

应用 CRISPR/Cas9 基因编辑系统对 HEK293 细胞系 TSC1 基因稳定敲除效果的实验鉴定

王 晶, 高 倩, 陈健康, 刘家云 (空军军医大学第一附属医院临床检验研究所, 西安 710032)

摘要: **目的** 利用成簇规律间隔短回文重复序列 / 成簇规律间隔短回文重复序列相关蛋白 (clustered regularly interspaced short palindromic repeat/CRISPR-associated protein, CRISPR/Cas9) 基因编辑系统在 HEK293 细胞系中对 TSC1 基因稳定敲除, 并对其敲除效果进行鉴定。**方法** 根据 TSC1 基因的序列设计 sgRNA, 将 sgRNA 克隆到载体 lentiCRISPRv2 上, 将连接产物转化至 Stbl3 感受态细胞, 对菌液进行测序鉴定。将鉴定成功的 lentiCRISPRV2-sgTSC1 质粒转染至 HEK293 细胞, 加入嘌呤霉素进行筛选, 挑选单细胞克隆进行 PCR 鉴定, 选取条带单一的细胞株用 Western blot 鉴定 TSC1 基因的表达。**结果** 成功构建 lentiCRISPRV2-sgTSC1-1/2 重组质粒, 并利用该质粒完成对 TSC1 基因的定点切割, Western blot 结果显示细胞中无 TSC1 表达。**结论** 用 CRISPR/Cas9 系统成功构建 TSC1 基因敲除的稳定细胞株, 为后续实验奠定了基础。

关键词: 成簇规律间隔短回文重复序列 (CRISPR)/CRISPR 相关蛋白 9 (Cas9); 结节性硬化症; 基因敲除; 结节性硬化症 1 基因

中图分类号: R596.2; Q786 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-7414 (2021) 04-129-04

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2021.04.027

Construction and Identification of TSC1 Gene Knockout Stable Cell Line in HEK293 Using CRISPR/Cas9 Gene Editing System

WANG Jing, GAO Qian, CHEN Jian-kang, LIU Jia-yun

(Research Institute of Clinical Laboratory Medicine, the First Affiliated Hospital of the Air Force Medical University, Xi'an 710032, China)

Abstract: **Objective** To establish TSC1 gene knockout stable strain in human embryonic kidney cells (HEK293) cell line by CRISPR/Cas9 Gene editing system and identify its knockout efficiency. **Methods** According to TSC1 genes sequence, designed two pairs of sgRNAs and clone them into vector lentiCRISPRv2. The ligation products were transformed into Stbl3 competent cells, coated plates, select monoclonal colony bacteria to sequencing. Co-transfect the correct recombinant plasmid into HEK293, add puromycin to sifting through the cells with resistance, the surviving cells were planked for pick monoclonal cells by PCR identification. Choose the cells with single band and measure the knockout effect by Western blotting. **Results** The recombinant plasmids lentiCRISPRV2-sgTSC1-1/2 were successfully constructed and completed the cleavage specificity in TSC1. Western Blot assay showed the there was no TSC1 express in HEK293 cells. **Conclusion** The TSC1 gene knockout stable cell line in HEK293 was correctly structured and lay the foundation for the future studies.

Keywords: clustered regularly interspaced short palindromic repeats(CRISPR)/CRISPR-associated protein 9(Cas9); tuberous sclerosis; gene knockout; TSC1 gene

TSC1 基因位于染色体 9q34, 包含 23 个外显子, 转录本 mRNA 长 8.6kb, 是结节性硬化症 (tuberous sclerosis, TSC) 的主要致病基因。TSC 是一种罕见的常染色体显性多系统遗传疾病^[1], 可发病于全身各个组织, 可累及脑、皮肤、视网膜、肾脏和心脏, 以癫痫、智力缺陷, 头面部血管纤维瘤最为常见, 称为“TSC 三联征”^[2]。TSC1 基因编码错构瘤蛋白 (hamartin) 和 TSC2 基因编码的马铃薯球蛋白 (tuberin) 共同构成复合体 TSC1/TSC2,

该复合体抑制哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 信号通路。当 TSC1 或 TSC2 基因发生突变, 导致 TSC1/TSC2 复合体功能异常, 进一步降低其对 mTOR 信号通路的抑制作用, 引起细胞的异常增殖, 从而发生机体的病理变化^[3]。

成簇规律间隔短回文重复序列 / 成簇规律间隔短回文重复序列相关蛋白 (clustered regularly interspaced short palindromic repeat / CRISPR-associated protein, CRISPR/Cas) 系统是细菌降解入

作者简介: 王晶 (1993-), 女, 硕士研究生, 检验技师, 主要从事临床检验与分子生物学, E-mail:wjmed0429@163.com。

通讯作者: 高倩, 女, 硕士研究生, 主管技师, E-mail:1228225756@qq.com。

侵的噬菌体或外源性遗传物质形成的获得性免疫防御机制^[4]。当入侵的噬菌体将其DNA片段整合到细菌CRISPR序列中,细菌利用相应的CRISPR RNAs(crRNAs)来指导同源序列的降解,从而提供细菌的免疫防御功能。张峰团队据此开发出基因编辑工具CRISPR/Cas9系统^[5],该系统主要由单链引导RNA(single guide RNA, sgRNA), Cas9核酸酶和前间隔序列邻近基序(protospacer adjacent motif, PAM)构成,即在PAM序列的引导下,sgRNA准确定位到目的片段,并与之互补配对结合,同时PAM序列激活Cas9核酸酶,使之完成对DNA的剪切^[6],从而实现基因敲除的功能,该方法以其快速高效、操作便捷的特点现已成为首选的基因编辑工具。因此,我们拟利用CRISPR/Cas9基因编辑系统在HEK293细胞中对TSC1基因进行敲除,从而为研究TSC1基因的生物学功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 细胞来源 人胚肾细胞HEK293细胞系(本实验室传代培养)。

1.2 仪器与试剂 lentiCRISPRv2空载质粒(本实验室保存);sgRNA(生工合成);限制性内切酶BsmB I,碱性磷酸酶、T4多聚核苷酸激酶(ThermoFisher Scientific);DNA胶回收试剂盒、基因组提取试剂盒(生工生物);DMEM培养基(Hyclone);Opti-MEM减血清培养基、胎牛血清(GIBCO);兔抗TSC1抗体、兔抗 β -tubulin抗体(Cell Signaling Technology),HRP偶联山羊抗兔二抗(Jackson Immuno Research)。

1.3 方法

1.3.1 设计并合成靶向TSC1基因的sgRNA:在NCBI中找到TSC1的基因序列(Gene ID:7248),根据TSC1的基因序列,使用CRISPR的sgRNA在线设计网站<http://crispr.mit.edu/>,选取分值高(score>95)且脱靶少的序列,网站分析结果为5'→3'端的正义链(20N),以原则:正义链序列为5'-GACC-G-20N-3';反义链序列为5'-AAAC-(20N的互补序列)-C-3'合成两条部分互补的寡核苷酸链见表1。设计的sg-TSC1-1位于6号外显子上游,sg-TSC1-2位于6号外显子下游,若该系统正确切割,TSC1基因的6号外显子则被整体删除。

1.3.2 构建重组质粒lentiCRISPRv2-sgTSC1:将合成的针对目的基因TSC1的寡核苷酸进行退火,形成双链sgRNA。用限制性内切酶BsmB I对空载质粒lentiCRISPRv2进行酶切,将酶切产物进行琼脂糖凝胶电泳,对目的片段进行切胶回收。将回收的BsmBI消化后载体和双链sgRNA进行连接,将

连接体系转化入Stbl3感受态细胞中,次日挑取单克隆菌落进行扩大培养,待菌液浑浊后将其送测序。

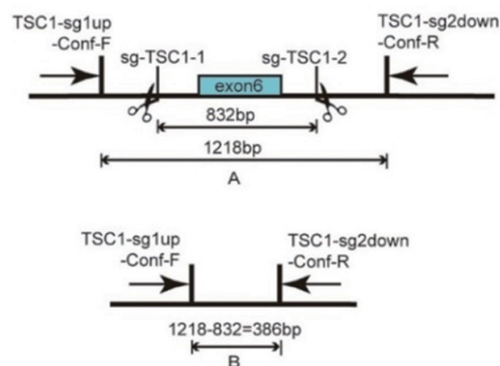
表1 合成的寡核苷酸序列

引物名称	序列(5'→3')
sg-TSC1-1 F	CACCGTACTGTACAATGCCGATCC
sg-TSC1-1 R	AAACGGATCGGCATTGTACAGTAC
sg-TSC1-2 F	CACCGCTCGTACTGAATTCGGCAA
sg-TSC1-2 R	AAACTTGGCGAATTCAGTACGAGC
TSC1-sg1up-Conf F	AAGCAGCTCCTTTTGTTCATCC
TSC1-sg2down-Conf R	CTAAGTCTGCGCTCTCTTCAGC

1.3.3 细胞培养与转染:将HEK293细胞接种于培养皿,当细胞密度约为70%时,更换无血清培养基,进行转染。对照组转染4 μ g lentiCRISPRv2空载体,实验组共转染lentiCRISPRv2-sgTSC1-1和lentiCRISPRv2-sgTSC1-2各2 μ g。

1.3.4 嘌呤霉素加压筛选:转染后48h进行换液并加入1 μ g/ml嘌呤霉素,每2天进行一次换液,7天后将筛选的细胞消化收集,PBS清洗三遍,制成单细胞悬液,重新铺板于15cm培养皿中,用于挑取单克隆细胞。

1.3.5 PCR鉴定TSC1基因敲除:培养5~7天后,挑取单克隆细胞于48孔板继续培养。设计位于TSC1基因的两个切割位点的上游和下游各一个确认引物TSC1-sg1up-Conf F和TSC1-sg2down-Conf R(表1),PCR产物的片段大小等于两引物之间的碱基数(1218bp)减去两切割位点间的碱基数(832bp)之差(386bp)时(图1),初步判定为sgTSC1双切割成功。收集48孔板每个孔中一半的细胞,提取基因组进行PCR鉴定,另一半细胞继续培养。



A: 切割前 B: 成功切割并修复末端后

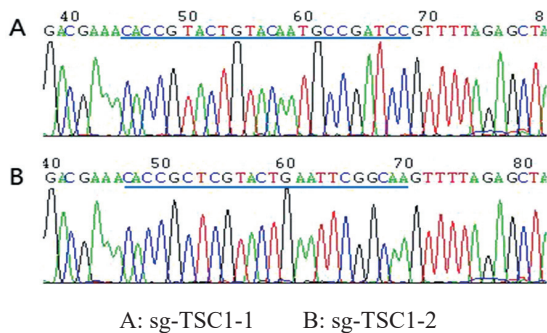
图1 PCR鉴定原理示意图

1.3.6 Western blot鉴定TSC1基因敲除效果:选取PCR阳性的结果进行扩大培养,收取细胞进行Western blot鉴定。收集待测细胞进行裂解,离心取上清进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳

(SDS-PAGE)。凝胶电泳分离蛋白后,用PVDF膜进行转印,封闭后用缓冲液洗膜后孵育一抗:内源抗体 anti-TSC1 和内参抗体 anti- β -tubulin。次日室温孵育二抗 2h 后显影。

2 结果

2.1 重组质粒 lentilCRISPRv2-sgTSC1 的构建 挑取单克隆菌落 lentilCRISPRv2-sgTSC1-1 和 lentilCRISPRv2-sgTSC1-2 送生工公司进行测序,测序结果见图2,两条目的sgTSC1序列已经正确插入载体,证明用于 TSC1 基因敲除的两个重组质粒构建成功。



A: sg-TSC1-1 B: sg-TSC1-2
图2 插入 sgTSC1 的测序结果

2.2 PCR 鉴定 lentilCRISPRv2-sgTSC1 成功转染并对 TSC1 基因进行有效切割 对 48 孔板中的单克隆细胞进行 PCR 鉴定,以转染筛选后的混合细胞所提基因组为阳性对照,空转的细胞为阴性对照,结果显示 2F6 和 4C8 两孔细胞出现 386bp 的正确条带(见图3)。且条带单一,无其他大小的杂带,即初步鉴定 TSC1 基因敲除成功。

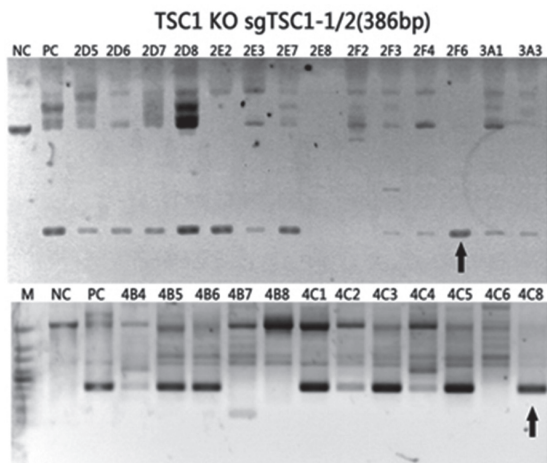


图3 琼脂糖凝胶电泳检测单克隆细胞基因敲除的 DNA 片段

2.3 Western blot 鉴定 HEK293 细胞 TSC1 基因敲除 Western blot 显影结果显示 2F6 细胞的 140KD 处仍有明显条带(见图4),说明 TSC1 没有敲除,4C8 细胞的 140KD 处无条带,说明 TSC1 基因无表达,提示成功敲除,即 4C8 细胞为 TSC1 敲除的稳定细胞株,命名为 HEK293-TSC1-KO,扩大培养后

及时冻存。

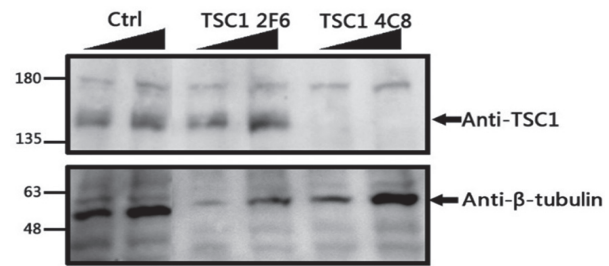


图4 Western blot 检测 TSC1 的敲除效果

3 讨论

TSC 几乎累及所有器官,其中肾脏病变、癫痫及新生儿心脏横纹肌瘤是 TSC 患者常见的死因^[7-8]。近年来有研究报道,TSC1 可调节骨髓造血干细胞及间充质干细胞的自我更新和分化;TSC1 通过不同信号通路促进巨噬细胞 M2 极化减弱 M1 极化而抑制炎症反应,在动物实验中发现,TSC1 的失活能促进糖尿病小鼠肾小管上皮发生上皮-间质转化(epithelial-to-mesenchymal transition, EMT),mTOR 抑制剂在控制糖尿病肾纤维化有潜在意义^[9-12]。因此,构建 TSC1 基因敲除的稳定细胞系能在细胞水平上模拟 TSC1 相关的分子机制。故本文利用 CRISPR/Cas9 基因编辑系统,采用双位点切割的方法进行敲除^[13],单个位点切割在一定程度上会发生脱靶效应,而双 sgRNA 进行双位点切割,能够显著降低脱靶效应^[14-15]。本研究设计了针对 TSC1 基因的两条 sgRNA,分别位于 6 号外显子的上游和下游。对 6 号外显子进行整体敲除,高效引发移码突变,从而实现 TSC1 基因的编辑。

我们利用 HEK293 细胞转染 lentilCRISPRv2-sgTSC1 的两个切割质粒后,对单克隆细胞进行 PCR 鉴定,结果挑取单一明亮的 386bp 目的条带,即 2F6 和 4C8 两株细胞。部分泳道电泳结果有多条杂带,可能是在挑取或培养单克隆细胞的过程中有携带污染。最后我们选取 2F6 和 4C8 两株细胞进行 Western blot 鉴定,并进行不同浓度的检测。结果 2F6 细胞中 TSC1 蛋白并无明显表达差异,可能是在培养过程中发生污染,应注意移液枪吸取液体后不应在样品上方移动,实验操作应轻柔,避免液滴飞溅污染其他细胞。4C8 细胞在上样量为梯度的情况下,均无表达,说明该蛋白已被完全敲除,可用于后续细胞水平的研究。

本文利用分子克隆方法构建了含有不同 sgRNA 的重组质粒 lentilCRISPRv2-sgTSC1-1 和 lentilCRISPRv2-sgTSC1-2,并测序验证了质粒构建的正确性。利用 CRISPR/Cas9 系统构建 TSC1 基因敲除的 HEK293 稳定细胞株,经 PCR(下转第 161 页)