

领域前沿 · 中国



魏文胜, 北京大学生命科学学院研究员。1999年7月毕业于密西根州立大学, 获得遗传学博士学位; 之后在美国斯坦福大学医学院从事博士后研究, 2005年转为Research Associate。2007年7月获北京大学“百人计划”引进国外杰出人才项目资助, 回国建立实验室。长期从事病原微生物和宿主细胞的相互作用研究, 多篇第一或者通讯作者论文发表在包括Cell、Nature、PNAS等学术杂志。近期, 在真核基因编辑技术的研发方面取得重要进展, 首次完成了TALE蛋白碱基识别RVD的全部解码(Yang *et al*, Cell Res 2014), 并开发出基于CRISPR/Cas9系统的人源细胞敲除文库, 用于基因的高通量功能性筛选研究(Zhou *et al*, Nature 2014)。

通过哺乳细胞CRISPR/Cas9敲除文库实现 高通量功能性基因筛选

蔡昌祖 周悦欣 朱诗优 魏文胜*

(北京大学生命科学学院, 北京 100871)

探索基因及其表达蛋白在各种生理和病理过程中的作用是生命科学领域研究的永恒主题。对原核或者模式生物来说, 有相对简单和成熟的遗传技术手段; 但是对高等生物特别是哺乳类细胞或者个体, 一直缺乏有效方法实现对特定基因的精准修饰来进行功能研究。随着近几年基因组靶向编辑技术的出现, 对单一真核基因进行定点改变的遗传手段得以迅速发展。这一炙手可热的新型遗传工具包括锌指核酸内切酶(zinc finger endonuclease, ZFN)^[1-4]、类转录激活因子效应物核酸酶(transcription activator-like effector nucleases, TALENs)^[5-7]以及成簇规律间隔短回文重复及其关联蛋白(clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR; CRISPR-associated protein 9, Cas9)^[8-10]系统。CRISPR/Cas9系统因其简便和高效的特性, 得到了最为广泛的应用与关注。

虽然对单一真核基因的修饰技术已经日趋成熟, 在哺乳细胞内基于基因完全敲除进行大规

模功能性筛选的方法依然空缺。RNA干扰(RNA interference, RNAi)文库曾被广泛应用于功能缺失型基因筛选。这种文库主要分为siRNA和shRNA两类, 二者的原理都是通过RNA干扰降低目的基因的表达来引起表型改变。不同之处在于, siRNA为人工合成的短RNA片段, 只能在96孔或384孔等培养板中进行彼此独立的表型筛选^[11]; shRNA需要通过表达载体实现作用, 因此可以构建到慢病毒等载体上通过病毒侵染方式进行混合型文库筛选, 再通过微阵列芯片(microarray)^[12-13]或者深度测序(deep sequencing)技术^[14-15]对筛选后富集的shRNA进行解码和分析。混合型shRNA文库筛选具有简便、经济、高效等特点, 逐渐成为RNAi文库筛选的主流方案。利用RNA干扰鉴定高等生物基因功能的技术虽然已经普及, 甚至被应用于高通量、全基因组规模的功能性筛选中, 但是由于RNA干扰不能完全抑制基因表达, 常常不足以造成稳定的表型变化, 从而影响对基因功能的正确判断。另外, RNA干扰经常伴随脱靶现象, 其基因回补验证的过程也非常繁琐复杂, 使用起来不尽如人意。

*通讯作者。Tel: 010-62757227, E-mail: wswei@pku.edu.cn

*Corresponding author. Tel: +86-10-62757227, E-mail: wswei@pku.edu.cn

网络出版时间: 2014-06-16 15:30

URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.07.9001.html>

另外一种高通量功能性研究手段是基于KBM7、HAP1等类单倍体细胞系进行的基因捕获筛选(gene trapping)^[16-17]。以KBM7细胞系为例^[16],其染色体除第8号以外均为单拷贝,在这样的细胞系中可以通过随机插入突变实现基因敲除,进行功能缺失型基因筛选研究。然而这种方法局限于少数细胞系,而且类单倍体细胞核型极不稳定,在培养过程中很容易转变成二倍体型。另外,被敲除基因的范围和数目也难以控制,文库质量得不到保障。

基因组编辑技术的发展和成熟,为解决上述文库所存在的不足提供了新的方法和思路。ZFN和TALENs技术均需要在靶向序列的上下游有针对性地构建一对克隆,方能实现有效的基因敲除。要进行大规模的混合筛选,在同一个细胞中同时转入针对一个位点设计的一对质粒在技术上难度很大。更重要的是利用慢病毒载体构建的TALEN克隆在入胞后会产生重组突变,极大地降低效率^[18]。比较而言,CRISPR/Cas9系统仅需在表达Cas9蛋白的基础上,使用人工设计的向导RNA(single-guide RNA, sgRNA)通过碱基互补配对(Watson-Crick base-pairing)的方式与靶位点特异结合,即可完成目的区域双链DNA的断裂,引发可能的宿主细胞DNA修复错误实现基因敲除的目的^[9-10]。

为了验证上述思路的可行性,我们首先构建了带有Cas9及OCT1基因的慢病毒表达载体、包装病毒并分别感染HEK293T、HT1080和HeLa细胞,得到上述细胞的Cas9稳定表达细胞系。我们表达OCT1基因的目的是为了进一步增强用于转录sgRNA的U6启动子^[19]。同时我们也构建了sgRNA的慢病毒表达载体,将已被证实可以有效造成CSPG4基因敲除的sgRNA序列克隆至该表达载体上,包装病毒感染上述稳定表达Cas9蛋白的细胞系,培养5~8天后,通过T7核酸内切酶I(T7 Endonuclease I, T7EI)检测证实,通过慢病毒感染后表达的sgRNA能够在稳定表达OCT1和Cas9的细胞系中对目标位点造成序列增减错误(indel)。然而,在上述三种细胞系中,sgRNA产生的indel效率并不相同,HeLa细胞中的效率明显低于另外两者。对单克隆细胞株的鉴定,发现造成indel的效率在细胞个体间差别很大。我们分离得到一个高效细胞株用于后续的建库实验。这个结果说明,利用慢病毒搭载sgRNA的策略是可行的,并且对一些“困难”的细胞系,筛选高效

的OCT1-Cas9表达系十分重要。另外,我们还证明CRISPR/Cas9结合慢病毒表达系统不会产生严重的脱靶效应。

基于上述验证,本课题组开发了一种基于CRISPR/Cas9系统的慢病毒聚焦型人源细胞文库、功能性基因筛选平台以及基于高通量深度测序技术解析数据的完整技术路线^[20]。首先,利用慢病毒感染构建稳定表达Cas9以及OCT1蛋白的细胞系,从中筛选介导sgRNA切割目标基因组序列效率最好的细胞克隆,用来构建sgRNA文库。sgRNA质粒文库是将设计及合成好的双链寡聚核苷酸通过Golden Gate法^[21]克隆到慢病毒载体完成,这一载体同时表达EGFP蛋白用于病毒感染细胞后通过流式细胞分选得到sgRNA文库。整合进入染色体的sgRNA编码序列可以通过PCR特异地扩增出来,这些来自功能性筛选富集获得的细胞和未经处理的原文库细胞的PCR扩增序列,通过深度测序分析及比较,可以获得被富集的sgRNA序列信息以及其所对应的基因(图1)。

在这篇报道中^[20],我们针对感兴趣的291个可能与炭疽毒素或白喉毒素毒性作用相关的基因设计了总共869条sgRNA,其中大多数基因设计了三条不同的sgRNA。分别使用两种致病细菌毒素进行文库筛选:嵌合型炭疽毒素(PA/LFnDTA)和白喉毒素(Diphtheria toxin)。经过三轮毒素重复处理之后,对照组细胞全部死亡时,实验组细胞基本无可见死亡。经过PCR扩增、深度测序以及统计分析,发现在炭疽毒素筛选后,针对已知炭疽毒素受体ANTXR1编码基因设计的三条sgRNA均得到了最大程度的富集;同样,在白喉毒素筛选后,针对已知的白喉毒素受体的一条sgRNA也获得最高程度的富集。这说明,CRISPR-Cas9文库可以有效地筛选功能相关基因。除此之外,我们还成功鉴定出PLXNA1、PECR、FZD10以及CD81等与炭疽毒素作用机制相关的新型蛋白,与白喉毒素作用相关的RAB2A。

较之于shRNA文库,CRISPR-Cas9文库通过靶向基因的敲除制造表型变化,可以使用更加严苛的筛选标准,更有效地去除假阳性;而且有着成本低廉、构建简单、操作方便等优点。

在本工作被报导的同一时期,Science杂志刊登的两篇文章^[22-23]以及Nature Biotechnology杂志的一篇文章^[24]也分别报导了类似技术路线。主要差异在

于, Zhang课题组将sgRNA和Cas9串联表达在同一个慢病毒载体上, 通过感染将二者一次性转入细胞^[22]; 而Lander课题组虽然将二者分别克隆在不同的载体上, 但仅仅是将Cas9先转入细胞, 获得稳定表达细胞系后不挑选单克隆直接使用携带有sgRNA的病毒进行感染^[23]。而我们的实验结果显示, 在细胞系中即便Cas9的表达量相近, 同样一条sgRNA造成的indel效率也可能会有较大差异。因此, 预选出高效率的

Cas9稳定表达克隆对文库构建和筛选意义重大。此外, 另外几个课题组都着眼于构建覆盖全基因组的CRISPR-Cas9文库, 然而覆盖全基因组所需要的细胞数目及其庞大, 实际操作极为困难。对大部分功能性筛选, 我们认为策略性选择较小规模、基于以往知识构建的聚焦型文库, 反而可以提高成功率。

总之, 这一高通量敲除技术的建立对基因的功能性筛选鉴定具有重要意义, 未来在广泛的生命科学研究领域将发挥巨大的推动作用。

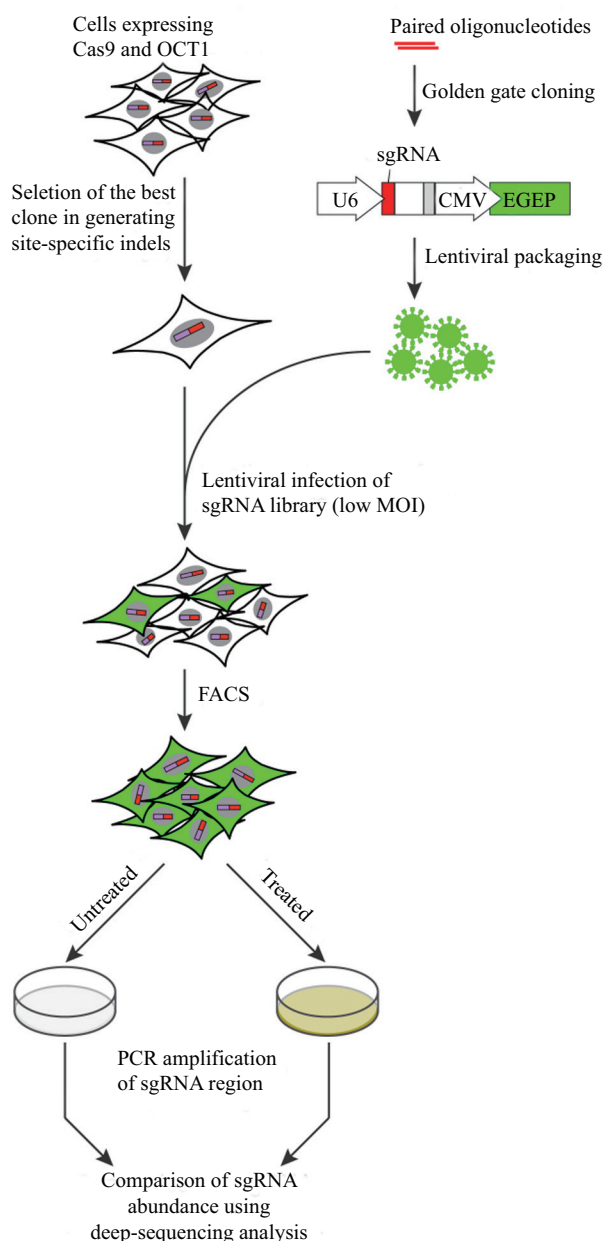


图1 利用慢病毒载体搭载CRISPR/Cas9系统在哺乳类细胞进行混合型功能性遗传筛选的流程图

Fig.1 Schematic of a pooled approach for functional screening in mammalian cells using a lentiviral CRISPR/Cas9 system

参考文献 (References)

- 1 Kim YG, Cha J, Chandrasegaran S. Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93(3): 1156-60.
- 2 Porteus MH, Baltimore D. Chimeric nucleases stimulate gene targeting in human cells. *Science* 2003; 300(5620): 763.
- 3 Miller JC, Holmes MC, Wang J, Guschin DY, Lee YL, Rupniewski I, *et al.* An improved zinc-finger nuclease architecture for highly specific genome editing. *Nat Biotechnol* 2007; 25(7): 778-85.
- 4 Wood AJ, Lo TW, Zeitler B, Pickle CS, Ralston EJ, Lee AH, *et al.* Targeted genome editing across species using ZFNs and TALENs. *Science* 2011; 333(6040): 307.
- 5 Boch J, Scholze H, Schornack S, Landgraf A, Hahn S, Kay S, *et al.* Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science* 2009; 326(5959): 1509-12.
- 6 Moscou MJ, Bogdanove AJ. A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors. *Science* 2009; 326(5959): 1501.
- 7 Miller JC, Tan S, Qiao G, Barlow KA, Wang J, Xia DF, *et al.* A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. *Nature biotechnology* 2011; 29 (2): 143-8.
- 8 Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 2012; 337(6096): 816-21.
- 9 Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, *et al.* Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* 2013; 339(6121): 819-23.
- 10 Mali P, Yang L, Esvelt KM, Aach J, Guell M, DiCarlo JE, *et al.* RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science* 2013; 339(6121): 823-6.
- 11 LaPan P, Zhang J, Pan J, Haney S. Quantitative optimization of reverse transfection conditions for 384-well siRNA library screening. *Assay and Drug Dev Technol* 2008; 6(5): 683-91.
- 12 Tsujii H, Eguchi Y, Chenchik A, Mizutani T, Yamada K, Tsujimoto Y. Screening of cell death genes with a mammalian genome-wide RNAi library. *J Biochem* 2010; 148(2): 157-70.
- 13 Bayona-Bafaluy MP, Sanchez-Cabo F, Fernandez-Silva P, Perez-Martos A, Enriquez JA. A genome-wide shRNA screen for new OxPhos related genes. *Mitochondrion* 2011; 11(3): 467-75.
- 14 Zuber J, McJunkin K, Fellmann C, Dow LE, Taylor MJ, Hannon GJ, *et al.* Toolkit for evaluating genes required for proliferation and survival using tetracycline-regulated RNAi. *Nat Biotechnol*

- 2011; 29(1): 79-83.
- 15 Zuber J, Shi J, Wang E, Rappaport AR, Herrmann H, Sison EA, et al. RNAi screen identifies Brd4 as a therapeutic target in acute myeloid leukaemia. *Nature* 2011; 478(7370): 524-8.
- 16 Carette JE, Guimaraes CP, Varadarajan M, Park AS, Wuethrich I, Godarova A, et al. Haploid genetic screens in human cells identify host factors used by pathogens. *Science* 2009; 326(5957): 1231-5.
- 17 Burckstummer T, Banning C, Hainzl P, Schobesberger R, Kerzendorfer C, Pauler FM, et al. A reversible gene trap collection empowers haploid genetics in human cells. *Nat Methods* 2013; 10(10): 965-71.
- 18 Holkers M, Maggio I, Liu J, Janssen JM, Miselli F, Mussolino C, et al. Differential integrity of TALE nuclease genes following adenoviral and lentiviral vector gene transfer into human cells. *Nucleic Acids Res* 2013; 41(5): e63.
- 19 Lin BR, Natarajan V. Negative regulation of human U6 snRNA promoter by p38 kinase through Oct-1. *Gene* 2012; 497(2): 200-7.
- 20 Zhou Y, Zhu S, Cai C, Yuan P, Li C, Huang Y, et al. High-throughput screening of a CRISPR/Cas9 library for functional genomics in human cells. *Nature* 2014; 509(7501): 487-91.
- 21 Engler C, Gruetzner R, Kandzia R, Marillonnet S. Golden gate shuffling: A one-pot DNA shuffling method based on type II restriction enzymes. *PLoS One* 2009; 4(5): e5553.
- 22 Shalem O, Sanjana NE, Hartenian E, Shi X, Scott DA, Mikkelsen TS, et al. Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells. *Science* 2014; 343(6166): 84-7.
- 23 Wang T, Wei JJ, Sabatini DM, Lander ES. Genetic screens in human cells using the CRISPR-Cas9 system. *Science* 2014; 343(6166): 80-4.
- 24 Koike-Yusa H, Li Y, Tan EP, Velasco-Herrera MD, Yusa K. Genome-wide recessive genetic screening in mammalian cells with a lentiviral CRISPR-guide RNA library. *Nat Biotechnol* 2014; 32(3): 267-73.