

DOI: 10.13376/j.cbls/2018111

文章编号: 1004-0374(2018)09-0926-06



黄军就, 男, 中山大学生命科学学院教授、博导、副院长。中山大学双一流建设“细胞基因编辑研究和应用”方向的团队负责人; 生命科学学院基因编辑动物平台负责人。研究方向为细胞衰老和再生的调控机制; 细胞基因编辑技术研究与应用。

在 *Molecular Cell*、*Cell Research*、*Stem Cells*、*Protein Cell* 等国际专业杂志上发表论文 50 篇, 总引用超 1500 次。世界上首次在人类胚胎通过 CRISPR/Cas9 技术和单碱基编辑技术修正地中海贫血症的突变基因, 被 *Nature*、*Science* 等科技媒体热点报道, 工作入选 2015 年 *Science* 杂志年度十大突破介绍和 2017 年 *Nature* 杂志年度科学事件盘点。2014 年入选广东特支计划百千万青年拔尖人才; 2015 年, *Nature* 杂志评选黄军就为年度全球十大科学人物; 2016 年, 获得中国干细胞协会评“干细胞青年研究员奖”; 2017 年, 中国遗传学会基因编辑分会第一届学术委员会委员; 2018 年, 广东省地中海贫血专委会副主任委员; 2018 年, 获邀为中国工程院全球工程前沿战略咨询研究项目医药卫生领域专家。科研获得国家重点研发计划、国家自然科学基金委面上项目等资助。

人类胚胎单碱基编辑治疗遗传疾病的研究

孙宏伟¹, 梁普平¹, 黄军就^{1,2,3*}

(1 中山大学生命科学学院, 基因功能与调控教育部重点实验室, 广州 510275; 2 中山大学生命科学学院和广州医科大学第三附属医院, 广东省生殖医学重点实验室, 广州 510275; 3 中山大学眼科中心, 眼科国家重点实验室, 广州 510060)

摘要: 基因编辑技术是当今生物学研究领域最为重要的颠覆性技术之一, 以 CRISPR/Cas9 系统为核心的基因编辑工具被广泛应用于包括人类体细胞、生殖细胞编辑相关的医学研究领域。虽然 CRISPR/Cas9 系统可以高效编辑靶基因, 但其精准编辑能力依赖于效率极低的同源重组方式, 这极大限制了其定点编辑的能力与应用范围, 所以寻找一种能高效引入点突变的新颖基因编辑工具具有重大的应用价值。以 CRISPR/Cas9 系统为基础的单碱基编辑系统可以在基因组靶位点实现精准、高效的 C/G 和 T/A 碱基间的转换, 其编辑能力已经在动植物、人体细胞以及人类胚胎中得到证实。利用单碱基编辑技术, 有望对人类超过 70% 的相关遗传性致病位点进行修复。现就人类胚胎单碱基编辑治疗遗传疾病的最新研究进展进行综述和展望。

关键词: 人类胚胎; CRISPR/Cas9; 单碱基编辑; 遗传疾病

中图分类号: Q78; R450 **文献标志码:** A

Research on genetic diseases treatment with base editing system in human embryos

SUN Hong-Wei¹, LIANG Pu-Ping¹, HUANG Jun-Jiu^{1,2,3*}

(1 MOE Key Laboratory of Gene Function and Regulation, School of Life Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou)

收稿日期: 2018-05-21; 修回日期: 2018-07-16

基金项目: 国家重点研发计划(2017YFC1001901和2017YFA0102801), 广州市科技攻关项目(201803010020), 广东省自然科学基金项目(2017A030313491)

*通信作者: E-mail: hjunjiu@mail.sysu.edu.cn

510275, China; 2 Guangdong Key Laboratory of Reproductive Medicine, the Third Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University & School of Life Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China; 3 State Key Laboratory of Ophthalmology, Zhongshan Ophthalmic Center, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510060, China)

Abstract: Gene editing technique is one of the breakthrough technologies in biological research today. The gene editing tools based on the CRISPR/Cas9 system are widely used in the medical research involving the editing of human somatic cells and germ cells. Although CRISPR/Cas9 system can target the gene efficiently, its ability to precisely editing the target site depends on the low-efficiency homologous directed repair (HDR) manner, which limits its application. It will be valuable to develop a novel gene editing technique which could efficiently introduce the point mutation. The base editing technique based on the CRISPR/Cas9 system enables precise and efficient conversion between C/G and T/A bases at the genomic target sites, and the editing capabilities have been widely confirmed in animals, plants, human cells and human embryos. It's expected more than 70% of related genetic pathogenic sites in human could be corrected using the base editing system. This review focused on the latest research and outlook about the base editing technique in correcting the genetic diseases in human embryos.

Key words: human embryos; CRISPR/Cas9; base editing; genetic diseases

CRISPR (clustered regularly interspaced palindromic repeats)/Cas (CRISPR-associated protein) 系统是细菌和古细菌在长期进化过程中形成的一种获得性免疫防御机制, 在防止病毒的入侵与整合过程中发挥至关重要的作用^[1-2]。经改造的 CRISPR/Cas9 系统具有简便、高效、适用性广泛等特点, 被广泛地用于不同物种的基因组编辑。该系统主要通过单链向导 RNA (single guide RNA, sgRNA) 与基因组靶位点形成碱基互补配对而引导 Cas9 核酸酶定向切割靶位点。该技术经过不断完善, 目前已经被广泛应用于包括动植物和人的基因编辑研究^[3-5]。CRISPR/Cas9 技术也为科学家在人类早期胚胎对遗传突变进行修复的研究和对关键的人类特异发育调控机制研究提供了变革性的工具^[6-10]。

基于 CRISPR/Cas9 系统, 2016 年哈佛大学的 David R. Liu 课题组首次报道了可作用于单个碱基的新型基因编辑工具——胞嘧啶脱氨酶单碱基编辑技术 (cytidine base editor, CBE 或 BE)^[11]。该系统的原理是将可催化胞嘧啶 (cytosine, C) 脱氨基的胞嘧啶脱氨酶 (cytidine deaminase) 与 Cas9 蛋白变体融合, 在 sgRNA 的引导下, 靶向结合到基因组特定位点后将互补链上的 C 脱氨基形成尿嘧啶 (uracil, U), 再通过 DNA 的复制过程形成胸腺嘧啶 (thymine, T)。因此, BE 系统可以在靶位点实现高效的 C 到 T 的转换, 而互补链实现鸟嘌呤 (guanine, G) 到腺嘌呤 (adenine, A) 的转换。2017 年, David R. Liu 课题组经过了 7 轮蛋白质分子进化, 再次突破性地开发新型腺嘌呤单碱基编辑工具——ABE 系统 (adenine base editor, ABE)^[12]。ABE 可以在靶位点实现高效的

A/T 到 G/C 的转换。以 CBE 和 ABE 系统为核心的单碱基编辑技术实现了 C/G 和 T/A 间的转换, 为后续以单碱基编辑系统为基础的基因治疗奠定了基础。

CRISPR/Cas9 系统介导精准的点修复依赖于细胞内部的同源重组机制, 但同源重组发生的概率极低, 极大地限制了该系统在遗传疾病精准修复领域的应用^[13]。与 CRISPR/Cas9 系统相比, CBE 和 ABE 系统由于不引发 DNA 双链损伤 (double strand breaks, DSB), 不会显著地激活非同源重组的修复机制而造成碱基的随机插入/缺失 (insertions and deletions, indels), 因此具有更加精准修复的特点。目前 CBE 系统已经在细胞模型、小鼠胚胎以及人类胚胎等模型中证明了其精准、高效的编辑能力^[11,14-18]。2017 年, 中山大学黄军就教授科研团队在世界上首次证明了在人胚胎中利用 CBE 系统可以阻断和治疗特定遗传点突变疾病的代际间传递^[19]。

本文将着重介绍单碱基编辑技术在人类胚胎治疗遗传疾病等方面的研究进展、存在的技术障碍和未来发展方向。

1 单碱基编辑技术

1.1 胞嘧啶单碱基编辑技术 (cytidine base editor, CBE 或 BE)

胞嘧啶脱氨酶单碱基编辑技术是依赖于 CRISPR/Cas9 系统和胞嘧啶脱氨酶组合的新型基因组编辑技术, 最早由 David R. Liu 团队报道, 主要由具有催化功能的蛋白复合物和 sgRNA 两部分组成, 其中蛋白复合物由大鼠的胞嘧啶脱氨酶 (rAPOBEC1)、无核酸酶活性的 Cas9 (nuclease dead Cas9, dCas9) 或

Cas9 切口酶 (Cas9 nickase, Cas9n) 和尿嘧啶糖基化酶抑制子 (uracil DNA glycosylase inhibitor, UGI) 三部分构成。根据蛋白复合物的组成不同, CBE 系统主要分为: BE1, rAPOBEC1-XTEN-dCas9; BE2, rAPOBEC1-XTEN-dCas9-UGI 和 BE3, rAPOBEC1-XTEN-Cas9n-UGI 三种^[11]。

CBE 系统的编辑功能首先依赖于 sgRNA 对于靶序列的识别以及 Cas9 变体蛋白的 DNA 双链解聚能力, 其次在胞嘧啶脱氨酶的催化下对靶位点胞嘧啶进行脱氨基作用。胞嘧啶脱氨酶的酶活窗口有 5 个核苷酸, 一般为距离 PAM 序列最远端起的第 4~8 位^[11]。由于脱氨酶的活性窗口较大, 使得窗口内的 C/G 位点都可能被编辑, 因此后续的许多研究都在致力于通过对脱氨酶进行蛋白质结构的改造, 以降低其脱氨酶活性并缩小酶活窗口。其中, David R. Liu 团队就通过在胞嘧啶脱氨酶关键酶活位点上引入点突变的方法改造获得编辑窗口更小的 CBE 系统, 如通过在脱氨酶的结合位点和催化位点上引入 W90Y、W126E 和 W132E 的 3 个位点突变, 可以在满足脱氨酶效率的前提下, 将其酶活窗口缩小至 1~2 个核苷酸^[20]。

CRISPR 系统中 PAM (protospacer adjacent motif) 序列识别的特异性限制了单碱基编辑系统靶位点选取的范围, David R. Liu 团队通过对化脓链球菌来源的 *Streptococcus pyogenes* Cas9 (SpCas9) 和金黄色葡萄球菌来源的 *Staphylococcus aureus* Cas9 (SaCas9) 蛋白进行突变, 改变了单碱基编辑系统识别的 PAM 序列, 拓展其应用范围^[20]。

除了将大鼠来源的胞嘧啶脱氨酶与变体 Cas9 核酸酶融合对基因组进行编辑之外, 将其他物种来源的胞嘧啶脱氨酶与变体 Cas9 核酸酶融合也可以获得新的单碱基编辑工具, 如日本的 Akihiko Kondo 实验室基于七鳃鳗的胞嘧啶脱氨酶 (activation-induced cytidine deaminase, AID) 类似物 PmCDA1 开发了 dCas9-PmCDA1-UGI 和 Cas9n-PmCDA1-UGI 单碱基编辑系统^[21]。常兴实验室则利用人源 AID 开发了 dCas9-AIDx 单碱基编辑系统^[22]。这两个系统都在细胞中验证了其高效的编辑活性。

1.2 腺嘌呤单碱基编辑技术 (adenine base editor, ABE)

腺嘌呤单碱基编辑系统是 David R. Liu 团队通过蛋白质进化和蛋白质工程的手段筛选得到的, 可在基因组靶位点实现 A 到 G 高效转换的突破性碱基编辑工具。与 CBE 系统类似, ABE 系统同样由

具有催化功能的蛋白质复合物和 sgRNA 组成。其中应用最广、编辑效率最高的 ABE 系统蛋白质复合物由两个串联的大肠杆菌来源的转运 RNA (transport RNA, tRNA) 特异的腺苷脱氨酶 (*E. coli* TadA, ecTadA) 和 dCas9 组成的单碱基编辑器 ecTadA-dCas9^[12]。单碱基编辑器 ecTadA-dCas9 在 sgRNA 的引导下, 靶向结合到基因组特定位置, 并将与 sgRNA 靶向结合链的互补链上的 A 进行脱氨基作用, 形成肌昔 (inosine, I)。在 DNA 复制过程中, I 会被 DNA 聚合酶识别为 G 进行复制, 因此, ABE 系统可以实现靶位点的 A 到 G 的转换以及互补链的 T 到 C 的转换^[12]。

与 CBE 系统相比, ABE 系统得到的编辑产物纯度非常高 ($\geq 99.9\%$), 且基本不会出现碱基的随机插入 / 缺失 ($\leq 0.1\%$)。这些优势使得 ABE 系统有望被广泛应用于基础研究和临床治疗等方面, 具有广阔的应用前景。

2 单碱基编辑技术在小鼠胚胎基因编辑的应用

单碱基编辑系统的编辑能力已经在体细胞中得到充分证明^[11], 但单碱基编辑系统是否可以在生殖细胞中进行有效的编辑仍有待验证。2017 年 2 月, 韩国首尔国立大学的 Jin-Soo Kim 课题组利用 BE3 系统在世界率先证明了 CBE 系统可用于小鼠受精卵基因组的高效编辑。他们选取了控制小鼠皮毛黑色素合成的酪氨酸激酶基因 *Tyr* (tyrosine kinase) 和与疾病相关的杜氏肌营养不良蛋白编码基因 *DMD* (duchenne muscular dystrophy), 通过在蛋白质编码区突变特定位点上的碱基 C 提前形成终止密码子的方式使蛋白质功能丧失, 以达到基因敲除的目的^[14]。

2017 年 4 月, 中山大学松洲洲教授和黄军就教授科研团队通过蛋白质改造的方法引入保真性更高, 且无核酸酶活性的 Cas9 突变体 dCas9-HF2 (D10A/N497A/R661A/H840A/Q926A/D1135E), 构建保真性更高的单碱基编辑器 rAPOBEC1-XTEN-dCas9-HF2-UGI (HF2-BE2), 希望改进 CBE 系统存在的特异性不高和碱基的随机插入 / 缺失等不足^[15]。通过靶向编辑 *Tyr* 基因, 证明 HF2-BE2 系统可以在小鼠胚胎和 F0 代小鼠中产生高效的靶位点编辑, 并且能获得 100% 纯合的编辑小鼠模型。该研究发现 HF2-BE2 系统编辑的小鼠仍然存在碱基的随机插入 / 缺失现象, 这与 Jin-Soo Kim 课题组利用 BE3 系统编辑小鼠胚胎得到的结果相同。由于 HF2-BE2 系统不切割基因组 DNA, 所以中山大学的课题组提出了有别于 Jin-Soo Kim 团队的观点, 他们认为 CBE

系统引起碱基的随机插入/缺失是由于系统中的 UGI 活性不强, 导致编辑得到的 U 被糖基化修饰切除后引起 DNA 损伤, 激活细胞损伤修复造成的^[15]。

紧随其后, David R. Liu 团队在 2017 年 6 月证明了 BE3 系统在小鼠胚胎基因组中也有高效编辑活性^[16]。三篇文章共同证明了 CBE 系统可以在小鼠受精卵基因组中进行精准、高效的基因编辑, 也暗示了其在人类早期胚胎基因编辑研究中的可行性。

3 单碱基编辑技术在人类胚胎中治疗遗传突变的研究

目前已知约 2/3 的人类遗传性疾病是由单碱基的突变引起的, 在这些单碱基突变引起的遗传疾病中, 有大约 900 种是可以利用 CBE 系统修复的^[11]。利用单碱基编辑技术治疗人类遗传性疾病必将是未来该技术的重要应用之一。

2017 年 9 月, *Protein Cell* 杂志报道了中山大学黄军就教授科研团队在世界上首次利用 CBE 系统在人胚胎中尝试阻断和治疗 β -地中海贫血的研究成果^[19]。 β -地中海贫血是我国华南地区常见的一种遗传性血液疾病, 在广东省的人群携带率接近 10%, 而广西可达到 20%^[23]。 β -地中海贫血症患者有非常大一部分人是由于单个碱基突变导致疾病发生。 β -地中海贫血症致病基因 *HBB* 在 -28(A>G) 的突变是最高发的点突变类型^[24]。中山大学团队利用 BE3 系统针对 *HBB* -28 A>G 致病点突变首次在人类体细胞和胚胎中进行了编辑修复的研究工作^[19]。

他们首先通过建立疾病细胞系模型筛选出能高效编辑疾病突变位点的 sgRNAs, 随后在 *HBB*-28 (A>G) 纯合突变患者来源的皮肤原代细胞中验证了编辑活性。实验结果显示, 在构建的细胞系和患者原代皮肤成纤维细胞中, CBE 的修复效率约为 20%, 虽然部分编辑细胞存在杂合子的现象, 但杂合子的 *HBB*-28(A>G) β -地中海贫血患者没有临床病症^[25]。

为了进一步了解 CBE 系统在人类早期胚胎中对致病点突变的编辑修复效果, 团队结合体细胞核移植技术将 *HBB* -28(A>G) 纯合子患者来源的体细胞与去核的体外培养成熟卵子融合重构了含有纯合突变的核移植胚胎模型。通过显微操作技术将 BE3 系统或优化后的 YEE-BE3 系统分别注射到核移植胚胎模型中检测它们对疾病突变位点的修复效率。结果显示, BE3 系统在 40.9%(9/22) 的胚胎中实现了 G>A 的精准修改, 但 4.5%(1/22) 中胚胎发现 G>C 的转换。而编辑窗口更小的 YEE-BE3 可在

40%(8/20) 的胚胎中精确地在 -28 位点实现 G>A 的正确修复而没有 G>C 的产生, 在 16.7%(8/48) 的卵裂球细胞中实现双等位基因的 100% 正确修复。

尽管目前还不能实现 100% 的修复, 但 *Nature* 杂志评论认为该系统在人类胚胎中的修复效率还是相当不错, 有治疗应用前景^[26]。文章中也指出在修复后的人胚胎中没有发现编辑位点碱基的随机插入/缺失以及位点外的脱靶效应^[19], 说明对于该疾病突变位点, CBE 系统具有非常高效、精准的优势。

此外, 广州医科大学附属第三医院的刘见桥课题组和山东大学附属生殖医院的陈子江课题组也分别利用 BE3 系统对人类三原核胚胎进行了基因编辑效率研究。人类三原核胚胎与正常胚胎接近, 是研究基因编辑效率的理想材料^[6]。刘见桥课题组证明在人的三原核胚胎中利用 BE3 系统可以对两个已经报道的基因位点 HEK293 site 4 和 RNF2 进行高效编辑, 但在 HEK293 site 4 靶位点的编辑过程中出现了明显的脱靶效应, 而且在胚胎中发现了碱基的随机插入/缺失^[17]。陈子江课题组则利用 BE3 系统和优化的 SaKKH-BE3 (PAM 序列为 NNNRRT) 系统对包括 *HBB*、*FANCF* 和 *DNMT3* 基因靶位点进行编辑, 发现 BE3 系统和优化后的 SaKKH-BE3 系统都有较高的编辑效率。该课题组也发现了 *FANCF* 的某些靶位点存在碱基的随机插入/缺失以及较低概率的脱靶^[18]。

国内三篇利用 CBE 系统成功修复或编辑人类胚胎基因组的实验充分证明了单碱基编辑技术在人类胚胎中治疗特定位点遗传性疾病的巨大优势和应用价值。中山大学团队报道的世界首例利用 CBE 系统治疗 β -地中海贫血的研究成果, 为后续以 CBE 系统为基础治疗近千种 T/A \rightarrow C/G 的遗传性致病点突变代际间传递提供重要的研究数据, 该研究也入选 *Nature* 杂志的 2017 年全球最重要的科学事件盘点^[27]。

4 单碱基编辑在人类胚胎编辑的研究展望

4.1 CBE 编辑系统在治疗人类疾病中的不足与改进方向

作为一种新型的基因组修饰工具, CBE 系统在发挥其编辑作用的同时也逐渐显现其需要改进的地方。

基因编辑产物不纯。在部分靶位点的编辑中出现 C \rightarrow G/A 碱基的转换以及碱基的随机插入/缺失。这种编辑产物的出现可能是由于 CBE 系统中 UGI 活性不强造成的, 可以通过替换成胞嘧啶脱氨酶的

同系物或串联多个 UGI 的方式提高靶位点的编辑效率和产物纯度，减少碱基的随机插入/缺失^[28]。

胞嘧啶脱氨酶活性窗口过大。编辑窗口过大容易造成活性窗口内非靶位点的脱氨基作用。David R. Liu 课题组通过突变胞嘧啶脱氨酶关键酶活位点的方式获得了一系列减小酶活窗口的变体酶，有望解决该问题^[20]。

CBE 系统存在靶位点依赖性的脱靶效应。这种现象主要是 CRISPR/Cas9 系统本身的问题，所以通过对 Cas9 蛋白进行突变修饰构建高保真性的 CBE 系统，同时利用 RNA-蛋白质复合物进行编辑这两种方式可以有效降低脱靶效应的产生^[16]。

靶位点受限。由于 Cas9 蛋白对 PAM 序列的特异性识别，导致目前 CBE 系统只能用于编辑不足 1/3 的 C/G→T/A 致病突变位点。通过对 Cas9 蛋白进行改造扩大 PAM 序列识别范围则有望使 CBE 系统对 2/3 的相关致病突变位点进行有效编辑^[20]。最近，David R. Liu 课题组再次发表重要的成果，构建了识别位点更为广泛的 xCas9 蛋白。通过将 CBE 或者 ABE 系统与最新发现的 xCas9 蛋白连用构建的新型基因编辑系统将覆盖超过 70% 的 C/G→T/A 和 A/T→G/C 致病突变位点^[29]。

CBE 系统可能具有胚胎毒性。CBE 系统的低毒活性已经在细胞系和小鼠胚胎中得到证明^[15,30]。在临床治疗中，CBE 系统是否对人类胚胎具有毒性仍需实验验证。

4.2 ABE编辑系统在生殖细胞基因编辑的应用

作为新一代单碱基编辑系统，ABE 自开发之日起就备受科学界关注，而围绕 ABE 系统在动物模型制备和治疗单碱基遗传疾病的潜力和风险成了国际研究的竞争热点。在动物胚胎基因编辑领域，来自中山大学松阳洲和黄军就课题组与华东师范大学李大力课题组等 4 个独立的研究组以及韩国科学家都分别报道了 ABE 系统可以在小鼠和大鼠受精卵中高效编辑靶位点，同时研究发现 ABE 系统较 CBE 系统编辑更加精准，在成功编辑后的胚胎和 F0 代小鼠中尚未发现碱基的插入或缺失突变^[31-35]。在植物基因组编辑领域，ABE 系统的编辑效果也得到了进一步证明^[36-38]。

值得一提的是，韩国科学家使用腺相关病毒载体将 ABE 系统成功递送到含有 *DMD* 基因致病性点突变的成年小鼠中，并在靶位点处修复了该突变^[35]，这项研究表明 ABE 有望用于治疗人类遗传性致病点突变，而在已知的人类致病单碱基

突变中，有超过 15 000 种可以通过 A/T→G/C 的碱基修复来治愈和缓解^[12]。可以想象，随着系统的进一步优化，ABE 系统必将在精准的动物模型制备和人类胚胎的特定遗传突变位点的修复中发挥巨大的潜能。

4.3 单碱基编辑的发展前景

基因组编辑是当今生物学的热点领域，也是生物学研究中最贴近于临床治疗转化的关键技术。随着单碱基编辑技术的开发、完善与应用，以 CBE 和 ABE 系统为核心的单碱基编辑技术未来将在基础理论研究和临床治疗遗传性疾病等方面发挥巨大的优势和展现无与伦比的光明前景。

[参 考 文 献]

- [1] Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*, 2007, 315: 1709-12
- [2] Marraffini LA, Sontheimer EJ. CRISPR interference limits horizontal gene transfer in *Staphylococci* by targeting DNA. *Science*, 2008, 322: 1843-5
- [3] Ran FA, Hsu PD, Lin CY, et al. Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell*, 2013, 154: 1380-9
- [4] Woo JW, Kim J, Kwon S, et al. DNA-free genome editing in plants with preassembled CRISPR-CAS9 ribonucleoproteins. *Nat Biotechnol*, 2015, 33: 1162-4
- [5] Cho SW, Kim S, Kim JM, et al. Targeted genome engineering in human cells with the CAS9 RNA-guided endonuclease. *Nat Biotechnol*, 2013, 31: 230-2
- [6] Liang P, Xu Y, Zhang X, et al. CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human tripronuclear zygotes. *Protein Cell*, 2015, 6: 363-72
- [7] Kang X, He W, Huang Y, et al. Introducing precise genetic modifications into human 3PN embryos by CRISPR/Cas-mediated genome editing. *J Assist Reprod Genet*, 2016, 33: 581-8
- [8] Tang L, Zeng Y, Du H, et al. CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human zygotes using Cas9 protein. *Mol Genet Genomics*, 2017, 292: 525-33
- [9] Ma H, Marti-Gutierrez N, Park SW, et al. Correction of a pathogenic gene mutation in human embryos. *Nature*, 2017, 548: 413-9
- [10] Fogarty NME, McCarthy A, Snijders KE, et al. Genome editing reveals a role for OCT4 in human embryogenesis. *Nature*, 2017, 550: 67-73
- [11] 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: 420-4
- [12] 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: 464-71
- [13] Capecchi MR. Gene targeting in mice: functional analysis of the mammalian genome for the twenty-first century.

- Nat Rev Genet, 2005, 6: 507-12
- [14] Kim K, Ryu SM, Kim ST, et al. Highly efficient RNA-guided base editing in mouse embryos. *Nat Biotechnol*, 2017, 35: 435-7
- [15] Liang P, Sun H, Sun Y, et al. Effective gene editing by high-fidelity base editor 2 in mouse zygotes. *Protein Cell*, 2017, 8: 601-11
- [16] 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
- [17] Li G, Liu Y, Zeng Y, et al. Highly efficient and precise base editing in discarded human tripronuclear embryos. *Protein Cell*, 2017, 8: 776-9
- [18] Zhou C, Zhang M, Wei Y, et al. Highly efficient base editing in human tripronuclear zygotes. *Protein Cell*, 2017, 8: 772-5
- [19] Liang P, Ding C, Sun H, et al. Correction of β -thalassemia mutant by base editor in human embryos. *Protein Cell*, 2017, 8: 811-22
- [20] 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: 371-6
- [21] Nishida K, Arazoe T, Yachie N, et al. Targeted nucleotide editing using hybrid prokaryotic and vertebrate adaptive immune systems. *Science*, 2016, 353: aaf8729
- [22] Ma Y, Zhang J, Yin W, et al. Targeted AID-mediated mutagenesis (TAM) enables efficient genomic diversification in mammalian cells. *Nat Methods*, 2016, 13: 1029-35
- [23] 李长刚. 地中海贫血临床诊治中存在的问题. *临床儿科杂志*, 2009, 27: 714-7
- [24] Cao A, Galanello R. β -thalassemia. *Genet Med*, 2010, 12: 61-76
- [25] Dever DP, Bak RO, Reinisch A, et al. CRISPR/Cas9 β -globin gene targeting in human haematopoietic stem cells. *Nature*, 2016, 539: 384-9
- [26] Cyranoski D. Chinese scientists fix genetic disorder in cloned human embryos. *Nature*, 2017, 550: 15-6
- [27] Callaway E, Castelvetti D, Cyranoski D, et al. 2017 in news: the science events that shaped the year. *Nature*, 2017, 552: 304-7
- [28] 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: eaao4774
- [29] Hu JH, Miller SM, Geurts MH, et al. Evolved CAS9 variants with broad PAM compatibility and high DNA specificity. *Nature*, 2018, 556: 57-63
- [30] Yang L, Briggs AW, Chew WL, et al. Engineering and optimising deaminase fusions for genome editing. *Nat Commun*, 2016, 7: 13330
- [31] Liang P, Sun H, Zhang X, et al. Effective and precise adenine base editing in mouse zygotes. *Protein Cell*, 2018, 9: 808-13
- [32] Yang L, Zhang X, Wang L, et al. Increasing targeting scope of adenosine base editors in mouse and rat embryos through fusion of TadA deaminase with Cas9 variants. *Protein Cell*, 2018, 9: 814-9
- [33] Ma Y, Yu L, Zhang X, et al. Highly efficient and precise base editing by engineered dCas9-guide tRNA adenosine deaminase in rats. *Cell Discov*, 2018, 4: 39
- [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: 2338
- [35] 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: 536-9
- [36] Hua K, Tao X, Yuan F, et al. Precise A·T to G·C base editing in the rice genome. *Mol Plant*, 2018, 11: 627-30
- [37] 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: 631-4
- [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: 59