

## 利用CRISPR/Cas9在HEK293T细胞实现 $\gamma$ 珠蛋白上调

黄献娟,赖永榕,李 静

(广西医科大学第一附属医院,南宁 530021)

**摘要** 目的:采用CRISPR/Cas9技术编辑HEK293T细胞的 $\gamma$ 珠蛋白启动子上调 $\gamma$ 珠蛋白,探索基因编辑技术治疗 $\beta$ 地中海贫血方法的可行性。方法:采用CRISPR/Cas9基因编辑技术,在 $\gamma$ 珠蛋白转录起始位点(TSS)区前420 bp设计2条sgRNA序列,通过脂质体转染CRISPR/Cas9质粒诱导HEK293T细胞血红蛋白 $\gamma$ (HBG)基因启动子切割,经阳性克隆筛选、Sanger测序验证、TIDE分析编辑效率、RT-qPCR和western blotting检测 $\gamma$ 珠蛋白基因表达量。结果:2条sgRNA序列均能对 $\gamma$ 珠蛋白进行基因切割且切割活性分别为44.20%(sgRNA1)、32.90%(sgRNA2),RT-qPCR和western blotting结果显示,与对照组(NCs组,转染空载PX459质粒)相比,sgRNA2组 $\gamma$ 珠蛋白基因表达量升高( $P<0.05$ )。结论:CRISPR/Cas9基因编辑技术可在 $\gamma$ 珠蛋白启动子上实现有效编辑,从而上调 $\gamma$ 珠蛋白。

**关键词** CRISPR/Cas9编辑; $\gamma$ 珠蛋白;HEK293T细胞;基因编辑

中图分类号:R556.61 文献标志码:A 文章编号:1005-930X(2025)02-0241-06

DOI:10.16190/j.cnki.45-1211/r.2025.02.011

### CRISPR/Cas9-mediated $\gamma$ -globin expression upregulation in HEK293T cells

HUANG Xianjuan, LAI Yongrong, LI Jing. (The First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China)

**Abstract Objective:** To edit the  $\gamma$ -globin promoter of HEK293T cells using the CRISPR/Cas9 technology to upregulate  $\gamma$ -globin and explore the feasibility of using gene editing technology for the treatment of  $\beta$ -thalassemia. **Methods:** Using gene editing technology to treat  $\beta$ -thalassemia, two sgRNA sequences were designed at 420 bp upstream of the  $\gamma$ -globin transcription start site (TSS). CRISPR/Cas9 plasmids were transfected via lipofectamine to induce cleavage of the hemoglobin gamma (HBG) gene promoter in HEK293T cells. Positive clone screening, Sanger sequencing validation, TIDE analysis for editing efficiency, reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) and western blotting were used to detect the expression level of the  $\gamma$ -globin gene. **Results:** Both sgRNAs achieved efficient gene cutting on  $\gamma$ -globin, with cutting of 44.20% (sgRNA1) and 32.90% (sgRNA2), respectively. The results of RT-qPCR and western blotting showed that, compared to the negative control groups (NCs transfected with empty PX459 plasmid), the expression levels of the  $\gamma$ -globin gene in the sgRNA2 group were elevated ( $P<0.05$ ). **Conclusion:** The CRISPR/Cas9 gene editing technology can achieve effective editing on the  $\gamma$ -globin promoter, thereby upregulating  $\gamma$ -globin.

**Keywords** CRISPR/Cas9 editing;  $\gamma$ -globin; HEK293T cells; gene editing

$\beta$ 地中海贫血是一种因 $\beta$ 珠蛋白合成缺陷导致的单基因遗传病,其主要病理是未配对的 $\alpha$ 珠蛋白链在红细胞内异常沉积,引发膜损伤和溶血性贫血<sup>[1]</sup>。在中间型或重型患者中,重新激活胎儿期表达的 $\gamma$ 珠蛋白可有效补偿 $\beta$ 链缺乏,但成人阶段胎

儿血红蛋白(HbF)表达受BCL11A和ZBTB7A等转录抑制因子严格调控<sup>[2-6]</sup>。近年来,靶向破坏HBG启动子区抑制性元件(如BCL11A结合位点)已成为治疗 $\beta$ 地中海贫血的重要策略。然而,目前针对HBG启动子的基因编辑研究多聚焦于BCL11A结合位点

[基金项目]国家卫生健康委员会人才交流中心科研课题资助项目(No.RCLX2315013);广西自然科学基金资助项目(No.305094881019)

[通信作者]李静,E-mail:nikky97@163.com

[收稿日期]2025-02-11

(如-115~-200 bp 区域),对上游调控元件的功能探索仍不充分。

成簇规律间隔短回文重复序列/CRISPR 关联蛋白 9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeat/CRISPR associated sequence 9, CRISPR/Cas9) 技术通过诱导靶位点双链断裂(double-strand break, DSB),可利用非同源末端连接(non-homologous end joining, NHEJ)修复机制实现基因敲除或调控元件编辑<sup>[7-8]</sup>。值得注意的是,HBG 启动子 TSS 上游 -200~-500 bp 区域存在多个保守的顺式作用元件(如 GATA1、NF-E2 结合位点),其染色质开放状态可能影响编辑效率<sup>[4, 9-10]</sup>。本研究拟在-420 bp 区域内设计 sgRNA (single guide RNA, sgRNA),筛选可高效诱导功能突变(如破坏抑制性结合位点或创建激活型变异)的靶点,旨在揭示该区域对γ珠蛋白表达的关键调控作用,为β地中海贫血的精准基因治疗提供新靶点。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞系和质粒

HEK293T 细胞购自普诺赛生物公司,CRISPR/Cas9 质粒 PX459 (pSpCas9-2A-Puro (PX459) V2.0) 购自森灵生物科技有限公司。本研究所用的菌种为 DH5α, 购自生工生物工程(上海)股份有限公司。重组质粒由金开瑞公司合成构建。

### 1.2 主要试剂

脂质体转染试剂 lipofectamine 3000 购自 Thermo Fisher Scientific 公司;LB 液体/固体培养基、嘌呤霉素购自 Solarbio 公司;DMEM 培养基、胎牛血清(FBS)购自 Gibco 公司;DNA 提取试剂盒和 RNA 提取试剂盒均购自 Seven 公司;无内毒素质粒小提中量试剂盒购自 Tiangen 公司;高保真酶、逆转录和 PCR 试剂盒均购自 Takara 公司。RIPA 裂解液、磷酸酶抑制剂购自上海碧云天生物技术有限公司;PMSF 购自北京索莱宝科技有限公司;γ 珠蛋白单克隆抗体购自美国 Cell Signaling Technology 公司;GAPDH 单克隆抗体购自中国 ABclonal 公司;山羊抗兔 IgG 二抗购自中国 Affinity 公司。

### 1.3 方法

**1.3.1 sgRNA 序列的设计** 根据 NCBI 数据库人类 HBG (Gene ID: 3048; chr11-: 5256203-5254773) 找到基因序列,选定 HBG2 启动子区 420 bp, 使用靶点在线设计网站 <http://chopchop.cbu.uib.no/results/>

1699291489153.9958/设计 sgRNA 靶点。根据综合评估选择排名前 2 的 sgRNA 序列,分别为 sgRNA1: 5'-ACGTTCCAGAAGCGAGTGTG-3', sgRNA2: 5'-GTTTGCCTTGTCAAGGCTAT-3'。将这 2 条序列的实验组设为 S1 组和 S2 组,转染空载 PX459 质粒的设为对照组(NCs 组)。

**1.3.2 Cas9-sgRNA 载体构建和质粒转化** 本实验选择质粒 PX459 (pSpCas9-2A-Puro (PX459) V2.0) 作为载体质粒,根据 cas9-sgRNA 重组质粒构建原则,在 SnapGene 软件上酶切位点:Bbs I 酶位置插入目的 sgRNA 序列。正向引物:CACC-(N)<sub>20</sub>,反向引物:AAAC-(N)<sub>20</sub>。若 CACC 端连接 sgRNA 序列无 G,则需要添加碱基 G。设计好的质粒序列和质粒委托金开瑞公司合成。将构建好的质粒转化感受态细胞 DH5α,接种于含 100 μg/mL 氨苄青霉素的 LB 固体培养基于 37 °C 恒温倒置过夜培养,第 2 天挑取单菌落于含 100 μg/mL 氨苄青霉素的 LB 液体培养基扩大培养,12~16 h 后用无内毒素质粒小提中量试剂盒提取质粒。

**1.3.3 细胞培养及质粒转染** HEK293T 细胞在培养基为 FBS(10%)+青/链霉素溶液(1%)+DMEM 中培养,置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养。根据 lipofectamine 3000 的说明进行转染操作,转染后继续培养。

**1.3.4 基因组 DNA 提取和 Sanger 测序** 转染 48 h 后,用 2 μg/mL puro 的培养基进行药物筛选,观察细胞状态和密度,直至空白组全部死亡,停止筛选,获得的阳性克隆继续扩大培养。吸取培养基,用 PBS 洗 2 次,根据试剂盒说明,提取基因组 DNA,设计引物用高保真酶将 DNA 继续 PCR 扩增出包含靶点序列在内的 DNA 片段,得到 PCR 液送捷尼斯公司进行 Sanger 测序。运用 TIDE 软件(<https://tide.nki.nl/>) 对进一步分析结果,检测 sgRNA 切割效率。PCR 引物上游:5'-TCCTGGTATCTTCTATGGTGG-3', 下游:5'-TTGTGATAGTAGCCTTGTCCCTC-3'。

**1.3.5 实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)检测** 使用 RNA 提取试剂盒提取筛选后细胞的 RNA,并检测浓度和纯度,用逆转录试剂盒将 RNA 逆转录为 cDNA。PCR 反应条件:95 °C 预变性 30 s; 95 °C 变性 10 s, 60 °C 退火、延伸 30 s, 共 40 个循环。以 GAPDH 为内参,用 2<sup>-ΔΔCT</sup> 法计算基因表达水平,实验重复 3 次。γ 珠蛋白、α 珠蛋白、β 珠蛋白引物均由捷尼斯生物公司合成,引物序列见表 1。

表1 PCR 引物序列

基因	序列	5'~3'
GAPDH	上游:GTCAGCCGCATCTCTTT 下游:CGCCAATACGACCAAAT	
$\gamma$ 珠蛋白	上游:GGTTATCAATAAGCTCCTAGTCC 下游:ACAACCAGGAGCCTTCCCA	

**1.3.6 蛋白质免疫印迹(western blotting)法检测 $\gamma$ 珠蛋白表达** 将上述筛选后的阳性克隆细胞,RIPA裂解细胞提取总蛋白。BCA法定量蛋白,湿转至PVDF膜,5%脱脂奶粉封闭2 h,一抗( $\gamma$ 珠蛋白单克隆抗体,1:1 000稀释;GAPDH单克隆抗体,1:50 000稀释)4 °C摇床孵育过夜,二抗(山羊抗兔IgG蛋白抗体,1:10 000稀释)室温摇床孵育1 h。以GAPDH为内参。使用ECL显影,凝胶成像分析系统进行图像采集。用Image J软件分析蛋白条带灰度值,以 $\gamma$ 珠蛋白与GAPDH蛋白比值作为 $\gamma$ 珠蛋白

相对表达量,实验重复3次。

#### 1.4 统计学方法

采用SPSS 20.0统计软件分析数据,计量资料以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,多组间比较用单因素方差分析,不符合正态分布和方差齐性用非参数检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结 果

### 2.1 PX459-sgRNA质粒构建成功和转染效率

将构建的2个PX459-sgRNA质粒进行测序,可见质粒构建成功,见图1。在HEK293T细胞中转染绿色荧光蛋白(dreenfluorescent protein, GFP)质粒,GFP质粒大小与PX459质粒相似或较大,评估lipofectamine 3 000转染效率。转染36 h后荧光显微镜下可见,转染相同质量的GFP质粒细胞转染效率较高,因此认为,同时转染PX459-sgRNA质粒的细胞能达到相似效果,可进行后续实验,见图1、图2。

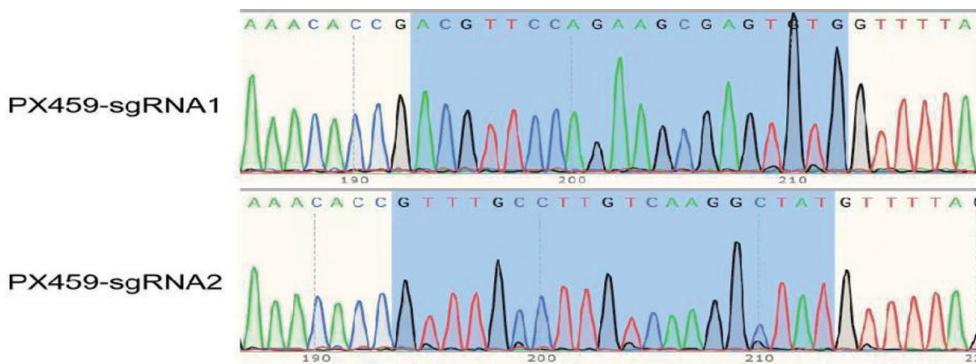


图1 PX459-sgRNA1、PX459-sgRNA2表达质粒测序峰图

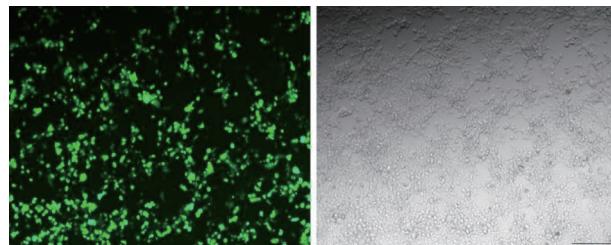


图2 HEK293T细胞转染GFP质粒36 h后荧光表达与明场对比

### 2.2 Sanger测序及切割效率

对NCs组和2个实验组的PCR产物测序确认sgRNA打靶位点DNA的编辑情况,如图3所示,2个实验组的特定靶点序列中均出现套峰,表明 $\gamma$ 珠蛋白的启动子引入突变。因puro筛选出的细胞为阳

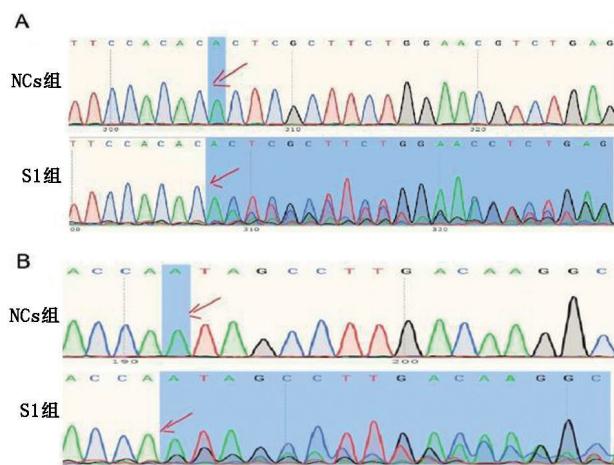
性多克隆细胞群,故峰图为杂合状态。TIDE分析2组内源切割效率分别为44.20%(sgRNA1)、32.90%(sgRNA2),具有切割活性,见图4。

### 2.3 各组珠蛋白表达情况比较

与NCs组比较,S1组 $\gamma$ 珠蛋白mRNA表达变化无显著差异( $P > 0.05$ ),S2组有统计学差异( $P < 0.05$ ),S1组与S2组比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),见图5。

### 2.4 $\gamma$ 珠蛋白的蛋白表达

与NCs组比较,S1组 $\gamma$ 珠蛋白表达变化无统计学差异( $P > 0.05$ ),S2组 $\gamma$ 珠蛋白表达升高( $P < 0.05$ ),但S1组与S2组比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),见图6。



A: NCs组与S1组比较;B: NCs组与S2组比较;箭头示编辑位点,阴影部分为实验组中出现套峰。

图3 各组总细胞提取DNA后PCR测序的峰图

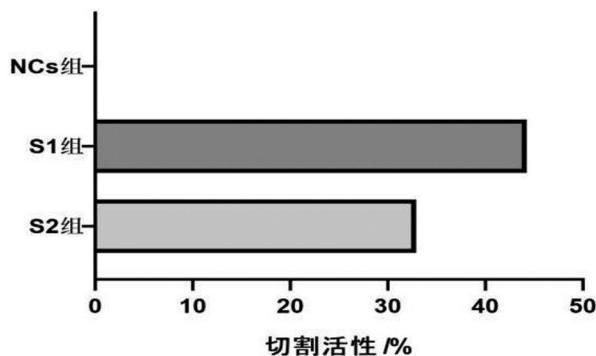
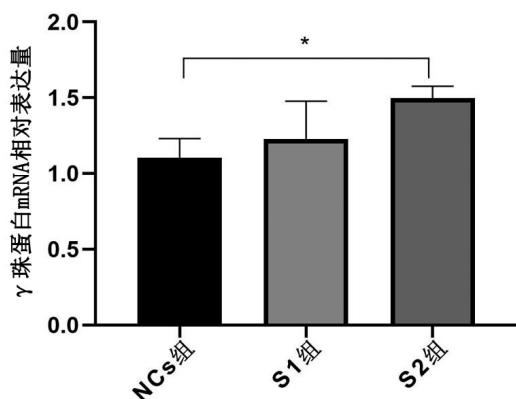


图4 TIDE分析各组切割效率



与NCs组比较, $P<0.05$ 。  
图5 各组 $\gamma$ 珠蛋白mRNA表达比较

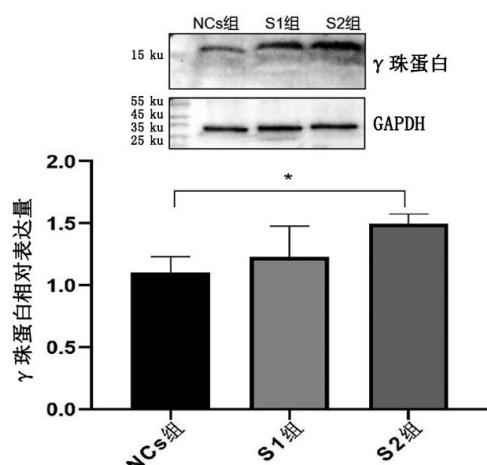


图6  $\gamma$ 珠蛋白 western blotting蛋白电泳图和表达情况

### 3 讨 论

在自然界中,DNA链断裂往往会进行自我修复,这种修复多是NHEJ修复。近期的研究指出,NHEJ介导Indels在靶位点出现了大片段缺失( $>1.5\text{ kb}$ )和复杂的基因重排,因此对于某些基因方面疾病在启动子、增强子等非编码序列造成DSB,通过NHEJ抑制或者激活目的基因的表达,可达到治疗的效果<sup>[1]</sup>。 $\gamma$ 珠蛋白主要在胎儿期表达,出生后表达沉默,在非红系细胞中 $\gamma$ 珠蛋白表达同样沉默。目前针对 $\beta$ 地中海贫血基因编辑治疗开展的临床研究主要采用重新活化 $\gamma$ 珠蛋白表达的策略。重新活化 $\gamma$ 珠蛋白表达使过剩的 $\alpha$ 珠蛋白与 $\gamma$ 珠蛋白形成HbF,是目前针对 $\beta$ 地中海贫血基因编辑治疗开展的临床研究主要策略<sup>[12-14]</sup>。已有研究表明,*BCLIIA*在HbF $\rightarrow$ HbA转变过程的重要作用,能抑制 $\gamma$ 珠蛋白的表达,敲除*BCLIIA*基因能明显促进 $\gamma$ 珠蛋白基因的表达,但会导致胎儿智力、癫痫发作、生长发育等方面存在缺陷<sup>[15-17]</sup>。有学者通过CRISPR/Cas9技术在人类脐带血衍生红细胞祖细胞HUDEP2中筛选得到了一个*BCLIIA*的红系特异性增强子并使其破坏,研究结果表明,红细胞前体中的*BCLIIA*表达明显降低,珠蛋白表达及HbF含量则显著提高,造血干细胞的红系发育分化功能并未受到影响<sup>[18]</sup>。本课题组前期在重型 $\beta$ 地中海贫血患者体外分化的红细胞中通过小RNA干扰技术(small RNA, RNAi)下调*BCLIIA*的表达,同样观察到 $\gamma$ 珠蛋白表达的增加<sup>[19]</sup>。

本实验通过在 $\gamma$ 珠蛋白启动子区域主要转录因子结合区域设计靶点,利用CRISPR/Cas9技术破坏启动子区域造成突变,重新活化 $\gamma$ 珠蛋白的表达。研究sgRNA2位于-115 bp附近,这区域被认为是BCL11A结合位点<sup>[5]</sup>。而sgRNA1靶点则位于TSS区。在本实验中,sgRNA2组实现了有效编辑,且上调 $\gamma$ 珠蛋白的表达。有学者利用Cas9编辑镰刀状贫血(sickle cell disease, SCD,  $\beta$ 珠蛋白突变导致的)患者的造血干细胞-102~-104 bp区域,发现病态镰刀状细胞比例明显降低<sup>[20]</sup>。此外,临幊上发现BCL11A结合区域缺失导致 $\gamma$ 珠蛋白表达上升<sup>[21]</sup>。 $\gamma$ 珠蛋白基因5'区域(从核苷酸-760~-+100)中的甲基化阻止转录,基因5'区的DNA甲基化可能在基因表达调控中起直接作用<sup>[22]</sup>。sgRNA1靶向区域附近的+5、+16存在CpG二核苷酸,这些CpG位点的甲基化导致人 $\gamma$ 珠蛋白启动子的转录抑制<sup>[23]</sup>。Fathallah等<sup>[24]</sup>发现,在非红系造血细胞CFU-GM和非造血细胞HeLa中的DNA甲基模式显着不同,CFU-GM衍生的细胞中的 $\gamma$ 珠蛋白启动子处的甲基化水平范围为86%~100%,而HeLa细胞中甲基化CpG二核苷酸的水平在 $\gamma$ 珠蛋白启动子处为6%~20%。这可能是造成sgRNA1组结果的原因。

综上所述,CRISPR/Cas9基因编辑技术可在 $\gamma$ 珠蛋白启动子上实现有效编辑,从而上调 $\gamma$ 珠蛋白。对于利用CRISPR/Cas9基因编辑技术上调 $\gamma$ 珠蛋白治疗 $\beta$ 地中海贫血,还需进一步的实验研究。

## 参考文献:

- [1] 赖永榕.地中海贫血的诊断治疗近况[J].内科急危重症杂志,2012,18(6): 328-332.
- [2] ZAKARIA N A, ISLAM M A, ABDULLAH W Z, et al. Epigenetic insights and potential modifiers as therapeutic targets in  $\beta$ -thalassemia[J]. Biomolecules,2021,11(5): 755.
- [3] TAHER A T, WEATHERALL D J, CAPPELLINI M D. Thalassaemia[J]. Lancet, 2018, 391(10116): 155-167.
- [4] MARTYN G E, WIENERT B, YANG L, et al. Natural regulatory mutations elevate the fetal globin gene via disruption of BCL11A or ZBTB7A binding[J]. Nature genetics, 2018, 50(4): 498-503.
- [5] FRANGOUL H, ALTSHULER D, DOMENICA CAPPELLINI M, et al. CRISPR-Cas9 gene editing for sickle cell disease and  $\beta$ -thalassemia[J]. New England journal of medicine, 2021, 384(3): 252-260.
- [6] MASUDA T, WANG X, MAEDA M, et al. Transcription factors LRF and BCL11A independently repress expression of fetal hemoglobin[J]. Science, 2016, 351(6270): 285-289.
- [7] SANDER J D, KEITH JOUNG J. CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes[J]. Nature biotechnology, 2014, 32(4): 347-355.
- [8] CONG L, ANN RAN F, COX D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems[J]. Science, 2013, 339(6121): 819-823.
- [9] FARRELL J J, SHERVA R M, CHEN Z Y, et al. A 3-bp deletion in the HBS1L-MYB intergenic region on chromosome 6q23 is associated with HbF expression[J]. Blood, 2011, 117(18): 4935-4945.
- [10] HUANG P, KELLER C A, GIARDINE B, et al. Comparative analysis of three-dimensional chromosomal architecture identifies a novel fetal hemoglobin regulatory element [J]. Genes & development, 2017, 31(16): 1704-1713.
- [11] KOSICKI M, TOMBERG K, BRADLEY A. Repair of double-strand breaks induced by CRISPR-Cas9 leads to large deletions and complex rearrangements[J]. Nature biotechnology, 2018, 36(8): 765-771.
- [12] WEATHERALL D J. Pathophysiology of thalassaemia[J]. Bailliere's clinical haematology, 1998, 11(1): 127-146.
- [13] VAN DER PLOEG L H, FLAVELL R A. DNA methylation in the human gamma delta beta-globin locus in erythroid and nonerythroid tissues[J]. Cell, 1980, 19(4): 947-958.
- [14] MUSALLAM K M, TAHER A T, CAPPELLINI M D, et al. Clinical experience with fetal hemoglobin induction therapy in patients with  $\beta$ -thalassemia[J]. Blood, 2013, 121(12): 2199-2212, quiz2372.
- [15] BORG J, PAPADOPOULOS P, GEORGITSI M, et al. Haploinsufficiency for the erythroid transcription factor KLF1 causes hereditary persistence of fetal hemoglobin [J]. Nature genetics, 2010, 42(9): 801-805.
- [16] WILBER A, HARGROVE P W, KIM Y S, et al. Therapeutic levels of fetal hemoglobin in erythroid progeny of  $\beta$ -thalassemic CD34+ cells after lentiviral vector-mediated gene transfer[J]. Blood, 2011, 117(10): 2817-2826.
- [17] PERON A, BRADBURY K, VISKOCHIL D H, et al. BCL11A-related intellectual disability[DB/OL]//ADAM M P, FELDMAN J, MIRZAA G M, et al. GeneReviews®.

- Seattle (WA): University of Washington, 1993 (2019-09-26) [2024-12-01], <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK547048/>.
- [18] CANVER M C, SMITH E C, SHER F, et al. BCL11A enhancer dissection by Cas9-mediated *in situ* saturating mutagenesis[J]. *Nature*, 2015, 527(7577): 192-197.
- [19] LI J, LAI Y R, SHI L L. BCL11A down-regulation induces  $\gamma$ -globin in human  $\beta$ -thalassemia major erythroid cells[J]. *Hemoglobin*, 2018, 42(4): 225-230.
- [20] TRAXLER E A, YAO Y, WANG Y D, et al. A genome-editing strategy to treat  $\beta$ -hemoglobinopathies that recapitulates a mutation associated with a benign genetic condition[J]. *Nature medicine*, 2016, 22(9): 987-990.
- [21] GILMAN J G, MISHIMA N, WEN X J, et al. Distal CCAAT box deletion in the A gamma globin gene of two black adolescents with elevated fetal A gamma globin[J]. *Nucleic acids research*, 1988, 16(22): 10635-10642.
- [22] BUSSLINGER M, HURST J, FLAVELL R A. DNA methylation and the regulation of globin gene expression[J]. *Cell*, 1983, 34(1): 197-206.
- [23] MURRAY E J, GROSVELD F. Site specific demethylation in the promoter of human gamma-globin gene does not alleviate methylation mediated suppression[J]. *EMBO journal*, 1987, 6(8): 2329-2335.
- [24] FATHALLAH H, WEINBERG R S, GALPERIN Y, et al. Role of epigenetic modifications in normal globin gene regulation and butyrate-mediated induction of fetal hemoglobin[J]. *Blood*, 2007, 110(9): 3391-3397.

本文引用格式：

黄献娟, 赖永榕, 李 静. 利用CRISPR/Cas9在HEK293T细胞实现 $\gamma$ 珠蛋白上调 [J]. 广西医科大学学报, 2025, 42(2): 241-246. DOI: 10.16190/j.cnki.45-1211/r.2025.02.011  
HUANG X J, LAI Y R, LI J. CRISPR/Cas9-mediated  $\gamma$ -globin expression upregulation in HEK293T cells [J]. Journal of Guangxi medical university, 2025, 42(2): 241-246. DOI:10.16190/j.cnki.45-1211/r.2025.02.011