
科学家开发逆转座子基因工程新技术 实现全RNA介导的基因精准写入

作者：writer 来源：中国科学院

本文原地址：<https://www.iikx.com/news/progress/28065.html>

本文仅供学习交流之用，版权归原作者所有，请勿用于商业用途！

科学家开发逆转座子基因工程新技术 实现全RNA介导的基因精准写入。

基因组DNA是生命的蓝图，对基因组DNA实现任意尺度的精准操作代表对生命蓝图进行修改绘制的底层能力，是基因工程技术发展的核心。以CRISPR基因编辑技术为代表的技术进步实现了基因组单碱基和短序列尺度的精准编辑，基本解决了基因组精准编辑的挑战。然而，如何针对应用场景的需求，实现大片段DNA在基因组的高效精准整合，仍然是整个基因工程领域亟需突破的难题。该技术的突破意味着可以通过外源功能基因的精准写入来干预多种不同位点基因突变导致的单基因遗传缺陷等疾病，从而开发更为通用的基因与细胞疗法，具有广泛的应用前景。

针对这一重大技术挑战，多种基因写入技术已被开发，如CRISPR核酸酶介导的同源重组或非同源末端连接技术等，但是这些技术都依赖于DNA模板作为基因写入的供体（donor）。在实际医学应用中，DNA供体面临免疫原性高、在体（in vivo）

递送困难、在基因组中具有随机整合风险等诸多挑战。相比之下，RNA供体具有免疫原性低、可被非病毒载体（如LNP）有效递送、在细胞内迅速降解，无随机整合风险等特点，能够有效应对DNA供体所面临的挑战。因此，以RNA为供体的大片段精准写入技术，在安全性、可递送性方面都具有显著的优势。然而，现有以RNA为供体的技术，要么无法实现>200 bp的DNA片段高效整合（如引导编辑等），要么依靠基因组随机整合从而带来基因组随机突变风险（如逆转录病毒等）。是否能够以RNA作为供体，实现功能基因尺度的大片段DNA基因组精准定点整合？仍然是基因工程领域面临的挑战。

7月8日，《细胞》（Cell）

以长文形式在线发表了中国科学院动物研究所/北京干细胞与再生医学研究院李伟研究员与周琪研究员团队合作完成的题为All-RNA-mediated Targeted Gene Integration in Mammalian Cells with Rationally Engineered R2 Retrotransposons

的研究论文。该研究结合基因组数据挖掘和大分子工程改造等手段，开发了使用RNA供体进行大片段基因精准写入的R2逆转座子工具，能够在多种哺乳动物细胞系、原代细胞中实现大片段基因（>1.5 kb）高效精准的整合，最高效率超过60%，成功实现了全RNA介导的功能基因（DNA）在多种哺乳动物基因组的精准写入，为新一代创新基因疗法的发展奠定了基础。

作为基因组进化的源动力之一，转座子可以通过在不同基因组间的跳跃，实现自我的复制与扩增

。其中，以RNA作为媒介的R2逆转座子的“跳跃”机制与以RNA作为供体的基因写入工具的开发思路不谋而合。同时，该类逆转座子天然倾向于整合在真核生物固定的28S rDNA基因组位点，这一位点在人基因组中拷贝数目多（约219个），且远离蛋白编码基因，是适合于外源基因整合的安全港位点（“safe harbor” loci）。因此，R2逆转座子是以RNA为供体的大片段基因写入工具开发的有力的候选者。然而，尽管R2逆转座子早在上世纪80年代就被发现，其在哺乳动物细胞中的功能性质尚未被系统性地探索，迄今为止，未能被利用来在哺乳动物细胞中实现大片段功能基因的有效整合。

在本研究中，研究团队首先通过数据挖掘，全面系统地分析了自然界中R2逆转座子元件的生物多样性；通过构建基于RNA供体的基因写入的报告体系，成功筛选出在哺乳动物细胞中具有完整GFP功能基因整合活性的R2Tg系统（来源于一种鸟Taeniopygia guttata的基因组）。随后，研究团队针对R2Tg系统发挥功能所必需的两个关键组分：R2蛋白质以及供体RNA，进行了系统性的功能探索与工程化改造，最终获得了在人细胞系中基因整合效率超过20%的en-R2Tg工具（图1）。

由于R2蛋白质可以通过mRNA表达，且供体RNA本身也是RNA，那么，en-R2Tg工具能否以全RNA形式介导的基因的高效精准写入？为了探究这一点，研究人员通过体外合成获得了编码R2蛋白质mRNA以及供体RNA，并使用脂质体递送的方式将两条mRNA导入人的细胞中。结果显示，en-R2Tg工具能够高效整合多个与疾病治疗相关基因，且这些基因能够有效表达功能蛋白。能够以全RNA的形式发挥功能，意味着en-R2Tg工具可以使用安全性已经在临床上得到证明的LNP纳米材料来进行递送，这将有可能解决长久以来基因写入工具依赖病毒载体进行高效递送的难题。研究发现，使用LNP递送en-R2Tg工具在人的肝脏细胞系中能够实现25%的基因整合效率。此外，研究还证明了R2工具在人类原代细胞中同样具有活性；同时，通过显微注射将en-R2Tg工具导入小鼠胚胎，成功实现了超过60%的GFP基因定点整合效率。

本研究的另一关键点在于，工程化改造的en-R2Tg工具是否还保留有天然R2逆转座子的28S rDNA位点特异性整合这一性质？为了回答这一问题，研究人员结合无偏好的基因整合富集高通量测序以及全基因组三代测序方法，发现en-R2Tg工具在全基因组范围内展现了极高的基因整合特异性，大于99%的外源基因都精准整合到28S rDNA安全港位点。同时，结合qRT-PCR以及RNA-Seq实验，研究发现en-R2Tg工具对细胞的转录组状态几乎没有影响。这说明en-R2Tg介导的基因写入是位点精准特异的，可以有效避免逆转录病毒等技术所产生的基因随机整合导致的基因突变风险。

综上，该研究基于自然界存在的R2逆转座系统，结合数据分析和工程化改造方法，成功开发了全RNA介导的、高效精准的基因写入技术，首次在多种人和小鼠细胞系及原代细胞中实现了功能基因的定点整合（图2）。R2基因精准写入工具在递送和安全性方面具有显著优势，未来有望基于此工具开发在体功能基因回补写入以及在体生成CAR-T细胞等全新的疾病治疗方法。值得注意的是，R2基因写入技术目前无法实现在不同基因组位点的可编程写入，且在人原代细胞中的基因写入效率较低，因此未来需要进一步发展和优化。

该研究由中国科学院动物研究所与北京干细胞与再生医学研究院合作完成。动物所博士后陈阳灿、博士生骆胜球、博士后胡艳萍、博士生毛邦炜、王鑫阁与卢宗宝为共同第一作者，李伟与周琪为共同通讯作者。研究工作得到科学技术部、国家自然科学基金委员会、中国科学院以及北京市自然科学基金等的支持。

[论文链接](#)

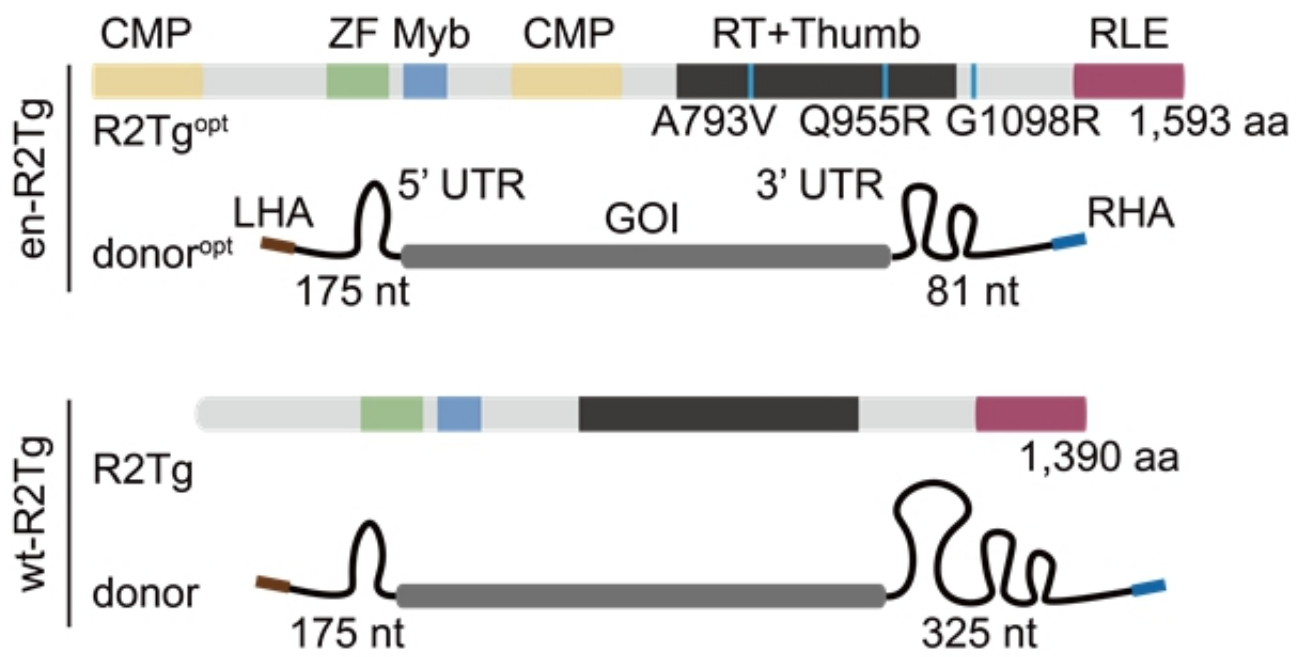


图1. 系统的工程化改造获得en-R2Tg工具

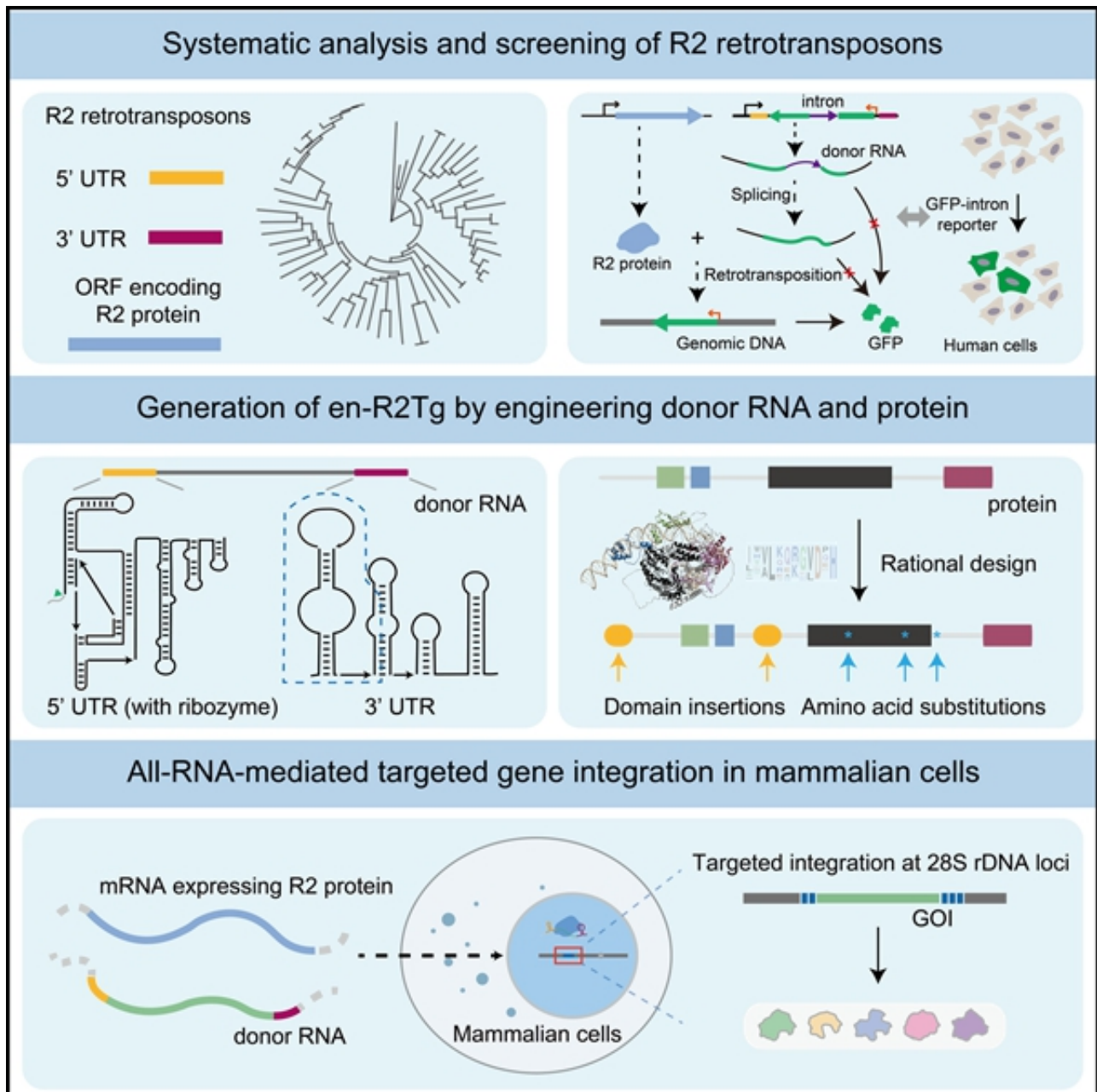


图2. 开发全RNA介导的、高效精准的哺乳动物细胞大片段功能基因写入工具

研究团队单位：动物研究所

更多 科学进展 请访问 <https://www.iikx.com/news/progress/>

本文版权归原作者所有，请勿用于商业用途，[爱科学iikx.com](http://iikx.com)转发