

## 基于 CRISPR/Cas9 技术建立敲除 OSBPL2 基因的 HeLa 细胞株

陈 庆,鲁雅洁,姚 俊,魏钦俊,曹 新\*

(南京医科大学生物技术系,江苏 南京 211166)

**[摘要]** 目的:利用 CRISPR/Cas9 技术构建 OSBPL2 基因敲除的稳定 HeLa 细胞株。方法:设计 3 个单导向 RNA(single-guide RNA,sgRNA),分别靶向 OSBPL2 基因的第 2、3 和 5 外显子,以 PGK1.1 为载体,构建出 3 个重组真核表达载体。分别转染 HeLa 细胞后,使用嘌呤霉素进行阳性细胞筛选,Cruiser™ 敲除检测实验和测序共同检验载体靶向效率。选出靶向效率最高的质粒转染 HeLa 细胞,进行单克隆细胞培养,最后用 Western blot 鉴定敲除效果。结果:sgRNA 正确插入到 PGK1.1 载体,靶向第 2 外显子的重组载体转染 HeLa 细胞并筛选单克隆后,细胞未检测出 OSBPL2 蛋白的表达。结论:敲除 OSBPL2 基因的稳定 HeLa 细胞株构建成功。

**[关键词]** CRISPR/Cas9;OSBPL2;HeLa 细胞株;单克隆细胞

**[中图分类号]** R394-33

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2016)09-1072-07

**doi:** 10.7655/NYDXBNS20160910

## Engineering an OSBPL2 gene knock-out HeLa strain by CRISPR/Cas9 technology

Chen Qing, Lu Yajie, Yao Jun, Wei Qinjun, Cao Xin\*

(Department of Biotechnology, NJMU, Nanjing 211166, China)

**[Abstract]** **Objective:** To apply CRISPR/Cas9 technology to construct stable OSBPL2 gene knockout HeLa strain. **Method:** Three single-guide RNA (sgRNA) targeting respectively to exon 2,3,5 of OSBPL2 gene were designed, then 3 recombinant eukaryotic expressional plasmids by the carrier of PGK1.1 were constructed. After transfection to HeLa cell respectively, puromycin was performed to screen positive cells and then cruiser™ gene knockout detection in combination with the sequencing were used to analyze targeting effect of the three plasmids. HeLa cells with the plasmid of the optimal targeting effect continued to screen monoclonal cell. The knockout effect was measured by Western blot. **Results:** SgRNAs were correctly inserted into the recombinant plasmids, OSBPL2 protein was undetected in HeLa cell after transfection with plasmid targeting to exon 2 and screening of monoclonal cell. **Conclusion:** Stable OSBPL2 gene knock-out HeLa strain can be successfully built.

**[Key words]** CRISPR/Cas9; OSBPL2; HeLa strain; monoclonal cell

[Acta Univ Med Nanjing, 2016, 36(09): 1072-1078]

氧化固醇是由胆固醇氧化衍生物构成的一大类物质,它们是胆固醇转运的重要形式。氧化固醇结合蛋白(oxysterol binding protein, OSBP)是一类存在于细胞质内,与氧化固醇具有高度亲和力的受体蛋白。与 OSBP 结构具有较高同源性的蛋白则被称为氧化固醇结合蛋白相关蛋白(oxysterol-binding proteins related proteins, ORPs)。OSBP 与 ORPs 共同构成了 ORPs 家族,该家族具有固醇/脂质转运与代谢调节、细胞生命活动调控以及信号转导等功能。

由 OSBPL2 (oxysterol binding protein like 2) 基因 (NM\_144498.2) 编码的蛋白是 ORPs 家族成员之一,由 480 个氨基酸构成。OSBPL2 蛋白的结构特征是 C 端包含 1 个氧化固醇结合结构域,而 N 端区域缺乏大多数 ORPs 家族成员具有的 pleckstrin homology (PH) 结构域。据报道,在哺乳动物细胞中,过表达 OSBPL2 改变了胆固醇合成、胆固醇酯化和胆固醇流出<sup>[1]</sup>。作为固醇受体,OSBPL2 能够在脂质颗粒上调节中性脂质的代谢,RNA 干扰沉默 OSBPL2 增加了甘油三酯和胆固醇酯的量<sup>[2]</sup>。

**[基金项目]** 国家自然科学基金(31171217,31571302)

\*通信作者(Corresponding author),E-mail:caoxin@njmu.edu.cn

基因组定点编辑技术是利用同源重组原理将外源 DNA 整合至受体细胞染色体特定位点,从而

高效编辑基因组序列,来实现对某个基因进行功能研究的重要手段之一。在现有的基因组编辑技术中,一种源于细菌和古生菌的 II 型成簇规律间隔短回文重复系统 [clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/CRISPR-associated nuclease 9 (Cas9), CRISPR/Cas9] 以其靶点选择灵活性强、设计简单、操作方便、突变效率高以及成本低等特征成为继锌指核酶 (zinc finger nucleases, ZFN) 和转录激活因子样效应物核酸酶 (transcription activator-like effector nuclease, TAL-EN) 技术之后最受欢迎的基因编辑技术。该系统的工作原理是 Cas9 核酸酶在 2 个非编码 RNA [crRNA (CRISPR RNA) 和 tracrRNA (trans-activating crRNA)] 结合形成的 crRNA/tracrRNA 复合物的指导下,直接对与 crRNA 配对的含有前导间隔相邻基序 (protospacer adjacent motif, PAM) 的 DNA 双链上游 3 bp 处进行靶向双链切割,然后通过非同源性末端连接 (non-homologous end joining, NHEJ) 或同源重组 (homologous recombination, HR) 机制对断裂的 DNA 进行修复,从而实现对特定基因靶位点的编辑<sup>[3-5]</sup>。

近期,基于本课题组前期研究发现 OSBPL2 是人类耳聋新的致病基因<sup>[6]</sup>,为进一步研究其分子发病机制,本课题利用 CRISPR/Cas9 系统构建 OSBPL2 基因敲除 HeLa 细胞系,为该基因体外功能的研究以及致聋机制的进一步探索提供细胞模型。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

HeLa 细胞 (ATCC 细胞库, 美国), PGK1.1 质粒、Annealing Buffer、基因组 DNA 提取试剂盒、Crusier™ 基因敲除检测试剂盒 (南京吉锐生物公司), 限制性内切酶 *Bbs* I (NEB 公司, 美国), T4 连接酶 (TaKaRa 公司, 日本); 质粒小提试剂盒 (Axygen Scientific 公司, 美国), 质粒中提试剂盒 (Invitrogen 公司, 美国), 琼脂糖凝胶回收试剂盒和 DH5 $\alpha$  感受态 (北京天根生化科技有限公司), 2 $\times$ PCR MIX (南京诺唯赞生物公司); lipofectamine 2000 transfection reagent (Invitrogen 公司, 美国), 嘌呤霉素 (Sigma 公司, 美国), T 载体 (南京全式金生物科技); DMEM (Gibco 公司, 美国), 胎牛血清 (上海依科赛生物制品有限公司), OSBPL2 抗体和羊抗兔抗体 (SAB 公司, 美国)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 单导向 RNA (single-guide RNA, sgRNA) 靶点选择及其寡核苷酸链合成

应用在线设计软件设计 OSBPL2 guide RNA 序列。设计标准如下: ①寻找靶标序列, 首先确定靶标 DNA 区域 (23~250 bp 基因片段), 利用 CRISPR 在线设计软件 (<http://crispr.mit.edu/>) 设计 3 对 20 bp 左右的 Oligo DNAs, 按照分值由高到低进行筛选; ②确定靶序列特异性, 利用 NCBI 中的 Nuclease Blast 数据库检测靶序列的特异性, 剔除与数据库中碱基序列匹配度高的靶序列; ③引物添加接头 (正向引物加 CACC, 反向引物添加 AAAC, 靶序列的第 1 个碱基必须是 G, 如果选取的靶序列第 1 个碱基不是 G, 需自行在靶序列前加 1 个 G)。

#### 1.2.2 PGK1.1-sgRNA 载体构建

将 3 对 sgRNA 寡核苷酸单链分别退火形成双链, 将合成后的正链寡核苷酸和负链寡核苷酸稀释到 10  $\mu$ mol/L, 退火形成 dsDNA。退火体系: 正链 Oligo 10  $\mu$ L, 负链 Oligo 10  $\mu$ L, 去离子水 16  $\mu$ L, 10 $\times$ Annealing buffer 4  $\mu$ L, 共 40  $\mu$ L。PCR 仪中的反应条件: 95 $^{\circ}$ C 孵育 3 min 后, 将 PCR 反应管留在 PCR 仪中放置 20 min 以上, 自然冷却至管中液体温度降低到 40 $^{\circ}$ C 以下。Bbs I 内切酶酶切环状载体 PGK1.1, 酶切产物回收后, 与退火后的 dsDNA 进行连接反应。16 $^{\circ}$ C 连接过夜。然后转化到 DH5 $\alpha$  感受态细胞中, 挑取单克隆, 小提质粒并测序验证 (由南京金斯瑞公司完成)。验证成功后, 扩大培养提取质粒。

#### 1.2.3 细胞培养和细胞转染

HeLa 细胞培养条件: 高糖 DMEM 培养基 (含 10% 胎牛血清), 5% CO $_2$ , 37 $^{\circ}$ C 恒温培养。转染前 24 h, 将 HeLa 细胞以 5 $\times$ 10 $^5$  个/孔接种至 6 孔板中培养, 转染时细胞汇合度达 80%~90%。转染前 1 h 更换新鲜培养基, 采用 lipofectamine 2000 转染试剂进行细胞转染。等量 PGK1.1 空载作为阴性对照。

#### 1.2.4 药物筛选和细胞基因组 DNA 提取

细胞以 1.0 $\times$ 10 $^4$  个/孔接种 96 孔板中, 根据嘌呤霉素浓度: 0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4  $\mu$ g/mL, 设置 15 组, 每组 3 个复孔。24 h 后换液, 加入含相应浓度嘌呤霉素的培养基。每 2 d 换 1 次液, 观察 1 周之内细胞全部死亡的最佳嘌呤霉素筛选浓度。

转染 24 h 后, 换液, 加入含最佳嘌呤霉素筛选浓度的培养基, 处理 2~5 d。将各组细胞消化收集,

用磷酸盐缓冲液洗涤3次,采用基因组DNA提取试剂盒提取基因组DNA。

### 1.2.5 PCR 以及 Cruiser™ 敲除检测实验

50  $\mu\text{L}$  PCR 体系:2 $\times$ PCR Mix 25  $\mu\text{L}$ ,去离子水 22  $\mu\text{L}$ ,基因组DNA(野生型DNA或突变型DNA) 1  $\mu\text{L}$ (80 ng),10  $\mu\text{mol/L}$ 引物(上游和下游)各 1  $\mu\text{L}$ ,共 50  $\mu\text{L}$ 。PCR 程序:95 $^{\circ}\text{C}$  5 min;95 $^{\circ}\text{C}$  30 s,55 $^{\circ}\text{C}$  30 s,72 $^{\circ}\text{C}$  30 s,40 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$  10 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 保持。然后进行琼脂糖凝胶电泳检测。对 sgRNA 靶点附近的基因组DNA扩增后,PCR产物进行正向测序,若 sgRNA 位点以后的区域出现低矮的套峰,说明基因敲除成功。

Cruiser™ 敲除检测实验步骤:如上获得的野生型基因组DNA PCR产物(wide type PCR products, WT)和潜在突变型基因组DNA(mutant type PCR products, MT)按照以下体系加入 0.2 mL 反应管中:WT 1.5  $\mu\text{L}$ ,MT 1.5  $\mu\text{L}$ ,5 $\times$ Cruiser™ Buffer 2  $\mu\text{L}$ ,去离子水 4  $\mu\text{L}$ ,共 9  $\mu\text{L}$ 。PCR 仪中 98 $^{\circ}\text{C}$  孵育 3 min,自然冷却至管中液体降低到 40 $^{\circ}\text{C}$ 以下,获得充分杂交DNA。加入 1  $\mu\text{L}$ 识别错配的 Cruiser™ 酶,于 PCR 仪中 45 $^{\circ}\text{C}$  孵育 15~20 min,同时另设阳性对照管(2  $\mu\text{L}$  positive control,2  $\mu\text{L}$  5 $\times$ Cruiser™ Buffer,5  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O,1  $\mu\text{L}$  1 $\times$ Cruiser™ 核酸酶),随后进行琼脂糖凝胶电泳检测。若电泳图上出现3个条带,证明基因敲除成功。

### 1.2.6 筛选 OSBPL2 基因稳定敲除细胞株

药物筛选 2~5 d 后的 HeLa 细胞采用有限稀释法,将单个细胞接种到 96 孔板中。具体如下:胰蛋白酶消化细胞并计数,采用梯度稀释法稀释至每 100  $\mu\text{L}$  培养液 10 个细胞,在 96 孔板第 1 排每孔加入 100  $\mu\text{L}$  细胞稀释液,然后用排枪取第 1 排液体 10  $\mu\text{L}$ ,加入 96 孔板后面 7 排的所有孔中,最后在 96 个孔中补充新鲜培养基至终体积 100  $\mu\text{L}$ 。分别在接种后 24 h 和 48 h,对存在单个细胞的孔进行标记。待细胞长至 96 孔板底 1/2 时,胰酶消化并转移到 48 孔板,逐渐由 48 孔板转移到 24 孔板再转移到 12 孔板,在细胞转移到 6 孔板前,提取基因组DNA并进行PCR,然后进行TA克隆。挑选至少5个克隆进行测序验证。测序结果与野生型基因组DNA

序列进行比对,以下是可能出现的4种情况:①若TA克隆测序结果全部一致,则对应的细胞克隆为两条链敲除相同碱基的纯合克隆;②若TA克隆测序结果不一样,有且只有2种测序结果,且与野生型的序列不匹配,则对应的细胞克隆为2条链敲除不同碱基的纯合克隆;③若TA克隆测序结果不一样,只有2种测序结果,有1种测序结果与野生型完全匹配,则对应的细胞克隆为杂合子克隆;④若TA克隆测序结果不一样,超过2种测序结果,则对应的细胞克隆不纯,需要重新进行亚克隆,再做TA克隆进行进一步验证。

### 1.2.7 Western blot 检测

蛋白样品经 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后,将蛋白转移到 PVDF 膜上,电压为 55 V。转膜 2 h 后,用含 5% 脱脂奶粉的 PBST 封闭 1 h,然后加兔抗 OSBPL2 抗体,4 $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜,移去一抗,PBST 洗膜 3 次,每次 10 min,加羊抗兔抗体室温孵育 1 h,PBST 洗 3 次。最后用 Bio-Rad ChemiDoc XRS 凝胶成像系统检测 OSBPL2 蛋白表达情况。

## 2 结果

### 2.1 sgRNA 靶点以及寡核苷酸序列确定

sgRNA 靶点以及寡核苷酸序列(表1)。PGK1.1 载体信息(图1A);Exon 2 sgRNA(SG1)、Exon 3 sgRNA(SG2)和 Exon 5 sgRNA(SG3)3个sgRNA插入位置和序列信息(图1B)。

### 2.2 PGK1.1-sgRNA 重组载体的 PCR 验证和测序结果

PGK1.1-Exon 2 sgRNA (PGK1.1-SG1)、PGK1.1-Exon 3 sgRNA(PGK1.1-SG2)、PGK1.1-Exon 5 sgRNA (PGK1.1-SG3)3个重组载体的PCR鉴定引物如表2。PCR产物电泳分析结果如图2A。测序之后发现插入序列的位置和方向符合预期,证明3个载体均构建成功(图2B~D)。

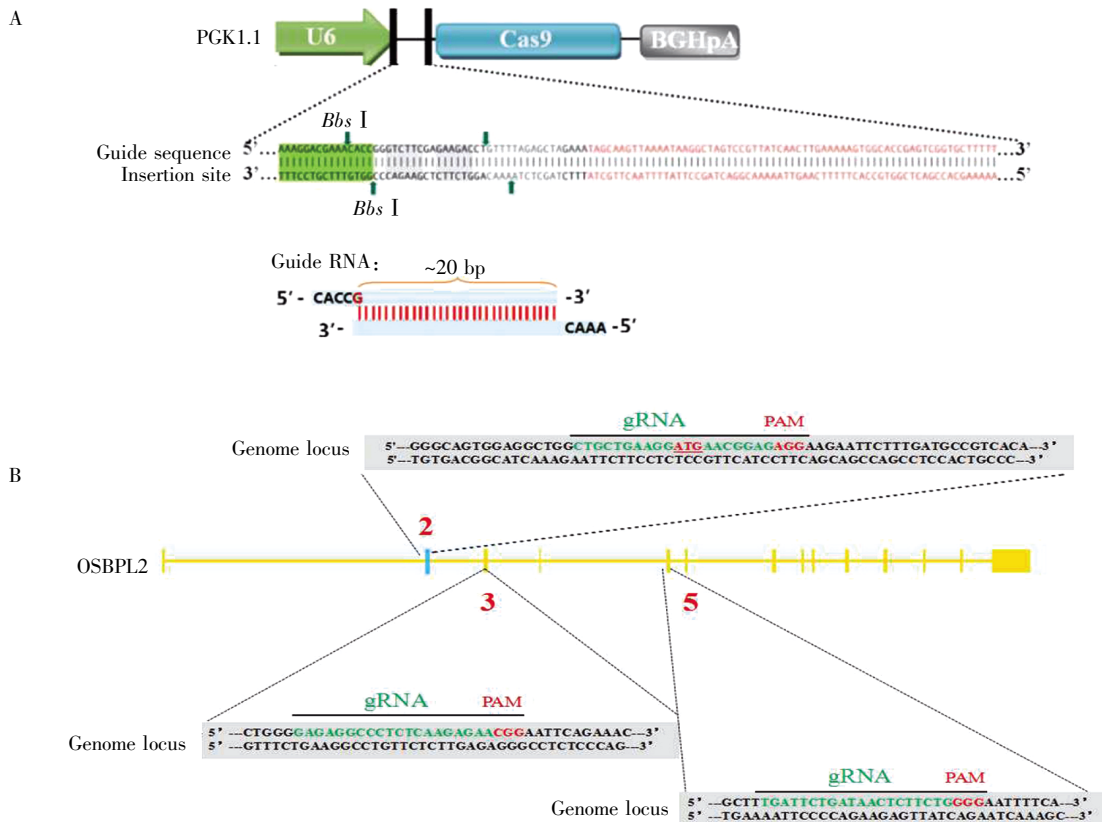
### 2.3 药物筛选、混合克隆测序验证和 Cruiser™ 敲除检测实验

HeLa 细胞的最佳嘌呤霉素药杀浓度为 0.9  $\mu\text{g/mL}$ 。为检测敲除是否出现在 sgRNA 目标序列中,对 sgRNA

表 1 sgRNA 靶点以及靶标寡核苷酸序列

Table 1 sgRNAs and target oligonucleotide sequences

sgRNA	正链引物序列(5'→3')	负链引物序列(5'→3')
Exon2 gRNA(SG1)	CACCGCTGCTGAAGGATGAACGGAG	AAACCTCCGTTTCATCCTTCAGCAGC
Exon3 gRNA(SG2)	CACCGAGAGCCCTCTCAAGAGAA	AAACTTCTTTGAGAGGGCCTCTC
Exon5 gRNA(SG3)	CACCGTGATTCTGATAACTCTTCTG	AAACCAGAAGAGTTATCAGAATCAC



A:PGK1.1 载体构建示意图;B: Exon 2 sgRNA、Exon 3 sgRNA 和 Exon 5 sgRNA 在 OSBPL2 基因序列的位置。

图 1 靶点选择与载体构建

Figure 1 Target sites selection and vector construction

目标序列所在 OSBPL2 基因片段进行编号,分别为 OSBPL2-Exon 2、OSBPL2-Exon 3、OSBPL2-Exon 5,同时设计相应的 3 对 PCR 扩增引物(表 3)。3 个载体分别转染 HeLa 细胞后发现,只有 PGK1.1-SG1 转染后,在 sgRNA 序列之后发现套峰,PGK1.1-SG2 和 PGK1.1-SG3 转染的细胞中均未出现(图 3)。证明 PGK1.1-SG1 具有敲除活性,PGK1.1-SG2 和 PGK1.1-SG3 未发挥作用。Cruiser™ 敲除检测实验同样验证 PGK1.1-SG1 转染的混合克隆能出现 3 条带(图 4),证明 PGK1.1-SG1 发挥功能。

#### 2.4 阳性克隆的筛选与鉴定

经药物筛选后,生长的 3 个克隆分别进行 TA 克隆和测序,发现均有大于 2 种的测序结果,证明有多个克隆细胞系。对其中 1 种混合克隆细胞系进行亚克隆培养筛选,然后再次对生长的 10 个克隆

进行 TA 克隆和测序验证,发现只有 1 种细胞(3 号克隆细胞)具有两种测序类型,且都与野生型序列不同,可认为是成功敲除靶基因的纯合克隆。测序结果与野生型序列比对如图 5。

#### 2.5 Western blot 检测 OSBPL2 Exon2 敲除后 OSBPL2 蛋白的表达

选取 OSBPL2 Exon 2 敲除的 3 号细胞株扩增,Western blot 检测表明,OSBPL2 Exon 2 敲除的细胞株中 OSBPL2 蛋白表达基本缺失(图 6)。

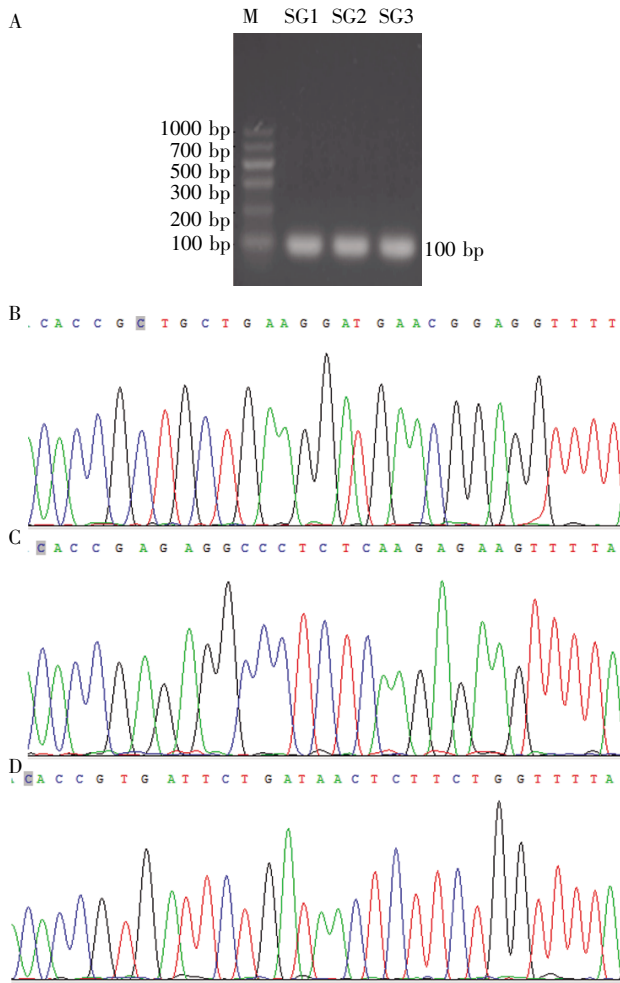
### 3 讨论

通过疾病家系谱分析,OSBPL2 基因突变已被确定引起常染色体显性遗传性耳聋(ADNSHL, DFNA67)<sup>[6,10]</sup>。OSBPL2 蛋白主要参与细胞胆固醇转运与脂质代谢等生理功能。研究表明 OSBP/ORPs

表 2 重组载体鉴定引物

Table 2 Primers of identification for recombinant vectors

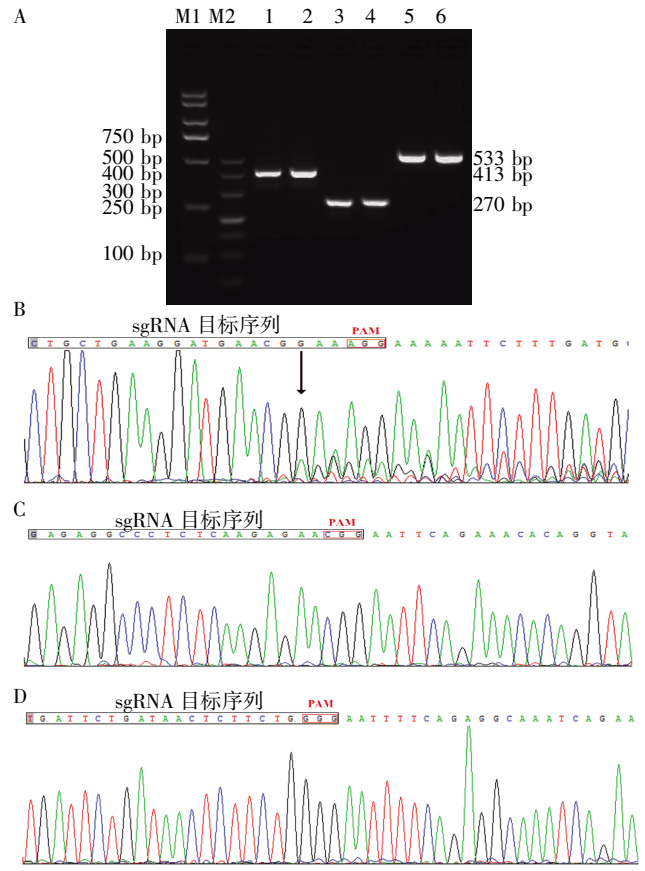
重组载体	正链引物序列(5'→3')	负链引物序列(5'→3')
PGK1.1-SG1	CATATGCTTACCGTAACCTTCAAAG	AAACCTCCGTTTCATCTTCAGCAGC
PGK1.1-SG2	CATATGCTTACCGTAACCTTCAAAG	AAACTTCTCTTGAAGGGCCTCTC
PGK1.1-SG3	CATATGCTTACCGTAACCTTCAAAG	AAACCAGAAGAGTTATCAGAATCAC



A: PGK1.1-SG1、PGK1.1-SG2、PGK1.1-SG3 重组载体 PCR 产物。  
M: DL1000; SG1: PGK1.1-SG1; SG2: PGK1.1-SG2; SG3: PGK1.1-SG3。  
B、C 和 D: 分别为插入 PGK1.1 载体的 Exon 2 sgRNA(B)、Exon 3 sgRNA(C)和 Exon 5 sgRNA(D)序列测序图。

图 2 3 个重组载体的构建

Figure 2 Construction of 3 recombinant vectors



A: PGK1.1-SG1、PGK1.1-SG2 和 PGK1.1-SG3 转染后的混合克隆基因组 DNA 的 PCR 产物。M1: Marker DL 2000; M2: Marker DL 500; 1、3、5: 野生型 HeLa 细胞中 OSBPL2 基因上包含 sgRNA 目标序列的 PCR 产物 OSBPL2-Exon 2、OSBPL2-Exon 3、OSBPL2-Exon 5; 2、4、6: 转染组 HeLa 细胞中 OSBPL2 基因上包含 sgRNA 目标序列的 PCR 产物 OSBPL2-Exon 2、OSBPL2-Exon 3、OSBPL2-Exon 5; B、C 和 D: 分别为 PGK1.1-SG1(B)、PGK1.1-SG2(C)、PGK1.1-SG3(D)转染后的混合克隆基因组 DNA 测序验证结果。

图 3 3 个重组载体转染后的混合克隆测序验证

Figure 3 Sequencing of PGK1.1-SG1/PGK1.1-SG2/PGK1.1-SG3 transfected pool cells

表 3 OSBPL2 基因敲除检测引物

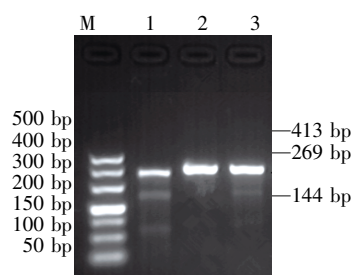
Table 3 Primers of knockout analysis for OSBPL2 gene

sgRNA 目标序列所在基因片段	正链引物序列(5'→3')	负链引物序列(5'→3')
OSBPL2-Exon 2	CCCTTTAGATCTTCAGTGTCTATTGG	AAATATCCGCACCCCAGGAAACTCTT
OSBPL2-Exon 3	GTCTCGCACAGGCTTTGATTCTGATA	AAATATCCGCACCCCAGGAAACTCTT
OSBPL2-Exon 5	TGTTCTCTCTGTACCGTGTCTGCTTC	AAATATCCGCACCCCAGGAAACTCTT

的功能不仅局限于细胞固醇代谢,还涉及细胞信号转导与发育调控等。2005 年,Anderson 及其同事证明 OSBP 在哺乳动物中作为丝氨酸/苏氨酸磷酸酶(PP2A)和酪氨酸磷酸酶(HePTP)的支架蛋白,以与固醇特异性相互作用的方式调控丝裂原激活蛋白激酶(MAPK)信号通路中心组件 ERK1/2 的活性和功能。OSBP 的固醇结合形式可以与活跃的磷酸酶结合形成复合物,胆固醇的耗竭或 25-羟基胆固醇的加入会使这一复合物分离,从而引起 ERK 的高度

磷酸化和激活<sup>[11]</sup>。动物实验证明 ERK1/2 对听力具有重要意义,ERK1/2 的频繁激活信号会损伤新生小鼠耳蜗<sup>[12]</sup>,新霉素诱导的 ERK 信号途径激活会诱导毛细胞死亡<sup>[13]</sup>。基于这些理论,有理由推断,OSBPL2 功能缺失可能通过胆固醇的转运与代谢调控 ERK 信号途径从而诱导特定细胞(如耳蜗毛细胞)的凋亡,该分子假说有待后续研究进一步验证。

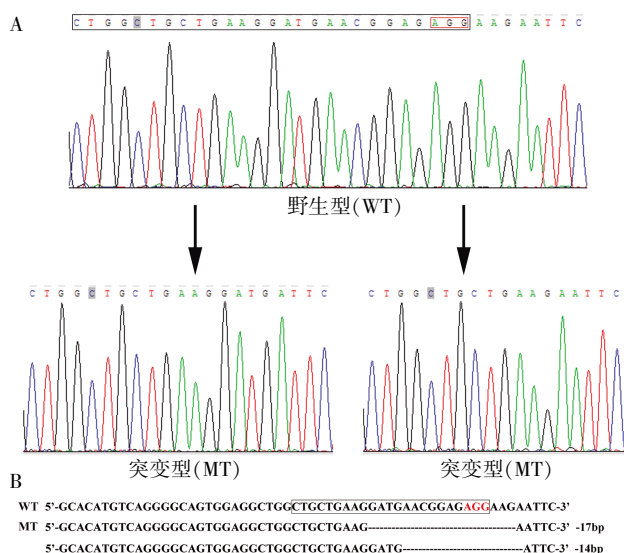
2012 年,Jinek 团队对传统 CRISPR/Cas9 系统进行改造<sup>[14]</sup>,将 crRNA 和 tracrRNA 两个非编码 RNA



M:Marker DL500;1: 阳性对照组;2:PGK1.1 空载转染组;3: PGK1.1-SG1 重组载体转染组。

图 4 PGK1.1-SG1 载体转染后的混合克隆 Cruiser™ 敲除检测分析

Figure 4 Cruiser™ gene knockout analysis for the pool of PGK1.1 transfected HeLa cells



A:野生型 HeLa 细胞基因组 DNA 和突变型(3 号克隆)细胞基因组 DNA 的 TA 克隆序列对比图;B:3 号克隆在靶标位点的缺失突变。

图 5 阳性克隆的筛选与鉴定

Figure 5 Screening and identification of positive clones

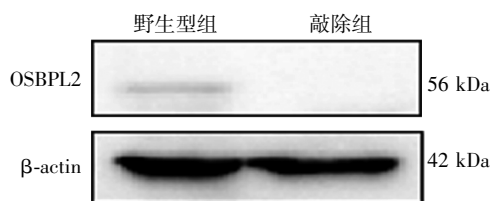


图 6 Western blot 分析野生型 HeLa 细胞和 OSBPL2 敲除组 HeLa 细胞中 OSBPL2 蛋白的表达

Figure 6 Expression of OSBPL2 protein in wide type HeLa cells and OSBPL2 gene knockout HeLa cells by Western blot

改造成一个 RNA,即 sgRNA,它能够指导 Cas9 蛋白对靶标 DNA 序列的编辑,为 CRISPR/Cas9 系统的广泛应用奠定了基础。2013 年以来,许多课题组已经成功地运用 CRISPR/Cas9 系统对人类细胞<sup>[15-16]</sup>、

斑马鱼<sup>[17]</sup>、小鼠<sup>[18]</sup>、羊<sup>[19]</sup>以及猪<sup>[20]</sup>等进行了基因编辑。CRISPR 还可以同时针对同一细胞中的多个位点进行研究,如剑桥大学的 Rudolf Jaenisch 课题组利用该技术在胚胎干细胞中同时敲除多达 5 个基因,并成功构建同时敲除 2 个基因的小鼠<sup>[21]</sup>。本研究选择 PGK1.1 质粒作为载体,该质粒可以同时表达 Cas9 核酸切口酶和插入的 sgRNA,简化了共转染的实验步骤。针对耳聋致病基因 OSBPL2 设计了 3 对 sgRNA,其中 2 对未发挥作用,另外 1 对 sgRNA 在 Cruiser™ 基因敲除检测实验中显示出酶切效率并不高。这说明 sgRNA 目标序列的设计对实验的成败以及后期单克隆细胞的筛选起到关键作用,提示在今后的实验中可以通过设计多组 sgRNA 来筛选靶向效率更高的 sgRNA。本研究使用 CRISPR/Cas9 技术建立 OSBPL2 基因敲除的 HeLa 细胞系,为该基因体外实验研究建立了细胞模型。同时为此后应用该技术在听觉相关细胞中敲除 OSBPL2 基因,为该基因与耳聋相关性研究提供了基础。

#### [参考文献]

- [1] Hynynen R, Laitinen S, Käkälä R, et al. Overexpression of OSBP-related protein 2 (ORP2) induces changes in cellular cholesterol metabolism and enhances endocytosis [J]. *Biochem*, 2005, 390(Pt 1): 273-283
- [2] Hynynen R, Suchanek M, Spandl J, et al. OSBP-related protein 2 is a sterol receptor on lipid droplets that regulates the metabolism of neutral lipids [J]. *J Lipid Res*, 2009, 50(7): 1305-1315
- [3] Mojica FJ, Díez-Villaseor C, García-Martínez J, et al. Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system [J]. *Microbiology*, 2009, 155 (Pt 3): 733-740
- [4] Garneau JE, Dupuis ME, Villion M, et al. The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA [J]. *Nature*, 2010, 468(7320): 67-71
- [5] Deltcheva E, Chylinski K, Sharma CM, et al. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III [J]. *Nature*, 2011, 471(7340): 602-607
- [6] Xing G, Yao J, Wu B, et al. Identification of OSBPL2 as a novel candidate gene for progressive nonsyndromic hearing loss by whole-exome sequencing [J]. *Genet Med*, 2015, 17(3): 210-218
- [7] Cohen M, Phillips JA 3rd. Genetic approach to evaluation of hearing loss [J]. *Otolaryngol Clin North Am*, 2012, 45 (1): 25-39
- [8] Hilgert N, Smith RJ, Van Camp G. Forty-six genes causing nonsyndromic hearing impairment: which ones should be analyzed in DNA diagnostics [J]. *Mutat Res*, 2009, 681

- (2-3):189-196
- [9] Van Camp G, Smith R. Hereditary hearing loss homepage [EB/OL]. [2016-01-01]. <http://hereditaryhearingloss.org>
- [10] Thoenes M, Zimmermann U, Ebermann I, et al. OSBPL2 encodes a protein of inner and outer hair cell stereocilia and is mutated in autosomal dominant hearing loss (DF-NA67)[J]. *Orphanet J Rare Dis*, 2015, 10:15
- [11] Wang PY, Weng J, Anderson RG. OSBP is a cholesterol-regulated scaffolding protein in control of ERK 1/2 activation[J]. *Science*, 2005, 307(5714):1472-1476
- [12] Battaglia A, Pak K, Brors D, et al. Involvement of ras activation in toxic hair cell damage of the mammalian cochlea[J]. *Neuroscience*, 2003, 122(4):1025-1035
- [13] Lahne M, Gale JE. Damaged-induced activation of ERK 1/2 in cochlear supporting cells is a hair cell death-promoting signal that depends on extracellular ATP and calcium[J]. *Neurosci*, 2008, 28(19):4918-4928
- [14] Jinek M, East A, Cheng A, et al. RNA-programmed genome editing in human cells[J]. *Elife*, 2013, 2:e00471
- [15] Mali P, Yang L, Esvelt KM, et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9[J]. *Science*, 2013, 339(6121):823-826
- [16] Cho SW, Kim S, Kim JM, et al. Targeted genome engineering in human cells with the Cas9 RNA-guided endonuclease[J]. *Nature Biotech*, 2013, 31(3):230-232
- [17] Hwang WY, Fu Y, Reyon D, et al. Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system[J]. *Nature Biotech*, 2013, 31(3):227-229
- [18] Cong L, Ran FA, Cox D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems[J]. *Science*, 2013, 339(6121):819-823
- [19] Ni W, Qiao J, Hu SW, et al. Efficient gene knockout in goats using CRISPR/Cas9 system[J]. *PLoS One*, 2014, 9(9):e106718
- [20] Hai T, Teng F, Guo RF, et al. One-step generation of knockout pigs by zygote injection of CRISPR/Cas system[J]. *Cell Res*, 2014, 24(3):372-375
- [21] Wang H, Yang H, Shivalila CS, et al. One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering [J]. *Cell*, 2013, 153(4):910-918

[收稿日期] 2016-05-13

(上接第 1071 页)

- tations[J]. *Mol Cell Neurosci*, 2011, 46(2):432-443
- [9] Yao P, Fox PL. Aminoacyl-tRNA synthetases in medicine and disease[J]. *EMBO Mol Med*, 2013, 5(3):332-343
- [10] Liem RK, Messing A. Dysfunctions of neuronal and glial intermediate filaments in disease[J]. *J Clin Invest*, 2009, 119(7):1814-1824
- [11] Moritz CP, Eckstein E, Tenzer S, et al. Neuroproteomics in the auditory brainstem: candidate proteins for ultrafast and precise information processing[J]. *Mol Cell Neurosci*, 2015, 64(1):9-23
- [12] Liu CH, Chien CL. Molecular cloning and characterization of chicken neuronal intermediate filament protein  $\alpha$ -internexin[J]. *J Comp Neurol*, 2013, 521(9):2147-2164
- [13] Song S, Mitchell DE, Crowder NA, et al. Postnatal accumulation of intermediate filaments in the cat and human primary visual cortex[J]. *J Comp Neurol*, 2015, 523(14):2111-2126
- [14] Michel V, Bakovic M. The ubiquitous choline transporter SLC44A1 [J]. *Cent Nerv Syst Agents Med Chem*, 2012, 12(2):70-81
- [15] Hartl D, Imler M, Römer I, et al. Transcriptome and proteome analysis of early embryonic mouse brain development[J]. *Proteomics*, 2008, 8(6):1257-1265
- [16] Michel V, Bakovic M. The solute carrier 44A1 is a mitochondrial protein and mediates choline transport [J]. *FASEB J*, 2009, 23(8):2749-2758
- [17] Kaltwaßer B, Schulenburg T, Beck F, et al. Developmental changes of the protein repertoire in the rat auditory brainstem: a comparative proteomics approach in the superior olivary complex and the inferior colliculus with DIGE and iTRAQ[J]. *J Proteomics*, 2013, 79(1):43-59
- [18] Attwell D, Laughlin SB. An energy budget for signaling in the grey matter of the brain[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2001, 21(10):1133-1145

[收稿日期] 2016-03-27