

林秋鹏, 朱秀丽, 马琳莎, 等. 引导编辑系统研究进展 [J]. 华南农业大学学报, 2024, 45(2): 159-171.

LIN Qiupeng, ZHU Xiuli, MA Linsha, et al. Recent advances in prime editing system[J]. Journal of South China Agricultural University, 2024, 45(2): 159-171.



引导编辑系统研究进展

林秋鹏[†], 朱秀丽[†], 马琳莎, 姚鹏程

(广东省植物分子育种重点实验室/华南农业大学农学院, 广东 广州 510642)

摘要: 引导编辑 (Prime editing, PE) 系统是一种全新的、革命性的基因组编辑策略。该系统由引导编辑器 (Prime editor) 组成, 包括 nCas9(H840A) 与逆转录酶 (Reverse transcriptase, RT) 的融合蛋白; 以及包含 PBS(Primer binding site) 序列和 RT 模板 (RT template, RTT) 序列的 pegRNA(Prime editing guide RNA) 两大部分。PE 系统可以在双链不断裂的情况下实现所有 12 种类型的碱基替换及小片段 DNA 增删, 是精准编辑的全新范式。自 2019 年开发至今不到 4 年时间, PE 系统作为一种通用的技术平台, 已广泛应用于医疗、农业等各个领域, 产生了一大批新种质资源、基因治疗药物等优秀应用案例。PE 作为目前最灵活、最具发展前景的基因组精准编辑新手段, 仍旧存在效率偏低、大片段操纵能力不足、系统组分设计复杂 (如 pegRNA)、安全性未全面评估等问题, 仍需要深入研究。本文详细介绍了 PE 系统的技术原理及限制因素, 全面总结了 PE 系统自开发以来的优化策略及在动植物系统、医疗领域的应用现状, 并对 PE 的发展前景进行了展望。

关键词: 引导编辑系统; 优化策略; 农业应用; 医疗应用

中图分类号: Q78

文献标志码: A

文章编号: 1001-411X(2024)02-0159-13

Recent advances in prime editing system

LIN Qiupeng[†], ZHU Xiuli[†], MA Linsha, YAO Pengcheng(Guangdong Provincial Key Laboratory of Plant Molecular Breeding/College of Agriculture,
South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: Prime editing (PE) system is a newly developed and greatly revolutionized genome editing technology. The system is based on prime editors, which are composed of two components: A fusion protein of nCas9 (H840A) and reverse transcriptase (RT), and a pegRNA which contains a PBS (Primer binding site) sequence and an RT template (RTT) sequence. The PE system can realize all 12 types of base substitutions and small fragment DNA additions and deletions without double-strand breaks, which is a new paradigm for precision editing. In less than 4 years since its development in 2019, the PE system, as a universal technology platform, has been widely used in various fields such as healthcare and agriculture, generating a large number of excellent application cases such as new germplasm resources and gene therapy drugs. PE, as the most flexible and promising new means of precision genome editing, still suffers from low efficiency, insufficient ability to manipulate large fragments, complex design of system components (such as pegRNAs), incomplete evaluation of safety, and still requires in-depth research. This paper described in detail the technical principles and

收稿日期: 2023-09-03 网络首发时间: 2023-11-02 10:03:47

首发网址: <https://link.cnki.net/urlid/44.1110.S.20231101.1555.004>

作者简介: 林秋鹏, 教授, 博士, 主要从事植物基因组精准编辑技术开发研究, E-mail: qiupenglin@scau.edu.cn; 朱秀丽, 博士研究生, 主要从事植物引导编辑系统优化研究, E-mail: zhuxiuli@stu.scau.edu.cn; [†]表示同等贡献

基金项目: 华南农业大学高层次引进人才项目

constraints of PE systems, comprehensively summarized the optimization strategies of PE systems since their development, and the current status of PE applications on animal and plant systems and medical fields. It also gave an outlook on the development prospects of PE.

Key words: Prime editing (PE) system; Optimization strategy; Agricultural application; Therapeutic application

高效、精准的基因组编辑修饰是理解和探索重要生物学问题的基础方法,同时也是精准育种、基因治疗等的重要手段,对农业及医疗领域的发展具有战略性意义。随着生物技术的不断发展,科学家先后研发出锌指核酸酶 (Zinc-finger nucleases, ZFN); 类转录激活因子样效应物核酸酶 (Transcription activator-like effector nucleases, TALEN); CRISPR/Cas 系统 (Clustered regularly interspaced short palindromic repeats-associated proteins system) 等一系列重要的序列特异性核酸酶 (Sequence specific nucleases, SSNs); 实现了基因组目标位点的精准识别和切割^[1-2]。其中, CRISPR/Cas 系统^[3-5] 以高效、简单、低成本等优点迅速成为应用场景最广的基因组编辑工具,并广泛应用于基础研究、医疗和育种^[6-9]。

通常情况下,以 SSNs 为基础的基因编辑技术可以实现高效的定点切割,激活细胞体内的非同源末端连接 (Non-homologous end joining, NHEJ) 或同源重组 (Homologous recombination, HR) 修复途径,实现目标位点序列的改变^[10]。然而, NHEJ 的修复结果通常会生成少量碱基的插入或缺失 (Insertions/deletions, Indels), 难以产生预期的编辑类型。而通过 HR 修复虽然可以实现精确碱基或片段的靶向置换,但其低效率仍然是许多高等生物例如植物中难以克服的瓶颈问题^[11]。为此,美国哈佛大学 Liu David 课题组于 2016 年开发出碱基编辑的全新技术体系,运用胞嘧啶碱基编辑器 (Cytosine base editor, CBE)^[12] 及腺嘌呤碱基编辑器 (Adenosine base editor, ABE)^[13], 采用缺口酶形式的 Cas9 (Nickase Cas9, nCas9) 绕开 NHEJ 及 HR 修复,通过单链断裂修复途径,成功实现了嘌呤间和嘧啶间的碱基转换 (Base transition), 同时极大减少了双链修复过程中可能会存在的非预期的 Indels^[14-17]。然而,科学家们也发现,碱基编辑技术存在大量全基因组及转录水平上难以预测的随机脱靶事件。这主要是由于脱氨酶非特异性识别 DNA 或 RNA 链上的碱基并诱发该碱基发生脱氨所导致,在应用层面造成严重的安全隐患^[18-21]。此外,常规的碱基编辑技术只能实现碱基之间的转换,不能实现碱基间

的颠换 (Base transversion), 也不能实现碱基的精准增删^[11]。虽然科学家们开发了一系列碱基颠换新工具,但他们的效率和产物纯度与上述的碱基编辑器相比仍存在较大的差距^[22-25]。

由于碱基编辑系统存在上述缺陷,2019 年, Liu David 课题组成功研发出引导编辑器 (Prime editor)^[26], 借助全新的技术路径完成了任意形式的碱基替换,从而再一次将基因编辑技术的精准度推向新的高度。该系统克服了碱基编辑只能实现 4 种碱基转换的问题,可以完成其余 8 种形式的碱基颠换以及小片段碱基的精准插入和删除^[26-27]。自引导编辑 (Prime editing, PE) 开发以来就广受关注,并被应用在医疗、农业等多个研究领域^[28-29]。然而,初代的 PE 仍存在如效率偏低、安全性尚未全面评估、难以实现大片段操纵等诸多问题需要解决。目前,学者们围绕 PE 存在的问题进行了大量的优化和研究,取得了一系列重要的进展。本文将概括 PE 的组成和技术原理,阐述 PE 存在的局限性,并综述和总结当前研究学者所采取的相关优化措施,最后对该系统目前及今后的应用方向和发展前景进行展望。

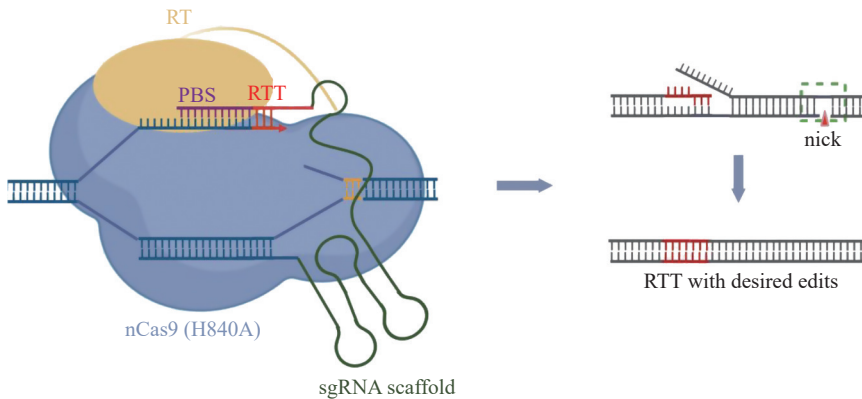
1 PE 系统的工作原理

通常情况下,引导编辑器主要由 2 个关键元件组成: H840A 缺口酶形式的 nCas9 融合逆转录酶 (Reverse transcriptase, RT) 组成的融合蛋白和引导编辑向导 RNA (Prime editing guide RNA, pegRNA)(图 1)。pegRNA 与常规的 sgRNA 非常类似,但其 3' 端延伸出一段包含 PBS (Primer binding site) 序列和 RT 模板 (RT template, RTT) 的序列。这 2 个关键元件会形成复合物,结合至目标位点。其中,融合蛋白中的 nCas9 主要行使非靶标链的切割功能,暴露出非靶标链上的单链。此时, pegRNA 上的 PBS 序列可以与该暴露出来的 DNA 单链结合,启动 PE 过程。在 RT 的作用下, pegRNA 上的 RTT 序列信息被逆转录成 DNA 形式,留在 DNA 断裂处,形成被称为 3' flap 的 DNA 单链结构。对于 3' flap 上的 DNA 信息如何被引入基因组目前尚不清楚,可能性最大的猜测是 3' flap 与 5'

flap 之间存在动态转换,使所需 DNA 信息有机会与基因组的靶标链结合,之后 5' flap 会在细胞修复的过程中被切除,经过 DNA 修复过程,最终实现基因组信息的修改(图 1)。在这个过程中,融合蛋白承担了切割目标位点非靶标链和逆转录的双重功能,而 pegRNA 既引导 PE 识别目标位点,又包含了编辑所需的信息。通过这 2 个组分,PE 系统实现了识别、切割、起始逆转录的引物序列结合、逆转录等一系列过程,并将所需 DNA 信息直接逆转录至目标位点的断裂处^[26]。PE 系统的设计非常简单精巧,无需引入 DNA 模板,也不产生双链断裂,是一种非常

聪明的技术策略。

为了进一步提升 PE 系统的性能,Liu David 团队接连开发了 3 个优化的 PE 版本,即:PE2、PE3、PE3b,其中,PE3 和 PE3b 通过在系统中引入 nicking sgRNA,使 PE 识别并切割编辑链的对侧链,从而促进修复机制保留编辑链上的编辑信息(图 1)。PE3b 通过将 nicking sgRNA 设计为只能识别突变引入后的序列,从而将编辑链切割和对侧链切割 2 个过程从时间上分开,减小双链同时断裂的可能性,从而大大降低非预期的 Indels 事件^[26]。



左侧为引导编辑器的构成,右侧为 flap 的转换及 DNA 修复过程;其中,PE3 和 PE3b 系统需要额外的 nicking sgRNA 产生缺口,而 PE2 则不需要

Left panel: Diagram of prime editor, right panel: Flap transition and DNA repair process; The PE3 and PE3b systems use an additional nicking sgRNA to generate a nick on DNA compared to PE2

图 1 引导编辑器的构成及引导编辑的原理示意图

Fig. 1 Schematic diagram of prime editor and desired prime edit installing

PE 系统被开发之后就有多个团队将其与常规 HR 技术及碱基编辑技术进行对比。例如 Liu David 团队在开发该系统时就发现 PE 系统编辑效率相当或高于 HR 技术和碱基编辑技术,并且相比之下副产物比例更低,在编辑产物纯度上更具优势^[26]。Gao 等^[30]也在小鼠中获得了类似的结论;Lin 等^[31]在植物细胞中将 PE 系统与碱基编辑系统进行比较,也发现 PE 在精确编辑上更具优势。因此,PE 系统是一个极具开发潜力、具有独特优势的全新技术。

2 PE 系统性能的限制因素

尽管 PE 系统与其他技术相比具有优势和前景,但依然存在诸多问题需要进一步解决完善。尤其是在该技术的开发初期,其编辑效率仍不理想。此外,可能受 RT 逆转录效率或 DNA 修复效率等因素的影响,PE 系统难以实现 DNA 大片段的基因组操纵。在 PE 系统的安全性方面,也亟待全面、详细的评估。因此,利用 PE 系统还难以做到真正意

义上的高效、精确、稳定、安全的编辑,它具备较大的优化空间和潜力。我们从以下几个方面归纳了目前其存在的主要问题,并对其产生原因及影响进行阐述。

2.1 效率偏低

多个团队的测试结果表明,PE 系统在一些位点上工作效率不够理想,甚至在有些物种中获得精准编辑的频率非常低,难以真正满足研究及应用层面的需求^[31-33]。由于 PE 系统的修复过程较为复杂,涉及 PE 对目标位点的识别和结合、PBS 序列与单链序列的结合、RTT 的逆转录、flap 结构引入基因组等一系列过程,每一个步骤都会对 PE 系统的编辑效率产生影响。例如,Vu 等^[34]发现 PE 系统的 pegRNA 自身会形成二级结构,影响其识别基因组目标位点的能力。Lin 等^[31]发现不同活性的 RT 会对 PE 效率有直接影响,证明 RT 模板的逆转录过程对 PE 十分重要。因此,需要针对以上过程中所参与的元件或反应进行优化,提升 PE 系统的工作效率。

2.2 难以实现大片段操纵

根据报道,由基因的插入、重复和缺失所引起的人类致病性变体已占到已知人类致病性变体的 14% 左右,而且,许多基因组异常都涉及较大的 DNA 片段 (>100 bp) 变异^[35]。虽然 Anzalone 等^[26]给出了运用 PE 系统产生包括高达 44 bp 的小片段精准插入和高达 80 bp 的小片段精准删除的例子,但仅限于少量细胞类型的测试,并且没有进行更大片段编辑的尝试。Lin 等^[31]在植物细胞中测试发现 PE 的编辑效率随着所需插入或删除长度的增长而显著降低,能检测到最长 30 nt 的插入和 40 nt 的删除,但其效率分别只有 0.3% 和 0.7%。Wang 等^[36]通过 PE 实现标签插入的效果也并不理想,编辑效率低于 0.1%。通过常规 PE 实现大片段插入、删除或替换的成功例子也很少。因此,对于初代的 PE 系统而言,大片段操纵仍具有较大的挑战性。

2.3 编辑范围受限

PE 系统的编辑范围受编辑窗口大小影响。虽然理论上编辑窗口可以远离切割位置,但受 RT 活性、RTT 长度、细胞修复机制等因素的影响,过远的编辑位置通常效率很低,这一点在多个团队的研究结果中均得到验证^[31-32, 37-39],这一现象也从侧面反映了 PE 系统效率仍然不足。此外,初代的 PE 系统通常使用化脓性链球菌 *Streptococcus pyogenes* Cas9 (SpCas9) 进行编辑,其编辑需要较为严格的间隔序列前体临近基序 (Protospacer adjacent motif, PAM),也对编辑范围产生了一些限制。

2.4 高效 pegRNA 设计较为复杂

目前研究表明,PE 系统中 pegRNA 的 PBS 序列、RTT 序列、nicking sgRNA 位置等参数均对编辑效率有较大影响^[26, 31, 40-41]。因此,其设计构建较为复杂并且需要大量测试才能找到最高效的组合形式。这为如何简单、低成本地设计高效 pegRNA 带来了挑战。

2.5 PE 系统的安全性未得到全面评估

目前已有研究表明,碱基编辑系统的脱氨酶元件异位表达会造成全基因组及转录水平的随机脱靶,为其应用带来严重的安全隐患^[18-21]。由于 PE 引入了 M-MLV RT,该酶在细胞内异位表达是否也会在全基因组或转录组水平产生随机突变,或者造成内源逆转录水平的扰动,尚未得到全面详细的评估。

此外,PE 系统还存在缺少高效多基因编辑技术体系、载体过大超过腺病毒相关病毒 (Adeno-associated virus, AAV) 包被容量等问题,上述这些限制因素制约了 PE 在应用层面的发展。如何克服

这一系列问题,优化 PE 的编辑特性,解决其瓶颈限制,对于研究学者来说是重大并且亟需解决的挑战。

3 PE 系统的优化策略

基于上述存在的问题,科学家们通过多种优化改进策略对 PE 系统进行提升。本文对自 PE 系统开发以来的优化方法进行归纳 (表 1),将其分成下述几类。

3.1 pegRNA 结构及表达的优化

由于 pegRNA 的 3'端为非结构化的 PBS 序列,在细胞中非常容易被消化降解,而 PBS 序列缺失将无法有效启动逆转录过程,进而极大影响 PE 的效率^[42]。因此,很多研究通过向 pegRNA 的 3'端添加特殊的 RNA 结构,增加其稳定性。例如 Nelson 等^[42]将结构化 RNA 基序整合到 pegRNA 的 3'端,由此产生的工程化 pegRNA (epgRNA) 可将多种不同细胞的编辑效率提高 3.0~4.0 倍。Li 等^[43]通过将 G 四联体结构引入 pegRNA,同样可以显著提升 PE 效率。Liu 等^[44]利用 Csy4 识别位点可形成发夹结构的特点,将其融合到 pegRNA 的 3'端提升 PE 的效率,并认为该方法可以减少 pegRNA 自身环化的现象。Zhang 等^[45]则是通过添加 xrRNA 非编码结状三级结构提升 pegRNA 抵抗外切酶消化的能力。Perroud 等^[46]通过引入植物病毒来源的 TYMVtls,在小立碗藓中实现 PE 系统效率提升。Chai 等^[47]通过附加 MS2 适配体,同时利用 MS2 适配体与 MCP 蛋白互作的方法,实现 MCP-RT 融合蛋白的原位招募,将 PE 效率提升 1.2~10.1 倍。此外,Liu 等^[48]通过将 pegRNA 的 PBS+RTT 序列与 sgRNA 拆分开,形成 petRNA,也可以实现与常规系统相当的效率,这个方法可能对保护 pegRNA 末端、减少 PBS 和 RTT 被消化起到一定作用。Feng 等^[49]也开发了 tethered PE (tPEs) 方法,通过在 pegRNA 末端添加 RNA 适配体,并在 nCas9 上融合 RNA 适配体的识别蛋白,将 pegRNA 的 3'末端拴住;此外,Feng 等^[49]也将 PBS+RTT 序列从 pegRNA 中拆分,融合 RNA 适配体序列并环化,开发了 split pegRNA PE (SnPEs) 方法以实现精准编辑。

此外,由于 pegRNA 的 PBS 序列与靶向目标的 spacer 序列存在反向互补,影响 PE 的效率^[34],为了减少其自身互补配对形成错误二级结构,Li 等^[50]通过在 pegRNA 逆转录模板的适当位置引入同义突变来开发 spegRNA,使 PE 的效率大幅度提升。Xu 等^[51]也在植物中通过 pegRNA 引入同义突变获得了类似的结果,猜测该过程可能通过错配修复途

表 1 PE 的优化策略
Table 1 Optimization strategies of PE

种类 Type	PE版本 PE version	测试物种 Test species	优化策略 Optimization strategy	优化效率 ¹⁾ Optimization efficiency	参考文献 Reference
植物 Plant	MS2PE	水稻	原位招募RT	1.2~10.1倍	[47]
	PE-P3-RT-M	水稻、玉米	Cas9的N端融合RT/RTT, 引入同义突变	7.0~10.0倍	[51]
	Pol II-PE3/PE3b	玉米、水稻	增加pegRNA转录	1.2~2.9倍	[52]
	PPE3-evopreQ1	水稻	epegRNA策略/高温处理	20.0%~60.5%	[53]
	ePPE	水稻	删除RT的RNaseH结构域/添加病毒核衣壳蛋白	平均5.8倍	[54]
	ePPEplus/CMPE	小麦	ePPE基础上融合RT增效突变/PEmax策略	平均33.0倍	[55]
	PE2 (v2)	水稻	引入T5核酸外切酶	1.7~2.9倍	[56]
	enpPE2	水稻	Pol II-PE策略/epegRNA策略/PEmax策略	平均43.5倍	[57]
	PBS Tm + dual-pegRNA	水稻	设计优化PBS Tm/双pegRNA策略	2.9~17.4倍	[58]
	ePE2	水稻	在enpPE2基础上融合ePPE策略	1.1~1.9倍	[59]
	ePE5max	玉米	Pol II-PE策略/epegRNA策略/PEmax策略	1.4%~21.5%	[60]
种类 Type	PE版本 PE version	测试物种 Test species	优化策略 Optimization strategy	优化效率 ¹⁾ Optimization efficiency	参考文献 Reference
动物 Animal	epegRNA	人类	添加结构化RNA基序	3.0~4.0倍	[42]
	G-PE	人类	添加G四联体结构	1.7~1.9倍	[43]
	ePE	人类、小鼠	添加Csy4识别位点	1.9~4.9倍	[44]
	xr-PE	人类、小鼠	添加xrRNA结状三级结构	2.5~4.5倍	[45]
	sPEs/tPEs/SnPEs	人类	pegRNA结构改造	2.0~4.0倍	[49]
	spegRNA/apegRNA	人类	RTT引入同义突变	平均353.0倍	[50]
	p2PE3	人类	采用Pol II型启动子	1.6~13.3倍	[61]
	PE+CPC/HDACi	人类、猪	添加小分子药剂(CPC/HDACi)	>4.0倍	[62]
	PE6	人类、小鼠	更换紧凑型RT酶/连续定向进化Cas9	24.0倍	[63]
	PE2*	人类	优化核定位信号序列	1.5~1.9倍	[64]
	PE5max	人类、小鼠	抑制DNA错配修复(MMR)/PE载体优化/引入nCas9增效突变	2.0~7.7倍	[65]
	hyPE2	人类	连接处添加结合蛋白Rad51结构域	1.0~2.6倍	[66]
	CMP-PE3 + dsgrNA	人类、小鼠	使用dead sgRNA/融合染色质调节肽	3.6~5.1倍	[67]
	IN-PE2	人类、小鼠	PE蛋白N端融合多肽序列	1.6倍	[68]
	HOPE	人类	使用双pegRNA	1.5~3.5倍	[69]

1) 除ePE2的优化效率是与enpPE2相比外,其余PE版本的优化效率均是与常规PE系统比较

1) In addition to the optimization efficiency of ePE2 comparing with enpPE2, the optimization efficiency of other PE versions is compared with conventional PE system

径提升效率。

除此之外,对 pegRNA 的表达策略进行优化也可以显著提升 PE 的工作效率。多项研究均表明,采用 Pol II 启动子辅以 RNA 自剪切可以实现 PE^[31-32, 38-39],其中, Jiang 等^[52]使用的启动子为 Pol II+Pol III 复合型启动子,包含了 35S、CmYLCV、U6 的重要启动区域,在玉米中实现了高效的 PE。

类似的结果也在动物细胞中被证明,例如 Huang 等^[61]、Yuan 等^[70]都利用 Pol II 启动子结合 RNA 自加工系统,最终实现了高效的多基因编辑。除此之外,通过对 pegRNA 中的 sgRNA 骨架结构进行优化,增加其稳定性,也可以提升 PE 效率^[38-39, 62]。

3.2 RT 效应蛋白元件的优化

RT 是 PE 系统最核心的组成,提升 RT 活性或

替换高活性 RT 是有效提升 PE 系统效率的方法。例如 Anzalone 等^[26]在 PE1 到 PE2 的开发过程中向 RT 引入 5 个显著提升性能的突变,显著提升了 PE 效率。Lin 等^[31]也通过提升温度至 M-MLV RT 更适应的条件,在植物原生质体中将编辑效率提升 1.6 倍。Zou 等^[53]结合 epegRNA 策略及提升温度处理,高效地获得了水稻 PE 植株。Zong 等^[54]发现删除 M-MLV RT 的 RNA 核酸酶 H(RNase H) 结构域和在 M-MLV RT 的 N 端融合病毒核衣壳蛋白 (Nucleocapsid, NC),可分别将其编辑效率提高 2.0 和 3.2 倍。Ni 等^[55]进一步在 RT 中引入 V223A 突变,可使编辑效率再提升 2.8 倍。Lu 等^[71]和 Bosch 等^[72]通过更换效应蛋白的启动子,分别实现 PE 系统的编辑和传代稳定性。Perroud 等^[46]发现植物内源的 Tnt1 RT 同样具备引导编辑能力,虽然效率不及常规的基于 M-MLV RT 的 PE 系统,但更为紧凑。2023 年, Doman 等^[63]再次升级 PE 系统,运用噬菌体辅助的连续进化 (Phage-assisted continuous evolution, PACE) 系统开发了 PE6 系列的全新 PE,其效率更高、结构更紧凑,在基于 AAV 递送的体内编辑中比最先进的 PE 系统效率还要高 24.0 倍。

除了直接提升 RT 活性之外,对融合蛋白的结构进行优化也可以提升效率,例如 Liu 等^[64]通过对核定位信号序列进行优化调整,提高了荧光报告系统和内源基因的编辑效率。Xu 等^[51]发现将 RT 融合在 nCas9 的 N 端,可有效提升 PE 系统的效率。此外,提升 nCas9 的识别能力,例如 Chen 等^[65]引入 nCas9 的高效变体 (R221K、N394K),可以有效实现 PE 效率的提升。该策略在植物中也有效^[55]。向 PE 系统引入一些重要元件或结构域,也会对提升编辑能力有所帮助。例如 Song 等^[66]在 nCas9 和 RT 结构域之间插入 Rad51-DBD,产生 hyPE2 系统,有效提高了 PE 效率。Liang 等^[56]将 T5 核酸外切酶引入 PE 系统,其中融合了 T5 的 PE2 (v2) 版本在几个基因组位点的 PE 效率提高 1.7~2.9 倍。Park 等^[67]也通过融合染色质调节肽提升 nCas9 的识别效率,来提升 PE 效率。Velimirovic 等^[68]通过高通量筛选多肽序列,并附加于 PE 融合蛋白的 N 端,确定了一系列可以对 PE 效果有不同程度提升的增强肽段。Li 等^[57]将该方法与其他优化方法结合,成功在植物中获得了最高效率达 77.08% 的 PE。此外,还有多个团队编辑目标基因的同时编辑抗性标记或抗除草剂基因的位点,通过抗性标记或除草剂筛选植物,从而富集编辑事件,提升 PE 效

率^[38-39]。

与 PE2 相比, PE3 可以有效提升 PE 效率,但该过程需要额外引入 nicking sgRNA 切割编辑链的对侧链。为了简化该系统,多个团队尝试利用 Cas 核酸酶替代 nCas9 进行 PE^[73-75]。结果表明该方法的编辑效率与 PE3 相似,但副产物比例更高。这种副产物可以通过抑制 NHEJ 途径 (例如使用小分子抑制剂 AZD7648 进行抑制),提升正确编辑的比例^[74]。此外, Qi 等^[62]也发现一些小分子例如组蛋白去乙酰化酶抑制剂等也对提升 PE 效率有所帮助。

在递送系统上, Sürün 等^[76]利用化学修饰的 pegRNA 及 nCas-RT 融合蛋白的 mRNA 形式向人类诱导性多功能干细胞递送 PE,实现了荧光蛋白报告系统的碱基置换。Petri 等^[77]利用 RNP 的方法在体外组装 PE 复合体,再进行递送,实现 DNA-free 的递送方法。此外,多个团队也通过成功截短 RT、将 PE 载体拆分至 2 个 AAV 病毒分别进行包被等方法压缩 PE,实现了基于 AAV 的递送^[78-83]。以上方法均实现了 PE 系统应用场景的扩展。

3.3 靶向范围的优化

常规 PE 使用的 nCas9 来源于化脓性链球菌,其特定的“NGG”的 PAM 需求限制了它在全基因组的靶向范围。为此,多个研究团队尝试替换 SpCas9,拓宽 PE 靶向范围。Hua 等^[84]和 Aird 等^[85]分别在植物和动物中构建来源于金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* 的 SaCas9 的 PE 系统,将 PE 的识别 PAM 基序拓宽至“NNGRRT”序列。Lin 等^[58]使用 SpG 变体替换 SpCas9,实现了 PAM 为“NG”的编辑,极大扩展了 PE 的靶向范围尤其是 dual-pegRNA 的靶向范围。Kweon 等^[86]通过使用 SpCas9-NG、SpG 及 SpRY 变体,极大拓宽了 PE 系统在全基因组的可编辑范围,使 PE 可以靶向基因组的任意位置。此外, Oh 等^[87]使用来源于新凶手弗朗西丝菌 *Francisella novicida* 的 FnCas9 为 PE 的设计提供更多的选择,虽然其识别 PAM 基序与经典的 SpCas9 相同,但其切口位置更为靠前,通常为 PAM 序列上游的 6~8 bp,而常规的 SpCas9 的非靶标链切口通常为上游的 3~4 bp^[4, 87-88]。

3.4 DNA 修复通路的优化

由于 PE 涉及到多个复杂的修复过程,因此,寻找其中的关键步骤或通路,改变 DNA 修复途径,理论上将有助于 PE 系统的改良。基于上述理论, Chen 等^[65]通过 CRISPRi 筛选,抑制修复相关蛋白表达,同时测试 PE 系统的效率,发现 MSH2、MSH6、MLH1 和 PMS2 这些 DNA 错配修复途径

(Mismatch repair, MMR) 中的关键蛋白显著影响 PE, 并通过 RNAi 和 MMR 通路缺失的 HAP1 细胞试验证明抑制 MMR 通路可以有效提升 PE 效率; 此外, 还通过融合功能缺失型突变 MLH1dn, 开发了 PE4 和 PE5, 以降低 MLH1 对目标位点的修复识别, 从而显著提升 PE 系统效率。Da Silva 等^[89] 也针对 32 个 DNA 修复因子进行了遗传筛选, 这些修复因子涵盖了所有已经被报道过的相关修复途径, 同样发现抑制 MMR 途径可有效提升 PE 效率^[65]。

3.5 高效 pegRNA 设计策略

Anzalone 等^[26] 研究表明, PE 系统中的 PBS 序列、RTT 序列、nicking sgRNA 位置等均对 PE 效率有非常大的影响, 但是如何设计能够使 PE 效率最大化, 这些参数似乎并没有非常明显的规律。因此在通常情况下, 科学家需要大量测试才能找到最高效的 pegRNA 形式, 费时费力。针对上述问题, 多个科学团队开发了辅助 pegRNA 设计的网站, 以简化 pegRNA 的设计流程。例如 pegFinder^[90] 和 PrimeDesign^[91] 这 2 种软件均可以根据目标位点和所需编辑设计出一系列 pegRNA, 并提供优先排列。其中, pegFinder 可针对多种不同 Cas9 变体设计 PE2 和 PE3; PrimeDesign 可以针对单种类型的编辑或多种类型组合的编辑进行设计, 也可以实现饱和突变的筛选; 该设计团队还开发了 PrimeVar, 可针对已知人类疾病变异位点数据库快速选择 pegRNA 和 nicking sgRNA。除了上述 2 个网站, multicrispr^[92] 和 PnB Designer^[93] 工具也在针对基因敲除或单碱基编辑进行 sgRNA 设计的基础上增加了针对 pegRNA 进行设计的功能。Standage-Beier 等^[94] 还开发了可以高通量设计 pegRNA 及提供对应引物的 PINE-CONE。Morris 等^[95] 开发的 Prime Editing Design Tool 在线网站工具, 可以实现针对所需致病变异的对应 pegRNA 的筛选和设计。此外, Hwang 等^[96] 开发的 PE-Designer 也可以实现用户友好、便捷的 pegRNA 设计。

Lin 等^[58] 通过总结 PBS 规律, 发现 PBS 的熔解温度与 PE 的效率显著相关, 在水稻中 PBS 的熔解温度为 30 °C 时 PE 具有高效率。类似结果也在 Kim 等^[97] 的高通量结果中得到印证, 除了目标位点 sgRNA 识别的效率外, 同一位点 PBS 序列的 G、C 碱基的比例及熔解温度也是影响 PE 的重要因素。为此, Lin 等^[58] 和 Jin 等^[98] 开发了 PlantPegDesigner 设计网站, 帮助研究人员简化高效 pegRNA 设计流程; 试验证明, PlantPeg Designer 由于有真实的植物试验数据支持, 其在植物中的表现优于多数 pegRNA 设

计网站。

由于高效 pegRNA 的设计规律较为复杂, 科学家们尝试通过深度学习的方法寻找 pegRNA 设计与编辑效率的关系。Kim 等^[97] 设计了 54 836 个 pegRNAs 进行高通量测试, 对 pegRNA 的 PBS 序列、RT 模板序列及靶向位点的间隔序列进行了长度、退火温度、碱基偏好等的深入分析, 发现靶向位点的 Cas9 核酸酶活性, PBS 序列的 G、C 碱基的比例, 熔解温度, PBS 及 RT 模板序列上 2 个 U 碱基的个数等, 都是影响 PE 系统效率的重要因素; 他们还通过机器学习开发了预测 PE 效率的方法计算模型 DeepPE, 并发现该模型计算结果与试验结果相拟合。Koepfel 等^[99] 也设计了 3 604 种不同的 pegRNA 序列, 用于实现不同类型的片段插入, 他们在 3 种细胞的 4 个不同位点进行高通量试验, 发现在不同 PE 和不同 DNA 修复环境下, 插入序列的长度、核苷酸组成和二级结构都会影响插入效率, 并且 TREX1 和 TREX2 会对大片段插入造成一定影响; 他们还开发了机器学习模型预测效率, 并能和试验数据有较好的相关性。此外, Li 等^[100] 也利用多个已发表的数据结果进行训练, 开发了基于机器学习的程序 Easy-Prime, 为海量的 GWAS 变异提供了高效的 pegRNA 设计。

为了进一步提升 PE 系统的效率, 多个科学团队均尝试了用成对的 pegRNA 策略进行编辑。所谓成对的 pegRNA, 指的是针对目标位点同时在正义链和反义链上设计 pegRNA。2 个 pegRNA 的 PBS+RT 序列间存在反向互补序列, 利用他们之间的互补配对, 可能有利于将所需编辑引入基因组中。Lin 等^[58] 在植物中进行测试, 提出了 dual-pegRNA 策略, 即针对正义链和反义链同时设计 pegRNA 实现相同编辑, 该策略在 15 个内源位点的测试结果表明, dual-pegRNA 的策略在多数内源位点上的效率均不低于单个 pegRNA 策略, 平均效率可以提高 3.0 倍; 他们也将该策略整合至 PlantPegDesigner 设计网站。Zhuang 等^[69] 开发了基于成对 pegRNA 的 HOPE 系统, 在 293T 细胞及 HCT116 细胞中都获得了更为高效的编辑; 与常规的 PE3 系统相比, HOPE 系统的副产物更少, 可以获得更高的产物纯度。

3.6 优化大片段操纵能力

大片段操纵是 PE 系统需要克服的重大瓶颈。为了克服以上问题, 多个团队通过结合特异性重组酶的方法来实现大片段定点插入。Yarnall 等^[101] 开发了 PASTE 方法, 使用单个 pegRNA 插入位点特异性重组酶的识别序列, 利用重组酶的定点整合实

现大片段插入,在 3 种不同细胞系的多个位点中,实现了最高 36 kb 的大片段定点插入;他们还通过宏基因组挖掘和工程化改造同源物确定了 25 614 种位点特异性丝氨酸重组酶及其 DNA 识别位点,大大扩展了位点特异性丝氨酸重组酶的多样性。此外,运用成对 pegRNA 的方法已成功应用于高效的定点大片段插入。例如 Wang 等^[102]基于成对的 pegRNA 开发了 GRAND editing 新方法,所需插入的大片段信息被装载在 pegRNA 的 RTT 序列上,2 个 pegRNA 的 RTT 序列之间存在互补序列,但 2 个 RTT 序列均与基因组序列不相似;运用该方法,他们实现了为 20 bp~1 kb 的精准插入,包括效率高达 63.0% 的 150 bp 的插入和 28.4% 的 250 bp 的插入。Li 等^[59]也运用了类似的策略,结合 PE 的其他优化方法,实现植物基因组中 HIS、HA、FLAG 等蛋白标签的有效插入。设计成对的 pegRNA 插入重组酶识别位点,并结合位点特异性丝氨酸重组酶的方式,也可以实现高效率的大片段定点插入。例如 Anzalone 等^[103]开发的 twinPE 系统,能够在人类细胞中定点整合>5 000 bp 的大片段和实现 40 kb 的 DNA 倒位。2023 年, Sun 等^[104]开发了 PrimeRoot 编辑工具,在植物中建立了基于 PE 的大片段定点插入新策略,该策略运用优化的 dual-pegRNA 插入重组酶识别位点,结合优化的位点特异性重组酶,实现了高达 11.1 kb 的定点大片段 DNA 插入。

成对的 pegRNA 策略同样也用于大片段的精准删除。例如 Choi 等^[105]开发了 PRIME-Del 的 DNA 大片段删除技术,他们利用成对 pegRNA 靶向基因组待删除位置,并将这 2 个 pegRNA 的 RTT 序列设计为分别与另一 pegRNA 产生的断裂处的基因组序列匹配;这种方法的精准删除比例比基于 Cas9 和成对的 sgRNA 产生的大片段精准删除的比例更高。Jiang 等^[106]通过构建基于 Cas9 核酸酶的 PE,利用成对 pegRNA 间互补配对实现小片段序列的插入并替换原基因组中的 DNA 大片段,实现插入不超过 60 bp 的情况下直接删除 1~10 kb 的基因组大片段,并成功在酪氨酸血症小鼠模型中修复了 1 个由 1.38 kb 大片段产生的致病性位点。Tao 等^[75,107]也通过成对的 pegRNA 和 Cas9 核酸酶相结合,相继开发了 Bi-PE 和 WT-PE 新策略,实现高效的大片段删除。其中 WT-PE 成功创制了高达 16.8 Mb 的大片段删除的案例,为大片段畸变导致的疾病的模型创制和疾病治疗提供了新的方法。

除了大片段插入及删除, Kweon 等^[108]也运用基于成对 pegRNA 的 PE 实现了基因组的易位和倒位, Tao 等^[107]也通过 WT-PE 实现了染色体易位。

3.7 同时针对多基因进行 PE

多基因编辑对于重要性状聚合等均有重要的意义。目前,有多个团队测试了基于 PE 系统进行多基因编辑的方法。Jiang 等^[52]将多个 pegRNA 分别转录,在玉米中实现了 *ALS* 基因 (*W542L* 和 *S621I*) 的同时突变。Yuan 等^[70]利用 tRNA 具有启动子和 RNA 加工的双功能,在不同 pegRNA 序列间加入间隔序列,开发了紧凑的 hCtRNA-M 阵列,实现了 3 个位点同时编辑,多基因编辑的最高效率可达 57.5%。Huang 等^[61]也运用 Pol II 启动子转录含有 poly(T) 序列的 pegRNA,通过 Csy4 系统对多个 pegRNA 进行加工,实现了多个基因的同时编辑。Li 等^[109]等运用上述提到的富集编辑策略,并运用 tRNA 对多个 pegRNA 的转录本进行加工,实现了多个内源基因的同时、精确的编辑。Ni 等^[55]通过开发增强版本的 ePPEplus,结合 Csy4 策略,在小麦原生质体中实现了 10 个基因的同时编辑,并在小麦植株中同时编辑 8 个基因位点,极大地扩展了 PE 在实现农艺性状叠加方面的适用性。

3.8 特异性评估

基因组编辑工具的脱靶效应,根据其作用原理通常可分为两类:一类为传统意义上的 sgRNA(或 pegRNA) 依赖型的脱靶效应,这是由于脱靶位点序列与 sgRNA 的识别序列具有较高的相似性,使 Cas9 与 sgRNA 形成的复合体错误地结合到脱靶位点所致;另一类为 sgRNA(或 pegRNA) 非依赖型的脱靶效应,通常情况下是由于基因编辑工具的组成元件异位表达所致。例如碱基编辑系统中脱氨酶的异位表达,会引起全基因组或转录水平的随机脱氨事件,造成难以预测的由脱氨酶引起的脱靶^[18-21]。与其他常规的 CRISPR/Cas 基因编辑系统相比,PE 系统需要引入 RT 这一元件,其异位表达是否也会造成全基因组或者转录本难以预测的随机脱靶事件,需要详细、全面的评估。当然,PE 系统的 pegRNA 依赖型脱靶水平也需要深入研究。Anzalone 等^[26]在细胞系中的测试结果表明,PE 系统的 pegRNA 依赖型脱靶频率很低,猜测主要是由于 PE 除了需要满足 sgRNA 与靶向序列之间的识别之外,还需要满足 PBS 与非靶向链的识别,以及逆转录产生的 flap 结构整合至基因组时与基因组序列的识别;此外,他们也在细胞系层面证明 PE 在转录水平上不会造成基因表达量的显著变化。Kim

等^[110]通过改进的 nDigenome-seq 技术对 PE 的脱靶效应进行了全面的分析,也证明 PE 系统的 pegRNA 依赖型的脱靶频率较 CRISPR/Cas9 更低,并且可以通过使用 Cas9 的高保真变体,在保证一定程度的编辑效率的情况下,进一步提升 PE 系统的保真性。Jin 等^[111]也利用原生质体脱靶位点的深度靶向测序与植物个体水平全基因组测序结合的方法检测了 PE 系统 pegRNA 依赖型的脱靶效应,发现其脱靶频率较低,且受错配的数量和位置的影响,可以通过理性设计 pegRNA 减少脱靶。综上所述,PE 鲜有 pegRNA 依赖型脱靶事件的发生。

此外, Jin 等^[111]还以水稻为代表在个体水平上进行了 PE 系统的 pegRNA 非依赖型脱靶的评估,全基因组测序没有检测到 PE 系统在全基因组范围内额外产生的碱基变换和增删突变。Jin 等^[111]还分析了逆转录转座子 *OsTos17* 和端粒区域的拷贝数及保真性,发现 PE 系统中 RT 的异位表达不影响内源逆转录转座子和端粒酶的活性。此外,PE 也不会对内源 mRNA 造成逆转录及基因组整合。Schene 等^[112]也通过对基因组编辑后的细胞团进行全基因组测序,分析了 PE 在全基因组范围内的特异性,获得了类似的结果。Gao 等^[113]构建背景突变数量极低的细胞系,敏锐地分析脱靶突变事件。全基因组和转录组范围分析结果显示 PE3 没有产生额外的 pegRNA 非依赖型的脱靶事件。Habib 等^[114]对人类多能干细胞进行评估的结果也表明 PE 的 RT 结构域的引入不会导致基因组发生随机突变。因此,PE 系统不会造成 pegRNA 非依赖型脱靶事件的发生,总体来说,PE 系统特异性较高,暂时没有发现安全性上的隐患。

4 PE 系统的应用

与 CRISPR/Cas9 编辑技术和碱基编辑技术产生的编辑类型相比,PE 系统突破了编辑限制,可以实现几乎任意形式的编辑类型。因此,该系统自开发以来就受到了众多科研工作者的关注,并迅速应用于细菌(如大肠埃希菌),动物(如小鼠、果蝇、斑马鱼、兔子、猪等),植物(如水稻、玉米、番茄、小麦、烟草、小立碗藓、马铃薯、拟南芥等)及各种人类细胞系中。本综述简略按照应用系统的区别对 PE 系统在生物系统中的应用现状进行总结。

4.1 PE 系统在植物育种中的应用

基因编辑技术对农业发展产生了深刻的影响,其应用已经非常广泛。2023 年 4 月 28 日,农业农

村部发布《2023 年农业用基因编辑生物安全证书(生产应用)批准清单》,下发了全国首个植物基因编辑安全证书,体现了国家对作物基因组编辑育种产业化的战略布局。基因编辑技术在农业上积累了丰富的研发及应用经验,正在逐渐转变为一项常规的农业生产技术,参与重塑未来农业的行业生态。PE 系统作为基因组编辑育种中编辑性能最优越的代表,尽管开发至今未满足 4 年,却以极快的速度在新型种质资源创制等重要农艺性状的开发上得以应用。PE 技术开发之初,就有多个研究小组在多种重要作物中进行测试,如水稻、小麦、玉米、番茄等^[31,52,71]。该系统可以实现碱基任意互换,为创制功能获得性突变(Gain-of-function mutation)提供了高效便捷的方法,最常见的应用方向是抗除草剂种质的创制^[37,115]。多个团队利用 PE 创制了常规碱基编辑器难以获得的新抗除草剂基因突变类型。例如 Jiang 等^[116]通过使用优化的 PE 系统,在水稻抗草甘膦基因(*EPSPS*)中有效地产生了可遗传的 TAP-IVS 突变,克服了之前抗草甘膦突变类型无法获得纯合后代的瓶颈问题,为水稻的非转基因草甘膦抗性育种提供了全新的技术路径。Xu 等^[117]运用 PE 系统针对抗除草剂基因 *OsACCI* 的重要位点进行饱和式筛选,鉴定出一系列赋予除草剂耐受性的全新突变类型,并将其应用到水稻育种中。Qiao 等^[60]也采用多种 PE 优化方法,成功产生了可遗传的抗除草剂玉米突变株系。Gupta 等^[118]通过 PE 系统赋予水稻白叶枯病抗性。此外,Zhang 等^[119]也运用 PE 系统创制功能获得性突变,赋予了烟草高水平的顺-冷杉醇合成能力。

4.2 PE 系统在动物及疾病治疗中的应用

据 OMIM 数据库(人类孟德尔病数据库)的统计,目前已知的人类单基因遗传病有 7 000 多种,其中 4 000 多种的致病基因和发病机制比较明确,而多数遗传病的治疗需求仍远远未被满足。PE 系统能够对致病基因的序列直接进行修改,纠正异常基因,从而达到治疗疾病的目的,具有一次治疗终身治愈的潜力。目前 PE 已经在多种不同类型的人类细胞或组织中实现了编辑,例如 Chemello 等^[120]利用 PE 系统在人类心肌细胞中对 *DMD* 基因的第 52 号外显子进行编辑,成功恢复了细胞内抗肌萎缩蛋白的表达;Sun 等^[121]对雄激素受体突变的 iPSCs 细胞进行修复,使其恢复分化为 3 个胚层的能力。这些结果表明,PE 系统在人类疾病治疗中有良好的应用前景。Schene 等^[112]利用 PE3 系统在功能上成功纠正了肠道类器官中 *DGATI* 基因的致病

突变和肝脏类器官中 *ATP7B* 基因的致病突变。

此外, PE 系统可以应用在动物中进行重要疾病模型的创制以研究其致病机理。PE 还可以在动物遗传育种中发挥重要作用, 创制畜禽重要优异性状, 也可以创制重要突变类型为基础研究提供技术支持。在非哺乳动物模型上, Bosch 等^[72] 在果蝇 S2R 细胞中测试了引导编辑器的效率, 他们利用引导编辑器将终止密码子引入 3 个标记基因中, 编辑效率分别为 35.2%、11.6% 和 21.9%, 并进一步在黑腹果蝇中实现了精准编辑。Petri 等^[77] 也将 PE 系统应用到斑马鱼胚胎中, 成功诱导了可遗传突变, 突变率高达 30%。在哺乳动物模型上, PE 也有很多应用成功的例子, 例如 Liu 等^[64] 基于双 AAV 将 PE 分成两部分递送到成年小鼠体内, 成功纠正小鼠肝脏中的致病性突变。Qian 等^[122] 将 PE 系统成功地应用到兔子身上, 并使用 PE 系统产生了一个新的 TSD(一类性神经退行性疾病) 兔模型。Qi 等^[62] 证明 PE 系统也可以编辑猪的基因组, 拓宽了 PE 系统的研究及应用范围。最近, Davis 等^[79] 基于优化双 AAV 的引导编辑器递送系统, 在小鼠多个重要器官包括大脑(皮层中编辑效率高达 42%)、肝脏(编辑效率高达 46%) 和心脏(编辑效率高达 11%) 中都实现了精准编辑。以上研究充分展示了 PE 系统在体内实现基因遗传疾病治疗的应用前景。

5 PE 系统发展前景

PE 系统以 CRISPR/Cas 技术为基础, 实现了基因组中灵活的精准编辑。针对其进行的开发及优化, 大大提升了编辑效率和对大片段的操纵能力。尽管如此, 目前整体上 PE 的编辑效率与碱基编辑技术等与其他方法相比仍有差距, 尤其 PE 在不同物种、不同细胞类型、不同靶向位点中的差异仍然很大, 这导致 PE 系统在很多情况下仍然比较吃力。因此, 进一步优化提升 PE 的编辑能力和 DNA 大片段操纵能力仍然十分重要。目前, PE 系统的优化仍不断有新突破, 尤其是最新出现的 PE6 系列优化版本, 通过 PACE 进化系统对 PE 系统中的 Cas9 组分进行定向进化, 使 PE 效率得以显著提升^[63]。结合最新出现的针对 RT 进行优化的 ePPEplus^[55] 等策略, 相信可以极大地拓宽 PE 的编辑场景。

目前 PE 系统相关的研究主要集中于编辑特定的目的靶点及基因组内的位点, 对高通量筛选、基因组外遗传物质的编辑(如线粒体、叶绿体基因组) 等场景的研究还不充分; 此外, 虽然目前 PE 系

统未发现全基因组或转录水平的脱靶效应, 但随着其编辑能力的进一步提升, 该方法的脱靶风险仍需谨慎的评估; PE 系统本身还存在载体较大的问题。因此, 如何开发高效、安全的递送系统, 保证 PE 系统在动植物体内特定部位(或者组织类型) 的有效表达, 也是其应用的关键因素。综上所述, PE 系统为疾病治疗、农业育种、基础研究等领域提供了高效、安全、灵活的基因编辑平台, 通过未来的优化改进, PE 系统将为上述领域提供更为稳健的技术支撑。

致谢: 感谢河北农业大学生命科学学院李君教授在文章写作方面给予的建议和帮助。

参考文献:

- [1] CHEN K, WANG Y, ZHANG R, et al. CRISPR/Cas genome editing and precision plant breeding in agriculture[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2019, 70: 667-697.
- [2] 刘耀光, 李构思, 张雅玲, 等. CRISPR/Cas 植物基因组编辑技术研究进展[J]. *华南农业大学学报*, 2019, 40(5): 38-49.
- [3] CONG L, RAN F A, COX D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems[J]. *Science*, 2013, 339(6121): 819-823.
- [4] JINEK M, CHYLINSKI K, FONFARA I, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity[J]. *Science*, 2012, 337(6096): 816-821.
- [5] GASIUNAS G, BARRANGOU R, HORVATH P, et al. 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-E2586.
- [6] 单奇伟, 高彩霞. 植物基因组编辑及衍生技术最新研究进展[J]. *遗传*, 2015, 37(10): 953-973.
- [7] ZHANG Y, PRIBIL M, PALMGREN M, et al. A CRISPR way for accelerating improvement of food crops[J]. *Nature Food*, 2020, 1(4): 200-205.
- [8] 瞿礼嘉, 郭冬妹, 张金喆, 等. CRISPR/Cas 系统在植物基因组编辑中的应用[J]. *生命科学*, 2015, 27(1): 64-70.
- [9] 王皓毅, 李劲松, 李伟. 基于 CRISPR-Cas9 新型基因编辑技术研究[J]. *生命科学*, 2016, 28(8): 867-870.
- [10] LIU G, LIN Q, JIN S, et al. The CRISPR-Cas toolbox and gene editing technologies[J]. *Molecular Cell*, 2022, 82(2): 333-347.
- [11] GAO C. Genome engineering for crop improvement and future agriculture[J]. *Cell*, 2021, 184(6): 1621-1635.
- [12] KOMOR A C, KIM Y B, PACKER M S, et al. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage[J]. *Nature*, 2016, 533(7603): 420-424.
- [13] GAUDELLI N M, KOMOR A C, REES H A, et al. Programmable base editing of A-T to G-C in genomic DNA without DNA cleavage[J]. *Nature*, 2017, 551(7681): 464-471.
- [14] 宗媛, 高彩霞. 碱基编辑系统研究进展[J]. *遗传*, 2019, 41(9): 777-800.
- [15] 魏瑜, 张晓辉, 李大力. 基因编辑之“新宠”: 单碱基基因组编辑系统[J]. *遗传*, 2017, 39(12): 1115-1121.
- [16] 孙宏伟, 梁普平, 黄军就. 人类胚胎单碱基编辑治疗遗传疾病的研究[J]. *生命科学*, 2018, 30(9): 926-931.
- [17] 张雅玲, 王铎和, 李构思, 等. 新型 DNA 碱基编辑器的研究进展[J]. *华南农业大学学报*, 2022, 43(6): 1-16.
- [18] JIN S, ZONG Y, GAO Q, et al. Cytosine, but not adenine, base editors induce genome-wide off-target mutations in rice[J]. *Science*, 2019, 364(6437): 292-295.

- [19] ZUO E, SUN Y, WEI W, et al. Cytosine base editor generates substantial off-target single-nucleotide variants in mouse embryos[J]. *Science*, 2019, 364(6437): 289-292.
- [20] GRÜNEWALD J, ZHOU R, GARCIA S P, et al. Transcriptome-wide off-target RNA editing induced by CRISPR-guided DNA base editors[J]. *Nature*, 2019, 569(7756): 433-437.
- [21] ZHOU C, SUN Y, YAN R, et al. Off-target RNA mutation induced by DNA base editing and its elimination by mutagenesis[J]. *Nature*, 2019, 571(7764): 275-278.
- [22] KURT I C, ZHOU R, IYER S, et al. CRISPR C-to-G base editors for inducing targeted DNA transversions in human cells[J]. *Nature Biotechnology*, 2021, 39(1): 41-46.
- [23] ZHAO D, LI J, LI S, et al. Glycosylase base editors enable C-to-A and C-to-G base changes[J]. *Nature Biotechnology*, 2021, 39(1): 35-40.
- [24] TONG H, WANG X, LIU Y, et al. 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.
- [25] CHEN L, HONG M, LUAN C, et al. Adenine transversion editors enable precise, efficient A · T-to-C · G base editing in mammalian cells and embryos[J/OL]. *Nature Biotechnology*, (2023-07-10)[2023-09-03]. <https://doi.org/10.1038/s41587-023-01821-9>.
- [26] ANZALONE A V, RANDOLPH P B, DAVIS J R, et al. Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA[J]. *Nature*, 2019, 576(7785): 149-157.
- [27] LIU Y, HUANG X, WANG X. Search-and-replace editing of genetic information[J]. *Frontiers of Agricultural Science and Engineering*, 2020, 7(2): 231-232.
- [28] LIN J, LIU X, LU Z, et al. Modeling a cataract disorder in mice with prime editing[J]. *Molecular Therapy-Nucleic Acids*, 2021, 25: 494-501.
- [29] LI Y, LI W, LI J. The CRISPR/Cas9 revolution continues: From base editing to prime editing in plant science[J]. *Journal of Genetics and Genomics*, 2021, 48(8): 661-670.
- [30] GAO P, LYU Q, GHANAM A R, et al. Prime editing in mice reveals the essentiality of a single base in driving tissue-specific gene expression[J]. *Genome Biology*, 2021, 22(1): 83.
- [31] LIN Q, ZONG Y, XUE C, et al. Prime genome editing in rice and wheat[J]. *Nature Biotechnology*, 2020, 38(5): 582-585.
- [32] TANG X, SRETENOVIC S, REN Q, et al. Plant prime editors enable precise gene editing in rice cells[J]. *Molecular Plant*, 2020, 13(5): 667-670.
- [33] VEILLET F, KERMARREC M P, CHAUVIN L, et al. Prime editing is achievable in the tetraploid potato, but needs improvement[EB/OL]. bioRxiv: 111162 (2020-06-18)[2023-09-03]. <https://doi.org/10.1101/2020.06.18.159111>.
- [34] VU T V, KIM J, DAS S, et al. The obstacles and potential clues of prime editing applications in tomato, a dicot plant[EB/OL]. bioRxiv: 435378 (2021-05-21)[2023-09-03]. <https://doi.org/10.1101/2021.03.15.435378>.
- [35] LANDRUM M J, LEE J M, RILEY G R, et al. ClinVar: Public archive of relationships among sequence variation and human phenotype[J]. *Nucleic Acids Research*, 2014, 42(D1): D980-D985.
- [36] WANG L, KAYA H B, ZHANG N, et al. Spelling changes and fluorescent tagging with prime editing vectors for plants[J]. *Frontiers in Genome Editing*, 2021, 3: 617553.
- [37] LI H, LI J, CHEN J, et al. Precise modifications of both exogenous and endogenous genes in rice by prime editing[J]. *Molecular Plant*, 2020, 13(5): 671-674.
- [38] XU R, LI J, LIU X, et al. Development of plant prime-editing systems for precise genome editing[J]. *Plant Communications*, 2020, 1(3): 100043.
- [39] XU W, ZHANG C, YANG Y, et al. Versatile nucleotides substitution in plant using an improved prime editing system[J]. *Molecular Plant*, 2020, 13(5): 675-678.
- [40] LIU Y, LI X, HE S, et al. Efficient generation of mouse models with the prime editing system[J]. *Cell Discovery*, 2020, 6: 27.
- [41] MARZEC M, HENSELH G. Prime editing: Game changer for modifying plant genomes[J]. *Trends in Plant Science*, 2020, 25(8): 722-724.
- [42] NELSON J W, RANDOLPH P B, SHEN S P, et al. Engineered pegRNAs improve prime editing efficiency[J]. *Nature Biotechnology*, 2022, 40(3): 402-410.
- [43] LI X, WANG X, SUN W, et al. Enhancing prime editing efficiency by modified pegRNA with RNA G-quadruplexes[J]. *Journal of Molecular Cell Biology*, 2022, 14(4): mjac022.
- [44] LIU Y, YANG G, HUANG S, et al. Enhancing prime editing by Csy4-mediated processing of pegRNA[J]. *Cell Research*, 2021, 31(10): 1134-1136.
- [45] ZHANG G, LIU Y, HUANG S, et al. Enhancement of prime editing via xrRNA motif-joined pegRNA[J]. *Nature Communications*, 2022, 13(1): 1856.
- [46] PERROUD P, GUYON-DEBAST A, CASACUBERTA J M, et al. Improved prime editing allows for routine predictable gene editing in *Physcomitrium patens*[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2023, 74(19): 6176-6187.
- [47] CHAI Y, JIANG Y, WANG J, et al. MS2 RNA aptamer enhances prime editing in rice[EB/OL]. bioRxiv: 465209 (2021-10-21)[2023-09-03]. <https://doi.org/10.1101/2021.10.20.465209>.
- [48] LIU B, DONG X, CHENG H, et al. A split prime editor with untethered reverse transcriptase and circular RNA template[J]. *Nature Biotechnology*, 2022, 40(9): 1388-1393.
- [49] FENG Y, LIU S, MO Q, et al. Enhancing prime editing efficiency and flexibility with tethered and split pegRNAs[J]. *Protein & Cell*, 2023, 14(4): 304-308.
- [50] LI X, ZHOU L, GAO B, et al. Highly efficient prime editing by introducing same-sense mutations in pegRNA or stabilizing its structure[J]. *Nature Communications*, 2022, 13(1): 1669.
- [51] XU W, YANG Y, YANG B, et al. A design optimized prime editor with expanded scope and capability in plants[J]. *Nature Plants*, 2022, 8(1): 45-52.
- [52] JIANG Y Y, CHAI Y P, LU M H, et al. Prime editing efficiently generates W542L and S621I double mutations in two ALS genes in maize[J]. *Genome Biology*, 2020, 21(1): 257.
- [53] ZOU J, MENG X, LIU Q, et al. Improving the efficiency of prime editing with epegRNAs and high-temperature treatment in rice[J]. *Science China-Life Sciences*, 2022, 65(11): 2328-2331.
- [54] ZONG Y, LIU Y, XUE C, et al. An engineered prime editor with enhanced editing efficiency in plants[J]. *Nature Biotechnology*, 2022, 40(9): 1394-1402.
- [55] NI P, ZHAO Y, ZHOU X, et al. Efficient and versatile multiplex prime editing in hexaploid wheat[J]. *Genome Biology*, 2023, 24(1): 156.
- [56] LIANG Z, WU Y, GUO Y, et al. Addition of the T5 exonuclease increases the prime editing efficiency in plants[J]. *Journal of Genetics and Genomics*, 2023, 50(8): 582-588.
- [57] LI J, CHEN L, LIANG J, et al. Development of a highly efficient prime editor 2 system in plants[J]. *Genome Biology*, 2022, 23(1): 161.
- [58] LIN Q, JIN S, ZONG Y, et al. High-efficiency prime editing with optimized, paired pegRNAs in plants[J]. *Nature Biotechnology*, 2021, 39(8): 923-927.
- [59] LI J, DING J, ZHU J, et al. Prime editing-mediated precise knockin of protein tag sequences in the rice genome[J]. *Plant Communications*, 2023, 4(3): 100572.
- [60] QIAO D, WANG J, LU M H, et al. Optimized prime editing efficiently generates heritable mutations in maize[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2023, 65(4): 900-906.
- [61] HUANG S, ZHANG Z, TAO W, et al. Broadening prime editing toolkits using RNA-Pol-II-driven engineered pegRNA[J]. *Molecu-*

- lar Therapy, 2022, 30(9): 2923-2932.
- [62] QI Y, ZHANG Y, TIAN S, et al. An optimized prime editing system for efficient modification of the pig genome[J/OL]. Science China-Life Sciences, (2023-08-12)[2023-09-03]. <https://doi.org/10.1007/s11427-022-2334-y>.
- [63] DOMAN J L, PANDEY S, NEUGEBAUER M E, et al. Phage-assisted evolution and protein engineering yield compact, efficient prime editors[J]. Cell, 2023, 186(18): 3983-4002.
- [64] LIU P, LIANG S Q, ZHENG C, et al. Improved prime editors enable pathogenic allele correction and cancer modelling in adult mice[J]. Nature Communications, 2021, 12(1): 2121.
- [65] CHEN P J, HUSSMANN J A, YAN J, et al. Enhanced prime editing systems by manipulating cellular determinants of editing outcomes[J]. Cell, 2021, 184(22): 5635-5652.
- [66] SONG M, LIM J M, MIN S, et al. Generation of a more efficient prime editor 2 by addition of the Rad51 DNA-binding domain[J]. Nature Communications, 2021, 12(1): 5617.
- [67] PARK S J, JEONG T Y, SHIN S K, et al. Targeted mutagenesis in mouse cells and embryos using an enhanced prime editor[J]. Genome Biology, 2021, 22(1): 170.
- [68] VELIMIROVIC M, ZANETTI L C, SHEN M W, et al. Peptide fusion improves prime editing efficiency[J]. Nature Communications, 2022, 13(1): 3512.
- [69] ZHUANG Y, LIU J, WU H, et al. Increasing the efficiency and precision of prime editing with guide RNA pairs[J]. Nature Chemical Biology, 2022, 18(1): 29-37.
- [70] YUAN Q, GAO X. Multiplex base- and prime-editing with drive-and-process CRISPR arrays[J]. Nature Communications, 2022, 13(1): 2771.
- [71] LU Y, TIAN Y, SHEN R, et al. Precise genome modification in tomato using an improved prime editing system[J]. Plant Biotechnology Journal, 2021, 19(3): 415-417.
- [72] BOSCH J A, BIRCHAK G, PERRIMON N. Precise genome engineering in *Drosophila* using prime editing[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2021, 118(1): e2021996118.
- [73] ADIKUSUMA F, LUSHINGTON C, ARUDKUMAR J, et al. Optimized nickase- and nuclease-based prime editing in human and mouse cells[J]. Nucleic Acids Research, 2021, 49(18): 10785-10795.
- [74] PETERKA M, AKRAP N, LI S, et al. Harnessing DSB repair to promote efficient homology-dependent and -independent prime editing[J]. Nature Communications, 2022, 13(1): 1240.
- [75] TAO R, WANG Y, JIAO Y, et al. Bi-PE: Bi-directional priming improves CRISPR/Cas9 prime editing in mammalian cells[J]. Nucleic Acids Research, 2022, 50(11): 6423-6434.
- [76] SÜRÜN D, SCHNEIDER A, MIRCETIC J, et al. Efficient generation and correction of mutations in human iPSCs utilizing mRNAs of CRISPR base editors and prime editors[J]. Genes, 2020, 11(5): 511.
- [77] PETRI K, ZHANG W, MA J, et al. CRISPR prime editing with ribonucleoprotein complexes in zebrafish and primary human cells[J]. Nature Biotechnology, 2022, 40(2): 189-193.
- [78] BOCK D, ROTHGANGL T, VILLIGER L, et al. In vivo prime editing of a metabolic liver disease in mice[J]. Science Translational Medicine, 2022, 14(636): eab19238.
- [79] DAVIS J R, BANSKOTA S, LEVY J M, et al. Efficient prime editing in mouse brain, liver and heart with dual AAVs[J/OL]. Nature Biotechnology, (2023-06-01)[2023-09-03]. <https://doi.org/10.1038/s41587-023-01758-z>.
- [80] SHE K, LIU Y, ZHAO Q, et al. Dual-AAV split prime editor corrects the mutation and phenotype in mice with inherited retinal degeneration[J]. Signal Transduction and Targeted Therapy, 2023, 8(1): 57.
- [81] ZHENG C, LIANG S Q, LIU B, et al. A flexible split prime editor using truncated reverse transcriptase improves dual-AAV delivery in mouse liver[J]. Molecular Therapy, 2022, 30(3): 1343-1351.
- [82] GRÜNEWALD J, MILLER B R, SZALAY R N, et al. Engineered CRISPR prime editors with compact, untethered reverse transcriptases[J]. Nature Biotechnology, 2023, 41(3): 337-343.
- [83] GAO Z, RAVENDRAN S, MIKKELSEN N S, et al. A truncated reverse transcriptase enhances prime editing by split AAV vectors[J]. Molecular Therapy, 30(9): 2942-2951.
- [84] HUA K, JIANG Y, TAO X, et al. Precision genome engineering in rice using prime editing system[J]. Plant Biotechnology Journal, 2020, 18(11): 2167-2169.
- [85] AIRD E J, ZDECHLIK A C, RUIS B L, et al. Split *Staphylococcus aureus* prime editor for AAV delivery[EB/OL]. bioRxiv: 426237 (2021-01-11)[2023-09-03]. <https://doi.org/10.1101/2021.01.11.426237>.
- [86] KWEON J, YOON J, JANG A, et al. Engineered prime editors with PAM flexibility[J]. Molecular Therapy, 2021, 29(6): 2001-2007.
- [87] OH Y, LEE W, HUR J K, et al. Expansion of the prime editing modality with Cas9 from *Francisella novicida*[J]. Genome Biology, 2022, 23(1): 92.
- [88] SHOU J, LI J, LIU Y, et al. Precise and predictable CRISPR chromosomal rearrangements reveal principles of Cas9-mediated nucleotide insertion[J]. Molecular Cell, 2018, 71(4): 498-509.
- [89] DA SILVA J F, OLIVEIRA G P, ARASE-VERGE E A, et al. Prime editing efficiency and fidelity are enhanced in the absence of mismatch repair[J]. Nature Communications, 2022, 13(1): 760.
- [90] CHOW R D, CHEN J S, SHEN J, et al. A web tool for the design of prime-editing guide RNAs[J]. Nature Biomedical Engineering, 2021, 5(2): 190-194.
- [91] HSU J Y, GRÜNEWALD J, SZALAY R, et al. PrimeDesign software for rapid and simplified design of prime editing guide RNAs[J]. Nature Communications, 2021, 12(1): 1034.
- [92] BHAGWAT A M, GRAUMANN J, WIEGANDT R, et al. Multicispr: gRNA design for prime editing and parallel targeting of thousands of targets[J]. Life Science Alliance, 2020, 3(11): e202000757.
- [93] SIEGNER S M, KARASU M E, SCHRÖDER M S, et al. PnB Designer: A web application to design prime and base editor guide RNAs for animals and plants[J]. BMC Bioinformatics, 2021, 22(1): 101.
- [94] STANDAGE-BEIER K, TEKEL S J, BRAFMAN D A, et al. Prime editing guide RNA design automation using PINE-CONE[J]. ACS Synthetic Biology, 2021, 10(2): 422-427.
- [95] MORRIS J A, RAHMAN J A, GUO X, et al. Automated design of CRISPR prime editors for 56, 000 human pathogenic variants[J]. iScience, 2021, 24(11): 103380.
- [96] HWANG G, JEONG Y K, HABIB O, et al. PE-Designer and PE-Analyzer: Web-based design and analysis tools for CRISPR prime editing[J]. Nucleic Acids Research, 2021, 49(W1): W499-W504.
- [97] KIM H K, YU G, PARK J, et al. Predicting the efficiency of prime editing guide RNAs in human cells[J]. Nature Biotechnology, 2021, 39(2): 198-206.
- [98] JIN S, LIN Q, GAO Q, et al. Optimized prime editing in monocot plants using PlantPegDesigner and engineered plant prime editors (ePPEs)[J]. Nature Protocols, 2023, 18(3): 831-853.
- [99] KOEPPPEL J, WELLER J, PEETS E M, et al. Prediction of prime editing insertion efficiencies using sequence features and DNA repair determinants[J/OL]. Nature Biotechnology, (2023-03-22)[2023-09-03]. <https://doi.org/10.1038/s41587-023-01678-y>.
- [100] LI Y, CHEN J, TSAI S Q, et al. Easy-Prime: A machine learning-based prime editor design tool[J]. Genome Biology, 2021, 22(1): 235.
- [101] YARNALL M T N, IOANNIDI E I, SCHMITT-ULMS C, et al. Drag-and-drop genome insertion of large sequences without double-strand DNA cleavage using CRISPR-directed integrases[J]. Nature Biotechnology, 2023, 41(4): 500-512.
- [102] WANG J, HE Z, WANG G, et al. Efficient targeted insertion of

- large DNA fragments without DNA donors[J]. *Nature Methods*, 2022, 19(3): 331-340.
- [103] ANZALONE A V, GAO X D, PODRACKY C J, et al. Programmable deletion, replacement, integration and inversion of large DNA sequences with twin prime editing[J]. *Nature Biotechnology*, 2022, 40(5): 731-740.
- [104] SUN C, LEI Y, LI B, et al. Precise integration of large DNA sequences in plant genomes using PrimeRoot editors[J/OL]. *Nature Biotechnology*, (2023-05-22)[2023-09-03]. <https://doi.org/10.1038/s41587-023-01769-w>.
- [105] CHOI J, CHEN W, SUITER C C, et al. Precise genomic deletions using paired prime editing[J]. *Nature Biotechnology*, 2022, 40(2): 218-226.
- [106] JIANG T, ZHANG X O, WENG Z, et al. Deletion and replacement of long genomic sequences using prime editing[J]. *Nature Biotechnology*, 2022, 40(2): 227-234.
- [107] TAO R, WANG Y, HU Y, et al. WT-PE: Prime editing with nuclease wild-type Cas9 enables versatile large-scale genome editing[J]. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2022, 7(1): 108.
- [108] KWEON J, HWANG H Y, RYU H, et al. Targeted genomic translocations and inversions generated using a paired prime editing strategy[J]. *Molecular Therapy*, 2023, 31(1): 249-259.
- [109] LI H, ZHU Z, LI S, et al. Multiplex precision gene editing by a surrogate prime editor in rice[J]. *Molecular Plant*, 2022, 15(7): 1077-1080.
- [110] KIM D Y, MOON S B, KO J, et al. Unbiased investigation of specificities of prime editing systems in human cells[J]. *Nucleic Acids Research*, 2020, 48(18): 10576-10589.
- [111] JIN S, LIN Q, LUO Y, et al. Genome-wide specificity of prime editors in plants[J]. *Nature Biotechnology*, 2021, 39(10): 1292-1299.
- [112] SCHENE I F, JOORE I P, OKA R, et al. Prime editing for functional repair in patient-derived disease models[J]. *Nature Communications*, 2020, 11(1): 5352.
- [113] GAO R, FU Z C, LI X, et al. Genomic and transcriptomic analyses of prime editing guide RNA-independent off-target effects by prime editors[J]. *CRISPR Journal*, 2022, 5(2): 276-293.
- [114] HABIB O, HABIB G, HWANG G, et al. Comprehensive analysis of prime editing outcomes in human embryonic stem cells[J]. *Nucleic Acids Research*, 2022, 50(2): 1187-1197.
- [115] BUTT H, RAO G S, SEDEEK K, et al. Engineering herbicide resistance via prime editing in rice[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2020, 18(12): 2370-2372.
- [116] JIANG Y, CHAI Y, QIAO D, et al. Optimized prime editing efficiently generates glyphosate-resistant rice plants carrying homozygous TAP-IVS mutation in *EPSPS*[J]. *Molecular Plant*, 2022, 15(11): 1646-1649.
- [117] XU R, LIU X, LI J, et al. Identification of herbicide resistance *Os-ACCI* mutations via in planta prime-editing-library screening in rice[J]. *Nature Plants*, 2021, 7(7): 888-892.
- [118] GUPTA A, LIU B, CHEN Q J, et al. High-efficiency prime editing enables new strategies for broad-spectrum resistance to bacterial blight of rice[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2023, 21(7): 1454-1464.
- [119] ZHANG J, ZHANG L, ZHANG C, et al. Developing an efficient and visible prime editing system to restore tobacco 8-hydroxy-copalyl diphosphate gene for labdane diterpene *Z*-abienol biosynthesis[J/OL]. *Science China-Life Sciences*, (2023-08-04)[2023-09-03]. <https://doi.org/10.1007/s11427-022-2396-x>.
- [120] CHEMELLO F, CHAI A C, LI H, et al. Precise correction of Duchenne muscular dystrophy exon deletion mutations by base and prime editing[J]. *Science Advances*, 2021, 7(18): eabg4910.
- [121] SUN R, CUI Y, LIU Z, et al. A prime editor efficiently repaired human induced pluripotent stem cells with AR gene mutation (c. 2710G > A; p. V904M)[J]. *Stem Cell Research*, 2023, 69: 103102.
- [122] QIAN Y, ZHAO D, SUI T, et al. Efficient and precise generation of Tay-Sachs disease model in rabbit by prime editing system[J]. *Cell Discovery*, 2021, 7(1): 50.



林秋鹏, 华南农业大学首聘教授, 博士生导师, 研究方向为作物基因组编辑技术开发及应用, 主要围绕开发高效、安全的精准编辑体系并将该技术应用于农业育种及医疗领域等开展工作。在国际上率先建立了适用于植物的引导编辑技术体系, 并开发了多套提升该系统效率的全新方法, 此外还开发了一系列基因组编辑新策略并应用于植物基因功能研究或分子育种; 相关工作已申请4项PCT国际专利。获博士后创新人才支持计划(博新计划)及中国博士后科学基金一等资助, 获中国科学院优秀博士毕业论文。近年来以第一作者(含共同)在《Cell》《Nature Biotechnology》《Nature Protocols》《Molecular Cell》等国际权威杂志发表SCI论文10篇, 累计影响因子超过350。

【责任编辑 李庆玲】