黄广燕, 王豪强, 李国玲, 等. Cas9 融合 RAD18 因子提高 HEK293T 细胞的定点敲入效率 [J]. 华南农业大学学报, 2021, 42(5): 8-18.
HUANG Guangyan, WANG Haoqiang, LI Guoling, et al. Increase of knock-in efficiency in HEK293T cells by fusing RAD18 factor to Cas9[J]. Journal of South China Agricultural University, 2021, 42(5): 8-18.

Cas9 融合 RAD18 因子提高 HEK293T 细胞的定点敲入效率

黄广燕[1]，王豪强[1]，李国玲[1]，吴珍芳[1,2]，张献伟[1,2]
(1 华南农业大学 动物科学学院/国家生猪种业工程技术研究中心，广东 广州 510642；
2 温氏食品集团股份有限公司，广东 云浮 527400)

摘要:【目的】在哺乳动物细胞中，RAD51 和 RAD18 是调节同源定向修复和非同源末端连接的关键因子。本研究目的在于探讨这 2 个因子在 eSpCas9 系统中对 HEK293T 细胞的定点敲入 (Knock-in, KI) 效率的影响，进而提高 KI 效率。【方法】通过构建 eSpCas9-RAD51、eSpCas9-RAD18 融合蛋白以及过表达 *RAD51*、*RAD18* 载体，比较它们的 KI 效率差异。【结果】eSpCas9-RAD18 系统可以显著提高 HEK293T 细胞 KI 效率，约为原来 eSpCas9 系统的 1.4~1.9 倍 (P<0.01)，而 eSpCas9-RAD51 系统和过表达 *RAD51*/*RAD18* 对 KI 效率无显著提高作用。【结论】本研究构建的 eSpCas9-RAD18 系统可以有效地提高 HEK293T 细胞的 KI 效率，可为基因编辑、基因治疗及定点转基因提供一种新的辅助整合工具。

关键词: 基因编辑；CRISPR/Cas9 系统；基因敲入；*RAD18*；融合蛋白
中图分类号: Q812; Q782 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-411X(2021)05-0008-11

Increase of knock-in efficiency in HEK293T cells by fusing RAD18 factor to Cas9

HUANG Guangyan[1], WANG Haoqiang[1], LI Guoling[1], WU Zhenfang[1,2], ZHANG Xianwei[1,2]
(1 College of Animal Science, South China Agricultural University/National Engineering Research Center for Breeding Swine Industry, Guangzhou 510642, China; 2 Wens Foodstuff Co., Ltd., Yunfu 527400, China)

Abstract: 【Objective】In mammalian cells, RAD51 and RAD18 are the key factors for regulating the relationship between non-homologous end joining and homology-directed repair. The purpose of this study was to explore the effects of these two factors on the knock-in (KI) efficiency in HEK293T cell lines by eSpCas9 system, and improve the KI efficiency.【Method】eSpCas9-RAD51, eSpCas9-RAD18 fusion proteins and *RAD51*, *RAD18* overexpression vectors were constructed to compare their difference of KI efficiency.【Result】Only the eSpCas9-RAD18 system could significantly increase the KI efficiency of HEK293T cells, which was about 1.4~1.9 times that of the original eSpCas9 system (P<0.01). The eSpCas9-RAD51 system and overexpression of *RAD51*/*RAD18* did not improve the KI efficiency.【Conclusion】The eSpCas9-RAD18 system constructed in this study can effectively improve the KI efficiency in HEK293T cells, and provides a novel auxiliary integration tool for gene editing, gene therapy and site-specific transgenesis.

Key words: gene editing; CRISPR/Cas9 system; gene knock-in; *RAD18*; fusion protein

收稿日期: 2020–11–25 **网络首发时间:** 2021–07–02 16:36:56
网络首发地址: https://kns.cnki.net/kcms/detail/44.1110.S.20210702.1502.002.html
作者简介: 黄广燕 (1995—)，女，硕士研究生，E-mail:guangyanh@foxmail.com；通信作者：吴珍芳 (1970—)，男，教授，博士，E-mail: wzf@163.com；张献伟 (1983—)，男，高级畜牧师，博士，E-mail: zxianw@163.com
基金项目: 国家转基因重大专项 (2016ZX08006002)；广东特支本土创新创业团队 (2019BT02N630)

近年来，来自化脓性链球菌 *Streptococcu pyogenes* 的 II 型 CRISPR/Cas9 系统因其能够高效产生基因组双链断裂 (Double-strand break, DSB)，在人类疾病模型制备[1]、基因治疗[2-3] 和农业遗传改良[4-5] 等方面得到广泛应用。当细胞产生 DSB 后，机体主要通过非同源末端连接 (Non-homologous end joining, NHEJ) 或同源定向修复 (Homology-directed repair, HDR) 竞争修复 DNA 损伤，以保持基因组的完整性[6]。其中 NHEJ 介导的 DNA 修复容易出错，常常会引入碱基对的随机插入或缺失[7]；而 HDR 利用同源染色体作为模板可以精准修复受损 DNA，为定点转基因或基因敲入 (Knock-in, KI) 技术提供了理论基础[8]。自然情况下，哺乳动物基因组的同源重组频率很低，约 10^{-4}~10^{-6}[9]。尽管 Cas9 系统高效地引入了 DSB，但目前由 HDR 介导的 KI 效率仍较低[9]。因此，寻找一种促进 HDR 的方法是提高哺乳动物细胞基因 KI 效率的关键。

HDR 过程相对 NHEJ 较为复杂。以哺乳细胞为例，当 DNA 损伤传感器 MRE11-RAD50-NBS1 复合物检测到有 DSB 产生后，与 DNA 损伤检验有关的毛细血管扩张性共济失调突变 (Ataxia telangiectasia mutated, ATM) 因子被招募到断裂位点上，并激活感知基因完整性检查点。通过一系列的磷酸化激活中心效应酶 CHK1 和 CHK2 传播信号，核酸酶不断地聚集并切除 5′端 DNA，使断裂处变成单链 DNA(Single-strand DNA, ssDNA)。ssDNA 先与复制蛋白 (Replication protein A, RPA) 因子结合，随后 RAD51 代替 RPA 结合到 ssDNA 上，产生 RAD51-ssDNA 核蛋白丝。该细丝在入侵的 DNA 和同源 dsDNA 模板之间形成物理连接，搜索同源序列，并在供体位点形成异源双链 D 环。当断裂的其中 1 条 ssDNA 修复后，细胞会根据碱基互补配对原则用这条修复好的单链修复另 1 条 ssDNA，至此完成同源修复的过程。RAD51 的重组酶活性是 HDR 通路的催化核心，且能作为复制阻断酶来维持脊椎动物细胞染色体 DNA 的稳定。RAD18 不是 HDR 关键因子，但其广泛参与有丝分裂细胞复制损伤旁路，是基因复制后修复的必需蛋白。研究表明，*RAD18* 基因敲除后的细胞有表现出明显的 HDR 依赖性修复降低以及对拓扑异构酶 I 抑制剂喜树碱敏感[10]，这说明了 RAD18 对维护基因组稳定性有十分重要的作用。当 DNA 损伤引发模板链复制停滞，ssDNA 暴露出来，被 RPA 复合物包裹后，ATR/Chk1 信号通路激活[11]。随后 RAD18 被招募到复制停滞位点，并与酵母中的 RAD6 或人类中的 HHR6A/HHR6B 结合形成紧密的 E2-E3 复合物。RAD18-RAD6 复合物及其介导的增殖细胞核抗原 (Proliferating cell nuclear antigen, PCNA) 单泛素化构成分子开关，招募复制性聚合酶如 polδ、polη 等开始修复。因此，单泛素化后的 PCNA 是 DNA 翻译合成聚合酶转换的关键，如 RAD18 经 c-Jun N 端激酶特异性磷酸化后，会单泛素化 PCNA，从而促进 polη 与停滞的复制叉结合并促进损伤合成[12]。蛋白激酶 CDC7 可以通过磷酸化酵母 RAD18 来诱导 PCNA 修饰，泛素化的 PCNA 招募 polκ聚合酶达到消除停滞分叉的目的，从而减弱 DNA 合成 S 期检查点[13]。此外，RAD18 是电离辐射环境下 DNA 损伤修复的关键介体，可以激活 G2/M 检查点来确保基因组的完整性[14]，在一定程度上增加 DNA 损伤修复反应效率，但具体的协调机制尚不清楚。研究表明，RAD18 在鸡和人细胞中能抑制 NHEJ 对 HDR 的毒性作用，从而促进 HDR 的过程[15]，这说明 RAD18 能在 DNA 损伤信号通路中发挥作用，并传递信号，引起 DNA 损伤后的同源重组修复。DSB 发生会引发 DNA 受损应激中心 ATM 介导的 H2AX 磷酸化，磷酸化后的 H2AX 直接与 MDC1 的 BRCT 域结合进而招募修复因子 MDC1。随后与 RAD18 的锌指结构域以 aRNF8/UBC13 方式结合，RNF E3 连接酶以此不断地将 RAD18 加载到损伤位点，从而激活 HDR 修复。但此修复过程独立于 RAD18 的 E3 连接酶功能和 PCNA 泛素化。同时 RAD18 作为衔接蛋白，直接与 RAD51 结合发挥作用，引导损伤信号通路促进 HDR[16]。

前期研究表明，激活或过表达 HDR 关键蛋白可以显著提高 KI 效率。Song 等[17] 研究发现通过 RAD51 激活剂 RS-1 激活 RAD51 表达，可以显著提高 *GFP* 基因靶向大鼠 *RLL* 基因 KI 效率。因此，本研究在 HEK293T 细胞系中，比较了 Cas9-RAD51、Cas9-RAD18 融合蛋白以及过表达 RAD51、RAD18 对 HDR 效率的影响，旨在提高动物细胞 KI 效率。

1　材料与方法

1.1　质粒与细胞

eSpCas9 (1.1) 质粒 (#71814)、pU6-(*Bbs*I)_CBh-Cas9-T2A-mCherry 质粒 (#64324) 和 pcDNA3.1 (+) 质粒 (#V790-20) 购自美国 Addgene，hGAPDH-P2A-EGFP 质粒由南京金斯瑞生物科技有限公司合成。HEK293T 细胞系 (#ACS-4500) 购自美国 ATCC。

1.2 引物设计

本研究所用引物信息见表 1，均由北京六合华大基因科技有限公司合成。

1.3 CRISPR/Cas9 系统构建

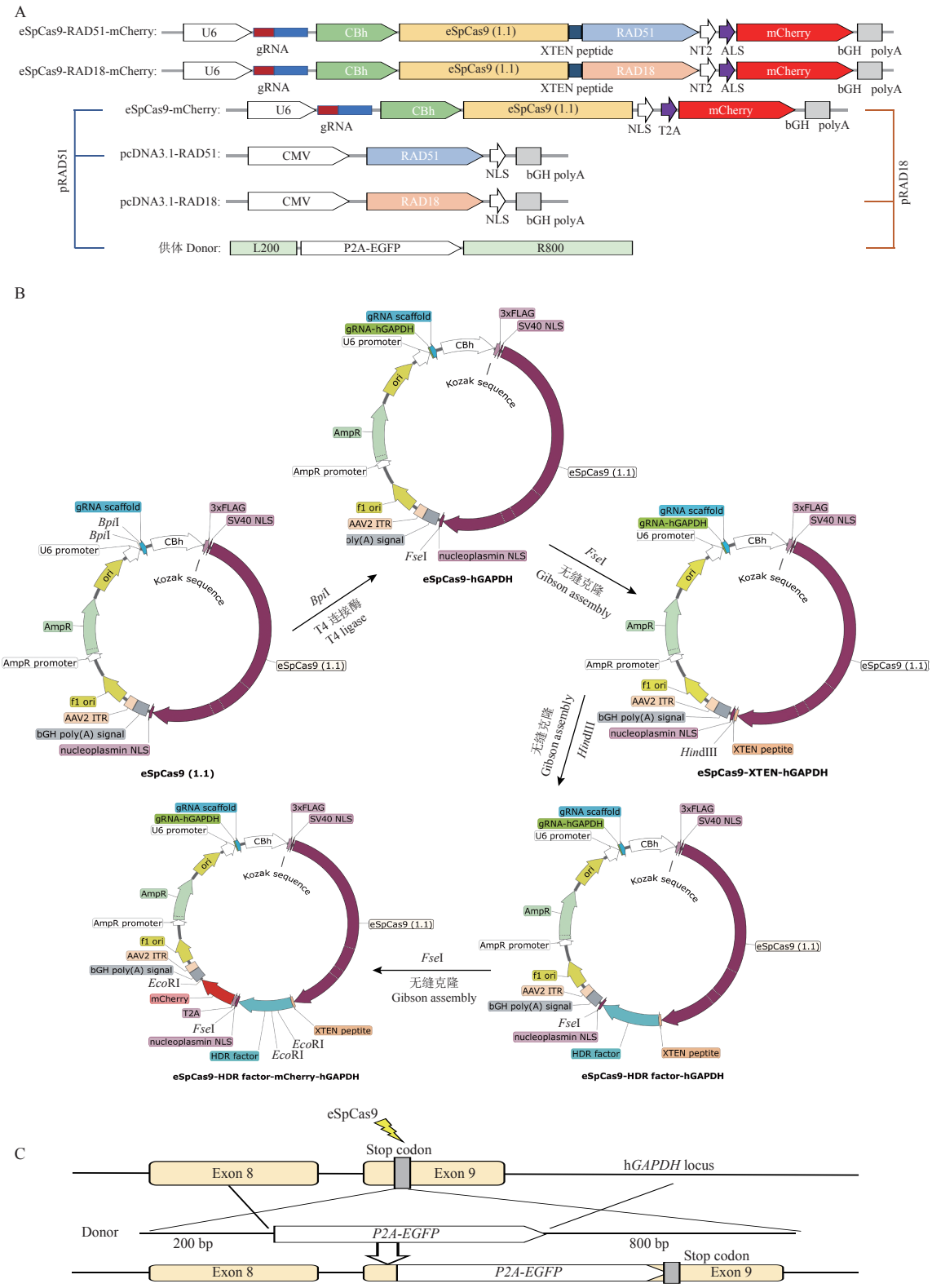
采用表 1 中的引物进行 PCR 扩增，其中引物 XTEN 的上下游有 20 bp 的互补序列，可在不加入任何模板的情况下扩增出目的片段；引物 IF-Cas9-RAD51 和 IF-Cas9-RAD18 的模板为 HEK293T 细胞 DNA；引物 L200R800 和 IF-T2A-mCherry 的模板分别为 hGAPDH-P2A-GFP 质粒和 pU6-(*Bbs*I)_CBh-Cas9-T2A-mCherry 质粒。PCR 体系和程序参照 PrimeSTAR® Max DNA Polymerase (TaKaRa) 说明书。

gRNA 载体构建 (图 1A)：根据 NCBI 数据库中人 *GAPDH* 基因 (Gene ID：2597) 设计 gRNA 并合成 oligo[18]。分别取 5 μL10 mmol/L 的 gRNA-

表 1 引物序列和用途

Table 1 Sequence and use of primer

引物名称 Primer name	正向序列 (5′→3′) Forward sequence	反向序列 (5′→3′) Reverse sequence	用途 Use
gRNA-hGAPDH	CACCAGCCCCAGCAAGAGCACAAG	AAACCTTGTGCTCTTGCTGGGGCT	gRNA载体构建 gRNA vector construction
L200R800	AACGACCACTTTGTCAAGCTCAT	ACCCTGACACATCTCAGTTCATCTT	转染供体 Transfection donor
XTEN	CAGCTGGGAGGCGACAGCGGTTCA GAGACCCCAGGAACTAGCGAGAGC GCTACACCGGAATCG	TTCTTTTTTGCCTGGCCGGCCTTTTT CGTGGCCGCCGGCCTTTTAAGCTTC GATTCCGGTGTAGCGCTCT	Cas9过度载体构建 Cas9 excessive vector construction
IF-Cas9-RAD51	GCTACACCGGAATCGATGGCAATG CAGATGCAGCT	GGCCGCCGGCCTTTTGTCTTTGGCA TCTCCCACTCCAT	Cas9-HDR载体构建 Cas9-HDR vector construction
IF-Cas9-RAD18	GCTACACCGGAATCGATGGACTCC CTGGCCGAGTC	GGCCGCCGGCCTTTTATTCCTATTA CGCTTGTTTCTTGGTTC	
IF-RAD51-NLS	TTGGTACCGAGCTCGGATCCGCCAC CATGGCAATGCAGATGCAGCT	CCTCTAGACTCGAGCGGCCGCTTAC TTTTTCTTTTTTGCCTGGCCGG	过表达载体构建 Overexpression vector construction
IF-RAD18-NLS	TTGGTACCGAGCTCGGATCCGCCAC CATGGACTCCCTGGCCGAGTC	CCTCTAGACTCGAGCGGCCGCTTAC TTTTTCTTTTTTGCCTGGCCGG	
IF-T2A-mCherry	CGGCCACGAAAAAGGCCGGCCAGG CAAAAAAGAAAAAGCTTGAGG	CTCTAGGAATTCTTACTTGTACAGC TCGTCCATGCC	
hU6	CCGTAACTTGAAAGTATTTCG		Sanger测序 Sanger sequencing
BGH		TAGAAGGCACAGTCGAGG	
T7	TAATACGACTCACTATAGGG		
mCherry		TTGGTCACCTTCAGCTTGG	
JD-KI-hGAPDH	ACCACAGTCCATGCCATCACT	AGTCGTGCTGCTTCATGTGGT	KI细胞鉴定 KI cell identification
q-ACTB	CCAACCGCGAGAAGATGACC	AGTCCATCACGATGCCAGT	荧光定量PCR Fluorescence quantitative PCR
q-CtIP	ACAGGAACGAATCTTAGATGCACA	ACATAAGCCTGCTCTTAACCGAT	
q-RAD50	AGATCGCCATCAAGAACATATCCG	TCACTGAATGGTCCACGCTCA	
q-RAD51	CCTGCCAGCTTCCCATTGACC	CGTTCTGGCCTAAAGGTACCCTC	
q-KU70	TGCCAACCTCTTTAGTGATGTCC	CCCAGGTTTCTTCAGGTGCAT	
q-LIG4	AACCATACAGCAAGTAAACGACCT	TCCGTATAAGCCACTTTTGCTCA	
q-EGFP	ACCACTACCAGCAGAACACC	CATGTGATCGCGCTTCTCGTT	



A：eSpCas9-HDR-mCherry 载体和 pcDNA3.1-HDR 过表达载体模式图，其中 U6、CBh 和 CMV 为启动子，NLS 为核定位信号，T2A 和 XTEN peptide 为连接肽，bGH polyA 为终止子，L200 为靶位点处 200 bp 的左同源臂，R800 为靶位点处 800 bp 的右同源臂，mCherry 用于矫正 eSpCas9 的转染效率；B：eSpCas9 相关载体构建流程；C：目的基因 (*P2A-EGFP*) 整合在人 *GAPDH* 位点的模式图，其中 eSpCas9 能够特异性切割基因组

A: Pattern diagram of eSpCas9-HDR-mCherry vector and pcDNA3.1-HDR overexpression vector, where U6, CBh and CMV are promoters, NLS is the nuclear localization sequence, T2A and XTEN peptide are linking peptides, bGH polyA is the terminator, L200 is the 200 bp left homologous arm of the target site, R800 is the 800 bp right homologous arm of the target site, and mCherry is used to correct the transfection efficiency of eSpCas9; B:eSpCas9 related vector construction process; C: A schematic diagram of the target gene (*P2A-EGFP*) integrated into the human *GAPDH* site, where eSpCas9 can specifically cleave the genome

图 1　不同 eSpCas9 系统的构建及 KI 模式图

Fig. 1　Construction of different eSpCas9 systems and KI pattern diagram

hGAPDH 上下游引物，混匀后做退火处理：95 ℃ 5 min，10 ℃ 1 min，2 个循环；95 ℃ 5 min，10 ℃ 3 min。参考 FastDigest*Bpi*I(Thermo Fisher Scientific) 说明书酶切 eSpCas9 (1.1) 质粒，切胶回收后参考 T4 DNA 连接酶 (TaKaRa) 说明书 16 ℃ 过夜连接退火后的 gRNA-hGAPDH 和线性化 eSpCas9 (1.1) 质粒。随后将连接后的 DNA 转化至 Trans10 感受态细胞 (#C101-01，北京全式金) 中，并划线涂板，待单克隆菌落成形后使用带氨苄抗性的培养基扩大培养并交由北京六合华大基因科技有限公司进行 Sanger 测序，测序引物为 hU6-F，测序正确的菌液命名为 eSpCas9-hGAPDH 并扩大培养，随后根据 Endo-Free Plasmid Mini Kit II (Omega Bio-Tek) 说明书进行质粒抽提和保存。

1.4 CRISPR/Cas9-HDR 系统构建

利用 16 个氨基酸的 XTEN 肽将 RAD51/RAD18 蛋白串联至 Cas9 蛋白的 C 端表达 (图 1A)。主要构建过程如下 (图 1B)：将纯化后的 XTEN 产物与经 *Fse*I (NEB) 酶切后的线性化 eSpCas9-hGAPDH 质粒进行无缝克隆，参照 In-Fusion HD Cloning Kits (TaKaRa) 说明书。随后，如上述的方法进行转化、测序 (引物 BGH-R) 和质粒抽提，正确的菌液和质粒命名为 eSpCas9-XTEN-hGAPDH。采用 FastDigest*Hind*III (Thermo Fisher Scientific) 酶切 eSpCas9-XTEN-hGAPDH 质粒，使用 IF-Cas9-RAD51 和 IF-Cas9-RAD18 引物进行 PCR 扩增，随后将这 2 种产物纯化后分别与线性化的 eSpCas9-XTEN-hGAPDH 质粒进行无缝克隆，测序引物为 BGH-R，其中测序无误的克隆菌分别命名为 eSpCas9-RAD51-hGAPDH 和 eSpCas9-RAD18- hGAPDH。

为了减少细胞转染效率对基因 KI 效率的影响，本研究使用 T2A 连接肽将红色荧光蛋白 (mCherry) 构置于 Cas9-HDR 融合蛋白 C 端 (图 1A)，主要用于矫正转染效率，进而反映出真实的 HDR 效率。Cas9-mCherry 系统的构建 (图 1B)：使用 *Fse*I 酶切 eSpCas9-hGAPDH、eSpCas9-RAD51-hGAPDH 和 eSpCas9-RAD18-hGAPDH 质粒，将酶切后的产物分别与纯化后的 PCR 产物 IF-T2A-mCherry 进行无缝克隆，测序引物为 mCherry-R。其中测序无误的克隆菌分别命名为 eSpCas9-mCherry-hGAPDH、eSpCas9-RAD51-mCherry-hGAPDH 和 eSpCas9-RAD18-mCherry-hGAPDH。

1.5 过表达载体构建

使用引物 IF-RAD51-NLS 和 IF-RAD18-NLS 分别对 eSpCas9-RAD51-hGAPDH 和 eSpCas9-RAD18- hGAPDH 进行 PCR 扩增，用 FastDigest*BamH*I 和 FastDigest*Not*I (Thermo Fisher Scientific) 对 pcDNA3.1 (+) 质粒双酶切，并切胶回收长片段。随后将纯化后的 PCR 产物分别与线性化质粒无缝克隆，成功克隆的质粒分别命名为 pcDNA3.1-RAD51 和 pcDNA3.1-RAD18 (图 1B)，测序引物为 T7-F 和 BGH-R。

1.6 细胞培养与转染

从液氮中取出 HEK293T 细胞，并迅速放入 37 ℃ 水浴锅中不断搅拌解冻。向解冻后的细胞中加入 2 mL 完全培养基 (体积分数为 10% 的胎牛血清和体积分数为 90% 的 DMEM 培养基混合)，经 800 r/min、5 min 离心后加入 8 mL 完全培养基重悬细胞至 10 cm 细胞培养板中。十字划线混匀细胞后，将细胞放置于 37 ℃、CO_2 体积分数为 5% 的恒温箱中培养。待细胞生长至 90% 时使用 PBS 缓冲液清洗细胞 2 次，随后加入适量的 Trypsin/EDTA (0.5 g/L，Gibco) 消化 1 min。向消化好的细胞中加入 2 倍体积的完全培养基终止消化，经 800 r/min、5 min 离心后将细胞重悬并按照 1∶3~1∶5 的比例接种于新的细胞板中培养。转染前将细胞传代至 24 孔板中，待细胞生长至 70%~90% 时参照 Lipofectamine 3000 Reagent 说明书进行转染。为了研究 Cas9 串联表达 HDR 因子对基因 KI 效率的影响，本研究将 eSpCas9-mCherry 载体和供体共转染至 HEK293T 细胞中。供体由 PCR 扩增并纯化得来，包含 200 bp 的左同源臂、绿色荧光蛋白基因 (*P2A-EGFP*) 和 800 bp 的右同源臂。本研究设计的 gRNA 位于人 *GAPDH* 基因终止密码子附近，当 DSB 产生后，供体模板能够充当基因组模板对 DNA 进行修复，进而实现目的基因的插入 (图 1C)。其中 Cas9 质粒和供体用量分别为每孔 500 和 125 ng，过表达质粒用量存在 5 个梯度，分别为 17、33、100、250 和 500 ng。pRAD51 和 pRAD18 分别为共转染 eSpCas9+Donor+pcDNA3.1-RAD51 和 eSpCas9+Donor+pcDNA3.1-RAD18 组。转染 6 h 后更换新的完全培养基，48 h 后收集细胞。

1.7 Western blotting

将转染 48 h 的细胞用 PBS 缓冲液清洗后，加入适量的含 1 mmol/L PMSF 的 Western 及 IP 细胞裂解液裂解细胞。经 3000 r/min、5 min 离心后，取微量上清液用于 BCA 法蛋白浓度测定。向剩余蛋白上清液中加入 5×蛋白缓冲液，沸水煮 5~10 min 后用于 SDS-PAGE 电泳。70 V 电泳 30 min，90 V 电泳 1~2 h，随后使用 iBlot 2 Gel Transfer

Device 系统 (Invitrogen) 将蛋白条带转移至 PVDF 膜上。50 g/L 脱脂奶粉封闭 2 h 后，参照说明书推荐浓度 4 ℃ 条件下过夜孵育 anti-RAD51 (Proteintech)/anti-RAD18 (Proteintech)/anti-GFP (Absin)/anti-β-actin (Proteintech)，经 TBST 洗膜 3 次，TBS 洗膜 1 次后，室温孵育相应二抗 2 h，并按上述方法洗膜。将清洗好的膜浸湿在适量的超敏 ECL 发光液中，避光孵育 2 min 后置于 UVP 显色装置曝光拍照。

1.8　荧光定量 PCR

将转染 48 h 的细胞用 PBS 缓冲液清洗后，使用 Total RNA Kit II (Omega) 抽提总 RNA。随后参照 PrimeScrip RT reagent Kit with gDNA Eraser (TaKaRa) 说明书进行反转录，将稀释好的 cDNA 按照 PowerUp SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems) 的说明书进行 PCR 体系配制。采用 $2^{-\triangle\triangle Ct}$ 法[19] 分析目的基因的表达量。

1.9　流式细胞术检测基因 KI 效率

用 PBS 缓冲液清洗转染 48 h 的细胞，800 r/min、5 min 离心后加入 PBS 缓冲液重悬，用于流式细胞术 (BD accuri C6 plus) 检测。使用 FL1 通路检测绿色荧光细胞比例，FL3 通路检测红色荧光细胞比例。

1.10　流式细胞术检测细胞周期

将转染 48 h 的细胞用 PBS 缓冲液清洗后，用预冷的体积分数为 70% 的乙醇溶液 4 ℃ 条件下过夜固定。经 800 r/min、5 min 离心后加入适量碘化丙啶并充分混匀，4 ℃ 条件下避光孵育 30 min 后，使用流式细胞仪上机检测。随后用 FlowJo 10 软件分析细胞周期。

1.11　数据分析

所有数据均使用 IBM SPSS Statistics 26 软件进行独立样本 *t* 检验或单因素 ANOVA 分析，数据结果以平均值±标准差表示。

2　结果与分析

2.1　不同 CRISPR/Cas9 系统的构建和表达

在 HEK293T 细胞中转染 eSpCas9-HDR-mCherry 后，XTEN 肽在翻译过程不会被切断，T2A 在翻译后会被切断，从而变成前后 2 个独立的蛋白。将构建的 eSpCas9 质粒进行 Sanger 测序，结果显示所有 eSpCas9 质粒均符合预期，序列正确 (图 2)。将不同的 eSpCas9 载体 (eSpCas9、eSpCas9-RAD51/RAD18、eSpCas9+pcDNA3.1-RAD51/RAD18) 分别转染至 HEK293T 细胞中，48 h 后发现，Cas9-HDR 融合蛋白均能够正常表达 (图 3)。其中，eSpCas9-RAD51 融合蛋白相对分子质量约为 200 000，eSpCas9-RAD18 融合蛋白相对分子质量约为 219 000。有趣的是，过表达 RAD18 的蛋白量没有过表达 RAD51 时提高的那么显著。通过荧光定量 PCR 发现，过表达 RAD18 仅能提高其 5~6 倍的转录水平，而过表达 RAD51 能提高自身 174~356 倍的 mRNA 表达量 (图 4)。

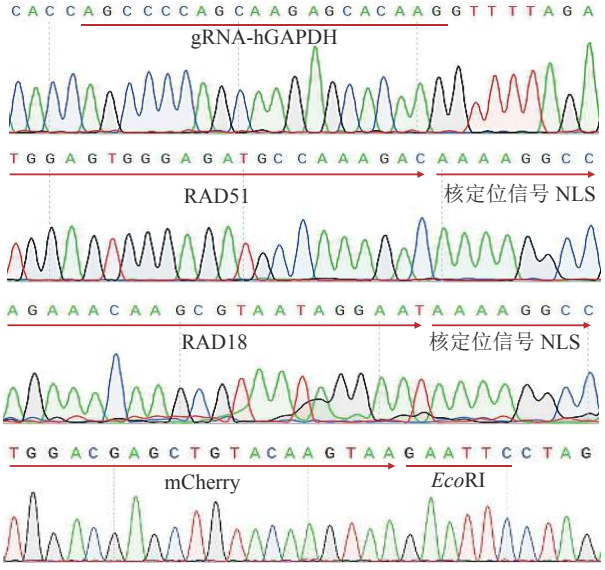
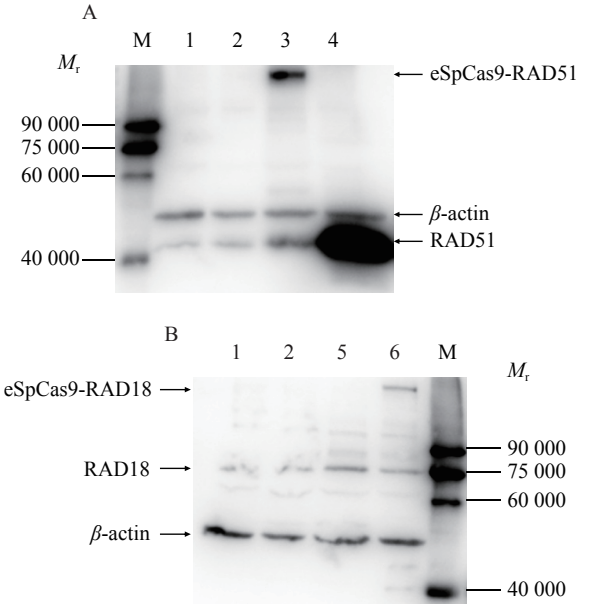


图 2　Sanger 测序结果

Fig. 2　Sanger sequencing results

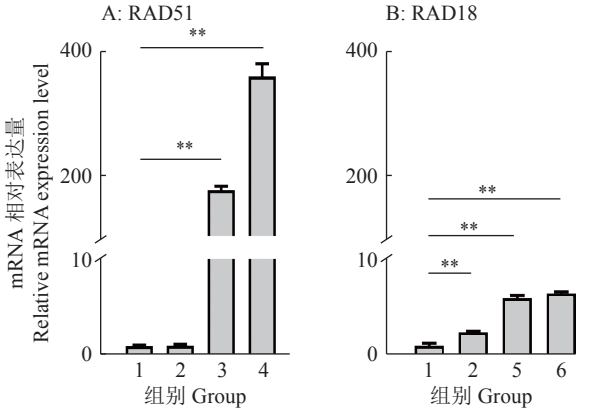


M：蛋白质相对分子质量标准，1：空白对照，2：eSpCas9，3：eSpCas9-RAD51，4：pRAD51，5：pRAD18，6：eSpCas9-RAD18；pRAD51/ pRAD18 中 pcDNA3.1-RAD51/RAD18 的质粒用量为 250 ng

M: Protein marker, 1: Blank, 2: eSpCas9, 3: eSpCas9-RAD51, 4: pRAD51, 5: pRAD18, 6: eSpCas9-RAD18; In pRAD51/ pRAD18, the amount of pcDNA3.1-RAD51/RAD18 plasmid is 250 ng

图 3　不同融合蛋白的表达结果

Fig. 3　The expression results of different fusion proteins



1：空白对照，2：eSpCas9，3 和 4 分别为使用 100 和 250 ng pcDNA3.1-RAD51 质粒的 pRAD51 组别，5 和 6 分别为使用 100 和 250 ng pcDNA3.1-RAD18 质粒的 pRAD18 组别；“**”表示差异显著 (P<0.01, t 检验)

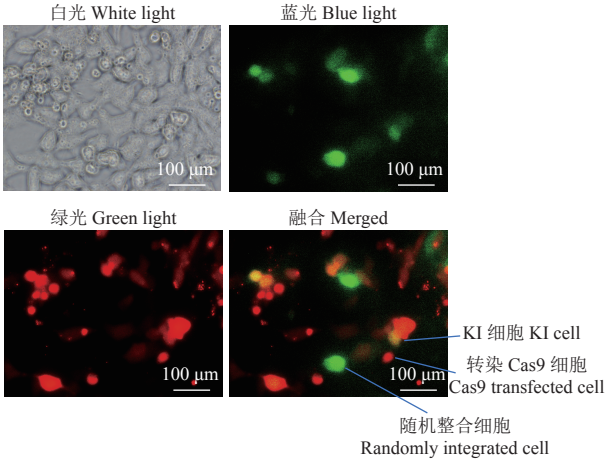
1: Blank, 2: eSpCas9, 3 and 4 are pRAD51 groups with 100 and 250 ng pcDNA3.1-RAD51 plasmid respectively, 5 and 6 are pRAD18 groups with 100 and 250 ng pcDNA3.1-RAD18 plasmid respectively; "**" indicates significant difference (P<0.01, t test)

图 4 RAD51/18 过表达后 mRNA 表达水平

Fig. 4 mRNA expression level after RAD51/18 overexpression

2.2 不同 eSpCas9 系统对 HEK293T 细胞 KI 效率的影响

哺乳动物细胞的 KI 效率主要受 Cas9 系统的递送效率 (转染效率)、Cas9 蛋白对基因组的切割效率和细胞的 HDR 效率影响。为了降低不同系统间递送效率和随机整合的误差，本研究使用 P2A 连接肽在 eSpCas9 蛋白 C 端串联表达 mCherry 进行矫正。因此，只有既表达红色荧光又表达绿色荧光的细胞才是真正的 KI 细胞 (图 5)。由流式结果得出，不同 eSpCas9 系统具有不同的转染效率和 KI 效果 (图 6)。将不同 eSpCas9 系统的转染效率矫正后，eSpCas9-RAD18-mCherry 系统的 KI 效率 (45.91%) 显著高于 eSpCas9-mCherry 系统 (27.69%)，而其他系统不能显著提高 KI 效率 (表 2)。调整过表达 RAD51/18 的质粒用量后，仍无法显著提高 HEK293T 细胞的 KI 效率 (图 7)。另外，当不使用 mCherry 蛋白矫正转染效率时 (结构图如图 8 所示)，eSpCas9-

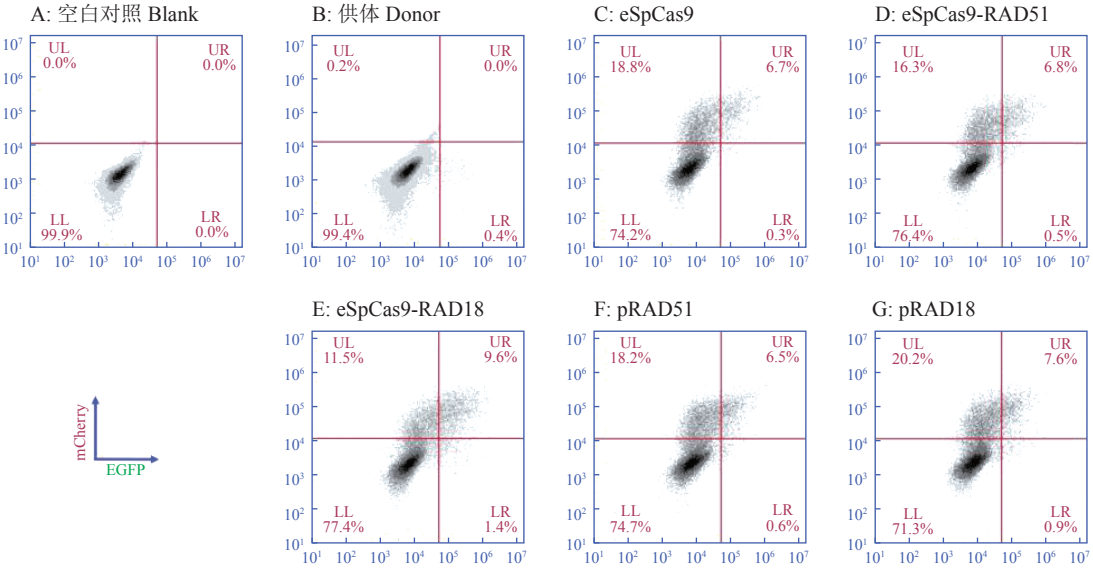


绿色荧光为表达 EGFP 的细胞，红色荧光为表达 mCherry 的细胞，橙色荧光为表达 EGFP 和 mCherry 的细胞

Green fluorescence means cells expressing EGFP, red fluorescence means cells expressing mCherry, and orange fluorescence means cells expressing EGFP and mCherry

图 5 eSpCas9-mCherry 系统的荧光图

Fig. 5 Fluorescence image of eSpCas9-mCherry system



UL 是仅表达红色荧光的细胞占比，UR 是既表达红色荧光又表达绿色荧光的细胞占比，LL 是不表达任何荧光的细胞占比，LR 是仅表达绿色荧光的细胞占比

UL means the proportion of cells that only expresses red fluorescence, UR means the proportion of that expresses both red and green fluorescence , LL means the proportion of cells that do not express fluorescence, and LR means the proportion of cells that only expresses green fluorescence

图 6 eSpCas9-HDR-mCherry 系统对基因 KI 效率的影响

Fig. 6 The effect of eSpCas9-HDR-mCherry system on gene KI efficiency

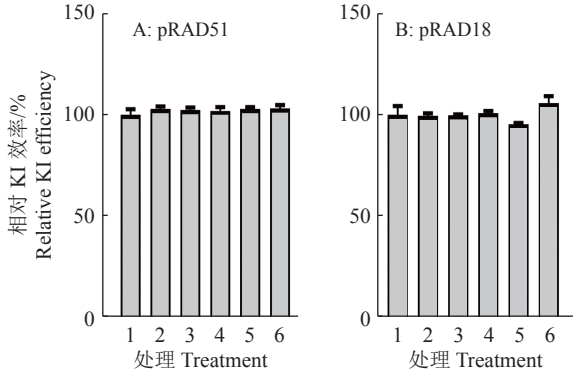
表 2　mCherry 蛋白矫正不同 eSpCas9 系统的 KI 效率[1)]

Table 2　The effect of different eSpCas9 systems on KI efficiency

组别 Group	Cas9载体转染效率/% Transfection efficiency of Cas9 vector (UL+UR)	KI效率/% KI efficiency	
		原始值 Original (UR)	校正值 Corrected [UR/(UL+UR)]
空白对照 Blank	—	0	—
供体 Donor	—	0.35±0.03	—
eSpCas9	24.25±1.33	6.71±0.33	27.69±1.00
eSpCas9-RAD51	22.87±0.60	6.63±0.11	29.01±1.02
eSpCas9-RAD18	20.36±0.99**	9.35±0.50**	45.91±0.51**
pRAD51	25.20±0.71	6.73±0.50	26.69±1.23
pRAD18	26.68±1.08*	7.08±0.95	26.43±2.69

1) UL是仅表达红色荧光的细胞占比，UR是既表达红色荧光又表达绿色荧光的细胞占比，即原始效率，LL是不表达任何荧光的细胞占比，LR是仅表达绿色荧光的细胞占比，UL+UR代表eSpCas9转进去的细胞占比，UR/(UL+UR)是矫正后的KI效率；由于Blank和Donor未转染eSpCas9载体，故在表中用“—”表示；“*”和“**”分别表示与eSpCas9组在0.05和0.01水平差异显著(单因素ANOVA分析)

1) UL means the proportion of cells that only express red fluorescent, UR means the proportion of cells that express both red and green fluorescence cells, which is the original efficiency, LL means the proportion of cells that do not express fluorescence, LR means the proportion of cells that only express green fluorescence, UL+UR represents the proportion of cells transferred by eSpCas9, and UR/(UL+UR) refers to the corrected KI efficiency; Since Blank and Donor were not transfected with eSpCas9 vector, they are indicated by “—” in the table; “*” and “**” represent significant difference from eSpCas9 group at 0.05 and 0.01 levels respectively(ANOVA)



相对 KI 效率=该组别的 KI 效率/Control 的 KI 效率×100%；1~6 表示 pRAD51/pRAD18 组别中 pcDNA3.1-RAD51/ pcDNA3.1-RAD18 质粒的用量分别为 0、17、33、100、250 和 500 ng

Relative KI efficiency=KI efficiency of the group/KI efficiency of control×100%; 1−6 indicate the amounts of pcDNA3.1-RAD51/ pcDNA3.1-RAD18 plasmid in pRAD51/pRAD18 group are 0,17,33,100,250 and 500 ng

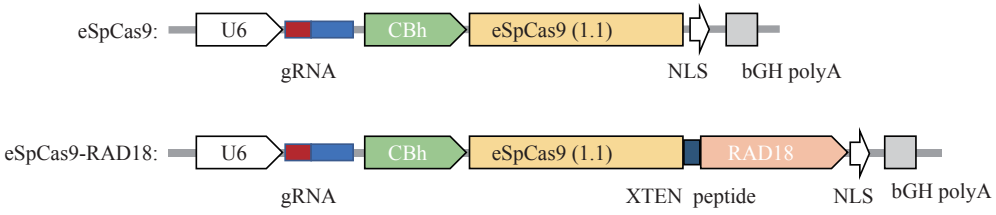
图 7　过表达不同浓度 HDR 因子对 KI 效率的影响

Fig. 7　The effect of overexpression of HDR factors with different concentrations on the KI efficiency

RAD18 系统的 KI 效率是 eSpCas9 系统的 1.4~1.9 倍 (图 9)。

2.3　eSpCas9-RAD18 系统对 HEK293T 细胞的影响

将 eSpCas9-RAD18 系统转染至 HEK293T 细胞中，48 h 后发现 eSpCas9-RAD18 能够促进细胞增殖 (图 10A)。其中 G1 期显著减少，S 期增加。为了进一步研究 eSpCas9-RAD18 系统对 DNA 修复途径的影响，本研究检测了 NHEJ 和 HDR 因子的表达水平。结果显示，与 eSpCas9 系统相比，Cas9-RAD18 系统能分别提高 *CtIP*、*RAD50* 和 *LIG4* 基因 82%、171% 和 115% 的 mRNA 表达水平 (图 10B)。另外，我们也检测到了 Cas9-RAD18 系统具有比 Cas9 系统更高的外源基因 EGFP 的蛋白表达水平 (图 11)，揭示了 Cas9-RAD18 系统具有更高的 KI 效率。Sanger 测序结果表明外源基因 *EGFP* 确实整合到了靶位点处 (图 12)。



U6 和 CBh 为启动子，NLS 为核定位信号，XTEN peptide 为连接肽，bGH polyA 为终止子

U6 and CBh are promoters, NLS is the nuclear localization sequence, XTEN peptide is the linking peptide, bGH polyA is the terminator

图 8　eSpCas9-HDR 载体结构图

Fig. 8　eSpCas9-HDR carrier structure diagram

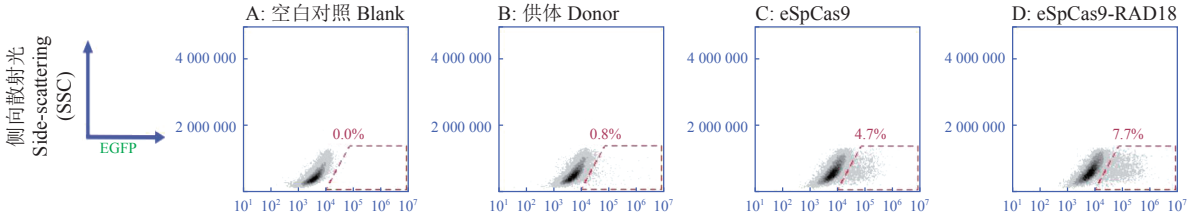
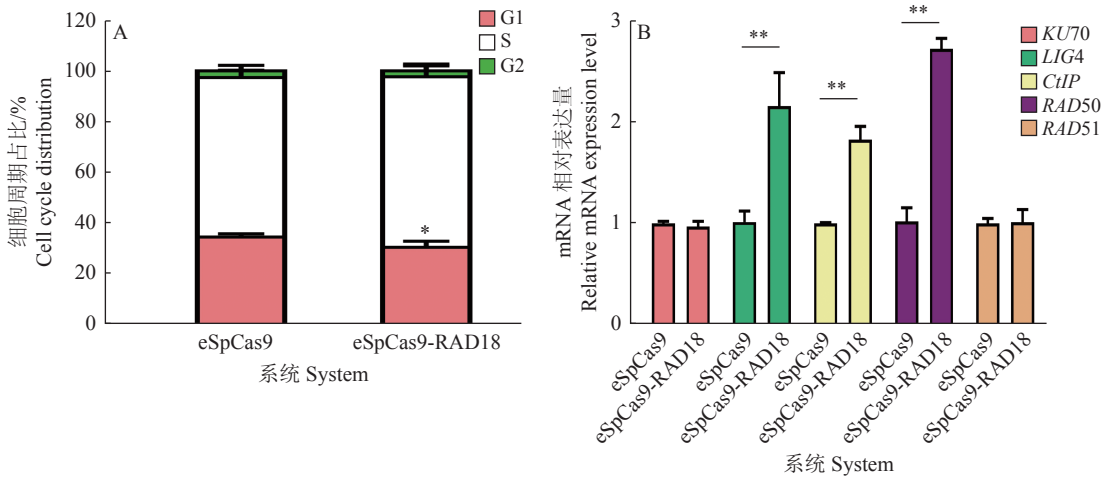


图 9 eSpCas9-RAD18 系统的 KI 效率

Fig. 9 KI efficiency of eSpCas9-RAD18 system



“*”和“**”分别表示差异达到 0.05 和 0.01 的显著水平 (*t* 检验)

"*" and "**" indicate difference at 0.05 and 0.01 significance levels, respectively (*t* test)

图 10 eSpCas9-RAD18 系统对细胞周期和 DNA 修复因子表达的影响

Fig. 10 The effect of eSpCas9-RAD18 system on cell cycle and expression of DNA repair factors

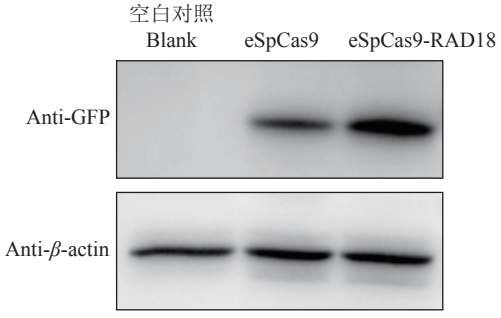


图 11 eSpCas9-RAD18 系统提高外源 EGFP 的表达

Fig. 11 eSpCas9-RAD18 system improves the expression of exogenous EGFP

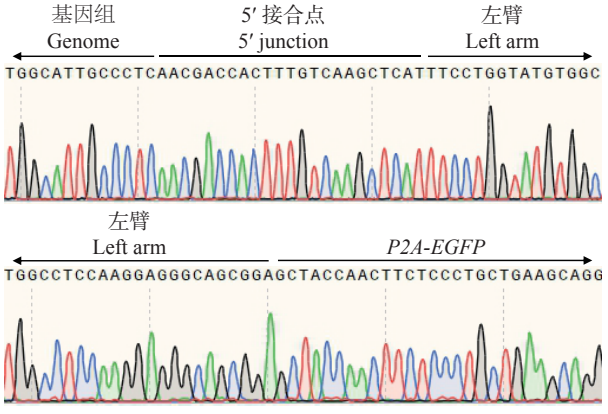


图 12 *EGFP* 定点整合至人 *GAPDH* 位点

Fig. 12 *EGFP* site-specific integration into human *GAPDH* site

3 讨论与结论

CRISPR/Cas9 系统能够高效、特异地切割目的基因并产生相应的 DSB，但其介导的基因组定点整合和修复被低效的 HDR 效率限制。由于人为构建的 CRISPR/Cas9 系统中 Cas9 核酸酶产生的 DSB 更容易被有偏的 NHEJ 途径修复，因此及时激活 HDR 对修复 DSB 和维护基因组稳定性是非常必要的。在哺乳动物细胞中，RAD51 和 RAD18 对 HDR 通路的激活有着重要作用。本研究通过 eSpCas9 融合 HDR 因子或过表达 HDR 因子以提高基因 KI 效率，结果发现仅有融合 RAD18 的 eSpCas9 系统能显著提高哺乳动物细胞的 KI 效率；而过表达 RAD18 不具备提高 HDR 效率的趋势。这可能是由于 RAD18 在细胞核内的定位和剂量差异导致的。eSpCas9-RAD18 系统的 RAD18 主要分布在靶位点处，且受 eSpCas9 系统的低转染效率限制；而过表达的 RAD18 在全细胞核中高表达 (5~6 倍)。尽管仅依赖 RAD18 的 UBZ 结构域就足够促进 HDR[20]，但目前并没有关于靶位点处不同 RAD18 剂量对 HDR 影响的研究。另外，RAD18 在细胞中存在至少 2 种形式，包括无活性的单泛素化形式 (RAD18-

Ub) 和有活性的非泛素化形式, 前者对后者有着强烈的结合偏好[21], 而 eSpCas9-RAD18 融合蛋白似乎不产生泛素化形式。因此 RAD18 的泛素化可能对提高 KI 效率是无益的。研究表明, UBZ 结构域的完整性对抑制 53BP1 有着决定性作用[22], 而缺失 SAP 结构域 RAD18 能够拦截 53BP1 向 DNA 损伤位点的募集, 进而增强 Cas9 介导的报告载体的 HDR 效率[20], 但是否影响 RAD18-Ub 的形成目前不能确定。因此, 构建 Cas9 融合突变型 RAD18 可能更有利于提高细胞的 KI 效率。调节 NHEJ 和 HDR 的平衡一直是提高基因编辑效率的重要手段。研究表明, 将 HDR 因子 CtIP 蛋白与 Cas9 蛋白融合后, Cas9 介导的 KI 效率增加了 1.5~2.5 倍[23]。MRE11 和 RAD52 分别与 Cas9 蛋白融合后, HDR 效率均提高了 2 倍, 而 NHEJ 显著降低[24]。这些策略说明 Cas9 与 HDR 因子融合表达能够特异性提高靶位点处的 HDR 效率。研究表明, 将突变型 hRAD51 融合到 Cas9 蛋白的 N 端或将其融合至 Cas9 (D10A) 切口酶 C 端均无法提高 HDR 效率, 而将其融合至 Cas9 (D10A) 切口酶 N 端能够将 HDR 效率提高 2.4 倍[25]。这表明 RAD51 的融合方式影响哺乳动物细胞的 KI 效率。Kurihara 等[26] 在小鼠神经元细胞中过表达 RAD51 发现, 其提高了 Cas9 的基因 KI 效率。在人胚胎干细胞、诱导性多功能干细胞和 HCT116 大肠癌细胞中也同样实现了编辑效率的提高[27]。然而, Paffett 等[28] 发现在酵母细胞中, 过量的 RAD51 会抑制 SRS2 对 RAD51 核蛋白丝的分解来抑制 DSB 引发的同源重组。Kim 等[29] 证实人源的 RAD51 在中国仓鼠卵巢细胞和人类细胞中高水平表达对同源重组有显著的负面影响。RAD51 作为 DNA 修复核心蛋白, 先与 ssDNA 缠绕形成突触细丝, 细丝搜索同源序列, 并形成 D 环结构。随后重组与 ssDNA 结合, 过程中会得到 RAD52、BRCA2 和 RAD51 旁系复合物的支持[30]。过量的 RAD51 可能会与多个蛋白相互作用, 来促进 DNA 损伤修复中间体的分离或者阻碍 HDR 相关蛋白有序地被招募到 DSB 位点[31]。同时, 过多的 RAD51 聚集, 使核蛋白丝延长, 从而增加同源链搜索和侵入的难度。而本研究过表达不同浓度的 RAD51 均未能提高 HEK293T 细胞的 KI 效率。因此, 在不同的物种或细胞类型中, 过表达内源或外源的 RAD51 会产生不同的变化。

RAD51 和 RAD18 在 DNA 修复过程中是独立的, 作用不同。但并不排除这 2 条通路之间可能存在重叠。Huang 等[32] 发现 RAD18 能促进 HDR 通路关键蛋白 RAD51C 的积累, 证实它们之间存在物理相互作用。此外, RAD18 和 RNF8 对 RAD51 在放射治疗诱导的 DSB 位点聚合有关键作用[33]。Branzei 等[34] 发现 RAD51 和 RAD18 可能协同促进复制叉处 X 形姐妹染色单体连接来影响复制完成并抑制异常同源重组的发生, 但目前对 2 个通路之间存在何种协调尚不清楚。本研究发现 eSpCas9-RAD18 融合蛋白不能调节 RAD51 的表达, 而能够上调 CtIP、RAD50 和 LIG4 因子的表达, 促使 KI 效率提高。另外, RAD18 调节细胞增殖, 这与其 E3 连接酶功能和 PCNA 单泛素化无关, 而可能与 PI3K-Akt 通路和细胞周期蛋白 D1 有关[35]。本研究揭示了 eSpCas9 融合 RAD18 因子能够提高基因 KI 效率, 为细胞 DNA 损伤修复的研究及快速获得基因修饰细胞系/动物模型提供一种新方法。

参考文献:

[1] 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.e13.

[2] 史梦然, 沈宗毅, 张楠, 等. CRISPR/Cas9 系统在疾病研究和治疗中的应用[J]. 生物工程学报, 2021, 37(4): 1205-1228.

[3] ZHOU H, SU J, HU X, et al. *Glia*-to-neuron conversion by CRISPR-CasRx alleviates symptoms of neurological disease in mice[J]. Cell, 2020, 181(3): 590-603.e16.

[4] ZHANG X, LI Z, YANG H, et al. Novel transgenic pigs with enhanced growth and reduced environmental impact[J]. Elife, 2018, 7: e34286.

[5] 钟翠丽. 制备一种共表达多个酶基因的环保型转基因猪[D]. 广州: 华南农业大学, 2018.

[6] 严振鑫, 徐冬一. DNA 双链断裂的非同源末端连接修复[J]. 生命科学, 2014, 26(11): 1157-1165.

[7] LIEBER M R. The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway[J]. Annual Review of Biochemistry, 2010, 79: 181-211.

[8] LANS H, MARTEIJN J A, VERMEULEN W. ATP-dependent chromatin remodeling in the DNA-damage response[J]. Epigenetics and Chromatin, 2012, 5: 4.

[9] FUJITANI Y, YAMAMOTO K, KOBAYASHI I. Dependence of frequency of homologous recombination on the homology length[J]. Genetics, 1995, 140(2): 797-809.

[10] SABERI A, HOCHEGGER H, SZUTS D, et al. RAD18 and poly(ADP-ribose) polymerase independently suppress the access of nonhomologous end joining to double-strand breaks and facilitate homologous recombination-mediated repair[J]. Molecular and Cellular Biology, 2007, 27(7): 2562-2571.

[11] BURROWS A E, ELLEDGE S J. How ATR turns on: TopBP1 goes on ATRIP with ATR[J]. Genes & Develop-

ment, 2008, 22(11): 1416-1421.

[12] BARKLEY L R, PALLE K, DURANDO M, et al. c-Jun N-terminal kinase-mediated Rad18 phosphorylation facilitates Polη recruitment to stalled replication forks[J]. Molecular Biology of The Cell, 2012, 23(10): 1943-1954.

[13] BI X, BARKLEY L R, SLATER D M, et al. Rad18 regulates DNA polymerase kappa and is required for recovery from S-phase checkpoint-mediated arrest[J]. Molecular and Cellular Biology, 2006, 26(9): 3527-3540.

[14] SASATANI M, XU Y, KAWAI H, et al. RAD18 activates the G2/M checkpoint through DNA damage signaling to maintain genome integrity after ionizing radiation exposure[J]. Plos One, 2015, 10(2): e0117845.

[15] INAGAKI A, VAN CAPPELLEN W A, VAN DER LAAN R, et al. Dynamic localization of human RAD18 during the cell cycle and a functional connection with DNA double-strand break repair[J]. DNA Repair, 2009, 8(2): 190-201.

[16] LIU T, HUANG J, CHEN J J. RAD18 lives a double life: Its implication in DNA double-strand break repair[J]. DNA Repair, 2010, 9(12): 1241-1248.

[17] SONG J, YANG D, XU J, et al. RS-1 enhances CRISPR/Cas9- and TALEN-mediated knock-in efficiency[J]. Nature Communications, 2016, 7: 10548.

[18] HE X, TAN C, WANG F, et al. Knock-in of large reporter genes in human cells via CRISPR/Cas9-induced homology-dependent and independent DNA repair[J]. Nucleic Acids Research, 2016, 44(9): e85.

[19] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method[J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.

[20] NAMBIAR T S, BILLON P, DIEDENHOFEN G, et al. Stimulation of CRISPR-mediated homology-directed repair by an engineered RAD18 variant[J]. Nature Biotechnology, 2019, 10(1): 3395.

[21] ZEMAN M K, LIN J R, FREIRE R, et al. DNA damage-specific deubiquitination regulates Rad18 functions to suppress mutagenesis[J]. Journal of Cell Biology, 2014, 206(2): 183-197.

[22] HELCHOWSKI C M, SKOW L F, ROBERTS K H, et al. A small ubiquitin binding domain inhibits ubiquitin-dependent protein recruitment to DNA repair foci[J]. Cell Cycle, 2013, 12(24): 3749-3758.

[23] CHARPENTIER M, KHEDHER A H Y, MENORET S, et al. CtIP fusion to Cas9 enhances transgene integration by homology-dependent repair[J]. Nature Communications, 2018, 9(1): 1133.

[24] TRAN N T, BASHIR S, LI X, et al. Enhancement of precise gene editing by the association of Cas9 with homologous recombination factors[J]. Frontiers in Genetics, 2019, 10: 365.

[25] REES H A, YEH W H, LIU D R. Development of hRAD51-Cas9 nickase fusions that mediate HDR without double-stranded breaks[J]. Nature Communications, 2019, 10(1): 2212.

[26] KURIHARA T, KOUYAMA-SUZUKI E, SATOGA M, et al. DNA repair protein RAD51 enhances the CRISPR/Cas9-mediated knock-in efficiency in brain neurons[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2020, 524(3): 621-628.

[27] TAKAYAMA K, IGAI K, HAGIHARA Y, et al. Highly efficient biallelic genome editing of human ES/iPS cells using a CRISPR/Cas9 or TALEN system[J]. Nucleic Acids Research, 2017, 45(9): 5198-5207.

[28] PAFFETT K S, CLIKEMAN J A, PALMER S, et al. Overexpression of RAD51 inhibits double-strand break-induced homologous recombination but does not affect gene conversion tract lengths[J]. DNA Repair, 2005, 4(6): 687-698.

[29] KIM P M, ALLEN C, WAGENER B M, et al. Overexpression of human RAD51 and RAD52 reduces double-strand break-induced homologous recombination in mammalian cells[J]. Nucleic Acids Research, 2001, 29(21): 4352-4360.

[30] THOMPSON L H, SCHILD D. Homologous recombinational repair of DNA ensures mammalian chromosome stability[J]. Mutation Research-fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 2001, 477(1/2): 131-153.

[31] LISBY M, BARLOW J H, BURGESS R C, et al. Choreography of the DNA damage response: Spatiotemporal relationships among checkpoint and repair proteins[J]. Cell, 2004, 118(6): 699-713.

[32] HUANG J, HUEN M S, KIM H, et al. RAD18 transmits DNA damage signalling to elicit homologous recombination repair[J]. Nature Cell Biology, 2009, 11(5): 592-603.

[33] KOBAYASHI S, KASAISHI Y, NAKADA S, et al. Rad18 and Rnf8 facilitate homologous recombination by two distinct mechanisms, promoting RAD51 focus formation and suppressing the toxic effect of nonhomologous end joining[J]. Oncogene, 2015, 34(33): 4403-4411.

[34] BRANZEI D, VANOLI F, FOIANI M. SUMOylation regulates Rad18-mediated template switch[J]. Nature, 2008, 456(7224): 915-920.

[35] WONG R P, AGUISSA-TOURE A H, WANI A A, et al. Elevated expression of Rad18 regulates melanoma cell proliferation[J]. Pigment Cell & Melanoma Research, 2012, 25(2): 213-218.

【责任编辑 庄 延】