

DOI:10.16781/j.0258-879x.2020.05.0513

· 论 著 ·

利用 CRISPR/Cas9 系统建立叉头框 G1 基因敲除的人胚胎干细胞系

袁媛^{1,2}, 张冠宇³, 孙平新³, 章越凡², 李铁军^{1,2}, 李文林^{3*}

1. 安徽中医药大学研究生院药理学系, 合肥 230012
2. 海军军医大学(第二军医大学)药学院药理学教研室, 上海 200433
3. 海军军医大学(第二军医大学)基础医学院细胞生物学教研室, 上海 200433

[摘要] **目的** 采用成簇的规律间隔的短回文重复序列及其相关蛋白 9 (CRISPR/Cas9) 基因编辑技术构建叉头框 G1 (*FOXG1*) 基因敲除的人胚胎干细胞系, 研究 *FOXG1* 基因在人胚胎干细胞早期神经诱导过程中的作用。**方法** 利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术, 通过转染 2 个向导 RNA (gRNA) 诱导人胚胎干细胞 *FOXG1* 基因的大片段敲除, 经单克隆筛选、测序分析和蛋白质印迹分析验证获得 *FOXG1* 基因敲除的人胚胎干细胞; 通过细胞免疫荧光染色、qRT-PCR 检测 *FOXG1* 基因敲除前后细胞在早期神经诱导过程中关键标志物配对框基因 6 (PAX6)、性别决定区 Y 框蛋白 2 (SOX2) 和正小齿同源物 2 (OTX2) 的表达。**结果** 利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术成功获得 *FOXG1* 基因大片段缺失的人胚胎干细胞, 细胞免疫荧光染色、qRT-PCR 结果均显示人胚胎干细胞早期神经诱导过程中的关键标志物 PAX6、SOX2 和 OTX2 的表达并未受 *FOXG1* 缺失的影响。**结论** 通过 2 个 gRNA 共转染可以快捷地诱导人胚胎干细胞 *FOXG1* 基因的大片段敲除。*FOXG1* 基因缺失并不影响人胚胎干细胞的早期神经诱导。

[关键词] CRISPR/Cas9 基因编辑; 叉头框蛋白 G1; 基因敲除; 人胚胎干细胞

[中图分类号] R 329.29 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2020)05-0513-07

Establishment of human embryonic stem cell line with forkhead box G1 gene knockout by CRISPR/Cas9

YUAN Yuan^{1,2}, ZHANG Guan-yu³, SUN Ping-xin³, ZHANG Yue-fan², LI Tie-jun^{1,2}, LI Wen-lin^{3*}

1. Department of Pharmacy, Graduate School, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012, Anhui, China
2. Department of Pharmacology, School of Pharmacy, Naval Medical University (Second Military Medical University), Shanghai 200433, China
3. Department of Cell Biology, College of Basic Medical Sciences, Naval Medical University (Second Military Medical University), Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To construct human embryonic stem cell (hESC) line with forkhead box G1 (*FOXG1*) gene knockout by clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR)/CRISPR-associated protein 9 (Cas9) gene editing technology, and to investigate the role of *FOXG1* gene in the early neural induction of hESCs. **Methods** Two guide RNAs (gRNAs) were transfected to induce *FOXG1* gene large fragment knockout in hESCs by CRISPR/Cas9 gene editing technology. *FOXG1* gene knockout hESCs were confirmed by monoclonal screening, sequencing and Western blotting analysis. The expression of the key markers including paired box 6 (PAX6), sex-determining region Y-box 2 (SOX2) and orthodenticle homeobox 2 (OTX2) was detected by immunofluorescence staining and qRT-PCR in the early process of neural induction before and after *FOXG1* gene knockout. **Results** hESCs with *FOXG1* gene large fragment knockout were successfully obtained by CRISPR/Cas9 gene editing technology. The results of immunofluorescence staining and qRT-PCR suggested that *FOXG1* deletion did not significantly influence the expression of PAX6, SOX2 and OTX2 during neural induction. **Conclusion** *FOXG1* gene large fragment knockout in hESCs can be quickly induced by a pair of gRNAs co-transfection. *FOXG1* deletion has no significant impacts on neural induction of hESCs.

[收稿日期] 2020-02-10 **[接受日期]** 2020-04-13

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81571094), 上海市科学技术委员会优秀学术带头人计划(17XD1404800). Supported by General Program of National Natural Science Foundation of China (81571094) and Project of Outstanding Academic Leaders of Science and Technology Commission of Shanghai Municipality (17XD1404800).

[作者简介] 袁媛, 硕士生. E-mail: yuanyuanchloe@163.com

*通信作者(Corresponding authors). Tel: 021-81871272, E-mail: Ltj204@163.com; Tel: 021-81870947, E-mail: liwenlin@smmu.edu.cn

[Key words] CRISPR/Cas9 gene editing; forkhead box protein G1; gene knockout; human embryonic stem cells

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2020, 41(5): 513-519]

成簇的规律间隔的短回文重复序列 (clustered regularly interspaced short palindromic repeat, CRISPR) 及其相关蛋白 9 (CRISPR-associated protein 9, Cas9) 介导的新一代基因编辑技术是近年来备受关注的高效且精准的基因编辑工具。CRISPR/Cas9 系统是一种原核生物的适应性免疫防御系统, 可以用来抵抗外来遗传物质的入侵, 比如噬菌体病毒感染等^[1]。当病毒首次入侵时, 细菌能够将病毒的遗传物质片段整合到自身遗传信息的 CRISPR 序列中, CRISPR 序列可转录成 CRISPR RNA (crRNA) 并能够与具有核酸内切酶活性的 Cas9 蛋白相结合; 类似于哺乳动物的二次免疫反应, 当与 crRNA 匹配的 DNA 片段再次出现时, Cas9 利用其内切酶活性剪切这些 DNA 片段, 防止病毒再次入侵^[2-3]。正是因为这种精确的靶向功能, 众多研究将 CRISPR/Cas9 应用于细胞的基因编辑^[1,4]。

人胚胎干细胞 (human embryonic stem cell, hESC) 是来自人类囊胚内细胞团的多能干细胞 (pluripotent stem cell, PSC), 具有分化为成年个体任何一种细胞的潜能。通过诱导 hESC 在体外的定向分化可以大量获得具有重要临床应用价值的功能细胞, 如心肌细胞和神经元。PSC 的体外分化过程通常忠实地模拟细胞的体内发育历程, 因此人 PSC 也是在体外模拟和研究人类细胞早期发育的重要细胞工具。通过 CRISPR/Cas9 技术对 hESC 特定基因进行编辑可以在体外揭示相关基因对 PSC 定向分化的影响及其功能。

叉头框 G1 (forkhead box G1, *FOXG1*) 是叉头框基因家族的转录因子。在目前研究的所有脊椎动物中, *FOXG1* 是神经板端脑区域中首先表达的转录因子之一, 它在前脑祖细胞中表达并持续到成年期。研究发现, 人类 *FOXG1* 基因突变会导致发生先天性神经退行性疾病 Rett 综合征^[5]。小鼠 *FOXG1* 基因敲除会导致脑部发育异常, 引起严重小头畸形^[6]。有文献报道, *FOXG1* 的缺失会抑制端脑祖细胞的增殖而促进其分化, 导致皮质神经元提前发生, 阻碍晚期皮质神经元的产生^[6-7]。本研究拟通过 CRISPR/Cas9 技术构建 *FOXG1* 基因缺失的

hESC, 并探究 *FOXG1* 基因在 hESC 早期神经诱导过程中的作用。

1 材料和方法

1.1 hESC 的培养 本实验采用由美国威斯康辛大学 J. Thomson 建立的 H1 系 hESC (代次 40~50), 用 E8 培养基培养于 2% 基质胶包被的细胞培养板。细胞每天换液, 待生长至 70%~80% 融合时用胰蛋白酶 (美国 Invitrogen 公司) 消化为单细胞, 按 1 : 10 传代。传代当天加入 5 $\mu\text{mol/L}$ 非肌肉肌球蛋白 II 型 ATP 酶抑制剂 blebbistatin [美国 Selleck 生物科技有限公司 (上海分公司)] 防止细胞凋亡, blebbistatin 于第 2 天换液后去除。

1.2 向导 RNA (guide RNA, gRNA) 的设计、载体构建及 hESC 的转染与克隆鉴定 利用美国麻省理工学院张峰实验室的在线工具 (<https://zlab.bio/guide-design-resources>) 设计了 2 条针对人 *FOXG1* 基因 (NM005249) 的 gRNA 序列 *FOXG1*-gRNA1 (5'-TCG CGT GGT GGT TGT CGT TC-3') 和 *FOXG1*-gRNA2 (5'-GTC CGC TTT AGC CCC GTC CA-3'), 并根据其实验室克隆策略将 gRNA 克隆到 pX459 载体 (美国 Addgene 公司)^[8]。

按照 3×10^5 / 孔的密度将 hESC 接种至 6 孔板, 第 2 天使用 FuGENE HD 转染试剂 (美国 Promega 公司) 将 pX459 *FOXG1*-gRNA1 和 pX459 *FOXG1*-gRNA2 质粒共转染 hESC。转染 24 h 后接种至基质胶包被的 10 cm 培养皿, 转染 48 h 开始使用嘌呤霉素 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 筛选 2~3 d。接着去除嘌呤霉素继续培养约 10 d, 挑单克隆至基质胶包被的 24 孔培养板, 再继续培养 1 周后按 1 : 2 比例接种至 2 块 24 孔培养板。接种 48 h 后, 用 50 mmol/L 的 NaOH 裂解其中一板细胞, 作为基因组鉴定的模板; 另一板细胞冻存, 待鉴定后挑取并扩增阳性克隆。*FOXG1* 基因的鉴定引物见表 1。hESC 克隆基因型初始鉴定使用引物 P1+ 和 P1- 组合, 基因组 PCR 采用 PrimerSTAR HS 高保真 PCR 酶结合 GC 缓冲液 [宝生物工程 (大连) 有限公司] 对目的条带进行扩增, 从中挑选出发生大片段敲除的单克隆, 并对克隆基因型进行测序验证; P2+、

P2-和P3-用于阳性克隆神经诱导后 *FOXG1* 基因表达的反转录聚合酶链反应 (reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR) 鉴定。

表1 用于hESC *FOXG1* 基因型鉴定的PCR引物序列

Tab 1 Primer sequences for genotyping *FOXG1* gene in hESCs by PCR

Primer	Sequence (5'-3')
P1+	GAG CCT GCG GTC CAA CTG CG
P1-	CCT TCT CCT TCT CGT CCG GC
P2+	CAA CCA CCA CGC GAG CCA CG
P2-	GGC GGC CGG TGG TGG CGG
P3-	TG CCC GGC TCG CCC TTG CCG CC

hESC: Human embryonic stem cell; *FOXG1*: Forkhead box G1; PCR: Polymerase chain reaction

1.3 hESC的神经诱导 本实验利用改进的双重Smad抑制^[9]进行hESC的神经诱导。神经诱导的基础培养基为DMEM/F12、1×N2和1×B27; 一组添加2 μmol/L的SB431542 (nodal/activing/Smad2/3信号通路抑制剂) [美国Selleck生物科技有限公司(上海分公司)]和1 μmol/L的DMH1 (骨形态发生蛋白受体抑制剂) [美国Selleck生物科技有限公司(上海分公司)], 此诱导条件记为SD; 另一组在SB431542和DMH1的基础上再添加0.1 μmol/L的LGK974 (豪猪酶抑制剂, 可以阻断WNT蛋白的分泌, 抑制因WNT自分泌导致的神经后端化) [美国Selleck生物科技有限公司(上海分公司)], 此诱导条件记为SDL。将hESC在上述2种诱导条件下连续培养7 d, 一部分细胞用TRIzol试剂裂解用于RNA的提取和qRT-PCR分析, 一部分细胞经多聚甲醛溶液固定进行细胞免疫荧光染色。

1.4 qRT-PCR分析 用PrimeScript反转录试剂盒[宝生物工程(大连)有限公司]将RNA反转录为cDNA, 使用SYBR Green预混试剂(美国Bio-Rad公司)和ABI7900定量PCR仪进行qRT-PCR, 引物序列见表2。使用相对Ct值分析法计算神经外胚层核心转录因子配对框基因6 (paired box 6, *PAX6*)、神经干细胞核心转录因子性别决定区Y框蛋白2 (sex-determining region Y-box 2, *SOX2*)、前脑特异的转录因子正小齿同源物2 (orthodenticle homeobox 2, *OTX2*) mRNA的相对

表达水平, 以 *GAPDH* 为内参照。实验重复3次, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 形式表示。

表2 qRT-PCR引物序列

Tab 2 Primer sequences for qRT-PCR

Primer	Sequence (5'-3')
<i>PAX6</i> +	TCT TTG CTT GGG AAA TCC G
<i>PAX6</i> -	CTG CCC GTT CAA CAT CCT TAG
<i>SOX2</i> +	GCC CTG CAG TAC AAC TCC AT
<i>SOX2</i> -	TGG AGT GGG AGG AAG AGG TA
<i>OTX2</i> +	CTG TTT GCC AAG ACC CGG TA
<i>OTX2</i> -	TGG CCA CTT GTT CCA CTC TC
<i>GAPDH</i> +	GAA GGT GAA GGT CGG AGT C
<i>GAPDH</i> -	GAA GAT GGT GAT GGG ATT TC

qRT-PCR: Quantitative real-time polymerase chain reaction; *PAX6*: Paired box 6; *SOX2*: Sex-determining region Y-box 2; *OTX2*: Orthodenticle homeobox 2; *GAPDH*: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

1.5 细胞免疫荧光染色 细胞经4%多聚甲醛溶液室温固定10 min, 用PBST (含0.2% Triton X-100的PBS)清洗3次, 每次5 min; 加入含有5%驴血清的PBST封闭液室温破膜封闭30 min, 加一抗4 °C过夜孵育; 然后用PBST清洗3次, 加入Alexa Fluor555和Alexa Fluor488标记的相应二抗 (稀释1 000倍, 美国Invitrogen公司) 室温孵育1 h, DAPI复染细胞核后使用荧光显微镜 (型号: ECLIPSE TE2000-U, 日本Nikon公司) 进行拍摄。使用的一抗包括兔抗*FOXG1*多克隆抗体 (稀释500倍, 英国Abcam公司)、兔抗*PAX6*多克隆抗体 (稀释400倍, 美国Proteintech公司)、小鼠抗*SOX2*单克隆抗体 (稀释200倍, 美国Santa Cruz公司)、小鼠抗八聚体结合转录因子4 (octamer-binding transcription factor 4, *OCT4*) 单克隆抗体 (稀释200倍, 美国Santa Cruz公司)。

1.6 细胞总蛋白的提取及蛋白质印迹分析 将细胞用含0.5%苯甲基磺酰氟[生工生物工程(上海)有限公司]的RIPA蛋白裂解液(上海碧云天生物技术有限公司)裂解; 13 800×g离心5 min后取蛋白上清, 加入1/4体积的蛋白上样缓冲液, 100 °C水浴中加热10 min后上样到SDS-PAGE胶 [雅酶生物科技(上海)有限公司]中, 80 V恒压电泳100 min, 然后将蛋白质转移到硝酸纤维素薄膜(美国Millipore公司)上。将膜用含5%脱

脂牛奶的TBST(含0.1% Tween-20的Tris-HCl缓冲盐溶液)室温封闭120 min。加一抗4℃过夜孵育;然后用TBST洗3次后加入相应二抗(稀释20 000倍)室温孵育1 h, TBST洗3次后在膜上完全覆盖化学发光液(美国ThermoFisher公司),立即使用Amersham Imager 680化学发光成像仪(英国GE公司)拍摄。使用的一抗包括兔抗FOXG1单克隆抗体(稀释5 000倍,英国Abcam公司)、小鼠抗 β -actin单克隆抗体(稀释1 000倍,美国Proteintech公司),使用的二抗包括HRP标记的山羊抗兔IgG、山羊抗小鼠IgG(美国Jackson ImmunoResearch公司)。

2 结果

2.1 FOXG1基因gRNA的设计和载体构建 FOXG1基因不含内含子,mRNA长度为3 491 bp,其中494~1 963 bp为FOXG1基因蛋白编码序列(coding sequence, CDS),本实验设计的FOXG1-gRNA1(580~599 bp)和FOXG1-gRNA2(840~859 bp)均位于蛋白编码区,Cas9在2条gRNA的编辑位点同时发生编辑将导致基因组产生大约260 bp的片段敲除。FOXG1-gRNA1和FOXG1-gRNA2及基因型鉴定引物在FOXG1基因序列上的对应位置如图1所示。

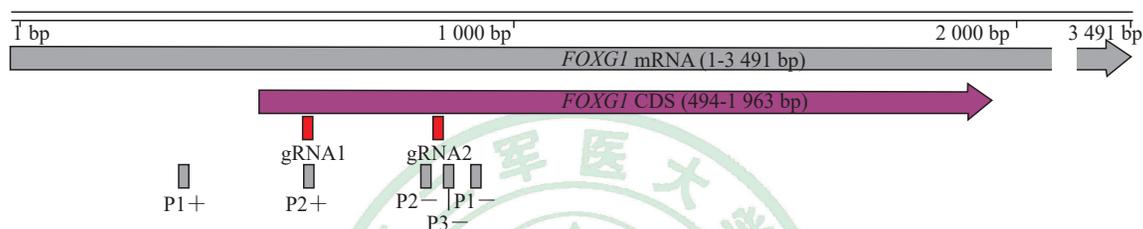


图1 gRNA及基因型鉴定引物在FOXG1 mRNA序列中的位置示意图

Fig 1 Schematic illustration of gRNAs and genotyping primers in the sequence of FOXG1 mRNA

gRNA: Guide RNA; FOXG1: Forkhead box G1; CDS: Coding sequence

2.2 利用CRISPR/Cas9技术建立FOXG1基因大片段敲除的hESC 共挑取21个单克隆进行基因型PCR鉴定。使用的PCR引物P1+和P1-可以扩增涵盖2条gRNA所在区域的FOXG1基因组片段,未发生大片段敲除的hESC的基因组PCR产物大小为600 bp,而FOXG1的2个等位基因均发生了大片段敲除的hESC的基因组PCR产物大小约340 bp。PCR结果显示克隆9(C9)的基因组PCR产物为340 bp,可能FOXG1的2个等位基因均发生大片段敲除;6个克隆(C4、C10、C11、C13、C15、C20)的基因组PCR产物为600 bp,提示这些克隆可能仅发生单gRNA编辑或未发生编辑;12个克隆(C1、C3、C5、C6、C7、C8、C12、C16、C17、C18、C19、C21)基因组PCR产物同时含有340 bp和600 bp的条带,提示这些克隆可能仅在1条染色体发生了大片段敲除,或克隆不纯;1个克隆(C2)的基因组PCR产物小于340 bp,提示该克隆的1条染色体发生了更大片段的敲除(图2A)。克隆C9的PCR产物测序结果表明存在2种基因型,基因型1缺失了266 bp,导致FOXG1基因在ATG后第31个密码子提前终止;基因型2缺失了260 bp,导致FOXG1基因在ATG

后第33个密码子提前终止(图2B)。

2.3 FOXG1基因缺失不影响hESC的多能性和早期神经诱导 在体外,C9细胞仍然维持了hESC正常的克隆样生长,细胞免疫荧光染色显示C9细胞仍然表达人PSC的标志分子OCT4和SOX2(图3A)。接下来我们利用C9细胞研究FOXG1敲除后对人PSC体外神经诱导的影响。我们采用2种神经诱导条件(SD条件和SDL条件)诱导C9细胞和对照hESC(H1细胞,pX459空载体转染H1后挑取的对照克隆)的神经分化。将C9细胞和对照H1细胞在SD和SDL条件下诱导7 d后,细胞免疫荧光染色表明诱导前的H1细胞不表达FOXG1,H1细胞诱导后有明显FOXG1的表达;C9细胞诱导后无FOXG1的表达,再次验证FOXG1基因被成功敲除(图3A、3B)。但是PAX6和SOX2的表达在C9细胞与对照H1细胞间无明显差异(图3A、3B)。蛋白质印迹分析结果证明FOXG1在C9细胞中被敲除(图3C)。

qRT-PCR分析结果(图4)证明FOXG1敲除并未显著影响神经诱导后PAX6、SOX2和OTX2 mRNA的表达,表明FOXG1基因敲除可能并不影响人PSC的神经发生。

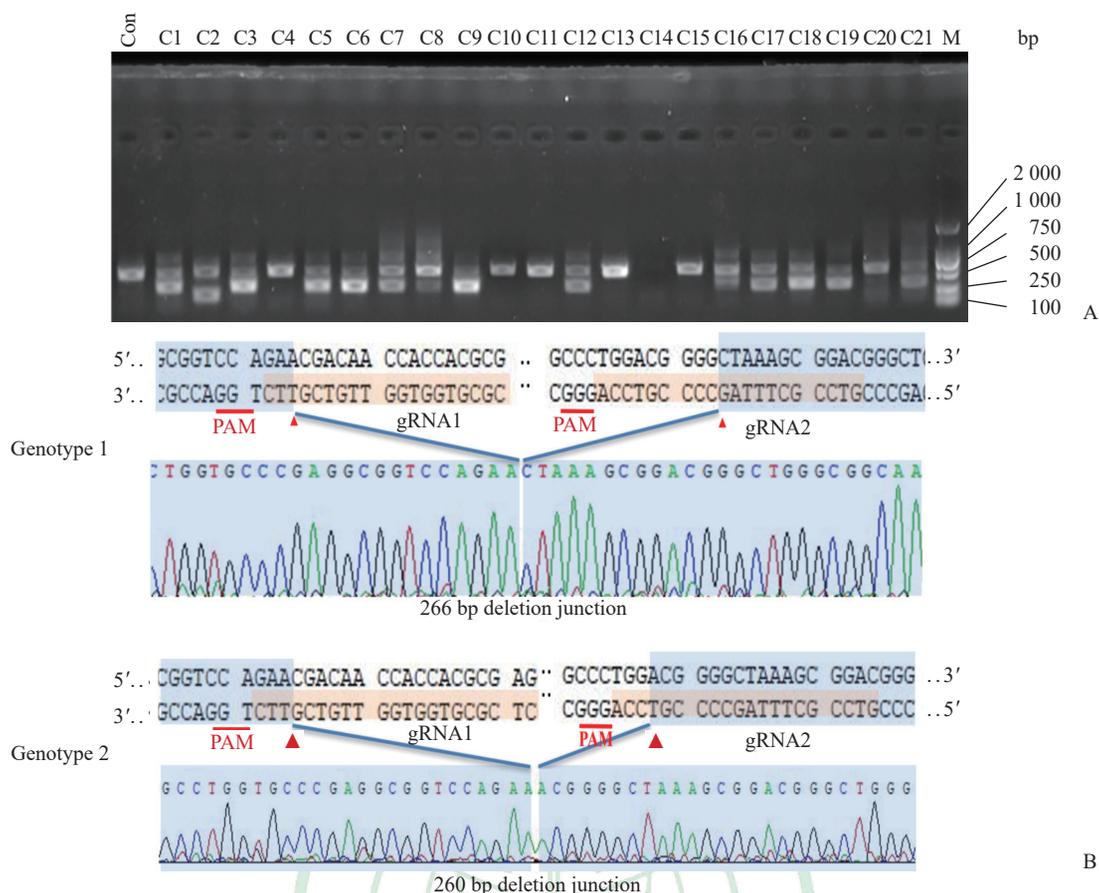


图 2 用 CRISPR/Cas9 技术建立 *FOXG1* 基因大片段敲除的 hESC

Fig 2 Establishment of hESCs with *FOXG1* gene large fragment knockout by CRISPR/Cas9

A: Twenty-one colonies (C1-C21) of hESCs were genotyped by PCR after pX459 *FOXG1*-gRNA1 and pX459 *FOXG1*-gRNA2 co-transfection and subsequential puromycin selection; B: The genotypes of clone 9 (C9) were further confirmed by sequencing. CRISPR: Clustered regularly interspaced short palindromic repeat; Cas9: CRISPR-associated protein 9; *FOXG1*: Forkhead box G1; hESC: Human embryonic stem cell; Con: Control (hESCs without *FOXG1* gene large fragment knockout); M: Marker; gRNA: Guide RNA; PAM: Protospacer adjacent motif

进一步使用 3 对引物对诱导后细胞 *FOXG1* 基因表达进行了 RT-PCR 检测, 引物位置见图 1。引物组合 P1+/P3- 在 gRNA 敲除片段的两侧, RT-PCR 结果显示诱导前的 C9 细胞和对照 hESC (H1 细胞) 中均不表达 *FOXG1*; 而神经诱导后均可以检测到 *FOXG1* 的表达, H1 细胞的 PCR 产物为 550 bp, 但 C9 细胞 *FOXG1* 的扩增片段显著截短, PCR 产物大小为 240 bp。引物 P2+ 和 P2- 均位于 2 条 gRNA 的编辑区域内, 使用引物组合 P1+/P2- 和 P2+/P3- 进行 RT-PCR, 仅能在神经诱导后的 H1 细胞中检测到 *FOXG1* 的表达条带, 大小分别为 500 bp 和 300 bp (图 5)。结果进一步证明 C9 克隆发生了 *FOXG1* 基因的大片段剪切编辑。

3 讨论

利用 CRISPR/Cas9 系统进行基因编辑时, 既可

以采用单个 gRNA 进行编辑, 也可以用多个 gRNA 进行片段敲除。我们的实践表明, 使用多个 gRNA 共转染进行大片段敲除编辑可以更方便、快速地建立基因敲除的人 hESC 系。使用单个 gRNA 进行基因编辑时, 被编辑的碱基数通常较少, 无法通过 PCR 扩增条带的大小筛选发生编辑的克隆; 需要对 PCR 产物变性、退火后, 再经 T7E1 内切酶识别并切割错配的杂合 DNA 双链来鉴定是否发生基因编辑; 该方法也无法确定 2 个等位基因是否均发生编辑, 需要对大量 T7E1 切割阳性的克隆进行测序验证^[8]。而使用 2 个 gRNA 共转染进行基因编辑, 因可诱导靶位点的大片段序列敲除, 基因编辑情况可以方便地通过 PCR 产物大小进行判断, 可以直接筛选出等位基因同时被编辑的克隆。通过该方法, 我们可以高度可控地在 4 周内获得特定基因敲除的人 hESC 系。

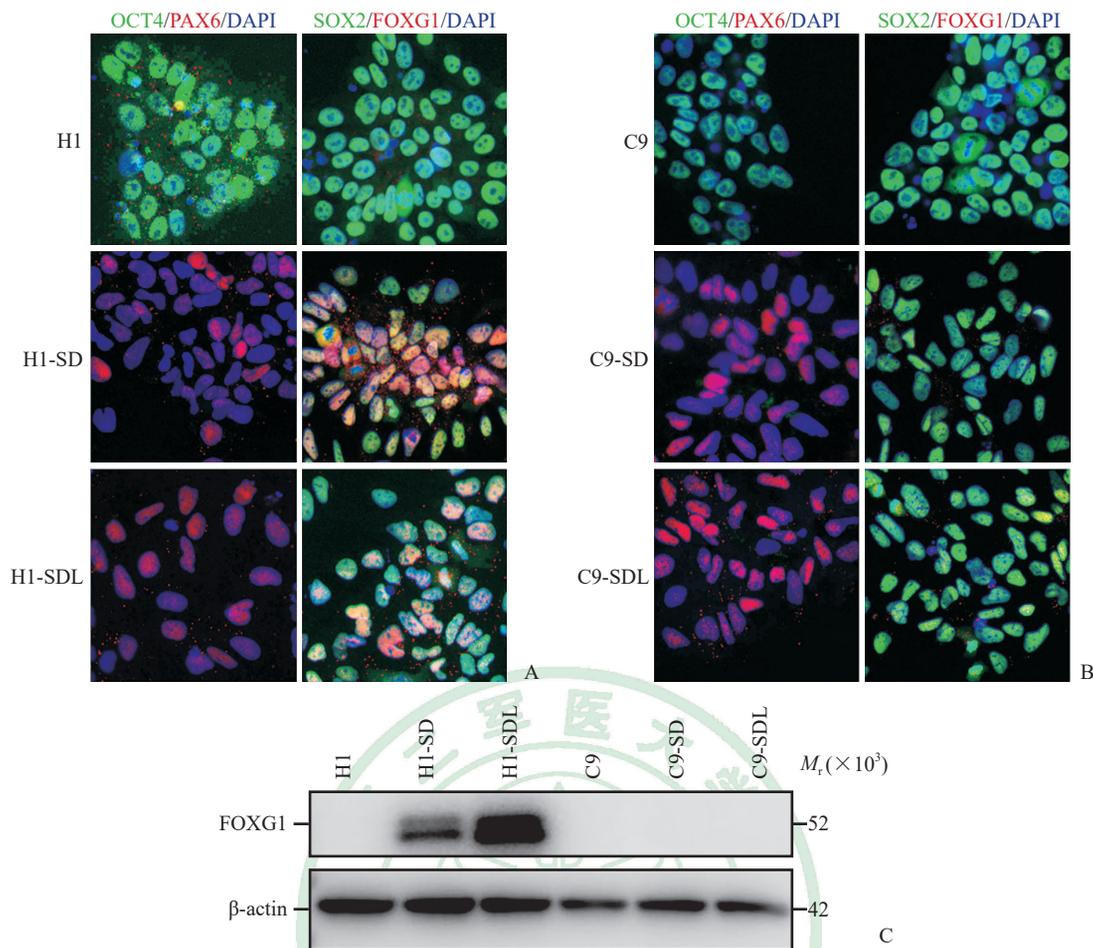


图3 C9细胞和对照hESC(H1细胞)神经诱导前后相关标志物的细胞免疫荧光染色及蛋白质印迹分析结果

Fig 3 Immunofluorescence staining and Western blotting analysis of related markers in C9 cells and control hESCs (H1 cells) before and after neural induction

A: Expression of OCT4, PAX6, SOX2 and FOXG1 was analyzed by immunofluorescence staining in H1 cells before and after neural induction; B: Expression of OCT4, PAX6, SOX2 and FOXG1 was analyzed by immunofluorescence staining in C9 cells before and after neural induction; C: Expression of FOXG1 protein was analyzed by Western blotting in H1 cells and C9 cells after neural induction. C9: Clone 9; hESC: Human embryonic stem cell; OCT4: Octamer-binding transcription factor 4; SOX2: Sex-determining region Y-box 2; PAX6: Paired box 6; DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole; FOXG1: Forkhead box G1; SD: SB431542+DMH1; SDL: SB431542+DMH1+LGK974. Original magnification: $\times 200$ (A, B)

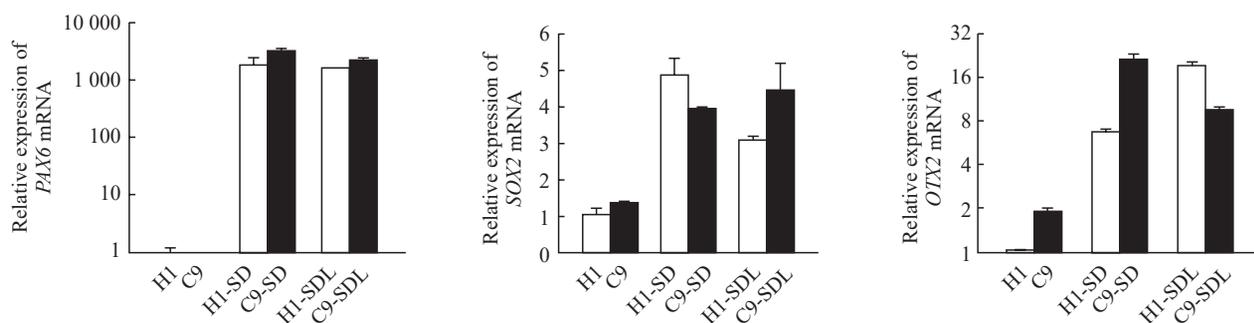


图4 C9细胞和对照hESC(H1细胞)神经诱导前后相关标志物的qRT-PCR分析

Fig 4 qRT-PCR analysis of related markers in C9 cells and control hESCs (H1 cells) before and after neural induction. C9: Clone 9; hESC: Human embryonic stem cell; qRT-PCR: Quantitative real-time polymerase chain reaction; PAX6: Paired box 6; SOX2: Sex-determining region Y-box 2; OTX2: Orthodenticle homeobox 2; SD: SB431542+DMH1; SDL: SB431542+DMH1+LGK974. $n=3, \bar{x} \pm s$

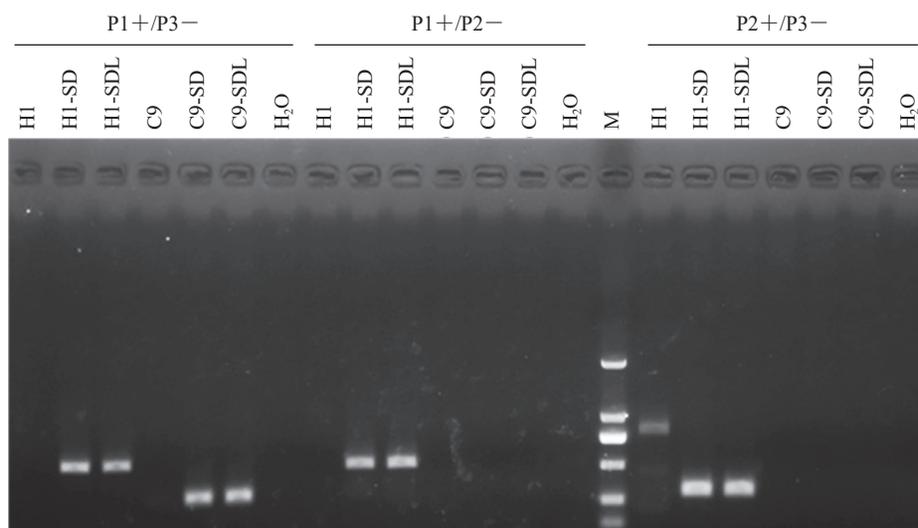


图5 C9细胞和对照hESC(H1细胞)神经诱导前后FOXG1基因表达的RT-PCR分析

Fig 5 RT-PCR analysis of FOXG1 gene expression in C9 cells and control hESCs (H1 cells) before and after neural induction

C9: Clone 9; hESC: Human embryonic stem cell; FOXG1: Forkhead box G1; RT-PCR: Reverse transcription polymerase chain reaction; M: Marker; SD: SB431542+DMH1; SDL: SB431542+DMH1+LGK974

既往研究发现FOXG1基因敲除小鼠出生后即死亡,大脑半球发育异常、体积较野生型小鼠显著减小,尤其是腹侧前脑几乎缺失^[6]。本研究借助人PSC研究FOXG1基因在体外神经诱导和分化中的作用,利用改进的双重Smad抑制诱导人PSC的神经分化,该方法可以在7d内高度均一地将人PSC诱导分化为类似于发育过程中的神经板细胞,但是结果显示FOXG1基因敲除并没有显著影响SOX2、PAX6和CTX2等基因的表达。SOX2既是PSC的标志分子,也是早期神经发生的关键基因;转录因子PAX6是人神经外胚层最早表达的核心分子^[10]; OTX2是前中脑的标志分子。发生这种体外和体内基因缺失后表型不吻合的可能原因是体外二维的神经诱导环境无法忠实地模拟体内三维的组织发生过程,因此有必要利用PSC的神经类器官分化体系进一步研究FOXG1对三维条件下神经诱导的影响。此外,FOXG1基因敲除是否会影响后期神经板细胞在神经发育前后轴和背腹轴上的区域化及神经元的分化有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] JINEK M, CHYLINSKI K, FONFARA I, HAUER M, DOUDNA J A, CHARPENTIER E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity[J]. Science, 2012, 337: 816-821.
- [2] GARNEAU J E, DUPUIS M È, VILLION M, ROMERO D A, BARRANGOU R, BOYAVAL P, et al. The CRISPR/

- Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA[J]. Nature, 2010, 468: 67-71.
- [3] BARRANGOU R, FREMAUX C, DEVEAU H, RICHARDS M, BOYAVAL P, MOINEAU S, et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes[J]. Science, 2007, 315: 1709-1712.
- [4] CONG L, RAN F A, COX D, LIN S, BARRETTO R, HABIB N, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems[J]. Science, 2013, 339: 819-823.
- [5] ARIANI F, HAYEK G, RONDINELLA D, ARTUSO R, MENCARELLI M A, SPANHOL-ROSSETO A, et al. FOXG1 is responsible for the congenital variant of Rett syndrome[J]. Am J Hum Genet, 2008, 83: 89-93.
- [6] XUAN S, BAPTISTA C A, BALAS G, TAO W, SOARES V C, LAI E. Winged helix transcription factor BF-1 is essential for the development of the cerebral hemispheres[J]. Neuron, 1995, 14: 1141-1152.
- [7] HANASHIMA C, LI S C, SHEN L, LAI E, FISHELL G. Foxg1 suppresses early cortical cell fate[J]. Science, 2004, 303: 56-59.
- [8] RAN F A, HSU P D, WRIGHT J, AGARWALA V, SCOTT D A, ZHANG F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system[J]. Nat Protoc, 2013, 8: 2281-2308.
- [9] CHAMBERS S M, FASANO C A, PAPAPETROU E P, TOMISHIMA M, SADELAIN M, STUDER L. Highly efficient neural conversion of human ES and iPSC cells by dual inhibition of SMAD signaling[J]. Nat Biotechnol, 2009, 27: 275-280.
- [10] ZHANG X Q, HUANG C T, CHEN J, PANKRATZ M T, XI J J, LI J, et al. Pax6 is a human neuroectoderm cell fate determinant[J]. Cell Stem Cell, 2010, 7: 90-100.

[本文编辑] 商素芳