

siRNA 干扰绵羊胚胎成纤维细胞 *Lig4* 基因增加同源重组载体重连修复效率

王伟^{1,2}, 王玉霜³, 黄兰兰¹, 简子健², 王新华¹, 刘守仁¹, 皮文辉¹

1. 新疆农垦科学院, 绵羊遗传改良与健康养殖国家重点实验室, 石河子 832000;
2. 新疆农业大学动物医学学院, 乌鲁木齐 830052;
3. 中国农业大学动物科技学院, 北京 100193

摘要: 在动物细胞中, 抑制非同源末端连接(Non-homologous end joining, NHEJ)修复途径, 可以提高同源重组(Homologous recombination, HR)修复基因组双链断裂(Double-strand breaks, DSBs)的发生概率。为了提高绵羊胚胎成纤维细胞的 HR 效率, 针对 NHEJ 修复途径中的关键因子 *Lig4*(DNA ligase 4)基因, 本文设计合成 4 个具有靶向性的 siRNA(Small interfering RNA)。绵羊胚胎成纤维细胞经电转导入 siRNA, 通过实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)和 Western blotting 检测, 筛选出有效抑制 *Lig4* 基因表达的 2 个 siRNA。应用质粒重连法检测 HR 修复效率, 将 *I-Sce I* 酶线性化的 HR 质粒和 siRNA 共转染绵羊胚胎成纤维细胞, 经 72 h 培养及流式细胞仪检测, 与对照组细胞比较, 结果表明 HR 质粒重连效率提高了 3~4 倍。瞬间干扰 *Lig4* 基因的表达可提高 HR 质粒重连效率, 为改善绵羊胚胎成纤维细胞基因打靶效率提供理论基础。

关键词: siRNA; *Lig4* 基因; 同源重组; 绵羊胚胎成纤维细胞

Increasing the efficiency of homologous recombination vector-mediated end joining repair by inhibition of *Lig4* gene using siRNA in sheep embryo fibroblasts

Wei Wang^{1,2}, Yushuang Wang³, Lanlan Huang¹, Zijian Jian², Xinhua Wang¹, Shouren Liu¹, Wenhui Pi¹

1. State Key Laboratory for Sheep Genetic Improvement and Healthy Production, Xinjiang Academy of Agricultural and Reclamation Sciences, Shihezi 832000, China;
2. College of Veterinary Medicine, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, China;
3. College of Animal Science and Technology, China Agricultural University, Beijing 100193, China

Abstract: In animal cells, inhibition of non-homologous end joining (NHEJ) pathway improves the efficiency of homologous recombination (HR)-mediated double-strand breaks (DSBs) repair. To improve the efficiency of HR in

收稿日期: 2016-03-03; 修回日期: 2016-07-18

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 31560321, 31360276)和兵团国际合作项目(编号: 2013BC004)资助[Supported by the National Natural Science Foundation of China (Nos. 31560321, 31360276) and International Cooperation Program in Xinjiang Production and Construction Corps (No. 2013BC004)]

作者简介: 王伟, 硕士, 专业方向: 动物分子与免疫病理学。E-mail: 1498497219@qq.com

通讯作者: 皮文辉, 博士, 研究员, 研究方向: 动物遗传育种。E-mail: wzjpwh@163.com

DOI: 10.16288/j.ycz.16-074

网络出版时间: 2016/8/16 16:10:00

URI: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20160816.1610.002.html>

sheep embryo fibroblasts, the NHEJ key molecule DNA ligase 4 (*Lig4*) was suppressed by siRNA interference. Four pairs of siRNA targeting *Lig4* were designed and chemically synthesized. These siRNA were electro-transferred into sheep embryo fibroblasts respectively. Compared with the control groups, two pairs of siRNA were identified to effectively inhibit the expression of sheep *Lig4* gene by qRT-PCR and Western blotting. The plasmid rejoining assay was adopted for examining the efficiency of HR-mediated DSB repair. *I-Sce* endonuclease linearized vector and siRNA were co-transfected into sheep embryo fibroblasts. Flow cytometry analysis of cells after transfection for 72 h showed that suppression of *Lig4* using siRNAs increased the rejoining efficiency of HR vector by 3-4 times compared with the control groups. Therefore, enhanced HR vector rejoining frequency by instant inhibition of *Lig4* gene provides theoretical basis for improving gene targeting efficiency of sheep embryo fibroblasts.

Keywords: small interfering RNA; DNA ligase 4 gene; homologous recombination; sheep embryo fibroblasts

利用人工核酸内切酶(Engineered endonuclease, EEN), 如锌指核酸酶(Zinc finger nucleases, ZFNs)、类转录激活因子效应物核酸酶(Transcription activator-like effector nucleases, TALENs)和 CRISPR/Cas9 (Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/CRISPR-associated 9 (Cas9)), 定点切割基因组, 产生特定位点基因组双链断裂(Double-strand breaks, DSBs)或缺口(Nicks), 成为动物品种改良和构建动物模型的重要研究工具^[1~4]。

细胞主要通过非同源末端连接(Non-homologous end joining, NHEJ)途径修复 DSBs, 产生基因敲除表型^[1]。共同转染 EEN 和单链寡核苷酸, 或同源序列的供体模板, 通过依赖同源模板修复途径, 如微同源臂介导连接(Microhomology-mediated end joining, MMEJ)^[5]和同源重组(Homologous recombination, HR)^[6,7], 精确地将外源目的基因敲入细胞基因组, 实现基因编辑。沈延等^[1]报道, 即使采用高效的 CRISPR/Cas9 系统产生基因组的 DSBs, 细胞选择 NHEJ 修复事件的发生概率也超过 90%, 利用同源模板的修复概率低于 10%^[1]。这说明在多数细胞中, NHEJ 远远超过依赖同源模板修复事件的发生概率^[8]。

在哺乳动物细胞中, NHEJ 在整个细胞周期中都有活性^[9,10]。NHEJ 修复过程是 KU70/KU80(X-ray repair cross-complementing protein 6/5)异二聚体蛋白结合在 DNA 断裂末端, 招募 DNA-PKcs(DNA-dependent protein kinase catalytic subunit)、Artemis 蛋白和聚合酶 Pol λ (或 μ)到修复位点, 最后由 Lig4(DNA ligase 4)、XRCC4(X-ray repair cross-complementing

protein 4)和 XLF(XRCC4like factor)复合物介导连接 DNA, 修复的 DNA 位点表现出缺失或插入^[9]。

抑制 NHEJ 途径, 促使细胞采用 HR 修复途径, 能够提高 HR 修复发生频率。Böttcher 等^[11]用 EEN 定点断裂果蝇(*Drosophila melanogaster*)细胞基因组, 通过 RNA 干扰(RNA inhibit, RNAi)瞬时抑制 *Lig4* 基因翻译, PCR 扩增短的左右同源臂(80nt 和 60nt)供体模板, 在药物筛选的细胞中, HR 效率达 50%。EEN 处理 *Lig4*^{-/-}突变体的果蝇胚胎^[12,13]及拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)^[14], 与野生型比较, HR 效率显著提高。调控制线虫(*Caenorhabditis elegans*)体细胞中的 Lig4 蛋白因子, 从而抑制 NHEJ, 使有机体修复 DSBs 途径转向 MMEJ^[15]。Bmku70 蛋白是 NHEJ 的必须因子, 敲除 *Bmku70* 基因的家蚕(*Bombyx mori linnaeus*)胚胎, 经显微注射 CRISPR/Cas9 系统质粒和供体模板, 与野生型家蚕胚胎比较, HR 效率更高^[16]。SCR7(5,6-bis(benzylideneamino)-2-mercapto-pyrimidin-4-ol)特异性同人类 Lig4 蛋白的 DNA 结合域(DNA binding domain, DBD)结合, 阻断了 Lig4 蛋白与 DNA 结合, 抑制 NHEJ 修复途径, 提高 HR 修复频率 4~5 倍^[17,18]。

目前的研究报道主要是关于细胞 DSBs 修复途径的关系和 NHEJ 修复途径的调控等方面的内容, 但未见关于调控绵羊细胞 DSBs 修复途径的报道。为了提高绵羊胚胎成纤维细胞的 HR 效率, 本文采用瞬时干扰绵羊 *Lig4* 基因表达、抑制绵羊胚胎成纤维细胞的 NHEJ 修复途径, 观察对细胞内 HR 修复途径产生影响, 以期对绵羊基因组精确编辑研究提供理论基础。

1 材料和方法

1.1 材料

pcDNA3.1⁺载体和 Stbl3 菌种购自 Invitrogen 公司, pMD18-T 购自 TaKaRa 公司, pDsRed2-N1 和 pEFGFP-N1 购自 Clontech 公司, HR 质粒由 Gorbunova 实验室惠赠^[19]。绵羊胚胎成纤维细胞由本实验室原代培养保存。

1.2 方法

1.2.1 引物设计

根据 GenBank 中预测的绵羊 *Lig4* 基因序列(XM_004012236)和 *GAPDH* 基因序列(NM_001289746.1)设计引物, 由上海生工生物工程技术有限公司合成。引物序列见表 1。

1.2.2 绵羊 *Lig4* 基因扩增及克隆

由于哺乳动物 *Lig4* 基因不含内含子^[20], 利用引物 Shlig4F/Shlig4R, 直接以绵羊基因组 DNA 为模板, PCR 扩增得到绵羊 *Lig4* 基因的编码序列。胶回收纯

化 PCR 产物, 用 pMD18-T 载体 16℃ 过夜连接, 连接产物转化 Stbl3 感受态细胞并接种于 Amp 抗性的 LB 平板, 挑取阳性克隆命名为 pMD18T-Shlig4, 由上海生工生物工程技术有限公司测序。以 pMD18T-Shlig4 为模板, 利用引物 Lig4F/Lig4R, PCR 扩增带有酶切位点的 *Lig4* 基因。PCR 产物和 pcDNA3.1⁺经 *Bam*H 和 *Xba* 双酶切, 切胶回收纯化目的片段, T4 连接酶 16℃ 过夜连接, 转化后接种 Amp 抗性的 LB 平板, 获得真核表达质粒 pcDNA3.1- Shlig4, 由上海生工生物工程技术有限公司测序。

1.2.3 siRNA 设计

针对绵羊 *Lig4* 基因编码序列的测序结果, 由上海吉玛制药技术有限公司设计合成 4 对 siRNA, 并提供针对小鼠 *Hsp72* 基因序列无关的阴性对照。具体信息见表 2。

1.2.4 绵羊胚胎成纤维细胞培养

选择妊娠 1 月龄新疆阿勒泰绵羊(*Altay oves*)的胎羊, 取肌肉组织剪切成小块, 按 0.5 cm 间距均匀

表 1 引物名称及序列

Table 1 PCR primer design and sequences

引物名称	序列(5' 3')	目的
ShLig4F	CTTCTATGGCTGCCTCACAAAC	从绵羊基因组中扩增 <i>Lig4</i> 基因
ShLig4R	GAAAGCTAGCTTCAAACCAATACTG	
Lig4F	CGCGGATCC ATGGCTGCCTCACAAACCTCACAGACT	构建表达载体
Lig4R	TGC TCTAGATCAAACCAATACTGATTTTCCT	
ShLig4RTF	TCTTCAGCTTATAACTCAGAGTTCAG	<i>Lig4</i> 基因定量
ShLig4RTR	TGTGGTGACATTATGCAACTCAGCAG	
GAPDHF	CTGACCTGCCGCCTGGAGAAA	<i>GAPDH</i> 基因定量
GAPDHR	GTAGAAGAGTGAGTGTCTGCTGTT	

注: 单下划线为 *Bam*H 酶切位点, 双下划线为 *Xba* 酶切位点。加粗字体为保护性碱基。

表 2 绵羊 *Lig4* 基因的 siRNA 序列信息

Table 2 siRNA sequences of sheep *Lig4* gene

编号	名称	序列(5' 3')	互补序列(5' 3')
SC	对照	UUCUCCGAACGUGUCACGTT	ACGUGACACGUUCGGAGAATT
Si-1	<i>Lig4</i> -siRNA-49	GCAGAUUUUAUGUUCGACUUTT	AAGUCGAACAUAAAUCUGCTT
Si-2	<i>Lig4</i> -siRNA-1132	GGACAUGAGACCCUGAGAATT	UUCUCAGGGUCUCAUGUCCTT
Si-3	<i>Lig4</i> -siRNA-1827	GCUCGCAUCCAAACACCUUTT	AAGGUGUUUGGAUGCGAGCTT
Si-4	<i>Lig4</i> -siRNA-2629	GCUAUUCGAAGGACUCUUAATT	UAAGAGUCCUUCGAAUAGCTT

种植于培养皿,待组织小块贴壁,加入培养液(Gibco 公司的 DMEM 高糖培养液+15%血清+1%双抗),置于 37℃、5%CO₂ 和完全饱和湿度条件下培养。3~4 d 换液 1 次,待原代细胞汇合成片,占培养皿的 80%~90%时,进行传代培养,获得绵羊胚胎成纤维细胞。收获细胞用 Gibco 胰酶替代物 TrypLE 消化,室温 2500 g 离心 5 min,收集绵羊胚胎成纤维细胞。

1.2.5 成纤维细胞电转染

电转液用 DEPC 处理的水配制。Solution I (10 mL): 2 g ATP-Na₂, 1.2 g MgCl₂·6H₂O; Solution II (500 mL): 6 g KH₂PO₄, 0.6 g NaHCO₃, 0.2 g C₆H₁₂O₆。加 Solution I,使用 0.2 μm 滤器过滤除菌,-20℃保存;Solution II 用 NaOH 调节 pH 值到 7.2,0.2 μm 滤器过滤除菌,4℃保存;用时将 Solution I 和 Solution II 按照 1:50 体积比混合^[21]。

待细胞生长至培养皿的 80% 时,消化收集 1.8×10⁶ 个细胞,100 μL 电转液悬浮(S1:S2=1:50),加入相应的 siRNA 和载体 DNA。将电击杯放置于电转仪(Amax Nucleofector II)的电击槽中,运行 CZ-167 电转程序,室温静置 10 min,混匀后铺于 6 cm 细胞培养皿中^[22]。9 h 细胞完全贴壁后,更换 1 次细胞培养液,72 h 收集细胞。

1.2.6 qRT-PCR

Trizol(15596-026, Invitrogen)试剂提取细胞总 RNA。cDNA 的制备按照 EasyScript 试剂盒说明操作(AT314,北京全式金生物技术有限公司)。反应结束后 cDNA 保存于-20℃。选用 GAPDH 为内参基因,以 ShLig4RTF/ShLig4RTR 和 GAPDHF/GAPDHR 为引物,根据实时荧光定量 PCR 试剂盒说明操作,扩增 Lig4 和 GAPDH 基因。qRT-PCR 反应体系为 20 μL,包括:2×qPCR Mix 10 μL,上下游引物各 0.4 μL,模板 cDNA 1 μL,去离子水 8.2 μL。扩增条件:95℃预变性 5 min;95℃ 5 s,60℃ 20 s,72℃ 20 s;在 72℃ 20 s 处收集荧光信号,共 45 个循环;扩增反应结束后,以 0.1℃/s 的速度进行溶解曲线分析。荧光定量 PCR 数据分析采用 2^{-ΔΔCt} 法,计算不同 siRNA 电转染后对绵羊胚胎成纤维细胞 Lig4 基因 mRNA 表达量的影响。利用 SPSS(18.0)软件对不同 siRNA 干扰绵羊胚胎成纤维细胞 Lig4 基因后,mRNA 表达量进行

单因素方差分析。

1.2.7 Western blotting

电转染细胞培养至 72 h,收集细胞,用哺乳动物蛋白(康为世纪)抽提试剂提取总蛋白,BCA 法测定蛋白含量,调整蛋白浓度,煮沸变性 5 min,12% SDS-PAGE 电泳后转印至 PVDF 膜,5% BSA 溶液 4℃ 过夜封闭,1:1000 稀释的 Lig4 抗体(GTX100100, GeneTex),室温孵育 4 h;1:5000 稀释的辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗(CW0103,康为世纪),室温孵育 1.5 h;洗膜后化学发光显色。内参对照为 GAPDH。

1.2.8 质粒重连法测定细胞内 HR 修复结果

由于绵羊胚胎成纤维细胞传代能力有限,建立稳定的克隆基本不可行。多篇文献采用质粒重连测试法(Plasmid rejoining assay),确定细胞采用不同途径修复 DSBs 的效率,已经在人类疾病生理方面取得有意义的研究结果^[10,23,24]。本文采用 HR 质粒重连测试法,定量检测绵羊胚胎成纤维细胞内采用 HR 修复途径重新连接 HR 载体的效率。

HR 质粒使用 GFP(green fluorescent protein)重构报告基因。该报告系统含有 2 段突变的 GFP 报告基因和 2 段 Pem1 基因的内含子,形成 2 个拷贝的 GFP-Pem1 片段。在第一拷贝的 GFP-Pem1 基因中,GFP 基因被 Pem1 基因的内含子分隔成 5'端和 3'端两部分外显子。其中 5'端的 GFP 基因有 22 bp 的缺失,并且插入两个反向对称的 I-Sce I 酶识别位点。这部分缺失确保 GFP 不能通过 NHEJ 发生重构。第二拷贝的 GFP-Pem1 基因片段缺少启动子、ATG 起始密码子和 GFP 的 3'端外显子。完整的 HR 质粒在细胞内呈现 GFP 阴性。当 I-Sce I 酶切线性化 HR 质粒后,产生不互补的粘性末端 DSBs。在细胞内,断裂的 HR 报告系统利用相连的供体同源 GFP 模板,经 HR 途径修复,在断裂位点发生同源序列重组,恢复 GFP 表达(图 1)。用流式细胞仪检测 GFP 阳性细胞,实现定量测定 HR 载体修复效率^[10,19]。

HR 质粒经 I-Sce I 酶线性化后,胶回收纯化。参考文献^[10,19,23]进行电转:2.0 μg 线性化的 HR 质粒,0.1 μg pDSRed2-N1,200 nmol/L siRNA。0.1 μg pDSRed2-N1 共转染,确定转染效率。收集 1.8×10⁶

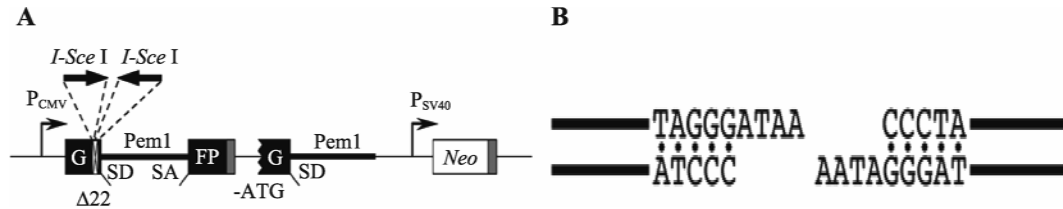


图1 HR修复途径的报告基因结构(A)和断裂DNA粘性末端(B)

Fig. 1 Report gene structure (A) and DNA sticky end (B) of HR repair pathways

细胞, 100 μ L 电转液悬浮, 加入相应的质粒和 siRNA, CZ-167 程序电转染, 每个实验处理 3 个平行样。分析采用绿色荧光细胞的百分比与红色荧光细胞百分比之间的比值来确定 HR 质粒重连修复效率。

1.2.9 流式细胞检测

电转染细胞后, 培养至 48~72 h, 使用荧光显微镜观察成纤维细胞 GFP 和 RFP(red fluorescent protein, RFP)表达。细胞培养 72 h, 收集细胞。重悬在 0.5 mL 的 PBS 中, 流式细胞仪分析(BDFACSAriaIII, FACSDiva Version 6.1.3)。FITC 通道检测绿色荧光细胞, PE 通道检测红色荧光细胞。每份样品细胞计数 10 000 个。

2 结果与分析

2.1 绵羊 *Lig4* 基因 CDS 序列扩增和克隆

以绵羊基因组 DNA 为模板, 引物 ShLig4F/ShLig4R PCR 扩增, 得到 2736 bp 的 *Lig4* 基因。克隆至 pMD18-T 载体, 引物 ShLig4RTF/ShLig4RTR PCR 检测, 得到 250 bp 的目的条带, 确定获得阳性克隆。

构建 pMD18T-Shlig4 和 pcDNA3.1-Shlig4 质粒, 经测序, 绵羊 *Lig4* 基因的 CDS 序列全长 2736 bp, 编码 911 个氨基酸。序列提交至 NCBI, GenBank 收录号为 KT180155.1。

2.2 siRNA 干扰绵羊 *Lig4* 基因表达的 qRT-PCR 结果

绵羊成纤维细胞电转 siRNA 后, 培养 60 h 提取 RNA, qRT-PCR 检测 *Lig4* 基因的 mRNA 表达量(图 2)。以同批次正常绵羊胚胎成纤维细胞 *Lig4* 基因表达水平为 1, qRT-PCR 结果显示, 电转染的空白细胞(KC)和电转质粒 pDSRed2-N1(RFP)、对照 siRNA

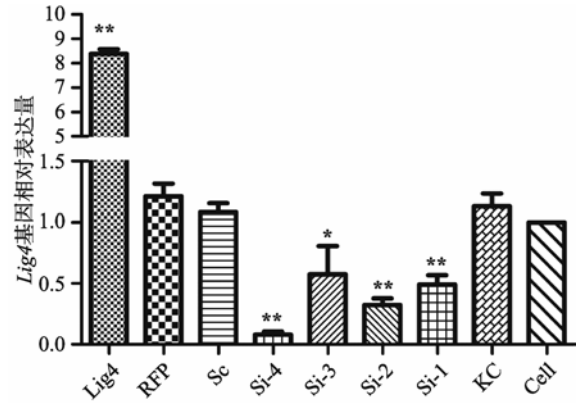


图2 qRT-PCR 检测 *Lig4* mRNA 在各组细胞中的表达

Fig. 2 *Lig4* mRNA level in cells of each group detected by qRT-PCR

Lig4: pcDNA3.1-Lig4; RFP: pDSRed2-N1; Sc: 对照 siRNA; Si-4: Lig4-siRNA-2629; Si-3: Lig4-siRNA-1827; Si-2: Lig4-siRNA-1132; Si-1: Lig4-siRNA-49; KC: 空白细胞电转; Cell: 正常细胞。(n=3 个重复, * $P<0.05$; ** $P<0.01$).

(Sc)的细胞 *Lig4* 基因的表达量都略高于正常细胞。siRNA 干扰后, *Lig4* 基因 mRNA 的表达量明显低于正常细胞。其中 Lig4-siRNA-1132 和 Lig4-siRNA-2629 干扰效果比较理想。

2.3 siRNA 干扰绵羊 *Lig4* 基因表达的 Western blotting 结果

为验证 siRNA 干扰后 *Lig4* 蛋白的表达情况, 根据 qRT-PCR 实验结果, 选取 Lig4-siRNA-1132 和 Lig4-siRNA-2629 干扰组和对照组细胞样品抽提蛋白。Western blotting 结果(图 3)显示, 针对绵羊 *Lig4* 基因设计的 siRNA(Lig4-siRNA-2629 和 Lig4-siRNA-1132), 电转染绵羊成纤维细胞后, *Lig4* 蛋白表达量明显低于其他实验处理的细胞样品。说明 Lig4-siRNA-2629 和 Lig4-siRNA-1132 能够有效抑制绵羊 *Lig4* 基因表达。电转质粒 pDSRed2-N1、空白对照

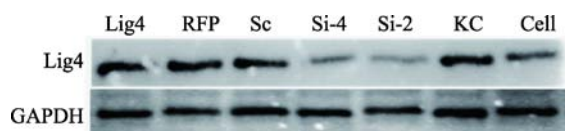


图 3 Western blotting 检测各组细胞中 Lig4 蛋白的表达
Fig. 3 Protein level of Lig4 in cells of each group detected by Western blotting

Lig4 : pcDNA3.1-Lig4 ; RFP : pDSRed2-N1 ; Sc : 对照 siRNA ; Si-4 : Lig4-siRNA-2629 ; Si-2 : Lig4-siRNA-1132 ; KC : 空白细胞电转 ; Cell : 正常细胞。

siRNA、空白电转细胞的 Lig4 蛋白表达都略高于正常细胞,与 qRT-PCR 结果一致。pcDNA3.1-Lig4 过表达细胞中, *Lig4* 基因 mRNA 表达量很高,而蛋白表达量只略高于正常细胞,可能为细胞选择性翻译的结果。

2.4 质粒重连 HR 载体荧光显微镜观测结果

根据 qRT-PCR 和 Western blotting 结果,选取有效抑制绵羊 *Lig4* 基因表达的两个 siRNA(Lig4-

siRNA-2629 和 Lig4-siRNA-1132),与线性化的 HR 质粒和 pDSRed2-N1 共转染绵羊胚胎成纤维细胞,观察 HR 质粒重连效果。结果显示,绵羊胚胎成纤维细胞电转线性化的 HR 质粒和 pDSRed2-N1,培养 36 h,即可观察到红色荧光细胞。培养 48 h,观察到绿色荧光细胞,说明 *I-Sce I* 酶线性化的 HR 质粒在绵羊胚胎成纤维细胞内,通过 HR 修复途径实现重连。电转染细胞培养至 72 h, siRNA 干扰实验组细胞荧光表达与对照组一样,在同一视野、不同光源的荧光显微镜下观察,能够观察到对应的报告蛋白表达细胞(图 4)。

2.5 流式细胞检测结果

流式细胞仪检测 HR 质粒重连效率 结果显示, siRNA 干扰组、siRNA 对照组和细胞对照组之间差异显著(图 5E)。说明 siRNA 瞬间干扰绵羊 *Lig4* 基因的表达,HR 质粒重连效率增加 3~4 倍。

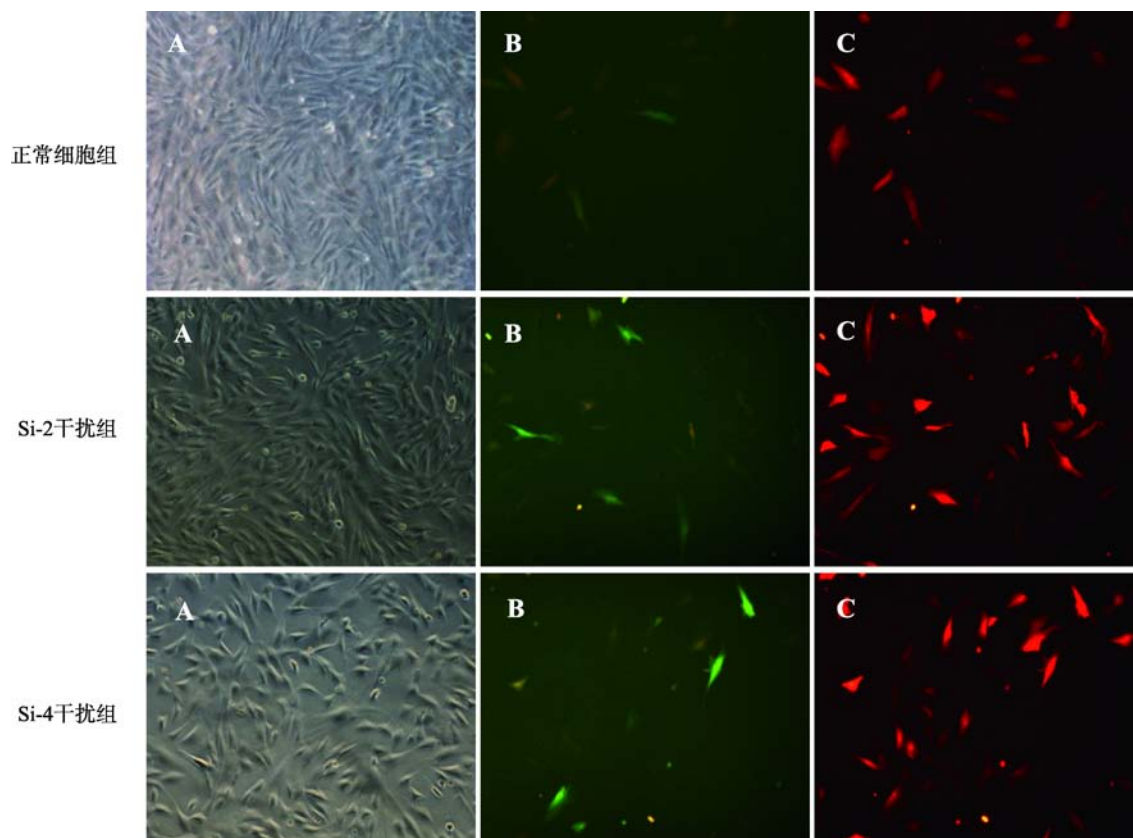


图 4 细胞内 HR 载体修复重连荧光成像

Fig. 4 The fluorescence images after rejoining linearized HR vector in cells

A : 白光 ; B : 绿色荧光光源,粉色细胞是 GFP 和 RFP 共表达细胞呈现的颜色 ; C : 红色荧光光源。Si-2 : Lig4-siRNA-1132+HR+Red ; Si-4 : Lig4-siRNA-2629+HR+Red。

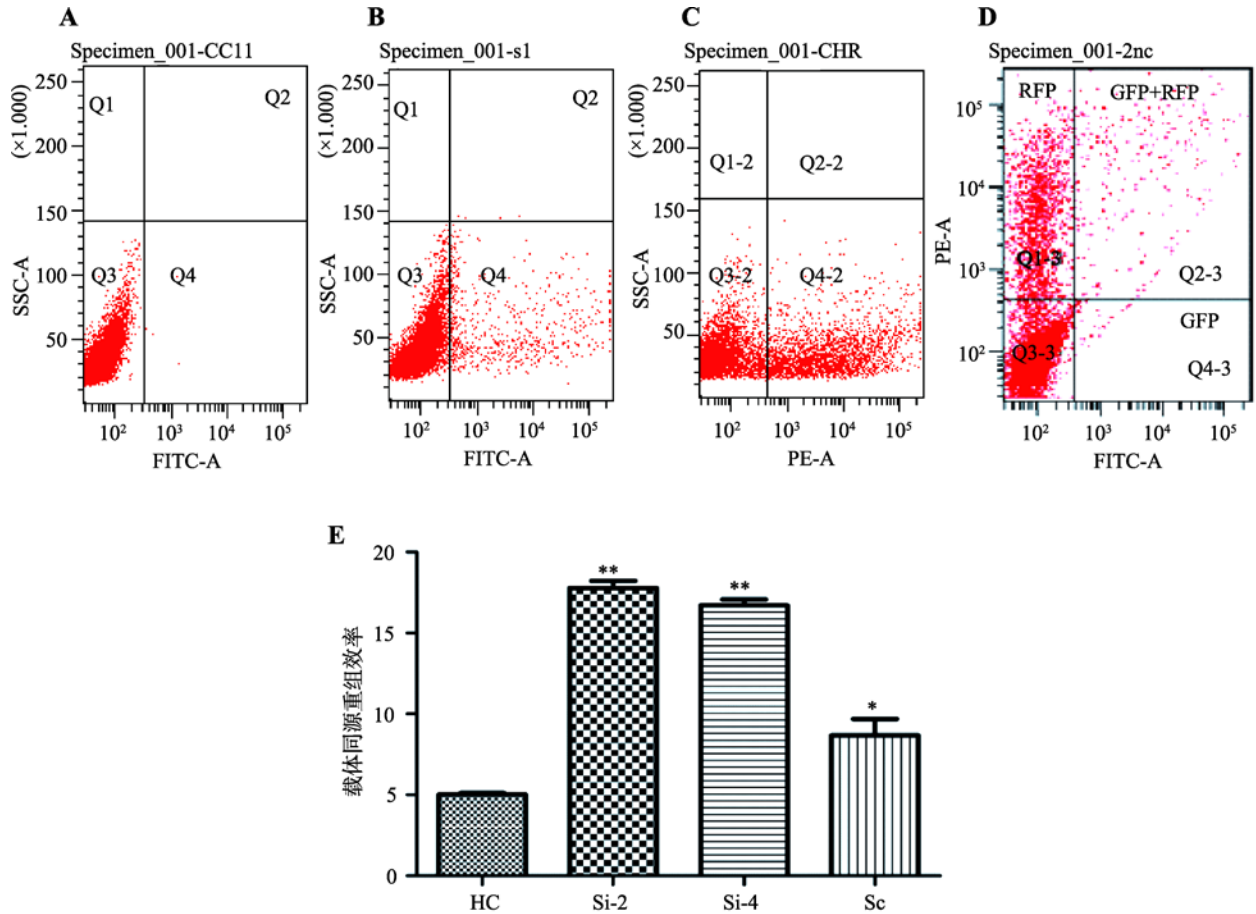


图5 流式细胞仪检测 HR 载体重连修复效率

Fig. 5 Calibration of the parameters for FACS analysis and efficiency of rejoining linearized HR vector

A: 空白细胞; B: GFP 单阳性; C: RFP 单阳性细胞; D: GFP+RFP 混合细胞; E: HR 载体重连修复效率图, HC: HR+Red; Si-2: Lig4-siRNA-1132+HR+Red; Si-4: Lig4-siRNA-2629+HR+Red; Sc: 对照 siRNA+HR+Red。(n=3 个重复, * $P<0.05$; ** $P<0.01$)

3 讨论

动物细胞修复 DSBs 有 3 种主要修复途径: NHEJ、HR 和 MMEJ^[9,25,26]。NHEJ 不需要任何同源模板, 是一条简单快捷的 DSBs 修复途径, 在整个细胞周期都有活性^[24]。同 NHEJ 相比, HR 和 MMEJ 是少且慢的 DSB 修复途径, 发生在细胞周期的 S 和 G₂ 期^[24,25]。NHEJ 和 HR 途径呈现相互抑制现象^[9,25,26]。如果 NHEJ 发生故障, 将迫使细胞剪切 DNA 末端, 采用慢且复杂的 HR 或 MMEJ 修复 DSBs^[26,27]。动物细胞修复 DSBs 的 3 条主要途径: NHEJ、HR 和 MMEJ, 呈现互补竞争关系。因此, 抑制 NHEJ 将刺激细胞选用 HR 修复途径。

NHEJ 修复途径中的 Lig4 蛋白是 ATP 依赖的

DNA 连接酶, 负责封闭 DSBs 末端, 是 NHEJ 途径必需的因子^[20]。抑制或敲除 *Lig4* 基因, 会促使细胞采用 HR 修复 DSBs, 增加 HR 修复的频率^[11~15,17,18]。*Lig4* 基因敲除的果蝇能够正常生存, 但小鼠 *Lig4* 基因敲除表现为胚胎致死^[20]。RNAi 能够有效降低 *Lig4* 基因翻译, 瞬间抑制 Lig4 蛋白。针对绵羊 *Lig4* 基因序列设计合成 siRNA, 电转染绵羊胚胎成纤维细胞, 荧光定量 PCR 和 Western blotting 分析检测, 确定获得两个 siRNA, 有效抑制绵羊 *Lig4* 基因表达。为研究调控绵羊 *Lig4* 基因和 DSBs 修复途径提供了基础。

多篇文献采用质粒重连测试法检测细胞内不同 DSBs 修复途径^[10,21,23,24,27], 以绿色荧光蛋白为报告基因, 通过在报告基因中引入大范围核酸酶(如 *I-SceI*)切点, 构建不同修复途径检测载体。Gorb-

unova 实验室定量研究 NHEJ 和 HR 修复途径, 获得细胞老龄化状态不同, 对基因组 DSBs 修复结果不同^[23]; 人类体细胞修复 DSBs, 主要采用 NHEJ 途径, 而且在细胞周期各个阶段都可以使用 NHEJ^[25]; HR 修复主要发生在 S 期^[23]。Yang 等^[27]使用 Gorbunova 实验室惠赠的 NHEJ 和 HR 质粒, 检测人多能干细胞 HR 修复途径, 得到 G₂/M 期多能干细胞采用 HR 途径修复基因比 G₁ 期高 6 倍。本研究利用 Gorbunova 实验室惠赠的 HR 质粒, 电转绵羊成纤维细胞, 通过荧光显微镜观察, 确定该检测系统在绵羊成纤维细胞中能够正常重连表达(图 4B)。通过流式细胞仪检测分析, 确定利用 siRNA 干扰抑制绵羊成纤维细胞 *Lig4* 基因, 降低 *Lig4* 蛋白表达量, 提高线性化的 HR 载体的重连效率, 说明在绵羊成纤维细胞中, 抑制 NHEJ 修复途径 将促使细胞采用 HR 途径修复 DSBs。

哺乳动物 *Lig4* 蛋白的氨基酸序列高度保守。分析 NCBI 有关绵羊 *Lig4* 基因预测序列数据(GI:426-236658、GI:509131157 和绵羊基因组 ISGC Oar_v3.1/oviAri3), 结合哺乳动物的 *Lig4* 基因 cDNA 序列不含内含子^[20], 设计引物, 直接从绵羊基因组中, PCR 扩增获得绵羊 *Lig4* 基因的 CDS 序列(KT180155), 测序比对人 *Lig4*(GI:46255050), 同源性 85.27%。将绵羊 *Lig4* 基因翻译成氨基酸序列, 同人类 *Lig4* 蛋白序列(GI:22766796)比对, 同源性 88.80%。实验确定了绵羊 *Lig4* 的氨基酸序列, 为使用小分子物质调控绵羊 *Lig4* 蛋白功能提供了研究基础。

基因打靶技术以 HR 为基础, 是一种定向改变生物活体遗传信息的实验手段, 促进了生物学研究。正常哺乳动物细胞发生 HR 的概率极低, 造成基因打靶效率极低(10^{-6})。siRNA 抑制绵羊成纤维细胞 *Lig4* 基因表达, 提高 HR 途径修复 HR 载体的重连概率, 为提高绵羊胚胎成纤维细胞基因打靶效率奠定基础。

参考文献(References):

- [1] Shen Y, Xiao A, Huang P, Wang WY, Zhu ZY, Zhang B. TALE nuclease engineering and targeted genome modification. *Hereditas (Beijing)*, 2013, 35(4): 395–409.
- [2] 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]
- [3] Zhou JW, Xu QP, Yao J, Yu SM, Cao SZ. CRISPR/Cas9 genome editing technique and its application in site-directed genome modification of animals. *Hereditas (Beijing)*, 2015, 37(10): 1011–1020.
- [4] Wang QH, Huai C, Sun RL, Zhuang H, Chen HY, Fei J, Lu DR. A quick and efficient method to generate hemophilia B mouse models by the CRISPR/Cas system. *Hereditas (Beijing)*, 2015, 37(11): 1143–1148.
- [5] Sakuma T, Nakade S, Sakane Y, Suzuki KT, Yamamoto T. MMEJ-assisted gene knock-in using TALENs and CRISPR-Cas9 with the PITCH systems. *Nat Protoc*, 2016, 11(1): 118–133. [DOI]
- [6] Zu Y, Tong XJ, Wang ZX, Liu D, Pan RC, Li Z, Hu YY, Luo Z, Huang P, Wu Q, Zhu ZY, Zhang B, Lin S. TALEN-mediated precise genome modification by homologous recombination in zebrafish. *Nat Methods*, 2013, 10(4): 329–331. [DOI]
- [7] Li HL, Fujimoto N, Sasakawa N, Shirai S, Ohkame T, Sakuma T, Tanaka M, Amano N, Watanabe A, Sakurai H, Yamamoto T, Yamanaka S, Hotta A. Precise correction of the Dystrophin gene in Duchenne Muscular Dystrophy patient induced pluripotent stem cells by TALEN and CRISPR-Cas9. *Stem Cell Rep*, 2015, 4(1): 143–154. [DOI]
- [8] Zhou YX, Zhu SY, Cai CZ, Yuan PF, Li CM, Huang YY, Wei WS. High-throughput screening of a CRISPR/Cas9 library for functional genomics in human cells. *Nature*, 2014, 509(7501): 487–491. [DOI]
- [9] Kim HS, Hromas R, Lee SH. Emerging features of DNA double-strand break repair in humans. In: Chen C, ed. New research directions in DNA repair. INTECH, 2013: 187–211. [DOI]
- [10] Mao ZY, Bozzella M, Seluanov A, Gorbunova V. DNA repair by nonhomologous end joining and homologous recombination during cell cycle in human cells. *Cell Cycle*, 2008, 7(18): 2902–2906. [DOI]
- [11] Böttcher R, Hollmann M, Merk K, Nitschko V, Obermaier

- C, Philippou-Massier J, Wieland I, Gaul U, Förstemann K. Efficient chromosomal gene modification with CRISPR/Cas9 and PCR-based homologous recombination donors in cultured *Drosophila* cells. *Nucleic Acids Res*, 2014, 42(11): e89. [DOI]
- [12] Beumer KJ, Trautman JK, Bozas A, Liu JL, Rutter J, Gall JG, Carroll D. Efficient gene targeting in *Drosophila* by direct embryo injection with zinc-finger nucleases. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(50): 19821–19826. [DOI]
- [13] Bozas A, Beumer KJ, Trautman JK, Carroll D. Genetic analysis of zinc-finger nuclease-induced gene targeting in *Drosophila*. *Genetics*, 2009, 182(3): 641–651. [DOI]
- [14] Qi YP, Zhang Y, Zhang F, Baller JA, Cleland SC, Ryu Y, Starker CG, Voytas DF. Increasing frequencies of site-specific mutagenesis and gene targeting in *Arabidopsis* by manipulating DNA repair pathways. *Genome Res*, 2013, 23(3): 547–554. [DOI]
- [15] Morton J, Davis MW, Jorgensen EM, Carroll D. Induction and repair of zinc-finger nuclease-targeted double-strand breaks in *Caenorhabditis elegans* somatic cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(44): 16370–16375. [DOI]
- [16] Ma SY, Chang JS, Wang XG, Liu YY, Zhang JD, Lu W, Gao J, Shi R, Zhao P, Xia QY. CRISPR/Cas9 mediated multiplex genome editing and heritable mutagenesis of *BmKu70* in *Bombyx mori*. *Sci Rep*, 2014, 4: 4489. [DOI]
- [17] Chu VT, Weber T, Wefers B, Wurst W, Sander S, Rajewsky K, Kühn R. Increasing the efficiency of homology-directed repair for CRISPR-Cas9-induced precise gene editing in mammalian cells. *Nat Biotechnol*, 2015, 33(5): 543–548. [DOI]
- [18] Maruyama T, Dougan SK, Truttmann MC, Bilate AM, Ingram JR, Ploegh HL. Increasing the efficiency of precise genome editing with CRISPR-Cas9 by inhibition of non-homologous end joining. *Nat Biotechnol*, 2015, 33(5): 538–542. [DOI]
- [19] Seluanov A, Mao ZY, Gorbunova V. Analysis of DNA double-strand break (DSB) repair in mammalian cells. *J Vis Exp*, 2010, (43): e2002. [DOI]
- [20] Barnes DE, Stamp G, Rosewell I, Denzel A, Lindahl T. Targeted disruption of the gene encoding DNA ligase IV leads to lethality in embryonic mice. *Curr Biol*, 1998, 8(25): 1395–1398. [DOI]
- [21] Vriend LE, Jasin M, Krawczyk PM. Assaying break and nick-induced homologous recombination in mammalian cells using the DR-GFP reporter and Cas9 nucleases. *Methods Enzymol*, 2014, 546: 175–191. [DOI]
- [22] Li WJ, Yang J, Wang CH, Luo J, Zhou P, Huang W, Yao JL, He GM, Pi WH. Optimization of an electrotransfer solution-L for *Ovis Aries* fibroblasts. *Xinjiang Agricultural Sciences*, 2015, 52(8): 1481–1485.
- 李炜杰, 杨娇, 王聪慧, 罗健, 周平, 黄威, 姚建龙, 何高明, 皮文辉. 电转液 L 对绵羊成纤维细胞电转染条件优化. *新疆农业科学*, 2015, 52(8): 1481–1485. [DOI]
- [23] Seluanov A, Mittelman D, Pereira-Smith OM, Wilson JH, Gorbunova V. DNA end joining becomes less efficient and more error-prone during cellular senescence. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(20): 7624–7629. [DOI]
- [24] Taleei R, Nikjoo H. Biochemical DSB-repair model for mammalian cells in G1 and early S phases of the cell cycle. *Mutat Res*, 2013, 756(1–2): 206–212. [DOI]
- [25] Gomez-Cabello D, Jimeno S, Fernández-Ávila MJ, Huetas P. New tools to study DNA double-strand break repair pathway choice. *PLoS One*, 2013, 8(10): e77206. [DOI]
- [26] Kurosawa A, Saito S, So S, Hashimoto M, Iwabuchi K, Watabe H, Adachi N. DNA ligase IV and Artemis act cooperatively to suppress homologous recombination in human cells: implications for DNA double-strand break repair. *PLoS One*, 2013, 8(8): e72253. [DOI]
- [27] Yang D, Scavuzzo MA, Chmielowiec J, Sharp R, Bajic A, Borowiak M. Enrichment of G2/M cell cycle phase in human pluripotent stem cells enhances HDR-mediated gene repair with customizable endonucleases. *Sci Rep*, 2016, 6: 21264. [DOI]

(责任编辑: 李明洲)