

利用CRISPR/Cas9技术制备B2M⁻细胞模型

李戊玲¹ 沈俊杰² 钱程^{1,2*}

(¹浙江理工大学生命科学学院, 杭州 310018; ²第三军医大学西南医院, 生物治疗中心, 400038 重庆)

摘要 I型主要组织相容性复合物(major histocompatibility complex class I, MHC I)是造成免疫排斥的重要分子, 该研究利用CRISPR/Cas9(clustered regularly interspersed short palindromic repeats)技术靶向其 $\beta 2$ 微球蛋白(beta-2 microglobulin, B2M)亚基实现MHC I的敲除, 并在分子和细胞水平进行验证。设计针对B2M基因的gRNA(guide RNA)并构建对应的CRISPR/Cas9基因敲除质粒, 通过电穿孔转染技术将同时带有Cas9蛋白与gRNA骨架的质粒瞬时转入HEK293细胞中进行蛋白表达与基因组核酸切割, 流式分选得到HEK293 B2M⁻阴性细胞, 提取其基因组并对gRNA靶向区域与脱靶区域进行聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR), 将PCR产物连接T载体测序检测基因打靶与脱靶情况。同时, 利用反转录聚合酶链式反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)与实时定量荧光聚合酶链式反应(Real-time polymerase chain reaction, Real-time PCR)测定B2M基因在RNA水平的表达。综上所述, 该研究发现了一种利用CRISPR/Cas9技术快速便捷、低成本的可用于敲除B2M基因的方法, 经检测可使目的细胞中B2M基因发生移码、插入、缺失、单碱基突变, 且未发现脱靶现象, 这在未来解决免疫排斥相关难题上意义重大。

关键词 B2M; CRISPR/Cas9; HEK293; 电穿孔; 脱靶

Preparation of B2M⁻ Cell By CRISPR/Cas9 Technology

Li Wuling¹, Shen Junjie², Qian Cheng^{1,2*}

(¹College of Life Science, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China;

²Biological Therapy Center, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract The major histocompatibility complex I (MHC I) is an extremely important molecule that causes immune rejection. In this study, they used CRISPR/Cas9 technology to target its B2M (beta-2 microglobulin) subunit to achieve MHC I knockout, and verify the deletion efficiency on molecular and cellular level. The guide RNA (gRNA) of B2M gene was designed and constructed to the CRISPR/Cas9 knockout plasmid containing both Cas9 protein and gRNA. Then the plasmid was transfected into HEK293 cells by electroporation systems. After that, HEK293-B2M⁻ cells were sorted by fluorescence activated cell sorting, followed by extracting genomic DNA from B2M knockout HEK293 cells. The polymerase chain reaction (PCR) was performed for amplifying either the gRNA targeted or potential off-target regions of genome. The PCR product was inserted into the T vector and analyzed of targeted and off-target efficiency using genetic sequencing. At the same time, the expression of B2M gene in RNA level was detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and Real-time polymerase chain reaction (Real-time PCR). In conclusion, this study developed a rapid and convenient method

收稿日期: 2018-01-29 接受日期: 2018-04-28

科技部重点专项(批准号: 2016YFC1303400)和第三军医大学第一附属医院重大技术创新计划重大项目(批准号: SWH2016ZDCX1004)资助的课题

*通讯作者。Tel: 15086883400, E-mail: cqian8634@gmail.com

Received: January 29, 2018 Accepted: April 28, 2018

This work was supported by the Key Projects of the Ministry of Science and Technology (Grant No.2016YFC1303400) and Major Projects of Major Technical Innovation Projects of the First Affiliated Hospital of the Third Military Medical University (Grant No.SWH2016ZDCX1004)

*Corresponding author. Tel: +86-15086883400, E-mail: cqian8634@gmail.com

网络出版时间: 2018-07-27 11:51:37

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20180727.1151.004.html>

for knocking out *B2M* gene using CRISPR/Cas9 technology. After detecting, it demonstrated to successfully introducing frameshift, insertion, deletion and single base mutations in *B2M* gene, and off-target phenomenon was not found. It could be a great application in solving the problem of immune rejection in the future.

Keywords B2M; CRISPR/Cas9; HEK293T; electroporation; off-target

B2M(beta-2 microglobulin)基因是位于15号染色体上非人类白细胞抗原(human leukocyte antigen, *HLA*)基因所编码的β链或轻链, 即β2微球蛋白^[1], 它不插入包膜, 并以非共价键与重链胞外α3相互作用, 这对维持I类MHC分子天然构型的稳定性及其分子表达具有重要意义。MHC I类分子是最重要的免疫排斥相关分子, 敲除此类分子是解决免疫排斥问题的突破口之一, 但由于其多基因性与多态性的特点, 对MHC I类分子进行直接敲除操作难度巨大, 技术水平还有待提高。相关报道证明, 缺乏β2微球蛋白的突变型小鼠不表达MHC I类分子^[2]。全基因组测序发现, 人类*B2M*基因无多态性, 具有高度保守的特点。目前, 越来越多的机构通过敲除*B2M*基因与其他相关基因达到避免细胞发生免疫排斥反应的目的^[3-5]。这一技术在近几年一项热门的免疫细胞治疗技术中也得到广泛应用^[6-8]。CRISPR/Cas9技术是近几年兴起的一种高效基因组编辑技术^[9-10], 其与锌指核酸酶(zinc-finger nucleases, ZFNs)^[11]和转录激活因子样效应物核酸酶(transcription activator-like effector nucleases, TALENs)^[12]技术相比具有易操作、更高效的优势, 该技术在各种动物细胞中已成功实现基因组编辑^[13-15]。本研究利用CRISPR/Cas9技术在模式细胞HEK293中成功实现对*B2M*基因的敲除, 并在分子与细胞水平对其进行基因编辑效率验证与基因脱靶率检测。本研究提出的敲除方法操作简便、操作难度小、成本低、实验周期短, 为该领域相关

研究提供了一种较好的技术选择方案。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

HEK293细胞购自美国标准生物制品收藏中心。表达质粒pX330购买于Addgene公司。大肠杆菌Top10菌株由本实验室长期保存。限制性内切酶*Bbs* I、T7核酸内切酶I购自NEB公司。Annealing Buffer for DNA Oligos(5×)购自碧云天生物技术有限公司。T4 DNA连接酶、胶回收试剂盒、大抽试剂盒、RNA提取试剂盒均购自Promega公司。Gelred核酸染料购自Biotium公司。胎牛血清、DMEM basic培养基均购自Gibco公司。PE-B2M单克隆抗体购自Biolegend公司。PE-HLA I类分子多克隆抗体购自Abcam公司。DNA Blood Mini QIAcube Kit购自Qiagen公司。Mighty TA-cloning Kit、2×PCR Solution Premix Taq™、反转录试剂盒、SYBR Advantage qPCR Premix均购自TaKaRa公司。氨苄青霉素、双抗、x-gal溶液、IPTG溶液及其他分析纯试剂均购自生工生物(上海)工程股份有限公司。

1.2 方法

1.2.1 pX330质粒构建 将载体pX330(图1)用限制性内切酶*Bbs* I消化,用琼脂糖凝胶电泳并割胶回收后, -20 °C保存备用。根据gRNA设计网站<http://crispr.mit.edu>使用说明,输入一段预打靶的DNA序列,选择符合靶位点设计要求的gRNA(位于1号外显

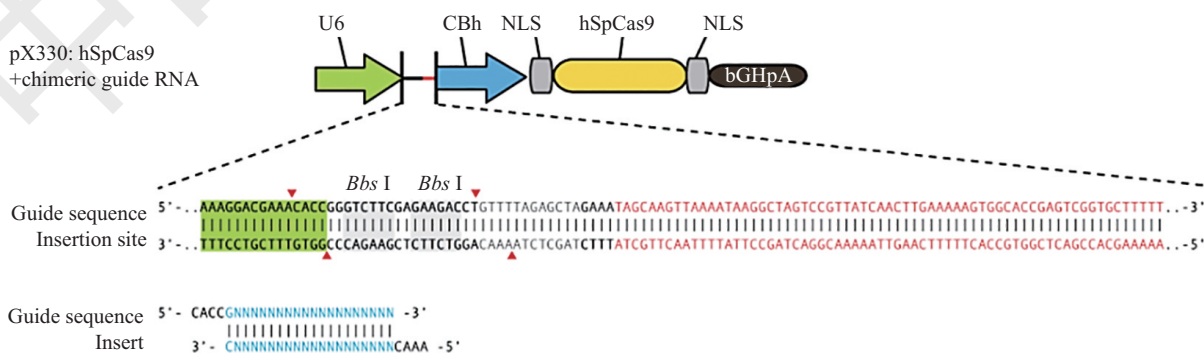


图1 pX330质粒示意图

Fig.1 Schematic diagram of pX330 vector

子上)。订购添加*Bbs* I酶切位点的gRNA上下游引物, sg-B2M-up: 5'-CAC CGA GTA GCG CGA GCA CAG CTA-3', sg-B2M-down: 5'-AAA CTA GCT GTG CTC GCG CTA CTC-3'。上下游引物退火后将退火产物与pX330酶切产物进行连接并转化Top10大肠杆菌感受态细胞,挑取单菌落培养后提取质粒。用*Bbs* I酶切鉴定,挑取阳性克隆质粒送南京金斯瑞生物科技有限公司测序,测序正确的质粒进行大抽后命名为pX330-sg-B2M。

1.2.2 电转染基因敲除质粒 HEK293细胞在10% FBS DMEM基础培养基, 37 °C、5% CO₂条件下培养,待细胞状态良好时用胰酶消化细胞,制成溶于R buffer的质粒与细胞悬液,细胞密度为5×10⁶/mL。用电转染仪器(Thermo公司)自带移液枪量取10 μL细胞悬液于电转仪器中,设定电转染条件为1 400 V、30 ms、电击2次,电击完成后将细胞转移至含有500 μL无双抗、含10% FBS培养基的24孔板中,摇匀后置于培养箱培养。24 h内更换新鲜的培养基(可含双抗),后续培养中每2~3天更换新鲜培养基即可。

1.2.3 流式检测与分选技术 电转后细胞培养4天时,取未电转细胞及电转后细胞各1×10⁶个, PBS洗2遍,用95 μL含1% FBS的PBS溶液重悬,加入5 μL PE标记的人B2M单克隆抗体混匀; 4 °C放置30 min,每隔10 min用涡旋仪震荡混匀1次, PBS洗2次,除去多余的抗体,取300 μL含1% FBS的PBS溶液重悬,流式检测B2M基因的蛋白表达水平。检测完毕即可进行流式分选B2M阴性的HEK293细胞,孵育抗体步骤与

检测相同,并继续培养扩增。

1.2.4 基因编辑验证 分选后培养一周的B2M⁻ HEK293细胞流式检测B2M分子,检测基因表达水平。提取基因组,设计针对B2M基因座的引物B2M-PCR-F、B2M-PCR-R(表1),利用PCR方法扩增基因组中的目的片段,并用琼脂糖凝胶电泳回收目的片段。T7核酸内切酶I消化目的片段后琼脂糖凝胶电泳,紫外曝光观察条带切割效率。纯化的目的片段连接T载体后送测序,明确打靶效率。

1.2.5 Real-time PCR检测B2M基因mRNA水平的表达 将HEK293细胞与HEK293 B2M阴性细胞分别接种于6 cm培养皿中,待细胞密度为90%左右时开始处理细胞,用试剂盒提取细胞总mRNA。获得的mRNA用RT-PCR逆转录合成cDNA,并用Real-time PCR技术测定B2M基因mRNA水平的表达,Real-time PCR中用到相关引物见表2, *GAPDH*为本实验室设计的标准内参引物。以获得的cDNA为模板,按照标准Real-time PCR体系加样,并用ABI Q3荧光定量PCR仪测定。PCR扩增体系为: 2×SYBR Advantage qPCR Premix 10 μL、10 μmol/L正反引物各1 μL、cDNA模板100 ng、ddH₂O补足至20 μL。反应程序为: 95 °C预变性10 min; 95 °C变性15 s, 60 °C退火1 min, 40个循环。结果以 $\Delta\Delta Ct$ 值计算相对表达量,用*t*检验计算差异。

1.2.6 基因敲除脱靶率检测 表3为gRNA设计网站预测的脱靶位点,即基因组上预期靶点以外的位点,表中下划线标记碱基是不同于打靶位点的碱基。

表1 打靶/脱靶位点扩增引物序列与长度

Table 1 Amplification primers' sequence and length of target/off-target site

引物名称 Primer name	序列(5'→3') Sequence (5'→3')	长度(bp) Length (bp)
B2M-PCR-F	CCT TGT CCT GAT TGG CTG GG	20
B2M-PCR-R	GAC GCT TAT CGA CGC CCT AA	20
Off-target-1-F	GAA GCC CTT TTC TCC AGG CT	20
Off-target-1-R	CAT GTT GGG GTC CAG TGT CA	20
Off-target-2-F	CAG CAG GGG AAA GGG AAG AG	20
Off-target-2-R	GGC CTA AAT CGC ACT GAC CT	20
Off-target-3-F	CAG CAG GGG AAA GGG AAG AG	20
Off-target-3-R	GGC CTA AAT CGC ACT GAC CT	20
Off-target-4-F	GGC ATG GAG TGA CAC ATA CGA	21
Off-target-4-R	AGA CGC AAG CTC AAG TAG GG	20

表2 Real-time PCR相关序列与长度
Table 2 Real-time PCR sequence and length

引物名称	序列(5'→3')	长度(bp)
Primer name	Sequence (5'→3')	Length (bp)
GAPDH-F	TAG CTG TGC TCG CGC TAC TC	20
GAPDH-R	ATG GTT CAC ACG GCA GGC AT	20
B2M-RT-F	GTC TCC TCT GAC TTC AAC AGC G	22
B2M-RT-R	ACC ACC CTG TTG CTG TAG CCA A	22

表3 预测脱靶位点突变频率分析
Table 3 Mutation frequency analysis of the predicted off-target sites

靶点	gRNA基序	PAM	基因	脱靶分析
Target site	gRNA motif	PAM	Gene	Off-target analysis
sg-B2M	GAG TAG CGC GAG CAC AGC TA	AGG	<i>B2M</i>	—
Off-target-1	GAG T <u>G</u> C CAC CAG CAC AGC TA	CAG	<i>ACPT</i>	0/14
Off-target-2	GAG TAG GGC GGG GAC AGC TA	GAG	<i>CXorf40A</i>	0/18
Off-target-3	GAG TAG GGC GGG GAC AGC TA	GAG	<i>CXorf40B</i>	0/10
Off-target-4	GAG TAG CAC CAC CAC ATC TA	GAG	<i>PLA2G4C</i>	0/16

下划线: 该脱靶位点与打靶位点对应位置碱基不同。

Underline: these bases in the off-target site differ from the corresponding positions of the target site.

以off-target-1为例, off-target-1表示*ACPT*基因上的一段序列(GAG TGC CAC CAG CAC AGC TA), 这段序列中下划线标记的四个碱基: 5(G)、6(C)、8(A)、10(C)与打靶位点对应位置碱基不同, 其余都相同。根据脱靶位点设计PCR引物(表1), 对提取的野生型和突变型基因组进行PCR, 琼脂糖凝胶电泳回收目的片段, 纯化的目的片段连接T载体后测序, 检测脱靶情况。

1.3 统计学分析

数据采用Graphpad prism 6统计软件进行*t*检验, 以*P*<0.05为具有统计学差异。

2 结果

2.1 表达载体pX330-sg-B2M酶切鉴定及测序

将针对*B2M*基因设计的gRNA(sg-B2M)构建产物用*Bbs* I酶进行酶切鉴定, 当成功插入到pX330质粒中时, *Bbs* I酶识别位点消失, 无法切割。酶切结果显示构建的质粒经*Bbs* I无法切割(图2A, 泳道1), 进一步对质粒进行测序验证(图2B), 测序结果显示, pX330-sg-B2M质粒构建成功。

2.2 敲除效率确认与分选

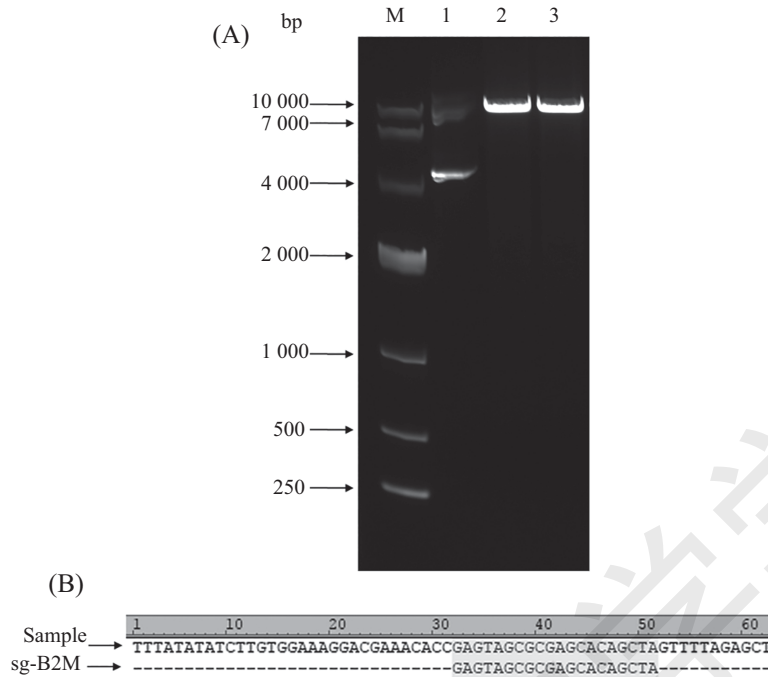
与对照HEK293细胞中B2M 100%阳性表达相比(图3A), 电转染敲除质粒pX330-sg-B2M后, 流式

检测对照细胞HEK293中B2M阳性率占总细胞数的比例为25.6%(图3B), 即敲除效率达到74.4%。为得到高纯度HEK293 B2M阴性细胞进行后续实验, 我们对这些细胞进行流式分选, 进而传代培养。流式检测结果显示, 分选得到的细胞纯度达到99.9%(图3C)。

HLA I类分子具有多态性并且由多个亚基分子组成, 通过直接敲除获得完全不表达所有类型HLA I类分子难度巨大。为了进一步验证B2M敲除是否可以清除HLA I类分子, 我们用流式检测B2M敲除前后细胞中HLA I类分子的表达情况, 由图4可知, 未敲除的HEK293细胞中HLA I类分子为全阳性表达(图4A), 经*B2M*基因敲除后的HEK293 B2M阴性细胞也不表达HLA I类分子(图4B), 这一结果与B2M分子敲除前后的表达情况一致。这也验证了B2M分子作为HLA I类分子各分型共同保守亚基的作用, 未来实验中我们可以通过敲除各种细胞系中的*B2M*基因获得HLA阴性细胞系, 这类细胞在细胞免疫排斥研究领域具有广泛的应用。

2.3 酶切鉴定及测序检测CRISPR/Cas9打靶效果

分别收集未敲除*B2M*基因的对照细胞以及分选纯化的B2M阴性细胞, 提取基因组, 用表1中的*B2M*基因PCR引物进行目的条带扩增, 得到大小为450 bp

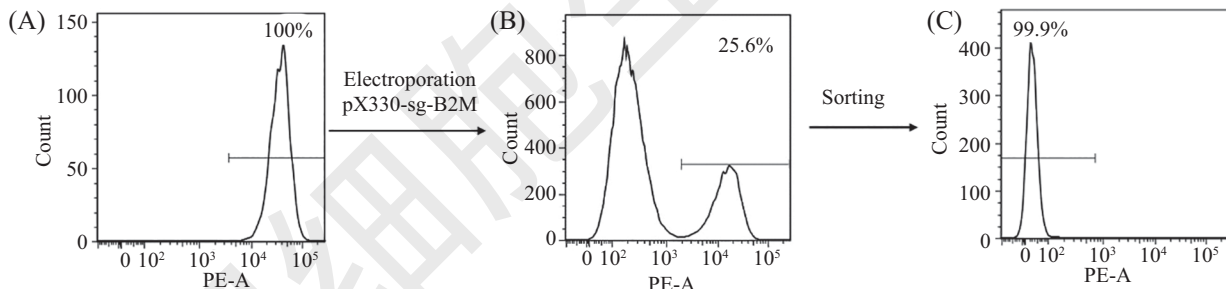


A: pX330-sg-B2M质粒及酶切凝胶电泳鉴定结果; M: DL10000 DNA分子量标准; 1: pX330成功连接sg-B2M阳性克隆*Bbs* I酶切; 2: pX330未连接成功阴性对照*Bbs* I酶切; 3: pX330原质粒*Bbs* I酶切; B: pX330-sg-B2M质粒测序比对。

A: digestion of pX330-sg-B2M plasmid by gel electrophoresis; M: DL10000 DNA marker; 1: *Bbs* I digestion of pX330 successfully connected with sg-B2M; 2: *Bbs* I digestion of pX330 unconnected with sg-B2M; 3: *Bbs* I digestion of pX330 plasmid; B: sequence alignment of pX330-sg-B2M plasmid.

图2 pX330-sg-B2M质粒酶切鉴定

Fig.2 Enzyme identification of px330-sg-B2M plasmid



A: sg-B2M阴性细胞, HEK293T细胞B2M分子表达量为100%; B: 电转pX330-sg-B2M质粒后B2M阳性细胞下降为25.6%; C: 流式分选B2M阴性细胞后, B2M阴性率为99.9%。

A: the expression of B2M in sg-B2M negative HEK293T cells was 100%; B: the expression of B2M was reduced to 25.6% after pX330-sg-B2M was electroporated; C: B2M negative cells were 99.9% after fluorescent cell sorting.

图3 HEK293细胞B2M表达量变化

Fig.3 B2M expression level change in HEK293 cell

条带。T7 E I酶切鉴定结果见图5, 未敲除的对照细胞基因组PCR不被切割, 而分选后的B2M阴性细胞基因组PCR产物可以被明显切割为两个条带: 1条约330 bp, 另外1条约100 bp。TA克隆测序显示, 大部分靶位点发生移码突变, 此外有少部分插入, 缺失及碱基突变。以上结果表明, 打靶成功。

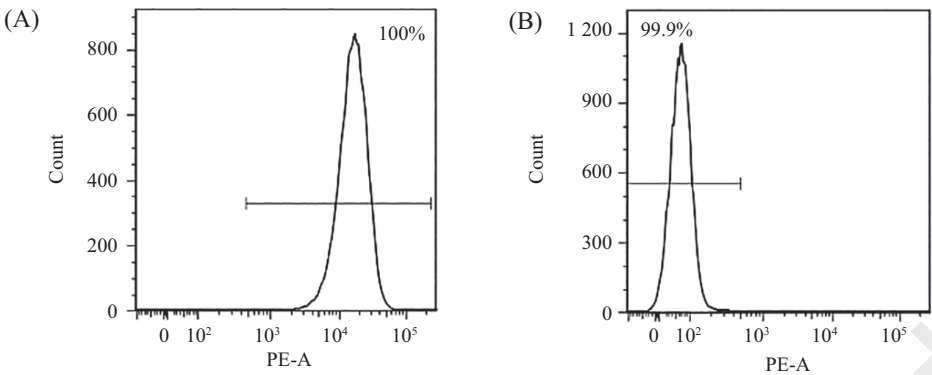
2.4 Real-time PCR检测B2M基因mRNA水平

Real-time PCR结果见图7, 以B2M基因在未敲除的HEK293-BLANK细胞中mRNA表达为对照,

经CRISPR/Cas9基因编辑技术敲除后, HEK293-B2M-细胞中表达为原来的16.4%。此结果说明, 基因敲除后B2M基因在mRNA水平的表达显著下降 ($P < 0.05$)。

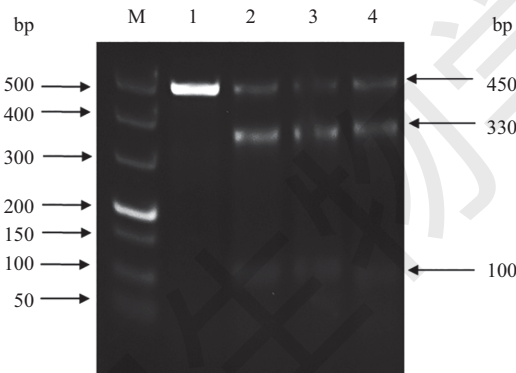
2.5 CRISPR/Cas9打靶后脱靶效率检测

根据gRNA设计网站预测脱靶位点, 用表1中对应脱靶位点引物对脱靶区域条带进行扩增, 获得包含脱靶位点序列在内的目的条带。以off-target-1为例, TA克隆(图8A)后测序显示(图8B), 随机挑取的14



A: sg-B2M阴性细胞, HEK293细胞HLA I分子表达量为100%; B: 电转pX330-sg-B2M质粒后分选得到的B2M-HEK293T细胞中HLA I分子不表达。
A: sg-B2M negative cells, HEK293 cells HLA I molecule expression was 100%; B: B2M HEK293T cells HLA I molecules are not expressed after electroporation pX330-sg-B2M plasmid and sorting.

图4 HLA I类分子与B2M分子关系
Fig.4 The relationship between HLA class I and B2M



M: DL500 DNA分子量标准; 1: 未敲除阴性对照组PCR产物T7 E I酶切鉴定; 2~4: 分选B2M阴性后PCR产物T7 E I酶切鉴定。
M: DL500 DNA; 1: T7 E I digestion of PCR product in negative control; 2-4: T7 E I digestion of PCR product in B2M negative cell after sorting.

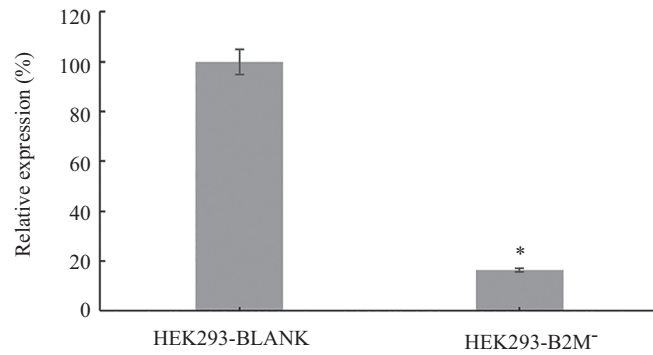
图5 靶区域PCR产物T7 E I酶切鉴定
Fig.5 Target area PCR fragment enzyme identification by T7 E I

WT	CCAGAAAGAGAGTAGCGGAGCAGCTAAGGCCACGGAGCGAGACATCTCGGCCCGAAT	
	CCAGAA-----CGCGA-----CGGAGCGAGACATCTCGGCCCGAAT	-26
	CCAGAAAGGAGAGTAGAGCGAG-----CATCTCGGCCCGAAT	M2-25
	CCAGAAAGAGAGAGTAGCGCGAG-----ACATCTCGGCCCGAAT	-23
	CCAGAAAGAGAGAGTAG-----AGCGAGACATCTCGGCCCGAAT	-23
	CCAGAAAGAGAGAGTAGCGCGAGC-----GAGACATCTCGGCCCGAAT	-19
	CCAGAAAGAGAGAGTA-----CTAAGGCCACGGAGCGAGACATCTCGGCCCGAAT	-12
	CCAGAAAGAGAGAGTAGCGCGAGCAGCTT-----CAGGAATGCTGTCATT-----CCGAAT	M9-9
	CCAGAAAGAGAGAGTAGCGCGAGC-----TAAGGCCACGGAGCGAGACATCTCGGCCCGAAT	-5
	CCAGAAAGAGAGAGTAGCGCGAGCAGC-----CTAAGGCCACGGAGCGAGACATCTCGGCCCGAAT	-2
	CCAGAAAGAGAGAGTAGCGCGAGCAGCAG-----TAAGGCCACGGAGCGAGACATCTCGGCCCGAAT	-1
	CCAGAAAGAGAGAGTAGCGCGAGCAGCAG-----GCTAAAGCCACGGAGCGAGACATCTCGGCCCGAAT	M1-1
	CCAGAAAGAGAGAGTAGCGCGAGCAGCAGCTAAGGCCACGGAGCGAGACATCTCGGCCCGAAT	+1
	CCAGAAAGAGAGAGTAGCGCGAGCAGCAGAGCTAAGGCCACGGAGCGAGACATCTCGGCCCGAAT	M1+1
	CCAGAAAGAGAGAGTAGCGCGAGCAGCAGAGCTAAGGCCACGGAGCGAGACATCTCGGCCCGAAT	+2
	CCAGAAAGAGAGAGTAGCGCGAGCAGCAGCTAAGGCCACGGAGCGAGACATCTCGGCCCGAAT	+4

下划线表示靶位点序列; 绿色表示PAM序列; 黑色虚线表示缺失碱基, 红色表示单个突变后碱基, 蓝色表示插入碱基。
Underlined indicates the sequence of the target site; green indicates the PAM sequence; black dotted lines indicate missing bases, red indicates single mutated bases and blue indicates inserted bases.

图6 代表性细胞突变类型
Fig.6 Representative cell mutation types

个单克隆样品均未发生突变。4个脱靶位点中, 在每个单克隆样品均未发生突变, 这说明本研究中使用的gRNA脱靶概率较低。

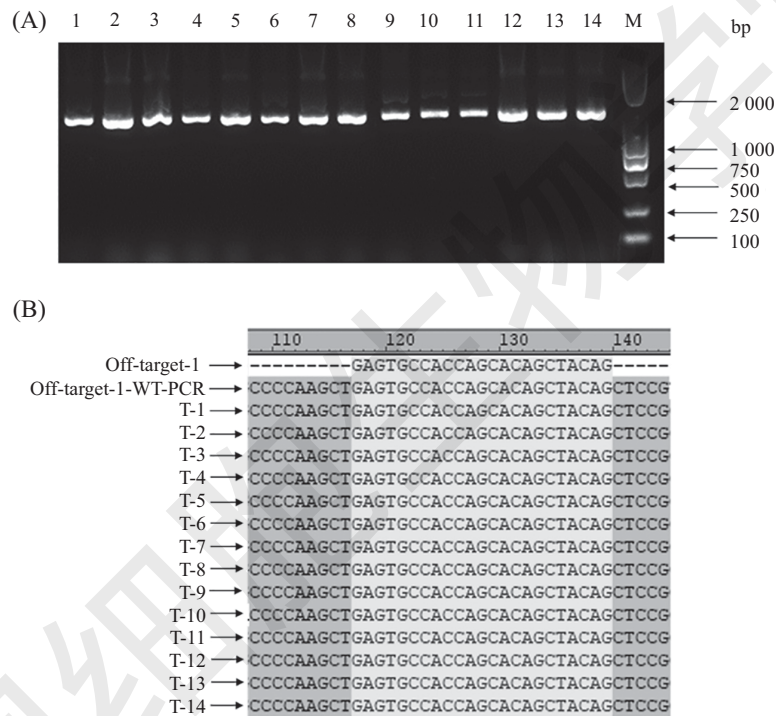


* $P < 0.05$, 与对照组相比。

* $P < 0.05$ vs control (HEK293-BLANK) group.

图7 Real-time PCR检测B2M的mRNA水平

Fig.7 The mRNA level of B2M detected by Real-time PCR



A: TA克隆质粒凝胶电泳图; M: DL2000 DNA分子量标准; 1~14为随机挑取的14个单克隆质粒; B: 随机挑取的14个单克隆M13引物测序结果, T表示连接在T载体上。

A: gel electrophoresis of TA cloning plasmid; M: DL2000 DNA marker; 1-14: randomly picked 14 monoclonal; B: M13 primer sequencing results of randomly picked 14 monoclonal, T means T-vector.

图8 脱靶效应检测结果

Fig.8 Detection result of off-target effects

3 讨论

CRISPR/Cas9是进行基因编辑的强大工具,可对基因进行精确的定点编辑,是研究各种基因功能的重要研究手段,在生命科学研究与医学研究中应用性也很强。随着该项技术的快速发展,应用方式不断增加,打靶精确度与编辑效率不断提高。国外一项新的研究中,利用CRISPR/Cas9基因编辑技术筛选急性骨髓性白血病(acute myelocytic leukemia,

AML)细胞的弱点^[16],这为开发治疗AML的新药物提供了又一项可靠证据。麻省理工学院的科学家开发出一种新型纳米颗粒,这种纳米颗粒能够运输CRISPR基因编辑系统,并对小鼠机体的基因进行特异性修饰。因此,研究人员就能够利用纳米颗粒来携带CRISPR组分,从而消除了使用病毒的需要^[17]。此外,目前还有相关报道研究制定出利用CRISPR/Cas9高效编辑基因组的规则^[18],并且正在测试这些

规则在更多的动物细胞中的反应。除了以上相关应用与进展外,我们相信在不久的将来,该技术还会有更高效便捷的应用成果被开发出来。

本研究采用CRISPR/Cas9基因组编辑技术,选择模式细胞HEK293,在其B2M基因第1个外显子上设计了gRNA靶点。利用电转染方法敲除细胞的B2M基因后,通过测序检测出有移码、插入、缺失及单碱基突变四种突变,其中以移码突变为主。对设计网站预测的基因脱靶位点进行检测,未发现sg-B2M发生脱靶效应。Real-time PCR结果显示,敲除B2M基因后的HEK293 B2M阴性细胞的mRNA表达量显著下调。流式检测表明,B2M基因敲除后的细胞,其B2M分子与HLA I类分子均不再表达,这在器官移植研究中借鉴意义极大。由于HLA I类分子中HLA-A、HLA-B、HLA-C三类具有多基因性、高度不保守与高度多态性的特点,单独敲除这三个分子难度很高。此前,为了敲除HLA I类分子,Torikai等^[19]通过确认细胞的HLA I类分子分型,再针对已知HLA I类分子重链亚基序列设计打靶位点进行基因敲除。这种方法必须完整测出该细胞所有分型序列才能确定打靶位点,实验过程复杂、成本高、周期长,此时,它们的共同亚基B2M就起到了很好的代替作用。近期,研究者利用体外转录的方法分别获得Cas9与靶向B2M的gRNA的RNA产物,并对二者混合物悬液进行电转,获得不错的敲除效果^[7]。但为了达到较好的效果,作者使用了两次电转。与之相比,本研究中通过单质粒转染的方式,经一次电转即可达到较高的效率,且无需体外转录步骤。从工序复杂程度、难度及时效上来说,本研究提供的方案更简洁,成本低且更容易推广。综上所述,本研究建立了一套可用于敲除B2M基因且操作简便的方法,为研究免疫排斥问题提供了一种细胞模型和技术方案。

参考文献 (References)

- 1 Kenneth M, Paul T, Mark W. Janeway's immunobiology, 8th ed. London and New York: Garland Science, 2011, 206-10.
- 2 Cooper JC, Dealtry GB, Ahmed MA, Arck PC, Klapp BF, Blois SM, *et al.* An impaired breeding phenotype in mice with a genetic deletion of beta-2 microglobulin and diminished MHC class I expression: role in reproductive fitness. *Biol Reprod* 2007; 77(2): 274-9.
- 3 Weiss EH, Lilienfeld BG, MüllerS, Müller E, Herbach N, Kessler B, *et al.* HLA-E/human beta2-microglobulin transgenic pigs: protection against xenogeneic human anti-pig natural killer cell cytotoxicity. *Transplantation* 2009; 87(1): 35-43.
- 4 Kobayashi S, Yoshida K, Ward JM, Letterio JJ, Longenecker G, Yaswen L, *et al.* Beta 2-microglobulin-deficient background ameliorates lethal phenotype of the TGF-beta 1 null mouse. *J Immunol* 1999; 163(7): 4013-19.
- 5 Gornalusse GG, Hirata RK, Funk SE, Riobolobos L, Lopes VS, Manske G, *et al.* HLA-E-expressing pluripotent stem cells escape allogeneic responses and lysis by NK cells. *Nat Biotechnol* 2017; 35(8): 765-72.
- 6 Ren J, Zhang X, Liu X, Fang C, Jiang S, June CH, *et al.* A versatile system for rapid multiplex genome-edited CAR T cell generation. *Oncotarget* 2017; 8(10): 17002-11.
- 7 Ren J, Liu X, Fang C, Jiang S, June CH, Zhao Y. Multiplex genome editing to generate universal CAR T cells resistant to PD1 inhibition. *Clin Cancer Res* 2017; 23(9): 2255-66.
- 8 Eyquem J, Mansilla-Soto J, Giavridis T, van der Stegen SJ, Hamieh M, Cunanan KM, *et al.* Targeting a CAR to the TRAC locus with CRISPR/Cas9 enhances tumour rejection. *Nature* 2017; 543(7643): 113-7.
- 9 Chen S, Sanjana NE, Zhang F, Shalem O, Lee K, Shi X, *et al.* Genome-wide CRISPR screen in a mouse model of tumor growth and metastasis. *Cell* 2015; 160(6): 1246-60.
- 10 Hsu PD, Scott DA, Zhang F, Ran FA, Konermann S, Agarwala V, *et al.* DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nat Biotechnol* 2013; 31(9): 827-32.
- 11 Bhakta MS, Henry IM, Ousterout DG, Das KT, Lockwood SH, Meckler JF, *et al.* Highly active zinc-finger nucleases by extended modular assembly. *J Genome Res* 2013; 23(3): 530-8.
- 12 Wood AJ, Lo TW, Zeitler B, Pickle CS, Ralston EJ, Lee AH, *et al.* Targeted genome editing across species using ZFNs and TALENs. *Science* 2011; 333(6040): 307.
- 13 Wang H, Yang H, Zhang F, 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.
- 14 Munoz IM, Szyniarowski P, Toth R, Rouse J, Lachaud C. Improved genome editing in human cell lines using the CRISPR method. *PLoS One* 2014; 9(10): e109752.
- 15 Duan Y, Ma G, Zhang F, D'Amore PA, Zhang F, Lei H. The clustered, regularly interspaced, short palindromic repeats-associated endonuclease 9 (CRISPR/Cas9)-created MDM2 T309G mutation enhances vitreous-induced expression of MDM2 and proliferation and survival of cells. *Biol Chem* 2016; 291(31): 16339-47.
- 16 Barbieri I, Tzelepis K, Pandolfini L, Shi J, Millán-Zambrano G, Robson SC, *et al.* Promoter-bound METTL3 maintains myeloid leukaemia by m6A-dependent translation control. *Nature* 2017; 552(7683): 126-31.
- 17 Yin H, Song CQ, Suresh S, Wu Q, Walsh S, Rhym LH, *et al.* Structure-guided chemical modification of guide RNA enables potent non-viral *in vivo* genome editing. *Nat Biotechnol* 2017; 35(12): 1179-87.
- 18 Paix A, Folkmann A, Goldman DH, Kulaga H, Grzelak MJ, Rasoloson D, *et al.* Precision genome editing using synthesis-dependent repair of Cas9-induced DNA breaks. *Proc Natl Acad Sci USA* 2017; 114(50): E10745-54.
- 19 Torikai H, Reik A, Soldner F, Warren EH, Yuen C, Zhou Y, *et al.* Toward eliminating HLA class I expression to generate universal cells from allogeneic donors. *Blood* 2013; 122(8): 1341-9.