

综述

碱基编辑器的研发及其应用

刘旭 仲祉霖 钟涛*

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

摘要 基因编辑技术可以通过靶向插入、敲除或替换的方法来改变或者修复目的基因。基于规律成簇间隔短回文重复序列(clustered regularly interspaced short palindromic repeat, CRISPR)及其相关蛋白(CRISPR-associated, Cas)开发出的单碱基编辑器(base editor, BE)是一类不依赖于DNA双链断裂便可以实现高效单碱基替换的新一代基因编辑工具, 包括胞嘧啶碱基编辑器(CBE)、腺嘌呤碱基编辑器(ABE)以及腺嘌呤胞嘧啶双碱基编辑器(A&CBE)等。碱基编辑器经过一系列的优化和改进有望为点突变型遗传病患者提供可行的临床治疗新手段。同时, 基于锌指(zinc-finger, ZF)、转录激活样效应因子(transcription activator-like effector, TALE)结构开发出的线粒体碱基编辑器填补了线粒体基因编辑的空白。该文对各类碱基编辑器的研发、优化及分类进行了概述, 并总结了利用碱基编辑器在模式动物小鼠(*Mus musculus*)和斑马鱼(*Danio rerio*)中模拟人类点突变遗传病并进行基因修正编辑的进展, 以及碱基编辑工具在植物育种等方面的研究现状。

关键词 胞嘧啶碱基编辑器; 腺嘌呤碱基编辑器; 小鼠; 斑马鱼; 植物; 疾病模型; 线粒体编辑; RNA编辑

Development and Application of Gene Base Editors

LIU Xu, ZHONG Zhilin, ZHONG P.Tao*

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

Abstract Gene editing technology can modify or repair target genes by targeted insertion, knockout or replacement. The BE (base editor) developed by CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeat) and Cas (CRISPR-associated) is a new generation of gene editing tools that has achieved efficient single base substitution without DNA double strand breaks, including CBE (cytosine base editor), ABE (adenine base editor), A&CBE (adenine and cytosine base editor). After a series of optimization and improvement, the base editors are expected to provide a feasible new means of clinical treatment for patients with point-mutation genetic diseases. At the same time, the mitochondrial base editor based on ZF (zinc-finger) and TALE (transcription activator-like effector) structure fills the blank of mitochondrial gene editing. Here, this study mainly overviews the development, optimization and classification of base editors, and summarizes the research progress of using base editors to model human point-mutation diseases and gene correction editing in mice, zebrafish and the plants breeding.

Keywords cytosine base editor; adenine base editor; mouse; zebrafish; plant; disease model; mitochondrial base editing; RNA editing

收稿日期: 2022-06-08

接受日期: 2022-08-23

国家科技计划项目重点专项(批准号: 2018YFA0800103、2018YFA0801004)和国家自然科学基金(批准号: 31970780、31530044)资助的课题

*通讯作者。Tel: 021-54345021, E-mail: tzhong@bio.ecnu.edu.cn

Received: June 8, 2022 Accepted: August 23, 2022

This work was supported by the Ministry of Science and Technology of China (Grant No.2018YFA0800103, 2018YFA0801004) and the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31970780, 31530044)

*Corresponding author. Tel: +86-21-54345021, E-mail: tzhong@bio.ecnu.edu.cn

点突变是引起人类遗传病的主要原因之一,其中GC突变为AT以及TA突变到CG这两种点突变是主要的人类致病点突变类型,在所有点突变类型中分别占比48%和14%^[1],而基因编辑技术是目前最有希望治疗此类遗传病的手段。基因编辑经过了锌指核酸酶(zinc-finger nuclease, ZFN)、转录激活样效应因子核酸酶(transcription activator-like effector nuclease, TALEN)和CRISPR/Cas系统三大类工具的技术革新后功能愈发完善。基于CRISPR/Cas系统开发的最新基因编辑工具——单碱基编辑器自问世以来,凭借高效、便捷、应用范围广等优势逐渐成为基因编辑领域的新宠。小鼠与人类同属哺乳纲,与人有很近的亲缘关系,其被用以构建动物点突变遗传病模型,可以很好地评估基因编辑技术在基因治疗方面的效果。同时,斑马鱼作为一种优良的模式动物,具有繁殖快、数量多、发育过程可视化等优点。用基因编辑工具构建特定基因点突变的斑马鱼可以用来模拟大量人类单基因遗传病表型。充分利用这两种模式动物的各自优势进行基因编辑的研究,不仅可以加快单碱基编辑器的优化进程,而且有助于推动疾病的病理研究和药物的筛选开发,为单碱基突变遗传病的临床治疗提供更多可能。同时,单碱基编辑器在农业育种方面的应用,更是进一步发掘了该技术的应用价值。

1 CRISPR/Cas9系统的发现及其作为基因编辑工具的早期应用

CRISPR/Cas系统是细菌和古生菌为抵御外源DNA侵染而进化形成的一种适应性免疫系统。该系统由规律成簇间隔短回文重复序列(clustered regularly interspaced short palindromic repeat, CRISPR)与Cas蛋白共同构成,并通过RNA介导发挥作用。其中,CRISPR的结构于1987年在大肠杆菌染色体中被首次发现^[2],但是当时人们对其一无所知。直到2002年,JANSEN等^[3]才发现这种结构的存在具有普遍性,并将这个重复序列家族正式命名为CRISPR。与此同时,Cas基因被发现与之具有密切的功能关系。2007年,BARRANGOU等^[4]证明了CRISPR和Cas蛋白可以共同作用,构成一种获得性自然免疫系统,保护细菌和古细菌免受噬菌体的感染。自此,CRISPR/Cas系统的重要生物学意义终于被揭示,但是这种自然结构仍无法被人们利用。2012年,CHARPEN-

TIER与DOUDNA团队^[5]利用人工改造的Cas9及体外转录成熟的crRNA(CRISPR RNA)和反式激活小RNA(trans-activating crRNA, tracrRNA)成功在体外重建了CRISPR-Cas9系统。相较于其他基因编辑技术,CRISPR/Cas9系统不仅构造简洁,而且能够更加高效精准地对目标DNA进行切割。在此后短短的一年时间里,张峰实验室^[6]实现了CRISPR/Cas9系统在哺乳动物(小鼠和人)细胞中的成功应用,再次证明该系统的简单可编程性和广泛适用性。至此,CRISPR/Cas9系统受到科学家们的强烈关注,与其相关的研究领域开始迅速发展。

在目前使用的CRISPR/Cas9系统中,crRNA和tracrRNA被设计融合为单一向导RNA(single-guide RNA, sgRNA),指导核酸酶Cas9蛋白与靶标序列在前间区序列邻近基序(protospacer adjacent motif, PAM)的上游结合并发挥切割活性,造成DNA双链断裂(double strands break, DSB),从而引发细胞利用非同源末端连接(non-homologous end joining, NHEJ)的方式进行自身修复。此外,在提供DNA修复模板的情况下,细胞还可以通过同源定向修复(homology-directed repair, HDR)的方式进行人工合成基因的插入或者替换^[7]。HDR途径需要提供DNA修复模板。供体DNA修复模板共分为两类:双链DNA(double-stranded DNA, dsDNA)和单链DNA(single-stranded DNA, ssDNA)。大片段的插入通常选择dsDNA来介导HDR途径,而精确的修饰(如点突变、小片段插入或精确缺失等)则优选单链寡聚脱氧核糖核酸(single-stranded oligodeoxynucleotides, ssODN)作为修复模板。因为与dsDNA相比,ssODN对同源重组臂的长度要求更短、构建更方便^[8],而且当导入ssODN和Cas9-gRNA时,细胞利用ssODN来修复DSB,能够有效降低基因组切割位点的整合风险,提供更高的插入效率^[9]。另外,目标位点处的供体DNA浓度与HDR编辑效率密切相关。研究显示利用生物素-链霉亲和素以及蛋白质-底物之间的相互作用可以提高Cas9-gRNA切割复合物附近ssODN的局部浓度^[10-13]。最近,也有科学家利用人工遗传密码扩展技术产生非典型氨基酸(ncAA)修饰的Cas9突变体,促进了ssODN的招募^[14]。这些方法都在原来的基础上进一步增强了HDR的编辑效率。但是,这项技术总体的安全性还不是特别高,胚胎中无模板连接的NHEJ发生概率仍然很高,经常造成靶位点不必要编辑的现象,很难

实现高效、稳定的单碱基突变^[15]。然而,对于人类遗传疾病来说,许多基因突变发生在单一碱基中^[1]。这种基于DSB的修复机制,不仅影响了精确基因编辑的效率,而且阻碍了基因组编辑治疗人类遗传病在临床上应用^[16]。因此,开发出能够安全高效地精确诱导目标基因中点突变的单碱基编辑工具极为重要。最新研究表明,与CRISPR/ssODN介导的校正相比,使用腺嘌呤单碱基编辑技术有效纠正了肥厚型心肌病(hypertrophic cardiomyopathy, HCM)小鼠模型胚胎中的致病性R404Q/+突变(Myh6 c.1211C>T),安全地消除了衍生小鼠及其后代中的HCM,而没有脱靶病变。单碱基编辑器展现了在不引入插入缺失的情况下更高的校正率和安全性^[17]。

2 碱基编辑工具的种类、研发及工作原理

2016年,LIU团队^[18]首次开发出了不依赖DSB能够进行精确编辑的单碱基编辑器(base editor, BE)。自此,国际上对于单碱基编辑工具的研究进展迅速。目前,基于CRISPR/Cas9系统开发的单碱基编辑器种类主要包括胞嘧啶碱基编辑器(cytosine base editor, CBE)、腺嘌呤碱基编辑器(adenine base editor, ABE)、C>G碱基编辑器(C-to-G base editor, CGBE)及嘧啶嘌呤双转换碱基编辑器(A&CBE)。另外,基于ZF和TALE开发出来的线粒体基因编辑技术以及RNA编辑也得到了快速的发展。

2.1 CBE工作原理及研发过程

第一代胞嘧啶碱基编辑器CBE是由大鼠的胞嘧啶脱氨酶rAPOBEC1和没有核酸内切酶活性的dCas9通过柔性连接蛋白TXEN连接融合而成的,可以实现胞嘧啶(C)到胸腺嘧啶(T)的碱基转换^[18]。其作用机制为:胞嘧啶脱氨酶在CRISPR/Cas9系统的帮助下定位到基因组的特定位置,对编辑窗口处非互补链的胞嘧啶(C)进行脱氨形成尿嘧啶(U),形成的尿嘧啶(U)在DNA复制过程中被DNA聚合酶识别为胸腺嘧啶(T)并以腺嘌呤(A)与之配对。经过多次DNA复制完成胞嘧啶(C)到胸腺嘧啶(T)的转换(图1)。至今,主流的CBE已历经四代的优化。CBE2在CBE1的基础之上通过添加尿嘧啶DNA糖基酶抑制因子(uracil DNA glycosylase inhibitor, UGI)来抑制细胞内的尿嘧啶DNA糖基酶(uracil DNA N-glycosylase, UNG)修复活性,从而提高单碱基编辑的效率和准确性^[19]。CBE3则是选用只有一个核酸内切酶活性

的nCas9来取代第二代中的dCas9,在编辑过程中切割磷酸二酯键产生了一个DNA链缺口,以此提高了编辑器的效率^[20]。第四代CBE在上一代的基础上选择串联了两个UGI,除在一定程度上提高了编辑效率外,也大大减少了错误编辑^[21]。

2.2 ABE工作原理及升级过程

腺嘌呤碱基编辑器ABE由腺嘌呤脱氨酶与Cas9蛋白融合而成,可以实现腺嘌呤(A)到鸟嘌呤(guanine, G)的碱基替换。腺嘌呤脱氨酶来源于大肠杆菌(*Escherichia coli*)腺苷脱氨酶ecTadA(*E. coli* TadA),但这种wtTadA并不能直接作用于腺嘌呤脱氨,于是GAUDELLI等^[22]通过定向进化筛选出了可以作用腺嘌呤脱氨的突变体TadA*,但TadA*只有与大肠杆菌中的内源野生型TadA形成二聚体才能行使脱氨功能。由于哺乳动物体内并不存在TadA,所以在哺乳动物细胞内进行基因编辑时需要将ecTadA、突变型TadA*同时整合到Cas9上才能发挥功能。其作用机制为:腺嘌呤脱氨酶二聚体可以将编辑窗口处的腺嘌呤(A)脱氨形成肌苷(I),然后肌苷(I)在DNA复制过程中被读取为鸟嘌呤(G)(图1)。最初的这一版本ABE经过一系列的优化改造和筛选最终得到了ABE7.10,该工具在人类细胞中的编辑效率也达到了50%。2020年,RICHTER等^[23]在ABE7.10的基础上借助噬菌体辅助进化(phage-assisted evolution)技术发现产生了8个氨基酸位点突变的腺嘌呤脱氨酶Tad-8e具有更高的脱氨效率,且Tad-8e单体在人类细胞中即可完成脱氨功能。

2.3 CGBE与双碱基编辑器的研发

CGBE是一种可以实现嘧啶与嘌呤之间转换(C to G)的单碱基编辑工具。由于细胞内的UNG可以识别错误产生的尿嘧啶并将其移除形成无嘌呤或无嘧啶位点(apurinic or apyrimidinic site, AP),裂合酶识别AP位点切割产生的缺口与nCas9切割产生的缺口造成了DNA双链断裂,诱导细胞内进行NHEJ修复机制,从而在发生错误的碱基位点处产生不定向的单点突变。基于这个原理,科学家将CBE系统中的UGI替换为UNG,开发出了不同种类的CGBE^[24-26]。这些CGBE包含了三个主要原件:胞嘧啶脱氨酶、nCas9、UNG或者其他的DNA修复蛋白。目前开发出来的CGBE在哺乳动物细胞的靶点修复最高可以达到50%以上的编辑效率。

由于单碱基编辑器功能过于单一,每种编辑器只

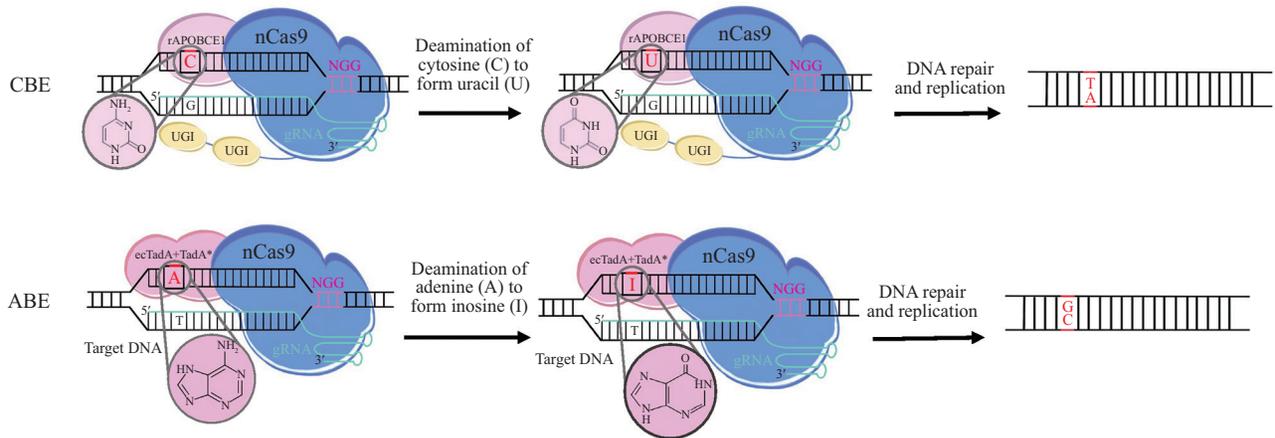


图1 CBE、ABE系统作用原理示意图
Fig.1 Schematic diagram of CBE and ABE systems

能进行一种碱基的转换, 为了打破这种限制, 科学家将胞嘧啶脱氨酶和腺嘌呤脱氨酶同时整合到nCas9而改造成的双碱基编辑器^[27-29], 使碱基编辑器的应用场景大大丰富。但是单碱基编辑器及双碱基编辑器的组合仍然不能实现12种碱基对的任意转换, 为达到这一目的, 来自LIU实验室的ANZALONE等^[30]开发出全新的碱基编辑工具先导编辑器(primer editors, PEs), PEs主要包含两个原件: 由逆转录酶与nCas9组合构成的先导编辑器, 包含引物结合位点(primer binding site, PBS)及逆转录模板序列的先导编辑向导RNA(prime editing guide RNA, pegRNA)。pegRNA不仅具有靶向基因组的功能, 而且在Cas9完成DNA链的切割之后, 能够以自身携带的RNA序列为模板在逆转录酶的作用下逆转录成相应的DNA序列, 这些DNA序列在细胞修复机制作用下整合到基因组中完成编辑。先导编辑器不仅可以实现12种碱基对的任意替换, 也能在靶点序列处进行DNA序列的插入和删除。先导编辑器具备了单碱基编辑器不能实现的功能, 将基因编辑技术带入了新的时代。但是从目前的实验结果来看, 先导编辑器整体的编辑效率偏低, 且具有很强的靶点偏好性, 这是限制先导编辑发展的主要短板。

2.4 线粒体基因编辑

锌指核酸酶(zinc-finger nuclease, ZFN)和转录激活样效应因子核酸酶(transcription activator-like effector nuclease, TALEN)是与CRISPR/Cas9系统功能类似的基因编辑工具, 可以精准定位基因组中的靶序列并产生DNA双链断裂, 从而进一步行使基因编辑功能。锌指核酸酶是由可以特异性识别基因

序列的锌指DNA结合域和非特异性限制内切酶两部分构成。锌指DNA结合域一般含有3个锌指结构, 每个锌指结构由大约30个氨基酸包裹一个锌原子构成, 可以识别3个碱基, 锌指环上突出的赖氨酸、精氨酸参与了DNA的结合, 改变锌指结构通用序列中的7个氨基酸就可以识别不同的DNA序列。FokI是在ZFN中应用最广泛的内切酶, 一般被拆分为两部分, 当两个锌指DNA结合域定位到靶点后, 通过linker将FokI拉到一起形成二聚体发挥切割靶点的功能^[31-32](图2)。但是ZFN技术仍有很大的缺陷, 例如: 要想靶向不同的序列, 需要构建很大的锌指蛋白库; ZFN在切割过程中不完全依赖于同源二聚体的产生, 异源二聚体形成会造成很强的脱靶效应; 锌指蛋白之间的相互干扰, 也会影响其与DNA结合的特异性。

与ZFN基本结构相似, TALEN也是由DNA识别结构域和DNA切割功能域构成的。不同之处在于, TALEN利用很多个TAL模块来进行DNA的识别和定位, 每个TAL模块由34个氨基酸构成, 其中第12位和13位氨基酸决定了该TAL模块识别的碱基类型, 通过改变TAL模块的种类和数量, 可以对DNA进行精准定位^[33](图2)。由于TALEN中的TAL模块对DNA的识别性和亲和性优于锌指结构, 所以TALEN的脱靶性和由脱靶产生的细胞毒性远低于ZFN, 同时其设计使用成本远低于ZFN, 这些都在很大程度上促进了TALEN技术的推广。直到CRISPR/Cas系统开发并逐渐成熟, 人们才找到了在各个方面都更优的选择, 所以现阶段在细胞核基因组基因敲除及基因编辑方面的应用中, CRISPR/Cas系统逐渐占据

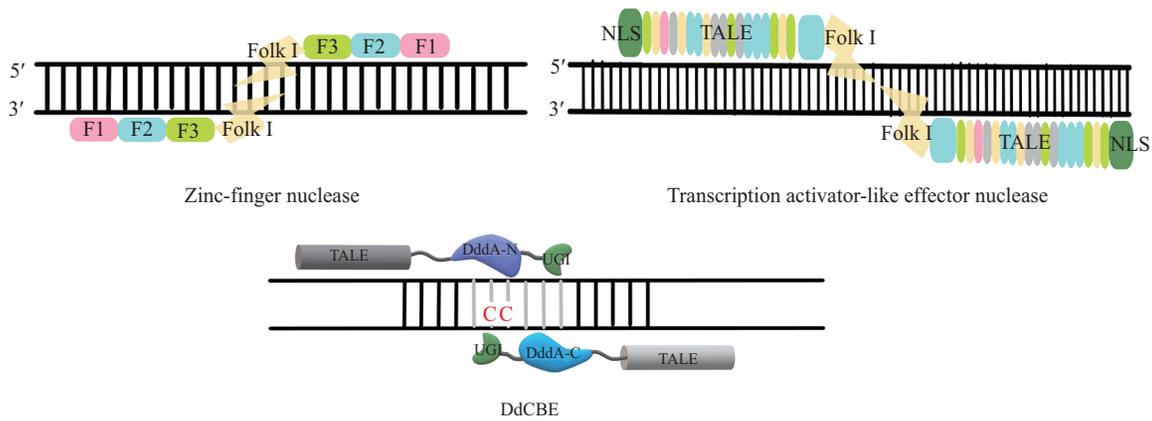


图2 锌指核酸酶、激活样效应因子核酸酶和DdCBE

Fig.2 Zinc-finger nuclease, transcription activator-like effector nuclease and DdCBE

了优势。

但是,细胞中的DNA不仅仅存在于细胞核中,在线粒体以及植物的叶绿体中也含有DNA。其中动物线粒体中的基因大多翻译为与能量代谢相关的蛋白,也与多种细胞能量代谢相关的疾病有关,所以对线粒体中的基因进行编辑,可以了解线粒体DNA与能量代谢相关疾病的关系,为临床治疗提供新思路。由于线粒体为双层膜结构,且没有类似细胞核孔复合体的孔状结构,仅允许含有线粒体定位信号肽的蛋白分子进入,因此RNA无法进入线粒体,CRISPR/Cas系统便无法在线粒体编辑中发挥作用。于是科学家考虑通过氨基酸序列定位的TALEN和ZFN添加信号肽,使其进入到线粒体中靶向DNA。因为目前的脱氨酶只能够在单链DNA结构中进行脱氨作用,而线粒体DNA极其不稳定,解旋后极易发生降解,使拷贝数跌落到正常范围以下。为了解决这个问题,科学家将可以在DNA双链水平上进行胞嘧啶脱氨的细菌毒素DddA拆分为两部分,分别连接到TALE的DNA识别功能域上,开发出线粒体胞嘧啶碱基编辑器DdCBE^[34-35](图2)。TALE通过线粒体信号肽的引导进入并靶向线粒体DNA,形成DddA二聚体,在DNA双链结构上行使脱氨功能,完成线粒体单碱基编辑,填补了基因编辑的最后一块空白。另外目前还没有发现可以直接作用在双链DNA上的腺嘌呤脱氨酶,但近期科学家将作用于单链DNA的腺嘌呤脱氨酶TadA8e连接到TALE上研发的TALED也成功地在人类细胞293T中将线粒体DNA中的腺嘌呤转化为鸟嘌呤,效率达到了49%^[36]。

综合来看, DdCBE在线粒体中的编辑具有很大

的局限性,对5'TC的序列有较强的编辑偏好,且编辑效率不高,因此应用范围被极大限制^[37];同时线粒体编辑也出现很大程度上的核基因组脱靶现象^[38]。这些都是接下来线粒体编辑需要克服的技术难点。

2.5 RNA基因编辑

RNA特异性腺苷脱氨酶(adenosine deaminase acting on RNA, ADAR)是一种表达在人体内的功能性蛋白,主要作用于单链RNA上的腺嘌呤使其脱氨形成肌苷,从而达到修正RNA的目的。早期RNA编辑的思路是通过在目的mRNA靶点处进行标记并招募外源表达的ADAR进行脱氨:将λ噬菌体RNA结合蛋白(λN)与ADAR连接,λN通过识别被标记mRNA上的boxB来定位并进行编辑^[39]。另外,STAFFORTS教授团队^[40]独辟蹊径地将ADAR通过SNPA标签与gRNA上的5'BG结构形成的共价键与gRNA相连,进而使其定位到靶点处并对其进行编辑。近十年来STAFFORST教授一直致力于对gRNA的修饰以进一步提高编辑效率,降低脱靶率。该团队通过大量的筛选得到的被命名为ASO(antisense oligonucleotide)的RNA变体具备更高的编辑能力,优化后的系统被命名为RESTORE(recruiting endogenous ADAR to specific transcripts for oligonucleotide-mediated RNA editing)^[41]。之后在RESTORE的gRNA的3'端添加三段招募序列(recruitment sequence)得到的CLUSTER guide RNA在编辑的效率和准确性上得到了进一步的提高^[42]。

与此同时,张锋团队^[43]也在利用基于特异性靶向RNA的CRISPR/Cas13系统进行RNA编辑的研究,将不具备切割活性的dCas13b和ADAR脱氨

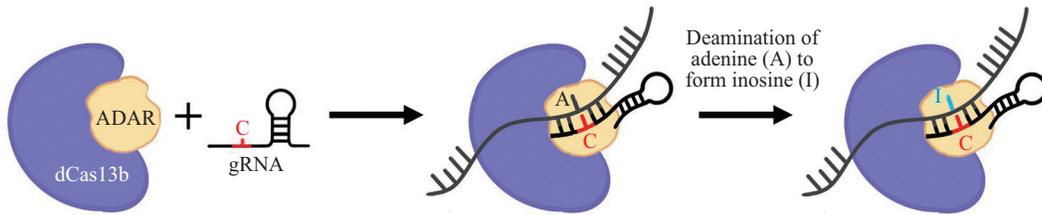


图3 RNA编辑示意图

Fig.3 Schematic diagram of RNA editing

酶结合,在gRNA的引导下进行RNA编辑(图3),利用这一原理设计成的工具被称为REPAIRv1(RNA editing for programmable A to I replacement, version 1)。通过对ADAR酶的定向进化,该团队又筛选出了可以同时实现腺嘌呤和胞嘧啶脱氨的突变体,构建了RESCUE(RNA editing for specific C to U exchange)工具^[44]。为解决REPAIR工具的高脱靶率问题,中国科学家构建了LEAPER(leveraging endogenous ADAR for programmable editing of RNA)系统,其中不依赖CRISPR/Cas13系统的arRNA(ADAR recruiting RNA)在招募内源ADAR酶进行脱氨的同时极大地降低了脱靶率,提高了编辑效率,并且具备递送简单的特点^[45]。虽然RNA编辑工具在一代代更新升级中各方面得到很大优化,但是这些工具在编辑效率、精确性以及递送方式上仍有很大需要改善的空间。

3 单碱基编辑器在小鼠疾病模型中的应用

利用基因编辑工具制作小鼠疾病模型的常用策略有两种。(1)使用单碱基编辑器在小鼠模型中突变某些重要基因的起始密码子;(2)使基因点突变后提前产生终止密码子。这些方式都可以对基因的功能产生影响,从而使小鼠产生相应的病理表型。例如,杜氏肌营养不良(duchenne muscular dystrophy, DMD)是一种致病基因位于X染色体的隐性遗传病^[46],患者在3~5岁时腿部肌肉便会出现无力的症状,大约12岁时失去行走能力,后期常常会因为呼吸衰竭而死亡。上世纪80年代科学家首次发现了Dystrophin基因的突变是造成DMD的原因。该基因编码的抗肌萎缩蛋白是一种细胞骨架蛋白,主要分布于骨骼肌和心肌细胞,对维持肌细胞的正常形态和功能起重要作用。Dystrophin基因异常会使细胞组织肌肉纤维变脆弱,在肌肉行使正常功能时会产生不可逆的机械损伤,最终导致肌细胞的死亡。

以第4代CBE为基础,添加DNA单链结合蛋白Rad51升级改造的hyA3A-BE_{max},可将Dystrophin基因外显子中的CAA突变为TAA,使其提前产生终止密码子而破坏基因功能,疾病小鼠肌肉组织切片的免疫荧光也显示出抗萎缩蛋白的表达缺失,小鼠表现出DMD的表型^[47-49]。

除了制造动物疾病模型外,单碱基编辑工具还可以通过点突变来恢复基因的表达水平,从而达到基因修正的目的。例如,I型酪氨酸血症(hereditary tyrosinemia type 1, HT1)是一种比较罕见的常染色体隐性遗传病,由于患者体内缺乏延胡索酰乙酰乙酸水解酶(fumarylacetoacetate hydrolase, FAH),使得酪氨酸代谢途径的最后一步反应无法完成,造成有毒代谢产物在体内的积累,从而导致严重的肝、肾损伤^[50]。利用ABE7.10对小鼠Fah基因的起始密码子ATG进行编辑形成GTG,使Fah基因无法正常表达功能蛋白,造成小鼠HT1表型^[51-52]。为了恢复Fah基因的正常表达,理论上选用CBE对突变后与G互补的C进行C-T的编辑,即可恢复Fah基因的起始密码子。但是,CBE无法避免的旁观者编辑(bystander active)会对处于编辑窗口处的其他胞嘧啶进行编辑,从而使该基因无法在原始位点形成起始密码子。鉴于此,科学家独辟蹊径,对起始密码子之前第12个鸟嘌呤的互补胞嘧啶进行编辑,形成一个全新的起始密码子,该策略也可达到恢复Fah基因正常表达的目的^[51](图4)。

此外,用ABE恢复早衰症关键基因Lmna的第1824位C>T突变,成功延长了早衰小鼠的寿命^[53];Pcsk9在细胞摄取低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)过程中发挥重要作用,对该基因引入T>C突变,可破坏mRNA的正常剪接,从而阻断该基因的翻译,使得血液中LDL-C的浓度降低,减小罹患高胆固醇血症的风险^[54]。以上事例都表明了单碱基编辑技术在基因治疗方面的巨大发展潜力。

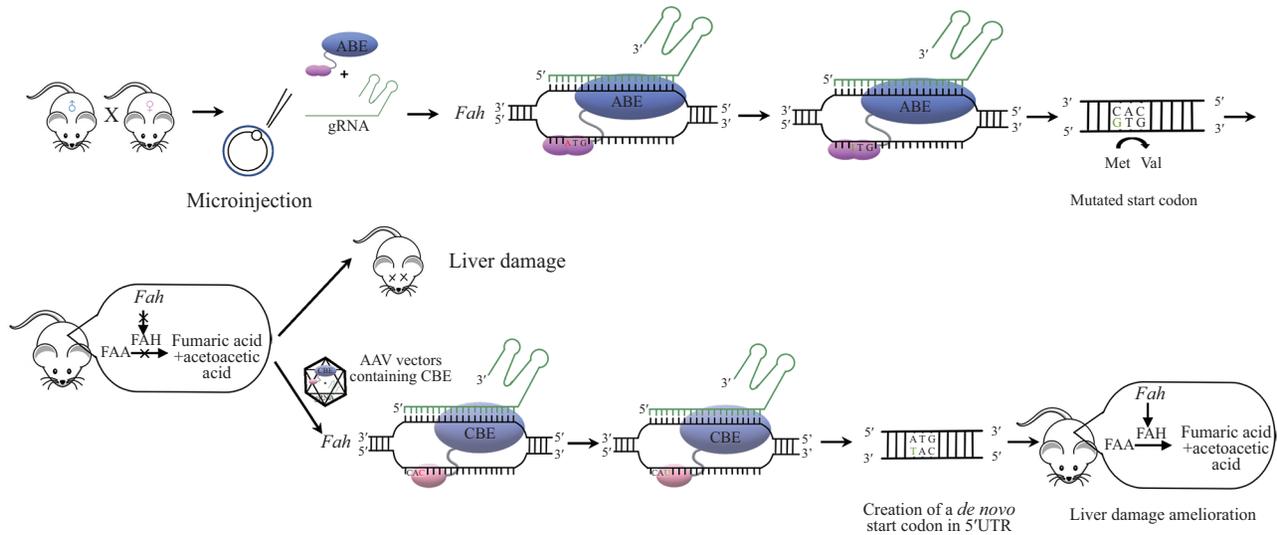


图4 利用ABE构建小鼠I型酪氨酸血症模型并利用CBE进行基因修正编辑

Fig.4 Establishment of mouse tyrosinemia model by ABE and gene correction with CBE

4 单碱基编辑器在斑马鱼中的优化及疾病模型中的应用

由于不同物种细胞在编码同一个氨基酸时使用的密码子频率不一样,这种密码子的偏好性对翻译的速度产生了一定的影响。为了使碱基编辑器在斑马鱼中更高效地发挥作用,需要对基因编辑工具进行密码子优化,即在不改变蛋白质氨基酸序列的前提下,尽量选用斑马鱼氨基酸密码子,避免选用其他物种密码子。这样可以使基因编辑工具在斑马鱼体内更快翻译,更高效地表达功能蛋白,从而更有效地发挥编辑作用。2018年ZHANG等^[55]首次通过斑马鱼密码子优化的方式将第三代CBE成功应用到斑马鱼中,并验证了该系统在斑马鱼中的编辑效率为9.25%~28.57%。在此基础上ZHAO等^[56]继续通过相同的策略对第四代胞嘧啶碱基编辑器CBE4max进行优化,研发出zAncBE4max,进一步将编辑效率提高到21.77%~67.36%。QIN等^[57]利用斑马鱼密码子优化策略将腺嘌呤碱基编辑器ABE7.10升级为zABE7.10,应用于斑马鱼中的编辑效率为7.14%~22.22%。同时,以ABEmax为基础进行优化的腺嘌呤碱基编辑器zABE7.10max在zABE7.10的基础上编辑效率进一步提高约10%~25%。

斑马鱼与人类基因组同源性高达87%^[58],是一种理想的模拟人类基因突变疾病的模式动物,其疾病表现、异常蛋白及分子机制与人类高度相关且保守,可以为下游疾病机制研究提供良好的动物模型。

例如,斑马鱼中的核糖体蛋白S14基因(*rps14*)是导致红细胞衰竭的候选基因^[59],可以诱导p53激活及其p53介导的细胞凋亡。*rps14*的功能丧失能够模拟人类骨髓增生异常综合征(myelodysplastic syndrome, MDS)表型。利用zABE7.10可以将斑马鱼*rps14*基因第35号位置A突变为G,使*rps14*第12号位关键氨基酸谷氨酸(Glu)转变为甘氨酸(Gly),产生了红系贫血的斑马鱼纯合突变模型(图5)。

酪氨酸酶基因(*tyr*)是体内合成黑色素的重要基因。黑色素产生的过程是酪氨酸(Tyr)在酪氨酸酶的作用下转化为多巴醌,之后经过氧化反应生成黑色素。Tyr功能的丧失便从上游抑制了体内黑色素的正常生成。斑马鱼*tyr*基因的功能丧失模拟了人类眼睛和皮肤白化病[human ocular albinism (OA) and oculocutaneous albinism (OCA)]。利用CBE将斑马鱼*tyr*基因907号位C突变为T,将其对应的关键位点氨基酸由脯氨酸(Pro)变为丝氨酸(Ser),可使斑马鱼眼部和皮肤的黑色素明显减少。

全外显子测序显示有巨口无睑综合征(ablepharon macrostomia syndrome, AMS)家族遗传病史的病人在*twist2*基因75号位置的谷氨酸发生突变,这是产生异常表型的原因^[60]。*twist2*基因作为转录因子通过与下游的目的DNA序列直接结合发挥作用。斑马鱼*twist2*基因所编码的78号位置谷氨酸(Glu)与人*TWIST2*基因中75号位置的致病点突变同源,并且该突变位于*TWIST2*蛋白与下游DNA结合的功能

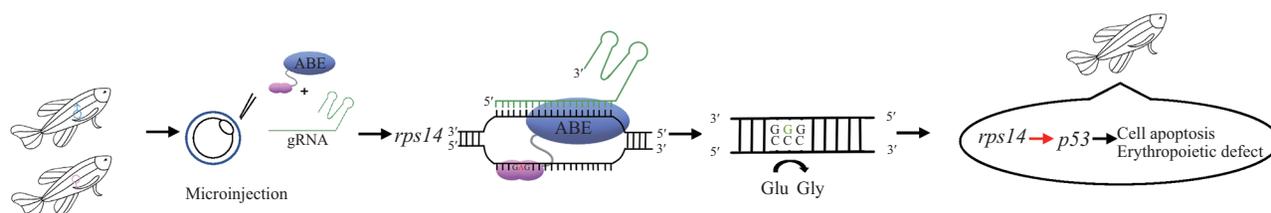


图5 利用ABE构建斑马鱼红系衰竭疾病模型

Fig.5 Establishment of zebrafish erythroid failure model by ABE

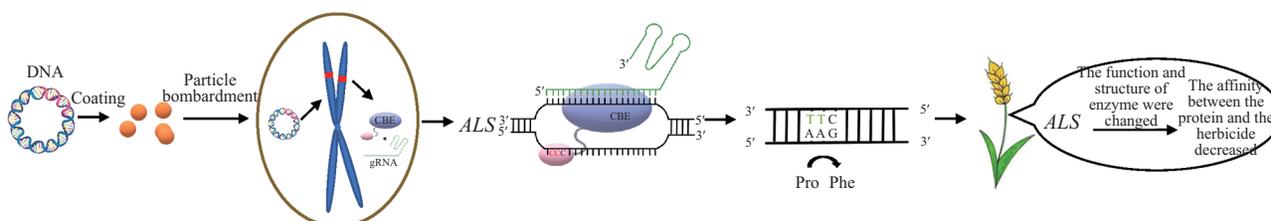


图6 利用CBE进行定向育种基因编辑使小麦获得除草剂抗性

Fig.6 Directive breeding gene editing by CBE to make wheat resistant to herbicides

结构域。CBE4max斑马鱼密码子优化升级而成的zAnCBE4max可以将斑马鱼*twist2*致病点突变位点对应的DNA互补链序列CTC编辑为CTT(谷氨酸改变为赖氨酸),导致F1中*twist2*基因点突变的杂合子斑马鱼在成年后出现下颚突出、上下颚不闭合且身体消瘦的表型,这与人类AMS相似。

斑马鱼作为一种广泛应用的模式生物,在基因编辑领域具有不可替代的研究价值。但是目前在斑马鱼研究领域中还还没有开发出效率可观、功能多样化的碱基编辑器,所以优化出一种针对斑马鱼的高效碱基编辑器,特别是在F0代即可产生纯合单碱基突变的斑马鱼单碱基编辑器,将大大提高实验效率,节约时间和实验成本。

5 单碱基编辑器在植物育种及改良中的应用

单碱基编辑器成功研发以来,科学家开始在植物研究领域中对基因编辑工具展开了探索。至此,单碱基编辑器在植物育种方面已经有了很广泛且重要的应用^[61]。

例如可以利用CBE培育非转基因除草剂耐受新作物。乙酰乳酸合酶(acetolactate synthase, ALS)和乙酰辅酶A羧化酶(acetyl-coenzyme A carboxylase, ACCase),分别是植物体内合成支链氨基酸和脂肪酸的关键酶,ALS和ACCase活性降低会导致植物蛋白与脂质生物合成受阻,进而引发植物失绿、黄

化甚至死亡,是很多除草剂的理想作用靶点。研究人员在针对谷类植物密码子优化的CBE3基础上,通过添加玉米泛素-1(*Ubi-1*)基因的启动子,构建了pnCas9-植物碱基编辑器(PBE)。利用该工具对小麦的ALS Pro-174密码子(TaALS-P174)及ACC Ala-1992密码子(TaACCCase-A1992)进行从C碱基到T碱基的位点突变,能够使小麦对咪唑啉酮类(IMI)、磺脲类(SU)和芳氧苯氧丙酸类(APP)除草剂产生抗性^[61-62](图6)。此外,使用基于CBE的Target-AID系统将水稻ALS基因第287号位的C碱基突变为T碱基,使第96位氨基酸由丙氨酸(Ala)变成缬氨酸(Val),也能够使水稻产生对IMI类除草剂的抗性^[63]。

2018年,研究人员将ecTadA与TadA*7.10通过32个氨基酸的连接序列连接在nCas9的N-端,将核定位序列VirD2添加到nCas9的C-端从而改造成第一代植物版本的腺嘌呤碱基编辑器ABE-P1,并利用该工具成功对水稻的基因组进行了编辑^[64]。在此工作基础之上,YAN等^[65]对TadA*7.10多种突变体进行评估和筛选,发现TadA9与TadA8e在植物中具有更加高效的编辑效率,并且在水稻中应用这些工具可成功突变负调控抗白叶枯病的*OsMPK6*和负调控抗高温的*OsWRKY45*等基因。

与基因编辑工具在疾病动物模型中的应用类似,利用单碱基编辑器对多种植物物种的某些关键且未知功能基因的起始密码子进行编辑^[63,66],或者在基因编码序列中提前引入终止密码子来破坏基因

序列,用以研究该基因在植物发育、抗病中的作用或筛选以获得优良性状,是目前常用的植物基因突变方式。

6 基因编辑的伦理问题

DNA层面的基因编辑涉及很多伦理的问题,当今社会关注的问题主要聚焦在:(1)编辑之后的基因可以随生殖细胞传给子代,破坏了自然存在的代际生命基因的传递,对人伦关系的界定产生了不利影响;(2)基因编辑技术使“人”被物化,人的各种基因在出生时便可以“预设”,使得有人可以通过控制基因来攫取垄断资源,固化阶级甚至种族灭绝。(3)基因编辑技术可能会破坏自然产生的基因库,同时基因还存在很多未知的功能,随意对其编辑会产生巨大隐患^[67]。这些问题和技术难点在短期内都难以解决,所以基因编辑技术在接下来很长一段时间内仍会存在争议。考虑到如果不在DNA水平,而是在转录本水平上进行编辑就不会涉及到这些问题,RNA编辑就是这样一种可以在转录水平上进行编辑的技术。同时,RNA编辑还具有可恢复性、高安全性等优点,在特定领域可作为DNA编辑的补充,因此科学界对RNA编辑技术的热情持续增加。

7 总结与展望

虽然碱基编辑器为治疗基因突变造成的遗传病提供了可能性,但是基因编辑技术走向临床应用仍面临许多问题。(1)临床应用对基因编辑工具的编辑效率有近乎严苛的要求,这也是科学家们升级改造单碱基编辑工具需要首先考虑的因素。四代CBE的优化以及ABE中Tad8e脱氨酶的筛选,无不从提高编辑效率的角度出发。除此之外,中国科学家创新性地筛选出人源的DNA单链结合蛋白Rad51并将其应用到CBE中,这也大大提高了编辑效率^[49]。(2)单碱基编辑工具受到了PAM和编辑窗口的限制,并不能完全覆盖所有的致病突变位点。为解决此问题,科学家对不同物种来源Cas9进行突变筛选,获得可识别不同PAM的Cas9蛋白变体,例如NISHIMASU等^[68]筛选出的spCas9-NG突变体通过识别NG PAM大大拓宽了基因编辑工具的识别范围。同时,Cas9对PAM的识别限制也极大地阻碍了单碱基编辑器在农业方面的应用,科研人员针对这个问题同样筛选进化了多种适用于植物的Cas9蛋白变体^[69-70]。(3)目前的单碱基

编辑工具还不能做到定点单碱基编辑,处于编辑窗口内的编辑位点都可能会被编辑,从而产生不需要的基因型,即旁观者编辑。解决这个问题的主要办法也是通过对脱氨酶突变体的筛选来缩小其编辑窗口,或者增加脱氨酶的编辑偏好性,以此在某些符合条件的靶点上达到定点突变的目的。除此之外,基因编辑工具脱靶性及其在某些物种当中具有很强的靶点偏好性,这都限制了基因编辑疗法的临床应用,目前还没有完全解决这些问题的手段,需要在研发中加以改进和提高。

另外,值得一提的是生物基因治疗的安全性问题:生物体是一个复杂的系统,一个基因可能同时具备很多功能,而我们对基因功能的认识还不够全面,贸然对基因进行编辑,对生物体带来的改变可能是毁灭性的。因此基因治疗应建立在我们对基因结构及功能充分研究了解的基础之上。在农业方面,基因编辑还可能会导致生态系统基因组的污染,例如杂草也可能会携带除草剂的抗性基因,这可能会对农作物的生长发育带来不利影响。

单碱基编辑器的发明受到了世人的广泛关注。经过实验证明,碱基编辑器在动物、植物、微生物等多个物种中均可以发挥作用^[71],特别在致病性突变疾病动物模型构建及人类基因疾病治疗方面具有不可估量的应用潜在价值;此外,在动植物育种、生物制药等领域其也具有广泛的应用前景。虽然单碱基编辑工具目前还远不能满足临床治疗的严苛要求,但是通过对其不断地升级改造,基因编辑工具将会越来越安全高效,终有一天会在包括基因治疗在内的众多高新技术领域发挥不可替代的作用。

参考文献 (References)

- [1] LANDRUM M J, LEE J M, BENSON M, et al. ClinVar: public archive of interpretations of clinically relevant variants [J]. *Nucleic Acids Res*, 2016, 44(D1): D862-8.
- [2] ISHINO Y, SHINAGAWA H, MAKINO K, et al. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product [J]. *J Bacteriol*, 1987, 169(12):5429-33.
- [3] JANSEN R, EMBDEN J D, GAASTRA W, et al. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes [J]. *Mol Microbiol*, 2002, 43(6):1565-75.
- [4] BARRANGOU R, FREMAUX C, DEVEAU H, et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes [J]. *Science*, 2007, 315(5819): 1709-12.
- [5] JINEK M, CHYLINSKI K, FONFARA I, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial im-

- munity [J]. *Science*, 2012, 337(6096): 816-21.
- [6] CONG L, RAN F A, COX D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems [J]. *Science*, 2013, 339(6121): 819-23.
- [7] GAJ T, GERSBACH C A, BARBAS C F, et al. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering [J]. *Trends Biotechnol*, 2013, 31(7): 397-405.
- [8] KAN Y, RUIS B, TAKASUGI T, et al. Mechanisms of precise genome editing using oligonucleotide donors [J]. *Genome Res*, 2017, 27(7): 1099-111.
- [9] MA M, ZHUANG F, HU X, et al. Efficient generation of mice carrying homozygous double-floxed alleles using the Cas9-Avidin/Biotin-donor DNA system [J]. *Cell Res*, 2017, 27(4): 578-81.
- [10] CARLSON-STEVERMER J, ABDEEN A A, KOHLENBERG L, et al. Assembly of CRISPR ribonucleoproteins with biotinylated oligonucleotides via an RNA aptamer for precise gene editing [J]. *Nat Commun*, 2017, 8(1): 1711.
- [11] GU B, POSFAI E, ROSSANT J. Efficient generation of targeted large insertions by microinjection into two-cell-stage mouse embryos [J]. *Nat Biotechnol*, 2018, 36(7): 632-7.
- [12] SAVIC N, RINGNALDA F C, LINDSAY H, et al. Covalent linkage of the DNA repair template to the CRISPR-Cas9 nuclease enhances homology-directed repair [J]. *eLife*, 2018, 7: e33761.
- [13] AIRD E J, LOVENDAHL K N, ST MARTIN A, et al. Increasing Cas9-mediated homology-directed repair efficiency through covalent tethering of DNA repair template [J]. *Commun Biol*, 2018, 1: 54.
- [14] LING X, XIE B, GAO X, et al. Improving the efficiency of precise genome editing with site-specific Cas9-oligonucleotide conjugates [J]. *Sci Adv*, 2020, 6(15): eaaz0051.
- [15] SYMINGTON L S, GAUTIER J. Double-strand break end resection and repair pathway choice [J]. *Annu Rev Genet*, 2011, 45: 247-71.
- [16] ZUCCARO M V, XU J, MITCHELL C, et al. Allele-specific chromosome removal after Cas9 cleavage in human embryos [J]. *Cell*, 2020, 183(6): 1650-64, e15.
- [17] MA S, JIANG W, LIU X, et al. Efficient correction of a hypertrophic cardiomyopathy mutation by ABEmax-NG [J]. *Circ Res*, 2021, 129(10): 895-908.
- [18] KOMOR A C, KIM Y B, PACKER M S, et al. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage [J]. *Nature*, 2016, 533(7603): 420-4.
- [19] KIM Y B, KOMOR A C, LEVY J M, et al. Increasing the genome-targeting scope and precision of base editing with engineered Cas9-cytidine deaminase fusions [J]. *Nat Biotechnol*, 2017, 35(4): 371-6.
- [20] REES H A, KOMOR A C, YEH W H, et al. Improving the DNA specificity and applicability of base editing through protein engineering and protein delivery [J]. *Nat Commun*, 2017, 8: 15790.
- [21] KOMOR A C, ZHAO K T, MICHAEL PACKER S, et al. Improved base excision repair inhibition and bacteriophage Mu Gam protein yields C:G-to-T: A base editors with higher efficiency and product purity [J]. *Sci Adv*, 2017, 3: eaao4774.
- [22] GAUDELLI N M, KOMOR A C, REES H A, et al. Programmable base editing of A*T to G*C in genomic DNA without DNA cleavage [J]. *Nature*, 2017, 551(7681): 464-71.
- [23] RICHTER M F, ZHAO K T, ETON E, et al. Phase-assisted evolution of an adenine base editor with improved Cas domain compatibility and activity [J]. *Nat Biotechnol*, 2020, 38(7): 883-91.
- [24] KURT I C, ZHOU R, IYER S, et al. CRISPR C-to-G base editors for inducing targeted DNA transversions in human cells [J]. *Nat Biotechnol*, 2021, 39(1): 41-6.
- [25] ZHAO D, LI J, LI S, et al. Glycosylase base editors enable C-to-A and C-to-G base changes [J]. *Nat Biotechnol*, 2021, 39(1): 35-40.
- [26] CHEN L, PARK J E, PAA P, et al. Programmable C:G to G:C genome editing with CRISPR-Cas9-directed base excision repair proteins [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 1384.
- [27] ZHANG X, ZHU B, CHEN L, et al. Dual base editor catalyzes both cytosine and adenine base conversions in human cells [J]. *Nat Biotechnol*, 2020, 38(7): 856-60.
- [28] GRUNEWALD J, ZHOU R, LAREAU C A, et al. A dual-deaminase CRISPR base editor enables concurrent adenine and cytosine editing [J]. *Nat Biotechnol*, 2020, 38(7): 861-4.
- [29] SAKATA R C, ISHIGURO S, MORI H, et al. Base editors for simultaneous introduction of C-to-T and A-to-G mutations [J]. *Nat Biotechnol*, 2020, 38(7): 865-9.
- [30] ANZALONE A V, RANDOLPH P B, DAVIS J R, et al. Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA [J]. *Nature*, 2019, 576(7785): 149-57.
- [31] SMITH J, BIBIKOVA M, WHITBY F G, et al. Requirements for double-strand cleavage by chimeric restriction enzymes with zinc finger DNA-recognition domains [J]. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28(17): 3361-9.
- [32] KIM Y G, CHA J, CHANDRASEGARAN S. Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 1996, 93(3): 1156-60.
- [33] LI T, HUANG S, ZHAO X, et al. Modularly assembled designer TAL effector nucleases for targeted gene knockout and gene replacement in eukaryotes [J]. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39(14): 6315-25.
- [34] MOK B Y, DE MORAES M H, ZENG J, et al. A bacterial cytidine deaminase toxin enables CRISPR-free mitochondrial base editing [J]. *Nature*, 2020, 583(7817): 631-7.
- [35] LIM K, CHO S I, KIM J S. Nuclear and mitochondrial DNA editing in human cells with zinc finger deaminases [J]. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 366.
- [36] CHO S I, LEE S, MOK Y G, et al. Targeted A-to-G base editing in human mitochondrial DNA with programmable deaminases [J]. *Cell*, 2022, 185(10): 1764-76, e12.
- [37] MOK B Y, KOTRY S A V, RAGURAM A, et al. CRISPR-free base editors with enhanced activity and expanded targeting scope in mitochondrial and nuclear DNA [J]. *Nat Biotechnol*, 2022, 40(9): 1378-87.
- [38] LEI Z, MENG H, LIU L, et al. Mitochondrial base editor induces substantial nuclear off-target mutations [J]. *Nature*, 2022, 606(7915): 804-11.
- [39] MONTIEL-GONZALEZ M F, VALLECILLO-VIEJO I, YUDOWSKI G A, et al. Correction of mutations within the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator by site-directed RNA editing [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(45): 18285-90.
- [40] STAFFORST T, SCHNEIDER M F. An RNA-deaminase conjugate selectively repairs point mutations [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2012, 51(44): 11166-9.

- [41] MERKLE T, MERZ S, REAUTSCHNIG P, et al. Precise RNA editing by recruiting endogenous ADARs with antisense oligonucleotides [J]. *Nat Biotechnol*, 2019, 37(2): 133-8.
- [42] REAUTSCHNIG P, WAHN N, WETTENGEL J, et al. CLUSTER guide RNAs enable precise and efficient RNA editing with endogenous ADAR enzymes *in vivo* [J]. *Nat Biotechnol*, 2022, 40(5): 759-68.
- [43] COX D B T, JGOOTENBERG J S, ABUDAYYEH O O, et al. RNA editing with CRISPR-Cas13 [J]. *Science*, 2017, 358(6366): 1019-27.
- [44] ABUDAYYEH O O, GOOTENBERG J S, FRANKLIN B, et al. A cytosine deaminase for programmable single-base RNA editing [J]. *Science*, 2019, 365(6451): 382-6.
- [45] QU L, YI Z, ZHU S, et al. Programmable RNA editing by recruiting endogenous ADAR using engineered RNAs [J]. *Nat Biotechnol*, 2019, 37(9): 1059-69.
- [46] MONACO A P, NEVE R L, COLLETTI-FEENER C, et al. Isolation of candidate cDNAs for portions of the duchenne muscular dystrophy gene [J]. *Nature*, 1986, 323(6089): 646-50.
- [47] MONACO A P. Dystrophin, the protein product of the duchenne/becker muscular dystrophy gene [J]. *Trends Biochem Sci*, 1989, 14(10): 412-5.
- [48] KIM K, RYU S M, KIM S T, et al. Highly efficient RNA-guided base editing in mouse embryos [J]. *Nat Biotechnol*, 2017, 35(5): 435-7.
- [49] ZHANG X, CHEN L, ZHU B, et al. Increasing the efficiency and targeting range of cytidine base editors through fusion of a single-stranded DNA-binding protein domain [J]. *Nat Cell Biol*, 2020, 22(6): 740-50.
- [50] MORROW G, ANGILERI F, TANGUAY R M. Molecular aspects of the FAH mutations involved in HT1 disease [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2017, 959: 25-48.
- [51] YANG L, WANG L, HUO Y, et al. Amelioration of an inherited metabolic liver disease through creation of a de novo start codon by cytidine base editing [J]. *Mol Ther*, 2020, 28(7): 1673-83.
- [52] PAULK N K, WURSTHORN K, WANG Z, et al. Adeno-associated virus gene repair corrects a mouse model of hereditary tyrosinemia *in vivo* [J]. *Hepatology*, 2010, 51(4): 1200-8.
- [53] KOBLAN L W, ERDOS M R, WILSON C, et al. *In vivo* base editing rescues Hutchinson-Gilford progeria syndrome in mice [J]. *Nature*, 2021, 589(7843): 608-14.
- [54] ROTHGANGL T, DENNIS M K, LIN P J C, et al. *In vivo* adenine base editing of PCSK9 in macaques reduces LDL cholesterol levels [J]. *Nat Biotechnol*, 2021, 39(8): 949-57.
- [55] ZHANG Y, QIN W, LU X, et al. Programmable base editing of zebrafish genome using a modified CRISPR-Cas9 system [J]. *Nat Commun*, 2017, 8(1): 118.
- [56] ZHAO Y, SHANG D, YING R, et al. An optimized base editor with efficient C-to-T base editing in zebrafish [J]. *BMC Biol*, 2020, 18(1): 190.
- [57] QIN W, LU X, LIU Y, et al. Precise A*T to G*C base editing in the zebrafish genome [J]. *BMC Biol*, 2018, 16(1): 139.
- [58] HOWE K, CLARK M D, TORROJA C F, et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome [J]. *Nature*, 2013, 496(7446): 498-503.
- [59] EAR J, HSUEH J, NGUYEN M, et al. A zebrafish model of 5q-syndrome using CRISPR/Cas9 targeting rps14 reveals a p53-independent and p53-dependent mechanism of erythroid failure [J]. *J Genet Genomics*, 2016, 43(5): 307-18.
- [60] MARCHEGIANI S, DAVIS T, TESSADORI F, et al. recurrent mutations in the basic domain of TWIST2 cause ablepharon macrostomia and barber-say syndromes [J]. *Am J Hum Genet*, 2015, 97(1): 99-110.
- [61] ZHANG R, LIU J, CHAI Z, et al. Generation of herbicide tolerance traits and a new selectable marker in wheat using base editing [J]. *Nat Plants*, 2019, 5(5): 480-5.
- [62] ZHANG Y, LIANG Z, ZONG Y, et al. Efficient and transgene-free genome editing in wheat through transient expression of CRISPR/Cas9 DNA or RNA [J]. *Nat Commun*, 2016, 7: 12617.
- [63] SHIMATANI Z, KASHOJIYA S, TAKAYAMA M, et al. Targeted base editing in rice and tomato using a CRISPR-Cas9 cytidine deaminase fusion [J]. *Nat Biotechnol*, 2017, 35(5): 441-3.
- [64] HUA K, TAO X, YUAN F, et al. Precise A·T to G·C base editing in the rice genome [J]. *Mol Plant*, 2018, 11(4): 627-30.
- [65] YAN D, REN B, LIU L, et al. High-efficiency and multiplex adenine base editing in plants using new TadA variants [J]. *Mol Plant*, 2021, 14(5): 722-31.
- [66] ZONG Y, SONG Q, LI C, et al. Efficient C-to-T base editing in plants using a fusion of nCas9 and human APOBEC3A [J]. *Nat Biotechnol*, 2018, doi: 10.1038/nbt.4261.
- [67] 邱仁宗, 翟晓梅, 雷瑞鹏. 可遗传基因组编辑引起的伦理和治理挑战[J]. *医学与哲学(QIU R Z, ZHAI X M, LEI R P. Ethical and governance challenges raised by heritable genome editing [J]. Medicine & Philosophy)*, 2019, 40(2): 1-6.
- [68] NISHIMASU H, SHI X, ISHIGURO S, et al. Engineered CRISPR-Cas9 nuclease with expanded targeting space [J]. *Science*, 2018, 361(6408): 1259-62.
- [69] HUA K, TAO X, ZHU J K. Expanding the base editing scope in rice by using Cas9 variants [J]. *Plant Biotechnol J*, 2019, 17(2): 499-504.
- [70] HUA K, TAO X, HAN P, et al. Genome engineering in rice using cas9 variants that recognize NG pam sequences [J]. *Mol Plant*, 2019, 12(7): 1003-14.
- [71] 宗媛, 高彩霞. 碱基编辑系统研究进展[J]. *遗传(ZONG Y, GAO C X. Progress on base editing systems [J]. Hereditas)*, 2019, 41(9): 777-800.