

特约评述

DOI: 10.12211/2096-8280.2023-038

引导编辑研究进展及其应用

许志猛, 谢震

(清华大学自动化系, 北京信息科学与技术国家研究中心, 生物信息学研究所, 生物信息学教育部重点实验室, 合成与系统生物学研究中心, 北京 100084)

摘要: 引导编辑器 (prime editor, PE) 是继碱基编辑器 (base editor, BE) 之后新问世的基于 CRISPR/Cas (clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated) 系统的基因编辑工具, 可以在不造成 DNA 双链断裂的情况下引入碱基替换、插入和删除。PE 因其全面的编辑能力, 问世即受到全球学者的广泛关注, 然而 PE 表达盒编码较长 (>6 kb)、编辑效率较低等问题也亟待研究人员解决。PE 的研究方向与 BE 有许多相似之处, 本文首先梳理了学界对 PE 本身编辑效率和安全性的探索; 然后重点介绍了 PE 效应蛋白、pegRNA 和其他细胞因子三个方面对 PE 的改进手段, 以及为方便 PE 应用而开发的自动化设计工具; 最后梳理了 PE 在动植物以及基因治疗中的应用。方兴未艾的 PE 领域尽管还难称完善, 但在提高编辑效率和改进安全性等方面已取得了许多重要进展。鉴于 Cas9、BE 等基因编辑工具已广泛应用于遗传病疗法, PE 走向遗传病治疗值得期待。

关键词: 引导编辑; 基因编辑; 基因治疗; CRISPR/Cas

中图分类号: Q812 **文献标志码:** A

Research progress and biotechnological applications of the prime editing

XU Zhimeng, XIE Zhen

(Department of Automation, Tsinghua University, Beijing National Research Center for Information Science and Technology, Center for Synthesis and Systems Biology, Key Laboratory of Bioinformatics, Ministry of Education, Department of Bioinformatics Research, Beijing 100084, China)

Abstract: Prime Editor (PE) is an innovative gene editing tool based on the Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR-associated protein (CRISPR/Cas) system, which has revolutionized multiple fields, including genetics, medicine, and agriculture. Emerging as a successor to Base Editor (BE), PE has gained worldwide attention due to its ability to introduce base substitutions, insertions, and deletions without causing double-strand DNA breaks, which significantly reduces the risk of off-target effect and unwanted genetic change. Notwithstanding its immense potential, researchers need to address PE's long encoding sequence and low editing efficiency for its maximal applications. Researchers have been working relentlessly to explore and enhance the editing efficiency and safety of PE

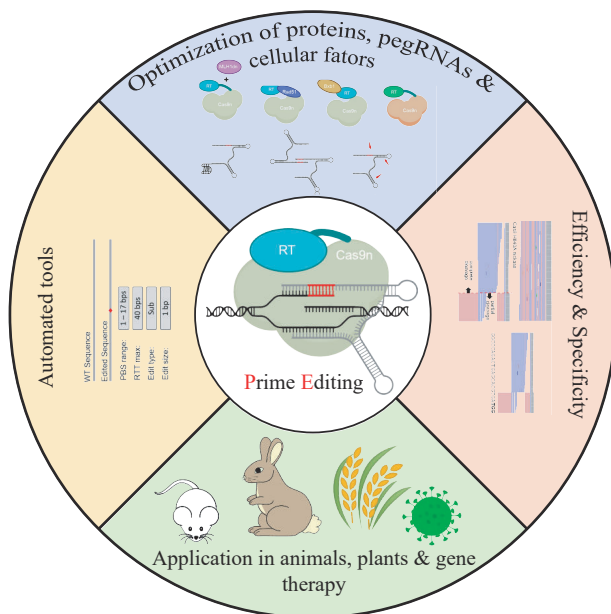
收稿日期: 2023-06-08 修回日期: 2023-09-08

基金项目: 国家自然科学基金 (32171413, 61721003)

引用本文: 许志猛, 谢震. 引导编辑研究进展及其应用[J]. 合成生物学, 2024, 5(1): 1-15

Citation: XU Zhimeng, XIE Zhen. Research progress and biotechnological applications of the prime editing[J]. Synthetic Biology Journal, 2024, 5(1): 1-15

by modifying its protein scaffold, optimizing the guide RNA design, and identifying cellular factors that influence its activity. Improved PE variants have been developed with enhanced accuracy and efficiency as well as decreased off-target effect when compared with their initial versions, demonstrating their potential in gene editing-related applications. Several strategies have been investigated to enhance PE performance, including: ① Modifying the structure of PE proteins to increase their efficiency, specificity, and binding affinity, thereby significantly improving their editing activity. ② Optimizing the design of pegRNAs, such as modifying the length, composition, or structure, that can boost PE's editing efficiency. ③ Identifying and manipulating cellular factors, such as proteins and RNAs, that bear functional relationships with the PE system, thus greatly enhancing its gene editing capabilities. ④ Developing automated design tools to facilitate the customization of the PE system for specific applications, vastly improving its practicality in research and clinical settings. Finally, this article summarizes the applications of PE in engineering animals and plants and developing gene therapy. Despite much room for further improvement in PE, significant advances have been made in improving its editing efficiency and safety. The rapid development of Cas9 and BE for treating genetic diseases stands as compelling testimony to the potential of PE in advancing gene editing technologies and applications. With continued research and development, PE holds great promise for improving human health and well-being.



Keywords: prime editing; gene editing; gene therapy; CRISPR/Cas

CRISPR/Cas9 系统及其衍生的碱基编辑器、引导编辑器是当前应用最广泛的基因编辑技术，已成功应用于多种细菌、植物以及动物中^[1]。CRISPR/Cas9 系统源于细菌或古菌的获得性免疫系统，其作用原理是 Cas9 在引导 RNA (single guide RNA, sgRNA) 的引导下，切割靶点形成双链断裂 (double-strand break, DSB)，此后会引发非同

源末端连接 (non-homologous end joining, NHEJ)、微同源末端连接 (microhomology-mediated end joining, MMEJ) 或同源重组 (homology dependent repair, HDR)^[2]。DSB 往往会产生大量不可控的小插入或缺失 (indel)，甚至是大片段缺失，还会引发 p53 介导的 DNA 损伤反应，致使细胞周期停止甚至细胞凋亡^[3-4]。

野生型 Cas9 蛋白可以切割 DNA 双链，而引入 D10A 或 H840A 突变可以使 Cas9 损失切割其中一条 DNA 单链的能力，使 Cas9 成为 Cas9 切口酶 (Cas9 nickase, Cas9n)。将 Cas9n 与脱氨酶结构域相融合而成的胞嘧啶碱基编辑器 (cytosine base editor, CBE) 可以将 DNA 上的胞嘧啶 (C) 脱氨而成尿嘧啶 (U)，经过内源 DNA 修复或复制过程后转化为胸腺嘧啶 (T)，最终实现 C 到 T 的替换。CBE 一经报道，其不引入双链断裂、编辑效率较高等优良特性迅速吸引学界关注和广泛应用^[5]。此后，研究人员又报道了可实现 A 到 G^[6]、C 到 G^[7]、A 到 C^[8] 以及 G 到 T^[9] 等其他碱基替换的碱基编辑器，近期也有报道将 Cas9 的远古祖先——IscB 蛋白开发成碱基编辑器^[10]，碱基编辑器领域可谓蓬勃发展。但碱基编辑器也存在编辑窗口局限，不能实现全部 12 种碱基替换，也有不能达到单碱基精度的替换等问题^[11]。

2019 年 David Liu 课题组^[11] 报道了引导编辑器 (prime editor, PE)。PE 将 Cas9n (H840A) 与莫洛尼鼠白血病病毒逆转录酶 (Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase, M-MLV RT) 融合，将

原 sgRNA 的 3' 端延长，延长区可分为引物结合区 (primer binding site, PBS) 和逆转录模板区 (RT template, RTT)。在 pegRNA 的引导下，Cas9n 在靶点形成单链缺刻，之后 PBS 与 DNA 单链互补配对，M-MLV RT 以 RT template 为模板，将 DNA 单链逆转录延伸，形成含有编辑内容的 3' flap 结构。3' flap 与 5' flap 相互竞争平衡，在一定机制下，5' flap 被切除，DNA 双链被修复，完成编辑 (图 1)。David Liu 课题组也对 M-MLV RT 引入多个点突变，提高了编辑效率，命名为 PE2。后又引入单独的一条 sgRNA，使非编辑链形成缺刻，进一步提高了编辑效率，命名为 PE3 或 PE3b。

PE 相较 BE 而言，可以实现单碱基精度的碱基替换，且编辑窗口远大于 BE，可以实现全部 12 种碱基替换^[11]。遗憾的是，尽管 PE 在编辑功能上相较 BE 更为全面，但就碱基替换而言，PE 的编辑效率较为有限^[11-12]，且 PE 表达盒的编码序列过长，难以通过单 AAV 递送，这限制了其作为基因治疗工具的发展。

PE 一经问世就受到全球研究者的广泛关注，并迅速掀起了对 PE 深入研究和扩展开发的热潮。

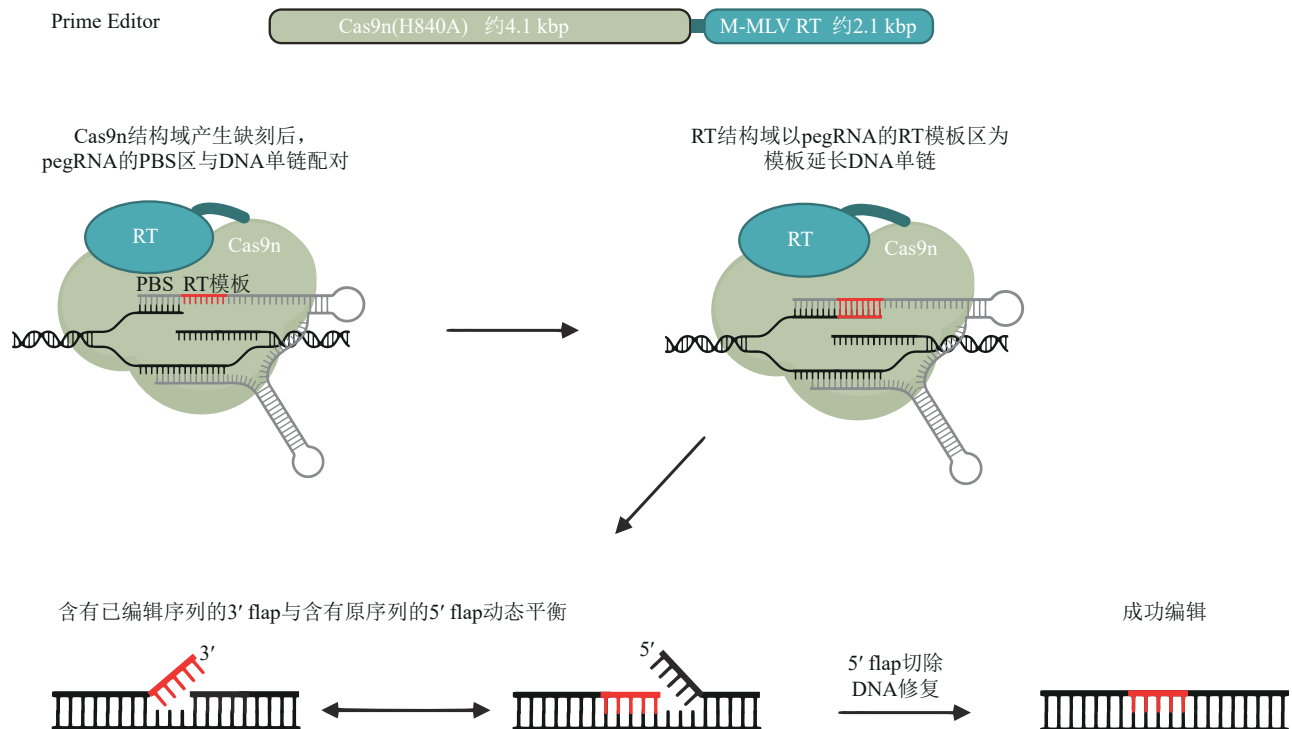


图1 PE原理示意图

Fig.1 Schematic diagram for PE

从目前的研究来看, PE的相关研究思路与BE领域有类似之处, 研究者需要评估其精确性、安全性, 以及提高其编辑效率。进一步地, 将PE应用于基因治疗也是研究者重点关注的研究目标。

1 影响PE编辑效率的因素与PE编辑效率预测

通过分析不同的PBS长度、RTT长度对编辑效率的影响, Anzalone等^[11]建议从约13nt的PBS和10nt以上的RTT开始优化, 并且pegRNA的3'端碱基不宜为C。Lin等^[13]率先将PE引入植物系统, 并发现PBS长度对目的编辑产物影响较小, 而RT模板长度影响明显; 不同反应温度对编辑效率也有影响, 37 °C条件下编辑效率要显著高于26 °C。Lin等^[14]还发现在植物PE中设计pegRNA时, PBS区的 T_m 值与编辑效率密切相关, 其在30 °C时PE编辑效率最高。但Ponnienselvan等^[15]报道称PBS区与待编辑位置的原间隔序列存在固有互补性, 如果发生互补配对会限制编辑效率。减少PBS区长度, PBS区 T_m 值约37 °C时, 是哺乳动物细胞中编辑效率最优的条件。

根据sgRNA的序列特点, 以高通量方式以及机器学习方法分析并预测编辑效率在以往的Cas9、Cas12研究中起到了重要作用^[16-20]。对于PE系统, 研究者也开发出了多款效率预测工具(表1)。

Kim等^[12]通过建立不同靶点、PBS长度、RT模板长度等条件的近5.5万条pegRNA而构成的高通量文库, 分析pegRNA影响PE2编辑效率的因素, 并给出了设计pegRNA时推荐的参数值。Kim

等建议设计pegRNA时, 使用13 nt的PBS与12 nt的RTT, 并且PBS要有较高的GC比。这与Anzalone等^[11]推荐的设计条件类似。但在pegRNA的3'端的碱基问题上, Kim等发现这与RTT长度有关, 在RTT不超过12 nt时, C反而更优。在该研究组进一步的工作中, 作者将研究范围扩展到HEK293T、HCT116、MDA-MB-231、HeLa、DLD1、A549和NIH3T3七种细胞系, 在其中探究了包含松弛PAM的Cas9n变体、PEmax以及PE4、PE5等优化后的PE编辑效率的影响因素, 并开发了DeepPrime工具^[21]。

Koeppel等^[23]报道插入序列长度、核苷酸组成以及二级结构都会影响PE插入片段的编辑效率, 并使用机器学习方法对PE插入片段的编辑效率、分析规律加以预测, 实现了平均 $R=0.68$ 的精度。而Mathis等^[22]则分析了逾9万条pegRNA的高通量结果数据, 训练了一个基于注意力机制的双向递归神经网络PRIDICT, 实现了 $R=0.85$ 级别的高准确率编辑效率预测。

2 PE安全性评价

是否存在脱靶效应是决定基因编辑工具安全性的关键指标。脱靶效应又可分为Cas9依赖和非Cas9依赖两种类型。而由于人类基因组本身就有内源逆转录元件和端粒酶, 说明PE的逆转录酶结构域对人类细胞并没有内在的毒性^[11], 所以现有的研究多关注于Cas9n结构域导致的脱靶效应。

Anzalone等^[11]测试了16个脱靶位点, 仅在1个位点发现了高于1%的脱靶编辑, 远低于直接

表1 PE编辑效率预测工具

Table 1 Efficiency prediction tools of PE

工具名称	特点	实验细胞系	链接	参考文献
DeepPE	给出DeepPE、PE_type、PE_position三个模型的结果	HEK293FT、HCT116、MDA-MB-231	http://deepcrispr.info/DeepPE	[12]
DeepPrime	将DeepPE扩展到7种细胞系、8种PE	HEK293FT、HCT116、MDA-MB-231、HeLa、DLD1、A549、NIH3T3	http://deepcrispr.info/DeepPrime/	[21]
PRIDICT	包括ClinVar突变体数据, 但输入格式较为复杂	HEK293T、U2OS、K562	https://www.pridict.it/	[22]
MinsePIE	Spacer、PBS等长度可手动调整, 自由度较高	HEK293T、HAP1	https://elixir.ut.ee/minsepie/	[23]

使用 Cas9 而产生的 indel, 是比较安全的基因编辑工具。Kim 等^[24]开发了 nDigenome-seq 技术, 在 HEK293T 细胞系中无偏评估了 PE 中 Cas9n 导致的脱靶效应, 发现在测试的 9 个基因组位点中, 仅有 5 个脱靶位点产生了可检出的脱靶编辑, 效率仅有 0.1%~1.9%, 证明了 PE 在全基因组范围内具有较高的精确性。Habib 等^[25]在人多能干细胞 (human pluripotent stem cell, hPSC) 中应用并评估了 PE 的安全性。作者也比较了 PE 和 BE, 发现 PE 的逆转录酶结构域与 BE 的脱氨酶结构域不同, 不会导致独立于 gRNA 的脱靶突变。Gao 等^[26]重点分析了逆转录酶结构域对基因组和转录组的影响, 发现在 PE3 编辑中没有证据表明存在非 pegRNA 依赖的脱靶, PE3 也不会影响端粒区域和内源逆转录元件, 没有发现 pegRNA 被整合进基因组或是影响转录组, 甚至也不会影响剪接或基因表达模式。Kwon 等^[27]使用 PE 将标签序列插入基因组, 超声随机打断基因组后对标签序列处测序用以分析全基因组脱靶情况, 命名为 TAPE-seq。相较于 GUIDE-seq 和 nDigenome-seq, TAPE-seq 直接利用的是 PE 的功能, 而非 Cas9n 的功能, 更能精准反映 PE 本身的脱靶; TAPE-seq 所不能检出的脱靶位点比前述二者也更少, 更为灵敏。与之类似, Liang 等^[28]也使用 PE 引入标签序列, 但使用 Tn5 转座酶打断基因组, Liang 等发现 PE 仅存在 gRNA 依赖的脱靶, 不存在独立于 gRNA 的脱靶。

Jin 等^[29]通过全基因组测序在水稻中对 Cas9 依赖的和非 Cas9 依赖的脱靶效应进行了全面分析, 发现 PE 系统仅产生了 0.23% 的 Cas9 依赖性的脱靶效应, 不产生非 Cas9 依赖的脱靶效应。通过逆转录相关的分析也发现 PE 不会影响植物细胞的内源转录机制。

3 PE 效应蛋白的优化

PE 系统主要发挥编辑功能的是其蛋白质模块, 所以对蛋白的优化尤为重要 (表 2)。

加入新的结构域是基因工具开发的常见思路 (图 2, 上), 比如 DNA 结合结构域曾在碱基编辑器的开发中有所报道^[49]。Song 等^[32]报道了在 PE2 的 Cas9n 与 RT 结构域中间融合加入 DNA 结合结构

域 Rad51, 开发出 hyPE2, 提高了编辑效率, 同时在脱靶效应上与原 PE2 相当。Song 等^[32]也发现 PBS 的 T_m 是 hyPE2 效率提高的重要参数, 在 T_m 较低时, hyPE2 表现更好。Park 等^[33]在 PE 中融合染色质操控肽, 可以改善目标位点的染色质开放性, 进而提高编辑效率; 也有报道发现转录因子 P65 也能提高染色质开放性, 继而可以提高 PE 编辑效率^[50]。Velimirovic 等^[51]报道在 PE 的 N 端融合 85 氨基酸的短肽可以提高 PE 编辑效率, 并开发了筛选这种短肽的高通量方法。Liu 等^[30]优化了 PE2 的核定位序列 (nuclear localization sequence, NLS), 开发出 PE2*, 也提高了编辑效率。Yarnall 等^[35]将 Bxb1 丝氨酸整合酶结构域与 PE 相融合, 在基因组插入 attB 位点的同时, 也导入含有 attP 位点的 DNA 供体, 整合酶结构域使供体序列可以整合进基因组特定位置, 最终可以在细胞系中实现最长达 36 kb 的大段 DNA 的基因组插入, 效率达 10%~20%。

调整原有结构域的方法也受到许多研究者的关注 [图 2(a)]。Xu 等^[42]发现在水稻中, Cas9n 和 MMLV RT 对调位置后编辑效率更高。甚至有研究者发现将 PE 的 Cas9n 和 MMLV RT 直接拆分仍然可以实现相近的编辑效率^[46, 52]。将 M-MLV RT 中的 RNaseH 结构域删除, 可以稍微减小尺寸而不降低其编辑效率^[41, 43-44]。还有研究者尝试 Cas9n 恢复成切割双链的野生型 Cas9, 实现更大片段的删除, 尽管会导致更多双链断裂, 降低了安全性, 但可以通过调控胞内 NHEJ 途径来优化^[37-38]; 而对 Cas9n (H840A) 结构域引入新的点突变 N863A 可以减少由 Cas9n 结构域产生的 DSB, 减少了意外的 indel 产生, 提高目的产物纯度, 引入 N854A 虽然也能减少 indel 产生, 提高目的产物纯度, 但会牺牲正确编辑的效率^[39]。

由于 PE 由 Cas9n 和逆转录酶结构域两部分组成, 将其中一部分更换为同类的具有其他特性的结构域, 可以为 PE 引入诸如改善靶向范围、改变逆转录能力等新特性 [图 2(a)]。比如可以将 SpCas9 换替为松弛 PAM 要求的 Cas9 变体^[47], 也有研究者换成了 SaCas9、CjCas9、SauriCas9 或 FnCas9 等同源物^[30-31, 44, 48]。同理, 逆转录酶结构域也可以更换为 marathon RT (一种从 *E. rectale* 中发现的逆

表2 PE的衍生变体及其特点

Table 2 Derivative variants of PE and their characteristics

名称	优化点	优化结果	实验细胞系或动植物模型	参考文献
PE2*	优化 NLS	提高编辑效率	HEK293T	[30]
PEmax	更换为 <i>SpCas9</i> (R221K/N394K/H840A), 优化 NLS, 优化 RT 密码子	提高编辑效率	HEK293T、HeLa	[31]
hyPE2	融合 Rad51 DNA 结合结构域	提高编辑效率	HEK293T、HCT116	[32]
CMP-PE-V1	融合染色体操纵肽	提高编辑效率	NIH/3T3、C2C12 细胞系, C57BL/6N、ICR 小鼠	[33]
IN-PE2	融合短肽	提高编辑效率	HEK293T、U2OS、HCT116	[34]
PASTE	融合 Bxb1 丝氨酸整合酶	可在非分裂细胞基因组中整合超大片段	HEK293FT、HepG2、K562、原代人外周血 CD8 T 细胞、原代人肝细胞	[35]
ePE	引入 Csy4 蛋白	提高编辑效率	HEK293T、HeLa、N2a	[36]
WT-PE、PE _n	Cas9n 更换为野生型 Cas9	增强大片段删除或易位编辑效率, 证明了 NHEJ 途径可用于 PE	HEK293T、HeLa、HCT116	[37-38]
未命名	对 Cas9n 引入 N863A 或 N854A 突变	减少 indel	HEK293T、HeLa、K562	[39]
GENEWRITE	更换 LINE-1 RT	实现大片段插入	<i>E. coli</i>	[40]
ePPE	融合病毒核衣壳蛋白, 删除 RNaseH 结构域	提高编辑效率	Zhonghua11、Kenong199	[41]
PE-P3	颠倒 Cas9n 和 M-MLV RT	提高编辑效率	Nipponbare	[42]
PE2 Δ Rnh	删除 RNaseH 结构域	缩小 PE 尺寸	HEK293T、Hepa1-6、RAW264.7 细胞系, C57BL/6J、FVB/NJ 小鼠	[41, 43-45]
sPE	拆分 Cas9n 和 M-MLV RT	方便递送和优化	HEK293T	[46]
PE2-VQR、PE2-VRQR、PE2-VRER、PE2-NG、PE2-SpG、PE2-SpRY	更换其他 Cas9 变体	松弛 PAM 要求, 扩展可编辑范围	HEK293T	[47]
SaPE2	<i>SpCas9</i> 更换为 <i>SaCas9</i>	更改 PAM 要求	HEK293T、HeLa、K562	[30-31, 44]
CjCas9-PE	<i>SpCas9</i> 更换为 <i>CjCas9</i>	更改 PAM 要求	HEK293T	[44]
FnCas9-PE	<i>SpCas9</i> 更换为 <i>FnCas9</i>	更改 PAM 要求	HEK293T、HeLa、K562、U2OS	[48]
SauriCas9-PE	<i>SpCas9</i> 更换为 <i>SauriCas9</i>	更改 PAM 要求	HEK293T	[44]

转录酶), 但在部分位点的编辑效率略低^[52]。Manoj 等^[40]将 M-MLV RT 结构域更换为 LINE-1 逆转录酶, 并同时导入 RNA 模板, 可以实现约 1.5 kb 的插入。

4 pegRNA 的优化

pegRNA 是 PE 系统的关键组分, 起到引导作用, 又要作为逆转录模板, 其结构和稳定性对 PE 编辑效率非常重要(表3)。

Nelson 等^[53]报道了对 pegRNA 的 3'端添加额外的 tevopreQ₁或 mpknot 特殊 RNA 基序结构, 可以

防止 pegRNA 的 3'端意外降解, 使 PE 编辑效率提高 3~4 倍。此策略也可与 2'-O-甲基化、硫代磷酸等常见 RNA 保护手段进一步结合使用^[53]。同理, 在 pegRNA 的 3'端添加 xrRNA 基序结构^[54]或 G-quadruplex 基序结构^[55], 均实现了编辑效率提升。

pegRNA 本身的序列特性或二级结构也会影响 PE 编辑效率[图2(b)]。由于 pegRNA 的 spacer 区域与 PBS 区域是互补配对的, 可能造成 pegRNA 意外成环, 影响编辑效率。Liu 等^[36]在 pegRNA 的 3'端引入名为 Csy4 识别位点的发夹结构, 可以减少环化。进一步地, 作者在 Csy4 识别位点之后串联 nick sgRNA, 并共表达 Csy4 蛋白, 可以在 Csy4

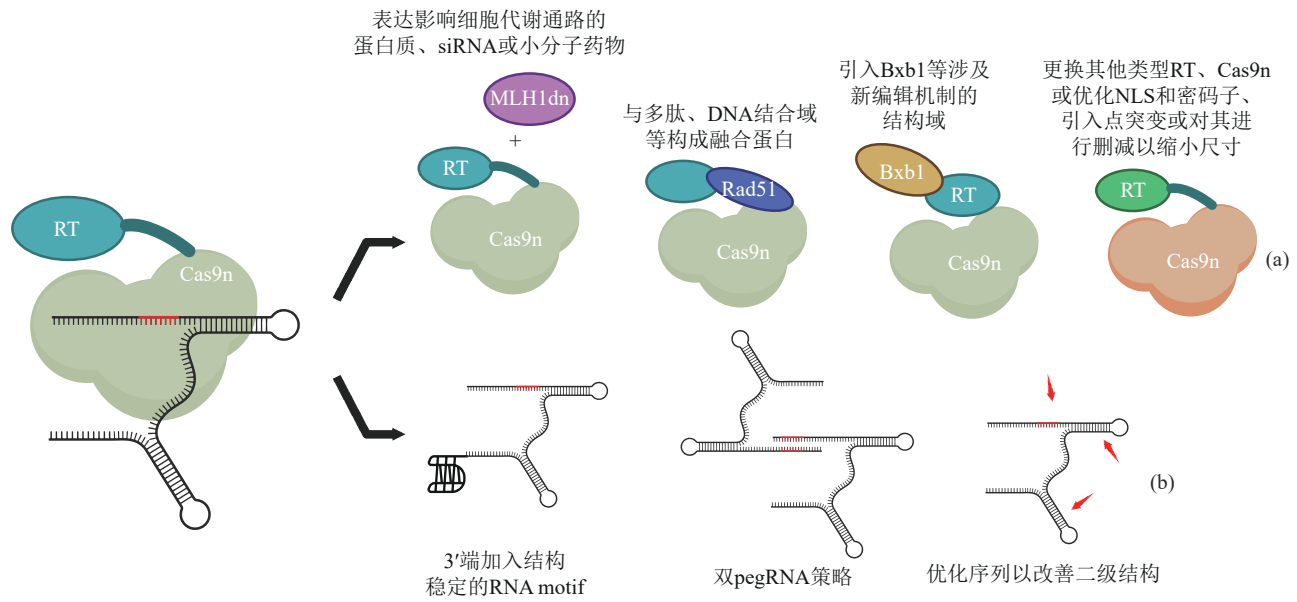


图2 PE典型改进方式示意图
 (a) 效应蛋白的优化; (b) pegRNA的优化
Fig. 2 Diagrams for major strategies to improve PE efficiency
 (a) Optimization of PE proteins; (b) Optimization of pegRNA

表3 pegRNA优化方式

名称	pegRNA优化方式	参考文献
epegRNA	3'端添加 tevopreQ ₁ 或 mpknot 基序以防降解	[53]
xrPE	3'端添加 xrRNA 继续以防降解	[54]
G-PE	3'端添加 G-quadruplex 基序以防降解	[55]
ePE	3'端添加 Csy4 基序以防环化	[36]
apegRNA	优化 hairpin	[56]
spegRNA	RT 模板引入统一突变以改善二级结构	[56]

识别位点之后剪切，释放 nick sgRNA。Li 等^[56]在 pegRNA 的 RT 模板区引入同义突变，改善其二级结构，显著提高了编辑效率，最高近 5000 倍，该方法命名为 sPE；作者也发现优化 pegRNA 的发夹结构可使编辑效率平均提高 2.77 倍，命名为 aPE。近期有报道将 gRNA 恒定区的第一颈环结构替换成一种超稳定颈环结构，提高了 gRNA 稳定性，减少了因 gRNA 错误折叠而无法编辑的情况，此种原理或亦可用于 pegRNA^[57]。

使用成对的 pegRNA 可以极大扩展 PE 的编辑能力限制，不仅能提高编辑效率，还能实现长片段的替换、插入及删除 [表 4, 图 2(b)]。

Lin 等^[14]发现在水稻中可以使用双 pegRNA 策

表4 成对 pegRNA

名称	特点	参考文献
无	在水稻中提高碱基替换、小片段插入删除编辑效率 2.9~17.4 倍	[14]
HOPE	提高碱基替换、小片段插入删除编辑效率和精确度	[58]
twinPE	大片段插入、删除、替换，可与 Bxb1 丝氨酸重组酶联用	[59]
PRIME-Del	高达 10 kb 的大片段删除，并允许再删除同时插入短片段	[60]
GRAND	高达 1 kb 的大片段插入	[61]
PEDAR	高达 1~10 kb 的大片段删除，并允许替换为高达 60 bp 的片段	[62]
PETI	染色体易位、颠倒	[63]
WT-PE	野生型 Cas9 引入 DSB，实现大片段删除和易位	[37]
Bi-PE	大片段删除	[64]

略提高 PE 编辑效率，最高提高了近 28 倍。HOPE 系统^[58]、GRAND 系统^[61]、PRIME-Del 系统^[60]、twinPE 系统^[59]、PEDAR 系统^[62]及 Bi-PE 系统^[64]等在待编辑的大片段两侧头对头地设计一对 pegRNA，产生两条可以互补配对的 DNA 单链，实现 kb 级的片段删除或高达 250 bp 的片段插入。

5 其他胞内通路和因子对PE的影响

Anzalone 等使用 CRISPRi 筛选发现细胞内的 DNA 错配修复 (mismatch repair, MMR) 过程中的多种蛋白质会抑制 PE 编辑效率。作者发现使用失活 MLH1 (MLH1dn) 可以在 MMR 丰富的细胞中有效抑制 MMR, 从而提高编辑效率并改善产物纯度^[31]。作者将共表达了 MLH1dn 的 PE2、PE3 系统分别命名为 PE4、PE5。Ferreira da Silva 等^[65] 筛选了 32 个 DNA 修复相关的因子, 发现在缺失 MMR 通路基因的单倍体 HAP1 细胞系中 PE 编辑效率提高了 2~7 倍, 用 siRNA 敲低 MMR 相关基因也可以提高 PE 编辑效率约 2 倍。Koeppel 等^[23] 也发现 MMR 通路中的 TREX1、TREX2 会抑制长片段插入。

组蛋白脱乙酰酶抑制剂 (histone deacetylase inhibitors, HDACi) 可以提高组蛋白乙酰化水平, 促进染色质开放, Liu 等^[66] 报道 nexturastat A、abexinostat 以及 vorinostat 等小分子 HDACi 可以提高 PE 编辑效率近 2 倍。

Cas9 直接切断基因组会诱发 p53 因子介导的细胞压力反应和细胞周期停滞, 不利于基因编辑进行^[34, 67]。尽管 PE 理论上不涉及 DSB, 但 Li 等^[68] 发现在 hPSC 中表达 p53 失活片段 p53DD 可以显著提高 PE 编辑效率, Huang 等^[69] 也发现使用 SV40LT 抑制 p53 可以提高 PE 在 hESC 中的编辑效率, 但相关机理尚未阐明。

6 PE 的自动化辅助工具

设计 pegRNA 的 PBS、RT 模板区并不像 protospacer 区一样直观, 而且其长度、二级结构都会影响编辑效率, 因此自动化辅助设计工具对研究人员意义重大 (表 5)。目前已报道有多款在线 pegRNA 辅助设计工具, 可以允许用户输入位点和意图实现的编辑结果, 给出参考 pegRNA 序列, 部分工具还允许选择不同的 Cas9, 甚至还可以预测编辑效率^[14, 70-78]。

7 PE 的递送

有效递送 PE 和 pegRNA 到细胞中是实验过程中的关键步骤之一。在哺乳动物细胞系的基因编辑实验中, 最常见的递送方法是转染质粒 DNA, 使之瞬时表达, 该方法最为简单便捷, 脱靶率不高, 再配合易转染细胞系如 HEK293T 等, 可以实现很高的转染效率^[11]。在动物实验中, 流体动力学注射在小鼠实验中也应用广泛^[30, 43]。但转染 DNA 存在 DNA 重组进基因组的隐患, 转染编码 PE 的 mRNA 和 pegRNA 的安全性和有效性更佳, 电转尤其适用于人诱导多能干细胞 (human induced pluripotent stem cell, hiPSC)、原代 T 细胞等难以化学转染的细胞^[31, 79-80]。直接转染 PE 蛋白和 pegRNA 组成的核糖蛋白复合体 (ribonucleoprotein, RNP),

表 5 pegRNA 辅助设计工具

Table 5 Assisted design tools for pegRNA

名称	软件特点	适用范围	参考文献
PINE-CONE	仅有离线可执行文件, 可部署在本地, 支持 Win 和 Mac	仅支持 PE	[70]
PnB Designer	在线, PBS、RTT 长度需自定	支持多种基因组, 兼容 BE	[71]
Easy-Prime	在线, 输入格式有要求	仅支持 PE	[72]
Prime Editor Designer	在线, 无自定义序列设计	仅对 NCBI、ClinVar 数据库基因设计, 支持两种 Cas9 变体	[73]
pegFinder	在线, 输入序列格式直观	支持对自定义序列设计, 支持三种 Cas9 变体	[74]
Plant Peg Designer	在线, 输入序列格式直观	针对植物, 支持两种 Cas9 变体和双 pegRNA 策略, 支持对自定义序列设计	[14]
PrimeDesign	在线, 输入序列格式直观, 支持预览二级结构	支持对自定义序列设计	[75]
PETAL	在线, 输入序列格式直观	需与其 PEA1 单质粒系统配合使用	[76]
pegIT	在线, 输出分子克隆序列参考	支持多种基因组和 ClinVar, 支持五种 Cas9	[77]
PE-designer	在线, 输入序列格式直观, 支持 E-mail 收取结果	支持极丰富的 Cas9 变体和基因组	[78]

由于不涉及胞内的转录翻译过程，编辑时间更短，安全性更好。Petri等^[81]在斑马鱼胚胎细胞中使用PE RNP实现了高达30%的编辑效率。然而有报道指出，转染RNP的编辑效率要低于质粒或mRNA，转染效率也更差^[31, 46]，在基因编辑实验中研究者要权衡安全性和效率二者的关系。

如需将PE整合进细胞基因组，或构建稳转细胞系，或是在难以转染的细胞系或原代细胞中进行实验，piggyBac转座子和慢病毒是常用的工具。Wolff等^[82]发现piggyBac系统将PE2和pegRNA整合到基因组后，由于编辑时间的延长，编辑效率会有所提升。Eggenchwiler等^[83]使用piggyBac转座子在hiPSC细胞中构建了稳定表达的PE，配合荧光报告系统，评价不同pegRNA的性能。而慢病毒载体由于容量限制（一般不超过8 kb），Anzalone等^[11]使用intein系统拆分PE3后，用两个慢病毒载体在小鼠原代皮层神经细胞中实现了单碱基替换的编辑结果。

腺相关病毒（adeno-associated virus, AAV）因其非整合性、组织特异性而应用广泛，但其装载容量仅有约4.5 kb，面对逾6 kb的PE，只能拆分PE后用双AAV载体递送^[43, 45, 84]。反式剪接双AAV载体（trans-splicing AAV, tsAAV）的递送能力可以高达10 kb^[85]，Jang等^[86]将PE3拆分后使用tsAAV载体递送，在小鼠中成功编辑了视网膜细胞。Davis等^[87]使用双AAV载体递送PE，实现了对小鼠大脑（最高达42%）、肝脏（最高达46%）和心脏（最高达11%）的编辑，证明了双AAV载体递送PE对基因疗法的潜在价值。腺病毒（adenovirus, AdV）的装载容量高达8.5 kb，可以单载体递送PE系统。Böck等^[44]使用单个AdV载体递送PE2系统在小鼠苯丙酮尿症模型中修正了Pah^{enu2}突变位点；作者还发现单AdV载体的PE递送效率要优于拆分的双AAV载体。Wang等^[88]使用完全病毒基因缺失的腺病毒载体（adenovector particle, AdVP）递送PE，在HEK293细胞系中转导效率可以高达99%。Aulicino等^[89]报道了使用杆状病毒载体（baculoviral-vector, BV）递送长达20 kb的同时编辑4个位点的PE系统，成功在HEK293T、RPE-1和SH-SY5Y细胞中实现高效编辑。

8 PE的应用

PE由于其全能编辑能力，迅速在动植物和遗传病研究等各个研究领域广泛应用。

8.1 在动物中的应用

Liu等^[90]在小鼠胚胎中显微注射PE2 mRNA和pegRNA建立了人类短指并指畸形相关基因Hoxd13突变疾病模型。Gao等^[91]通过显微注射PE2 mRNA和pegRNA成功地在小鼠Tspan2启动子引入突变，造成平滑肌功能丧失。Liu等^[30]使用流体动力学注射方法，在小鼠体内纠正了 α 1-抗胰蛋白酶缺乏症（ α 1-antitrypsin deficiency, AATD）的致病突变SERPINA1 E342K，也成功引入Ctnnb1 S45F突变建立了肝癌模型。Jang等^[86]用AAV递送PE2和PE3成功纠正了小鼠的酪氨酸血症和莱伯氏黑矇症。Lin等^[92]显微注射PE3质粒到小鼠胚胎，造成了Crygc基因外显子3上的移码突变，建立了白内障小鼠模型。

对于其他哺乳动物，Qian等^[93]通过显微注射PE2 mRNA和pegRNA到兔子胚胎，造成 β -己糖胺酶A（ β -hexosaminidase A, HexA）缺陷，建立了Tay-Sachs病（Tay-Sachs disease, TSD）模型。Kim等^[94]使用PE纠正了已患有髋关节发育不良（hip dysplasia, HD）家犬的耳成纤维细胞中的致病突变，并使用已经纠正的耳成纤维细胞克隆出两只幼犬。

在非哺乳动物中，Petri等^[81]在斑马鱼胚胎中注射PE RNP，引入了当前不能使用BE实现的两种突变，即眼皮白化病基因TYR P301L和原癌基因KRAS G12V，证明了PE在斑马鱼中构建人类疾病模型的能力。Atsuta等^[95]成功编辑了鸡成纤维细胞和原始生殖细胞，但遗憾的是并没有进一步培养出成体鸡。对于无脊椎动物，Bosch等^[96]成功编辑了果蝇的体色基因，并且可遗传给子代果蝇，但作者也发现在果蝇细胞中PE的编辑效率远低于哺乳动物细胞。

8.2 在基因治疗方面的应用

在遗传性代谢疾病方面，PE用于纠正遗传性

酪氨酸血症 (hereditary tyrosinemia, HT)、莱伯氏黑矇症 (Leber's congenital amaurosis, LCA)、AATD、苯丙酮尿症 (phenylketonuria, PKU) 等病的潜在能力在小鼠模型中已得以验证^[30, 44, 86, 97]。

一些罕见遗传病的PE治疗已通过细胞系水平的验证。杜氏肌营养不良 (Duchenne muscular dystrophy, DMD) 是一种致命的伴X遗传病, Chemello等^[98]在hiPSC衍生的心肌细胞中纠正了外显子51缺失突变, Mbakam等^[99]纠正了人成肌细胞系中的c.8713C>T突变, 验证了PE治疗DMD的潜在能力。Lv等调研了一个X连锁色素性视网膜炎 (X-linked recessive retinitis pigmentosa, XLRP) 的患者家族, 发现该家族携带RPGR ORF15 c.2234_2237del1突变, 作者在HEK293细胞系中验证了用ePE纠正这一突变^[36, 100]。隐性萎缩性表皮松解症 (recessive dystrophic epidermolysis bullosa, RDEB) 是一种严重的皮肤脆性疾病, 由COL7A1基因的功能丧失性突变引起, Hong等^[101]在患者的成纤维细胞中验证了PE纠正该致病突变的能力。Eggenschwiler等^[83]在患者来源的iPSC中纠正了家族性肌萎缩侧索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis, ALS) 的致病SOD1 R115G突变。Zhou等^[102]在iPSC中通过删除SMN2基因内含子的剪接沉默子, 验证了PE治疗脊髓性肌萎缩症 (spinal muscular atrophy, SMA) 的可能性。Zhang等^[103]使用PE3成功在红细胞祖细胞系HUDEP-2的HBB基因中引入了β-地中海贫血 (β-thalassemia, β-thal) 突变, 为β-地中海贫血的研究提供了疾病模型; 在该作者的另一项研究中, 作者验证了在小鼠模型中纠正β-地中海贫血IVS-II-654突变的能力^[104]。

在癌症方面, Abuhamad等^[105]在T47D luminal A乳腺癌细胞系中纠正了TP53 (L194F) 错义突变, 为PE应用于癌症治疗提供了验证。Tremblay等^[106]在HEK293细胞系中验证了向淀粉样前体蛋白 (amyloid precursor protein, APP) 引入冰岛突变, 探索了阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 的一种可能的预防方案。

8.3 在植物中的应用

对水稻、小麦等单子叶植物, 在PE技术诞生

之后研究人员迅速跟进了相关研究, 然而其本身编辑效率却比较低^[13, 107-108], 结合删减RT RNaseH结构域、添加病毒核衣壳蛋白等PE蛋白优化手段, 以及结合epegRNA或双pegRNA策略等pegRNA优化手段, 可以有效提高PE系统在水稻中的编辑效率^[14, 41]。Jin等^[109]还总结了在单子叶植物中的PE实验流程, 为其他研究者参考提供了便利。Xu等^[110]基于PE开发了一种饱和诱变方法, 在水稻OsACCI基因上筛选出多个除草剂抗性突变, 验证了PE在农业生产领域的应用潜力。玉米也是一种重要的单子叶粮食作物, 也有报道使用PE成功在玉米乙酰乳酸合酶 (acetolactate synthase, ALS) 基因中引入突变^[111-112]。

拟南芥是一种重要的双子叶模式生物, 在科学研究中扮演了重要的角色, Jiang等^[113]使用PE在拟南芥中引入突变, 但平均编辑效率仅有1.15%。在双子叶农作物方面, Lu等^[114]使用针对植物优化的PE可以在二倍体番茄中引入3%的编辑, Perroud等^[115]在四倍体马铃薯中用PE2实现了极低的编辑效率, 而PE3甚至不能检出编辑, 也有报道在花生、鹰嘴豆和豇豆中实现了不足1%的编辑^[116]。以上数据表明在双子叶植物中, PE的表现远差于单子叶植物。然而即便是在单子叶植物中, PE的编辑效率也远不及哺乳动物细胞中高达百分之几十的效率, 开发在植物细胞中可用的高效PE工具依然任重道远。

9 结语

PE是目前功能最全面的基因编辑工具, 可以实现12种碱基替换、插入和删除。其编辑效率不高的缺点正逐渐被研究者通过蛋白质工程或pegRNA改造等手段改善, 效果较为显著。PE推动了基因编辑领域新的研究高潮, 然而其使用单AAV递送PE仍然囿于其过大的尺寸尚不能实现, 且indel和脱靶问题仍然不能忽视, 这限制了基因治疗方面的进一步应用。我们期待在全球学者的共同努力下, 早日诞生更小更安全的PE, 推动罕见遗传病的基因治疗实现新的发展。

参 考 文 献

- [1] ANZALONE A V, KOBLAN L W, LIU D R. Genome editing with CRISPR-Cas nucleases, base editors, transposases and prime editors[J]. *Nature Biotechnology*, 2020, 38(7): 824-844.
- [2] KOMOR A C, BADRAN A H, LIU D R. CRISPR-based technologies for the manipulation of eukaryotic genomes[J]. *Cell*, 2017, 168(1/2): 20-36.
- [3] WILLIAMS A B, SCHUMACHER B. p53 in the DNA-damage-repair process[J]. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2016, 6(5): a026070.
- [4] HAAPANIEMI E, BOTLA S, PERSSON J, et al. CRISPR-Cas9 genome editing induces a p53-mediated DNA damage response[J]. *Nature Medicine*, 2018, 24(7): 927-930.
- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] KURT I C, ZHOU R H, IYER S, et al. CRISPR C-to-G base editors for inducing targeted DNA transversions in human cells [J]. *Nature Biotechnology*, 2021, 39(1): 41-46.
- [8] CHEN L, HONG M J, LUAN C M, et al. Adenine transversion editors enable precise, efficient A•T-to-C•G base editing in mammalian cells and embryos[J/OL]. *Nature Biotechnology*, 2023[2023-07-14]. <https://www.nature.com/articles/s41587-023-01821-9>.
- [9] 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.
- [10] HAN D Y, XIAO Q Q, WANG Y F, et al. Development of miniature base editors using engineered IscB nickase[J]. *Nature Methods*, 2023, 20(7): 1029-1036.
- [11] 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.
- [12] KIM H K, YU G, PARK J, et al. Predicting the efficiency of prime editing guide RNAs in human cells[J]. *Nature Biotechnology*, 2021, 39(2): 198-206.
- [13] LIN Q P, ZONG Y, XUE C X, et al. Prime genome editing in rice and wheat[J]. *Nature Biotechnology*, 2020, 38(5): 582-585.
- [14] LIN Q P, JIN S, ZONG Y, et al. High-efficiency prime editing with optimized, paired pegRNAs in plants[J]. *Nature Biotechnology*, 2021, 39(8): 923-927.
- [15] PONNIENSELVAN K, LIU P P, NYALILE T, et al. Reducing the inherent auto-inhibitory interaction within the pegRNA enhances prime editing efficiency[J]. *Nucleic Acids Research*, 2023, 51(13): 6966-6980.
- [16] 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.
- [17] CHARI R, MALI P, MOOSBURNER M, et al. Unraveling CRISPR-Cas9 genome engineering parameters *via* a library-on-library approach[J]. *Nature Methods*, 2015, 12(9): 823-826.
- [18] KIM H K, SONG M, LEE J N, et al. *In vivo* high-throughput profiling of CRISPR-Cpf1 activity[J]. *Nature Methods*, 2017, 14(2): 153-159.
- [19] KIM H K, MIN S, SONG M, et al. Deep learning improves prediction of CRISPR-Cpf1 guide RNA activity[J]. *Nature Biotechnology*, 2018, 36(3): 239-241.
- [20] KIM H K, KIM Y, LEE S, et al. *SpCas9* activity prediction by Deep*SpCas9*, a deep learning-based model with high generalization performance[J]. *Science Advances*, 2019, 5(11): eaax9249.
- [21] YU G, KIM H K, PARK J, et al. Prediction of efficiencies for diverse prime editing systems in multiple cell types[J]. *Cell*, 2023, 186(10): 2256-2272.e23.
- [22] MATHIS N, ALLAM A, KISSLING L, et al. Predicting prime editing efficiency and product purity by deep learning[J]. *Nature Biotechnology*, 2023, 41(8): 1151-1159.
- [23] KOEPEL J, WELLER J, PEETS E M, et al. Prediction of prime editing insertion efficiencies using sequence features and DNA repair determinants[J]. *Nature Biotechnology*, 2023, 41: 1446-1456.
- [24] KIM D Y, MOON S B, KO J H, et al. Unbiased investigation of specificities of prime editing systems in human cells[J]. *Nucleic Acids Research*, 2020, 48(18): 10576-10589.
- [25] HABIB O, HABIB G, HWANG G H, et al. Comprehensive analysis of prime editing outcomes in human embryonic stem cells[J]. *Nucleic Acids Research*, 2022, 50(2): 1187-1197.
- [26] GAO R Z, FU Z C, LI X Y, et al. Genomic and transcriptomic analyses of prime editing guide RNA-independent off-target effects by prime editors[J]. *The CRISPR Journal*, 2022, 5(2): 276-293.
- [27] KWON J, KIM M, BAE S, et al. TAPE-seq is a cell-based method for predicting genome-wide off-target effects of prime editor[J]. *Nature Communications*, 2022, 13: 7975.
- [28] LIANG S Q, LIU P P, PONNIENSELVAN K, et al. Genome-wide profiling of prime editor off-target sites *in vitro* and *in vivo* using PE-tag[J]. *Nature Methods*, 2023, 20(6): 898-907.
- [29] JIN S, LIN Q P, LUO Y F, et al. Genome-wide specificity of

- prime editors in plants[J]. *Nature Biotechnology*, 2021, 39(10): 1292-1299.
- [30] LIU P P, LIANG S Q, ZHENG C W, et al. Improved prime editors enable pathogenic allele correction and cancer modelling in adult mice[J]. *Nature Communications*, 2021, 12: 2121.
- [31] CHEN P J, HUSSMANN J A, YAN J, et al. Enhanced prime editing systems by manipulating cellular determinants of editing outcomes[J]. *Cell*, 2021, 184(22): 5635-5652.e29.
- [32] SONG M, LIM J M, MIN S, et al. Generation of a more efficient prime editor 2 by addition of the Rad51 DNA-binding domain[J]. *Nature Communications*, 2021, 12: 5617.
- [33] PARK S J, JEONG T Y, SHIN S K, et al. Targeted mutagenesis in mouse cells and embryos using an enhanced prime editor[J]. *Genome Biology*, 2021, 22(1): 170.
- [34] VELIMIROVIC M, ZANETTI L C, SHEN M W, et al. Peptide fusion improves prime editing efficiency[J]. *Nature Communications*, 2022, 13(1): 3512.
- [35] YARNALL M T N, IOANNIDI E I, SCHMITT-ULMS C, et al. Drag-and-drop genome insertion of large sequences without double-strand DNA cleavage using CRISPR-directed integrases [J]. *Nature Biotechnology*, 2023, 41(4): 500-512.
- [36] LIU Y, YANG G, HUANG S H, et al. Enhancing prime editing by Csy4-mediated processing of pegRNA[J]. *Cell Research*, 2021, 31(10): 1134-1136.
- [37] TAO R, WANG Y H, HU Y, et al. WT-PE: prime editing with nuclease wild-type Cas9 enables versatile large-scale genome editing[J]. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2022, 7: 108.
- [38] PETERKA M, AKRAP N, LI S Y, et al. Harnessing DSB repair to promote efficient homology-dependent and-independent prime editing[J]. *Nature Communications*, 2022, 13(1): 1240.
- [39] LEE J, LIM K, KIM A, et al. Prime editing with genuine Cas9 nickases minimizes unwanted indels[J]. *Nature Communications*, 2023, 14: 1786.
- [40] MANOJ F, TAI L W, WANG K S M, et al. Targeted insertion of large genetic payloads using Cas directed LINE-1 reverse transcriptase[J]. *Scientific Reports*, 2021, 11: 23625.
- [41] ZONG Y, LIU Y J, XUE C X, et al. An engineered prime editor with enhanced editing efficiency in plants[J]. *Nature Biotechnology*, 2022, 40(9): 1394-1402.
- [42] XU W, YANG Y X, YANG B Y, et al. A design optimized prime editor with expanded scope and capability in plants[J]. *Nature Plants*, 2022, 8(1): 45-52.
- [43] ZHENG C W, LIANG S Q, LIU B, et al. A flexible split prime editor using truncated reverse transcriptase improves dual-AAV delivery in mouse liver[J]. *Molecular Therapy*, 2022, 30(3): 1343-1351.
- [44] BÖCK D, ROTHGANGL T, VILLIGER L, et al. *In vivo* prime editing of a metabolic liver disease in mice[J]. *Science Translational Medicine*, 2022, 14(636): eabl9238.
- [45] GAO Z L, RAVENDRAN S, MIKKELSEN N S, et al. A truncated reverse transcriptase enhances prime editing by split AAV vectors[J]. *Molecular Therapy*, 2022, 30(9): 2942-2951.
- [46] LIU B, DONG X L, CHENG H Y, et al. A split prime editor with untethered reverse transcriptase and circular RNA template[J]. *Nature Biotechnology*, 2022, 40(9): 1388-1393.
- [47] KWEON J, YOON J K, JANG A H, et al. Engineered prime editors with PAM flexibility[J]. *Molecular Therapy*, 2021, 29(6): 2001-2007.
- [48] OH Y, LEE W J, HUR J K, et al. Expansion of the prime editing modality with Cas9 from *Francisella novicida*[J]. *Genome Biology*, 2022, 23(1): 92.
- [49] ZHANG X H, CHEN L, ZHU B Y, et al. 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.
- [50] CHEN R H, CAO Y, LIU Y J, et al. Enhancement of a prime editing system *via* optimal recruitment of the pioneer transcription factor P65[J]. *Nature Communications*, 2023, 14: 257.
- [51] VELIMIROVIC M, ZANETTI L C, SHEN M W, et al. Peptide fusion improves prime editing efficiency[J]. *Nature Communications*, 2022, 13(1): 3512.
- [52] GRÜNEWALD J, MILLER B R, SZALAY R N, et al. Engineered CRISPR prime editors with compact, untethered reverse transcriptases[J]. *Nature Biotechnology*, 2023, 41(3): 337-343.
- [53] NELSON J W, RANDOLPH P B, SHEN S P, et al. Engineered pegRNAs improve prime editing efficiency[J]. *Nature Biotechnology*, 2022, 40(3): 402-410.
- [54] ZHANG G Q, LIU Y, HUANG S S, et al. Enhancement of prime editing *via* xrRNA motif-joined pegRNA[J]. *Nature Communications*, 2022, 13: 1856.
- [55] LI X Y, WANG X, SUN W J, et al. Enhancing prime editing efficiency by modified pegRNA with RNA G-quadruplexes[J]. *Journal of Molecular Cell Biology*, 2022, 14(4): mjac022.
- [56] LI X S, ZHOU L N, GAO B Q, et al. Highly efficient prime editing by introducing same-sense mutations in pegRNA or stabilizing its structure[J]. *Nature Communications*, 2022, 13: 1669.
- [57] RIESENBERG S, HELMBRECHT N, KANIS P, et al. Improved gRNA secondary structures allow editing of target sites resistant to CRISPR-Cas9 cleavage[J]. *Nature*

- Communications, 2022, 13: 489.
- [58] ZHUANG Y, LIU J L, WU H, et al. Increasing the efficiency and precision of prime editing with guide RNA pairs[J]. Nature Chemical Biology, 2022, 18(1): 29-37.
- [59] ANZALONE A V, GAO X D, PODRACKY C J, et al. Programmable deletion, replacement, integration and inversion of large DNA sequences with twin prime editing[J]. Nature Biotechnology, 2022, 40(5): 731-740.
- [60] CHOI J, CHEN W, SUITER C C, et al. Precise genomic deletions using paired prime editing[J]. Nature Biotechnology, 2022, 40(2): 218-226.
- [61] WANG J L, HE Z, WANG G Q, et al. Efficient targeted insertion of large DNA fragments without DNA donors[J]. Nature Methods, 2022, 19(3): 331-340.
- [62] JIANG T T, ZHANG X O, WENG Z P, et al. Deletion and replacement of long genomic sequences using prime editing[J]. Nature Biotechnology, 2022, 40(2): 227-234.
- [63] KWEON J, HWANG H Y, RYU H, et al. Targeted genomic translocations and inversions generated using a paired prime editing strategy[J]. Molecular Therapy, 2023, 31(1): 249-259.
- [64] TAO R, WANG Y H, JIAO Y G, et al. Bi-PE: bi-directional priming improves CRISPR/Cas9 prime editing in mammalian cells[J]. Nucleic Acids Research, 2022, 50(11): 6423-6434.
- [65] FERREIRA DA SILVA J, OLIVEIRA G P, ARASA-VERGE E A, et al. Prime editing efficiency and fidelity are enhanced in the absence of mismatch repair[J]. Nature Communications, 2022, 13: 760.
- [66] LIU N, ZHOU L F, LIN G F, et al. HDAC inhibitors improve CRISPR-Cas9 mediated prime editing and base editing[J]. Molecular Therapy - Nucleic Acids, 2022, 30: 173.
- [67] IHRY R J, WORRINGER K A, SALICK M R, et al. p53 inhibits CRISPR-Cas9 engineering in human pluripotent stem cells[J]. Nature Medicine, 2018, 24(7): 939-946.
- [68] LI M, ZHONG A, WU Y J, et al. Transient inhibition of p53 enhances prime editing and cytosine base-editing efficiencies in human pluripotent stem cells[J]. Nature Communications, 2022, 13: 6354.
- [69] HUANG S S, ZHANG Z W, TAO W Y, et al. Broadening prime editing toolkits using RNA-Pol-II-driven engineered pegrRNA[J]. Molecular Therapy, 2022, 30(9): 2923-2932.
- [70] STANDAGE-BEIER K, TEKEL S J, BRAFMAN D A, et al. Prime editing guide RNA design automation using PINE-CONE[J]. ACS Synthetic Biology, 2021, 10(2): 422-427.
- [71] SIEGNER S M, KARASU M E, SCHRÖDER M S, et al. PnB Designer: a web application to design prime and base editor guide RNAs for animals and plants[J]. BMC Bioinformatics, 2021, 22(1): 101.
- [72] LI Y C, CHEN J J, TSAI S Q, et al. Easy-Prime: a machine learning-based prime editor design tool[J]. Genome Biology, 2021, 22(1): 235.
- [73] MORRIS J A, RAHMAN J A, GUO X Y, et al. Automated design of CRISPR prime editors for 56, 000 human pathogenic variants[J]. iScience, 2021, 24(11): 103380.
- [74] CHOW R D, CHEN J S, SHEN J, et al. A web tool for the design of prime-editing guide RNAs[J]. Nature Biomedical Engineering, 2021, 5(2): 190-194.
- [75] HSU J Y, GRÜNEWALD J, SZALAY R, et al. PrimeDesign software for rapid and simplified design of prime editing guide RNAs[J]. Nature Communications, 2021, 12: 1034.
- [76] ADIKUSUMA F, LUSHINGTON C, ARUDKUMAR J, et al. Optimized nickase- and nuclease-based prime editing in human and mouse cells[J]. Nucleic Acids Research, 2021, 49(18): 10785-10795.
- [77] ANDERSON M V, HALDRUP J, THOMSEN E A, et al. pegIT-a web-based design tool for prime editing[J]. Nucleic Acids Research, 2021, 49(W1): W505-W509.
- [78] HWANG G H, JEONG Y K, HABIB O, et al. PE-Designer and PE-Analyzer: web-based design and analysis tools for CRISPR prime editing[J]. Nucleic Acids Research, 2021, 49(W1): W499-W504.
- [79] LI H Q, BUSQUETS O, VERMA Y, et al. Highly efficient generation of isogenic pluripotent stem cell models using prime editing[J]. eLife, 2022, 11: 79208.
- [80] SÜRÜN D, SCHNEIDER A, MIRCETIC J, et al. Efficient generation and correction of mutations in human iPSCs utilizing mRNAs of CRISPR base editors and prime editors[J]. Genes, 2020, 11(5): 511.
- [81] PETRI K, ZHANG W T, MA J Y, et al. CRISPR prime editing with ribonucleoprotein complexes in zebrafish and primary human cells[J]. Nature Biotechnology, 2022, 40(2): 189-193.
- [82] WOLFF J H, HALDRUP J, THOMSEN E A, et al. piggyPrime: high-efficacy prime editing in human cells using piggyBac-based DNA transposition[J]. Frontiers in Genome Editing, 2021, 3: 786893.
- [83] EGGENSCHWILER R, GSCHWENDTBERGER T, FELSKI C, et al. A selectable all-in-one CRISPR prime editing piggyBac transposon allows for highly efficient gene editing in human cell lines[J]. Scientific Reports, 2021, 11: 22154.
- [84] ZHI S Y, CHEN Y X, WU G L, et al. Dual-AAV delivering split prime editor system for *in vivo* genome editing[J]. Molecular Therapy, 2022, 30(1): 283-294.
- [85] SUN L W, LI J, XIAO X. Overcoming adeno-associated virus vector size limitation through viral DNA heterodimerization[J]. Nature Medicine, 2000, 6(5): 599-602.

- [86] JANG H, JO D H, CHO C S, et al. Application of prime editing to the correction of mutations and phenotypes in adult mice with liver and eye diseases[J]. *Nature Biomedical Engineering*, 2022, 6(2): 181-194.
- [87] DAVIS J R, BANSKOTA S, LEVY J M, et al. Efficient prime editing in mouse brain, liver and heart with dual AAVs[J/OL]. *Nature Biotechnology*, 2023[2023-07-10]. <https://www.nature.com/articles/s41587-023-01758-z>.
- [88] WANG Q, LIU J, JANSSEN J M, et al. Broadening the reach and investigating the potential of prime editors through fully viral gene-deleted adenoviral vector delivery[J]. *Nucleic Acids Research*, 2021, 49(20): 11986-12001.
- [89] AULICINO F, PELOSSE M, TOELZER C, et al. Highly efficient CRISPR-mediated large DNA docking and multiplexed prime editing using a single baculovirus[J]. *Nucleic Acids Research*, 2022, 50(13): 7783-7799.
- [90] LIU Y, LI X Y, HE S T, et al. Efficient generation of mouse models with the prime editing system[J]. *Cell Discovery*, 2020, 6: 27.
- [91] GAO P, LYU Q, GHANAM A R, et al. Prime editing in mice reveals the essentiality of a single base in driving tissue-specific gene expression[J]. *Genome Biology*, 2021, 22(1): 83.
- [92] LIN J X, LIU X C, LU Z Y, et al. Modeling a cataract disorder in mice with prime editing[J]. *Molecular Therapy Nucleic Acids*, 2021, 25: 494-501.
- [93] QIAN Y Q, ZHAO D, SUI T T, et al. Efficient and precise generation of Tay-Sachs disease model in rabbit by prime editing system[J]. *Cell Discovery*, 2021, 7: 50.
- [94] KIM D E, LEE J H, BIN JI K, et al. Prime editor-mediated correction of a pathogenic mutation in purebred dogs[J]. *Scientific Reports*, 2022, 12: 12905.
- [95] ATSUTA Y, SUZUKI K, IIKAWA H, et al. Prime editing in chicken fibroblasts and primordial germ cells[J]. *Development, Growth & Differentiation*, 2022, 64(9): 548-557.
- [96] BOSCH J A, BIRCHAK G, PERRIMON N. Precise genome engineering in *Drosophila* using prime editing[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2021, 118(1): e2021996118.
- [97] KIM Y, HONG S A, YU J, et al. Adenine base editing and prime editing of chemically derived hepatic progenitors rescue genetic liver disease[J]. *Cell Stem Cell*, 2021, 28(9): 1614-1624.e5.
- [98] CHEMELLO F, CHAI A C, LI H, et al. Precise correction of Duchenne muscular dystrophy exon deletion mutations by base and prime editing[J]. *Science Advances*, 2021, 7(18): eabg4910.
- [99] HAPPI M, BAKAM C, ROUSSEAU J, LU Y Y, et al. Prime editing optimized RTT permits the correction of the c. 8713C>T mutation in *DMD* gene[J]. *Molecular Therapy Nucleic Acids*, 2022, 30: 272-285.
- [100] LV X J, ZHENG Z, ZHI X, et al. Identification of *RPGR* ORF15 mutation for X-linked retinitis pigmentosa in a large Chinese family and *in vitro* correction with prime editor[J]. *Gene Therapy*, 2023, 30(1/2): 160-166.
- [101] HONG S A, KIM S E, LEE A Y, et al. Therapeutic base editing and prime editing of *COL7A1* mutations in recessive dystrophic epidermolysis bullosa[J]. *Molecular Therapy*, 2022, 30(8): 2664-2679.
- [102] ZHOU M J, TANG S Q, DUAN N N, et al. Targeted-deletion of a tiny sequence *via* prime editing to restore *SMN* expression [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(14): 7941.
- [103] ZHANG H K, ZHOU Q, CHEN H Y, et al. Prime editor 3 mediated beta-thalassemia mutations of the *HBB* gene in human erythroid progenitor cells[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(9): 5002.
- [104] ZHANG H K, SUN R L, FEI J, et al. Correction of beta-thalassemia IVS-II-654 mutation in a mouse model using prime editing[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(11): 5948.
- [105] ABUHAMAD A Y, MOHAMAD ZAMBERI N N, LING S E, et al. Reverting *TP53* mutation in breast cancer cells: prime editing workflow and technical considerations[J]. *Cells*, 2022, 11(10): 1612.
- [106] TREMBLAY G, ROUSSEAU J, M, BAKAM C H, et al. Insertion of the Icelandic mutation (A673T) by prime editing: a potential preventive treatment for familial and sporadic Alzheimer's disease[J]. *The CRISPR Journal*, 2022, 5(1): 109-122.
- [107] XU R F, LI J, LIU X S, et al. Development of plant prime-editing systems for precise genome editing[J]. *Plant Communications*, 2020, 1(3): 100043.
- [108] LI Z S, MA R, LIU D, et al. A straightforward plant prime editing system enabled highly efficient precise editing of rice *Waxy* gene[J]. *Plant Science*, 2022, 323: 111400.
- [109] JIN S, LIN Q P, GAO Q, et al. Optimized prime editing in monocot plants using PlantPegDesigner and engineered plant prime editors (ePPEs) [J]. *Nature Protocols*, 2023, 18(3): 831-853.
- [110] XU R F, LIU X S, LI J, et al. Identification of herbicide resistance *OsACC1* mutations *via* in planta prime-editing-library screening in rice[J]. *Nature Plants*, 2021, 7(7): 888-892.
- [111] JIANG Y Y, CHAI Y P, LU M H, et al. Prime editing efficiently generates W542L and S621I double mutations in two ALS genes in maize[J]. *Genome Biology*, 2020, 21(1): 257.

- [112] QIAO D X, WANG J Y, LU M H, et al. Optimized prime editing efficiently generates heritable mutations in maize[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2023, 65(4): 900-906.
- [113] JIANG Z Z, ABDULLAH, ZHANG S, et al. Development and optimization of CRISPR prime editing system in photoautotrophic cells[J]. *Molecules*, 2022, 27(6): 1758.
- [114] LU Y M, TIAN Y F, SHEN R D, et al. Precise genome modification in tomato using an improved prime editing system [J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2021, 19(3): 415-417.
- [115] PERROUD P F, GUYON-DEBAST A, VEILLET F, et al. Prime Editing in the model plant *Physcomitrium patens* and its potential in the tetraploid potato[J]. *Plant Science*, 2022, 316: 111162.
- [116] BISWAS S, BRIDGELAND A, IRUM S, et al. Optimization of prime editing in rice, peanut, chickpea, and cowpea protoplasts by restoration of GFP activity[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(17): 9809.



通讯作者: 谢震(1976—),男,博士,副教授。研究方向为人工分子机器的设计与控制、合成生物学、肿瘤基因组学、肿瘤基因与细胞治疗。

E-mail: zhenxie@tsinghua.edu.cn



第一作者: 许志锰(1995—),男,博士研究生。研究方向为合成生物学、基因编辑。

E-mail: xuzm18@mails.tsinghua.edu.cn