



猪 *VIM* 基因的引导编辑与效率优化

李 韬^{1,2}, 艾新洁^{1,2}, 倪梦茹^{1,2}, 吴望军^{1,2}, 李平华^{1,2}, 侯黎明^{1,2*}, 黄瑞华^{1,2*}

(1. 南京农业大学养猪研究所/农业农村部畜禽资源(猪)评价利用重点实验室(南京), 南京 210095;

2. 南京农业大学淮安研究院, 淮安 223005)

摘要: 旨在建立高效的猪细胞基因编辑技术体系, 为引导编辑(prime editing, PE)系统在猪遗传育种上的应用奠定基础。本研究从 *VIM* 基因编码区选取多个候选位点, 严格遵循 CRISPR/Cas9 系统的靶位点设计原则, 进行 sgRNA 设计。通过生物信息学工具对候选 sgRNA 进行评分, 筛选出评分最高的两条 sgRNA 序列, 以上述优选的两条 sgRNA 为基础, 进一步设计对应的 pegRNA。利用药物 hydroxyurea 和 nocodazole 处理细胞使其停留在 G1/S 或 G2/M 时期, 并将 nCas9-RT 融合蛋白编辑器载体和 pegRNA 表达载体电转染进细胞, 48 h 后提取混合细胞基因组 DNA, PCR 扩增靶位点后进行二代测序, 利用 CRISPResso2 分析编辑结果。结果表明, PE2 系统在 PK15 细胞中的编辑效率为 0.16%~14.03%。在 IPEC-J2 细胞中的编辑效率为 0.08%~0.58%。PEmax 系统在 PK15 细胞上的编辑效率为 0.63%~23.25%。而 PE4 和 PE4max 系统在 PK15 细胞中的编辑效果较差, 编辑效率最高分别为 0.7% 和 0.36%。调控细胞周期可以提升 PE2 系统对猪 *VIM* 基因单碱基替换和单碱基缺失两者编辑类型的编辑效率, 前者编辑效率提升了 1.4 倍, 后者编辑效率提升了 2.6 倍。结果显示, PE 技术能够对猪 *VIM* 基因进行多种不同类型的精确编辑且通过细胞周期调控能够提升其编辑效率。可以为下一步结合体细胞克隆技术制备生产性能改良较高的猪群体提供技术参考。

关键词: 猪; CRISPR/Cas9 技术; PE 技术; *VIM* 基因

中图分类号: S828.2

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2026)02-0677-14

Prime Editing and Efficiency Optimization of Pig *VIM* Gene

LI Tao^{1,2}, AI Xinjie^{1,2}, NI Mengru^{1,2}, WU Wangjun^{1,2}, LI Pinghua^{1,2}, HOU Liming^{1,2*},

HUANG Ruihua^{1,2*}

(1. Key Laboratory of Evaluation and Utilization of Livestock and Poultry Resources (PIG) of Ministry of Agriculture and Rural Affairs (Nanjing), Institute of Swine Science, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2. Huai'an Academy, Nanjing Agricultural University, Huai'an 223005, China)

Abstract: The purpose of this study was to establish an efficient pig cell gene editing technology system and lay a foundation for the application of PE system in pig genetics and breeding. Multiple candidate sites were selected from the coding region of *VIM* gene, and sgRNA was designed strictly according to the target site design principle of CRISPR/Cas9 system. The candidate sgRNAs were scored by bioinformatics tools, and the two sgRNA sequences with the highest scores were screened out. Based on the above two sgRNAs, the corresponding pegRNAs were further designed. The cells

收稿日期: 2025-07-07

基金项目: 江苏省种业振兴揭榜挂帅项目(JBGS[2021]026; JBGS[2021]024); 江苏省农业科技自主创新资金项目(CX(20)1003); 生猪数智育种与疾病防控学科突破先导项目

作者简介: 李 韬, 硕士生, 主要从事动物分子育种与基因编辑研究, E-mail: litao19962441@126.com

* 通信作者: 黄瑞华, 主要从事猪健康生产学与遗传育种研究, E-mail: rhhuang@njau.edu.cn; 侯黎明, 主要从事动物遗传育种与繁殖研究, E-mail: liminghou@njau.cn

were treated with drugs hydroxyurea and nocodazole to stay in the G1/S or G2/M phase, and the nCas9-RT fusion protein editor vector and pegRNA expression vector were electro-transfected into the cells. After 48 h, the genomic DNA of the mixed cells was extracted, the target sites were amplified by PCR, and the next-generation sequencing was performed. CRISPResso2 was used to analyze the editing results. The results showed that the editing efficiency of PE2 system in PK15 cells was between 0.16% and 14.03%. The editing efficiency in IPEC-J2 cells was between 0.08% and 0.58%. The editing efficiency of PEmax system in PK15 cells was between 0.63% and 23.25%. However, the editing efficiency of PE4 and PE4max systems in PK15 cells was poor, with the highest editing efficiency of 0.7% and 0.36%, respectively. Regulating the cell cycle could improve the editing efficiency of the PE2 system for the editing types of single base substitution and single base deletion of porcine *VIM* gene. The editing efficiency of the former had increased by 1.4 times, and the editing efficiency of the latter had increased by 2.6 times. According to the results, PE technology can perform a variety of different types of precise editing of pig *VIM* gene and improve its editing efficiency through cell cycle regulation. It provides a technical reference for the next step to combine somatic cell cloning technology to prepare pig populations with improved production performance.

Keywords: pigs; CRISPR/Cas9 technology; PE technology; *VIM* gene

* **Corresponding authors:** HUANG Ruihua, E-mail: rhhuang@njau.edu.cn; HOU Liming, E-mail: liminghou@njau.cn

波形蛋白(vimentin, VIM)是一种中间丝蛋白,该蛋白广泛存在于多种生物的组织细胞中。Ivaska等^[1]通过比对发现,VIM蛋白在人、鼠、鸡等物种中表现出高度的同源性。VIM蛋白具有重要的生理功能,Strouhalova等^[2-3]通过研究发现,VIM蛋白在上皮-间充质转化(EMT)过程中起到关键作用,说明其对正常生理活动起到重要作用。此外,VIM蛋白是多种病原体的受体,Kim等^[4]研究表明,VIM蛋白是PRRSV的受体之一,在该病毒感染过程中发挥作用。因此,基于基因编辑技术对VIM基因进行靶向修饰,为深入探究该基因的生物学功能及其分子调控机制提供了有效的研究手段。在猪细胞系上建立VIM基因编辑技术体系,不仅为培育具有抗病性状的基因编辑猪模型奠定了技术基础,同时也为现代分子育种提供了新的技术路径。

CRISPR/Cas9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated protein 9)是一种由向导RNA(gRNA)介导的基因组编辑技术。该系统最初由Ishino等^[5]在大肠杆菌基因组中发现,其特征为规律间隔的短回文重复序列。后续研究表明,当CRISPR位点整合特定病毒DNA序列时,细菌可获得对该病毒的特异性免疫能力,这揭示了CRISPR系统作为原核生物适应性免疫机制的重要功能^[6-7]。2012年,Jinek研究团队^[8]首次实现了

CRISPR/Cas9系统在植物细胞中的靶向基因组编辑。随后,Cong等^[9]成功将该技术拓展至哺乳动物细胞体系。与传统基因编辑技术相比,CRISPR/Cas9系统通过设计特异性gRNA即可实现DNA靶向识别,无需构建复杂的核酸酶蛋白骨架,这显著提高了试验设计的便捷性和效率^[10]。近年来,研究者通过蛋白质工程技术对Cas9核酸酶持续进行优化。Dominguez等^[11]开发的核酸酶失活型Cas9(dCas9)为CRISPR干扰技术(CRISPR interference,CRISPRi)奠定了基础。在此基础上,Tanenbaum团队^[12-13]进一步开发出CRISPR激活系统(CRISPR activation,CRISPRa),实现了对基因表达的正向调控。CRISPR/Cas9系统的一个显著优势在于其靶向位点选择的灵活性较高。该系统能够识别并结合DNA链上任意含有PAM(原间隔序列邻近基序)的23碱基序列^[8,14]。以化脓链球菌Cas9(SpCas9)为例,其典型PAM序列在基因组中平均每8个碱基对就会出现一次^[15],进一步提高了该系统的可及性和适用范围。

尽管CRISPR/Cas9技术已趋于成熟,但其应用仍存在若干技术瓶颈:1)脱靶效应导致的非特异性编辑;2)HDR机制所介导的基因编辑效率低于NHEJ机制^[16];3)同源定向修复(homology directed repair,HDR)效率低下等,这些问题亟待解决。

2019 年,引导编辑(prime editing, PE)技术问世,该系统由 3 部分组成:pegRNA (prime editing guide RNA)、逆转录酶(reverse transcriptase, RT)、nCas9 蛋白(H840A)^[17]。该系统利用逆转录反应而不是 DNA 修复机制来完成对目的序列的修改。不同于 CRISPR/Cas9 技术的双链切割,在 pegRNA 识别并结合目的位点后,nCas9 对 DNA 进行单链切割,之后逆转录酶以 RT 序列为模板对 DNA 序列进行修改,从而实现了基因编辑的目的^[18-19]。PE 系统不需要对 DNA 双链进行切割,降低了对 DNA 的损伤,利用 nCas9 即可完成插入缺失等多种类型的基因编辑,并且大大降低了脱靶现象的产生^[20]。自 PE 系统问世以来,PE 系统不断被优化更新。Anzalone 等^[21]筛选了 M-MLV RTase 的 14 种突变体,通过对逆转录酶的 D200N/L603W 等位点进行突变,构建了 PE2 系统。与 PE1 相比,PE2 的编辑效率得到显著提升,且 indels 率下降^[21]。在 PE2 的基础上,Anzalone 等^[21]又额外转染了一条作用于非编辑链的 sgRNA(nicking sgRNA),利用同源性错配修复机制来保留编辑后的 DNA 单链即编辑链,从而进一步提高了 PE 系统的编辑效率。2021 年,Chen 等^[22]开发出 PE4 和 PE5 引导编辑系统,分别为 PE2 和 PE3 系统的优化版,相对于后两者,PE4 和 PE5 系统会短暂表达一种工程设计的蛋白 MLH1dn,该蛋白对于 DNA 错配修复(MMR)有一定抑制作用。该研究团队还通过对 PE2 系统的 RT 及 Cas9 蛋白进行系统性密码子优化,显著提升了其在哺乳动物细胞中的表达效率。研究人员对 SpCas9 蛋白实施了 R221K 及 N394K 位点突变,并在其 C 末端融合了包含双核定位信号(nuclear localization signals, NLS)的连接肽序列,由此成功开发出 PEMax 系统^[22]。在此基础上,团队进一步对 PE4 系统开展密码子优化工程,最终获得了具有更高编辑效率的 PE4max 变体^[22]。2023 年,Doman 等^[23]开发出噬菌体辅助的连续进化选择(PACE),以此为基础结合蛋白质工程技术开发出了 PE6 系统(包含 a-g6 种突变体)。该系统使得 RT 的结构更紧凑,不仅提升了引导编辑系统的编辑效率,还使其更容易在细胞中递送。2024 年,Yan 等^[24]发现一种细胞因子,小 RNA 结合外切核酸酶保护因子(La)。该团队研究发现,La 能够与 pegRNA 3' 端相互作用从而提升 PE 系统编辑效率,并以此开发出 PE7 系统。Schene 等^[25]研究表明,转染细胞的细胞周

期对 PE 系统的编辑效率有一定影响,Li 等^[26]将 PE 系统组件以核糖核蛋白形式递送(ribonucleoprotein, RNP),实现了高效率的编辑,均为 PE 系统的优化提供了新思路。该技术目前已成功用于多个物种例如人、鼠、兔和植物等不同编辑类型的定点编辑,包括碱基的任意替换、插入、缺失以及基因片段的插入缺失等。引导编辑技术在猪、牛、羊等大型家畜中的研究与应用仍相对有限。刘尧^[27]通过应用增强型引导编辑器(enhanced prime editor, ePE),在绵羊胎儿成纤维细胞中成功实现了精准的点突变编辑,为该技术在大型动物遗传修饰领域的应用提供了重要实证依据。

猪肉是我国最主要的肉食来源之一,利用先进的现代育种技术对于保护我国优良地方品种,提高畜禽质量和性能,提高养殖业生产效率和经济效益至关重要。基因编辑技术作为新型育种技术,可以避免传统育种的缺陷。CD163 是 PRRSV 进入猪巨噬细胞的必需受体,与 PRRS 感染密切相关^[28]。2014 年,Whitworth 等^[28]利用 CRISPR/Cas9 技术敲除了猪 CD163 基因,CD163 敲除猪对猪蓝耳病的耐受性大幅提升,未表现出任何明显症状。肌肉生长抑制素(myostatin, MSTN),由 MSTN 基因调控表达。研究表明,该蛋白能够抑制肌肉细胞增殖,对肌肉生长具有负调控功能^[29]。2015 年,Wang 等^[30]利用 CRISPR/Cas9 技术同样对猪胎儿成纤维细胞进行编辑,获得敲除 MSTN 基因的猪胎儿成纤维细胞,再利用体细胞核移植技术成功获得了 MSTN 基因敲除猪,该团队研究发现,MSTN 基因敲除仔猪的出生重比未编辑仔猪高了 15%。胰岛素生长因子 2(insulin-like growth factor-2, IGF2)对肌肉发育具有重要调节作用,IGF2 的表达量增加能够促进肌肉生长发育^[31]。2018 年,Xiang 等^[32]通过 CRISPR/Cas9 技术对该基因位点进行突变,获得了 IGF2 基因突变猪,与野生型猪相比,其生产性能显著提升。然而,PE 编辑系统在猪上的成功应用鲜有报道。因此本研究拟利用引导编辑技术,在细胞水平对猪 VIM 基因进行定点编辑,系统评估其编辑效率。通过平行对比试验,系统评估 PE2、PEmax、PE4、PE4max 等编辑系统,以确定最适合猪细胞系的引导编辑系统。最后通过药物处理将细胞停留在分裂间期(G1/S 期)或分裂期(M 期),从而探寻细胞周期对 PE 系统编辑效率的影响,以期在猪细胞系上寻求更高的编辑效率。为 PE 编辑系统在猪遗传

育种上的应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 细胞与载体

PK15细胞购买自武汉普诺赛公司;IPEC-J2细胞购买自广州赛业生物科技有限公司;pCMV-PE2(Addgene#132775)和pGL3-U6-sgRNA-PGK-puromycin(Addgene#51133),pCMV-PEmax(Addgene#174820),PE2-P2A-MLH1dn(PE4,Addgene#174827),pCMV-PEmax-P2A-hMLH1dn(PE4max,Addgene#174828)均购自Addgene。

1.2 主要试剂

血液/细胞/组织DNA提取试剂盒(D3018-03)购自南京京浩生物科技有限公司;无内毒素质粒小量提取试剂盒(19021ES70)购自翌圣生物科技(上海)股份有限公司;FastPure Gel DNA Extraction Mini Kit胶回收试剂盒(DC301-01)和高保真酶2×Phanta Flash Master Mix(Dye Plus)(P520-02)均购

自南京诺唯赞生物科技有限公司;EdU-488细胞增殖检测试剂盒(C0078S)购自上海碧云天生物技术股份有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 引物设计与合成 对提取的细胞DNA利用高保真酶2×Phanta Flash Master Mix(Dye Plus)进行PCR扩增,本试验采用单端barcode引物进行PCR扩增,共设计12条barcode引物,c.251G位点引物扩增片段大小为202 bp(1-F1/R)和145 bp(1-F2/R),c.518T位点引物扩增片段大小为256 bp(2-F/R)。所设计引物序列见表1,引物F1和F2所用下游引物相同,barcode序列见表2,引物由南京擎科基因合成部合成。PCR反应体系:2×Phanta Flash Master Mix(Dye Plus)25 μL,上、下游引物各2 μL,DNA模板1 μL,加无菌无酶的ddH₂O至50 μL。PCR扩增程序:98℃预变性30 s;98℃变性10 s,55℃退火5 s,72℃延伸1 s,循环35次;72℃延伸60 s。

表1 目的位点PCR扩增引物序列

Table1 Target site PCR amplification primer sequences

引物 Primer	序列(5'→3') Sequence	片段长度/bp Products length
VIM-pegRNA1-F1	AGCCTCTACACCTCGTC	202
VIM-pegRNA1-F2	TGTACGCCACGCGCTCCT	145
VIM-pegRNA1-R	TGCAGCTCCACCTTCTCGTT	
VIM-pegRNA2-F	TGGAGCAGCAGAACAAGAT	256
VIM-pegRNA2-R	GGCGTGTTAGCTTCGGTTC	

表2 PCR扩增引物barcode序列

Table 2 PCR amplification primer barcode sequences

名称 Name	序列(5'→3') Sequence	名称 Name	序列(5'→3') Sequence	名称 Name	序列(5'→3') Sequence
barcode1	ATCACG	barcode5	ACAGTG	barcode9	GATCAG
barcode2	CGATGT	barcode6	GCCAAT	barcode10	TAGCTT
barcode3	TTAGGC	barcode7	CAGATC	barcode11	GGCTAC
barcode4	TGACCA	barcode8	ACTTGA	barcode12	CTTGTA

1.3.2 VIM基因pegRNA的设计 利用NCBI数据库查询猪VIM基因(NCBI ID: NC_010452.4)转录本序列并下载。从VIM基因编码区选择多个位点,依据CRISPR/Cas9的靶位点设计原则,使用sgRNA设计网站(<https://zlab.bio/guide-design-resources>)设计sgRNA,从中挑选评分最高的两条,命名为VIM-sgRNA1和VIM-sgRNA2,并以此为基础进行pegRNA的设计。

本试验所用pegRNA均使用pegFinder: pegRNA designer for Prime Editing网站进行设计(<http://pegfinder.sidichenlab.org/>),输入VIM基因原始序列和拟编辑的目的序列。根据编辑类型和编辑位点的不同,设计了单碱基插入/缺失/突变和小片段插入/缺失(6 bp)总计5种编辑类型,共10条pegRNA序列。将以VIM-sgRNA1为基础设计的pegRNA命名为VIM-pegRNA1。同理,以

VIM-sgRNA2为基础设计的 pegRNA 命名为 VIM-pegRNA2。5 种编辑类型和 pegRNA 序列可扫描 OSID 码查看。

1.3.3 VIM 基因 pegRNA 载体的构建 所有 pegRNA 序列和 VIM-pegRNA 表达载体均由杭州金唯智公司合成。

1.3.4 PK15 细胞与 IPEC-J2 细胞的培养与转染

PK15 细胞和 IPEC-J2 细胞复苏后均接种至含 10% 胎牛血清、1% 青霉素-链霉素双抗的培养基中,置于 37℃,5%CO₂培养箱中培养,当细胞密度达到 70% 以上进行电转。PE 系统相对于传统的 CRISPR/Cas9 需要将 pegRNA 表达载体和 nCas9-RT 融合蛋白编辑器载体共转染进细胞才能发挥编辑功能。试验转染质粒比例为 Cas9 编辑器:pegRNA 为 2:1,质量为 Cas9 编辑器载体 600 ng (12 孔板),pegRNA 载体 300 ng (12 孔板),每组 3 个重复。

1.3.5 细胞周期调控 PK15 细胞 hydroxyurea 药物处理浓度 350 $\mu\text{m}\cdot\text{mL}^{-1}$,处理时间 9 h; nocodazole 药物处理浓度为 60 ng $\cdot\text{mL}^{-1}$,处理时间 8 h。hydroxyurea 处理后的 PK15 细胞通过 EdU 检测,方法参考 EdU-488 细胞增殖检测试剂盒说明书。nocodazole 药物处理后的 PK15 细胞通过免疫荧光检测,所用一抗为磷酸化组蛋白 H3(Ser28)兔多克隆抗体,稀释比例为 1:100。所用二抗为 Cy3 标记山羊抗兔 IgG,稀释比例为 1:1 000。

1.3.6 VIM 基因编辑效率检测 转染 48 h 后收取各组细胞,利用血液/细胞/组织 DNA 提取试剂盒进行细胞 DNA 的提取并以其为模板进行扩增。PCR 反应体系与程序同“1.3.1”。利用琼脂糖凝胶电泳确认是否扩增出目的条带,所制作凝胶浓度为 3%,电泳参数为 120 V,400 mA,30 min。确认扩增片段大小符合后,PCR 扩增产物由 FastPure Gel DNA Extraction Mini Kit 试剂盒进行胶回收,胶回收产物由北京诺禾致源进行二代测序。

1.3.7 二代测序数据分析 公司返回数据为 fastq 格式压缩文件,通过 MD5 值对文件进行校验^[33]。校验后的文件利用 fastq-multx 通过 barcode 序列对数据进行拆分^[34],拆分后的文件利用 CRISPResso2 进行分析^[35]。通过与原序列比对,判断是否产生目的定点编辑(intended edits)和非目的编辑(indels),并利用 GraphPad Prism 8 计算编辑效率, t 检验用于分析两组之间的统计学意义。结果以

“平均值 $\pm$ 标准差”表示。

2 结 果

2.1 PE2 对 PK15 和 IPEC-J2 细胞的编辑效率

VIM 基因编辑位点如图 1 所示。细胞汇合度达到 70% 后进行电转染,48 h 后收集转染细胞 DNA。测序结果通过与原序列比对来判断是否产生编辑,图 2A 和 2B 为 PE2 编辑系统对 PK15 细胞的 VIM 基因的两个位点编辑效果。如图所示,对于 pegRNA1 编辑位点(c. 251G),单碱基插入/替换以及小片段缺失 3 种编辑类型编辑效率极低(其中单碱基插入编辑效率 0.44% $\pm$ 0.02%,单碱基替换编辑效率 0.49% $\pm$ 0.08%,小片段缺失编辑效率 0.51% $\pm$ 0.12%);单碱基缺失编辑效率较低(1.88% $\pm$ 0.94%);小片段插入类型没有编辑成功,但 indels 率较高(2.98% $\pm$ 0.65%)。同样,单碱基缺失和小片段缺失两种编辑类型的 indels 率也较高,分别为 1.37% $\pm$ 0.34% 和 1.42% $\pm$ 0.15%。对于 pegRNA2 作用位点(c. 518T),单碱基插入编辑类型效率较高(14.03% $\pm$ 0.9%);单碱基替换效率较低(2.38% $\pm$ 0.18%);单碱基缺失和小片段缺失效率极低(0.92% $\pm$ 0.38% 和 0.16% $\pm$ 0.07%);小片段插入类型未编辑成功。

如图 2C 所示,PE2 对同一编辑位点(c. 251G)表现出了较为不同的编辑结果,这可能是不同的细胞类型导致。小片段插入类型编辑未成功,其余编辑效率均极低(单碱基插入效率 0.58% $\pm$ 0.08%,单碱基替换 0.08% $\pm$ 0.01%,单碱基缺失 0.49% $\pm$ 0.27%,小片段缺失 0.34% $\pm$ 0.21%)。此外,PE2 编辑系统在 IPEC-J2 细胞上对小片段插入/缺失两种编辑类型 indels 率也较低,分别为 0.23% $\pm$ 0.2% 和 0.28% $\pm$ 0.2%。

2.2 PEmax 对 PK15 细胞的编辑效率

由于 PE 系统在不同猪细胞系上表现差异较大,后续选择编辑效果较好的 PK15 细胞进行试验。结果如图 3A 所示,在 pegRNA1 作用位点(c. 251G),相对于 PE2 系统,PEmax 在单碱基插入和小片段缺失两种编辑类型表现出更高的编辑效率(前者 4.48% $\pm$ 0.46%,后者编辑效率 23.25% $\pm$ 5.52%),且差异极显著。在单碱基替换编辑类型,PEmax 的编辑效率(0.63% $\pm$ 0.06%)显著高于 PE2(0.49% $\pm$ 0.08%)。对于单碱基缺失,两者编辑效率近似(PE2 效率 1.88% $\pm$ 0.94%,PEmax 效率 2.01% $\pm$

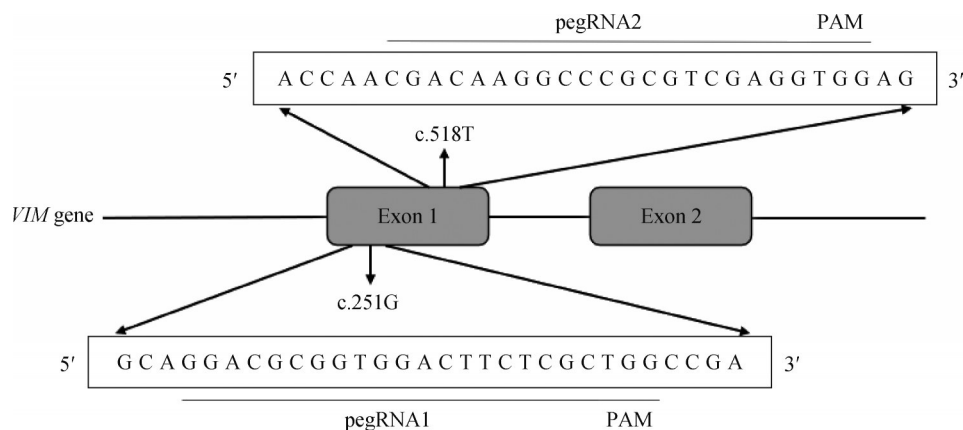
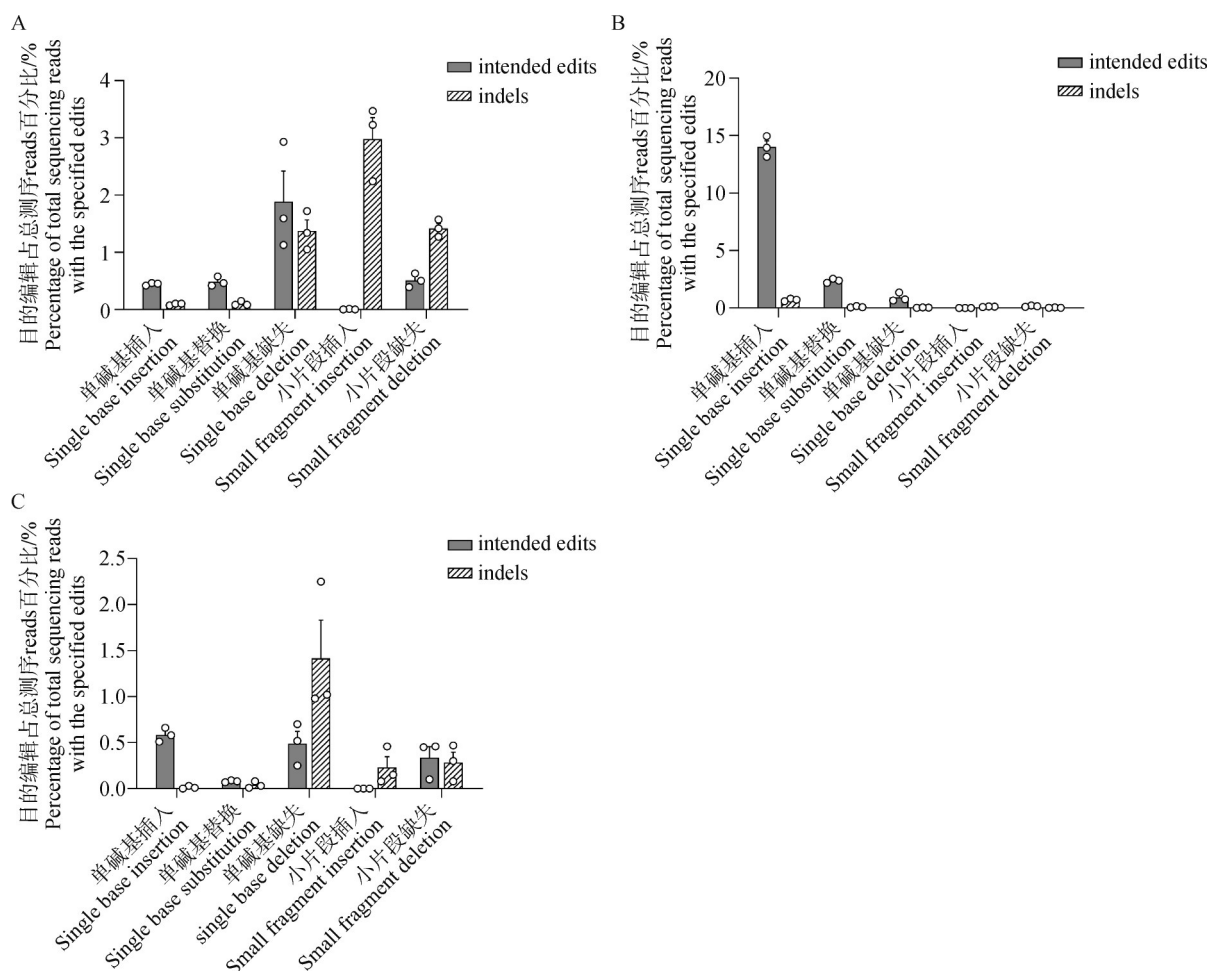


图1 *VIM* 基因编辑位点及 pegRNA 序列示意图

Fig. 1 Schematic diagram of *VIM* gene editing sites and pegRNA sequences



图A为PK15细胞 *VIM* 基因 c. 251G 位点编辑效率;图B为PK15细胞 *VIM* 基因 c. 518T 位点编辑效率;图C为IPEC-J2细胞 *VIM* 基因 c. 251G 位点编辑效率

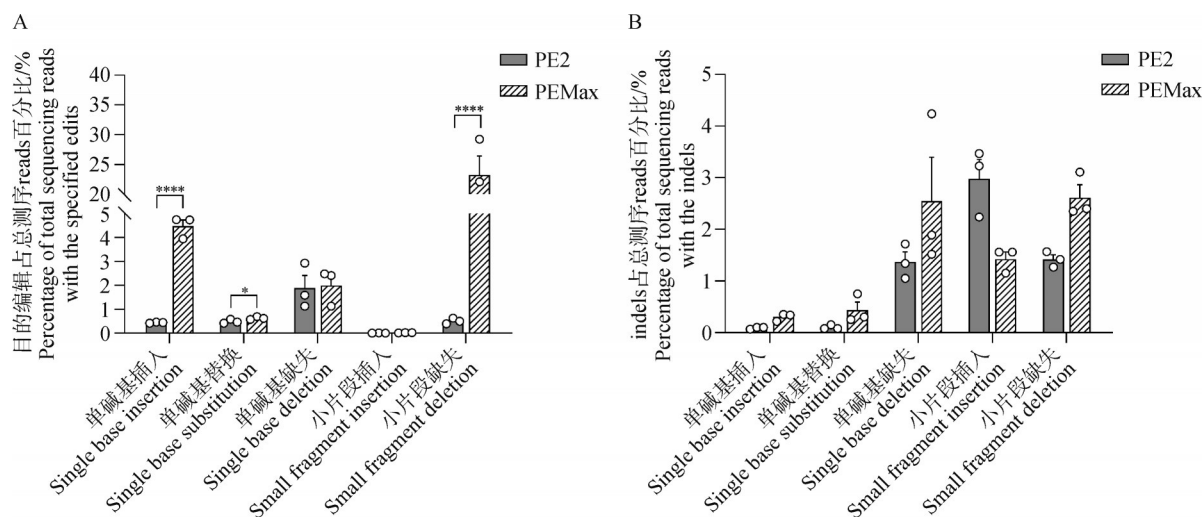
Figure A show the editing efficiency of *VIM* gene c. 251G locus in PK15 cells; Figure B show the editing efficiency of *VIM* gene c. 518T locus in PK15 cells; Figure C shows the editing efficiency of *VIM* gene c. 251 G locus in IPEC-J2 cells

图2 PE2对PK15细胞和IPEC-J2细胞5种不同编辑类型编辑效率

Fig. 2 The editing efficiency of PE2 on 5 different editing types in PK15 cells and IPEC-J2 cells

0.76%)对于小片段插入编辑类型,均无编辑效率。而在 indels 方面,虽然 PEmax 除小片段插入编辑类型外,相比于 PE2 均保持较高的水平(图 3B)。但其

编辑效率/indels 比值最高达到 14.9,高于 PE2 系统(最高为 4.9)。



A 图为 PE2 和 PEmax 系统在 *VIM* 基因 c. 251G 位点编辑效率;B 图为 PE2 和 PEmax 系统在该位点的 indels。*表示差异显著 ($P<0.05$);**表示差异极显著 ($P<0.01$);***表示差异极显著 ($P<0.001$);****表示差异极显著 ($P<0.0001$),下同

The editing efficiency of PE2 and PEmax systems at c. 251G locus of *VIM* gene was showed in figure A, and the indels of PE2 and PEmax systems at this locus was showed in figure B. * indicate the significant difference ($P<0.05$); ** indicate the extremely significant difference ($P<0.01$). *** indicate the extremely significant difference ($P<0.001$). **** indicate the extremely significant difference ($P<0.0001$), the same as below

图 3 PE2 和 PEmax 对 PK15 细胞 5 种不同编辑类型编辑效率比较

Fig. 3 Comparison of editing efficiency of PE2 and PEmax on 5 different editing types in PK15 cells

2.3 PE4 对 PK15 细胞的编辑效率

如图 4A 所示,在 c. 251G 位点,PE4 仅在单碱基缺失编辑效率与 PE2 系统有较大差异,PE4 的编辑效率 ($0.23\% \pm 0.05\%$) 极显著低于 PE2 系统 ($1.88\% \pm 0.94\%$),单碱基插入/替换两种类型编辑效率 ($0.3\% \pm 0.03\%$ 和 $0.25\% \pm 0.04\%$) 均略低于 PE2。小片段缺失编辑效率 ($0.7\% \pm 0.18\%$) 略高于 PE2,但是 PE4 在这 3 种类型与 PE2 系统均无显著性差异。对于小片段插入类型,同样无编辑效力。

2.4 PE4max 对 PK15 细胞的编辑效率

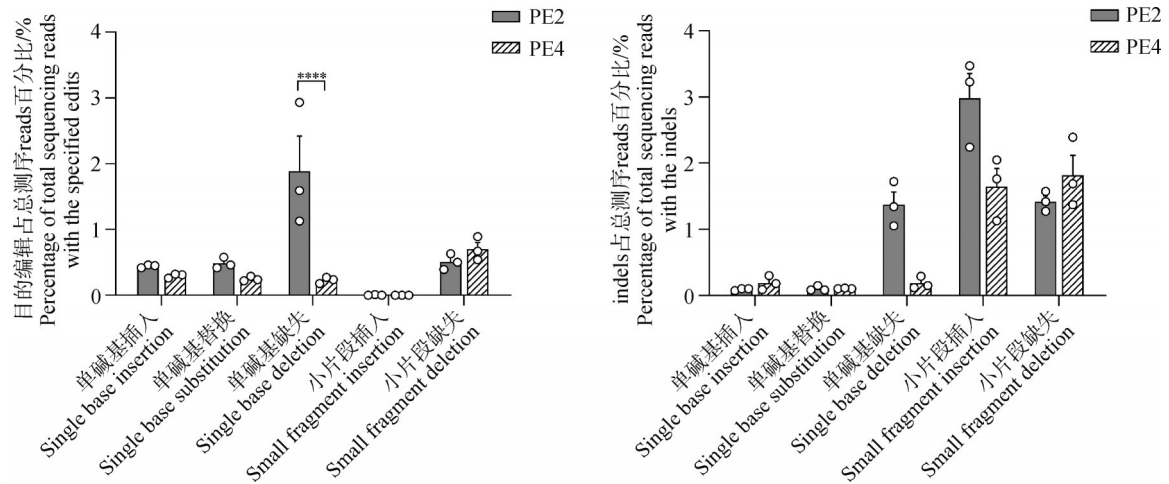
如图 5A 所示,在同样的作用位点(c. 251G)对于单碱基缺失编辑类型,PE4max 与 PE4 表现相同,效率极显著性低于 PE2 系统,编辑效率为 $0.28\% \pm 0.06\%$ 。单碱基插入/替换类型(前者编辑效率 $0.34\% \pm 0.03\%$,后者 $0.36\% \pm 0.06\%$)和小片段缺失类型 ($0.24\% \pm 0.13\%$) 编辑效率均略低于 PE2,但无显著性差异。对于小片段插入编辑类型同样无编辑效力。

2.5 细胞周期调控后 PE2 对 PK15 细胞的编辑效率

EdU 检测结果如图 6 所示,用 $350 \mu\text{M} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的药物浓度处理 PK15 细胞后,EdU 荧光表达相对于对照组明显降低(对照组 45.8%,处理组 8.8%),说明 hydroxyurea 药物对 PK15 细胞产生了效果,DNA 合成受到抑制。

免疫荧光结果如图 7 所示,用 $60 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 nocodazole 处理 PK15 细胞 8 h 后,phh3 阳性细胞数量上升(对照组阳性率 3.1%,处理组阳性率 70%),说明 nocodazole 药物处理成功,PK15 细胞成功停留在 G2/M 期。

利用药物将细胞停留在不同细胞周期后,PE2 对 PK15 细胞 pegRNA1 作用位点的编辑结果如图 8 所示。图 8A 表示单碱基插入编辑类型编辑效果,对于该编辑类型,停留在 G1/S 期(hydroxyurea 药物处理)和 G2/M 期(nocodazole 药物处理)的 PK15 细胞对 PE2 编辑效率没有较大影响,与 PE2 编辑效率 ($0.44\% \pm 0.02\%$) 相比无显著性差异(hydroxyurea 组编辑效率 $0.42\% \pm 0.05\%$,nocodazole 组编辑效

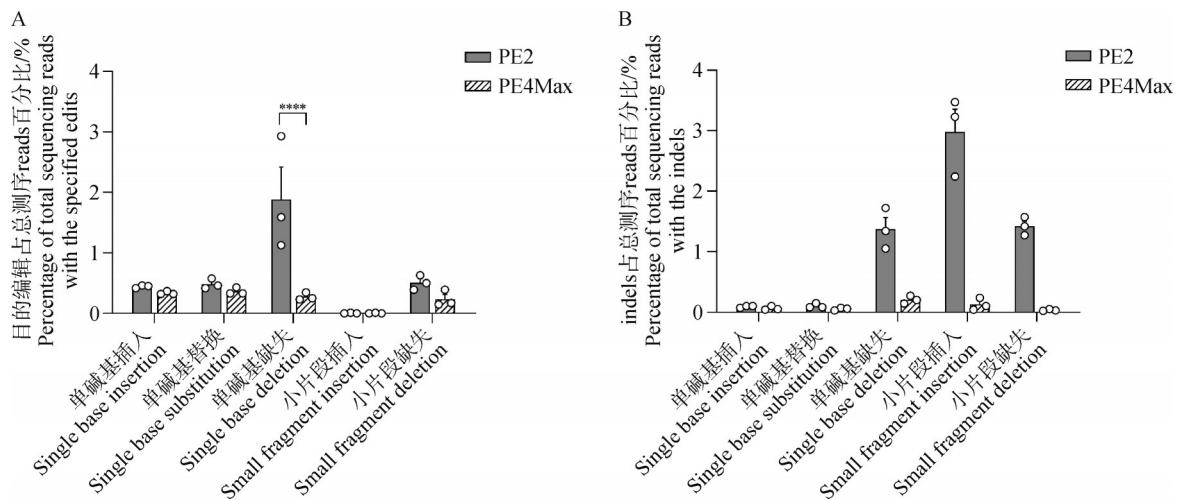


A 图为 PE2 和 PE4 系统在 *VIM* 基因 c. 251G 位点编辑效率; B 图为 PE2 和 PE4 系统在该位点的 indels

The editing efficiency of PE2 and PE4 systems at c. 251G locus of *VIM* gene was showed in figure A, and the indels of PE2 and PE4 systems at this locus was showed in figure B

图 4 PE2 和 PE4 对 PK15 细胞 5 种不同编辑类型编辑效率比较

Fig. 4 Comparison of editing efficiency of PE2 and PE4 on 5 different editing types in PK15 cells



A 图为 PE2 和 PE4max 系统在 *VIM* 基因 c. 251G 位点编辑效率; B 图为 PE2 和 PE4max 系统在该位点的 indel

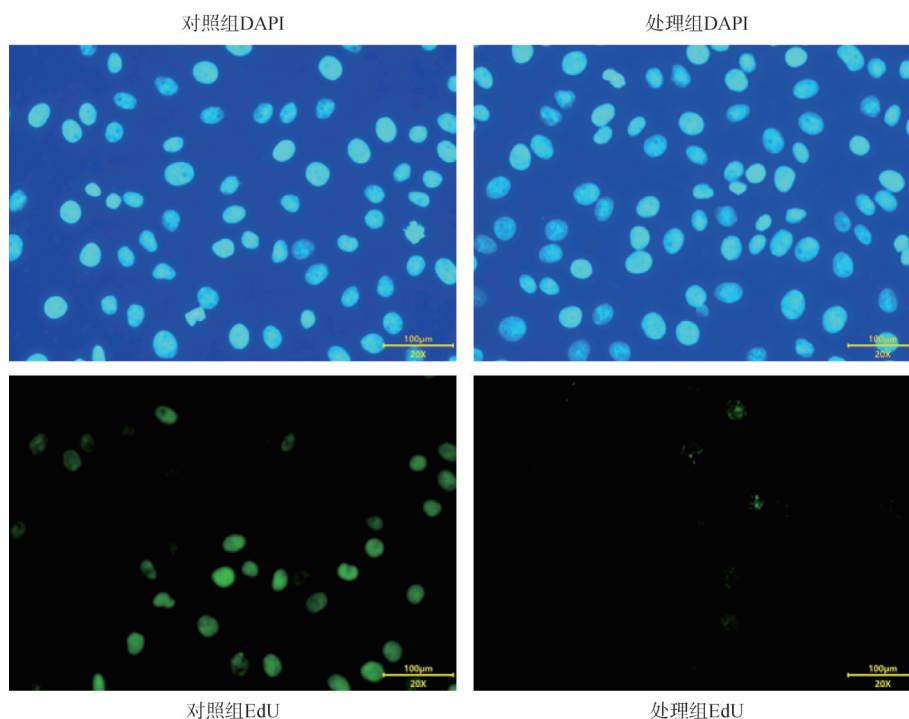
The editing efficiency of PE2 and PE4max systems at c. 251G locus of *VIM* gene was showed in figure A, and the indels of PE2 and PE4max systems at this locus was showed in figure B

图 5 PE2 和 PE4max 对 PK15 细胞 5 种不同编辑类型编辑效率比较

Fig. 5 Comparison of editing efficiency of PE2 and PE4max on 5 different editing types in PK15 cells

率 $0.33\% \pm 0.16\%$)。从图 8B 结果上看,对于单碱基替换编辑类型,hydroxyurea 组编辑效率 ($0.68\% \pm 0.09\%$) 显著高于 PE2 ($0.49\% \pm 0.08\%$),而 nocodazole 组编辑效率 ($0.09\% \pm 0.02\%$) 极显著低于 PE2 ($0.49\% \pm 0.08\%$)。图 8C 结果显示,在单碱基缺失编辑类型上,hydroxyurea 组编辑效率 ($4.81\% \pm 1.45\%$) 显著高于 PE2 ($1.88\% \pm 0.94\%$),nocodazole 组编辑效率 ($0.56\% \pm 0.32\%$) 低于 PE2 组 ($1.88\% \pm 0.94\%$) 但差异不显著。图 8D 和图 8E

分别表示小片段插入/缺失两种编辑类型编辑结果。对于小片段插入编辑类型,hydroxyurea 组和 nocodazole 组均无编辑效率。对于小片段缺失编辑,hydroxyurea 组编辑效率 $0.76\% \pm 0.13\%$,nocodazole 组编辑效率 $1.34\% \pm 0.2\%$,均高于 PE2 ($0.51\% \pm 0.12\%$),但差异均不显著。此外,对于小片段插入/缺失两种编辑类型,hydroxyurea 组 indels 率极显著高于 PE2 组 (小片段插入类型 hydroxyurea 组 indels 率 $16.88\% \pm 8.45\%$,PE2 组

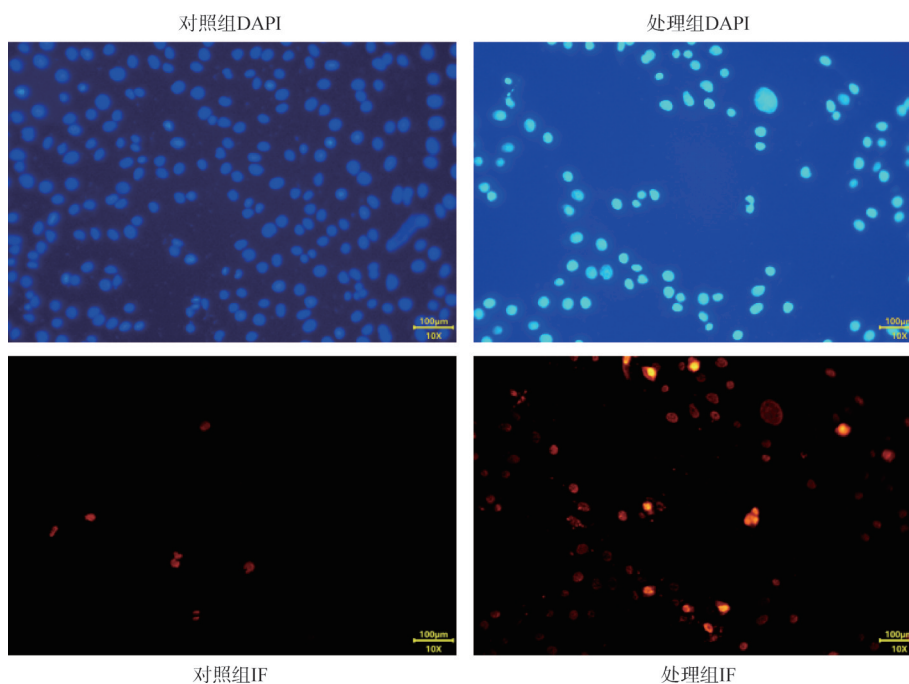


左侧为对照组,右侧为 hydroxyurea 药物处理组。蓝色 . DAPI 细胞核染色;绿色 . EdU 染色

The left side is the control group, the right side is the hydroxyurea drug treatment group. blue. DAPI nuclear staining; green. EdU staining

图 6 hydroxyurea 药物处理后 EdU 检测结果(标尺:100 μm)

Fig. 6 EdU test results after hydroxyurea treatment (scale bar: 100 μm)

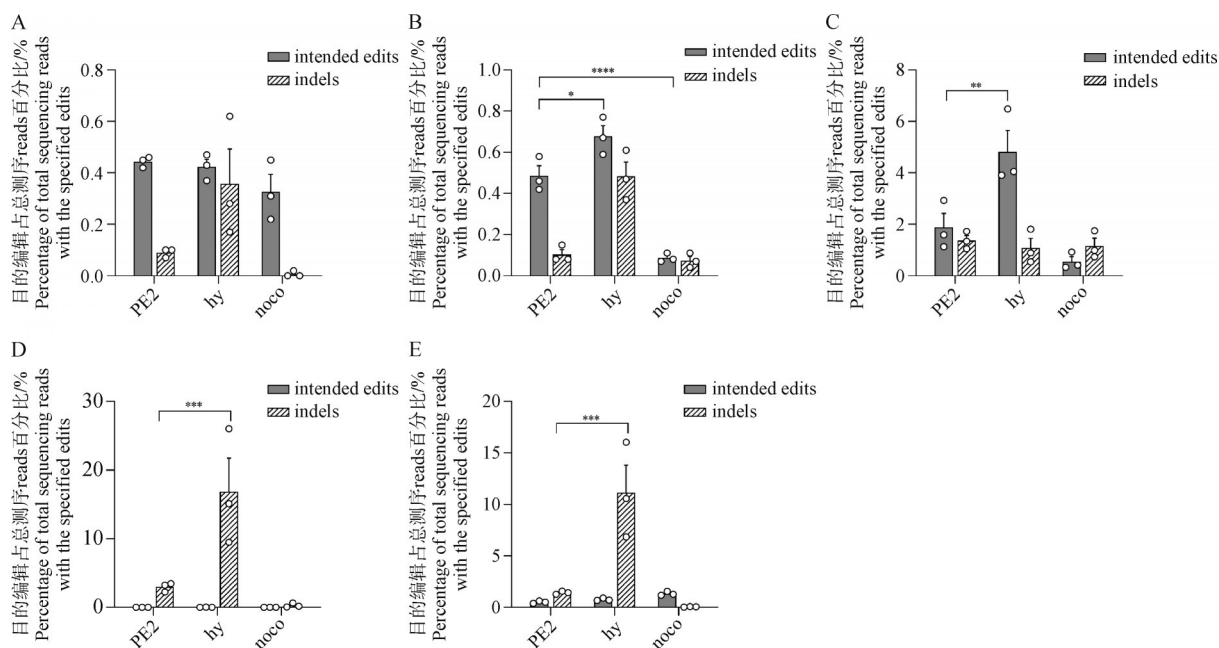


左侧为对照组,右侧为 nocodazole 药物处理组。蓝色 . DAPI 细胞核染色;红色 . 免疫荧光染色

The left side is the control group, and the right side is the nocodazole drug treatment group. blue. DAPI nuclear staining; red. Immunofluorescence staining

图 7 nocodazole 药物处理后免疫荧光检测结果(标尺:100 μm)

Fig. 7 Immunofluorescence test results after nocodazole treatment (scale bar: 100 μm)



hy 表示 hydroxyurea 药物处理组; noco 表示 nocodazole 药物处理组。图 A 为单碱基插入编辑类型; 图 B 为单碱基替换编辑类型; 图 C 为单碱基缺失编辑类型; 图 D 为小片段插入编辑类型; 图 E 为小片段缺失编辑类型

hy represents the hydroxyurea drug treatment group, and noco represents the nocodazole drug treatment group. Figure A is the single base insertion editing type; Figure B is the single base substitution editing type; Figure C is the single base deletion editing type; Figure D is the small fragment insertion editing type; Figure E is the small fragment deletion editing type

图 8 PE2 编辑系统在不同细胞周期对 PK15 细胞 *VIM* 基因 c. 251G 位点编辑效率对比

Fig. 8 Comparison of editing efficiency of PE2 editing system on c. 251G locus of *VIM* gene in PK15 cells at different cell cycles

2.98%±0.65%。小片段缺失类型 hydroxyurea 组 indels 率 11.15%±4.63%, PE2 组 1.42%±0.15%)。

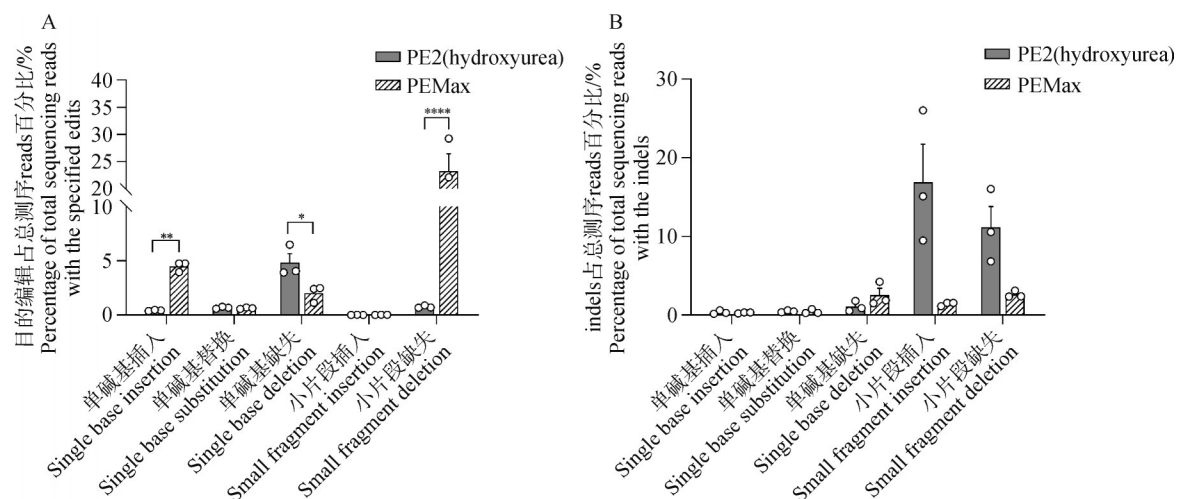
2.6 PEmax 与 PK15 细胞停留在 G1/S 期后的 PE2 编辑效率对比

结果如图 9 所示, 对于单碱基插入和小片段缺失两种编辑类型, PEmax 的编辑效率(前者 4.48%±0.46%, 后者编辑效率 23.25%±5.52%)显著或极显著高于 hydroxyurea 处理组(单碱基插入编辑效率 0.42%±0.05%, 小片段缺失编辑效率 0.76%±0.13%)。对于单碱基缺失编辑类型, PEmax 的编辑效率则显著低于 hydroxyurea 处理组(前者 2.01%±0.76%, 后者 4.81%±1.45%)。剩余两种编辑类型两者编辑效率近似或无编辑效率。

3 讨论

PE 系统利用单链断裂原理实现对目的基因的编辑, 相对于传统的 CRISPR/Cas9 技术, 其编辑效率更高的同时减少了 indels 率^[36]。CRISPR/Cas9 技术在实现目的编辑时需要引入额外 DNA 模板且

受到 HDR 发生概率等因素的影响, 极大限制了其在精确编辑上的应用。自 CRISPR/Cas9 系统发展而来的 PE 编辑系统通过逆转录反应与 pegRNA 自带的 RT 模板, 不仅解决了上述问题, 还提升了精确编辑的效率, 是对基因编辑技术的完善, 但是该技术在大家畜尤其是猪上鲜有报道和应用。本试验结果表明, 引导编辑系统 PE2 在 PK15 和 IPEC-J2 两种细胞系中均能实现有效的基因编辑, 但其编辑效率表现出显著的位点依赖性与编辑类型特异性。值得注意的是, 由于两种细胞的电转染效率相近, 可排除转染条件差异对编辑结果的影响, 进一步证实了编辑效率的差异源于引导编辑系统自身对不同基因组位点及不同编辑类型的固有特性。引导编辑系统在猪细胞系上对单碱基插入/替换/缺失几类编辑类型均有一定编辑效率。对于小片段插入/缺失编辑类型效率极低或无编辑效率。这可能与对 DNA 的编辑程度有关, 较大片段的精确编辑相对于单碱基的精确编辑难度较高^[37]。此外, 引导编辑系统在不同物种不同细胞上的不稳定性也会



A 图为两者在 VIM 基因 c. 251G 位点编辑效率;B 图为两者在该位点的 indels

Figure A shows the editing efficiency of the two at the VIM gene c. 251G locus; Figure B shows the indels of the two at this locus

图 9 PEmax 与 PK15 细胞停留在 G1/S 期后的 PE2 对 VIM 基因 c. 251G 位点编辑效率对比

Fig. 9 The comparison of editing efficiency of PEmax and PE2 on VIM gene c. 251G locus after PK15 cells stayed in G1/S phase

对不同编辑类型效率产生影响^[21]。对于 pegRNA1/2 作用位点(c. 251G 和 c. 518T),pegRNA1 在单碱基缺失类型上产生较高的编辑类型,pegRNA2 则在单碱基插入/替换编辑类型上产生了较高的编辑效率。这与 PE 系统在 HEK293T 细胞上的结果相似,对于不同编辑类型,PE 系统在 HEK293T 细胞上的效率也较为不同,说明 PE 系统在猪细胞系上表现出同样的不稳定性^[21]。对于 pegRNA,其设计上的参数,例如 PBS 长度、RT 模板长度等参数的组合也会对引导编辑系统的编辑效率有较大影响,这也可能是两个位点编辑效率差异较大的原因^[38]。

与 PK15 细胞相比,PE2 在 IPEC-J2 细胞上的编辑效果较差。Anzalone 等^[21]研究表明,PE 编辑系统在 K562 细胞中编辑效率为 15%~30%,而在 HeLa 细胞中平均编辑效率为 12%,且 PE 系统在两种细胞上的编辑效率均低于 HEK293T 细胞。因此,引导编辑系统在不同细胞上的表现不稳定性可能导致了其在 IPEC-J2 细胞编辑效果较差。

PEmax 为 PE2 的优化版本,相对于 PE2 系统,该系统在 RT 酶的结构上做出了优化,将其 RT 酶序列上的一段优化成人类密码子^[22]。此外,该系统还包含了一段长 34aa 的包含有 SV40 核定位信号的连接子以及在 C 端添加了 C-Myc 核定位信号,这些优化使得其编辑效率在 HeLa 细胞中得到了显著提升^[22]。在本试验中,该系统在 PK15 细胞上同样表现出了更优的编辑效果。PEmax 在单碱基插入/替

换和小片段缺失类型上的编辑效率均显著高于 PE2,仅在单碱基缺失类型编辑效率与 PE2 近似。综上所述,在 PK15 细胞中 PEmax 的表现更好,特别是在单碱基插入和小片段缺失两种编辑类型上,说明 PEmax 在猪 PK15 细胞中同样也是优于 PE2 的引导编辑系统。

MMR 机制是机体内重要的 DNA 修复机制,但是其在引导编辑精确编辑目的位点过程中会影响引导编辑系统中的精确编辑,使其产生较多不精确的目的编辑,从而导致其编辑效率下降^[22]。因此,如果在引导编辑过程中短暂抑制 MMR 机制有利于引导编辑的精确编辑效率提升。PE4 则是基于此开发出的新型引导编辑系统,该系统会额外表达 MMR 抑制蛋白,从而提高编辑效率。但是在猪 PK15 细胞中,PE4 系统的表现则不如 PE2 系统。其在多种编辑类型表现出的编辑效率近似或显著低于 PE2 系统,这可能与 PE4 载体大小有关。PE4 载体大小为 12 075 bp,相对于 PE2 系统的 9 753 bp,其质粒载体大小增加了 24%,过大的质粒载体导致了其相对于 PE2 系统,更难转染进 PK15 细胞,相比较低的转染效率可能导致了其在 PK15 细胞上表现不如 PE2。而对于 PE4max,其相当于 PE4 的优化版本,同样是在 RT 酶的结构上进行优化,并没有进行载体大小上的优化,其质粒载体大小为 12 117 bp,与 PE4 质粒载体大小近似,所以 PE4max 在 PK15 细胞中的表现同样不如 PE2,并且与 PE4 表现近似。

细胞周期对于真核细胞是受到严格调控的重要生命过程,其对细胞的生长发育,分裂增殖都具有重要作用。Wang等^[39]通过研究表明,细胞周期通过DNA的修复机理对于PE系统编辑效率有一定影响。本试验通过药物处理将PK15细胞停留在G1/S期和G2/M期,观察不同细胞周期对PE系统的影响以判断出最利于PE系统编辑PK15细胞的时期。对于单碱基插入编辑类型,不同时期对于PE2系统影响不大,药物处理组与对照组(PE2)编辑效率近似。对于单碱基替换,hydroxyurea组编辑效率显著高于对照组,与对照组相比,其编辑效率平均提高了1.4倍,而nocodazole组编辑效率极显著低于对照组,其编辑效率平均降低了5.4倍。在单碱基缺失编辑类型上,hydroxyurea组编辑效率极显著高于对照组,与对照组相比,其编辑效率平均提升了2.6倍,而nocodazole组编辑效率略低于对照组,但差异不显著。对于小片段插入/缺失编辑类型,两组药物处理组均无编辑效率,与对照组结果相同。从总体结果上看,停留在G1/S期对于PE2系统编辑PK15细胞起到了促进作用,单碱基替换/缺失两种编辑类型的编辑效率均显著提升,而停留在G2/M期则对PE2系统编辑PK15细胞起到了一定抑制作用,在单碱基缺失编辑类型上极显著降低了其编辑效率,其余几种编辑类型也均无显著效率提升。Schene等^[25]研究发现,DNA修复机理尤其是DNA同源重组的活性对于PE系统具有促进作用。原因是停留在G1/S期后的细胞在解除药物抑制后,同源重组的活性会提升PE系统的编辑效率^[40],这可能是hydroxyurea药物处理组编辑效率高于PE2对照组的原因。而nocodazole组效率较低则可能与染色质的开放程度有关^[41]。G2/M期染色质丝高度螺旋化成染色体,产生的空间位阻导致PE2蛋白难以与目的DNA位点结合有关。此外,hydroxyurea组在小片段插入/缺失两种编辑类型上的indels率极显著高于对照组,一定程度上证明了停留在G1/S期有利于PE2系统在PK15细胞上发挥功能,但由于在PK15细胞上小片段类型编辑的难度,使其未能够产生精确编辑。最后,通过将PEmax系统与hydroxyurea组编辑效率进行比对,两者在不同编辑类型上的编辑效率各有优劣,说明根据编辑类型的不同,选择合适的PE系统或处理可以提升PE系统在猪PK15细胞中的编辑效率。

4 结 论

本试验利用引导编辑工具PE2和PEmax成功在猪细胞系VIM基因c. 251G和c. 518T位点上实现精确编辑,并通过调控细胞周期提升了PE2在PK15细胞中的编辑效率,为研究引导编辑在猪细胞上的应用提供了理论依据。

参考文献(References):

- [1] IVASKA J, PALLARI H M, NEVO J, et al. Novel functions of vimentin in cell adhesion, migration, and signaling [J]. *Exp Cell Res*, 2007, 313 (10): 2050-2062.
- [2] STROUHALOVA K, PRECHOVA M, GANDALOVICOVA A, et al. Vimentin intermediate filaments as potential target for cancer treatment [J]. *Cancers (Basel)*, 2020, 12(1):184.
- [3] 宋双龙,王 石. 波形蛋白的结构与功能及其在肿瘤中的研究进展[J]. *中国实验诊断学*, 2022, 26(8): 1238-1243.
SONG S L, WANG S. The structure and function of vimentin and its research progress in tumor [J]. *Chinese Journal of Laboratory Diagnosis*, 2022, 26 (8):1238-1243. (in Chinese)
- [4] KIM J K, FAHAD A M, SHANMUKHAPPA K, et al. Defining the cellular target(s) of porcine reproductive and respiratory syndrome virus blocking monoclonal antibody 7G10 [J]. *J Virol*, 2006, 80(2):689-696.
- [5] ISHINO Y, SHINAGAWA H, MAKINO K, et al. Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product [J]. *J Bacteriol*, 1987, 169(12):5429-5433.
- [6] LANDER E S. The heroes of CRISPR [J]. *Cell*, 2016, 164(1-2):18-28.
- [7] BARRANGOU R, FREMAUX C, DEVEAU H, et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes [J]. *Science*, 2007, 315(5819): 1709-1712.
- [8] 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.
- [9] CONG L, RAN F A, COX D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems [J]. *Science*, 2013, 339(6121):819-823.

- [10] SHUVALOV O, PETUKHOV A, DAKS A, et al. Current genome editing tools in gene therapy: new approaches to treat cancer[J]. *Curr Gene Ther*, 2015, 15(5):511-529.
- [11] DOMINGUEZ A A, LIM W A, QI L S. Beyond editing: repurposing CRISPR-Cas9 for precision genome regulation and interrogation[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2016, 17(1):5-15.
- [12] TANENBAUM M E, GILBERT L A, QI L S, et al. A protein-tagging system for signal amplification in gene expression and fluorescence imaging [J]. *Cell*, 2014, 159(3):635-646.
- [13] CHAVEZ A, SCHEIMAN J, VORA S, et al. Highly efficient Cas9-mediated transcriptional programming [J]. *Nat Methods*, 2015, 12(4):326-328.
- [14] DEVEAU H, BARRANGOU R, GARNEAU J E, et al. Phage response to CRISPR-encoded resistance in *Streptococcus thermophilus* [J]. *J Bacteriol*, 2008, 190(4):1390-1400.
- [15] RAMAKRISHNA S, KWAKU D A, BELOOR J, et al. Gene disruption by cell-penetrating peptide-mediated delivery of Cas9 protein and guide RNA[J]. *Genome Res*, 2014, 24(6):1020-1027.
- [16] MARUYAMA T, DOUGAN S K, TRUTTMANN M C, et al. Increasing the efficiency of precise genome editing with CRISPR-Cas9 by inhibition of nonhomologous end joining[J]. *Nat Biotechnol*, 2015, 33(5):538-542.
- [17] YU X, HUO G, YU J, et al. Prime editing: Its systematic optimization and current applications in disease treatment and agricultural breeding [J]. *Int J Biol Macromol*, 2023, 253:127025.
- [18] BARANAUSKAS A, PALIKSA S, ALZBUTAS G, et al. Generation and characterization of new highly thermostable and processive M-MuLV reverse transcriptase variants[J]. *Protein Eng Des Sel*, 2012, 25(10):657-668.
- [19] KEIJZERS G, BOHR V A, RASMUSSEN L J. Human exonuclease 1 (EXO1) activity characterization and its function on flap structures [J]. *Biosci Rep*, 2015, 35(3):e00206.
- [20] PETROVA I O, SMIRNIKHINA S A. The development, optimization and future of prime editing [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(23):17045.
- [21] 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.
- [22] 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.
- [23] DOMAN J L, PANDEY S, NEUGEBAUER M E, et al. Phage-assisted evolution and protein engineering yield compact, efficient prime editors [J]. *Cell*, 2023, 186(18):3983-4002.
- [24] YAN J, OYLER-CASTRILLO P, RAVISANKAR P, et al. Improving prime editing with an endogenous small RNA-binding protein [J]. *Nature*, 2024, 628(8008):639-647.
- [25] SCHENE I F, JOORE I P, BAIJENS J H L, et al. Mutation-specific reporter for optimization and enrichment of prime editing[J]. *Nat Commun*, 2022, 13(1):1028.
- [26] LI H, BUSQUETS O, VERMA Y, et al. Highly efficient generation of isogenic pluripotent stem cell models using prime editing [J]. *Elife*, 2022, 11:e79208.
- [27] 刘 尧. 增强型引导编辑器的开发及其在绵羊胎儿成纤维细胞中的应用[D]. 咸阳:西北农林科技大学, 2022.
- LIU Y. The development of enhanced prime editor and its application in sheep fetal fibroblasts[D]. Xianyang: Northwest A&F University, 2022. (in Chinese)
- [28] WHITWORTH K M, LEE K, BENNE J A, et al. Use of the CRISPR/Cas9 system to produce genetically engineered pigs from *in vitro*-derived oocytes and embryos[J]. *Biol Reprod*, 2014, 91(3):78.
- [29] THOMAS M, LANGLEY B, BERRY C, et al. Myostatin, a negative regulator of muscle growth, functions by inhibiting myoblast proliferation [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(51):40235-40243.
- [30] WANG K, OUYANG H, XIE Z, et al. Efficient generation of myostatin mutations in pigs using the CRISPR/Cas9 system[J]. *Sci Rep*, 2015, 5:16623.
- [31] FLORINI J R, EWTON D Z, COOLICAN S A. Growth hormone and the insulin-like growth factor system in myogenesis[J]. *Endocr Rev*, 1996, 17(5):481-517.
- [32] XIANG G, REN J, HAI T, et al. Editing porcine IGF2 regulatory element improved meat production in Chinese Bama pigs [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2018, 75(24):4619-4628.
- [33] RIVSET R L. The MD5 message-digest algorithm [S/OL]. Request for Comments(1321), 1992.
- [34] ARONESTY E. Comparison of sequencing utility

- programs(Article)[J]. *Open Bioinform J*, 2013, 7(1): 1-8.
- [35] CLEMENT K, REES H, CANVER M C, et al. CRISPResso2 provides accurate and rapid genome editing sequence analysis[J]. *Nat Biotechnol*, 2019, 37(3): 224-226.
- [36] 许志锰, 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.
XU Z M, XIE Z. Research progress and biotechnological applications of the prime editing[J]. *Synthetic Biology Journal*, 2024, 5(1): 1-15. (in Chinese)
- [37] LI F, HOU H N, SONG M L, et al. Targeted insertion of large DNA fragments through template-jumping prime editing in rice[J]. *Plant Biotechnol J*, 2025, 23(7): 2645-2647.
- [38] PONNIENSELVAN K, LIU P, NYALILE T, et al. Reducing the inherent auto-inhibitory interaction within the pegRNA enhances prime editing efficiency [J]. *Nucleic Acids Res*, 2023, 51(13): 6966-6980.
- [39] 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 Res*, 2021, 49(20): 11986-12001.
- [40] ZHAO X, WEI C, LI J, et al. Cell cycle-dependent control of homologous recombination [J]. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 2017, 49(8): 655-668.
- [41] 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 Biol*, 2021, 22(1): 170.

(编辑 郭云雁)