

CRISPR/Cas9 介导的定点同源重组基因插入单质粒系统的设计和验证研究

刘涵菲^{1,2}, 张 砾^{1,3}, 刘军花³, 孙 刚²

¹解放军医学院, 北京 100853; ²解放军总医院第一医学中心消化内科, 北京 100853; ³解放军总医院医学创新研究部, 北京 100853

摘要: **背景** CRISPR/Cas9 系统现已成为基因编辑的核心工具, 但在使用过程中仍面临长片段基因整合困难、转基因沉默等挑战。**目的** 拟设计一种基于 CRISPR/Cas9 系统的环状单质粒, 可在多种细胞内实现外源基因的定点插入和稳定表达。**方法** 将 Cas9、靶向特定基因位点的 sgRNA 及同源重组供体模板[选用绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)作为报告基因进行验证]整合至单一环状质粒系统, 使用阳离子聚合物转染法将该单质粒递送至细胞内, 并通过荧光显微镜观察、聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)扩增及 Sanger 测序进行验证。**结果** 该单质粒系统在人类 HEK293T 和小鼠 3T3 细胞中实现了长片段基因的精准定点插入。荧光显微镜观察发现, 该质粒在转染后第 6 天仍保持稳定 GFP 表达; PCR 扩增和测序验证了插入位点的准确性。流式细胞分析显示, 在无药物筛选条件下, 293T 细胞的靶向整合效率达 5.3%。qPCR 分析表明, 插入后内源 *ACTB* 基因表达未受显著影响(变化范围 0.2 ~ 1.3 倍), 证实了该策略的安全性。**结论** 本研究为长片段基因的稳定整合提供了一种简便、高效的解决方案, 在工程化细胞构建、转基因体外模型构建中具有重要应用价值。

关键词: CRISPR/Cas9 系统; 基因定点插入; 长片段基因整合; 单质粒系统; 工程化细胞构建

中图分类号: R394; Q813.4

文献标志码: A

文章编号: 2095-5227(2025)11-1019-09

DOI: 10.12435/j.issn.2095-5227.25070702

引用本文: 刘涵菲, 张砾, 刘军花, 等. CRISPR/Cas9 介导的定点同源重组基因插入单质粒系统的设计和验证研究[J]. 解放军医学院学报, 2025, 46 (11): 1019-1027.

Design and validation of a CRISPR/Cas9-mediated site-specific homologous recombination for single-plasmid gene insertion system

LIU Hanfei^{1,2}, ZHANG Luo^{1,3}, LIU Junhua³, SUN Gang²

¹Chinese PLA Medical School, Beijing 100853, China; ²Department of Gastroenterology, the First Medical Center of PLA General Hospital, Beijing 100853, China; ³Medical Innovation Research Department of PLA General Hospital, Beijing 100853, China

Corresponding author: SUN Gang. Email: sungang@301hospital.com.cn

Abstract: Background The CRISPR/Cas9 system has emerged as a cornerstone technology for genome editing. However, it still faces challenges such as inefficient long-fragment integration and transgene silencing. **Objective** To design a circular single-plasmid CRISPR/Cas9 system to achieve site-specific integration and stable expression of exogenous genes in multiple cell types. **Methods** Cas9, sgRNA targeting specific gene loci and homologous recombination donor templates (green fluorescent protein was selected as the reporter gene for verification) were integrated into a single circular plasmid system. The single plasmid was delivered into the cells by cationic lipid-based transfection method and verified by fluorescence microscopy observation, PCR amplification and sequencing. **Results** The single-plasmid system achieved precise site-specific insertion of long gene fragments in both human HEK293T cells and mouse 3T3 cells. Fluorescence microscopy observations revealed that stable GFP expression was maintained even on the 6th day post-transfection. PCR amplification and Sanger sequencing were used to confirm the accuracy of the insertion sites. Flow cytometry analysis demonstrated that, under drug-free selection conditions, the targeted integration efficiency in 293T cells reached 5.3%. qPCR analysis indicated that the expression of the endogenous *ACTB* gene remained largely unaffected following insertion (variation range: 0.2 - 1.3-fold), confirming the safety of this strategy. **Conclusion** This study provides a simple

收稿日期: 2025-07-07

基金项目: 国家自然科学基金(32371490)

第一作者: 刘涵菲, 硕士. Email: liuhanfei0228@163.com

通信作者: 孙刚, 博士, 主任医师, 教授. Email: sungang@301hospital.com.cn

and efficient solution for stable integration of long-fragment gene, which has significant potential in engineered cell construction and *in vitro* transgenic model development.

Keywords: CRISPR/Cas9; site-specific integration; integration of long-fragment gene; single plasmid system; engineering cell construction

Cited as: Liu HF, Zhang L, Liu JH, et al. Design and validation of a CRISPR/Cas9-mediated site-specific homologous recombination for single-plasmid gene insertion system[J]. Acad J Chin PLA Med Sch, 2025, 46(11): 1019-1027.

CRISPR/Cas9系统是源于细菌和古生菌的一种适应性免疫系统,该系统可针对性切除外来病毒及质粒整合在细菌基因组上的片段,从而抵抗外源性遗传物质的入侵^[1-2]。2012年发表的研究表明,CRISPR/Cas9系统通过特异性双RNA引导结构指导DNA内切酶Cas9进行DNA特异性位点的切割。该研究进一步简化了CRISPR/Cas9系统,提出设计特异性单RNA引导系统(single guide RNA, sgRNA)实现靶向特异基因位点的切割,奠定了CRISPR/Cas9基因组编辑技术发展的基础^[1,3-4]。该系统在特定位点诱导DNA双链断裂(double strand break, DSB),激活内源性DNA修复途径——非同源末端连接(non-homologous end joining, NHEJ)或同源重组修复(homology directed repair, HDR)^[5]。NHEJ通常导致碱基缺失或插入突变,而HDR在提供同源臂供体模板的情况下,可实现基因精准插入或替换。CRISPR/Cas9系统介导的精准基因编辑广泛应用于医学、生物技术、农业等领域,在基因改造模型构建^[6]、基因治疗^[7]和功能基因组学研究^[8]中具有重要意义。

虽然CRISPR/Cas9技术的快速发展使得基因组精准编辑成为可能,但长片段基因的定点整合仍面临许多挑战。理论上HDR可实现基因的精准定点插入,但事实上,HDR本身效率较低,并受NHEJ的竞争抑制,且基因编辑效率随插入基因片段长度的增加而下降^[9]。既往研究表明,当插入的基因片段长度超过3 kb时,HDR效率显著降低^[10]。先导编辑(prime editing, PE)技术的出现,减少了对DSB和HDR的依赖,但仅限于单碱基替换、小片段基因插入和敲除的编辑,无法实现长基因片段的整合。有研究提出,抑制NHEJ/NMEJ途径所必需的酶,可提高基因编辑的效率及精确度^[11-13]。此外,也有研究报道通过NHEJ途径而非HDR途径实现长片段基因在人原代T细胞中的整合^[14]。

在供体递送方面,病毒载体是目前递送CRISPR/Cas9系统进入细胞的最常见、高效的方法^[9],但也存在一定局限性,如仅限于短基因片段的插入、表达易沉默、存在随机整合导致的安全

风险等问题。腺相关病毒(adeno-associated virus, AAV)最大包装容量仅为4.7 kb,面对体积庞大的CRISPR/Cas9基因编辑系统,常需要将递送系统分割为两个载体^[15],或探索使用更小的Cas蛋白^[16-18]。在使用病毒载体时,转基因沉默也是进行复杂细胞工程改造的主要障碍,多种机制可使细胞沉默转入基因,如通过识别病毒顺式元件,实现基因或转录物的主动表观遗传沉默^[19],且病毒DNA的随机整合也有导致肿瘤发生的风险^[20]。既往研究使用整合酶缺陷型慢病毒(integrase-deficient lentiviruses, IDLV)作为递送载体,实现了长片段基因的定点整合及稳定表达,且降低了病毒基因组随机整合的风险^[19]。

质粒系统因具有易构建、操作简便、成本相对较低等优点而备受关注。然而,现有的单质粒系统在长基因片段插入方面仍缺乏优化。因此,为实现长基因片段的整合,并优化现有递送系统的不足,本研究提出构建包含Cas9、sgRNA及同源重组供体模板的单一环状质粒载体。通过该载体,可将外源基因直接插入内源必需基因编码区的上游和阅读框内,使得插入基因受到内源基因启动子的调控,确保其长期稳定表达。

1 材料与方法

1.1 质粒与主要试剂

载体pLDDg-GFP-h*ACTB*-Cas(靶向人源*ACTB*基因)、pLDDg-GFP-m*Actb*-Cas(靶向鼠源*Actb*基因组)的克隆构建及质粒抽提均由通用生物(安徽)股份有限公司完成;转染试剂JetPRIME(101000046)购自Polyplus公司;磷酸缓冲液PBS(C10010500BT, Gibco)、0.25% EDTA胰酶(25200056, Gibco)、双抗-青/链霉素(10 000 IU/mL)、DMEM细胞培养基(C11995500BT, Gibco)均购自LifeTech公司,胎牛血清FBS(FND500)购自Excell公司;细胞冻存液购自上海碧云天生物有限公司。

1.2 重组载体构建与合成

本研究设计了一种环状单质粒载体,其大小为14 370 bp。该质粒将pCas9表达盒、U6启动子

驱动的sgRNA表达盒以及同源重组供体模板整合于单一环状DNA中。对于sgRNA序列的设计,为了分别靶向人源 β -肌动蛋白(*ACTB*)基因和小鼠源 β -肌动蛋白(*Actb*)基因,通过 chopchop 网站(<http://chopchop.cbu.uib.no/>)设计并筛选了邻近起始密码子附近且预测编辑效率高的sgRNA序列(表1)。HDR 供体模板包含以下关键元件:位于外源基因两侧、长度约350~400 bp、与靶位点同源的5'和3'同源臂(homology arms, HAs);绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)作为报告基因;以及用于连接GFP与下游*ACTB*或*Actb*靶基因的P2A连接序列。此外,在供体模板两端同源臂的外侧引入了一段含原间隔序列临近基序(protospacer adjacent motif, PAM)的sgRNA序列,该设计旨在使进入细胞后表达的Cas9-sgRNA复合物能够切割质粒上的PAM位点^[21],从而将环状质粒线性化并释放出游离的HDR修复模板,理论上可提高模板利用效率。综上,将含PAM区的sgRNA序列-上游5'同源臂序列-GFP序列-P2A连接序列-下游3'同源臂序列-含PAM区的sgRNA序列-U6启动子-sgRNA序列-gRNA通用发夹序列,依次串联得到一条新的DNA拼接序列。采用化学合成基因法合成该DNA片段,并借助分子生物学中的无缝克隆技术将其连接至含pCas9表达盒的骨架载体中,得到最终靶向人*ACTB*基因的载体pLDDg-GFP-h*ACTB*-Cas和靶向小鼠*Actb*基因的载体pLDDg-GFP-m*Actb*-Cas(图1A)。该质粒进入细胞后的工作原理如图1B所示。

表1 引物信息

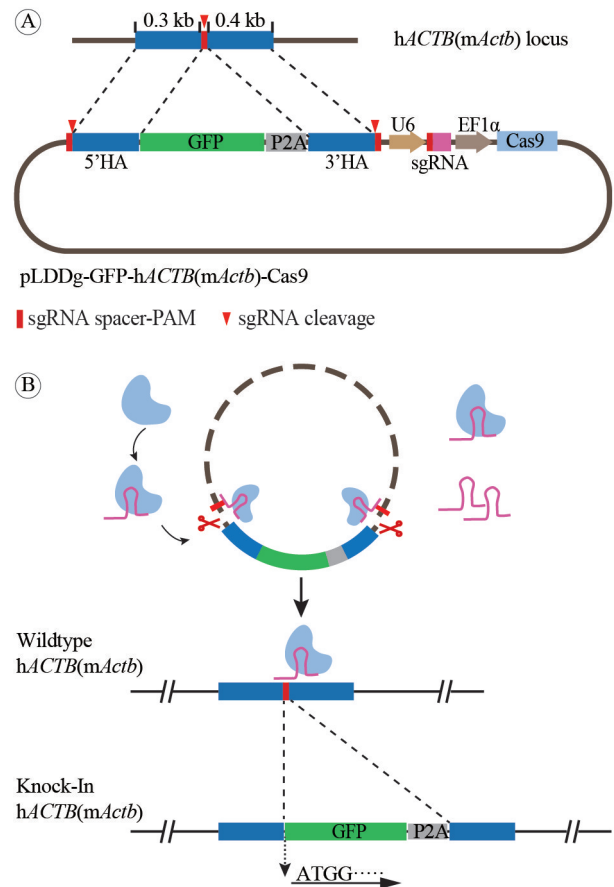
Tab. 1 Primer information

引物	引物序列(5'→3')
<i>ACTB</i> _sgRNA	CGCGGCGATATCATCATCCATGG
<i>Actb</i> _sgRNA	CGCAGCGATATCGTCATCCAATGG
GFP-F	CTACTACAGCTTCGTGGTGGAC
<i>ACTB</i> -R	ACTCACCTGGGTCATCTTCTCG
<i>Actb</i> -R	CAATTGAGAAAGGGCGTGGC

划线部分为PAM位点。

1.3 细胞培养、传代与转染

实验中HEK293T细胞(ATCC CRL-3216)、3T3细胞(ATCC CRL-1658)均来源于本课题组细胞冻存库。HEK293T细胞和3T3细胞的培养体系均为DMEM完全培养基(由90%DMEM、10%FBS及1%双抗配置),并置于37°C、5% CO₂细胞培养箱进行培养。根据细胞的生长密度进行传代,传代比例



A: 本研究构建的环状单质粒载体示意图; B: 该质粒进入细胞内后的工作原理——Cas9与sgRNA复合物识别HDR供体模板两端的PAM序列,实现质粒的自切割;随后Cas9与sgRNA复合物靶向插入位点区域的PAM序列并诱导DSB,在HDR供体模板的存在下,进行同源重组修复,实现GFP基因的定点插入。

图1 质粒载体的设计及工作原理

Fig. 1 Design and working principle of the plasmid vectors

为1:3。提前一天将HEK293T、3T3细胞传代于6孔板中。次日,待密度达70%~80%进行转染。按照转染试剂说明将4.0 μ g质粒pLDDg-GFP-h*ACTB*-Cas或pLDDg-GFP-m*Actb*-Cas与100 μ L JetPRIME®缓冲液温和混匀。在以上混合液中加入8.0 μ L的jetPRIME®转染试剂,涡旋10 s,室温下静置孵育10 min。缓慢滴入HEK293T或3T3细胞孔中,4~6 h更新培养基,并放回CO₂细胞培养箱中。

1.4 单克隆细胞筛选

细胞转染两周后,通过显微镜观察细胞的绿色荧光信号,圈画含绿色荧光的细胞群体。采用装有DMEM培养基的200 μ L移液枪吹打画圈区域的细胞,并快速收集至15 mL离心管,500 g离心3 min。取细胞沉淀加入适量0.25%胰酶进行消化,加入DMEM完全培养基中和并定容至10 mL。经

计数后, 取100个细胞再次重悬至10 mL DMEM完全培养基中, 按照每孔100 μ L量用排枪转移至96孔板中。

本研究使用显微镜成像系统(Nikon, Japan)对细胞进行成像。每日观察GFP荧光的变化情况, 使用 $\times 10$ 镜头对含GFP荧光视野区域拍照记录。

1.5 PCR扩增及测序鉴定

取少量单克隆细胞沉淀于1.5 mL EP管中, 使用快速DNA提取检测试剂盒(KG203, TIANGEN)进行基因组DNA提取。取1 μ L DNA以相应的特定引物进行PCR扩增(KT211, TIANGEN), 反应体系为20 μ L。反应结束后, 对产物进行1.5%琼脂糖凝胶电泳检测, 在凝胶成像仪(Bio-Rad, USA)中拍照成像。根据预期扩增条带大小来判定, 并进一步切胶测序。实验中使用的PCR引物序列均由通用生物(安徽)股份有限公司合成, 具体引物序列见表1。

1.6 流式细胞学分析

按照常规步骤对不同组别的细胞进行消化, 400 g离心5 min, 弃上清。细胞沉淀用PBS再次重悬并计数, 使其终浓度为 10^7 cells/mL。取等量的300 μ L细胞悬液(3×10^6 cells), 并通过70 μ m细胞筛网(Falcon)过滤到流式管中, 直接在FACSAria™ III流式细胞仪(BD Biosciences, USA)上采集分析GFP荧光信号(使用激光488 nm), 最后, 采用FlowJo™ v10.8.1软件进行数据分析。

1.7 qPCR分析

将不同克隆细胞采用RNA提取试剂盒(LS1040, TIANGEN)提取总RNA, 并使用NanoDrop One分光光度计(Thermo Fisher, USA)进行浓度测定。取1 μ g总RNA, 使用逆转录试剂盒(KR118, TIANGEN)进行基因组DNA去除及逆转录, 相关反应体系参照说明书, 并将获得的cDNA稀释至10 ng/ μ L进行后续的qPCR反应。qPCR反应采用FastReal快速荧光定量(SYBR Green)试剂盒(FP217, TIANGEN)在ABI7500实时PCR仪器(Thermo Fisher, USA)上进行, 相关反应体系配置及反应程序均参照说明书, 上游引物序列分别是qACTB-Forward: ACTGGAACGGTGAAGGTGAC; qACTB-Reverse: AGTGGGGTGGCTTTTAGGAT; qGAPDH-Forward: AGCCACATCGCTCAGACAC; qGAPDH-Reverse: GCCAATACGACCAAATCC; qActb-Forward: GCCATTCAGGCTGTGCTGTC; qActb-Reverse: CAGGTCCAGACGCAGGATGG;

qGapdh-Forward: TACAGCAACAGGGTGGTGGAC; qGapdh-Reverse: TGGGATAGGGCCTCTCTTGCT。每个样本均设有3个平行重复, 基因相对表达量以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算得到。

1.8 统计学分析

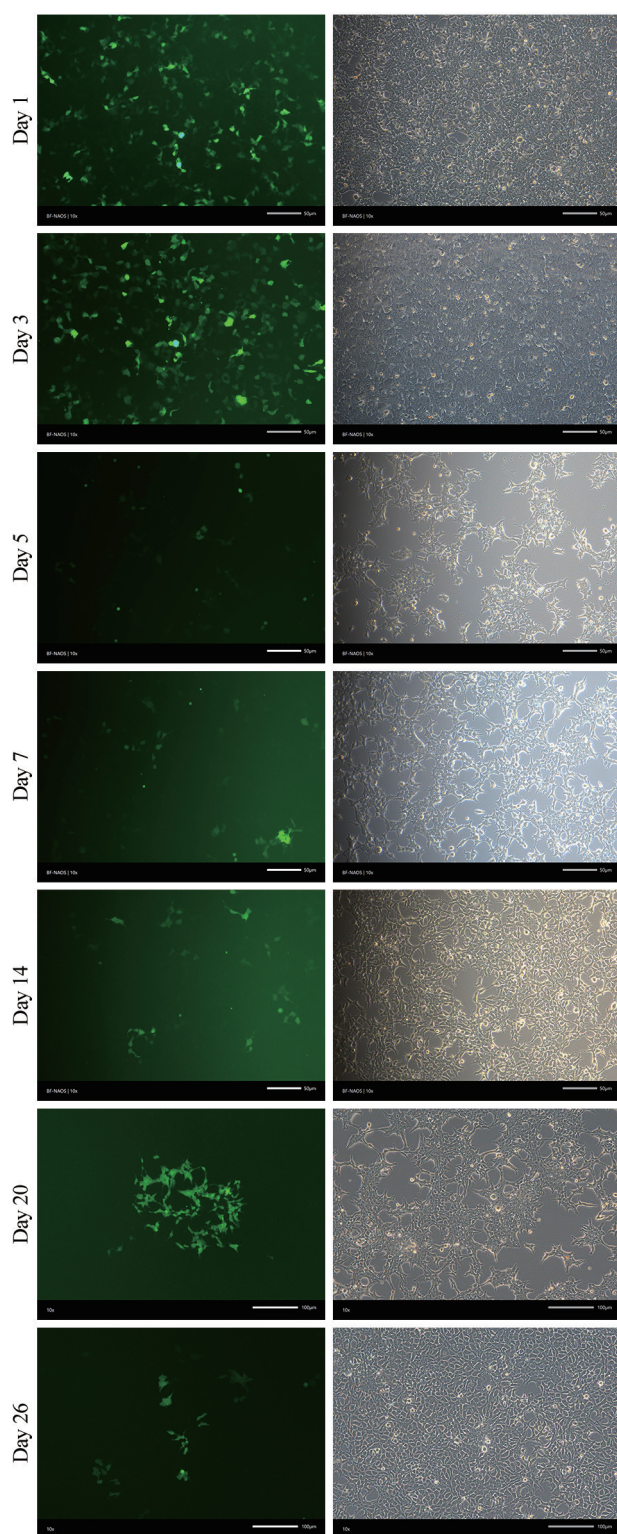
采用GraphPad Prism 10.0软件进行数据处理及作图, qPCR结果以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析; 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 单质粒系统在人HEK293T细胞中实现长片段基因定点插入

为评估所构建的环状单质粒载体(图1A, 设计细节见方法1.2)在长片段基因定点插入中的应用潜力, 首先在人类HEK293T细胞中进行验证。通过阳离子聚合物转染方式将pLDDg-GFP-hACTB-Cas9载体递送至HEK293T细胞, 并进行不间断地传代培养。通过在不同时间点进行荧光显微镜成像观察, 发现Day1、Day3荧光表达较强, 考虑细胞中存在质粒自身瞬时表达的情况, 随时间推移及细胞传代稀释, 细胞中游离质粒DNA逐渐消耗, 表达绿色荧光的细胞逐渐减少, 但始终存在部分细胞一直呈现荧光信号, 初步认为持续呈现荧光信号的细胞是已成功整合GFP基因的细胞(图2)。

为进一步评估该单质粒系统的转染效率, 分别用仅不含gRNA序列的pLDDg-No gRNA-GFP-hACTB-Cas9质粒(该质粒除不含gRNA序列外, 其他序列与pLDDg-GFP-hACTB-Cas9质粒完全相同)和pLDDg-GFP-hACTB-Cas9质粒转染293T细胞。流式细胞学分析数据表明, 在第6天293T No gRNA-GFP组GFP信号为0.87%, 考虑存在质粒的瞬时表达, 但未发生基因编辑(GFP整合现象); 而293T hACTB-GFP组仍存在5.3%的GFP阳性细胞, 结合持久的荧光观察结果, 证实在未经筛选的前提下该质粒体系可实现基因敲入效率约为5.3%(图3)。经无限稀释单克隆筛选并获得单克隆细胞株, 通过荧光显微镜观察初步筛选出3株表达绿色荧光蛋白的单克隆细胞293T C1、293T C2、293T C3(图4A)。为验证GFP是否成功实现定点敲入, 本研究设计了一对特异性引物(表1), 一条引物靶向插入序列, 另一条引物靶向非同源臂的细胞基因组区域。对敲入片段进行PCR扩增检测, 预期发生正确敲入的细胞可检测到741 bp条带。结果显示, 293T C1、293T C2、293T C3三株细胞均在

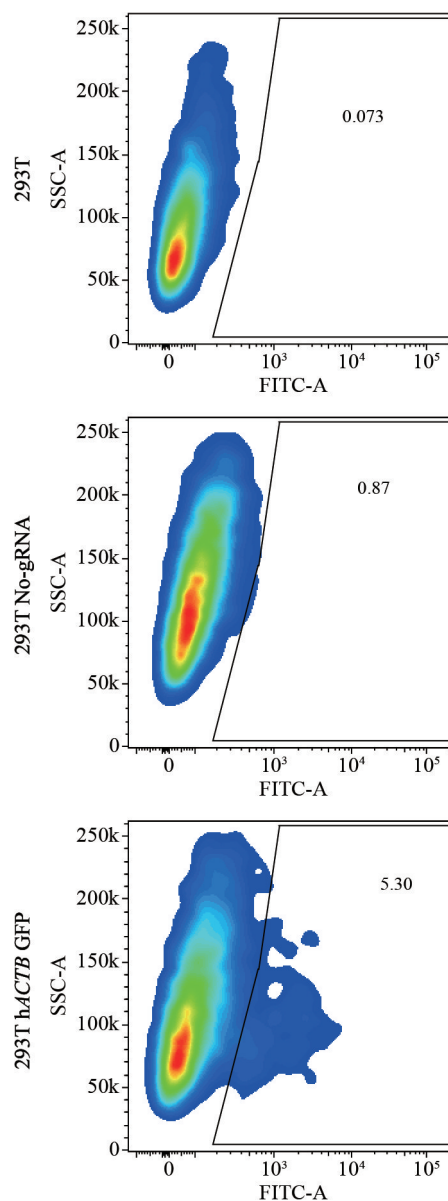


293T细胞转染后，不同时间点荧光显微镜下成像；放大倍数：10×，明场+荧光；比例标尺：100 μm。

图2 293T细胞GFP荧光表达情况

Fig. 2 Fluorescence expression of GFP in 293T cells

750 bp附近出现特异性扩增条带(图4B)，与预期条带大小相符。进一步切取293T C1条带并进行Sanger测序。将测序结果与预期序列进行比对，结



使用同等质量的pLDDg-GFP-hACTB-Cas9质粒及pLDDg-No gRNA-GFP-hACTB-Cas9(不含gRNA序列)质粒分别转染293T细胞。转染后的第六天，通过流式分析评估其GFP荧光表达。其中，293T指的是未经特殊处理的293T细胞；293T No gRNA-GFP指的是pLDDg-No gRNA-GFP-hACTB-Cas9(不含gRNA序列)质粒转染293T细胞组；293T hACTB-GFP指的是pLDDg-GFP-hACTB-Cas9质粒转染293T细胞组。

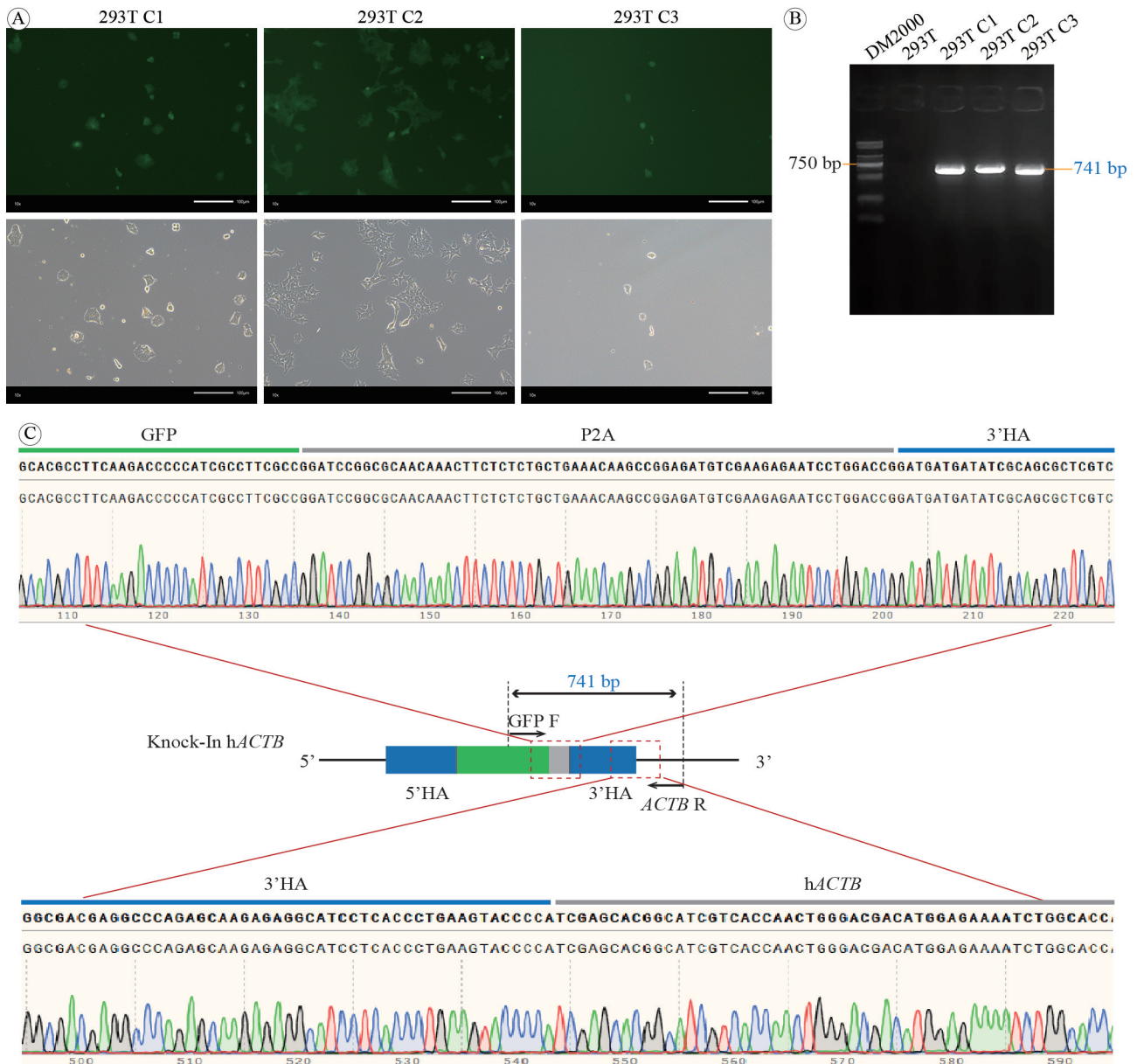
图3 pLDDg-GFP-hACTB-Cas9质粒转染293T细胞效率

Fig. 3 Transfection efficiency of the pLDDg-GFP-hACTB-Cas9 plasmid into 293T cells

果显示，二者序列完全一致，充分证实GFP基因已精准插入预定基因位点(图4C)。

2.2 单质粒系统在小鼠3T3细胞中实现长片段基因定点插入

为进一步验证该单质粒系统的适用性，在小鼠胚胎成纤维细胞-3T3细胞中进行了验证。通过



A: 转染后经筛选的293T GFP阳性的三株单克隆细胞株(分别命名为293T C1、293T C2、293T C3)在荧光显微镜下的成像。放大倍数: 10×, 明场+荧光; 比例标尺: 100 μm。B: 293T C1、293T C2、293T C3单克隆株基因组扩增电泳结果。DM2000(从低到高依次是100, 250, 500, 750, 1 000, 1 500, 2 000 bp)。C: 293T C1单克隆株的基因组Sanger测序结果。

图4 293T hACTB GFP单克隆株筛选及验证结果

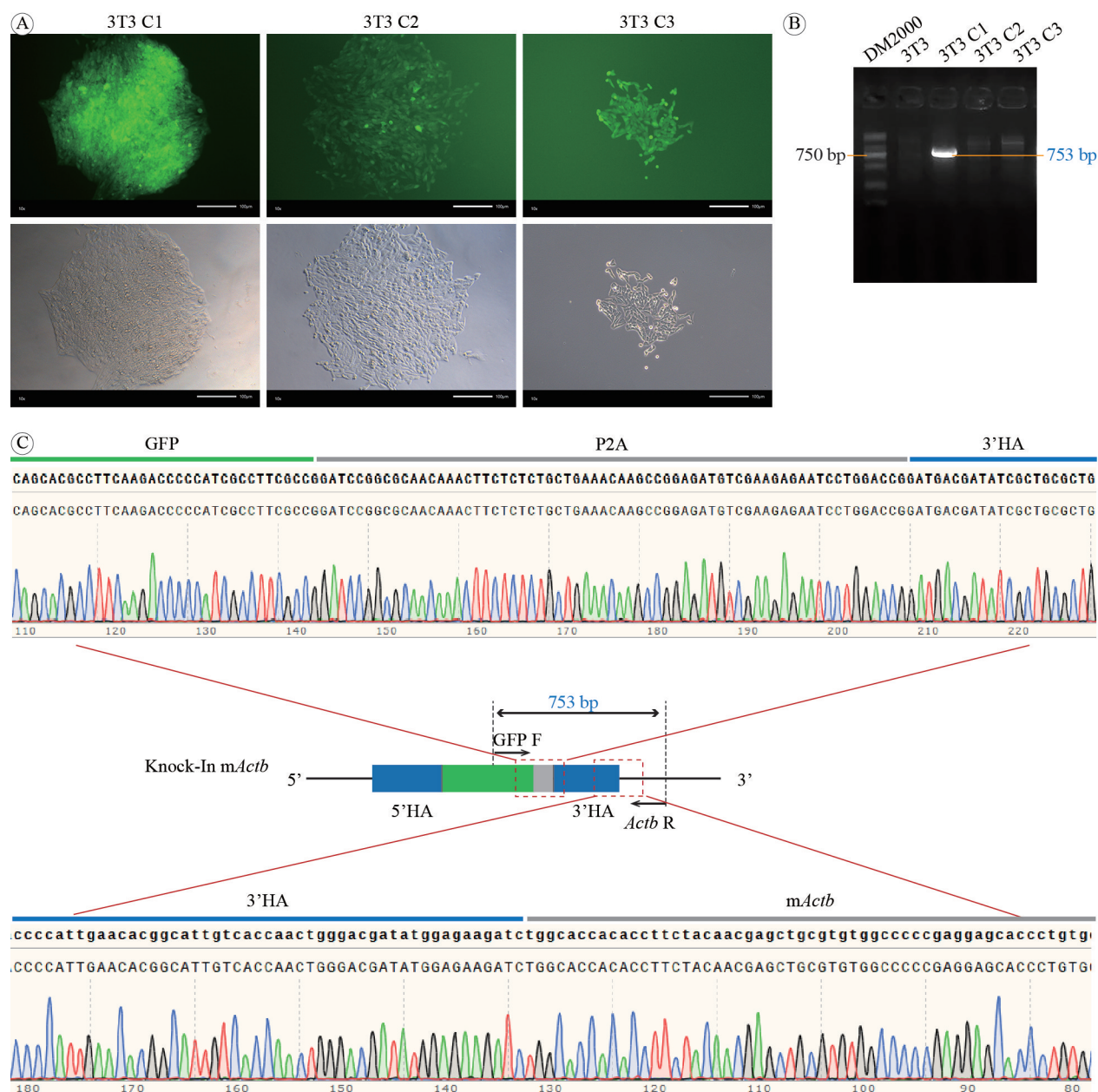
Fig. 4 Screening and verification results of 293T hACTB GFP monoclonal strain

脂质体转染将pLDDg-GFP-mActb-Cas9载体递送至293T细胞,进行稀释、传代及单克隆株筛选培养,成功筛选出表达绿色荧光的三株单克隆细胞293T C1、293T C2、293T C3(图5A)。本研究同样设计了靶向插入序列和非同源臂的细胞基因组区域的特异性引物(表1),对敲入片段进行检测。预期发生正确敲入的细胞可检测到753 bp条带。凝胶电泳结果提示,单克隆细胞293T C1在750 bp附近出现特异性扩增条带(图5B),提示GFP基因序列成功定点插入。进一步切取293T C1条带并进行Sanger

测序,结果证实GFP基因序列精准插入Actb基因编码区的上游,无任何碱基移码突变,与预期序列一致(图5C)。

2.3 基因定点插入对ACTB基因表达的影响

本研究选择了ACTB基因编码区的上游作为外源基因敲入位点,为进一步评估该系统的安全性,利用qPCR方法对上述实验中获得单克隆细胞进行hACTB/mActb表达变化的分析评估。结果表明,在获取的3株293T hACTB GFP细胞中,ACTB基因表达分别下调至0.2、下调至0.4,上调至1.2; 293T



A: 转染后经筛选的3T3 *Actb* GFP阳性的三株单克隆细胞株(分别命名为3T3 C1、3T3 C2、3T3 C3)在荧光显微镜下的成像。放大倍数: 10×, 明场+荧光; 比例标尺: 100 μm。B: 3T3 C1、3T3 C2、3T3 C3单克隆株基因组扩增电泳结果; DM2000(从低到高依次是100, 250, 500, 750, 1 000, 1 500, 2 000 bp)。C: 3T3 C1单克隆株的基因组 sanger 测序结果。

图5 3T3 *Actb* GFP单克隆株筛选及验证结果

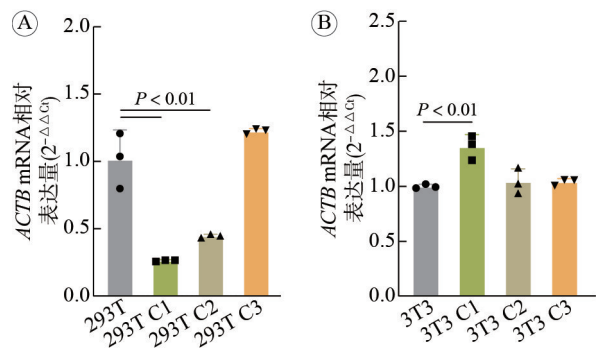
Fig. 5 Screening and verification results of 3T3 *Actb* GFP monoclonal strain

mActb GFP细胞中, 3T3 C1细胞的*mActb*基因表达上调至1.3(图6)。上述数据表明, 在该位点进行*gfp*基因敲入时, 存在部分细胞株的*hACTB/mActb*表达量处于可用于后续实验的接受范围。

3 讨论

近年来, 合成生物学的快速发展推动了基因工程化细胞疗法的突破。通过设计基因调控电路, 使改造后的细胞能够感知环境信号并执行特定功

能, 为治疗复杂疾病提供了全新策略^[22]。其中, 工程化嵌合抗原受体T细胞在白血病等血液系统恶性肿瘤的治疗中展现出显著疗效^[23-24], 并逐渐拓展至肝癌、胃肠肿瘤等实体瘤及自身免疫性疾病的治疗领域^[25-26]。这类工程化细胞的构建高度依赖精准、高效的基因编辑技术。本研究构建的基于CRISPR/Cas9的环状单质粒系统, 正是为响应这一技术需求而设计。本研究选取在所有真核细胞中持续高表达的*ACTB*基因编码区上游作为敲入



A: 未经处理的293T细胞、293T C1、293T C2、293T C3单克隆细胞株的*ACTB*基因表达水平(三次技术重复, n=3); B: 未经处理的3T3细胞、3T3 C1、3T3 C2、3T3 C3单克隆细胞株的*Actb*基因表达水平(三次技术重复, n=3)。

图6 293T *hACTB* GFP单克隆株及3T3 *mActb* GFP的单克隆株*ACTB*基因表达情况

Fig. 6 Expression of *ACTB* gene in 293T *hACTB* GFP monoclonal strain and 3T3 *Actb* GFP monoclonal strain

位点,旨在利用其强启动子实现外源基因的稳定、长期表达^[27-29]。实验结果表明该系统在人和小鼠细胞系中均能实现GFP报告基因的精准整合,并在无筛选条件下获得可观的整合效率,证实其作为体外基因组编辑平台的可靠性。作为对该系统应用潜力的初步探索,已利用该平台成功构建了响应炎症信号的抗炎工程化巨噬细胞模型,预示着该系统在细胞疗法开发中具有良好的应用前景。

CRISPR/Cas9基因编辑技术的发展为基因组精准修饰提供了多样化工具,但外源基因整合效率低仍是限制其应用的关键瓶颈,尤其是长基因片段的高效整合问题,亟需在递送系统、供体模板、修复机制等策略上进一步优化。本研究构建的单质粒系统借鉴了Chavez等^[19]报道的IDLV策略中“借用内源基因调控元件实现外源基因稳定表达”的核心思路,但本研究提供了非病毒载体的替代方案,降低了生产复杂性和成本,且与传统的病毒载体递送方案相比,降低了随机整合风险。

近年来,基因编辑领域涌现了大量创新性设计,标志着大片段基因编辑正式进入精准可控的时代。既往研究报道了多种实现基因定点敲入的策略。Koch等^[30]使用了双切口酶法,将Cas9切口酶突变体(D10A)分别与靶向目标位点正义和反义DNA链的配对gRNA相结合,以质粒形式递送进入细胞,在携带供体模板的质粒的存在下,即可通过HDR修复将外源基因(荧光蛋白基因)插入特定基因位点。此方法有效降低了脱靶效应,但需要构建多个质粒(gRNA质粒、供体模板质粒);此

外,该研究还开发了一种简单、低廉、高效的基因插入验证流程。本研究中对于基因成功插入的验证也借鉴了该流程。后续Callegari等^[31]对该方案进一步优化,使用Neon电穿孔系统代替了脂质体转染方法,进一步提高了编辑效率,虽降低了脱靶整合风险,但仍需递送多个载体。

Allen等^[32]开发的“SLEEK(SeLection by Essential-gene Exon Knock-in)”基因敲入技术,筛选了必需基因GAPDH的最后一个外显子Exon9的序列区域作为外源基因插入位点。供体敲入模板包含Exon9的同源臂及部分Exon9基因序列,以确保敲入后GAPDH正常表达。该策略确保仅外源基因正确整合至Exon9的细胞才能表达GAPDH并存活,而发生NHEJ的细胞会使GAPDH失活,导致细胞死亡。该研究证实了多个基因同步敲入的可行性,但结果显示同一供体模板上各基因的表达有所差异,位于供体模板后端(靠近3'端)的基因表达明显低于位于供体模板前端的基因(靠近5'端)。

尽管本研究在HEK293T和3T3细胞中验证了该单质粒系统的有效性,但仍存在一些局限。首先,该系统在难转染细胞(如原代细胞、非分裂细胞)中的应用可能存在挑战。为拓展其应用范围,未来工作可探索将本系统与更高效的递送技术相结合,如电穿孔技术^[19,33-34]或其他新型递送技术(如纳米吸管电驱动转染技术^[35]),并通过优化转染参数、联合使用可增强原代细胞HDR效率的小分子物质(如NHEJ抑制剂等^[36])以进一步提高转染效率。其次,本研究主要聚焦在*ACTB*基因位点的整合,仍需进一步验证该策略在其他基因位点的普适性。此外,该系统长期安全性及潜在的脱靶效应仍需通过全基因组测序等更全面的方法进行评估。未来研究将致力于优化递送方法、拓展靶点验证范围,并系统评估该系统的安全性与适用性。

综上,本研究开发的基于CRISPR/Cas9的单质粒递送系统,为长片段基因的定点整合提供了一种简便、高效的方案,有望为未来工程化细胞构建与治疗开发提供一个可扩展的技术平台。

作者贡献 刘涵菲、刘军花: 论文撰写, 实验操作; 张璐: 实验设计, 监督指导, 审读和修订; 孙刚: 监督指导, 审读和修订。

利益冲突 所有作者声明无利益冲突。

数据共享声明 本论文相关数据可依据合理理由从作者处获取, Email: liuhanfei0228@163.com。

参考文献

- 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.
- Wiedenheft B, Sternberg SH, Doudna JA. RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and Archaea [J]. *Nature*, 2012, 482 (7385): 331-338.
- Mali P, Yang LH, Esvelt KM, et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9 [J]. *Science*, 2013, 339 (6121): 823-826.
- Cho SW, Kim S, Kim JM, et al. Targeted genome engineering in human cells with the Cas9 RNA-guided endonuclease [J]. *Nat Biotechnol*, 2013, 31 (3): 230-232.
- Doudna JA, Charpentier E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9 [J]. *Science*, 2014, 346 (6213): 1258096.
- Heckl D, Kowalczyk MS, Yudovich D, et al. Generation of mouse models of myeloid malignancy with combinatorial genetic lesions using CRISPR-Cas9 genome editing [J]. *Nat Biotechnol*, 2014, 32 (9): 941-946.
- Bak RO, Dever DP, Porteus MH. CRISPR/Cas9 genome editing in human hematopoietic stem cells [J]. *Nat Protoc*, 2018, 13 (2): 358-376.
- Wang T, Wei JJ, Sabatini DM, et al. Genetic screens in human cells using the CRISPR-Cas9 system [J]. *Science*, 2014, 343 (6166): 80-84.
- Wang D, Zhang F, Gao GP. CRISPR-based therapeutic genome editing: strategies and in vivo delivery by AAV vectors [J]. *Cell*, 2020, 181 (1): 136-150.
- Qin Q, Ling C, Zhao YQ, et al. CRISPR/Cas9 editing genome of extremophile *Halomonas* spp [J]. *Metab Eng*, 2018, 47: 219-229.
- Arai D, Nakao Y. Efficient biallelic knock-in in mouse embryonic stem cells by in vivo-linearization of donor and transient inhibition of DNA polymerase θ /DNA-PK [J]. *Sci Rep*, 2021, 11: 18132.
- Bosch-Guiteras N, Uroda T, Guillen-Ramirez HA, et al. Enhancing CRISPR deletion via pharmacological delay of DNA-PKcs [J]. *Genome Res*, 2021, 31 (3): 461-471.
- Riesenberg S, Kanis P, Macak D, et al. Efficient high-precision homology-directed repair-dependent genome editing by HDRobust [J]. *Nat Methods*, 2023, 20 (9): 1388-1399.
- Webber BR, Johnson MJ, Skeate JG, et al. Cas9-induced targeted integration of large DNA payloads in primary human T cells via homology-mediated end-joining DNA repair [J]. *Nat Biomed Eng*, 2024, 8 (12): 1553-1570.
- Truong DJ, Kühner K, Kühn R, et al. Development of an intein-mediated split-Cas9 system for gene therapy [J]. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43 (13): 6450-6458.
- Strecker J, Jones S, Koopal B, et al. Engineering of CRISPR-Cas12b for human genome editing [J]. *Nat Commun*, 2019, 10: 212.
- Kim E, Koo T, Park SW, et al. In vivo genome editing with a small Cas9 orthologue derived from *Campylobacter jejuni* [J]. *Nat Commun*, 2017, 8: 14500.
- Liu J-J, Orlova N, Oakes BL, et al. CasX enzymes comprise a distinct family of RNA-guided genome editors [J]. *Nature*, 2019, 566 (7743): 218-223.
- Chavez M, Rane DA, Chen XY, et al. Stable expression of large transgenes via the knock-in of an integrase-deficient lentivirus [J]. *Nat Biomed Eng*, 2023, 7 (5): 661-671.
20. Haapaniemi E, Botla S, Persson J, et al. CRISPR - Cas9 genome editing induces a p53-mediated DNA damage response [J]. *Nat Med*, 2018, 24 (7): 927-930.
21. Anders C, Niewoehner O, Duerst A, et al. Structural basis of PAM-dependent target DNA recognition by the Cas9 endonuclease [J]. *Nature*, 2014, 513 (7519): 569-573.
22. Pelosse M, Marcia M. biGMamAct: efficient CRISPR/Cas9-mediated docking of large functional DNA cargoes at the ACTB locus [J]. *Synth Biol*, 2025, 10: ysaf003.
23. Wang LJ, Sun JX, Liu ZP, et al. Comparison of multiple strategies for precision transgene knock-In in *Gallus gallus* genome via microhomology-mediated end joining [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24 (21): 15731.
24. Tran NT, Sommermann T, Graf R, et al. Efficient CRISPR/Cas9-mediated gene knockin in mouse hematopoietic stem and progenitor cells [J]. *Cell Rep*, 2019, 28 (13): 3510-3522. e5.
25. Koch B, Nijmeijer B, Kueblbeck M, et al. Generation and validation of homozygous fluorescent knock-in cells using CRISPR - Cas9 genome editing [J]. *Nat Protoc*, 2018, 13 (6): 1465-1487.
26. Callegari A, Kueblbeck M, Morero NR, et al. Rapid generation of homozygous fluorescent knock-in human cells using CRISPR - Cas9 genome editing and validation by automated imaging and digital PCR screening [J]. *Nat Protoc*, 2025, 20 (1): 26-66.
27. Allen AG, Khan SQ, Margulies CM, et al. A highly efficient transgene knock-in technology in clinically relevant cell types [J]. *Nat Biotechnol*, 2024, 42 (3): 458-469.
28. Cubillos-Ruiz A, Guo T, Sokolovska A, et al. Engineering living therapeutics with synthetic biology [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2021, 20 (12): 941-960.
29. Zhang C, He J, Liu L, et al. Novel CD19 chimeric antigen receptor T cells manufactured next-day for acute lymphoblastic leukemia [J]. *Blood Cancer J*, 2022, 12 (6): 96.
30. Turtle CJ, Hanafi LA, Berger C, et al. CD19 CAR-T cells of defined CD4⁺:CD8⁺ composition in adult B cell ALL patients [J]. *J Clin Invest*, 2016, 126 (6): 2123-38.
31. Du B, Qin J, Lin B, et al. CAR-T therapy in solid tumors [J]. *Cancer Cell*, 2025, 43 (4): 665-679.
32. Wang XB, Zhang Y, Jin Y, et al. An iPSC-derived CD19/BCMA CAR-NK therapy in a patient with systemic sclerosis [J]. *Cell*, 2025, 188 (16): 4225-4238. e12.
33. Kagita A, Lung MSY, Xu HG, et al. Efficient ssODN-Mediated targeting by avoiding cellular inhibitory RNAs through pre complexed CRISPR-Cas9/sgRNA ribonucleoprotein [J]. *Stem Cell Rep*, 2021, 16 (4): 985-996.
34. Breau KA, Ok MT, Gomez-Martinez I, et al. Efficient transgenesis and homology-directed gene targeting in monolayers of primary human small intestinal and colonic epithelial stem cells [J]. *Stem Cell Rep*, 2022, 17 (6): 1493-1506.
35. Kumar ARK, Low J, Lim J, et al. Non-viral, high throughput genetic engineering of primary immune cells using nanostraw-mediated transfection [J]. *Biomaterials*, 2025, 317: 123079.
36. Shy BR, Vykunta VS, Ha A, et al. High-yield genome engineering in primary cells using a hybrid ssDNA repair template and small-molecule cocktails [J]. *Nat Biotechnol*, 2023, 41 (4): 521-531.

(责任编辑: 迟素敏, 孙菲)