

## 基于 episomal CRISPR/Cas9 载体的基因敲入方法

邹征伟, 赖兴强, 李伟强

(中山大学中山医学院干细胞与组织工程研究中心, 广东 广州 510080)

**摘要:**【目的】研究一种在哺乳动物细胞中高效的基因敲入方法, 比较带有 oriP-EBNA1 序列的 episomal CRISPR/Cas9 载体与普通 CRISPR/Cas9 载体的基因敲入效率是否有差别。【方法】首先利用慢病毒载体构建稳定表达红色荧光蛋白 DsRedE2 的人胚肾细胞系(293FT)与人诱导多能干细胞系(hiPS); 利用 CRISPR/Cas9 序列设计网站, 设计和合成靶向 DsRedE2 的向导 RNA (sgRNA), 分别克隆至带有 oriP-EBNA1 的 episomal CRISPR/Cas9 敲除载体与普通 CRISPR/Cas9 敲除载体中, 测序筛选插入正确片段的克隆; 然后设计靶向 DsRedE2 的同源臂, 把同源臂连接在绿色荧光蛋白(GFP)的两端, 构建 GFP 敲入片段的载体。把两种敲除载体分别导入到 DsRedE2-293FT 与 DsRedE2-hiPS 细胞系中, 在不同时间点通过荧光显微镜观察以及流式细胞分析比较细胞的敲除效率, 同时利用 PCR 检测靶基因的敲除情况; 在筛选获得有效的 sgRNA 片段后, 把两种敲除载体和同源臂同时导入到 DsRedE2-293FT 与 DsRedE2-hiPS 细胞系中, 在不同时间点通过荧光显微镜观察以及流式细胞分析比较细胞的敲入效率, 同时利用 PCR 检测 DsRedE2 序列中 GFP 的敲入情况。【结果】成功构建表达 DsRedE2 的 293FT 与 hiPS 细胞系; 获得靶向 DsRedE2 的 episomal CRISPR/Cas9 敲除载体、普通 CRISPR/Cas9 敲除载体及带有 GFP 的同源臂载体; 荧光显微镜观察与流式细胞分析结果显示, 转染两种 CRISPR/Cas9 质粒均可以使 DsRedE2 阳性细胞明显减少, 而且 episomal CRISPR/Cas9 质粒组的 DsRedE2 阳性细胞数量显著低于转染普通 CRISPR/Cas9 质粒组。同时, 敲入实验证实 episomal CRISPR/Cas9 组的 GFP 阳性细胞数量比普通 CRISPR/Cas9 组更多; TA 克隆测序证实打靶位点有敲除与敲入片段。【结论】episomal CRISPR/Cas9 载体与普通 CRISPR/Cas9 载体在细胞上都能实现基因的敲除与敲入; 带有 oriP-EBNA1 序列的 episomal CRISPR/Cas9 载体敲除和敲入的效率均比普通 CRISPR/Cas9 载体高。以上结果为利用 episomal CRISPR/Cas9 载体进行人多能干细胞的基因敲入研究和谱系追踪动物模型的建立提供了重要的实验基础。

**关键词:** CRISPR/Cas9; episomal 载体; 敲除; 敲入

**中图分类号:** R31      **文献标志码:** A      **文章编号:** 1672-3554(2018)05-0660-09

### An Episomal Vector-based CRISPR/Cas9 System for Gene Knockin

ZOU Zheng-wei, LAI Xing-qiang, LI Wei-qiang

(Center for Stem Cell Biology and Tissue Engineering, Zhongshan School of Medicine, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Corresponding to: LI Wei-qiang; E-mail: liweiq6@mail.sysu.edu.cn

**Abstract:** 【Objective】 To seek an efficient method for gene knockin in mammalian cells and compare the gene knockin efficiency of episomal CRISPR/Cas9 vector carrying orip-EBNA1 sequence with traditional CRISPR/Cas9 vector. 【Methods】 Firstly, the DsRedE2-expressing human embryonic kidney cell line (DsRedE2-293FT) and human induced pluripotent stem cells (DsRedE2-hiPS) cell lines were constructed by lentiviral vector transduction. Then we designed and synthesized the guide RNAs (single-guide RNA, sgRNA) for targeting DsRedE2. And the sgRNAs were cloned into the episomal CRISPR/Cas9 vector and traditional CRISPR/Cas9 vector, respectively. Then the homologous arms of

**收稿日期:** 2018-04-03

**基金项目:** 国家自然科学基金(81570487); 中山大学青年教师重点培育项目(17ykzd07)

**作者简介:** 邹征伟, 硕士在读, 研究方向: 干细胞与基因编辑, E-mail: zouzhenwg@126.com; 李伟强, 通信作者, 教授, 博士生导师, E-mail: liweiq6@mail.sysu.edu.cn

DsRedE2 were designed, amplified by PCR and connected to the two ends of green fluorescent protein (GFP) to construct the DsRedE2-specific knockin fragment. Two kinds of CRISPR/Cas9 vectors, guide RNA vector, with or without homologous arms were transfected into the DsRedE2-293FT and DsRedE2-hiPS cell lines respectively, and the knockout/knockin efficiency was confirmed and measured by PCR, fluorescence microscopy and flow cytometry at different time points post transfection. 【Results】 293FT and hiPS cell lines expressing DsRedE2 were successfully constructed; The episomal CRISPR/Cas9 knockout vector, traditional CRISPR/Cas9 knockout vector and the homologous arm with GFP for targeting DsRedE2 were also obtained respectively. The results of fluorescence microscopy and flow cytometry showed that the number of DsRedE2 positive cells in episomal group was significantly lower than that in traditional CRISPR/Cas9 plasmid transfection group. Meanwhile, the number of GFP positive cells (successful GFP knockin) in the episomal CRISPR/Cas9 group was statistically higher than that of the traditional CRISPR/Cas9 group. TA cloning sequencing confirmed that the target site has knock-out and knock-in fragments. 【Conclusions】 Both type of CRISPR/Cas9 vectors are functional in gene knockout and knockin in mammalian cells and episomal CRISPR/Cas9 vector with oriP-EBNA1 sequence is more efficient than the traditional CRISPR/Cas9 construct. These results may have important implications for the generation of lineage tracing hiPS cell lines and animal models by using episomal CRISPR/Cas9 vector.

**Key words:** CRISPR/Cas9; episomal vectors; knockout; knockin

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2018, 39(5):660-668]

当细胞基因组 DNA 双链断裂时,细胞通过不同的基因重组方式进行基因的修复,其中之一为同源重组<sup>[1-2]</sup>。同源重组需要左右两个同源臂,从而起到精确修复的作用。而通过加入外源的同源臂,则能够把外源基因导入到特定的位点中,起到基因敲入的效果。CRISPR 成簇的规律间隔的短回文重复序列 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR) 和 CRISPR 相关蛋白 (CRISPR-associated proteins, Cas) 即 CRISPR/Cas9 系统能有效的引起基因组双链的断裂,一旦基因组发生断裂,外源的同源臂会聚集到基因组的断裂处,从而发生同源重组修复<sup>[1, 3-4]</sup>。利用同源重组技术可以进行缺陷基因修复和建立特异基因的谱系追踪细胞系或动物模型,但是通常在细胞和体内发生同源重组的效率很低<sup>[5-6]</sup>,只有 1% 甚至更低。很多研究者通过改变同源臂,例如改变同源臂的长度或者加向导 RNA (single-guide RNA, sgRNA) 片段来提高同源重组的效率,但是效果也不是很理想,效率约为 5% ~ 20%<sup>[7]</sup>。研究表明,带有 oriP-EBNA1 序列的 episomal 载体,其 EBNA1 序列能通过 AT-hook 活性与细胞内染色体的 AT 富集区结合,在 S 期通过空间共定位,使之在同一个复制舱与细胞染色体同时复制,然后随染色体分裂到子细胞<sup>[8]</sup>。在没有筛选压力下,细胞内质粒会慢慢丢失,而在药物存在的情况下能长时间存在于细胞内<sup>[8]</sup>,从而让 CRISPR/Cas9 系统能一直发挥作用,

使靶向基因组发生双链断裂。而撤掉筛选药物后 episomal 载体则会慢慢丢失,使 CRISPR/Cas9 系统失去作用。因为它的可持续表达的特性,使之成为一种非常有效的基因编辑方法,具有高效的基因敲除效率<sup>[9]</sup>,但其能否用于基因敲入目前未见报道。在本研究中,我们主要通过体外实验研究比较 episomal CRISPR/Cas9 载体与普通 CRISPR/Cas9 在 293FT 细胞和人诱导多能干细胞系 (human induced pluripotent stem cells, hiPS) 中的基因敲入效率,寻找在 hiPS 细胞中更有效的基因敲入方法。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 细胞株、质粒与主要试剂

hiPS 细胞系 (本实验室建系)<sup>[10]</sup>, 293FT 细胞 (购自 Invitrogen 公司); PX459 质粒 (hSpCas9-2A-Puro V2.0; 购于 addgene 公司)、oriP-EBNA1 载体 (购于 addgene 公司)、慢病毒包装质粒 psPAX2 及包膜蛋白质粒 pMD2.G (购于 addgene 公司)、红色荧光质粒 DsRedE2 (购于 Clontech 公司)。PCR 产物回收试剂盒,质粒提取试剂盒购自 Qiagen 公司。限制性核酸内切酶 *Bbs* I、*Nhe* I、T7 Endonuclease I (T7E1) 及连接酶等,购自 New England Biolabs 公司。

### 1.2 DsRedE2 细胞系的构建

取状态良好的 293FT 细胞,当细胞密度达到

70%~80%,把DsRedE2、psPAX2、pMD2.G质粒按照3:2:1的比例加入到Opti-MEM,然后加入转染试剂Megatran 1.0,混匀后室温放置30 min,然后加入到293FT细胞中,过夜培养;转染后12 h换液,转染后72 h收集培养上清,上清用600 g离心15 min,用0.45 μm滤器进行过滤,去除细胞碎片;然后50 000 g高速离心90 min沉淀病毒颗粒,沉淀用培养基重悬病毒沉淀,然后分装到小管-80℃保存。取不同梯度量的病毒分别感染293FT、hiPS细胞(polybrene的浓度为5 μg/mL),感染12 h后换液。细胞扩增到一定量进行流式筛选,得到纯化的表达红色荧光的DsRedE2-293FT和DsRedE2-hiPS细胞系。

### 1.3 sgRNA靶点的选择及其序列的合成

利用麻省理工学院张峰实验室<sup>[11]</sup>(Zhang Feng Lab, MIT)提供的网络工具CRISPR DESIGN(<http://crispr.mit.edu>)设计目的基因DsRed的sgRNA靶点。根据目的基因DsRedE2的序列,设计了3个sgRNA靶点。寡核苷酸链的合成及DNA测序均由(上海)生工生物工程股份有限公司完成。

### 1.4 DsRedE2敲除和敲入质粒的构建

sgRNA的克隆:首先,用Bbs I切割质粒PX459,电泳后行切胶回收。按照说明书步骤将设计的单链oligo磷酸化并退火形成双链。再将退火形成的双链DNA连接到线性化的PX459载体中,进而将连接产物在42摄氏度转化到DH-5α感受态细胞中,用含有氨苄青霉素的琼脂糖平板进行筛选过夜,挑取单克隆,提取质粒DNA测序验证插入序列的正确性。Episomal CRISPR/Cas9载体构建:PCR扩增靶点Cas9片段。PCR引物:EPI-CAS9F:tcctctagagtcgacgctaggaggcctatttccc;EPI-CAS9R:taatgcagcggatccgctagtcaggcaccgggcttgcgggtc。PCR产物电泳,切胶回收正确PCR条带。将回收的PCR产物连接到经Nhe I酶切的oriP-EBNA1载体中。将连接产物在42℃转化到DH-5α感受态细胞中,用含有氨苄青霉素的琼脂糖平板进行筛选过夜,挑取单克隆,提取质粒DNA测序验证插入序列的正确性。同源臂载体的构建:PCR扩增靶向序列两端约600 bp的序列为同源臂,Left Arm-F: atggaggacgcggcgtcgggag; Left Arm-R: tgcttcacgtacacctggagcc; Right Arm-F: acggcggcgtgtgacctgac-cc; Right Arm-R: acaactcctcataaagagacagcaacca;同时扩增IRES-GFP片段 IRES-GFP-F:

gccctctcc-ctccccccccctaa; IRES-GFP-R (ttactgtacagctgctccatgcgcg),将Left Arm、Right Arm和IRES-GFP片段通过无缝克隆的方式连入oriP-EBNA1载体。将连接产物在42℃转化到DH-5α感受态细胞中,用含有氨苄青霉素的琼脂糖平板进行筛选过夜,挑取单克隆,提取质粒DNA测序验证插入序列的正确性。

### 1.5 细胞培养、转染和药物筛选

293FT细胞的培养:使用高糖DMEM培养基,体积分数为10%胎牛血清及双抗(100 U/mL青霉素和0.1 mg/mL链霉素),置于37℃,体积分数为5% CO<sub>2</sub>的细胞培养箱内培养。293FT细胞的转染:将293FT细胞种至6孔板中,转染前汇合度达70%。转染前1 h进行细胞换液,每孔更换1 mL含体积分数为3%胎牛血清不含抗生素的DMEM培养基。每孔转染CRISPR/Cas9质粒或episomal CRISPR/Cas9质粒2 μg(敲入同时转染同源臂质粒2 μg),然后加入转染试剂Megatran 1.0,转染12 h后更换为新的完全培养基。转染24 h后加puro(1 μg/mL)筛选;hiPS细胞的培养:使用StemFlex培养基,含双抗,置于37℃,体积分数为5% CO<sub>2</sub>的细胞培养箱内培养。hiPS细胞的转染:参照lipofectamine stem说明书。转染24 h后加puro(1 μg/mL)筛选。

### 1.6 流式检测

把细胞消化下来,用PBS洗一遍,然后用10 g/L的多聚甲醛溶液(PFA)固定30 min,最后上机检测DsRedE2和GFP的表达情况。流式细胞仪为贝克曼库尔特公司(Beckman Coulter, Inc)生产的,型号:CytoFLEX S。本实验GFP的检测参数为488 nm/507 nm, DsRedE2的检测参数为557 nm/579 nm,流式数据分析软件为FlowJo。

### 1.7 基因打靶的鉴定及T7E1酶切鉴定

用PCR法扩增打靶区域的DNA序列,根据靶点的位置,设计基因敲除鉴定引物:F:gtcatcaagcccttcatgcgcttcaa, R: actgtccaccacgggtgtagtctc。PCR产物电泳,切胶回收正确PCR条带,然后进行TA克隆连接。将连接产物转化DH-5α感受态细胞,接种在含有氨苄青霉素的琼脂糖平板上。37℃培养过夜,长出菌落后,挑取单克隆,摇菌,提质粒后送样测序;同时用T7 Endonuclease I(T7E1)切割回收的PCR产物(方法见说明书),跑胶。用Image J软件分析电泳结果中各条带的灰度值,利

用下面的公式分析敲除效率: % Indels =  $[1 - \sqrt{1 - (a+b)/(a+b+c)}] \times 100$ 。  $a$  和  $b$  表示被切割后获得的短片段的灰度值,  $c$  表示主条带的灰度值。

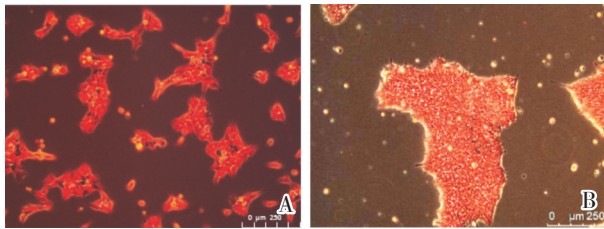
### 1.8 统计学方法

采用 SPSS 17.0 进行单因素方差分析,  $P$  值显著性水准均为 0.05 (双侧检验)。

## 2 结果

### 2.1 表达红色荧光的 293FT 与 hiPS 细胞系的建立

通过慢病毒转染及流式分选的方法得到纯化的表达红色荧光的 DsRedE2-293FT (图 1A) 与 DsRedE2-hiPS 细胞系 (图 1B), 为后续的基因敲除与敲入做准备。



A is the DsRedE2-293FT cell line expressing red fluorescent protein; B is the DsRedE2-hiPS cell line expressing red fluorescent protein. Scale bar = 250  $\mu$ m

图 1 红色荧光细胞系的建立

Fig.1 The establishment of cell lines expressing DsRedE2

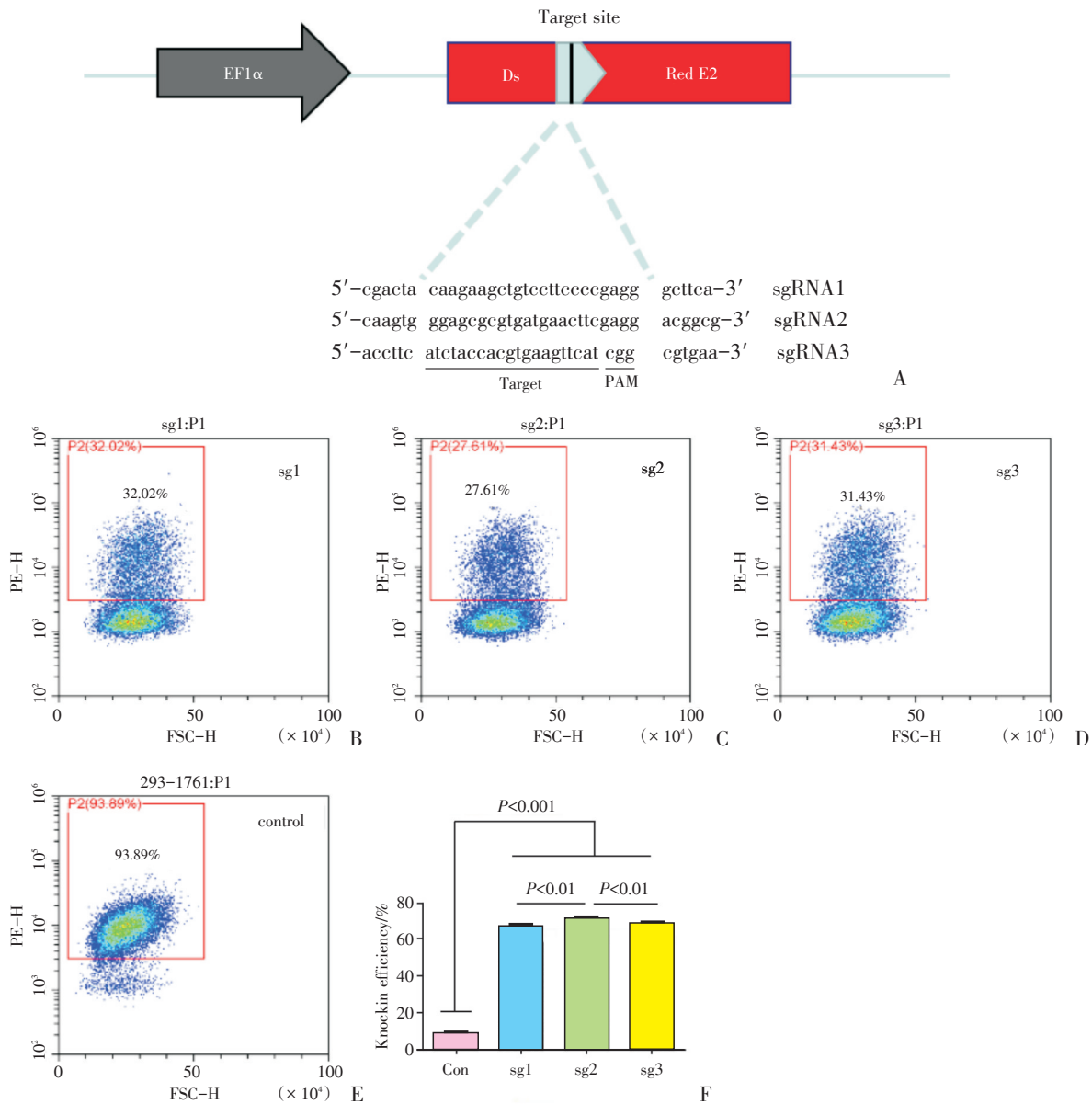
### 2.2 CRISPR/Cas9 基因打靶载体的设计、构建与筛选

利用麻省理工学院张峰实验室提供的网络工具, 在目的基因 DsRedE2 设计了 3 个 sgRNA, 并命名为 sgRNA1、sgRNA2、sgRNA3 (图 2A 为 sgRNA 的设计示意图)。通过退火使寡核苷酸单链形成双链, 然后将退火产物克隆于 episomal CRISPR/Cas9 载体与普通 CRISPR/Cas9 载体, 测序后, 扩增正确的质粒, 然后在 293FT 转染构建的质粒, 挑选出效率最高 sgRNA2 用于后续实验 (图 2B~D)。图 2E 为没有转质粒的对照。图 2F 为不同 sgRNA 敲除效率比较的柱状图 (sgRNA1、sgRNA2、sgRNA3 样本量为 3, 组间平均方差值为 0.001, 组内平均方差值为  $2.5 \times 10^{-4}$ ,  $F = 4.940$ ,  $P = 0.054$ )。

### 2.3 不同载体基因敲除效率比较

得到纯化的 DsRedE2-293FT 与 DsRedE2-hiPS 细胞系后, 同时转染相同摩尔量的 episomal-CRISPR/Cas9 质粒/sgRNA2 与普通 CRISPR/Cas9 质粒/sgRNA2 为实验组, 阴性对照组仅加入转染试剂。在转染 24 h 后实验组同时加入  $1 \mu\text{g/mL}$  的嘌呤霉素筛选, 其中 episomal CRISPR/Cas9 (epiCRISPR) 组持续加药筛选, 而普通 CRISPR/Cas9 组在加药筛选 3 d 后停药 (一般瞬时表达的质粒表达高峰期为转染后 48~72 h<sup>[12-13]</sup>)。在转染后的不同时间点 (d7 与 d14) 分别检测两组的敲除效率。在荧光显微镜下观察可以看到 d7 普通 CRISPR/Cas9 质粒组的 DsRedE2+ 细胞数量明显较对照低, 而转染 epiCRISPR 质粒的实验组 DsRedE2+ 细胞数量比普通 CRISPR/Cas9 质粒的实验组更低; 流式细胞分析数据显示实验组 DsRedE2+ 细胞数量比对照组明显下降, 且 epiCRISPR 质粒组的 DsRedE2+ 细胞数量 ( $36.89 \pm 2.83$ )% 显著少于普通 CRISPR/Cas9 质粒组 ( $62.28 \pm 3.90$ )%, 说明两种质粒都能有效的敲除目的片段, 但是 epiCRISPR 质粒的敲除效率比普通 CRISPR/Cas9 质粒高 (图 3A、B)。在 d14 的时候继续观察, 荧光显微镜下可以看到, 普通 CRISPR/Cas9 质粒组 DsRedE2+ 细胞量比例较 d7 基本无变化, 而 epiCRISPR 组只有非常少量的细胞表达红色荧光。同时流式检测也发现转染 epiCRISPR 组 DsRedE2+ 细胞的比例仅为 ( $0.86 \pm 0.21$ )%, 而转染普通 CRISPR/Cas9 组 DsRedE2+ 细胞的比例为 ( $37.35 \pm 3.83$ )% (图 3C、D)。

我们也在 hiPS 细胞上做了相同的实验, 转染 d14 后, 通过荧光显微镜观察与流式细胞分析也发现, epiCRISPR 组 DsRedE2+ 细胞的比例为 ( $0.77 \pm 0.25$ )%, 而普通 CRISPR/Cas9 组 DsRedE2+ 细胞的比例为 ( $8.51 \pm 3.91$ )% (图 3E、F)。我们比较了在不同时间点 293FT 细胞与 hiPS 细胞中敲除效率 (图 3G; 293FT 细胞 d7 样本量为 3, 组间平均方差值为 0.096, 组内平均方差值为 0.001,  $F = 83.319$ ,  $P = 0.001$ ; 293FT 细胞 d14 样本量为 3, 组间平均方差值为 0.572, 组内平均方差值为  $7.4 \times 10^{-4}$ ,  $F = 777.697$ ,  $P = 0.000$ ; hiPS 细胞样本量为 3, 组间平均方差值为 0.009, 组内平均方差值为  $4.5 \times 10^{-6}$ ,  $F = 2237.911$ ,  $P = 0.000$ )。同时我们也对 293FT、hiPS 敲除细胞进行了 T7E1 酶切电泳分析 (图 3H)。可以看到, 与对照组相比, 实验组酶切出现



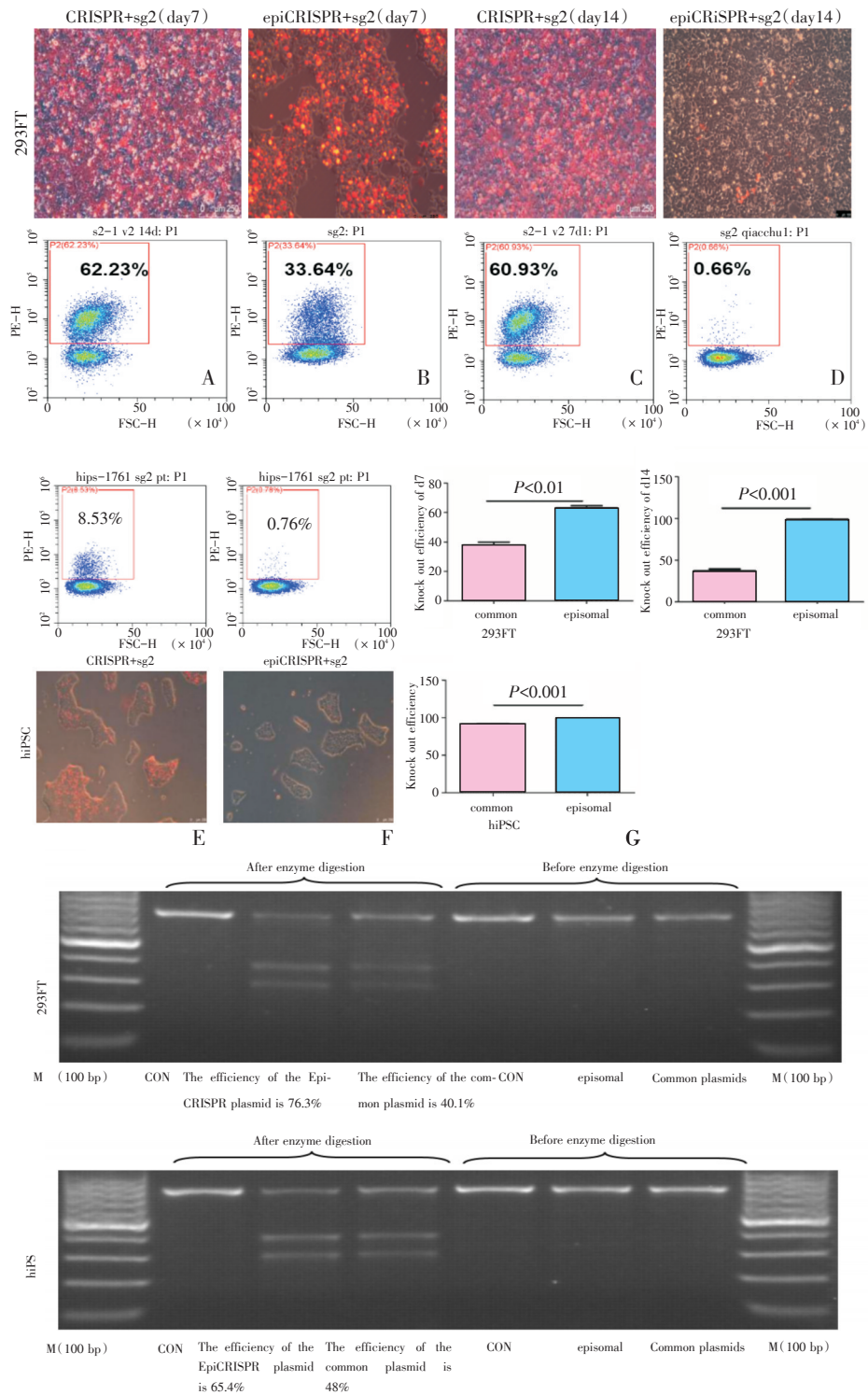
**图2** 基因打靶载体的设计与构建  
**Fig.2** The design and construction of the targeting vector

两条带,说明存在碱基的不配对(即碱基的缺失或插入)。同时灰度扫描分析显示在293FT细胞中,epiCRISPR质粒与普通CRISPR/Cas9质粒的酶切效率分别为76.3%、40.1%;在hiPS细胞中,epiCRISPR质粒与普通CRISPR/Cas9质粒的酶切效率分别为65.4%、48%。

#### 2.4 不同质粒基因敲入效率比较

接着我们又做了细胞敲入实验。同时转染敲

除质粒与构建好的同源臂,如果敲入成功,则细胞由表达红色荧光转变为表达绿色荧光(图4A为敲入的原理图)。转染质粒的24 h后同时加1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的嘌呤霉素筛选。与细胞敲除一样,转染epiCRISPR质粒的细胞持续加药筛选,而转染普通CRISPR/Cas9质粒的细胞在加药筛选2 d后停药(因普通质粒在细胞内一般存在72 h左右)。转染后的d14通过荧光显微镜观察与流式分析,发现



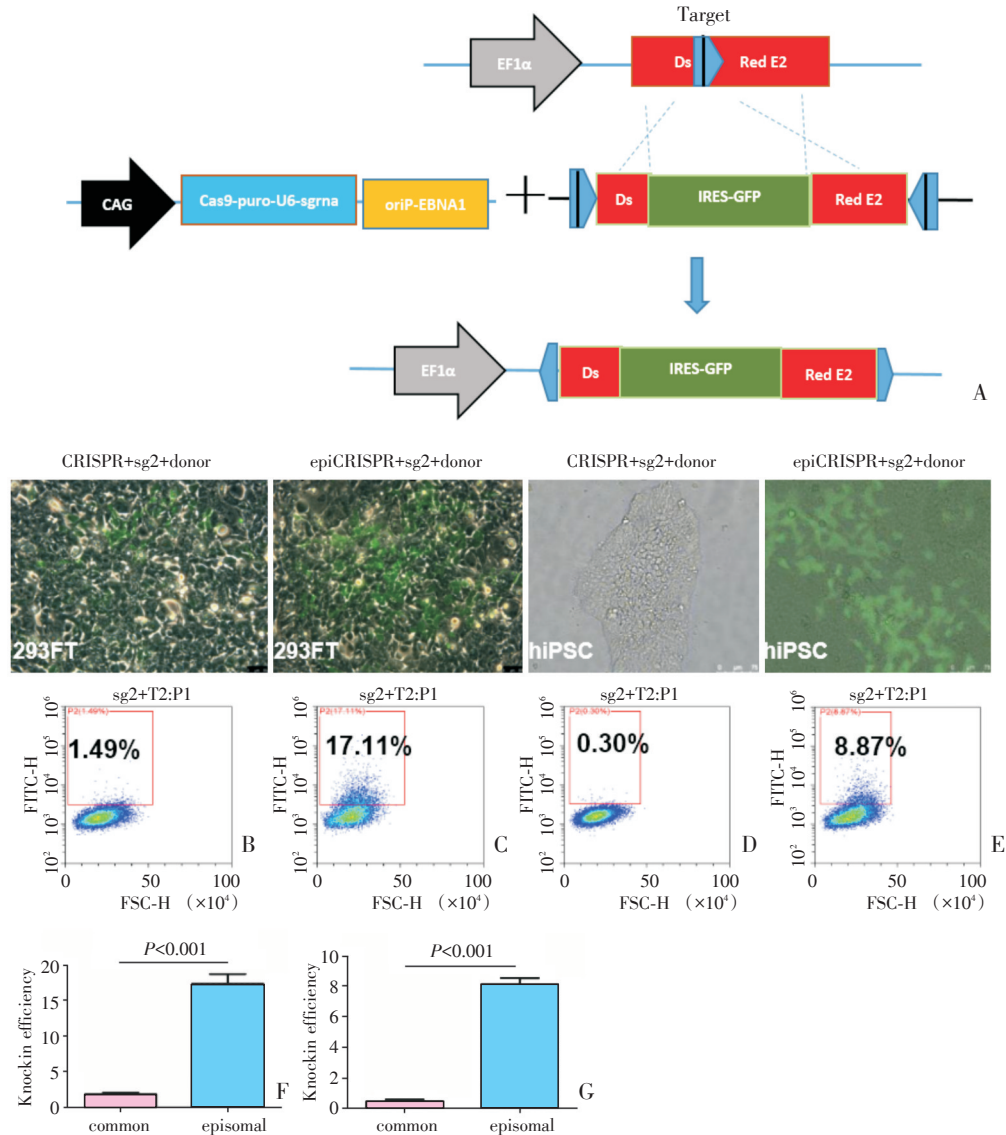
A: Traditional knockout plasmid was transfected into DsRedE2-293FT cells. DsRedE2 positive cells were detected by fluorescence microscope and FACS at d7; B: EpiCRISPRplasmid was transfected into DsRedE2-293FT cells. DsRedE2 positive cells were detected by fluorescence microscope and FACS at d7; C: DsRedE2 positive cells of traditional knockout plasmid group were detected by fluorescence microscope and FACS at d14. D: DsRedE2 positive cells of episomal group were detected by fluorescence microscope and FACS at d14. E: Traditional knockout plasmid was transfected into DsRedE2-hiPSC cells. DsRedE2 positive cells were detected by fluorescence microscope and FACS at d14. F: EpiCRISPRplasmid was transfected into DsRedE2-hiPSC cells. DsRedE2 positive cells were detected by fluorescence microscope and FACS at d14. G: Comparison of the efficiency of different knockout plasmids at different time points in 293FT and hiPSC cells; H: The T7E1 enzyme-cutting diagram was performed for 293FT and hiPSC respectively. Scale bar = 250  $\mu$ m.

图3 不同载体基因敲除效率比较

Fig.3 Comparison of gene knockout efficiency of different vectors

epiCRISPR组(图4C)GFP+细胞明显较普通CRISPR/Cas9组多(图4B),流式检测其比例分别为(17.30 ± 2.33)%(epiCRISPR组)、(1.83 ± 0.41)%(普通CRISPR/Cas9组,  $P < 0.01$ )。同时我们也在DsRedE2-hiPS上进行比较,发现epiCRISPR组(图4E)GFP+细胞明显较普通CRISPR/Cas9组多(图

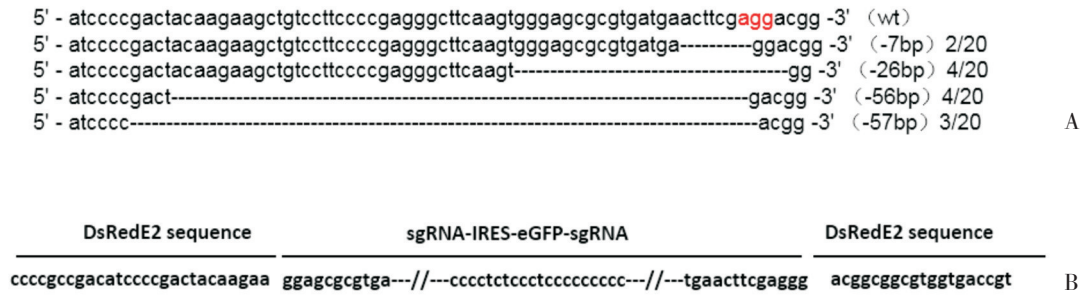
4D),流式检测其比例分别为(8.12 ± 0.73)%(epiCRISPR组)、(0.45 ± 0.27)%(普通CRISPR/Cas9组,  $P < 0.01$ )。图4F为293FT细胞普通CRISPR/Cas9组与epiCRISPR组敲入效率比较的柱状图(样本量为3,组间平均方差值为0.035,组内平均方差值为 $2.7 \times 10^{-4}$ ,  $F = 128.672$ ,  $P = 0.000$ )。图



A: The design of knockin vector. B: Traditional knockout plasmid, sgRNA2 and homologous arms were co-transfected into DsRedE2-293FT cells. GFP positive cells were detected by fluorescence microscope and FACS at d14; C: EpiCRISPR plasmid, sgRNA2 and homologous arms were co-transfected into DsRedE2-293FT cells. GFP positive cells were detected by fluorescence microscope and FACS at d14; D: Traditional knockout plasmid, sgRNA2 and homologous arms were transfected into DsRedE2-hiPS cells. GFP positive cells were detected by fluorescence microscope and FACS at d14; E: EpiCRISPR plasmid, sgRNA2 and homologous arms were transfected into DsRedE2-hiPS cells. GFP positive cells were detected by fluorescence microscope and FACS at d14; F: Comparison of the knockin efficiency of different plasmids in DsRedE2-293FT. G: Comparison of the knockin efficiency of different plasmid in DsRedE2-hiPS. Scale bar=75  $\mu\text{m}$ .

图4 不同载体基因敲入效率比较

Fig.4 Comparison of gene knockin efficiency of different vectors



A: The DNA sequencing result of hiPS knockout samples (the dotted line is the knockout sequence, and the red part is the target site. A total of 20 clones were selected, of which 13 were mutated. B: The DNA sequencing result of hiPSknockin samples. The dotted line is the omitted base (the ratio of sequencing clones is 2/10)

图5 测序结果

Fig.5 The result of the DNA sequencing

4G 为 hiPS 细胞普通 CRISPR/Cas9 组与 epiCRISPR 组敲入效率比较的柱状图(样本量为 3, 组间平均方差值为 0.008, 组内平均方差值为  $3.0 \times 10^{-5}$ ,  $F = 286.193$ ,  $P = 0.000$ )。

### 2.5 细胞打靶基因型的鉴定

对利用 episomal 载体进行 hiPS 敲除与敲入的细胞进行了提取基因组 DNA、PCR、连接载体以及测序鉴定。分析测序结果证实,在靶位点发生了碱基的切割(图 5A)与插入(图 5B)。插入的序列为 IRES-eGFP, 插入位点在 sgRNA2 靶向位点。

## 3 讨论

CRISPR 和 Cas 蛋白在细菌等原核生物的获得性免疫中发挥重要作用,可特异降解外源侵入的核酸<sup>[7]</sup>。通过这一原理建立的 CRISPR/Cas9 技术,可有效的在体外细胞和体内进行基因编辑。而在基因编辑的同时引入同源片段,则可达到基因敲入的目的,实现突变基因的修复或基因片段的定点插入。因其具有操作简单快速、成本较低及相对传统基因敲除/敲入及 TALEN、ZFN 等技术更高的效率,在该技术建立后的短短几年内,已经成功应用于各种动物及人类细胞,成为了生命科学领域最重要的研究工具之一<sup>[3]</sup>,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和谱系追踪细胞/动物模型的建立<sup>[3-4]</sup>。

近年来,人多能干细胞包括人胚胎干细胞和

诱导多能干细胞的建系,因其具有自我更新和三胚层多向分化能力,因而在胚胎发育研究、细胞替代治疗、基因治疗和基因功能研究等领域有广阔的应用前景<sup>[5]</sup>。尽管 CRISPR/Cas9 技术被报道在多种细胞系中可高效的发挥基因编辑作用,然而,其在人多能干细胞(human pluripotent stem cells)的基因编辑总体效率较低,因人多能干细胞难于转染,转染后细胞容易发生凋亡。传统的 CRISPR/Cas9 质粒进入多能干细胞后作用时间较短效率较低,而基于慢病毒的 CRISPR/Cas9 载体虽然效率较高,但是慢病毒感染后可能发生基因组整合,有可能发生基因突变<sup>[9]</sup>。因此,急需寻找适用于人多能干细胞的高效的非整合的基因编辑技术体系。

在本研究中,我们探讨了传统的 CRISPR/Cas9 质粒与 epiCRISPR 质粒在基因编辑中的效率,可以明显的看到 epiCRISPR 有着明显的优势。在基因敲除效率方面,无论是 293FT 细胞还是 hiPS 细胞,由于 epiCRISPR 质粒在药物的压力下能一直存在于细胞内<sup>[14-15]</sup>,所以能够在细胞中持续发挥敲除作用,最终敲除效率能够接近 100%,同时研究表明 epiCRISPR 质粒在筛选药物撤除后会慢慢丢失,不会长期存在于细胞内。而传统的 CRISPR/Cas9 质粒只能用药筛选 2~3 d,其敲除效率较低。而在基因敲入方面,我们发现在不同的细胞系中, epiCRISPR 质粒的效率同样明显高于普通 CRISPR/Cas9 质粒,在 293FT 细胞中效率达到  $(17.30 \pm 2.33)\%$ ,而在 hiPS 细胞中达到  $(8.12 \pm 0.73)\%$ ,略低于文献报道的基因敲入比例<sup>[7]</sup>。另

有文献报道,在基因敲入的同时结合一些促进同源修复的小分子和改变细胞周期的药物,可使hiPS的基因敲入效率达到30%<sup>[7]</sup>,如小分子SCR7,然而,本研究利用同样条件进行敲入研究时,却发现小分子SCR7并未能明显提升其效率[未加小分子的敲入效率为(6.62 ± 0.21)%,加入小分子的敲入效率为[(8.12 ± 0.73)%,  $P > 0.05$ ],我们推测这可能与所用的细胞系、培养环境等不同有关。另外,关于基因编辑中存在的脱靶问题,因epiCRISPR载体长期存在于细胞内,有可能导致脱靶率增加,但是也有研究提示利用epiCRISPR载体进行

基因编辑并不会明显增加脱靶率<sup>[16]</sup>。如能结合使用新的高保真性Cas9蛋白或双切口策略(Double nicking strategy),则有望在提高基因编辑效率的同时减少脱靶率,有助于推动epiCRISPR载体的广泛应用。

综上,我们的结果提示,epiCRISPR载体可以在人诱导多能干细胞中有效地实现基因敲除和基因敲入,是一种更为高效的基因编辑载体。相关结果为利用epiCRISPR载体进行人多能干细胞的特异基因敲入、疾病基因修复和谱系追踪动物模型的建立提供了重要的科学依据。

#### 参考文献:

- [1] Yang H, Wang H, Shivalila CS, et al. One-step generation of mice carrying reporter and conditional alleles by CRISPR/Cas-mediated genome engineering [J]. *Cell*, 2013, 154(9): 1370-1379.
- [2] Hockemeyer D, Wang H, Kiani S, et al. Genetic engineering of human pluripotent cells using TALE nucleases [J]. *Nat Biotechnol*, 2011, 29(4): 731-734.
- [3] Mali P, Yang L, Esvelt KM, et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9 [J]. *Science*, 2013, 339(5): 823-826.
- [4] Cong L, Ran FA, Cox D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems [J]. *Science*, 2013, 339(5): 819-823.
- [5] Cox DB, Platt RJ, Zhang F, et al. Therapeutic genome editing: prospects and challenges [J]. *Nat Med*, 2015, 21(1): 121-131.
- [6] Maruyama T, Dougan SK, Truttmann MC, et al. Increasing the efficiency of precise genome editing with CRISPR-Cas9 by inhibition of nonhomologous end joining [J]. *Nat Biotechnol*, 2015, 33(3): 538-542.
- [7] Yao X, Wang X, Hu X, et al. Homology-mediated end joining-based targeted integration using CRISPR/Cas9 [J]. *Cell Res*, 2017, 27(8): 801-814.
- [8] Nanbo A, Sugden A, Sugden B, et al. The coupling of synthesis and partitioning of EBV's plasmid replicon is revealed in live cells [J]. *EMBO J*, 2007, 26(7): 4252-4262.
- [9] Li L, Gao F, Wu S, et al. An episomal CRISPR/Cas9 system to derive vector-free gene modified mammalian cells [J]. *Protein Cell*, 2016, 7(9): 689-691.
- [10] Ke Q, Li L, Yao X, et al. Enhanced generation of human induced pluripotent stem cells by ectopic expression of Connexin 45 [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 458-462.
- [11] Xu H, Xiao T, Chen CH, et al. Sequence determinants of improved CRISPR sgRNA design [J]. *Genome Res*, 2015, 25(8): 1147-1157.
- [12] Howcroft TK, Kirshner SL, Singer DS, et al. Measurement of transient transfection efficiency using  $\beta$ -galactosidase protein [J]. *Anal Biochem*, 1997, 244(1): 22-27.
- [13] Rice GC, Pennica D, Borree JA, et al. Measurement of transient cDNA expression in mammalian cells using flow cytometric cell analysis and sorting? [J]. *Cytometry*, 1991, 12(3): 221-233.
- [14] Yates JL, Warren N, Sugden B, et al. Stable replication of plasmids derived from Epstein-Barr virus in various mammalian cells [J]. *Nature*, 1985, 313, 28(8): 1321-1332.
- [15] Nanbo A, Sugden A, Sugden B, et al. The coupling of synthesis and partitioning of EBV's plasmid replicon is revealed in live cells [J]. *EMBO J*, 2007, 26(23): 4252-4262.
- [16] Xie Y, Wang D, Lan F, et al. An episomal vector-based CRISPR/Cas9 system for highly efficient gene knockout in human pluripotent stem cells [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(14): 2320-2327.

(编辑 余菁)