

# 利用 CRISPR/Cas9 技术敲除小鼠 ES 细胞 *H2-K1* 基因\*

陈瑞俊<sup>1</sup>, 李蔚然<sup>1</sup>, 黄乙涓<sup>1</sup>, 刘建中<sup>1</sup>, 李亮平<sup>1,2</sup>

(1. 中山大学中山医学院生物学教研室, 广东 广州 510080;  
2. 暨南大学附属第一医院临床医学研究院, 广东 广州 510632)

**摘要:** 利用 CRISPR/Cas9 和 ES 细胞技术, 在小鼠 ES 细胞株上敲除小鼠 *H2-K1* 基因, 为研发 MHC I 类基因人源化小鼠打下基础。设计了两个单向导 RNA (single guide RNA, sgRNA), 分别靶向 *H2-K1* 基因的外显子 2 和外显子 3。以 pX330 质粒为骨架构建表达 sgRNA 的打靶载体。用电穿孔转染法将构建好的质粒以及 pSUPER-puro 共同导入小鼠 ES 细胞中, 实现基因敲除。在嘌呤霉素筛选后, 利用 PCR 初步检测靶基因的敲除情况, 再通过测序以及流式细胞分析确定敲除 *H2-K1* 基因的小鼠 ES 细胞。结果显示: 利用 CRISPR/Cas9 技术, 小鼠 ES 细胞的 *H2-K1* 基因被成功敲除, 通过 PCR 检测到 4 个克隆为 *H2-K1* 单等位基因敲除 (19.0%), 2 个克隆为 *H2-K1* 双等位基因敲除 (9.5%)。经过测序以及流式细胞分析, 2 株小鼠 ES 细胞被确认为 *H2-K1* 双等位基因敲除。本研究利用 CRISPR/Cas9 技术得到 *H2-K1* 基因敲除的小鼠 ES 细胞株, 为 MHC I 类基因的敲除和置换提供了参考。

**关键词:** *H2-K1* 基因; CRISPR/Cas9 技术; mES 细胞; 基因敲除

**中图分类号:** R392    **文献标志码:** A    **文章编号:** 0529-6579 (2017) 02-0005-07

## The *H2-K1* gene knockout of mouse ES cells through CRISPR/Cas9 technology

CHEN Ruijun<sup>1</sup>, LI Weiran<sup>1</sup>, HUANG Yijun<sup>1</sup>, LIU Jianzhong<sup>1</sup>, LI Liangping<sup>1,2</sup>

(1. Department of Biology, Zhongshan School of Medicine, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China;

2. Central Laboratory, The First Affiliated Hospital, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

**Abstract:** The CRISPR/Cas9 technology was used to achieve the *H2-K1* gene knockout of mouse ES cells, which will be useful for generation of MHC class I gene humanized mice. In this study, two sgRNAs were designed, which are targeting to the Exon2 and Exon3 of *H2-K1*, respectively. The plasmids expressing the sgRNAs were constructed using pX330 as the matrix plasmid. In order to knockout *H2-K1*, the constructed plasmids and pSUPER-puro were cotransfected into the mES cells through electroporation. After screening by puromycin, the result of gene targeting was determined by PCR, and *H2-K1* knockout mouse ES cells were further confirmed through sequencing and flow cytometry. We found that *H2-K1* in the mouse ES cell was knocked out using CRISPR/Cas9 technology. Through PCR, 4 clones were determined as one allele knockout (19.0%), 2 clones were determined as two allele knockout (9.5%). 2 clones were further confirmed as two allele knockout clones by sequencing and flow cytometry. The generated *H2-K1* knockout mouse ES cells would provide a reference for the knockout and replacement of MHC class I gene.

**Key words:** *H2-K1* gene; CRISPR/Cas9 technology; mES cell; gene knockout

\* 收稿日期: 2016-09-05

基金项目: 国家自然科学基金 (31270920; 81472824); 广东省科技计划项目 (2013B060300004)

作者简介: 陈瑞俊 (1989 年生), 男; 研究方向: 肿瘤免疫学; E-mail: 347770864@qq.com

通信作者: 李亮平 (1961 年生), 男; 研究方向: 肿瘤免疫学; E-mail: liliping2@mail.sysu.edu.cn, liangping\_li@jnu.edu.cn

肿瘤免疫治疗是通过生物制剂直接或间接地诱发或者增强机体的抗肿瘤免疫应答以及破坏肿瘤的免疫抑制效应,达到抑制肿瘤生长或者直接杀伤肿瘤细胞的效果<sup>[1]</sup>。肿瘤免疫治疗的进展之一是特异性 T 细胞免疫治疗,而 T 细胞肿瘤免疫法中一个很重要的进展是 T 细胞受体 (T cell receptor, TCR) 基因治疗的发展。TCR 基因治疗的主要目的是将病人原代 T 细胞改造成为抗肿瘤或抗感染性疾病的 T 细胞,实现对疾病的治疗<sup>[2]</sup>。TCR 基因治疗的主要瓶颈是如何获得高亲和力的抗肿瘤 TCR 基因。李亮平等<sup>[3]</sup>构建了整个人源的 TCR-HLA (human leukocyte antigen) 基因位点的基因人源化小鼠,并利用该小鼠模型成功地建立起可以分离得到高亲和力治疗性 TCR 分子的基础系统。TCR-HLA 小鼠的构建需要实现 HLA 基因的人源化。HLA 基因为多等位基因,有将近 30 种常用的 HLA 等位基因。这些等位基因将被用于构建 HLA 基因人源化小鼠,为肿瘤免疫治疗的研发提供了极为重要的基础,和更广泛的应用群体。

小鼠的 MHC (major histocompatibility complex, MHC) 基因称为 H-2 (histocompatibility-2) 基因,人的 MHC 基因称为 HLA 基因。小鼠 H-2 I 类基因包括: H-2K、H-2D 和 H-2L 等,在一些小鼠中, H-2L 基因没有功能。H2-K1 基因是 H-2K 基因的一种单体型 (haplotype)。作为 MHC I 类分子,其表达产物 H-2Kb 能将内源性抗原肽 (如肿瘤抗原肽) 提呈到细胞表面,供 T 细胞的 TCR 识别<sup>[4-5]</sup>。1993 年,科学家证实,在 HLA 转基因小鼠体内,如果小鼠自身 H-2 I 类分子所限制的免疫应答被抑制,HLA I 类分子所限制的免疫应答会很活跃而且多样<sup>[6]</sup>。根据这一结果,科学家开始研发不表达 H-2 I 类分子而只表达 HLA I 类分子的基因工程小鼠。一种策略是:选取 H-2L 基因没有功能的小鼠,通过基因敲除分别得到 H2-K、H2-D 单基因敲除的小鼠;然后让这些小鼠交配得到 H2-K、H2-D 双基因敲除 (即 H-2 I 类基因被敲除) 的小鼠。H-2 I 类基因被敲除的小鼠和 HLA I 类转基因小鼠交配,最后得到 H-2 I 类基因敲除、HLA I 类基因人源化小鼠<sup>[7]</sup>。实验证明,与 H-2 I 类基因没有被敲除的 HLA I 类转基因小鼠相比,这些小鼠体内 HLA I 类分子限制的免疫应答被增强<sup>[8-10]</sup>。这些 H-2 I 类分子缺陷的 HLA I 类基因人源化小鼠在肿瘤免疫治疗、病毒疫苗、基因治疗等领域中有重要的应用<sup>[7,11,12]</sup>。

CRISPR/Cas9 技术来源于细菌和古细菌中的一

种干扰破坏入侵的外源性遗传物质的适应性免疫系统,即 CRISPR (Clustered regularly interspaced short palindromic repeats) /Cas (CRISPR-associated proteins) 9 系统。该系统的主要工作组分包括: Cas9 蛋白, crRNA (CRISPR RNA) 以及 tracrRNA (trans-activating crRNA)。在破坏外源性遗传物质时, tracrRNA 与 crRNA 结合形成二聚体并结合在靶序列上,和 Cas9 蛋白一起介导对靶序列的切割<sup>[13]</sup>。而 CRISPR/Cas9 技术对该系统进行了优化,将 crRNA 和 tracrRNA 融合成一个 sgRNA,由 sgRNA 与 Cas9 蛋白介导 DNA 的靶向切割<sup>[14]</sup>。无论是 CRISPR/Cas9 系统还是改造后的 CRISPR/Cas9 技术,其作用的靶序列附近需要有几个保守的碱基被称为 protospacer-adjacent motif (PAM), PAM 通常是: 5'-NGG-3' (N 为任意一个碱基)<sup>[15-16]</sup>。现在, CRISPR/Cas9 技术已经被用于对细胞以及实验动物的基因组 DNA 进行基因编辑<sup>[14,17-18]</sup>。

本研究利用 CRISPR/Cas9 系统构建了稳定敲除 H2-K1 基因的小鼠 ES 细胞 (以下简称 mES 细胞) 株,可通过此细胞株得到 H2-K1 基因敲除的小鼠,为进一步研发有重大应用价值的免疫基因人源化小鼠提供有效的工具。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞株、质粒和主要试剂

129 小鼠品系胚胎干细胞 (mouse embryonic stem, mES)、怀孕 13.5 d 的 ICR 小鼠品系胚胎成纤维细胞 (mouse embryo fibroblast, MEF), 购自赛业 (广州) 生物科技有限公司。pSuperpuro 质粒为本实验室保存。pX330 质粒, 购自 Addgene。

大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞、氨苄青霉素, 购自广州鼎国生物技术有限公司。1 kb DNA Ladder, 购自上海生工生物工程技术有限公司。琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、pGH 平末端 PCR 产物克隆试剂盒和质粒小量制备试剂盒, 购自上海捷瑞生物工程有限公司。FastDigest Bbs I 限制性内切酶, 购自 Fermentas。去内毒素质粒中量制备试剂盒, 购自 Promega 公司。基因组 DNA 提取试剂盒 (DNeasy Blood & Tissue Kit), 购自 Qiagen 公司。Quick™ Ligation Kit、T4 Polynucleotide Kinase (T4 PNK), 购自 New England Biolabs 公司。电转试剂盒, Amaxa™ P3 Primary Cell 4D-Nucleofector™ X Kit L, 购自 Lonza 公司。Primer Star Max (Takara 公司), 购自广州瑞真生物公司。寡核苷酸单链合

成、PCR 引物合成和质粒测序服务, 购自 Invitrogen 公司。流式抗体: FITC Mouse Anti-Mouse H-2Kb (Isotype : Mouse IgG2a,  $\kappa$ )、FITC Mouse Anti-Mouse H-2Db (Isotype : Mouse IgG2b,  $\kappa$ )、FITC Mouse IgG2a,  $\kappa$  Isotype Control 以及 FITC Mouse IgG2b,  $\kappa$  Isotype Control, 购自 BD Bioscience 公司。胎牛血清、青链霉素、嘌呤霉素、DMEM、Trypsin-EDTA、谷氨酰胺 (100  $\times$ ),  $\beta$ -巯基乙醇, 非必需氨基酸 (100  $\times$ ), 丙酮酸钠, 购自 Life Technologies。白血病抑制因子 (Leukemia inhibitory factor, LIF), 购自 Millipore。二甲基亚砜 (Dimethyl sulfoxide, DMSO)、明胶、丝裂霉素 C, 购自 Sigma 公司。

### 1.2 sgRNA 靶点的选择及其序列的合成

利用哈佛大学张峰实验室 (Zhang Feng Lab, MIT) 提供的网络工具 CRISPER DESIGN (<http://crispr.mit.edu>) 设计 *H2-K1* 基因的向导 RNA (sgRNA) 靶点。根据 *H2-K1* 基因的结构, 分别在其外显子 2 和外显子 3 上各设计一个 sgRNA 靶点。根据质粒 pX330 中 *Bbs* I 酶切位点的结构, 在正义链寡核苷酸 (oligo) 序列的 5' 端添加 "CACC", 并在反义链寡核苷酸序列的 5' 端添加 "AAAC", 这与 *Bbs* I 酶切后形成的黏性末端互补 (图 1: A)。为增强 U6 启动子的转录, 在其起始转录位点需要添加碱基 G<sup>[19]</sup>。如果正义链寡核苷酸序列的 "CACC" 后面的碱基不是 "G", 则需要添加碱基 "G", 并在反义链寡核苷酸序列的 3' 端添加碱基 "C"。

### 1.3 质粒构建

首先, 用 *Bbs* I 内切酶切割质粒 pX330 (1 ~ 2  $\mu\text{g}$ ), 电泳后, 按照琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒说明书进行切胶回收。将设计的单链 oligo 退火形成双链, 退火体系: 1  $\mu\text{L}$ , oligo 1 (100  $\mu\text{mol/L}$ ); 1  $\mu\text{L}$ , oligo 2 (100  $\mu\text{mol/L}$ ); 1  $\mu\text{L}$ , 10  $\times$  T4 Ligation Buffer (NEB); 6.5  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O; 0.5  $\mu\text{L}$ , T4 PNK (NEB); 退火程序: 37  $^{\circ}\text{C}$ , 30 min; 95  $^{\circ}\text{C}$ , 5 min; -6  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , 降温至 25  $^{\circ}\text{C}$ 。将退火形成的双链 DNA 连接到经 *Bbs* I 酶切回收后的 pX330 载体中, 连接体系: 线性化的 pX330, 50 ng; 退火产物经 1:200 稀释, 后取 1  $\mu\text{L}$  稀释液; 2  $\times$  Quickligation Buffer, 5  $\mu\text{L}$ ; 补水至 10  $\mu\text{L}$ ; 加入 1  $\mu\text{L}$  Quick Ligase 后, 室温连接 10 min。将连接产物在 42  $^{\circ}\text{C}$  转化到 DH 5 $\alpha$  感受态细胞中, 用含有氨苄青霉素的琼脂糖平板进行筛选过夜, 挑取单克隆, 提取小制备质粒 DNA 并通过测序验证插入序列的正确性。

### 1.4 细胞培养、转染和药筛

MEF 细胞培养条件: DMEM + 15% (*w*) 胎牛血清 + 1% (*w*) 谷氨酰胺 + 1 mmol/L 丙酮酸钠 + 1% (*w*) 非必需氨基酸 + 100 U/mL 青霉素 + 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  链霉素。37  $^{\circ}\text{C}$ 、 $\varphi=5\%$  CO<sub>2</sub> 恒温培养。

用丝裂霉素 C 处理 MEF 细胞: 往 MEF 培养基中加入丝裂霉素 C, 使其质量浓度为 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。待 MEF 铺板率达到 90% 以上后, 吸除培养基, 加入含丝裂霉素 C 的 MEF 培养基。37  $^{\circ}\text{C}$ 、 $\varphi=5\%$  CO<sub>2</sub> 恒温培养 2 h 后, 吸除培养基, 用 PBS 洗 3 遍。此时, MEF 细胞可用普通 MEF 培养基培养; 也可以消化下来, 种在用明胶处理的培养皿中, 用于培养 mES 细胞。

明胶处理培养皿: 往 100 mm 培养皿中加入 *w* = 0.1% 的无菌的明胶溶液, 于 37  $^{\circ}\text{C}$  恒温培养箱中, 放置 2 h, 然后彻底除去明胶溶液。

mES 细胞的培养条件: 用 DMEM + 15% (*w*) 胎牛血清 + 0.1 mmol/L  $\beta$ -巯基乙醇 + 10<sup>6</sup> IU/mL LIF (白血病抑制因子) + 1% (*w*) 谷氨酰胺 + 1 mmol/L 丙酮酸钠 + 1% (*w*) 非必需氨基酸 + 100 U/mL 青霉素 + 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  链霉素的培养基培养 mES 细胞。在明胶处理好的培养皿中种上 MEF 细胞, 然后换成将 mES 细胞培养基, 将 mES 细胞种在皿中, 37  $^{\circ}\text{C}$ 、 $\varphi=5\%$  CO<sub>2</sub> 恒温培养。

mES 细胞去除 MEF 细胞处理: 在电转和鉴定打靶的 mES 时需要去除 MEF。用胰酶将 mES 细胞消化下来。加入培养基终止消化, 离心去除胰酶上清后, 用 mES 培养基重悬细胞, 转移到明胶处理过的培养皿中, 置于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、 $\varphi=5\%$  CO<sub>2</sub> 恒温培养 20 ~ 30 min, 使 MEF 贴壁生长。然后, 轻轻吸出悬液, 离心收集悬浮的 mES 细胞。如果 MEF 细胞没有除尽, 可在 mES 克隆长出来后, 可以重复上述步骤去除 MEF 细胞, 直到可进行下一步实验。

mES 的 CRISPR/Cas9 基因打靶: 培养 129-mES 细胞, 使其保持未分化状态。未分化 mES 细胞团浓密, 呈椭圆形或圆形且边界清晰明显; 在还没有出现细胞团融合时, 用胰酶将 ES 细胞消化下来。经过去除 MEF 细胞的处理后, 按照 "Amara™ 4D-Nucleofector™ Protocol" 中小鼠 ES 电转化法的使用说明进行电转, 电转程序选用 4D-Nucleofector™ System 中已设定的小鼠 ES 细胞电转程序。收集 4  $\times$  10<sup>6</sup> 个细胞, 用电转缓冲液重悬; 并加入 7.5  $\mu\text{g}$  的 pX330-H2K1-Exon2, 7.5  $\mu\text{g}$  的 pX330-H2K1-Exon3, 5  $\mu\text{g}$  的 pSuper-puro, 1  $\mu\text{g}$  的 pmaxGFP。电转 36 h 后, 给细胞换上含 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  嘌呤霉素的

mES 细胞培养基, 进行药筛, 在药筛 18 h 时, 补充  $3 \times 10^5$  个经丝裂霉素 C 处理的 MEF 细胞。药筛 36 h 后, 给细胞换上普通的 mES 细胞培养基, 并再次补充  $5 \times 10^5$  个经丝裂霉素 C 处理的 MEF 细胞, 继续培养。

### 1.5 mES 细胞克隆的扩增和基因组 DNA 的提取

mES 细胞集落形成后, 挑取单克隆, 进行单独培养以及基因型鉴定。每个 mES 细胞单克隆在扩增后都分成两份, 一份用于冻存, 一份用于扩增细胞。扩增的 ES 细胞, 去 MEF 细胞后提基因组 DNA 进行鉴定。提取基因组 DNA 时, 先消化收集细胞 (每个样品约收集  $6 \times 10^5$  个细胞), 并用 PBS 洗两次, 按照基因组 DNA 提取试剂盒说明书的操作步骤提取基因组 DNA。

### 1.6 mES 细胞基因打靶的鉴定

用 PCR 法扩增打靶区域的 DNA 序列, 根据靶点的位置, 设计基因敲除鉴定引物: H2-K1- (2, 3) -F: CGGATCCGGTGGCGGATCACCAAGAAC-CAATC; H2-K1- (2, 3) -R: GGAATTCCTGACACATTCAGCAGGACAGGAGTC。

PCR 条件如下: Primer Star Max 10  $\mu\text{L}$ , 基因组 DNA 1  $\mu\text{L}$  (60 ng), Primers (F + R) (2  $\mu\text{mol/L}$ ) 2  $\mu\text{L}$ , 补水至 20  $\mu\text{L}$ 。程序如下: 第 1 个循环, 95  $^{\circ}\text{C}$ , 变性 3 min。95  $^{\circ}\text{C}$ , 变性 30 s; 57  $^{\circ}\text{C}$ , 退火 45 s; 72  $^{\circ}\text{C}$ , 延伸 1 min 45 s, 共 35 个循环。最后 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 5 min, 4  $^{\circ}\text{C}$  保存。取反应后产物 5  $\mu\text{L}$  进行琼脂糖凝胶电泳检测。

对发生了基因打靶的 PCR 产物进行分子克隆和测序: 用基因组 DNA 做 PCR (50  $\mu\text{L} \times 8$ ), 对需要检查的条带进行胶回收。用 pGH 平末端 PCR 产物克隆试剂盒将 PCR 目的条带接入载体, 连接反应体系: pGH Blunt end Vector (25 ng/ $\mu\text{L}$ ), 2  $\mu\text{L}$ ; 插入片段 (50 ng/ $\mu\text{L}$ ), 1.5  $\mu\text{L}$  (分子数 vector: insert 大约为 1:5); 2  $\times$  quick ligation solution, 5  $\mu\text{L}$ ; ddH<sub>2</sub>O, 1.5  $\mu\text{L}$ ; 16  $^{\circ}\text{C}$  连接过夜。将连接产物转化 DH5 $\alpha$  感受态细胞, 接种在含有氨苄青霉素的琼脂糖平板上。37  $^{\circ}\text{C}$  培养过夜, 长出菌落后, 挑取单克隆; 摇菌, 提质粒后送样测序。

### 1.7 基因打靶细胞表型鉴定

mES 细胞分化培养: 对确定有 H2-K1 基因敲除的 ES 细胞克隆进行分化培养。首先复苏冻存的拷贝, 去除 mES 细胞中的 MEF 细胞, 然后将 mES 细胞接种在没有经明胶处理的培养皿中, 37  $^{\circ}\text{C}$ 、 $\varphi = 5\%$  CO<sub>2</sub> 恒温培养。用 mES 细胞培养基培养几天以扩增细胞数量, 然后, 用 mES 细胞分化培养基

进行分化培养, 分化的细胞多数呈纤维状。

细胞表面 H-2Kb 分子表达的检测: 在大部分 mES 细胞分化后, 消化收集细胞, 调整细胞浓度为  $10^6 \sim 10^7$  个/ $\text{mL}$ , 用小鼠 MHC 分子单克隆抗体 (anti-mouse H-2Kb) 检测 H-2Kb 分子的表达。取流式抗体 (每种流式抗体各 2  $\mu\text{L}$ ) 加入 100  $\mu\text{L}$  的待测细胞悬液中, 4  $^{\circ}\text{C}$ , 避光反应 30 min。反应完毕后, 离心收集细胞, 用 PBS 洗细胞后, 加入 100  $\mu\text{L}$  PBS 重悬细胞, 然后上样检测以及分析结果。

## 2 结果

### 2.1 CRSPR/Cas9 基因打靶载体的设计与构建

利用哈佛大学张峰实验室提供的网络工具, 在 H2-K1 基因的外显子 2 和外显子 3 上各设计了一个 sgRNA, 并命名为 H2-K1 -Exon2-sgRNA 和 H2-K1 -Exon3-sgRNA (图 1: B)。两个靶位点之间的序列长度为 0.56 kb。

根据 pX330 质粒中 Bbs I 酶切位点的结构以及 U6 启动子的特性, 设计了需要合成的寡核苷酸链 (表 1)。通过退火使寡核苷酸单链形成双链, 然后将退火产物克隆于 pX330 质粒的 Bbs I 酶切位点上, 得到 pX330-H2-K1-Exon2 和 pX330-H2-K1-Exon3 载体; 测序后, 扩增正确的质粒, 用于下一步实验。

### 2.2 小鼠 ES 细胞 H2-K1 基因打靶

消化 mES 细胞并经过 MEF 细胞的处理后, 用 AmaxaTM P3 Primary Cell 4D-NucleofectorTM X Kit L 电转试剂盒, 将 pX330-H2K1-Exon2, pX330-H2K1-Exon3, pSuper-puro, pmaxGFP 共 4 个载体共转染 mES 细胞。电转 36 h 后, 在荧光显微镜下可观察到电转后的细胞表达绿色荧光, 表示电转染成功, 用含 1  $\mu\text{g/mL}$  嘌呤霉素 mES 细胞培养基进行药筛。

筛选后, 换普通的 mES 细胞培养基继续培养 mES 细胞, 5 d 后挑取 mES 细胞单克隆并培养扩增。mES 细胞扩增后, 取一部分用于去 MEF 细胞、提取基因组 DNA 并做 PCR 鉴定 H2-K1 基因是否被敲除。以野生型的 mES 细胞 (wildtype mES cell) 为对照组, 标记为: WT。对于野生型 DNA、仅发生小片段缺失或插入的 DNA, 其 PCR 条带为 1.43 kb; 对于在两靶点间发生整个片段敲除的 DNA, 其 PCR 条带为 0.87 kb。本实验通过 PCR 鉴定了 21 个克隆 (图 2), 其中, #3、#5、#9、#20, 共 4 个克隆都在一个等位基因上发生两靶点间的片段敲除 (19.0%); #12、#17, 共 2 个克隆在双等位基因上都发生两靶点间的片段敲除 (9.5%); 总共

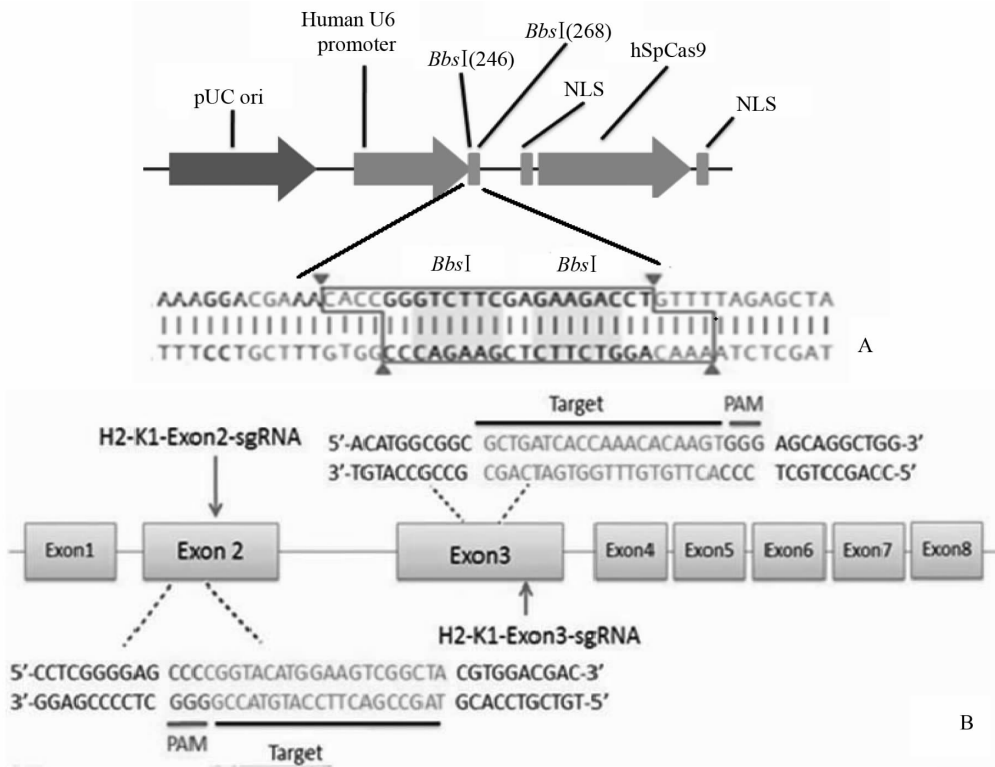


图 1 构建靶向 *H2-K1* 的 pX330 质粒

Fig. 1 Construction of *H2-K1*-targeting pX330 plasmids

A: pX330 质粒结构, 包含 2 个 *Bbs* I 酶切位点以及启动子; B: *H2-K1*-Exon2-sgRNA 以及 *H2-K1*-Exon3-sgRNA 的靶位点及其附件序列

表 1 设计的寡核苷酸序列

Table 1 The designed oligo sequences

sgRNA	Oligonucleotide sequence
H2-K1-Exon2-sgRNA	sense oligo: 5'-CACCGTAGCCGACTTCCATGTACCG-3'
	antisense oligo: 5'-AAACCGGTACATGGAAGTCGGCTAC-3'
H2-K1-Exon3-sgRNA	sense oligo: 5'-CACCGCTGATCACCAAACACAAGT-3'
	antisense oligo: 5'-AAACACTTGTGTTTGGTGATCAGC-3'

打靶效率为 28.5% (6/21)。

### 2.3 mES 细胞克隆基因型鉴定

本次研究对#12 和#17 克隆进行了提取基因组 DNA、PCR、连接载体以及测序鉴定。分析测序结果证实, 这两株克隆的靶位点间的片段被敲除。假设特异性切割的位置是在靶位点 5' 往 3' 方向的第 17 和第 18 个碱基之间 (即 PAM 序列前的第 3 和第 4 个碱基之间)<sup>[14]</sup>。其中, #17 克隆有 3 个靶位点在假设位置上发生了精确的切割 (Clone17-Allele-1 的 *H2-K1*-Exon2-sgRNA 靶点, Clone17-Allele-2 的 *H2-K1*-Exon2-sgRNA 靶点和 *H2-K1*-Exon3-

sgRNA 靶点), #12 和#17 克隆其他 5 个靶位点上的靶向切割都发生了小片段的缺失或者插入 (图 3)。

### 2.4 *H2-K1* 基因表达的鉴定

MHC 分子在 ES 细胞上只有少量的表达, 为了便于分析, 本次研究对#12、#17mES 细胞克隆以及野生型 mES 细胞克隆进行分化培养, 前 4~5 d 用 mES 细胞培养基培养, ES 细胞克隆长出来后, 用 mES 细胞分化培养基培养 (图 4)。培养 25~30 d 后, 大部分的 mES 细胞发生分化, 收集细胞, 进行流式细胞术检测 (图 4)。

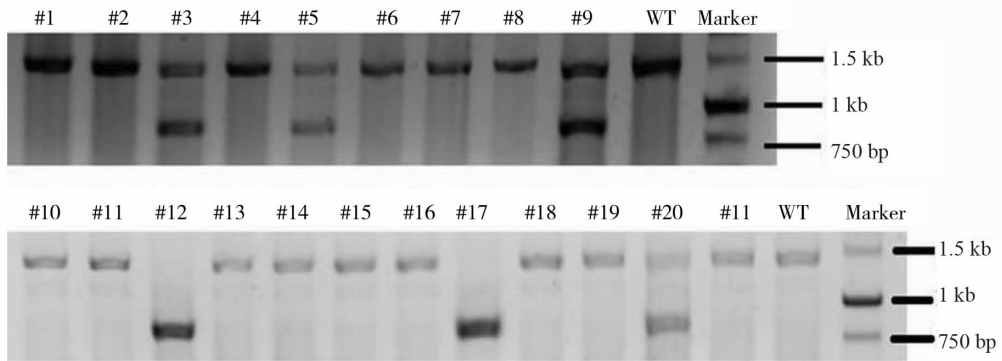


图 2 PCR 鉴定基因片段敲除的 mES 细胞克隆

Fig. 2 The identification of the mES cell clones with gene deletion

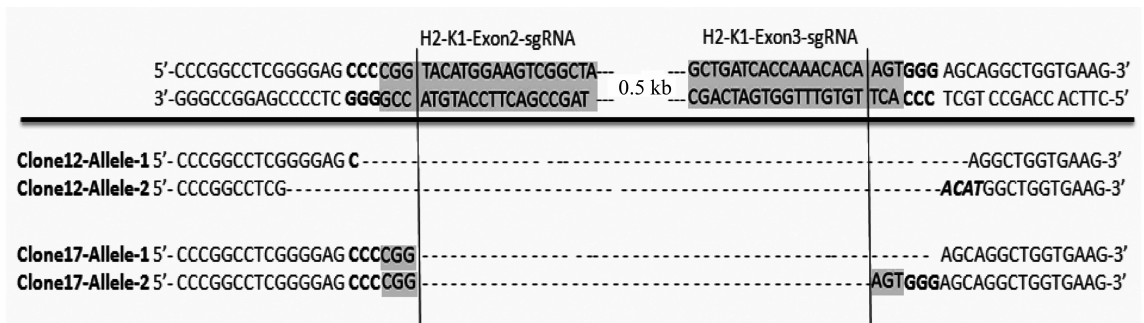


图 3 #12 和#17 克隆的测序结果

Fig. 3 The results of #12 and #17 clones

灰色阴影标记为靶位点序列以及互补序列；加粗字体为 PAM 序列及其互补序列；斜体加粗标记为插入序列

对已分化的 mES 细胞 (differentiated wildtype mES cells)、已分化的#12 mES 细胞 (differentiated #12 mES cells) 以及已分化的#17 mES 细胞 (differentiated #17 mES cells) 进行流式细胞分析, 检测 H-2Kb 分子和 H-2Db 分子的表达水平。H-2Db 是 ES 细胞中另外一种 MHC I 类分子, 为 *H2-D1* 基因的表达产物, *H2-K1* 基因与 *H2-D1* 基因位于同一染色体上, 在野生型的细胞中, H-2Kb 分子和 H-2Db 分子的表达水平相近。流式结果 (图 5) 显示: 已分化的 mES 细胞表达了 H-2Kb 和 H-2Db 分子; 已分化的#12 mES 细胞以及已分化的#17 mES 细胞表达 H-2Db 分子, 但是没有表达 H-2Kb 分子。这一结果进一步证实, 我们通过 CRISPR/Cas9 技术获得#12 和#17 两株敲除 *H2-K1* 基因的 mES 细胞株。

### 3 讨论

*H2-K1* 基因是小鼠 MHC I 类基因的一种, 其表达产物 H-2Kb 参与了病毒抗原、肿瘤抗原等内源性抗原的加工和提呈。MHC I 类基因人源化小鼠在肿瘤免疫治疗、病毒疫苗、基因治疗等领域中

有重要的应用<sup>[7,11-12]</sup>。CRISPR/Cas9 技术是一项新的基因组编辑技术, 和锌指核酸酶 (zinc finger endonuclease, ZFN)、转录激活因子样效应物核酸酶 (transcription activator-like effector nuclease, TALEN) 一样, 可以用于编辑细胞和实验动物的基因组 DNA<sup>[20-21]</sup>。本实验应用 CRISPR/Cas9 技术, 以 pX330 质粒为骨架, 快速地构建了用于敲除 *H2-K1* 基因的质粒载体, 并且通过电击穿孔转染的方法将载体转染到 mES 细胞中。在 mES 细胞单克隆挑取以及细胞扩增后, 经 PCR、DNA 测序以及流式细胞分析证实, 本研究得到了两株 *H2-K1* 双等位基因敲除的 mES 细胞株。

本研究选取了一对靶位点, 去除的是一段基因。如果只设计一个靶位点, 可能会产生小片段碱基的缺失或者插入, 但是少数几个碱基的变化不一定能够使基因沉默。而且小片段的突变很难通过 PCR 的方法来检测, 需要通过 T7 核酸内切酶 I 或者 Suveryor 试验等方法进行检测, 过程比较复杂。与之相比, 本次实验去除的基因片段包含了 *H2-K1* 基因的 Exon2 和 Exon3 的序列, 破坏了其对应的分子的  $\alpha 1$  和  $\alpha 2$  结构, 能够更有效地敲除 *H2-K1* 基

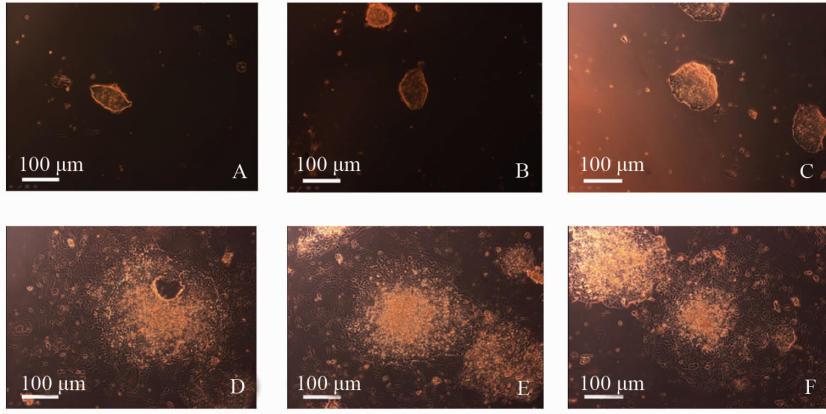


图 4 mES 细胞分化培养

Fig. 4 The differentiation of mES cells

A: #12 mES 细胞分化前的形态; B: #17 mES 细胞分化前的形态; C: 野生型 mES 细胞分化前的形态; D: #12 mES 细胞分化后的形态; E: #17 mES 细胞分化后的形态; F: 野生型 mES 细胞分化后的形态

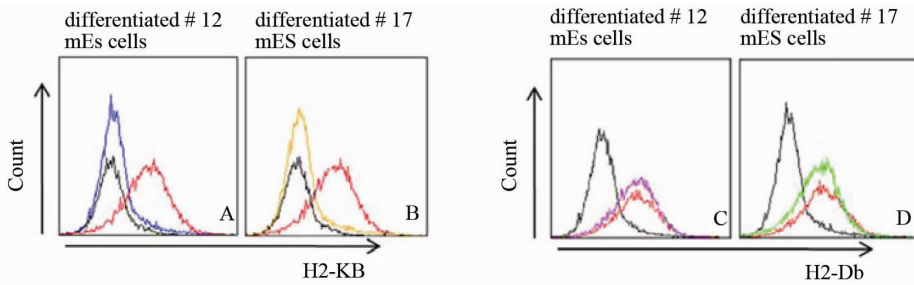


图 5 流式细胞术检测结果

Fig. 5 The result of flow cytometry

A、B: 蓝色曲线代表用 FITC Mouse Anti-Mouse H-2Kb 流式抗体标记分化的#12 mES 细胞的检测结果; 橙色曲线代表用 FITC Mouse Anti-Mouse H-2Kb 流式抗体标记分化的#17 mES 细胞的检测结果; 黑色曲线代表用 FITC Mouse IgG2a,  $\kappa$  Isotype 流式抗体标记分化的野生型 mES 细胞的检测结果; 红色曲线代表用 FITC Mouse Anti-Mouse H-2Kb 流式抗体标记分化的野生型 mES 细胞的检测结果;

C、D: 紫色曲线代表用 FITC Mouse Anti-Mouse H-2Db 流式抗体标记分化的#12 mES 细胞的检测结果; 绿色曲线代表用 FITC Mouse Anti-Mouse H-2Db 流式抗体标记分化的#17 mES 细胞的检测结果; 黑色曲线代表用 FITC Mouse IgG2b,  $\kappa$  Isotype 流式抗体标记分化的野生型 mES 细胞的检测结果; 红色曲线代表用 FITC Mouse Anti-Mouse H-2Db 流式抗体标记分化的野生型 mES 细胞的检测结果

因。通过普通的 PCR 方法即可鉴定 DNA 片段是否被敲除。除此之外, 在提供带同源臂的 DNA 模板的条件下, Cas9 蛋白对 DNA 进行切割产生 DNA 双链断裂 (double-strand break, DSB) 后, 可通过以同源指导修复 (homology directed repair, HDR) 为基础的 DNA 修方式, 实现对 DNA 的修饰<sup>[17-18]</sup>。本实验成功地敲除 *H2-K1* 基因两个靶点间的基因片段, 证实所设计的两个靶点可以作为 CRISPR/Cas9 系统的靶点。靶点所在的 Exon2 和 Exon3 对应 H2-Kb 分子的  $\alpha 1$  和  $\alpha 2$  结构, 正是 MHC I 类分子与抗原肽结合的部位, 这是不少科学家在人源化小鼠的 MHC 基因时修饰的基因区间<sup>[7]</sup>。因此, 本次实验所设计的两个靶位点为 *H2-K1* 基因的修饰

提供两个可靠的靶位点。

研发 MHC I 类基因人源化小鼠的一种策略是先分别得到 H2-K、H2-D 单基因敲除的小鼠。通过显微注射技术, 本研究获得的 *H2-K1* 双等位基因敲除的 mES 细胞可以被注射到小鼠早期胚胎内。通过对小鼠的饲养、繁殖以及鉴定, 可以得到 *H2-K1* 双等位基因敲除的基因工程小鼠。这为 MHC I 类基因人源化小鼠的研发打下基础。这与本实验组的研发 HLA 基因人源化小鼠的目的相符。我们在进行本实验的同时在利用基因置换技术开展 HLA 转基因小鼠的研究, 计划将 H2 基因敲除小鼠与 HLA 转基因小鼠交配, 得到新一代 HLA 基因人源化小鼠。这一系列 HLA 基因人源化小鼠模型将

为肿瘤免疫治疗提供研究平台。

综上所述,本研究联合使用 CRISPR/Cas9 技术、电穿孔转染法等技术得到两株 *H2-K1* 双等位基因敲除的 mES 细胞,同时也证实所设计的两个靶位点的有效性。这些获得的 mES 细胞株、所设计的靶位点以及打靶载体都为 MHC I 类基因人源化小鼠的研发以及病毒疫苗、基因治疗等研究提供很好的工具。

#### 参考文献:

- [1] DOUGAN M, DRANOFF G. Immune therapy for cancer [J]. *Annu Rev Immunol*,2009,27:83 – 117.
- [2] KIEBACK E, UCKERT W. Enhanced T cell receptor gene therapy for cancer [J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2010,10(5):749 – 762.
- [3] LI Liangping, LAMPERT J C, CHEN Xiaojing, et al. Transgenic mice with a diverse human T cell antigen receptor repertoire [J]. *Nat Med*, 2010, 16 (9): 1029 – 1034.
- [4] STEVANOVIC S, SCHILD H. Quantitative aspects of T cell activation-peptide generation and editing by MHC class I molecule [J]. *Seminars in Immunology*,1999,11 (6):375 – 384.
- [5] GIL-TORREGROSA B C, CASTANO A R, LOPEZ D, et al. Generation of MHC class I peptide antigens by protein processing in the secretory route by furin [J]. *Traffic*, 2000,1(8):641 – 651.
- [6] BARRA C, GOURNIER H, GARCIA Z, et al. Abrogation of H-2-restricted CTL responses and efficient recognition of HLA-A3 molecules in DBA/2 HLA/A24 responder mice [J]. *J Immunol*,1993,150:3681-3689.
- [7] PASCOLO S. HLA class I transgenic mice: development, utilisation and improvement [J]. *Expert Opinion on Biological Therapy*,2005,5(7):919 – 938.
- [8] DAFTRIAN P, ALI S, SHARAN R, et al. Immunization with Th-CTL fusion peptide and cytosine-phosphate-guanine DNA in transgenic HLA\_A2 mice induces recognition of HIV-infected T cells and clears vaccinia virus challenge [J]. *J Immunol*,2003,171:4028 – 4039.
- [9] PETER K, MEN Y, PANTALEO G, et al. Induction of a cytotoxic T-cell response to HIV-1 proteins with short synthetic peptides and human compatible adjuvants [J]. *Vaccine*,2001,19:4121 – 4129.
- [10] FIRAT H, COCHET M, ROHRLICH P S, et al. Comparative analysis of the CD8(+) T cell repertoires of H-2 class I wild-type/HLA-A2.1 and H-2 class I knockout/HLA-A2.1 transgenic mice [J]. *Int Immunol*, 2002,14:925 – 934.
- [11] SEYED N, TAHERI T, VAUCHY C, et al. Immunogenicity evaluation of a rationally designed polytope construct encoding HLA-A \* 0201 restricted epitopes derived from *Leishmania major* related proteins in HLA-A2/DR1 transgenic mice: Steps toward polytope vaccine [J]. *PLoS One*,2014,9(10):e108848.
- [12] BOUCHERMA R, KRIDANE-MILEDI H, BOUZIAT R, et al. HLA-A \* 01:03, HLA-A \* 24:02, HLA-B \* 08:01, HLA-B \* 27:05, HLA-B \* 35:01, HLA-B \* 44:02, and HLA-C \* 07:01 Monochain Transgenic/H-2 class I null mice: Novel versatile preclinical models of human T Cell responses [J]. *Journal of Immunology*, 2013,191(2):583 – 593.
- [13] JIANG W, MARRAFFINI L A. CRISPR-Cas: New tools for genetic manipulations from bacterial immunity systems [J]. *Annual Review of Microbiology*,2015,69: 209 – 228.
- [14] CANVER M C, BAUER D E, DASS A, et al. Characterization of genomic deletion efficiency mediated by clustered regularly interspaced palindromic repeats (CRISPR)/Cas9 nuclease system in mammalian cells [J]. *Journal of Biological Chemistry*,2014,289(31): 21312 – 21324.
- [15] CENCIC R, MIURA H, MALINA A, et al. Protospacer adjacent motif (PAM)-distal sequences engage CRISPR Cas9 DNA target cleavage [J]. *PLoS One*, 2014, 9 (10):e109213.
- [16] JINEK M, CHYLINSKI K, FONFARA I, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity [J]. *Science*, 2012, 337 (6096):816 – 821.
- [17] MA Yuanwu, MA Jing, ZHANG Xu, et al. Generation of eGFP and Cre knockin rats by CRISPR/Cas9 [J]. *Febs Journal*,2014,281(17):3779 – 3790.
- [18] YANG Hui, WANG Haoyi, SHIVALILA C S, et al. One-step generation of mice carrying reporter and conditional alleles by CRISPR/Cas-mediated genome engineering [J]. *Cell*,2013,154(6):1370 – 1379.
- [19] MALI P, YANG Luhan, ESVELT K M, et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9 [J]. *Science*,2013,339(6121):823 – 826.
- [20] 聂宇, 乔艳乐, 陈瑶生, 等. 供体同源臂长度对 ZFN 介导的同源重组效率的影响 [J]. *中山大学学报(自然科学版)*,2016,55(4):100 – 107.
- NIE Yu, QIAO Yanle, CHEN Yaosheng, et al. The effect of the length of donor homologous arm on the efficiency of ZFN-induced homologous recombination [J]. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni*, 2016,55(4):100 – 107.
- [21] 倪培凌, 刘畅, 陈凌懿. DNA 剪刀—TALEN 和 CRISPR/Cas [J]. *中国细胞生物学学报*,2014,36 (1):5 – 11.
- NI Peiling, LIU Chang, CHEN Lingyi. DNA scissors—TALEN and CRISPR/Cas [J]. *Chinese Journal of Cell Biology*,2014,36(1):5 – 11.