



中山大学基因编辑学科发展

黎镇祥[†], 周依潼[†], 黄军就^{*}, 李剑峰^{*}

中山大学生命科学学院, 广州 510275

[†] 同等贡献

^{*} 联系人, E-mail: hjunjiu@mail.sysu.edu.cn; lijfeng3@mail.sysu.edu.cn

收稿日期: 2024-05-05; 接受日期: 2024-05-29; 网络版发表日期: 2024-09-03

DNA序列变异是决定许多人类疾病发生发展和农作物优良性状形成的遗传基础. 基因编辑是指利用位点特异性核酸酶(site-specific nuclease, SSN)在基因组特定位点引入序列变异, 从而实现基因功能操控、人类疾病治疗和作物分子设计育种的目的. 常用的SSN包括锌指蛋白核酸酶(zinc-finger nuclease, ZFN)、转录激活因子样效应蛋白核酸酶(transcription activator-like effector nuclease, TALEN)和CRISPR/Cas (clustered regularly interspaced short palindromic repeat/CRISPR-associated)技术^[1-4]. 其中, ZFN和TALEN对靶序列的识别依赖特异的蛋白-DNA相互作用, 因此靶向不同的DNA序列时需要重新设计和构建新的ZFN和TALEN蛋白, 相当耗时费力. 相比之下, CRISPR/Cas技术通过RNA-DNA碱基互补配对实现对靶序列的识别, 因而具有设计、构建简便和无与伦比的多靶点平行编辑能力^[5].

CRISPR/Cas技术的发明受到原核生物抵御噬菌体入侵的CRISPR适应性免疫系统启发^[6]. 2012年, Jinek等人^[7]把原核type-II的CRISPR/Cas9系统中分别发挥靶向作用的crRNA和支架作用的tracrRNA融合为单个向导RNA(guide RNA, gRNA), 并证明通过改变gRNA 5'末端20个核苷酸的向导序列, 即可引导来自化脓链球菌(*Streptococcus pyogenes*)的Cas9核酸酶

(SpCas9)在体外切割由向导序列(protospacer)和PAM (protospacer adjacent motif)序列组成的DNA靶序列. 在此重大突破的基础上, 后续研究者在2013年迅速把CRISPR/Cas9系统改造成为能够在细胞内高效切割DNA靶序列的技术, 并把这一技术成功应用于人(*Homo sapiens*)、小鼠(*Mus musculus*)、斑马鱼(*Danio rerio*)、拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、水稻(*Oryza sativa*)等多个物种^[3,5,8].

CRISPR/Cas9技术利用可编程的gRNA引导Cas9核酸酶结合到任意基因组中特定的DNA靶位点并切割产生DNA双链断裂(double-strand break, DSB). 细胞随后通过非同源末端连接(non-homologous end joining, NHEJ)和同源性介导的修复(homology-directed repair, HDR)两种主要途径对DSB进行修复. 前者通常会在靶位点处产生少量碱基的插入或缺失(insertions/deletions, Indels), 从而造成靶基因的移码突变而被敲除. 后者则利用与靶位点同源的DNA修复模板诱导同源重组, 从而使靶基因发生精确的序列替换^[3,5,8]. 在CRISPR/Cas9技术基础上, 部分或完全失去DNA切割活性的Cas9, 即仅能切割单链的Cas9缺刻酶(Cas9 nickase, nCas9)或失活的Cas9(dead Cas9, dCas9), 能够作为一种可编程的特异DNA结合平台, 通过与其他功能结构域进一步融合而被赋予新功能^[9]. 例如, 将

引用格式: 黎镇祥, 周依潼, 黄军就, 等. 中山大学基因编辑学科发展. 中国科学: 生命科学, 2024, 54: 1534–1548

Li Z X, Zhou Y T, Huang J J, et al. Progress in developing and implementing CRISPR technologies made by Sun Yat-sen University (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2024, 54: 1534–1548, doi: [10.1360/SSV-2024-0145](https://doi.org/10.1360/SSV-2024-0145)

nCas9(D10A)与胞苷或腺苷脱氨酶融合得到的胞嘧啶碱基编辑器(cytosine base editor, CBE)或腺嘌呤碱基编辑器(adenine base editor, ABE)可实现对基因靶位点C→T或A→G的碱基替换^[10~12]; nCas9(H840A)与逆转录酶融合得到的引导编辑器(prime editor, PE)与携带逆转录模板的特殊gRNA(称为pegRNA)合作可在基因靶位点处实现小片段插入或任意碱基之间的变换^[13]; 将dCas9与转录激活域或抑制域融合得到的人工转录因子通过gRNA引导结合到靶基因的启动子上, 可实现对靶基因的转录激活(CRISPR activation, CRISPRa)或转录抑制(CRISPR interference, CRISPRi)^[14,15]. 这些衍生技术极大丰富了CRISPR/Cas9工具箱, 为功能基因组学、合成生物学、疾病治疗和农作物遗传改良提供了有力的技术支持.

中山大学生命科学学院在基因工程领域具有悠久的历史. 自20世纪80年代起, 著名遗传学家李宝健教授已经围绕外源基因的植物遗传转化技术开展了引领性的探索并取得多项重要突破. 进入基因编辑时代以来, 学院多个研究团队长期致力于基因编辑及衍生技术的开发、优化与应用, 研究对象涵盖人类细胞、动物模型、经济动物和模式植物等, 并做出了一系列具有国际影响力的原创性成果. 本文将重点介绍这些团队在基因编辑领域取得的研究进展.

1 哺乳动物CRISPR工具

1.1 基因编辑工具

目前, 人类疾病中有超过58%的遗传突变由单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphisms, SNPs)导致^[16], 为单碱基突变(又称为“点突变”). 因此, 如何高效制备点突变的动物疾病模型对于开发相关治疗方案极为重要. 使用CRISPR/Cas9诱导的HDR进行点突变需要导入DNA修复模板且效率低下, 而以CBE和ABE为代表的碱基编辑器可在不切割DNA双链的情况下将目标DNA的单个核苷酸精确突变为其他核苷酸, 实现碱基的替换(transition)或颠换(transversion). 2017年, 松阳洲教授和黄军就教授团队^[17]开发了CBE高保真变体HF2-BE2(在dCas9引入N497A/R661A/Q695A/Q926A/D1135E五个点突变), 并在小鼠胚胎中测试了其编辑效率, 发现其能够在小鼠胚胎和F0代小鼠中实现高效的C→T碱基编辑. 与最常用的CBE(BE3)不同

的是, 该团队所构建的HF2-BE2可在两条同源染色体上高效介导C→T编辑, 获得F0小鼠点突变疾病模型. 文章发表后被*Protein & Cell*杂志亮点推荐^[18]并入选科睿唯安ESI高被引论文. 此外, 该团队还合作利用ABE系统在小鼠中靶向目标基因mRNA的剪接位点, 通过突变mRNA剪接所必需的5' GT或3' AG序列而造成靶基因的mRNA剪接错误, 进而导致基因失活. 这种策略被称为AI-MAST(ABE-induced mRNA splicing defect). 利用AI-MAST策略, 该团队证明了利用ABE系统编辑小鼠胚胎的可行性^[19], 研究再次被*Protein & Cell*杂志亮点推荐^[20]并入选科睿唯安ESI高被引论文. CBE和ABE只能实现12种碱基替换中的4种, 很大程度上限制了碱基编辑器的应用. Keith Joung及Wei Leong Chew等团队^[21,22]分别在人类细胞中建立了介导C→G颠换的CGBE和rAPOBEC-nCas9-rXRCC1(下称CGBE-XRCC1)系统, 从而扩大了碱基编辑系统的应用范围. 黄军就教授团队^[23]通过在小鼠胚胎中引入CGBE和CGBE-XRCC1, 证明这两种碱基编辑器均能在小鼠受精卵的靶基因位点上产生C→G的突变, 但编辑结果也显示CGBE和CGBE-XRCC1会以一定频率诱导包含C→T转换的非目标产物, 表明这两种工具仍有进一步优化的空间.

除了对现有编辑工具的改进和应用, 松阳洲教授团队^[24]还发掘了源自铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)的I-F型Cas蛋白系统, 通过将转录激活域与该Cas蛋白融合获得了新型CRISPRa工具PaeCascade-VPR, 并在人类细胞中实现了高效的靶基因转录激活(图1A). 此外, 发现延长crRNA可以增强该系统的转录激活活性, 并且可以通过使用靶向不同基因的多个crRNA实现多基因同时激活. 该基因激活系统特异性良好, 未检测到脱靶效应. 进一步, 松阳洲教授团队基于生物大分子可在细胞内通过液-液相分离形成区隔化的无膜细胞器而提高生物化学反应效率这一原理^[25], 将不同的相分离蛋白连接到前人开发的CRISPRa系统dCas9-VPR上, 发现该策略能够显著提高CRISPRa系统的转录激活效率(图1B)^[26]. 其中, 融合人类核孔蛋白98(NUP98)的dCas9-VPRN和连接肉瘤融合蛋白(FUS)的dCas9-VPRF表现出较高的转录激活活性. 由于dCas9-VPRF具有基因激活效率高和序列偏好性低的优点, 该CRISPRa工具展现出巨大的应用潜能.

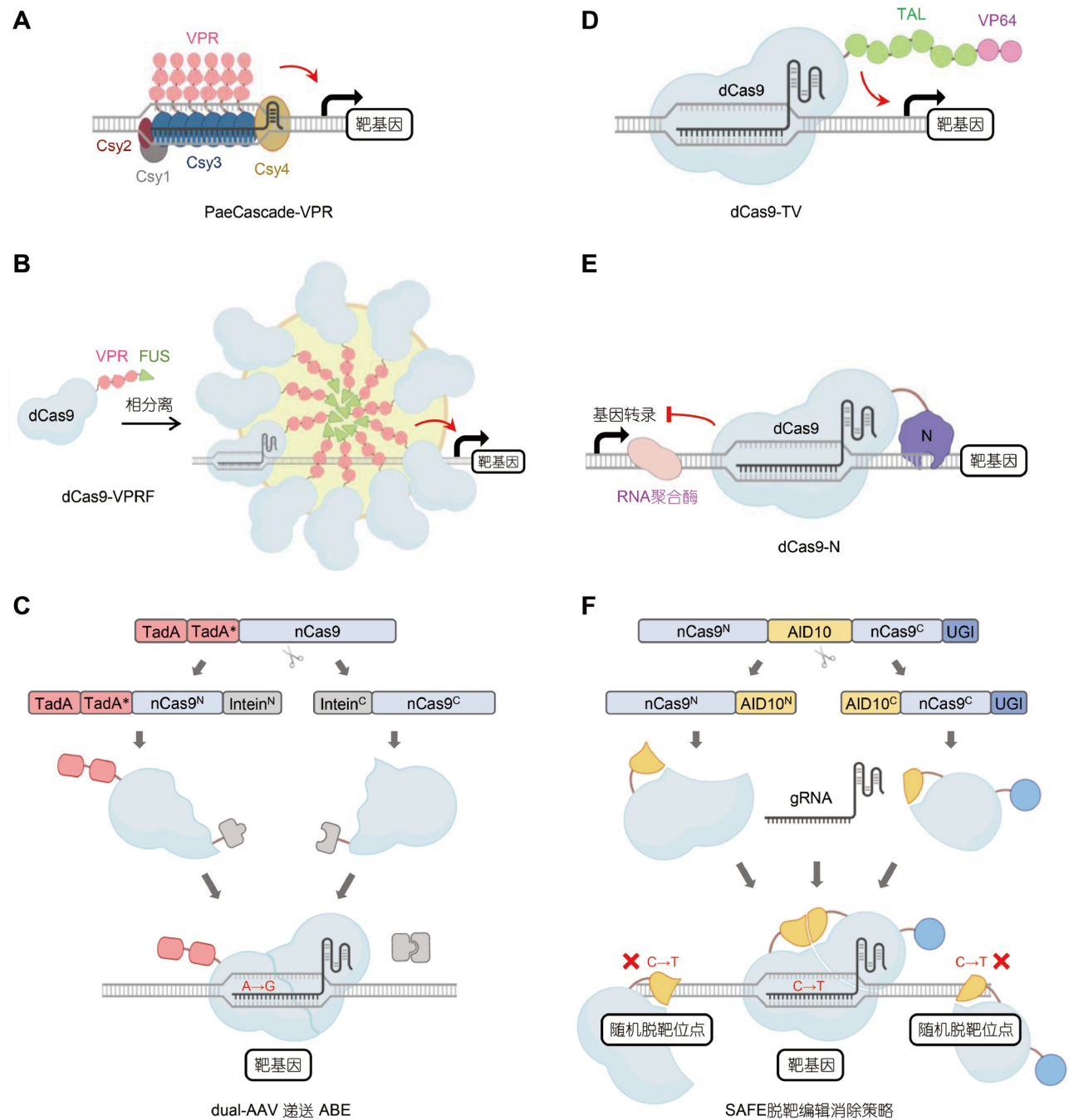


图 1 中山大学生命科学学院CRISPR基因编辑相关领域代表性成果. A: I-F型CRISPRa系统PaeCascade-VPR; B: 基于液-液相分离的CRISPRa系统dCas9-VPRF; C: 利用dual-AAV系统递送ABE; D: 植物CRISPRa工具dCas9-TV; E: 植物CRISPRi工具dCas9-N; F: 碱基编辑器SAFE脱靶编辑消除策略

Figure 1 Representative innovations in CRISPR derived technologies developed by researchers in the School of Life Sciences at Sun Yat-sen University. A: Type I-F CRISPRa system PasCascade-VPR; B: CRISPRa system dCas9-VPRF based on liquid-liquid phase separation; C: ABE delivery by dual-AAV system; D: plant CRISPRa system dCas9-TV; E: plant CRISPRi system dCas9-N; F: SAFE strategy for eliminating off-target edits by base editors

1.2 基因编辑元件递送方法研究

CRISPR基因编辑元件递送至目标细胞的效率直接影响其介导的基因编辑效率。在动物疾病模型制备方面, 黄军就教授团队^[17,19,23]通过显微注射法将编码碱基编辑器的mRNA和靶向目标基因的gRNA共注射到小鼠受精卵中, 成功实现对靶基因的编辑。由于受精卵注射对仪器和操作技术要求高, 因此松阳洲教授和黄军就教授团队^[27]比较了显微注射法和电穿孔法将ABE和gRNA组成的核糖核蛋白复合物(ribonucleoproteins, RNP)递送入小鼠受精卵制备动物模型的效率, 结果表明电穿孔法介导的靶基因A→G编辑效率显著高于显微注射法, 提示受精卵电穿孔法是一种成本低并且能够高效产生基因编辑小鼠模型的递送方法。

随着基因编辑疗法日渐兴起, 腺病毒(adeno-associated virus, AAV)由于其低免疫原性、高效的核酸递送效率以及对不同细胞类型的通用性等优点, 成为基因编辑元件体内递送的重要载体。目前虽然已经开发了多种纳米材料介导的编辑药物递送方法, 但对于神经类疾病、眼科疾病等仍需要通过病毒方式进行靶向递送。然而, AAV载体对外源核酸的运载能力有限, 最大载荷约为4.7 kb, 这极大制约了其对于基因编辑元件的体内递送能力。为此, 黄军就教授团队^[28]开发了双AAV(dual-AAV)递送系统(图1C)。该系统基于被拆分的内含肽所保持的自剪接能力, 通过将拆分成两部分的ABE碱基编辑器与拆分的内含肽两部分分别融合, 再独立包装入两个不同的AAV载体并共递送到体内。内含肽介导的ABE蛋白剪接能够在细胞内恢复完整的ABE并执行编辑功能。通过测试Rma, Npu和Mxe三种内含肽及其不同拆分位点的组合, 该团队鉴定出两种能够高效编辑靶基因的拆分型ABE, 即split-ABE-Rma573和split-ABE-Rma674。随后, 进一步将内含肽介导的Dual-AAV策略应用于PE和CBE, 分别建立了可实现高效基因编辑的split-PE1024及split-BE3-Rma674组合^[29,30]。此外, 克服AAV载荷限制的另一种方法是探索和开发尺寸更小的Cas9同系物。黄军就教授团队^[31,32]成功将序列更短的来自金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)的SaCas9(1053个氨基酸)和来自脑膜炎奈瑟球菌(*Neisseria meningitidis*)的Nme₂Cas9(1082个氨基酸)包装入单个AAV载体中靶向清除致病病毒DNA或内源致病基因, 实现了体内高效的基因编辑, 证明了该策略的可行性。

1.3 脱靶检测

研究显示, Cas9在与gRNA不完全匹配的基因组位点可能会造成gRNA依赖性脱靶编辑^[33]。近年来, 碱基编辑器所包含的脱氨酶被发现在全基因组范围内诱导随机脱氨, 导致gRNA非依赖性脱靶, 这进一步增加了基因编辑领域对碱基编辑器脱靶效应的担忧^[34,35]。因此, 脱靶检测方法对于评估和优化基因编辑工具的安全性具有重要意义。全基因组测序通常是检测基因编辑工具在全基因组范围内脱靶效应的最可靠方法^[34,35]。然而, 为区分基因编辑工具造成的基因组脱靶编辑和基因编辑个体自发的单核苷酸变异, 需要对大量的基因编辑个体进行全基因组测序, 由此带来高昂的测序和数据分析成本。为简化脱靶检测, 松阳洲和黄军就教授团队^[36]开发了国际首个用于系统评估ABE全基因组脱靶效应的EndoV-seq方法。该方法基于ABE包含的腺苷脱氨酶会在脱靶位点造成A→I(inosine, 肌昔)的突变, 从而利用核酸内切酶Endonuclease V(EndoV)在体外对含有肌昔的DNA单链进行切割, 随后再通过基因组测序来反映ABE的脱靶编辑情况。结果显示, ABE在每个基因组平均有8个脱靶编辑, 显著少于Cas9的平均160.7个。该方法发表于*Nature Communications*杂志, 并入选科睿唯安ESI高被引论文, 比韩国首尔国立大学Jin-Soo Kim团队发表于*Nature Biotechnology*的用于ABE脱靶检测的Digenome-seq方法^[37]更早。此外, 贺雄雷教授和李剑峰教授团队^[38]则以酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)为编辑对象开发了一种高灵敏度基因组脱靶编辑的检测方法, 称为EASY(haplotype sequencing of a single yeast cell)法。因为酵母基因组非常小(约12 M), 而且靶基因被成功编辑的酵母克隆能够通过菌落颜色进行可视化选择, 研究者仅需较低的测序成本即可对数以百计的基因编辑酵母克隆进行深度全基因组测序。因此, EASY法既能有效排除酵母克隆之间的单核苷酸变异, 又能提高脱靶编辑检测的灵敏度。

2 动物模型构建

2.1 小鼠模型

小鼠作为模式生物, 具有繁殖快、成本低等优点, 是最广泛用于生成疾病模型的模式动物。松阳洲和黄

军就教授团队建立了中山大学首个基因编辑动物平台, 并成为国内最早把SaCas9, CBE, ABE, CGBE等基因编辑工具应用到动物疾病模型创制的团队之一。他们先后利用SaCas9高效获得*Slx2*, *Tyr*敲除小鼠模型以及Flag-*H1c*的敲入小鼠模型^[39], 利用高保真CBE变体HF2-BE2编辑小鼠胚胎, 成功获得*Tyr*基因发生突变的F0代小鼠^[17]。利用前述的AI-MAST策略, 该团队又使用ABE碱基编辑器编辑小鼠胚胎, 获得了*Tyr*^{E219X/E219X}和杜氏肌肉营养不良(Duchenne muscular dystrophy, DMD)两种小鼠疾病模型^[19]。进一步, 该团队还使用CGBE碱基编辑器编辑小鼠受精卵, 并通过胚胎移植获得了具有预期基因型*Rad50*^{S369X/+}的F0代小鼠。此外, 黄军就和松阳洲教授团队^[40-42]还利用CRISPR/Cas9构建了*Gykl*^{-/-}, *Gk2*^{-/-}, *Pdcl2*^{-/-}和*USSP1*^{-/-}等小鼠突变体, 为研究精子功能障碍提供了良好的模型。

2.2 大动物模型

在重大疾病的研究上, 疾病模型小鼠与患者之间存在较大的疾病表型和生理差异。相比之下, 大动物模型可以更准确地模拟人的疾病特征。 β -地中海贫血症是一种由*HBB*基因突变引起的严重遗传病, 我国南方人群中 β -地中海贫血致病基因的携带率约为4.7%^[43]。鉴于人类和小鼠珠蛋白的类型和表达模式存在差异, 需要一种合适的非人灵长类动物模型来推动人类 β -地中海贫血症的研究和治疗。2019年, 黄军就教授团队与合作者^[44]构建了国际上首个*HBB*缺陷的 β -地中海贫血症食蟹猴(*Macaca fascicularis*)模型。通过向受精卵注射3种gRNA与Cas9组成的RNP后将胚胎移植到假孕母体中, 该团队获得1只*HBB*位点具有217 bp缺失的新生猴。长期观察发现, 与野生型相比, 该模型猴血红蛋白、红细胞等血常规指数降低, 与人类患者的贫血表型一致。该猴在6月龄出现明显的脾肿大, 8月龄体重减少, 活动减少。以上结果均显示*HBB*基因敲除猴具有严重的 β -地中海贫血症表型, 为开展该病的基础研究及开发治疗方法提供了重要的动物模型。

在经济动物研究方面, 陈瑶生教授和何祖勇副教授团队^[45]为研究影响母猪(*Sus scrofa*)繁殖力的因素, 利用CRISPR/Cas9技术构建了*BMP15*基因敲低和双等位基因编辑的猪模型。两种模型猪均表现出生育力降低的表型, 与*BMP15*敲除小鼠的表型明显不同。基于上述模型猪, 该团队解析了*BMP15*基因调控母猪卵泡

发育的分子机制^[46]。在构建大动物模型时, 即使较为精准且高效的碱基编辑也可能导致后代出现嵌合体^[17,19], 需要通过进一步繁殖和筛选来获得非嵌合后代。为优化基因编辑大动物的创制, 黄军就教授和从佩清副教授团队^[47,48]联合开发了一种称为生发囊泡卵母细胞碱基编辑(germinal vesicle oocyte base editing, GVBE)的基因编辑方法。通过显微注射向猪生发囊泡(germinal vesicle, GV)卵母细胞导入编码Cas9或CBE(BE3)的mRNA和靶向X染色体*Dmd*基因的gRNA后, 再对其进行体外受精, 编辑胚胎中可产生比例较高的非嵌合胚胎。该方法不影响卵母细胞的成熟潜力, 是一种有效的一步构建大动物模型的方法。

3 动物基因编辑的应用

3.1 家猪育种

中国土生猪因其优良的品质广受欢迎, 但其产量较低。胰岛素样生长因子IGF2能够通过调节细胞增殖与分化促进骨骼肌生长^[49], 而转录抑制因子ZBED6通过结合猪*IGF2*内含子3的序列, 抑制*IGF2*的转录和肌肉生长。陈瑶生教授和何祖勇副教授团队^[50,51]通过CRISPR/Cas9和CBE两种基因编辑技术破坏了*IGF2*内含子3的ZBED6结合基序, 提升了两广小花猪的瘦肉产量和猪肉品质。此外, 该团队还利用细胞SSA(single-strand annealing)修复途径介导的基因编辑突变体富集报告系统将获得CRISPR/Cas9编辑猪的效率提高了约5倍^[52]。该研究解决了常规育种在追求高瘦肉率育种目标时造成肉质下降的难题, 为地方猪的遗传改良和生产效率提高提供了优秀范例。

毛色是决定家猪品种和商品猪销售价格的重要性状。*KIT*基因通过影响黑色素细胞前体物的迁移和存活决定约克郡猪和长白猪品种的白色被毛^[53]。何祖勇副教授团队^[54]使用CRISPR/Cas9技术删除了约克郡猪肾细胞中*KIT*位点上450 kb的重复拷贝, 并通过体细胞核移植重编程技术获得基因编辑的约克郡猪。有趣的是, 删除该片段并未改变基因编辑猪的白色被毛颜色, 却显著改善约克郡猪的鲜肉颜色, 红细胞数量也显著增加。修复*KIT*结构性变异的基因编辑猪由于肉色性状大幅提升, 并可用于杂交生产黑色优质商品猪, 具有较大的市场应用前景。

动物基因编辑育种相比常规育种, 能够更加高效

快捷地获得抗病新品种. 以猪繁殖与呼吸综合征病毒 (porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV) 为例, 该病的高发病率和高死亡率严重影响养猪业的发展. 猪CD163蛋白是PRRSV感染宿主细胞所必需的膜上受体, 而CD163 SRCR5结构域的缺失可抑制PRRSV对宿主细胞的侵袭. 该团队利用CRISPR/Cas9技术构建了CD163 SRCR5部分缺失的基因编辑猪, 发现这些猪对PRRSV具有完全的抗性^[55]. 该研究为建立商业化的PRRSV抗病猪系奠定了重要基础.

3.2 人胚胎基因编辑

2015年, 黄军就教授团队^[56]首次在临床废弃的人类三原核(tripronuclear, 3PN)胚胎中研究CRISPR/Cas9通过同源重组途径修复 β -地中海贫血症的HBB致病基因突变的有效性和安全性. 研究发现, Cas9的编辑效率为52%(28/54). 在Cas9编辑的胚胎中, 14.3%(4/28)使用了单链DNA寡核苷酸作为模板进行修复, 25%(7/28)使用了同源基因HBD作为修复模板, 表明胚胎中倾向于利用内源性同源序列作为修复模板, 与小鼠胚胎中的发现类似^[57]. 在证明基因编辑技术在人胚胎中的可行性的同时, 该研究也发现CRISPR/Cas9技术可能存在一系列安全性问题, 如脱靶编辑、产生indels等. 该工作被Nature和Science等杂志广泛报道, 并分别在Nature和Science杂志评选的“2015年度十大科学事件”中被提及^[58,59]. 黄军就教授入选Nature杂志评选的“2015年全球年度十大科学人物”^[60], 该工作也促进了第一届国际人类基因组编辑峰会的召开^[61].

β -地中海贫血症的HBB致病基因突变多为点突变. 黄军就教授团队基于在小鼠胚胎中使用单碱基编辑器制备动物模型的研究积累, 2017年又与中山大学孙逸仙纪念医院方建培教授团队合作, 通过碱基编辑获得了-28纯合点突变的患者皮肤成纤维细胞, 证明了CBE可以在细胞水平高效且精准修复单个点突变. 继而与中山大学附属第一医院周灿权教授团队利用临床废弃的卵子结合核移植技术重构了-28纯合点突变的核移植人类胚胎模型, 并在国际上首次应用CBE编辑器BE3和YEE-BE3来纠正HBB-28位点的致病突变. 结果表明, BE3能够在靶位点实现精准的G→A转换, 而编辑窗口更小的YEE-BE3变体在16.7%的修复卵裂球中完成双等位基因的纠正, 并且两种CBE均未发生旁观者编辑(即靶序列中非目标碱基发生编辑)现象^[62].

研究发表后被Nature杂志专题报道^[63]. 该研究证明了碱基编辑系统在人类胚胎中治疗点突变遗传疾病的可行性, 并入选Nature杂志“2017年全球最重要的科学事件盘点”^[64].

3.3 疾病预防与治疗

基因编辑工具可通过对内源基因进行改造实现对基因功能的操控, 为遗传疾病的干预和治疗提供了重要的“手术刀”. 在人类胚胎中进行基因编辑治疗仍存在许多有待解决的困难, 而基因编辑技术用于体细胞治疗重大遗传疾病已成为新的研究热点. 中山大学团队在重大疾病的基因编辑治疗策略研发方面也做出一系列重要工作.

单纯疱疹性角膜炎(herpes simplex keratitis, HSK)由单纯疱疹病毒1型(herpes simplex virus, HSV-1)和2型(HSV-2)感染引起, 是发达国家角膜失明最常见的原因. 该病毒会侵入三叉神经细胞中进行DNA整合, 因此难以通过药物治疗清除^[65]. ICP0和ICP4是参与HSV-1基因表达、病毒复制和再激活的两个重要蛋白. 黄军就和松阳洲教授团队^[66]在Vero细胞中使用SpCas9或SaCas9敲除ICP0和ICP4后, 发现HSV-1的复制被明显抑制. 进一步通过分离小鼠的原代三叉神经细胞进行病毒DNA的靶向清除研究, 发现通过AAV递送靶向ICP4的SaCas9可以显著减少小鼠三叉神经节神经细胞中HSV-1的复制. 该研究为HSK的基因治疗提供了新思路.

转甲状腺素蛋白相关家族性淀粉样变性多发性神经病(transthyretin familial amyloid polyneuropathy, TTR-FAP)是由编码转甲状腺素蛋白的TTR基因致病变异导致的一种罕见的常染色体显性遗传疾病. TTR主要在肝脏合成, 形成四聚体复合物后在血浆和脑脊液中运输甲状腺激素和维生素A^[67,68]. TTR基因的致病突变使其蛋白四聚体的稳定性被破坏, 错误折叠的单体沉积形成淀粉样物质, 并在器官中累积引起心肌病变. 黄军就教授团队^[31]先后尝试在人类hTTR V30M转基因小鼠模型中使用Dual-AAV策略递送SpCas9或单AAV递送Nme₂Cas9两种方法来切割hTTR基因, 从而减少有害TTR蛋白的产生. 结果显示, 单AAV递送Nme₂Cas9效果更为显著, 在小鼠模型中有效降低了hTTR V30M突变基因的表达水平. 该研究为TTR淀粉样变性的基因治疗提供了新的治疗策略.

以脉络膜新生血管(choroidal neovascularization, CNV)为特征的湿性年龄相关性黄斑变性(age-related macular degeneration, AMD)占AMD相关失明症的90%, 是老年人视力丧失的主要原因. HIF-1 α , VEGF和VEGFR2通路的激活是湿性AMD发病的关键因素. 黄军就教授团队^[32]使用单AAV递送Nme₂Cas9分别敲除以上3个关键因子对应的基因后发现, 在新生血管生成阶段尽早干预VEGF可以有效抑制血管生成, 使CNV面积减少49.5%, 而靶向HIF-1 α 和VEGFR2没有明显的治疗效果. 该研究证明了基因编辑疗法治疗湿性AMD的可行性, 具有临床转化的潜能.

脑常染色体显性动脉病变伴皮层下梗死和白质脑病(cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy, CADASIL)是由NOTCH3基因突变引起的常染色体显性遗传病, 目前对CADASIL病理分子机制研究较少, 临床仅有支持性治疗方案. 黄军就教授团队通过患者来源的外周血单核细胞生成NOTCH3 c.1261(C→T)诱导多能干细胞, 并分化为血管平滑肌细胞和血管类器官来模拟CADASIL疾病模型. 随后使用Dual-AAV递送split-ABEmax编辑工具以纠正血管类器官中的NOTCH3突变. 在感染后第30天, 类器官中最高可以观察到13.2%的编辑效率^[69]. 该工作创制的血管类器官为研究CADASIL的致病机制和开发基因疗法提供了一个重要模型.

4 植物CRISPR工具

4.1 植物外源基因转化技术

基因编辑元件的植物细胞高效递送是成功实施植物基因编辑的前提条件. 多种外源基因递送方法的开发和完善, 为CRISPR/Cas技术在植物中的广泛应用奠定了基础. 李宝健教授自20世纪80年代起已围绕“如何将外源基因导入植物基因组”这一关键技术难题取得一系列原创性突破. 1985年, 李宝健教授与合作者首次通过电转化法将外源基因成功整合入植物原生质体细胞的基因组并进行了稳定表达^[70]. 随后, 李宝健教授团队研制了新一代的电转化仪“HPES-3”, 并获得国家专利授权(专利号: CN91105038.8). 在此基础上, 利用该仪器将外源基因导入多种植物细胞并成功再生获得转基因植物^[71~74]. 例如, 该团队于1991年在国内外首

次通过电转化法获得转基因籼稻植株^[71].

目前植物中最常用的基因编辑元件递送方法是利用农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)将基因编辑工具以T-DNA(transferred DNA)的形式整合至植物基因组. 然而, 过去学术界曾认为农杆菌介导的基因转化法只适用于双子叶植物, 而无法用于水稻等单子叶植物. 李宝健教授团队于20世纪80年代中期开始研究农杆菌与单子叶植物的相互作用. 经过多年研究, 他们发现单子叶植物的伤流液中缺少双子叶植物伤流液所含有的复合酚类化合物, 而这类化合物可以诱导农杆菌Ti质粒*Vir*区基因的表达. 在此基础上, 利用上述复合酚类化合物预处理农杆菌, 然后再与水稻细胞在一定条件下共培养, 成功实现了农杆菌介导的水稻遗传转化. 1989年, 该团队首次利用农杆菌转化法将外源基因导入籼稻细胞, 使外源基因得到整合和表达^[75,76]. 随后于1993年利用大体相同的原理和技术, 首次利用农杆菌将外源基因导入小麦(*Triticum aestivum*)^[77]. 1994年, 日本科学家Hiei等人^[78]申请了一项利用农杆菌进行水稻转基因操作的国际专利, 并报道了相关方法和研究成果. 以李宝健教授为首的中国科学家对日本科学家的这项专利提出了质疑^[79], 为我国维护了一项关键性的知识产权. 此外, 李宝健教授与合作者^[80]还通过测试不同的大豆(*Glycine max*)品种、取材部位和培养条件, 成功建立了使大豆体细胞再生为植株的实验体系, 证明了大豆体细胞的全能性, 为日后利用农杆菌进行大豆遗传转化奠定了坚实的基础. 如今基因编辑技术在各种植物中的广泛应用, 离不开李宝健教授团队在植物外源基因转化技术方面的早期探索.

4.2 植物基因敲除与敲低技术

2013年, 在CRISPR/Cas9技术成功实现对人类细胞的基因编辑后不久, 国内外三个研究团队率先利用该技术在植物细胞中实现基因编辑^[81~83]. 这些工作首次证明CRISPR/Cas9技术在植物基因编辑中的可行性, 开启了植物基因编辑的新时代. 其中, 李剑峰教授与合作者^[81]将CRISPR/Cas9导入模式植物拟南芥和烟草(*Nicotiana benthamiana*)的原生质体细胞和叶片中, 成功对单个或多个内源靶基因进行了编辑. 该工作被2020年诺贝尔化学奖官方授奖声明作为CRISPR/Cas技术在真核生物中的代表性应用之一进行了引用

(<https://www.nobelprize.org/uploads/2020/10/advanced-chemistryprize2020.pdf>).

CRISPR/Cas技术介导的基因敲除因其简便性和高效性,已被广泛应用于多种植物的基因功能研究和遗传性状改良。然而,常规的基因编辑突变体筛选需要对大量转基因植株进行靶点的PCR和测序鉴定,筛选工作耗时费力,这一问题在进行多基因同时编辑或编辑效率低下时尤为突出。另一方面,整合入植物基因组的*Cas9*转基因需要从突变体后代中剔除,以便后续回补目的基因进行表型-基因型关联性验证,同时也避免*Cas9*长期存在造成的脱靶风险^[84]。经基因编辑育种获得的农作物新品种在推广应用前,同样也需要排除*Cas9*转基因的存在,以满足相关农业生物安全政策的监管。针对上述两方面的需求,李剑峰教授团队^[85]建立了一种既能富集植物CRISPR多基因突变体,又能快速剔除*Cas9*转基因的方法。该方法利用失活的D-氨基酸氧化酶(DAO)基因作为代理筛选的报告基因,并借助DAO既可解除D-丝氨酸的细胞毒害作用又可将无毒的D-缬氨酸转化成有毒产物这一双重特性。该方法同时表达靶向失活DAO报告基因的单个gRNA和分别靶向不同内源目的基因的多个gRNA,前者介导对失活DAO报告基因的编辑并诱导SSA途径修复DAO基因。在DAO的作用下,基于D-丝氨酸的正向筛选可富集多个目的基因发生共编辑的第一代转基因植株,随后基于D-缬氨酸的反向筛选可从突变体后代中剔除含有*Cas9*和DAO转基因的子代。鉴于D-丝氨酸对多种植物均有毒害作用^[86],该基因编辑双功能筛选系统有望推广至其他植物。

真核基因组中广泛分布着串联排列的同源基因(tandemly arrayed genes, TAGs),这类基因在植物基因组中占比约14%~35%^[87]。由于TAGs存在基因功能冗余,其功能研究往往需要构建多基因突变体,但染色体连锁导致极难通过遗传杂交手段获得高阶突变体。理论上,利用*Cas9*搭配一对gRNA分别靶向TAGs最外侧的两个基因,可将整段携带TAGs的染色体片段删除,从而实现TAGs的功能缺失。李剑峰教授团队^[88]在利用成对的gRNA创制植物TAGs删除突变体时,意外发现很多突变体中一条染色体上的TAGs已被删除,而另一条同源染色体上的TAGs则在两个靶位点之间发生了倒置。这种新型的染色体片段删除(deletion)和倒置(inversion)并存的双等位变异被命名为“delinver突

变”。这种delinver突变极易被传统的基因型鉴定PCR误判为TAGs纯合删除突变,从而容易误导后续的基因功能研究。为解决此问题,该团队提出一套新的基因型鉴定PCR流程,可有效区分纯合删除突变体和delinver突变体。

前述发现提示,基因敲除过程中*Cas9*产生的DSB可能会导致意外的染色体结构变异。因此,开发不依赖于DSB的基因敲除方法能够有效避免染色体异常突变的发生,提高基因编辑的安全性。考虑到碱基编辑器能在不产生DSB的情况下实现精准的碱基替换,李剑峰教授团队^[89]提出一种不依赖DSB的基因失活方法,即利用CBE碱基编辑器突变目的基因内含子剪接位点5' GT或3' AG中的C/G碱基对,从而引起mRNA的错误剪接,造成靶基因的功能失活。利用此策略,该团队在拟南芥和水稻中成功创制了单基因或多基因的剪接位点突变植株。这些植株均无法产生正常的mRNA剪接产物,并表现出相应的基因功能缺失表型,证明了这种基因失活方法的有效性。随后,国外研究团队使用相同策略在人类免疫T细胞中实现了基因失活,并通过微滴式数字PCR等手段证明这些细胞中并未发生染色体易位,而使用CRISPR/Cas9敲除基因的对照组中染色体易位事件发生的频率可高达2.0%^[90]。该研究佐证了利用碱基编辑器诱导靶基因mRNA错误剪接而使靶基因失活的方法具有较好的安全性。

当靶基因是植物生长发育必需的基因时,无论是CRISPR/Cas9介导的基因敲除还是CBE编辑内含子剪接位点诱导的基因失活,都会导致突变植株死亡。为解决基因敲除致死的难题,李剑峰教授团队^[91]提出可利用CBE在蛋白编码基因5'非翻译区(untranslated region, UTR)内突变产生新的ATG,从而通过创造上游开放可读框(upstream open reading frame, uORF)抑制下游主要ORF的蛋白翻译效率,实现程度可控的基因敲低。在拟南芥中,通过CBE在*BAK1*基因的5' UTR内三个不同位点创制ATG,他们发现不同的uORF能够实现从20%~82%不等的基因敲低效率。

李陈龙教授团队^[92]利用CRISPR/Cas9技术删除或修改植物组蛋白H3K27去甲基化酶REF6在内源靶基因中的识别基序CTCTGYTY,发现当这个基序被*Cas9*破坏后,REF6无法再结合到该靶基因上。该研究为验证植物转录因子或表观修饰蛋白所识别的特异DNA基序提供了一种新的研究思路。

4.3 植物基因表达调控工具

在植物中使用的第一代CRISPRa系统dCas9-VP64由dCas9和来自人类疱疹病毒的VP64转录激活域融合而成,但在植物细胞中仅能微弱激活靶基因的表达^[93,94]。李剑峰教授团队^[95]通过设计和筛选多种复合型转录激活域,开发了第二代植物CRISPRa系统dCas9-TV(图1D)。dCas9-TV包含6个拷贝的黄单胞菌(*Xanthomonas oryzae*)TAL转录激活域和2个拷贝的VP64转录激活域,通过gRNA引导dCas9-TV结合至靶基因启动子的转录起始位点上游邻近区域,可以对靶基因的转录进行高效原位激活。该团队证明dCas9-TV可在拟南芥、水稻以及人类HEK293T细胞中高效激活靶基因的表达,其激活效率远超dCas9-VP64。他们还证明,dCas9-TV和gRNA能够以RNP的形式直接转染植物原生质体细胞,从而实现快速、瞬时、不依赖于转基因的靶向基因激活。进一步,该团队利用dCas9-TV在水稻中实现对多个内源基因的同时激活,使植株表现出靶基因超表达表型的堆叠,并证明高水平的基因激活至少可遗传至第三代^[96]。他们对dCas9-TV系统介导的转录激活特征进行了分析,发现dCas9-TV的转录激活效率与靶基因的基础转录水平呈负相关,而转录组测序证明dCas9-TV在全基因组水平具有较好的基因激活特异性^[95]。随后,国内外多个研究团队陆续利用dCas9-TV系统在水稻、小麦、葡萄(*Vitis vinifera*)、棉花(*Gossypium hirsutum*)等作物中成功实现靶基因激活^[97-100],证明了该系统的高效性和通用性。

李剑峰教授团队还与合作者^[101]使用黄瓜(*Cucumis sativus*)组蛋白乙酰转移酶TEN的N结构域和dCas9融合,开发了一种新型的CRISPRi工具dCas9-N/N-dCas9(图1E)。生化数据表明,N结构域具有结合染色质的活性,因而可增强dCas9复合体结合靶位点以及阻遏靶基因转录的能力。他们在黄瓜和拟南芥中靶向具有不同本底表达水平的基因,均可实现有效的转录抑制,抑制效果最高可达97%。通过定量PCR和转录组测序对潜在脱靶基因的表达进行分析,结果未发现明显的脱靶效应,表明该系统在基因表达抑制方面具有很好的特异性。

4.4 植物碱基编辑工具

CRISPR技术衍生的CBE和ABE碱基编辑器能够

在靶序列特定位点高效诱导C→T或A→G的碱基替换,从而可实现基因的功能获得或功能缺失。由于PAM序列和脱氨酶活性窗口位置和窗口宽度的限制,早期使用的CBE(如BE3)在基因组中能够靶向的碱基C数量较为有限。通过使用不同的胞苷脱氨酶,可以使CBE展现出不同的编辑窗口位置和窗口宽度^[102]。为了满足日益多样化的植物碱基编辑需求,李剑峰教授团队基于贺雄雷教授团队开发的高活性人源AID10胞苷脱氨酶^[103]开发了一套植物单碱基编辑工具箱^[91]。他们通过将AID10融合于nCas9(D10A)的氮端、碳端或两端,获得三种编辑活性窗口不同的CBE:氮端融合AID10可产生较宽的、位于PAM远端的编辑窗口,碳端融合AID10则产生较窄的、位于PAM近端的编辑窗口,而两端融合AID10会兼具前两者的编辑活性窗口。利用Cas蛋白变体或同系物nSpCas9-NG, nSaCas9或nSa-Cas9-KKH分别替换最初设计中使用的nSpCas9,可改变上述CBE的PAM序列要求,拓宽其在基因组中可靶向的碱基C范围。进一步,通过在前述CBE中引入腺苷脱氨酶TadA8e又开发了能够在靶序列中同时诱导C→T和A→G突变的双碱基编辑器。该工作为植物碱基编辑提供了多样化的工具选择,拓宽了碱基编辑技术在植物基因功能研究和农作物分子育种中的应用范围。

近年来的研究表明,碱基编辑器中的胞苷或腺苷脱氨酶会在动植物基因组和转录组中造成不可预测的、gRNA非依赖性的DNA/RNA随机脱靶^[34,35,104]。目前解决gRNA非依赖性脱靶的常用方法是通过脱氨酶点突变或额外的调控元件限制脱氨酶的脱靶活性^[105]。然而,点突变策略缺乏通用性,针对特定脱氨酶的点突变未必适用于其他序列不同、类型不同的脱氨酶,而且消除DNA和RNA脱靶的点突变叠加后可能会削弱脱氨酶的中靶编辑效率;引入额外的脱氨酶调控元件则会增加系统的复杂性,也可能降低其通用性。针对碱基编辑器的脱靶问题,李剑峰教授团队提出一种简单普适的脱靶消除方法,即SAFE(split deaminase for safe editing)策略(图1F)。通过把脱氨酶内嵌于nCas9(D10A)内部,再从脱氨酶内部将碱基编辑器拆分为两部分进行表达,即可使nCas9(D10A)和脱氨酶同时处于失活状态,从而防止完整脱氨酶的组成型活性造成gRNA非依赖性脱靶;只有在靶位点处,gRNA作为分子胶才能将拆分的两部分稳定重构为具有完全活性的

碱基编辑器, 从而介导靶位点的编辑^[38]. 随后, 该团队在水稻、拟南芥植株以及人HEK293T细胞、酵母中先后评估了SAFE策略对靶位点的编辑效率和脱靶效应, 证明SAFE策略能够在维持高效靶位点编辑的同时, 大幅减少gRNA非依赖的DNA和RNA随机脱靶编

辑. 意外的是, 该策略还能降低gRNA依赖性脱靶编辑, 并且完全消除CBE造成的indel突变. SAFE策略简单高效, 通用性强, 为提高动植物碱基编辑的安全性提供了全新思路, 在人类疾病治疗和农作物育种中具有广阔的应用前景.

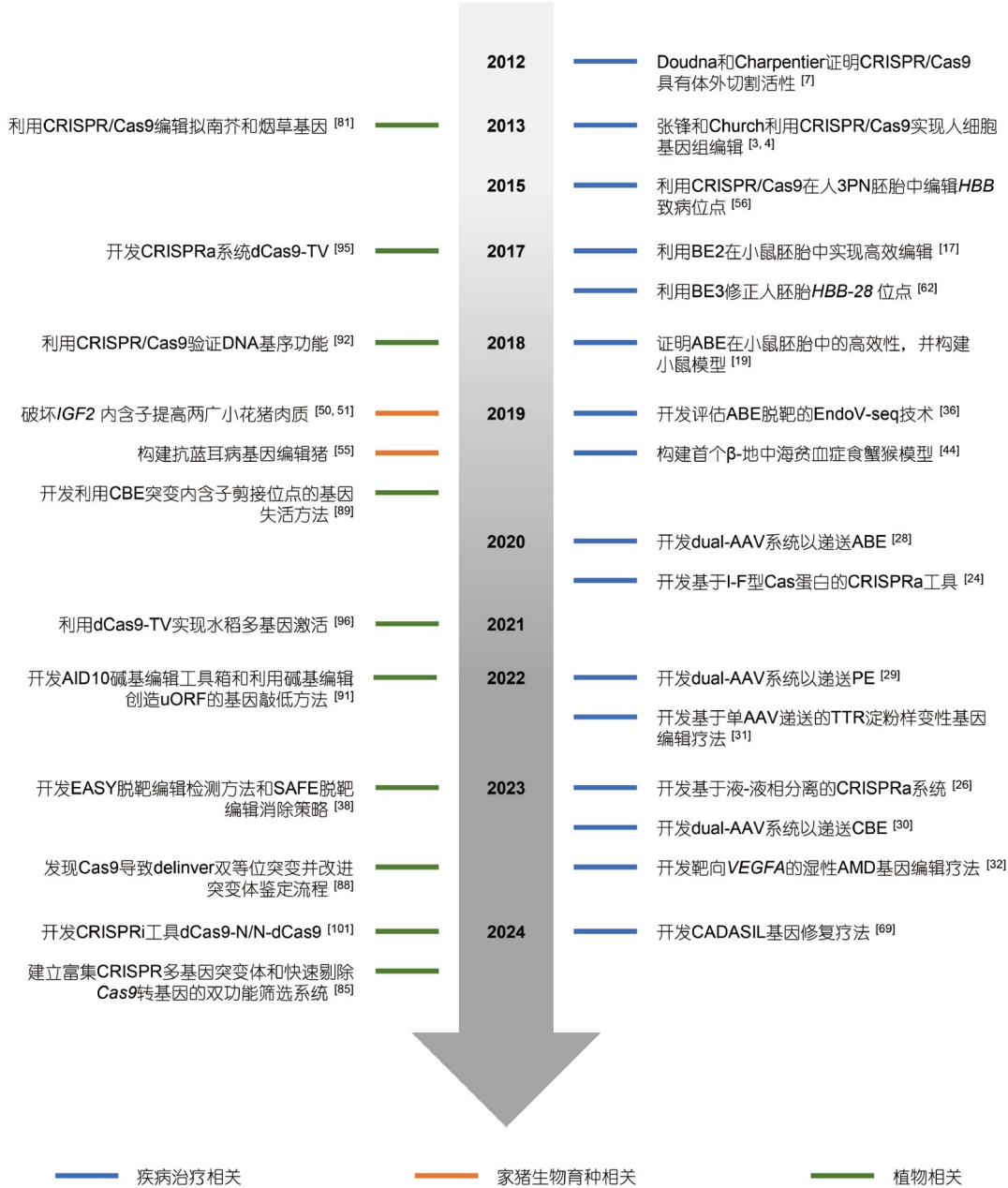


图 2 中山大学生命科学学院CRISPR基因编辑相关领域研究成果汇总(统计截至2024年4月)
Figure 2 Summary of research achievements related to the CRISPR genome editing made by the School of Life Sciences at Sun Yat-sen University (Till April 2024)

5 总结与展望

CRISPR/Cas技术自问世至今虽不过十余年, 但因其设计与操作简便, 且具备强大的多靶点同时编辑能力, 已给人和动植物的基因功能研究带来了颠覆性的影响。例如, 在该技术出现之前, 串联排列的同源基因功能研究一直受到基因功能冗余和遗传连锁这两大难题困扰, 而在其出现后, 只需要利用Cas蛋白搭配一对gRNA对包含串联同源基因的染色体片段进行删除, 即可获得高阶突变体用于功能研究。然而, CRISPR/Cas技术也并非完美无缺。比如, 它无法用于编辑敲除后会致死的动植物生长发育关键基因, 其脱靶效应以及由Cas蛋白产生的DSB进一步诱发的染色体异常变异也已经受到关注。值得庆幸的是, CRISPR/Cas技术正在不断优化, 同时还衍生出一系列功能各异的靶向基因修饰和操控工具, 如碱基编辑器、引导编辑器、CRISPRa和CRISPRi技术等。这些技术的发展极大推动了依赖精准基因操控的生物学基础研究和应用研究, 为人类遗传疾病的治疗以及经济动植物的分子设计育种提供了重要的技术支撑。

我国在基因编辑研究领域整体处于国际领先地位, 取得了诸多原创性成果。中山大学生命科学学院在

李宝健教授等老一辈遗传学家“勇于探索、敢于创新”的精神激励下, 以哺乳动物和人类细胞以及家猪、拟南芥、水稻等动植物为研究对象, 针对基因敲除、单碱基编辑和CRISPRa等关键核心技术进行了系统优化和创新, 并积极开展人胚胎基因编辑、疾病治疗和家猪育种方面的应用(图2)。这些成果正是我国基因编辑领域蓬勃发展和创新的一个生动写照。面向未来, 我们仍需在多个方面持续努力, 包括: 在基因编辑底层技术方面仍需进一步加强创新, 如利用新兴的人工智能和机器学习^[106]发掘和创制新型基因编辑工具; 基因编辑的一些关键技术瓶颈亟需打破, 如CRISPR/Cas技术无法用于线粒体等细胞器基因组编辑以及引导编辑技术在双子叶植物中的工作效率低下; 动植物中优化基因编辑工具的创新性思路需要相互借鉴, 加强交叉; 需要大力推进CRISPR/Cas技术在农业有害生物绿色防控上的应用^[107], 加强基于CRISPR/Cas系统的生物传感器的研发以及在人和动植物病原微生物核酸检测方面的应用^[108]。总之, 要紧密围绕国家在“生命健康”和“种业安全”两大领域的重大需求, 积极尝试将CRISPR及其衍生技术应用于疾病治疗和种质创新, 创造出更多既有重大科学价值又有巨大现实意义的原创性成果。

参考文献

- 1 Bibikova M, Beumer K, Trautman J K, et al. Enhancing gene targeting with designed zinc finger nucleases. *Science*, 2003, 300: 764
- 2 Miller J C, Tan S, Qiao G, et al. A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. *Nat Biotechnol*, 2011, 29: 143–148
- 3 Cong L, Ran F A, Cox D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 2013, 339: 819–823
- 4 Mali P, Yang L, Esvelt K M, et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*, 2013, 339: 823–826
- 5 Doudna J A, Charpentier E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, 2014, 346: 1258096
- 6 Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*, 2007, 315: 1709–1712
- 7 Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 2012, 337: 816–821
- 8 Hsu P D, Scott D A, Weinstein J A, et al. DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nat Biotechnol*, 2013, 31: 827–832
- 9 Adli M. The CRISPR tool kit for genome editing and beyond. *Nat Commun*, 2018, 9: 1911
- 10 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. *Nature*, 2016, 533: 420–424
- 11 Nishida K, Arazoe T, Yachie N, et al. Targeted nucleotide editing using hybrid prokaryotic and vertebrate adaptive immune systems. *Science*, 2016, 353: aaf8729
- 12 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. *Nature*, 2017, 551: 464–471
- 13 Anzalone A V, Randolph P B, Davis J R, et al. Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA. *Nature*, 2019, 576: 149–157

- 14 Gilbert L A, Larson M H, Morsut L, et al. CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes. *Cell*, 2013, 154: 442–451
- 15 Pacesa M, Pelea O, Jinek M. Past, present, and future of CRISPR genome editing technologies. *Cell*, 2024, 187: 1076–1100
- 16 Landrum M J, Lee J M, Benson M, et al. ClinVar: public archive of interpretations of clinically relevant variants. *Nucleic Acids Res*, 2016, 44: D862–D868
- 17 Liang P, Sun H, Sun Y, et al. Effective gene editing by high-fidelity base editor 2 in mouse zygotes. *Protein Cell*, 2017, 8: 601–611
- 18 Wang H. Editing base in mouse model. *Protein Cell*, 2017, 8: 558–559
- 19 Liang P, Sun H, Zhang X, et al. Effective and precise adenine base editing in mouse zygotes. *Protein Cell*, 2018, 9: 808–813
- 20 Ren R, Belmonte J C I, Liu G H. Adenine base editing to mimic or correct disease mutations in rodents. *Protein Cell*, 2018, 9: 752–753
- 21 Kurt I C, Zhou R, Iyer S, et al. CRISPR C-to-G base editors for inducing targeted DNA transversions in human cells. *Nat Biotechnol*, 2021, 39: 41–46
- 22 Chen L, Park J E, Paa P, et al. Programmable C:G to G:C genome editing with CRISPR-Cas9-directed base excision repair proteins. *Nat Commun*, 2021, 12: 1384
- 23 Cao T, Liu S, Qiu Y, et al. Generation of C-to-G transversion in mouse embryos via CG editors. *Transgenic Res*, 2022, 31: 445–455
- 24 Chen Y, Liu J, Zhi S, et al. Repurposing type I-F CRISPR-Cas system as a transcriptional activation tool in human cells. *Nat Commun*, 2020, 11: 3136
- 25 Wang B, Zhang L, Dai T, et al. Liquid-liquid phase separation in human health and diseases. *Sig Transduct Target Ther*, 2021, 6: 290
- 26 Liu J, Chen Y, Nong B, et al. CRISPR-assisted transcription activation by phase-separation proteins. *Protein Cell*, 2023, 14: 874–887
- 27 Sun H, Zhi S, Wu G, et al. Cost-effective generation of A-to-G mutant mice by zygote electroporation of adenine base editor ribonucleoproteins. *J Genet Genomics*, 2020, 47: 337–340
- 28 Chen Y, Zhi S, Liu W, et al. Development of highly efficient dual-AAV split adenosine base editor for *in vivo* gene therapy. *Small Methods*, 2020, 4: 2000309
- 29 Zhi S, Chen Y, Wu G, et al. Dual-AAV delivering split prime editor system for *in vivo* genome editing. *Mol Ther*, 2022, 30: 283–294
- 30 Liu Q, Chen Y, Hu S, et al. Screening an effective dual-adeno-associated virus split-cytosine base editor system for C-to-T conversion *in vivo*. *Hum Gene Ther*, 2023, 34: 629–638
- 31 Wen J, Cao T, Wu J, et al. Single AAV-mediated CRISPR-Nme₂Cas9 efficiently reduces mutant *hTTR* expression in a transgenic mouse model of transthyretin amyloidosis. *Mol Ther*, 2022, 30: 164–174
- 32 Hu S, Chen Y, Xie D, et al. Nme₂Cas9-mediated therapeutic editing in inhibiting angiogenesis after wet age-related macular degeneration onset. *Clin Transl Med*, 2023, 13: e1383
- 33 Fu Y, Foden J A, Khayter C, et al. High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. *Nat Biotechnol*, 2013, 31: 822–826
- 34 Zuo E, Sun Y, Wei W, et al. Cytosine base editor generates substantial off-target single-nucleotide variants in mouse embryos. *Science*, 2019, 364: 289–292
- 35 Jin S, Zong Y, Gao Q, et al. Cytosine, but not adenine, base editors induce genome-wide off-target mutations in rice. *Science*, 2019, 364: 292–295
- 36 Liang P, Xie X, Zhi S, et al. Genome-wide profiling of adenine base editor specificity by EndoV-seq. *Nat Commun*, 2019, 10: 67
- 37 Kim D, Kim D, Lee G, et al. Genome-wide target specificity of CRISPR RNA-guided adenine base editors. *Nat Biotechnol*, 2019, 37: 430–435
- 38 Xiong X, Liu K, Li Z, et al. Split complementation of base editors to minimize off-target edits. *Nat Plants*, 2023, 9: 1832–1847
- 39 Zhang X, Liang P, Ding C, et al. Efficient Production of Gene-Modified Mice using *Staphylococcus aureus* Cas9. *Sci Rep*, 2016, 6: 32565
- 40 Chen Y, Liang P, Huang Y, et al. Glycerol kinase-like proteins cooperate with Pld6 in regulating sperm mitochondrial sheath formation and male fertility. *Cell Discov*, 2017, 3: 17030
- 41 Li M, Chen Y, Ou J, et al. PDCL2 is essential for spermiogenesis and male fertility in mice. *Cell Death Discov*, 2022, 8: 419
- 42 Lin Z, Liang P, Yao Z, et al. A novel undifferentiated spermatogonia-specific surface protein 1 (USSP1) in neonatal mice. *Sci Bull*, 2019, 64: 524–533
- 43 Shang X, Peng Z, Ye Y, et al. Rapid targeted next-generation sequencing platform for molecular screening and clinical genotyping in subjects with hemoglobinopathies. *Ebiomedicine*, 2017, 23: 150–159

- 44 Huang Y, Ding C, Liang P, et al. *HBB*-deficient *Macaca fascicularis* monkey presents with human β -thalassemia. *Protein Cell*, 2019, 10: 538–542
- 45 Qin Y, Tang T, Li W, et al. Bone morphogenetic protein 15 knockdown inhibits porcine ovarian follicular development and ovulation. *Front Cell Dev Biol*, 2019, 7: 286
- 46 Jiao Y, Jiang T, Lin Q, et al. Molecular characterization of the follicular development of BMP15-edited pigs. *Reproduction*, 2023, 166: 247–261
- 47 Su X, Chen W, Cai Q, et al. Effective generation of maternal genome point mutated porcine embryos by injection of cytosine base editor into germinal vesicle oocytes. *Sci China Life Sci*, 2020, 63: 996–1005
- 48 Su X, Chen W, Cai Q, et al. Production of non-mosaic genome edited porcine embryos by injection of CRISPR/Cas9 into germinal vesicle oocytes. *J Genet Genomics*, 2019, 46: 335–342
- 49 Florini J R, Ewton D Z, Coolican S A. Growth hormone and the insulin-like growth factor system in myogenesis. *Endocrine Rev*, 1996, 17: 481–517
- 50 Liu X, Liu H, Wang M, et al. Disruption of the ZBED6 binding site in intron 3 of *IGF2* by CRISPR/Cas9 leads to enhanced muscle development in Liang Guang Small Spotted pigs. *Transgenic Res*, 2019, 28: 141–150
- 51 Duo T, Liu X, Mo D, et al. Single-base editing in *IGF2* improves meat production and intramuscular fat deposition in Liang Guang Small Spotted pigs. *J Anim Sci Biotechnol*, 2023, 14: 141
- 52 Wu J Q, Mei G, Liu Z G, et al. Improving gene targeting efficiency on pig *IGF2* mediated by ZFNs and CRISPR/Cas9 by using SSA reporter system (in Chinese). *Hereditas*, 2015, 37: 55–62 [吴金青, 梅瑰, 刘志国, 等. 应用SSA报告载体提高ZFN和CRISPR/Cas9对猪IGF2基因的打靶效率. *遗传*, 2015, 37: 55–62]
- 53 Chabot B, Stephenson D A, Chapman V M, et al. The proto-oncogene *c-kit* encoding a transmembrane tyrosine kinase receptor maps to the mouse *W* locus. *Nature*, 1988, 335: 88–89
- 54 Liang X, Lan J, Xu M, et al. Impact of *KIT* editing on coat pigmentation and fresh meat color in yorkshire pigs. *CRISPR J*, 2022, 5: 825–842
- 55 Guo C, Wang M, Zhu Z, et al. Highly efficient generation of pigs harboring a partial deletion of the CD163 SRCR5 domain, which are fully resistant to porcine reproductive and respiratory syndrome virus 2 infection. *Front Immunol*, 2019, 10: 1846
- 56 Liang P, Xu Y, Zhang X, et al. CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human triprenuclear zygotes. *Protein Cell*, 2015, 6: 363–372
- 57 Wu Y, Liang D, Wang Y, et al. Correction of a genetic disease in mouse via use of CRISPR-Cas9. *Cell Stem Cell*, 2013, 13: 659–662
- 58 Travis J. Making the cut. *Science*, 2015, 350: 1456–1457
- 59 Baker M, Callaway E, Castelvocchi D, et al. 365 days: the science events that shaped 2015. *Nature*, 2015, 528: 448–451
- 60 365 days: *Nature's* 10. *Nature*, 2015, 528: 459–467
- 61 Reardon S. Global summit reveals divergent views on human gene editing. *Nature*, 2015, 528: 173
- 62 Liang P, Ding C, Sun H, et al. Correction of β -thalassemia mutant by base editor in human embryos. *Protein Cell*, 2017, 8: 811–822
- 63 Cyranoski D. Chinese scientists fix genetic disorder in cloned human embryos. *Nature*, 2017, 550: 15–16
- 64 Callaway E, Castelvocchi D, Cyranoski D, et al. 2017 in news: the science events that shaped the year. *Nature*, 2017, 552: 304–307
- 65 Farooq A V, Shukla D. Herpes simplex epithelial and stromal keratitis: an epidemiologic update. *Surv Ophthalmol*, 2012, 57: 448–462
- 66 Chen Y, Zhi S, Liang P, et al. Single AAV-mediated CRISPR-SaCas9 inhibits HSV-1 replication by editing *ICP4* in trigeminal ganglion neurons. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 2020, 18: 33–43
- 67 Rapezzi C, Quarta C C, Riva L, et al. Transthyretin-related amyloidoses and the heart: a clinical overview. *Nat Rev Cardiol*, 2010, 7: 398–408
- 68 Vieira M, Saraiva M J. Transthyretin: a multifaceted protein. *Biomol Concepts*, 2014, 5: 45–54
- 69 Wang J, Zhang L, Wu G, et al. Correction of a CADASIL point mutation using adenine base editors in hiPSCs and blood vessel organoids. *J Genet Genomics*, 2024, 51: 197–207
- 70 Langridge W H R, Li B J, Szalay A A. Electric field mediated stable transformation of carrot protoplasts with naked DNA. *Plant Cell Rep*, 1985, 4: 355–359
- 71 Li B J, Xu X P, Shi H P, et al. Introduction of foreign genes into the seed embryo cells of rice by electroinjection and the regeneration of transgenic rice plants. *Sci China (Sci Sin)*, 1991, 34: 923–931
- 72 Xu X, Li B. Fertile transgenic Indica rice plants obtained by electroporation of the seed embryo cells. *Plant Cell Rep*, 1994, 13: 237–242
- 73 Ke X Y, Zhang X W, Shi H P, et al. Electroporation of immature maize zygotic embryos and regeneration of transgenic plants. *Transgenic Res*, 1996, 5: 219–221

- 74 Ke X Y, Huang Y, Shi H P, et al. A study on gene transformation of immature wheat embryos by electroporation (in Chinese). *J Wuhan Bot Res*, 1997, 15: 103–107 [柯遐义, 黄粤, 石和平, 等. 利用电激法转化小麦幼胚的研究. *武汉植物学研究*, 1997, 15: 103–107]
- 75 Li B J, Ouyang X Z, Xu Y. Studies on the introduction of the foreign genes harboured by *Agrobacterium* Ti plasmid into cultured rice cells (in Chinese). *Acta Sci Nat Univ Sunyatseni*, 1989, 8: 40–47 (suppl) [李宝健, 欧阳学智, 许耀. 将农杆菌Ti质粒携带的外源基因转入水稻细胞. *中山大学学报论丛*, 1989, 8: 40–47]
- 76 Li B J, Ouyang X Z, Xu Y. Studies on introduction of foreign genes into cultured cells of *Oryza sativa* Indica using *Agrobacterium* Ti Plasmid. *Sci China (Sci Sin)*, 1991, 34: 54–61
- 77 Xu Y, Li B, Jia J. A novel system for *Agrobacterium*-mediated transformation of wheat (*Triticum aestivum* L.) cells. *Cell Res*, 1993, 3: 49–60
- 78 Hiei Y, Ohta S, Komari T, et al. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *Plant J*, 1994, 6: 271–282
- 79 Coghlan A. Chinese deal blow to key gene patent. *New Scientist*, 1995, 2008: 3–4
- 80 Li B J, Langridge W H R, Szalay A A. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration in the soybean *Glycine max*. *Plant Cell Rep*, 1985, 4: 344–347
- 81 Li J F, Norville J E, Aach J, et al. Multiplex and homologous recombination-mediated genome editing in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana* using guide RNA and Cas9. *Nat Biotechnol*, 2013, 31: 688–691
- 82 Shan Q, Wang Y, Li J, et al. Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system. *Nat Biotechnol*, 2013, 31: 686–688
- 83 Nekrasov V, Staskawicz B, Weigel D, et al. Targeted mutagenesis in the model plant *Nicotiana benthamiana* using Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nat Biotechnol*, 2013, 31: 691–693
- 84 Zhang Q, Xing H L, Wang Z P, et al. Potential high-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR/Cas9 in *Arabidopsis* and its prevention. *Plant Mol Biol*, 2018, 96: 445–456
- 85 Wang F Z, Bao Y, Li Z, et al. A dual-function selection system enables positive selection of multigene CRISPR mutants and negative selection of Cas9-free progeny in *Arabidopsis*. *aBIOTECH*, 2024, 5: 140–150
- 86 Erikson O, Hertzberg M, Näsholm T. A conditional marker gene allowing both positive and negative selection in plants. *Nat Biotechnol*, 2004, 22: 455–458
- 87 Rizzon C, Ponger L, Gaut B S. Striking similarities in the genomic distribution of tandemly arrayed genes in *Arabidopsis* and rice. *PLoS Comput Biol*, 2006, 2: e115
- 88 Liu J, Wang F Z, Li C, et al. Hidden prevalence of deletion-inversion bi-alleles in CRISPR-mediated deletions of tandemly arrayed genes in plants. *Nat Commun*, 2023, 14: 6787
- 89 Li Z, Xiong X, Wang F, et al. Gene disruption through base editing-induced messenger RNA missplicing in plants. *New Phytol*, 2019, 222: 1139–1148
- 90 Webber B R, Lonetree C, Kluesner M G, et al. Highly efficient multiplex human T cell engineering without double-strand breaks using Cas9 base editors. *Nat Commun*, 2019, 10: 5222
- 91 Xiong X, Li Z, Liang J, et al. A cytosine base editor toolkit with varying activity windows and target scopes for versatile gene manipulation in plants. *Nucleic Acids Res*, 2022, 50: 3565–3580
- 92 Li C, Chen C, Chen H, et al. Verification of DNA motifs in *Arabidopsis* using CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis. *Plant Biotechnol J*, 2018, 16: 1446–1451
- 93 Lowder L G, Zhang D, Baltes N J, et al. A CRISPR/Cas9 toolbox for multiplexed plant genome editing and transcriptional regulation. *Plant Physiol*, 2015, 169: 971–985
- 94 Vazquez-Vilar M, Bernabé-Orts J M, Fernandez-del-Carmen A, et al. A modular toolbox for gRNA-Cas9 genome engineering in plants based on the GoldenBraid standard. *Plant Methods*, 2016, 12: 10
- 95 Li Z, Zhang D, Xiong X, et al. A potent Cas9-derived gene activator for plant and mammalian cells. *Nat Plants*, 2017, 3: 930–936
- 96 Xiong X, Liang J, Li Z, et al. Multiplex and optimization of dCas9-TV-mediated gene activation in plants. *J Integr Plant Biol*, 2021, 63: 634–645
- 97 Gong X, Zhang T, Xing J, et al. Positional effects on efficiency of CRISPR/Cas9-based transcriptional activation in rice plants. *aBIOTECH*, 2020, 1: 1–5
- 98 Zhou H, Xu L, Li F, et al. Transcriptional regulation by CRISPR/dCas9 in common wheat. *Gene*, 2022, 807: 145919
- 99 Ren C, Li H, Liu Y, et al. Highly efficient activation of endogenous gene in grape using CRISPR/dCas9-based transcriptional activators. *Hortic*

- Res, 2022, 9: uhab037
- 100 Yu L, Li Z, Ding X, et al. Developing an efficient CRISPR-dCas9-TV-derived transcriptional activation system to create three novel cotton germplasm materials. *Plant Commun*, 2023, 4: 100600
- 101 Wang B, Liu X, Li Z, et al. A nuclease-dead Cas9-derived tool represses target gene expression. *Plant Physiol*, 2024, 195: 1880–1892
- 102 Anzalone A V, Koblan L W, Liu D R. Genome editing with CRISPR-Cas nucleases, base editors, transposases and prime editors. *Nat Biotechnol*, 2020, 38: 824–844
- 103 Liu K, Deng S, Ye C, et al. Mapping single-cell-resolution cell phylogeny reveals cell population dynamics during organ development. *Nat Methods*, 2021, 18: 1506–1514
- 104 Grünewald J, Zhou R, Garcia S P, et al. Transcriptome-wide off-target RNA editing induced by CRISPR-guided DNA base editors. *Nature*, 2019, 569: 433–437
- 105 Tao J, Bauer D E, Chiarle R. Assessing and advancing the safety of CRISPR-Cas tools: from DNA to RNA editing. *Nat Commun*, 2023, 14: 212
- 106 Zhou Z, Yan C, Zhang C Y. Artificial intelligence biology—biology V3.0 (in Chinese). *Sci Sin Vitae*, 2022, 52: 291–300 [周桢, 闫超, 张辰宇. 人工智能生物学——生物学3.0. 中国科学: 生命科学, 2022, 52: 291–300]
- 107 Yuan Z L, Ye W W, Hou Y P, et al. Current situation and the development of green pesticides in China (in Chinese). *Sci Sin Vitae*, 2023, 53: 1643–1662 [袁治理, 叶文武, 侯毅平, 等. 我国绿色农药研究现状及发展建议. 中国科学: 生命科学, 2023, 53: 1643–1662]
- 108 Zhao Z Y, Peng J P. Research progress of CRISPR/Cas systems in nucleic acid detection (in Chinese). *Sci Sin Vitae*, 2023, 53: 1101–1119 [赵子渊, 彭俊平. CRISPR/Cas核酸检测技术的研究进展. 中国科学: 生命科学, 2023, 53: 1101–1119]

Progress in developing and implementing CRISPR technologies made by Sun Yat-sen University

LI ZhenXiang, ZHOU YiTong, HUANG JunJiu & LI JianFeng

School of Life Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China

doi: [10.1360/SSV-2024-0145](https://doi.org/10.1360/SSV-2024-0145)