

· 实验研究 ·

利用 CRISPR/Cas9 技术对 VSX2 绿色荧光报告基因人诱导多能干细胞系的构建

郑丹丹 王远 张祖明 关远远 谢冰冰 晋康新 向孟清 钟秀凤

中山大学中山眼科中心 眼科学国家重点实验室, 广州 510060

通信作者: 钟秀凤, Email: zhongxf7@mail.sysu.edu.cn

郑丹丹和王远对本文有同等贡献

【摘要】 目的 构建表达视觉系统同源框 2 (VSX2) 增强绿色荧光蛋白 (eGFP) 报告基因的人诱导多能干细胞系 (hiPSCs)。**方法** 根据成簇规律间隔短回文重复序列及其相关蛋白 9 (CRISPR/Cas9) 技术原理, 设计 VSX2 的小向导 RNA (sgRNA), 构建敲除质粒及包含左右同源臂的 P2A-eGFP 供体质粒; 2 个质粒经测序鉴定后电转野生 BC1-hiPSCs 细胞系, 采用嘌呤霉素筛选获得单克隆, 扩增培养并鉴定。采用 PCR 和 Sanger 测序鉴定基因型; 采用核型分析法分析报告细胞系核型; 采用 STR 法排除细胞交叉污染; 采用免疫荧光法及逆转录 PCR 法检测报告细胞系的多能干细胞分子标志物的表达; 通过体外三胚层形成实验鉴定报告细胞系向三胚层分化的能力; 应用 3D 视网膜类器官诱导技术获得视网膜类器官, 并采用免疫荧光染色法评价 VSX2 蛋白与 eGFP 的共定位情况。**结果** 电转后通过 PCR 鉴定和 Sanger 测序成功筛选到 1 株含有 VSX2-eGFP 报告基因的 hiPSC 系。核型分析结果显示该报告细胞系核型正常。STR 鉴定结果表明, BC1-VSX2^{eGFP}-iPSCs 无细胞系交叉污染。逆转录 PCR 检测和免疫荧光染色表明, BC1-VSX2^{eGFP}-iPSCs 中 iPSCs 标志物基因和蛋白表达阳性, 包括 NANOG、OCT4、SOX2、DNMT3B 和 GDF3 mRNA 以及 NANOG、OCT4、SSEA4 和 TRA-1-60 蛋白。免疫荧光染色表明, 由 BC1-VSX2^{eGFP}-iPSCs 分化的三胚层组织中内胚层标志物甲胎蛋白 (AFP)、中胚层标志物 α -平滑肌肌动蛋白 (α -SMA) 和外胚层标志物神经细胞特异性微管蛋白 (TUJ1) 表达均为阳性; eGFP 与 VSX2 共表达于视网膜类器官的神经视网膜。**结论** 成功构建 1 株表达 VSX2-eGFP 报告基因的 hiPSCs, 该细胞系可实时指示 VSX2 蛋白的时空表达变化, 为视网膜发育、疾病机制研究及治疗方法评价提供有力工具。

【关键词】 CRISPR/Cas9; 视觉系统同源框 2 基因; 人诱导多能干细胞; 报告细胞系; 视网膜类器官; 分化

基金项目: 广东省科技计划项目 (2017B020230003); 广州市科技计划项目 (201803010078); 国家自然科学基金项目 (81570874、81970842); 科技部国家重点研发计划项目 (2017YFA0104101、2016YFC1101103); 中山大学百人计划项目 (PT1001010); 中山大学中山眼科中心眼科学国家重点实验室 PI 经费支持项目

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20200729-00535

Generation of VSX2 fluorescent reporter human induced pluripotent stem cells by CRISPR/Cas9 technology

Zheng Dandan, Wang Yuan, Zhang Zuming, Guan Yuanyuan, Xie Bingbing, Jin Kangxin, Xiang Mengqing, Zhong Xiufeng

State Key Laboratory of Ophthalmology, Zhongshan Ophthalmic Center, Sun Yat-sen University, Guangdong 510600, China

Corresponding author: Zhong Xiufeng, Email: zhongxf7@mail.sysu.edu.cn

Zheng Dandan and Wang Yuan are contributed equally to the article

【Abstract】 Objective To establish a fluorescent reporter human induced pluripotent stem cell line (hiPSCs) for monitoring the expression of visual system homeobox 2 (VSX2). **Methods** VSX2_small guide RNA (sgRNA) was inserted into vector PX459 to construct knockout plasmid, and the P2A-eGFP knock-in donor plasmid was conducted at the same time. The two plasmids were transfected into BC1-hiPSCs. Single cell clones were generated after treatment of puromycin. Correct insertion was confirmed by PCR and Sanger sequencing. The isogenicity of the

parental and the reporter hiPSCs was confirmed by STR analysis and karyotyping. Pluripotency capacity of the reporter hiPSCs was analysed by reverse transcription PCR and immunofluorescence. Three-germ-layer formation experiment was carried out to analyse the multi-lineage differentiation ability of the reporter hiPSCs. The reporter hiPSCs were further differentiated to obtain three-dimension (3D) retinal organoids, and immunofluorescence was used to identify the co-localization of the enhanced green fluorescent protein (eGFP) and VSX2. **Results** A VSX2^{eGFP} reporter hiPSC clone was successfully obtained by CRISPR/Cas9 technology, which was consistent with the parental hiPSCs (BC1-hiPSCs) in morphology, without any chromosomal aberrations or cell line cross-contamination. Reverse transcription PCR assay and immunofluorescence showed obvious positive expressions of iPSCs markers in BC1-VSX2^{eGFP}-iPSCs, including NANOG, OCT4, SOX2, DNMT3B and GDF3 mRNA as well as NANOG, OCT4, SSEA4 and TRA-1-60 protein. The α -fetoprotein (AFP), α -smooth muscle actin (α -SMA) and neuronal class III β -tubulin (TUJ1) were expressed in endoderm, mesoderm and ectoderm, respectively, derived from BC1-VSX2^{eGFP}-iPSCs, and eGFP and VSX2 were co-stained in the neural retinal layer of 3D retinal organoids derived from BC1-VSX2^{eGFP}-iPSCs by immunofluorescence. **Conclusions** VSX2 fluorescent reporter hiPSCs is successfully generated, which can monitor the temporal and spatial expression changes of VSX2 protein in real time, providing a powerful tool for evaluation of retina development mechanism and cell therapy.

[Key words] CRISPR/Cas9; Visual system homeobox 2 gene; Human induced pluripotent stem cells; Reporter cell line; Retinal organoids; Differentiation

Fund program: Science & Technology Project of Guangdong Province (2017B020230003); Science & Technology Project of Guangzhou (201803010078); National Natural Science Foundation of China (81570874, 81970842); National Key Research and Development Program of the Ministry of Science and Technology (2017YFA0104101, 2016YFC1101103); Hundred Talent Program of Sun Yat-sen University (PT1001010); Fundamental Research Funds of the State Key Laboratory of Ophthalmology, the Zhongshan Ophthalmic Center Fund DOI:10.3760/cma.j.cn115989-20200729-00535

视网膜退行性疾病导致的不可逆盲给人类的健康和生活带来了沉重的经济和精神负担,这些疾病主要包括黄斑变性疾病和视网膜色素变性 (retinitis pigmentosa, RP) 等^[1-2],目前尚无有效治疗方法。人诱导多能干细胞 (human induced pluripotent stem cells, hiPSCs) 在体外可通过诱导分化获得各种类型的视网膜细胞,为细胞替代疗法治疗相关疾病带来了希望^[3-5]。近年来相关研究表明,hiPSCs 在特定条件下还可分化获 3D 视网膜类器官,可在体外模拟神经视网膜的发育过程和视网膜自然病变进程,为视网膜变性疾病干预药物的筛选和其他治疗方法的探索提供研究平台,也可为视网膜移植治疗提供丰富的种子细胞^[6-10]。hiPSCs 诱导分化获得 3D 视网膜类器官技术的快速发展使得人视网膜发育和视网膜疾病的体外研究成为可能,近年来成簇规律间隔短回文重复序列及其相关蛋白 9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats associated protein 9, CRISPR/Cas9) 等基因编辑技术的发展,以及利用基因编辑技术构建的荧光报告基因细胞系更是为视网膜类器官的活体实时观察提供了强有力的工具^[11-12]。视觉系统同源框 2 (visual system homeobox 2, VSX2) 是神经视网膜发育过程中至关重要的转录因子,为视网膜祖细胞 (retinal

progenitor cells, RPCs) 代表性的标志物之一^[13-14]。在视网膜形成早期,VSX2 主要表达于 RPCs 中^[15],而在视网膜发育后期和成熟的视网膜中,VSX2 主要表达于双极细胞^[16]。对 hiPSCs 诱导分化为视网膜类器官过程中 VSX2 在不同类型视网膜细胞中的表达进行研究是关键环节之一,目前对于 VSX2 在视网膜细胞中的表达主要是通过动物模型进行研究^[15-19],但由于动物与人类之间存在明显的种属差异,且人视网膜样本难以获得,因此迄今为止 VSX2 在人视网膜中表达的相关研究仍存在空缺。本研究中采用 CRISPR/Cas9 技术构建 VSX2 的增强绿色荧光蛋白 (enhanced green fluorescence protein, eGFP) 报告基因 hiPSCs 细胞系,为视网膜发育的实时观察、相关疾病机制研究、视网膜疾病干预药物的筛选及细胞替代治疗提供工具。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞来源 BC1-iPSCs 系由中国科学技术大学程临钊教授馈赠,该细胞系详细信息见文献[20]。

1.1.2 主要试剂及仪器 mTeSR1 培养基 (加拿大 Stemcell Technologies 公司); 基质胶 (Matrigel) (美国 Corning 公司); DMEM/F12、DMEM Basic、N2 添加剂、

非必需氨基酸 (non-essential amino acids, NEAA) 基础培养基、GlutaMAX 标准细胞培养基、B27 (不含维生素 A) (美国 Gibco 公司); 肝素、牛磺酸 (美国 Sigma 公司); 胎牛血清 (阿根廷 Natocor 公司); 动物基因组快速鉴定试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司); 2 倍 TaqMasterMix 预混酶 (日本 TaKaRa 公司); 兔抗人 NANOG 一抗 (ab21624, 1:100)、鼠抗人 SSEA4 一抗 (ab16287, 1:100)、鼠抗人 TRA-1-60 一抗 (ab16288, 1:100)、鼠抗人神经细胞特异性微管蛋白 (neuronal class III β -tubulin, TUJ1) 一抗 (ab7751, 1:500)、鼠抗人 α -平滑肌肌动蛋白 (α -smooth muscle actin, α -SMA) 一抗 (ab119952, 1:500)、鼠抗人甲胎蛋白 (α -fetoprotein, AFP) 一抗 (ab3980, 1:200) (英国 Abcam 公司); 兔抗人 OCT4 一抗 (A7920, 1:200) (武汉爱博泰克生物科技有限公司); 羊抗人 VSX2 一抗 (ab9016, 1:200) (德国 Millipore 公司); 驴抗兔 Alexa Fluor-555 标记二抗 (A31572, 1:500)、驴抗鼠 Alexa Fluor-555 标记二抗 (A31570, 1:500)、驴抗羊 Alexa Fluor-555 标记二抗 (A21436, 1:500) (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); DAPI 染液 (NY809, 1:1000) (中国东仁化学科技(上海)有限公司)。TDL-40B 型飞鸽牌离心机 (上海安亭科学仪器厂); Neon 型电转仪 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); TS100 型光学倒置显微镜 (日本尼康株式会社)。

1.2 方法

1.2.1 hiPSCs 的培养及 3D 视网膜类器官的分化

采用 mTeSR1 培养基将 hiPSCs 培养于基质胶包被的培养板上,待细胞融合度达到约 80% 时进行传代或诱导分化。参照文献[7-10]的方法诱导分化 hiPSCs,将 hiPSCs 酶解成小块状,用 mTeSR1 培养基重悬细胞,置于低吸附培养皿进行悬浮培养,获得拟胚体,当天记录为分化第 0 天。培养 1 d 后培养液逐渐过渡到神经诱导培养基 (neural induction medium, NIM),培养第 5 天将拟胚体接种到基质胶包被的培养皿贴壁培养,培养第 16 天将培养基更换为视网膜分化培养基 (retinal differentiation medium, RDM),培养第 28 天在光学倒置显微镜下用钨针分离神经视网膜样结构域,收集悬浮培养,培养第 42 天在 RDM 培养基中添加体积分数 10% 胎牛血清、100 mmol/L 牛磺酸和 2 mmol/L GlutaMAX,继续培养至收样检测。

1.2.2 小向导 RNA 设计及供体质粒的构建 在 NCBI GeneBank 数据库下载人 VSX2 基因的基因组序列,于网站 <http://crispor.tefor.net/> 上设计小向导 RNA (small guide RNA, sgRNA),由上海生工生物工程

股份有限公司合成 sgRNA 引物,95 °C 变性 5 min,4 °C 退火后插入至 pSpCas9 (BB)-2A-Puro (PX459) 载体,构建敲除质粒 PX459-VSX2_sgRNA。以 pBluescript SK (-) 载体为骨架,构建 pBluescript-LA-P2A-eGFP-RA 供体质粒。

1.2.3 电转及筛选存活单克隆 采用 Accutase 消化液将 BC1-iPSCs 分解为单细胞,用 100 μ l 含 10 μ g PX459-VSX2_sgRNA 敲除质粒和 10 μ g pBluescript-LA-P2A-eGFP-RA 供体质粒的电转缓冲液重悬细胞,进行电转。电转仪参数设定为 1100 V、10 ms/脉冲,共 3 个脉冲。电转后细胞用含终质量浓度为 300 ng/ml 嘌呤霉素的 mTeSR1 培养基进行筛选培养,挑取存活单克隆并进行扩增。

1.2.4 PCR 法鉴定及 Sanger 测序法验证插入的 P2A-eGFP 片段 扩增培养后的细胞克隆经过消化、离心和收集,用动物基因组快速鉴定试剂盒制备 DNA 混合液,采用 2 倍 TaqMasterMix 预混酶进行 PCR 检测,PCR 引物为验证上游引物 1 (validation forward primer 1, VF1) 与验证下游引物 1 (validation reverse primer 1, VR1),其中 VF1 位于供体质粒左同源臂对应基因组的 5' 端上游,VR1 位于供体质粒右同源臂对应基因组的 3' 端下游。插入片段大小为 786 bp,插入片段的克隆经 PCR 获得的条带大小为 1468 bp,野生型对照 BC1-iPSCs 克隆的条带大小为 682 bp,引物序列见表 1。PCR 体系:2 倍 TaqMasterMix 25.0 μ l,上下游引物各 1.5 μ l, DNA 混合液 1.0 μ l, 无菌超纯 H₂O 21.0 μ l,共 50.0 μ l。PCR 反应:95 °C 预变性 3 min; 95 °C 变性 15 s,55 °C 退火 15 s,72 °C 延伸 1 min,共 35 个循环;72 °C 再延伸 5 min,4 °C 保存。质量分数 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,目的条带切胶并由上海生工生物工程股份有限公司进行 Sanger 测序。

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequence

引物名称	引物序列 (5'-3')
VF1	AAGATGGCTTTCCAGCGCTTT
VR1	GCCAAAACCACTGAGCGTTGCAA

注:VF1:验证上游引物 1;VR1:验证下游引物 1
Note:VF1:validation forward primer 1;VR1:validation reverse primer 1

1.2.5 STR 检测排除细胞交叉污染 BC1-VSX2^{eGFP}-iPSCs 培养至融合度达 80%~90% 时,采用 0.5 mmol/L EDTA 消化,离心半径为 15 cm,1500 r/min 离心 5 min,收集细胞,由南京科佰生物科技有限公司进行 STR 检测。

1.2.6 采用核型分析法检测报告细胞系的核型 BC1-VSX2^{eGFP}-iPSCs 培养至融合度约 50% 时,加入含终质量浓度为 0.8 μg/ml 秋水仙素的 mTeSR1 培养基,处理 2.5 h,采用质量分数 0.25% 胰蛋白酶 37 °C 消化 1 min,1 500 r/min 离心 10 min,收集细胞,由广州达安临床检验中心完成制片及核型分析。

1.2.7 逆转录 PCR 检测培养的细胞中 iPSCs 标志物表达 BC1-hiPSCs 及 BC1-VSX2^{eGFP}-iPSCs 培养至融合度约 80% 时,采用 0.5 mmol/L EDTA 消化,1 500 r/min 离心 10 min,收集细胞沉淀,由广州洪祥生物医药科技有限公司检测 BC1-VSX2^{eGFP}-iPSCs 及 BC1-iPSCs 中 iPSCs 分子标志物 mRNA 表达水平,以 GAPDH 作为内参。iPSCs 分子标志物的基因引物序列见表 2。

表 2 iPSCs 分子标志物基因引物序列
Table 2 Primer sequence of iPSCs markers

基因	引物序列 (5'-3')	片段长度 (bp)
GAPDH	F: TGCACCACCAACTGCTTAGC	87
	R: GGCATGGACTGTGGTCATGAG	
NANOG	F: AAGGTCCCGTCAAGAAACAG	237
	R: CTTCTGCGTCACACCATTGC	
GDF3	F: AAATGTTTGTGTTCGGGTCA	179
	R: TCTGGCACAGGTCTTTCAG	
DNMT3B	F: ATAAGTCGAAGGTGCGTCGT	203
	R: GGCAACATCTGAAGCCATTT	
SOX2	F: GACAGTTAGCGGCACATGAA	176
	R: TAGGTCTGGAGCTGGTCAT	
OCT4	F: AACCCACACTGCAGCAGATCA	127
	R: TCTCGTTGTGCATAGTCGCT	

注:iPSCs:诱导多能干细胞;GAPDH:磷酸甘油醛脱氢酶;F:正向;R:反向

Note: iPSCs: induced pluripotent stem cells; GAPDH: glyceraldehyde-phosphate dehydrogenase; F: forward; R: reverse

1.2.8 三胚层形成实验 用 0.5 mmol/L EDTA 溶液将 hiPSCs 酶解成小块,在 mTeSR1 培养基悬浮培养并诱导拟胚体形成,培养第 12 天将培养基更换为 DMEM-F12,并添加体积分数 1% GlutaMAX、体积分数 10% FBS、体积分数 1% NEAA 基础培养基和体积分数 0.2% 2-巯基乙醇。继续培养 14 d,收集样本,采用免疫荧光染色法检测三胚层标志物。

1.2.9 免疫荧光染色检测 iPSCs 标志物、各胚层标志物以及视网膜类器官中 VSX2 蛋白的表达 参照文献 [21] 中的方法进行免疫荧光染色。用体积分数 4% PFA 固定细胞爬片 10 min,4% PFA 固定三胚层组织及视网膜类器官 30 min,梯度蔗糖脱水,OCT 包埋,冰冻切片后进行免疫荧光染色。用含体积分数 10% 驴血清的体积分数 0.25% Triton-X100 封闭通透 1 h,滴加相应一抗,4 °C 孵育过夜,洗去一抗,滴加相应二抗,室温避光孵育 1 h。洗去二抗,加入 DAPI 溶液,室温

下避光染核 5 min,洗涤封片。荧光显微镜下观察样本中各标志物的表达情况。

2 结果

2.1 CRISPR/Cas9 介导构建的 BC1-VSX2^{eGFP}-hiPSCs 系

CRISPR/Cas9 介导构建的敲除质粒和供体质粒经测序鉴定后电转至 BC1-hiPSCs (图 1A),经嘌呤霉素筛选后获得单克隆集落(图 1B)。随机挑取 20 个单克隆培养并扩增后经 PCR 片段插入鉴定显示有 4 个克隆(C5、C11、C14、C15)插入了片段(图 1C)。Sanger 测序证实克隆 C5 成功插入了 p2A 接头和 eGFP 片段,VSX2 基因第 5 号外显子 TAG 终止密码子后面的序列被 P2A-eGFP 代替(图 1D),将克隆 C5 命名为 BC1-VSX2^{eGFP}-iPSCs,扩大培养并连续传代及鉴定,发现细胞生长形态良好,呈集落样生长,边界清楚。

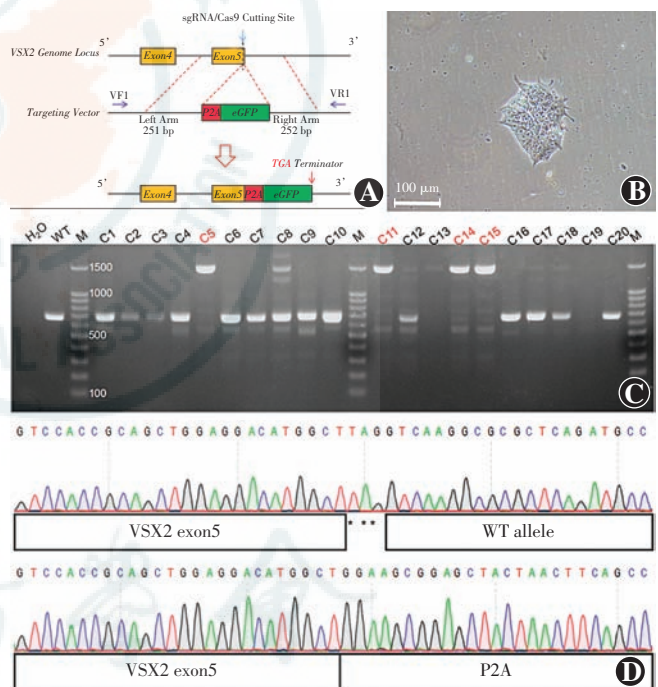


图 1 PCR 鉴定及 Sanger 测序验证 eGFP 报告基因的正确插入 A:CRISPR/Cas9 介导 BC1-VSX2^{eGFP}-hiPSCs 系构建流程图 B:嘌呤霉素筛选后 1 株 hiPSCs 克隆明场图(标尺=100 μm) C:嘌呤霉素筛选后随机挑取的 20 个 hiPSCs 克隆的 PCR 鉴定;WT 为野生型对照 BC1-iPSCs,M 为 100 bp DNA Ladder;C1~C20 分别对应 20 个 hiPSCs 克隆,红色表示 P2A-eGFP 敲入成功的克隆 D:克隆 C5 的 Sanger 测序结果图 注:sgRNA:小向导 RNA;VSX2:视觉系统同源框 2;VF1:验证上游引物 1;VR1:验证下游引物 1;WT:野生型
Figure 1 The identification of correct insertion of P2A-eGFP by PCR and Sanger sequencing A: A construction flow chart of BC1-VSX2^{eGFP}-hiPSCs line mediated by CRISPR/Cas9 B: A bright field of a hiPSCs clone after being selected by puromycin (bar = 100 μm) C: PCR analysis of 20 clones after being selected by puromycin WT: wild-type control (BC1-iPSCs); M: DNA ladder (100 bp); C1-C20: hiPSC clones after being selected by puromycin, clones with P2A-eGFP knock-in were marked in red D: Sanger sequencing result showed correct insertion of P2A-eGFP in clone 5 Note: sgRNA: small guide RNA; VSX2: visual system homeobox 2; VF1: validation forward primer 1; VR1: validation reverse primer 1; WT: wild type

2.2 BC1-VSX2^{eGFP}-iPSCs 核型分析及细胞系交叉污染情况

核型分析结果表明,BC1-VSX2^{eGFP}-iPSCs 显示正常的 G 带核型,无染色体畸变发生(图 2)。STR 检测结果表明,BC1-VSX2^{eGFP}-iPSCs 无其他细胞系的交叉污染。

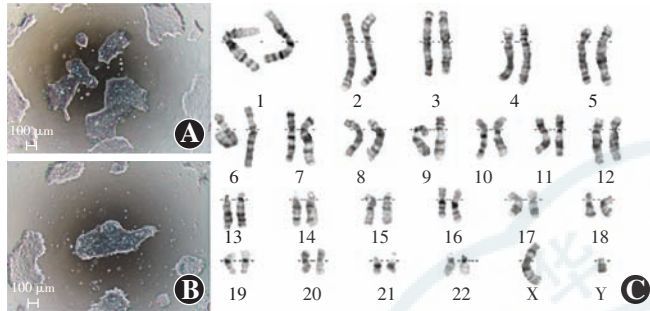


图 2 BC1-VSX2^{eGFP}-iPSC 的核型分析 A:秋水仙素处理前 BC1-VSX2^{eGFP}-iPSC 的明场图(标尺=100 μm) B:秋水仙素处理后 2.5 h,BC1-VSX2^{eGFP}-iPSCs 的明场图(标尺=100 μm) C:BC1-VSX2^{eGFP}-iPSC 核型分析图 显示正常的 G 带核型

Figure 2 Karyotype analysis of BC1-VSX2^{eGFP}-iPSCs A: Bright field of BC1-VSX2^{eGFP}-iPSCs before being treated by colchicine (bar = 100 μm) B: Bright field of BC1-VSX2^{eGFP}-iPSCs after being treated by colchicine for 2.5 hours (bar=100 μm) C: Karyotype analysis of BC1-VSX2^{eGFP}-iPSCs showed normal G-band karyotype

2.3 BC1-VSX2^{eGFP}-iPSCs 中 iPSCs 分子标志物表达情况

逆转录 PCR 检测结果显示,BC1-VSX2^{eGFP}-iPSCs 在 mRNA 水平上表达 iPSCs 分子标志物 NANOG、OCT4、SOX2、DNMT3B 和 GDF3,且与 BC1-iPSCs 中的表达强度一致(图 3A)。免疫荧光染色检测结果显示,iPSCs 分子标志物 OCT4、NANOG、SSEA4 和 TRA-1-60 在 BC1-VSX2^{eGFP}-iPSCs 中均呈阳性表达(图 3B~E)。

2.4 BC1-VSX2^{eGFP}-iPSCs 的三胚层分化潜能评价

BC1-VSX2^{eGFP}-iPSCs 酶解后悬浮培养形成的拟胚体能够在特定诱导条件下体外自发分化,获得三胚层组织。三胚层组织中内胚层标志物 AFP、中胚层标志物 α-SMA 和外胚层标志物 TUJ1 表达均为阳性,说明 BC1-VSX2^{eGFP}-iPSC 具备分化获得三胚层的能力(图 4)。

2.5 3D 视网膜类器官中 eGFP 与 VSX2 的共表达

在特定诱导条件下,BC1-VSX2^{eGFP}-hiPSCs 体外分化获得了 3D 视网膜类器官,包括神经视网膜和黑色 RPE 细胞。分化第 45 天,在悬浮的 3D 视网膜类器官中,神经视网膜层可见 eGFP 阳性表达,呈亮丽的绿色荧光,与黑色 RPE 细胞形成鲜明对比(图 5A~C),免疫荧光染色检测结果显示视网膜类器官中 eGFP 与 VSX2 蛋白共表达(图 5D~I)。

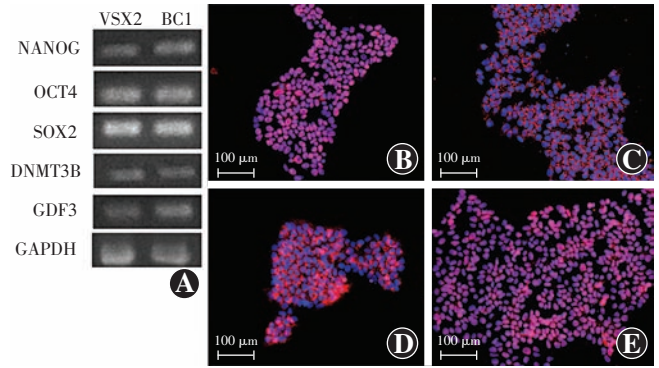


图 3 BC1-VSX2^{eGFP}-hiPSC 中 iPSCs 分子标志物的表达 A:逆转录 PCR 检测显示 BC1-VSX2^{eGFP}-hiPSCs (VSX2) 及 BC1-hiPSCs (BC1) 中 NANOG、OCT4、SOX2、DNMT3B 和 GDF3 mRNA 均有表达,且表达条带强度相似 B:免疫荧光检测显示 BC1-VSX2^{eGFP}-hiPSCs 中 NANOG 表达呈红色荧光 (Alexa Fluor-555),细胞核呈蓝色荧光 (DAPI)(标尺=100 μm) C:免疫荧光检测显示 BC1-VSX2^{eGFP}-hiPSCs 中 SSEA4 表达呈红色荧光 (Alexa Fluor-555),细胞核呈蓝色荧光 (DAPI)(标尺=100 μm) D:免疫荧光检测显示 BC1-VSX2^{eGFP}-hiPSCs 中 TRA-1-60 表达呈红色荧光 (Alexa Fluor-555),细胞核呈蓝色荧光 (DAPI)(标尺=100 μm) E:免疫荧光检测显示 BC1-VSX2^{eGFP}-hiPSCs 中 OCT4 表达呈红色荧光 (Alexa Fluor-555),细胞核呈蓝色荧光 (DAPI)(标尺=100 μm) 注:VSX2:视觉系统同源框 2; GAPDH:磷酸甘油醛脱氢酶

Figure 3 Expressions of pluripotency markers in BC1-VSX2^{eGFP}-hiPSCs A: Reverse transcription PCR presented positive expressions of NANOG, OCT4, SOX2, DNMT3B and GDF3 mRNA in both BC1-VSX2^{eGFP}-hiPSCs (VSX2) and BC1-hiPSCs (BC1) with the similar intensity B: NANOG showed a positive expression in BC1-VSX2^{eGFP}-hiPSCs with the red fluorescence (Alexa Fluor-555), and nucleus presented blue fluorescence (DAPI) (bar = 100 μm) C: SSEA4 showed a positive expression in BC1-VSX2^{eGFP}-hiPSCs with the red fluorescence (Alexa Fluor-555), and nucleus presented blue fluorescence (DAPI) (bar = 100 μm) D: TRA-1-60 showed a positive expression in BC1-VSX2^{eGFP}-hiPSCs with the red fluorescence (Alexa Fluor-555), and nucleus presented blue fluorescence (DAPI) (bar = 100 μm) E: OCT4 showed a positive expression in BC1-VSX2^{eGFP}-hiPSCs with the red fluorescence (Alexa Fluor-555), and nucleus presented blue fluorescence (DAPI) (bar = 100 μm) Note: VSX2: visual system homeobox 2; GAPDH: glyceraldehyde-phosphate dehydrogenase

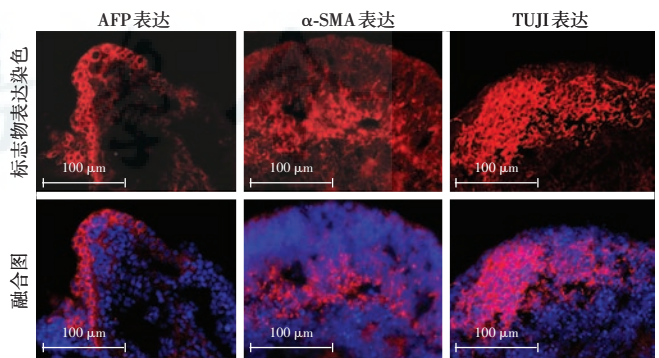


图 4 免疫荧光染色检测各胚层标志物在 BC1-VSX2^{eGFP}-hiPSCs 三胚层中的表达(标尺=100 μm) 免疫荧光显示三胚层组织中内胚层标志物 AFP、中胚层标志物 α-SMA 和外胚层标志物 TUJ1 均呈红色荧光 (Alexa Fluor-555),细胞核呈蓝色荧光 (DAPI) AFP:甲胎蛋白;α-SMA:α-平滑肌肌动蛋白;TUJ1:神经细胞特异性微管蛋白

Figure 4 Expressions of triploblastic markers in BC1-VSX2^{eGFP}-hiPSCs by immunofluorescence staining (bar = 100 μm) Endoderm marker AFP, mesoderm marker α-SMA and ectoderm marker TUJ1 proteins showed positive expression in the organoids derived from BC1-VSX2^{eGFP}-hiPSCs with the red fluorescence (Alexa Fluor-555), and cell nuclei were blue fluorescence (DAPI) AFP: α-fetoprotein; α-SMA: α-smooth muscle actin; TUJ1: neuronal class III β-tubulin

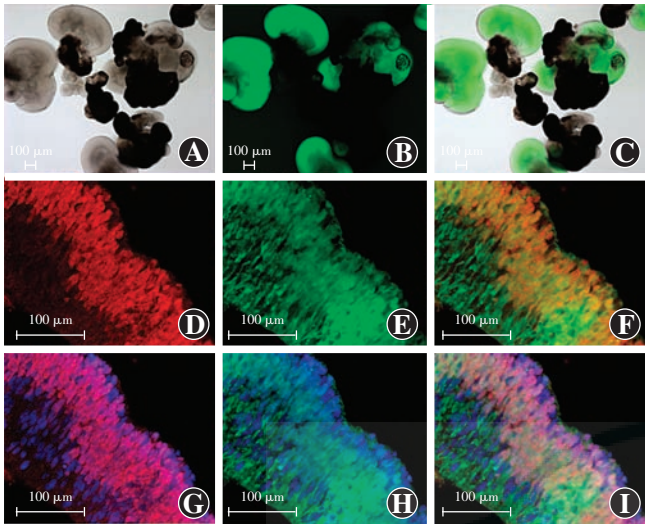


图 5 3D 视网膜类器官中 eGFP 与 VSX2 蛋白共表达 (标尺 = 100 μm) A: 明场图可见神经视网膜和黑色 RPE 细胞 B: eGFP 表达在神经视网膜层, 呈绿色荧光 (自发荧光) C: 图 A 和 B 融合图 D: VSX2 蛋白表达于视网膜类器官中, 呈红色荧光 (Alexa Fluor-555) E: 视网膜类器官中 eGFP 阳性表达, 呈绿色荧光 (自发荧光) F: 图 D 和 E 融合图 视网膜类器官中 VSX2 蛋白与 eGFP 共表达 G: 视网膜类器官中 VSX2 蛋白与细胞核染色, VSX2 蛋白呈红色荧光 (Alexa Fluor-555), 细胞核呈蓝色荧光 (DAPI) H: 视网膜类器官中 eGFP 与细胞核染色叠加图 I: VSX2、eGFP 与细胞核 DAPI 染色叠加图

Figure 5 Co-expression of eGFP and VSX2 protein in 3D retinal organoids derived from BC1-VSX2^{eGFP}-iPSCs (bar = 100 μm)

A: Bright field of 3D retinal organoids exhibited neural retina and black RPE cells B: eGFP was expressed in the neural layer of retinal organoids, showing a green fluorescence (autofluorescence) C: Merged picture of A and B D: VSX2 expressed in 3D retinal organoids, with a red fluorescence (Alexa Fluor-555) E: The expression of eGFP showed a green fluorescence in the 3D retinal organoids F: Merged picture of D and E VSX2 and eGFP co-expressed in the 3D retinal organoids G: Merged picture of red-staining VSX2 (Alexa Fluor-555) and blue-staining nucleus (DAPI) H: Merged picture of green-staining eGFP and blue-staining nucleus I: Merged picture of VSX2, eGFP and DAPI

3 讨论

本研究利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术成功构建了 VSX2 荧光报告基因 hiPSCs 系, 即 BC1-VSX2^{eGFP}-hiPSCs。通过在 hiPSCs 的 VSX2 基因编码序列 (coding sequence, CDS) 末端引入 1 个 P2A 短肽序列及 1 个 eGFP, 理论上靶蛋白 VSX2 表达量与 eGFP 表达量相同。因此, 荧光显微镜下实时观察 eGFP 蛋白表达水平即可反映出 VSX2 的表达状况, 而无需繁琐的末端检测。此外, BC-VSX2^{eGFP}-hiPSCs 经过基因操作后仍具备体外多胚层分化能力, 特别是向 3D 视网膜类器官分化的能力。eGFP 表达在早期发育的、富含视网膜前体细胞的神经视网膜层, 且与 VSX2 蛋白共表达, 与其他类型细胞, 如 RPE 细胞区分明显, 说明本研究构建的 VSX2-eGFP 报告系统特异性强, 有很好的应用

前景。

荧光报告基因的表达强度及稳定性受多种因素影响, 常见的因素有报告基因本身特性、启动子强度、内部核糖体进入位点、内含子、基因产物的发夹结构和组织固定剂等。Lam 等^[22]报道构建了 1 株含有 3 个报告基因 (VSX2^{Cerulean}-BRN3b^{eGFP}-RCVRN^{mCherry}) 的 hiPSCs 系, 其所构建的荧光报告基因细胞系分化得到的样本在组织固定及切片后出现报告荧光全部丢失, 可能与多个报告基因共同表达影响荧光蛋白的空间结构稳定性从而导致荧光消失有关。本研究构建的 VSX2-eGFP 荧光报告蛋白不仅特异性表达在分化早期视网膜类器官神经视网膜层的 RPCs 上, 荧光强度高, 而且在组织固定及切片进行末端检测时仍然能检测到强荧光信号, 为相关的下游研究提供了实验基础。

BC1-VSX2^{eGFP}-hiPSCs 及其构建策略可为视网膜相关疾病的建模、发展机制和防治研究提供有用的工具, 如 Ito 等^[23]通过 Nrl-GFP-miPSCs 及活细胞成像系统在体外构建感光细胞变性药物筛选平台; Sluch 等^[24]利用 BRN3B-mCherry-hESC 对视网膜类器官中的视网膜神经节细胞进行分选纯化、细胞移植等研究。类似地, 通过报告荧光, BC1-VSX2^{eGFP}-hiPSCs 也可用于视网膜细胞命运转归的追踪以及分化系统的优化、眼杯的分选纯化, 甚至药物筛选和细胞移植等下游研究。

本研究采用 CRISPR/Cas9 系统成功构建了 BC1-VSX2^{eGFP}-hiPSCs 系, 可实时指示 VSX2 蛋白的表达情况, 提示 hiPSCs 向视网膜分化的进程, 为视网膜细胞命运追踪、基因表达网络构建、疾病建模、药物筛选以及细胞移植治疗等下游研究提供了有用工具。

利益冲突 所有作者均声明不存在任何利益冲突

参考文献

- [1] Lim LS, Mitchell P, Seddon JM, et al. Age-related macular degeneration [J]. Lancet, 2012, 379 (9827): 1728-1738. DOI: 10.1016/S0140-6736(12)60282-7.
- [2] He Y, Zhang Y, Su G. Recent advances in treatment of retinitis pigmentosa [J]. Curr Stem Cell Res Ther, 2015, 10 (3): 258-265. DOI: 10.2174/1574888x096661410271103552.
- [3] Di Foggia V, Makwana P, Ali RR, et al. Induced pluripotent stem cell therapies for degenerative disease of the outer retina: disease modeling and cell replacement [J]. J Ocul Pharmacol Ther, 2016, 32 (5): 240-252. DOI: 10.1089/jop.2015.0143.
- [4] Rathod R, Surendran H, Battu R, et al. Induced pluripotent stem cells (iPSC)-derived retinal cells in disease modeling and regenerative medicine [J]. J Chem Neuroanat, 2019, 95: 81-88. DOI: 10.1016/j.jchemneu.2018.02.002.
- [5] Llonch S, Carido M, Ader M. Organoid technology for retinal repair [J]. Dev Biol, 2018, 433 (2): 132-143. DOI: 10.1016/j.ydbio.2017.09.028.
- [6] Eiraku M, Takata N, Ishibashi H, et al. Self-organizing optic-cup morphogenesis in three-dimensional culture [J]. Nature, 2011,

- 472(7341) : 51-56. DOI:10. 1038/nature09941.
- [7] Li GL, Xie BB, He LW, et al. Generation of retinal organoids with mature rods and cones from urine-derived human induced pluripotent stem cells [J/OL]. *Stem Cells Int*, 2018, 2018 : 4968658 [2020-06-16]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6020468/>. DOI:10. 1155/2018/4968658.
- [8] Luo Z, Zhong X, Li K, et al. An optimized system for effective derivation of three-dimensional retinal tissue via Wnt signaling regulation [J]. *Stem Cells*, 2018, 36(11) : 1709-1722. DOI:10. 1002/stem. 2890.
- [9] Zhong X, Gutierrez C, Xue T, et al. Generation of three-dimensional retinal tissue with functional photoreceptors from human iPSCs [J/OL]. *Nat Commun*, 2014, 5 : 4047 [2020-07-01]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4370190/>. DOI:10. 1038/ncomms5047.
- [10] Li G, Gao G, Wang P, et al. Generation and characterization of induced pluripotent stem cells and retinal organoids from a leber's congenital amaurosis patient with novel RPE65 mutations [J/OL]. *Front Mol Neurosci*, 2019, 12 : 212 [2020-07-03]. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnmol.2019.00212/full>. DOI:10. 3389/fnmol.2019.00212.
- [11] Phillips MJ, Capowski EE, Petersen A, et al. Generation of a rod-specific NRL reporter line in human pluripotent stem cells [J/OL]. *Sci Rep*, 2018, 8(1) : 2370 [2020-07-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5799252/>. DOI:10. 1038/s41598-018-20813-3.
- [12] Kaewkhaw R, Swaroop M, Homma K, et al. Treatment paradigms for retinal and macular diseases using 3-D retina cultures derived from human reporter pluripotent stem cell lines [J/OL]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2016, 57(5) : 1-11 [2020-07-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4855830/>. DOI:10. 1167/iov. 15-17639.
- [13] Liu IS, Chen JD, Ploder L, et al. Developmental expression of a novel murine homeobox gene (Chx10); evidence for roles in determination of the neuroretina and inner nuclear layer [J]. *Neuron*, 1994, 13(2) : 377-393. DOI:10. 1016/0896-6273(94)90354-9.
- [14] Liang L, Sandell JH. Focus on molecules: homeobox protein Chx10 [J]. *Exp Eye Res*, 2008, 86(4) : 541-542. DOI:10. 1016/j. exer. 2007. 03. 004.
- [15] Green ES, Stubbs JL, Levine EM. Genetic rescue of cell number in a mouse model of microphthalmia: interactions between Chx10 and G1-phase cell cycle regulators [J]. *Development*, 2003, 130(3) : 539-552. DOI:10. 1242/dev. 00275.
- [16] Rowan S, Cepko CL. Genetic analysis of the homeodomain transcription factor Chx10 in the retina using a novel multifunctional BAC transgenic mouse reporter [J]. *Dev Biol*, 2004, 271(2) : 388-402. DOI:10. 1016/j. ydbio. 2004. 03. 039.
- [17] Burmeister M, Novak J, Liang MY, et al. Ocular retardation mouse caused by Chx10 homeobox null allele; impaired retinal progenitor proliferation and bipolar cell differentiation [J]. *Nat Genet*, 1996, 12(4) : 376-384. DOI:10. 1038/ng0496-376.
- [18] Livne-Bar I, Pacal M, Cheung MC, et al. Chx10 is required to block photoreceptor differentiation but is dispensable for progenitor proliferation in the postnatal retina [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103(13) : 4988-4993. DOI:10. 1073/pnas. 0600083103.
- [19] Hoshino A, Ratnapriya R, Brooks MJ, et al. Molecular anatomy of the developing human retina [J]. *Dev Cell*, 2017, 43(6) : 763-779. DOI:10. 1016/j. devcel. 2017. 10. 029.
- [20] Chou BK, Mali P, Huang X, et al. Efficient human iPSC cell derivation by a non-integrating plasmid from blood cells with unique epigenetic and gene expression signatures [J]. *Cell Res*, 2011, 21(3) : 518-529. DOI:10. 1038/cr. 2011. 12.
- [21] Gutierrez C, McNally M, Canto-Soler MV. Cytoskeleton proteins previously considered exclusive to ganglion cells are transiently expressed by all retinal neuronal precursors [J/OL]. *BMC Dev Biol*, 2011, 11 : 46 [2020-07-01]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3161946/>. DOI:10. 1186/1471-213X-11-46.
- [22] Lam PT, Gutierrez C, Del Rio-Tsonis K, et al. Generation of a retina reporter hiPSC line to label progenitor, ganglion, and photoreceptor cell types [J]. *Trans Vis Sci Tech*, 2020, 9(21) : 1-14. DOI:10. 1167/tvst. 9. 3. 21.
- [23] Ito SI, Onishi A, Takahashi M. Chemically-induced photoreceptor degeneration and protection in mouse iPSC-derived three-dimensional retinal organoids [J]. *Stem Cell Res*, 2017, 24 : 94-101. DOI:10. 1016/j. scr. 2017. 08. 018.
- [24] Sluch VM, Davis CH, Ranganathan V, et al. Differentiation of human ESCs to retinal ganglion cells using a CRISPR engineered reporter cell line [J]. *Sci Rep*, 2015, 5(16595) : 1-17. DOI:10. 1038/srep16595.

(收稿日期:2020-07-29 修回日期:2020-08-26)

(本文编辑:尹卫靖)

读者·作者·编者

本刊投稿方式

初次投稿作者请按照下列步骤投稿:登陆中华医学会网站(<http://www.cma.org.cn>)→点击页面右上角的“注册”→选项注册账号→返回首页→点击页面右下方的“申请成为杂志作者”成为本刊作者进行投稿。投稿时请使用 Word 格式(.doc 文件类型),投稿后请注意自留原稿,并保留论文相关的原始资料,以备稿件修改补充所用。投稿后请从“业务中心”下载“中华医学会系列杂志论文投送介绍信及授权书(中文版)”,填写有关项目并请每位作者亲笔签字,加盖第一作者单位公章后寄 2 份至本刊编辑部,其中作者签名顺序和作者单位署录名称应与投稿时文章中署录的相一致,如有变更应由每位作者同意并请通信作者告知编辑部。投稿请注意:(1)在非公开刊物发表的稿件、学术会议交流的文章不属于一稿两投,但投稿时应向编辑部说明,非中文文字期刊已发表的文章再次在本刊投稿须征得首次发表期刊和本刊编辑部的同意。(2)作者须告知与该研究有关的利益冲突,如该研究被某机构资金资助的声明等利益关系。(3)如涉及保密问题,需附有关部门审查同意发表的证明。

本刊对实验研究中动物使用方面的要求

为了提高实验研究论文中实验动物这个基础环节在国际上的认可度,本刊要求作者投稿时提供以下相应信息:(1)实验动物的种属、来源、一般信息及饲养条件;(2)实验动物的等级;(3)实验所遵循的相关实验动物保护条例或法规的具体名称以及颁布的机构名称。

(本刊编辑部)