

CRISPR-Cas9 系统定向编辑 TCR 基因的 sgRNA 筛选

邵红伟^{1,2}, 陈辉^{1,2}, 彭鑫^{1,2}, 徐畅^{1,2}, 张广献³, 黄树林^{1,2}

(1. 广东药学院生命科学与生物制药学院, 广东广州 510006; 2. 广东省生物技术候选药物研究重点实验室, 广东广州 510006; 3. 广州中医药大学基础医学院, 广东广州 510006)

[摘要] 为构建靶向 T 细胞抗原受体 (T Cell Receptor, TCR) 基因的 CRISPR-Cas9 基因组编辑系统, 基于 pX458 质粒构建靶向 TCR 基因 β 链 C 区的 CRISPR-Cas-sgRNA 质粒, 将其转染 HepG2 细胞系, 用流式细胞术检测转染效率; 转染 48 h 后提取 HepG2 细胞基因组 DNA, 扩增含有编辑位点的片段, 测序分析该片段的峰图改变; 对出现双峰的扩增片段做 T-A 克隆后测序分析, 确定基因编辑发生的位置, 并结合转染效率计算基因编辑效率. 结果表明, 成功构建含有 3 种 sgRNA 序列 (N1、N2、S1) 的 pX458-sgRNA 质粒, 其转染效率分别为 38.5% (N1)、39.7% (N2) 和 24.2% (S1); 基因组 PCR 产物测序分析发现, S1 组扩增片段在打靶位置出现杂峰; T-A 克隆测序发现, 20 克隆有 4 个发生了基因编辑 (20%), 结合转染效率 (24.2%) 可知, 编辑效率约为 83%. 可见, 本文成功构建靶向 TCR 基因的 CRISPR-Cas-sgRNA 质粒, 并鉴定出基因编辑效率较高的一种 sgRNA 序列.

[关键词] T 细胞抗原受体; 靶向; CRISPR; 基因组; 编辑

[中图分类号] R 392.11

[文献标志码] A

Selection of sgRNA for Efficient Editing of TCR Gene by CRISPR-Cas9 System

SHAO Hong-wei^{1,2}, CHEN Hui^{1,2}, PENG Xin^{1,2}, XU Chang^{1,2},
ZHANG Guang-xian³, HUANG Shu-lin^{1,2}

(1. School of Biosciences and Biopharmaceutics, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China;

2. Guangdong Province Key Laboratory for Biotechnology Drug Candidate, Guangzhou 510006, China;

3. School of Basic Medical Sciences, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China)

Abstract: To establish a TCR-targeted CRISPR-Cas9 system for study of TCR functions, the CRISPR-Cas-sgRNA constructs targeting TRBC were made based on pX458 vector and transferred into HepG2. The transfection efficiencies were detected by flow cytometry (FCM) after 48 h. Subsequently, the genomic DNA of HepG2 was extracted and a fragment covering target sequence was amplified by PCR and analyzed by sequencing. The fragment exhibiting overlapping peaks in target sequence was subject to T-A cloning. The sequencing results were then analyzed to confirm the occurrence of indel and calculate the editing efficiency. The results showed that three pX458-sgRNA constructs (N1、N2、S1) were made. The transfection efficiencies were 38.5% (N1), 39.7% (N2) and 24.2% (S1), respectively. Sequencing results of S1 fragment exhibited overlapping peaks. After cloning and sequencing, 4 of 20 S1 clones showed sequence alteration.

Considering the 24.2% transfection efficiency, the indel efficiency induced by the sgRNA – S1 is approximate 83%. CRISPR-Cas-sgRNA constructs targeting TRBC were successfully made and a type of sgRNA has been identified for high-efficiency genome editing.

Key words: TCR; targeting; clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR); genome; editing

0 引言

T 细胞抗原受体 (T Cell Receptor, TCR) 决定着 T 淋巴细胞的抗原识别特异性, 在免疫识别中具有重要的靶向作用. 将特定识别某种抗原的 TCR 基因转入普通的 T 细胞, 将能够赋予细胞特定的抗原识别能力^[1]. Clay 等人在黑色素瘤模型上进行的相关研究首先表明了 TCR 基因改造 T 细胞的可行性^[2], 随后很多研究者^[3-8]陆续在抗肿瘤和抗病毒的治疗研究中证明了这一点. 然而, 在转有外源 TCR 基因的 T 细胞内存在 2 种 α 链和 2 种 β 链, 内源性 α 和 β 链组成的 TCR 分子是细胞自身原有的, 导入的 α 和 β 链组成的 TCR 分子抗原识别特异性也很明确, 但是内源 α 链与外源 β 链或内源 β 链或外源 α 链之间形成的杂合 TCR 分子则存在着不确定性, 有识别自身抗原导致自身免疫性疾病的可能, 之前的研究^[9-11]也确定了这种杂合 TCR 的存在. 因此, 减少或避免杂合 TCR 分子对于 TCR 基因改造 T 细胞的临床应用具有非常重要的意义. 利用基因组定点编辑技术将内源 TCR 基因敲除, 再利用经过适当改造的外源 TCR 基因进行修饰是值得尝试的方案之一.

规律成簇间隔短回文重复序列 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats, CRISPR) 是一种在细菌和古细菌中广泛存在的基因结构, 用于抵抗噬菌体等外源遗传物质的入侵^[12], 该结构与一些功能相关的蛋白质 (CRISPR – associated, Cas) 组成了 CRISPR – Cas 系统, 靶向于特定的 DNA 序列发挥着获得性免疫的作用. 近年来人们将其改造成了一种对基因组进行定点编辑的强大工具, 并很快取得了一系列令人瞩目的进展^[13]. 本研究基于 CRISPR – Cas9 系统构建了靶向 TCR 分子 β 链 C 区基因 (TRBC) 的编辑模型, 考虑到转染效率的问题, 本研究利用肿瘤细胞株 HepG2 代替 T 细胞进行编辑效率的验证和编辑 sgRNA 序列的筛选, 为将来构建重组腺病毒编辑载体, 进一步在 T 细胞中进行 TCR 基因敲除的研究奠定基础.

1 材料和方法

1.1 材料

pX458 质粒购自美国 Addgene 公司; 质粒抽提及凝胶回收试剂盒均购自 Axygen 公司; EasyPureR Genomic DNA Kit 购自北京全式金生物技术有限公司; DH5 α 感受态细胞、T4 PNK 酶、Taq 酶、Bam-HI 和 EcoRI 购自 Takara 公司; T 载体及 T4 连接酶购自美国 Promega 公司; BbsI 核酸内切酶购自 NEB 公司; X – Treme GENE HP DNA transfection reagent 购自罗氏公司; RPMI – 1640 培养基和胎牛血清均购自美国 Hyclone 公司; Opt – MEM 培养基购自 Life 公司.

1.2 方法

1.2.1 sgRNA 靶位点设计以及寡核苷酸链的合成

以 TRBC 基因第一外显子序列为对象, 利用 DNASTar 软件或者参照 <http://tools.genome-engineering.org> 网站设计 TRBC Guide RNA, sgRNA 核心序列按照 5' – G (N)₁₉ NGG – 3' 的 PAM 结构为设计原则, 长 20 个碱基. 在合成核心序列的两条互补链时, 分别在其 5' 端添加 5' – CACC – 3' 和 5' – AAAC – 3' 序列 (见表 1), 使其退火

表 1 3 对 sgRNA 核心序列

Tab. 1	Sequence information of three pairs of sgRNAs
sgRNA	Sequences
S1	F: 5' – cacc – gCGCTGACGATCTGGGTGAC – 3' R: 3' – cGCGACTGCTAGACCCACTG – caaa – 5'
N1	F: 5' – cacc – gATCGTCAGCGCCGAGGCCT – 3' R: 3' – cTAGCAGTCGCGGCTCCGGA – caaa – 5'
N2	F: 5' – cacc – gTTCTACGGGCTCTCGGAGA – 3' R: 3' – cAAGATGCCCGAGAGCCTCT – caaa – 5'

2.3 pX458 – sgRNA 各载体对 HepG2 细胞系的编辑效率验证

分别提取各转染组的基因组 DNA，电泳结果（见图 3a）表明，所提 DNA 条带清晰，较为完整，以其为模板进行 PCR 扩增，琼脂糖电泳检测结果（见图 3b）显示，在约 200 bp 处出现目的条带。

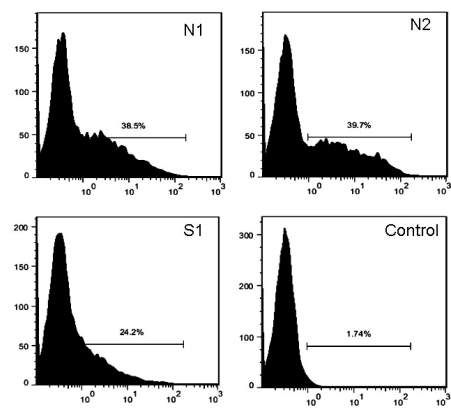
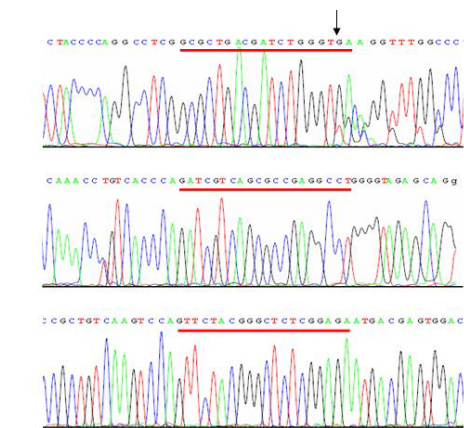


图 2 各组 GFP pX458–sgRNA 质粒转染 HepG2 细胞的效率检测

Fig.2 Transfection efficiency of three pX458–sgRNA constructs in HepG2 cell

将 PCR 产物直接测序分析，发现 pX458 – sgRNA – S1 转染组从第 sgRNA 序列的第 18 个碱基处开始出现双峰（见图 4a），而 pX458 – sgRNA – N1 和 pX458 – sgRNA – N2 组均没有出现双峰现象，表明 pX458 – sgRNA – S1 质粒具有更好的编辑效果。



a. 各组 PCR 产物测序分析
Sequencing analysis of PCR products of different groups

图 4 靶向 TRBC 的基因组编辑效果与位点分析
Fig.4 The effect and sites analysis of gene-editing targeting TRBC

2.4 PCR 产物的 T – A 克隆与测序结果

将 pX458 – sgRNA – S1 转染组的 PCR 产物与 T 载体连接转化 DH5 α 感受态，随机挑选 20 个阳性克隆进行测序分析，结果（见图 5）表明，有 4 个克隆在 sgRNA 序列内发生了碱基的插入，图 5 中箭头所指为 SNP 位点，可见基因组上的两个等位基因均发生了突变，表明该 PAM 位点的 SNP 对编辑没有造成显著的影响。

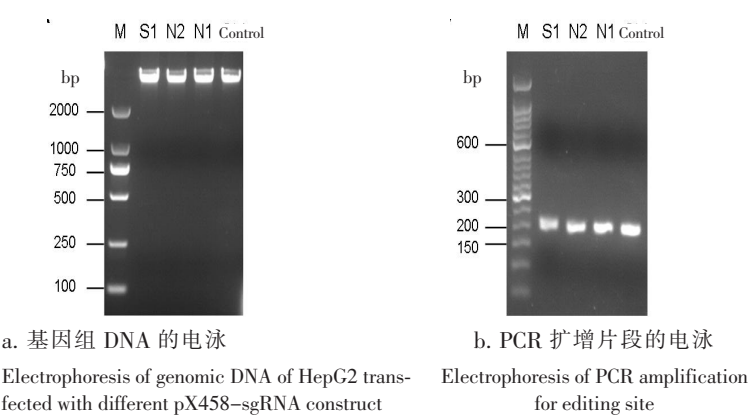
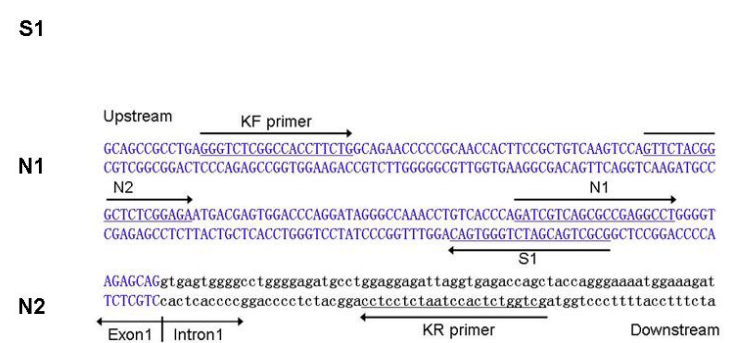


图 3 转染后基因组 DNA 的提取与 PCR 扩增
Fig.3 Electrophoresis of genomic DNA and PCR amplification after transfection with different pX458–sgRNA



b. 各 sgRNA 在基因组上的分布情况
A diagram showing the sites and directions of sgRNAs

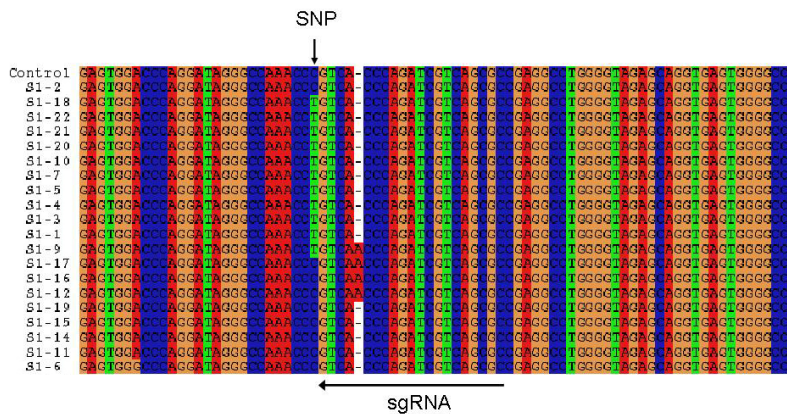


图 5 sgRNA-S1 组克隆测序分析

Fig.5 Sequencing analysis of different clones of sgRNA-S1 group

3 讨论

TCR 基因修饰的 T 细胞 (TCR – T) 抗肿瘤治疗日益显示出巨大的应用前景, 多个临床实验正在开展. 然而, 杂合 TCR 分子的存在始终是 TCR – T 应用中不可忽视的障碍之一, 因此设法降低或避免杂合 TCR 分子显得尤为重要^[14]. 目前, 几个研究小组进行了这方面的尝试^[15–19], 主要是针对 TCR 分子的 C 区进行改造, 尽管取得了一定的进展, 但是仍然无法从根本上解决这一问题. 随着基因组定点编辑技术的发展, 本文尝试利用这一技术先将细胞内的 TCR 基因敲除, 然后再转入经过改造的外源 TCR 基因, 这样就可以彻底解决杂合 TCR 的问题.

在本研究中, 针对 TRBC 设计了 3 个候选的 sgRNA 序列, 考虑到基因组上有两个 TRBC 基因座位, 尽量在保守区内进行设计. 常规方法对于 T 细胞的转染效率过低, 由于 C 区基因在不同类型细胞中的基因组定位都是一样的, 因此, 本文利用肿瘤细胞株 HepG2 代替 T 细胞进行实验. 结果表明, 本文设计的 sgRNA – S1 能够对 TRBC 进行有效地编辑, 综合考虑其 24.2% 的转染效率和 20% 的突变克隆率, sgRNA – S1 的基因编辑效率 (突变克隆率/转染效率) 约为 83%. 值得注意的是, 发生突变的 4 个克隆均为插入突变, 且插入的位点和碱基都一样. 之前 Cong 等^[20]和 Mali 等^[21]的实验都显示出了非一致性的编辑, 然而 Li 等^[22]利用 CRISPR 对烟草和拟南芥同样进行 PDS 基因定点编辑, 结果表明, 在不同的物种进行编辑结果是不一致的: 在烟草中多为大片段的缺失或者插入, 而在拟南芥中则多为单核苷酸突变, 说明 CRISPR/Cas 系统对不同植物的编辑模式存在差异. 考虑到本研究所用细胞系为肿瘤细胞, 其非同源末端连接 (NHEJ) 机制很可能与正常细胞不同, 这从维护基因组完整性的 P53 基因在很多肿瘤中都发生了突变这一点可以推断. 此外 CRISPR/Cas 系统编辑效率还可能受到染色体结构、染色体甲基化以及对靶细胞的结合力等因素有关, 因此本实验中发现的一致性突变也可能是由于受到细胞本身特定因素的影响, 非常值得进一步的深入研究. 通过本研究, 本文筛选确定了能对 TRBC 基因进行有效编辑的 sgRNA 序列, 为今后基于这一序列进行重组病毒载体构建以便在 T 细胞中进行相关研究奠定了基础.

[参 考 文 献]

[1] WANG X, RIVIÈRE I. Manufacture of tumor-and virus-specific T lymphocytes for adoptive cell therapies [J]. Cancer Gene Ther, 2015, 22(2): 85-94.

[2] CLAY T M, CUSTER M C, SACHS J, et al. Efficient transfer of a tumor antigen-reactive TCR to human peripheral blood lymphocytes confers anti-tumor reactivity [J]. J Immunol, 1999, 163(1): 507-513.

[3] COOPER L J, KALOS M, LEWINSOHN D A, et al. Transfer of specificity for human immunodeficiency virus type 1 into primary human T lymphocytes by introduction of T-cell receptor genes [J]. J Virol, 2000, 74(17): 8207-8212.

- [4] HEEMSKERK M H, HOOGEBOOM M, DE PAUS R A, et al. Redirection of antileukemic reactivity of peripheral T lymphocytes using gene transfer of minor histocompatibility antigen HA-2-specific T-cell receptor complexes expressing a conserved alpha joining region [J]. *Blood*, 2003, 102(10): 3530-3540.
- [5] MORGAN R A, DUDLEY M E, YU Y Y, et al. High efficiency TCR gene transfer into primary human lymphocytes affords avid recognition of melanoma tumor antigen glycoprotein 100 and does not alter the recognition of autologous melanoma antigens [J]. *J Immunol*, 2003, 171(6): 3287-3295.
- [6] XUE S A, GAO L, HART D, et al. Elimination of human leukemia cells in NOD/SCID mice by WT1-TCR gene-transduced human T cells [J]. *Blood*, 2005, 106(9): 3062-3067.
- [7] PEGRAM H J, JACKSON J T, SMYTH M J, et al. Adoptive transfer of gene-modified primary NK cells can specifically inhibit tumor progression in vivo [J]. *J Immunol*, 2008, 181(5): 3449-3455.
- [8] PHAN G Q, ROSENBERG S A. Adoptive cell transfer for patients with metastatic melanoma: the potential and promise of cancer immunotherapy [J]. *Cancer Control*, 2013, 20(4): 289-297.
- [9] SHAO H, ZHANG W, HU Q, et al. TCR mispairing in genetically modified T cells was detected by fluorescence resonance energy transfer [J]. *Mol Biol Rep*, 2010, 37(8): 3951-3956.
- [10] SOMMERMEYER D, NEUDORFER J, WEINHOLD M, et al. Designer T cells by T cell receptor replacement [J]. *Eur J Immunol*, 2006, 36: 3052-3059.
- [11] HEEMSKERK M H, HAGEDOORN R S, VAN DER HOORN M A, et al. Efficiency of T-cell receptor expression in dual-specific T cells is controlled by the intrinsic qualities of the TCR chains within the TCR-CD3 complex [J]. *Blood*, 2007, 109(1): 235-243.
- [12] 王梦瑶, 杨亦农, 边红武. 基于 CRISPR-Cas 系统的基因组定点修饰新技术 [J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2014, 30(5): 426-433.
- [13] HSU P D, LANDER E S, ZHANG F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering [J]. *Cell*, 2014, 157(6): 1262-1278.
- [14] XUE S, GILLMORE R, DOWNS A, et al. Exploiting T cell receptor genes for cancer immunotherapy [J]. *Clin Exp Immunol*, 2005, 139(2): 167-172.
- [15] COHEN C J, ZHAO Y, ZHENG Z, et al. Enhanced antitumor activity of murine-human hybrid t-cell receptor (TCR) in human lymphocytes is associated with improved pairing and TCR/CD3 stability [J]. *Cancer Res*, 2006, 66(17): 8878-8886.
- [16] BOULTER J M, GLICK M, TODOROV P T, et al. Stable, soluble T-cell receptor molecules for crystallization and therapeutics [J]. *Protein Eng*, 2003, 16: 707-711.
- [17] SEBESTYÉN Z, SCHOOTEN E, SALS T, et al. Human TCR that incorporate CD3zeta induce highly preferred pairing between TCRalpha and beta chains following gene transfer [J]. *J Immunol*, 2008, 180(11): 7736-7746.
- [18] RICHMAN S A, AGGEN D H, DOSSETT M L, et al. Structural features of T cell receptor variable regions that enhance domain stability and enable expression as single-chain ValphaVbeta fragments [J]. *Mol Immunol*, 2009, 46(5): 902-916.
- [19] TAO C, SHAO H, YUAN Y, et al. Imaging T-cell receptor combined CD3 ζ reveals improving expression and pairing in living cells [J]. *Int J Mol Med*, 2014, 34(3): 849-855.
- [20] CONG L, RAN F A, COX D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems [J]. *Science*, 2013, 339(6121): 819-823.
- [21] MALI P, YANG L, ESVELT K M, et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9 [J]. *Science*, 2013, 339(6121): 823-826.
- [22] LI J F, NORVILLE J E, AACH J, et al. Multiplex and homologous recombination-mediated genome editing in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana* using guide RNA and Cas9 [J]. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(8): 688-691.