

CRISPR/Cas9介导的同源重组插入 敲除人SH2B3基因

蔡元星 王宁 王思乐 王华岩*

(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, 杨凌 712100)

摘要 SH2B3基因的突变可以显著提高人干细胞向红细胞诱导分化的效率。该研究利用CRISPR/Cas9技术介导的同源重组插入敲除策略, 建立了一种高效获得特定基因编辑类型的敲除SH2B3基因的方法。通过设计两个含有不同荧光标记和不同抗性基因的同源重组筛选载体和一个靶向SH2B3基因的CRISPR/Cas9敲除载体, 共转染HeLa细胞, 然后用嘌呤霉素和新霉素进行筛选, 两周后一部分细胞用于分子生物学检测, 另一部分细胞通过有限稀释法分离单细胞克隆。结果显示, 在药物抗性筛选两周的HeLa细胞中, 野生型SH2B3基因转录产物几乎检测不到, 可以检测到重组型转录产物的表达。敲除效率的统计结果显示, 在获得的19株SH2B3基因敲除细胞中, 有11株细胞为双等位基因插入敲除。另外8株细胞为单等位基因插入敲除, 其中有2株细胞的等位基因没有检测到突变, 而剩余的6株细胞的等位基因都检测到有突变。因此, 该研究的双插入敲除率为57.9%, 双敲除率达到89.5%。该研究为构建SH2B3基因敲除的人多能干细胞系奠定了基础, 也为建立一种高效、低成本的诱导红细胞的技术体系提供了有效的工具。

关键词 CRISPR/Cas9技术; 同源重组; SH2B3基因; 敲除; 红细胞诱导

CRISPR/Cas9 Mediated Homology Recombination Insertion Knockout of Human SH2B3 Gene

Cai Yuanxing, Wang Ning, Wang Sile, Wang Huayan*

(College of Veterinary Medicine, Northwest A&F University,
Shaanxi Center for Stem Cell Engineering and Technology, Yangling 712100, China)

Abstract Mutation of SH2B adapter protein 3 (SH2B3) gene resulted in significantly increasing the induced efficiency of red blood cells derived from human pluripotent stem cells. We established a high-efficiency method through certain type of gene editing to knockout SH2B3 gene in human cells via CRISPR/Cas9-mediated homology-dependent DNA repair. Two homology-dependent repair screening plasmids, which retain different fluorescent genes and different drug-resistant genes, and one plasmid targeting SH2B3 gene were designed and were cotransfected into HeLa cells that were cultured in medium with antibiotics puromycin and neomycin. After 2-week selection, one part of drug-resistant HeLa cells was used for the molecular biology assays, and rest of cells were sorted for colonies via limiting dilution. Results showed that expression of wild type SH2B3 gene could not be detected in the drug-resistant HeLa cells, however, the recombinant insertion was able to be detected in drug-resistant HeLa cells. The statistical analysis of knockout efficiency showed that among the 19 SH2B3-KO clones,

收稿日期: 2017-07-26 接受日期: 2017-10-24

国家自然科学基金(批准号: 31571521、31371505)资助的课题

*通讯作者。Tel: 029-87080069, E-mail: hhwang101@163.com

Received: July 26, 2017 Accepted: October 24, 2017

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31571521, 31371505)

*Corresponding author. Tel: +86-29-87080069, E-mail: hhwang101@163.com

网络出版时间: 2018-01-03 17:24:22 URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20180103.1724.022.html>

11 clones were double knockout via double knock-in of reporter genes, and 8 clones were knockout via single knock-in of reporter genes. Moreover, within these 8 clones, there were 2 clones that had the wild type gene in the allele, and 6 clones had site mutations in the allele. Therefore, the efficiency of double knockout via knock-in of reporter genes was 57.9%, and double knockout was 89.5%. This study provides a powerful tool to establish an efficient and low-cost means to improve the induction-efficiency of red blood cells derived in human pluripotent stem cells.

Keywords CRISPR/Cas9 system; homology-dependent repair; SH2B3 gene; knockout; induction of red blood cells

目前, 医疗用血主要是通过社会无偿献血的途径获得。随着干细胞领域的发展, 利用人胚胎干细胞或诱导多能干细胞诱导获得成熟红细胞的策略, 在基础研究上已被证明是可行的。但是, 当前存在的问题是, 利用干细胞诱导获得成熟红细胞的效率较低, 诱导获得可供临床应用的红细胞数量少, 成本较高, 阻碍了其在临床上推广应用^[1]。为解决上述问题, 研究者希望通过优化培养条件和基因修饰等手段, 建立一种高效率低成本的诱导成熟红细胞的方法^[2]。

SH2B3(SH2B adapter protein 3)也叫淋巴细胞调节蛋白(lymphocyte adapter protein, LNK), 该基因位于人染色体12q24位点上^[3], 在很多组织和细胞中都有表达, 其作为信号通路的调节因子在血细胞生成、炎症和细胞迁移中发挥作用^[4-5]。具有SH2B3基因突变的个体其血液中的血红蛋白含量比正常人高。敲除SH2B3基因, 可以提高干细胞诱导分化为红细胞的效率^[6-7]。因此, 我们希望通过构建一株SH2B3基因敲除的人多能干细胞, 以求为进一步建立一种高效低成本的红细胞诱导方法打下基础。

CRISPR/Cas9(clustered regularly interspaced palindromic repeats/CRISPR-associated protein 9)技术, 作为一种新型的基因编辑技术可以通过设计一个特异的sgRNA引导Cas9蛋白质在特异位点对基因进行定点修饰。该技术已经成功用于衣藻^[8]、线虫^[9]、果蝇^[10]、斑马鱼^[11]、小鼠^[12]、猪^[13]和人^[14]等不同物种。但是, CRISPR/Cas9定点基因编辑技术, 有一定的不可控性, 会导致一些碱基的丢失、插入或突变。同源重组介导的基因编辑技术所获得的基因编辑是可控的, 但是同源重组发生的概率很低。为了提高同源重组的概率, 可通过CRISPR/Cas9技术, 在同源重组位点使DNA链发生断裂, 以达到显著提高同源重组的概率^[11]。由于人SH2B3基因所在的染色

体12q24位点的突变与一些疾病的发生有关联, 如红细胞增多症、骨髓增生病、自身免疫病和血管类疾病等^[15]。因此, 为了在敲除SH2B3基因时不引入不可控的突变, 本研究尝试采用CRISPR/Cas9技术介导的同源重组插入敲除的策略, 同时引入不同抗性(嘌呤霉素抗性和新霉素抗性)和不同荧光标记(mCherry和copGFP)以及Cre/LoxP系统, 希望建立一种高效获得特定基因编辑类型的SH2B3基因敲除的技术体系。

1 材料与方法

1.1 材料

大肠杆菌(*Escherichia coli*)Rosetta(DE3)、质粒pcDNA-3.1、pEGFP-C1、pmCherry-N1和pCDH-PGK-Nluc-P2A-copGFP-T2A-Puro、HeLa细胞和人胚肾上皮293细胞由陕西省干细胞工程技术研究中心提供。

1.2 试剂及耗材

凝胶纯化回收试剂盒、质粒提取试剂盒、基因组提取试剂盒和总RNA提取试剂盒等常规试剂均购自天根生化科技有限公司。DNA marker购自BioLabs公司。限制性核酸内切酶、T₄连接酶、Taq DNA聚合酶和反转录试剂盒均购自Thermo公司。高保真DNA聚合酶购自南京诺唯赞生物科技有限公司(Vazyme)。pGEM-T-Easy购自Promega公司。胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购自Hyclone公司。细胞培养基(dulbecco's modified eagle medium, DMEM)购自Invitrogen公司。PCR Mix购自西安擎科泽西生物科技有限责任公司。PCR引物由西安擎科泽西生物科技有限责任公司合成, 引物信息见表1。

1.3 载体构建

1.3.1 构建敲除载体pSH2B3-KO 以哺乳动物表

达载体pX330(同时携带鸡 β -actin启动子驱动的Cas9蛋白表达元件和U6启动子驱动的sgRNA表达元件)作为骨架敲除载体,参考Giani等^[6]采用的SH2B3敲除序列GCT CCA GCA TCC AGG AGG TCC GG,分别在其正义链和反义链的5'端添加CACC和AAAC序列,退火形成含有与线性化载体pX330黏性末端互补的双链DNA片段,与通过Bbs I限制性核酸内切酶线性化的pX330载体进行连接,转化到大肠杆菌Rosetta(DE3)中,挑选阳性单克隆,送西安Tsingke公司测序,构建了敲除载体pSH2B3-KO。

1.3.2 构建同源重组筛选载体 以293细胞提取的DNA为模板,PCR获得4 098 bp SH2B3基因组产物。以该产物为模板分别PCR获得上游同源臂(5'arm)和下游同源臂(3'arm)产物。以pcDNA-3.1为模板,通过PCR在CMV-bGH两端连入loxP位点,获得'loxP-CMV-bGH-loxP'片段。利用Bbs I异尾酶介导的边酶切边连接的方法将上游同源臂与'loxP-CMV-bGH-loxP'片段进行连接,连接产物'上游同源臂-loxP-

CMV-bGH-loxP'借助pGEM-T-Easy载体,在CMV与bGH间的多克隆位点中连入CopGFP-T2A-PuroR筛选元件,获得含有'上游同源臂-loxP-CMV-copGFP-T2A-PuroR-bGH-loxP'框架的中间载体pGEM-T-Easy。

在此基础上,借助pEGFP-C1上的Kpn I、Sal I和Bgl II酶切位点,将下游同源臂与上面获得的拼接片段进行拼接,拼接产物连到pGEM-T-Easy载体中,最终获得含有'上游同源臂-loxP-CMV-copGFP-T2A-PuroR-bGH-loxP-下游同源臂'框架的同源重组筛选载体pGEM-T-copGFP-PuroR(即pTGP)。mCherry-T2A-NeoR和mCherry-T2A-PuroR元件的PCR产物分别通过Hind III和Xba I酶切位点替换掉pTGP载体中的copGFP-T2A-PuroR元件,获得载体pGEM-T-mCherry-NeoR(即pTMN)和pGEM-T-mCherry-PuroR(即pTMP)。

1.4 载体功能鉴定

293细胞在10% FBS的高糖DMEM中培养,待细

表1 引物汇总

Table 1 The list of primers

引物 Primer	序列(5'→3') Sequence (5'→3')	长度(bp) Length (bp)
sgRNA-SH2B3	F: CAC CGC TCC AGC ATC CAG GAG GTC CGG R: AAA CCC GGA CCT CCT GGA TGC TGG AGC	/
SH2B3	F: GAG TTG GGG AAG AAC CCC TG R: TCC CGA GGA TGC AGT AGA CA	4 098
5' arm-SH2B3	F: AAA ATG GGC AAG AGC GCA GA R: GTG <u>AAG ACC</u> TAA ACG ACC TCC TGG ATG CTG GAG	1 449
3' arm-SH2B3	F: ACG <u>CCT CGA GGT</u> CCG GTG GTG CAC ACG GCT R: GAA <u>GAT CTT</u> CTG CCG CAC CAG GAA CAC	701
Knock-in-Upstream	F: CAC TCG CAC CTT ACC CAT R: TTT GGA AAG TCC CGT TGA	1 668
Knock-in-Downstream	F: CAT CGC ATT GTC TGA GTA GGT R: GAA GAT CTT CTG CCG CAC CAG GAA CAC	2 407
Knock-in-mCherry-NeoR	F: CTG GAC GAA GAG CAT CAG GG R: CCG AGG GAA AGT GGA GGT	1 626
Knock-in-COPGFP-PuroR	F: CGA CCA CCA GGG CAA GG R: GAA GAT CTT CTG CCG CAC CAG GAA CAC	2 028
Wild-gene	F: CAC CGC TCC AGC ATC CAG GAG GTC CGG R: CCG AGG GAA AGT GGA GGT	943
Wild-mRNA-SH2B3	F: CAC CGC TCC AGC ATC CAG GAG GTC CGG R: TCC GGG AGG ATG AGT CCA TT	928
Knock-in-mRNA-SH2B3	F: CAC CGC TCC AGC ATC CAG GAG GTC CGG R: TCC GGG AGG ATG AGT CCA TT	1 058

下划线代表酶切位点。

The underline is the restriction enzyme cutting site.

胞密度达到80%左右的时候, 利用脂质体2000介导pTGP、pTMN和pTMP等分别转染293细胞, 2 d后在荧光显微镜下观察细胞相应的荧光信号。

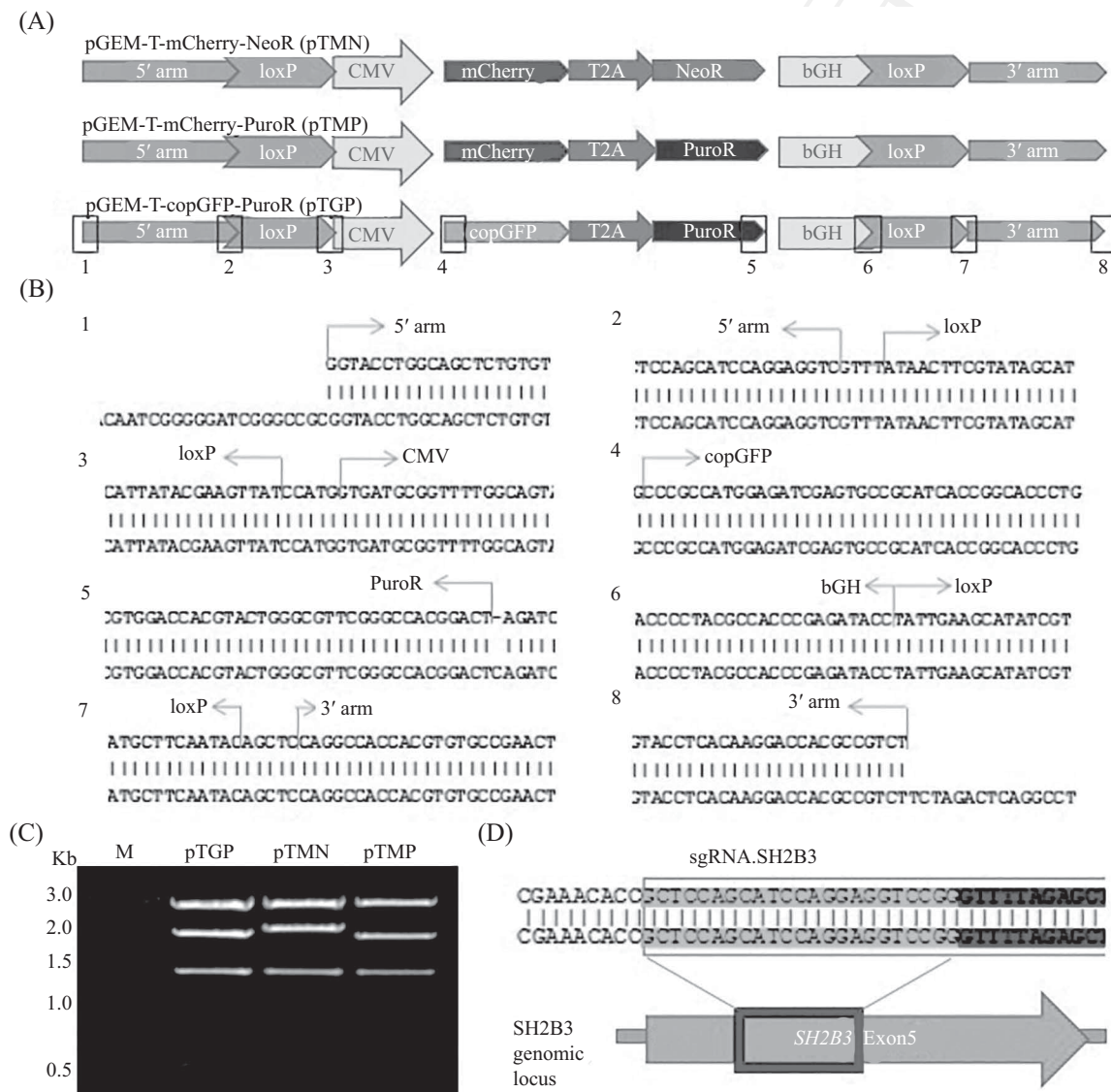
1.5 插入敲除位点的鉴定

同源重组筛选载体pTGP和敲除载体pSH2B3-KO共转染293细胞, 转染2 d后, 用1 μg/mL嘌呤霉素筛选。在21 d时取出一部分细胞, 用于基因组DNA提取。用位于同源臂5'端的上游引物和位于CMV启动子内的下游引物进行PCR, 对基因组上游(knock-

in-upstream, 1 668 bp)插入进行鉴定。用位于bGH元件内的上游引物和位于同源臂3'端的下游引物进行PCR, 对基因组下游(knock-in-Downstream, 2 407 bp)插入进行鉴定。

1.6 双荧光双抗性同源重组插入敲除效率的分析

pTGP和pTMN与pSH2B3-KO共转染HeLa细胞, 转染2 d后用1 μg/mL嘌呤霉素和800 μg/mL新霉素筛选14 d, 然后转到普通培养基中培养。取一部分细胞提取总RNA用于RT-PCR鉴定, 操作步骤参照试剂



A: 构建的pTGP、pTMN和pTMP载体。矩形圈为8个拼接位点。B: 对8个拼接位点测序(上行序列为基因库的序列, 下行为测定序列)。C: 对构建的载体进行Hind III/EcoR I双酶切鉴定; M: DNA marker。D: 敲除载体pSH2B3-KO拼接位点测序比对及其靶位点在SH2B3基因上对应的位置。A: structure of pTGP, pTMN and pTMP plasmids. Eight rectangles indicate stitching locations. B: DNA sequences of 8 stitching locations (upper sequence is from Genbank and lower sequence is from sample). C: Hind III and EcoR I double digestions of constructed plasmids; M: DNA marker. D: DNA sequence of the stitching location of pSH2B3-KO and the targeted site in SH2B3 genome.

图1 筛选载体和敲除载体的构建和鉴定

Fig.1 Construction and evaluation of screening and knockout vectors

盒说明书。用sgRNA靶序列正义链为上游引物,在同源臂下游第10外显子内的下游引物,进行PCR鉴定野生型SH2B3(wild-mRNA-SH2B3, 928 bp)。用位于bGH元件内的上游引物和位于同源臂第十外显子内的下游引物,进行PCR鉴定重组型SH2B3(knock-in-mRNA-SH2B3, 1 058 bp)。

另一部分细胞用有限稀释法接种到96-孔板上培养,从中分离获得19株细胞株。从这些细胞株中提取基因组DNA,用于后期的敲除效率PCR鉴定。上游引物位于PuroR元件内,下游引物位于同源臂下游,PCR鉴定copGFP-PuroR的插入情况(knock-in-copGFP-PuroR, 2 028 bp)。上游引物位于NeoR内,下游引物位于下游同源臂下游,PCR鉴定mCherry-NeoR的插入情况(knock-in-mCherry-NeoR, 1 626 bp)。用sgRNA靶序列正义链的上游引物和同源臂下游的引物,对基因组野生型进行检测(wild-gene, 943 bp)。对两个元件都插入的HeLa细胞的PCR检测产物进行进一步的测序鉴定,以确认插入元件是否准确插入到了指定位点,从而达到插入敲除的目的。鉴定结果进行统计学分析,分别算出双插入敲除效率和双敲除(靶位点被破坏或插入筛选片段)效率。

2 结果

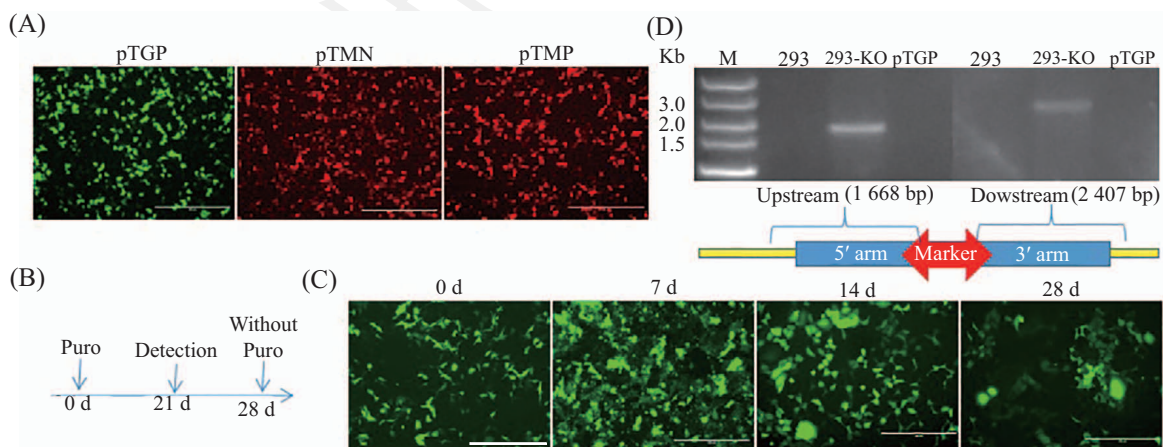
2.1 同源重组筛选载体和敲除载体的构建

本研究首先构建了同源重组筛选载体pTGP,在此基础上分别用mCherry-T2A-NeoR和mCherry-

T2A-PuroR元件替换CopGFP-T2A-PuroR元件,获得了pTMN和pTMP两个筛选载体(图1A)。经DNA测序检测,确认所有拼接位点的序列都正确(图1B)。根据Hind III和EcoR I酶切图谱,pTGP可被切成2 999、2 035、1 338和506 bp等4个片段;pTMN可被切成2 999、2 162、1 338和506 bp等4个片段;pTMP可被切成2 999、1 967、1 338和506 bp等4个片段。酶切后电泳检测结果证明,上述推测与实验相符(图1C)。此外,我们还构建了SH2B3基因敲除载体pSH2B3-KO,拼接位点的测序鉴定结果显示正确(图1D)。

2.2 SH2B3敲除体系的建立和检测

同源重组筛选载体pTGP、pTMN和pTMP分别转染293细胞,2 d后经荧光显微镜观察发现,转染的细胞能够表达相应的绿色荧光(pTGP)和红色荧光(pTMN和pTMP),从细胞水平上证明构建的同源重组筛选载体工作正常(图2A)。为了验证敲除体系是否能够正常工作,将同源重组筛选载体pTGP和敲除载体pSH2B3-KO共转染293细胞,并用嘌呤霉素筛选28 d(图2B)。在嘌呤霉素处理1~4周后,获得了一批细胞增殖较好、依然携带绿色荧光的293细胞。在细胞水平上,通过绿色荧光表达情况证明所设计的筛选元件已经整合到293细胞的基因组中(图2C)。分子水平的鉴定结果显示,在基因组靶位点的上游(upstream, 1 668 bp)和靶位点的下游(downstream, 2 407 bp)通过PCR检测都能得到

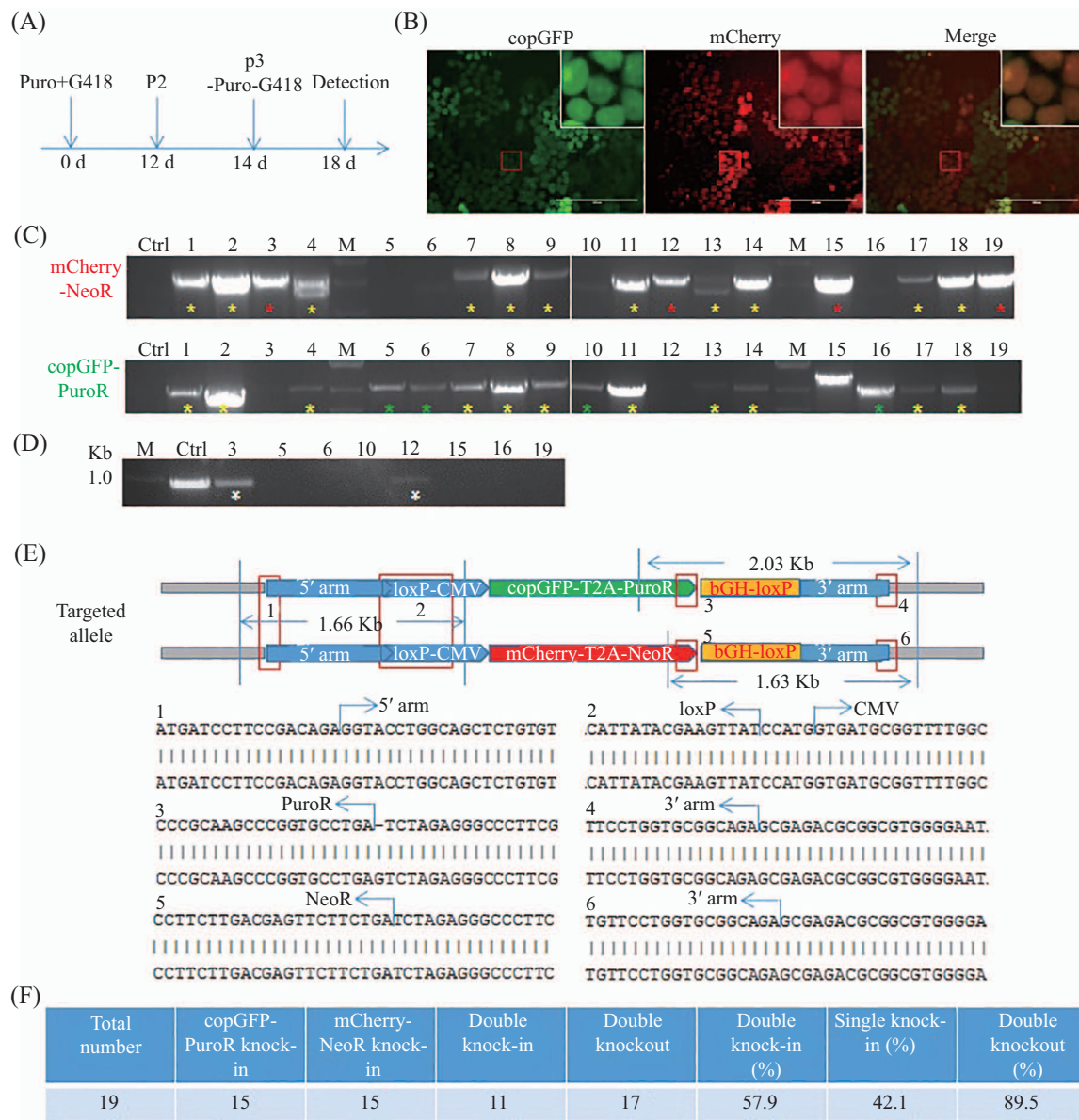


A: pTGP, pTMN和pTMP转染293细胞。B: 实验流程图。C: pTGP和pSH2B3-KO共转染293细胞不同时间的荧光检测。D: PCR示意图和鉴定结果。标尺=400 μm。

A: fluorescence detection of 293 cells after transfection of pTGP, pTMN and pTMP. B: flow chart of drug-screening. C: fluorescence detection of 293 cells in different dates. D: PCR diagram and electrophoresis result. Scale bars=400 μm.

图2 SH2B3敲除体系的建立和鉴定

Fig.2 Construction and evaluation of SH2B3-KO system



A: 实验流程图。B: 用嘌呤霉素和新霉素抗性筛选HeLa细胞。C: PCR检测插入敲除SH2B3的阳性细胞; 红色*: 只有mCherry-NeoR插入; 绿色*: 只有copGFP-PuroR插入; 黄色*: 两者双插入。Ctrl: 正常HeLa细胞为阴性对照组。D: PCR检测单插入敲除SH2B3的阳性细胞; M: DNA marker。E: HeLa细胞基因组测序比对结果(上行序列为正确的序列, 下行为测序结果)。F: 敲除效率统计表。

A: scheme of screening and detection. B: fluorescence detection of HeLa cells screened by Puromycin and G418. C: PCR analysis of SH2B3-KO cells; Red *: mCherry-NeoR single knock-in; Green *: copGFP-PuroR single knock-in; Yellow *: double knock-in. Ctrl: normal HeLa cells as negative control. D: PCR analysis of 8 single knock-in HeLa cells; M: DNA marker. E: DNA sequencing of the genome of HeLa cells (upper sequence is from Genbank and lower sequence is from sample). F: result of knockout-efficiency.

图3 在HeLa细胞中敲除SH2B3及其鉴定

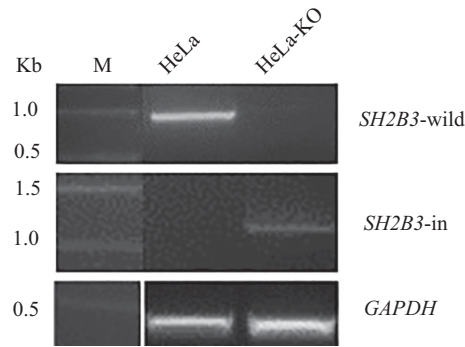
Fig.3 Knockout of SH2B3 gene in HeLa cells and its evaluation

插入片段, 进一步证明元件已经成功整合到基因组中(图2D)。因此, 我们利用293细胞建立了插入敲除SH2B3基因的技术体系。

2.3 敲除HeLa细胞SH2B3基因及其鉴定

将同源重组筛选载体pTGP、pTMN和敲除载体pSH2B3-KO共转染HeLa细胞, 用嘌呤霉素和新霉素筛选14 d, 然后在普通培养基上继续培养4 d(图

3A)。在荧光显微镜下观察发现, 经抗性筛选获得的HeLa细胞同时携带红色荧光和绿色荧光(图3B), 从细胞水平证明筛选元件已经整合到HeLa细胞的基因组中。对19株抗性筛选获得的HeLa细胞的基因组进行PCR检测发现, 19株HeLa细胞都发生了基因修饰。其中, mCherry-NeoR元件插入的细胞有15株, copGFP-PuroR元件插入的细胞有15株, 两个元件都



RT-PCR对HeLa和HeLa-KO进行检测。M: DNA marker。

RT-PCR analysis of HeLa and HeLa-KO cells. M: DNA marker.

图4 RT-PCR鉴定SH2B3敲除

Fig.4 RT-PCR analysis of SH2B3-KO

插入的细胞有11株(见黄星), 单个元件插入的有8株, 分别用红星和绿星标注(图3C)。在单插入的8株细胞中, 有两株还能检测到野生型基因的存在, 说明在这两株细胞的等位基因没有发生突变。而其他6株细胞的等位基因虽然没有检测到相关元件的插入, 但靶位点已经发生了突变(图3D)。进一步将两个元件都插入的HeLa细胞的基因组PCR检测产物进行测序, 鉴定结果证明, 两个元件都按设计准确插入到HeLa细胞的基因组的指定位置上, 达到插入敲除的目的(图3E)。根据上述结果进行统计的敲除效率是, 双插入敲除的效率为57.9%, 双敲除(靶位点被破坏或插入筛选片段)的效率为89.5%(图3F)。

2.4 SH2B3-KO转录产物的检测

对SH2B3基因转录产物检测结果显示, 在HeLa细胞中能够明显的检测到SH2B3基因野生型转录产物(SH2B3-wild)的表达, 但检测不到重组型转录产物(SH2B3-in)的表达。但是, 在HeLa-KO的细胞中, SH2B3基因野生型转录产物只有微弱的表达, 能明显地检测到重组型转录产物的表达。因此, 在转录水平上进一步证明了筛选片段已经整合到SH2B3基因中, 并达到移码突变的设计目标(图4)。

3 讨论

为了实现一种高效低成本的红细胞诱导途径, 本文以优化诱导体系和基因组修饰两方面的研究作为突破口, 解决体外诱导血细胞所面临的问题。研究显示, 敲除或抑制SH2B3基因的表达, 可以促进红细胞诱导的效率^[6]。为了尽快获得SH2B3敲除的细胞, 我们建立了一种高效获得特定基因编辑类型的敲除SH2B3基因的敲除体系, 并在模式细胞293和肿

瘤细胞HeLa中进行了验证。

在Cas9蛋白质与相应的sgRNA都存在的情况下, sgRNA先与Cas9结合, 然后引导Cas9识别特异的靶位点并将其切断。因为体内降解机制的存在, 断开的两个DNA链末端会有一些的碱基发生降解, 在没有同源序列引导的情况下, DNA损伤修复机制会随机地引入不可控的突变^[16-17]。SH2B3基因所在的人染色体12q24位点的突变与一些疾病的发生有联系^[15], 单独使用CRISPR/Cas9敲除体系, 会在敲除SH2B3基因时引入一些不可控的突变。利用同源重组介导的插入敲除的方法获得的突变是可控的, 但是在自然条件下, 同源重组介导的基因敲除发生的概率极低。如果在相应位点发生DNA链断裂的前提下, 同源重组的发生概率会显著提高^[9,18]。本研究在CRISPR/Cas9敲除体系的基础上, 引入两个不同的抗性基因和两个不同的荧光标记基因, 建立一种CRISPR/Cas9和双荧光双抗性介导的同源重组插入敲除体系, 并在293细胞中证明了该敲除策略的可行性。

研究显示, 传统的CRISPR/Cas9敲除体系, 在多种人细胞中的突变效率约为38%^[19]。这意味着所获得的细胞群体中, 会含有大量没发生基因敲除的细胞, 而且不能够在后面的培养过程中通过添加筛选药物进行富集, 往往很难一步得到满足对一个基因进行研究的敲除细胞群体。为了验证该敲除体系能否快速地获得满足对SH2B3基因进行初步研究与鉴定条件的SH2B3敲除的细胞, 将同源重组筛选载体和敲除载体共转染HeLa细胞, 用嘌呤霉素和新霉素筛选14 d后, 与对照组相比, 实验组HeLa细胞中的野生型SH2B3 mRNA只能检测到微弱的表达, 但能够

检测得到整合型SH2B3 mRNA的表达。挑选的19株HeLa细胞的DNA检测结果显示, 双插入敲除的效率为57.9%, 双敲除(靶位点被破坏或插入筛选片段)的效率为89.5%。以上实验证明, 本研究建立的敲除体系, 与传统的敲除体系比较, 其敲除效率更高, 在不进行单克隆操作的前提下, 药物筛选两周就可以获得满足对SH2B3基因进行初步研究与鉴定的细胞群体, 而且该细胞群体中的敲除细胞所占的比例, 从理论上讲, 将会随着药物处理时间的延长而不断提高。

考虑到筛选标记基因可能会对细胞的状态造成影响, 本研究的敲除体系在筛选元件的两端引入两段loxP序列。在Cre重组酶表达的条件下, 能够对引入的筛选元件进行切割, 只剩下一个loxP序列整合在上下游同源臂中间^[20], 并且能刚好在中间引入了一个终止子。从而排除筛选标记基因会对后期实验造成影响的可能性, 在此并未进行更深一步的研究。

本研究也存在一些不足之处。经两种药物筛选后, 理论上存活下来的有嘌呤霉素和新霉素抗性的HeLa细胞都应该是双敲除的细胞。但是, 分离获得的19株HeLa细胞中, 双等位基因插入敲除的细胞只有57.9%, 低于预期效率。推测可能由以下原因造成, 即有一部分细胞内还含有未整合的同源重组筛选载体, 或有抗性基因产物残留, 从而导致筛选后的HeLa细胞中还存在部分未能实现双等位基因插入敲除的细胞。因此, 在后续用于人多能干细胞的敲除实验中, 我们会进一步优化敲除体系。

参考文献 (References)

- Rousseau GF, Giarratana MC, Douay L. Large-scale production of red blood cells from stem cells: what are the technical challenges ahead? *Biotechnol J* 2014; 9(1): 28-38.
- Williamson LM, Devine DV. Challenges in the management of the blood supply. *Lancet* 2013; 381(9880): 1866-75.
- Li Y, He X, Schembri-King J, Jakes S, Hayashi J. Cloning and characterization of human Lnk, an adaptor protein with pleckstrin homology and Src homology 2 domains that can inhibit T cell activation. *J Immunol* 2000; 164(10): 5199-206.
- Seita J, Ema H, Ooehara J, Yamazaki S, Tadokoro Y, Yamasaki A, et al. Lnk negatively regulates self-renewal of hematopoietic stem cells by modifying thrombopoietin-mediated signal transduction. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104(7): 2349-54.
- Takizawa H, Eto K, Yoshikawa A, Nakauchi H, Takatsu K, Takaki S. Growth and maturation of megakaryocytes is regulated by Lnk/Sh2b3 adaptor protein through crosstalk between cytokine- and integrin-mediated signals. *Exp Hematol* 2008; 36(7): 897-906.
- Giani FC, Fiorini C, Wakabayashi A, Ludwig LS, Salem RM, Jobaliya CD, et al. Targeted application of human genetic variation can improve red blood cell production from stem cells. *Cell Stem Cell* 2016; 18(1): 73-8.
- van der Harst P, Zhang W, Mateo Leach I, Rendon A, Verweij N, Sehmi J, et al. Seventy-five genetic loci influencing the human red blood cell. *Nature* 2012; 492(7429): 369-75.
- Shin SE, Lim JM, Koh HG, Kim EK, Kang NK, Jeon S, et al. CRISPR/Cas9-induced knockout and knock-in mutations in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Sci Rep* 2016; 6: 27810.
- Paix A, Folkmann A, Rasoloson D, Seydoux G. High efficiency, homology-directed genome editing in *Caenorhabditis elegans* using CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein complexes. *Genetics* 2015; 201(1): 47-54.
- Bassett AR, Liu JL. CRISPR/Cas9 and genome editing in *Drosophila*. *J Genet Genomics* 2014; 41(1): 7-19.
- Auer TO, Del Bene F. CRISPR/Cas9 and TALEN-mediated knock-in approaches in zebrafish. *Methods* 2014; 69(2): 142-50.
- Kimura Y, Oda M, Nakatani T, Sekita Y, Monfort A, Wutz A, et al. CRISPR/Cas9-mediated reporter knock-in in mouse haploid embryonic stem cells. *Sci Rep* 2015; 5: 10710.
- 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.
- He X, Tan C, Wang F, Wang Y, Zhou R, Cui D, et al. Knock-in of large reporter genes in human cells via CRISPR/Cas9-induced homology-dependent and independent DNA repair. *Nucleic Acids Res* 2016; 44(9): e85.
- Auburger G, Gispert S, Lahut S, Omur O, Damrath E, Heck M, et al. 12q24 locus association with type 1 diabetes: SH2B3 or ATXN2? *World J Diabetes* 2014; 5(3): 316-27.
- Lu XJ, Xue HY, Ke ZP, Chen JL, Ji LJ. CRISPR-Cas9: a new and promising player in gene therapy. *J Med Genet* 2015; 52(5): 289-96.
- Zhang F, Wei Y, Guo X. CRISPR/Cas9 for genome editing: progress, implications and challenges. *Hum Mol Genet* 2014; 23(R1): R40-6.
- Rivera-Torres N, Strouse B, Bialk P, Niamat RA, Kmiec EB. The position of DNA cleavage by TALENs and cell synchronization influences the frequency of gene editing directed by single-stranded oligonucleotides. *PLoS One* 2014; 9(5): e96483.
- 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.
- 赵青, 郭仰东, 谢华马, 荣才, 姚磊. 基于AlcR/alcA和Cre/loxP系统的标记基因诱导删除体系. *中国农业科学* (Zhao Qing, Guo Yangdong, Xie Huama, Rong Cai, Yao Lei. Excision of selectable markers based on inducible AlcR/alcA and Cre/loxP. *Scientia Agricultura Sinica*) 2011; 44(17): 3491-500.