

doi: 10.3969/j.issn.0490-6756.2019.02.028

基于核酶的自剪切 sgRNA 及其在基因编辑中的应用

单 策, 李中瀚

(四川大学生命科学学院, 成都 610064)

摘 要: 为减少在 CRISPR/Cas9 基因编辑系统中, sgRNA 通常由 III 型启动子持续转录产生, III 型启动子不易控制, sgRNA 持续表达又容易产生细胞毒性这一缺陷, 本文拟建立由 II 型启动子转录, 并由内含子中释放 sgRNA 的方法. 我们在 sgRNA 的两端设计了三种“核酶-sgRNA-核酶”的组合, 通过核酶的自剪切作用实现 sgRNA 的释放. 实验结果表明, HHRz-sgRNA-HDVRz 的设计能够正确的从内含子中释放 sgRNA, 并且该 sgRNA 在构建的 copG-FP 敲除模型中能够实现有效的基因编辑. 这一发现证明在哺乳动物细胞中利用 II 型启动子, 在核酶和内含子剪切的协助下可以实现 sgRNA 的表达, 这为 Cas9 和 sgRNA 整合在一个 II 型启动子之下实现组织特异性和药物诱导性表达提供了基础.

关键词: CRISPR/Cas9 系统; 内含子; 核酶; sgRNA

中图分类号: Q291 **文献标识码:** A **文章编号:** 0490-6756(2019)02-0345-06

Ribozymes based self-cleavage sgRNA and its application in gene editing

SHAN Ce, LI Zhong-Han

(College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610064)

Abstract: Currently, sgRNAs are usually transcribed by type III promoters in CRISPR/Cas9 system, which makes it difficult to achieve tissue-specific and time-specific expression. Cytotoxicity is an additional concern for constitutive transcription of small RNAs. In this paper, we designed an intron-based approach for sgRNA expression by type II promoters, which uses ribozyme switches to facilitate sgRNA release from the spliced intron. We designed three combinations of "ribozyme-sgRNA-ribozyme" at both ends of sgRNAs to release them through the self-cleavage of ribozymes. The results indicated that the design of HHRz-sgRNA-HDVRz could correctly release sgRNA from the intron, and the released sgRNAs could achieve gene editing in human cells. Our finding demonstrated that an intron-based sgRNA expression cassette was compatible with type II promoters and ribozyme switches could be used to facilitate sgRNAs release for gene editing.

Keywords: CRISPR/Cas9 system; Intron; Ribozyme; sgRNA

1 引 言

CRISPR/Cas 系统是在细菌和古生菌中进化的由 RNA 介导的适应性免疫系统, 能够保护生物

免受病毒和质粒的入侵^[1]. 其中, II 型 CRISPR 系统中的 Cas9 蛋白由于能够在 RNA 的介导下实现靶标 DNA 双链的高效切割^[2], 因此被广泛应用于基因编辑. Cas9 切割靶标 DNA 时起引导作用的

收稿日期: 2018-03-12

基金项目: 国家自然科学基金青年基金(31401262)

作者简介: 单策(1990-), 女, 河北邢台人, 硕士研究生, 主要从事分子生物学研究. E-mail: 282154721@qq.com

通讯作者: 李中瀚. E-mail: Zhonghan.li@scu.edu.cn

RNA 由两部分构成:识别目标序列的 20 个碱基的 crRNA 和与 crRNA 形成二级结构的 tracrRNA. 而两者可以通过人工改造融合成一个 sgRNA^[1]与 Cas9 形成 Cas9-sgRNA 复合物实现基因编辑. sgRNA 的转录通常采用 Pol-III 启动子,但此方法存在一些局限性,一方面 U6 启动子长期持续表达小 RNA 可导致细胞毒性^[3];另一方面其无法实现组织特异性和时间特异性诱导表达^[4]. 因此,设计一种依赖于 Pol- II 启动子的 sgRNA 的转录方法显得尤为必要. 本项目拟将 sgRNA 序列整合进内含子中,从而使得整个基因表达体系可以通过 Pol- II 启动子调控,而 sgRNA 从内含子中释放即可实现基因编辑.

由于内含子剪切时通常成套索状^[5],为了实现 sgRNA 的释放,需要解决的关键问题是实现 sgRNA 在内含子中的自我剪切. 为解决该问题,本文在 sgRNA 的两侧引入了核酶,利用核酶自我剪切的特点,实现 sgRNA 从内含子中释放. 我们选择了 Hammerhead Ribozyme (HHRz), Hepatitis delta virus Ribozyme (HDVRz) 和 U14 snRNA 作为核酶备选项. Hammerhead 核酶(HHRz)是在植物卫星 RNA 中发现的第一个自我剪切核酶^[6],大小在 50~150 核苷酸之间,属于小分子核酶^[7]. HHR 通过转酯反应实现自身磷酸二酯键的剪切,反应过程不需要辅助因子,并且有三种环型排列方式^[8]. 最小的 HHRz 由三个茎环构成的活性中心组成,并且可与目标 RNA 形成一个颈环,实现目标序列 3'或 5'端的剪切^[9].

HDV 是 HBV 的一个 RNA 卫星病毒,不与目标序列形成二级结构,适合作为目标序列 3'端的核酶^[9]. 另外, U14 snRNA 也是一种可以自我剪切的 RNA. U14 snRNA 是存在于 Hsc70 热激蛋白内含子 5、6、8 中的小 RNA,能够实现内含子中 RNA 的自我剪切和释放^[10].

根据三种核酶的特点,我们在 sgRNA 的两侧设计了三种核酶组合(5'-3'): U14-sgRNA-U14, HHRz-sgRNA-HDVRz, HHRz-sgRNA-HHRz, 为方便检测 sgRNA 的功能性,此处选择的 sgRNA 为经过筛选能够有效敲除 copGFP 基因的 sgRNA. 将这三种核酶组合插入 Flipo 的球蛋白内含子中,通过 RT-PCR、Western 证明 HHRz-sgRNA-HDVRz 组合能够实现 sgRNA 的正确释放并且不影响原蛋白的表达. 并且通过 FACS 和 T7 EN1 cleavage assay 分析证明 HHRz-sgRNA-

HDVRz 组合释放的 sgRNA 能够与 SpCas9 结合实现 copGFP 基因的有效敲除. 实验结论表明通过 HHRz-sgRNA-HDVRz 的核酶组合可以在内含子中释放有基因编辑功能的 sgRNA,从而可以实现 Pol- II 启动子启动转录的目的.

2 材料和方法

2.1 材料和试剂

人类胚胎肾细胞系 HEK 293FT, DMEM basic 培养基(Gibco, C11995500BT), 胎牛血清(Natocor, NTC-HK009), 抗生素-抗真菌剂(Gibco, 15240-062), 转染试剂 Doge Fect (内蒙古尼迪生物, 23427-01), Mir-X miRNA First-strand synthesis 试剂盒(Takara, 638315), 细胞裂解液 M-PER (Thermo scientific, QJ222436), GAPDH 抗体(华安, R1208-3), Flag 抗体(Sigma, F1804-50 UG), Anti-rabbit 二抗(Invitrogen, SA5-10044), Anti-mouse 二抗(Invitrogen, SA5-10172), polybrene (Millipore, 638313).

2.2 方法

2.2.1 慢病毒的包装及感染 将 HEK 293FT 细胞按 3×10^5 每孔的密度接种到 12 孔板中,第二天细胞可达到 60%~70%的汇合度. 将目的质粒 pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP 与包装质粒 pPACKH1-GAG, pPACKH1-REV, pVSV-G 按质量比 1.2 : 2 : 3 : 1 的比例用 DogoFect 转染进 293FT 中. 48 小时后,收集上清,4000 r/min 离心 10 min,取上层病毒液悬浮感染 293FT 细胞,同时添加 polybrene (Millipore) 至终浓度为 $4 \mu\text{g}/\text{mL}$, 24 h 后换新鲜的培养基继续培养,感染 72 h 后得到 copGFP 稳定表达的细胞株.

2.2.2 western blot 吸弃目的细胞的培养基,加入预冷的 PBS,用细胞刮刀收集细胞置于 1.5 mL 的 EP 管中,3000 r/min 离心 5 min,去上清,加入适量细胞裂解液 M-PER (Thermo scientific),用移液器吹打均匀(冰上操作). 每 10 min 震荡一次,共裂解 30 min,裂解好后于 $4 \text{ }^\circ\text{C}$, 14000 g 离心 20 min,收集上清,加入 $4 \times$ 蛋白上样液, $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 煮 5 min 使蛋白变性. SDS-PAGE 电泳分离蛋白, 23 V 恒压半干转膜 30 min. 用溶于 TBST 的 5% 脱脂奶粉封闭 1 h,一抗(Anti-GAPDH 1 : 2000, Anti-Flag 1 : 1000)于 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱中低温孵育过夜,二抗(Anti-rabbit 1 : 10000, Anti-mouse 1 : 10000)常温孵育 1 h,显影.

2.2.3 RT-PCR Trizol 法提取目的细胞的总 RNA, 用 Mir-X miRNA First-strand synthesis 试剂盒(Takara, 638315)实现 miRNA 的反转录和 3'端的多聚腺苷酸化. 用 Guide RNA 对应的 DNA 为 5'引物和试剂盒提供的 3'引物对 cDNA 进行 PCR 反应, 检测 sgRNA 的转录情况, 作为对照, 用试剂盒中提供的 U6 snRNA 引物对相同的 cDNA 进行 PCR, 1.5% 琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 产物. Guide RNA sequence: GATGCGCACTCGATCTCCA

2.2.4 T7 EN1 cleavage assay 在 copGFP 基因组预测切割位点的两侧 200~400 nt 处设计引物用于 PCR. 提取目的细胞的基因组 DNA, 并用设计好的引物进行 PCR, 之后对 PCR 产物进行纯化. 取纯化后的 PCR 产物 200 ng, 在 PCR 仪中进行退火处理, 用 T7 内切酶处理 15 min 后蛋白酶处理

5 min 终止反应, 产物加入 DNA loading 后用 10% TBE PAGE 电泳鉴定.

PCR 引物: Forward: 5'-CTGTGGTGCCTC-CTGAACTG-3'

Reverse: 5'-TCGGTGAAGATCACGCTGTC-3'.

3 结果与分析

3.1 实验方案设计

为了实现 sgRNA 的正确释放, 在 sgRNA 的两侧设计了三种核酶组合 (5'-3'): U14-sgRNA-U14、HHRz-sgRNA-HDVRz、HHRz-sgRNA-HHRz, 其中 sgRNA 是经过测试能够实现 copGFP 有效敲除的 sgRNA. 将这三种组合插入 Flipo 的球蛋白内含子中, 探究 sgRNA 的释放情况和释放出的 sgRNA 的基因编辑能力(图 1).

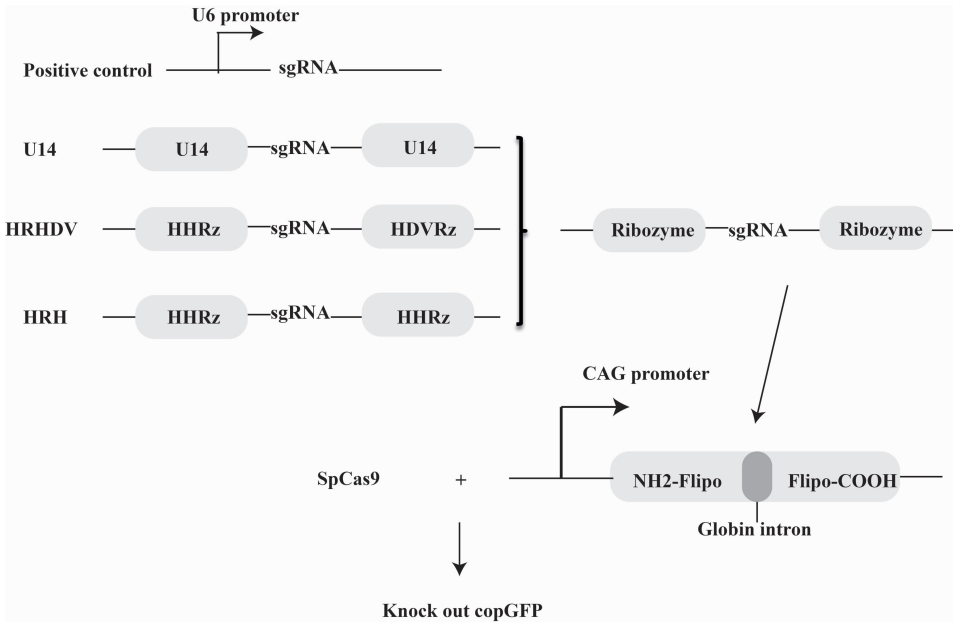


图 1 实验设计方案

Fig. 1 Schematic of the intron sgRNA design

U14-sgRNA-U14 组合序列:

tcgctgtgatgatggattccaaaaccattcgtagtgtccaccaga
 agtgcgtgtgtggctagtctccttcttggatgtctgagcgaaGATG
 CGGCACTCGATCTCCAgtttttagagctaGAAAtagc
 aagttaaaataaggctagtcggttatcaacttgaaaaagtgaccga
 gtcggtgctcgctgtgatgatggattccaaaaccattcgtagtgtcca
 ccagaagtgcgtgtgtggctagtctccttcttggatgtctgagcgaa.

HHRz-sgRNA-HDVR 组合序列:

cgcatacCTGATGAGTCCGTGAGGACGAAA
 CGAGTAAGCTCGTTCGATGCGGCACTCGATC
 TCCAgtttttagagctaGAAAtagcaagttaaaataaggctagt
 ccggttatcaacttgaaaaagtgaccagtcggtgcTCACGA
 GTAAGCTCGTCTGATGAGTCCGTGAGGAC
 GAAAgcaccg

ccggttatcaacttgaaaaagtgaccagtcggtgcGGCCGGC
 ATGGTCCCAGCCTCCTCGCTGGCGCCGGCT
 GGGCAACATGCTTCGGCATGGCGAATGGG
 AC

HHRz-sgRNA-HHRz 组合序列:

cgcatacCTGATGAGTCCGTGAGGACGAAA
 CGAGTAAGCTCGTTCGATGCGGCACTCGATC
 TCCAgtttttagagctaGAAAtagcaagttaaaataaggctagt
 ccggttatcaacttgaaaaagtgaccagtcggtgcTCACGA
 GTAAGCTCGTCTGATGAGTCCGTGAGGAC
 GAAAgcaccg

3.2 copGFP 稳定表达的 293FT 细胞株的构建

为了得到 copGFP 拷贝数稳定的细胞株,需要对感染后的细胞进行梯度稀释,之后按每孔 1 个细胞的密度种在 96 孔板中,两周左右得到十几株能

够稳定表达 copGFP 的细胞株,进行增值培养.挑选一株细胞株用于后续实验,显微镜观察和流式分析证明这一株细胞株的 GFP 阳性比例达到 96% 以上(图 2).

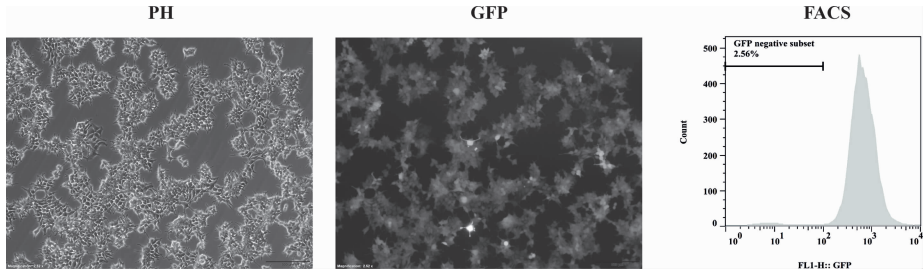


图 2 构建 copGFP 稳定表达的 293FT 细胞株
Fig. 2 Construction of a 293FT cell line that could express copGFP stably

3.3 筛选靶向 copGFP 的高效 sgRNA

通过 CRISPR/Cas9 设计网站 (<http://tools.genome-engineering.org>),针对人基因组对 copGFP 序列进行 sgRNA 的设计.选择网站推荐的评分较高的 4 个 sgRNA,并通过 Bbs I 酶切位点整合到 pX330 质粒的 U6 启动子之后.通过脂质体转染的方法将含 sgRNA 和 Cas9 的质粒转染进 copGFP 稳定表达的 293FT 细胞株中.通过流式结

果筛选高效的 sgRNA,用于后续的实验设计.流式结果显示,4 个 sgRNA 均能表现出针对于 copGFP 的高效敲除效率,文中使用的 sgRNA 为其中的 #2sgRNA. Guide RNA 序列如下:

- #1:GAACGGCGTGGAGTTCGAGC,
- #2:GATGCGGCACTCGATCTCCA
- #3:CTGCACGCCATCAACAACGG,
- #4:GAAGGGGTTCTCGTAGCCGC

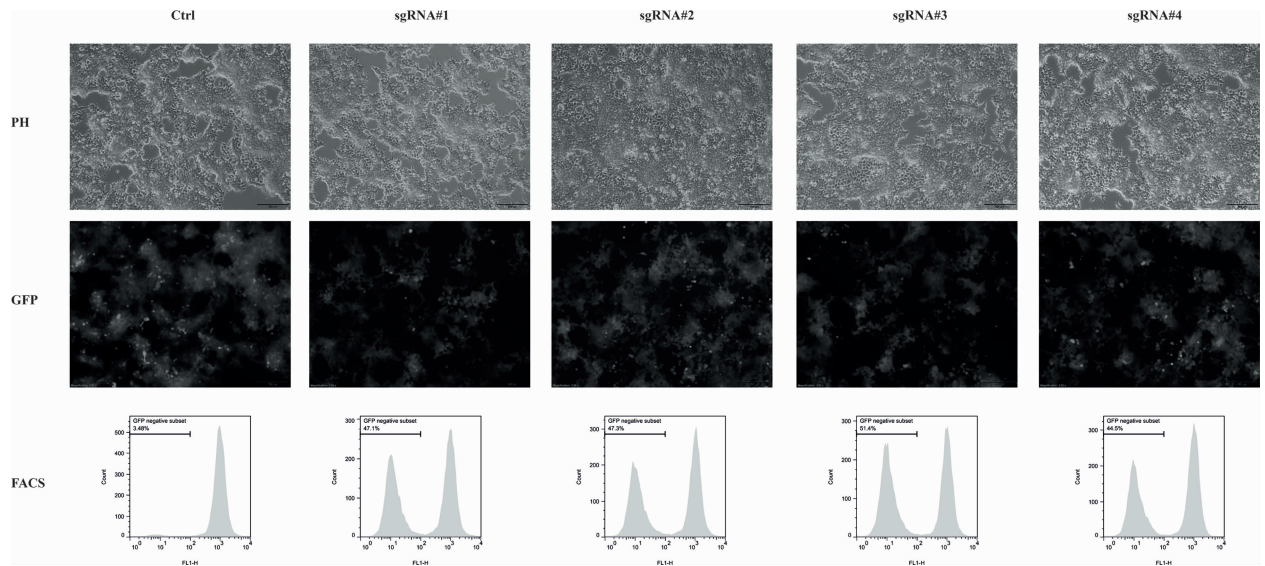


图 3 筛选靶向 copGFP 的高效 sgRNA
Fig. 3 Screening for highly efficient sgRNA targeting copGFP

3.4 Flipo 中插入含三种核酶组合的球蛋白内含子,不影响 Flipo 的表达

三种核酶组合设计好后通过基因合成的方法得到含各自序列的 DNA,通过 Xho I 和 Age I 两个酶切位点整合到 Flipo 中的球蛋白内含子中.为了检测在 Flipo 中插入含三种核酶组合的球蛋白内含

子不影响 Flipo 的表达,将含核酶组合的 Flipo-intron 和 Flipo-intron 空载体通过转染试剂转入 293FT 细胞中,24 h 后收集细胞通过 western blot 证明 Flipo 中插入含三种核酶组合的球蛋白内含子,不影响 Flipo 的表达(图 4).

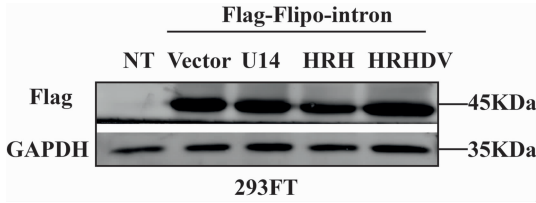


图 4 Western Blot 分析内含子中插入 sgRNA 后原蛋白的表达情况

Fig. 4 Test the expression level of Flipo by western blot when sgRNA inserting in its intron

3.5 核酶-sgRNA-核酶组合中 HHRz-sgRNA-HDVRz 组合能够实现 sgRNA 的正确释放

为了检测核酶-sgRNA-核酶组合中 sgRNA 的剪切情况,将含核酶组合的 Flipo-intron 和 Flipo-intron 空载体通过转染试剂转入 293FT 细胞中, 24 h 后收集细胞提取 RNA,并通过 RT-PCR 分析证明 HHRz-sgRNA-HDVRz 组合可以实现 sgRNA 的正确释放(图 5).

3.6 HHRz-sgRNA-HDVRz 组合释放的 sgRNA 能够有效敲除 copGFP

为了证明 HHRz-sgRNA-HDVRz 组合释放的 sgRNA 具有功能性,将插入 HHRz-sgRNA-

HDVRz 的 Flipo-intron 和 Flipo-intron 空载体与能表达 SpCas9 的 pX330 质粒共转入 copGFP 稳定表达的 293FT 细胞中,6 d 后收集细胞进行流式细胞分析. 流式结果显示与 Flipo-intron 空载体相比,插入 HHRz-sgRNA-HDVRz 的 Flipo-intron 释放的 sgRNA 能够与 SpCas9 一起有效敲除 copGFP. 为了进一步证明实验的真实性,提取转染 6 d 后细胞的基因组 DNA,通过 T7 EN1 cleavage assay 在 DNA 水平证明释放的 sgRNA 能够与 Sp-Cas9 蛋白结合实现基因编辑(图 6).

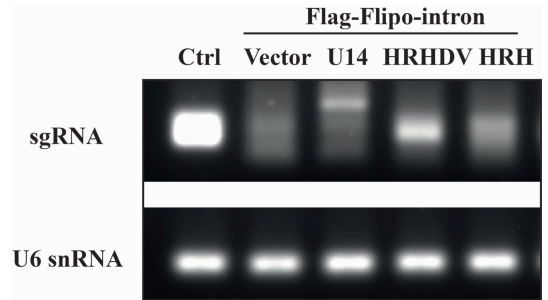


图 5 RT-PCR 分析内含子中插入 sgRNA 后 sgRNA 的转录情况

Fig. 5 Test the transcription level of sgRNA by RT-PCR when it inserting in an intron

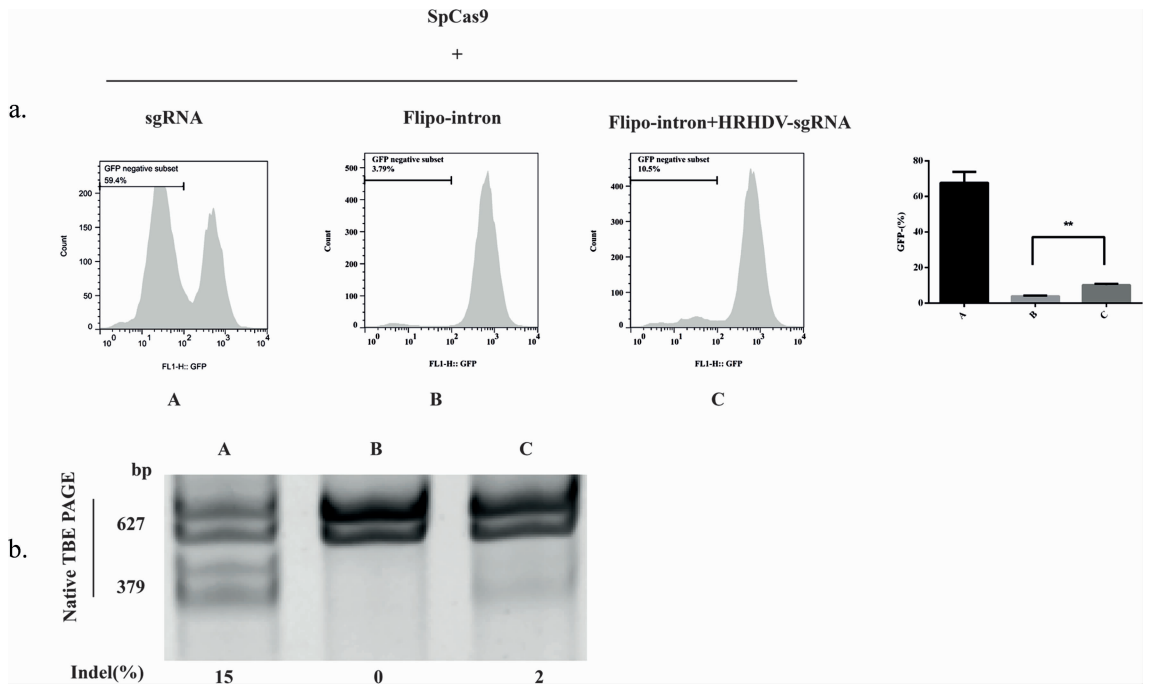


图 6 检测内含子中剪切的 sgRNA 的功能性

Fig. 6 Test the function of sgRNA that released from intron

4 讨论

CRISPR-Cas9 技术能够在小鼠基因组中进行

可遗传的基因编辑,其特点是制作简单,成本低,突变率高^[11],并且能快速的产生小鼠的模型^[12,13]. 但是纯合的突变容易引起胚胎致死或者发育缺

陷^[14],因此开发一个能够在特定时期,特定组织诱导性基因编辑的系统是必要的.现有的诱导性体系,大多以 Cas9 为研究对象,在转录水平和蛋白水平控制 Cas9 的表达^[14,15],从而达到调控基因编辑的目的.我们在研究中发现,当在 sgRNA 的两侧加入能够自我剪切的核酶,并将其插入一个蛋白的内含子中,不仅能够从内含子中正确剪切出有功能的 sgRNA,而且不会影响原蛋白的表达.那么如果能将 sgRNA 插入 Cas9 的内含子中,再通过诱导体系实现 Cas9 和 sgRNA 的同时调控,有望实现效果更好的诱导性基因编辑体系.但是在实验过程中发现,虽然释放的 sgRNA 与阳性对照大小一致,也能实现基因敲除,但相对于阳性对照来说敲除的效率还是很低.因此提高内含子中释放的 sgRNA 的基因编辑效率也是我们之后研究的方向之一,效率低的原因之一可能是与培养基中二价离子的浓度有关,因为核酶发生作用时二价离子起到了很重要的作用^[6],所以调整培养基的二价离子浓度可能是提高效率的方法之一.

参考文献:

- [1] Jinek M, Chylinski K, Fonfaral, *et al.* A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity [J]. *Science*, 2012, 337: 816.
- [2] Pyzocha N K, Ran F A, Hsu P D, *et al.* RNA-guided genome editing of mammalian cells [J]. *Methods Mol Biol*, 2014, 1114: 269.
- [3] Grimm D, Streetz K L, Jopling C L, *et al.* Fatality in mice due to oversaturation of cellular microRNA/short hairpin RNA pathways [J]. *Nature*, 2006, 441: 537.
- [4] Giering J C, Grimm D, Storm T A, *et al.* Expression of shRNA from a tissue-specific pol II promoter is an effective and safe RNAi therapeutic [J]. *Mol Ther*, 2008, 16: 1630.
- [5] Black D L. Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing [J]. *Annu Rev Biochem*, 2003, 72: 291.
- [6] Fedor M J. Comparative enzymology and structural biology of RNA self-cleavage [J]. *Annu Rev Biophys*, 2009, 38: 271.
- [7] Lilley D M. Structure, folding and mechanisms of ribozymes [J]. *Curr Opin Struct Biol*, 2005, 15: 313.
- [8] Hammann C, Luptak A, Perreault J, *et al.* The ubiquitous hammerhead ribozyme [J]. *RNA*, 2012, 18: 871.
- [9] Avis J M, Conn G L, Walker S C. Cis-acting ribozymes for the production of RNA in vitro transcripts with defined 5' and 3' ends [J]. *Methods Mol Biol*, 2012, 941: 83.
- [10] Liu J, Maxwell E S. Mouse U14 snRNA is encoded in an intron of the mouse cognate hsc70 heat shock gene [J]. *Nucleic Acids Res*, 1990, 18: 6565.
- [11] 龙添珍, 黄学琴, 刘海朋, 等. XIAP 在 TRAIL 抗性细胞 HCT116 bax^{-/-} 中的作用机制研究 [J]. *四川大学学报: 自然科学版*, 2016, 53: 1398.
- [12] Li D, Qiu Z, Shao Y, *et al.* Heritable gene targeting in the mouse and rat using a CRISPR-Cas system [J]. *Nat Biotechnol*, 2013, 31: 681.
- [13] Wang H, Al E. One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering [J]. *Cell*, 2013, 153: 910.
- [14] Dow L E, Fisher J, O'Rourke K P, *et al.* Inducible in vivo genome editing with CRISPR-Cas9 [J]. *Nat Biotechnol*, 2015, 33: 390.
- [15] Senturk S, Shirole N H, Nowak D G, *et al.* Rapid and tunable method to temporally control gene editing based on conditional Cas9 stabilization [J]. *Nat Commun*, 2017, 8: 14370.

引用本文格式:

中文: 单策, 李中瀚. 基于核酶的自剪切 sgRNA 及其在基因编辑中的应用 [J]. *四川大学学报: 自然科学版*, 2019, 56: 345.

英文: Shan C, Li Z H. Ribozymes based self-cleavage sgRNA and its application in gene editing [J]. *J Sichuan Univ: Nat Sci Ed*, 2019, 56: 345.