### 技术与方法

## CRISPR系统介导的小鼠细胞染色体标记

宋 展\* 张淑贤 (中国海洋大学海洋生命学院,青岛 266003)

摘要 细胞基因组生物学功能的发挥依赖于其染色质空间组成方式和动态活动,而对染色体的动态变化进行研究的首要任务,就是通过一种简单而有效的方法实现基因组中特定序列的标记。近年来,随着CRISPR技术的发展,应用其对特定基因进行标记将成为研究染色体动态变化的有力手段。该研究中,对CRISPR系统的sgRNA支架序列进行F+E修饰,增强了dCas9蛋白复合体对DNA的结合能力,获得支架序列增强型CRISPR(enhance sgRNA scaffold-CRISPR, Esgs-CRISPR)系统。接着,进一步将Esgs-CRISPR标记系统与PB转座系统以及Tet-on系统相结合,构建了适用于稳定标记细胞的质粒系统,即PB-Tet-on-Esgs-CRISPR(PTE-CRISPR)系统。在PTE-CRISPR质粒中插入特定的sgRNA序列,通过脂质体转染成功标记了小鼠神经瘤母细胞(mouse neuroblastoma cell line-2A, N2A)的端粒和卫星序列。通过与表达转座酶(PB transposase, PBase)的质粒共转染小鼠胚胎干细胞(mouse embryonic stem cells, mESC),该研究成功标记了mESC的端粒及卫星序列,并通过流式细胞术筛选获得了标记端粒和卫星序列的稳转细胞系。该研究实现了CRISPR系统介导的mESC染色体特定基因序列的标记,为进一步研究活细胞内染色体结构和动态变化提供了基础。

关键词 染色体标记; CRISPR技术; 小鼠神经瘤母细胞; 小鼠胚胎干细胞

### **CRISPR Mediated Chromosome Labeling in Mouse Cells**

Song Zhan\*, Zhang Shuxian

(College of Marine Life Sciences, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

**Abstract** The biological function of genome bases on its spatial organization and dynamic in different situations. The primary task of studying the spatial dynamics of chromosome is to achieve a simple and effective method of labeling specific genomic sequence. With the development of CRISPR, this technology has provided a powerful labeling means for imaging of specific genomic locus in chromosome. In this study, the scaffold of sgRNA had been F+E modified to enhance the binding capacity between dCas9 and DNA sequence, and received enhance sgRNA scaffold-CRISPR (Esgs-CRISPR) system. Furthermore, this Esgs-CRISPR labeling system was combind with piggyBac transposition system and Tet-on system, to construct a PB-Tet-on-Esgs-CRISPR (PTE-CRISPR) system, which was suitable to build a stable labelled cell line. By inserting a particular sgRNA in the PTE-CRISPR plasmid and transfecting it into mouse neuroblastoma cell line-2A (N2A), we successfully imaged the telomere and major satellite genomic locus in N2A cells. To establish a stable labelled mouse embryonic stem cells (mESC), we cotransfected the sgRNA-PTE-CRISPR plasmid with a PBase expressing plasmid into mESC, and we obtained cell

收稿日期: 2017-07-22 接受日期: 2017-12-04

\*通讯作者。Tel: 15092056601, E-mail: songzhan ouc@163.com

Received: July 22, 2017 Accepted: December 4, 2017

\*Corresponding author. Tel: +86-15092056601, E-mail: songzhan\_ouc@163.com

网络出版时间: 2018-01-30 16:19:10 URL: http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20180130.1619.002.html

lines with stably labeled telomere and major satellite by fluorescent activated cell sorting. In this study, we showed that the CRISPR system enables special genome locus labeling in mESC, which provided a robust tool for further research on the organization and dynamic of chromosome in living cells.

Keywords chromosome labelling; CRISPR technology; mouse neuroblastoma cell line-2A; mESC

在细胞分化和发育过程中,细胞核的结构也在 不断地改变。哺乳动物基因组在细胞核内的装配不 是随机的,且被认为与基因的表达调控有关,不正确 的基因装配会导致一些疾病的产生。目前,基因定位 与基因表达之间的因果关系尚不明确,对于基因位置 动态变化的分析技术依然受限,染色体标记技术的兴 起和发展,对研究基因的定位和表达具有重要意义。

随着CRISPR技术的发展,研究者们尝试将 CRISPR技术应用于染色体标记。CRISPR技术作为 一种基因编辑技术,其系统组成主要分为两部分:具 有核酸酶结构域的Cas9蛋白和引导其与特定DNA 序列结合的sgRNA<sup>[1-5]</sup>。Cas9由HNH结构域和RuvC1 结构域构成。若对两个结构域中的关键氨基酸进 行突变,便可得到没有核酸内切酶活性的Cas9(dead Cas9, dCas9), dCas9只能与DNA双链结合而没有切 割活性<sup>[6]</sup>。将dCas9与荧光蛋白融合表达,荧光蛋白 在sgRNA的介导下随dCas9结合在目标DNA上,就 可以对特定DNA序列进行精确靶向定位。

一些研究表明,修饰过的sgRNA支架也能被用 来招募荧光蛋白,从而对基因组位点进行标记[7-9]。 sgRNA结构中,除15~20 nt长的RNA外,其后还有一 段长约70~90 nt的碱基序列可转录形成带有茎环结 构的支架,以保证前端sgRNA在靶向过程中的稳定 性。这段长的碱基序列经过修饰也可作为蛋白质 结合位点,用于招募与荧光蛋白融合表达的RNA 结合蛋白,从而将荧光蛋白固定在特定基因位点 上以实现标记作用。Cheng等<sup>[7]</sup>将CRISPR-dCas9 与PUF(Pumilio/fem-3-binding factor)相结合构建了 Casilio系统,在sgRNA支架中插入PUF蛋白结合区 域,通过招募融合表达荧光蛋白的PUF蛋白,实现对 染色体特定序列的标记。修饰sgRNA的支架结构为 标记提供了更多的可操作性,如增加sgRNA支架结 构上PUF蛋白结合位点的数量,荧光强度随着招募 的荧光蛋白的增加而级联放大,以提高成像效率。

由于Cas9种类多样,不同的Cas9应用于同一系统中,可以实现CRISPR系统针对不同位点进行多色标记。Ma等<sup>[10]</sup>将三种不同来源的Cas9突变为dCas9,

并分别与不同颜色的荧光蛋白融合表达。由于Cas9 必须与其对应的同源sgRNA结合,因而设计靶向相 同或不同位点的sgRNA就能实现对同一位点或不 同位点的多色标记效果。此外,对sgRNA支架的修 饰也可以进行多色标记。2016年, Wang等<sup>[8]</sup>构建了 一种双色CRISPR标记系统,在sgRNA支架上分别添 加与MS2外壳蛋白结合的MS2寡核苷酸适配子和与 PP7外壳蛋白结合的PP7寡核苷酸适配子,两种蛋白 质分别融合表达不同的荧光蛋白, 使得该系统在只 使用一种Cas9的前提下同时表达两种荧光,从而对 人活细胞中重复序列进行双色标记。随后, Qin等<sup>[9]</sup> 延长了sgRNA支架上的MS2序列,使得一个特定的 基因组位点上可以招募14个效应因子,从而实现了 对非重复序列的标记。多色标记能够显示活细胞中 染色体基因位点之间的距离,可用于探查同一染色 体上不同基因或不同染色体上的基因间的相互影 响,还可用于研究基因转座、等位基因之间的相互 影响等。因此, CRISPR/dCas9系统在染色体特定序 列标记方面具有很强的实用性和一系列潜在应用价 值,为研究染色体的复杂结构及动态变化提供了强 有力的手段。

Chen等<sup>[11]</sup>在将CRISPR/dCas9系统应用于染色 体标记时,对sgRNA的支架进行了修饰。在sgRNA Pol-III茎环结构中,连续的4个尿嘧啶碱基可能会 形成U6的转录终止子,影响sgRNA结构的形成,为 了避免U6转录过早的被终止,将该处的第4个尿嘧 啶碱基替换成腺嘌呤,得到sgRNA<sup>F</sup>。同时,为了提 高sgRNA与dCas9结合的稳定性,在sgRNA支架的 发卡结构上新增5对互补碱基,得到sgRNA<sup>E</sup>。这种 F+E的修饰使得sgRNA的结构更加稳定,同时也增 强了sgRNA与dCas9蛋白的结合作用,得到一种优 化的sgRNA<sup>(F+E)</sup>序列。通过慢病毒将sgRNA<sup>(F+E)</sup>转染 到稳定表达dCas9的细胞中,实现了对癌细胞系端 粒序列的有效标记。但该系统需要依次转染dCas9、 Tet-On和sgRNA<sup>(F+E)</sup>才能实现序列标记,标记过程繁 琐且时间长,并且其能否适用于干细胞中基因序列 的标记尚未可知。目前已构建的CRISPR/dCas9染 色体标记系统大多用于标记细胞系细胞或癌细胞<sup>[8-</sup><sup>11]</sup>。由于mESC能够通过核移植、四倍体补偿等方式 发育成为完整的小鼠个体,对mESC特定基因组序 列标记后,结合荧光成像技术,可以研究该序列在 早期发育过程中的一系列动态变化<sup>[12]</sup>。因此,建立 一种针对mESC特定序列的有效标记方法具有重要 意义。

本研究的主要目的是通过构建mESC稳转细胞 系的方法,实现mESC染色体上特定基因序列的稳定 标记。为了实现这一目的,我们将Esgs-CRISPR系 统和PB转座子系统以及Tet-on系统相结合,构建了 PTE-CRISPR系统,成功标记了N2A和mESC的端粒 和卫星序列。本研究构建了mESC特定基因序列标 记的稳转细胞系,为进一步研究特定基因序列在早 期胚胎发育过程中的时空特异性和动态调控作用奠 定了坚实的基础。

#### 1 材料与方法

#### 1.1 试剂和仪器

mESC(E14)和N2A细胞系均为实验室现存。 Pci I、Xba I、Fse I、Mlu I、Bbs I限制性内切核酸 酶和T4 DNA连接酶购自NEB公司。DMEM培养 基、青霉素/链霉素、胎牛血清(FBS)和左旋谷氨酸 (L-glutamine)购自Gibco公司。非必需氨基酸(NEAA)、 核苷(nucleosides)、β-巯基乙醇、小鼠白血病抑制 剂购自Milipore公司。抑制分化因子PD0325901和 CHIR99021购自Selleck公司。CRISPR表达质粒 PX330(plasmid<sup>#42230</sup>)购自Addgene公司。骨架质粒PBdCas9-Tet-on和绿色荧光蛋白表达质粒pEGFP-N1为 本实验室现存。大肠杆菌感受态DH5α购自唯地生物 科技有限公司。引物由华津生物科技有限公司合成。 凝胶成像仪购自Tano公司。强力霉素、PCR仪购自 Sigma公司。Lipofectamine<sup>®</sup> 3000试剂盒购自Thermo 公司。In-fusion连接试剂盒购自Vazyme公司。荧光 显微镜购自Nikon公司。流式细胞仪购自Beckman公 司。

#### 1.2 Esgs-CRISPR系统表达载体的构建

按照Chen等<sup>[11]</sup>的方法对sgRNA支架序列进行 F+E修饰,用Snapgene软件分别设计上下游PCR引 物,并在引物两端引入酶切位点。通过下游引物将 sgRNA支架序列中需要突变的两个位点引入到序列 中,引物序列如下。sgRNA<sup>(F+E)</sup>-F: 5'-ACA TGT GAG GGC CTA TTT CCC ATG ATT-3'; sgRNA<sup>(F+E)</sup>-R: 5'-TCT ACA AAA AAA AGC ACC GAC TCG GTG CCA CTT TTT CAA GTT GAT AAC GGA CTA GCC TTA TTT AAA CTT GCT ATG CTG TTT CCA GCA TAG CTC TTA AAC T-3'。以PX330质粒为模板进 行PCR,并通过下游引物在sgRNA支架序列中引入 突变碱基,扩增获得带有F+E修饰的U6-sgRNA支架 序列,即U6-sgRNA<sup>(F+E)</sup>。利用*Pci*I和Xba I对PCR产 物和PX330分别进行双酶切,通过T4 DNA连接酶将 PCR片段与酶切后的骨架载体连接,得到含有F+E 修饰的sgRNA支架的质粒PX330-U6-sgRNA<sup>(F+E)</sup>,即 Esgs-CRISPR表达载体。

#### 1.3 PTE-CRISPR系统骨架载体的构建

对含有dCas9、PB转座系统和Tet-on系统的 PB-dCas9-Tet-on骨架质粒进行改造,在dCas9序 列后面加入一个增强型绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein, EGFP),使其与dCas9融 合表达,以实现对染色体的荧光标记。设计*egfp*扩 增引物,并在上下游引物分别加入15 bp的同源臂, 引物序列如下。*egfp*-F: 5'-TAG TGG GCC GGC CGT GAG CAA GGG CGA GGA GCT GTT CA-3'; *egfp*-R: 5'-TTT AAA CTC ATT ACT AAC CGG CCG GCC GGT CTT GTA CAG CTC GTC CAT-3'。 以pEGFP-N1质粒为模板, PCR扩增获得*egfp*序列。 用*Fse* I对PB-dCas9-Tet-on骨架载体进行酶切并回 收,与扩增的*egfp*片段进行In-fusion连接,得到PBdCas9-EGFP-Tet-on质粒。

以Esgs-CRISPR表达载体为模板, PCR扩增获 得含U6启动子和F+E sgRNA支架的U6-sgRNA<sup>(F+E)</sup> 序列, 引物序列如下。Esgs-CRISPR-F: 5'-CTT TTT TAG GGC ACG CGT GAT CCG ACG CGC CAT CTC TAG-3'; Esgs-CRISPR-R: 5'-GGG ATA CGG GGA AAC GCG TAA AGC CAT ACC AAT GGC CTG C-3'。用*Mlu* I对 PB-dCas9-EGFP-Tet-on质粒 进行酶切并回收, 与扩增的U6-sgRNA<sup>(F+E)</sup>序列进行 In-fusion连接得到含有融合表达EGFP的dCas9、PB 转座系统、Tet-on系统和增强型sgRNA支架序列的 骨架质粒PB-dCas9-EGFP-Tet-on-U6-sgRNA<sup>(F+E)</sup>, 即 PTE-CRISPR系统骨架载体。

# **1.4** PTE-CRISPR端粒标记和卫星序列标记载体的构建

参考Deng等<sup>[13]</sup>的方法设计标记小鼠端粒和

主要卫星序列的sgRNA, 引物序列如下。sgRNA-Telomere-F: 5'-CAC CGT TAG GGT TAG GGT TAG GGT TA-3', sgRNA-Telomere-R: 5'-AAA CTA ACC CTA ACC CTA ACC CTA AC-3'; sgRNA-Major Satellite-F: 5'-CAC CCC ATA TTC CAC GTC CTA CAG-3', sgRNA-Major Satellite-R: 5'-AAA CCT GTA GGA CGT GGA ATA TGG-3'。退火得到双链sgRNA 片段, 用T4 DNA连接酶分别连接到经*Bbs* I酶切后 的PTE-CRISPR-骨架载体中, 得到标记端粒序列的 PTE-CRISPR-Telomere质粒和标记主要卫星序列的 PTE-CRISPR-Major Satellite质粒。

#### 1.5 细胞培养

N2A细胞培养在含有10% FBS和1%青/链霉素的DMEM培养基中, 2~3 d传一代, 传代比例为1:4。E14细胞用mESC专用培养液培养, 即每400 mL高糖DMEM培养基中加入15% FBS、1%青/链霉素、1×NEAA、1×nucleosides、1×β-巯基乙醇、1×L-glutamine、1 μmol/L PD0325901和3 μmol/L CHIR99021及1 000 U/mL的Mouse LIF。细胞培养板均置于37 °C、5% CO<sub>2</sub>恒温培养箱中, 每周定期进行支原体检测, 确保没有支原体污染。

#### 1.6 质粒转染

N2A细胞的传代比例为1:4, 传代后12~16 h, 细胞在培养板底的覆盖率达到60%~80%。E14细胞的传代比例为1:3, 传代后8~12 h, 待细胞长至60%~70%汇合时, 使用Lipofectamine<sup>®</sup> 3000转染细胞, 按照试剂盒使用方法进行操作。于转染后12 h, 在培养基中添加强力霉素, 诱导dCas9-EGFP表达, 一段时间后收集细胞并观察染色体。

#### 1.7 染色体制片和观察

为了更好地观察端粒的标记效果,在收集细胞 前2~3 h更换新的细胞培养基,并向其中加入终浓度 为200 ng/mL的秋水仙素,使细胞阻滞在分裂中期。 将细胞消化并收集,0.075 mol/L KCl低渗处理后,用 30~50 μL含有50 ng/mL Hoechst的抗荧光猝灭剂对细 胞沉淀进行重悬。Hoechst染色5~10 min后,滴加细胞 悬液到载玻片上,封片后用荧光显微镜观察和拍照。

#### 2 结果

**2.1 Esgs-CRISPR系统和PTE-CRISPR系统的构建** 2.1.1 Esgs-CRISPR系统表达载体的构建 我们 首先按照F+E的方法对CRISPR系统的sgRNA支架 序列进行修饰,增强dCas9与sgRNA的结合能力(图 1A)。将PCR扩增获得的U6-sgRNA<sup>(F+E)</sup>序列插入到 骨架质粒中,所得测序正确的质粒为Esgs-CRISPR 系统表达载体。

2.1.2 PTE-CRISPR骨架载体的构建及其在N2A细胞中的表达 为了使标记程序更为简便,我们将sgRNA<sup>(F+E)</sup>、dCas9、PB转座系统和Tet-on系统等多个元件构建于同一个质粒中,这样只需转染一次就能实现对特定基因序列的有效标记。首先,将扩增的*egfp*序列插入到PB-dCas9-Tet-on骨架质粒中,所得测序正确的质粒为PB-dCas9-EGFP-Tet-on质粒。然后,将U6-sgRNA<sup>(F+E)</sup>序列插入到该质粒中,所得测序正确的质粒为PB-dCas9-EGFP-Tet-on-U6-sgRNA<sup>(F+E)</sup>,即PTE-CRISPR系统骨架载体,其结构如图1B所示。

为了确定PTE-CRISPR能否在强力霉素诱导下 表达出dCas9-EGFP融合蛋白,我们在N2A细胞中进 行了验证。N2A细胞传代后12 h转染PTE-CRISPR 质粒,转染后12 h加入强力霉素来诱导表达。12 h后 在倒置荧光显微镜下观察,未添加强力霉素的对照 组细胞没有观察到明显的绿色荧光,而在强力霉素 诱导下的N2A细胞能够表达绿色荧光蛋白。结果表 明,PTE-CRISPR质粒成功转入细胞内,并且在Tet-on 系统调控下表达dCas9-EGFP融合蛋白(图1C)。培养 基中去除强力霉素后,不能继续诱导dCas9和EGFP 的表达,细胞中的绿色荧光随细胞分裂而逐渐减弱, 传代1~2次后就几乎观察不到绿色荧光了。

#### 2.2 N2A细胞端粒和卫星序列的标记

为了检测PTE-CRISPR系统对基因组特定序列的标记效果,我们对N2A细胞染色体的端粒序列和卫星序列进行了标记。将退火得到的sgRNA-Telomere序列插入到PTE-CRISPR骨架载体的U6启动子和sgRNA<sup>(F+E)</sup>支架序列之间,筛选出序列正确的克隆即为标记端粒序列的PTE-CRISPR-Telomere质粒。

成功构建出PTE-CRISPR-Telomere表达载体 后,我们以N2A细胞系为模型进行了研究。按照1:3 的比例传代,待N2A细胞长至60%~70%汇合时,将 PTE-CRISPR-Telomere表达载体转染到细胞中,并 以转染PTE-CRISPR骨架载体的细胞作为对照组。 转染后12 h,在培养基中加入强力霉素,诱导dCas9-EGFP的表达,诱导12 h后荧光显微镜下观察。图2 结果显示,对照组中的GFP弥散分布于细胞核中,这



A: sgRNA支架序列的F+E修饰示意图; B: PTE-CRISPR系统骨架载体示意图; C: PTE-CRISPR系统骨架载体在N2A细胞中的转染效果, 以未添加强力霉素诱导的细胞为对照组。

A: the schematic of sgRNA<sup>(F+E)</sup> scaffold; B: the schematic of PTE-CRISPR plasmid; C: the transfection effects of PTE-CRISPR plasmid in N2A cells. The control group was normal cultured N2A cells without doxycycline.



#### 图1 Esgs-CRISPR系统和PTE-CRISPR系统的构建

Fig.1 The construction of Esgs-CRISPR plasmid and PTE-CRISPR plasmid

PTE-CRISPR-Telomere质粒和PTE-CRISPR-Major Satellite质粒分别对N2A细胞端粒和卫星序列的标记效果。以转染PTE-CRISPR骨架质粒的 N2A细胞为对照。

Fluorescent microscopy images of N2A cells labeled by PTE-CRISPR-Telomere and PTE-CRISPR-Major Satellite. The telomere and major satellite labeling in N2A cells with PTE-CRISPR system.

图2 PTE-CRISPR系统对N2A细胞端粒和卫星序列的标记效果

Fig.2 Telomere and Major Satellite labeling in N2A cells with PTE-CRISPR System

表明, PTE-CRISPR系统在强力霉素诱导下能够表达dCas9-EGFP,并在核定位信号的引导下进入细胞核。但由于对照组中没有sgRNA序列, dCas9-EGFP进入细胞核后呈弥散样分布。与对照组相比,实验组GFP在细胞核中呈点状分布,表明dCas9-EGFP在sgRNA的引导下,集中分布在染色体上。此外,在sgRNA的引导下,细胞核非标记区域中GFP的荧光强度更弱。这进一步表明,我们的标记系统能特异性地将dCas9-EGFP引导与染色体结合。

为了进一步研究PTE-CRISPR系统对染色体 上的其他重复序列能否起到标记作用,我们选择 以卫星序列为研究对象。Major Satellite序列也是 由重复序列构成,每个重复大约234 bp,总长度可 达6 Mb。首先设计小鼠卫星序列的sgRNA,并通 过survey assay检测其可行性。将验证后的sgRNA-Major Satellite连接到酶切后的PTE-CRISPR骨架载 体中,测序筛选出序列正确的克隆,即标记卫星序列 的PTE-CRISPR-Major Satellite质粒。

我们用PTE-CRISPR-Major Satellite质粒转染 N2A细胞,并以转染PTE-CRISPR骨架质粒的细胞为 对照组,强力霉素诱导12 h后,进行细胞染色体制片 和观察。结果显示,实验组中的GFP不仅全部聚集 在细胞核内,而且与对照组相比,GFP集中分布在染 色体上并呈点状分布。与端粒标记产生的绿色荧光 亮点相比,该组的荧光亮点直径较大(图2),这是由 于染色体上的主要卫星序列与端粒序列相比更长, 因而能够招募更多的GFP。

# 2.3 端粒和卫星序列标记的mESC稳转细胞系的 构建

前期研究表明, PTE-CRISPR系统能够标记小鼠N2A细胞的端粒及卫星序列, 且具有较好的标记效果。为了进一步研究PTE-CRISPR系统能否用于mESC稳转细胞系的构建, 我们将含有sgRNA的PTE-CRISPR表达质粒与PB转座酶表达质粒共同转染到mESC中。PTE-CRISPR质粒中含有PB转座子序列, 在PB转座酶的作用下将质粒序列插入到基因组中, 从而实现标记蛋白质的稳定表达。转染PTE-CRISPR-Telomere后12 h, 加入强力霉素诱导dCas9-EGFP表达,转染后第3 d, mESC长出明显的克隆, 能观察到部分克隆有明显的绿色荧光(图3A)。这些细胞作为第1代细胞(P1), 经消化、收集后用流式细胞仪进行检测, 结果显示, 19.2%的细胞为EGFP阳性

表达的细胞,而未转染的对照组则没有阳性细胞(图 3B)。将P1中分选出的阳性细胞继续培养6 d,待长 出克隆时对第2代细胞(P2)进行分选,此时阳性比例 已经高达83.9%,表明P2中大部分细胞的基因组已经 整合了目标序列(图3B)。将分选到的阳性细胞继续 培养3 d后,在培养基中加入嘌呤霉素以去除少量未 整合目标序列的细胞,筛选出的存活细胞既能表达 荧光标记蛋白又能持续生长和增殖,即为标记端粒 序列的mESC稳转细胞系,用同样的方法可获得标记 卫星序列的mESC稳转细胞系。

为了验证整合在基因组中的目标序列在mESC 中的标记效果,用荧光显微镜分别观察标记端粒和 卫星序列的mESC稳转细胞系,结果如图3C所示。 对照组中的GFP弥散分布于细胞核中,而实验组中 的GFP集中分布在染色体上并呈点状分布。在具有 明显分裂相的PTE-CRISPR-Telomere稳转细胞中, 每个染色体的端粒位置都有明显的绿色荧光亮点出 现,表明PTE-CRISPR-Telomere已整合到基因组中, 并能高效标记mESC的端粒序列。在标记卫星序列 的mESC稳转细胞中,绿色荧光亮点位于染色体的近 着丝粒处,即为Major Satellite序列在染色体上的位 置,表明PTE-CRISPR-Major Satellite稳转的mESC中 卫星序列标记效果较好。

#### 3 讨论

基因组功能的发挥与其结构及空间组成密切 相关,同时会随着基因组结构的动态变化而被增强 或抑制<sup>[14]</sup>。了解基因所在位置并追踪特殊的基因序 列在细胞生命活动中的变化,对了解基因组的功能 具有重要意义,特别是对胚胎干细胞中的特定基因 进行标记、对研究该基因在个体胚胎发育过程中的 调控作用具有重要意义。对小鼠胚胎干细胞染色体 标记,除了可以研究干细胞染色体动态变化外,还可 以与胚胎显微注射、核移植和四倍体补偿等结合, 以观察小鼠胚胎发育过程中一些特殊基因的命运和 动态变化等<sup>[15]</sup>。

传统的DNA位点的标记方法包括DNA荧光 原位杂交(DNA-fluorescence *in situ* hybridization, DNA-FISH)和荧光乳糖操纵子/抑制子报告系统。 DNA-FISH能准确高效地靶向到染色体的特殊位 点,是广泛用于标记内源性基因位点的重要手段, 但要求样本必须是固定的,因此不能应用于活细胞



A: PTE-CRISPR-Telomere在mESC中的转染效果; B: 细胞流式术分选结果; Control: 正常培养的未转染的mESC; P1: 转染PTE-CRISPR-Telomere 后3 d的P1代mESC; P2: 将分选出的P1代阳性细胞继续培养6 d得到的P2代mESC; C: PTE-CRISPR-Telomere和PTE-CRISPR-Major Satellite表达 质粒分别转染后, 流式分选获得的mESC稳转细胞系; 以转染PTE-CRISPR骨架质粒的mESC为对照。

A: the transfection effects of PTE-CRISPR-Telomere plasmid in mESC. B: fluorescent activated cell sorting (FACS) was used to obtain a cell line with stable telomere-labeling. The control group was normal cultured mESC without transfection. The P1 group was mESC transfected with the PTE-CRISPR-Telomere plasmid for 3 days. The GFP-positive cells sorted from P1 were further cultured for 6 days and analyzed by FACS shown as P2. C: the stably labeled mESC lines were obtained through transfection of PTE-CRISPR-Telomere or PTE-CRISPR-Major Satellite plasmid. The mESC transfected by PTE-CRISPR was control.

#### 图3 端粒和卫星序列标记的mESC稳转细胞系的构建 Fig.3 The establishment of mESC lines with stably labeled telomere or major satellite

观察<sup>[16-17]</sup>。荧光乳糖操纵子/抑制子报告系统虽然可 用于活细胞成像,但需要在基因组区域整合进一段 很长的内源性DNA序列(约10 Kb),操作复杂且脱靶 率高<sup>[18]</sup>。随着基因编辑技术的快速发展,锌指核酸 酶(zinc fingers, ZF)技术、TELEN和CRISPR技术也 逐渐应用到基因标记领域<sup>[7,10-11,19-20]</sup>。ZF的设计非常 复杂,其DNA结合位点需要设计3~4个Cys2-His2锌 指结构,共同组成靶向一个碱基位点的结构域<sup>[19,21-22]</sup>; 而TALEN技术的核心TALEs,也是一种能特异性与 DNA序列上单个碱基对相结合的蛋白<sup>[20,23-24]</sup>。相对 于ZF和TALEN技术而言,CRISPR技术不需要设计 复杂的DNA结合蛋白,操作简单,通过改变sgRNA 的序列便可追踪活细胞中的不同基因组位点的活动 情况。除此之外,在基因编辑或者标记方面,其效率 远远高于前两者,同时CRISPR系统可以进行多种形 式的改造,以满足不同的基因操作需求<sup>[2,25]</sup>。

CRISPR-dCas9系统中,将dCas9与GFP融合表 达,GFP在sgRNA的介导下随dCas9结合在目标DNA 上,在特定波长的激发光下显示所标记基因的位置。 研究表明, sgRNA结构会影响其与dCas9-EGFP结合 的稳定性,从而影响对基因的标记效果。未经修饰 的sgRNA支架序列结构稳定性较差, dCas9与sgRNA 结合效率低,因而标记效果不好。为了消除这种弊 端,科学家们进行了多种尝试。Chen等<sup>[11]</sup>对sgRNA 支架序列进行了F+E修饰,使得sgRNA结构更加稳 定,与dCas9的结合能力更强。虽然对sgRNA的支架 序列进行修饰可以改变dCas9对sgRNA的结合能力, 但能否提高对染色体DNA的结合能力尚不清楚。本 研究所建立的标记端粒的mESC稳转细胞系,在检 测标记效果时即使细胞核膜破裂,每个端粒末端的 GFP依然存在,并未因染色体散开时对端粒造成的 冲击使得GFP与端粒脱离(图3C)。由此表明, F+E修 饰后的sgRNA支架序列不仅能提高dCas9对sgRNA 的结合能力,也能提高dCas9对DNA的结合能力,使 得sgRNA-dCas9-EGFP复合体更不容易解离,从而提 高其染色体标记稳定性。

此外, dCas9-EGFP的持续表达使得细胞中的绿 色荧光背景较高,这是以前的CRISPR系统标记效 果差的另一个重要原因。Tet-on系统由TRE 3G和 Tet-on 3G启动子构成,在添加有强力霉素的情况下, Tet-on 3G启动子的构象发生改变, 启动下游蛋白的 表达,同时其表达产物能够结合到前端的TRE 3G位 点上,促进其发挥启动子的功能,启动下游dCas9和 GFP的表达。因此, 通过Tet-on系统控制dCas9的表 达,从而避免dCas9-EGFP在细胞中的过量表达<sup>[26]</sup>。 强力霉素诱导前,细胞中未观察到明显的绿色荧光, 而添加强力霉素后,诱导了dCas9和GFP的表达,显 示出明显的绿色荧光(图1C),该结果与已报道的Teton系统对dCas9的表达调控作用相似[11]。通过Tet-on 系统的调控作用,能减少由未结合的dCas9-EGFP产 生的背景荧光,提高信号强度与背景的对比度(图2) 和图3C), 增强被标记区的成像效率。去除强力霉素 诱导作用后,绿色荧光逐渐消失,不影响对细胞的免 疫荧光染色等其他荧光显色反应。

·技术与方法 ·

Chen等<sup>[11]</sup>提出的基因标记方法需要先用编码 dCas9-EGFP和Tet-on 3G的慢病毒转染RPE细胞或 Hela细胞,挑选出稳定表达dCas9-EGFP的单克隆细 胞。之后用编码sgRNA<sup>(F+E)</sup>的慢病毒转染稳定表达 dCas9-EGFP的细胞,以实现对特定基因序列的标 记。该方法需要分别转染dCas9-EGFP和sgRNA,过 程繁琐且时间长。本文在此基础上进行了改进,将 dCas9-EGFP、Tet-on 3G和sgRNA构建于同一载体 中,只需要转染一次就能实现对染色体特定序列的 标记,降低背景荧光强度的同时还能提高标记效果, 而且只要简单改变sgRNA就能灵活实现对其他特定 位点的标记。

常用的质粒转染只能实现对基因位点的短时 标记,随时间延长质粒被排除细胞外,标记效果随之 消失。为了使标记作用持续存在, 需要借助PB转座 系统来构建一个稳转细胞系<sup>[27]</sup>,我们在PTE-CRISPR 质粒中添加了PB转座酶识别序列5′TR long和3′TR long,转染PTE-CRISPR质粒的同时共转染一个表达 PB转座酶的质粒。PB转座酶对质粒和染色体基因 组进行切割,使得含有标记元件的序列可以随机整 合到染色体基因组中,实现了对mESC端粒和卫星序 列的稳定标记。由于mESC作为核移植供体产生克 隆小鼠的成功率是体细胞的10~20倍[12],因此,本研 究构建的PTE-CRISPR系统不仅可用于mESC染色 体动态观察,还可以通过核移植的方法研究小鼠胚 胎发育过程中特定基因组序列的动态活动。本研究 所构建的PTE-CRISPR标记系统为研究细胞基因组 结构和早期胚胎发育过程中基因组的动态变化提供 了一个强有力的工具。

#### 参考文献 (References)

- Bolotin A, Quinquis B, Sorokin A, Ehrlich SD. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. Microbiology 2005; 151(Pt 8): 2551-61.
- 2 Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, Boyaval P, Moineau S, *et al.* CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. Science 2007; 315(5819): 1709-12.
- 3 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.
- 4 Liu L, Fan XD. CRISPR-Cas system: a powerful tool for genome engineering. Plant Mol Biol 2014; 85(3): 209-18.
- 5 Yuan M, Webb E, Lemoine NR, Wang Y. CRISPR-Cas9 as a powerful tool for efficient creation of oncolytic viruses. Viruses 2016; 8(3): 72.

- 6 Anton T, Bultmann S, Leonhardt H, Markaki Y. Visualization of specific DNA sequences in living mouse embryonic stem cells with a programmable fluorescent CRISPR/Cas system. Nucleus 2014; 5(2): 163-72.
- 7 Cheng AW, Jillette N, Lee P, Plaskon D, Fujiwara Y, Wang W, et al. Casilio: a versatile CRISPR-Cas9-Pumilio hybrid for gene regulation and genomic labeling. Cell Res 2016; 26(2): 254-7.
- 8 Wang S, Su JH, Zhang F, Zhuang X. An RNA-aptamer-based two-color CRISPR labeling system. Sci Rep 2016; 6: 26857.
- 9 Qin P, Parlak M, Kuscu C, Bandaria J, Mir M, Szlachta K, et al. Live cell imaging of low- and non-repetitive chromosome loci using CRISPR-Cas9. Nat Commun 2017; 8: 14725.
- 10 Ma H, Naseri A, Reyes-Gutierrez P, Wolfe SA, Zhang S, Pederson T. Multicolor CRISPR labeling of chromosomal loci in human cells. Proc Natl Acad Sci USA 2015; 112(10): 3002-7.
- 11 Chen B, Gilbert LA, Cimini BA, Schnitzbauer J, Zhang W, Li GW, et al. Dynamic imaging of genomic loci in living human cells by an optimized CRISPR/Cas system. Cell 2013; 155(7): 1479-91.
- 12 Humpherys D, Eggan K, Akutsu H, Friedman A, Hochedlinger K, Yanagimachi R, *et al.* Abnormal gene expression in cloned mice derived from embryonic stem cell and cumulus cell nuclei. Proc Natl Acad Sci USA 2002; 99(20): 12889-94.
- 13 Deng W, Shi X, Tjian R, Lionnet T, Singer RH. CASFISH: CRISPR/Cas9-mediated in situ labeling of genomic loci in fixed cells. Proc Natl Acad Sci USA 2015; 112(38): 11870-5.
- 14 Sexton T, Cavalli G. The role of chromosome domains in shaping the functional genome. Cell 2015; 160(6): 1049-59.
- 15 Amano T, Tani T, Kato Y, Tsunoda Y. Mouse cloned from embryonic stem (ES) cells synchronized in metaphase with nocodazole. J Exp Zool 2001; 289(2): 139-45.
- 16 Markaki Y, Smeets D, Cremer M, Schermelleh L. Fluorescence in situ hybridization applications for super-resolution 3D structured illumination microscopy. Methods Mol Biol 2013; 950: 43-64.
- 17 Cui C, Shu W, Li P. Fluorescence *in situ* hybridization: cell-based genetic diagnostic and research applications. Front Cell Dev Biol

2016; 4: 89.

- 18 Belmont AS, Li G, Sudlow G, Robinett C. Visualization of largescale chromatin structure and dynamics using the lac operator/lac repressor reporter system. Methods Cell Biol 1999; 58: 203-22.
- 19 Lindhout BI, Fransz P, Tessadori F, Meckel T, Hooykaas PJ, van der Zaal BJ. Live cell imaging of repetitive DNA sequences via GFP-tagged polydactyl zinc finger proteins. Nucleic Acids Res 2007; 35(16): e107.
- 20 Miyanari Y, Ziegler-Birling C, Torres-Padilla ME. Live visualization of chromatin dynamics with fluorescent TALEs. Nat Struct Mol Biol 2013; 20(11): 1321-4.
- 21 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.
- 22 Perez EE, Wang J, Miller JC, Jouvenot Y, Kim KA., Liu O, et al. Establishment of HIV-1 resistance in CD4<sup>+</sup> T cells by genome editing using zinc-finger nucleases. Nat Biotechnol 2008; 26(7): 808-16.
- 23 Christian M, Cermak T, Doyle EL, Schmidt C, Zhang F, Hummel A, et al. Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. Genetics 2010; 186(2): 757-61.
- 24 Zhang F, Cong L, Lodato S, Kosuri S, Church GM, Arlotta P. Efficient construction of sequence-specific TAL effectors for modulating mammalian transcription. Nat Biotechnol 2011; 29(2): 149-53.
- 25 Jiang W, Marraffini LA. CRISPR-Cas: New tools for genetic manipulations from bacterial immunity systems. Annu Rev Microbiol 2015; 69: 209-28.
- 26 Das AT, Tenenbaum L, Berkhout B. Tet-on systems for doxycycline-inducible gene expression. Curr Gene Ther 2016; 16(3): 156-67.
- 27 Park TS, Han JY. piggyBac transposition into primordial germ cells is an efficient tool for transgenesis in chickens. Proc Natl Acad Sci USA 2012; 109(24): 9337-41.