

技术与方法

基于CRISPR/Cas9技术的GATA-1基因敲除K562细胞系的构建

于海川^{1,2*} 吴 娇^{2,3} 翟鹏飞⁴ 姚瑞宁¹ 马月月¹ 隋 娟¹¹新乡医学院医学检验学院, 新乡 453003; ²河南省分子诊断与医学检验技术协同创新中心, 新乡 453003;³新乡医学院医学药学院, 新乡 453003; ⁴河南师范大学体育学院, 新乡 453007)

摘要 GATA-1(GATA binding protein-1)在造血分化过程是最重要的转录调控因子, 在红细胞和巨核细胞中特异性高表达, 并通过调节相关基因的转录在红系和巨核系造血细胞的分化发育过程中发挥重要作用。该研究采用CRISPR/Cas9技术将K562细胞中的GATA-1基因敲除, 建立了GATA-1基因敲除K562细胞株。首先, 设计了4个CRISPR的靶向位点, 利用pGL3-U6-sgRNA-PGK-puromycin质粒构建了4个导向RNA(single guide RNA, sgRNA)载体。利用电穿孔的方法将sgRNA载体与Cas9载体pST1374-NLS-flag-linker-Cas9共转K562细胞。转染48 h, 经定点PCR和T7EN1内切酶酶切鉴定后, 采用细胞有限稀释法嘌呤霉素筛选, 定点测序和Western blot检测结果显示, 成功构建了GATA-1基因敲除K562细胞株, 命名为K562-KO GATA-1。使用联苯胺染色和流式细胞术的方法检测血型糖蛋白A(glycophorin A, CD235a)发现, 与正常K562细胞相比, K562-KO GATA-1细胞株经Hemin诱导红系分化明显受到抑制。综上, 该研究建立了敲除GATA-1的K562细胞系, 可用于后续的造血分化相关研究。

关键词 CRISPR/Cas9技术; K562细胞; GATA-1基因; 红系分化

Construction of GATA-1 Knockout K562 Cell Line by CRISPR/Cas9 Technology

Yu Haichuan^{1,2*}, Wu Jiao^{2,3}, Zhai Pengfei⁴, Yao Ruining¹, Ma Yueyue¹, Sui Juan¹

¹School of Laboratory Medicine, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, China; ²Henan Collaborative Innovation Center of Molecular Diagnosis and Laboratory Medicine, Xinxiang 453003, China; ³School of Pharmacy, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, China; ⁴Institute of Physical Education, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China)

Abstract GATA-1 (GATA binding protein-1) is a critical transcription factor which is essential for hematopoiesis differentiation. GATA-1 has specific high expression in the red blood cells and megakaryocyte, and promotes erythroid differentiation and megakaryocytopoiesis through activating related genes expression. The objective of this study is to construct a GATA-1 knockout cell line using CRISPR/Cas9 technique. Firstly, four

收稿日期: 2015-12-20 接受日期: 2016-03-28

国家自然科学基金项目(批准号: 31301135)和河南省教育厅科学技术研究重点项目(批准号: 14B320015)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0373-3832183, E-mail: 1522591758@163.com

Received: December 20, 2015 Accepted: March 28, 2016

This work was supported by the National Natural Sciences Foundation of China (Grant No.31301135) and Science and Technology Research Key Project in Education Department of Henan (Grant No.14B320015)

*Corresponding author. Tel: +86-373-3832183, E-mail: 1522591758@163.com

网络出版时间: 2016-05-27 10:08:22

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20160527.1008.004.html>

CRISPR target sites were designed, and the single guide RNA (sgRNA) expression vectors were constructed by pGL3-U6-sgRNA-PGK-puromycin vector. K562 cells were cotransfected with the different sgRNA vector and Cas9 vector (pST1374-NLS-flag-linker-Cas9), respectively. After 48 hours of transfection, genomic DNA was extracted and mutation sites were identified by site-directed PCR and T7EN1 enzyme reaction. The K562 cells with *GATA-1* knockout (K562-KO *GATA-1*) were screened with puromycin. The results of sequencing and Western blot indicated that K562-KO *GATA-1* included the nucleotide sequence mutation in the No.2 sites. Furthermore, the marked decrease in benzidine-positive cells and the decreased expression of CD235a in K562-KO *GATA-1* cells occurred during Hemin-induced erythroid differentiation. In a word, a K562-KO *GATA-1* cell lines were constructed, and the cell lines could be a valuable tool for the study of hematopoietic differentiation.

Keywords CRISPR/Cas9 technique; K562 cells; *GATA-1* gene; erythroid differentiation

近年来,基因组编辑技术的快速发展为生命科学带来了新的契机,DNA序列的插入、敲除、定点突变及组合编辑等有助于基因功能与调控元件的深入研究^[1]。目前,主要的基因组编辑技术有3种:转录激活样效应因子核酸酶(transcription activator-like effector nuclease,TALEN)技术、锌指核酸酶(zinc-finger nuclease,ZFN)技术和成簇规律间隔短回文重复(clustered regulatory interspaced short palindromic repeat,CRISPR)技术^[2]。CRISPR/Cas9(CRISPR-associated 9)是一种由RNA指导Cas核酸酶9对靶向基因进行特定DNA修饰的技术。具有引导作用的单链RNA(single guide RNA,sgRNA)引导核酸酶Cas9蛋白质在与sgRNA配对的靶位点处剪切双链DNA,引起DNA双链断裂,进而利用生物体内非同源末端连接(non-homologous end joining,NHEJ)或同源性重组(homologous recombination,HR)机制修复DNA,重新连接断裂处的基因组DNA,并引入插入或缺失突变。在无外源的同源DNA存在时,切割的DNA可以通过NHEJ,从而在切割位点引入碱基删除、插入或替换,引起移码突变以实现目的基因的敲除;在有同源片段存在的条件下,切割的DNA发生HR,将外源片段整合到基因组中,以实现基因的敲除、敲入及突变等。该技术以其操作简单、特异性高的特点已成为当前研究热点^[3-6]。

GATA-1(*GATA* binding protein-1,又名Ery-1、NF-E1、NF-1、GF-1)是*GATA*家族的一员,为最重要的、目前研究最为透彻的造血转录因子。它在成熟红细胞、巨核细胞、肥大细胞和嗜酸性粒细胞的发育中都有表达。在造血分化过程中,*GATA-1*能够

促进红系和巨核细胞的分化,对粒细胞和肥大细胞形成也有影响^[7-8]。已有研究表明,*GATA-1*对于正常红细胞的生成是必需的^[9]。*GATA-1*缺失的胚胎干细胞在嵌合子小鼠中不能分化为成熟红细胞^[9]。*GATA-1*缺失导致原红细胞阶段发生阻滞在原红阶段^[10],并且阻滞的前体细胞发生凋亡^[11],*GATA-1*敲除的小鼠在E10死于严重贫血。K562细胞是一种红白血病细胞系,能够在Hemin的诱导下向红系分化,主要表达 α -珠蛋白、 ϵ -珠蛋白和 γ -珠蛋白,并能够检测到CD235a的表达增加,联苯胺染色可以确定其红系分化程度。因此,K562细胞是研究红系造血分化调节机制的最佳细胞模型^[12]。本研究采用CRISPR/Cas9技术对K562细胞中*GATA-1*基因进行了成功的敲除,并利用Hemin诱导的K562细胞红系分化验证了*GATA-1*蛋白质对红系细胞分化的重要作用。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 细胞、菌株和质粒 K562细胞株由本实验室保存,DH5 α 感受态菌株购自北京全式金生物技术有限公司(货号:CD201-02)。pGL3-U6-sgRNA-PGK-puromycin载体(#51133)和pST1374-NLS-flag-linker-Cas9载体(#44758)均购自Addgene公司(图1A和图1B)。

1.1.2 主要试剂和仪器 *GATA1*抗体(ab181544)和 β -actin抗体(6609-1-Ig)分别购自Abcam公司和Proteintech公司。辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠(ZB-5305)和山羊抗兔(ZB-5301)购自北京中杉

金桥生物技术有限公司。蛋白分子量标准(26616)购自Thermo Fisher Scientific公司。流式CD235a抗体(12-9987)为eBioScience公司产品。RPMI 1640培养基(31800-022)、Opti-MEM培养基(31985-070)和胎牛血清(10099-141)均购自Gibco公司。嘌呤霉素(puromycin)、青霉素(penicillin)、链霉素(streptomycin)、DMSO、氯化血红素(Hemin)均购自Sigma公司。细胞培养器皿均购自Corning公司。BCA蛋白质定量试剂盒(CW0014)购自康为世纪生物技术有限公司。PVDF膜和ECL化学发光试剂盒(WBKLS0500)购自Millipore公司。*Bsa* I酶购自NEB公司。基因组提取试剂盒(DP304)购自天根生化科技(北京)有限公司。QIAGEN Plasmid Maxi Kit(12162)购自QIAGEN公司。

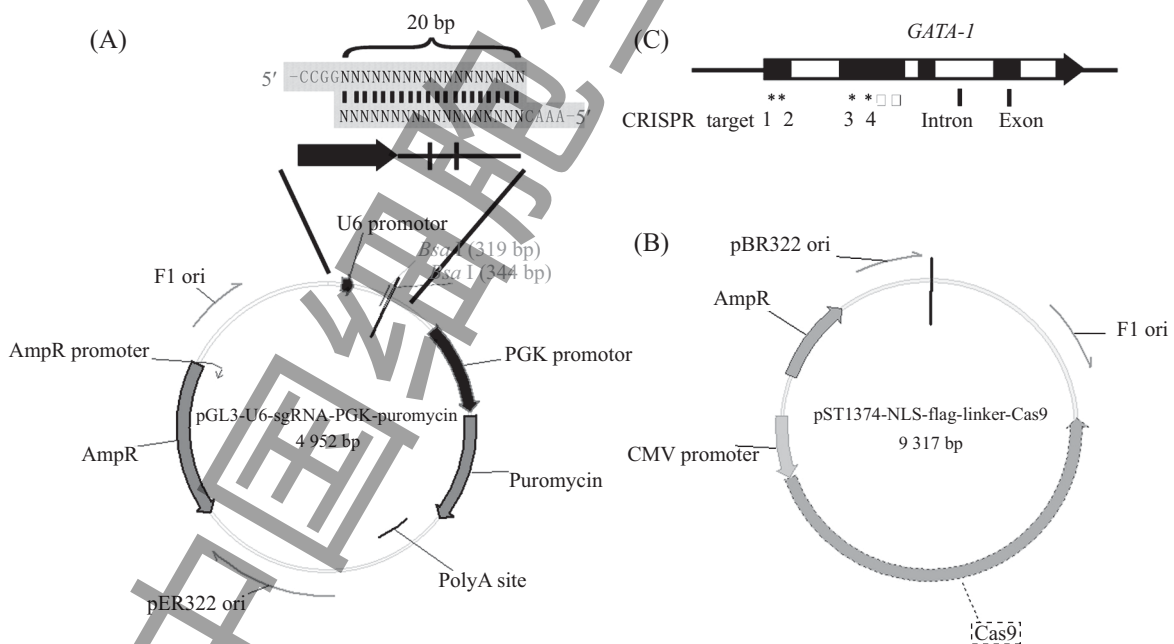
实验所用主要仪器有: 冷冻台式离心机(Sigma公司, 德国)、PCR仪(Eppendorf公司, 德国)、MilliQ Plus超纯水系统(Millipore公司, 德国)、流式细胞仪(BD公司, 美国)、荧光显微镜及照相系统(Nikon公司, 日本)、CO₂培养箱(Thermo Scientific公司, 美国)、-80 °C冰箱(Sanyo公司, 日本)以及Model

CUY21EX电穿孔仪(BEX公司, 日本)等。

1.2 实验方法

1.2.1 CRISPR载体的构建

在人*GATA-1*基因(ID: 2623)的合适位点选择sgRNA的靶向序列, 鉴于CRISPR可能出现脱靶效应, 本研究针对*GATA-1*基因设计了4对sgRNA的靶向序列引物(图1)。首先, 使用*Bsa* I酶将sgRNA载体pGL3-U6-sgRNA-PGK-puromycin进行酶切线性化, 线性化的载体两端将产生不同的黏性末端。根据被*Bsa* I酶切后的sgRNA载体的特点设计靶向序列引物, sgRNA的上游引物5'端均为CCG G, 下游引物5'端均为AAA C, 上下游引物其余部分为反向互补序列。将sgRNA的上下游引物进行变性、退火(10 μL反应体系: 100 μmol/L的上下游引物各2.5 μL+1 μL NEB buffer2+4 μL去离子水; 95 °C, 5 min; 95 °C至25 °C按2 °C/s梯度逐步降温退火至室温)。利用T4连接酶将退火的sgRNA上下游引物和线性化的sgRNA载体连接(连接体系包括: 3 μL退火产物、1 μL sgRNA载体线性化产物、1 μL T4 Ligation buffer、0.5 μL T4 Ligase、4.5 μL灭菌水), 16 °C孵育过夜。转化DH5α感受态细胞, Amp⁺



A: sgRNA载体pGL3-U6-sgRNA-PGK-puromycin结构示意图; B: Cas9载体pST1374-NLS-flag-linker-Cas9结构示意图; C: 构建sgRNA载体的引物位点分别位于*GATA-1*基因第一和第二外显子。

A: sgRNA vector, pGL3-U6-sgRNA-PGK-puromycin; B: Cas9 vector, pST1374-NLS-flag-linker-Cas9; C: the four primers were designed against the first and second exon of *GATA-1* gene, respectively.

图1 CRISPR/Cas9双载体系统以及*GATA-1*基因敲除位点的设计

Fig.1 Schematic diagram of CRISPR vectors and CRISPR target sites of *GATA-1* gene

平板筛选后,用U6启动子测序引物(5'→3': GAC TAT CAT ATG CTT ACC GT)进行测序鉴定阳性克隆。对阳性菌株进行37 °C摇床过夜培养并用QIAGEN Plasmid Maxi Kit抽提质粒。

1.2.2 细胞培养与转染 K562细胞培养于含10%胎牛血清的RPMI 1640培养基中,培养条件为37 °C、5% CO₂及饱和湿度。本研究使用日本BEX公司的Model CUY21EX电穿孔仪,电穿孔转染法按我们以前的方法^[13]进行操作:K562细胞培养至密度70%~80%时,1 000 r/min离心5 min,弃上清液,收集细胞,重悬于少量Opti-MEM中。取细胞悬液10 μL进行计数,调整细胞密度为10⁴/μL。取25 μL细胞悬液,向细胞悬液中加入2.5 μg的sgRNA重组载体pGL3-U6-sgRNA-PGK-puromycin和2.5 μg Cas9载体pST1374-NLS-flag-linker-Cas9充分混合均匀,选择合适的电穿孔条件电击细胞(穿孔电压150 V、20 ms,驱动电压20 V、3 ms,5个循环),同时电转PEGFP-N1作为荧光对照。电穿孔后10 min转入含10%胎牛血清的RPMI 1640培养基的6孔板中,在37 °C、5% CO₂中培养48 h后,在荧光显微镜下观察检测PEGFP-N1转染效率。

1.2.3 基因敲除细胞的筛选 T7EN1酶切检测:使用细胞基因组提取试剂盒对转染48 h和未转染的K562细胞提取基因组。使用T7EN1鉴定引物H-GATA1 sg12-F和H-GATA1 sg12-R及H-GATA1 sg34-F和H-GATA1 sg34-R(表1),分别以各种基因

组DNA为模板进行PCR,使用DNA纯化试剂盒对PCR产物进行纯化,各取200 ng变性、退火(95 °C、5 min,95 °C至25 °C按2 °C/s梯度逐步降温退火至室温),然后使用T7EN1(NEB、M0302L)酶切30 min,并用2.5%的琼脂糖胶电泳检测。将T7EN1鉴定后的含*GATA-1*基因敲除K562细胞转入96孔板中进行培养,10% FBS的RPMI 1640培养基中加入筛选浓度的嘌呤霉素(1 μg/mL),对K562细胞进行有限梯度稀释,直至显微镜下每个视野只能见到单一细胞。在维持1 μg/mL嘌呤霉素筛选压力下,培养2~4周,挑取嘌呤霉素抗性K562细胞扩大培养备用。

1.2.4 筛选细胞的鉴定 Western blot鉴定方法如下。室温1 000 r/min离心5 min,收集细胞,预冷的PBS洗涤2次,6孔板每孔细胞(约10⁶个)沉淀重悬于100 μL冰预冷的RIPA缓冲液,摇晃吹打30 min使其充分裂解,4 °C低温离心机中以12 000 r/min离心5 min,离心后的上清即为蛋白质样本,吸入到新的洁净EP管中,采用BCA法测定蛋白质浓度,加入加样缓冲液后分装置于-80 °C超低温冰箱保存备用。进行SDS-PAGE电泳时,蛋白质上样量为20 μL,电泳完成后,依次进行PVDF膜转膜、牛奶封闭、孵育一抗、洗膜、孵育二抗、洗膜、显色及X光胶片显影,用UVP凝胶成像系统的软件对结果进行灰度值分析。用β-actin作内参对蛋白质进行相对定量测序鉴定,方法如下。针对本研究的4个*GATA-1*基因

表1 引物列表

Table 1 List of primers

	引物名称 Primer name	引物序列(5'→3') Primer sequences (5'→3')	
<i>GATA-1</i> sgRNA targeted	H-GATA-1 sgRNA-1-F	CCG GGT CCT CCA CAC CAG AAT CAG	
	H-GATA-1 sgRNA-1-R	AAA CCT GAT TCT GGT GTG GAG GAC	
	H-GATA-1 sgRNA-2-F	CCG GGC TGC TGC ATC CAA GCC CTC	
	H-GATA-1 sgRNA-2-R	AAA CGA GGG CTT GGA TGC AGC AGC	
	H-GATA-1 sgRNA-3-F	CCG GCA TTG CTC AAC TGT ATG GAG	
	H-GATA-1 sgRNA-3-R	AAA CCT CCA TAC AGT TGA GCA ATG	
	H-GATA-1 sgRNA-4-F	CCG GCA GGC CGT GGA AGA TCT GGA	
	H-GATA-1 sgRNA-4-R	AAA CTC CAG ATC TTC CAC GGC CTG	
	CRISPR site	H-GATA-1 sg12-F	GAG ACG GGA GAA AGA CAG G
		H-GATA-1 sg12-R	TAG GGC AAC CAC CAC ATA C
H-GATA-1 sg34-F		AGT TGT CGA GTG ATC CGT GG	
H-GATA-1 sg34-R		TTT ACT TTG GGC CAC CCC TC	

CRISPR的靶向序列, 我们设计了2个位置的测序引物(表1), 对转染后的K562细胞提基因组DNA, 使用这2个测序引物进行测序, 分别判定4个位点的核苷酸序列是否发生改变。

1.2.5 红系分化相关实验 红系分化相关实验按照我们以前方法进行^[14]。使用50 μmol/L Hemin分别诱导正常的K562细胞和*GATA-1*基因敲除的K562细胞向红系分化。并使用联苯胺染色和流式细胞技术检测红系分化的情况。联苯胺染色步骤如下。向50 μL联苯胺溶液中加入1 μL过氧化氢混匀即为染色液; 取少量细胞, 离心收集, PBS洗1遍后, 100 μL PBS重悬细胞; 取81 μL上述细胞悬液加入9 μL染色液混匀后, 室温放置3~5min; 取部分细胞涂片观察或计数, 一般计200个细胞, 算出其中的阳性细胞百分比。流式细胞术检测红系分化标志物CD235a的操作步骤如下。收集K562细胞, 4 °C 2 000 r/min离心5 min; 用预冷的PBS洗细胞2次; 去除上清液, 加入100 μL PBS悬浮细胞; 除阴性对照细胞外, 每份细胞分别加入对应流式抗体(CD235a及其同型对照均为100倍稀释后加入20 μL); 4 °C孵育30 min, 期间轻摇晃均匀; 离心去上清, 并用PBS清洗细胞2次; 去上清, 加入400 μL PBS悬浮细胞; 300目筛网过滤生成单细胞悬液; 用于流式细胞分析。

1.2.6 统计学分析 实验数据以平均值±标准误(mean±S.D.)表示, 采用SPSS 19.0统计分析软件进行数据分析, 两组间的比较采用*t*检验, *P*<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CRISPR sgRNA载体的构建

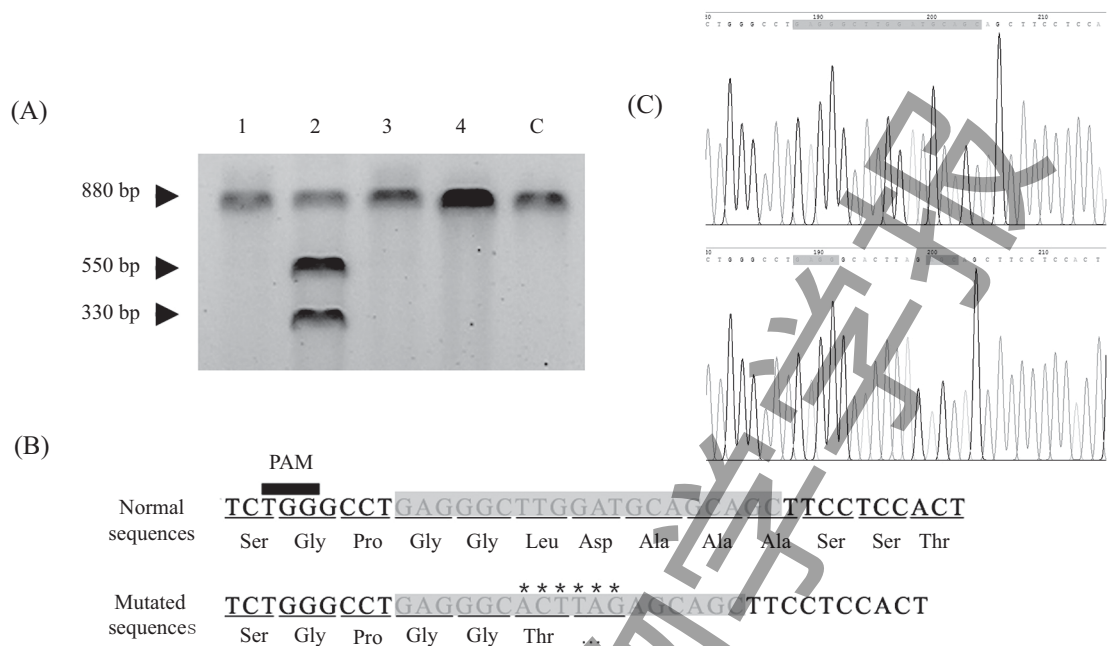
针对人*GATA-1*基因(ID: 2623)选择了4个sgRNA的靶向序列位点。如图1C所示, 靶位点1和2位于*GATA-1*基因的第二个外显子, 靶位点3和4位于第二个外显子。sgRNA正反向引物的退火后分别和经BsaI酶线性化的sgRNA载体pGL3-U6-sgRNA-PGK-puromycin连接, 测序鉴定后构建成功了4个*GATA-1*基因敲除相关的CRISPR sgRNA载体, 大量提取质粒, 并将4种重组载体分别命名为GATA-1-sgRNA-1、GATA-1-sgRNA-2、GATA-1-sgRNA-3、GATA-1-sgRNA-4。

2.2 *GATA-1*基因敲除K562细胞的建立、筛选及鉴定

本研究使用电穿孔的方法将2.5 μg的sgRNA重组载体GATA-1-sgRNA-1、GATA-1-sgRNA-2、GATA-1-sgRNA-3、GATA-1-sgRNA-4分别和2.5 μg的Cas9载体pST1374-NLS-flag-linker-Cas9共转K562细胞。转染后继续培养48 h, 使用细胞基因组提取试剂盒对转染和未转染的K562细胞提取基因组, 分别以各种基因组DNA为模板, 使用CRISPR位点鉴定引物H-GATA-1 sg12-F和H-GATA-1 sg12-R对位点1和位点2进行PCR, 使用H-GATA-1 sg34-F和H-GATA-1 sg34-R对位点3和位点4进行PCR(表1), 2种PCR产物分别纯化后, 各取200 ng用T7EN1酶切30 min, 并用2.5%的琼脂糖胶电泳检测。如图2A所示, 只有共转染了GATA-1-sgRNA-2载体和pST1374-NLS-flag-linker-Cas9载体的细胞能够被T7EN1酶切成约550 bp和330 bp的两条带, 1号、3号、4号位点并未被酶切开, 也即本研究所设计的4个CRISPR位点只有2号位点突变成功。

为了得到*GATA-1*基因敲除的K562细胞株, 我们利用有限稀释法在96孔板中对T7EN1酶切鉴定后的2号位点有突变的K562细胞进行嘌呤霉素(1 μg/mL)筛选, 细胞被梯度稀释至显微镜下每个视野只能见到单一细胞。在维持筛选1 μg/mL嘌呤霉素压力下, 培养2~4周, 挑取嘌呤霉素抗性K562细胞扩大培养备用。将存活的嘌呤霉素耐受的K562细胞群分别进行基因组提取, 并使用鉴定引物H-GATA-1 sg12-F和H-GATA-1 sg12-R进行扩增, 得到的PCR产物送测序, 使用测序引物为正向鉴定引物H-GATA-1 sg12-F。测序结果如图2B, 本研究所得到的嘌呤霉素抗性K562细胞群有2种测序结果, 其中有部分测序为正常*GATA-1*序列, 而另一部分为存在突变序列, 该突变为2号CRISPR突变位点上碱基“TTG GAT GC”被突变为“ACT TAG”。根据三联体密码子的阅读顺序, 突变后的*GATA-1*基因在1个Thr后出现了终止密码子TAG而终止编码。

本研究同时对嘌呤霉素筛选后的K562细胞群提取蛋白质, 进行Western blot鉴定。如图3A所示, 我们所检测的5个嘌呤霉素抗性K562细胞群中, 4、5号细胞群没有发现GATA-1蛋白质表达, 而1、2、3

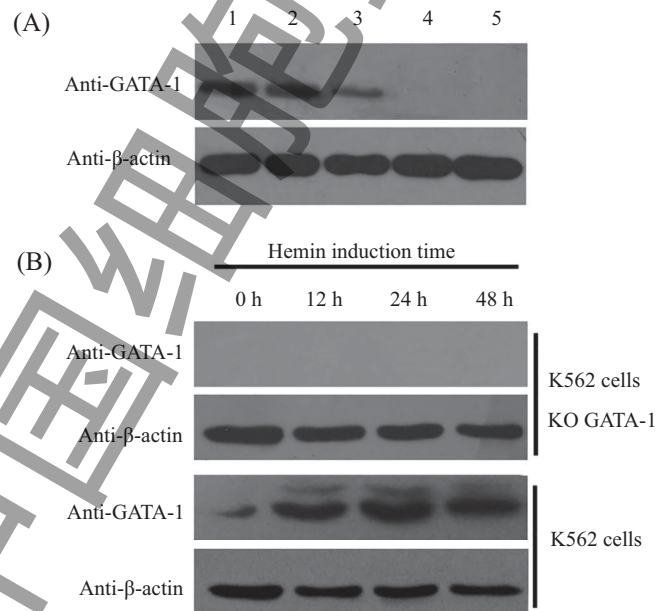


A: T7EN1酶鉴定突变体, 1、2、3、4、C分别代表转染了GATA-1-sgRNA-1、2、3、4和pGL3-U6-sgRNA-PGK-puromycin的K562细胞。测序图谱B和测序峰图C显示第2个突变位点发生了突变, *代表突变碱基, PAM代表Cas9识别位点。

A: T7EN1 enzyme was employed to identify the mutation in the sgRNA sites. The agarose gel electrophoresis showed that the second site was mutated and cut to three bands by T7EN1. 1, 2, 3, 4, C were used on behalf of the transfected K562 cells with GATA-1-sgRNA-1, 2, 3, 4 and control (pGL3-U6-sgRNA-PGK-puromycin). Black arrowheads indicated fragment sizes for each bands. B and C: the sequencing results of the 2 sgRNA site in *GATA-1* gene were shown. Gray area indicated the CRISPR sgRNA domain and * represented the mutated sites. PAM means the identified site in Cas9.

图2 序列分析检测GATA-1-sgRNA-2的靶向敲除效果

Fig.2 The targeted knockout effect of GATA-1-sgRNA-2 measured by sequencing

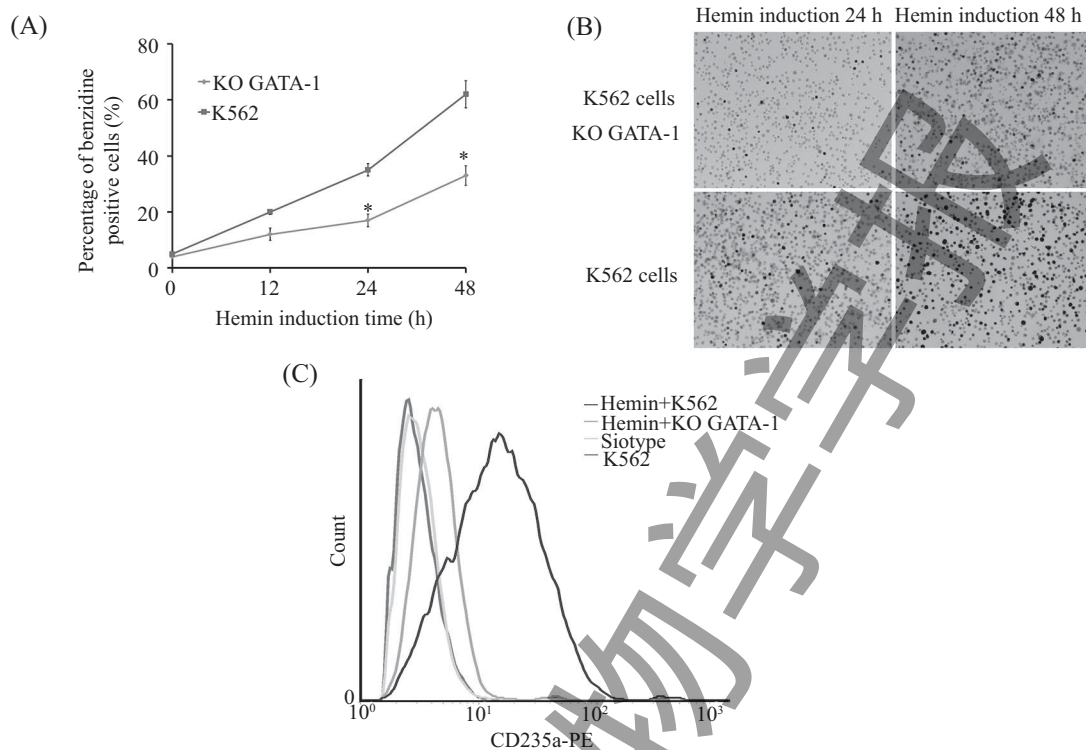


A: 不同嘌呤霉素筛选K562细胞株中GATA-1蛋白表达情况; B: Hemin诱导红系分化过程中GATA-1基因突变K562细胞和正常K562细胞中GATA-1蛋白表达情况。

A: GATA-1 protein level was measured in five K562 cells clones; B: during Hemin-induced K562 erythroid differentiation.

图3 Western blot检测K562细胞中GATA-1蛋白的表达水平

Fig.3 Expression of GATA-1 protein level in K562 cells



A: *GATA-1*基因敲除前后, K562细胞Hemin诱导过程中联苯胺染色的阳性细胞率分析。* $P < 0.05$, 与K562细胞比较。B: K562细胞Hemin红系诱导24 h、48 h联苯胺染色细胞图片。C: 流式分析联苯胺诱导48 h后K562细胞红系表面标志CD235a。

A: Benzidine staining of K562 cells with or without KO *GATA-1*. The percentage of benzidine-positive cells in each group was counted following Hemin induction periods of 0, 12, 24 or 48 h. Data were obtained from three independent experiments, and error bars represent standard deviation. * $P < 0.05$ compared with K562 cells. B: representative benzidine staining of knockout and normal K562 cells that were Hemin-induced for 24 or 48 h. C: flow cytometric analysis of K562 cells with anti-glycophorin A (CD235a) antibodies after 48 h of Hemin induction.

图4 *GATA-1*基因敲除对Hemin诱导K562细胞红系分化的影响

Fig.4 Knockout of *GATA-1* inhibits erythroid differentiation of K562 cells

号细胞群仍然有GATA-1蛋白质表达。Western blot结果与测序结果完全吻合, 1、2、3号细胞群基因组测序为正常*GATA-1*序列, 而4、5号细胞群基因组测序为突变*GATA-1*序列。至此, 我们利用CRISPR/Cas9技术得到了2号位点突变导致GATA-1蛋白质表达提前终止的*GATA-1*基因敲除(KO *GATA-1*)K562细胞株。

2.3 *GATA-1*基因敲除对K562细胞红系分化的影响

K562细胞经Hemin诱导向红系分化, 联苯胺染色可以确定红系分化程度, 诱导后的K562细胞的联苯胺染色阳性细胞明显增加, 且颜色加深。分别对正常K562细胞和*GATA-1*基因敲除(KO *GATA-1*)K562细胞进行Hemin诱导, 并于诱导0 h、12 h、24 h、48 h收集K562细胞提取总蛋白, 使用Abcam公司的GATA-1抗体(ab181544)和Proteintech公司的 β -actin抗体(6609-1-Ig)通过Western blot的方法来检

测GATA-1的蛋白水平的变化。由图3B可见, 在正常K562细胞红系分化过程中, GATA-1的蛋白水平随红系分化逐渐增加, 而*GATA-1*基因敲除后的K562在Hemin诱导过程中GATA-1蛋白始终没有表达。

为了观察*GATA-1*基因敲除对Hemin诱导的K562细胞红系分化的影响, 我们对正常K562细胞和*GATA-1*基因敲除K562细胞进行Hemin诱导, 使之向红系分化, 分别在12 h、24 h和48 h收集细胞, 进行联苯胺染色, 分析细胞中的血红蛋白含量。在Hemin诱导各个时间点, *GATA-1*基因敲除会使K562细胞联苯胺染色阳性细胞百分数比明显降低。图4A说明KO *GATA-1*能够抑制Hemin诱导的K562细胞红系分化。图4B为Hemin诱导24 h和48 h不同处理的K562细胞经联苯胺染色照片, 由图可以直观地看出敲除*GATA-1*基因后的K562细胞无论Hemin诱导24 h还是48 h联苯胺染色阳性细胞均少于对照组。

CD235a是红系特异的细胞表面分子,它们是红系分化的重要标志。为了进一步说明GATA-1在红系分化中的重要作用,我们用流式细胞术检测了K562细胞中CD235a的表达。如图4C所示,不同处理的K562细胞经Hemin诱导48 h后,CD235a的同型对照和阴性对照基本重合在一起,表明标记抗体的特异性很好而非特异性标记完全可以忽略。KO GATA-1后的K562细胞的CD235a的荧光强度明显低于对照组,荧光峰图相对于对照有明显的左移。总之,KO GATA-1减少了红系表面标志CD235a的量,这些都说明GATA-1基因对红系分化有重要作用。

3 讨论

GATA-1是研究最为充分的造血转录因子,为红系特异核蛋白的转录因子,与此后陆续发现的GATA-2、GATA-3、GATA-4、GATA-5、GATA-6一起构成GATA家族,该家族为锌指结构家族的转录因子^[15]。GATA-1的活性调控方式包括自调控及与其他蛋白质相互作用而产生的调控。GATA-1能通过C-端或N-端锌指与其自身相互作用形成二聚体,招募染色质重塑复合物调控启动子活性进而形成正向自调控^[16]。此外,GATA-1与其他蛋白质相互作用实现对其翻译后修饰,GATA-1能被乙酰基转移酶p300和CREB结合蛋白(CREB binding protein, CBP)乙酰化^[17],MAPK和PI3K参与细胞因子IL-3和Epo诱导的GATA-1特异位点磷酸化,从而影响GATA-1的活性^[18],核环锌指蛋白PIASy(protein inhibitor of activated STAT 4)能够与GATA-1发生相互作用并且促进GATA-1的SUMO化,明显抑制GATA-1的活性^[19]。

GATA-1促进红系分化及细胞发育成熟与激活特异基因的转录有关。GATA-1的靶基因众多,包括: α -球蛋白和 β -球蛋白^[20]、血红蛋白生物合成酶^[21]、促红细胞生成素(erythropoietin, Epo)与Epo受体(erythropoietin receptor, EpoR)^[22]、编码抗凋亡蛋白Bcl-XL^[23]等,几乎所有红系特异性基因的转录调控区都含有GATA-1的DNA结合基序(A/T)GA TA(A/G)。GATA-1还可以抑制细胞周期蛋白如Cyclin D2和Cdk6(cyclin-dependent kinase 6)的表达,激活细胞周期抑制因子,如p18^{INK4C}和p27^{Kip1}的

转录^[24]。GATA-1能够调控多种造血相关转录因子,如Gfi1b、EKLf和NF-E2等^[25]。GATA-1可与许多种蛋白质发生相互作用,如FOG1(FOG family member 1)、PIASy、RB(retinoblastoma)、EKLf(erythroid kruppel-like factor 1)、PU.1(Spi-1 proto-oncogene)、p300/CBP和p53等^[26]。这些相互作用通过活化或抑制GATA-1活性及其靶基因表达,在血细胞的生成中发挥着重要的作用。

基因编辑技术是人们认识基因功能的钥匙。近年来,基因编辑技术主要是通过核酸酶在DNA靶位点引起DNA双链断裂,激活细胞内非同源末端连接和同源重组机制,对靶位点DNA进行修复。规律成簇的间隔短回文重复(CRISPR)与内切酶Cas9的组合,这一系统的关键是基因组的靶序列中有长约20 bp的片段与sgRNA互补配对;靶序列末端的保守的间隔相邻基序(proto-spacer adjacent motifs, PAM)为Cas9识别位点(5'-NGG-3')^[27-28]。CRISPR/Cas9技术的诞生使得人们能够方便而精确地对DNA和核苷酸序列进行编辑,在整个生命科学研究领域掀起了一场“风暴”,该技术也被Science杂志评为2013年度十大科技进展之一。

CRISPR/Cas9成功与否的关键在于sgRNA的设计,sgRNA的特异性决定了脱靶效率,特别是靠近PAM的8~10 bp不能和非目的区有高同源性。按sgRNA的设计原则,靶位点应该遵从以下几个原则。一是位于基因的外显子,便于目的片段的缺失或移框突变,最好在不同的各种剪切形式的共有外显子。二是与ATG起始子离开一定距离,防止转录会从下游另一个ATG开始而出现一个被截短的基因形式。三是位于整个基因的前半段,最好在基因的功能结构域中。四是选择相隔一定距离(10~30 bp)成对的位点,利于形成特异性的片段缺失,也有利于降低脱靶效应。五是优先选择5'-GGN(19~21)GG-3'的序列,在UCSC或NCBI的数据库中用BLAT或BLAST sgRNA的靶向序列以确定该序列唯一,减少潜在的脱靶位点。此外,也可以使用在线设计软件,如麻省理工学院的CRISPR Design(<http://CRISPR.mit.edu/>)、德国癌症研究中心的E-Crisp(<http://www.e-crisp.org/E-CRISP/designcrispr.html>)、北京大学生物信息中心的Cas9 Design(<http://cas9.cbi.pku.edu.cn/>)。K562

为悬浮细胞, 转染难度大、效率低一直是制约基因重组技术的难点。针对普通脂质体转染效率低, 而慢病毒包装操作繁琐等问题, 本研究使用了日本BEX公司的Model CUY21EX电穿孔仪, 操作简单、转染率比较高。该方法通过高强度穿孔电脉冲引发细胞膜的结构发生一过性改变, 致膜上出现短暂可逆性亲水性孔道, 多次驱动电压从而促进质粒大分子物质进入细胞内。与以往的电穿孔技术相比, 本方法关键改进技术是脉冲电压和脉冲时间的设置, 通过多次优化我们找到了合适的电穿孔条件电击细胞(穿孔电压150 V、20 ms, 驱动电压20 V、3 ms, 5个循环), 此外转染缓冲液、细胞密度和核酸浓度对电穿孔转染效率也有影响。通过PEGFP-N1质粒为对照, 我们发现, 使用本方法转染后的K562细胞存活率和转染效率较好。CRISPR/Cas9构建稳定株的另一个关键步骤是嘌呤霉素抗性筛选和阳性细胞株的鉴定, 我们使用了T7EN1酶切PCR鉴定, 之后运用有限稀释法和1 $\mu\text{mol/L}$ 后运用L嘌呤霉素抗性筛选, 通过4周维持该筛选压力的细胞培养, 挑取嘌呤霉素抗性K562单个细胞扩大培养。

总之, CRISPR/Cas9技术刚刚使用几年已经点燃了新的基因编辑的火焰, 让我们一起期待Cas9技术在生物技术和医学等诸多生物学领域里创造出更多的奇迹吧。本研究采用CRISPR/Cas9技术建立了敲除GATA-1的K562细胞系, 为进一步构建GATA-1敲除的干细胞实验体系, 脊索动物门斑马鱼实验体系以及更高等的哺乳动物小鼠等提供实验体系依据, 可用于后续的造血分化相关研究。

参考文献 (References)

- 1 Agrotis A, Ketteler R. A new age in functional genomics using CRISPR/Cas9 in arrayed library screening. *Front Genet* 2015; 6(300): 1-15.
- 2 Zhang F, Wen Y, Guo X. CRISPR/Cas9 for genome editing: Progress, implications and challenges. *Hum Mol Genet* 2014; 23(R1): R40-6.
- 3 Horii T, Hatada I. Genome editing using mammalian haploid cells. *Int J Mol Sci* 2015; 16(10): 23604-14.
- 4 Dow LE. Modeling disease *in vivo* with CRISPR/Cas9. *Trends Mol Med* 2015; 21(10): 609-21.
- 5 Torres-Ruiz R, Rodriguez-Perales S. CRISPR-Cas9: A revolutionary tool for cancer modelling. *Int J Mol Sci* 2015; 16(9): 22151-68.
- 6 卢利莎, 白杨, 刘鑫, 王洪涛, 高洁, 杨亦青, 等. 利用CRISPR/Cas9技术构建敲除MEIS2基因的HEK293T人胚肾细胞系. *中国细胞生物学学报*(Lu Lisha, Bai Yang, Liu Xin, Wang Hongtao, Gao Jie, Yang Yiqing, *et al.* Construction of MEIS2 knockout HEK293T cell line by CRISPR/Cas9 technology. *Chinese Journal of Cell Biology*) 2015; 37(4): 1-7.
- 7 Songdej N, Rao AK. Hematopoietic transcription factor mutations and inherited platelet dysfunction. *F1000Prime Rep* 2015; 7(66): 1-6.
- 8 Kaushansky A, Kaushansky K. Systems biology of megakaryocytes. *Adv Exp Med Biol* 2014; 844(12): 59-84.
- 9 Pevny L, Simon MC, Robertson E, Klein WH, Tsai SF, D'Agati V, *et al.* Erythroid differentiation in chimaeric mice blocked by a targeted mutation in the gene for transcription factor GATA-1. *Nature* 1991; 349(6306): 257-60.
- 10 Weiss MJ, Keller G, Orkin SH. Novel insights into erythroid development revealed through *in vitro* differentiation of GATA-1 embryonic stem cells. *Genes Dev* 1994; 8(10): 1184-97.
- 11 Weiss MJ, Orkin SH. Transcription factor GATA-1 permits survival and maturation of erythroid precursors by preventing apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92(21): 9623-7.
- 12 Rutherford TR, Clegg JB, Weatherall DJ. K562 human leukaemic cells synthesise embryonic haemoglobin in response to haemin. *Nature* 1979; 280(5718): 164-5.
- 13 隋娟, 张高丽, 李平法, 于海川. 电穿孔转染法与脂质体转染法对K562和HepG2细胞转染效率的影响. *新乡医学院学报*(Sui Juan, Zhang Gaoli, Li Pingfa, Yu Haichuan. Effect of lipofectin and electroporation transfection method on cells transfection efficiency of K562 and HepG2 cells. *Journal of Xinxiang Medical University*) 2015; 8: 698-701.
- 14 Yu HC, Zhao HL, Wu ZK, Zhang JW. Eos negatively regulates human gamma-globin gene transcription during erythroid differentiation. *PLoS One* 2011; 6(7): e22907.
- 15 Stachura DL, Chou ST, Weiss MJ. Early block to erythromegakaryocytic development conferred by loss of transcription factor GATA-1. *Blood* 2006; 107(1): 87-97.
- 16 Nishikawa K, Kobayashi M, Masumi A, Lyons SE, Weinstein BM, Liu PP, *et al.* Self-association of Gata1 enhances transcriptional activity *in vivo* in zebra fish embryos. *Mol Cell Biol* 2003; 23(22): 8295-305.
- 17 Boyes J, Byfield P, Nakatani Y, Ogrzyzko V. Regulation of activity of the transcription factor GATA-1 by acetylation. *Nature* 1998; 396(6711): 594-8.
- 18 Towatari M, Ciro M, Ottolenghi S, Tsuzuki S, Enver T. Involvement of mitogen-activated protein kinase in the cytokine-regulated phosphorylation of transcription factor GATA-1. *Hematol J* 2004; 5(3): 262-72.
- 19 Collavin L, Gostissa M, Avolio F, Secco P, Ronchi A, Santoro C, *et al.* Modification of the erythroid transcription factor GATA-1 by SUMO-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101(24): 8870-5.
- 20 Philipsen S, Pruzina S, Grosveld F. The minimal requirements for activity in transgenic mice of hypersensitive site 3 of the beta globin locus control region. *EMBO J* 1993; 12(3): 1077-85.
- 21 Shirihai OS, Gregory T, Yu C, Orkin SH, Weiss MJ. ABC-me: A novel mitochondrial transporter induced by GATA-1 during erythroid differentiation. *EMBO J* 2000; 19(11): 2492-502.

- 22 Imagawa S, Suzuki N, Ohmine K, Obara N, Mukai HY, Ozawa K, *et al.* GATA suppresses erythropoietin gene expression through GATA site in mouse erythropoietin gene promoter. *Int J Hematol* 2002; 75(4): 376-81.
- 23 Gregory T, Yu C, Ma A, Orkin SH, Blobel GA, Weiss MJ. GATA-1 and erythropoietin cooperate to promote erythroid cell survival by regulating bcl-xL expression. *Blood* 1999; 94(1): 87-96.
- 24 Whyatt DJ, Karis A, Harkes IC, Verkerk A, Gillemans N, Elefanty AG, *et al.* The level of the tissue-specific factor GATA-1 affects the cell-cycle machinery. *Genes Funct* 1997; 1(1): 11-24.
- 25 Laurent B, Randrianarison-Huetz V, Kadri Z, Romeo PH, Porteu F, Dumenil D. Gfi-1B promoter remains associated with active chromatin marks throughout erythroid differentiation of human primary progenitor cells. *Stem Cells* 2009; 27(9): 2153-62.
- 26 Trainor CD, Mas C, Archambault P, Di Lello P, Omichinski JG. GATA-1 associates with and inhibits p53. *Blood* 2009; 114(1): 165-73.
- 27 Sternberg SH, Redding S, Jinek M, Greene EC, Doudna JA. DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9. *Nature* 2014; 507(7490): 62-7.
- 28 Nishimasu H, Ran FA, Hsu PD, Konermann S, Shehata SI, Dohmae N, *et al.* Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA. *Cell* 2014; 156(5): 935-49.

中国细胞生物学