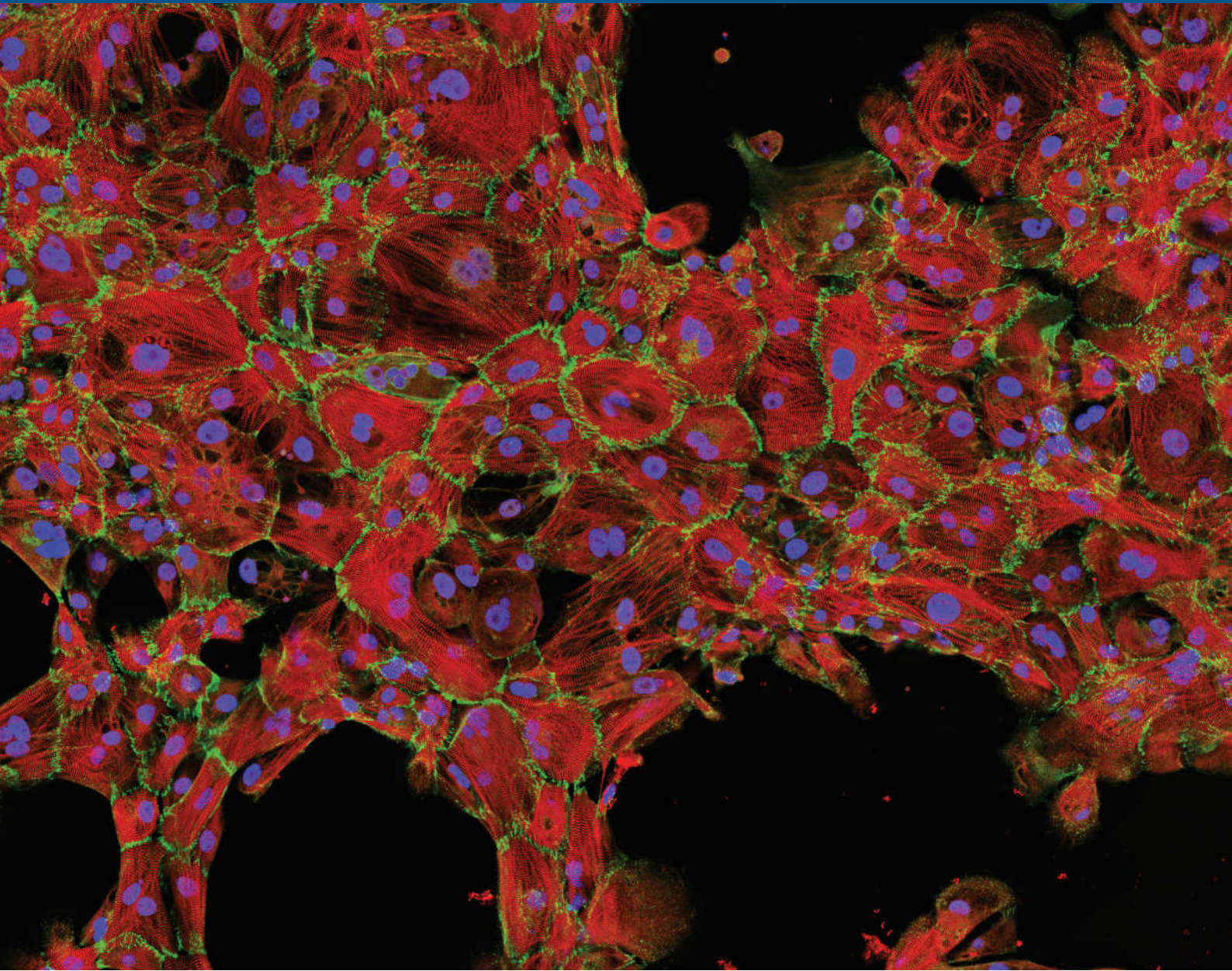


gibco



疾病模型构建：5步法构建心脏疾病模型

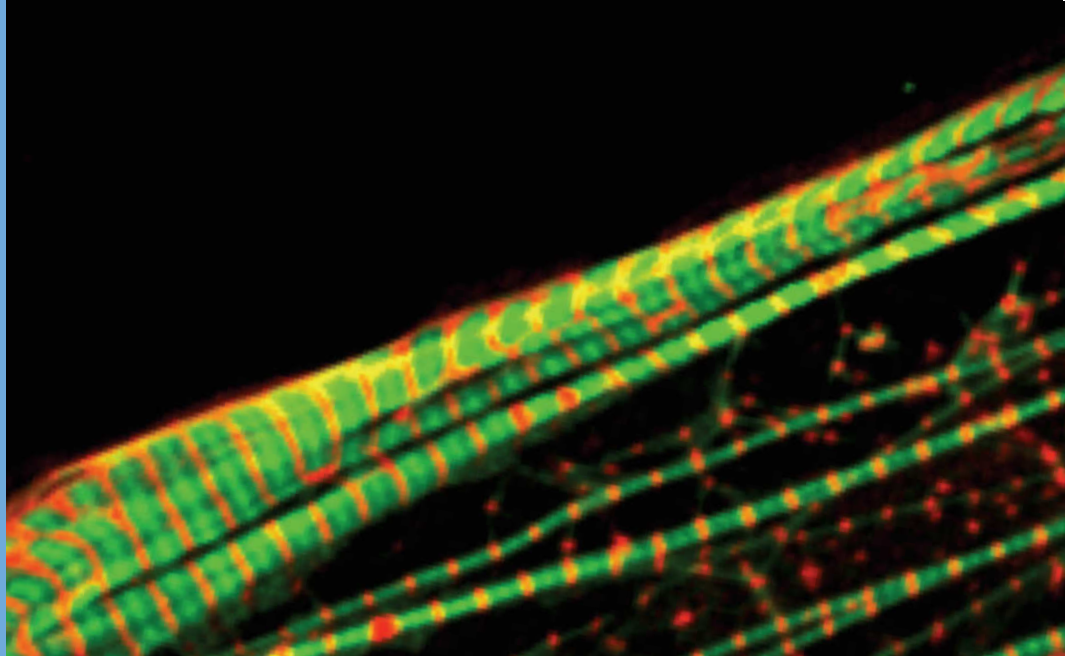
促进iPSC分化疾病建模

ThermoFisher
SCIENTIFIC

引言

多种类型的体细胞可重编程为人诱导多能干细胞 (hiPSC) 并进一步分化成疾病相关细胞, 如神经细胞和心肌细胞。如今, 科研人员可利用这一技术, 采用患者来源细胞构建体外疾病模型, 开展生物学研究和药物发现工作。随着CRISPR-Cas9和TALEN™系统等基因组编辑工具问世, 科研人员现可引入或修改疾病相关的基因变化——如单核苷酸多态性(SNPs)——以便研究它们对疾病表型的影响, 从而进一步推进疾病模型构建研究。

理想的疾病模型由等基因对 (即突变hiPSC细胞系和对照) 组成。首先基因组编辑生成等基因对hiPSC细胞系并全面鉴定, 然后使其分化成相关类型细胞。随后, 利用分化细胞对疾病表型体外成像。本指南重点介绍了使用hiPSC构建心脏疾病模型的5个关键步骤。



1



编辑—设计和订购基因组编辑工具

主要试剂和工具:

- Invitrogen™ 多能干细胞(PSC)基因编辑演示试剂盒
- Invitrogen™ TrueCut™ Cas9蛋白v2和 TrueGuide™ gRNA
- Invitrogen™ GeneArt™ Precision gRNA合成试剂盒
- Invitrogen™ GeneArt™ PerfectMatch™ TALs
- Invitrogen™ Neon™ 转染系统
- Gibco™ StemFlex™ 培养基
- Gibco™ RevitaCell™ 补充剂
- Invitrogen™ GeneArt™ 基因组切割检测试剂盒
- Ion GeneStudio™ S5系统和Ion AmpliSeq™ 引物

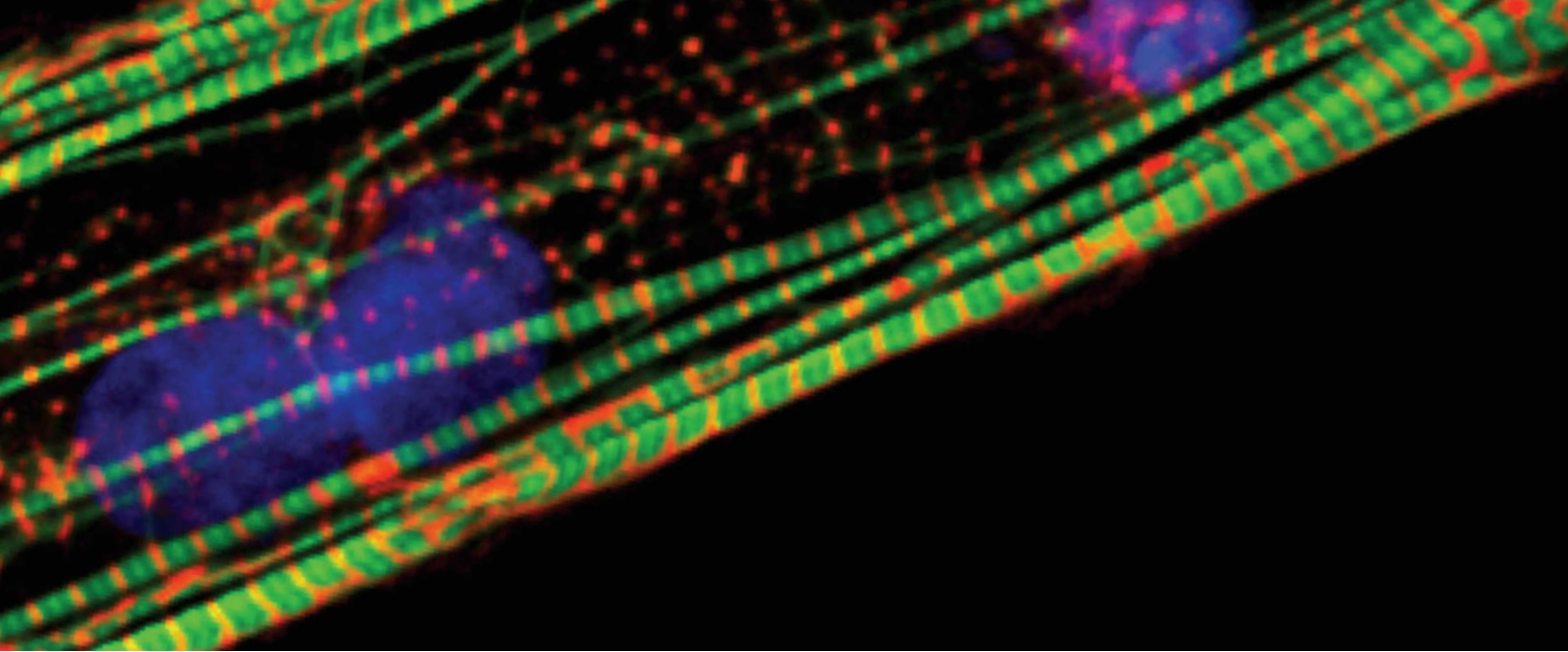
2



克隆—从基因组编辑hiPSC pool中分离并扩增克隆

主要试剂和工具:

- StemFlex培养基
- RevitaCell补充剂
- rhLaminin-521
- Invitrogen™ TRA-1-60活细胞成像试剂盒
- Invitrogen™ 碘化丙啶



3



鉴定—检验编辑后的多能性和基因组稳定性

主要试剂和工具:

- PluriTest™服务和工具
- Applied Biosystems™ KaryoStat™服务和工具
- Applied Biosystems™ TaqMan® Hpsc Scorecard服务和工具
- Ion GeneStudio S5系统和Ion AmpliSeq引物
- Invitrogen™ Attune™ NxT流式细胞仪
- Thermo Scientific™ CellInsight™ CX5和CX7高内涵分析 (HCA) 平台
- Invitrogen™ EVOS™成像系统
- Invitrogen™多能干细胞4-标记物免疫细胞化学试剂盒

4



分化—hiPSC分化成心肌细胞

主要试剂和工具:

- Gibco™ PSC心肌细胞分化试剂盒
- Invitrogen™人心肌细胞免疫细胞化学试剂盒

5



测定—针对hiPSC分化心肌细胞中进行疾病相关测定

主要试剂和工具:

- Invitrogen™ Fluo-4荧光指示剂
- Invitrogen™ FluoVolt™膜电位检测试剂盒
- Applied Biosystems™ TaqMan® qPCR探针和试剂
- CellInsight CX5 和 CX7 HCA平台
- Thermo Scientific™ Varioskan™ LUX多模酶标仪

第一步: 编辑

设计和订购基因组编辑工具

为改善hiPSC基因组编辑工作流程, 应最大限度提高编辑效率, 以促进下游克隆分离。除了特异位点差异外, hiPSC基因组编辑效率主要取决于所用的编辑工具以及这些工具的递送方法。使用TALEN技术或CRISPR-Cas9系统都可完成基因组编辑, 但后者更易实施(图1)。通过这两种工具, 可引入非同源性末端连接(NHEJ)随机修复的DNA断裂, 形成插入缺失(indels)混合物; 也可能引入同源定向修复(HDR)选择性修复的DNA断裂。NHEJ引入的插入缺失混合物可用于构建基因敲除细胞系, 而HDR引入的DNA断裂可用于改变单个碱基或引入大小标签(如6xHis或GFP), 产生突变或标记细胞系。

贴士

- 可以100 nt单链DNA(ssDNA)寡核苷酸为供体引入SNP, 因为这种寡核苷酸采用CRISPR-Cas9和TALEN基因组编辑效果很好。
- 实验方案采用Neon转染系统时, 可能需要优化实验方案以提升您的hiPSC细胞系基因组编辑效率和细胞活率, 但总体来说, 利用该系统的程序7, CRISPR编辑工具实现了良好的递送效果和细胞活率, 同时维持了较高的编辑效率。
- 有关如何将Cas9蛋白、gRNA和寡核苷酸递送到hiPSC细胞系的完整实验方案, 请见 thermofisher.com/diseasemodeling。

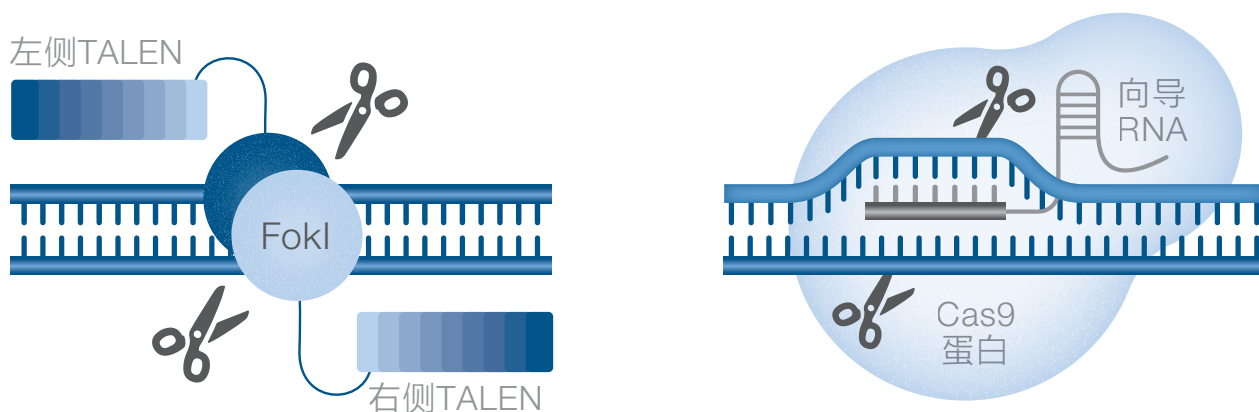


图1. TALEN和CRISPR-Cas9基因组编辑工具。 每个编辑工具在基因组的特定位点处结合并切割双链DNA。此特异性由TALEN或向导RNA(gRNA)序列决定, 可更改此序列以靶向所需的不同基因组DNA序列。CRISPR-Cas9可简单地设计和订购gRNA, 易于使用, 但受制于自身的序列局限性, 此技术可靶向的位点有限。PerfectMatch TAL可以靶向人类基因组中的任何序列, 且由于DNA结合位点更长, 脱靶效应更低。

产品亮点

- 多能干细胞(PSC)基因编辑演示试剂盒: 该试剂盒提供的关键试剂, 可用于目标细胞系内构建并检测敲除和点突变。该试剂盒可优化条件, 从而利用hiPSC实现有效基因组编辑, 实操时间更短、成功率更高。更多信息请见 thermofisher.com/pscgeneeditingkit。
- Cas9 iPSC和TrueCut Cas9蛋白v2: 将gRNA转染到表达Cas9的稳定的hiPSC细胞系(如Invitrogen™ Cas9 hiPSC)中, 可利用CRISPR-Cas9编辑hiPSC。也可将高效的Cas9核酸酶(如TrueCut Cas9蛋白v2)与gRNA一起递送到细胞中(图3)。相对于基于质粒或RNA的方法, 这两种方法编辑效率更高。有关我们的CRISPR产品和服务, 请见thermofisher.com/crispr。
- GeneArt Precision gRNA合成试剂盒: 自行制备体外转录(IVT) gRNA, 并与现有的编辑和递送工具兼容。为获取gRNA序列, 可访问thermofisher.com/crisprdesign, 使用Invitrogen™ GeneArt™ CRISPR搜索和设计工具。
- PerfectMatch TAL; PerfectMatch TAL可定位FokI核酸酶特异位点。与其他TAL效应蛋白不同, 工程改造的PerfectMatch TAL去除了5'端碱基限制, 因此可设计为靶向基因组内的任一目标序列。有关我们的TALEN产品和服务, 请见thermofisher.com/tals。
- 定制基因组编辑服务: 凭借我们值得信赖的产品和专业知识, 为您提供基因组编辑服务。如需向项目咨询, 请访问thermofisher.com/cellmodels。

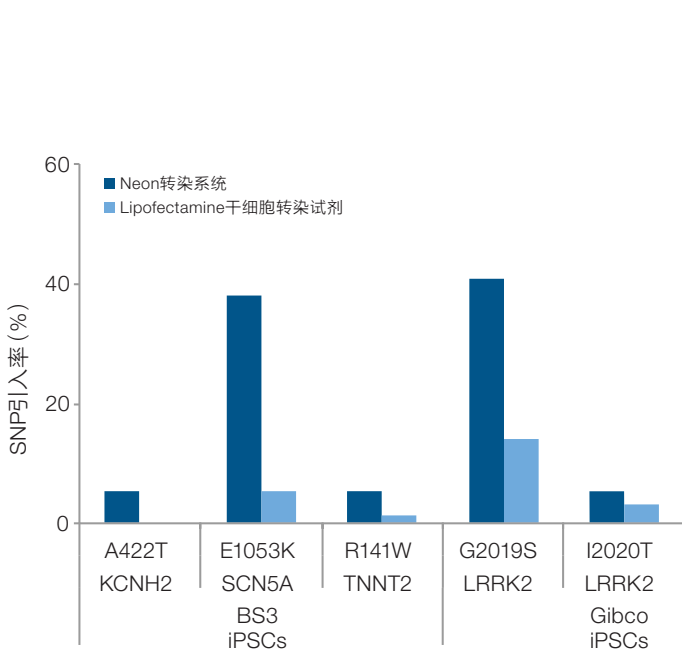


图2. Neon转染系统和Invitrogen™ Lipofectamine™ 干细胞转染试剂编辑工具递送效率对比。此过程使用TrueCut Cas9蛋白v2、IVT gRNA和单链寡核苷酸供体, 在指定基因组位点编辑Gibco™ Episomal和BS3 iPSC细胞系。

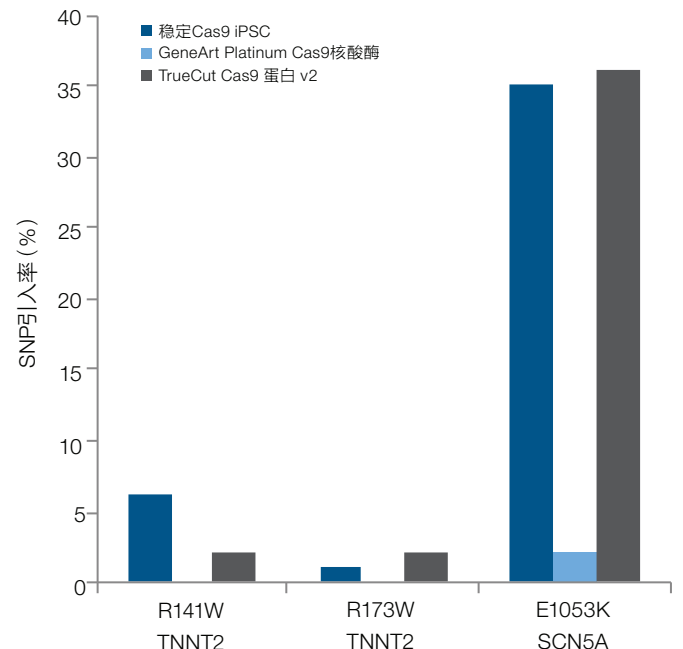


图3. TrueCut Cas9蛋白v2能够诱导SNP形成, 其诱导频率与稳定Cas9 iPSC相当。此过程利用稳定Cas9 hiPSC或Cas9蛋白完成HDR介导的基因组编辑, 其中使用gRNA和单链寡核苷酸供体和Neon设备递送编辑工具。

第二步: 克隆

克隆—从基因组编辑hiPSC库中分离和扩增克隆

完成基因组编辑后, 下一步是分离克隆hiPSC细胞群。手动分离单个细胞铺板形成的克隆比较繁琐, 通常需要多轮亚克隆才能分离出完整的克隆群体。更为明智的做法是利用细胞分选方法进行单细胞分离, 但人们最近发现这种方法在处理hiPSC细胞系时有诸多不便。随着专门针对单细胞解离和hiPSC存活而优化的最新hiPSC培养试剂出现, 我们现可利用细胞分选法可靠地分离单细胞克隆, 克隆回收率为20-60%——具体取决于hiPSC细胞系。合适的细胞外基质、生长培养基和细胞存活添加剂是实现高回收率的关键。此外, 为可靠地分离单个hiPSC活细胞, 需要严格的细胞分选设置, 并且可以通过对碘化丙啶(PI) 阴性且多能性标记物TRA-1-60染色阳性的细胞进行设门来实现分离(图4A)。分选后约2周, 即可对单细胞克隆成像, 并进一步扩增以用于基因分析, 从而鉴定出包含目标编辑的克隆(图4B)。有关克隆hiPSC分离和扩增的实验方案, 请见 thermofisher.com/diseasemodeling。

贴士

- 采用专为单细胞活力修复而开发的试剂, 可显著提高分选后的hiPSC细胞存活率。
- 单细胞分选后三天内, 不可更换培养基, 以免吸走未完全贴壁的单细胞。
- 使用StemFlex培养基时, 每3天更换一次培养基足以实现克隆扩增。
- 将单细胞分选到96孔板中, 可方便自动化下游克隆处理。

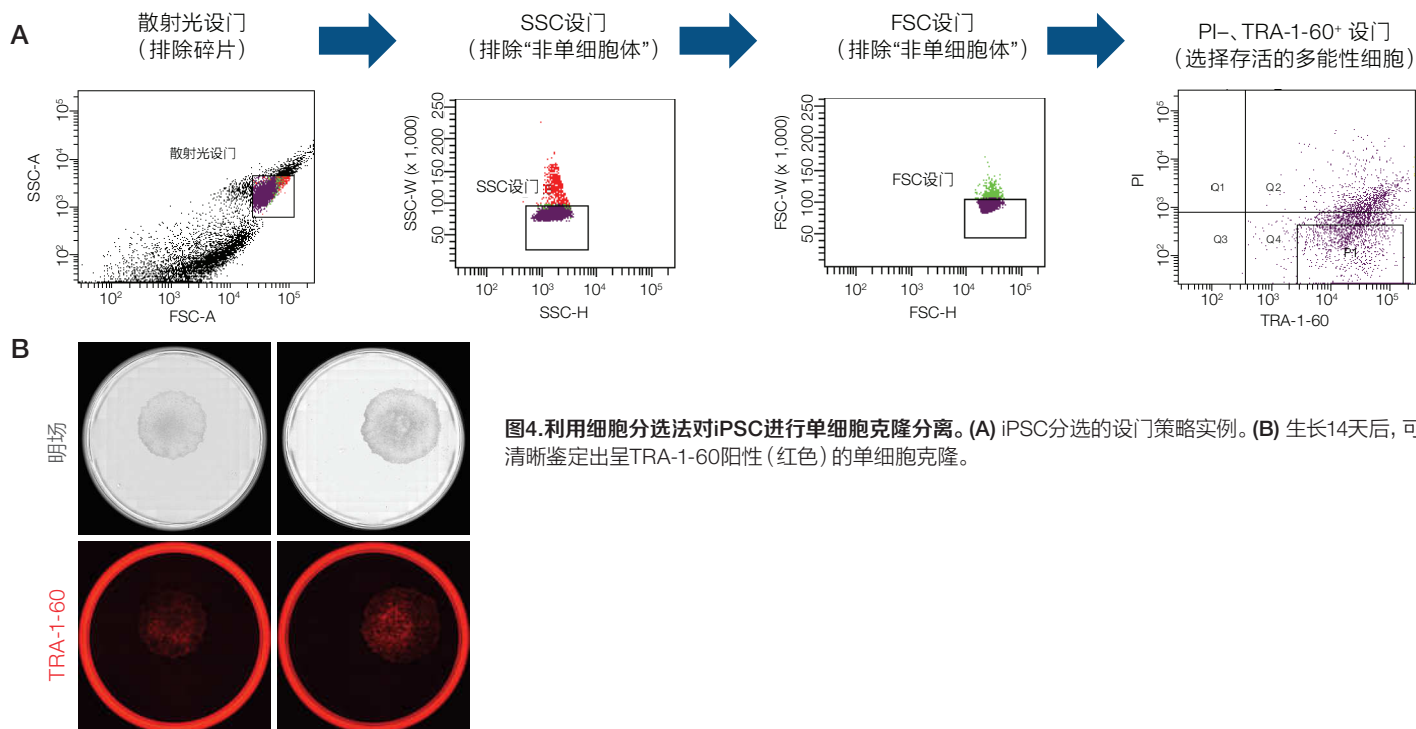


图4. 利用细胞分选法对iPSC进行单细胞克隆分离。(A) iPSC分选的设门策略实例。(B) 生长14天后, 可以清晰鉴定出呈TRA-1-60阳性(红色)的单细胞克隆。

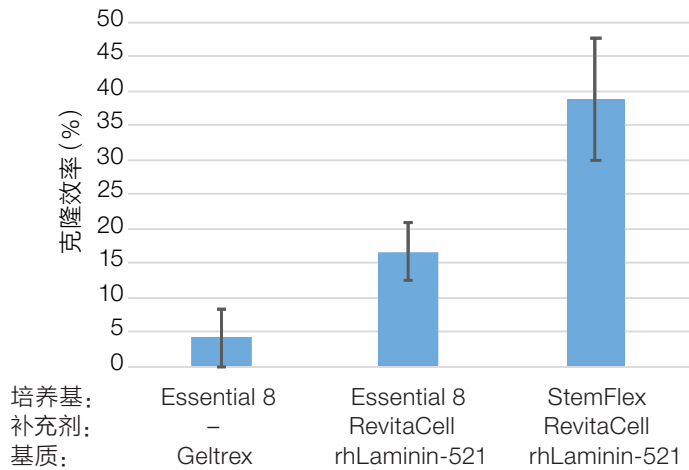


图5. StemFlex培养基增强了分选后的克隆效率。StemFlex培养基、RevitaCell添加剂和rhLaminin-521针对复杂应用优化，如单细胞传代和克隆分离。

产品亮点

- StemFlex培养基: 单细胞分选hiPSC需要稳定的培养基, 须既可培养单个hiPSC且适用于hiPSC扩增培养, 同时无需每天换液(图5和6)。有关实验方案和其他应用数据, 请见thermofisher.com/stemflex。
- rhLaminin-521: 单个hiPSC贴壁是确保分选后有效回收克隆的关键。相对于其他基质(如玻连蛋白Vitronectin), 我们的rhLaminin-521可提供更高的单细胞贴壁率和hiPSC存活率。
- RevitaCell补充剂: 细胞存活混合物能够大幅提高单一化后的hiPSC回收率。此外, 在分选后向培养基中添加此类混合物能够进一步促进克隆回收。



图6. 利用单细胞hiPSC克隆分离和回收工作流程(细胞分选法)。

第三步: 鉴定

检测编辑后的多能性和基因组稳定性

基因组编辑和克隆分离可能对hiPSC细胞造成很大应激应力。尽管通常观察不到不利影响,但在基因组编辑和克隆分离实验前后,必须鉴定hiPSC。有多种方法可供轻松地评估hiPSC在蛋白质或mRNA水平的多能性状态,包括将您的hiPSC细胞系与大量常用PSC细胞系标准集关联的系统(图7)。通常,可利用传统G带核型分析或更客观的数字核型分析方法测定基因组稳定性,后者可使用基因组DNA探针比对染色体增加和缺失。如需了解这些方法以及更多信息,请访问thermofisher.com/stemcellanalysis。

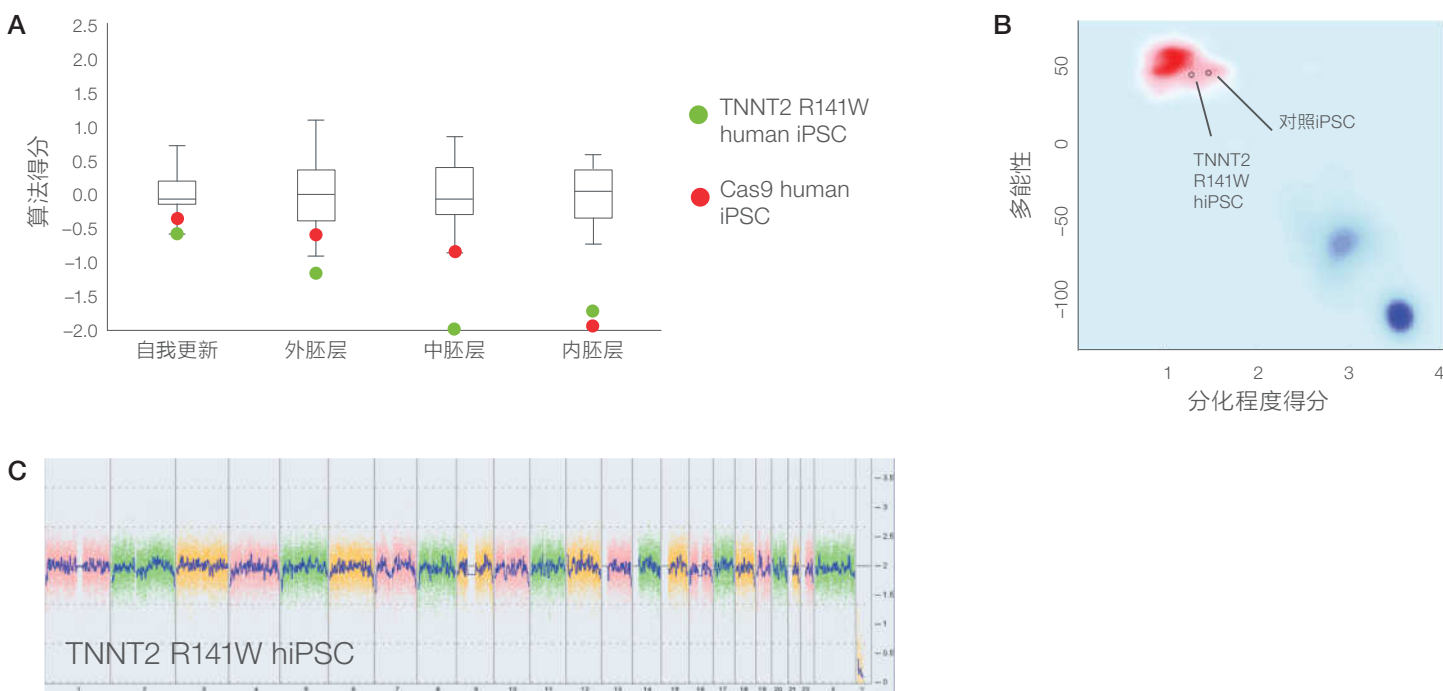
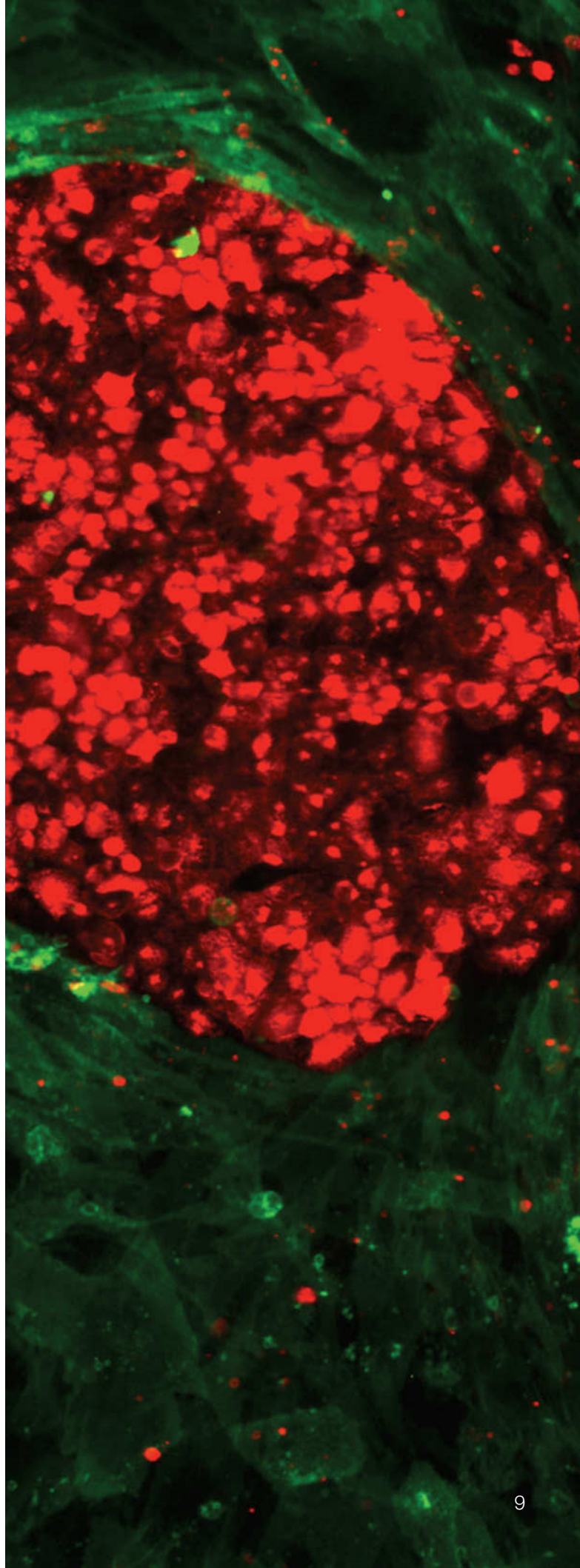


图7.心脏疾病的细胞模型鉴定: 扩张型心肌病 (DCM)。利用Cas9 hiPSC的基因编辑引入心肌肌钙蛋白T基因 (TNNT2 R141W) 的DCM相关突变。多种方法组合表明,多能性和核型不受基因组编辑影响。**(A)**使用TaqMan hPSC Scorecard Panel对比样品与参考集的基因表达谱(分别为彩色点图和灰色箱形图)。该检测使用90多个基因和13个PSC的静态数据库进行比较。**(B)**PluriTest检测可利用基因芯片数据,根据多能性得分(反映多能性程度)和分化程度得分(反映分化程度)确认多能性标志物表达。该检测使用了36,000多个转录子和450多种细胞和组织类型的液体参考集进行比较。**(C)**KaryoStat检测具有全基因组覆盖度,可准确检测拷贝数变化和基因组异常。

产品亮点

- TaqMan hPSC Scorecard Panel: 畸胎瘤形成是证明hiPSC细胞系真实多能性的方法之一,但这一过程过于漫长且需要动物实验。在基因表达分析中使用从hiPSC和拟胚体(一种从hiPSC产生所有三个胚层的无偏差方法)分离的mRNA,可通过检测hiPSC中是否存在多能性基因及拟胚体中是否存在胚层基因,验证多能性^[1,2]。
- PluriTest检测: 利用RT-qPCR方法对一组特征明确的选定基因进行mRNA表达分析,可评估多能性。而利用基于全基因组mRNA的无偏差方法,能够更准确地比较一组特征明确的hiPSC mRNA谱图^[2,3]。PluriTest检测是一种基于生物信息学的分析,可通过样品基因芯片分析获得的转录谱与广泛的hESC细胞系、iPSC细胞系、体细胞和组织参考集进行比较。
- KaryoStat检测: 由于已知hiPSC具有不稳定的基因组,因此应定期检查hiPSC的基因组稳定性。传统方法是使用G带核型分型技术分析hiPSC核型,以揭示染色体畸变。也可使用一种分子分析方法,采用包含基因组DNA探针的基因芯片检测hiPSC细胞系的基因组DNA。然后,基于探针强度了解基因组整个DNA区域的详细拷贝数和畸变信息。



第四步: 分化

hiPSC分化成心肌细胞

为实现疾病相关表型的可视化, 必须使hiPSC分化成疾病相关细胞类型。分化通常发生在多个阶段, 可能需要长达2个月的时间, 具体取决于细胞类型。在短短2周内, 即可获得能表达大部分功能蛋白(如 *TNNT2*、*NKX2.5*、*MYH6*和*ACTN1*)、并且能够在培养物中进行功能性收缩的心肌细胞。为监测分化过程的有效性, 务必在分化过程中利用免疫细胞化学技术或qPCR监测目标细胞类型的特异性标志物(图8)。

贴士

- PSC心肌细胞分化试剂盒可简化从PSC生成心肌细胞的操作流程
- 可观察细胞的自发收缩, 并能轻松鉴定形成的心肌细胞——收缩行为通常在分化开始后10-14天观察到
- 心肌细胞可以从PSC大量生成并重新接种, 以供高通量下游测定使用。

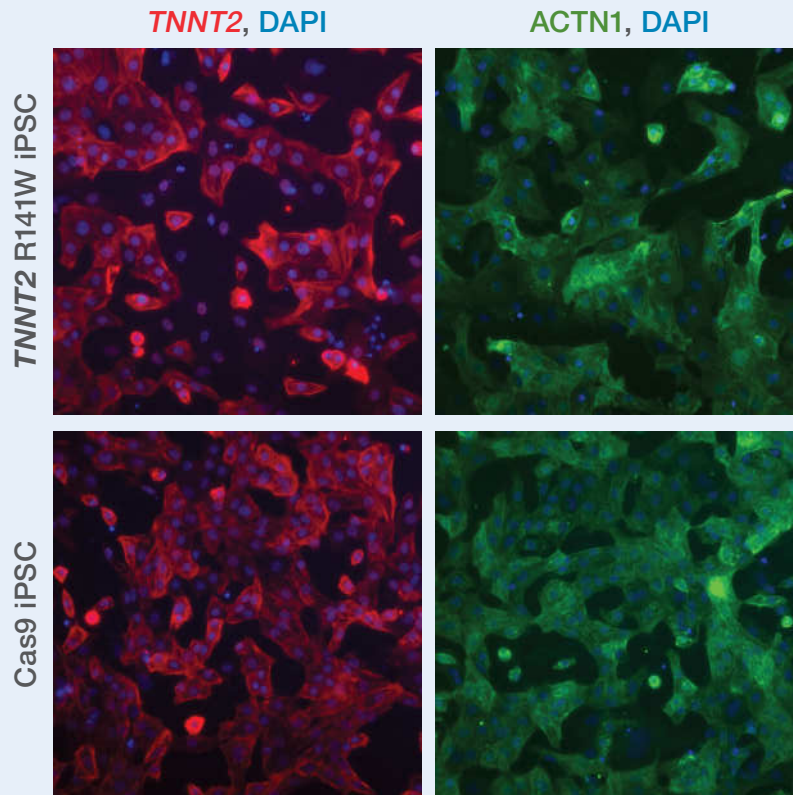
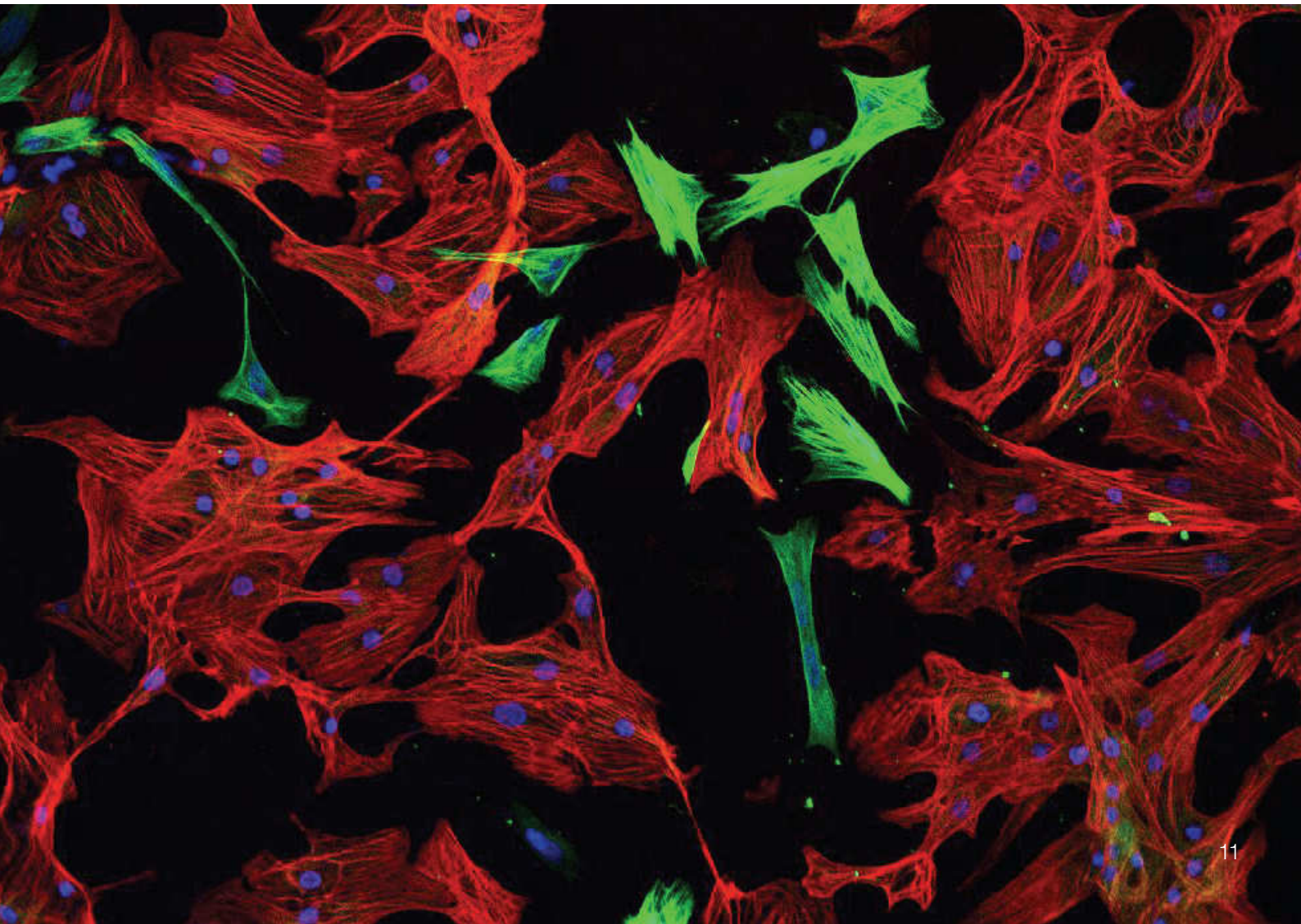


图8.来自携带 *TNNT2* R141W突变的iPSC的心肌细胞。对细胞进行TNNT2和ACTN1染色, 它们是心肌细胞收缩部位的两个必需结构蛋白。

产品亮点

- PSC心肌细胞分化试剂盒: 心肌细胞等特化细胞分化过程复杂且漫长, 所以非常具有挑战性。凭借少数用于指定祖细胞以及最终成熟细胞的培养基, 现可提供能够简化实验室用的hiPSC分化的试剂盒。有关该试剂盒的实验方案和数据, 请见thermofisher.com/differentiation。
- 人心肌细胞免疫细胞化学试剂盒: 在整个分化过程中, 可对目标细胞特异性标志物 (如NKX2.5和TNNT2) 进行蛋白表达分析, 跟踪不同分化阶段的效率。



第五步: 检测

在hiPSC分化成的心肌细胞中进行疾病相关检测

应始终使用编辑hiPSC细胞系分化细胞及其匹配的等基因对照细胞进行疾病相关检测。可以使用多种Invitrogen™检测方法,包括用于检测线粒体功能(MitoTracker™探针)、增殖(CyQUANT™ Direct试剂盒)和凋亡(CellEvent™检测)的终点检测法,或用于检测钙通量(Fluo-4检测)、钾通量(FluxOR™监测)或膜电压(FluoVolt检测)的动力学变化的动态功能检测方法。在DCM中,心脏功能会受到影响,且压力或过度劳累情况下,心脏可能会停止收缩^[6]。对*TNNT2* R141W突变的疾病模型进行体外分析表明,确实观察到了提示实际疾病的功能表型(图9和10)。

贴士

- 可以使用带台式培养箱的HCA仪器,如CellInsight CX7 HCA平台,检测细胞行为和健康状况变化时程。
- 通过使用HCA仪器测量细胞大小,可以轻松分析心肌细胞肥大。
- 可以使用Fluo-4(钙)或FluoVolt(膜电位)荧光探针对心肌细胞功能成像,以开展毒性和疾病模型研究。
- 为促进大规模筛查,更方便的方法是批量生成心肌细胞,然后重新铺板,以供下游分析使用。

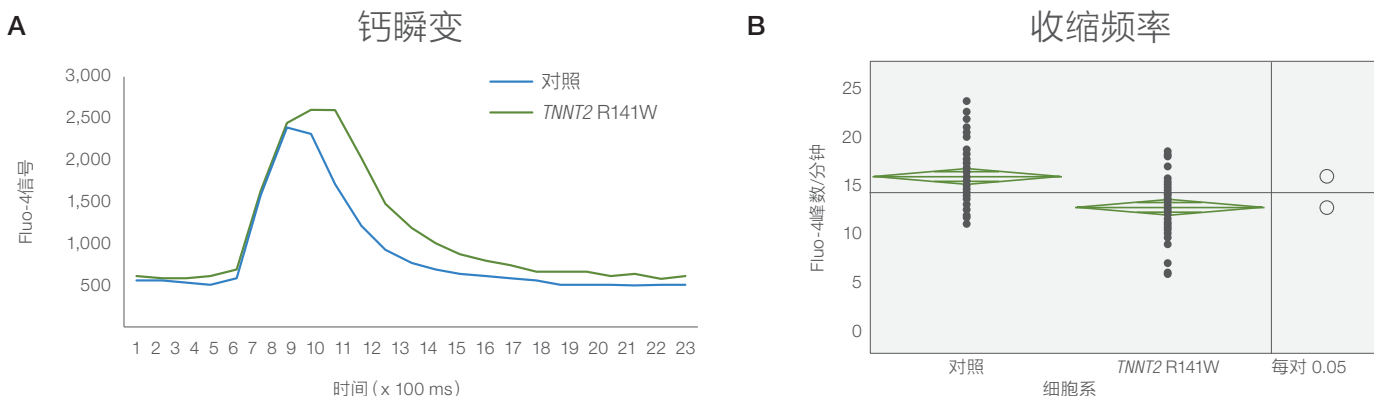


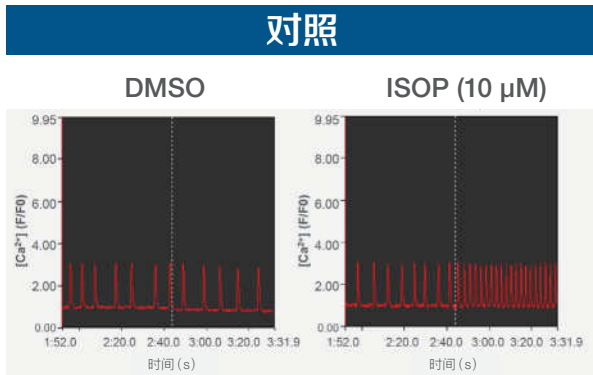
图9. DCM相关的*TNNT2* R141W突变在体外影响心肌细胞功能。(A)对照和*TNNT2* R141W编辑心肌细胞中的代表性钙调控Fluo-4信号追踪曲线。从图中可以观察到,钙水平衰减时间略有延迟。(B) DCM心肌细胞的收缩频率略有降低,这可能是由图A中观察到的钙释放延迟所致。

产品亮点

- FluoVolt膜电位检测试剂盒：心血管疾病通常以心肌动作电位异常为特征。FluoVolt电压敏感型荧光指示剂是一种快速响应探针，可搭配离子敏感型荧光探针使用，以确认心脏衰竭时电压门控离子通道的变化。更多信息请见hermofisher.com/fluovoltbp70。
- CellInsight HCA平台搭配台式培养箱：疾病模型分析需要精确控制温度、湿度和CO₂水平，以观察和测量生物活性及其变化时程。CellInsight HCA系统支持长期成像研究，其数据是定量分析研究的基础，这有助于利用图像分析软件生成有意义的的数据。有关活细胞HCA的更多信息，请见 thermofisher.com/hca。



A



B

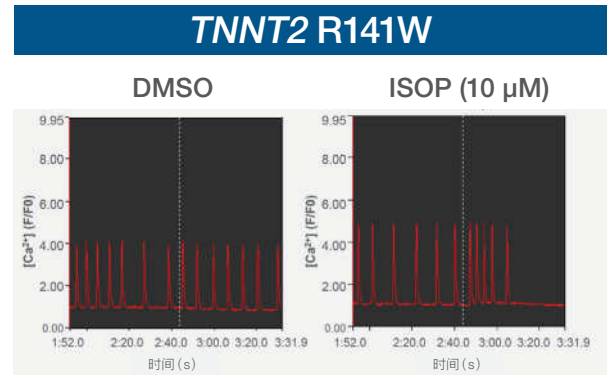


图10.携带DCM突变的心肌细胞对肾上腺素能刺激产生不良反应。(A)在正常健康心肌细胞中， β -肾上腺素能刺激剂异丙肾上腺素 (ISOP) 增加收缩频率，而对照品DMSO无此作用 (白色虚线表示添加化合物)。(B) 用ISOP处理时，DCM心肌细胞最初产生反应，但很快便丧失自发收缩能力。此实验采用Hamamatsu™ FDSS™ 6000系统。

参考文献

1. Bock C, Kiskinis E, Verstappen G et al. (2011) Reference maps of human ES and iPS cell variation enable high-throughput characterization of pluripotent cell lines. *Cell* 144:439–452.
2. Bouma MJ, van Iterson M, Janssen B et al. (2017) Differentiation-defective human induced pluripotent stem cells reveal strengths and limitations of the teratoma assay and *in vitro* pluripotency assays. *Stem Cell Reports* 8:1340–1353.
3. Müller FJ, Schuldt BM, Williams R et al. (2011) A bioinformatic assay for pluripotency in human cells. *Nat Methods* 8:315–317.
4. Sun N, Yazawa M, Liu J et al. (2012) Patient-specific induced pluripotent stem cells as a model for familial dilated cardiomyopathy. *Sci Transl Med* 4:130ra47.

更多信息请见 thermofisher.com/cardiomodel



赛默飞
官方微信



赛默飞
生命科学官方微信

免费服务电话：800 820 8982/400 820 8982

信息咨询邮箱：cnbidmarketing@thermofisher.com

ThermoFisher
S C I E N T I F I C