

利用 CRISPR/Cas9 系统构建人 *HPRT1* 基因定点突变细胞株

张楷, 刘蔚, 刘小凤, 陈瑶生, 刘小红, 何祖勇

中山大学生命科学学院, 有害生物控制与资源利用国家重点实验室, 广州 510006

摘要: Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase1 (*HPRT1*) 基因突变会导致次黄嘌呤和鸟嘌呤代谢异常, 严重的代谢障碍被称为 Lesch-Nyhan 综合征, 表现为智力低下, 行为上出现强迫性自我毁伤, 并伴随痛风或肾结石等症状。*HPRT1* 基因具有多种突变模式, 近年来对其突变谱的研究表明该基因具有一些“突变热点”。本研究选取了导致翻译提前终止的热点突变 c.508C>T 突变和 c.151C>T 突变, 在 HEK293T 和 HeLa 细胞中, 以单链寡核苷酸(single-stranded oligo-deoxyribonucleotides, ssODN)作为同源重组模板, 利用 CRISPR/Cas9 技术构建了这两种突变的单克隆细胞株, 发生定点突变的效率分别为 16.3% 和 10%。进一步通过 Western blot 检测点突变的单克隆细胞的 *HPRT1* 蛋白表达水平, 通过 6-TG 毒性实验检测点突变的单克隆细胞的次黄嘌呤/鸟嘌呤磷酸核糖转移酶活性, 结果表明纯合突变的单细胞克隆不能正常表达 *HPRT1* 蛋白, 其次黄嘌呤/鸟嘌呤磷酸核糖转移酶活性丧失; 杂合突变的单细胞克隆的 *HPRT1* 蛋白表达量降低, 仍具有部分次黄嘌呤/鸟嘌呤磷酸核糖转移酶活性。*HPRT1* 基因定点突变细胞模型的建立可为今后建立其他 *HPRT1* 基因突变的细胞系或动物模型提供借鉴, 为研究 Lesch-Nyhan 致病机制提供基础。

关键词: CRISPR/Cas9; *HPRT1*; 基因定点突变

Generation of cell strains containing point mutations in *HPRT1* by CRISPR/Cas9

Kai Zhang, Wei Liu, Xiaofeng Liu, Yaosheng Chen, Xiaohong Liu, Zuyong He

State Key Laboratory of Biocontrol, School of Life Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510006, China

Abstract: Mutations in Hypoxanthine-guanine Phosphoribosyltransferase1 (*HPRT1*) gene can lead to metabolic disorder of hypoxanthine and guanine metabolism, and other severe symptoms such as hypophrenia, gout, and kidney stones, called

收稿日期: 2019-05-27; 修回日期: 2019-06-28

基金项目: 国家转基因生物新品种培育重大专项(编号: 2016ZX08006003-006)和广东省重点领域研发计划项目(编号: 2018B020203003)资助

[Supported by the National Transgenic Major Program (No. 2016ZX08006003-006) and the Key R&D Program of Guangdong Province (No. 2018B020203003)]

作者简介: 张楷, 硕士研究生, 专业方向: 生物化学与分子生物学。E-mail: zhangk48@mail2.sysu.edu.cn

刘蔚, 硕士研究生, 专业方向: 生物化学与分子生物学。E-mail: 1119035661@qq.com

张楷和刘蔚并列第一作者。

通讯作者: 何祖勇, 博士, 副教授, 研究方向: 动物遗传与育种。E-mail: zuyonghe@foxmail.com

DOI: 10.16288/j.ycz.19-108

网络出版时间: 2019/7/9 17:03:42

URI: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20190709.1702.002.html>

the Lesch-Nyhan disease (LND). Although the mutations are widely distributed throughout the *HPRT1* gene, there are some isolated hot spots. In this study, we aim to introduce two previously reported hot spots, c.508 C>T and c.151 C>T, which could lead to premature translational termination in *HPRT1* gene. Through CRISPR/Cas9 mediated homology-directed repair (HDR) by using single-stranded oligo-deoxyribonucleotides (ssODN) as donor template, we obtained cell clones containing these two mutations in HEK293T or HeLa cells. Targeted mutation of c.508 C>T and c.151 C>T reached to 16.3% and 10%, respectively. We further detect HPRT1 protein levels with Western blot and enzyme activity with 6-TG in 5 different cell clones. HPRT1 protein and its enzymatic activity both was hardly detected in homozygous mutant cells, while reduced HPRT1 protein expression and enzymatic activity was detected in heterozygous mutant cells. Our study will be beneficial to those who working on generation of cell or animal models of HRPT1 mutations, and provides a basis for further investigations on the genetic mechanism of Lesch-Nyhan disease.

Keywords: CRISPR/Cas9; *HPRT1*; site-directed mutagenesis

CRISPR/Cas9 基因编辑系统自问世以来获得了举世瞩目的关注与飞速的发展,被广泛地应用到多个物种,同时因其高效、精准的特点被越来越多地运用到分子治疗领域。利用 CRISPR/Cas9 系统进行基因编辑时,经由 sgRNA 对靶位点识别后,Cas9 蛋白会结合到靶位点上对其进行切割,产生 DNA 双链断裂(DNA double-stranded breaks, DSBs)。发生 DNA 双链断裂的细胞会启动自身的修复机制,主要有两类不同的修复途径:非同源染色体末端连接(non-homologous end joining, NHEJ)和同源重组(homology-directed repair, HDR)。其中,NHEJ 是 DNA 修复的最主要途径,这一途径常在连接时发生碱基插入或缺失突变,因此往往用于单位点基因敲除或大片段的删除^[1,2]。HDR 途径则是以另一条染色体或具有同源臂的外源的 DNA 片段作为模板进行基因重组。这一机制可以用于引入基因单核苷酸突变或片段的插入或删除,从而对基因进行更加可控的、定向的、精确的编辑。通常来说,细胞内 HDR 发生的频率要小于 NHEJ,并且只发生在细胞分裂时,且很大程度上受细胞种类、周期和同源重组模板影响^[3]。因此在使用 CRISPR/Cas9 系统进行基因编辑时,利用 NHEJ 机制对靶位点进行随机的基因敲除的效率通常较高,但是利用 HDR 机制对靶位点进行定点突变则相对比较困难。研究表明利用单链寡核苷酸(single-stranded oligo-deoxyribonucleotides, ssODN)做为同源重组的模板,可以增加 HDR 的频率,诱导细胞向特定的方向突变,从而达到精确的基因编辑

的效果^[4]。因此,本研究拟以 ssODN 作为模板,应用 CRISPR/Cas9 对次黄嘌呤/鸟嘌呤磷酸核糖转移酶 1 (hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase1, *HPRT1*)基因进行精确的点突变遗传修饰。

HPRT1 基因位于 X 染色体末端 q26-27 区域,编码序列长 44 kb,其结构包括 8 个内含子和 9 个外显子,共编码 217 个氨基酸,蛋白质大小为 25 kDa。次黄嘌呤/鸟嘌呤磷酸核糖转移酶 1 可以促进次黄嘌呤或鸟嘌呤与磷酸核糖焦磷酸进行转磷酸核糖基作用,生成相应的核苷-5-磷酸。HPRT1 蛋白参与核苷酸合成的补救途径,对于维持细胞内嘌呤核苷酸的浓度具有重要意义。HPRT1 蛋白的功能障碍会导致细胞内尿酸过量生成并排出,引起血液内尿酸浓度过高,从而导致高尿酸血症的发生。大约 10% 的高尿酸血症患者会出现尿酸盐的结晶在关节附近的沉积从而引起痛风^[5-7]。严重的 *HPRT1* 基因突变会引起大脑基底神经节的功能障碍,从而表现出一些神经行为疾病症状,如自残、脑发育不足、智力低下等,被称为 Lesch-Nyhan 综合征(又称自毁容貌症)^[5]。研究发现,*HPRT1* 基因存在多个遗传变异位点,且这些突变位点不完全是随机分布的,存在某些位点出现突变的频率很高,因此这些高突变频率位点很可能与疾病的发生密切相关。Jinnah 等^[5]对 271 个 *HPRT1* 基因突变病例的统计分析表明,不同突变可以导致氨基酸单位点替换、翻译提前终止、mRNA 剪接错误或大片段删除。不同突变导致的症状也不尽相同,部分症状轻微的突变可能仅仅表现为高尿

酸血症或轻度的神经疾病,但有一部分(196 个病例)表现为严重的 Lesch-Nyhan 综合征。在该 196 个病例当中,有 25 个病例为翻译提前终止突变的病例,其中有 11 个病例发生了 c.151 C>T 突变,使该位点编码精氨酸的密码子变为终止密码子;有 10 个病例发生了 c.508 C>T 突变,同样使精氨酸密码子突变为终止密码子。在这些突变病例当中,除 1 例症状未知,1 例表现为轻微神经障碍以外,其余均呈现严重的 Lesch-Nyhan 综合征^[6],由此推测这两个位点的突变可能和 Lesch-Nyhan 综合征的发病机制有密切的关联。因此,本研究在 HEK293T 和 HeLa 细胞中,以 ssODN 作为同源重组模板,利用 CRISPR/Cas9 系统技术构建了这两种突变的单克隆细胞株。进一步通过 Western blot 以及 6-TG 毒性实验分别对点突变的单克隆细胞的 HPRT1 蛋白表达水平和次黄嘌呤/鸟嘌呤磷酸核糖转移酶活性进行检测,结果表明纯合突变的单细胞克隆不能正常表达 HPRT1 蛋白,其次黄嘌呤/鸟嘌呤磷酸核糖转移酶活性丧失;杂合突变的单细胞克隆的 HPRT1 蛋白表达量降低,仍具有部分次黄嘌呤/鸟嘌呤磷酸核糖转移酶活性。

1 材料与方法

1.1 材料

HEK293T 细胞和 HeLa 细胞由本实验室保存, pX458 质粒(Cas9/sgRNA/EGFP 共同表达质粒)购于美国 Addgene 公司,引物和 Oligo、ssODN 由生工生物工程(上海)股份有限公司合成, *Bbs*、*Nla*、T7E1 等核酸内切酶购于美国 NEB 公司,HPRT 抗体和 6-TG 购于德国 Sigma-Aldrich 公司。

1.2 sgRNA 设计和 CRISPR/Cas9 表达质粒构建

在靶位点附近寻找 PAM 序列(5'NGG3'),在 PAM 序列上游选取 20 bp 序列即为 sgRNA 结合序列。对于起始碱基不是 G 的 gRNA 需要在 5'端加 G。随后在正反向 gRNA 的 5'端分别添加 *Bbs* 酶在 pX458 质粒上的粘性末端 CACC (加在正向序列前)和 AAAC (加在反向序列前)即可。本研究针对 c.508C>T 位点设计了 4 条 gRNA,针对 c.151C>T 位点设计

1 条 gRNA (表 1),5 条 gRNA 在 *HPRT1* 基因上的位置如图 1A 所示。将合成的 gRNA 正负链分别加入超纯水溶解稀释到 100 μ L 进行磷酸化和退火,使之成为带有 *Bbs* 酶切位点的双链 DNA 片段,克隆到 pX458 质粒载体中。将构建完成的质粒进行转化,涂平板,过夜培养后挑取单克隆,测序验证表达质粒是否构建成功。

1.3 ssODN 设计

选择突变位点左右各 40 bp 序列作为同源臂,合成含有突变位点的反义链作为同源重组的 ssODN (表 2)。设计 ssODN 时,在不引起氨基酸移码突变或错义突变的前提下,为防止基因组 DNA 成功突变后 CRISPR/Cas9 系统在突变位点继续发挥切割活性,同时对 PAM 位点进行突变以终止其切割活性。同时为方便后续的鉴定,在突变位点附近引入一个新的限制酶识别位点(图 1B):(1)在 c.508C>T 突变位点前 4 个碱基处进行 c.504C>A 的同义突变,使该处的 PAM 位点 GGG 突变为 GGT,重组后即可令此处失去 Cas9 蛋白的切割活性;c.508C>T 突变本身向该位点引入了限制性内切酶 *Nla* 的识别位点(CATG),因而不需另外引入其他酶切位点;(2)在 c.151C>T 突变位点下游第 15~16 位的 GA 碱基突变为 AC 碱基(模板上的反向互补序列为 TC>GT),使该处的 PAM 位点失活的同时引入了 *Bbs* 酶切位点(GAAGAC)。

表 1 CRISPR/Cas9 基因编辑质粒 Oligo 序列
Table 1 The inserted sequence of CRISPR/Cas9 konckout plasmid

名称	gRNA 序列(5'→3')
<i>HPRT1</i> 508-1 top oligo	caccgAAAAGGACCCACGAAGTGT
<i>HPRT1</i> 508-1 bottom oligo	aaacACACTTCGTGGGGTCTTTTc
<i>HPRT1</i> 508-2 top oligo	caccGGCTTATATCCAACACTTCG
<i>HPRT1</i> 508-2 bottom oligo	aaacCGAAGTGTGGATATAAGCC
<i>HPRT1</i> 508-3 top oligo	caccGCTTATATCCAACACTTCGT
<i>HPRT1</i> 508-3 bottom oligo	aaacACGAAGTGTGGATATAAGC
<i>HPRT1</i> 508-4 top oligo	caccgCTTATATCCAACACTTCGTG
<i>HPRT1</i> 508-4 bottom oligo	aaacCACGAAGTGTGGATATAAGc
<i>HPRT1</i> 151-1 top oligo	caccgTCTTGCTCGAGATGTGATGA
<i>HPRT1</i> 151-1 bottom oligo	aaacTCATCACATCTCGAGCAAGAc

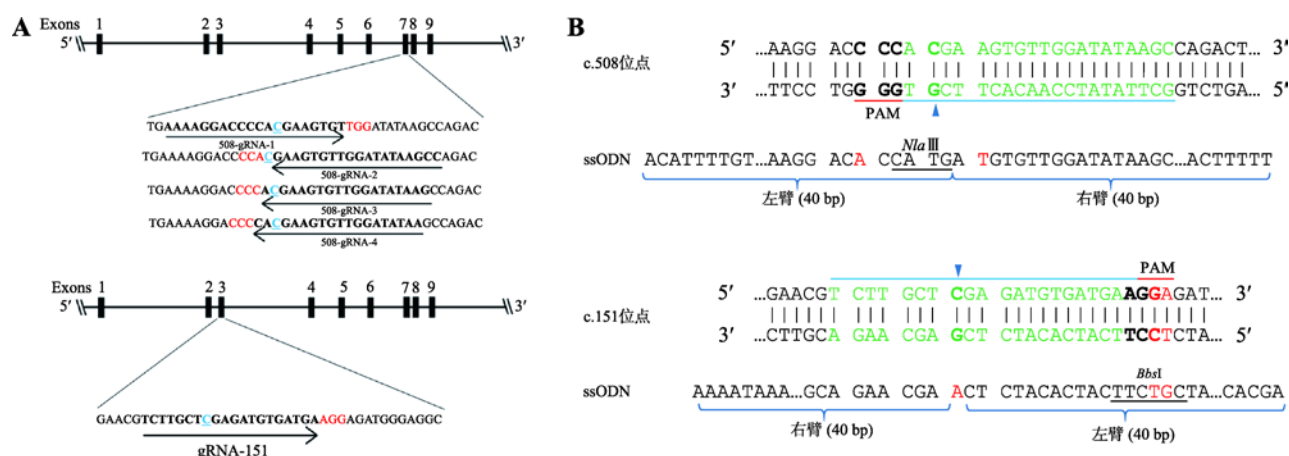


图 1 gRNA 和 ssODN 位点示意图

Fig. 1 Target sites of gRNA and ssODN

A: *HPRT1* 基因 gRNA 位置(蓝色表示突变位点, 红色表示 PAM 序列); B: ssODN 设计示意图(箭头表示靶位点, 红色字母表示为破坏 PAM 序列或引入酶切位点而引入的无义突变)。

表 2 *HPRT1* 基因的同源重组寡核苷酸序列Table 2 ssODNs used for homologous recombination on *HPRT1* gene

名称	序列(5'→3')
ssODN-508	acattttgtaattaacagcttgctggtgaaaaggacAccaTgaagtgttgatataagccagactgtaagtgaattactttt
ssODN-151	agcacacagagggtcataatgtgatggcctcccatcGTtctcatcacatctcAagcaagacgttcagtcctacagaaataaatcagga

大写字母表示与 *HPRT1* 基因序列不同的碱基, 即引入的突变位点。

1.4 细胞转染

转染前 24 h 将细胞接种至六孔板中, 用含有 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基进行传代培养。待细胞密度达到 70%~80% 进行转染操作。用 Opti-MEM 减血清培养基分别将 3 μ L 待转染质粒和 5 μ L PEI-MAX 溶液(2 μ g/ μ L)稀释至 150 μ L, 轻轻吹打混匀, 室温静置 5 min 后混合, 再次吹打混匀后室温静置 15 min。将混合液缓缓加入 6 孔板中, 摇匀, 37 $^{\circ}$ C 培养过夜, 24 h 后更换新鲜培养基并在荧光显微镜下观察转染情况并拍照。

1.5 流式细胞分选

细胞转染 72 h 后, 弃培养基并用 PBS 洗细胞两次后用胰酶消化, 200 \times g 离心 5 min, 弃上清, PBS 洗一次, 弃上清, 用 600 μ L PBS 重悬, 经孔径为 40 μ m 的细胞网筛筛入流式管中, 分选 GFP 阳性较强的部分细胞。使用单细胞模式直接分选到 96 孔板, 每孔 1 个细胞, 96 孔板中预加 200 μ L 培养基(新鲜

培养基和旧培养基 1:1 混合后经 0.22 μ m 滤膜过滤后使用)。另外使用富集模式分选一管用于基因组 DNA 提取和 T7E1 实验。

1.6 T7E1 实验

T7 核酸内切酶 1 (T7E1) 可以识别 DNA 上的茎环结构并切开 DNA 双链, 即由基因编辑产生的含有杂交异源双链 DNA, 酶切产物中包括扩增主带以及酶切形成的两条较小的 DNA 条带, 通过聚丙烯酰胺凝胶电泳分离 3 条大小不一的条带, 即可根据亮度估算 CRISPR/Cas9 的编辑效率。提取分选后的细胞的基因组 DNA, 设计包含突变位点且不位于扩增片段中央的扩增长度约 500 bp 的 PCR 引物(表 3)并进行扩增, 用胶回收试剂盒进行 PCR 产物纯化。纯化后的 PCR 产物经变性和退火后即可形成异源双链 DNA, 在经变性退火的产物中加入 0.5 μ L T7E1 酶, 37 $^{\circ}$ C 水浴 30 min。在新鲜配置的 10% PAGE 胶中 120 V 恒压电泳 90 min。电泳结束后小心取出 PAGE 胶, EB 溶液染色 15 min 后用蒸馏水洗 3 次, 置于

表 3 T7E1 酶切实验所用引物

Table 3 Primers for amplification of targeted sites for T7E1 assay

名称	序列(5'→3')
<i>HPRT1</i> 508-F	gcacggatgaaatgaacag
<i>HPRT1</i> 508-R	tatgaggctgctggaaggaga
<i>HPRT1</i> 151-F	caaaggatgtgttacgtggaag
<i>HPRT1</i> 151-R	gtcataggaatggatctatcac

凝胶成像仪中拍照,反色后用 ImageJ 软件计算每个条带的灰度,根据公式:突变率=1-[c/(a+b+c)]^{0.5}(其中 a, b, c 分别为峰面积, c 为最大峰面积)估算切割效率。

1.7 单克隆培养和鉴定

分选至 96 孔板的细胞培养 7 d 后在显微镜下观察形态和状态。选取只有单个细胞团的孔的细胞进行传代并扩大培养。当细胞形成一个单克隆细胞团时弃去培养基,用 PBS 洗两遍后加入 20 μ L 胰酶消化,终止消化后吹散并转移至 48 孔板再扩大培养,以此类推。在从 48 孔板向 24 孔板转移时取少量细胞提取基因组 DNA,扩增含有突变位点的片段并克隆到 pMD-18T 载体中,转化涂板,培养过夜后挑单克隆进行测序鉴定基因型。

1.8 Western blot 检测

将细胞接种于六孔板中,待生长至汇合度达到约 90%时,弃培养基并用 PBS 洗 2 遍,加入 100 μ L 含有 1 mmol/L PMSF 的 RIPA 细胞裂解液中,冰上裂解 2 min 后收集悬液至 1.5 mL 离心管中。加入 5 \times SDS Loading Buffer,100 μ L 水浴 10 min,14000 $\times g$ 离心 5 min,在 12%浓度分离胶的 SDS-PAGE 胶中电泳。电泳结束后小心剥下凝胶,采用半干转法将蛋白转移到 PVDF 膜上,室温封闭 1 h,4 $^{\circ}$ C 孵育一抗过夜。孵育完毕用 TBST 洗膜 3 次,随后室温孵育二抗 1 h,孵育完毕用 TBST 洗膜 3 次,采用 ECL 法在化学发光自显影仪检测蛋白条带并拍照。

1.9 6-TG 毒性实验

将细胞接种于 6 孔板中传代培养,待细胞进入对数期时,加入 6-TG 至终浓度为 5 μ L/mL,48 h 后

在显微镜白光下观察细胞状态。

2 结果与分析

2.1 gRNA 的活性鉴定

将构建成功的 5 个 pX458-gRNA 载体分别转染到 HEK293T 细胞,48 h 后收集细胞并提取基因组 DNA,PCR 扩增切割位点两侧片段,通过 T7E1 实验检测 gRNA 对 *HPRT1* 基因相应位点的切割活性。另将 PCR 扩增产物纯化后连接 pMD18-T 载体,转化涂板并过夜培养,16 h 后在各板上挑选 50 个单克隆测序,以鉴定 gRNA 的实际切割效率。T7E1 实验结果显示 5 条 gRNA 均表现出切割活性,活性分别为 21.2%、27.6%、31.2%、29.8%和 35.2% (图 2A)。靶位点测序结果表明,151 位点的 gRNA 有约 31.7% 的切割活性,对于 508 位点,活性最高的一条 gRNA 是 3 号 gRNA,其切割活性达到约 30.2% (图 2B)。后续的基因定点突变实验选用以上两条 gRNA 进行。

2.2 流式分选富集 *HPRT1* 基因点突变细胞

将 pX458-gRNA 载体和对应位点的 ssODN 共转染到 HEK293T 细胞,培养 24 h 后在倒置荧光显微镜下观察带有绿色荧光的细胞并拍照(图 3A)。继续培养至细胞汇合度达到 90%以上进行流式分析,结果表明 pX458-508gRNA3 和 pX458-151gRNA 的阳性率分别为 41.0%和 38.5% (图 3B)。对两个样品分别将荧光强度最强的 24.5%和 21.4%的细胞分选出来用于提取基因组 DNA,同时提取未经分选的细胞基因组 DNA,通过 T7E1 实验和靶位点测序结果分析对比分析两者基因组 DNA 发生编辑的效率。经分选的细胞用 T7E1 和各自通过 ssODN 引入的酶切位点的酶,其酶切条带亮度都更高于未分选的细胞,灰度扫描结果显示,c.508 位点的 T7E1 酶切和 *Nla* 酶切 DNA 量分别提高了 1.5 倍和 4 倍,c.151 位点的 T7E1 酶切和 *Bbs* 酶切 DNA 量分别提高了 2.4 倍和 1.5 倍(图 3C)。说明经流式分选后的细胞群表现了更强的 DNA 双链切割效率和更高的基因组 DNA 重组效率。与酶切实验结论相同,靶位点测序结果也证明经过流式分选富集后的细胞,其总体突

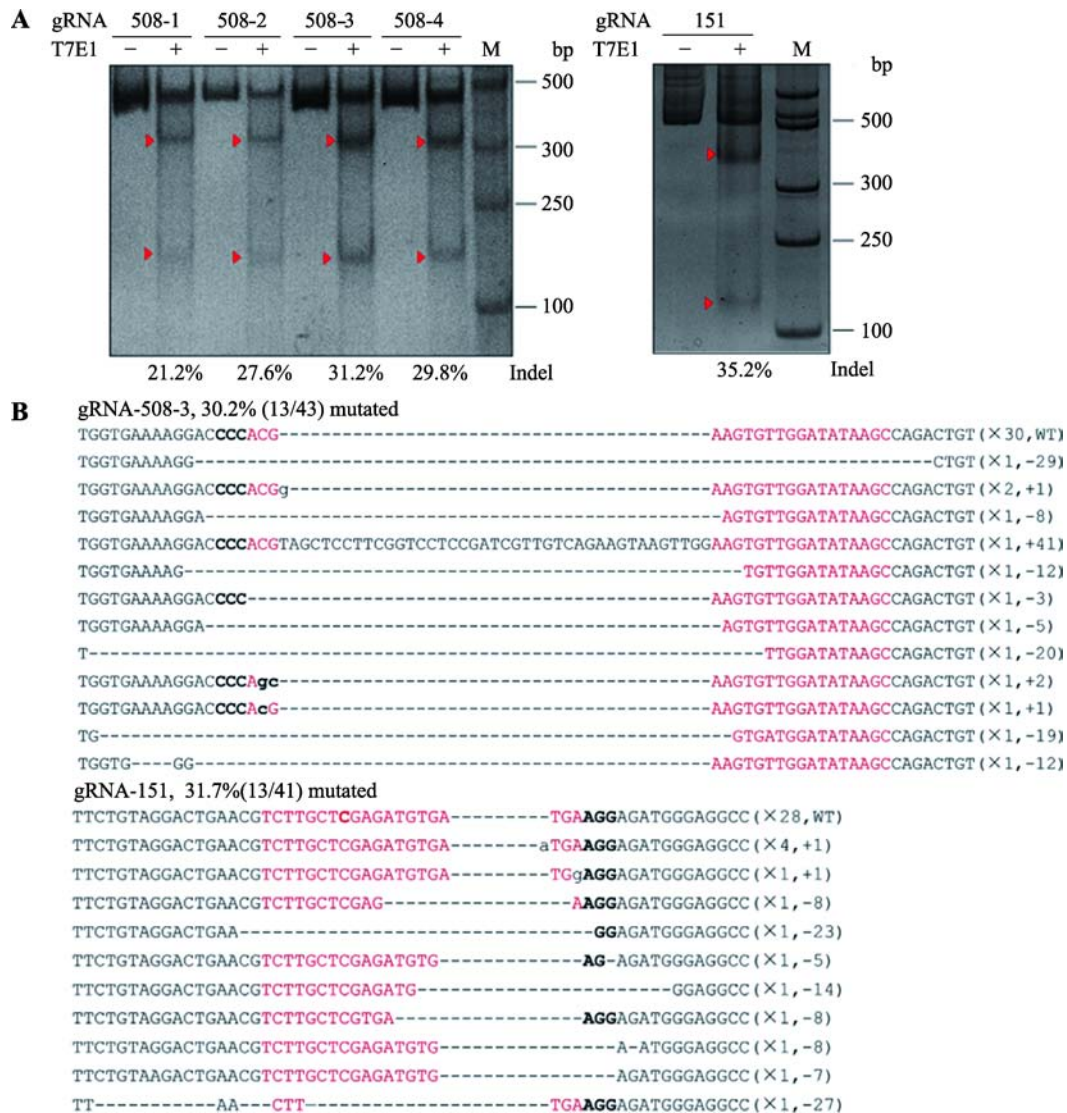


图 2 gRNA 活性检测和切割效率验证

Fig. 2 Detection of gRNA activity and knock out efficiency

A : T7E1 实验 (红色箭头示 T7E1 酶切条带) ; B : 靶位点测序结果比对 (红色字体示 gRNA 识别序列, 黑色加粗字体示 PAM 位点)。

变效率和基因组 DNA 发生重组的概率都高于未分选的细胞, c.508 位点分选前的点突变和总体突变率分别为 2.0% 和 32%, 经分选后分别提高到 16.3% 和 56.3%, c.151 位点分选前的点突变和总体突变率分别为 2.22% 和 28.9%, 分选后分别提高到 10% 和 56.7% (图 3D)。

2.3 HPRT1 基因点突变单克隆细胞株构建

重新将 pX458-508gRNA3 和 pX458-151gRNA 与相应的 ssODN 分别共转到 HEK293T 细胞和 HeLa 细胞, 48 h 后以单细胞模式分选到 96 孔板, 待细胞

形成单克隆(图 4A)时进行传代扩大培养。细胞扩大到 24 孔板时收集部分细胞提取基因组 DNA, PCR 扩增含有靶位点的片段, 对 PCR 产物直接测序。选择目标位点出现双峰且双峰包括基因突变后的 T 碱基的细胞株(图 4B), 将其 PCR 产物纯化并连接 T 载体, 转化涂板, 过夜培养后挑取 10 个菌落单克隆测序, 以鉴定该单克隆细胞株的基因型(图 4C)。c.508 位点基因编辑的 HEK293T 细胞最终得到 43 个正常增殖的单克隆细胞株, 其中 3 个克隆(#1、#2 和 #3)的 PCR 产物测序结果在靶位点显示双峰。细胞单克隆靶位点测序结果显示: #1 单克隆细胞株的靶位点

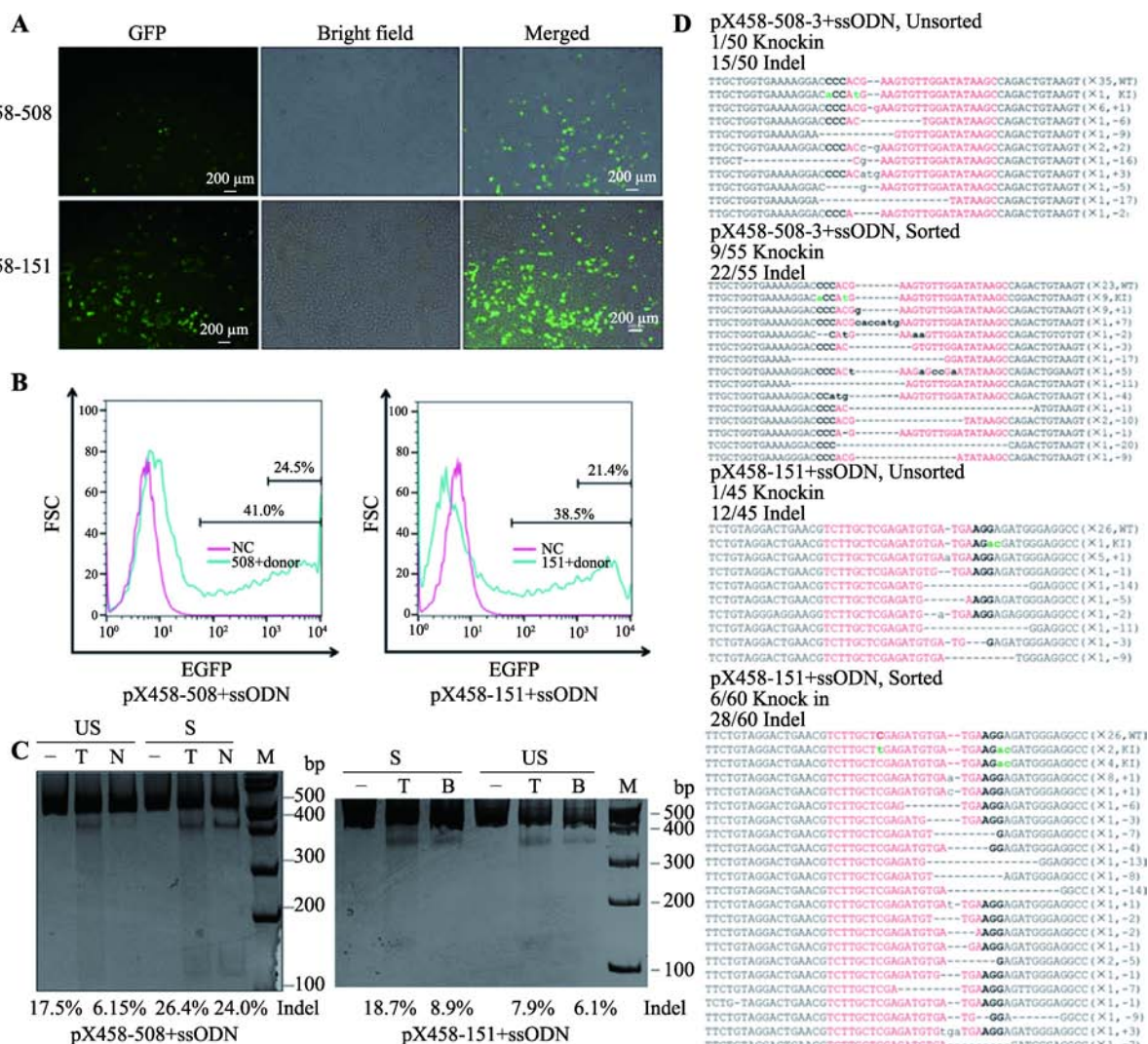


图3 流式分选富集 GFP 阳性细胞提高突变频率和重组效率

Fig. 3 Enhanced mutation rate and HDR efficiency with FACS

A : 转染 24 h 后荧光拍照 ; B : 流式分选较强 GFP 阳性细胞 ; C : 酶切实验 (US: unsorted ; S: sorted ; T: T7E1 cleaved ; N: *Nla* cleaved ; B: *Bbs* cleaved ; M: 100 bp DNA marker) ; D : 流式分选前后靶位点测序结果对比。

测序的 10 个菌落单克隆中有 3 个发生了定点突变, 7 个为野生型, 因 HEK293T 细胞含有 3 条 X 染色体^[7], 故可认为 *HPRT1* 的一个等位基因发生了 c.508C>T 突变, 另外两个等基因未发生编辑, 仍为野生型; #2 单克隆细胞株的靶位点测序的 10 个菌落单克隆中有 7 个发生了定点突变, 3 个在切割位点下游发生一段长为 27 bp 的 DNA 片段插入, 该插入片段在原读码框下游 8 个氨基酸处引入了一个终止密码子 (TGA), 该条染色体的转录本也会使蛋白翻译提前终止, 推测该株细胞的 3 个等位基因中 2 个发生了定点突变, 另一个等位基因发生翻译提前终止的突变。

该株细胞近似看作翻译提前终止的纯合细胞株；#3 单克隆细胞株的靶位点测序的 10 个菌落单克隆中有 3 个发生了定点突变，3 个为野生型，4 个发生了 17 bp 的删除突变，该删除突变造成移码，突变位点的第 4 个密码子为 TAA，同样造成翻译提前终止，推测该株细胞的 3 个等位基因的 2 个发生了预期的定点突变和删除突变，1 个为野生型(图 4C，表 4)。c.151 位点突变的 HeLa 细胞最终得到 60 个正常增殖的细胞株，其中 2 个克隆(#4 和#5)的 PCR 产物测序结果在靶位点显示双峰。细胞单克隆测序结果显示：#4 单克隆细胞株的靶位点测序的 10 个菌落

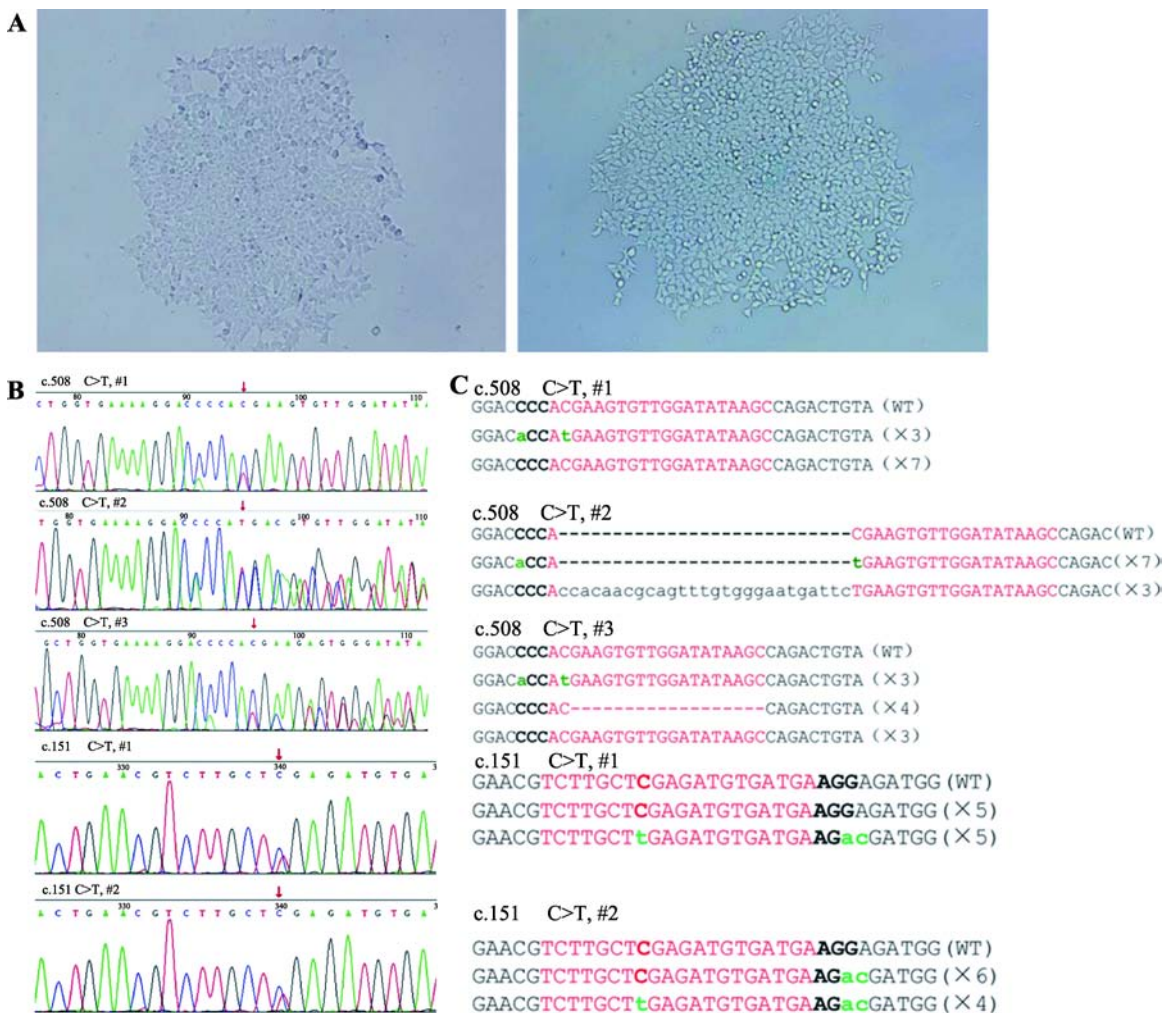


图 4 细胞单克隆基因型鉴定
Fig. 4 Genotyping of monoclonal cells
 A: 细胞单克隆左: HEK29T 细胞, 508 位点; 右: HeLa 细胞, 151 位点; B: PCR 产物测序结果; C: 细胞单克隆 T-A 克隆测序结果 (红色字体示 gRNA 识别序列, 黑色加粗字体示 PAM 位点, 绿色字体示 ssODN 引入的无义突变)。

表 4 单克隆细胞基因型鉴定
Table 4 Genotyping of monoclonal cell strains

细胞编号	编辑位点	T-A 克隆测序结果	基因型
#1	c.508C>T	点突变 野生型=3 7	突变杂合子
#2	c.508C>T	点突变 提前终止=7 3	突变纯合子
#3	c.508C>T	点突变 野生型 提前终止=3 3 4	突变杂合子
#4	c.151C>T	点突变 野生型=5 5	突变杂合子
#5	c.151C>T	点突变 野生型=4 6	突变杂合子

单克隆中 5 个为野生型, 5 个同时发生了 C>T 和 GA>AC 突变, 该株细胞为定点突变的杂合子; #5 单克隆细胞株的靶位点测序的 10 个菌落单克隆中 10 个单克隆中 4 个同时发生了 C>T 和 GA>AC 突变, 6 个仅发生 GA>AC 突变, 使该处由谷氨酸突变为苏氨酸, 但不影响该条染色体转录合成完整的 HPRT1 肽链, 该株细胞同样视为定点突变的杂合子(图 4C, 表 4)。

2.4 Western blot 验证突变株的 *HPRT1* 蛋白表达情况

培养上述 5 株细胞,提取蛋白进行 Western Blot 实验,使用抗原结合位点为 *HPRT1* 蛋白 N 端序列的抗体,以野生型细胞为对照,检测基因突变的细胞株的 *HPRT1* 蛋白表达情况。在 508 位点突变的 HEK293T 细胞株中,#1 细胞克隆可以正常表达大小为 25 kDa 的完整的 *HPRT1* 蛋白,3 条染色体均发生转录提前终止的#2 细胞克隆则完全不表达正常的 *HPRT1* 蛋白,2 条 X 染色体发生翻译提前终止的#3 细胞克隆的 *HPRT1* 蛋白表达量明显下降。另外,在预期的 17 kDa 位置未检测到翻译提前终止产生的截短的蛋白。在 151 位点突变的 2 个 HeLa 细胞株中,

HPRT1 蛋白表达量均下调,同样地,在预期的 5 kDa 的位置也未检测到截短的蛋白条带(图 5A)。这表明两种突变可能意味着嘌呤磷酸核糖转移酶功能的完全丧失。

2.5 6-TG 实验检测突变株的次黄嘌呤/鸟嘌呤磷酸核糖转移酶活性

6-TG 是一种嘌呤类似物,经 *HPRT1* 酶催化可以在 DNA 复制过程中掺入 DNA 双链中,诱导 DNA 的双链断裂,破坏 DNA 结构的稳定性并产生细胞毒性。*HPRT1* 基因的功能缺陷会使体外培养的细胞能够抵抗 6-TG 的毒性从而在含有 6-TG 的培养基中正常存活。因此 6-TG 实验是一种普遍使用的筛选 *HPRT1* 突变细胞的方式。在细胞达到对数生长期时

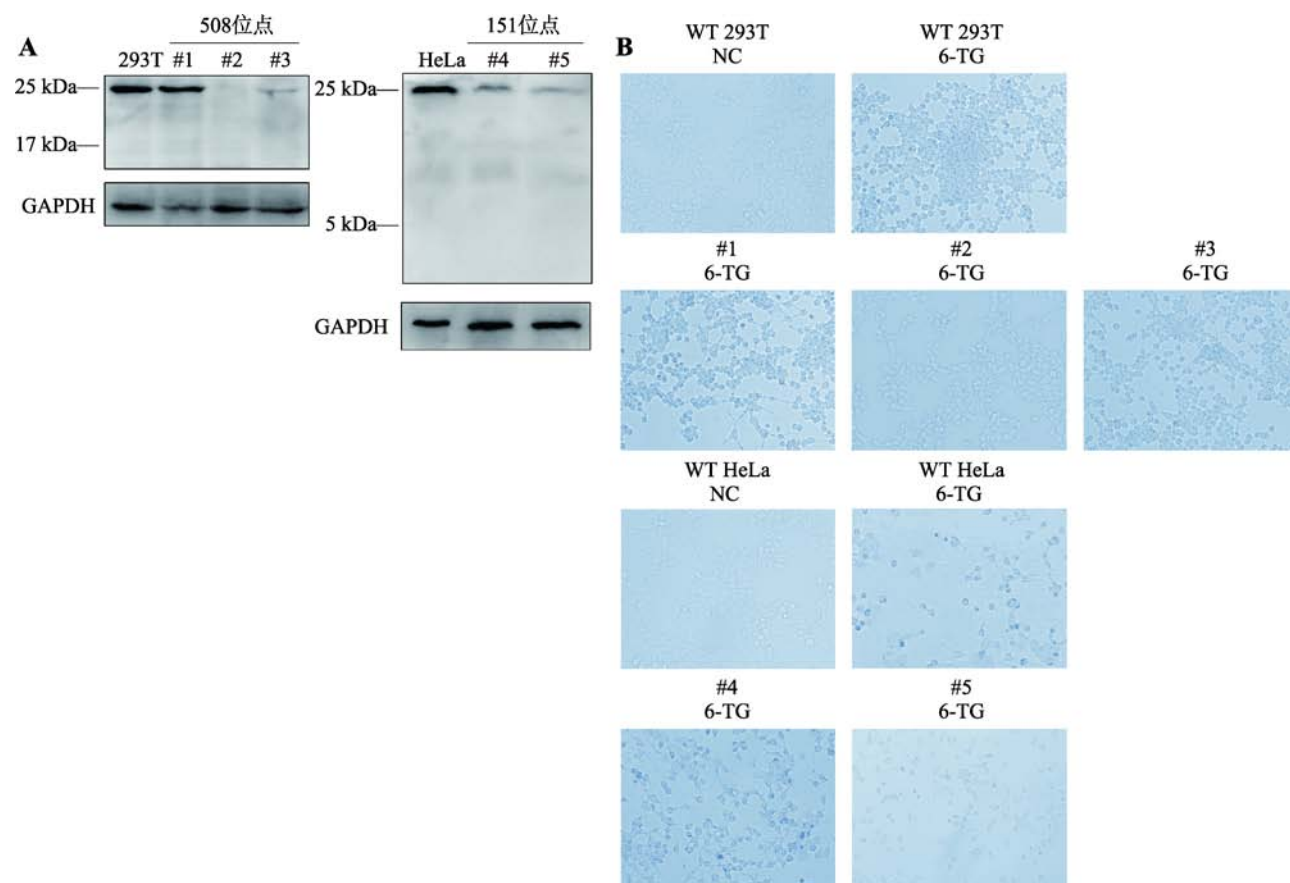


图 5 Western blot 和 6-TG 实验结果

Fig. 5 Results of Western blot and 6-TG

A: Western blot 结果。*HPRT1* 蛋白仅在 1 条等位基因翻译提前终止的#1 细胞株中正常表达,其他 4 株细胞中都不能正常表达,且在预测的可能出现截短肽链的位置均未能检测到截短的肽链;B: 6-TG 实验结果。仅全部 *HPRT1* 等位基因翻译提前终止的#2 细胞株可以在添加 6-TG 的培养体系中存活,其他 4 株细胞都死亡。

加入 6-TG 继续培养 48 h 后,光镜下可见,5 株细胞中仅有#2 细胞克隆可以存活,其他 4 株细胞均大量死亡,这表明仅有#2 细胞克隆由于完全不表达正常的 HPRT1 蛋白,所以几乎完全丧失了 HPRT1 蛋白的次黄嘌呤/鸟嘌呤磷酸核糖转移酶活性,其他 4 株细胞由于仍能表达少量的 HPRT1 蛋白,其次黄嘌呤/鸟嘌呤磷酸核糖转移酶活性未完全丧失,因而导致细胞死亡(图 5B)。

3 讨论

本研究针对 *HPRT1* 基因,利用 CRISPR/Cas9 系统结合流式细胞分选的富集手段,成功进行了 c.508C>T 和 c.151C>T 的点突变,经流式分选后细胞总体的突变频率从 2%提高到了 10%~20%,说明流式分选富集 GFP 阳性细胞是一种有效的筛选和提高突变频率的手段。此外,在对 c.151 位点进行突变时,本研究同时突变了其 gRNA 对应的 PAM 序列, T-A 克隆测序结果表明: #5 细胞克隆的 10 个 T-A 克隆产物均发生了 GA>AC 的突变,仅有 4 个单克隆出现了 C>T 的突变。这可能是由于 DNA 双链断裂修复中 HDR 的效率受位点与 DSB 位点的距离有关,在更靠近 DSB 位点的位置上 HDR 的效率更高^[8]。本研究对这些突变的细胞株进行了 Western blot 实验检测其 HPRT1 蛋白表达情况,发现除了 3 个位于不同 X 染色体上的等位基因全部发生翻译提前终止突变的 508 位点#2 号细胞克隆株完全不表达 HPRT1 蛋白以外,其余 4 个杂合的突变细胞株均表达部分正常的 HPRT1 蛋白。但在翻译提前终止的#3 细胞克隆、#5 细胞克隆中未检测到被截短的肽链,说明这两个位点的翻译提前终止突变导致了最终细胞内该蛋白水平的降低甚至完全消失,而不是存在具有部分次黄嘌呤/鸟嘌呤磷酸核糖转移酶功能的蛋白质残基,推测这可能是由于真核生物广泛存在的无义介导的 mRNA 降解(nonsense-mediated mRNA decay, NMD)机制的存在,由于突变引入了一个新的提前终止密码子,引起 Upf 蛋白复合物识别并降解了突变的 mRNA 序列^[9,10]。与此同时,只有 508 位点的#2 细胞克隆能在含有 6-TG 的培养基中存活,由此推测 HPRT1 蛋白的翻译提前终止导致 *HPRT1* 不能正常

而稳定地表达,细胞内次黄嘌呤/鸟嘌呤磷酸核糖转移酶活性几乎完全消失,是该位点突变导致严重的 Lesch-Nyhan 疾病的主要原因。

HPRT1 基因定点突变细胞模型的建立可在今后建立其他 *HPRT1* 基因突变的细胞系或动物模型提供借鉴,为深入研究 Lesch-Nyhan 致病机制提供基础。

参考文献(References):

- [1] Chen F, Pruett-Miller SM, Huang Y, Gjoka M, Duda K, Taunton J, Collingwood TN, Frodin M, Davis GD. High-frequency genome editing using ssDNA oligonucleotides with zinc-finger nucleases. *Nat Methods*, 2011, 8(9): 753–755. [DOI]
- [2] Perez EE, Wang J, 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]
- [3] Saleh-Gohari N, Helleday T. Conservative homologous recombination preferentially repairs DNA double-strand breaks in the S phase of the cell cycle in human cells. *Nucleic Acids Res*, 2004, 32(12): 3683–3688. [DOI]
- [4] Sørensen CB, Krogsdam AM, Andersen MS, Kristiansen K, Bolund L, Jensen TG. Site-specific strand bias in gene correction using single-stranded oligonucleotides. *J Mol Med (Berl)*, 2005, 83(1): 39–49. [DOI]
- [5] Merriman TR. An update on the genetic architecture of hyperuricemia and gout. *Arthritis Res Ther*, 2015, 17: 98. [DOI]
- [6] Merriman TR, Dalbeth N. The genetic basis of hyperuricaemia and gout. *Joint Bone Spine*, 2011, 78(1): 35–40. [DOI]
- [7] Vitart V, Rudan I, Hayward C, Gray NK, Floyd J, Palmer CN, Knott SA, Kolcic I, Polasek O, Graessler J, Wilson JF, Marinaki A, Riches PL, Shu X, Janicijevic B, Smolej-Narancic N, Gorgoni B, Morgan J, Campbell S, Biloglav Z, Barac-Lauc L, Pericic M, Klaric IM, Zgaga L, Skaric-Juric T, Wild SH, Richardson WA, Hohenstein P, Kimber CH, Tenesa A, Donnelly LA, Fairbanks LD, Aringer M, McKeigue PM, Ralston SH, Morris AD, Rudan P, Hastie ND, Campbell H, Wright AF. SLC2A9 is a newly

- identified urate transporter influencing serum urate concentration, urate excretion and gout. *Nat Genet*, 2008, 40(4): 437–442. [DOI]
- [8] Visser JE, Bär PR, Jinnah HA. Lesch-Nyhan disease and the basal ganglia. *Brain Res Rev*, 2000, 32(2–3): 449–475. [DOI]
- [9] Jinnah HA, De Gregorio L, Harris JC, Nyhan WL, O'Neill JP. The spectrum of inherited mutations causing HPRT deficiency: 75 new cases and a review of 196 previously reported cases. *Mutat Res*, 2000, 463(3): 309–326. [DOI]
- [10] Boone M, Lin YC, Meuris L, Lemmens I, Van Roy N, Soete A, Reumers J, Moisse M, Plaisance S, Drmanac R, Chen J, Speleman F, Lambrechts D, Van de Peer Y, Tavernier J, Callewaert N. Genome dynamics of the human embryonic kidney 293 lineage in response to cell biology manipulations. *Nat Commun*, 2014, 5: 4767. [DOI]
- [11] He Z, Proudfoot C, Whitelaw CB, Lillico SG. Comparison of CRISPR/Cas9 and TALENs on editing an integrated EGFP gene in the genome of HEK293FT cells. *Springer Plus*, 2016, 5(1): 814. [DOI]
- [12] Holbrook JA, Neu-Yilik G, Hentze MW, Kulozik AE. Nonsense-mediated decay approaches the clinic. *Nat Genet*, 2004, 36(8): 801–808. [DOI]
- [13] Ma ZP, Chen J. Nonsense mutations and genetic compensation response. *Hereditas(Beijing)*, 2019, 41(5): 359–364. 马志鹏, 陈军. 无义突变与“遗传补偿效应”. *遗传*, 2019, 41(5): 359–364. [DOI]

(责任编辑: 吴强)

更正声明

更正: 碱基编辑系统研究进展

宗媛, 高彩霞

中国科学院遗传与发育生物学研究所, 植物细胞与染色体工程国家重点实验室, 基因组编辑中心, 北京 100101
原文: *遗传*, 2019, 41(9): 777–800. doi: 10.16288/j.ycz.19-205.

《遗传》2019 年 41 卷第 9 期刊登的“碱基编辑系统研究进展”一文中, 第 790 页对参考文献[111]的表述有误, 原文中“Jin-Soo Kim 实验室率先利用 ABE7.10 对小鼠 *Tyr* 基因引入了错义突变, 并将 ABE7.10 包裹到双反式剪接的 AAV 病毒系统中, 对 *Dmd* 基因进行了无义突变, 建立了杜氏肌营养不良的小鼠疾病模型”现更正为“Jin-Soo Kim 实验室率先利用 ABE7.10 对小鼠 *Tyr* 基因引入了错义突变, 并将 ABE7.10 包裹到双反式剪接的 AAV 病毒系统中, 递送到 *Dmd* 小鼠模型中进行无义突变的校正, 成功治疗了杜氏肌营养不良的小鼠疾病表型。”

由此给读者带来的不便, 作者深表歉意!