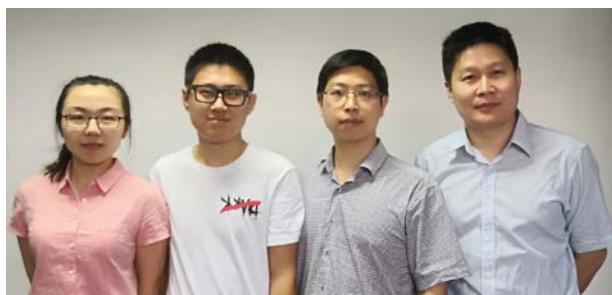


高效特异的 CRISPR/dCas9 转录激活系统——flySAM 系统

贾豫, 徐荣刚, 孙锦, 倪建泉

清华大学医学院基因表达与调控实验室, 北京 100084



左起: 贾豫(博士研究生),

徐荣刚(博士研究生), 孙锦(博士后), 倪建泉(教授)

随着人类等物种的基因组计划的完成, 关于基因组的研究已经从结构基因组学转向了功能基因组学。将基因组的序列信息转化为功能信息, 解密生命的密码, 完成基因组的功能注释对于全面理解生长发育、疾病衰老、学习记忆等过程具有重大意义。黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*)具有易于饲养、生命周期短、繁殖能力强、染色体简单等诸多优点, 因此成为科研领域最为经典、最为重要的模式生物之一。更为重要的是, 果蝇基因高度保守且与人类基因同源性高, 80%以上果蝇基因与人类基因同源, 60%以上人类致病基因都存在果蝇中。利用果蝇的遗传技术, 可以方便地研究基因功能。据文献报道, 许多重要基因编码的蛋白质(如 polycomb、HP1 等)和重要的细胞信号通路(如 Hh、Toll 等)就是首先在果蝇中发现, 随后在其他模式动物和人类中被发现而且发挥同样功能。因此, 果蝇上的研究成果可供对人类疾病的相关研究借鉴参考, 同时还摆脱了伦理方面的限制。

研究基因的功能主要通过降低基因表达(loss-of-function, LOF)和增强基因表达(gain-of-function, GOF)来实现。对于 LOF, 本实验室在果蝇中开发并优化了基于 CRISPR/Cas9 系统的基因组定点编辑技术, 构建了在生殖细胞中稳定表达 Cas9 的转基因果蝇品系, 因此直接注射表达 sgRNA 的质粒就能实现果蝇体内高效的可遗传靶基因突变, 该项研究成果分别于 2013 年 11 月 19 日和 2014 年 11 月 6 日发表在 *Proc Natl Acad Sci USA*(doi: 10.1073/pnas.1318481110)和 *Cell Reports*(doi: 10.1016/j.celrep.2014.09.044)。此外, 果蝇中较为成熟的转基因 RNAi 技术, 具有操作简单、适合大规模筛选、可实现在

特定组织器官、发育阶段敲低目的基因表达等优点, 是研究基因功能的重要手段。在三代转基因 RNAi 技术的基础上, 本实验室成功开发了新一代的转基因 RNAi 技术, 干扰效率高、特异性强、毒副作用小, 能够高效地敲低各种基因, 并且首次突破性实现了多个基因的同时干扰, 该项技术已获得国家发明专利(专利号: ZL2014103107462.2)。相比于多样的 LOF 方法, GOF 的手段在果蝇中的应用较为有限, 主要通过果蝇体内表达由外源载体携带的目的基因编码序列(cDNA), 来实现特定基因的过量表达, 但是其目的基因的克隆步骤繁琐, 不能模拟基因自身的表达模式, 尤其是对多剪切形式的基因, 容易出现假阳性结果, 而且不能同时过表达多个基因。更为重要的是, 这种方式无法实现大规模的构建, 阻碍了基因组范围的基因 GOF 的功能筛选。

CRISPR/Cas9 基因编辑系统包括 sgRNA 和 Cas9 蛋白两个核心元件, sgRNA 可以引导 Cas9 蛋白到达特定的靶标区域, Cas9 具有核酸酶的作用, 有两个负责切割 DNA 双链的结构域: HNH 和 RuvC, 可以切割特定 DNA 双链。将这两个结构域定点突变(D10A 和 H480A)后形成 dCas9(nuclease-null Cas9), dCas9 仍然可以识别并结合双链 DNA, 但不对其进行切割。如果在 dCas9 的 C 端融合适当的转录激活结构域, 在特定 sgRNA 的协助下, dCas9 蛋白和转录激活结构域的复合物可以结合到目的基因的启动子区域, 从而实现基因原位的转录激活。这种 CRISPR/dCas9 转录激活系统仅需在 dCas9 转录激活复合物背景下, 引入一个或几个 sgRNA 载体即可, 因此适合大规模、高通量的操作, 而且这种原位激活基因表达的模式更接近自身基因, 受空间和时序调控。

为在果蝇体内开发 CRISPR/dCas9 介导的转录激活系统, 本实验室首先在果蝇体内开发了采用 dCas9-VPR 的转录激活系统, 将 3 个不同转录激活因子串联在 dCas9 上, 在两个或两个以上 sgRNA 引导下, 原位激活果蝇体内目的基因的表达并产生相应的表型, 为果蝇体内 GOF 的研究提供了重要的技术支持。该方法于 2017 年 8 月发表于 *Proc Natl Acad Sci USA* (doi: 10.1073/pnas.1707635114)。尽管这一系统可以激活目的基因转录而产生表型, 但是其激活效果仍然较低, 需要两个或两个以上 sgRNA 才能实现转录激活, 增加了系统的成本和构建载体复杂性。另外, 这个系统需要 3 个独立的元件, Gal4、UAS: dCas9-VPR 和 sgRNA, 使用时需要复杂的遗传整合。

为解决上述问题并进一步提高激活效率, 本实验室通过 Gal4/UAS 系统表达 dCas9 转录激活复合体, 在 Cas9 的 C 端融合了转录激活结构域 VP64, 同时巧妙地利用 T2A 自剪切多肽介导 dCas9-VP64 和 MCP-p65-HSF1 两个转录激活结构域的表达, 构建了 flySAM 系统。结果显示, 该系统只需要一个 sgRNA 就可以特异高效地激活目的基因, 产生比 dCas9-VPR 系统更强的表型(图 1: A 和 B), 且与传统 UAS-cDNA 的方式效率相当。此外, 该系统还可以通过同时表达不同的 sgRNA 来激活多个基因的表达, 首次实现了多基因同时显现表型, 为研究蛋白

质复合物以及功能冗余基因的功能提供了一套强有力的技术手段。与此同时, 本实验室将 flySAM 系统的两个元件: UAS: dCas9-activator 和 sgRNA 整合成为一个载体 flySAM2.0。通过验证, flySAM2.0 不仅具有 flySAM 系统的全部优点, 而且由于 dCas9 和 sgRNA 在一个载体上, 效率更高。注射该载体得到的转基因果蝇, 只需一步杂交, 例如与不同的 Gal4 工具果蝇进行一次遗传杂交就可以实现对目的基因的转录激活(图 2), 也可以调控多个基因并进行嵌合体分析(图 3), 比如一个组织中, 只有部分细胞的基因被激活, 用来研究基因被激活细胞和野生型细胞之间的相互作用。目前, 以 flySAM2.0 系统为基础的基因组范围的转基因转录激活资源库正在构建中, 这将是世界上第一个果蝇转基因过表达资源库, 实现全基因组范围的 GOF 功能筛选, 这一品系资源库将为整个果蝇研究领域提供重要的实验材料, 推动整个研究领域的快速发展。研究成果于 2018 年 5 月 1 日在线发表于 *Proc Natl Acad Sci USA* (doi: 10.1073/pnas.1800677115)。清华大学医学院倪建泉教授为本文的通讯作者, 课题组贾豫博士、徐荣刚博士、孙锦博士后并列该文第一作者。该研究得到了国家自然科学基金(31571320)、国家科技支撑计划(2015BAI09B03)和政府间国际科技创新合作重点专项(2016YFE0113700)等项目的资助。

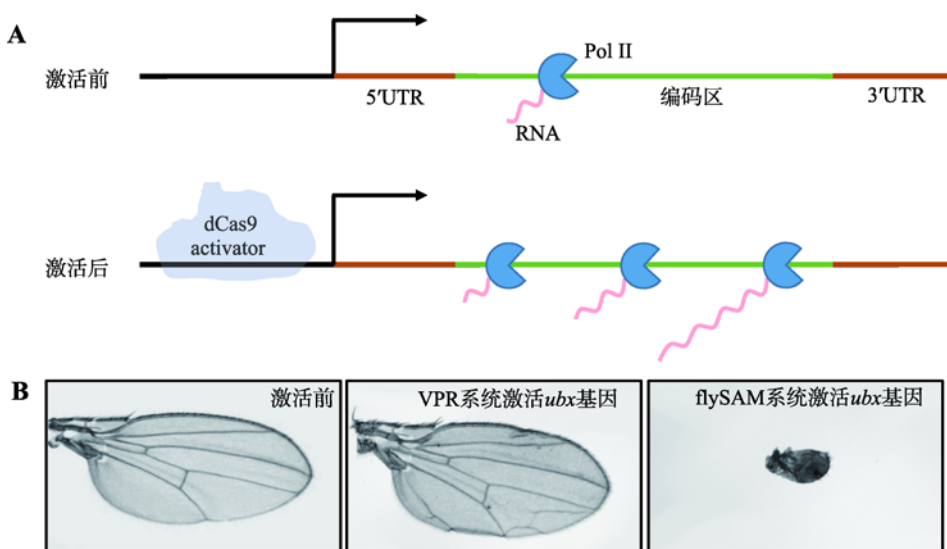


图 1 flySAM 系统激活方式与效果图

Fig. 1 The mechanism and efficacy of flySAM

A: sgRNA 引导 dCas9 转录激活因子到达目的基因的上游调控区域, 大大提高了目的基因的转录; B: flySAM 系统在翅膀中的工作效果, flySAM 只需要一个 sgRNA 就可以特异高效地激活目的基因, 并产生比 dCas9-VPR 系统更强的表型。

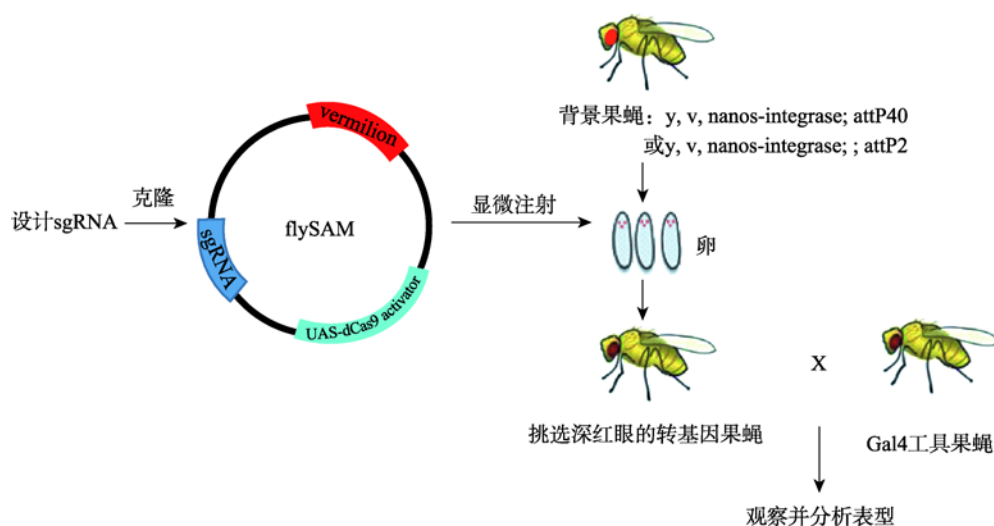


图 2 flySAM 系统构建与激活目的基因流程

Fig. 2 The workflow of flySAM system

首先, 针对目的基因设计特异的 sgRNA, 并将其克隆到 flySAM 的载体。随后将载体显微注射到背景果蝇的卵中(2 号染色体选择 attP40, 3 号染色体选择 attP2)。在果蝇羽化之后, 挑选深红眼的转基因果蝇。最后通过与组织器官特异的 Gal4 工具果蝇杂交, 观察并分析表现。

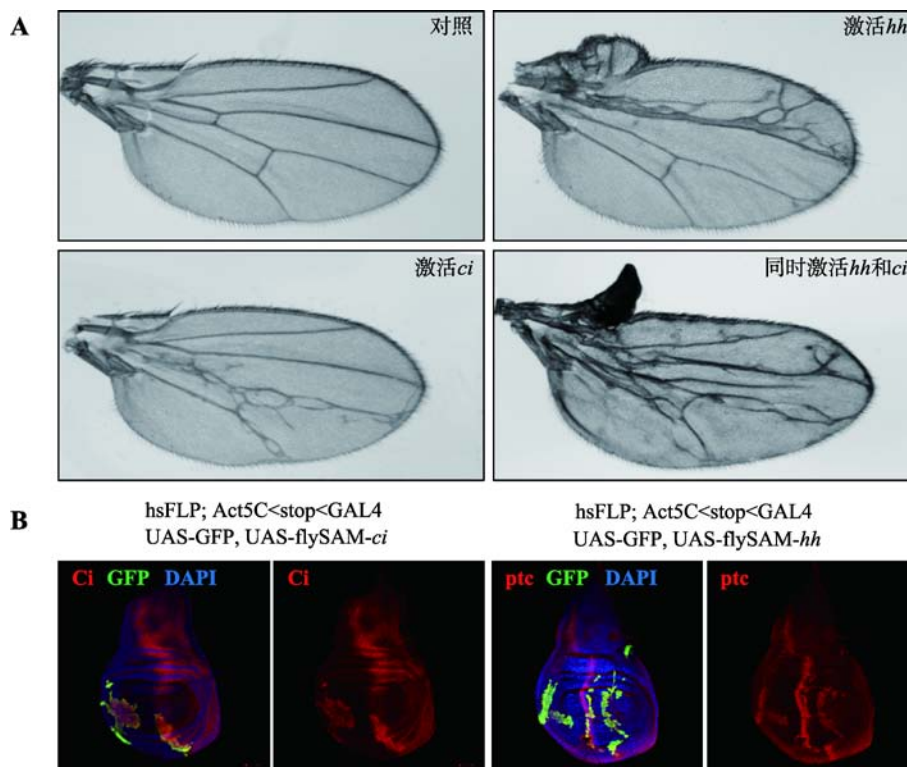


图 3 flySAM 系统首次具有同时激活多个基因, 构建多基因激活嵌合体的能力

Fig. 3 flySAM system not only successfully activates multiple genes simultaneously, but also can easily generate mosaic

A: flySAM 系统同时激活 hh 和 ci 并产生相应的表型; B: 利用 FLP-out Gal4 系统在三龄幼虫的翅膀 discs 中进行 ci 和 hh 的嵌合体分析。