

论著·基础研究

基于CRISPR/Cas9n技术建立携带mT-F2A-EGFP报告系统的小鼠胚胎干细胞系

王靖怡, 王 琼

上海交通大学基础医学院组织胚胎学与遗传发育学系, 上海市生殖医学重点实验室, 上海市细胞稳态调控与疾病前沿科学研究基地, 上海 200025

[摘要] **目的**·通过CRISPR/Cas9n (clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated protein 9 nickase)介导的同源定向修复 (homologous-directed repair, HDR) 技术在小鼠胚胎干细胞 (mouse embryonic stem cell, mESC) 的中内胚层关键调控分子T-box转录因子Brachyury (即T基因) 末端依次敲入手足口病毒2A (foot-and-mouth disease virus 2A, F2A) 和增强绿色荧光蛋白 (enhanced green fluorescent protein, EGFP) 以建立T荧光报告细胞系 (mT-F2A-EGFP)。**方法**·首先, 针对T基因构建特异性单链导向RNA (single guide RNA, sgRNA) 质粒和包含F2A-EGFP的供体质粒。利用电穿孔将这2种质粒递送到mESC E14Tg2a (E14) 内, 通过HDR在T基因末端插入F2A-EGFP。然后, 通过药物筛选和基因测序验证所获得的单克隆细胞, 并将其诱导形成类胚体 (embryonic body, EB) 进行分化。通过荧光显微镜和流式细胞技术分别监测mT-F2A-EGFP细胞克隆在分化前后的荧光信号变化, 并进行实时定量聚合酶链反应 (real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction, RT-qPCR) 来检测多能性标志基因、中内胚层以及外胚层标志基因的转录水平变化。同时, 检测克隆细胞的周期、生长曲线, 并利用碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, AP) 染色检测候选克隆干细胞特性。最后, 挑选克隆细胞系T1进行了EB分化。利用流式细胞技术分选出分化细胞群中EGFP荧光表达细胞 (EGFP⁺) 和无荧光表达的细胞 (EGFP⁻), 并检测各谱系基因的表达情况。**结果**·EGFP被正确插入到E14细胞的T基因, 其荧光强度能正确反映T基因表达水平且未产生明显的不良反应。当T1报告克隆分化时, 通过流式细胞技术分选出的包含mT-F2A-EGFP的荧光细胞主要高表达中内胚层标志基因。**结论**·成功构建携带mT-F2A-EGFP的mESC, 可实现对T基因调控程度的快速监测, 并实时追踪分化过程中表达T基因标记EGFP的中内胚层细胞。

[关键词] 小鼠胚胎干细胞; CRISPR/Cas9n; 中内胚层分化; 增强绿色荧光蛋白; 报告基因; Brachyury; 手足口病毒2A

[DOI] 10.3969/j.issn.1674-8115.2023.04.003 **[中图分类号]** R394.1 **[文献标志码]** A

Establishment of a mouse embryonic stem cell line carrying a reporter of mT-F2A-EGFP based on CRISPR/Cas9n technology

WANG Jingyi, WANG Qiong

Department of Histoembryology, Genetics and Developmental Biology, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine; Shanghai Key Laboratory of Reproductive Medicine; Shanghai Frontiers Science Center of Cellular Homeostasis and Human Disease, Shanghai 200025, China

[Abstract] **Objective**·To establish a T-box transcription factor Brachyury (T gene) fluorescence reporter cell line, in which foot-and-mouth disease virus 2A (F2A) and enhanced green fluorescent protein (EGFP) were knocked in at the end of mouse T gene (mT-F2A-EGFP) in mouse embryonic stem cells (mESCs) by CRISPR/Cas9n (clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated protein 9 nickase)-mediated homologous-directed repair (HDR) technology. **Methods**·First of all, the specific single guide RNA (sgRNA) plasmid targeting the sequence near the stop codon of the mouse T gene and the plasmid donor containing F2A-EGFP were constructed. These two plasmids were co-delivered into mESCs E14Tg2a (E14) by electroporation. In this way, the desired fluorescent marker EGFP with self-cleaving peptide F2A were introduced into the end of T gene via HDR. Then, the monoclonal cells, obtained after drug selection and verified by sequencing, were induced for differentiation as embryonic bodies (EB), of which the fluorescence signals of mT-F2A-EGFP were monitored by fluorescence microscope and flow cytometry.

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目 (31771512, 32070865)。

[作者简介] 王靖怡 (1998—), 女, 硕士生; 电子信箱: 1459892116@qq.com。

[通信作者] 王 琼, 电子信箱: wangqiong@shsmu.edu.cn。

[Funding Information] National Natural Science Foundation of China (31771512, 32070865)。

[Corresponding Author] WANG Qiong, E-mail: wangqiong@shsmu.edu.cn。



These reporter clones were also selected before and after differentiation by real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-qPCR), which detected the transcription levels of marker genes determining pluripotency, mesendoderm differentiation or ectoderm differentiation. In addition, the cell cycle and growth curve of these clones were detected. Meanwhile, alkaline phosphatase (AP) staining was used to detect the stem cell characteristics of these candidate clones. Finally, the clone T1 carrying mT-F2A-EGFP was selected for EB differentiation. Flow cytometry was used to sort out EGFP expression cells (EGFP⁺) and non-EGFP expressing cells (EGFP⁻) from the EBs comprising multiple lineage cells upon differentiation, of which cell lineage markers were checked by RT-qPCR. **Results**•EGFP was correctly inserted after the *T* gene in E14, whose fluorescence intensity reflected the expression level of endogenous *T* without observed side effects. When the fluorescence reporter clone T1 was differentiated, the EGFP⁺ cells sorted by flow cytometry mainly expressed mesendoderm marker genes. **Conclusion**•The establishment of mESC line carrying mT-F2A-EGFP can realize rapid monitoring of the degree of *T* regulation, and track mesendoderm cells expressing *T* marker, EGFP in real time during differentiation.

[Key words] mouse embryonic stem cell (mESC); CRISPR/Cas9n; mesendoderm differentiation; enhanced green fluorescent protein (EGFP); reporter gene; Brachyury; foot-and-mouth disease virus 2A (F2A)

哺乳动物早期发育过程受到一系列复杂且精密的调控。小鼠和人类的生命均始于卵子受精。在小鼠胚胎 3.5 d 时, 合子通过细胞增殖和分化产生滋养外胚层和内细胞团。内细胞团进而分化成上胚层和原始内胚层。上胚层前部发育成外胚层 (ectoderm), 而其背部则形成原条。原条是向中胚层 (mesoderm) 和内胚层 (endoderm) 分化的中间过渡阶段, 因此又被称为中内胚层 (mesendoderm) 阶段。

小鼠胚胎干细胞 (mouse embryonic stem cell, mESC) 来源于内细胞团^[1]。多项研究发现白血病抑制因子 (leukemia inhibitory factor, LIF) 是稳定维持和培养 mESC 最重要的蛋白分子^[2]。在 mESC 中约有 0.5% 的细胞类似于胚胎二细胞阶段的二细胞样细胞 (2-cell-like cell, 2CLC), 表达双向同源框因子 (double homeobox, *Dux*)、锌指和扫描结构域 4 因子 (zinc finger and scan domain containing 4, *Zscan4*) 以及 *Zscan4d* 等^[3]。当 mESC 在无 LIF 的悬浮培养基中, 需要先形成类胚体 (embryoid body, EB), 再逐步分化为 3 个胚层^[4]。EB 分化的过程在体外重现了体内的胚层分化。因此胚胎干细胞是研究早期胚胎细胞分化命运选择机制的经典模型。

胚胎干细胞具有多能性和自我更新的特点, 其干性维持主要由多能性因子和自我更新信号通路等共同调控^[5]。但随着多能性因子与分化调控因子间平衡被打破, 干细胞的命运便发生改变, 多能性逐渐丢失, 进一步分化成不同谱系的细胞。当 mESC 退出多能性状态 1~2 d 后, 关键中内胚层分化因子 *T-box* 转录因子 *Brachyury* (即 *T* 基因) 等率先开始上调, 之后其他分化基因如 *GSC* 同源盒 (*goosecoid homeobox*, *Gsc*) 才会逐渐被诱导表达^[6], 从而正式

启动中内胚层分化。因此, 解析 *T* 基因的调控网络将有助于阐明干细胞向中内胚层分化的关键机制。如果能在 mESC 中构建 *T* 基因的增强绿色荧光蛋白 (enhanced green fluorescent protein, EGFP) 报告系统, 那么当 mESC 形成 EB 进入三胚层分化的情况下, *T* 报告基因的荧光信号就会随着 *T* 基因的表达增强而逐渐显露, 从而实时反映中内胚层分化情况。

目前, CRISPR/Cas9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeat/CRISPR associated protein 9) 技术已成为研究干细胞功能的重要手段^[7]。利用 CRISPR/Cas9 和同源定向修复 (homologous-directed repair, HDR) 技术, 可以在特定靶基因位点敲入转基因^[8], 构建携带特定转基因的细胞系。但该技术仍存在频繁脱靶现象, 于是 CRISPR/Cas9n (Cas9 nickase, Cas9n) 应运而生。CRISPR/Cas9n 系统能诱导 DNA 发生单链切口而不是双链断裂。通常在真核细胞中, 单链缺口会被高保真修复, 因此其脱靶率被大大降低^[9]。此外, 当需要在细胞中同时表达 2 个或以上的基因时, 2A 肽段 [例如手足口病毒 2A (foot-and-mouth disease virus 2A, F2A)]^[10] 常常被置于需要同时表达的基因之间。当核糖体从上游基因到达 F2A 序列的 C 末端时, 跳过了甘氨酸-脯氨酸肽键的合成。这种核糖体跳跃导致了 F2A 和下游肽的断裂, 从而保证 F2A 上下游基因在不产生融合的情况下又能同时独立表达^[11]。

本研究旨在利用 CRISPR/Cas9n 技术在 mESC 的 *T* 基因末端依次敲入 F2A 和 EGFP, 用以建立 *T* 荧光报告细胞系 (mT-F2A-EGFP)。EGFP 的荧光强度可实时反映中内胚层细胞分化情况, 这将为深入研究中内胚层早期分化调控机制和互作网络奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞 mEST系E14Tg2a (E14细胞) 购自美国ATCC公司。

1.1.2 质粒 pX461-Cas9n-2A-GFP (#48140) 购自美国Addgene公司。

1.1.3 主要试剂 菌株Trans10化学感受态细胞(#CD201)和反转录试剂盒(#AT341-02)购自中国全式金公司; Knockout DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) 培养基(10829-018)、DMEM+GlutaMAX培养基(10569-010)、丙酮酸钠(11360-070)、55 mmol/L 2-巯基乙醇(21985023)、TrypLE(12605028)、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS; 5H30070.03)、青霉素/链霉素(15140-122)均购自美国Thermo Fisher Scientific公司; 小鼠LIF(#ESG1107)购自美国Millipore公司; 0.1% 明胶(#07903)购自加拿大Stem Cell公司; 小鼠胚胎干细胞核转染试剂盒(#VPH-1001)购自瑞士Lonza公司; Hieff Canace高保真DNA聚合酶(10148ES60)购自中国翊圣公司; T4 DNA连接酶(B0202S)和Gibson组装预混液(E2611)购自美国NEB公司; 去内毒素质粒大量提取试剂盒(740420.50)、NucleoZol RNA提取试剂(740404.200)购自德国MN公司; PI染色液(#P4171)购自北京Lablead公司; 碱性磷酸酶染色试剂盒(Vector Blue Substrate Kit, Alkaline Phosphatase; #SK-5300)购自美国Vector Laboratories公司。

1.2 方法

1.2.1 质粒构建

(1) 构建pX461-Cas9n-2A-Hygro质粒 利用*FseI*和*SbfI*的酶切位点移除pX461-Cas9n-2A-GFP质粒的GFP片段, 并利用Gibson试剂插入抗潮霉素DNA片段。Gibson组装方法: 将0.5 pmol DNA片段和10 μ L Gibson Assembly Master Mix混合, 加入双蒸水(ddH₂O)补齐20 μ L, 在50 $^{\circ}$ C放置1 h。

(2) 构建pX461-mT-sgRNA质粒 挑选小鼠*T*基因终止密码子附近的靶序列(GTGCTGAGACTG-TAACAAC)设计单链导向RNA(single guide RNA, sgRNA)并通过互补链退火形成mT-sgRNA双链, 再插入pX461-Cas9n-2A-Hygro质粒中。反应体系:

0.2 μ L 100 ng pX461-Cas9n-2A-Hygro, 2 μ L mT-sgRNA双链(1:200稀释), 2 μ L Tango缓冲液, 1 μ L 10 mmol/L DTT, 1 μ L 10 mmol/L ATP, 1 μ L FastDigest Bbs1, 0.5 μ L T4 DNA连接酶, 加入ddH₂O补齐至20 μ L。在PCR仪器上进行反应: 37 $^{\circ}$ C 5 min, 23 $^{\circ}$ C 5 min, 重复6个循环。

(3) 构建mT-F2A-EGFP-Donor供体质粒 利用PCR技术分别扩增出EGFP和杀稻瘟菌素-S脱氨酶(blasticidin-S deaminase, BSD), 并且将小鼠基因组中*T*基因的终止密码子上下游各1 000 bp分别扩增, 得到左同源臂(left homologous arm, HAL)和右同源臂(right homologous arm, HAR)片段。通过Gibson试剂把这些片段组装相连。

1.2.2 细胞培养与单克隆筛选 提前在培养皿中加入0.1%明胶, 10 min后去除。然后将所需的E14细胞和3 mL培养基混合后静置于37 $^{\circ}$ C二氧化碳培养箱中培养。E14培养基成分: Knockout DMEM、丙酮酸钠(100 mmol/L)、MEM-NEAA、胎牛血清、青霉素/链霉素溶液、两性霉素B、谷氨酰胺(200 mmol/L)、 β -巯基乙醇(55 mmol/L)和LIF(10⁷ unit/mL)。EB分化实验的培养基中不添加LIF, 将6 \times 10⁵个E14细胞种于低吸附培养皿中, 持续培养4 d。每2 d更换1次培养液。

将pX461-mT-sgRNA重组质粒和mT-F2A-EGFP-Donor供体质粒按4:6的比例, 使用小鼠胚胎干细胞核转染试剂盒, 对2 \times 10⁶个细胞进行电转。电转24~48 h后, 用带有潮霉素(hygromycin, Hygro)和BSD的含药培养基进行药筛培养5 d。将药筛后存活的细胞按照每孔1个细胞种入96孔板中, 在培养约10 d后, 即可收取单克隆细胞系。采用PCR进行鉴定, 测序引物序列为T-HAL-F(GATTGAGCAGTAG-TGGTCTA)、T-EGFP-R(CGTCCTTGAAGAAGATGGT)、T-BSD-F(CCACATACACTTCATTCTCAG)、T-HAR-R(TCAGCCTCTTCCTATCTCAT)、mT-F(CTGGTCTGTGAGCAATGG)、mT-R(CTCTGTCCTT-GGCTTCATAA)。

1.2.3 RNA的提取 利用500 μ L NucleoZOL充分裂解细胞, 随后加入200 μ L ddH₂O, 上下剧烈振荡15 s, 12 000 \times g离心15 min后, 将含有RNA的上清液转移至干净的1.5 mL EP管中, 加入等体积异丙醇沉淀RNA, 上下颠倒混匀后, 室温静置10 min, 12 000 \times g离心10 min。去上清液后, 分别用75%和100%乙醇清洗1次, 晾干后加入干净的DEPC水溶解

RNA, 随后定量。使用反转录试剂盒将RNA反转录为cDNA。

1.2.4 实时定量聚合酶链反应 按如下反应体系配制实时定量聚合酶链反应 (real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction, RT-

qPCR) 的混合液: 5 μL PowerUp™ SYBR™ Green 预混液、2.5 μL 1:10 稀释后的 cDNA、1 μL 1 $\mu\text{mol/L}$ 上下游引物和 1.5 μL ddH₂O, 在 Bio-rad 荧光定量 PCR 仪上检测。RT-qPCR 的引物序列见表 1。

表 1 RT-qPCR 引物序列

Tab 1 Primer sequences for RT-qPCR

| Gene | Forward primer (5'→3') | Reverse primer (5'→3') |
|----------------|--------------------------------|-----------------------------|
| <i>Gapdh</i> | CTCCACTCACGGCAAATTCA | CGCTCCTGGAAGATGGTGAT |
| <i>Sox2</i> | GCGGAGTGGAAGCTTTTGTCC | CGGGAAGCGTGACTTATCCTT |
| <i>Gsc</i> | TTGCACAGACAGTCGATGCTACT | TCGTTGCTTTCTCGACCCC |
| <i>T</i> | TCCTCCATGTGCTGAGACTTGT | CCAAGAGCCTGCCACTTTG |
| <i>Eomes</i> | GCGCATGTTTCTTTCTTGAG | GGTCGGCCAGAACCACCTC |
| <i>nestin</i> | CAGGATTGGGAGGAGGCAGAG | GGAGGCAGGAGACTTCAGGTAG |
| <i>Pax6</i> | GTTCCCTGTCCTGTGGACTC | ACCGCCCTTGTTAAAGTCT |
| <i>Sox1</i> | ATACCGCAATCCCCTCTCAG | ACAACATCCGACTCCTCTTCC |
| <i>Dux</i> | CCCAGCGACTCAAACCTCTTC | GGACTTCGTCCAGCAGTTGAT |
| <i>Zscan4</i> | GAGATTTCATGGAGAGCTGACTGATGAGTG | GCTGTTGTTTCAAAGCTTGATGACTTC |
| <i>Zscan4d</i> | GTCCTGACAGAGCCTGCC | GAGATGTCTGAAGAGGCAAT |

Note: *Gapdh*—glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; *Sox2*—sex determining region Y-box 2; *Eomes*—eomesodermin; *Pax6*—paired box 6.

1.2.5 荧光显微镜的使用 使用尼康倒置荧光显微成像系统, 将培养皿平放在载物台上。10 倍物镜下选择合适的滤光片, 对样品的荧光表达强度进行观察和拍照记录。

1.2.6 碱性磷酸酶染色 对 6 孔板中的细胞进行固定和碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, AP) 染色。每孔加入 1 mL 4% 多聚甲醛固定, 室温静置 10 min。配制染色液: 在 5 mL pH 为 8.2~8.5 的 100 mmol/L Tris-HCl 溶液中加入 2 滴 Vector Blue Reagent 1、2 滴 Vector Blue Reagent 2 和 2 滴 Vector Blue Reagent 3, 充分混匀后使用。将 6 孔板中的 4% 多聚甲醛吸干, 加入预冷的 PBS 洗 2 次后, 加入预先配好的染色液, 在显微镜下观察到蓝色即可终止染色并拍照。

1.2.7 细胞周期检测 收取 2×10^6 个细胞于 15 mL 离心管中, 加入预冷的 PBS 洗 2 次。使用预冷的 70% 乙醇 4 °C 固定过夜。然后, 4 °C 160×g 离心 5 min。PBS 洗 2 次后加入终浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ 的 RNase A, 于 37 °C 反应 30 min。360×g 离心 5 min, 弃上清液, 加入终浓度为 50 $\mu\text{g/mL}$ PI 染料, 室温避光 15 min 后, 上流式细胞仪进行细胞周期检测。然后使用 FlowJo Version 10.8 软件和 Modfit LT Version 5.0 软件对流式数据进行处理。

1.2.8 生长曲线 在 24 孔板每孔接种 5×10^3 个细胞, 进行常规细胞培养 6 d。每 24 h 换液 1 次, 并取样、

计数。每次取 3 个孔的细胞, 多次计数取平均值以提高数据准确性。以天数为横坐标, 以细胞数为纵坐标, 绘制散点图, 得到细胞生长曲线。

1.3 统计学分析

通过 GraphPad Prism 9.0 软件进行统计学分析。所有实验均进行 3 次以上独立重复实验。数据以 $\bar{x} \pm s$ 的形式表示。组间比较采用独立样本 *t* 检验。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

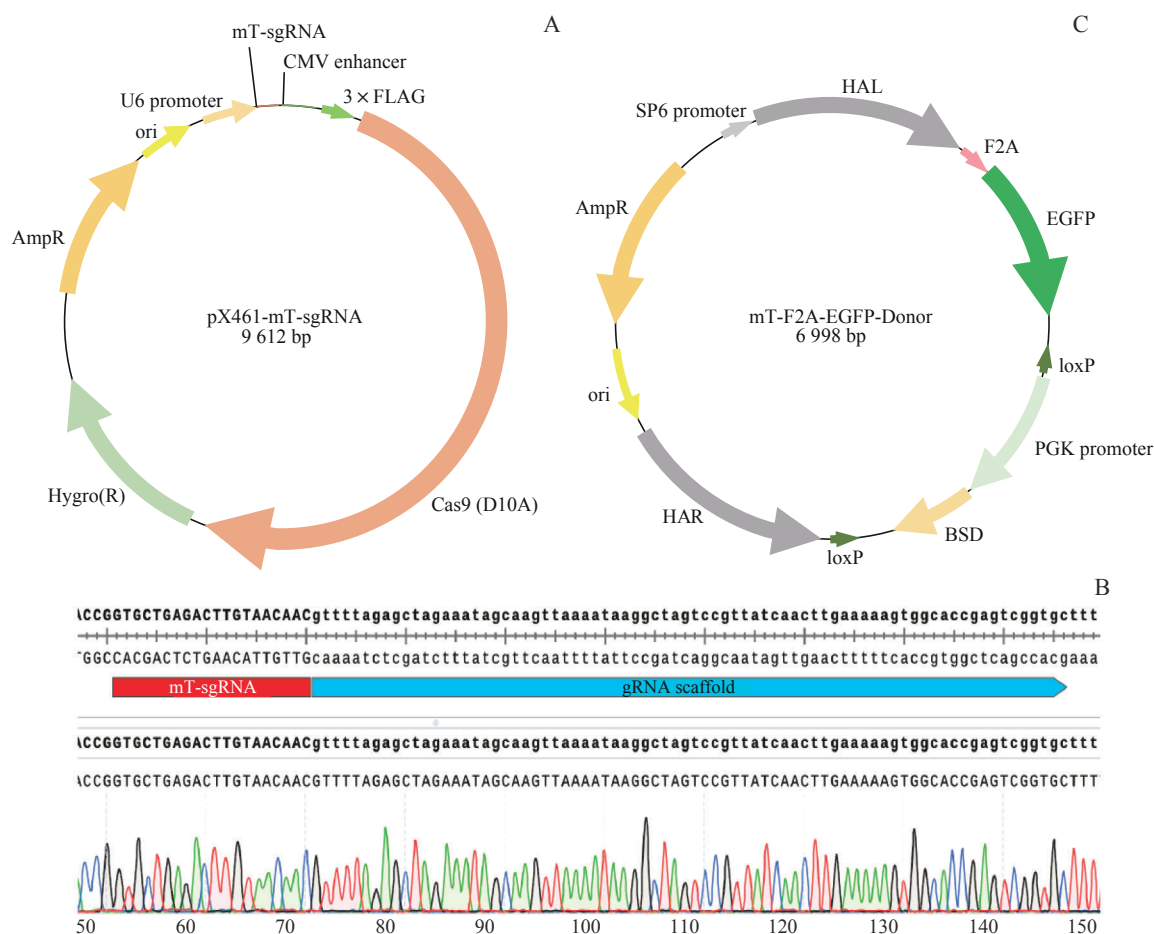
2.1 构建 pX461-mT-sgRNA 和 mT-F2A-EGFP-Donor 质粒

首先, 将 pX461-Cas9n-2A-GFP 质粒中的 GFP 片段替换成 Hygro 序列。然后, 将 mT-sgRNA 双链克隆到 pX461-Cas9n-2A-Hygro 质粒中以获得正确的 pX461-mT-sgRNA 重组质粒 (图 1A)。此后, 通过 PCR 测序验证了质粒序列的正确性 (图 1B)。pX461-mT-sgRNA 将在 *T* 基因终止密码子下游的 18 个核苷酸处切割以产生单链 DNA 断裂, 从而启动细胞内的 DNA 修复系统。

mT-F2A-EGFP-Donor 质粒 (图 1C) 可以为 DNA 修复提供模板 (template), 从而在 *T* 基因终止密码子

之前插入F2A-EGFP标记。*T*终止密码子前后约1 000 bp的HAL和HAR分别连接在F2A-EGFP的上下游。而PGK启动子驱动的BSD药物筛选标记可以提高重组单克隆细胞的筛选效率。此外,在PGK-BSD

序列。在挑选到正确的mT-F2A-EGFP克隆后,可以通过重组酶系统(cyclization recombination enzyme, Cre)使2个loxP位点间发生基因重组,从而有效删除2个loxP位点间的PGK-BSD序列。



Note: A. Scheme of pX461-mT-sgRNA plasmid map. B. Sequencing result of mT-sgRNA cloned into pX461-Cas9n-2A-Hygro plasmid. C. Scheme of mT-F2A-EGFP-Donor plasmid map.

图1 pX461-mT-sgRNA质粒和mT-F2A-EGFP-Donor质粒的构建

Fig 1 Construction of pX461-mT-sgRNA plasmid and mT-F2A-EGFP-Donor plasmid

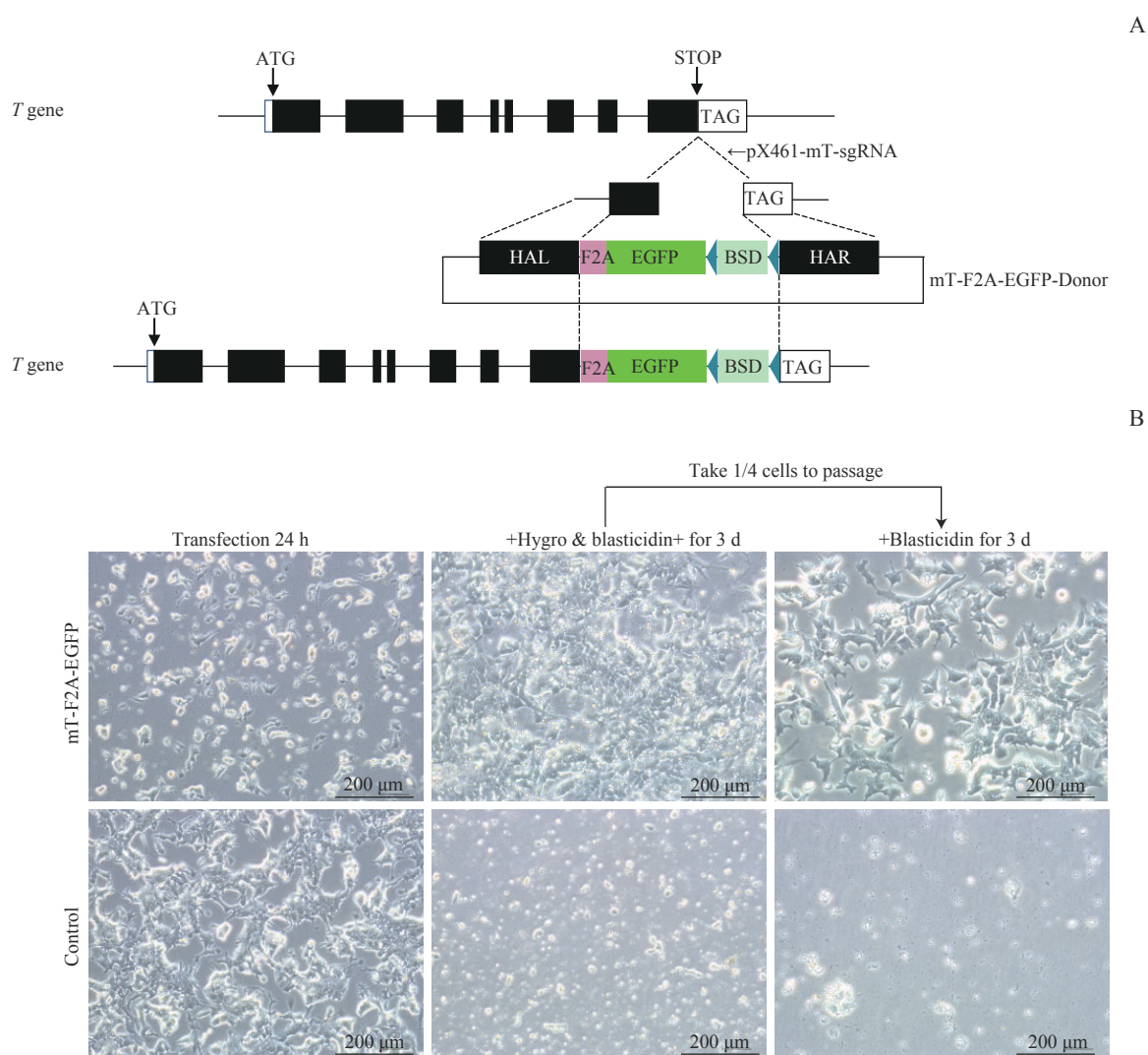
2.2 共转染 pX461-mT-sgRNA 和 mT-F2A-EGFP-Donor 质粒

通过电穿孔将 pX461-mT-sgRNA 和 mT-F2A-EGFP-Donor 质粒瞬转到 E14 细胞中。mT-sgRNA 引导 Cas9n 蛋白在 *T* 基因的终止密码子附近进行了单链切割,所产生的单链缺口则以 mT-F2A-EGFP-Donor 质粒为模板进行高保真修复,从而在基因组上 *T* 基因终止密码子之前插入 F2A-EGFP 和 BSD 标记。当 *T* 基因被转录表达时, F2A 序列确保了 EGFP 和 BSD 的同时表达(图 2A)。电转后 24 h, 转染组细胞在形态上与对照组有所不同, 部分细胞呈现出扁平或者梭形的

应激状态。而对照组细胞保持克隆样隆起的集落。值得注意的是, 在添加了 Hygro 和杀稻瘟菌素的培养基中培养 3 d 时, 稳转成功的细胞由于存在抗药性而保持正常生长, 而对照组细胞大部分死亡(图 2B)。这就证明 F2A-EGFP-BSD 序列已经通过 HDR 的方式整合进入了 *T* 基因序列中。

2.3 mT-F2A-EGFP 单克隆细胞的鉴定

将存活的转染组细胞通过有限稀释法接种于 96 孔板中, 通过传代使单克隆细胞得以增殖并分别收取每个克隆的基因组 DNA。若为正确的 mT-F2A-EGFP



Note: A. The scheme showed that F2A-EGFP was inserted before the stop codon of *T* gene. B. The cell morphology of E14 cells 24 h after electroporation with 2 kinds of plasmids (upper left), 3 d after Hygro and blasticidin selection (middle upper) and another 3 d with blasticidin (upper right). The untransfected E14 cells were used as a control (bottom).

图2 共转染 pX461-mT-sgRNA 和 mT-F2A-EGFP-Donor 质粒

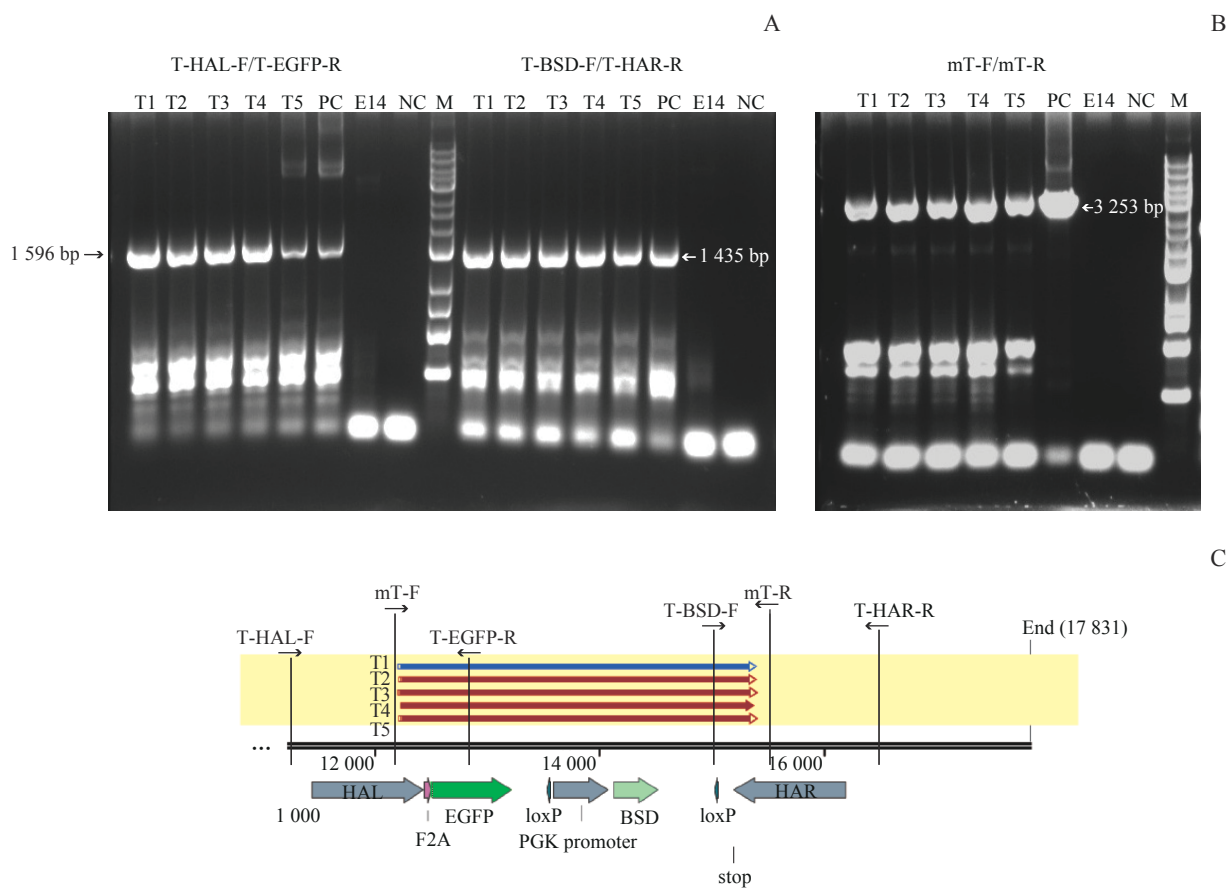
Fig 2 Co-transfection of pX461-mT-sgRNA and mT-F2A-EGFP-Donor plasmid

单克隆细胞, 则PCR扩增后进行琼脂糖凝胶电泳时, T-HAL-F和T-EGFP-R引物所扩增出来的片段大小应为1 596 bp (图3A左); T-BSD-F和T-HAR-R引物所扩增出来的片段应为1 435 bp (图3A右); 而利用mT-F和mT-R引物所扩增出的片段为3 253 bp (图3B)。对PCR产物大小正确的克隆再进行测序, 最终确定了5个拥有正确基因型单克隆细胞T1、T2、T3、T4和T5 (图3C)。

2.4 mT-F2A-EGFP 荧光报告干细胞系具有正常的分化功能

通过上述实验已经获得了5个候选单克隆细胞系。接下来进行EB分化实验来鉴定这些单克隆细胞

的多能性和分化功能是否正常。在分化过程中, *T*基因作为mESC向中内胚层发育的关键调控因子, 其表达量会随着EB分化的进行而逐渐升高。野生型E14和mT-F2A-EGFP报告细胞系T1~T5均能在不含mLIF的悬浮培养基中逐渐形成EB, 且形态上并无明显异常。收取未分化的干细胞RNA (D0), 以及EB分化后第3日 (D3) 和第4日 (D4) 的RNA, 进行RT-qPCR实验检测多能性标志基因以及各胚层标志基因的表达情况, 结果显示除了T2和T3的分化能力异常之外, 其余3个候选单克隆细胞系T1、T4和T5的EB分化能力和野生型E14并无区别: 随着分化的进行, 它们在转录水平上表现出多能性基因性别决定域Y框蛋白2 (*Sox2*) 的下调, 中内胚层分化基因 *T*、脱中



Note: A. Gel electrophoresis of PCR products with primers of T-HAL-F/T-EGFP-R (left, 1 596 bp) or T-BSD-F/T-HAR-R (right, 1 435 bp). B. Gel electrophoresis of PCR products with primers of mT-F/mT-R (3 253 bp). C. Sequencing results of T1, T2, T3, T4 and T5 clones. Primers used for PCR were also labeled here. PC—positive control; NC—negative control; M—marker.

图3 mT-F2A-EGFP单克隆细胞的鉴定

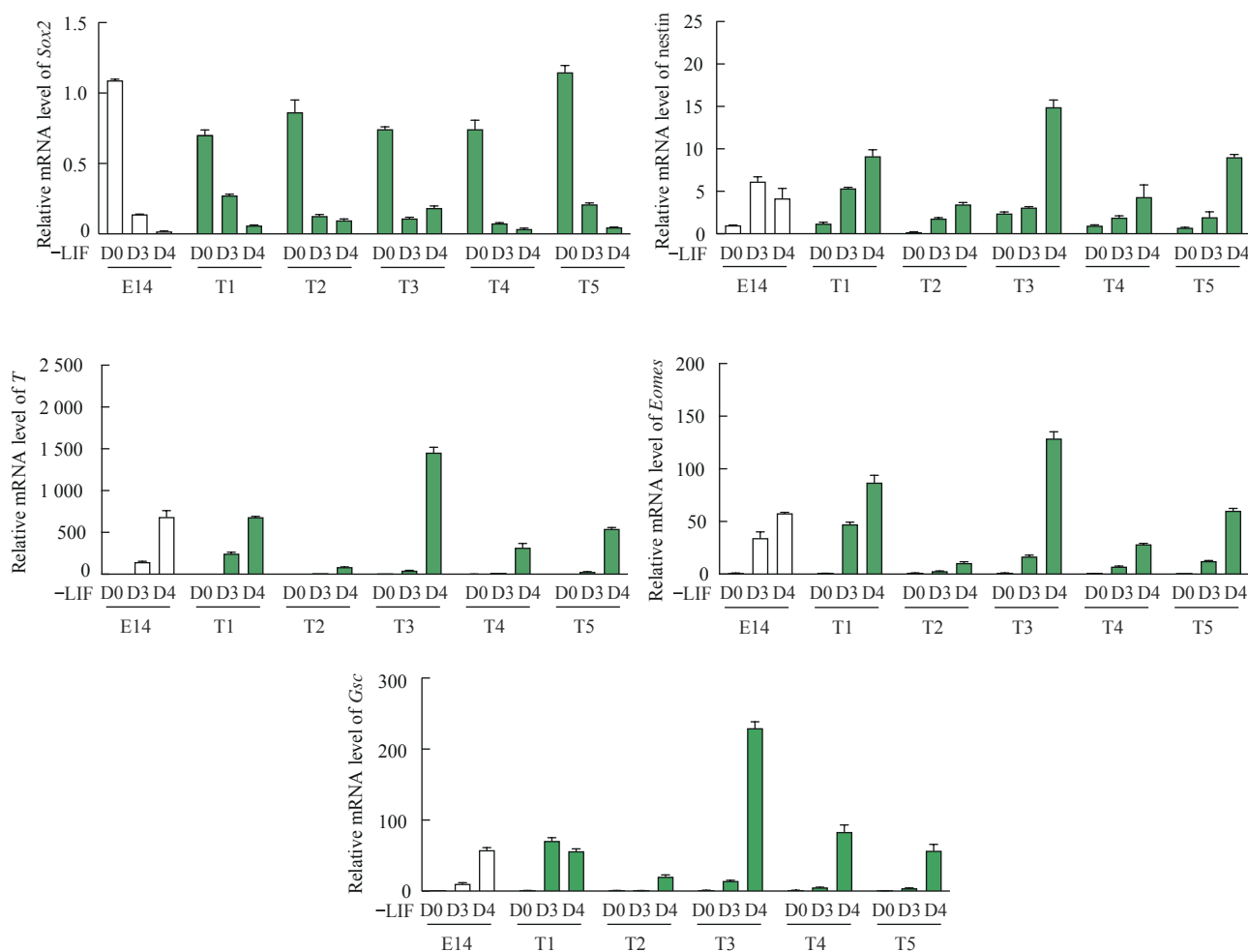
Fig 3 Identification of mT-F2A-EGFP clones

胚蛋白 (*Eomes*) 和 *Gsc*, 以及外胚层基因巢蛋白 (*nestin*) 的上调。其中, 单克隆 T1 的多能性基因以及中内胚层、外胚层基因的表达量均与正常对照组 E14 最为接近 (图 4)。因此推测, 在 T1 克隆中 F2A-EGFP 和 *T* 基因的重组对于 E14 细胞的干性维持和分化能力无明显影响。

2.5 mT-F2A-EGFP 荧光报告干细胞克隆的鉴定

为验证 mT-F2A-EGFP 荧光报告细胞系的构建是否成功, 分别从形态学、分化时 *T* 荧光表达强度、AP 活性、生长曲线和细胞周期等方面进行检测。首先, 挑选 E14、T1、T2、T3、T4 和 T5 克隆进行 EB 分化实验。在添加 LIF 的情况下, E14 和 *T* 报告细胞系均呈边界平滑的克隆状生长; 在不含 LIF 的培养基中, 均被诱导形成大小相似的球状 EB (图 5A, D0)。在荧光显微镜下, 野生型 E14 细胞由于没有 *T* 荧光报告基因, 无论是分化前 D0, 还是分化后 D3 和 D4 均

不表达 *T* 绿色荧光 (图 5A); 而在携带 mT-EGFP 报告基因的克隆细胞中, 只有 T1、T3 和 T4 的荧光表达强度与 *T* 基因的表达水平呈现正相关: D0 时, *T* 基因不表达, 因此没有 EGFP 荧光被检测到; 但随着 *T* 基因的表达上升, T1、T3 和 T4 在分化后 D3 开始呈现绿荧光, 并在 D4 时 mT-EGFP 荧光到达高峰 (图 5A)。这证明在分化前后 mT-EGFP 的荧光动态变化和 *T* 基因的表达水平高度一致 (图 4 和图 5A), 尤其是 T1 克隆的荧光信号最强。这一现象在流式细胞分析中得到了进一步的验证。当分化到 D3 和 D4 时, EB 中包含了多种谱系的细胞^[4-5]; 以野生型 E14 为阴性对照, 利用流式细胞技术从 T1、T3 和 T4 细胞系分化的多谱系细胞群中分选出 mT-F2A-EGFP 荧光表达细胞 (EGFP⁺) 和无荧光表达的细胞 (EGFP⁻)。通过分析荧光表达细胞的比例可以更直观地证明, T1、T3 和 T4 细胞系的 EGFP⁺ 细胞在分化 D3 时出现, 并在分化 D4 时显著增多。值得注意的是, 克隆 T1 在 D4 时有



Note: RT-qPCR experiments show relative mRNA levels of pluripotent marker (*Sox2*), mesoderm marker (*T*, *Eomes* and *Gsc*), and ectoderm marker (*nestin*). RNA of E14, T1, T2, T3, T4 and T5 clones were collected before differentiation (D0), and on the 3rd (D3) and the 4th (D4) day of EB differentiation.

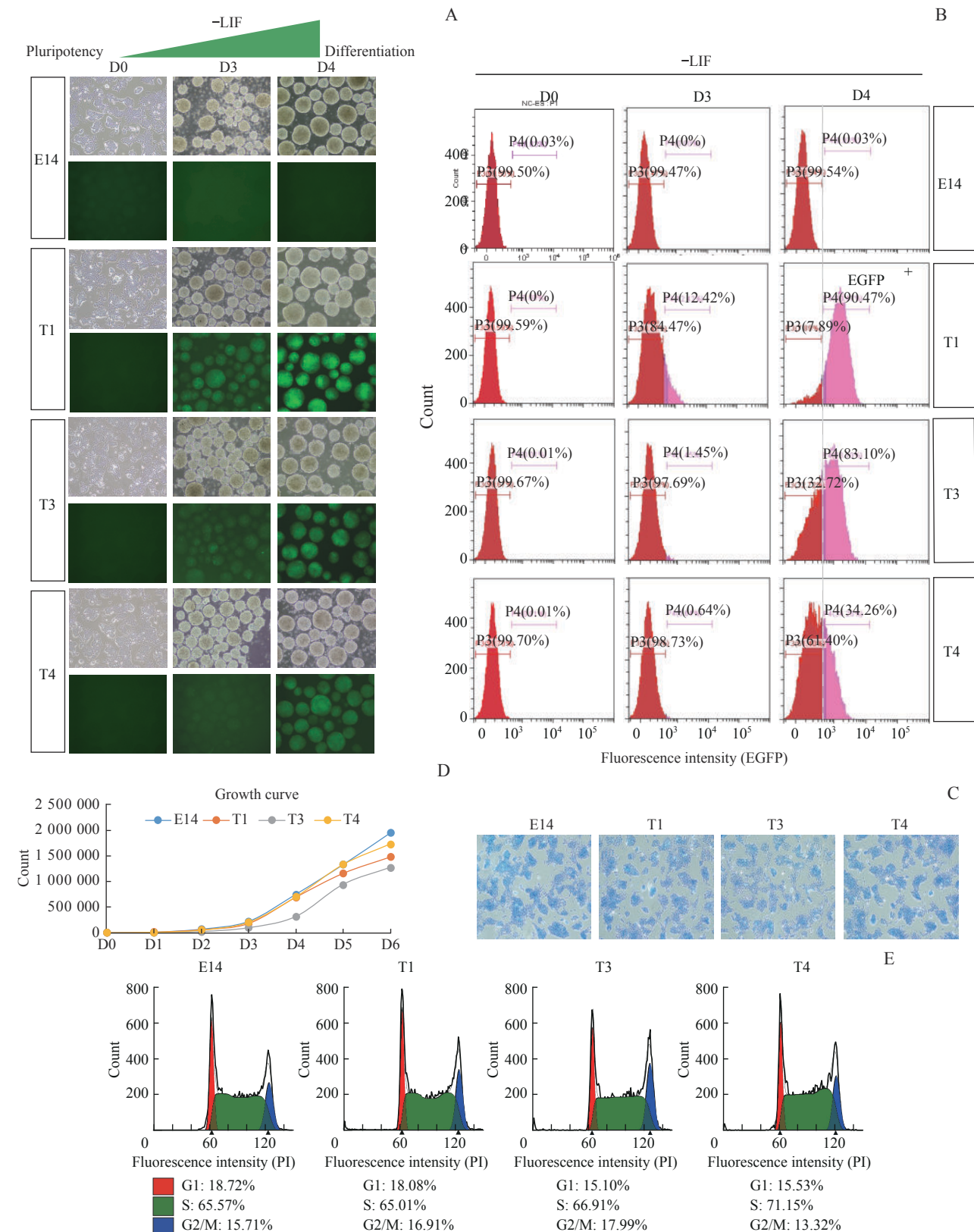
图4 mT-F2A-EGFP单克隆细胞分化过程中各标记基因的相对表达量

Fig 4 Relative expression levels of marker genes during lineage differentiation of mT-F2A-EGFP clones

高达 90.47% 的 EGFP⁺ 细胞, 并且该克隆的多能性基因和三胚层分化基因, 包括 *T* 基因的表达水平和野生型 E14 最为一致 (图 4), 因此 T1 报告细胞系能通过 EGFP 的荧光强度实时准确地反映出 EB 中内源 *T* 基因的表达情况 (图 4, 图 5A、5B)。同时, E14 细胞以及 3 个克隆报告细胞系均具有较高的 AP 染色活性 (图 5C), 说明 F2A-EGFP 的敲入对 E14 细胞的干性维持无明显不良影响。另外, T1、T3 和 T4 细胞的生长曲线和 E14 的生长曲线并无明显区别 (图 5D)。并且, 和 E14 相比, 这些克隆细胞的细胞周期均分布正常 (图 5E)。总之, 本研究基于 CRISPR/Cas9n 技术成功建立了携带 mT-F2A-EGFP 报告系统的小鼠胚胎干细胞系, 其中 T1 克隆无论是在基因表达水平还是在荧光强度上都能准确反映 *T* 基因的表达情况。

2.6 应用 mT-F2A-EGFP 报告系统分选中内胚层细胞

在去除 LIF 的 4 d 中, EB 细胞可以向外胚层和中内胚层分化, 其中还包含了少量未分化的干细胞和 2CLC 细胞。因此, 如果想从多谱系的 EB 中分选和鉴定 *T* 基因高表达的中内胚层细胞群, 可以利用 mT-F2A-EGFP 报告基因的荧光表达特性来实现。本研究中 T1 克隆已被证实是最能反映 *T* 基因且不影响干细胞特性的报告细胞系。以分化 4 d 的 E14 细胞作为阴性对照, 对分化 D4 的 T1 细胞系进行流式细胞分选, 分别收集 EGFP⁺ 和 EGFP⁻ 细胞群 (图 6A)。然后, 分别提取 EGFP⁺ 和 EGFP⁻ 2 组细胞的 RNA, 并进行了 RT-qPCR 检测 (图 6B)。结果显示, EGFP⁺ 细胞主要高表达中内胚层标志基因 *T*、*Eomes* 和 *Gsc*, 而 EGFP⁻ 细胞则表达多种谱系标志物, 例如多能性标志物 *Sox2*, 外胚层标志物配对盒因子 6 (paired box 6,



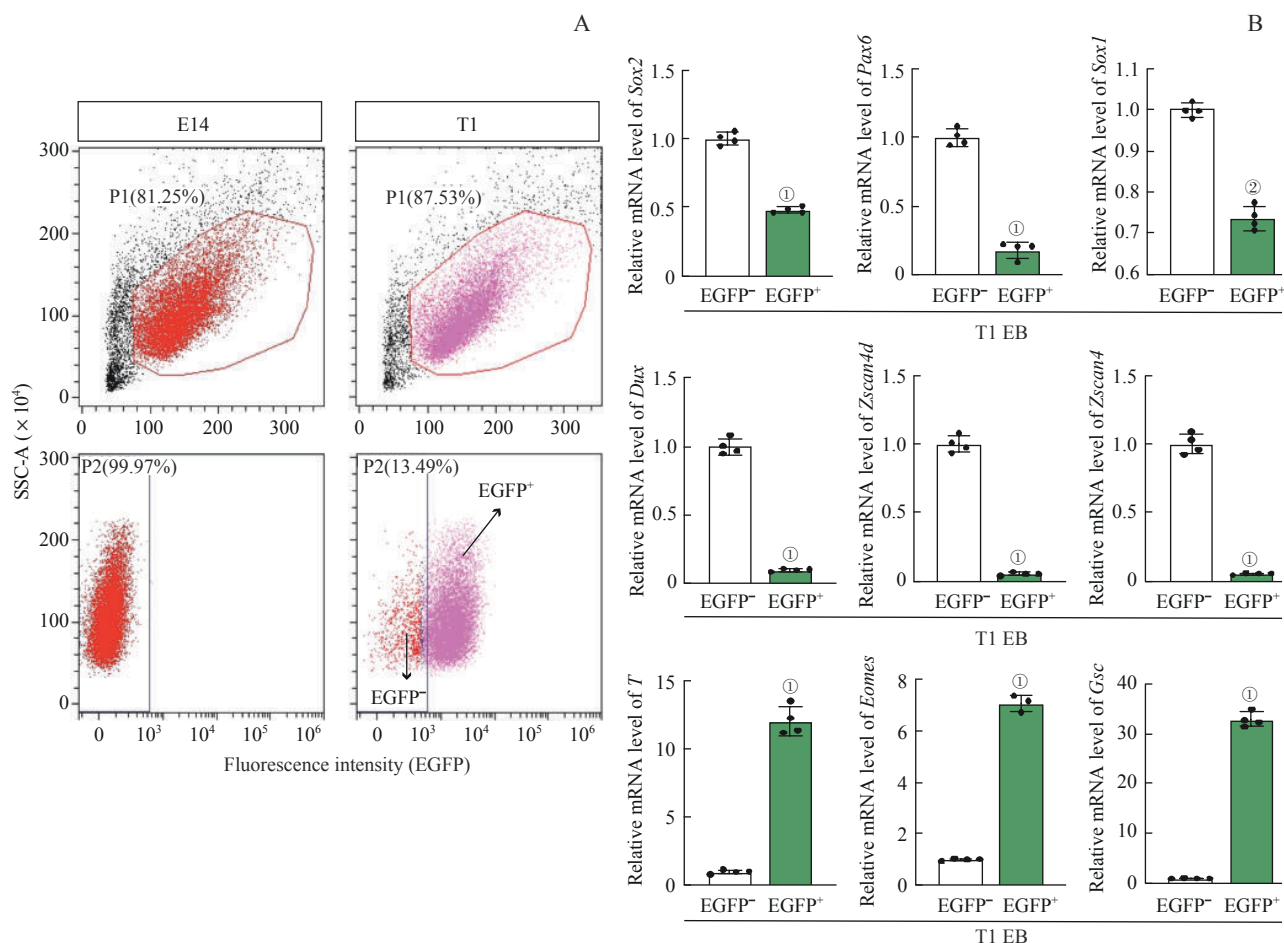
Note: A. Cell morphology and EGFP expression of E14, T1, T3 and T4 clones on Day 0 (D0), Day 3 (D3) and Day 4 (D4) of EB differentiation upon LIF removal ($-LIF$). All the microscopic pictures were taken under $\times 10$ magnification. B. Flow cytometry analysis of E14, T1, T3 and T4 on D0, D3 and D4 of EB differentiation upon LIF removal ($-LIF$). Pink indicates EGFP⁺ cells, and red indicates EGFP⁻ cells. C. AP staining of E14, T1, T3, and T4 cells. All the microscopic pictures were taken under $\times 10$ magnification. D. The growth curve of E14, T1, T3 and T4. E. Cell cycle analysis of E14, T1, T3 and T4 cells.

图5 mT-F2A-EGFP荧光报告干细胞系的功能检测

Fig 5 Function test of mT-F2A-EGFP clones

Pax6) 和 *Sox1* 以及 2CLC 标志基因 *Dux*、*Zscan4d* 和 *Zscan4* (图 6B)。这说明本研究构建的 mT-F2A-EGFP

报告系统 T1 克隆能正确反映内源性 *T* 基因的表达变化, 在 EB 分化中特异性标记中内胚层细胞。



Note: A. Flow cytometry analysis of E14 and T1 on EB differentiation day 4. Pink represents EGFP⁺ cells, and red represents EGFP⁻ cells. B. Both EGFP⁺ and EGFP⁻ cells of T1 on EB differentiation day 4 were collected by flow cytometry for RNA extraction. Relative mRNA levels of pluripotent marker *Sox2*, ectoderm markers *Pax6* and *Sox1*, 2CLC markers *Dux*, *Zscan4d* and *Zscan4*, and mesoderm markers *T*, *Eomes* and *Gsc* of EGFP⁺ and EGFP⁻ cells were detected by RT-qPCR. ① $P=0.000$, ② $P=0.005$, compared with the EGFP⁻ group.

图6 应用mT-F2A-EGFP报告系统分选中内胚层细胞

Fig 6 mT-F2A-EGFP fluorescent reporter stem cell line used to sort mesoderm cell populations

3 讨论

多能干细胞具有强大的自我更新和多向分化潜能, 因此, 在临床上有广泛的应用前景。然而, 由于获取途径困难、培养条件高和分化异质性问题, 干细胞目前在临床上的实际应用仍具有不小的挑战^[12]。只有深入阐明多能干细胞复杂的调控机制和功能, 才能够进一步推动发育生物学进展和疾病模型构建, 并最终促进干细胞替代疗法真正服务于临床。

2012年, CRISPR基因编辑技术首次问世。它的出现为定点基因编辑技术带来了新的契机。Cas9蛋白由sgRNA引导至特定的基因位点并诱导双链断裂。

Cas9系统的优势在于构建简单且效率较高, 但其高脱靶率带来了应用上的局限性。之后的Cas9n技术在Cas9的基础上进行了改进, 仅能切割与sgRNA结合的DNA单链, 并能最大限度地减少因错配导致的脱靶效应。Cas9n蛋白进行切割之后, 如果存在外源性修复模板, 供体基因则可以通过HDR途径被引入细胞中^[13]。目前, CRISPR技术已广泛应用于农业、医疗等多个领域。利用CRISPR技术, 研究人员可以在动物模型、细胞和分子层面进行发育与遗传生物学的探究; 可以改良作物基因创造出更优良的优势品种、燃料、食物以及新型生物材料^[14]; 可以为疾病诊疗提供新方案, 例如针对新型冠状病毒(2019-nCoV)

检测及治疗的研发^[15];还在干细胞研究和修正人类缺陷基因以治疗遗传疾病等方面开辟了新的道路^[16-17]等。

在小鼠胚胎的早期发育过程中,转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β) 和 Wnt (wingless and int-1) 信号通路在中内胚层的命运抉择中扮演了重要的角色。但是,早期胚胎向中内胚层分化的确切分子机制仍亟待研究。mESC 能在体外重现体内的胚层分化,但是EB分化早期产生的多谱系细胞在一定程度上影响了对中内胚层细胞的研究。*T* 基因作为中内胚层分化的重要调控因子,可以抑制神经外胚层的形成,并对于启动和诱导中内胚层的分化必不可少。缺失 *T* 基因的胚胎无法形成近轴中胚层^[18],并且在 mESC 中, *T* 基因和 *Eomes* 的表达均早于其他中内胚层基因^[6]。因此, *T* 基因能正确、及时地反映 mESC 向中内胚层分化的情况。

本研究正是基于 CRISPR/Cas9n 和 HDR 技术,在 mESC E14 中成功构建了 mT-F2A-EGFP 荧光报告细胞系 T1。F2A 肽介导的核糖体跳跃实现了 Brachyury 和 EGFP 的同时翻译与表达,并且 F2A-EGFP 和 *T* 基因的重组并没有影响 E14 细胞的干性维

持和分化潜能。通过监测和分析 T1 报告细胞系的荧光信号变化,可以实时追踪分化前后 *T* 基因的表达情况,并分选出 *T* 基因高表达的中内胚层细胞。这个报告系统的建立为后续研究干细胞 E14 在退出多能性和诱导中内胚层分化过程中的作用奠定了坚实的基础。若与前沿的基因库或者化学小分子库的筛选技术相结合,则能更进一步地阐明 mESC 早期发育过程的命运决定机制。

利益冲突声明/Conflict of Interests

所有作者声明不存在利益冲突。

Both authors disclose no relevant conflict of interests.

作者贡献/Authors' Contributions

王靖怡完成细胞培养、分子实验和文章撰写,王琼负责论文整体构思与文章修改。所有作者均阅读并同意了最终稿件的提交。

WANG Jingyi performed the cell culture, molecular experiments, and manuscript draft. WANG Qiong designed and supervised the project and revise the manuscript. Both the authors have read the last version of paper and consented for submission.

• Received: 2023-01-29

• Accepted: 2023-03-21

• Published online: 2023-04-28

参 · 考 · 文 · 献

- [1] EVANS M. Discovering pluripotency: 30 years of mouse embryonic stem cells[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2011, 12(10): 680-686.
- [2] STEWART C L, KASPAR P, BRUNET L J, et al. Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukaemia inhibitory factor[J]. Nature, 1992, 359(6390): 76-79.
- [3] SHAHBAZI M N, ZERNICKA-GOETZ M. Deconstructing and reconstructing the mouse and human early embryo[J]. Nat Cell Biol, 2018, 20(8): 878-887.
- [4] YANG F, HUANG X, ZANG R, et al. DUX-miR-344-ZMYM2-mediated activation of MERV LTRs induces a totipotent 2C-like state[J]. Cell Stem Cell, 2020, 26(2): 234-250. e7.
- [5] LI M, BELMONTE J C I. Ground rules of the pluripotency gene regulatory network[J]. Nat Rev Genet, 2017, 18(3): 180-191.
- [6] TOSIC J, KIM G J, PAVLOVIC M, et al. Eomes and Brachyury control pluripotency exit and germ-layer segregation by changing the chromatin state[J]. Nat Cell Biol, 2019, 21(12): 1518-1531.
- [7] CHO S W, KIM S, KIM J M, et al. Targeted genome engineering in human cells with the Cas9 RNA-guided endonuclease[J]. Nat Biotechnol, 2013, 31(3): 230-232.
- [8] DOUDNA J A, CHARPENTIER E. Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9[J]. Science, 2014, 346(6213): 1258096.
- [9] DETTMER R, NAUJOK O. Design and derivation of multi-reporter pluripotent stem cell lines via CRISPR/Cas9n-mediated homology-directed repair[J]. Curr Protoc Stem Cell Biol, 2020, 54(1): e116.
- [10] RYAN M D, KING A M, THOMAS G P. Cleavage of foot-and-mouth disease virus polyprotein is mediated by residues located within a 19 amino acid sequence[J]. J Gen Virol, 1991, 72(Pt 11): 2727-2732.
- [11] DE FELIPE P, LUKE G A, BROWN J D, et al. Inhibition of 2A-mediated 'cleavage' of certain artificial polyproteins bearing N-terminal signal sequences[J]. Biotechnol J, 2010, 5(2): 213-223.
- [12] VERES A, FAUST A L, BUSHNELL H L, et al. Charting cellular identity during human *in vitro* β -cell differentiation[J]. Nature, 2019, 569(7756): 368-373.
- [13] SALEH-GOHARI N, HELLEDAY T. Conservative homologous recombination preferentially repairs DNA double-strand breaks in the S phase of the cell cycle in human cells[J]. Nucleic Acids Res, 2004, 32(12): 3683-3688.
- [14] FU R J, XIANYU Y L. Gold nanomaterials-implemented CRISPR-cas systems for biosensing[J]. Small, 2023: e2300057.
- [15] TANG W F, TRAN A T, WANG L Y, et al. SARS-CoV-2 pandemics: an update of CRISPR in diagnosis and host-virus interaction studies[J]. Biomed J, 2023, 46(2): 100587.
- [16] GODBOUT K, TREMBLAY J P. Prime editing for human gene therapy: where are we now?[J]. Cells, 2023, 12(4): 536.
- [17] MOLLASHAHI B, LATIFI-NAVID H, OWLIAEE I, et al. Research and therapeutic approaches in stem cell genome editing by CRISPR toolkit[J]. Molecules, 2023, 28(4): 1982.
- [18] YAMAGUCHI T P, TAKADA S, YOSHIKAWA Y, et al. *T* (Brachyury) is a direct target of Wnt3a during paraxial mesoderm specification[J]. Genes Dev, 1999, 13(24): 3185-3190.

[本文编辑] 包 玲

