

网络出版时间: 2022-04-01 10:58 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20220330.1417.001.html>

◇基础医学研究◇

人/猪 *SERPING1* 同源性比较及猪 *SERPING1* 敲除细胞系的建立

王蒙, 朱晓晗, 刘晓蕊, 李琳, 王盈, 杨海元, 戴一凡

摘要 目的 利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术建立 *SERP-ING1*^{-/-} 猪胎儿成纤维细胞(PFFs)系,为构建遗传性血管性水肿模型提供细胞实验材料。方法 首先比较人/猪 *SERP-ING1* 氨基酸同源性。其次,分析猪 *SERPING1* 基因有效的编码区,据此选择第八外显子为敲除靶点,设计并合成靶向猪 *SERPING1* 的单导向 RNA (sgRNA),连接到含有 Cas9 核酸内切酶的 pX330 载体上,构建 *SERPING1* 打靶载体 pX330sgRNA,将其转染至猪胎儿成纤维细胞中,经 G418 药物筛选阳性单克隆细胞。最后,用 T7E1 酶切实验检测靶点编辑情况,测序验证单克隆细胞基因型。结果 生物信息学分析结果提示人/猪 *SERPING1* 蛋白氨基酸同源性较高,氨基酸比对相似性达到 65.87%。成功构建打靶 *SERPING1* 的载体,并转染到细胞,药物筛选获得 *SERPING1* 基因敲除的单克隆细胞,测序确认了突变的基因型。结论 人/猪 *SERP-ING1* 蛋白同源性较高,适合用于构建遗传性血管性水肿模型。构建的 Cas9/sgRNA 表达载体实现了 *SERPING1* 基因编辑,获得基因敲除的单细胞克隆,为后续 *SERPING1*^{-/-} 猪模型的构建提供了必需的实验材料。

关键词 *SERPING1*; CRISPR/Cas9; 猪胎儿成纤维细胞

中图分类号 R 784

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2022)04-0505-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.04.001

遗传性血管性水肿 (hereditary angioedema, HAE) 是一种罕见的,以皮肤和黏膜下肿胀为特征的潜在威胁生命的疾病,常见受累部位为面部、四肢、躯干、生殖道、上呼吸道和胃肠道^[1]。1888 年,William Osler 确定遗传性血管性水肿为常染色体显性遗传病^[2],表明编码补体 C1 抑制剂的基因突变是 HAE 发病的根本原因。经典的 HAE 是由于编码补体 C1 抑制剂的基因 *SERPING1* 突变造成^[3],

HAE-I 型患者,突变分布整个基因序列,HAE-II 型突变主要位于 *SERPING1* 第八号外显子,第八号外显子编码补体 C1 抑制剂的反应中心环。补体 C1 抑制剂的反应中心环为 C1 抑制剂与靶蛋白酶的结合位点,若编码该功能域序列的 *SERPING1* 第八号外显子突变则导致补体 C1 抑制剂的功能缺陷。因此,笔者选择敲除对应基因序列,用于建立疾病模型。

近年来,CRISPR/Cas9 基因编辑技术由于操作简便,基因编辑效率高而引起广泛关注,已成功应用于基因修饰的猪等大动物模型构建^[4-6]。猪的解剖结构与生理情况都与人的极其相似,被视为研究人类疾病的理想大动物模型。该研究拟利用 CRISPR/Cas9 建立 *SERPING1* 敲除细胞系,为后续构建 *SERP-ING1* 敲除克隆猪,模拟遗传性血管性水肿疾病奠定重要前期工作。

1 材料与方法

1.1 主要材料 引物和磷酸化的寡核苷酸序列 (金斯瑞公司);猪胎儿成纤维细胞 (南京医科大学江苏省异种移植重点实验室);pX330 质粒 (Addgene 423230)、BbsI 限制性内切酶、Quick Ligase 连接酶、DH5 α 感受态和质粒小提中量试剂盒 (北京天根生化科技公司);Basic NucleofectorTM Kits 和细胞转染仪 (德国 Lonza 公司);胰酶、胎牛血清、Penn/Strep 双抗、DMEM 培养基和 PBS 缓冲液 (美国 Gibco 公司);T7E1 酶 (美国 New England Biolabs 公司);琼脂糖凝胶回收试剂盒 (德国 Qiagen 公司);pMD18-T 载体 (日本 Takara 公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 人/猪 *SERPING1* 氨基酸序列同源性分析 使用 Clustal 软件对人和猪两个物种进行 *SERPING1* 氨基酸序列比对,比较分析 *SERPING1* 在人和猪上的同源保守性。

1.2.2 人/猪 *SERPING1* 蛋白二级结构和三维结构的预测 利用 SOPMA 软件对人/猪 *SERPING1* 蛋白

2021-12-31 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81874144,81970164)

作者单位:南京医科大学医学遗传学系,江苏省异种移植重点实验室,南京 211166

作者简介:王蒙,女,硕士研究生;

戴一凡,男,教授,博士生导师,责任作者,E-mail: daiyifan@njmu.edu.cn

进行二级结构分析,预测了人/猪 *SERPING1* 蛋白 α 螺旋、 β 转角、延伸链、无规则卷曲的比例。采用 Swiss Model 软件(<https://www.swissmodel.expasy.org/>)进行 *SERPING1* 蛋白三维建模,比较人/猪的二级和三维结构的一致性。

1.2.3 *SERPING1*-Exon8 靶点设计和 pX330-Exon8 载体构建 参照 NCBI 上猪 *SERPING1* 序列,使用 CRISPR 在线设计软件(<http://crispr.mit.edu/>) 在第八号外显子上设计一对 20 bp 的单向 RNA (single guide RNA, sgRNA) 序列,5' 末端加上磷酸化修饰,由金斯瑞公司合成。设计了两对 sgRNA 寡核苷酸序列, *SERPING1*-Exon8-Oligo1 F: 5'-CACCGctctgt-ggcccgagtttgc-3', *SERPING1*-Exon8-Oligo1 R: 5'-AAACgcaactgcgggcccacagagC-3', *SERPING1*-Exon8-Oligo2 F: 5'-CACCGtcccagagcagcaaaaggaa-3', *SERPING1*-Exon8-Oligo2 R: 5'-AAACTtcttttctgtctctgggaC-3'。

接下来进行寡核苷酸链的退火、酶切、连接(参照 <http://www.genome-engineering.org/crispr/>) 首先将每条寡核苷酸链稀释为 100 $\mu\text{mol/L}$,退火形成双链:正向 Oligo 1 μl ,反向 Oligo 1 μl ,去离子水 8 μl ,PCR 程序:37 $^{\circ}\text{C}$ 30 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; -5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$,降至 25 $^{\circ}\text{C}$; 4 $^{\circ}\text{C}$ 保持。Bbs I 线性化的 pX330 载体与退火双链 Oligo(稀释 250 倍)连接,然后转化到 DH5 α 中,挑取单克隆菌落,测序公司验证。验证成功后使用试剂盒提取质粒,并用 50% 甘油保留菌种。

1.2.4 细胞转染和阳性单克隆细胞的筛选和鉴定

细胞培养与转染: 原代猪胎儿成纤维细胞(巴马小型猪, δ) 复苏后培养在含 16% 胎牛血清的培养基中,长至对数生长期。使用细胞计数仪(Thermo CountessIIFL) 测量细胞密度约 4.7×10^6 个/ml,配制转染液,共转染 1 μg pX330-Exon8-1 质粒和 1 μg pX330-Exon8-2 质粒,使用 U-023 核转程序。用 2 ml 培养基重悬转染后的细胞,分至 10 cm 培养皿中。隔天换用含 G418(1 mg/ml) 的培养基培养,观察细胞生长状态,据此调整培养基中 G418 浓度。

挑取单克隆细胞: 转染后的细胞经过 9 d 的筛选,可观察到单克隆细胞群。显微镜下在 10 cm 培养皿的血底标记单克隆细胞群的位置。吸出培养基, PBS 清洗 2 遍,在合适的克隆环中加入 0.25% 的胰蛋白酶消化单克隆细胞群,用 Eppendorf 微量移液器移入 24 孔板中,将克隆转移时间及编号标记在孔板盖子上。

细胞传代和冻存: 观察 24 孔板中的细胞状态,

待细胞长满后消化传至 12 孔板,长满冻存。

提取冻存细胞基因组: 留存在 24 孔板的细胞长满后,消化,离心,加入 NP40 裂解细胞,提取基因组。

TA 克隆鉴定细胞基因型: PCR 扩增目的片段,反应条件 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s; 56.5 $^{\circ}\text{C}$ 30 s; 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min; 35 个循环,总延伸 72 $^{\circ}\text{C}$ 7 min; 切胶回收,连接到 pMD-18T 载体上,转化到 DH5 α 感受态中,涂板。每个固体培养基挑取 15 个单克隆菌落,送到公司测序,比对敲除细胞基因型。

1.2.5 T7E1 酶切检测突变 提取转染细胞的基因组,扩增目的片段,对上述 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳并切胶回收。T7E1 酶切体系:取纯化产物 5 μl , 10 \times NEBuffer 2.0 2 μl , Nuclease-free 水 12 μl , 在 PCR 仪中进行退火反应,结束后各取 9.5 μl 退火产物,分别加入 0.5 μl T7E1 酶和去离子水,去离子水作为对照,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 15 min,加入 Proteinase K 0.5 μl 失活 T7E1 酶,采用 1% 琼脂糖凝胶电泳后分析结果。

2 结果

2.1 人/猪 *SERPING1* 氨基酸序列同源性分析结果 人和猪蛋白的氨基酸序列比对显示,二者 *SERPING1* 氨基酸排列顺序相似性达到 65.87%,人/猪 *SERPING1* 蛋白的同源性较高。见图 1。

2.2 人/猪 *SERPING1* 蛋白结构比对结果 利用 SOPAM(蛋白质结构预测软件)对人和猪 *SERPING1* 蛋白进行二级结构分析。其中预测到人 *SERPING1* 蛋白 Alpha helix 占 39.60%, Beta turn 占 4.8%, Extended strand 占 15.20%, Random coil 占 40.40%。猪 *SERPING1* 蛋白 Alpha helix 占 39.92%, Beta turn 占 3.87%, Extended strand 占 12.01%, Random coil 占 44.20%。由此推算, *SERPING1* 蛋白二级结构在人和猪上一致性较高(图 2A)。蛋白三维结构显示人/猪 *SERPING1* 相似(图 2B)。生物信息学分析结果表明,人(*Homo sapiens*)和猪(*Sus scrofa*) *SERPING1* 分子具有较近的亲缘关系,序列比对和结构分析具有高度的同源性,推测 *SERPING1* 在 *Homo sapiens*/*Sus scrofa* 的血浆接触级联系统发挥相近的生物学功能。

2.3 重组打靶载体测序 pX330 载体上连接 *SERPING1* 基因靶点 sgRNA 序列。5'-ACTATCATAT-GCTTAC-3' 为 U6 启动子序列(图 3A)。重组载体 pX330 上成功插入 *SERPING1* Exon8 的靶点 sgRNA 序列(图 3B)。

2.4 SERPING1 基因敲除情况的验证 转染 pX330-Exon8-1 和 pX330-Exon8-2 载体的猪胎儿成纤维细胞对应的 PCR 产物目的条带下面有被剪切过的片段条带。验证了第八外显子靶点发生了碱基的突变。见图 4。

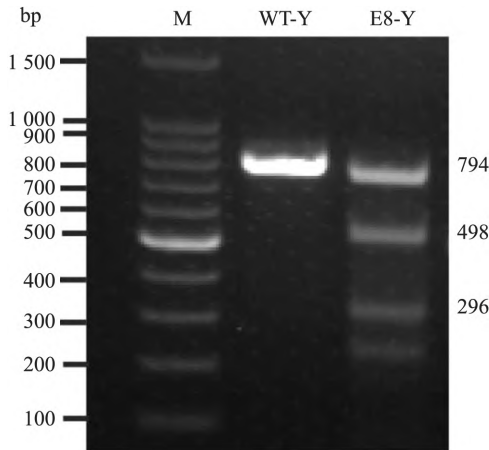


图4 两个 sgRNA 敲除情况验证

M: 100 bp marker; WT-Y: 加入 T7E1 酶的野生型基因组; E8-Y: 加 T7E1 酶的第八外显子敲除基因组

2.5 SERPING1 敲除细胞系的基因型鉴定 共获得 44 个单克隆, 进行 TA 克隆测序。PCR 所用的引物如下, F: 5'-AACTTGGGAGCAACCCAGAAA-3', R: 5'-TCACAGGGAAGGGATGGTAGA-3'。测序结果显示 SERPING1 基因的第八外显子靶点区域为缺失突变。其中最常出现的突变类型为缺失 29 个碱基。见图 5。

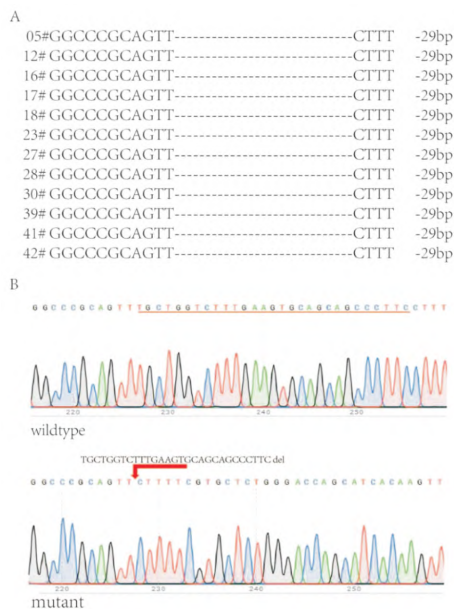


图5 单克隆细胞在目的 sgRNA 位点的缺失情况

3 讨论

遗传性血管性水肿是一种罕见遗传病, 发病率为 1/50 000 至 1/10 000^[7], 会导致水肿(肿胀) 反复发作。因喉部水肿导致呼吸道梗阻患者窒息, 引起广大临床工作者的重视。但目前因为其比较罕见, 导致医务工作者对其认知还不透彻, 易被误诊为其他疾病。并且我国目前还没有新型治疗药物, 所以急需动物模型, 对其发病机制有更进一步的了解并据此研制新型治疗药物缓解患者的痛苦^[8]。现有的研究^[9-10]显示 HAE 的发病机制除了与 C1INH 有关, 第三型遗传性血管性水肿还与凝血因子 FXII 有关, 第四型还与其他蛋白酶有关。将来有必要进一步探索不同类型的发病机制。

本研究重点关注与 C1INH 有关的一型和二型 HAE, 有关 SERPING1 单基因敲除的克隆鼠虽有报道^[11], 但无法复制人遗传性血管性水肿表型, 以巴马小型猪胎儿成纤维细胞为材料, 通过 CRISPR/Cas9 技术构建 SERPING1^{-/-} 细胞系。首先通过生物信息学分析表明, 猪的 SERPING1 蛋白无论是在氨基酸排列顺序、二级结构、三维空间上都与人类具有较高的相似性, 并且其生物特征更贴合人类, 所以猪是构建 HAE 的理想模型。CRISPR/Cas9 的深入研究使得该技术成为动植物基因功能研究和建立动物细胞系^[12-14] 主要手段, 因此本实验也选择该技术作为主要研究手段。

目前已发现超过 450 种与补体 C1 抑制剂缺乏致遗传性血管性水肿相关的基因突变^[15], 集中于 SERPING1 的第八号外显子。因此, 选择在第八号外显子上设计打靶载体, 通过测序验证敲除的基因型, 发现敲除的形式比较稳定, 均为靶点附近 29 bp 的缺失, 若用于后续模型的构建, 动物的表征一致, 方便分析。共挑选了 44 个细胞克隆, 经鉴定产生了 12 个敲除成功的单克隆细胞系, 敲除效率较高, 敲除单个基因是可能的原因之一, 且在这基因上同时设计两个打靶载体也有效地提高了基因编辑效率。

本研究利用 CRISPR/Cas9 技术成功制备了 SERPING1^{-/-} 猪胎儿成纤维细胞系, 为后续构建 SERPING1^{-/-} 巴马小型猪遗传性血管性水肿模型, 以及研究相关机制提供了重要的供体细胞。

参考文献

[1] Reshef A, Kidon M, Leibovich I. The story of angioedema: From quinke to bradykinin[J]. Clin Rev Allerg Immu, 2016, 51(2):

- 121–39.
- [2] Bernstein J A. Severity of hereditary angioedema, prevalence, and diagnostic considerations [J]. *Am J Manag Care*, 2018, 24(14 Suppl): S292–8.
- [3] Ponard D, Gaboriaud C, Charignon D, et al. Serping1 mutation update: Mutation spectrum and c1 inhibitor phenotypes [J]. *Hum Mutat*, 2019, 41(1): 38–57.
- [4] Yan S, Tu Z, Liu Z et al. A huntingtin knockin pig model recapitulates features of selective neurodegeneration in huntington's disease [J]. *Cell*, 2018, 173(4): 989–1002.
- [5] Chen Q, Fang B, Wang Y, et al. Overexpressing dominant-negative FGFR2-IIIb impedes lung branching morphogenesis in pigs [J]. *J Genet Genomics*, 2018, 45(3): 147–54.
- [6] Fang B, Ren X Y, Wang Y, et al. Apolipoprotein E deficiency accelerates atherosclerosis development in miniature pigs [J]. *Dis Model Mech*, 2018, 11(10): dmm036632.
- [7] Busse B J, Christiansen S C. Hereditary angioedema [J]. *New Engl J Med*, 2020, 382(12): 1136–48.
- [8] 张凌凡, 赵宇晗, 李智慧, 等. 遗传性血管性水肿治疗药物的临床研究进展 [J]. *世界临床药物* 2020, 41(4): 319–22.
- [9] Ivanov I, Matafonov A, Sun M F, et al. A mechanism for hereditary angioedema with normal C1-inhibitor: An inhibitory regulatory role for the factor XII heavy chain [J]. *Blood*, 2019, 133(10): 1152–63.
- [10] Veronez C L, Moreno A S, Constantino-Silva R N, et al. Hereditary angioedema with normal C1 inhibitor and F12 mutations in 42 Brazilian families [J]. *J Allergy Clin Immunol Pract*, 2017, 6(4): 1209–16.
- [11] Han E D, Macfarlane R C, Mulligan A N, et al. Increased vascular permeability in C1 inhibitor – deficient mice mediated by the bradykinin type 2 receptor [J]. *J Clin Invest*, 2002, 109(8): 1057–63.
- [12] 曾华沙, 姚俊, 王红顺, 等. 人/猪 OSBPL2 同源性比较及猪 PFFs 靶基因敲除细胞系的建立 [J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2018, 38(2): 149–54.
- [13] 苏丛, 徐方明, 伍婷, 等. 基于 CRISPR-Cas9 技术构建 gpr41 基因敲除的 RAW264.7 细胞系 [J]. *安徽医科大学学报*, 2020, 55(5): 800–3.
- [14] 厉小雪, 李楚, 任雪洋, 等. GGT1/β4GalNT2 双基因敲除的巴马小型猪 PFFs 细胞系的建立 [J]. *实用器官移植电子杂志*, 2019, 7(4): 277–82.
- [15] 任华丽, 张宏誉. 一个遗传性血管性水肿家系基因分析 [J]. *中华临床免疫和变态反应杂志*, 2007, 1(2): 141–5.

Homology comparison between human and pig *SERPING1* and establishment of pig PFFs with *SERPING1* knockout

Wang Meng, Zhu Xiaohan, Liu Xiaorui, Li Lin, Wang Ying, Yang Haiyuan, Dai Yifan
(Dept of Medical Genetics, Nanjing Medical University,
Jingsu Key Laboratory of Xenotransplantation, Nanjing 211166)

Abstract Objective To build *SERPING1*-knockout porcine fetal fibroblasts (PFFs) based on CRISPR/Cas9 technology and provide cell experimental materials for the construction of hereditary angioedema models. **Methods**

Firstly, protein structure prediction software was used to analyze the amino acid homology between human and pig *SERPING1*. Secondly, the eighth exon was selected as the knockout target by screening the effective coding region of the pig *SERPING1* gene. A single guide RNA targeting pig *SERPING1* was designed, synthesized and linked to pX330 vector containing Cas9 endonuclease. G418 was used to obtain the positive monoclonal cells after transfection into PFFs. Finally, the circumstance of CRISPR/Cas9 mediated knockout was assessed by the T7EN1 enzyme digestion assay and the genotypes of monoclonal cells were identified by sequencing analysis. **Results** Bioinformatic analysis revealed that the *SERPING1* protein of human and pig had high homology, amino acid sequence identity reached 65.87%. A vector targeting *SERPING1* was constructed successfully and transfected into cells. Monoclonal cells with knockout *SERPING1* gene were obtained through drug screening. Sequencing confirmed the mutant genotype. **Conclusion** The human and pig *SERPING1* sequences and their protein structures are highly homologous, and it is suitable for the construction of disease model. CRISPR/Cas9 expression vectors were constructed to achieve the *SERPING1* gene targeting in PFFs. *SERPING1*-knockout monoclonal cells were obtained, which could contribute to the construction of the *SERPING1* knockout miniature pig model.

Key words *SERPING1*; CRISPR/Cas9; porcine fetal fibroblasts