



通过引入逆转录酶Tf1结合高温处理建立新型水稻引导编辑系统

侯兵兵^{1,2}, 陈俐克², 鲁宏伟², 刘小双¹, 王克剑^{2,3}, 王春², 魏鹏程¹, 邹金鹏^{2*}

1. 安徽农业大学农学院, 合肥 230031

2. 中国水稻研究所, 水稻生物育种全国重点实验室, 中国农业科学院, 杭州 310006

3. 农业农村部基因编辑创新利用重点实验室(海南), 三亚 572025

* 联系人, E-mail: zoujinpeng@caas.cn

2024-07-16 收稿, 2024-09-19 修回, 2024-11-08 接受, 2024-11-11 网络版发表

农业生物育种重大专项(2023ZD04074)和国家自然科学基金(32301803)资助

摘要 逆转录酶作为引导编辑(prime editing, PE)系统不可或缺的效应蛋白组分, 其性能对于PE效率至关重要. 目前, 植物PE系统可用高活力逆转录酶资源相对匮乏, 主要集中在逆转录酶莫洛尼鼠白血病病毒(moloney murine leukemia virus, M-MLV)的优化与利用上. 因此, 挖掘适用于植物的新型逆转录酶对于推动PE系统进化具有重要意义. 本研究在植物高效ePE2系统基础上, 一方面引入了从酵母中挖掘的逆转录酶Tf1(*Schizosaccharomyces pombe* Tf1 retrotransposon), 替换原有的M-MLV(6c策略), 另一方面整合了在哺乳动物细胞中表现优异的nCas9(Cas9 nickase)变体(K775R和K918A)(6e策略), 构建了新型植物PE系统—ePE2-6ce. 研究选取了*OsCDC48*、*OsALS*和*OsROC5*三个不同的编辑位点, 评估了ePE2-6ce系统在抗性愈伤组织和T₀植株中的精准编辑效率. 结果显示, 在抗性愈伤组织中, *OsCDC48*、*OsALS*和*OsROC5*三个位点的编辑效率分别为6.82%、34.55%和23.72%. 在T₀植株中, 这3个位点的编辑效率分别为22.00%、56.52%和58.00%, 以上结果表明ePE2-6ce系统在精准编辑方面的高效性与可靠性. 进一步地, 通过将ePE2-6ce系统与适当的高温处理结合, 构建了ePE2-6ce-H系统, 并测试了*OsROC5*位点的精准编辑效率. 结果显示, 在抗性愈伤组织和T₀植株中, 与ePE2-6ce系统相比, ePE2-6ce-H系统的精准编辑效率分别提升了1.97倍和1.12倍, 表明适当高温处理可进一步提高ePE2-6ce系统的编辑效率. 综上所述, 本研究成功将新型逆转录酶Tf1应用于水稻精准编辑, 为未来植物PE系统中逆转录酶优化与应用提供了基础.

关键词 水稻, 引导编辑, Tf1, 高温处理, 编辑效率

引导编辑(prime editing, PE)系统作为一种最新的精准基因编辑工具, 其独特优势在于能够在不引入DNA双链断裂(DNA double-strand breaks, DSBs)且无需额外DNA供体模板的情况下, 实现对目标位点的任意形式小片段DNA的精准修改^[1,2]. 经典的PE系统由PE效应蛋白和PE向导RNA(PE guide RNA, pegRNA)两部分构成. PE效应蛋白是由Cas9切口酶(Cas9 nick-

ase, nCas9)和逆转录酶莫洛尼鼠白血病病毒(moloney murine leukemia virus reverse transcriptase, M-MLV)组成的融合蛋白. pegRNA则包括靶序列(protospacer)、向导RNA骨架(single guide RNA scaffold, sgRNA scaffold)、引物结合位点(primer binding site, PBS)以及逆转录模板(RT template, RTT)等部分. PE技术的基本原理是, 在pegRNA的引导下, nCas9切口酶会在目标单链

引用格式: 侯兵兵, 陈俐克, 鲁宏伟, 等. 通过引入逆转录酶Tf1结合高温处理建立新型水稻引导编辑系统. 科学通报, 2025, 70: 2558–2569

Hou B B, Chen L K, Lu H W, et al. Establishment of a novel prime editing system by introducing the reverse transcriptase Tf1 combined with high-temperature treatment in rice (in Chinese). Chin Sci Bull, 2025, 70: 2558–2569, doi: [10.1360/TB-2024-0766](https://doi.org/10.1360/TB-2024-0766)

DNA打开切口。随后,在逆转录酶M-MLV的协助下,PBS与目标序列结合并启动逆转录反应,沿着RTT方向将突变信息准确写入基因组。PE系统最早是在哺乳动物细胞中开发的^[1],鉴于其高效和精准特性,Lin等人^[2]率先将PE引入植物,建立了植物PPE2(plant prime editor 2)和PPE3(plant prime editor 3)系统,验证了植物PE系统可以精准引入各种类型的碱基替换以及小片段DNA的插入或缺失,但编辑效率较低。随后,多个研究团队对植物PE系统进行了进一步的优化研究,取得了不同程度的编辑效率提升,为作物育种改良和新种质创制提供了有效的工具^[3-8]。目前,PE系统已广泛应用于多种植物中,包括单子叶植物如水稻、玉米和小麦^[2,3,9]等,以及双子叶植物如番茄、马铃薯和烟草等^[10-12]。

逆转录酶作为PE效应蛋白的核心组成部分,其作用原理是根据未配对的pegRNA序列合成新的DNA序列。随后,通过细胞的DNA修复机制将新合成的DNA整合到目标基因组中,从而实现精准编辑。因此,逆转录酶在PE系统中发挥着至关重要的作用^[1]。目前植物中可用的逆转录酶资源相对匮乏,主要集中在逆转录酶M-MLV上。多项研究已对M-MLV进行了优化,显著提升了植物PE效率。最初,野生型M-MLV介导的PE系统是在哺乳动物细胞中开发的,编辑效率较低。Anzalone等人^[1]利用噬菌体辅助连续进化系统(phage-assisted continuous evolution, PACE)对野生型M-MLV进行定向改造,得到了工程化的M-MLV(D200N/L603W/T330P/T306K/W313F),从而建立了PE2系统,编辑效率得到显著提升。在植物中,多个研究团队^[2,3,7,9,10]跳过野生型M-MLV,直接将工程化的M-MLV引入,建立了植物PE2和PE3系统。Zong等人^[6]和Li等人^[5]对工程化的M-MLV进行进一步优化,去除了M-MLV的RNA核酸酶H(RNase H)结构域,并在M-MLV的N端融合病毒核衣壳蛋白,建立了ePPE和ePE2系统,大幅提高了小麦和水稻中的PE编辑效率。Ni等人^[9]发现了工程化M-MLV的一个新的突变位点V223A,引入该突变建立了ePPEplus系统,使小麦PE编辑效率提高了2.8倍。因此,对M-MLV的优化显著提升了植物PE效率。然而,目前的优化主要集中于逆转录酶M-MLV,亟需挖掘更多适用于植物的逆转录酶,为植物PE系统的开发与应用提供基础。

在自然界中,逆转录酶广泛存在于各种植物、动物细胞以及许多病毒中。曾有研究调查了14个类别的

59种不同的逆转录酶在哺乳动物中的编辑效率,发现其中有20个逆转录酶表现出不同程度的编辑效率,但效率均低于工程化的M-MLV^[13]。其中,表现最优秀且体积相对较小的野生型逆转录酶Tf1也仅接近PE2的编辑效率。通过PACE技术定向进化Tf1,产生了聚合突变,如K118R、I128V、K413E和S492N等,使Tf1与DNA和RNA的结合更紧密;其他突变,如P70T、G72V、M102I、K106R、I128V、L158Q、F269L、A363V、K413E和S492N等,可促进Tf1与pegRNA的相互作用。在综合理性设计和定向进化突变后的Tf1变体基础上发展了PE6c系统,该系统具有较高的碱基替换和小片段插入效率。此外,研究人员还对nCas9进行了同步进化,获得了工程化的nCas9变体(K775R和K918A),构建了PE6e系统,编辑效率提升了1.8倍。目前,挖掘到的新的逆转录酶Tf1以及工程化的nCas9仅在哺乳动物细胞中进行检测,其在植物中的可行性和效率尚未得知。鉴于逆转录酶M-MLV的最适工作温度为42℃,高于水稻愈伤组织转化及植株培养温度。Zou等人^[7]在抗性愈伤组织培养阶段给予适当的42℃高温处理以增强M-MLV的活性,结果发现PE效率得到显著提升。上述Tf1变体是在酵母细胞中挖掘的,在哺乳动物细胞中进行测试的,二者的温度同样高于水稻培养的温度。因此,是否可通过适当的高温处理来增强Tf1的活性,并进一步提升PE效率,目前尚未得知。

综上所述,本研究拟在植物高效ePE2系统的基础上,引入从酵母中挖掘到的逆转录酶Tf1至水稻中,取代原有的逆转录酶M-MLV,并结合工程化的nCas9变体(K775R和K918A),构建植物ePE2-6ce系统。同时,将适当的高温处理与之结合,形成ePE2-6ce-H系统,旨在水稻中建立一个新型植物PE系统。该系统的建立将丰富植物PE系统的逆转录酶资源,为未来植物PE系统进一步优化和利用提供了重要基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 水稻材料

本研究所用材料为水稻(*Oryza sativa* L.)常规粳稻品种中花11号。

1.1.2 菌株

根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)EHA105。大肠杆菌(*Escherichia coli*)Dh5α。

1.1.3 精准编辑信息

在本研究中, 选择了水稻内源基因*OsCDC48*(LOC_Os03g05730)、*OsALS*(LOC_Os02g30630)和*OsROC5*(LOC_Os02g45250)作为靶基因, 设计了3种不同的精准编辑类型. 其中, *OsCDC48*(+5 G-A)代表单碱基替换类型, *OsALS*(+1 A-G, +3 G-T, +4 T-C)代表多碱基替换类型, *OsROC5*(+1-3 insCTT, +3 C-A)代表小片段插入和替换类型(图1).

1.2 方法

1.2.1 骨架载体ePE2-6ce构建

(1) 载体酶切. ePE2-6ce载体是在植物高效ePE2系统的基础上构建的. 将ePE2利用*BsrGI*进行酶切(ePE2/*BsrGI*).

(2) 工程化的nCas9变体(K775R、K918A)扩增. 设计位点特异性突变引物(表1), 以ePE2为模板, *BsrGI*-F/1R-775、2F-775/2R-918和3F-918/3R-Tf1-RT等引物扩增获得nCas9-m1、nCas9-m2、nCas9-m3片段.

(3) 逆转录酶Tf1扩增. 为适合在水稻中表达, 将酵母来源的Tf1 DNA序列经过水稻密码子优化工具(<https://www.vectorbuilder.cn/tool/codon-optimization.html>)进行优化, 送往浙江尚亚生物技术有限公司进行序列合成. 以4F-Tf1-RT/4R-Tf1-RT、5F-Tf1-RT/5R-Tf1-RT、6F-Tf1-RT/*BsrGI*-R等引物(表1)分别扩增得到Tf1-m1、Tf1-m2、Tf1-m3片段.

(4) 终载构建. 将nCas9-m1、nCas9-m2、nCas9-m3、Tf1-m1、Tf1-m2和Tf1-m3等片段通过以同源重

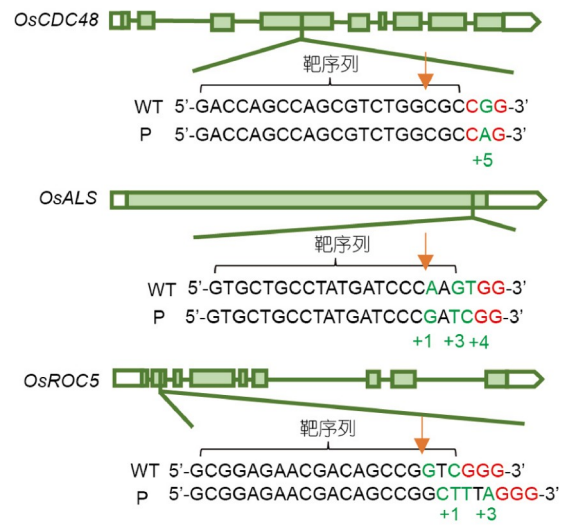


图1 靶基因结构及编辑位置示意图. *OsCDC48*、*OsALS*和*OsROC5*为3个水稻内源基因; 绿色方框代表外显子所在位置; WT代表野生型序列; P代表精准编辑后序列; 橙色箭头代表切割位置; 红色字母代表PAM序列; 绿色字母代表突变信息

Figure 1 The schematic diagram of target gene structure and editing position. *OsCDC48*, *OsALS*, and *OsROC5* are three endogenous genes in rice; green boxes represent the positions of exons; WT represents the wild-type sequence; P represents the precise edited sequence; orange arrows indicate the cleavage sites; red letters represent the PAM sequence; green letters represent the mutation information

组方式连接至ePE2/*BsrGI*酶切载体上, 经过大肠杆菌*Dh5a*遗传转化得到ePE2-6ce载体后经Sanger测序验证载体正确性.

1.2.2 精准编辑载体的构建

(1) pegRNA设计. 根据图1提供的各个位点的精准

表1 ePE2-6ce系统构建引物

Table 1 The primers of ePE2-6ce system construction

引物名称	引物序列(5'→3')	目标
BsrGI-F	cctctacgagtacttcacgtgtacaacgagctgaccaaggtgaag	骨架载体ePE2-6ce构建
1R-775	gcgggagttccgttgccctctgtgtggtctgtctcg	
2F-775	gaagggccaacggaactcccgcgagcgcatgaagaggatc	
2R-918	gagctggcgcgcatgaagccggccttatcaagctcggaa	
3F-918	cggcttcacgcgcgccagctcgtcgagacacgccagatc	
3R-Tf1-RT	gtgtgtttggaagagcttatgagcgcgccagatgagccgc	
4F-Tf1-RT	gcggctcatctggcggctccataagctcttccaaacacac	
4R-Tf1-RT	cgtcttcacatgtttgacgtgttcgcttcgctctttga	
5F-Tf1-RT	tcaaagagcgaaagcgaacacgtcaaacatgtgaagacg	
5R-Tf1-RT	ttcctcttcttctcgggctaagtctatctgttcacga	
6F-Tf1-RT	tcgtgaaccagataagcattagcccgaagaagaggaa	
BsrGI-R	gccgcgggatatcaccactttgtacaagaagctgggtcgcgcg	

突变信息, 利用PlantPegDesigner网站^[14](www.plantgenomeediting.net)设计靶位点, RTT和PBS序列(图2)。Nelson等人^[15]发现在pegRNA的3'端添加RNA基序evopreQ1可防止pegRNA的降解, 提高PE效率。根据设计的靶位点, RTT和PBS序列, 利用pegLIT网站^[15](<https://peglit.liugroup.us/>)设计PBS与evopreQ1之间的8nt Linker序列。

(2) 目标突变精准编辑载体构建。首先, 根据图2设计的序列进行引物设计(表2)。接着, 将RT、PBS、Sg2.0和evopreQ1引物靶标退火后以Golden Gate克隆方式^[5]连接至*Bsa* I -HFv2酶预切过的ePE2和ePE2-6ce表达载体上。随后, 将连接产物转化大肠杆菌*Dh5α*, 筛选出含有正确插入片段的克隆, 并通过Sanger测序验证载体的正确性。最终成功构建了ePE2-CDC48^{+5 G-A}、ePE2-ALS^{+1 A-G, +3 G-T, +4 T-C}、ePE2-ROC5^{+1-3 ins CTT, +3 C-A}、ePE2-6ce-CDC48^{+5 G-A}、ePE2-6ce-ALS^{+1 A-G, +3 G-T, +4 T-C}和ePE2-6ce-ROC5^{+1-3 ins CTT, +3 C-A}载体。

1.2.3 遗传转化

(1) 愈伤组织培养。选取无病斑健康水稻种子进行消毒。具体方法如下: 先用70%乙醇清洗1 min, 然后使用2.5%有效活性氯的次氯酸钠溶液消毒30 min, 随后用无菌水冲洗3~5次。将消毒完成的种子放在无菌滤纸上吸干水分, 置于愈伤诱导培养基上, 在黑暗条件下28℃

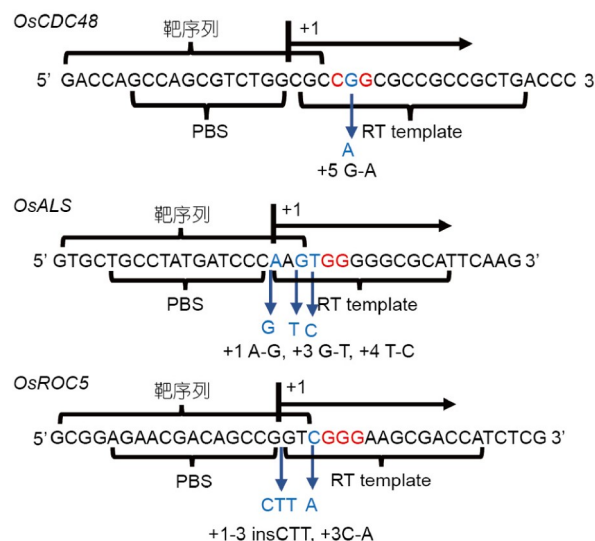


图2 pegRNA设计的示意图。PAM序列标记为红色。括号中指示了pegRNA的靶序列、PBS序列和RTT对应的区域。期望的突变显示为蓝色。所需编辑的位置从箭头后的切割位点开始计数

Figure 2 Schematic illustrations of pegRNA design. For each site, the PAM used for gRNA design is labeled in red. The region corresponding to the protospacer, PBS sequence and RT template of the pegRNA is indicated in the bracket. The expected mutations are shown in blue. The position of the desired edit was counted from the nick site following the arrow

培养15 d。剥离成熟胚盾片长出的愈伤组织, 转移到成熟胚继代培养基上, 在相同条件下继代培养5 d, 筛选生

表2 目标突变载体构建引物

Table 2 The primers of targets construction

引物名称	引物序列(5'→3')	目标
Sg2.0-g++	agagctatgctggaacagcatagcaagttgaaataaggctagtcctgtatcaacttgaaaaagtgccaccgagtcg	目标突变载体构建
Sg2.0-g-	gcaccgactcgggtccactttttcaagttgataacggactagcctattttcaacttgctatgctgtttccagcatag	
evopreQ1-g++	TTGACGCGGTTCTATCTAGTTACGCGTTAAACCAACTAGAAA	
evopreQ1-g-	GGCCTTTCTAGTTGGTTTAAACGCGTAACTAGATAGAACC GCG	
ALS-g++	tgcagtgtgctctatgatcccaaggtttc	
ALS-g-	ctctgaaaccttgggatcataggcagcac	
ALS-RP++	gtgcatgcccccgatcgggatcataggcaattaatag	
ALS-RP-	tcaactattaattgcctatgatcccgatcgggggcgcat	
CDC48-g++	tgcagaccagccagcgtctggcgctgttc	
CDC48-g-	ctctgaaacgcgccagacgtggctggtc	
CDC48-RP++	gtgctcagcgcgcgctggcgccagacgtggctctctctc	
CDC48-RP-	tcaagagagagaccagcgtctggcgccagcgccgctga	
ROC5-g++	tgcagcggagaacgacagccggtcgttc	
ROC5-g-	ctctgaaacgaccggtgtctgtctccgc	
ROC5-RP++	gtgcatggctccttccataagcggtgtctgtctctctc	
ROC5-RP-	tcaagagagagaagaacgacagccgctgttaggaagcgacat	

长旺盛、色泽淡黄的胚性愈伤组织,用于后续遗传转化实验。

(2) 农杆菌转化. 将构建完成的1.2.2(2)载体转化农杆菌*EHA105*, 制备用于水稻共培养转化的农杆菌悬浮液。

(3) 农杆菌侵染. 将1.2.3(1)诱导20 d愈伤组织置于无菌三角瓶中, 加入适量农杆菌悬浮液, 室温静置20 min并轻轻摇动。倒掉菌液后, 转移到铺有无菌滤纸的培养皿中, 在黑暗条件下22℃共培养2 d。

(4) 抗性愈伤组织获得. 在含有50 mg/L潮霉素B和300 mg/L羧苄青霉素二钠的筛选培养基上, 继续在28℃黑暗条件下培养28 d, 取出部分抗性愈伤组织用于精准编辑效率鉴定。

(5) 转基因 T_0 植株获得. 挑选乳黄色致密的抗性愈伤组织转至含有50 mg/L潮霉素B的分化培养基上, 先暗培养3 d, 然后转至15 h/d光照条件下培养, 一般经过25 d左右, 有绿点出现。30~40 d后进一步分化出 T_0 小苗, 经过潮霉素B筛选获得阳性植株, 取对应叶片用于 T_0 植株编辑效率鉴定。

1.2.4 高温处理

在农杆菌侵染后的愈伤组织培养过程中, 将起始培养天数标记为0 d。首先, 在28℃的滤纸上进行3 d的黑暗培养, 随后将愈伤组织转移到愈伤诱导培养基上, 并在相同的黑暗条件下继续培养2周。在此时期, 实施适当的高温处理, 即在恒温42℃的培养箱中对愈伤组织进行2 h的热击处理, 然后将其转移回至34℃的黑暗环境中继续培养2周。完成这些步骤后, 选取抗性愈伤组织用于愈伤组织编辑效率的鉴定。接下来, 为了进一步培养抗性愈伤组织以获得 T_0 代植株, 维持与之前描述的相同培养条件(参见1.2.3(5))。从获得的 T_0 代植株

中取叶片, 进行 T_0 植株编辑效率的鉴定(图3)。

1.2.5 编辑效率鉴定

(1) DNA提取. 利用十六烷基三甲基溴化铵(cetyltrimethylammonium bromide, CTAB)法对所获得抗性愈伤组织及 T_0 叶片进行DNA提取^[16]。具体方法如下: 首先, 向每个样品中加入300 μ L 2% CTAB后进行研磨处理; 然后, 将混合物放入65℃的烘箱中裂解30 min。待冷却后, 加入100 μ L氯仿充分混合。以12000 r/min的速度离心8 min, 小心吸取100 μ L上清液与300 μ L无水乙醇充分混合, 之后在-20℃条件下沉淀10 min。再次以12000 r/min的速度离心8 min, 弃去上清液, 将沉淀物置于室温下晾干, 最后, 加入50 μ L dd H₂O溶解DNA。

(2) 二代测序及Sanger测序引物设计. 根据每个位点的基因信息, 设计特异性扩增引物, 用于检测编辑类型和效率。同时, 在设计二代测序引物时, 需要在引物的正向和反向的5'端分别添加接头序列(正向: 5'-ggagt-gagtacggtgtgc-3'和反向: 5'-gagttggatgctggatgg-3'), 以便进行后续的二代测序建库分析(表3)。

(3) 目标编辑DNA扩增及测序. 以1.2.5(1)提取的DNA为模板, 利用1.2.5(2)设计的特异性引物进行PCR扩增。在扩增反应完成后, 通过1%琼脂糖凝胶电泳来检测PCR扩增产物的正确性。一方面, 将二代测序产物送至本实验室开发的高通量突变分析平台Hi-TOM (high-throughput tracking of mutations)进行二代测序^[17]。具体操作步骤请参考Hi-TOM平台的详细登记步骤, 网址为http://www.hi-tom.net/Hi-TOM_protocol.png。在Hi-TOM平台中, 愈伤组织的测序数据过滤阈值设定为0.01%, 每个愈伤组织样品的测序深度为50,000 reads, T_0 植株的测序数据过滤阈值设定为5%, 每个 T_0 植株样品的测序深度为5000 reads。另一方面, 将精准编辑的

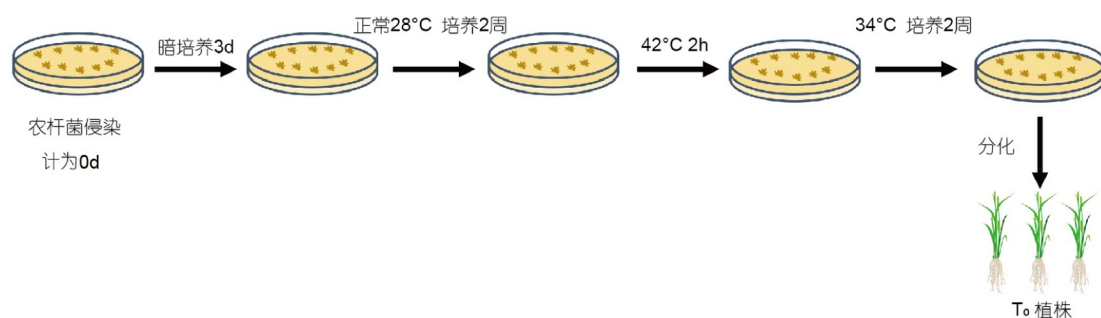


图3 愈伤组织高温处理示意简图。在培养皿中, 愈伤组织用褐色表示。重点展示了愈伤组织培养过程中的高温处理条件, 并简化展示了 T_0 植株的分化过程

Figure 3 The schematic diagram of high-temperature treatment for callus. In the culture dish, callus is represented in brown. The emphasis is on the high-temperature treatment during callus culture, with a simplified representation of T_0 plant differentiation process

表 3 测序引物

Table 3 The primers of sequencing

靶基因	引物名称	引物序列(5'→3')	用途
<i>OsALS</i>	OsCDC48-HF	ggagtgagtacgggtgtgacccctattgctagagctg	二代测序
	OsCDC48-HR	gagttggatgctggatggatgattgatggtgcattctt	
<i>OsROC5</i>	OsALS-HF	ggagtgagtacgggtgtgctgctcgagactccaggccatac	
	OsALS-HR	gagttggatgctggatgggtgcttggccaacatacagat	
<i>OsCDC48</i>	OsROC5-HF	ggagtgagtacgggtgtgctgctgctggttctagcgcgggc	
	OsROC5-HR	gagttggatgctggatggcttctcttgcgggagtgtctg	
<i>OsALS</i>	OsCDC48-SF	atacggcatcagagagaaca	Sanger测序
	OsCDC48-SR	tcaacaagttccagccttgc	
<i>OsROC5</i>	OsALS-SF	ttgatggggatggtagcttc	
	OsALS-SR	gtacttctatgcaatagctc	
<i>OsCDC48</i>	OsROC5-SF	ggtagatccaaggaagagga	
	OsROC5-SR	tcaagttctggttccagaat	

T₀植株PCR扩增产物进行Sanger测序, 验证Hi-TOM获得的精准编辑准确性。

1.2.6 数据分析

根据Hi-TOM平台测序结果计算每个独立愈伤组织和T₀植株中的精准编辑效率。愈伤组织精准编辑效率=(检测到的精准编辑reads数/总测序reads数)×100%^[7]。T₀植株精准编辑效率=(发生精准编辑的植株数/转基因阳性植株数)×100%^[17]。利用GraphPad Prism 8.0.1软件进行数据采集及图表制作。Sanger测序峰图通过Chromas软件分析获得。

2 结果与分析

2.1 ePE2-6ce和lePE2-6ce-H系统建立

ePE2系统是由本实验室开发的高效植物PE系统, 能够实现不同基因不同突变类型的高效精准编辑^[5]。该系统由2个关键组成部分构成: 工程化的pegRNA和PE效应蛋白。工程化的pegRNA包含靶序列、sgRNA、RTT、PBS和evopreQ1五个部分, 由35S-*CmYLCV-U6*启动子进行启动。PE效应蛋白由nCas9、NC和M-MLV RT-ΔRNase H三部分组成, 由*ZmUbi*启动子进行启动(图4(a))。其中, 逆转录酶M-MLV RT-ΔRNase H是在工程化的M-MLV基础上去掉RNA核酸酶H(RNase H)结构域, 从而增强了其活性, 显著提升了PE系统编辑效率^[6]。先前的研究表明, 来自酵母的逆转录酶Tf1变体(P70T、G72V、S87G、M102I、K106R、K118R、I128V、L158Q、S188K、I260L、F269L、R288Q、

S297Q、A363V、K413E和S492N)介导的PE系统(6c)和nCas9新变体(K775R和K918A)介导的PE系统(6e)在哺乳动物细胞中具备高效的编辑效率^[13]。因此, 本研究在ePE2系统基础上, 将酵母来源的逆转录酶Tf1变体引入水稻, 替换原有的M-MLV RT-ΔRNase H, 并引入了nCas9新变体, 开发了ePE2-6ce系统, 旨在评估其在水稻中的精准编辑能力(图4(b))。此外, 以往的研究还发现, 对M-MLV介导的PE系统进行适当的高温处理可增强逆转录酶活性, 显著提升编辑效率^[7]。因此, 本研究在ePE2-6ce系统基础上尝试在愈伤组织培养阶段进行同样的高温处理(图3, 42℃ 2 h, 34℃ 2周), 开发了ePE2-6ce-H系统, 以探索其在植物中提升编辑效率的潜力(图4(c))。

2.2 ePE2-6ce系统在水稻中具备高效精准编辑能力

先前的研究表明, 抗性愈伤组织的编辑效率可以作为T₀植株编辑效率的重要指标^[18]。因此, 为了提前评估ePE2-6ce系统的编辑能力, 我们利用Hi-TOM测序对抗性愈伤组织中的编辑效率进行分析。在单碱基替换的*OsCDC48*位点上, 我们发现12个独立的抗性愈伤组织中精准编辑效率为1.69%~14.61%, 平均编辑效率为6.82%。而在多碱基替换的*OsALS*位点上, 编辑效率范围13.53%~53.19%, 平均编辑效率为34.55%。在小片段插入和替换的*OsROC5*位点上, 编辑效率为13.98%~43.72%, 平均编辑效率为23.72%(图5(a))。为了更准确地评估ePE2-6ce系统的能力, 我们进一步将抗性愈伤组织分化培养得到稳定的T₀植株。在*OsCDC48*位点, 我们

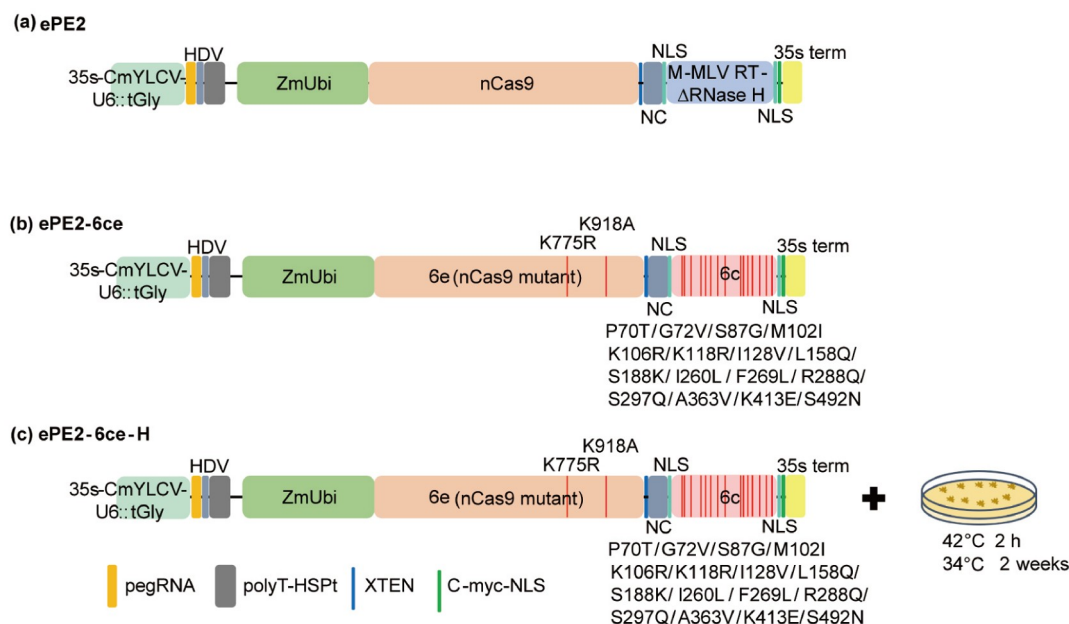


图 4 ePE2-6ce和ePE2-6ce-H系统结构示意图. (a) ePE2系统(对照); (b) ePE2-6ce系统; (c) ePE2-6ce-H系统结构示意图. 35S, 花椰菜花叶病毒35S启动子; *CmYLCV*, 发芽黄叶卷曲病毒; pegRNA, PE向导RNA, 包括靶序列, sgRNA, RTT, PBS和evopreQ1; HDV, HDV核糖酶; polyT-HSPt, polyT终止序列; *ZmUbi*, 玉米ubiquitin启动子; nCas9, Cas9切口酶; 6e, nCas9变体(K775R、K918A); NLS, 入核信号; XTEN: 48 bp接头; NC, 病毒核衣壳蛋白; M-MLV RT-ΔRNase H: 逆转录酶M-MLV去掉ΔRNase H结构域; 6c, 逆转录酶Tf1变体; 35s term, 35s终止子

Figure 4 The structure diagrams of ePE2-6ce and ePE2-6ce-H systems. (a) ePE2 system; (b) ePE2-6ce system; (c) ePE2-6ce-H system. 35S, Cauliflower Mosaic Virus 35S promoter; *CmYLCV*, Cestrum Yellow Leaf Curling Virus; pegRNA, PE guide RNA, including target sequence, sgRNA, RTT, PBS, and evopreQ1; HDV, HDV ribozyme; polyT-HSPt, polyT termination sequence; *ZmUbi*, maize ubiquitin promoter; nCas9, Cas9 nickase; 6e, nCas9 variant (K775R, K918A); NLS, nuclear localization signal; XTEN: a 48 bp linker; NC, viral nucleocapsid protein; M-MLV reverse transcriptase lacking the ΔRNase H domain; 6c, Tf1 reverse transcriptase variant; 35s term, 35s terminator

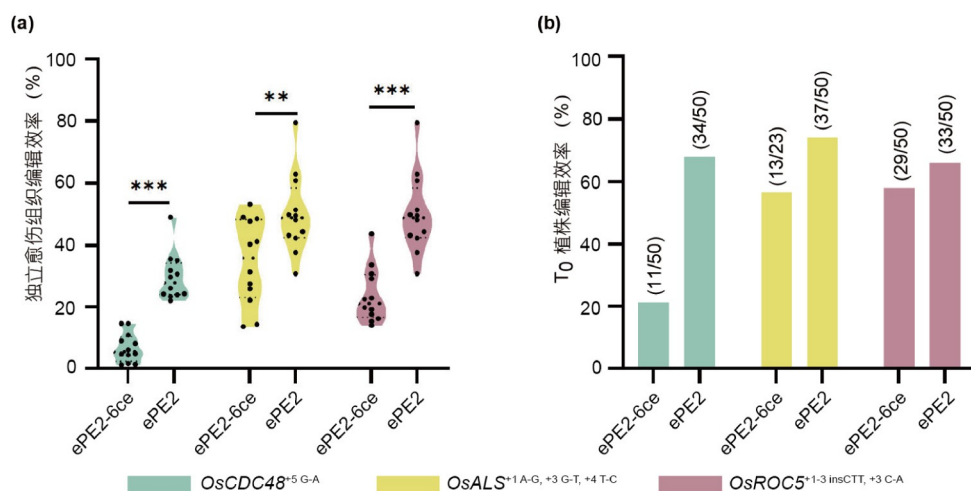


图 5 ePE2-6ce和ePE2系统编辑效率比较. (a) 抗性愈伤组织中精准编辑效率比较. 每个位点检测12个独立的愈伤组织作为12个生物学重复 ($n=12$). 星号表示与ePE2-6ce系统相比的统计学差异. **和***分别代表 $P<0.01$ 和 $P<0.001$. (b) T_0 植株中精准编辑效率比较. 括号中的数字代表精准编辑植株占阳性植株的百分比. 横坐标为2种不同的系统, 纵坐标为精准编辑效率. 不同的位点用不同的颜色表示

Figure 5 Comparison of editing efficiency among ePE2-6ce and ePE2 systems. (a) Comparison of precise editing efficiency in resistant callus. Twelve independent callus were tested at each site as 12 biological replicates ($n=12$). Data are shown as mean $\pm$ SD ($n=12$). Asterisks indicate statistically significant differences compared with ePE2-6ce system: **, $P<0.01$; ***, $P<0.001$ (Student's *t*-test). (b) Comparison of precise editing efficiency in T_0 plants. The numbers in parentheses represent the percentage of precisely edited plants among the total transformed plants. The x-axis represents the two different systems, while the y-axis represents the precise editing efficiency. Different sites are represented by different colors

获得了50株 T_0 材料,其中8株为纯合精准编辑,3株为杂合精准编辑,编辑效率达到22.00%。在 $OsALS$ 位点,我们获得了23株 T_0 材料,其中12株为纯合精准编辑,1株为杂合精准编辑,编辑效率高达56.52%。而在 $OsROC5$ 位点,同样获得了50株 T_0 材料,其中27株为纯合精准编辑,2株为杂合精准编辑,编辑效率为58.00%(图5(b))。以上结果表明,抗性愈伤组织和 T_0 植株中的编辑效率具有对应关系, $OsALS$ 和 $OsROC5$ 位点的精准编辑效率明显高于 $OsCDC48$ 位点。综合以上结果,我们发现ePE2-6ce系统在不同基因的不同位上都展现出高效的精准编辑能力,表明逆转录酶TfI在水稻PE系统中的应用具有潜在的高效编辑潜力。

为了更准确地确认获得的精准编辑 T_0 植株,我们对三个位点的纯合和杂合编辑植株进行了Sanger测序验证(图6)。结果显示,通过Hi-TOM测序鉴定的突变类型与Sanger测序鉴定的编辑类型一致,再次证实了我们建立的ePE2-6ce系统具有高效的精准编辑能力。

2.3 ePE2-6ce系统编辑效率低于ePE2系统

不同的植物PE系统采用不同的逆转录酶。ePE2系统作为一种高效的植物精准编辑系统,具备高效的精准编辑能力。该系统使用了去除了RNA核酸酶H(RNase H)结构域的工程化M-MLV RT- Δ RNase H逆转录酶,是经过M-MLV优化得到^[5]。本研究开发的ePE2-6ce系统使用了来自酵母的TfI变体逆转录酶,尚未在植物中进行优化。因此,本研究对比测试了ePE2系统和ePE2-6ce系统在 $OsCDC48$ 、 $OsALS$ 和 $OsROC5$ 位点的精准编辑效率,包括抗性愈伤组织和 T_0 植株。结果显示,在这3个位点上,无论是在抗性愈伤组织还是 T_0 植株中,ePE2系统的编辑效率均高于ePE2-6ce系统,这表明经过优化的M-MLV RT- Δ RNase H的效率要高于未经优化的TfI变体(图5)。

2.4 高温处理提升ePE2-6ce系统编辑效率

酶活性与温度之间存在密切的关系,一般来说,在不同的温度下,酶的活性会有所不同。工程化的逆转录酶M-MLV最适工作温度为42℃,而水稻愈伤组织转化过程中的温度远低于42℃。先前的研究已经证实,在愈伤组织培养过程中施加适当的高温处理(42℃ 2 h, 34℃ 2周)可以显著提高PE3系统的编辑效率^[7]。此外,先前的研究还表明,经过优化的酵母来源逆转录酶TfI在哺乳动物细胞中具有较高的效率,但其培养温度仍然明显

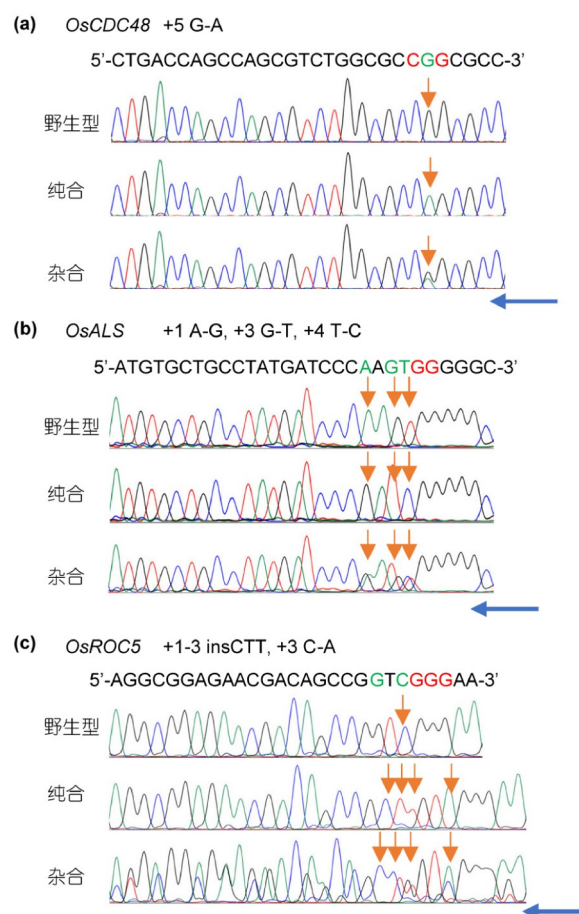


图6 Sanger测序验证 T_0 植株精准编辑类型。(a) $OsCDC48$ 位点测序峰图。(b) $OsALS$ 位点测序峰图。(c) $OsROC5$ 位点测序峰图。黄色箭头代表突变峰图位置。绿色字母代表突变碱基。红色字母代表PAM序列。蓝色箭头代表测序方向

Figure 6 Sanger sequencing validation of precise editing types in T_0 plants. (a) Sanger sequencing chromatogram of the $OsCDC48$ site. (b) Sanger sequencing chromatogram of the $OsALS$ site. (c) Sanger sequencing chromatogram at the $OsROC5$ site. The yellow arrows indicate the position of mutation peaks. The green letters represent the mutated bases. The red letters represent the PAM sequences. The blue arrows indicate the sequencing direction

高于水稻遗传转化的温度^[13]。因此,为了实验条件的一致性,本研究在同等高温处理条件下(愈伤组织, 42℃ 2 h, 34℃ 2周)测试了 $OsROC5$ 位点在抗性愈伤组织和 T_0 植株中的编辑效率差异。结果显示,在12个独立的抗性愈伤组织中,ePE2系统的编辑效率为30.80%~79.55%,高温处理后编辑效率为43.20%~86.29%;ePE2-6ce系统的编辑效率为13.98%~43.72%,高温处理后(ePE2-6ce-H)编辑效率为16.70%~75.81%(图7(a))。在 T_0 植株中,高温处理前ePE2系统和ePE2-6ce系统的编辑效率分别为66.00%和58.00%,高温处理后二者的编

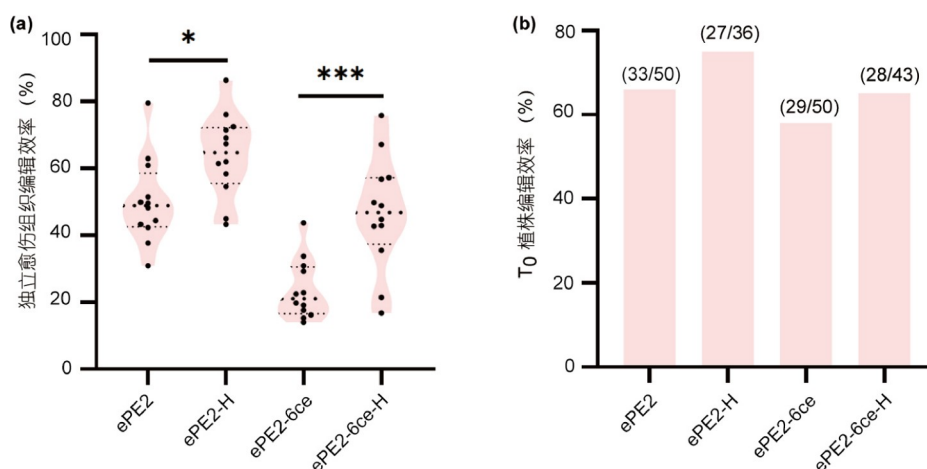


图7 ePE2-6ce和ePE2系统在同等高温条件下编辑效率比较。(a) 抗性愈伤组织中精准编辑效率比较。每个位点检测12个独立的愈伤组织作为12个生物学重复($n=12$)。星号表示正常条件和高温处理相比的统计学差异。*代表 $P<0.05$, ***代表 $P<0.001$ 。(b) T_0 植株中精准编辑效率比较。括号中的数字代表精准编辑植株占阳性植株的百分比。H代表高温处理条件下编辑效率

Figure 7 Comparison of editing efficiency between the ePE2-6ce and ePE2 systems under same high-temperature conditions. (a) Comparison of precise editing efficiency in resistant callus. Twelve independent callus were tested at each site as 12 biological replicates ($n=12$). Data are shown as mean $\pm$ SD ($n=12$). Asterisks indicate statistically significant differences between normal and high-temperature conditions: *, $P<0.05$, ***, $P<0.001$ (Student's *t*-test). (b) Comparison of precise editing efficiency in T_0 plants. The numbers in parentheses represent the percentage of precisely edited plants among the total transformed plants. -H represents editing efficiency under high-temperature treatment conditions

辑效率分别为75.00%和65.12%(图7(b))。以上结果发现,适当的高温处理不仅提升了ePE2系统的编辑效率,对ePE2-6ce系统的编辑效率的提升也有所帮助,表明适当的高温处理会影响逆转录酶Tf1的活性。未来,可以利用ePE2-6ce-H系统对目标位点进行精准编辑。

3 结论与讨论

本研究成功地将来自酵母的逆转录酶Tf1引入水稻,建立了ePE2-6ce系统,实现了对水稻内源位点的高效精准编辑。最新的研究显示,Tf1介导的PE6c系统的编辑效率高于M-MLV介导的PE系统的^[19],因此,Tf1具有很大的优化潜力。就编辑效率而言,目前ePE2-6ce系统的效率低于ePE2系统。推测相较于ePE2系统,ePE2-6ce系统编辑效率低的原因,一方面Tf1的活性可能不如经过多次优化的M-MLV RT- Δ RNase H,表明Tf1在未来具有很大的优化潜力。由于Tf1是来自酵母,其在植物中的表达可能并未达到最佳水平。与Cas9的优化过程相似,在未来可通过PACE和随机突变等技术对Tf1进行持续改良,以提高其编辑效率和特异性^[20-22]。此外,人工智能的快速发展指导了蛋白优化方式,如基于AI预测Cas12i3与核酸互作位点,并通过对Cas核酸识别区域候选点突进行组合获得了高编辑活性的优化版本Cas-SF01,为动植物基因编辑提供高效新工具^[23]。在

未来可利用预测与优化Tf1蛋白结构,从而设计出更具活性和特异性的Tf1变体^[24]。另一方面,M-MLV RT- Δ RNase H是删除M-MLV RT的RNase H结构域且在N端NC蛋白构成,其中,NC蛋白通过其核酸退火活性,在逆转录过程中辅助M-MLV发挥功能,提升了编辑效率3.2倍^[6],因此,ePE2系统的编辑效率很高。而在本研究中,我们推测NC蛋白和Tf1变体之间可能无协同作用甚至NC蛋白抑制了Tf1的活性,从而导致了编辑效率低于ePE2系统。在未来应进行更为全面的比较以衡量二者之间编辑效率差异的原因。

ePE2-6ce系统测试了对单碱基替换、多碱基替换和小片段的插入替换等类型的精准编辑效率,ePE2-6ce-H系统仅测试了小片段的插入替换类型编辑效率,均实现了高效的精准编辑。在未来,应对ePE2-6ce和ePE2-6ce-H系统进行更多位点和更多编辑类型的测试,例如精准片段删除和较大片段插入等^[25,26],以评估两个系统的潜力。另外,多基因编辑作为作物育种改良的重要手段,在未来也应测试两个系统在多基因精准编辑中的潜力。目前,逆转录酶M-MLV介导的PE系统经过多重优化已在水稻、小麦和玉米等单子叶植物中实现了高效的精准编辑,但在双子叶,如番茄、烟草和杨树等物种中的编辑效率相对较低^[2,3,9-12]。本研究开发的ePE2-6ce系统目前仅在单子叶水稻中进行测试,未来应

在更多的物种,特别是双子叶物种中测试其精准编辑的潜力,为不同物种提供新的PE系统选择。

尽管本研究发现ePE2-6ce-H系统显著提升了编辑效率,其高温处理条件为42°C 2 h, 34°C 2周,表明适当的高温处理对编辑效率的提升十分有效。然而,由于Tf1作为酵母来源的逆转录酶,其最适温度可能并不是42°C,因此,在未来应对不同温度下的Tf1工作效率进行测试,摸索其工作最适温度,进而进一步提升其效率。与此同时,本研究仅在*OsROC5*位点测试了ePE2-6ce-H系统的编辑效率,未来应将更多位点应用于ePE2-6ce-H系统的测试,以更全面地评价ePE2-6ce-H系统的性能。除了高温处理外,PE系统的优化过程中发现多种组件,如通过RNA干扰(RNAi)直接抑制DNA错配修复

系统的功能^[27]、PE效应蛋白融合T5核酸外切酶^[28],融合促进染色质开放的人源RNA m6A去甲基化酶^[29]和在pegRNA上增加RNA Motif^[7]等均可增强PE系统,在未来可将Tf1与这些元件进行不同的组合,测试其增强编辑效率的能力。

综上所述,本研究展示了ePE2-6ce和ePE2-6ce-H系统在水稻中实现了高效的精准编辑。未来的研究可以在此基础上进一步优化Tf1蛋白本身以及PE系统的各个组件,探索更多编辑类型和多基因编辑的潜力,并在更多植物物种中测试其应用,为精准遗传改造提供更多可能性^[30]。同时,通过结合不同的外部处理条件,可以进一步提升ePE2-6ce系统的编辑效率,为农业育种和生物技术研究提供强大的工具和理论支持。

参考文献

- 1 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
- 2 Lin Q, Zong Y, Xue C, et al. Prime genome editing in rice and wheat. *Nat Biotechnol*, 2020, 38: 582–585
- 3 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. *Genome Biol*, 2020, 21: 257
- 4 Li H, Zhu Z, Li S, et al. Multiplex precision gene editing by a surrogate prime editor in rice. *Mol Plant*, 2022, 15: 1077–1080
- 5 Li J, Chen L, Liang J, et al. Development of a highly efficient prime editor 2 system in plants. *Genome Biol*, 2022, 23: 161
- 6 Zong Y, Liu Y, Xue C, et al. An engineered prime editor with enhanced editing efficiency in plants. *Nat Biotechnol*, 2022, 40: 1394–1402
- 7 Zou J, Meng X, Liu Q, et al. Improving the efficiency of prime editing with epegRNAs and high-temperature treatment in rice. *Sci China Life Sci*, 2022, 65: 2328–2331
- 8 Zhong Z, Fan T, He Y, et al. An improved plant prime editor for efficient generation of multiple-nucleotide variations and structural variations in rice. *Plant Commun*, 2024, 5: 100976
- 9 Ni P, Zhao Y, Zhou X, et al. Efficient and versatile multiplex prime editing in hexaploid wheat. *Genome Biol*, 2023, 24: 156
- 10 Lu Y, Tian Y, Shen R, et al. Precise genome modification in tomato using an improved prime editing system. *Plant Biotechnol J*, 2021, 19: 415–417
- 11 Perroud P F, Guyon-Debast A, Veillet F, et al. Prime Editing in the model plant *Physcomitrium patens* and its potential in the tetraploid potato. *Plant Sci*, 2022, 316: 111162
- 12 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. *Sci China Life Sci*, 2023, 66: 2910–2921
- 13 Doman J L, Pandey S, Neugebauer M E, et al. Phage-assisted evolution and protein engineering yield compact, efficient prime editors. *Cell*, 2023, 186: 3983–4002.e26
- 14 Lin Q, Jin S, Zong Y, et al. High-efficiency prime editing with optimized, paired pegRNAs in plants. *Nat Biotechnol*, 2021, 39: 923–927
- 15 Nelson J W, Randolph P B, Shen S P, et al. Engineered pegRNAs improve prime editing efficiency. *Nat Biotechnol*, 2022, 40: 402–410
- 16 Kuo P, Henderson I R, and Lambing C. CTAB DNA extraction and genotyping-by-sequencing to map meiotic crossovers in plants. *Methods Mol Biol*, 2022, 2484: 43–53
- 17 Sun T, Liu Q, Chen X, et al. Hi-TOM 2.0: An improved platform for high-throughput mutation detection. *Sci China Life Sci*, 2024, 67: 1532–1534
- 18 Yang X, Meng X B, Wang C, et al. Evaluating prime editing efficiency through rice callus transformation (in Chinese). *Chin Sci Bull*, 2025, 70: 2570–2578 [杨茜, 孟祥兵, 王春, 等. 利用水稻转化愈伤组织评估引导编辑效率. *科学通报*, 2025, 70: 2570–2578]
- 19 Cao Z, Sun W, Qiao D, et al. PE6c greatly enhances prime editing in transgenic rice plants. *J Intergr Plant Biol*, 2024, 66: 1864–1870
- 20 Ruta G V, Ciciani M, Kheir E, et al. Eukaryotic-driven directed evolution of Cas9 nucleases. *Genome Biol*, 2024, 25: 79
- 21 Christie K A, Guo J A, Silverstein R A, et al. Precise DNA cleavage using CRISPR-SpRYgests. *Nat Biotechnol*, 2023, 41: 409–416
- 22 Huang T P, Heins Z J, Miller S M, et al. High-throughput continuous evolution of compact Cas9 variants targeting single-nucleotide-pyrimidine

- PAMs. *Nat Biotechnol*, 2023, 41: 96–107
- 23 Duan Z, Liang Y, Sun J, et al. An engineered Cas12i nuclease that is an efficient genome editing tool in animals and plants. *Innovation*, 2024, 5: 100564
- 24 Yang L, Chen J. Expanding genome editing scopes with artificial intelligence. *Sci Bull*, 2023, 68: 2881–2883
- 25 Liu M, Zhang X, Xu W, et al. Efficient and precise genomic deletion in rice using enhanced prime editing. *aBIOTECH*, 2024, 5: 214–218
- 26 Li G, Zhang Q, Liang T, et al. Precise insertions of large DNA fragments for cell and gene therapy. *Sci Bull*, 2023, 68: 857–859
- 27 Liu X, Gu D, Zhang Y, et al. Conditional knockdown of OsMLH1 to improve plant prime editing systems without disturbing fertility in rice. *Genome Biol*, 2024, 25: 131
- 28 Liang Z, Wu Y, Guo Y, et al. Addition of the T5 exonuclease increases the prime editing efficiency in plants. *J Genet Genomics*, 2023, 50: 582–588
- 29 Bai M, Lin W, Peng C, et al. Expressing a human RNA demethylase as an assister improves gene-editing efficiency in plants. *Mol Plant*, 2024, 17: 363–366
- 30 Zou J, Huang Y, Gao C, et al. Unlocking crop diversity: Enhancing variations through genome editing. *Sci Bull*, 2024, 69: 281–284

Summary for “通过引入逆转录酶Tf1结合高温处理建立新型水稻引导编辑系统”

Establishment of a novel prime editing system by introducing the reverse transcriptase Tf1 combined with high-temperature treatment in rice

Bingbing Hou^{1,2}, Like Chen², Hongwei Lu², Xiaoshuang Liu¹, Kejian Wang^{2,3}, Chun Wang², Pengcheng Wei¹ & Jinpeng Zou^{2*}

¹ College of Agronomy, Anhui Agricultural University, Hefei 230031, China

² State Key Laboratory of Rice Biology and Breeding, China National Rice Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310006, China

³ Key Laboratory of Gene Editing Technologies (Hainan), Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Sanya 572025, China

* Corresponding author, E-mail: zoujinpeng@caas.cn

Reverse transcriptase is a vital component of the prime editing (PE) system and responsible for converting RNA templates carrying mutational information into DNA, thereby achieving precise editing of target genes. In plants, the PE system has demonstrated powerful precision editing capabilities; however, there are relatively limited resources for effective reverse transcriptases, with current reliance primarily on the optimization and application of Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (M-MLV). The aim of this study was to enhance the performance of the plant PE system by introducing novel reverse transcriptases based on the highly efficient plant ePE2 system. First, the reverse transcriptase Tf1 (from the *Schizosaccharomyces pombe* Tf1 retrotransposon) has demonstrated high stability and efficiency after phage-assisted evolution in mammalian cells, suggesting that it may possess high reverse transcription capabilities. Therefore, we replaced the original M-MLV reverse transcriptase with the Tf1 reverse transcriptase after rice codon optimization; this strategy is referred to as 6c. Second, a nCas9 variant (K775R and K918A) has shown a role in stabilizing the R-loop and mediating conformational changes in the HNH domain upon DNA binding, significantly enhancing editing efficiency in mammalian cells. Thus, we introduced the same two-point mutations, K775R and K918A, into the ePE2 system; this strategy is referred to as 6e. Finally, the 6c and 6e strategies were combined to develop the novel ePE2-6ce system. For validating the feasibility and efficiency of the newly constructed ePE2-6ce system, we selected three specific targets, *OsCDC48*, *OsALS*, and *OsROC5*, in the rice genome for verification. These three sites represent different editing types and can comprehensively evaluate the editing capability of the ePE2-6ce system. The experimental results demonstrated that in the resistant callus, the ePE2-6ce system achieved editing efficiencies of 6.82%, 34.55%, and 23.72% for the *OsCDC48*, *OsALS*, and *OsROC5* sites, respectively, whereas in the regenerated T₀ generation plants, the corresponding editing efficiencies were 22.00%, 56.52%, and 58.00%. These data demonstrate the powerful precision editing capability of the ePE2-6ce system. Remarkably, appropriate high-temperature treatment during the callus screening stage can improve the activity of the reverse transcriptase. Therefore, we verified the effect of high-temperature treatment on the editing efficiency of the ePE2-6ce system. The results demonstrated that when combined with high-temperature treatment, the editing efficiency of the *OsROC5* site increased by 1.97- and 1.12-fold in the callus and T₀ generation plants, respectively. This result provides novel insights into further improving the editing efficiency of the ePE2-6ce system through environmental factors. To summarize, we successfully applied the novel reverse transcriptase Tf1 to precise gene editing in rice, expanding the selection range of reverse transcriptases in plant PE systems. The ePE2-6ce system provides a powerful new tool for crop genetic improvement and functional genomics research, while also laying an important foundation for the optimization and application of reverse transcriptases in future plant PE systems.

rice, prime editing, Tf1, high-temperature treatment, editing efficiency

doi: [10.1360/TB-2024-0766](https://doi.org/10.1360/TB-2024-0766)