

文章编号 1006-8147(2022)06-0602-07

论著

鼠原始生殖细胞报告基因系统的建立及验证

黄书奇, 阎晗, 胡德庆

(天津医科大学基础医学院细胞生物学系, 天津 300070)

摘要 目的: 构建小鼠原始生殖细胞(PGCs)报告基因系统。方法: 根据 CRISPR 基因编辑技术结合同源重组原理, 针对鼠 *Prdm1* 和 *Dppa3* 基因的翻译起始位点 ATG 附近位置分别设计一对 sgRNA, 并根据 Cas9 切割位点以及拟插入目的片段构建相应的用于同源重组的供体质粒, 将 sgRNA 与 Donor 质粒同时转染入小鼠胚胎干细胞(ESCs)中, 并利用质粒携带的抗性基因筛选出目标单克隆细胞, 并进行基因型鉴定。结果: 通过提取单克隆细胞的基因组 DNA 进行基因型鉴定, PCR 和 Sanger 测序结果显示, 单克隆细胞的基因组中, *Prdm1* 和 *Dppa3* 基因翻译起始位点后分别成功插入 eGFP 和 mCherry 荧光蛋白编码序列。利用细胞因子诱导 eGFP-*Prdm1*/mCherry-*Dppa3*mESCs(mouse ESCs)定向分化为 mPGCs(mouse PGCs), 流式细胞仪检测显示诱导分化的 mPGCs 特异表达 eGFP 和 mCherry 荧光信号。结论: 成功构建 mPGCs 报告基因系统, 可用于后续研究 mPGCs 命运决定的分子机制, 对于研究小鼠早期胚胎发育过程具有重要意义。

关键词 胚胎干细胞; 原始生殖细胞; 基因敲入

中图分类号 R3

文献标志码 A

The establishment and validation of genetic reporter systems in mouse primordial germ cells

HUANG Shu-qi, YAN Han, HU De-qing

(Department of Cell Biology, School of Basic Medical Sciences, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

Abstract Objective: To establish a genetic reporter system in mouse primordial germ cells (PGCs). **Methods:** Using CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) gene editing technology and homologous recombination, a pair of sgRNAs were designed near the ATG, the translation initiation sites of the mouse *Prdm1* and *Dppa3* genes, respectively. At the same time, the corresponding Donor plasmids for homologous recombination were constructed according to the sgRNA cleavage site and the inserted target fragment. The sgRNA and Donor fragment were simultaneously transferred into the mouse embryonic stem cells (ESCs), and the target monoclonal cells are screened for genotype identification by corresponding resistance. **Results:** Genotype identification was performed by extracting the genomic DNA of the monoclonal cells. The results of PCR and Sanger sequencing showed that eGFP and mCherry fluorescent tags were successfully inserted into the genome of the monoclonal cells after the translation initiation sites of mouse *Prdm1* and *Dppa3* genes, respectively. Cytokines were used to induce directional differentiation of eGFP-*Prdm1*/mCherry-*Dppa3* mESCs (mouse ESCs) into mPGCs (mouse PGCs). Flow cytometry showed that the differentiated mPGCs specifically expressed eGFP and mCherry fluorescent signals. **Conclusion:** mPGCs reporter gene system is successfully constructed, which can be used to study the molecular mechanism of the mPGCs fate determination, and also has positive significance for the study of early embryonic development in mice.

Key words embryonic stem cells; primordial germ cells; knock in

胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)是一类具有无限增殖能力、多能性以及自我更新能力的细胞, 可以分化成包括生殖细胞在内的多种细胞^[1]。在小鼠早期胚胎发育过程中, 胚胎基因组在受精卵形成后的 2 细胞时期开始激活。在 8 细胞时期, 胚胎经历紧束化形成桑椹胚, 此时细胞开始出现极性, 在胚内的一侧形成一个充满液体的腔, 即囊胚腔, 在囊胚腔的一侧存在一个小的细胞团, 即内细胞团(inner cell mass, ICM), ICM 具有分化为成熟个

体中全部细胞类型的潜能。随着胚胎的继续发育, ICM 将快速增殖并进一步分化, 逐步形成 3 个胚层以及相应的组织和器官^[2-5]。哺乳动物胚胎植入子宫后, 在 BMP 信号通路以及 Wnt 信号通路的共同作用下, 近端外胚层细胞分化产生原始生殖细胞(primordial germ cells, PGCs)^[6-9], 鼠 PGCs(mPGCs)呈碱性磷酸酶染色阳性, 最早发现于原条后端, 存在于胚胎发育的第 6.25 天(E6.25)。

基因转录调节因子 *Prdm1*(PR/SET Domain 1)的蛋白序列中包含一个 N 端 PR/SET 结构域和 5 个近 C 端的 C₂H₂ 锌指结构域(鼠源 *Prdm1* 蛋白一级结构示意图见图 1)。在早期胚胎发育过程中, *Prdm1*

基金项目 国家自然科学基金(31872825)

作者简介 黄书奇(1997-), 女, 硕士在读, 研究方向: 医学细胞生物学; 通信作者: 胡德庆, E-mail: hudq@tmu.edu.cn。

可以抑制体细胞形成相关信号通路的转导,并致使部分外胚层细胞向生殖细胞谱系分化^[10]。Dppa3 (developmental pluripotency-associated 3)由母体效应基因编码,主要在 PGCs、植入前胚胎和其他多能干细胞中表达,其表达始于小鼠胚胎发育的第 7.5 天(E7.5),并持续表达至 E15.5^[11-12]。Dppa3 主要包含 N 端结构域、SAP-like 和 Splicing-like 结构域(包含核定位信号及出核信号)、C 端结构域(鼠源 Dppa3 蛋白一级结构示意图见图 1)。卵母细胞中 Dppa3 的缺失会导致囊胚数量减少、存活幼崽的数量下降^[13]。Dppa3 特异表达于 PGCs 和减数分裂前的生殖细胞,在 PGCs 特化过程中发挥了重要作用。

研究表明,Dppa3 与 Prdm1 在胚胎-胚外界面存在共定位^[14-15]。并且,Prdm1 和 Dppa3 为 mPGCs 的常用标志基因。本研究利用 CRISPR 基因编辑技术,在小鼠 ESCs 的 Prdm1 和 Dppa3 基因翻译起始位点后分别插入 eGFP 和 mCherry 荧光蛋白编码序列,构建了小鼠原始生殖细胞报告基因系统,对于研究小鼠早期胚胎发育过程具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞系及质粒 mESCs:V6.5 购自美国模式培养物集存库(American type culture collection,ATCC)。pSpCas9(BB)-2A-Puro(PX459)、pBluescript SK+质粒购自美国 Addgene。

1.2 针对鼠 Prdm1 和 Dppa3 基因 sgRNA 的设计 利用网站 (<http://crispr.mit.edu>) 对鼠源 Prdm1 和 Dppa3 基因起始密码子位置分别设计一对 sgRNA,序列见表 1,由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

表 1 sgRNA 名称及序列

Tab 1 The name and sequences of sgRNA

名称	序列(5'→3')
PX459-Prdm1-sg-F	GAGAGCCTTATCTCAGATGT
PX459-Prdm1-sg-R	ACATCTGAGATAAGCCTCTC
PX459-Dppa3-sg-F	TTTCTCTGATGGTTCCTCCA
PX459-Dppa3-sg-R	TGGAGGAACCATCAGAGAAA

1.3 Donor 质粒的设计 Donor 质粒由 pBluescript SK+载体骨架以及目的 Donor 片段构成,Donor 片段主要由同源臂序列和要插入的目的片段构成。eGFP-Prdm1 Donor 片段由 6 部分组成,第 1 部分为切割位点上游 5'端 500 bp 同源臂,第 2 部分为绿色荧光标签 eGFP 序列,第 3 部分为荧光标签与目的基因 Prdm1 之间的 Linker 序列,第 4 部分为切割位点下游 Prdm1 1 号外显子序列(去除 ATG)及 450 bp

内含子序列,第 5 部分为 FRT 序列及 Neomycin 抗性基因序列,第 6 部分为 3'端 500 bp 同源臂。mCherry-Dppa3 Donor 片段设计原理同上。

1.4 mESC 基因组 DNA 提取 (1)收取细胞至 1.5 mL EP 管中,用 200 μ L Genomic Lysis Buffer 重悬,加入终浓度为 200 μ g/mL 的蛋白酶 K,置于金属浴 55 $^{\circ}$ C 过夜。(2)每管加入 200 μ L 异丙醇,颠倒混匀,置于-20 $^{\circ}$ C 静置 30 min,后 4 $^{\circ}$ C,13 500 r/min 离心 20 min。(3)弃掉上清,将沉淀用 200 μ L 75%乙醇洗 2 次,再用 100%乙醇洗 1 次,弃掉上清,将沉淀晾干。(4)每管加入 80 μ L ddH₂O,吹打混匀,将 EP 管置于 55 $^{\circ}$ C 金属浴 1 h 至沉淀彻底溶解。

1.5 PX459-sgRNA 质粒及 Donor 质粒的构建

1.5.1 PX459-sgRNA 质粒的构建 (1)引物退火:利用降落 PCR,使 sgRNA 与其互补链形成二聚体。体系:100 mmol/L 浓度的 sgRNA 与其互补链各 10 μ L,ddH₂O 30 μ L; 程序:95 $^{\circ}$ C,5 min;-1 $^{\circ}$ C/min,至 25 $^{\circ}$ C;4 $^{\circ}$ C 终止。(2)PX459 载体线性化:用 BbsI 内切酶切割载体,体系:PX459 载体 1 μ g;10 \times FD buffer 2 μ L;FastDigestBbsI 0.5 μ L;用 ddH₂O 补至 20 μ L。程序:37 $^{\circ}$ C,1 h。载体酶切产物在电泳后切胶,纯化回收。(3)连接:体系:线性化 PX459 载体 50 ng;双链 sgRNA 100 ng,10 \times T4 ligase buffer 2 μ L;T4 ligase 1 μ L;用 ddH₂O 补至 20 μ L。室温连接 2 h。(4)转化:将连接产物加入到 100 μ L DH5 α 感受态细胞中,冰上静置 30 min;42 $^{\circ}$ C 水浴热激 30 s;冰上静置 2 min,加入 600 μ L LB 培养基,37 $^{\circ}$ C,180 r/min 摇菌 45 min,转化产物涂于 Amp 抗性的平板,37 $^{\circ}$ C 过夜培养,后挑取单克隆菌落,送公司进行测序。

1.5.2 Donor 质粒的构建 (1)pBluescript SK+载体线性化:用 EcoR1 和 BamH1 内切酶切割载体,体系:pBluescript SK+载体 1 μ g;10 \times FD buffer 2 μ L;Fast-Digest EcoR1 和 BamH1 内切酶各 0.5 μ L;用 ddH₂O 补至 20 μ L。程序:37 $^{\circ}$ C,1 h。载体酶切产物在电泳后切胶,纯化回收。(2)eGFP-Prdm1 和 mCherry-Dppa3 Donor 片段扩增:以 mESC 基因组 DNA 或质粒为模板,利用 PCR 扩出 Donor 片段。体系:5 \times HF Buffer 10 μ L;10 mmol/L dNTP 1 μ L;10 μ mol/L 上下游引物各 1 μ L;DMSO 1.5 μ L;高保真 DNA 聚合酶 0.5 μ L;模板:若用质粒为模板,则加入 10 ng,若用基因组 DNA 为模板,则加入 250 ng;用 ddH₂O 补至 50 μ L。程序:98 $^{\circ}$ C 预变性 3 min;98 $^{\circ}$ C 变性 30 s,52 $^{\circ}$ C 退火 20 s,72 $^{\circ}$ C 延伸,延伸时间根据片段长度确定,本实验中所使用的高保真 DNA 聚合酶延伸速率为 30 s/kb,扩增循环数为 32~35 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸

10 min。(3)连接:体系:线性化 pBluescript SK+载体 50 ng; Donor 片段 100 ng; T5 Mix 4 μ L, 用 ddH₂O 补至 20 μ L。程序:30 $^{\circ}$ C, 40 min。(4)将连接产物转化 DH5 α 感受态中, 37 $^{\circ}$ C 过夜培养, 后挑取单克隆菌落进行菌落 PCR 鉴定, 并送公司进行测序。

1.6 细胞培养及转染 mESCs 在 2i+LIF 条件下培养, 培养基成分为 DMEM、15% FBS、0.1 mmol/L 非必需氨基酸、2 mmol/L L-glutamine、1 mmol/L PD、3 mmol/L CHIR、1 000 U/mL LIF。将 12 孔板用 0.1% Gelatin 包被 30 min, 每个孔接种 1×10^5 个细胞, 每两天传代一次。提取 px459-sgRNA、pBlue-script-eGFP-Prdm1 和 pBluescript-mCherry-Dppa3 Donor 质粒。将 px459-sgRNA 和线性化 pBluescript-eGFP-mPrdm1 Donor 质粒各 2 μ g 转染至 2×10^6 个细胞中。

1.7 单克隆细胞的筛选及鉴定 转染 24 h 后更换培养基并加入 1.5 μ g/mL Puromycin 培养 48 h, 后更换培养基并加入 400 μ g/mL Neomycin 培养 1 周。挑取单克隆细胞至 24 孔板中培养, 提取基因组 DNA 进行 PCR 鉴定。选取阳性细胞, 将 2 μ g pCAGGS-FLPe 质粒转染至 2×10^6 个细胞中, 转染 24 h 后更换培养基并加入 1.5 μ g/mL Puromycin 培养 48 h 后撤药, 继续培养 1 周后挑取单克隆细胞至 24 孔板中培养, 提取基因组 DNA 进行 PCR 鉴定。

1.8 从 mESCs 向 mPGCs 的定向诱导 在体外诱

导过程中, 由 mESCs 向 mPGCs 的定向诱导主要由两个步骤组成, 第一步是 mESCs 在 ActivinA 和 bFGF 的作用下形成 EpiLCs (epiblast-like cells), 第二步是在 BMP4、BMP8a、SCF、EGF、LIF 的作用下由 EpiLCs 诱导形成 PGCLCs (primordial germ cell-like cells)。

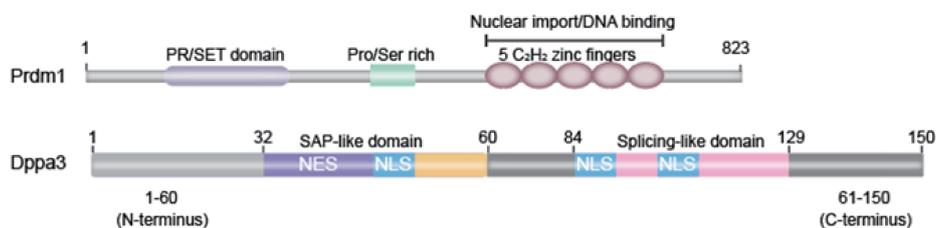
EpiLCs 诱导: 培养基成分为 N2B27、1% KSR (Knockout serum replacement)、20 ng/mL ActivinA、12 ng/mL bFGF。将 12 孔板用 0.1% Gelatin 包被 30 min, 每个孔接种 1×10^5 个 mESCs 细胞, 培养 2 d, 每天更换新鲜培养基, 得到 EpiLCs。

PGCLCs 诱导: 将 2×10^3 个 EpiLCs 接种到低吸附 96 孔板的一个孔中, PGCLCs 培养基成分为 GMEM、15% KSR、0.1 mmol/L 非必需氨基酸、2 mmol/L L-glutamine、1 mmol/L sodium pyruvate、55 nmol/L 2-Mercaptoethanol、1 000 U LIF、500 ng/mL BMP4、500 ng/mL BMP8a、100 ng/mL SCF、50 ng/mL EGF。培养 4 d 后收集细胞, 用流式细胞仪检测荧光信号。

2 结果

2.1 CRISPR/Cas9 基因敲入系统的构建

2.1.1 PX459-sgRNA 质粒的构建结果 对 PX459-eGFP-Prdm1-sgRNA 和 PX459-mCherry-Dppa3-sgRNA 重组质粒进行测序, 序列比对, 编码序列插入的位置和方向均正确, 证明质粒构建成功(测序

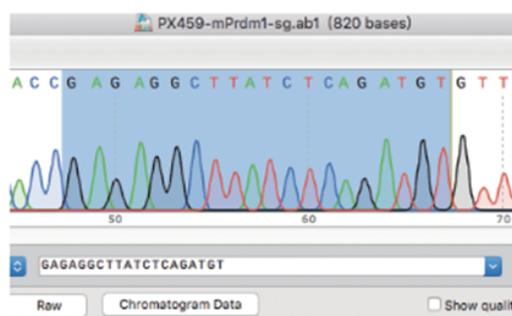


注: NLS: 核定位信号; NES: 出核信号

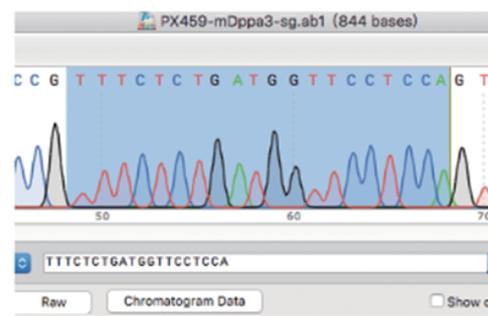
图1 鼠源 Prdm1、鼠源 Dppa3 蛋白一级结构示意图

Fig 1 Schematic diagram of the primary structure of mouse Prdm1 and Dppa3 proteins

A



B



注: A: PX459-eGFP-Prdm1-sgRNA 质粒测序结果; B: PX459-mCherry-Dppa3-sgRNA 质粒测序结果

图2 sgRNA 测序结果

Fig 2 The sequencing results of sgRNA

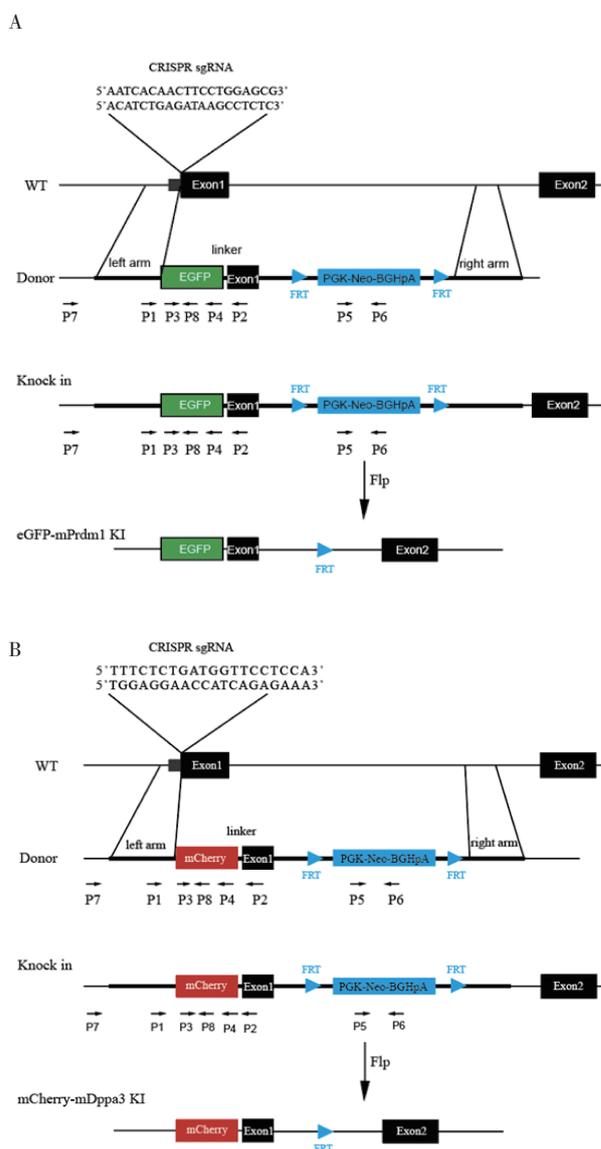
结果见图 2)。

2.1.2 Donor 质粒的构建结果 eGFP-Prdm1 Donor 片段由 6 部分组成,第 1 部分为切割位点上游 5'端 500 bp 同源臂,第 2 部分为绿色荧光蛋白 eGFP 编码序列,第 3 部分为 eGFP 编码序列与目的基因 *Prdm1* 之间的 Linker 序列,Linker 序列为 5 个连续的甘氨酸,第 4 部分为切割位点下游 *Prdm1* 1 号外显子序列(去除 ATG)及 450 bp 内含子序列,第 5 部分为 FRT 序列及 Neomycin 抗性基因序列,第 6 部分为 3'端 500 bp 同源臂(图 3A)。mCherry-Dppa3 Donor 片段同样由 6 部分组成,第 1 部分为切割位点上游 5'端 500 bp 同源臂,第 2 部分为红色荧光标签 mCherry 序列,第 3 部分为荧光标签与目的基因 *Dppa3* 之间的 Linker 序列,第 4 部分为切割位点下游 *Dppa3* 1 号外显子序列(去除 ATG)及 450 bp 内含子序列,第 5 部分为 FRT 序列及 Neomycin 抗性编码序列,第 6 部分为 3'端 500 bp 同源臂(图 3B)。以 mESCs 基因组 DNA 为模板 PCR 扩增出 Donor 片段的第 1、4、6 部分,从含有相应序列的质粒上 PCR 扩增出第 2、5 部分,第 3 部分 Linker 序列为公司合成,根据 DNA 同源重组的原理使用 T5 酶将这些片段克隆到 pBluescript SK+载体上,经公司测序,序列插入的位置和方向均正确,Donor 质粒构建成功。

2.2 鼠 *Prdm1* 基因翻译起始位点后插入 eGFP 编码序列的细胞株鉴定 引物设计方案见图 3A。提取不同单克隆细胞的基因组 DNA 进行 PCR,首先通过引物 P3 和 P4 从 37 个单克隆中鉴定出 2 个阳性克隆,以野生型(WT)细胞为对照,4 号和 37 号克隆在 750 bp 位置出现条带,说明这 2 个克隆均成功插入 eGFP 编码序列。接下来通过引物 P1 和 P2 判断这 2 个阳性克隆是纯合子或是杂合子,其中 WT 在 250 bp 处出现条带,4 号克隆只在 1 kb 处出现条带,为纯合子;37 号克隆分别在 250 bp 和 1 kb 处出现条带,为杂合子。为了进一步确认 eGFP 编码序列是否正确插入到鼠 *Prdm1* 基因翻译起始位点后,从 5'同源臂上游选取上游引物 P7,在 eGFP 编码片段上选取下游引物 P8,PCR 结果显示,4 号克隆和 37 号克隆均在 700 bp 位置出现条带,说明 eGFP 编码序列正确插入到鼠 *Prdm1* 基因翻译起始位点后。

为了提高基因编辑的效率,在 *Prdm1* 的 1 号和 2 号外显子之间的内含子上插入了 Neomycin 抗性编码序列,其表达产物可以给细胞提供复制压力,在使用 Neomycin 进行筛选时,细胞为了存活,会产生更多的同源重组,同时在 Neomycin 抗性编码片

段两端插入了同向的 FRT 位点,外源表达的重组酶 Flippase 可以切除两个方向相同的 FRT 位点之间的序列,从而达到去除 Neomycin 抗性编码片段的目的。挑选 4 号和 37 号阳性克隆,转入 pCAGGS-FLPe 质粒后用药物进行筛选,提取不同细胞克隆的基因组 DNA 进行 PCR,引物设计方案见图 3A。用引物 P5 和 P6 进行 PCR,成功去除 Neomycin 抗性编码片段的克隆无法扩出 300 bp 的条带(图 4A)。



注:A:*Prdm1* 基因翻译起始位点后插入 eGFP 标签示意图;B:*Dppa3* 基因翻译起始位点后插入 eGFP 标签示意图。WT: Wild Type; left arm: 5'端同源臂; right arm: 3'端同源臂; linker: 5 个连续的甘氨酸序列; Flp: 重组酶 (Flippase); FRT: 重组酶识别位点 (Flippase recognition target); PGK-Neo-BGHpA: Neomycin 抗性基因片段; P1-P8: 基因型鉴定引物

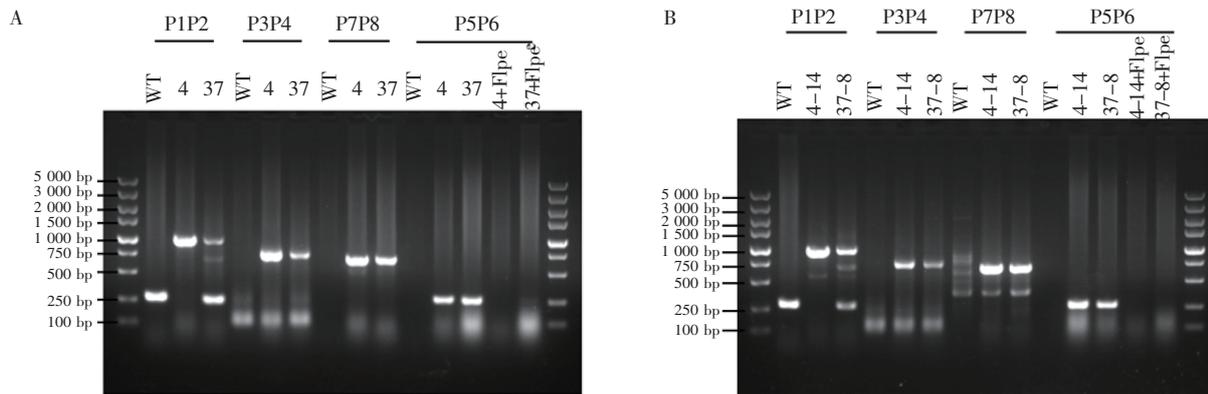
图 3 CRISPR 介导的基因敲入策略模式图

Fig 3 Schematic diagram of CRISPR-mediated gene knock-in strategy

2.3 鼠 *Dppa3* 基因翻译起始位点后插入 mCherry 编码序列的细胞株鉴定 分别向上述 4 号和 37 号细胞克隆转染 PX459-mCherry-Dppa3-sgRNA 和 mCherry-Dppa3-Donor 质粒, 进行抗性筛选后挑取单克隆并提取基因组 DNA 进行鉴定, 基因型鉴定引物设计方案见图 3B。挑取 4 号克隆中的纯合子以及 37 号克隆中的杂合子, 转染 pCAGGS-FLPe 质粒去除 Neomycin 抗性基因片段。最后得到 4-14 号克隆为 eGFP-Prdm1/mCherry-Dppa3 双纯合子细胞, 37-8 号克隆为 eGFP-Prdm1/mCherry-Dppa3 双杂

合子细胞(图 4B)。

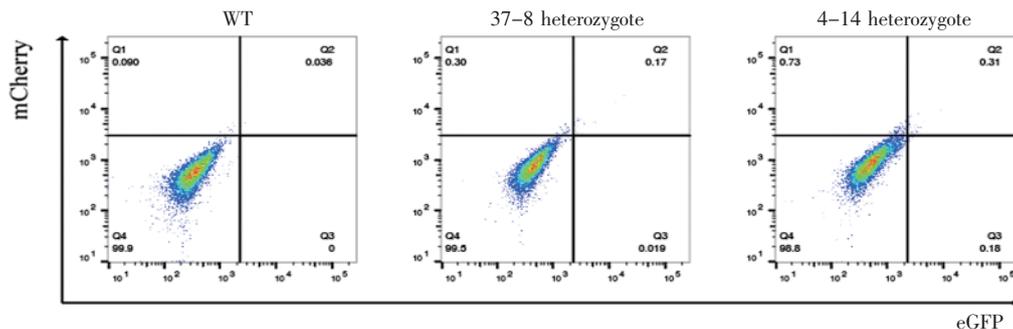
2.4 流式检测 PGCs 诱导结果 在进行体外诱导前, 即 2i+LIF 培养条件下, 对 WT 细胞、eGFP-Prdm1/mCherry-Dppa3 双杂合子细胞及双纯合子细胞进行流式分析, 结果见图 5, WT 细胞中未检测到 eGFP 和 mCherry 荧光信号, Knock In 细胞中可以检测到微弱 mCherry 和 eGFP 荧光信号, 并且纯合子的 mCherry 和 eGFP 荧光信号比杂合子强, 此结果符合在 mESCs 中 *Dppa3* 基因有少量表达, *Prdm1* 基因也有微弱表达。



注:A:eGFP-Prdm1 基因型鉴定结果;B:mCherry-Dppa3 基因型鉴定结果;WT: Wild Type;FLPe: 重组酶(Flippase);P1-P8: 基因型鉴定引物

图 4 eGFP-Prdm1/mCherry-Dppa3 Knock In 细胞基因型鉴定结果

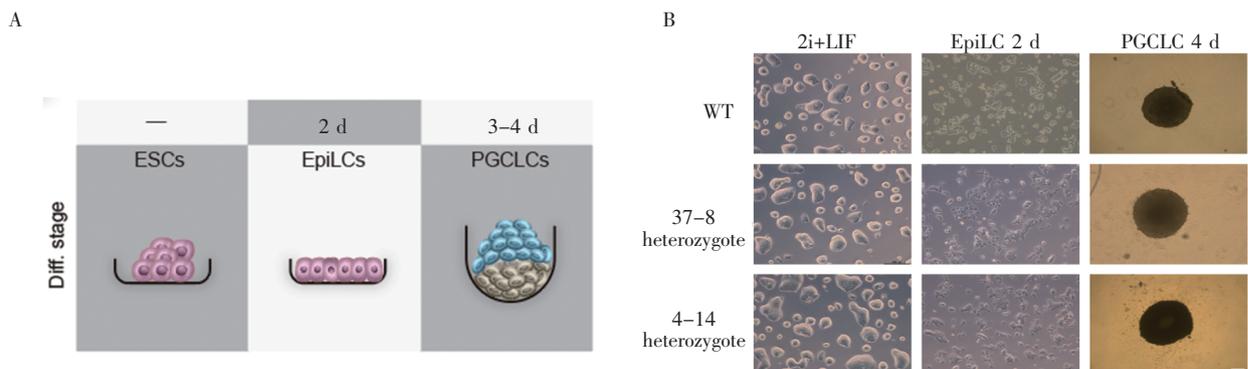
Fig 4 The genotyping results of eGFP-Prdm1/mCherry-Dppa3 Knock In cells



注:WT: Wild type, 野生型;heterozygote:eGFP-Prdm1/mCherry-Dppa3 双杂合子细胞; homozygote:eGFP-Prdm1/mCherry-Dppa3 双纯合子细胞

图 5 未诱导时 WT 及 Knock In 细胞流式检测结果

Fig 5 Flow cytometry results of WT and Knock In cells without induction



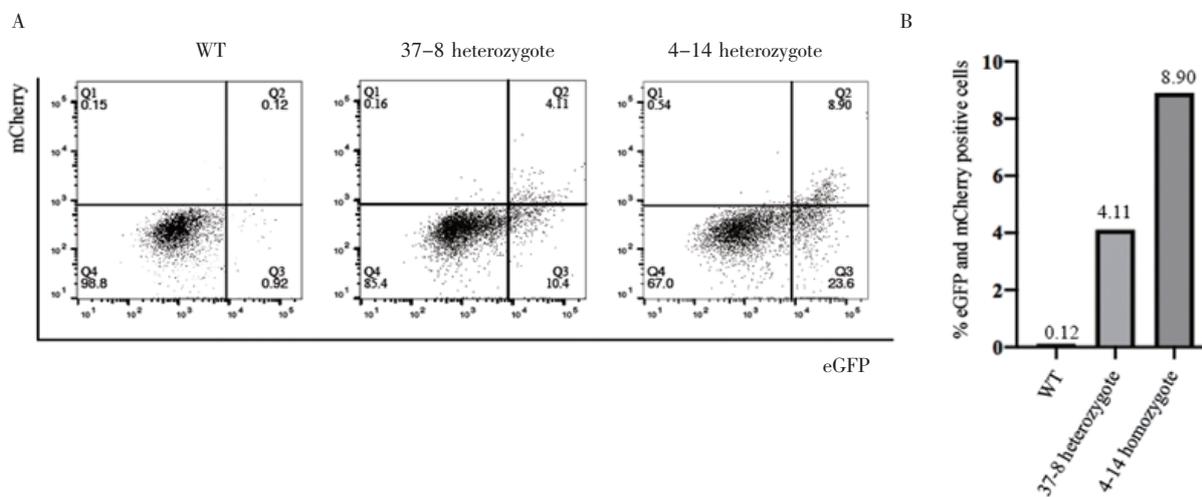
注:A:PGCs 诱导实验流程示意图;B:PGCs 诱导过程图;2i+LIF:ESCs 在 2i+LIF 条件下培养,成克隆状生长;EpiLC 2 d:在 Activin A、bFGF 和 1%KSR 的刺激下,2 d 后形成 EpiLCs,细胞形态变成扁平的上皮样细胞形态;PGCLC 4 d:在 BMP4、BMP8a、SCF、EGF、LIF 刺激下,在低吸附 U 型底 96 孔板中成团生长 4 d 后形成 PGCLCs;Scale bar: 100 μ m

图 6 PGCLCs 诱导实验流程示意图

Fig 6 Schematic diagram of PGCs induction experiment

选用 WT 细胞和 eGFP-Prdm1/mCherry-Dppa3 Knock In 细胞进行 PGCs 诱导实验(实验流程示意图见图 6A),使用 Activin A、bFGF 和 1%KSR 刺激 2 d 后,细胞形态从克隆状变成扁平的上皮样,说明成功将 ESCs 诱导为 EpiLCs;然后将 3×10^3 个细胞转移到低吸附 96 孔板中培养,加入 500 ng/mL

BMP4、500 ng/mL BMP8a、100 ng/mL SCF、50 ng/mL EGF、1 000 U LIF,培养 4 d 后收集细胞进行流式分析,培养过程见图 6B,流式分析结果见图 7,与 WT 相比,Knock In 细胞出现明显的 eGFP 和 mCherry 阳性,成功由 EpiLCs 状态诱导为 PGCLCs,成功构建了 eGFP-Prdm1/mCherry-Dppa3 Knock In 细胞系。



注:A:分别收取 3 种细胞进行流式分析,横轴代表 eGFP 信号,纵轴代表 mCherry 信号;B:统计 eGFP 和 mCherry 双阳性细胞所占比例

图 7 原始生殖细胞诱导流式检测结果

Fig 7 The flow cytometry results of primordial germ cell induction

3 讨论

PGCs 是生殖细胞的起源,在早期胚胎发育过程中,PGCs 在尿囊底部形成,随着胚胎发育,大量的 PGCs 沿着后肠迁移到生殖嵴,最终分化为功能性配子,这种早期谱系选择依赖于 BMP/Smad 信号通路激活 *Prdm1* 基因表达,从 PGCs 形成直至迁移到生殖嵴,*Prdm1* 一直持续表达^[16]。在小鼠中,*Prdm1* 基因缺失可导致胚胎出现大量的血液渗漏和组织凋亡,并在妊娠中期死亡。*Prdm1* 纯合子突变体胚胎无法产生 PGCs,杂合子突变体胚胎中 PGCs 数量显著减少^[17]。*Dppa3* 最初是在小鼠原肠胚时期出现并一直持续表达达到 E15.5。*Dppa3* 缺陷的雌性个体可以正常受精,但由于染色质压缩和基因转录抑制,很难产生后代^[18]。在生殖细胞发育过程中,PGCs 在不同的时间点表达不同的基因并进行特定的表观遗传重塑。当在小鼠胚胎成纤维细胞中过表达 3 种特定的生殖细胞基因(*Dppa3*、*Oct4* 和 *Nanos2*)时,许多与干细胞自我更新以及生殖细胞程序相关的基因会被激活^[19],这些都表明 *Dppa3* 在生殖细胞发育过程中具有重要作用。

胚胎发育以及相关的遗传信息通过配子传递给后代,因此研究 PGCs 的特化过程对于理解早期胚胎发育过程以及相关疾病的机制具有重要意义。

但是早期胚胎发育过程中,体内 PGCs 数量十分稀少,这极大地影响了对于早期生殖细胞发育进程及相关分子机制的探究,因此需要在体外建立由 ESCs 分化形成 PGCs 的培养系统。在之前的研究中,Ohinata 等^[20]构建 *Prdm1*-Venus 及 *ECFP*-*Dppa3* BAC(Bacterial artificial chromosome),用显微注射针将线性化的外源 DNA 片段注入小鼠受精卵的原核中,从而获得 *Prdm1*-Venus 及 *ECFP*-*Dppa3* 转基因小鼠,将这两种小鼠进行后续交配以获得双纯合小鼠(将双纯合命名为 BVSC: *Blimp1*-Venus and *Stella*-*ECFP*),并从与 BVSC 雄性交配的雌性小鼠囊胚中获得带有 PGC 报告基因的 ES 细胞系。此方法中外源 DNA 为随机整合,不同整合位点的 PGC 报告基因的表达水平有很大的差异需要通过建系筛选外源基因高表达的系,过程繁琐,并且外源 DNA 的随机整合还可能影响内源基因的表达。此外,真核细胞中的很多顺式作用元件与靶基因相距较远,BAC 质粒中可能缺失这些远程调控元件,因此利用 BAC 质粒获得的带有 PGC 报告基因的 ES 细胞系并不一定能真实地反映 PGC 基因在 ES 细胞分化过程中的表达。CRISPR-Cas9 系统通过非常短小的 guideRNA 形成靶向特异性,该系统极大地简化了基因组编辑操作,应用领域涵盖干细胞工程、基因治

疗、组织和动物疾病建模等诸多方面。

在本实验中,利用 CRISPR 技术实现基因组定点编辑,在 mESCs 中构建 mPGCs 分化的报告基因系统,为 PGCs 提供稳定、可靠和安全的标记方法,有助于后续进一步探究 PGCs 分化的分子机制,也可促进对早期胚胎发育过程的理解以及不孕不育等相关疾病的研究。

参考文献:

- [1] EVANS M J, KAUFMAN M H. Establishment in culture of pluripotent cells from mouse embryos[J]. *Nature*, 1981, 292(5819): 154-156.
- [2] SMITH A. Formative pluripotency: the executive phase in a developmental continuum[J]. *Development*, 2017, 144(3): 365-373.
- [3] LAWSON K A, MENESES J J, PEDERSEN R A. Clonal analysis of epiblast fate during germ layer formation in the mouse embryo[J]. *Development*, 1991, 113(3): 891-911.
- [4] ZHAO J, YAO K, YU H, et al. Metabolic remodelling during early mouse embryo development[J]. *Nat Metab*, 2021, 3(10): 1372-1384.
- [5] YANG M, YU H, YU X, et al. Chemical-induced chromatin remodeling reprograms mouse ESCs to totipotent-like stem cells[J]. *Cell Stem Cell*, 2022, 29(3): 400-418, e13.
- [6] KITADATE Y, JORG D J, TOKUE M, et al. Competition for mitogens regulates spermatogenic stem cell homeostasis in an open niche[J]. *Cell Stem Cell*, 2019, 24(1): 79-92, e6.
- [7] WANG M, LIU X, CHANG G, et al. Single-cell RNA sequencing analysis reveals sequential cell fate transition during human spermatogenesis[J]. *Cell Stem Cell*, 2018, 23(4): 599-614, e4.
- [8] YAN Y, WANG Q. BMP Signaling: lighting up the way for embryonic dorsoventral patterning[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 799772.
- [9] GUGLIELMI L, HELIOT C, KUMAR S, et al. Smad4 controls signaling robustness and morphogenesis by differentially contributing to the Nodal and BMP pathways[J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 6374.
- [10] FANG F, ANGULO B, XIA N, et al. A PAX5-OCT4-PRDM1 developmental switch specifies human primordial germ cells[J]. *Nat Cell Biol*, 2018, 20(6): 655-665.
- [11] SAITOU M, YAMAJI M. Primordial germ cells in mice[J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2012, 4(11): a008375.
- [12] NAKAMURA T, ARAI Y, UMEHARA H, et al. PGC7/Stella protects against DNA demethylation in early embryogenesis[J]. *Nat Cell Biol*, 2007, 9(1): 64-71.
- [13] HAN L S, REN C, LI L, et al. Embryonic defects induced by maternal obesity in mice derive from Stella insufficiency in oocytes (vol 50, pg 432, 2018)[J]. *Nat Genet*, 2018, 50(5): 768.
- [14] MIKEDIS M M, DOWNS K M. PRDM1/BLIMP1 is widely distributed to the nascent fetal-placental interface in the mouse gastrula[J]. *Dev Dynam*, 2017, 246(1): 50-71.
- [15] WOLFE A D, RODRIGUEZ A M, DOWNS K M. STELLA collaborates in distinct mesendodermal cell subpopulations at the fetal-placental interface in the mouse gastrula[J]. *Dev Biol*, 2017, 425(1): 44-57.
- [16] FANG F, ANGULO B, XIA N, et al. A PAX5-OCT4-PRDM1 developmental switch specifies human primordial germ cells[J]. *Nat Cell Biol*, 2018, 20(6): 655-665.
- [17] VINCENT S D, DUNN N R, SCIAMMAS R, et al. The zinc finger transcriptional repressor Blimp1/Prdm1 is dispensable for early axis formation but is required for specification of primordial germ cells in the mouse[J]. *Development*, 2005, 132(6): 1315-1325.
- [18] SHIN S W, VOGT E J, JIMENEZ-MOVILLA M, et al. Cytoplasmic cleavage of DPPA3 is required for intracellular trafficking and cleavage-stage development in mice[J]. *Nat Commun*, 2017, 8(1): 1643.
- [19] FARSHCHIAN M, MATIN M M, ARRANANT O, et al. Suppression of dsRNA response genes and innate immunity following Oct4, Stella, and Nanos2 overexpression in mouse embryonic fibroblasts [J]. *Cytokine*, 2018, 106: 1-11.
- [20] OHINATA Y, SANO M, SHIGETA M, et al. A comprehensive, non-invasive visualization of primordial germ cell development in mice by the Prdm1-mVenus and Dppa3-ECFP double transgenic reporter[J]. *Reproduction*, 2008, 136(4): 503-514.

(2022-04-30 收稿)

(上接第 601 页)

- [11] EFRONI S, DUTTAGUPTA R, CHENG J, et al. Global transcription in pluripotent embryonic stem cells[J]. *Cell Stem Cell*, 2008, 2(5): 437-447.
- [12] DONG D, BERGMAIER P, SACHS P, et al. The CUE1 domain of the SNF2-like chromatin remodeler SMARCD1 mediates its association with KRAB-associated protein 1 (KAP1) and KAP1 target genes[J]. *J Biol Chem*, 2018, 293(8): 2711-2724.
- [13] SACHS P, DING D, BERGMAIER P, et al. SMARCD1 ATPase activity is required to silence endogenous retroviruses in embryonic stem cells[J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 1335.
- [14] COLLATZ M, MOCK F, BARTH E, et al. EpiDope: a deep neural network for linear B-cell epitope prediction[J]. *Bioinformatics*, 2021, 37(4): 448-455.
- [15] SIDNEY J, PETERS B, SETTE A. Epitope prediction and identification-adaptive T cell responses in humans [J]. *Semin Immunol*, 2020, 50: 101418.

2021-12-31 收稿)