

单碱基编辑技术的原理、发展及其在家畜育种中的应用

张迎冰¹, 张成图², 吴英², 于芮峦¹, 苏建民^{1*}

1 西北农林科技大学动物医学院 农业农村部动物生物技术重点实验室, 陕西 杨凌 712100

2 西宁市动物疫病预防控制中心, 青海 西宁 810016

张迎冰, 张成图, 吴英, 于芮峦, 苏建民. 单碱基编辑技术的原理、发展及其在家畜育种中的应用[J]. 生物工程学报, 2023, 39(1): 19-33.

ZHANG Yingbing, ZHANG Chengtu, WU Ying, YU Ruiluan, SU Jianmin. Principle and development of single base editing technology and its application in livestock breeding[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(1): 19-33.

摘 要: 基因编辑技术 CRISPR/Cas (clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated protein)在家畜育种领域得到广泛应用, 但其效率低下, 且存在非靶向切割、安全性较低等问题, 极大地限制了家畜育种中单碱基突变的引入。单碱基编辑(single base editing)作为一种最新的基因编辑工具, 能够在不导入双链断裂的情况下直接进行碱基的替换, 具有编辑效率高和特异性强的特性, 为家畜育种的精确基因修饰提供了一种更简单、更有效的方法。本文主要介绍了单碱基编辑系统的原理及发展进程和碱基编辑技术在家畜育种中的应用, 以为单碱基编辑器在家畜育种中进一步优化和选择应用提供参考。

关键词: 碱基编辑; 胞嘧啶碱基编辑器; 腺嘌呤碱基编辑器; 家畜育种

资助项目: 国家自然科学基金(32172812); 青海省重点研发与转化项目(2022-QY-209, 2023-NK-131)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32172812) and the Key Research and Development and Transformation Project of Qinghai Province (2022-QY-209, 2023-NK-131).

*Corresponding author. E-mail: sujm@nwafu.edu.cn

Received: 2022-04-27; Accepted: 2022-09-21

Principle and development of single base editing technology and its application in livestock breeding

ZHANG Yingbing¹, ZHANG Chengtu², WU Ying², YU Ruiluan¹, SU Jianmin^{1*}

¹ Key Laboratory of Animal Biotechnology of the Ministry of Agriculture, College of Veterinary Medicine, Northwest A&F University, Yangling 712100, Shaanxi, China

² Xining Animal Disease and Prevention Control center, Xining 810016, Qinghai, China

Abstract: CRISPR/Cas (clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated protein) is widely used in the field of livestock breeding. However, its low efficiency, untargeted cutting and low safety have greatly hampered its use for introducing single base mutations in livestock breeding. Single base editing, as a new gene editing tool, can directly replace bases without introducing double strand breaks. Single base editing shows high efficiency and strong specificity, and provides a simpler and more effective method for precise gene modification in livestock breeding. This paper introduces the principle and development of single base editing technology and its application in livestock breeding.

Keywords: base editing; cytosine base editors; adenine base editors; livestock breeding

CRISPR/Cas (clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated protein)系统是目前被广泛使用的第三代基因组编辑系统^[1]。该系统是具有核酸酶活性 Cas9 蛋白在向导 RNA (sgRNA)的引导下在靶点基因处进行切割,从而产生 DNA 双链断裂(double strand break, DSB),断裂后的基因组利用同源重组(homologous recombination, HR)和非同源末端连接(non-homologous end joining, NHEJ)实现对基因组 DNA 进行编辑^[2]。其中由于 DSB 具有细胞毒性、HR 途径必须人为提供供体 DNA 且依赖于细胞周期、NHEJ 的修复精确度低并会产生插入和缺失(indels)^[2-4],因此单纯依靠 CRISPR/Cas 系统较难实现高效且稳定的基因编辑。

碱基编辑系统(base editing)是在 CRISPR/Cas 系统的基础上进一步衍生出的一种新型基因修饰技术,依据融合的碱基修饰酶种类不同可以分为胞嘧啶碱基编辑器(cytosine base editors, CBE)以及腺嘌呤碱基编辑器(adenine base editors, ABE)^[5]。其原理为将失活的 dCas9 (deactivated

Cas9)或只有单链切割活性的 nCas9 (nickase Cas)与能够作用于 ssDNA (single-stranded DNA)的嘧啶或嘌呤脱氨酶融合,精准实现靶位点的碱基编辑。由于编辑过程中不依赖于 DSB 的产生、不需要供体 DNA 的参与、不依赖于细胞周期和产物纯度高等优点,碱基编辑系统可以实现较为高效且精准的基因编辑,目前已成功应用于各类动物、植物、人类胚胎和细菌等^[4]。

碱基编辑器 CBE 和 ABE 只能实现将 C·G 碱基对替换为 T·A 碱基对(C-T),或者将 A·T 替换为 G·C (A-G)。除此之外,研究人员在 CBE 的基础上开发了能够将胞嘧啶转换为鸟嘌呤的新型碱基编辑器(C-to-G base editor, CGBE)^[6]。工作原理是首先将 C 转换成 U,其次是尿嘧啶 DNA 糖基化酶(uracil DNA N-glycosylase, UNG)将 U 切除后,通过碱基切除修复机制引入效应诱导靶向 C-G 碱基转换,还有 C-T 和 C-A 转换^[7]。当然最终的目的是实现高效、高纯度的 C-G 碱基编辑,于是 David R. Liu 团队通过 CRISPR 筛选、靶点数

数据库分析并联合机器学习开发了更有应用前景的 CGBE^[8]。随后左二伟团队也利用深度学习模型开发能够准确预测目标位点的 OPTI-CGBEs^[9]。

1 单碱基编辑系统的原理及发展进程

1.1 胞嘧啶碱基编辑器 (cytosine base editors, CBE) 的原理和发展

CBE 系统由 nCas9 或 dCas9 与胞嘧啶脱氨酶组成^[5,10]。工作原理是在 sgRNA 引导下靶向目标 DNA，并与基因组 DNA 和 Cas9 蛋白形成 R-loop 复合物，Cas9 蛋白使 DNA 局部解链，使得胞嘧啶脱氨酶可以与 R-loop 复合物中未与

sgRNA 配对的 ssDNA 结合，将 ssDNA 上一定区域的胞嘧啶(C)脱氨变成尿嘧啶(U)，继而通过 DNA 修复或者复制机制使尿嘧啶(U)被胸腺嘧啶(T)替换，最终实现完成 C 到 T 或 G 到 A 的替换^[10](图 1)。

研究者通过不断地对 CBE 系统各个元件的改造升级，并基于此开创性地研发了 4 代碱基编辑器(BE1-BE4)，同时基于 CBE 系统的限制又对各代碱基编辑器不断地作出优化改造^[10]。2016 年，刘如谦团队率先开发第一代碱基编辑器(base editors1, BE1)，该系统由具有脱氨酶活性最高的大鼠 APOBEC1、连接蛋白(XTEN)和完全失去切割活性的 dCas9 组成。编辑活性窗口为距离前间

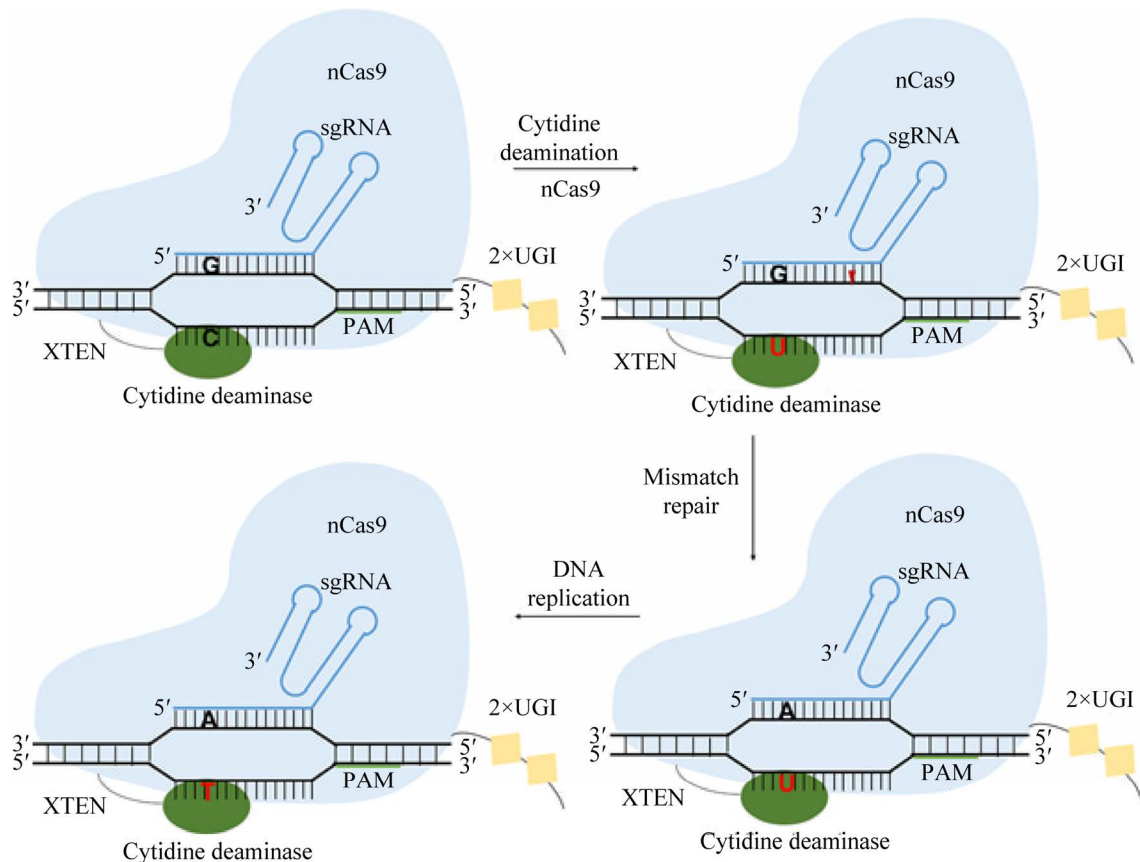


图 1 CBE 工作模式图(根据参考文献[4]修改)

Figure 1 Mechanisms of CBE (modified from reference [4]).

隔序列邻近基序 (protospacer adjacent motif, PAM) 序列最远端开始数起的第 4–8 位, 体外编辑效率可达 25%–40%, 但在哺乳动物细胞内编辑效率却大幅下降至 0.8%–7.7%。这主要是因为尿嘧啶 DNA 糖基化酶 (uracil DNA glycosylase, UDG) 可以识别 U·G 错配, 并通过碱基错配修复途径逆转由 BE1 产生的 U·G 中间产物返回到 C·G 碱基对。于是, 催生了第二代碱基编辑器 (BE2) 的开发, 即只在原来的基础上引入了 UDG 抑制剂 (uracil DNA glycosylase inhibitor, UGI), UGI 通过抑制 UDG 作用将原来编辑效率提高 3 倍。随后, 该团队通过将单链切口酶活性的 nCas9 替换 dCas9 生成了第三代碱基编辑器 (BE3), 该系统通过碱基错配修复将碱基编辑效率提高至 37% 左右, 其编辑活性窗口仍为第 4–8 位。缺点是编辑产物的纯度较低, 具体机制是 UDG 可以切除靶基因上的碱基 U 形成无嘌呤或者无嘧啶位点 (apurinic or apyrimidinic site, AP), 被 AP 裂解酶识别后编辑链会被切开, 加上非编辑链也被 nCas9 切开, 从而导致 DBS 的形成, 进而引发 NHEJ 随机修复^[11]。为了解决上述问题, 第四代碱基编辑器 (BE4) 在 BE3 的基础上应运而生, 通过再融合一个 UGI 提高对 UDG 的抑制作用, 使得编辑效率大大提高, 并且非目标编辑产物的出现频率大约也降低了一半^[12]。

在上述四代碱基编辑器的基础上, 科研人员为了提高编辑的限制继而开发出了一系列改良版本的 CBE 系统。高彩霞团队发现, BE3 会在水稻中诱导全基因组发生无法预测的脱靶突变^[13], Zuo 等也在小鼠胚胎中证实了 BE3 会诱导基因组发生大量脱靶突变的这一特性^[14]。研究表明, 这种脱靶事件与 Cas9 依赖性脱靶编辑和非 Cas9 依赖性脱氨基作用相关^[15]。因此, 可通过使用有更高 DNA 特异性的 Cas9 变体以及 rAPOBEC1 突变体, 来减少脱靶事件的发生。针

对 Cas9 依赖性脱靶突变, 刘如谦团队将 BE3 与一种高保真 SpCas9 变体 (HF-Cas9) 结合构建了 HF-BE3, 将 BE3 的脱靶水平降低了 37 倍, 并使用核糖核蛋白复合物 (ribonucleoprotein, RNP) 代替质粒递送碱基编辑器系统, 有效降低了脱靶事件的概率^[16], 但高彩霞团队发现其在水稻中仍会诱导基因组发生无法预测的脱靶突变^[13]。针对非 Cas9 依赖性脱氨作用, Grünewald 团队通过引入破坏 rAPOBEC1 α -螺旋的两种突变, 构建了 BE3-R33A 和 BE3-R33A/K34A, 与野生型 CBE 相比, 在目标位点上实现了更为精准的 DNA 编辑^[17]。刘如谦团队通过运用细菌耐药性测定、细菌胸苷激酶毒性试验和体外动力学测定等多种方法发现, 在能够保留与 BE4 类似编辑效率的前提下, 带有 YE1 脱氨酶结构域的 CBE 系统大幅降低了依赖于 Cas9 和非依赖于 Cas 的脱靶事件的发生, 实现目标位点的高保真碱基编辑^[15]。杨贝团队通过融合可切割的脱氧胞嘧啶脱氨酶抑制剂 (deoxycytidine deaminase inhibitor, dCDI) 结构域, 构建了 transformer BE (tBE) 系统, 可在仅有背景水平的脱靶突变下实现高效碱基编辑^[18]。

针对编辑产物的纯度问题, 通过将 Gam 与编辑系统结合, 开发的 CBE4-Gam 可以有效降低 indels 的产生^[12]。对于提高编辑效率的问题, 通过核定位信号 (nuclear localization signal, NLS) 修饰、密码子优化以及脱氨酶改造, 进一步优化了 CBE4, 构建了编辑效率更高的 BE4max 和 AncBE4max^[19]。然而, 由于 APOBEC1 对底物靶点上下游序列有偏好性, 富含 GC 的序列脱氨基并不理想^[10,20]。因此刘如谦团队开发了使用噬菌体辅助连续进化碱基编辑器 (phage-assisted continuous evolution of base editors, BE-PACE) 技术, 用于改进的脱氨酶^[21]。结果表明, CBE 进化后产生的 evoAPOBEC1-BE4max, 在富含 GC 的序列中编辑胞嘧啶的效

率比野生型 APOBEC1 高 26 倍,同时能在其他所有的序列维持高效编辑。李亦学团队通过突变 rAPOBEC1 上负责活性位点疏水性的位点(p.W90Y)、引入 p.R126E 突变以及进一步优化核定位信号构建了 YE1- BE3-FNLS。该编辑器不仅保留有与 BE4max 相当甚至高于 BE4max 的编辑效率,同时造成的非目标编辑与 indels 的水平更低^[22]。Lukas E Dow 团队通过 NLS 修饰以及 nCas9 密码子优化重新设计了 BE3、BE4Gam 和 xBE3 的序列,优化后的编辑系统碱基编辑范围(2X-BE3)扩大,编辑效率也提高为 BE3 的 15 倍(FNLS-BE3)^[23]。李大力团队基于 nCas9 和脱氨酶之间插入一个 Rad51 单链 DNA 结合蛋白的功能域开发了一系列超高活性 CBE (hyCBE)。编辑窗口由 4-9 拓展为 4-15,活性最高提高了 257 倍^[24]。

面对碱基编辑活性窗口的问题,可根据研究目的选择不同类型的 CBE。David R. Liu 团队通过突变 rAPOBEC1 与 DNA 互作的关键酶活位点,构建了 YE1-BE3、YE2-BE3、EE-BE3 以及 YEE-BE3 系统,虽然编辑效率有所降低,但成功将编辑窗口由第 4-8 位缩小至第 4 位或第 4-5 位^[25]。此外,其中的 YEE-BE3 系统也有助于减少脱靶突变^[13]。黄行许实验室利用 SunTag 系统研发出了 BE-PLUS,在 BE3 的基础上将编辑窗口由第 4-8 位扩大至第 4-16 位^[26]。

1.2 腺嘌呤碱基编辑器 (adenine base editors, ABE)的原理和发展

ABE 系统由人工改造的腺嘌呤脱氨酶和 nCas9 构成^[27],工作原理类似于 CBE 系统,即在 sgRNA 的作用下,与 Cas9N 相连接的脱氨酶可将靶点 DNA 上一定区域的腺嘌呤脱氨(A)转化为腺苷(I),而在 DNA 上的 I 会被当作鸟嘌呤(G)识别,进而使得非编码链上与 A 配对的 T 变为 C,最终完成 A 到 G 或 T 到 C 的替换(图 2)。

ABE 系统发展缓慢的原因在于目前发现的自然界存在的腺嘌呤脱氨酶都不能以 DNA 为底物^[27]。David R. Liu 研发团队^[27]选用大肠杆菌 TadA 经过定向进化和改造,筛选出了能够作用于 ssDNA 的腺嘌呤脱氨酶 ecTadA (*Escherichia coli* TadA)的突变体 ecTadA*,虽然在大肠杆菌中可以进行 A-I 转换,但在哺乳动物细胞上表现出的编辑效率不高。为了进一步提高编辑效率,在脱氨酶改造的过程中将野生型 ecTadA 单体与定向进化出的 ecTadA*单体融合形成单链异二聚体,该异二聚体与 nCas9 结合形成了 ecTadA-ecTadA*-nCas9 融合蛋白,之后经过 7 轮的进化与改造后,筛选出编辑效率最高且应用最广的 ABE 系统 ABE7.10,其编辑效率可达 53%,编辑窗口为距离 PAM 序列最远端开始数起的第 4-7 位^[27]。虽然 ABE 系统有着碱基替换的高精确度,且 indels 的发生频率较低,但其仍存在编辑效率低下、编辑范围、脱靶和编辑窗口的限制性问题^[4]。在提高编辑效率方面,David R. Liu 团队通过密码子序列优化以及增加 NLS 个数优化了 ABE7.10,成功构建了 ABEmax,有效提高了碱基编辑效率^[19]。高彩霞团队通过密码子优化、异二聚体和 NLS 位置的调整以及 NLS 数目的增加等方式优化出的 PABE-7 系统,相较于 ABE7.10 在小麦和水稻中的编辑效率提高了 1 倍以上^[23]。Nicole M. Gaudelli 团队和 David R. Li 等^[28]通过在 ABE7.10 的 TadA 中引入额外的突变,构建了 ABE8s 和 ABE8e。其中 ABE8s 在非 NGG 的 PAM 序列中编辑效率比 ABE7.10 高约 4.2 倍,在 NGG 的 PAM 序列中 A5-A7 位点的编辑效率高约 1.5 倍,在 A3-A4 和 A8-A10 位点的编辑效率高约 3.2 倍,不仅编辑效率得到了提高,编辑范围也有所扩大^[28]。而 ABE8e 有效提高了 ABE 与 Cas 同源物的兼容性,显著增加了 ABE 在与多种 Cas 同源物配对时的碱基编

辑效率^[29]。随后研究人员在 ABE8e 基础上生成新的变体 ABE9e 表现出更高和更精确的碱基编辑活性^[30]。此外, Fu 等通过对脱氨酶成分改造生成 3 种高活性 ABE 变体, 其中 NG-ABEmax-KR (N127K/Q154R) 变体在人类细胞和小鼠疾病模型中表现出较高的编辑效率^[31]。在扩大编辑范围方面, David R. Liu 团队通过使用可与非 NGG 序列 PAM 相容的 SpCas9 变体, 创建了 VRQR-ABEmax、VRER-ABEmax、SaABEmax 以及 SaKKH-ABEmax 等, 成功在哺乳动物细胞上扩大了碱基编辑范围^[32]。此外, 该团队通过使用循环排列的 Cas9 变体, 在保证编辑效率与 ABEmax 相同的条件下, 将编辑窗口由 4-5 个核

苷酸(nt)扩展为 8-9 nt^[32]。面对脱靶的问题, 研究人员设计了脱氨酶 TadA 7.10 中突变(eTadA-K20A/R21A 或 eTadA-V82G)生成高保真碱基编辑器, 从而大大减小了脱靶效率^[33]。此外, 通过合并 wtTadA-F148A 和 eTadA-F148A 来改进 ABE7.10, 同样大大减小了脱靶效率^[34]。

现有的碱基编辑器仅能单独诱导单一类型的修饰, 而李大力团队^[35]和 J. Keith Joung^[36]团队通过将胞嘧啶脱氨酶、腺嘧啶脱氨酶与 Cas9 切口酶融合, 分别创建了 A&C-BEmax 和 SPACE (synchronous programmable adenine and cytosine editor), 在同一靶点上能够同时实现 C 至 T 和 A 至 G 的转换, 扩大了碱基编辑的应用范围。

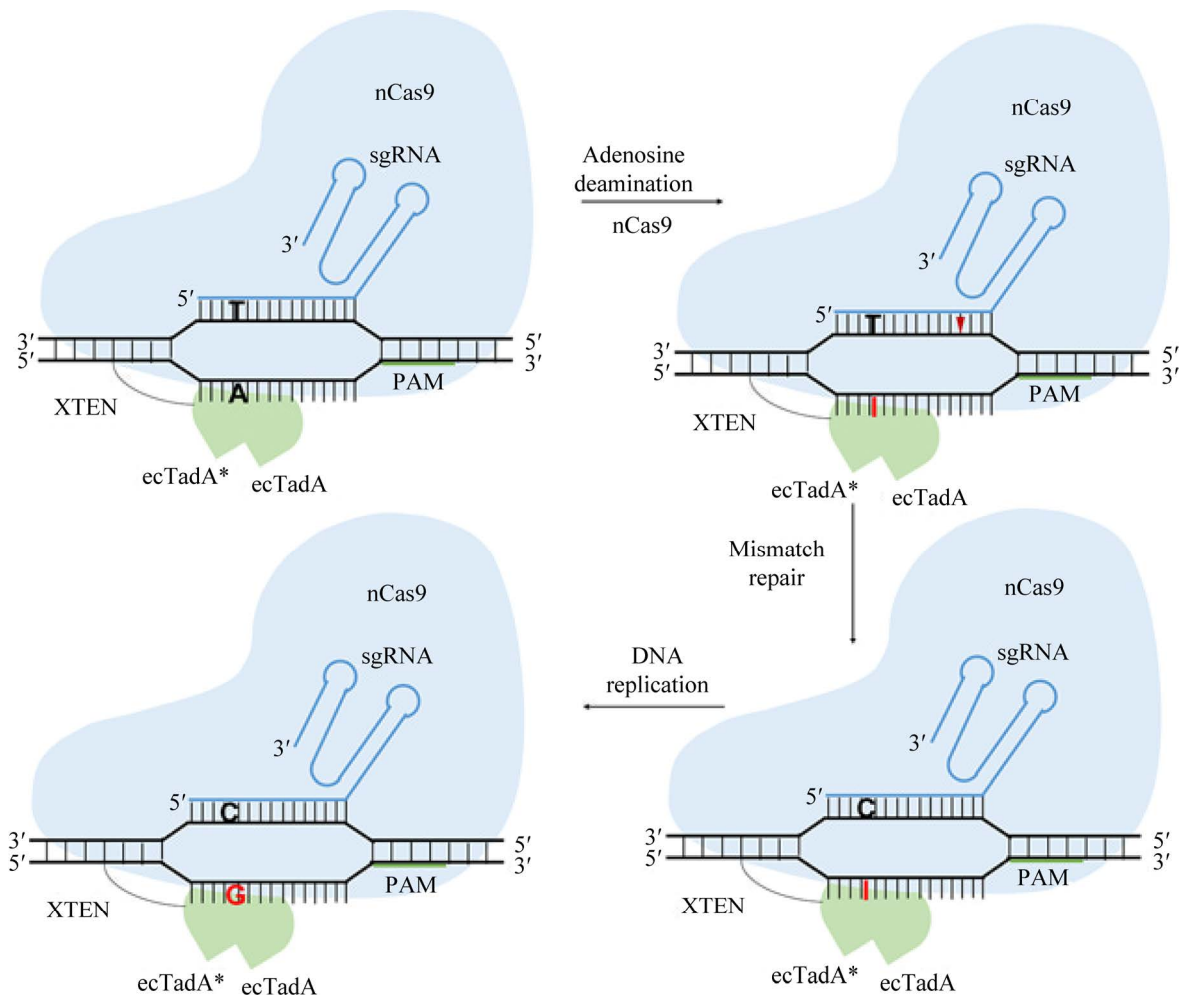


图 2 ABE 工作模式图(根据参考文献[4]修改)

Figure 2 Mechanisms of ABE (modified from reference [4]).

2 单碱基编辑系统在家畜育种上的应用

在家畜育种中选择性状主要体现在家畜生产性状改良,包括生长性状、肉质和奶品质;家畜繁殖性能改良,包括排卵数和产羔数等;家畜经济性状改良,包括羊毛产量和品质;家畜抗病性能改良,包括抗病毒、细菌及寄生虫等;家畜动物模型制备,包括人类疾病模型或制备药品等;家畜异体器官移植方面的应用等^[37]。在家畜育种中利用全基因组关联分析(genome-wide association study, GWAS)、全基因组重测序、转录组测序和蛋白组技术等技术挖掘与鉴定了一批家畜上与生产、经济、繁殖和抗病等性状相关的功能基因。其次利用多组学测序(三维基因组(Hi-C)、ATAC-Seq、ChIP-Seq、单细胞测序和空间转录组测序)和单碱基基因编辑技术对上述重要性状主效基因的功能鉴定、重要性状的遗传及表观遗传调控网络解析和重要性状的功能基因组学研究。

2.1 在家畜生产性状改良中的应用

肌肉生长抑制素(myostatin, MSTN)是肌肉生长发育的负调控因子,参与抑制肌细胞的增殖与分化。MSTN 突变显著增加肌肉纤维的直径和肌纤维数量^[38]。姚旭东利用 AncBE4max 系统在哈萨克羊 MSTN 基因中提前引入终止密码子,其中在细胞中 sg1 和 sg2 靶位点编辑效率分别为 26.7%和 6.7%。而 sg1 在孤雌胚和受精胚中编辑效率分别为 70%和 90%。随后将 28 枚 MSTN 基因编辑胚胎移植到 9 个受体母羊中,其中 6 只妊娠母羊,最终获得 8 只羔羊,5 只健康羔羊,3 只死亡。8 只羔羊均发生预期的碱基转换,编辑效率为 100%^[39]。除此之外, Pan 等利用改造的 YE1-BE4maxNG 对巴马猪成纤维细胞 MSTN 基因中提前引入终止密码子,结果发现 sg1-sg5

编辑效率分别是 10.3%、1.0%、10.5%、28.7%和 29.8%^[40]。Wang 等通过新改造 hA3A-BE3-NG 载体在猪胎儿成纤维细胞中对 MSTN 基因进行单碱基编辑,靶位点编辑效率是 46.3%^[41]。

王煜等利用碱基编辑器在巴马猪胎儿成纤维细胞中对胰岛素样生长因子 2 (insulin-like growth factor 2, IGF2)进行高效、精确的定点编辑。结果表明, hA3A-BE3 的编辑效率可以达到 71.43%, 但有 42.86%的细胞存在插入和缺失(indels); hA3A-BE3-Y130F 和 hA3A-eBE-Y130F 的编辑效率分别是 56.86%和 40.38%, indels 的效率分别是 31.37%和 21.15%^[42]。SOCS2 基因的突变也会使个体产生体重增加/体型增大的表型。陈玉林团队利用 BE3 系统对绵羊上 SOCS2 基因进行碱基编辑,通过原核注射共出生 3 只阳性后代,突变效率为 25%左右,基因编辑后代羊在体型、体重和产奶量等生产性状上明显高于野生型羊^[43](表 1)。

2.2 在家畜繁殖性能改良中的应用

繁殖性状作为绵羊重要的经济性状。骨形态发生蛋白受体 1B (BMPR1B, FecB)、骨形态发生蛋白 15 (BMP15, FecX)和生长分化因子 9 (GDF9, FecG)作为绵羊多羔性状候选主效基因,在调控绵羊产羔性状方面起到至关重要的作用。丁一格利用腺嘌呤碱基编辑器对滩羊成纤维细胞上 FecB 基因进行单碱基定点编辑。结果显示,在细胞层面 ABE7.10、ABEmax 和 xCas9-ABE 的编辑效率分别为 18.75%、53.85%及 38.46%。在胚胎上编辑效率为 22.91%。同时胚胎移植到 18 个受体母羊中,获得 6 只妊娠母羊,最终获得 8 只基因编辑羔羊。其中 6 只羔羊产生了预期的碱基替换^[44]。之后通过扩繁获得 FecB 基因编辑羊,51 只 FecB 基因突变母羊中 36 只母羊妊娠,产羔 54 只,产羔母羊百分率为 70.59%,产羔率为 150.00%。相比野生型, FecB 基因突

变产羔率提高 43.86%^[45](表 1)。

2.3 在家畜经济性性状改良中的应用

FGF5 基因与毛囊生长发育相关, 该基因敲除后可以使山羊绒毛生长速度加快, 产绒量大幅度提高。李冠纬使用 BE3 在陕北白绒山羊的 *FGF5* 基因的第一外显子区域提前引入终止密码子。结果发现 4 个 sgRNA 细胞水平的编辑效率在 10%–34% 之间。其中 7 只受体母羊, 受孕 3 只, 最终获得 5 只羔羊。5 只羔羊的 *FGF5* 基因均发生了编辑, 编辑效率为 100%, 阳性后代毛纤维显著长于野生型山羊, 毛囊也显著多于野生型山羊^[46]。孙嘉媛等选定陕北白绒山羊的 *FGF5* 基因, 利用 xCas9-BE4、BE3 和 BE4max 三种新型单碱基编辑器, 在成纤维细胞上 BE4max 的编辑效率为 92.86%, 比普通编辑器 BE3 高 56.5%, 但 xCas9-BE4 未产生编辑^[47]。周平团队利用 BE4max 对绵羊成纤维细胞和胚胎中 *FGF5* 基因第 1 外显子引入终止密码子, 结果发现 sgRNA-T1 和 sgRNA-T4 的编辑效率分别为 68.75% 和 47.37%。sgRNA-T4 孤雌激活胚胎中编辑效率为 80%^[48](表 1)。

2.4 在家畜抗病育种中的应用

在家畜抗病育种中, 通过基因编辑技术敲除或敲入抗病基因可快速培育抗病品种, 降低疾病引起的经济损失。Wang 等通过新改造 hA3A-BE3-NG 载体, 对具有猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV)抗性的 *CDI63* 基因和猪传染性胃肠炎病毒(TGEVs)抗性的 *APN* 基因在猪胎儿成纤维细胞进行单碱基编辑, 靶位点编辑效率分别是 33.33% 和 35.19%^[41]。同时 Pan 等利用改造的 YE1-BE4maxNG 对巴马猪成纤维细胞 *CDI63* 基因靶位点编辑效率为 6.5%^[40]。此外, 赵建国团队通过在细胞和胚胎层面筛选出影响最小的碱基编辑器 hA3A-BE3-Y130, 结合显微注射的方法生产一个 *MSTN*、*CDI63* 和 *IGF2* 三基因突

变猪。结果发现猪的 *CDI63* 和 *MSTN* 基因不表达, *IGF2* 表达增加, 显著提高猪的生长性能和抗病能力(表 1)。

2.5 家畜疾病动物模型的建立

研究人员通过将 BE3 系统与体细胞核移植技术结合, 对猪的 *TWIST2* 和 *TYR* 基因进行单碱基编辑, 成功建立了无脸巨口综合征和皮肤白化病的大动物疾病模型^[19]。张婷婷等采用 BE3 和 ABE7.10 对猪 PK15 细胞的 *CMAH*、*MC1R(1-2)* 和 *MC1R(2-1)* 基因编辑窗口内 C-T 的效率分别为 2.2%、0.4% 和 1.3%, 猪 *GGTA*、*MSTN-2* 窗口内 A-G 的效率分别为 1.4% 和 1.4%^[49]。赖良学课题组利用 BE3 和 A3A-BE3 在猪的细胞和胚胎层面, 对基因组进行三基因单碱基编辑。在胚胎上, 三基因同时被编辑效率最高可达 50%。而在细胞层面上, 三基因同时被编辑效率最高可达 25%。并且通过体细胞核移植和胚胎注射两种途径获得两种单位点单碱基突变猪模型(杜氏肌营养不良症和早衰症猪模型)和一种三位点单碱基突变猪模型(重症免疫缺陷猪模型)^[50](表 1)。

2.6 在家畜异体器官移植方面的应用

猪作为人类器官移植最理想的异种器官移植供体。*pol* 基因作为猪与人异种器官移植安全性的关键基因之一, 赖良学课题组利用 BE3 在 *pol* 基因中提前引入终止密码子, 结果发现最高可减少 84.9% 的 PERV 拷贝数^[50]。此外, 袁泓明使用 BE4-Gam 和 AncBE4max 系统对猪 *GGTA*、*CMAH* 和 *B4GalNT2* 进行单碱基编辑。结果表明 BE4-Gam 系统在猪胎儿成纤维细胞和孤雌囊胚中 *GGTA1*、*B4GalNT2* 和 *CMAH* 基因目的位点分别可实现 5.3%–10.1% 和 66.7%–71.4% 的单基因编辑效率; 在猪胎儿成纤维细胞和孤雌囊胚 *GGTA1*、*B4GalNT2* 和 *CMAH* 基因目的位点分别可实现 7.5% 和 18.1% 的多基因编辑效率。同时发现 AncBE4max 系统在猪孤雌囊胚及成纤维细

表 1 碱基编辑系统在家畜中的应用

Table 1 Application of base editing system in livestock breeding

Species	Traits	Gene	Application	Editor	Editing	References
Kazakh sheep	Growth traits	<i>MSTN</i>	Meat production	AncBE4max	Fibroblast cells 6.7%–26.7%, Embryo 90%, positive rate of offspring 100%	[39]
Bama pig	Growth traits	<i>MSTN</i>	Meat production	YE1-BE4maxNG	Fibroblast cells 1%–29.8%	[40]
Pig	Growth traits	<i>MSTN</i>	Meat production	hA3A-BE3-NG	Fibroblast cells 46.3%	[41]
Bama pig	Growth traits	<i>IGF2</i>	Meat production	hA3A-BE3	Fibroblast cells 71.43%	[42]
				hA3A-BE3-Y130F	Fibroblast cells 56.86%	
				hA3A-eBE-Y130F	Fibroblast cells 40.38%	
Tan sheep	Growth traits	<i>SOCS2</i>	Growth traits	BE3	Positive rate of offspring 75.00%	[43]
Tan sheep	Reproductive traits	<i>FecB</i>	Reproductive traits	ABE7.10	Fibroblast cells 18.75%	[44]
				ABEmax	Fibroblast cells 53.85%	
				xCas9-ABE	Fibroblast cells 38.46%	
				ABEmax	Embryo 22.91%, positive rate of offspring 75%	
Goat	Economically traits	<i>FGF5</i>	Wool growth	BE4max	Fibroblast cells 92.86%	[46-47]
				BE3	Fibroblast cells 56.50%, positive rate of offspring 100%	
				xCas9-BE4	Fibroblast cells 56.5%	
Sheep	Economically traits	<i>FGF5</i>	Wool growth	BE4max	Fibroblast cells 47.37%–68.75%, parthenogenetic embryo 80%	[48]
Pig	Disease resistance	<i>CDI63</i>	Resistance to PRRS virus	hA3A-BE3-NG	Fibroblast cells 33.33%	[41]
		<i>APN</i>	Resistance to TGEVs virus	hA3A-BE3-NG	Fibroblast cells 35.19%	
Bama pig	Disease resistance	<i>CDI63</i>	Resistance to PRRS virus	YE1-BE4maxNG	Fibroblast cells 6.5%	[40]
Pig	Disease models	<i>TWIST2</i>	Treacher Collins syndrome	BE3	Successfully created	[19]
		<i>TYR</i>	Oculocutaneous albinism type 1 disease			
Pig	Disease models	<i>DMD</i>	Duchenne muscular dystrophy model	BE3, A3A-BE3	Successfully created	[50]
		<i>LMNA</i>	Hutchinson-Gilford progeria syndrome			
		<i>RAG1, RAG2, IL2RG</i>	Model for severe combined immunodeficiency			
Pig	Organ transplantation	<i>GGTA, CMAH, B4GalNT2</i>	A source of bioprosthesis heart valves	BE4-Gam, AncBE4max	Successfully created	[51]
Cattle	Embryonic development	<i>SMAD4, TEAD4, CDX2</i>	Early embryo development	BE3, ABE7.10	Embryo 25.8% and 23.3%	[52]

胞的目的基因位点可以提升近 5 倍的单基因编辑效率,在胚胎水平上可实现 71.4%的多基因编辑效率。之后通过胚胎移植技术获得了 1 头 *GGTA1* 和 2 头 *B4galNT2* 嵌合突变的 F0 代大白猪。最后通过体细胞核移植技术,获得了 1 头三基因突变(*GGTA1* 基因杂合突变、*B4galNT2* 纯合突变及 *CMAH* 基因杂合突变)的 F0 代巴马香猪^[51](表 1)。

2.7 在家畜胚胎发育机理研究方面的应用

牛的早期胚胎发育涉及一系列基因的调控,如 *SMAD4*、*TEAD4* 和 *CDX2* 等。张坤团队通过显微注射的方法利用 BE3 和 ABE7.10 在牛胚胎中对 *SMAD4* 进行基因编辑,结果发现 BE3 在靶位点 6 和 7 位的平均效率分别为 86.3%和 85.4%。ABE7.10 在靶位点第 5 位的平均效率为 79.4%。同时靶向二代测序的结果表明在靶位点附近有脱靶现象存在,但在 6 个预测的潜在脱靶位点中均未发现明显的脱靶现象。BE3 和 ABE7.10 对牛胚胎中 *SMAD4*、*CDX2* 和 *TEAD4* 三基因同时编辑的效果分别是 25.8%和 23.3%,但胚胎存在镶嵌。同时利用 BE3 在牛胚胎中的 *CDX2* 基因中提前引入终止密码子,结果发现 BE3 能够在牛胚胎中进行高效率的基因敲除^[52](表 1)。

3 前景与展望

虽然应用最广泛的基因编辑技术 CRISPR/Cas9 拥有众多优点,但是在单个碱基水平的编辑时其效率很低。与 CRISPR/Cas9 系统 DBS 具有细胞毒性、HR 途径必须人为提供供体 DNA 且依赖于细胞周期和 NHEJ 的修复精确度低并会产生插入和缺失相比,碱基编辑具有不依赖于 DBS 的产生、不需要供体 DNA 的参与、不依赖于细胞周期和产物纯度高优点,碱基编辑系统可以实现较为高效且精准的基因编辑,因此,碱基编辑器能够在动物品种改良、畜牧业生产、动

物模型构建和疾病治疗等方面发挥强大的作用。碱基编辑系统自 2016 年首次开发至今,已经成功应用于多个研究领域,但在家畜上开展的研究还相对较少^[5,53-55]。我们团队近期建立了藏绵羊 *MSTN*、*FecB*、*GDF9* 和 *BMP15* 单碱基编辑体系,为后续培育多胎以及双肌藏绵羊提供了基础。

时至今日,面对碱基编辑器发展中遇到的各种问题,科研工作者从降低编辑产物纯度、序列背景依赖性、提高编辑效率、扩大或缩小编辑范围、碱基编辑活性窗口和脱靶效应等问题不断改进和优化碱基编辑器^[56-60]。因此想要进一步开发碱基编辑器工具在家畜育种中的应用必须对其作更多的改进。我们实验室前期研究中,ABE_{max} 和 BE4_{max} 在对绵羊成纤维细胞中 *FecB*、*GDF9* 和 *BMP15* 基因进行单碱基编辑时,发现目的位点附近并没有合适的 PAM 序列,细胞编辑效率低下、碱基编辑活性窗口内非靶点编辑和 indels 发生率高问题。因此笔者希望在今后的研究中对碱基编辑器进行改造以达到在动物育种中发挥强大作用的目的。碱基编辑系统改造主要有 4 个方面:(1) PAM 位点的限制。由于碱基编辑技术依赖于 Cas9 蛋白对单个碱基进行编辑,对靶点的选择十分依赖于 PAM 位点。虽然 SpCas9、xCas9 和 SpCas9-NG 等非 NGG PAM 的 Cas9 变体的开发大大拓宽了碱基编辑的应用范围,但仍不能做到对任意位点的覆盖^[25,61-63]。(2) 编辑效率低下。可以通过以下几个手段提高编辑效率:在 nCas9 和脱氨酶之间插入一个 Rad51 单链 DNA 结合蛋白^[15],小巧的 Cas12a 蛋白取代了传统的 Cas9 蛋白减少载体大小^[62,64-65],小分子抑制剂和胞嘧啶脱氨酶做家畜的密码子优化等^[66-68]。(3) 碱基编辑活性窗口内非靶点编辑。依据不同的研究目的需要对编辑活性窗口做相应的改变。如何进一步缩小突变窗口,真正做到只改变单一碱基而不影响旁侧序列,将是碱基

编辑系统今后重点攻克的方向^[25,69-70]。(4) indels 发生率高。产物特异性不佳, CBE 系统有时会出现碱基编辑产物不纯的现象, 即会有 C 到非 T 产物的出现, 还会有碱基的随机插入和缺失, 即出现脱靶现象^[12,16,71]。

综上所述, 碱基编辑技术在家畜育种领域有着巨大潜力, 但由于家畜中, 通过显微注射和核移植技术获得基因编辑后代存在概率小、难度大和周期长等问题, 因此会在 PAM 位点的限制、编辑效率、精确度及脱靶效应等方面导致碱基编辑技术在家畜育种领域中仍然受到一些限制。尽管目前碱基编辑技术做出了一定程度的改良, 但还有许多不完善之处, 因此开发精准碱基编辑将会为家畜育种提供强有力的技术工具。

REFERENCES

- [1] MALI P, ESVELT KM, CHURCH GM. Cas9 as a versatile tool for engineering biology[J]. *Nature Methods*, 2013, 10(10): 957-963.
- [2] SYMINGTON LS, GAUTIER J. Double-strand break end resection and repair pathway choice[J]. *Annual Review of Genetics*, 2011, 45: 247-271.
- [3] CHEN KL, WANG YP, ZHANG R, ZHANG HW, GAO CX. CRISPR/Cas genome editing and precision plant breeding in agriculture[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2019, 70: 667-697.
- [4] 宗媛, 高彩霞. 碱基编辑系统研究进展[J]. *遗传*, 2019, 41(9): 777-800.
ZONG Y, GAO CX. Progress on base editing systems full text replacement[J]. *Hereditas*, 2019, 41(9): 777-800 (in Chinese).
- [5] REES HA, LIU DR. Base editing: precision chemistry on the genome and transcriptome of living cells[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2018, 19(12): 770-788.
- [6] KURT IC, ZHOU RH, IYER S, GARCIA SP, MILLER BR, LANGNER LM, GRÜNEWALD J, JOUNG JK. CRISPR C-to-G base editors for inducing targeted DNA transversions in human cells[J]. *Nature Biotechnology*, 2021, 39(1): 41-46.
- [7] ZHAO DD, LI J, LI SW, XIN XQ, HU MZ, PRICE MA, ROSSER SJ, BI CH, ZHANG XL. Glycosylase base editors enable C-to-A and C-to-G base changes[J]. *Nature Biotechnology*, 2021, 39(1): 35-40.
- [8] KOBLAN LW, ARBAB M, SHEN MW, HUSSMANN JA, ANZALONE AV, DOMAN JL, NEWBY GA, YANG D, MOK B, REPLOGLE JM, XU A, SISLEY TA, WEISSMAN JS, ADAMSON B, LIU DR. Efficient C•G-to-G•C base editors developed using CRISPRi screens, target-library analysis, and machine learning[J]. *Nature Biotechnology*, 2021, 39(11): 1414-1425.
- [9] YUAN TL, YAN NN, FEI TY, ZHENG JT, MENG J, LI NN, LIU J, ZHANG HH, XIE L, YING WQ, LI D, SHI L, SUN Y, LI Y, LI Y, SUN Y, ZUO E. Optimization of C-to-G base editors with sequence context preference predictable by machine learning methods[J]. *Nature Communications*, 2021, 12: 4902.
- [10] KOMOR AC, KIM YB, PACKER MS, ZURIS JA, LIU DR. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage[J]. *Nature*, 2016, 533(7603): 420-424.
- [11] 李广栋, 张鲁, 富俊才, 连正兴, 刘国世. 单碱基水平上胞嘧啶碱基编辑器(CBE)的研究进展[J]. *畜牧兽医学报*, 2020, 51(1): 1-8.
LI GD, ZHANG L, FU JC, LIAN ZX, LIU GS. Research progress of cytosine base editor at the single base level[J]. *Chinese Journal of Animal and Veterinary Sciences*, 2020, 51(1): 1-8 (in Chinese).
- [12] KOMOR AC, ZHAO KT, PACKER MS, GAUDELLI NM, WATERBURY AL, KOBLAN LW, KIM YB, BADRAN AH, LIU DR. Improved base excision repair inhibition and bacteriophage Mu Gam protein yields C:G-to-T:A base editors with higher efficiency and product purity[J]. *Science Advances*, 2017, 3(8): eaao4774.
- [13] JIN S, ZONG Y, GAO Q, ZHU ZX, WANG YP, QIN P, LIANG CZ, WANG DW, QIU JL, ZHANG F, GAO C. Cytosine, but not adenine, base editors induce genome-wide off-target mutations in rice[J]. *Science*, 2019, 364(6437): 292-295.
- [14] ZUO EW, SUN YD, WEI W, YUAN TL, YING WQ, SUN H, YUAN LY, STEINMETZ LM, LI YX, YANG H. Cytosine base editor generates substantial off-target single-nucleotide variants in mouse embryos[J]. *Science*, 2019, 364(6437): 289-292.
- [15] DOMAN JL, RAGURAM A, NEWBY GA, LIU DR. Evaluation and minimization of Cas9-independent off-target DNA editing by cytosine base editors[J]. *Nature Biotechnology*, 2020, 38(5): 620-628.
- [16] REES HA, KOMOR AC, YE H WH,

- CAETANO-LOPES J, WARMAN M, EDGE ASB, LIU DR. Improving the DNA specificity and applicability of base editing through protein engineering and protein delivery[J]. *Nature Communications*, 2017, 8: 15790.
- [17] GRÜNEWALD J, ZHOU RH, GARCIA SP, IYER S, LAREAU CA, ARYEE MJ, JOUNG JK. Transcriptome-wide off-target RNA editing induced by CRISPR-guided DNA base editors[J]. *Nature*, 2019, 569(7756): 433-437.
- [18] WANG LJ, XUE W, ZHANG HX, GAO RZ, QIU HY, WEI J, ZHOU LN, LEI YN, WU XC, LI X, LIU C, WU J, CHEN Q, MA H, HUANG X, CAI C, ZHANG Y, YANG B, YIN H, YANG L, et al. Eliminating base-editor-induced genome-wide and transcriptome-wide off-target mutations[J]. *Nature Cell Biology*, 2021, 23(5): 552-563.
- [19] KOBLAN LW, DOMAN JL, WILSON C, LEVY JM, TAY T, NEWBY GA, MAIANTI JP, RAGURAM A, LIU DR. Improving cytidine and adenine base editors by expression optimization and ancestral reconstruction[J]. *Nature Biotechnology*, 2018, 36(9): 843-846.
- [20] GEHRKE JM, CERVANTES O, CLEMENT MK, WU YX, ZENG J, BAUER DE, PINELLO L, JOUNG JK. An APOBEC3A-Cas9 base editor with minimized bystander and off-target activities[J]. *Nature Biotechnology*, 2018, 36(10): 977-982.
- [21] THURONYI BW, KOBLAN LW, LEVY JM, YEH WH, ZHENG C, NEWBY GA, WILSON C, BHAUMIK M, SHUBINA-OLEINIK O, HOLT JR, LIU DR. Continuous evolution of base editors with expanded target compatibility and improved activity[J]. *Nature Biotechnology*, 2019, 37(9): 1070-1079.
- [22] ZUO EW, SUN YD, YUAN TL, HE BB, ZHOU CY, YING WQ, LIU J, WEI W, ZENG R, LI YX, YANG HA. A rationally engineered cytosine base editor retains high on-target activity while reducing both DNA and RNA off-target effects[J]. *Nature Methods*, 2020, 17(6): 600-604.
- [23] LI C, ZONG Y, WANG YP, JIN S, ZHANG DB, SONG QN, ZHANG R, GAO CX. Expanded base editing in rice and wheat using a Cas9-adenosine deaminase fusion[J]. *Genome Biology*, 2018, 19(1): 59.
- [24] ZHANG XH, CHEN L, ZHU BY, WANG LR, CHEN CY, HONG MJ, HUANG YF, LI HY, HAN HH, CAI BL, YU WS, YIN SM, YANG L, YANG ZZ, LIU MZ, ZHANG Y, MAO ZY, WU YX, LIU MY, LI DL. Increasing the efficiency and targeting range of cytidine base editors through fusion of a single-stranded DNA-binding protein domain[J]. *Nature Cell Biology*, 2020, 22(6): 740-750.
- [25] KIM YB, KOMOR AC, LEVY JM, PACKER MS, ZHAO KT, LIU DR. Increasing the genome-targeting scope and precision of base editing with engineered Cas9-cytidine deaminase fusions[J]. *Nature Biotechnology*, 2017, 35(4): 371-376.
- [26] JIANG W, FENG SJ, HUANG SS, YU WX, LI GL, YANG G, LIU YJ, ZHANG Y, ZHANG L, HOU Y, CHEN J, CHEN J, HUANG X. BE-PLUS: a new base editing tool with broadened editing window and enhanced fidelity[J]. *Cell Research*, 2018, 28(8): 855-861.
- [27] GAUDELLI NM, KOMOR AC, REES HA, PACKER MS, BADRAN AH, BRYSON DI, LIU DR. Programmable base editing of A•T to G•C in genomic DNA without DNA cleavage[J]. *Nature*, 2017, 551(7681): 464-471.
- [28] LI JN, YU WX, HUANG SS, WU SS, LI LP, ZHOU JK, CAO Y, HUANG XX, QIAO YB. Structure-guided engineering of adenine base editor with minimized RNA off-targeting activity[J]. *Nature Communications*, 2021, 12: 2287.
- [29] RICHTER MF, ZHAO KT, ETON E, LAPINAITE A, NEWBY GA, THURONYI BW, WILSON C, KOBLAN LW, ZENG J, BAUER DE, DOUDNA JA, LIU DR. Phage-assisted evolution of an adenine base editor with improved Cas domain compatibility and activity[J]. *Nature Biotechnology*, 2020, 38(7): 883-891.
- [30] TU TX, SONG ZM, LIU XY, WANG SX, HE XX, XI HT, WANG JH, YAN T, CHEN HR, ZHANG ZW, LV X, LV J, HUANG XF, ZHAO J, LIN CP, GAO C, ZHANG J, GU F. A precise and efficient adenine base editor[J]. *Molecular Therapy*, 2022, 30(9): 2933-2941.
- [31] FU JH, LI Q, LIU XY, TU TX, LV XJ, YIN XD, LV JN, SONG ZM, QU J, ZHANG JW, LI J, GU F. Human cell based directed evolution of adenine base editors with improved efficiency[J]. *Nature Communications*, 2021, 12: 5897.
- [32] HUANG TP, ZHAO KT, MILLER SM, GAUDELLI NM, OAKES BL, FELLMANN C, SAVAGE DF, LIU DR. Author correction: circularly permuted and PAM-modified Cas9 variants broaden the targeting scope of base editors[J]. *Nature Biotechnology*, 2019, 37(7): 820.
- [33] GRÜNEWALD J, ZHOU RH, IYER S, LAREAU CA,

- GARCIA SP, ARYEE MJ, JOUNG JK. CRISPR DNA base editors with reduced RNA off-target and self-editing activities[J]. *Nature Biotechnology*, 2019, 37(9): 1041-1048.
- [34] ZHOU CY, SUN YD, YAN R, LIU YJ, ZUO EW, GU C, HAN LX, WEI Y, HU XD, ZENG R, LI Y, ZHOU H, GUO F, YANG H. Off-target RNA mutation induced by DNA base editing and its elimination by mutagenesis[J]. *Nature*, 2019, 571(7764): 275-278.
- [35] ZHANG XH, ZHU BY, CHEN L, XIE L, YU WS, WANG Y, LI LX, YIN SM, YANG L, HU HD, HAN HH, LI YM, WANG LR, CHEN G, MA XY, GENG HQ, HUANG WF, PANG XF, YANG ZZ, WU YX, et al. Dual base editor catalyzes both cytosine and adenine base conversions in human cells[J]. *Nature Biotechnology*, 2020, 38(7): 856-860.
- [36] GRÜNEWALD J, ZHOU RH, LAREAU CA, GARCIA SP, IYER S, MILLER BR, LANGNER LM, HSU JY, ARYEE MJ, JOUNG JK. A dual-deaminase CRISPR base editor enables concurrent adenine and cytosine editing[J]. *Nature Biotechnology*, 2020, 38(7): 861-864.
- [37] 王海涛, 李亭亭, 黄勋, 马润林, 刘秋月. 遗传修饰技术在绵羊分子设计育种中的应用[J]. *遗传*, 2021, 43(6): 580-600.
WANG HT, LI TT, HUANG X, MA RL, LIU QY. Application of genetic modification technologies in molecular design breeding of sheep[J]. *Hereditas*, 2021, 43(6): 580-600 (in Chinese).
- [38] ARGILÉS JM, ORPÍ M, BUSQUETS S, LÓPEZ-SORIANO FJ. Myostatin: more than just a regulator of muscle mass[J]. *Drug Discovery Today*, 2012, 17(13/14): 702-709.
- [39] 姚旭东. 单碱基编辑哈萨克羊 MSTN 基因的研究[D]. 石河子: 石河子大学硕士学位论文, 2021.
YAO XD. Research of base editing system-mediated MSTN gene editing in Kazak sheep[D]. Shihezi: Master's Thesis of Shihezi University, 2021 (in Chinese).
- [40] PAN JS, LIN ZS, WEN JC, GUO JF, WU XH, LIU YY, LAI WJ, LIANG QY, XIE YS, CHEN YR, YAN AF, FENG J, LIU L, GONG DY, ZHU XX, LU JH, TANG DS. Application of the modified cytosine base-editing in the cultured cells of Bama minipig[J]. *Biotechnology Letters*, 2021, 43(9): 1699-1714.
- [41] WANG Y, BI DF, QIN GS, SONG RG, YAO J, CAO CW, ZHENG QT, HOU NP, WANG YF, ZHAO JG. Cytosine base editor (hA3A-BE3-NG)-mediated multiple gene editing for pyramid breeding in pigs[J]. *Frontiers in Genetics*, 2020, 11: 592623.
- [42] 王煜, 宋瑞高, 赵建国, 王彦芳. 碱基编辑器介导的猪 *IGF2* 基因高效定点突变[J]. *中国畜牧兽医*, 2020, 47(11): 3427-3435.
WANG Y, SONG RG, ZHAO JG, WANG YF. Efficient site-directed mutation of porcine *IGF2* gene via base editors[J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2020, 47(11): 3427-3435 (in Chinese).
- [43] ZHOU SW, CAI B, HE C, WANG Y, DING Q, LIU J, LIU Y, DING YG, ZHAO XE, LI GW, YU H, KOU Q, NIU W, PETERSEN B, SONSTEGARD T, MA B, CHEN Y, WANG X. Programmable base editing of the sheep genome revealed no genome-wide off-target mutations[J]. *Frontiers in Genetics*, 2019, 10: 215.
- [44] 丁一格. ABEs 介导的 *FecB* 基因突变滩羊的制备[D]. 杨凌: 西北农林科技大学硕士学位论文, 2020.
DING YG. Highly efficient generation of sheep with a defined *FecB* mutation via adenine base editing[D]. Yangling: Master's Thesis of Northwest A&F University, 2020 (in Chinese).
- [45] 吴艳芳. *MSTN* 基因敲除和 *FecB* 基因突变滩羊扩繁试验[D]. 杨凌: 西北农林科技大学硕士学位论文, 2021.
WU YF. Breeding experiment of *MSTN* gene knockout tan sheep and *FecB* gene mutation tan sheep[D]. Yangling: Master's Thesis of Northwest A&F University, 2021 (in Chinese).
- [46] 李冠纬. 单碱基基因编辑系统介导的 *FGF5* 基因敲除绒山羊的创制与评价[D]. 杨凌: 西北农林科技大学硕士学位论文, 2020.
LI GW. Creation and evaluation of *FGF5* gene knockout in cashmere goats mediated by single base editing system[D]. Yangling: Master's Thesis of Northwest A&F University, 2020 (in Chinese).
- [47] 孙嘉媛, 孙珂欣, 丁一格, 周世卫, 高亚伟, 陈玉林, 王小龙. 四种单碱基编辑器在羊成纤维细胞上的编辑效率[J]. *农业生物技术学报*, 2021, 29(1): 169-177.
SUN JY, SUN KX, DING YG, ZHOU SW, GAO YW, CHEN YL, WANG XL. Editing efficiency of four single base editors in sheep (*Ovis aries*) and goat (*Capra hircus*) fibroblasts[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2021, 29(1): 169-177 (in Chinese).
- [48] 蒙亚琦, 姚旭东, 任秀美奥, 郭延华, 唐红, 张译元, 王立民, 周平. 绵羊胚胎 *FGF5* 基因单碱基突变体系的建立[J]. *中国畜牧兽医*, 2021, 48(10): 3533-3544.
MENG YQ, YAO XD, REN XMO, GUO YH, TANG H, ZHANG YY, WANG LM, ZHOU P. Establishment of

- single base mutation system of *FGF5* gene in sheep embryos[J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2021, 48(10): 3533-3544 (in Chinese).
- [49] 张婷婷, 陈涛, 李燕莉, 杨漫漫, 魏强, 王然, 李林, 李勇. CRISPR/Cas9 技术介导猪基因组单碱基编辑效率的研究[J]. *湖北农业科学*, 2020, 59(18): 143-149, 155.
ZHANG TT, CHEN T, LI YL, YANG MM, WEI Q, WANG R, LI L, LI Y. Programmable base editing efficiency study of CRISPR/Cas9-guided DNA base editors in pig genome[J]. *Hubei Agricultural Sciences*, 2020, 59(18): 143-149, 155 (in Chinese).
- [50] XIE JK, GE WK, LI N, LIU QS, CHEN FB, YANG XY, HUANG XY, ZHEN OY, ZHANG QJ, ZHAO Y, LIU ZM, GOU SX, WU H, LAI CD, FAN N, JIN Q, SHI H, LIANG YH, LAN T, QUAN LQ, LI XP et al. Efficient base editing for multiple genes and loci in pigs using base editors[J]. *Nature Communications*, 2019, 10: 2852.
- [51] 袁泓明. 基于基因编辑技术制备 *CD163* 基因修饰猪及 α -Gal/Neu5Gc/Sd^a 缺失猪[D]. 长春: 吉林大学博士学位论文, 2020.
YUAN HM. Generation of *CD163* modified pigs and α -gal/Neu5Gc/sd^a delete pigs with gene-editing technique[D]. Changchun: Doctoral Dissertation of Jilin University, 2020 (in Chinese).
- [52] 王紫曾晨. 碱基编辑器在牛胚胎中的应用效果研究[D]. 杭州: 浙江大学硕士学位论文, 2021.
WANG ZCC. Research on the effectiveness of base editors in cattle embryos[D]. Hangzhou: Master's Thesis of Zhejiang University, 2021 (in Chinese).
- [53] MOLLA KA, YANG YN. CRISPR/Cas-mediated base editing: technical considerations and practical applications[J]. *Trends in Biotechnology*, 2019, 37(10): 1121-1142.
- [54] YANG B, YANG L, CHEN J. Development and application of base editors[J]. *The CRISPR Journal*, 2019, 2(2): 91-104.
- [55] LI GL, LIU XY, HUANG SS, ZENG YT, YANG G, LU ZY, ZHANG Y, MA X, WANG LS, HUANG XX, LIU J. Efficient generation of pathogenic A-to-G mutations in human tripronuclear embryos via ABE-mediated base editing[J]. *Molecular Therapy-Nucleic Acids*, 2019, 17: 289-296.
- [56] 徐茜, 杨莎, 郝海生, 杜卫华, 庞云渭, 赵善江, 邹惠影, 朱化彬, 李树静, 余文莉, 赵学明. 单碱基编辑技术的应用研究进展[J]. *中国畜牧兽医*, 2021, 48(12): 4403-4411.
- XU X, YANG S, HAO HS, DU WH, PANG YW, ZHAO SJ, ZOU HY, ZHU HB, LI SJ, YU WL, ZHAO XM. Research progress on application of single base editing technology[J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2021, 48(12): 4403-4411 (in Chinese).
- [57] 徐鑫, 刘明军. 碱基编辑系统研究最新进展及应用[J]. *生物工程学报*, 2021, 37(7): 2307-2321.
XU X, LIU MJ. Recent advances and applications of base editing systems[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2021, 37(7): 2307-2321 (in Chinese).
- [58] KANTOR A, MCCLEMENTS ME, MACLAREN RE. CRISPR-Cas9 DNA base-editing and prime-editing[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(17): 6240.
- [59] ANZALONE AV, KOBLAN LW, LIU DR. Genome editing with CRISPR-Cas nucleases, base editors, transposases and prime editors[J]. *Nature Biotechnology*, 2020, 38(7): 824-844.
- [60] 刘俊豪. CRISPR-Cas9 与碱基编辑技术的研究进展[J]. *德州学院学报*, 2021, 37(2): 47-50.
LIU JH. Research progress of CRISPR-Cas9 and base editing technology[J]. *Journal of Dezhou University*, 2021, 37(2): 47-50 (in Chinese).
- [61] CHATTERJEE P, LEE J, NIP L, KOSEKI SRT, TYSINGER E, SONTHEIMER EJ, JACOBSON JM, JAKIMO N. A Cas9 with PAM recognition for adenine dinucleotides[J]. *Nature Communications*, 2020, 11: 2474.
- [62] LI XS, WANG Y, LIU YJ, YANG B, WANG X, WEI J, LU ZY, ZHANG YX, WU J, HUANG XX, YANG L, CHEN J. Base editing with a Cpf1-cytidine deaminase fusion[J]. *Nature Biotechnology*, 2018, 36(4): 324-327.
- [63] KLEINSTIVER BP, SOUSA AA, WALTON RT, TAK YE, HSU JY, CLEMENT K, WELCH MM, HORNG JE, MALAGON-LOPEZ J, SCARFÒ I, MAUS MV, PINELLO L, ARYEE MJ, JOUNG JK. Engineered CRISPR-Cas12a variants with increased activities and improved targeting ranges for gene, epigenetic and base editing[J]. *Nature Biotechnology*, 2019, 37(3): 276-282.
- [64] WANG X, DING CF, YU WX, WANG Y, HE ST, YANG B, XIONG YC, WEI J, LI JF, LIANG JY, LU Z, ZHU W, WU J, ZHOU Z, HUANG X, LIU Z, YANG L, Chen J. Cas12a base editors induce efficient and specific editing with low DNA damage response[J]. *Cell Reports*, 2020, 31(9): 107723.
- [65] KIM DY, CHUNG Y, LEE YJ, JEONG D, PARK KH,

- CHIN HJ, LEE JM, PARK S, KO S, KO JH, KIM YS. Hypercompact adenine base editors based on transposase B guided by engineered RNA[J]. *Nature Chemical Biology*, 2022, 18(9): 1005-1013.
- [66] SHIN HR, SEE JE, KWEON J, KIM HS, SUNG GJ, PARK S, JANG AH, JANG G, CHOI KC, KIM I, KIM JS, KIM Y. Small-molecule inhibitors of histone deacetylase improve CRISPR-based adenine base editing[J]. *Nucleic Acids Research*, 2021, 49(4): 2390-2399.
- [67] ZHAO TY, LI Q, ZHOU CC, LV XJ, LIU HY, TU TX, TANG N, CHENG YB, LIU XY, LIU CB, ZHAO J, SONG Z, WANG H, LI J, GU F. Small-molecule compounds boost genome-editing efficiency of cytosine base editor[J]. *Nucleic Acids Research*, 2021, 49(15): 8974-8986.
- [68] 徐天鹏. 单碱基编辑技术在鸡体细胞上编辑效率优化的初步研究[D]. 南宁: 广西大学硕士学位论文, 2021.
- XU TP. Optimization of single-base editing technology in chicken somatic cells[D]. Nanning: Master's Thesis of Guangxi University, 2021 (in Chinese).
- [69] 江浩筠, 幸宇云. CRISPR/Cas9 和碱基编辑器: 农业动物研究领域的新利器[J]. *生物灾害科学*, 2020, 43(3): 215-218.
- JIANG HY, XING YY. CRISPR/Cas9 and base editors: novel sharp weapons in the research areas of agricultural animals[J]. *Biological Disaster Science*, 2020, 43(3): 215-218 (in Chinese).
- [70] 赵亚伟, 姜卫红, 邓子新, 汪志军, 芦银华. 碱基编辑器的开发及其在细菌基因组编辑中的应用[J]. *微生物学通报*, 2019, 46(2): 319-331.
- ZHAO YW, JIANG WH, DENG ZX, WANG ZJ, LU YH. Development and application of base editors in bacterial genome editing[J]. *Microbiology China*, 2019, 46(2): 319-331 (in Chinese).
- [71] 连萌. 基于 CRISPR/Cpf1 的胞嘧啶碱基编辑器的优化[D]. 合肥: 安徽大学硕士学位论文, 2021.
- LIAN M. Optimization of cytosine base editor based on CRISPR/Cpf1[D]. Hefei: Master's Thesis of Anhui University, 2021 (in Chinese).

(本文责编 陈宏宇)