

基于 CRISPR/cas9 文库筛选的慢病毒库包装方法研究

刘铁柱 李阿茜 李乃哲 曲园园 李川 张全福 刘洋 李德新 梁米芳 王世文
中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所病毒性出血热室, 北京 102206
通信作者: 王世文, Email: wangshiwencdc@163.com, 电话: 010-58900675; 梁米芳, Email: mifangl@163.com, 电话: 010-58900822

【摘要】 **目的** 探讨基于 CRISPR/cas9 (Clustered regularly interspaced short palindromic repeat sequences/CRISPR-associated protein 9) 文库筛选的慢病毒库包装优化条件。**方法** 采用 RT-PCR、酶联免疫吸附试验 (ELISA 法) 和免疫荧光法, 对不同质粒配比、不同收毒时间以及不同量的 Lipofectamine 3000 reagent 包装出的慢病毒滴度进行检测, 最后通过高通量测序技术评价慢病毒库的 sgRNA (single guide RNA, 单链引导 RNA) 覆盖度和 reads 数分布。**结果** 当质粒配比 psPAX2 : pMD2.0G : Lentivirus library = 2 : 1 : 1 时, 慢病毒滴度较高; 当加入 Lipofectamine 3000 reagent 的量为 10 μ l 时, 慢病毒滴度较高。两种情况, RT-PCR 和 ELISA 法结果一致。免疫荧光显示, 收毒时间为 60 h 时慢病毒滴度较高。经 Ion Torrent 高通量测序, 按照本研究的最优条件包装出的慢病毒库覆盖度达 99.3%, sgRNA 的 reads 数符合正态分布。**结论** 本研究探索了慢病毒库包装的优化条件, 为下一步 CRISPR/cas9 文库筛选提供保证。

【关键词】 CRISPR/cas9 文库筛选; 慢病毒库包装; 高通量测序技术

基金项目: 国家科技重大专项 (2018ZX10711001)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1003-9279.2019.02.020

Methods of packaging lentivirus library for CRISPR/cas9 -based screening

Liu Tiezhu, Li Aqian, Li Naizhe, Qu Yuanyuan, Li Chuan, Zhang Quanfu, Liu Yang, Li Dexin, Liang Mifang, Wang Shiwen

National Institute for Viral Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Key Laboratory for Medical Virology, Ministry of Health, Beijing 102206, China

Corresponding author: Wang Shiwen, Email: wangshiwencdc@163.com, Tel: 0086-10-58900675; Liang Mifang, Email: mifangl@163.com, Tel: 0086-10-58900822

【Abstract】 **Objective** To obtain the optimum of lentiviral library packaging based on CRISPR/cas9 (Clustered regularly interspaced short palindromic repeat sequences/CRISPR-associated protein 9). **Methods** Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR), immunofluorescence antibody (IFA) and enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) were used to detect the lentivirus titers in condition of different ratio of packaging plasmids, different addition of lipofectamine 3000 reagent and different time points post-transfection. Then, high-throughput sequencing was performed to evaluate the representation and distribution of single guide (sg)RNAs in the library. **Results** The lentivirus titer was the highest when the molar ratio of psPAX2:pMD2.0G:Lentivirus library was 2:1:1, and the optimum addition of Lipofectamine 3000 reagent was 10 μ l, while the result of ELISA were correspondent to that of RT-PCR. The IFA result showed that the lentivirus titer was the highest at 60 h post-transfection. The coverage of sgRNAs in the lentivirus library packaged with the optimum we obtained was 99.3%, and the read counts of sgRNAs was observed in a normal distribution. **Conclusions** The optimal lentivirus library packaging was obtained, and this can provide basis for CRISPR/cas9-based screening.

【Key words】 CRISPR/cas9 screening; Lentivirus library packaging; High-throughput sequencing

Fund programs: National Major Scientific and Technological Project (2018ZX10711001)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1003-9279.2019.02.020

CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeat sequences/CRISPR-associated protein 9) 系统最早由日本科学家在细菌中发现^[1]。最近的报道揭示了其可以在真菌和古生菌中发挥固有免疫的作用^[2-3]。基于这个功能,CRISPR 系统被运用在动物细胞和植物细胞的基因编辑上,从而诞生了第三代基因编辑技术,即 CRISPR/cas9 技术,即通过人为设计单链向导 RNA (sgRNA) 来引导具有核酸内切酶活性的 Cas9 酶,靶向结合在目的基因并引起双链断裂,并利用机体自我修复功能恢复双链结构。相对于 RNA 干扰技术,CRISPR/cas9 脱靶率更低,基因敲除更彻底,而且可以实现基因的永久敲除^[4-5]。因此 CRISPR/cas9 被广泛运用在基因敲除细胞系、甚至基因敲除动物模型的建立。以 CRISPR/Cas9 为基础的文库筛选技术也获得广泛应用并取得巨大进展。该技术通过慢病毒包装技术,将针对人体 18 080 个基因的 sgRNA 各自整合在一个细胞中,通过加入药物、病毒等筛选因素,获得与药物作用靶点、病毒感染受体等相关的宿主基因^[6-7]。在病毒感染领域,科学家们已经获得了诸多研究成果。比如, Sara Cherry 和 Michael S. Diamand 等通过该技术筛选出一组内质网相关信号多肽复合物 (SPCS) 蛋白,这些宿主因子与黄病毒结构蛋白 (prM 和 E) 的剪切相关,是黄病毒感染的关键因子^[8]; Zhang 等^[8] 利用该技术筛选出 EMC2、EMC3、SEL1L 等 7 个基因,这些基因都属于内质网相关蛋白降解通路 (ERAD),且敲除后不会阻止西尼罗病毒 (WNV) 的复制,但会阻止该病毒所致的细胞死亡^[9]。然而高质量的筛选依赖于慢病毒库中 sgRNA 的高覆盖度和均一性,本研究对该筛选中慢病毒包装条件进行优化研究,为后续 CRISPR/cas9 文库筛选奠定基础,可为本领域研究者提供参考。

1 材料与方 法

1.1 电转化法扩增质粒库 质粒库,即 Lenti CRISPRv2 human library。其中,6 万多条 sgRNA 和 Cas9 酶编码序列被整合在慢病毒载体质粒中,通过与慢病毒包装 helper 质粒即 psPAX2、pMD2.G 共转染 HEK293T 细胞 (ATCC; Virginia, USA),包装出慢病毒库。该质粒库购自 Addgene Distributors 北京中原公司。利用 Bio-Rad 原核细胞电转仪 MicroPulser,将 3 μ l 质粒库在 2.1KV, Ec2 条件下电转化 SS320 感受态细胞 (Biorise, cc0731pk)。37 $^{\circ}$ C,

1 000 \times g,复苏 1 h。15 000 \times g,离心 2 min,吸去上清,剩余 100 μ l 重悬菌液涂于氨苄霉素抗性的固体培养皿,过夜培养后将菌落刮下并收集至 EP 管中,利用 HiSpeed Plasmid Midi Kit (Qiagen, 12643) 大量提取质粒,-80 $^{\circ}$ C 保存。

1.2 质粒转染 将 HEK 293T 细胞种进 6 孔板,待细胞密度达到 80% 时,吸掉细胞上清,加入 1 ml 提前温育的 opti-MEM,37 $^{\circ}$ C 30 min。利用 LipofectamineTM 3000 Transfection Reagent 试剂盒 (Invitrogen, L3000015),将慢病毒包装 helper 质粒即 psPAX2、pMD2.G 和核心质粒即 sgRNA 质粒库,按照三种质粒的不同摩尔比例,每孔中加入不同 Lipofectamine 3000 reagent 量,转染 HEK 293T 细胞。

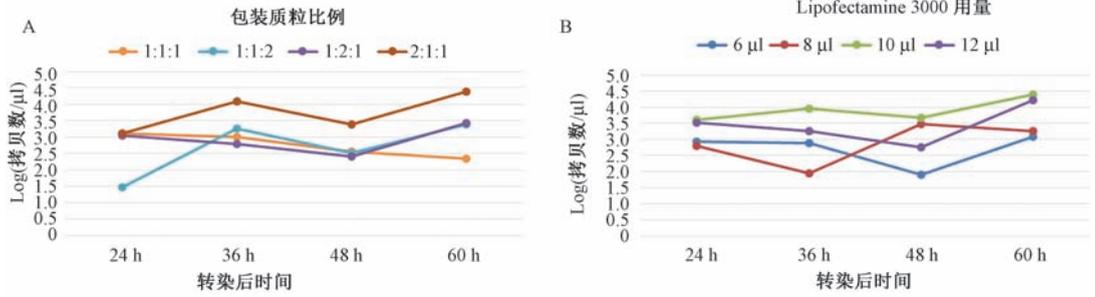
1.3 慢病毒收集 分别在转染后 24 h、36 h、48 h 和 60 h 收集转染后细胞上清,每次收集时,将上清吸进 1.5 ml Eppendorf 管中,15 000 \times g,离心 5 min,4 $^{\circ}$ C。用 0.45 μ m 滤器过滤后分装冻存于-80 $^{\circ}$ C 备用。

1.4 慢病毒滴度检测 先将慢病毒上清冰上解冻,使用 QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, 52904) 提取慢病毒 RNA,使用 Lenti-Pac HIV qRT-PCR Titration Kit (RT-PCR) (Genecopoeia, HPR-LTK-050) 检测慢病毒 RNA 滴度;同时使用慢病毒滴度 (HIV P24) ELISA 检测试剂盒 (Biodragon, BF06203) 检测慢病毒 P24 抗原水平;利用免疫荧光法观察慢病毒感染 293T 细胞后的病毒密度。

1.5 高通量测序技术评价慢病毒库覆盖度和均一性 将本实验的最优条件包装出的慢病毒库,按照 MOI 为 0.2 感染 HeLa 细胞,24 h 后换为新鲜维持液。48 h 后提取细胞基因组 DNA,扩增慢病毒整合段,所用上游引物:5'-TATCTTGTGGAAAGGAAAG GACGA;下游引物:5'-GGTGTTTCGTCTTTTCCA。然后对 PCR 产物进行纯化,加 barcode,利用 E-gel 预制琼脂糖凝胶电泳 (Thermo Fisher, G530001) 后进行片段分选,油包水 PCR,ISPS 富集,最后通过 Ion Torrent 平台 (Life, America) 上机测序。

2 结果

2.1 电化学转化法扩增质粒库和慢病毒库收集 将固体培养皿扩增的菌落均匀刮下后,大量提取质粒,经 Nanodrop 微量分光光度计检测,质粒浓度为 1 530 ng/ μ l。按照不同收集时间,将不同转染条件下的慢病毒上清离心、过滤后,收集于 15 ml 离心管,



注: A. 按照不同质粒配比,在不同收毒时间的慢病毒滴度变化,其中质粒配比依次为 psPAX2:pMD2.0G:Lentivirus library;
B 按照 6 孔板每孔加入不同 Lipofectamine 3000 reagent 量,在不同收毒时间的慢病毒滴度变化

图 1 RT-PCR 法检测慢病毒在不同转染条件下的滴度变化

Note: A. Copy numbers of lentivirus with different ratio of packaging plasmids at different time-points;

B. Copy numbers of lentivirus with different addition of Lipofectamine 3000 reagent at different time points

Fig.1 RT-PCR results for copy number of lentivirus in different conditions

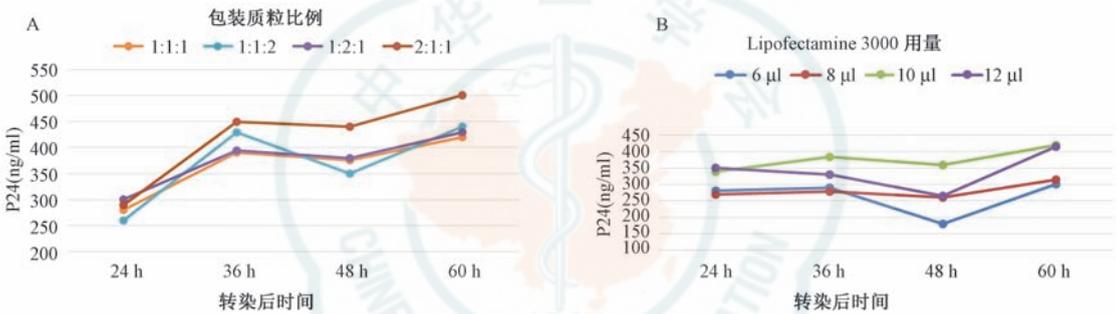


图 2 ELISA 法检测慢病毒在不同转染条件下的滴度变化

Fig.2 ELISA results for copy number of lentivirus in different conditions

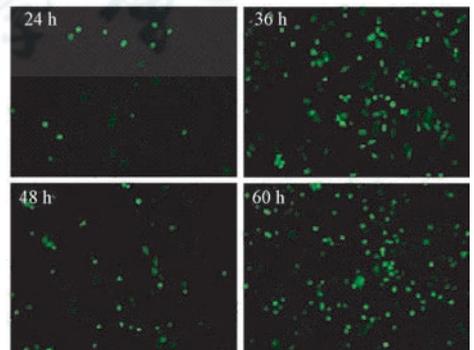
同时取 500 μl 分装于 1.5 ml Eppendorf 管中,冻存于 -80 ℃。

2.2 不同转染条件下的慢病毒滴度比较 将慢病毒包装系统 psPAX2、pMD2.0G、Lentivirus library 质粒,分别按照 1:1:1、1:1:2、1:2:1、2:1:1 4 种配比转染 HEK 293T 细胞,分别在转染后 24 h、36 h、48 h、60 h 收集上清。由于 HEK 293T 细胞在 6 孔板中生长易出现发黄并脱落,本实验在第 36 h 收集病毒后,将上清更换为新鲜培养基。结果显示,当 psPAX2:pMD2.0G:Lentivirus library = 2:1:1 时,慢病毒滴度较高,且在转染后 60 h 慢病毒滴度较其他时间点更高(图 1 A,图 2 A)。

按照每孔加入 Lipofectamine 3000 reagent 量为 6 μl、8 μl、10 μl、12 μl 进行转染,结果显示,当每孔加入 10 μl 的 Lipofectamine 3000 reagent 时,慢病毒滴度较高,且在转染后 60 h 慢病毒滴度较其他时间点更高(图 1 B,图 2 B)。

2.3 不同收毒时间的慢病毒滴度变化 本研究在质粒配比 psPAX2:pMD2.0G:Lentivirus library = 2:1

:1, Lipofectamine 3000 reagent 量为 10 μl 条件下,利用荧光观察法,统计慢病毒库的感染率,结果显示当收毒时间为 60 h 时,慢病毒滴度最高,与前述结果一致(图 3)。

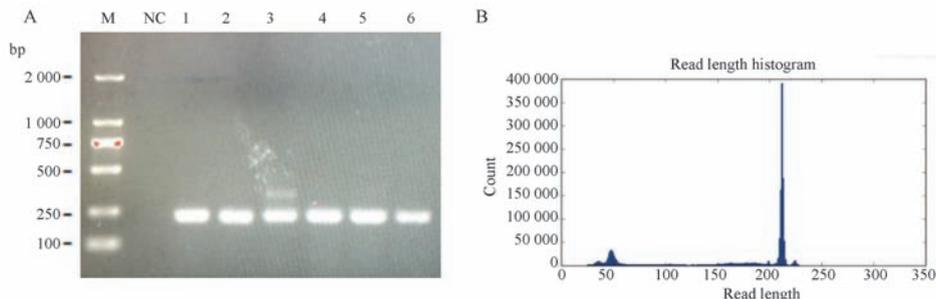


psPAX2:pMD2.0G:Lentivirus library = 2:1:1,
Lipofectamine 3000 reagent 量为 10 μl

图 3 不同收毒时间的慢病毒滴度变化

Addition of Lipofectamine 3000 reagent was 10 μl,
psPAX2:pMD2.0G:Lentivirus library = 2:1:1

Fig.3 Titers of lentivirus at different timepoints post-transfection

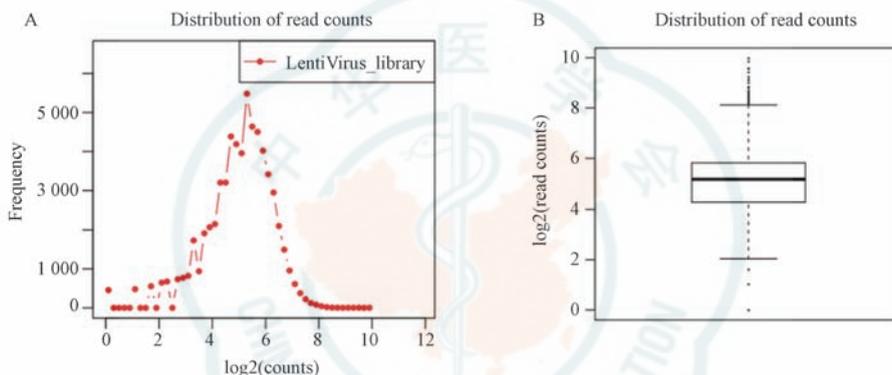


注:A: M. DL2000 DNA marker; NC. Negative control; 1~6. 6个平行样本; B: Read length 代表测序读长

图 4 慢病毒整合片段的 PCR 扩增和高通量测序后片段长度鉴定

Note: A: M. DL2000 DNA marker; NC. Negative control; 1~6. 6 replicates; B: Read length represents the length of sequence

Fig.4 Detection of integrated fragment of lentivirus with PCR and high-throughput sequencing



注:A. sgRNA read 数分布的 hisgram 图; B. sgRNA read 数中位数的分布图

图 5 高通量测序检测慢病毒库 sgRNA reads 数分布

Note: A. Histogram of read counts in all samples; B. Distribution of median read counts

Fig.5 The distribution of sgRNAs read counts in lentivirus library detected by high-throughput sequencing

2.4 慢病毒整合片段长度鉴定 将收集的慢病毒感染 HeLa 细胞, 48 h 后提取基因组 DNA, 扩增慢病毒整合片段, 并用琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 产物长度(图 4 A); 同时 Ion Torrent 高通量测序结果显示, 建库后的目的片段长度为 210 bp 左右, 与琼脂糖凝胶电泳结果一致(图 4B)。

2.5 慢病毒库的 sgRNA 覆盖度和 reads 数分布 通过高通量测序, 结果显示按照本实验的最优条件包装的慢病毒库, 其 sgRNA 覆盖度达 99.3%, 即在全部 63 950 种 sgRNA 中, 只有 456 种 sgRNA 丢失。sgRNA 的 reads 数呈现正态分布, 且 reads 数中位数集中在 32 条附近(图 5)。

3 讨论

CRISPR/Cas9 文库包含针对人体 19 050 个基因的 73 150 条 sgRNA^[10], 在进行筛选前, 需要保证尽可能全部 sgRNA 都能被包装成慢病毒, 然后按照一个细胞仅整合一个病毒的原则构建筛选细胞文

库。在这个过程中, 需要让慢病毒的滴度足够高, 才能使其中的 sgRNA 种类全面而且覆盖度高; 另外, 还需要慢病毒库中的 sgRNA 具有一定均一性, 避免出现有些 sgRNA 过多而有些 sgRNA 过少所导致的筛选偏差。目前尚没有基于 CRISPR/cas9 文库筛选的慢病毒包装条件的报道, 本研究通过在不同质粒配比, 不同 Lipofectamine 3000 reagent 加入量以及不同收毒时间检测慢病毒的滴度, 探索了该包装技术的最优条件。

本实验选择 HEK 293T 细胞包装慢病毒, 在转染质粒 36 h 后, 细胞上清已明显变黄, 需及时更换新鲜培养基来防止细胞脱落。故选择在此时收集第二次病毒上清, 并更换新鲜培养基(含 2% 胎牛血清的 DMEM), 这个原因可以解释转染 48 h 后的慢病毒滴度较 36 h 明显减少。本实验收集慢病毒的最晚时间选择在 60 h, 原因是 HEK 293T 细胞在 6 孔板中孵育 60 h 过程中经历了 3 次收毒过程, 由于反复吸掉和加入液体, 细胞已经出现不同程度的脱落

现象,不能继续维持产毒状态。另外,对 Lipofectamine 3000 reagent 不同加入量包装出的慢病毒滴度进行比较,发现在加入 10 μg 时,慢病毒滴度最高,而当加入 12 μg 时慢病毒滴度反而下降,说明过高的剂量可能会对细胞的毒性增强,从而影响了转染效率。为了验证包装出慢病毒库的覆盖度和均一性,本研究并没有选择直接用慢病毒作为模板进行 PCR,而是先将慢病毒感染待筛选的细胞后,提取细胞的基因组 DNA,PCR 扩增慢病毒整合段,然后将 PCR 产物进行高通量扩增子测序。这样就能直接反映被筛选的细胞中 sgRNA 的种类。

由于将慢病毒感染 Hela 细胞时,是通过较低的 MOI 值来尽可能保证一个细胞中只被整合一种 sgRNA,但这种方法并不能保证所有细胞中只进入一种 sgRNA,进而造成后期筛选结果的偏差。另外,本实验中使用了 Invitrogen 公司的转染试剂,对于其他厂家的转染试剂未做研究,下一步将对不同厂家的转染试剂进行对比,以获得更为全面的优化条件。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

作者贡献声明 刘铁柱:论文撰写;刘铁柱、李乃哲、曲园园:实验操作;李阿茜、李川、张全福、刘洋、李德新、梁米芳、王世文:研究设计、指导、论文修改、经费支持

参考文献

[1] 梁奔梦,狄冉,刘秋月,等. CRISPR/Cas9 基因组编辑技术

及其影响因素[J]. 中国畜牧杂志, 2017, 53(8): 5-9. DOI: 10.19556/j.0258-7033.2017-08-005.

- [2] Gasiunas G, Barrangou R, Horvath P, et al. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2012, 109(39): E2579-2586. DOI: 10.1073/pnas.1208507109.
- [3] Wiedenheft B, Sternberg S H, Doudna J A. RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea [J]. Nature, 2012, 482(7385): 331-338. DOI: 10.1038/nature10886.
- [4] 赵秀娟,陈万标,张沛涛,等. 应用 CRISPR/Cas9 系统在 G401 细胞株中敲除 p21 基因 [J]. 天津医药, 2016, 44(10): 1190-1194. DOI: 10.11958/20160731
- [5] 郑小梅,张晓立,于建东,等. CRISPR-Cas9 介导的基因组编辑技术的研究进展 [J]. 生物技术进展, 2015, (1): 1-9. DOI: 10.3969/j.issn.2095-2431.2015.10.01.
- [6] Seeger C, Sohn JA. Targeting Hepatitis B Virus With CRISPR/Cas9 [J]. Mol Ther Nucleic Acids, 2014, 3: e216. DOI: 10.1038/mtna.2014.68.
- [7] 王大勇,马宁,惠洋,等. CRISPR/Cas9 基因组编辑技术在癌症研究中的应用 [J]. 遗传, 2016, 38(1): 1-8. DOI: 10.16288/j.ycz.15-252.
- [8] Zhang R, Miner JJ, Gorman MJ, et al. A CRISPR screen defines a signal peptide processing pathway required by flaviviruses [J]. Nature, 2016, 535(7610): 164-168. DOI: 10.1038/nature18625.
- [9] Ma H, Dang Y, Wu Y, et al. A CRISPR-Based Screen Identifies Genes Essential for West-Nile-Virus-Induced Cell Death [J]. Cell Rep, 2015, 12(4): 673-683. DOI: 10.1016/j.celrep.2015.06.049.
- [10] Wang T, Wei J J, Sabatini D M, et al. Genetic screens in human cells using the CRISPR-Cas9 system [J]. Science, 2014, 343(6166): 80-84. DOI: 10.1126/science.1246981.

(收稿日期:2018-12-01)

(本文编辑:陈培莉)

欢迎订阅 欢迎投稿 欢迎刊登广告

中华实验和临床病毒学杂志

<http://zhshylcbdxzz.yiigle.com>

邮发代号 18-224, 电话:010-63530971, 010-63540009, Email:bianjibu2005@sina.com, 邮编:100052, 地址:北京市西城区迎新街 100 号。