



中国科大在基因敲入供体的优化方面取得新进展

来源: 科研部 发布时间: 2023-05-24 浏览次数: 198

中国科学技术大学合肥微尺度物质科学国家研究中心、化学与材料科学学院梁好均教授与生命科学与医学部鲍坚强研究员合作, 针对目前基因敲入供体的低效率、高成本等问题, 优化并提出了一种新型的功能核酸供体, 极大地提高了基因敲入的效率。研究成果以“Efficient precise integration of large DNA sequences with 3'-overhang dsDNA donors using CRISPR/Cas9”为题, 于5月22日通过直投方式 (DirectSubmission) 发表在国际学术期刊美国科学院院刊《PNAS》上。

CRISPR技术改变了我们操纵基因组进行研究和基因治疗的能力, 使用带有同源臂的外源供体作为模板依赖同源介导修复 (HDR) 途径来精确敲入基因。然而, 对于基因大小的DNA供体模板, HDR途径十分低效。目前, 可采用在ssDNA或dsDNA供体末端引入化学修饰以增强供体稳定性, 供体共价连接到CRISPR系统上提高切割位点局部浓度等方法提高基因敲入效率。但是, 这些方法具有操作困难, 成本高等问题。所以, 迫切需要进一步优化基因敲入的供体, 以促进CRISPR/Cas9介导的基因大小的敲入在生命科学和临床治疗中的应用。

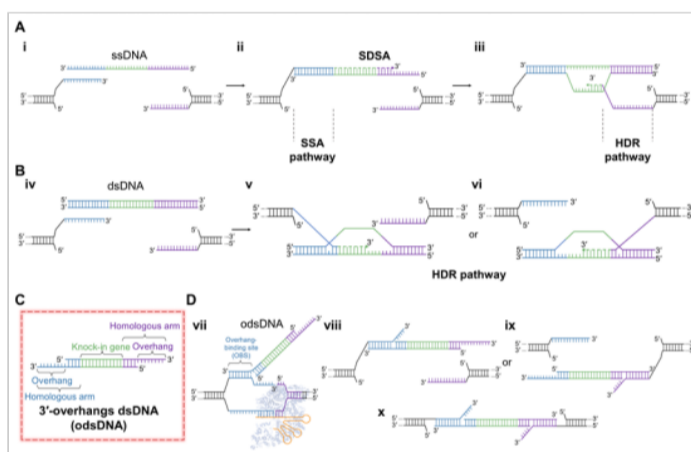


图1 (A) ssDNA供体基因敲入的机理; (B) dsDNA供体基因敲入的机理; (C) odsDNA的结构; (D) odsDNA供体基因敲入的机理。

鉴于此, 梁好均教授课题组深入调研ssDNA和dsDNA作为供体的敲入机理, 结合课题组在核酸化学领域的经验, 在单个供体中整合ssDNA和dsDNA的独特优势, 设计并提出了一种具有3'悬突的dsDNA结构 (odsDNA), 并将其作为供体实现CRISPR/Cas9介导的大片段基因敲入 (LOCK)。

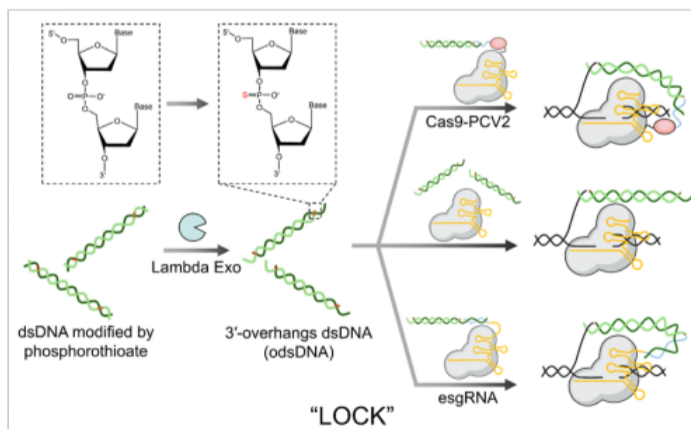


图2 odsDNA的合成示意图及用于基因敲入的三种方法。

本项工作是梁好均教授课题组继dsDNA供体5'末端化学修饰提高基因敲入效率 (Nat. Chem. Biol., 2020, 16, 387–390) 和RNA介导的CRISPR-dCas9转录调控系统 (J. Am. Chem. Soc., 2022, 144, 12690–12697) 之后, 基因编辑方向又一重大突破。该研究提出了一种经济普适的方法来制备任意3'悬突长度的odsDNA供体, 利用链中带有连续五个硫代磷酸酯 (phosphorothioate) 修饰的引物通过PCR扩增目的基因序列, 再通过Lambda核酸外切酶消化处理, 得到具有3'悬突的odsDNA。通过比较基因大小 (1.1kb和2.5kb) 的DNA供体的敲入效率, 发现odsDNA显著提高了靶向精确敲入效率, 与通用的dsDNA供体相比最高可提高4.3倍, 同时在许多哺乳动物细胞跨多个基因组位点中保持了较低的插入缺失率和脱靶事件。当利用3'单链悬臂与偶联技术结合时, 使用odsDNA供体的敲入效率比

dsDNA供体提高5.2倍。该LOCK策略在基因敲入中具有显著优势，在未来有望取代ssDNA或dsDNA供体，实现其他策略无法完成的大片段基因敲入。

中国科学技术大学合肥微尺度物质科学国家研究中心博士研究生韩汶杰为该论文第一作者。中国科学技术大学合肥微尺度物质科学国家研究中心、化学与材料科学学院梁好均教授和生命科学与医学部鲍坚强研究员为该论文通讯作者。该项研究得到科技部和国家自然科学基金委等项目的支持。

论文链接: <https://www.pnas.org/doi/10.1073/pnas.2221127120>

(合肥微尺度物质科学国家研究中心、化学与材料科学学院、生命科学与医学部、科研部)

