

论著·基础研究

构建反转录病毒小向导 RNA 表达载体用于小鼠 T 细胞基因功能研究

赵艳娜¹, 邱荣², 沈南¹, 唐元家¹

1. 上海交通大学医学院附属仁济医院风湿病科, 上海市风湿病学研究所, 上海 200125; 2. 中国科学院大学上海营养与健康研究所, 上海 200031

[摘要] **目的**·构建反转录病毒小向导 RNA (small guide RNA, sgRNA) 表达载体, 用于小鼠 T 细胞分化调控及其基因功能的研究。**方法**·表达短发夹 RNA (short hairpin RNA, shRNA) 的反转录病毒载体 (MSCV-LTR-miR30-PIG, LMP) 经过 XhoI 和 SalI 双酶切后, 回收得到反转录病毒载体骨架。以慢病毒 sgRNA 表达载体为模版, 通过 PCR 扩增获得 U6-sgRNA-PGK-Puro-BFP 片段。利用同源重组将 U6-sgRNA-PGK-Puro-BFP 片段组装进反转录病毒载体骨架。为了验证系统的有效性, 设计靶向 *Il17a*、*Rorc* 和 *Irf4* 的 sgRNA 序列并进行克隆。分离 Cas9 转基因小鼠 CD4 T 细胞分别进行 sgRNA 反转录病毒感染, 诱导其向 Th17 细胞分化。细胞因子染色, 流式检测 *Il17a* 阳性细胞比例。2 组独立样本数据比较采用非配对 *t* 检验。**结果**·①成功构建反转录病毒 sgRNA 载体。②利用反转录病毒载体向小鼠 CD4 T 细胞递送 sgRNA 并实现 *Il17a* 基因敲除。③ *Rorc*-sgRNA 和 *Irf4*-sgRNA 阳性群体中, *Il17a* 阳性群体比率显著降低 ($P<0.05$)。**结论**·利用 sgRNA 反转录病毒载体成功向目的细胞递送 sgRNA 并实现基因敲除。*Rorc* 和 *Irf4* 基因敲除结果提示该系统可用于小鼠 T 细胞基因功能研究。

[关键词] CRISPR/Cas9; Cas9 转基因小鼠; 反转录病毒载体; Th17 细胞分化**[DOI]** 10.3969/j.issn.1674-8115.2020.12.003 **[中图分类号]** R593.24¹ **[文献标志码]** A

Construction of retroviral small guide RNA expression vector for studying gene function of mouse T cells

ZHAO Yan-na¹, QIU Rong², SHEN Nan¹, TANG Yuan-jia¹

1. Shanghai Institute of Rheumatology, Department of Rheumatology, Renji Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200125, China; 2. Shanghai Institute of Nutrition and Health, University of Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China

[Abstract] **Objective**·To construct retroviral small guide RNA (sgRNA) expression vector for studying gene function in mouse T cells. **Methods**·The short hairpin RNA (shRNA)-expressing retroviral vector MSCV-LTR-miR30-PIG (LMP) was digested with XhoI and SalI to obtain the backbone of the retroviral vector. The lentiviral sgRNA vector was used as template for PCR amplification to obtain the U6-sgRNA-PGK-Puro-BFP fragment. The PCR fragment was then assembled into the retroviral vector backbone by homologous recombination. To verify the effectiveness of the system, sgRNA sequences targeting *Il17a*, *Rorc* and *Irf4* were designed and cloned. CD4 T cells isolated from Cas9 transgenic mice were infected with individual sgRNA retrovirus and differentiated into Th17 cells. After cytokine intracellular staining, the percentage of *Il17a* positive population was detected by flow cytometry. Unpaired *t* test was used to compare the data of independent samples between the two groups. **Results**·① The sgRNA retroviral vector was successfully constructed. ② The retroviral vector was used to successfully deliver sgRNA to CD4 T cells, which mutated *Il17a* gene. ③ The percentage of *Il17a* positive population was significantly reduced in the *Rorc*-sgRNA and *Irf4*-sgRNA positive populations ($P<0.05$). **Conclusion**·The sgRNA retroviral vector is successfully used to deliver sgRNA to target cells. In addition, the results of *Rorc* and *Irf4* gene knockout experiments prove that the system can be used for studying gene function in mouse T cells.

[Key words] CRISPR/Cas9; Cas9 transgenic mouse; retroviral vector; Th17 cell differentiation

CRISPR/Cas9 系统作为一个强大的基因组编辑工具, 最早发现于细菌和古细菌中。它是细菌和古细菌在长期不断进化的过程中产生的适应性免疫防御机制, 用以保护自身的基因组免受外源核酸 (如噬菌体、病毒等) 的干

扰和破坏^[1]。CRISPR-Cas9 系统主要由 2 个部分组成: 一是 CRISPR 相关核酸酶, 目前基因编辑系统中用到的主要是 Cas9 核酸酶; 二是小向导 RNA (small guide RNA, sgRNA), 含有 20 nt 能够与靶基因组互补的序列^[2-3]。

[基金项目] 国家自然科学基金 (81871287, 31630021); 上海交通大学医学院高水平地方高校创新团队 (SSMU-ZDCX20180100)。**[作者简介]** 赵艳娜 (1997—), 女, 硕士生; 电子信箱: nanalr0704@163.com。**[通信作者]** 唐元家, 电子信箱: yjtang@sibs.ac.cn。**[Funding Information]** National Natural Science Foundation of China (81871287, 31630021); Innovative Research Team of High-Level Local Universities in Shanghai (SSMU-ZDCX20180100)。**[Corresponding Author]** TANG Yuan-jia, Email: yjtang@sibs.ac.cn。

Cas9 核酸内切酶可以在 sgRNA 的引导下对靶基因组 DNA 进行切割, 导致 DNA 双链断裂^[4]。在哺乳动物细胞中由 CRISPR/Cas9 系统引起的双链断裂主要通过易错的非同源末端连接 (non-homologous end joining) 机制修复, 往往导致基因突变和功能丧失^[5-6], 因此被广泛应用于各种疾病治疗、基因功能鉴定、动物模型建立以及药物研发^[6]。然而, 如何有效递送 CRISPR/Cas9 系统至目标细胞及靶器官仍是该技术面临的主要挑战之一。

辅助性 CD4 T 细胞在适应性免疫系统中发挥着重要作用。在免疫应答过程中, 初始 CD4 T 细胞受到刺激后会分化成不同的效应 T 细胞亚群, 包括辅助性 T 细胞 1 (T helper cell 1, Th1)、辅助性 T 细胞 2 (T helper cell 2, Th2)、辅助性 T 细胞 17 (T helper cell 17, Th17) 和调节性 T 细胞 (Regulatory T cells, Treg)^[7]。不同的效应 T 细胞亚群在免疫应答过程中发挥着不同的功能。例如, Th17 及其分泌的效应细胞因子在宿主对抗各种感染 (尤其是细胞外细菌感染) 以及多种自身免疫疾病中发挥了重要作用^[8]。Treg 细胞可以分泌转化生长因子 β (transforming growth factor- β , TGF- β) 和白介素 -10 (interleukin 10, IL-10) 等抑制性细胞因子, 不仅可以控制免疫耐受和免疫反应强度, 而且在避免组织炎症损伤方面发挥重要作用^[9]。因此, 研究辅助性 T 细胞的分化发育及其分子调控机制至关重要。

目前, CRISPR/Cas9 技术的发展, 使得对免疫细胞进行大规模基因研究成为可能。如 Shifrut 等^[10]利用慢病毒 sgRNA 文库和 Cas9 蛋白, 进行全基因组筛选影响人类 T 细胞免疫反应的调控分子。但目前现有的 CRISPR/Cas9 文库大多基于慢病毒表达载体, 很难感染小鼠 T 细胞。因此, 建立适合小鼠 T 细胞基因功能研究的高通量筛选系统是亟待解决的问题。本研究构建了 sgRNA 反转录病毒载体, 结合 Cas9 转基因小鼠, 研究影响 Th17 分化的调控分子, 为小鼠 T 细胞功能研究提供工具。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 Rosa26-LSL-Cas9 (024857) 和 CD4-

Cre (022071) 小鼠购自美国杰克森实验室, 饲养于中国科学院上海生命科学研究院 SPF 级动物房 [实验动物生产许可证号 SCXK (沪) 2018-0002, 使用许可证号 SYXK (沪) 2019-0001], 饲养温度 22 ~ 25 $^{\circ}\text{C}$, 空气相对湿度 40% ~ 60%。实验获中国科学院上海生命科学研究院医学研究伦理委员会批准 (伦理审批号为 201903H486)。

1.1.2 主要试剂 抗小鼠 IL17A 抗体 (PE anti-mouse IL-17A antibody, TC11-18H10.1; BioLegend, 美国); 抗小鼠 CD3e 抗体 (145-2C11)、抗小鼠 CD28 抗体 (37.51)、抗小鼠 γ 干扰素 (interferon- γ , IFN- γ) 抗体 (XMG1.2)、抗小鼠 IL-4 抗体 (11-B11; eBioscience, 美国); 细胞固定/破膜试剂盒 (BD Cytotfix/CytopermTM Kit; BD Biosciences, 美国), 小鼠 CD4 T 细胞分选试剂盒 (Miltenyi, 德国); Xho1 内切酶、Sal1 内切酶、Taq DNA 聚合酶、NEBuiider HiFi DNA Assembly Master Mix (NEB, 美国); 磷酸缓冲盐溶液 (phosphate buffer saline, PBS)、DMEM 培养基、Opti-MEM 无血清培养基、RPM 1640、胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS; Gibco, 美国); TGF- β 1、IL-6 (R&D, 美国); Lipo2000 (Thermo Fisher Scientific, 美国), QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, 中国)。

1.1.3 主要仪器和设备 超净工作台、CO₂ 培养箱 (Thermo Fisher Scientific, 美国), Centrifuge 5417R 低温高速离心机 (Eppendorf, 德国), DNA Thermal Cycler 9700 PCR 仪 (Applied Biosystems; Thermo Scientific, 美国), 凝胶图像分析系统 (Bio-Rad 3000, 中国), 普通光学显微镜 (Olympus, 日本), 荧光显微镜 (ZEISS, 德国), CytoFLEX LX 流式细胞仪 (Beckman Coulter, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 构建 sgRNA 反转录病毒表达载体 利用内切酶 Xho1 和 Sal1 双酶切 MSCV-LTR-miR30-PIG (LMP) 反转录病毒载体, 回收大片段得到反转录病毒载体骨架。以慢病毒载体 pKLV-U6-sgRNA 为模版设计 PCR 引物, 引物序列如表 1。利用 NEBuiider HiFi DNA Assembly Master Mix 将 U6-sgRNA-PGK-Puro-BFP 片段组装进反转录病毒载体骨架。经过转化, 挑克隆, 测序得到正确载体。

表 1 U6-sgRNA-PGK-Puro-BFP 片段的 PCR 引物序列
Tab 1 Primer sequences for U6-sgRNA-PGK-Puro-BFP PCR

Primer	Sequence (5' \rightarrow 3')
U6-F	GTTAACCCAACAGAAGGCTCGAGGAGGGCCTATTTCCTATGATTCCTT
BFP-R	TCGATAAGCTTGGCTGCAAGTCTGACTCAATTAAGCTTGTGCCCCAGTTTGC

1.2.2 sgRNA 设计和重组反转录病毒包装 MIT CRISPR (<http://crisp.mit.edu>) 网站设计 sgRNA 序列, 设计好的 sgRNA 序列交由苏州金唯智生物科技公司合成。用 Plat-E 包装细胞产生反转录病毒, 使用 Lipo2000 进行质粒转染。以 10 cm 培养皿为例, 500 μ L Opti-MEM 无血清培养基中加入 20 μ g sgRNA 反转录病毒载体; 另取 500 μ L Opti-MEM 加入 40 μ L Lipo2000, 将前 2 步所得混合液混匀。室温放置 15 min 后, 加入培养皿中。转染 6 h 后细胞换液, 48 h 后收集上清 (病毒), 0.45 μ m 细胞滤网过滤后冻存于 -80°C 冰箱中, 备用。

1.2.3 T7E1 实验验证 sgRNA 编辑效果 使用 DNA 提取试剂盒提取细胞基因组 DNA, Taq DNA 聚合酶进行 PCR 扩增。在 *Il17a* sgRNA 靶向区域上下游设计引物, PCR 产物纯化, 取 200 ng DNA 按照 T7E1 实验说明书进行操作。加入 1 μ L T7 核酸内切酶, 37°C 反应 30 min, 加入乙二胺四乙酸终止反应。产物在 2% 琼脂糖凝胶上进行凝胶电泳。T7E1 引物见表 2。

表 2 T7E1 PCR 引物序列
Tab 2 Primer sequences for T7E1

Primer	Sequence (5' \rightarrow 3')
<i>Il17a</i> -F	GAGGAGATGGCAGAAGCTGACATT
<i>Il17a</i> -R	GGTATACATGGTGCATCAGAGAATG

1.2.4 分离 Cas9 转基因小鼠 CD4 T 细胞 分离 Cas9 转基因小鼠脾脏细胞, 裂解红细胞。按照小鼠 CD4 T 细胞分选试剂盒说明书分离小鼠初始 CD4 T 细胞。流式细胞仪检测细胞纯度 (95% 以上), 进行后续实验。

1.2.5 CD4 T 细胞体外激活培养 CD3 和 CD28 抗体包被在 96 孔板, 按照 5 μ g/mL 的终浓度加入抗小鼠 CD3e 抗体 (145-2C11) 和抗小鼠 CD28 抗体 (37.51), 100 μ L/孔包被 96 孔板, 并于 4°C 过夜。吸掉抗体悬液, 加入 200 μ L 封闭液 (PBS+ 1% FBS), 于室温封闭 30 min, 封闭结束加入 200 μ L PBS 洗涤 2 次。分离得到 CD4 T 细胞, 按照细胞浓度 1×10^6 /mL 重悬。每孔加入 200 μ L 细胞, 放入 37°C 的 CO_2 培养箱中进行培养。

1.2.6 反转录病毒感染和小鼠 Th17 细胞诱导分化 小鼠 CD4 T 细胞激活 24 h 后进行反转录病毒的感染。以 96 孔板为例, 准备病毒和聚凝胺 (polybrene, 5 μ g/mL) 的混合液并吸取培养基上清液, 加入病毒和 polybrene 混合液; 32°C 、1 000 mL 离心 90 min。离心结束后, 弃去病毒上清液, 加入 Th17 分化培养基。Th17 分化培养基

为 1640 完全培养基并添加相应细胞因子 (mTGF- β 1 1 ng/mL, mIL-6 10 ng/mL, 抗小鼠 IFN- γ 抗体 10 μ g/mL, 抗小鼠 IL-4 抗体 10 μ g/mL)。体外诱导 3 d, 进行后续检测。

1.2.7 细胞因子刺激和检测 小鼠 Th17 细胞体外分化 3 d 后, 检测细胞因子 *Il17A* 表达水平。收集细胞前, 用 50 ng/mL 佛波酯、500 ng/mL 离子霉素和蛋白转运抑制剂刺激 4 h。收集细胞, 用 BD 细胞因子染色试剂盒进行染色, 流式细胞仪检测。使用 FlowJo 软件 (Becton Dickinson 10.0.7) 进行流式数据分析。

1.3 统计学方法

采用 GraphPad Prism 5 软件进行数据分析, 通过非配对 *t* 检验, 统计分析 NC-sgRNA、*Il17a*-sgRNA、*Irfa*-sgRNA、*Rorc*-sgRNA 组 sgRNA⁺*Il17a*⁺/sgRNA⁻*Il17a*⁺ 的数值。*P*<0.05 为差异有统计学意义。

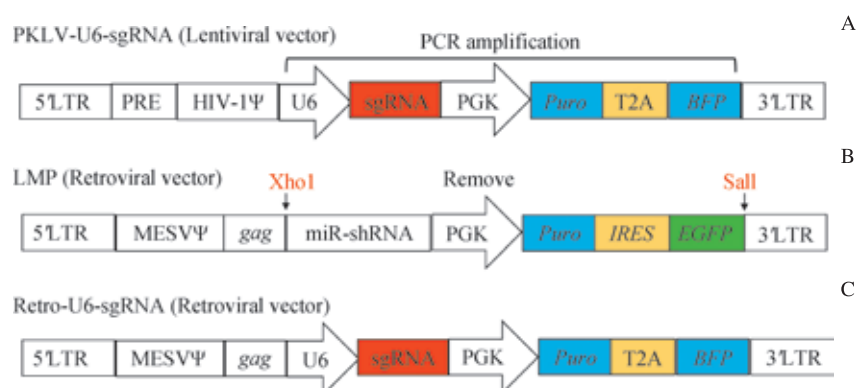
2 结果

2.1 构建反转录病毒 sgRNA 表达载体

为了建立用于小鼠 T 细胞基因功能研究的 CRISPR/Cas9 系统, 实验构建了反转录病毒 sgRNA 表达载体: 用 Xho1 和 Sal1 双酶切反转录病毒载体 LMP, 通过胶回收得到反转录病毒载体骨架; 以慢病毒载体 pKLV-U6-sgRNA 为模版, 通过 PCR 扩增获得 U6-sgRNA-PGK-Puro-BFP 片段。利用同源重组将 U6-sgRNA-PGK-Puro-BFP 片段组装进反转录病毒载体骨架得到反转录病毒 sgRNA 表达载体。在该载体中, U6 启动子驱动 sgRNA 表达, 而 PGK 启动子驱动嘌呤霉素抗性基因 (puromycin, *Puro*) 和蓝色荧光蛋白 (blue fluorescent protein, *BFP*) 表达 (图 1)。

2.2 表达 sgRNA 反转录病毒包装和细胞感染

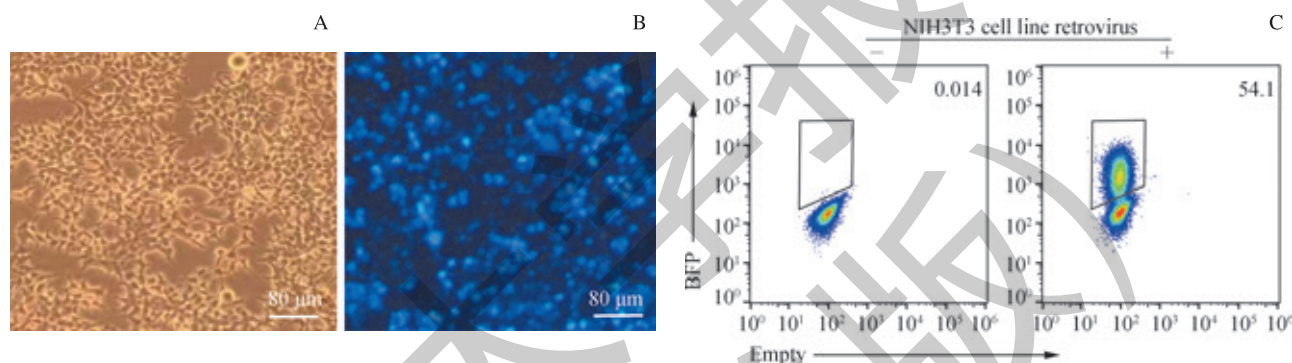
为了验证新构建的载体是否可以产生具有感染性的病毒颗粒, 实验对载体进行病毒包装和细胞感染, 结果见图 2。病毒包装细胞为 Plat-E 细胞, 只需要转染反转录病毒载体质粒即可。转染 24 h 后, 光学显微镜下观察细胞状态, 细胞形态正常。转染 48 h 后, 荧光显微镜下观察到 BFP 的成功表达。为了验证反转录病毒是否具有感染活性, 实验用产生的反转录病毒对 NIH3T3 细胞进行感染。病毒感染 48 h 后收集细胞, 流式细胞仪检测 BFP 阳性细胞的情况, 结果显示 BFP 阳性细胞比例为 54.1%, 说明反转录病毒 sgRNA 表达载体构建成功并可产生有感染性的病毒颗粒, 可用于后续实验。



Note: A. Lentiviral sgRNA vector was used for PCR amplification template. B. miR-shRNA retroviral vector was obtained after digestion. C. Newly modified retroviral sgRNA expression vector.

图1 反转录病毒 sgRNA 表达载体构建策略

Fig 1 Construction strategy of retroviral sgRNA expression vector



Note: A. Plat-E cells were transfected with the plasmid for 24 h, the cell status was observed under white light using a microscope ($\times 10$). B. Plat-E cells were transfected with the plasmid for 48 h, the expression of BFP was observed under a fluorescent microscope ($\times 10$). C. The retrovirus infection efficiency of NIH3T3 was detected by flow cytometry, and BFP positive cells represent retrovirus-infected cells.

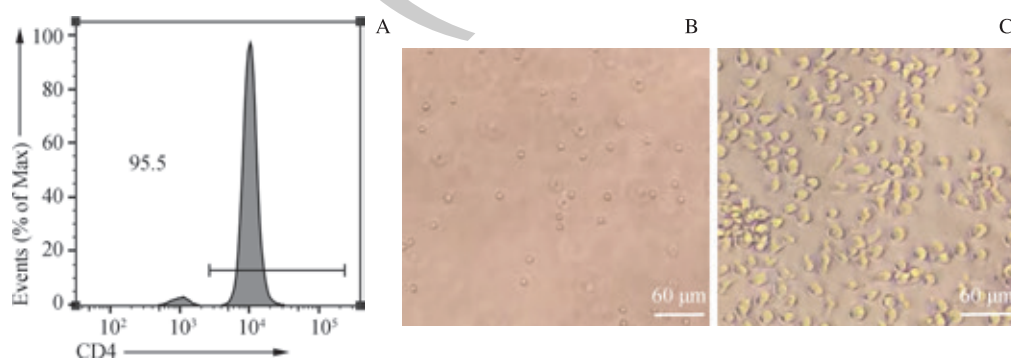
图2 反转录病毒包装和 NIH3T3 细胞感染

Fig 2 Retrovirus packaging and NIH3T3 cell infection

2.3 小鼠 Th17 细胞体外分化系统建立

为了将 CRISPR/Cas9 系统应用于小鼠 Th17 细胞分化研究, 实验首先建立了 Th17 细胞体外诱导分化系统。利用小鼠 CD4 T 细胞分选试剂盒分离 Cas9 转基因小鼠初始 CD4 T 细胞, 流式细胞仪检测结果表明细胞纯度在 95%

以上 (图 3)。CD4 T 细胞铺孔, 观察发现最先分离得到的小鼠 CD4 T 细胞体积较小, 呈圆形。经过 3 d 体外诱导培养后, 细胞数目明显变多, 形态逐渐变成椭圆形或者条形。结果说明, 实验成功分离小鼠 CD4 T 细胞并可以进行体外培养, 可进行后续实验。



Note: A. The purity of CD4 T cells was analyzed by flow cytometry. B. The initial shape of CD4 T cells of mice was small in size and round. C. After the differentiation of Th17 cells, the number of cells increased significantly and the shape gradually became elliptical or striped.

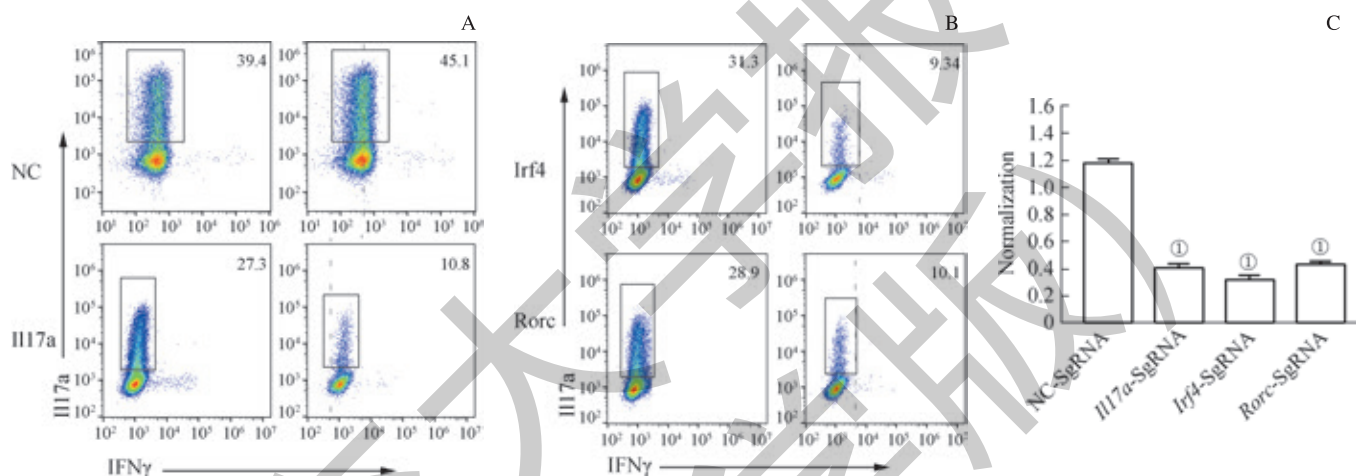
图3 小鼠 Th17 细胞分化过程中的形态变化

Fig 3 Morphological changes of mouse Th17 cells during differentiation

2.4 小鼠 Th17 细胞中基因敲除

Th17 主要分泌 IL17a 和 IL17f 等促炎症细胞因子, 在自身免疫病发病中发挥作用, 而 Th17 的分化受到很多转录因子的调控, 如 *Irf4*、*Rorc*、*Batf* 等。为了验证系统是否可用于基因敲除以及 Th17 分化调控研究。实验分别设计了靶向 *Il17a*、*Irf4*、*Rorc*, 以及 NC 的 sgRNA, 并进行克隆和病毒包装。分离 Cas9 转基因小鼠初始 CD4 T 细胞, 经过 CD3/28 抗体刺激 24 h 后, 进行反转录病毒感染。感染完成后, 加入 Th17 细胞培养基诱导分化 3 d, 流式细胞仪检测 Th17 细胞内 IL17a 表达。结果发现, 在 NC-sgRNA 组中 IL17a 阳性细胞在 sgRNA⁺ 和 sgRNA⁻ 2 个群体中的比例大致相等。而在 *Il17a*-sgRNA 组中, IL17a 阳性细胞在

sgRNA⁺ 群体较 sgRNA⁻ 群体中的比例明显降低。结果说明在 IL17a 孔中, sgRNA⁺ 群体 *Il17a* 基因被成功敲除。同样在 *Rorc* 和 *Irf4* 组中, 2 组 sgRNA⁺ 群体和 sgRNA⁻ 群体相比, IL17a 阳性细胞的比例明显降低。结果说明 2 组 sgRNA⁺ 群体中 *Rorc* 和 *Irf4* 基因被成功敲除。为了减小孔间差异对结果偏差的影响, 实验进一步统计了同一个孔中 sgRNA⁺ 组与 sgRNA⁻ 组中 IL17a 阳性细胞比例的比值, 对数据进行标准化处理。对标准化后的比值进行统计分析 (图 4)。结果发现, 与 NC 组相比, *Il17a*、*Rorc* 和 *Irf4* 组比值均显著降低。以上结果说明, 利用该系统可以成功进行基因敲除。

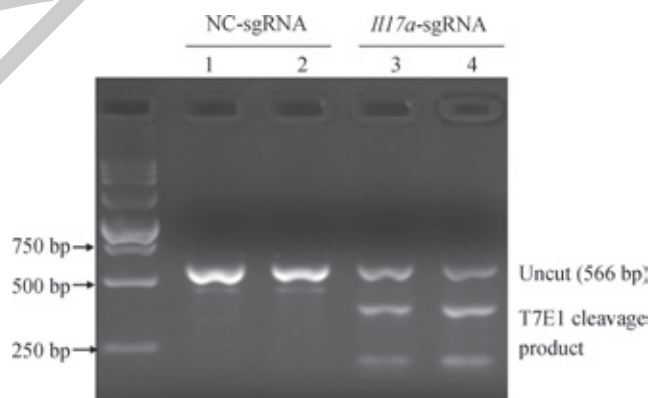


Note: A. NC-sgRNA and *Il17a*-sgRNA group; the proportion of IL17A in sgRNA⁺ and sgRNA⁻ groups. B. *Rorc*-sgRNA and *Irf4*-sgRNA group; the proportion of IL17A in sgRNA⁺ and sgRNA⁻ groups. C. Statistical results after data standardization, obtained by calculating the ratio of the sgRNA⁺ population IL17A ratio to the sgRNA⁻ population IL17A ratio in the sgRNA of the same gene. ^① $P = 0.001$, compared with the NC-sgRNA group.

图 4 小鼠 Th17 细胞中基因敲除
Fig 4 Gene knockout in mouse Th17 cells

2.5 T7E1 实验检测 *Il17a* 位点 DNA 突变

为了进一步验证 *Il17a* 基因组 DNA 是否发生突变, 实验提取编辑后细胞基因组 DNA。在 *Il17a*-sgRNA 靶向位置上下游, 设计引物进行 PCR 扩增, 进行后续 T7E1 实验。凝胶电泳结果显示, 在 NC-sgRNA 组中, 条带完整未发生切割; 而在 *Il17a*-sgRNA 组中, 条带被切割成约 380 bp 和 180 bp 的 2 个条带, 符合 *Il17a*-sgRNA 靶向突变预期。结果表明, NC-sgRNA 组 *Il17a* 基因未发生基因编辑; 而 *Il17a*-sgRNA 组 IL17A 位点 DNA 发生突变, *Il17a* 基因被敲除 (图 5)。通过检测基因组 DNA 突变, 进一步证明了系统的有效性。



Note: 1 and 2 are the NC-sgRNA electrophoresis results, and the band is complete; 3 and 4 are the *Il17a*-sgRNA electrophoresis results, the band is cut, and the size of which meets the expected mutation.

图 5 T7E1 实验检测 *Il17a* 位点 DNA 突变

Fig 5 Detecting DNA mutations of *Il17a* locus by T7E1

3 讨论

初始 CD4 T 细胞在不同细胞因子的刺激下, 会分化成不同的细胞亚群, 如 Th1、Th2、Th17 和 Treg^[11]。但不同分化亚群在介导疾病发生中发挥着不同的作用, 如 Th17 细胞主要在自身免疫病以及炎症中发挥重要作用, 而 Treg 细胞主要维持机体免疫稳态从而抑制自身免疫病的发生^[12]。因此, 研究 T 细胞分化调控, 有助于更好地理解自身免疫病的发病机制。

近年来, 很多新技术应用于 T 细胞分化的研究。Chen 等^[13]建立一套基于 RNA 干扰体内筛选系统, 用以筛选淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒 (LCMV) 感染状态下影响抗病毒 CD4 和 CD8 T 细胞分化的调控分子。CRISPR/Cas9 基因编辑技术的发展, 使得全基因组功能筛选成为可能。Shalem 等^[14]建立了全基因组筛选影响人类肿瘤细胞增殖的基因。Parnas 等^[15]基于慢病毒载体的全基因组 sgRNA 文库和 Cas9 转基因小鼠进行了全基因组筛选, 用

于研究树突状细胞在受到细菌脂多糖刺激产生肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 的调控分子。但是, 由于 Cas9 蛋白分子量大, 很难包装进病毒载体, 限制了 CRISPR/Cas9 在小鼠免疫细胞中的广泛应用。因此, 实验构建了 Cas9 转基因小鼠。只需要构建表达 sgRNA 的病毒载体即可在小鼠 T 细胞中进行基因功能研究。近年来, 慢病毒载体由于能整合到宿主基因组 DNA 稳定遗传, 被广泛应用于 sgRNA 递送系统^[16]。但是, 慢病毒感染小鼠 T 细胞效率较低, 而且表达速度较慢^[17]。所以实验构建了反转录病毒 sgRNA 表达载体用于小鼠 T 细胞分化和基因功能研究。

综上, 本研究利用反转录病毒 sgRNA 表达载体和 Cas9 转基因小鼠, 成功在小鼠 T 细胞中进行基因敲除, 并将此系统应用于 Th17 细胞分化调控研究, 验证 Rorc 和 Irf4 是 Th17 细胞分化中的关键调控分子。未来可以利用该系统构建反转录病毒 sgRNA 全基因组筛选文库通量研究小鼠 T 细胞分化调控分子, 以期找到新的靶点。

参 · 考 · 文 · 献

- [1] Horvath P, Barrangou R. CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea[J]. *Science*, 2010, 327(5962): 167-170.
- [2] Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity[J]. *Science*, 2012, 337(6096): 816-821.
- [3] Garneau JE, Dupuis MÈ, Villion M, et al. The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA[J]. *Nature*, 2010, 468(7320): 67-71.
- [4] Ran FA, Hsu PD, Lin CY, et al. Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity[J]. *Cell*, 2013, 154(6): 1380-1389.
- [5] Hwang WY, Fu YF, Reyon D, et al. Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system[J]. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(3): 227-229.
- [6] Jinek M, East A, Cheng A et al. RNA-programmed genome editing in human cells[J]. *Elife*, 2013, 2 (6121): e00471.
- [7] Luckheeram RV, Zhou R, Verma AD, et al. CD4⁺T cells: differentiation and functions[J]. *Clin Dev Immunol*, 2012, 2012: 1-12.
- [8] Ouyang WJ, Kolls JK, Zheng Y. The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation[J]. *Immunity*, 2008, 28(4): 454-467.
- [9] Sharma A, Rudra D. Emerging functions of regulatory T cells in tissue homeostasis[J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 883.
- [10] Shifrut E, Carnevale J, Tobin V, et al. Genome-wide CRISPR screens in primary human T cells reveal key regulators of immune function[J]. *bioRxiv*, 2018, 175 (7): 1958-1971 e1915.
- [11] Zhu JF, Yamane H, Paul WE. Differentiation of effector CD4 T cell populations[J]. *Annu Rev Immunol*, 2010, 28(1): 445-489.
- [12] Lee G. The balance of Th17 versus treg cells in autoimmunity[J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(3): 730.
- [13] Chen RQ, Bélanger S, Frederick MA, et al. *In vivo* RNA interference screens identify regulators of antiviral CD4⁺ and CD8⁺ T cell differentiation[J]. *Immunity*, 2014, 41(2): 325-338.
- [14] Shalem O, Sanjana NE, Hartenian E, et al. Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells[J]. *Science*, 2014, 343(6166): 84-87.
- [15] Parnas O, Jovanovic M, Eisenhaure TM, et al. A genome-wide CRISPR screen in primary immune cells to dissect regulatory networks[J]. *Cell*, 2015, 162(3): 675-686.
- [16] O'Keefe EP. Nucleic acid delivery: lentiviral and retroviral vectors[J]. *Mater Methods*, 2013, 3:174-177.
- [17] Baumann JG, Unutmaz D, Miller MD, et al. Murine T cells potently restrict human immunodeficiency virus infection[J]. *J Virol*, 2004, 78(22): 12537-12547.

[收稿日期] 2020-01-21

[本文编辑] 徐 敏

