综述

基于非病毒方法的大片段外源 DNA 定点整合技术研究进展

崔 佳，刘振华 *

（长治医学院基础医学部，基础医学研究所感染与免疫实验室，山西长治 046099）

摘要：基于非病毒方法的大片段 DNA 定点整合技术具有成本低、容量大、无免疫原性，以及可避免遗传毒性和癌基因表达等优点，在基因治疗、细胞治疗等领域应用广泛。根据作用机制，可将基于非病毒方法的 DNA 定点整合技术分为 3 种，即基于 DNA 损伤修复的、基于重组酶的和基于转座酶的。3 种基于非病毒方法的 DNA 定点整合技术均可以与成簇规律间隔短回文重复序列（CRISPR）及其相关蛋白 9（Cas9）技术结合，快速、方便地将外源 DNA 引导至目标 DNA 区域。该文总结了 3 种基于非病毒方法的 DNA 定点整合技术的研究进展及其应用，以期为开发更高效的细胞治疗体系提供新思路。

关键词：定点整合；非病毒；CRISPR/Cas9；DNA 损伤修复；重组酶 / 整合酶；转座酶；研究进展

中图分类号：Q784 **文献标志码**：A **文章编号**：1001-8255(2024)08-1045-08

引用：崔 佳，刘振华．基于非病毒方法的大片段外源 DNA 定点整合技术研究进展［J］．中国医药工业杂志，2024, 55(8)：1045-1052．DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2024.08.001

Progress of Site-specific Integration of Large Exogenous DNA Fragments Based on Non-viral Methods

CUI Jia, LIU Zhenhua*

(*Lab. of Infection and Immunity, Institute of Basic Medicine, Dept. of Basic Medical, Changzhi Medical College, Changzhi 046099*)

ABSTRACT: Site-specific integration of large DNA fragments based on non-viral methods are widely used in gene therapy and cell therapy because of their low cost, large capacity, non-immunogenicity, and the ability to avoid genotoxicity and oncogene expression. According to the mechanism, non-viral methods can be classified into three types, DNA damage repair-, recombinase- and transposase-based site-specific integration technologies. All three non-viral DNA targeting methods can be combined with the clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) and CRISPR associated proteins 9 (Cas9) technology to quickly and easily direct exogenous DNA to the target DNA region. In this study, the research progress of the three non-viral-based DNA targeting methods and their applications are summarized to provide new ideas for the development of more efficient cell therapy systems.

Key Words: site-specific integration; non-viral; CRISPR/Cas9; DNA damage repair; recombinase/integrase; transposase; research progress

近年来，细胞治疗在恶性肿瘤治疗中发挥着越来越重要的作用，已成为继手术、化疗、放疗、靶向治疗等方法之后的又一种重要治疗手段，甚至可以治愈某些血液肿瘤[1]。大多数针对恶性肿瘤的细胞治疗的机制是将一段外源基因受体整合到免疫细胞的基因组中，使免疫功能增强，以识别并杀死肿瘤细胞。目前细胞治疗中广泛使用的外源 DNA 整合方法是以逆转录病毒作为载体的 DNA 转导技术。逆转录病毒具有转导效率高、整合频率高等优点，但

收稿日期：2024-03-15

基金项目：山西省基础研究计划（自由探索类）项目（20210302124230）、长治医学院博士科研启动基金项目（BS202002、BS202121）

作者简介：崔 佳（1985—），女，博士，副教授，从事微生物方向研究。

通信作者：刘振华（1980—），男，博士，副教授，从事生物工程方向研究。

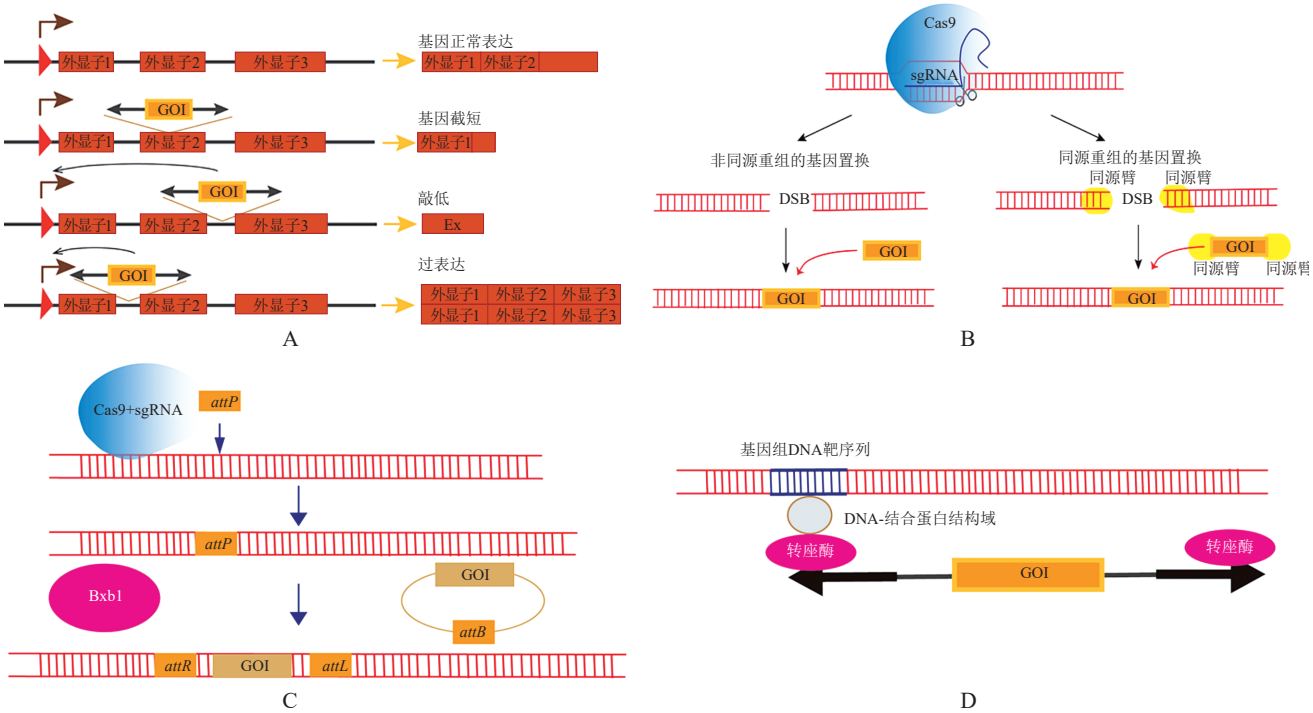
E-mail：liuzhenhua@CEMC.edu.cn

缺点也非常明显。①逆转录病毒引起的随机整合可能导致某些遗传毒性[2]，如使某些宿主基因失活或过表达（图 1A）。情况严重时，癌基因还可能被激活[3]。②逆转录病毒载体容量较小，不能满足同时整合多个外源基因的目的。③逆转录病毒有时会导致不良的体液免疫反应[4]。④基于病毒的整合，在商业化生产过程中具有高成本和劳动密集型的特点[5]。

为了克服逆转录病毒的这些缺点，研究者们探索了一些非病毒的大片段外源 DNA 整合方法。这些方法从原理上分别基于 DNA 损伤修复、重组酶和转座酶（图 1B ～ 1D）。与传统的逆转录病毒相比，这些非病毒方法具有成本低、整合片段大的优势。更重要的是，此类方法可以实现定点整合，减少基因随机整合带来的安全性问题。然而，非病毒整合方法的缺点也非常明显，即基因的整合效率低。这与各种外源性工具酶或 sgRNA 等分子进入细胞的效率低有关。本文对非病毒大片段外源 DNA 整合方法进行了综述，以期为开发更高效的细胞治疗体系提供新思路。

1　基于核酸内切酶和 DNA 损伤修复的定点整合

正常细胞内的 DNA，如果遭受内源性代谢产物（如活性氧）刺激或暴露于辐射、诱变试剂等外源性环境条件，少数情况下会自发发生 DNA 的 DSB[6]。此时，尚存活的细胞会持续表达用于识别和修复 DSB 的生化成分，以维持基因组的完整性。传统的外源基因定点整合技术即转基因技术，是将外源 DNA（供体）转导进细胞，利用细胞内生的 DSB 和自身修复机制实现基因整合，但其整合效率仅为 1×10^{-5} ～ 1×10^{-7}[7]。新的基因编辑技术如锌指核酸酶（zinc finger nucleases，ZFN）、转录激活因子样效应器核酸酶（transcription activator-like effector



A—随机整合外来基因的可能结果（▶代表启动子）；B—基于 DNA 损伤修复的外源基因整合；C—重组酶介导的外源基因整合（*att* 位点代表同源侧翼臂）；D—转座酶介导的外源基因整合（粗箭头代表反向重复序列）。

GOI—感兴趣的基因；Cas 9—成簇规律间隔短回文重复序列相关蛋白（clustered regularly interspaced short palindromic repeats-associated proteins）；sgRNA—小向导 RNA；DSB—双链断裂（double-strand break）。

图 1　外源基因整合策略

Fig.1　The Insertion Strategies of Exogenous Genes

nucleases，TALEN）和成簇规律间隔短回文重复序列（clustered regularly interspaced short palindromic repeats，CRISPR）及 Cas9 系统，可以人为造成特定基因位点的 DSB，不仅提高了整合效率，而且可实现特定位点的整合。

DSB 通常有 2 种修复途径：同源重组修复（homologous-directed repair，HDR）和非同源末端连接（nonhomologous end joining，NHEJ）。HDR 修复机制是在一个带有同源臂的供体存在情况下，供体中外源目的基因通过同源重组过程完整地整合到靶位点，不会出现随机的碱基整合或丢失。NHEJ 修复机制中，断裂的 DNA 在修复、重连的过程中会发生碱基的随机整合或丢失，造成移码突变，使基因失活，实现目的基因敲除；但如果一个外源供体基因序列存在，NHEJ 机制会将其连入 DSB 位点，从而实现基因整合。HDR 的优点是精度高，缺点是频率低，通常发生在细胞的 S 期和 G2 期。NHEJ 是修复 DSB 的主要手段，可发生在细胞分裂的任何阶段，但该过程容易出现错配修复。

1.1 基于 HDR 途径的外源 DNA 整合方法

CRISPR/cas9 与 HDR 途径相结合的方法已用于 T 细胞 [8]、人胚肾细胞（HEK 293 细胞）[9] 和中国仓鼠卵巢细胞（CHO 细胞）[10] 中外源基因的精确整合，并表现出较好的应用前景。ROTH 等 [11] 研究显示，向人类原代 T 细胞电转染 CRISPR-Cas9 核糖核蛋白（RNP）复合物和长（>1 kb）线性双链 DNA（dsDNA）模板（作为供体），可降低 dsDNA 模板的毒性，目标整合效率达 33.7%（表 1）。

HDR 和 NHEJ 途径之间存在竞争关系，为了使 DSB 修复更多地以精度较高的 HDR 途径进行，提高定点整合的效率，可采取策略激活 HDR 或抑制 NEHJ。例如，敲除秀丽隐杆线虫 [12] 或果蝇中的 DNA 连接酶Ⅳ [13]，可抑制 NHEJ 途径以增加 HDR 的频率；使用 NHEJ 抑制剂 SCR7[14] 或通过对 Ku70、Ku80、DNA 连接酶Ⅰ的基因沉默 [7]，也可抑制 NHEJ 途径，从而提高 HDR 效率。此外，由于 HDR 发生在 S 后期和 G2 期的频率较高，通过化学诱导使细胞维持在这 2 个周期亦可提高 HDR 效率 [15]。JAYAVARADHAN 等 [16] 将显性负性突变 53BP1（称为 DN1S）与 Cas9 核酸酶融合，构建了一种更安全、更有效的系统，可显著阻断 Cas9 剪切位点的 NHEJ，提高 HDR 频率。

传统的、基于 HDR 途径的基因整合方法通常需要在供体序列两侧分别补充同源碱基。一些新方法缩短了所需的同源长度，如精确整合到靶染色体（precise integration into target chromosome，PITCh）[17]、同源臂介导的末端接合（homology-mediated end-joining，HMEJ）[18] 等。值得注意的是，尽管这些方法利用了供体序列和靶序列之间的同源性，但并不总是通过经典的 HDR 途径起作用。

1.2 基于 NHEJ 途径的外源 DNA 整合方法

一般而言，HDR 途径精度高、效率低 [19]，多用于基因整合；而 NHEJ 途径效率高、精度低，多用于基因敲除。但和其他方法相结合，在有外源 DNA 存在的情况下，NHEJ 也可在 DSB 位点实现高精度的定点整合。HE 等 [20] 报道，采用 CRISPR/

表 1 基于非病毒方法的大片段 DNA 定点整合方法

Tab.1 Site-specific Integration Methods of Large DNA Fragments Based on Non-viral Methods

定点整合方法	靶细胞	靶位点	整合 DNA 片段大小	定点整合效率	参考文献
CRISPR 介导 HDR	人 T 细胞	*aavs1* 基因安全港	800 bp	约 10%	[8]
		T 细胞受体	1.5 kb	33.70%	[11]
CRISPR 介导 NHEJ	人 HSPC	*itgb2* 基因	2.1 kb	21%	[22]
CRISPR 介导微同源末端连接	CHO 细胞	*hprt* 位点	7.6 kb	30.70%	[17]
CRISPR 结合重组酶	293 细胞系	*ACTB* 位点	约 36 kb	50%～60%	[38]
	293T 细胞	*aavs1* 基因安全港	1.2 kb	4.13%	[48]
	HEK 293T 细胞、K-562 细胞	*aavs1* 位点；*trac* 位点	超过 8 kb	5%～22%	[49]
类 CRISPR 转座子	*E. Coli* 基因组	前间隔序列下游 60～66 bp	2.5 kb	>80%	[50]

Cas9 诱导基因组 DNA 双链断裂后，基因组和外源质粒 DNA 可通过 NHEJ 途径有效重连，且在所有检测的人类细胞类型中，基于 NHEJ 途径的基因整合比基于 HDR 途径的更有效。

最近，一种新的、基于 NHEJ 的 CRISPR/Cas9 介导的基因整合方法，同源非依赖性靶向整合（homology-independent targeted integration，HITI），已被证明在分裂期和非分裂期的非造血组织细胞中均可提高 DSB 位点处特异性转基因整合的效率[21]。BLOOMER 等[22]研究显示，在将造血干细胞和祖细胞（hematopoietic stem and progenitor cells，HSPC）移植到免疫缺陷小鼠体内后，稳定 HITI 介导的基因组编辑效率可高达 21%（表 1）。该 HITI 介导的基因组编辑方法为 $CD34^+$ HSPC 中基于 HDR 的转基因整合提供了有效的替代方案。

另一种使用 NHEJ 途径进行大片段 DNA 位点特异性基因组整合的方法是专性连接门控重组（obligate ligation-gated recombination，ObLiGaRe）[23]，在培养细胞中，整合效率达到约 2%，比传统的 HDR 方法高 5 倍左右。

1.3　小结

随着 CRISPR 基因编辑技术的发展，快速在基因组中定点 DSB 成为可能，结合细胞内的 DNA 损伤修复机制，外源 DNA 定点整合技术得到了很大发展。然而，基于 DSB 的基因编辑方法还具有一定局限性，如基因组损伤容易导致不良后果，包括整合 / 缺失（INDEL）、易位以及激活原癌基因 *p53* 等[24]。

2　基于重组酶 / 整合酶的定点整合

特异性重组酶（site-specific recombinase，SSR）是宿主基因组特定位点整合和切除噬菌体 λ 基因的酶系统。目前，已有 1 000 多个位点特异性重组系统被发现、鉴定，绝大多数来自细菌，也有一些来自古细菌和真核微生物（特别是酵母菌）[25]。在位点特异性重组过程中，单个 DNA 分子内不同位置的 2 个短 DNA 序列（位点）结合在一起，DNA 链在特定磷酸二酯键上断裂，断裂的末端以新的组合重新连接，形成重组体。该过程中的序列识别和化学催化步骤依赖于 SSR。

与 HDR 或 NHEJ 不同，位点特异性重组过程不涉及任何 DNA 合成、降解或辅助因子（如 ATP）。此外，位点特异性重组也不依赖于 DNA 同源性。根据亲核活性位点氨基酸残基的不同，已知的数千个位点特异性重组系统的 SSR 可以分为 2 个家族：丝氨酸重组酶和酪氨酸重组酶。迄今为止，有 4 个 SSR 在位点特异性重组中占据主导地位：Cre、Flp、φC31 整合酶和 Bxb1 整合酶，下面分别进行介绍。

2.1　Cre

酪氨酸重组酶 Cre 来自大肠埃希菌（*Escherichia coli*，*E. coli*）噬菌体 P1，相对分子质量为 38 000，可作用于 *loxP* 位点（34 bp），是首个应用于高等真核生物的 SSR[26]。Cre-Lox 技术相对成熟，已被应用于许多领域，如在 CHO 细胞中生产抗体[27]，甚至可用于植物[28]、昆虫[29]、小鼠[30]和其他高等动物。然而，Cre 的缺点是容易引起遗传毒性[31]。

2.2　Flp

Flp 是一种相对分子质量为 45 000 的酪氨酸重组酶，由酵母 2μ 质粒编码，作用于 *frt* 位点（34 bp）[32]。有报道[33]在 CHO 细胞中应用了基于 Flp 的位点特异性重组，但其他方面报道不多。

2.3　φC31 整合酶

φC31 整合酶属于丝氨酸整合酶家族，来自链霉菌噬菌体 φC31。φC31 仅催化 *attP* 和 *attB* 2 个不同位点之间的重组，形成 *attL* 和 *attR* 2 个重组位点。φC31 整合酶已被开发为非病毒位点的特异性基因治疗载体[34]，在组织培养细胞和小鼠体内都有作用[35]。

φC31 整合酶可催化含有 *attB* 的质粒整合到哺乳动物基因组中的伪 *attP* 位点。伪位点之间的染色体重排是限制 φC31 整合酶临床应用的主要问题，可能导致主要的 DNA 损伤[36]。

2.4　Bxb1 整合酶

Bxb1 整合酶也属于丝氨酸整合酶家族，可通过使用 DNA 附着位点（宿主基因组中的 *attP* 和供体 DNA 中的 *attB*，或宿主基因组中的 *attB* 和供体 DNA 中的 *attP*）作为底物，催化有效、精确的基因整合过程（图 1C）[37]。与其他整合酶不同，Bxb1 整

合酶的效率高，在哺乳动物基因组中缺乏假位点，相对安全性更高。

通过融合Cas9、逆转录酶和Bxb1整合酶，YARNALL等[38]开发了一种通过位点特异性靶向元件进行的可编程添加体系（programmable addition via site-specific targeting elements，PASTE）。PASTE可在单次递送反应中整合长达36 kb的外源DNA，在HEK 293细胞系中的整合效率高达50%～60%，在原代人肝细胞和T细胞中的效率达4%～5%（表1）。与NHEJ（特别是HITI）相比，PASTE具有更好的基因整合效率和更低的INDEL发生率。与HDR相比，尽管PASTE在*ACTB*位点的整合效率相似，甚至在*LMNB1*位点的效率较低，但产生的INDEL较少。

ANZALONE等[39]描述了一种独立于DSB的方法，即双先导编辑（twin prime editing，twinPE）技术。该方法使用先导编辑蛋白和2个先导编辑向导RNA（prime editing guide RNAs，pegRNAs），可程序性替换或切除人类基因组特定位点的内源性DNA序列。利用这2个pegRNAs作为模板，能在对应的基因组DNA单链上合成互补的DNA-RNA片段，替换该系统诱导的缺口位点之间的内源性DNA序列。当与Bxb1整合酶结合时，twinPE使通过DNA质粒（目的基因序列>5 000 bp）靶向替换人细胞DNA序列（40 kb）的技术具有实现的可能。twinPE扩展了精准基因编辑的能力，并可能与其他工具协同校正或补充大型或复杂的人类致病等位基因。

最近，多个基于Cas9-Bxb1的靶向整合酶系统被开发，以实现大片段DNA的有效整合。这些依赖Bxb1整合酶的方法不仅可实现大片段外源DNA的有效、定点整合，而且具有较低的基因毒性风险；不仅可用于开发和研究人类疾病的下一代小鼠模型，而且在肿瘤基因组学、人类遗传学、系统生物学和细胞工程领域均具有良好前景；此外，在人类遗传疾病治疗方面也具有重要的临床意义。

3 基于转座酶的定点整合

3.1 转座酶与靶向核酸内切酶相结合

转座子结合了病毒载体的优点（可持续表达治疗基因）与非病毒载体的优点（低免疫原性和低制造成本），是基因治疗中病毒载体的良好替代品。在转座酶系统中，*piggy*Bac（PB）和睡美人（sleeping beauty，SB）是人类细胞中广泛使用的基因转移工具[40]。在治疗性基因整合应用中使用这些系统的主要障碍是半随机整合。

为了避免转座子系统的非特异性整合，并在预定的基因组位点实现靶向转座，转座酶可与位点特异性DNA结合域或程序性位点定向蛋白进行不同方式的融合（图1D），如PB转座酶融合ZFP[41]、转录激活因子样效应蛋白（transcription activator-like effector, TALE）[42]、Gal4 DNA结合域（DBD）[43]，以及SB转座酶融合ZFP[44]和Gal4 DBD[45]。有研究[46]报道PB转座酶与dCas9融合后可在*hprt*位点进行定点整合，但试验结果不是很成功。另一项研究[47]表明，保留切除能力而缺失整合能力（Exc^+ Int^-）的高活性PB转座酶与dCas9融合后，能够靶向*ccr5*安全港序列，不过效率较低。

相对较小的DBD与相对较大的转座酶蛋白连接间悬殊的相对分子质量差，可能是基于转座酶的基因编辑系统靶向整合失败的主要原因。因此，需要探索更适合转座酶的靶向DNA位点的方法，如对转座酶结构中与DNA靶位点结合域进行突变。转座酶具有半随机整合功能，即自身具有一定的与特定DNA靶点结合的能力，而转座酶与特定功能蛋白融合后，转座酶自身与DNA的结合能力可能会干扰与转座酶融合的结合域结合DNA的能力。

REZAZADE BAZAZ等[48]报道了一种基于转座酶的基因编辑系统，融合了*piggy*Bac转座酶和dCas9基因编辑系统，能在HEK 293细胞中的*aavs1*和*pml* 2个基因位点实现定点整合，效率分别为4.13%和3.69%，而用CRISPR-HITI方法在*pml*位点的定点整合效率仅为0.6%。PALLARÈS-MASMITJÀ等[49]基于工程化Cas9-PB融合蛋白开发了一种高效、精确、可程序化操作的基因递送技术，并在HEK 293T细胞内对该技术进行了测试，靶向效率为5%～22%，且未观测到脱靶现象。随后，采用该体系在小鼠模型中成功实现了向小鼠肝脏和生殖细胞靶向递送外源基因。以

上研究说明，转座酶与靶向核酸内切酶融合后实现外源基因的定点整合是值得探索的方向，深入了解转座酶的结构生物学和转座机制或有助于该技术的进一步发展。

3.2 CRISPR 相关转座子

CRISPR 相关转座子（CRISPR-associated transposons，CASTs）或转座子编码的 CRISPR-Cas 系统（transposon-encoded CRISPR-Cas systems），是能够在 RNA 引导下进行 DNA 整合的 Tn7 样元件。2019 年，来自蓝细菌和霍乱弧菌的天然 CASTs 被开发成一种强大的 DNA 整合工具，能将 CRISPR 系统 RNA 引导下的 DNA 靶向功能与转座子系统的 DNA 整合机制结合起来 [50]。重要的是，该创新系统消除了目标 DNA、供体 DNA 同源臂或宿主 DNA 修复因子中双链断裂的需求，从而促进了基因编辑技术的重大进步。

然而，该系统的一些缺点仍然需要解决。首先，转座子末端序列不可避免地与待递送 DNA 一起被整合基因组中，使精确的基因调控或无瘢痕整合难以实现。其次，该系统仅成功地将目的 DNA 整合到 *E. coli*、柠檬塔图姆菌（*Tatumella citrea*）、产酸克雷伯菌（*Klebsiella oxytoca*）、恶臭假单胞菌（*Pseudomonas putida*）等少数原核生物的基因组中，还未在真核细胞中进行测试 [51]。因此，仍需进一步研究、阐明转座子相关 CRISPR/Cas 系统的生化和结构机制，以设计及构建更简化、适合更多物种的系统。

4 总结与展望

定点整合或位点特异性整合方法在基因治疗、细胞治疗等领域非常重要。而非病毒位点特异性整合方法具有更高的基因安全性、较低的免疫原性和更低的成本，但当前非病毒整合方法的主要问题是效率低。表 1 汇总了已报道的基于非病毒的大片段 DNA 定点整合方法，不同方法的比较如表 2 所示。目前，本课题组正尝试将转座酶的 DNA 整合能力和 CRISPR/dCas9 的 DNA 靶向能力结合起来，希望实现非病毒外源基因定点整合。为了更好地开发有效、精确的非病毒定点整合方法，需要深入了解转座酶 / 重组酶的分子结构和作用机制，同时尝试多种技术的结合，如与 CRISPR/dCas9 的结合，与表观遗传学（染色质开放性）的结合等。这些可能是未来的研究方向。

致谢：长治医学院中心实验室冀菁荃老师提供指导。

表 2　各种大片段外源 DNA 定点整合方法的比较

Tab.2　Comparison of Various Site-specific Integration Methods of Large Exogenous DNA Fragments

技术的实施要求或特点	基于 DNA 损伤修复方法		基于重组酶方法				基于转座酶方法	
	HDR	NHEJ	Cre	Flp	φC31	Bxb1	与靶向酶结合	CRISPR 相关转座子
整合前是否需要 DNA 双链断裂	需要	需要	不需要	不需要	不需要	不需要	不需要	不需要
是否需要 DNA 同源臂	需要	不需要	不需要	不需要	不需要	不需要	不需要	不需要
靶向 DNA 是否需要含有重组识别位点	不需要	不需要	需要	需要	需要	需要	不需要	不需要
DNA 片段大小	较大	较大	较大	较大	较大	较大	较大	较大
整合后是否有 DNA 损伤或基因毒性	有	有	有	—	有	小	小	小
定点整合效率	高	高	—	—	—	高	低	高
可否在哺乳动物细胞中应用	可以	可以	可以	可以	可以	可以	可以	不可以

注：“—”表示未见报道。

参考文献：

[1] TRAPANI J A, DARCY P K. Immunotherapy of cancer [J]. *Aust Fam Physician*, 2017, **46**(4): 194-199.

[2] SCHENKWEIN D, AFZAL S, NOUSIAINEN A, *et al*. Efficient nuclease-directed integration of lentivirus vectors into the human ribosomal DNA locus [J]. *Mol Ther*, 2020, **28**(8): 1858-1875.

[3] 王丹阳, 徐婷婷, 陈建军, 等. 基因治疗产品及其载体的研究进展和挑战 [J]. 中国医药工业杂志, 2023, **54**(4): 481-488.

[4] NAYAK S, HERZOG R W. Progress and prospects: immune responses to viral vectors [J]. *Gene Ther*, 2010, **17**(3): 295-304.

[5] VAN DER LOO J C M, WRIGHT J F. Progress and

challenges in viral vector manufacturing [J]. *Hum Mol Genet*, 2016, **25**(R1): R42-R52.

[6] ZOU S Z, GOU X M, WEN K M. Advances in the role of long non-coding RNAs and RNA-binding proteins in regulating DNA damage repair in cancer cells [J]. *Int J Mol Med*, 2023, **52**(4): 93.

[7] 李国玲, 钟翠丽, 莫健新, 等. 动物基因组定点整合转基因技术研究进展 [J]. 遗传, 2017, **39**(2): 98-109.

[8] ZHANG J Q, HU Y X, YANG J X, *et al*. Non-viral, specifically targeted CAR-T cells achieve high safety and efficacy in B-NHL [J]. *Nature*, 2022, **609**(7926): 369-374.

[9] YANG H, WANG J X, ZHAO M L, *et al*. Feasible development of stable HEK293 clones by CRISPR/Cas9-mediated site-specific integration for biopharmaceuticals production [J]. *Biotechnol Lett*, 2019, **41**(8/9): 941-950.

[10] ZHAO M L, WANG J X, LUO M Y, *et al*. Rapid development of stable transgene CHO cell lines by CRISPR/Cas9-mediated site-specific integration into C12orf35 [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2018, **102**(14): 6105-6117.

[11] ROTH T L, PUIG-SAUS C, YU R, *et al*. Reprogramming human T cell function and specificity with non-viral genome targeting [J]. *Nature*, 2018, **559**(7714): 405-409.

[12] MORTON J, DAVIS M W, JORGENSEN E M, *et al*. Induction and repair of zinc-finger nuclease-targeted double-strand breaks in *Caenorhabditis elegans* somatic cells [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, **103**(44): 16370-16375.

[13] BEUMER K J, TRAUTMAN J K, BOZAS A, *et al*. Efficient gene targeting in drosophila by direct embryo injection with zinc-finger nucleases [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, **105**(50): 19821-19826.

[14] CHU V T, WEBER T, WEFERS B, *et al*. Increasing the efficiency of homology-directed repair for CRISPR-Cas9-induced precise gene editing in mammalian cells [J]. *Nat Biotechnol*, 2015, **33**(5): 543-548.

[15] LIN S, STAAHL B T, ALLA R K, *et al*. Enhanced homology-directed human genome engineering by controlled timing of CRISPR/Cas9 delivery [J]. *Elife*, 2014, **3**: e04766.

[16] JAYAVARADHAN R, PILLIS D M, GOODMAN M, *et al*. CRISPR-Cas9 fusion to dominant-negative 53BP1 enhances HDR and inhibits NHEJ specifically at Cas9 target sites [J]. *Nat Commun*, 2019, **10**(1): 2866.

[17] KAWABE Y, KOMATSU S, KOMATSU S, *et al*. Targeted knock-in of an scFv-Fc antibody gene into the *hprt* locus of Chinese hamster ovary cells using CRISPR/Cas9 and CRIS-PITCh systems [J]. *J Biosci Bioeng*, 2018, **125**(5): 599-605.

[18] HU Z, WU Y, XIAO R, *et al*. Correction of F8 intron 1 inversion in hemophilia A patient-specific iPSCs by CRISPR/Cas9 mediated gene editing [J]. *Front Genet*, 2023, **14**: 1115831.

[19] YAMAMOTO Y, GERBI S A. Making ends meet: targeted integration of DNA fragments by genome editing [J]. *Chromosoma*, 2018, **127**(4): 405-420.

[20] HE X J, TAN C L, WANG F, *et al*. Knock-in of large reporter genes in human cells via CRISPR/Cas9-induced homology-dependent and independent DNA repair [J]. *Nucleic Acids Res*, 2016, **44**(9): e85.

[21] SUZUKI K, TSUNEKAWA Y, HERNANDEZ-BENITEZ R, *et al*. *In vivo* genome editing via CRISPR/Cas9 mediated homology-independent targeted integration [J]. *Nature*, 2016, **540**(7631): 144-149.

[22] BLOOMER H, SMITH R H, HAKAMI W, *et al*. Genome editing in human hematopoietic stem and progenitor cells via CRISPR-Cas9-mediated homology-independent targeted integration [J]. *Mol Ther*, 2021, **29**(4): 1611-1624.

[23] MARESCA M, LIN V G, GUO N, *et al*. Obligate ligation-gated recombination (ObLiGaRe): custom-designed nuclease-mediated targeted integration through nonhomologous end joining [J]. *Genome Res*, 2013, **23**(3): 539-546.

[24] GEISINGER J M, STEARNS T. CRISPR/Cas9 treatment causes extended TP53-dependent cell cycle arrest in human cells [J]. *Nucleic Acids Res*, 2020, **48**(16): 9067-9081.

[25] OLORUNNIJI F J, ROSSER S J, STARK W M. Site-specific recombinases: molecular machines for the genetic revolution [J]. *Biochem J*, 2016, **473**(6): 673-684.

[26] BESSEN J L, AFEYAN L K, DANČÍK V, *et al*. High-resolution specificity profiling and off-target prediction for site-specific DNA recombinases [J]. *Nat Commun*, 2019, **10**(1): 1937.

[27] SRIRANGAN K, LOIGNON M, DUROCHER Y. The use of site-specific recombination and cassette exchange technologies for monoclonal antibody production in Chinese hamster ovary cells: retrospective analysis and future directions [J]. *Crit Rev Biotechnol*, 2020, **40**(6): 833-851.

[28] YE X D, VAGHCHHIPAWALA Z, WILLIAMS E J, *et al*. Cre-mediated autoexcision of selectable marker genes in soybean, cotton, canola and maize transgenic plants [J]. *Plant Cell Rep*, 2023, **42**(1): 45-55.

[29] CARABAJAL PALADINO L Z, WILSON R, TNG P Y L, *et*

al. Optimizing CRE and PhiC31 mediated recombination in *Aedes aegypti* [J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2023, **11**: 1254863.

[30] VELUSAMY T, SINGH N, CROFT S, *et al*. The expression and function of HSV ICP47 and its promoter in mice [J]. *J Virol*, 2023, **97**(11): e0110723.

[31] BALKAWADE R S, CHEN C, CROWLEY M R, *et al*. Podocyte-specific expression of Cre recombinase promotes glomerular basement membrane thickening [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2019, **316**(5): F1026-F1040.

[32] BALBONTÍN R, RATEL M, FIGUEROA-BOSSI N, *et al*. Converting an *frt*-tagged gene into a fluorescent protein gene fusion by Flp-mediated site-specific recombination [J]. *Cold Spring Harb Protoc*, 2023, **2023**(9): 663-670.

[33] HUHTINEN O, SALBO R, LAMMINMÄKI U, *et al*. Selection of biophysically favorable antibody variants using a modified Flp—in CHO mammalian display platform [J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2023, **11**: 1170081.

[34] GUHA T K, CALOS M P. Nucleofection of phiC31 integrase protein mediates sequence-specific genomic integration in human cells [J]. *J Mol Biol*, 2020, **432**(13): 3950-3955.

[35] KERAVALA A, CALOS M P. Site-specific chromosomal integration mediated by phiC31 integrase [J]. *Methods Mol Biol*, 2008, **435**: 165-173.

[36] LIU J, JEPPESEN I, NIELSEN K, *et al*. Phi C31 integrase induces chromosomal aberrations in primary human fibroblasts [J]. *Gene Ther*, 2006, **13**(15): 1188-1190.

[37] HOSUR V, LOW B E, WILES M V. Programmable RNA-guided large DNA transgenesis by CRISPR/Cas9 and site-specific integrase Bxb1 [J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2022, **10**: 910151.

[38] YARNALL M T N, IOANNIDI E I, SCHMITT-ULMS C, *et al*. Drag-and-drop genome insertion of large sequences without double-strand DNA cleavage using CRISPR-directed integrases [J]. *Nat Biotechnol*, 2023, **41**(4): 500-512.

[39] ANZALONE A V, GAO X D, PODRACKY C J, *et al*. Programmable deletion, replacement, integration and inversion of large DNA sequences with twin prime editing [J]. *Nat Biotechnol*, 2022, **40**(5): 731-740.

[40] MORETTI A, PONZO M, NICOLETTE C A, *et al*. The past, present, and future of non-viral CAR T cells [J]. *Front Immunol*, 2022, **13**: 867013.

[41] KETTLUN C, GALVAN D L, GEORGE A L Jr, *et al*. Manipulating *piggy*Bac transposon chromosomal integration site selection in human cells [J]. *Mol Ther*, 2011, **19**(9): 1636-1644.

[42] OWENS J B, MAURO D, STOYTCHEV I, *et al*. Transcription activator like effector (TALE)-directed *piggy*Bac transposition in human cells [J]. *Nucleic Acids Res*, 2013, **41**(19): 9197-9207.

[43] OWENS J B, URSCHITZ J, STOYTCHEV I, *et al*. Chimeric *piggy*Bac transposases for genomic targeting in human cells [J]. *Nucleic Acids Res*, 2012, **40**(14): 6978-6991.

[44] VOIGT K, GOGOL-DÖRING A, MISKEY C, *et al*. Retargeting sleeping beauty transposon insertions by engineered zinc finger DNA-binding domains [J]. *Mol Ther*, 2012, **20**(10): 1852-1862.

[45] YANT S R, HUANG Y, AKACHE B, *et al*. Site-directed transposon integration in human cells [J]. *Nucleic Acids Res*, 2007, **35**(7): e50.

[46] LUO W T, GALVAN D L, WOODARD L E, *et al*. Comparative analysis of chimeric ZFP-, TALE- and Cas9-*piggy*Bac transposases for integration into a single locus in human cells [J]. *Nucleic Acids Res*, 2017, **45**(14): 8411-8422.

[47] HEW B E, SATO R, MAURO D, *et al*. RNA-guided *piggy*Bac transposition in human cells [J]. *Synth Biol* (Oxf), 2019, **4**(1): ysz018.

[48] REZAZADE BAZAZ M, GHAHRAMANI SENO M M, DEHGHANI H. Transposase-CRISPR mediated targeted integration (TransCRISTI) in the human genome [J]. *Sci Rep*, 2022, **12**(1): 3390.

[49] PALLARÈS-MASMITJÀ M, IVANČIĆ D, MIR-PEDROL J, *et al*. Find and cut-and-transfer (FiCAT) mammalian genome engineering [J]. *Nat Commun*, 2021, **12**(1): 7071.

[50] STRECKER J, LADHA A, GARDNER Z, *et al*. RNA-guided DNA insertion with CRISPR-associated transposases [J]. *Science*, 2019, **365**(6448): 48-53.

[51] ZHANG Y W, SUN X M, WANG Q Z, *et al*. Multicopy chromosomal integration using CRISPR-associated transposases [J]. *ACS Synth Biol*, 2020, **9**(8): 1998-2008.