

张婷婷,杨漫漫,魏强,等. CRISPR/Cas9 介导人 HBB 基因突变体在猪成纤维细胞的靶向敲入[J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(6): 779-787.

Zhang TT, Yang MM, Wei Q, et al. Generation of human HBB mutant knock-in porcine fibroblasts using CRISPR/Cas9-mediated homologous recombination [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(6): 779-787.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2020.06.007

CRISPR/Cas9 介导人 HBB 基因突变体在猪成纤维细胞的靶向敲入

张婷婷^{1,3}, 杨漫漫^{2,3}, 魏强^{2,3}, 李燕莉^{1,3}, 李林^{2,3}, 王然^{2,3}, 胡莉花^{1,3}, 姜芳芳^{1,3},
刘瑜⁴, 赵卫华^{5*}, 李勇^{1,2,3*}

(1. 深圳华大三生园科技有限公司, 广东 深圳 518000; 2. 深圳动物基因组辅助育种工程实验室, 广东 深圳 518000;
3. 深圳市华大农业应用研究院, 广东 深圳 518000; 4. 重庆市医药卫生学校, 重庆 408000;
5. 深圳市第二人民医院, 深圳大学第一附属医院, 广东 深圳 518028)

【摘要】 目的 将人地贫相关基因 *HBB*(*hHBB*) 的高频突变体基因型 Condons41/42(-CTTT) 靶向敲入猪成纤维细胞, 并筛选出基因型阳性的纯合子细胞系。**方法** (1) 合成人地贫相关基因 *HBB*(*hHBB*) 突变体, 并构建猪 *HBB* 位点两条同源臂载体。(2) 利用 *infusion* 技术将 *hHBB* 突变体插入两个同源臂之间, 构建同源重组终载体。(3) 用在线软件 <http://crispr.mit.edu/> 设计靶向猪 *HBB* 的 sgRNA, 并在猪 PK15 细胞中验证其活性。(4) 利用电转染法把 CRISPR/Cas9、sgRNA 和目的载体共同转入巴马猪胎儿成纤维细胞中, 筛选单细胞克隆。**结果** (1) 合成了 *hHBB* 突变体, 从野生型巴马猪基因组上扩增左同源臂 (1.062×10^3) 以及右同源臂 (1.024×10^3), 并将三者连接到终载体 pGH-LA-*hHBB*-RA。(2) 设计合成了 11 条靶向猪 *HBB* 基因的 sgRNA, 全部验证活性后最终挑选 #2sgRNA 和 #11sgRNA 用于后续实验。(3) 通过 CRISPR 系统共制备出 15 株有 *hHBB* 突变体定点敲入的猪成纤维细胞系, 其中 6 株细胞正常表达 *hHBB* 基因。**结论** 本研究所制备的携带人源化 *HBB* 基因突变体的猪成纤维细胞, 将为创制高度模拟人地贫的模型猪奠定基础。

【关键词】 地中海贫血; *HBB* 基因突变体; 同源重组; 靶向敲入; 成纤维细胞

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2020) 06-0779-09

Generation of human HBB mutant knock-in porcine fibroblasts using CRISPR/Cas9-mediated homologous recombination

ZHANG Tingting^{1,3}, YANG Manman^{2,3}, WEI Qiang^{2,3}, LI Yanli^{1,3}, LI Lin^{2,3},
WANG Ran^{2,3}, HU Lihua^{1,3}, JIANG Fangfang^{1,3}, LIU Yu⁴, ZHAO Weihua^{5*}, LI Yong^{1,2,3*}

(1. BGI-Shenzhen Sanshengyuan Technology Co, Shenzhen 518000, China. 2. Shenzhen Engineering Laboratory for Genomics-Assisted Animal Breeding, Shenzhen 518000. 3. BGI-Agricultural Application Research Institute, Shenzhen 518000.
4. Chongqing Medical and Health School, Chongqing 408000. 5. the Second People's Hospital of Shenzhen, the First Affiliated Hospital of Shenzhen University, Shenzhen 518028)

【基金项目】 广东省深圳市大鹏新区产业发展专项资金 (KY20160305), 深圳市基因组辅助育种工程实验室提升项目和深圳市卫计委医疗卫生“三名工程”(SZSM201512003), 广东省基础与应用基础研究基金 (2019B1515210028)。

Funded by Dapeng New District Industrial Development Special Fund of Shenzhen (KY20160305), Engineering Lab for genome-assistant breeding of Shenzhen and Sanming Project of Medicine in Shenzhen (SZSM201512003), Guangdong Province Basic and Applied Basic Research Fund (2019B1515210028).

【作者简介】 张婷婷 (1991—), 女, 助理生物工程师, 学士, 研究方向: 基因编辑和动物克隆研究。

Email: zhangtingting100@countrygarden.com.cn

【通信作者】 李勇 (1981—), 男, 副研究员, 博士, 研究方向: 动物遗传育种和克隆动物研究。Email: liyong3@genomics.cn;

赵卫华 (1966—), 男, 主任医师, 博士, 研究方向: 妇产科临床、高危妊娠、多种妊娠合并症及并发症处理研究。

Email: zwhzyz123@163.com。 * 共同通信作者

Corresponding author: LI Yong. E-mail: liyong3@genomics.cn; ZHAO Weihua. E-mail: zwhzyz123@163.com

[Abstract] Objective The high-frequency mutant genotype Codons41/42 (-CTTT) of human thalassaemia-related *HBB* gene (*hHBB*) was knocked into genome of the porcine fibroblasts by using CRISPR-Cas9 Site-specific recombination systems. Then the transfected fibroblasts were screened to establish homozygous cell lines with positive genotype. **Methods** (1) Synthesize the human *HBB* mutant with Codons41/42 (-CTTT) and cloned the left and right homology arm located at the flanking sequence of the pig *HBB* gene. (2) Then the *HBB* mutant was inserted between the left and right homology arm using infusion PCR method to building a final homologous recombination vector. (3) The sgRNA targeting pig *HBB* gene were designed using online software and then were verified its activity in pig PK15 cells. (4) Bama pig fetal fibroblasts were co-transfected with CRISPR/Cas9 vector, sgRNA and pGH-LA-hHBB-RA using by electroporation and then were screened to establish single clone. **Results** (1) We synthesized full length of the *hHBB* CDS with a mutant Codons41/42 (-CTTT). The left and right homology arm of 1.062 kb and 1.024 kb were cloned from Bama pig genome. Then we constructed a final vector pGH-LA-hHBB-RA. (2) Two sgRNAs targeted pig *HBB* gene were validated in PK15 cells and used for further experiments. (3) Finally, we identified 15 single-cell clones of the porcine fibroblast carry the human *HBB* gene mutant. **Conclusions** We generated porcine fibroblast carrying the human *HBB* gene mutant using CRISPR/Cas9. Our study provides key materials for scientist to generate pig models of human thalassemia.

[Keywords] thalassemia; *HBB* mutant; homologous recombination; targeted knock-in; fibroblast

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

地中海贫血症主要是调控珠蛋白合成的基因发生缺失或突变,导致构成血红蛋白的 α 链和 β 链珠蛋白链表达不平衡、红细胞寿命缩短的一种溶血性血液疾病。全球 160 多个国家和地区有近 2.8 亿地中海贫血病患者。 β 地贫是广东省发病率最高、危害最大的遗传病之一。其致病原因是第 11 号染色体的 β -珠蛋白(β -globin)基因发生缺失或点突变,造成 β -珠蛋白合成完全或部分受抑,导致 α/β 链比例失衡,进而发生溶血性贫血。在多种 β 基因突变或缺失中,Codons41/42(-CTTT)突变约占 β -地贫突变的 36%以上^[1]。一直以来,造血干细胞移植是唯一治愈 β 地贫的手段,但配型合格的供体少之又少。近年来,基于特定突变修复的基因治疗将成为 β 地贫永久性“治愈”最有效的手段之一。

为便于开展对 Codons41/42(-CTTT)突变型 β 地贫的基因治疗研究,国内外已通过多种途径建立了携带该突变体的载体、细胞甚至基因工程小鼠^[2]。Niu 等^[3]利用来自 β 地贫病人细胞构建的纯合 *HBB* Codons41/42(-CTTT)突变的 iPS 细胞,结合 CRISPR/Cas9 系统进行突变矫正,并评价矫正细胞的功能特性。然而,iPS 细胞实验只能体外检测编辑效率和功能特性,无法完成体内的功能 and 安全性评价。Jamsai 等^[4]利用基因打靶技术制备了人 *HBB* 41/42(-CTTT)小鼠,发现纯合子小鼠存活到妊娠后期,表现出严重的贫血症状。尽管 β 地贫小鼠模型可以比较好的模拟其病理过程,但像地贫患者

输血后出现的铁过载现象在实验鼠的身上却不能完全拟合,不能很好反映出病程。因此,其作为临床前的药物使用剂量、安全评价并不合适^[5]。因此,开发携带人 β 地贫大动物模型十分必要。

我们发现,较小鼠而言,猪与人 β -珠蛋白氨基酸一致性较高,达到 85%。此外,天然猪血红蛋白与人血红蛋白的分子构象几乎一致,二者有高度相似的抗原性^[6]。这提示我们:猪 β -珠蛋白在其生物学功能上或许与人 β -珠蛋白更为相似,暗示以猪 *HBB* 蛋白突变体而构建地贫模型,更能模拟出人地贫症的机制。因此,开发携带人 β 地贫大动物模型十分必要。同时,猪在器官发育、生理生化、疾病进程以及基因组序列方面和人类具有高度的相似性,是人类疾病的理想实验模型,被广泛应用到生物医学研究^[7]。在血液生理生化方面,小型猪 19 项生理指标、9 项生化指标和人类的参考值接近^[8]。以猪替代小鼠研究人地贫等相关疾病模型具有无法比拟的优势。

本研究利用 CRISPR/Cas9 技术制备了携带人源化 *HBB* 基因 Codons41/42(-CTTT)突变体的巴马猪胎儿成纤维细胞株,经 PCR 方法和 DNA 测序法验证了插入的 *hHBB* 突变体基因序列正确。最后,通过 PCR 方法检测到表达外源 *hHBB* Codons41/42(-CTTT)基因的细胞株 6 株。该细胞株为进一步获得人地贫的小型猪模型,为研究地贫的发生、发展及新药创制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞及载体

CRR 质粒由本实验室设计并合成, hCas9 为华中农业大学种猪测定中心韩晓松博士提供, 猪 PK 细胞和巴马猪胎儿成纤维细胞为中国农业科学院北京畜牧研究所杨述林研究组提供。

1.1.2 主要试剂与仪器

限制性内切酶、T7 核酸内切酶、T4 连接酶均购于 NEB 公司; 无内毒素质粒提取试剂盒购于 Omega 公司; Lipofectamine2000 脂质体转染试剂盒购于 Invitrogen 公司; 电转染试剂盒 Amaxa Basic Nucleofector Kit Primary Fibroblasts 购于 Lonza 公司; 反转录试剂盒 TransScript First-Strand cDNA Synthesis SuperMix 购于北京全式金生物公司。

高速离心机 (Eppendorf, 德国), 倒置光学显微镜 (莱卡, 德国), 核转仪 (Lonza, 瑞士), 二氧化碳培养箱 (Eppendorf, 德国), 水浴锅 (北京六一仪器厂) 电泳槽 (北京六一仪器厂), PCR 扩增仪 (Bio-Rad, 美国), 凝胶成像仪 (Bio-Rad, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 sgRNA 设计及表达载体构建

根据猪 *HBB* 基因序列 (Gene ID: 407066), 利用张锋实验室在线网站 <http://crispr.mit.edu/> 设计了 11 条靶向 sgRNA (small guide RNA) 序列 (表 1), sgRNA 序列由华大基因合成, 上、下游序列按体积比 1:1 混合, 95℃, 10 min; 25℃, 30 min; 变性; 退火后, 以 T4 DNA 连接酶介导, 连接入 BsaI 内切酶酶切回收后的骨架载体 CRR, 最终构建出 CRR-sgRNA 表达载体。将该载体转化大肠杆菌 DH5α, 经涂板、挑选单克隆菌落和菌落 PCR 鉴定阳性克隆。

1.2.2 sgRNA 活性鉴定

转染前 24 h 将猪 PK15 细胞铺于 24 孔板 (1 × 10⁴ 细胞/孔), 次日, 将构建好的 sgRNA 转染细胞 (参照 Lipo2000 转染试剂盒说明书), 转染质粒总量 500 ng, hCas9:CRR-sgRNA = 3:1。细胞于培养箱培养 48 h。收集细胞并提取基因组 DNA (gDNA), 按表 2 引物做 PCR, 体系为: gDNA 0.1 μg, Premix Ex Taq 10 μL, 上下游引物 (10 μmol/L) 各 0.4 μL, ddH₂O 补足体积至 20 μL。PCR 反应程序: 98℃, 1 min; 98℃ 10 s, 58℃ 30 s, 72℃ 10 s, 循环 32 次; 72℃, 5 min。

T7 变性程序: 95℃, 10 min; 95 ~ 85℃ (-2.0℃/s); 85 ~ 25℃ (-0.3℃/s); 25℃, 1 min。

T7 酶切反应体系: PCR 产物 17 μL, NEB Buffer 2.2 μL, T7 酶 0.2 μL, ddH₂O 补足体积至 20 μL。反应条件: 37℃, 45 min。将酶切产物电泳后利用 DNA 凝胶成像系统检测。

表 1 sgRNA 靶点序列

Table 1 Sequences of the sgRNAs	
靶序列编号 Target sequence number	靶位点序列 (5'-3') Sequences of the sgRNAs (5'-3')
pHBB-#1sgRNA	CACCCTGTGGAACCACGCC
pHBB-#2sgRNA	AAAGTGAATGTGGACGAAGT
pHBB-#3sgRNA	AGGCCAGGGCGCTGGTCCAC
pHBB-#4sgRNA	GAGGCCGCTCTCGGCCTGTG
pHBB-#5sgRNA	AAGCAAATGTAGGTGGCTGC
pHBB-#6sgRNA	TCTAAACGCATCCTCCGTTT
pHBB-#7sgRNA	AGAAGAGAGGGCCGAAACGG
pHBB-#8sgRNA	CTCAGCCATGACCAAGGAGC
pHBB-#9sgRNA	GTTGTTCTGCGTCGCCGCT
pHBB-#10sgRNA	TGACTTCAACCCGATGTGC
pHBB-#11sgRNA	GGGGAACCTAGTGTACTTG

表 2 sgRNA 活性鉴定引物

Table 2 Primers used for PCR of sgRNA targeted sites	
活性鉴定引物名称 Primer name	序列 (5'-3') Primer sequence (5'-3')
pHBB (Exon1,2) -iden-F1	CAGACTTGCTAAGGAGGATGAA
pHBB (Exon1,2) -iden-R1	GAGGAAATGATGGCTGTGAATA
pHBB (Exon1-3) iden-F1	TTGAGGCAAGAAGGATAAAATG
pHBB (Exon1-3) iden-R1	TTAGAGGAACACGGTCTCTTTA

1.2.3 人源化 *HBB* 基因打靶载体构建

靶位点上、下游 1000 bp 左右的序列作为同源臂序列, 设计含有 NotI 酶切位点的上游同源臂引物、含有 XhoI 酶切位点的下游同源臂引物及融合扩增引物 (表 3)。以猪基因组 DNA 为模板, 扩增上、下游同源臂, 反应体系为: gDNA 0.1 μg, KOD Buffer 5 μL, 2 mmol dNTPs 5 μL, 25 mmol MgSO₄ 2 μL, 上、下游引物 (10 μmol/L) 各 1.5 μL, DNA 聚合酶 1 μL, ddH₂O 补足体积至 50 μL。PCR 反应程序: 94℃, 3 min; 94℃, 15 s; 55℃, 30 s; 72℃, 2 min, 循环 35 次; 72℃, 5 min。PCR 产物回收作模板, 进行融合 PCR。把融合 PCR 产物与 pGH-T 载体 (NotI 和 XhoI 切过) 进行融合, 融合反应体系为: pGH-T 载体 5 μL, 融合 PCR 产物 3 μL, infusion 酶 2 μL。反应程序为: 50℃, 15 min, 构建重组载体 pGH-LA-RA, 测序序列完全正确后, 大量提取无内毒素质粒备用。

以 *hHBB* (CD41/42, -CTTT) -T 质粒为模板, 分别扩增两个片段, 反应的引物序列见表 4。 *hHBB* (CD41/42, -CTTT) 片段扩增反应体系: DNA

0.05 μg, KOD Buffer 5 μL, 2 mmol dNTPs 5 μL, 25 mmol MgSO₄ 2 μL, 上下游引物 (10 μmol/L) 各 1.5 μL, DNA 聚合酶 1 μL, ddH₂O 补足体积至 50 μL。反应程序为: 94℃, 3 min; 94℃ 15 s, 55℃ 30 s, 72℃ 2 min, 循环 35 次; 72℃, 5 min。PCR 产物回收后, 进行融合 PCR。融合 PCR 产物经 BsaI 酶介导构建于重组骨架载体 pGH-LA-RA。

表 3 左右同源臂扩增引物序列及融合扩增引物序列

Table 3 Primers used for PCR or infusion PCR of the homologous arms

引物名称 Primer name	引物序列 (5'-3') Primer sequence (5'-3')
pLA (pHBB) -F	ACATTAAGACATGGAATATGG
pLA (pHBB) -R	AGACTCACCTGAAGTTCTCAG
pRA (pHBB) -F	TAACGTCTACACGCAGCTCAC
pRA (pHBB) -R	TTAACGATGGATTTCAGTCTCCTC
pLA (pHBB) -infusion-F	TTAGGTACCGCGCCGCAATACAGCCCGTACTATAAC
pRA (pHBB) -infusion-R	CTTCCCCTTACTCGAGCAGGCATCATTATCAGTGAT

表 4 人源 hHBB 片段扩增及融合引物序列

Table 4 Primers used for PCR or infusion PCR of the human HBB gene

引物名称 Primer name	引物序列 (5'-3') Primer sequence (5'-3')
hHBB (Ex1-3) -F1	GCACAAACAGACAACATGGTGCATCTGACTCCTGA
hHBB (Ex1-3) -R1	CAGGAGTGGACAGATCCCCAAAGGACTCAACCTCTGGGTCCAAGGGTA
hHBB (Ex1-3) -F2	TACCCTTGGACCCAGAGGTGAGTCTCTTGGGGATCTGTCCACTCCTG
hHBB (Ex1-3) -R2	ATCAGGAAGGGGAACCTAGTGATACCTTGTTGGGCCA
hHBB (Ex1-3) -infusion-F	GCACAAACAGACAACATGGTGCATCTGACTCCTGA
hHBB (Ex1-3) -infusion-R	ATCAGGAAGGGGAACCTAGTGATACCTTGTTGGGCCA

1.2.5 单克隆细胞系筛选及鉴定

转染后的细胞, 用含 400 μg/mL G418、20% FBS 的 DMEM 药筛培养基药筛 5 d, 而后用含 20% FBS 的 DMEM 培养基继续培养 7 d, 至第 12 天形成单克隆细胞团, 用单克隆环挑选生长状态好、大小合适的单克隆细胞团到 48 孔细胞培养板。待细胞汇合度达 90% 对单克隆细胞消化, 进行 PCR 鉴定。

对收集到的单克隆细胞进行裂解, 裂解程序 60℃, 60 min; 95℃, 10 min, 以细胞裂解产物 (gDNA) 为模板, 分别用 3 对定点敲入鉴定引物进行扩增, 引物序列见表 5。

第 1 对鉴定引物为转基因阴阳性鉴定引物, 第 2 对鉴定引物为跨左同源臂鉴定引物、第 3 对为跨右同源臂鉴定引物, 三对引物反应体系为: DNA 2 μL, Premix Ex Taq 10 μL, 上下游引物 (10 μmol/L) 各 0.4 μL, ddH₂O 补足体积至 20 μL。反应程序均为: 98℃, 1 min; 98℃ 10 s, 65℃ 30 s, 72℃ 1 kb/s, 循环 35 次; 72℃, 5 min。

3 对鉴定引物扩增均为阳性的细胞株, 将其传代到 12 孔板继续培养, 代细胞汇合度达到 90% 及以

1.2.4 CRISPR/Cas9 载体及同源重组载体转染巴马猪胎儿成纤维细胞

将 CRISPR/Cas9 3 μg、sgRNA 环状质粒 1 μg 和 hHBB 同源重组载体 3 μg 通过电穿孔转染法转染巴马猪胎儿成纤维细胞。转染 60 h 后, 采用有限稀释法将细胞悬液稀释至每个培养皿 5000 个细胞, 放入培养箱培养, 培养条件: 37℃, 5% CO₂。

上时, 进行冻存。

1.2.6 人源化 HBB 基因定点敲入细胞株纯合子、杂合子鉴定

针对猪 HBB 基因序列设计了一对鉴定定点敲入细胞株为纯合子或杂合子的鉴定引物,

采用 1.2.5 中细胞裂解产物 (gDNA) 为模板, 用纯/杂合子鉴定引物进行扩增, 上游引物 sp-pHBB-iden-F1 (AGGCAGGATGCCCCTTAGAA); 下游引物 sp-pHBB-iden-R1 (CACTATCACGTTGCCAGGA)。反应体系为: DNA 2 μL, Premix Ex Taq 10 μL, 上下游引物浓度为 10 μmol/L 各取 0.4 μL, ddH₂O 补足体积至 20 μL。反应程序同步骤 1.2.5。

表 5 单克隆细胞定点敲入鉴定引物

Table 5 Primers used for hHBB knock-in examination

定点敲入引物 Targeted knock-in primer	序列 (5'-3') Primer sequence (5'-3')
sp-hHBB-iden-F	CCAATAGAAACTGGGCATGTGG
sp-hHBB-iden-R	AATCCAGCCTTATCCCAACC
sp-LA-iden-F	ATTCGTTACGCGGGGAAGAG
sp-LA-iden-R	GCACCTTCTTGCCATGAGCC
sp-RA-iden-F	CATGCCTCTTTGCACCATTC
sp-RA-iden-R	CCCTCCCTTTCTTTTCTGAGTTG

1.2.7 人源化 *HBB* 基因在猪成纤维细胞中表达情况鉴定

根据人和猪 *HBB* 基因 CDS 区的差异,设计一对针对人源化 *HBB* 基因表达的鉴定引物,上游引物 hHBB-iden-qF1 (CTGAGGAGAAGTCTGCCGTTAC),下游引物 hHBB-iden-qR1 (CAGGCCATCACTAAAGGCAC)。提取人源化 *HBB* 基因发生定点整合细胞株的总 RNA,随后反转录为 cDNA,用鉴定引物 hHBB-iden-qF1/R1 进行检测。反转录反应体系为:RNA 500 ng, Anchored Oligo (dT) 18 1 μL, 2X TS Reaction Mix 10 μL, TransScript RT/RI Enzyme Mix 1 μL, RNase-free Water 补足体积至 20 μL。反应程序为:42℃, 30 min 孵育。

PCR 反应体系为:cDNA 1 μL, Premix Ex Taq 10 μL, 上下游引物浓度为 10 μmol/L 各取 0.4 μL, ddH₂O 补足至 20 μL。反应程序为:98℃, 1 min; 98℃ 10 s, 62℃ 30 s, 72℃, 13 s, 循环 35 次; 72℃ 5min。同时,用内参引物作为对照,按照前面的体系及反应程序进行扩增。

2 结果

2.1 人、猪和鼠 *HBB* 基因比较分析

通过 MegAlign7 软件 Construct-Test Neighbor joining Tree 算法对包括小鼠、猪、猴等 8 种哺乳类动物与人 *HBB* 基因做系统发育树分析,结果发现:人 *HBB* 遗传距离与灵长类动物最近,其次为猪,再其次为小鼠。即相比于小鼠而言,猪与人类 *HBB* 基因遗传距离更近(图 1A)。我们进一步利用 UniProt 网站在线软件 Clustal Omega 对人、猪和小鼠 β-珠蛋白氨基酸序列进行比对。结果表明:小鼠与人 β-珠蛋白氨基酸一致性为 80%,而猪与人 β-珠蛋白氨基酸一致性则更高,达到 85%(图 1B)。总之,以上

结果提示:猪 β-珠蛋白在其生物学功能上或许与人 β-珠蛋白更为相似,暗示以猪 *HBB* 蛋白突变体而构建地贫模型,更能模拟出人地贫症的机制。

2.2 CRR-sgRNA 表达载体活性验证结果

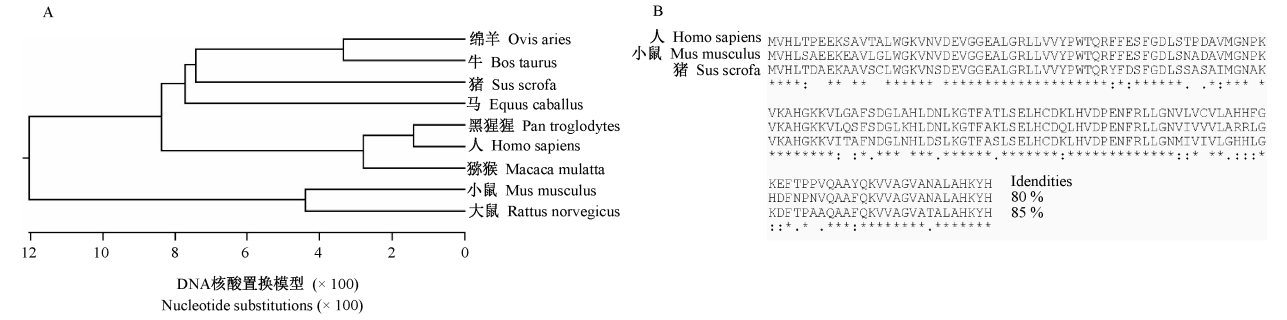
本研究中合成了 11 条靶向 sgRNA,分别连接 CRR 质粒,构建成 11 个 CRR-sgRNA 表达载体,并分别与 CRISPR/Cas9 表达载体共转染至 PK15 细胞中。48 h 后,提取细胞基因组 DNA 作为 PCR 模板,用鉴定引物做 PCR,扩增产物进行 T7 酶切和凝胶成像作鉴定。结果表明鉴定引物对#2sgRNA 扩增后产物片段大小为 913 bp, T7 酶切后片段大小为 364 bp 和 549 bp;鉴定引物对#11sgRNA 扩增后产物片段大小为 877 bp, T7 酶切后片段大小为 393 bp 和 484 bp, #2sgRNA 和#11sgRNA 这两条剪切活性高于其他 9 份(图 2)。

2.3 人源化打靶载体构建结果

首先,以猪基因组 DNA 为模板,构建同源臂载体 pGH-LA-RA,其中左臂 1.062×10^3 ,右臂 1.024×10^3 。其次,利用融合 PCR 方法将人 *HBB* 突变体插入 pGH-LA-RA 的两个同源臂之间,构建成带有人源化 *HBB* 基因突变体(-CTTT)的同源重组终载体 pGH-LA-hHBB-RA。进行 sanger 测序验证,测序结果表明:携带有人源化 *HBB* 基因突变体的同源重组载体构建成功,图 3 所示包含“-CTTT”四碱基缺失的测序结果的峰图,可用于下一步的转染。

2.4 单克隆细胞株鉴定结果

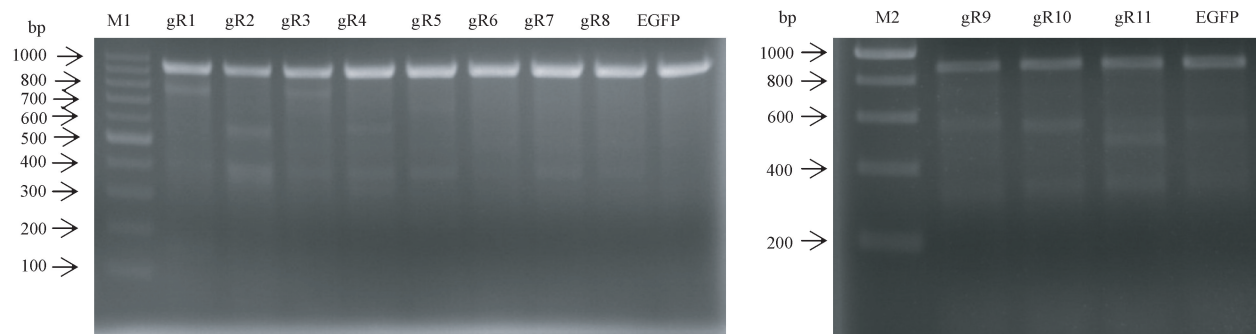
利用电穿孔转染法 CRISPR/Cas9 质粒、#2sgRNA 和#11sgRNA 及 pGH-LA-hHBB-RA 同源重组载体共同转入巴马猪胎儿成纤维细胞,经 G418 筛选后共获得了 99 株单克隆细胞。再利用转基因鉴定引物对敲入的人源化 *HBB* 基因突变体做 PCR 扩增,扩增后片段大小为 1105 bp,凝胶成像结果如



注:A:鼠、猪、猴等 8 种哺乳类动物与人 *HBB* 基因做系统发育树分析;B:人、猪和小鼠 β-珠蛋白氨基酸序列比对。

Figure 1 Identities of the *HBB* gene sequence among human, pig and mouse

Note. A. Building the phylogenetic trees for *HBB* genes of 8 different mammals. B. Identities of β-globin amino acid among human, pig and mouse.



注:gR1~11:分别转染 sgRNA1~11 质粒的细胞样品;EGFP:转染 EGFP 质粒的对照组细胞样品;M1:100 bp DNA ladder marker;M2:200 bp DNA ladder marker。

图 2 猪 *HBB* 基因 sgRNA T7 酶切活性验证结果

Note. gR1~11. Cell samples transfected with sgRNA1~11 plasmids respectively. EGFP. Control cell sample transfected with EGFP plasmid. M1. 100 bp DNA ladder marker. M2. 200 bp DNA ladder marker.

Figure 2 T7 Enzyme digestion for Pig *HBB* gene sgRNA activity examination

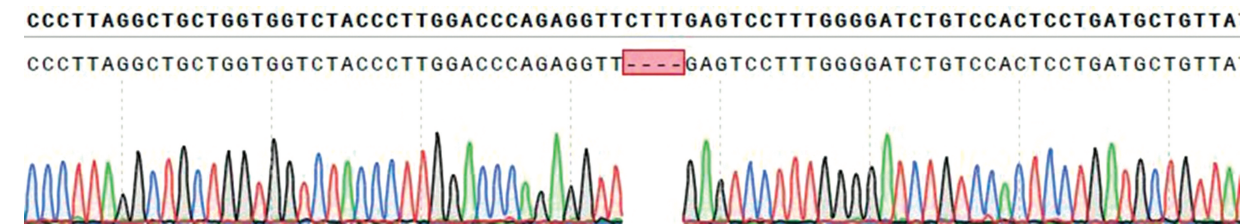


图 3 同源重组打靶载体测序结果

Figure 3 Homologous recombination targeting vector sequencing results

图 4A 所示,结果统计如图 4B 所示:一共鉴定了 99 株细胞,转基因阳性细胞克隆为 69 份,转基因阴性细胞克隆为 30 份。

左端同源臂鉴定,上游引物位于左端同源臂外侧,下游引物位于人源化 *HBB* 基因特异性区域内,可完全扩增出左同源臂全长及部分 *hHBB* 基因,PCR 产物大小为 1550 bp,扩增结果如图 5A 所示。结果统计如图 5B:一共鉴定了 99 株细胞,阳性细胞克隆为 25 株,阴性细胞克隆为 74 份。

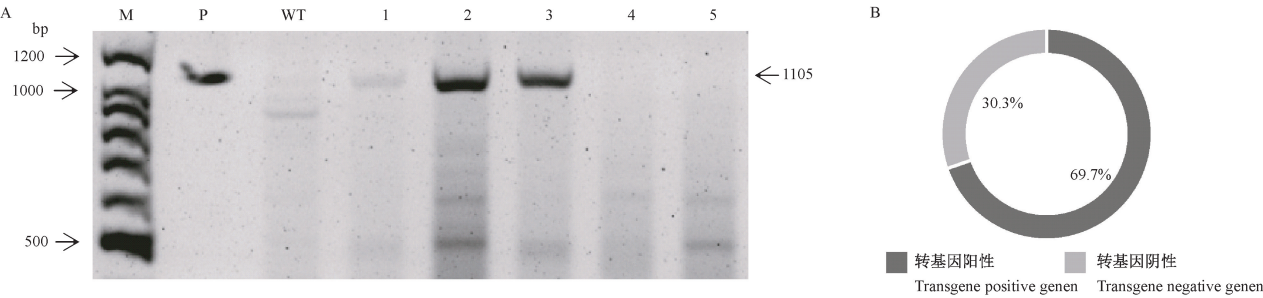
右端同源臂鉴定,上游引物位于 *hHBB* 基因特异性区域,下游引物位于右端同源臂外侧,PCR 产物大小为 1507 bp,扩增结果如图 6A 所示。结果统计如图 6B 所示,一共鉴定了 32 株细胞,阳性细胞克隆为 15 份,阴性细胞克隆为 17 份。总之,通过对 99 个细胞克隆的筛选与基因型鉴定,我们一共获得 69 株整合人 *HBB* 基因的猪成纤维细胞,其中定点整合 15 株,随机定点整合 54 株。

通过上述 3 重 PCR 鉴定,筛选出 3 对引物都鉴定为阳性的单克隆细胞,并做 *hHBB* 突变体位点的 sanger 测序。如图 7 所示,猪 *HBB* 基因靶序列为 CTTC,正常人源 *HBB* 基因靶序列为 CTTT,而人源

HBB 基因突变体对应的位置缺少 4 个碱基 (-CTTT),测序结果(图 7A)证明:我们在巴马胎猪胚胎成纤维细胞中成功地插入了人源化 *HBB* 基因的突变体。随后,我们通过对猪内源 *HBB* (*pHBB*) 基因检测,发现全部样品均能扩增到 *pHBB* 条带,并未鉴定到纯合子细胞,即本实验所得 15 株细胞均为杂合子(图 7B)。最后,通过提取细胞总 RNA 和进一步的 PCR 验证,我们共获得 6 株阳性表达外源 *HBB* 基因的突变体(图 7C)。

3 讨论

我国的地贫患者主要分布于广东、广西、湖南、四川、云南和贵州等南部省份^[9],β 地中海贫血是广东省发病较高的地贫类型^[10]。β 地贫涉及到 200 多种 β 珠蛋白突变,热点的突变类型包括 Codons41/42(-CTTT)、IVS-II-654(C→T)、-28(A→G)、IVS1.6(T→C)、-87(C→G)等,其中 Codons41/42(-CTTT)作为主要的突变体约占发病人群的 36% 以上。β 珠蛋白基因在哺乳动物中保守性较好。由于纯合敲除的小鼠致死性较高,加上缺乏特定的突变体,应用性较差。相比而言,携带人源化突变体

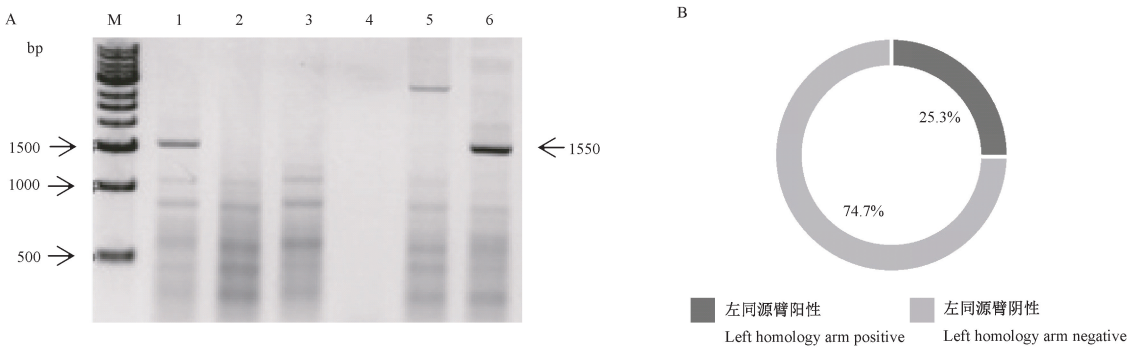


注:A:转基因鉴定引物扩增结果,M:100 bp plus DNA ladder marker,P:阳性质粒对照,WT:野生型细胞对照,1~5:鉴定细胞克隆的编号;
B:基因型阳性和阴性细胞克隆的统计。

图 4 转基因阴阳性鉴定引物扩增结果

Note. A. Amplification result of transgene identification primer. M. 100 bp plus DNA Ladder Marker. P. Positive control. WT. Wild type control. 1~5. The number of cell clones identified. B. Number of positive and negative cell clones.

Figure 4 Amplification result of transgenic negative and positive identification primers

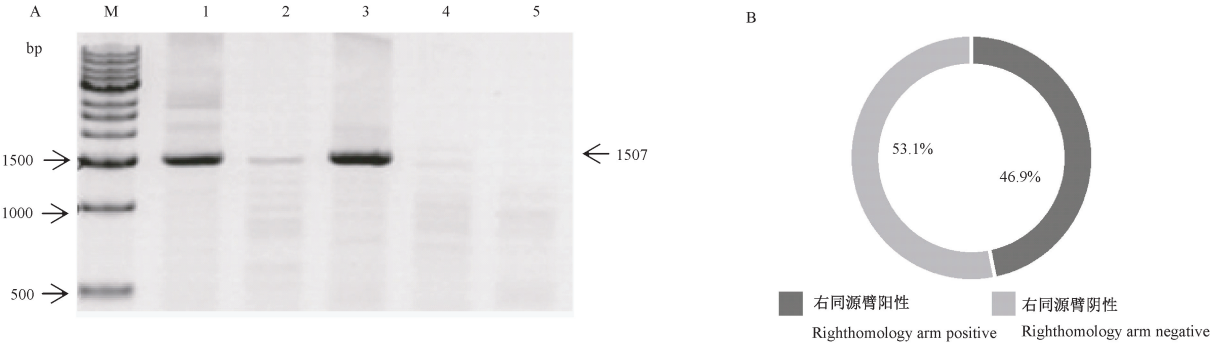


注:A:跨左端同源臂鉴定引物扩增结果,M:1 kb DNA Ladder Marker,1~6:鉴定细胞克隆的编号;B:基因型阳性和阴性细胞克隆的统计。

图 5 跨左端同源臂鉴定引物扩增结果

Note. A. Identify primer amplification results across the left homology arm. M. 1 kb DNA ladder marker. 1~6. The number of cell clones identified. B. Number of positive and negative cell clones.

Figure 5 Identify primer amplification results across the left homology arm

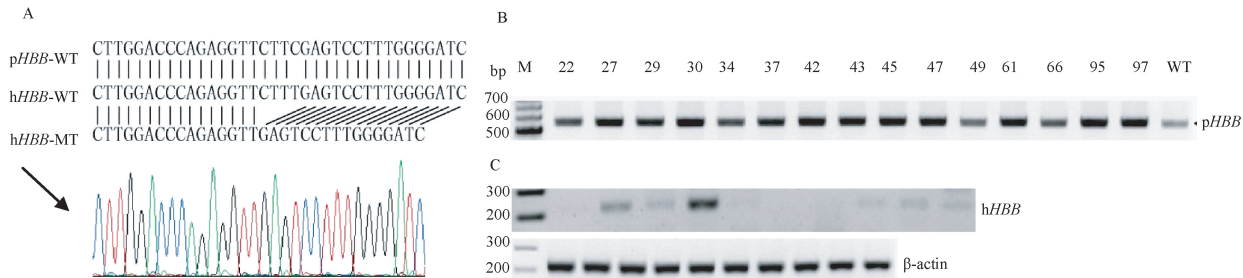


注:A:跨右端同源臂鉴定引物扩增结果,M:1 kb DNA Ladder Marker,1~5:鉴定细胞克隆的编号;B:基因型阳性和阴性细胞克隆的统计。

图 6 跨右端同源臂鉴定引物扩增结果

Note. A. Identify primer amplification results across the right homology arm. M. 1 kb DNA Ladder Marker. 1~5. The number of cell clones identified. B. Number of positive and negative cell clones.

Figure 6 Identify primer amplification results across the right homology arm



注:A:猪野生型 *HBB* 基因、人野生型 *HBB* 基因及人突变型 *HBB* 基因序列对比;B:15 株定点敲入细胞株纯合子、杂合子鉴定结果;C:定点敲入细胞株人源化 *HBB* 基因表达情况鉴定结果。

图 7 猪胎儿成纤维细胞 *hHBB* 基因型及基因表达检测

Note. A. Sequence comparison of swine wild-type *HBB* gene, human wild-type *HBB* gene and human mutant *HBB* gene. B. Identification of 15 homozygous and heterozygous site-specific knock-in cell lines. C. Identification results of humanized *HBB* gene expression in targeted knock-in cell lines.

Figure 7 *hHBB* genotype and mRNA expression examination in the pig fibroblasts

的杂合小鼠能较好模拟 β-地贫的相关症状,同时包含特定的人类突变位点,为基因治疗提供了理想的靶点材料^[4]。然而,我们对小鼠、猪与人的 *HBB* 基因和蛋白氨基酸比对发现,小鼠、猪与人的 *HBB* 蛋白同源性分别为 80% 和 85%,较小鼠而言猪与人 *HBB* 遗传距离更近。根据这些数据我们推测,无论是研究 *HBB* 基因功能,或是研究 *HBB* 突变体致地贫发病机制,利用猪为研究对象更能模拟其在人体内的生物学本质。且小鼠由于体型大小和生理生化数据一致性的限制,并不是基因治疗最为理想的疾病模型。本研究采用同样的思路构建了携带人源化 *HBB* 基因突变体同源打靶载体,并利用两条靶向切割猪内源 *HBB* 基因的 sgRNA 对其进行了敲除,同时结合同源重组修复,使得携带了目的突变体的人源 *HBB* 基因准确地敲入到巴马猪胎儿成纤维细胞基因组之中。该方法制备的突变体敲入阳性细胞可作为核供体,借助体细胞克隆技术,为下一步创制携带缺陷型人源化 *HBB* 基因的地贫模型猪奠定基础。

本研究中,我们将 CRISPR/Cas9 体系及同源重组载体经电转染方式导入巴马猪胎儿成纤维细胞,并结合 G418 药物筛选获得单克隆细胞。我们一共鉴定了 99 株单克隆,其中转基因阳性克隆 69 株,效率为 69.7%,定点敲入人源化 *HBB* 基因突变体的阳性细胞 15 株,阳性率为 15%。在这些成功定点敲入的细胞中 1 株纯合,其余为杂合,单等位基因的同源重组效率远高于双等位基因。

CRISPR/Cas9 技术的介导可提高同源重组效率达千倍以上,远远高于传统基因打靶效率,相比

而言,我们的结果稍低于同类定点整合效率。相关研究表明定点整合效率与多种因素有关,如细胞类型、同源臂的长短、细胞周期、转染效率等^[11-15]。从细胞 DNA 修复机制看,非同源末端连接修复和同源重组修复同时存在,但在非分裂期的细胞中,细胞会更偏向于非同源末端连接修复,如此一来,重组效率在一定程度上受到了影响,人们常用 NHEJ 的抑制剂 Scr7 或 HDR 相关 RAD51 激动剂 RS-1,从而使同源重组修复效率显著提高^[16]。在转染效率方面,一方面,不同的转染方式会影响效率,慢病毒或核转染比电转染、脂质体等其他转染方式效率更高;另一方面,转染体系的构成在一定程度上也会影响转染的效率,多个载体共转染较单个多基因表达载体效率低^[17]。当然,我们可以通过药物筛选或流式细胞仪富集的方式来弥补转染效率的不足,从而提高同源重组效率。

在同源臂长度研究方面,传统的基因打靶研究表明同源臂长度与重组效率成正比^[18],但在 CRISPR/Cas9 介导的 HDR 中,同源臂的影响并不一定是正相关,不同的研究有不同的结果,如 Li 等^[19]利用 5' 端 1.2×10^3 同源臂长度,3' 端 5.6×10^3 同源臂长度的打靶载体结合 TALEN 技术在猪 *Rosa26* 位点获得 31.3% 的整合效率;Ruan 等^[20]利用左右同源臂长度均为 0.8×10^3 的载体结合 CRISPR/Cas9 技术在猪 *H11* 位点获得 23% 的整合效率;此外,Xie 等^[21]的研究结果表明当 5' 端、3' 端同源臂长度分别为 0.5×10^3 和 1×10^3 时整合效率较高,能达到 29.6%;相比而言,我们打靶载体左臂 1.062×10^3 ,右臂 1.024×10^3 。可见,同源臂的长短能在一定程度

上影响同源重组效率,但并没有一致性的规律。

本研究以巴马猪胎儿成纤维细胞作为研究材料,利用 CRISPR/Cas9 基因编辑手段,制备出携带人源化 HBB 基因突变体的转基因阳性细胞株。未来,这些阳性细胞可作为核供体,为下一步创制携带缺陷型人源化 HBB 基因的地贫模型猪奠定基础,也为人们研究地贫的发生机制和临床治疗提供珍贵的材料。

参 考 文 献(References)

- [1] Kazazian HH Jr, Dowling CE, Waber PG, et al. The spectrum of beta-thalassemia genes in China and Southeast Asia[J]. Blood, 1986, 68(4): 964-966.
- [2] 赵文忠, 叶嘉玲, 王柏贤, 等. 人 β 地中海贫血 $\beta 41-41(-CTTT)$ 转基因小鼠的构建[J]. 热带医学杂志, 2014, 14(12): 1552-1555.
Zhao WZ, Ye JL, Wang BX, et al. Establishment of transgenic mouse with human thalassemia mutation $\beta 41-42(-CTTT)$ gene[J]. J Trop Med, 2014, 14(12): 1552-1555.
- [3] Niu XH, He WY, Song B, et al. Combining single strand oligodeoxynucleotides and CRISPR/Cas9 to correct gene mutations in β -thalassemia-induced pluripotent stem cells[J]. J Biol Chem, 2016, 291(32): 12576-12585.
- [4] Jamsai D, Zaibak F, Khongnium W, et al. A humanized mouse model for a common $\beta 0$ -thalassemia mutation[J]. Genomics, 2005, 85(4): 453-461.
- [5] Wang X, Garrick MD, Collins JF. Animal models of normal and disturbed iron and copper metabolism[J]. J Nutr, 2019, 149(12): 2085-2100.
- [6] Rogers CS. Genetically engineered livestock for biomedical models[J]. Transgenic Res, 2016, 25(3): 345-359.
- [7] 涂尾龙, 王洪洋, 张莺莺, 等. 实验用小型猪血液生理生化指标分析[J]. 上海畜牧兽医通讯, 2019, 4: 45-46, 49.
Tu WL, Wang HX, Zhang YY, et al. Analysis of blood physiological and biochemical indexes of experimental mini pigs[J]. Shanghai J Anim Husbandry Vet Med, 2019, 4: 45-46, 49.
- [8] 李军, 倪燕秀, 张继娟, 等. 聚乙二醇修饰猪血红蛋白的抗原性研究[J]. 中国药理学杂志, 2008, 43(2): 91-94.
Li J, Ni YX, Zhang JJ, et al. Antigenicity of PEG-modified porcine hemoglobin[J]. Chin Pharm J, 2008, 43(2): 91-94.
- [9] Liao C, Mo QH, Li J, et al. Carrier screening for alpha- and beta-thalassemia in pregnancy: the results of an 11-year prospective program in Guangzhou maternal and neonatal hospital[J]. Prenat Diagn, 2005, 25(2): 163-171.
- [10] Xu XM, Zhou YQ, Luo GX, et al. The prevalence and spectrum of alpha and Beta thalassemia in Guangdong province: implications for the future health Burden and population screening[J]. J Clin Pathol, 2004, 57(5): 517-522.
- [11] Lee JS, Kallehauge TB, Pedersen LE, et al. Site-specific integration in CHO cells mediated by CRISPR/Cas9 and homology-directed DNA repair pathway[J]. Sci Rep, 2015, 5: 8572.
- [12] Shin J, Chen J, Solnica-Krezel L. Efficient homologous recombination-mediated genome engineering in zebrafish using TALE nucleases[J]. Development, 2014, 141(19): 3807-3818.
- [13] Byrne SM, Ortiz L, Mali P, et al. Multi-kilobase homozygous targeted gene replacement in human induced pluripotent stem cells[J]. Nucleic Acids Res, 2015, 43(3): e21.
- [14] Moore JK, Haber JE. Cell cycle and genetic requirements of two pathways of nonhomologous end-joining repair of double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Mol Cell Biol, 1996, 16(5): 2164-2173.
- [15] Saintigny Y, Delacôte F, Boucher D, et al. XRCC4 in G1 suppresses homologous recombination in S/G2, in G1 checkpoint-defective cells[J]. Oncogene, 2007, 26(19): 2769-2780.
- [16] Hu Z, Shi Z, Guo X, et al. Ligase IV inhibitor SCR7 enhances gene editing directed by CRISPR-Cas9 and ssODN in human cancer cells[J]. Cell Biosci, 2018, 8: 12.
- [17] 李广磊. CRISPR/Cas9 定点编辑猪基因组及克隆猪 DNA 异常甲基化研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2015.
Li GL. Site-Specific editing of pig genome using CRISPR/Cas9 and dysregulation of DNA methylation in cloned piglets[D]. Whuan: HuaZhong Agricultural University, 2015.
- [18] Fujitani Y, Yamamoto K, Kobayashi I. Dependence of frequency of homologous recombination on the homology length[J]. Genetics, 1995, 140(2): 797-809.
- [19] Li X, Yang Y, Bu L, et al. Rosa26-targeted swine models for stable gene over-expression and Cre-mediated lineage tracing[J]. Cell Res, 2014, 24(4): 501-504.
- [20] Ruan J, Li H, Xu K, et al. Highly efficient CRISPR/Cas9-mediated transgene knock in at the H11 locus in pigs[J]. Sci Rep, 2015, 5: 14253.
- [21] Xie Z, Pang D, Wang K, et al. Optimization of a CRISPR/Cas9-mediated knock-in strategy at the porcine rosa26 locus in porcine foetal fibroblasts[J]. Sci. Rep, 2017, 7(1): 3036.

[收稿日期] 2020-05-28