

技术与方法

运用改良的CRISPR/Cas9系统建立*HtrA2*敲除细胞株

胡袁 张婷 姜长安*

(四川大学生物治疗国家重点实验室/生物治疗协同创新中心, 成都 610041)

摘要 能识别特定基因组DNA序列的核酸酶是基因编辑的重要工具。在单链RNA引导下,来源于一种产脓链球菌的成簇规律间隔短回文重复(clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR)关联蛋白(CRISPR-associated protein 9, Cas9)能够发挥其核酸酶功能对基因组特定序列进行剪切。这种功能依赖于单链引导RNA(single-guide RNAs, sgRNAs或gRNAs)中20 nt的核心靶向序列。在该研究中,作者对已有的CRISPR/Cas9系统载体进行了优化,简化了gRNA表达载体的构建。运用优化后的CRISPR/Cas9系统,我们敲除了HEK293T细胞中*HtrA2*基因的第一个外显子。这一改进大幅度降低了CRISPR/Cas9技术的使用成本。

关键词 CRISPR/Cas9; *HtrA2*; 基因敲除

Generation of *HtrA2* Knockout Cell Line with An Improved CRISPR/Cas9 System

Hu Yuan, Zhang Ting, Jiang Chang'an*

(State Key Laboratory of Biotherapy/Collaborative Innovation Center of Biotherapy, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

Abstract Sequence-specific nucleases are powerful tools for genome editing. The RNA-guided Cas9 nuclease from *Streptococcus pyogenes* can be effectively targeted to genomic loci and generate DNA breaks. The site-specific DNA cleavages of Cas9 rely on the core 20 nt targeting sequences within its guide RNA (sgRNA or gRNA). In this paper, we describe a modified version of the CRISPR/Cas9 system, which significantly simplifies the construction of gRNA expression vectors. Using this system, we have efficiently generated *HtrA2* knockout HEK293T cells by removing the first exon of the gene. This improvement significantly reduces the cost associated with the genome editing using CRISPR/CAS9 system.

Key words CRISPR/Cas9; *HtrA2*; knockout

随着我国人口老龄化趋势越来越明显,帕金森氏病(Parkinson's disease, PD)的发病率也不断升高,因此研究它的发病机制具有非常重要的意义。研究表明,线粒体功能受损是帕金森氏病发病的重要特

征之一。已知的遗传性帕金森氏病相关蛋白HtrA2就在线粒体功能的维持中发挥了重要作用^[1]。HtrA2又称为Omi,是一种线粒体丝氨酸蛋白酶,由核基因组编码,在细胞质中翻译合成后在其N-端的线粒体定位序列的帮助下转运至线粒体内外膜间隙中,剪切形成成熟形式的HtrA2。在小鼠中,含有S276C点突变*HtrA2*基因的*Mnd2*(motor neuron degeneration 2)小鼠表现出明显的帕金森氏病表型,如体重减轻、肌肉萎缩、神经元减少等^[2]。*HtrA2*完全敲除的小鼠中也表现出类似的症状,并且在小鼠出生30 d左右后死亡^[3]。这些数据均证明,HtrA2具有重要的

收稿日期: 2014-08-21 接受日期: 2014-10-09

国家自然科学基金(批准号: 31171333)资助的课题

*通讯作者。Tel: 028-85503905, E-mail: cjcareer@qq.com

Received: August 21, 2014 Accepted: October 9, 2014

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31171333)

*Corresponding author. Tel: +86-28-85503905, E-mail: cjcareer@qq.com

网络出版时间: 2014-12-01 19:24

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.12.0270.html>

神经元保护功能, 但是其具体的保护机制尚未研究清楚。由于*HtrA2*敲除小鼠在出生不久后死亡, 而*HtrA2*敲除的MEF细胞也难以长期存活, 为了进一步研究*HtrA2*在线粒体中的作用, 有必要建立完全敲除*HtrA2*基因的细胞株。

最近, 有研究者发现一种细菌来源的成簇规律间隔短回文重复关联蛋白(clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR; CRISPR-associated protein 9, Cas9)系统^[4-15], 可以在单链引导RNA(gRNA)的帮助下定位至指定的基因组序列, 进行基因组修饰。CRISPR/Cas9系统一般由Cas9表达载体和gRNA表达载体构成。虽然它非常高效, 但构建gRNA表达载体往往比较费时。在本研究中, 我们对空白gRNA表达载体进行了改进, 简化了gRNA载体的构建过程。运用这一系统, 我们能高效地在HEK293T细胞中切除*HtrA2*第一外显子, 建立完全不表达*HtrA2*的细胞株。这一工作为进一步研究*HtrA2*在线粒体中的功能和机制奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 试剂和仪器

Cas9表达质粒购自灵动生物技术有限公司; 限制性内切酶购自NEB公司; 质粒提取及胶回收试剂盒购自OMEGA公司; Direct PCR Kit购自FORE-GENE公司; 序列合成购自金唯智生物技术公司; 引物合成及测序均由上海生工生物技术公司完成; 转染试剂MegaTran 1.0购自Origene公司; *HtrA2*抗体购自武汉三鹰生物技术有限公司; β -tubulin购自正能生物技术公司; CO₂培养箱购自Sanyo公司; 恒温金属浴器材购自Eppendorf公司; PCR仪购自Bio-Rad公司; Western blot电泳槽购自Bio-Rad公司; 其他生化试剂均为国产分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 质粒构建 合成U6-gRNA *Bsa* I-*EcoR* I-*Bsa* I序列时在其两端分别加上*Hind* III和*Xba* I酶切位点, 利用相应的限制性内切酶酶切目的基因片段以及预先清除了*Bsa* I酶切位点的pBSK载体, pBSK(Δ lB), 用T4连接酶将目的基因片段连入表达载体。将连接产物转化入感受态DH5 α 中, 并将其均匀涂在相应抗性的LB-琼脂糖平板上, 37 °C培养, 待长出菌落后, 挑取单克隆摇菌, 最后提取质粒并用*Hind* III和*Xba* I进行酶切检测目的基因片段是否连入。

1.2.2 细胞培养及转染 HEK293T细胞培养液为DMEM完全培养基, 其中含有10%胎牛血清和1% Penicillin-Streptomycin Solution(PS), 培养箱环境为37 °C和5% CO₂。在转染前12 h将HEK293T细胞(购自灵动生物技术有限公司)按1 \times 10⁵/孔接种至24孔板中, 转染时细胞密度达到50%~60%, 将Cas9、gRNA T1、gRNA T2表达质粒分别按500 ng、250 ng、250 ng用MegaTran 1.0共转染, 转染操作按照MegaTran1.0说明书进行。

1.2.3 Western blot检测 蛋白样品经10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后, 通过湿转法将蛋白转移到PVDF膜上, 电压为55 V。转膜2 h后用含5%脱脂奶粉的PBST封闭1 h, 然后孵育兔抗*HtrA2*抗体, 4 °C孵育过夜, 移去一抗, PBST洗膜3次, 用Dylight 680荧光标记的羊抗兔二抗在室温孵育1 h, 二抗孵育后用PBST洗3次。最后用Li-Cor Odyssey红外激光成像系统检测*HtrA2*蛋白表达情况。

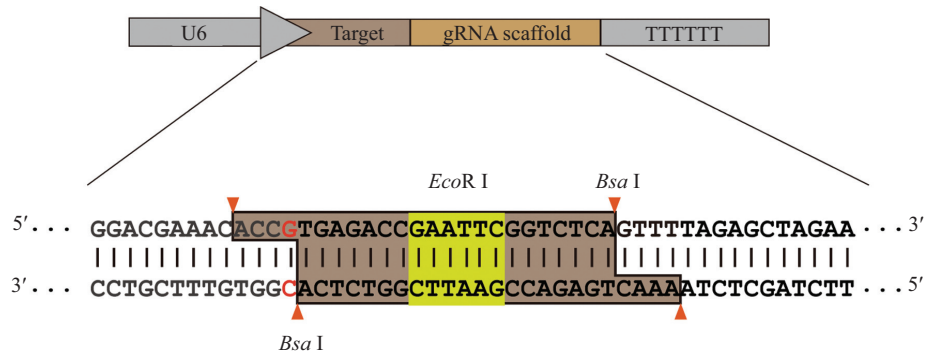
2 结果

2.1 gRNA表达载体的设计

在传统的sgRNA表达系统中, U6启动子起始转录位点需要碱基G^[9], 在设计gRNA时需在基因组上寻找GN₁₉NGG这种形式的靶点^[11], 我们优化了gRNA的表达系统, 在设计gRNA表达载体时在U6启动子后加上一个碱基G(图1), 并在两个*Bsa* I酶切位点之间引入*EcoR* I位点便于成功连接gRNA后检测。将合成的U6-gRNA-*Bsa* I-*EcoR* I-*Bsa* I序列克隆至已预先清除了*Bsa* I酶切位点的pBSK载体pBSK(Δ lB)中。引入U6启动子起始碱基G之后, gRNA靶点选择范围大大增加, 可以打靶到基因组上任意包含N₁₉NGG序列的位点上。

2.2 gRNA靶点的选择及其序列的合成

依据文献报道的gRNA靶点设计方法^[6], 在*HtrA2*基因组第一个外显子N-端、C-端分别设计一个gRNA(Target 1, T1; Target 2, T2), 在T1、T2 gRNA的介导下, Cas9定位至相应的基因组位点并发挥其核酸酶功能, 剪切掉*HtrA2*基因组第一个外显子(图2)。设计标准为: (1)长19 nt的寡核苷酸gRNA核心序列按N₁₉NGG序列设计; (2)正义链5'端添加序列ACCG, 反义链5'端添加序列AAAC, 分别与pBSK(Δ lB)-U6-gRNA-*Bsa* I-*EcoR* I-*Bsa* I经*Bsa* I酶切后所产生的黏性末端互补(图1), 合成gRNA序列(表

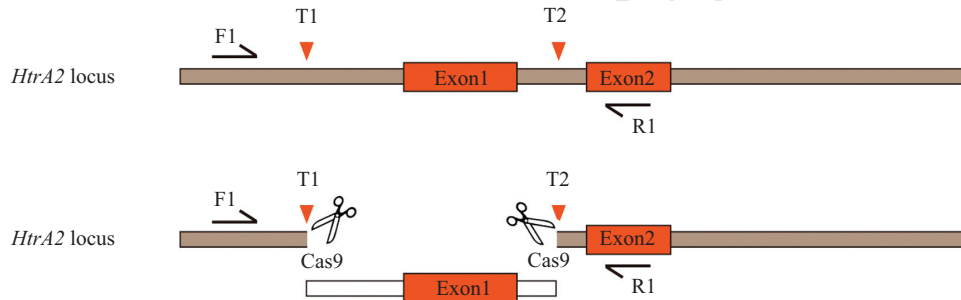


在gRNA表达载体的U6启动子后含有转录起始碱基G(红色), 将含有gRNA序列的双链DNA片段连入Bsa I酶切后的pBSK(delB)-U6-gRNA-Bsa I-EcoR I-Bsa I载体中, 两个Bsa I酶切位点之间的EcoR I(黄色)位点用于连接后检测。

The gRNA expression vector contains the transcription initiation G (red) after the U6 promoter. The annealed oligos containing the targeting sequence of gRNA could be ligated with the pBSK(delB)-U6-gRNA-Bsa I-EcoR I-Bsa I vector predigested with Bsa I. The EcoR I site (yellow) between the two Bsa I sites was used for identification.

图1 Cas9和gRNA表达载体示意图

Fig.1 Schematic diagram of the Cas9 and gRNA expression vectors



T1和T2为打靶第一外显子的gRNAs, F1、R1为敲除第一外显子的鉴定引物。

T1 and T2 were gRNAs targeting Exon1. F1 and R1 were the PCR primers used for the verification of Exon1 deletion.

图2 用CRISPR/Cas9敲除HtrA2第一外显子

Fig.2 CRISPR/Cas9-mediated deletion of the Exon1 of HtrA2 gene

表1 用于构建gRNA表达载体的引物序列

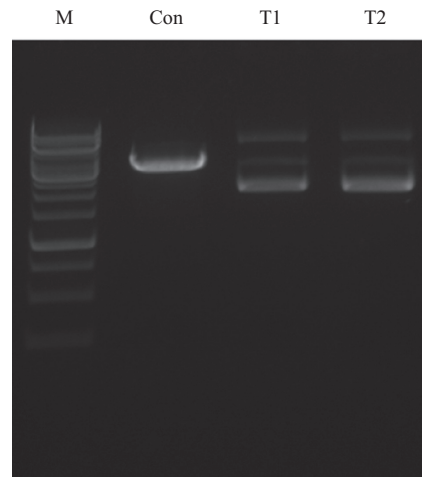
Table 1 Oligonucleotide sequences used to generate gRNA expression vectors

引导RNA	寡核苷酸序列
gRNA	Oligonucleotide sequence
T1F	5'-TCT GAA GGA CTT CAG GTA C-3'
T1R	3'-AGA CTT CCT GAA GTC CAT G-5'
T2F	5'-TGT GCT TTC CCT CCA TTT C-3'
T2R	3'-ACA CGA AAG GGA GGT AAA G-5'

1)。合成HtrA2第一外显子敲除鉴定引物: F1: 5'-AGT CCT GAG GCG CGC CGG AAG-3'; R1: 5'-GGC GTT GGT GAC AAT GAG CCC-3'。

2.3 pBSK(delB)-U6-gRNA T1、T2载体构建

将合成的gRNA引物退火(升温至98 °C, 3 min后降至室温), 连入经Bsa I酶切回收的pBSK(delB)-U6-gRNA-Bsa I-EcoR I-Bsa I载体, 转化至DH5α中, 挑取单克隆用EcoR I酶切鉴定, 成功连入gRNA序列

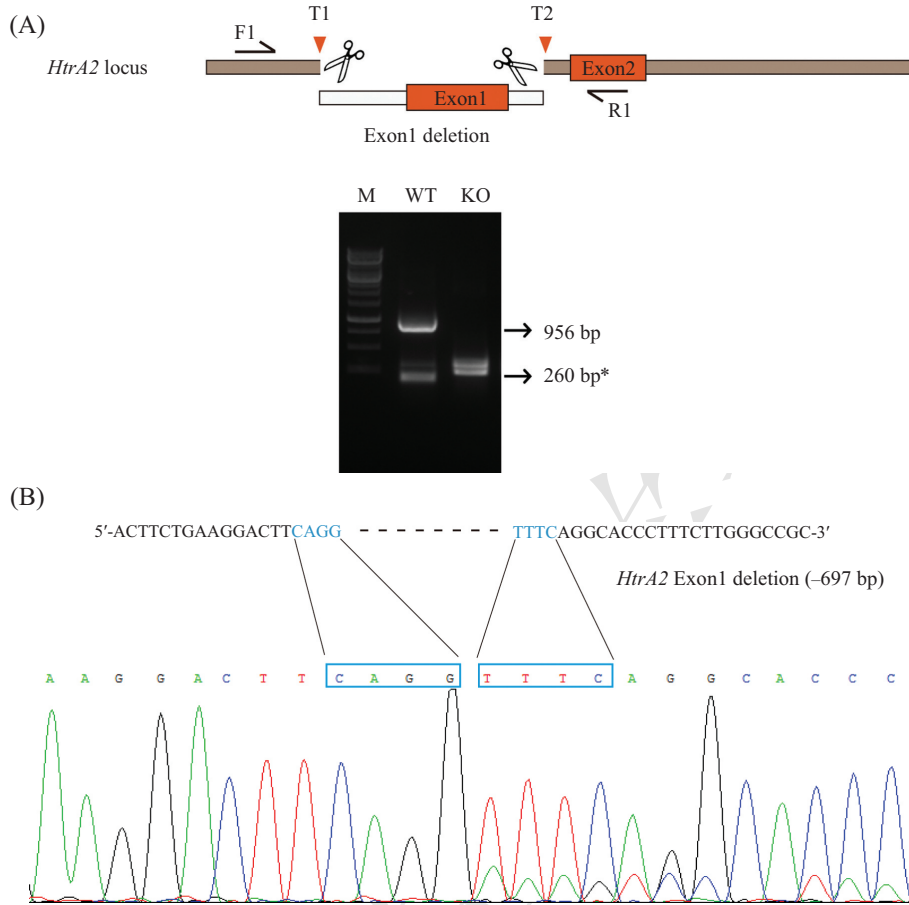


成功连入gRNA序列的载体不能被EcoR I切成线性。M: DNA marker; Con: 对照; T1/T2: 连入T1/T2 gRNA序列的gRNA表达载体。

Eliminating the EcoR I site in the gRNA expression vector after the insertion of the targeting sequence. M: DNA marker; Con: control; T1/T2: T1/T2 gRNA targeting vector.

图3 EcoR I酶切鉴定gRNA表达载体

Fig.3 Identification of the gRNA expression vectors with EcoR I



A: 基因组PCR鉴定*HtrA2* Exon1敲除的细胞株,用敲除鉴定引物F1/R1 PCR鉴定Exon1的敲除情况,野生型(WT)的细胞株序列扩增长度为956 bp,敲除*HtrA2* Exon1(KO)的扩增长度约为260 bp。“*”表示非特异性PCR条带。B: 将PCR鉴定*HtrA2* Exon1(KO)敲除细胞的产物克隆至pBSK(delB)中,测序,T1、T2位点之间的697 bp的序列缺失。

A: genomic PCR analysis of the cells with *HtrA2* Exon1 deleted. The PCR product of wild type cell line was 956 bp, and that of knock-out cell line was about 260 bp. “*” means non-specific PCR band. B: cloning and sequencing the PCR product, result showed 697 bp deletion between T1 and T2 target.

图4 鉴定*HtrA2* Exon1敲除的细胞株

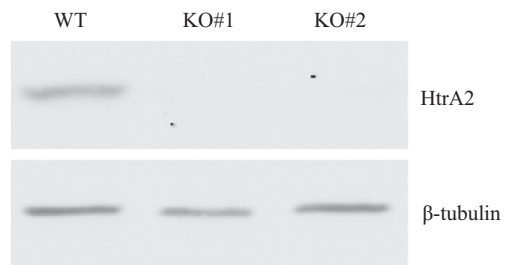
Fig.4 Identification the cell lines with *HtrA2* Exon1 deleted

的质粒不能被*EcoR* I切成线性(图3)。再经测序验证连入的序列正确。

2.4 建立*HtrA2* Exon1敲除的单克隆细胞株

将Cas9、gRNA T1、gRNA T2共转染入HEK293T细胞中。48 h后消化计数,有限稀释细胞,将单细胞接种至96孔板中。待细胞在96孔板中长满至70%后取少量细胞用Direct PCR Kit扩增第一外显子序列,鉴定是否敲除。初步鉴定*HtrA2* Exon1敲除后将PCR产物克隆至pBSK(delB)中测序,与原基因组序列进行比对,检测*HtrA2*第一外显子是否敲除成功。

成功敲除*HtrA2*第一外显子的序列长度约为260 bp,野生型的扩增序列长度为956 bp(图4A)。将扩增的PCR产物克隆至pBSK(delB)中测序比对,确认*HtrA2* Exon1的靶向敲除效果(图4B)。



敲除*HtrA2* Exon1的细胞株(KO#1、KO#2)HtrA2表达缺失;WT:野生型细胞株;β-tubulin:内参。

HtrA2 expression is undetectable in the Exon1 knockout cell lines (KO#1、KO#2); WT: wide type cell line; β-tubulin was served as the loading control.

图5 WB检测*HtrA2* Exon1敲除后HtrA2的表达
Fig.5 The expression of HtrA2 in *HtrA2* Exon1 targeted cell line

2.5 Western blot检测*HtrA2* Exon1敲除后HtrA2的表达

PCR测序鉴定之后, 选取*HtrA2* Exon1敲除的细胞株扩增, 用1×SDS上样buffer收样。Western blot检测表明, *HtrA2* Exon1敲除的细胞株中HtrA2蛋白表达完全缺失(图5)。

3 讨论

HtrA2在维持线粒体稳态中发挥了重要作用, 因此, HtrA2与神经退行性疾病的发生发展密切相关, 而*HtrA2*敲除小鼠在出生后30 d左右就会死亡, 这限制了对其保护线粒体机制的研究。因此, 建立稳定敲除*HtrA2*的细胞株有助于研究其具体功能。

当前, 随着CRISPR/Cas9系统的发现, 基因组编辑的效率越来越高。其原理是Cas9在长20 nt的核心序列引导下特异地打靶到含GN₁₉NGG的基因组中^[9]。在传统的gRNA表达载体设计中, U6启动子后的起始碱基须为G, 所以在选择打靶位点时受到一定的限制。本研究对CRISPR/Cas9系统进行了优化, 在设计gRNA表达载体时在U6启动子后引入了碱基G, 使Cas9可以打靶到任意包含N₁₉NGG序列的基因组中, 扩大了靶点选择范围。运用优化后的CRISPR/Cas9系统, 我们把Cas9同时特异性地打靶到*HtrA2*第一外显子两端, 得到了特异性敲除其第一外显子的稳定细胞株。我们的实验结果不仅简化了CRISPR/Cas9系统的使用, 也为研究HtrA2的线粒体保护机制提供了重要的细胞模型。

参考文献 (References)

- Vande Walle L, Lamkanfi M, Vandenabeele P. The mitochondrial serine protease HtrA2/Omi: An overview. *Cell Death Differ* 2008; 15(3): 453-60.
- Strauss KM, Martins LM, Plun-Favreau H, Marx FP, Kautzmann S, Berg D, *et al.* Loss of function mutations in the gene encoding Omi/HtrA2 in Parkinson's disease. *Hum Mol Genet* 2005; 14(15): 2099-111.
- Martins LM, Morrison A, Klupsch K, Fedele V, Moiso N, Teismann P, *et al.* Neuroprotective role of the Reaper-related serine protease HtrA2/Omi revealed by targeted deletion in mice. *Mol Cell Biol* 2004; 24(22): 9848-62.
- Deveau H, Garneau JE, Moineau S. CRISPR/Cas system and its role in phage-bacteria interactions. *Annu Rev Microbiol* 2010; 64: 475-93.
- Horvath P, Barrangou R. CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. *Science* 2010; 327(5962): 167-70.
- Makarova KS, Haft DH, Barrangou R, Brouns SJ, Charpentier E, Horvath P, *et al.* Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol* 2011; 9(6): 467-77.
- Bhaya D, Davison M, Barrangou R. CRISPR-Cas systems in bacteria and archaea: Versatile small RNAs for adaptive defense and regulation. *Annu Rev Genet* 2011; 45: 273-97.
- 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.
- 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.
- Jinek M, East A, Cheng A, Lin S, Ma E, Doudna J. RNA-programmed genome editing in human cells. *Elife* 2013; 2: e00471.
- Cho SW, Kim S, Kim JM, Kim JS. Targeted genome engineering in human cells with the Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nat Biotechnol* 2013; 31(3): 230-2.
- Jiang W, Bikard D, Cox D, Zhang F, Marraffini LA. RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems. *Nat Biotechnol* 2013; 31(3): 233-9.
- Wang H, Yang H, Shivalila CS, Dawlaty MM, Cheng AW, Zhang F, *et al.* One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell* 2013; 153(4): 910-8.
- Chang N, Sun C, Gao L, Zhu D, Xu X, Zhu X, *et al.* Genome editing with RNA-guided Cas9 nuclease in zebrafish embryos. *Cell Res* 2013; 23(4): 465-72.
- Shen B, Zhang J, Wu H, Wang J, Ma K, Li Z, *et al.* Generation of gene-modified mice via Cas9/RNA-mediated gene targeting. *Cell Res* 2013; 23(5): 720-3.
- 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.