

文章编号 1006-8147(2015)06-0480-04

论 著

# 利用改良的 CRISPR/Cas9 基因编辑系统构建 HeLa 细胞 *SND1* 基因敲除稳定株

刘郁莹<sup>1</sup>, 崔晓腾<sup>1</sup>, 高星杰<sup>2</sup>, 赵秀娟<sup>3</sup>, 付雪<sup>1</sup>, 葛林<sup>1</sup>, 苏超<sup>2</sup>, 杨洁<sup>1,2</sup>

(天津医科大学 1.生物化学系;2.基础医学研究中心;3.细胞生物学系,天津 300070)

**摘要** 目的:利用改良的 CRISPR/Cas9 基因编辑系统敲除 HeLa 细胞中 *SND1* 基因,构建 HeLa 细胞 *SND1* 基因敲除稳定株。方法:设计一对特异性识别 *SND1* 基因第二个启动子的上下游 sgRNA,以 PX462 质粒为载体,构建出一对重组真核表达质粒。酶切和测序鉴定后,将一对重组质粒共同转染进入 HeLa 细胞中,使用嘌呤霉素进行阳性细胞筛选,挑取单克隆细胞进行培养。最后用 Western Blot 鉴定敲除效果。结果:sgRNA 正确插入到 PX462 质粒载体中,转染并筛选单克隆后的细胞中没有 *SND1* 蛋白的表达。结论:成功构建出 HeLa 细胞 *SND1* 基因敲除稳定株。

**关键词** *SND1*; 基因敲除; CRISPR/Cas9; HeLa 细胞

中图分类号 Q7

文献标志码 A

## Construction of HeLa *SND1* knockout gene stable strain by using modified CRISPR/Cas9 gene editing system

LIU Yu-ying<sup>1</sup>, CUI Xiao-teng<sup>1</sup>, GAO Xing-jie<sup>2</sup>, ZHAO Xiu-juan<sup>3</sup>, FU Xue<sup>1</sup>, GE Lin<sup>1</sup>, SU Chao<sup>2</sup>, YANG Jie<sup>1,2</sup>

(Tianjin Medical University 1.Department of Biochemistry; 2. Research Center of Basic Medical Science; 3. Department of Cell Biology, Tianjin 300070, China)

**Abstract Objective:** To apply modified CRISPR/Cas9 gene editing system to knock out the *SND1* gene in HeLa cell and construct HeLa *SND1* gene knockout stable strain. **Methods:** A pair of sgRNAs that could specially identify the upstream and downstream of *SND1* gene second promoter were designed, then a recombinant eukaryotic expressional plasmid by the carrier of PX462 was constructed. After enzyme digestion and sequencing, a pair of recombinant plasmids into HeLa cell were co-transfected, then puromycin was used to screen positive cell and the monoclonal cell was developed. The knockout effect was measured by western blotting. **Results:** sgRNA was correctly inserted into the PX462 recombinant plasmid, and *SND1* protein was undetected in HeLa cell after transfection and screening of monoclonal cell.

**Conclusion:** HeLa *SND1* gene knockout stable strain can be successfully built.

**Key words** *SND1*; gene knockout; CRISPR/Cas9; HeLa cells

人类 *SND1* (Staphylococcal Nuclease Domain-Containing Protein 1) 蛋白是在不同种属间具有高度保守性的蛋白质<sup>[1-4]</sup>, 广泛参与细胞多种生物学过程<sup>[5-8]</sup>。本实验是利用改良的 CRISPR/Cas9 基因编辑系统, 即以一对单链向导 RNA (single guide-RNA, sgRNA) 靶标 *SND1* 基因, 招募 Cas9 核酸酶的突变体 Cas9n 核酸切口酶 (Cas9 D10 nickase, Cas9n) 对其进行切割, 从而敲除 *SND1* 基因, 构建出 HeLa 细胞 *SND1* 基因敲除稳定株, 为更加深入地研究 *SND1* 蛋白的功能提供了一个 *SND1* 基因敲除的人类细胞模型。

### 1 材料与方法

#### 1.1 试剂及仪器 HeLa 细胞为本实验室留存; 真

作者简介 刘郁莹 (1986-), 女, 硕士在读, 研究方向: 肿瘤免疫; 通信作者: 杨洁, E-mail: yangjie@tmu.edu.cn。

核表达质粒 pSpCas9n(BB)-2A-Puro(PX462)由天津医科大学吴旭东教授惠赠; trans1-T1 感受态细胞、Trans2K PlusII DNA marker 购自北京全式金生物技术有限公司; 限制性内切酶 *Bbs*I、DMEM 高糖培养基购自 Thermo 公司; T4 连接酶购自 NEB 公司; 质粒保护的核酸外切酶(plasmid safe exonuclease)购自 Epicentre 公司; 去内毒素质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒购自 Biomiga 公司; Neofect 转染试剂购自零客创智生物科技有限公司; BCA 蛋白测定试剂盒购自 Pierce 公司; 鼠源 *SND1* 蛋白抗体为本实验室自制<sup>[9]</sup>;  $\beta$ -tubulin 蛋白抗体购自 Sigma 公司; 辣根过氧化物酶标记的抗鼠源 IgG 二抗购自 Fermentas 公司; LumiGlo 化学发光底物购于 KPL 公司; RIPA 裂解液、嘌呤霉素(puromycin)购自北京索莱宝科技有限公司。CO<sub>2</sub> 培养箱购自 Thermo 公司; Western blot

电泳槽、电泳仪购自Bio-Rad公司。sgRNA序列合成由苏州金唯智生物科技有限公司完成;质粒测序由北京天一辉远生物科技有限公司完成。

## 1.2 实验方法

1.2.1 针对SND1基因序列的sgRNA设计 (1)采用<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>网站确定人类SND1(NM\_014390.2)的基因序列。(2)根据文献提示<sup>[10]</sup>,使用<http://crispr.mit.edu/>设计SND1基因double nick的上下游sgRNA。sgRNA设计原则:(1)sgRNA的5'端第一个碱基若不是G,则需要在前面加上1个G;(2)以sgRNA序列为模版,设计出其互补链;(3)sgRNA及其互补链分别添加BbsI的酶切位点。

1.2.2 重组真核表达质粒PX462-sgRNA的构建 (1)PX462载体线性化:使用快速限制性内切酶BbsI线性化PX462质粒载体,切胶回收。体系:1 μg PX462载体,1 μL BbsI,1 μL FastAP,2 μL 10×Green FastDigest Buffer,加水稀释至20 μL。程序:37℃,30 min;4℃,stop。(2)sgRNA的合成及形成二聚体:人工合成sgRNA寡核苷酸链A、B及其互补链,使用降落PCR退火形成二聚体。体系:100 nmol sgRNA-A/B,100 nmol sgRNA-A/B的互补链,1 μL 10×T4 Ligation Buffer,0.5 μL T4 PNK,加水至10 μL。程序:37℃,30 min;95℃,5 min;-1℃/min,至25℃;4℃,stop。(3)sgRNA二聚体与PX462线性载体连接:PX462载体和降落PCR产物比例为1:3,室温(25℃)反应60 min。体系:PX462线性载体50 ng,降落PCR产物150 ng,1 μL 10×T4 Ligation Buffer,加水稀释至10 μL,1 μL T4 Ligase。程序:25℃,60 min;4℃,stop。(4)重组质粒纯化:使用质粒保护的核酸外切酶去除非特异连接。体系:11 μL二聚体与载体连接后的产物,1.5 μL 10×PlasmidSafe Buffer,1.5 μL 10 mmol ATP,1 μL PlasmidSafe exonuclease。程序:37℃,30 min;4℃,stop。(5)转化trans1-T1感受态细胞,挑取单克隆摇菌,使用去内毒素质粒小提试剂盒提取质粒,进行酶切和测序验证。

1.2.3 重组真核表达质粒的酶切鉴定 使用快速限制性内切酶BbsI对PX462质粒载体、PX462-sgRNA-A、PX462-sgRNA-B进行酶切。体系:1 μg质粒,1 μL BbsI,1 μL FastAP,2 μL 10×Green FastDigest Buffer,加水稀释至20 μL。程序:37℃,30 min;4℃,stop。酶切后,使用1%的琼脂糖凝胶电泳对酶切产物进行鉴定。

1.2.4 HeLa细胞培养及转染 以去内毒素质粒提取试剂盒提取无内毒素质粒载体PX462和重组真核表达质粒PX462-sgRNA-A、PX462-sgRNA-B。

HeLa细胞接种至6 cm皿中,加入含10%胎牛血清的DMEM高糖培养基,置于37℃、5%的CO<sub>2</sub>培养箱中培养,至细胞50%~60%汇合时,根据产品说明书使用Neofect转染试剂瞬时转染质粒载体PX462(HeLa-SND1-WT)或共转重组真核表达质粒PX462-sgRNA-A和PX462-sgRNA-B(HeLa-SND1-KO)。

1.2.5 HeLa细胞SND1基因敲除稳定株的单克隆筛选 转染后48 h,更换培养基为含有2 μg/mL Puromycin和10%胎牛血清的DMEM高糖培养基,以未转染的HeLa细胞为阴性对照。加药48 h后,未转染的HeLa细胞全部被杀死。72 h后撤去培养基中的Puromycin继续培养。待细胞长满,将细胞用胰酶消化,铺到10 cm皿中,平均每个显微镜低倍镜视野中有3~5个细胞即可。待细胞长成单克隆集落,用枪头分别将单克隆集落轻轻刮取,移至96孔板中培养。待96孔板长满,移至24孔板中继续培养。

1.2.6 HeLa细胞SND1基因敲除稳定株Western Blot检测 将筛选后的单克隆稳定株HeLa-SND1-WT和HeLa-SND1-KO分别传至6 cm皿中培养。待细胞长满,使用预冷的PBS缓冲液对细胞洗涤3次,吸净PBS后,加入300 μL RIPA裂解液,用干净的细胞刮刮取细胞至1.5 mL离心管中,冰上静置裂解15 min。之后对其进行超声处理,强度60%,时间30 s(1次10 s,间隔5 s,共进行3次)。4℃13 000 r/min超速离心10 min,取上清细胞裂解液。用BCA蛋白测定试剂盒测定裂解液的蛋白浓度后,加入5×上样缓冲液(50%甘油,10% SDS,0.5%溴酚蓝,250 mmol pH6.8 Tris-HCl),99℃对其热变性10 min。进行8% SDS-PAGE电泳后,用湿电转膜仪将PAGE胶上蛋白质转移到0.45 μm PVDF上。使用含有5%脱脂牛奶的TBST溶液封闭2 h后,用自制鼠源SND1抗体4℃孵育过夜。使用TBST溶液洗涤PVDF膜3次,每次10 min。用辣根过氧化物酶标记的抗鼠源IgG二抗室温孵育2 h。之后再用TBST溶液洗涤PVDF膜3次,每次10 min。孵育LumiGlo化学发光底物1 min,进入暗室曝光。

## 2 结果

2.1 sgRNA靶点的选择及寡核苷酸链的设计 由于SND1基因第1个外显子区(expressed region 1, EXON 1)和基因编码区(Coding Sequence, CDS)的重叠区域过短,因此选取第2个外显子区进行sgRNA设计。CRISPR/Cas9系统工作示意图如图1。设计好的sgRNA及其互补链如表1。

2.2 重组真核表达质粒PX462-sgRNA的酶切和测

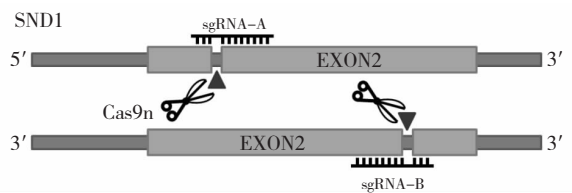


图 1 CRISPR/Cas9 系统切割 *SND1* 基因外显子上下游  
Fig 1 CRISPR/Cas9 system cut the upstream and downstream of *SND1*

表 1 上下游 sgRNA 及其互补链寡核苷酸序列  
Tab 1 The nucleotide sequences of the upstream and downstream sgRNA

sgRNA	寡核苷酸序列
上游(A)	5'-CACC-G-AGGTTGATCTGCCGCTCAGG-3' 3'-TCCAAC TAGACGGCGAGTCC-CAAA-5'
下游(B)	5'-CACC-CTGCTGGAAATCTTGCTCGC-3' 3'-CACGACCTTTAGAACGAGCG-CAAA-5'

序结果 利用 *Bbs*I 限制性内切酶对构建好的 PX462-sgRNA-A 和 PX462-sgRNA-B 进行酶切。结果如图 2 A, 成功构建的质粒不含有 *Bbs*I 酶切位点, 因此不能被切割为线性。测序结果如图 2 B, 插入序列的位置、方向均正确, 质粒构建成功。

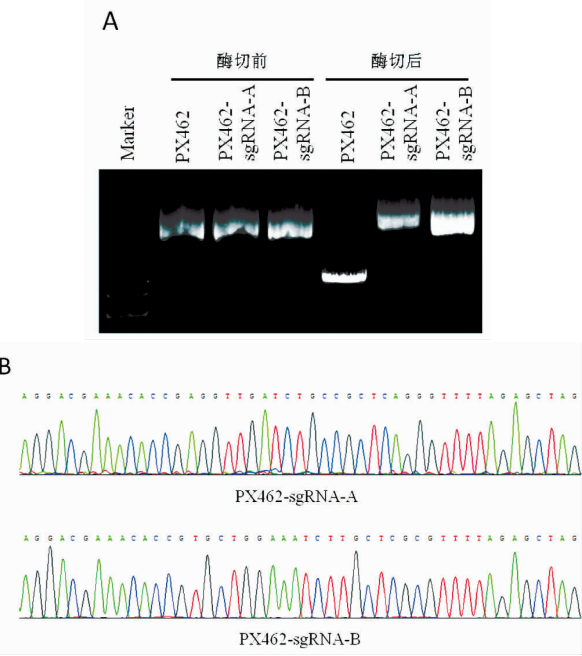


图 2 重组真核表达质粒的酶切和测序结果  
Fig 2 The enzyme digestion and sequencing of recombinant eukaryotic expression plasmid

2.3 Western blot 检测 HeLa 细胞 *SND1* 基因敲除稳定株中 *SND1* 蛋白的表达 结果如图 3, 同 HeLa-SND1-WT 相比, HeLa-SND1-KO 中的 *SND1* 没有表达, HeLa 细胞 *SND1* 基因敲除稳定株构建成功。

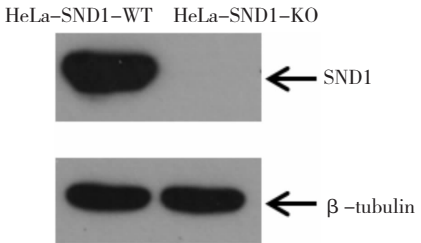


图 3 单克隆稳定株 Western blot  
Fig 3 Western blotting of monoclonal stable strain

3 讨论

*SND1* 蛋白序列在不同生物中具有高度的保守性, 参与调控细胞多种重要的生理过程。有研究表明, *SND1* 蛋白在肿瘤迁移中也有作用<sup>[11]</sup>。因此, 建立稳定敲除 *SND1* 蛋白的细胞株有助于研究其生理病理条件下的功能。

本实验中, 我们利用 CRISPR/Cas9 系统来完成对 HeLa 细胞中 *SND1* 基因的靶向性敲除。CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeat sequences, CRISPR) 序列本是细菌抵御病毒入侵的防御机制, 近年来科学家对其进行改造, 成为基因编辑的又一有力武器。传统 CRISPR/Cas9 系统是以 sgRNA 为向导, 靶标目的基因, 招募 Cas9 核酸酶对 DNA 双链进行切割, 从而敲除该基因<sup>[12]</sup>。对比 ZFN (Zinc-finger nucleases) 技术和 TALEN (transcription activator-like effector nucleases) 技术, 此方法简便易行, 成为靶向基因编辑的重要技术。但是由于 sgRNA 长度的局限, 传统 CRISPR/Cas9 系统容易产生脱靶效应, 即 sgRNA 识别到其他基因处, 导致其他基因敲除。麻省理工学院的 Zhang 等<sup>[13]</sup>对其进行改良, 将 Cas9 核酸酶的 RuvC 结构域中的天冬氨酸突变成丙氨酸(D10A), 导致 RuvC 结构域失去活性, 突变后的 Cas9 酶变成 Cas9n 核酸切口酶, 只能切割单链。如果 DNA 只被一个 Cas9n 切割, 产生单链缺口, 细胞很快利用碱基切除修复途径进行 DNA 修复。因此使用一对 sgRNA 对目的基因上下游进行靶标并招募 Cas9n 进行切割, 导致细胞利用非同源性末端接合 (non-homologous end joining, NHEJ) 机制进行 DNA 修复。此修复机制并不精确, 易产生框移突变, 从而达到敲除目的基因的作用。

实验中, 我们选择 PX462 质粒作为载体, 该质粒可以同时表达 Cas9n 和插入的 sgRNA, 简化了表达 Cas9n 质粒和 sgRNA 质粒共转染的步骤。转染后, 使用 2 μg/mL Puromycin 进行阳性细胞筛选。同时使用未转染的 HeLa 细胞作为对照, 也加入 2 μg/



mL Puromycin,待该细胞全部杀死时,即认为转染组存活下来的细胞为带有 Puromycin 抗性的阳性细胞。之后撤掉药物,使用完全培养基对其进行培养和单克隆筛选。最后,使用 Western Blot 对单克隆细胞进行鉴定,从而获得 HeLa 细胞 *SND1* 基因敲除稳定株。

#### 参考文献:

- [1] Saarikettu J, Ovod V, Vuoksio M, et al. Monoclonal antibodies against human Tudor-SN[J]. Hybridoma (Larchmt), 2010,29(3):231
- [2] Rodríguez L, Ochoa B, Martínez M J. NF- $\kappa$ B and Sp1 are involved in transcriptional regulation of rat *SND1* p102 gene[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2007,356(1):226
- [3] Broadhurst M K, Lee R S, Hawkins S, et al. The p100 EBNA-2 coactivator: a highly conserved protein found in a range of exocrine and endocrine cells and tissues in cattle[J]. Biochim Biophys Acta, 2005,1681(2/3):126
- [4] Zhao C T, Shi K H, Su Y, et al. Two variants of zebrafish p100 are expressed during embryogenesis and regulated by Nodal signaling [J]. FEBS Lett, 2003,543(1/3):190
- [5] Liu X, Dong L, Zhang X, et al. Identification of p100 target promoters by chromatin immunoprecipitation-guided ligation and selection (ChIP-GLAS)[J]. Cell Mol Immunol, 2011,8(1):88
- [6] Gao X, Zhao X, Zhu Y, et al. Tudor staphylococcal nuclease (Tudor-SN) participates in small ribonucleoprotein (snRNP) assembly via interacting with symmetrically dimethylated Sm proteins[J]. J Biol Chem, 2012,287(22):18130
- [7] Su C, Zhang C, Tecle A, et al. Tudor staphylococcal nuclease (Tudor-SN), a novel regulator facilitating G1/S phase transition, acting as a co-activator of E2F-1 in cell cycle regulation[J]. J Biol Chem, 2015, 290(11):7208
- [8] Gao X, Fu X, Song J, et al. Poly (a)(+) mRNA-binding protein Tudor-SN regulates stress granules aggregation dynamics[J]. FEBS J, 2015, 282(5):874
- [9] Saarikettu J, Ovod V, Vuoksio M, et al. Monoclonal antibodies against human Tudor-SN[J]. Hybridoma (Larchmt), 2010,29(3):231
- [10] Ran F A, Hsu P D, Wright J, et al. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system[J]. Nat Protoc, 2013,8(11):2281
- [11] Yu L, Liu X, Cui K, et al. *SND1* Acts downstream of TGF $\beta$ 1 and upstream of smurf1 to promote breast Cancer metastasis[J]. Cancer Res, 2015,75(7):1275
- [12] Gilbert L A, Larson M H, Morsut L, et al. CRISPR-Mediated modular RNA-Guided regulation of transcription in eukaryotes[J]. Cell, 2013,154(2):442
- [13] Ran F A, Hsu P D, Lin C Y, et al. Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity[J]. Cell, 2013, 154(6):1380

(2015-04-13 收稿)

(上接第 468 页)

仍不清楚,初步研究显示可能与其激活 NF- $\kappa$ B 和 EGFR-MAPK 信号通路有关<sup>[10-11]</sup>。本研究证实,沉默 HE4 表达后,磷酸化的 Erk 和 Akt 水平显著降低,而 Erk 和 Akt 在细胞增殖和凋亡中发挥着重要的作用<sup>[12]</sup>。提示 HE4 可能通过调控 Erk 和 Akt 参与乳腺癌的增殖和凋亡,其内在的分子机制尚需进一步阐明。

综上,HE4 作为一种新的肿瘤标志物正在引起越来越多研究者的关注,在肿瘤发生、发展和患者预后预测方面的作用在不断被发现,但有关其在肿瘤中的作用机制还研究甚少,其与乳腺癌发生、发展和转移的关系尚需进一步讨论。

#### 参考文献:

- [1] Bingle L, Singleton V, Bingle C D. The putative ovarian tumour marker gene HE4 (WFDC2), is expressed in normal tissues and undergoes complex alternative splicing to yield multiple protein isoforms[J]. Oncogene, 2002,21(17):2768
- [2] Clauss A, Lilja H, Lundwall A. A locus on human chromosome 20 contains several genes expressing protease inhibitor domains with homology to whey acidic protein[J]. Biochem J, 2002,368(Pt 1):233
- [3] Galgano M T, Hampton G M, Frierson H F. Comprehensive analysis of HE4 expression in normal and malignant human tissues [J]. Mod Pathol, 2006,19(6):847
- [4] Zou S L, Chang X H, Ye X, et al. Effect of human epididymis protein 4 gene silencing on the malignant phenotype in ovarian cancer[J]. Chin Med J (Engl), 2011,124(19):3133
- [5] Li J, Chen H, Mariani A, et al. HE4 (WFDC2) promotes tumor growth in endometrial cancer cell lines[J]. Int J Mol Sci, 2013,14(3): 6026
- [6] Zhuang H, Tan M, Liu J, et al. Human epididymis protein 4 in association with Annexin II promotes invasion and metastasis of ovarian cancer cells[J]. Mol Cancer, 2014,13:243
- [7] Guo Y D, Wang J H, Lu H, et al. The human epididymis protein 4 acts as a prognostic factor and promotes progression of gastric cancer [J]. Tumour Biol, 2015,36(4):2457
- [8] Wang X, Fan Y, Wang J, et al. Evaluating the expression and diagnostic value of human epididymis protein 4 (HE4) in small cell lung cancer[J]. Tumour Biol, 2014,35(7):6847
- [9] Hellström I, Raycraft J, Hayden-Ledbetter M, et al. The HE4 (WFDC2) protein is a biomarker for ovarian carcinoma [J]. Cancer Res, 2003,63(13):3695
- [10] Clauss A, Ng V, Liu J, et al. Overexpression of elafin in ovarian carcinoma is driven by genomic gains and activation of the nuclear factor kappaB pathway and is associated with poor overall survival [J]. Neoplasia, 2010,12(2):161
- [11] Wang H, Zhu L, Gao J, et al. Promotive role of recombinant HE4 protein in proliferation and carboplatin resistance in ovarian cancer cells[J]. Oncol Rep, 2015,33(1):403
- [12] Mccubrey J A, Steelman L S, Chappell W H, et al. Ras/Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR cascade inhibitors: how mutations can result in therapy resistance and how to overcome resistance[J]. Oncotarget, 2012,3(10):1068

(2015-03-12 收稿)