

· 热点评 ·

中国科学家发现胞嘧啶单碱基编辑工具存在基因组范围的脱靶

谢卡斌*

华中农业大学, 作物遗传改良国家重点实验室, 武汉 430070

摘要 基于CRISPR-Cas的单碱基编辑工具是近2年基因组编辑技术的重大突破之一, 已经在人类(*Homo sapiens*)细胞和动植物中得到了验证与应用。最近, 中国科学家分析了胞嘧啶编辑器(CBE) BE3和HF1-BE3, 以及腺嘌呤编辑器(ABE)等单碱基编辑工具在水稻(*Oryza sativa*)中的脱靶现象, 发现BE3和HF1-BE3两个CBE在全基因组范围内存在脱靶编辑, 而ABE则没有脱靶现象。这一发现对单碱基编辑工具的应用和进一步改进具有重要意义。

关键词 单碱基编辑, CRISPR, 脱靶

谢卡斌 (2019). 中国科学家发现胞嘧啶单碱基编辑工具存在基因组范围的脱靶. 植物学报 54, 296–299.

基于CRISPR系统的基因组编辑技术是近年来的革命性技术, 现已广泛应用于基础研究、疾病治疗和作物遗传改良等各个方面。与此同时, 对CRISPR的改进和探索也在不断进行。近几年, 多种CRISPR系统(如Cas12a和Cas13)被发掘并改造成基因编辑工具; 此外, 最常用的源自酿脓链球菌(*Streptococcus pyogenes*)的Cas9 (*Streptococcus pyogenes* Cas9, 简称Cas9)蛋白也被定向改造出多个变体, 包括识别不同PAM (protospacer adjacent motif)的Cas9变体和高保真的Cas9 (High-fidelity Cas9, HF-Cas9)等。随着CRISPR技术的日臻完善也出现了许多新型的应用, 尤其是基于CRISPR-Cas的单碱基编辑技术, 能够精确地将生物体内DNA靶位点上的单个碱基进行转换, 为遗传信息的精准编辑提供了一种新的策略。单碱基编辑技术被*Science*杂志选为2017年度的十大科学突破之一(<http://vis.sciencemag.org/breakthrough2017/>)。该技术对生物学基础研究和实际应用都具有重大意义。

目前的单碱基编辑技术依赖简单的生物化学原理, 但通过非常巧妙的设计来实现(图1A): 利用脱氨酶将胞嘧啶(C)或腺嘌呤(A)上的氨基去掉, 分别转换为尿嘧啶(U)或次黄嘌呤(I), 然后在DNA复制或修复时进一步将两者转换为胸腺嘧啶(T)或鸟嘌呤(G), 从

而实现生物体DNA序列的靶向碱基转换。因此, 单碱基编辑技术依赖核苷酸特异的脱氨酶。根据靶向碱基的不同, 单碱基编辑技术可以分为胞嘧啶单碱基编辑(cytosine base editor, CBE)和腺嘌呤单碱基编辑(adenine base editor, ABE)。2016年4月, 哈佛大学的David R. Liu实验室首次成功开发了靶向编辑胞嘧啶的工具BE3 (base editor 3) (图1B), 在生物体内实现了靶位点内C•G碱基对到T•A碱基对的转换。BE3编辑器是将具有切口酶活性的nCas9 (Cas9 nickase)蛋白融合1个来自大鼠(*Rattus norvegicus*)的胞嘧啶脱氨酶(APOBEC1), 此外还包含1个尿嘧啶糖基化酶抑制子(Uracil DNA glycosylase inhibitor, UGI), 用来抑制细胞的DNA修复系统(将U•G复原为C•G的修复)。在sgRNA (single guide RNA)的引导下, 该BE3可在细胞内高效率地将靶DNA编辑窗口序列中的C转换为T (Komor et al., 2016)。此外, 日本神户大学Akihiko Kondo和上海交通大学常兴实验室分别利用来源于七鳃鳗(*Petromyzon marinus*)和经修改的人(*Homo sapiens*)源的激活诱导性胞嘧啶脱氨酶(activation-induced deaminase, AID)开发出类似的CBE工具(Ma et al., 2016; Nishida et al., 2016)。相比CBE编辑工具, ABE编辑工具的开发更具挑战性。目前, 在生物体内尚未发现能够作用于单链DNA的

收稿日期: 2019-01-21; 接受日期: 2019-01-22

* 通讯作者。E-mail: kabinxie@mail.hzau.edu.cn

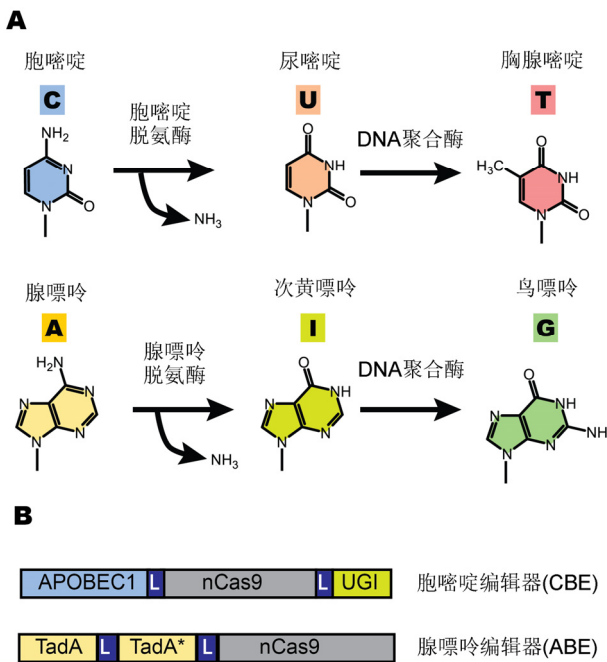


图1 基于CRISPR-Cas9的单碱基编辑

(A) 利用脱氨酶进行DNA碱基转换的原理; (B) 胞嘧啶编辑器(CBE, 以BE3为例)和腺嘌呤编辑器(ABE)的结构示意图。L: 连接肽

Figure 1 CRISPR-Cas9 base editing

(A) Deaminase-mediated base editing reactions; (B) The schematic structure of cytosine (CBE, take BE3 as an example) and adenine (ABE) base editors. L: Peptide linker

腺嘌呤脱氨酶, 因此需要通过遗传工程来创造能作用于DNA的腺嘌呤脱氨酶才能构建ABE编辑器。2017年, David R. Liu实验室进一步通过分子进化技术, 在大肠杆菌(*Escherichia coli*) tRNA脱氨酶(TadA)的基础上改造出能作用于单链DNA底物的腺嘌呤脱氨酶(标记为TadA*), 将TadA和TadA*同时与nCas9融合(图1B), 得到能高效率实现A•T到G•C转换的ABE编辑器(Gaudelli et al., 2017)。

CBE和ABE编辑器的效率很快就在多个动物和植物物种中得到了验证和优化(May, 2017)。在植物中, 多个研究小组均证实CBE单碱基编辑工具(Li et al., 2017; Lu and Zhu, 2017; Shimatani et al., 2017; Zong et al., 2017; Ren et al., 2018)和后来的ABE单碱基编辑工具(Hua et al., 2018; Kang et al., 2018; Li et al., 2018; Yan et al., 2018)能够高效地在sgRNA靶位点对目标碱基进行转换。与动物中的研究结果一

致, 单碱基编辑工具的作用范围会限制在靶位点的一定区域内(“编辑窗口”)。同时, 对单碱基编辑工具的改进也没有停止。例如, 利用高保真的Cas9变体改造BE3 (HF1-BE3)以降低Cas9脱靶的风险, 而利用更高活性的APOBEC3A或AID超活性突变体可以提高CBE编辑工具的效率(Rees and Liu, 2018)。此外, 在全基因组水平检测单碱基编辑工具的脱靶也尤为重要。

最近, 中国科学院遗传与发育生物学研究所高彩霞实验室对ABE和CBE两个单碱基编辑工具进行深入研究, 发现利用APOBEC1和UGI构建的BE3和HF1-BE3两个CBE编辑工具存在全基因组范围不可预测的脱靶现象, 但利用ABE编辑工具则没有检测到脱靶(Jin et al., 2019)。Jin等(2019)在水稻(*Oryza sativa*)中对ABE、BE3和HF1-BE3单碱基编辑器进行了脱靶编辑分析。他们通过60×深度的基因组测序比较了同时转化的愈伤组织再生植株和转化单碱基编辑器的水稻材料, 其中包括装载了gRNA的载体和空载体。除了检测到预期的靶位点编辑之外, 他们还发现转化BE3和HF1-BE3的水稻中SNVs (single nucleotide variants)的频率显著高于对照。进一步分析发现, 这些植株的C>T (G>A)转换突变的数目高于对照。在转化ABE的水稻植株中, 各种类型的SNVs频率与对照相比均无显著差异。以上结果表明, BE3和HF1-BE3这两个CBE胞嘧啶编辑工具存在脱靶现象, 而在ABE系统中则没有可检测到的脱靶现象。此外, 研究表明, BE3和HF1-BE3植株中所检测到C>T脱靶编辑位点的序列与sgRNA的引导序列无相似性, 且不能够通过目前的Cas9脱靶预测软件来预测。作者推断这种全基因组范围的脱靶编辑很可能是所用到的胞嘧啶脱氨酶或者UGI导致的, 而不是Cas9和gRNA脱靶。作者也特别注意到, C>T脱靶碱基转换的分布在染色体间没有显著差异, 但偏向于分布在转录活跃的基因编码区。

Jin等(2019)的研究结果表明, ABE编辑器能够精准实现单碱基编辑, 但BE3和HF1-BE3的胞嘧啶编辑器在全基因组范围都有脱靶编辑, 而脱靶的原因很可能是所用的胞嘧啶脱氨酶或UGI引起基因组随机变异。该研究对单碱基编辑工具的应用和改造具有重要指导意义。值得注意的是, 动物中单碱基编辑工具的脱靶分析也发现了同样的现象(Zuo et al., 2019)。虽

然现在还不确定利用其它胞嘧啶脱氨酶(如AID和APOBEC3A)构建的CBE是否也存在基因组范围的脱靶,但相信很快就会有答案。如何降低或消除胞嘧啶单碱基编辑工具的脱靶,将是基因编辑技术优化的一个重要方向。此外,降低DNA结合活性的胞嘧啶脱氨酶变体(Kim et al., 2017),可能为降低全基因组范围脱靶提供新的解决思路。

参考文献

- Gaudelli NM, Komor AC, Rees HA, Packer MS, Badran AH, Bryson DI, Liu DR (2017). Programmable base editing of A·T to G·C in genomic DNA without DNA cleavage. *Nature* **551**, 464–471.
- Hua K, Tao X, Yuan F, Wang D, Zhu JK (2018). Precise A·T to G·C base editing in the rice genome. *Mol Plant* **11**, 627–630.
- Jin S, Zong Y, Gao Q, Zhu Z, Wang Y, Qin P, Liang C, Wang D, Qiu J, Zhang F, Gao C (2019). Cytosine, but not adenine, base editors induce genome-wide off-target mutations in rice. *Science* **364**, 292–295.
- Kang BC, Yun JY, Kim ST, Shin Y, Ryu J, Choi M, Woo JW, Kim JS (2018). Precision genome engineering through adenine base editing in plants. *Nat Plants* **4**, 427–431.
- Kim YB, Komor AC, Levy JM, Packer MS, Zhao KT, Liu DR (2017). Increasing the genome-targeting scope and precision of base editing with engineered Cas9-cytidine deaminase fusions. *Nat Biotechnol* **35**, 371–376.
- Komor AC, Kim YB, Packer MS, Zuris JA, Liu DR (2016). Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature* **533**, 420–424.
- Li C, Zong Y, Wang Y, Jin S, Zhang D, Song Q, Zhang R, Gao C (2018). Expanded base editing in rice and wheat using a Cas9-adenosine deaminase fusion. *Genome Biol* **19**, 59.
- Li J, Sun Y, Du J, Zhao Y, Xia L (2017). Generation of targeted point mutations in rice by a modified CRISPR/Cas9 system. *Mol Plant* **10**, 526–529.
- Lu Y, Zhu JK (2017). Precise editing of a target base in the rice genome using a modified CRISPR/Cas9 system. *Mol Plant* **10**, 523–525.
- Ma Y, Zhang J, Yin W, Zhang Z, Song Y, Chang X (2016). Targeted AID-mediated mutagenesis (TAM) enables efficient genomic diversification in mammalian cells. *Nat Methods* **13**, 1029–1035.
- May A (2017). Base editing on the rise. *Nat Biotechnol* **35**, 428–429.
- Nishida K, Arazoe T, Yachie N, Banno S, Kakimoto M, Tabata M, Mochizuki M, Miyabe A, Araki M, Hara KY, Shimatani Z, Kondo A (2016). Targeted nucleotide editing using hybrid prokaryotic and vertebrate adaptive immune systems. *Science* **353**, aaf8729.
- Rees HA, Liu DR (2018). Base editing: precision chemistry on the genome and transcriptome of living cells. *Nat Rev Genet* **19**, 770–788.
- Ren B, Yan F, Kuang Y, Li N, Zhang D, Zhou X, Lin H, Zhou H (2018). Improved base editor for efficiently inducing genetic variations in rice with CRISPR/Cas9-guided hyperactive hAID mutant. *Mol Plant* **11**, 623–626.
- Shimatani Z, Kashojiya S, Takayama M, Terada R, Arazoe T, Ishii H, Teramura H, Yamamoto T, Komatsu H, Miura K, Ezura H, Nishida K, Ariizumi T, Kondo A (2017). Targeted base editing in rice and tomato using a CRISPR-Cas9 cytidine deaminase fusion. *Nat Biotechnol* **35**, 441–443.
- Yan F, Kuang Y, Ren B, Wang J, Zhang D, Lin H, Yang B, Zhou X, Zhou H (2018). Highly efficient A·T to G·C base editing by Cas9n-guided tRNA adenosine deaminase in rice. *Mol Plant* **11**, 631–634.
- Zong Y, Wang Y, Li C, Zhang R, Chen K, Ran Y, Qiu JL, Wang D, Gao C (2017). Precise base editing in rice, wheat and maize with a Cas9-cytidine deaminase fusion. *Nat Biotechnol* **35**, 438–440.
- Zuo E, Sun Y, Wei W, Yuan T, Ying W, Sun H, Yuan L, Steinmetz LM, Li Y, Yang H (2019). Cytosine base editor generates substantial off-target single-nucleotide variants in mouse embryos. *Science* **364**, 289–292.

Chinese Scientists Reveal Genome-wide Off-targeted Editing of Cytosine Base Editor

Kabin Xie*

National Key Laboratory of Crop Genetic Improvement, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Abstract Targeted base editing with CRISPR-Cas systems is a breakthrough in genome editing technologies and is widely used in studies of humans, animals and plants. Recently, Chinese scientists discovered that the cytosine base editor (CBE) including BE3 and HF1-BE3 but not the adenine base editor (ABE) has substantial promise for genome-wide off-targeted editing in rice. This discovery is of great significance to the application and further optimization of targeted base editing.

Key words base editing, CRISPR, off-targeting

Xie KB (2019). Chinese scientists reveal genome-wide off-targeted editing of cytosine base editor. *Chin Bull Bot* **54**, 296–299.

* Author for correspondence. E-mail: kabinxie@mail.hzau.edu.cn

(责任编辑: 朱亚娜)