

## · 实验研究 ·

# CRISPR/Cas9 技术介导 Crx-iCreERT2 红色荧光报告人胚胎干细胞系的构建及其三维视网膜类器官培养

杜雨馨<sup>1</sup> 刘依宗<sup>1</sup> 阎飞跃<sup>2</sup> 沈吟<sup>1</sup><sup>1</sup>武汉大学人民医院眼科中心 430060; <sup>2</sup>武汉大学医学研究院 430060

通信作者:沈吟, Email: yinshen@whu.edu.cn

**【摘要】** 目的 利用 CRISPR/Cas9 技术构建 Crx-iCreERT2 红色荧光报告人胚胎干细胞(ESCs)系及其 3D 视网膜类器官培养。方法 对 H9 细胞系靶位点序列进行 PCR 扩增并测序验证后,利用 CRISPR/Cas9 技术设计多条 sgRNA 并对其进行活性检测,根据活性、特异性等因素选择最合适的 sgRNA。经酶切鉴定和测序确认打靶载体构建完成后,将打靶载体电转 H9 细胞系,在 *hES-ZLM-001* 基因 Exon4 和 3'-非翻译区之间终止密码子前插入 P2A-tdTomato-P2A-iCreERT2,进行药物筛选、阳性克隆富集。设计引物对目标区域进行 PCR 扩增并测序,根据测序结果和测序峰图选出纯合去抗性敲进阳性细胞克隆。培养所得 1-A07 细胞系,通过流式细胞分析法检测 OCT4 阳性细胞比例,采用细胞爬片免疫荧光染色法观察干细胞标志物 SOX2、NANOG 和 SSEA4 表达情况。采用核型分析方法检测细胞核型。应用 3D 培养技术获得视网膜类器官,于分化后不同时间点行冰冻切片,免疫荧光染色法检测不同种类细胞分子标志物的表达分布情况。结果 H9 细胞系靶位点序列与 Genebank 和 Ensembl 所提供序列一致。根据 H9 细胞系靶位点序列共设计 16 条 sgRNA,最终选择 sgRNA8 和 sgRNA12 作为 sgRNA。电转后通过 PCR 筛选得到 4 个去抗性敲进阳性克隆,其中 1-A07 细胞系经流式细胞仪分析 OCT4 阳性细胞比例约为 98.7%,所得细胞系外源性 tdTomato-P2A-iCreERT2 片段重组位置正确,正常表达干细胞标志物,核型分析结果正常。应用 3D 培养技术可定向诱导 1-A07 细胞系分化为表达 tdTomato 红色荧光的视网膜类器官。分化后 30 d,出现 BRN3A 阳性神经节细胞、CALBINDIN 阳性水平细胞、CHAT 阳性无长突细胞,分化后 45 d,出现 RECOVERIN 阳性光感受器细胞,分化后 90 d 出现 PKC $\alpha$  阳性双极细胞。神经节细胞分布于视网膜类器官深层,水平细胞、无长突细胞、双极细胞分布于中深层,光感受器细胞主要分布于顶层。结论 成功构建 Crx-iCreERT2 红色荧光报告人 ESCs 系,该细胞系可经 3D 培养诱导分化为表达 tdTomato 红色荧光的视网膜类器官。得到的视网膜类器官同人类正常视网膜的神经细胞组成一致,且发育的时间和空间顺序接近于正常的人类视网膜。该细胞系是一种强大的工具,可帮助实现人类视网膜发育和疾病产生的相关研究,并促进致盲疾病治疗方法的开发。

**【关键词】** 视网膜类器官; 3D 培养; 胚胎干细胞; 光感受器前体细胞**基金项目:** 国家重点研发计划“政府间国际科技创新合作/港澳台科技创新合作”重点专项项目(2017YFE0103400)

DOI:10.3760/cma.j.cn115989-20210208-00103

## Construction of Crx-iCreERT2 fluorescent reporter human embryonic stem cells by CRISPR/Cas9 technology and 3D retinal organoid culture

Du Yuxin<sup>1</sup>, Liu Yizong<sup>1</sup>, Yan Feiyue<sup>2</sup>, Shen Yin<sup>1</sup><sup>1</sup>Eye Center, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, China; <sup>2</sup>Medical Research Institute, Wuhan University, Wuhan 430060, China

Corresponding author: Shen Yin, Email: yinshen@whu.edu.cn

**【Abstract】** **Objective** To establish Crx-iCreERT2 fluorescent reporter human embryonic stem cell lines using CRISPR/Cas9 technology and 3D retinal organoid culture. **Methods** The target site sequence of H9 cell line was verified by polymerase chain reaction (PCR). SgRNAs were designed by CRISPR/Cas9 technique and their activity was detected. The most optimal sgRNA was selected according to the factors such as activity and specificity. After identification of the target vectors by restriction enzyme and sequencing, the target vectors were transferred to the

H9 cell line by electroporation. P2A-tdTomato-P2A-iCreERT2 was inserted between Exon4 and 3' -untranslated region of *hES-ZLM-001* gene. Knockin positive clones were obtained after drug treatment, enrichment of positive clones. Primers were designed to perform PCR on the target region, and homozygous de-resistant knockin positive cell clones were selected according to the sequencing results and peaks. The 1-A07 cell line was cultured, and then flow cytometry for the proportion of OCT4 positive cells, immunofluorescence for three stem cell molecular markers including SOX2, NANOG, SSEA4, karyotype analysis were carried out to confirm whether the 1-A07 cell line could be used for further experiments. Retinal organoids were obtained by three-dimensional (3D) culture technology and the expression of molecular markers was detected by immunofluorescence at different developmental stages of retinal organoids.

**Results** The target site sequence of H9 cell line was consistent with that given by Genbank and Ensembl. Sixteen sgRNAs were designed according to the target site sequence of H9 cell line, and finally sgRNA8 and sgRNA12 were selected. The sgRNAs and recombinant plasmids were transfected into the H9 cell line by electroporation, and four homozygous de-resistant knockin positive cell clones were obtained by PCR. Crx-iCreERT2 fluorescent reporter human embryonic stem cell lines were successfully obtained. In 1-A07 cell line, the proportion of OCT4 positive cells was about 98.7% by flow cytometry, and the expression of three stem cell markers was positive by immunofluorescence, and the karyotype was normal 46, XX. The results showed that the 1-A07 cell line could be used for further experiments. The Crx-iCreERT2 fluorescent reporter human embryonic stem cell lines were differentiated into tdTomato positive retinal organoids by 3D culture technology. BRN3A positive ganglion cells, CALBINDIN positive horizontal cells and CHAT positive amacrine cells appeared on day 30 of differentiation. RECOVERIN positive photoreceptors arose on day 45 of differentiation. PKC $\alpha$  positive bipolar cells presented on day 90 of differentiation. Ganglion cells were shown in the deep layer of retinal organoids, and horizontal cells, amacrine cells and bipolar cells in the middle layer, and photoreceptors in the top layer. **Conclusions** Crx-iCreERT2 fluorescent reporter human embryonic stem cell lines are successfully established and can be differentiated into retinal organoids that express tdTomato red fluorescence through 3D culture technology. Those retinal organoids contain the same types of neurons as normal human retinas, and follow a certain temporal and spatial developmental sequence similar to the developmental rules of normal human retinas. Crx-iCreERT2 fluorescent reporter human embryonic stem cell line is a powerful tool for researching retinal development and diseases and can be applied in treatments for blindness.

**[Key words]** Retinal organoid; Three-dimensional culture; Embryonic stem cell; Photoreceptor precursor

**Fund program:** National Key R&D Program of China Inter-Government International Science and Technology Innovation Cooperation/Science and Technology Innovation with Hong Kong, Macao and Taiwan (2017YFE0103400)  
DOI:10.3760/ema.j.cn115989-20210208-00103

视网膜退行性疾病包括视网膜色素变性、Leber 先天性黑矇、年龄相关性黄斑变性等,均伴随光感受器功能障碍和丧失,最终导致视力障碍和盲<sup>[1]</sup>。在疾病早期阶段,视网膜内尚有相当数量的光感受器细胞存在,将其作为靶细胞进行基因治疗和基因编辑是非常有前景的治疗方法。在光感受器细胞已大量丧失的疾病晚期阶段,以恢复视网膜光敏性为目的的替代策略正处于探索阶段,包括光遗传工具、光敏开关、视网膜假体和光感受器移植<sup>[2-4]</sup>,其中光感受器移植是一种很有前途的再生策略,影响其治疗效果的一个重要因素为供体细胞的来源<sup>[5]</sup>。视网膜变性疾病的细胞治疗中首选活性强、有丝分裂后的原代光感受器细胞,即光感受器前体细胞<sup>[6-9]</sup>。移植后光感受器前体细胞较成熟的光感受器细胞有更高的存活率,在视网膜下间隙可有效成熟,对晚期视网膜变性的功能修复有一定效果<sup>[10-12]</sup>。以往研究利用 2D 培养系统从胚胎干细胞 (embryonic stem cells, ESCs) 和诱导多能干细胞

(induced pluripotent stem cells, iPSCs) 中获得可移植的光感受器,但其效率低,仅有不足 20% 的细胞表达光感受器特异性标志物<sup>[13]</sup>。3D 培养是指在体外培养时为细胞提供一个接近体内微环境的培养技术。近年来其在体外生物科学领域迅速发展,实现了体外类器官的培养。2011 年, Eiraku 等<sup>[14]</sup>在体外培养光感受器方面取得了重大突破,首次通过 3D 培养技术将小鼠 ESCs 诱导分化为视杯。目前已有许多从人 ESCs 和 iPSCs 产生视网膜类器官的 3D 培养方案<sup>[15-17]</sup>。随着培养技术的进步,理论上可以实现从 ESCs 及 iPSCs 产生无限数量的可移植光感受器,光感受器移植用于临床的基本前提已经确立<sup>[18]</sup>。然而筛选出合适的光感受器前体细胞尚需抗原-抗体反应步骤,影响了细胞活性,且带抗体的细胞可能对移植效果有影响。成簇规律间隔的短回文重复序列 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR)/CRISPR 关联 (CRISPR associated, Cas) 基因是一种原核

生物的免疫系统,其可准确识别外源 DNA,利用 Cas 蛋白将 DNA 双链切断,因此成为第 3 代基因组定点编辑技术<sup>[19]</sup>。利用 CRISPR/Cas 技术对细胞系进行基因编辑可实现所需细胞系的构建<sup>[20]</sup>。Crx 是一种同源结构域转录因子,为光感受器前体细胞的分子标志物,可用于筛选适合移植的光感受器前体细胞。TdTomato 是一种信号非常强的红色荧光蛋白,对细胞和小鼠无明显毒性,是理想的细胞成像工具。本研究中拟通过 CRISPR/Cas 技术构建 Crx-iCreERT2 荧光报告人 ESCs 系,其 3D 培养得到的视网膜类器官中表达的 tdTomato 荧光可指示光感受器前体细胞,为光感受器移植疗法提供供体来源及细胞筛选、为人类视网膜发育和疾病发生的相关研究提供支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 细胞来源** H9 人 ESCs 系(美国 WiCell 公司)。

**1.1.2 主要试剂及仪器** mTeSR1 培养基(85850,美国 Stem Cell 公司);0.5 mol/L EDTA(174621)、PBS(干粉)(G0002),(武汉赛维尔生物科技有限公司);基质胶(356237,美国 BD Biosciences 公司);培养皿(CLS430165,美国 Corning 公司);细菌培养皿(BS-90-D,中国 Biosharp 公司);3D 细胞培养 96 孔板(MS-9096VZ,日本 Sumitomo Bakelite 公司);杜氏磷酸缓冲盐溶液(Dulbecco's phosphate buffered saline, DPBS)(c14190500bt)、DMEM/F12+GlutaMAX(10565-018)、N2 添加剂(17502-048)、MEM 非必需氨基酸溶液(MEM non-essential amino acids, MEM NEAA)(11140-050)、稳定型胰蛋白酶替代酶(12563-011)、丙酮酸钠(11360-070)、G-MEM 培养基(1710-035)、青链霉素双抗(15140-122)、血清替代物(10828-028)(美国 Gibco 公司);SMO 拮抗剂(HY-12848/CS-4176,美国 MedChemExpress 公司);Y-27632 HCl(S1049,美国 Selleck 公司);胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)(04-001-1A-AUS,以色列 Biological Industries 公司);2-巯基乙醇(M-3148)、脱氧核糖核酸酶 I(DNase I)(D5025)、视黄酸(R2625)(美国 Sigma 公司);兔抗人 SOX2 一抗(AF2018)(美国 R&D Systems 公司);兔抗人 NANOG 一抗(4903S)、小鼠抗人 SSEA4 一抗(4755S)(美国 Cell Signaling Technology 公司);兔抗人 OCT4(abs106544)(上海爱必信生物科技有限公司);兔抗小鼠 BRN3A 一抗(ab245230)(英国 Abcam 公司);兔抗大鼠 CALBINDIN 一抗(cb38)(瑞士 SWANT 公司);Wnt 信号抑制剂 I(681669)(Wnt Antagonist

I, IWR-1-endo)、山羊抗人 CHAT 一抗(AB144P)、兔抗人 RECOVERIN 一抗(ab5585)(美国 Millipore 公司);兔抗人 PKC $\alpha$  一抗(sc-208)(美国 Santa Cruz 公司);驴抗兔 IgG Alexa Flour-488(711-545-152)、驴抗山羊 IgG Alexa Flour-488(705-545-147)、驴抗绵羊 IgG Alexa Flour-488(713-545-147)、驴抗小鼠 IgG Alexa Flour-594(715-585-151)(美国 Jackson ImmunoResearch 公司);DAPI(D1306,美国 Life Technologies 公司);抗荧光淬灭封片剂(G1401,武汉谷歌生物科技有限公司);多聚甲醛(80096618,上海国药集团化学试剂有限公司);牛血清白蛋白(4240GR100,德国 Biofrox 公司);TRI 试剂(93289,美国 Sigma-Aldrich 公司)。离心机(5424R,德国 Eppendorf 公司);倒置荧光显微镜(IX73,日本 Olympus 公司);激光扫描共聚焦显微镜(LSM880,德国 Zeiss 公司);培养箱(CLM-170B-8-NF)、生物安全柜(AC2-4S1)(新加坡 Esco 公司);水浴锅(DK-S22,上海精宏公司);冰冻切片机(CM1950,德国 Leica 公司);流式细胞分析仪(LSRFortessa X-20 Cell Analyzer,美国 BD Biosciences 公司)。

### 1.2 方法

**1.2.1 CRISPR/Cas9 介导 Crx-iCreERT2 H9 红色荧光报告细胞系构建** 对 H9 细胞系靶位点序列进行 PCR 扩增并测序验证,确认其是否与 Genebank 和 Ensembl 所给序列一致,扩增引物信息见表 1。在 hES-ZLM-001 基因 Exon4 和 3' 非翻译区(untranslated region, UTR)之间终止密码子前插入 P2A-tdTomato-P2A-iCreERT2,利用 CRISPR/Cas9 技术制备 hES-ZLM-001 敲进 H9 细胞系(图 1)。基于 sgRNA 的设计原则,在靶位点区域设计多条 sgRNA。基于 CRISPR/Cas9 技术进行 sgRNA 活性检测。综合考虑活性、特异性等因素选择符合要求的 sgRNA 进行下一步实验。经过酶切鉴定和测序,确认打靶载体构建完成。将打靶载体电转 H9 细胞系后,进行药物筛选、阳性克隆富集。在野生型基因序列中设计引物 hES-ZLM-001-L-GT-F、hES-ZLM-001-L-GT-F3 和 hES-ZLM-001-R-GT-R,在外源序列中设计引物 hES-ZLM-001-L-GT-R、hES-ZLM-001-R-GT-F 和 Puro-GT-F(表 1)。使用 hES-ZLM-001-L-GT-F3/hES-ZLM-001-L-GT-R、hES-ZLM-001-R-GT-F/hES-ZLM-001-R-GT-R 和 hES-ZLM-001-L-GT-F/Puro-GT-F 这 3 对引物扩增突变型等位基因,使用 hES-ZLM-001-L-GT-F3/hES-ZLM-001-R-GT-R 引物同时扩增野生型和突变等位基因。对 PCR 扩增产物进行测序,根据测序结果和测序峰图判断具体基因型:纯合/杂合/野生型,最终得到去抗性敲进阳性细胞克隆。

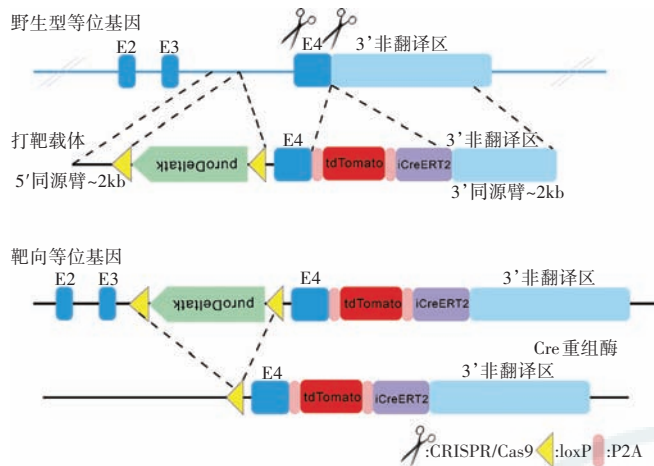


图 1 CRISPR/Cas9 介导 Crx-iCreERT2 H9 红色荧光报告细胞系构建流程图 在 *hES-ZLM-001* 基因的 Exon4 和 3' 非翻译区之间终止密码子前插入 P2A-tdTomato-P2A-iCreERT2

Figure 1 Construction flow chart of Crx-iCreERT2 H9 fluorescent reporter cell lines mediated by CRISPR/Cas9 P2A-tdTomato-P2A-iCreERT2 was inserted before the termination codon between Exon4 and 3' UTR of *hES-ZLM-001* gene

表 1 *hES-ZLM-001* 基因的 PCR 引物信息  
Table 1 PCR primers of *hES-ZLM-001* gene

引物	序列 (5'-3')	温度 (°C)	扩增产物长度 (bp)
<i>hES-ZLM-001</i> -5MSD-F	GCATCAAGCTTGGTACCGATGTATGTATGTTGCAATTAGATGG	52	957
<i>hES-ZLM-001</i> -5MSD-R	ACTTAATCGTGGAGGATGATCCATCTATCCATCCAATCATACCTGC	59	
<i>hES-ZLM-001</i> -3MSD-F	GCATCAAGCTTGGTACCGATCACCTCCCTATCAGGCCAGAGCTA	65	431
<i>hES-ZLM-001</i> -3MSD-R	ACTTAATCGTGGAGGATGATGCCAGACGCTGTTAGGCTTGAGAGA	66	

注:PCR:聚合酶链式反应  
Note:PCR:polymerase chain reaction

**1.2.2 流式细胞分析法验证细胞系干性** 分别向 H9 细胞系及 1-A07 细胞系的培养皿内加入 EDTA 消化液, 孵育 6~8 min, 低速 (1 200 r/min) 离心 5 min 去上清, 用 DPBS 培养基重悬细胞, 细胞计数。将细胞悬液转移至离心管内, 保证每个离心管内细胞数为  $1 \times 10^7 \sim 5 \times 10^7$ , 低速离心 5 min 去上清, 用质量分数 4% 多聚甲醛 4 °C 固定 1 h, 低速离心 5 min 去上清, PBS 清洗后低速离心 5 min 去上清; 用体积分数 4% 牛血清白蛋白和 2% TRI 在 4 °C 封闭过夜, 低速离心 5 min 去上清; 分别向含 H9 细胞悬液 (阳性对照) 及 1-A07 细胞悬液的离心管中加入 OCT4 (1:500) 一抗, 另一管 H9 细胞悬液 (阴性对照) 不加一抗, 4 °C 孵育 24 h, 低速离心 5 min 去上清, PBS 清洗后低速离心 5 min 去上清; 向各个离心管内加相应荧光标记二抗

(1:500), 4 °C 避光孵育过夜, 低速离心 5 min 去上清, PBS 清洗后低速离心 5 min 去上清。用 PBS 重悬细胞, 200 目尼龙网过滤后将其转移至流式管中, 应用流式细胞仪检测, 观察 OCT4 阳性细胞比例。

**1.2.3 免疫荧光染色法验证细胞系干性** 将 24 mm × 24 mm 盖玻片置于浓硫酸中过夜, 次日用自来水冲洗后放入无水乙醇中浸泡 6 h, 冲洗后高压消毒并烘干; 将盖玻片放入质量浓度 0.1 mg/ml 多聚赖氨酸溶液中浸泡 5 min, 晾干备用。向 ESCs 的培养皿内加入 EDTA 消化液, 孵育 6~8 min, 1 200 r/min 离心 5 min 去上清, 用 mTeSR1 培养基重悬细胞, 密度约为  $3.5 \times 10^5$  个/ml; 将处理好的玻片放入 6 孔板内, 将细胞悬液逐滴滴到玻片上, 放入培养箱培养, 待细胞达 70%~80% 融合时, 吸去培养基, 使用质量分数 4% 多聚甲醛固定 20 min, PBS 清洗; 用 0.5% TRI 室温通透 20 min, PBS 漂洗; 用 10% 牛血清白蛋白和 0.5% TRI 在 4 °C 条件下封闭 30 min, 吸去封闭液; 加入 SOX2 (1:1 000)、NANOG (1:200)、SSEA4 (1:500) 一抗, 4 °C 孵育过夜, PBS 漂洗; 加相应荧光标记二抗 (1:500), 37 °C 避光孵育 30 min, PBS 清洗; 加 DAPI 溶液 (1:100), 避光染核 5 min, PBS 漂洗后使用抗荧光淬灭封片剂封片。在荧光显微镜下观察细胞中各分子标志物的表达情况。

**1.2.4 细胞系核型分析** 取构建成功的细胞系, 光学显微镜下观察细胞状态、密度, 待细胞融合面积占整个培养皿 70%~80% 时, 于含 0.2 μg/ml 秋水仙素的 mTeSR1 培养基中 37 °C 培养 2 h。向培养皿内加入 EDTA 消化液孵育 6~8 min, 1 200 r/min 离心 5 min 去上清, 用 mTeSR1 培养基重悬并轻轻吹散均匀。经低渗处理、预固定、固定后, 吸取细胞悬液, 滴至预冷的载玻片, 室温下干燥。滴加 Giemsa 工作液, 孵育 20~30 min, 自来水冲洗终止染色并烘干, 使用封片剂封片。在光学显微镜下观察细胞核, 使用 Chromosome Analysis Suite (ChAS) Software 进行细胞核型分析。

**1.2.5 细胞系 3D 培养诱导分化为视网膜类器官** 将构建的细胞系培养于含 mTeSR1 培养基的基质胶包被培养皿中, 待细胞融合度达 70%~80% 时传代或诱导分化。参照文献 [21] 的方法诱导分化人 ESCs, 将人 ESCs 酶解成单细胞, 用含 Y-27632 的 Medium I 培养基重悬细胞, 置于 3D 细胞培养 96 孔板中, 细胞接种密度为  $9 \times 10^3$  个/孔, 每孔 100 μl, 当天记录为分化第 0 天; 分化第 2 天, 向每孔加入质量分数 1% 基质胶; 分化第 6 天, 用不含 Y-27632 的 Medium I 培养基更换孔内一半原培养基; 分化第 12 天, 将每孔内的拟胚体转

移到细菌培养皿中,使用含 1% 基质胶的 Medium II 培养基继续培养;分化第 18 天,将拟胚体切割成 4~5 小块后,转移到新的细菌培养皿中,使用含视黄酸的 Medium III 培养基继续培养,之后每 7 d 换液 1 次。分化

第 100 天时,开始使用不含视黄酸的 Medium III 培养基。培养至分化第 30 天开始,每隔 15 d 取样进行 1 次检测,直至分化第 180 天,Medium I、II、III 培养基分别对应图中 D0~D12、D12~D18、D18 以后所用培养基(图 2)。

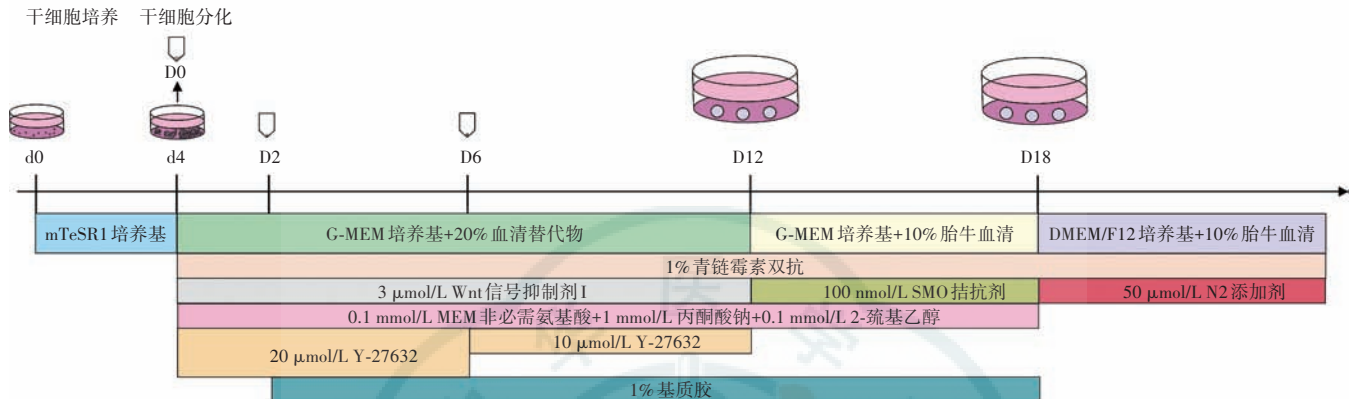


图 2 干细胞培养及诱导分化流程 d:干细胞培养天数;D:干细胞分化天数

Figure 2 Flow chart of culturing and induced differentiation of stem cell d:days of stem cell culture;D:days of stem cell differentiation

**1.2.6 免疫荧光染色法检测视网膜类器官中各类神经细胞蛋白的表达** 培养至分化第 30 天开始,每隔 15 d 进行 1 次收样,直至分化第 180 天。取培养的视网膜类器官,用 4% 多聚甲醛在 4 °C 固定 1 h,进行 OCT 包埋,行 14 μm 厚冰冻切片;取切片用 4% 牛血清白蛋白和 0.5% TRI 试剂封闭 1 h,滴加神经节细胞标志物 BRN3A (1:200)、水平细胞标志物 CALBINDIN (1:500)、无长突细胞标志物 CHAT (1:200)、光感受器细胞标志物 RECOVERIN (1:500)、双极细胞标志物 PKCα (1:500),4 °C 孵育过夜, PBS 漂洗;滴加相应荧光标记二抗,室温避光孵育 1 h, PBS 漂洗;滴加 DAPI 溶液,室温下避光染核 5 min, PBS 漂洗后抗荧光淬灭封片剂封片。激光扫描共聚焦显微镜下观察样本各标志物的表达情况,以此来判断视网膜类器官中是否存在相应种类的细胞。

靶位点区域共设计 16 条 sgRNA,其中 sgRNA1~8 为 5' 端引物,sgRNA9~16 为 3' 端引物。基于 CRISPR/Cas9 技术的活性检测结果显示,5' 端引物 sgRNA1、sgRNA2、sgRNA8 活性较高,3' 端引物 sgRNA11、sgRNA12、sgRNA13 活性较高(图 3)。最终选择 sgRNA8 和 sgRNA12 作为 sgRNA。打靶载体分别经限制内切酶 EcoRI+ScaI、BamHI+HindIII 和 BgIII 处理后,相应获得 3、4 和 4 个酶切产物,产物的长度和测序结果与目标产物一致,确认打靶载体构建完成(图 4)。

2 结果

2.1 Crx-iCreERT2 H9 红色荧光报告细胞系打靶载体的构建

经测序验证, hES-ZLM-001 基因扩增产物序列与 Genbank DNA 序列数据库和 Ensembl 基因组数据库中所提供序列一致。在

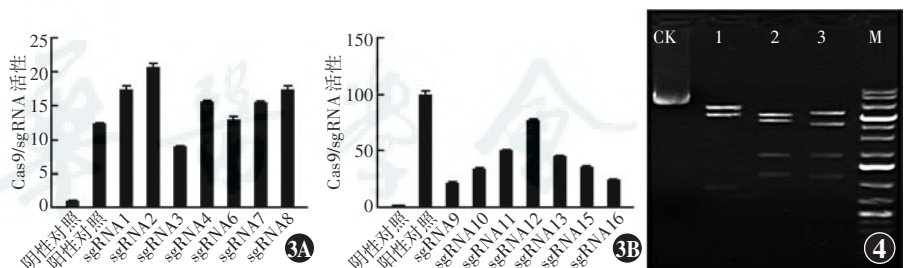


图 3 sgRNA 引物活性检测 A:5' 端 sgRNA 引物活性检测 sgRNA1、sgRNA2 和 sgRNA8 活性较高 B:3' 端 sgRNA 引物活性检测 sgRNA11、sgRNA12 和 sgRNA13 活性较高 图 4 打靶载体酶切验证 琼脂糖凝胶电泳结果显示不同限制性内切酶的酶切产物均与目标产物相一致 CK:阴性对照;1:限制性内切酶 EcoRI+ScaI (目标产物为 6 494 bp+5 308 bp+934 bp);2:限制性内切酶 BamHI+HindIII (目标产物为 5 227 bp+4 445 bp+1 867 bp+1 197 bp);3:限制性内切酶 BgIII (目标产物为 5 579 bp+4 124 bp+1 871 bp+1 162 bp);M:DNA 标志物

Figure 3 Detection of sgRNA primer activity A:The activity analysis results of 5'-sgRNA primers The activities of sgRNA1,sgRNA2 and sgRNA8 were higher among sgRNA 1-8 B:The activity analysis results of 3'-sgRNA primers The activities of sgRNA11,sgRNA12 and sgRNA13 were higher among sgRNA 9-16 Figure 4 Identification of the target vector by restriction enzyme sequencing Agarose gel electrophoretogram showed that the restriction enzyme products were consistent with the target products CK:negative control;1:Restriction Enzyme EcoRI+ScaI (expected products were 6 494 bp+5 308 bp+934 bp);2: Restriction Enzyme BamHI+HindIII (expected products were 5 227 bp+4 445 bp+1 867 bp+1 197 bp);3: Restriction Enzyme BgIII (expected products were 5 579 bp+4 124 bp+1 871 bp+1 162 bp);M:DNA marker

## 2.2 Crx-iCreERT2 H9 红色荧光报告细胞系基因型筛选及干性鉴定

对待筛选的细胞系克隆进行 PCR 测序, 根据测序来判断细胞系具体基因型, 综合考虑 PCR 结果及细胞株状态后, 最终得到 4 个去抗性敲进阳性克隆 (表 2), 分别为 1-C06、1-B06、1-C07 和 1-A07 (图 5)。通过流式分析确认 1-A07 细胞系干性良好 (图 6)。免疫荧光染色检测结果显示 1-A07 细胞系中 ESC 分子标志物 SOX2、NANOG 和 SSEA4 均呈阳性表达 (图 7)。核型分析表明, 1-A07 细胞系核型无异常, 为 46, XX (图 8)。结果显示, 外源性 tdTomato-P2A-iCreERT2 段重组位置正确, 且该干细胞系正常表达干细胞标志物, 核型分析结果无异常, 可用于后续实验。

表 2 4 个去抗性敲进阳性克隆信息  
Table 2 Four homozygous de-resistant knockin positive cell clones

克隆	同源重组等位基因	非同源重组等位基因			基因型
		Indel	野生型	Del	
1-C06	KI	5'WT (intron); 3'Δ2bp (UTR)	none	no band	KI, Indel
1-B06	KI	5'WT (intron); 3'Δ2bp (UTR)	none	no band	KI, Indel
1-C07	KI	5'WT (intron); 3'Δ2bp (UTR)	none	no band	KI, Indel
1-A07	KI	5'WT (intron); 3'Δ2bp (UTR)	none	no band	KI, Indel

注: KI: 敲入; Indel: 插入缺失标记; WT: 野生型; Δ: 碱基缺失; UTR: 非翻译区; none: 目的基因不存在; Del: 缺失; no band: 通过 PCR 反应未检测到预期的条带

Note: KI: knockin; Indel: insertion-deletion mark; WT: wild type; Δ: base deletion; UTR: untranslated region; none: target gene non-existent; Del: deletion; no band: expected band not detected by PCR

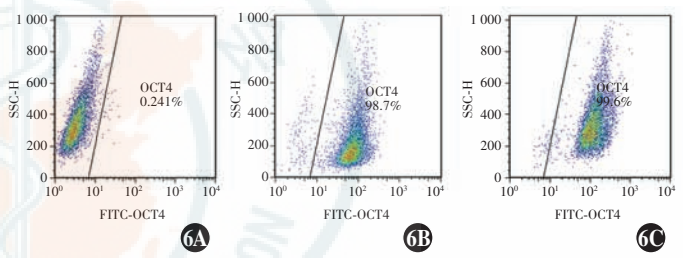
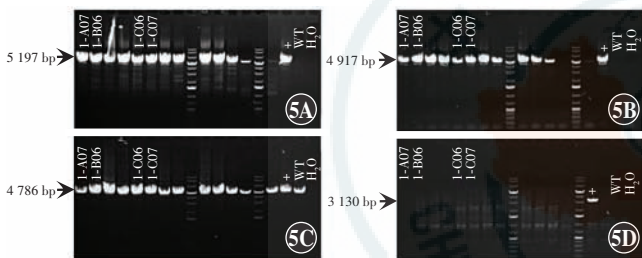


图 5 各细胞克隆不同引物扩增产物的琼脂糖凝胶电泳图 对 12 个待筛选的克隆进行 PCR 扩增, 综合考虑 PCR 结果及细胞株状态后, 最终得到 4 个去抗性敲进阳性克隆, 分别标记为 1-A07、1-B06、1-C06 和 1-C07 A: hES-ZLM-001-L-GT-F3/hES-ZLM-001-L-GT-R 引物扩增产物电泳图 B: hES-ZLM-001-R-GT-F/hES-ZLM-001-R-GT-R 引物扩增产物电泳图 C: hES-ZLM-001-L-GT-F3/hES-ZLM-001-R-GT-R 引物扩增产物电泳图 D: hES-ZLM-001-L-GT-F/Puro-GT-F 引物扩增产物电泳图 +: 阳性对照; WT: H9 野生型细胞系对照; H<sub>2</sub>O: 空白对照 图 6 各细胞系流式细胞分析 A: 阴性对照 (H9 细胞系无抗体) 的流式分析结果 OCT4 阳性细胞占 0.241% B: 1-A07 细胞系的流式分析结果 OCT4 阳性细胞占 98.7%, 表明 1-A07 细胞系干性良好 C: 阳性对照 (H9 细胞系抗体染色) 的流式分析结果 OCT4 阳性细胞占 99.6%, 表明 H9 细胞系干性良好

Figure 5 Agarose gel electrophoretogram of amplified products acquired by different primers of cell clones The 12 clones to be screened was tested by PCR. With PCR results and cell line status comprehensively considered, four de-resistant knockin positive clones were obtained and were labeled as 1-A07, 1-B06, 1-C06 and 1-C07 A: Primers were hES-ZLM-001-L-GT-F3/hES-ZLM-001-L-GT-R B: Primers were hES-ZLM-001-R-GT-F/hES-ZLM-001-R-GT-R C: Primers were hES-ZLM-001-L-GT-F3/hES-ZLM-001-R-GT-R D: Primers were hES-ZLM-001-L-GT-F/Puro-GT-F +: positive control; WT: wild-type H9 cell line control; H<sub>2</sub>O: blank control Figure 6 Flow cytometry analysis of different cell lines A: OCT4 positive cells accounted for 0.241% in H9 cell line with no antibody B: OCT4 positive cells accounted for 98.7% in 1-A07 cell line, which indicated that the stemness of 1-A07 cell line was good C: OCT4 positive cells accounted for 99.6% in H9 cell line stained with antibody, showing the stemness of H9 cell line was good

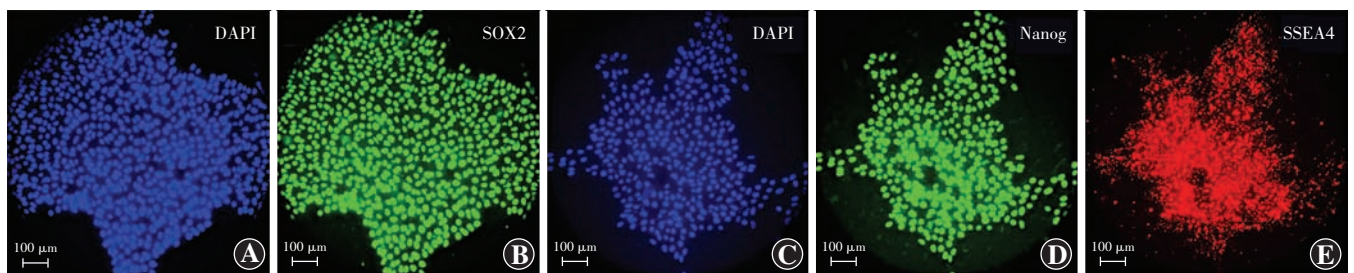


图 7 细胞爬片免疫荧光染色 (标尺 = 100 μm) A、C: 细胞核呈蓝色荧光 (DAPI, Alexa Fluor-405) B: SOX2 染色阳性, 呈绿色荧光 (Alexa Fluor-488) D: NANOG 染色阳性, 呈绿色荧光 (Alexa Fluor-488) E: SSEA4 染色阳性, 呈红色荧光 (Alexa Fluor-594)

Figure 7 Immunofluorescence of 1-A07 cell slides (scale bar = 100 μm) A, C: Cell nuclei presented blue fluorescence (DAPI, Alexa Fluor-405) B: SOX2 indicated green fluorescence (Alexa Fluor-488) D: Nanog showed green fluorescence (Alexa Fluor-488) E: SSEA4 displayed red fluorescence (Alexa Fluor-594)

### 2.3 Crx-iCreERT2 H9 红色荧光报告细胞系体外自发分化为视网膜类器官

分化第 2 天,细胞聚集成一球状,周围有部分散在细胞;分化第 6 天,细胞聚集成一致密球状,较之前体积增大,周围散在细胞基本消失,细胞团边缘处较其他部分略透明;分化第 12 天,可观察到球状拟胚体体积较之前进一步增大,边缘处出现突起的半透明小囊泡结构;拟胚体被切割后小囊泡逐渐形成视杯,且视杯体积逐渐增大;分化第 30 天,视网膜类器官形成,较透亮,呈淡黄色,并逐渐增大;分化后第 75 天,视网膜类器官中央厚,边缘稍薄,并逐渐增大、增厚;分化第 150 天,视网膜类器官形态、体积无明显变化(图 9)。

### 2.4 不同发育阶段视网膜类器官 tdTomato 荧光表达

TdTomato 荧光表达标记的为表达 Crx 的光感受器

前体细胞。分化第 30 天,在视网膜类器官内侧开始出现少量 tdTomato 荧光表达;分化第 45 天,荧光表达多集中在中深层;分化第 60 天和第 75 天,荧光表达主要集中在中深层,部分开始出现在顶层;分化第 90 天,荧光表达主要集中在顶层;分化第 150 天,荧光表达达峰值,随后荧光强度无明显变化(图 10)。

### 2.5 视网膜类器官中各标志蛋白表达情况

分化第 30 天,在类器官深层已出现较多 BRN3A 性神经节细胞,为视网膜类器官中最早出现的神经细胞类型,同时在视网膜类器官中深层开始零星出现 CALBINDIN 阳性水平细胞,以及 CHAT 阳性无长突细胞;分化第 45 天,在视网膜类器官最顶层开始零星出现 RECOVERIN 阳性光感受器细胞;分化第 90 天,在视网膜类器官中深层出现少量 PKC $\alpha$  阳性双极细胞(图 11)。

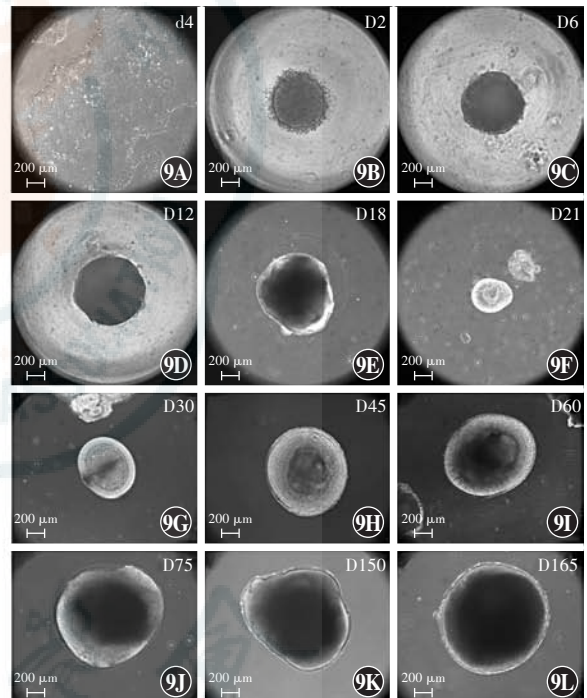
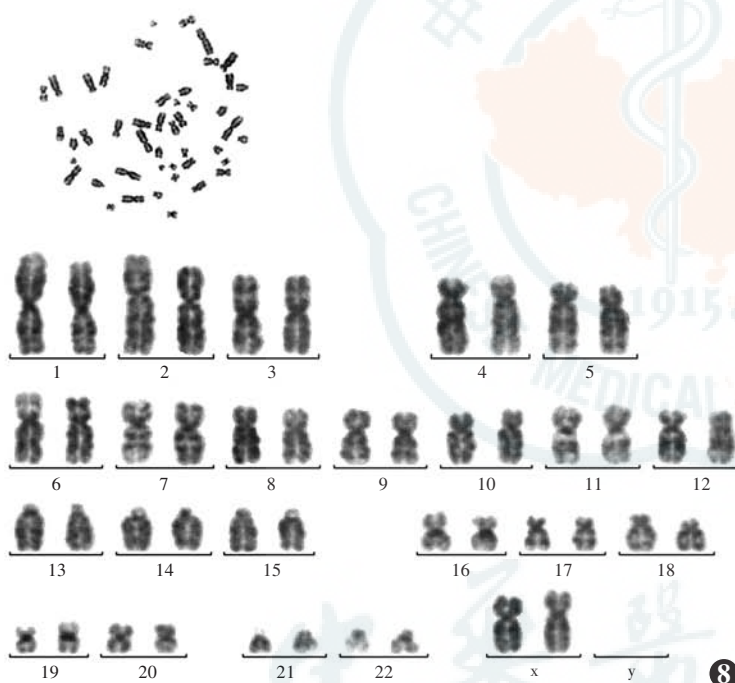


图 8 1-A07 细胞系核型分析 1-A07 细胞系的核型分析结果为 46 XX,染色体数量和形态无异常 图 9 光学显微镜下观察 Crx-iCreERT2 H9 红色荧光报告细胞系的体外自发分化( $\times 100$ ,标尺=200  $\mu\text{m}$ ) A: ESCs 细胞培养后 4 d,细胞互相连接连成片,细胞之间呈致密连接,不同细胞团片之间尚留有部分空间 B: 分化第 2 天,细胞聚集成一球状,球状细胞团位于孔中央底部,周围有部分散在细胞 C: 分化第 6 天,细胞聚集成一致密球状,较之前体积增大,周围散在细胞基本消失,边缘处较其他部分略微透明 D: 分化第 12 天,球状拟胚体体积较之前进一步增大,边缘处出现突起的半透明小囊泡结构 E: 分化第 18 天,切割后的拟胚体 F: 分化第 21 天,被切割后的小囊泡逐渐形成视杯,且视杯体积逐渐增大 G: 分化第 30 天,视网膜类器官基本形成,较透亮,呈淡黄色,并逐渐增大 H、I: 分化第 45 天和第 60 天,视网膜类器官逐渐增大 J: 分化第 75 天,视网膜类器官中央厚,边缘稍薄 K、L: 分化第 150 天和第 165 天,视网膜类器官形态、体积均无明显变化

**Figure 8 Karyotype analysis of 1-A07 cell line** The karyotype of 1-A07 cell line was 46 XX, indicating that the 1-A07 cell line was originated from a human female with normal number and morphology of chromosomes **Figure 9 Spontaneous differentiation of Crx-iCreERT2 H9 fluorescent reporter stem cells in vitro observed by light microscope**( $\times 100$ , scale bar = 200  $\mu\text{m}$ ) A: After 4 days of culture, the ESCs attached to each other, showing tight attachment of cells, and there was space between cell clusters B: On day 2 of differentiation, the cells were aggregated into a sphere at the central bottom of the well and were surrounded by some scattered cells C: On day 6 of differentiation, the sphere grew larger and denser, and the scattered cells disappeared, and the edges were more transparent than other parts D: On day 12 of differentiation, the sphere grew larger, and translucent vesicles were observed at the edges E: On day 18 of differentiation, embryoid bodies were cut into several pieces F: On day 21 of differentiation, vesicles gradually formed optic cups, the volume of which was increased gradually G: On day 30 of differentiation, the retinal organoids were basically formed, presenting bright and yellowish, and grew larger gradually H, I: On day 45 and 60 of differentiation, the retinal organoids continued growing gradually J: On day 75 of differentiation, the retinal organoids were thick in the center and thin in the edge K, L: On day 150 and 165 of differentiation, the morphology and volume of retinal organoids were not obviously changed

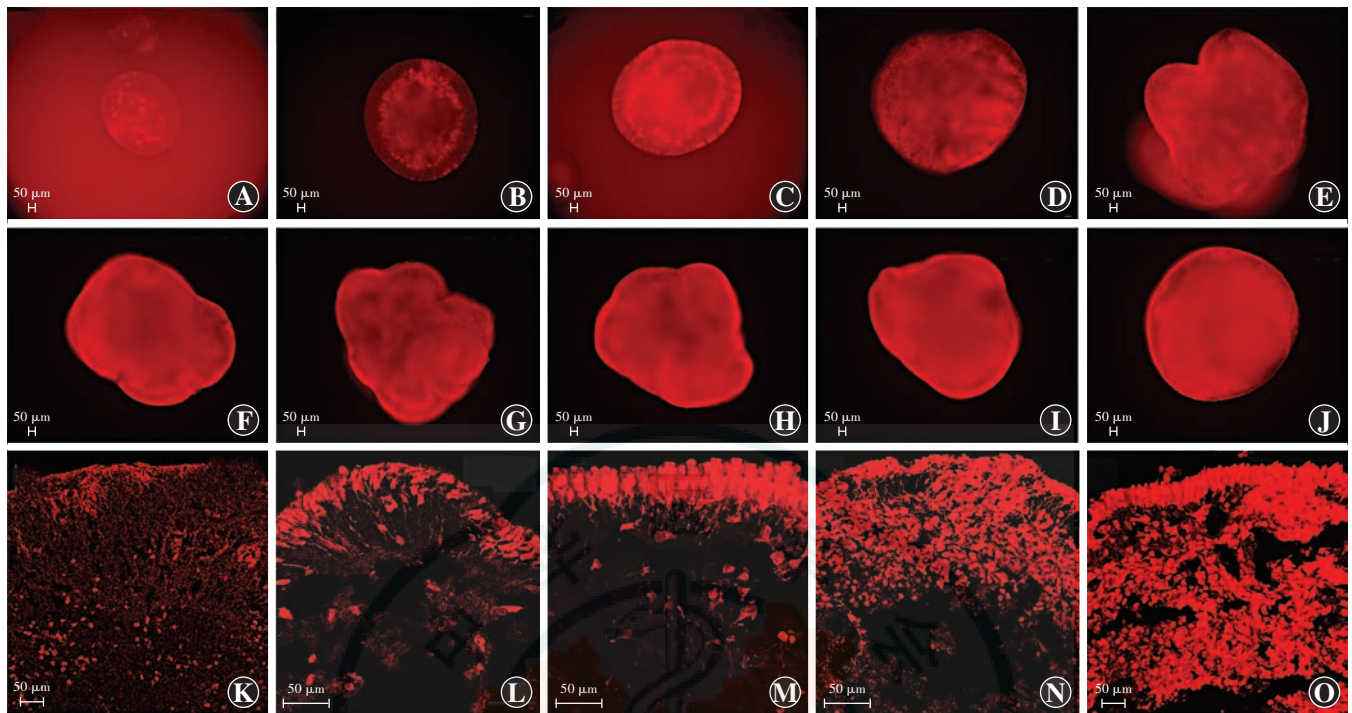


图 10 不同发育阶段视网膜类器官 tdTomato 荧光表达情况 (标尺 = 50 μm) A: 分化第 30 天, 在类器官深层开始出现少量 tdTomato 荧光表达 B: 分化第 45 天, 中深层有 tdTomato 荧光表达 C: 分化第 60 天, 在类器官顶层出现少量 tdTomato 荧光表达 D~I: 分化第 75、90、105、120、135 和 150 天, 类器官 tdTomato 荧光逐渐增强 J: 分化第 165 天, 类器官 tdTomato 荧光无明显变化 K: 分化第 60 天, 类器官冰冻切片 tdTomato 荧光表达主要分布于中深层, 少量分布于顶层 L: 分化第 90 天, 类器官 tdTomato 荧光表达主要分布于顶层 M~N: 分化第 120 和 150 天, 类器官冰冻切片 tdTomato 荧光表达逐渐增强 O: 分化第 180 天类器官冰冻切片 tdTomato 荧光表达与分化第 150 天时无明显变化

**Figure 10** tdTomato fluorescence expression of retinal organoids at different developmental stages (scale bar = 50 μm) A: Few tdTomato fluorescence expression appeared in the deep layer of retinal organoids on day 30 of differentiation B: The tdTomato fluorescence was observed in the middle and deep layer of retinal organoids on day 45 of differentiation C: Few tdTomato fluorescence arose in the top layer of retinal organoids on day 60 of differentiation D~I: The tdTomato fluorescence was gradually increased on day 75, 90, 105, 120, 135, and 150 of differentiation J: There was no obvious difference in tdTomato fluorescence of retinal organoids between the day 165 and day 150 of differentiation K: Most tdTomato fluorescence was mainly shown in the middle layer of retinal organoids frozen section with few fluorescence in the top layer on day 60 of differentiation L: Most tdTomato fluorescence was observed in the top layer of retinal organoids frozen section on day 90 of differentiation M~N: The fluorescence was gradually increased on day 120 and 150 of differentiation O: There was no obvious difference in tdTomato fluorescence of retinal organoids between the day 180 and day 150 of differentiation

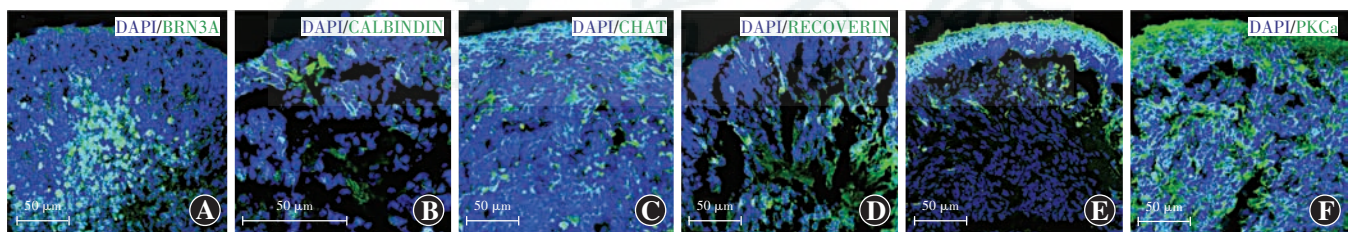


图 11 免疫荧光染色观察视网膜类器官中各细胞标志物表达 (FITC, 标尺 = 50 μm) A: 分化第 30 天, 在视网膜类器官深层有大量 BRN3A 阳性神经节细胞 B: 分化第 30 天, 在视网膜类器官深层开始零星出现 CALBINDIN 阳性水平细胞 C: 分化第 30 天, 在视网膜类器官中深层开始零星出现 CHAT 阳性无长突细胞 D: 分化第 45 天, 在视网膜类器官最顶层及中深层零星出现 RECOVERIN 阳性光感受器细胞 E: 分化第 120 天, RECOVERIN 阳性光感受器细胞数量较分化第 45 天增多, 仍为少量零星分布 F: 分化第 90 天在视网膜类器官中深层零星出现 PKCα 阳性双极细胞

**Figure 11** Cell markers expression in retinal organoids observed by immunofluorescence staining (FITC, scale bar = 50 μm) A: Many BRN3A positive ganglion cells appeared in the deep layer of retinal organoids on day 30 of differentiation B: Few CALBINDIN ositive horizontal cells were detected in the middle layer of retinal organoids on day 30 of differentiation C: Few CHAT positive amacrine cells showed in the middle layer of retinal organoids on day 30 of differentiation D: Few RECOVERIN positive photoreceptors presented in the middle and top layers of retinal organoids on day 45 of differentiation E: More RECOVERIN positive photoreceptors arose on day 120 of differentiation in comparison with day 45 F: Few PKCα positive bipolar cells emerged in the middle layer of retinal organoids on day 90 of differentiation



### 3 讨论

本研究通过 CRISPR/Cas9 技术介导顺利构建了 Crx-iCreERT2 H9 红色荧光报告细胞系,且该细胞系核型分析结果无异常,具有干性特征,可体外自发分化为视网膜类器官。通过免疫荧光染色检测视网膜类器官中神经细胞蛋白的表达后发现,该视网膜类器官细胞类型同人类正常视网膜一致,即含有神经节细胞、水平细胞、无长突细胞、光感受器细胞和双极细胞;并且各类细胞出现的时间顺序与人胚胎视网膜发育过程相符,即最先出现神经节细胞,随后水平细胞、无长突细胞、光感受器细胞相继出现,双极细胞最晚出现;视网膜类器官同人类正常视网膜中各类细胞的空间分布也基本一致,神经节细胞位于最深层,水平细胞、无长突细胞、双极细胞位于中深层,光感受器细胞位于顶层。通过本法获得的视网膜类器官遵循一定的发育时间和空间顺序,接近于正常的人类视网膜发育过程<sup>[22-23]</sup>。

视网膜类器官中的光感受器细胞大部分位于顶层,然而,与人类正常视网膜中光感受器细胞空间分布不一致的是,视网膜类器官的中深层有部分 RECOVERIN 阳性光感受器细胞散在分布。与之对应的,分化第 60 天时 Crx 阳性光感受器前体细胞大部分位于中深层,之后在中深层逐渐减少,在顶层分布逐渐增多;至分化第 90 天时, Crx 阳性光感受器前体细胞大部分位于顶层,少部分位于中深层。视网膜类器官分化早期出现在中深层的光感受器前体细胞性质尚不清楚。目前没有报道描述人胎儿视网膜中光感受器前体的异位现象<sup>[24]</sup>。光感受器前体的这种异位现象也许同样存在于人胎儿视网膜中,由于变化细微而被忽略。出现在中深层的光感受器细胞是否具有与顶层的光感受器细胞一样的成熟度和亚型目前尚不清楚,有待后续进行研究。

大多数类型的视网膜变性主要损害光感受器细胞,利用视网膜类器官作为供体来源补足缺失的光感受器细胞具有一定的可行性。利用流式细胞分选技术从视网膜类器官中筛选出 Crx 阳性光感受器前体细胞,有针对性地进行移植;由于分化后 30~90 d 时 tdTomato 荧光表达逐渐增多,因此选择分化 90 d 以后的视网膜类器官作为供体较合适。已有研究将供体神经视网膜整体移植到视网膜变性的啮齿类动物模型中,供体视网膜内的光感受器细胞通过宿主的视觉通路连接到宿主神经节细胞,且宿主的视觉活动有一定地恢复<sup>[25]</sup>。

体外培养的视网膜类器官有一个共性的问题——

不均一性,即由同一株细胞系诱导分化而来的类器官,同一批分化的类器官,乃至同一培养容器中的类器官,其大小、成熟程度可能存在差异。本研究中的视网膜类器官同样存在发育大小和成熟度的不均一,因此我们通过比较其体积大小和 tdTomato 荧光表达情况,选用其中发育最成熟的视网膜类器官用于后续研究。目前有研究者使用机器人和生物反应器来进行标准化工作并扩大生产规模,这些方法已经被用于脑类器官的生成和视网膜类器官的生成<sup>[26-27]</sup>。

本研究中建立的 Crx-iCreERT2 H9 红色荧光报告细胞系及其 3D 培养视网膜类器官技术是一种强大的工具,可以帮助实现人类视网膜发育和疾病产生的相关研究,并促进致盲疾病治疗方法的开发。

**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] Striebel JF, Race B, Williams K, et al. Microglia are not required for prion-induced retinal photoreceptor degeneration [J/OL]. *Acta Neuropathol Commun*, 2019, 7 (1) : 48 [2021-01-16]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30909963>. DOI: 10.1186/s40478-019-0702-x.
- [2] Cronin T, Vandenberghe LH, Hantz P, et al. Efficient transduction and optogenetic stimulation of retinal bipolar cells by a synthetic adeno-associated virus capsid and promoter [J]. *EMBO Mol Med*, 2014, 6(9) : 1175-1190. DOI: 10.15252/emmm.201404077.
- [3] Van Gelder RN. Photochemical approaches to vision restoration [J]. *Vision Res*, 2015, 111 (Pt B) : 134-141. DOI: 10.1016/j.visres.2015.02.001.
- [4] Cheng DL, Greenberg PB, Borton DA. Advances in retinal prosthetic research; a systematic review of engineering and clinical characteristics of current prosthetic initiatives [J]. *Curr Eye Res*, 2017, 42 (3) : 334-347. DOI: 10.1080/02713683.2016.1270326.
- [5] da Cruz L, Fynes K, Georgiadis O, et al. Phase 1 clinical study of an embryonic stem cell-derived retinal pigment epithelium patch in age-related macular degeneration [J]. *Nat Biotechnol*, 2018, 36 (4) : 328-337. DOI: 10.1038/nbt.4114.
- [6] MacLaren RE, Pearson RA, MacNeil A, et al. Retinal repair by transplantation of photoreceptor precursors [J]. *Nature*, 2006, 444(7116) : 203-207. DOI: 10.1038/nature05161.
- [7] Eberle D, Santos-Ferreira T, Grahl S, et al. Subretinal transplantation of MACS purified photoreceptor precursor cells into the adult mouse retina [J/OL]. *J Vis Exp*, 2014, (84) : e50932 [2021-01-16]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24638161>. DOI: 10.3791/50932.
- [8] Santos-Ferreira T, Postel K, Stutzki H, et al. Daylight vision repair by cell transplantation [J]. *Stem Cells*, 2015, 33 (1) : 79-90. DOI: 10.1002/stem.1824.
- [9] Smiley S, Nickerson PE, Comanita L, et al. Establishment of a cone photoreceptor transplantation platform based on a novel cone-GFP reporter mouse line [J/OL]. *Sci Rep*, 2016, 6 : 22867 [2021-01-18]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26965927>. DOI: 10.1038/srep22867.
- [10] Gust J, Reh TA. Adult donor rod photoreceptors integrate into the mature mouse retina [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2011, 52 (8) : 5266-5272. DOI: 10.1167/iov.10-6329.
- [11] Eberle D, Kurth T, Santos-Ferreira T, et al. Outer segment formation of transplanted photoreceptor precursor cells [J/OL]. *PLoS One*, 2012, 7(9) : e46305 [2021-02-01]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

- pubmed/23029471. DOI:10.1371/journal.pone.0046305.
- [12] Singh MS, Charbel Issa P, Butler R, et al. Reversal of end-stage retinal degeneration and restoration of visual function by photoreceptor transplantation [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2013, 110(3): 1101-1106. DOI:10.1073/pnas.1119416110.
- [13] Osakada F, Ikeda H, Mandai M, et al. Toward the generation of rod and cone photoreceptors from mouse, monkey and human embryonic stem cells [J]. Nat Biotechnol, 2008, 26(2): 215-224. DOI:10.1038/nbt1384.
- [14] 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.
- [15] Pearson RA, Gonzalez-Cordero A, West EL, et al. Donor and host photoreceptors engage in material transfer following transplantation of post-mitotic photoreceptor precursors [J/OL]. Nat Commun, 2016, 7: 13029 [2020-10-25]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27701378>. DOI:10.1038/ncomms13029.
- [16] Mandai M, Watanabe A, Kurimoto Y, et al. Autologous induced stem-cell-derived retinal cells for macular degeneration [J]. N Engl J Med, 2017, 376(11): 1038-1046. DOI:10.1056/NEJMoa1608368.
- [17] 孙筱, 谢浩寰, 章梅, 等. 视网膜类器官在体移植及感光细胞长期存活实验研究 [J]. 中华实验眼科杂志, 2020, 38(10): 829-836. DOI:10.3760/cma.j.cn.115989-20200331-00227.
- Sun X, Xie HH, Zhang M, et al. Transplantation of retinal organoids *in vivo* and long-term survival of photoreceptor cells [J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2020, 38(10): 829-836. DOI:10.3760/cma.j.cn.115989-20200331-00227.
- [18] 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.
- [19] Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, et al. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product [J]. J Bacteriol, 1987, 169(12): 5429-5433. DOI:10.1128/jb.169.12.5429-5433.1987.
- [20] Cho SW, Kim S, Kim JM, et al. Targeted genome engineering in human cells with the Cas9 RNA-guided endonuclease [J]. Nat Biotechnol, 2013, 31(3): 230-232. DOI:10.1038/nbt.2507.
- [21] Nakano T, Ando S, Takata N, et al. Self-formation of optic cups and storable stratified neural retina from human ESCs [J]. Cell Stem Cell, 2012, 10(6): 771-785. DOI:10.1016/j.stem.2012.05.009.
- [22] Hu Y, Wang X, Hu B, et al. Dissecting the transcriptome landscape of the human fetal neural retina and retinal pigment epithelium by single-cell RNA-seq analysis [J/OL]. PLoS Biol, 2019, 17(7): e3000365 [2021-03-29]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31269016>. DOI:10.1371/journal.pbio.3000365.
- [23] Galli-Resta L, Ensigni M. An intrinsic time limit between genesis and death of individual neurons in the developing retinal ganglion cell layer [J]. J Neurosci, 1996, 16(7): 2318-2324.
- [24] O'Brien KM, Schulte D, Hendrickson AE. Expression of photoreceptor-associated molecules during human fetal eye development [J]. Mol Vis, 2003, 9: 401-409.
- [25] Seiler MJ, Aramant RB, Thomas BB, et al. Visual restoration and transplant connectivity in degenerate rats implanted with retinal progenitor sheets [J]. Eur J Neurosci, 2010, 31(3): 508-520. DOI:10.1111/j.1460-9568.2010.07085.x.
- [26] Qian X, Jacob F, Song MM, et al. Generation of human brain region-specific organoids using a miniaturized spinning bioreactor [J]. Nat Protoc, 2018, 13(3): 565-580. DOI:10.1038/nprot.2017.152.
- [27] DiStefano T, Chen HY, Panebianco C, et al. Accelerated and improved differentiation of retinal organoids from pluripotent stem cells in rotating-wall vessel bioreactors [J]. Stem Cell Reports, 2018, 10(1): 300-313. DOI:10.1016/j.stemcr.2017.11.001.

(收稿日期:2021-02-08 修回日期:2021-03-29)

(本文编辑:张宇)

读者·作者·编者

## 本刊对论文中统计学方法描述的要求

研究论文如有量化测试指标时须有统计学分析的内容,并在方法部分提供统计学方法的描述,反应变量为单变量时请提供测量指标数据资料的性质(如计量数据资料及计数数据资料的表达方式)、多个样本计量数据资料正态分布检验方法的名称及方差齐性检验方法的名称、实(试)验设计方法及与之相匹配的统计学设计(如配对设计、成组设计、交叉设计、析因设计、正交设计等)、与统计设计相应的统计方法名称(如  $t$  检验、方差分析)以及检验水准。选择方差分析统计设计时应根据单因素或多因素设计选择正确的方法,不宜简单套用单因素方差分析。反应变量为双变量时,应根据实(试)验设计正确选择简单直线相关分析、回归分析或其他方法,不宜简单套用直线相关分析。统计学的检验水准请提供为双侧检验或单侧检验。论文结果部分的统计学分析内容可用相应的图表达。

统计学符号的著录执行 GB/T 3358.1—2009/ISO 3534-1:2006《统计学词汇及符号》的有关规定,统计学符号一律采用斜体,如样本量用  $n$ ; 样本的算术平均数用英文小写  $\bar{x}$ ; 中位数用英文斜体大写  $M$ , 标准差用英文大写  $SD$ , 样本均数的标准误用英文小写  $\sigma_{\bar{x}}$ ,  $t$  检验用英文小写  $t$ ,  $F$  检验用英文大写  $F$ , 卡方检验用希腊小写  $\chi^2$ , 相关系数用英文小写  $r$ , 秩相关分析相关系数用  $r_s$ , 确定系数用  $R^2$ , 自由度用希腊小写  $\nu$ ; 概率用英文大写  $P$ ; 检验水准用  $\alpha$ 。统计结果的解释和表达采用对比组或比较对象之间差异有统计学意义的描述方法,而不用对比组之间差异具有显著性(或非常显著性)的描述。论文的统计学分析结果提倡提供统计学检验量值和  $P$  值的具体数据,如不能提供  $P$  值的具体数据时,必须提供统计学检验量值如  $\chi^2$  值、 $t$  值、 $F$  值等。当涉及总体参数(如总体均数、总体率等)时,在给出显著性检验结果的同时,请给出 95% 可信区间(CI)。

(本刊编辑部)