引文格式：许永汉, 齐泽宇, 李文静, 等. 精准序列替换基因组编辑技术研究进展[J]. 云南农业大学学报 (自然科学), 2024, 39(0): 1−14. DOI: 10.12101/j.issn.1004-390X(n).202302027

精准序列替换基因组编辑技术研究进展*

许永汉#，齐泽宇#，李文静，赵啊慧，武德传**
(安徽农业大学 农学院，安徽 合肥 230036)

摘要: 利用基因组编辑技术可以对微生物、动植物和人类细胞系基因组进行精准的序列替换，加速生物育种进程和遗传性疾病治疗，从而在农业生产和医疗上取得突破。基因组序列替换策略主要分为 2 种：第 1 种依赖 DNA 双链断裂，包括将 CRISPR-Cas 分别与同源重组、单链退火、微同源末端连接等 DNA 修复途径相结合，或由位点特异性重组系统介导，实现精准的序列替换；第 2 种依赖 DNA 单链断裂，主要包括引导编辑、碱基编辑器等技术。本研究综述了不同精准序列替换策略和技术及相关研究进展，理清各策略和技术的优缺点，有助于根据基因组编辑的目的，选择适合的技术和方法实现精准高效的序列替换。

关键词: 基因组编辑；序列替换；DNA 双链断裂；DNA 单链断裂；DNA 修复
中图分类号: S503.53　　**文献标志码:** A　　**文章编号:**

Research Progress of Genome Editing Technologies for Precise Sequence Replacement

XU Yonghan，QI Zeyu，LI Wenjing，ZHAO Ahui，WU Dechuan
(School of Agronomy, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China)

Abstract: Genome editing technologies have been used for precise genome sequence replacement in microbe, animals, plants, and human cell lines and thus speeding up the process of biological breeding and genetic disease treatment, making a breakthrough in agricultural production and medicine. Two kinds of strategies are commonly utilized for precise sequence replacement. The first kind relies on DNA double-strand break to realize precise sequence replacement, including the combination of CRISPR-Cas system with DNA repair pathway such as homologous recombination, single strand annealing and micro-homologous end joining, and site-specific-recombination-mediated precise sequence replacement. The second kind relies on the DNA single-strand break and mainly includes the technical strategy such as prime editing and base editor. This study mainly reviews the progress on different genome editing strategies and related technologies for precise sequence replacement. This will be of help to choosing the most suitable technical strategy according to the advantages and disad-

收稿日期：2023-02-13　　修回日期：2024-03-11　　网络首发日期：
*基金项目：安徽省高校协同创新项目 (GXXT-2019-033)；安徽省自然科学基金项目 (1808085MC87)；安徽农业大学高层次人才项目 (2018008)。
作者简介：#对本文贡献等同，为并列第一作者。许永汉 (1969—)，男，江西万年人，博士，副教授，主要从事作物遗传育种和植物分子生物学研究。E-mail：xuyh13@163.com；齐泽宇 (1997—)，男，安徽六安人，在读硕士研究生，主要从事作物遗传育种和分子生物学研究。E-mail：CarlosStuade@163.com
**通信作者 Corresponding author：武德传 (1974—)，男，安徽定远人，博士，副教授，主要从事作物遗传育种和植物分子生物学研究。E-mail：wudc555@ahau.edu.cn
网络首发地址：

vantages of them, to realize precise and efficient sequence replacement.

Keywords: genome editing; sequence replacement; DNA double-strand break; DNA single-strand break; DNA repair

近年来，随着以 CRISPR-Cas 系统为代表的基因组编辑工具的快速发展，已能够对基因组靶序列进行定点编辑。利用不同的基因组编辑工具，可以实现基因组序列敲除、插入和替换；其中最有效的编辑工具为精准序列替换——将基因组靶标序列完全替换为人工设计的序列，实现定点敲除、定点插入和单碱基替换[1]。迄今为止，在真核生物和原核生物中均能实现精准的序列替换，运用序列替换编辑技术能够加速动植物品种的有利基因聚合，或治疗多种遗传疾病[2]。

生物体细胞易受到内外因素的影响，产生以 DNA 双链断裂为主要形式的 DNA 损伤后果[3]。为维持 DNA 的稳定性，生物体进化出完善的 DNA 损伤应答系统，包括利用同源重组定向修复或末端连接机制，实现 DNA 双链断裂的修复[4]。大多数基因组编辑技术会引起 DNA 双链断裂，包括 CRISPR-Cas9、锌指核酸酶 (zinc finger nucleases，ZFNs)、转录激活因子样效应因子核酸酶 (transcription activator-like effector nucleases，TALENs) 等技术[2]。基因组编辑过程中，可以利用外源修复模板，依赖生物体内源的 DNA 修复机制修复 DNA 双链断裂，实现精准的序列替换。如利用 CRISPR-Cas 产生 DNA 双链断裂，通过同源重组、单链退火、微同源末端连接等修复途径实现 DNA 片段的定点敲除或插入；或利用外源位点特异性重组系统，识别并切割靶标 DNA 和供体模板，产生双链断裂，重组酶构象发生改变，促使靶标 DNA 和供体模板链之间发生重组，实现精准的序列替换[2]。已有研究通过不断挖掘和人工改进 CRISPR-Cas 相关核酸酶获得多种 Cas 蛋白及变体，如 Cas9 切口酶即是一类改造后的 Cas9 酶，不同于原始的 Cas9 酶，Cas9 切口酶只产生 DNA 单链断裂[5]。这类核酸酶能更好地应用于精准的序列替换策略，并衍生出引导编辑器 (prime editing，PE) 系统和碱基编辑器 (base editor，BE) 系统[5]。本研究主要综述各种序列替换编辑技术策略，探讨如何选择和利用不同的策略实现高效、安全、精准的序列替换。

1 依赖 DNA 双链断裂的精准序列替换策略

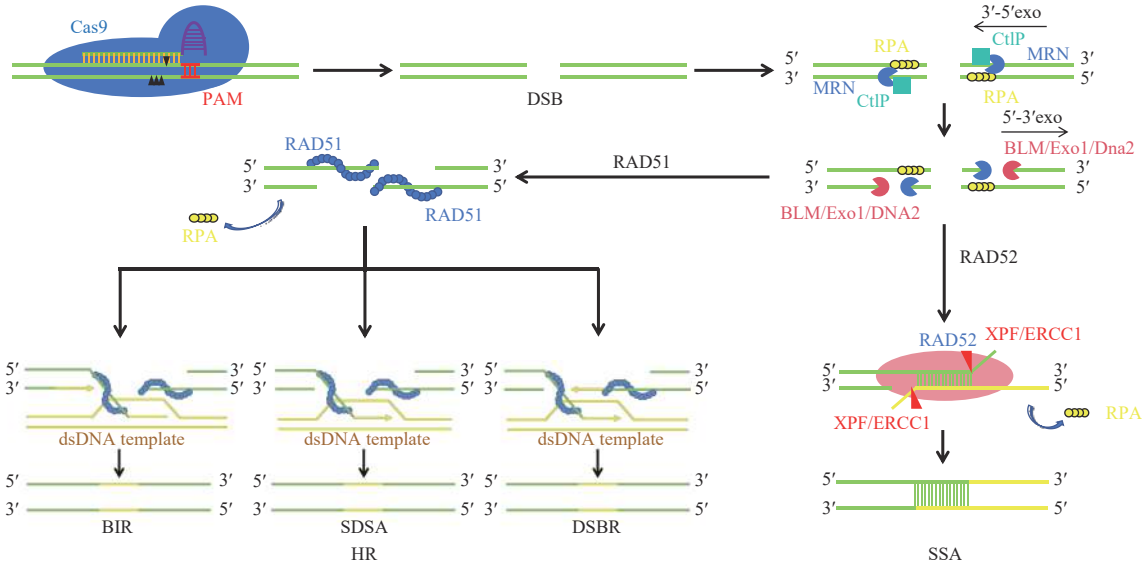
1.1 同源定向修复机制介导精准序列替换

1.1.1 同源定向修复分子机制

当细胞中存在与 DNA 双链断裂处侧翼序列具有较高同源性的修复模板时，主要通过多蛋白复合体介导的同源定向修复机制修复双链断裂，包括同源重组和单链退火修复途径[6]。

在原核生物中，同源重组修复途径主要依赖 RecA 蛋白，其过程分为 3 步。第 1 步，RecA 蛋白分别与双链断裂处侧翼的 2 条 DNA 单链结合，形成 RecA-DNA 丝状体 (RecA 核蛋白丝)[7]；第 2 步，丝状体结合双链 DNA 修复模板，形成霍利迪连接中间体[8]；第 3 步，RuvABC 蛋白复合体结合并切割中间体，完成 2 条双链 DNA 的交换和分离[8]。除同源重组修复途径，来自噬菌体的单链退火修复途径也可在原核细胞中修复双链断裂，其中应用最广泛的是来自大肠杆菌 Rec 噬菌体的 RecET 重组系统 (由 RecE 和 RecT 蛋白组成)，或来自 λ 噬菌体的 λ-red 重组系统 (由 gam、exo 和 beta 蛋白组成)，后者相对更高效[9-10]。

在真核生物中，同源定向修复机制需通过 3 步修复 DNA 双链断裂。第 1 步，具有 3′→5′核酸外切酶活性的 MRN 复合体 (MRE11-RAD50-NBS1，酵母中为 MRX 复合物) 和 CtIP 蛋白 (CtBP 互作蛋白) 结合到 DNA 双链断裂处的 5′-DNA 末端附近，从 3′→5′方向切除短单链片段，暴露出 3′-单链 DNA 末端[11]；第 2 步，为增加 3′-单链 DNA 末端同源序列的长度，布卢姆综合征解旋酶 (bloom syndrome RecQ-like helicase，BLM，酵母中为 Sgs1 解旋酶)、外切酶 1 和 DNA2 核酸酶结合在 5′-单链 DNA 末端，并按 5′→3′方向切除 5′-单链 DNA，同时，复制蛋白 A (RPA) 复合体结合 3′-单链 DNA 末端形成退火中间体，保护后者不被降解[12]；第 3 步，根据断裂处 3′-单链 DNA 末端与修复模板间同源序列的长度，后续分别通过同源重组 (末端同源序列>50 nt) 或单链退火 (末端同源序列在 20~50 nt 之间) 修复途径完成 DNA 双链断裂修复 (图 1)[13]。在同源重组修复途径中，



注：HR. 同源重组途径；SSA. 单链退火途径。

Note: HR. homologous recombination pathway; SSA. single strand annealing pathway.

图 1　CRISPR-Cas9 结合同源定向修复机制介导的精准序列替换

Fig. 1　Precise sequence replacement mediated by homology-directed repair mechanism combined with CRISPR-Cas9

RecA 家族重组酶 RAD51 替代 RPA 与 3′-单链 DNA 末端形成螺旋状 RAD51-DNA 丝状体 (RAD51 核蛋白丝)，并入侵修复模板的 3′端形成异源双链 DNA 接头 (也称置换环结构[13])，再通过断裂诱导复制、合成依赖的链退火或典型的 DNA 双链断裂修复等 3 种子途径之一完成 DNA 双链断裂修复 (图 1)[14]。合成依赖的链退火是同源重组修复过程中主要的子途径，利用修复模板延伸入侵的 DNA 单链，使置换环扩大，直到入侵链脱离修复模板，并与 DNA 双链断裂处 5′-单链 DNA 末端退火，实现 DNA 双链断裂修复，需注意的是，该过程不会形成霍利迪连接中间体[15]。与同源重组修复途径不同，在单链退火修复过程中，不依赖 RAD51，RPA 复合体从 2 个退火中间体中解离，形成 2 条游离的 3′-单链 DNA 末端，通过 RAD52 蛋白介导进行退火，同时 XPF/ERCC1 (萌芽酵母中为 Rad1/Rad10) 复合物去除未退火的非同源单链突出端 (图 1)[16-17]，最后 DNA 聚合酶修补 DNA 缺口和 DNA 连接酶连接 DNA 单链末端，完成 DNA 双链断裂修复[18]。

1.1.2　CRISPR-Cas 系统结合同源重组修复机制实现精准的序列替换

早期，利用改造的 ZFNs 或 TALENs 切割 DNA 产生双链断裂，再利用供体修复模板，通过同源重组修复途径实现精准的序列替换，但这些技术存在脱靶和操作繁琐等缺陷[19-22]。随着 CRISPR-Cas 技术的发展，使用以 Cas9 为主的 CRISPR 相关核酸酶产生 DNA 双链断裂，利用供体模板，通过同源重组修复途径实现精准序列替换，其编辑效率显著提高，已广泛用于小鼠、非洲爪蟾、水稻、玉米、烟草、拟南芥等物种[23-27]。但是，在真核细胞中，依赖同源重组修复途径实现的精准序列替换易受到非同源末端连接途径的干扰，导致替换效率仍很低[23, 28]。在动物细胞中，可通过抑制非同源末端连接途径以提高同源重组修复途径介导的序列替换效率。在植物中，主要通过提高细胞内供体模板的浓度进而提高同源重组的效率。GIL-HUMANES 等[29]将含有小麦矮化病毒复制子、供体修复模板和 CRISPR-Cas9 系统的表达载体转化六倍体小麦细胞，通过同源重组修复途径将 *GFP* 整合到泛素基因第 3 个外显子序列中，相比非病毒复制子构建的载体，编辑效率提高了 12 倍。EINI 等[30]用含有植物病毒复制子 (如甜菜卷顶病毒 BCTV 复制子) 和 CRISPR-Cas12a 系统的表达载体转化烟草，依赖同源重组修复途径将 *GFP* 转变为 *YFP*，编辑效率显著提高。LI 等[31]利用转录本 RNA 为修复模板，由核酶进行切割，同时利用 CRISPR-Cas12a 系统切割靶位点 DNA 双链，通过内源的同源重组修复途径，精准替换了水稻乙酰乳酸合成酶的 2 个

氨基酸序列。

1.1.3 CRISPR-Cas 系统结合单链退火修复机制实现精准的序列替换

迄今为止，单链退火修复途径已充分应用于 CRISPR-Cas 系统介导的微生物基因组精准序列替换策略。PYNE 等[32]首次将 CRISPR-Cas9 与 λ-Red 重组系统结合，在大肠杆菌中表达 λ-Red 蛋白 (Exo、Beta 和 Gam) 和 Cas9 蛋白，利用向导 RNA (guide RNA，gRNA；也称单一向导 RNA，single guide RNA，sgRNA) 和 DNA 修复供体模板，通过单链退火修复途径实现大片段 DNA 无痕敲除和插入。HUANG 等[33]构建分别包含 CRISPR-Cas9 系统和 λ-Red 系统的双质粒系统，在大肠杆菌染色体中实现 12 kb DNA 片段插入和 186.7 kb DNA 片段敲除，编辑效率和阳性率分别达到 10^{-3}~10^{-4} 和 97.0%~98.3%；利用该方法将异丁醇合成途径相关基因整合到大肠杆菌 MG1665 基因组中，得到高产稳产异丁醇 (1.3 g/L) 的菌株。早期，在动植物细胞中，单链退火修复途径会导致基因组序列丢失和染色体易位重排，因此主要用于基因打靶完成后去除基因组内选择标记[34]。以植物为例，OHTSUKI 等[35]将水稻中两侧具有正向重复序列 (30 bp) 和 *I-Sce* I 内切酶识别位点的负筛选标记 (白喉毒素 A) 序列与具有突变位点的 *OsCly1* 融合为供体模板，利用 T-DNA 重组系统替换基因组靶标序列；再通过转入 *I-Sce* I 内切酶表达载体，由 *I-Sce* I 内切酶切割筛选标记，重复序列间单链退火，删除整合标记，实现靶基因定点突变。近期，LU 等[36]将待插入序列融合于与靶标序列同源的序列中形成供体模板，并构建到载体中，利用 CRISPR-Cas9 切割靶标，通过非同源末端连接途径将供体模板序列整合到水稻基因组，供体模板中的同源序列与受体基因组的同源序列形成串联重复；然后再利用 CRISPR-Cas9 切割 2 个重复序列之间的间隔序列，形成双链断裂，进而通过单链退火修复途径去除间隔序列及 1 个重复单元，最终实现插入序列的无缝替换。

1.2 末端连接修复机制在精准序列替换策略中的应用

1.2.1 末端连接修复机制

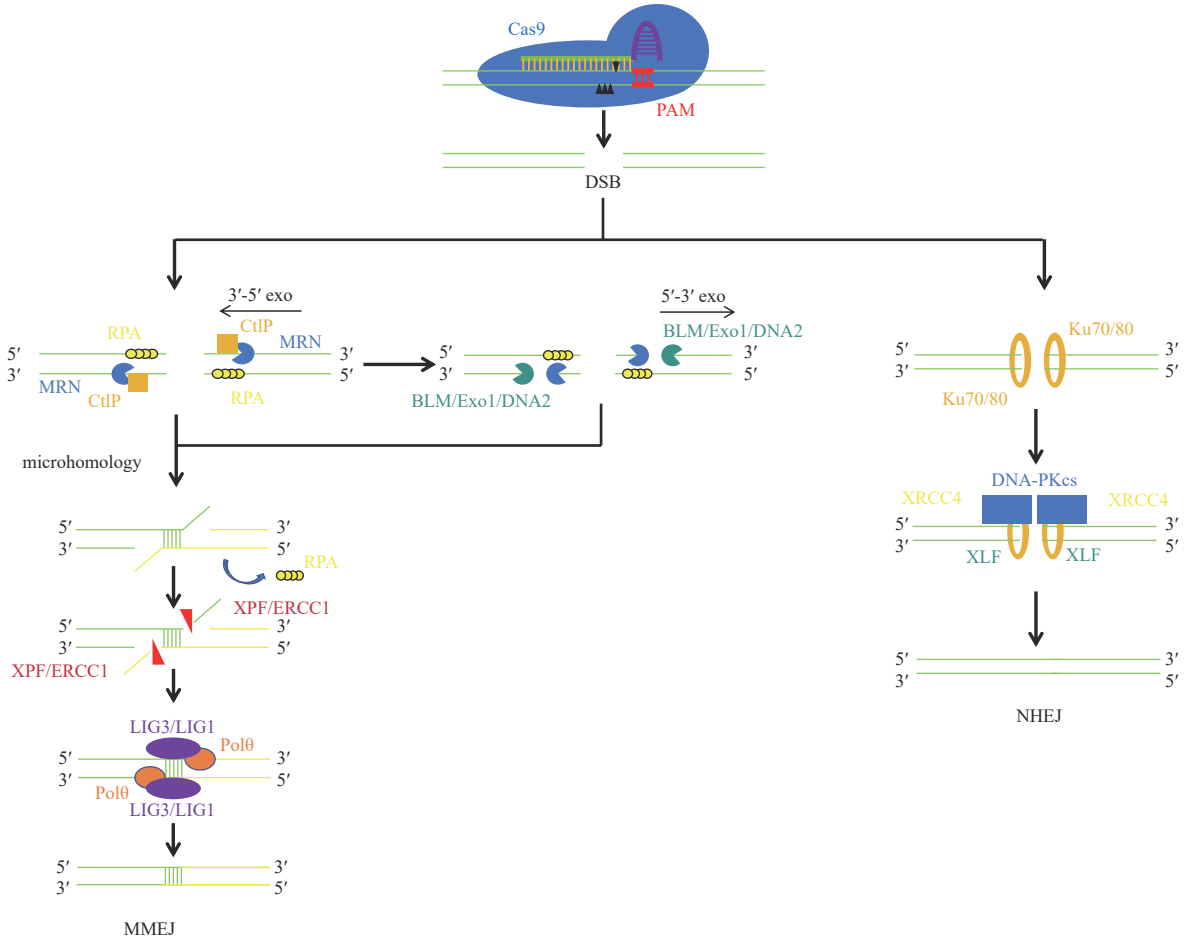
除同源定向修复外，末端连接修复机制也可修复 DNA 双链断裂，根据 DNA 断裂处末端序列的类型，分为 2 种途径：第 1 种为不依赖同源末端序列的非同源末端连接途径，也称为经典的非同源末端连接途径[37]；第 2 种为依赖于微同源序列的微同源末端连接途径，也称为替代非同源末端连接途径[38]。

与依赖同源重组修复途径的原核生物不同，真核生物主要通过非同源末端连接途径连接断裂处的 DNA 末端，实现 DNA 双链断裂修复[39]。以哺乳动物细胞为例，非同源末端连接途径需要 Ku70 和 Ku80 蛋白形成异源二聚体，结合到双链断裂处的 DNA 末端，并招募其他非同源末端连接途径相关因子 (包括 DNA 依赖蛋白激酶催化亚单位、X 射线修复交叉互补蛋白 4、DNA 连接酶 4、XRCC4 类因子和 RecQ 家族的沃纳蛋白) 到 DNA 末端连接，完成 DNA 双链断裂修复 (图 2)[40-41]。该过程可以发生在整个细胞周期，且在细胞分裂间期 G1 期最活跃[42-43] 。

在真核生物中，当非同源末端连接途径缺失或受到抑制时，DNA 双链断裂可通过微同源末端连接途径，利用断裂处两侧的 2~20 bp 重叠碱基序列 (微同源序列) 退火实现修复[43]。微同源末端连接途径主要包括 3 个步骤 (图 2)[38]。前两步与 1.1.1 节所述同源定向修复机制一样，也需要 MRN 蛋白复合物、CtIP 蛋白、BLM 解旋酶、外切酶 1 和 DNA2 核酸酶切割并降解 DNA 断裂处侧翼的 5′-单链 DNA 末端，直到 3′-单链 DNA 末端暴露出微同源序列，同时 RPA 复合体结合 3′-单链 DNA 末端形成退火中间体 (图 1、2)[44-46]；第 3 步，XPF/ERCC1 (酵母中为 Rad1/Rad10) 蛋白复合体切除退火中间体的非同源尾部，产生符合 DNA 聚合酶延伸条件的 3′-羟基末端，最后由低保真的 DNA 聚合酶 Polθ (酵母中为 Polδ 和 Pol4) 修补 DNA 缺口，连接酶 LIG3/LIG1 连接 DNA 单链末端，实现 DNA 双链断裂修复[47-49]。

1.2.2 抑制非同源末端连接途径实现精准的序列替换

非同源末端连接途径不需要修复模板，而是直接连接断裂处的末端，但同时会产生大量非期望的插入或缺失，导致基因突变[50]。因此，非同源末端连接机制难以应用于精准的序列替换，在绝大多数动物细胞的相关研究报道中，还可通过抑制该途径以更高效地实现其他途径介导的精准序列替换[51]。如：在哺乳动物细胞中，通过使用小分子抑制剂 (如连接酶 IV 抑制剂 SCR7、NU-



注：NHEJ. 非同源末端连接途径；MMEJ. 微同源末端连接途径。

Note: NHEJ. non-homologous end joining pathway; MMEJ. microhomology-mediated end joining pathway.

图 2　CRISPR-Cas9 结合末端连接修复机制介导的精准序列替换

Fig. 2　Precise sequence replacement mediated by end joining repair mechanism combined with CRISPR-Cas9

7026、曲古抑菌素 A 等) 阻断和抑制该途径，可提高同源重组途径介导的序列替换编辑效率[24]。近期研究还表明：利用非同源末端连接机制可在植物中实现非精准的序列替换[52]。

1.2.3　CRISPR-Cas 结合微同源末端连接机制实现精准的序列替换

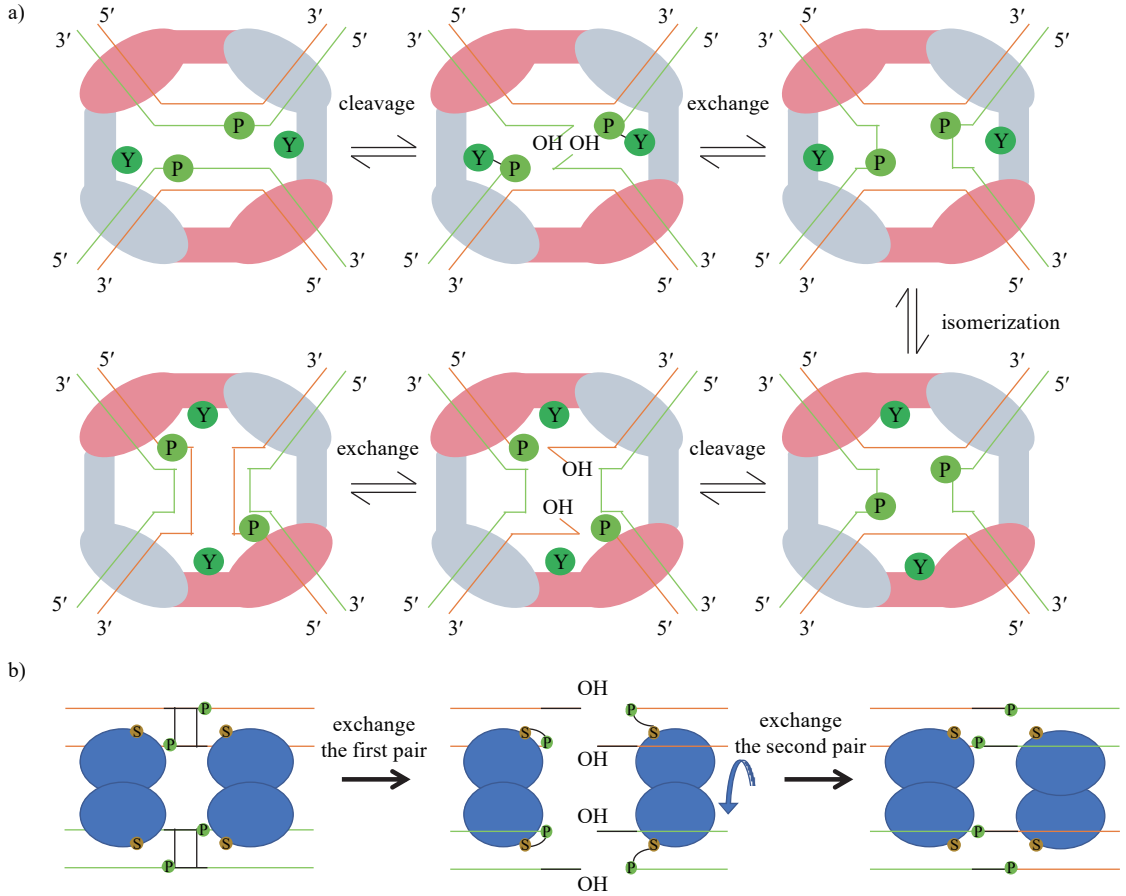
虽然利用同源定向修复机制可以实现精准的大片段替换，但在构建供体修复模板时，需要较长的同源臂，导致载体构建相对困难[13]；而微同源末端连接途径仅仅需要不到 25 bp 的微同源序列就可以完成 DNA 双链断裂修复，因此，研究人员开始尝试将该途径与 CRISPR-Cas 结合实现序列替换。HISANO 等[53]利用 CRISPR-Cas9 切割靶点，通过微同源末端连接途径，在斑马鱼细胞中成功将外源 *mCherry* 或 *eGFP* 精准地整合到靶标序列中，其使用的供体模板与基因组靶位点两侧都具有短同源序列 (1 040 bp)。SAKUMA 等[54]结合 TALENs 和 CRISPR-Cas9 系统，构建靶染色体精确整合 (precise integration into target chromosome，PITCh) 系统，利用同一对 TALEN 同时切割基因组序列和 TAL-PITCh 载体，产生线性化的 TAL-PITCh 载体片段，其末端具有与基因组切割位点两侧对应的微同源序列，最后通过微同源末端连接途径，将整个载体精确地整合到人类细胞基因组中。SAKUMA 等[55]用同样的策略将中国仓鼠卵巢细胞中 9.6 kb 的全质粒和 7.6 kb 的 DNA 片段 (无质粒骨架) 整合到基因组特定靶点中。KATAYAMA 等[56]结合 CRISPR-SaCas9 和微同源末端连接途径，利用具有微同源序列的供体修复模板，成功将荧光蛋白基因敲入到人视网膜细胞 *ROSA26* 的开放阅读框中。在植物细胞中，CRISPR-Cas 结合微同源末端连接途径也可以实

现精准的序列替换[52, 57]。VANVU 等[52]利用 SpCas9 蛋白和 2 个 sgRNA 同时切割 2 个基因组靶位点，形成双链断裂缺口，依赖末端含有 820 nt 微同源序列 (可与缺口侧翼的末端序列碱基互补) 的供体模板，通过微同源末端连接途径，精准替换生菜或卷心菜 *SlHPAT3* 基因外显子上的 56 个碱基对。需强调的是，该方法必须在原生质体受体培养基中加入 DNA 依赖性蛋白激酶抑制因子 NU7441，以抑制同源定向修复机制和非同源末端连接途径[52]。

1.3 位点特异性重组介导的精准序列替换

1.3.1 位点特异性重组的分子机制

位点特异性重组技术也可实现精准的序列替换。该技术主要依赖特定的识别位点和位点特异性重组酶 (site-specific recombinases，SSRs)，并根据重组位点的序列及其排列方向实现外源 DNA 片段在染色体的整合以及染色体片段的切除和倒位。根据重组酶种类，该技术分为酪氨酸重组酶系统和丝氨酸重组酶系统[58]。以常用的 Cre/*loxP* 系统为例，由酪氨酸重组酶介导的序列替换过程主要分为 6 步 (图 3a)。第 1 步，4 个酪氨酸重组酶亚基形成的四聚体复合物同时结合 2 个 DNA 双链底物的 *loxP* 位点 (由 2 个 13 bp 的反向重复序列和间隔序列组成，其中反向重复序列可与酪氨酸亚基结合)，使 DNA 分子发生弯曲[59]；第 2 步，酪氨酸重组酶利用亲核酪氨酸攻击 *loxP* 位点的间隔序列，产生单链断裂切口并形成具有 3′-磷酸基—酪氨酸末端和 5′-羟基末端的切割中间体，该中间体与同源重组过程中产生的霍利迪连接中间体相似[59]；第 3 步，游离的 5′-羟基末端侵入另一条 DNA 双链的 3′-磷酸基—酪氨酸末端，实现 2 个双链 DNA 之间的交换[59]；第 4 步，四聚体复合物发生构象变化，并准备第 2 轮链交换[59]；第 5 步，同第 2 步，酪氨酸重组酶进攻另一组未交换的 DNA 链；第 6 步，同第 4 步，在完成第 2 组



注：a) 酪氨酸重组酶系统；b) 丝氨酸重组酶系统。

Note: a) tyrosine recombinase system; b) serine recombinase system.

图 3 位点特异性重组系统介导的精准序列替换

Fig. 3 Precise sequence replacement mediated by site-specific recombination system

DNA 链交换后，2 条 DNA 双链完成重组[59]。丝氨酸重组酶系统主要分为 3 步，以常用的大肠杆菌噬菌体 φC31 重组酶为例 (图 3b)：第 1 步，2 个由丝氨酸重组酶亚基形成的二聚体复合物同时结合在 2 条不同 DNA 双链上的识别位点 (来源于噬菌体基因组的 *attP* 位点和大肠杆菌基因组的 *attB* 位点，均由 2 段反向重复序列和包含交叉序列的中间序列组成，其中反向重复序列可与丝氨酸重组酶亚基结合)，形成联会复合体[60]；第 2 步，丝氨酸重组酶同时切割 2 条 DNA 双链，断裂处 DNA 单链末端的 5′-磷酸基团与重组酶的丝氨酸结合形成磷酸—丝氨酸中间体，然后丝氨酸重组酶亚基二聚体复合物旋转 180°，实现 2 条 DNA 双链的交换[60]；第 3 步，重组酶系统连接 DNA 双链断裂的缺口，形成 *attL* 和 *attR* 位点 (*attL* 和 *attR* 位点分别由 *attP* 位点和 *attB* 位点各自的一半序列组成) 序列，完成重组[60]。

1.3.2　位点特异性重组的应用

早期，酪氨酸重组酶系统主要在体外用于质粒的 Gateway 克隆[58]。HARTLEY 等[61]测试 λ Int/*att* 和 Cre/*loxP* 两种酪氨酸重组酶系统，发现 λ Int 整合酶可以更好地将两侧含有 *attB* 或 *attL* 位点的 PCR 克隆产物定向整合到目标载体的 *attP* 或 *attR* 位点上，并替换目标载体的 *ccdB* 筛选标记。之后，酪氨酸重组酶系统逐渐应用于真核生物的序列替换，但由于真核生物基因组没有天然的重组酶位点，所以需要先通过其他基因组编辑策略在染色体内引入重组位点，再利用含有重组酶基因和重组位点的载体转化细胞，实现外源 DNA 片段的定向整合[62]。在植物中，酪氨酸重组酶系统主要用于删除在转基因过程中整合到受体基因组的筛选标记。HU 等[63]通过转基因技术获得含有 FLP 重组酶表达基因的水稻株系，与整合了玉米泛素启动子 (Ubi)、卡那霉素抗性基因 (*nptII*) 筛选标记 (两侧具有 FRT 位点) 和 β-葡萄糖醛酸酶基因 (*gusA*，位于 *nptII* 的下游，无法被 Ubi 转录) 的转基因株系杂交，在杂一代中依赖外源 FLP 酪氨酸重组酶系统，删除 *nptII* 基因，使得 *gusA* 表达被激活，通过检测 β-葡萄糖醛酸酶的活性，筛选出无卡那霉素抗性的水稻株系。SREEKALA 等[64]将可被化学调节的 Cre/*loxP* 特异性重组系统转化到含 *hpt* (两侧含有 *loxP* 位点) 筛选标记的转基因水稻中，在 T_0 代筛选到无筛选标记的株系。在动物细胞中，通过基因打靶等手段将 *loxP* 位点插入动物细胞基因组中，再转入含 *loxP* 位点的供体模板和 Cre 重组酶表达载体，通过位点特异性重组实现序列替换[65]。SAKURAI 等[66]在人类胚胎干细胞 (hESC) 中，先通过同源重组在基因组 *HPRT* 外显子区域插入两侧具有 *loxP* 位点的新霉素抗性基因片段；再转入 Cre 重组酶表达载体和具有单个 *loxP* 位点的供体模板，通过位点特异性重组将新霉素抗性基因替换为供体模板序列，该方法不仅特异性高，且重组效率较高。

早期，丝氨酸重组酶系统主要用于原核生物的精准基因组序列替换。HOANG 等[67]在铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 中转入包含 ΦCTX 丝氨酸重组酶表达框、ΦCTX *attP* 位点、2 个 FRT 位点、四环素抗性基因、需要整合的目标序列等元件的表达载体，丝氨酸重组酶系统在细胞中表达后，能够将整个外源载体精准地整合到铜绿假单胞菌染色体的 *attB* 位点，插入效率为 10^{-8}~10^{-7}；然后用含 FLP 酪氨酸重组酶表达框的表达载体转化受体细胞，FLP 重组酶表达后，结合基因组中的 FRT 位点，去除载体骨架，仅保留目标序列。近期，DURRANT 等[68]通过开发算法，检索不同种类的噬菌体基因组序列，发现 6 207 种大丝氨酸重组酶；选择 5 种较优的重组酶基因分别与 *GFP* 融合，构建到含有 *attB* 位点序列的慢病毒整合载体，通过转染人类细胞，将 *LSR-GFP* 和 *attB* 位点序列整合到基因组中，得到可以表达大丝氨酸重组酶和具有 *attB* 位点的着陆垫细胞系，再用含有 *attP* 识别位点序列和 *mCherry* 的供体载体转化该细胞系，成功将 *mCherry* 精准地插入到基因组 *attB* 位点，其中大丝氨酸重组酶 Pa01 替换效率最高，可达 75%。

虽然利用位点特异性重组技术可以精准、高效地替换基因组识别位点间的靶标序列，但由于该过程可以容忍识别位点序列的微小变化，将引起一定的脱靶现象[58]。

2　依赖 DNA 单链断裂的基因组精准序列替换策略

2.1　PE 介导的基因组精准序列替换

2.1.1　PE 的分子机制

CRISPR-Cas9 通过识别 PAM 序列，并与靶标 DNA 结合，利用 Cas9 蛋白的 HNH 和 RuvC 核酸酶结构域诱导 DNA 双链断裂，然后通过细胞

内自我修复机制完成对基因组 DNA 片段的敲除和敲入[69]。而 PE 技术主要依赖 DNA 单链断裂，它由 2 部分组成：第 1 部分为逆转录酶和 Cas9 切口酶 (H840A) 的融合蛋白，第 2 部分为 1 个 3′ 端携带引物结合位点和逆转录模板的 gRNA，称为引导编辑器向导 RNA (prime editing guide RNA，pegRNA)[70]。融合蛋白由 pegRNA 引导与靶标 DNA 结合，Cas9 切口酶 (H840A 突变体) 结合 PAM 并切割 1 条 DNA 链，暴露出 3′-羟基端，同时逆转录酶与 pegRNA 上的引物结合位点结合，根据逆转录模板逆转录出作为修复模板的 DNA 3′突出链；之后，被切割的 DNA 链产生 1 个未被修饰的 DNA 5′突出链和 1 个被修饰的 DNA 3′突出链 (修复模板链)，通过内源 DNA 修复系统降解 DNA 5′突出链、保留 DNA 3′突出链，完成编辑。通过该方式可以实现小片段的精准插入、精准缺失和精准突变 (图 4)[70]。

2.1.2 PE 的发展及应用

为扩大靶点范围和提高 PE 的编辑效率，研究人员对 PE 进行了多种改造。ANZALONE 等[70]将莫洛尼鼠白血病病毒 (M-MLV) 逆转录酶融合到 Cas9 切口酶 (H840A) 的 C 末端，开发出 PE 升级版——PE1，实现高达 12 种编辑效果，包括碱基突变、插入和删除；并发现将 M-MLV 逆转录酶突变体 (D200N、L603W、T306K、W313F、T330P) 用于 PE 中效果最好，由此开发出 PE2，其替换效率是 PE1 的 1.6~5.1 倍；之后，在 PE2 的基础上，添加可以对非编辑链进行切割的 gRNA，成功开发出 PE3，其编辑效率约为 PE2 的 3 倍，但会引入更多错误的缺失和插入[70]。近期，ZHUANG 等[71]开发出一种新型 PE——HOPE (homologous 3′ extensions mediated prime editor)，该技术利用 2 条可以分别与靶标正义和反义 DNA 链配对的 pegRNAs，在人类胚胎肾 293T 细胞以及存在 DNA 错配修复途径缺陷的人类结肠直肠癌 116 细胞中实现高效的基因组精准序列替换。CHEN 等[72]开发出具有更高编辑效率和更低突变率的 PE4 和 PE5，通过抑制 DNA 错配修复途径有效增强 PE 的编辑效率和准确性。LIN 等[73]开发出植物 pegRNA 设计网站 PlantPegDesigner，可设计出最佳的 pegRNA 或 pegRNA 对，当引物结合位点的熔解温度设定为 30 ℃ 时，PE 在水稻中可以达到最佳编辑效果。ZONG 等[74]在 Cas9 切口酶 (H840A) 和去除其核糖核酸酶 H 结构域的 M-MLV 逆转录酶连接处加入 NC 蛋白，构建出具有更高编辑效率的 PE——EPPE。JIANG 等[75]基于 PE介导的基因组缺失和修复，开发出能够对靶标序列实现精准替换的 PE-Cas9-based deletion and repair (PEDAR) 技术，在酪氨酸血症小鼠模型中去除 *Fah* 基因内插入的致病性 DNA 片段 (1.38 kb)，最终恢复 *Fah* 基因在肝脏中的功能。LI 等[76]通过优化 PE3，构建了 3 种代理 PE，即 PE3-HS、PE3-AS 和 PE3-DS，率先实现了水稻多基因引导编辑，且编辑效率最高可提升 50 倍。总之，近几年来，PE 成为当下非常热门的编辑工具，不仅成功应用于多个领域，而且实现了高效且精准的序列替换。

2.2 BE 介导的单碱基替换

2.2.1 BE 的分子机制

为实现精准高效的单碱基替换，将无核酸酶

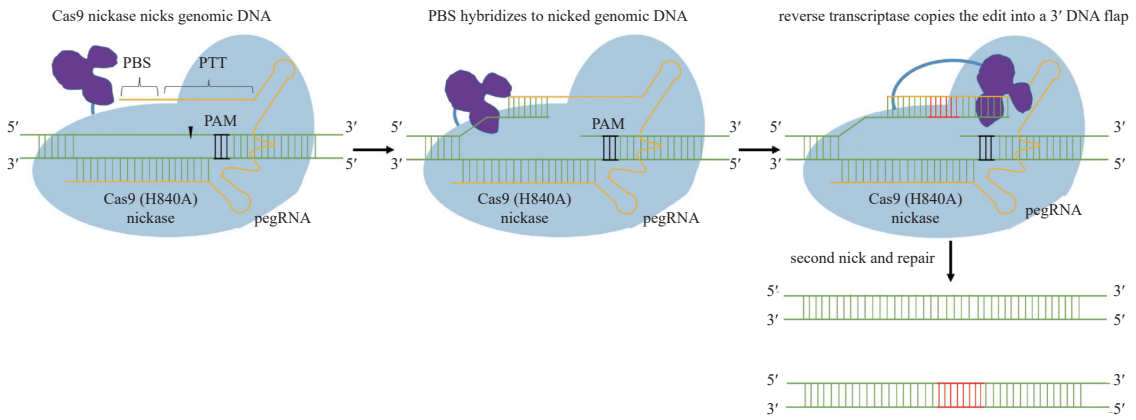


图 4 PE 介导的精准序列替换

Fig. 4 Precise sequence replacement mediated by PE

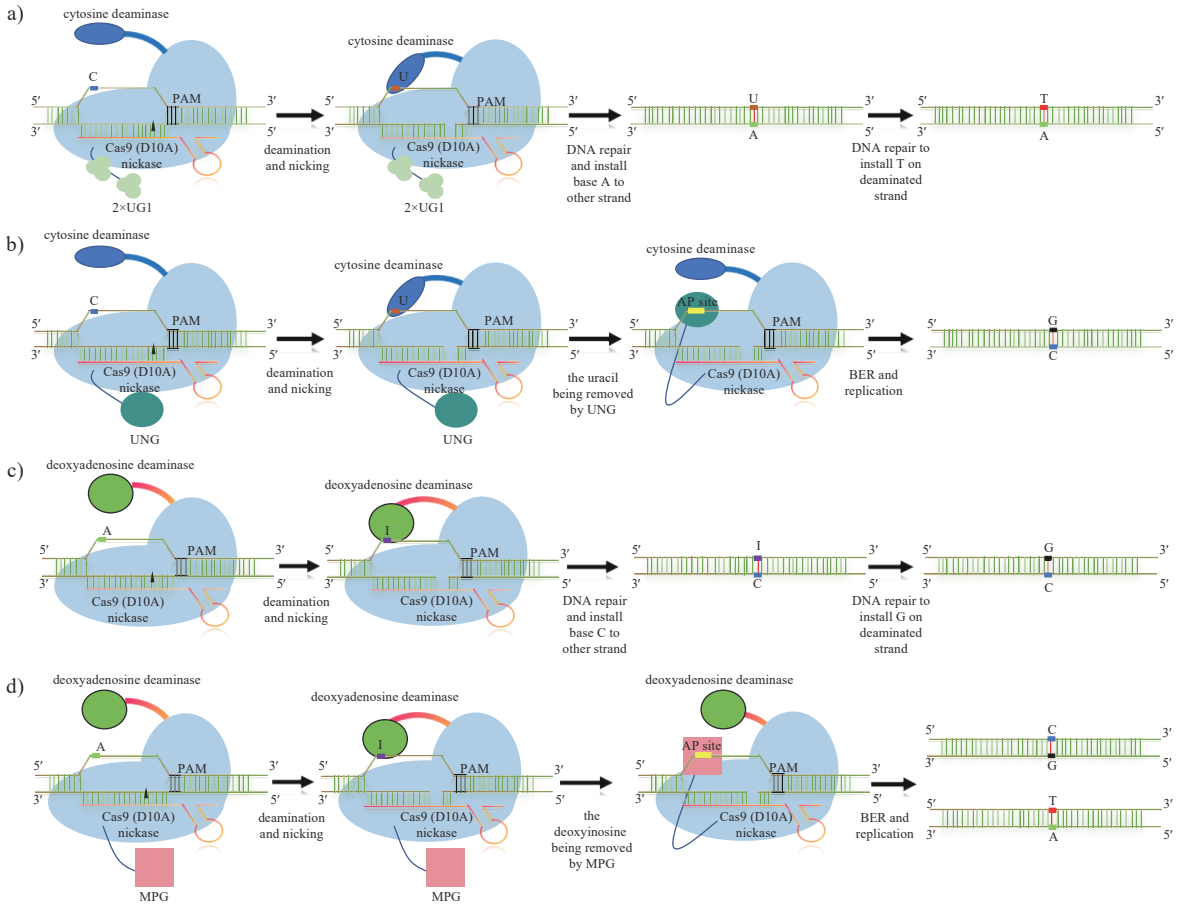
活性的 Cas9 (Cas9 变体 dCas9) 或只能切割 DNA 单链的 Cas9 切口酶 (D10A 或 H840A) 与核苷脱氨酶融合，开发出 BE 技术，包括胞嘧啶 BE、腺嘌呤 BE、糖基化酶 BE 以及腺嘌呤碱基颠换编辑器[77]。

以应用最广泛的 BE3 为例，胞嘧啶 BE 由 Cas9 切口酶 (D10A)、胞苷脱氨酶和尿嘧啶 DNA 糖基化酶抑制剂融合而成，通过 sgRNA 引导结合靶标序列，利用胞苷脱氨酶将脱氧胞苷脱氨转变为脱氧尿苷 (C→U)，糖基化酶抑制剂抑制尿嘧啶 DNA 糖基化酶的脱氧尿苷 (U) 切除功能，Cas9 切口酶 (D10A 或 H840A) 切割非脱氨基单链 (含 G 链)，并利用脱氨基单链 (含 U 链) 作为修复模板修复非脱氨基单链，使其脱氧鸟苷 (G) 变成脱氧腺苷 (A)，最终在 DNA 复制过程中实现脱氧胞苷到脱氧胸苷 (C→U→T) 的转变 (图 5a)[78]。

糖基化酶 BE 是在胞嘧啶 BE 的基础上，去除尿嘧啶 DNA 糖基化抑制剂，融合尿嘧啶 DNA 糖基化酶或其他碱基切除修复途径相关蛋白 (如 XRCC1 蛋白等)，通过 Cas9 切口酶切割 DNA 单链、胞苷脱氨酶脱氨基作用和碱基切除修复途径，诱导脱氧胞苷到脱氧鸟苷 (C→G) 的转变 (图 5b)[79]。

腺嘌呤 BE 中，腺苷脱氨酶与 Cas9 切口酶 (D10A) 融合蛋白由 sgRNA 引导结合靶标序列，腺苷脱氨酶催化脱氧腺苷 (A) 脱氨转化成脱氧肌苷 (I)[77]。由于脱氧肌苷 (I) 与脱氧鸟苷 (G) 分子结构类似，可以与脱氧胞苷 (C) 进行碱基互补，之后与胞嘧啶 BE 一样，利用 nCas9 切割非脱氨单链，并在 DNA 修复和复制的过程中实现脱氧腺苷到脱氧鸟苷 (A→I→G) 的转变 (图 5c)[77]。

腺嘌呤碱基颠换编辑器由 N-甲基嘌呤 DNA 糖基化酶和腺嘌呤 BE 融合而成[80]。腺苷脱氨酶将脱氧腺苷 (A) 脱氨转化成脱氧肌苷 (I)，通过 N-甲基嘌呤 DNA 糖基化酶切除脱氧肌苷的次黄



注：a) 胞嘧啶碱基编辑器；b) 糖基化酶碱基编辑器；c) 腺嘌呤碱基编辑器；d) 腺嘌呤碱基颠换编辑器。

Note: a) cytosine base editor; b) glycosylase base editor; c) adenine base editors; d) adenine transversion base editor.

图 5　BE 介导的精准序列替换

Fig. 5　Precise sequence replacement mediated by BE

嘌呤基团，产生脱嘌呤/脱嘧啶位点，最后利用 Cas9 切口酶切割另一条 DNA 单链，通过碱基切除修复途径实现脱氧腺苷到脱氧胞苷或脱氧胸苷的转变 (A→I→C 或 T)(图 5d)[81]。

2.2.2 BE 的发展及应用

BE 通过多代改造，可针对不同靶标实现不同的编辑结果。KOMOR 等[82]将胞嘧啶脱氨酶与无核酸酶活性的 dCas9 融合，开发了第 1 代胞嘧啶碱基编辑器 BE1，但由于细胞自身碱基切除修复途径的干扰，导致编辑效率极低；于是将尿嘧啶 DNA 糖基化酶与 BE1 融合，开发了效率更高的第 2 代胞嘧啶碱基编辑器 BE2；之后，为了进一步提高效率，通过筛选多种胞苷脱氨酶得到活性最高的大鼠 APOBEC1 脱氨酶，将其融合到 Cas9 切口酶 (D10A) 的氨基末端，构建出最高效的第 3 代胞嘧啶碱基编辑器 BE3 (CBE)，成功恢复人类细胞系基因组中的突变碱基，编辑效率比 BE2 提高了 26 倍。为了精准调控人类淋巴细胞基因的表达，WEBBER 等[83]使用胞嘧啶 BE，在人类细胞系多个基因编码区引入终止密码子 (pmS-TOPs)，提前终止翻译过程，使基因功能失活。KLUESNER 等[84]开发出模块化工具 SpliceR (http://z.umn.edu/spliceR)，可为任何有 Ensembl 注释的基因组序列设计用于 BE 的 gRNA。为减少胞嘧啶 BE 的脱靶现象，JIN 等[85]分别将 7 种人类 APOBEC3 胞苷脱氨酶替换为 BE3 的脱氨酶结构域，筛选出编辑效率最高的胞嘧啶碱基编辑器 A3Bctd-BE3，通过蛋白质理性设计获得 16 种 A3Bctd-BE3 变体；同时在水稻原生质体中建立基于 R-loop 的高通量 BE 特异性评估方法，对 A3Bctd-BE3 变体进行筛选，得到 2 种特异性最高的碱基编辑器——A3Bctd-KKR-BE3 和 A3Bctd-VHM-BE3。

为进一步实现脱氧胞苷到脱氧鸟苷的碱基替换，ZHAO 等[86]首次将尿嘧啶 DNA 糖基化酶替换为胞嘧啶 BE 中的 DNA 糖基化酶抑制剂亚基，构建出 Ung-nCas9-AID 和 APOBEC-nCas9-Ung 两种糖基化酶 BE，整体编辑效率介于 5.3%~53.0% 之间。ZENG 等[80]将高活性胞苷脱氨酶 evoFENRY 和能识别更广泛 PAM (NG) 序列的 Cas9 切口酶 (D10A) 变体 SpGn 融合，将该融合蛋白分别与水稻尿嘧啶 DNA N-糖基化酶 (rUNG) 或人尿嘧啶 DNA N-糖基化酶 (hUNG) 融合，构建出 CGBE-rUNG 和 CGBE-hUNG 两种糖基化酶 BE，在水稻中可分别实现替换效率 5.9% 和 8.2% 的胞嘧啶碱基转换 (C→G)。

为解决自然存在的腺嘌呤脱氨酶 (wtTadA) 不能直接用于转换腺嘌呤[87]这一问题，GAUDELLI 等[78]对多种腺苷脱氨酶进行 7 代定向进化，筛选出效果最佳的大肠杆菌 tRNA 腺苷脱氨酶突变体 (*ecTadA**)，通过与 Cas9 切口酶 (D10A) 融合，开发出在动物和微生物细胞中具有腺嘌呤转换 (A→I→G) 功能的腺嘌呤编辑器 ABE7.10。KANG 等[88]利用 ABE7.10 在拟南芥和油菜原生质体基因组靶标位点实现精准的单碱基替换 (A→T)，替换效率高达 4.1%。HUA 等[89]用 SpCas9 切口酶变体 (VQR-Cas9-D10A、VRER-Cas9-D10A 和 SaKKH-Cas9-D10A) 或 SaCas9 切口酶变体 (SaKKH-Cas9-D10A) 替换腺嘌呤 BE 中的 Cas9 切口酶 (SpCas9-D10A)，构建了多种可更广泛识别 PAM 序列的腺嘌呤 BE (ABE-P2、ABE-P3、ABE-P4 和 ABE-P5)，可在水稻中实现精准的碱基替换。ZENG 等[80]将高活性腺苷脱氨酶 TadA8e 和 Cas9 切口酶变体 SpGn 融合，再分别与大肠杆菌核酸内切酶 V (EndoV) 和人类烷基腺嘌呤 DNA 糖基化酶 (hAAG) 融合，得到腺嘌呤碱基颠换编辑器 ABE8e-EndoV 和 ABE8e-hAAG；但在水稻基因组中，它们均未实现脱氧腺苷到脱氧胞苷或脱氧胸苷的转变 (A→C 或 T)，仅 ABE8e-EndoV 产生可预测的小片段 DNA 缺失。TONG 等[81]通过改造 N-甲基嘌呤 DNA 糖基化酶，并将其与腺嘌呤 BE 融合，开发出腺嘌呤颠换碱基编辑器 AYBEv3，成功将人类细胞系基因组中的脱氧腺苷替换为脱氧胞苷或脱氧胸苷，替换效率高达 72%。

3 展望

虽然多种精准序列替换策略已成功应用于编辑微生物和动植物基因组，但它们各有优势和局限性。

CRISPR-Cas 和不同 DNA 双链断裂修复途径结合实现精准序列替换的策略，需要 Cas 蛋白切割靶标产生 DNA 双链断裂，再根据修复模板同源序列 (可与断裂处末端序列进行碱基互补) 的长度，分别通过同源重组、单链退火和微同源末端连接修复途径进行修复，实现序列替换。在依赖同源重组修复途径的策略中，需要供体修复模板具有较长的同源序列 (>50 bp)，相对其他 2 种策

略，可以实现更精准的序列替换；但在真核生物中，该策略易受到非同源末端连接途径的干扰，导致编辑效率较低[19, 90-92]。依赖单链退火修复途径的策略，修复模板的同源序列需>35 bp，在原核细胞中，利用噬菌体的 λ-Red 系统可实现精准高效的基因敲入和敲除；在植物细胞中，通过结合非同源末端连接途径也可达到同样的效果，但依然会存在一定的脱靶现象[34-36]。依赖微同源末端连接修复途径的策略能很好地应用于真核生物，修复模板中只需要含有 220 bp 的微同源序列，相对于同源重组修复途径介导的序列替换，该技术具有更高的序列替换效率；但是，植物中只有 1 例成功报道，且由于微同源末端连接途径在动物细胞中参与癌细胞的形成，其应用存在安全风险[38]。

相对于 CRISPR-Cas 系统结合不同 DNA 双链断裂修复途径介导的序列替换，位点特异性重组系统可直接利用重组酶切割供体模板和靶标 DNA 双链并促使它们相互交换，实现大片段 DNA (数百或数千个碱基对) 的插入、删除或重排，具有特异性高、操作简单和高效等优点；但该策略容易产生脱靶现象和细胞毒性，且在真核生物中需要提前将识别位点序列整合到基因组中[93]。

相较于上述序列替换策略对 DNA 双链断裂的依赖，PE 和 BE 主要依赖 Cas9 切口酶 (D10A 或 H840A) 切割靶标产生 DNA 单链断裂，实现序列替换。由于 PAM 的限制，导致 BE 在许多靶标中难以实现精准的碱基替换，且部分 BE (GBE 和 AYBE) 过度依赖细胞内源的碱基切除修复途径，从而产生非期望的小片段插入和缺失[77-81]。相对于 BE，PE 受 PAM 的限制较小，可以针对更多的靶标区段进行编辑，实现 DNA 小片段 (0~44 bp) 的精准替换，但难以实现大片段的精准替换[94]。

总之，根据各种序列替换技术策略的优缺点以及不同的研究目的或要求，选择最合适的技术策略可提高实验操作的可行性和编辑效率。此外，针对各种策略的缺陷，可以进行改造和优化，如通过筛选和改造 Cas 蛋白，提高 PAM 的广泛性和降低脱靶率，在真核生物中通过抑制其他 DNA 修复途径，从而提高同源重组和微同源末端连接修复途径的编辑效率；通过蛋白质工程改造和优化逆转录酶和脱氨酶，增加 PE 替换的 DNA 片段长度，扩大 BE 可实现的碱基转化种类。虽然基于 CRISPR-Cas 技术可实现单个靶标精准高效的序列替换，但 Cas 蛋白介导的双链断裂和单链断裂会损伤 DNA，引起细胞死亡，导致难以对全基因组进行多靶点编辑；无核酸酶活性的 Cas 蛋白 (如 dCas9) 虽不会引起细胞死亡，但编辑效率低，且存在脱靶效应。因此，针对全基因组序列，如何同时精准高效地替换多个靶点是现阶段亟待解决的难题。

[参考文献]

[1] ZHANG D Q, ZHANG Z Y, UNVER T, et al. CRISPR/Cas: a powerful tool for gene function study and crop improvement[J]. Journal of Advanced Research, 2021, 29(2): 207. DOI: 10.1016/j.jare.2020.10.003.

[2] 韩冰舟, 张亚鸽, 张博, 等. 基因组靶向敲入技术在模式动物中的发展与应用: 以斑马鱼为例[J]. 生命科学, 2018, 30(9): 967. DOI: 10.13376/j.cbls/2018116.

[3] CICCIA A, ELLEDGE S J. The DNA damage response: making it safe to play with knives[J]. Molecular Cell, 2010, 40(2): 179. DOI: 10.1016/j.molcel.2010.09.019.

[4] OLIVIERI M, CHO T, ÁLVAREZ-QUILÓN A, et al. A genetic map of the response to DNA damage in human cells[J]. Cell, 2020, 182(2): 481. DOI: 10.1016/j.cell.2020.05.040.

[5] MOLLA K A, SRETENOVIC S, BANSAL K C, et al. Precise plant genome editing using base editors and prime editors[J]. Nature Plants, 2021, 7(9): 1166. DOI: 10.1038/s41477-021-00991-1.

[6] NAMBIAR T S, BAUDRIER L, BILLON P, et al. CRISPR-based genome editing through the lens of DNA repair[J]. Molecular Cell, 2022, 82(2): 348. DOI: 10.1016/j.molcel.2021.12.026.

[7] DE VLAMINCK I, VAN LOENHOUT M T, ZWEIFEL L, et al. Mechanism of homology recognition in DNA recombination from dual-molecule experiments[J]. Molecular Cell, 2012, 46(5): 616. DOI: 10.1016/j.molcel.2012.03.029.

[8] SHINAGAWA H, IWASAKI H. Molecular mechanisms of Holliday junction processing in *Escherichia coli*[J]. Advances in Biophysics, 1995, 31(31): 49. DOI: 10.1016/0065-227X(95)99382-Y.

[9] MURPHY K C. Use of bacteriophage λ recombination functions to promote gene replacement in *Escherichia coli*[J]. Journal of Bacteriology, 1998, 180(8): 2063. DOI: 10.1128/JB.180.8.2063-2071.1998.

[10] JIANG W Y, BIKARD D, COX D, et al. CRISPR-assisted editing of bacterial genomes[J]. Nature Biotechnology, 2013, 31(3): 233. DOI: 10.1038/nbt.2508.

[11] WANG Q H, GOLDSTEIN M, ALEXANDER P, et al. Rad17 recruits the MRE11-RAD50-NBS1 complex to regulate the cellular response to DNA double-strand breaks[J]. The EMBO Journal, 2014, 33(8): 862. DOI: 10.1002/embj.201386064.

[12] MLADENOV E, MAGIN S, SONI A, et al. DNA double-strand-break repair in higher eukaryotes and its role in genomic instability and cancer: cell cycle and

proliferation-dependent regulation[J]. Seminars in Cancer Biology, 2016, 37/38(9): 51. DOI: 10.1016/j.semcancer.2016.03.003.

[13] SALSMAN J, DELLAIRE G. Precision genome editing in the CRISPR era[J]. Biochemistry and Cell Biology, 2017, 95(2): 187. DOI: 10.1139/bcb-2016-0137.

[14] 赵华煜, 徐冬一. DNA双链断裂修复途径的选择与调控[J]. 中国科学, 2021, 51(1): 56. DOI: 10.1360/SSV-202.

[15] FILIPPO J S, SUNG P, KLEIN H. Mechanism of eukaryotic homologous recombination[J]. Annual Review of Biochemistry, 2008, 77(1): 229. DOI: 10.1146/annurev.biochem.77.061306.125255.

[16] GRIMME J M, MASAYOSHI H, REBECCA W, et al. Human Rad52 binds and wraps single-stranded DNA and mediates annealing *via* two hRad52-ssDNA complexes[J]. Nucleic Acids Research, 2010, 38(9): 2917. DOI: 10.1093/nar/gkp1249.

[17] AL-MINAWI A Z, NASROLLAH S G, THOMAS H. The ERCC1/XPF endonuclease is required for efficient single-strand annealing and gene conversion in mammalian cells[J]. Nucleic Acids Research, 2007, 36(1): 1. DOI: 10.1093/nar/gkm888.

[18] YEH C D, RICHARDSON C D, CORN J E. Advances in genome editing through control of DNA repair pathways[J]. Nature Cell Biology, 2019, 21(12): 1468. DOI: 10.1038/s41556-019-0425-z.

[19] DURAI S, MANI M, KANDAVELOU K, et al. Zinc finger nucleases: custom-designed molecular scissors for genome engineering of plant and mammalian cells[J]. Nucleic Acids Research, 2005, 33(18): 5978. DOI: 10.1093/nar/gki912.

[20] PORTEUS M H, CARROLL D. Gene targeting using zinc finger nucleases[J]. Nature Biotechnology, 2005, 23(8): 967. DOI: 10.1038/nbt1125.

[21] HOCKEMEYER D, WANG H Y, KIANI S, et al. Genetic engineering of human pluripotent cells using TALE nucleases[J]. Nature Biotechnology, 2011, 29(8): 731. DOI: 10.1038/nbt.1927.

[22] NEKRASOV V, STASKAWICZ B, WEIGEL D, et al. Targeted mutagenesis in the model plant *Nicotiana benthamiana* using Cas9 RNA-guided endonuclease[J]. Nature Biotechnology, 2013, 31(8): 691. DOI: 10.1038/nbt.2655.

[23] CHU V T, WEBER T, WEFERS B, et al. Increasing the efficiency of homology-directed repair for CRISPR-Cas9-induced precise gene editing in mammalian cells[J]. Nature Biotechnology, 2015, 33(5): 543. DOI: 10.1038/nbt.3198.

[24] ASLAN Y, TADJUIDJE E, ZORN A M, et al. High-efficiency non-mosaic CRISPR-mediated knock-in and indel mutation in F0 *Xenopus*[J]. Development, 2017, 144(15): 2852. DOI: 10.1242/dev.152967.

[25] SHAN Q W, WANG Y P, LI J, et al. Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system[J]. Nature Biotechnology, 2013, 31(8): 686. DOI: 10.1038/nbt.2650.

[26] SHI J R, GAO H R, WANG H Y, et al. ARGOS 8 variants generated by CRISPR-Cas9 improve maize grain yield under field drought stress conditions[J]. Plant Biotechnology Journal, 2017, 15(2): 207. DOI: 10.1111/pbi.12603.

[27] LI J F, NORVILLE J E, AACH J, et al. Multiplex and homologous recombination-mediated genome editing in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana* using guide RNA and Cas9[J]. Nature Biotechnology, 2013, 31(8): 688. DOI: 10.1038/nbt.2654.

[28] RIESENBERG S, MARICIC T. Targeting repair pathways with small molecules increases precise genome editing in pluripotent stem cells[J]. Nature Communications, 2018, 9(1): 2164. DOI: 10.1038/s41467-018-04609-7.

[29] GIL-HUMANES J, WANG Y P, LIANG Z, et al. High-efficiency gene targeting in hexaploid wheat using DNA replicons and CRISPR/Cas9[J]. Plant Journal, 2017, 89(6): 1251. DOI: 10.1111/tpj.13446.

[30] EINI O, SCHUMANN N, NIESSEN M, et al. Targeted mutagenesis in plants using Beet curly top virus for efficient delivery of CRISPR/Cas12a components[J]. New Biotechnology, 2022, 67: 1. DOI: 10.1016/j.nbt.2021.12.002.

[31] LI S Y, LI J Y, HE Y B, et al. Precise gene replacement in rice by RNA transcript-templated homologous recombination[J]. Nature Biotechnology, 2019, 37(4): 445. DOI: 10.1038/s41587-019-0065-7.

[32] PYNE M E, MOO-YOUNG M, CHUNG D A, et al. Coupling the CRISPR/Cas9 system with lambda red recombineering enables simplified chromosomal gene replacement in *Escherichia coli*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2015, 81(15): 5103. DOI: 10.1128/AEM.01248-15.

[33] HUANG C Y, GUO L W, WANG J G, et al. Efficient long fragment editing technique enables large-scale and scarless bacterial genome engineering[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2020, 104(18): 7943. DOI: 10.1007/s00253-020-10819-1.

[34] ENDO M, IWAKAMI S, TOKI S. Precision genome editing in plants *via* gene targeting and subsequent break-induced single-strand annealing[J]. Plant Biotechnology Journal, 2021, 19(3): 563. DOI: 10.1111/pbi.13485.

[35] OHTSUKI N, KIZAWA K, MORI A, et al. Precise genome editing in miRNA target site *via* gene targeting and subsequent single-strand-annealing-mediated excision of the marker gene in plants[J]. Frontiers in Genome Editing, 2021, 2: 617713. DOI: 10.3389/fgeed.2020.617713.

[36] LU Y M, TIAN Y F, SHEN R D, et al. Targeted, efficient sequence insertion and replacement in rice[J]. Nature Biotechnology, 2020, 38(12): 1402. DOI: 10.1038/s41587-020-0581-5.

[37] XUE C Y, GREENE E C. DNA repair pathway choices in CRISPR-Cas9-mediated genome editing[J]. Trends in Genetics, 2021, 37(7): 639. DOI: 10.1016/j.tig.2021.02.008.

[38] SEOL J H, SHIM E Y, LEE S E. Microhomology-mediated end joining: good, bad and ugly[J]. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 2018, 809: 81. DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2017.07.002.

[39] CHAYOT R, MONTAGNE B, MAZEL D, et al. An end-joining repair mechanism in *Escherichia coli*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2010,

107(5): 2141. DOI: 10.1073/pnas.0906355107.

[40] CISNEROS-AGUIRRE M, LOPEZCOLORADO F W, TSAI L J, et al. The importance of DNAPKcs for blunt DNA end joining is magnified when XLF is weakened[J]. Nature Communications, 2022, 13(1): 3662. DOI: 10.1038/s41467-022-31365-6.

[41] REUVEN N, ADLER J, BROENNIMANN K, et al. Recruitment of DNA repair MRN complex by intrinsically disordered protein domain fused to Cas9 improves efficiency of CRISPR-mediated genome editing[J]. Biomolecules, 2019, 9(10): 584. DOI: 10.3390/biom9100584.

[42] SAITO S, KUROSAWA A, ADACHI N. Mutations in XRCC4 cause primordial dwarfism without causing immunodeficiency[J]. Journal of Human Genetics, 2016, 61(8): 679. DOI: 10.1038/jhg.2016.46.

[43] TALEEI R, NIKJOO H. Biochemical DSB-repair model for mammalian cells in G1 and early S phases of the cell cycle[J]. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 2013, 756(1/2): 206. DOI: 10.1016/j.mrgentox.2013.06.004.

[44] CANNAVO E, CEJKA P. Sae2 promotes dsDNA endonuclease activity within Mre11-Rad50-Xrs2 to resect DNA breaks[J]. Nature, 2014, 514(7520): 122. DOI: 10.1038/nature13771.

[45] PAULL T T. Making the best of the loose ends: Mre11/Rad50 complexes and Sae2 promote DNA double-strand break resection[J]. DNA Repair, 2010, 9(12): 1283. DOI: 10.1016/j.dnarep.2010.09.015.

[46] AHRABI S, SARKAR S, PFISTER S X, et al. A role for human homologous recombination factors in suppressing microhomology-mediated end joining[J]. Nucleic Acids Research, 2016, 44(12): 5743. DOI: 10.1093/nar/gkw326.

[47] AHMAD A, ROBINSON A R, DUENSING A, et al. ERCC1-XPF endonuclease facilitates DNA double-strand break repair[J]. Molecular and Cellular Biology, 2008, 28(16): 5082. DOI: 10.1128/MCB.00293-08.

[48] LEE K, LEE S E. Saccharomyces cerevisiae Sae2-and Tel1-dependent single-strand DNA formation at DNA break promotes microhomology-mediated end joining[J]. Genetics, 2007, 176(4): 2003. DOI: 10.1534/genetics.107.076539.

[49] MEYER D, FU B X H, HEYER W. DNA polymerases δ and λ cooperate in repairing double-strand breaks by microhomology-mediated end-joining in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2015, 112(50): E6907. DOI: 10.1073/pnas.1507833112.

[50] CHANG H H, PANNUNZIO N R, ADACHI N, et al. Non-homologous DNA end joining and alternative pathways to double-strand break repair[J]. Nature Reviews Molecular Cell biology, 2017, 18(8): 495. DOI: 10.1038/nrm.2017.48.

[51] LIU M J, REHMAN S, TANG X D, et al. Methodologies for improving HDR efficiency[J]. Frontiers in Genetics, 2019, 9: 691. DOI: 10.3389/fgene.2018.00691.

[52] VAN VU T, DOAN D H T, KIM J, et al. CRISPR/Cas-based precision genome editing *via* microhomology-mediated end joining[J]. Plant Biotechnology Journal, 2021, 19(2): 230. DOI: 10.1111/pbi.13490.

[53] HISANO Y, SAKUMA T, NAKADE S, et al. Precise in-frame integration of exogenous DNA mediated by CRISPR/Cas9 system in zebrafish[J]. Scientific Reports, 2015, 5(1): 8841. DOI: 10.1038/srep08841.

[54] SAKUMA T, NAKADE S, SAKANE Y, et al. MMEJ-assisted gene knock-in using TALENs and CRISPR-Cas9 with the PITCh systems[J]. Nature Protocols, 2016, 11(1): 118. DOI: 10.1038/nprot.2015.140.

[55] SAKUMA T, TAKENAGA M, KAWABE Y, et al. Homologous recombination-independent large gene cassette knock-in in CHO cells using TALEN and MMEJ-directed donor plasmids[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2015, 16(10): 23849. DOI: 10.3390/ijms161023849.

[56] KATAYAMA S, SATO K, NAKAZAWA T. *In vivo* and *in vitro* knockout system labelled using fluorescent protein *via* microhomology-mediated end joining[J]. Life Science Alliance, 2020, 3(1): e201900528. DOI: 10.26508/lsa.201900528.

[57] TAN J T, ZHAO Y C, WANG B, et al. Efficient CRISPR/Cas9-based plant genomic fragment deletions by microhomology-mediated end joining[J]. Plant Biotechnology Journal, 2020, 18(11): 2161. DOI: 10.1111/pbi.13390.

[58] 张霖, 赵国屏, 丁晓明. 位点特异性重组系统的机理和应用[J]. 中国科学(生命科学), 2010, 40(12): 1090.

[59] MEINKE G, BOHM A, HAUBER J, et al. Cre recombinase and other tyrosine recombinases[J]. Chemical Reviews, 2016, 116(20): 12785. DOI: 10.1021/acs.chemrev.6b00077.

[60] BROWN W R A, LEE N C O, XU Z Y, et al. Serine recombinases as tools for genome engineering[J]. Methods, 2011, 53(4): 372. DOI: 10.1016/j.ymeth.2010.12.031.

[61] HARTLEY J L, TEMPLE G F, BRASCH M A. DNA cloning using *in vitro* site-specific recombination[J]. Genome Research, 2000, 10(11): 1788. DOI: 10.1101/gr.143000.

[62] OLORUNNIJI F J, ROSSER S J, STARK W M. Site-specific recombinases: molecular machines for the genetic revolution[J]. Biochemical Journal, 2016, 473(6): 673. DOI: 10.1042/BJ20151112.

[63] HU Q, KONONOWICZ-HODGES H, NELSON-VASILCHIK K, et al. FLP recombinase-mediated site-specific recombination in rice[J]. Plant Biotechnology Journal, 2008, 6(2): 176. DOI: 10.1111/j.1467-7652.2007.00310.x.

[64] SREEKALA C, WU L F, GU K, et al. Excision of a selectable marker in transgenic rice (*Oryza sativa* L.) using a chemically regulated Cre/loxP system[J]. Plant Cell Reports, 2005, 24(2): 86. DOI: 10.1007/s00299-004-0909-5.

[65] METZGER D, FEIL R. Engineering the mouse genome by site-specific recombination[J]. Current Opinion in Biotechnology, 1999, 10(5): 470. DOI: 10.1016/s0958-1669(99)00012-9.

[66] SAKURAI K, SHIMOJI M, TAHIMIC C G, et al. Efficient integration of transgenes into a defined locus in human embryonic stem cells[J]. Nucleic Acids Research, 2010, 38(7): e96. DOI: 10.1093/nar/gkp1234.

[67] HOANG T T, KUTCHMA A J, BECHER A, et al. Integ-

ration-proficient plasmids for *Pseudomonas aeruginosa*: site-specific integration and use for engineering of reporter and expression strains[J]. Plasmid, 2000, 43(1): 59. DOI: 10.1006/plas.1999.1441.

[68] DURRANT M G, FANTON A, TYCKO J, et al. Systematic discovery of recombinases for efficient integration of large DNA sequences into the human genome[J]. Nature Biotechnology, 2022, 41(4): 488. DOI: 10.1038/s41587-022-01494-w.

[69] DOUDNA J A, CHARPENTIER E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9[J]. Science, 2014, 346(6213): 1258096. DOI: 10.1126/science.1258096.

[70] 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. DOI: 10.1038/s41586-019-1711-4.

[71] 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. DOI: 10.1038/s41589-021-00889-1.

[72] 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. DOI: 10.1016/j.cell.2021.09.018.

[73] 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. DOI: 10.1038/s41587-021-00868-w.5.

[74] 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. DOI: 10.1038/s41587-022-01254-w.

[75] 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. DOI: 10.1038/s41587-021-01026-y.

[76] LI H Y, ZHU Z W, LI S Y, et al. Multiplex precision gene editing by a surrogate prime editor in rice[J]. Molecular Plant, 2022, 15(7): 4. DOI: 10.1016/j.molp.2022.05.009.

[77] MOLLA K A, YANG Y N. CRISPR/Cas-mediated base editing: technical considerations and practical applications[J]. Trends in Biotechnology, 2019, 37(10): 1121. DOI: 10.1016/j.tibtech.2019.03.008.

[78] 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. DOI: 10.3389/fgene.2018.00021.

[79] 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, 2020, 39(1): 41. DOI: 10.1038/s41587-020-0609-x.

[80] ZENG D C, ZHENG Z Y, LIU Y X, et al. Exploring C-to-G and A-to-Y base editing in rice by using new vector tools[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(14): 7990. DOI: 10.3390/ijms23147990.

[81] TONG H, 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. DOI: 10.1038/s41587-022-01595-6.

[82] 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. DOI: 10.1038/nature17946.

[83] WEBBER B R, LONETREE C, KLUESNER M G, et al. Highly efficient multiplex human T cell engineering without double-strand breaks using Cas9 base editors[J]. Nature Communications, 2019, 10(1): 5222. DOI: 10.1038/s41467-019-13007-6.

[84] KLUESNER M G, LAHR W S, LONETREE C, et al. CRISPR-Cas9 cytidine and adenosine base editing of splice-sites mediates highly-efficient disruption of proteins in primary and immortalized cells[J]. Nature Communications, 2021, 12(1): 2437. DOI: 10.1038/s41467-021-22009-2.

[85] JIN S, FEI H Y, ZHU Z X, et al. Rationally designed APOBEC3B cytosine base editors with improved specificity[J]. Molecular Cell, 2020, 79(5): 728. DOI: 10.1016/j.molcel.2020.07.005.

[86] ZHAO D D, LI J, LI S W, et al. Glycosylase base editors enable C-to-A and C-to-G base changes[J]. Nature Biotechnology, 2021, 39(1): 35. DOI: 10.1038/s41587-020-0592-2.

[87] 刘旭, 仲祉霖, 钟涛. 碱基编辑器的研发及其应用[J]. 中国细胞生物学学报, 2022, 44(12): 2294. DOI: 10.11844/cjcb.2022.12.0008.

[88] KANG B C, YUN J Y, KIM S T, et al. Precision genome engineering through adenine base editing in plants[J]. Nature Plants, 2018, 4(7): 427. DOI: 10.1038/s41477-018-0178-x.

[89] HUA K, TAO X, ZHU J K. Expanding the base editing scope in rice by using Cas9 variants[J]. Plant Biotechnology Journal, 2019, 17(2): 499. DOI: 10.1111/pbi.12993.

[90] CHATTERJEE N, WALKER G C. Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis[J]. Environmental and Molecular Mutagenesis, 2017, 58(5): 235. DOI: 10.1002/em.22087.

[91] PUCHTA H, DUJON B, HOHN B. Two different but related mechanisms are used in plants for the repair of genomic double-strand breaks by homologous recombination[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1996, 93(10): 5055. DOI: 10.1073/pnas.93.10.5055.

[92] MIYAOKA Y, BERMAN J R, COOPER S B, et al. Systematic quantification of HDR and NHEJ reveals effects of locus, nuclease, and cell type on genome-editing[J]. Scientific Reports, 2016, 6(1): 23549. DOI: 10.1038/srep23549.

[93] TIAN X Y, ZHOU B. Strategies for site-specific recombination with high efficiency and precise spatiotemporal resolution[J]. Journal of Biological Chemistry, 2021, 296: 100509. DOI: 10.1016/j.jbc.2021.100509.

[94] 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. DOI: 10.1038/s41592-022-01399-1.

责任编辑：何承刚