



植物引导编辑技术的研究进展

彭春燕¹, 柏梦焱², 关跃峰^{2*}

1. 福建农林大学生命科学学院, 福州 350002

2. 广州大学生命科学学院分子遗传与进化创新中心, 广东省植物适应与分子设计重点实验室, 广州市作物基因编辑重点实验室, 广州 510006

* 联系人, E-mail: guan@gzhu.edu.cn

2023-10-28 收稿, 2023-12-25 修回, 2023-12-28 接受, 2023-12-29 网络版发表

国家重点研发计划(2022YFA0912104)资助

摘要 成簇的规律间隔短回文重复序列及其相关蛋白(clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR associated proteins, CRISPR/Cas)介导的基因组编辑可以在不引入外源基因的情况下, 直接在基因组水平靶向编辑生物体内的目标基因, 实现对特定DNA片段的修饰, 极大地加速了植物遗传研究和农业育种的进程. 近年来, 由CRISPR/Cas衍生的引导编辑技术(prime editing, PE)不仅可以实现任意类型的碱基置换, 而且可以实现小片段甚至大片段的精准插入和删除, 为植物基因功能研究及遗传改良提供了强大的技术支撑. 目前研究人员已经在多种植物, 如水稻、玉米、小麦和番茄等中建立了引导编辑技术, 但其编辑效率依然较低, 尤其是在双子叶植物中, 因此开发更加高效灵活的植物引导编辑技术具有重要意义. 本文综述了引导编辑技术的工作原理、植物中引导编辑技术的开发历程、动植物中的优化进展, 并展望了引导编辑技术在作物遗传改良中的应用前景.

关键词 CRISPR/Cas, 植物引导编辑, 精准编辑, 作物育种

遗传变异是作物育种的基础. 传统的育种包括杂交育种、诱变育种等都是通过随机突变后再进行选育, 耗时长、成本高且效率低. 转基因育种技术的出现极大地加快了育种进程, 它可以极快地将外源的优质性状基因引入植物体从而快速实现作物改良. 但是由于基因组整合了外源基因, 转基因作物的安全性问题受到了广泛质疑和严格监管, 极大地限制了其应用.

随着序列特异性人工核酸酶(engineered endonuclease, EEN)被发现, 新一代基因工程技术基因组编辑技术(genome editing)随即诞生. 基因组编辑可以在不引入外源基因的情况下, 直接在基因组水平靶向编辑生物体内的目标基因, 实现对特定DNA片段的修饰. 与过去的育种策略相比, 基因编辑技术大大缩短了育种周期且更加安全高效. 目前基因编辑技术已经应用于水稻、小麦、玉米、番茄等各种作物的基因功能研

究和分子设计育种中^[1,2].

人工核酸酶包括锌指核酸酶(zinc fingernucleases, ZFNs)、转录激活样效应因子核酸酶(transcription activator-like effector nucleases, TALENs)和CRISPR(clustered regularly interspaced palindromic repeats, 成簇规律间隔短回文重复序列)/Cas(CRISPR-associated proteins, CRISPR相关蛋白)核酸酶^[3~5]. 其中, ZFNs系统和TALENs系统由于组装费时、成本高、基因编辑效率低等因素限制了其应用范围^[6,7]. 与前两者相比, CRISPR/Cas系统作为一种新兴的基因组编辑工具, 具有高效、设计和操作简单、成本低、适用性广等优势, 为目前主导的基因编辑技术, 其中最常用的CRISPR/Cas系统由核酸酶Cas9和人工设计的单链向导RNA(single guide RNA, sgRNA)组成. CRISPR/Cas系统在基因组靶位点产生双链断裂(double-strand break, DSB)后通过细胞的

引用格式: 彭春燕, 柏梦焱, 关跃峰. 植物引导编辑技术的研究进展. 科学通报, 2025, 70: 2423–2437

Peng C Y, Bai M Y, Guan Y F. Recent advance of prime editing in plants (in Chinese). Chin Sci Bull, 2025, 70: 2423–2437, doi: [10.1360/TB-2023-1111](https://doi.org/10.1360/TB-2023-1111)

非同源末端连接(non-homologous end joining, NHEJ)或同源定向修复(Homology-directed repair, HDR)途径实现基因组定向修饰^[8]。其中, NHEJ是主要的修复途径, 但该途径仅能产生小片段的随机插入或缺失(insertions or deletions, InDels)。HDR修复途径是以供体DNA为模板进行精准修复, 但是植物中由于同源重组效率低以及供体DNA递送困难等因素依旧难以实现高效的精准基因编辑^[9,10]。

为了实现更精准地编辑, 科学家们通过向CRISPR/Cas系统引入不同类型的碱基脱氨酶衍生出了单碱基编辑技术(base editor, BE), 可实现C-T碱基编辑(cytidine BE, CBE)、A-G碱基编辑(adenine BE, ABE)或C-G碱基编辑(C-to-G BE, CGBE), 以及A-Y或A-K的碱基编辑等, 且无需产生DSB, 也无需供体模板和依赖HDR的修复途径即可实现靶位点的精准点突变^[11~16]。然而, BE系统的使用受到特定类型的碱基转换的限制, 因此不能完全满足精准编辑的需求^[17,18]。

为了进一步解决CRISPR/Cas9系统介导HDR效率低且BE系统编辑类型受限制的问题, 科学家开发了一种全新的基因编辑工具——引导编辑技术(prime editing, PE)。该技术是一种基于“搜索和替换”(search-and-replace)的基因组编辑方式, 不仅可以实现任意类型的碱基置换, 还可以实现小片段甚至大片段的精准插入和删除^[19]。目前, PE系统已在多种植物中建立, 但其编辑效率依然较低, 尤其是在双子叶植物中, 因此开发更加高效灵活的植物引导编辑技术对于植物基因功能研究和作物遗传改良具有重要意义。

本文综述了PE系统的工作原理以及PE系统在植物中的开发历程, 重点介绍了PE系统在动植物中的优化进展, 并展望了PE系统在植物遗传改良和精准育种中的应用前景。

1 引导编辑技术的建立及工作原理

引导编辑技术2019年由David Liu团队开发^[19]。最初的PE1系统包括nSpCas9(H840A)与野生型M-MLV RT逆转录酶(moloney murine leukemia virus reverse transcriptase, M-MLV RT)融合构建的效应蛋白和引导编辑向导RNA(prime editing guide RNA, pegRNA)。与常规的sgRNA相比, pegRNA的3'端额外增加了一段RNA序列, 包括引物结合位点(prime binding site, PBS)序列和含有目标编辑序列的RT模板(reverse transcriptase template, RT template, RTT)^[19]。引导编辑技术的

工作原理如图1所示, 效应蛋白在pegRNA的引导下靶向基因组目标位点, 其中nSpCas9(H840A)在PAM上游第3个碱基处切割DNA单链, 产生一条5'游离单链DNA链和一条3'游离单链DNA链; 游离的3'端单链DNA与PBS碱基互补, 逆转录酶沿着PBS的3'端序列以RTT为模板逆转录合成新的单链DNA; 带有新合成的单链DNA的3'flap, 与5'flap竞争, 细胞中的DNA修复机制切除5'flap, 3'flap在DNA连接酶的作用下, 被整合进基因组, 形成带有错配的DNA双链, 内源DNA修复机制识别此错配的DNA双链起始修复, 以编辑链为模板, 修复非编辑链, 从而实现双链的精准编辑^[19]。

然而, PE1系统在大多数目标靶点的精准编辑效率均较低。为了提高系统的编辑效率, Anzalone等人^[19]在野生型M-MLV RT逆转录酶上引入5个位点突变(D200N/L603W/T330P/T306K/W313F), 以提高逆转录酶的热稳定性、逆转录反应的持续性、逆转录酶与DNA:RNA杂交链的亲水性, 以及抑制逆转录酶RNase H结构域的活性, 并以此开发了PE2系统。经测试, 与PE1系统相比, PE2系统编辑效率得到了极大地提高。为了促使DNA修复机制以编辑链为模板修复非编辑链, 从而更高效地实现DNA的双链编辑, Anzalone等人^[19]在PE2系统的基础上, 在编辑位点上下游50~100 bp的位置添加一条nicking sgRNA, 从而利用nCas9的单链切割活性在非编辑链上引入一个切口, 开发了PE3系统^[19]。为减少由于增加切口导致的DSB和InDels, Anzalone等人^[19]将nicking sgRNA的gRNA spacer序列改为靶向编辑后的序列, 开发了PE3b系统。与PE2系统相比, PE3系统和PE3b系统的编辑效率进一步提高了约3倍^[19]。

2 植物中引导编辑技术的开发

自2019年引导编辑技术出现以来, 国内外许多研究团队陆续在植物中建立了引导编辑技术, 如表1所示(详细情况见表S1)。其中, Lin等人^[20]通过对PE系统中的nCas9和M-MLV RT进行植物密码子优化, 首次建立了适用于植物的引导编辑系统(plant prime editing, PPE)PPE2、PPE3和PPE3b, 在水稻和小麦原生质体中实现了12种类型单碱基替换、多碱基替换、小片段插入和缺失, 编辑效率为0.2%~8.0%, 并在水稻愈伤再生植株中实现6个碱基的精准缺失, 编辑效率为21.8%, G-T碱基替换编辑效率为14.3%, GGC-TAA多核苷酸替换编辑效率为2.6%。随后, 多个团队均在水稻中测试了PE

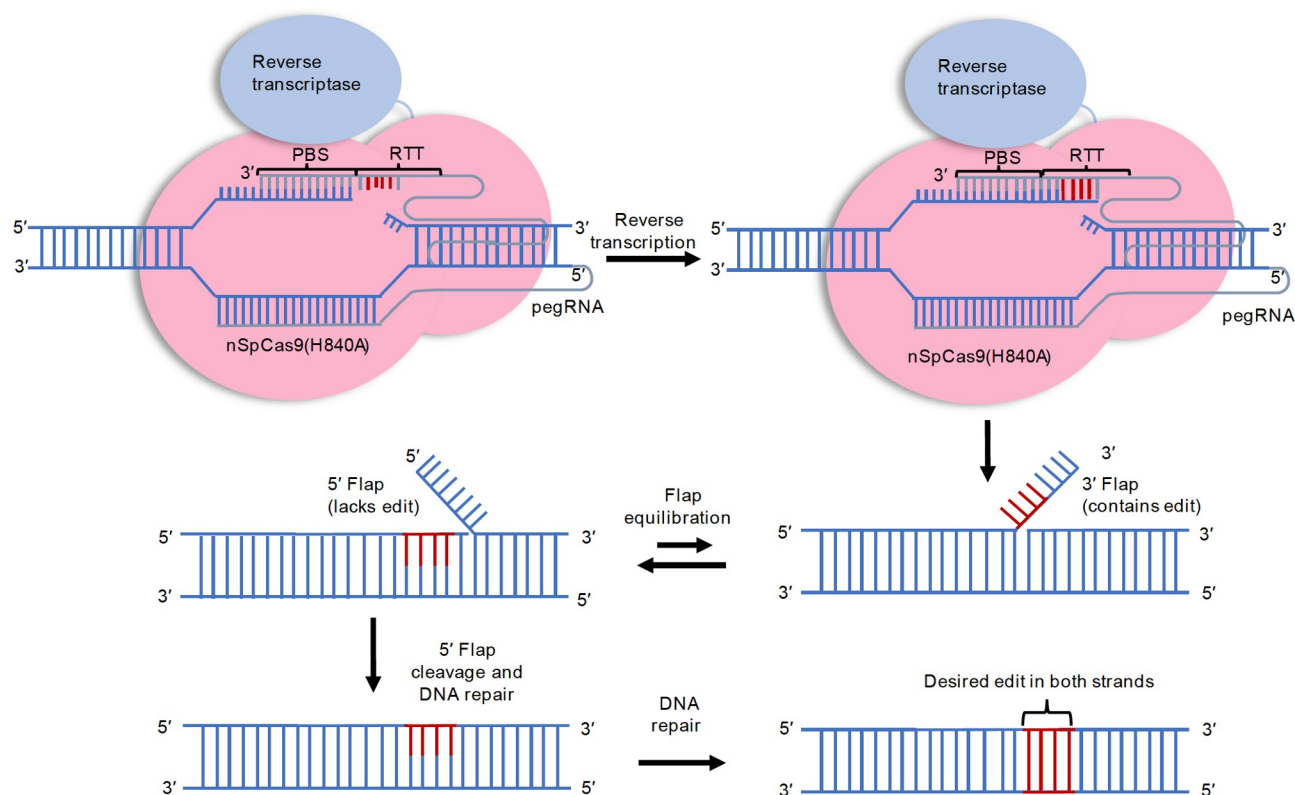


图1 (网络版彩色)引导编辑工作模型

Figure 1 (Color online) Model of prime editing

系统, 编辑效率约为0~31.3%^[21~26]。为了进一步提高PE系统在水稻中的编辑效率, 许多团队相继进行了一系列优化, 使得水稻中的PE编辑效率得到了极大的提升, 不仅可以实现任意碱基的替换、小片段的精准插入和删除, 且实现了精准的大片段插入^[27~33]。

在小麦中, Ni等人^[34]通过优化M-MLV RT活性、添加不同类型的核定位信号等策略开发了ePPEplus系统。在小麦原生质体测试体系中, 与PPE和ePPE系统相比, ePPEplus系统平均编辑效率分别提高了33.0和6.4倍, 最高可达18.9%, 同时建立了多基因引导编辑系统CMPE系统, 在小麦原生质体测试体系中实现了4~10个基因的同时编辑, 效率平均为7.4%~10.3%, 并在小麦转基因植株中实现了2~8个基因的精准编辑。

除了水稻和小麦, Jiang等人^[35]首次在玉米中建立了引导编辑系统, 并用该系统在玉米的*ZmALS*基因中同时引入W542L和S621I, 实现了53.2%的编辑效率, 但未能在2个位点获得可遗传的纯合突变。Xu等人^[27]通过将M-MLV RT融合到nCas9的N端、优化RT模板序列等策略开发了PE-P2、PE-P3系统, 在玉米原生质体测试

体系中, 4个靶点的平均编辑效率为6.2%。Qiao等人^[36]利用多重优化开发的ePE5max系统通过精准编辑*ZmEPSPS*、*ZmALS*和*ZmACC1*基因的相应位点获得了相应除草剂抗性的玉米纯合植株。

与单子叶植物中的PE系统开发相比, 双子叶植物中的PE系统开发则较为缓慢。Lu等人^[37]通过对PE系统中相关核苷酸序列进行植物密码子优化和使用番茄内源启动子RPS5A介导PE系统的表达, 首次在番茄中建立了引导编辑系统, 在番茄叶片荧光素酶测试体系中检测到编辑效率为0.26%~2.6%, T_0 代稳定转化植株的编辑效率为0.025%~1.66%, 但均为嵌合体。Wang等人^[38]将PE系统应用于烟草叶片瞬转, 效率约为0.06%, 而在拟南芥原生质体测试体系中, PE系统介导66 bp精准插入的效率约为0.07%。Perroud等人^[39]在小立碗藓中测试了PE系统, 但最高编辑效率仅0.06%; 此外, 作者也在马铃薯中测试了PE系统, 编辑效率同样较低。Biswas等人^[40]在花生、鹰嘴豆和豇豆原生质体体系中测试了双pegRNA引导编辑策略, 编辑效率为0.2%~0.5%。近期, Zhang等人^[41]通过将M-MLV RT融合到nCas9的N

表 1 引导编辑器在植物中的优化及应用

Table 1 Optimization and application of prime editor in plants

编辑器名称	编辑类型	编辑效率	转化方式	物种	参考文献
PPE2、PPE3、PPE3b	碱基替换、缺失、插入	0~21.8%	PEG介导转化、农杆菌介导转化	<i>Oryza sativa</i> 、 <i>Triticum aestivum</i>	[20]
PPE-CaMV	碱基替换、缺失	5.8%、0.3%	PEG介导转化	<i>Oryza sativa</i>	[20]
PPE2-R、PPE3-R、PPE3b-R	插入	>9%	PEG介导转化、农杆菌介导转化	<i>Oryza sativa</i>	[20]
PPE3-V01、PPE3b-V01	碱基替换、插入	0.05%~0.4%	PEG介导转化	<i>Oryza sativa</i>	[21]
PPE2-V02、PPE3-V02	碱基替换、插入	<1.55%	PEG介导转化	<i>Oryza sativa</i>	[21]
Prime editor basic	碱基替换	9.38%、2.22%	基因枪介导转化	<i>Oryza sativa</i>	[22]
PE2	碱基替换	0.26%~2%	农杆菌介导转化	<i>Oryza sativa</i>	[23]
PE3	碱基替换	0.26%~2%	农杆菌介导转化	<i>Oryza sativa</i>	[23]
pPE2	碱基替换、缺失、插入	0~31.3%	农杆菌介导转化	<i>Oryza sativa</i>	[24]
pPE3、pPE3b	碱基替换、缺失、插入	0~18.8%	农杆菌介导转化	<i>Oryza sativa</i>	[24]
PE-P1	碱基替换	0~1.4%	农杆菌介导转化	<i>Oryza sativa</i>	[25]
PE-P2	碱基替换	1.7%~26%	农杆菌介导转化	<i>Oryza sativa</i>	[25]
Sp-PE2	碱基替换	15.60%	农杆菌介导转化	<i>Oryza sativa</i>	[26]
Sp-PE3	碱基替换、缺失、插入	0~17.1%	农杆菌介导转化	<i>Oryza sativa</i>	[26]
Sa-PE3	碱基替换	0	农杆菌介导转化	<i>Oryza sativa</i>	[26]
PE-P2(rice)	碱基替换	0~5.9%	农杆菌介导转化	<i>Oryza sativa</i>	[27]
PE-P3(rice)	碱基替换	2.6%~92.3%	农杆菌介导转化	<i>Oryza sativa</i>	[27]
PE-P2(maize)	碱基替换	0~7.7%	PEG介导转化	<i>Zea mays</i>	[27]
PE-P3(maize)	碱基替换	2.9%~80%	PEG介导转化	<i>Zea mays</i>	[27]
ePPE	碱基替换、插入、缺失	0~31.5%	农杆菌介导转化	<i>Oryza sativa</i>	[28]
PPE3-evopreQ1	碱基替换、插入	2.6%~60.5%	PEG介导转化、农杆菌介导转化	<i>Oryza sativa</i>	[29]
PPE3-mpknot	碱基替换、插入	0~6.3%	PEG介导转化、农杆菌介导转化	<i>Oryza sativa</i>	[29]
MS2PE	碱基替换	1.7%~55.6%	PEG介导转化、农杆菌介导转化	<i>Oryza sativa</i>	[30]
pPEmax	碱基替换、插入、缺失	14.58%~66.67%	农杆菌介导转化	<i>Oryza sativa</i>	[31]
enpPE2	碱基替换、插入、缺失	64.58%~77.08%	农杆菌介导转化	<i>Oryza sativa</i>	[31]
pPEman-MLHdn	碱基替换、插入、缺失	0.18%~2.3%	农杆菌介导转化	<i>Oryza sativa</i>	[31]
pINPE2	碱基替换、插入、缺失	0.01%~0.8%	农杆菌介导转化	<i>Oryza sativa</i>	[31]
phyPE2	碱基替换、插入、缺失	<0.1%	农杆菌介导转化	<i>Oryza sativa</i>	[31]
ePE3max	碱基替换	~40%	农杆菌介导转化	<i>Oryza sativa</i>	[32]
ePE5max	碱基替换	~40%(纯合率提高)	农杆菌介导转化	<i>Oryza sativa</i>	[32]
PrimeRoot	大片段缺失、大片段插入(最大11.1 kb)	0~8.3%	PEG介导转化、农杆菌介导转化	<i>Oryza sativa</i>	[33]
ePPE*	碱基替换、插入、缺失	平均7.6%	PEG介导转化、农杆菌介导转化	<i>Triticum aestivum</i>	[34]
ePPEmax	碱基替换、插入、缺失	平均9.1%	PEG介导转化、农杆菌介导转化	<i>Triticum aestivum</i>	[34]
ePPEmax*	碱基替换、插入、缺失	平均9.7%	PEG介导转化、农杆菌介导转化	<i>Triticum aestivum</i>	[34]
ePPEplus	碱基替换、插入、缺失	0~18.9%	PEG介导转化、农杆菌介导转化	<i>Triticum aestivum</i>	[34]
pB-CMPE-ePPEplus	碱基替换、缺失	19.6%~86.3%	PEG介导转化、农杆菌介导转化	<i>Triticum aestivum</i>	[34]

(续表1)

编辑器名称	编辑类型	编辑效率	转化方式	物种	参考文献
		2%~21.6%			
pZ1PE3/3b、pZ1WSCsy4、 pZ1WS、p4xZ1PE3/3b-Csy4	碱基替换	0~53.2%	农杆菌介导转化	<i>Zea mays</i>	[35]
ePE5max	碱基替换	15%~75%	农杆菌介导转化	<i>Zea mays</i>	[36]
pCXPE01	碱基替换、缺失	0.26%	基因枪介导转化	<i>Solanum lycopersicum</i>	[37]
pCXPE02	碱基替换、缺失	0.85%	基因枪介导转化	<i>Solanum lycopersicum</i>	[37]
pCXPE03	缺失、替换	2.6%, 0.025% ~1.66%	基因枪介导转化、农杆 菌介导转化	<i>Solanum lycopersicum</i>	[37]
pPPED	碱基替换	0.06%	农杆菌介导转化	<i>Nicotiana benthamiana</i>	[38]
pPPEDs	碱基替换、插入	0.07±0.12%	PEG 介导转化	<i>Arabidopsis</i>	[38]
pPPEM	碱基替换、插入	0.7%~2.2%	PEG 介导转化	<i>Oryza sativa</i>	[38]
pAct-PPE	碱基替换、缺失、插入	0~5%	农杆菌介导转化	<i>Physcomitrium patens</i> 、 <i>tetraploid potato</i>	[39]
PPE2、PPE3、PPE3b	碱基替换	0.2%~0.5%	PEG介导转化	<i>Arachis hypogaea</i> , <i>Cicer</i> <i>arietinum</i> , <i>Vigna</i> <i>unguiculata</i>	[40]
PE-Nt2	碱基替换	0~1.4%	农杆菌介导转化	<i>Nicotiana tabacum</i>	[41]
PE-Nt3	碱基替换	1.1%~7.5%	农杆菌介导转化	<i>Nicotiana tabacum</i>	[41]
PE-Nt4	碱基替换	1.3%~16.3%	农杆菌介导转化	<i>Nicotiana tabacum</i>	[41]
PPE2、PPE3、PPE3b	碱基替换、缺失、插入	0~21.5%	农杆菌介导转化	<i>Oryza sativa</i>	[42]
PE(v2)	碱基替换	3.5%~48.65%	PEG 介导转化、农杆菌 介导转化	<i>Oryza sativa</i>	[43]
PE3-HS vector	碱基替换、插入、缺失	1.3%~2.1%	农杆菌介导转化	<i>Oryza sativa</i>	[44]
PE3-AS vector	碱基替换、插入、缺失	2.4%~14.3%	农杆菌介导转化	<i>Oryza sativa</i>	[44]
PE-DS vector	碱基替换、插入、缺失	3.2%~54.2%	农杆菌介导转化	<i>Oryza sativa</i>	[44]
PE-DSM vector	碱基替换、插入、缺失	1.8%~45.8%	农杆菌介导转化	<i>Oryza sativa</i>	[44]

端、优化RT模板序列以及花青素标记辅助筛选等优化策略在烟草中建立了PE-Nt4系统，并通过该系统实现了NtCPS2基因的G-T的碱基转换，赋予了烟草合成冷杉醇的能力。

综上，研究人员已在多种植物中建立了引导编辑技术，包括水稻、小麦、玉米、拟南芥、番茄和烟草等，其中较单子叶植物相比，双子叶植物中PE系统的编辑效率依然较低，因此，植物中的PE系统仍需进一步优化，以拓展引导编辑技术在作物育种中的应用。

3 引导编辑技术的优化

针对引导编辑技术效率较低这一问题，研究人员在动植物中进行了一系列优化，其中包括对效应蛋白nCas9-M-MLV RT、pegRNA、DNA修复途径和染色质结构调控等方面的优化，如图2所示。

3.1 引导编辑系统中效应蛋白的优化策略

nSpCas9(H840A)与M-MLV RT融合构建了引导编辑系统中的效应蛋白，对nSpCas9(H840A)和M-MLV RT进行优化是提高引导编辑效率的途径之一。

3.1.1 nCas9的优化

nCas9作为PE系统中效应蛋白的重要组成部分之一，其切割活性是PE系统实现编辑的关键因素之一，因此，可以通过增强nCas9核酸酶的切割活性来提高PE系统的编辑效率。在哺乳动物细胞中，Chen等人^[45]通过在nSpCas9(H840A)基础上增加2个氨基酸突变(R221K/N394K)增强其单链切割能力，同时融合不同类型的核定位信号等策略开发了增强版的PEmax系统。用类似的策略，在植物中，Li等人^[31]发现，与pPE2系统相比，pPE2max系统介导的水稻3个位点的编辑效率平均增

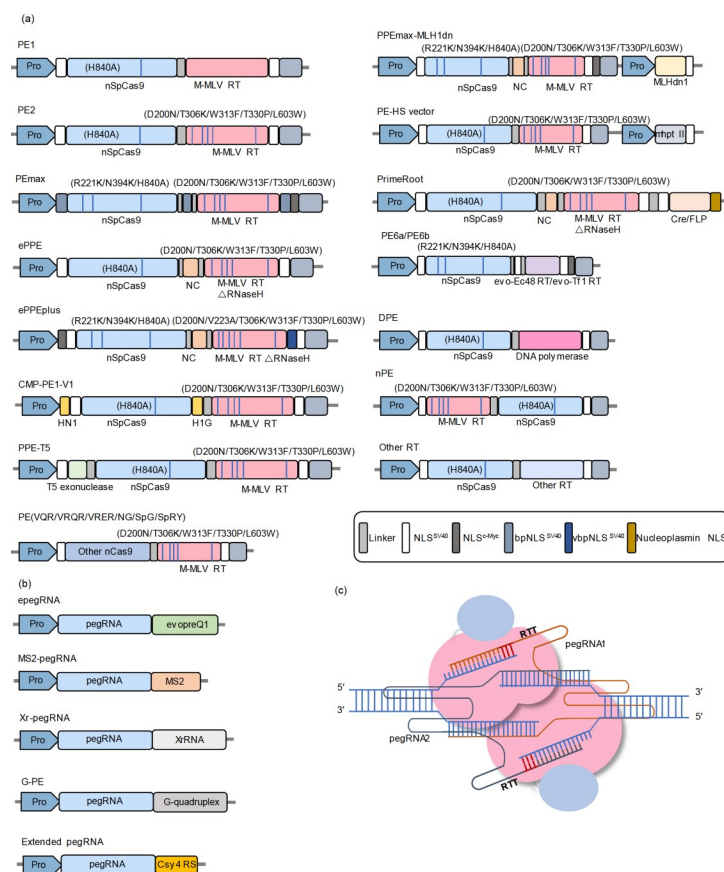


图 2 (网络版彩色)引导编辑器的载体结构优化示意图。(a) 效应蛋白结构优化。PE1为原始的PE系统; PE2优化为工程M-MLV RT; PEmax由nCas9(H840A)变体改为nCas9(R221K/N394K/H840A)变体,并添加bpNLS^{SV40}、NLS^{c-Myc}; ePPE更新为M-MLV RT-ΔRNaseH,并添加了NC蛋白; ePPEplus在ePPE的基础上将nCas9(H840A)变体改为nCas9(R221K/N394K/H840A)变体,并在M-MLV RT-ΔRNaseH变体中增加V223A突变,且优化了NLS的种类和位置; CMP-PE1-V1在PE2的nCas9的两端添加了染色质调节肽; PPE-T5在PE2的nCas9前添加了一个T5外切酶; PPEmax-MLH1dn比PEmax多一个单独表达的MLH1dn蛋白; PE-HS vector增加了潮霉素基因表达盒; PrimeRoot比ePPE增加了整合酶(Cre/FLP)和Nucleoplasmin NLS; PE(VQR/VRQR/VRER/NG/SpG/SpRY)将nCas9更换为其他的核酸酶; DPE将工程M-MLV RT更换为DNA聚合酶; PE6a/PE6b在PEmax基础上将工程M-MLV RT更换为evo-EC48或者evo-Tf1; nPE将工程M-MLV RT融合到nCas9的N端; Other RT指将工程M-MLV RT更换为其他的RT。Pro, 启动子; NLS, 核定位信号; MLH1dn, MLH1蛋白的显性负效应蛋白变体; M-MLV RT-ΔRNaseH, 一种具有缺失核糖核酸酶H(RNaseH)结构域的M-MLV RT变体; NC, 一种具有核酸伴侣活性的病毒蛋白,对多种与逆转录相关的功能具有影响; VQR/VRQR/VRER/NG/SpG/SpRY, nCas9的多种变体。(b) pegRNA结构优化。在原始pegRNA的基础上在其3'端增加基序提高PE效率。evopreQ1, 一个结构化的RNA假结,保护3'延伸免受外切酶的降解; MS2, 一种发夹,通过结合融合的MS2外壳蛋白,促进其招募到逆转录酶; XrRNA, 寨卡病毒外核糖核酸酶抗性RNA基序; G-quadruplex, G-四链体,一种由富含G的核酸片段形成的特殊二级结构; Csy4 RS, Csy4识别序列,可以形成发夹结构防止pegRNA环化。(c) 双pegRNA策略模型

Figure 2 (Color online) The optimization of the PE system. (a) The optimization of prime editors. PE1 is the original PE system; Optimized for engineering M-MLV RT in PE2; PEmax was changed to nCas9 (H840A) variant and bpNLS^{SV40} and NLS^{c-Myc} were added; ePPE was changed to M-MLV RT-ΔRNaseH and NC protein was added. Based on ePPE, ePPEplus changes the nCas9(H840A) variant and adds V223A mutation to M-MLV RT-ΔRNaseH variant, and optimises the type and location of NLS. CMP-PE1-V1 adds chromatin regulatory peptides to both ends of nCas9 of PE2. PPE-T5 adds a T5 exonuclease before nCas9 of PE2; PPEmax-MLH1dn has one more MLH1dn protein than PEmax. PE-HS vector added hygromycin gene expression box. Compared with ePPE, PrimeRoot increases integrase (Cre/FLP) and Nucleoplasmin NLS. PE(VQR/VRQR/VRER/NG/SpG/SpRY) for will nCas9 replacement for other nucleic acid enzyme; DPE is to replace engineering M-MLV RT with DNA polymerase; PE6a/PE6b is to replace the engineering M-MLV RT with evo-EC48 or evo-Tf1 based on PEmax. nPE is the fusion of engineering M-MLV RT into the N terminal of nCas9; Other RT refers to the replacement of the engineering M-MLV RT with another RT. Pro, promoter; NLS, nuclear localization signal; MLH1dn, dominant negative protein variant of MLH1 protein; M-MLV RT-ΔRNaseH, a variant of M-MLV RT with the deletion of the ribonuclease H (RNaseH) domain; NC, a viral protein with nucleic acid chaperone activity that influences a variety of reverse transcription-related functions; VQR/VRQR/VRER/NG/SpG/SpRY, nCas9 multiple variations. (b) The optimization of pegRNA. On the basis of the original pegRNA, adding a motif at its 3' end improves the PE efficiency. evopreQ1, a structured RNA pseudojunction that protects the 3' extension from exonuclease degradation; MS2, a hairpin that promotes the recruitment of fused MS2 coat proteins to reverse transcriptase by binding to them; XrRNA: zika virus external ribonuclease resistant RNA motif; G-quadruplex, a special secondary structure formed by G-rich nucleic acid fragments; Csy4 RS, the Csy4 recognition sequence can form a hairpin structure to prevent pegRNA cyclization. (c) Dual pegRNA strategy model diagram

加了4.38倍。Qiao等人^[36]在玉米的3个除草剂相关靶点上测试发现, ePE5max系统的编辑效率高于PPE2或PPE3系统, 并用该系统获得了具有抗除草剂抗性的玉米新种质资源。Jiang等人^[32]使用ePE5max系统获得了水稻*OsEPSPS*突变的抗除草剂新种质资源。

此外, Doman等人^[46]使用其开发的噬菌体辅助连续进化系统PE-PACE(prime editor phage-assisted continuous evolution, PE-PACE)进化和设计了Cas9结构域, 并用其获得的性能最佳Cas9变体生成了PE6e-g, 在测试的13个位点中5个位点均可提高编辑效率。在哺乳动物中, Lee等人^[47]将Cas9的HNH结构域中与目标链切割有关的额外残基进行突变生成了nCas9变体(H840A/N863A), 并发现由该变体介导的PE系统可产生更高纯度的精准编辑。

3.1.2 M-MLV RT的优化

M-MLV RT是PE系统中效应蛋白的另一个重要组成部分, 通过将pegRNA 3'末端延伸的RNA序列逆转录合成带有目标编辑的新DNA序列, 新合成的DNA序列通过细胞自身修复机制整合到基因组DNA中来实现精确的基因编辑^[19]。因此, 通过提高M-MLV RT的稳定性和活性可以提高PE系统的编辑效率。为了增强RT的活性, Anzalone等人^[19]通过突变M-MLV RT的5个氨基酸(D200N/L603W/T330P/T306K/W313F), 以提高其热稳定性和改善逆转录过程, 从而开发了更高效的PE2系统。在植物中, Zong等人^[28]在上述工程化M-MLV RT的基础上去除RNase H结构域, 并在nCas9和M-MLV RT之间增添一个逆转录病毒核衣壳蛋白NC, 进一步提高了M-MLV RT的活性, 开发了ePPE系统, 使水稻PE系统的编辑效率平均提高了5.8倍。另有研究表明, V223A突变可以使RT比野生型酶更快、更有效地进行cDNA合成和具有更高的加工能力, Ni等人^[34]将V223A突变引入ePPE2系统, 在小麦的8个位点上测试发现, 与ePPE系统相比, ePPE(V223A)系统将各种碱基替换和小片段缺失的编辑效率平均提高了2.8倍。

此外, 多个团队在动植物中测试了用其他的RT替换M-MLV RT, 期望可以找到更高效精准的RT来提高PE系统的编辑效率。Lin等人^[20]在水稻中测试了花椰菜花叶病毒的CaMV RT(RT-CaMV)和大肠杆菌BL21的反转录衍生RT(RT-retron), 但与工程化M-MLV RT构成的PE系统相比编辑效率均较低。Chai等人^[30]测试了含有20个氨基酸突变的SuperScript4(SS4) M-MLV RT变体(thermo fisher scientific), 发现与PE2的工程化M-MLV

RT有相似的编辑效率, 而CaMV-RT构成的PE系统的编辑效率远低于工程化M-MLV RT构成的PE系统。Grüne-wald等人^[48]对7种逆转录酶进行测试筛选, 发现HERV-K_{con}-RT与细菌来源的II型内含子逆转录酶GsI-IIC-RT、Marathon-RT具有编辑活性, 其中经过工程化改造后Marathon-RT(D14R/N26R/D74R/N116K/N197R)活性显著提高, 作者将其与nCas9拆开分别表达开发了split-PE, 发现分开表达的PE系统同样具有编辑活性。最近, Doman等人^[46]在哺乳动物细胞中测试了59种不同来源的RT, 其中有20个RT构成的PE系统检测到编辑活性。然而, 所有RT构成的PE系统编辑效率都低于工程化M-MLV RT构成的PE系统, 最终通过对有潜力的RT进行工程化设计, 作者开发了evo-Ec48衍生的PE6a系统和evo-Tf1 RT衍生的PE6b系统。其中编码evoEc48 RT蛋白的核苷酸序列长度较PEmax系统中的工程化M-MLV RT短810 bp, 比去除RNase H结构域后的M-MLV RT短270 bp, 因此该系统更有利于递送^[46]。为了进一步提高编辑效率, Doman等人^[46]在PE6b的基础上结合多种有利突变生成了PE6c, 在PE2基础上对工程化的M-MLV RT聚合酶活性位点附近的多个位点进行突变(T128N、V129A/G、P196S/T/F、N200S/Y、V223A/M/L/E等), 生成了PE6d。经测试发现, 与PEmax Δ RNaseH、PEmax相比, PE6c/d对长片段插入的平均编辑效率显著提高。

与DNA聚合酶相比, 逆转录酶缺乏校对活性、与脱氧核苷三磷酸底物的亲和力较低且持续合成能力较弱, 这可能是PE编辑效率低的一个潜在因素^[49]。近期, 在哺乳动物细胞中, Liu等人^[49]使用一种DNA依赖性DNA聚合酶(phi29)代替M-MLV RT, 用修饰的核苷酸合成的线性DNA模板代替pegRNA 3'末端衍生的RNA模板, 实现了精准的基因组编辑, 效率最高达60%。同时, 另一个团队^[50]也报道了使用DNA依赖性DNA聚合酶代替PE系统中逆转录酶的策略, 他们将大肠杆菌DNA聚合酶I的外切酶缺陷Klenow片段与nCas9、HUH核酸内切酶融合, 开发了点击编辑器(click editor, CE), 编辑效率最高为26.6%。

3.1.3 蛋白间融合方式的优化

由于PE系统需要递送至细胞核才可实现对基因组序列的编辑, 因此通过添加核定位信号有助于PE系统顺利进入细胞核, 从而提高其在细胞核中的丰度, 最终提高PE系统的编辑效率。Chen等人^[45]发现, PEmax的优化过程中, 在M-MLV RT C端增加NLS^{c-Myc}可以提高

编辑效率. 在小麦中, Ni等人^[34]发现, 在nCas9 N端添加NLS^{c-Myc}和bpNLS^{SV40}、在M-MLV RT Δ RNaseH C端添加vbNLS^{SV40}和NLS^{SV40}, 可以进一步提高编辑效率.

M-MLV RT蛋白与nCas9蛋白之间的融合方式以及Linker序列对蛋白功能具有较大的影响. 在哺乳动物细胞中, Anzalone等人^[19]发现, M-MLV RT融合到nCas9 C端(cPE)比融合到N端(nPE)编辑效率更高. 然而, Xu等人^[27]发现, 在转基因水稻植株和玉米原生质体测试体系中, nPE策略的编辑效率显著高于cPE策略. 该现象可能是由于动植物中蛋白质表达、稳定以及折叠等方面的差异造成的. 此外, Chen等人^[24,45]通过优化M-MLV RT和nCas9之间的Linker序列提高了PE系统的编辑效率. 在哺乳动物细胞中, Velimirovic等人^[51]将IGFpm1-NFATC2IPpI(IN)融合到nCas9 N端以增强其翻译, 建立了INPE2系统, 显著提高了PE系统的编辑效率. 然而, Li等人^[31]发现, 将IGFpm1-NFATC2IPpI(IN)融合到nCas9的N端或将人源Rad51的单链DNA结构域融合到nCas9和M-MLV RT之间的策略优化PE系统, 在水稻愈伤组织中并不能提高编辑效率.

此外, Liu等人^[52]测试了nCas9与M-MLV RT分开表达的策略, 通过将M-MLV RT与MS2外壳蛋白MCP融合, 以及MS2与pegRNA骨架序列(Scaffold)融合, 实现nCas9与M-MLV RT的融合. 该策略建立的PE系统编辑效率与PE2系统相当, 但与nCas9和M-MLV RT直接融合表达的策略相比, 该系统更利于递送.

3.1.4 效应蛋白表达水平的优化

植物通过农杆菌介导转化时, T-DNA在基因组中多为单拷贝插入, 因此基因编辑工具的表达水平较低, 也限制了基因编辑效率. 所以, 通过提高PE系统中效应蛋白的表达水平可以提高细胞内PE系统的丰度, 从而提高PE系统的编辑效率. Lu等人^[37]使用番茄内源启动子RPS5A替换2x35S启动子, 驱动nCas9-M-MLV RT的表达, 提高了番茄的PE系统的编辑效率.

3.2 引导编辑系统中pegRNA的优化策略

pegRNA作为PE系统的另一个重要组成部分, 其结构和稳定性对PE系统的编辑效率有较大影响, 因此对其表达稳定性、PBS和RTT序列特征等方面进行优化是提高引导编辑效率的一种途径.

3.2.1 pegRNA结构的优化

pegRNA 3'末端额外增加了一段RNA序列, 并且该

RNA序列不能进行折叠, 暴露在细胞中, 易被细胞内的核酸外切酶降解, 导致pegRNA结构不稳定, 降低PE系统的编辑效率. 因此, 提高pegRNA结构的稳定性可以提高PE的编辑效率^[53]. 在哺乳动物细胞中, Nelson等人^[53]将2个可提高pegRNA稳定性的RNA结构基序evopreQ1和mpknot融合到pegRNA 3'端, 防止其因暴露而被降解, 将PE的编辑效率提高了3~4倍. 研究人员将此策略应用在水稻和玉米的PE系统中, 证明evopreQ1均能显著提高PE系统的编辑效率^[28,29,31,36]. 而Chai等人^[30]将MS2 RNA融合到pegRNA 3'末端, 并将MS2的外壳蛋白MCP与M-MLV RT融合, 构建了MS2PE系统, 在水稻中发现, 与PPE系统相比, 其编辑效率提高了1.2~10.1倍. 此外, 在哺乳动物中, 还可以通过添加其他可提高pegRNA稳定性的RNA序列或者调整pegRNA结构来提高PE的编辑效率, 如寨卡病毒外核糖核酸酶抗性RNA基序(xr-pegRNA)^[54]、G⁻四链体(G-PE)^[55]、环状RNA(petRNA)^[52]和apegRNA^[56].

除了pegRNA 3'端RNA延伸序列存在易降解的风险, 其5'端gRNA spacer序列和3'端PBS、RTT序列之间的互补性也会导致pegRNA的环化, 从而降低PE系统的编辑效率. Liu等人^[57]将Csy4识别序列融合到pegRNA 3'端, 当pegRNA表达后Csy4识别序列会形成发夹结构, 抑制pegRNA环化, 从而显著提高了PE系统的编辑. Zhang等人^[58]发现, 把pegRNA通过热变性和缓慢冷却的物理方式处理使其发生重新折叠, 以及在其PBS中引入更多的点突变以降低其与gRNA的互补性的策略可显著提高PE系统的编辑效率.

3.2.2 pegRNA中PBS和RTT序列设计的优化

pegRNA是PE系统“搜索和替换”的关键, 包括sgRNA以及位于3'端的PBS和RTT序列^[19]. 因此, 设计高效的pegRNA对PE系统编辑效率的稳定至关重要. 在哺乳动物细胞中, Anzalone等人^[19]发现, PE系统的编辑效率受pegRNA序列特征的影响, 如G/C含量低的序列通常需要较长的PBS以实现高效的引导编辑, 因此设计pegRNA时需要测试不同长度的PBS和RTT序列, 以实现目标位点较高效的精准编辑. 在植物中, Lin等人^[20]发现, pegRNA的PBS长度、RT模板长度和nicking sgRNA的位置等因素显著影响PE系统的编辑效率, 且这种影响在不同靶位点中存在较大差异.

基于类似的发现, 有许多研究团队提出了一系列辅助pegRNA设计的规则. Jiang等人^[35]发现, 在引导编辑过程中pegRNA骨架序列被误识别为RT模板的频率

较高, 因此为了减少此类副产物产生的频率, 提出了pegRNA设计的终止规则, 即将毗邻RT模板pegRNA骨架上1~3个核苷酸(CGC或TGC)作为逆转录RT模板的终止信号。Xu等人^[25,27]在水稻稳定转化和与玉米原生质体测试体系中发现, 在RT模板中引入多个同义核苷酸替换, 可以提高PE系统的编辑效率。该结果可能是由于在引入几个辅助碱基后, RT模板与基因组3'flap结合的紧密性较弱, 有利于逆转录过程。同时, Xu等人^[25,27]提出诱导同义核苷酸替换时, 应尽可能避免使用稀有密码子。同样的策略在哺乳动物细胞中也有报道。Li等人^[56]通过在pegRNA的RT模板的适当位置引入同义突变, 开发了spegRNA, 将PE系统碱基替换的编辑效率提高了平均353倍。

此外, pegRNA的设计需考虑gRNA、PBS和RT模板序列的长度和结构等多种因素。为了实现更高效的pegRNA设计, 目前研究人员在动植物中开发了多个高效的pegRNA设计工具, 如在哺乳动物细胞中基于不同算法开发的pegFinder^[59]、pegIT^[60]、PrimeDesign^[61]、DeepPE^[62]、Easy-Prime^[63]、PE-Designer^[64]、PINE-CONE^[65]和PnB Designer^[66]。在植物中, Lin等人^[67]经测试发现, 当PBS的 T_m 值接近30°C时, PE系统的编辑效率最高, 以此为依据开发了名为PlantPegDesigner的pegRNA的设计工具。

3.2.3 pegRNA表达水平的优化

提高pegRNA表达水平也是提高PE系统基因组编辑效率的有效策略, 其中常见的是使用强启动子驱动pegRNA表达^[28,37]。Jiang等人^[35]采用CaMV 35S-CmYLCV-U6复合启动子驱动pegRNA, 发现在玉米中使用该策略可将PE系统的编辑效率从0显著提高到43.8%。同时, Li等人^[31]也发现, 将OsU3启动子替换成CaMV 35S-CmYLCV-U6复合启动子, 可以显著提高水稻PE系统的编辑效率。另一种提高表达的方式是增加pegRNA的拷贝数。Qiao等人^[36]发现, 玉米中通过在PPEmax系统中增加pegRNA的拷贝数可显著提高PE系统的编辑效率。

3.2.4 双pegRNA策略

Lin等人^[67]开发了双pegRNA系统。该策略是使用2个pegRNA分别靶向正义链与反义链, 使目标编辑分别引入DNA双链中, 以提高PE系统的编辑效率。在水稻原生质体测试体系中, 与使用单个pegRNA的PE系统相比, 使用双pegRNA策略的PE系统的编辑效率平均提高3倍。

3.2.5 nicking sgRNA策略

在哺乳动物细胞中, 为了提高以编辑链为模板进行DNA修复的效率, 研究人员以PE2系统为基础, 在编辑位点上下游50~100 bp的位置添加一条nicking sgRNA来制造额外的切口, 该系统命名为PE3; 为了减少nicking sgRNA所产生的编辑副产物, 研究人员将nicking sgRNA设计为靶向精准编辑完成后所产生的DNA序列开发了PE3b系统。PE3系统和PE3b系统的编辑效率比PE2系统提高了约3倍; 而与PE3系统相比, PE3b系统显著减少了InDels的形成^[19]。在植物中测试发现, PE3系统较PE2系统相比并未显著提高引导编辑的效率^[20,21,23,24,39]。在后续的研究中发现, PE3系统在植物中的编辑效率取决于合适的nicking sgRNA, 通过选择具有高活性和合适位置的nicking sgRNA, 在水稻原生质体测试体系和水稻转基因植株中PE3系统可显著提高基因编辑效率, 因此nicking sgRNA的设计显得尤为主要^[32]。

3.3 DNA修复途径和染色质结构调控

在PE系统介导的精准编辑过程中, 当DNA在RT作用下完成逆转录后, 编辑链与互补链之间会形成错配的DNA双链, 进而在内源相应DNA修复机制的作用下, 以编辑链为模板修复非编辑链, 完成精准编辑。因此, 在该修复过程中, 通过调控细胞修复途径的发生过程是提高PE精准编辑效率的一个有效途径。此外, 调控靶位点区域的染色质开放水平是提高引导编辑效率的另一有效途径。

3.3.1 DNA修复途径调控

Chen等人^[45]研究发现, 内源性DNA错配修复(mismatch repair, MMR)途径抑制PE系统介导的编辑过程。因此, 调控MMR修复途径的关键基因表达可能是提高PE系统编辑效率的有效策略。在哺乳动物细胞中, Chen等人^[45]发现, MLH1蛋白是MMR修复途径中的关键蛋白, 降低其表达即可显著抑制MMR修复途径的发生频率, 因此通过融合MLH1显性负效应蛋白变体MLH1dn竞争性抑制内源MLH1功能可显著提高PE系统的编辑效率。同样, Da Silva等人^[68]也发现, MMR的关键因子可直接作用于PE系统编辑过程中的中间产物(逆转录后产生的异源DNA双链), 因此通过瞬时抑制或者降解MMR关键蛋白MLH1可显著提高PE系统的编辑效率。在植物中, 起初Li等人^[31]发现, 过表达哺乳动物的MLH1dn并不能提高水稻的PE系统的编辑效率, 而在

之后的研究中, Jiang等人^[32,36]在水稻和玉米中过表达植物内源的*OsMLH1dn*或*ZmMLH1dn*, 可显著提高PE系统的编辑效率. 此外, 在哺乳动物中, Li等人^[69]发现, 使用NHEJ修复途径的抑制剂DNAPK处理细胞可提高PE系统的编辑效率.

M-MLV RT逆转录后生成含有目标编辑序列的3' flap, 此时该3' flap 与5' flap处于动态平衡, 只有在5'-3'端核酸外切酶的作用下将5' flap切割, 同时3' flap通过DNA修复途径引入基因组才可完成PE系统介导的精准编辑过程^[19]. 因此, 在PE系统的编辑过程中, 5' flap的快速有效切除对正确编辑的DNA序列能否整合到基因组具有重要的影响. Liang等人^[42]发现, 在PE2(v2)系统中将T5核酸外切酶融合到nCas9-MMLV RT融合蛋白的N端, 与PE2(v1)系统相比, 植物细胞中碱基替换、缺失和插入的编辑效率提高了1.7~2.9倍. 但是Chen等人^[70]发现, T5核酸外切酶与PE2系统的直接融合会对哺乳动物细胞中的PE系统产生负面影响, 这可能是因为哺乳动物和植物的DNA修复机制的差异.

3.3.2 染色质可及性调控

染色质折叠和组蛋白修饰等因素影响染色质的可及性, 进而影响基因编辑器结合到靶位点的可能性, 因此通过调节染色质可及性亦可提高基因编辑的效率^[43,71]. 在哺乳动物细胞中, Park等人^[72]发现, 通过使用合适位置、gRNA spacer序列为14或15个碱基的sgRNA(dead sgRNA, dsgrNA)和染色质调节肽(chromatin-modulating peptides, CMPs), 可以通过提高染色质可及性来提高PE系统的编辑效率. 类似地, Chen等人^[70]证实, P65蛋白的招募可以有效提高PE3系统和PE5系统的编辑效率. Liu等人^[73]发现, 使用组蛋白去乙酰化酶抑制剂(HDACi)可以提高PE系统介导的插入和缺失的编辑效率, 但不能改善点突变的编辑效率.

3.4 其他优化策略

3.4.1 培养温度的优化

PE系统中的nCas9核酸酶和逆转录酶的工作温度会影响其活性, 但是植物培养的最适温度均低于nCas9和M-MLV RT的最佳工作温度(37和42°C). 因此, 可以采用适当提高植物培养温度的策略增强编辑器的活性, 从而提高PE系统的编辑效率. Lin等人^[20]在水稻原生质体测试体系中比较了26°C和37°C时PPE系统的编辑效率, 发现37°C时的PPE平均效率为6.3%, 而26°C时的PPE系统的平均编辑效率为3.9%. 而Tang等人^[21]发现,

将温度从32°C提高到37°C并不能提高水稻原生质体中的编辑效率. 水稻转化的最佳培养温度约为28~32°C, Zou等人^[29]发现, 与转化在最佳温度条件下相比, 将抗性愈伤组织置于42°C培养2 h、34°C培养两周的PPE3系统的编辑效率显著提高了约4倍.

3.4.2 辅助筛选策略

除了优化编辑器和pegRNA, 还可以通过代理系统(surrogate system)来富集已发生正确编辑的植物细胞或组织, 从而更高效地获得PE编辑的再生植株. Xu等人^[24]通过结合潮霉素(HPT^{ATG})报告系统来富集编辑的细胞, 提高了再生植株中PE系统的编辑效率. Li等人^[74]开发了一种植物协同编辑系统, 在编辑目标基因的同时编辑T-DNA上的*hpt*^{Y46*}和水稻内源的*OsALS*^{S627I}, 再通过潮霉素和除草剂的双重选择来富集已发生精准编辑的愈伤组织, 利用该协同编辑系统筛选出的再生植株中目标基因的精准编辑效率提高了2~50倍.

4 引导编辑技术的拓展

4.1 实现大片段DNA序列的精准插入和缺失

PE系统虽然可以高效介导小片段的DNA精准插入、缺失和所有12种碱基的转换, 但其介导的大片段碱基插入或缺失的效率依然较低. 为了提高PE系统介导的大片段插入或缺失的编辑效率, Anzalone等人^[75]在哺乳动物细胞中提出了一种新的twinPE策略, 使用nCas9-MMLV RT和一对pegRNAs进行可编程的替换或切除大片段DNA序列. 在哺乳动物细胞中还开发出了许多类似策略的优化系统, 包括PRIME-Del^[44]、Bi-PE^[76]、GRAND^[77]和PEDAR^[78]. 同时在植物中, Li等人^[79]开发了适用于植物GRAND系统的蛋白质标签序列, 如组氨酸(His)、血凝素(Hemagglutinin, HA)和FLAG插入水稻基因组. Sun等人^[33]将ePPE系统与高特异性重组酶Cre结合, 开发了PE系统介导的PrimeRoot系统, 可以精准地将大片段DNA整合到水稻和玉米基因组中, 成功插入的最长片段长度为11.1 kb, 编辑效率最高为6%.

4.2 实现多重引导编辑

利用多重引导编辑可以实现优良性状的快速聚合, 是遗传改良的重要策略. Li等人^[74]开发了一种植物协同编辑系统, 并利用该系统实现了同时对多个内源基因进行精准编辑. Ni等人^[34]建立了高效的csy4核糖核

酸内切酶介导的多重引导编辑系统, 在小麦原生质体测试体系中实现了多达10个基因的同时编辑。以上工作证明, PE系统在快速精准聚合优良性状方面的潜力。

4.3 实现引导编辑系统PAM识别范围的拓展

基础的PE系统使用的是化脓性链球菌Cas9 (SpCas9)的一种变体nCas9(H840A), 其PAM序列为5'-NGG-3'。为了进一步拓展PE系统的PAM识别范围, 在哺乳动物细胞中开发了基于SpCas9变体的PE2-VQR、PE2-VRQR、PE2-VRER、PE2-SpG和PE2-SpRY等可识别不同PAM序列的PE系统, 可实现几乎不受PAM限制的PE编辑^[80]。在植物中, Zong等人^[28]用植物密码子优化的nSpG变体取代原始PPE系统中的nCas9, 开发了PPE-SpG系统, 在水稻原生质体测试体系中可实现PAM序列为NG的PE精准编辑, 编辑效率为0.4%~7.5%。此外, 还有研究利用野生型的化脓性链球菌Cas9 (SpCas9)代替nCas9构建PE系统, 发现能够更高效地介导精准缺失这一编辑类型^[81,82]。

5 总结与展望

PE系统作为一种精准的基因编辑系统极大地拓展了基因编辑的应用范围, 为植物基础研究和作物遗传改良提供了强大的技术支持。近年来, 为了提高PE系统的编辑效率, 科研人员对其进行了诸多方面的优化, 包括对nCas9-MMLV RT、pegRNA、细胞内源因素调控、培养温度以及其他辅助筛选方式等方面的优化, 实现了各种类型碱基的置换、小片段甚至大片段DNA序列的插入和删除, 并在水稻、玉米和小麦等作物中利用PE技术创制出了多种具有优异性状的新种质资源。但植物中的PE系统仍需进一步优化和拓展, 如提高编辑效率、拓展其应用范围等。

双子叶植物中的PE系统编辑效率仍需进一步提

高。单子叶植物中的PE系统经过研究人员一系列的优化已实现较高的精准编辑效率, 但在双子叶植物中利用PE系统仍难以实现精准编辑, 目前在水稻、玉米和小麦等单子叶植物中PE系统的优化主要集中于提高PE系统在植物中表达量、提高PE系统的活性和稳定性以及植物内源MMR修复途径的调控。因此, 在双子叶植物PE系统的优化中可主要从以上几个方面展开。在哺乳动物中研究发现, 使用DNA聚合酶可以替代逆转录酶实现PE编辑, 与逆转录酶相比, DNA聚合酶具有校对活性、与脱氧核苷三磷酸底物的亲和力更高且持续合成能力更强, 在未来植物PE系统的优化中可进行测试。pegRNA序列特征对于PE系统具有较大影响, 不同靶点、不同长度的PBS、不同的RT模板等对编辑效率均有很大的影响, 因此需针对不同物种开发更加高效的pegRNA序列设计工具以提高其在植物中的活性和稳定性。另外, 已有研究表明, PE系统可通过进一步升级与优化实现大片段的精准插入和删除, 展现出PE系统强大的编辑能力, 因此在今后的研究中可依据PE系统的原理进一步拓展其在基因编辑领域的应用, 以实现更多类型、更加精准和更加高效的基因编辑, 为植物功能基因研究与精准育种提供强大的技术支持。此外, 基因编辑精准育种往往需要同时对多个基因进行精准编辑, 因此需开发更加高效的多重PE精准编辑系统以实现多个优异性状的快速聚合。

未来, PE系统作为一种精确而强大的基因组编辑技术, 在植物基因功能研究以及实现作物精准的定制化改良等方面, 具有广阔的应用前景。例如通过对作物基因组进行精细地修饰, 对非编码调控区域、启动子元件或上游开放阅读框(upstream open reading frame, uORF)区域进行分子设计实现基因表达水平或翻译水平的调控, 最终在提高产量、营养成分、抗病虫害、抗除草剂和耐非生物胁迫等方面实现快速种质改良。

参考文献

- 1 Molla K A, Yang Y. CRISPR/Cas-mediated base editing: Technical considerations and practical applications. *Trends Biotechnol*, 2019, 37: 1121–1142
- 2 Zhu H, Li C, Gao C. Applications of CRISPR–Cas in agriculture and plant biotechnology. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2020, 21: 661–677
- 3 Wright D A, Townsend J A, Winfrey Jr R J, et al. High-frequency homologous recombination in plants mediated by zinc-finger nucleases. *Plant J*, 2005, 44: 693–705
- 4 Christian M, Cermak T, Doyle E L, et al. Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. *Genetics*, 2010, 186: 757–761
- 5 Gasiunas G, Barrangou R, Horvath P, et al. Cas9–crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109: E2579–2586

- 6 Urnov F D, Rebar E J, Holmes M C, et al. Genome editing with engineered zinc finger nucleases. *Nat Rev Genet*, 2010, 11: 636–646
- 7 Joung J K, Sander J D. TALENs: A widely applicable technology for targeted genome editing. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2013, 14: 49–55
- 8 Zhang H, Zhang J, Lang Z, et al. Genome Editing—Principles and applications for functional genomics research and crop improvement. *Crit Rev Plant Sci*, 2017, 36: 291–309
- 9 Chen K, Wang Y, Zhang R, et al. CRISPR/Cas genome editing and precision plant breeding in agriculture. *Annu Rev Plant Biol*, 2019, 70: 667–697
- 10 Nishimasu H, Ran F A, Hsu P D, et al. Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA. *Cell*, 2014, 156: 935–949
- 11 Shimatani Z, Kashojiya S, Takayama M, et al. Targeted base editing in rice and tomato using a CRISPR-Cas9 cytidine deaminase fusion. *Nat Biotechnol*, 2017, 35: 441–443
- 12 Zong Y, Wang Y, Li C, et al. Precise base editing in rice, wheat and maize with a Cas9-cytidine deaminase fusion. *Nat Biotechnol*, 2017, 35: 438–440
- 13 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
- 14 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. *Nat Biotechnol*, 2023, 41: 1080–1084
- 15 Li Y, Li S, Li C, et al. Engineering a plant A-to-K base editor with improved performance by fusion with a transactivation module. *Plant Commun*, 2023, 4: 100667
- 16 Wu X, Ren B, Liu L, et al. Adenine base editor incorporating the N-methylpurine DNA glycosylase MPGv3 enables efficient A-to-K base editing in rice. *Plant Commun*, 2023, 4: 100668
- 17 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
- 18 Grünwald 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
- 19 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
- 20 Lin Q, Zong Y, Xue C, et al. Prime genome editing in rice and wheat. *Nat Biotechnol*, 2020, 38: 582–585
- 21 Tang X, Sretenovic S, Ren Q, et al. Plant prime editors enable precise gene editing in rice cells. *Mol Plant*, 2020, 13: 667–670
- 22 Li H, Li J, Chen J, et al. Precise modifications of both exogenous and endogenous genes in rice by prime editing. *Mol Plant*, 2020, 13: 671–674
- 23 Butt H, Rao G S, Sedeek K, et al. Engineering herbicide resistance via prime editing in rice. *Plant Biotechnol J*, 2020, 18: 2370–2372
- 24 Xu R, Li J, Liu X, et al. Development of plant prime-editing systems for precise genome editing. *Plant Commun*, 2020, 1: 100043
- 25 Xu W, Zhang C, Yang Y, et al. Versatile nucleotides substitution in plant using an improved prime editing system. *Mol Plant*, 2020, 13: 675–678
- 26 Hua K, Jiang Y, Tao X, et al. Precision genome engineering in rice using prime editing system. *Plant Biotechnol J*, 2020, 18: 2167–2169
- 27 Xu W, Yang Y, Yang B, et al. A design optimized prime editor with expanded scope and capability in plants. *Nat Plants*, 2022, 8: 45–52
- 28 Zong Y, Liu Y, Xue C, et al. An engineered prime editor with enhanced editing efficiency in plants. *Nat Biotechnol*, 2022, 40: 1394–1402
- 29 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
- 30 Chai Y P, Jiang Y Y, Wang J Y, et al. MS2 RNA aptamer greatly enhances prime editing in rice. *bioRxiv*, 2021, <https://doi.org/10.1101/2021.10.20.465209>
- 31 Li J, Chen L, Liang J, et al. Development of a highly efficient prime editor 2 system in plants. *Genome Biol*, 2022, 23: 161
- 32 Jiang Y, Chai Y, Qiao D, et al. Optimized prime editing efficiently generates glyphosate-resistant rice plants carrying homozygous TAP-IVS mutation in EPSPS. *Mol Plant*, 2022, 15: 1646–1649
- 33 Sun C, Lei Y, Li B, et al. Precise integration of large DNA sequences in plant genomes using PrimeRoot editors. *Nat Biotechnol*, 2023, 42: 316–327
- 34 Ni P, Zhao Y, Zhou X, et al. Efficient and versatile multiplex prime editing in hexaploid wheat. *Genome Biol*, 2023, 24: 156
- 35 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
- 36 Qiao D, Wang J, Lu M, et al. Optimized prime editing efficiently generates heritable mutations in maize. *J Integr Plant Biol*, 2023, 65: 900–906
- 37 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
- 38 Wang L, Kaya H B, Zhang N, et al. Spelling changes and fluorescent tagging with prime editing vectors for plants. *Front Genome Ed*, 2021, 3: 617553
- 39 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

- 40 Biswas S, Bridgeland A, Irum S, et al. Optimization of prime editing in rice, peanut, chickpea, and cowpea protoplasts by restoration of GFP activity. *Int J Mol Sci*, 2022, 23: 9809
- 41 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
- 42 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
- 43 Liu G, Yin K, Zhang Q, et al. Modulating chromatin accessibility by transactivation and targeting proximal dsRNAs enhances Cas9 editing efficiency *in vivo*. *Genome Biol*, 2019, 20: 145
- 44 Choi J, Chen W, Suiter C C, et al. Precise genomic deletions using paired prime editing. *Nat Biotechnol*, 2022, 40: 218–226
- 45 Chen P J, Hussmann J A, Yan J, et al. Enhanced prime editing systems by manipulating cellular determinants of editing outcomes. *Cell*, 2021, 184: 5635–5652.e29
- 46 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
- 47 Lee J, Lim K, Kim A, et al. Prime editing with genuine Cas9 nickases minimizes unwanted indels. *Nat Commun*, 2023, 14: 1786
- 48 Grünewald J, Miller B R, Szalay R N, et al. Engineered CRISPR prime editors with compact, untethered reverse transcriptases. *Nat Biotechnol*, 2023, 41: 337–343
- 49 Liu B, Dong X, Zheng C, et al. Targeted genome editing with a DNA-dependent DNA polymerase and exogenous DNA-containing templates. *Nat Biotechnol*, 2023, 42: 1039–1045
- 50 Da Silva J F, Tou C J, King E M, et al. Click editing enables programmable genome writing using DNA polymerases and HUH endonucleases. *bioRxiv*, 2023, <https://doi.org/10.1101/2023.09.12.557440>
- 51 Velimirovic M, Zanetti L C, Shen M W, et al. Peptide fusion improves prime editing efficiency. *Nat Commun*, 2022, 13: 3512
- 52 Liu B, Dong X, Cheng H, et al. A split prime editor with untethered reverse transcriptase and circular RNA template. *Nat Biotechnol*, 2022, 40: 1388–1393
- 53 Nelson J W, Randolph P B, Shen S P, et al. Engineered pegRNAs improve prime editing efficiency. *Nat Biotechnol*, 2022, 40: 402–410
- 54 Zhang G, Liu Y, Huang S, et al. Enhancement of prime editing via xrRNA motif-joined pegRNA. *Nat Commun*, 2022, 13: 1856
- 55 Li X Y, Wang X, Sun W J, et al. Enhancing prime editing efficiency by modified pegRNA with RNA G-quadruplexes. *J Mol Cell Biol*, 2022, 14: mjac022
- 56 Li X, Zhou L, Gao B Q, et al. Highly efficient prime editing by introducing same-sense mutations in pegRNA or stabilizing its structure. *Nat Commun*, 2022, 13: 1669
- 57 Liu Y, Yang G, Huang S, et al. Enhancing prime editing by Csy4-mediated processing of pegRNA. *Cell Res*, 2021, 31: 1134–1136
- 58 Zhang W T, Petri K, Ma J Y, et al. Enhancing CRISPR prime editing by reducing misfolded pegRNA interactions. *bioRxiv*, 2023, <https://doi.org/10.1101/2023.08.14.553324>
- 59 Chow R D, Chen J S, Shen J, et al. A web tool for the design of prime-editing guide RNAs. *Nat Biomed Eng*, 2021, 5: 190–194
- 60 Anderson M V, Haldrup J, Thomsen E A, et al. pegIT: A web-based design tool for prime editing. *Nucleic Acids Res*, 2021, 49: W505–W509
- 61 Hsu J Y, Grünewald J, Szalay R, et al. PrimeDesign software for rapid and simplified design of prime editing guide RNAs. *Nat Commun*, 2021, 12: 1034
- 62 Kim H K, Yu G, Park J, et al. Predicting the efficiency of prime editing guide RNAs in human cells. *Nat Biotechnol*, 2021, 39: 198–206
- 63 Li Y, Chen J, Tsai S Q, et al. Easy-Prime: A machine learning-based prime editor design tool. *Genome Biol*, 2021, 22: 235
- 64 Hwang G H, Jeong Y K, Habib O, et al. PE-Designer and PE-Analyzer: web-based design and analysis tools for CRISPR prime editing. *Nucleic Acids Res*, 2021, 49: W499–W504
- 65 Standage-Beier K, Tekel S J, Brafman D A, et al. Prime editing guide RNA design automation using PINE-CONE. *ACS Synth Biol*, 2021, 10: 422–427
- 66 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. *BMC Bioinf*, 2021, 22: 101
- 67 Lin Q, Jin S, Zong Y, et al. High-efficiency prime editing with optimized, paired pegRNAs in plants. *Nat Biotechnol*, 2021, 39: 923–927
- 68 Ferreira da Silva J, Oliveira G P, Arasa-Verge E A, et al. Prime editing efficiency and fidelity are enhanced in the absence of mismatch repair. *Nat Commun*, 2022, 13: 760
- 69 Li X, Zhang G, Huang S, et al. Development of a versatile nuclease prime editor with upgraded precision. *Nat Commun*, 2023, 14: 305
- 70 Chen R, Cao Y, Liu Y, et al. Enhancement of a prime editing system via optimal recruitment of the pioneer transcription factor P65. *Nat Commun*, 2023, 14: 257
- 71 Ding X, Seebeck T, Feng Y, et al. Improving CRISPR-Cas9 genome editing efficiency by fusion with chromatin-modulating peptides. *CRISPR J*, 2019, 2: 51–63

- 72 Park S J, Jeong T Y, Shin S K, et al. Targeted mutagenesis in mouse cells and embryos using an enhanced prime editor. [Genome Biol](#), 2021, 22: 170
- 73 Liu N, Zhou L, Lin G, et al. HDAC inhibitors improve CRISPR-Cas9 mediated prime editing and base editing. [Mol Ther Nucleic Acids](#), 2022, 29: 36–46
- 74 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
- 75 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. [Nat Biotechnol](#), 2022, 40: 731–740
- 76 Tao R, Wang Y, Jiao Y, et al. Bi-PE: Bi-directional priming improves CRISPR/Cas9 prime editing in mammalian cells. [Nucleic Acids Res](#), 2022, 50: 6423–6434
- 77 Wang J, He Z, Wang G, et al. Efficient targeted insertion of large DNA fragments without DNA donors. [Nat Methods](#), 2022, 19: 331–340
- 78 Jiang T, Zhang X O, Weng Z, et al. Deletion and replacement of long genomic sequences using prime editing. [Nat Biotechnol](#), 2022, 40: 227–234
- 79 Li J, Ding J, Zhu J, et al. Prime editing-mediated precise knockin of protein tag sequences in the rice genome. [Plant Commun](#), 2023, 4: 100572
- 80 Kweon J, Yoon J K, Jang A H, et al. Engineered prime editors with PAM flexibility. [Mol Ther](#), 2021, 29: 2001–2007
- 81 Tao R, Wang Y, Hu Y, et al. WT-PE: Prime editing with nuclease wild-type Cas9 enables versatile large-scale genome editing. [Sig Transduct Target Ther](#), 2022, 7: 108
- 82 Adikusuma F, Lushington C, Arudkumar J, et al. Optimized nickase- and nuclease-based prime editing in human and mouse cells. [Nucleic Acids Res](#), 2021, 49: 10785–10795

补充材料

表S1 引导编辑器在植物中的优化及应用

本文以上补充材料见网络版csb.scichina.com. 补充材料为作者提供的原始数据, 作者对其学术质量和内容负责.

Summary for “植物引导编辑技术的研究进展”

Recent advance of prime editing in plants

Chunyan Peng¹, Mengyan Bai² & Yuefeng Guan^{2*}

¹ College of Life Sciences, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China

² Guangdong Provincial Key Laboratory of Plant Adaptation and Molecular Design, Guangzhou Key Laboratory of Crop Gene Editing, Innovative Center of Molecular Genetics and Evolution, School of Life Sciences, Guangzhou University, Guangzhou 510006, China

* Corresponding author, E-mail: guan@gzhu.edu.cn

Genetic variation is the basis of crop breeding. However, traditional breeding is time-consuming, costly, and inefficient. The emergence of transgenic breeding technology has greatly accelerated the breeding process, but safety concerns regarding foreign gene integration have restricted its widespread use. The clustered regularly interspersed palindromic repeats (CRISPR)/CRISPR-associated (Cas) protein system allows precise genome editing in organisms without introducing foreign genes, achieving modifications to specific DNA fragments. Compared with previous breeding strategies, genome editing has markedly shortened breeding cycles, providing enhanced safety and efficiency, thereby accelerating progress in plant genetic research and agricultural breeding. Following double-strand breaks at target sites, the CRISPR/Cas system achieves targeted gene modifications through nonhomologous end joining (NHEJ) or homology-directed repair (HDR) pathways. Although NHEJ is the main repair pathway, it produces random insertions and deletions of small fragments. The HDR pathway uses donor DNA as a template for accurate repair, but the low efficiency of homologous recombination in plants and difficulty of donor DNA delivery pose challenges for efficient and accurate genome editing. To improve accuracy, scientists have developed base editors by introducing different types of base deaminase into the CRISPR/Cas system; however, the use of base editors is limited by specific types of base conversion. Thus, the CRISPR/Cas system cannot fully meet the needs of precision editing. In recent years, a novel CRISPR/Cas-based gene editing technique, known as prime editing (PE), has integrated engineered reverse transcriptase with a catalytically impaired Cas9 endonuclease. This innovation introduces genetic information into a guided-editing guide RNA (pegRNA), allowing for direct and precise editing of specific DNA sites. PE facilitates not only any type of base replacement but also precise insertion and deletion of small or large fragments, offering robust technical assistance for studying plant gene function and genetic improvement. PE has been established in various plants, including rice, maize, wheat, and tomato, creating germplasm resources with exceptional traits. Despite its establishment in numerous crops, the editing efficiency of PE remains low, especially in dicotyledonous plants. Therefore, there is a need to enhance the efficiency and flexibility of plant PE. This paper reviews the working principle of PE, its development process in various plants, and the ongoing optimization progress of prime editors in both animals and plants. This optimization includes refining nCas9-M-MLV RT and pegRNA, regulating endogenous factors, adjusting culture temperature, and employing other auxiliary screening methods. The application prospect of PE in crop genetic improvement was explored, with the aim of providing valuable references for further development of PE in plants.

CRISPR/Cas, plant prime editing, precision gene editing, crop breeding

doi: [10.1360/TB-2023-1111](https://doi.org/10.1360/TB-2023-1111)