

· 综 述 ·

植物基因组编辑新工具——引导编辑技术

杜秋丽^{1,2}, 王超¹, 刘关稳², 张丹丹², 张树军³, 邱金龙²

1 济宁学院 生命科学与工程系, 山东 曲阜 273155

2 中国科学院微生物研究所 植物基因组学国家重点实验室, 北京 100101

3 济宁市林业保护和发展服务中心, 山东 济宁 272000

杜秋丽, 王超, 刘关稳, 张丹丹, 张树军, 邱金龙. 植物基因组编辑新工具——引导编辑技术. 生物工程学报, 2022, 38(1): 26-33.

DU QL, WANG C, LIU GW, ZHANG DD, ZHANG SJ, QIU JL. Plant prime editing technique: a new genome editing tool for plants. Chin J Biotech, 2022, 38(1): 26-33.

摘 要: 基于 CRISPR/Cas9 系统的引导编辑(prime editing, PE)技术作为一种新兴的基因组编辑技术, 能在不产生双链断裂的情况下实现所有 12 种单碱基替换和小片段 DNA 的缺失或插入。引导编辑技术已经在多种植物中成功应用并将在植物精准育种中发挥重要作用。虽然植物引导编辑(plant prime editing, PPE)技术极大地扩展了植物基因组精准编辑的范围和能力, 但是其编辑效率仍需进一步改善才能推动其在植物基础研究及育种中的广泛应用。文中介绍了植物引导编辑的开发历程、组成结构、优点和局限性, 并重点介绍了植物引导编辑效率优化的进展, 包括 T_m 值指导的 PBS 序列设计、RT 模板长度、双 pegRNA 策略、PlantPegDesigner 网站的开发和 PPE 效应蛋白优化策略。最后, 对植物引导编辑技术的未来发展和应用提出了展望。

关键词: 植物引导编辑技术; 优化; 双 pegRNA; pegRNA 设计

Received: April 13, 2021; **Accepted:** July 14, 2021; **Published online:** October 14, 2021

Supported by: Central Finance Forestry Science and Technology Extension Demonstration Subsidy Project, China (2021); Natural Science Foundation of Shandong Province, China (ZR2019MC070); Strategic Priority Research Program of the Chinese Academy of Sciences (XDA24020101)

Corresponding authors: QIU Jinlong. Tel: +86-10-64807403; E-mail: qiujl@im.ac.cn

DU Qiuli. Tel: +86-537-3196163; E-mail: njduqiuli@163.com

基金项目: 2021 年度中央财政林业科技推广示范补贴项目; 山东省自然科学基金 (ZR2019MC070); 中国科学院战略先导性专项 (XDA24020101)

Plant prime editing technique: a new genome editing tool for plants

DU Qiuli^{1,2}, WANG Chao¹, LIU Guanwen², ZHANG Dandan², ZHANG Shujun³,
QIU Jinlong²

1 Department of Life Science and Engineering, Jining University, Qufu 273155, Shandong, China

2 State Key Laboratory of Plant Genomics, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

3 Jining Forestry Protection and Development Service Center, Jining 272000, Shandong, China

Abstract: The CRISPR/Cas9 based prime editing (PE) technique enables all 12 types of base substitutions and precise small DNA deletions or insertions without generating DNA double-strand breaks. Prime editing has been successfully applied in plants and plays important roles in plant precision breeding. Although plant prime editing (PPE) can substantially expand the scope and capabilities of precise genome editing in plants, its editing efficiency still needs to be further improved. Here, we review the development of PPE technique, and introduce structural composition, advantages and limitations of PPE. Strategies to improve the PPE editing efficiency, including the T_m -directed PBS length design, the RT template length, the dual-pegRNA strategy, the PlantPegDesigner website, and the strategies for optimizing the target proteins of PPE, were highlighted. Finally, the prospects of future development and application of PPE were discussed.

Keywords: plant prime editing; optimization; dual-pegRNA; design of pegRNA

遗传变异是农作物改良的基础。植物育种的目的就是创造和利用优良的遗传变异提高农业生产率^[1]。植物育种的发展过程中,主要使用了4类技术:杂交育种、诱变育种、转基因育种和基因组编辑育种^[2-5]。无论是杂交育种还是诱变育种,突变的产生都是随机的,育种过程耗时费力、周期长、效率低^[6]。转基因育种是植物育种技术的重大突破,它将外源基因或优良性状引入农作物,大大加速了农作物遗传改良进程;但由于植物基因组中整合了外源DNA,转基因植物受到各国政府的严格监管,目前只有少数转基因作物被商业化利用^[7]。基因组编辑技术无需导入外源基因就能对植物基因组进行靶向修饰从而获得新的性状,它与转

基因植物有本质不同,而与传统育种获得的产品实质相同。基因编辑已成为高效、安全的新一代作物育种技术,迅速地应用于水稻、小麦、玉米、番茄、马铃薯、木薯、西瓜和棉花等作物,对未来农业生产将产生巨大影响^[4,8-12]。

基因组编辑技术是指对基因组特定的DNA序列进行高效定点修饰的遗传操作技术,主要是通过工程化的序列特异性核酸酶(sequence-specific nucleases, SSNs)实现的。常用的SSNs主要有锌指核酸酶(zinc finger nuclease, ZFN)、转录激活因子样效应物核酸酶(transcription activator-like effector nuclease, TALEN)和成簇的规律间隔短回文重复序列及其相关系统(clustered regularly interspaced short palindromic

repeats/CRISPR associated system, CRISPR/Cas)^[13-15]。CRISPR/Cas 因其简单、高效和低成本, 迅速超越 ZFN 和 TALEN 成为用途最广的基因编辑工具^[16-18]。Emmanuelle Charpentier 和 Jennifer Doudna 因开发 CRISPR/Cas9 获得 2020 年诺贝尔化学奖, 成为技术创新推动科学进步的又一案例^[19]。

CRISPR/Cas 系统在基因组靶位点产生 DNA 双链断裂 (double-strand breaks, DSBs), 并通过细胞的非同源末端连接 (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^[20-22]。NHEJ 是主要的修复途径, 可导致小片段的随机插入或删除 (insertions or deletions, indels), 通常造成移码突变和蛋白活性丧失, 实现基因敲除 (gene knockout)^[12,23]。HDR 修复途径以导入的外源供体 DNA 为模板进行精准修复, 但在植物细胞中, DSB 介导的 HDR 难以实现高效的基因编辑, 原因在于同源重组效率低下和供体 DNA 递送困难^[4,24]。

随着 CRISPR/Cas 技术的不断发展, 其衍生升级技术, 如单碱基编辑技术 (base editor, BE) 及引导编辑技术 (prime editing, PE) 也已相继建立^[23,25-27]。BE 包括胞嘧啶单碱基编辑器 (cytosine base editor, CBE) 和腺嘌呤单碱基编辑器 (adenine base editor, ABE), 是将仅有单链切割活性的 Cas 缺刻酶 (Cas nickase, nCas) 或失去切割活性的 Cas 蛋白 (dead Cas, dCas) 与工程化的脱氨酶相融合构建而成^[25-26], 它避开了 DSB 的修复途径, 也无需提供供体 DNA, 精准实现了 C-to-T (或 G-to-A) 和 A-to-G (或 T-to-C) 的碱基转换 (transitions), 但对于嘧啶碱基和嘌呤碱基之间的颠换 (transversions) 及小片段的精确插入或删除却很难实现。另外 BE 系统有可能会在全基因组水平上产生不可预测的脱靶效应^[28-30]。

精准基因编辑新工具 PE 编辑器由 Broad 研究所的 David R. Liu 实验室研发^[23] (图 1), 是一种基于“搜索和替换”(search-and-replace) 的基因组编辑方式, 由两部分组成: 即 nCas9 (H840A) 与逆转录酶 (moloney murine leukaemia virus reverse transcriptase, M-MLV RT) 相融合形成的效应蛋白, 以及引导编辑向导 RNA (prime editing guide RNA, pegRNA)。与 CRISPR/Cas9 系统的 sgRNA (single guide RNA) 相比, pegRNA 的 3'端又延伸出了一段 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)。在 pegRNA 引导下, nCas9(H840A) 切割非靶标 DNA 链产生缺刻, 释放出与 PBS 配对的单链 DNA, 逆转录酶以缺刻产生的单链 DNA 的 3'端作为引物, 在 RT 模板指导下开启逆转录过程合成新的 DNA, pegRNA 上的目标编辑序列即被转移到

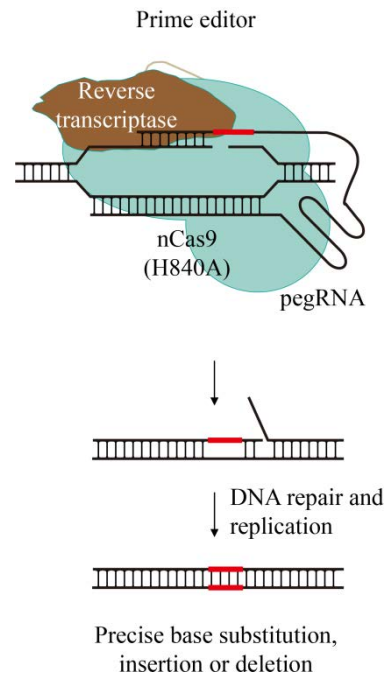


图 1 引导编辑器示意图

Figure 1 Schematic diagram of prime editor.

非靶标 DNA 链上, 随后通过 DNA 修复, 将新合成的含有目标编辑的 DNA 引入基因组, 替换原来断裂的 DNA 序列^[23]。PE 的突破在于可以精确实现所有 12 种任意类型的碱基置换、多碱基替换和 DNA 小片段的定点插入与删除, 极大地拓宽了基因组编辑的范围^[23,31]。

为了提高编辑效率, David R. Liu 团队相继研发了 PE1、PE2、PE3 和 PE3b 引导编辑系统^[23]。PE2 系统筛选获得了含有 5 个点突变 (D200N、L603W、T330P、T306K 和 W313F) 的 M-MLV 突变体, 使其热稳定性和对 RNA-DNA 底物亲和力得到了改善; PE3 系统通过引入 nicking sgRNA 进一步提高了编辑效率; PE3b 则进一步减少了由于引入 nicking sgRNA 而产生的 indels^[23]。

1 PE 编辑技术在植物中的应用

PE 技术一经开发便迅速应用于植物细胞中, 获得了编辑成功的再生植株^[24,32-33]。高彩霞研究组借鉴了 David R. Liu 团队构建的 PE2、PE3 和 PE3b 系统, 通过改造优化植物偏好密码子、启动子和编辑条件, 构建了适用于植物的 PPE2、PPE3 和 PPE3b 系统, 并在水稻和小麦原生质体细胞中获得了靶位点精确的碱基突变、插入和缺失编辑, 转基因水稻植株中 *OsCDC48-T1* 位点的编辑效率达到 21.8% (12/55)^[24]。张勇研究组在水稻原生质体中测试了 PPE3-V01 系统的编辑效率, 发现其活性仅有 0.05%–0.15%, 经过优化编辑效率得到了提升, 最高达到 1.55%^[34]。Magdy M. Mahfouz 研究组利用该技术, 获得了除草剂抗性的 PE 编辑水稻植株^[33]。夏兰琴研究组利用 PE3 系统获得了精准编辑的纯合水稻植株^[35]。魏鹏程研究组利用 PPE2 系统, 在水稻基因组中编辑多个靶位点, 编辑效率为 0%–31%^[36]。杨进孝研究组利用增强型 sgRNA 骨架 (EsgRNA scaffold) 等

多种策略提高了植物 PE 的编辑效率^[37]。朱健康研究组利用基于 SaCas9 的 PPE 系统在水稻细胞中编辑了报告基因^[38]。此外, 朱健康研究组利用番茄内源的强启动子增加融合蛋白的表达量, 实现了编辑效率的提升^[39]。

PPE 开发仅一年左右, 已经在植物中得到了迅速应用。目前植物引导编辑系统已经广泛地应用于水稻、小麦、玉米、番茄、马铃薯、烟草和拟南芥等植物中。但目前编辑效率多数偏低, 且在不同位点的效率差异较大^[1,24,40-41], 需要进一步优化提高。2021 年 3 月 *Nature Biotechnology* 报道了中国科学院遗传与发育生物学研究所高彩霞研究组和李家洋研究组合作研究成果, 展示了提高 PPE 编辑效率的新策略^[42]。

2 提高 PPE 编辑效率的优化策略

2.1 pegRNA 优化策略

2.1.1 基于 T_m 值的 PBS 序列优化

由于引导编辑系统的 PBS 序列与非靶标链的结合是起始逆转录过程的重要条件, 而熔解温度 (melting temperature, T_m) 是决定两条链结合稳定性的重要参数。PBS 序列及其 T_m 值可能是影响 PPE 编辑效率的重要因素。Tang 等^[34]选择水稻内源基因的 23 个编辑位点, 分别测试了不同 PBS 长度条件下 PPE 系统的工作效率。结果表明其编辑效率明显受到 PBS 长度的影响, 然而不同内源位点达到最大效率时的 PBS 长度并没有明显的规律性, Lin 等^[24]首先在水稻原生质体中选择 *OsCDC48-T1*、*OsCDC48-T2* 和 *OsALS-T1* 3 个基因组靶位点测试了不同的 PBS 长度 (6–16 nt) 对 PPE2 编辑效率的影响, 得出了与 Tang 相似的结果。但当 *OsCDC48-T1* 位点 PBS 序列的 T_m 值为 30 °C、*OsCDC48-T2* 为 28 °C、*OsALS-T1* 为 30 °C 时 PPE 系统的编辑效率最大。随后又选择 *OsACC-T1*、*OsCDC48-T3*、

OsEPSPS-T1 和 *OsPDS-T1* 4 个位点, 在 6–17 nt 的 PBS 长度范围内 (其对应 PBS 的 T_m 值范围为 18–52 °C) 对 pegRNA 的编辑活性进行测试, 也发现 PBS 的 T_m 值为 30 °C 左右时 pegRNA 的编辑活性最高, 比其他 T_m 值高出 1.5–4.3 倍 (其中 *OsACC-T1* 的最佳 T_m 值范围为 24–30 °C, *OsEPSPS-T1* 为 26–34 °C, *OsCDC48-T3* 为 28–36 °C, *OsPDS-T1* 为 30 °C)。对另外 11 个位点 (*OsALS-T2*、*OsDEPI-T1*、*OsEPSPS-T2*、*OsAAT-T1*、*OsGAPDH-T1*、*OsLDMAR-T1*、*OsODEV-T1*、*OsIPAI-T1*、*OsIPAI-T2*、*OsNRT1.1B-T1* 和 *OsROC5-T1*) 的检测结果显示, 81.8% (9/11) 的位点符合 T_m 值为 30 °C 左右时编辑效率最大的规律, 当 T_m 值超出此范围 (无论升高或降低) 编辑效率均降低^[42]。这些结果表明, PBS 序列的 T_m 值与 PPE 的编辑效率密切相关, 在水稻中多数编辑位点最适 T_m 值为 30 °C。也就是说, 最适 T_m 值指导下的对应 PBS 序列是优化 pegRNA 设计, 能够提高 PPE 的编辑效率。

2.1.2 RT 模板长度优化

研究者们分别测试了水稻不同内源位点不同 RT 模板长度对 PPE 编辑效率的影响^[24,34], 结果表明, RT 模板长度是影响其效率的重要参数, 但不同内源位点达到最大效率时的 RT 模板长度并不一致, 没有明显的规律性。

2.1.3 双 pegRNA 策略

基于双 pegRNA (dual-pegRNA) 可以进一步提高 PPE 的编辑效率^[42]: 即针对同一靶标位点同时设计 2 个 pegRNA (NGG-pegRNA 和 CCN-pegRNA), 分别识别对应的 2 条 DNA 单链。Lin 等^[42]选取了 9 个水稻基因中的 15 个内源位点, 分别在仅使用 NGG-pegRNA、仅使用 CCN-pegRNA 和使用双 pegRNA 条件下对同一位点进行引导编辑, 发现 86.7% 的位点 (13/15)

使用双 pegRNA 的编辑效率明显提高, 它们产生了 C-to-A、G-to-A、G-to-T、A-to-G、T-to-A、C-to-G 和 CT-to-AG 点突变, 单碱基或 2 个碱基缺失以及单碱基插入, 编辑效率最高达到 24.5%; 所有检测位点的双 pegRNA 平均编辑效率比单 NGG-pegRNA 高出约 4.2 倍 (其中 *OsNRT1.1B* 位点的 A 碱基插入效率高出 27.9 倍), 比单 CCN-pegRNA 高出 1.8 倍 (其中 *OsALS* 位点 A-to-G 碱基替换效率高出 7.2 倍)。值得注意的是, 双 pegRNA 策略在 *OsNRT1.1B* (A 碱基插入)、*OsNRT1.1B* (G-to-A) 和 *OsODEV* (CT-to-AG) 位点的引导编辑效率高达 2.7%, 而采用 NGG-pegRNA 则没有任何的引导编辑事件产生。更重要的是, 在以上编辑中, 双 pegRNA 策略的副产物 (包括 indels 在内) 比例与单 pegRNA 策略相比并没有升高。

2.1.4 PlantPegDesigner 网站助力植物 pegRNA 的高效设计

设计高活性的植物 pegRNA 是提高引导编辑效率的有效途径, 但通过常规实验方法设计 pegRNA 耗时费力。基于 T_m 指导的 PBS 序列设计优化及双 pegRNA 优化策略, Lin 等设立了植物 pegRNA 设计网站 PlantPegDesigner (<http://www.plantgenomeediting.net/>), 大大简化了植物 pegRNA 的设计流程^[42]。PlantPegDesigner 提供了包括“PAM 序列”“spacer 的 GC 含量”“引导编辑窗口”“PBS 长度”“推荐的 PBS 的 T_m 值”“RT 模板同源臂长度”等一系列参数选择, 以满足用户的不同需求。使用者只需输入 DNA 序列, 即可分析获得靶位点、PBS 序列、RT 模板序列及载体构建所需的引物等推荐方案。与其他 pegRNA 设计网站相比, PlantPegDesigner 推荐的双 pegRNA 策略在 *OsCDC48*、*OsNRT1.1B* 和 *OsALS* 靶位点处的编辑效率比平均高出 1.8 倍、16.3 倍和 45.8 倍^[42]。

此外, 研究者们采用了 PPE-核酶 (PPE-ribozyme, PPE-R) 系统或 tRNA 加工策略对 pegRNA 进行表达优化^[32,34-35,43]; 或者通过引入增强型骨架 (EsgRNA scaffold) 提高编辑效率^[36-37]。另外, 研究发现 PPE 编辑的副产物受到 RT 模板序列的影响, 不同 RT 模板序列可影响副产物的类型及比例, 可以通过调整 RT 模板序列降低副产物产生的频率^[42]。

2.2 使用不同来源的 Cas9 或变体拓展 PPE 的编辑范围

朱健康研究组通过构建 CRISPR/SaCas9 介导的引导编辑系统, 将其识别的 PAM 基序拓宽至 NNGRRT 序列, 并在水稻细胞中实现了报告系统的精确修改和荧光的激发^[38]。高彩霞研究组开发的基于 nCas9 (H840A) 切刻酶的双 pegRNA 策略需要分别识别 DNA 两条单链的 5'-NGG-3'和 5'-CCN-3' PAM 基序, 因而限制了编辑范围。为了解决这一问题, Lin 等^[42]选择了使用 PAM 基序为 NG 的 SpCas9 变体 SpG^[44], 通过 SpG-PPE 系统进行引导编辑, 在水稻中的编辑效率最高可达 1.9%。此外, 基于 SpG-PPE 使用双 pegRNA 策略检测了另外 2 个 NG PAM 靶位点的编辑效率, 发现使用双 pegRNA 与单 pegRNA 相比同样可提高 PPE 系统的编辑效率^[42]。通过计算分析水稻基因组数据库 (Os-Nipponbare reference IRGSP-1.0) 中双 pegRNA 的编辑范围, 发现当 PPE 系统的编辑窗口范围设定值在 +1~+15 位时, 基于 SpCas9 的双 pegRNA 策略可编辑水稻基因组 21.5%的碱基序列, 而基于 SpG-PPE 的双 pegRNA 策略理论上可编辑水稻基因组 89.2%的碱基序列。此外, 可以利用识别不同 PAM 基序的其他 Cas 变体, 进一步扩大 PPE 编辑的靶向范围。

2.3 PPE 蛋白优化策略

提高 PPE 编辑效率的另一有效途径是对

PPE 效应蛋白进行优化。研究者们利用包括对载体系统中植物密码子偏好性优化、增加核定位信号序列 (nuclear localization sequence, NLS)、启动子优化、更换逆转录酶和改变培养条件等一系列策略, 可以达到提高融合蛋白表达量和活性的目的。

Lin 等^[24]、Tang 等^[34]分别通过对载体系统中植物密码子偏好性优化、启动子优化和增加核定位信号等方法, 实现了水稻原生质体的 PPE 编辑效率的提升。朱健康研究组通过将融合蛋白启动子更换为由番茄内源的强启动子 RPS5A 驱动, 实现了编辑效率的提升^[34]。尝试不同的 RT 是优化 PPE 的思路之一。然而, Lin 等^[24]采用来源于植物花椰菜花叶病毒逆转录酶 (cauliflower mosaic virus RT, CaMV RT) 和大肠杆菌 BL21 来源的 retron 系统逆转录酶 (RT-retron) 替换工程化的 M-MLV RT, 水稻原生质体中的研究结果表明, 这两种 RT 能够实现 PPE 精准编辑, 但并没有提高编辑效率。M-MLV 逆转录酶最佳温度在 37 °C 左右, Lin 等测试了 37 °C 培养条件下 PPE 系统在水稻原生质体中的编辑效率, 将 26 °C 培养 12 h 的原生质体置于 37 °C 培养 8 h 后继续 26 °C 培养 8 h。结果显示 37 °C 培养后, 在 5 个测试位点中的 2 个位点上, PPE 的平均编辑效率由 3.9% 提升至 6.3%, 说明通过改变培养条件可以提升 PPE 的编辑效率。

3 总结与展望

许多作物的农艺性状改变都与特定位点处的碱基变异密切相关, 这些变异部分源自碱基突变, 部分源自小片段 DNA 的删除和插入^[45-46]。通过同源重组可以实现以上的遗传修饰, 但其在植物细胞中的频率低^[4,24]。单碱基编辑器主要实现碱基的转换, 对碱基颠换仍无能为力; 而

开发仅一年左右的 PPE 能够在植物中实现基因组目标位点处任意类型的单碱基精准替换。目前针对全基因组的特异性分析发现 PE 不会产生显著的单核苷酸水平的脱靶及 indels^[47], 其脱靶率远低于 CRISPR/Cas9 系统和 BE 系统。而对于多碱基置换和小片段 DNA 的任意编辑, 引导编辑系统则是目前功能更为强大、应用范围也更广泛的工具, 对于基础研究和精准分子育种等方面都会产生深远的影响。展望未来, 后续研究工作中可以进一步从两个方向加快现有 PPE 技术的优化: 一个方向是提高 pegRNA 编辑活性; 另一个方向是针对 PPE 效应蛋白进行优化, 包括融合蛋白的结构优化、提高蛋白表达水平和酶活性, 或者开发更高效、精准的 PPE 系统, 提高编辑效率实现这项技术在未来农作物遗传改良和植物精准分子育种领域的突破, 将推动农业的可持续发展。

REFERENCES

- [1] Gao C. Genome engineering for crop improvement and future agriculture. *Cell*, 2021, 184(6): 1621-1635.
- [2] Chen K, Gao C. Targeted genome modification technologies and their applications in crop improvements. *Plant Cell Rep*, 2014, 33(4): 575-583.
- [3] Hickey LT, Hafeez A, Robinson H, et al. Breeding crops to feed 10 billion. *Nat Biotechnol*, 2019, 37(7): 744-754.
- [4] 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.
- [5] Zhang Y, Pribil M, Palmgren M, et al. A CRISPR way for accelerating improvement of food crops. *Nat Food*, 2020, 1(4): 200-205.
- [6] Holme IB, Gregersen PL, Brinch-Pedersen H. Induced genetic variation in crop plants by random or targeted mutagenesis: convergence and differences. *Front Plant Sci*, 2019, 10: 1468.
- [7] Raman R. The impact of genetically modified (GM) crops in modern agriculture: a review. *GM Crops Food*, 2017, 8(4): 195-208.
- [8] Zhu H, Li C, Gao C. Applications of CRISPR-Cas in agriculture and plant biotechnology. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2020, 21(11): 661-677.
- [9] Molla KA, Yang Y. CRISPR/Cas-mediated base editing: technical considerations and practical applications. *Trends Biotechnol*, 2019, 37(10): 1121-1142.
- [10] Yang B, Yang L, Chen J. Development and application of base editors. *Crispr J*, 2019, 2(2): 91-104.
- [11] Hess GT, Tycko J, Yao D, et al. Methods and applications of CRISPR-mediated base editing in eukaryotic genomes. *Mol Cell*, 2017, 68(1): 26-43.
- [12] Voytas DF, Gao C. Precision genome engineering and agriculture: opportunities and regulatory challenges. *PLoS Biol*, 2014, 12(6): e1001877.
- [13] Townsend JA, Wright DA, Winfrey RJ, et al. High-frequency modification of plant genes using engineered zinc-finger nucleases. *Nature*, 2009, 459(7245): 442-445.
- [14] Bogdanove AJ, Voytas DF. TAL effectors: customizable proteins for DNA targeting. *Science*, 2011, 333(6051): 1843-1846.
- [15] Gasiunas G, Barrangou R, Horvath P, et al. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *PNAS*, 2012, 109(39): E2579-E2586.
- [16] Feng Z, Zhang B, Ding W, et al. Efficient genome editing in plants using a CRISPR/Cas system. *Cell Res*, 2013, 23(10): 1229-1232.
- [17] Shan QW, Wang YP, Li J, et al. Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(8): 686-688.
- [18] Yin K, Gao C, Qiu JL. Progress and prospects in plant genome editing. *Nat Plants*, 2017, 3: 17107.
- [19] 龚路遥, 向华. 2020 年度诺贝尔化学奖: 源自微生物学前沿研究的重大突破. *科学通报*, 2020, 65(36): 4171-4176.
Gong LY, Xiang H. Nobel Prize in chemistry 2020: the great breakthrough from frontier research in microbiology. *Chin Sci Bull*, 2020, 65(36): 4171-4176 (in Chinese).
- [20] Nishimasu H, Ran FA, Hsu PD, et al. Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA. *Cell*, 2014, 156(5): 935-949.
- [21] Jiang F, Taylor DW, Chen JS, et al. Structures of a CRISPR-Cas9 R-loop complex primed for DNA cleavage. *Science*, 2016, 351(6275): 867-871.

- [22] Que Q, Chen Z, Kelliher T, et al. Plant DNA repair pathways and their applications in genome engineering. *Methods Mol Biol*, 2019, 1917: 3-24.
- [23] Anzalone AV, Randolph PB, Davis JR, et al. Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA. *Nature*, 2019, 576(7785): 149-157.
- [24] Lin QP, Zong Y, Xue CX, et al. Prime genome editing in rice and wheat. *Nat Biotechnol*, 2020, 38(5): 582-585.
- [25] Komor AC, Kim YB, Packer MS, et al. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature*, 2016, 533(7603): 420-424.
- [26] Gaudelli NM, Komor AC, Rees HA, et al. Programmable base editing of A•T to G•C in genomic DNA without DNA cleavage. *Nature*, 2017, 551(7681): 464-471.
- [27] Rees HA, Liu DR. Base editing: precision chemistry on the genome and transcriptome of living cells. *Nat Rev Genet*, 2018, 19(12): 770-788.
- [28] Zuo E, Zuo E, Sun Y, et al. Cytosine base editor generates substantial off-target single-nucleotide variants in mouse embryos. *Science*, 2019, 364(6437): 289-292.
- [29] 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(6437): 292-295.
- [30] 宗媛, 高彩霞. 碱基编辑系统研究进展. *遗传*, 2019, 41(9): 777-800.
Zong Y, Gao CX. Progress on base editing systems full text replacement. *Hereditas*, 2019, 41(9): 777-800 (in Chinese).
- [31] Anzalone AV, Koblan LW, Liu DR. Genome editing with CRISPR-Cas nucleases, base editors, transposases and prime editors. *Nat Biotechnol*, 2020, 38(7): 824-844.
- [32] Jiang YY, Chai YP, Lu MH, et al. Prime editing efficiently generates W542L and S621I double mutations in two ALS genes in maize. *Genome Biol*, 2020, 21(1): 257.
- [33] Butt H, Rao GS, Sedeek K, et al. Engineering herbicide resistance *via* prime editing in rice. *Plant Biotechnol J*, 2020, 18(12): 2370-2372.
- [34] Tang X, Sretenovic S, Ren Q, et al. Plant prime editors enable precise gene editing in rice cells. *Mol Plant*, 2020, 13(5): 667-670.
- [35] 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(5): 671-674.
- [36] Xu R, Li J, Liu X, et al. Development of plant prime-editing systems for precise genome editing. *Plant Commun*, 2020, 1(3): 100043.
- [37] Xu W, Zhang CW, Yang YX, et al. Versatile nucleotides substitution in plant using an improved prime editing system. *Mol Plant*, 2020, 13(5): 675-678.
- [38] Hua K, Jiang Y, Tao X, et al. Precision genome engineering in rice using prime editing system. *Plant Biotechnol J*, 2020, 18(11): 2167-2169.
- [39] Lu Y, Tian Y, Shen R, et al. Precise genome modification in tomato using an improved prime editing system. *Plant Biotechnol J*, 2021, 19(3): 415-417.
- [40] 秦瑞英, 魏鹏程. Prime editing 引导植物基因组精确编辑新局面. *遗传*, 2020, 42(6): 519-523.
Qin RY, Wei PC. Prime editing creates a novel dimension of plant precise genome editing. *Hereditas*, 2020, 42(6): 519-523 (in Chinese).
- [41] Li JY, Li HY, Chen JL, et al. Toward precision genome editing in crop plants. *Mol Plant*, 2020, 13(6): 811-813.
- [42] Lin QP, Jin S, Zong Y, et al. High-efficiency prime editing with optimized, paired pegRNAs in plants. *Nat Biotechnol*, 2021, 39(8): 923-927.
- [43] Wang L, Kaya HB, Zhang N, et al. Spelling changes and fluorescent tagging with prime editing vectors for plants. *Front Genome Ed*, 2021, 3: 617553.
- [44] Walton RT, Christie KA, Whittaker MN, et al. Unconstrained genome targeting with near-PAMless engineered CRISPR-Cas9 variants. *Science*, 2020, 368(6488): 290-296.
- [45] Zhao K, Tung CW, Eizenga GC, et al. Genome-wide association mapping reveals a rich genetic architecture of complex traits in *oryza sativa*. *Nat Commun*, 2011, 2: 467.
- [46] Huang X, Zhao Y, Wei X, et al. Genome-wide association study of flowering time and grain yield traits in a worldwide collection of rice germplasm. *Nat Genet*, 2011, 44(1): 32-39.
- [47] Schene IF, Joore IP, Oka R, et al. Prime editing for functional repair in patient-derived disease models. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 5352.

(本文责编 陈宏宇)