doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2018.19.001

・基础研究・

基于 CRISPR/Cas9 基因编辑技术的 EGFP 基因定点整合表达*

都永义 吴晓洁 林艳丽 钟荣斌 周艳荣 陈红星 王友亮[△] (军事科学院军事医学研究院生物工程研究所 北京100081)

摘要目的:利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术,实现 EGFP 基因在 CHO 细胞 ACTB 基因座位置定点整合和表达,建立基于 CRISPR/Cas9 技术的外源基因定点整合和表达技术。方法:根据 CHO 细胞β-actin(ACTB)基因起始密码子区基因序列,设计相应 CRISPR/Cas9 系统,同时构建含有 ACTB 同源臂和 EGFP 基因的同源供体载体 (donor vector),通过脂质体转染法同时转染 CRISPR/Cas9 和供体载体,流式分选 EGFP 阳性细胞,分析基因编辑技术在 EGFP 基因定点整合和表达方面的可行性。结果:构建 了能有效切割 CHO 细胞 ACTB 基因的 CRISPR/Cas9 系统,筛选到 EGFP 定点整合至 ACTB 基因座并有效表达的细胞,ACTB 基 因缺失后由于 γ-actin 代偿性表达增强,ACTB 缺失细胞形态和生长未受影响。结论:单纯依靠基因编辑技术可以实现 1 kb 以内 的基因同源置换,但效率较低,如实现更大片段的外源基因置换,需借助其它实验技术。

关键词:基因编辑;CRISPR/Cas9;同源置换;定点整合

中图分类号:R-33;Q784;Q75 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2018)19-3601-06

Site-directed Integrated Expression of EGFP Gene Based on CRISPR / Cas9 Gene Editing*

XI Yong-yi, WU Xiao-jie, LIN Yan-li, ZHONG Rong-bin, ZHOU Yan-rong, CHEN Hong-xing, WANG You-liang

(Beijing Institute of biotechnology, Beijing, 100081, China)

ABSTRACT Objective: To use CRISPR / Cas9 gene editing technology to achieve the site-specific integration and expression of EGFP gene in the ACTB locus of CHO cells, and establish the site-directed integration and expression of exogenous genes based on CRISPR / Cas9 technology. **Methods:** The CRISPR / Cas9 system was designed according to the start codon region of β -actin (ACTB) gene in CHO cells. At the same time, a homologous donor vector containing ACTB homology arm and EGFP gene was constructed. The transfection of CRISPR / Cas9 plasmid and donor vector was carried out by Liposomes transfection method. The EGFP positive cells were sorted by flow cytometry. The feasibility of gene editing in the site-specific integration and expression of EGFP gene was analyzed. **Results:** The CRISPR / Cas9 system effectively cut the ACTB gene of CHO cells. The EGFP expressed efficiently in the ACTB locus. After ACTB gene deletion, the compensatory expression of γ -actin was enhanced, and CHO cell growth well. **Conclusions:** Genomic replacement within 1 kb can be achieved by simply relying on gene editing techniques, but the efficiency is low. To achieve exogenous gene replacement of larger fragments, other experimental techniques are needed.

Key words: Gene editing; CRISPR/Cas9; Homologous substitution; Site-specific integration

Chinese Library Classification(CLC): R-33; Q784; Q75 Document code: A Article ID: 1673-6273(2018)19-3601-06

前言

由于缺乏高效的基因同源重组技术,转基因动植物研究 中,外源基因多是以非定点整合方式进入细胞染色体组,并且 其表达调控框架也不是宿主细胞自身的。虽然目前还没有明确 证据证明其危害,但如果能将外源基因定点整合至细胞特定位 置,利用细胞自身表达调控元件表达外源基因,其有可能降低 外源遗传物质对宿主细胞遗传功能的影响,这也是转基因动植 物研究面临的技术难题。利用锌指核酸酶(zinc finger nuclease, ZFN)、转录激活样效应因子核酸酶(transcription activator-like effector nuclease, TALEN)和 CRISPR(Clustered Regularly Interspersed Short Palindromic Repeats)/Cas9(CRISPR- associated 9) 等基因编辑技术^[14],造成 DNA 双链断裂,细胞启动修复机制, 在外源同源供体存在情况下,细胞利用外源供体进行同源重组 修复,进而实现外源基因的定点整合和表达。CRISPR/Cas9 技 术可以将寡核苷酸片段(\leq 100 bp)定点整合的效率提高至

^{*}基金项目:国家重点实验室基金项目(SKLPBS1444);全军医学科技研究基金项目(16QNP126)

作者简介:郗永义(1979-),博士研究生,主要研究方向:生物学,E-mail: xiyongyixyy@163.com

[△] 通讯作者:王友亮(1970-),硕士生导师,研究员,主要研究方向:生物学

⁽收稿日期:2018-03-28 接受日期:2018-04-25)

100-10000倍^[5],更长片段(大于 600 bp)的外源基因定点整合的 报道还比较少(事实上,转基因动植物外源基因的表达框都在 数百 bp、甚至几千 bp 左右)。本研究拟借助 CRISPR/Cas9 基因 编辑和同源重组技术,研究 EGFP 外源基因定点整合的效率和 相关技术要点,为后续外源基因定点整合研究积累技术资料。

1 材料与方法

1.1 材料

Q5 高保真 DNA 聚合酶、dNTPs、T4 DNA 连接酶、BbsI 限 制性内切酶购自 Invitrogen 公司;pEASY-blunt 试剂盒购自 transgen 公司;T7E1 酶、CRISPR/Cas9 构建试剂盒购自唯尚立 德公司;DNA 凝胶回收试剂盒、高纯度质粒提取试剂盒购自 Tiangen 公司;Jetprime 转染试剂购自 Polyplus 公司;胎牛血清、 二甲基亚矾 (DMSO) 购自 Sigma 公司;DMEM/F12 培养基、 0.25%胰酶 /EDTA 购自美国 Gibco 公司;β-actin 抗体和γ-actin 抗体购自 RD 公司;光学显微镜购自尼康公司;NanoDrop 浓度 定量仪、细胞培养温箱购自赛默飞世尔公司;PCR 基因扩增仪 购自 BIO-RAD 公司;电泳仪、水浴锅购自六一仪器厂;CHO 细 胞由本课题组保存。

1.2 方法

1.2.1 CHO 细胞 ACTB 基因序列鉴定 使用 DMEM/F12 培养基 +10%胎牛血清培养基培养 CHO 细胞, 酚 - 氯仿提取法提 取 CHO 细胞基因组 DNA,使用 Q5 高保真 DNA 聚合酶,用引物 CHO-U1 和 CHO-D1 扩增 ACTB 基因起始密码子区(-410 至 -119)291 bp 的片段,用引物 CHO-3-U1 和 CHO-3-D1 扩增 ACTB 基因终止密码子区(-88 至 +323)411 bp 的片段(引物序列见表 1),1%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 结果,DNA 凝胶回收试剂盒回收目的片段,NanoDrop 测定 DNA 片段浓度,连接至 pEASY-blunt 载体,转化 DH5α 感受态细胞,涂 Amp 抗性平板,次日每个平板挑取 3 个克隆,委托中美泰和公司测序。

表1 PCR 扩增引物序列

Table 1 PCR amplification primer sequences			
Prime Name	Prime sequence		
CHO-U1	5'- GTGCGTATTGAGACTTGGAGCG-3'		
CHO-D1	5'- CCAAACTCAGGGGACAAAGGAA-3'		
CHO-3-U1	5'-CTCACTGTCCACCTTCCA-3'		
CHO-3-D1	5'-GACTTCCTGTAGCCATCTC-3'		
CHO-LU1	5'-GGGGATCCTTTTTGCAAAAGGAGGGGAGA-3'		
CHO-LD1	5'-ACAGCTCCTCGCCCTTGCTCACCATGGCGAACTATATCAGGGCAC-3'		
EGFP-U	5'-GTGCCCTGATATAGTTCGCCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGT-3'		
EGFP-D	5'-ACACAGCTCAGTAACAGTCCGCCTACTTGTACAGCTCGTCCATGCC -3'		
CHO-3-LU1	5'-GGCATGGACGAGCTGTACAAGTAGGCGGACTGTTACTGAGCTGTGT-3'		
CHO-3-LD1	5'-CCAAGCTTCTAGTCTAGAGGCAAGCCCTGGCT-3'		

1.2.2 sgRNA 设计及 CRISPR 系统构建 选择含有 CHO 细胞基因组信息的 sgRNA 设计网站(https://crispr.cos.uni-heidelberg.de/)设计相应 sgRNA。设计原则^[67]:ACTB 基因 ATG 起始 密码子 gRNA 选择区域为起始密码子 ATG 上游 300 bp, sgR-NA 长度限定为 20 bp,第一个碱基必须是 G,设计 sgRNA 数量

为6个(表2:ATG-1至6);ACTB 基因 TGA 终止密码子 gR-NA 选择区域为终止密码子 TGA 下游 300 bp,sgRNA 长度限 定为20 bp,第一个碱基必须是G,sgRNA 设计数量为6个(表 2:TGA-1至6)。sgRNA 的序列见表2。

Table 2 gRNA sequences		
gRNA	gRNA Sequence(5'-3')	PAMSequence
ATG-1	GCTGCGCTCGTTGTCGACAA	CGG
ATG-2	CTCGTTGTCGACAACGGCTC	CGG
ATG-3	GCTCCGGCATGTGCAAAGC	CGG
ATG-4	GCATGTGCAAAGCCGGCTTCG	CGG
ATG-5	GCCGTCTTCCCATCCATCGT	GGG
ATG-6	GTAGGTGACCCTTCCCTTTG	CGG
TGA-1	GACCCATGATGGGCCCTTCC	AGG
TGA-2	CAGGTCAACCCCTTGACTG	TGG
TGA-3	CCCTTGACTGTGGGTAAGAC	AGG
TGA-4	CACACAGAGTACTTGCGCTC	AGG
TGA-5	AAGCAGGAGTACGATGAGTC	CGG
TGA-6	TTGCGGTGGACGATGGAGGG	CGG

表 2 gRNA 序列

• 3603 •

根据 sgRNA 序列,合成正反向互补序列,并在正向序列前 方加入 AAACACCG,在反向序列末尾加入 CAAAATCTC,而 后按照 CRISPR/Cas9 载体试剂盒说明书,将正反向互补引物溶 解为 100 mM,1:1 混合后 98℃加入 5 min,后自然冷却至室温。 而后使用 T4 DNA 连接酶连接各 sgRNA 片段和 CRISPR/Cas9 载体,转化 DH5α 感受态细胞,涂 Amp 抗性平板,次日每个平 板挑取 2 个克隆,提取质粒,并测序验证,构建 pCAG-Cas9-gR-NA 载体。

1.2.3 T7E1 酶鉴定 sgRNA 活性 按照 Jetprime 转染试剂说 明,传代 CHO-K1 细胞至 48 孔板(2 万细胞/孔),次日细胞汇 合度达到 90%时开始转染。每孔细胞培养基为 300 µL, Jetprime 转染试剂 30 µL,其中含 sgRNA 质粒 0.3 µg, jetprime 脂 质体 0.6 µL,按照转染试剂操作说明,上述混合物静置 10 min, 而后均匀加入到各细胞孔,转染 6 h 后更换新鲜生长培养基, 48 h 后收集和提取细胞基因组 DNA。PCR 扩增目的基因区域 (方法见 1.2.1)。而后将该 PCR 产物加热至 98℃,并自然冷切 至室温。取 10 µLPCR 产物加入 0.5 µLT7E1 酶,37 ℃放置 30 min (具体操作见 T7E1 酶说明书),3%琼脂糖凝胶电泳检测酶 切结果,计算各 sgRNA 引导 Cas9 核酸酶切割目的基因的活性。

1.2.4 同源重组 EGFP 供体载体构建 根据 GeneBank 网站公布的 CHO 细胞 ACTB 基因组信息,使用 Q5 高保真 DNA 聚合酶,用引物 CHO-LU1 和 CHO-LD1 扩增 ACTB 基因起始密码子前 1204 bp 的序列,用引物 CHO-3-LU1 和 CHO-3-LD1 扩增 ACTB 基因基因终止密码子后 614 bp 序列(引物序列见表 1),,连接入 pEASY-Blunt 载体后测序验证,作为同源供体载体 左右同源臂。用引物 EGFP-U 和 EGFP-D,从 p-EGFP-N1 载体上扩增出 EGFP 基因序列(引物序列见表 1),连接构建同源供体载体 pEASY-LA-EGFP-RA。

1.2.5 CRISPR/Cas9 系统和 EGFP 供体载体共转染 CHO 细胞 及细胞单克隆筛选 传代 CHO 细胞至 24 孔板,次日待细胞 生长汇合度达 90%,按照 jetprime 转染试剂操作说明进行转 染,每孔细胞含有 0.5 mL 培养基,取 50 μL Jetprime buffer,加 入 0.5 μg 高活性的 CRISPR/Cas9 载体 (靶向起始密码子区域 和靶向终止密码子区域的 CRISPR/Cas9 质粒各 0.25 μg)和 0.5 μg 的 pEASY-LA-EGFP-RA,混匀静置 10 min,加入细胞培养 上清并缓慢混匀。转染 36 h 后使用流式细胞分选仪,分选 EGFP 阳性细胞,进行细胞单克隆 (单克隆用培养基为含有 10%胎牛血清的 DMEM/F12 培养基)。

1.2.6 EGFP 置换 ATCB 阳性细胞克隆鉴定 使用荧光显微 镜观察各单克隆细胞 EGFP 表达情况,筛选有绿色荧光的细胞 克隆,进行基因 PCR 鉴定,并使用抗 γ-actin 和 β-actin 抗体检 测细胞内 actin 蛋白表达情况。分析总结 CRISPR/Cas9 基因编 辑技术结合同源重组技术在 EGFP 基因置换 ACTB 内源基因 方面的技术可行性。

1.3 统计学分析

sgRNA 活性鉴定实验,每个 sgRNA 实验均设置 2 个复孔。 T7E1 实验中,各 sgRNA 活性计算公式为:%indel=100× (a+b)/ (a+b+c),a 和 b 表示被切割后的片段灰度值,c 表示未切割的片 段灰度值。

2 结果

2.1 CHO 细胞 ACTB 基因座序列鉴定

使用 CHO-U1 和 CHO-D1, CHO-3-U1 和 CHO-3-D1 两对 引物,按照预先设定的实验条件,扩增到和预期大小一致的特 异性靶基因(图 1),测序结果和网上公布的 CHO 细胞 ATCB 基因起始密码子前序列(-410bp 至 -119bp)、终止密码子后序列 (-88 bp 至 +323 bp) 一致,提示本研究可以按照该序列设计 sgRNA。



图 1 CHO 细胞 ACTB 基因扩增结果 Fig.1 ACTB gene amplification results in CHO cells

2.2 sgRNA 设计及活性鉴定

根据 CHO 细胞 ACTB 基因测序结果和 sgRNA 设计原则,本研究每个基因靶点均设计了 6 条 sgRNA(见表 2)。sgR-NA 活性分析实验中,PCR 扩增产物经 T7E1 酶切后电泳显示, 靶向 ATG 位置的 6 条 sgRNAs,ATG-2 和 ATG-6 两条 sgRNA 活性最强,切割效率均达到 15%,其它几条 sgRNA 活性在 5-10%左右(图 2)。而靶向 TGA 位置的 6 条 sgRNAs,TGA-2 活性最强,切割效率达 14%,另一条是 TGA-5 (切割活性为 10%),其它几条 sgRNA 活性不到 5%(图 3)。

2.3 EGFP 基因置换 CHO 细胞内 ACTB 基因

根据 sgRNA 活性检测结果,本研究选用 ATG-2 和 TGA-2 作为引导 Cas9 核酸酶切割 ACTB 基因的 sgRNA。CHO 细胞 转染实验中,同时转染含有 ATG-2 和 TGA-2 的 CRISPR 系统、 以及含有 EGFP 的供体载体。流式分选和单克隆培养出共 80 个单克隆,其中筛选到强 EGFP 表达的细胞克隆 2 株,弱 EGFP 表达的细胞克隆 4 株(图 4)。PCR 结果显示强 EGFP 表达的细胞 地株是 EGFP 双置换 ACTB(ACTB⁺, EGFP⁺⁺),而 EGFP 表达 较弱的细胞株为 EGFP 单置换 ACTB(ACTB⁺, EGFP⁺⁺)(图5)。



图 2 靶向 ATG 区域的 sgRNA 活性测定

ATG-1 左侧泳道为 PCR 产物电泳结果,右侧为 PCR 产物经 T7E1 酶切电泳结果,余此类推。ATG-7 为空 CRISPR 载体转染对照。 * 表示 T7E1 酶切产生条带。M 为 100bp DNA Ladder(从下往上依次为 100,200,300,400,500,600,700,800,900,1000,1500bp)。 Fig.2 sgRNA activity targeting the ATG region

The left lane of ATG-1 is PCR product electrophoresis, the right side is T7E1 digestion of PCR product. ATG-7 was empty CRISPR vector control.

* The band cut by T7E1. M is 100 bp DNA Ladder (from bottom to up: 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500 bp).



图 3 靶向 TGA 区域的 sgRNA 活性测定 TGA-7 为空 CRISPR 载体转染对照。* 表示 T7E1 酶切产生条带, M 为 100bp DNA Ladder。 Fig.3 sgRNA activity targeting the TGA region ATG-7 was empty CRISPR vector control. * The band cut by T7E1.



图 4 EGFP 表达阳性细胞克隆镜下观察上图 6 号克隆(ACTB⁺;EGFP⁺⁺);下图:2 号克隆(ACTB⁺⁺;EGFP⁺⁺)。 Fig.4 Positive EGFP expression cells expressed EGFP Upper: clone 6 (ACTB⁺⁺;EGFP⁺⁺); Lower: clone 2 (ACTB⁺⁺;EGFP⁺⁺).

2.4 CHO 细胞 ACTB 基因被置换后细胞分子表型变化

EGFP 置换 CHO 细胞 ACTB 基因后,细胞形态和生长状态并未发生明显变化(见图 6),Western-blotting 实验结果显示,EGFP 双置换后的 CHO 细胞内 β -actin 蛋白(ACTB 基因表达产物)条带消失,而 γ -actin 蛋白条带明显增强,提示 EGFP 基因置换掉 ACTB 基因后,其 β -actin 蛋白缺失会通过 γ -actin 蛋白代偿性表达增强弥补,从而保证细胞骨架和细胞形态的完整性。

3 讨论

3.1 CRISPR/Cas9 系统及 sgRNA 设计

CRISPR系统是存在于细菌和古生菌中用于抵抗外源病毒 (噬菌体)攻击的免疫系统^[89],噬菌体首次攻击细菌时,细菌会 切割下噬菌体的一部分基因(protospacer)整合至自身染色体上 的CRISPR基因座中,作为对该噬菌体的识别标记,而当该噬菌 体再次攻击细菌时,细菌自身 CRSPR基因座上 protospacer 通 过基因互补结合方式识别噬菌体身份,并启动 CRISPR系统的 核酸酶活性,酶解噬菌体,因此,CRISPR系统也称为细菌的获 得性免疫系统。CRISPR系统识别和抵抗入侵噬菌体的主要元 件有两部分,一是 gRNA,即细菌切割下噬菌体部分基因(protospacer)的转录产物,二是核酸内切酶,不同 CRISPR系统的 核酸酶也不一样,用于基因编辑的核酸酶是 II 型 CRISPR系统



 M
 1
 2
 3
 4
 5
 6
 7

 图 5
 EGFP 表达阳性克隆 PCR 鉴定分析

Fig.5 PCR identification analysis with EGFP positive clones Lane 1-6: six EGFP positive cell clones, Lane 7: Negative control. Upper panel: 5 'identity results (= 1600 bp) when EGFP gene replaced ACTB; middle panel: 3 'identity results (= 690 bp) when EGFP gene replaced ACTB; lower panel: Full ACTB gene amplification results (ACTB band was 3993 bp. The2828 bp bandwere amplified if EGFP gene replaced ACTB gene)

的 Cas9 核酸酶。gRNA 功能是靶向识别(结合)外来噬菌体, Cas9 核酸酶会酶切 gRNA 靶向结合的入侵噬菌体。2012 年末, Emmanuelle Charpentier 和 Jennifer A. Doudna 首次在体外阐明 了该系统的作用机制和原理^[10],2013 年,张锋等检验了该系统 用于真核细胞基因组编辑的可行性^[4,6,11,12],很快,该系统在包括 植物细胞、哺乳动物细胞、昆虫细胞、酵母细胞、斑马鱼细胞、干 细胞、疟原虫等^[13-17]多种生物中验证了其基因组编辑的可操作 性和便捷性。

CRISPR/Cas9 基因编辑系统的效率与 sgRNA 序列及二级 结构、靶基因序列组成和空间结构、sgRNA 靶向特异性等因素 有很大关系^[18-20]。sgRNA 设计的基本原则有四条,即 gRNA 长 度在 20 bp 左右,sgRNA 后面必须是 NGG (N 代表 A、G、C、T 任意一个)序列(即 PAM 序列),gRNA 序列(尤其是前 12 bp) 靶向唯一性要好,gRNA 转录起始第一个碱基是 G (部分启动 子需要 GG 开头)。目前有许多关于 sgRNA 优化设计的文献, 比如 sgRNA 最后一个碱基最好是 G 或 C 等等。但从本次实验



EG+/+ WtEG+/+ Wt

图 6 Western-Blot 鉴定 EGFP 阳性细胞内 β-actin 和γ-actin 表达情况上 图:WB 检测 β-actin 表达情况(左侧:抗 β-actin 检测结果;右侧:抗 gapdh 检测结果);下图:WB 检测 γ-actin 表达情况(左侧:抗 γ-actin 检 测结果;右侧:抗 gapdh 检测结果)。"EG**" 表示 EGFP 双置换细胞

(EGFP=**, ACTB^{-/-}); "Wt" 表示野生型 CHO-K1 细胞 Fig. 6 Expression of β-actin and γ-actin in EGFP-positive cells. Upper panel: WB detection of β-actin expression (left: anti-β-actin test; right: anti-gapdh test). Lower panel: WB detection of γ-actin expression (left: anti-γ-actin test results; right: anti-gapdh test results). "EG^{+/+}" indicates EGFP double-substituted cells (EGFP =**, ACTB^{-/-}); "Wt" indicates wild type CHO-K1 cells

结果来看,这些技巧对于 sgRNA 设计和筛选似乎帮助不大。如 要筛选到高效率的 SgRNA,每个靶基因至少设计 3 个 sgRNA。 另外,sgRNA 靶向特异性必须要好,特别是 0-12 bp 位置,最好 不要有非特异靶向序列,否则,CRISPR/Cas9 会非特异切割细 胞基因组,一方面会大大降低基因编辑效率,另一方面也会对 已编辑成功的细胞活性造成威胁。

3.2 EGFP 基因定点置换 ATCB 效率

基因编辑技术已经在基因敲除方向显示出极大的便利性 [21-23]和市场价值,如中科院高彩霞课题组利用基因编辑技术成 功培育了抗白粉病的基因编辑小麦[24],美国基于基因编辑技术 的蘑菇和玉米已获得美国农业部和 FDA 批准上市。在基因定 点突变、小片段基因敲除和插入也显示出一定的优势,如基于 锌指核酸酶技术的干细胞治疗艾滋病和地中海贫血已进入临 床 I 期研究阶段^[2],基于 CRISPR-Cas9 基因编辑技术的肿瘤细 胞治疗早在 2016 年在中国开展实施, 京都大学 iPS 细胞研究 和应用中心(CiRA)的研究人员在携带突变 dystrophin 基因的 小鼠胚胎细胞中注射 CRISPR/Cas9 系统,用于纠正 dystrophin 基因突变,而后将已纠正的胚胎细胞输入野生型雌性小鼠体 内,这样子代小鼠即可具有正常的 dystrophin 和骨骼肌功能, 而且即使是只有17%的细胞得到纠正也能令其骨骼肌恢复功 能四,这种技术虽然目前还不能应用于人类,但这一概念为未 来治疗成人遗传性疾病带来了希望,通过 CRISPR 等基因编辑 技术治疗雷伯氏先天性黑内障(LCA10)可能是最早上市的基 因编辑治疗成人遗传病生物技术产品。而基因基因编辑技术的 大片段基因置换,较少有成功案例报道,一些基于基因编辑和 同源重组的基因置换片段也只有几十 bp,多是置换入一个酶切 位点,以验证基因置换的有效性和可行性。本研究 EGFP 置换 ACTB 实验证实,外源大片段基因(大于 600 bp)置换也可以借 助基因编辑和同源重组技术实现,并可以利用内源基因表达调 控元件实现高效表达,但其置换效率与外源基因大小有密切关 系,如本实验中 EGFP(约 700 bp)定点整合置换的效率在 2-6% 左右,而本实验中做的另一项人溶菌酶基因(约 2500 bp)置换 效率就非常低,筛选了 300 个克隆也未能筛选到阳性置换克 隆,借助 scr7 等非同源重组抑制剂或许可以提高基因置换效率 抗性标记)来降低实验难度,后续可通过 Loxp 技术去除筛选 标记。

3.3 ACTB 是外源基因定点整合和表达的有效靶点

由于 ACTB 存在于几乎所有类型细胞中,含量丰富且基因 (包括两端调控序列)较小,因此常被用于外源基因高效表达研 究对象。目前研究路线有两条^[30-33],一是在转基因动物研究领 域,将外源基因(多为 GFP)直接通过靶向性同源重组方式置于 受精卵细胞 ACTB 基因第二外显子处(第一内含子处可能含有 表达调控元件),然后在胚胎或子代动物可以看到广泛的外源 基因表达(单ACTB基因突变后子代动物除了体型偏小外,没 有其它异常,包括血象,血生化和X射线检测情况)。另外一条 研究路线是将 ACTB 的上游调控序列(包括第一内含子和第二 外显子起始端)和下游调控序列作为表达调控元件,表达外源 基因(用 gfp 等作为检测基因),实验结果证明外源基因可以得 到很好的表达。本研究利用基因编辑技术,可以很便捷的实现 EGFP 基因和 ACTB 基因的置换和高效表达,且 EGFP 置换 ACTB 后细胞形态和生长速度没有明显改变^[34],提示 ACTB 可 以作为外源基因定点整合表达的一个候选位点,进行其它转基 因动植物产品研究开发。

参考文献(References)

- Urnov FD, Miller JC, Lee YL, et al. Highly efficient endogenous human gene correction using designed zinc-finger nucleases [J]. Nature, 2005, 435(7042): 646-651
- [2] Wood AJ, Lo TW, Zeitler B, et al. Targeted genome editing across species using ZFNs and TALENs[J]. Science, 2011, 333(6040): 23
- [3] Li HL, Fujimoto N, Sasakawa N, et al. Precise correction of the dystrophin gene in duchenne muscular dystrophy patient induced pluripotent stem cells by TALEN and CRISPR-Cas9 [J]. Stem Cell Reports, 2015, 4(1): 143-154
- [4] Cong L, Ran FA, Cox D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems[J]. Science, 2013, 339(6121): 819-823
- [5] Xie F, Ye L, Chang JC, et al. Seamless gene correction of beta-thalassemia mutations in patient-specific iPSCs using CRISPR/Cas9 and piggy Bac[J]. Genome Res, 2014, 24(9): 1526-1533
- [6] Mali P, Yang L, Esvelt KM, et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9[J]. Science, 2013, 339(6121): 823-826
- [7] Qi LS, Larson MH, Gilbert LA, et al. Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression[J]. Cell, 2013, 152(5): 1173-1183

- [8] Sorek R, Lawrence C M, Wiedenheft B. CRISPR-mediated adaptive immune systems in bacteria and archaea [J]. Annual Review of Biochemistry, 2013, 82(1): 237-266
- [9] Bhaya D, Davison M, Barrangou R. CRISPR-Cas systems in bacteria and archaea: versatile small RNAs for adaptive defense and regulation [J]. Annual Review of Genetics, 2011, 45(45): 273-297
- [10] Martin Jinek, Krzysztof Chylinski, Ines Fonfara, et al. A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity[J]. Science, 2012, 337(6096): 816
- [11] Shen B, Zhang J, Wu H, et al. Generation of gene-modified mice via Cas9/RNA-mediated gene targeting [J]. Cell Research, 2013, 23(5): 720
- [12] Jiang W, Bikard D, Cox D, et al. RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems[J]. Nature Biotechnology, 2013, 31(3): 233
- [13] Dicarlo J E, Norville J E, Mali P, et al. Genome engineering in Saccharomyces cerevisiae using CRISPR-Cas systems [J]. Nucleic Acids Research, 2013, 41(7): 4336-4343
- [14] Scott J Gratz, Alexander M Cummings, Jennifer N Nguyen, et al. Genome Engineering of Drosophila with the CRISPR RNA-Guided Cas9 Nuclease[J]. Genetics, 2013, 194(4): 1029-1035
- [15] Friedland AE, Tzur YB, Esvelt KM, et al. Heritable genome editing in C. elegans via a CRISPR-Cas9 system [J]. Nat Methods, 2013, 10 (8): 741-743
- [16] Wang H, Yang H, Shivalila C S, et al. One-Step Generation of Mice Carrying Mutations in Multiple Genes by CRISPR/Cas-Mediated Genome Engineering[J]. Cell, 2013, 153(4): 910
- [17] Nekrasov V, Staskawicz B, Weigel D, et al. Targeted mutagenesis in the model plant Nicotiana benthamiana using Cas9 RNA-guided endonuclease[J]. Nature Biotechnology, 2013, 31(8): 691
- [18] Dang Y, Jia G, Choi J, et al. Optimizing sgRNA structure to improve CRISPR-Cas9 knockout efficiency[J]. Genome Biology, 2015, 16(1): 280
- [19] Morenomateos M A, Vejnar C E, Beaudoin J D, et al. CRISPRscan: designing highly efficient sgRNAs for CRISPR/Cas9 targeting in vivo [J]. Nature Methods, 2015, 12(10): 982
- [20] Fu Y, Sander JD, Reyon D, et al. Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs [J]. Nat Biotechnol, 2014, 32 (3): 279-284
- [21] Shan Q, Wang Y, Li J, et al. Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system [J]. Nat Biotech, 2013, 31 (8): 686-688
- [22] Niu Y, Shen B, Cui Y, et al. Generation of Gene-Modified Cynomolgus Monkey via Cas9/RNA-Mediated Gene Targeting in One-Cell Embryos[J]. Cell, 156(4): 836-843
- [23] Hai T, Teng F, Guo R, et al. One-step generation of knockout pigs by zygote injection of CRISPR/Cas system [J]. Cell Res, 2014, 24(3): 372-375
- [24] Shan Q, Wang Y, Li J, et al. Genome editing in rice and wheat using the CRISPR/Cas system[J]. Nature Protocols, 2014, 9(10): 2395
- [25] Roman M, Sebastian M, Christian V, et al. Multiplexed pancreatic genome engineering and cancer induction by transfection-based CRISPR/Cas9 delivery in mice [J]. Nature Communications, 2016, 7: 10770 (下转第 3617 页)

advances[J]. Strait Pharmaceutical, 2012, 24(1): 37-39

[8] 李娜,宋金春.莲生物碱抗肿瘤研究进展[J].中国药师, 2016, 19(11): 2141-2143

Li Na, Song Jin-chun. Anti-tumor research progress of alkaloids in lotus[J]. Chinese Pharmacist, 2016, 19(11): 2141-2143

- [9] Zhang X, Liu Z, Xu B, et al. Neferine, an alkaloid ingredient in lotus seed embryo, inhibits proliferation of human osteosarcoma cells by promoting p38 MAPK-mediated p21 stabilization[J]. European Journal of Pharmacology, 2012, 677(1-3): 47
- [10] Mercatelli D, Bortolotti M, Bazzocchi A, et al. Immunoconjugates for Osteosarcoma Therapy: Preclinical Experiences and Future Perspectives[J]. Biomedicines, 2018, 6(1): 19
- [11] He H, Ni J, Huang J. Molecular mechanisms of chemoresistance in osteosarcoma (Review)[J]. Oncology Letters, 2014, 7(5): 1352
- [12] Raimondi L, De A L, Costa V, et al. Circulating biomarkers in osteosarcoma: new translational tools for diagnosis and treatment [J]. Oncotarget, 2017, 8(59): 100831
- [13] Aljubran A H, Griffin A, Pintilie M, et al. Osteosarcoma in adolescents and adults: survival analysis with and without lung metastases [J]. Annals of Oncology, 2009, 20(6): 1136-1141
- [14] 陈健,孙伟,华莹奇,等:常见骨原发肿瘤研究新进展[J].中国骨与关节杂志,2018,(1)

Chen Jian, Sun Wei, Hua Ying-qi, et al. New advances in common primary bone tumor research [J]. Chinese Journal of Bone and Joint, 2018, (1)

[15] 曹丽荣,王鸿梅,李军.植物来源抗肿瘤药物药理机制、不良反应与 临床应用[J].药学研究, 2013, 32(9): 539-542

Cao Li-rong, Wang Hong-mei, Li Jun. Pharmacological mechanism, adverse reactions and clinical application of antitumor drugs derived from plants[J]. Pharmaceutical research, 2013, 32(9): 539-542

[16] 李希珍.莲子心化学成分及生物活性的研究[D].吉林大学, 2016

(上接第3606页)

- [26] Li, Hongmei, Lisa, et al. Precise Correction of the Dystrophin Gene in Duchenne Muscular Dystrophy Patient Induced Pluripotent Stem Cells by TALEN and CRISPR-Cas9 [J]. Stem Cell Reports, 2015, 4 (1): 143
- [27] Maruyama T, Dougan S K, Truttmann M C, et al. Increasing the efficiency of precise genome editing with CRISPR-Cas9 by inhibition of nonhomologous end joining [J]. Nature Biotechnology, 2015, 33(5): 538
- [28] Chu V T, Weber T, Wefers B, et al. Increasing the efficiency of homology-directed repair for CRISPR-Cas9-induced precise gene editing in mammalian cells[J]. Nature Biotechnology, 2015, 33(5): 543
- [29] Yu C, Liu Y, Ma T, et al. Small molecules enhance CRISPR genome editing in pluripotent stem cells[J]. Cell Stem Cell, 2015, 16(2): 142
- [30] Shawlot W, Deng J M, Fohn L E, et al. Restricted beta-galactosidase expression of a hygromycin-lacZ gene targeted to the beta-actin locus

Li Xi-zhen. Study on chemical composition and biological activity of lotus seed[D]. Jilin University, 2016

- [17] 孟雪莲,李超,王妹,等.双苄基异喹啉类生物碱的药理活性研究进展[J].辽宁大学学报(自然科学版), 2016, 43(3): 243-247 Meng Xue-lian, Li Chao, Wang Shu, et al. Advances in research on pharmacological activities of bisbenzylisoquinoline alkaloids[J]. Journal of Liaoning University (Natural Science Edition), 2016, 43(3): 243-247
- [18] Kadioglu O, Byk L, Swf M, et al. Mode of Action Analyses of Neferine, a Bisbenzylisoquinoline Alkaloid of Lotus (Nelumbo nucifera) against Multidrug-Resistant Tumor Cells[J]. Frontiers in Pharmacology, 2017, 8: 238
- [19] Jung H A, Jin S E, Ran J C, et al. Anti-amnesic activity of neferine with antioxidant and anti-inflammatory capacities, as well as inhibition of ChEs and BACE1[J]. Life Sciences, 2010, 87(14): 420-430
- [20] Poornima P, Weng C F, Padma V V. Neferine from Nelumbo nucifera, induces autophagy through the inhibition of PI3K/Akt/mTOR pathway and ROS hyper generation in A549 cells[J]. Food Chemistry, 2013, 141(4): 3598-3605
- [21] Yoon J S, Kim H M, Yadunandam A K, et al. Neferine isolated from Nelumbo nucifera enhances anti-cancer activities in Hep3B cells: molecular mechanisms of cell cycle arrest, ER stress induced apoptosis and anti-angiogenic response [J]. Phytomedicine International Journal of Phytotherapy & Phytopharmacology, 2013, 20(11): 1013
- [22] Wei Z, Li H H. IGFBP-3 may trigger osteoarthritis by inducing apoptosis of chondrocytes through Nur77 translocation [J]. International Journal of Clinical & Experimental Pathology, 2015, 8(12): 15599
- [23] Poornima P, Quency R S, Padma V V. Neferine induces reactive oxygen species mediated intrinsic pathway of apoptosis in HepG2 cells[J]. Food Chemistry, 2013, 136(2): 659-667

and embryonic lethality of beta-actin mutant mice[J]. Transgenic Research, 1998, 7(2): 95

- [31] Shmerling D, Danzer C P, Mao X, et al. Strong and ubiquitous expression of transgenes targeted into the beta-actin locus by Cre/lox cassette replacement[J]. Genesis, 2005, 42(4): 229
- [32] Bunnell TM, Burbach BJ, Shimizu Y, et al. A Highlights from MBoC Selection: β-Actin specifically controls cell growth, migration, and the G-actin pool [J]. Molecular Biology of the Cell, 2011, 22 (21): 4047-4058
- [33] Tomasek J J, Haaksma C J, Schwartz R J, et al. Whole animal knockout of smooth muscle alpha-actin does not alter excisional wound healing or the fibroblast-to-myofibroblast transition[J]. Wound Repair and Regeneration, 2013, 21(1): 166
- [34] Perrin B J, Sonnemann K J, Ervasti J M. β-Actin and γ-Actin Are Each Dispensable for Auditory Hair Cell Development But Required for Stereocilia Maintenance[J]. Plos Genetics, 2010, 6(10): e1001158