

文章编号 1006-8147(2018)05-0395-04

论 著

利用 CRISPR/Cas9 系统构建稳定敲除 *CBX2* 基因的 A549 细胞系

董旭,张兆域,苟芳琳,兰蓓

(天津医科大学生物化学与分子生物学系,天津 300070)

摘要 目的:利用 CRISPR/Cas9 系统构建稳定敲除 *CBX2* 基因的 A549 细胞系。方法:设计针对敲除 *CBX2* 的 short guide RNA (sgRNA),并克隆到载体 PX459 中。将测序正确的重组质粒转染到 A549 细胞中,利用嘌呤霉素筛选转染阳性细胞并分离得到 5 个单克隆细胞系,通过 Western blot 方法检测构建的细胞系中 *CBX2* 蛋白表达情况。结果:成功构建了靶向 *CBX2* 的 CRISPR/Cas9 重组质粒,筛选出的 5 个单克隆细胞系中 *CBX2* 蛋白表达水平均显著下降。结论:成功利用 CRISPR/Cas9 系统构建了稳定敲除 *CBX2* 基因的 A549 细胞系。

关键词 *CBX2* 基因;CRISPR/Cas9 系统;基因敲除

中图分类号 Q7

文献标志码 A

Construction of *CBX2* gene knockout stable A549 cell line with CRISPR /Cas9 system

DONG Xu, ZHANG Zhao-yu, GOU Fang-lin, LAN Bei

(Department of Biochemistry and Molecular Biology, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

Abstract Objective: To construct *CBX2* gene knockout stable A549 cell line with CRISPR/Cas9 system. **Methods:** The single guide RNA (sgRNA) targeting *CBX2* gene was designed and inserted into the expression vector PX459 using molecular cloning technique. The recombinant plasmid was verified by sequencing. The plasmid was transfected into A549 cell line. After puromycin selection, monoclonal cell line was picked for expansion. Finally, the expression of *CBX2* protein in A549 *CBX2* knockout cell line was detected by Western blot. **Results:** The CRISPR / Cas9 recombinant plasmid targeting *CBX2* was successfully constructed, and the expression of *CBX2* protein was significantly decreased. **Conclusion:** The A549 *CBX2* knockout cell line could be successfully constructed by CRISPR/Cas9 system.

Key words *CBX2* gene; CRISPR/Cas9 system; gene knockout

多梳蛋白家族(PcG)是重要的表观遗传修饰调控复合物,发挥转录抑制功能^[1],在生物进程中具有十分重要的作用,如 X 染色体失活、维持胚胎干细胞多能性和自我更新、细胞命运决策和发展控制^[2]。在哺乳动物中,PcG 主要有两种表现形式:多梳抑制复合物 1(PRC1)和多梳抑制复合物 2(PRC2),它们是维持胚胎干细胞和成体干细胞干性必需的重要组分^[3],对细胞周期调控、DNA 修复、细胞分化、衰老和死亡发挥重要的作用^[4]。PRC2 依赖于其组分 EZH2 在转录起始发挥作用。EZH2 是甲基转移酶,能特异性三甲基化组蛋白 H3K27,从而抑制转录。PRC1 通过识别 H3K27me3 并募集到染色质上,维持染色质的抑制状态。此外,PRC1 还能泛素化组蛋白 H2A,进一步发挥转录抑制作用^[5]。CBX 蛋白家族是 PRC1 的经典组成成分,主要功能为识别 H3K27me3 并将

PRC1 定位到染色质。CBX 蛋白家族包括 CBX2, CBX4, CBX6, CBX7 和 CBX8,其拥有共同的结构域,从而在转录抑制方面功能相似^[6]。同时,CBX 家族成员之间也存在结构差异,因此功能也有所差别:CBX4 拥有 SUMO 活性^[7],这种活性在人类肿瘤细胞增殖和 DNA 损伤修复过程中发挥作用^[8]。CBX6 是维持胚胎干细胞多能性和干细胞分化所需的关键因子^[9]。CBX7 和 CBX8 能够在癌症中发挥作用。CBX7 是研究最广泛的 CBX 家庭成员,有大量的研究表明它在多种癌症中有特异性活性^[10],能够抑制脑癌、结肠癌和肺癌等^[11]。CBX8 对 MLL/AF9 白血病发生至关重要^[12]。然而,CBX2 对癌症的作用及分子机制还并不清楚,有待更为深入的研究。CRISPR/Cas9 技术是一种高效、方便、灵活的基因编辑工具^[13],是细菌和古细菌演化形成的一种对抗入侵病毒及外源 DNA 的适应性免疫防御^[14]。CRISPR/Cas9 系统已被设计成能够在多个真核系统中实现 RNA 引导基因组修改的工具,使基因编辑更为方便^[15]。通过人工设计 sgRNA,使外源核酸酶 Cas9 和基因组靶基

基金项目 天津市应用基础与前沿技术研究计划一般项目 (14JCYBJC26000)

作者简介 董旭(1993-),男,硕士在读,研究方向:肿瘤和表观遗传学;通信作者:兰蓓,E-mail: lanpei@tmu.edu.cn。

因位点相结合并随机剪切,然后通过同源重组等DNA修复过程最终实现基因敲除。本文利用CRISPR/Cas9系统构建稳定敲除CBX2基因的A549细胞系。该细胞系为今后研究CBX2对肺腺癌的作用及分子机制提供了实验基础。

1 材料与方法

1.1 菌株,质粒和细胞系 DH5 α 购自北京博迈德生物公司,PX459载体购自Addgene公司,A549细胞购自ATCC公司。

1.2 主要试剂耗材 胎牛血清和高糖培养基购自Hyclone公司,胰酶购自Gibco公司,蛋白Marker购自Thermo Fisher Scientific公司,30%丙烯酰胺购自北京索莱宝公司,Opti-MEM购自Gibco公司,CBX2蛋白抗体和 β -actin蛋白抗体购自Sigma公司,Lipofectamine[®] 2000转染试剂购自Thermo Fisher Scientific公司,T4 PNK(T4多聚核苷酸激酶)和Bbs I限制性内切酶及T4连接酶购自NEB公司,DNA小提试剂盒购自Tiangen公司,质粒大提试剂盒购自北京庄盟生物公司。

1.3 PX459-CBX2-sgRNA质粒构建

1.3.1 载体酶切和回收 用Bbs I酶切PX459质粒,酶切体系为:PX459 1 μ g,Bbs I 1 μ L,10X Buffer 2 μ L,ddH₂O 16 μ L,37 $^{\circ}$ C反应1 h。用新鲜的TAE buffer配置1.5% DNA胶,酶切产物进行琼脂糖凝胶电泳,用DNA胶回收试剂盒将质粒条带切胶回收。

1.3.2 引物退火延伸和添加磷酸根 反应体系为sgRNA上下游引物(100 μ mol/L)各1 μ L,T4 PNK(T4多聚核苷酸激酶)0.5 μ L,T4连接酶 buffer 1 μ L,ddH₂O 6.5 μ L。其中T4 PNK是一种多聚核苷酸5'羟基激酶,可以催化ATP的 γ 位磷酸基团向单链或双链DNA、RNA、寡核苷酸或带有3'磷酸基团的单核苷酸的5'羟基转移。加完体系后将EP管放入37 $^{\circ}$ C金属浴30 min,使引物5'端加上磷酸根。然后在95 $^{\circ}$ C金属浴放置5 min后,缓慢降温到25 $^{\circ}$ C(1 $^{\circ}$ C/min),完成引物退火。

1.3.3 载体和引物连接 反应体系为:经过酶切回收的PX459载体质粒1 μ L,磷酸化和退火的引物1 μ L,10X T4连接酶 buffer 1 μ L,T4连接酶1 μ L,ddH₂O 6 μ L。16 $^{\circ}$ C连接过夜。

1.3.4 转化及重组质粒测序 将连接产物转化到DH5 α ,挑取单克隆菌落并用质粒提取试剂盒提取质粒DNA。由华大基因公司对重组质粒进行测序。

1.4 转染细胞 将A549细胞铺于6孔板,24 h后,使细胞密度达到70%。转染体系为:Optimem 200 μ L,重组质粒3 μ g,Lipofectamine[®] 2000转染试剂6 μ L。

室温静置20 min,形成脂质体后将转染体系加入到6孔板细胞中,轻轻混匀,放入37 $^{\circ}$ C、5%CO₂培养箱中培养。细胞转染6 h后换成新鲜培养基,继续培养48 h。

1.5 细胞筛选及分离单克隆细胞 由于PX459载体中带有嘌呤霉素抗性,所以成功转染的细胞将有其抗性。细胞转染48 h后加入含有1 μ g/mL的嘌呤霉素的培养基进行筛选,72 h后将存活细胞消化,用细胞计数板计数,稀释为1个/100 μ L的细胞浓度,将细胞传入96孔板,每孔加100 μ L细胞液,可得到单克隆细胞(每孔只有一个细胞)。将单克隆细胞扩大培养。

1.6 单克隆细胞CBX2蛋白检测 收取转染PX459-CBX2-sgRNA的单克隆和转染空载PX459单克隆细胞,PBS洗两遍,再用200 μ L PBS重悬。在细胞悬液中加入50 μ L的5X蛋白缓冲液,放于95 $^{\circ}$ C金属浴震荡加热30 min。将蛋白样品进行SDS-PAGE(80 V,120 min),转膜(400 mA,90 min),用5%脱脂牛奶封闭30 min,CBX2蛋白抗体(1:1 000)结合过夜,结合二抗后曝光。之后将膜用1 mol/L NaOH进行洗脱,再重新结合 β -actin抗体,检测 β -actin内参蛋白表达量。

2 结果

2.1 sgRNA的设计 在NCBI网站查询CBX2的基因序列,在第一个外显子区域设计针对CBX2敲除的sgRNA(图1A)。sgRNA序列应该位于Cas9蛋白识别的保守区PAM(NGG)之前。将CBX2第一个外显子序列提交于麻省理工大学张峰sgRNA设计网站<http://crispr.mit.edu/>,得到5条待选序列(图1B)。选出分数最高的序列为CBX2-sgRNA序列,该序列对应CBX2基因的位置如(图1C)所示。在CBX2-sgRNA正向序列5'端添加CACCG碱基,在反向序列5'端添加AAAC碱基,在3'端添加末尾加上C碱基(表1),从而能够与PX459质粒经Bbs I酶切后形成的黏性末端互补。

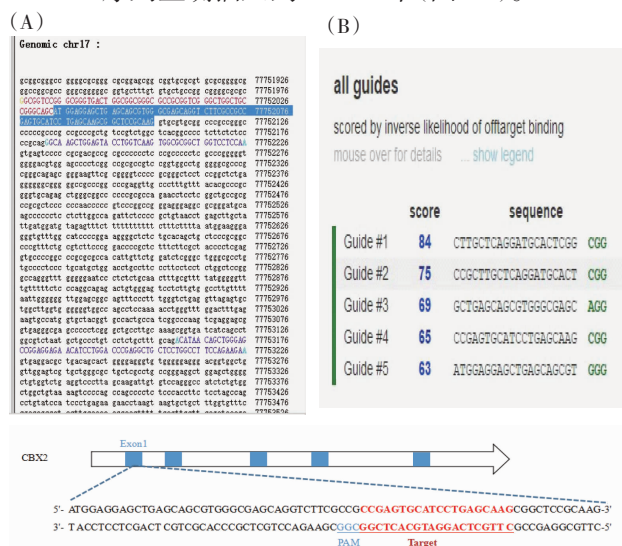
2.2 PX459-CBX2-sgRNA重组质粒的构建和鉴定 将合成的CBX2-sgRNA两条引物退火,形成双链,并用T4 PNK在5'端加磷酸根。PX459质粒用Bbs I酶切并切胶回收,与退火的CBX2-sgRNA连接,构建PX459-CBX2-sgRNA质粒(图2A)。将

表1 CBX2-sgRNA寡核苷酸序列

Tab 1 The oligo sequences of CBX2-sgRNA

向导RNA	寡核苷酸序列
CBX2-sgRNA	F:5'-CACCGCTTGTCTCAGGATGCACTCGG-3'
	R:5'-AAACCCGAGTGCATCCTGAGCAAGC-3'

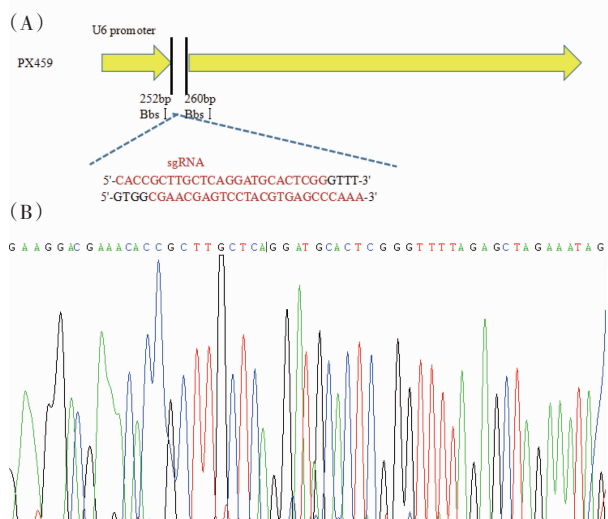
PX459-*CBX2*-sgRNA 重组质粒测序,测序结果显示 *CBX2*-sgRNA: 5'-CACCGCTTGCTCAGGATGCACTCGG-3' 序列正确插入到 PX459 中(图 2B)。



A. *CBX2* 基因组序列,蓝色标记的是第一个外显子区域;B. 针对 *CBX2* 的 5 条待选序列,并选择评分最高的序列;C. *CBX2*-sgRNA 序列对应在 *CBX2* 基因中的位置

图 1 *CBX2*-sgRNA 的设计

Fig 1 Design of sgRNA of *CBX2*



A. 用 Bbs I 酶切 PX459, 将 *CBX2*-sgRNA 插入该位点; B. 重组质粒测序结果,划线部分为 *CBX2* sgRNA 序列

图 2 PX459-*CBX2*-sgRNA 重组质粒的构建与鉴定

Fig 2 Construction and identification of PX459-*CBX2*-sgRNA recombinant plasmid

2.3 *CBX2* 敲除细胞系构建及鉴定 将 PX459-*CBX2*-sgRNA 重组质粒和空载 PX459 分别转染入 A549 细胞中,培养 48 h 后,加嘌呤霉素筛选转染阳性细胞。经过 3 d 的嘌呤霉素筛选(正常细胞无存活),将存活的细胞稀释到 96 孔板中分离单克隆。

选择 5 个单克隆进行扩大培养,并通过 Western blot 检测细胞系中 *CBX2* 的表达情况。结果显示,与转染空载 PX459 的单克隆细胞系相比,5 个敲除细胞系中 *CBX2* 蛋白表达明显降低(图 3)。

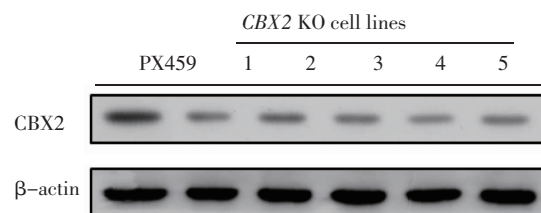


图 3 转染 PX459-*CBX2*-sgRNA 质粒的 5 个单克隆细胞系 *CBX2* 的表达量显著低于对照组细胞

Fig 3 The expression of *CBX2* protein in five A549 *CBX2* knockout cell lines was significantly lower than that in the control group

3 讨论

PRC1 对维持胚胎干细胞干性、调控细胞周期以及癌症的发生和转移有重要的作用。PRC1 的经典组分 CBX 蛋白家族有共同的结构域:C 端的 PcR box (polycomb repressor box),N 端的染色质区,和靠近 N 端的 DNA 结合区。C 端结构域主要发挥转录抑制作用,还可以和 PRC1 另一组分泛素连接酶 Ring1B 蛋白相互作用。N 端的染色质区主要调控异染色质和基因表达,并且可以结合 H3K27me3。

虽然 *CBX* 能够抑制转录,但是其在癌症中的作用机制还不明确。有研究表明,小鼠 *CBX2* 同源基因 M33 敲低后,可以减弱 E2F 依赖性的细胞周期进展,使小鼠胚胎成纤维细胞阻滞在 G0/G1 期^[6]。在人类造血干细胞中,*CBX2* 敲低能够促进抑癌基因 p21 的表达,从而抑制细胞增殖、促进细胞凋亡^[17]。由此推测,*CBX2* 极大可能在癌症的发生和转移过程中也发挥着重要作用,但是其具体的作用机制还有待进一步研究。因此我们构建稳定敲除 *CBX2* 基因的肺腺癌细胞系对研究 *CBX2* 基因在肺腺癌的发生发展机理有重要的意义。

CRISPR/Cas9 系统是种高效、方便的基因编辑工具,近年来研究人员对它不断的改进和应用,使得该系统对基因编辑拥有多种优势,包括操作简单,靶向精确性高,基因修饰率高,可遗传,实验成本小,周期短。本实验利用 CRISPR/Cas9 系统,设计了针对 *CBX2* 敲除的 sgRNA,并连入 PX459 载体,构建重组质粒。将重组质粒转染入 A549 细胞中,采用嘌呤霉素筛选细胞后,分离单克隆细胞,成功构建了敲除 *CBX2* 基因的 A549 稳定细胞系。但是由于肿瘤细胞存在染色体异常导致的多倍体细胞,利

用 CRISPR/Cas9 系统敲除基因,不能同时编辑多个等位基因,往往只能达到敲低的效果。采用 CRISPR/Cas9 系统构建 *CBX2* 敲除的细胞系克服了以往 *CBX2* 小干扰 RNA(siRNA)效果差和用慢病毒转染细胞引发的突变及不稳定表达的缺点。该细胞系的构建为 *CBX2* 在肺腺癌发生和转移的机制研究奠定了实验基础。

参考文献:

- [1] Morey L, Helin K. Polycomb group protein-mediated repression of transcription[J]. Trends Biochem Sci, 2010, 35(6):323
- [2] Muller J, Verrijzer P. Biochemical mechanisms of gene regulation by polycomb group protein complexes[J]. Curr Opin Genet Dev, 2009, 19(2):150
- [3] Pirrotta V. Polycomb the genome: PcG, trxG, and chromatin silencing[J]. Cell, 1998, 93(3):333
- [4] Sauvageau M, Sauvageau G. Polycomb group proteins: multi-faceted regulators of somatic stem cells and cancer[J]. Cell Stem Cell, 2010, 7(3):299
- [5] Pirrotta V, Poux S, Melfi R, et al. Assembly of Polycomb complexes and silencing mechanisms[J]. Genetica, 2003, 117(2/3):191
- [6] Bezsonova I, Walker J R, Bacik J P, et al. Ring1B contains a ubiquitin-like docking module for interaction with Cbx proteins[J]. Biochemistry, 2009, 48(44):10542
- [7] Li J, Xu Y, Long X D, et al. Cbx4 governs HIF-1 α to potentiate angiogenesis of hepatocellular carcinoma by its SUMO E3 ligase activity[J]. Cancer Cell, 2014, 25(1):118
- [8] Wang X, Li L, Wu Y, et al. CBX4 Suppresses Metastasis via Recruitment of HDAC3 to the Runx2 Promoter in Colorectal Carcinoma[J]. Cancer Res, 2016, 76(24):7277
- [9] Santanach A, Blanco E, Jiang H, et al. The Polycomb group protein CBX6 is an essential regulator of embryonic stem cell identity[J]. Nat Commun, 2017, 8(1):1235
- [10] Forzati F, Federico A, Pallante P, et al. CBX7 is a tumor suppressor in mice and humans[J]. J Clin Invest, 2012, 122(2):612
- [11] Forzati F, Federico A, Pallante P, et al. Tumor suppressor activity of CBX7 in lung carcinogenesis[J]. Cell Cycle, 2012, 11(10):1888
- [12] Tan J, Jones M, Koseki H, et al. CBX8, a polycomb group protein, is essential for MLL-AF9-induced leukemogenesis[J]. Cancer Cell, 2011, 20(5):563
- [13] Sapranas R, Gasiunas G, Fremaux C, et al. The Streptococcus thermophilus CRISPR/Cas system provides immunity in Escherichia coli[J]. Nucleic Acids Res, 2011, 39(21):9275
- [14] Terns M P, Terns R M. CRISPR-based adaptive immune systems[J]. Curr Opin Microbiol, 2011, 14(3):321
- [15] Cong L, Ran F A, Cox D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems[J]. Science, 2013, 339(6121):819
- [16] Core N, Joly F, Boned A, et al. Disruption of E2F signaling suppresses the INK4a-induced proliferative defect in M33-deficient mice[J]. Oncogene, 2004, 23(46):7660
- [17] van den Boom V, Rozenveld-Geugien M, Bonardi F, et al. Nonredundant and locus-specific gene repression functions of PRC1 paralog family members in human hematopoietic stem/progenitor cells [J]. Blood, 2013, 121(13):2452

(2018-03-23 收稿)

(上接第 394 页)

- [6] Agarwal A, Sengupta P, Durairajanayagam D. Role of L-carnitine in female infertility[J]. Reprod Biol Endocrinol, 2018, 16(1):5
- [7] El-Ashmawy N E, Khalil R M. A review on the role of L-carnitine in the management of tamoxifen side effects in treated women with breast cancer[J]. Tumour Biol, 2014, 35(4):2845
- [8] 叶因涛, 王晨, 王冬, 等. 左卡尼汀联合表柔比星对 GLC-82 细胞增殖及凋亡影响机制的探讨[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2013, 20(10):744
- [9] 郎娟娟, 刘艳霞, 钱兴运, 等. 左卡尼汀联合多西他赛对 GLC-82 细胞增殖与凋亡影响研究[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2017, 24(4):223
- [10] 郎娟娟, 钱兴运, 陶若琳, 等. 左卡尼汀联合氟尿嘧啶对 MGC803 细胞增殖及凋亡影响的研究[J]. 中国药理学杂志, 2016, 51(24):2102
- [11] Jackson J G, Post S M, Lozano G. Regulation of tissue- and stimulus-specific cell fate decisions by p53 in vivo[J]. J Pathol, 2011, 223(2):127
- [12] Vogelstein B, Lane D, Levine A J. Surfing the p53 network[J]. Nature, 2000, 408(6810):307
- [13] Purvis J E, Karhohs K W, Mock C, et al. p53 dynamics control cell fate[J]. Science, 2012, 336(687):1440
- [14] Lee E P, Muller W J. Oncogenes and tumor suppressor genes[J]. Experientia, 1996, 52(1):A64
- [15] He G, Siddik Z H, Huang Z, et al. Induction of p21 by p53 following DNA damage inhibits both Cdk4 and Cdk2 activities[J]. Oncogene, 2005, 24(18):2929
- [16] Abbas T, Dutta A. p21 in cancer: intricate networks and multiple activities[J]. Nat Rev Cancer, 2009, 9(6):400
- [17] Bizarro A, Ferreira I C, Soković M, et al. Cordyceps militaris (L.) Link Fruiting Body Reduces the Growth of a Non-Small Cell Lung Cancer Cell Line by Increasing Cellular Levels of p53 and p21[J]. Molecules, 2015, 20(8):13927
- [18] Guterres F A, Martinez G R, Rocha M E, et al. Simvastatin rises reactive Oxygen species levels and induces senescence in human melanoma cells by activation of p53/p21 pathway[J]. Exp Cell Res, 2013, 319(19):2977
- [19] Du W W, Yang W N, Liu E, et al. Foxo3 circular RNA retards cell cycle progression via forming ternary complexes with p21 and CDK2[J]. Nucleic Acids Res, 2016, 44(6):2846
- [20] 李瑛, 石廷章, 焦顺昌, 等. 多西他赛诱导 HL60 细胞凋亡的实验研究[J]. 肿瘤防治杂志, 2005, 12(24):1854

(2018-03-20 收稿)