

基于 CRISPR/Cpf1 系统下的诱导型多基因激活体系的建立

黄秋月, 李中瀚, 殷旖珂
(四川大学生命科学学院, 成都 610064)

摘要: 为开发高效率的内源多基因激活工具,利用 CRISPR/Cpf1 系统能够促使 pre-crRNA 中多个 crRNA 自我剪切和释放的特性,将 As/Fn/LbCpf1 的核酸酶区域定点突变形成 dCpf1,并在 C 端和 N 端分别引入了 VPR 三元转录激活域和不稳定结构域(DD-domain)、四环素控制的操纵子,构建了 TRE3G-DD-dCpf1-VPR 激活系统. 结果显示,Oct4 基因的转录水平提升高达 10^4 倍,且 Myod1、Oct4 基因的转录水平分别在 Dox 和 TMP 单药的控制下,能够实现不同程度的转录水平的提升,在加双药的条件下 Myod1、Oct4 基因可分别提高 80、120 多倍. 证明该系统能够通过靶向 DNA 快捷、高效的进行诱导内源性多基因激活.

关键词: CRISPR/Cpf1 系统; 诱导性; 多基因激活

中图分类号: Q291 **文献标识码:** A **DOI:** 10.19907/j.0490-6756.2021.016003

Aninducible CRISPR/Cpf1 system for multiplex gene activation

HUANG Qiu-Yue, LI Zhong-Han, YIN Yi-Ke
(College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610064, China)

Abstract: In order to develop high-efficiency endogenous multi-gene activation tools, and based on the CRISPR/Cpf1 system, which can promote the self-cleavage and release of multiple crRNAs in pre-crRNA, the TRE3G-DD-dCpf1-VPR activation system was constructed. In this system, the site-directed mutation of the nuclease region of As/Fn/LbCpf1 to form dCpf1, and The VPR with DD-domain the tetracycline-controlled operon were introduced at the C and N terminal, respectively. The results showed that the transcription level of Oct4 gene was increased by 10^4 times, and the transcription levels of Myod1 and Oct4 genes can achieve different levels under the control of Dox and TMP single drugs respectively. Under the condition of adding dual drugs, Myod1 and Oct4 genes can be increased by more than 80 and 120 times respectively. It proves that the system can induce endogenous multi-gene activation quickly and efficiently by targeting DNA.

Keywords: CRISPR/Cpf1 system; Inducible; Multi-activation

1 引言

细胞的谱系分化与命运决定一直是细胞生物

学研究的重点方向. 体细胞重编程与功能细胞间转分化研究表明,哺乳动物细胞可通过特异性地表达少数几个特征性的转录因子而实现细胞命运的相

收稿日期: 2020-06-21
基金项目: 四川大学专职博士后项目(2018SCU12053)
作者简介: 黄秋月(1995-), 女, 重庆忠县人, 硕士研究生, 主要从事分子生物学研究. E-mail: 493288022@qq.com
通讯作者: 殷旖珂. E-mail: ytyike@outlook.com

互转化,例如 Oct4、Sox2、Nanog 和 Lin28 可将成纤维细胞重编程为诱导性多能干细胞(iPSC, induced pluripotent stem cells)^[1]; Ascl1、Brn2、Myt1l 的表达可实现成纤维细胞向神经元转换^[2]; 而 Hnf4 α 、Foxa1/2 以及 Gata4、Mef2c、Tbx5 组合则可以分别将成纤维细胞转分化为肝实质样细胞和心肌细胞^[3-4]. 这些研究表明,通过激活特征转录因子的表达,可实现细胞命运与功能的人工改造与转变.

传统的基因过表达策略通常依赖质粒、慢病毒、人工 mRNA 等形式将含有强启动子的转基因引入靶标细胞中,但是此类方法的缺陷在于当需要引入多个基因时,投递效率较低、载体能承受的基因大小受限以及外源基因整合可能破坏细胞内源基因及其调控元件等,因此,开发高效率的内源基因激活技术逐渐成为当前重编程与转分化研究中的重点方向之一. 随着基因编辑技术的发展,尤其是 CRISPR/Cas9 系统的广泛应用,利用核酸酶活性突变体 dCas9 及转录激活结构域构建靶向内源基因的基因激活技术已见报道,并被成功用于重编程与转分化研究中,例如,可将 MEF 细胞重编程为 iPSC^[5]、成纤维细胞转分化为骨骼肌细胞^[6]、将 iPSC 定向分化为神经元等^[7]. 然而, dCas9 介导的多基因激活须将多个 sgRNA 转录元件串联,且每个元件皆须具备 U6 启动子、终止子等序列,造成质粒构建繁琐且载体能承载的 sgRNA 元件数量有限. 而近年来兴起的 CRISPR/Cpf1 多基因编辑因其具有 RNA 酶活性,能够实现 pre-crRNA 中多个 crRNA 的剪切和释放^[8-9],成为更具潜力和普适性的多基因激活工具.

Cpf1 蛋白晶体采用识别叶 (Recognition lobe, REC) 和核酸酶叶 (Nuclease lobe, NUC) 的二裂片结构,呈蟹钳状^[10]. 根据 Cpf1 识别功能域和内切酶功能域分开的特点,将 NUC 进行定点突变使其失去核酸内切酶活力,并与转录激活域融合构建出基因激活工具. 为了更能够了解生命活动的情况,研究各生命机体生化反应下的多基因调控机制,本论文拟构建以 CRISPR/Cpf1 系统为基础的诱导性基因激活系统.

基于此,本论文采用了在 C 端融合三元转录激活域 VPR (VP64-P65-Rta) 的 dAsCpf1、dFnCpf1、dLbCpf1,筛选获得了最强激活效果的 dAsCpf1-VPR 系统. 此外,在该系统中还引入了不稳定结构域 (DD-domain) 和四环素控制的操纵子,

从蛋白水平和转录水平分别控制融合蛋白表达,从而实现了特定时间、定向激活基因转录. 最后,本论文实现了 MYOD1、Oct4 两个基因同时激活,证明了 TRE3G-DD-dAsCpf1-VPR 系统具有诱导性多基因激活的能力.

综上所述,在本论文中,我们成功建立了基于 CRISPR/Cpf1 系统的可诱导性的多基因激活体系,能够快捷、高效的通过靶向 DNA 进行诱导内源性激活,在转录水平进行有效调控,从而具备定向调控细胞基因表达的效果,为实现细胞命运与功能的人工改造与转变奠定技术基础.

2 材料和方法

2.1 材料和试剂

人类胚胎肾细胞系 HEK 293FT,小鼠胚胎成纤维细胞系 NIH3T3,DMEM basic 培养基 (Gibco, C11995500BT),胎牛血清 (Natacor, 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), SuperScript™ II Reverse Transcriptase 试剂盒 (Invitrogen, 638315),细胞裂解液 M-PER (Thermo scientific, QJ222436), GAPDH 抗体 (华安, R1208-3), HA 抗体 (Sigma, F1804-50 μ g), Anti-rabbit 二抗 (Invitrogen, SA5-10044), Anti-mouse 二抗 (Invitrogen, SA5-10172), polybrene (Millipore, 638313).

2.2 方法

2.2.1 瞬时转染 6 孔板中每孔铺 7.5×10^5 个细胞,24 h 后,在显微镜下检查细胞覆盖率,当细胞覆盖率达到 60%~70% 时进行转染. 转染时,取 6 μ L Dogo 加入 94 μ L DMEM 中涡旋混匀后,瞬离并静置 5 min;同时 1 μ g 目的质粒用 DMEM 补齐体积至 100 μ L;瞬离后加入静置 5 min 后的 Dogo 混合液涡旋混匀,室温静置 30 min;最后将脂质体与质粒混合液缓慢滴入细胞孔板中,轻摇混匀后放入 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中培养.

2.2.2 免疫印迹 去除培养基后,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,重复 3 次,随后于 4 $^{\circ}$ C,14 000 g 离心 20 min,收集上清,加入 4 \times 蛋白上样液,95 $^{\circ}$ C 孵育 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 : 2 000, Anti-HA 1 : 1 000) 于 4 ℃ 冰箱中低温孵育过夜, 二抗 (Anti-rabbit 1 : 10 000, Anti-mouse 1 : 10 000) 常温孵育 1 h, 显影.

2.2.3 荧光定量 去除培养基后, 加入 1×PBS 清洗 2~3 次, Trizol 法提取目的细胞的总 RNA, 使用 Invitrogen SuperScript™ II Reverse Transcriptase 试剂盒, 将 RNA 反转录为 cDNA. 使用 BIO-RAD SYBR Green Supermix 试剂盒进行荧光定量分析, 其中 Gapdh 为内参.

qPCR 引物:
mus-Gapdh-F: GCACAGTCAAGGCCGAGAAT
mus-Gapdh-R: GCCTTCTCCATGGTGGTGAA
mus-Myod1-F: AGCGACACAGAACAGGGAAC
mus-Myod1-R: TCGAAAGGACAGTTGGGAAG
mus-Oct4-F: GCCCTCCCTACAGCAGATCACT-
CACATCG
mus-Oct4-R: AAGGTGTCCCTGTAGCCTCATA
CTCTTCTCGT

2.2.4 质粒构建

- a) dAs/Fn/LbCpf1-VPR 的构建
- 使用 KOD-Plus Mutagenesis Kit(公司)点突变试剂盒分别将 pcDNA3. 1-As/Fn/LbCpf1-3 × HA 的 908 位、832 位、917 位的天冬氨酸突变为丙氨酸;在青兰基因合成 VPR 序列,通过 infusion 的方法将 VPR 连接在 dCpf1 的 C 端, 构建成 pcDNA3. 1-dAs/Fn/LbCpf1-3×HA-VPR ;
- b) TRE3G-DD-dAsCpf1-VPR 的构建
- 将 pLVX-TRE3G 空载酶切, 将 DD Domain 片段 PCR 并纯化, 并将 dAsCpf1-3 × HA-VPR 片段 PCR 并纯化后, 用 infusion 的方法将 DD Domain 连接于 dAsCpf1-3 × HA-VPR 的 N 端, 构建成 pLVX-TRE3G-DD-dAsCpf1-3×HA-VPR;

3 结果分析

3.1 构建 CRISPR/Cpf1-VPR 基因激活系统

将来源于 *Acidaminococcus sp.* 的 AsCpf1 的第 908 位, *Francisella novicida* 的 FnCpf1 的第 917 位和 *Lachnospiraceae bacterium* 的 LbCpf1 的第 832 位的天冬氨酸突变为丙氨酸, 并且在 dAs/Fn/LbCpf1 的 C 端连接了由 VP64, P65 和 Rta (VPR)蛋白组成的三元复合转录激活因子的激活效应区域(TAD), 形成具有激活作用的融合蛋白

(图 1a). 将需激活的靶标基因的 sgRNA 设计在该基因转录起始位点(Transcription Start Site, TSS)之前, dCpf1-VPR 在 sgRNA 的介导下能够特异性识别并且结合在该基因启动子或者增强子区域, VPR 通过招募细胞因子或其他共转录激活因子, 并结合形成多元复合物, 进而定向激活靶标基因(图 1b).

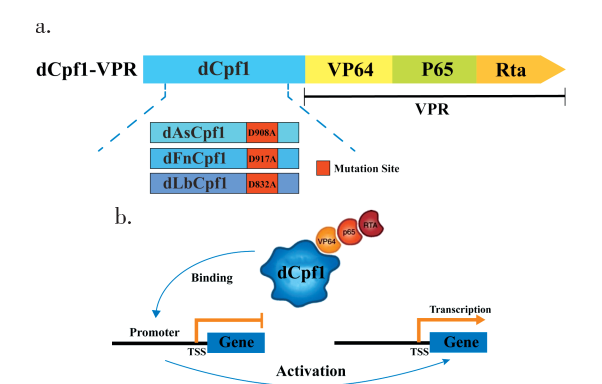


图 1 dCpf1-VPR 激活系统的构建策略
Fig. 1 Construction strategy of dCpf1-VPR activation system

3.2 dCpf1-VPR 激活系统能够定向上调基因的转录

图 2 为 NIH3T3 细胞中 Oct4 基因的转录水平. 结果显示, dAs/Fn/LbCpf1-VPR 三种激活系统都有不同程度的激活作用, 其中在 dAsCpf1-VPR 系统下的 Oct4 基因 mRNA 水平与对照组相比可提升到 10⁴ 倍, 证明 dAsCpf1-VPR 系统激活效果最强. 因此我们将选用 dAsCpf1-VPR 激活系统进行后续的实验. 同时测试由单个 sgRNA 介导下的激活效果, sgRNA-2 和 5 介导的激活效果与对照组相比提升到 10² 倍, 并且证明了由 sgRNA-2 和 5 介导的激活效果与 5 个 sgRNA 介导的强度相同, 与对照组相比可提升到 10⁴ 倍.

3.3 构建诱导性激活系统

为了构建诱导性基因激活系统, 将 TET-ON 系统和不稳定配体(DD Domain)与 dAsCpf1-VPR 相结合, 形成可由 TMP 和 Dox 小分子药物诱导的基因激活系统(图 3). DD Domain 是来源于大肠杆菌二氢叶酸还原酶(DHFR)突变体的不稳定结构域, 能够在小分子化合物 TMP 的存在下保持结构稳定, 促使其融合蛋白 DD-dAsCpf1-VPR 稳定表达. TET-ON 系统中蛋白的表达受到 TRE3G 启动子的控制. 只有在 Dox 存在的情况下, rtTA 才能促使 TRE3G 启动子发挥作用并致使下游基因的转录.

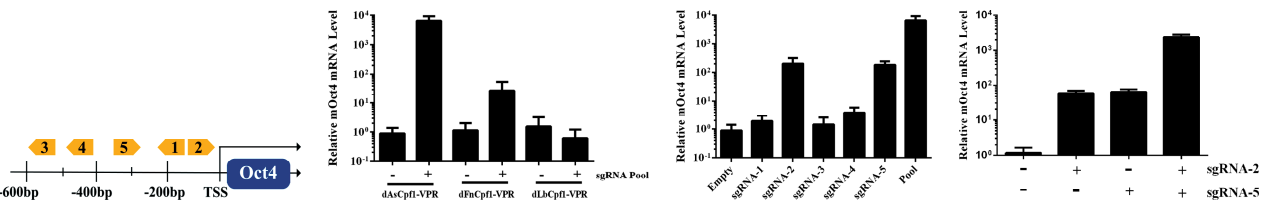


图 2 dCpf1-VPR 系统定向激活 Oct4 基因转录情况
Fig. 2 Transcription of Oct4 gene by activation of dCpf1-VPR system



图 3 构建诱导性激活系统
Fig. 3 Construct an inducible activation system

3.4 TRE3G-DD-dAsCpf1-VPR 系统实现蛋白稳定表达和诱导性基因激活

为了验证 TRE3G-DD-dAsCpf1-VPR 系统的诱导控制效果,分别从蛋白水平和转录水平进行验

证.图 4a 结果显示,在 Dox 和 TMP 双药诱导下 DD-dAsCpf1-VPR 融合蛋白均得到高表达,且诱导系统的本底水平表达量很低.同时图 4b 结果显示,加双药诱导组与对照组相比,Oct4 基因的 mRNA 水平提高了 250 倍,能显著提高 Oct4 基因的转录水平.以上结果说明,TRE3G-DD-dAsCpf1-VPR 系统可以在 Dox 和 TMP 双药的诱导下,实现对目标基因的诱导性激活.

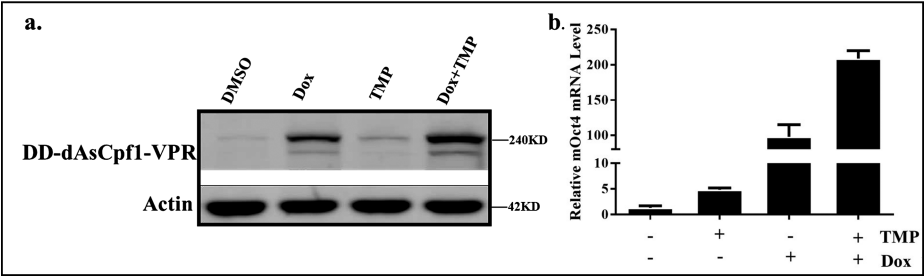


图 4 Dox 和 TMP 双药诱导蛋白表达和基因激活情况
Fig. 4 Protein expression and gene activation induced by Dox and TMP

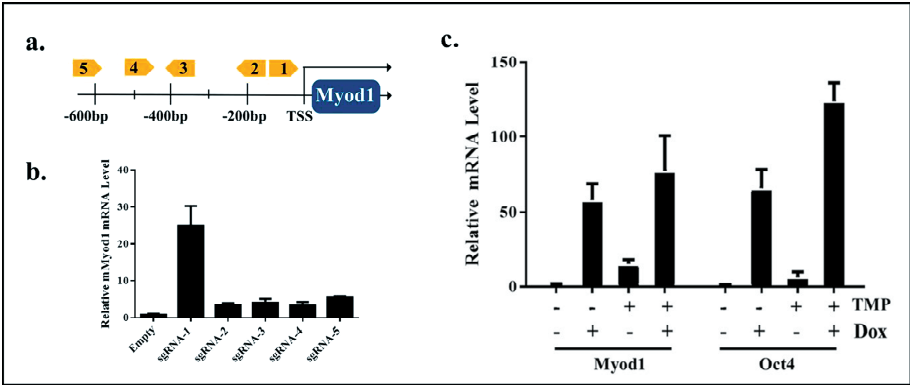


图 5 单个 sgRNA 介导 Myod1 基因的激活情况和 Dox、TMP 双药诱导下多基因激活的情况
Fig. 5 Single sgRNA mediated Myod1 gene activation and analysis of polygene activation induced by Dox TMP

3.5 TRE3G-DD-dAsCpf1-VPR 系统能够介导诱导性多基因激活

图 5b 为 Myod1 基因由单个 sgRNA 介导的激活效果,筛选出了激活效果较强的 sgRNA-1 和 5.然后同时对 Myod1、Oct4 基因进行激活,根据图 5c 的结果显示,Myod1、Oct4 基因的转录水平分别在

Dox 和 TMP 单药的控制下,能够实现不同程度的转录水平的提升.在 Dox 诱导下,Myod1 和 Oc4 基因的转录水平分别提升了大约 50 倍和 70 倍,在同时加双药的条件可分别提高 80、120 多倍,表明 TRE-3G-DD-dAsCpf1-VPR 系统可以高效介导诱导性多基因激活.

4 讨 论

随着基因编辑技术的发展,尤其是 CRISPR/Cas9 系统的广泛应用,利用核酸酶活性突变体 dCas9 及转录激活结构域构建靶向内源基因的基因激活技术已见报道,并被成功用于重编程与转分化研究中.然而,dCas9 介导的多基因激活须将多个 sgRNA 转录元件串联,且每个元件皆须具备 U6 启动子、终止子等序列,造成质粒构建繁琐且载体能承载的 sgRNA 元件数量有限.CRISPR/Cpf1 系统是近年来兴起的多基因编辑系统,其突出特点是,Cpf1 具有 RNA 酶活性,能够促使 pre-crRNA 中的多个 crRNA 的剪切和释放,因此更具备作为多基因激活工具的潜力和普适性.

为了更好地实现细胞命运与功能的人工改造与转变,本文构建了基于 CRISPR/Cpf1 系统下能够定时定向激活多基因的工具.为了筛选出最高效激活能力的 Cpf1,对比了 dAs/Fn/LbCpf1-VPR 的激活效果.基于此,为了构建可诱导的 Cpf1 基因激活技术方法,在 dAsCpf1-VPR 的 N 端引入了不稳定结构域(DD-domain)和四环素控制的操纵子,通过在转录和蛋白稳定性两个层面添加诱导性调控元件,证明能够在 Dox 和 TMP 双药调控下蛋白水平和转录水平的高效诱导表达和激活.最后,对 MYOD1、Oct4 两个基因同时激活,证明 TRE3G-DD-dAsCpf1-VPR 系统具有诱导性多基因激活的能力.综上所述,成功将 CRISPR/Cpf1 系统与 TET-ON 系统融合,建立了诱导性多基因激活体系,能够快速、高效的通过靶向 DNA 进行诱导内源性激活,在 DNA 水平上对细胞转录水平进行有效调控,具有定向调控细胞基因表达,能够实现细胞命运与功能的人工改造与转变的潜力.

参考文献:

[1] Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent

stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors [J]. Cell, 2006, 126: 663.

[2] Yu J, Vodyanik M A, Smuga-otto K, *et al.* Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells [J]. Science, 2007, 318: 1917.

[3] Vierbuchen T, Ostermeier A, Pang Z P, *et al.* Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors [J]. Nature, 2010, 463: 1035.

[4] Pang Z P, Yang N, Vierbuchen T, *et al.* Induction of human neuronal cells by defined transcription factors [J]. Nature, 2011, 476: 220.

[5] Zhou Q, Brown J, Kanarek A, *et al.* In vivo reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to β -cells [J]. Nature, 2008, 455: 627.

[5] Maeder M L, Linder S J, Cascio V M, *et al.* CRISPR RNA - guided activation of endogenous human genes [J]. Nature methods, 2013, 10: 977.

[6] Konermann S, Brigham M D, Trevino A E, *et al.* Genome-scale transcriptional activation by an engineered CRISPR-Cas9 complex [J]. Nature, 2015, 517: 583.

[7] Chavez A, Scheiman J, Vora S, *et al.* Highly efficient Cas9 - mediated transcriptional programming [J]. Nature methods, 2015, 12: 326.

[8] Zetsche B, Heidenreich M, Mohanraju P, *et al.* Multiplex gene editing by CRISPR - Cpf1 using a single crRNA array [J]. Nature Biotechnol, 2017, 35: 31.

[9] 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.

[10] Yamano T, Nishimasu H, Zetsche B, *et al.* Crystal structure of Cpf1 in complex with guide RNA and target DNA [J]. Cell, 2016, 165: 949.

引用本文格式:

中 文: 黄秋月, 李中瀚, 殷旖珂. 基于 CRISPR/Cpf1 系统下的诱导型多基因激活体系的建立[J]. 四川大学学报: 自然科学版, 2021, 58: 016003.

英 文: Huang Q Y, Li Z H, Yin Y K. Aninducible CRISPR/Cpf1 system for multiplex gene activation [J]. J Sichuan Univ; Nat Sci Ed, 2021, 58: 016003.