

碱基编辑系统的研究进展

钟静丽¹, 林健香², 周建奎^{1*}, 乔云波^{2*}

1 广州大学生命科学学院, 广东 广州 510006

2 上海交通大学医学院附属第九人民医院 上海精准医学研究院, 上海 200125

钟静丽, 林健香, 周建奎, 乔云波. 碱基编辑系统的研究进展[J]. 生物工程学报, 2024, 40(5): 1271-1292.

ZHONG Jingli, LIN Jianxiang, ZHOU Jiankui, QIAO Yunbo. Advances in base editing systems[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(5): 1271-1292.

摘要: 基于可编程核酸酶的基因编辑工具表现出编辑高效、产物纯度高、编辑副产物少的优势, 已广泛应用于生物医药研发和作物育种。鉴于研究和应用的需求多样化, 开发功能特异的碱基编辑器成为基因编辑领域的研究热点。目前由规律成簇的间隔短回文重复序列系统及相关蛋白 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats and CRISPR-associated, CRISPR-Cas) 和转录激活因子类效应因子 (transcription activator-like effector, TALE) 系统衍生的基因编辑系统包括单碱基编辑器、双碱基编辑器、线粒体碱基编辑器和 CRISPR 相关转座酶系统等。本文全面梳理了碱基编辑系统的发展历程, 总结了各类碱基编辑器的特点、脱靶效应、优化和改良策略等, 为基因编辑系统的进一步改进和应用提供参考。

关键词: 规律成簇的间隔短回文重复序列系统及相关蛋白 9 (CRISPR-Cas9); 碱基编辑器; 转录激活因子类效应因子 (TALE) 系统; 脱氨酶

Advances in base editing systems

ZHONG Jingli¹, LIN Jianxiang², ZHOU Jiankui^{1*}, QIAO Yunbo^{2*}

1 School of Life Sciences, Guangzhou University, Guangzhou 510006, Guangdong, China

2 Shanghai Institute of Precision Medicine, Ninth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200125, China

Abstract: Programmable nucleases-based genome editing systems offer several advantages,

资助项目: 国家自然科学基金(82371668); 上海市“科技创新行动计划”自然科学基金(23ZR1437700); 上海市科委合成生物学重点专项(23HC1400700)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (82371668), the “Science and Technology Innovation Action Plan” of Shanghai Natural Science Foundation (23ZR1437700), and the Shanghai Municipal Science and Technology Commission Key Project of Synthetic Biology (23HC1400700).

*Corresponding authors. E-mail: ZHOU Jiankui, zhoujk@gzhu.edu.cn; QIAO Yunbo, ybqiao@shsmu.edu.cn

Received: 2023-09-06; Accepted: 2023-12-23; Published online: 2024-01-08

such as high editing efficiency, high product purity, and fewer editing by-products. They have been widely used in biopharmaceutical research and crop engineering. Given the diverse needs for research and application, developing functional base editors has become a major focus in the field of genome editing. Currently, genome editing systems derived from clustered regularly interspaced short palindromic repeats and CRISPR-associated (CRISPR-Cas) and transcription activator-like effector (TALE) systems include single base editors, dual base editors, mitochondrial base editors, and CRISPR-related transposase systems. This review provides a comprehensive overview of the development of base editing systems, summarizes the characteristics, off-target effects, optimization, and improvement strategies of various base editors, and provides insights for further improvement and application of genome editing systems.

Keywords: clustered regularly interspaced short palindromic repeats and CRISPR-associated 9 (CRISPR-Cas9); base editor; transcription activator-like effector (TALE) system; deaminase

传统的基因编辑工具包括锌指核酸酶系统(zinc finger nucleases, ZFNs)^[1]、转录激活剂样效应核酸酶系统(transcription activator-like effector nucleases, TALENs)^[2]和规律成簇的间隔短回文重复序列系统(clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR)^[3], 三者都具有 DNA 识别结构域和 DNA 切割结构域, 在靶序列处形成双链断裂(double-strand breaks, DSB)从而实现基因编辑。CRISPR-Cas 编辑系统与另外 2 个系统相比, 具有靶向效率高、成本低、脱靶率低等优点^[3-4], 因此近年来针对 CRISPR-Cas 系统的研究呈现暴发式增长。基于 CRISPR-Cas 系统的碱基编辑器的优化与改良一般聚焦于 Cas 蛋白、脱氨酶和其他小元件, 优化目标包括提高编辑效率、扩大基因组靶向范围、改变编辑窗口宽度和减少副产物等。在研究和治疗遗传性疾病的应用上, 碱基编辑器可利用腺相关病毒(adeno-associated virus, AAV)进行体内递送, 但受到了装载容量的限制。因此, 开发不同的递送载体和递送方式也是碱基编辑发展的重要内容之一。而为了解决线粒体靶向递送问题, 基于 TALEN 系统的线粒体基因组碱基编辑器也是该

领域的重要研究方向。本综述将回顾碱基编辑系统的发展历程, 总结已开发的碱基编辑系统的特点、进化策略和局限性, 以拓宽基因编辑工具的靶向和应用范围, 对基础和应用研究均具有较强的指导意义。

1 CRISPR-Cas 系统

1.1 CRISPR-Cas 系统的简介

在自然界中, 细菌和古生菌利用 CRISPR 及相关蛋白(CRISPR-associated, CRISPR-Cas)系统中 RNA 引导的内切酶结合和切割外源核酸来作为适应性免疫系统的一部分^[5]。这些系统通过捕获以往感染病原体的核酸序列保留病原体感染信息, 然后利用这些捕获的基序(spacers)指导 CRISPR-Cas 蛋白在未来遇到病原体时破坏病原体的 DNA 或 RNA 以对抗感染。

天然 CRISPR-Cas 免疫系统进行核酸切割时有利用多蛋白复合物和单种蛋白的效应域 2 种类型。由于单种蛋白组分简单、功能多样且作用高效, 因此成为生物学研究和应用最广泛的 CRISPR 工具^[6-7], 可进一步细分为 II 型、V 型和 VI 型。大多数 II 型的 Cas9 变体^[8]和 V 型的 Cas12 变体均具有 RNA 引导的 DNA 核酸内切酶活性,

而VI型的 Cas13 变体则表现出靶向 RNA 的切割活性。本综述将重点总结 DNA 编辑工具研究进展,因此主要讨论具有 DNA 内切酶活性的 Cas9 和 Cas12。

1.2 Cas9 核酸酶

2013 年,研究人员发现 CRISPR-Cas9 可进行高效的基因组编辑^[9]。在原生环境中, Cas9 核酸酶由 CRISPR RNA (crRNA)引导,与反式激活 crRNA (tracrRNA)配对,形成核酸内切酶复合物(ribonucleoprotein, RNP)。经过工程化改造,将 crRNA 和 tracrRNA 融合成单引导 RNA (single guide RNA, sgRNA),也能引导 Cas9 靶向切割双链 DNA (double-stranded DNA, dsDNA)^[3]。当目标 DNA 序列位于合适的原间隔序列临近基序 (protospacer adjacent motif, PAM)附近时^[3], CRISPR-Cas 系统只需在向导 RNA (guide RNA, gRNA)分子中使用不同的基序,即可轻松重编程,靶向不同病原体来源的核酸序列。PAM 序列可保证编码 gRNA 的基因组 DNA 不被 CRISPR-Cas 系统破坏^[5]。此外, Cas9 具有 HNH 和 RuvC 两个活性域,其中一个发生突变失活 (D10A 或 H840A),产生只切割一条 DNA 链的 Cas9 切口酶(Cas9 nickase, nCas9);若 2 个活性域同时失活(H840A 和 D10A),则产生只有识别能力而没有切割活性的 dCas9 (dead Cas9)^[9-10]。

自从化脓性链球菌 Cas9 (*Streptococcus pyogenes* Cas9, SpCas9)被报道能在体外^[3]和哺乳动物细胞中^[9]程序性切割 DNA 以来,研究人员开发出多种 Cas9 变体,包括金色葡萄球菌 Cas9 (*Staphylococcus aureus* Cas9, SaCas9)、嗜热链球菌 Cas9 (*Streptococcus thermophiles* Cas9, SthCas9)、空肠弯曲杆菌 Cas9 (*Campylobacter jejuni* Cas9, CjeCas9)、脑膜炎奈瑟菌 Cas9 (*Neisseria meningitidis* Cas9, NmeCas9)和许多同源物。这些 Cas9 核酸酶在蛋白大小、同源性、

PAM 序列、gRNA 结构、最佳间隔长度、编辑效率和编辑特异性方面特点迥异,为基因编辑工具的多样性提供了基础。

1.3 Cas12 核酸酶

与 Cas9 相比, Cas12 核酸酶利用单一的 RuvC 活性域切割目标 dsDNA。许多天然的 Cas12 由单个 crRNA 引导,通常在 PAM 序列远端原间隔基序产生交错切割^[11]。第一个被广泛应用于基因组编辑的 Cas12 核酸酶——Cas12a (Cpf1)^[11]能够利用特有的核糖核酸酶 (ribonuclease, RNase)处理 crRNA,从而促进多重基因编辑^[12]。Cas12a 同源物通常识别富含 T 的 PAM,与大多数 Cas9 的 PAM 不一致; Cas12f (Cas14)可有效切割 dsDNA 产生不对称黏性末端^[13]; Cas12b (c2c1)和 Cas12i 主要切割 dsDNA^[14-16]; Cas12e (CasX)因小于 1 000 个氨基酸(amino acids, aa)且在细菌和人类细胞中都具有活性而闻名^[17-18]。包括 Cas12a 在内的一些 Cas12 变体,在目标位点识别和核酸酶激活后无差别切割单链 DNA (single strand DNA, ssDNA)或 RNA^[16,19],基于这种切割活性 Cas12 核酸酶被开发为多种核酸检测工具^[13,19]。

1.4 修复途径

生物体内受到细胞类型、细胞状态和 DSB 性质的影响^[20],存在多种 DNA 修复机制^[21]。DSB 修复途径主要有两种:一是非同源末端连接 (non-homologous end joining, NHEJ);二是利用 DNA 模板进行同源定向修复(homology-directed repair, HDR)^[22]。NHEJ 是大多数细胞修复 DSB 的主要方式,简单高效但保真度低^[23],容易在 DSB 位点周围引入无法预测的核苷酸插入或缺失(insertions and deletions, indels)从而阻止随后的核酸识别和重新切割^[24]。如果 Cas 核酸酶靶向开放阅读框, NHEJ 产生的 indels 产物通常会在编码区产生移码突变,从而去除蛋白质功能^[25-27]。

存在 DNA 供体模板时, 细胞会启动 HDR 修复方式从而引入多种低效的基因组编辑, 包括点突变、精确插入、精确删除和 DNA 片段整合^[28]。目前已有多种方法可提高 HDR 的效率, 但大多数情况下由 Cas 核酸酶引起的插入或缺失 (insertions/deletions, indels) 仍然难以避免^[23,29]。

2 单碱基编辑器

第一代碱基编辑器 (base editors, BE) 是在 CRISPR-Cas9 系统的基础上, 将 Cas9 蛋白与一种作用于 ssDNA 的脱氨酶融合, 在不产生 DSB 的情况下实现精确的点突变^[29-32]。目前应用最广泛的 Cas 核酸酶是 SpCas9, 含有 1 368 aa, 识别常见的 NGG (N=C、T、A 或 G) PAM, 具有强大的 DNA 靶向切割活性, 但存在较高水平的脱靶编辑^[29]。迄今为止, 研究人员已经开发了胞嘧啶碱基编辑器 (cytosine base editors, CBE) 和腺嘌呤碱基编辑器 (adenine base editors, ABE) 两类主要的单碱基编辑器, 前者催化 C•G→T•A 碱基对的转换, 后者催化 A•T→G•C 的转换^[30-31]。CBE 和 ABE 可有效介导 4 种单碱基突变 (C→T, A→G, T→C, G→A), 这 4 种突变约占目前已注释的人类致病遗传变异位点的 30%^[33]。因此, CBE 和 ABE 被应用于多种细胞和生物体中碱基转换造成的疾病模型构建和疾病治疗^[34], 在农业领域成功实现了家畜繁殖性能改良、异体器官移植、农作物经济性状改良等目标^[35-36]。目前, 碱基编辑器的应用主要受限于副产物的产生, 包括发生在目标位点的副产物如目标核苷酸的颠换突变 (transversions, 即 C•G→A•T 或 G•C、A•T→C•G 或 T•A)、旁侧编辑和各种 indels, 以及发生在脱靶位点的副产物等。因此, 研究者们对碱基编辑系统的各个组分 (包括 Cas 蛋白、脱氨酶、小元件等) 进行优化和改良以拓展其编辑范围, 降低其脱靶效应等。

2.1 单碱基编辑器简介

2.1.1 CBE 系统的开发

2016 年, Komor 等^[30,37] 开发出融合鼠源胞嘧啶脱氨酶 APOBEC1 的 CBE 系统, 该系统利用 APOBEC1 将 R-环内的胞嘧啶 (C) 脱氨成为尿嘧啶 (U), 而后 DNA 聚合酶会将 U 识别为胸腺嘧啶 (T), 从而实现 C→T 转换 (图 1A)。第一代碱基编辑器 BE1 (APOBEC1-XTEN-dCas9) 在体外可实现 25%–40% 的编辑效率, 编辑窗口为 sgRNA 的第 4–8 位 (第 1 位是 PAM 远端 sgRNA 的第 1 个核苷酸, PAM 位于第 21–23 位)。BE1 在体内的编辑效率却大幅下降, 原因是产生的中间体 U 会被尿嘧啶 DNA N-糖基化酶 (uracil DNA N-glycosylase, UNG)^[38] 识别并切除, 从而启动碱基切除修复途径 (base excision repair, BER) 使中间产物 U•G 恢复到原始序列 C•G (图 1A)。为了延长 U 在目标位点的半衰期从而提高编辑效率和纯度, 研究人员在 BE1 的基础上融合尿嘧啶糖基化酶抑制剂 (uracil DNA glycosylase inhibitor, UGI) 开发出 BE2; 随后, 又结合细胞的内源性机制将 BE2 中的 dCas9 替换成 nCas9, 刺激细胞内碱基错配修复途径 (mismatch repair, MMR), 开发出的 BE3 能大幅提高编辑效率和产物纯度。自此, 碱基编辑系统打开了精准基因组编辑的大门, 在较长一段时间内, BE3 成为使用最为广泛的 CBE 版本。

2.1.2 ABE 系统的开发

利用类似于 CBE 的策略, 2017 年 Gaudelli 等^[31] 报道了 ABE 系统, 利用进化的 TadA* 脱氧腺苷脱氨酶将 R-环内的腺嘌呤 (A) 转化为肌苷 (I), 这些肌苷被 DNA 聚合酶识别为鸟嘌呤 (G), 从而实现 A→G 转换 (图 1B)。由于已知的腺嘌呤脱氨酶无法以 DNA 为底物对 A 进行脱氨, 研究人员对大肠杆菌 TadA 进行定向进化, 成功筛选出引入了 14 个突变位点的 ecTadA*, 开发出可直接作用于 ssDNA 的 ABE7.10 系统 (ecTadA*-ecTadA*-nCas9), 在人类细胞中的编辑效率约

50%，编辑窗口为第 4–9 位^[31]。对于 ABE，融合抑制 N-甲基嘌呤 DNA 糖基化酶(N-methylpurine DNA glycosylase, MPG or AAG)后，并没有进一步提升编辑产物纯度，这表明在哺乳动物细胞中，I 的切除效率远低于 U 的切除效率^[31]。2020 年，Richter 等^[39]利用噬菌体辅助的连续进化和非连续

进化(phage-assisted continuous and non-continuous evolution, PACE 和 PANCE)为 ABE7.10 的脱氨酶增加了 8 个突变，得到了活性增加 590 倍的 TadA8e，进而衍生出 ABE8e。结合多种 Cas9 或 Cas12 进行测试时，ABE8e 的编辑效率都较 ABE7.10 有显著提高。

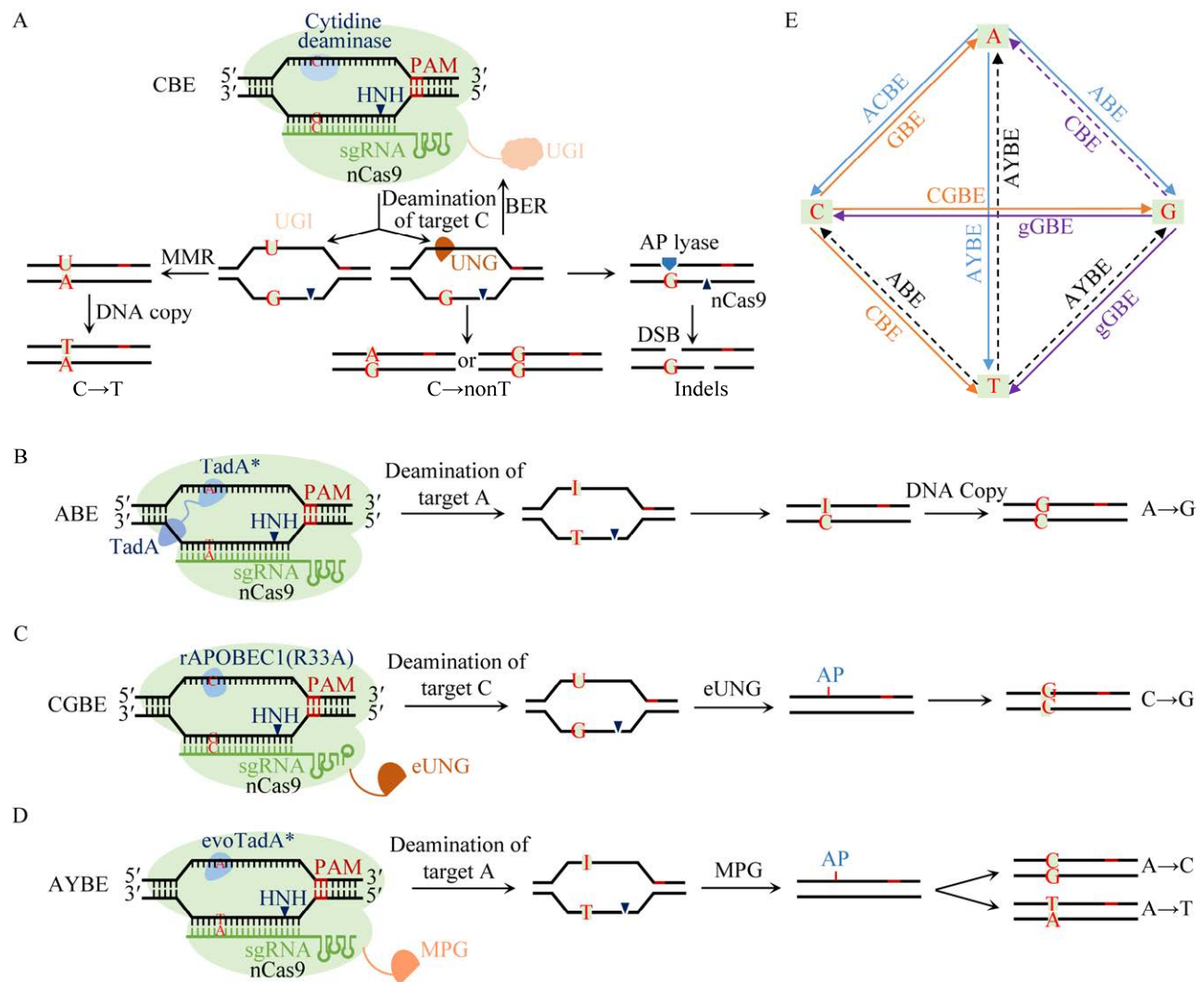


图 1 单碱基编辑器工作模式图

Figure 1 Mechanisms of single base editors. A: CBEs use cytidine deaminases to convert C to U and achieve C→T in the presence of UGI and polymerases. B: ABEs use deoxyadenosine deaminases to convert A to I and achieve A→T in the presence polymerases. C: CGBE system achieves C→G using a fusion of a UNG to a CBE. D: AYBE system achieves A→C/T using a fusion of an optimized MPG to an ABE8e. E: Solid lines indicate direct base deamination on the edited strand and the dashed lines indicate a corresponding transition of paired bases on the non-edited strand due to a transition of bases on the edited strand.

2.1.3 颠换编辑系统的开发

由于 UNG 可在胞嘧啶脱氨位点脱去 U, 从而建立无嘌呤/无嘧啶(apurinic apyrimidinic, AP)位点实现嘧啶与嘌呤之间的碱基颠换^[40]。2020 年, Zhao 等^[40]融合 UNG 到 CBE 中, 构建了糖基化酶碱基编辑器(glycosylase base editor, GBE)。研究人员首先利用活化诱导性胞苷脱氨酶(activation-induced cytidine deaminase, AID)构建出 AID-nCas9-UNG 系统, 在大肠杆菌中实现了高效的 C→A 颠换; 随后, 利用 APOBEC1 替换 AID, 构建的 APOBEC1-nCas9-UNG 在真核细胞中实现了 C→G 颠换。利用同样的原理, Kurt 等^[41]将 APOBEC 替换成 rAPOBEC1 (R33A), 构建的 CGBE1 系统可有效介导 C→G 碱基颠换并降低在 RNA 和 DNA 水平的脱靶效应(图 1C)。2022 年, Dong 等^[42]将转录激活因子 VP64 融合到 GBE 系统, 显著提高 C→G 的编辑效率; 随后, GBE 系统又分别与 SunTag 和 SpRY-Cas9 系统融合, 构建的 SunTag-GBEs 和 SpRY-GBEs 在编辑效率、产物纯度和靶向范围方面都比原始 GBE 有较大提高。

最近, 鉴于内源糖苷酶低效的肌苷切除能力, Tong 等^[43]将优化后的人源 MPG 融合在 ABE8e 的 C 端构建出 AYBE 系统, 首次实现了 A→Y (Y=C 或 T) 的高效颠换(图 1D)。随后, Chen 等^[44]融合鼠源 mAAG 构建出可识别 YAR (R=A 或 G) PAM 的 AXBE 系统。此外, 研究人员还将带有 2 个突变的 mAAG-EF 和 TadA8e (N108Q) 结合并开发出 ACBE-Q, 显著提升非 YAR PAM 位点的编辑效率, 实现高效的 A→Y, 其中编辑窗口位于第 4–6 位, 且具有较低的脱靶水平。利用 ACBE-Q 构建杜氏肌营养不良小鼠疾病模型中, 70% 突变小鼠实现了靶位点 A→C 的编辑, 平均编辑效率为 56%, A→C 编辑纯度最高可达 99.8%, 显示了其体内应用的巨大潜力, 有望纠正苯丙酮尿症、血友病 B 等多种遗传疾病。

虽然非编辑链上的 G 或 T 在编辑链上的 C

或 A 被编辑的同时也会发生相应的转变, 但受到 PAM 及编辑窗口等限制, 很多情况下仍需要对 G 或 T 进行直接编辑。因此, Tong 等^[45]开发出不依赖于任何脱氨酶的、基于工程化糖基化酶的鸟嘌呤碱基编辑器(glycosylase-based guanine base editor, gGBE), 经过多轮优化筛选后得到 gGBEv6.3, 其 G→Y 的编辑活性比野生型 gGBEv0.1 高 1 700 倍, 且具有较低的 indels 频率。至此, 在众多实验室的努力下实现了 12 种碱基之间的自由转换(图 1E), 尽管部分碱基编辑系统还需要进一步完善和优化才能实现高效编辑和应用。

2.2 优化小元件

大多数碱基编辑器, 如 BE3 和 ABE7.10, 利用 nCas9 切割非编码链^[30-31]来提高碱基编辑效率(图 1A、1B), 产生的切口刺激非编码链的修复, 再利用编码链作为模板重新合成非编码链。BE4 系统则通过优化 linker 和融合多个 UGI 等方法来减少颠换频率, 进一步提高编辑效率^[37]。另一方面, 添加核定位序列(nuclear localization sequence, NLS)和优化密码子产生的 BE4max 和 ABEmax 变体也大大提高了其在细胞和动物体内的编辑效率^[46-47]。

颠换一般认为源于碱基位点的易错修复途径, 在 DNA 糖基化酶水解将脱氨碱基(如 U)连接到脱氧核糖骨架的糖苷键时产生的^[37]。Wang 等^[48]通过优化 P2A 连接 UGI 的表达量, 构建了由 4 个拷贝的 UGI 组成的 eBE-S3, 具有更高的编辑产物纯度。而 Komor 等^[37]则将来源于噬菌体的 Gam 蛋白结合到 DSB 末端防止其降解, 构建的 BE4-Gam 进一步减少了 indels 的形成。

2.3 优化或替换 Cas 蛋白

2.3.1 扩大基因组的靶向范围

扩大基因组编辑的靶向范围一直是 CRISPR-Cas 技术发展的重点方向。Cas 蛋白结合的限制条件在于是否存在匹配的 PAM 序列^[5], 许多研

究发现 Cas9 和 Cas12 直系同源物可识别各种 PAM^[49], 这种自然多样性已被利用以实现靶向更广泛的基因组序列。然而, 在哺乳动物细胞中, 目前发现的所有天然 Cas 蛋白只能识别一小部分的 PAM, 因此许多研究人员设计或进化了具有较少 PAM 限制性的 Cas9 或 Cas12 变体(图 2A)。

(1) 优化或替换 Cas9 蛋白

2018 年和 2020 年, Hu 等^[50]和 Kim 等^[51]利用 PACE 和细菌中选择进化出的 xCas9-3.7 变体构建 xBE3, 在非 NGG PAM (尤其是 NGT 和 NGA)上显示出比野生型 SpCas9 更高的活性, 并大大降低了人类细胞中的脱靶活性。同理, Nishimasu 等^[52]基于结构功能设计出 SpCas9-NG 变体并构建出 BE3-NG, 可靶向 NGN PAM, 在许多情况下比 xCas9-3.7 具有更高的编辑效率。

随后, Miller 等^[53]利用定向进化产生了 3 种新的 SpCas9 变体(SpCas9-NRRH、SpCas9-NRCH 和 SpCas9-NRTH, H=A、C 或 T, R=A 或 G), 比 xCas9-3.7 具有更高的活性, 几乎可靶向任何 NR PAM。而 Walton 等^[54]则通过结构工程化方式进化出 SpG 和 SpRY 两种 SpCas9 的变体, 分别识别 NGN 和 NRN/NYN PAM, 其中 NRN 的识别效率高于 NYN。

除了进化已知 PAM 的 Cas9 蛋白外, 还可通过筛选识别不同 PAM 的 Cas9 同源物以构建具有不同识别序列特征的碱基编辑器。本课题组^[55-56]利用来自嗜热链球菌(*Streptococcus thermophilus*)的 Sth1aCas9、来自戈登链球菌(*Streptococcus gordonii*)的 SgoCas9、来自中华链球菌(*Streptococcus sinensis*)的 SsiCas9 等 SpCas9 的同源物分别构建出相应的 BE4max 和/或 ABE8e 编辑器, 识别的 PAM 分别为 NNAAAG、NHGYRAA 和 NNAAA, 均具有高活性、高保真度、不同的编辑窗口和低副产物的特点, 同时 DNA 和 RNA 脱靶率较低。

尺寸较小的 SaCas9 (1 053 aa)在某些基因组

编辑应用上占据了优势^[57], 研究人员通过对与 PAM 相互作用的结构域进行诱变和细菌选择, 开发出能识别 NNNRRT PAM 的 SaCas9-KKH 变体, 靶向范围比野生型 SaCas9 扩大了 4 倍左右^[58], 并基于该变体开发了 SaKKH-BE3^[59]和 SaKKH-ABE^[60]。随后, Hu 等^[61]、Wang 等^[62]和 Gao 等^[63]基于 SaCas9 的同源物开发了 SlugBE4max、SchBE4max, 基于 CjCas9 的同源物开发了 Hsp1-Hsp2Cas9-Y-CBE 分别识别 NNGG、NNGR、N₄CY PAM, 其蛋白尺寸小、特异性高且脱靶水平低, 进一步扩展了基因组编辑的范围。

(2) 优化或替换 Cas12 蛋白

Cas12 蛋白识别的富含 T 的 PAM 序列, 填补了许多 Cas9 直系同源物只识别富含 G 的 PAM 序列的空白。然而, Cas12 识别的 PAM 序列也具有一定的限制性, 例如 LbCas12a 和 AsCas12a 只识别 TTTV PAM (V=A、C 或 G)^[11]。2017 年, Gao 等^[64]利用结构引导诱变得到的 AsCas12a-RVR 变体可以识别 TATV PAM, AsCas12a-RR 变体能够识别 TYCV PAM。紧接着, Li 等^[65]开发了 dCpf1-eBE (APOBEC1-dCpf1-4xUGI-3xNLS) 系统, 该系统以 TTTV 为 PAM 并以第 8-13 位为编辑窗口。2019 年, Kleinstiver 等^[66]进化的 enAsCas12a 变体在 TTTV PAM 上的活性大约是野生型 AsCas12a 的 2 倍; 随后又开发出能识别 TTYN、VTTV 和 TRTV PAM 的变体, 构建出能以第-5-25 位为编辑窗口的 enAsBE1.1-1.4。

而 Kim 等^[67]对 gRNA 经过工程化改造构建的 Un1Cas12f1 和 Wu 等^[68-69]改造的能识别 TTR PAM 的 AsCas12f1 以及识别 NTTTY PAM 的 SpaCas12f1, 与 SpCas9 的编辑效率相当且与 AsCas12a 的特异性相似。随后, Kong 等^[70]又通过蛋白质和 sgRNA 工程进化出了 enOsCas12f1 和 enRhCas12f1 变体, 分别识别 TTN 和 CCD (D=not C) PAM, 显示出更高的编辑效率和更广

泛的靶向范围。以上 Cas12f 变体尺寸不到 Cas9 和 Cas12a 的 50%, 可应用于包括 AAV 在内的多种递送系统。

2.3.2 挖掘小尺寸的核酸酶

除了上述小尺寸的 Cas9 和 Cas12f 以外, 研究人员也在不断挖掘新的具有基因编辑潜力的新工具, 以解决现有基因编辑工具尺寸太大难以被单个 AAV 载体递送的问题。此后研究者在原核生物 IS200/IS605 转座子超家族中发现了新型核酸内切酶专性移动元素引导活动 (obligate mobile element-guided activity, OMEGA) 系统, 其中的 TnpB 和 IscB/IsrB 分别被认为是 CRISPR-Cas12 和 Cas9 系统的祖先。这类核酸内切酶体积更小 (400–700 aa), 并具有类似的 RNA 引导且 PAM/TAM (target-adjacent motif) 依赖的 dsDNA 切割活性, 其中的 RNA 被命名为 ω RNA^[71]。Han 等^[72]对约 500 aa 大小的 OgeuIscB 及其 ω RNA 进行工程化设计后开发出 enIscB 变体, 而后对其进行改造和筛选得到 enIscB 切口酶, 并构建出单碱基编辑效率极高的迷你型单碱基编辑器 miABE 和 miCBE, 更适合 AAV 进行体内递送。Xiang 等^[73]建立了适用于 TnpB 编辑器的大规模筛选体系, 鉴定了 ISAam1 和 ISYmu1 两个小于 400 aa 的 TnpB 核酸酶并构建相应的微型基因编辑系统, 均具有与 SaCas9 相似的编辑效率。Saito 等^[74]报道了一种源于真核生物的 RNA 引导的核酸内切酶——Fanzor, 其祖先或为 TnpB。相较 CRISPR-Cas 系统, Fanzor 系统非常紧凑且没有旁侧切割活性, 更容易递送到细胞和组织中并实现更精准的基因组编辑, 但开发成碱基编辑系统仍需进一步研究。

2.3.3 改变编辑活性窗口

天然的 Cas 蛋白和工程化的 Cas 变体具有不同编辑窗口, 其中 SaCas9 介导的碱基编辑器 (CBE 为第 3–12 位, ABE 为第 4–12 位)^[59]的编辑窗口比 SpCas9 介导的碱基编辑器 (CBE 为第

4–8 位, ABE 为第 4–7 位) 更宽, 而 Cas12a 衍生的 CBE 和 ABE 通常以第 8–13 位为编辑窗口 (其中第 1 位是 5' PAM 之后的第一个核苷酸)^[65]。此外, 研究人员对 SpCas9 结构域进行工程化改造, 例如 Tan 等^[75]开发的 BE3-PAPAPAP 和 nCDA1-BE3, 修改 linker 能保证高效编辑的同时还有效地将编辑窗口缩小 1–2 nt; Huang 等^[76]开发的 CP-CBEmax 利用 SpCas9 的环状排列 (circular permutation, CP) 改变脱氨酶在 R-环的位置, 使编辑窗口扩宽为第 4–11 位; Jiang 等^[77]利用 SunTag 系统开发出 BE-PLUS, 将多个拷贝脱氨酶招募到 R-环以增加核苷酸暴露的脱氨酶环境浓度来拓宽编辑窗口。

2.3.4 减少 Cas 蛋白依赖的脱靶

Cas 蛋白依赖的脱靶主要是由 gRNA 结合到与目标位点相似的序列所引起的^[78], 影响因素包括编辑窗口内 C 或 A 的含量、核苷酸序列背景、脱氨酶到 R-环的可及性等。由 Cas9 介导形成 R-环来驱动的脱靶, 可用软件预测 (如 Cas-OFF-inder 等) 或者使用高灵敏度的 Cas 核酸酶脱靶检测方法 (如 CIRCLE-seq^[79]) 来识别 Cas 蛋白依赖的脱靶位点。

降低 Cas 蛋白依赖的脱靶效应的策略主要有 3 种: (1) 使用高保真的 Cas 核酸酶。研究表明, 增加 Cas 结构域的 DNA 特异性确实可以最大限度地减少 CBE 和 ABE 的 DNA 脱靶^[50,80–82]; (2) 修饰 sgRNA。Lee 等^[80]开发的 Sniper-Cas9 可通过延长或截短的 sgRNA 来降低脱靶效率, 同时保持原有的靶向活性; (3) 缩短细胞中 Cas 蛋白与脱氨酶融合蛋白的作用时间。以 mRNA^[83]、RNP^[82]、eVLP 和脂质体等方式递送, 使其在细胞内快速降解, 既保持了靶向活性又大大降低了脱靶效率。

2.4 优化脱氨酶结构域

APOBEC1 是第一个应用于碱基编辑器的脱氨酶^[30], 在随后的研发过程中, 科学家们又报道了不同的 APOBEC1 家族成员以及其他脱氨

酶,如 CDA、AID 和 APOBEC3 家族成员(A3A、A3B、A3C、A3D、A3F、A3G 和 A3H)等。脱氨酶的动力学参数和对核苷酸底物的偏好性不同,导致了不同的编辑窗口宽度和不同的底物序列活性(图 2A)。

2.4.1 改变编辑活性窗口

改变碱基编辑器的脱氨酶结构域能为碱基编辑器提供不同的编辑窗口。因此,2016 年 Nishida 等^[32]利用来源于七鳃鳗(*Lampetra japonicum*)的胞嘧啶脱氨酶 PmCDA1 开发的 Target-AID,其编辑窗口为 sgRNA 的第 5–9 位。Ma 等^[84]融合了 hAID、dCas9 和 UGI 开发了一种靶向辅助诱变系统(targeted AID-mediated mutagenesis, TAM),Hess 等^[85]通过大肠杆菌噬菌体 MS2 (*Escherichia coli* bacteriophage MS2) 招募 hAID 开发了 CRISPR-X 系统,这 2 种系统可通过结合多个 sgRNA 把编辑范围拓宽至 100 nt。Kim 等^[59]和 Liu 等^[86]基于 APOBEC1 结构的诱变开发出具有狭窄窗口的编辑器,以削弱其催化活性。融合 CDA、AID 和 APOBEC3A (A3A)脱氨酶的碱基编辑器通常具有较宽的窗口,可能是由于这些脱氨酶的较高活性^[32,81,87-88],同时也更易产生旁侧突变。

在 ABE 系统中, Li 等^[89]通过将 TadA 融合在 Cas9 蛋白内部特定位点筛选出一系列 ABE-nSpCas9-DSs,编辑窗口主要位于第 4–7 位和第 9–16 位;随后,融合 Cas12f 与各类 TadA 突变体开发出一系列 miniABEs,其中 CL-dRRAABE-TadA*(82G)编辑窗口为第 16–17 位^[90],突破了已有研究中 ABE 编辑窗口的局限性,并进一步降低了 RNA 脱靶水平。

2.4.2 改变序列背景偏好性

脱氨酶具有一定的序列偏好性,如大鼠 APOBEC1 偏好 TC 基序中进行胞嘧啶脱氨且排斥 GC 环境。为了进一步扩大编辑器的应用范围,科学家们开发出不同序列背景偏好的脱氨

酶。2018 年, Wang 等^[87]对人源 A3A 脱氨酶进行优化,生成的 hA3A 脱氨酶可对高度甲基化区域的 C 进行脱氨;而 Komor 等^[30]和 Liu 等^[91]等优化的 A3G 更偏好于编辑 CC 基序。Gehrke 等^[81]对 A3A 进行工程化改造得到具有强烈 TC 基序偏好的脱氨酶 eA3A (APOBEC3A N57G)并开发出 eA3A-BE3 系统;去除 N 端 RNA 结合域的截短的 A3B 变体比野生型 A3B 脱氨酶显示出更高的编辑活性,而 APOBEC1、A3A 和 CDA 的截短形式都已被证明支持高效的碱基编辑活性^[92-94]。Thuronyi 等^[95]通过 BE-PACE 的方法开发出编辑活性和序列背景兼容性都更高的 evoAPOBEC1-BE4max 以及具有不明显的序列背景偏好性的 evoFERNY-BE4max,为不同序列背景的编辑位点提供更多选择。

2.4.3 降低不依赖于 Cas 蛋白的 DNA/RNA 脱靶

碱基编辑器中不依赖于 Cas 蛋白的 DNA 脱靶,主要因为脱氨酶长期表达,或随机或规律地对 ssDNA、转录区域、复制区域的 DNA 进行脱氨。为了进一步降低不依赖于 Cas 蛋白的 DNA 脱靶, Doman 等^[96]设计出明显降低 DNA 脱靶效率的 YE1-BE4,在保持编辑效率的同时还扩大了靶向范围。随后, Yu 等^[97]也改造出 4 种 APOBEC 脱氨酶变体(PpAPOBEC1、RrA3F、AmAPOBEC1 和 SsAPOBEC3B)和“hifi”版本的编辑器,都明显降低了不依赖于 Cas 蛋白的 DNA 脱靶。Zhang 等^[90]通过融合 Cas12f 和重编程的 TadA-8e 突变体实现了 ABE 向 ACBE 和 CBE 的转变,构建出的新型功能性 miniCBEs,具有高编辑效率、单碱基编辑精度并消除了不依赖于 Cas 蛋白的 DNA 脱靶。

CBE 和 ABE 融合的脱氨酶均为可作用于 RNA 的脱氨酶,在细胞中过表达会诱导产生不依赖于 Cas 蛋白的 RNA 脱靶^[98]。为了降低不依赖于 Cas 蛋白的 RNA 脱靶, Grünwald 等^[99]开发出 BE3-R33A 和 BE3-R33A/K34A,与 BE3 相

比显著降低了 RNA 脱靶效率。Zhou 等^[100]也通过引入点突变的方法改造了 BE3、BE3-hA3A 和 ABE7.10 中的脱氨酶结构域,显著降低 RNA 脱靶。本课题组^[101]也开发了 2 个具有极低 RNA 脱靶活性的 eABEs,分别是 del153/del153*和 mini del153。Wang 等^[102]利用胞嘧啶脱氨酶中天然存在的抑制序列结构域(deoxycytidine deaminase inhibitor, dCDI)开发出的变形式碱基编辑器(transformer base editors, tBEs)极显著降低了 DNA 和 RNA 脱靶。tBE 对 β -地中海贫血等罕见病已经展现出超过 80% 的高编辑效率,其中治疗 β -地中海贫血的管线正在系统进展,相比于传统 Cas9 核酸酶基因编辑技术展现出更为优异的疗效和安全性。此外,研究者利用将脱氨酶包裹于 Cas 蛋白中间进行表达的策略,大幅降低了碱基编辑器的 RNA 脱靶活性。Liu 等^[103]在优化 RNA 碱基编辑器时,通过引入突变将脱氨酶嵌入到 dCasRx 中,构建的 REPAIRx 可大幅降低脱靶效应,由于定点 RNA 编辑是可逆的,因此该策略或可应用于 DNA 编辑领域。

3 其他碱基编辑器

3.1 双碱基编辑器

单碱基编辑器只能催化单一类型碱基的转换和颠换,这限制了其广泛应用。因此,开发新的碱基编辑器能高效地同时产生 2 种不同碱基的突变(图 2B),极大地丰富了碱基编辑工具的应用,在基因治疗、物种改良和分子进化等方面都有重要意义。2020 年, Li 等^[104]将 A3A 和 ABE7.10 同时融合到 nCas9 的 N 端,构建出双碱基编辑器 STEME-1,首次实现在一个 sgRNA 引导下同时突变 C 和 A。Zhang 等^[105]也利用 hAID-TadA-TadA*-nCas9 开发出 A&C-BE_{max} 双碱基编辑器,在同一等位基因的靶序列上实现 C 和 A 的同时高效突变,且具有较低的 RNA 脱靶

效应。

为了进一步优化双碱基编辑器的产物纯度、编辑效率和活性窗口, Sakata 等^[106]将 rAPOBEC1 和 PmCDA1 分别与 TadA 融合到 nCas9 的 N 端和 C 端,开发了 3 种新的双碱基碱基编辑器 Target-ACE/Target-ACE_{max}/ACB_{max}。而 Grünwald 等^[107]将更短的 TadA 和 PmCDA1 融合到 nCas9 的 N 端和 C 端,开发出同步可编程 A 和 C 的系统(synchronous programmable adenine and cytosine editor, SPACE)。上述双碱基编辑器在产物纯度、编辑效率、活性窗口等方面的特性比之单个系统相当或更好, DNA 和 RNA 脱靶都与单碱基编辑器相当。

2021 年, Tao 等^[108]报道了结合 hA3A (Y130F)、TadA8e (V106W) 和 SpRY 的无序列限制的 CABE-RY 双碱基编辑器,具有较小的编辑窗口和较低的 RNA 脱靶编辑。目前已开发的双碱基编辑器均基于 Cas9 蛋白偶联 2 种不同类型的脱氨酶,导致复合物尺寸过大从而在一定程度上限制了体内递送和临床应用,因此,本课题组^[109]提出了一种双 sgRNA 与单碱基编辑器或双碱基编辑器相结合的策略,能在同一等位基因上同时诱导 C•G→T•A 和 A•T→G•C 转换或多碱基转换类型组合。

3.2 线粒体碱基编辑器

gRNA 不易进入线粒体,阻碍了线粒体 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA) 的基因组操作。直到 2021 年, Mok 等^[110]将介导 dsDNA 胞苷脱氨的菌间毒素 DddA 和 TALE 融合,构建出 DdCBE 系统,该系统利用 TALE 系统实现序列靶向,并利用 dsDNA 脱氨酶的活性实现脱氨,首次在 mtDNA 中实现单碱基 C→T 转换,且具有高特异性和产物纯度,但偏好 TC 序列。2022 年, Cho 等^[111]通过融合 TALE、TadA8e 和 DddAtox 开发出 TALED,实现 mtDNA 的 A→G 转换,进一步扩大了线粒体基因组的编辑范围(图 2B)。Mok 等^[112]发现

TALED 在植物叶绿体 DNA (chloroplast DNA, cpDNA) 中能实现靶向诱导 A→G 和 C→T 的碱基编辑且无显著的脱靶编辑。

为了进一步优化现有的线粒体碱基编辑器, Mok 等^[113]利用定向进化得到的 DddA6 将 TC 靶点的编辑效率平均提高了 3.3 倍, 用 DddA11 构建的 DdCBE 系统提高了对 HC 序列的兼容性且将 AC 和 CC 靶点的平均编辑效率从低于 10% 提高至 15%–30%。本课题组^[114]则利用来源于肠道菌毒素 (*Roseburia intestinalis*) 的 riDddA_{tox} 开发出核基因 DdCBE (crDdCBE) 和线粒体基因 CBE (mitoCBE), 该酶可实现核内和线粒体基因 HC 和 GC 靶点的 C→T 高效编辑。此外, 研究还进一步发现反式激活因子如 VP64、P65 或 Rta 与

DddA_{tox} 或 riDddA_{tox} 融合产生的 crDdCBE 和 mitoCBEs 可显著提高核和 mtDNA 的编辑效率 3.5 倍和 1.7 倍。

此外, Mi 等^[115]通过融合 Ddd_Ss 所开发的 DdCBE_Ss, 可以在 dsDNA 中有效地对 DC 环境中的 C 脱氨; 在 Ddd_Ss 中引入单个氨基酸替换开发出 DdCBE_Bc, 成功提高了其活性和序列兼容性。随后该团队^[116]又报道了一种不依赖于 DddA 系统的 mitoBEs, 通过引入单链切口酶 MutH 或 Nt.BspD6I, 不仅能高效地实现 A→G 或 C→T, 还可以编辑特定 DNA 链, 且未观察到明显的脱靶现象。近期, Hu 等^[117]利用 FokI 失活突变体和外切核酸酶配合单链 DNA 脱氨酶, 开发了链特异性编辑器 CyDENT, 集成

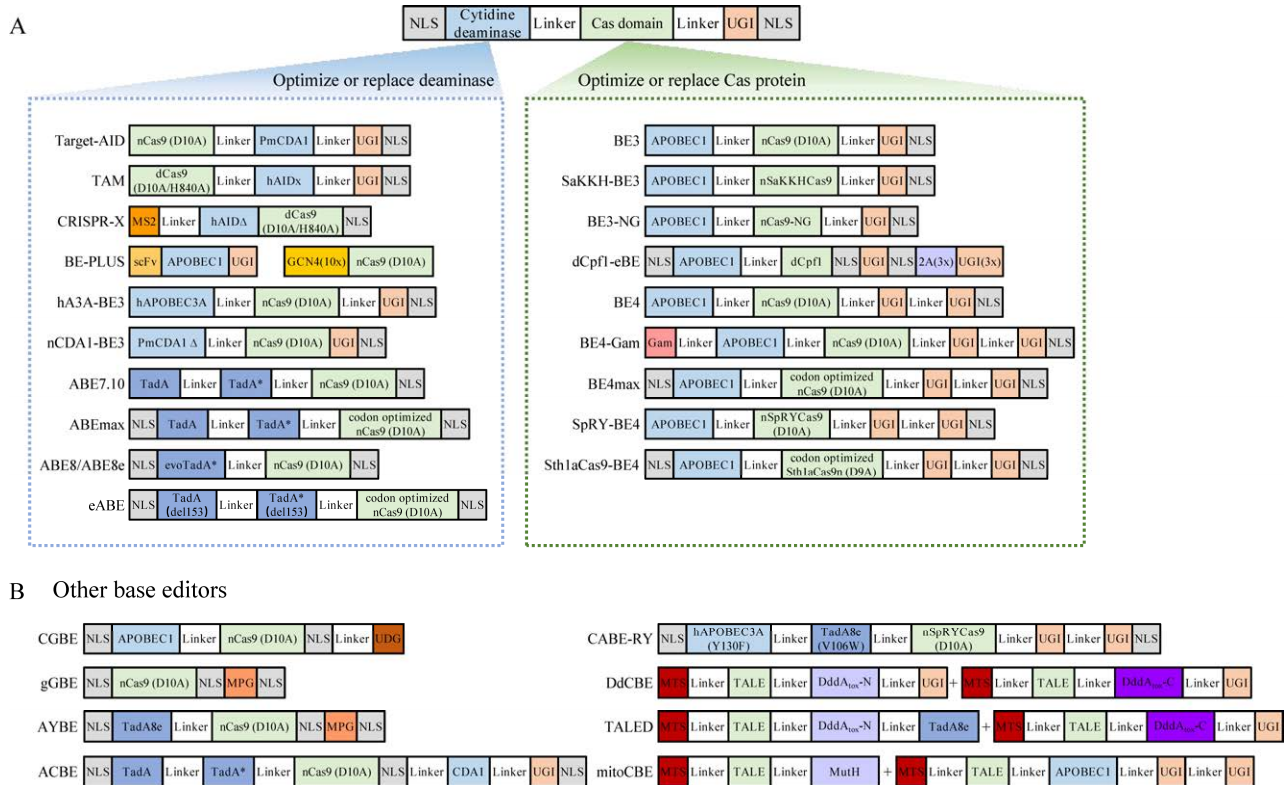


图 2 经典碱基编辑器结构示意图

Figure 2 Schematic diagram of the architectures of the classical base editors. A: Ways to transform CBEs and ABEs involve optimizing or replacing deaminases and/or Cas proteins, as well as enhancing small elements such as linkers, UGI and NLS. B: Transversion base editors use a fusion of UDG or MPG to achieve transversion of bases; Dual base editors achieve C→T and A→G simultaneously using cytidine deaminases and deoxyadenosine deaminases fusions; Mitochondrial base editors use a fusion of DddA to TALE to achieve mtDNA editing.

了对细胞核、线粒体和叶绿体进行精准编辑的能力,介导的线粒体碱基编辑具有优于 DdCBE 的单链偏好性。

3.3 CRISPR 相关转座酶

在细胞中进行基因组靶向整合一直是基因编辑领域的重大挑战,Cas 蛋白介导的 HDR 可插入遗传物质但受限于分裂细胞。近年来,科学家们发现天然的 CRISPR 相关转座酶和工程化的 Cas 蛋白融合而产生的转座酶系统可在体外和细菌中进行基因组整合^[118]。工程化的 Cas 融合重组酶,理论上可以如 CRISPR-Cas 系统一样实现 DNA 插入、删除、倒置或替换目标 DNA 等,但效率较低、靶标序列限制较大。

转座子整合的位置对其生存和传播至关重要,原核生物的 DNA 转座子 Tn7 进化成在不破坏必需基因的情况下整合到靶位点,同时避开宿主的防御系统。Tn7 样转座子通常包含 *tnsA*、*tnsB*、*tnsC*、*tnsD* 和 *tnsE* 基因以及其他基因元件。一些重组的 Tn7 样转座子变体在细菌中参与 CRISPR 相关转座子介导的基因组整合事件。首先,TnsA 和 TnsB 形成 TnsAB 复合体,特异性识别转座子侧翼的左端(LE)和右端(RE)基序,并催化转座子切除供体位点^[119-120]。然后,TnsB 将转座子 DNA 的游离 3'端连接到由 TnsD 或 TnsE 底物分区域决定的目标 DNA 底物上,在 5'端连接处留下小间隙,这些间隙的修复导致 5 bp 目标位点重复。

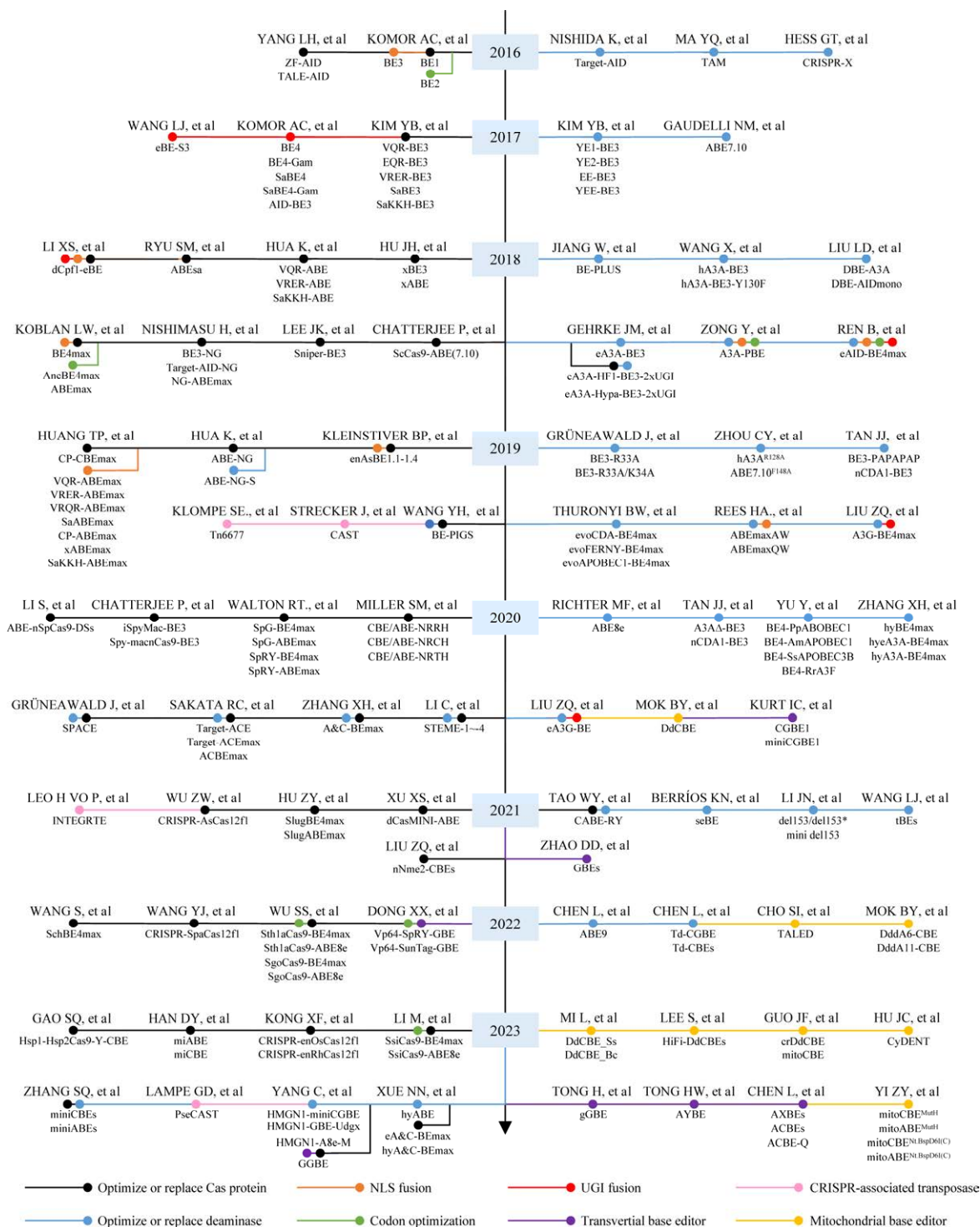
此外,研究人员^[118-121]还发现从霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)中分离出的 I-F 型转座子(Tn6677)可以将遗传物质插入大肠杆菌基因组。该系统使用辅助质粒、pQCascade 和包含供体 DNA 的质粒,形成 R 环(R-loop)结构并整合基因组。Tn6677 系统识别 CC PAM,插入片段的最佳长度为 775 bp。在细菌基因组中,Tn6677 未检测到全基因组脱靶位点^[118]。而后,Strecker 等^[122]又开发了基于 V-K 型 Tn7 样的 CAST 系统,一是 *Anabaena cylindrica* (AcCAST),可识别

NGTN PAM 并在 PAM 下游 49-56 bp 的窄窗口内观察到插入;二是 *Scytonema hofmannii* (ShCAST),不仅可以识别 NGTN PAM 并在 PAM 下游 60-66 bp 之间观察到插入,还支持插入高达 10 kb 的基因片段,但在多个位点检测到脱靶转位。随后,研究人员^[123]对 CRISPR 转座酶系统进行优化与改造,获得的新系统 INTEGRTE 可在细菌中实现大片段 DNA (长达 10 kb)的多位点定向整合,具有极高的特异性且整合效率高达 100%。最近,研究人员^[124]又在人类细胞中将进化的 PseCAST 和提高转座活性的因子 ClpX 结合,开发出无需 DSB 的 DNA 整合工具,为利用 CRISPR 相关转座酶进行真核基因组整合奠定了基础。

4 讨论和展望

作为一种新兴基因编辑技术,碱基编辑器一经问世便备受关注。ZFNs、TALENs 和 CRISPR-Cas 三种基因编辑工具都具有 DNA 识别和切割能力,但各有优劣。ZFNs 可以实现大片段插入,但效率较低且脱靶效应严重。TALENs 在线粒体基因组编辑中表现出优异的靶向递送能力,但可能出现多拷贝的随机插入。相比之下,CRISPR-Cas 系统设计简单、可操作性强、具有精准的靶向性,大幅缩短了动物模型的构建时间,能够实现模式动物基因的定点编辑,因此应用愈发广泛,但难以实现细胞器 DNA 的靶向编辑。

目前已有多篇综述总结基于 CRISPR-Cas 的单碱基编辑器的发展及应用^[34-36],但随着研究技术的不断深入推进,新型碱基编辑器的开发愈加迅速,但同时总结 CRISPR-Cas 和 TALE 系统的工作较少。本文系统介绍了 CRISPR-Cas 和 TALE 系统及其衍生的碱基编辑器的开发与优化(图 2),并梳理了碱基编辑器的发展历程^[125-141](图 3,鉴于篇幅限制,部分碱基编辑器未在文中

图3 碱基编辑器发展历程^[125-141]Figure 3 The development of base editors^[125-141].

阐述)。总而言之，碱基编辑系统充分发挥了可编程核酸酶的功能和优势，未来广泛应用于基础研究、临床研究和农业育种值得期待。最近，全

球首例基于碱基编辑技术开发的通用型细胞疗法——BE CAR7 用于治疗急性 T 淋巴细胞白血病(T-lymphocytic leukemia, T-ALL)取得成功。研

究团队以 mRNA 的形式将优化的 CBE——coBE 递送到健康 T 细胞中,通过引入终止密码子敲除细胞中的 TRBC、CD52、CD7,并为其添加上嵌合抗原受体 CAR。一名 13 岁 T-ALL 患者接受该疗法治疗半年后,恢复状况良好且未检测到癌细胞^[142]。然而,碱基编辑系统目前仍存在一定的技术性瓶颈亟待突破。例如,碱基编辑器已经实现了直接对 A、C、G 的高效编辑,虽然非编辑链上的 T 在编辑链上 A 被编辑的同时发生转变,但仍然无法直接编辑 T 碱基(图 1E)。另外,受 PAM 序列、编辑窗口活性、脱靶效应和递送形式的限制,在实际的应用中碱基编辑器无法实现对基因组高效编辑的同时还不引入其他副产物。因此,未来碱基编辑器的发展在技术改造和应用层面还具有更深层次的开发潜力。

首先,迄今为止报道的天然和工程化 Cas 蛋白变体只能识别一半左右的 PAM 序列,而且工程化 Cas 蛋白变体的稳定性通常不及天然的 Cas 蛋白^[51],因此,扩大 Cas 核酸酶的靶向范围(尤其是识别不含嘌呤的 PAM 序列)的同时保持高活性和稳定性的 Cas 变体的开发仍然是未来发展的重要方向^[143]。另外,利用天然的和工程化的脱氨酶,可以扩宽碱基编辑器的靶向范围、提高精度和有效性。将 Cas 蛋白与脱氨酶结合,大大增加了碱基编辑器的功能和效用,如 Chen 等^[144]利用重编程的 TadA-8e 构建了 Td-CGBE/Td-CBEs,其中 eTd-CBE_m 非常精准且无序列偏好地主要编辑第 5 位的 C。Huang 等^[145]运用人工智能(artificial intelligence, AI)辅助的高通量蛋白聚类方法,实现了脱氨酶功能结构的深入挖掘,并成功开发了一系列编辑效率高、序列偏好不明显、脱靶效率极低的新颖碱基编辑工具。因此,结合智能 AI 和宏基因组高通量测序开发更多性能优异的 Cas 蛋白和脱氨酶,从而最大限度地减少非预期的碱基编辑,能提高碱基编

辑系统的应用价值并拓展其应用前景。

另外,在全球科研人员的努力下,碱基编辑系统发展迅速、种类繁多、各有所长,但在实际应用中,缺少有效的统计工具总结目前已开发的碱基编辑系统的作用特点。因此,结合 AI 和大数据实时智能统计,定期更新碱基编辑系统的研究进展,有助于各领域把握最新进展并利用新型有效的系统开展研究,对于推进临床试验和促进精准医学发展具有重要意义。

其次,在基于 CRISPR 的筛选应用上,碱基编辑系统可实现大规模突变疾病位点,结合单细胞测序构建相应的疾病模型,从而揭示遗传信息的异质性。根据 PhosphoSitePlus 数据库统计,已经确定的蛋白质翻译后修饰(post-translational modifications, PTMs)类型超过 500 种,广谱的功能研究表明人类蛋白质上 PTM 位点超过 50 万。本课题组^[146]利用 CBE 和 ABE 对接近 18 000 个人类蛋白质组磷酸化位点进行功能化筛选,发现了多个参与结直肠癌细胞周期和蛋白质翻译后共价修饰的基因,该筛选方法可用于人类多种疾病化疗中的功能性磷酸化蛋白质组学研究。

此外,基于碱基编辑系统的饱和突变实现深入的蛋白挖掘和智能设计,除了单碱基编辑器以外,双碱基编辑器也是非常强大的工具,通过对多种类型的蛋白质进行功能突变从而实现蛋白质功能改造和定向进化,从而开发具有不同功能的蛋白质也是碱基编辑系统未来应用的一个重要方向。

最后,在编辑器的递送方面,开发更安全、靶向性更强的递送工具是碱基编辑器应用于体内治疗的重要发展方向。鉴于 AAV 能长期表达、毒性低、免疫原性低和组织特异性高等优势,现已成为基因治疗领域最重要的基因载体之一。但 AAV 的基因组承载量在 4.7 kb 以内,而许多碱基编辑器都超过该大小,因此 AAV 的承载量成

为最大的应用限制。为了进一步扩大其应用,研究人员通过拆分碱基编辑系统,分别包装到 2 个 AAV 中再共同转染的方法来实现较大片段的递送^[147],又或者开发体积较小的 Cas 蛋白^[67-72]和截短的脱氨酶^[92-94]以方便 AAV 递送。此外,研究人员还开发了多项瞬时表达的递送技术,如基于脂类或类脂化合物生成脂质体或脂质纳米颗粒(lipid nanoparticles, LNPs)的非病毒载体和类病毒载体(virus-like particle, VLP),但递送效率不佳^[148]。在 mRNA 疫苗应用时,由此开发的 VLP-mRNA 实现了细胞感染效率高、表达周期短和脱靶效应显著降低^[149]。随着基因编辑技术的进一步发展,也会有更多的碱基编辑工具逐步出现在基因编辑研发领域。在基因治疗中,递送工具需要兼具瞬时、高效、安全以及包容性强的特点,因此病毒载体的安全性问题和非病毒载体效率上的挑战使得递送系统仍需要进一步开发和探索。

值得一提的是,新策略的出现并不是对传统方法的否决,更多的是互相填补应用领域的空白。随着越来越多的技术瓶颈被突破,基于可编程核酸酶的碱基编辑系统在整个基因治疗和农业育种领域的潜力将被进一步激发,最终造福人类。

REFERENCES

- [1] CARROLL D. Genome engineering with zinc-finger nucleases[J]. *Genetics*, 2011, 188(4): 773-782.
- [2] BOCH J, SCHOLZE H, SCHORNACK S, LANDGRAF A, HAHN S, KAY S, LAHAYE T, NICKSTADT A, BONAS U. Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors[J]. *Science*, 2009, 326(5959): 1509-1512.
- [3] JINEK M, CHYLINSKI K, FONFARA I, HAUER M, DOUDNA JA, CHARPENTIER E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity[J]. *Science*, 2012, 337(6096): 816-821.
- [4] GASIUNAS G, BARRANGOU R, HORVATH P, SIKSNYS V. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(39): E2579-2586.
- [5] HILLE F, RICHTER H, WONG SP, BRATOVIČ M, RESSEL S, CHARPENTIER E. The biology of CRISPR-Cas: backward and forward[J]. *Cell*, 2018, 172(6): 1239-1259.
- [6] KOONIN EV, MAKAROVA KS, ZHANG F. Diversity, classification and evolution of CRISPR-Cas systems[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2017, 37: 67-78.
- [7] MAKAROVA KS, WOLF YI, IRANZO J, SHMAKOV SA, ALKHNABASHI OS, BROUNS SJJ, CHARPENTIER E, CHENG D, HAFT DH, HORVATH P, MOINEAU S, MOJICA FJM, SCOTT D, SHAH SA, SIKSNYS V, TERNIS MP, VENCLOVAS Č, WHITE MF, YAKUNIN AF, YAN W, et al. Evolutionary classification of CRISPR-Cas systems: a burst of class 2 and derived variants[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2020, 18(2): 67-83.
- [8] JIANG FG, DOUDNA JA. CRISPR-Cas9 structures and mechanisms[J]. *Annual Review of Biophysics*, 2017, 46: 505-529.
- [9] CONG L, COX D, LIN SL, BARRETTO R, HABIB N, HSU PD, WU XB, JIANG WY, MARRAFFINI LA, ZHANG F. Multiplex genome engineering using CRISPR-Cas systems[J]. *Science*, 2013, 339(6121): 819-823.
- [10] NISHIMASU H, RAN FA, HSU PD, KONERMANN S, SHEHATA SI, DOHMAE N, ISHITANI R, ZHANG F, NUREKI O. Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA[J]. *Cell*, 2014, 156(5): 935-949.
- [11] ZETSCHKE B, GOOTENBERG JS, ABUDAYYEH OO, SLAYMAKER IM, MAKAROVA KS, ESSLETZBICHLER P, VOLZ SE, JOUNG J, van der OOST J, REGEV A, KOONIN EV, ZHANG F. Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system[J]. *Cell*, 2015, 163(3): 759-771.
- [12] ZETSCHKE B, HEIDENREICH M, MOHANRAJU P, FEDOROVA I, KNEPPERS J, DEGENNARO EM, WINBLAD N, CHOUDHURY SR, ABUDAYYEH OO, GOOTENBERG JS, WU WY, SCOTT DA, SEVERINOV K, van der OOST J, ZHANG F. Multiplex gene editing by CRISPR-Cpf1 using a single crRNA array[J]. *Nature Biotechnology*, 2017, 35(1): 31-34.
- [13] HARRINGTON LB, BURSTEIN D, CHEN JS, PAEZ-ESPINO D, MA EB, WITTE IP, COFSKY JC, KYRPIDES NC, BANFIELD JF, DOUDNA JA. Programmed DNA destruction by miniature CRISPR-Cas14 enzymes[J]. *Science*, 2018, 362(6416):

- 839-842.
- [14] SHMAKOV S, ABUDAYYEH OO, MAKAROVA KS, WOLF YI, GOOTENBERG JS, SEMENOVA E, MINAKHIN L, JOUNG J, KONERMANN S, SEVERINOV K, ZHANG F, KOONIN EV. Discovery and functional characterization of diverse class 2 CRISPR-Cas systems[J]. *Molecular Cell*, 2015, 60(3): 385-397.
- [15] STRECKER J, JONES S, KOOPAL B, SCHMID-BURCK J, ZETSCHKE B, GAO LY, MAKAROVA KS, KOONIN EV, ZHANG F. Engineering of CRISPR-Cas12b for human genome editing[J]. *Nature Communications*, 2019, 10: 212.
- [16] YAN WX, HUNNEWELL P, ALFONSE LE, CARTE JM, KESTON-SMITH E, SOTHISELVAM S, GARRITY AJ, CHONG SR, MAKAROVA KS, KOONIN EV, CHENG DR, SCOTT DA. Functionally diverse type V CRISPR-Cas systems[J]. *Science*, 2019, 363(6422): 88-91.
- [17] BURSTEIN D, HARRINGTON LB, STRUTT SC, PROBST AJ, ANANTHARAMAN K, THOMAS BC, DOUDNA JA, BANFIELD JF. New CRISPR-Cas systems from uncultivated microbes[J]. *Nature*, 2017, 542(7640): 237-241.
- [18] LIU JJ, ORLOVA N, OAKES BL, MA EB, SPINNER HB, BANEY KLM, CHUCK J, TAN D, KNOTT GJ, HARRINGTON LB, AL-SHAYEB B, WAGNER A, BRÖTZMANN J, STAAHL BT, TAYLOR KL, DESMARAIS J, NOGALES E, DOUDNA JA. CasX enzymes comprise a distinct family of RNA-guided genome editors[J]. *Nature*, 2019, 566(7743): 218-223.
- [19] CHEN JS, MA EB, HARRINGTON LB, Da COSTA M, TIAN XR, PALEFSKY JM, DOUDNA JA. CRISPR-Cas12a target binding unleashes indiscriminate single-stranded DNase activity[J]. *Science*, 2018, 360(6387): 436-439.
- [20] TAYLOR MRG, BOULTON SJ. Playing the end game: DNA double-strand break repair pathway choice[J]. *Molecular Cell*, 2012, 47(4): 497-510.
- [21] CICCIA A, ELLEDGE SJ. The DNA damage response: making it safe to play with knives[J]. *Molecular Cell*, 2010, 40(2): 179-204.
- [22] YEH CD, RICHARDSON CD, CORN JE. Advances in genome editing through control of DNA repair pathways[J]. *Nature Cell Biology*, 2019, 21(12): 1468-1478.
- [23] LIEBER MR. The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway[J]. *Annual Review of Biochemistry*, 2010, 79: 181-211.
- [24] BRINKMAN EK, CHEN T, de HAAS M, HOLLAND HA, AKHTAR W, van STEENSEL B. Kinetics and fidelity of the repair of Cas9-induced double-strand DNA breaks[J]. *Molecular Cell*, 2018, 70(5): 801-813.e6.
- [25] WANG T, WEI JJ, SABATINI DM, LANDER ES. Genetic screens in human cells using the CRISPR-Cas9 system[J]. *Science*, 2014, 343(6166): 80-84.
- [26] SHALEM O, SANJANA NE, HARTENIAN E, SHI X, SCOTT DA, MIKKELSON T, HECKL D, EBERT BL, ROOT DE, DOENCH JG, ZHANG F. Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells[J]. *Science*, 2014, 343(6166): 84-87.
- [27] DOENCH JG, FUSI N, SULLENDER M, HEGDE M, VAIMBERG EW, DONOVAN KF, SMITH I, TOTHOVA Z, WILEN C, ORCHARD R, VIRGIN HW, LISTGARTEN J, ROOT DE. Optimized sgRNA design to maximize activity and minimize off-target effects of CRISPR-Cas9[J]. *Nature Biotechnology*, 2016, 34(2): 184-191.
- [28] JASIN M, ROTHSTEIN R. Repair of strand breaks by homologous recombination[J]. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2013, 5(11): a012740.
- [29] KOMOR AC, BADRAN AH, LIU DR. CRISPR-based technologies for the manipulation of eukaryotic genomes[J]. *Cell*, 2017, 168(1/2): 20-36.
- [30] KOMOR AC, KIM YB, PACKER MS, ZURIS JA, LIU DR. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage[J]. *Nature*, 2016, 533(7603): 420-424.
- [31] 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[J]. *Nature*, 2017, 551(7681): 464-471.
- [32] 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[J]. *Science*, 2016, 353(6305): eaaf8729.
- [33] LANDRUM MJ, LEE JM, BENSON M, BROWN G, CHAO C, CHITIPIRALLA S, GU BS, 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[J]. *Nucleic Acids Research*, 2016, 44(D1): D862-D868.
- [34] 徐鑫, 刘明军. 碱基编辑系统研究最新进展及应用[J]. *生物工程学报*, 2021, 37(7): 2307-2321.
- XU X, LIU MJ. Recent advances and applications of base editing systems[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2021, 37(7): 2307-2321 (in Chinese).

- [35] 张迎冰, 张成图, 吴英, 于芮岱, 苏建民. 单碱基编辑技术的原理、发展及其在家畜育种中的应用[J]. 生物工程学报, 2023, 39(1): 19-33.
ZHANG YB, ZHANG CT, WU Y, YU RL, SU JM. Principle and development of single base editing technology and its application in livestock breeding[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(1): 19-33 (in Chinese).
- [36] 余传照, 莫健新, 赵鑫, 李国玲, 张献伟. 基于CRISPR/Cas系统的DNA碱基编辑技术及其在生物医学和农业中的应用[J]. 生物工程学报, 2021, 37(9): 3071-3087.
YU CZ, MO JX, ZHAO X, LI GL, ZHANG XW. CRISPR/Cas-mediated DNA base editing technology and its application in biomedicine and agriculture[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2021, 37(9): 3071-3087 (in Chinese).
- [37] KOMOR AC, ZHAO KT, PACKER MS, GAUDELLI NM, WATERBURY AL, KOBLAN LW, 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[J]. Science Advances, 2017, 3(8): eaao4774.
- [38] Di NOIA J, NEUBERGER MS. Altering the pathway of immunoglobulin hypermutation by inhibiting uracil-DNA glycosylase[J]. Nature, 2002, 419(6902): 43-48.
- [39] RICHTER MF, ZHAO KT, ETON E, LAPINAITE A, NEWBY GA, THURONYI BW, WILSON C, KOBLAN LW, ZENG J, BAUER DE, DOUDNA JA, LIU DR. Phage-assisted evolution of an adenine base editor with improved Cas domain compatibility and activity[J]. Nature Biotechnology, 2020, 38(7): 883-891.
- [40] ZHAO DD, LI J, LI SW, XIN XQ, HU MZ, PRICE MA, ROSSER SJ, BI CH, ZHANG XL. Glycosylase base editors enable C-to-A and C-to-G base changes[J]. Nature Biotechnology, 2021, 39(1): 35-40.
- [41] KURT IC, ZHOU RH, IYER S, GARCIA SP, MILLER BR, LANGNER LM, GRÜNEWALD J, JOUNG JK. CRISPR C-to-G base editors for inducing targeted DNA transversions in human cells[J]. Nature Biotechnology, 2021, 39(1): 41-46.
- [42] DONG XX, YANG C, MA ZZ, CHEN M, ZHANG XL, BI CH. Enhancing glycosylase base-editor activity by fusion to transactivation modules[J]. Cell Reports, 2022, 40(3): 111090.
- [43] TONG HW, WANG XC, LIU YH, LIU NN, LI Y, LUO JM, MA Q, WU DN, LI JY, XU CL, YANG H. Programmable A-to-Y base editing by fusing an adenine base editor with an N-methylpurine DNA glycosylase[J]. Nature Biotechnology, 2023, 41(8): 1080-1084.
- [44] CHEN L, HONG MJ, LUAN CM, GAO HY, RU GM, GUO XY, ZHANG DJ, ZHANG S, LI CW, WU J, RANDOLPH PB, SOUSA AA, QU C, ZHU YF, GUAN YT, WANG LR, LIU MY, FENG B, SONG GJ, LIU DR, et al. Adenine transversion editors enable precise, efficient A•T-to-C•G base editing in mammalian cells and embryos[J]. Nature Biotechnology, 2023. doi: 10.1038/s41587-023-01821-9. Epub.
- [45] TONG H, LIU NN, WEI YH, ZHOU YX, LI Y, WU DN, JIN M, CUI SN, LI HB, LI GL, ZHOU JX, YUAN Y, ZHANG HN, SHI LY, YAO X, YANG H. Programmable deaminase-free base editors for G-to-Y conversion by engineered glycosylase[J]. National Science Review, 2023, 10(8): nwad143.
- [46] 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 JW, VAKOC CR, LOWE SW, TSCHAHARGANEH DF, DOW LE. Optimized base editors enable efficient editing in cells, organoids and mice[J]. Nature Biotechnology, 2018, 36(9): 888-893.
- [47] 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[J]. Nature Biotechnology, 2018, 36(9): 843-846.
- [48] WANG LJ, XUE W, YAN L, LI XS, WEI J, CHEN MM, WU J, YANG B, YANG L, CHEN J. Enhanced base editing by co-expression of free uracil DNA glycosylase inhibitor[J]. Cell Research, 2017, 27(10): 1289-1292.
- [49] CEBRIAN-SERRANO A, DAVIES B. CRISPR-Cas orthologues and variants: optimizing the repertoire, specificity and delivery of genome engineering tools[J]. Mammalian Genome, 2017, 28(7): 247-261.
- [50] HU JH, MILLER SM, GEURTS MH, TANG WX, CHEN LW, SUN N, ZEINA CM, GAO X, REES HA, LIN Z, LIU DR. Evolved Cas9 variants with broad PAM compatibility and high DNA specificity[J]. Nature, 2018, 556(7699): 57-63.
- [51] KIM HK, LEE S, KIM Y, PARK J, MIN S, CHOI JW, HUANG TP, YOON S, LIU DR, KIM HH. High-throughput analysis of the activities of xCas9, SpCas9-NG and SpCas9 at matched and mismatched target sequences in human cells[J]. Nature Biomedical Engineering, 2020, 4(1): 111-124.
- [52] NISHIMASU H, SHI X, ISHIGURO S, GAO LY, 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, et al. Engineered CRISPR-Cas9 nuclease with expanded targeting space[J]. *Science*, 2018, 361(6408): 1259-1262.
- [53] MILLER SM, WANG TN, RANDOLPH PB, ARBAB M, SHEN MW, HUANG TP, MATUSZEK Z, NEWBY GA, REES HA, LIU DR. Continuous evolution of SpCas9 variants compatible with non-G PAMs[J]. *Nature Biotechnology*, 2020, 38(4): 471-481.
- [54] WALTON RT, CHRISTIE KA, WHITTAKER MN, KLEINSTIVER BP. Unconstrained genome targeting with near-PAMless engineered CRISPR-Cas9 variants[J]. *Science*, 2020, 368(6488): 290-296.
- [55] WU SS, LI LP, LI M, SUN SY, ZHAO YT, XUE XW, CHEN FY, ZHONG JL, GUO JF, QU QH, WANG XJ, LIU Z, QIAO YB. Two compact Cas9 ortholog-based cytosine base editors expand the DNA targeting scope and applications *in vitro* and *in vivo*[J]. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2022, 10: 809922.
- [56] LI M, ZHAO YT, XUE XW, ZHONG JL, LIN JX, ZHOU JK, YU WH, CHEN J, QIAO YB. Cas9-orthologue-mediated cytosine and adenine base editors recognizing NNAAAA PAM sequences[J]. *Biotechnology Journal*, 2023, 18(5): e2200533.
- [57] RAN FA, CONG L, YAN WX, SCOTT DA, GOOTENBERG JS, KRIZ AJ, ZETSCHKE B, SHALEM O, WU XB, MAKAROVA KS, KOONIN EV, SHARP PA, ZHANG F. *In vivo* genome editing using *Staphylococcus aureus* Cas9[J]. *Nature*, 2015, 520(7546): 186-191.
- [58] KLEINSTIVER BP, PREW MS, TSAI SQ, NGUYEN NT, TOPKAR VV, ZHENG ZL, JOUNG JK. Broadening the targeting range of *Staphylococcus aureus* CRISPR-Cas9 by modifying PAM recognition[J]. *Nature Biotechnology*, 2015, 33(12): 1293-1298.
- [59] 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[J]. *Nature Biotechnology*, 2017, 35(4): 371-376.
- [60] HUA K, TAO XP, ZHU JK. Expanding the base editing scope in rice by using Cas9 variants[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2019, 17(2): 499-504.
- [61] HU ZY, ZHANG CD, WANG S, GAO SQ, WEI JJ, LI MM, HOU LH, MAO HL, WEI YY, QI T, LIU HM, LIU D, LAN F, LU DR, WANG HY, LI JX, WANG YM. Discovery and engineering of small SlugCas9 with broad targeting range and high specificity and activity[J]. *Nucleic Acids Research*, 2021, 49(7): 4008-4019.
- [62] WANG S, MAO HL, HOU LH, HU ZY, WANG Y, QI T, TAO C, YANG Y, ZHANG CD, LI MM, LIU HH, HU SJ, CHAI RJ, WANG YM. Compact SchCas9 recognizes the simple NNGR PAM[J]. *Advanced Science (Weinheim, Baden-Wuerttemberg, Germany)*, 2022, 9(4): e2104789.
- [63] GAO SQ, WANG Y, QI T, WEI JJ, HU ZY, LIU JT, SUN SN, LIU HH, WANG YM. Genome editing with natural and engineered CjCas9 orthologs[J]. *Molecular Therapy: the Journal of the American Society of Gene Therapy*, 2023, 31(4): 1177-1187.
- [64] GAO LY, COX DBT, YAN WX, MANTEIGA JC, SCHNEIDER MW, YAMANO T, NISHIMASU H, NUREKI O, CROSETTO N, ZHANG F. Engineered Cpf1 variants with altered PAM specificities[J]. *Nature Biotechnology*, 2017, 35(8): 789-792.
- [65] LI XS, WANG Y, LIU YJ, YANG B, WANG X, WEI J, LU ZY, ZHANG YX, WU J, HUANG XX, YANG L, CHEN J. Base editing with a Cpf1-cytidine deaminase fusion[J]. *Nature Biotechnology*, 2018, 36(4): 324-327.
- [66] 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[J]. *Nature Biotechnology*, 2019, 37(3): 276-282.
- [67] KIM DY, LEE JM, BIN MOON S, CHIN HJ, PARK S, LIM Y, KIM D, KOO T, KO JH, KIM YS. Efficient CRISPR editing with a hypercompact Cas12f1 and engineered guide RNAs delivered by adeno-associated virus[J]. *Nature Biotechnology*, 2022, 40(1): 94-102.
- [68] WU ZW, ZHANG YF, YU HP, PAN D, WANG YJ, WANG YN, LI F, LIU C, NAN H, CHEN WZ, JI QJ. Programmed genome editing by a miniature CRISPR-Cas12f nuclease[J]. *Nature Chemical Biology*, 2021, 17(11): 1132-1138.
- [69] WANG YJ, WANG YN, PAN D, YU HP, ZHANG YF, CHEN WZ, LI F, WU ZW, JI QJ. Guide RNA engineering enables efficient CRISPR editing with a miniature *Syntrophomonas palmitatica* Cas12f1 nuclease[J]. *Cell Reports*, 2022, 40(13): 111418.
- [70] KONG XF, ZHANG HN, LI GL, WANG ZK, KONG XQ, WANG LC, XUE MX, ZHANG WH, WANG Y, LIN JJ, ZHOU JX, SHEN XW, WEI YH, ZHONG N, BAI WY, YUAN Y, SHI LY, ZHOU YS, YANG H. Engineered CRISPR-OsCas12f1 and RhCas12f1 with robust activities and expanded target range for genome editing[J]. *Nature Communications*, 2023, 14(1): 2046.
- [71] ALTAE-TRAN H, KANNAN S, ESRA DEMIRICIOGLU F, OSHIRO R, NETY SP, MCKAY LJ, DLAKIĆ M, INSKEEP WP, MAKAROVA KS,

- MACRAE RK, KOONIN EV, ZHANG F. The widespread IS200/IS605 transposon family encodes diverse programmable RNA-guided endonucleases[J]. *Science*, 2021, 374(6563): 57-65.
- [72] HAN DY, XIAO QQ, WANG YF, ZHANG HN, DONG X, LI GL, KONG XF, WANG SH, SONG JH, ZHANG WH, ZHOU JX, BI LT, YUAN Y, SHI LY, ZHONG N, YANG H, ZHOU YS. Development of miniature base editors using engineered IscB nickase[J]. *Nature Methods*, 2023, 20(7): 1029-1036.
- [73] XIANG GH, LI YQ, SUN J, HUO YY, CAO SW, CAO YW, GUO YY, YANG L, CAI YJ, ZHANG YE, WANG HY. Evolutionary mining and functional characterization of TnpB nucleases identify efficient miniature genome editors[J]. *Nature Biotechnology*, 2023. doi: 10.1038/s41587-023-01857-x.
- [74] SAITO M, XU PY, FAURE G, MAGUIRE S, KANNAN S, ALTAE-TRAN H, VO S, DESIMONE A, MACRAE RK, ZHANG F. Fanzor is a eukaryotic programmable RNA-guided endonuclease[J]. *Nature*, 2023, 620(7974): 660-668.
- [75] TAN JJ, ZHANG F, KARCHER D, BOCK R. Engineering of high-precision base editors for site-specific single nucleotide replacement[J]. *Nature Communications*, 2019, 10: 439.
- [76] 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[J]. *Nature Biotechnology*, 2019, 37(6): 626-631.
- [77] JIANG W, FENG SJ, HUANG SS, YU WX, LI GL, YANG G, LIU YJ, ZHANG Y, ZHANG L, HOU Y, CHEN J, CHEN JP, HUANG XX. BE-PLUS: a new base editing tool with broadened editing window and enhanced fidelity[J]. *Cell Research*, 2018, 28(8): 855-861.
- [78] FU YF, FODEN JA, KHAYTER C, MAEDER ML, REYON D, JOUNG JK, SANDER JD. High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells[J]. *Nature Biotechnology*, 2013, 31(9): 822-826.
- [79] TSAI SQ, NGUYEN NT, MALAGON-LOPEZ J, TOPKAR VV, ARYEE MJ, JOUNG JK. CIRCLE-seq: a highly sensitive *in vitro* screen for genome-wide CRISPR-Cas9 nuclease off-targets[J]. *Nature Methods*, 2017, 14(6): 607-614.
- [80] LEE JK, JEONG E, LEE J, JUNG M, SHIN E, KIM YH, LEE K, JUNG I, KIM D, KIM S, KIM JS. Directed evolution of CRISPR-Cas9 to increase its specificity[J]. *Nature Communications*, 2018, 9: 3048.
- [81] GEHRKE JM, CERVANTES O, CLEMENT MK, WU YX, ZENG J, BAUER DE, PINELLO L, JOUNG JK. An APOBEC3A-Cas9 base editor with minimized bystander and off-target activities[J]. *Nature Biotechnology*, 2018, 36(10): 977-982.
- [82] 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[J]. *Nature Communications*, 2017, 8: 15790.
- [83] REES HA, LIU DR. Base editing: precision chemistry on the genome and transcriptome of living cells[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2018, 19(12): 770-788.
- [84] MA YQ, ZHANG JY, YIN WJ, ZHANG ZC, SONG Y, CHANG X. Targeted AID-mediated mutagenesis (TAM) enables efficient genomic diversification in mammalian cells[J]. *Nature Methods*, 2016, 13(12): 1029-1035.
- [85] HESS GT, FRÉSARD L, HAN K, LEE CH, LI A, CIMPRICH KA, MONTGOMERY SB, BASSIK MC. Directed evolution using dCas9-targeted somatic hypermutation in mammalian cells[J]. *Nature Methods*, 2016, 13(12): 1036-1042.
- [86] LIU ZQ, CHEN SY, SHAN HH, JIA YQ, CHEN M, SONG YN, LAI LX, LI ZJ. Efficient base editing with high precision in rabbits using YFE-BE4max[J]. *Cell Death & Disease*, 2020, 11: 36.
- [87] WANG X, LI JN, WANG Y, YANG B, WEI J, WU J, WANG RX, HUANG XX, CHEN J, YANG L. Efficient base editing in methylated regions with a human APOBEC3A-Cas9 fusion[J]. *Nature Biotechnology*, 2018, 36(10): 946-949.
- [88] ZONG Y, SONG QN, LI C, JIN S, ZHANG DB, WANG YP, QIU JL, GAO CX. Efficient C-to-T base editing in plants using a fusion of nCas9 and human APOBEC3A[J]. *Nature Biotechnology*, 2018, 36(10): 950-953.
- [89] LI S, YUAN B, CAO JX, CHEN JQ, CHEN JL, QIU JY, ZHAO XM, WANG XL, QIU ZL, CHENG TL. Docking sites inside Cas9 for adenine base editing diversification and RNA off-target elimination[J]. *Nature Communications*, 2020, 11: 5827.
- [90] ZHANG SQ, SONG LT, YUAN B, ZHANG C, CAO JX, CHEN JL, QIU JY, TAI YL, CHEN JQ, QIU ZL, ZHAO XM, CHENG TL. TadA reprogramming to generate potent miniature base editors with high precision[J]. *Nature Communications*, 2023, 14: 413.
- [91] LIU ZQ, CHEN SY, SHAN HH, JIA YQ, CHEN M, SONG YN, LAI LX, LI ZJ. Precise base editing with CC context-specificity using engineered human APOBEC3G-nCas9 fusions[J]. *BMC Biology*, 2020, 18(1): 111.
- [92] TAN JJ, ZHANG F, KARCHER D, BOCK R. Expanding the genome-targeting scope and the site

- selectivity of high-precision base editors[J]. *Nature Communications*, 2020, 11: 629.
- [93] ST MARTIN A, SALAMANGO DJ, SEREBRENIK AA, SHABAN NM, BROWN WL, HARRIS RS. A panel of eGFP reporters for single base editing by APOBEC-Cas9 editosome complexes[J]. *Scientific Reports*, 2019, 9: 497.
- [94] ZUO EW, SUN YD, YUAN TL, HE BB, ZHOU CY, YING WQ, LIU J, WEI W, ZENG R, LI YX, YANG H. A rationally engineered cytosine base editor retains high on-target activity while reducing both DNA and RNA off-target effects[J]. *Nature Methods*, 2020, 17(6): 600-604.
- [95] THURONYI BW, KOBLAN LW, LEVY JM, YE H, WANG C, NEWBY GA, WILSON C, BHANU M, SHUBINA-OLEINIK O, HOLT JR, LIU DR. Continuous evolution of base editors with expanded target compatibility and improved activity[J]. *Nature Biotechnology*, 2019, 37(9): 1070-1079.
- [96] DOMAN JL, RAGURAM A, NEWBY GA, LIU DR. Evaluation and minimization of Cas9-independent off-target DNA editing by cytosine base editors[J]. *Nature Biotechnology*, 2020, 38(5): 620-628.
- [97] YU Y, LEETE TC, BORN DA, YOUNG L, BARRERA LA, LEE SJ, REES HA, CIARAMELLA G, GAUDELLI NM. Cytosine base editors with minimized unguided DNA and RNA off-target events and high on-target activity[J]. *Nature Communications*, 2020, 11(1): 2052.
- [98] GRÜNEWALD J, ZHOU RH, IYER S, LAREAU CA, GARCIA SP, ARYEE MJ. CRISPR DNA base editors with reduced RNA off-target and self-editing activities[J]. *Nature Biotechnology*, 2019, 37(9): 1041-1048.
- [99] GRÜNEWALD J, ZHOU RH, GARCIA SP, IYER S, LAREAU CA, ARYEE MJ, JOUNG JK. Transcriptome-wide off-target RNA editing induced by CRISPR-guided DNA base editors[J]. *Nature*, 2019, 569(7756): 433-437.
- [100] ZHOU CY, SUN YD, YAN R, LIU YJ, ZUO EW, GU C, HAN LX, WEI Y, HU XD, ZENG R, LI YX, ZHOU HB, GUO F, YANG H. Off-target RNA mutation induced by DNA base editing and its elimination by mutagenesis[J]. *Nature*, 2019, 571: 275-278.
- [101] LI JN, YU WX, HUANG SS, WU SS, LI LP, ZHOU JK, CAO Y, HUANG XX, QIAO YB. Structure-guided engineering of adenine base editor with minimized RNA off-targeting activity[J]. *Nature Communications*, 2021, 12: 2287.
- [102] WANG LJ, XUE W, ZHANG HX, GAO RZ, QIU HY, WEI J, ZHOU LN, LEI YN, WU XC, LI X, LIU CF, WU J, CHEN QB, MA HH, HUANG XX, CAI CG, ZHANG Y, YANG B, YIN H, YANG L, et al. Eliminating base-editor-induced genome-wide and transcriptome-wide off-target mutations[J]. *Nature Cell Biology*, 2021, 23(5): 552-563.
- [103] LIU YJ, MAO SS, HUANG SS, LI YQ, CHEN YX, DI MH, HUANG XX, LV JJ, WANG XX, GE JY, SHEN SX, ZHANG XM, LIU DH, HUANG XX, CHI T. REPAIRx, a specific yet highly efficient programmable A>I RNA base editor[J]. *The EMBO Journal*, 2020, 39(22): e104748.
- [104] LI C, ZHANG R, MENG XB, CHEN S, ZONG Y, LU CJ, QIU JL, CHEN YH, LI JY, GAO CX. Targeted, random mutagenesis of plant genes with dual cytosine and adenine base editors[J]. *Nature Biotechnology*, 2020, 38(7): 875-882.
- [105] ZHANG XH, ZHU BY, CHEN L, XIE L, YU WS, WANG Y, LI LX, YIN SM, YANG L, HU HD, HAN HH, LI YM, WANG LR, CHEN G, MA XY, GENG HQ, HUANG WF, PANG XF, YANG ZZ, WU YX, et al. Dual base editor catalyzes both cytosine and adenine base conversions in human cells[J]. *Nature Biotechnology*, 2020, 38(7): 856-860.
- [106] SAKATA RC, ISHIGURO S, MORI H, TANAKA M, TATSUNO K, UEDA H, YAMAMOTO S, SEKI M, MASUYAMA N, NISHIDA K, NISHIMASU H, ARAKAWA K, KONDO A, NUREKI O, TOMITA M, ABURATANI H, YACHIE N. Publisher correction: base editors for simultaneous introduction of C-to-T and A-to-G mutations[J]. *Nature Biotechnology*, 2020, 38(7): 901.
- [107] GRÜNEWALD J, ZHOU RH, LAREAU CA, GARCIA SP, IYER S, MILLER BR, LANGNER LM, HSU JY, ARYEE MJ, JOUNG JK. A dual-deaminase CRISPR base editor enables concurrent adenine and cytosine editing[J]. *Nature Biotechnology*, 2020, 38(7): 861-864.
- [108] TAO WY, LIU Q, HUANG SS, WANG X, QU SY, GUO JF, OU DF, LI GL, ZHANG Y, XU XM, HUANG XX. CABE-RY: a PAM-flexible dual-mutation base editor for reliable modeling of multi-nucleotide variants[J]. *Molecular Therapy Nucleic Acids*, 2021, 26: 114-121.
- [109] ZHAO YT, LI M, LIU J, XUE XW, ZHONG JL, LIN JX, YE B, CHEN J, QIAO YB. Dual guide RNA-mediated concurrent C•G-to-T•A and A•T-to-G•C conversions using CRISPR base editors[J]. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 2023, 21: 856-868.
- [110] MOK BY, de MORAES MH, ZENG J, BOSCH DE, KOTRYS AV, RAGURAM A, HSU F, RADEY MC, PETERSON SB, MOOHA VK, MOUGOUS JD, LIU DR. A bacterial cytidine deaminase toxin enables

- CRISPR-free mitochondrial base editing[J]. *Nature*, 2020, 583(7817): 631-637.
- [111] CHO SI, LEE S, MOK YG, LIM K, LEE J, LEE JM, CHUNG E, KIM JS. Targeted A-to-G base editing in human mitochondrial DNA with programmable deaminases[J]. *Cell*, 2022, 185(10): 1764-1776.e12.
- [112] MOK YG, HONG S, BAE SJ, CHO SI, KIM JS. Targeted A-to-G base editing of chloroplast DNA in plants[J]. *Nature Plants*, 2022, 8(12): 1378-1384.
- [113] MOK BY, KOTRYS AV, RAGURAM A, HUANG TP, MOOTHA VK, LIU DR. CRISPR-free base editors with enhanced activity and expanded targeting scope in mitochondrial and nuclear DNA[J]. *Nature Biotechnology*, 2022, 40(9): 1378-1387.
- [114] GUO JF, YU WX, LI M, CHEN HY, LIU J, XUE XW, LIN JX, HUANG SS, SHU WJ, HUANG XX, LIU Z, WANG SQ, QIAO YB. A DddA ortholog-based and transactivator-assisted nuclear and mitochondrial cytosine base editors with expanded target compatibility[J]. *Molecular Cell*, 2023, 83(10): 1710-1724.e7.
- [115] MI L, SHI M, LI YX, XIE G, RAO XC, WU DM, CHENG AM, NIU MX, XU FL, YU Y, GAO N, WEI WS, WANG XH, WANG YM. DddA homolog search and engineering expand sequence compatibility of mitochondrial base editing[J]. *Nature Communications*, 2023, 14: 874.
- [116] YI ZY, ZHANG XX, TANG W, YU Y, WEI XX, ZHANG X, WEI WS. Strand-selective base editing of human mitochondrial DNA using mitoBEs[J]. *Nature Biotechnology*, 2024, 42(3): 498-509. doi: 10.1038/s41587-023-01791-y.
- [117] HU JC, SUN Y, LI BS, LIU Z, WANG ZW, GAO Q, GUO MY, LIU GW, ZHAO KT, GAO CX. Strand-preferred base editing of organellar and nuclear genomes using CyDENT[J]. *Nature Biotechnology*, 2023. doi: 10.1038/s41587-023-01910-9.
- [118] KLOMPE SE, VO PLH, HALPIN-HEALY TS, STERNBERG SH. Transposon-encoded CRISPR-Cas systems direct RNA-guided DNA integration[J]. *Nature*, 2019, 571(7764): 219-225.
- [119] HAREN L, TON-HOANG B, CHANDLER M. Integrating DNA: transposases and retroviral integrases[J]. *Annual Review of Microbiology*, 1999, 53: 245-281.
- [120] PETERS JE, CRAIG NL. Tn7: smarter than we thought[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2001, 2(11): 806-814.
- [121] HALPIN-HEALY TS, KLOMPE SE, STERNBERG SH, FERNÁNDEZ IS. Structural basis of DNA targeting by a transposon-encoded CRISPR-Cas system[J]. *Nature*, 2020, 577(7789): 271-274.
- [122] STRECKER J, LADHA A, GARDNER Z, SCHMID-BURGK JL, MAKAROVA KS, KOONIN EV, ZHANG F. RNA-guided DNA insertion with CRISPR-associated transposases[J]. *Science*, 2019, 365(6448): 48-53.
- [123] LEO H VO P, RONDA C, KLOMPE SE, CHEN EE, ACREE C, WANG HH, STERNBERG SH. CRISPR RNA-guided integrases for high-efficiency, multiplexed bacterial genome engineering[J]. *Nature Biotechnology*, 2021, 39(4): 480-489.
- [124] LAMPE GD, KING RT, HALPIN-HEALY TS, KLOMPE SE, HOGAN MI, LEO H VO P, TANG S, CHAVEZ A, STERNBERG SH. Targeted DNA integration in human cells without double-strand breaks using CRISPR-associated transposases[J]. *Nature Biotechnology*, 2024 Jan;42(1):87-98.
- [125] YANG L, BRIGGS AW, CHEW WL, MALI P, GUELLE M, AACH J, GOODMAN DB, COX D, KAN Y, LESH A E, SOUNDARARAJAN V, ZHANG F and CHURCH G. Engineering and optimising deaminase fusions for genome editing[J]. *Nature Communications*, 2016, 7: 13330.
- [126] RYU SM, KOO T, KIM K, LIM K, BAEK G, KIM ST, KIM HS, KIM DE, LEE H, CHUNG E and KIM JS. Adenine base editing in mouse embryos and an adult mouse model of Duchenne muscular dystrophy[J]. *Nature Biotechnology*, 2018, 36(6): 536-539.
- [127] LIU LD, HUANG M, DAI P, LIU T, FAN S, CHENG X, ZHAO Y, YEAP LS and MENG FL. Intrinsic Nucleotide Preference of Diversifying Base Editors Guides Antibody Ex Vivo Affinity Maturation[J]. *Cell Reports*, 2018, 25(4): 884-892.e883.
- [128] CHATTERJEE P, JAKIMO N and JACOBSON JM. Minimal PAM specificity of a highly similar SpCas9 ortholog[J]. *Science Advances*, 2018, 4(10): eaau0766.
- [129] REN B, YAN F, KUANG Y, LI N, ZHANG D, ZHOU X, LIN H and ZHOU H. Improved Base Editor for Efficiently Inducing Genetic Variations in Rice with CRISPR/Cas9-Guided Hyperactive hAID Mutant[J]. *Molecular Plant*, 2018, 11(4): 623-626.
- [130] HUA K, TAO X, HAN P, WANG R and ZHU JK. Genome Engineering in Rice Using Cas9 Variants that Recognize NG PAM Sequences[J]. *Molecular Plant*, 2019, 12(7): 1003-1014.
- [131] WANG Y, ZHOU L, LIU N and YAO S. BE-PIGS: a base-editing tool with deaminases inlaid into Cas9 PI domain significantly expanded the editing scope[J]. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2019, 4(36).
- [132] REES HA, WILSON C, DOMAN JL and LIU DR. Analysis and minimization of cellular RNA editing by DNA adenine base editors[J]. *Science Advances*, 2019, 5(5): eaax5717.

- [133] CHATTERJEE P, LEE J, NIP L, KOSEKI SRT, TYSINGER E, SONTHEIMER EJ, JACOBSON JM and JAKIMO N. A Cas9 with PAM recognition for adenine dinucleotides[J]. *Nature Communications*, 2020, 11(1): 2474.
- [134] ZHANG X, CHEN L, ZHU B, WANG L, CHEN C, HONG M, HUANG Y, LI H, HAN H, CAI B, YU W, YIN S, YANG L, YANG Z, LIU M, ZHANG Y, MAO Z, WU Y, LIU M and LI D. Increasing the efficiency and targeting range of cytidine base editors through fusion of a single-stranded DNA-binding protein domain[J]. *Nature Cell Biology*, 2020, 22(6): 740-750.
- [135] XU X, CHEMPARATHY A, ZENG L, KEMPTON HR, SHANG S, NAKAMURA M and QI LS. Engineered miniature CRISPR-Cas system for mammalian genome regulation and editing[J]. *Molecular Cell*, 2021, 81(20): 4333-4345.e4334.
- [136] BERRIOS KN, EVITT NH, DEWEERD RA, REN D, LUO M, BARKA A, WANG T, BARTMAN CR, LAN Y, GREEN AM, SHI J and KOHLI RM. Controllable genome editing with split-engineered base editors[J]. *Nature Chemical Biology*, 2021, 17(12): 1262-1270.
- [137] LIU Z, CHEN S, JIA Y, SHAN H, CHEN M, SONG Y, LAI L and LI Z. Efficient and high-fidelity base editor with expanded PAM compatibility for cytidine dinucleotide[J]. *Science China: Life Sciences*, 2021, 64(8): 1355-1367.
- [138] CHEN L, ZHANG S, XUE N, HONG M, ZHANG X, ZHANG D, YANG J, BAI S, HUANG Y, MENG H, WU H, LUAN C, ZHU B, RU G, GAO H, ZHONG L, LIU M, LIU M, CHENG Y, YI C, WANG L, ZHAO Y, SONG G and LI D. Engineering a precise adenine base editor with minimal bystander editing[J]. *Nature Chemical Biology*, 2023, 19(1): 101-110.
- [139] LEE S, LEE H, BAEK G and KIM JS. Precision mitochondrial DNA editing with high-fidelity DddA-derived base editors[J]. *Nature Biotechnology*, 2023, 41(3): 378-386.
- [140] YANG C, MA Z, WANG K, DONG X, HUANG M, LI Y, ZHU X, LI J, CHENG Z, BI C and ZHANG X. HMGN1 enhances CRISPR-directed dual-function A-to-G and C-to-G base editing[J]. *Nature Communications*, 2023, 14(1): 2430.
- [141] XUE N, LIU X, ZHANG D, WU Y, ZHONG Y, WANG J, FAN W, JIANG H, ZHU B, GE X, GONZALEZ RVL, CHEN L, ZHANG S, SHE P, ZHONG Z, SUN J, CHEN X, WANG L, GU Z, ZHU P, LIU M, LI D, ZHONG TP and ZHANG X. Improving adenine and dual base editors through introduction of TadA-8e and Rad51DBD[J]. *Nature Communications*, 2023, 14(1): 1224.
- [142] CHIESA R, GEORGIADIS C, SYED F, ZHAN H, ETUK A, GKAZI SA, PREECE R, OTTAVIANO G, BRAYBROOK T, CHU J, KUBAT A, ADAMS S, THOMAS R, GILMOUR K, O'CONNOR D, VORA A, QASIM W. Base-edited CAR7 T cells for relapsed T-cell acute lymphoblastic leukemia[J]. *New England Journal of Medicine*, 2023, 389(10): 899-910.
- [143] LIU ZQ, CHEN SY, JIA YQ, SHAN HH, CHEN M, SONG YN, LAI LX, LI ZJ. Efficient and high-fidelity base editor with expanded PAM compatibility for cytidine dinucleotide[J]. *Science China Life Sciences*, 2021, 64(8): 1355-1367.
- [144] CHEN L, ZHU BY, RU GM, MENG HW, YAN YC, HONG MJ, ZHANG D, LUAN CM, ZHANG S, WU H, GAO HY, BAI SJ, LI CQ, DING RY, XUE NN, LEI ZX, CHEN YT, GUAN YT, SIWKO S, CHENG YY, et al. Re-engineering the adenine deaminase TadA-8e for efficient and specific CRISPR-based cytosine base editing[J]. *Nature Biotechnology*, 2023, 41(5): 663-672.
- [145] HUANG JY, LIN QP, FEI HY, HE ZX, XU H, LI YJ, QU KL, HAN P, GAO Q, LI BS, LIU GW, ZHANG LX, HU JC, ZHANG R, ZUO EW, LUO YL, RAN YD, QIU JL, Zhao KT, GAO CX. Discovery of deaminase functions by structure-based protein clustering[J]. *Cell*, 2023, 186(15): 3182-3195.e14.
- [146] LI JN, LIN JX, HUANG SS, LI M, YU WX, ZHAO YT, GUO JF, ZHANG PM, HUANG XX, QIAO YB. Functional phosphoproteomics in cancer chemoresistance using CRISPR-mediated base editors[J]. *Advanced Science*, 2022, 9(30): e2200717.
- [147] LEVY JM, YEH WH, PENDSE N, DAVIS JR, HENNESSEY E, BUTCHER R, KOBLAN LW, COMANDER J, LIU Q, LIU DR. Cytosine and adenine base editing of the brain, liver, retina, heart and skeletal muscle of mice *via* adeno-associated viruses[J]. *Nature Biomedical Engineering*, 2020, 4(1): 97-110.
- [148] LI GL, LI XY, ZHUANG SK, WANG LR, ZHU YF, CHEN YC, SUN W, WU ZG, ZHOU Z, CHEN J, HUANG XX, WANG J, LI DL, LI W, WANG HY, WEI WS. Gene editing and its applications in biomedicine[J]. *Science China Life Sciences*, 2022, 65(4): 660-700.
- [149] LING SK, YANG SQ, HU XD, YIN D, DAI Y, QIAN XQ, WANG DW, PAN XY, HONG JX, SUN XD, YANG H, PALUDAN SR, CAI YJ. Lentiviral delivery of co-packaged Cas9 mRNA and a Vegfa-targeting guide RNA prevents wet age-related macular degeneration in mice[J]. *Nature Biomedical Engineering*, 2021, 5(2): 144-156.

(本文责编 陈宏宇)