

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2017.12.004

· 研究快报 ·

## 定向编辑 *CTLA4* 基因的向导 RNA 体外合成体系的构建及其编辑效率

任飞飞<sup>1,2</sup>, 李峰<sup>1</sup>, 李砺锋<sup>1</sup>, 赵启泰<sup>1</sup>, 黄岚<sup>1</sup>, 张毅<sup>1,2,3</sup> (1. 郑州大学第一附属医院生物细胞治疗中心, 河南 郑州 450052; 2. 郑州大学生命科学学院, 河南 郑州 450052; 3. 郑州大学第一附属医院肿瘤科, 河南 郑州 450052)

**[摘要]** **目的:** 基于 CRISPR/Cas9 基因编辑技术原理体外合成定向编辑细胞毒性 T 淋巴细胞相关抗原 4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4, *CTLA4*) 基因的向导 RNA (small guide RNA, sgRNA)。 **方法:** (1) 使用 Crispr 网站对 *CTLA4* 位点的 sgRNA 进行预测并设计出 3 个 sgRNA (sgRNA1、sgRNA2、sgRNA3), 构建 sgRNA 重组质粒, 将其转染 293T 细胞, 48 h 后提取基因组 DNA, 利用 T7EN1 核酸内切酶筛选活性较高的 sgRNA 序列; (2) 以筛选到的 sgRNA 重组质粒为模板, 设计引物并用 PCR 扩增体外合成 sgRNA 的 DNA 模板片段, 进一步优化体外转录条件, 转录出 sgRNA, 并利用 Cas9 核酸酶体外检测转录纯化 sgRNA 的切割效率; (3) 将 sgRNA 与转录得到的 Cas9 mRNA 电转入肺癌患者 CD3<sup>+</sup>T 细胞, 实现靶基因敲除。 **结果:** T7EN1 核酸内切酶实验证实了 sgRNA2 序列靶向敲除效率最高, 效率达到 66%; 优化体外合成体系后, 转录得到的 *CTLA4* sgRNA2 产量高, 具有较高的活性, 在靶点上成功切开了 DNA 双链, Cas9 核酸酶检测出其切割效率达到了 65%; 最终可在肺癌患者 CD3<sup>+</sup>T 细胞中有效敲除 *CTLA4* 基因, *CTLA4* 分子的表达从 46% 降低到 22%, T7E1 核酸内切酶实验进一步证实了其编辑效率为 56%。 **结论:** 体外成功构建了具有较高编辑效率的定向编辑 *CTLA4* 基因的 sgRNA, 为后续针对该基因制定相应的免疫治疗策略奠定了基础。

**[关键词]** 肺癌; 免疫检查点; *CTLA4*; CRISPR/Cas9; 向导 RNA; 体外转录

**[中图分类号]** R734.2; Q784; **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2017)012-1362-08

## Optimization of screening and *in vitro* construction of small guide RNA targeting *CTLA4* gene

REN Feifei<sup>1,2</sup>, LI Feng<sup>1</sup>, LI Lifeng<sup>1</sup>, ZHAO Qitai<sup>1</sup>, HUANG Lan<sup>1</sup>, ZHANG Yi<sup>1,2,3</sup> (1. Biotherapy Center, First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan, China; 2. School of Life Science, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, Henan, China; 3. Department of Oncology, First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the *in vitro* synthesis of sgRNA that specific editing *CTLA4* (cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4) gene based on the principle of CRISPR/CAS9 gene editing technology. **Methods:** Firstly, we predicted sgRNAs for *CTLA4* locus by CRISPR website, and three sgRNAs (sgRNA1, sgRNA2, sgRNA3) were designed. The recombinant sgRNA plasmids were constructed and transfected into 293T cells. After 48h, the genomic DNA of 293T cells was extracted, and the sgRNA sequence with high activity was screened with T7EN1 endonuclease. Subsequently, the screened sgRNA recombinant plasmid was selected as template to design the premier and further amplify the sgRNA core fragment using PCR technology; and then it was transcribed into sgRNA *in vitro* after optimizing the transcription conditions. Moreover, the cutting efficiency of purified sgRNA was assessed *in vitro* by Cas9 nuclease. And finally the sgRNA and the transcribed *Cas9* mRNA were electroporated into CD3<sup>+</sup> T cell of the lung cancer patients to knockout the target gene. **Results:** The T7EN1 endonuclease experi-

**[基金项目]** 国家重点研发计划重点专项资助(No. 2016YFC1303501); 河南省医学科技攻关计划项目(No. 201501004); 河南省重大科技专项项目(No. 1611003101000); 郑州大学第一附属医院-中国科学院大连化学物理研究所合作项目。 Project supported by the Research Grant from the National Key Research and Development Program of China (No. 2016YFC1303501), the Medical Science and Technique Foundation from Ministry of Public Health of Henan Province (No. 201501004), the Major Science and Technology Projects of Henan Province (No. 1611003101000), and the Cooperative Project of the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University and Dalian Institute of Chemical Physics of Chinese Academy of Sciences

**[作者简介]** 任飞飞(1986-), 男, 硕士, 主要从事肿瘤免疫相关研究, E-mail: feifeiren312@163.com

**[通信作者]** 张毅(ZHANG Yi, corresponding author), 博士, 教授, 主任医师, 博士研究生导师, 主要从事肿瘤免疫相关的基础与临床研究, E-mail: yizhang@zzu.edu.cn

**[优先出版]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20171215.1757.006.html>

ment verified that the knockout rate of sgRNA2 was the maximum with an efficiency up to 66%; after optimization of in vitro synthesis system, the activity and the yield of obtained *CTLA4* sgRNA2 were high; it successfully cut the target double-stranded DNA at the designed site, and Cas9 nuclease detected the cutting efficiency of *CTLA4* sgRNA2 reached 65%. Finally the *CTLA4* gene can be effectively knocked out in CD3<sup>+</sup> T cell of the lung cancer patients, and the amount of *CTLA4* expression decreased from 46% to 22%, the T7E1 endonuclease experiment also verified that the editing efficiency of sgRNA2 was 56%. **Conclusion:** A sgRNA with high editing efficiency targeting *CTLA4* locus was obtained, which lays a foundation for further establish corresponding immunotherapy strategy targeting *CTLA4* gene.

**[Key words]** lung cancer; immune checkpoint; *CTLA4*; CRISPR/Cas9; sgRNA; *in vitro* transcription

[Chin J Cancer Biother, 2017, 24(12): 1362-1369. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2017.12.004]

免疫检查点分子(immune checkpoint)在调节 T 细胞免疫反应中发挥了重要作用,其中的典型代表是细胞毒性 T 淋巴细胞相关抗原 4(cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4, CTLA4)。CTLA4 又名 CD152,定位于 2 号染色体长臂 33 带(2q33),是一种穿膜糖蛋白分子,主要在活化 T 细胞表面表达<sup>[1]</sup>。CTLA-4 作为一种共抑制分子,活化后能够抑制 T 细胞功能。在肿瘤患者中,利用抗体阻断 CTLA4 信号通路后,能够增强肿瘤特异 T 细胞功能、促进机体抗肿瘤免疫应答、改善治疗效果。然而,CTLA4 抗体阻断治疗也会活化非肿瘤特异性细胞,导致严重副作用。因而,利用基因编辑方法靶向抑制或敲除肿瘤特异性 T 细胞中 CTLA4 分子将能够提高肿瘤治疗的有效性与安全性。

CRISPR/Cas9(CRISPR-associated 9)是一种由向导 RNA(guide RNA, gRNA),又称为小向导 RNA(small guide RNA, sgRNA),指导 Cas 核酸酶 9 对靶向基因进行特定 DNA 修饰的技术,其实际上就是一种基因编辑器,可以用来删除、添加、激活或抑制其他生物体的目标基因<sup>[2-4]</sup>。CRISPR/Cas9 基因编辑技术自 2013 年建立后就迅速发展了起来,并给基础生物学研究、临床医学研究等提供了更为方便和快捷的分子生物学工具。与之前的重组锌指核酸酶(zinc finger nuclease, ZFN)和转录激活因子样效应蛋白核酸酶(transcription activator-like effector nuclease, TALEN)等技术相比较,该技术具有操作简单、效率高、成本低等优点<sup>[5-6]</sup>。

近年来,CRISPR/Cas9 系统的出现,使在 T 细胞中的基因定向编辑成为了可能,但是针对抗癌热门靶点 *CTLA4* 基因编辑的报道相对较少。本研究拟采用 CRISPR/Cas9 系统,在体外合成定向编辑 *CTLA4* 基因的 sgRNA,并且在原代 T 细胞中敲除该基因,为进一步研究抑制 *CTLA4* 对 T 细胞免疫的影响奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

1.1.1 细胞株、质粒及主要试剂 人胚肾 293T 细胞购自中国科学院细胞所。胎牛血清、DMEM 高糖培养基购自 GIBCO 公司, PX458 载体(#48138)购自美国 Addgene 公司, T7-Cas9 载体购自上海吉玛制药技术有限公司,限制性内切酶 *Bbs*I、限制性内切酶 *Not*I、T7 核酸内切酶 1(T7EN1)、Cas9 核酸酶、HiScribe T7 ARCA mRNA Kit 均购自 NEB 公司,质粒提取试剂盒、基因组 DNA 提取试剂盒、蛋白酶 K 购自天根生化科技(北京)有限公司, DNA 纯化试剂盒、T4 DNA Ligase、TaqDNA 聚合酶、DH5 $\alpha$  感受态细胞、pMD<sup>TM</sup>19-T Vector、反转录试剂盒均购自 TaKaRa 公司, Lipofectamine 3000 转染试剂、pfu DNA 聚合酶、CD3 分离试剂盒、CD3 单抗、CD28 单抗均购自 Thermo Fisher 公司、T7 体外转录试剂盒购自南京诺唯赞生物科技有限公司, sgRNA 纯化试剂盒购自百奥迈科生物技术有限公司,酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)混合液购自北京索莱宝科技有限公司,淋巴细胞分离液购自天津灏洋生物制品公司,重组人 IL-2 购自北京双鹭药业股份有限公司,电转染试剂购自 Lonza 公司。

1.1.2 靶位点 sgRNA 的设计 使用在线工具(<http://crispr.mit.edu/>)设计靶向人 *CTLA4* 的 sgRNA。编码 sgRNA 的 DNA 序列由上海生工以引物形式合成(详细序列见表 1)。

### 1.2 CTLA4-sgRNA 重组质粒的构建

将设计好的 sgRNA 上下游引物(表 1)退火形成双链(10  $\mu$ l 反应体系: 10  $\mu$ mol/L 的上下游引物各 1  $\mu$ l+8  $\mu$ l 去离子水,混匀后放入沸腾的水中,待沸水自然冷却至室温)。用 *Bbs* I 酶线性化 pX458 质粒并使用 DNA 纯化试剂盒对酶切产物进行纯化。利用 T4 连接酶将其与退火好的 sgRNA 上下游引物进行连接(连接体系包括 1  $\mu$ l 退火产物、50 ng 载体线性化产物、1  $\mu$ l T4 Ligation buffer、1  $\mu$ l T4 DNA 连接酶,用灭菌水补充至 10  $\mu$ l), 16  $^{\circ}$ C 孵育过夜。转化 DH5 $\alpha$  感受态,待长出单克隆后,挑取单克隆至含有 LB 培养基

和适量浓度的抗生素的 1.5 ml 或 2 ml 的离心管中。250 r/min 水平摇床培养活化菌种 2~3 h。活化后取 1  $\mu$ l 菌液用 PX458checkF 上游引物(详细序列见表 1)及各 sgRNA 的下游引物进行菌液 PCR 鉴定。对阳性克隆进行 37  $^{\circ}$ C 摇床过夜扩大培养并抽提质粒送测序, 测序由上海生工生物工程有限公司完成。构建的重组载体分别命名为 CTLA4- sgRNA1、CTLA4- sgRNA2、CTLA4- sgRNA3。

表 1 sgRNA 序列及其他引物序列

Tab. 1 Sequences of sgRNA oligos and other primers

Primer name	Sequences(5'-3')
CTLA4sgRNA1F	CACCGCCGGGTGACAGTGCTTCGGC
CTLA4sgRNA1R	AAACGCCGAAGCACTGTCACCCGGC
CTLA4sgRNA2F	CACCGTGCGGCAACCTACATGATG
CTLA4sgRNA2R	AAACCATCATGTAGGTTGCCGCAC
CTLA4sgRNA3F	CACCGTACCCACCGCCATACTACC
CTLA4sgRNA3R	AAACGGTAGTATGGCGGTGGGTAC
pX458checkF	CCATGATTCCTTCATATTTGC
CTLA4check1F	CGTGGGGATGAAGCTAGAAGG
CTLA4check1R	GTTAGCACTCCAGAGCGAGAG
CTLA4g2vitroF	TAATACGACTCACTATAGGGTGCGGC AACCTACATGATGGTTTTAGAGCTAG AAATAGC
CTLA4g2vitroR	AAAAGCACCGACTCGGTGCC

### 1.3 293T 细胞培养和 CTLA4-sgRNA 重组载体转染

293T 细胞培养条件: 含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基, 5% CO<sub>2</sub>、37  $^{\circ}$ C 恒温培养箱培养。将处于对数期生长的细胞接种于 24 孔板, 接种量以转染时细胞汇合度达到 90% 为宜, 培养 24 h 后将构建好的 3 个 CTLA4-sgRNA 重组载体分别转染入 293T 细胞。质粒用量和转染方法按照 lip3000 说明书进行。由于 pX458 质粒上含有 EGFP 标签, 成功转染进目的细胞的质粒在荧光显微镜下观察能够看到绿色荧光。绿色荧光蛋白表达量的高低代表了质粒的转染效率。

### 1.4 敲除效率的检测

转染 48 h 后, 将各组细胞消化处理, 用磷酸盐缓冲液洗涤 3 次, 提取基因组 DNA, 基因组 DNA 提取方法按照说明书进行。使用上游引物 CTLA4check1F 和下游引物 CTLA4check1R(详细序列见表 1)以及 Taq DNA 聚合酶对其进行扩增, 并使用 DNA 纯化试剂盒对 PCR 产物进行纯化。将纯化产物各取 200 ng 进行变性、退火处理(95  $^{\circ}$ C 5 min, 95  $^{\circ}$ C 至 85  $^{\circ}$ C 按 2  $^{\circ}$ C/s 梯度程序降温至 85  $^{\circ}$ C, 85  $^{\circ}$ C 至 25  $^{\circ}$ C 按 0.1  $^{\circ}$ C/s 梯度程序降温至 25  $^{\circ}$ C), 然后使用 T7EN1 酶切 15 min, 并用 2% 的琼脂糖凝胶电泳检测。若 CRISPR/

Cas9 对靶点造成了突变, 用 T7EN1 酶切处理, 琼脂糖凝胶电泳结果会出现除 PCR 产物带之外的条带, 并且通过 photoshop 软件进行灰度分析可以进一步比较各个 sgRNA 的剪切效率。

### 1.5 TA 克隆鉴定敲除序列以及体外转录出的 sgRNA 序列

按照 1.5 方法得到的 PCR 纯化产物(Taq 酶扩增, 产物已经加 A 处理)与 pMD<sup>TM</sup>19-T Vector 载体按照摩尔比 5:1 进行连接。对于体外转录出的 sgRNA, 使用反转录试剂盒得到 cDNA, 再以 cDNA 为模板, 使用体外转录引物 CTLA4vitroF 和 CTLA4vitroR(详细序列见表 1)以及 Taq 酶对其进行扩增, PCR 产物纯化后同样以摩尔比 5:1 与 pMD<sup>TM</sup>19-T Vector 进行连接。上述连接产物转化 DH5 $\alpha$  感受态, 挑取单克隆用 M13 通用引物进行菌液 PCR 鉴定。对阳性克隆进行 37  $^{\circ}$ C 摇床过夜培养并抽提质粒送测序, 测序由上海生工生物工程有限公司完成。

### 1.6 体外转录 sgRNA 及其验证

1.6.1 体外转录 sgRNA 使用 CTLA4vitroF, CTLA4vitroR 引物, 以构建好的 CTLA4-sgRNA 重组载体质粒为模板, 利用 pfu DNA 聚合酶进行 PCR 扩增。RCR 反应体系为模板 DNA 200 ng, 上下游引物各 2  $\mu$ l, pfu 缓冲液 5  $\mu$ l, pfu DNA 聚合酶 1  $\mu$ l, dNTP Mix 5  $\mu$ l, ddH<sub>2</sub>O 补充至 50  $\mu$ l。PCR 产物纯化后即得到 sgRNA 体外转录的模板, 利用 T7 体外转录试剂盒转录得到 sgRNA。转录体系为 10 $\times$ 反应缓冲液 2  $\mu$ l、ATP 2  $\mu$ l、GTP 2  $\mu$ l、UTP 2  $\mu$ l、CTP 2  $\mu$ l、T7 RNA 聚合酶混合液 2  $\mu$ l、模板 DNA 500 ng, 去核酸酶水补足至 20  $\mu$ l, 37  $^{\circ}$ C 孵育过夜; 然后加入 DNase I 1  $\mu$ l, 37  $^{\circ}$ C 孵育 15 min。利用 sgRNA 纯化试剂盒纯化转录得到的 sgRNA, 按照试剂盒说明书操作。最后用去核酸酶的水溶解 sgRNA。测定浓度、纯度后 -80  $^{\circ}$ C 保存。

1.6.2 利用 Cas9 核酸酶体外验证转录出的 sgRNA 活性 以未转染任何质粒的 293T 细胞基因组 DNA 为模板, 以及 CTLA4check1F 和 CTLA4check1R 做为上下游引物, 扩增出相应的片段并回收纯化。将体外转录得到的 sgRNA 与 Cas9 核酸酶在室温孵育 10 min, 反应体系: 10 $\times$ Cas9 buffer 2  $\mu$ l, 转录得到的 sgRNA (2  $\mu$ mol/L) 2  $\mu$ l, Cas9 核酸酶(1  $\mu$ mol/L) 2  $\mu$ l, 以及适量的去核酸酶水。上述程序结束后, 加入回收纯化的片段 0.2 pmol, 37  $^{\circ}$ C 孵育 30 min, 之后向上述体系中(19  $\mu$ l)中加入 1  $\mu$ l 蛋白酶 K, 37  $^{\circ}$ C 反应 15 min, 电泳观察条带大小并用灰度分析软件确定切割效率。

### 1.7 体外转录 Cas9 mRNA

Cas9 表达质粒: T7-Cas9 载体, 经 Not I 酶切线性

化,酶切反应体系如下:10×buffer 3 μl, T7-Cas9 质粒 2 μg, *Not* I 核酸内切酶 2 μl, ddH<sub>2</sub>O 补足至 30 μl。酶切 3 h 后,经酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)抽提纯化,最后溶于无核酸酶水。取 1 μg 纯化产物作为体外转录模板,使用 NEB 公司的 HiScribe T7 ARCA mRNA Kit 体外转录获得 *Cas9* mRNA。具体方法参照试剂盒说明书进行。最后转录产物利用试剂盒提供的 LiCl, 沉淀纯化 *Cas9* mRNA, 并用无核酸酶水溶解, 于 -80℃ 保存备用。

### 1.8 肺癌患者 CD3<sup>+</sup> T 细胞的分离

肺癌患者外周血由郑州大学第一附属医院胸外科提供,经医院伦理委员会批准。收集 10 ml 患者外周血,用淋巴细胞分离液分离出外周血单个核细胞(PBMC)。使用美国 Life Technology 公司 CD3 分离试剂盒纯化出 CD3<sup>+</sup> T 细胞。纯化方法按照试剂盒说明书进行。

### 1.9 CD3<sup>+</sup> T 细胞电转化 CTLA4sgRNA2 并鉴定

**1.9.1 CD3<sup>+</sup> T 细胞电转化** 将 1×10<sup>6</sup> 个/ml CD3<sup>+</sup> T 细胞铺于 24 孔板中,1640 培养基加 10% 灭活血清重悬细胞,加入 IL-2 (100 U/μl)、CD3 单抗(5 μg/ml)、CD28 单抗(2 μg/ml),培养 5 d 后收获细胞,离心弃上清后,重悬 1×10<sup>6</sup> 个细胞与 100 μl 电转缓冲液中,加入 5 μg 体外转录获得的 CTLA4 sgRNA2 以及 5 μg 体外转录得到的 *Cas9* mRNA, 将其混合后转移到电转杯中,使用 Lonza 4D 细胞核转染仪进行电转,电转完毕后,将细胞悬液转移入 37℃ 预温的含 10% 灭活血清的 1640 培养基,放置于 5% CO<sub>2</sub>、37℃ 恒温培养箱培养。

**1.9.2 流式细胞仪检测 CD3<sup>+</sup> T 细胞表面 CTLA4 的表达** 转染 48 h 后,收集细胞,加入荧光标记的抗人 CD3、CTLA4 抗体,4℃ 避光染色 30 min,流式细胞仪检测 CD3<sup>+</sup> T 细胞表面 CTLA4 的表达。

## 2 结果

### 2.1 成功构建靶向 *CTLA4* 基因的特异 sgRNA 质粒

针对不同位点的 sgRNA 对靶基因编辑效率的影响较大。为了筛选到具有较高活性的序列,本课题组利用在线工具设计了 3 条靶向人 *CTLA4* 编码基因不同位置的 sgRNA。然后,合成含酶切位点的编码 DNA (详细序列见表 1), 并将编码 DNA 连接入线性化处理的 PX458 质粒中。质粒与插入位点信息见图 1。菌落 PCR 与测序结果见图 2, 显示插入序列大小与碱基序列均符合预期,证明 sgRNA 表达质粒构建成功。

### 2.2 sgRNA 介导的基因编辑效率的比较

为了比较不同 sgRNA 序列对基因编辑的影响,将含报告基因 *GFP* 的 sgRNA 表达质粒转染入 293T

细胞。80% 以上的 293T 细胞均表达 *GFP*, 证明转染成功(图 3A)。转染后 48 h, 不同 sgRNA 介导的 *CTLA-4* 编辑效率分别为 38%、66%、55%(图 3B)。其中,sgRNA2 活性最高,介导的 DNA 重组效率达到 66%。

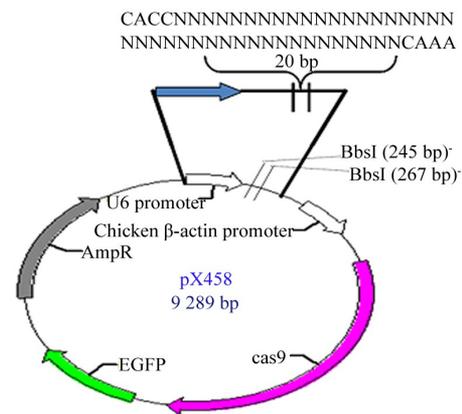
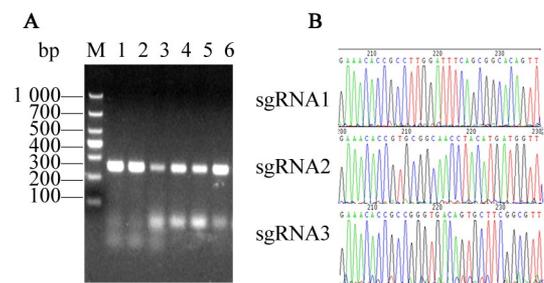


图 1 靶向 *CTLA4* 重组质粒构建示意图

Fig. 1 Establishment of recombinant plasmid targeting *CTLA4* gene



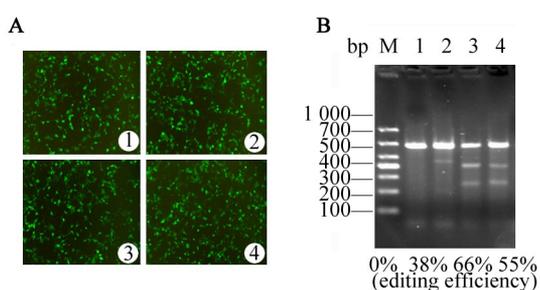
A: Identification of recombinant plasmids by colony PCR; M: Marker; 1,2: CTLA4-sgRNA1; 3, 4: CTLA4-sgRNA2; 5,6: CTLA4-sgRNA3; B: Confirmation of recombinant plasmids by gene-sequencing

图 2 重组质粒菌落的 PCR 和测序鉴定结果

Fig. 2 Results of Colony PCR and sequencing identification of the established recombinant plasmids

### 2.3 sgRNA 介导基因编辑使 CTLA4 出现高效率突变

T7EN1 错配酶实验鉴定出了 sgRNA2 的活性最高,进而对 sgRNA2 介导基因编辑类型进行分析。将编码 sgRNA2 的质粒转染 293T 细胞,48 h 后流式分选 GFP 阳性细胞。分选后细胞纯度达到 98%(图 4A)。提取基因组 DNA,PCR 扩增 *CTLA4* 靶序列,将扩增产物进行 TA 克隆后,随机挑取 15 个单菌落进行测序。测序结果显示,12 个单菌落中 *CTLA-4* 序列发生突变(图 4B),突变效率达到了 80%,说明 sgRNA2 能够有效地编辑目的基因表达。



A: The GFP fluorescence was observed of each recombinant plasmid( $\times 10$ ). 1,2,3,4: the empty pX458 plasmid,CTLA4-sgRNA1, CTLA4-sgRNA2, CTLA4-sgRNA3. B: T7EN1 mismatch enzyme assay was used to detect the efficiency of each recombinant plasmid. 1,2,3,4: the empty pX458 plasmid, CTLA4-sgRNA1, CTLA4-sgRNA2, CTLA4-sgRNA3

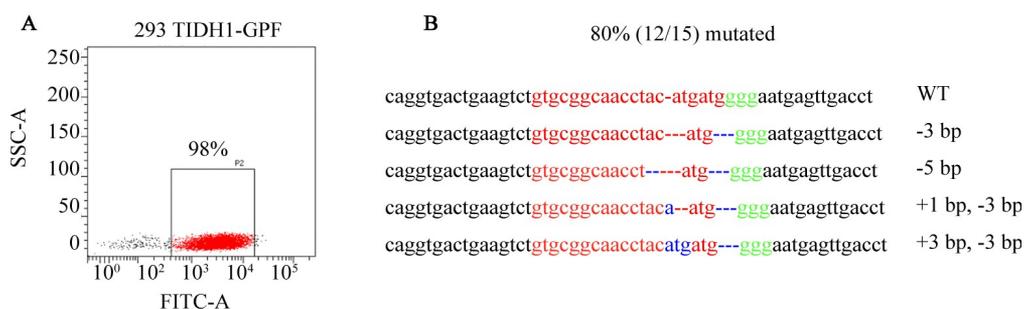
图3 sgRNA介导的CTLA4基因编辑效率比较

Fig. 3 Comparison of different sgRNA mediated CTLA4 gene editing efficiency

2.4 体外转录sgRNA引物设计以及sgRNA体外合成与优化

体外转录sgRNA引物设计方法见图5A,合成包括T7启动子、特异的sgRNA靶序列和sgRNA保守序列起始部分碱基的正向引物,以及与pX458质粒序列互补的反向引物,作为体外转录sgRNA的上下游引物。上游引物与pX458-sgRNA重组质粒模板互补40个碱基,下游引物与模板完全互补。最终设计出了上游引物CTLA4g2vitroF以及下游引物CTLA4vitroR(详细序列见表1)。

本课题组对体外转录的条件做了优化,图5B的第2个泳道代表37℃转录2h,第1个泳道代表37℃转录4h,结果显示,转录得到的sgRNA在不同程度上都产生了一些杂带,并且经纯化后得到的sgRNA产量也比较低,分别为5和10μg。而图5C将转录时间延长到10h左右,之前的杂带得到了完全消除,并且获得的sgRNA经纯化后总量达到了65μg。另外,由于在体外转录过程中RNA自身碱基会进行配对,转录后的电泳条带会比转录前偏小,图中的电泳结果进一步证明了体外转录得到的sgRNA条带大小与预期一致。



A: The GFP positive cells were sorted by flow cytometry; B: The sgRNA2 mediated gene editing type was analyzed by TA cloning assay. The PAM sequences are underlined and highlighted in green; the targeting sequences in red; the mutations in blue.

图4 sgRNA2介导的基因编辑类型分析

Fig. 4 Analysis of the sgRNA mediated gene editing type

2.5 体外转录得到的sgRNA测序正确并具有良好的切割活性

将体外转录得到的CTLA4 sgRNA2反转录成cDNA,用TA克隆鉴定,测序结果显示序列与预期一致。进一步用Cas9核酸酶验证其转录出的CTLA4 sgRNA2活性,电泳以及灰度分析软件分析出其切割效率为65%,说明体外合成的CTLA4 sgRNA2具有较高的活性,并成功在靶点上切开了DNA双链。

2.6 CTLA4 sgRNA2与Cas9 mRNA能够敲低肺癌患者CD3<sup>+</sup>T细胞的CTLA4基因

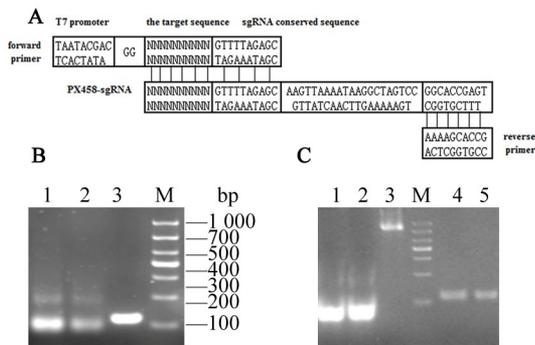
为了进一步验证体外合成的CTLA4 sgRNA2活性,将Cas9表达质粒线性化后用T7 RNA聚合酶体外转录合成Cas9 mRNA(图7A),随后将其与CTLA4 sgRNA2混合后,电转化入肺癌患者的CD3<sup>+</sup>T

细胞,培养48h后,流式术检测细胞表面CTLA4的表达(图7B)。进一步提取CD3<sup>+</sup>T细胞基因组DNA, T7EN1酶切处理并PCR扩增,然后进行琼脂糖凝胶电泳分析。电泳结果(图7C)显示,CTLA4 sgRNA2编辑效率达到了56%。结果提示,利用CTLA4 sgRNA2和Cas9 mRNA成功敲低了原代T细胞的CTLA4基因。

3 讨论

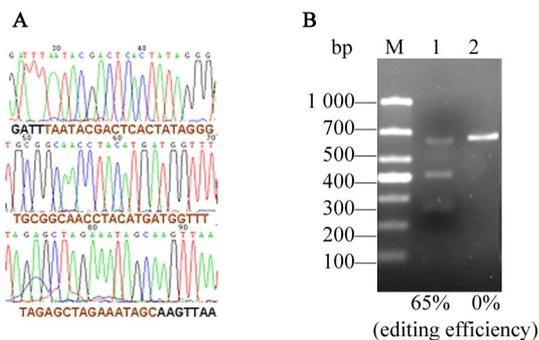
“免疫检验点”即为抑制受体和抑制信号通路,它们能够抑制T细胞的活化和增殖,在免疫应答的负性调控方面发挥重要作用。同时,在肿瘤组织中可能被肿瘤利用形成免疫逃逸。程序性死亡分子-1(programmed death-1,PD-1)、细胞毒性T淋巴细胞相

关抗原4(cytotoxic T lymphocyte associated antigen-4, *CTLA4*)、T 细胞免疫球蛋白及粘蛋白结构域分子-3 (T cell immunoglobulin and mucin-containing protein-3, Tim-3)、淋巴细胞活化基因-3 (lymphocyte activation gene 3, LAG-3) 等分子均属于检查点分子。在肿瘤免疫治疗中,抑制这些免疫检查点目前被认为是最有前景的治疗方式之一。通过靶向调控 T 细胞信号来增强抗肿瘤免疫反应,从而解除肿瘤患者的免疫抑制,达到治疗肿瘤的目的。



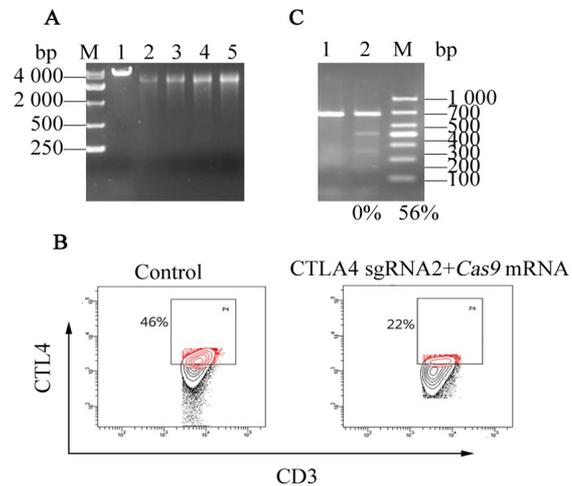
A: The diagram of the method for designing the primer. B: Gel electrophoresis assay for the obtained CTLA4 sgRNA2 *in vitro*, 1 and 2 respectively indicate that the transcription template was transcribed for 4 h and for 2 h; 3: the transcription template; M: Marker. C: Gel electrophoresis map of optimized transcription conditions. 1,2: the transcription template was transcribed for 10 h; 3: positive control; M: Marker, the bands are 1 000 bp, 700 bp, 500 bp, 400 bp, 300 bp, 200 bp, 100 bp, from top to bottom; 4,5: the transcription template

图5 体外转录sgRNA 引物设计以及sgRNA 体外合成与优化  
Fig. 5 Design of the primer for *in vitro* transcription of sgRNA and *in vitro* synthesis and optimization of sgRNA



A: The CTLA4 sgRNA2 was reversely transcribed into CDNA, the sequencing results after TA cloning assay; B: The activity of CTLA4 sgRNA2 was verified by Cas9 nuclease, 1: Treated; 2: Untreated

图6 体外转录得到sgRNA 的测序鉴定以及活性鉴定  
Fig. 6 Sequence and activity identification of *in vitro* transcribed sgRNA



A: The *Cas9* mRNA was synthesized by *in vitro* transcription. M: Marker; 1: Transcription template; 2,3: Transcripts(100 ng); 4,5: Transcripts(200 ng). B: Flow cytometry was used to detect the knockdown effect of *CTLA4* in CD3<sup>+</sup>T cells. C: *CTLA4* deletion efficiency in CD3<sup>+</sup>T cells was detected by T7EN1 mismatch enzyme

图7 利用 CTLA4 sgRNA2 和 Cas9 mRNA 敲除肺癌患者的 CD3<sup>+</sup>T 细胞的 CTLA4 基因

Fig. 7 *CTLA4* gene in CD3<sup>+</sup>T cells of lung cancer patients was knocked out using CTLA4 sgRNA2 and *Cas9* mRNA

CTLA4 在多种感染性疾病和肿瘤中都具有重要作用,但它最主要的功能是抑制 T 细胞活化。关于 CTLA4 是如何抑制 T 细胞的活化,目前有很多解释:(1)CTLA-4 作为一种共刺激分子,与 CD28 分子高度同源,竞争性地与 B7 分子结合,传递抑制性信号,阻断 CD28 分子对 T 细胞的作用,从而下调或者终止 T 细胞活化<sup>[7-8]</sup>;(2)CTLA4 能够抑制 IL-2 的产生,使细胞周期停滞在 G0/G1 期,不向 S 期发展,进而抑制 T 细胞活化<sup>[9]</sup>;(3)CTLA4 能够促使 T 细胞分泌 TGF-β、IL-10 等细胞因子,抑制 CD8<sup>+</sup> 细胞毒性 T 细胞的作用,进而在 T 细胞应答过程中起负性调节作用<sup>[10]</sup>;(4) T 细胞中主要表达 CTLA4 的细胞为免疫抑制细胞 Treg(调节性 T 细胞),Treg 需要通过 CTLA4 行使其功能<sup>[11]</sup>。

在众多的免疫检查点分子中,CTLA-4 也是目前研究的热点,并且已有相关药物针对这个免疫抑制分子,例如, ipilimumab 是第一个获批上市的 CTLA4 抑制剂,并且已经用于 III 期黑色素瘤的临床研究。CTLA4 单克隆抗体 tremelimumab 也已经被美国食品和药品管理局(FDA)批准用于恶性间皮瘤治疗。但是,并不是所有患者都会对这些治疗有效,一些患者能够获得长期生存,而其他一些患者则根本没有反应<sup>[12]</sup>。另外这些治疗在临床应用中对患者也会产生

不少免疫相关性不良反应,例如神经损伤、皮炎、肝炎等,所以这些治疗方法还需要更进一步的优化。

目前,普遍使用RNA干扰技术敲低目的细胞*CTLA4*基因来研究该基因功能。Yu等<sup>[13]</sup>使用了靶向*CTLA-4*基因的小干扰RNA,来研究抑制*CTLA4*对慢性乙肝患者外周血Th1/Th2细胞因子的影响。但是RNAi技术仅影响mRNA降解,不能完全敲除目的细胞*CTLA4*基因的表达,对充分研究*CTLA4*基因功能有一定的局限性。CRISPR/Cas9作为一种新的基因编辑技术,是目前被广泛应用的热门技术。其有许多明显的优势:没有物种限制;基因调控方式多样(敲除、插入、抑制、激活等);可实现对多个靶基因同时敲除;并且该系统是由RNA调控的对DNA的修饰,其基因修饰与RNA干扰技术相比具有可遗传性<sup>[14-15]</sup>。该技术已经开始尝试对人类T细胞进行基因修饰。Kaminski等<sup>[16]</sup>利用此技术成功清除人T细胞基因组中的HIV-1病毒,并且在HIV-1已被清除的T细胞中,这种系统的持续存在可以阻止它们再次感染。Eyquem等<sup>[17]</sup>用CRISPR/Cas9将肿瘤抗原受体编辑入T细胞受体基因TRAC位点后,大大增强了编辑后T细胞的受体表达量。Su等<sup>[18]</sup>利用CRISPR/Cas9敲除了人原代T细胞的免疫抑制分子PD-1,增强了T细胞杀死癌细胞的能力。并且,中国华西医院卢铀教授团队已经开启了全球首个CRISPR技术的人体临床应用,他们将肺癌患者T细胞分离出来,利用CRISPR/Cas9技术敲除了其中的免疫抑制分子PD-1,继而将基因编辑过的T细胞回输到肺癌患者体内,进行肺癌的治疗<sup>[19]</sup>。Manguso等<sup>[20]</sup>利用CRISPR/Cas9技术,筛选了小鼠中数千个肿瘤基因,最终发现了增强PD-1检查点抑制剂效果的新药物靶点*Ptpn2*。

CRISPR/Cas9技术通常是构建一个含*Cas9*和sgRNA的质粒,并将其转染入细胞内或者体内表达。但是普通脂质体转染质粒的效率非常低,而慢病毒包装操作繁琐并且效率也不高。并且质粒转入细胞内后,其降解还需要一定的时间,对后续试验还会有潜在的影响。通过体外转录的方法获得sgRNA,可以克服这些缺点。方法是将含sgRNA和*Cas9*的质粒通过体外转录反应,产生成熟的*Cas9* mRNA和sgRNA,然后通过显微注射或电穿孔导入目标细胞。这种方法具有转染效率高、可重复性强、同时可以转入多个针对不同靶点的sgRNA等优点。Liu等<sup>[21]</sup>在CAR-T细胞(嵌合抗原受体T细胞)中利用此方法同时敲除了T细胞受体(*TCR*)、人类白细胞抗原(*HLA*)和*PD-1*等三个基因,改造后的CAR-T细胞同未经过基因编辑的CAR-T细胞相比,在体内、体外实验中都具有了更强的细胞杀伤功能。

本研究构建了靶向*CTLA4*的sgRNA表达质粒,转染293T细胞,并利用错配酶筛选到了活性最高的sgRNA质粒。考虑到*CTLA4* sgRNA表达质粒直接通过脂质体或者慢病毒转染原代T细胞,转染效率低,后期只有很小比例的T细胞能被成功修饰。并且转染入细胞内,未降解的质粒对后续实验还可能产生影响。所以本研究继续利用*CTLA4* sgRNA表达质粒为模板,通过优化体外转录条件,转录出了较高产量的sgRNA,并且验证了体外转录出的sgRNA具有较高的切割效率。为了进一步验证其活性,将其与同样体外转录获得的*Cas9* mRNA共同电转化入原代T细胞,检测*CTLA4*分子的敲除效果,结果在原代T细胞中有效敲除了*CTLA4*基因,这就为后续抑制该基因,研究T细胞功能的变化,以及针对该免疫抑制分子制定相应的免疫治疗策略,提高患者预后打下了良好的基础。

#### [参考文献]

- [1] BALZANO C, BUONAVISTA N, ROUVIER E, et al. CTLA-4 and CD28: similar proteins, neighbouring genes [J]. *Int J Cancer*, 1992, 72(2): 28-32.
- [2] CONG L, RAN F A, COX D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems [J]. *Science*, 2013, 339(6121): 819-823. DOI: 10.1126/science.1231143.
- [3] MALI P, ESVELT K M, CHURCH G M. Cas9 as a versatile tool for engineering biology [J]. *Nat Methods*, 2013, 10(10): 957-963. DOI: 10.1038/nmeth.2649.
- [4] 谢一方, 王永明. 基因编辑技术的原理及其在癌症研究中的应用 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2017, 24(8): 815-827. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2017.08.001.
- [5] MUSSOLINO C, CATHOMEN T. RNA guides genome engineering [J]. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(3): 208-209. DOI: 10.1038/nbt.2527.
- [6] GAJ T, GERSBACH C A, BARBAS III C F, ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas- based methods for genome engineering [J]. *Trends Biotechnol*, 2013, 31(7): 397-405. DOI: 10.1016/j.tibtech. 2013. 04. 004.
- [7] WALKER L S, SANSOM D M. Confusing signals: recent progress in CTLA-4 biology [J]. *Trends Immunol*, 2015, 36(2): 63-70. DOI: 10.1016/j.it.2014.12.001.
- [8] CHEN L. Co-inhibitory molecules of the B7-CD28 family in the control of T-cell immunity [J]. *Nat Rev Immunol*, 2004, 4(5): 336-347. DOI: 10.1038/nri1349.
- [9] KRUMMEL M F, ALLISON J P. CTLA-4 engagement inhibits IL-2 accumulation and cell cycle progression upon activation of resting T cells [J]. *J Exp Med*, 1996, 183(6): 2533-2540.
- [10] NIRSCHL C J, DRAKE C G. Molecular pathways: coexpression of immune checkpoint molecules: signaling pathways and implications for cancer immunotherapy [J]. *Clin Cancer Res*, 2013, 19(18): 4917-4924. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-12-1972.
- [11] WALKER L S, SANSOM D M. Confusing signals: recent progress in CTLA-4 biology [J]. *Trends Immunol*, 2015, 36(2): 63-70. DOI: 10.1016/j.it.2014.12.001

- [12] SHARMA P, ALLISON J P. The future of immune checkpoint therapy [J]. *Science*, 2015, 348(6230): 56-61. DOI: 10.1126/science.aaa8172.
- [13] YU Y, WU H, TANG Z, et al. CTLA4 silencing with siRNA promotes deviation of Th1/Th2 in chronic hepatitis B patients [J]. *Cell Mol Immunol*, 2009, 6(2): 123-127. DOI: 10.1038/cmi.2009.17.
- [14] MALI P, YANG L, ESVELT K M, et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9[J]. *Science*, 2013, 339(6121): 823-826. DOI: 10.1126/science.1232033.
- [15] PATTANAYAK V, GUILINGER J P, LIU D R. Determining the specificities of TALENs, Cas9, and other genome-editing enzymes [J/OL]. *Methods Enzymol*, 2014, 546: 47-78[2017-07-25]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4440668/> DOI: 10.1016/B978-0-12-801185-0.00003-9.
- [16] KAMINSKI R, CHEN Y, FISCHER T, et al. Corrigendum: elimination of HIV-1 genomes from human T-lymphoid cells by CRISPR/Cas9 gene editing[J/OL]. *Sci Rep*, 2016, 6: 28213[2017-07-25]. <https://www.nature.com/articles/srep22555>. DOI:10.1038/srep28213.
- [17] EYQUEM J, MANSILLA-SOTO J, GIAVRIDIS T, et al. Targeting a CAR to the TRAC locus with CRISPR/Cas9 enhances tumour re-jection[J/OL]. *Nature*, 2017, 543(7643): 113-117[2017-07-25]. DOI: 10.1038/nature21405.
- [18] SU S, HU B, SHAO J, et al. CRISPR-Cas9 mediated efficient PD-1 disruption on human primary T cells from cancer patients[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 20070[2017-07-25]. <https://www.nature.com/articles/srep20070>. DOI: 10.1038/srep20070.
- [19] CYRANOSKI D. CRISPR gene-editing tested in a person for the first time [J/OL]. *Nature*, 2016,539(7630): 479[2017-07-25]. <http://www.nature.com/news/crispr-gene-editing-tested-in-a-person-for-the-first-time-1.20988>. DOI: 10.1038/nature.2016.20988.
- [20] MANGUSO R T, POPE H W, ZIMMER M D, et al. In vivo CRISPR screening identifies Ptpn2 as a cancer immunotherapy target[J]. *Nature*, 2017, 547(7664): 413-418. DOI: 10.1038/nature23270.
- [21] LIU X, ZHANG Y, CHENG C, et al. CRISPR-Cas9-mediated multiplex gene editing in CAR-T cells[J]. *Cell Res*, 2017, 27(1): 154-157. DOI: 10.1038/cr.2016.142.

[收稿日期] 2017-08-20

[修回日期] 2017-11-08

[本文编辑] 黄静怡

· 读者·作者·编者·

## 《中国肿瘤生物治疗杂志》征稿和征订启事

《中国肿瘤生物治疗杂志》是由中国免疫学会和中国抗癌协会联合主办的高级学术刊物,为中国精品科技期刊、RCCSE 中国权威学术刊物、中国中文核心期刊、中国科学引文数据库核心源期刊、中国科技核心期刊、中国人民解放军优秀医学期刊,为同行专家评审期刊和开放获取(OA)期刊;获 2015-2017 年度中国科协精品科技期刊工程项目资助。本刊主要报道肿瘤生物治疗领域基础研究和临床应用的新成果、新理论、新技术和新经验,常设有述评、院士论坛、专家论坛、研究快报、青年学者论坛、基础研究、临床研究、转化医学、技术方法、短篇论著、学术争鸣、文献综述、个案报告等栏目,以从事肿瘤防治的中高级临床和科研工作者、医药院校师生及相关学科科技人员为读者对象。月刊,每月 25 日出版,国内外公开发行。

本刊主编为中国医学科学院院长、中国免疫学会理事长曹雪涛院士,编委会由包括 19 名院士和 9 名外籍专家的众多名家大师组成。本刊已被美国《化学文摘》(CA)、俄罗斯《文摘杂志》(AJ)、荷兰《医学文摘》(Embase)等 10 个国际著名检索系统收录。本刊在国内肿瘤学领域的学术地位和影响力名列前茅,在国际学术界的显示度日益广泛和增强。

本刊使用网络远程投稿、审稿系统和编校管理系统进行编辑出版工作,工作效率高,编校质量好,论文发表周期短。另设“快速发表通道”,将有较高创新性的论文以 2~3 个月的速度快速发表。

热忱欢迎广大肿瘤防治工作者通过本刊网站投稿系统、电子邮箱踊跃投稿。

《中国肿瘤生物治疗杂志》每册定价 15.00 元,全年定价 180.00 元。邮发代号: 4-576,若错过,可从本刊编辑部补订,请将 180.00 元(优惠免邮资)寄编辑部,并注明详细通讯地址及邮政编码,编辑部负责将每期杂志准时寄给您。

联系地址:上海市翔殷路 800 号;海军军医大学免疫楼《中国肿瘤生物治疗杂志》编辑部(邮编 200433)

联系人: 韩丹, 黄静怡 联系电话: 021-55620605×22, 021-81871002×22

传 真: 021-81871007 网 址: [www.biother.org](http://www.biother.org)

电子邮箱: [cjcb@biother.org](mailto:cjcb@biother.org)