利用CRISPR/Cas9系统靶向敲除Jurkat T细胞 *Kcna3* 及其功能研究

石书娟¹, 柯才华¹, 龙思如¹, 张丰¹, 何回香¹, 姜嘉欣¹, 邹宁², 尹世金^{1*}

1. 中南民族大学药学院, 武汉 430074;

2. 湖北省肿瘤医院放疗中心, 武汉 430079

* 联系人, E-mail: yinshijinyf@163.com

收稿日期: 2019-08-22; 接受日期: 2019-10-12; 网络版发表日期: 2019-11-18

武汉市国际科技合作计划(批准号: 2017030209020256)、中央高校基本科研业务费专项资金(批准号: CZZ19005)、湖北省对外科技合作类技术创新专项(批准号: 2017AHB067)、湖北省自然科学基金(批准号: 2016CFB405)和国家自然科学基金(批准号: 81373379, 81641186)资助

摘要 为探究如何利用CRISPR/Cas9系统靶向敲除Jurkat T细胞Kv1.3通道编码基因*Kcna3*, 以期阐明Jurkat T细胞中Kv1.3通道介导的病理生理功能, 本研究设计*Kcna3*第一个外显子sgRNA, 将构建的pX458-sgRNA重组质粒经电穿孔方式转染Jurkat T细胞, 联合使用T7EN1酶切、基因组PCR产物和TA克隆测序、Western Blot检测以及电生理、钙成像和ELISA等功能检测技术鉴定Jurkat T细胞中*Kcna3*敲除效果. 测序结果显示, 靶向*Kcna3*基因CRISPR/Cas9重组质粒pX458-sgRNA建立成功, 设计的sgRNA2可高效切割基因组DNA. Western Blot未检测到Kv1.3蛋白表达, 基因组PCR产物及TA克隆测序显示发生Indel突变. 全细胞膜片钳实验结果表明, *Kcna3*敲除成功的Jurkat T细胞未记录到Kv1.3通道电流, 钙成像技术显示*Kcna3*敲除Jurkat T细胞内自由Ca²⁺浓度上升的幅度显著低于野生型Jurkat T细胞. ELISA实验结果显示, 与野生型Jurkat T细胞相比, *Kcna3*敲除Jurkat T细胞IL-2水平显著下降($P < 0.001$). 本研究成功利用CRISPR/Cas9系统靶向敲除Jurkat T细胞*Kcna3*, 有力证明Kv1.3介导了Jurkat T细胞的免疫炎症反应, 为深入研究Kv1.3通道的病理生理功能提供了新的细胞模型.

关键词 CRISPR/Cas9, 基因敲除, Jurkat T细胞, *Kcna3*

钾离子通道是生物体最重要的离子通道之一, 它是一种四聚体膜蛋白, 可选择性地跨细胞膜传导钾离子, 广泛表达在多种细胞上, 与机体生命活动密切相关^[1,2]. 在人类基因组中已鉴定出80多个不同的钾离子通道基因, 人源性Jurkat T细胞主要表达两类钾通道: 电压门控性Kv1.3通道及II型小电导钙激活钾通道

SKCa2^[3,4]. Kv1.3通道在许多正常组织和癌组织中都大量表达, 其主要功能是引起细胞产生复极化, 维持静息膜电位, 决定细胞的兴奋性与传导性, 并且在维持细胞信号转导和形态方面发挥重要作用^[5,6]. 研究表明, Kv1.3通道过量表达会引起T细胞膜电位超极化而导致炎症因子异常释放, 继而引发自身免疫反应; 阻

引用格式: 石书娟, 柯才华, 龙思如, 等. 利用CRISPR/Cas9系统靶向敲除Jurkat T细胞*Kcna3*及其功能研究. 中国科学: 生命科学, 2020, 50: 44–53
Shi S J, Ke C H, Long S R, et al. Targeted knockout of *Kcna3* and its function in Jurkat T cells using the CRISPR/Cas9 system (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2020, 50: 44–53, doi: 10.1360/SSV-2019-0131

断Kv1.3通道,可有效抑制T淋巴细胞的激活增殖及IL-2分泌,从而发挥抗炎及免疫抑制作用^[7,8].近年来,Kv1.3通道已经成为研究免疫调节通路中的重要信号蛋白,有望作为治疗T细胞介导的自身免疫性疾病药物新靶点^[5,9,10],但Kv1.3通道介导T细胞的免疫炎症反应确切机制有待进一步阐明. CRISPR/Cas9(clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated proteins 9)是一种能够对特定目的基因进行靶向敲除的新技术,其核心原理是通过sgRNA(single guide RNA)引导Cas9核酸酶在细胞特定的基因位点上进行切割和修饰^[11~13].本研究采用CRISPR/Cas9技术,构建Kv1.3通道编码基因*Kcna3*敲除系统,靶向敲除Jurkat T细胞的*Kcna3*,以探讨*Kcna3*敲除后Jurkat T细胞的功能变化,为深入阐明Kv1.3通道介导T细胞的免疫炎症反应提供重要的理论依据.

1 材料与方法

1.1 实验材料

(1) 细胞株与质粒. 人白血病Jurkat T细胞购自武汉大学保藏中心, pX458质粒由中南民族大学生命科学院薛璐副教授课题组馈赠.

(2) 实验试剂与仪器. DNA凝胶回收试剂盒、去内毒素质粒提取试剂盒及DH5 α 感受态均购自武汉擎科生物公司, 1640培养基购自Gibco公司(美国), 胎牛血清和Fura-2 AM购自YESEN公司(上海), 抗Kv1.3抗体购自R&D公司(美国), β -actin 抗体、辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)偶联的山羊抗兔Ig G购自ABclonal公司(上海), Fast Digest Bbs I, Fast AP, 10 $\times$ Fast Digest Buffer购自Thermo Scientific公司(美国), T4 PNK购自NEB公司(美国), T4 ligase, 10 $\times$ T4 ligation Buffer, ATP, pMD-T Vector Cloning Kit购自TaKaRa公司(日本), 超微量基因组DNA模板制备试剂盒购自南京尧舜禹公司, DTT购自BioFrox公司(德国), Kv1.3通道阻断剂ADWX-1购自武汉摩尔生物公司, 刀豆蛋白A(ConA)购自MP Biomedicals公司(美国). 实验仪器包括电穿孔仪(Celetrix, 上海)、流式分选仪(Sony, 日本)、Ti-E倒置生物显微镜(Nikon, 日本)、钙离子成像分析仪(Nikon, 日本)、双荧光细胞分析仪(Cellometer K2, 美国)、EPC9膜片钳放大器(HEKA, 德国)等.

(3) 引物合成. 实验用引物由武汉擎科生物公司合成.

1.2 实验方法

(1) sgRNA设计与寡聚核苷酸链的合成. 使用在线设计软件<http://crispr.mit.edu/>(来自哈佛大学张峰实验室开放软件), 在来源*Kcna3*第1外显子设计sgRNA, 找到该基因CDS(coding domain sequence)区, 分析相应的基因组结构, 明确CDS的外显子部分, 找到Kv1.3蛋白重要结构功能域确定待敲除基因位置, 然后将该序列粘贴到<http://crispr.mit.edu/>网站, 根据网站最终显示结果选择分数较高的几对序列以进行后续研究.

(2) 构建pX458-sgRNA重组质粒. 用Fast Digest Bbs I 对pX458进行酶切, DNA凝胶电泳后回收线性化的载体. 针对网站设计的sgRNA, 在正义链模板的5'端添加CACCG, 反义链模板的5'端添加AAAC, 3'端添加C, 两者均可与Bbs I 酶切后的pX458黏性末端互补, 对设计的sgRNA行退火和末端磷酸化处理. 用T4 ligase将线性的pX458质粒载体分别与退火后的产物室温连接20 min. 连接产物转化DH5 α 感受态, 挑取阳性克隆测序, 测序验证正确后用无内毒素的质粒小提试剂盒进行质粒提取, 以进行后续实验.

(3) 电穿孔转染Jurkat T细胞. 为获得稳定敲除*Kcna3*的Jurkat T细胞, 将测序正确的pX458-sgRNA重组质粒电穿孔转染Jurkat T细胞48 h后, 通过流式细胞仪分选带绿色荧光的细胞至96孔板中, 保证单细胞接种, 待长成单克隆细胞后, 转入24孔板, 长满后消化离心至6孔板继续培养, 一部分保种, 另一部分进行T7EN1酶切鉴定, 验证sgRNA活性.

(4) T7EN1的酶切鉴定. 用超微量基因组DNA模板制备试剂盒提取基因组DNA作为模板进行PCR扩增. PCR扩增程序: 95 $^{\circ}$ C 5 min, 95~85 $^{\circ}$ C -2 $^{\circ}$ C/s, 85~25 $^{\circ}$ C -0.1 $^{\circ}$ C/s, 4 $^{\circ}$ C 30 min. 扩增纯化产物按照T7EN1试剂盒操作步骤进行酶切操作, 最后用2%琼脂糖凝胶进行分析, 并计算切割效率.

(5) Western Blot检测Kv1.3蛋白表达. RIPA(radio immunoprecipitation assay)裂解液提取单克隆Jurkat T细胞蛋白, BCA(bicinchoninic acid)定量后将提取的蛋白加入SDS缓冲液沸水浴10 min, 进行SDS-PAGE(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)凝胶电泳, 电泳结束后转移至PVDF(polyvinylidene

dene fluoride)膜上, 5%脱脂奶粉室温封闭2 h, 用抗Kv1.3抗体4℃过夜孵育, TBST(tris buffered saline with tween)洗膜3次, 每次7 min, HRP偶联的兔抗羊Ig G室温孵育1 h, TBST洗膜3次, 每次7 min, ECL(electrogenenerated chemiluminescence)化学发光液进行曝光显影。经Western Blot印记检测Kv1.3蛋白的表达情况。

(6) 基因组PCR产物和TA克隆测序检测*Kcna3*敲除效果。提取基因组DNA, 进行PCR反应, PCR产物与TA载体连接、转化、挑单克隆、菌落摇菌培养后测序。PCR反应体系包括2×Taq plus Master Mix 25 μL, 引物PrimerF, PrimerR各1 μL, 基因组DNA 150~200 ng。扩增程序: 94℃ 1.5 min; 94℃ 30 s, 55~62℃ 30 s, 72℃ 60 s, 35~40个循环; 72℃ 5 min; 98℃ 3 min。测序引物序列FP: GTCATCAACATCTCCGGGCT, RP: TACTCGAAGAGCAGCCACAC。基因组PCR产物和TA克隆送擎科生物公司测序, 测序结果与野生型细胞基因组比对。

(7) 全细胞膜片钳记录Kv1.3通道电流。运用全细胞膜片钳实验检测Kv1.3通道电流, 全细胞电压钳采用EPC9放大器进行实验记录, 实验参数设置、数据采集与刺激模式均通过Patch Master软件来完成, 采集到的电流数据用pulse软件分析处理。将膜电位钳制于-60 mV, 每隔30 s给予400 ms步长的+50 mV去极化方波刺激激活细胞膜上Kv1.3通道电流。使用Kv1.3通道特异性阻断剂ADWX-1^[14]鉴定所记录电流的类型。记录Kv1.3通道电流的细胞外液包括: KCl 4 mmol/L, NaCl 137 mmol/L, CaCl₂ 1.8 mmol/L, HEPES 10 mmol/L, MgCl₂ 1 mmol/L, D-Glucose 10 mmol/L, 用NaOH调节pH值至7.4后定容, 用0.22 μm微孔滤膜过滤; 细胞内液包括: KCl 130 mmol/L, MgCl₂ 1 mmol/L, EGTA 5 mmol/L, Na₂ATP 3 mmol/L, HEPES 5 mmol/L, 用KOH调pH值至7.2后用0.22 μm微孔滤膜过滤。

(8) 钙离子成像技术检测细胞内钙信号变化。钙离子成像技术中, 目前最常用的钙离子荧光指示剂为Fura-2 AM, 它可与胞内游离钙离子特异结合, 游离形式的Fura-2 AM激发波长为380 nm, 结合形式的Fura-2 AM激发波长为340 nm, Fura-2 AM比率(F340/F380)反映细胞内钙离子浓度的变化。本研究采用2 μmol/L Fura-2 AM作为荧光探针标记Jurkat T细胞, 细胞洗脱3次后在室温下用无钙无镁的磷酸缓冲液(Hank's balanced salt solution, HBSS)孵化后, 置于37℃恒温培养箱中培养孵育40 min。用尼康Ti-E倒置生物显微镜成

像软件记录Ca²⁺浓度变化信号, Fura-2 AM比率(F340/F380)反映Ca²⁺浓度变化, 对比检测野生型和Kv1.3基因敲除Jurkat T细胞内钙信号变化。

(9) ELISA Kit检测IL-2的释放。野生型和*Kcna3*敲除Jurkat T细胞用1640完全培养基重悬。Cellometer K2双荧光细胞分析仪计数并将细胞按1×10⁶个接种于6孔板培养, 终体积为2 mL, 细胞分为空白组和刺激组, 置于37℃, 5% CO₂培养箱, 刺激组1 h后加ConA, 空白组给予1×PBS代替ConA, 孵育24 h后, 吸出细胞培养基到离心管中, 离心后收集细胞上清, 用ELISA Kit(R&D)试剂盒检测IL-2浓度。

(10) 数据处理与分析。所有数据都用均数±样本标准误差(mean±SD)表示, 其中*n*表示独立实验次数。不同实验组之间差异采用配对资料ANOVA检验或*t*-检验统计分析, 用*P*<0.05作为数据差异性显著的标准。

2 结果

2.1 pX458-sgRNA重组质粒的成功构建与转染

根据在线设计软件<http://crispr.mit.edu/>设计sgRNA, 选择评分较高、特异性较好的序列送武汉擎科生物公司合成。合成后的寡聚核苷酸退火形成双链, 与Bbs I酶切后的pX458连接, 构建pX458-sgRNA1和pX458-sgRNA2重组质粒。测序结果如图1A~C所示。利用电穿孔仪可成功将重组质粒pX458-sgRNA转入Jurkat T细胞, 转染情况如图1D和E所示。

2.2 sgRNA可高效编辑*Kcna3*

T7EN1酶切法是检测CRISPR/Cas9基因编辑效率的常用方法之一^[15,16]。CRISPR/Cas9造成目的基因突变后, 其PCR产物重新退火形成的杂链DNA会产生错配、茎环结构等现象, 从而被T7EN1识别并造成双链DNA断裂。琼脂糖凝胶DNA电泳发现, 与对照组相比, sgRNA1, sgRNA2编辑后的*Kcna3*均有切开的条带, 切割效率分别为25%和34%(图2), 其中sgRNA2编辑组有三条切开的条带, 表明设计的sgRNA2可高效编辑*Kcna3*。

2.3 Western Blot未检测到阳性细胞株中Kv1.3通道蛋白表达

为获得*Kcna3*稳定敲除的Jurkat T细胞株, 流式分

图 1 重组质粒pX458-sgRNA的构建与转染。A: 靶向*Kcna3*的sgRNA图谱; B: pX458-sgRNA1重组质粒测序峰图; C: pX458-sgRNA2重组质粒测序峰图; D: 明场下Jurkat T细胞视野(20×); E: 荧光下电穿孔转染PX458-sgRNA重组质粒的Jurkat T细胞视野(20×)

Figure 1 Construction and transfection of recombinant plasmid pX458-sgRNA. A: Sequences of sgRNA targeting *Kcna3*; B: pX458-sgRNA1 recombinant plasmid sequencing peak map; C: pX458-sgRNA2 recombinant plasmid sequencing peak map; D: image of Jurkat T cell under white light (20×); E: image of Jurkat T transfected with pX458-sgRNA recombinant plasmid by electroporation under fluorescence (20×)

选pX458-sgRNA重组质粒转染并发绿色荧光的Jurkat T细胞至96孔板, 待单克隆长出后离心消化, RIPA裂解液提取蛋白进行Western Blot检测, 以鉴定Kv1.3蛋白的表达情况。结果如图3所示, sgRNA1组仍能检测到少量Kv1.3通道蛋白表达, sgRNA2组未检测到Kv1.3通道蛋白, 所以选择pX458-sgRNA2重组质粒转染的阳性Jurkat T细胞株进行后续研究。

2.4 sgRNA2诱导Jurkat T细胞*Kcna3*靶位点发生缺失突变

既然pX458-sgRNA2重组质粒转染阳性Jurkat T细胞未能检测到Kv1.3通道蛋白表达, 提示其编码基因发生了框移突变。为此, 本实验提取pX458-sgRNA2重组

图 2 T7EN1酶切基因组的琼脂糖凝胶电泳图。A和B图中1为野生型Jurkat T细胞基因组PCR条带, 2为转染pX458-sgRNA1, pX458-sgRNA2重组质粒的Jurkat T细胞基因组PCR条带

Figure 2 Agarose gel electrophoresis of genome digested by T7EN1. In A and B, 1 is the PCR band of wild-type Jurkat T cell genome, and 2 is the PCR band of Jurkat T cell transfected with pX458-sgRNA1 and pX458-sgRNA2 recombinant plasmid

图 3 Western Blot检测Jurkat T细胞Kv1.3蛋白表达图。pX458-sgRNA1重组质粒转染的Jurkat T细胞检测到Kv1.3蛋白少量表达, pX458-sgRNA2重组质粒转染的Jurkat T细胞未检测到Kv1.3蛋白表达

Figure 3 Detection of Kv1.3 expression in Jurkat T cells with Western Blot. Cells transfected with pX458-sgRNA1 recombinant plasmid showed a small amount of Kv1.3 expression, the other group transfected with pX458-sgRNA2 recombinant plasmid had no Kv1.3 expression detected

质粒转染的阳性Jurkat T细胞株基因组, 其中两个阳性Jurkat T细胞株基因组PCR产物测序发现, 在pX458-sgRNA2靶位点处出现了套峰, 提示发生了Indel突变, 为进一步确定其突变基因型, PCR扩增*Kcna3*目的片段后构建TA克隆载体, TA克隆测序发现, 其中一个单克隆细胞株在*Kcna3*靶位点处与野生型序列(图4A)比对发生了1 bp碱基缺失, 编号为1号细胞(图4B), 另一个单克隆细胞株在*Kcna3*靶位点处与野生型序列比对分别发生了4 bp(图4C)和5 bp(图4D)的碱基缺失, 编号为2号细胞。1号(图4E)和2号(图4F)阳性单克隆细胞株与野生型Jurkat T细胞*Kcna3*序列比对, 结果提示发生

图 4 *Kcna3*敲除单克隆细胞株的TA克隆测序鉴定与序列比对图。A: 野生型Jurkat T细胞TA克隆测序鉴定图; B: 1号阳性单克隆Jurkat T细胞TA克隆测序鉴定图, 发现与野生型Jurkat T细胞*Kcna3*靶位点比对少1 bp, 黑色箭头为CRISPR/Cas9系统开始剪切的位置; C, D: 2号阳性单克隆Jurkat T细胞株TA克隆测序图, 发现与野生型Jurkat T细胞*Kcna3*靶位点处分别缺失4和5 bp, 黑色箭头为CRISPR/Cas9系统开始剪切的位置; E, F: 分别为1号和2号阳性单克隆细胞株与野生型Jurkat T细胞*Kcna3*序列比对图; G: 3类Jurkat T细胞株TA克隆测序的比对结果汇总图

Figure 4 TA clone sequencing and alignment of *Kcna3* knockout monoclonal cell lines. A: The codons and TA sequencing map of wild-type Jurkat T cell; B: the codons and TA sequencing map of positive monoclonal Jurkat T cells numbered 1; the target site of *Kcna3* was 1 bp less than wild-type Jurkat T cell; C, D: the codons and sequencing map of positive monoclonal Jurkat T cells numbered 2; it was found that 4 and 5 bp missing from the *Kcna3* target site compared with wild-type Jurkat T cell, respectively; E, F: the *Kcna3* sequence alignment of wild-type with number 1 and number 2 positive monoclonal cell line, respectively; G: summary of the results of TA sequencing of three Jurkat T cell lines

了框移突变。这两种突变均能改变*Kcna3*的可读框, 提前终止Kv1.3的翻译过程。TA克隆测序结果表明本实验成功从基因水平敲除Jurkat T细胞*Kcna3*(图4G)。

2.5 pX458-sgRNA2重组质粒转染的阳性Jurkat T细胞未能记录到Kv1.3通道电流

膜片钳实验可用于细胞膜上离子通道电流记录和功能特性分析。人源性Jurkat T细胞膜上主要表达SKCa2和Kv1.3两种类型钾通道^[4,6], 为进一步确定pX458-sgRNA2重组质粒转染的阳性Jurkat T细胞上*Kcna3*是否被敲除, 本研究维持电极内液自由Ca²⁺浓度接近0以避免激活SKCa2通道, 将细胞膜电位钳制于-60 mV, 给予400 ms步长+50 mV的去极化脉冲刺激, 采用全细胞膜片钳模式记录Jurkat T细胞膜上通道电流的激活情况。结果显示, 野生型Jurkat T细胞可正常记录到较大的电压门控性外向电流, 该电流能够被Kv1.3通道特异性阻断剂ADWX-1抑制(图5A), 而pX458-sgRNA2重组质粒转染的阳性Jurkat T细胞仅能记录到较弱的电压门控性外向电流, 该电流不能被

ADWX-1所阻断(图5B)。电生理实验进一步证实, pX458-sgRNA2重组质粒转染的阳性Jurkat T细胞*Kcna3*确实被敲除, 因而也就不能通过膜片钳实验记录到Kv1.3通道电流。

2.6 *Kcna3*敲除显著减弱Jurkat T细胞的钙内流信号

Kv1.3通道参与维持Jurkat T细胞的静息膜电位, Kv1.3通道开放会引起K⁺外流而导致细胞膜电位超极化, 提供的电势能是驱动Ca²⁺内流的重要因素, 借以调控T细胞内Ca²⁺动态平衡和信号转导过程^[17]。既然电生理实验不能在*Kcna3*敲除的Jurkat T细胞上记录到Kv1.3通道电流, 提示细胞内钙信号可能也发生了相应变化, 为此, 本研究采用Ca²⁺成像技术检测野生型和*Kcna3*敲除的Jurkat T细胞内钙信号变化差异。首先在细胞外Ca²⁺缺乏时, 用肌质网Ca²⁺-ATP酶抑制剂环己阿尼酸(cyclopiazonic acid, CPA)将细胞内钙库中的钙离子消耗尽, 此时会激活Jurkat T细胞膜上钙释放激活钙通道(Ca²⁺ release activated Ca²⁺ channels,

图 5 ADWX-1对野生型Jurkat T细胞和pX458-sgRNA2重组质粒转染的阳性Jurkat T细胞膜电流的影响。A: 野生型Jurkat T细胞膜电流可以被Kv1.3通道特异性阻断剂ADWX-1抑制; B: pX458-sgRNA2重组质粒转染的阳性Jurkat T细胞膜电流不能被ADWX-1抑制

Figure 5 Effects of ADWX-1 on cell membrane currents in wild-type and Jurkat T cells transfected with pX458-sgRNA2 recombinant plasmid. A: The membrane current of wild-type Jurkat T cells could be inhibited by Kv1.3 channel specific blocker ADWX-1; B: the membrane current of positive Jurkat T cells transfected with pX458-sgRNA2 recombinant plasmid could not be inhibited by ADWX-1

CRAC)^[18,19], 当向外液中添加2 mmol/L浓度Ca²⁺时, 钙离子成像系统记录到较强的Ca²⁺内流信号(图6), 其中野生型Jurkat T细胞F340/F380上升幅度为0.174±0.01, 相比而言, *Kcna3*敲除Jurkat T细胞F340/F380上升幅度明显减小, 约为0.07±0.03($P<0.01$)。钙离子成像实验结果表明, 敲除Jurkat T细胞*Kcna3*后, 通过CRAC内流的Ca²⁺信号明显减弱。

2.7 *Kcna3*敲除显著减弱Jurkat T细胞IL-2的释放

作为一植物血凝素, 刀豆蛋白A(ConA)具有促进有丝分裂的作用, 能选择激活T细胞, 引起T细胞膜上Kv1.3通道高表达, 通过钙离子依赖途径诱导炎症细胞因子IL-2的合成与释放^[20]。既然*Kcna3*敲除显著减弱Jurkat T细胞内自由钙浓度, 提示*Kcna3*敲除也能够抑制Jurkat T细胞IL-2的合成与分泌。本研究在培养基中添加10 μg/mL的ConA刺激后, 野生型Jurkat T细胞IL-2释放明显增多, 而*Kcna3*敲除的Jurkat T细胞IL-2释放量显著低于野生型Jurkat T细胞($P<0.001$), 结果如图7所示。实验结果表明, *Kcna3*敲除显著减弱Jurkat T细胞的激活及其炎症细胞因子IL-2的释放。

3 讨论

基因编辑技术为阐明特定基因的功能提供了直接证据, 有力地推动了蛋白质功能组学研究进程。目前锌指核酸酶技术(zinc-finger nucleases, ZFNs)和转录激活子类似的效应子核酸酶技术(transcription activator-like effector nucleases, TALENs)虽然有效解决了基因定点

编辑这一难题, 但二者对实验要求较高, 而且耗时较长, 较难广泛普及应用^[21,22]。新近开发的CRISPR/Cas9系统可以对特定基因位点进行高效切割置换, 而且能同时作用于多个靶位点, 具有简单灵活、特异性高、细胞毒性低等优点, 是目前应用最为广泛的基因编辑技术^[23-25]。

全球近7%的人口受到约80余种自身免疫性疾病的威胁, 自身免疫性疾病正成为严重危害人类健康的最常见病种。由于自身免疫性疾病病因和发病机制尚未完全被阐明, 临床还缺乏特异高效的治疗措施。目前用于自身免疫性疾病临床治疗的药物主要包括非甾体抗炎药(non-steroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs)^[26]、糖皮质激素(glucocorticoids, GCs)^[27]、生物制剂等类型^[28], 这些药物由于缺乏对异常自身免疫反应的高选择性抑制, 存在削弱机体正常保护性免疫反应的毒副作用。如何找到新的药物治疗靶点, 使靶点药物在抑制异常自身免疫反应的同时, 维持机体正常的保护性免疫反应, 减少免疫毒性作用的发生, 成为国际上医药领域新的研发热点。自身免疫性疾病发生时, 效应记忆T淋巴细胞(effector memory T cells, T_{EM})膜上Kv1.3通道表达量急剧增加^[29], 可能是引起T_{EM}细胞异常激活增殖的重要因素, Kv1.3通道结构与功能深入研究将为自身免疫性疾病的治疗带来新希望。人源性Jurkat T细胞内源性表达Kv1.3通道, 是研究Kv1.3通道结构与功能的重要细胞模型^[30], 敲除Jurkat T细胞Kv1.3通道编码基因*Kcna3*, 将为阐明Kv1.3通道功能提供最为直接的证据。

本研究尝试利用CRISPR/Cas9系统对Jurkat T细胞

图 6 野生型和*Kcna3*敲除Jurkat T细胞质 Ca^{2+} 浓度变化。A: 数据用100个Jurkat T细胞的F340/F380比值平均值表示, 黑色线条代表野生型Jurkat T细胞, 红色线条代表*Kcna3*敲除的Jurkat T细胞。第一个峰值是在细胞外液中无 Ca^{2+} 条件下, 加入10 $\mu\text{mol/L}$ CPA后, 细胞内钙库释放引起的细胞质 Ca^{2+} 浓度快速上升信号; 第二个峰值是细胞外 Ca^{2+} 通过CRAC内流引起的细胞质 Ca^{2+} 浓度快速上升信号。B: 细胞外 Ca^{2+} 通过CRAC内流引起的F340/F380比值增幅。**, $P<0.01$

Figure 6 Changes in cytoplasmic Ca^{2+} concentration of wild-type and *Kcna3* knockout Jurkat T cells. A: Data are represented by the F340/F380 ratio means of 100 Jurkat T cells, with black lines representing wild-type Jurkat T cells and red lines representing *Kcna3* knockout Jurkat T cells. Under the condition of 0 Ca^{2+} in extracellular fluid, adding 10 $\mu\text{mol/L}$ CPA caused the first rise of cytoplasm Ca^{2+} ; the second peak is the signal of rapid increase of cytoplasmic Ca^{2+} caused by extracellular Ca^{2+} through CRAC influx. B: Increase in the F340/F380 ratios caused by extracellular Ca^{2+} influx through CRAC. **, $P<0.01$

图 7 *Kcna3*敲除显著减弱Jurkat T细胞IL-2的释放。未经ConA刺激的野生型Jurkat T细胞IL-2释放量极少(Control), 经ConA刺激后IL-2释放量显著上升(WT), *Kcna3*敲除的Jurkat T细胞IL-2释放量显著低于野生型Jurkat T细胞(*Kcna3* KO)。***, $P<0.001$

Figure 7 *Kcna3* knockout significantly decreased the release of IL-2 in Jurkat T cells. The release of IL-2 from wild-type Jurkat T cells without ConA stimulation (Control) was very low, but increased significantly after ConA stimulation (WT), and the release of IL-2 from *Kcna3* knockout Jurkat T cells (*Kcna3* KO) was significantly lower than that from wild-type Jurkat T cells. ***, $P<0.001$

*Kcna3*进行敲除。构建的pX458-sgRNA重组质粒通过电穿孔的方式顺利转染Jurkat T细胞, 并成功对Jurkat T细胞*Kcna3*进行了编辑, 诱导*Kcna3*靶位点发生Indel突变而提前终止翻译过程, Western Blot未检测出Kv1.3通道蛋白表达, 全细胞膜片钳实验也不能记录

到Kv1.3通道电流。Jurkat T细胞的外源质粒转入及内源性基因敲除具有较大的挑战性^[31,32], 本研究结合质粒电穿孔和流式细胞仪分选的方法有效克服了这一难题, 并首次从基因、蛋白和电生理功能水平强有力证明CRISPR/Cas9系统能够实现对Jurkat T细胞*Kcna3*敲除, 为从基因敲除的分子水平深入研究Kv1.3通道功能提供了新型细胞模型。本研究还意外发现, Kv1.3基因敲除的Jurkat T细胞本底外向电流要略强于野生型Jurkat T细胞(图5), 该本底外向电流对10 nmol/L电压门控性钾通道毒素ADWX-1不敏感, 排除了Kv1.1, Kv1.2等同源蛋白代偿性增强表达的可能。本实验通过控制电极内液钙离子浓度接近为零, 不能诱发钙激活钾通道电流, 所以也排除了小电导钙激活钾通道代偿性增强的可能。*Kcna3*敲除后, Jurkat T细胞本底外向电流增强可能是细胞维持膜电位而进行的代偿性反应, 其确切离子通道机制有待进一步阐明。

本研究进一步探究了*Kcna3*敲除的Jurkat T细胞模型功能改变。钙离子成像实验表明, *Kcna3*敲除减弱了Jurkat T细胞外 Ca^{2+} 通过CRAC的内流过程, 显著降低了细胞内自由 Ca^{2+} 浓度(图6), 这一病理生理过程也很好解释了ELISA实验结果, *Kcna3*敲除后Jurkat T细胞IL-2表达和分泌水平显著下降(图7)。这一实验现象很好地支持了当前关于Kv1.3通道所介导

的自身免疫反应病理过程, 当机体自身免疫耐受被打破时, 自身抗原反复刺激引起 T_{EM} 细胞的激活增殖与细胞膜上Kv1.3通道表达升高有关, 高表达的Kv1.3通道介导钾离子外流引起 T_{EM} 细胞膜电位超极化, 驱动钙离子经细胞膜上CRAC持续内流, 胞内钙离子通过钙调磷酸酶-NFAT信号通路激活IL-2, IL-17, IFN- γ 等多种炎性因子的转录、合成和分泌, 加剧了自身免疫反应对机体的损伤^[33]. 尽管目前已经建立了*Kcna3*全基因敲除小鼠动物模型, 并初步证明*Kcna3*敲除小鼠自身免疫性疾病的发病率显著降低^[34], 但小鼠 T_{EM} 淋巴细胞膜上除表达Kv1.3通道以外, 还表达Kv1.1和Kv1.2等多种类型电压门控性钾通道, 当全基因敲除小鼠*Kcna3*后, 其他类型钾通道会发生代偿性表达

增强而补偿Kv1.3通道功能^[17], 从而对Kv1.3通道功能评价造成一定干扰. 本研究利用CRISPR/Cas9系统建立的*Kcna3*敲除Jurkat T细胞模型是对*Kcna3*全基因敲除小鼠动物模型的必要补充, 能更好地从分子和细胞水平评价Kv1.3通道如何介导T细胞的免疫炎症反应.

总之, 本研究首次利用CRISPR/Cas9系统成功建立了*Kcna3*敲除Jurkat T细胞模型, 并利用该细胞模型阐明了Kv1.3通道是介导细胞外钙离子通过CRAC进入细胞内的重要辅助蛋白, Kv1.3功能缺失有助于减弱T细胞炎症细胞因子IL-2的合成与释放, 研究结果为阐明Kv1.3通道在自身免疫性疾病治疗中的作用提供了重要理论依据.

致谢 感谢中南民族大学生命科学学院薛璐副教授馈赠的pX458质粒.

参考文献

- 1 Kuang Q, Purhonen P, Hebert H. Structure of potassium channels. *Cell Mol Life Sci*, 2015, 72: 3677–3693
- 2 Huang X, Jan L Y. Targeting potassium channels in cancer. *J Cell Biol*, 2014, 206: 151–162
- 3 Storey N M, Gómez-Angelats M, Bortner C D, et al. Stimulation of Kv1.3 potassium channels by death receptors during apoptosis in Jurkat T lymphocytes. *J Biol Chem*, 2003, 278: 33319–33326
- 4 Desai R, Peretz A, Idelson H, et al. Ca^{2+} -activated K^{+} channels in human leukemic Jurkat T cells. *J Biol Chem*, 2000, 275: 39954–39963
- 5 Chandy K G, DeCoursey T E, Cahalan M D, et al. Voltage-gated potassium channels are required for human T lymphocyte activation. *J Exp Med*, 1984, 160: 369–385
- 6 Chandy K G, Wulff H, Beeton C, et al. K^{+} channels as targets for specific immunomodulation. *Trends Pharmacol Sci*, 2004, 25: 280–289
- 7 Cahalan M D, Wulff H, Chandy K G. Molecular properties and physiological roles of ion channels in the immune system. *J Clin Immunol*, 2001, 21: 235–252
- 8 Rus H, Pardo C A, Hu L, et al. The voltage-gated potassium channel Kv1.3 is highly expressed on inflammatory infiltrates in multiple sclerosis brain. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102: 11094–11099
- 9 Koo G C, Blake J T, Talento A, et al. Blockade of the voltage-gated potassium channel Kv1.3 inhibits immune responses *in vivo*. *J Immunol*, 1997, 158: 5120–5128
- 10 Zhao N, Dong Q, Du L L, et al. Potent suppression of Kv1.3 potassium channel and IL-2 secretion by diphenyl phosphine oxide-1 in human T cells. *PLoS ONE*, 2013, 8: e64629
- 11 Nishimasu H, Ran F A, Hsu P D, et al. Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA. *Cell*, 2014, 156: 935–949
- 12 Sorek R, Lawrence C M, Wiedenheft B. CRISPR-mediated adaptive immune systems in bacteria and archaea. *Annu Rev Biochem*, 2013, 82: 237–266
- 13 Rodríguez-Rodríguez D R, Ramírez-Solís R, Garza-Elizondo M A, et al. Genome editing: A perspective on the application of CRISPR/Cas9 to study human diseases (Review). *Int J Mol Med*, 2019, doi: 10.3892/ijmm.2019.4112
- 14 Han S, Yi H, Yin S J, et al. Structural basis of a potent peptide inhibitor designed for Kv1.3 channel, a therapeutic target of autoimmune disease. *J Biol Chem*, 2008, 283: 19058–19065
- 15 Niu Y, Shen B, Cui Y, et al. Generation of gene-modified cynomolgus monkey via Cas9/RNA-mediated gene targeting in one-cell embryos. *Cell*,

- 2014, 156: 836–843
- 16 Zhou J, Shen B, Zhang W, et al. One-step generation of different immunodeficient mice with multiple gene modifications by CRISPR/Cas9 mediated genome engineering. *Int J Biochem Cell Biol*, 2014, 46: 49–55
- 17 Chiang E Y, Li T, Jeet S, et al. Potassium channels Kv1.3 and KCa3.1 cooperatively and compensatorily regulate antigen-specific memory T cell functions. *Nat Commun*, 2017, 8: 14644
- 18 Wayman C P, McFadzean I, Gibson A, et al. Two distinct membrane currents activated by cyclopiazonic acid-induced calcium store depletion in single smooth muscle cells of the mouse anococcygeus. *British J Pharmacol*, 1996, 117: 566–572
- 19 Xiao B, Coste B, Mathur J, et al. Temperature-dependent STIM1 activation induces Ca^{2+} influx and modulates gene expression. *Nat Chem Biol*, 2011, 7: 351–358
- 20 Lee D H, Son D J, Park M H, et al. Glutathione peroxidase 1 deficiency attenuates concanavalin A-induced hepatic injury by modulation of T-cell activation. *Cell Death Dis*, 2016, 7: e2208
- 21 Seruggia D, Montoliu L. The new CRISPR-Cas system: RNA-guided genome engineering to efficiently produce any desired genetic alteration in animals. *Transgenic Res*, 2014, 23: 707–716
- 22 Azam P, Sankaranarayanan A, Homerick D, et al. Targeting effector memory T cells with the small molecule Kv1.3 blocker PAP-1 suppresses allergic contact dermatitis. *J Invest Dermatol*, 2007, 127: 1419–1429
- 23 Gaj T, Gersbach C A, Barbas III C F. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends Biotech*, 2013, 31: 397–405
- 24 Chang N, Sun C, Gao L, et al. Genome editing with RNA-guided Cas9 nuclease in zebrafish embryos. *Cell Res*, 2013, 23: 465–472
- 25 Cox D B T, Platt R J, Zhang F. Therapeutic genome editing: Prospects and challenges. *Nat Med*, 2015, 21: 121–131
- 26 Abukhalaf I K, von Deutsch D A, Ansari N A, et al. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs, disease-modifying antirheumatic drugs, and agents used in gout. In: *Handbook of Drug Interactions*. Totowa: Humana Press, 2012. 415–475
- 27 Zhao Y, Ding C. Effects of hydrocortisone on regulating inflammation, hemodynamic stability, and preventing shock in severe sepsis patients. *Med Sci Monit*, 2018, 24: 3612–3619
- 28 Cantini F, Niccoli L, Nannini C, et al. Second-line biologic therapy optimization in rheumatoid arthritis, psoriatic arthritis, and ankylosing spondylitis. *Semin Arthritis Rheum*, 2017, 47: 183–192
- 29 Beeton C, Wulff H, Standifer N E, et al. Kv1.3 channels are a therapeutic target for T cell-mediated autoimmune diseases. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103: 17414–17419
- 30 Zhao N, Dong Q, Fu X X, et al. Acacetin blocks Kv1.3 channels and inhibits human T cell activation. *Cell Physiol Biochem*, 2014, 34: 1359–1372
- 31 Su S, Hu B, Shao J, et al. CRISPR-Cas9 mediated efficient PD-1 disruption on human primary T cells from cancer patients. *Sci Rep*, 2016, 6: 20070
- 32 Mandal P K, Ferreira L M R, Collins R, et al. Efficient ablation of genes in human hematopoietic stem and effector cells using CRISPR/Cas9. *Cell Stem Cell*, 2014, 15: 643–652
- 33 Fischer B S, Qin D, Kim K, et al. Capsaicin inhibits Jurkat T-Cell activation by blocking calcium entry current I_{CRAC} . *J Pharmacol Exp Ther*, 2001, 299: 238–246
- 34 Gocke A R, Lebson L A, Grishkan I V, et al. Kv1.3 deletion biases T cells toward an immunoregulatory phenotype and renders mice resistant to autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*, 2012, 188: 5877–5886

Targeted knockout of *Kcna3* and its function in Jurkat T cells using the CRISPR/Cas9 system

SHI ShuJuan¹, KE CaiHua¹, LONG SiRu¹, ZHANG Feng¹, HE HuiXiang¹, JIANG JiaXin¹,
ZOU Ning² & YIN ShiJin¹

¹ School of Pharmaceutical Sciences, South-Central University for Nationalities, Wuhan 430074, China;

² Department of Radiation Oncology, Hubei Cancer Hospital, Wuhan 430079, China

To explore the use of the CRISPR/Cas9 system to target Kv1.3 channel-encoding genes *Kcna3* and elucidate the pathophysiological function mediated by Kv1.3 channels in Jurkat T cells. The first exon sgRNA of human *Kcna3* in pX458-sgRNA recombinant vector was transferred into human Jurkat T cells via electroporation. T7EN1 digestion, Genomic PCR products and TA cloning sequencing, Western blot, and functional assays, such as electrophysiology, live-cell calcium imaging and ELISA were used to validate *Kcna3* knockout effect in Jurkat T cells. The results of the sequencing analysis showed that the CRISPR/Cas9 recombinant plasmids pX458-sgRNA targeting *Kcna3* were successfully constructed. The designed sgRNA2 can efficiently cleave genomic DNA. Kv1.3 protein expression could not be detected using Western blot analysis. Genomic PCR products and TA cloning sequencing showed the presence of Indel mutation. Whole-cell patch clamp experiments showed that Kv1.3 channel currents could not be recorded in *Kcna3* knockout Jurkat T cells. Live-cell calcium imaging showed that the increase in free Ca^{2+} concentration in *Kcna3* knockout Jurkat T cells was significantly lower than that in wild type Jurkat T cells. ELISA results showed that the IL-2 level of *Kcna3* knockout Jurkat T cells was significantly decreased compared with that in wild-type Jurkat T cells ($P < 0.001$). The successful knockout of *Kcna3* in Jurkat T cells using the CRISPR/Cas9 system strongly proved that Kv1.3 mediated the immune inflammatory response of Jurkat T cells, which provides a novel cell model for further study of the pathophysiological function of the Kv1.3 channel.

CRISPR/Cas9, gene knockout, Jurkat T cell, *Kcna3*

doi: 10.1360/SSV-2019-0131