

利用单细胞PCR技术高效筛选鉴定CRISPR/Cas9介导的lncRNA敲除克隆细胞株

王 卉 冯甜甜 王冰蕊 任思蕊 张玲玲 刘金花 高 洁 周家喜
苏 培 佟静媛* 石莉红*

(中国医学科学院、北京协和医学院血液学研究所、血液病医院, 实验血液学国家重点实验室, 天津 300020)

摘要 CRISPR/Cas9技术可简便、快捷、高效地实现基因的敲除。敲除长非编码RNA(long noncoding RNA, lncRNA)时需同时引入1对guide RNA, 将lncRNA基因组的全部或者大部分片段敲除, 以实现目的基因功能的缺失。现有鉴定lncRNA敲除细胞株所用的方法一般需单细胞增殖至较多数量, 敲除效率较低且筛选耗时耗力。lncRNA *DANCR*(differentiation antagonizing non-protein coding RNA)在干祖细胞的干性维持过程中起重要作用, 且与多种癌症的发生有关, 但其作用机制仍未完全明确。作者针对*DANCR*基因组的3'及5'端设计sgRNA并同时转染到人红白血病细胞系(K562)中。为建立一种高效筛选鉴定lncRNA敲除细胞株的方法, 他们先后采用了基因组DNA PCR、少量细胞PCR、单细胞PCR这3种方法来鉴定lncRNA *DANCR*的敲除情况, 系统比较了3种检测方法的优缺点。该文成功建立了利用单细胞PCR技术高效筛选鉴定CRISPR/Cas9介导的lncRNA敲除克隆细胞株的方法。这一方法适用于其他lncRNA敲除情况的鉴定, 有助于lncRNA的功能及机制研究。

关键词 CRISPR/Cas9; lncRNA; 单细胞PCR

Single Cell PCR Screens and Identifies lncRNA Knockout Cell Line Mediated by CRISPR/Cas9

Wang Hui, Feng Tiantian, Wang Bingrui, Ren Sirui, Zhang Lingling, Liu Jinhua, Gao Jie,
Zhou Jiayi, Su Pei, Tong Jingyuan*, Shi Lihong*

(State Key Laboratory of Experimental Hematology, Institute of Hematology, Blood Disease Hospital,
Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Tianjin 300020, China)

Abstract CRISPR/Cas9 technology is applied to knocking out genes rapidly and efficiently nowadays. In order to knock out long noncoding RNA (lncRNA), a pair of guide RNAs should be used simultaneously. Common methods for identifying lncRNA knockout cell lines generally need a single cell proliferating to a large number of cells, which demands a relatively long period of time. lncRNA *DANCR* (differentiation antagonizing non-protein coding RNA) plays an important role in stem and progenitor cells differentiation and is related to several

收稿日期: 2016-11-12 接受日期: 2017-02-09

国家自然科学基金面上项目(批准号: 31471291)、天津市应用基础研究计划项目(面上)(批准号: 15JCYBJC54500)、留学人员科技活动项目择优资助经费和“131”创新型人才培养工程第一层次人选培养经费资助的课题

*通讯作者。Tel: 022-23909446, E-mail: tongjingyuan@ihcams.ac.cn; Tel: 022-23909448, E-mail: shilihongxys@ihcams.ac.cn

Received: November 12, 2016 Accepted: February 9, 2017

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31471291), Tianjin Research Program of Application Foundation (Grant No.15JCYBJC54500), Technology Foundation for Selected Overseas Chinese and “131” Training Foundation for the First Level of Innovative Talents

*Corresponding authors. Tel: +86-22-23909446, E-mail: tongjingyuan@ihcams.ac.cn; Tel: +86-22-23909448, E-mail: shilihongxys@ihcams.ac.cn

出版时间: 2017-03-28 12:31:32 URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20170328.1231.002.html>

kinds of cancer, but the detailed function and mechanisms are still unknown. In this study, we designed two guide RNAs targeting to the *DANCR* 5' end and 3' end domains and transfected them into K562 cell line simultaneously. To establish a more efficient method for screening and identifying the lncRNA knockout cell lines, we used the genomic DNA, lysate of a small amount of cell and single cell lysate as the templates of PCR, respectively. We successfully established several lncRNA knockout cell lines and compared the advantages and disadvantages of the three methods. We considered the single cell PCR could be used as an important tool for further study of the function of lncRNAs.

Keywords CRISPR/Cas9; lncRNA; single cell PCR

1987年,日本科学家Ishino等^[1]在大肠埃希氏菌中发现串联间隔重复序列。2002年, Jansen等^[2]将规律成簇的间隔短回文重复序列命名为串联间隔短回文重复序列(clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR)。当病毒或外源质粒入侵细菌时,细菌的防御系统将外源的DNA片段整合到CRISPR基因座处。CRISPR基因座转录后被加工生成成熟的crRNA(CRISPR RNA)^[3]。Cas(CRISPR-associated)基因临近于CRISPR基因座,编码的蛋白质包含有可与核酸酶、聚合酶、解旋酶以及与核糖核酸酶结合的结构域^[4]。在菌体中,crRNA与外源DNA互补配对从而启动Cas蛋白催化的DNA剪切^[5-6]。利用CRISPR/Cas系统这一特性可以实现基因组特定位点的基因编辑。CRISPR/Cas系统根据Cas蛋白的不同可分为I、II、III这三类,其中II类中的Cas9单独作用时足以实现基因的切割^[7]。2012年, Jinek^[8]首次改造了天然CRISPR/Cas9系统,设计了向导RNA(single-guide RNA, sgRNA)。切割后的DNA有2种修复方式:非同源末端连接(non-homologous end-joining, NHEJ)和同源重组(homologous re-combination, HR)。非同源DNA时,断裂的DNA末端通过NHEJ彼此连接在一起,连接过程中会引起切割位点序列的碱基插入或缺失^[9],引发移码突变,以实现为目的基因的敲除。有同源DNA时,断裂的DNA末端通过HR实现精确的点突变、基因修复、基因敲入、基因替换等^[10]。与传统的锌指核酸酶(zinc finger nucleases, ZFNs)和转录激活因子样效应因子核酸酶(transcription activator-like effector nucleases, TALENs)基因编辑技术相比,CRISPR/Cas9技术有很多优势,它可简便、快捷、高效地实现基因的敲除,且CRISPR/Cas9技术花费较低,靶向精确性高^[11]。CRISPR/Cas9系统已成功应用于人类细胞基因敲除^[12]和动物、植物模型建立^[13-15]等基础研究中。此外,CRISPR/Cas9技术还应用于单基因突变

疾病的基因治疗,例如镰状细胞贫血^[16]、 β 地中海贫血^[17]等。科研工作者也正在尝试用CRISPR/Cas9技术治疗艾滋病(acquired immunodeficiency syndrome, AIDS)^[18]和亨廷顿病(Huntington's disease, HD)等^[19]。

长非编码RNA(long non-coding RNA, lncRNA)是长度大于200 bp的非编码RNA^[20]。由PolII(RNA polymerase II)起始转录^[21],转录本中有类似于编码蛋白质基因的转录产物的5'端帽结构^[22],60%以上的lncRNA有Poly(A)尾^[23]。lncRNA存在细胞、组织特异性^[24],且物种间保守性较差^[21]。lncRNA大部分位于细胞核内^[25],分布于细胞质内的lncRNA可结合在核糖体上或自由分布于细胞质中。lncRNA是转录调控网络的重要组成部分,以诱饵、向导和增强子等方式^[26],参与转录起始阶段、转录中及转录后的基因调控^[27]。另有研究表明,lncRNA可与mRNA和微小RNA(microRNA, miRNA)等联合作用,调控细胞周期、细胞增殖、凋亡、入侵、转移和致瘤^[28]。目前,针对lncRNA功能研究主流技术手段是敲减和过表达。lncRNA的敲减是利用RNA干扰(RNA interference, RNAi)的方法,即由小干扰RNA(small interfering RNAs, siRNAs)和短发夹RNA(short hairpin RNAs, shRNAs)介导的特异性降解同源RNA。RNAi技术存在着严重的脱靶效应^[29],针对同一靶基因的siRNAs或shRNAs的干扰效率不同^[30]。此外,相当数量的lncRNA位于细胞核内, RNAi技术对核内RNA的敲低作用有限。

CRISPR/Cas9介导的基因敲除技术是研究lncRNA功能的有效手段。lncRNA主要通过一级序列及二级结构发挥作用^[31],仅仅通过移码突变并不一定能完全影响lncRNA的作用。因此,通常需要引入一对guide RNA,将lncRNA基因组的全部或者大部分片段敲除,才有可能真正实现该基因功能的缺失。利用CRISPR/Cas9系统敲除lncRNA时,可以将

Cas9和sgRNA分别构建重组载体,同时导入到细胞中^[32],也可以先实现Cas9蛋白在细胞中稳定表达,之后再导入sgRNA^[33]。对于生殖细胞,甚至可以将体外转录的sgRNA以及Cas9 mRNA或蛋白质通过显微注射的方式导入到细胞中^[34]。在筛选鉴定敲除细胞株时,一般是在单细胞增殖到至少100 000个细胞后,提取基因组DNA进行PCR和测序。由于敲除效率较低,筛选敲除克隆时需要培养大量单细胞株,这一过程耗时耗力。除上述方法之外还可以同时将sgRNA和带筛选标记基因和同源臂序列的供体(donor)共同导入细胞,通过同源重组的方式将筛选标记基因整合到靶基因处,从而实现目的基因的敲除^[12]。该方法可以在早期筛除大量非敲除细胞,避免了细胞培养过程中人力物力的浪费,但是同源重组发生的概率极低。现有lncRNA的敲除策略中缺少一个快速高效鉴定lncRNA敲除克隆株的方法。

本研究利用CRISPR/Cas9系统敲除lncRNA *DANCR*。*DANCR*(differentiation antagonizing non-protein coding RNA)位于人类4号染色体,包含3个外显子和2个内含子。研究发现,lncRNA *DANCR*在干祖细胞的干性维持过程中起重要作用^[35],且与多种癌症的发生密切相关。本文将含有编码Cas9蛋白序列和针对*DANCR* 3'及5'端的2个sgRNA序列的质粒同时转到人红白血病细胞系(K562)中,建立敲除细胞株。在筛选鉴定时,我们先后采用了传统的提取基因组DNA PCR并测序,单细胞PCR和使用少量细胞(10个细胞左右)直接裂解进行PCR这3种方法来鉴定*DANCR*的敲除情况,我们成功构建了稳定敲除*DANCR*的K562细胞株,并且系统比较了3种检测敲除方法的优缺点,建立了针对不同情况下快速高效鉴定lncRNA敲除克隆株的首选方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株和质粒 K562细胞、HEK293T细胞购自ATCC。HEK293T细胞、pL-CRISPR-EFS-GFP购自Addgene公司。pLKO5-EFS-tRFP购自Addgene公司。质粒由本文作者之一——中国医学科学院(血液学研究所)周家喜研究员课题组提供。

1.1.2 实验试剂 质粒小提试剂盒购于天根生化科技有限公司。质粒中量提试剂盒、RNasin、RQ1 DNase Stop Solution、RQ1 DNase、T4 DNA ligase、

T4 DNA ligase Buffer、pGEM-T Easy Vector System购自Promega公司。转染试剂Lipofectamine[®]3000、琼脂糖购自Invitrogen公司。限制性内切酶*BsmB*I购自New England Biolabs公司。胶回收试剂盒Gel Extraction Kit购自OMEGA Bio-Tek公司。RPMI-1640、胎牛血清FBS购自Gibco公司。SURVEYOR分析试剂盒购自Transgenomic公司。基因组试剂盒DNeasy Blood & Tissue Kit购自QIAGEN公司。蛋白酶K购自Beyotime公司;KOD-Plus-Neo购自TOYOBO公司。Es Taq MasterMix购自CWBio公司。Trans Taq、Trans 5 α 感受态购自北京全式金生物技术公司。SYBR、GeneJET Gel Extraction Kit购自Thermo Fisher Scientific公司。

1.1.3 引物寡核苷酸链信息 所有引物寡核苷酸链均由深圳华大基因股份测序有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 设计和合成sgRNA寡核苷酸序列 我们针对*DANCR*的5'端和3'端,利用张锋实验室的sgRNA设计网站(<http://crispr.mit.edu>),设计敲除*DANCR*的sgRNA。选取评分较高的sgRNA,5'端和3'端sgRNA分别命名为:sgRNA-1、sgRNA-2。在正义链和反义链模板的5'端分别添加CACC和AAAC,使其可与*BsmB*I酶切后形成的黏性末端互补。sgRNA序列如表1。根据靶点位置设计敲除鉴定引物,分别为外侧引物(outside primer)和内侧引物(inside primer),引物信息如表1。

1.2.2 载体构建 sgRNA-1、sgRNA-2寡核苷酸单链退火形成双链。用*BsmB*I内切酶切割质粒pL-CRISPR.EFS.GFP,pLKO5.sgRNA.EFS.tRFP(5 μ g),并按照Gel Extraction Kit胶回收试剂盒切胶回收。分别连入sgRNA-1、sgRNA-2。退火程序:取浓度为100 μ mol/L的正义链和反义链各1 μ L加水稀释至10 μ L,95 $^{\circ}$ C退火5 min后,以-5 $^{\circ}$ C/s降至25 $^{\circ}$ C(产物200倍稀释),使得sgRNA寡核苷酸单链形成双链;连接体系:线性化质粒(100~200 ng);退火产物,1 μ L;10 \times T4 DNA ligase Buffer 1 μ L;T4 DNA ligase 1 μ L;加水到10 μ L,室温连接2 h;转化:连接产物转化Trans 5 α 感受态,氨苄抗性平板筛选,挑取单克隆,送菌液进行测序验证。测序成功后用Promega的质粒中量提试剂盒提取目的质粒。我们将测序成功的质粒命名为pL-sgRNA-1.CRISPR.EFS.GFP;pLKO5.sgRNA-2.EFS.tRFP。

1.2.3 细胞培养和细胞转染 HEK293T细胞培

表1 引物寡核苷酸序列
Table 1 The oligo sequences

| 引物名称 The oligo name | 寡核苷酸序列 Sequence |
|------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|
| sgRNA-1 | F: 5'-GAG GGC ATC GAG GTT ACT CC-3' |
| sgRNA-2 | F: 5'-GGT AAA ATG GCA ACG TGC TC-3' |
| 5'-targeted primer | F: 5'-ACT CCT ACC CTC CAG CTG ATT A-3' R: 5'-CTG ACA AAG AGG CCT GCG-3' |
| 3'-targeted primer | F: 5'-CCA TGA TCT TGT CAC CGT GC-3' R: 5'-ATG GTG GGA ACT AAG GTG GAC-3' |
| Outside primer | F: 5'-TTT TTG GTT TCC CTT CCT GCT C-3' R: 5'-CTA CAA AAG GTC AAG CAC CTG-3' |
| Inside primer | F: 5'-CAA AGC ACC CTT TCC TGT GCC-3' R: 5'-GCC TGT CCC TAA CAG AAT CCA C-3' |
| <i>Actin</i> primer | F: 5'-CTC TTC CAG CCT TCC TTC CT-3' R: 5'-AGC ACT GTG TGT TGG CGT ACA G-3' |
| <i>DANCR</i> primer | F: 5'-GCC ACT ATG TAG CGG GTT TC-3' R: 5'-ACC TGC GCT AAG AAC TGA GG-3' |

养条件: DMEM 高糖培养基(含10%胎牛血清)、1% L-glutamine、1%丙酮酸钠。K562细胞培养条件: RPMI-1640培养基(含10%胎牛血清)、1% L-glutamine于37 °C恒温培养、5% CO₂条件下培养。

转染前将HEK293T以4×10⁵/ml接种至12孔板中培养,当至70%~90%汇合度时,按照Lipofectamine[®] 3000转染试剂说明书进行转染(质粒终浓度为0.5 μg/L),转染组合: pL-sgRNA-1.CRISPR.EFS.GFP; pLKO5.sgRNA-2.EFS.tRFP+pL-CRISPR.EFS.GFP,分别以pL-CRISPR.EFS.GFP、pLKO5.EFS.tRFP空载为阴性对照。K562细胞转染时取1.0×10⁵/mL接种至10 cm皿中培养,当至70%~90%汇合度时,同样按照Lipofectamine[®] 3000转染试剂说明进行转染。转染组合: pL-sgRNA-1.CRISPR.EFS.GFP和pLKO5.sgRNA-2.EFS.tRFP质粒(质量比1:1)。

1.2.4 提取细胞基因组DNA 取一部分细胞进行传代以及保种。另一部分按照DNeasy Blood & Tissue Kit试剂盒说明书操作步骤提取基因组DNA。

1.2.5 SURVEYOR试剂盒分析sgRNA切割效率 HEK293T基因组DNA PCR程序: 95 °C 5 min; 95 °C 30 s, 56 °C 30 s, 72 °C 30 s, 共35个循环; 72 °C 10 min。25 μL PCR体系: 12.5 μL Trans Taq-T PCR SuperMix, 50 ng基因组DNA, 0.5 μL 鉴定引物, 补水至25 μL。回收PCR扩增引物进行退火,退火程序: 95 °C 10 min, 95至85 °C每秒下降2 °C, 85 °C 1 min, 85至4 °C每秒下降0.3 °C, 75 °C、65 °C、55 °C、45 °C、

35 °C、25 °C时各保持1 min; 退火体系: 10×PCR缓冲液2 μL, 纯化/回收后的PCR产物360 ng, 加水至20 μL。

取退火后的产物,用SURVEYOR分析试剂盒分析sgRNA切割效率。1.5%琼脂糖凝胶进行电泳。随后用凝胶定量软件计算Indel率,公式为: Indel(%)=100×(1-√(1-fcut)), fcut=(b+c)/(a+b+c), a和b表示切割产生的新条带的灰度值, c表示未被切割条带的灰度值。

1.2.6 流式细胞术分选双阳细胞群体 K562细胞转染后48 h, 300 ×g离心5 min收集细胞,用含2%胎牛血清的PBS重悬细胞。收集重悬的细胞,过1次200目滤膜; FACS Aria III流式细胞分选仪(BD公司)进行单细胞分选,将分选的细胞放入培养箱培养,采用FlowJo软件进行数据分析。

1.2.7 PCR检测DANCR敲除效率 基因组DNA PCR检测DANCR敲除效率: 待分选的单细胞扩增至24孔板中时,一半提取基因组DNA,另一半继续培养。提取的基因组DNA进行PCR, 25 μL PCR体系: 12.5 μL Es Taq Master Mix, outside primer、inside primer各0.5 μL, 1 μL模板, 余下用水补齐。程序: 95 °C 5 min; 95 °C 30 s, 56 °C 1 min/30 s, 72 °C 1 min, 共35个循环; 72 °C 10 min。

挑取各克隆中的单细胞进行PCR检测DANCR敲除效率: 各克隆增长至几个细胞时,挑取单细胞进行PCR。单细胞PCR需先将细胞进行裂解,裂解液配比为16.75 μL H₂O, 2 μL 10×KOD缓冲液, 0.25 μL蛋

白酶K。裂解程序: 55 °C 45 min, 94 °C 5 min, 4 °C 保持。将裂解产物平分为2份, 分别加到事先配好的单细胞PCR MIX1/2中, MIX1/2配比为0.5 μL KOD酶、0.75 μL outside primer/inside primer、1.5 μL 10×KOD缓冲液、2.5 μL 10×KOD dNTP、2 μL KOD MgSO₄。PCR程序1/2: 94 °C 5 min, 94 °C 15 s, 61/62 °C 1 min, 68 °C 1 min/40 s, 共40个循环, 68 °C 10 min。

挑取各克隆中的少量细胞进行PCR检测 *DANCR* 敲除效率: 待分选的单细胞扩增至500个细胞左右时, 每孔吸取1 μL细胞。用裂解单细胞的裂解液配比裂解并进行PCR。PCR MIX1/2同单细胞PCR MIX。PCR程序1/2: 94 °C 5 min, 94 °C 15 s, 61/62 °C 1 min, 68 °C 1 min/40 s, 共35个循环, 68 °C 10 min。

1.2.8 纯合和杂合敲除株测序 为进一步确定基因组PCR得到的纯合和杂合株, 将纯合和杂合株基因组outside primer PCR产物连接T载体, 并送深圳华大基因股份测序有限公司测序。

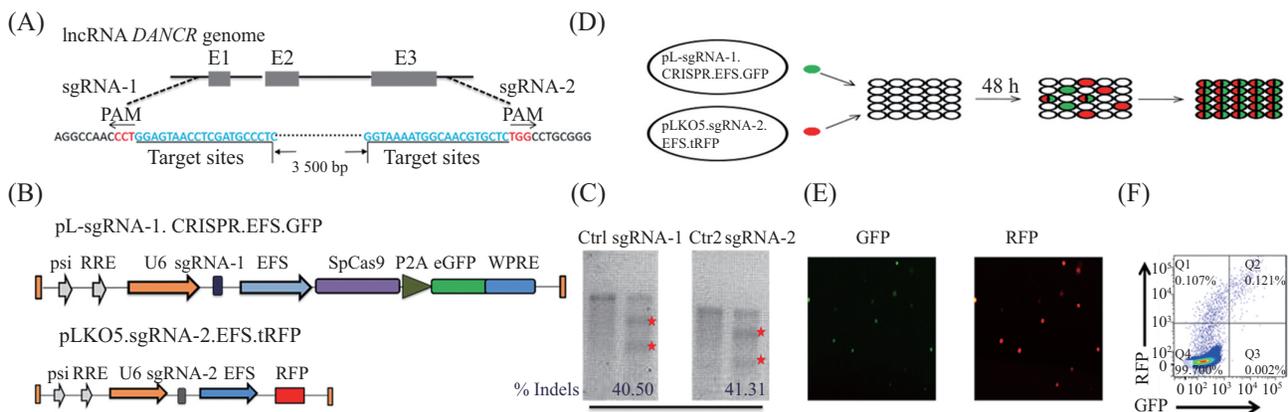
1.2.9 qRT-PCR检测纯合和杂合敲除株 *DANCR* 表达水平 我们对基因组PCR得到的纯合和杂合株进行了qRT-PCR检测, 以验证 *DANCR* 的表达情况。收集细胞, 使用Trizol法提取纯合和杂合株的RNA。将得到的RNA逆转录, 逆转录体系及程序: (1) 1 μg RNA、0.5 μL RNasin、1 μL RQ1 DNase、1 μL 5×First Strand Buffer、6.5 μL H₂O, 37 °C 30 min。(2)混合物中加

入1 μL RQ1 DNase Stop Solution, 65 °C、10 min。(3)加入1 μL随机引物和1 μL dNTP, 65 °C 5 min, 后置于冰上。(4)混合物中加入6.5 μL RNasin、3 μL First Strand Buffer、2 μL 0.1 mol/L DTT、0.8 μL 25 mmol/L MgCl₂、0.7 μL H₂O, 25 °C 5 min, 42 °C 2 min。(5)向混合物中加入SuperScript®II RNase Transcriptase, 42 °C 50 min, 70 °C 15 min。实时荧光定量PCR(qRT-PCR)实验每个样品做3个复孔, 反应体系及条件参照 Thermo Fisher Scientific公司 SYBR试剂说明书。内参基因为 *Actin*, 目的基因为 *DANCR*。

2 结果

2.1 合成sgRNA寡核苷酸序列并构建载体

我们针对 *DANCR* 3'及5'端分别设计sgRNA, 挑选评分较高, 脱靶位点少的sgRNA并命名为sgRNA-1、sgRNA-2(图1A)。然后送深圳华大基因股份测序有限公司合成寡核苷酸链。合成后退火得到双链, 分别连入 *BsmB* I酶切回收后的pL-CRISPR.EFS.GFP和pLKO5.sgRNA.EFS.tRFP质粒载体中。质粒送深圳华大基因股份测序有限公司进行测序, 获得了连入sgRNA的pL-sgRNA-1.CRISPR.EFS.GFP和pLKO5.sgRNA-2.EFS.tRFP质粒。质粒送深圳华大基因股份测序有限公司进行测序, 获得了连入



A: *DANCR* sgRNA的靶向识别位置及其周围的DNA序列; B: pL-CRISPR.EFS.GFP和pLKO5.sgRNA.EFS.tRFP质粒结构; C: SURVEYOR分析sgRNA-1的有效性, 空载的pL-CRISPR.EFS.GFP为阴性对照, SURVEYOR分析sgRNA-2的有效性, 空载的pLKO5.EFS.tRFP为阴性对照; D: 建立K562 lncRNA *DANCR*敲除细胞株示意图; E: 转染48 h荧光蛋白表达情况(10×); F: 转染48 h流式细胞术分选结果。

A: the sequence of sgRNAs and their protospacer adjacent motifs (PAM); B: the linear map of pL-CRISPR.EFS.GFP and pLKO5.sgRNA.EFS.tRFP; C: SURVEYOR assay for Cas9-mediated cleavage in 293T cells using single HEK293T targeting, pL-CRISPR.EFS.GFP and pLKO5..EFS.tRFP empty vector are used as control; D: schematic representation of the strategy of establishing *DANCR* knockout K562 cell line; E: expression of fluorescent protein 48 hours after transfection (10×); F: sorting GFP⁺/RFP⁺ single cells by flow cytometry 48 hours after transfection.

图1 利用CRISPR/Cas9系统建立lncRNA *DANCR*敲除的K562细胞系

Fig.1 Establishment of lncRNA *DANCR* knockout K562 cell line by CRISPR/Cas9

sgRNA的pL-sgRNA-1.CRISPR.EFS.GFP和pLKO5.sgRNA-2.EFS.tRFP质粒(图1B)。我们将测序正确的质粒进行扩增,用于下一步实验。

2.2 sgRNA可高效切割HEK293T基因组DNA

用构建好的pL-sgRNA-1.CRISPR.EFS.GFP质粒, pLKO5.sgRNA-2.EFS.tRFP质粒(不带有Cas9基因,只有在Cas9存在时sgRNA才能发挥作用,因此需同时转染pL-CRISPR.EFS.GFP空载)转染HEK293T细胞,培养48 h,提基因组DNA,PCR扩增包含sgRNA靶位点在的约500 bp序列。按照SURVEYOR试剂盒操作步骤进行操作,用1.5%琼脂糖凝胶进行分析。随后用凝胶定量软件计算切割效率发现,sgRNA-1和sgRNA-2均可成功切割目的片段,Indel率分别为40.50%和41.31%(图1C)。

2.3 转染DANCR敲除质粒并分选双阳细胞

为了敲除DANCR,我们需要同时向K562中转染pL-sgRNA-1.CRISPR.EFS.GFP和pLKO5.sgRNA-2.EFS.tRFP质粒,分别带绿色、红色荧光(图1D)。共转染48 h观察到,K562同时表达绿色、红色荧光(图1E)。转染后48 h进行流式细胞术分选,双阳性率约0.121%(图1F)。

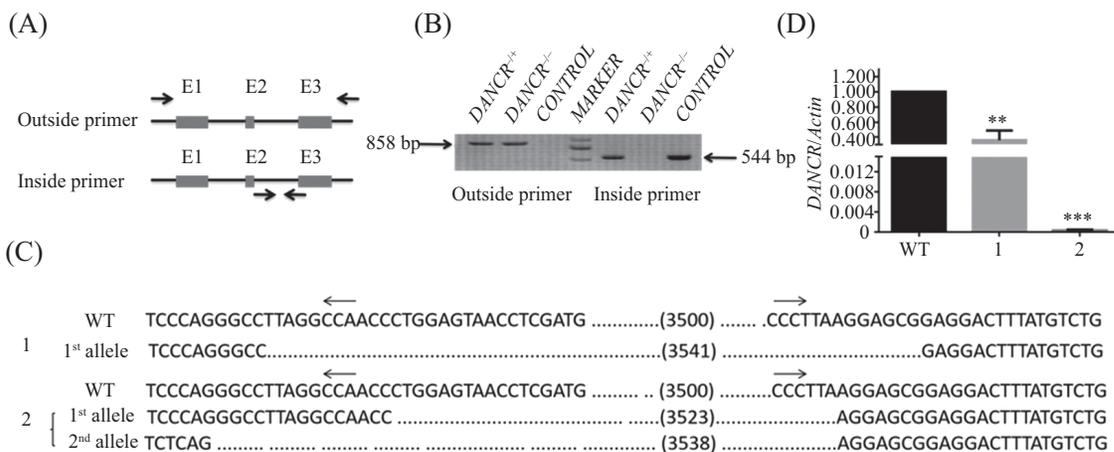
2.4 筛选稳定敲除DANCR的K562细胞株

2.4.1 提取基因组DNA进行PCR检测DANCR敲除效率 第一批分选获得53株单细胞。分选后15 d左右,单细胞增殖到一定数量,可提取基因组DNA

进行PCR。我们针对DANCR sgRNA-1和sgRNA-2外侧的序列设计了外侧引物,在DANCR基因内部设计了内侧引物(图2A)。当DANCR的一个等位基因(allele)被成功敲除时,外侧引物PCR结果中,有目的条带,同时内侧引物也能PCR出目的条带,这样的细胞株定义为杂合敲除株;当DANCR的2个等位基因(allele)同时被敲除时,外侧引物PCR结果中,有目的条带,但内侧引物PCR结果中,没有目的条带,这样的细胞株定义为纯合敲除株;当DANCR allele未被删除时,外侧引物和内侧引物PCR结果中,均没有目的条带。经鉴定,我们成功获得了lncRNA DANCR的纯合和杂合敲除K562细胞株(图2B)。53株克隆中我们共获得DANCR敲除株17株(敲除率为32.08%),其中DANCR纯合敲除株4株(纯合率为7.55%)。

2.4.2 纯合和杂合敲除株测序 将基因组DNA PCR确定纯合株 $2^{-/-}$ 和杂合株 $1^{+/-}$ 的outside primer PCR产物连接T载体,并送深圳华大基因股份测序有限公司测序。测序结果显示,我们成功获得了DANCR的纯合和杂合敲除株(图2C)。

2.4.3 qRT-PCR检测纯合和杂合敲除株DANCR表达水平 为进一步检测DANCR的敲除情况,我们对纯合株 $2^{-/-}$ 和杂合株 $1^{+/-}$ 进行了qRT-PCR检测(图2D)。鉴定结果显示,纯合株DANCR表达水平只有WT细胞株的万分之一,各个杂合株DANCR表达水平约为50%。

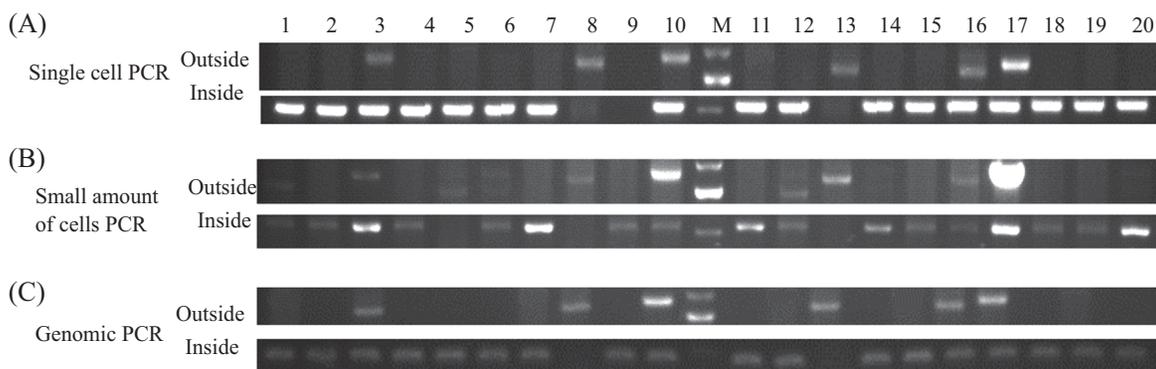


A: 鉴定DANCR敲除情况外侧引物和内侧引物设计位点; B: 纯合和杂合敲除株outside primer和inside primer PCR产物条带大小; C: 杂合株 $1^{+/-}$ 、纯合株 $2^{-/-}$ 测序结果; D: qRT-PCR检测各敲除株DANCR的表达水平。1: 杂合株 $1^{+/-}$; 2: 纯合株 $2^{-/-}$ 。** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$,与WT组比较。

A: schematic representation of outside primer and inside primer designed; B: the outside primer and inside primer PCR product size of DANCR heterozygous and homozygous knockout cell lines; C: sequencing results of heterozygous $1^{+/-}$ and homozygous $2^{-/-}$; D: the expression of DANCR in heterozygous and homozygous knockout cell lines by qRT-PCR. 1: heterozygous $1^{+/-}$; 2: homozygous $2^{-/-}$. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs WT group.

图2 lncRNA DANCR杂合和纯合敲除株DANCR表达情况及测序结果

Fig.2 The expression and sequencing of lncRNA DANCR in heterozygous and homozygous knockout cell lines



A: 单细胞外侧引物和内侧引物PCR产物, 第3、10、16、17泳道为杂合敲除株, 第8、13泳道为纯合敲除株, 第9泳道未取得单细胞; B: 少量细胞外侧引物和内侧引物PCR产物, 第1、3、6、10、12、16、17泳道为杂合株; 第5、8、13泳道为纯合株; C: 基因组外侧引物和内侧引物PCR产物, 第3、10、16、17泳道为杂合敲除株, 第8、13泳道为纯合敲除株。

A: the outside primer and inside primer PCR product size of a single cell. Lane 3, 10, 16, 17 are heterozygous. Lane 8, 13 are homozygous, single cell is lacked as template in lane 9; B: the outside primer and inside primer PCR product size of a small amount cell lysate. Lane 1, 3, 6, 10, 12, 16, 17 are heterozygous. lane 5, 8, 13 are homozygous. C: the outside primer and inside primer PCR product size of genome DNA. Lane 3, 10, 16, 17 are heterozygous. Lane 8, 13 are homozygous.

图3 单细胞PCR、多细胞PCR、基因组PCR鉴定DANCR敲除情况

Fig.3 Identifying the lncRNA *DANCR* knockout K562 cell line by single cell PCR, a small amount cell PCR and genomic PCR

表2 单细胞PCR、少量细胞PCR、基因组PCR鉴定DANCR敲除情况对比

Table 2 The statistics of single cell PCR, a small amount of cells PCR, genomic PCR

| PCR类型 | 纯合敲除株率 | 杂合敲除株率 |
|---------------------------|------------|--------------|
| Types of PCR | Homozygous | Heterozygous |
| Single cell PCR | 10.53% | 21.05% |
| Small amount of cells PCR | 15.00% | 35.00% |
| Genomic PCR | 10.00% | 21.00% |

2.4.4 单细胞PCR、少量细胞PCR、基因组DNA PCR鉴定DANCR敲除情况 取各克隆单细胞进行PCR, 检测DANCR敲除效率: 重新获取20个单细胞克隆并于96孔板中进行培养, 分选48 h后, 各克隆增长至几个细胞时, 每个克隆中挑取1个细胞进行单细胞PCR。单细胞PCR结果(图3)显示, *DANCR*的杂合敲除株处于第3、10、16、17泳道, 共4株, 杂合敲除率为21.05%(4/19), 纯合株处于第8、13泳道, 共2株, 纯合敲除率为10.53%(2/19)。第9泳道未取得单细胞。

取各克隆的少量细胞进行PCR检测DANCR敲除效率: 分选7 d后, 细胞株正常增殖并达到500个细胞以上时, 取1 μ L细胞, 这些少量细胞直接裂解后进行PCR, 结果显示, *DANCR*杂合株处于第1、3、6、10、12、16、17泳道, 共7株, 杂合敲除率为35.00%(7/20); 纯合株处于第5、8、13泳道, 共3株, 纯合敲除率为15.00%(3/20)(图3)。3种方法统计结果见表2。

提取各克隆的基因组DNA进行PCR检测

*DANCR*敲除效率: 分选15 d后, 各克隆增至较多细胞时, 各个克隆一半提基因组, 另一半继续培养。进行基因组DNA PCR(图3)。DANCR的杂合敲除株处于第3、10、16、17泳道, 共4株, 杂合敲除率为21.00%(4/20), 纯合株处于第8、13泳道, 共2株, 纯合敲除率为10.00%(2/20)。

3 讨论

本研究成功构建了lncRNA *DANCR*稳定敲除的K562细胞株, 建立了单细胞PCR鉴定lncRNA敲除情况的方法。我们先用传统提取基因组DNA PCR的方法鉴定了53株克隆的DANCR敲除情况, 虽然也得到了DANCR的纯合和杂合敲除株, 但耗时耗力, 实验周期较长。为建立一种高效筛选鉴定lncRNA敲除细胞株的方法, 我们重新获取了20个克隆分别进行单细胞PCR、少量细胞PCR和基因组DNA PCR。3种方法均可鉴定DANCR的敲除情况并各有优缺点, 适用于不同情况下敲除株的鉴定。基因组DNA

PCR鉴定结果最为准确,测序正确率100%,但需细胞扩增至较多时才能进行,实验周期长,工作量大。少量细胞PCR取样方便快捷,操作简单。可大幅缩减实验时间。鉴定到的敲除株可覆盖后续基因组DNA PCR确定的敲除株,但存在一定的假阳性。少量细胞PCR各泳道间条带亮度相差很大,且非特异带较多。其原因可能是取样时不能保证各个克隆株间细胞量相同,不同细胞数在相同裂解时间内裂解情况不同。由于lncRNA敲除效率通常较低,往往需要大批量筛选,我们可以使用少量细胞PCR进行粗筛。

与少量细胞PCR相比,单细胞PCR鉴定结果和基因组PCR鉴定结果较一致,所用细胞量少,并且在实验初期即可进行,可以大大减少培养细胞的工作量,可快速高效筛选鉴定CRISPR/Cas9介导的lncRNA敲除克隆细胞株。但从各克隆中获取单细胞需要较为精密的操作,并且偶尔会由于取样原因漏检少数敲除株(如图3中单细胞PCR的第9泳道未取到细胞)。现有的半自动取细胞仪可基本解决挑取单细胞耗时的问题。随着技术的进步,我们建立的单细胞PCR体系不光可以鉴定lncRNA的敲除情况,也同样适用于样本量少的其他目的的鉴定。比如胚胎发育早期疾病检测、癌前病变组织、微生物耐药性等的相关鉴定。CRISPR/Cas9系统还面临着很多问题,比如脱靶效应^[36]以及不同的细胞、组织类型Cas9蛋白导入方法、效率差异^[37]等。利用单细胞PCR技术可初步鉴定Cas9蛋白起作用的情况,便于快速高效筛选lncRNA敲除克隆细胞株。

本研究成功建立了快速高效鉴定lncRNA敲除情况的方法。这一方法可用于其他lncRNA的敲除情况的鉴定,有助于lncRNA的功能及机制研究。

参考文献 (References)

- Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, Amemura M, Nakata A. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J Bacteriol* 1987; 169(12): 5429-33.
- Jansen R, Embden JD, Gastra W, Schouls LM. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Mol Microbiol* 2002; 43(6): 1565-75.
- van der Oost J, Westra ER, Jackson RN, Wiedenheft B. Unravelling the structural and mechanistic basis of CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol* 2014; 12(7): 479-92.
- Mali P, Esvelt KM, Church GM. Cas9 as a versatile tool for engineering biology. *Nat Methods* 2013; 10(10): 957-63.
- Deveau H, Garneau JE, Moineau S. CRISPR/Cas system and its role in phage-bacteria interactions. *Annu Rev Microbiol* 2010; 64: 475-93.
- Kunin V, Sorek R, Hugenholtz P. Evolutionary conservation of sequence and secondary structures in CRISPR repeats. *Genome Biol* 2007; 8(4): R61.
- Makarova KS, Haft DH, Barrangou R, Brouns SJ, Charpentier E, Horvath P, *et al.* Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. *Nat Reviews Microbiol* 2011; 9(6): 467-77.
- Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 2012; 337(6096): 816-21.
- Orthwein A, Fradet-Turcotte A, Noordermeer SM, Canny MD, Brun CM, Strecker J, *et al.* Mitosis inhibits DNA double-strand break repair to guard against telomere fusions. *Science* 2014; 344(6180): 189-93.
- Symington LS, Gautier J. Double-strand break end resection and repair pathway choice. *Annu Rev Genet* 2011; 45: 247-71.
- Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protocols* 2013; 8(11): 2281-308.
- Ho TT, Zhou N, Huang J, Koirala P, Xu M, Fung R, *et al.* Targeting non-coding RNAs with the CRISPR/Cas9 system in human cell lines. *Nucleic Acids Res* 2015; 43(3): e17.
- Bao D, Ma Y, Zhang X, Guan F, Chen W, Gao K, *et al.* Preliminary characterization of a leptin receptor knockout rat created by CRISPR/Cas9 system. *Sci Rep* 2015; 5: 15942.
- Heckl D, Kowalczyk MS, Yudovich D, Belzaira R, Puram RV, McConkey ME, *et al.* Generation of mouse models of myeloid malignancy with combinatorial genetic lesions using CRISPR-Cas9 genome editing. *Nat Biotechnol* 2014; 32(9): 941-6.
- Bortesi L, Zhu C, Zischewski J, Perez L, Bassie L, Nadi R, *et al.* Patterns of CRISPR/Cas9 activity in plants, animals and microbes. *Plant Biotechnol J* 2016; 14(12): 2203-16.
- DeWitt MA, Magis W, Bray NL, Wang T, Berman JR, Urbinati F, *et al.* Selection-free genome editing of the sickle mutation in human adult hematopoietic stem/progenitor cells. *Sci Transl Med* 2016; 8(360): 360ra134.
- Xie F, Ye L, Chang JC, Beyer AI, Wang J, Muench MO, *et al.* Seamless gene correction of beta-thalassemia mutations in patient-specific iPSCs using CRISPR/Cas9 and piggyBac. *Genome Res* 2014; 24(9): 1526-33.
- Bialek JK, Dunay GA, Voges M, Schafer C, Spohn M, Stucka R, *et al.* Targeted HIV-1 latency reversal using CRISPR/Cas9-derived transcriptional activator systems. *PLoS One* 2016; 11(6): e0158294.
- Malkki H. Huntington disease: Selective deactivation of Huntington disease mutant allele by CRISPR-Cas9 gene editing. *Nat Reviews Neurol* 2016; 12(11): 614-5.
- Bhartiya D, Scaria V. Genomic variations in non-coding RNAs: Structure, function and regulation. *Genomics* 2016; 107(2/3): 59-68.
- Guttman M, Amit I, Garber M, French C, Lin MF, Feldser D, *et al.* Chromatin signature reveals over a thousand highly conserved large non-coding RNAs in mammals. *Nature* 2009; 458(7235): 191-196.

- 223-7.
- 22 Derrien T, Johnson R, Bussotti G, Tanzer A, Djebali S, Tilgner H, *et al.* The GENCODE v7 catalog of human long noncoding RNAs: Analysis of their gene structure, evolution, and expression. *Genome Res* 2012; 22(9): 1775-89.
- 23 Cheng J, Kapranov P, Drenkow J, Dike S, Brubaker S, Patel S, *et al.* Transcriptional maps of 10 human chromosomes at 5-nucleotide resolution. *Science* 2005; 308(5725): 1149-54.
- 24 Flynn RA, Chang HY. Long noncoding RNAs in cell-fate programming and reprogramming. *Cell Stem Cell* 2014; 14(6): 752-61.
- 25 Clark MB, Mattick JS. Long noncoding RNAs in cell biology. *Semin Cell Dev Biol* 2011; 22(4): 366-76.
- 26 Mercer TR, Mattick JS. Structure and function of long noncoding RNAs in epigenetic regulation. *Nat Struct Mol Biol* 2013; 20(3): 300-7.
- 27 Yang L, Froberg JE, Lee JT. Long noncoding RNAs: Fresh perspectives into the RNA world. *Trends Biochem Sci* 2014; 39(1): 35-43.
- 28 Li T, Mo X, Fu L, Xiao B, Guo J. Molecular mechanisms of long noncoding RNAs on gastric cancer. *Oncotarget* 2016; 7(8): 8601-12.
- 29 Jackson AL, Burchard J, Schelter J, Chau BN, Cleary M, Lim L, *et al.* Widespread siRNA "off-target" transcript silencing mediated by seed region sequence complementarity. *RNA* 2006; 12(7): 1179-87.
- 30 Kaelin WG Jr. Molecular biology. Use and abuse of RNAi to study mammalian gene function. *Science* 2012; 337(6093): 421-2.
- 31 Morceau F, Chateauvieux S, Gaigneaux A, Dicato M, Diederich M. Long and short non-coding RNAs as regulators of hematopoietic differentiation. *Int J Mol Sci* 2013; 14(7): 14744-70.
- 32 Shalem O, Sanjana NE, Hartenian E, Shi X, Scott DA, Mikkelsen TS, *et al.* Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells. *Science* 2014; 343(6166): 84-7.
- 33 Zhou Y, Zhu S, Cai C, Yuan P, Li C, Huang Y, *et al.* High-throughput screening of a CRISPR/Cas9 library for functional genomics in human cells. *Nature* 2014; 509(7501): 487-91.
- 34 Han J, Zhang J, Chen L, Shen B, Zhou J, Hu B, *et al.* Efficient *in vivo* deletion of a large imprinted lncRNA by CRISPR/Cas9. *RNA Biol* 2014; 11(7): 829-35.
- 35 Kretz M, Webster DE, Flockhart RJ, Lee CS, Zehnder A, Lopez-Pajares V, *et al.* Suppression of progenitor differentiation requires the long noncoding RNA ANCR. *Genes Dev* 2012; 26(4): 338-43.
- 36 Fu Y, Foden JA, Khayter C, Maeder ML, Reyon D, Joung JK, *et al.* High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. *Nat Biotechnol* 2013; 31(9): 822-6.
- 37 Zhang F, Wen Y, Guo X. CRISPR/Cas9 for genome editing: Progress, implications and challenges. *Human molecular genetics* 2014; 23(R1): R40-6.