

哺乳动物基因组靶向修饰阳性细胞富集的报告载体系统研究进展

白义春¹, 徐坤¹, 魏泽辉¹, 马琰², 张智英¹

1. 西北农林科技大学动物科技学院, 杨凌 712100;

2. 陕西省兴平市畜牧局, 兴平 713199

摘要: 基因组靶向修饰技术对基因功能研究、基因治疗以及转基因育种研究都具有重要的意义和价值。近年来发展起来的人工核酸酶如 ZFNs、TALENs 和 CRISPR/Cas9 等的应用大大提高了基因组靶向修饰的效率。但是由于核酸酶表达载体转染效率、核酸酶表达效率及活性以及基因组被打靶后的修复效率等因素在一定程度上制约着基因组靶向修饰阳性细胞的获得。因此富集和筛选基因组靶向修饰阳性细胞是一个亟待解决的问题。报告载体系统可以间接地反映核酸酶的工作效率并有效富集核酸酶修饰的阳性细胞, 进而提高基因组靶向修饰阳性细胞的富集和筛选效率。本文主要针对由非同源末端连接(Non-homologous end joining, NHEJ)和单链退火(Single-strand annealing, SSA)两种修复机制分别介导的报告载体系统的原理和应用进行了详细的介绍, 以期以后的相关研究提供借鉴和参考。

关键词: 基因组靶向修饰; 人工核酸酶; 报告载体系统; 阳性细胞富集

Research progress in developing reporter systems for the enrichment of positive cells with targeted genome modification

Yichun Bai¹, Kun Xu¹, Zehui Wei¹, Zheng Ma², Zhiying Zhang¹

1. College of Animal Science & Technology, Northwest A&F University, Yangling 712100, China;

2. Xingping Animal Husbandry Bureau of Shaanxi Province, Xingping 713199, China

Abstract: Targeted genome editing technology plays an important role in studies of gene function, gene therapy and transgenic breeding. Moreover, the efficiency of targeted genome editing is increased dramatically with the application of recently developed artificial nucleases such as ZFNs, TALENs and CRISPR/Cas9. However, obtaining positive cells with targeted genome modification is restricted to some extent by nucleases expression plasmid transfection efficiency, nucleases expression and activity, and repair efficiency after genome editing. Thus, the enrichment and screening of positive cells with targeted genome modification remains a problem that need to be solved. Surrogate

收稿日期: 2015-06-01; 修回日期: 2015-10-30

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(973 计划)(编号: 2011CBA01002)项目和国家科技重大专项(编号: 2014ZX0801009B)资助[Supported by the National Basic Research Program of China (973 Program) (No. 2011CBA01002) and the National Science and Technology Major Project of China (No. 2014ZX0801009B)]

作者简介: 白义春, 博士研究生, 专业方向: 动物遗传育种。E-mail: yichun1979@126.com

通讯作者: 张智英, 博士, 教授, 研究方向: 动物基因编辑。E-mail: zhangzhy@nwsuaf.edu.cn

DOI: 10.16288/j.ycz.15-247

网络出版时间: 2015-12-4 13:47:19

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20151204.1347.005.html>

reporter systems could be used to reflect the efficiency of nucleases indirectly and enrich genetically modified positive cells effectively, which may increase the efficiency of the enrichment and screening of positive cells with targeted genome modification. In this review, we mainly summarized principles and applications of reporter systems based on NHEJ and SSA repair mechanisms, which may provide references for related studies in future.

Keywords: targeted genome modification; engineered nucleases; surrogate reporter system; enrichment of positive cells

随着全基因组测序技术的发展和應用, 越来越多物种的基因组序列被公布。但是获得基因组序列并不是人们的最终目的, 诠释基因的功能才是研究这些基因的意义所在。研究基因功能最直接、最可靠的方法就是对基因组进行靶向修饰。基因组靶向修饰技术最初主要是依赖细胞体内的自发同源重组 (Homologous recombination, HR) 机制实现的。但是高等动植物机体内的同源重组几率很低, 只有千万分之一^[1], 因此大大限制了该项技术的应用。

已有的研究表明, 如果在 DNA 靶位点上引入双链断裂 (Double strand breaks, DSBs), 哺乳动物细胞中同源重组的几率会大大提高^[2,3]。近年来先后发展起来的人工锌指核酸酶 (Zinc-finger nuclease, ZFN)^[4~6]、类转录激活因子效应物核酸酶 (Transcription activator-like effector nuclease, TALEN)^[7~9]、CRISPR/Cas (Clustered, regularly interspaced, short palindromic repeats (CRISPR)/CRISPR-associated protein (Cas))^[10,11] 系统可以定点切割 DNA 双链, 从不同程度上极大提高了基因靶向修饰的效率和精确性^[12]。

但是核酸酶有时活性很低, 可能只有一小部分

的细胞被核酸酶靶向修饰, 要从大量的细胞中筛选到基因靶向修饰的阳性细胞仍然费时费力, 因此如何富集到阳性细胞是解决这个问题的关键。传统的方法是与核酸酶同时转入一个表达荧光或抗性基因的报告载体, 通过荧光或抗性来进行阳性细胞的筛选。但是通过这种方法富集阳性细胞效率很低^[13~15]。生物细胞内存在自发的 DNA 双链断裂修复机制: 同源重组 (Homologous recombination, HR)、单链退火 (Single-strand annealing, SSA) 和非同源末端连接 (Non-homologous end joining, NHEJ)。当生物的基因组断裂后, 细胞会通过自身的修复机制对基因组进行修复, 从而引起基因组移码突变或是片段的缺失。根据细胞内的不同修复机制, 近两年逐渐发展出游离于细胞染色体之外的 NHEJ 和 SSA 介导的报告载体富集筛选系统。本文主要综述了这两种系统的原理及应用, 以期为科研工作者提供参考。

1 DNA 双链断裂的修复方式

DNA 双链断裂后, 主要通过 3 种方式进行修复,

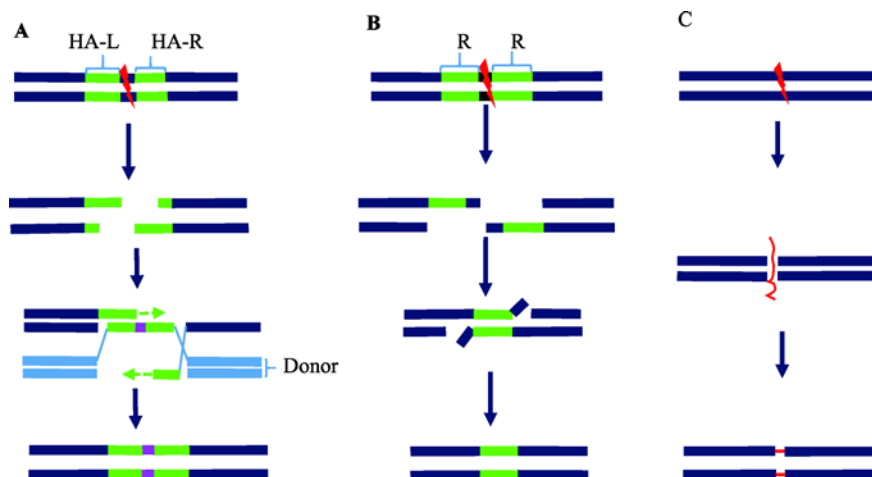


图 1 DNA 双链断裂的修复方式

Fig. 1 Repair pathways of DNA double strand break

A: 同源重组的修复方式; B: 单链退火的修复方式; C: 非同源末端连接的修复方式。HA-L: 左侧同源臂; HA-R: 右侧同源臂, Donor: 供体; R: 重复序列。

即 HR、SSA 和 NHEJ(图 1)。HR 严格意义上是保护基因组完整性的重要机制,当 DNA 双链断裂时,以姐妹染色单体或同一染色体上含有同源 DNA 分子模板进行修复,该修复是无错误的修复方式^[16],只发生在细胞周期的 S/G₂ 期^[17]。在基因组编辑中,如果人为地提供供体并对供体进行改造(如在供体的同源臂之间插入基因序列或是对一些碱基进行突变),就能达到基因编辑的目的,如基因敲入、基因突变等^[18-20]。SSA 是同源重组修复方式的一种特殊情况,即在 DSB 两端有一段同源重复序列的情况下,两个同源的序列可能会相互结合发生退火,进行后续的合成和再连接,最后删除一个重复序列及中间包含的序列从而实现基因修复^[21-23]。NHEJ 是哺乳动物细胞中 DSBs 修复的主要机制,即 DSB 两端不通过同源臂,而通过非特异性的末端连接实现修复,同时一般会引入少量核苷酸碱基的插入或缺失(Insertions and deletions, Indels),进而可能导致移码甚至是基因敲除^[24-28]。

2 报告载体系统

HR 介导的报告系统需要提供供体,因此关于 HR 介导的报告系统现在仅限于检测核酸酶活性的报告细胞系^[29-31],还未见 HR 介导的报告载体系统富集基因编辑的阳性细胞的报道。因此,下文重点介绍 NHEJ 和 SSA 介导的报告载体系统。

2.1 NHEJ 介导的报告载体系统

Kim 课题组发现人工核酸酶如果能够有效地切割载体上含有细胞内源靶基因序列,那么该核酸酶也能够有效的切割内源染色体上的靶基因序列^[6,32-34],这启示在细胞中转入一个游离的含有核酸酶靶位点的报告载体,该报告载体可能会反映出该细胞中核酸酶的活性,从而用报告载体来富集基因编辑的阳性细胞^[35],基于此, Kim 课题组开发出 NHEJ 介导的报告载体系统^[35-38]。

2.1.1 NHEJ 介导的荧光蛋白报告载体系统

荧光蛋白是一类在一定波长光照射下可以发出荧光的蛋白。最早发现的荧光蛋白是从维多利亚发光水母中分离的绿色荧光蛋白(Green fluorescent protein, GFP)^[39],具有稳定、检测简单、灵敏度高、

对活细胞无毒性、荧光反应不需要任何外源反应底物等优点,因此作为一种报告基因受到了广大科研工作者的青睐。之后,人们对 GFP 进行了一系列的改造,大大增强了 GFP 的荧光强度并且产生了不同颜色的突变^[40,41]。现有的荧光蛋白有蓝色荧光蛋白、红色荧光蛋白、黄色荧光蛋白等,使荧光蛋白具有更广泛的应用价值。

2011 年, Kim 课题组利用 ZFN 靶向人 *TP53* 基因时,除了转入一对靶向 *TP53* 基因的 ZFN 外,还转入了一个含有 ZFN 靶位点的荧光蛋白报告载体到 HEK293T 细胞中^[35]。该报告载体骨架是用 CMV 启动子,将红色荧光 *mRFP* 与绿色荧光蛋白 *eGFP* 融合表达。在 *mRFP* 与 *eGFP* 之间插入 ZFN 作用的靶位点和终止密码子,使 *eGFP* 的开放阅读框移码突变,终止 *eGFP* 绿色荧光蛋白的表达。当没有核酸酶作用时,转入报告载体的细胞只发红光,当将该报告载体与 ZFN 共同转入细胞中后, ZFN 切割报告载体靶位点,细胞通过 NHEJ 机制进行修复,伴随着几个碱基的插入或缺失, *eGFP* 的阅读框进行重新排列,会有一部分细胞表达绿色荧光(图 2)。因此该系统中红光表示转染效率,绿光表示切割效率。转染 72 h 后用流式细胞仪分析, 16% 的细胞只发红光不发绿光(*mRFP*⁺*eGFP*⁻), 5% 的细胞既发红光也发绿光(*mRFP*⁺*eGFP*⁺)。对 *mRFP*⁺*eGFP*⁺ 细胞用流式细胞仪分选后进行 T7E1 检测,分选后 *mRFP*⁺*eGFP*⁺ 的细胞基因突变率为 37%, 比不分选的细胞高出 13 倍;而 *mRFP*⁻*eGFP*⁻ 细胞、*mRFP*⁺*eGFP*⁻ 细胞和只转染 ZFN 核酸酶没有转染报告载体的细胞,切割效率只有 2.8%~4.8%。脱靶检测显示这种富集细胞的方法并没有加剧脱靶效应,因此这种报告载体系统在富集基因编辑的阳性细胞中是没有副作用的。该课题组同时又利用两对靶向人 *CCR5* 基因的 ZFN 及一对 TALENs 和对应的报告载体分别对基因突变的细胞进行富集,结果富集的阳性细胞率大大提高。在小鼠诱导性多潜能干细胞(Induced pluripotent stem cells, iPS)上的实验结果也显示该富集系统是可用且高效的(表 1)^[35]。

尽管上述 NHEJ 介导的报告载体系统大大提高了核酸酶作用后基因组编辑阳性细胞的效率,但是该系统只有 1/3 的概率能表达有功能的 *eGFP* 蛋白,理论上只反映核酸酶 1/3 的活性。因此, Kim 课题组又对该报告载体做了一些改进^[36],将上述报告载

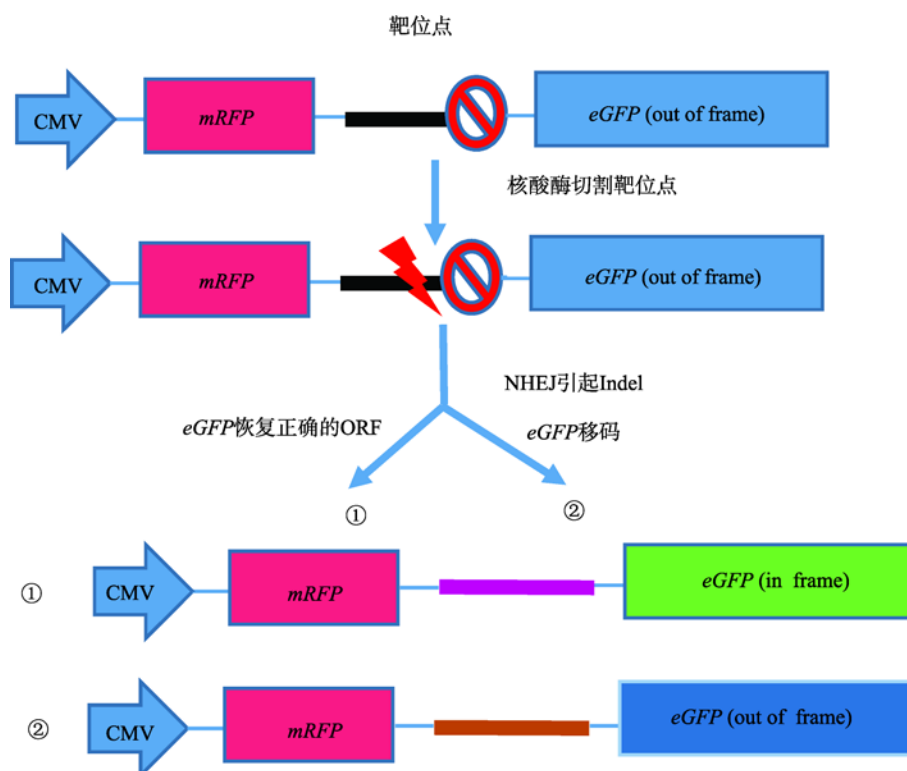


图 2 NHEJ 介导的荧光蛋白报告载体系统作用机制

Fig. 2 Functional principle of the fluorescent reporters mediated by NHEJ

当核酸酶切割靶位点后,细胞通过 NHEJ 方式修复 DSB: 一部分引起 $3n+1$ 个碱基插入或缺失使 *eGFP* 恢复正常的 ORF, *eGFP* 蛋白表达; 一部分引起 $3n$ 或 $3n+2$ 个碱基插入或缺失, *eGFP* 仍旧移码, *eGFP* 蛋白不表达。

体第一个 *eGFP* 后又加了一个移码的 *eGFP*, 这样当核酸酶作用于靶位点时, 移码 $3n+1$ 或 $3n+2$ 碱基的 *eGFP* 都可以正常表达, 从而用流式细胞仪富集出阳性细胞。这样理论上可以将报告基因的富集效率提高到 $2/3$ 。当将靶向人 *BMP1*、*F13A1* 和 *PPP1R1B* 的 CRISPR/Cas 和相应的报告载体转染 HEK293T 细胞时, T7E1 检测细胞的突变效率都能达到 36% 以上^[36] (表 1), 突变效率大部分都高于靶位点后仅有一个 *eGFP* 的报告载体富集阳性细胞的效率。

NHEJ 介导的荧光蛋白基因报告载体系统, 只转入一个含有靶位点的报告载体就可以对基因编辑的阳性细胞进行富集, 这种方法简单、省时省力, 富集基因编辑的阳性细胞效率较高。因此, Koo 等^[42] 采用该报告系统成功得到了 *CMAH* 基因编辑的猪胎儿成纤维细胞 (表 1)。

2.1.2 NHEJ 介导的抗性基因报告载体系统

尽管用流式分选可以有效地富集到基因编辑的

阳性细胞, 但是流式分选需要价格昂贵的流式细胞仪, 并且分选的细胞有时会由于强激光或液体静压力影响细胞的活性。抗性基因是编码分解抗生素相关酶的基因, 如嘌呤霉素 (Puromycin) 抗性基因、潮霉素 (Hygromycin) 抗性基因、新霉素 (Neomycin) 抗性基因等, 这些是真核表达载体常用的筛选标志, 当把抗性基因导入对该抗生素敏感的细胞中, 能赋予细胞对该抗生素的抗性, 从而通过抗生素筛选可以得到具有抗性基因或其他用途的细胞。用抗生素筛选细胞, 不需要特殊的设备, 在一般的实验室都可以进行, 应用很广泛。

Kim 课题组于 2013 年对 NHEJ 介导的荧光基因报告载体进行改造, 改造出可以用抗生素来对阳性细胞进行富集的系统^[38]。该系统是将 *Hygro^R* 和 *eGFP* 融合表达, 将靶位点插入 *mRFP* 和 *Hygro^R* 之间, 并且在靶位点后面插入终止密码子, 因此 *Hygro^R* 和 *eGFP* 不表达, 但是当核酸酶作用于靶位点时, 细胞在 NHEJ 的作用下终止密码子可能移码, 从而

表 1 采用 NHEJ 介导的荧光蛋白基因报告载体系统富集前后的 Indel 效率比较
Table 1 Comparison of the Indel frequencies before and after enrichment with the fluorescent reporters mediated by NHEJ

| 细胞类型 | 打靶位点 | 核酸酶 | T7E1 | | T-A 克隆 | | 参考文献 |
|-----------|----------------|-------------|--------|--------|--------|--------|------|
| | | | 富集前(%) | 富集后(%) | 富集前(%) | 富集后(%) | |
| HEK293T | <i>TP53</i> | ZFN | 3.8 | 37 | 1 | 20 | [35] |
| HEK293T | <i>CCR5</i> | ZFN224 | 12 | 69 | | | [35] |
| HEK293T | <i>CCR5</i> | ZFN891 | 0.8 | 8.7 | | | [35] |
| HEK293T | <i>CCR5</i> | TALEN | <0.5 | 4.3 | | | [35] |
| 小鼠 iPS 细胞 | <i>Thumpd3</i> | ZFN | <0.5 | 46 | | | [35] |
| 猪胎儿成纤维细胞 | <i>CMAH</i> | ZFN | 0.5 | 13 | | | [42] |
| HEK293T | <i>BMP1</i> | CRISPR/Cas9 | 2.3 | 41 | 4.5 | 33 | [38] |
| HEK293T | <i>F13A1</i> | CRISPR/Cas9 | 4.6 | 36 | 3.1 | 32 | [38] |
| HEK293T | <i>PPP1R1B</i> | CRISPR/Cas9 | 11 | 53 | 5.3 | 23 | [38] |
| HeLa | <i>PPP1R1B</i> | CRISPR/Cas9 | 11.5 | 52 | | | [38] |

注：文献[38]中运用报告载体系统的靶位点后含两个 *eGFP* 阅读框。

会有一部分细胞的 *eGFP* 和 *Hygro^R* 处于阅读框中，重新表达，通过 Hygromycin 可以富集出 RFP⁺Hygro^R⁺GFP⁺细胞(图 3)。当用 ZFN 和该系统靶向人的 *CCR5* 基因时，细胞的突变率达到 42%，是不富集细胞的 16 倍。同时用 TALEN 靶向 *BRCA1* 基因，用该系统富集突变的细胞时，结果显示富集后的细胞突变效率是不富集的细胞突变效率的 11 倍(表 2)。

当用 CRISPR/Cas9 靶向 *PPP1R1B*、*BMP1* 和

F13A1 基因并用该报告载体系统富集细胞后，富集后的细胞突变效率比不富集的至少高出 5.4 倍^[36](表 2)。由此可见，该报告载体系统对于三种核酸酶都是适应的，并且富集基因突变的阳性细胞的效率都非常高。

2.1.3 NHEJ 介导的抗原基因报告载体系统

用抗性基因报告载体系统进行基因编辑的阳性

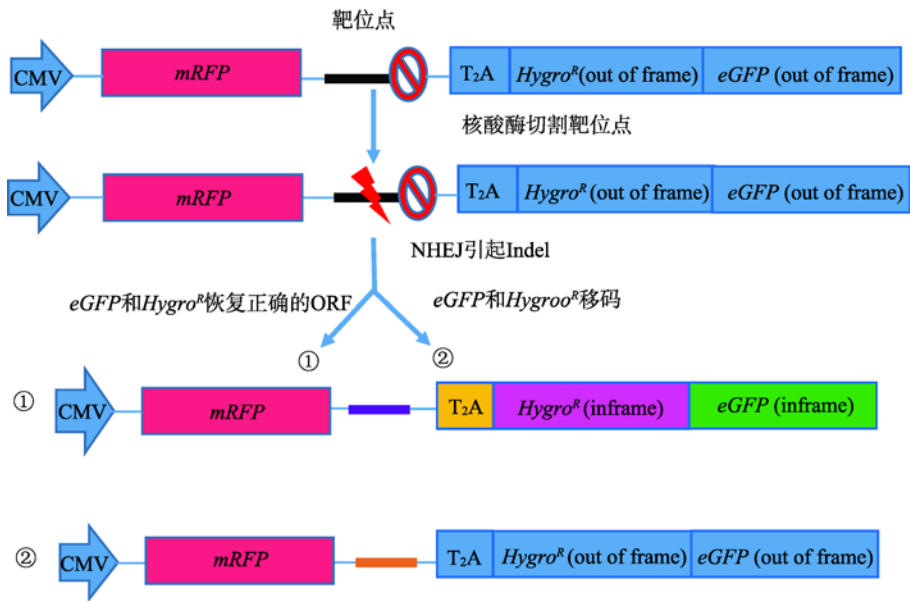


图 3 NHEJ 介导的抗性基因报告载体系统作用机制

Fig. 3 Functional principle of the resistant reporters mediated by NHEJ

当核酸酶切割靶位点后，细胞通过 NHEJ 方式修复 DSB：一部分引起 3n+1 个碱基插入或缺失使 *Hygro^R* 和 *eGFP* 恢复正常的 ORF，*Hygro^R* 和 *eGFP* 蛋白表达；一部分引起 3n 或 3n+2 个碱基插入或缺失，*Hygro^R* 和 *eGFP* 仍旧移码，*Hygro^R* 和 *eGFP* 蛋白不表达。

表 2 采用 NHEJ 介导的抗性基因报告载体系统富集前后的 Indel 效率比较

Table 2 Comparison of the Indel frequencies before and after enrichment with the resistant reporters mediated by NHEJ

| 细胞类型 | 靶位点 | 核酸酶 | T7E1 | | T-A 克隆 | | 参考文献 |
|---------|---------|-------------|--------|--------|--------|--------|------|
| | | | 富集前(%) | 富集后(%) | 富集前(%) | 富集后(%) | |
| HEK293T | CCR5 | ZFN891 | 2.7 | 42 | 4.6 | 39 | [37] |
| HEK293T | BRCA1 | TALEN | 2.3 | 35 | 1.8 | 39 | [37] |
| HEK293T | PPP1R1B | CRISPR/Cas9 | 6.4 | 57 | 2.9 | 23 | [38] |
| HEK293T | BMP1 | CRISPR/Cas9 | 2.8 | 33 | 2.9 | 20 | [38] |
| HEK293T | F13A1 | CRISPR/Cas9 | 6.1 | 34 | 3.4 | 25 | [38] |
| HeLa | PPP1R1B | CRISPR/Cas9 | 6.6 | 37 | | | [38] |

细胞富集不需要特殊的仪器设备, 细胞也不需要特殊的处理, 富集细胞的阳性率也比较高, 但是用该系统富集细胞, 实验周期较长, 一般都要用抗生素筛选 7 d 或者更长的时间; 并且不同的细胞在不同的条件下, 对于抗生素的敏感性不同, 需要摸索不同细胞对不同抗生素的最适敏感浓度。抗原基因是编码某种抗原物质的基因, 该抗原物质可以特异性地与包被抗体的免疫磁珠结合形成免疫复合物, 在外加磁场的作用下被滞留, 从而与其他成分分离, 免疫磁珠分离细胞速度快、效率高、操作简单、不需要昂贵的仪器设备。

Kim 课题组的抗原基因报告系统是将 eGFP 和

H-2K^k 蛋白通过 T₂A 剪切肽连接, 该系统作用机理同 3.1.2(图 4), 只是将 *Hygro^R* 基因换成 *H-2K^k* 基因^[38]。当核酸酶工作时, H-2K^k 蛋白恢复活性从而可以通过磁珠分选富集 RFP⁺H-2K^k+GFP⁺细胞。用靶向 CCR5 基因的 ZFN 和报告载体转染 HEK293 细胞, 3 d 后用结合了抗 H-2K^k 标记抗体的磁珠分选 RFP⁺H-2K^k+GFP⁺细胞, 结果显示 H-2K^k 细胞的 CCR5 基因的突变率是 46%, 与不分选细胞相比高出 12 倍之多(表 3)。同时又在 HEK293T 和 Huh7.5 细胞上进行实验, 用 ZFN、TALEN 和 CRISPR/Cas9 靶向 TP53、CD81、F13A1、BMP1 等基因并用该报告系统对细胞分选, 分选后的细胞突变率是不分选细胞的

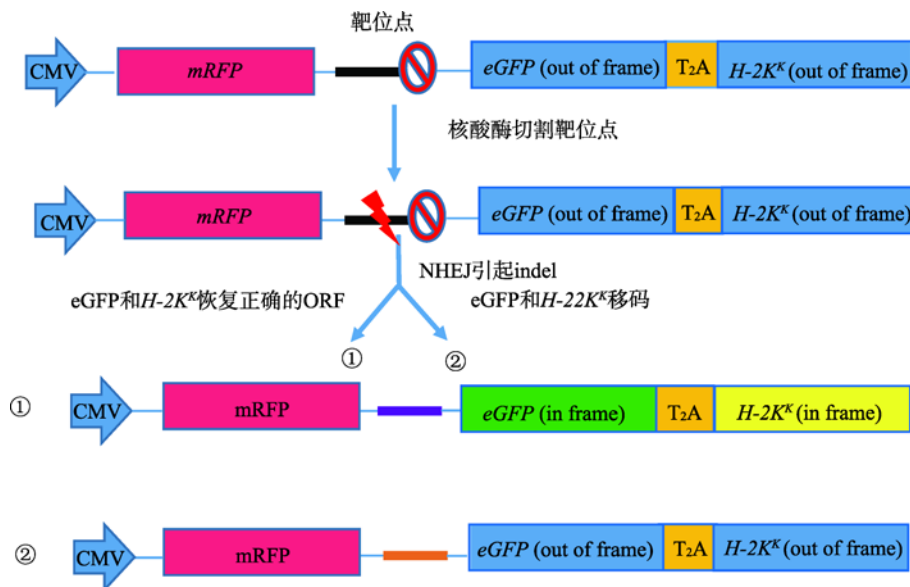


图 4 NHEJ 介导的抗原基因报告载体系统作用机制

Fig. 4 Functional principle of the antigen reporters mediated by NHEJ

当核酸酶切割靶位点后, 细胞通过 NHEJ 方式修复 DSB: 一部分引起 $3n+1$ 个碱基插入或缺失使 *H-2K^k* 和 *eGFP* 恢复正常的 ORF, *H-2K^k* 和 *eGFP* 蛋白表达; 一部分引起 $3n$ 或 $3n+2$ 个碱基插入或缺失, *H-2K^k* 和 *eGFP* 仍旧移码, *H-2K^k* 和 *eGFP* 蛋白不表达。

表 3 采用 NHEJ 介导的抗原基因报告载体系统富集前后的 Indel 效率比较

Table 3 Comparison of the Indel frequencies before and after enrichment with the antigen reporters mediated by NHEJ

| 细胞类型 | 打靶位点 | 核酸酶 | T7E1 | | T-A 克隆 | | 参考文献 |
|----------|----------------|-------------|--------|--------|--------|--------|------|
| | | | 富集前(%) | 富集后(%) | 富集前(%) | 富集后(%) | |
| HEK293T | <i>CCR5</i> | ZFN891 | 3.7 | 46 | 2.8 | 60 | [37] |
| HEK293T | <i>TP53</i> | ZFN | 1.5 | 25 | | | [37] |
| Huh7.5 | <i>CD81</i> | ZFN | <0.5 | 8.6 | | | [37] |
| HEK293T | <i>BRCA1</i> | TALEN | 2.7 | 47 | | | [37] |
| HEK293T | <i>F13A1</i> | CRISPR/Cas9 | 5.7 | 55 | 2.8 | 31 | [38] |
| HEK293T | <i>BMP1</i> | CRISPR/Cas9 | 2.6 | 42 | 3.1 | 32 | [38] |
| HEK293T | <i>PPP1R1B</i> | CRISPR/Cas9 | 16.5 | 60 | 7.1 | 26 | [38] |
| HeLa | <i>PPP1R1B</i> | CRISPR/Cas9 | 9.6 | 36 | | | [38] |
| 猪胎儿成纤维细胞 | <i>CMAH</i> | ZFN | 2 | 25 | | | [42] |

3.7~17 倍^[36](表 3),这说明该系统对于 3 种人工核酸酶都是适应的,并且发现核酸酶活性越低,分选后细胞的突变效率增加越高。Koo 等^[42]用该报告系统富集 ZFN 打靶的猪 *CMAH* 基因的胎儿成纤维细胞,效率高达 65%^[42](表 3)。

综上所述,以上 3 种报告载体都能有效地富集基因编辑的阳性细胞,3 种方法各有优劣之处。流式分选筛选周期短,但是需要特殊的仪器设备,并且流式分选对细胞活性有影响,磁力分选比流式分选周期短并且容易操作^[43,44]。Koo 等^[42]对流式分选和磁力分选的猪胎儿成纤维细胞的囊胚发育率比较后,认为磁力分选的细胞更适合进行核移植^[42]。抗生素筛选虽然周期长,但是不需要特殊的仪器设备,在一般的实验室都可以操作,因此可以依据实验室条件根据不同的需要采用不同的细胞富集筛选系统。

2.2 SSA 介导的报告载体

NHEJ 介导的报告载体修复后只有 1/3~2/3 的几率使 *eGFP* 报告基因修复表达,尤其是在核酸酶活性较低时,其灵敏度受到了很大的限制。Szczepek 等^[31]在检测 ZFN 的活性时,构建了一个基于 SSA 修复机制的荧光素酶基因报告载体,该载体将荧光素酶报告基因中间插入终止密码子和一个 ZFN 的靶位点,分开的两部分含有 870 bp 的重复序列,使该基因失活。当 ZFN 和该报告载体共转染细胞时,靶位点被切割,细胞可能通过 SSA 方式来修复 DSB,使细胞荧光素酶基因恢复活性,从而通过荧光素酶

的表达来检测 ZFN 的活性^[31]。Kuhar 等^[29]运用构建的 SSA-TLR 的报告细胞系来检测 HR、NHEJ 和 SSA 三种细胞修复方式的效率,意外发现 SSA 的修复效率要远远高于 HR 和 NHEJ 的效率,因此推测如果在靶位点附近存在重复序列时,SSA 修复应该是主要的修复方式。本课题组基于以上研究结果,开发出 SSA 介导的报告载体系统来富集基因编辑的阳性细胞。

2.2.1 SSA 介导的双荧光报告载体系统

SSA 介导的双荧光报告载体系统是本课题组在检测核酸酶活性时构建的一个报告载体系统^[45]。最初的双荧光报告载体是用 *mRFP* 作为标记基因,用 *eGFP* 作为报告基因, *mRFP* 和 *eGFP* 融合表达 *eGFP* 基因被分成两部分,其中含有 200 bp 的正向重复序列,重复序列中间插入核酸酶的靶位点,使 *eGFP* 失活。当核酸酶作用于靶位点时,细胞中由于 SSA 的修复方式, *eGFP* 恢复活性,从而用来检测核酸酶的活性。但是无论是直接融合表达还是通过 T₂A 剪切肽或 IRES 内部核糖体结合位点来介导表达, *eGFP* 报告基因的表达效率都会受到很大的影响,因此当本课题组后来检测 CRISPR/Cas9 的活性时又构建了 DsRed-eGFP 报告载体(图 5)^[46]。该报告载体是将标记基因 *DsRed* 和报告基因 *eGFP* 分别用 CMV 启动子表达,将靶位点插入 *eGFP* 的两个重复序列之间,通过 *eGFP* 的表达来反映核酸酶的活性,这就解决了融合表达时 *eGFP* 报告基因修复后表达强

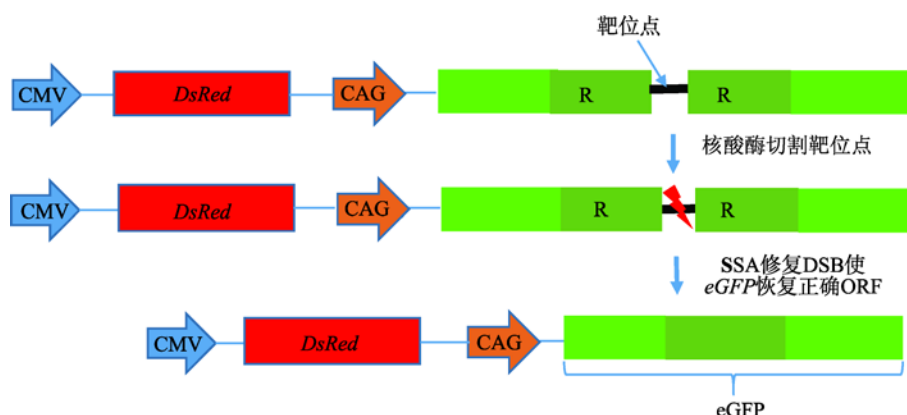


图 5 SSA 介导的荧光基因报告载体系统作用机制

Fig. 5 Functional principle of the fluorescent reporters mediated by SSA

当核酸酶切割靶位点后, 细胞主要通过 SSA 方式修复 DSB, 使 *eGFP* 基因恢复正常的 ORF, 细胞发出绿色荧光。R: 重复序列。

度较弱的问题。基于该报告载体的 StCRISPR/Cas9 哺乳动物细胞活性验证系统中, 针对 SP1.sgRNA.WT 和 SP1.sgRNA.Opti/hStCas9 的报告载体检测活性分别为 10.95% 和 31.66%, 而 NHEJ 介导的报告载体检测活性只有 3.71% 和 4.66%, 说明用 SSA 介导的报告载体系统检测核酸酶活性要优于 NHEJ 介导的报告载体系统^[46]。但由于受流式细胞仪的限制, 本课题组只是用该系统进行了核酸酶活性的检测, 没有用流式细胞仪富集阳性细胞。中山大学吴金青等^[47]用自主构建的 SSA 介导的荧光报告载体系统通过流式分选来富集靶向 *IGF2* 基因的猪胎儿成纤维细胞, 用 ZFN 和 CRISPR/Cas9 编辑过的细胞富集后打靶效

率可以提高 5 倍^[47]。

2.2.2 SSA 介导的抗性基因报告载体系统

由于双荧光报告载体系统受限于流式细胞仪, 因此本课题组又开发出 SSA 介导的抗性基因报告载体系统(图 6)。该系统是将 *Puro^R* 作为报告基因, 将靶位点插入 *Puro^R* 中, 靶位点两边有 300 bp 的同源臂, 当核酸酶作用于靶位点时, 通过 SSA 机制恢复 *Puro^R* 的功能, 细胞表现出 Puromycin 抗性, 从而可以通过 Puromycin 来富集阳性细胞, 用 3 对 ZFN 分别靶向奶山羊乳腺上皮细胞 *as1-casein* 基因的同一位点, 并用该系统富集后进行突变检测, 3 对 ZFN 的靶位

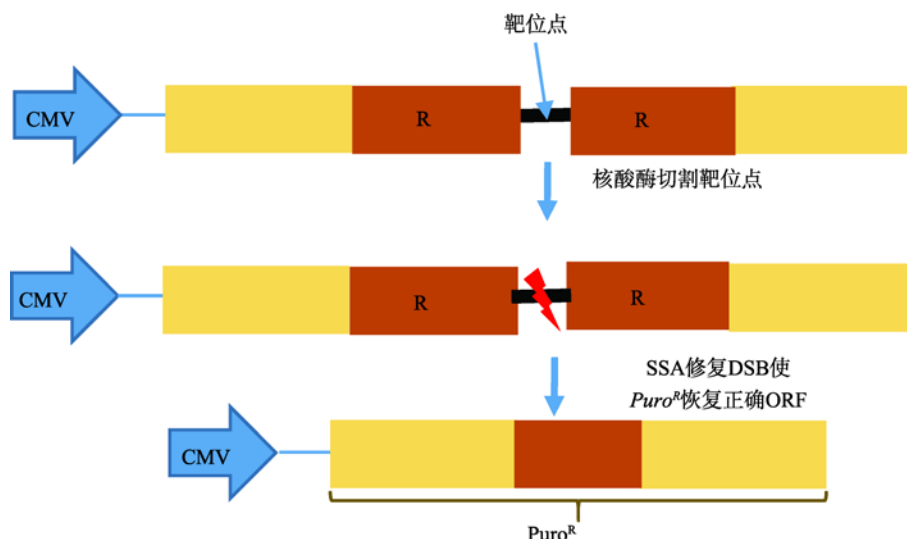


图 6 SSA 介导的抗性基因报告载体系统作用机制

Fig. 6 Functional principle of the resistant reporters mediated by SSA

当核酸酶切割靶位点后, 细胞主要通过 SSA 方式修复 DSB, 使 *Puro^R* 基因恢复正常的 ORF, 细胞表现 Puromycin 抗性。R: 重复序列。

点的突变效率分别达到 9.4% , 15.9%和 4.1%^[48]。但是这些报告载体只是进行了阳性细胞的富集, 没有对 SSA 介导的报告载体做进一步的研究。

2.2.3 SSA 介导的双报告基因载体系统

2014 年, 本实验室 Ren 等^[49]对 SSA 介导的报告载体富集筛选系统进行了深入的研究, 开发出 DsRed-Puro^R-eGFP (RPG)双报告基因载体系统(图 7)。在该系统中, 用 CMV 启动子启动红色荧光 DsRed 的表达, 用 CAG 启动子启动通过 T₂A 融合的 Puro^R和 eGFP 作为双报告基因, 将靶位点插入 Puro^R中, 靶位点两侧有同向重复序列, 正常情况下, 该报告载体不表达 Puro^R和 eGFP, 当核酸酶作用于靶位点时, 由于 SSA 的修复机制, Puro^R和 eGFP 恢复表达, 细胞表现出 Puromycin 抗性和绿色荧光, 从而可以通过 Puromycin 或流式细胞仪对阳性细胞进行富集。同时对 SSA 同源臂从 50~350 bp 长度进行了比较, 发现 CRISPR/Cas9 靶向切割基因的能力随着同源臂从 50~200 bp 的增加而增加, 从 1.1%增加到 6.8%, 而同源臂从 200~350 bp 差异不大, 因此确

认了最佳的同源臂为 200 bp。同时在对 CRISPR/Cas9 靶向 CCR5.a 位点时, 对该报告系统与 Kim 的 NHEJ 的报告系统对比, 发现在同源臂为 50 bp 时的报告系统富集突变细胞的效率比 NHEJ 介导的报告系统的富集细胞的效率要高出 3 倍。随后用 ZFN 靶向 CCR5 基因, 发现 SSA 介导的报告载体系统富集阳性细胞的效率在同源臂在 200 bp~350 bp 时也比 NHEJ 介导的报告载体富集阳性细胞的效率高 3 倍。在用同源臂为 200 bp 的报告系统富集阳性细胞时, CRISPR/Cas9 靶向 AAVS1 基因也得到了同样的结果。这与 Kuhar 等^[29]在报告细胞系上所发现的结果吻合, 即在靶位点附近存在重复序列时, SSA 修复机制占主要方式^[29]。因此随后利用 SSA 介导的报告系统, 本课题组用 CRISPR/Cas9 分别靶向 CCR2, CCR5.a 和 CCR5.b 三个位点时, 发现富集细胞的切割效率比不富集的细胞提高了 6.3~34.8 倍(表 4), 证实了这是一个有效的富集阳性细胞的系统。目前本课题组正在用这个报告载体系统对鸡 DF-1 细胞系、猪肾原代

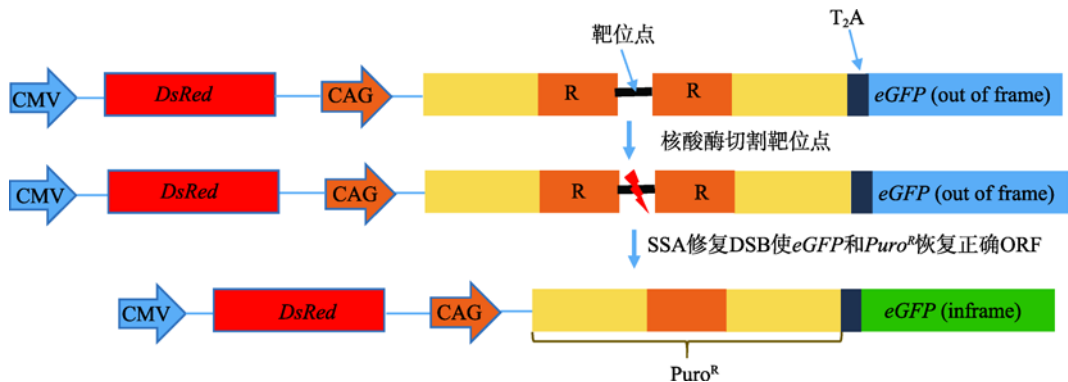


图 7 SSA 介导的双报告基因载体系统作用机制

Fig. 7 Functional principle of the dual Reporter system mediated by SSA

当核酸酶切割靶位点后, 细胞主要通过 SSA 方式修复 DSB, 使 Puro^R和 eGFP 基因恢复正常的 ORF, 细胞发出绿色荧光并表现 Puromycin 抗性。R: 重复序列。

表 4 采用 SSA 介导的双报告基因载体系统富集前后的 Indel 效率比较

Table 4 Comparison of the Indel frequencies before and after enrichment with dual reporters system mediated by SSA

| 细胞类型 | 打靶位点 | 核酸酶 | T7E1 | | T-A 克隆 | | 参考文献 |
|---------|-------|-------------|--------|--------|--------|--------|------|
| | | | 富集前(%) | 富集后(%) | 富集前(%) | 富集后(%) | |
| HEK293T | CCR2 | CRISPR/Cas9 | 4.2 | 57.8 | 2.1 | 72.7 | [48] |
| HEK293T | CCR5a | CRISPR/Cas9 | 2.2 | 27.1 | 1.7 | 30.8 | [48] |
| HEK293T | CCR5b | CRISPR/Cas9 | 3.9 | 24.7 | 3.8 | 45 | [48] |
| HEK293T | CCR5 | ZFN | <1.0 | 34.2 | 1.4 | 26.3 | [48] |

细胞进行基因编辑, 富集后基因编辑的细胞阳性率都达到 90% 以上(数据未发表), 为以后研究转基因动物或基因功能的研究奠定基础。

在 SSA 介导的报告载体系统中, 由于在两个重复序列之间插入的片段比较短(<40 bp), 当两个重复序列之间的靶位点被打断后, SSA 的修复方式是主要方式, 因此 SSA 介导的报告载体系统富集阳性细胞的效率要优于 NEHJ 介导的报告载体系统。但是在哺乳动物细胞中, DSB 主要以 NHEJ 为主要的修复方式^[28], 因此当两个重复序列之间的靶序列片段较长, 是否 SSA 介导的报告载体优于 NEHJ 介导的报告载体还需要进一步验证。

3 展 望

基因组编辑技术是近年来研究基因功能的主要工具, ZFN、TALEN 和 CRISPR/Cas 等基因组编辑技术的出现, 更是推动了人们对基因组靶向编辑技术研究的热潮。尽管 ZFN、TALEN 和 CRISPR/Cas 技术相比传统的同源重组技术, 在不同程度上大大提高了基因组靶向编辑的效率, 但是如果要研究基因功能, 还需要筛选出比较纯正的阳性克隆, 因此富集阳性细胞就成为获得阳性克隆的关键。NHEJ 和 SSA 介导的基因组编辑阳性细胞富集系统, 大大提高了基因编辑细胞的阳性率, 并且人们可以根据不同的条件采用不同的报告载体系统进行阳性细胞的富集, 为基因功能的进一步研究和转基因动物的生产提供了重要基础。

参考文献(References):

- [1] Porteus M. Using homologous recombination to manipulate the genome of human somatic cells. *Biotechnol Genet Eng Rev*, 2007, 24(1): 195–212. [DOI]
- [2] Bibikova M, Carroll D, Segal DJ, Trautman JK, Smith J, Kim YG, Chandrasegaran S. Stimulation of homologous recombination through targeted cleavage by chimeric nucleases. *Mol Cell Biol*, 2001, 21(1): 289–297. [DOI]
- [3] Porteus MH, Baltimore D. Chimeric nucleases stimulate gene targeting in human cells. *Science*, 2003, 300(5620): 763. [DOI]
- [4] Cost GJ, Freyvert Y, Vafiadis A, Santiago Y, Miller JC, Rebar E, Collingwood TN, Snowden A, Gregory PD. BAK and BAX deletion using zinc-finger nucleases yields apoptosis-resistant CHO cells. *Biotechnol Bioeng*, 2010, 105(2): 330–340. [DOI]
- [5] Ménoret S, Iscache AL, Tesson L, Rémy S, Usal C, Osborn MJ, Cost GJ, Brüggemann M, Buelow R, Anegón I. Characterization of immunoglobulin heavy chain knockout rats. *Eur J Immunol*, 2010, 40(10): 2932–2941. [DOI]
- [6] Santiago Y, Chan E, Liu PQ, Orlando S, Zhang L, Urnov FD, Holmes MC, Guschin D, Waite A, Miller JC, Rebar EJ, Gregory PD, Klug A, Collingwood TN. Targeted gene knockout in mammalian cells by using engineered zinc-finger nucleases. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(15): 5809–5814. [DOI]
- [7] Christian M, Cermak T, Doyle EL, Schmidt C, Zhang F, Hummel A, Bogdanove AJ, Voytas DF. Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. *Genetics*, 2010, 186(2): 757–761. [DOI]
- [8] Miller JC, Tan SY, Qiao GJ, Barlow KA, Wang JB, Xia DF, Meng XD, Paschon DE, Leung E, Hinkley SJ, Dulay GP, Hua KL, Ankoudinova I, Cost GJ, Urnov FD, Zhang HS, Holmes MC, Zhang L, Gregory PD, Rebar EJ. A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. *Nat Biotechnol*, 2011, 29(2): 143–148. [DOI]
- [9] Li T, Huang S, Zhao XF, Wright DA, Carpenter S, Spalding MH, Weeks DP, Yang B. Modularly assembled designer TAL effector nucleases for targeted gene knockout and gene replacement in eukaryotes. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39(14): 6315–6325. [DOI]
- [10] Cong L, Ran FA, Cox D, Lin SL, Barretto R, Habib N, Hsu PD, Wu XB, Jiang WY, Marraffini LA, Zhang F. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 2013, 339(6121): 819–823. [DOI]
- [11] Mali P, Yang LH, Esvelt KM, Aach J, Guell M, Dicarlo JE, Norville JE, Church GM. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*, 2013, 339(6121): 823–826. [DOI]
- [12] Gaj T, Gersbach CA, Barbas III CF. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends Biotechnol*, 2013, 31(7): 397–405. [DOI]
- [13] Frank S, Skryabin BV, Greber B. A modified TALEN-based system for robust generation of knock-out human pluripotent stem cell lines and disease models. *BMC Genomics*, 2013, 14: 773. [DOI]
- [14] Ding QR, Lee YK, Schaefer EAK, Peters DT, Veres A, Kim K, Kuperwasser N, Motola DL, Meissner TB, Hendriks WT, Trevisan M, Gupta RM, Moisan A, Banks E, Friesen M, Schinzel RT, Xia F, Tang A, Xia YL, Figueroa E, Wann A, Ahfeldt T, Daheron L, Zhang F, Rubin LL, Peng LF, Chung RT, Musunuru K, Cowan CA. A TALEN genome-editing system for generating human stem cell-based

- disease models. *Cell Stem Cell*, 2013, 12(2): 238–251. [DOI]
- [15] Carlson DF, Tan WF, Lillico SG, Stverakova D, Proudfoot C, Christian M, Voytas DF, Long CR, Whitelaw CBA, Fahrenkrug SC. Efficient TALEN-mediated gene knockout in livestock. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(43): 17382–17387. [DOI]
- [16] Krejci L, Altmannova V, Spirek M, Zhao XL. Homologous recombination and its regulation. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40(13): 5795–5818. [DOI]
- [17] Pâques F, Haber JE. Multiple pathways of recombination induced by double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1999, 63(2): 349–404. [DOI]
- [18] Beumer K, Bhattacharyya G, Bibikova M, Trautman JK, Carroll D. Efficient gene targeting in *Drosophila* with zinc-finger nucleases. *Genetics*, 2006, 172(4): 2391–2403. [DOI]
- [19] Liang PP, Xu YW, Zhang XY, Ding CH, Huang R, Zhang Z, Lv J, Xie XW, Chen YX, Li YJ, Sun Y, Bai YF, Songyang Z, Ma WB, Zhou CQ, Huang JJ. CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human tripronuclear zygotes. *Protein Cell*, 2015, 6(5): 363–372. [DOI]
- [20] Shukla VK, Doyon Y, Miller JC, Dekelver RC, Moehle EA, Worden SE, Mitchell JC, Arnold NL, Gopalan S, Meng XD, Choi VM, Rock JM, Wu YY, Katibah GE, Zhifang G, Mccaskill D, Simpson MA, Blakeslee B, Greenwalt SA, Butler HJ, Hinkley SJ, Zhang L, Rebar EJ, Gregory PD, Urnov FD. Precise genome modification in the crop species *Zea mays* using zinc-finger nucleases. *Nature*, 2009, 459(7245): 437–441. [DOI]
- [21] Lin FL, Sperle K, Sternberg N. Repair of double-stranded DNA breaks by homologous DNA fragments during transfer of DNA into mouse L cells. *Mol Cell Biol*, 1990, 10(1): 113–119. [DOI]
- [22] Fishman-Lobell J, Rudin N, Haber JE. Two alternative pathways of double-strand break repair that are kinetically separable and independently modulated. *Mol Cell Biol*, 1992, 12(3): 1292–1303. [DOI]
- [23] Maryon E, Carroll D. Characterization of recombination intermediates from DNA injected into *Xenopus laevis* oocytes: evidence for a nonconservative mechanism of homologous recombination. *Mol Cell Biol*, 1991, 11(6): 3278–3287. [DOI]
- [24] Lieber MR. The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway. *Annu Rev Biochem*, 2010, 79: 181–211. [DOI]
- [25] Rodgers K, Mcvey M. Error-prone repair of DNA double-strand breaks. *J Cell Physiol*, 2016, 231(1): 15–24. [DOI]
- [26] Bétermier M, Bertrand P, Lopez BS. Is non-homologous end-joining really an inherently error-prone process? *PLoS Genet*, 2014, 10(1): e1004086. [DOI]
- [27] Ramsden DA, Gellert M. Ku protein stimulates DNA end joining by mammalian DNA ligases: a direct role for Ku in repair of DNA double-strand breaks. *EMBO J*, 1998, 17(2): 609–614. [DOI]
- [28] Wang C, Lees-Miller SP. Detection and repair of ionizing radiation-induced DNA double strand breaks: new developments in nonhomologous end joining. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2013, 86(3): 440–449. [DOI]
- [29] Kuhar R, Gwiazda KS, Humbert O, Mandt T, Pangallo J, Brault M, Khan I, Maizels N, Rawlings DJ, Scharenberg AM, Certo MT. Novel fluorescent genome editing reporters for monitoring DNA repair pathway utilization at endonuclease-induced breaks. *Nucleic Acids Res*, 2014, 42(1): e4. [DOI]
- [30] Alwin S, Gere MB, Guhl E, Effertz K, Barbas III CF, Segal DJ, Weitzman MD, Cathomen T. Custom zinc-finger nucleases for use in human cells. *Mol Ther*, 2005, 12(4): 610–617. [DOI]
- [31] Szczepek M, Brondani V, Büchel J, Serrano L, Segal DJ, Cathomen T. Structure-based redesign of the dimerization interface reduces the toxicity of zinc-finger nucleases. *Nat Biotechnol*, 2007, 25(7): 786–793. [DOI]
- [32] Lee HJ, Kim E, Kim JS. Targeted chromosomal deletions in human cells using zinc finger nucleases. *Genome Res*, 2010, 20(1): 81–89. [DOI]
- [33] Kim HJ, Lee HJ, Kim H, Cho SW, Kim JS. Targeted genome editing in human cells with zinc finger nucleases constructed via modular assembly. *Genome Res*, 2009, 19(7): 1279–1288. [DOI]
- [34] Perez EE, Wang JB, Miller JC, Jouvenot Y, Kim KA, Liu O, Wang N, Lee G, Bartsevich VV, Lee YL, Guschin DY, Rupniewski I, Waite AJ, Carpenito C, Carroll RG, Orange JS, Urnov FD, Rebar EJ, Ando D, Gregory PD, Riley JL, Holmes MC, June CH. Establishment of HIV-1 resistance in CD4⁺ T cells by genome editing using zinc-finger nucleases. *Nat Biotechnol*, 2008, 26(7): 808–816. [DOI]
- [35] Kim H, Um E, Cho SR, Jung C, Kim H, Kim JS. Surrogate reporters for enrichment of cells with nuclease-induced mutations. *Nat Methods*, 2011, 8(11): 941–943. [DOI]
- [36] Ramakrishna S, Cho SW, Kim S, Song M, Gopalappa R, Kim JS, Kim H. Surrogate reporter-based enrichment of cells containing RNA-guided Cas9 nuclease-induced mutations. *Nat Commun*, 2014, 5: 3378. [DOI]

- [37] Kim YH, Ramakrishna S, Kim H, Kim JS. Enrichment of cells with TALEN-induced mutations using surrogate reporters. *Methods*, 2014, 69(1): 108–117. [DOI]
- [38] Kim H, Kim MS, Wee G, Lee CI, Kim H, Kim JS. Magnetic separation and antibiotics selection enable enrichment of cells with ZFN/TALEN-induced mutations. *PLoS One*, 2013, 8(2): e56476. [DOI]
- [39] Prasher DC, Eckenrode VK, Ward WW, Prendergast FG, Cormier MJ. Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene*, 1992, 111(2): 229–233. [DOI]
- [40] Baird GS, Zacharias DA, Tsien RY. Biochemistry, mutagenesis, and oligomerization of DsRed, a red fluorescent protein from coral. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(22): 11984–11989. [DOI]
- [41] Heim R, Prasher DC, Tsien RY. Wavelength mutations and posttranslational autooxidation of green fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91(26): 12501–12504. [DOI]
- [42] Koo OJ, Park SJ, Lee C, Kang JT, Kim S, Moon JH, Choi JY, Kim H, Jang G, Kim JS, Kim S, Lee BC. Production of mutated porcine embryos using zinc finger nucleases and a reporter-based cell enrichment system. *Asian-Australas J Anim Sci*, 2014, 27(3): 324–329. [DOI]
- [43] Willasch A, Eing S, Weber G, Kuçi S, Schneider G, Soerensen J, Jarisch A, Rettinger E, Koehl U, Klingebiel T, Kreyenberg H, Bader P. Enrichment of cell subpopulations applying automated MACS technique: purity, recovery and applicability for PCR-based chimerism analysis. *Bone Marrow Transplant*, 2010, 45(1): 181–189. [DOI]
- [44] Grutzkau A, Radbruch A. Small but mighty: how the MACS®-technology based on nanosized superparamagnetic particles has helped to analyze the immune system within the last 20 years. *Cytometry A*, 2010, 77(7): 643–647. [DOI]
- [45] Wang L. Construction of zinc finger nucleases and its application of animal genomic editing [Dissertation]. Xianyang: Northwest Agriculture and Forestry University of Science and Technology, 2013.
- 王令. 锌指核酸酶的构建及其在动物基因组编辑中的应用[学位论文]. 咸阳: 西北农林科技大学, 2013. [DOI]
- [46] Xu K, Ren CH, Liu ZT, Zhang T, Zhang TT, Li D, Wang L, Yan Q, Guo LJ, Shen JC, Zhang ZY. Efficient genome engineering in eukaryotes using Cas9 from *Streptococcus thermophilus*. *Cell Mol Life Sci*, 2015, 72(2): 383–399. [DOI]
- [47] Wu JQ, Mei G, Liu ZG, Chen YS, Cong PQ, He ZY. Improving gene targeting efficiency on pig IGF2 mediated by ZFNs and CRISPR/Cas9 by using SSA reporter system. *Hereditas(Beijing)*, 2015, 37(1): 55–62.
- 吴金青, 梅瑰, 刘志国, 陈瑶生, 丛佩清, 何祖勇. 应用 SSA 报告载体提高 ZFN 和 CRISPR/Cas9 对猪 IGF2 基因的打靶效率. *遗传*, 2015, 37(1): 55–62. [DOI]
- [48] Wang L, Lin J, Zhang TT, Xu K, Ren CH, Zhang ZY. Simultaneous screening and validation of effective zinc finger nucleases in yeast. *PLoS One*, 2013, 8(5): e64687. [DOI]
- [49] Ren CH, Xu K, Liu ZT, Shen JC, Han FR, Chen ZL, Zhang ZY. Dual-reporter surrogate systems for efficient enrichment of genetically modified cells. *Cell Mol Life Sci*, 2015, 72(14): 2763–2772. [DOI]

(责任编辑: 高彩霞)