

质粒电穿孔Jurkat细胞递送CRISPR/Cas9系统的优化

赵日^{1,2} 蒙露³ 冯建琼² 刘攀³ 家婷¹ 郑武燕⁴ 张悦⁵ 刘佳慧⁴ 张涛² 邹强³ 李华^{2*}

(¹西南交通大学医学院, 成都 610031; ²西部战区总医院, 成都 610083; ³成都医学院, 成都 610500;

⁴成都中医药大学, 成都 610075; ⁵川北医学院, 南充 637007)

摘要 CRISPR/Cas9是一种应用广泛的高效基因编辑技术。运用CRISPR/Cas9对T细胞进行基因修饰能增强T细胞的特异性免疫应答能力, 在过继性肿瘤免疫T细胞治疗中具有巨大应用前景。CRISPR/Cas9的递送途径及效率影响着其基因编辑的效率。电穿孔是一种安全、简单、经济、高效、适用范围广和重复性好的转染方法, 可用来高效递送CRISPR/Cas9系统。本研究以常用的T淋巴细胞系癌细胞Jurkat细胞为T细胞模型材料, 利用绿色荧光蛋白基因质粒观测转染效率, 探索质粒电穿孔Jurkat细胞的最优体系, 进一步采用该优化体系成功递送CRISPR/Cas9系统进入Jurkat细胞, 高效地敲除目的 $\beta 2M$ 基因, 使之成为HLA- Γ Jurkat细胞。该研究提供了适用于质粒CRISPR/Cas9系统电穿孔T细胞的优化系统, 为后续将CRISPR/Cas9基因编辑系统运用于过继性T细胞肿瘤治疗奠定了基础。

关键词 CRISPR/Cas9; 电穿孔; 基因编辑; 优化; CAR-T

Optimization of Plasmid Electroporation of Jurkat Cells for Delivery of CRISPR/Cas9 System

Zhao Ri^{1,2}, Meng Lu³, Feng Jianqiong², Liu Pan³, Jia Ting¹, Zheng Wuyan⁴, Zhang Yue⁵,

Liu Jiahui⁴, Zhang Tao², Zou Qiang³, Li Hua^{2*}

(¹College of Medical, Southwest Jiaotong University, Chengdu 610031, China; ²The General Hospital of Western Theater Command, Chengdu 610083, China; ³Chengdu Medical College, Chengdu 610500, China; ⁴Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China; ⁵North Sichuan Medical College, Nanchong 637007, China)

Abstract CRISPR/Cas9, a highly efficient gene editing technology, can be used for gene modification in T cells to enhance their specific immune response in adaptive cellular therapy of tumor. However, the delivery methods and efficiency of CRISPR/Cas9 system affects the efficiency of gene editing. Electroporation is a safe, simple, economical and reproducible transfection strategy and could be used to deliver CRISPR/Cas9 system into the cells. In this study, Jurkat cells were used as a T cell model and the plasmid with green fluorescent protein gene was used as a detective marker to observe the transfection efficiency and optimize the parameters in plasmid electroporation of Jurkat cells. Furthermore, using these optimized parameters, the CRISPR/Cas9 system was successfully delivered into Jurkat cells and the $\beta 2M$ gene was effectively knocked out to become HLA- Γ Jurkat cells. This study provided an optimal system of plasmid electroporation of Jurkat cells suitable for delivery of CRISPR/Cas9 system, laid a foundation for subsequent application of CRISPR/Cas9 system in adaptive cellular therapy of tumor.

Keywords CRISPR/Cas9; electroporation; gene editing; optimize; CAR-T

收稿日期: 2018-12-09

接受日期: 2019-01-16

*通讯作者。Tel: 13550317631, E-mail: 1749775313@qq.com

Received: December 9, 2018

Accepted: January 16, 2019

*Corresponding author. Tel: +86-13550317631, E-mail: 1749775313@qq.com

网络出版时间: 2019-05-09 11:15:49

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20190509.1115.004.html>

近年来, CRISPR(clustered regularly interspaced short palindromic repeat)/Cas(CRISPR-associated) 基因编辑系统已成为基础生物医学研究和治疗应用中最强大的平台之一^[1-3]。CRISPR/Cas基因编辑系统有多种类型, 其中化脓性链球菌的II型CRISPR/Cas系统由于其组成简单、通用性好、特异性高和编辑效率高等特点, 而被广泛应用于生物医学领域^[4], 特别在过继性肿瘤免疫细胞治疗的研发中, 更是受到极大的欢迎。利用CRISPR/Cas基因编辑技术, 可望将目前昂贵的自体肿瘤免疫T细胞治疗模式转变为经济型的通用型异体模式, 还可以增强回输T细胞抗肿瘤微环境的能力。例如, 在带来治愈曙光的嵌合抗原受体基因修饰T(CAR-T)细胞疗法^[5-7]的通用化改造研究中, 有报道利用CRISPR/Cas9基因编辑技术敲除供体T细胞的HLA-I类分子, 制备无免疫原性的T细胞^[2]。也有研究团队利用CRISPR/Cas9技术敲除自体回输T细胞表面的抑制性受体PD-1, 以增强T细胞抗肿瘤PD-L1的抑制作用^[8]。

然而, 如何将CRISPR/Cas9系统的核心原件Cas9蛋白和sgRNA有效递送到特定靶细胞, 一直是CRISPR/Cas9技术运用的关键挑战之一。递送CRISPR/Cas9系统可以采用多种转基因方式, 如利用慢病毒、腺病毒、腺相关病毒和细胞膜穿透肽等生物方式, 也可以采用物理化学方式, 如利用脂质体、磷酸钙法、DNA纳米团聚合物、电穿孔等。电穿孔法具有操作简单经济、转染效率高、无残留毒性、也无潜在的病毒随机插入基因组带来癌变的风险等优点^[9], 是CRISPR/Cas9系统递送的主要方式^[2-3,10]。但是对T细胞, 电穿孔质粒DNA对其毒性很大^[11-12], 细胞的活力与转染效率不理想, 是当前应用电穿孔对T细胞进行基因编辑的主要难点。影响电穿孔效果的因素很多, 包括电压、脉冲时间、质粒浓度、电转缓冲液和温度等。优化电穿孔条件, 能提高CRISPR/Cas9系统的递送效率, 从而有效提高基因编辑效率。

Jurkat细胞是人急性T淋巴细胞白血病细胞株, 常被作为研究T细胞功能的平台。最近, 有研究者开发了一种基于Jurkat细胞的CRISPR/Cas9工具, 加速了对T细胞的研究^[13]。本研究以电穿孔绿色荧光蛋白基因质粒进入Jurkat细胞为模型, 系统考察了电压、脉冲时间、电转缓冲液、质粒浓度及电穿孔后静置时间等参数对转染效率和细胞存活率的影响, 确定质粒电穿孔Jurkat细胞的最优条件, 并运用这一

系列优化参数将靶向人 $\beta 2M$ 基因的CRISPR/Cas9系统导入Jurkat细胞, 成功敲除Jurkat细胞的 $\beta 2M$ 基因。研究结果为CRISPR/Cas9系统更好地应用于过继性T细胞治疗奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 试剂和仪器

Jurkat细胞购于中国科学院细胞库; Pmax-GFP质粒购于Celetrix公司; PCLXE-EGFP质粒购于Addgene公司; Endfree plasmid Maxi Kit试剂盒(12362)购于Qiagen公司; FITC anti-HLA-ABC(311404)、PE anti-HLA-ABC(311406)购于Biolegend公司; 电穿孔仪(CTX-1500A)购于Celetrix公司; 流式细胞仪(Novocyt 3130)购于ACEA公司; 倒置荧光显微镜(IX2-ILL100)购于Olympus公司。

1.2 实验方法

1.2.1 质粒提取 按照QIAGEN Endofree plasmid Maxi Kit说明书提取Pmax-GFP和PCLXE-EGFP质粒, 获得纯度均为 $D_{260}/D_{280}=1.8\sim 1.9$, $3.42\text{ ng}/\mu\text{L}$ Pmax-GFP和 $2.48\text{ ng}/\mu\text{L}$ PCLXE-EGFP质粒, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 长期保存。

1.2.2 设计和构建CRISPR/Cas9系统 HiFi Cas9 Nuclease 3NLS、TracrRNA、CrRNA均购于Integrated DNA Technologies公司。靶向 $\beta 2M$ 基因的gRNA序列来源于Ren等^[2]的研究, $\beta 2M$ -gRNA: 5'-CGC GAG CAC AGC TAA GGC CA-3'。

1.2.3 细胞培养与电穿孔 Jurkat细胞按常规培养。电穿孔前用电转缓冲液(Opti-MEM)洗涤细胞, 电穿孔操作按说明书进行。电穿孔后铺板, 72 h后荧光显微镜观察和流式检测转染效率及细胞存活情况。

1.2.4 细胞转染效率和细胞存活率检测 7-AAD(7-amino-actinomycin D)室温染色10min, 流式检测细胞绿色荧光蛋白表达与细胞存活情况。细胞转染效率(%)=绿色荧光阳性细胞数/活细胞总数 $\times 100\%$; 细胞存活率(%)=电穿孔后活细胞总数/未电穿孔条件活细胞总数 $\times 100\%$ 。

1.2.5 检测HLA-I类分子的敲除情况 FITC anti-HLA-ABC和PE anti-HLA-ABC $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 染色10~15 min, 流式细胞仪检测。与未电穿孔组对比, 记录HLA-I类分子敲除率。

1.3 数据处理及统计学分析

每组实验在相同条件下重复3次, 所得数据采

用GraphPad Prism 6统计软件分析,数据以均数 $\pm$ 标准误表示,采用One-Way ANOVA和*t*检验进行组间比较,以 $P<0.05$ 为具有统计学差异。

2 结果

2.1 电压对细胞转染效率和存活率的影响

固定脉冲时间20 ms, Pmax-GFP和PCLXE-EGFP质粒不同电压下电穿孔Jurkat细胞, 72 h后, 流式细胞仪检测细胞转染效率和存活率(图1)。400~450 V时转染效率逐渐升高($P<0.05$), 而480 V以后转染效率开始下降。450 V和480 V细胞转染效率最高, 且无显著性差异, 但电压越高细胞存活率越低, 两种质粒的细胞存活率由450 V电压时的(52.5 $\pm$ 3.5)%和(22.3 $\pm$ 1.8)%降为480 V时的(26.5 $\pm$ 2.1)%和(10.3 $\pm$ 0.9)%, 具有显著

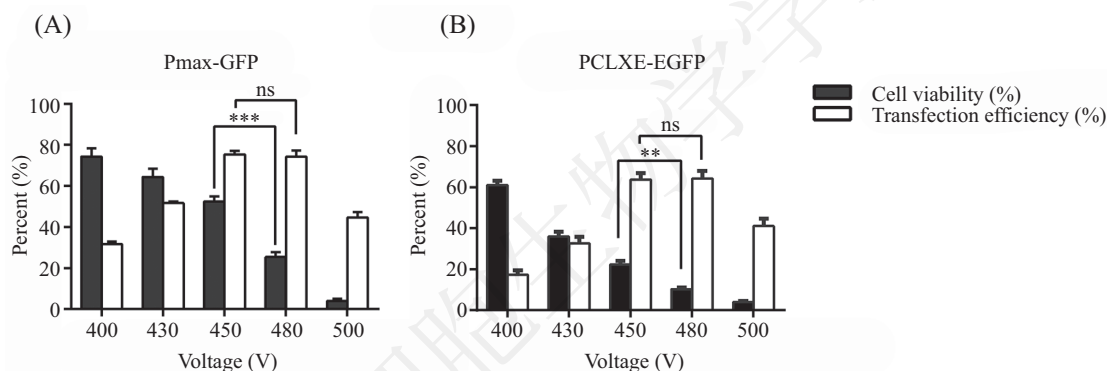
差异。结果表明, 450 V是质粒电穿孔Jurkat细胞的合适电压条件。

2.2 脉冲时间对细胞转染效率和存活率的影响

在最适电压450 V下分别使用Pmax-GFP和PCLXE-EGFP两种质粒以不同脉冲时间电穿孔Jurkat细胞, 72 h后流式检测细胞转染效率和存活率。脉冲时间20 ms, 两种质粒的转染效率最高分别可达(62.5 $\pm$ 0.7)%和(59.6 $\pm$ 2.3)%; 延长至40 ms, 转染效率并未提高, 但细胞存活率显著下降(图2)。结果表明, 20 ms是质粒电穿孔Jurkat细胞的合适脉冲时间。

2.3 电转缓冲液体系对细胞电转效率和存活率影响

电转缓冲液中的离子强度直接影响电穿孔的强度和细胞存活率。选用实验室常用的4种介质(PBS、RPMI、RPMI+10% FBS和Opti-MEM)作为

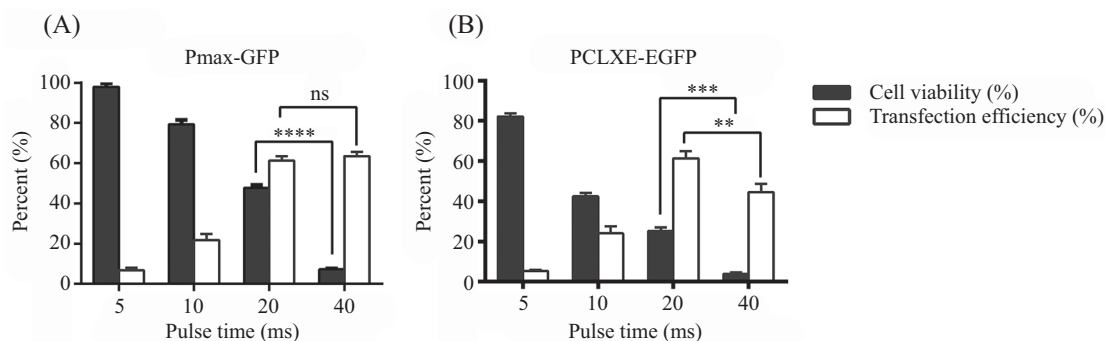


A: 电压对Pmax-GFP质粒转染效率和细胞存活率的影响; B: 电压对PCLXE-EGFP质粒转染效率和细胞存活率的影响。所有的结果均表示为均值 $\pm$ 标准误($n=3$); ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, ns表示没有显著性差异。

A: effect of voltage on Pmax-GFP plasmid transfection efficiency and cell viability; B: effect of voltage on PCLXE-EGFP plasmid transfection efficiency and cell viability. All values are presented as means $\pm$ S.E.M. ($n=3$); ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, ns means no significant difference.

图1 电压对细胞电转效率和存活率的影响

Fig.1 Effect of pulse voltages on transfection efficiency and cell viability



A: 脉冲时间对Pmax-GFP质粒转染效率和细胞存活率的影响; B: 脉冲时间对PCLXE-EGFP质粒转染效率和细胞存活率的影响。所有的结果均表示为均值 $\pm$ 标准误($n=3$); ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$, ns表示没有显著性差异。

A: effect of pulse time on Pmax-GFP plasmid transfection efficiency and cell viability; B: effect of pulse time on PCLXE-EGFP plasmid transfection efficiency and cell viability. All values are represented as means $\pm$ S.E.M. ($n=3$); ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$, ns means no significant difference.

图2 脉冲时间对细胞转染效率和存活率的影响

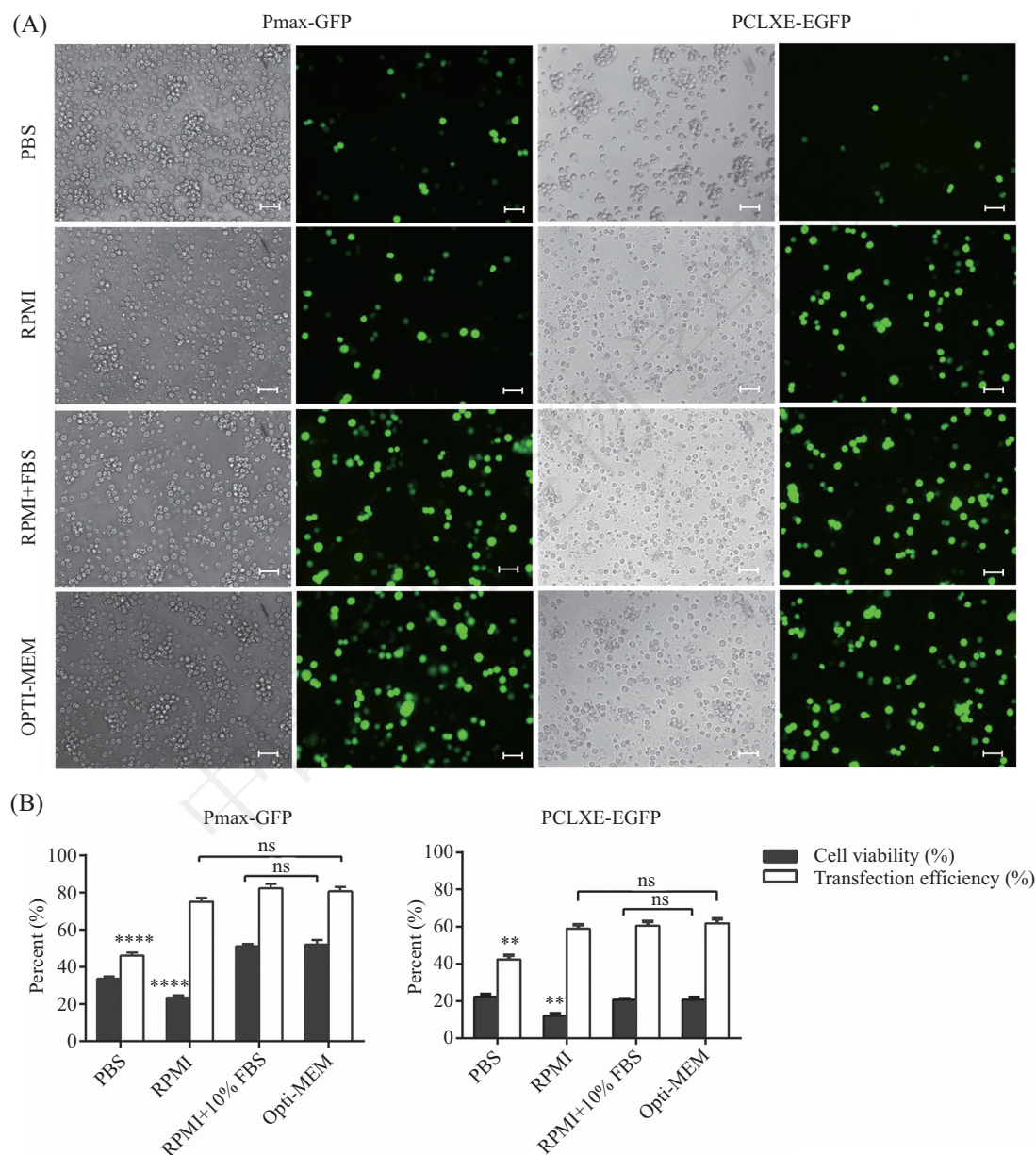
Fig.2 Effect of pulse times on transfection efficiency and cell viability

研究对象, 450 V、20 ms条件下分别用Pmax-GFP和PCLXE-EGFP质粒电穿孔Jurkat细胞, 72 h后用荧光倒置显微镜和流式细胞仪检查转染效率和细胞存活情况。使用PBS作电穿孔介质时, 转染效率最低分别是 $(47.5\pm1.7)\%$ 和 $(42.3\pm2.1)\%$; 而使用RPMI培养基作为电穿孔介质时, 细胞存活率最低 $(24.6\pm0.6)\%$ 和 $(12.1\pm1.1)\%$, 在RPMI中添加FBS后, 细胞存活率显

著提高到 $(52.2\pm1.4)\%$ 和 $(20.6\pm0.7)\%$, 同时又不影响转染效率 $(84.3\pm2.9)\%$ 和 $(60.5\pm2.3)\%$, 这与常用的电转缓冲液Opti-MEM具有相同的电穿孔效果(图3)。结果表明, RPMI+10% FBS和Opti-MEM均适合作为电穿孔缓冲液。

2.4 质粒浓度对细胞电转效率和存活率的影响

质粒对细胞具有一定毒性, 优化质粒浓度可以

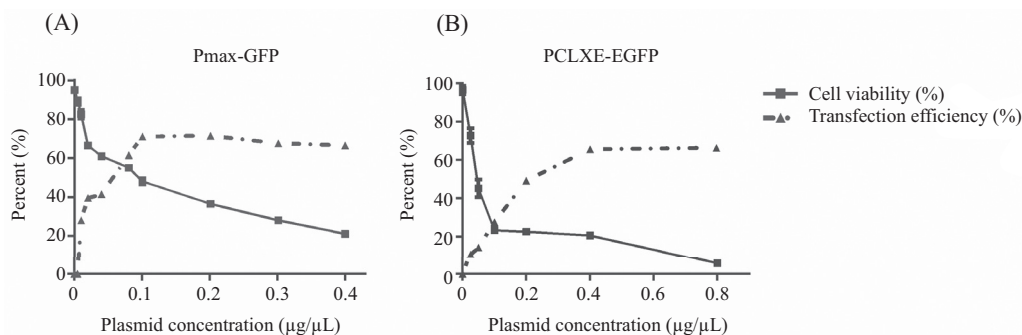


A: 不同电转缓冲液条件下两种质粒转染效率荧光图; B: 不同电转缓冲液条件下转染效率和细胞存活率比较。所有的结果均表示为均值±标准误($n=3$), $**P<0.01$, $****P<0.0001$, ns表示没有显著性差异。标尺=200 μm 。

A: fluorescence maps of transfection efficiency of two kinds of plasmid under different electroporation buffer conditions; B: comparison of transfection efficiency and cell viability under different electroporation buffer conditions. All alues are presented as mean±S.E.M. ($n=3$), $**P<0.01$, $****P<0.0001$, ns means no significant difference. Scale bars=200 μm .

图3 电转缓冲液对细胞电转效率和存活率的影响

Fig.3 Effect of electroporation buffer on transfection efficiency and cell viability

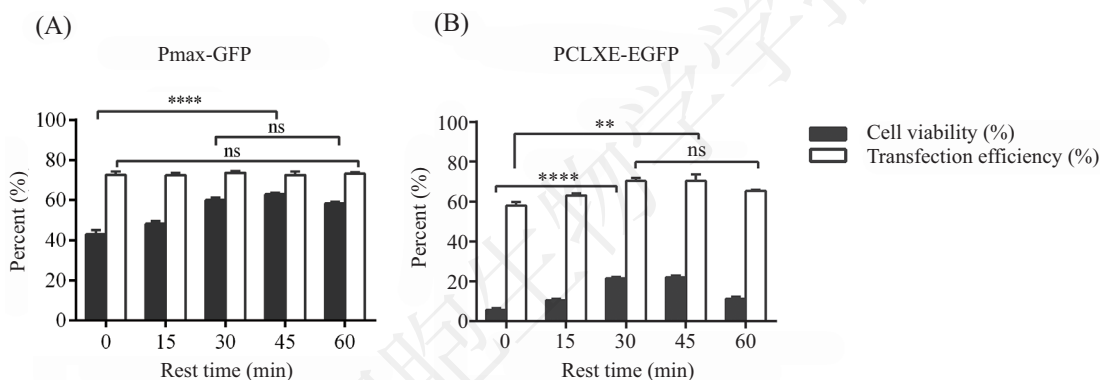


A: Pmax-GFP质粒浓度对转染效率和细胞存活率的影响; B: PCLXE-EGFP质粒浓度对转染效率和细胞存活率的影响。所有的结果均表示为均值 $\pm$ 标准误($n=3$)。

A: effect of Pmax-GFP plasmid concentration on transfection efficiency and cell viability; B: effect of PCLXE-EGFP plasmid concentration on transfection efficiency and cell viability. All values are presented as mean $\pm$ S.E.M. ($n=3$).

图4 质粒浓度对电转效率和存活率的影响

Fig.4 Effect of plasmid concentration on transfection efficiency and cell viability



A: 静置时间对Pmax-GFP质粒转染效率和细胞存活率的影响; B: 静置时间对PCLXE-EGFP质粒转染效率和细胞存活率的影响。所有的结果均表示为均值 $\pm$ 标准误($n=3$), **** $P<0.0001$, ns表示没有显著性差异。

A: effect of rest time on Pmax-GFP plasmid transfection efficiency and cell viability; B: effect of rest time on PCLXE-EGFP plasmid transfection efficiency and cell viability. All values are presented as mean $\pm$ S.E.M. ($n=3$), ** $P<0.01$, **** $P<0.0001$, ns means no significant difference.

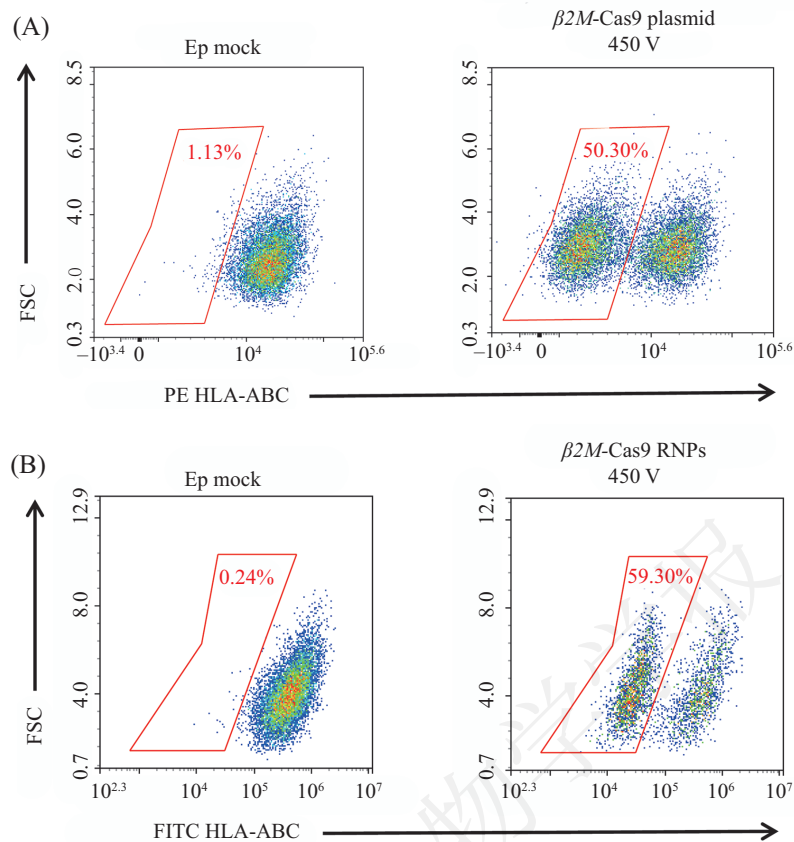
图5 静置时间对细胞电转效率和存活率的影响

Fig.5 Effect of rest times on transfection efficiency and cell viability

提高细胞转染效率和存活率。使用20 μL 规格电穿孔杯,电穿孔细胞浓度 $1\times 10^6/\text{mL}$,在450 V、20 ms、Opti-MEM缓冲液条件下,使用不同质粒浓度电穿孔Jurkat细胞,72 h后流式检测细胞转染效率和存活率。在一定浓度范围($<0.1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$)内,Pmax-GFP质粒增加可提高转染效率,当质粒浓度达到 $0.1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 时,转染效率达到最高,为 $(71.0\pm 1.4)\%$;继续提高质粒浓度,转染效率不再提高;同时质粒对细胞具有一定毒性,质粒浓度越高毒性越强(图4A)。PCLXE-EGFP质粒也具有类似的规律(图4B):浓度为 $0.4 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 时,转染效率达到最高,为 $(65.5\pm 1.2)\%$ 。结果提示:Pmax-GFP电穿孔Jurkat细胞的最佳浓度是 $0.1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$,PCLXE-EGFP电穿孔Jurkat细胞的最佳浓度是 $0.4 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。

2.5 电穿孔后不同静置时间对细胞电转效率和存活率的影响

在优化条件450 V、20 ms、Opti-MEM下电穿孔Jurkat细胞,电穿孔后细胞直接随电极管静置于细胞培养箱中,不同时间后再转移细胞至预热完全培养基中培养,72 h后流式检测。Pmax-GFP质粒电穿孔后,在45 min以内,静置时间越长细胞存活率越高;静置45 min细胞存活率可达 $(62.2\pm 1.1)\%$;进一步延长静置时间,存活率反而降低(图5A)。PCLXE-EGFP质粒电穿孔结果与之相同,静置45 min可获得最高细胞存活率 $(21.3\pm 0.9)\%$ 与转染率 $(68.4\pm 0.8)\%$ (图5B)。静置45 min处理组与不静置处理组(0 min)相比,具有显著差异,表明电穿孔后静置细胞45 min能同时



A: 电穿孔 $\beta 2 M$ -Cas9质粒敲除Jurkat细胞HLA-I类分子; B: 电穿孔 $\beta 2 M$ -Cas9 RNP敲除Jurkat细胞HLA-I类分子。

A: electrotransfer $\beta 2 M$ -Cas9 plasmids into Jurkat cell to knock out HLA-I; B: electrotransfer $\beta 2 M$ -Cas9 RNPs into Jurkat cell to knock out HLA-I.

图6 CRISPR/Cas9系统基因敲除HLA-I类分子

Fig.6 Knocking out the HLA-I using the CRISPR/Cas9 system

提高细胞存活率与电转效率, 增加电穿孔阳性细胞比例。

2.6 电穿孔递送不同CRISPR/Cas9载体系统, 敲除Jurkat细胞HLA-I类分子

为验证该质粒电穿孔Jurkat细胞优化体系是否适用于CRISPR/Cas9系统递送, 本研究在上述摸索的优化条件(450 V、20 ms、Opti-MEM缓冲液和电穿孔后静置45 min)下使用靶向 $\beta 2 M$ 基因的gRNA-Cas9质粒(大小是14 Kb, 最佳质粒浓度约为0.6 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)电穿孔Jurkat细胞。72 h后用PE anti-HLA-ABC荧光抗体染色, 流式检测Jurkat细胞表面HLA-I类分子表达情况发现, 50.3%的细胞已无HLA-I类分子表达, 表明 $\beta 2 M$ 基因已成功敲除(图6A)。随即利用此优化体系将 $\beta 2 M$ -gRNA与Cas9蛋白混合形成的核糖核蛋白复合物(ribonucleoprotein complexes, RNP)电穿孔Jurkat细胞, 所使用Cas9蛋白的终浓度为1 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 。72 h后FITC anti-HLA-ABC荧光抗体检测(图6B), 验证该优化体系也能将RNA与蛋白组合形式的CRISPR/Cas9

系统有效地电穿孔Jurkat细胞。

3 讨论

CRISPR/Cas9系统是一个强大的基因编辑工具, 相比于ZFN与TALEN等以往的基因编辑技术, CRISPR具有显著的优势, 包括良好的特异性、成本低廉、使用方便、使用范围广、操作简单等。近年来, CRISPR/Cas9系统已成为了生命科学领域最重要的研究工具之一, 被广泛应用于各种基因突变的细胞模型或模式动物的构建, 以及遗传疾病的治疗研究等。

CRISPR/Cas9基因编辑技术为肿瘤过继性免疫细胞治疗的改进提供了有力技术手段。首先是有望将目前的自体过继性免疫细胞治疗模式变为更为便利成本更低的异体过继性免疫细胞治疗模式——构建通用型免疫细胞药物。当前CAR-T细胞疗法需要采集患者自身T细胞, 进行基因修饰扩增后回输患者体内。整个过程技术难度高、耗时并且花费高昂,

同时也受到患者T细胞质量和数量的限制。如果能对健康人的T细胞进行基因编辑,制备适合于不同患者的通用型CAR-T细胞,那么CAR-T治疗将变得更加便宜和快速^[14]。然而,宿主和外来CAR-T细胞会相互识别并排斥,引起宿主抗移植反应(host versus graft reaction, HVGR)和移植瘤抗宿主反应(graft versus host disease, GVHD),这也是当前制备通用型CAR-T细胞的主要障碍。运用基因编辑工具就有望解决这一问题, Ren等^[2]使用CRISPR/Cas9系统敲除健康人T细胞内源性的TCR和 $\beta 2M$ 基因用来制备同种异体的通用型CAR-T细胞,在不影响治疗效果的同时又可有效避免GVHD和HVGD的出现。其次,利用CRISPR/Cas9技术可以敲除免疫检查点介导的免疫抑制信号,如程序性死亡分子-1(programmed death 1, PD-1)、细胞毒性T淋巴细胞相关抗原-4(cytotoxic T lymphocyte-associated antigen-4, CTLA-4)、淋巴细胞激活基因-3(lymphocyte activation gene-3, LAG-3),进一步提升免疫细胞的抗肿瘤效应^[15]。由于肿瘤细胞表达抑制性第二信号分子的配体,能与活化T细胞表面的抑制性受体结合,使T细胞耗竭,这是导致CAR-T细胞治疗效果不理想的一个重要原因^[16]。PD-1是最有希望的基因编辑靶点,它在T细胞活化后表达,并与相应的配体PD-L1/PD-L2结合从而抑制T细胞活化,使T细胞耗竭^[17]。有研究发现,利用电穿孔方法将Cas9蛋白和sgRNA导入原代T细胞中敲除PD-1基因,能显著增强CAR-T细胞的抗肿瘤活性^[2,11]。最后,利用CRISPR/Cas9技术可以实现目的基因在基因组上的精准敲入,避免病毒感染随机插入可能带来的癌变可能。当前CAR-T细胞制备过程中,CAR基因通常是通过逆转录病毒或慢病毒方式导入T细胞中,在基因组中随机插入基因具有潜在诱发肿瘤的风险^[18]。Eyquem等^[19]报道了运用CRISPR/Cas9技术在T细胞TRAC位点精准敲入anti-CD19 CAR基因,不仅实现了CAR基因在T细胞上的均一表达,同时也表现出更强的抗肿瘤活性。综上所述,应用CRISPR/Cas9基因编辑技术能解决CAR-T临床应用上的障碍,将大大提升CAR-T细胞治疗血液肿瘤和实体瘤的潜力。

尽管利用CRISPR/Cas9技术能解决CAR-T细胞治疗临床应用上的诸多难题,但是当前运用CRISPR/Cas9基因编辑仍然面临两个难题,即基因编辑效率和安全性问题。CRISPR/Cas9系统的细胞内递

送效率是影响其基因编辑效率的最主要因素。电穿孔是常用的基因递送方法,具有安全性高、成本低、适用范围广、转染效率高等特点。运用电穿孔能高效地递送CRISPR/Cas9基因编辑系统。影响电穿孔的因素很多,本研究讨论了电压、脉冲时间、质粒浓度、电穿孔缓冲介质等常规因素对细胞电转效率和存活率的影响,并引入电穿孔后的静置时间这一因素对电穿孔的影响。

电压和脉冲时间是影响细胞电转效率和存活率的最主要因素,通过对电压和脉冲时间的摸索,我们发现450 V、20 ms是质粒电穿孔Jurkat细胞的最佳参数。此外,缓冲液中的离子强度决定了电穿孔的强度,影响着细胞电转效率和存活率。通过对比发现,实验室中常用的RPMI完全培养基和Opti-MEM均适合作为电转缓冲液,且两者无显著性差异。而一般认为血清中的某些组份可能会对电转效率造成影响,缓冲液中的血清成分可减少电穿孔对细胞损伤^[20],本实验通过比较发现缓冲液中的血清对电转效率和细胞存活率并无影响。

质粒的浓度是影响电转效率的另一重要因素。从实验结果可以看出,质粒浓度对电转效率的影响并非一个简单的正相关线性关系。质粒浓度对电转效率的影响存在平台期,达到平台期后继续增加质粒浓度,电转效率不再提高,反而细胞死亡率增加,质粒对T细胞的毒性作用显现出来。此外,质粒的大小也影响着电穿孔效果,质粒越大转染效率和细胞存活率也就越低^[9],这也是我们在多次实验中得到的普遍规律。由于电穿孔过程中质粒在电脉冲的作用下嵌入细胞膜内,通过内吞进入细胞。此时的细胞极为脆弱,电穿孔后立即吹打混匀细胞可能极大影响细胞转染效率和存活率,因此Lesueur等^[21]认为,电穿孔后将细胞静置于电穿孔杯中30 min以上再对其进行吹吸等操作,就能显著提高细胞转染效率和存活率。我们的实验结果显示,电穿孔后静置一段时间能显著提高细胞存活率,静置45 min可获得最高细胞存活率和转染效率。

CRISPR/Cas9基因编辑在CAR-T细胞治疗上仍然存在不可忽视的安全性问题。CRISPR/Cas9基因编辑容易造成脱靶,可能会破坏正常的基因。有研究报道,优化CRISPR/Cas9系统各组件的用量能有效降低脱靶效应^[22-23]。当前递送CRISPR/Cas9系统的非病毒载体有3种,分别是质粒、mRNA和蛋

白。质粒形式的CRISPR系统, 成本较低且稳定性好, 但是质粒会长期存在细胞内, 增加了脱靶的概率, 且质粒需要经过转录、翻译才能发挥作用, 因此可能会降低基因编辑效率和推迟基因编辑的时间。mRNA形式的CRISPR系统, 不需要经过入核转录, 基因编辑时间快, 且mRNA降解快, 不容易造成脱靶, 当然mRNA很不稳定, 基因编辑效率低, 需要多次电穿孔才能达到理想的敲除效果^[2]。蛋白形式的CRISPR系统相比较而言是最佳的, 不需要转录和翻译, 基因编辑时间快, 引起脱靶的可能性较小, 且Cas9蛋白较mRNA更稳定。因此, 在基于电穿孔递送CRISPR/Cas9系统时, 选择电穿孔RNP的形式能有效降低CRISPR/Cas9脱靶效应。本研究的CRISPR/Cas9基因敲除验证实验表明, 该质粒电穿孔Jurkat细胞的优化体系不仅适用于CRISPR/Cas9质粒体系的递送, 同样也适合于递送CRISPR/Cas9蛋白系统。

综上所述, 本研究建立了电压、脉冲时间、质粒浓度、电转缓冲液和电穿孔后静置时间的电穿孔Jurkat细胞优化体系。该体系适用于递送CRISPR/Cas9基因编辑系统, 为将CRISPR/Cas9系统更好地应用于过继性肿瘤免疫T细胞治疗打下了基础, 同时也为优化其他类型细胞电穿孔递送CRISPR/Cas9基因编辑系统提供了有价值的参考。

参考文献 (References)

- Li L, Hu S, Chen X. Non-viral delivery systems for CRISPR/Cas9-based genome editing: Challenges and opportunities. *Biomaterials* 2018; 171: 207-18.
- 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: 2255-66.
- Zhang Y, Zhang X, Cheng C, Mu W, Liu X, Li N, *et al.* CRISPR-Cas9 mediated LAG-3 disruption in CAR-T cells. *Front Med* 2017; 11: 554-62.
- Makarova KS, Haft DH, Rodolphe B, Brouns SJJ, Emmanuelle C, Philippe H, *et al.* Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. *Nature Rev Microbiol* 2011; 9: 467-77.
- David LP, Bruce LL, Michael K, Adam B, Carl HJ. Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia. *N Engl J Med* 2011; 365: 725-33.
- Kochenderfer JN, Wilson WH, Janik JE, Dudley ME, Maryalice SS, Feldman SA, *et al.* Eradication of B-lineage cells and regression of lymphoma in a patient treated with autologous T cells genetically engineered to recognize CD19. *Blood* 2010; 116(20): 4099-102.
- Kochenderfer JN, Dudley ME, Feldman SA, Wilson WH, Spaner DE, Maric I, *et al.* B-cell depletion and remissions of malignancy along with cytokine-associated toxicity in a clinical trial of anti-CD19 chimeric-antigen-receptor-transduced T cells. *Blood* 2012; 119(12): 2709-20.
- Castillo A. Gene editing using CRISPR-Cas9 for the treatment of lung cancer. *Colomb Med (Cali)* 2016; 47: 178-80.
- Sheng Y, Mancino V, Birren B. Transformation of *Escherichia coli* with large DNA molecules by electroporation. *Nucleic Acids Res* 1995; 23(11): 1990-6.
- Rodolphe B, Christophe F, Hélène D, Melissa R, Patrick B, Sylvain M, *et al.* CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science* 2007; 315: 1709-12.
- Su S, Hu B, Shao J, Shen B, Du J, Du Y, *et al.* CRISPR-Cas9 mediated efficient PD-1 disruption on human primary T cells from cancer patients. *Sci Rep* 2016; 6: 20070.
- Mandal P, Ferreira LMR, Collins R, Meissner T, Boutwell C, Friesen M, *et al.* Efficient ablation of genes in human hematopoietic stem and effector cells using CRISPR/Cas9. *Cell Stem Cell* 2014; 15: 643-52.
- Chi S, Weiss A, Wang H. A CRISPR-based toolbox for studying T cell signal transduction. *Biomed Res Int* 2016; 2016: 5052369.
- Fellmann C, Gowen BG, Lin PC, Doudna JA, Corn JE. Cornerstones of CRISPR-Cas in drug discovery and therapy. *Nat Rev Drug Discov* 2017; 16(2): 89-100.
- Cyranoski, David. CRISPR gene-editing tested in a person for the first time. *Nature* 2016; 539 (7630): 479.
- Khalil DN, Smith EL, Brentjens RJ, Wolchok JD. The future of cancer treatment: immunomodulation, CARs and combination immunotherapy. *Nat Rev Clin Oncol* 2016; 13(5): 273-90.
- Karwacz K, Bricogne C, Macdonald D, Arce F, Bennett CL, Collins M, *et al.* PD-L1 co-stimulation contributes to ligand-induced T cell receptor down-modulation on CD8⁺ T cells. *EMBO Mol Med* 2011; 3(10): 581-92.
- Von KC, Deichmann A, Schmidt M. Vector integration and tumorigenesis. *Hum Gene Ther* 2014; 25(6): 475-81.
- Eyquem J, Mansilla-Soto J, Giavridis T, Sjö VDS, 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.
- Friedrich U, Stachowicz N, Simm A, Fuhr G, Lucas K. High efficiency electrotransfection with aluminum electrodes using microsecond controlled pulses. *Bioelectrochem Bioenerg* 1998; 47(1): 103-11.
- Lesueur LL, Mir LM, André FM. Overcoming the specific toxicity of large plasmids electrotransfer in primary cells *in vitro*. *Mol Ther Nucleic Acids* 2016; 5: e291.
- Yanfang F, Foden JA, Cyd K, Maeder ML, Deepak R, J Keith J, *et al.* High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. *Nat Biotechnol* 2013; 31(9): 822-6.
- Hsu PD, Scott DA, Weinstein JA, F Ann R, Silvana K, Vineeta A, *et al.* DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nat Biotechnol* 2013; 31(9): 827-32.