

应用 CRISPR-Cas9 基因编辑技术实现染色体大片段缺失

程丽华 刘玉 牛挺

【摘要】目的 应用 CRISPR-Cas9 基因编辑技术来实现同一染色体片段上的多个基因共缺失。**方法** 利用分子克隆技术构建能使小鼠染色体 11B3 上 Alox3-Alox12b-Alox8 基因簇缺失的 CRISPR-Cas9 慢病毒质粒;通过转染 HEK293T 细胞来包装带 CRISPR 或 Cas9 cDNA 的慢病毒,进而感染小鼠 NIH3T3 细胞,提取这些细胞的全基因组;通过 PCR 扩增缺失后的片段,TA 克隆、Sanger 测序等技术手段鉴定 Alox3-Alox12b-Alox8 基因簇缺失的情况。**结果** 成功构建了能使 Alox3-Alox12b-Alox8 基因簇发生缺失的 CRISPR-Cas9 慢病毒质粒;PCR 检测证实了目的染色体片段(Alox3-Alox12b-Alox8 基因簇)的缺失;TA 克隆和 Sanger 测序明确了 Alox3-Alox12b-Alox8 基因簇发生缺失,并且该 CRISPR-Cas9 系统介导的切割事件产生的断点被准确地连接在一起,在两个切割位点间没有发生插入突变。**结论** 利用 CRISPR-Cas9 基因编辑技术可以有效实现小鼠染色体 11B3 上 Alox3-Alox12b-Alox8 基因簇的大片段缺失。

【关键词】 CRISPR-Cas9; 基因编辑; 染色体大片段缺失; 血液系统肿瘤

基金项目:国家自然科学基金(81670182)

Chromosomal large fragment deletion induced by CRISPR/Cas9 gene editing system Cheng Lihua, Liu Yu, Niu Ting. Department of Hematology and Research Laboratory of Hematology, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China

Corresponding author: Niu Ting, Email: tingniu@sina.com.cn

【Abstract】 Objective Using CRISPR-Cas9 gene editing technology to achieve a number of genes co-deletion on the same chromosome. **Methods** CRISPR-Cas9 lentiviral plasmid that could induce deletion of Alox3-Alox12b-Alox8 cluster genes located on mouse 11B3 chromosome was constructed via molecular clone. HEK293T cells were transfected to package lentivirus of CRISPR or Cas9 cDNA, then mouse NIH3T3 cells were infected by lentivirus and genomic DNA of these cells was extracted. The deleted fragment was amplified by PCR, TA clone, Sanger sequencing and other techniques were used to confirm the deletion of Alox3-Alox12b-Alox8 cluster genes. **Results** The CRISPR-Cas9 lentiviral plasmid, which could induce deletion of Alox3-Alox12b-Alox8 cluster genes, was successfully constructed. Deletion of target chromosome fragment (Alox3-Alox12b-Alox8 cluster genes) was verified by PCR. The deletion of Alox3-Alox12b-Alox8 cluster genes was affirmed by TA clone, Sanger sequencing, and the breakpoint junctions of the CRISPR-Cas9 system mediate cutting events were accurately recombined, insertion mutation did not occur between two cleavage sites at all. **Conclusion** Large fragment deletion of Alox3-Alox12b-Alox8 cluster genes located on mouse chromosome 11B3 was successfully induced by CRISPR-Cas9 gene editing system.

【Key words】 CRISPR-Cas9; Gene editing; Chromosomal large deletion; Hematologic malignancies

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81670182)

染色体大片段缺失是肿瘤基因组的一个特

点^[1]。染色体大片段缺失常涉及众多基因,使得研究复杂化。过去常通过研究单个基因来反映多个基因的缺失在肿瘤发生、发展中的机制,然而这种方法忽略了多个基因间的相互作用^[2]。而 CRISPR-Cas9 基因编辑技术可实现染色体大片段缺失,设计靶向同一条染色体上两个不同位点的小向导 RNA

DOI:10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2017.05.014

作者单位:610041 成都,四川大学华西医院血液科及血液病研究室

通信作者:牛挺,Email:tingniu@sina.com.cn

(small guide, sgRNA), Cas9 核酸内切酶在 sgRNA 与目标 DNA 序列通过碱基互补配对结合的引导下对靶位点进行切割,导致 DNA 双链断裂,断裂后的 DNA 双链通过非同源重组末端连接来修复 DNA,从而产生染色体大片的缺失^[3,4]。本研究我们运用 CRISPR-Cas9 基因编辑技术来实现染色体大片的缺失,为研究染色体大片缺失在血液系统肿瘤发生、发展中的机制提供新的技术选择。

材料与方 法

1. 仪器与试剂: T7E1 核酸内切酶购自北京唯尚立德生物科技有限公司; DMEM 培养基购自美国 Life 技术公司; 胎牛血清购自新西兰 VisTech 公司; DNA 纯化试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司; 质粒提取试剂盒购自美国 OMEGA 公司; Go-taq Master Mix 购自美国 Promega 公司; 限制性内切酶购自美国 NEB 公司; PCR[®]2.1 载体购自美国 Invitrogen 公司; lentiCRISPRv2 质粒购自美国麻省理工学院张峰教授实验室。

2. 计算机设计 sgRNA 和 PCR 引物: 选择小鼠染色体 11B3 上 Alox3-Alox12b-Alox8 (与人染色体 17p13.1 区域的 ALOXE3-ALOX12B-ALOX8 基因同源) 基因簇作为实现染色体缺失的目标片段。sgRNA1 靶向 Alox3、Hes7 基因之间的一段非编码序列, 不影响 Alox3、Hes7 基因的功能; sgRNA2 靶向 Alox8 和 Gucy2e 基因之间的一段非编码序列, 不影响 Alox8 和 Gucy2e 基因的功能, 当 sgRNA1 和 sgRNA2 引导 Cas9 切割靶向基因位点后, 则可导致 11B3 染色体上 Alox3-Alox12b-Alox8 基因簇的缺失。所有 sgRNA 序列均在 <http://crispr.mit.edu/> 网站中设计。sgRNA1F: caccGTGCCTAGACCAGCCA CGCG, sgRNA1R: aaacCGCGTGGCTGGTCTAGG CAC; sgRNA2F: caccGCAACACCCGACAGTGAT GT, sgRNA2R: aaacACATCACTGTCGGGTGTT GC。PCR 反应的引物位置设计于 sgRNA1/2 靶向位点的前后约 1 kb 基因片段处, 引物在 IDT- Primer-Quest Input 网站 (<http://sg.idtdna.com/PrimerQuest/Home/Index>) 中设计, pr sgRNA1F 序列为 TGCT-GTTCCCTCTTCTGATTG; pr sgRNA2R 序列为 GACCACACAGAGAAACCTAGTC。所有的 DNA 引物均由成都擎科梓熙生物技术有限公司合成。

3. 构建 CRISPR-Cas9 慢病毒质粒: 将 sgRNA1、sgRNA2 分别连入 lentiCRISPRv2 质粒, 得到 lentiCRISPRv2-sgRNA 1/2 (v2-sgRNA1/2) 质粒, 方

法参照文献[5-6]。ClaI 和 EcoRI 酶切 v2-sgRNA1 作为载体, BstBI 和 EcoRI 酶切 v2-sgRNA2 作为插入片段。将插入片段和载体连接后得到质粒 lentiCRISPRv2-sgRNA 1-2 (v2-sgRNA1-2), 通过此方法可连入多个 sgRNA。

4. 细胞培养: HEK293T 细胞培养于含 1×链霉素/青霉素、10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中, NIH3T3 细胞培养于含 1×链霉素/青霉素、10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中, 并提供 37 °C、5% CO₂ 的培养条件。两种细胞均隔天换液、传代培养。实验时取对数增长长期生长状态良好的细胞。

5. 转染 HEK293T 细胞: 慢病毒质粒转染 HEK293T 细胞包装病毒时分为两组: 细胞转染 lentiCRISPRv2 质粒组和转染 lentiCRISPRv2-sgRNA1-sgRNA2 质粒组。取生长状态良好的 HEK293T 细胞, 转染前 12 h 接种在直径为 10 cm 培养皿中, 转染前更换培养基为预热新鲜培养基, 用磷酸钙共沉淀的方法转染 HEK293T 细胞包装病毒, 方法参照文献[7]。溶液 A: 含目的质粒 20 μg、psPAX2 质粒 10 μg、pMD2.G 5 μg、2 mol/L CaCl₂ 62.5 μl, 水补足体积到 500 μl; 溶液 B: 2×HBS 500 μl。溶液 B 以 1 200 r/min 涡旋, 将溶液 A 逐滴加入溶液 B 中, 涡旋 15 s, 将混合后的液体均匀滴入 HEK293T 细胞中, 置于 37 °C、5% CO₂ 饱和湿度培养箱中培养 24 h 换液, 于 30、36、40、48 h 收集含丰富病毒的细胞培养上清。

6. 病毒感染 NIH3T3 细胞: 实验组: 感染 lentiCRISPRv2-sgRNA1-sgRNA2 病毒的 NIH3T3 细胞; 对照组: 感染 lentiCRISPRv2 病毒的 NIH3T3 细胞。感染前 12 h 将 NIH3T3 细胞接种到 10 cm 培养皿中。感染时实验组加 5 ml lentiCRISPRv2-sgRNA1-sgRNA2 病毒、0.1% polebrene, 对照组加 5 ml lentiCRISPRv2 病毒、0.1% polebrene。

7. PCR 及 Sanger 测序鉴定染色体大片缺失: NIH3T3 细胞感染病毒 72 h 后, 利用 SNET 裂解缓冲液 (20 mmol/L Tris-Cl、5 mmol/L EDTA、400 mmol/L NaCl、1% SDS, pH 8.0) 的操作步骤提取细胞全基因组, PCR 引物为 Alox3 基因前的 pr sgRNA 1F 和 Alox8 基因后的 pr sgRNA 2R, 根据 Go-taq Master Mix 试剂盒说明书, PCR 扩增 sgRNA1 和 sgRNA2 靶位点前后的基因片段 (约 75 kb)。PCR 条件: 94 °C 预变性 2 min, 94 °C 变性 30 s, 58 °C 退火 20 s, 72 °C 延伸 1 min, 34 个循环, 72 °C 终止 5 min。若发生了目标染色体 (Alox3-Alox12b-

Alox8 基因簇)的大片段缺失则可通过PCR扩增出一段融合基因片段,若未发生染色体大片段缺失则由于PCR扩增的目的片段过大,不能扩增出任何片段。将一部分PCR产物进行琼脂糖凝胶电泳,分析扩增后得到的产物,将另一部分PCR产物送成都擎科梓熙生物技术有限公司进行Sanger测序。

8. TA克隆:根据DNA纯化试剂盒说明书,用DNA纯化试剂盒回收得到的PCR产物,将其连入PCR[®]2.1载体,连接反应条件:新鲜PCR产物3 μl、PCR[®]2.1载体1 μl、10×T4连接酶缓冲液1 μl、T4连接酶0.5 μl、水4.5 μl,25℃连接1h,将连接产物转化到Stab13感受态细胞。连接成功后的质粒送成都擎科梓熙生物技术有限公司进行Sanger测序。

结 果

1. 成功构建CRISPR-Cas9慢病毒质粒:图1为构建成功质粒的简化示意图。该质粒为慢病毒载体,其转染包装细胞后产生的慢病毒可携带外源sgRNA和Cas9基因整合到目的细胞中,从而实现目的基因的有效编辑。

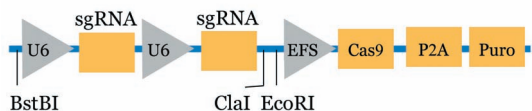


图1 v2-sgRNA1-2质粒构建示意图

2. PCR鉴定染色体大片段缺失:设计的sgRNA1靶向Aloxe3和Hes7基因之间的一段非编码序列,sgRNA2靶向Alox8和Gucy2e基因之间的一段非编码序列,sgRNA1和sgRNA2之间的基因片段大小为75 kb,sgRNA1和sgRNA2引导Cas9切割靶向基因位点后,可导致小鼠染色体11B3上Aloxe3-Alox12b-Alox8基因簇发生大片段缺失,原理如图2所示。

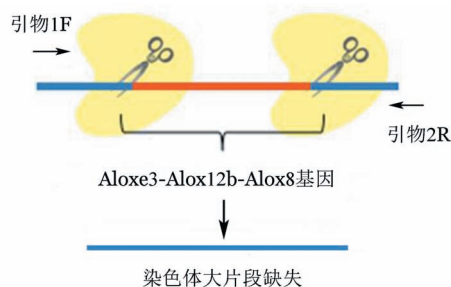


图2 染色体大片段缺失示意图

提取实验组、对照组NIH3T3细胞的基因组后,

通过PCR扩增Aloxe3-Alox12b-Alox8基因簇缺失后形成的融合片段,PCR产物行琼脂糖凝胶电泳,发现实验组通过PCR可以扩增出一条近1 kb的片段,对照组未扩增出任何片段。这表明sgRNA1、sgRNA2成功靶向了目的基因的位置,并且引导Cas9核酸内切酶对靶位点进行切割,导致染色体大片段(Aloxe3-Alox12b-Alox8基因簇)发生了缺失(图3)。

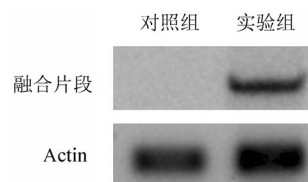


图3 PCR鉴定染色体大片段缺失

3. Sanger测序检测染色体大片段缺失情况:提取实验组NIH3T3细胞全基因组后,通过PCR扩增Aloxe3-Alox12b-Alox8基因簇缺失后形成的融合片段。将PCR产物直接进行Sanger测序,测序结果在Ensembl数据库(<http://asia.ensembl.org>)中进行匹配,结果显示Aloxe3-Alox12b-Alox8基因簇发生了缺失,Aloxe3基因前的片段和Alox8基因后的片段发生了融合(图4)。表明在sgRNA1和sgRNA2结合到小鼠11B3染色体上的靶位点后,Cas9核酸内切酶对靶位点进行切割,断裂后的DNA双链通过非同源重组末端连接修复了断裂的染色体,从而产生染色体大片段缺失。

4. TA克隆鉴定染色体大片段缺失的具体情况:提取实验组NIH3T3细胞全基因组后,通过PCR扩增Aloxe3-Alox12b-Alox8基因簇缺失后形成的融合基因片段。将PCR产物连入PCR[®]2.1载体,对TA克隆成功的质粒进行Sanger测序,结果表明在sgRNA1、sgRNA2之间的Aloxe3-Alox12b-Alox8基因簇发生了丢失,断裂的染色体片段发生了准确的重组,并且连接处未发生任何碱基插入突变(图5)。

讨 论

过去的研究主要关注单核苷酸多态性在肿瘤发生中的机制,然而在人类肿瘤中,有25%的肿瘤患者存在染色体大片段缺失^[8],在18.3%的慢性淋巴细胞白血病患者中存在染色体17p13.1缺失,这部分患者的2年总体生存率、无进展生存率较低(53.8%对89.7%,23.1%对82.8%)^[9];存在染色体17p缺失的多发性骨髓瘤患者的中位无进展生存时

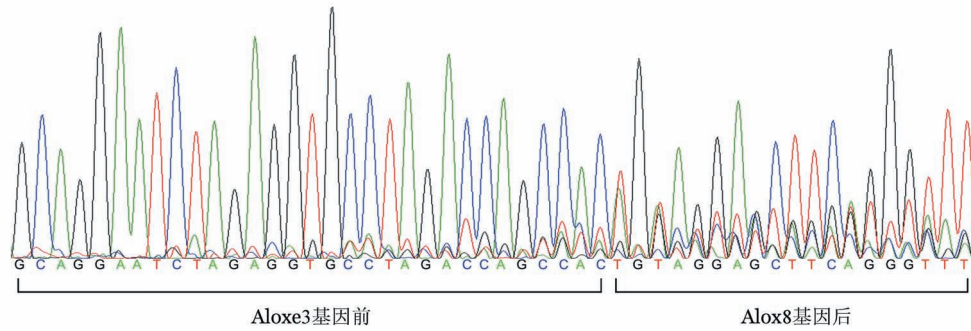
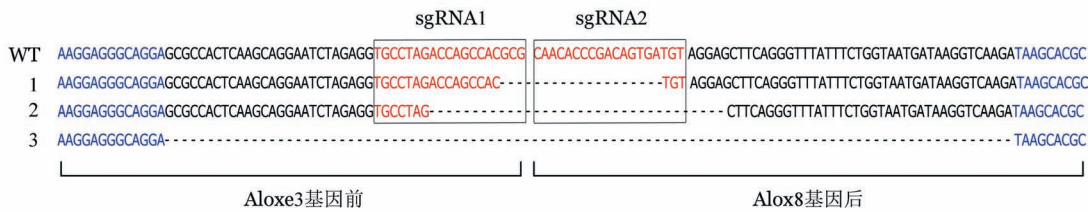


图4 Sanger测序结果



红色碱基:sgRNA位置;蓝色碱基:共同序列;—:缺失突变;WT:野生型;1、2、3:TA克隆成功的质粒

图5 TA克隆产物测序结果

间为1.3年,中位总生存期为2.7年,这些患者预后明显变差^[10],这表明染色体的缺失与血液系统肿瘤的发生、发展及预后间有密切联系。如果能对正常细胞或者肿瘤细胞进行基因编辑实现染色体大片段缺失,建立血液系统肿瘤模型,可以使我们更好地理解染色体大片段缺失与血液系统肿瘤发生发展间的关系。

目前,Cre/loxP重组酶系统、锌指核酸酶技术(ZFN)和转录激活因子样效应物核酸酶(TALEN)等技术均被用于基因编辑,然而Cre/loxP主要用于对胚胎干细胞进行基因编辑且花费巨大^[11]。ZFN和TALEN基因编辑效率低、设计合成DNA结合结构域较麻烦且成本高而使其应用受限^[12-13]。与这些技术相比,CRISPR-Cas9的设计简单、成本低廉(仅需设计合成20 bp的sgRNA)、操作灵活、基因编辑效率高、脱靶效率低,且能同时编辑多个基因、实现染色体大片段的缺失,为研究染色体缺失在血液系统肿瘤发生发展中的作用提供了新的技术选择^[14-15]。

我们的研究证实了CRISPR-Cas9基因编辑技术能有效的实现小鼠11B3染色体上Aloxe3-Aloxe12b-Aloxe8基因簇的大片段缺失。虽然ZFN和TALEN基因编辑技术也能实现染色体的大片段缺失,但在基因断裂连接点处常发生小的插入突变^[16],而我们的研究发现CRISPR-Cas9基因编辑技

术在切割靶位点后,断裂的染色体片段发生了准确的重组,并且未发生任何碱基的插入突变,这表明CRISPR-Cas9基因编辑技术可使染色体大片段的缺失更加准确。因此CRISPR-Cas9基因编辑技术可用于实现染色体大片段缺失,为我们提供了从分子水平研究血液系统疾病发生、发展机制的方法。

参考文献

- [1] Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer [J]. Cell, 2000, 100(1):57-70. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)81683-9.
- [2] Jerez A, Sugimoto Y, Makishima H, et al. Loss of heterozygosity in 7q myeloid disorders: clinical associations and genomic pathogenesis [J]. Blood, 2012, 119 (25):6109- 6117. DOI: 10.1182/blood-2011-12-397620.
- [3] Sánchez-Rivera FJ, Jacks T. Applications of the CRISPR-Cas9 system in cancer biology [J]. Nat Rev Cancer, 2015, 15(7):387-395. DOI: 10.1038/nrc3950.
- [4] Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity [J]. Science, 2012, 337 (6096):816- 821. DOI: 10.1126/science.1225829.
- [5] Sanjana NE, Shalem O, Zhang F. Improved vectors and genome-wide libraries for CRISPR screening [J]. Nat Methods, 2014, 11 (8):783-784. DOI: 10.1038/nmeth.3047.
- [6] Cong L, Ran FA, Cox D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems [J]. Science, 2013, 339 (6121):819-823. DOI: 10.1126/science.1231143.
- [7] Nasri M, Karimi A, Allahbakhshian Farsani M. Production,

purification and titration of a lentivirus-based vector for gene delivery purposes [J]. Cytotechnology, 2014, 66 (6):1031-1038. DOI: 10.1007/s10616-013-9652-5.

[8] Beroukhim R, Mermel CH, Porter D, et al. The landscape of somatic copy- number alteration across human cancers [J]. Nature, 2010, 463(7283):899-905. DOI: 10.1038/nature08822.

[9] El-Ghannaz AM, Abdelwahed E, Mostafa NN, et al. De novo deletion 17p13.1 as a predictor for disease progression in chronic lymphocytic leukemia [J]. Clin Exp Med, 2015, 15 (4): 493-499. DOI: 10.1007/s10238-014-0317-2.

[10] Hebraud B, Magrangeas F, Cleynen A, et al. Role of additional chromosomal changes in the prognostic value of t(4;14) and del (17p) in multiple myeloma: the IFM experience [J]. Blood, 2015, 125 (13):2095- 2100. DOI: 10.1182/blood- 2014- 07- 587964.

[11] Liu Z, Xie Y, Zhang X, et al. Efficient Construction of Large Genomic Deletion in Agrobacterium tumefaciens by Combination of Cre/loxP System and Triple Recombineering [J]. Curr Microbiol, 2016, 72 (4):465- 472. DOI: 10.1007/s00284-015-0977-5.

[12] Sander JD, Dahlborg EJ, Goodwin MJ, et al. Selection-free zinc-finger- nuclease engineering by context- dependent assembly (CoDA) [J]. Nat Methods, 2011, 8 (1):67- 69. DOI: 10.1038/nmeth.1542.

[13] Wood AJ, Lo TW, Zeitler B, et al. Targeted Genome Editing Across Species Using ZFNs and TALENs [J]. Science, 2011, 333(6040):307. DOI: 10.1126/science.1207773.

[14] Cong L, Zhang F. Genome engineering using CRISPR- Cas9 system [J]. Methods Mol Biol, 2015, 1239:197- 217. DOI: 10.1007/978-1-4939-1862-1_10.

[15] Paquet D, Kwart D, Chen A, et al. Efficient introduction of specific homozygous and heterozygous mutations using CRISPR/Cas9 [J]. Nature, 2016, 533 (7601):125- 129. DOI: 10.1038/nature17664.

[16] He Z, Proudfoot C, Mileham AJ, et al. Highly efficient targeted chromosome deletions using CRISPR/Cas9 [J]. Biotechnol Bioeng, 2015, 112(5):1060-1064. DOI: 10.1002/bit.25490.

(收稿日期:2016-12-05)

(本文编辑:徐茂强)

·读者·作者·编者·

2017年本刊可直接用英文缩写的常用词汇

磷酸盐缓冲液	PBS	乳酸脱氢酶	LDH	粒-巨噬细胞集落刺激因子	GM-CSF
胎牛血清	FBS	凝血酶原时间	PT	巨噬细胞集落刺激因子	M-CSF
血红蛋白	HGB	部分激活的凝血活酶时间	APTT	粒-巨噬细胞集落形成单位	CFU-GM
红细胞计数	RBC	EB病毒	EBV	细胞毒性T淋巴细胞	CTL
白细胞计数	WBC	巨细胞病毒	CMV	噻唑蓝实验	MTT实验
血小板计数	PLT	乙型肝炎病毒	HBV	弥漫性血管内凝血	DIC
中性粒细胞绝对计数	ANC	丙型肝炎病毒	HCV	磁共振成像	MRI
核因子-κB	NF-κB	人类免疫缺陷病毒	HIV	正电子发射断层扫描	PET
聚合酶链反应	PCR	自然杀伤细胞	NK细胞	乙二胺四乙酸	EDTA
逆转录-聚合酶链反应	RT-PCR	白细胞介素	IL	十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳	SDS-PAGE
酶联免疫吸附实验	ELISA	干扰素	IFN	二甲基亚砜	DMSO
辅助性T淋巴细胞	Th	肿瘤坏死因子	TNF	荧光原位杂交	FISH
丙氨酸转氨酶	ALT	红细胞生成素	EPO	美国国家综合癌症网络	NCCN
天冬氨酸转氨酶	AST	血小板生成素	TPO	国际预后积分系统	IPSS
谷氨酰转氨酶	GGT	干细胞生长因子	SCF	常见不良反应事件评价标准	CTCAE
碱性磷酸酶	ALP	粒细胞集落刺激因子	G-CSF		本刊编辑部