

翻转课堂第3期：优秀案例



西北农林科技大学
NORTHWEST A&F UNIVERSITY

西北农林科技大学2023级动物科技学院

“偷梁换柱”——RNA editing

生物育种专业·基因编辑技术课程

答辩人：徐兆颖 指导老师：徐坤

小组成员：徐兆颖 李信霏 郭正翰 邢达云 吴明明

诚朴勇毅

目录

CONTENTS



提纲挈领

辨类穷理



大显身手

披荆斩棘



终篇归旨



Part **1**

提纲挈领

1-1 什么是RNA编辑
1-2 与BE的区别和联系

什么是RNA编辑

- 属于**转录后修饰**，不改变基因组序列，但会影响 RNA 的结构与功能。
- **RNA编辑**是指在转录后对 **RNA 分子碱基序列**进行**定点改变**，使其与**DNA模板不同**。
- 编辑后的 RNA 在翻译中可产生新的氨基酸或改变调控元件，从而影响蛋白表达与细胞功能。
- RNA编辑 **可逆、瞬时、安全性高**，广泛存在于动物、植物与微生物中。

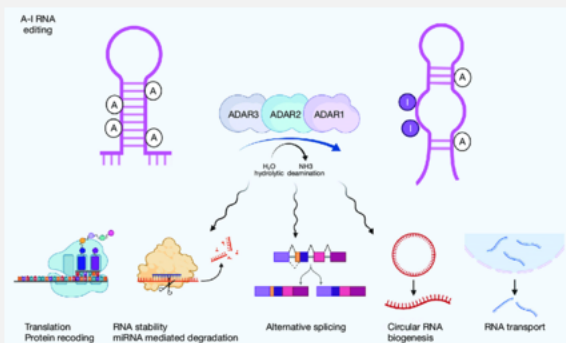


图1：A-to-I RNA编辑的总体示意图

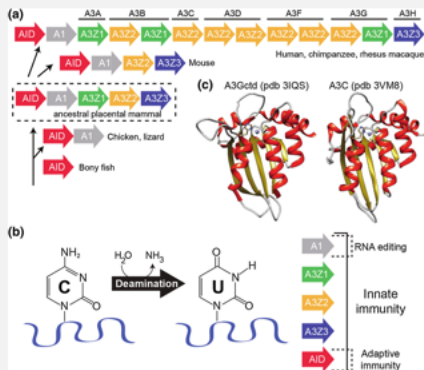
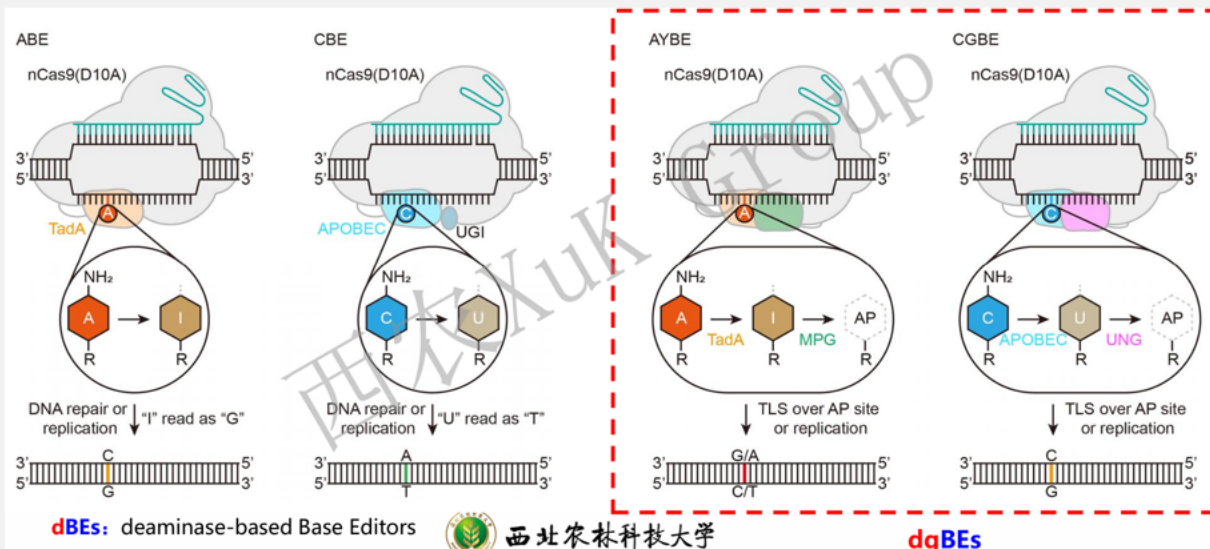


图2：APOBEC家族总体示意图

与BE的区别和联系

- 碱基编辑器 (Base Editor, BE)** 是人造的基因编辑工具，**不可逆转的**，直接在 **DNA** 上进行定点碱基替换，而且不产生双链断裂。



都有**脱氨酶**。

RNA编辑是BE
在RNA
层面上的具体应用

与BE的区别和联系

○ 脱氨酶

	Base editor	RNA editing
C-to-U	rAPOBEC1 (BE系列) AID等	APOBEC
A-to-I	ecTadA (ABE 7.10 ABE 8e ABE 8e V106W)	ADAR酶

APOBEC 家族酶 (包括 AID) 具备处理单链核酸 (无论是 DNA 还是 RNA) 的能力。

•**底物亲和力:** 胞苷脱氨酶 (CDA) 的催化口袋相对灵活。对于这些酶来说, 单链 DNA 和单链 RNA 在化学结构上的微小差异 (脱氧核糖 vs 核糖) 不足以阻止它们发挥作用。因此**既可用于BE也可用于RNA editing。**

为什么不能用 ADAR 做碱基编辑 (DNA)?

- 底物识别机制:** **ADAR** (Adenosine Deaminase Acting on RNA) 拥有专门的**双链 RNA 结合结构域 (dsRBD)**。它识别的是双链 RNA 的空间构型, 而不是简单的单链碱基。
- 结构不匹配:** DNA 的 B 型双螺旋结构与 RNA 的 A 型双螺旋结构在沟槽宽度和深度上有显著差异。ADAR 无法识别 DNA 的螺旋结构, 更无法在 Cas9 产生的单链 DNA 泡 (R-loop) 上开展工作。

为什么碱基编辑要用 TadA?

- TadA 的背景:** TadA 是细菌中的一种 **tRNA 脱氨酶**。它识别的是 tRNA 反密码子环上的单链腺苷 (A34)。
- 改造潜力:** 科学家发现 TadA 的底物是单链形态的 RNA, 这与 Cas9 形成的单链 DNA 目标区在物理形态上更接近。ABE 7.10, ABE 8e, ABE 8e V106W



Part 2

辨类穷理

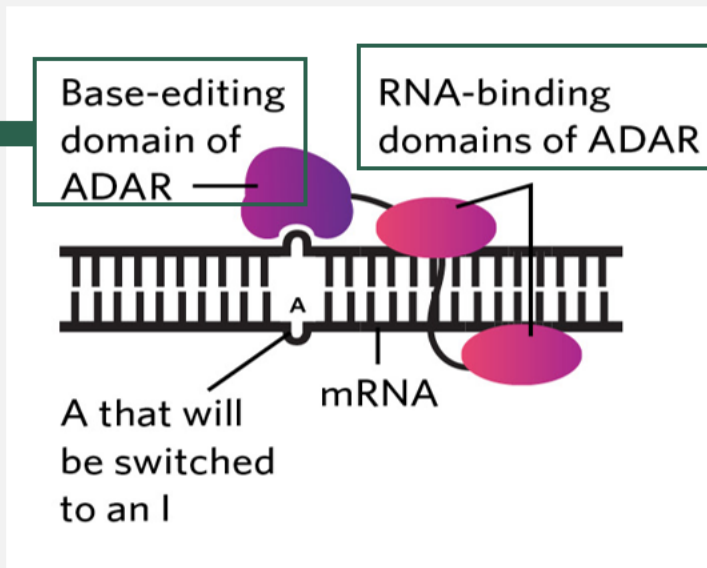
2-1 A-to-I编辑

2-2 C-to-U编辑

2-3 其他类型的编辑

A-to-I编辑：经典的A-to-I编辑

ADAR的催化核心：催化腺苷脱氨反应



ADAR的dsRNA结合结构域：识别RNA的双链结构并稳定结合在dsRNA上

mRNA形成局部双链

A-to-I编辑：CRISPR系统导向的新兴技术



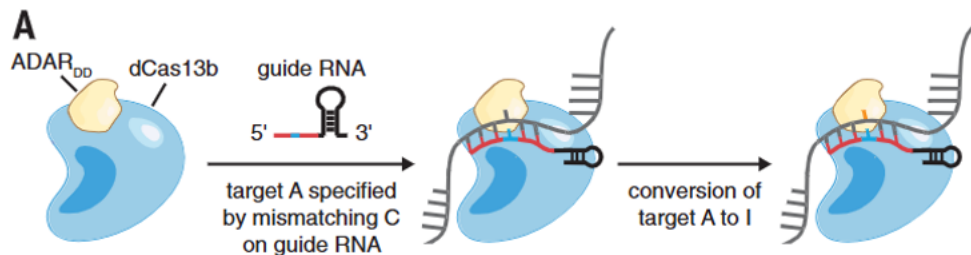
西北农林科技大学
NORTHWEST A&F UNIVERSITY

RNA editing with CRISPR-Cas13

David B T Cox ^{1 2 3 4 5 6}, Jonathan S Gootenberg ^{1 2 3 4 7}, Omar O Abudayyeh ^{1 2 3 4 6},
Brian Franklin ^{1 2 3 4}, Max J Kellner ^{1 2 3 4}, Julia Joung ^{1 2 3 4}, Feng Zhang ^{8 2 3 4}

Affiliations + expand

PMID: 29070703 PMCID: PMC5793859 DOI: 10.1126/science.aag0180



REPAIR:

引导系统: CRISPR dCas13

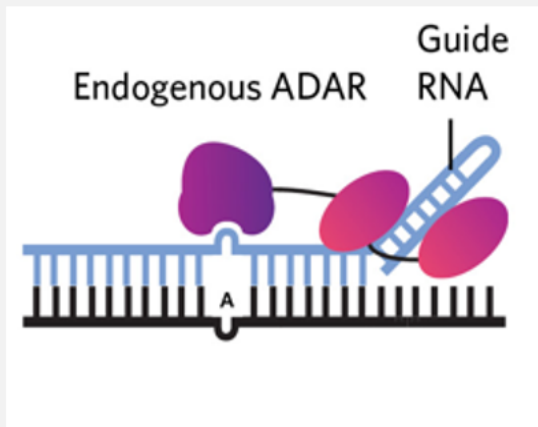
脱氨酶: ADAR

复合物组装
dCas13+
ADAR

gRNA与靶
mRNA形成
暂时性双链

ADAR脱氨
A→I

A-to-I编辑：内源招募型



LEAPER

arRNA的设计：与mRNA高度互补；在目标A位点引入错配

arRNA与mRNA形成局部dsRNA招募ADAR

ADAR催化腺苷脱氨 A→I

> Nat Biotechnol. 2019 Sep;37(9):1059-1069. doi: 10.1038/s41587-019-0178-z. Epub 2019 Jul 15.

Programmable RNA editing by recruiting endogenous ADAR using engineered RNAs

Liang Qu ^{#1,2}, Zongyi Yi ^{#1,3}, Shiyu Zhu ^{#1}, Chunhui Wang ^{#1}, Zhongzheng Cao ^{#1,3}, Zhuo Zhou ^{#1}, Pengfei Yuan ^{#4}, Ying Yu ¹, Feng Tian ¹, Zhiheng Liu ^{1,3}, Ying Bao ¹, Yanxia Zhao ⁴, Wensheng Wei ⁵

Affiliations + expand

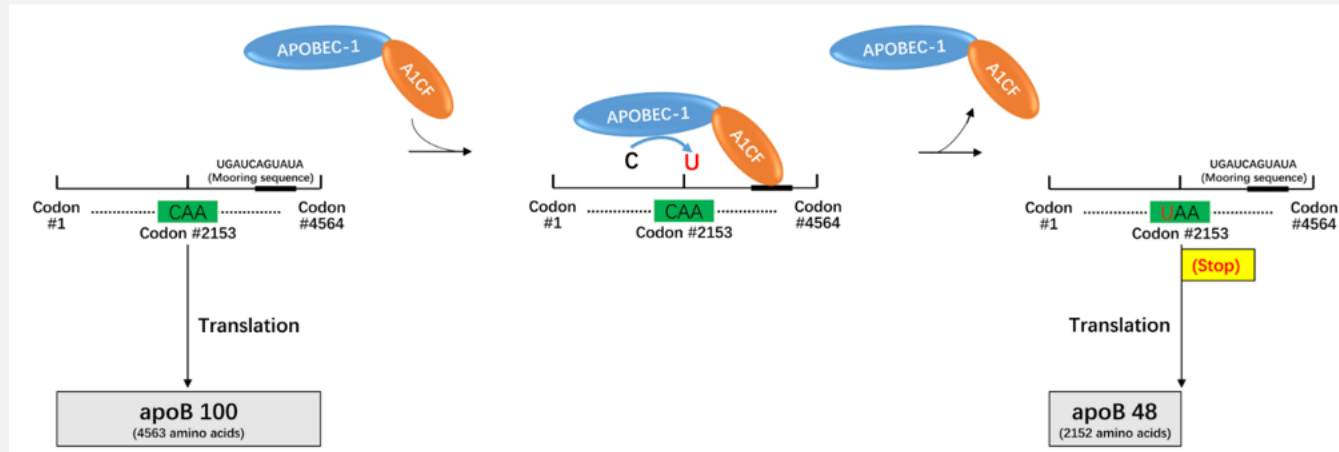
PMID: 31308540 DOI: 10.1038/s41587-019-0178-z

组成：

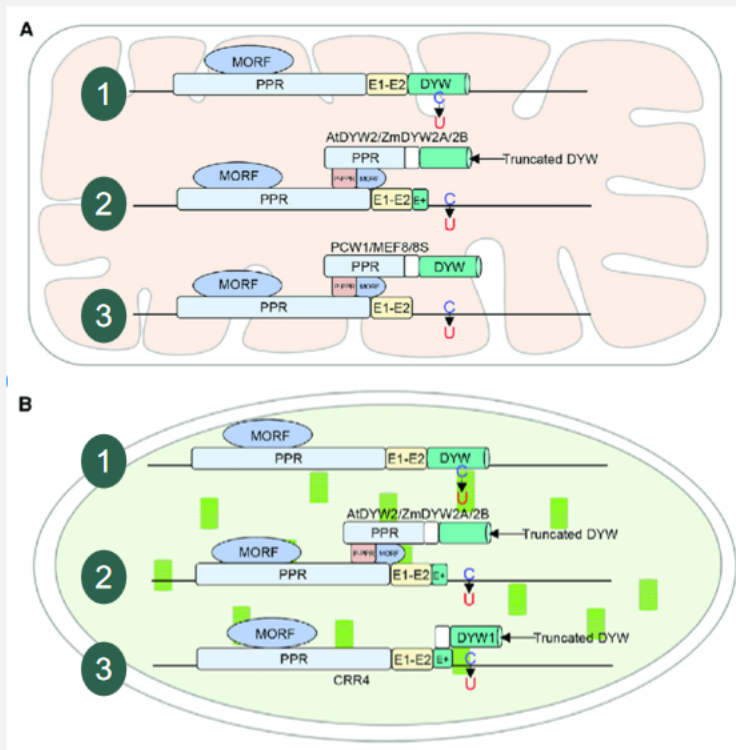
arRNA + 细胞内自带的ADAR脱氨酶



C-to-U编辑：经典的C-to-U编辑



C-to-U编辑：线粒体/叶绿体C to U编辑



核心组分：

PPR蛋白：定位元件，由多个重复单元构成，每个单元对应识别RNA上一个特定碱基

DYW结构域：有胞苷脱氨酶活性，实现C→U

MORF：辅助因子，帮助PPR更牢固结合mRNA

三种作用机制：

①（顺式作用）：

PPR 蛋白和 DYW 结构域是连在一起的“一体机”。一个含有 DYW 结构域的 PPR 蛋白直接识别位点，并由自带的 DYW 完成编辑。这是最简单直接的模式。

②（反式补足 - 截断型）：

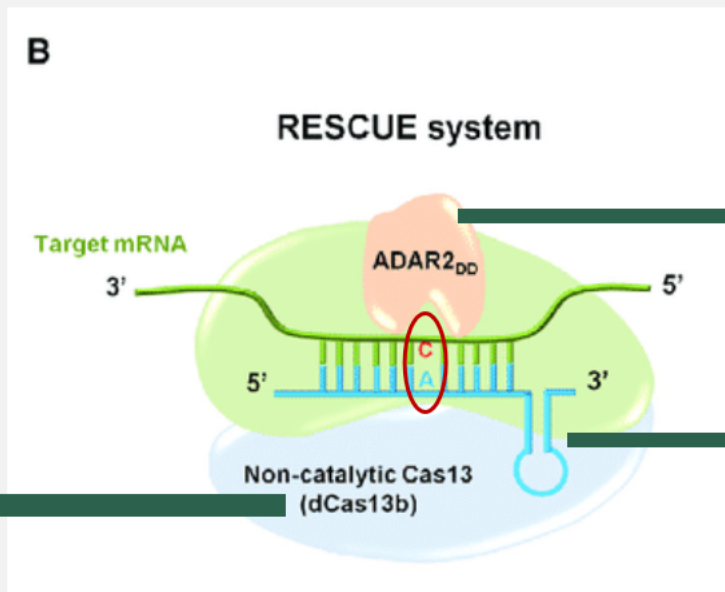
主 PPR 蛋白没有完整的 DYW 结构域，它需要招募另一个含有 DYW 的短蛋白。通过 P-PPR/MORF 相互作用区域，两个蛋白像搭积木一样拼在一起，由 DYW 完成编辑。

③（反式补足 - 独立酶）：

主 PPR 蛋白完全不带 DYW，而是招募专门的脱氨酶蛋白。这类似于哺乳动物中 APOBEC1 与 ACF 的协作，由主 PPR 蛋白找位置，招募独立的 DYW 蛋白来干活。

C-to-U编辑：CRISPR系统导向的新兴技术

RESCUE:
Guide RNA
ADAR2dd
dCas13b

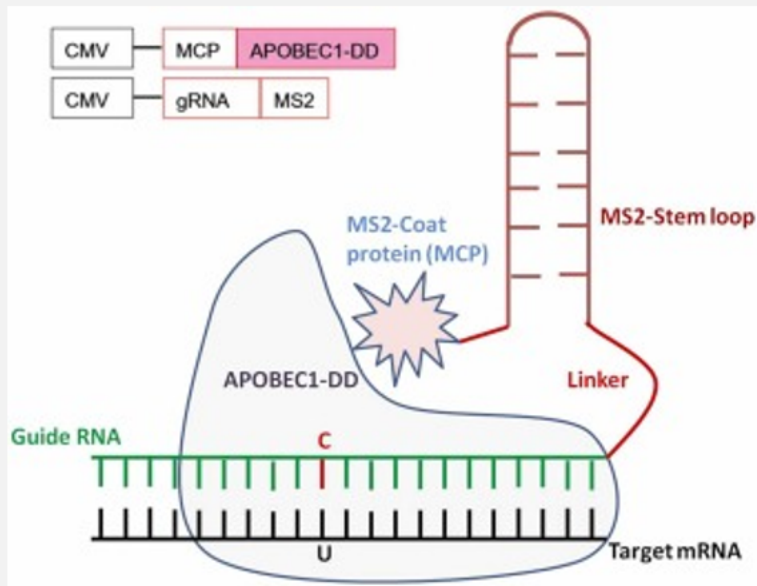


ADAR2dd: 定向改变为可以实现C→U的脱氨酶

guide RNA: 在目标C的位置被设计成A。A-C错配更容易进入酶的活性中心

dCas13b: 只识别不切割

C-to-U编辑： MS2-APOBEC系统



MS2-APOBEC系统:

gRNA: 包括MS2茎环结构
MCP和APOBEC1

定位:
gRNA 结合
目标
mRNA 上的
特定位置

招募: 融合了
APOBEC1 的
MCP 蛋白寻
找 gRNA 上的
MS2 发卡
结构并结合上
去。

编辑: 由于
MCP 被固定
在了发卡结
构上, 它带
过来的
APOBEC1
就会被强行
拉到目标 C
碱基附近

U-to- Ψ 编辑

由假尿苷合酶(PUS)催化, 被称为'第五核苷酸', 在rRNA、tRNA和snRNA中广泛存在, 通过C-C糖苷键增强RNA稳定性。

RNA独立机制

由PUS直接催化

RNA依赖机制

需H/ACA
snoRNA引导,
形成H/ACA
RNP复合物。

非标准的A to I编辑——A to G

位置: 广泛发生于后生动物的mRNA中, 在中枢神经系统尤为丰富

机制:

1

由ADAR酶家族催化, ADAR识别mRNA的双链区域, 将腺嘌呤(A)脱氨转变为肌苷(I)

2

肌苷在翻译和剪接过程中被识别为鸟嘌呤(G)



Part **3**

大显身手

A

A 提升**转录组与蛋白质组多样性**

一个基因可产生不同转录本或改变氨基酸，形成多功能蛋白

B

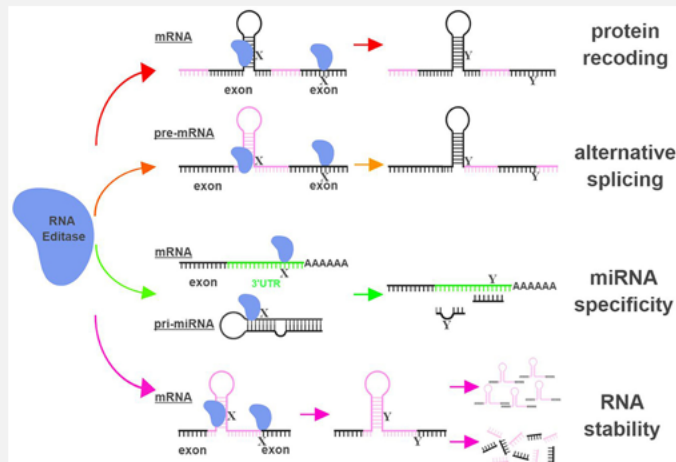
B 调控**基因表达与转录后过程**

影响 mRNA 的稳定性、剪接、核输出与翻译效率。可改变 miRNA、lncRNA 和 circRNA 的结合模式与生物学功能。

C

C 改变**蛋白质编码序列**（重编码）

A→I 编辑被读取为“G”，可导致氨基酸改变，改变蛋白活性。





功能与价值

A

D 维持**免疫稳态与细胞命运**

ADAR1 调控先天免疫传感器（如 MDA5、PKR），避免过度免疫激活。

B

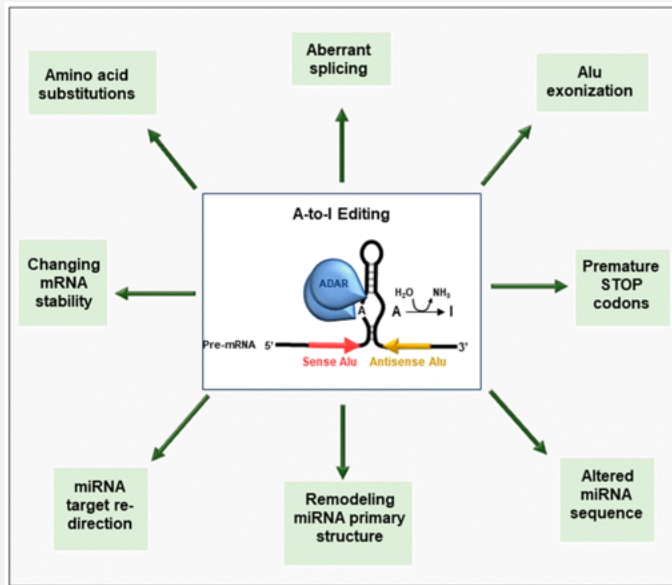
与多种**疾病**密切相关

癌症：如 AZIN1 等基因的异常 A→I 编辑促进肿瘤进展。遗传病：RNA编辑异常会影响关键蛋白功能。

C

治疗潜力巨大

可用于遗传病校正、癌症免疫治疗、病毒感染、农业育种等领域。因可逆性更强，被视作比 DNA编辑更安全 的下一代基因治疗方式。





Part **4**

披荆斩棘

旁编辑

Article | Published: 01 July 2021

Adenine base editor engineering reduces editing of bystander cytosines

[You Kyeong Jeong](#), [SeokHoon Lee](#), [Gue-Ho Hwang](#), [Sung-Ah Hong](#), [Se-eun Park](#), [Jin-Soo Kim](#), [Jae-Sung Woo](#) & [Sangsu Bae](#)

Nature Biotechnology 39, 1426–1433 (2021) | [Cite this article](#)

12k Accesses | 104 Citations | 23 Altmetric | [Metrics](#)



核心逻辑：缩小编辑窗口

- 蛋白进化 (Protein Engineering)：该研究通过对脱氨酶（如 TadA-8e）进行理性设计和定向进化，筛选出了如 TadA-8e (V106W) 等变体。
- 原理：改变了酶与 RNA/DNA 底物接触的几何结构，使得“活性中心”变得更加狭窄。这样，只有处于最中心位置的碱基能被编辑，而在旁边的碱基 (Bystander) 因为够不到活性中心而逃过一劫。

• gRNA依赖性脱靶

Article | Published: 15 April 2019

Increasing the specificity of CRISPR systems with engineered RNA secondary structures

[D. Dewran Kocak](#), [Eric A. Josephs](#), [Vidit Bhandarkar](#), [Shaunak S. Adkar](#), [Jennifer B. Kwon](#) & [Charles A. Gersbach](#) 

[Nature Biotechnology](#) **37**, 657–666 (2019) | [Cite this article](#)

33k Accesses | 319 Citations | 239 Altmetric | [Metrics](#)



核心逻辑：**发夹结构 gRNA** (hp-sgRNA)：在 gRNA 的 5' 端设计一个特定的“发夹”二级结构。

- 原理：这个发夹结构像是一个“安全栓”。只有当 gRNA 遇到完全匹配的目标序列时，释放的能量才足以打开这个发夹并启动编辑；如果遇到不完全匹配的脱靶位点，能量不足以打开“安全栓”，从而阻止了误编辑。
- 补充：此外，通过化学修饰（如 2'-OMe）提高 gRNA 的稳定性，也能显著减少此类脱靶。

• gRNA非依赖性脱靶

Letter | Published: 17 April 2019

Transcriptome-wide off-target RNA editing induced by CRISPR-guided DNA base editors

[Julian Grünewald](#), [Ronghao Zhou](#), [Sara P. Garcia](#), [Sowmya Iyer](#), [Caleb A. Lareau](#), [Martin J. Aryee](#) & [J. Keith Joung](#) 

Nature 569, 433–437 (2019) | [Cite this article](#)

50k Accesses | 586 Citations | 710 Altmetric | [Metrics](#)



首先发现常用的DNA碱基编辑器（CBE和ABE）会在细胞内诱导数以万计的RNA脱靶，且这些脱靶与gRNA序列完全无关，纯粹是由脱氨酶（APOBEC1或TadA）的过表达引起的。

> *Science*. 2019 Apr 19;364(6437):289–292. doi: 10.1126/science.aav9973.  Epub 2019 Feb 28.

Cytosine base editor generates substantial off-target single-nucleotide variants in mouse embryos

[Erwei Zuo](#) ^{# 1 2}, [Yidi Sun](#) ^{# 3}, [Wu Wei](#) ^{# 4 5 6}, [Tanglong Yuan](#) ^{# 2}, [Wenqin Ying](#) ¹, [Hao Sun](#) ⁷, [Liyun Yuan](#) ⁴, [Lars M Steinmetz](#) ^{8 9 10}, [Yixue Li](#) ^{11 12 13}, [Hui Yang](#) ¹⁴

Affiliations + expand

PMID: 30819928 PMCID: [PMC7301308](#) DOI: [10.1126/science.aav9973](#) 

> *Nature*. 2019 Jul;571(7764):275–278. doi: 10.1038/s41586-019-1314-0.  Epub 2019 Jun 10.

Off-target RNA mutation induced by DNA base editing and its elimination by mutagenesis

[Changyang Zhou](#) ^{# 1 2}, [Yidi Sun](#) ^{# 2 3 4}, [Rui Yan](#) ^{# 5}, [Yajing Liu](#) ^{# 2 6}, [Erwei Zuo](#) ^{# 1 7}, [Chan Gu](#) ⁵, [Linxiao Han](#) ¹, [Yu Wei](#) ¹, [Xinde Hu](#) ^{1 2}, [Rong Zeng](#) ^{3 6}, [Yixue Li](#) ^{8 9 10}, [Haibo Zhou](#) ¹¹, [Fan Guo](#) ¹², [Hui Yang](#) ¹³

Affiliations + expand

PMID: 31181567 DOI: [10.1038/s41586-019-1314-0](#) 

开发了GOT1检测技术，发现在小鼠胚胎中，CBE会引起严重的、随机的DNA单核苷酸变异（SNVs），这也是典型的gRNA非依赖性脱靶。



gRNA非依赖性脱靶

Letter | Published: 02 September 2019

CRISPR DNA base editors with reduced RNA off-target and self-editing activities

[Julian Grünewald](#), [Ronghao Zhou](#), [Sowmya Iyer](#), [Caleb A. Lareau](#), [Sara P. Garcia](#), [Martin J. Aryee](#) & [J. Keith Joung](#) 

Nature Biotechnology **37**, 1041–1048 (2019) | [Cite this article](#)

17k Accesses | 317 Citations | 92 Altmetric | [Metrics](#)



提出了 **SECURE** (Selective Curbing of Unwanted RNA Editing) 策略。通过在**APOBEC1脱氨酶上引入特定点突变** (如R33A等), 削弱了酶与RNA的结合力, 从而在保持DNA编辑效率的同时, 将RNA脱靶降低了两个数量级以上。

Cytosine base editor generates substantial off-target single-nucleotide variants in mouse embryos

[ERWEI ZUO](#) , [YIDI SUN](#) , [WU WEI](#) , [TANGLONG YUAN](#) , [WENQIN YING](#) , [HAO SUN](#), [LIYUN YUAN](#) , [LARS M. STEINMETZ](#) , [YIXUE LI](#) , AND [HUI YANG](#) 

[Authors Info & Affiliations](#)

SCIENCE · 28 Feb 2019 · Vol 364, Issue 6437 · pp. 289-292 · DOI:10.1126/science.aav9973 



发现CBE在水稻中由过活泼的**脱氨酶 (APOBEC1)** 造成的脱靶会引起大量gRNA非依赖性的随机单核苷酸变异 (SNV)。筛选了不同的脱氨酶, 并提出了**通过优化脱氨酶的表达水平和结构来降低风险**。

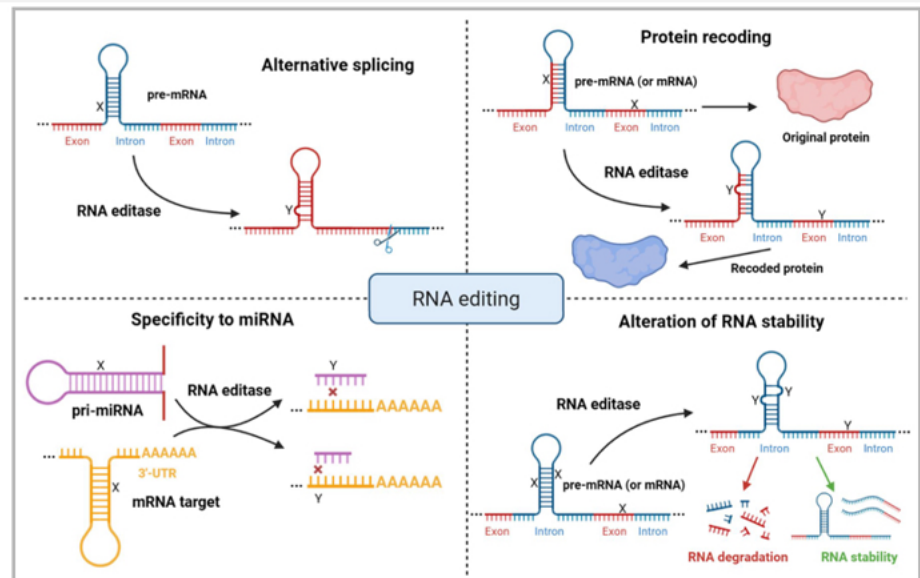


Part 5

终篇归旨

RNA editing的结果

RNA编辑是一种关键的**转录后**调控机制，通过改变 RNA 序列来扩展生命活动的调控层级。

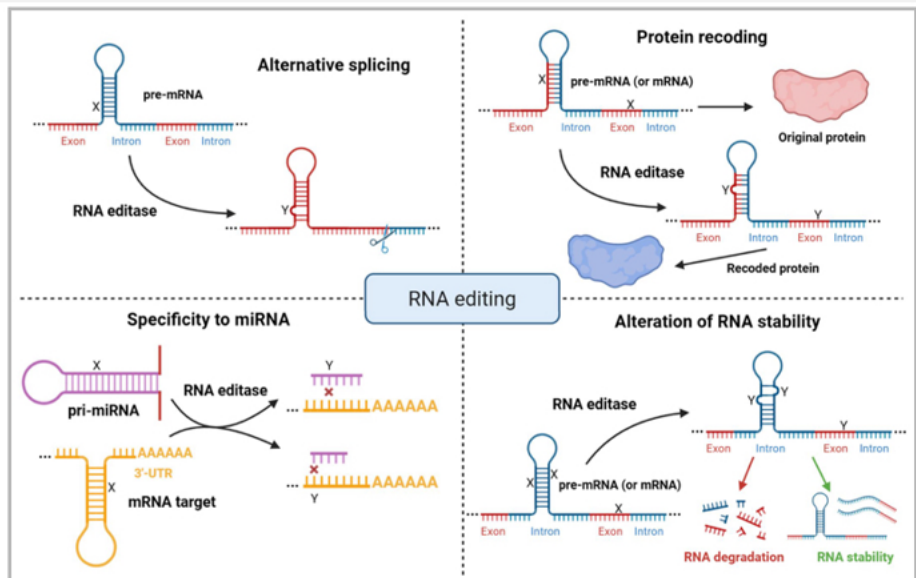


可变剪接 (Alternative splicing)

- ✓ 核心逻辑：RNA编辑（图中用 X \rightarrow Y 表示）发生在内含子与外显子的交界处，或者剪接位点的关键碱基上。
- ✓ 后果：碱基的改变导致原有的剪接位点失活或产生新的剪接位点，从而改变了剪接模式。

RNA editing的结果

RNA编辑是一种关键的**转录后**调控机制，通过改变 RNA 序列来扩展生命活动的调控层级。

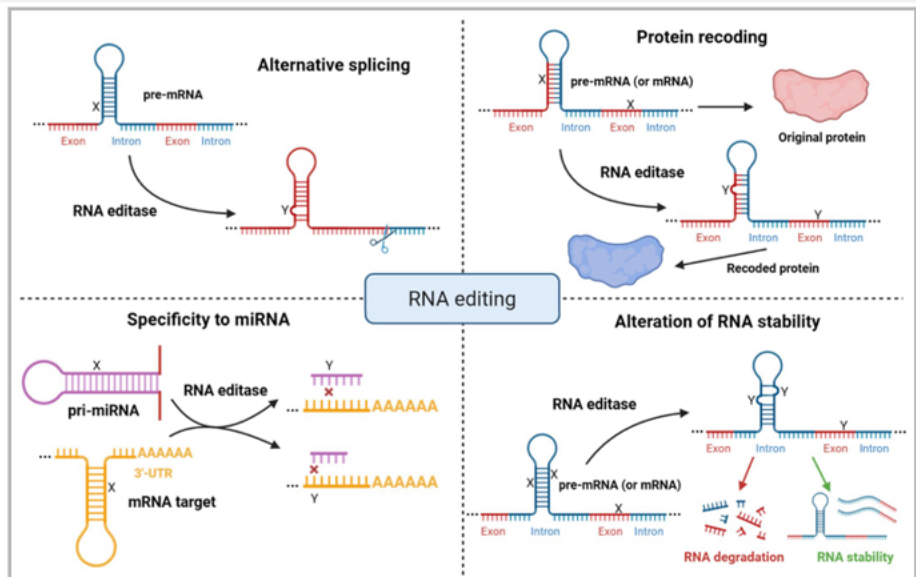


蛋白质重编码 (Protein recoding)

- ✓ 核心逻辑：这是你之前关注的 ApoB 编辑所属的类别。编辑发生在 mRNA 的**外显子 (Exon)** 区。
- ✓ 后果：改变了密码子（如 CAA \rightarrow UAA），导致翻译出来的蛋白质氨基酸序列发生变化，或者蛋白质提前终止。

RNA editing的结果

RNA编辑是一种关键的**转录后**调控机制，通过改变 RNA 序列来扩展生命活动的调控层级。

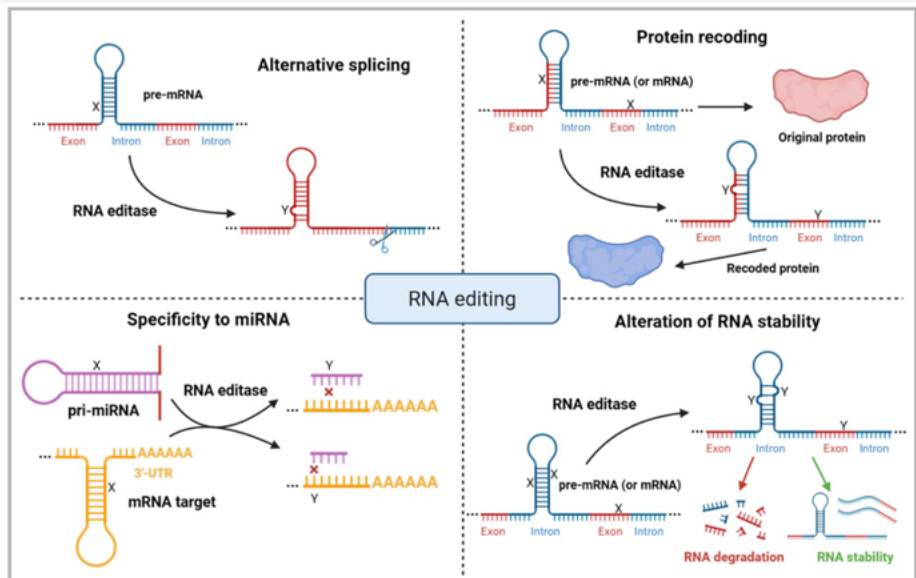


对 miRNA 的影响 (Specificity to miRNA)

- ✓ 核心逻辑：编辑发生在微小 RNA (miRNA) 的前体 (pri-miRNA) 上，或者发生在 mRNA 的 3'-UTR 靶向区域。
- ✓ 后果：如果 pri-miRNA 被编辑，它可能无法正确加工，或靶向了错误的 mRNA；如果 mRNA 靶区被编辑，原本能结合的 miRNA 可能无法结合（反之亦然）。

RNA editing的结果

RNA编辑是一种关键的**转录后**调控机制，通过改变 RNA 序列来扩展生命活动的调控层级。



调节 RNA 稳定性 (Alteration of RNA stability)

- ✓ 核心逻辑：编辑改变了 RNA 的高级结构（如发卡结构）或招募了不同的 RNA 结合蛋白。
- ✓ 后果：RNA degradation（红色箭头）：编辑导致 RNA 更容易被核酸酶降解；RNA stability（绿色箭头）：编辑保护了 RNA，延长了它的寿命。



RNA editing的类型

特征	A to I 编辑	C to U 编辑	U to Ψ 编辑
修饰类型	脱氨反应 (腺苷(A)→肌苷(I), 翻译中识别为鸟苷(G))	脱氨反应 (胞苷(C)→尿苷(U))	异构化反应 (尿苷(U)→假尿苷(Ψ), 碱基结构改变但序列不变)
酶	ADAR家族 (腺苷脱氨酶作用于RNA, 含dsRBD结构域)	APOBEC家族和PPR蛋白	PUS家族 (假尿苷合酶家族, 如TruA、TrmA等)
识别机制/方式	依赖于RNA双链结构	依赖于序列特异性	序列/结构特异性或snoRNA引导
分布	真核生物中广泛存在, 主要分布于mRNA (特别是Alu元件)、非编码RNA	动物和植物细胞器中 (如线粒体、叶绿体)	rRNA、tRNA、snRNA (集中于核糖体、剪接体等功能RNA)
功能	改变编码序列 (如受体亚型)、调控RNA稳定性/翻译效率、影响剪接、神经功能调控	调控基因表达 (如APOB基因编辑影响脂蛋白合成)、植物器官发育	维持RNA高级结构稳定、增强翻译效率、调控剪接/定位
可逆性	理论上可逆 (肌苷可被特定酶还原为腺苷), 但生理条件下罕见	不可逆 (脱氨反应通常单向)	不可逆 (异构化反应单向)
举例	1. 哺乳动物脑中GluA2编辑 (Q/R位点, 调控钙离子通透性) 2. 果蝇性别决定基因dsx编辑	哺乳动物APOB基因编辑	1. tRNA ^(Phe) 中Ψ55修饰 (增强密码子识别) 2. 人类28S rRNA中Ψ位点 (维持核糖体结构)

基因治疗的巨大潜力

可逆性和安全性：
疾病修复：
药物化和可控化：

神经科学和脑疾病研究

通过 RNA 编辑调控神经信号传导，开发新型神经药物或神经修复策略；模拟或纠正神经疾病相关的 RNA 编辑缺陷（如 ALS、精神分裂症）。

抗病毒和感染控制

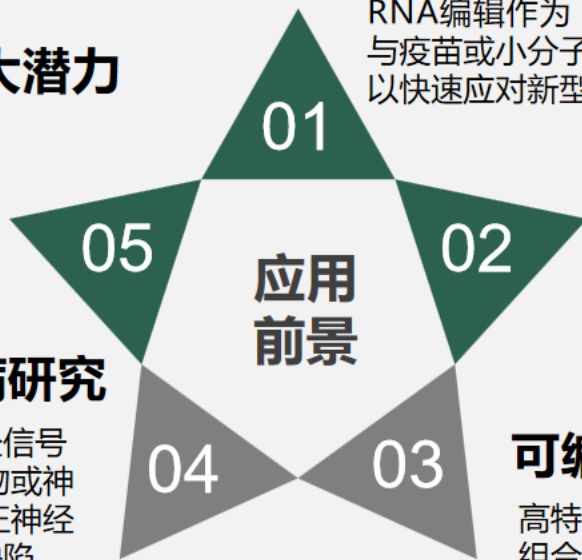
RNA编辑作为 抗病毒疗法，可以与疫苗或小分子药物联合使用。可以快速应对新型病毒突变。

工业与农业生物技术

作物改良
蛋白工程与合成生物学
生物制药

可编程 RNA 编辑的发展方向

高特异性、低脱靶
组合编辑
体内递送系统
可调控和可逆系统



面临挑战

生物学和安全性未知

脱靶效应和特异性问题

编辑效率和可控性

体内递送难题

可逆性与治疗持续性

特定疾病适用性限制



西北农林科技大学
NORTHWEST A&F UNIVERSITY

西北农林科技大学2023级动物科技学院

敬请老师批评指正

生物育种专业·基因编辑技术课程

答辩人：徐兆颖 指导老师：徐坤

