

· 组织工程与细胞培养 ·

利用 CRISPR/Cas9n double nick 系统构建人 *DNAH2* 基因敲除的 U2OS 细胞株

常丽贤, 孙聪聪, 陈晓娟, 杨文钰, 张家源, 张英弛, 袁卫平, 竺晓凡

中国医学科学院 北京协和医学院 血液病医院血液学研究所, 天津 300020

常丽贤, 孙聪聪, 陈晓娟, 等. 利用 CRISPR/Cas9n double nick 系统构建人 *DNAH2* 基因敲除的 U2OS 细胞株. 生物工程学报, 2017, 33(2): 284–293.

Chang LX, Sun CC, Chen XJ, et al. Knocking out of human *DNAH2* gene in U2OS cells by CRISPR/Cas9n double nick system. Chin J Biotech, 2017, 33(2): 284–293.

摘 要: 基于 CRISPR/Cas9n double nick 技术构建人 *DNAH2* (Homo sapiens dynein, axonemal, heavy chain 2) 基因敲除的 U2OS 稳定细胞株, 旨在研究 *DNAH2* 基因的生物学功能。首先设计并合成 A、B 两个 sgRNA (Single guide RNA) 以及各自的互补链, 退火连接形成 *DNAH2* sgRNA-A、B 双链, 再分别与带有 *Bbs* 粘性末端的 pX462 线性载体相连, 形成 pX462-*DNAH2*-A、pX462-*DNAH2*-B 重组真核表达质粒。质粒共转染至 U2OS 细胞后, 加入嘌呤霉素, 以有限稀释法获得阳性单克隆细胞株, 再以蛋白印迹实验检测 *DNAH2* 蛋白的表达, 最后通过 PCR-基因测序技术分析突变特点。结果显示 A、B sgRNA 双链成功插入 pX462 载体, U2OS-*DNAH2*-KO 单克隆细胞株中 *DNAH2* 蛋白不表达, *DNAH2* 基因发生移码突变, 从而证实利用 CRISPR/Cas9n double nick 系统成功构建人 *DNAH2* 基因敲除的 U2OS 稳定细胞株, 为研究 *DNAH2* 基因提供有利工具。

关键词: *DNAH2*, CRISPR/Cas9n, 基因敲除, 稳定细胞株

Received: July 21, 2016; **Accepted:** September 26, 2016

Supported by: National Natural Science Foundation of China (Nos. 81500156, 81470339, 81470280, 81300394), Tianjin Science and Technology Project (No.12ZCDZSY18100).

Corresponding author: Xiaofan Zhu. Tel/Fax: +86-22-23909196; E-mail: xfzhu@ihcams.ac.cn

国家自然科学基金 (Nos. 81500156, 81470339, 81470280, 81300394), 天津市科技计划项目 (No. 12ZCDZSY18100) 资助。

Knocking out of human *DNAH2* gene in U2OS cells by CRISPR/Cas9n double nick system

Lixian Chang, Congcong Sun, Xiaojuan Chen, Wenyu Yang, Jiayuan Zhang, Yingchi Zhang, Weiping Yuan, and Xiaofan Zhu

Institute of Hematology and Blood Diseases, Hospital Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Tianjin 300020, China

Abstract: To study the biological function of *DNAH2* (Homo sapiens dynein, axonemal, heavy chain 2) gene, we constructed human stable U2OS cell line of *DNAH2* gene knockout through CRISPR/Cas9n double nick system. The A, B sgRNAs (Single guide RNA) and complementary strands were designed and synthesized. The double-stranded structures were formed during annealing, and connected with Bbs cohesive ends-containing pX462 linear vector to construct the recombinant eukaryotic expression plasmids, including pX462-DNAH2-A and pX462-DNAH2-B. After the co-transfection of the two plasmids into U2OS cells, the addition of puromycin and limiting dilution method were used to obtain positive monoclonal cell line. Western blotting assay was then performed to detect the expression of *DNAH2* protein, and PCR-sequencing technology was finally utilized to analyze the mutation feature. The results showed that A, B sgRNAs duplex was successfully inserted into pX462 vector, and *DNAH2* protein was not expressed and *DNAH2* gene suffered from the frame-shift mutation in U2OS-DNAH2-KO monoclonal cell line. These demonstrated that *DNAH2* knockout U2OS stable cell line was successfully constructed through CRISPR/Cas9n double nick system, which providing a useful tool for the study of *DNAH2* gene.

Keywords: *DNAH2*, CRISPR/Cas9n, knock-out, stable cell line

DNAH2 (Homo sapiens dynein, axonemal, heavy chain 2) 基因可以编码 *DNAH2* 蛋白, 后者主要表达于气管和睾丸部位, 可参与精子鞭毛的组成, 是呼吸道纤毛主要的动力产生蛋白^[1-3]。*DNAH2* 基因突变的患者可能会出现呼吸道抵抗力下降、反复呼吸道感染、支气管扩张症等症状^[2-4]。范可尼贫血 (Fanconi anemia, FA) 是一种主要由 FA 基因纯合或复合杂合突变引起的常染色体或 X 连锁隐性遗传性疾病^[5-7]。目前已发现并克隆出多个可致范可尼贫血的突变基因 (如 *FANCA*、*FANCB*、*FANCD1*、*FANCD2* 等)^[5-6]。本实验室前期对明确诊断为范可尼贫血的 5 例患者及其父母进行了全外显子组测序, 结果发现 5 例患者均有已知 FA 基因突变, 并且含有 2 个或 2 个以上 FA 基因的杂合突变,

同时还发现了其他多个新的突变基因, 其中包括 *DNAH2* 基因^[8]。然而, 目前尚无 *DNAH2* 基因与范可尼贫血的相关性研究。CRISPR/Cas9 (Clustered regulatory interspaced short palindromic repeat/Cas9) 系统是一种在 sgRNA 的指导下, 在基因组水平上对目的基因 DNA 序列进行改造的定点编辑技术, 可实现对于目的基因的完全敲除。本实验旨在利用 CRISPR/Cas9 系统建立 *DNAH2* 基因靶向敲除细胞株, 有助于探讨 *DNAH2* 基因在范可尼贫血中的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

U2OS 细胞为本实验室冻存, trans1-T1 感受态细胞、*Taq* 酶、SDS 上样缓冲液、0.2% 通透

液购自天津科仪嘉欣科技有限公司；真核表达质粒 pSpCas9n(BB)-2A-Puro (pX462) 购自 Addgene；限制性内切酶 *Bbs* 购自 Thermo Fisher Scientific 公司；质粒保护核酸外切酶 (PlasmidSafe exonuclease) 购自 epicentre 公司；T4 DNA 连接酶购自 NEB 公司；DNA 快速凝胶回收试剂盒购自北京博大泰克生物基因技术有限公司；嘌呤霉素购自北京索莱宝科技有限公司；质粒快速小提试剂盒购自北京索来宝科技有限公司；sgRNA 序列及基因测序工作由苏州金唯智生物科技有限公司完成。去内毒素质粒提取试剂盒购自 Promega 公司；NeoFect DNA 转染试剂购自零客创智有限公司；BCA 蛋白测定试剂盒购自 Pierce 公司；鼠源单克隆抗 DNAH2 抗体为本实验室制备；鼠源单克隆抗 β -actin 蛋白抗体购自 Sigma 公司；辣根过氧化物酶标记的抗鼠源 IgG 二抗购自 KPL 公司；BeyoECL Plus (超敏 ECL 化学发光试剂盒) 购于碧云天公司。

1.2 方法

1.2.1 sgRNA 寡核苷酸双链序列设计

应用 <http://crispr.mit.edu/> 网站针对 *DNAH2* 基因 (NM_020877.2) 第 1 个外显子区的序列“5'-ATGTCCAGCAAAGCTGAGAAGAAGCAGCGATTGAGTGGCCGAGGAAGCTCCAGGC AAGCTGGTCAGGGCGGGCCACTCGGGCTGCTGTGGCCACACAGGAGCAGGGGAATGCC CCGGCTGTCA GTGAGCCAGAGCTGCAGGCTGAGCTCCCCAAGGAGGAGCCTG-3'”进行 A、B 两个 sgRNA 的靶点选择及序列设计。首先通过在线网站获取特定靶点的 A、B 两对 sgRNA 原始片段,再对 A 原始片段进行如下修改:1) 去掉由网站设计的 sgRNA 原始片段 3'端的“NGG”;5'端添加“CACC”,若“CACC”后非“G”,

可加入“G”,以增加酶切效率,从而获得 DNAH2-sgRNA-A 序列;2) 去掉由网站设计的 sgRNA 片段 3'端的“NGG”;再以此为基础设计出反向互补序列;5'端添加“AAAC”后即为 DNAH2-sgRNA-A 序列的互补链。然后,依此法对 B 原始片段进行修改。由此便分别获得带有 *Bbs* 酶切位点的 DNAH2-sgRNA-A、DNAH2-sgRNA-B 两种寡核苷酸双链,具体序列见表 1。

1.2.2 DNAH2-sgRNA 双链和线性 pX462 载体的获取

由公司合成上述的 DNAH2 sgRNA 序列及其互补链;利用 Thermo cycler 使 sgRNA 序列与其互补链退火连接形成 DNAH2-sgRNA-A、B 两个双链结构,并稀释至 0.5 μ mol/L。反应体系:100 nmol/L DNAH2-sgRNA-A/B, 100 nmol/L sgRNA-A/B 的互补链,1 μ L 10 \times T4 连接缓冲液,100 U T4 PNK,加超纯水至 10 μ L。退火程序:95 $^{\circ}$ C 5 min;94 $^{\circ}$ C 1 min, -1° C/循环,22 个循环;72 $^{\circ}$ C 30 min;71 $^{\circ}$ C 1 min, -1° C/循环,46 个循环;4 $^{\circ}$ C 1 h。同时,以质粒快速小提试剂盒提取 pX462 质粒,再以 *Bbs* 限制性内切酶,37 $^{\circ}$ C、15 min 进行酶切线性化。反应体系:1 μ g pX462 载体,1 μ L *Bbs*, 1 μ L FastAP, 2 μ L 10 \times Green Fast Digest Buffer, 加超纯水稀释

表 1 DNAH2 sgRNA (A-B) 寡核苷酸双链序列

Table 1 The double-stranded oligonucleotide sequences of DNAH2 sgRNA (A-B)

Primer names	Primer sequence (5'-3')
A-Forward	CACCGCTCTGGCTCACTGACAGCCG
A-Reverse	AAACCGGCTGTCA GTGAGCCAGAGC
B-Forward	CACCGCAGGCTGAGCTCCCCAAGG
B-Reverse	AAACCCTTGGGGAGCTCAGCCTGC

至 20 μL 。以 DNA 快速凝胶回收试剂盒回收线性 pX462 载体。

1.2.3 pX462-DNAH2-sgRNA 的连接、转化及鉴定

取 50 ng 线性化 pX462 质粒, 1 μL DNAH2-sgRNA 双链 (0.5 $\mu\text{mol/L}$), 1.5 μL 10 \times T4 DNA 连接酶缓冲液, 0.5 μL 牛血清白蛋白 (10 g/L), 再加超纯水至 11 μL 体系, 室温孵育 60 min。在上述体系中加入 1.5 μL 10 \times 质粒保护缓冲液, 1.5 μL ATP (10 mmol/L), 1 μL 质粒保护核酸外切酶, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min, 目的是防止非特异的重组产物。然后, 分别将连接的 pX462-DNAH2-sgRNA-A、B 重组质粒转化入 trans1-T1 感受态细胞中, 挑取单克隆进行摇菌扩增; 再以质粒快速小提试剂盒提取两个重组质粒 pX462-DNAH2-A 和 pX462-DNAH2-B, 分别采用 U6 启动子序列 (ATACGATACAAGGCTGT TAGAGAGATA) 进行测序验证, 同时利用 *Bbs* 限制性内切酶进行酶切鉴定。

1.2.4 细胞培养与质粒共转染

在 6 孔板内以高糖-DMEM 培养基 (含 10% 胎牛血清), 5% CO_2 , 37 $^{\circ}\text{C}$ 常规培养 U2OS 细胞。以去内毒素质粒提取试剂盒提取无内毒素质粒, 包括 pX462-DNAH2-A、pX462-DNAH2-B 及空载体对照 pX462。当 U2OS 细胞达 60%–70% 汇合时, 更换新鲜培养基, 1 h 后根据产品说明书以 NeoFect 转染试剂对 U2OS 细胞转染空载体对照 pX462, 以制备 U2OS-DNAH2-WT 细胞株; 或共转染 pX462-DNAH2-A、pX462-DNAH2-B 质粒, 以制备 U2OS-DNAH2-KO 细胞株。

1.2.5 细胞稳定株的单克隆筛选

以 6 孔板常规培养未转染的 U2OS 细胞, 分别以加入 20、10、5、2.5、1.25 和 0.62 $\mu\text{g/mL}$

嘌呤霉素的培养基培养 48 h, 确定将所有未转染的 U2OS 细胞杀死的最低浓度为 2.5 $\mu\text{g/mL}$ 。然后在上述细胞转染后 48 h, 更换培养基为含有 2.5 $\mu\text{g/mL}$ 嘌呤霉素的新鲜培养基, 继续培养 72 h 后撤去嘌呤霉素继续培养。待细胞长满时, 以胰酶消化后铺到 15 cm 皿中, 平均每个显微镜低倍镜视野中有 3–5 个细胞即可。待细胞长出单克隆集落时, 以高压灭菌过的细棉签将单克隆集落轻轻刮取, 分别移至 96 孔板中培养, 并进行编号。待 96 孔板长满, 移至 24 孔板中继续培养。

1.2.6 蛋白印迹实验鉴定

分别将上述各孔细胞再接种至 6 cm 皿中扩大培养。对同一单克隆来源的细胞分为两部分, 一部分进行蛋白印迹鉴定, 另一部分继续培养, 用于鉴定成功后的细胞冻存。待细胞融合至 80%–90%, 先以 1 \times 磷酸缓冲液 (PBS) 溶液洗涤细胞 3 次, 再加入预冷的 1 \times NP-40 裂解液裂解细胞, 超声破碎细胞后 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 10 min, 取上清获得全细胞裂解液; 再以 BCA 蛋白测定试剂盒测定总蛋白浓度; 裂解液中加入 SDS 上样缓冲液, 99 $^{\circ}\text{C}$ 热变性 5 min, 进行 6% SDS-PAGE 电泳。电泳结束后, 以湿转法将凝胶上蛋白转移至 PVDF 膜, 用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 溶液室温封闭 3 h, 分别加入鼠源单克隆抗 DNAH2 或抗 β -actin 一抗 (1:1 000), 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。TBST 溶液洗膜 3 次, 10 min/次, 加入辣根过氧化物酶标记的抗鼠源 IgG 二抗 (1:15 000) 室温孵育 1 h, TBST 溶液再次洗膜 3 次, 10 min/次。加入 BeyoECL Plus (超敏 ECL 化学发光试剂盒) 后暗室曝光。

1.2.7 PCR-基因测序分析

常规培养单克隆细胞株, 提取基因组 DNA, 以 PCR 法扩增包含第 1 个外显子的 DNA 片段,

再以 DNA 快速凝胶回收试剂盒回收 PCR 产物后送测序，分析第 1 个外显子区的序列特点。相关引物序列见表 2。

2 结果与分析

2.1 pX462-DNAH2-sgRNA 的构建

首先提取 pX462 质粒 (图谱见图 1A)，并以 *Bbs* 限制性内切酶进行酶切处理，胶回收含 *Bbs* 粘性末端的 pX462 线性片段；由公司合成 DNAH2 sgRNA-A、B 以及其互补链，退火连接形成含 *Bbs* 粘性末端的寡核苷酸双链结构 (图 1B)；然后以 T4 DNA 连接酶将 pX462 线性片段分别与 DNAH2 sgRNA-A、B 寡核苷酸双链结构相

连形成 pX462-DNAH2-A、pX462-DNAH2-B 重组真核表达质粒。将这两种质粒共转染入 U2OS 细胞中，可表达 DNAH2 sgRNA-A、B 和 Cas9n 蛋白。在 sgRNA 引导下，Cas9n 蛋白识别 DNAH2 基因的第 1 个外显子进行剪切、重组，最终实现 DNAH2 基因的敲除 (图 1C)。

表 2 PCR 及基因测序引物序列

Table 2 The primer sequences of the PCR and gene sequencing

Primer names	Primer sequence (5'–3')
PCR-Forward	TGCCCCGAAGACAGTAGGATA
PCR-Reverse	GGTAGGAGCAACCAGGAACA
Sequencing	TGCCCCGAAGACAGTAGGATA

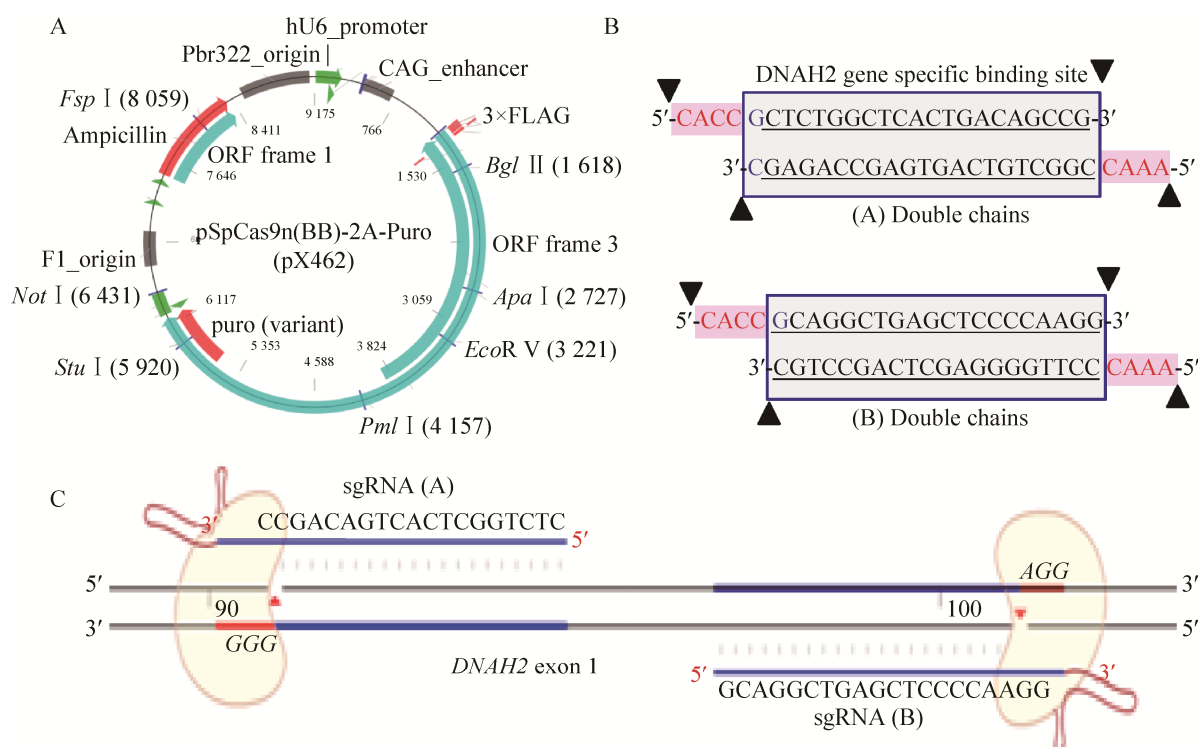


图 1 pX462 载体及 sgRNA 寡核苷酸双链序列

Fig. 1 The enzyme digestion of pX462-DNAH2-sgRNA recombinant plasmid. (A) The map of pX462 plasmid. (B) The A, B sgRNAs and complementary strands were designed and synthesized. The double-stranded oligonucleotide structures containing *Bbs* cohesive ends were formed during annealing. (C) The constructed recombinant eukaryotic expression plasmids, including pX462-DNAH2-A, pX462-DNAH2-B, can lead to the knocking out of DNAH2 gene, through the role of two sgRNAs in the exon 1 regions of DNAH2 gene.

2.2 pX462-DNAH2-sgRNA 的酶切与测序鉴定

分别以 *Bbs* 限制性内切酶酶切与基因测序方法对重组真核表达质粒 pX462-DNAH2-A、pX462-DNAH2-B 进行鉴定。实验结果如图 2 所示, pX462 空载质粒可被 *Bbs* 内切酶酶切为线性载体 (泳道 2); 但成功插入 DNAH2 sgRNA-A、B 寡核苷酸双链结构的真核表达质粒 pX462-DNAH2-A、pX462-DNAH2-B, 已经破坏了 *Bbs* 酶切位点, 故不会被 *Bbs* 酶切割为线性质粒 (泳道 4, 6)。同时, 基因测序结果 (图 3) 表明 DNAH2 sgRNA-A、B 寡核苷酸双链已成功插入 pX462 载体。

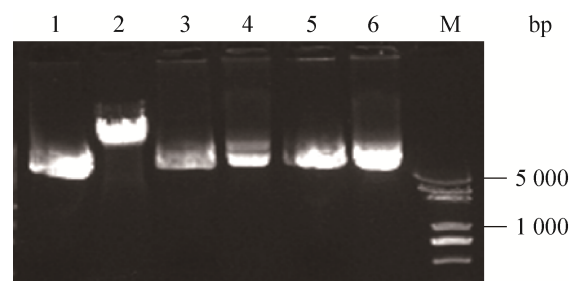


图 2 pX462-DNAH2-sgRNA 重组质粒的酶切鉴定

Fig. 2 The enzyme digestion of pX462-DNAH2-sgRNA recombinant plasmid. 1: pX462 vector/*Bbs* (-); 2: pX462 vector/*Bbs* (+); 3: pX462-DNAH2-sgRNA-A/*Bbs* (-); 4: pX462-DNAH2-sgRNA-A/*Bbs* (+); 5: pX462-DNAH2-sgRNA-B/*Bbs* (-); 6: pX462-DNAH2-sgRNA-B/*Bbs* (+); M: marker.

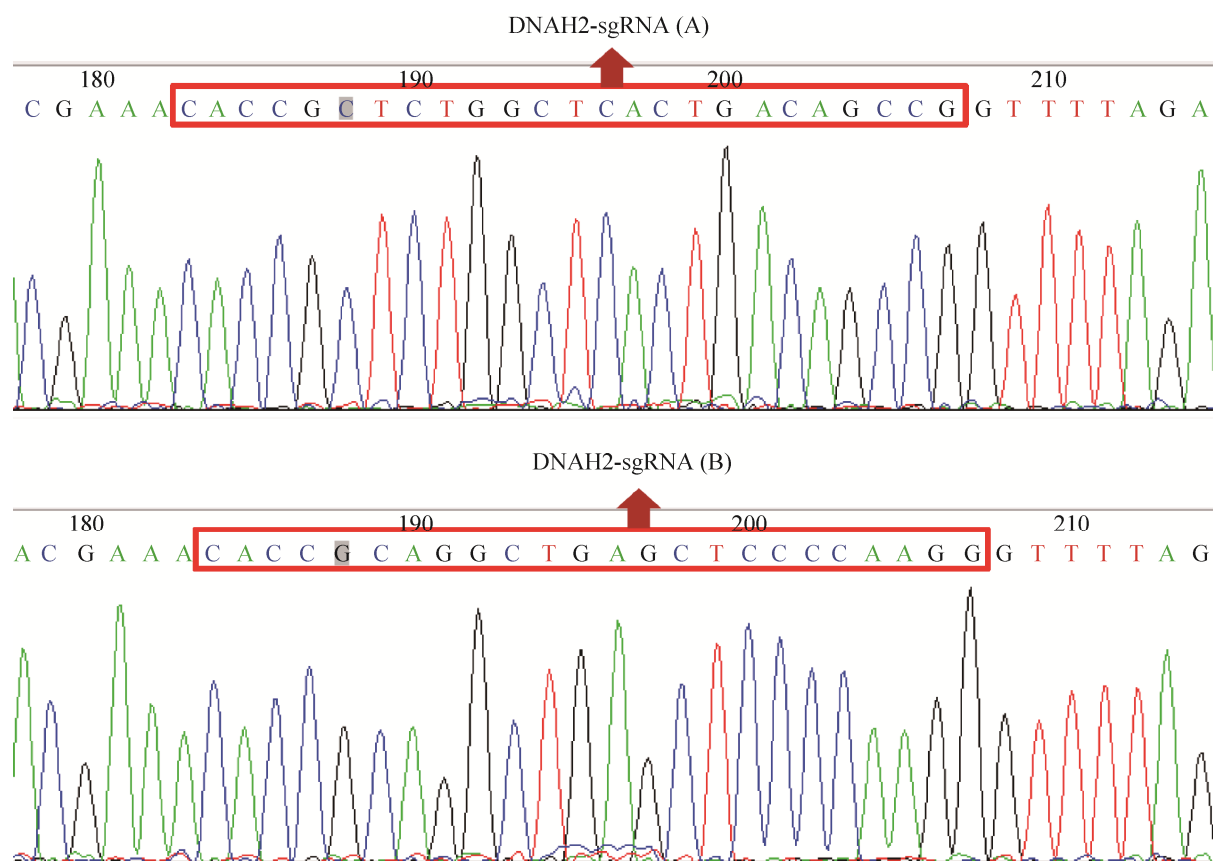


图 3 pX462-DNAH2-sgRNA 重组质粒的基因测序鉴定

Fig. 3 The gene sequencing of pX462-DNAH2-sgRNA recombinant plasmid.

2.3 U2OS-DNAH2-KO 单克隆细胞稳定株的蛋白印迹鉴定

通过筛选, 获得 U2OS-DNAH2-KO 的 3 个单克隆株 (#1-#3) 和 U2OS-DNAH2-WT, 再分别以 NP-40 裂解液裂解细胞获全细胞裂解液, 以鼠源抗 DNAH2、 β -actin 抗体进行蛋白印迹鉴定。实验结果如图 4 所示, U2OS-DNAH2-WT 细胞 (泳道 1) 和 U2OS-DNAH2-KO 细胞株的 #2 号 (泳道 3) 表达 DNAH2 蛋白, 而 U2OS-DNAH2-KO 细胞株的 #1 号 (泳道 2) 与 #3 号 (泳道 4) 中 DNAH2 不表达。 β -actin 内参蛋白同时表达于以上 4 个细胞株。这些证明 #1、#3 这两个细胞株中的 *DNAH2* 基因已被敲除。

2.4 U2OS-DNAH2-KO 单克隆细胞稳定株的 PCR-基因测序分析

分别对 U2OS-DNAH2-WT 细胞和 U2OS-

DNAH2-KO 细胞株 (#1、#3) 进行 PCR-基因测序分析。结果如图 5 所示, U2OS-DNAH2-WT 单克隆细胞稳定株没有发生基因突变; 而 U2OS-DNAH2-KO (#1) 细胞株中在 sgRNA (A) 与 sgRNA (B) 识别区域间发现多处点突变, 以及 8 个碱基的插入突变; U2OS-DNAH2-KO (#3) 细胞株也发生类似多处点突变和 1 个碱基的插入突变。两者均可导致 *DNAH2* 基因发生移码突变。

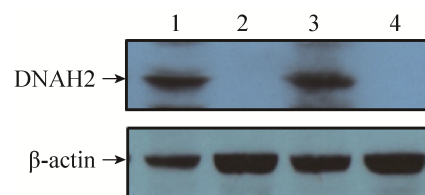


图 4 U2OS-DNAH2-KO 细胞稳定株的蛋白印迹实验
Fig. 4 Western blotting of U2OS-DNAH2-KO stable cell lines. 1: U2OS-DNAH2-WT; 2: U2OS-DNAH2-KO (#1); 3: U2OS-DNAH2-KO (#2); 4: U2OS-DNAH2-KO (#3).

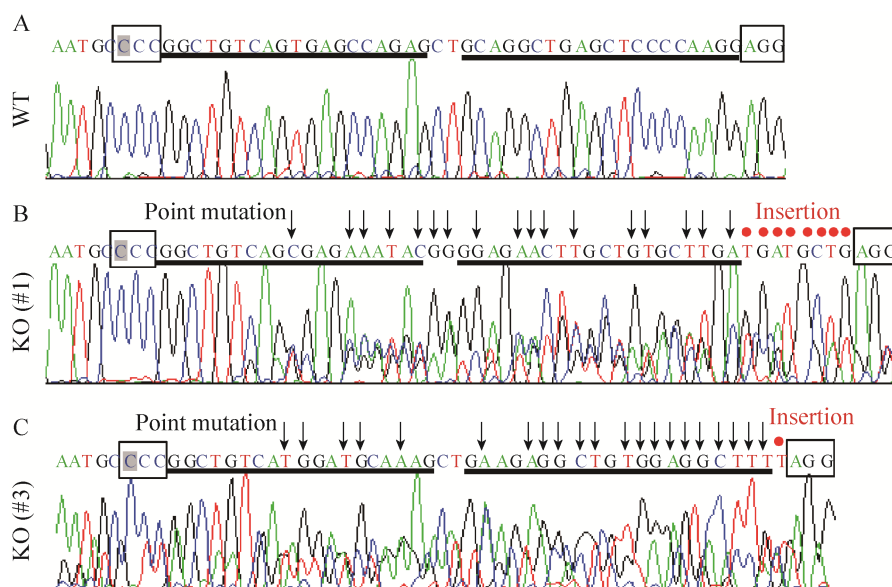


图 5 单克隆细胞株的 PCR-基因测序分析

Fig. 5 PCR-gene sequencing analysis of monoclonal cell lines. (A) U2OS-DNAH2-WT. (B) U2OS-DNAH2-KO (#1). (C) U2OS-DNAH2-KO (#3). “CCC”: the complementary “NGG” site for sgRNA-A; “AGG”: the “NGG” site for sgRNA-B; left black line: binding sequence of sgRNA-A; right black line: complementary binding sequence of sgRNA-B; black arrows: point mutation; red dot: insertion mutation.

3 讨论

利用 siRNA (Small interfering RNA)、shRNA (Small hairpin RNA) 等技术可以下调细胞内目的基因的表达,但这种技术不能完全敲除细胞内的目的基因。基因编辑技术则是利用多种基因修饰手段从 DNA 水平对目的基因的断裂区进行缺失、插入、替换和修复等靶向改造,最终可以导致细胞或动物体内目的基因的完全敲除^[9-12]。目前,最常见的基因编辑系统包括锌指核酸酶 (Zinc finger nucleases, ZFN)、转录激活因子样效应物核酸酶 (Transcription activator-like effector nucleases, TALEN) 和 CRISPR/Cas9^[13]。ZFN 系统是由 *FokI* 核酸内切酶和一系列锌指蛋白组成,两个 ZFN 分别与目的基因特定位点识别后激活 *FokI*,后者介导 DNA 的双链断裂^[14]。TALEN 系统是由 *FokI* 酶和 TALE 蛋白组成,利用 TALE 的序列模块组装成模块化组合蛋白,后者可与 DNA 序列结合,激活 *FokI* 酶的双链切割功能^[15]。CRISPR/Cas9 系统则是由 Cas9 核酸内切酶和 CRISPR 相关基因组成,基本原理是首先在前间区序列邻近基序 (Protospacer adjacent motif, PAM) 处人工设计 sgRNA,后者可特异性结合于目的基因靶序列,形成杂合双链;Cas9 酶在 sgRNA 的引导下,能够对双链进行切割,造成 DNA 的双链断裂;细胞通过错误倾向的非同源末端连接、同源重组修复等机制对切断的双链进行修复,在断裂处插入异常碱基或致使正常碱基缺失,造成移码突变,最终实现目的基因的敲除^[16-18]。作为第 3 代基因组定点编辑技术,CRISPR/Cas9 系统可操作性强,已广泛用于人、细菌、病毒、动物及植物的基因编辑研究,在多种基因敲除或标签标记稳定细胞株

的构建、不同基因敲除或转基因动物模型的建立和致病突变基因的校正等方面发挥重要作用^[19-21]。

CRISPR/Cas9 系统基因编辑的高效性有赖于 sgRNA 与目的基因靶序列的特异性碱基配对;错配的出现会导致脱靶效应 (Off-target effects) 的产生^[19,22]。学者们常通过软件分析、特定实验设计来评估或尽量排除脱靶效应的影响,比如同时采用同一目的基因不同区域的多个 sgRNAs 进行实验,观察是否出现相同表型,或通过质粒转染方式使基因敲除细胞株重新表达目的基因,观察敲除基因的表型是否恢复。另外,也可通过多种手段或方法从技术层面来降低脱靶效应,比如设计与非靶位点互补性最低的高效 sgRNA 序列;改造或寻找更强效的 Cas 酶;采用确保靶向活性的最低质粒浓度以及针对动物模型的多次交配稀释法^[22-25]。CRISPR/Cas9 系统已得到不同程度的改进及应用,本实验所采用的 CRISPR/Cas9n double nick 改良系统有助于减少脱靶效应的影响^[10,22,26-29]。野生型 Cas9 酶会对 DNA 双链进行切割,而 CRISPR/Cas9n double nick 系统采用的是 Cas9 酶的突变体 (Cas9 nickase, Cas9n),其只对与 sgRNA 结合的 DNA 单链进行切割,后者容易被细胞修复。因此,只有当两个距离相近的一对 sgRNA(A/B) 同时识别并结合目的基因的特定区域后,Cas9n 酶才可通过两个相邻的单链切口来实现 DNA 双链的断裂,从而降低了脱靶效应。

DNAH2 基因定位于 17p13^[3],可编码 DNAH2 蛋白,后者包括 4 427 个氨基酸,相对分子量约为 500 kDa (NP_065928.2)。研究发现,DNAH2 蛋白中的 P-loop-NTPase 结构域含有经典的核苷酸磷酸盐结合模序 (Walker A 与 Walker B 模序),并可通过三磷酸核苷水解酶的

作用释放能量,介导微管间的相互移动,最终参与纤毛的运动^[1-3]。目前,学者对于 *DNAH2* 基因的研究数据非常有限。为了方便探讨 *DNAH2* 基因的功能,本实验利用 CRISPR/Cas9n 系统建立了 *DNAH2* 基因靶向敲除 U2OS 细胞株。另外,考虑到范可尼贫血的相关突变基因多编码与 DNA 损伤修复相关的蛋白^[5],利用 *DNAH2* 基因敲除细胞株,从 DNA 损伤修复角度深入分析 *DNAH2* 基因在范可尼贫血中的作用机制是本实验室以后工作的重点。

REFERENCES

- [1] Jones RT, Abedalthagafi MS, Brahmandam M, et al. Cross-reactivity of the BRAF VE1 antibody with epitopes in axonemal dyneins leads to staining of cilia. *Mod Pathol*, 2015, 28(4): 596–606.
- [2] Chapelin C, Duriez B, Magnino F, et al. Isolation of several human axonemal dynein heavy chain genes: genomic structure of the catalytic site, phylogenetic analysis and chromosomal assignment. *FEBS Lett*, 1997, 412(2): 325–330.
- [3] Pazour GJ, Agrin N, Walker BL, et al. Identification of predicted human outer dynein arm genes: candidates for primary ciliary dyskinesia genes. *J Med Genet*, 2006, 43(1): 62–73.
- [4] Morillas HN, Zariwala M, Knowles MR. Genetic causes of bronchiectasis: primary ciliary dyskinesia. *Respiration*, 2007, 74(3): 252–263.
- [5] Duxin JP, Walter JC. What is the DNA repair defect underlying Fanconi anemia?. *Curr Opin Cell Biol*, 2015, 37: 49–60.
- [6] Bogliolo M, Surrallés J. Fanconi anemia: a model disease for studies on human genetics and advanced therapeutics. *Curr Opin Genet Dev*, 2015, 33: 32–40.
- [7] Longerich S, Li J, Xiong Y, et al. Stress and DNA repair biology of the Fanconi anemia pathway. *Blood*, 2014, 124(18): 2812–2819.
- [8] Chang LX, Yuan WP, Zeng HM, et al. Whole exome sequencing reveals concomitant mutations of multiple FA genes in individual Fanconi anemia patients. *BMC Med Genomics*, 2014, 7: 24.
- [9] Boettcher M, McManus MT. Choosing the right tool for the job: RNAi, TALEN, or CRISPR. *Mol Cell*, 2015, 58(4): 575–585.
- [10] Ran FA, Hsu PD, Wright J, et al. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc*, 2013, 8(11): 2281–2308.
- [11] Yang H, Wang HY, Shivalila CS, et al. One-step generation of mice carrying reporter and conditional alleles by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell*, 2013, 154(6): 1370–1379.
- [12] Ma YW, Ma J, Zhang X, et al. Generation of *eGFP* and *Cre* knockin rats by CRISPR/Cas9. *FEBS J*, 2014, 281(17): 3779–3790.
- [13] Doudna JA, Charpentier E. Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, 2014, 346(6213): 1258096.
- [14] Ul Ain Q, Chung JY, Kim YH. Current and future delivery systems for engineered nucleases: ZFN, TALEN and RGEN. *J Control Release*, 2015, 205: 120–127.
- [15] Wright DA, Li T, Yang B, et al. TALEN-mediated genome editing: prospects and perspectives. *Biochem J*, 2014, 462(1): 15–24.
- [16] Barrangou R. RNA events. Cas9 targeting and the CRISPR revolution. *Science*, 2014, 344(6185): 707–708.
- [17] Cong L, Ran FA, Cox D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 2013, 339(6121): 819–823.
- [18] Mali P, Yang LH, Esvelt KM, et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*, 2013, 339(6121): 823–826.
- [19] Duan JZ, Lu GQ, Xie Z, et al. Genome-wide identification of CRISPR/Cas9 off-targets in human genome. *Cell Res*, 2014, 24(8): 1009–1012.
- [20] Jiang WY, Bikard D, Cox D, et al. RNA-guided

- editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(3): 233–239.
- [21] Kennedy EM, Kornepati AVR, Mefferd AL, et al. Optimization of a multiplex CRISPR/Cas system for use as an antiviral therapeutic. *Methods*, 2015, 91: 82–86.
- [22] Wu Z, Feng G. Progress of application and off-target effects of CRISPR/Cas9. *Hereditas*, 2015, 37(10): 1003–1010.
- [23] Ran FA, Cong L, Yan WX, et al. *In vivo* genome editing using *Staphylococcus aureus* Cas9. *Nature*, 2015, 520(7546): 186–191.
- [24] Hsu PD, Lander ES, Zhang F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell*, 2014, 157(6): 1262–1278.
- [25] Shengsong X, Yi Z, Lisheng Z, et al. sgRNA design for the CRISPR/Cas9 system and evaluation of its off-target effects. *Hereditas*, 2015, 37(11): 1125–1136.
- [26] Ran FA, Hsu PD, Lin CY, et al. Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell*, 2013, 154(6): 1380–1389.
- [27] Shen B, Zhang WS, Zhang J, et al. Efficient genome modification by CRISPR-Cas9 nickase with minimal off-target effects. *Nat Methods*, 2014, 11(4): 399–402.
- [28] Fu YF, Sander JD, Reyon D, et al. Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs. *Nat Biotechnol*, 2014, 32(3): 279–284.
- [29] Trevino AE, Zhang F. Genome editing using Cas9 nickases. *Methods Enzymol*, 2014, 546: 161–174.

(本文责编 陈宏宇)