

◆ 生物技术 ◆

CORRECT 介导的人 *HBB-28* 基因定点突变细胞株的建立及其应用^{*}刘永祥¹, 麦庆云², 黎允诗¹, 梅琚琰¹, 梁爱军¹, 彭新良¹, 周瑞鸿³, 周少虎^{1**}

(1. 广州中医药大学第一附属医院生殖医学科, 广东广州 510405; 2. 中山大学附属第一医院生殖医学中心, 广东广州 510080; 3. 广州医药研究总院有限公司, 广东广州 510220)

摘要:为利用 CRISPR/Cas9 系统建立一种新型、高效的定点突变和基因修复的新方法——引入阻断突变碱基的 CORRECT(Consecutive re-Guide or re-Cas steps to Erase CRISPR/Cas blocked Targets)方法,本研究使用规律间隔成簇短回文重复序列(Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats, CRISPR)在线设计工具,针对人 β -珠蛋白(*HBB*)基因设计小向导 RNA (small guide RNA, sgRNA),构建 PX459-sgRNA-Cas9 共表达质粒,然后以含阻断突变碱基(G>T)的单链寡核苷酸(single-stranded Oligo DNA Nucleotides, ssODNs)为同源模板,通过脂质体转染 HEK293T 细胞,并通过 Sanger 测序和酶切(*T7E I* 和 *Aat II*)检测编辑效率,最后通过 Sanger 测序分析敲除 *HBB* 单克隆细胞的基因型。结果表明,成功构建 β -地中海贫血(简称 β -地贫)*HBB-28*(A>G)基因纯合定点突变的 HEK293T 细胞株。阻断突变碱基优化的 ssODNs 减少 Cas9 蛋白对靶点的再次编辑,提高了整合效率。本研究建立的新型点突变技术可以高效获得纯合定点突变的 HEK293T 细胞株,既为单碱基突变疾病模型的建立提供实验依据,又为基因修复治疗提供高效的方法。

关键词: β -地中海贫血 *HBB* 阻断突变 定点突变 基因修复治疗

中图分类号: Q754 文献标识码: A 文章编号: 1005-9164(2022)06-01125-09

DOI: 10.13656/j.cnki.gxkx.20230110.012

β -地中海贫血(简称 β -地贫)是由人 β -珠蛋白(*HBB*)基因突变引起的,是我国南方发病率最高的单基因遗传病^[1]。其中,*HBB-28*(A>G)突变是我国 β -地贫患者携带的 5 种最常见的 *HBB* 突变之一^[2]。与其他亚型不同,*HBB-28*(A>G)突变位于

起始密码子上游 28 个碱基的启动子区内,突变的产生破坏了转录因子 ATA box 的结合,降低了 *HBB* 的 RNA 表达^[3]。纯合子或复合杂合子-28(A>G)突变的患者可出现重度贫血或中间型贫血^[4],然而,由于纯合子患者临床材料有限,并且其基因突变位于非

收稿日期: 2022-06-17

修回日期: 2022-09-29

* 广州中医药大学“双一流”与高水平大学学科协同创新团队培育基金项目(2021xk64)资助。

【作者简介】

刘永祥(1990-),男,主管技师,主要从事辅助生殖技术与遗传缺陷疾病研究。

【**通信作者】

周少虎(1962-),男,教授,主要从事中西医结合治疗不孕不育症研究, E-mail: zhoushaohu@vip.163.com。

【引用本文】

刘永祥, 麦庆云, 黎允诗, 等. CORRECT 介导的人 *HBB-28* 基因定点突变细胞株的建立及其应用[J]. 广西科学, 2022, 29(6): 1125-1133.

LIU Y X, MAI Q Y, LI Y S, et al. Construction and Application of CORRECT-mediated Human *HBB-28* Gene Site-directed Mutagenesis Cell Line [J]. Guangxi Sciences, 2022, 29(6): 1125-1133.

编码区,目前非编码区突变影响相关基因转录组表达水平的研究较少。

近年来,由于操作简单、成本低和效率高等优点,规律间隔成簇短回文重复序列(Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats, CRISPR)技术被广泛应用于各种生物体的基因组编辑^[5]。利用CRISPR/Cas9基因编辑技术在特定位点制造特定的DNA双链断裂(DNA Double Strand Breaks, DSBs)和同源定向修复(Homology Directed Repair, HDR)以引入或纠正特定的基因突变已经成为首选的方法^[6]。本研究在CRISPR/Cas9技术的基础上,通过沉默突变阻断连续的再次靶向或再次切割的CRISPR/Cas9靶点(Consecutive re-Guide or re-Cas steps to Erase CRISPR/Cas9-blocked Targets, CORRECT)的新型无痕基因组编辑技术^[7],在人HBB基因上引入HBB-28(A>G)点突变,高效建立人β地贫HBB-28(A>G)HEK293T纯合突变细胞株,为后续疾病的细胞和分子基础研究,以及建立基因突变修复方法奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株和质粒

HEK293T细胞由本实验室保存,CRISPR/Cas9质粒PX459购自美国Addgene公司,pCMV-GFP-p62购自上海碧云天生物技术有限公司。

1.1.2 主要试剂和仪器

限制性核酸内切酶Bbs I、T7E I、Aat II、T4连接酶、T4磷酸化酶均购于美国NEB公司,小向导RNA(small guide RNA, sgRNA)以及PCR引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,单链寡核苷酸(single-stranded Oligo DNA Nucleotides, ssODNs)由苏州金唯智生物科技有限公司合成,Trans 5α感受态细胞购自北京全式金生物技术有限公司,质粒提取试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司,X-tremeGENE HP DNA细胞转染试剂盒购于上海罗氏制药有限公司。荧光倒置显微镜为德国徕卡(Leica)仪器有限公司产品,PCR基因扩增仪为赛默飞世尔科技(中国)有限公司产品。

1.2 方法

1.2.1 sgRNA的设计与CRISPR/Cas9表达质粒构建

查询人HBB基因序列(Genbank:NC_000011.

10;https://www.ncbi.nlm.nih.gov/),利用网站https://crispr.mit.edu设计sgRNA靶点。根据确定的sgRNA靶点序列合成2对互补引物,sgRNA均为正义链序列靶点,因此,需在引物5'端加上Bbs I酶的黏性末端,其中,CACC加在正向引物前,AAAC加在反向引物前(表1)。sgRNA引物磷酸化与退火:分别取1 μL T4磷酸化酶、1 μL正向引物和1 μL反向引物(浓度均为100 μmol),混匀后进行5'端磷酸化修饰,并经退火形成双链(37℃,30 min;95℃,10 min)。双链sgRNA与线性化CRISPR/Cas9质粒连接:分别取1 μL T4连接酶、2 μL退火产物,以及100 ng经Bbs I酶处理的线性化二合一CRISPR/Cas9质粒,混匀后于16℃连接过夜,获得PX459-sgRNA1-Cas9和PX459-sgRNA2-Cas9的共表达质粒。转化(热激法):按照Trans 5α感受态细胞的产品说明书,将10 μL连接产物转化入100 μL感受态细胞中,轻轻摇匀,冰上放置30 min,42℃水浴中热激45 s,迅速置于冰上冷却2 min,涂布于含50 μg/mL氨苄青霉素(Amp)的LB固体平板,37℃倒置培养16-18 h。测序验证:分别挑取8个单克隆菌落至LB液体培养基中,37℃、220 r/min摇床扩增培养12-16 h,测序鉴定并挑选连接成功的PX459-sgRNA1-Cas9和PX459-sgRNA2-Cas9共表达阳性克隆,根据天根质粒小量提取试剂盒说明书提取阳性克隆质粒。

表1 sgRNA互补引物序列

Table 1 Primer sequence and its complementary strand of sgRNA

名称 Name	引物序列(5'→3') Primer sequence (5'→3')
sgRNA1	Forward: CACCAGGGCTGGGCATAAAAAGTCA Reverse: AAACGACTTTTATGCCAGCCCT
sgRNA2	Forward: CACCAGGGCTGGGCATAAAAAGTC Reverse: AAACGACTTTTATGCCAGCCCTG

1.2.2 ssODNs序列设计

选择突变位点左右两侧各50 bp序列作为同源臂,合成外源性同源重组模板ssODNs(图1)。设计ssODNs时采用CORRECT技术^[7],即在不引起氨基酸移码突变或错义突变的前提下,为防止基因组DNA成功突变后被CRISPR/Cas9系统二次切割,依据氨基酸的简并性,在前间隔序列的邻近基序(Protospacer Adjacent Motif, PAM)附近引入同义突变碱基(A>C),重组后以终止Cas9蛋白切割活

1.2.5 单克隆培养与鉴定

根据酶切实验的结果,选择整合效率最高的实验组采用96孔板计数稀释接种的方法^[9]进行单克隆筛选,细胞采用含有10%的FBS、1%双抗的DMEM培养基,于37℃、5% CO₂培养箱培养4-5 d后,观察除去双细胞和多细胞孔,对细胞形态正常且单一细胞孔做标记;继续培养7-9 d,待细胞长满整个孔后,吸取孔内2/3的单克隆集落细胞提取基因组DNA,挑选10个单克隆集落细胞,采用1.2.4节的PCR方法

扩增含有突变位点的片段,并进行测序鉴定,获得含目标纯合突变的单克隆细胞株。

2 结果与分析

2.1 CRISPR/Cas9 表达质粒构建

根据图2的质粒测序分析结果可知,PX459-sgRNA1-Cas9和PX459-sgRNA2-Cas9共表达质粒构建成功。

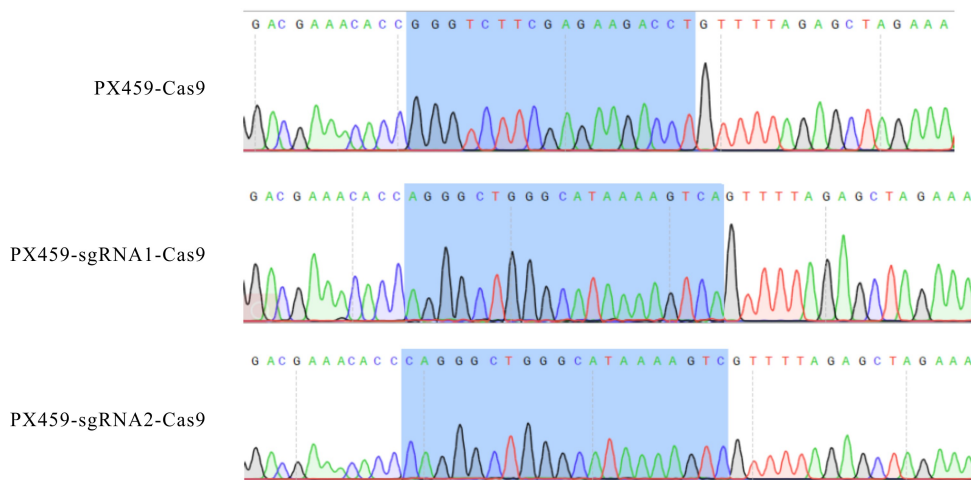


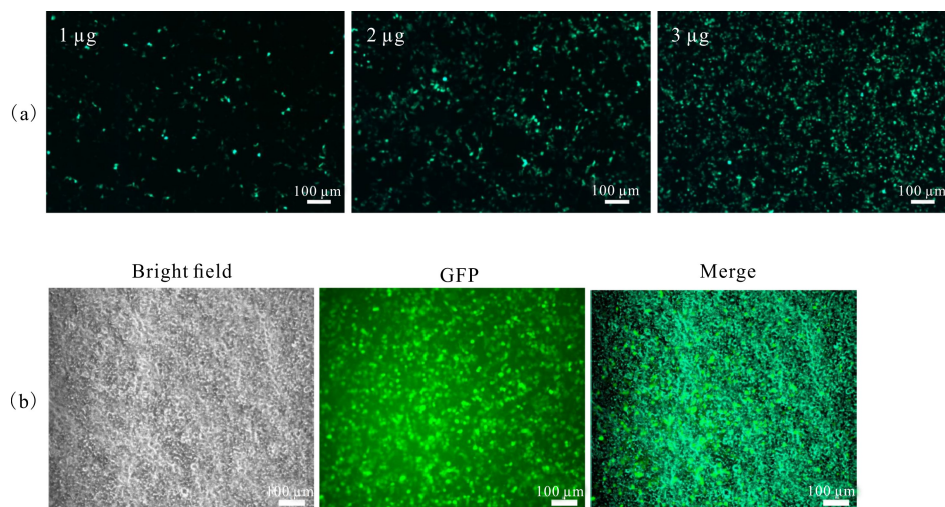
图2 PX459-sgRNA1-Cas9和PX459-sgRNA2-Cas9共表达质粒测序结果

Fig. 2 Sequencing result of co-expression plasmid PX459-sgRNA1-Cas9 and PX459-sgRNA2-Cas9

2.2 脂质体转染效率

荧光显微镜下观察发现,转染1 μg质粒时不到20%的细胞表达GFP,转染2 μg质粒时表达GFP的细胞比例达到80%,转染3 μg质粒时表达GFP的细

胞比例在85%以上(图3)。为了减少转染的毒性同时又达到较好的转染效果,选择转染2 μg质粒进行后续实验。



(a) Fluorescence spectra of transfected by 1 μg, 2 μg and 3 μg GFP plasmids; (b) The bright field and green fluorescence image of 2 μg GFP plasmid transfection

图3 脂质体转染 HEK293T 细胞的效率

Fig. 3 Efficiency of liposome transfected into HEK293T cells

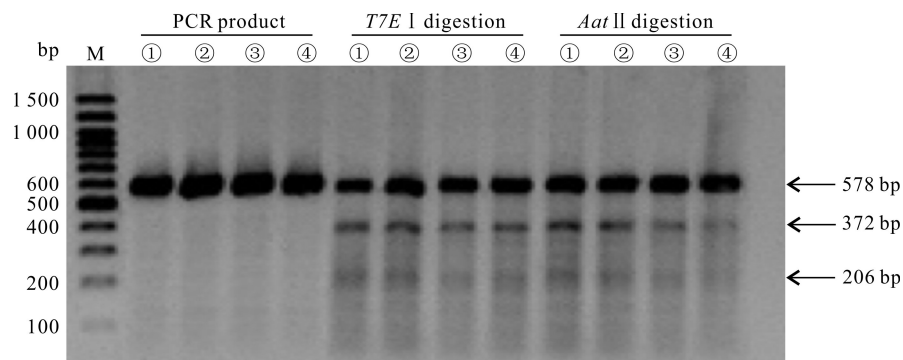
2.3 *HBB-28* 基因(A>G)定点突变 HEK293T 细胞株的建立

2.3.1 sgRNA 切割效率和 ssODNs 整合效率验证

sgRNA 切割效率实验 (*T7E I* 酶切活性): PCR 扩增包含有突变位点在内的片段, 实验组①-④的 PCR 产物总长度是 578 bp, 且均表现出切割活性, 酶切后分为 3 条条带: 原有条带 578 bp, 以及被切割后的 372 bp 和 206 bp 两条条带(图 4)。结合灰度分析, 实验组①-④的切割效率分别为 27.19%、

22.72%、18.62% 和 21.49%(表 2)。对于 *HBB-28* 基因, 活性最高的是 sgRNA1, 因此, 后续的基因定点突变实验选用 sgRNA1 进行。

ssODNs 整合效率实验 (*Aat II* 酶切活性): 当 ssODNs 整合至目标位置时, 会被 *Aat II* 酶识别并切割, 如图 4 的电泳图及表 2 的灰度分析结果所示, 实验组①-④均有 *Aat II* 酶的酶切活性, 整合效率分别为 26.41%、22.25%、14.78% 和 12.84%, 说明这 4 组均有 ssODNs 整合。



M: Marker; ①: sgRNA1 + ssODN1; ②: sgRNA1 + ssODN2; ③: sgRNA2 + ssODN1; ④: sgRNA2 + ssODN2

图 4 不同靶点切割效率和不同 ssODNs 整合效率比较

Fig. 4 Comparison of editing efficiency and integration efficiency of different targets and ssODNs

表 2 各组切割效率、整合效率和相对整合效率

Table 2 Cutting, integration efficiency and relative integration efficiency of each group

组别 Group	切割效率 (%) Cutting efficiency (%)	整合效率 (%) Integration efficiency (%)	相对整合 效率(%) Relative integration efficiency (%)
①	27.19	26.41	97.14
②	22.72	22.25	97.96
③	18.62	14.78	79.42
④	21.49	12.84	59.72

根据表 2 汇总的各组切割效率、整合效率和相对整合效率可知, 实验组①的切割效率和整合效率最高, 其相对整合效率为 97.14%, 与相对整合效率最高的实验组②(97.96%)相差不大。为了减少实验结果的误差, 对实验中的 PCR 产物进行 *T7E I* 酶切

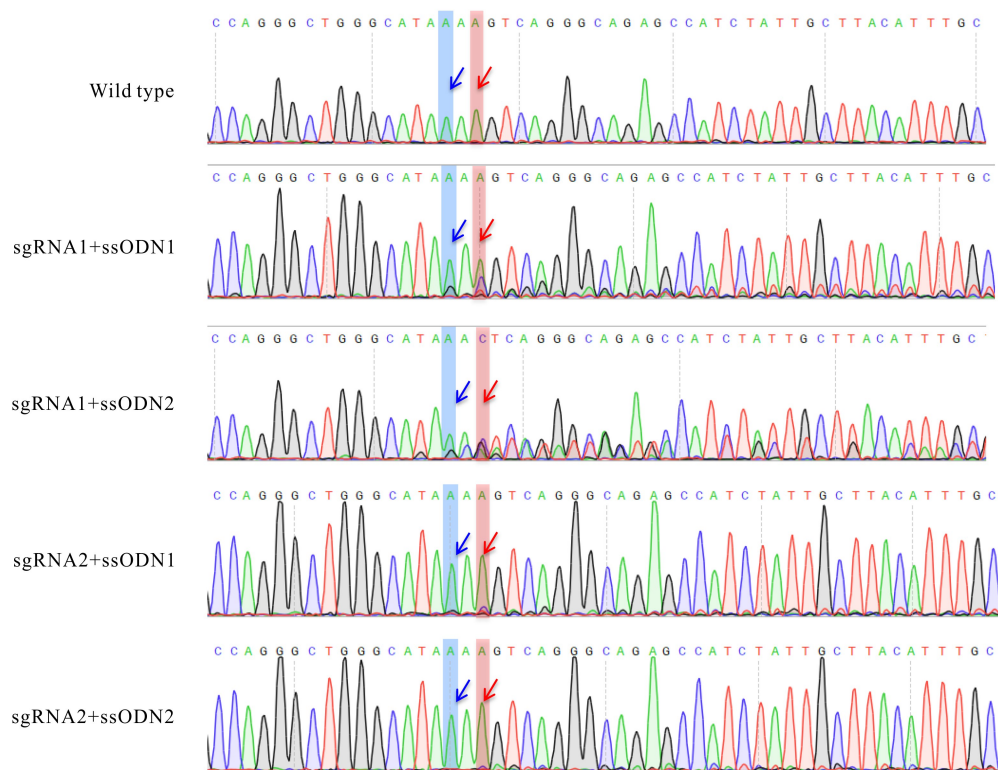
和 *Aat II* 酶切的重复实验, 结果与初次实验差异不大。因此, 选择实验组①进行后续的单克隆筛选实验。

2.3.2 测序鉴定

结合图 4 和表 2 的灰度分析, 以及图 5 峰值结果, 实验组①-④均发生了切割和整合, 引入了 β -地贫基因 *HBB-28* (A>G) 和阻断突变碱基(A>C), 且实验组①和②的杂合峰值比实验组③和④高(图 5), 说明实验组①和②的切割效率和整合效率高, 但未进行单克隆挑选, 故显示为杂合的峰图。

2.4 β -地贫基因 *HBB-28* (A>G) 定点突变的单克隆 HEK293T 细胞株的建立

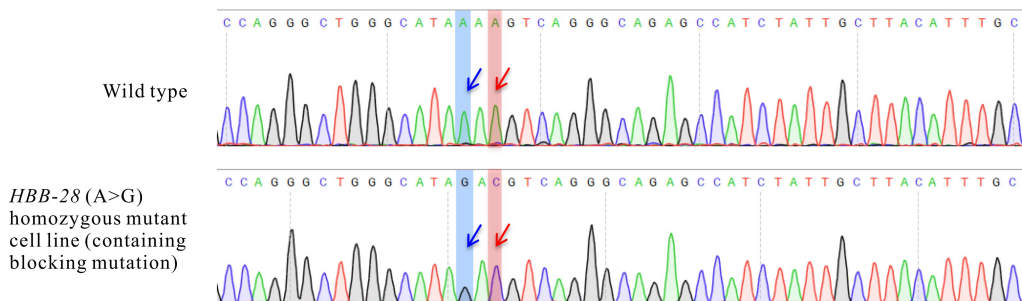
如图 6 所示, 单克隆 HEK2937 细胞株同时引入了 *HBB-28* (A>G) 和阻断突变(A>C) 碱基。10 个单克隆中还包含 5 个杂合突变、1 个非目标突变纯合细胞株以及 3 个无相应碱基突变的野生型细胞株。



The blue arrow shows *HBB-28* pathogenic point mutation base (A>G), and the red arrow shows blocking mutation base (A>C)

图5 各组总细胞提DNA后进行PCR测序的峰图

Fig. 5 Peaks of DNA extracted from total cells of each group for PCR sequencing



The blue arrow shows *HBB-28* pathogenic point mutation base (A>G), and the red arrow shows blocking mutation base (A>C)

图6 野生型与 *HBB-28* (A>G) 突变型单克隆 HEK293T 细胞株的测序峰图

Fig. 6 Sequencing peak maps of wild-type cells verse *HBB-28* (A>G) mutant monoclonal HEK293T cells

3 讨论

CRISPR/Cas9 基因编辑技术是继锌指核酸酶 (Zinc-Finger Nucleases, ZFNs) 和转录激活因子样效应物核酸酶 (Transcription Activator-Like Effector Nucleases, TALENs) 技术之后出现的第三代新型基因编辑技术。CRISPR/Cas9 基因编辑技术通过导向 sgRNA 招募 Cas9 蛋白在细胞内靶基因特定位点进

行特异切割形成 DNA 双链断裂, 进而诱发同源重组和非同源末端连接的自我修复过程, 实现对基因组特定靶点的编辑^[5,10]。该技术操作便捷、重复性好, 而且易于设计、插入效率高, 已在医学、药物、生命科学等多领域得到广泛应用^[11]。

在哺乳动物细胞中, 基因 HDR 频率相对少见, 大多数情况下 DSBs 由非同源连接 (Non-Homologous End Joining, NHEJ) 修复^[12]。然而, HDR 介导的基因插入在人类疾病模型制备、基因治疗和农业遗

传改良等方面具有重要作用,但是其效率很低^[13]。因此,如何提高 HDR 的频率对提高编辑效率显得格外重要。其中,单链供体 ssODNs 模板的应用,有助于提高 HDR 的频率。与利用双链 DNA (double strand DNA, dsDNA) 模板或其他遗传操作进行小片段插入、缺失或点突变不同,对于短片段的插入,ssODNs 作为供体模板具有更高的基因插入效率^[14]。另外,dsDNA 同源模板受拓扑结构、同源臂长度等影响,构建过程需要数周,而 ssODNs 合成时间短,且不需要任何筛选标记就可以一步完成基因精确修复,不会随机整合到基因组中,是一种更加安全、精确的基因编辑方法^[15-16]。

Kwart 等^[7] 和 Paquet 等^[17] 利用 CRISPR/Cas9 和 ssODN 在人类多功能干细胞中引入与疾病相关的致病突变时发现,高达 95% 的已编辑位点的序列会被再次编辑,造成额外的 indel 突变破坏。利用 CORRECT 技术能够有效阻断多个位点的再次编辑,这些阻断突变碱基能以高效率、高精度选择性引入单等位或双等位基因序列,使 HDR 的编辑精度提高到每个等位基因的 10 倍,阻断突变的位点越接近 PAM 位点,HDR 的效率越高^[7,17]。为了提高 HDR 的频率,本研究一方面利用 CORRECT 基因编辑新技术在 CRISPR/Cas9 靶向所需 PAM 序列附近插入同义突变碱基到 HDR 模板中,在很大程度上阻止不良的再次编辑,提高了 ssODNs 的相对整合效率(达 97.14%),获得了纯合的单克隆 *HBB-28* (A>G) 细胞株。另一方面,本研究在 PAM 前 5 个碱基处引入限制性内切酶 *Aat* II 识别位点,同样得到较好的编辑和整合效率。比较 ssODNs 的正反方向对整合效率的影响发现,sgRNA1 和 sgRNA2 均为正义链序列的靶点,对于编辑效率高的 sgRNA1 靶点,正、反向 ssODNs 的整合效率分别为 26.41% 和 22.25%,相对整合效率分别为 97.14% 和 97.96%,表明正、反方向的 ssODNs 对相对整合效率影响不大。对于编辑效率相对较弱的 sgRNA2 靶点,正、反向 ssODNs 的整合效率分别为 14.78% 和 12.84%,相对整合效率分别为 79.42% 和 59.72%,表明对 sgRNA2 靶点而言,正向 ssODN1 的相对整合效率更高。但该结果是否适用于其他靶点,需要进一步验证。尽管针对单个等位基因的阻断突变碱基(同义突变)的引入不影响氨基酸序列,但是引入的突变碱基是否在 DNA 或 RNA 水平影响细胞的转录调控或内部功能尚不清楚。遗传密码被破解以来,人们通常认为遗传密码具

有简并性,同义突变是无害的,不会改变蛋白质序列^[18,19]。然而 Shen 等^[20] 最近的研究发现大多数同义突变是非常有害的,他们通过改造酿酒酵母基因组中 21 个有代表性的基因,制造了 8 341 个突变体,结果显示至少 75% 的同义突变显著损害酿酒酵母的适应度,且损害幅度超过 0.1%,是自然选择在酿酒酵母中所能感知的最小适应度变化的 10 000 倍。但是该实验是在单倍体芽殖酵母中进行的,后期需要在不同生物体及其杂合状态下做进一步的实验验证。

本研究虽然未进行基因点突变后的细胞功能验证,但是在方法学上提供了一种新型、高效的点突变编辑方法,且该方法同样适用于特定基因突变位点的修复,为后续的研究奠定了模型和方法基础。

参考文献

- [1] XU X X, WU X D. Epidemiology and treatment of beta thalassemia major in China [J]. *Pediatric Investigation*, 2020, 4(1): 43-47.
- [2] LAI K T, HUANG G F, SU L, et al. The prevalence of thalassemia in mainland China: evidence from epidemiological surveys [J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 920.
- [3] ORKIN S H, SEXTON J P, CHENG T C, et al. AT box transcription mutation in beta-thalassemia [J]. *Nucleic Acids Research*, 1983, 11(14): 4727-4734.
- [4] CAO A, GALANELLO R. Beta-thalassemia [J]. *Genetics in Medicine*, 2010, 12(2): 61-76.
- [5] RAN F A, HSU P D, WRIGHT J, et al. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system [J]. *Nature Protocols*, 2013, 8(11): 2281-2308.
- [6] NIU X H, HE W Y, SONG B, et al. Combining single strand oligodeoxynucleotides and CRISPR/Cas9 to correct gene mutations in β -thalassemia-induced pluripotent stem cells [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2016, 291(32): 16576-16585.
- [7] KWART D, PAQUET D, TEO S, et al. Precise and efficient scarless genome editing in stem cells using CORRECT [J]. *Nature Protocols*, 2017, 12(2): 329-354.
- [8] 张楷, 刘蔚, 刘小凤, 等. 利用 CRISPR/Cas9 系统构建人 *HPRT1* 基因定点突变细胞株 [J]. *遗传*, 2019, 41(10): 939-949.
- [9] 高利利, 王聪聪, 杨帆, 等. CRISPR/Cas9 介导的 RPSA 基因敲除细胞系的建立及其应用 [J]. *微生物学报*, 2021, 61(7): 1945-1956.
- [10] PLAGENS A, RICHTER H, CHARPENTIER E, et al. DNA and RNA interference mechanisms by CRISPR-Cas surveillance complexes [J]. *FEMS Micro-*

- biology Reviews, 2015, 39(3): 442-463.
- [11] KARIMIAN A, AZIZIAN K, PARSIAN H, et al. CRISPR/Cas9 technology as a potent molecular tool for gene therapy [J]. Journal of Cellular Physiology, 2019, 234(8): 12267-12277.
- [12] LIU M J, REHMAN S, TANG X D, et al. Methodologies for improving HDR efficiency [J]. Frontiers in Genetics, 2019, 9: 691.
- [13] MARUYAMA T, DOUGAN S K, TRUTTMANN M C, et al. Increasing the efficiency of precise genome editing with CRISPR-Cas9 by inhibition of nonhomologous end joining [J]. Nature Biotechnology, 2015, 33(5): 538-542.
- [14] GRATZ S J, UKKEN F P, RUBINSTEIN C D, et al. Highly specific and efficient CRISPR/Cas9-catalyzed homology-directed repair in *Drosophila* [J]. Genetics, 2014, 196(4): 961-971.
- [15] STEYER B, BU Q, CORY E, et al. Scarless genome editing of human pluripotent stem cells via transient puromycin selection [J]. Stem Cell Reports, 2018, 10(2): 642-654.
- [16] LEVI T, SLOUTSKIN A, KALIFA R, et al. Efficient in vivo introduction of point mutations using ssODN and a Co-CRISPR approach [J]. Biological Procedures Online, 2020, 22: 14.
- [17] PAQUET D, KWART D, CHEN A, et al. Efficient introduction of specific homozygous and heterozygous mutations using CRISPR/Cas9 [J]. Nature, 2016, 533(7601): 125-129.
- [18] KIMURA M. Genetic variability maintained in a finite population due to mutational production of neutral and nearly neutral isoalleles [J]. Genetical Research, 1968, 11(3): 247-269.
- [19] KING J L, JUKES T H. Non-darwinian evolution: most evolutionary change in proteins may be due to neutral mutations and genetic drift [J]. Science, 1969, 164(3881): 788-798.
- [20] SHEN X K, SONG S L, LI C, et al. Synonymous mutations in representative yeast genes are mostly strongly non-neutral [J]. Nature, 2022, 606(7915): 725-731.

Construction and Application of CORRECT-mediated Human *HBB-28* Gene Site-directed Mutagenesis Cell Line

LIU Yongxiang¹, MAI Qingyun², LI Yunshi¹, MEI Junyan¹, LIANG Aijun¹, PENG Xinliang¹, ZHOU Ruihong³, ZHOU Shaohu^{1* *}

(1. Department of Reproductive Medicine, The First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou, Guangdong, 510405, China; 2. Reproductive Medicine Center, The First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou, Guangdong, 510080, China; 3. Guangzhou General Pharmaceutical Research Institute Company Limited, Guangzhou, Guangdong, 510220, China)

Abstract: In order to establish a new and efficient method named CORRECT (Consecutive re-Guide or re-Cas steps to Erase CRISPR/Cas blocked Targets) for site-directed mutagenesis and gene repair using CRISPR/Cas9 system, Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR) online design tool was used in this study to design small guide RNA (sgRNA) for human β -globin (*HBB*) gene. PX459-sgRNA-Cas9 co-expression plasmid was constructed, and then single-stranded Oligo DNA Nucleotides (ssODNs) containing blocking mutation bases (G>T) were used as homologous templates. HEK293T cells were transfected with liposomes and the editing efficiency was examined by Sanger sequencing and enzyme digestion (*T7E I* and *Aat II*). Finally, the genotype of *HBB* knockout monoclonal cells was analyzed by Sanger sequencing. The results showed that β -thalassemia *HBB-28* (A>G) homozygous mutant HEK293T cell line was successfully constructed. Blocking mutant base-optimized ssODNs reduced the re-editing of Cas9 protein

to the target and improved the integration efficiency. The HEK293T cell strain with homozygous point mutation can be efficiently obtained by the novel point mutation technology, which not only provides experimental basis for the establishment of single base mutation disease model, but also provides an efficient method for gene repair therapy.

Key words: β -thalassemia; HBB; blocking mutation; direct mutagenesis; gene repair therapy

责任编辑: 陆 雁

《广西科学》致谢 2021 - 2022 年审稿专家

《广西科学》在主管/主办单位以及主编、编委和审稿专家的大力支持和帮助下,圆满完成了 2022 年 1-6 期的编辑和出版工作。专家们在百忙中承担繁重的审稿任务,你们严谨治学的态度和奉献精神保证了《广西科学》的学术质量,为提升《广西科学》影响力作出重大贡献。同时,编辑和作者也有幸得到了审稿专家的帮助。在此,《广西科学》编辑部谨向以下审稿专家致以诚挚的敬意和最衷心的感谢!祝各位专家在新的一年里身体健康,万事如意!

丁少雄	丁晓雯	刁宏燕	于道德	万 中	马姜明	马艳弘	王一兵	王广华	王中华	王月桐
王文卿	王为东	王红瑞	王 芳	王青艳	王现涛	王金霞	王 祎	王建新	王 栋	王 威
王桂文	王 晖	王祥红	韦友传	韦宇拓	韦树根	韦钧元	韦桂宁	韦嘉章	韦毅刚	牛建峰
文益民	方志杰	邓爱华	邓雁如	石胜良	石洪源	龙丽娟	卢立华	卢 伟	叶 勇	申乃坤
申友利	申玉春	史晓翀	冉祥滨	付顺军	付家想	冯民权	兰 伟	皮国良	巩 杰	过 杰
毕忠勤	吕龙宝	吕军影	吕兑安	吕郁彪	朱志斌	朱 坤	朱晓姝	朱鹏锦	乔少杰	任 黎
伊力塔	向悟生	邬 满	刘文君	刘文其	刘文耀	刘布鸣	刘乐军	刘必林	刘永贤	刘连芳
刘希刚	刘叔文	刘相全	刘洪波	刘晓东	刘晓收	刘 峰	刘 铎	刘 浩	刘海燕	刘容容
刘清华	刘焱雄	刘 演	祁 超	农旭华	孙文国	孙玉林	孙平楠	孙 军	孙晓梅	孙凌宇
纪云西	苏思标	杜 欣	李广原	李月红	李文涛	李世晋	李冬梅	李 刚	李先琨	李典鹏
李宝泉	李 彦	李桂银	李 浪	李陶深	李 琪	李 晶	李锐祥	李瑞杰	李鹏飞	李意德
李慧慧	李 贇	杨秀芳	杨建刚	杨 勇	杨振德	杨 梅	杨盛昌	杨登峰	杨献文	杨 楠
杨 键	杨慧良	杨 磊	杨曦亮	肖秀春	吴仁协	吴立潮	吴传芳	吴 昊	吴 娜	吴海一
吴 源	吴慧哲	何志义	何勇强	何铁光	何 维	何斌源	佟 岩	余水平	余克服	余俊英
邹丽芳	邹承武	汪文俊	沈振萍	宋凤卿	宋方茗	宋佳明	宋金明	迟 恒	张木清	张中峰
张乔民	张全发	张全斌	张克勤	张 国	张建全	张 勃	张 亮	张彦东	张晓勇	张 敏
张鸿雁	张敬伟	张寒冰	张 颖	张 新	张 慧	张 翼	陈宁江	陈红锋	陈国福	陈法锦
陈 波	陈 思	陈胜龙	陈洪松	陈振雄	陈 罡	陈海珊	陈 燕	陈鹭真	招礼军	范冰冰
林明霖	林起庆	林 峰	昌 盛	罗永巨	罗应华	罗 奇	罗 明	罗 森	季孔庶	周文武
周本杰	周永权	周先丽	周旭东	周建平	周 俊	周洪雷	周晓果	周越菡	周 智	周 燕
庞玉生	庞 浩	郑 立	郑海雷	郑景辉	郑 霖	宗洪祥	赵 伟	赵宇鸾	赵 诚	赵冠伟
赵 斌	赵 鹏	郝林华	胡小波	胡传明	胡兴宜	胡忠军	胡 玲	胡湛波	胡榜利	钟艳平
侯小涛	侯西勇	姜明国	姚焕玫	姚维志	秦 玮	秦 莉	秦 超	袁华茂	聂光辉	莫发荣
莫灼强	莫曾南	贾玉萍	贾洪飞	柴 玲	党 超	徐邦浩	徐泽水	徐智广	徐新亚	高英俊
高学鲁	高 隼	高程海	郭启振	唐玉兰	唐 立	唐 其	唐振军	唐静亮	黄仁彬	黄月艳
黄仕训	黄廷磊	黄志勇	黄志碧	黄宏兴	黄建荣	黄荣韶	黄胜阳	黄 勇	黄 晖	黄 锋
曹 荣	崔 毅	康 敏	章忠明	梁明坤	梁晋涛	彭小清	董仕勇	董永峰	董 全	董志扬
蒋协远	蒋先军	蒋国芳	蒋俊俊	韩维栋	覃 晓	程光平	程道宾	焦 俊	曾宋君	湛永钟
温远光	温 放	谢晓兰	谢能中	蒙健宗	鲍献文	蔡泽富	蔡 炳	裴彦良	廖 宏	廖咏梅
廖晓辉	廖锡文	廖 馨	阙光明	谭立新	熊丽婷	熊康宁	樊 英	黎承杨	黎晓峰	黎燕宁
潘小炎	潘英妮	潘尚领	潘国富	潘 孟	潘鲁青	潘熠平	霍丹群	戴 磊	魏世娜	魏光涛
魏 群										

(致谢名单按姓氏笔画排序)