

技术与方法

利用CRISPR/Cas9技术建立诱导性敲除 *MEIS1*基因的HEK293T细胞株

张明智^{1#} 王梦鸽^{2#} 王洪涛² 苏培² 刘鑫² 张磊升² 刘翠翠² 王钰²
吴丹² 周家喜^{2*} 彭莎^{1*}

(¹西北农林科技大学动物医学院, 陕西省干细胞工程技术研究中心,
陕西省农业分子生物学重点实验室, 杨凌 712100; ²中国医学科学院, 北京协和医学院血液病医院
(血液学研究所), 实验血液学国家重点实验室, 天津 300020)

摘要 CRISPR/Cas9是新一代基因组编辑技术, 可简便快捷地在哺乳动物细胞对基因进行敲除、敲入。但常规的CRISPR/Cas9表达系统直接转染效果差、病毒包装效率低, 极大地限制了CRISPR/Cas9系统的广泛使用。该研究应用Tet-on系统, 建立了Dox诱导Cas9表达的293T细胞株, 命名为293T-iCas9。MEIS1(myeloid ectropic viral integration site 1)是TALE(three amino acid loop extension)同源域家族的转录因子, 其在白血病发生发展、胚胎造血系统发育及神经系统发育中有重要作用, 但其作用机制仍未完全明确。将靶向*MEIS1* Exon3的sgMEIS1表达载体转入293T-iCas9, SURVEYOR实验和Western blot检测结果表明, sgMEIS1有效地指导Cas9进行基因组编辑。最终经测序和Western blot结果证明, 成功建立了MEIS1敲除细胞株, 这为研究MEIS1的功能提供了重要的工具。

关键词 MEIS1; CRISPR/Cas9; iCas9; 基因敲除; HEK293T细胞

The Establishment of Inducible *MEIS1* Knockout HEK293T Cell Line by CRISPR/Cas9

Zhang Mingzhi^{1#}, Wang Mengge^{2#}, Wang Hongtao², Su Pei², Liu Xin², Zhang Leisheng², Liu Cuicui²,
Wang Yu², Wu Dan², Zhou Jiaxi^{2*}, Peng Sha^{1*}

(¹College of Veterinary Medicine, Shaanxi Stem Cell Engineering and Technology Research Center, Shaanxi Key Laboratory of
Molecular Biology for Agriculture, Northwest Agriculture and Forestry University, Yangling 712100, China;
²Stata Key Laboratory of Experimental Hematology, Institute of Hematology & Blood Diseases Hospital,
Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Tianjin 300020, China)

收稿日期: 2016-03-21 接受日期: 2016-06-13

国家自然科学基金(批准号: 31500949)、国家重大科学研究计划(批准号: 2012CB966403、2015CB964902)、北京协和医学院“协和青年基金”(批准号: 3332015128)、教育部留学回国人员启动经费(批准号: K308021501)、留学人员科技活动项目择优资助经费(批准号: A289021502)和西北农林科技大学基本科研业务费(批准号: 2452015034)资助的课题

[#]共同第一作者

^{*}通讯作者。Tel: 022-23909412, E-mail: zhoujx@ihcams.ac.cn; Tel: 029-87080069, E-mail: pengshacxh@163.com

Received: March 21, 2016 Accepted: June 13, 2016

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31500949), the National Basic Research Program of China (Grant No.2012CB966403, 2015CB964902), Peking Union Medical College Youth Research Fund Projects (Grant No.3332015128), Scientific Research Foundation for Returned Scholars, Ministry of Education of China (Grant No.K208021501), Technology Foundation for Selected Overseas Chinese (Grant No.A289021502) and the Fundamental Research Funds for Northwest & Forestry University (Grant No.245201534)

[#]These authors contributed equally to this work

^{*}Corresponding authors. Tel: +86-22-23909412, E-mail: zhoujx@ihcams.ac.cn; Tel: +86-29-87080069, E-mail: pengshacxh@163.com

网络出版时间: 2016-08-31 16:13:39

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20160831.1613.010.html>

Abstract CRISPR/Cas9 is a novel genome editing tool which enables rapid and highly efficient generation of biallelic knockout cell lines for loss-of-function studies, as well as homozygous knockin cell lines with specific nucleotide alterations for disease modeling. However, there are lots of limitations in common CRISPR/Cas9 system, such as low efficiency of direct transfection and virus packaging. In this study, we used a Tet-on system to establish an inducible genome-engineering platform which can express the Cas9 with Doxycycline treatment in HEK293T cell line named as 293T-iCas9 cell line. MEIS1, a transcription factor of TALE homeodomain family, plays important roles in leukemia, hematopoiesis and the nervous development. However, the mechanism by which MEIS1 regulates these processes remains unclear. We transfected a sgRNA expression vector targeting the Exon3 of MEIS1 into 293T-iCas9 cell line. SURVEYOR assay and Western blot results demonstrated that sgMEIS1 was able to edit genomic DNA at MEIS1 loci. MEIS1 knockout cell line had been derived successfully after further confirmation by sequencing and Western blot. It could be used as an important tool for further study of the function of MEIS1.

Keywords MEIS1; CRISPR/Cas9; iCas9; gene knockout; HEK293T

规律成簇间隔短回文重复/CRISPR相关蛋白9(clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated protein 9, CRISPR/Cas9)技术是新一代基因组编辑技术^[1], CRISPR/Cas9系统由sgRNA(single-guide RNA)^[2]与Cas9两部分组成。sgRNA通过碱基互补配对靶向基因组序列, Cas9核酸酶在sgRNA的特定指导下对基因组DNA进行切割并引起DNA双链断裂。细胞通过非同源末端连接或同源重组机制修复双链断裂, 引起阅读框移码或DNA片段替换, 达到基因敲除、位点突变、片段插入等目的, 该技术已被广泛应用到动物模型建立、哺乳动物发育研究中^[3-6]。目前, 常规的CRISPR/Cas9表达策略是将sgRNA与Cas9整合到一个表达载体上。但由于Cas9蛋白质编码序列约为4 100 bp, 致使同时表达sgRNA和Cas9的载体分子量过大, 而分子量大的载体直接转染效果差、病毒包装效率低以及转入细胞后的表达效率较低^[7-8], 这都限制了CRISPR/Cas9系统的广泛应用。同时, 常规方法中Cas9在细胞内的持续表达会引起Cas9的累积, 这可能增加脱靶效应的风险^[9]。可诱导的敲除技术通过可控的诱导表达Cas9蛋白质实现基因敲除, 可有效克服上述局限性。

髓细胞异位病毒整合位点(myeloid ectropic viral integration site, MEIS)家族包括MEIS1、MEIS2、MEIS3三个成员, 它们都属于TALE(three amino acid loop extension)同源域转录因子。在我们以往的研究中, 利用CRISPR/Cas9成功建立了MEIS2基因敲除的细胞株^[10]。MEIS家族中另一个成员MEIS1在白血病发生、神经发生和造血发生中有着重要的作用,

虽然其功能被广泛研究, 但作用机制仍不明确。因此, 本研究拟建立可诱导的MEIS1条件性敲除的细胞株并探索其发挥作用的机制。

本研究首先应用Tet-on系统^[11]构建了四环素(doxycycline, Dox)诱导Cas9表达的慢病毒载体pTight-Cas9-GFP-Puro, 并利用该载体建立了293T-iCas9细胞株。利用该293T-iCas9细胞株, 本研究成功对MEIS1基因进行了敲除, 为MEIS1基因功能和机制的研究奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株和质粒 HEK293T细胞株购自ATCC; pL-CRISPR.EFS.GFP(Catalog #57818)和pLKO5.sgRNA.EFS.RFP(Catalog #57823)购自Addgene公司; pLVX-Tight-Puro(Catalog #632162)购自Clontech公司; pSIN-EF1a-rtTA-neo为本实验室保存。

1.1.2 试剂及仪器 Oligo合成及测序由英潍捷基(Invitrogen)公司完成; Fugene HD购自Roche公司; FBS、丙酮酸钠、双抗购自Gibco公司; L-谷氨酰胺购自Invitrogen公司; DMEM购自Hyclone公司; 限制性内切酶购自NEB公司; 胶回收试剂盒、T4连接酶、T easy载体、质粒提取试剂盒购自Promega公司; Trans 5 α 感受肽购自Transgene公司; 基因组提取试剂盒购自Qiagen公司; PCR相关试剂购自Invitrogen公司; SURVEYOR试剂盒购自Transgenomic公司; 抗MEIS1抗体、抗 α -tubulin抗体购自Abcam公司; 抗Cas9抗体购自CST公司; 抗Flag抗体购自Sigma公司。

1.2 实验方法

1.2.1 sgRNA设计与sgRNA表达载体构建 在 <http://crispr.mit.edu> 设计MEIS1的sgRNA, 命名为“sgMEIS1”, 两条Oligo序列为: 5'-CAC CGT ACT TGT ACC CCC CGC GAG C-3'和5'-AAA CGC TCG CGG GGG GTA CAA GTA C-3'。Oligo退火: 两条Oligo各1 μ L, T4连接缓冲液1 μ L, T4 PNK 1 μ L, 无菌去离子水6 μ L。37 $^{\circ}$ C孵育30 min, 95 $^{\circ}$ C降温至25 $^{\circ}$ C, 每秒降温0.1 $^{\circ}$ C。取连接后的Oligo 1 μ L, 再加99 μ L无菌去离子水, 制成Oligo工作液。

构建sgMEIS1表达载体: *BmsB* I酶对pLKO5.sgRNA.EFS.tRFP进行酶切、电泳、切胶回收。使用T4连接酶将回收产物与Oligo工作液连接过夜, DH5 α 转化, 氨苄抗性LB平板筛选, 选取单克隆菌落摇菌, 提取质粒, 测序鉴定。

1.2.2 细胞培养 293T细胞用High Glucose DMEM (含10% FBS、1%丙酮酸钠和1% L-谷氨酰胺)培养。流式细胞仪分选到96孔板的293T单细胞, 培养约7 d, 待克隆生长至该96孔的1/2时, 将各单克隆细胞传代接种至24孔板中。

1.2.3 病毒包装、感染及转染 病毒包装(6孔板每孔): 按照Fugene HD说明书操作。包装质粒psPAX2 0.75 μ g及PMD2G 0.25 μ g, 目的质粒1 μ g。将混合液均匀加入到密度为60%~70%的293T细胞中, 缓慢摇匀后置于37 $^{\circ}$ C细胞培养箱中。12 h后更换培养液, 每孔加入2 mL病毒包装培养基(含30% FBS的DMEM培养基)。再过48 h后, 收集培养基上清, 获得病毒液。

病毒感染: 将获得的两种病毒液pTight-Cas9-P2A-GFP-puro和pSIN-EF1 α -rtTA-neo按1:1混匀, 并添加polybrene(6 μ g/mL)提高感染效率, 24 h后添加嘌呤霉素1 μ g/mL进行药物筛选。

磷酸钙法转染(6孔板每孔): 向无菌去离子水中加入2 mol/L CaCl₂ 12.2 μ L, 混匀。再加入目的质粒1.6 μ g, 轻弹混匀。再逐滴加入2 $\times$ HBS 100 μ L, 边加边轻弹, 无菌去离子水量补齐至200 μ L。将混合液均匀加入到密度为60%~70%的293T细胞中, 缓慢摇匀后置于37 $^{\circ}$ C细胞培养箱中。24 h后更换正常293T细胞培养基。

1.2.4 基因组DNA提取 磷酸钙法转染sgMEIS1表达载体48 h后, 收集部分细胞, 用PBS洗1次, 最后用200 μ L PBS重悬, 按照Qiagen基因组提取试剂盒

说明提取基因组。

1.2.5 SURVEYOR检测突变效率 扩增MEIS1 Exon3基因组序列: PCR SuperMix 45 μ L, 上下游引物各1 μ L, 293T基因组100 ng, 加无菌去离子水补至50 μ L。反应程序为: 94 $^{\circ}$ C预变性2 min; 94 $^{\circ}$ C变性30 s, 60 $^{\circ}$ C退火30 s, 72 $^{\circ}$ C延伸1 min, 32个循环; 72 $^{\circ}$ C延伸10 min, 4 $^{\circ}$ C保存。电泳, 切胶, 用胶回收试剂盒回收584 bp大小的目的条带。引物序列为: 5'-AAC GCT TGG GTT TTA TTC GTA GC-3'和5'-CTT AAG GCC GAC TAC GTG CTG-3'。

PCR产物退火: PCR回收产物260 ng, 10 $\times$ PCR Buffer 2 μ L, 加无菌去离子水至20 μ L。梯度退火程序为: 95 $^{\circ}$ C 10 min, 95 $^{\circ}$ C~85 $^{\circ}$ C每秒降温2 $^{\circ}$ C, 85 $^{\circ}$ C 1 min, 此后每10 $^{\circ}$ C为一梯度, 每秒降温0.3 $^{\circ}$ C, 每降温10 $^{\circ}$ C后停留1 min, 直至25 $^{\circ}$ C, 25 $^{\circ}$ C~4 $^{\circ}$ C每秒降温0.3 $^{\circ}$ C, 4 $^{\circ}$ C保存。

SURVEYOR切割: 退火产物20 μ L, MgCl₂ 2.5 μ L, SURVEYOR Nuclease S 1 μ L, SURVEYOR Enhancer S 1 μ L, 加无菌去离子水至25 μ L。42 $^{\circ}$ C切割30 min, 加入终止液(Stop Solution) 2 μ L终止反应。2%琼脂糖凝胶电泳, 当发生基因组编辑时, 584 bp的条带被切割为约360 bp和224 bp的两条带。

1.2.6 蛋白免疫印迹(Western blot) 使用电泳缓冲液80 V恒压电泳30 min, 待样品进入10%分离胶后换120 V恒压电泳90 min。转膜, 按负极、海绵垫、滤纸、胶、硝酸纤维素膜、滤纸、海绵垫、正极的顺序装好电转夹, 加入转膜缓冲液, 200 mA恒流电泳150 min。1 $\times$ TBST配制的5%牛奶室温封闭30 min。一抗MEIS1(1:400)、 α -tubulin(1:10 000)、Cas9(1:1 000)、Flag(1:1 000), 4 $^{\circ}$ C孵育过夜。1 $\times$ TBST洗3次。鼠(α -tubulin、Cas9、Flag)或兔(MEIS1)二抗(1:5 000)室温孵育2 h, 1 $\times$ TBST洗3次。加显影液显色, IQ4000曝光显影。抗体均由5%牛奶配制。

1.2.6 流式细胞术 磷酸钙法转染sgMEIS1表达载体48 h后, 用胰蛋白酶将293T细胞消化为单细胞, 加入正常293T细胞培养液终止消化, 1 000 r/min离心5 min。弃上清, 加入PBS重悬细胞。PBS重悬的细胞过200目滤网后, 用FACS Aria III流式细胞分选仪(BD公司)进行单细胞分选, 采用FlowJo软件进行数据分析。

1.2.7 测序及序列分析 扩增MEIS1 Exon3基因组序列: 提取各293T单克隆细胞基因组, 引物、条

件同上。测序样品制备: PCR产物50 ng, T easy载体1 μ L, 2 $\times$ T4连接缓冲液5 μ L, T4连接酶1 μ L, 加无菌去离子水至10 μ L, 4 $^{\circ}$ C连接过夜。将10 μ L连接产物加入到50 μ L DH5 α 感受态细胞中, 冰浴30 min; 然后于42 $^{\circ}$ C热激45 s, 冰浴2 min, 加入500 μ L SOC, 再置于37 $^{\circ}$ C摇床中, 165 r/min培养1 h; 取200 μ L菌液均匀涂抹于氨苄抗性LB平板上, 置于37 $^{\circ}$ C恒温培养箱中。12 h后挑取单克隆菌落, 摇菌12 h, 送检测序。

序列分析: 使用<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>网站比对测序结果, 野生型(wildtype, WT)作为对照。比较实验组与WT组碱基情况, 氨基酸对应的密码子碱基数为3, 故当实验组的碱基改变数为3n $\pm$ 1时, 阅读框移码。

1.2.8 脱靶效应验证 在<http://crispr.mit.edu>设计MEIS1的sgRNA时, 每条sgRNA信息中显示相应潜在脱靶位点。对排名前5位的潜在脱靶位点设计引物, 引物序列如下(方向均为5'→3')。chr17-8199128引物序列为: TTA ACC AAG CAC CAA CCC GT, CCT TCA AGA GCC ACA ACC GA; chr10-79507636引物序列为: GGG CTT TAC AAC TGT CCC CA, TCC CAT CAT GTG CTC AAG GG; chr2+119992914引物序列为: TGC TCA GCC AGG AAA CTC TG, CTC CAG GCC ACT TAC CCT TG; chr10+2156408引物序列为: ATT GCC CCA TTC CTC CAC TG, GTT TCT GCC GTA GCA TGC AG; chr5-140856454

引物序列为: CAG CAT CCC GGT TAC AAG GT, ATT GGA GAT TAG CGA GGC CG。扩增序列、测序样品制备、序列分析方法同1.2.7。

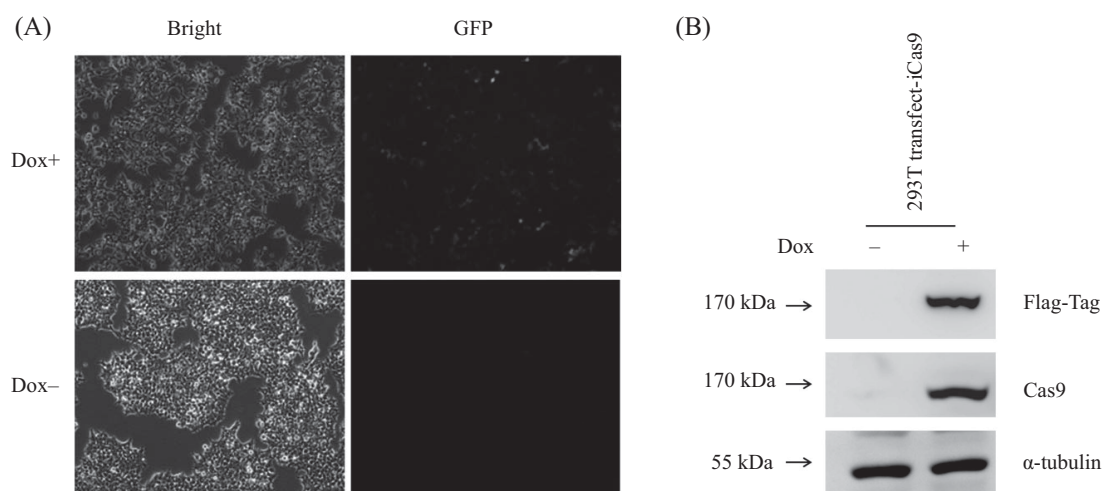
2 结果

2.1 构建Dox诱导表达Cas9的慢病毒载体

通过BamH I、Mlu I双酶切, 再经电泳、切胶回收, 从pL-CRISPR.EFS.GFP载体获得了Flag-Cas9-P2A-GFP片段, 从pLVX-Tight-Puro载体获得了pTight-Puro片段, 并使用T4连接酶连接Flag-Cas9-P2A-GFP片段和pTight-Puro片段。DH5 α 感受态细胞转化、挑取单克隆菌落摇菌、提质粒、酶切鉴定等, 成功地构建了pTight-Cas9-P2A-GFP-Puro载体。用磷酸钙方法向293T细胞同时转染pTight-Cas9-P2A-GFP-Puro与pSIN-EF1 α -rtTA-neo两种载体, 一组(Dox+)添加2 mg/mL Dox激活Cas9表达, 另一组(Dox-)不添加Dox做为阴性对照组。48 h后荧光显微镜下观察, 发现Dox+组有绿色荧光蛋白表达, 而Dox-组无GFP表达(图1A)。提取蛋白质, Western blot检测发现, Dox+组有Cas9蛋白质(图1B), 而Dox-组未检测到Cas9蛋白质。这表明, 我们成功构建了表达Cas9蛋白质的pTight-Cas9-P2A-GFP-Puro载体。

2.2 建立Dox诱导表达Cas9的293T-iCas9细胞株

将pTight-Cas9-P2A-GFP-puro和pSIN-EF1 α -rtTA-neo分别包装病毒, 并用两种病毒液共同感染293T



A: 荧光显微镜观察Dox+组与Dox-组的GFP表达(10 $\times$); B: Western blot检测Dox+组与Dox-组Cas9蛋白质水平。

A: observation of GFP expression by fluorescence microscopy with or without doxycycline (10 $\times$); B: the protein levels of Cas9 are detected by Western blot with or without doxycycline.

图1 Dox诱导表达Cas9载体的构建及鉴定

Fig.1 Construction and identification of Dox-inducible Cas9 expression vector

细胞。感染病毒24 h后添加Puromycin(1 $\mu\text{g/mL}$)进行筛选,同时添加2 mg/mL Dox, 48 h后荧光显微镜下观察该细胞,发现有部分细胞表达GFP。使用流式细胞分选仪分选表达GFP的293T细胞,并以单细胞接种到96孔板上,扩大培养(图2A)。添加2 mg/mL Dox, 48 h后荧光显微镜下观察,发现筛选到的18株单克隆细胞中,只有2株表达GFP。选取其中1株,命名为293T-iCas9。293T-iCas9细胞株表达GFP(图2B)。Western blot检测发现, 293T-iCas9细胞株表达Cas9(图2C)。将293T-iCas9细胞株备份孔细胞传代、扩大培养。该结果表明,已成功建立了Dox诱导Cas9表达的293T-iCas9细胞株。

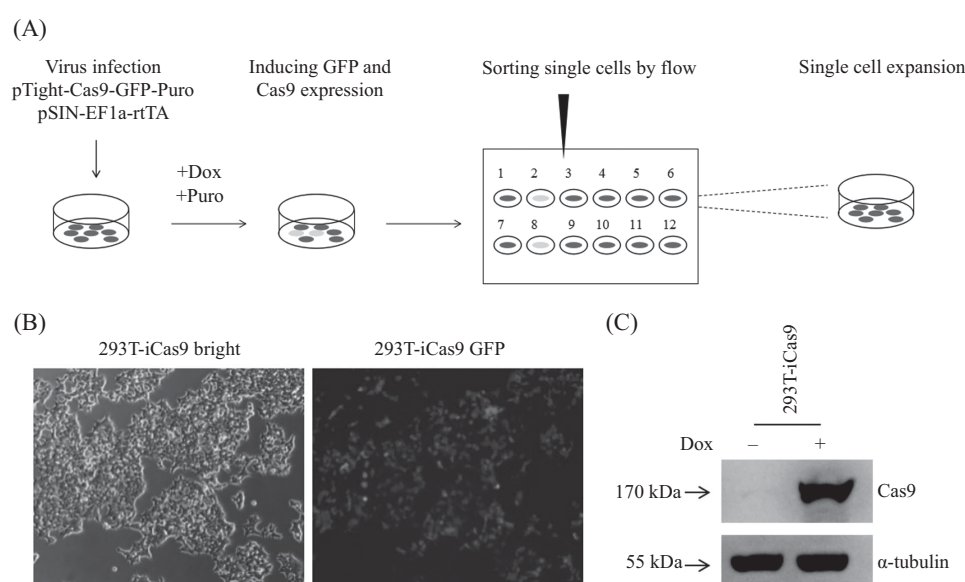
2.3 鉴定sgMEIS1表达载体对MEIS1基因组编辑的功能

向293T-iCas9细胞株添加Dox诱导Cas9表达,再用磷酸钙法直接转染pLKO5.sgMEIS1.EFS.tRFP载体,该载体表达红色荧光蛋白(red fluorescent protein, RFP)和靶向MEIS1 Exon3的sgMEIS1(图3A)。转染48 h后,提取基因组DNA和蛋白质。SURVEYOR检测表明,sgMEIS1可以指导Cas9对MEIS1 Exon3进行切割(图3B)。Western blot检测到MEIS1蛋白质水平下降(图3C),表明sgMEIS1可以指导Cas9对MEIS1 Exon3进行有效的基因组编辑,同时也表明该方法可

能实现MEIS1基因的敲除。

2.4 利用Dox诱导表达Cas9的方法建立MEIS1基因敲除的293T细胞株

293T-iCas9表达GFP和Cas9,而sgMEIS1表达载体表达RFP和sgMEIS1,因此用GFP和RFP可以作为CRISPR/Cas9系统是否成功引入的标记。向293T-iCas9添加Dox并转染sgMEIS1表达载体。48 h后,流式细胞分选仪分选表达GFP⁺/RFP⁺的293T细胞,并以单细胞接种到96孔板中,分选后的细胞停止添加Dox(图4A)。在分选到的2个96孔板中,分别有24株和26株单克隆细胞。随机选取9株单克隆细胞传代、扩大培养,分别提取分选得到的各293T单克隆细胞的蛋白质和基因组,Western blot检测发现,293T细胞中2#、5#、7#、9#的MEIS1蛋白质完全消失(图4B)。PCR扩增这9个细胞株MEIS1 Exon3基因组序列,测序并分析细胞2条染色体MEIS1基因组序列变化。4株细胞MEIS1完全敲除(括号内为2条染色体基因组碱基变化情况):2#(+1, -1)、5#(-8, -4)、7#(-17, -2)、9#(-1, -1);4株细胞MEIS1半敲除:1#(-4, 0)、3#(-1, 0)、6#(-2, 0)、8#(-4, -9),其中8#的-9为缺失3个氨基酸,但未发生阅读框移码;1株细胞未检测到基因组变化:4#(0, 0)(图4C)。此结果表明,Dox诱导表达Cas9的293T-iCas9细胞株具有基因组编辑的功能,并

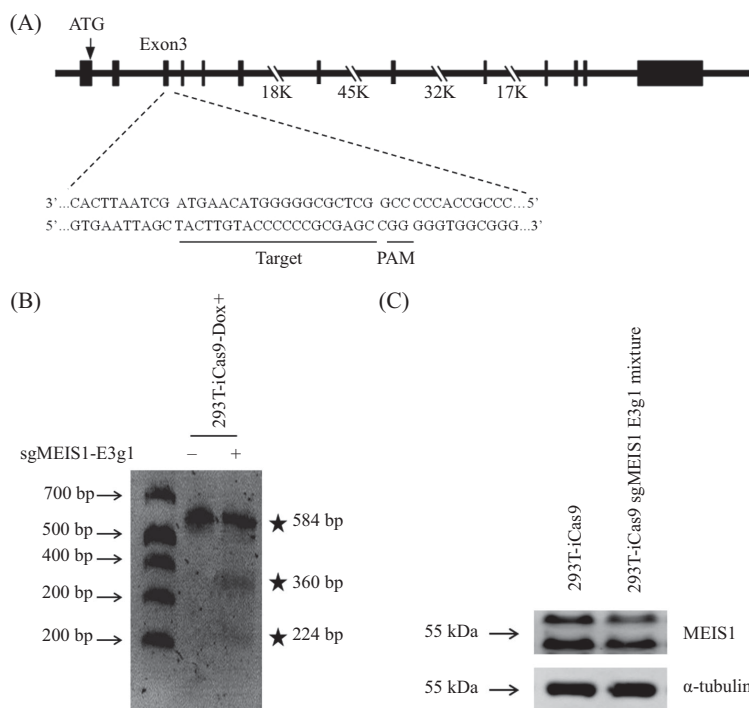


A: 建立293T-iCas9细胞株示意图; B: 293T-iCas9细胞株在Dox条件下表达GFP(10 $\times$); C: 293T-iCas9细胞株在Dox条件下表达Cas9蛋白质。

A: schematic diagram of establishing 293T-iCas9 cell line; B: 293T-iCas9 expresses GFP with doxycycline (10 $\times$); C: 293T-iCas9 cell line expresses Cas9 with Doxycycline.

图2 建立Dox诱导Cas9表达的293T-iCas9细胞株

Fig.2 Establishment of 293T-iCas9 cell line expressing Cas9 with Doxycycline



A: sgRNA靶向MEIS1基因的Exon3; B: SURVEYOR分析sgMEIS1对基因组切割; C: Western blot检测MEIS1蛋白质水平下降。

A: sgRNA targets to Exon3 locus of MEIS1 gene; B: the result of SURVEYOR analysis demonstrates that genome is cut by sgRNA of MEIS1; C: the decrease of MEIS1 protein is detected by Western blot.

图3 鉴定sgMEIS1表达载体指导的MEIS1基因组编辑功能
Fig.3 Identification of sgMEIS1-guide genome edit function

利用该细胞株成功敲除了MEIS1基因。

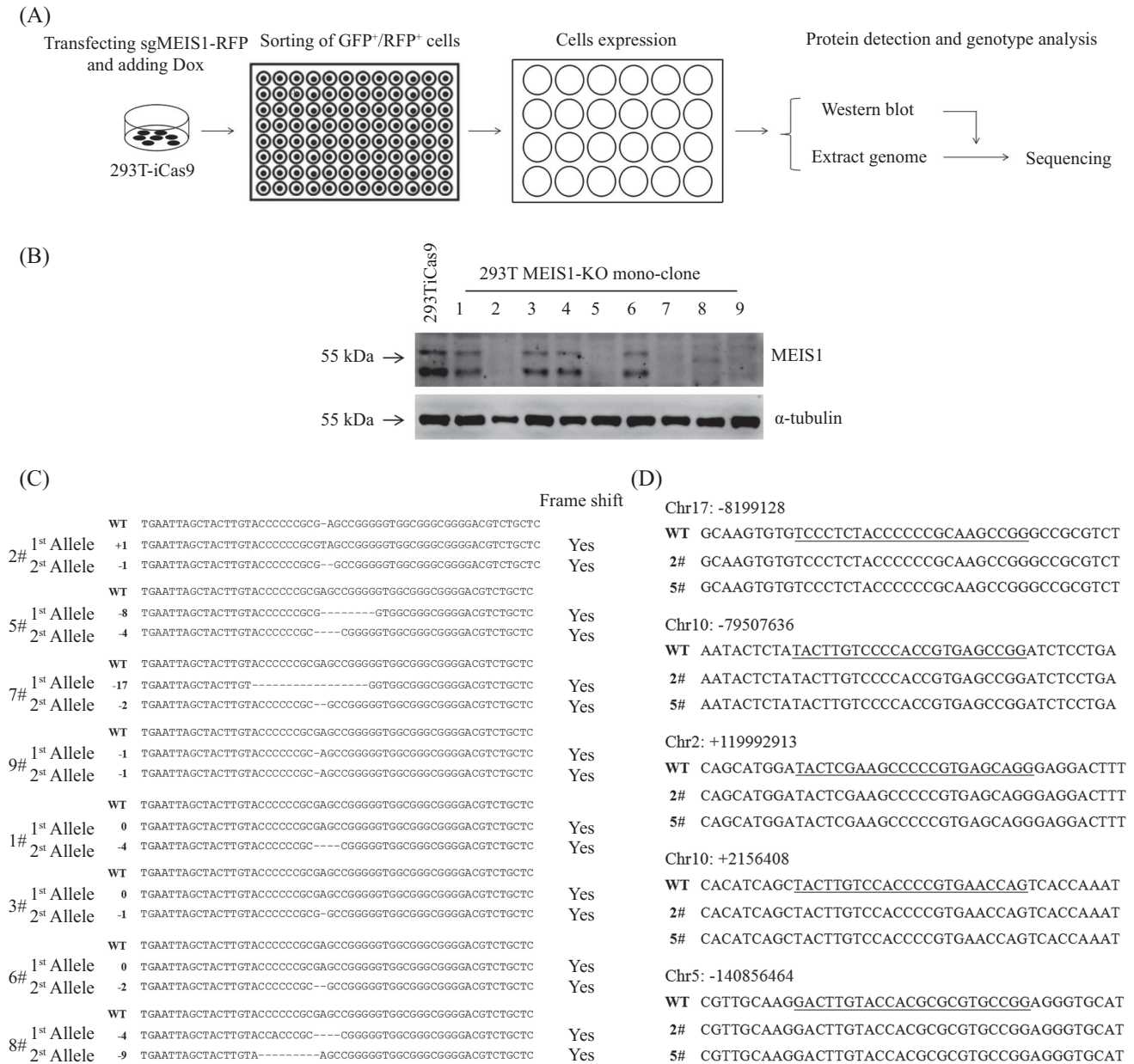
为了验证利用Dox诱导表达Cas9并成功敲除MEIS1基因的293T细胞株没有发生脱靶效应,我们选取了2#及5# 293T-iCas9细胞株通过PCR扩增了5个潜在脱靶位点片段的基因组序列(网站上脱靶得分由高至低排列的前5个),测序并分析每段基因组序列的变化情况(图4D)。测序结果表明,2#及5# 293T-iCas9细胞株中不存在脱靶效应。

3 讨论

本研究首先成功建立了诱导表达Cas9的293T-iCas9细胞株,将转染效率高的CRISPR/Cas9另一组件sgRNA转入293T-iCas9,即可实现CRISPR/Cas9系统的高效引入。因此,一旦建立了Dox诱导表达Cas9的细胞株,可以针对不同的基因设计sgRNA,高效快速地对目的基因进行敲除,有助于研究目的基因的功能及其机制。同时,利用sgRNA转染效率高的特点,通过转入两个或两个以上针对不同基因的sgRNA,可实现多个基因的敲除,为研究多基因参与的疾病及胚胎发育过程提供了重要的工具。目前,非编码RNA及转录调控区域的研究越来越受到

关注,通过非编码RNA或转录调控元件的两端设计sgRNA,也可以高效便捷地对非编码RNA或转录调控元件进行敲除,从而为研究非编码RNA的功能、了解转录调控事件的意义、拓展转录调控的网络奠定基础。此外,同时转入sgRNA和目的基因的片段供体,还可实现目的基因的敲入。

CRISPR/Cas9技术目前已经在细胞基因编辑中得到了广泛的应用,但由于Cas9蛋白质编码序列约为4 100 bp,致使其转染及病毒包装效率均很低,而建立Cas9蛋白质可诱导表达的细胞株可以通过直接转入sgRNA实现高效的基因组编辑,从而克服以上局限性。González等^[12]利用转录激活因子样效应物核酸酶(transcription activator-like effector nucleases, TALEN)技术在人多能干细胞腺病毒相关整合位点(adeno-associated virus integration site, AAVS)位点定点敲入Cas9基因和四环素反式激活因子(reverse tetracycline transactivator, M2rtTA)基因,建立了Dox诱导表达Cas9蛋白质的人多能干细胞株,并利用该细胞株实现了神经元素(neurogenin, NGN)家族基因NGN3、GATA结合蛋白(GATA binding protein, GATA)家族基因GATA4、GATA6及10-11甲基胞嘧



A: 建立MEIS1敲除的293T细胞株示意图; B: Western blot检测293T单克隆中MEIS1蛋白质水平; C: 293T细胞株MEIS1基因位点序列分析结果; D: sgRNA-MEIS1脱靶位点的序列分析。

A: schematic diagram of establishing MEIS1 knockout 293T cell line; B: MEIS1 protein within monoclonal-293T by Western blot; C: the sequencing of MEIS1 in 293T-iCas9; D: the sequences of off-target sites of sgRNA-MEIS1.

图4 利用293T-iCas9建立MEIS1敲除的293T细胞株

Fig.4 Establishment of MEIS1 knockout 293T cell line by 293T-iCas9

啮双加氧酶(ten-eleven translocation, TET)家族基因 *TET1*、*TET2*、*TET3* 单基因的敲除和 *GATA4*、*GATA6* 双基因的敲除以及 *TET1*、*TET2*、*TET3* 三基因的敲除。除了直接建立Cas9蛋白质可诱导表达的人多能干细胞株, 研究者也利用CRISPR/Cas9技术通过其他方式实现了可诱导的基因敲除。Chen等^[13]利用CRISPR/Cas9技术首先将重组酶识别位点(FRT)序列敲入到人多能干细胞目的基因外显子两侧, 随

后在AAVS位点定点敲入重组酶基因与药物诱导基因融合的基因 *Flpe-ER^{T2}*, 在添加4-羟基三苯氧胺(4-OHT)的条件下可以实现目的基因的诱导敲除, 并利用该体系成功实现了人多能干细胞中成对盒基因6(paired box 6, *PAX6*)、转录抑制复合物关键基因 *AGO2*(argonaute 2)、邻齿同源盒基因2(orthodenticle homeobox 2, *OTX2*)单基因敲除与 *PAX6* 和 *SOX2* 双基因敲除。Matsunaga等^[14]利用CRISPR/Cas9技术将

Tet-OFF/TRE-CMV系统敲入到小鼠胚胎干细胞*Flk*基因的5'UTR区域,从而可以通过Dox的添加与否实现内源性胎肝激酶(fetal liver kinase, *Flk*)基因的沉默和表达。但上述方法都涉及到了TALEN技术或是CRISPR/Cas9技术介导的基因敲入,实验操作复杂、难于掌握,而本文建立的利用慢病毒感染获得Cas9蛋白质可诱导表达的HEK-293T细胞株的方法相对简单快捷,易于掌握。此方法的建立为可诱导表达Cas9的人多能干细胞稳定株提供了新的思路。

MEIS1在白血病发生发展、造血系统发育、神经系统发育中发挥重要作用^[15-16]。在人类急性白血病中,MEIS1的异常激活造成急性白血病病程加快^[17]。在神经系统发育过程中,MEIS1缺失会引起后脑菱节谱系化明显受阻^[18-19]以及眼部晶状体、视网膜发育出现异常^[20-21]。在造血系统中,MEIS1缺失导致造血干祖细胞大量减少,并引起造血系统缺陷,MEIS1敲除的小鼠E12.5全身弥漫性出血并死亡^[22]。虽然MEIS1基因已经被广泛研究,但其作用机制仍未完全明确。本研究利用诱导性CRISPR/Cas9方法成功建立了MEIS1敲除的HEK293T细胞株。该方法的建立为诱导性敲除MEIS1的人多能干细胞系的建立提供了依据,并为探究MEIS1在人多能干细胞早期造血分化过程中发挥作用的机制奠定了基础。

参考文献 (References)

- 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.
- 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.
- Bao D, Ma Y, Zhang X, Guan F, Chen W, Gao K, *et al.* Preliminary characterization of a leptin receptor knockout rat created by CRISPR/Cas9 system. *Sci Rep* 2015; 5: 15942.
- Ruan J, Li H, Xu K, Wu T, Wei J, Zhou R, *et al.* Highly efficient CRISPR/Cas9-mediated transgene knockin at the H11 locus in pigs. *Sci Rep* 2015; 5: 14253.
- Heckl D, Kowalczyk MS, Yudovich D, Belizaire R, Puram RV, McConkey ME, *et al.* Generation of mouse models of myeloid malignancy with combinatorial genetic lesions using CRISPR-Cas9 genome editing. *Nat Biotechnol* 2014; 32(9): 941-6.
- Liao J, Karnik R, Gu H, Ziller MJ, Clement K, Tsankov AM, *et al.* Targeted disruption of DNMT1, DNMT3A and DNMT3B in human embryonic stem cells. *Nat Genet* 2015; 47(5): 469-78.
- Ribeiro S, Mairhofer J, Madeira C, Diogo MM, Lobato da Silva C, Monteiro G, *et al.* Plasmid DNA size does affect nonviral gene delivery efficiency in stem cells. *Cell Reprogram* 2012; 14(2): 130-7.
- Yin W, Xiang P, Li Q. Investigations of the effect of DNA size in transient transfection assay using dual luciferase system. *Anal Biochem* 2005; 346(2): 289-94.
- 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.
- 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): 535-41.
- Gossen M, Bujard H. Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89(12): 5547-51.
- González F, Zhu Z, Shi ZD, Lelli K, Verma N, Li QV, *et al.* An iCRISPR platform for rapid, multiplexable, and inducible genome editing in human pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 2014; 15(2): 215-26.
- Chen Y, Cao J, Xiong M, Petersen AJ, Dong Y, Tao Y, *et al.* Engineering human stem cell lines with inducible gene knockout using CRISPR/Cas9. *Cell Stem Cell* 2015; 17(2): 233-44.
- Matsunaga T, Yamashita JK. Single-step generation of gene knockout-rescue system in pluripotent stem cells by promoter insertion with CRISPR/Cas9. *Biochem Biophys Res Commun* 2014; 444(2): 158-63.
- Garcia-Cuellar MP, Steger J, Fuller E, Hetzner K, Slany RK. Pbx3 and Meis1 cooperate through multiple mechanisms to support Hox-induced murine leukemia. *Haematologica* 2015; 100(7): 905-13.
- Ariki R, Morikawa S, Mabuchi Y, Suzuki S, Nakatake M, Yoshioka K, *et al.* Homeodomain transcription factor Meis1 is a critical regulator of adult bone marrow hematopoiesis. *PLoS One* 2014; 9(2): e87646.
- Wang QF, Li YJ, Dong JF, Li B, Kaberlein JJ, Zhang L, *et al.* Regulation of MEIS1 by distal enhancer elements in acute leukemia. *Leukemia* 2014; 28(1): 138-46.
- Waskiewicz AJ, Rikhsaf HA, Hernandez RE, Moens CB. Zebrafish Meis functions to stabilize Pbx proteins and regulate hindbrain patterning. *Development* 2001; 128(21): 4139-51.
- Choe SK, Vlachakis N, Sagerstrom CG. Meis family proteins are required for hindbrain development in the zebrafish. *Development* 2002; 129(3): 585-95.
- Marcos S, Gonzalez-Lazaro M, Beccari L, Carramolino L, Martin-Bermejo MJ, Amarie O, *et al.* Meis1 coordinates a network of genes implicated in eye development and microphthalmia. *Development* 2015; 142(17): 3009-20.
- Zhang X, Friedman A, Heaney S, Purcell P, Maas RL. Meis homeoproteins directly regulate Pax6 during vertebrate lens morphogenesis. *Genes Dev* 2002; 16(16): 2097-107.
- Hisa T, Spence SE, Rachel RA, Fujita M, Nakamura T, Ward JM, *et al.* Hematopoietic, angiogenic and eye defects in Meis1 mutant animals. *EMBO J* 2004; 23(2): 450-9.