



陈佳, 博士、研究员、博士生导师, 长期从事DNA修复以及基因编辑相关的研究工作。陈佳研究员领导的团队已阐明胞嘧啶脱氨酶APOBEC在CRISPR/Cas9介导的基因编辑过程中产生突变的分子机制, 成功创建更高精度和更高效率的增强型Cas9碱基编辑器(eBE)、可在基因组A/T富集区域内开展有效编辑的Cpf1碱基编辑器(dCpf1-BE)以及可在G/C富集区域和高甲基化区域内开展高效编辑的普适型Cas9碱基编辑器(hA3A-BE)。至今, 在*Nat Biotechnol*、*Nat Struct Mol Biol*和*Cell Res*等期刊上共发表研究论文及综述/专评20余篇。

## 碱基编辑技术的发展与应用

王丽洁<sup>1#</sup>, 王潇<sup>1#</sup>, 杨力<sup>2</sup>, 陈佳<sup>1,3\*</sup>

(<sup>1</sup>上海科技大学生命科学与技术学院, 上海 201210; <sup>2</sup>中国科学院-马普学会计算生物学伙伴研究所, 中国科学院上海生命科学研究院营养与健康研究院, 上海 200031; <sup>3</sup>中国科学院分子细胞科学卓越创新中心, 上海 200031)

**摘要:** 碱基编辑技术, 以CRISPR/Cas系统为平台, 引导胞嘧啶脱氨酶或腺嘌呤脱氨酶至特定的基因组靶点, 产生靶向性的C至T或者A至G的碱基转换。自碱基编辑技术问世以来, 全球多个科研团队通过优化改进得到了一系列高精度性、广靶向性、小编辑框、普适性的碱基编辑器。在应用方面, 碱基编辑器能够在人体细胞、动植物细胞以及胚胎中进行高效的碱基转换, 在治疗人类遗传病、构建动物疾病模型、植物育种等方面具有巨大的应用潜能。本文就碱基编辑技术的发展、优化和应用等方面进行综述和展望。

**关键词:** 碱基编辑技术; 胞嘧啶/腺嘌呤脱氨酶; CRISPR/Cas

## Development and application of base editor

WANG Lijie<sup>1#</sup>, WANG Xiao<sup>1#</sup>, YANG Li<sup>2</sup>, CHEN Jia<sup>1,3\*</sup>

(<sup>1</sup>School of Life Science and Technology, ShanghaiTech University, Shanghai 201210, China; <sup>2</sup>Key Laboratory of Computational Biology, CAS-MPG Partner Institute for Computational Biology, Shanghai Institute of Nutrition and Health, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China; <sup>3</sup>CAS Center for Excellence in Molecular Cell Science, Shanghai Institute of Biochemistry and Cell Biology, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

**Abstract:** Cytidine base editor (BE/CBE) or adenine base editor (ABE) combines the APOBEC cytidine deaminase or TadA adenine deaminase with the CRISPR/Cas system to perform targeted cytosine to thymine (C-to-T) or adenine to guanine (A-to-G) editing. Since first reported in 2016, a series of BEs have been developed to optimize base editing efficiency and target sequence specificity/preference. Up to now, base editors have been successfully applied in various species. Meanwhile, base editing has great potential in modeling human

收稿日期: 2018-12-28

基金项目: 科技部重点研发计划项目(2018YFC1004602); 国家自然科学基金项目(31822016、81872305、31600654)

#共同第一作者: 王丽洁, E-mail: wanglj1@shanghaitech.edu.cn; 王潇, E-mail: wangxiao4@shanghaitech.edu.cn

\*通信作者: E-mail: chenjia@shanghaitech.edu.cn

genetic disorders, correcting genetic mutations, plant breeding and so on. Here, we summarize the development, improvement and application of base editing, and discuss the future direction of base editing.

**Key Words:** base editor; cytidine/adenine deaminase; CRISPR/Cas

腺嘌呤(A)、鸟嘌呤(G)、胞嘧啶(C)、胸腺嘧啶(T)与脱氧核糖和磷酸交替形成的骨架所构成的核酸是生命的基石,而遗传信息则存在于这些碱基排列的编码顺序中。基因组多态性来源于基因组中包括单碱基的转换、颠换在内的单碱基变异,也被称之为单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)。这种单碱基多态性有助于解释个体的表型差异、对各种药物的耐受性、对环境因子的反应以及不同群体对疾病特别是复杂疾病的易感性。目前为止,约58%的致病性突变为点突变<sup>[1]</sup>。其中, $\alpha$ -地中海贫血、 $\beta$ -地中海贫血等都是由单碱基突变引起的常见遗传病<sup>[2]</sup>。该类遗传病无法用常规方法进行根治,患者往往需要终生服药,并承受药物带来的副作用和心理压力。因此,高效且精准地修复致病性的点突变对于遗传病的治疗和研究是非常重要的,并且也需要一种方法能够在庞大的基因组中特异性地改变单个碱基对。

CRISPR/Cas(clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated protein)基因组编辑系统自问世以来,就有着其他基因组编辑技术无可比拟的优势,被认为能够在活细胞中广泛使用,并且是迄今为止最有效、最便捷的基因组编辑系统<sup>[3]</sup>。Cas9核酸酶利用向导RNA(guide RNA, gRNA)可在多种细胞的基因组特定靶点定位,对其进行切割从而产生DNA双链断裂(double strand breaks, DSBs),然后利用细胞内源的DNA修复机制来实现编辑<sup>[4-6]</sup>。根据不同DNA修复通路的激活,基因组编辑将会导致基因的失活或者突变的校正。通常来说,有两种主要的修复通路会被DSB所激活,一种是非同源末端连接(non-homologous end joining, NHEJ),另一种是同源性介导修复(homology-directed repair, HDR)。作为DNA双链断裂最主要的修复通路,NHEJ在修复过程中能在DSB附近的基因组位点引入随机性碱基插入或缺失,从而导致基因的失活。与NHEJ相反,当HDR被激活时,HDR能够以外源性供体

DNA作为模版,利用同源重组机制将外源性供体DNA的序列替换靶点基因组DNA的序列,从而完成基因突变的校正。但实际上,由于同源重组机制本身的局限性,HDR介导的基因校正效率通常很低(一般低于10%)。在临床应用方面,现有的HDR介导基因编辑方法并不能高效地校正基因组中的点突变,而同时发生NHEJ反而会带来许多核苷酸的插入和缺失。因此,这些特点极大限制了CRISPR/Cas基因组编辑工具从科研向应用的转化,尤其是在精准基因治疗方面的应用,这也是基因编辑领域的一大难题。

因此,我们需要不断改善现有的基因编辑方法,提高其诱导单核苷酸定点突变的效率,并且降低其带来的随机核苷酸插入与缺失,从而更加高效精确地进行基因组编辑,更全面地研究基因功能,为后续的遗传性疾病及癌症的基因治疗提供新工具和新方法。

## 1 碱基编辑技术的产生

### 1.1 胞嘧啶碱基编辑器的产生(cytidine base editor, BE/CBE)

基于CRISPR/Cas系统,哈佛大学的David Liu团队首先将大鼠的rA1(APOBEC1)与dCas9(catalytically dead Cas9)蛋白融合,产生了第1代碱基编辑器(base editor 1, BE1)<sup>[7]</sup>。切割能力失活的dCas9能够被gRNA引导到目标位点,sgRNA与基因组DNA形成稳定的R环(R-loop),而R环中暴露出来的单链DNA能够被APOBEC攻击,使其中的C脱氨形成尿嘧啶(U),后续的DNA复制完成C到T的转换。但是,将第1代碱基编辑器应用于哺乳动物细胞后发现仅有0.8%到7.7%的C-to-T碱基编辑效率。经分析,APOBEC在单链DNA上诱发C脱氨形成的U会激活细胞中碱基切除修复通路(base excision repair, BER),并被BER通路中的尿嘧啶-N-糖基化酶(uracil-DNA glycosylase, UNG)所切除形成碱基缺失位点(AP site)。接着,BER在AP位点上游对单链DNA进行切割,并以另一条DNA链上的G为模板重新

合成C, 从而降低了基因组上C到T的编辑效率。随后, 研究人员将BER通路中UNG的抑制剂(uracil-DNA glycosylase inhibitor, UGI)融合进BE1中, 得到第2代碱基编辑器(BE2)。然而, BE2在哺乳动物细胞内仅能有限地提高了碱基编辑的效率。为了进一步最大程度地提升C-to-T碱基编辑的效率, 研究人员将具有切刻酶活性的nCas9替代BE2中的dCas9, 从而产生了第3代碱基编辑器(BE3)。BE3可利用nCas9在sgRNA的靶向链(即与sgRNA结合的DNA链)产生一个切刻, 激活体内的错配修复(mismatch repair, MMR), 从而更倾向于修复G所在的靶向链并保留U所在非靶向链。通过这种诱导细胞修复偏好的方法得到更多U:G→U:A→T:A的修复结果, 从而更高效地完成C-to-T的碱基编辑<sup>[7]</sup>。

2016年8月, 神户大学的Akihiko Kondo团队证明, 利用七鳃鳗的胞嘧啶脱氨酶(activation-induced cytidine deaminase, AID)类似物PmCDA1和d/nCas9融合蛋白(target-AID)也能进行碱基编辑<sup>[8]</sup>。这些系统都在细胞中实现了高效的胞嘧啶碱基编辑。

## 1.2 腺嘌呤碱基编辑器的产生(adenine base editor, ABE)

David Liu团队经过7轮的蛋白质分子进化与改造, 突破性地开发出腺嘌呤碱基编辑器(ABE)。通过融合表达野生型以及突变型的RNA脱氨酶TadA和nCas9组成ABE, ABE通过sgRNA的引导在靶向位置将腺嘌呤脱氨变成肌苷(inosine, I), 随后通过DNA复制, DNA聚合酶将I识别为G, 从而实现非常高效的腺嘌呤到鸟嘌呤的转换, 同时保证了高精度度( $\geq 99\%$ )以及极少的随机插入与缺失( $\leq 1\%$ )<sup>[9]</sup>。相比于CBE, C到T的碱基转换, 能够矫正约14%与疾病相关的点突变, 而ABE所实现的A到G的碱基转换能矫正多达47%与疾病相关的点突变<sup>[1]</sup>。

## 2 碱基编辑技术的改进和创新

### 2.1 高精准度的碱基编辑器

碱基编辑器并不是完美的。相对于含有dCas9的BE2, 含有nCas9的BE3虽然在靶点序列有着更高的C-to-T编辑效率, 但BE3在靶点序列由nCas9所引起的随机碱基插入或缺失(insertion/deletion, indel)率却更高<sup>[7]</sup>。同时, 在BE3的实际应用中, 除了目的性C-to-T碱基编辑之外, 还发现了非目的性

C-to-A/C-to-G碱基转换。在某些情况下, 非目的性C-to-A/C-to-G碱基转换的频率能够达到与目的性C-to-T碱基编辑频率相近的水平<sup>[10]</sup>。因此, BE3虽然提高了碱基编辑的效率, 却降低了碱基编辑产物的纯度, 即目的性C-to-T碱基编辑率与非目的性碱基插入或缺失率和C-to-A/C-to-G碱基转换率的比值:  $(\text{C-to-T editing rate})/(\text{indel rate} + \text{C-to-A/C-to-G substitution rate})$ 。上海科技大学陈佳教授长期从事DNA修复引发突变的相关研究, 曾发现人胞嘧啶脱氨酶APOBEC在DNA单链断裂修复过程中能引发C-to-T碱基转换<sup>[11]</sup>。该团队及其合作者通过深入探索发现, BE3虽然通过激活MMR的修复方式获得了高效的定点C-to-T碱基编辑, 但由于MMR切除了切刻所在的靶向链, 使靶向链与sgRNA的结合被破坏, 导致非靶向链上的U失去BE3中UGI的保护而被暴露出来。在没有UGI保护的情况下, U会被UNG切除, 产生AP位点。接着, 由于AP位点的化学性质并不稳定, 可在其所在的非靶向链也产生单链断裂, 该单链断裂与由nCas9造成靶向链的断裂构成了DSB。DSB会引发机体内的NHEJ并在DSB附近的基因组位点引入随机性indel<sup>[12]</sup>。另一方面, AP位点会激活跨损伤DNA合成(translesion DNA synthesis, TLS), 由跨损伤DNA聚合酶(TLS DNA polymerase)以AP位点为模版随机合成DNA, 从而引入C-to-A或者C-to-G的碱基转换<sup>[13]</sup>。因此, indel和C-to-A/C-to-G的碱基转换的形成降低了BE3介导C-to-T碱基编辑产物的纯度。

2017年8月, 陈佳教授团队及其合作者利用双载体共表达或者通过自剪接多肽-2A融合表达多个UGI的方法, 构建了一种增强型的碱基编辑系统(enhanced base editor, eBE)<sup>[14]</sup>。同时, David Liu团队通过优化rA1与nCas9以及nCas9与UGI的连接(linker)序列同时增多一个拷贝的UGI, 构建了BE4系统<sup>[15]</sup>。两种改进型的碱基编辑系统都能够提高目的性C-to-T碱基编辑的效率(约1.5倍), 并且降低非目的性C-to-A/C-to-G碱基转换(约2.3倍)以及非目的性indel(约2.3倍), 从而有效地提高了碱基编辑产物的纯度。

对于ABE, 由于细胞切除DNA上I的活性要远远低于U<sup>[16]</sup>, 所以I所在的非靶向链产生单链断裂

的概率就更低。因此, ABE能够展现出高精准度的A-to-G碱基编辑, 产生极少的indel和非A-to-G的碱基转换。到目前为止, ABE在细胞、小鼠以及植物的实际应用中也并没有发现非A-to-G的碱基转换<sup>[17-20]</sup>。

## 2.2 靶向范围更广的碱基编辑器

碱基编辑器中一个重要的组成部分就是Cas蛋白, 碱基编辑器利用Cas蛋白与基因组进行靶向性的结合, 而这种靶向性的结合依赖于靶点旁侧的PAM(protospacer adjacent motif)序列。该条件导致只有约26%的致病性点突变可以被以spCas9(*Streptococcus pyogenes* Cas9)为元件的编辑器修复<sup>[17]</sup>。因此这需要开发出可以识别多种PAM序列的碱基编辑器来扩大编辑器在内源性染色体DNA上的应用范围。

2017年2月, David Liu团队报道了一系列可以识别非NGG(N=A,G,C,T)的PAM序列的碱基编辑器, 分别包括SaBE3、Sa(KKH)-BE3、spCas9(VQR)-BE3、spCas9(VRER)-BE3和spCas9(EQR)-BE3<sup>[21]</sup>。2018年3月, 陈佳团队及其合作者开发出了以Cpf1(Cas12a)(PAM=TTTV, V=A,G,C)为元件的碱基编辑器dLbCpf1-BE, 该碱基编辑器可以在腺嘌呤/胸腺嘧啶富集(A/T-rich)区域进行高效的碱基编辑, 弥补了spCas9-BE或者SaCas9-BE只能在鸟嘌呤/胞嘧啶富集(G/C-rich)区进行编辑的缺口。由于dLbCpf1不会造成双链断裂, 因此dLbCpf1-BE产生的非目的性indel以及C-to-A/C-to-G碱基转换相对spCas9-BE3更少, 其安全性更高<sup>[22]</sup>。

2018年2月, David Liu团队通过PACE(phage-assisted continuous evolution)方法, 利用噬菌体繁殖周期短的特点, 对Cas蛋白进行大批量、持续性的突变并定向筛选噬菌体, 得到一种具有广泛PAM兼容性的进化版Cas9——xCas9(3.7)。xCas9(3.7)具有更灵活的PAM选择性, 能识别更大范围的PAM序列, 包括NGG、NG、GAA和GAT。将其替代BE3和ABE中spCas9所构建的新编辑器xCas9(3.7)-BE3, xCas9(3.7)-ABE能够对致病性突变位点进行C-to-T和A-to-G的碱基转换, 其效率分别高达73%和71%, 明显优于SpCas9-BE3/ABE<sup>[17]</sup>。2018年9月, 东京大学的Osamu Nureki开发出一种SpCas9变异体(SpCas9-NG), 它能够识别的PAM序列为

NG, 而不是NGG。这种SpCas9-NG变异体增加了Cas9在基因组中的靶向范围, 与AID相连后, 所构建的Target-AID-NG在含有多聚胞嘧啶核苷酸(poly-C)的位点展现出了比xCas9-BE4更高的编辑效率<sup>[23]</sup>。

## 2.3 不同编辑框的碱基编辑器

作为碱基编辑器中的另一重要元件脱氨酶(APOBEC, AID), 会在sgRNA与基因组DNA形成稳定的R环(R-loop)后攻击R环中暴露出来的单链DNA, 如果暴露出来的单链DNA中有不止一个胞嘧啶, 那么这些暴露在单链上的胞嘧啶就都会被脱氨酶所催化, 这就形成了编辑器的编辑框。spCas9-BE3和spCas9-ABE的编辑框分别为PAM序列NGG上游的4~8位和4~7位(NGG定为21~23位), 约五个或四个碱基宽度的编辑框。在基因编辑的实际应用中, 例如破坏启动子、剪接位点或者调节序列, 或者通过引入终止密码子来敲除基因等, 都需要特异性地靶向转换单个碱基, 特别是蛋白编码区域。2017年2月, David Liu团队通过改造rA1, 引入特定的氨基酸突变来减弱该脱氨酶的脱氨活性, 得到编辑框更小的YE1-BE3、YE2-BE3和YEE-BE3。将碱基编辑器的编辑框从5个碱基的范围缩小到1~2个碱基, 使靶向突变更为精准<sup>[21]</sup>。另一方面, 中国科学院上海生命科学研究院/上海交通大学医学院健康科学研究所常兴课题组将人源胞嘧啶脱氨酶(AID)融合dCas9形成TAM(targeted AID-mediated mutagenesis)编辑系统, 极大地拓宽了编辑窗口<sup>[24]</sup>。2018年6月, 上海科技大学黄行许团队及其合作者将10个拷贝的GCN4肽融合到nCas9中, 同时引入scFv-APOBEC-UGI-GB1实现编辑框更大的碱基编辑(BE-PLUS), 将编辑框扩大至PAM序列上游的4~16位<sup>[25]</sup>。不同编辑框的碱基编辑器扩大了碱基编辑器在科研和疾病治疗中的应用范围。

## 2.4 普适性的碱基编辑器

除了PAM序列和编辑框对碱基编辑靶向位点的限制以外, 利用不同脱氨酶构建的编辑器对靶向位点有不同的偏好性。例如基于rA1构建的C-to-T碱基编辑器(BE3、BE4、eBE或dCpf1-BE等), 在GpC位点都出现编辑效率低效甚至无效的情况, 而利用人源AID或者PmCDA1构建的碱基编辑器并没有展现出这一特殊的偏好性, 但是其编

辑效率在其他大部分靶向位点都低于rA1。2018年8月,中国科学院—马普计算生物学研究所研究员杨力团队及其合作者发现基于人APOBEC3A的碱基编辑器(hA3A-BE)可在基因组高甲基化区域实现高效的甲基化胞嘧啶mC至胸腺嘧啶T碱基编辑。通过深入的研究发现, hA3A-BE是一种普适且高效的碱基编辑器, 在GpC位点以及常规位点(低甲基化区域且非GpC位点)等多种环境中都能介导非常高效的胞嘧啶C(或甲基化胞嘧啶mC)至胸腺嘧啶T的碱基编辑<sup>[26]</sup>。同时, 哈佛医学院的Keith Joung团队及其合作者也构建了基于人APOBEC3A的碱基编辑器, 且在APOBEC3A的功能结构域引入突变的改进型eA3A更偏好转换编辑框内的TpC位点<sup>[27]</sup>。

## 2.5 碱基编辑器的脱靶效应

现有的碱基编辑器, 无论是CBE还是ABE都存在靶位点依赖性的脱靶效应。大部分的脱靶问题都来源于CRISPR/Cas9系统对于目标序列识别的准确性降低, sgRNA与目标基因互相配对的过程中允许1~5个碱基的错配, 从而导致目标序列以外的相似序列被编辑<sup>[28]</sup>。2017年4月, 首尔国立大学的Jin-Soo Kim团队开发出一种称为Digenome-seq的高效率、高灵敏度能在体外全面检测CBE脱靶的方法, 证明CBE在全基因组范围的脱靶效应低于Cas9, 但是仍然存在一定的脱靶率<sup>[29]</sup>。为了提高CBE的基因组DNA靶向特异性, David Liu团队将经过突变修饰的高保真型Cas9<sup>[30]</sup>与BE3中的sp-Cas9相替换得到了高保真型的BE3(HF-BE3)<sup>[31]</sup>。2018年8月, Jin-Soo Kim团队和其合作者通过在原核细胞中定向进化的方法筛选得到了Sniper-BE3<sup>[32]</sup>。两种改进型的碱基编辑器分别都能在保持靶向位点编辑效率不变的同时大幅度降低脱靶效应。随后, David Liu团队将HF-BE3以RNA-蛋白质复合物(ribonucleoprotein, RNP)的形式递送进斑马鱼胚胎和小鼠内耳, Kim的团队将Sniper-BE3同样是以RNP的形式递送进人原代T细胞和诱导多功能干细胞, 两个团队都证明, 利用RNP进行编辑的方法, 相比转染环形质粒的方法, 能够提高靶向位点的编辑特异性, 并且有效降低脱靶效率。这些都提示, 碱基编辑器对于疾病基因治疗方面的应用有很大的潜能。

## 3 碱基编辑技术的应用

### 3.1 碱基编辑技术对动物基因组的改造

碱基编辑技术能够在体细胞中进行非常高效的C-to-T以及A-to-G的碱基转换, 在生殖细胞中, CBE和ABE系统同样都能发挥高效的编辑作用。2017年2月, Jin-Soo Kim团队率先通过CBE系统靶向编辑小鼠受精卵中酪氨酸激酶基因(tyrosine kinase, *Tyr*)和杜氏肌营养不良蛋白编码基因(duchenne muscular dystrophy, *Dmd*), 在*Tyr*和*Dmd*的蛋白质编码区域引入终止密码子, 使蛋白质翻译提前终止<sup>[10]</sup>。2017年6月, 中山大学松阳洲团队及其合作者利用具有更高特异性的碱基编辑系统HF-BE2对小鼠受精卵进行编辑, 在得到的F0代小鼠中发现了高效的靶位点编辑<sup>[33]</sup>。以上都证明, CBE系统能够在小鼠胚胎中进行精确高效的碱基编辑。2018年6月, 黄行许团队及其合作者同时注射ABE7.10和SaBE3靶向编辑同一个小鼠胚胎的*Tyr*以及先天性并指(趾)多指(趾)致病基因*Hoxd13*, 随后可以在同一个F0代小鼠中同时检测到A-to-G和C-to-T的碱基转换<sup>[34]</sup>。2018年7月, 吉林大学的李占军和赖良学团队利用BE3、BE4-Gam和ABE7.10碱基编辑系统, 精确靶向模拟人类疾病的无义突变、错义突变和RNA错误剪切, 并成功构建了白化病(*Tyr*无义突变)、双肌臀(肌肉生成抑制素无义突变)、HGPS (Hutchinson-Gilford syndrome)早衰(*Lmna* RNA错误剪切)和X-连锁扩张性心肌病(*Dmd*错义突变)等疾病模型兔<sup>[35]</sup>。这些成果证明了CBE和ABE系统都可以在小鼠、大鼠以及兔子中进行精准、高效的基因编辑, 并且可以作为构建疾病模型的重要工具。

### 3.2 碱基编辑技术对植物基因组的改造

在植物方面, 单碱基突变是作物许多重要农艺性状发生改变的遗传基础。单碱基的变异会导致氨基酸替换或蛋白质翻译终止, 使蛋白功能发生改变, 从而产生优良性状。传统诱变技术需要进行基因组规模的筛选, 耗时、耗力且鉴定到的点突变数目和种类有限。因此, 植物育种和基因功能研究迫切需要新技术来提高基因组单碱基定点突变的效率, 以实现基因功能与农艺性状的定向改良。

2017年2月, 中国科学院遗传与发育生物学研

研究所的高彩霞研究员与其合作者成功地利用BE3在三大重要农作物(小麦、水稻和玉米)基因组中实现高效、精确的单碱基定点突变,突变效率最高可达43.48%<sup>[36]</sup>。同年3月, Akihiko Kondo团队将他们开发出的Target-AID编辑器应用在水稻和番茄这两种作物中,都实现了有效的碱基编辑<sup>[37]</sup>。2018年2月,中国农业科学院植物保护研究所周焕斌团队及中国科学院植物逆境生物学研究中心朱健康团队证实了ABE系统能够在水稻中实现A-to-G的碱基转换<sup>[19-20]</sup>。同年5月,高彩霞研究员及其合作团队优化了ABE系统,在水稻中实现了高达59.1%的A-to-G编辑效率,使水稻表现出除草剂抗性<sup>[38]</sup>。同年6月, Jin-Soo Kim团队利用ABE系统成功编辑拟南芥,得到了可以进行种系传递的晚熟和矮化的优良性状<sup>[39]</sup>。同年10月,高彩霞研究员团队及其合作团队优化了普适性碱基编辑器hA3A-BE,在植物中实现了高效的C-to-T碱基编辑<sup>[40]</sup>。碱基编辑技术避免了传统育种的低效率,以其高效率、高精准确性的特点在农作物品种改良方面得到广泛应用的同时,也提供了新的思路和方法。

### 3.3 碱基编辑技术在治疗人类遗传疾病中的应用

目前已知约60%的人类遗传性疾病是由单碱基突变引起的<sup>[1]</sup>,因此碱基编辑技术主要的应用之一一是研究和治疗人类遗传疾病相关的单碱基突变。2017年8月,广州医科大学第三附属医院刘见桥团队及合作者利用BE3在人类三原核胚胎靶向编辑一个或两个基因,结果发现,编辑单个基因以及同时编辑两个基因的效率分别为87.5%和100%,但同时也发现了脱靶效应和随机性的插入与缺失<sup>[41]</sup>。同年9月,山东大学陈子江团队利用BE3和Sa(K-KH)-BE3成功编辑了人类三原核胚胎中的三个靶向位点<sup>[42]</sup>。2017年9月,中山大学黄军就团队首次利用CBE系统在人类早期胚胎中尝试阻断和治疗 $\beta$ -地中海贫血,他们将BE3和YEE-BE3显微注射到核移植胚胎模型,修复了 $\beta$ -地中海贫血致病基因(beta globin, *HBB*)的致病突变。结果显示, BE3在胚胎中实现了40.9%的G-to-A精准修复,而YEE-BE3实现了40%的精准修复,并且16.7%的卵裂球细胞实现了双等位基因百分百的精准修复<sup>[43]</sup>。2018年9月,黄行许团队及其合作者从马凡综合征患者捐赠的卵子和临床上废弃的不成熟卵子着手,利用

体外受精技术(IVF)制备成能自行发育的人类胚胎,在一细胞期通过BE3成功修复胚胎中马凡综合征(MFS)的致病基因编码原纤维蛋白1(*FBNI*)的致病突变,效率高达89%<sup>[44]</sup>。这些成果都证明了碱基编辑器能在人类胚胎中矫正单点突变引起的基因缺陷,同时也暗示了碱基编辑器在临床治疗方面的巨大潜能。

### 3.4 碱基编辑技术的其他应用

CBE能够通过蛋白质编码区域提前引入终止密码来实现基因敲除,比之前用野生型Cas9进行基因敲除的方法更为安全高效。例如前文有提及的Jin-Soo Kim通过CBE在*Tyr*和*Dmd*基因中引入终止密码子使其蛋白质翻译提前终止,科学家则利用这样的原理开发出了iSTOP<sup>[45]</sup>和CRISPR-Stop<sup>[46]</sup>技术。iSTOP技术可以利用BE3在人、小鼠、大鼠、斑马鱼、线虫、果蝇、拟南芥、酵母八个物种中实现CAA、CAG、CGA和TGG四种密码子转变为终止密码子TAA、TAG或TGA<sup>[45]</sup>。研究发现,可能由于碱基编辑器带来的双链断裂较野生型Cas9少,所以CRISPR-Stop技术规避了传统基因敲除技术容易带来的DNA损伤、染色体易位与重排、细胞凋亡等风险<sup>[46]</sup>。

碱基编辑器除了在生物医药方面的应用,还有在合成生物学方面的应用。2018年2月, David Liu团队利用碱基编辑器构建出了细胞记录系统,作为细胞中的“黑匣子”记录细胞接触病毒、营养物质和抗生素等刺激物时的反应情况<sup>[47]</sup>。

## 4 碱基编辑技术的发展前景

碱基编辑技术自2016年问世以来,相关应用和机制研究便如雨后春笋般兴起。各种各样改进型、优化型的碱基编辑器能够降低原始编辑器的副产物、脱靶效应,提高编辑效率,扩大编辑范围。碱基编辑器也能够动植物品种改良、动物模型构建和疾病治疗等方面发挥强大的作用,因此碱基编辑器也被称为是继ZFN(Zinc finger nucleases)、TALEN(transcription activator-like effector nucleases)、CRISPR/Cas9之后第四代基因编辑工具。往后,基因编辑技术依然是当今生命科学的热点研究领域。现有改进型的小窗口碱基编辑器仍然还存在1~2个碱基的编辑框,并未实现真正

的单碱基编辑。因此未来可以进一步缩小编辑框, 实现更加精确的碱基编辑。前文所提到的所有的碱基编辑器都是能够实现碱基转换的编辑器, 而对于碱基颠换, 现在还存在着巨大的挑战。对于碱基编辑安全性问题而言, 碱基编辑器上的脱氨酶可以特异性的结合单链DNA(ssDNA), 在DNA复制或者转录中瞬时出现的ssDNA都有可能被脱氨酶攻击, 从而在非靶向位置产生随机性的点突变。这些都是碱基编辑技术从科研向临床应用转化所要注意到的问题。但是尽管如此, 碱基编辑技术在基础科研、人类食品安全以及疾病的临床治疗方面都展现出巨大的优势和光明的发展前景。

### 参 考 文 献

- [1] Rees HA, Liu DR. Base editing: precision chemistry on the genome and transcriptome of living cells. *Nat Rev Genet*, 2018, 19(12): 770-788
- [2] Cao A, Galanello R. Beta-thalassemia. *Genet Med*, 2010, 12(2): 61-76
- [3] Mali P, Esvelt KM, Church GM. Cas9 as a versatile tool for engineering biology. *Nat Methods*, 2013, 10(10): 957-963
- [4] Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 2012, 337(6096): 816-821
- [5] Mali P, Yang L, Esvelt KM, et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*, 2013, 339(6121): 823-826
- [6] Cong L, Ran FA, Cox D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 2013, 339(6121): 819-823
- [7] Komor AC, Kim YB, Packer MS, et al. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature*, 2016, 533(7603): 420-424
- [8] Nishida K, Arazoe T, Yachie N, et al. Targeted nucleotide editing using hybrid prokaryotic and vertebrate adaptive immune systems. *Science*, 2016, 353(6305): doi: 10.1126/science.aaf8729
- [9] Gaudelli NM, Komor AC, Rees HA, et al. Programmable base editing of A\*T to G\*C in genomic DNA without DNA cleavage. *Nature*, 2017, 551(7681): 464-471
- [10] Kim K, Ryu SM, Kim ST, et al. Highly efficient RNA-guided base editing in mouse embryos. *Nat Biotechnol*, 2017, 35(5): 435-437
- [11] Chen J, Miller BF, Furano AV. Repair of naturally occurring mismatches can induce mutations in flanking DNA. *Elife*, 2014, 3: e02001
- [12] Lei L, Chen H, Xue W, et al. APOBEC3 induces mutations during repair of CRISPR-Cas9-generated DNA breaks. *Nat Struct Mol Biol*, 2018, 25(1): 45-52
- [13] Yang B, Li X, Lei L, et al. APOBEC: From mutator to editor. *J Genet Genomics*, 2017, 44(9): 423-437
- [14] Wang L, Xue W, Yan L, et al. Enhanced base editing by co-expression of free uracil DNA glycosylase inhibitor. *Cell Res*, 2017, 27(10): 1289-1292
- [15] Komor AC, Zhao KT, Packer MS, et al. Improved base excision repair inhibition and bacteriophage Mu Gam protein yields C:G-to-T:A base editors with higher efficiency and product purity. *Sci Adv*, 2017, 3(8): eaao4774
- [16] Lau AY, Wyatt MD, Glassner BJ, et al. Molecular basis for discriminating between normal and damaged bases by the human alkyladenine glycosylase, AAG. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(25): 13573-13578
- [17] Hu JH, Miller SM, Geurts MH, et al. Evolved Cas9 variants with broad PAM compatibility and high DNA specificity. *Nature*, 2018, 556(7699): 57-63
- [18] Ryu SM, Koo T, Kim K, et al. Adenine base editing in mouse embryos and an adult mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Nat Biotechnol*, 2018, 36(6): 536-539
- [19] Hua K, Tao X, Yuan F, et al. Precise A.T to G.C Base editing in the rice genome. *Mol Plant*, 2018, 11(4): 627-630
- [20] Yan F, Kuang Y, Ren B, et al. Highly efficient A.T to G.C base editing by Cas9n-guided tRNA adenosine deaminase in rice. *Mol Plant*, 2018, 11(4): 631-634
- [21] Kim YB, Komor AC, Levy JM, et al. Increasing the genome-targeting scope and precision of base editing with engineered Cas9-cytidine deaminase fusions. *Nat Biotechnol*, 2017, 35(4): 371-376
- [22] Li X, Wang Y, Liu Y, et al. Base editing with a Cpf1-cytidine deaminase fusion. *Nat Biotechnol*, 2018, 36(4): 324-327
- [23] Nishimasu H, Shi X, Ishiguro S, et al. Engineered CRISPR-Cas9 nuclease with expanded targeting space. *Science*, 2018, 361(6408): 1259-1262
- [24] Ma Y, Zhang J, Yin W, et al. Targeted AID-mediated mutagenesis (TAM) enables efficient genomic diversification in mammalian cells. *Nat Methods*, 2016, 13(12): 1029-1035
- [25] Jiang W, Feng S, Huang S, et al. BE-PLUS: a new base editing tool with broadened editing window and enhanced fidelity. *Cell Res*, 2018, 28(8): 855-861
- [26] Wang X, Li J, Wang Y, et al. Efficient base editing in methylated regions with a human APOBEC3A-Cas9 fu-

- sion. *Nat Biotechnol*, 2018, 36(10): 946-949
- [27] Gehrke JM, Cervantes O, Clement MK, et al. An APO-BEC3A-Cas9 base editor with minimized bystander and off-target activities. *Nat Biotechnol*, 2018, 36(10): 977-982
- [28] Hsu PD, Scott DA, Weinstein JA, et al. DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(9): 827-832
- [29] Kim D, Lim K, Kim ST, et al. Genome-wide target specificities of CRISPR RNA-guided programmable deaminases. *Nat Biotechnol*, 2017, 35(5): 475-480
- [30] Kleinstiver BP, Pattanayak V, Prew MS, et al. High-fidelity CRISPR-Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects. *Nature*, 2016, 529(7587): 490-495
- [31] Rees HA, Komor AC, Yeh WH, et al. Improving the DNA specificity and applicability of base editing through protein engineering and protein delivery. *Nat Commun*, 2017, 8: 15790
- [32] Lee JK, Jeong E, Lee J, et al. Directed evolution of CRISPR-Cas9 to increase its specificity. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 3048
- [33] Liang P, Sun H, Sun Y, et al. Effective gene editing by high-fidelity base editor 2 in mouse zygotes. *Protein Cell*, 2017, 8(8): 601-611
- [34] Liu Z, Lu Z, Yang G, et al. Efficient generation of mouse models of human diseases via ABE- and BE-mediated base editing. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 2338
- [35] Liu Z, Chen M, Chen S, et al. Highly efficient RNA-guided base editing in rabbit. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 2717
- [36] Zong Y, Wang Y, Li C, et al. Precise base editing in rice, wheat and maize with a Cas9-cytidine deaminase fusion. *Nat Biotechnol*, 2017, 35(5): 438-440
- [37] Shimatani Z, Kashojiya S, Takayama M, et al. Targeted base editing in rice and tomato using a CRISPR-Cas9 cytidine deaminase fusion. *Nat Biotechnol*, 2017, 35(5): 441-443
- [38] Li C, Zong Y, Wang Y, et al. Expanded base editing in rice and wheat using a Cas9-adenosine deaminase fusion. *Genome Biol*, 2018, 19(1): 59
- [39] Kang BC, Yun JY, Kim ST, et al. Precision genome engineering through adenine base editing in plants. *Nat Plants*, 2018, 4(7): 427-431
- [40] Zong Y, Song Q, Li C, et al. Efficient C-to-T base editing in plants using a fusion of nCas9 and human APOBEC3A. *Nat Biotechnol*, 2018, doi: 10.1038/nbt.4261
- [41] Li G, Liu Y, Zeng Y, et al. Highly efficient and precise base editing in discarded human tripronuclear embryos. *Protein Cell*, 2017, 8(10): 776-779
- [42] Zhou C, Zhang M, Wei Y, et al. Highly efficient base editing in human tripronuclear zygotes. *Protein Cell*, 2017, 8(10): 772-775
- [43] Liang P, Ding C, Sun H, et al. Correction of beta-thalassemia mutant by base editor in human embryos. *Protein Cell*, 2017, 8(11): 811-822
- [44] Zeng Y, Li J, Li G, et al. Correction of the Marfan syndrome pathogenic FBN1 mutation by base editing in human cells and heterozygous embryos. *Mol Ther*, 2018, 26(11): 2631-2637
- [45] Billon P, Bryant EE, Joseph SA, et al. CRISPR-mediated base editing enables efficient disruption of eukaryotic genes through induction of STOP codons. *Mol Cell*, 2017, 67(6): 1068-1079 e1064
- [46] Kuscu C, Parlak M, Tufan T, et al. CRISPR-STOP: gene silencing through base-editing-induced nonsense mutations. *Nat Methods*, 2017, 14(7): 710-712
- [47] Tang W, Liu DR. Rewritable multi-event analog recording in bacterial and mammalian cells. *Science*, 2018, 360(6385): eaap8992