improved base editor for efficient editing in GC contexts in rabbits with an optimized AID-Cas9 fusion. *FASEB J*, 2019, doi: 10.1096/fj.201900476RR. [DOI]
- [66] Li Z, Duan X, An X, Feng T, Li P, Li L, Liu J, Wu P, Pan D, Du X, Wu S. Efficient RNA-guided base editing for disease modeling in pigs. *Cell Discov*, 2018, 4: 64. [DOI]
- [67] Xie J, Ge W, Li N, Liu Q, Chen F, Yang X, Huang X, Ouyang Z, Zhang Q, Zhao Y, Liu Z, Gou S, Wu H, Lai C, Fan N, Jin Q, Shi H, Liang Y, Lan T, Quan L, Li X, Wang K, Lai L. Efficient base editing for multiple genes and loci in pigs using base editors. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 2852. [DOI]
- [68] Zhou S, Cai B, He C, Wang Y, Ding Q, Liu J, Liu Y, Ding Y, Zhao X, Li G, Li C, Yu H, Kou Q, Niu W, Petersen B, Sonstegard T, Ma B, Chen Y, Wang X.

- Programmable base editing of the sheep genome revealed no genome-wide off-target mutations. *Front Genet*, 2019, 10: 215. [DOI]
- [69] Li G, Zhou S, Li C, Cai B, Yu H, Ma B, Huang Y, Ding Y, Liu Y, Ding Q, He C, Zhou J, Wang Y, Zhou G, Li Y, Yan Y, Hua J, Petersen B, Jiang Y, Sonstegard T, Huang X, Chen Y, Wang X. Base pair editing in goat: nonsense codon introgression into *FGF5* results in longer hair. *FEBS J*, 2019, doi: 10.1111/febs.14983. [DOI]
- [70] Zhang Y, Qin W, Lu X, Xu J, Huang H, Bai H, Li S, Lin S. Programmable base editing of zebrafish genome using a modified CRISPR-Cas9 system. *Nat Commun*, 2017, 8(1): 118. [DOI]
- [71] Tanaka S, Yoshioka S, Nishida K, Hosokawa H, Kakizuka A, Maegawa S. *In vivo* targeted single-nucleotide editing in zebrafish. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 11423. [DOI]
- [72] Park DS, Yoon M, Kweon J, Jang AH, Kim Y, Choi SC. Targeted base editing via RNA-guided cytidine deaminases in *Xenopus laevis* embryos. *Mol Cells*, 2017, 40(11): 823–827. [DOI]
- [73] Shi Z, Xin H, Tian D, Lian J, Wang J, Liu G, Ran R, Shi S, Zhang Z, Shi Y, Deng Y, Hou C, Chen Y. Modeling human point mutation diseases in *Xenopus tropicalis* with a modified CRISPR/Cas9 system. *FASEB J*, 2019, 33(6): 6962–6968. [DOI]
- [74] Hua K, Tao X, Han P, Wang R, Zhu JK. Genome engineering in rice using Cas9 variants that recognize NG PAM sequences. *Mol Plant*, 2019, 12(7): 1003–1014. [DOI]
- [75] Li J, Sun Y, Du J, Zhao Y, Xia L. Generation of targeted point mutations in rice by a modified CRISPR/Cas9 system. *Mol Plant*, 2017, 10(3): 526–529. [DOI]
- [76] Lu Y, Zhu JK. Precise editing of a target base in the rice genome using a modified CRISPR/Cas9 system. *Mol Plant*, 2017, 10(3): 523–525. [DOI]
- [77] Ren B, Liu L, Li S, Kuang Y, Wang J, Zhang D, Zhou X, Lin H, Zhou H. Cas9-NG greatly expands the targeting scope of the genome-editing toolkit by recognizing NG and other atypical PAMs in rice. *Mol Plant*, 2019, 12(7): 1015–1026. [DOI]
- [78] Zhong Z, Sretenovic S, Ren Q, Yang L, Bao Y, Qi C, Yuan M, He Y, Liu S, Liu X, Wang J, Huang L, Wang Y, Baby D, Wang D, Zhang T, Qi Y, Zhang Y. Improving plant genome editing with high-fidelity xCas9 and non-canonical PAM-targeting Cas9-NG. *Mol Plant*, 2019, 12(7): 1027–1036. [DOI]
- [79] Qin R, Li J, Li H, Zhang Y, Liu X, Miao Y, Zhang X, Wei P. Developing a highly efficient and wildly adaptive CRISPR-SaCas9 toolset for plant genome editing. *Plant Biotechnol J*, 2018, 17(4): 706–708. [DOI]
- [80] Tang X, Ren Q, Yang L, Bao Y, Zhong Z, He Y, Liu S, Qi C, Liu B, Wang Y, Sretenovic S, Zhang Y, Zheng X, Zhang T, Qi Y, Zhang Y. Single transcript unit CRISPR 2.0 systems for robust Cas9 and Cas12a mediated plant genome editing. *Plant Biotechnol J*, 2019, 17(7): 1431–1445. [DOI]
- [81] Ren B, Yan F, Kuang Y, Li N, Zhang D, Lin H, Zhou H. A CRISPR/Cas9 toolkit for efficient targeted base editing to induce genetic variations in rice. *Sci China Life Sci*, 2017, 60(5): 516–519. [DOI]
- [82] Zong Y, Wang Y, Li C, Zhang R, Chen K, Ran Y, Qiu JL, Wang D, Gao C. Precise base editing in rice, wheat and maize with a Cas9-cytidine deaminase fusion. *Nat Biotechnol*, 2017, 35(5): 438–440. [DOI]
- [83] Zhang R, Liu J, Chai Z, Chen S, Bai Y, Zong Y, Chen K, Li J, Jiang L, Gao C. Generation of herbicide tolerance traits and a new selectable marker in wheat using base editing. *Nat Plants*, 2019, 5(5): 480–485. [DOI]
- [84] Chen Y, Wang Z, Ni H, Xu Y, Chen Q, Jiang L. CRISPR/Cas9-mediated base-editing system efficiently generates gain-of-function mutations in *Arabidopsis*. *Sci China Life Sci*, 2017, 60(5): 520–523. [DOI]
- [85] Tian S, Jiang L, Guo S, Li M, Zhang H, Ren Y, Gong G, Zong M, Liu F, Chen Q, Xu Y. Engineering herbicide-resistant watermelon variety through CRISPR/Cas9-mediated base-editing. *Plant Cell Rep*, 2018, 37(9): 1353–1356. [DOI]
- [86] Qin L, Li J, Wang Q, Xu Z, Sun L, Alariqi M, Manghwar H, Wang G, Li B, Ding X, Rui H, Huang H, Lu T, Lindsey K, Daniell H, Zhang X, Jin S. High-efficient and precise base editing of C•G to T•A in the allotetraploid cotton (*Gossypium hirsutum*) genome using a modified CRISPR/Cas9 system. *Plant Biotechnol J*, 2019, doi: 10.1111/pbi.13168. [DOI]
- [87] Shimatani Z, Kashojiya S, Takayama M, Terada R, Arazoe T, Ishii H, Teramura H, Yamamoto T, Komatsu H, Miura K, Ezura H, Nishida K, Ariizumi T, Kondo A. Targeted base editing in rice and tomato using a CRISPR-Cas9 cytidine deaminase fusion. *Nat Biotechnol*, 2017, 35(5): 441–443. [DOI]
- [88] Shimatani Z, Fujikura U, Ishii H, Terada R, Nishida K, Kondo A. Herbicide tolerance-assisted multiplex targeted nucleotide substitution in rice. *Data Brief*, 2018, 20: 1325–1331. [DOI]
- [89] Wu Y, Xu W, Wang F, Zhao S, Feng F, Song J, Zhang C, Yang J. Increasing cytosine base editing scope and efficiency with engineered Cas9-pmCDA1 fusions and

- the modified sgRNA in rice. *Front Genet*, 2019, 10: 379. [DOI]
- [90] Veillet F, Perrot L, Chauvin L, Kermarrec MP, Guyon-Debast A, Chauvin JE, Nogu   F, Mazier M. Transgene-free genome editing in tomato and potato plants using *agrobacterium*-mediated delivery of a CRISPR/Cas9 cytidine base editor. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(2): E402. [DOI]
- [91] Bastet A, Zafirov D, Giovinazzo N, Guyon-Debast A, Nogu   F, Robaglia C, Gallois JL. Mimicking natural polymorphism in *elF4E* by CRISPR-Cas9 base editing is associated with resistance to potyviruses. *Plant Biotechnol J*, 2019, 17(9): 1736–1750. [DOI]
- [92] Endo M, Mikami M, Endo A, Kaya H, Itoh T, Nishimasu H, Nureki O, Toki S. Genome editing in plants by engineered CRISPR-Cas9 recognizing NG PAM. *Nat Plants*, 2019, 5(1): 14–17. [DOI]
- [93] Banno S, Nishida K, Arazoe T, Mitsunobu H, Kondo A. Deaminase-mediated multiplex genome editing in *Escherichia coli*. *Nat Microbiol*, 2018, 3(4): 423–429. [DOI]
- [94] Zheng K, Wang Y, Li N, Jiang FF, Wu CX, Liu F, Chen HC, Liu ZF. Highly efficient base editing in bacteria using a Cas9-cytidine deaminase fusion. *Commun Biol*, 2018, 1: 32. [DOI]
- [95] Gu T, Zhao S, Pi Y, Chen W, Chen C, Liu Q, Li M, Han D, Ji Q. Highly efficient base editing in *Staphylococcus aureus* using an engineered CRISPR RNA-guided cytidine deaminase. *Chem Sci*, 2018, 9(12): 3248–3253. [DOI]
- [96] Chen W, Zhang Y, Zhang Y, Pi Y, Gu T, Song L, Wang Y, Ji Q. CRISPR/Cas9-based genome editing in *Pseudomonas aeruginosa* and cytidine deaminase-mediated base editing in *Pseudomonas* species. *iScience*, 2018, 6: 222–231. [DOI]
- [97] Wang Y, Wang S, Chen W, Song L, Zhang Y, Shen Z, Yu F, Li M, Ji Q. CRISPR-Cas9 and CRISPR-assisted cytidine deaminase enable precise and efficient genome editing in *Klebsiella pneumoniae*. *Appl Environ Microb*, 2018, 84(23): e01834–18. [DOI]
- [98] Kescu C, Parlak M, Tufan T, Yang J, Szlachta K, Wei X, Mammadov R, Adli M. CRISPR-STOP: gene silencing through base-editing-induced nonsense mutations. *Nat Methods*, 2017, 14(7): 710–712. [DOI]
- [99] 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.e4. [DOI]
- [100] Jia K, Lu Z, Zhou F, Xiong Z, Zhang R, Liu Z, Ma Y, He L, Li C, Zhu Z, Pan D, Lian Z. Multiple sgRNAs facilitate base editing-mediated i-stop to induce complete and precise gene disruption. *Protein Cell*, 2019, doi: 10.1007/s13238-019-0611-6. [DOI]
- [101] Zhang S, Samocha KE, Rivas MA, Karczewski KJ, Daly E, Schmandt B, Neale BM, MacArthur DG, Daly MJ. Base-specific mutational intolerance near splice sites clarifies the role of nonessential splice nucleotides. *Genome Res*, 2018, 28(7): 968–974. [DOI]
- [102] Gapinske M, Luu A, Winter J, Woods WS, Kostan KA, Shiva N, Song JS, Perez-Pinera P. CRISPR-SKIP: programmable gene splicing with single base editors. *Genome Biol*, 2018, 19(1): 107. [DOI]
- [103] Yuan J, Ma Y, Huang T, Chen Y, Peng Y, Li B, Li J, Zhang Y, Song B, Sun X, Ding Q, Song Y, Chang X. Genetic modulation of RNA splicing with a CRISPR-guided cytidine deaminase. *Mol Cell*, 2018, 72(2): 380–394.e7. [DOI]
- [104] Xue C, Zhang H, Lin Q, Fan R, Gao C. Manipulating mRNA splicing by base editing in plants. *Sci China Life Sci*, 2018, 61(11): 1293–1300. [DOI]
- [105] Li Z, Xiong X, Wang F, Liang J, Li JF. Gene disruption through base editing-induced messenger mRNA missplicing in plants. *New Phytol*, 2018, 222(2): 1139–1148. [DOI]
- [106] Li Q, Li Y, Yang S, Huang S, Yan M, Ding Y, Tang W, Lou X, Yin Q, Sun Z, Lu L, Shi H, Wang H, Chen Y, Li J. CRISPR-Cas9-mediated base-editing screening in mice identifies DND1 amino acids that are critical for primordial germ cell development. *Nat Cell Biol*, 2018, 20(11): 1315–1325. [DOI]
- [107] Gaudelli NM, Komor AC, Rees HA, Packer MS, Badran AH, Bryson DI, Liu DR. Programmable base editing of A•T to G•C in genomic DNA without DNA cleavage. *Nature*, 2017, 551(7681): 464–471. [DOI]
- [108] Li C, Zong Y, Wang Y, Jin S, Zhang D, Song Q, Zhang R, Gao C. Expanded base editing in rice and wheat using a Cas9-adenosine deaminase fusion. *Genome Biol*, 2018, 19(1): 59. [DOI]
- [109] Chatterjee P, Jakimo N, Jacobson JM. Minimal PAM specificity of a highly similar SpCas9 ortholog. *Sci Adv*, 2018, 4(10): eaau0766. [DOI]
- [110] Li G, Liu X, Huang S, Zeng Y, Yang G, Lu Z, Zhang Y, Ma X, Wang L, Huang X, Liu J. Efficient generation of pathogenic A-to-G mutations in human triprenuclear embryos via ABE-mediated base editing. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2019, 17: 289–296. [DOI]
- [111] Ryu SM, Koo T, Kim K, Lim K, Baek G, Kim ST, Kim HS, Kim DE, Lee H, Chung E, Kim JS. Adenine base editing in mouse embryos and an adult mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Nat Biotechnol*, 2018,

- 36(6): 536–539. [DOI]
- [112] Huang S, Liao Z, Li X, Liu Z, Li G, Li J, Lu Z, Zhang Y, Li X, Ma X, Sun Q, Huang X. Developing ABEmax-NG with precise targeting and expanded editing scope to model pathogenic splice site mutations *in vivo*. *iScience*, 2019, 15: 640–648. [DOI]
- [113] Liang P, Sun H, Zhang X, Xie X, Zhang J, Bai Y, Ouyang X, Zhi S, Xiong Y, Ma W, Liu D, Huang J, Songyang Z. Effective and precise adenine base editing in mouse zygotes. *Protein Cell*, 2018, 9(9): 808–813. [DOI]
- [114] Yang L, Zhang X, Wang L, Yin S, Zhu B, Xie L, Duan Q, Hu H, Zheng R, Wei Y, Peng L, Han H, Zhang J, Qiu W, Geng H, Siwko S, Zhang X, Liu M, Li D. Increasing targeting scope of adenosine base editors in mouse and rat embryos through fusion of TadA deaminase with Cas9 variants. *Protein Cell*, 2018, 9(9): 814–819. [DOI]
- [115] Ma Y, Yu L, Zhang X, Xin C, Huang S, Bai L, Chen W, Gao R, Li J, Pan S, Qi X, Huang X, Zhang L. Highly efficient and precise base editing by engineered dCas9-guide tRNA adenosine deaminase in rats. *Cell Discov*, 2018, 4: 39. [DOI]
- [116] Qin W, Lu X, Liu Y, Bai H, Li S, Lin S. Precise A•T to G•C base editing in the zebrafish genome. *BMC Biol*, 2018, 16(1): 139. [DOI]
- [117] Hua K, Tao X, Yuan F, Wang D, Zhu JK. Precise A•T to G•C base editing in the rice genome. *Mol Plant*, 2018, 11(4): 627–630. [DOI]
- [118] Yan F, Kuang Y, Ren B, Wang J, Zhang D, Lin H, Yang B, Zhou X, Zhou H. Highly efficient A•T to G•C base editing by Cas9n-guided tRNA adenosine deaminase in rice. *Mol Plant*, 2018, 11(4): 631–634. [DOI]
- [119] Kang BC, Yun JY, Kim ST, Shin Y, Ryu J, Choi M, Woo JW, Kim JS. Precision genome engineering through adenine base editing in plants. *Nat Plants*, 2018, 4(7): 427–431. [DOI]
- [120] Kim D, Kim DE, Lee G, Cho SI, Kim JS. Genome-wide target specificity of CRISPR RNA-guided adenine base editors. *Nat Biotechnol*, 2019, 37(4): 430–435. [DOI]
- [121] Kim D, Lim K, Kim ST, Yoon SH, Kim K, Ryu SM, Kim JS. Genome-wide target specificities of CRISPR RNA-guided programmable deaminases. *Nat Biotechnol*, 2017, 35(5): 475–480. [DOI]
- [122] Kim D, Luk K, Wolfe SA, Kim JS. Evaluating and enhancing target specificity of gene-editing nucleases and deaminases. *Annu Rev Biochem*, 2019, 88: 191–220. [DOI]
- [123] Rees HA, Komor AC, Yeh WH, Caetano-Lopes J, Warman M, Edge ASB, Liu DR. Improving the DNA specificity and applicability of base editing through protein engineering and protein delivery. *Nat Commun*, 2017, 8: 15790. [DOI]
- [124] Liang P, Xie X, Zhi S, Sun H, Zhang X, Chen Y, Chen Y, Xiong Y, Ma W, Liu D, Huang J, Songyang Z. Genome-wide profiling of adenine base editor specificity by EndoV-seq. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 67. [DOI]
- [125] Lee HK, Willi M, Miller SM, Kim S, Liu C, Liu DR, Hennighausen L. Targeting fidelity of adenine and cytosine base editors in mouse embryos. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 4804. [DOI]
- [126] Zuo E, Sun Y, Wei W, Yuan T, Ying W, Sun H, Yuan L, Steinmetz LM, Li Y, Yang H. Cytosine base editor generates substantial off-target single-nucleotide variants in mouse embryos. *Science*, 2019, 364(6437): 289–292. [DOI]
- [127] Jin S, Zong Y, Gao Q, Zhu Z, Wang Y, Qin P, Liang C, Wang D, Qiu JL, Zhang F, Gao C. Cytosine, but not adenine, base editors induce genome-wide off-target mutations in rice. *Science*, 2019, 364(6437): 292–295. [DOI]
- [128] Petersen-Mahrt SK, Harris RS, Neuberger MS. AID mutates *E. coli* suggesting a DNA deamination mechanism for antibody diversification. *Nature*, 2002, 418(6893): 99–103. [DOI]
- [129] Rogozin IB, Iyer LM, Liang L, Glazko GV, Liston VG, Pavlov YI, Aravind L, Pancer Z. Evolution and diversification of lamprey antigen receptors: evidence for involvement of an AID-APOBEC family cytosine deaminase. *Nat Immunol*, 2007, 8(6): 647–656. [DOI]
- [130] Burns MB, Lackey L, Carpenter MA, Rathore A, Land AM, Leonard B, Refsland EW, Kotandeniya D, Tretyakova N, Nikas JB, Yee D, Temiz NA, Donohue DE, McDougale RM, Brown WL, Law EK, Harris RS. APOBEC3B is an enzymatic source of mutation in breast cancer. *Nature*, 2013, 494(7437): 366–370. [DOI]
- [131] Grünewald J, Zhou R, Garcia SP, Iyer S, Lareau CA, Aryee MJ, Joung JK. Transcriptome-wide off-target RNA editing induced by CRISPR-guided DNA base editors. *Nature*, 2019, 569(7756): 433–437. [DOI]
- [132] Rees HA, Wilson C, Doman JL, Liu DR. Analysis and minimization of cellular RNA editing by DNA adenine base editors. *Sci Adv*, 2019, 5(5): eaax5717. [DOI]
- [133] Zhou C, Sun Y, Yan R, Liu Y, Zuo E, Gu C, Han L, Wei Y, Hu X, Zeng R, Li Y, Zhou H, Guo F, Yang H. Off-target RNA mutation induced by DNA base editing and its elimination by mutagenesis. *Nature*, 2019, 571(7764): 275–278. [DOI]
- [134] Gajula KS. Designing an elusive C•G→G•C CRISPR

base editor. *Trends Biochem Sci*, 2018, 44(2): 91–94. [\[DOI\]](#)

(责任编辑: 张博)