

## 技术与方法

# 基于CRISPR/Cas9系统构建TIA1基因突变的人诱导多能干细胞系

卢媛媛<sup>1</sup> 安艳茹<sup>2\*</sup><sup>1</sup>安徽大学物质科学与信息技术研究院, 合肥 230601; <sup>2</sup>深圳华大生命科学研究院, 深圳 518083)

**摘要** 利用CRISPR/Cas9基因编辑技术构建TIA1-P362L突变的人诱导多能干细胞(iPSCs)系, 并使其分化为运动神经元, 为研究TIA1突变导致肌萎缩侧索硬化症(ALS)的分子机制及药物筛选提供细胞模型。利用CRISPR在线工具设计sgRNA, 将其构建到pX330载体中, 扩增左右同源臂并将其构建到供体载体中, 接着对该供体载体的靶位点进行突变以获得同源重组的Donor质粒。将sgRNA和Donor质粒同时电转到野生型iPSCs系C11中, 经G418抗性筛选获得单克隆, 利用PCR和Sanger测序鉴定基因型, 采用Western blot鉴定TIA1蛋白表达情况, 并用核型分析、免疫荧光染色、定量反转录PCR及拟胚体(EBs)三胚层分化对TIA1-P362L突变的iPSCs系进行多能性鉴定, 通过抑制SMAD信号通路诱导iPSCs分化为运动神经元并用特异性抗体验证。该研究成功建立具有TIA1-P362L突变的iPSCs系, 该细胞系正常表达TIA1蛋白, 具有多能性且能成功分化为运动神经元, 对阐明TIA1在ALS疾病中的作用具有重要意义。

**关键词** TIA1; CRISPR/Cas9; 肌萎缩侧索硬化症; 人诱导多能干细胞; 运动神经元

## Generation of Human Induced Pluripotent Stem Cell Line Carrying TIA1 Gene Mutation by CRISPR/Cas9 System

LU Yuanyuan<sup>1</sup>, AN Yanru<sup>2\*</sup><sup>1</sup>Institutes of Physical Science and Information Technology, Anhui University, Hefei 230601, China;<sup>2</sup>BGI-Shenzhen, Shenzhen 518083, China)

**Abstract** Using CRISPR/Cas9-mediated genome editing, a human iPSCs (induced pluripotent stem cells) line carrying TIA1-P362L mutation was generated and differentiated into motor neurons, providing a useful cell model for studying the molecular mechanisms of ALS (amyotrophic lateral sclerosis) and drug screening. sgRNA was designed using the CRISPR online design tool, and was ligated into the pX330 vector as the targeting plasmid. Meanwhile, left and right arms for homologous recombination were amplified and inserted into a Donor vector, which was mutated subsequently at target site to construct the Donor plasmid for mutation. The two plasmids were co-transfected into the iPSCs line C11. After screened for G418 resistance, single clones were selected and expanded. PCR and Sanger sequencing were applied to validate the genotype of the selected clones. The expression of TIA1 was identi-

收稿日期: 2023-04-20 接受日期: 2023-08-21

深圳市科技研发基金(批准号: JCYJ20180507183628543)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 13682577610, E-mail: anyanru@genomics.cn

Received: April 20, 2023 Accepted: August 21, 2023

This work was supported by the Science, Technology and Innovation Commission of Shenzhen Municipality (Grant No. JCYJ20180507183628543)

\*Corresponding author. Tel: +86-13682577610, E-mail: anyanru@genomics.cn

fied by Western blot. Pluripotency of the TIA1-P362L iPSCs line was analyzed by karyotyping, immunofluorescence, quantitative reverse transcription PCR and three-germ-layer differentiation of EBs (embryoid bodies). The TIA1-P362L iPSCs were further differentiated into motor neurons by inhibition of SMAD pathway and immunofluorescence was used to validate the expression of specific motor neuron markers. The above study demonstrated that an iPSCs line carrying TIA1-P362L mutation was successfully constructed, which had normal pluripotency capacity and could be differentiated into motor neurons, providing a resource for elucidating the role of TIA1 in ALS disease.

**Keywords** TIA1; CRISPR/Cas9; amyotrophic lateral sclerosis; human induced pluripotent stem cells; motor neurons

肌萎缩侧索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis, ALS) 是一种由大脑和脊髓运动神经元的缺失引起的神经退行性疾病。ALS 与另一种神经退行性疾病额颞叶痴呆 (frontotemporal dementia, FTD) 具有相同的病理和遗传特征<sup>[1]</sup>。ALS 主要影响从运动皮质投射到脑干和脊髓的下行皮质脊髓运动神经元 (上运动神经元), 以及投射到骨骼肌的延髓或脊髓运动神经元 (下运动神经元)。在大多数情况下, ALS 进展迅速, 发病后平均寿命为 2~5 年<sup>[2-3]</sup>。ALS 和 ALS/FTD 病例根据病因可分为两类: 由基因突变引起的家族性 ALS (family ALS), 占 ALS 的 5%~10%; 由环境因素引起的散发性 ALS (sporadic ALS), 占 ALS 的 90%~95%<sup>[4]</sup>。迄今为止, 已有超过 50 个基因与 ALS 和 FTD 的家族性和散发性病例有关。铜锌超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase 1, *SOD1*) 基因是第一个被发现与 ALS 相关的基因<sup>[5]</sup>, 其突变约占家族性 ALS 的 15%~30%, 散发性 ALS 的 2%。其他受影响的基因包括最常见的 *C9ORF72*<sup>[6-7]</sup>、*FUS*<sup>[8]</sup> 和 *TDP-43*<sup>[9-10]</sup>, 相对不常见的 *HNRNP1*、*SQSTM1*、*VCP*、*OPTN* 和 *PFN1*<sup>[11]</sup>。

最近有研究证明, T 细胞限制性细胞内抗原-1 (T cell-restricted intracellular antigen-1, TIA1) 突变会导致 ALS/FTD<sup>[12-13]</sup>。TIA1 是一种 RNA 结合蛋白, 含有无序结构域, 容易通过相分离形成无膜细胞器, 研究发现在无序结构域中存在 P362L 突变, TIA1-P362L 是一个很强的致病候选基因突变类型, 该突变携带者在死后表现出有大量圆形、透明、TAR DNA 结合蛋白 43 (TDP-43) 阳性包涵体形成的神经病理学特征。同时 TIA1 是应激颗粒 (stress granules, SGs) 的重要组成部分, TIA1 的突变可能导致应激颗粒的损伤, 从而导致 ALS 疾病发生。ALS/FTD 中 TIA1 突变的发现增加了研究 RNA 代谢和 SGs 动力学在 ALS/FTD 发病机制中作用的重要性。除了参与神经退行性疾病的病理学机制外, TIA1 也在脑正常功能行使过程中

发挥作用, 如与恐惧记忆和焦虑等功能相关<sup>[14]</sup>。了解 TIA1 功能将有助于阐明 TIA1 与其他引起 ALS 的 RNA 结合蛋白及其致病途径之间的联系。因此, 我们提出利用人诱导多能干细胞 (induced pluripotent stem cells, iPSCs) 技术<sup>[15]</sup>, 构建 TIA1-P362L 突变的 iPSCs 系并使其分化为运动神经元, 为研究这一突变导致的 ALS 的发病机制和药物治疗提供细胞模型。iPSCs 技术的优点在于这种细胞与胚胎干细胞 (embryonic stem cells, ESCs) 在基因表达谱和功能上十分相似, 并且可以弥补 ESCs 的伦理问题<sup>[16]</sup>。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要材料与试剂

1.1.1 实验材料 我们使用了由人尿细胞产生的人 iPSCs 系 C11<sup>[17]</sup>; 质粒 pX330 购自美国 Addgene 公司; 供体 pl452-pGK-neo-loxP、pKD-Cre 质粒由笔者实验室构建。

1.1.2 实验试剂 *Bbs* I、*Bam*H I、*Not* I、*Eco*R I、*Sal* I 酶、mTeSR 培养基、Advanced DMEM/F12 培养基、0.5 mol/L EDTA、Trizol、Knockout DMEM、L-谷氨酰胺购自美国 ThermoFisher 公司; 核酸裂解液购自普洛麦格 (北京) 生物技术有限公司; Stbl3 感受态细胞购自安徽吐露港生物科技有限公司; SYBR Green 购自宝日医生物技术 (北京) 有限公司; DMEM/F12 培养基、Neurobasal 培养基、 $\beta$ -巯基乙醇、DPBS 缓冲液购自美国 Gibco 公司; Y-27632、DAPT、SB431542 购自德国 Tocris Bioscience 公司; Accutase 购自美国 ICT 公司; CS10、Matrigel 基质胶、维生素 C、视黄酸、4% 多聚甲醛购自美国 Sigma 公司; 嘌呤胺、LDN193189、CHIR99021 购自美国 Stemgent 公司; FGF8、BDNF 以及抗体 VIMENTIN、SOX17 购自美国 R&D 公司; GDNF 购自美国 Peprotech 公司; Insulin 购自上海碧云天生物技术有限公司; BSA 购自美国

Genview公司; 无内毒素小提中量质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒购自广州美基生物科技有限公司; 电转试剂盒购自美国Lonza公司; 抗体PAX6、OCT4、SSEA-3、TRA-1-60、TRA-1-81购自英国Abcam公司。

## 1.2 方法

### 1.2.1 sgRNA的合成及表达载体的构建

从NCBI上获取*TIA1*基因组序列, 在第12外显子(35 949–39 350序列)前的内含子区域在线设计sgRNA, 选择评分较高的sgRNA进行合成(表1), 将合成的sgRNA用ddH<sub>2</sub>O稀释到浓度为10 μmol/L, sgRNA-F和sgRNA-R以1:1的比例混匀放入PCR仪中进行退火, 反应条件: 95 °C预变性10 s; 85 °C变性1 min, 保温1 min后按照1 °C/s的速度降

表1 引物序列  
Table 1 Primer sequences

引物名称 Primer names	引物序列(5'→3') Primer sequences (5'→3')
TYCZ-TIA1-sgRNA-F	CAC CGT AGG TTC CCT ACA ACG AAA A
TYCZ-TIA1-sgRNA-R	AAA CTT TTC GTT GTA GGG AAC CTA C
TYCZ-TIA1-left-F	CGC GGT CGA CGA ATT TAG TGG GCT GGG CGT GGT AG
TYCZ-TIA1-left-R	CGC GGA ATT CCC TAC AAC GAA AAA GGA ACA TTA TAC
TYCZ-TIA1-right-F	CGC GGG ATC CGG AAC CTA CCT GAC TCT TTC AG
TYCZ-TIA1-right-R	CGT TGC GGC CGC ATT GGC AGA CAT CCA GCA TCT TGT T
TYCZ-loxP-P362L-F	ACC AAA TTA TGG AGT GCA ACT GCC TCA AGG GCA AAA TGG C
TYCZ-loxP-P362L-R	GCC ATT TTG CCC TTG AGG CAG TTG CAC TCC ATA ATT TGG T
left+gene-F1	CAC TGA GTT TGA TGC TAG TTG TTG T
left+gene-R1	CAC AGC TGC GCA AGG AAC GC
right+gene-F1	GAG AGG CTA TTC GGC TAT GA
right+gene-R1	AAT GCA AAC TAG AAC TGC ACA CTA C
SOX2-F	CCC AGC AGA CTT CAC ATG T
SOX2-R	CCT CCC ATT TCC CTC GTT TT
NANOG-F	TGA ACC TCA GCT ACA AAC AG
NANOG-R	TGG TGG TAG GAA GAG TAA AG
OCT4-F	CCT CAC TTC ACT GCA CTG TA
OCT4-R	CAG GTT TTC TTT CCC TAG CT
MAP2-F	TGG TGC CGA GTG AGA AGA AG
MAP2-R	AGT GGT TGG TTA ATA AGC CGA AG
SOX1-F	CCT CCG TCC ATC CTC TG
SOX1-R	AAA GCA TCA AAC AAC CTC AAG
PAX6-F	TCT TTG CTT GGG AAA TCC G
PAX6-R	CTG CCC GTT CAA CAT CCT TAG
SNAI2-F	CAG ACC CTG GTT GCT TCA A
SNAI2-R	TGA CCT GTC TGC AAA TGC TC
HAND1-F	CCA AGG ATG CAC AGT CTG G
HAND1-R	CGG TGC GTC CTT TAA TCC T
CDX2-F	CTG GAG CTG GAG AAG GAG TTT C
CDX2-R	ATT TTA ACC TGC CTC TCA GAG AGC
GATA3-F	TGT GTG AAC TGT GGG GCA A
GATA3-R	TCT GAC AGT TCG CAC AGG AC
GATA6-F	ACT TGA GCT CGC TGT TCT CG
GATA6-R	CAG CAA AAA TAC TTC CCC CA
FOXA1-F	ACT ACT CCT TCA ACC ACC CGT TCT
FOXA1-R	TAT TGC AGT GCC TGT TCG TAT GCC TTG
ACTB-F	CCC AGA GCA AGA GAG G
ACTB-R	GTC CAG ACG CAG GAT G

温至25 °C, 25 °C延伸1 min, 保温1 min后按照0.1 °C/s的速度降温至16 °C, 16 °C保温。退火后, 形成双链DNA片段, 将其用于后续实验。

用*Bbs* I酶切pX330载体, 1%的琼脂糖凝胶进行电泳, 然后用胶回收试剂盒纯化目的产物, 测定纯化后骨架浓度, 将其与退火后的sgRNA用Solution I酶连接, 将10 μL连接产物加入到100 μL *E. coli* Stbl3感受态细胞中, 经含氨苄抗性的LB固体平板37 °C过夜生长, 第二天挑取单克隆至含氨苄抗性的LB液体培养基中, 于37 °C摇床过夜扩大培养, 之后按照去内毒素小提中量质粒提取试剂盒的说明书提取质粒, 测量质粒浓度, 最后将质粒送至广州艾基生物技术有限公司测序。

**1.2.2 同源重组Donor质粒的构建** CRISPR/Cas9可以引发DNA双链断裂, 该研究利用同源重组Donor质粒作为模板进行基因突变, Donor质粒的骨架载体为p1452-pGK-neo-loxP(简称loxP)。Donor质粒设计如图1所示, 在基因组序列中sgRNA切割位点两侧分别设计引物, 并根据loxP质粒图谱(图2)添加相应的酶切位点, 通过PCR反应扩增得到左右同源臂, 将其载

入骨架载体loxP中完成Donor质粒构建。构建Donor质粒过程中所用到的引物序列如表1所示。

构建左右臂步骤如下: 先PCR扩增右臂(R-arm), PCR条件为0.5 μL模板(C11 gDNA)、12.5 μL KOD ONE酶、10.75 μL ddH<sub>2</sub>O、0.75 μL引物(TYCZ-TIA1-right-F、TYCZ-TIA1-right-R)。反应条件为: 98 °C预变性3 min, 98 °C变性10 s, 61 °C退火5 s, 68 °C延伸8 s, 2~4步共30个循环, 68 °C延伸2 min, 16 °C保温。用1%琼脂糖凝胶进行电泳, 用胶回收试剂盒纯化目的产物R-arm, 测量其浓度。用*Bam*H I和*Not* I酶切loxP质粒和纯化后的R-arm, 用胶回收试剂盒进行纯化, 测量两者的浓度。用Solution I酶将这两者进行连接, 然后转化, 提取质粒。用相同的PCR反应体系和反应条件得到左臂(L-arm), 用胶回收试剂盒纯化L-arm, 用*Eco*R I和*Sal* I酶切载体loxP-right和纯化后的L-arm, 用胶回收试剂盒进行纯化, 用solution I酶连接, 转化, 提取质粒, 此时得到left-loxP-right质粒。

接着构建带有TIA1-P362L突变的left-loxP-right质粒, 利用反向PCR的方法, PCR反应体系为: 25 μL KOD ONE酶、1.5 μL引物(TYCZ-loxP-P362L-F、

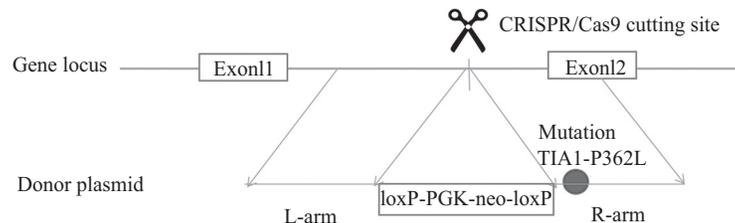


图1 Donor质粒的构建示意图

Fig.1 Construction of Donor plasmid

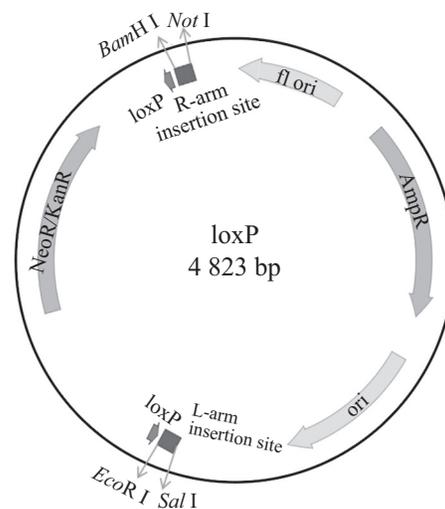


图2 loxP质粒图谱

Fig.2 loxP plasmid map

TYCZ-loxP-P362L-R)、50 ng模板(left-loxP-right), 加ddH<sub>2</sub>O补足体积到50 μL。反应条件为: 98 °C预变性3 min, 98 °C变性10 s, 60 °C退火5 s, 68 °C延伸1 min, 2~4步共15个循环, 68 °C延伸2 min, 16 °C保温。PCR结束后, 用Dpn I酶切去除原质粒, 用胶回收试剂盒纯化目的产物, 测量其浓度, 转化, 提取质粒, 然后送至广州艾基生物技术有限公司测序, 选择正确的带有突变的left-loxP-right质粒用于后续实验。

### 1.2.3 TIA1-P362L突变细胞系的建立和基因型的鉴定

#### (1) TIA1-P362L突变细胞系的建立

待6孔板中的C11细胞密度为70%时, 按照Lonza电转说明书电转, 工作模式为A-023, 将sgRNA和Donor质粒一起电转进细胞, 两个质粒的用量都为5 μg。72 h后加入100 μg/mL的G418进行筛选, 根据细胞的死亡情况加药5~7天。将克隆培养到合适大小后, 用mTesR+Y培养基将单克隆用枪头刮下来, 并接种到24孔板中培养, 待密度达70%以上时继续扩大培养, 取部分细胞用核酸裂解液提取基因组DNA, 进行PCR鉴定。

#### (2) 单克隆PCR鉴定

PCR引物设计如图3所示。在插入的neo抗性位点及基因组左右同源臂的上下游分别设计引物, 引物序列如表1所示, 使用三对引物left+gene-F1/left+gene-R1、right+gene-F1/right+gene-R1和left+gene-F1/right+gene-R1分别进行PCR筛选, 挑选三次PCR均能获得目标片段大小的克隆, 将具有目标片段大小的PCR产物送测序。

#### (3) Cre-loxP切除实验

由于用的是同源重组的方法, 在基因组中插入

DNA片段, 可能会影响TIA1蛋白的表达, 利用Cre酶切除loxP位点之间的DNA片段。对筛选出的突变克隆电转pKD-Cre质粒, 电转方法如上步骤所示, 只需要转入一个pKD-Cre质粒(用量为7.5 μg)。电转后的细胞培养扩大, 用1 μg/mL嘌呤霉素处理3~5天, 然后分单细胞进行筛选。再进行PCR鉴定、测序和蛋白表达鉴定。

### 1.2.4 细胞系的鉴定

#### (1) 核型分析

待6孔板中细胞密度达到70%时, 加入0.2 μg/mL的秋水仙素37 °C处理90 min, 用Acctase消化7 min, 用DPBS洗一次再重悬在2 mL DPBS中, 送至广州浩宇生物科技有限公司进行核型检测。

#### (2) 荧光定量PCR(qRT-PCR)

用qRT-PCR检测突变iPSCs系多能性基因(SOX2、NANOG、OCT4)的表达情况, 将iPSCs接种于包被Matrigel的6孔板中, 当细胞密度达到约70%时, 用Trizol裂解细胞, ddH<sub>2</sub>O、异丙醇抽提总RNA, 使用poly-dT进行反转录得到cDNA, 以此为模板使用SYBR荧光染料, 进行qRT-PCR。所用引物见表1。

#### (3) 免疫荧光染色

待24孔板中细胞长到合适大小时, 用4%多聚甲醛固定20 min, 用含3% BSA和0.2% Triton X-100的DPBS封闭1 h, 然后加一抗(稀释比例为1:100)4 °C过夜孵育, 再加二抗(稀释比例为1:500)常温孵育1 h, 所选多能性基因抗体为: OCT4、SSEA3、TRA-1-60、TRA-1-81。

#### (4) 微卫星STR分析

将iPSCs采用DNA裂解液进行裂解, 提取基因组DNA, 后续STR分析由广州艾基生物技术有限公司

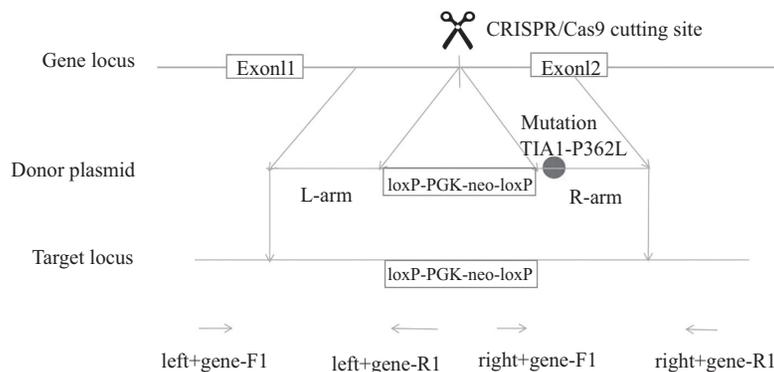


图3 PCR鉴定引物位置示意图

Fig.3 Schematic diagram of primers designed for PCR validation

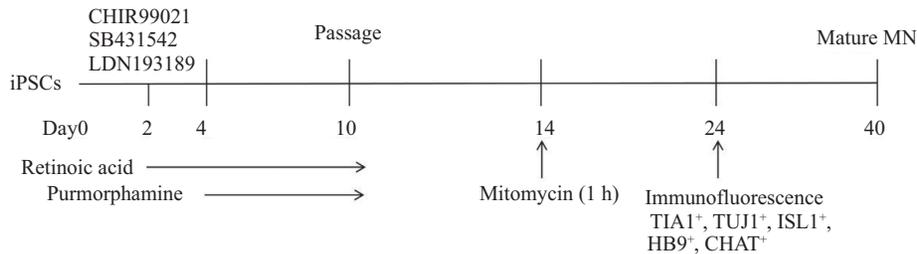


图4 运动神经元分化示意图

Fig.4 Schematic diagram of motor neuron differentiation

司完成。

#### (5) 支原体检测

待6孔板中细胞长到70%时,取1 mL过夜培养的培养基送至中国科学院广州生物医药与健康研究院刘晶课题组检测。

#### (6) iPSCs体外分化能力检测

待6孔板中细胞长到70%时,用Acctuse消化细胞,计数,以10 000个/孔的细胞密度接种到Ag-grewell™ 800板中,加入mTesR+Y培养基培养,第二天用EB培养基(KnockOut™ DMEM培养基中加入1%谷氨酰胺、1% NEAA、20% KSR)将细胞转移到斜颈细胞培养瓶中,3~5天换一次液,第10天取部分形成的拟胚体用Trizol裂解液提取RNA,用qRT-PCR检测分化后的EBs的外、中、内3个胚层的特异性基因(*MAP2*、*SOX1*、*PAX6*、*SNAI2*、*HAND1*、*CDX2*、*GATA3*、*GATA6*、*FOXA1*)的表达情况,引物序列见表1。同时第10天再取部分用于免疫染色的EBs转移到Matrigel涂层板上,第15天固定细胞,以上述同样步骤进行免疫荧光染色,所用抗体为: PAX6、VIMENTIN、SOX17。

1.2.5 诱导多能干细胞向脊髓运动神经元的分化运动神经元分化步骤如图4所示<sup>[18]</sup>,待6孔板中细胞长到70%时,用Acctuse消化成单细胞,计数,以每孔40万个细胞铺到6孔板中,加mTesR+Y培养基,第二天将其换成N2B27培养基(DMEM/F12:Neurobasal为1:1, 10 mmol/L HEPES、1% N2、1% B27、1% L-谷氨酰胺、5 μmol/L维生素C、20 μg/mL胰岛素)加CHIR99021(3 μmol/L)、SB431542(400 μmol/L)、LDN193189(0.2 μmol/L)因子,记作Day0,在Day3加视黄酸(0.1 μmol/L),Day4~Day10培养基为N2B27培养基加视黄酸(0.1 μmol/L)、嘌呤胺(1 μmol/L),Day10提前铺好多聚-L-赖氨酸/层粘连蛋白的6孔板,用Acctuse消化细胞7 min,计数,以每孔150万个细

胞加到铺好的板子上。剩下的细胞用CS10+Y冻存。Day10~Day14培养基为N2B27培养基加BDNF(20 ng/mL)、GDNF(10 ng/mL)、DAPT(10 nmol/L),Day14用丝裂霉素(10 μg/mL)处理细胞1 h,1 h后,去除培养基,换上N2B27培养基加上BDNF(20 ng/mL)、GDNF(10 ng/mL)、层粘连蛋白(1 μg/mL),后面每2~3天换一次液。在培养到Day24时,用TIA1、神经元标记物(TUJ1)和运动神经元标记物(ISL1、HB9、CHAT)进行免疫荧光染色。

## 2 结果与分析

### 2.1 sgRNA-Cas9表达载体构建及鉴定

质粒载体pX330经限制性内切酶Bbs I酶切,得到线性化载体,回收载体片段并将其与退火后的sgRNA连接,构建形成质粒载体pX330-sgRNA,测序结果表明表达sgRNA的质粒构建成功。

### 2.2 Donor质粒的构建及鉴定

以C11基因组为模板,设计引物,在引物上添加合适的酶切位点,通过PCR反应扩增得到左右臂片段。右臂扩增产物经Sal I和EcoR I酶切,连接入骨架载体得到重组质粒loxP-right,左臂经BamH I和Not I酶切连接入loxP-right中得到重组质粒left-loxP-right,然后采用点突变在右臂序列中引入P362L突变,得到同源重组质粒Donor-TIA1-P362L,测序结果如图5所示。

### 2.3 TIA1-P362L突变的iPSCs的建立与鉴定

2.3.1 PCR鉴定 将电转后经过筛选的细胞扩大培养,提取基因组DNA进行PCR鉴定,利用引物对left+gene-F1/left+gene-R1与right+gene-F1/right+gene-R1,鉴定的PCR产物长度分别为1 862 bp和1 992 bp。引物对left+gene-F1/right+gene-R1的PCR产物,野生型的长度为1 767 bp,有neo插入基因的长度为3 662 bp。鉴定显示有4个细胞株(1-14、1-26、1-38、2-7)中成

功插入了完整的neo抗性基因片段, 且这4个细胞株的基因组上含有TIA1-P362L突变(图6A~图6C)。但是这几个细胞株不纯, 混有野生型细胞, 因此选择2-7细胞株进一步纯化挑选单细胞(96孔板挑单克隆), PCR鉴定结果显示克隆5和19实现了双等位基因的插入, PCR产物测序结果显示克隆5和19含有杂合子基因突

变(图6D和图6E)。

2.3.2 Cre酶切除结果 在鉴定细胞株中选取19号克隆, 在19号克隆里电转入pKD-Cre质粒, 经嘌呤霉素筛选后获得单克隆, 扩增后的单克隆用引物left+gene-F1/right+gene-R1进行PCR鉴定, 凝胶电泳和测序结果表明, 克隆19-1、19-2、19-3、19-7、

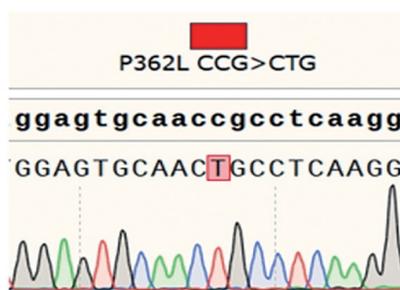
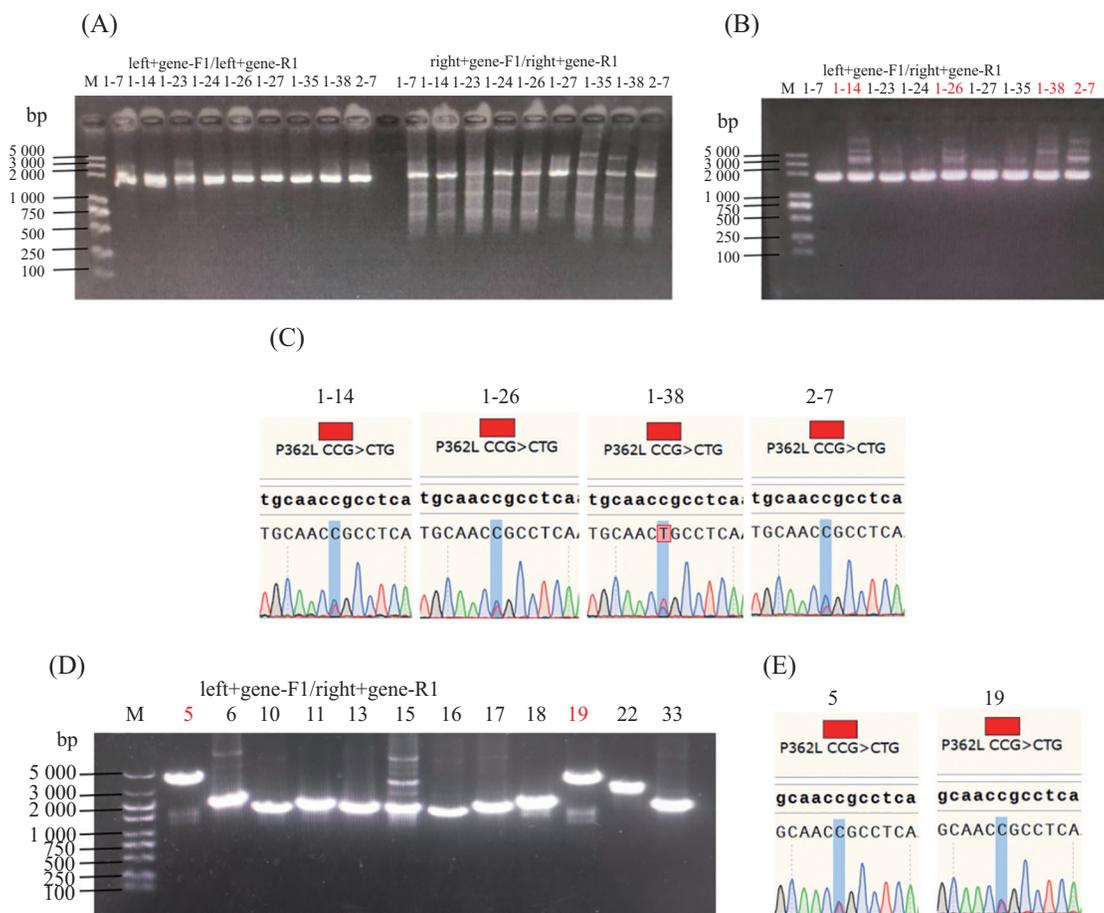


图5 Donor-TIA1-P362L质粒测序结果

Fig.5 Sequencing results of Donor-TIA1-P362L

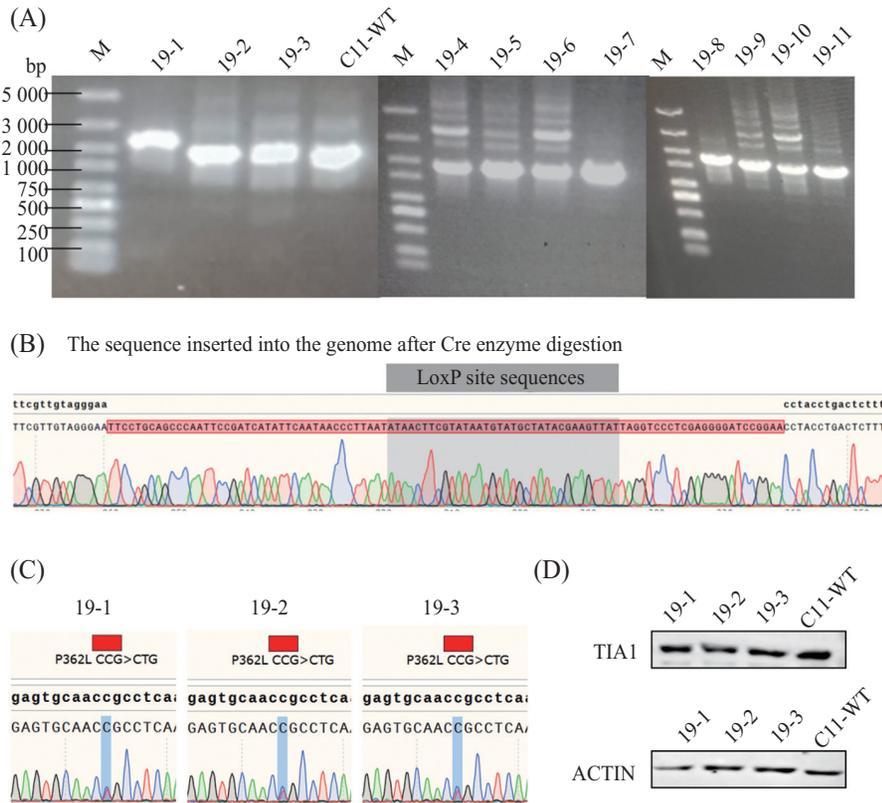


A、B: PCR鉴定结果; C: 克隆1-14、1-26、1-38、2-7的测序结果显示靶位点发生突变; D: 细胞株2-7分单克隆后PCR鉴定结果(克隆5、19有目标大小片段); E: 克隆5、19测序结果。

A,B: PCR identification results; C: sequencing results showed mutation at target site in clones 1-14, 1-26, 1-38, 2-7; D: PCR analysis of single-cell clones from 2-7 cells (clones 5 and 19 showed correct insertion); E: sequencing results of clones 5 and 19.

图6 PCR鉴定和测序结果

Fig.6 Results of PCR identification and sequencing



A、B: 19号克隆Cre酶切后PCR和测序结果; C: 克隆19-1、19-2、19-3 PCR产物测序结果; D: 克隆19-1、19-2、19-3 TIA1蛋白表达结果。

A,B: PCR and sequencing results after Cre enzyme digestion of clone 19; C: sequencing results of PCR products from clones 19-1, 19-2, and 19-3; D: Western blot showed TIA1 expression in clones 19-1, 19-2, and 19-3.

图7 Cre酶切后PCR和测序鉴定及Western blot TIA1蛋白表达结果

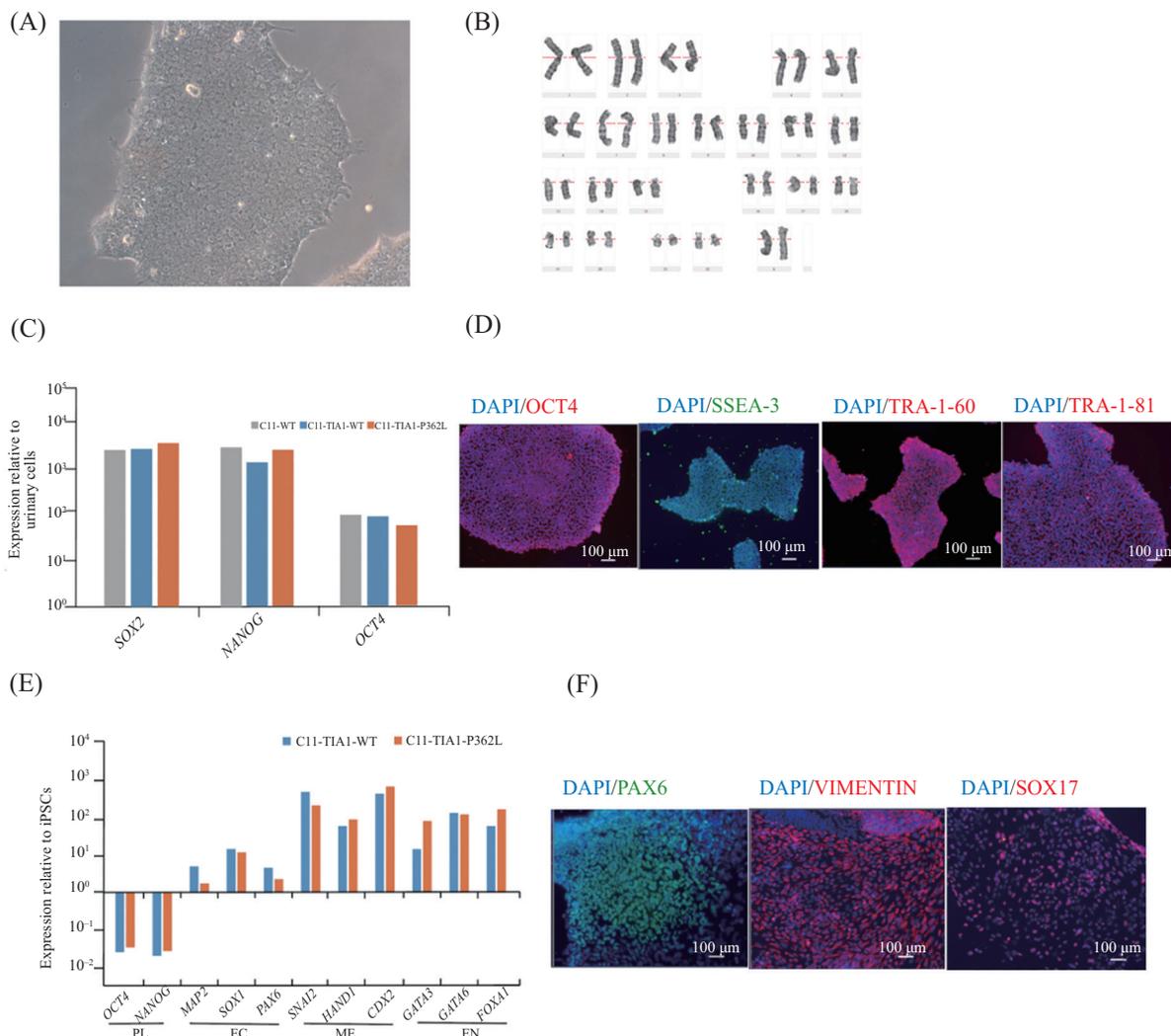
Fig.7 Results of PCR identification, sequencing and Western blot of TIA1 after Cre digestion

19-8、19-11基因组上loxP中间的插入片段被切除(图7A和图7B)。选择19-1、19-2、19-3进行测序及Western blot鉴定,结果显示这三个克隆均有TIA1-P362L突变(图7C)并且其TIA1蛋白正常表达(图7D)。

**2.3.3 C11-TIA1-P362L iPSCs多能性鉴定** 将克隆19-3命名为C11-TIA1-P362L,扩大培养并连续传代及鉴定,细胞呈集落样生长,克隆边缘清晰,细胞生长状态良好(图8A),支原体检测结果为阴性。STR检测结果表明无其他细胞系交叉污染。首先,核型分析结果表明C11-TIA1-P362L表现出正常的46XX核型(图8B),在构建突变细胞系过程中无染色体畸变发生。qRT-PCR鉴定结果表明,C11-TIA1-P362L的内源性多能性基因*SOX2*、*OCT4*和*NANOG*相对表达水平和其原始iPSCs系C11中的表达水平是相似的(图8C)。免疫荧光染色结果表明,人胚胎干细胞标志物OCT4、SSEA3、TRA-1-60、TRA-1-81在C11-TIA1-P362L中均显著表达(图8D)。另外,C11-TIA1-P362L悬浮培养形成的

拟胚体能够在特定诱导条件下自发分化,获得包含内、中、外三个胚层的组织,在mRNA水平上,内(*GATA3*、*GATA6*、*FOXA1*)、中(*SNAI2*、*HAND1*、*CDX2*)、外(*MAP2*、*SOX1*、*PAX6*)胚层标志基因显著表达(图8E)。免疫荧光也显示,内胚层标志物VIMENTIN,中胚层标志物SOX17和外胚层标志物PAX6表达均为阳性,说明C11-TIA1-P362L具备三胚层分化的能力(图8F)。综上,我们所构建的携带ALS致病基因TIA1-P362L突变的细胞系具有多能性。

**2.3.4 运动神经元分化** 在C11-TIA1-P362L分化到第14天时,可以看到有神经前体细胞的形成(图9A),到第28天可以观察到运动神经元样细胞已形成突触连接,到第40天时,运动神经元成熟,可以看到紧密的神经网络。免疫荧光染色显示 $\beta$  III-微管蛋白( $\beta$  III-tubulin/TUJ1),及运动神经元特异性标志物HB9、ISL1和CHAT正常表达,证明C11-TIA1-P362L能够被诱导分化为运动神经元,并且TIA1在运动神



A: 细胞形态; B: 核型分析; C、D: 多能性基因表达qRT-PCR结果和免疫荧光结果; E、F: EBs体外分化为内、中、外三胚层能力的qRT-PCR结果和免疫荧光结果。

A: cell morphology; B: karyotype analysis; C,D: qRT-PCR and immunofluorescence showed expression of pluripotency genes; E,F: qRT-PCR and immunofluorescence showed *in vitro* differentiation into three-germ layers from EBs.

图8 C11-TIA1-P362L iPSCs多能性验证

Fig.8 Validation of the pluripotency of C11-TIA1-P362L iPSCs

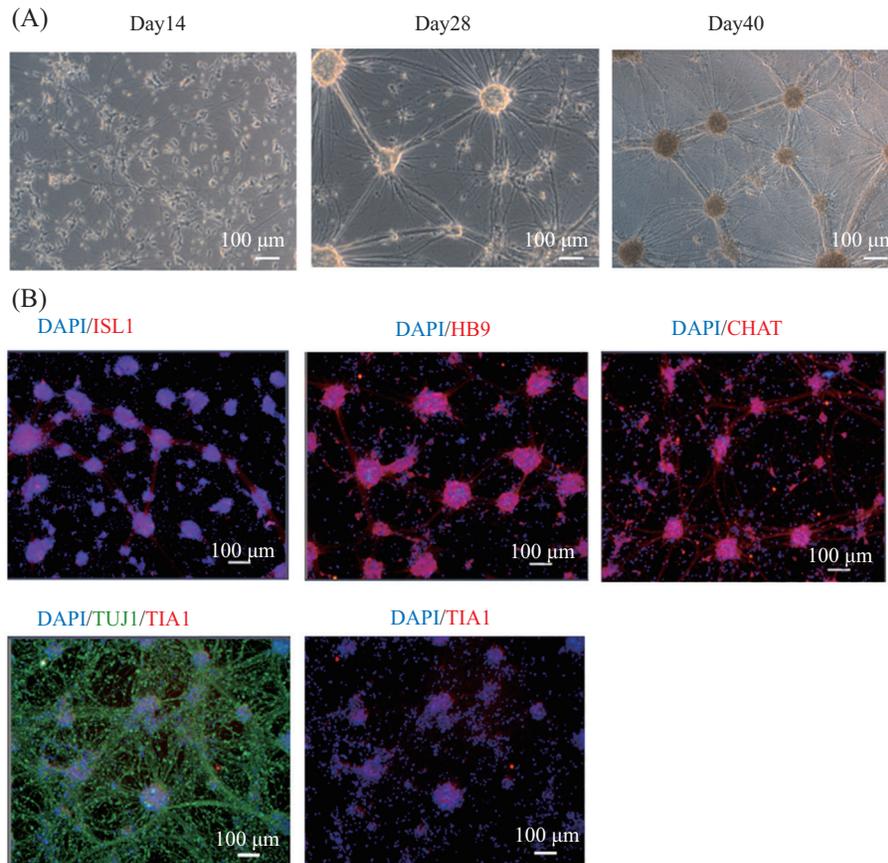
经元核内显著表达(图9B)。

### 3 讨论

ALS是一种危及生命且目前尚无法治愈的神经退行性疾病,其病因复杂多样,早期诊断难且治疗手段少,给患者、家庭和社会都带来了沉重负担。ALS、阿尔茨海默病和额颞叶痴呆与对RNA结合蛋白(RNA binding proteins, RBPs)的错误调节相关<sup>[19]</sup>。RBPs在细胞应激期间通过形成应激颗粒控制mRNA的翻译<sup>[20-21]</sup>。响应于细胞应激,SGs在细胞质基质中积累并发挥抑制mRNA翻译的作用,随后在应激恢复期间消散。然而,SGs相关RBPs的突变会导致神

经退行性疾病中明显地出现蛋白质聚集物病理性积累。此外,随年龄变化的mRNA甲基化和甲基化依赖性RBPs也与神经变性相关<sup>[22]</sup>。虽然RBPs与多种神经系统疾病相关,但它们在疾病进展中的确切作用尚不清楚。RBPs正日益成为备受关注的神经退行性疾病的治疗靶标。近期研究表明,TIA1作为一个RNA结合蛋白,其突变会导致ALS疾病,并且与其他神经退行性疾病相关<sup>[23]</sup>,具有较大研究意义。随着技术的发展,基于iPSCs技术构建的细胞疾病模型在研究ALS疾病的致病机制中具有广阔的应用前景。

在本项研究中,为了更好了解TIA1基因突变产生的影响,我们利用CRISPR/Cas9基因编辑技术构



A: C11-TIA1-P362L细胞诱导为运动神经元过程中第14、28和第40天的细胞形态; B: 免疫荧光染色证明诱导出的运动神经元表达TIA1, 神经元的标志物TUJ1以及运动神经元的特异性标志物HB9、ISL1和CHAT。

A: cell morphology at day 14, 28, and 40 during the differentiation of C11-TIA1-P362L into motor neurons; B: immunofluorescence showed the expression of TIA1, neuron marker TUJ1 and motor neuron markers HB9, ISL1, and CHAT.

图9 C11-TIA1-P362L细胞分化为运动神经元

Fig.9 Differentiation of C11-TIA1-P362L cells into motor neurons

建了TIA1-P362L突变的iPSCs系,在构建过程中使用同源重组突变的方法,可以提高获得目的基因突变细胞的准确性和效率。通过检测基因突变细胞系的基因型、核型、STR、多能性基因表达、体外分化为内中外三胚层的能力、蛋白表达情况发现,该突变细胞系无异常,可用于后续实验。特异性标志物显著表达的结果表明,TIA1-P362L突变的iPSCs系成功分化为运动神经元。我们还可以利用此模型进行疾病机制研究,使对照和TIA1-P362L突变的细胞系同时分化为运动神经元,再选择亚砷酸钠( $\text{NaAsO}_2$ )进行处理<sup>[24]</sup>,收集其RNA进行转录组分析,分析其RNA剪接上存在的差异从而了解其疾病机制。

综上所述,本文主要在于通过建立ALS疾病体外模型,为探索ALS疾病的分子机理和药物治疗方向提供基础,其在研究技术和研究内容上具有重大意义。

## 参考文献 (References)

- [1] FERRARI R, KAPOGIANNIS D, HUEY E D, et al. FTD and ALS: a tale of two diseases [J]. *Curr Alzheimer Res*, 2011, 8: 273-94.
- [2] TSAI M J, HSU C Y, SHEU C C. Amyotrophic lateral sclerosis [J]. *N Engl J Med*, 2017, 377(16): 1602.
- [3] TAYLOR J P, BROWN R H J, CLEVELAND D W. Decoding ALS: from genes to mechanism [J]. *Nature*, 2016, 539(7628): 197-206.
- [4] DHASMANA S, DHASMANA A, NARULA A, et al. The panoramic view of amyotrophic lateral sclerosis: a fatal intricate neurological disorder [J]. *Life Sciences*, 2021, 288: 120156.
- [5] ROSEN D R, SAPP P, O'REGAN J, et al. Genetic linkage analysis of familial amyotrophic lateral sclerosis using human chromosome 21 microsatellite DNA markers [J]. *Am J Med Genet*, 1994, 51(1): 61-9.
- [6] RENTON A E, MAJOUNIE E, WAITE A, et al. A hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72 is the cause of chromosome 9p21-linked ALS-FTD [J]. *Neuron*, 2011, 72(2): 257-68.
- [7] DEJESUS-HERNANDEZ M, MACKENZIE I R, BOEVE B F, et al. Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in noncoding

- region of C9ORF72 causes chromosome 9p-linked FTD and ALS [J]. *Neuron*, 2011, 72(2): 245-56.
- [8] SABATELLI M, MONCADA A, CONTE A, et al. Mutations in the 3' untranslated region of FUS causing FUS overexpression are associated with amyotrophic lateral sclerosis [J]. *Hum Mol Genet*, 2013, 22(23): 4748-55.
- [9] MENESES A, KOGA S, O'LEARY J, et al. TDP-43 pathology in Alzheimer's disease [J]. *Mol Neurodegener*, 2021, 16(1): 1-15.
- [10] HAYES L R, KALAB P. Emerging therapies and novel targets for TDP-43 proteinopathy in ALS/FTD [J]. *Neurotherapeutics*, 2022, 19(4): 1061-84.
- [11] JANINE K, AFNAN A S, RACHEL W, et al. The genetics of amyotrophic lateral sclerosis: current insights [J]. *Degener Neurol Neuromuscul Dis*, 2016, 6: 49-64.
- [12] MACKENZIE I R, NICHOLSON A M, SARKAR M, et al. TIA1 mutations in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia promote phase separation and alter stress granule dynamics [J]. *Neuron*, 2017, 95(4): 808-16,e9.
- [13] VANDERWEYDE T, APICCO D J, YOUMANS-KIDDER K, et al. Interaction of tau with the RNA-binding protein TIA1 regulates tau pathophysiology and toxicity [J]. *Cell Rep*, 2016, 15(7): 1455-66.
- [14] RAYMAN J B, HIJAZI J, LI X, et al. Genetic perturbation of TIA1 reveals a physiological role in fear memory [J]. *Cell Rep*, 2019, 26(11): 2970-83,e4.
- [15] TAKAHASHI K, YAMANAKA S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors [J]. *Cell*, 2006, 126(4): 663-76.
- [16] SHI Y. Induced pluripotent stem cells, new tools for drug discovery and new hope for stem cell therapies [J]. *Curr Mol Pharmacol*, 2009, 2(1): 15-8.
- [17] ZHOU T, BENDA C, DUZINGER S, et al. Generation of induced pluripotent stem cells from urine [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2011, 22(7): 1221-8.
- [18] BHINGE A, NAMBOORI S C, ZHANG X, et al. Genetic correction of SOD1 mutant iPSCs reveals ERK and JNK activated API as a driver of neurodegeneration in amyotrophic lateral sclerosis [J]. *Stem Cell Reports*, 2017, 8(4): 856-69.
- [19] WILSON D M III, COOKSON M R, VAN DEN BOSCH L, et al. Hallmarks of neurodegenerative diseases [J]. *Cell*, 2023, 186(4): 693-714.
- [20] WOLOZIN B. Regulated protein aggregation: stress granules and neurodegeneration [J]. *Mol Neurodegener*, 2012, 7: 56.
- [21] WOLOZIN B, IVANOV P. Stress granules and neurodegeneration [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2019, 20(11): 649-66.
- [22] MCMILLAN M, GOMEZ N, HSIEH C, et al. RNA methylation influences TDP43 binding and disease pathogenesis in models of amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia [J]. *Mol Cell*, 2023, 83(2): 219-36,e7.
- [23] VANDERWEYDE T, APICCO D J, YOUMANS-KIDDER K, et al. Interaction of tau with the RNA-binding protein TIA1 regulates tau pathophysiology and toxicity [J]. *Cell Rep*, 2016, 15(7): 1455-66.
- [24] MARKMILLER S, SOLTANIEH S, SERVER K L, et al. Context-dependent and disease-specific diversity in protein interactions within stress granules [J]. *Cell*, 2018, 172(3): 590-604,e13.