

丛日旭,佟巍,向志光,等. 成年狨猴肾脏细胞体外培养体系的建立及 CRISPR/Cas9 基因编辑的应用 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(8): 50–54.

Cong RX, Tong W, Xiang ZG, et al. Establishment of an *in vitro* culture system for adult marmoset kidney cells and applications of clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/CRISPR-associated protein 9 gene editing [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(8): 50–54.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2019.08.008

成年狨猴肾脏细胞体外培养体系的建立及 CRISPR/Cas9 基因编辑的应用

丛日旭,佟巍,向志光,张丽芳,刘先菊,阮研硕,郭智,刘云波*

(中国医学科学院医学实验动物研究所,北京 100021)

【摘要】 目的 建立成年狨猴肾脏细胞体外培养的培养体系,并将 Cas9 编辑系统初步应用于所培养的狨猴肾脏细胞,建立检测 sgRNA 切割活性的体系。**方法** 取成年的狨猴肾脏,采用贴壁法、消化法得到狨猴肾脏细胞。对细胞进行生长曲线测定、转染试剂 (Viafect 和 Lipo2000) 及抗性 (嘌呤霉素和杀稻瘟菌素) 浓度筛选,将 *SIRT1* 的 sgRNA 质粒和 Cas9 质粒共转染狨猴细胞,提取基因组并对基因修饰目的片段扩增,并将扩增产物进行测序。**结果** 建立狨猴肾脏细胞体外培养体系;ViaFect 转染试剂转染率大于 60%;细胞抗性筛选适宜浓度嘌呤霉素 4 μg/mL,杀稻瘟菌素 8 μg/mL;测序结果表明,从 sgRNA 的 PAM 序列附近开始出现突变峰,证明 sgRNA 成功引入突变。**结论** 成功建立了狨猴肾脏细胞的体外培养、细胞转染和抗性筛选体系;CRISPR/Cas9 可以用于狨猴肾脏细胞编辑,为基因修饰狨猴靶点选择提供依据。

【关键词】 狨猴;肾脏细胞培养;Cas9 基因编辑

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2019) 08-0050-05

Establishment of an *in vitro* culture system for adult marmoset kidney cells and applications of clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/CRISPR-associated protein 9 gene editing

CONG Rixu, TONG Wei, XIANG Zhiguang, ZHANG Lifang, LIU Xianju, RUAN Yanshuo, GUO Zhi, LIU Yunbo*
(Institute of Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Sciences (CAMS) & Peking Union Medical College (PUMC), Beijing 100021, China)

【Abstract】 Objective To establish an *in vitro* culture system of adult marmoset kidney cells, and create a means for detecting single guide (sg) RNA cutting activity based on the Cas9 editing system. **Methods** A growth curve was initially determined for adult marmoset kidney cells. The growth curve, transfection reagent and resistance concentration were determined. These were then used to co-transfect *SIRT1* sgRNA and Cas9 into marmoset cells. Following transfection, the genome was extracted and sequenced. **Results** The transfection rate of ViaFect was greater than 50% ~ 70%. The optimum concentration of puromycin was 4 μg/mL and that of blasticidin was 8 μg/mL for cell resistance screening. Sequencing result showed that mutation peaks appeared near the PAM sequence of sgRNA, which proved that sgRNA was

[基金项目] 北京市科技计划 (Z161100000216154); 国家重点研究计划 (2017YFA0105201)。

[作者简介] 丛日旭 (1987—), 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 动物学。E-mail: congrixu0805@163.com

[通信作者] 刘云波, 教授, 研究方向: 实验动物质量控制。E-mail: yunbolu@126.com

successfully introduced mutations into the marmoset genome. **Conclusions** We successfully established an *in vitro* culture, transfection and resistance screening system for marmoset kidney cells, which can be used as a reference for gene editing site testing. CRISPR/Cas9 is suitable for renal cell editing in marmosets.

[Keywords] marmosets; kidney cell culture; Cas9 editing

基因修饰大小鼠对生物学做出了巨大贡献。由于灵长类动物和啮齿类动物之间的神经生理功能、代谢途径和药物敏感性等遗传和生理差异,阻碍了从大小鼠疾病模型中的结果直接应用于人类临床^[1]。基因修饰灵长类动物疾病模型在人类神经系统疾病研究中,发挥着更为重要作用^[2-3]。普通狨猴(*common marmoset*, *Callithrix jacchus*)是一种新世界灵长类动物,与恒河猴相比,虽与人类的亲缘关系较远,但它们具有多胎(每胎 2~4 只)、妊娠期较短(约 144 d)、全年发情等特性^[4-5]等,生殖特性,利用这种特性可以种系传播的转基因狨猴已经被报道^[6-7],狨猴作为人类疾病的基因修饰灵长类模型有独特的价值。

由于非灵长类动物基因修饰较大小鼠相比、胚胎难以获得且数量有限,生殖周期较长,生育数量少,基因组更复杂等因素的限制^[8-9],选择编辑效率高的基因修饰技术和活性高 sgRNA 靶点显著提高基因修饰效率。CRISPR/Cas9 系统因其系统成分简单、操作方便、突变效率高、成本低廉的优点,已成为现在发展最为迅速、国内外学者广泛研究开发、应用于多种生物体基因组的定向基因编辑技术^[10]。普通狨猴在我国是一种较新的实验动物,其相关细胞系较少。为了获得可用于 sgRNA 筛选的细胞,本文建立狨猴肾脏细胞培养体系,及细胞相关转染、抗性筛选体系,将含有 sgRNA 与 Cas9 质粒共同转入狨猴细胞,检测 sgRNA 靶点的活性及基因编辑效率,为基因修饰狨猴模型的构建的基因修饰靶点的筛选提供基础。

1 材料和方法

1.1 实验动物

普通狨猴 1 只,雄性,体重 280 g,27 月龄,普通环境饲养,由中国医学科学院医学实验动物研究所提供,生产许可证号[SCXK(京)2014-0011],使用许可证号[SYXK(京)2017-0027],本实验通过实验动物伦理委员会审查,符合 3R 原则,实验动物伦理委员会批准号:LYB18003。

1.2 主要试剂及仪器

DMEM/F12 培养基(11330032, Gibco), RPMI1640 培养基(11875093, Gibco),胎牛血清

(10099141, Gibco), 0.25% 胰酶-EDTA (25200056, Gibco), 青霉素链霉素溶液双抗(SV30010, HyClone),二甲基亚砜 DMSO(D2650, Sigma),嘌呤霉素(P8833, Sigma),杀稻瘟菌素(15205, Sigma),胰岛素(I5500, Sigma),转铁蛋白(T0665, Sigma),地塞米松(D4902, Sigma),ViaFect™ Transfection Reagent(E4982, Promega)。CO₂ 恒温培养箱(Thermo),离心机(Multifuge 1S-R, Thermo),电热恒温水浴锅(SSW-600-2S, 上海博源实业有限公司医疗设备厂),倒置显微镜及成像(CF-2098, 长方),PCR 仪(T100, Bio-Rad)。

1.3 实验方法

1.3.1 狨猴肾脏原代细胞培养

培养液 I: RPMI1640 + 10% 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS) + 1% 双抗;

培养液 II: DMEM/F12 + 10% 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS) + 1% 双抗;

两种培养中分别加入 10 μg/mL 胰岛素, 5.5 μg/mL 转铁蛋白和 40 ng/mL 地塞米松,促进原代细胞增殖。

无菌操作摘除狨猴肾脏组织。去除肾脏上的脂肪和肾包膜, PBS 冲洗并将其剪成 1 mm³ 的碎块,洗涤 3 次。

(一)贴壁组织块法^[11]: 1 mm³ 组织小块摆放在培养瓶底,轻轻将培养瓶翻转,瓶底朝上,加入培养液 I 5 mL。置于 37℃ 培养箱中培养 3 h 左右,缓慢翻转培养瓶,使液体缓缓覆盖组织块。

(二)消化法^[12], 离心管加入约 4 倍量的 0.25% 胰酶-EDTA, 放置在 37℃ 电热恒温水浴锅中消化,每 5 min 摇动 1 次,30 min 后,去除组织块,加入培养液 I 终止消化。细胞悬液以 800 r/min 低速离心 10 min,弃上清液,加培养液 I 轻轻吹打形成细胞悬液,置于培养瓶内,培养液 I 5 mL。

37℃, 5% CO₂ 培养箱中进行培养;48 h 后观察细胞迁出情况,拍照并按 1/3~1/2 换液量更换培养基。

1.3.2 传代培养

当细胞生长到细胞瓶底 70%~80% 左右时对细胞进行传代培养,显微镜下观察细胞细化程度,以细胞变圆不连接成片为标准,时间 2~3 min 左右,吸

去消化液,加入培养液终止消化并吹打,按照 1:3。

1.3.3 生长曲线的测定与绘制

细胞计数:吸取 500 μL 细胞悬液加入台盼蓝 (0.4%),并吹打均匀。然后吸取 10 μL 沿着边缘缓缓滴入一次性细胞计数板,保证计数板充满悬液,不留气泡。对 9 个大格中没有被染液染色 (活) 的细胞数目进行计数。细胞数量计算如下:

$$n=N/3\times10^6$$

式中 n 表示每毫升细胞悬液中的活细胞数, N 表示计数板 4 个大格子的活细胞数。

1.3.4 细胞冻存与复苏

冷冻保存:用 0.25% 胰酶-EDTA 消化细胞,培养液终止消化,收集细胞至离心管,800 r/min,10 min,弃上清。用冷冻液 (90% FBS + 10% DMSO),重悬,将冷冻管放入程序降温盒内,放在 -70℃ 冰箱暂存,置于液氮中长期保存。

解冻复苏:从 -70℃ 冰箱取出冷冻管,移入 37℃ 水浴锅内,并摇晃明至完全解冻。时间不超过 3 min。取少量进行活细胞计数。800 r/min 离心,10 min,倾弃上清,彻底去除保护剂,再往加入培养液,充分混悬后分瓶培养。

1.3.5 药物抗性筛选与转染

消化狨猴肾脏细胞至 6 孔板,第 2 天更换培养基,将 1 mg/mL 的连接有 GFP 的质粒 3 μL 与 ViaFect™ Transfection Reagent 和 Lipo2000,按照 1:3 的进行转染,24 h 后,荧光显微镜观察转染效率。

消化狨猴肾脏细胞至 24 孔板,第二天加入药物,杀稻瘟菌素+嘌呤霉素:(0+0)、(1+0.5)、(2+1)、(4+2)、(8+4)、(10+5) μg/mL,观察 48 ~ 72 h,每个浓度 3 个孔,细胞死亡数在 90% 左右,定为药物筛选终浓度。

1.3.6 CRISPR-Cas9 在狨猴原代肾脏细胞的应用研究

选择狨猴 *SIRT1* 基因的第五个外显子的两个靶点: A1 (GAACATAGACACGCTGGAACAGG) 和 A2 (GACACGCTGGAACAGGTTGCAGG) 进行质粒构建,将 sgRNA (pGL-U6-gRNA-Puromycin) 和 cas9 (pST1374-flag-linker-Cas9) 质粒各 1 μg/mL,同时转入狨猴 F3 肾脏细胞,8 μg/mL 的 Blasticidin (杀稻瘟菌素) 和 4 μg/ml puromycin (嘌呤霉素) 抗性筛选,2 周后盐析法提取细胞基因组,扩包含 sgRNA 结合位点的片段,测序验证靶点处是否引入突变。

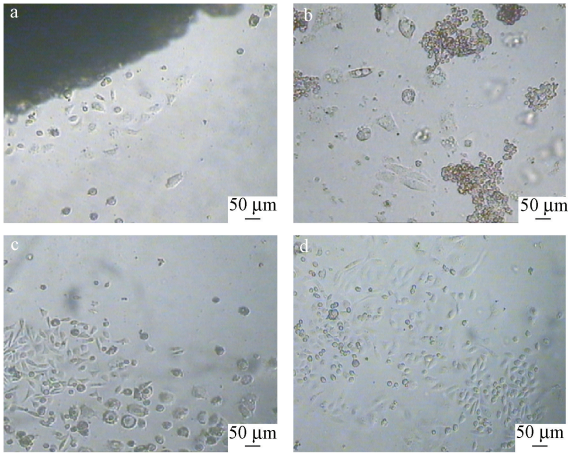
1.4 数据与图片

生长曲线数据处理软件为 Graph Pad,图像处理软件为 Image J。

2 结果

2.1 原代肾脏细胞培养

对肾脏细胞进行培养,48 h 后可明显看出在贴壁的组织块及消化的团块周边缘迁出较透明的细胞 (图 1a 和 1b)。更换培养基后再培养 5~6 d,可以看到有更多的细胞团从组织块边缘脱落。经 7 d 的培养,大多数组织块周围迁出的细胞单层。胰酶消化法由于细胞分散细胞生长速度快,单层细胞占培养瓶面积>70%,组织块贴壁法培养的细胞由于组织块脱落细胞迁出慢,单层细胞<50% (图 1c 和 1d)。培养基中肾细胞多为圆形或梭形,为致密的单层细胞。实验表明,RPMI1640 培养液可以用于肾脏细胞的原代培养。组织贴壁法与胰酶消化法均可得到原代培养的细胞,相比较之下,胰酶消化法获得细胞比组织块贴壁法获得细胞生长速度快。



注:a:48 h 后,组织贴壁法培养的肾脏细胞;b:48 h 后,胰酶消化法培养的肾脏细胞;c:7 d 后,组织贴壁法培养的肾脏细胞;d:7 d 后,胰酶消化法培养的肾脏细胞。

图 1 RPMI1640 培养液培养狨猴肾脏原代细胞 (×40)

Note. a, Kidney cells by adhesive culture for 48 h. b, Kidney cells obtained by trypsin digestion, cultured after 48 h. c, Kidney cells by adhesive culture for 7 d. d, Kidney cells obtained by trypsin digestion, cultured after 7 d.

Figure 1 The primary culture of marmoset kidney cells in RPMI1640 medium

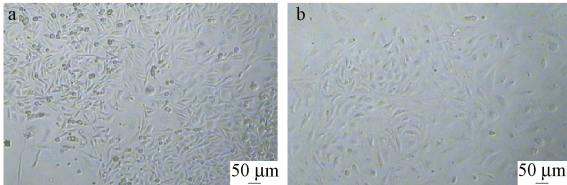
2.2 肾脏细胞培养传代

狨猴肾细胞传代后培养大约 3~4 d 可长成单层细胞,为梭形,胞膜完整清晰,胞质明亮 (图 2a)。培养液 I (RPMI 1640) 传代培养至第 4 代时,细胞排列较疏松,细胞多呈圆形,细胞形态改变,胞膜边缘较清晰。细胞出现衰老现象,在 F1 代更换,DMEM/F12 培养液 II 后,在第 8 代会出现类似的衰老现象。实验表明,在相同培养条件下,狨猴肾细

胞在 DMEM/F12 培养基中生长比 RPMI 1640 较好。由于本次实验取材的是成年狨猴肾脏,在本实验条件下能培养至第 7 代,细胞增殖能力有限,为保证实验结果的稳定性和可靠性,选取 DMEM/F12 培养基中生长 2~5 代的细胞进行后续实验。

2.3 生长曲线的测定与绘制

取生长状态良好的细胞,制备细胞悬液。计数,将细胞悬液接种于 24 孔培养板中每天取出 3 瓶孔细胞进行计数,计算均值。培养 3 d 给未计数的细胞更换培液。以培养时间为横轴,细胞数为纵轴,绘制细胞的生长曲线。狨猴肾脏细胞生长曲线中,在一定在时间内,细胞数量随时间的增加而增殖,生长状态良好。其中 0~1 d 为潜伏期、1~3 d 为细胞增殖期、3~5 d 为对数生长期、5~7 d 为平台期(见图 3)。



注:a,F1 代肾脏细胞;b:F4 代肾脏细胞。

图 2 RPMI1640 培养不同代数狨猴肾脏细胞形态对比
Note.a, The kidney cells of F1 generation. b, The kidney cells of F4 generation.

Figure 2 Comparison of the morphology of marmoset kidney cells cultured in RPMI1640 medium.

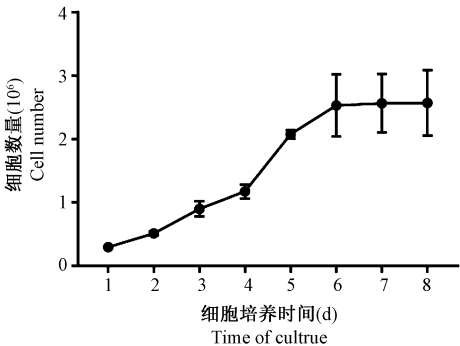


图 3 狨猴肾脏细胞生长曲线(F3)

Figure 3 Growth curve of the marmoset kidney cells (F3)

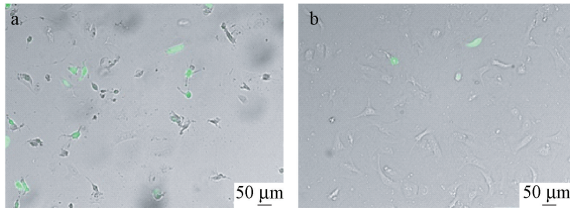
2.4 细胞冻存与复苏

狨猴肾脏细胞复苏后,进行细胞的活力检测(台盼蓝排斥实验),复苏成活率约为 70%~80%。证明狨猴肾脏细胞的生物学性状稳定,用 90% FBS + 10% DMSO 可成功冻存。

2.5 药物抗性筛选与转染

荧光显微镜观察结果,ViaFect 和 Lipo2000 相比,ViaFect 的转染率大于 60%,明显高于 Lipo2000

(如图 4),但随着细胞转染率的增高,对细胞的毒性也会增大。细胞抗性筛选适宜浓度嘌呤霉素 4 μg/mL,杀稻瘟菌素 8 μg/mL。



注:a;ViaFect;b:Lipo2000。

图 4 不同转染试剂 GFP 质粒转染后狨猴肾脏细胞(F3)

Figure 4 Marmoset kidney cells transfected with GFP plasmid (F3). a. ViaFect. b. Lipo2000.

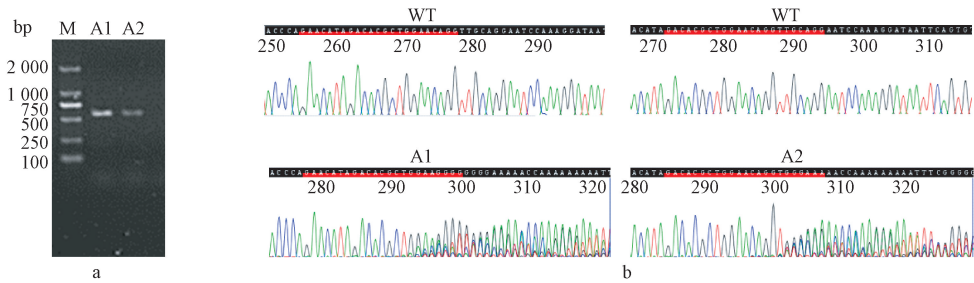
2.6 CRISPR-Cas9 在狨猴细胞的应用研究

细胞 DNA 提取后,针对 sgRNA 靶点合成特异性引物 F (GGCCAAGTTCGCTAATTGCTG), R (GCAACGGCAACATCTTTGAA),对基因组进行扩增(如图 5 左),两组细胞均在目的扩增 600 bp 处有明显条带,且单一,将 PCR 产物测序,测序结果表明,SIRT1 基因的两个靶点,均从 sgRNA 的切割位点开始出现杂峰,证明了 sgRNA 成功地引入基因组突变(如图 5 右)。Cas9 可以用于狨猴肾脏细胞编辑。

3 讨论

狨猴作为灵长类动物替代模型越来越多应用于生物医学研究,但狨猴相关细胞培系却很少。在对狨猴各组织器官培养的实验基础上,选取细胞增殖快、细胞数量多的狨猴肾脏细胞作为目的细胞。哺乳动物的肾脏有 15~20 多种细胞,如肾小球毛细血管内皮细胞、肾小球毛细血管上皮细胞、肾小球系膜细胞、肾小管上皮细胞及肾间质成纤维细胞等^[13]。本研究得到的肾脏细胞为多种细胞混合细胞,细胞均一性不好,但除了生殖细胞外每个细胞都有全部的遗传信息,可以将 CRISPR/Cas9 基因编辑技术应用培养的狨猴肾脏细胞。此外,肾脏细胞还可以应用于生物制品的生产、转基因动物的培养、药物筛选、器官移植培养等方面^[14-15]。

本研究进行了狨猴肾脏的原代培养的研究,在相同培养条件下培养 7 d 观察组织贴壁法和胰酶消化法培养的细胞形态与生长速度。实验结果表明,组织块贴壁法,对细胞的损伤较小,但由于细胞从组织块迁出速度慢,使得细胞培养周期加长。胰酶消化法可在短时间内获取大量单个细胞,细胞增殖快,原代细胞培养的周期缩短(图 1)。选择不同培养基培养狨猴肾脏细胞实验中,研究人员发现再添



注:a:PCR 产物 1% 琼脂糖凝胶电泳 (从左到右 Marker, A1, A2); b: *SIRT1* 基因 A1, A2 位点与 WT 的测序结果。

图 5 Cas9 基因编辑技术在狨猴肾脏细胞的应用

Note. a, 1% agarose gel electrophoresis of the PCR products (from left to right: marker, A1, A2).

b, Sequencing results of *SIRT1* gene A1, A2 and WT loci.

Figure 5 Application of Cas9 gene editing in the marmoset kidney cells

加同等剂量促进细胞生长的血胰岛素、转铁蛋白和地塞米松培养基,DMEM/F12 比 RPMI 1640 更适合培养狨猴肾脏细胞。可能与两种培养基中丙氨酸、半胱氨酸及铁、锌无机盐及次黄嘌呤钠、亚油酸、硫辛酸等的含量有关。随着分子生物学和细胞生物学的不断发展,转染和抗性的筛选已经成为研究和控制真核细胞基因功能的常规工具。本研究将带有 GFP 的质粒分别用实验室常用的两种转染试剂 ViaFect™ Transfection Reagent 和 Lipo2000 进行转染。结果表明, ViaFect™ Transfection Reagent 转染效率大于 50%, 明显高于 Lipo2000 (图 4), 为保证细胞的活性, 适当降低转染试剂的使用剂量, 可以获得更好的效果。与此同时, 确定嘌呤霉素和杀稻瘟菌素两种抗生素在抗性筛选时的使用的浓度分别为 4 μg/mL、8 μg/mL。

本文以狨猴肾脏细胞培养、转染和筛选体系为基础, 选取了对代谢综合征、细胞凋亡和神经退行性疾病等发挥重要作用的 *SIRT1* 基因^[15] 的两个位点, 与 Cas9 一起转染到狨猴肾脏细胞中, 测序结果表明 Cas9 可以用于狨猴肾脏细胞编辑, 狨猴肾脏细胞可以用于基因修饰灵长类动物模型建立的基因靶点切割活性的筛选, 同时也为狨猴肾脏细胞系的建立及永生提供基础。

参考文献:

[1] Schultz-Darken N, Braun KM, Emborg ME. Neurobehavioral development of common marmoset monkeys [J]. Dev Psychobiol, 2016, 58(2): 141-158.
[2] Liu H, Chen Y, Niu Y, et al. TALEN-mediated gene mutagenesis in rhesus and cynomolgus monkeys [J]. Cell Stem Cell, 2014, 14(3): 323-328.
[3] Yang SH, Cheng PH, Banta H, et al. Towards a transgenic model of Huntington's disease in a non-human primate [J].

Nature, 2008, 453(7197): 921-924.
[4] Okano H, Hikishima K, Iriki A, et al. The common marmoset as a novel animal model system for biomedical and neuroscience research applications [J]. Semin Fetal Neonatal Med, 2012, 17(6): 336-340.
[5] Sato K, Oiwa R, Kumita W, et al. Generation of a nonhuman primate model of severe combined immunodeficiency using highly efficient genome editing [J]. Cell Stem Cell, 2016, 19(1): 127-138.
[6] Sasaki E, Suemizu H, Shimada A, et al. Generation of transgenic non-human primates with germline transmission [J]. Nature, 2009, 459(7246): 523-527.
[7] Chen Y, Niu Y, Ji W. Transgenic nonhuman primate models for human diseases: approaches and contributing factors [J]. J Genet Genomics, 2012, 39(6): 247-251.
[8] Chan AW. Progress and prospects for genetic modification of nonhuman primate models in biomedical research [J]. ILAR J, 2013, 54(2): 211-223.
[9] 康宇, 陈永昌, 牛昱宇. 灵长类动物基因编辑技术研究进展 [J]. 生命科学, 2015, 27(1): 50-55.
[10] 崔益强. 利用 CRISPR/Cas9 系统构建基因编辑猴及 CRISPR/Cas9 系统应用优化 [D]. 南京: 南京医科大学, 2017.
[11] 张丽娇, 田园, 丁亦男, 等. 小鼠肾细胞分离培养方法的改良 [J]. 黑龙江畜牧兽医, 2013, 56(7): 145-146.
[12] 顾光, 高芑, 支媛, 等. 大鼠肾细胞分离制备及培养方法的比较 [J]. 卫生研究, 2005, 34(5): 574-576.
[13] 熊相应, 梅俏, 徐叔云. 肾组织上皮细胞的培养及其应用进展 [J]. 中国药理学通报, 1999, 15(4): 303-306.
[14] 戴伟, 顾光, 高芑, 等. 原代肝、肾细胞培养在保健食品原料毒性筛选中的应用 [J]. 中国食品卫生杂志, 2010, 22(3): 233-236.
[15] 唐爱存, 张志伟, 黄仁彬, 等. 原代肾细胞体外培养及其在药物毒理学中的应用 [J]. 中外健康文摘, 2009, 6(8): 211-214.
[16] 王颖, 高静, 钱进军. SIRT1 与神经变性疾病 [J]. 生命科学, 2010, 22(4): 317-320.

[收稿日期] 2019-01-23