



不同秀丽隐杆线虫U6启动子对CRISPR/Cas9介导的基因编辑效率的影响*

冯理想¹, 黄颖¹, 赵容乾¹, 张奎², 杨文星¹[△]

1. 四川大学华西基础医学与法医学院生理学教研室(成都 610041);

2. 四川大学华西基础医学与法医学院法医病理学教研室(成都 610041)

【摘要】目的 本研究拟以秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*, *C. elegans*)为模型,探究其内源性U6启动子对*dpy-10*基因编辑效率的影响。**方法** 利用WormBase数据库筛选*C. elegans*内源性U6 snRNA基因;通过分子克隆技术,以pSX524质粒($P_{eff-3}::Cas9::tbb-2\ terminator::U6_{r07e5.16}::dpy-10\ sgRNA$)为模板,替代其U6_{r07e5.16}启动子,以构建其他14种靶向*dpy-10*基因的打靶载体;采用标准化微注射流程,对野生型*C. elegans*进行基因编辑,基于其子1代线虫*dpy-10*基因突变表型的筛选,计算基因编辑效率和高效基因编辑指数这两个观测指标。**结果** 从WormBase数据库获得15个U6 snRNA基因(*r07e5.16*, *f35c11.9*, *t20d3.13*, *k09b11.15*, *k09b11.16*, *w05b2.8*, *c28a5.7*, *f54c8.9*, *k09b11.11*, *k09b11.12*, *k09b11.14*, *t20d3.12*, *f54c8.8*, *f54c8.10*, *k09b11.13*)。基于基因编辑效率和高效基因编辑指数对这些基因启动子活性进行评估后,发现4个U6基因(*w05b2.8*, *c28a5.7*, *f54c8.9*, *k09b11.11*)启动子能显著提高基因编辑的成功率,其表现优于其他启动子,包括*C. elegans*研究中广泛使用的U6_{r07e5.16}和U6_{k09b11.12}启动子。此外,在使用高效U6_{w05b2.8}启动子的情况下,gRNA^{F+E}支架相较于gRNA支架并未表现出更高的编辑效率。**结论** 本研究鉴定了能显著提高*C. elegans*基因编辑效率的U6启动子,揭示了U6启动子优化选择在基因编辑系统中的关键作用,为改进基因组编辑策略提供了重要依据,并为优化线虫研究中的CRISPR技术提供了新思路。

【关键词】 秀丽隐杆线虫 U6启动子 CRISPR/Cas9 基因编辑 效率

Effect of Different *Caenorhabditis elegans* U6 Promoters on the Efficiency of CRISPR/Cas9-Mediated Gene Editing

FENG Lixiang¹, HUANG Ying¹, ZHAO Rongqian¹, ZHANG Kui², YANG Wenxing¹[△]. 1. Department of Physiology, West China School of Basic Medical Sciences & Forensic Medicine, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Department of Forensic Pathology, West China School of Basic Medical Sciences & Forensic Medicine, Sichuan University, Chengdu 610041, China

△ Corresponding author, E-mail: yangwx@scu.edu.cn

【Abstract】Objective To investigate the effects of *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) endogenous U6 promoters on *dpy-10* gene editing efficiency. **Methods** We screened endogenous U6 small nuclear RNA (snRNA) genes of *C. elegans* from the WormBase database and constructed 14 editing plasmids targeting *dpy-10* by replacing the U6_{r07e5.16} promoter in the pSX524 plasmid ($P_{eff-3}::cas9::tbb-2\ terminator::U6_{r07e5.16}::dpy-10\ sgRNA$) through molecular cloning. Gene editing was performed in wild-type *C. elegans* using a standardized microinjection protocol. Gene editing efficiency and the high-efficiency gene editing index were quantified based on the screening of *dpy-10* mutant phenotypes in the F1 progeny. **Results** A total of 15 U6 snRNA genes (*r07e5.16*, *f35c11.9*, *t20d3.13*, *k09b11.15*, *k09b11.16*, *w05b2.8*, *c28a5.7*, *f54c8.9*, *k09b11.11*, *k09b11.12*, *k09b11.14*, *t20d3.12*, *f54c8.8*, *f54c8.10*, and *k09b11.13*) were identified from the WormBase database. Based on the editing efficiency and high-efficiency gene editing index, the activity of these promoters was evaluated, and 4 U6 promoters (*w05b2.8*, *c28a5.7*, *f54c8.9*, and *k09b11.11*) were found to have significantly enhanced gene editing success rates, outperforming other promoters, including U6_{r07e5.16} and U6_{k09b11.12}, which are commonly used in the *C. elegans* research community. Notably, the gRNA^{F+E} scaffold did not show superior editing efficiency over the gRNA scaffold when paired with the optimal U6_{w05b2.8} promoter. **Conclusion** In this study, U6 promoters that significantly improve gene editing efficiency in *C. elegans* are identified and the critical role of promoter optimization in CRISPR-Cas9 systems is highlighted. These findings provide a valuable foundation for improving genome editing strategies and offer new ideas for optimizing the CRISPR technology applied in nematode research.

【Key words】 *Caenorhabditis elegans* U6 promoter CRISPR/Cas9 Gene editing Efficiency

* 国家自然科学基金面上项目(No. 32271178)资助

△ 通信作者, E-mail: yangwx@scu.edu.cn

出版日期: 2025-07-20

CRISPR/Cas9基因编辑系统因其设计简便、操作性强及靶向精准等特点,已成为当前生物医学领域广泛应用的基因编辑工具。该系统由剪切双链DNA的Cas9核酸内切酶和靶向特定基因位点的单链向导RNA(single-strained guide RNA, sgRNA)组成, Cas9蛋白可通过体外纯化蛋白、表达质粒或信使RNA(message RNA, mRNA)形式递送^[1-7], 而sgRNA可通过sgRNA或表达质粒形式递送^[8-10]。由于合成蛋白或RNA的成本较高,质粒递送Cas9和sgRNA因其经济性成为首选的基因编辑手段。然而,如何通过优化质粒载体提升基因编辑效率仍是亟待解决的科学问题。

作为经典的模式生物,秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*, *C. elegans*)被广泛用于神经调控、感染免疫、衰老及生殖、环境毒理机制等多领域研究^[11-14]。在*C. elegans*研究领域, CALARCO实验室和GOLDSTEIN实验室于2013年分别开发了两套Cas9/sgRNA基因编辑质粒系统^[1-2]。这两套系统的主要差异在于CALARCO实验室的Cas9和sgRNA分别由两个质粒递送,而GOLDSTEIN实验室的Cas9和sgRNA由一个质粒递送;前者采用U6小核RNA(small nuclear RNA, snRNA)基因 $k09b11.12$ 的启动子来启动sgRNA转录;后者采用 $r07e5.16$ 启动子来启动sgRNA转录。尽管基于这两种U6启动子表达的sgRNA均能成功进行基因编辑,但不同的实验室报道的编辑效率存在争议,有报道显示 $k09b11.12$ 启动子的效率更高,亦有研究表明 $r07e5.16$ 启动子更具优势^[15-16]。这表明U6启动子的选择可能影响编辑效率,但迄今缺乏系统的比较研究。

CHEN等^[10]在哺乳动物细胞中的研究表明,经过改造的gRNA支架,即翻转加扩展引导RNA支架(flipped plus extended gRNA scaffold, gRNA^{F+E} scaffold)展现出更优越的基因编辑活性。此外,已有研究证实gRNA^{F+E}支架在*C. elegans*中同样可显著提升基因编辑效率^[17]。在使用更高效U6启动子的前提下, gRNA^{F+E}支架是否能进一步提高基因编辑效率尚有待揭示。

大多数基因的敲除或编辑不会导致明显的表型变化,在利用上述两种质粒系统对*C. elegans*进行基因编辑后, F1代*C. elegans*是否成功发生基因编辑缺乏直观的筛选标记,因此还需要大量的基因分型实验进行筛选。这不仅增加了实验成本,也降低了筛选效率。为解决这一问题,研究人员开发了辅助CRISPR(Co-CRISPR)策略^[18-21]。该策略通过同时靶向目标基因和一个易于检测的内参基因,利用内参基因突变产生的可见表型(如行为或形态变化等)作为筛选依据,从而提高目标基因编辑的筛选效率。在Co-CRISPR策略中, $dpy-10$ 是常用的内参基因之一^[21]。

DPY-10是一种线虫特异性胶原蛋白,它的cn64突变是一种显性功能获得性突变,其分子机制为该蛋白第92位的精氨酸(Arg92)被半胱氨酸(Cys)取代(p.Arg92Cys)^[22]。该突变通过破坏胶原蛋白的结构稳定性,导致角质层发育异常,并引发3种显性表型^[18, 22]: 短胖体型(dumpy, DPY)、滚动爬行(roller, ROL)和短胖且滚动爬行(DPY+ROL), 见图1。当F1代线虫出现上述表型时,表明Co-CRISPR策略成功介导了基因编辑。随后,可在这些突变个体的后代中进一步筛选目标基因的编辑事件。

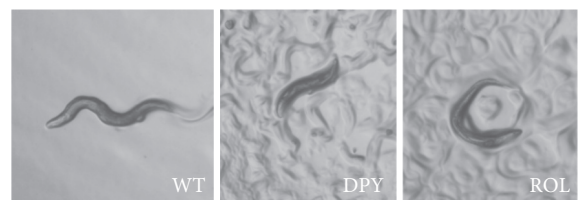


图1 野生型秀丽隐杆线虫及DPY和ROL表型秀丽隐杆线虫

Fig 1 *C. elegans* with WT, DPY, and ROL phenotypes

WT: wild type; DPY: dumpy; ROL: roller.

基于上述研究背景,本研究将比较*C. elegans*的15种内源性U6 snRNA基因启动子及gRNA^{F+E}支架对 $dpy-10$ 基因编辑效率的影响,以期能为优化*C. elegans*的CRISPR/Cas9基因编辑系统提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 秀丽隐杆线虫与试剂

N2野生型雌雄同体*C. elegans*, 购自美国秀丽隐杆线虫遗传学中心。所有线虫饲养于线虫生长培养基(nematode growth medium, NGM)平板中,以大肠杆菌OP50进行常规培养^[11, 23]。2×高保真PCR预混液(Cat. No. HY-K0533 MCE)购自MCE生物科技公司、无缝克隆试剂盒(Cat. No. MC40101M)购自莫纳生物科技有限公司。

1.2 质粒构建

所有打靶质粒均以pDD162(Peft-3::Cas9 + Empty sgRNA)为模板构建^[1]。pDD162质粒含有Cas9表达盒P_{eft-3}::Cas9、U6启动子(源于 $r07e5.16$ 基因,后续记作U6 _{$r07e5.16$}),不含打靶位点互补配对序列的引导RNA支架结构。通过分子克隆将互补配对序列替换为靶向 $dpy-10$ 基因的打靶位点的序列(20 bp, 图2),即得到pSX524质粒。本研究中所使用pSX524质粒由浙江大学邹炜教授惠赠。采用无缝克隆技术将原载体中的U6 _{$r07e5.16$} 启动子替换为其他U6基因启动子,从而构建得到本研究所用的打靶质粒。所有重组质粒均经DNA测序验证其序列准确性。详细的分子克隆方案、各质粒的完整DNA序列信息以及构建过程中使用的引物序列见网络资源附件附表1和附表2(见“辅助

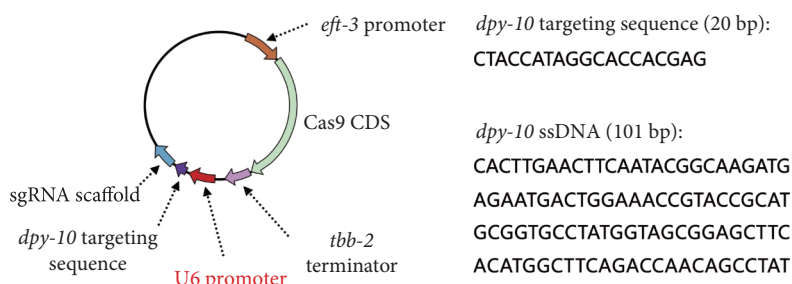


图 2 U6启动子相关质粒的组成

Fig 2 The composition of U6 promoter-related plasmids

sgRNA: single-strained guide RNA; ssDNA: single strand DNA.

数据”。

1.3 显微注射

*C. elegans*的生殖腺由两个对称的U形臂组成。为提高实验可操作性和减少误差,本研究采用显微注射技术将打靶质粒递送至靠近头侧的远端性腺区域。注射用质粒混合液按总体积10 μ L体系配制,包含打靶质粒(30 ng/ μ L)、*dpy-10*基因编辑模版单链DNA(ssDNA, 101 bp, 序列信息见图2, 0.6 μ mol/L)、微注射标记质粒($P_{unc-122}::GFP$, 30 ng/ μ L)、微注射质粒浓度平衡用质粒(pUC19, 30 ng/ μ L),用双蒸水补足至10 μ L。每只线虫的注射体积为20 nL。本研究以pYW616质粒混合液作为标准对照。为确保实验一致性,每次显微注射实验(无论涉及多少组质粒混合液)均需包含一组pYW616质粒混合液作为内参对照。

1.4 基因编辑效率量化方法

为了量化评估显微注射后的基因编辑效果,本研究将每只成功注射的P0代线虫单独培养并每日更换培养皿以收集F1代。当F1代发育至L4幼虫期或成虫第1天时,通

过体视显微镜统计该培养皿中线虫总数及呈现*dpy-10*突变表型的线虫数量。基于这些数据,我们建立了两个量化指标,即基因编辑效率(gene-editing efficiency)和高效基因编辑指数(high efficiency gene-editing index, HEGE index)。基因编辑效率定义为单只P0代线虫所产生的F1代中,携带*dpy-10*突变表型的个体所占百分比。将基因编辑效率 $\geq 20\%$ 的事件定义为高效基因编辑事件,并进一步计算HEGE Index。该指数通过将某质粒混合液组中高效编辑事件的比例与对应P0代线虫的实际基因编辑效率相乘得到。这一指标能够同时反映基因编辑的成功率和高效编辑的可靠性。

1.5 数据分析

本文数据以箱形图呈现,分别标注中位数、四分位数间距、最大值和最小值,“+”代表均数。统计学分析通过Graphpad Prism 10完成,图3和图4以Kruskal-Wallis *H*检验后,进行Dunn多重比较分析;图5采用Mann-Whitney *U*检验分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

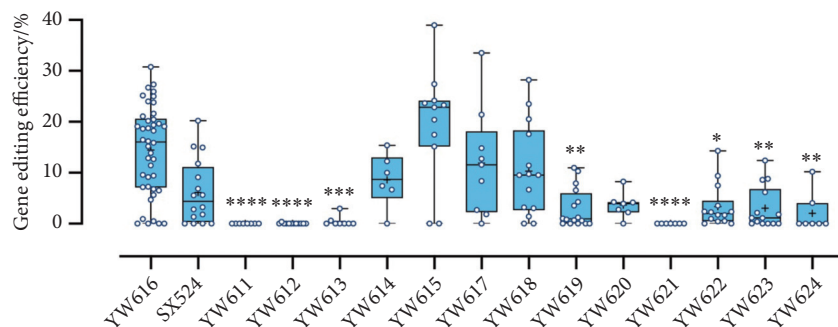


图 3 不同U6启动子对基因编辑效率的影响

Fig 3 The effect of U6 promoters on gene-editing efficiency

**** $P < 0.0001$, *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$, vs. YW616. From left to right, the sample sizes (*n*) are 42, 16, 8, 12, 8, 6, 11, 9, 14, 16, 7, 7, 14, 14, 7, respectively.

2 结果

2.1 不同U6启动子相关质粒载体的构建

通过在WormBase数据库(www.wormbase.org)的“基

因”选项中检索“U6”,得到15个U6 snRNA基因(表1)。pSX524质粒($P_{eft-3}::Cas9::tbb-2$ terminator::U6_{r07e5.16}::*dpy-10* sgRNA)中Cas9的表达受 P_{eft-3} 启动子控制,同时以*tbb-2*基因3端非编码序列作为转录终止子; Cas9表达盒下游有受

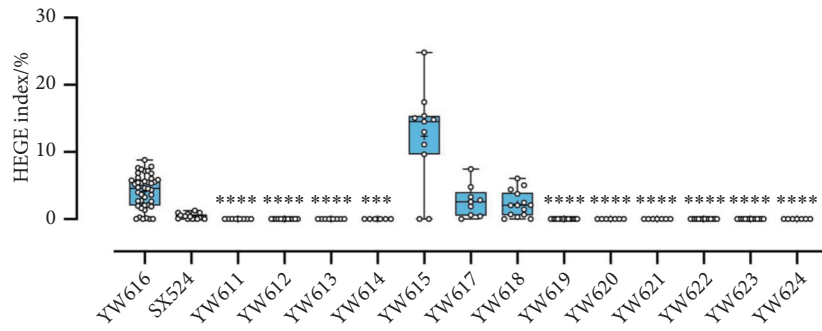


图 4 不同U6启动子对高效基因编辑指数的影响

Fig 4 The effect of U6 promoters on high efficiency gene-editing index

HEGE index: high efficiency gene-editing index. **** $P < 0.0001$, *** $P < 0.001$, vs. YW616. From left to right, the sample sizes (n) are 42, 16, 8, 12, 8, 6, 11, 9, 14, 16, 7, 14, 14, and 7, respectively.

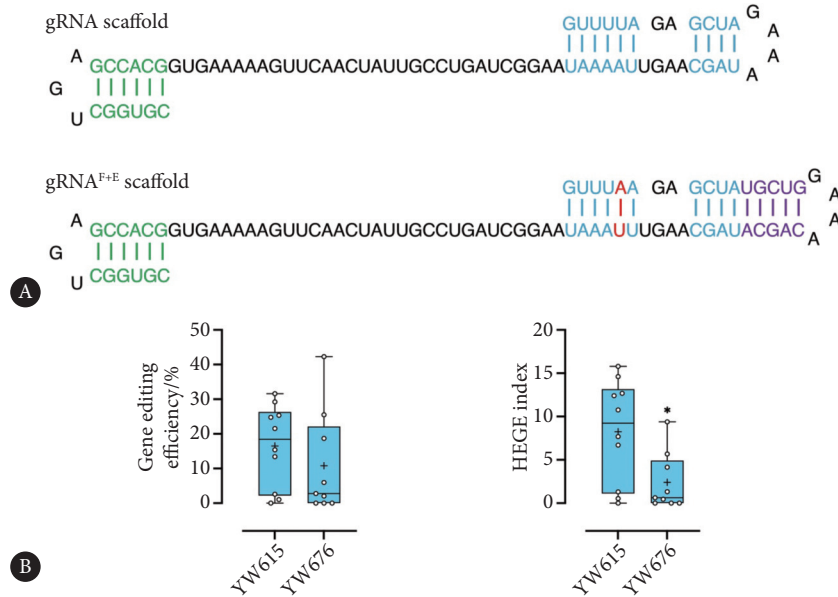


图 5 不同gRNA支架对基因编辑的影响

Fig 5 The effect of different gRNA scaffolds on gene-editing

gRNA^{F+E} scaffold: flipped plus extended gRNA scaffold; HEGE index: high efficiency gene-editing index. * $P < 0.05$, vs. YW615. $n = 10$ (YW615), $n = 9$ (YW676).

U6_{r07e5.16}启动子控制的*dpy-10* sgRNA表达盒(图2)。本研究构建了pYW611 ~ pYW624质粒, 将pSX524质粒中的U6_{r07e5.16}启动子替换为其他14种U6启动子, 质粒名称与U6启动子的对应关系见表1。

2.2 不同U6启动子可导致不同的基因编辑效率

*dpy-10*的cn64突变通过破坏胶原蛋白的结构稳定性, 导致角质层发育异常, 并引发3种显性表型: DPY、ROL和DPY+ROL(图1)。通过sgRNA引导Cas9靶向特定位点, 并辅以101bp的单链DNA(single strand DNA, ssDNA, 图2)作为DNA修复模板, 野生型*C. elegans*经基因编辑后将产生携带cn64突变的子代线虫。该突变表型可以通过体视显微镜识别。若对野生型P0代线虫微注射以实施基因编辑, F1代线虫便会出现上述cn64突变表型。因此, 以

F1代中表型阳性的个体比例作为基因编辑效率的衡量指标, 能够有效反映基因组编辑效果。

为了评估15种U6启动子对基因编辑效率的影响, 本研究基于pSX524及pYW611 ~ pYW624质粒, 实施了191个微注射实验(表1)。结果显示, pYW611、pYW612、pYW613及pYW621等4种质粒的基因编辑效率接近零, 表明这4种质粒的U6 snRNA基因(*f35c11.9*、*t20d3.13*、*k09b11.15*、*t20d3.12*)启动子几乎无法有效驱动基因编辑过程(图3)。pYW616组显示的基因编辑效率高于pYW619组($P < 0.01$), 表明*c28a5.7*基因启动子的编辑效率优于CALARCO实验室所用的*k09b11.12*基因启动子。与GOLDSTEIN实验室所使用的*r07e5.16*基因启动子(pSX524组)相比, pYW616组表现出编辑效率提升趋势,

表 1 U6 snRNA 基本信息表
Table 1 U6 snRNA-related information

U6 snRNA	Alternative name	Plasmid	Length of U6 promoter/bp	Genomic location	The number of microinjections
<i>f35c11.9</i>	U6	YW611	500	II: 0.75 +/- 0.000 cM	8
<i>f54c8.8</i>	U6-1	YW622	500	III: 0.52 +/- 0.000 cM	14
<i>f54c8.9</i>	U6-2	YW617	500	III: 0.52 +/- 0.000 cM	9
<i>f54c8.10</i>	U6-3	YW623	500	III: 0.52 +/- 0.000 cM	14
<i>c28a5.7</i>	U6-4	YW616	500	III: -3.17 +/- 0.000 cM	42
<i>k09b11.11</i>	U6-8	YW618	500	IV: 9.25 +/- 0.000 cM	14
<i>k09b11.12</i>	U6-9	YW619	500	IV: 9.25 +/- 0.000 cM	16
<i>k09b11.13</i>	U6-10	YW624	500	IV: 9.26 +/- 0.000 cM	7
<i>k09b11.14</i>	U6-11	YW620	500	IV: 9.26 +/- 0.000 cM	7
<i>k09b11.15</i>	U6-12	YW613	500	IV: 9.26 +/- 0.000 cM	8
<i>k09b11.16</i>	U6-13	YW614	500	IV: 9.26 +/- 0.000 cM	6
<i>r07e5.16</i>	U6-15	SX524	350	III: -3.17 +/- 0.000 cM	16
<i>t20d3.12</i>	U6-17	YW621	500	IV: 4.18 +/- 0.000 cM	7
<i>t20d3.13</i>	U6-18	YW612	500	IV: 4.18 +/- 0.000 cM	12
<i>w05b2.8</i>	U6-19	YW615	500	III: 5.82 +/- 0.000 cM	11
					Total: 191

但差异无统计学意义($P > 0.05$),提示*c28a5.7*基因启动子的编辑效率未显著优于后者。此外,pYW616组的基因编辑效率与pYW614、pYW615、pYW617、pYW618及pYW620组之间无明显差异($P > 0.05$),说明*k09b11.16*、*w05b2.8*、*f54c8.9*、*k09b11.11*及*k09b11.14*基因启动子的编辑效率与*c28a5.7*基因启动子相似;相较之下,pYW616组基因编辑效率优于pYW621($P < 0.0001$)、pYW622($P < 0.05$)、pYW623($P < 0.01$)、pYW624组($P < 0.01$),表明*c28a5.7*基因启动子的编辑效率明显优于*t20d3.12*、*f54c8.8*、*f54c8.10*、*k09b11.13*基因启动子。

2.3 *c28a5.7*、*w05b2.8*、*f54c8.9*和*k09b11.11*基因启动子具有更优异高效基因编辑指数

如图3所示,各实验组中均观察到编辑效率为0的个体,提示基因编辑的发生具有概率性,显微注射成功并不等同于编辑成功。因此,本研究进一步采用高效基因编辑指数对基因编辑效果进行了量化分析。如图4所示,pYW616组的HEGE指数高于pYW611组~pYW614组以及pYW619组~pYW624组($P < 0.001$ 或 $P < 0.0001$),并呈现出较pSX524组($P = 0.0512$)更高的趋势;而pYW615组~pYW618组的HEGE指数则无明显差异($P > 0.05$)。上述结果说明,*c28a5.7*、*w05b2.8*、*f54c8.9*和*k09b11.11*启动子能显著提升高效基因编辑指数。

2.4 两种不同的引导RNA支架对*w05b2.8*启动子介导的基因编辑的影响不明显

在本研究中,所有质粒均采用了gRNA支架。为了进

一步探讨gRNA^{F+E}支架(图5A)是否能够在高效U6启动子基础上进一步提高基因编辑效率,本研究设计了对比实验以比较两种支架的编辑效果。图3和图4显示,在4种表现出较高编辑效率的U6启动子质粒中,YW615表现出最高的基因编辑效率及HEGE指数中位值,表明其可能为这4种高效U6启动子中最优者。基于此,本研究以YW615为基础构建了YW676质粒,两者唯一的差异在于gRNA支架,YW676采用了gRNA^{F+E}支架。如图5B所示,两种gRNA支架对基因编辑效率的影响无明显差异($P > 0.05$)。然而,采用gRNA^{F+E}支架的YW676组其HEGE指数反而降低($P < 0.05$)。这可能是使用gRNA^{F+E}支架时不发生基因编辑的可能性较gRNA支架高,从而导致整体高效基因编辑指数的下降。

3 讨论

*C. elegans*因其培养简便、遗传操作容易,成为基因功能研究的重要模式生物。通过在其基因组中进行精准的靶向突变,研究人员可以深入探究基因与表型之间的关系。自2012年首次在*C. elegans*中报道CRISPR-Cas9系统应用以来,该技术极大推动了线虫遗传学的发展^[24]。尽管过去十余年中,关于CRISPR-Cas9系统在*C. elegans*中的优化工作持续推进,但其编辑效率仍有待提升。

采用注射表达质粒递送Cas9蛋白与sgRNA,是一种经济且操作简便的基因编辑策略。本研究比较了15种不同的U6启动子对基因编辑效率的影响,发现*w05b2.8*、

c28a5.7、*f54c8.9*和*k09b11.11*启动子表现出较高的编辑效率和成功概率,显著优于目前广泛应用于*C. elegans*的*k09b11.12*(源自CALARCO实验室)和*r07e5.16*(源自GOLDSTEIN实验室)启动子。在本研究中,尽管*r07e5.16*启动子在基因编辑效率上表现出高于*k09b11.12*启动子的趋势,但差异未见统计学意义。结果显示,*k09b11.12*启动子的大部分数据均接近于0,提示其在诱导线虫发生基因编辑方面的效率极低。因此,对于这两种启动子,本研究仍更推荐优先选择*r07e5.16*。

FROELICH等^[25]对*w05b2.8*启动子和*r07e5.16*启动子的基因编辑效率进行了比较,发现*w05b2.8*启动子表现出更高的编辑效率,与本研究结果一致。他们发现*w05b2.8*基因在生殖腺的表达优于*r07e5.16*启动子,推测这是其较高编辑效率的潜在机制。在本研究中,除pYW676质粒外,其他质粒中唯一的差异在于U6启动子。因此,笔者推测不同质粒间基因编辑效率的差异,主要源于U6启动子在生殖腺中驱动sgRNA表达的水平差异。具体而言,*c28a5.7*、*w05b2.8*、*f54c8.9*和*k09b11.11*启动子可能在生殖腺中介导了较高水平的sgRNA转录。综上所述,建议优先选用*w05b2.8*、*c28a5.7*、*f54c8.9*和*k09b11.11*启动子,用于生殖腺内高表达sgRNA,以实现更高的基因编辑效率。

与原gRNA支架相比,gRNA^{F+E}支架通过A-U碱基对置换消除了潜在的RNA聚合酶III终止子,同时还扩展了Cas9结合结构域^[10]。既往研究表明,gRNA^{F+E}支架在多种模式生物中均表现出提升基因编辑效率的潜力^[10,17]。然而,在本研究中,当采用高效U6启动子时,gRNA^{F+E}支架并未显示出优于传统gRNA支架的优势。该结果提示,通过促进sgRNA在生殖腺的转录,优化U6启动子表达水平,可能比单纯改进gRNA支架更能有效提升基因编辑效率。这为基于质粒的基因编辑策略提供了新的优化思路。

* * *

辅助数据 部分辅助数据已存放于Figshare平台(doi: 10.6084/m9.figshare.29567744)。

Supporting Data Additional supporting data can be accessed via Figshare (doi: 10.6084/m9.figshare.29567744)。

作者贡献声明 冯理想负责数据审编、正式分析、调查研究、研究方法、可视化、初稿写作和审读与编辑写作,黄颖和赵容乾负责调查研究、验证和审读与编辑写作,张奎负责论文构思、研究方法、监督指导和审读与编辑写作,杨文星负责论文构思、经费获取、研究方法、监督指导、可视化、初稿写作和审读与编辑写作。所有作者已经同意将文章提交给本刊,且对将要发表版本进行最终定稿,并同意对工作的所有方面负责。

Author Contribution FENG Lixiang is responsible for data curation, formal analysis, investigation, methodology, visualization, writing--original draft, and writing--review and editing. HUANG Ying and ZHAO Rongqian

are responsible for investigation, validation, and writing--review and editing. ZHANG Kui is responsible for conceptualization, methodology, supervision, and writing--review and editing. YANG Wenxing is responsible for conceptualization, funding acquisition, methodology, supervision, visualization, writing--original draft, and writing--review and editing. All authors consented to the submission of the article to the Journal. All authors approved the final version to be published and agreed to take responsibility for all aspects of the work.

利益冲突 浙江大学邹炜教授赠送了pSX524质粒。本文作者杨文星是本刊编委会编委,该文在编辑评审过程中所有流程严格按照期刊政策进行,且未经其本人经手处理。除此之外,所有作者均声明不存在利益冲突。本研究相关成果已发布于预印本平台bioRxiv(doi: 10.1101/2025.07.16.664859),预印本内容与本文一致。

Declaration of Conflicting Interests Professor ZOU Wei from Zhejiang University donated the pSX524 plasmid. YANG Wenxing is a member of the Editorial Board of the journal. All processes involved in the editing and reviewing of this article were carried out in strict compliance with the journal's policies and there was no inappropriate personal involvement by the author. Other than this, all authors declare no competing interests. The findings of this study have been published on the preprint platform bioRxiv (doi: 10.1101/2025.07.16.664859), and the content of the preprint is consistent with this article.

参 考 文 献

- [1] DICKINSON D J, WARD J D, REINER D J, *et al.* Engineering the *Caenorhabditis elegans* genome using Cas9-triggered homologous recombination. *Nat Methods*, 2013, 10(10): 1028-1034. doi: 10.1038/nmeth.2641.
- [2] FRIEDLAND A E, TZUR Y B, ESVELT K M, *et al.* Heritable genome editing in *C.elegans* via a CRISPR-Cas9 system. *Nat Methods*, 2013, 10(8): 741-743. doi: 10.1038/nmeth.2532.
- [3] CHIU H, SCHWARTZ H T, ANTOSHECHKIN I, *et al.* Transgene-free genome editing in *Caenorhabditis elegans* using CRISPR-Cas. *Genetics*, 2013, 195(3): 1167-1171. doi: 10.1534/genetics.113.155879.
- [4] LO T W, PICKLE C S, LIN S, *et al.* Precise and heritable genome editing in evolutionarily diverse nematodes using TALENs and CRISPR/Cas9 to engineer insertions and deletions. *Genetics*, 2013, 195(2): 331-348. doi: 10.1534/genetics.113.155382.
- [5] SHEN B, ZHANG J, WU H, *et al.* Generation of gene-modified mice via Cas9/RNA-mediated gene targeting. *Cell Res*, 2013, 23(5): 720-723. doi: 10.1038/cr.2013.46.
- [6] NIU Y, SHEN B, CUI Y, *et al.* Generation of gene-modified cynomolgus monkey via Cas9/RNA-mediated gene targeting in one-cell embryos. *Cell*, 2014, 156(4): 836-843. doi: 10.1016/j.cell.2014.01.027.
- [7] BASSETT A R, TIBBIT C, PONTING C P, *et al.* Highly efficient targeted mutagenesis of drosophila with the CRISPR/Cas9 system. *Cell Rep*, 2013, 4(1): 220-228. doi: 10.1016/j.celrep.2013.06.020.
- [8] CHO S W, LEE J, CARROLL D, *et al.* Heritable gene knockout in *Caenorhabditis elegans* by direct injection of Cas9-sgRNA ribonucleoproteins. *Genetics*, 2013, 195(3): 1177-1180. doi: 10.1534/genetics.113.155853.
- [9] PAIX A, FOLKMANN A, RASOLOSON D, *et al.* High efficiency, homology-directed genome editing in *Caenorhabditis elegans* using CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein complexes. *Genetics*, 2015, 201(1): 47-54. doi: 10.1534/genetics.115.179382.
- [10] CHEN B, GILBERT L A, CIMINI B A, *et al.* Dynamic imaging of genomic loci in living human cells by an optimized CRISPR/Cas system. *Cell*, 2013, 155(7): 1479-1491. doi: 10.1016/j.cell.2013.12.001.
- [11] YANG W, WU T, TU S, *et al.* Redundant neural circuits regulate

- olfactory integration. *PLoS Genet*, 2022, 18(1): e1010029. doi: [10.1371/journal.pgen.1010029](https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1010029).
- [12] WANG Y, SUN X, FENG L, *et al.* Nervous system guides behavioral immunity in *Caenorhabditis elegans*. *PeerJ*, 2024, 12: e18289. doi: [10.7717/peerj.18289](https://doi.org/10.7717/peerj.18289).
- [13] KERN C C, SRIVASTAVA S, EZCURRA M, *et al.* *C.elegans* ageing is accelerated by a self-destructive reproductive programme. *Nat Commun*, 2023, 14(1): 4381. doi: [10.1038/s41467-023-40088-1](https://doi.org/10.1038/s41467-023-40088-1).
- [14] ZHANG J, YANG W, LI Z, *et al.* Multigenerational exposure of cadmium trans-generationally impairs locomotive and chemotactic behaviors in *Caenorhabditis elegans*. *Chemosphere*, 2023, 325: 138432. doi: [10.1016/j.chemosphere.2023.138432](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.138432).
- [15] FARBOUD B, MEYER B J. Dramatic enhancement of genome editing by CRISPR/Cas9 through improved guide RNA design. *Genetics*, 2015, 199(4): 959-971. doi: [10.1534/genetics.115.175166](https://doi.org/10.1534/genetics.115.175166).
- [16] KATIC I, XU L, CLOSK R. CRISPR/Cas9 genome editing in *Caenorhabditis elegans*: evaluation of templates for homology-mediated repair and knock-ins by homology-independent dna repair. *G3 (Bethesda)*, 2015, 5(8): 1649-1656. doi: [10.1534/g3.115.019273](https://doi.org/10.1534/g3.115.019273).
- [17] WARD J D. Rapid and precise engineering of the *Caenorhabditis elegans* genome with lethal mutation co-conversion and inactivation of NHEJ repair. *Genetics*, 2015, 199(2): 363-377. doi: [10.1534/genetics.114.172361](https://doi.org/10.1534/genetics.114.172361).
- [18] ARRIBERE J A, BELL R T, FU B X, *et al.* Efficient marker-free recovery of custom genetic modifications with CRISPR/Cas9 in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 2014, 198(3): 837-846. doi: [10.1534/genetics.114.169730](https://doi.org/10.1534/genetics.114.169730).
- [19] KIM H, ISHIDATE T, GHANTA K S, *et al.* A co-CRISPR strategy for efficient genome editing in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 2014, 197(4): 1069-1080. doi: [10.1534/genetics.114.166389](https://doi.org/10.1534/genetics.114.166389).
- [20] SMITH A, BERGWELL M, SMITH E, *et al.* CRISPR/Cas9 editing of the *C. elegans* *rbm-3.2* gene using the *dpy-10* Co-CRISPR screening marker and assembled ribonucleoprotein complexes. *J Vis Exp*, 2020, 166: e62001. doi: [10.3791/62001](https://doi.org/10.3791/62001).
- [21] TOKER I A, HOBERT O. The Cbr-DPY-10(Arg92Cys) modification is a reliable co-conversion marker for CRISPR/Cas9 genome editing in *Caenorhabditis briggsae*. *microPubl Biol*, 2022, 2022: 10.17912/micropub.biology.000554. doi: [10.17912/micropub.biology.000554](https://doi.org/10.17912/micropub.biology.000554).
- [22] LEVY A D, YANG J, KRAMER J M. Molecular and genetic analyses of the *Caenorhabditis elegans* *dpy-2* and *dpy-10* collagen genes: a variety of molecular alterations affect organismal morphology. *Mol Biol Cell*, 1993, 4(8): 803-817. doi: [10.1091/mbc.4.8.803](https://doi.org/10.1091/mbc.4.8.803).
- [23] LI J, QIN Y, SHEN C, *et al.* A new miniMOS tool kit capable of visualizing single copy insertion in *C.elegans*. *PeerJ*, 2023, 11: e15433. doi: [10.7717/peerj.15433](https://doi.org/10.7717/peerj.15433).
- [24] JINEK M, CHYLINSKI K, FONFARA I, *et al.* A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 2012, 337(6096): 816-821. doi: [10.1126/science.1225829](https://doi.org/10.1126/science.1225829).
- [25] FROELICH J J, UYAR B, HERZOG M, *et al.* Parallel genetics of regulatory sequences using scalable genome editing *in vivo*. *Cell Rep*, 2021, 35(2): 108988. doi: [10.1016/j.celrep.2021.108988](https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.108988).

(2025-05-21收稿, 2025-06-20修回)

编辑 何学令



开放获取 本文使用遵循知识共享署名—非商业性使用 4.0国际许可协议(CC BY-NC 4.0), 详细信息请访问

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>。

OPEN ACCESS This article is licensed for use under Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International license (CC BY-NC 4.0). For more information, visit <https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>.

© 2025 《四川大学学报(医学版)》编辑部

Editorial Office of *Journal of Sichuan University (Medical Sciences)*