

引用格式：刘子贤, 李承平, 刘俊杰. 新型基因编辑底盘工具的开发现状与展望. 中国科学院院刊, 2025, 40(1): 14-24, doi: 10.16418/j.issn.1000-3045.20241230005.

Liu Z X, Li C P, Liu G J J. Recent progress and perspectives on development of gene editing tools. Bulletin of Chinese Academy of Sciences, 2025, 40(1): 14-24, doi: 10.16418/j.issn.1000-3045.20241230005. (in Chinese)

新型基因编辑底盘工具的开发现状与展望

刘子贤* 李承平 刘俊杰*

1 清华大学 生命科学学院 北京 100084

2 清华大学 北京生物结构前沿研究中心 北京 100084

3 清华大学 膜生物学国家重点实验室 北京 100084

4 清华大学 生命科学联合中心 北京 100084

摘要 近年来基因编辑底盘工具的开发取得了长足进展，多维度基因编辑平台的建立和优化，实现了基因的靶向敲除、修复和插入等应用需求，推动了基础研究、医学、农业、环境保护、工业应用等多个领域的快速发展。文章在回顾基因编辑工具开发历史的基础上，分析了新型基因编辑工具的开发进展，对基因编辑工具开发的未来研究方向进行了展望。

关键词 基因编辑，CRISPR-Cas 系统，转座子，RNA 核酶，未来研究方向

DOI 10.16418/j.issn.1000-3045.20241230005

CSTR 32128.14.CASbulletin.20241230005

基因编辑技术的诞生与发展为生命科学研究带来了深远的影响，其精准操控基因组的能力已成为推动基础研究和应用科学的重要工具。自其诞生以来，基因编辑技术经历了从基础工具的创制到系统性平台构建的深刻变革。特别是近年来，研究人员通过活性优化和功能扩展，显著提升了基因编辑工具的效率和适

用性，使其从基础研究走向了更广泛的应用领域，包括合成生物学、生物育种和精准医学等。

随着学界对生命系统复杂性理解的加深和技术需求的多样化，基因编辑技术正朝着更高精准度、更低脱靶效应，以及更广泛应用场景的方向发展。本文回顾了基因编辑工具的发展历史，梳理了当前的研究热

*通信作者

资助项目：国家自然科学基金青年学生基础研究项目（博士研究生）（324B2051），国家自然科学基金原创探索计划项目（32150018），科技创新2030—重大项目（2022ZD0213900）

修改稿收到日期：2025年1月9日

点与关键进展,并对未来的技术发展方向进行了展望,以期对相关领域的未来探索提供有益的借鉴与启发。

1 基因编辑工具开发的历史回顾

1.1 基因编辑工具开发的历史背景

在19世纪中后期至20世纪初,孟德尔的一系列豌豆杂交实验为遗传学的初步建立和发展奠定了坚实基础。伴随着DNA被证实承载着遗传信息、DNA双螺旋结构的确立、中心法则的提出,以及DNA测序和扩增技术的相继发展,遗传学渐渐迈入了分子层面,研究者们逐步更加关注基因型与表型之间的内在联系,并着力于通过遗传操作验证基因功能等^[1]。然而,通过辐射诱变或化学诱变方法对基因序列进行修改的方式特异性差,且效率较低,难以满足研究需求。如何实现基因的靶向编辑成了研究人员关注的重要问题。20世纪70年代,斯坦福大学的研究团队向酿酒酵母中导入了与基因组靶标区域存在同源性的**人工DNA序列**,通过酿酒酵母自身的同源重组机制,使人工构建的DNA序列靶向替代了染色体中的目标区域,实现了在酿酒酵母染色体中的定点基因整合^[2]。基于这一机制,研究人员后续又在哺乳动物细胞和模式动物中实现了基因的靶向操纵^[3],但是这些基因操纵方式往往需要大规模的基因型或表型筛选操作,面临着步骤烦琐、效率较低等问题。

1.2 基因编辑底层技术的开发

20世纪80年代,为了实现更为简便高效的基因编辑,研究人员关注到了可识别较长DNA序列的限制性内切酶,如来自酿酒酵母第一类内含子的巨核酸酶I-SceI,其可特异性识别DNA序列,并切割产生DNA断裂,进一步可通过细胞内源修复系统实现基因编辑^[4]。目前,研究人员已基于巨核酸酶技术,在动植物系统中均实现了基因的靶向编辑^[5,6]。然而,巨核酸

酶通过特定的蛋白质序列来识别DNA,并对靶向位点造成切割,重编程核酸酶靶向新的DNA位点涉及蛋白质的改造,通常比较困难,从而使得编辑窗口较为局限。如何实现可编程化的基因操纵成了领域关注的重点。为此,研究人员针对基因的靶向识别和切割过程,设计了相应的模块,并通过有机组合,形成了一系列的可编程基因编辑底盘工具。

1996年,美国约翰斯·霍普金斯大学研究团队在具备DNA特异性识别功能的锌指蛋白模块基础上,融合表达核酸内切酶Fok I模块,创制了锌指核酸酶(ZFN)基因编辑技术^[7],其中的锌指蛋白模块包含多个锌指单元,每个单元可负责识别3个碱基对,通过串联多个识别相应碱基三联体的单元模块,即可精准识别较长的DNA序列,从而引导核酸酶模块,对感兴趣的核酸位点实现靶向切割。类似地,随着转录激活因子样效应因子(TALE)识别DNA序列的模式被破译,学界将核酸内切酶Fok I模块与TALE融合,形成了新的基因靶向编辑技术TALEN。通过改变TALE蛋白重复单元两个关键氨基酸,即可使TALE靶向感兴趣的目标DNA序列,与ZFN技术相比,其分子设计更加简单^[8,9]。基于这些技术,学界已在哺乳动物细胞、果蝇、斑马鱼和拟南芥等生物系统中实现了基因编辑^[10]。

与巨核酸酶相比,ZFN和TALEN尽管在一定程度上提升了基因编辑工具使用的灵活性,但这些技术均依赖于蛋白质和DNA之间的复杂相互作用,来识别核酸底物,如需靶向新的基因位点,则需要对DNA序列特异性识别蛋白模块进行重编程和合成,这往往涉及对系统的深入理解、实验经验及筛选试错过程等,烦琐且耗时。CRISPR-Cas^①技术的出现为基因编辑领域带来了重大变革。这项技术摆脱了巨核酸酶、ZFN和TALEN基因编辑工具在DNA识别过程中对蛋白质的

① 指成簇规律间隔短回文重复序列及相关蛋白质。

需求，是一种由RNA引导的DNA靶向编辑技术，为基因编辑带来了全新的分子底盘。2012—2013年，来自美国和法国的多个研究团队报道了CRISPR-SpCas9系统可用于靶向基因编辑^[11-13]。CRISPR-SpCas9系统包含负责执行DNA切割功能的SpCas9蛋白和引导RNA，其中的引导RNA可与靶标DNA通过碱基互补配对相结合，具有优良的可编程性，可根据靶标位点进行自由设计。由于该系统简便的分子架构和设计方式，以及较高的基因编辑效率，其应用出现了爆发式的增长，被广泛用于基础研究、微生物工程化改造、农作物育种，以及疾病治疗等多种场景。

此外，研究者们还对CRISPR-Cas系统进行了广泛的挖掘鉴定，以及深入的活性和机理表征等。目前已鉴定到的CRISPR-Cas系统主要可分为两类，其中I类具有多蛋白组分效应器，II类则具有单一蛋白组分效应器^[14]。由于II类系统的分子构造更为简洁，在应用层面具有更大的优势，研究者们主要关注于此类系统。例如，常用于DNA靶向切割的Cas9和Cas12a系统，以及用于RNA靶向切割的Cas13a/b系统等。这些发现为基因靶向敲除、敲入、敲低等提供了有效的分子工具，扩充了CRISPR-Cas系统的应用场景和维度。

1.3 CRISPR-Cas基因编辑工具存在着多种限制

虽然传统的巨核酸酶、ZFN、TALEN及CRISPR-Cas系统中的SpCas9、Cas12a和Cas13a/b等工具为基因的靶向操纵提供了有效解决方案，但也面临着诸多问题。特别是现已成为基因编辑领域核心技术的CRISPR-Cas系统，在应用中仍面临多种挑战：① Cas蛋白的长度通常超过了1 000个氨基酸，对应的编码序列较长，给细胞递送带来了挑战。② CRISPR-Cas系统在识别靶标DNA时，还需要靶标区域附近的序列满足PAM^②序列要求。例如，SpCas9偏好G富集的

PAM序列，从而限制了在基因组中可选的编辑窗口范围。③ CRISPR-Cas技术还面临着脱靶效应以及免疫反应性等问题，亦在一定程度上限制了其广泛应用^[15]。为应对这些挑战，研究人员展开了多方面的探索，包括广泛的新型系统挖掘与改造、开发精准编辑工具和插入工具，以及开发基于RNA的基因编辑工具等，形成了维度多样化的新型基因编辑工具开发模式。

2 新型基因编辑工具开发的模式

2.1 CRISPR-Cas系统的扩展与优化

CRISPR-Cas系统中负责底物切割的Cas蛋白通常编码序列较长，使其在高效的细胞递送方面面临挑战，这也是其应用中存在的关键技术瓶颈之一。对此，研究者们积极开展数据挖掘，力图发现新型的小型CRISPR-Cas系统，从而推动基因编辑技术的更广泛应用。2019年，美国加州大学伯克利分校的团队对一类来自非致病菌的小型CRISPR-Cas12e（CasX）核酸酶^③进行了深入研究，发现其具有TTCN的PAM序列偏好性，且在细菌和人源细胞中都具有编辑活性。值得注意的是，CasX与传统的Cas9和Cas12a系统截然不同，其引导RNA相对较大，而Cas蛋白组分则较小，且包含全新的结构域，整体呈现出了全新的分子构象，代表着一类新型的基因编辑系统^[16]。2020年，立陶宛维尔纽斯大学团队发现了超迷你型Cas12f核酸酶（含有约400—600个氨基酸），这一新型核酸酶被证明在细菌中具有双链DNA切割活性，且具有T或C富集的PAM序列偏好性，拓展了在基因组中的可靶向范围^[17]。辉大（上海）生物科技有限公司（以下简称“辉大基因”）研发团队进一步开发了两种在哺乳动物细胞中基因编辑效率最高超过90%的新型CRISPR-

② 原间隔序列邻近基序(protospacer adjacent motif)。

③ 包括PlmCasX和DpbCasX，含有约980个氨基酸。

Cas12f 系统——enOsCas12f1^④和 enRhCas12f1^⑤。基于前者，研发团队还开发了活性可被精确调控的 DD-enOsCas12f1 系统、表观编辑工具 miniCRISPRoff，以及基因表达激活工具 denOsCas12f1-VPR^[18]。此外，2023 年，清华大学团队综合生物信息学、生物化学、细胞生物学及结构生物学等多学科方法，发现并鉴定了一类来源于非致病菌的小型 CRISPR-Cas π 系统，该系统含有约 860 个氨基酸，具有 C 富集的 PAM 序列，能够耐受广谱的生化条件，并在哺乳动物细胞中展现了显著的基因编辑活性。研究人员进一步利用冷冻电镜技术成功解析了 CRISPR-Cas π 系统的结构，发现其结构特征显著不同于已知系统，有望成为未来微生物和动植物基因编辑工作的又一得力工具^[19]。这些创新不仅丰富了基因编辑工具箱，也为基因编辑技术进入“迷你时代”奠定了基础。

针对 CRISPR-Cas 系统脱靶效应和部分系统活性较低的问题，学界则从蛋白质和 RNA 两个维度，展开了广泛探索，以创制精准高效基因编辑工具，满足应用场景需求。①在蛋白质方面，定向进化作为一种常用的工程改造方法，通过引入随机突变，构建包含大量突变体的文库，并结合高效筛选策略，筛选出具有显著功能提升的突变体。韩国研究团队即通过这种思路，对 Cas9 进行了优化，在不损失在靶效率的情况下，降低了脱靶效应，提升了特异性^[20]。此外，随着对 Cas 蛋白三维结构和催化机制的深入了解，基于理性设计和半理性设计对 Cas 蛋白进行工程化改造，逐渐成为一种优化提升 CRISPR-Cas 系统的有力手段。美国 Broad 研究所研究团队关注于 Cas9 蛋白与 DNA 底物结合的区域，对正电荷氨基酸进行丙氨酸替换筛选，获得了高特异性的 Cas9 编辑工具^[21]。类似地，美国的其他多个研究团队也获得了多种高特异性的 Cas 核酸酶

工具^[22-24]。②在 RNA 方面，2022 年清华大学与加州大学伯克利分校团队合作，利用冷冻电镜解析 PlmCasX 的三维结构，并与 DpbCasX 进行对比，揭示了二者在体内外 DNA 切割活性差异的结构基础，并通过对引导 RNA 的结构优化，显著提高了 DpbCasX 和 PlmCasX 的基因编辑效率，为 CRISPR-Cas 系统的优化与改造提供了新的思路^[25]。德国研究团队也关注于 RNA，通过设计其恒定区域的发夹结构并引入化学修饰，有效提高了 gRNA 的结构稳定性，减少了错误折叠的风险，并增强了抗核酸酶降解能力，提高了基因编辑效率^[26]。

除了对 CRISPR-Cas 系统本身进行挖掘和优化之外，学界还对可与 CRISPR-Cas 系统发生相互作用来提升其活性的辅助元件进行了挖掘。2024 年，清华大学研究团队系统性地分析了 Cas9 蛋白的分子进化轨迹，并据此鉴定到了一类新型基因编辑辅助元件 PcrIIC1。结果表明，PcrIIC1 蛋白可以通过二聚化与 CbCas9 形成 CbCas9-PcrIIC1 异源四聚体，从而增强 CRISPR-CbCas9 系统对靶标 DNA 的搜寻、结合和切割效率，提高细菌对噬菌体的抵抗能力，为基于新型辅助元件的高效 CRISPR-Cas 基因编辑工具开发奠定了重要基础^[27]。

2.2 碱基编辑

单核苷酸变异是影响人类疾病及动植物经济性状的关键遗传因素。如何更加高效、精准地实现基因组中的碱基替换，以应对单核苷酸变异，成为生命科学领域的研究核心之一。碱基编辑（BE）技术是基于 CRISPR-Cas 系统开发的新型精准基因编辑技术，通过将没有酶切活性的 Cas 蛋白或仅具有单链切割活性的 Cas 蛋白与碱基修饰酶融合，从而在不引入双链断裂的情况下，实现对目标基因碱基的精确替换。

2016 年，哈佛大学研究团队在这一思路的基础

④ 含有 433 个氨基酸，PAM 序列为 TTN。

⑤ 含有 415 个氨基酸，PAM 序列为 CCD。

上，对脱氨酶种类、融合位置及连接方式进行了优化，形成了第一代工具BE1。研究表明，编辑所产生的U碱基容易被尿嘧啶DNA糖基酶识别并切除，导致无碱基位点的形成，从而引发非预期的插入或删除^[28]。为提升目标编辑效率，该团队又采取了融合尿嘧啶糖基酶抑制剂，以及用具有单链切割活性的nCas9替代无切割活性dCas9的策略，获得了BE2和BE3工具^[28]。接下来，该团队又进一步增加了UGI的融合次数，推出了第4代工具BE4^[29]，并通过对BE4进行密码子优化并引入核定位序列，进一步提高了工具的效率，最终开发出了碱基编辑工具BE4max^[30]。

研究显示，大多数单碱基遗传病是由G到A的突变引起的，而胞嘧啶碱基编辑器（CBE）仅能实现C到T的点突变，因此研究者开始着眼于腺嘌呤碱基编辑器（ABE）系统的开发。然而，自然界并没有已知的DNA腺嘌呤脱氨酶。为此，哈佛大学研究团队挑选大肠杆菌来源的TadA脱氨酶，通过抗生素筛选系统进行定向进化，最终筛选出了人工进化的腺嘌呤脱氨酶。该腺嘌呤脱氨酶与nCas9融合，在RNA引导下可靶向基因组DNA，实现A到G的定点突变^[31]。

值得注意的是，2023年，为了克服现有碱基编辑器面临的可选工具底盘有限、系统体积较大，以及存在脱靶效应等问题，中国科学院遗传与发育生物学研究所联合苏州齐禾生科生物科技有限公司研究团队通过大规模蛋白结构预测和聚类，对脱氨酶开展了深入挖掘，鉴定到了全新的脱氨酶底盘工具，并开发出了高活性、高特异性的新型碱基编辑器，为动植物中的广泛应用提供了新的工具^[32]。此外，在2024年，中国科学院天津工业生物技术研究所、辉大基因和北京大学还采取了摒弃使用脱氨酶的传统编辑模式，转而使用DNA糖基酶进行碱基切除，并依赖细胞内源的修复机制完成碱基编辑，分别实现了对胸腺嘧啶的靶向编辑，拓展了现有的碱基编辑模式^[33-35]。

重要的是，碱基编辑器的出现突破了传统

CRISPR-Cas系统的限制，将其从原本的DNA切割“手术刀”升级为能够精确修正特定碱基的“修正液”。由于其所具有的高效、不产生DNA双链断裂、不需要供体DNA等优点，在精准医疗和作物育种等领域展现出了广阔的应用前景，例如用于血色素沉着症、肌营养不良症、癌症、罕见肝病等疾病的治疗，以及用于赋予农作物除草剂抗性等多元化场景^[36-38]。

2.3 先导编辑

2019年，美国哈佛大学研究团队为了拓展精准基因编辑模式，并实现小片段DNA的靶向插入与删除，对CRISPR-Cas9系统进行了创新性的改造：一方面在RNA末端加入了引物结合位点和逆转录模板序列，另一方面，将具有单链切割活性的Cas9与逆转录酶融合，形成了先导编辑器（PE）^[39]。这一新型工具可不依赖DNA双链断裂或DNA供体，在人类细胞中进行小片段的靶向插入、删除及各种碱基替换，为精准基因编辑开辟了新的方向。

初始版本PE1的编辑效率相对较低，因此该研究团队通过对逆转录酶序列进行突变，推出了PE2版本，提高了编辑效率。研究人员还增加了可介导互补链切割的引导RNA，辅以进一步优化，开发了PE3和PE3b版本，进一步提升了编辑效率，降低了非目标插入或删除的比率^[39]。2021年，美国哈佛大学与普林斯顿大学的合作团队发现，DNA错配修复途径在一定程度上抑制了先导编辑的效率和精确性。通过对此途径进行抑制，研究人员观察到编辑效率的显著提升。基于这一发现，他们在PE2和PE3的基础上，共表达错配修复途径抑制蛋白，开发了PE4和PE5系统，使编辑效率分别提高了7.7倍和2倍。进一步通过密码子优化、Cas9的氨基酸突变及增加核定位序列，开发了PEmax系统，再次提升了编辑效率。在与镰状细胞贫血症等疾病治疗相关的6个基因靶点上编辑测试时，PE4max和PE5max均显示出显著的编辑效率提升和非目标插入或删除效应的降低^[40]。2023年，美国哈佛大

学研究团队通过噬菌体辅助进化技术对原始PE进行定向进化，又获得了具有全新逆转录酶的PE6，与PEmax相比分子尺寸更小，且效率更高^[41]。2024年，美国普林斯顿大学的团队进一步发现了与PE编辑效率密切相关的La小RNA结合蛋白，其可以结合PE系统中RNA组分的3'末端，从而可能通过提高RNA的稳定性来提高编辑效率，并据此开发了PE7系统，在多个疾病治疗相关靶点和3种细胞系中，证明其具有显著的效率提升^[42]。

先导编辑技术已经在动植物细胞等多种生物系统中表现出了强大的精准基因编辑能力。在植物领域，中国科学院遗传与发育生物学研究所的团队率先在水稻和小麦两种重要农作物中开发并优化了植物先导编辑器^[43]；此后，又在水稻全基因组范围内评估了先导编辑的脱靶效应，证明该系统具有较高的特异性和安全性，还对系统设计进行了优化，为其在植物领域的应用奠定了坚实基础^[44,45]。接下来，团队进一步对逆转录酶进行了改造，并引入了病毒核衣壳蛋白元件，作为核酸的分子伴侣，显著提升了植物基因编辑效率，同时未发现非目标编辑效应的显著增加。基于这一技术，团队还成功培育了可耐受除草剂的水稻植株，为先导编辑在农业育种、作物改良等相关领域的广泛应用提供了优良范式^[46]。

与此同时，先导编辑技术的临床应用也在快速推进。目前，其已在杜氏肌营养不良症、先天性黑蒙症、酪氨酸血症、 α -1抗胰蛋白酶缺乏症和苯丙酮尿症等疾病模型中被证明有效^[47]。2024年，PE基因编辑疗法获得了美国食品药品监督管理局的批准，将开展1/2期临床试验，用于治疗慢性肉芽肿病，旨在评估其在儿童和成年患者中的安全性和有效性^[48]。这标志着先导编辑技术在基因治疗中的潜力正得到越来越广泛的认可，为精准医学打开了新的局面。

2.4 基因插入工具

尽管PE系统可以用于DNA的靶向插入，但是可

插入的片段通常较短，大约仅为50个碱基对，而2023年报道的TJ-PE系统则可在哺乳动物细胞中靶向插入约为800个碱基对的DNA片段，整体而言，仅依赖于PE系统尚不能满足大片段靶向插入需求^[49]。为拓展核酸插入工具箱，近年来学界关注于转座子等系统，创制了一系列的基因片段靶向插入系统。

转座子是一类可以在基因组中跳跃的天然可移动元件，根据转座中间体的不同，可分为逆转录转座子和DNA转座子。其中，前者会先通过转录得到RNA，之后再通过逆转录合成DNA，插入到新的靶标位点；而后者则被从原始位点剪切出来，以DNA的形式直接插入新的位点。

2023年，清华大学研究团队关注于R2逆转录转座子，阐明了其RNA组分调控转座过程的机制，并在此基础上对系统进行了改造设计，在哺乳动物细胞中实现了基因片段靶向插入。此项研究通过冷冻电子显微镜技术解析获得了R2逆转录转座子在不同状态下的高分辨率三维结构，并综合运用生物化学手段验证，表明R2逆转座子的mRNA中具有两段结构性的RNA，可调控两条靶标DNA链的先后切割次序，以巧妙地保障基因片段通过逆转录转座反应插入新的靶标位点。进一步，基于对RNA结构和功能的认知，该团队还对RNA进行了精简，在HEK293T细胞中灵敏地检测到了有效基因插入事件的发生，从而为开发新的基因插入工具奠定了重要基础^[50]。同一时期，美国Broad研究所团队也解析了R2逆转录转座子在基因组中进行靶向插入的机制，并尝试了通过Cas9引导，对靶标位点进行精准的序列插入，亦为开发基于转座子的基因插入工具带来了新的启发^[51]。2024年，中国科学院动物研究所的研究团队还针对R2逆转录转座子进行了系统性的挖掘和分析，并在哺乳动物细胞中构建了基因插入活性筛选系统，成功鉴定到了一种来源于鸟类基因组的R2Tg系统，团队成员进一步通过工程化改造，获得了en-R2Tg系统，并在人类肝细胞中观察到可达

25%的基因整合效率，在小鼠胚胎中的基因整合效率更是超过了60%，从而建立了一套高效精准的基因写入技术，为基因靶向插入提供了新的底盘工具^[52]。类似地，美国加州大学伯克利分校的研究团队也在2024年，基于R2系统建立了名为PRINT的精准插入技术，在人类原代细胞系中实现了基因靶向插入^[53]。

针对DNA转座子，美国Broad研究所的团队于2019年，在蓝藻中鉴定出了与CRISPR-Cas系统偶联的Tn7样转座系统，被称为CAST系统（CRISPR-associated Tn7 transposon）；其中的Tn7样转座酶可以与CRISPR-Cas系统相互作用，并通过其引导，在大肠杆菌中向靶标位点插入长达10 kb的DNA片段^[54]。同年，美国哥伦比亚大学的研究团队在霍乱弧菌中，也鉴定到了类似的系统，并在细菌中证实其具有精准的DNA片段插入能力^[55]。

除了上述介绍的系统，研究人员还采取了单链DNA退火蛋白与Cas9偶联或PE系统与整合酶联用等策略，在人类细胞和植物细胞等场景中亦实现了基因的靶向插入^[56]。值得一提的是，Arc研究所团队关注于插入序列元件，在2024年又报道了一种由桥式RNA引导的重组酶，可执行DNA靶向插入、删除，以及倒位，并且具有良好的重编程能力，展现出了广阔的应用前景^[57]。此外，学界目前还在大量挖掘可以执行多维度基因编辑的新型底盘工具。2024年，中国科学院动物研究所的研究团队建立了生物信息学挖掘流程，在无脊椎和脊椎动物基因组中鉴定到了大量具有潜在活性的DNA转座子，并进一步在人类细胞中建立了高通量筛选平台，发现了40个具有转座活性的转座子，极大地扩充了现有的活跃DNA转座子数据库，为基因片段插入相关的应用场景提供了大量新型可选工具^[58]。

2.5 以RNA为基础的基因编辑工具

2024年，清华大学研究团队关注于第二类内含子，首次鉴定到了一类可通过水解机制，执行DNA靶

向切割的RNA核酶，并在细菌和哺乳动物细胞中，分别证实其具备DNA切割能力，为基因编辑提供了全新的分子平台^[59]。第二类内含子也是一类逆转录转座子，其编码的内含子RNA，可在细菌或真核细胞器中的DNA上，通过“复制—粘贴”的方式，在靶标位点进行逆转录扩增。这段内含子RNA通常包含结构性元件和蛋白质编码序列两部分，后者所编码的蛋白质分子可与RNA的结构性元件部分结合，在宿主的DNA序列中靶向并切割目标位点，发生逆转座扩增，形成多个拷贝。有趣的是，研究团队发现尽管一些第二类内含子RNA仅包含结构性元件，不含蛋白质编码序列，无法翻译产生蛋白质分子，但仍具有多个拷贝，暗示这些结构性的RNA分子，可能依赖自身，即可完成靶标位点的识别和切割，以促进其扩增。

基于这一大胆假设，研究团队进行了系统性的挖掘，在多种细菌中鉴定到了这种类型的RNA，并通过深入的体外活性验证实验，首次证实了RNA分子可通过水解机制靶向切割DNA，并将这一类全新发现的RNA分子命名为水解型核酸内切核酶（HYER）。接下来，团队成员在大肠杆菌和HEK293T细胞中开展了活性验证，鉴定出了在两套实验体系中均具备DNA靶向切割能力的HYER1分子。此外，团队成员还通过冷冻电子显微镜技术解析获得了HYER1的高分辨率三维结构，并据此进行了多种理性设计，有效提高了对靶标序列识别的特异性和切割活性，证明HYER1分子可以兼容多维度的分子设计，具有良好的改造能力，可用于多种基因编辑场景。这项研究工作不仅首次报道了一类全新的第二类内含子RNA核酶，扩充了RNA分子数据库，更新了科学界对RNA功能的理解，也革新了传统的基因编辑工具开发模式，将基因编辑所需的DNA识别和切割能力都集成在了单一而简洁的RNA分子上，为开发基于RNA的全新基因编辑平台提供了坚实基础，具有重要的理论意义和应用潜力。

3 基因编辑技术未来关键创新方向展望

3.1 智能化基因编辑工具的开发与应用

随着人工智能技术的迅速发展,智能化基因编辑工具的开发正在成为推动基因编辑领域进步的重要因素。人工智能辅助的基因编辑工具优化,有望提高编辑效率和特异性,为研究人员提供更加高效、精准的解决方案,从而可以强有力地推动基础生物学研究、工程化菌株改造、复杂疾病的精准治疗和农作物性状改良等领域的快速发展。

在基因编辑工具的优化方面,已有的部分工具虽然表现出了较高的基因编辑能力,但在实际应用过程中,在特定生物体内的编辑场景下,编辑效率和特异性仍存在提升空间。人工智能辅助的新型功能元件挖掘和设计方法,已经在多项工作中帮助研究人员发现了全新的高效精准编辑工具,能够克服传统工具面临的局限性。进一步拓展人工智能在工具开发和优化方面的应用,将有助于为复杂生物系统中的精确操作提供更多解决方案。在靶点选择方面,基于机器学习算法,可以整合基因组序列、表观遗传修饰和三维基因组结构等信息,优化功能性靶点的选择,同时尽可能规避脱靶效应。这种多层次的整合分析不仅能够加速应用推进和效果评估,还能提高编辑的安全性。未来,随着人工智能技术的进一步发展,智能化基因编辑工具将为生命科学研究开辟更多可能性。

3.2 多维度基因编辑工具开发

现有基因编辑技术主要集中在DNA层面的操作,近年来,RNA层面的靶向编辑工具开发与应用也逐步吸引了学界的注意。与DNA编辑相比, RNA编辑具有暂时性和可逆性的特点,在需要短期干预的场景中更具优势,同时其无需对遗传物质进行直接修改,也具有更加优良的安全性。此外, RNA编辑工具还可用于对功能性非编码RNA进行调控,拓展基因编辑操作的维度,为多元应用需求提供更多选择。未来的研究

还可进一步拓展到蛋白质层面。例如,实现对蛋白质序列和结构进行人为调控,从而影响其催化功能或与其他生物分子的相互作用,进而得以对复杂的生命系统网络进行精细操纵,形成一套多维度整合的全链条式编辑工具系统,为生物体系的全局化理解提供强有力的底盘工具支撑。

3.3 递送方式优化与安全性提升

基因编辑技术的实际应用不仅依赖于编辑工具本身的性能,还高度依赖于递送系统的效率和安全性。递送方式的优化与安全性提升亦是未来基因编辑技术从实验室走向临床和产业化应用的关键。

当前,基因编辑工具的递送方式主要包括病毒载体(如腺病毒和慢病毒)、非病毒载体(如脂质纳米颗粒和电穿孔,以及直接注射核酸或核酸蛋白质复合物)。尽管这些方法在不同场景下各有优势,但在递送效率、组织特异性和免疫原性方面仍存在改进空间。此外,基因编辑的脱靶效应可能引发严重的不良反应,而递送系统的不精准性会进一步放大这一风险。因此,提高编辑工具的空间和时间特异性具有重要意义。例如,可利用高靶向性的配体或抗体修饰递送载体,来实现对特定组织或细胞的精准递送。此外,光控、热控和化学小分子诱导的靶向激活或释放系统也是学界关注的研究热点,这些系统能够在特定刺激下激活编辑工具,从而减少对非目标组织的影响。而在临床应用方面,递送方式的选择和优化还需要考虑复杂组织环境中的障碍,如血脑屏障和肿瘤微环境等。上述问题的不断优化和解决,将有效提升基因编辑工具的有效性和安全性,加速基因编辑技术的临床和产业化应用转化。

参考文献

- 1 Durmaz A A, Karaca E, Demkow U, et al. Evolution of genetic techniques: Past, present, and beyond. BioMed Research International, 2015, doi: 10.1155/2015/461524.
- 2 Scherer S, Davis R W. Replacement of chromosome segments with altered DNA sequences constructed *in vitro*.

- PNAS, 1979, 76(10): 4951-4955.
- 3 Capecchi M R. The new mouse genetics: Altering the genome by gene targeting. *Trends in Genetics*, 1989, 5: 70-76.
- 4 Jasin M. Genetic manipulation of genomes with rare-cutting endonucleases. *Trends in Genetics*, 1996, 12(6): 224-228.
- 5 Ménoret S, Fontanière S, Jantz D, et al. Generation of Rag1-knockout immunodeficient rats and mice using engineered meganucleases. *FASEB Journal*, 2013, 27(2): 703-711.
- 6 Gao H R, Smith J, Yang M Z, et al. Heritable targeted mutagenesis in maize using a designed endonuclease. *Plant Journal*, 2010, 61(1): 176-187.
- 7 Kim Y G, Cha J, Chandrasegaran S. Hybrid restriction enzymes: Zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *PNAS*, 1996, 93(3): 1156-1160.
- 8 Deng D, Yan C Y, Pan X J, et al. Structural basis for sequence-specific recognition of DNA by TAL effectors. *Science*, 2012, 335: 720-723.
- 9 Yang J J, Zhang Y, Yuan P F, et al. Complete decoding of TAL effectors for DNA recognition. *Cell Research*, 2014, 24 (5): 628-631.
- 10 Gaj T, Gersbach C A, Barbas C F. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends in Biotechnology*, 2013, 31(7): 397-405.
- 11 Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 2012, 337: 816-821.
- 12 Cong L, Ann Ran F, Cox D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 2013, 339: 819-823.
- 13 Mali P, Yang L H, Esvelt K M, et al. RNA-guided human genome engineering *via* Cas9. *Science*, 2013, 339: 823-826.
- 14 Makarova K S, Wolf Y I, Iranzo J, et al. Evolutionary classification of CRISPR-cas systems: A burst of class 2 and derived variants. *Nature Reviews Microbiology*, 2020, 18(2): 67-83.
- 15 Li T X, Yang Y Y, Qi H Z, et al. CRISPR/Cas9 therapeutics: Progress and prospects. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2023, 8: 36.
- 16 Liu J J, Orlova N, Oakes B L, et al. CasX enzymes comprise a distinct family of RNA-guided genome editors. *Nature*, 2019, 566: 218-223.
- 17 Karvelis T, Bigelyte G, Young J K, et al. PAM recognition by miniature CRISPR-Cas12f nucleases triggers programmable double-stranded DNA target cleavage. *Nucleic Acids Research*, 2020, 48(9): 5016-5023.
- 18 Kong X F, Zhang H N, Li G L, et al. Engineered CRISPR-OsCas12f1 and RhCas12f1 with robust activities and expanded target range for genome editing. *Nature Communications*, 2023, 14(1): 2046.
- 19 Sun A, Li C P, Chen Z H, et al. The compact Cas π (Cas12l) 'bracelet' provides a unique structural platform for DNA manipulation. *Cell Research*, 2023, 33(3): 229-244.
- 20 Lee J K, Jeong E, Lee J, et al. Directed evolution of CRISPR-Cas9 to increase its specificity. *Nature Communications*, 2018, 9(1): 3048.
- 21 Slaymaker I M, Gao L Y, Zetsche B, et al. Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity. *Science*, 2016, 351: 84-88.
- 22 Kleinstiver B P, Pattanayak V, Prew M S, et al. High-fidelity CRISPR-Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects. *Nature*, 2016, 529: 490-495.
- 23 Chen J S, Dagdas Y S, Kleinstiver B P, et al. Enhanced proofreading governs CRISPR-Cas9 targeting accuracy. *Nature*, 2017, 550: 407-410.
- 24 Kleinstiver B P, Sousa A A, Walton R T, et al. Engineered CRISPR-Cas12a variants with increased activities and improved targeting ranges for gene, epigenetic and base editing. *Nature Biotechnology*, 2019, 37(3): 276-282.
- 25 Tsuchida C A, Zhang S Y, Doost M S, et al. Chimeric CRISPR-CasX enzymes and guide RNAs for improved genome editing activity. *Molecular Cell*, 2022, 82(6): 1199-1209.
- 26 Riesenberger S, Helmbrecht N, Kanis P, et al. Improved gRNA secondary structures allow editing of target sites resistant to CRISPR-Cas9 cleavage. *Nature Communications*, 2022, 13 (1): 489.
- 27 Zhang S Y, Sun A, Qian J M, et al. Pro-CRISPR PerIIC1-associated Cas9 system for enhanced bacterial immunity. *Nature*, 2024, 630: 484-492.

- 28 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.
- 29 Komor A C, Zhao K T, Packer M S, et al. Improved base excision repair inhibition and bacteriophage Mu Gam protein yields C: G-to-T: A base editors with higher efficiency and product purity. *Science Advances*, 2017, 3(8): eaao4774.
- 30 Koblan L W, Doman J L, Wilson C, et al. Improving cytidine and adenine base editors by expression optimization and ancestral reconstruction. *Nature Biotechnology*, 2018, 36(9): 843-846.
- 31 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.
- 32 Huang J Y, Lin Q P, Fei H Y, et al. Discovery of deaminase functions by structure-based protein clustering. *Cell*, 2023, 186(15): 3182-3195.e14.
- 33 Ye L J, Zhao D D, Li J, et al. Glycosylase-based base editors for efficient T-to-G and C-to-G editing in mammalian cells. *Nature Biotechnology*, 2024, 42(10): 1538-1547.
- 34 Tong H W, Wang H Q, Wang X C, et al. Development of deaminase-free T-to-S base editor and C-to-G base editor by engineered human uracil DNA glycosylase. *Nature Communications*, 2024, 15(1): 4897.
- 35 Yi Z Y, Zhang X X, Wei X X, et al. Programmable DNA pyrimidine base editing *via* engineered uracil-DNA glycosylase. *Nature Communications*, 2024, 15(1): 6397.
- 36 Rees H A, Liu D R. Base editing: Precision chemistry on the genome and transcriptome of living cells. *Nature Reviews Genetics*, 2018, 19(12): 770-788.
- 37 Molla K A, Sretenovic S, Bansal K C, et al. Precise plant genome editing using base editors and prime editors. *Nature Plants*, 2021, 7(9): 1166-1187.
- 38 Porto E M, Komor A C, Slaymaker I M, et al. Base editing: Advances and therapeutic opportunities. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2020, 19(12): 839-859.
- 39 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.
- 40 Chen P J, Hussmann J A, Yan J, et al. Enhanced prime editing systems by manipulating cellular determinants of editing outcomes. *Cell*, 2021, 184(22): 5635-5652.
- 41 Doman J L, Pandey S, Neugebauer M E, et al. Phage-assisted evolution and protein engineering yield compact, efficient prime editors. *Cell*, 2023, 186(18): 3983-4002.
- 42 Yan J, Oyler-Castrillo P, Ravisankar P, et al. Improving prime editing with an endogenous small RNA-binding protein. *Nature*, 2024, 628: 639-647.
- 43 Lin Q P, Zong Y, Xue C X, et al. Prime genome editing in rice and wheat. *Nature Biotechnology*, 2020, 38(5): 582-585.
- 44 Jin S, Lin Q P, Luo Y F, et al. Genome-wide specificity of prime editors in plants. *Nature Biotechnology*, 2021, 39(10): 1292-1299.
- 45 Lin Q P, Jin S, Zong Y, et al. High-efficiency prime editing with optimized, paired pegRNAs in plants. *Nature Biotechnology*, 2021, 39(8): 923-927.
- 46 Zong Y, Liu Y J, Xue C X, et al. An engineered prime editor with enhanced editing efficiency in plants. *Nature Biotechnology*, 2022, 40(9): 1394-1402.
- 47 Zhao Z H, Shang P, Mohanraju P, et al. Prime editing: Advances and therapeutic applications. *Trends in Biotechnology*, 2023, 41(8): 1000-1012.
- 48 FDA clears prime editors for testing in humans. *Nature Biotechnology*, 2024, 42(5): 691.
- 49 Zheng C W, Liu B, Dong X L, et al. Template-jumping prime editing enables large insertion and exon rewriting *in vivo*. *Nature Communications*, 2023, 14(1): 3369.
- 50 Deng P J, Tan S Q, Yang Q Y, et al. Structural RNA components supervise the sequential DNA cleavage in R2 retrotransposon. *Cell*, 2023, 186(13): 2865-2879.
- 51 Wilkinson M E, Frangieh C J, MacRae R K, et al. Structure of the R2 non-LTR retrotransposon initiating target-primed reverse transcription. *Science*, 2023, 380: 301-308.
- 52 Chen Y C, Luo S Q, Hu Y P, et al. All-RNA-mediated targeted gene integration in mammalian cells with rationally engineered R2 retrotransposons. *Cell*, 2024, 187(17): 4674-4689.
- 53 Zhang X Z, Van Treeck B, Horton C A, et al. Harnessing eukaryotic retroelement proteins for transgene insertion into human safe-harbor loci. *Nature Biotechnology*, 2024, doi:

- 10.1038/s41587-10.1038/s41024-02137-y.
- 54 Strecker J, Ladha A, Gardner Z, et al. RNA-guided DNA insertion with CRISPR-associated transposases. *Science*, 2019, 365: 48-53.
- 55 Klompe S E, Vo P L H, Halpin-Healy T S, et al. Transposon-encoded CRISPR-Cas systems direct RNA-guided DNA integration. *Nature*, 2019, 571: 219-225.
- 56 Wang X T, Xu G X, Johnson W A, et al. Long sequence insertion *via* CRISPR/Cas gene-editing with transposase, recombinase, and integrase. *Current Opinion in Biomedical Engineering*, 2023, 28: 100491.
- 57 Durrant M G, Perry N T, Pai J J, et al. Bridge RNAs direct programmable recombination of target and donor DNA. *Nature*, 2024, 630: 984-993.
- 58 Zhang T T, Tan S J, Tang N, et al. Heterologous survey of 130 DNA transposons in human cells highlights their functional divergence and expands the genome engineering toolbox. *Cell*, 2024, 187(14): 3741-3760.
- 59 Liu Z X, Zhang S Y, Zhu H Z, et al. Hydrolytic endonucleolytic ribozyme (HYER) is programmable for sequence-specific DNA cleavage. *Science*, 2024, 383: eadh4859.

Recent progress and perspectives on development of gene editing tools

LIU Zi-Xian* LI Cheng-Ping LIU Gogo Jun-Jie*

(1 School of Life Sciences, Tsinghua University, Beijing 100084, China;

2 Beijing Frontier Research Center for Biological Structure, Tsinghua University, Beijing 100084, China;

3 State Key Laboratory of Membrane Biology, Tsinghua University, Beijing 100084, China;

4 Center for Life Sciences, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract The gene editing field has witnessed remarkable advancements in recent years, leading to the establishment and refinement of multidimensional gene editing platforms. These innovations have enabled precise targeted gene knockout, repair, and insertion. These tools have stimulated significant progress in fundamental research, therapeutics, agriculture, environment protection, and industrial applications. In this review, we provide a comprehensive overview of the milestones in gene editing tool development and offer perspectives on potential future directions for this rapidly evolving field.

Keywords gene editing, CRISPR-Cas systems, transposons, ribozymes, future directions

刘子贤 清华大学生命科学院博士研究生。主要研究领域：新型RNA核酶开发、RNA核酶活性表征等。

E-mail: liuzx21@mails.tsinghua.edu.cn

LIU Zi-Xian Ph.D. Candidate, School of Life Sciences, Tsinghua University. His research focuses on development of novel ribozymes, characterization of ribozymes, etc. E-mail: liuzx21@mails.tsinghua.edu.cn

刘俊杰 清华大学生命科学院副教授。主要研究领域：RNA核酶、逆转录转座子、CRISPR-Cas系统等。

E-mail: junjegogoliu@tsinghua.edu.cn

LIU Gogo Jun-Jie Ph.D. in Biology, Associate Professor of School of Life Sciences, Tsinghua University. His research focuses on ribozymes, retrotransposons, CRISPR-Cas systems, etc. E-mail: junjegogoliu@tsinghua.edu.cn

■责任编辑：文彦杰

*Corresponding author