

“分子钩针”让基因敲入不再“伤筋动骨”

● 本报记者 张晴丹

在基因编辑的世界里,传统CRISPR-Cas9技术像一把力道刚猛的“分子剪刀”,在剪断DNA双链的同时,引发细胞惊慌失措的“紧急修复”,带来安全隐患。

如果把传统的双链切割比作“伤筋动骨”的大手术,那么清华大学生命科学学院副教授王海峰团队开发的KNIT Editing(KE)系统,如同一枚温柔的“分子钩针”,只需在DNA的一条链上制造一个切口,便能实现大片段基因的高效精准“织”入,效率最高可达89%,支持从0.7kb(千碱基对)到超过10kb DNA片段的可编程整合。

这项成果近日发表于《自然》,有望为遗传病治疗和细胞疗法提供更精准安全的工具,同时也打破了“仅基于单链切口的基因编辑效率低下”的传统认知。

一次关于“时空”的跨界思考

王海峰的科研之路并非一开始就向基因编辑奔去。在博士和博士后阶段,她更像一个痴迷于细胞内部动态的“观察者”。“我特别想知道细胞里生命过程是如何发生的,比如染色质究竟如何运动、DNA互作如何在时空维度上动态变化。”王海峰在接受记者采访时回忆道。

王海峰之前开发的CRISPR LiveFISH技术让DNA带上荧光,在活细胞里为染色质的运动和DNA互作拍“纪录片”,并开发了CRISPR-GO技术调控染色质在细胞核内不同区室的定位。这种对染色质时空动态和三维基因组互作的理解,为她后来开发新工具埋下了伏笔。

“我们做活细胞成像时学到了‘时空’概念。一件事在正确的时间、地点才能发生,一个分子也需要在正确的时空才能更好地发挥功能。”王海峰说,这种思路被巧妙地借鉴到基因编辑中。

传统的双链切割方法依靠细胞自身的修复机制去“补洞”,而“洞”补得是否精确很难控制。团队意识到,想要实现安全精准的插入,关键或许不在于如何“破坏”,而在于如何“引导”。

2022年前后,团队进行了一项关键的系统性筛选。一个看似简单却十



图片来源:视觉中国

分关键的策略最终脱颖而出——把修复模板“拉”到单链切口旁边。“我们发现,只要把供体DNA拉到足够近的位置,单链切口就能非常有效地启动修复和插入。”论文共同第一作者、清华大学博士后部艳敏解释道。

团队给这项技术命名为“KNIT Editing”,既寓意“编织”(knit)的过程,也对应其英文全称 kilobase-scale nickase-targeting editing(千碱基尺度切口酶靶向编辑)。名字的灵感来自织毛衣的动作——切口酶(nickase)如同一枚细小的钩针,在DNA上形成精准的单链切口;而供体DNA则像一根毛线,在空间定位的引导下被牵引并“编织”进基因组,实现精准的基因信息写入。

“很多工具的突破看起来可能只是捅破了一层窗户纸,但在哪里捅破这层窗户纸,通常需要经历长期的探索和反复尝试。”王海峰说,“这个看起来很简单的方法,我们花了4年才找到。”

一种效率与安全的平衡术

团队开发的KE系统的第一个版本KE1验证了“供体空间邻近性”是提升单链切口修复效率的关键。它能实现从0.7kb到超过10kb的大片段基因精准敲入,且非预期的插入缺失突变、染色体易位和脱靶编辑显著低于传统方法。

但团队并不满足于此,“能不能再提高效率?”在KE1系统的基础上,他们开始了第二轮优化,尝试了抑制其他DNA修复通路、融合DNA修复蛋白等,最终开发出优化的第二个版本——KE2系统。

如果说KE1是一枚钩针,那么KE2就是一枚“多钩针”。“我们让切口

位点招募更多的供体DNA。”王海峰打了个比方,“就像以前勾一条线,现在勾一堆线过来,哪条能补上就用哪条。”这种略显“粗暴”但有效的策略,进一步提高了供体DNA在切口附近的局部浓度,使得精准插入效率进一步提升,在某些位点比KE1提高了1.5倍。

KE系统支持重复编辑,也支持多位点同时编辑。数据表明,效率的提升并不以牺牲安全性为代价。恰恰相反,由于KE系统完全不产生DNA双链断裂,从根本上规避了传统技术最令人担忧的风险。染色体易位几乎检测不到,脱靶效应同样极低。

部艳敏提到,这项成果最重要的价值在于安全性。她指出,传统的CAR-T细胞制备常使用病毒载体实现CAR的随机插入,存在引发继发性肿瘤的潜在风险;而基于Cas9的双链断裂方法又会导致基因组不稳定。相比之下,KE系统提供了一种“无病毒、无断裂”的精准整合方案,有望为提高细胞治疗的安全性开辟新路径。

一线“织补生命”的曙光

工具的意义在于应用。为验证KE系统的临床潜力,研究团队在两种具有挑战性的场景中进行了测试。

第一种是遗传病基因修复。很多遗传病是单个基因突变导致的,但这个基因可能有多种不同的“出错方式”。比如,有一种叫溶酶体酸性脂肪酶缺乏症(LAL-D)的病,相关基因有100多种不同突变。

面对这种“多种突变导致同一疾病”的复杂性,科学家希望开发一种“通用型”策略。团队选取了含有LAL-D相关LIPA基因突变的细胞模型,并利用KE系统成功将正常的LIPA基因cDNA精准插入基因组的“安全港”位点(AAVS1),甚至在原位基因位点也进行了整合,有效恢复了蛋白表达。

第二种则是当下肿瘤免疫治疗热门的CAR-T细胞疗法。传统的CAR-T制备依赖病毒载体将CAR随机整合到T细胞基因组,存在不确定性,欧美机构曾就此发出过安全性警

示。新近的研究用基因编辑技术在特定基因定点敲入CAR,但涉及双链断裂,可能导致基因组不稳定。

KE系统在精准编辑方面展现了独特的优势。研究团队在临床相关的TRAC位点实现了CAR基因的高效精准整合,平均效率约32%,最高达40.6%,同时显著降低了染色体易位和脱靶整合的风险。“这样制备出的CAR-T细胞,保持了很好的活性和增殖能力,在体内外都展现出较好的肿瘤杀伤效果。”王海峰介绍。

这一过程中,团队学习了很多国内外同行的前沿方法,尤其从国内优秀团队的工作中获益良多。部艳敏说:“在做CAR-T细胞编辑时,我们一开始并不知道多高的效率才有临床意义。后来从专家那里学习,发现大约20%的插入效率在临床达到治疗效果,这给了我们一个清晰的目标。”

从一次偶然的发现到一个原创工具的诞生,再到具有临床前景的应用尝试,团队走了整整4年。其间经历了多轮系统优化和修改打磨,写了200多页的审稿回复,但团队最终坚持了下来。

“我希望我们的工具能够真正发挥作用。”王海峰说。怀揣着对解决真正科学问题的渴望,这个年轻的团队不断前行。他们用一枚温柔的“分子钩针”,在基因组的“天书”上绣出了一幅安全与高效并重的未来图景,期望为那些患有被视作不治之症的遗传病和肿瘤疾病的人带来一线曙光。

和很多基因编辑工具一样,KE系统的应用也会受到递送系统的限制。此外,依赖单链切口介导同源重组修复(HDR)的分子机制仍需要进一步解析。团队下一步的方向是继续优化递送系统、探索招募模块的迭代,以及研究单链切口介导HDR的分子机理。

“专业的事需要专业的人去做。”王海峰说,“我们希望与更多领域的专家开展合作,也期待有相关背景的人才加入团队,探索这一系统在疾病研究和精准医学应用中的潜力。”

相关论文信息:

<https://doi.org/10.1038/s41586-026-10819-7>