

DOI: 10.13376/j.cblls/2021164

文章编号: 1004-0374(2021)12-1462-07



张学礼, 中国科学院天津工业生物技术研究所研究员。国家自然科学基金优秀青年基金获得者, 科技部国家重点研发计划“微生物化学品工厂的途径创建及应用”项目首席科学家。主要研究方向为合成生物学与基因编辑。研究组近年来的主要研究工作包括: (1) 应用合成生物学与代谢工程技术构建高效微生物细胞工厂, 生产氨基酸、维生素、材料化学品和萜类天然产物; (2) 开发碱基编辑技术用于遗传疾病的基因治疗。研究成果发表在 *Nature Biotechnology* 等刊物上; 13 个化学品细胞工厂完成技术转让或委托开发, 其中 L- 丙氨酸、缬氨酸、丁二酸和 D- 乳酸实现万吨级产业化生产。L- 丙氨酸技术获中国轻工业联合会技术发明一等奖和中国专利优秀奖, 作为华恒生物的主营产品, 支撑企业在科创板上市。

基因组编辑技术及未来发展

赵东东¹, 宗媛², 尹蕾³, 毕昌昊^{1*}, 王金^{4*}, 高彩霞^{2*}, 张学礼^{1*}

(1 中国科学院天津工业生物技术研究所, 天津 300308; 2 中国科学院遗传与发育生物学研究所, 北京 100101; 3 上海师范大学, 上海 200234; 4 深圳市第二人民医院转化医学研究院, 深圳 518000)

摘要: 基因组编辑技术是合成生物学的一项核心使能技术。CRISPR基因组编辑技术在生命科学领域掀起了一场全新的技术革命, 助推了合成生物学快速发展。然而, 目前CRISPR基因组编辑技术的性能尚有欠缺, 智能设计、表达和投递系统等相关技术也不能满足医疗和农业领域的应用需求。未来基因组编辑技术的发展方向, 一方面亟待开发更精准、高效、全面和智能的CRISPR基因组编辑技术; 另一方面, 需利用大数据分析和人工智能技术, 开发CRISPR之外全新的颠覆性基因组编辑技术。

关键词: 基因组编辑; 合成生物学; CRISPR; 碱基编辑; 引导编辑

中图分类号: Q-33; Q78 **文献标志码:** A

Genome editing technology and future development

ZHAO Dong-Dong¹, ZONG Yuan², YIN Lei³, BI Chang-Hao^{1*}, WANG Jin^{4*}, GAO Cai-Xia^{2*}, ZHANG Xue-Li^{1*}

(1 Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China;
2 Institute of Genetics and Developmental Biology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China;
3 Shanghai Normal University, Shanghai 200234, China; 4 Institute of Translational Medicine,
Shenzhen Second People's Hospital, Shenzhen 518000, China)

Abstract: Genome editing is an incredibly enabling synthetic biology technology. CRISPR genome editing technology represents a technological revolution across all life sciences. However, currently CRISPR genome editing technologies are still limited by many challenges, and other related technologies such as intelligent design, expression and delivery systems are unable to meet requirements of applying CRISPR editing across medicine and agriculture. For future genome editing technology developments, it is necessary to generate more accurate, efficient, comprehensive and intelligent CRISPR genome editing technologies. Additionally, big data analyses and artificial

收稿日期: 2021-10-04

*通信作者: E-mail: bi_ch@tib.cas.cn (毕昌昊); wangj01@hotmail.com (王金); cxgao@genetics.ac.cn (高彩霞); zhang_xl@tib.cas.cn (张学礼)

intelligence approaches are essential towards developing novel subversive genome editing technologies that differ from CRISPR approaches.

Key words: genome editing; synthetic biology; CRISPR; base editing; prime editing

1 基因组编辑技术概述

基因组编辑是指在基因组尺度对生物体进行精确设计与高效改造。基因组编辑技术经历了从锌指核酸酶 (ZFNs)、转录激活因子样效应物核酸酶 (TALEN) 到成簇规律间隔短回文重复 (CRISPR) 系统的三次技术革新 (图 1)。

1.1 ZFN技术

ZFN 技术^[1] 出现于 20 世纪 90 年代, 主要包括用于识别和结合特定 DNA 序列的锌指蛋白 (ZFP) 和非特异性切割 DNA 的核酸内切酶 Fok I。利用一对串联的锌指结合特异 DNA, 将 Fok I 的两个亚基带到特定基因组位点, 对 DNA 进行切割产生 DNA 双链断裂 (double strand breaks, DSBs)。该技术靶向结合效率高, 但是其识别特定 DNA 的锌指序列需要通过文库筛选来确定, 耗时费力, 成本也高, 至今难以被大规模应用。

1.2 TALEN技术

TALEN 技术^[2-3] 发明于 2009 年, 与 ZFN 相似, 由两部分构成。一部分是由 33~35 个氨基酸的重复单元组成, 位于 12 位和 13 位的两个可变氨基酸残基负责识别并结合 DNA 序列; 通过构建 12 位和 13 位不同的可变氨基酸残基, 理论上可以靶向几乎任何 DNA 序列。另一部分是限制性核酸内切酶 Fok I。将 TALEN 与特定的表观遗传修饰酶或一些

转录调控效应因子进行融合, 可实现基因的表达调控。与 ZFN 相比, TALEN 更为灵活, 筛选、构建更加容易, 效率有所提高, 是合成生物学等领域广泛使用的工具。但是, TALEN 技术构建较为复杂, 成本依然偏高。

1.3 CRISPR技术

CRISPR 系统^[4] 作为细菌或古细菌的“免疫系统”, 于 2012 年被开发, 并成为目前最便捷高效的基因组编辑工具。相比于 ZFN 和 TALEN 技术, CRISPR 技术构建简单、价格低廉、易于编程且高效, 已广泛应用于生命科学多个领域, 迅速成为全世界生命科学研究的焦点。CRISPR 相关技术在 2013、2015 和 2017 年先后被 *Science* 杂志评为十大科学突破之一, 并获得 2020 年度诺贝尔化学奖。

1.3.1 传统CRISPR技术

CRISPR 系统包含与目的 DNA 片段匹配的向导 RNA (sgRNA) 以及具有核酸酶功能的 Cas 蛋白。向导 RNA 引导 Cas 蛋白结合靶位点, 切割靶 DNA, 产生 DSB 损伤, 再通过易错的非同源末端连接 (non-homologous end-joining, NHEJ) 或者高保真的同源重组修复 (homology-directed repair, HDR) 等方式进行修复^[5]。NHEJ 会形成碱基丢失、插入或置换等小片段突变, HDR 需要以内源或者外源导入的同源序列作为修复模板进行编辑。在部分细胞中 (如植物或者哺乳动物细胞), HDR 效率远远低于

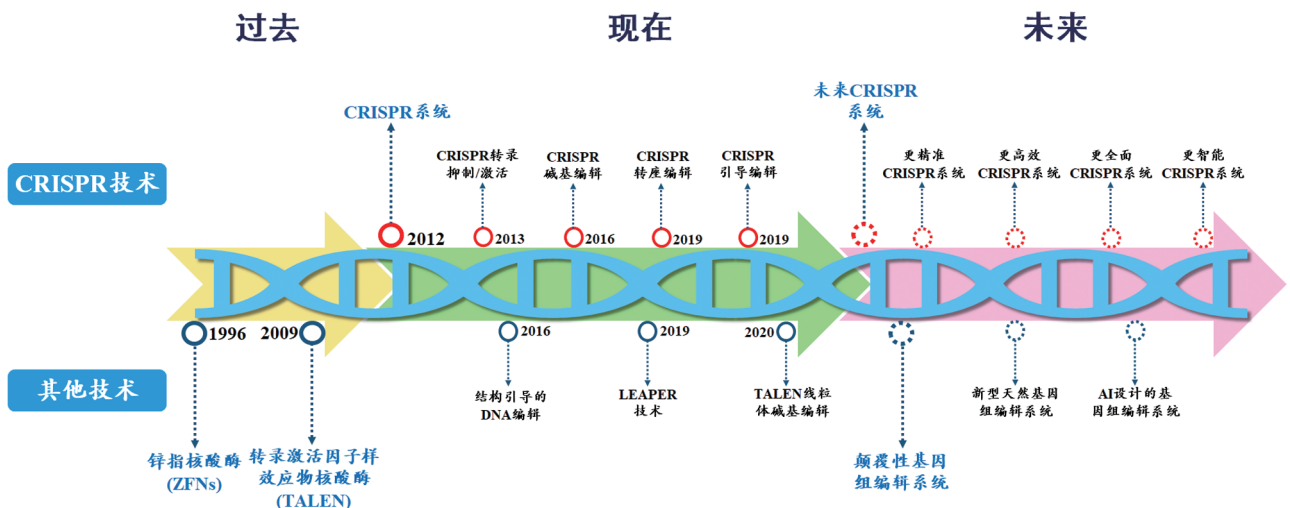


图1 基因组编辑技术发展历程

NHEJ, 倾向于产生核苷酸的插入和缺失。目前最为常用的 Cas9 蛋白可被改造为切割 DNA 单链的 nCas9 或无切割活性的 dCas9, 将其与其他功能蛋白融合, 定位到靶位点, 可实现各种基因组靶向操作。

1.3.2 单碱基编辑技术

单碱基编辑 (base editing, BE) 主要利用 Cas9 变体 (dCas9/nCas9) 与脱氨酶蛋白融合而成, 可将一定窗口内的胞嘧啶核苷酸转化为胸腺嘧啶核苷酸 (C>T)^[6-7], 将腺嘌呤核苷酸转化为鸟嘌呤核苷酸 (A>G)^[8]。新型糖基化酶碱基编辑器利用细胞自身 DNA 修复系统, 将胞嘧啶脱氨和尿嘧啶糖基化两步反应形成的“非常规碱基”(AP) 修复生成特定碱基, 并首次实现碱基颠换编辑。在大肠杆菌中, 可将胞嘧啶编辑成腺嘌呤, 结合其他碱基编辑器可以实现任意碱基间的变化; 在哺乳动物细胞中, 可将胞嘧啶特异性编辑成鸟嘌呤^[9-10]。碱基编辑技术突破了传统编辑技术的制约, 无需产生 DNA 双链断裂, 也无需供体 DNA 的参与, 具有简单、广适、高效的特点。

1.3.3 引导编辑和转座编辑

将逆转录酶与 nCas9 融合, 同时在向导 RNA 的 3' 端延伸出一段序列作为逆转录的引物和模板构建的引导编辑 (prime editor, PE) 技术^[11], 可以实现任意碱基之间的替换以及特定碱基序列的插入与删除。将 CRISPR 系统与转座子结合可以实现位点特

异性 DNA 片段的高效、特异插入^[12-13]。

2 CRISPR基因组编辑技术存在的问题及未来发展

CRISPR 基因组编辑技术虽然发展迅速, 但目前其精准性、高效性、全面性和智能性四大方面尚有欠缺 (表 1)。

2.1 CRISPR基因组编辑技术的精准性

2.1.1 基因组脱靶

目前 CRISPR 基因组编辑技术的精准性不足主要体现在脱靶问题。脱靶现象一般分为两种: sgRNA 依赖型和 sgRNA 非依赖型。对于 sgRNA 依赖的脱靶, 通过合理设计 spacer 序列、使用高特异性的 Cas9 变体、瞬时表达 CRISPR 系统等策略均可以降低其脱靶效率^[14]; 对于 sgRNA 非依赖的脱靶, 目前已在 BE 系统中被报道。解决方法主要是通过开发脱氨酶变体, 降低其与 ssDNA 或者 RNA 的结合能力, 进而降低其脱靶水平^[15-16]。但目前的解决方案在提高编辑精准性的同时在一定程度上影响了靶向效率。未来可通过蛋白质工程手段, 如基于蛋白质结构的理性设计、蛋白质定向进化以及基于人工智能的蛋白质从头设计, 开发新型编辑系统, 兼顾高精准性与高效率。

2.1.2 副产物编辑

基因组编辑系统的精准性还体现在降低副产物

表1 CRISPR基因组编辑技术瓶颈与未来发展

	瓶颈问题	未来解决方案
精准性	基因组脱靶	利用蛋白质工程等方法开发低脱靶编辑系统
	副产物编辑	通过蛋白质理性设计、定向进化、AI设计等方法开发低副产物编辑系统
高效性	动植物细胞同源重组效率低	精细化调控修复途径; 控制细胞周期; 提高供体模板可利用性
	引导编辑效率低	优化pegRNA结构; 调控修复途径关键蛋白; 提高PE的逆转录效率及表达水平
	微生物多靶点同时编辑效率低	提高修复效率; 应用不引入DSB的编辑技术
全面性	PAM框范围受限	通过工程化改造Cas9、挖掘新型Cas蛋白等方式开发不同PAM类型编辑系统; 开发无PAM需求的Cas新变体
	碱基编辑种类不足	利用功能蛋白与DNA修复途径相结合等方式开发新型高效的碱基编辑器
	特定细胞器编辑问题	改造RNA解决细胞器RNA投递问题; 利用细胞自身的导向RNA或蛋白, 开发细胞器CRISPR编辑技术
	DNA大片段操作问题	开发新型转座技术; 挖掘可操作大片段的DNA修复系统
	植物编辑组分递送及再生过程优化	挖掘再生促进因子; 开发新型生物介质、新材料等递送系统
	动物编辑组分递送	开发以mRNA-LNP为代表的新型递送技术
	微生物通用遗传操作系统缺乏	建立通用型遗传操作系统工具库; 建立CRISPR/Cas瞬时表达或RNP直接转化的编辑筛选体系
	原核微生物基因组转录激活	挖掘更多转录激活因子
	智能性	位点编辑差异性大、结果不可预测
智能化设计不足		利用人工智能结合大数据信息进行智能化设计

的发生频率, 提高编辑产物纯度方面。如针对碱基编辑系统而言, 可通过理性设计蛋白变体、开发序列偏好的碱基编辑系统等进一步缩小突变窗口^[17], 甚至做到只改变单一碱基而不影响旁侧序列。同样地, 对于 PE 系统, 也需要解决其额外产生的副产物问题。

2.2 CRISPR基因组编辑技术的高效性

2.2.1 动植物细胞同源重组效率低

基于 CRISPR 系统介导的同源重组可实现精准的插入、删除及替换, 但 HDR 在动植物细胞中的发生频率很低。尽管目前已有多种提高 HDR 效率的优化方式, 如限制 NHEJ 修复途径、促进 HDR 修复途径、优化供体 DNA 等, 但这些方式仍难以从实质上改变 HDR 发生的频率^[18-19]。未来可尝试在已有的研究基础上, 通过深入了解细胞修复途径并结合系统性分析, 探寻核酸酶介导的 HDR 发生的关键因子, 从而更精细地对细胞修复途径进行把控; 并可通过控制细胞周期、提高供体模板的可利用性等辅助方式进一步提高 HDR 效率。

2.2.2 引导编辑效率低

PE 系统可实现碱基之间的任意转变及小片段的插入和缺失, 虽然其能够在一定程度上弥补 HDR 效率极低的短板, 但该系统也存在效率偏低的问题^[17, 20]。未来可尝试通过优化 pegRNA (prime editing guide RNA) 的结构、寻找修复途径过程的关键蛋白、提高 PE 的逆转录效率及表达水平等手段来增加 PE 的编辑效率, 使其普适性及开发利用性更高。

2.2.3 微生物多靶点同时编辑效率低

微生物中多靶点 (> 3) 的编辑效率相对较低, 只有酿酒酵母可实现基于 CRISPR 技术一次高效编辑 8 个基因^[21]。未来不仅需要在体内成功表达多条向导 RNA, 更需要提高修复效率。不引入 DSB 的编辑技术, 如 BE^[22], 则有望实现更多靶点的编辑。

2.3 CRISPR基因组编辑技术的全面性

2.3.1 PAM框范围受限

尽管 SpCas9-NG、SpG 以及 SpRY 等变体的开发使得 CRISPR/Cas9 的前间隔序列邻近基序 (protospacer adjacent motif, PAM) 靶向范围由 NGG 拓展到 NG 和 NA, 甚至可以摆脱 PAM 的困扰, 但这些变体在不同 PAM 上的编辑活性差别较大^[17]。通过结合基础研究, 进一步工程化改造出新型 Cas9、挖掘新型 Cas 蛋白, 使其能够在不同 PAM 类型下均可实现高效的编辑, 甚至能在保证高编辑活性的同时, 开发出无任何 PAM 需求的 Cas 新变体, 以突破目前

CRISPR 基因组编辑系统对 PAM 的限制。

2.3.2 碱基颠换技术

目前在细菌或人类细胞中过表达尿嘧啶糖基化酶, 可使被脱氨的 U 变成 AP 位点, 再经过 DNA 复制和修复, 能够实现 C>A 或 C>G 的碱基颠换^[9-10]。类似地, 若在 A>G 碱基编辑过程中, 同时过表达人源烷基腺嘌呤 DNA 糖基化酶 (hAAG) 用于将 A 脱氨形成的 I 切除, 形成 AP 位点, 可能会实现 A>T 或 A>C 的碱基颠换。另外, 可基于碱基颠换本身的发生机制, 融合天然存在或者定向进化的功能蛋白, 结合 DNA 修复途径等开发新型高效的碱基颠换技术。

2.3.3 特定细胞器基因组编辑技术

许多动物疾病、植物发育相关过程以及重要天然产物合成途径等都在特定细胞器内完成, 受许多细胞器基因控制。目前已报道的细胞器编辑主要是利用 TALEN 技术来实现^[23]。CRISPR 技术由于 RNA 的导入问题一直未被开发。通过改造 RNA 以及利用细胞自身的导向 RNA 或蛋白, 开发可以对细胞器编辑的 CRISPR 技术对细胞器功能研究以及合成生物学等领域均具有重要意义。

2.3.4 新型DNA大片段插入技术

目前通过同源重组进行 DNA 大片段插入发生频率低且容易产生 DSB 带来的副产物。利用其他类型的 DNA 修复途径或使用新的转座因子来开发高效的基因定点插入技术是未来基因组编辑研究的重要方向。例如, 可开发真核生物转座子系统或细菌的 Tn7-CRISPR-Cas 系统^[12-13], 从而实现 DNA 大片段的插入、多个基因控制的通路插入以及多个重要性状的叠加等。

2.3.5 植物基因组编辑组分递送及再生过程优化

基因组编辑组分的递送和后续组织培养再生过程是植物基因组编辑的瓶颈^[18, 20]。目前植物中主要依托农杆菌、基因枪等传统遗传转化方法, 在不同作物、不同品种中效率差异较大, 递送完成后一般需要进行组织培养再生才能获得编辑植株, 但再生过程对于大多数植物来说效率很低, 因此寻找促进再生的关键因子成为解决该问题的重要方案。研究发现, 过表达 *WUS*、*BBM*、*GRF* 或者 *GRF-GIF* 等因子可明显促进多个难再生的作物品种的再生效率^[20]。另外, 有研究在双子叶植物上利用农杆菌原位转化生长调节因子可实现从头分生组织诱导^[24], 该方法避开了传统转化法对组织培养的依赖, 具有广泛的应用前景。

另一方面,开发和利用新的生物介质或新材料递送基因组编辑组分,实现可遗传、不需要组织培养和不受基因型依赖的基因组编辑技术是破解当前困局的重要途径。例如,近年来多个研究报道利用植物 RNA 病毒载体递送 CRISPR/Cas 组分,可以在烟草、小麦以及大麦中实现编辑^[25-26];病毒载体转化方法的开发利用,有望解决植物遗传转化中对组织培养和受体材料基因型依赖的限制。另外,纳米材料(如碳纳米管)目前已经可以在多种植物叶片及叶绿体中实现递送^[27-28],因此该方法有潜力在植物基因组编辑领域很快得到拓展和应用。

2.3.6 哺乳动物基因组编辑组分递送

哺乳动物基因组编辑效率除了受编辑工具效率影响外,还受编辑工具导入效率的制约。CRISPR 系统中的 Cas 蛋白进入哺乳动物细胞的形式可以有 DNA、RNA 及蛋白质,向导 RNA 进入细胞的形式包含 DNA 及 RNA。然而,不论以哪种形式,CRISPR 系统都很难进入细胞,一方面是由于其分子量较大,另一方面是其稳定性差,在进入靶细胞之前容易在体内被很快降解或结合。目前递送 CRISPR 系统的方法主要有物理法、病毒法和纳米递送法^[29-30]。

物理递送方法主要包括电穿孔法和显微注射法,电穿孔法往往只适用于体外细胞转染,注射法虽然可以用于体内细胞转染,但其对细胞有损伤,并且通量低,往往只适用于胚胎细胞的转染。病毒法递送效率高,但是可能产生致癌、致突变的风险,另外病毒负载能力有限,比如腺相关病毒(AAV)只能负载不大于 4.7 kb 的 DNA 序列,很难实现碱基编辑系统高效又安全的递送。因此,开发或者改造安全、高载荷的病毒载体以及更小型化的 CRISPR 编辑系统是未来的研究重点。纳米材料由于其优良的理化特性逐步开始在哺乳动物细胞递送方面发挥作用。随着 mRNA 新冠疫苗的快速获批和大量应用,mRNA-脂质纳米颗粒(LNP)技术获得了大量研究,与其他基因递送载体相比,LNP 具有安全性、低免疫原性、非整合性等优点,避免了病毒载体可能存在的诱变风险。以 mRNA-LNP 为代表的新技术未来将在哺乳动物基因组编辑工具递送中发挥重要作用。

2.3.7 微生物通用基因编辑系统

除了一部分真菌已建成了基于 CRISPR/Cas 瞬时表达来实现基因组编辑外^[31],大部分非模式微生物的基因组编辑则需要克服遗传物质的转化以及胞内的遗传表达等难题^[32]。针对不同微生物种类,往往需先筛选内源质粒作为载体,并需要优化转化和

筛选条件,这对很多非模式微生物来说是一个巨大的挑战。未来需通过建立包含各种通用型遗传操作系统的基因组编辑工具库,快速筛选适合特定微生物种类的基因编辑系统。针对某些尚未建成遗传操作系统的微生物菌株,需建立基于 CRISPR 核糖核蛋白复合物(ribonucleoproteins)转化和筛选技术的基因组编辑系统。

2.3.8 原核微生物基因转录激活系统

原核微生物已建成了成熟的 CRISPR 抑制系统,包括单基因^[33]和多基因^[34],通过抑制 RNA 聚合酶的起始或延伸来高效抑制靶标基因的转录。而对于激活系统的研究,目前仅筛选到了 AsiA 转录激活子可实现对内源靶标基因的高效转录激活^[35]。未来,该系统的普适性还需要更多验证,特别是在富含天然产物合成基因簇的放线菌中,同时也需筛选更多转录激活子来满足不同的转录激活需求。

2.4 CRISPR 基因组编辑技术的智能性

尽管基因组编辑已经广泛应用于各种生物细胞,但是决定基因组编辑结果的因素尚不十分清楚(尤其是动植物细胞)。机器学习适用于从大规模异质性的数据中寻找特征,目前机器学习在基因组编辑产物和效率预测等方面已经展现出其特有的优势^[15,36]。将基因组编辑与机器学习结合起来是一种可以提高基因组编辑能力的有效方法。通过开发规模化的数据获取系统和不同基因组编辑技术的大数据库,结合人工智能的大数据信息系统,可以极大提高基因组编辑的效率、准确预测编辑类型以及降低脱靶等,同时也有利于未来植物分子设计育种、遗传疾病精准治疗等智能化设计。

3 其他基因组编辑技术的未来发展

CRISPR 系统作为基因组编辑领域的当家花旦,能否长久独占鳌头?科学家们一直在尝试开发不依赖于 CRISPR 的新型基因组编辑技术,例如利用向导 RNA 招募内源脱氨酶实现目标 RNA 编辑的 LEAPER 技术^[37]以及不受序列限制的结构引导核酸内切酶技术^[38]。细胞中存在内源的核酸编辑酶,包括 ADAR 及 APOBEC 家族蛋白等,因此可以不依赖 CRISPR 系统而直接利用这些酶类进行基因组编辑与表达调控。ADAR 是一类在人体内各组织中广泛表达的腺苷脱氨酶,能够催化 RNA 分子中腺苷 A 到肌苷 I(鸟苷 G)的转换。研究发现,仅在细胞中导入经过特殊设计的、能够招募细胞内源 ADAR 蛋白的 RNA (ADAR-recruiting RNA, arRNA),

即可在一系列基因转录本中实现高效、精准的编辑^[37]。利用这个称为 LEAPER 的方法, 研究者成功修复了来源于 Hurler 综合征患者的 α -L-艾杜糖醛酸酶缺陷细胞。相比 DNA 编辑, RNA 编辑不需要对基因组序列进行永久性改变, 这种可逆的、易于调控的编辑方式在安全性上可能更具优势, 可推进基于碱基修饰的合成生物学方法在医疗领域的应用。另外, 由于内源的 ADAR 及 APOBEC 的表达都受到干扰素的调控, 因此可以运用外源刺激来操纵细胞内 RNA 的靶向编辑事件, 从而进行基因组编辑 / 修饰的动态调控以及细胞的可控编程。

未来, 随着基因组序列信息的不断扩大和大数据分析技术的不断进步, 隐藏在自然界中的越来越多的基因组编辑系统会被发现; 另一方面, 随着人工智能技术的快速发展, 人工设计基因组编辑技术也将成为可能。

致谢: 感谢北京大学魏文胜教授提供相关素材。

[参 考 文 献]

- [1] Kim YG, Cha J, Chandrasegaran S. Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996, 93: 1156-60
- [2] Boch J, Scholze H, Schornack S, et al. Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science*, 2009, 326: 1509-12
- [3] Moscou MJ, Bogdanove AJ. A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors. *Science*, 2009, 326: 1501
- [4] Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 2012, 337: 816-21
- [5] Wyman C, Kanaar R. DNA double-strand break repair: all's well that ends well. *Annu Rev Genet*, 2006, 40: 363-83
- [6] 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
- [7] Nishida K, Arazoe T, Yachie N, et al. Targeted nucleotide editing using hybrid prokaryotic and vertebrate adaptive immune systems. *Science*, 2016, 353: 8729
- [8] 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
- [9] Kurt IC, Zhou R, Iyer S, et al. CRISPR C-to-G base editors for inducing targeted DNA transversions in human cells. *Nat Biotechnol*, 2021, 39: 41-6
- [10] Zhao D, Li J, Li S, et al. Glycosylase base editors enable C-to-A and C-to-G base changes. *Nat Biotechnol*, 2021, 39: 35-40
- [11] Anzalone AV, Randolph PB, Davis JR, et al. Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA. *Nature*, 2019, 576: 149-57
- [12] Klompe SE, Vo PLH, Halpin-Healy TS, et al. Transposon-encoded CRISPR-Cas systems direct RNA-guided DNA integration. *Nature*, 2019, 571: 219-25
- [13] Strecker J, Ladha A, Gardner Z, et al. RNA-guided DNA insertion with CRISPR-associated transposases. *Science*, 2019, 365: 48-53
- [14] Kim D, Luk K, Wolfe SA, et al. Evaluating and enhancing target specificity of gene-editing nucleases and deaminases. *Annu Rev Biochem*, 2019, 88: 191-220
- [15] Arbab M, Shen MW, Mok B, et al. Determinants of base editing outcomes from target library analysis and machine learning. *Cell*, 2020, 182: 463-80
- [16] Jeong YK, Song B, Bae S. Current status and challenges of DNA base editing tools. *Mol Ther*, 2020, 28: 1938-52
- [17] Anzalone AV, Koblan LW, Liu DR. Genome editing with CRISPR-Cas nucleases, base editors, transposases and prime editors. *Nat Biotechnol*, 2020, 38: 824-44
- [18] Chen K, Wang Y, Zhang R, et al. CRISPR/Cas genome editing and precision plant breeding in agriculture. *Annu Rev Plant Biol*, 2019, 70: 667-97
- [19] Tang XD, Gao F, Liu MJ, et al. Methods for enhancing clustered regularly interspaced short palindromic repeats/Cas9-mediated homology-directed repair efficiency. *Front Genet*, 2019, 10: 551
- [20] Gao C. Genome engineering for crop improvement and future agriculture. *Cell*, 2021, 184: 1621-35
- [21] Zhang Y, Wang J, Wang Z, et al. A gRNA-tRNA array for CRISPR-Cas9 based rapid multiplexed genome editing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat Commun*, 2019, 10: 1053
- [22] Banno S, Nishida K, Arazoe T, et al. Deaminase-mediated multiplex genome editing in *Escherichia coli*. *Nat Microbiol*, 2018, 3: 423-9
- [23] Mok BY, De Moraes MH, Zeng J, et al. A bacterial cytidine deaminase toxin enables CRISPR-free mitochondrial base editing. *Nature*, 2020, 583: 631-7
- [24] Maher MF, Nasti RA, Vollbrecht M, et al. Plant gene editing through *de novo* induction of meristems. *Nat Biotechnol*, 2020, 38: 84-9
- [25] Zhu H, Li C, Gao C. Applications of CRISPR-Cas in agriculture and plant biotechnology. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2020, 21: 661-77
- [26] Oh Y, Kim H, Kim SG. Virus-induced plant genome editing. *Curr Opin Plant Biol*, 2021, 60: 101992
- [27] Demirer GS, Zhang H, Matos JL, et al. High aspect ratio nanomaterials enable delivery of functional genetic material without DNA integration in mature plants. *Nat Nanotechnol*, 2019, 14: 456-64
- [28] Kwak SY, Lew TTS, Sweeney CJ, et al. Chloroplast-selective gene delivery and expression in planta using chitosan-complexed single-walled carbon nanotube carriers. *Nat Nanotechnol*, 2019, 14: 447-55
- [29] Doudna JA. The promise and challenge of therapeutic genome editing. *Nature*, 2020, 578: 229-36
- [30] Porto EM, Komor AC, Slaymaker IM, et al. Base editing: advances and therapeutic opportunities. *Nat Rev Drug*

- Discov, 2020, 19: 839-59
- [31] Wang Q, Coleman JJ. Progress and challenges: development and implementation of CRISPR/Cas9 technology in filamentous fungi. *Comput Struct Biotechnol J*, 2019, 17: 761-9
- [32] Jiang W, Bikard D, Cox D, et al. RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems. *Nat Biotechnol*, 2013, 31: 233-9
- [33] Qi LS, Larson MH, Gilbert LA, et al. Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. *Cell*, 2013, 152: 1173-83
- [34] Zhang X, Wang J, Cheng Q, et al. Multiplex gene regulation by CRISPR-ddCpf1. *Cell Discov*, 2017, 3: 17018
- [35] Ho HI, Fang JR, Cheung J, et al. Programmable CRISPR-Cas transcriptional activation in bacteria. *Mol Syst Biol*, 2020, 16: e9427
- [36] Allen F, Crepaldi L, Alsinet C, et al. Predicting the mutations generated by repair of Cas9-induced double-strand breaks. *Nat Biotechnol*, 2019, 37: 64-72
- [37] Qu L, Yi Z, Zhu S, et al. Programmable RNA editing by recruiting endogenous ADAR using engineered RNAs. *Nat Biotechnol*, 2019, 37: 1059-69
- [38] Xu S, Cao S, Zou B, et al. An alternative novel tool for DNA editing without target sequence limitation: the structure-guided nuclease. *Genome Biol*, 2016, 17: 186