

特约评述

DOI:10.12211/2096-8280.2025-073

基于CRISPR系统的高通量基因组编辑研究进展

滕佳尧^{1,2,3}, 任传宏^{1,2,3}, 朱芮莹^{1,2,3}, 鲍泽华^{1,2,3,4}

(¹ 浙江大学化学工程与生物工程学院, 生物质化工教育部重点实验室, 浙江 杭州 310058; ² 浙江大学杭州国际科创中心, 全省功能化学品智造重点实验室, 浙江 杭州 311215; ³ 浙江大学化学工程与生物工程学院, 生物工程研究所, 浙江 杭州 310058; ⁴ 浙江大学化学工程与生物工程学院, 浙江省智能生物材料重点实验室, 浙江 杭州 310058)

摘要: 高通量基因组编辑是快速分析大量基因突变功能和进行遗传育种的有效方法。相比于传统随机诱变, 基于规律间隔成簇短回文重复序列 (CRISPR) 系统的基因组编辑具有效率高、可靶向的优点。通过设计靶向目标基因的向导 RNA 文库可以实现高通量基因组编辑和筛选。近年来, 多种 CRISPR 系统以及 CRISPR 衍生基因编辑技术的开发进一步丰富了高通量基因组编辑工具箱。本文主要介绍基于 CRISPR 系统的高通量基因组编辑方法, 包括 CRISPR 辅助的同源定向修复、碱基编辑系统、引导编辑系统等, 并阐述了这些方法在不同领域的应用, 如工业微生物育种、人类功能基因组学和作物改良。最后, 对相关方法存在的物种适用性有限、突变多样性低、编辑范围窄、多基因编辑困难等问题以及潜在的解决方法进行讨论和展望。

关键词: 规律间隔成簇短回文重复序列 (CRISPR); 基因组编辑; 高通量; 同源定向修复; 碱基编辑; 引导编辑

中图分类号: Q812 文献标志码: A

Research advances in CRISPR-based high-throughput genome editing

TENG Jiayao^{1,2,3}, REN Chuanhong^{1,2,3}, ZHU Ruiying^{1,2,3}, BAO Zehua^{1,2,3,4}

(¹ Key Laboratory of Biomass Chemical Engineering of Ministry of Education, College of Chemical and Biological Engineering, Zhejiang University, Hangzhou 310058, Zhejiang, China; ² Zhejiang Key Laboratory of Intelligent Manufacturing for Functional Chemicals, ZJU-Hangzhou Global Scientific and Technological Innovation Center, Zhejiang University, Hangzhou 311215, Zhejiang, China; ³ Institute of Bioengineering, College of Chemical and Biological Engineering, Zhejiang University, Hangzhou 310058, Zhejiang, China; ⁴ Zhejiang Key Laboratory of Smart Biomaterials, College of Chemical and Biological Engineering, Zhejiang University, Hangzhou 310058, Zhejiang, China)

Abstract: High-throughput genome editing is an effective approach for rapidly analyzing the function of massive genetic mutations and to perform genetic breeding. Compared with random mutagenesis, the Clustered, Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR)-based genome editing is more efficient and programmable. High-throughput genome editing and screening is enabled by the design of guide RNA libraries targeting specific genes. In

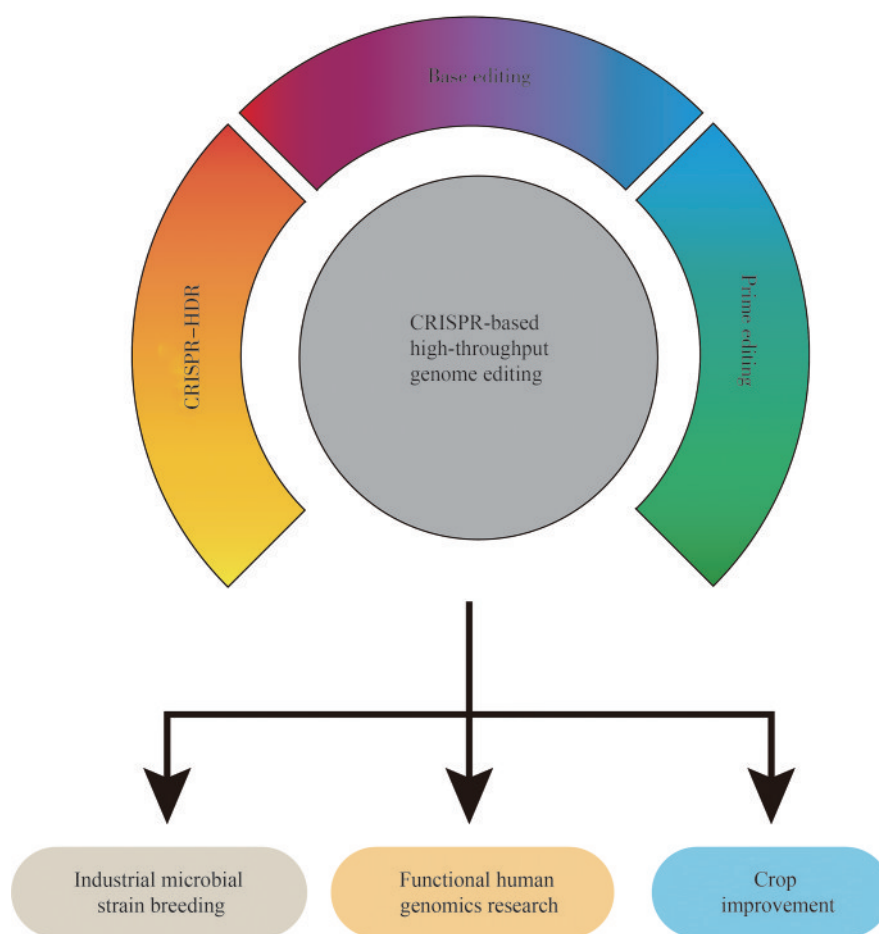
收稿日期: 2025-07-15 修回日期: 2025-10-30

基金项目: 国家重点研发计划 (2023YFF1204500); 国家自然科学基金 (22308316); 中央高校基本科研业务费专项资金 (226-2025-00043)

引用本文: 滕佳尧, 任传宏, 朱芮莹, 鲍泽华. 基于CRISPR系统的高通量基因组编辑研究进展[J]. 合成生物学, 2026, 7(2): 318-334

Citation: TENG Jiayao, REN Chuanhong, ZHU Ruiying, BAO Zehua. Research advances in CRISPR-based high-throughput genome editing[J]. Synthetic Biology Journal, 2026, 7(2): 318-334

recent years, the high-throughput genome editing toolbox is enriched by various CRISPR systems and CRISPR-derived technologies. Here we review major CRISPR-based high-throughput genome editing methods, including CRISPR-assisted homology directed repair, base editing systems, and prime editing systems, and discuss their applications in different fields, including industrial microbial strain breeding, functional human genomics research, and crop improvement. These methods have been applied in improving the production capacity of microorganisms in industrial breeding, analyzing the functions of disease-associated single nucleotide variants (SNVs) in functional human genomics research, and enhancing the herbicide resistance of plants in crop improvement. Meanwhile, we also discuss limitations of these methods, including the limited species applicability, the low mutation diversity, the narrow editing window, and the difficulty in multiplex genome editing. We further provide prospects to address these limitations, including: firstly, expanding the applicable species from model organisms such as *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* to other important industrial microorganisms including *Actinomyces* and *Pseudomonas aeruginosa* by using related CRISPR systems; secondly, increasing mutation diversity by developing more advanced editors, particularly base editors; thirdly, broadening the targeting region of genome editors by using PAM-relaxed or computationally designed Cas variants, as well as novel base editor and prime editor architectures; fourthly, scaling up multiplex genome editing for more targeted sites. With the development of artificial intelligence and automation platforms, as well as the continued rapid advancement of CRISPR and its derivative technologies, we expect that more advanced high-throughput genome editing technologies will emerge.



Keywords: CRISPR; genome editing; high-throughput; homology directed repair; base editing; prime editing

基因组编辑技术是一种能够对细胞基因组中目标基因序列进行编辑和修饰的技术, 可实现基因的定向敲除和修改^[1]。高通量基因组编辑是一种能够在基因组原位区域产生大量定制突变的基因组编辑技术, 是实现功能序列的筛选和分析、基因突变功能的快速鉴定、蛋白质定向进化以及遗传育种等的有力工具。基因编辑技术出现之前, 易错 PCR^[2]、定点饱和突变^[3]和 DNA 重组^[4-5]等技术是构建突变序列的经典方法。这些方法在体外进行突变文库的构建, 并通过特定的方法将文库递送至宿主细胞内表达以进行表型筛选。该过程较为烦琐, 基因通常在质粒或基因组安全港位点进行异位表达, 且文库大小受限于宿主细胞的转化效率^[6]。通过将突变步骤引入到胞内, 体内连续进化方法实现了在细胞生长过程中自主进行目标基因的连续突变和筛选^[7]。体内连续进化虽然规避了突变文库构建和转化或转染等步骤, 但目的基因的异位表达仍然受质粒不稳定性、拷贝数效应、染色体位置效应等的影响^[8]。这些方法无法复现对于突变体功能分析至关重要的内源调控环境。因此, 上述方法主要应用于酶的序列-功能关系和定向进化研究, 在细胞水平的系统生物学研究中存在较大局限性。

基因组编辑能够在目标基因原位直接产生突变, 能够在最大程度上模拟突变在内源染色体环境下的功能^[9]。相比于自发突变、化学诱变或物理诱变等传统诱变方法, 基因组编辑的效率显著提升^[10-11]。从广义上讲, 寡核苷酸重组也属于基因组编辑的范畴^[12]。然而, 受限于不同物种细胞中重组效率的巨大差异及可改造性, 该方法目前主要应用于部分酵母^[13-15]和细菌菌种^[16-19], 尚未在高等生物细胞中实现应用。另外, 广义的基因组编辑还包括可以进行 DNA 重排的酪氨酸重组酶 (Cre) -*loxP* 系统^[20]和可以构建基因组突变文库的 Tn5 转座酶系统^[21]。狭义的基因组编辑主要指可编程核酸酶介导的基因组编辑, 主要包括锌指核酸酶、转录激活因子样效应物核酸酶以及规律间隔成簇短回文重复序列 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR) /CRISPR 相关蛋白 (CRISPR-associated, Cas) 系统。由于在突变文库构建中的巨大优势, 本文主要讨论 CRISPR/Cas 系统。

CRISPR/Cas 系统是细菌和古细菌抵抗外来核酸的免疫系统, 根据效应复合物的组成可分为 1 类 (包括 I、III 和 IV 型) 和 2 类 (包括 II、V 和 VI 型) 系统^[22]。最早被研究清楚且使用最广泛的系统为来自化脓链球菌的 II 型 CRISPR/Cas9 系统^[23]。2020 年诺贝尔化学奖正是基于该系统的研究及其在各个生命科学领域的巨大应用价值授予了法国科学家 Emmanuelle Charpentier 和美国科学家 Jennifer Doudna。在这个系统中, Cas9 蛋白在单向导 RNA (single guide RNA, sgRNA) 的引导下靶向基因组上的特定位点 (称为原间隔区), 该位点紧邻一个原间隔区相邻基序 (protospacer adjacent motif, PAM), 并与 sgRNA 的引导序列相匹配^[23]。随后, Cas9 蛋白解旋目标 DNA 双链, 进而通过 RuvC 和 HNH 核酸酶结构域分别切割双链, 产生 DNA 双链断裂 (double-strand break, DSB) (图 1)。DSB 是一种非常严重的 DNA 损伤。在宿主细胞如大肠杆菌、酿酒酵母和哺乳动物细胞等中, 可以通过非同源末端连接 (non-homologous end joining, NHEJ) 或同源定向修复 (homology-directed repair, HDR) 这两种修复机制对 DSB 进行修复^[24-26]。科学家可以利用 NHEJ 修复保真度低的特点引入随机突变进行基因敲除, 或利用 HDR 的高保真度添加定制的 HDR 模板实现精准突变的敲入。近年来, 传统的重组工程与 CRISPR/Cas 系统相结合, 利用 CRISPR/Cas 生成靶向 DSB 的能力, 促进了细菌、酵母和人类细胞系中基于 HDR 的突变文库构建和下游应用。

CRISPR/Cas 基因编辑技术发展过程中一个关

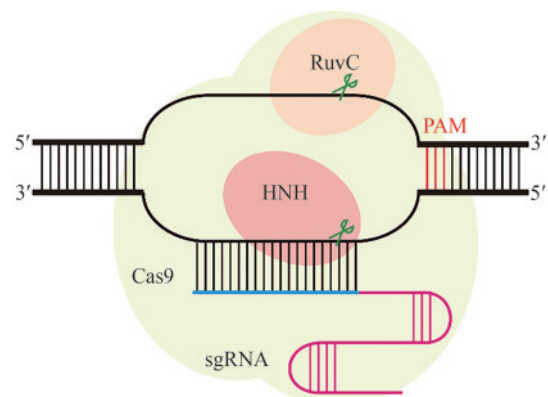


图 1 CRISPR/Cas9 系统切割 DNA

Fig. 1 Schematic of DNA cleavage by the CRISPR/Cas9 system

键的里程碑是不依赖于DSB的CRISPR衍生技术的开发。将Cas9的两个核酸酶结构域(HNH和RuvC)中的活性位点氨基酸突变为丙氨酸可获得失活Cas9(dead Cas9, dCas9)^[27], 而突变其中一个结构域(HNH或RuvC)则可获得切口酶Cas9(Cas9 nickase, nCas9)^[28]。其中, dCas9完全丧失了DNA切割活性, 但仍保留靶向结合DNA的能力, 其最初可作为一种阻碍RNA聚合酶的基因敲低技术, 后续通过蛋白融合及sgRNA支架改造被进一步开发为可招募其他效应蛋白的平台, 如较早实现的基因调控技术^[29-30]; nCas9则保留了切割DNA单链的能力, 通过融合脱氨酶、逆转录酶等效应蛋白, 科学家开发出了可引入点突变的基因编辑工具碱基编辑器和引导编辑器^[31-32]。上述CRISPR衍生技术利用不同于NHEJ和HDR的引入突变的机制, 摆脱了对于DSB的依赖, 大大提升了安全性和编辑精度。此外, 天然Cas蛋白也具有其他的一些局限性。通过蛋白质工程手段对Cas蛋白进行改造, 可获得PAM识别范围更广、编辑效率更高、脱靶效率更低或体积更小的Cas蛋白突变体^[33]。这些进展为高通量

基因组编辑技术的发展奠定了坚实基础。sgRNA因其设计简单、可编程性强、易于合成等特点, 可以大批量设计构建获得sgRNA文库, 配合上述不同的CRISPR技术实现高通量基因组编辑(图2)。高通量基因组编辑技术通过适配各个领域中的高通量筛选和功能分析场景, 极大促进了基础生命科学研究及治疗药物、生物基产品开发和作物改良等实际应用。

本文接下来为读者详细解读基于各种CRISPR系统的高通量基因组编辑方法, 主要聚焦于编辑精度高的点突变引入方法。我们将系统比较各种策略的优势与局限性, 介绍相关方法在多个物种中的典型应用, 并对未来发展方向进行探讨。

1 CRISPR辅助的高通量基因组编辑方法

如前所述, 利用CRISPR系统及Cas蛋白突变体, 以及sgRNA文库的高通量设计和合成, 科研工作者们开发了一系列的高通量基因组编辑技术,

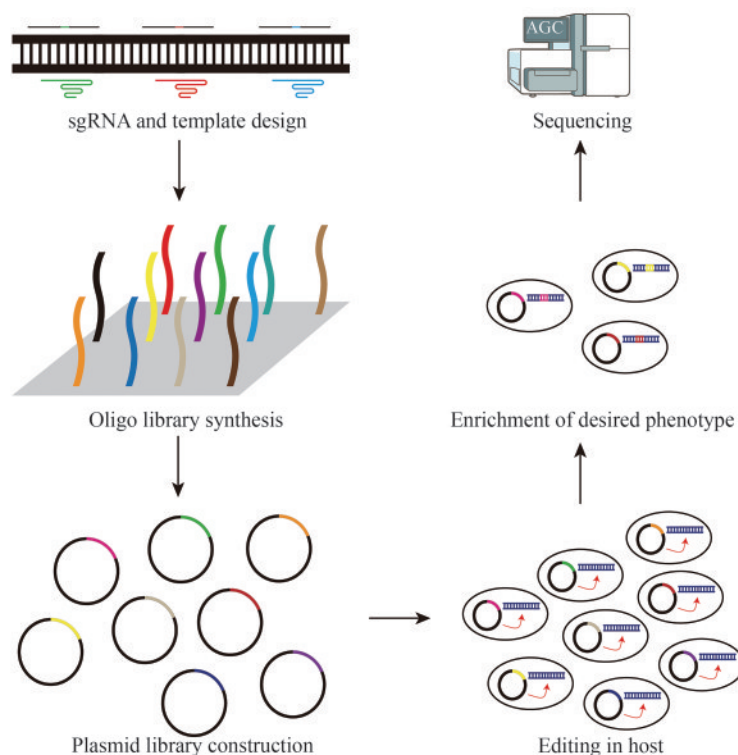


图2 CRISPR辅助的高通量编辑方法工作流程

Fig. 2 Workflow of CRISPR-assisted high-throughput genome editing methods

包括CRISPR辅助的同源定向修复、碱基编辑系统和引导编辑系统（图3）。

1.1 CRISPR辅助的同源定向修复

生物体内自发的HDR效率通常较低^[34]。然而，

在靶位点处先产生DSB可以显著提高通过HDR途径进行外源DNA模板靶向整合的效率^[35]。通过设计sgRNA序列，CRISPR/Cas系统可以在特定位点引入DSB^[23]。在存在外源修复模板的情况下，细胞可通过HDR途径进行修复，从而实现精准的基因组编辑（CRISPR-HDR），见图3（a）^[36-37]。利用

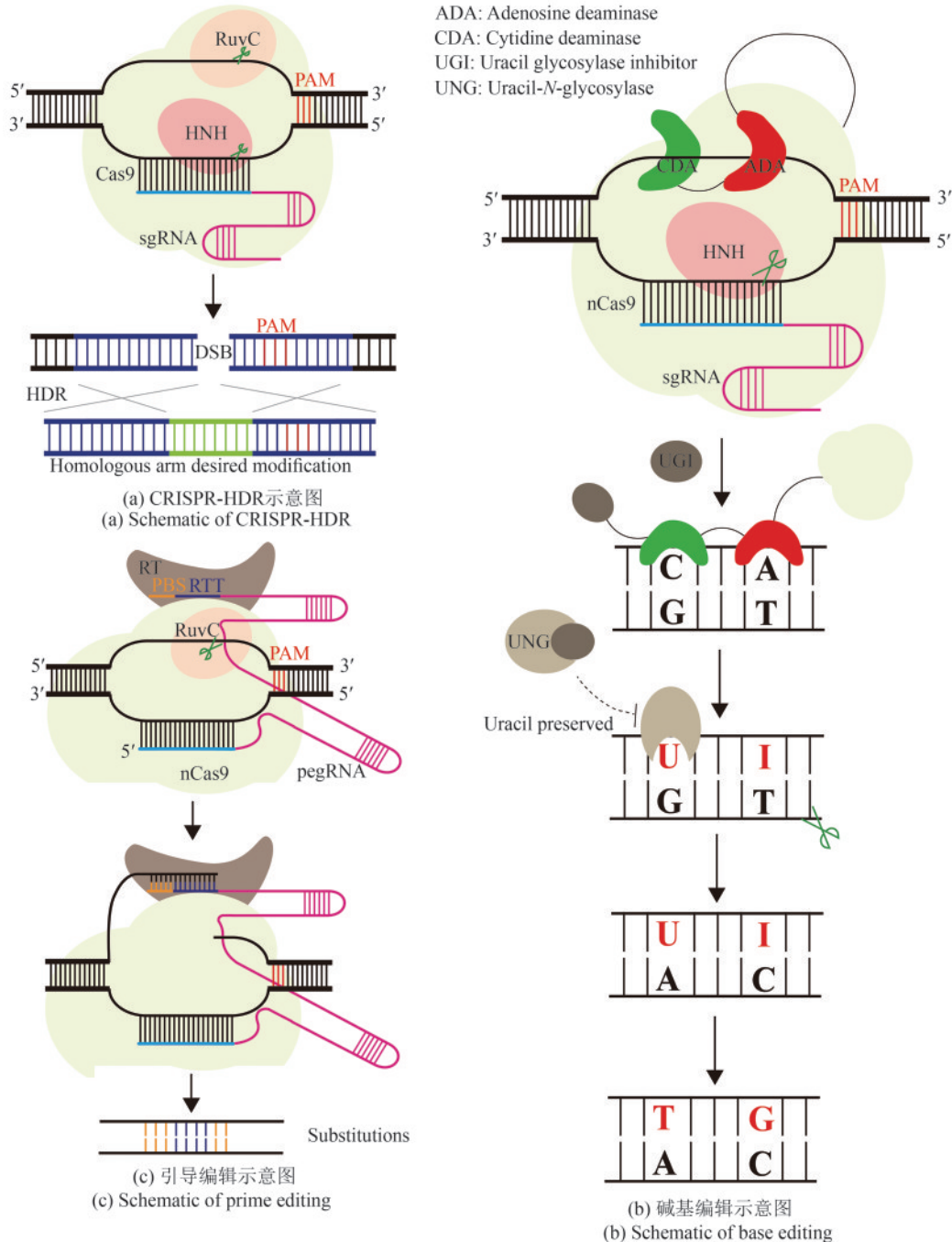


图3 基于CRISPR的点突变引入方法

Fig. 3 CRISPR-based methods for introducing point mutations

CRISPR-HDR技术,通过大规模合成含有目标突变的HDR模板以及相应的sgRNA设计,可实现基于HDR的高通量基因组编辑。

2014年,Findlay等^[38]首次在人类细胞系中应用CRISPR-HDR技术,利用sgRNA引导Cas9进行基因组切割,并结合体外合成的供体质粒文库,实现了人类基因的饱和编辑。此后,多项研究在哺乳动物细胞中使用CRISPR-HDR技术进行了基因组区域的饱和编辑和大规模功能分析^[39-42]。哺乳动物细胞中HDR所用的修复模板通常需要600~1000 bp的同源臂^[38-39]。因此在供体质粒文库构建的过程中需要先克隆相应的同源臂片段。相比之下,在酿酒酵母等微生物中,HDR对同源臂长度的需求通常不超过100 bp。例如,Jakočiūnas等^[43]在酿酒酵母中开发的Cas9介导的蛋白质进化反应技术(CasPER),将较短的同源臂直接合成在引物上,继而采用易错PCR合成全长基因片段作为修复模板,在基因组多个位点整合效率达到98%以上。在CasPER技术中,切割目的基因的sgRNA只用了一条,在离切割位点较远的区域(基因两端)突变效率会有一定程度的降低。这一问题可以通过针对每个突变设计相应的邻近sgRNA解决。例如,Garst等^[44]率先在大肠杆菌中开发了CRISPR支持的可跟踪基因组工程技术(CREATE),将修复模板供体整合到sgRNA表达质粒上,确保相互匹配的供体和sgRNA共转至同一细胞实现编辑,这一技术不仅可用于某一基因片段的饱和突变,也可应用于全基因组范围内的高通量基因组编辑。Dewachter等^[45]对CREATE优化后,成功实现了大肠杆菌必需基因*fabZ*、*lpxC*和*murA*的全长饱和编辑,揭示了抗生素耐受相关突变。在酿酒酵母中,包括本课题组在内的多个研究团队开发了基于CRISPR-HDR的高通量基因组编辑技术^[46-50]。CRISPR/Cas9和同源定向修复辅助的基因组规模工程(CHAnGE),使用质粒文库实现了全基因组基因敲除筛选^[46]。Roy等^[47]则开发了多重精确基因组编辑技术(MAGESTIC),通过在编辑的同时整合短小、可追踪的集成条码序列,实现了更为可靠的高通量筛选数据分析。Sharon等^[49]则开发了CRISPEY技术,通过利用Retron元件,实现了全基因组范围内对大量自然遗传变异的重构和分析。此外,在CHAnGE基础上,

本课题组^[50]最近开发的CRISPR/Cas9和同源定向修复辅助的饱和编辑技术(CHASE)使用PAM识别范围更广的Cas9变体进一步拓展了基因组靶向范围。

上述研究中使用的HDR修复模板均为双链DNA^[43-44, 46-50]。研究表明,RNA也可在酿酒酵母中作为DSB修复的供体模板^[51]。基于此,Jensen等^[52]开发的CRISPR和RNA辅助的体内定向进化方法(CRAIDE)利用了嵌合供体RNA(cgRNA),同时用于Cas9靶向和DSB修复。通过利用易错T7 RNA聚合酶在供体RNA模板中引入随机突变,可将突变引入靶位点。

CRISPR-HDR技术在高通量基因组编辑,特别是饱和基因编辑中已有相当广泛的应用,但仍然有一些局限性。最主要的也是一般基因编辑技术都有的问题是DSB可能诱发的不可预知的染色体突变,如随机插入或缺失(indel)以及染色体结构变异(如染色体倒位、易位、大片段缺失等)^[37, 53-56]。此外,CRISPR-HDR并不适用于HDR效率低的物种或细胞系^[57-58]。接下来探讨两种不依赖于DSB的高通量基因组编辑方法。

1.2 CRISPR辅助的碱基编辑系统

碱基编辑器(base editor, BE)是一种可以实现精确单碱基编辑的基因编辑工具,它将nCas或dCas与脱氨酶或糖基化酶融合,可在不引入DSB的情况下,实现一种碱基向另一种碱基的替换[图3(b)]^[31, 59-62]。根据靶向碱基类型的不同,BE可分为胞嘧啶碱基编辑器(cytosine base editor, CBE)^[31]、腺嘌呤碱基编辑器(adenine base editor, ABE)^[59]和融合两种不同类型脱氨酶的双碱基编辑器(dual base editor, DBE)^[60],以及基于糖基化酶的鸟嘌呤碱基编辑器(glycosylase-based guanine base editor, gGBE)^[61]和胸腺嘧啶碱基编辑器(thymine base editor, TBE)^[62]。

2016年,Komor等^[31]报道了第一代CBE,其将胞苷脱氨酶(cytidine deaminase, CDA)与dCas9融合,诱导非模板链中特定定位点的胞嘧啶脱氨基生成尿嘧啶。在后续DNA复制过程中,该尿嘧啶被识别为胸腺嘧啶,从而实现C-G到T-A的替换。

2017年, Gaudelli等^[59]进一步开发了ABE, 将nCas9与腺苷脱氨酶(adenosine deaminase, ADA)融合, 可以介导腺嘌呤脱氨基生成次黄嘌呤, 并在之后的DNA复制过程中被识别为鸟嘌呤, 从而实现A-T到G-C的替换。为了拓展突变的多样性, 多个课题组几乎在同一时间开发了多个DBE系统。例如, Zhang等^[60]将CDA和ADA同时与nCas9融合, 使其能在同一靶位点兼具CBE和ABE的功能。目前, 这些使用脱氨酶的BE系统, 由于开发较早, 技术较为成熟, 已经广泛应用于哺乳动物细胞、微生物以及植物的高通量基因组编辑研究。

在哺乳动物细胞中, 靶向激活诱导性胞苷脱氨酶(AID)介导的诱变系统(TAM)和CRISPR-X首次证实了CBE进行高通量基因组编辑的可行性。这两种系统均采用了dCas9与AID的融合蛋白或复合物, 通过sgRNA文库引导, 在目标位点区域产生大量突变^[63-64]。其中, TAM将AID变体AIDx直接与dCas9的C端融合^[63], 而CRISPR-X通过在sgRNA骨架茎环结构中插入两个MS2结合位点, 招募与MS2蛋白融合的AID或高活性变体AID* Δ ^[64]。上述两种技术主要应用于蛋白质的体内定向进化。在全基因组水平上, Xu等^[65]开发了内置分子条码的CBE介导的基因敲除方法(BARBKO), 通过干扰基因的起始密码子或剪接位点, 或提前引入终止密码子, 进行基因组规模的敲除筛选。相比于传统的CRISPR-KO策略, 该技术具有文库构建所需细胞数少、筛选质量高、低免疫毒性等优点。最近, Chen等^[66]开发了DNA解旋酶和脱氨酶融合的解旋酶辅助连续编辑系统(HACE)。在此系统中, 解旋酶与Cas9介导的R环单链DNA(ssDNA)结合, 随后沿3'到5'方向解开DNA双螺旋。在这一过程中, 脱氨酶以ssDNA为底物引入编辑。Cas9在这一过程中起到了定位与帮助起始解旋的作用。参考在大肠杆菌中融合nCas9与易错DNA聚合酶I开发的EvolvR技术, 可通过多条sgRNA共表达实现多个基因组位点的随机突变^[67], HACE也有可能通过引入sgRNA文库, 在基因组范围内产生大量编辑。

在微生物中, 高通量碱基编辑也非常便捷有效。例如, Wang等^[68]利用AID和nCas9(D10A)融合蛋白, 在谷氨酸棒状杆菌中开发了多重自动化

碱基编辑系统MACBETH, 可进行多重基因编辑, 并能快速构建多个基因的组合失活文库, 配合自动化系统高效构建了大量工程菌株, 提升了谷氨酸生产能力。Zimmermann等^[69]在酿酒酵母中开发了使用I-E型CRISPR/Cas系统进行局部突变(CoMuTER)的方法, 将Cas3与胞苷脱氨酶融合, 可克服Cas9单条sgRNA编辑窗口限制, 实现数万碱基对基因组区域的高通量编辑。Gawllitt等^[70]在大肠杆菌中利用PAM更宽松的ScCas9构建了ScBE3系统, 可将突变范围扩展至启动子区域, 实现了全基因组水平的高通量敲除筛选。

在植物中, Li等^[71]在水稻中开发了饱和靶向内源性突变编辑器(STEME), 将CDA(APOBEC3A)和ADA(ecTadA-ecTadA7.10)以不同的构型融合到nCas9的N端, 实现了双碱基编辑。进一步通过利用PAM放松的Cas9突变体Cas9-NG和sgRNA文库, STEME-NG系统成功应用于*OsACC*基因的定向进化。此外, Zhang等^[72]开发了多重正交碱基编辑系统(MoBE), 通过改造sgRNA骨架正交茎环, 使其同时招募了ADA(TadA9)和CDA(CDA1), 也在水稻中实现了高通量基因组双碱基编辑。

1.3 CRISPR辅助的引导编辑系统

引导编辑器(prime editor, PE)是另一种不依赖DSB的基因组编辑方法, 由一个蛋白质复合物和经过改造后的sgRNA, 即引导编辑引导RNA(pegRNA)组成。其中, 蛋白质复合物包含nCas9(H840A突变体)和一个与其C端融合的逆转录酶结构域; pegRNA 5'端为引导序列, 3'端含有引物结合序列(PBS)和逆转录酶模板(RTT)。研究人员想要引入的目标突变位于RTT中, 逆转录酶以此为模板, 以nCas9形成的ssDNA为引物进行逆转录, 从而将RNA上的突变引入至基因组DNA中[图3(c)]。与CRISPR-HDR相同, PE可通过人工合成编码pegRNA的DNA, 实现所有12种类型的点突变^[32]。目前, 大量研究通过使用pegRNA文库以及引导编辑器在多个物种中实现了高通量基因组编辑^[73-81]。

Xu等^[73]在水稻中开发了引导编辑文库介导的

饱和突变 (PLSM), 这是首次使用 pegRNA 文库实现高通量引导编辑, 虽然其文库大小仅包含数条 pegRNA。在哺乳动物细胞中, Erwood 等^[74] 采用与 PLSM 相似的策略, 开发了饱和引导编辑方法 SPE。后续有研究将 pegRNA 文库进一步扩大, 开发出文库引导编辑筛选方法 PRIME^[75]、引导编辑和内源区域测序方法 PEER-seq^[76] 等。PEER-seq 在引入目标突变时在突变位点附近同时引入一个碱基的同义突变作为编辑标记, 使假阳性读数减少了 625 倍, 编辑效率提高了 3.4 倍^[76]。为了提升 pegRNA 文库构建效率, Hsu 等^[77] 开发了用于原位表征的多重位点特异性突变方法 (MOSAIC), 利用融合 PCR 将混合碱基或高通量合成的寡核苷酸池引入至线性 DNA 片段中, 可更快速地构建 pegRNA 文库。他们通过这种高通量编辑方法, 进一步对 PBS/RTT 长度的海量组合进行了测试, 从而对 PE 的编辑效率实现优化。Cirincione 等^[80] 则开发了用于高通量基因敲除筛选的 PE 平台, 通过构建约含 24 万个工程化 pegRNA (epegRNA) 的文库 (StopPR), 靶向约 1.7 万个密码子, 筛选出了

1149 个必需基因。该方法可以在一定程度上减少 DNA 错配修复的干扰, 并进一步拓宽高通量 PE 方法在基因组上的可编辑范围。类似地, Niu 等^[81] 开发了基于引导编辑器的筛选方法 (PRESENT), 使用含 29.79 万个 epegRNA 的文库, 靶向 HCT116 细胞中的 3644 个蛋白质编码基因, 并结合机器学习模型和生物信息学算法, 系统性地分析了同义突变对细胞生长的影响, 首次揭示了人类基因组上同义突变的功能和机制。

使用 PE 进行高通量基因组编辑时, 高效的 pegRNA 设计技术难度较高。针对这一问题, Park 等^[82] 开发了一款 pegRNA 文库设计工具 SynDesign。该工具可以针对目标基因或突变体生成 pegRNA 文库, 预测其在不同 PE 系统及细胞类型中的编辑效率。同时 SynDesign 也整合了带有同义突变的标记以提高编辑效率并促进目标突变的检测。此类工具将有助于利用 PE 进行高通量基因组编辑, 促进人类疾病相关基因变异表征等研究。

上述三类高通量基因组编辑方法的相关技术细节总结于表 1。

表 1 CRISPR 辅助的高通量基因组编辑方法

Table 1 CRISPR-assisted high-throughput genome editing methods

编辑方法	方法名称	物种	Cas 蛋白	PAM	效应蛋白	参考文献
CRISPR-HDR	Saturation editing	哺乳动物细胞	SpCas9	NGG	—	[38]
	CasPER	酿酒酵母	SpCas9	NGG	—	[43]
	CREATE	大肠杆菌	SpCas9	NGG	—	[44-45]
	CHAnGE	酿酒酵母	SpCas9	NGG	—	[46]
	MAGESTIC	酿酒酵母	SpCas9	NGG	—	[47]
	CRISPEY	酿酒酵母	SpCas9	NGG	—	[49]
	CHASE	酿酒酵母	SpiG (SpCas9 突变体)	NGN	—	[50]
	CRAIDE	酿酒酵母	SpCas9	NGG	—	[52]
Base editing	TAM	哺乳动物细胞	dSpCas9	NGG	胞苷脱氨酶 AID-P182X (AIDx)	[63]
	CRISPR-X	哺乳动物细胞	dSpCas9	NGG	胞苷脱氨酶 AID/AID*Δ	[64]
	BARBEKO	哺乳动物细胞	nSpCas9	NGG	胞苷脱氨酶 Anc689 APOBEC	[65]
	HACE	哺乳动物细胞	nSpCas9	NGG	胞苷脱氨酶 AID*Δ 解旋酶 PcrA M6	[66]
	MACBETH	谷氨酸棒状杆菌	nSpCas9	NGG	胞苷脱氨酶 AID-P47S (AID ^{TS})	[68]
	CoMuTER	酿酒酵母	Cas3	AAG	胞苷脱氨酶 rAPOBEC1	[69]
	ScBE3	大肠杆菌	nScCas9	NNG	胞苷脱氨酶 rAPOBEC1	[70]
	STEME	水稻	nSpCas9	NGG	胞苷脱氨酶 APOBEC3	[71]
	STEME-NG		nCas9-NG	NG	腺苷脱氨酶 ecTadA-ecTadA7.10	
	MoBE	水稻	nSpCas9	NGG	胞苷脱氨酶 CDA1 腺苷脱氨酶 TadA9	[72]

续表

编辑方法	方法名称	物种	Cas 蛋白	PAM	效应蛋白	参考文献
Prime editing	PLSM	水稻	nSpCas9	NGG	逆转录酶MMLV-RT(基于pPE2)	[73]
	SPE	哺乳动物细胞	nSpCas9	NGG	逆转录酶MMLV-RT(基于PE2)	[74]
	PRIME	哺乳动物细胞	nSpCas9	NGG	逆转录酶MMLV-RT(基于PE3)	[75]
	PEER-seq	哺乳动物细胞	nSpCas9	NGG	逆转录酶MMLV-RT (基于PEmax)	[76]
	MOSAIC	哺乳动物细胞	nSpCas9	NGG	逆转录酶MMLV-RT(基于PE2)	[77]
	高通量基因敲除筛选的PE平台	哺乳动物细胞	nSpCas9	NGG	逆转录酶MMLV-RT (基于PEmax)	[80]
	PRESENT	哺乳动物细胞	nSpCas9	NGG	逆转录酶MMLV-RT (基于PEmax)	[81]

2 CRISPR 辅助的高通量基因组编辑方法应用

CRISPR 辅助的高通量基因组编辑方法因其广泛的适用性及编辑的多样性,已在不同物种中应用,本文重点介绍其在三个关键领域中的应用,包括工业微生物技术、生命健康和农业领域。

2.1 工业微生物育种

大肠杆菌、酿酒酵母和其他非模式微生物已被广泛应用于生物制造,以实现精准发酵和可持续的生物经济。然而,尽管人们对微生物生理学和代谢途径设计的认知不断深入,经过工程改造的实验室原型菌株通常需要经过实验室适应性进

化(adaptive laboratory evolution, ALE)才能满足产业化需求^[83]。ALE可在一定程度上解决诸如产品产量低^[84]、底物毒性大^[85]以及菌种抗逆能力低^[86]等问题,但传统的ALE过程常存在突变效率低与无法理性选择突变靶点等局限性。CRISPR 辅助的高通量基因组编辑显著加速了微生物菌种的实验室进化过程,特别是在菌株耐受性和生产能力方面(图4)。利用CREATE进化大肠杆菌,研究人员快速实现了热耐受性和抗生素抗性的提升^[44]。利用CHANGE和CHASE,通过全基因组敲除筛选和靶向全局转录因子的饱和突变,研究人员实现了酿酒酵母抗逆性的提升^[50]。Liu等^[87]利用CBE,在谷氨酸棒状杆菌ATCC 13032中构建了覆盖基因组98.1%基因的敲除文库,筛选出了与耐药性或耐受性相关的基因。在生产能力提升方面,Jakočiūnas等^[43]利用CasPER进化酿酒酵母代谢途

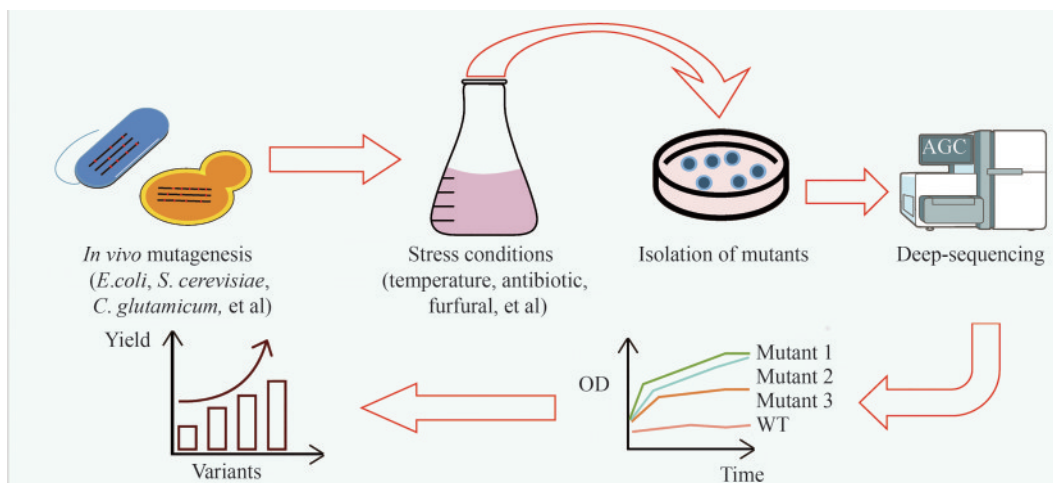


图4 CRISPR 辅助的高通量基因组编辑在工业微生物育种中的应用

Fig. 4 Applications of CRISPR-assisted high-throughput genome editing in industrial microbial strain breeding

径中两种关键酶，使异戊二烯产量提高了11倍。Wang等^[68]应用MACBETH构建组合基因失活文库，筛选发现 pyk 和 $ldhA$ 双基因失活的谷氨酸棒状杆菌菌株，其谷氨酸合成能力提高了3倍。Zimmermann等^[69]利用CoMuTER系统对番茄红素合成途径进行进化，成功使酿酒酵母中番茄红素产量翻倍。Hao等^[88]使用BE构建了枯草芽孢杆菌Sec转位酶原位突变体文库并进行筛选，获得了蛋白质产量更高的菌株，随后又开发了由dCas12b介导的BE系统，获得了蛋白质分泌效率提高的大肠杆菌底盘细胞^[89]。上述例子表明，CRISPR辅助的高通量基因组编辑结合高通量筛选可以显著加速工业微生物育种过程。

2.2 人类功能基因组学

人类功能基因组学的一个重要研究使命是阐明自然存在于健康人群中或与疾病相关的大量遗传变异的功能。传统方法通过搜集临床和人群基因组数据来分析这些变异的功能，例如解析癌基因中大量意义不明的遗传突变，但这一方法的效率较低^[90]。相比较而言，高通量基因组编辑技术能够在短时间内产生大量突变，并通过比较编辑前后的细胞表型或分子特征变化，高效鉴定变异功能（图5）。以乳腺癌易感基因 $BRCA1$ 为例，其有害突变积累会显著增加女性患乳腺癌和卵巢癌

的风险^[91]。Findlay等^[39]使用CRISPR-HDR策略靶向 $BRCA1$ 的13个关键外显子，产生了约4000个单核苷酸位点变异（single nucleotide variant, SNV），并从中鉴定出400个非功能性错义SNV和300个影响基因表达的SNV。这一研究范式几乎可以分析所有的单核苷酸突变，并且大大缩短了所需时间。类似地， $DDX3X$ 基因的功能丧失会导致女性神经发育障碍。Radford等^[42]通过CRISPR-HDR对 $DDX3X$ 所有17个外显子进行饱和编辑，鉴定出3432个功能异常变异，并基于此训练了一个机器学习模型用于功能异常变异的预测。除此之外，CRISPR-HDR策略还促进了许多其他重要基因的变异功能解析，如 $BAP1$ ^[40]、 $BRCA2$ ^[92-95]、 $RAD51C$ ^[96]、 VHL ^[97]等。BE在人类功能基因组学研究中的应用也非常广泛。例如，研究人员利用BE对 $BCL2$ ^[92]、 $TP53$ ^[98]、 $DNMT3A$ ^[99]等基因进行大规模突变，鉴定出了许多具有重要影响的变异类型。此外，基于BE开发的BARBEKO可用于人类全基因组的敲除筛选，规避了CRISPR-KO因DNA切割所致的细胞毒性问题，是传统CRISPR筛选方法的重要补充。BE技术，由于其特定的碱基转换特点，还可应用于特定氨基酸残基的功能分析。例如，Li等^[100]使用ABE对全蛋白质组范围内的丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸位点进行精准编辑，在人视网膜色素上皮细胞系RPE1中成功鉴定

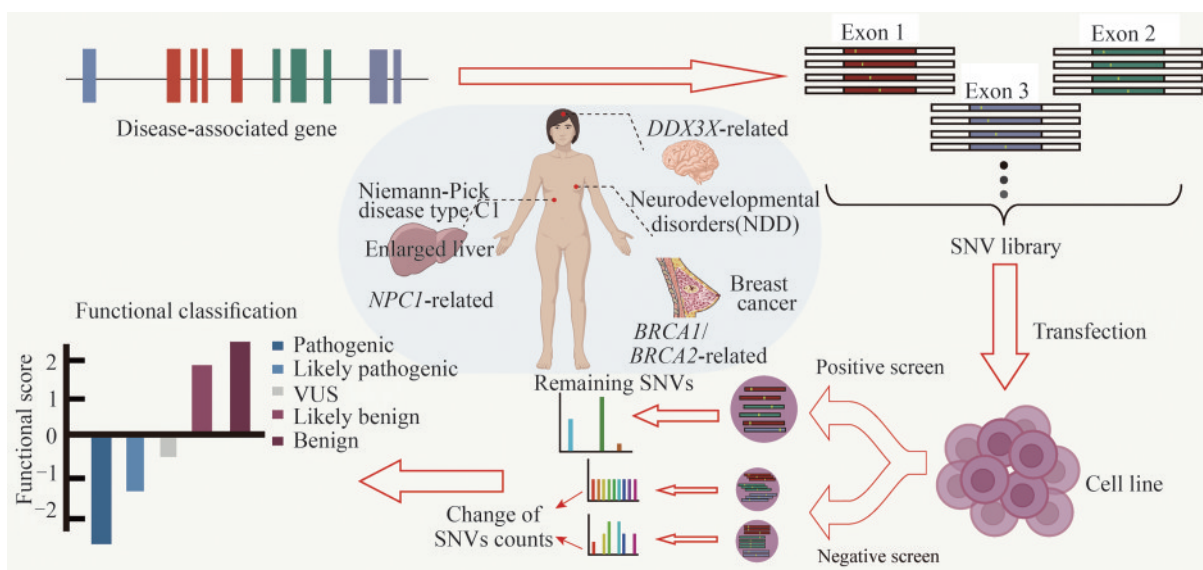


图5 CRISPR 辅助的高通量基因组编辑在人类功能基因组学中的应用

Fig. 5 Applications of CRISPR-assisted high-throughput genome editing in functional human genomics

出3467个功能性氨基酸位点，并揭示了这些位点与磷酸化修饰、蛋白结构维持和癌症相关突变的关联。近年来，PE技术也因其可诱导全部突变类型且不依赖DSB的特性，被越来越多的研究人员应用于分析疾病相关基因SNV的功能，这些基因包括*NPCI*^[74]、*BRCA2*^[74]、*BRCA1*^[76]、*RPL15*^[76]、*EGFR*^[76, 78]、*BCR-ABL1*^[77]、*SMARCB1*^[79]、*MLH1*^[79]等。可见，这些高通量的基因组编辑技术将大大加速人们对致病遗传变异的理解，所产生的突变-表型数据库将促进临床诊断及帮助医生制定个性化的治疗方案。

2.3 作物改良

面对人口增长和气候变化等多重挑战，确保粮食安全已成为全球农业领域的共同目标，利用基因工程技术进行作物改良是关键应对策略之一。然而，作物遗传性状的自然变异积累过程漫长。尽管传统的化学或物理诱变方法能在一定程度上加速突变产生，但筛选具有目标优良性状的作物效率较低^[101]。CRISPR辅助的高通量基因组编辑技术显著加速了作物改良进程（图6）。植物中HDR效率往往较低，因此不依赖HDR的BE和PE辅助的高通量基因组编辑应用更为广泛，主要集中在除草剂抗性等性状的进化方面。例如，Li等^[71]针对水稻OsACC蛋白CT结构域的400个氨基酸，使用STEME-1和STEME-NG对其进行了大规模编辑和筛选，成功获得了除草剂抗性增强的突变体。Kuang等^[102]通过构建基于CBE和ABE

的基因进化方法BEMGE，靶向水稻*OsALS1*基因筛选得到了具有除草剂耐受性的不同突变体，并进一步利用BE将有益突变类型成功引入到了商业化水稻品种中。此外，Wang等^[103]通过BE对拟南芥中的*EPSPS*、*ALS*和*HPPD*基因进行大规模编辑和筛选，也成功鉴定到了除草剂抗性突变体。Xu等^[73]在水稻中通过PLSM技术靶向*OsACC1*的六个保守残基，鉴定到16种具有除草剂抗性的突变类型。这些例子充分展示了高通量基因组编辑在加速作物改良中的巨大潜力；此外，在这些模式植物中获得的突变体及其相关机制，也为改良其他作物的相关性状提供了参考。预计在不久的将来，高通量基因组编辑会被应用于更多更复杂的作物性状的进化筛选，如植株形态、产量或其他类型的胁迫耐受性。

3 展望

在物种适用性方面，CRISPR辅助的高通量基因组编辑方法仍然有一定的扩展空间（图7）。例如，PE在大肠杆菌等微生物中应用较为困难，这与3'→5' DNA核酸外切酶*sbcB*有关，抑制*sbcB*的表达可以大幅提升PE在大肠杆菌中的编辑效率^[104]。HDR在特定物种，特别是植物中的低效率限制了CRISPR-HDR在高通量基因组编辑方面的应用^[105]。拓展其物种适用性需要在分子层面提升HDR效率。例如，可以通过使用具有HDR增强模块的ssDNA作为供体^[106]等方法提高HDR效率。

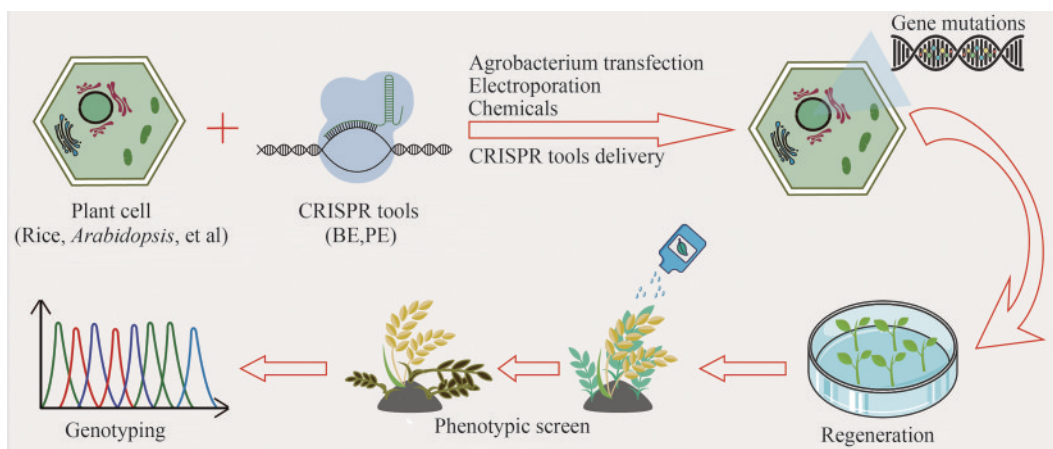


图6 CRISPR辅助的高通量基因组编辑在作物改良中的应用

Fig. 6 Applications of CRISPR-assisted high-throughput genome editing in crop improvement

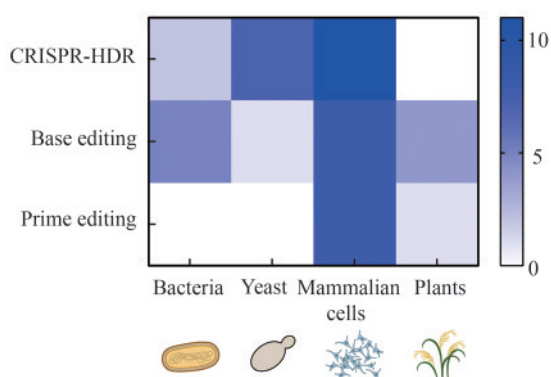


图7 CRISPR辅助的高通量基因组编辑方法在不同物种中的适用性

(热图程度代表本文所引相关文献数)

Fig. 7 Applicability of CRISPR-assisted high-throughput genome editing methods in different species
(The heat map indicates the number of relevant publications cited in this review)

这些策略有望应用于基于HDR的高通量基因组编辑。除了前文提及的酿酒酵母、大肠杆菌等，放线菌也是一种重要的工业微生物。由于CRISPR/Cas系统存在于近一半的放线菌基因组中，放线菌可以使用内源性或相近菌种的CRISPR/Cas系统，具有无或低毒性、高相容性的独特优势。以放线菌中现有的CRISPR高效基因组编辑工具为基础，或许可以开发出高通量的基因组编辑方法，对于放线菌的工业生产，尤其是天然产物的研究，能够有所帮助^[107]。此外，不同于前述的三类高通量基因组编辑方法，Chen等^[108]在铜绿假单胞菌中开发了定点转座基因组改造(STAGE)技术，使用CRISPR-Cas12k引导的蓝藻CRISPR相关转座酶(ShCAST)，可构建大规模靶向文库，鉴定抗生素抗性基因，将CRISPR辅助的高通量基因组编辑方法应用拓展到了铜绿假单胞菌中，且在未来可能进一步拓展到其他细菌中。

在突变多样性方面，BE的突变谱仍然具有较大的局限性。虽然研究人员已开发出DBE来解决这一局限性^[60, 71]，但其诱导的突变多样性与CRISPR-HDR和PE相比仍然较低。目前一些研究已经进一步开发出能在DBE系统中实现腺嘌呤(A)到所有四种碱基转换的编辑系统。例如，通过将ABE与N-甲基腺嘌呤DNA糖基化酶融合构建的AYBE，能够切除腺嘌呤脱氨基产生的次黄嘌呤，从而实现碱基A到嘧啶碱基的转换^[109]。近年来开

发的一系列基于糖基化酶的碱基编辑器包括能实现G到C或T转换的gGBE^[61]和T到A或G转换的TBE^[62]等，进一步拓展了BE的突变谱。这些新型的碱基编辑器未来有望应用于高通量基因组编辑中。此外，基因增变器可显著提高基因组突变率，并诱导产生多种突变类型，未来可结合高通量基因组编辑工具协同应用，以进一步提升突变多样性^[110]。

另外，编辑器的靶向范围尚有待突破。受PAM序列识别特征、引导序列活性以及脱氨酶编辑窗口限制，目前CRISPR辅助的基因组编辑工具的编辑范围还无法覆盖任意基因组位点。使用PAM识别范围更广的Cas9突变体可在一定程度上拓宽基因组靶向范围^[50, 111-112]，但可能伴随着脱靶效应增强^[113-114]以及编辑活性降低^[115-116]的风险；因此，为了更高的安全性和基因编辑效率，可以结合机器学习和蛋白质工程，设计和开发一系列不同PAM偏好的Cas蛋白突变体，共同对基因组进行广泛、高效、安全的编辑^[117]。针对BE，已有研究通过RNA支架改造或蛋白质工程拓展其编辑窗口。例如，Jiang等^[118]将dCas9与SunTag支架组合，通过招募多个脱氨酶，实现了编辑窗口的拓宽，从而扩大了基因组靶向范围。另有研究表明，通过将脱氨酶插入到Cas9的PAM互作结构域或用脱氨酶替换Cas9的HNH核酸酶结构域，可在不影响Cas9特异性的情况下拓展BE的编辑窗口^[119-120]。这些工程化改造方法可以使用较小的sgRNA文库覆盖相同的编辑范围。通过将脱氨酶与具有不同PAM识别特异性的Cas蛋白融合，亦可进一步扩大编辑窗口^[89]。例如，识别高AT含量PAM的Cas12a也可应用于PE，其优势包括脱靶效应更低以及递送更为便捷等^[121]。此外，常规的PE使用nCas9对非目标链进行切割并完成修饰，其编辑窗口在切割位置的下游。而Chen等利用Cas9和新开发的目标链编程pegRNA(tsp-pegRNA)，成功实现了切割位点上游的编辑，显著拓展了PE的编辑空间^[122]。这些工程化方法都可以应用于高通量基因组编辑。

最后，当前的研究多聚焦于单个基因或特定区域的基因组编辑，或是基因组范围的敲除筛选，而高通量多重基因编辑的研究较少。多重基因编

辑技术可用于探究蛋白质相互作用、基因电路调控、代谢途径优化等。而由于基因相互作用的复杂性,包括上位效应等,提高多重基因编辑的通量有助于筛选到更多有益的组合突变。近期,已有研究使用BE和PE工具在原核生物、哺乳动物细胞和植物中成功实现靶向少数位点的多重基因编辑^[123-126]。但要实现大规模的多基因编辑,仍需克服一些技术挑战,如如何设计合理大小的“智能”sgRNA文库、如何进行测序和数据分析等。

综上所述,CRISPR辅助的高通量基因组编辑技术适用于微生物、哺乳动物、植物等多个物种,并在工业、医学、农业等领域展现出极大的应用价值。未来,随着人工智能算法和自动化平台的迅速发展,高通量筛选生成的大量数据可用于构建预测模型,助力高效文库设计和发现有益突变。另外,得益于基因编辑领域CRISPR及其衍生技术的持续快速发展,我们预期将有更多更先进的高通量基因组编辑技术问世。同时,高通量基因组编辑所助力发现的靶点也将转化成真正的社会价值。

参 考 文 献

- [1] 曹中正,张心怡,徐艺源,等.基因组编辑技术及其在合成生物学中的应用[J].合成生物学,2020,1(4):413-426.
CAO Z Z, ZHANG X Y, XU Y Y, et al. Genome editing technology and its applications in synthetic biology[J]. Synthetic Biology Journal, 2020, 1(4): 413-426.
- [2] DRUMMOND D A, IVERSON B L, GEORGIU G, et al. Why high-error-rate random mutagenesis libraries are enriched in functional and improved proteins[J]. Journal of Molecular Biology, 2005, 350(4): 806-816.
- [3] ZHENG L, BAUMANN U, REYMOND J L. An efficient one-step site-directed and site-saturation mutagenesis protocol[J]. Nucleic Acids Research, 2004, 32(14): e115.
- [4] STEMMER W P. DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: *in vitro* recombination for molecular evolution[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1994, 91(22): 10747-10751.
- [5] ZHAO H M, GIVER L, SHAO Z X, et al. Molecular evolution by staggered extension process (StEP) *in vitro* recombination [J]. Nature Biotechnology, 1998, 16(3): 258-261.
- [6] FRYER T, WOLFF D S, OVERATH M D, et al. Post-assembly plasmid amplification for increased transformation yields in *E. coli* and *S. cerevisiae*[J]. Chem & Bio Engineering, 2025, 2(2): 87-96.
- [7] MOLINA R S, RIX G, MENGISTE A A, et al. *In vivo* hypermutation and continuous evolution[J]. Nature Reviews Methods Primers, 2022, 2: 36.
- [8] CHEN X S, ZHANG J Z. The genomic landscape of position effects on protein expression level and noise in yeast[J]. Cell Systems, 2016, 2(5): 347-354.
- [9] ERDOGAN M, FABRITIUS A, BASQUIN J, et al. Targeted *in situ* protein diversification and intra-organelle validation in mammalian cells[J]. Cell Chemical Biology, 2020, 27(5): 610-621.e5.
- [10] LYNCH M, ACKERMAN M S, GOUT J F, et al. Genetic drift, selection and the evolution of the mutation rate[J]. Nature Reviews Genetics, 2016, 17(11): 704-714.
- [11] LEWIS J A, MORRAN L T. Advantages of laboratory natural selection in the applied sciences[J]. Journal of Evolutionary Biology, 2022, 35(1): 5-22.
- [12] WANNIER T M, CIACCIA P N, ELLINGTON A D, et al. Recombineering and mage[J]. Nature Reviews Methods Primers, 2021, 1: 7.
- [13] DICARLO J E, CONLEY A J, PENTTILÄ M, et al. Yeast oligo-mediated genome engineering (YOGE) [J]. ACS Synthetic Biology, 2013, 2(12): 741-749.
- [14] BARBIERI E M, MUIR P, AKHUETIE-ONI B O, et al. Precise editing at DNA replication Forks enables multiplex genome engineering in eukaryotes[J]. Cell, 2017, 171(6): 1453-1467.e13.
- [15] CIACCIA P N, LIANG Z B, SCHWEITZER A Y, et al. Enhanced eMAGE applied to identify genetic factors of nuclear hormone receptor dysfunction *via* combinatorial gene editing[J]. Nature Communications, 2024, 15: 5218.
- [16] WANG H H, ISAACS F J, CARR P A, et al. Programming cells by multiplex genome engineering and accelerated evolution[J]. Nature, 2009, 460(7257): 894-898.
- [17] WANG H H, KIM H, CONG L, et al. Genome-scale promoter engineering by coselection MAGE[J]. Nature Methods, 2012, 9(6): 591-593.
- [18] CARR P A, WANG H H, STERLING B, et al. Enhanced multiplex genome engineering through co-operative oligonucleotide co-selection[J]. Nucleic Acids Research, 2012, 40(17): e132.
- [19] NYERGES Á, CSÖRGŐ B, NAGY I, et al. A highly precise and portable genome engineering method allows comparison of mutational effects across bacterial species[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2016, 113(9): 2502-2507.
- [20] GHOSH K, VAN DUYN G D. Cre-loxP biochemistry[J]. Methods, 2002, 28(3): 374-383.
- [21] KANG Y S, DURFEE T, GLASNER J D, et al. Systematic mutagenesis of the *Escherichia coli* genome[J]. Journal of Bacteriology, 2004, 186(15): 4921-4930.
- [22] MAKAROVA K S, WOLF Y I, IRANZO J, et al. Evolutionary classification of CRISPR-Cas systems: a burst of class 2 and

- derived variants[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2020, 18(2): 67-83.
- [23] JINEK M, CHYLINSKI K, FONFARA I, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity[J]. *Science*, 2012, 337(6096): 816-821.
- [24] PÂQUES F, HABER J E. Multiple pathways of recombination induced by double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1999, 63(2): 349-404.
- [25] CUI Y L, DONG H N, MA Y Y, et al. Strategies for applying nonhomologous end joining-mediated genome editing in prokaryotes[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2019, 8(10): 2194-2202.
- [26] SCULLY R, PANDAY A, ELANGO R, et al. DNA double-strand break repair-pathway choice in somatic mammalian cells[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2019, 20(11): 698-714.
- [27] QI L S, LARSON M H, GILBERT L A, et al. Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression[J]. *Cell*, 2013, 152(5): 1173-1183.
- [28] MALI P, AACH J, STRANGES P B, et al. Cas9 transcriptional activators for target specificity screening and paired nickases for cooperative genome engineering[J]. *Nature Biotechnology*, 2013, 31(9): 833-838.
- [29] XU X S, QI L S. A CRISPR-dCas toolbox for genetic engineering and synthetic biology[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2019, 431(1): 34-47.
- [30] SANG Y T, XU L J, BAO Z H. Development of artificial transcription factors and their applications in cell reprogramming, genetic screen, and disease treatment[J]. *Molecular Therapy*, 2024, 32(12): 4208-4234.
- [31] 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[J]. *Nature*, 2016, 533(7603): 420-424.
- [32] ANZALONE A V, RANDOLPH P B, DAVIS J R, et al. Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA[J]. *Nature*, 2019, 576(7785): 149-157.
- [33] 梁丽亚, 刘嵘明. 靶向DNA的II类CRISPR/Cas系统的蛋白工程化改造[J]. *合成生物学*, 2023, 4(1): 86-101.
LIANG L Y, LIU R M. Protein engineering of DNA targeting type II CRISPR/Cas systems[J]. *Synthetic Biology Journal*, 2023, 4(1): 86-101.
- [34] BROWN A D, CLAYBON A B, BISHOP A J R. A conditional mouse model for measuring the frequency of homologous recombination events *in vivo* in the absence of essential genes [J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2011, 31(17): 3593-3602.
- [35] ROUET P, SMIH F, JASIN M. Introduction of double-strand breaks into the genome of mouse cells by expression of a rare-cutting endonuclease[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 1994, 14(12): 8096-8106.
- [36] EID A, MAHFOUZ M M. Genome editing: the road of CRISPR/Cas9 from bench to clinic[J]. *Experimental & Molecular Medicine*, 2016, 48(10): e265.
- [37] CONG L, RAN F A, COX D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems[J]. *Science*, 2013, 339(6121): 819-823.
- [38] FINDLAY G M, BOYLE E A, HAUSE R J, et al. Saturation editing of genomic regions by multiplex homology-directed repair[J]. *Nature*, 2014, 513(7516): 120-123.
- [39] FINDLAY G M, DAZA R M, MARTIN B, et al. Accurate classification of *BRCA1* variants with saturation genome editing[J]. *Nature*, 2018, 562(7726): 217-222.
- [40] WATERS A J, BRENDLER-SPAETH T, SMITH D, et al. Saturation genome editing of *BAP1* functionally classifies somatic and germline variants[J]. *Nature Genetics*, 2024, 56(7): 1434-1445.
- [41] JIA X Y, BURUGULA B B, CHEN V, et al. Massively parallel functional testing of *MSH2* missense variants conferring Lynch syndrome risk[J]. *The American Journal of Human Genetics*, 2021, 108(1): 163-175.
- [42] RADFORD E J, TAN H K, ANDERSSON M H L, et al. Saturation genome editing of *DDX3X* clarifies pathogenicity of germline and somatic variation[J]. *Nature Communications*, 2023, 14: 7702.
- [43] JAKOČIŪNAS T, PEDERSEN L E, LIS A V, et al. CasPER, a method for directed evolution in genomic contexts using mutagenesis and CRISPR/Cas9[J]. *Metabolic Engineering*, 2018, 48: 288-296.
- [44] GARST A D, BASSALO M C, PINES G, et al. Genome-wide mapping of mutations at single-nucleotide resolution for protein, metabolic and genome engineering[J]. *Nature Biotechnology*, 2017, 35(1): 48-55.
- [45] DEWACHTER L, BROOKS A N, NOON K, et al. Deep mutational scanning of essential bacterial proteins can guide antibiotic development[J]. *Nature Communications*, 2023, 14: 241.
- [46] BAO Z H, HAMEDIRAD M, XUE P, et al. Genome-scale engineering of *Saccharomyces cerevisiae* with single-nucleotide precision[J]. *Nature Biotechnology*, 2018, 36(6): 505-508.
- [47] ROY K R, SMITH J D, VONESCH S C, et al. Multiplexed precision genome editing with trackable genomic barcodes in yeast[J]. *Nature Biotechnology*, 2018, 36(6): 512-520.
- [48] GUO X G, CHAVEZ A, TUNG A, et al. High-throughput creation and functional profiling of DNA sequence variant libraries using CRISPR-Cas9 in yeast[J]. *Nature Biotechnology*, 2018, 36(6): 540-546.
- [49] SHARON E, CHEN S A A, KHOSLA N M, et al. Functional genetic variants revealed by massively parallel precise genome editing[J]. *Cell*, 2018, 175(2): 544-557.e16.
- [50] DENG L, ZHOU Y L, CAI Z K, et al. Massively parallel

- CRISPR-assisted homologous recombination enables saturation editing of full-length endogenous genes in yeast[J]. *Science Advances*, 2024, 10(20): eadj9382.
- [51] STORICI F, BEBENEK K, KUNKEL T A, et al. RNA-templated DNA repair[J]. *Nature*, 2007, 447(7142): 338-341.
- [52] JENSEN E D, LALOUX M, LEHKA B J, et al. A synthetic RNA-mediated evolution system in yeast[J]. *Nucleic Acids Research*, 2021, 49(15): e88.
- [53] KOSICKI M, TOMBERG K, BRADLEY A. Repair of double-strand breaks induced by CRISPR-Cas9 leads to large deletions and complex rearrangements[J]. *Nature Biotechnology*, 2018, 36(8): 765-771.
- [54] CULLOT G, BOUTIN J, TOUTAIN J, et al. CRISPR-Cas9 genome editing induces megabase-scale chromosomal truncations[J]. *Nature Communications*, 2019, 10: 1136.
- [55] ADIKUSUMA F, PILTZ S, CORBETT M A, et al. Large deletions induced by Cas9 cleavage[J]. *Nature*, 2018, 560(7717): E8-E9.
- [56] LEIBOWITZ M L, PAPATHANASIOU S, DOERFLER P A, et al. Chromothripsis as an on-target consequence of CRISPR-Cas9 genome editing[J]. *Nature Genetics*, 2021, 53(6): 895-905.
- [57] KARANAM K, KAFRI R, LOEWER A, et al. Quantitative live cell imaging reveals a gradual shift between DNA repair mechanisms and a maximal use of HR in mid S phase[J]. *Molecular Cell*, 2012, 47(2): 320-329.
- [58] PLOESSL D, ZHAO Y X, CAO M F, et al. A repackaged CRISPR platform increases homology-directed repair for yeast engineering[J]. *Nature Chemical Biology*, 2022, 18(1): 38-46.
- [59] 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[J]. *Nature*, 2017, 551(7681): 464-471.
- [60] ZHANG X H, ZHU B Y, CHEN L, et al. Dual base editor catalyzes both cytosine and adenine base conversions in human cells[J]. *Nature Biotechnology*, 2020, 38(7): 856-860.
- [61] TONG H W, LIU N N, WEI Y H, et al. Programmable deaminase-free base editors for G-to-Y conversion by engineered glycosylase[J]. *National Science Review*, 2023, 10(8): nwad143.
- [62] 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[J]. *Nature Biotechnology*, 2024, 42(10): 1538-1547.
- [63] MA Y Q, ZHANG J Y, YIN W J, et al. Targeted AID-mediated mutagenesis (TAM) enables efficient genomic diversification in mammalian cells[J]. *Nature Methods*, 2016, 13(12): 1029-1035.
- [64] HESS G T, FRÉSARD L, HAN K, et al. Directed evolution using dCas9-targeted somatic hypermutation in mammalian cells[J]. *Nature Methods*, 2016, 13(12): 1036-1042.
- [65] XU P, LIU Z H, LIU Y, et al. Genome-wide interrogation of gene functions through base editor screens empowered by barcoded sgRNAs[J]. *Nature Biotechnology*, 2021, 39(11): 1403-1413.
- [66] CHEN X D, CHEN Z Y, WYTHES G, et al. Helicase-assisted continuous editing for programmable mutagenesis of endogenous genomes[J]. *Science*, 2024, 386(6718): eadn5876.
- [67] HALPERIN S O, TOU C J, WONG E B, et al. CRISPR-guided DNA polymerases enable diversification of all nucleotides in a tunable window[J]. *Nature*, 2018, 560(7717): 248-252.
- [68] WANG Y, LIU Y, LIU J, et al. MACBETH: multiplex automated *Corynebacterium glutamicum* base editing method [J]. *Metabolic Engineering*, 2018, 47: 200-210.
- [69] ZIMMERMANN A, PRIETO-VIVAS J E, CAUTEREELS C, et al. A Cas3-base editing tool for targetable *in vivo* mutagenesis[J]. *Nature Communications*, 2023, 14: 3389.
- [70] GAWLITT S, COLLINS S P, YU Y Y, et al. Expanding the flexibility of base editing for high-throughput genetic screens in bacteria[J]. *Nucleic Acids Research*, 2024, 52(7): 4079-4097.
- [71] LI C, ZHANG R, MENG X B, et al. Targeted, random mutagenesis of plant genes with dual cytosine and adenine base editors[J]. *Nature Biotechnology*, 2020, 38(7): 875-882.
- [72] ZHANG A, SHAN T F, SUN Y, et al. Directed evolution rice genes with randomly multiplexed sgRNAs assembly of base editors[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2023, 21(12): 2597-2610.
- [73] XU R F, LIU X S, LI J, et al. Identification of herbicide resistance *OsACCI* mutations *via* in planta prime-editing-library screening in rice[J]. *Nature Plants*, 2021, 7(7): 888-892.
- [74] ERWOOD S, BILY T M I, LEQUYER J, et al. Saturation variant interpretation using CRISPR prime editing[J]. *Nature Biotechnology*, 2022, 40(6): 885-895.
- [75] REN X J, YANG H, NIERENBERG J L, et al. High-throughput PRIME-editing screens identify functional DNA variants in the human genome[J]. *Molecular Cell*, 2023, 83(24): 4633-4645.e9.
- [76] KIM Y, OH H C, LEE S, et al. Saturation profiling of drug-resistant genetic variants using prime editing[J]. *Nature Biotechnology*, 2025, 43(9): 1471-1484.
- [77] HSU J Y, LAM K C, SHIH J, et al. MOSAIC enables *in situ* saturation mutagenesis of genes and CRISPR prime editing guide RNA optimization in human cells[PP/OL]. *bioRxiv* [2025-10-01]. <https://biorxiv.org/content/10.1101/>
- [78] CHARDON F M, SUITER C C, DAZA R M, et al. A multiplex, prime editing framework for identifying drug resistance variants at scale[PP/OL]. *bioRxiv* (2023-07-30) [2025-10-01]. <https://doi.org/10.1101/2023.07.27.550902>.
- [79] HERGER M, KAJBA C M, BUCKLEY M, et al. High-throughput screening of human genetic variants by pooled prime editing[J]. *Cell Genomics*, 2025, 5(4): 100814.
- [80] CIRINCIONE A, SIMPSON D, YAN W H, et al. A benchmarked, high-efficiency prime editing platform for

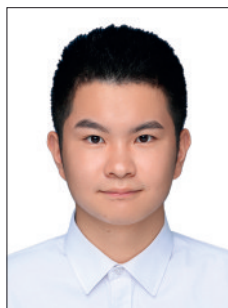
- multiplexed dropout screening[J]. *Nature Methods*, 2025, 22(1): 92-101.
- [81] NIU X R, TANG W, LIU Y S, et al. Prime editor-based high-throughput screening reveals functional synonymous mutations in human cells[J/OL]. *Nature Biotechnology*, 2025. (2025-06-24)[2025-10-10]. <https://doi.org/10.1038/s41587-025-02710-z>.
- [82] PARK J, YU G, SEO S Y, et al. SynDesign: web-based prime editing guide RNA design and evaluation tool for saturation genome editing[J]. *Nucleic Acids Research*, 2024, 52(W1): W121-W125.
- [83] MAVROMMATI M, DASKALAKI A, PAPANIKOLAOU S, et al. Adaptive laboratory evolution principles and applications in industrial biotechnology[J]. *Biotechnology Advances*, 2022, 54: 107795.
- [84] BASSALO M C, LIU R M, GILL R T. Directed evolution and synthetic biology applications to microbial systems[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2016, 39: 126-133.
- [85] LAM F H, TURANLI-YILDIZ B, LIU D, et al. Engineered yeast tolerance enables efficient production from toxified lignocellulosic feedstocks[J]. *Science Advances*, 2021, 7(26): eabf7613.
- [86] ALPER H, STEPHANOPOULOS G. Global transcription machinery engineering: a new approach for improving cellular phenotype[J]. *Metabolic Engineering*, 2007, 9(3): 258-267.
- [87] LIU Y, WANG R Y, LIU J H, et al. Base editor enables rational genome-scale functional screening for enhanced industrial phenotypes in *Corynebacterium glutamicum*[J]. *Science Advances*, 2022, 8(35): eabq2157.
- [88] HAO W L, CUI W J, CHENG Z Y, et al. Development of a base editor for protein evolution *via in situ* mutation *in vivo*[J]. *Nucleic Acids Research*, 2021, 49(16): 9594-9605.
- [89] HAO W L, CUI W J, LIU Z M, et al. A new-generation base editor with an expanded editing window for microbial cell evolution *in vivo* based on CRISPR-Cas12b engineering[J]. *Advanced Science*, 2024, 11(22): 2309767.
- [90] MARTÍNEZ-JIMÉNEZ F, MUIÑOS F, SENTÍS I, et al. A compendium of mutational cancer driver genes[J]. *Nature Reviews Cancer*, 2020, 20(10): 555-572.
- [91] KRAIS J J, JOHNSON N. BRCA1 mutations in cancer: coordinating deficiencies in homologous recombination with tumorigenesis[J]. *Cancer Research*, 2020, 80(21): 4601-4609.
- [92] SANGREE A K, GRIFFITH A L, SZEGLETES Z M, et al. Benchmarking of SpCas9 variants enables deeper base editor screens of *BRCA1* and *BCL2*[J]. *Nature Communications*, 2022, 13: 1318.
- [93] HANNA R E, HEGDE M, FAGRE C R, et al. Massively parallel assessment of human variants with base editor screens [J]. *Cell*, 2021, 184(4): 1064-1080.e20.
- [94] KWEON J, JANG A H, SHIN H R, et al. A CRISPR-based base-editing screen for the functional assessment of *BRCA1* variants[J]. *Oncogene*, 2020, 39(1): 30-35.
- [95] HUANG C C, LI G Y, WU J Y, et al. Identification of pathogenic variants in cancer genes using base editing screens with editing efficiency correction[J]. *Genome Biology*, 2021, 22(1): 80.
- [96] OLVERA-LEÓN R, ZHANG F, OFFORD V, et al. High-resolution functional mapping of *RAD51C* by saturation genome editing[J]. *Cell*, 2024, 187(20): 5719-5734.e19.
- [97] BUCKLEY M, TERWAGNE C, GANNER A, et al. Saturation genome editing maps the functional spectrum of pathogenic VHL alleles[J]. *Nature Genetics*, 2024, 56(7): 1446-1455.
- [98] SÁNCHEZ-RIVERA F J, DIAZ B J, KASTENHUBER E R, et al. Base editing sensor libraries for high-throughput engineering and functional analysis of cancer-associated single nucleotide variants[J]. *Nature Biotechnology*, 2022, 40(6): 862-873.
- [99] LUE N Z, GARCIA E M, NGAN K C, et al. Base editor scanning charts the *DNMT3A* activity landscape[J]. *Nature Chemical Biology*, 2023, 19(2): 176-186.
- [100] LI Y Z, XU T, MA H Z, et al. Functional profiling of serine, threonine and tyrosine sites[J]. *Nature Chemical Biology*, 2025, 21(4): 532-543.
- [101] HOLME I B, GREGERSEN P L, BRINCH-PEDERSEN H. Induced genetic variation in crop plants by random or targeted mutagenesis: convergence and differences[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2019, 10: 1468.
- [102] KUANG Y J, LI S F, REN B, et al. Base-editing-mediated artificial evolution of OsALS1 in planta to develop novel herbicide-tolerant rice germplasms[J]. *Molecular Plant*, 2020, 13(4): 565-572.
- [103] WANG X, PAN W B, SUN C, et al. Creating large-scale genetic diversity in *Arabidopsis* *via* base editing-mediated deep artificial evolution[J]. *Genome Biology*, 2024, 25(1): 215.
- [104] ZHANG H Y, MA J C, WU Z W, et al. BacPE: a versatile prime-editing platform in bacteria by inhibiting DNA exonucleases[J]. *Nature Communications*, 2024, 15: 825.
- [105] TUNCEL A, PAN C T, CLEM J S, et al. CRISPR-Cas applications in agriculture and plant research[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2025, 26(6): 419-441.
- [106] JIN Y Y, ZHANG P, LIU L L, et al. Enhancing homology-directed repair efficiency with HDR-boosting modular ssDNA donor[J]. *Nature Communications*, 2024, 15: 6843.
- [107] MITOUSIS L, MUSIOL-KROLL E, WOHLLEBEN W. CRISPR-Cas in actinomycetes: still a lot to be discovered[J]. *microLife*, 2025, 6: uqaf010.
- [108] CHEN W Z, REN Z H, TANG N, et al. Targeted genetic screening in bacteria with a Cas12k-guided transposase[J]. *Cell Reports*, 2021, 36(9): 109635.
- [109] TONG H W, WANG X C, LIU Y H, et al. Programmable A-to-Y base editing by fusing an adenine base editor with an *N*-methylpurine DNA glycosylase[J]. *Nature Biotechnology*,

- 2023, 41(8): 1080-1084.
- [110] 潘颖佳, 夏思杨, 董昌, 等. 基因增变器驱动的酿酒酵母基因组连续进化[J]. 合成生物学, 2023, 4(1): 225-240.
PAN Y J, XIA S Y, DONG C, et al. Mutator-driven continuous genome evolution of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Synthetic Biology Journal, 2023, 4(1): 225-240.
- [111] YAO Y, ZHOU Z W, WANG X L, et al. SpRY-mediated screens facilitate functional dissection of non-coding sequences at single-base resolution[J]. Cell Genomics, 2024, 4(7): 100583.
- [112] CAI Z K, XIE W Y, BAO Z H. Broadening the targetable space: engineering and discovery of PAM-flexible Cas proteins [J]. Trends in Microbiology, 2024, 32(8): 728-731.
- [113] YANG C, ZHOU Z W, SUN X L, et al. PAMless SpRY exhibits a preference for the seed region for efficient targeting [J]. Cell Reports, 2024, 43(5): 114225.
- [114] KIM H K, LEE S, KIM Y, et al. High-throughput analysis of the activities of xCas9, SpCas9-NG and SpCas9 at matched and mismatched target sequences in human cells[J]. Nature Biomedical Engineering, 2020, 4(1): 111-124.
- [115] ZHANG W W, YIN J H, ZHANG-DING Z R, et al. In-depth assessment of the PAM compatibility and editing activities of Cas9 variants[J]. Nucleic Acids Research, 2021, 49(15): 8785-8795.
- [116] SHI H L, AL-SAYYAD N, WASKO K M, et al. Rapid two-step target capture ensures efficient CRISPR-Cas9-guided genome editing[J]. Molecular Cell, 2025, 85(9): 1730-1742.e9.
- [117] SILVERSTEIN R A, KIM N, KROELL A S, et al. Custom CRISPR - Cas9 PAM variants *via* scalable engineering and machine learning[J]. Nature, 2025, 643(8071): 539-550.
- [118] JIANG W, FENG S J, HUANG S S, et al. BE-PLUS: a new base editing tool with broadened editing window and enhanced fidelity[J]. Cell Research, 2018, 28(8): 855-861.
- [119] WANG Y H, ZHOU L F, LIU N, et al. BE-PIGS: a base-editing tool with deaminases inlaid into Cas9 PI domain significantly expanded the editing scope[J]. Signal Transduction and Targeted Therapy, 2019, 4: 36.
- [120] VILLIGER L, SCHMIDHEINI L, MATHIS N, et al. Replacing the SpCas9 HNH domain by deaminases generates compact base editors with an alternative targeting scope[J]. Molecular Therapy - Nucleic Acids, 2021, 26: 502-510.
- [121] LIANG R H, HE Z X, ZHAO K T, et al. Prime editing using CRISPR-Cas12a and circular RNAs in human cells[J]. Nature Biotechnology, 2024, 42(12): 1867-1875.
- [122] CHEN P B, LI X Y, ZHOU Q, et al. Configuration of adaptable template RNA architectures to unfold the editable space of a nuclease prime editor[J]. Nucleic Acids Research, 2025, 53(11): gkaf522.
- [123] CHEN F B, LIAN M, MA B X, et al. Multiplexed base editing through Cas12a variant-mediated cytosine and adenine base editors[J]. Communications Biology, 2022, 5: 1163.
- [124] GEURTS M H, GANDHI S, BORETTO M G, et al. One-step generation of tumor models by base editor multiplexing in adult stem cell-derived organoids[J]. Nature Communications, 2023, 14: 4998.
- [125] WU Y K, LI Y, LIU Y F, et al. Multiplexed *in-situ* mutagenesis driven by a dCas12a-based dual-function base editor[J]. Nucleic Acids Research, 2024, 52(8): 4739-4755.
- [126] GUPTA A, LIU B, RAZA S, et al. Modularly assembled multiplex prime editors for simultaneous editing of agronomically important genes in rice[J]. Plant Communications, 2024, 5(2): 100741.



通讯作者: 鲍泽华(1988—), 男, 博士, 研究员, 博士生导师。研究方向为合成生物学、基因编辑、人工转录因子和定向进化等。

E-mail: zbao@zju.edu.cn



第一作者: 滕佳尧(2002—), 男, 硕士研究生。研究方向为合成生物学。

E-mail: 22428049@zju.edu.cn



共同第一作者: 任传宏(1993—), 男, 博士, 助理研究员。研究方向为植物天然产物合成调控。

E-mail: chuanhongren@163.com