

利用CRISPR/Cas9系统和TALEN技术干预 *XIST*基因的表达

刺 婷¹ 马健阳¹ 沈 南^{1,2} 唐元家^{1,2*}

(¹上海交通大学医学院/中国科学院上海生命科学研究院健康科学研究所, 分子风湿病学研究组, 上海 200025;

²上海交通大学医学院附属仁济医院, 上海市风湿病研究所, 上海 200001)

摘要 *XIST*是维持雌性哺乳动物X染色体稳定失活的重要长链非编码基因。X染色体失活异常导致X连锁基因的过量表达从而参与了癌症等疾病的发生。干预*XIST*的表达在*XIST*的生物学功能和相关疾病发生的研究中是必不可少的。该研究利用CRISPR/Cas9系统和TALEN技术在293T细胞中对已知的*XIST*核心启动子进行编辑, 建立了通过酶切、测序等鉴定突变效率的方法, 并且结合极限稀释法、片段分析和TA克隆测序得到基因型确定的*XIST*低表达的单克隆细胞系。结果显示, CRISPR/Cas9和TALEN对*XIST*核心启动子的突变可以有效地抑制*XIST*的表达。该研究表明, 针对*XIST*核心启动子的基因组编辑可以干预*XIST*的表达, 这为长链非编码RNA基因的敲低提供了新的思路。

关键词 *XIST*; CRISPR/Cas9; TALEN; 基因敲低; 长链非编码RNA

Interfering *XIST* expression by CRISPR/Cas9 and TALEN

La Ting¹, Ma Jianyang¹, Shen Nan^{1,2}, Tang Yuanjia^{1,2*}

(¹Laboratory of Molecular Rheumatology of Institute of Health Sciences, Shanghai Jiaotong University School of Medicine (SJTUSM) & Shanghai Institutes for Biological Science (SIBS), Chinese Academy of Sciences (CAS), Shanghai 200025, China; ²Shanghai Institute of Rheumatology, Shanghai Jiaotong University School of Medicine Affiliated Renji Hospital, Shanghai 200001, China)

Abstract *XIST* is one of the long noncoding genes which could help to keep X chromosome silenced in mammals. The abnormality of X chromosome in activation increases the expression of X-linked genes, which is thought to represent a key event in oncogenesis and the occurrence of other diseases. Interfering *XIST* expression is necessary to study functions of *XIST* and associated diseases. In this study, we edited the known core promoter of *XIST* by CRISPR/Cas9 and TALEN in 293T cells. T7E1 assay and sequencing were used to detect the efficiency of mutation. Limiting dilution, fragment analysis and TA cloning were used to get the monoclonal cell lines expressing low *XIST* and identify their genotypes. Results showed that compared with the control group, both CRISPR/Cas9 and TALEN could mutate the core promoter and knock down the expression of *XIST*. In conclusion, the edited core promoter of *XIST* could knock down its expression. The results may contribute to new strategy about silencing long noncoding genes.

Key words *XIST*; CRISPR/Cas9; TALEN; gene knockdown; long noncoding RNA

收稿日期: 2014-08-19 接受日期: 2014-09-20

国家自然科学基金(批准号: 31370880)、国家重点基础研究发展计划(973计划)(批准号: 2014CB541901)和上海市自然科学基金(批准号: 12ZR1435900)资助的课题

*通讯作者。Tel: 021-54923360, E-mail: tangyuanjia028@163.com

Received: August 19, 2014 Accepted: September 20, 2014

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31370880), the National Key Basic Research and Development Program of China (973 Program) (Grant No.2014CB541901) and the Shanghai Natural Science Foundation (Grant No.12ZR1435900)

*Corresponding author. Tel: +86-21-54923360, E-mail: tangyuanjia028@163.com

网络出版时间: 2014-11-21 17:21 URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.12.0267.html>

大多数哺乳动物的细胞都是二倍体。一般雌性哺乳动物有两条X性染色体, 雄性性染色体为一条X染色体和一条Y染色体。雌性为了避免基因过剩表达, 其中一条X染色体在发育早期将失活, 以异染色质化的方式存在, 该染色体上大多数基因都不能表达^[1-3]。*XIST*(X-inactive specific transcript)是特异表达在失活X染色体上的非编码基因, 转录加工后, 其RNA转录本会从X染色体失活中心(X inactivation center, XIC)的位置开始, 逐渐将要失活的X染色体包裹起来, 同时在其他RNA和蛋白的共同作用下, 促使基因沉默, 使得该条X染色体失活^[4-5]。近年来, 科学家对*XIST*基因的进一步研究发现, *XIST*对于稳定X染色体的失活非常重要^[6-7]。

此外, 越来越多的证据表明, *XIST*基因的表达水平与一些癌症的发生密切相关。失活的X染色体在细胞核中浓缩成染色较深的染色质体称为巴氏小体, 乳腺癌和卵巢癌细胞中通常没有巴氏小体^[8-10], 睾丸瘤的产生一般依赖于异常增多的X染色体^[11]。Yildirim等^[12]通过研究发现, 在造血干细胞中敲除*XIST*可导致小鼠高侵袭性骨髓增生性肿瘤和骨髓增生异常综合症。*XIST*的缺失会导致细胞内基因转录谱的变化, 癌症相关基因表达上调^[13]。这说明*XIST*作为一个长链非编码基因在癌症发生中发挥了重要的生物学作用。

*XIST*低表达或者不表达在*XIST*的功能研究中非常重要, 在不同细胞系或者动物模型中干预其表达可为生物学和疾病研究提供便利。*XIST*在人类细胞中的转录本长达19 Kb(19 280 bp, GRCh38/hg38), 且存在另外一个转录本*TSIX*与*XIST*尾对尾重叠。小鼠基因组上*XIST*基因也与*TSIX*基因重叠。目前, 人们已经在小鼠ES细胞中进行了*XIST*的敲除, 采用Cre酶同源重组的方式进行大片的敲除或者替换^[14-16]。由于*XIST*与*TSIX*重叠, 传统的敲除方法只针对*XIST*全长进行敲除, 难免在基因组上破坏*TSIX*基因; 或者针对*XIST*的启动子和第一个外显子进行敲除, 如此针对*XIST*的序列敲除是不完全的。此外, 这种大片段敲除的方法操作复杂且成本高、效率低。针对基因组的敲除, 基因型一般会随着细胞的增殖得到保留。除了这种针对基因组的操作之外, 科学家们还尝试了不改变基因组的siRNA的干预方式^[17]。

CRISPR/Cas9系统是基于细菌和古细菌的免疫防御机制而改造的一种基因组修饰技术^[18-20]。与基

因组特异互补配对的RNA引导核酸酶Cas9对双链DNA进行剪切, 从而引发非同源末端连接或者同源重组这两类修复。在没有同源模板存在的情况下容易发生非同源末端连接修复, 这是一种倾向于错误的修复机制。修复之后的DNA序列往往会有突变或者部分碱基的缺失或者插入。这些突变非常容易引起编码基因功能的丧失。

Hendrich等^[21]利用荧光素酶报告基因系统对*XIST*的启动子进行的研究表明, *XIST*上游有一段序列对于*XIST*的转录启动非常重要, 为*XIST*的核心启动子区域。本研究使用CRISPR/Cas9系统针对已报道的*XIST*核心启动子及周围区域进行突变, 同时针对该位点将TALEN和CRISPR/Cas9系统进行了比较, 发现这两种技术对*XIST*的表达均有一定的影响。相对于传统的针对基因组编辑的敲除方法, 该方法成本低, 操作更加简便。

1 材料与方法

1.1 实验材料

人胚肾细胞293T(human embryonic kidney 293T, HEK293T)购自中国科学院上海细胞库; 大肠杆菌菌株DH-5 α 和普通DNA产物纯化试剂盒购自天根生物科技有限公司; 大肠杆菌stbl3购自GeneCopoeia公司; pEMT载体购自南京诺唯赞生物科技有限公司; pX260(addgene编号42229)质粒由华东师范大学李大力老师馈赠; 快速构建TALEN试剂盒购自斯丹赛生物技术有限公司; *Bbs* I内切酶和T7核酸内切酶I(T7E1)购自美国NEB公司; T4 DNA ligase购自美国Promega公司; 逆转录PrimeScript RT reagent Kit、SYBR Premix Ex Taq II、50 bp DNA ladder marker、proteinase K和La Taq聚合酶购自TaKaRa公司; Annealing Buffer for DNA Oligos(5 $\times$)购自碧云天生物技术有限公司; ssDNA Oligos和引物由上海生工生物技术有限公司合成; TransDirect Animal Tissue PCR Kit购自北京全式金生物技术有限公司; 转染试剂Lipofectamine 2000、Trizol、Opti-MEM、胎牛血清、高糖DMEM购自Life Technology公司。

1.2 实验方法

1.2.1 sgRNA表达载体的构建与sgRNA的设计 构建pEMT/sgRNA质粒: 设计引物U6 forward primer: 5'-GAG GGC CTA TTT CCC ATG ATT CC-3'和*Bbs* I sgRNA primer: 5'-AAA AAA AGC ACC GAC TCG

GTG CCA CTT TTT CAA GTT GAT AAC GAC TAG
CCT TAT TTT AAC TTG CTA TTT CTA GCT CTA
AAA CAG GTC TTC TCG AAG ACC CGG TGT
TTC GTC CTT TCC ACC AAG-3'。以pX260质粒
为模板进行PCR, 得到含有U6启动子和*Bbs* I酶切
位点的sgRNA表达序列的片段, 序列如下: 5'-GAG
GGC CTA TTT CCC ATG ATT CCT TCA TAT TTG
CAT ATA CGA TAC AAG GCT GTT AGA GAG ATA
ATT GGA ATT AAT TTG ACT GTA AAC ACA AAG
ATA TTA GTA CAA AAT ACG TGA CGT AGA AAG
TAA TAA TTT CTT GGG TAG TTT GCA GTT TTA
AAA TTA TGT TTT AAA ATG GAC TAT CAT ATG
CTT ACC GTA ACT TGA AAG TAT TTC GAT TTC
TTG GCT TTA TAT ATC TTG TGG AAA GGA CGA
AAC ACC GGG TCT TCG AGA AGA CCT GTT TTA
GAG CTA GAA ATA GCA AGT TAA AAT AAG GCT
AGT CCG TTA TCA ACT TGA AAA AGT GGC ACC
GAG TCG GTG CTT TTT T-3'。纯化该PCR产物后
连接到pEMT骨架质粒上, 得到可插入20 bp sgRNA
的表达载体(图1A), 命名为pEMT/sgRNA。

利用在线软件Optimized CRISPR Design(<http://crispr.mit.edu/>)针对*XIST* promoter设计sgRNA。序列为: *XIST* sgRNA-1-top: 5'-CAC CGT GTC CGG CTT TCA ATC TTC T-3'; *XIST* sgRNA-1-bottom: 5'-AAA CAG AAG ATT GAA AGC CGG ACA C-3'; *XIST* sgRNA-2-top: 5'-CAC CGC GGA GAG AGC ATA AGA GGC G-3'; *XIST* sgRNA-2-bottom: 5'-AAA CCG CCT CTT ATG CTC TCT CCG C-3'。位置如图1B所示。采用碧云天Annealing Buffer for DNA Oligos(5×)将以上序列退火, 形成可连接至*Bbs* I酶切之后的线性pEMT/sgRNA载体上。Cas9表达质粒使用pX260。

1.2.2 TALEN质粒的构建 针对*XIST*启动子区域由斯丹赛公司设计TALEN序列, 共设计5条TALEN序列, 其中左臂3条, 右臂2条。自由组合成6对TALEN打靶序列, 如图1B所示, 左臂骨架质粒均为嘌呤霉素N-乙酰转移酶(*PAC*)基因标记, 右臂骨架质粒均为eGFP标记。

1.2.3 细胞培养和转染 HEK293T用含有10%胎牛血清的高糖DMEM培养液置于37 °C、5% CO₂温箱中培养。

转染前12~16 h, HEK293T细胞以 2×10^5 /孔的密

度接种至6孔板, 5×10^4 /孔的密度接种至24孔板。6孔板转染TALEN质粒, 每孔左、右臂质粒各2 μg。24孔板转染插入sgRNA的pEMT/sgRNA质粒, 500 ng/孔, pX260质粒1 μg/孔。4~6 h后换培养基。

1.2.4 T7E1酶切分析检测突变效率 转染后24 h使用2 μg/mL嘌呤霉素(puromycin)筛选阳性转染细胞。约2~3 d后收集经过puromycin筛选且生长良好的细胞, 提取基因组DNA, 使用La Taq酶进行PCR, 使用引物: T7E1-XIST-PROMOTER-F: 5'-TCC CTT GAA GAT GGT ACT AAC CTC A-3'; T7E1-XIST-PROMOTER-R: 5'-GGA GGA CGT GTC AAG AAG ACA CTA-3'。之后使用普通DNA产物纯化试剂盒将PCR产物进行纯化。纯化后的DNA采用以下程序进行退火: 98 °C 5 min, 一个循环; 98 °C 30 s, 之后每30 s降1 °C, 60个循环后降至39 °C。取500 ng退火产物进行T7E1酶切, 37 °C酶切30 min后电泳拍照。

1.2.5 极限稀释法进行单克隆的培养 对经过puromycin筛选且生长良好的细胞进行计数, 以0.5~0.8细胞/孔的密度接种至96孔板。生长7~12 d后在4倍物镜下观察细胞, 将只含有一个圆滑细胞群落且群落大小适当[约(0.5~5)×10³细胞]的孔视为单克隆细胞所在的孔。

1.2.6 直接PCR和片段分析 将生长7~12 d之后的单克隆细胞从96孔板上转移, 一半分至24孔板继续培养, 另一半使用TransDirect Animal Tissue PCR Kit进行PCR, 使用引物: *XIST* fam-F: 5'-GAA AAC CCA TTG AAG TTG TGA C-3'(5' FAM标记); *XIST* fam-R: 5'-AAA TAC GCC ATA AAG GGT GTT-3'。PCR产物稀释后, 使用ABI公司的3730 DNA Analyzer进行片段分析, 判断打靶位点敲除或插入的片段长度。

1.2.7 定量PCR 经过puromycin筛选生长良好的细胞除抽提基因组和接种单克隆之外, 一部分用Trizol处理抽提RNA, 逆转录200 ng成cDNA备用。使用ABI ViiA 7实时荧光定量PCR系统进行检测, *RPL13A*作为内参。使用引物序列如下: *RPL13A*上游引物序列: 5'-CCT GGA GGA GAA GAG GAA AGA GA-3'; *RPL13A*下游引物序列: 5'-TTG AGG ACC TCT GTG TAT TTG TCAA-3'。*XIST*上游引物序列: 5'-CCA TTG AAG ATA CCA CGC TGC-3'; *XIST*下游引物序列: 5'-GGT TGT TGC CCA GTG GTA GTG-3'。

1.3 统计学分析

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用GraphPad Prism 5软件

进行统计学数据分析, 多组间单因素比较采用One-way ANOVA检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 sgRNA和TALEN质粒的设计和构建

Hendrich等^[21]使用荧光素酶报告基因实验证明, *XIST*基因上游约20~40 bp(图1B所示下划线部分)处对*XIST*的转录非常重要。这一段的突变和缺失可以导致荧光素酶的显著下调甚至不表达。我们针对这一段序列设计sgRNA和TALEN质粒(图1B)。

合成sgRNA-X1和sgRNA-X2相关的单链寡核苷酸, 退火形成带有黏性末端的双链DNA后连接到经过*Bbs* I酶切的pEMT/sgRNA质粒上, 得到pEMT/sgRNA-X1和pEMT/sgRNA-X2, 测序表明质粒序列正确。TALEN质粒的构建参照斯丹赛生物技术有限公司的FastTALE™ TALEN试剂盒构建, 测序结果也表明质粒序列正确。

2.2 转染293T细胞和鉴定基因组突变效率

在293T细胞中转染相关质粒, 24 h后加2 $\mu\text{g/mL}$ 的puromycin筛选。未转染的细胞作为阴性对照, 待阴性细胞全部死亡后换无puromycin培养基, 培养

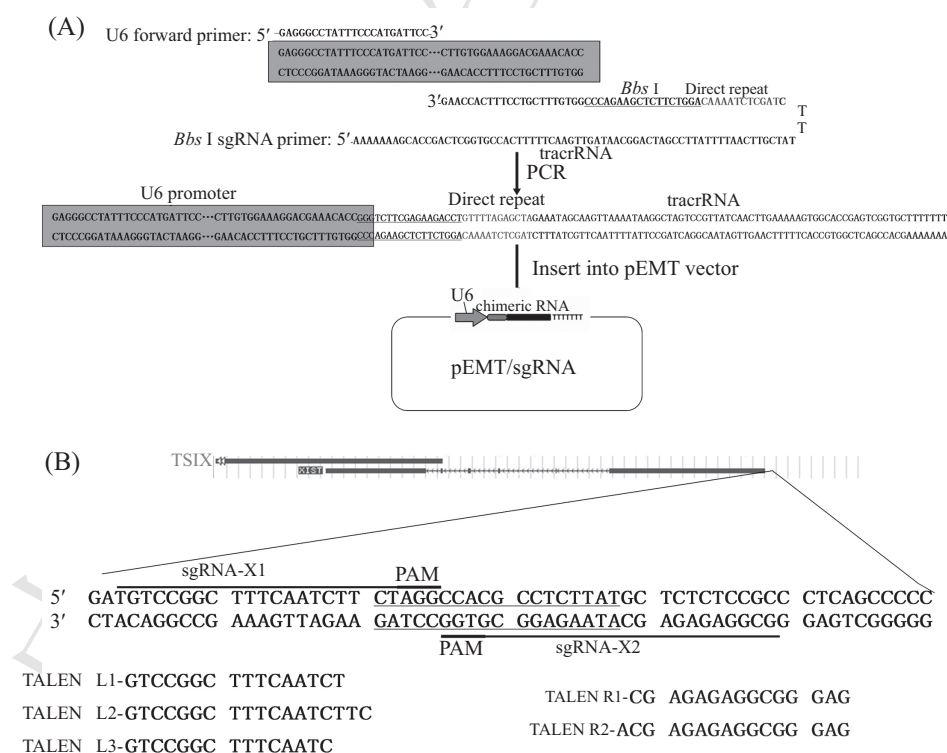
2~3 d, 待细胞生长至足够的数量且状态良好时, 一部分细胞抽提基因组DNA用于鉴定基因组打靶位置突变效率。

T7E1酶识别并切割不完全配对的双链DNA。经CRISPR/Cas9或TALEN处理过的细胞, 其基因组有相当一部分发生了突变。该位点突变的基因组DNA的PCR产物和野生型基因组DNA的PCR产物随机退火, 形成不完全配对的双链DNA。NEB的T7E1酶可以精确识别至少一个碱基的错误匹配从而完成双链的切割, 酶切效率可以反应突变效率。T7E1酶切分析实验检测突变效率结果如图2所示, 针对*XIST*的核心启动子, CRISPR/Cas9的效率明显高于TALEN。

也可以直接将PCR产物进行测序用来检测突变效率, 突变位点将有套峰出现, 但是该方法并不能准确地量化突变效率, 并且没有T7E1酶切分析实验灵敏, 例如图2D所示结果对应的样本使用测序方法检测没有显示套峰, 图2C所示样本可显示明显的套峰。

2.3 CRISPR/Cas9和TALEN对*XIST*表达的影响

经过puromycin筛选的细胞生长状态良好后, 取一部分细胞用Trizol处理, 提取total RNA, 使用定量PCR方法检测CRISPR/Cas9和TALEN对*XIST*表达

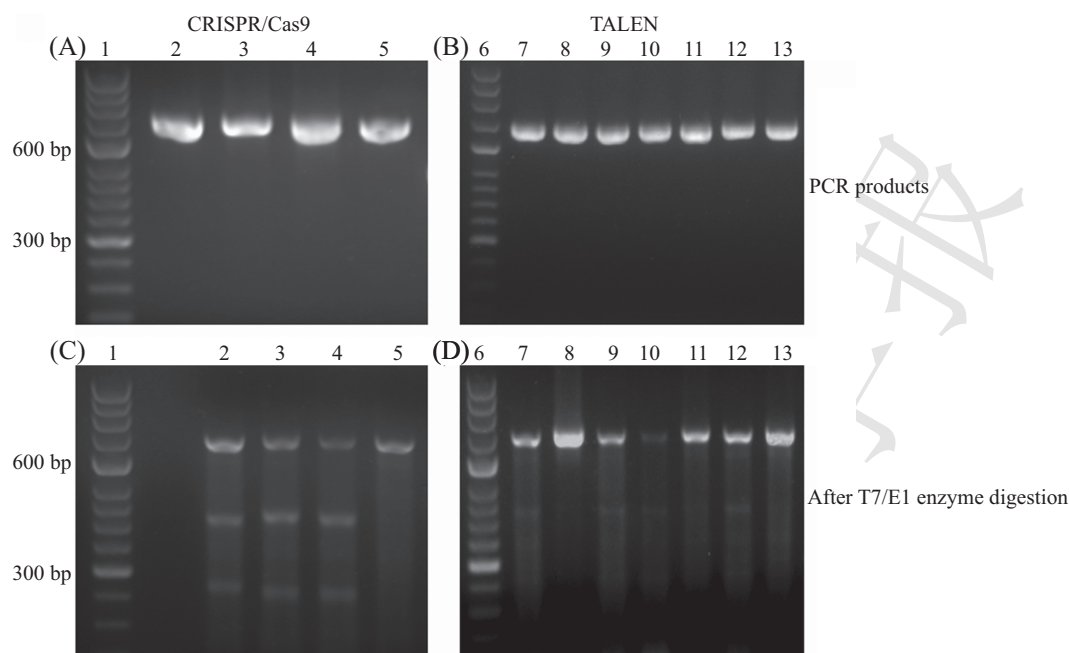


A: sgRNA表达载体的构建; B: sgRNA和TALEN靶向位置示意图。

A: the construction of sgRNA expression vector; B: the location of the sgRNAs and TALEN targets.

图1 sgRNA和TALEN质粒的设计和构建

Fig.1 The design and construction of sgRNA and TALEN plasmids

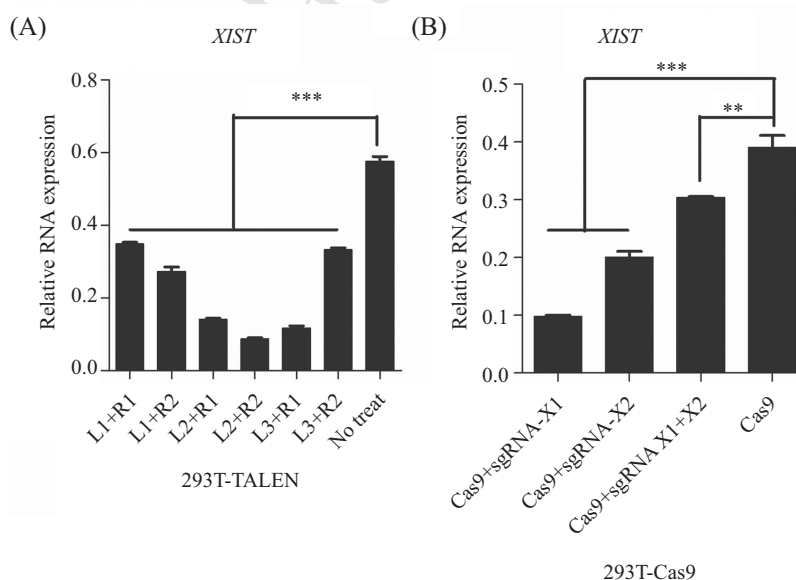


A和C: CRISPR/Cas9处理组。泳道1: 50 bp DNA ladder marker; 泳道2: pX260+pEMT/sgRNA-X1; 泳道3: pX260+pEMT/sgRNA-X2; 泳道4: pX260+pEMT/sgRNA-X1+pEMT/sgRNA-X2; 泳道5: pX260; B和D: TALEN处理组。泳道6: 50 bp DNA ladder marker; 泳道7: TALEN L1+TALEN R1; 泳道8: TALEN L1+TALEN R2; 泳道9: TALEN L2+TALEN R1; 泳道10: TALEN L2+TALEN R2; 泳道11: TALEN L3+TALEN R1; 泳道12: TALEN L3+TALEN R2; 泳道13: 未转染的293T细胞。C和D: T7E1酶切实验鉴定突变效率, 2~5, 7~13道每道为500 ng退火产物酶切后的结果。

A and C: CRISPR/Cas9 treated group. lane 1: 50 bp DNA ladder marker; lane 2: pX260+pEMT/sgRNA-X1; lane 3: pX260+pEMT/sgRNA-X2; lane 4: pX260+pEMT/sgRNA-X1+pEMT/sgRNA-X2; lane 5: pX260. B and D: TALEN treated group. lane 6: 50 bp DNA ladder marker; lane 7: TALEN L1+TALEN R1; lane 8: TALEN L1+TALEN R2; lane 9: TALEN L2+TALEN R1; lane 10: TALEN L2+TALEN R2; lane 11: TALEN L3+TALEN R1; lane 12: TALEN L3+TALEN R2; lane 13: No treat 293T cells. C and D: T7E1 assay for mutation efficiency. 500 ng annealing product digested by T7E1 enzyme per lane except lane 1 and lane 6.

图2 CRISPR/Cas9或TALEN针对XIST核心启动子的突变效率

Fig.2 The indel (insert and deletion) of XIST core promoter after treated by CRISPR/Cas9 and TALEN

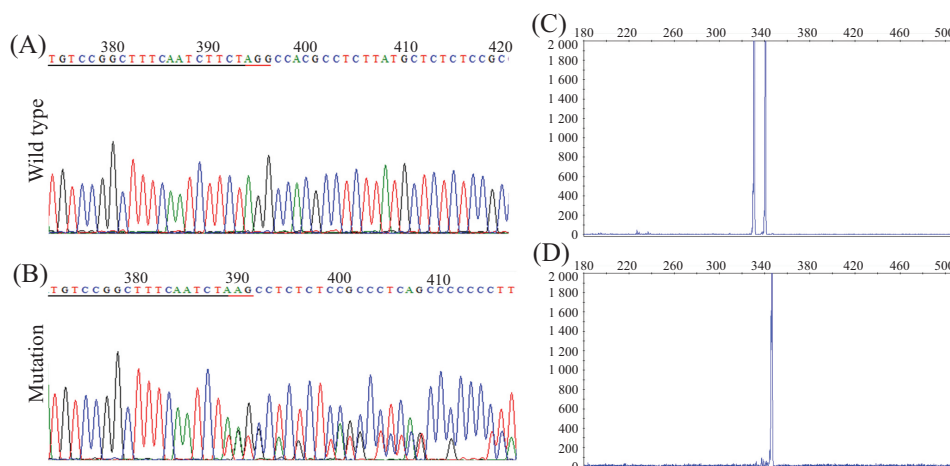


定量 PCR检测不同处理组XIST的表达水平。** $P < 0.01$, *** $P < 0.0001$ 。

XIST expression was detected by Q-PCR. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.0001$ 。

图3 CRISPR/Cas9和TALEN对XIST表达的影响

Fig.3 The XIST expression interfered by CRISPR/Cas9 and TALEN



A: 未处理的293T细胞测序结果; B: 突变后的单克隆测序结果; C和D: 片段分析显示靶位点的缺失, 其中D为野生型。

A: the sequence of no treat 293T cells; B: the sequence of mutation monoclonal; C and D: the fragment analysis shows monoclonal with various sizes of mutation, and D means wild type.

图4 测序和片段分析技术鉴定单克隆基因型

Fig.4 Sequencing and fragment analysis for the genotype identification

的影响(图3)。我们发现, CRISPR/Cas9和TALEN对*XIST*的表达都有一定干扰作用。由于双链断裂后引发的修复是随机的, 从T7E1酶切分析实验结果看, 还有相当一部分细胞的基因组未发生突变, 且突变的细胞基因型也不尽一致。因此, 这种表达水平的改变反映的是CRISPR/Cas9和TALEN系统对*XIST*表达的细胞群体水平的改变。

结合T7E1酶切分析实验和定量PCR的结果, 我们发现CRISPR/Cas9处理的细胞整体突变效率高, pX260+pEMT/sgRNA-X1组合有更高的敲低效果; TALEN整体突变效率低, TALEN L1+TALEN R2和TALEN L3+TALEN R1组合突变效率极低, TALEN L2+TALEN R2组合整体敲低效率高。

2.4 极限稀释法获得单克隆细胞和单克隆细胞的鉴定

由于CRISPR/Cas9和TALEN是针对基因组的修饰, 它们对基因组碱基的突变可以通过DNA复制稳定遗传, 即敲低作用也可以随着细胞的增殖和DNA的复制得到保留。因此我们可以挑选单克隆, 得到基因型确定的细胞株。

将pX260+pEMT/sgRNA-X1+pEMT/sgRNA-X2处理过的细胞使用极限稀释法获取基因型确定的单克隆细胞。如实验方法1.2.5所示, 待细胞生长7~12 d后挑选只含有一个圆滑细胞群落且群落大小适当[约(0.5~5)×10³细胞]的细胞群落视作单克隆。将细胞吹打下来之后取一半使用TransDirect Animal

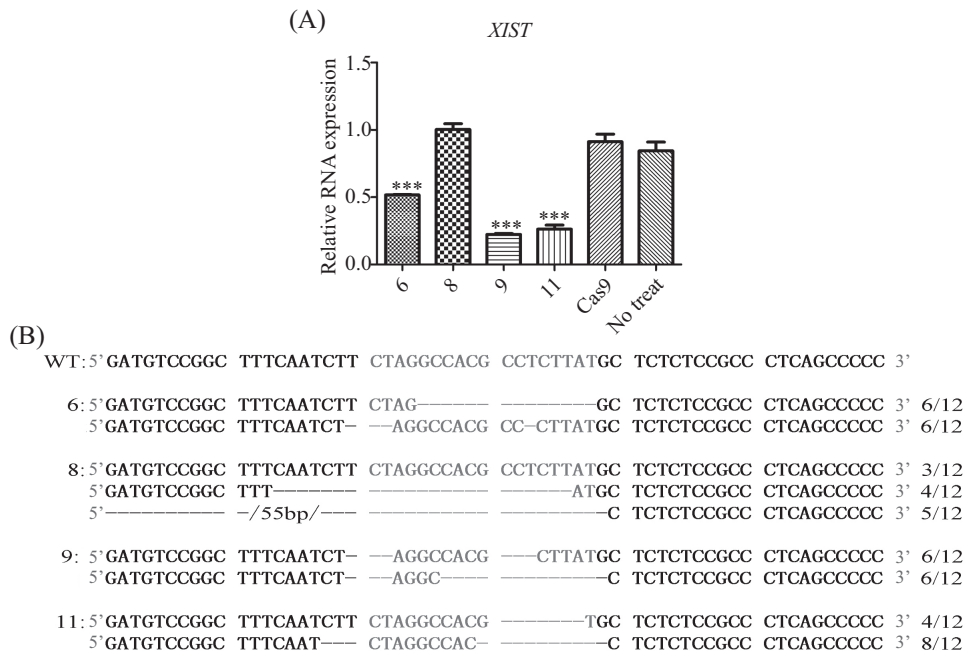
Tissue PCR Kit裂解进行直接PCR, 另一半继续培养, 留待后续使用。PCR产物可直接测序, 因为得到等位基因序列一致的突变体纯合子是小概率事件, 出现测序套峰可以表示该细胞基因组发生突变(图4B), 无套峰的单克隆细胞则根据序列判断是否为野生型。使用FAM标记的引物进行PCR所得产物, 可以使用ABI公司的3730 DNA Analyzer对其进行毛细管电泳, 毛细管电泳可以依赖PCR产物分子量与泳动位移的正比关系得到PCR产物的相对大小, 从而判断各个单克隆细胞株的目标位点是否缺失或者插入碱基(图4C和图4D), 这种鉴定单克隆细胞基因型的方法可以检测出1~2 bp的缺失或者插入。

我们使用上述提到的鉴定单克隆的两种方法对所得的一部分单克隆细胞进行了鉴定, 鉴定结果表明, 和T7E1酶切分析实验结果一致, 针对*XIST*的核心启动子区域, CRISPR/Cas9有更高的切割突变效率。

除以上两种方法之外, 还可以使用TA克隆测序的方法鉴定单克隆细胞的基因型, 这是一种较以上两种方法成本高但更为准确的方法。将PCR所得片段插入到T载体上, 转化后每一种单克隆细胞挑选12个单克隆细菌抽质粒进行测序, 理论上认为每种单克隆细胞的等位基因同位点的各种基因型都可以被检测到。

2.5 单克隆细胞*XIST*的表达

从经过pX260+pEMT/sgRNA-X1+pEMT/sgRNA-



A: 单克隆和对照组(Cas9和no treat) *XIST*的相对表达量。*** $P < 0.0001$, 与Cas9组比较。

A: the relative expressions of *XIST* of the monoclones and control groups (Cas9 and no treat). *** $P < 0.0001$ compared with Cas9 group.

图5 单克隆细胞中*XIST*的表达

Fig.5 The *XIST* expression of monoclones

X2组合处理后的单克隆细胞中挑选生长状态良好的单克隆细胞抽提RNA, 使用定量PCR检测*XIST*表达。如图5A所示, 9和11号单克隆表达量最低。同时通过TA克隆得到各单克隆细胞具体的基因型。如图5B所示, 每种单克隆测序12个连接产物, 8号克隆有一条X染色体是野生型, 其整个细胞系*XIST*的表达和野生型相当。Hendrich等^[21]发表的*XIST*核心启动子如图5B灰色部分所示, 该18个碱基在荧光素酶报告系统中显示了非常重要的调节转录的能力。如图5所示, 在293T细胞中, 针对*XIST*核心启动子敲低*XIST*的表达, 有一个等位基因是野生型的杂合子敲低作用并不明显, 如8号克隆。而敲低作用明显的9号和11号克隆, 其等位基因都在核心启动子的中间位置有较长片段的缺失。

3 讨论

*XIST*是雌性哺乳动物细胞中维持X染色体失活的最主要的基因。*XIST*的异常会引发发育异常或者癌症等疾病的发生。目前, 科学家们对*XIST*在X染色体沉默过程当中的行为做了一些研究, 但是针对*XIST*与其他分子的相互作用、*XIST*在疾病发生中的具体行为还有待研究, 本文为这些工作的开展奠定了一定的技术基础。此外, 本文结果表明, *XIST*核心

启动子区域的突变可干预其表达, 这提示我们在其他长链非编码RNA基因功能的研究工作中, 也可以根据实际需要在准确定位关键调控序列后对启动子进行编辑来操控长链非编码RNA的表达水平。

继锌指酶之后, TALEN和CRISPR/Cas9技术使得基因组修饰技术的效率大大提高, 更加易于操作, 并且很大程度上降低了基因组修饰的成本。与TALEN相比, 从切割位点的特异性来看, CRISPR/Cas9更易脱靶。决定TALEN切割位点的序列比CRISPR/Cas9长, 因此更加特异。CRISPR/Cas9由于与靶基因结合的序列只有20个碱基, 并且在远离PAM结构的5'端碱基与靶基因不完全互补的情况下也可引起靶点的切割, 使得其脱靶的概率增加^[22-24]。科学家们尝试了许多新的方法来改善CRISPR/Cas9的脱靶问题^[25-26], 这些方法针对Cas9进行了修饰, 都取得了良好的效果, 使得CRISPR/Cas9在基因组上的操作更精确。此外, 一些文章还从全基因组层次对CRISPR/Cas9技术的特异性进行了研究, 全基因组测序证明该技术引起的脱靶是有限的^[27-28], 基因组编辑主要针对目标位点。

基因组编辑的效率决定基因组编辑的成功与否。检测靶点位置的突变效率, 可以采用多种方法。T7E1酶切分析是最常用且较灵敏的一种方法。除

此之外, 还有PCR产物直接测序的方法, 这种方法对于突变效率较高的细胞群体会显示套峰, 既可以用来检测突变效率, 也可用来指标单克隆细胞的基因型是否为野生型。但是套峰的多少和高低并不能量化指标突变效率的高低。与此同时, 该方法不能检出突变效率较低的样本。另一方面, 当测序样本纯化不理想时, 主峰下方也会出现较低的杂峰。片段分析目前还没有被大家广泛用到, 该方法主要用于检测片段缺失和插入的大小, 它既可以检测本文提到的单克隆细胞的靶点缺失或插入, 也可以检测群体细胞靶点位置缺失或插入的情况, 片段分析峰值的高低可以用来评估该基因型在总样本中的频率。如果实验目的是为了得到一定长度序列缺失的细胞, 可以使用该方法检测整体突变效率以及所得目的片段缺失的细胞的多少。片段分析只需要极少量的样本就可以检测。样本在毛细管中电泳之后, 微量的荧光信号就可以被捕提到, 因此该方法对PCR引物的特异性要求很高, 即使少量的非特异性扩增也可以被检测到。所以该方法必须使用特异性非常好的引物, 否则易出现假阳性。

相比TALEN复杂的模块组合, CRISPR/Cas9更容易操作。CRISPR/Cas9只需设计一段毗邻-NGG结构的20个碱基的sgRNA即可。与此同时, 包括本文在内, 还有其他文献证实, 针对某些具体的位点, CRISPR/Cas9的效率高于TALEN^[29-31]。但是如本文图3所示, TALEN的干预效率高于CRISPR/Cas9, 这一结果与突变效率不一致。这部分检测的RNA来自于puromycin处理后大约生长2~3 d的细胞, 与生长后的单克隆细胞相比, 该细胞内相关质粒的表达产物有更多的富集(曾使用*PAC*基因的引物检测过)。我们猜测除了基因组突变导致的敲低作用以外, TALEN和CRISPR/Cas9质粒在细胞内所转录出的结合基团或者核酸酶特异结合在*XIST*核心启动子区, 阻碍RNA转录相关的酶和蛋白复合物的结合, 从而抑制了RNA的表达。

对于单克隆细胞基因型的鉴定, 我们使用了直接PCR的方法。因为单克隆细胞生长较慢, 我们要从一个细胞增殖得到足够提基因组DNA的细胞需要很长的时间。直接PCR是将少量细胞裂解处理, 使用裂解液为模板进行PCR的方法。根据我们的经验, 大约5 000个细胞就可以使用直接PCR的方法得到可检测到的目的片段的PCR产物。基本上所有的

单克隆都可以在12 d内生长至这个数量。直接PCR为我们节省了工作时间和细胞传代所耗费的成本。

本文并没有挑选到*XIST*表达量特别低的单克隆细胞系。图3中部分*XIST*的整体下调程度也超过了单克隆所示的结果, 我们在实验中观察到, 与针对其他基因突变的细胞相比, 针对*XIST*核心启动子突变的细胞生长速度明显低于其他细胞。我们猜测*XIST*明显下调的细胞系在挑选单克隆的过程中由于生长缓慢或者增殖能力的欠缺无法长成相应的单克隆, 从而导致我们无法得到*XIST*明显下调的单克隆细胞系。敲除*XIST*可影响X染色体的失活, 导致一系列X染色体上的基因表达异常。*XIST*敲除小鼠会死于原肠胚形成期。针对293T细胞而言, 敲除*XIST*是否会影响细胞增殖和生长, 还有待后续研究。

对于检测单克隆基因型的TA克隆测序实验, 由于所测样本数量限制, 没有得到*XIST*表达量和具体基因型的对应关系。如果突变位点有更重要的意义, 可以参考本文所示方法进行测序检测, 例如遗传学上功能重要的多态性位点。此外, 还可以在转染本文所示的质粒的基础上共转同源臂, 同源臂的设计根据自己的需求, 从而获得各种基因型确定的细胞, 但是这种方法的效率较低。

针对*XIST*的敲除, 传统的方法是利用Cre-LoxP重组酶系统进行大片段的缺失, 相对来说难度大、效率低。本文的方法无法像Cre-LoxP重组酶系统一样使得*XIST*完全不表达, 但是其操作更容易。Matoba等^[17]和Oikawa等^[32]使用siRNA针对小鼠的*XIST*进行了敲低, 这种方法会在某一时期敲低*XIST*, 但并非如针对基因组的编辑可以使*XIST*长期低表达。对于需要大量使用某种敲低或者敲除的细胞进行实验的情况, 采用CRISPR/Cas9技术建立相应的细胞系是更好的选择。

参考文献 (References)

- 1 Lyon M. Gene action in the X-chromosome of the mouse (*Mus musculus* L.). *Nature* 1961; 190: 372-3.
- 2 BEUTLER E, YEH M, FAIRBANKS VF. The normal human female as a mosaic of X-chromosome activity: Studies using the gene for C-6-PD-deficiency as a marker. *Proc Natl Acad Sci USA* 1962; 48: 9-16.
- 3 OHNO S, KAPLAN WD, KINOSITA R. Formation of the sex chromatin by a single X-chromosome in liver cells of *Rattus norvegicus*. *Exp Cell Res* 1959; 18: 415-8.
- 4 Clemson CM, McNeil JA, Willard HF, Lawrence JB. *XIST* RNA paints the inactive X chromosome at interphase: Evidence for

- a novel RNA involved in nuclear/chromosome structure. *J Cell Biol* 1996; 132(3): 259-75.
- 5 Jeon Y, Lee Jeannie T. YY1 tethers *XIST* RNA to the inactive X nucleation center. *Cell* 2011; 146(1): 119-33.
- 6 Kalantry S, Purushothaman S, Bowen RB, Starmer J, Magnuson T. Evidence of *XIST* RNA-independent initiation of mouse imprinted X-chromosome inactivation. *Nature* 2009; 460(7255): 647-51.
- 7 Simon MD, Pinter SF, Fang R, Sarma K, Rutenberg-Schoenberg M, Bowman SK, *et al.* High-resolution *XIST* binding maps reveal two-step spreading during X-chromosome inactivation. *Nature* 2013; 504(7480): 465-9.
- 8 Ganesan S, Silver DP, Greenberg RA, Avni D, Drapkin R, Miron A, *et al.* BRCA1 supports *XIST* RNA concentration on the inactive X chromosome. *Cell* 2002; 111(3): 393-405.
- 9 Kawakami T, Okamoto K, Ogawa O, Okada Y. *XIST* unmethylated DNA fragments in male-derived plasma as a tumour marker for testicular cancer. *Lancet* 2004; 363(9402): 40-2.
- 10 Richardson AL, Wang ZC, de Nicolo A, Lu X, Brown M, Miron A, *et al.* X chromosomal abnormalities in basal-like human breast cancer. *Cancer Cell* 2006; 9(2): 121-32.
- 11 Kawakami T, Okamoto K, Sugihara H, Hattori T, Reeve AE, Ogawa O, *et al.* The roles of supernumerical X chromosomes and *XIST* expression in testicular germ cell tumors. *J Urol* 2003; 169(4): 1546-52.
- 12 Yildirim E, Kirby JE, Brown DE, Mercier FE, Sadreyev RI, Scadden DT, *et al.* *XIST* RNA is a potent suppressor of hematologic cancer in mice. *Cell* 2013; 152(4): 727-42.
- 13 Lessing D, Anguera MC, Lee JT. X chromosome inactivation and epigenetic responses to cellular reprogramming. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2013; 14: 85-110.
- 14 Penny GD, Kay GF, Sheardown SA, Rastan S, Brockdorff N. Requirement for *XIST* in X chromosome inactivation. *Nature* 1996; 379(6561): 131-7.
- 15 Csankovszki G, Panning B, Bates B, Pehrson JR, Jaenisch R. Conditional deletion of *XIST* disrupts histone macroH2A localization but not maintenance of X inactivation. *Nat Genet* 1999; 22(4): 323-4.
- 16 Marahrens Y, Panning B, Dausman J, Strauss W, Jaenisch R. *XIST*-deficient mice are defective in dosage compensation but not spermatogenesis. *Genes Dev* 1997; 11(2): 156-66.
- 17 Matoba S, Inoue K, Kohda T, Sugimoto M, Mizutani E, Ogonuki N, *et al.* RNAi-mediated knockdown of *XIST* can rescue the impaired postimplantation development of cloned mouse embryos. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108(51): 20621-6.
- 18 李铁民. RNA介导干扰原核细胞适应性免疫. *细胞生物学杂志* (Li Tiemin. Prokaryotic adaptive immunity mediated by RNA interference system. *Chinese Journal of Cell Biology*) 2008; 30(3): 287-90.
- 19 Sapranaukas R, Gasiunas G, Fremaux C, Barrangou R, Horvath P, Siksnys V. The *Streptococcus thermophilus* CRISPR/Cas system provides immunity in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res* 2011; 39(21): 9275-82.
- 20 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.
- 21 Hendrich BD, Plenge RM, Willard HF. Identification and characterization of the human *XIST* gene promoter: Implications for models of X chromosome inactivation. *Nucleic Acids Res* 1997; 25(13): 2661-71.
- 22 Cradick TJ, Fine EJ, Antico CJ, Bao G. CRISPR/Cas9 systems targeting β -globin and CCR5 genes have substantial off-target activity. *Nucleic Acids Res* 2013; 41(20): 9584-92.
- 23 Hsu PD, Scott DA, Weinstein JA, Ran FA, Konermann S, Agarwala V, *et al.* DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nat Biotechnol* 2013; 31(9): 827-32.
- 24 Fu Y, Foden JA, Khayter C, Maeder ML, Reyon D, Joung JK, *et al.* High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. *Nat Biotechnol* 2013; 31(9): 822-6.
- 25 Ran FA, Hsu Patrick D, Lin CY, Gootenberg Jonathan S, Konermann S, Trevino AE, *et al.* Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell* 2013; 154(6): 1380-9.
- 26 Tsai SQ, Wyvekens N, Khayter C, Foden JA, Thapar V, Reyon D, *et al.* Dimeric CRISPR RNA-guided FokI nucleases for highly specific genome editing. *Nat Biotechnol* 2014; 32(6): 569-76.
- 27 Duan J, Lu G, Xie Z, Lou M, Luo J, Guo L, *et al.* Genome-wide identification of CRISPR/Cas9 off-targets in human genome. *Cell Res* 2014; 24(8): 1009-12.
- 28 Smith C, Gore A, Yan W, Abalde-Atristain L, Li Z, He C, *et al.* Whole-genome sequencing analysis reveals high specificity of CRISPR/Cas9 and TALEN-based genome editing in human iPSCs. *Cell Stem Cell* 2014; 15(1): 12-3.
- 29 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.
- 30 Ding Q, Regan Stephanie N, Xia Y, Ostrom Leonie A, Cowan Chad A, Musunuru K. Enhanced efficiency of human pluripotent stem cell genome editing through replacing TALENs with CRISPRs. *Cell Stem Cell* 2013; 12(4): 393-4.
- 31 Yang L, Guell M, Byrne S, Yang JL, De Los Angeles A, Mali P, *et al.* Optimization of scarless human stem cell genome editing. *Nucleic Acids Res* 2013; 41(19): 9049-61.
- 32 Oikawa M, Matoba S, Inoue K, Kamimura S, Hirose M, Ogonuki N, *et al.* RNAi-mediated knockdown of *XIST* does not rescue the impaired development of female cloned mouse embryos. *J Reprod Dev* 2013; 59(3): 231-7.