

应用改良体细胞基因敲入技术内源标记跨膜丝氨酸蛋白酶 RHBDD1 的研究

宋 伟 李尚泽 张慧慧 缪时英 王琳芳 张晓东 杜润蕾

摘 要 **目的** 应用改良的体细胞基因敲入技术将标签序列靶向敲入目的基因。**方法** 设计引物并构建 RHBDD1 的打靶载体,经过腺相关病毒包装、感染、新霉素筛选和鉴定等步骤获得含有新霉素抗性的阳性单克隆细胞株,最后通过 cre 病毒感染和筛选获得 RHBDD1 内源敲入 FLAG 和 SBP 双标签的 HCT116 结直肠癌细胞株。**结果** 经过包装病毒感染与筛选验证后得到 6 个打靶阳性克隆;进一步经 cre 病毒感染与筛选后得到 2 株去除新霉素抗性标记的阳性细胞克隆;通过 Western blotting 实验证明 RHBDD1-FLAG-SBP 融合蛋白的表达。**结论** 通过改良的体细胞基因敲入技术成功构建跨膜丝氨酸蛋白酶 RHBDD1 内源敲入 FLAG 和 SBP 双标签的 HCT116 结直肠癌细胞株。

关键词 基因敲入 RHBDD1 同源重组

Study of Epitope Tagging of Intramembrane Serine Protease RHBDD1 by Improved Somatic Cell Knock-in Approach. Song Wei, Li Shangze, Zhang Huihui, Miao Shiyang, Wang Linfang, Zhang Xiaodong, Du Runlei. National Key Laboratory of Medical Molecular Biology, Institute of Basic Medical Sciences, CAMS and PUMC, Beijing 100005, China

Abstract **Objective** To apply improved somatic cell knock-in methods for endogenous tagging of target gene. **Methods** We designed primers and constructed targeting vector of RHBDD1. After adeno-associated virus (AAV) packaging, targeting, screening and verification, positive cell clones with neomycin resistance were obtained. Finally, we excised neomycin marker with adenovirus expressing cre-recombinase to get HCT116 cell line expressing FLAG and SBP tagged RHBDD1. **Results** Six positive clones were identified through AAV infection, screening and verification. Two positive clones which neomycin marker was excised were obtained by cre adenovirus infection and screening. The expression of RHBDD1-FLAG-SBP fusion protein was verified by Western blotting analysis. **Conclusion** We successfully constructed colorectal cancer cell line expressing FLAG and SBP tagged RHBDD1 endogenously by improved somatic cell knock-in approach.

Key words Knock-in; RHBDD1; Homologous recombination

同源重组介导的基因打靶技术是研究基因功能的强有力工具。利用该技术构建的基因敲除小鼠已经广泛应用于人类基因的研究^[1]。与基因敲除小鼠相比,体细胞基因敲除/敲入技术具有制备周期短,技术难度低和操作简便等优点,是近年来逐渐被研究者应用于科学研究的新技术。通过该技术可以制备靶基因敲除或敲入的人正常或肿瘤细胞株,在细胞水平上对人源基因参与的生物学功能进行研究。本研究

采用改良的体细胞基因敲入技术构建人跨膜丝氨酸蛋白酶 RHBDD1 靶向敲入 FLAG 和 SBP 双标签的 HCT116 结直肠癌细胞株,为进一步研究其在结直肠癌中的功能机制奠定基础。

材料与方法

1. 材料:(1)克隆构建:pTK-loxp-Neo-AAV-USER-3×FLAG-SBP 载体为张晓东教授馈赠;限制性内切酶、USER 酶和高保真 pfu DNA 聚合酶购自 NEB;质粒小提试剂盒购自 QIAGEN;玻璃奶回收试剂盒购自博大泰克。(2)细胞培养:293T 和 HCT116 细胞株为武汉大学张晓东教授馈赠;DMEM 和 IMDM 培养基、胎牛血清和胰蛋白酶购自美国 Hyclone 公司;Fugene 转染试剂购自 Roche;抗生素新霉素(G418)购自 GIBCO。(3)其他:FLAG 抗体购自 Sigma;RHBDD1 单克隆抗体为本室自制;GAPDH 抗体和兔抗小鼠 IgG 购自中杉金桥生物技术有限公司。

2. 方法:(1)载体构建:1)根据 RHBDD1 的基因组序列信息设计 5 对引物,包括 RHBDD1 同源打靶的左、右臂引物,

基金项目:国家重大研究计划基金资助项目(2011CB944302);国家重点实验室专项基金资助项目(2060204);中国医学科学院基础医学研究所(所)长基金项目(2009PY10)

作者单位:100005 北京,中国医学科学院基础医学研究所医学分子生物学国家重点实验室/北京协和医学院(清华大学医学部)基础医学院(宋伟、缪时英、王琳芳);430072 武汉大学生命科学院(李尚泽、张慧慧、张晓东、杜润蕾)

通讯作者:杜润蕾,电子信箱:runleidu@163.com

CRE 引物,筛选引物和新霉素测序引物。引物序列信息如下:左臂上游引物:CAACTAGTAGGAGAGAACAGAGTGCT,左臂下游引物:CAACTAGTCTGGCTATCGAATCTGTGAA;右臂上游引物:TGACCAAGCTTGGTGGCATCTTGGAAGACA,右臂下游引物:TGACCAAGCTTCGACTCAGACAGACAATCTG;CRE 上游引物:CACCTACGGGTTTCATCTC,CRE 下游引物:GAGCGATCTGGAGCAATACC;筛选上游引物:GCAGGTGCTGTTGAGTCAAGT,筛选下游引物:TCATGGAACACAAGCACAG;新霉素测序上游引物:TCGCCTTCTTGACGAGTTCT,新霉素测序下游引物:GGGTTTGCTCGACATTG。2) 通过 PCR 从人基因组中扩增并玻璃奶回收打靶片段。3) 使用 USER 酶进行连接并转化大肠杆菌^[2]。4) 菌落 PCR 鉴定阳性克隆并测序正确后提取质粒。(2) 腺相关病毒的包装:1) 293T 细胞传至 60mm 培养皿,16~18h 内转染。2) 将 9 μ g DNA 质粒(3 μ g 打靶质粒+3 μ g ZV1 包装质粒+3 μ g ZV2 包装质粒)与 18 μ l Eugene 转染试剂按照说明书混合孵育并均匀滴加至培养皿的 293T 细胞中,轻摇混匀后置于 37 $^{\circ}$ C 孵箱。3) 48~72h 后收集 293T 细胞沉淀,加 1ml PBS 重悬,涡旋混匀,交替置于干冰和 37 $^{\circ}$ C 水浴反复冻融 3~4 次,离心取上清-80 $^{\circ}$ C 保存。(3) 病毒感染:1) 将 HCT116 细胞消化并传至 24 孔板培养,使得 24h 后密度为 60%~80%。2) 次日吸去培养基,加 0.5ml 培养基并加入病毒 100~150 μ l,3h 后再加 0.5ml 培养基,轻轻摇匀。3) 感染 48h 后胰酶消化细胞,用含有 0.5mg/ml 新霉素的 IMDM 培养基将感染细胞按梯度分至 5 个 96 孔板,保鲜膜封口并置于 37 $^{\circ}$ C 孵箱培养 12~15 天。(4) 筛选:1) 在显微镜下挑取 96 个单克隆,消化后转移至一个新 96 孔板。2) 约 2~3 天后消化细胞,并取少量细胞提取基因组 DNA,其他细胞重新种回原 96 孔板,37 $^{\circ}$ C 孵育。3) 以提取的基因组 DNA 为模板,通



图 1 基因打靶的引物设计示意图

以人基因组 DNA 为模板,分别扩增 RHBDD1 同源打靶的左臂和右臂片段(图 2)。回收片段后通过 USER 酶连接 pTK-loxp-Neo-AAV-USER-3 $\times$ FLAG-SBP 载体并转化大肠杆菌 DH5 α 。挑选 PCR 鉴定阳性并测序正确的克隆菌扩大培养并提取质粒。

2. 包装病毒并感染 HCT116 结直肠癌细胞系:将包装质粒 ZV1、ZV2 和打靶质粒按 1:1:1 比例转染 293T 细胞。48~72h 后收细胞,通过反复冻融法释放病毒颗粒。使用包装病毒感染 HCT116 细胞系 48h 后,用含新霉素的培养基将感染细胞按倍比稀释法分至 5 个 96 孔板中。

3. 筛选并验证打靶成功的细胞克隆:细胞培养 12~15 天后,分别取少量细胞提取基因组 DNA,其余细胞继续培养。将新霉素测序上游引物和筛选下游

过 PCR 鉴定右臂是否打靶成功。4) 将筛选得到的阳性克隆消化(每孔 25 μ l 胰酶)后取 4 μ l 提基因组 DNA,通过 PCR 同时对左右臂验证,剩余的 21 μ l 阳性克隆细胞转至 24 孔板,37 $^{\circ}$ C 孵育。(5) cre 病毒感染和筛选:1) 挑出 24 孔中的 2 个阳性克隆消化,取其中的 1/3 传至新 24 孔板培养,用于加 cre 病毒。其余的阳性克隆全部保存在 24 孔板,加冻存液后-80 $^{\circ}$ C 保存。2) 24h 后各加 10 μ l cre 病毒。再 24h 后,50 μ l 胰酶消化细胞,细胞计数后取约 600~1200 个细胞分到 3 个 96 孔板中,37 $^{\circ}$ C 孵育 10 天后筛选。3) 在 3 个 96 孔板中挑选 20 个单克隆,消化后(每孔用 50 μ l 胰酶)转至 96 孔板,等 24~48h 后提取基因组 DNA,通过 PCR 鉴定阳性克隆。4) 挑取 96 孔板中的 6 个阳性克隆消化,转至 24 孔板培养;待 24 孔板中的 6 个克隆密度约为 50%时,挑取其中 3 个阳性克隆消化,分两份至 6 孔板中,使其中一份次日细胞密度为 10%~20%;第 2 天,一孔密度小的克隆按 1:100 加 50mg/ml 新霉素筛选,另一孔密度大的克隆作为对照,同时注意消化换液;10 天后,假若新霉素对应的克隆死亡,则获得第一条链打靶细胞株。将阳性克隆(未加新霉素)消化,1/3 转到 100mm 培养皿培养,余下的 2/3 仍在 6 孔板培养,用来提蛋白验证表达。(6) Western blotting 分析:12% SDS-PAGE 电泳分离蛋白质后,转印蛋白至 PVDF 膜,TBST(TBS 缓冲液+1% Tween 20)配制 5% 脱脂奶粉室温封闭 1h;FLAG、RHBDD1 和 GAPDH 抗体以 1:3000 稀释,4 $^{\circ}$ C 下反应过夜;山羊抗小鼠 IgG 以 1:10000 稀释,室温 1h;化学发光法(ECL)曝光。

结 果

1. 构建打靶载体:根据 RHBDD1 的基因组序列信息依次设计打靶左右臂引物、cre 引物和筛选引物等(图 1)。

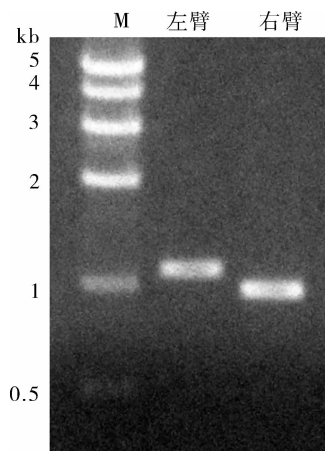


图 2 人基因组 DNA 中扩增 RHBDD1 同源打靶的左、右臂

引物配对进行PCR筛选。结果如图3所示,共筛选得到6个打靶阳性克隆。对阳性细胞克隆进一步进行左

右臂PCR筛选验证,结果显示6个阳性克隆均可扩增到左右臂打靶条带,说明细胞打靶成功(图4)。

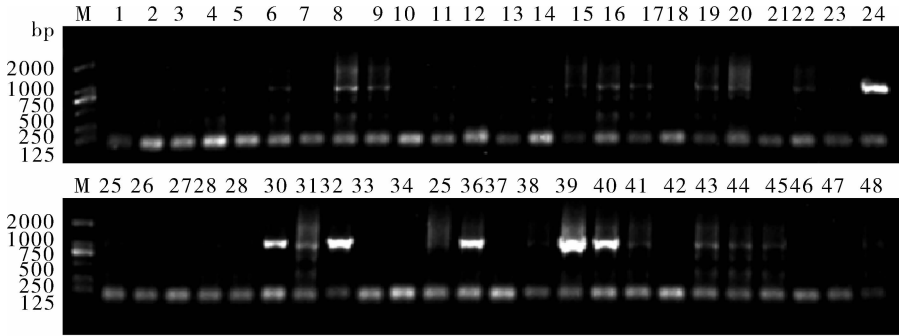


图3 PCR扩增右臂初步鉴定打靶阳性细胞克隆

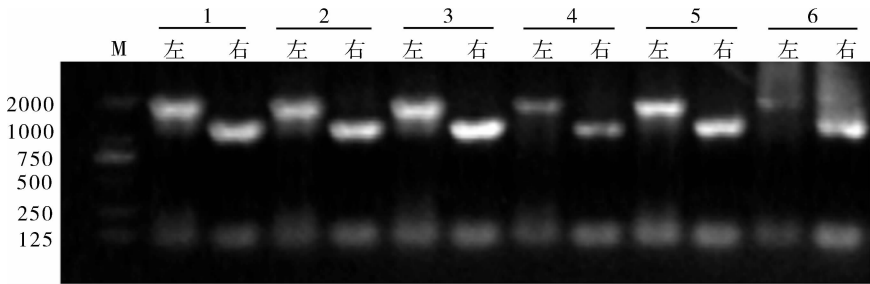


图4 PCR扩增左右臂鉴定阳性细胞克隆

4. 切除新霉素抗性标记:挑选2个阳性克隆传至24孔板,经cre病毒感染后各取600~1200个细胞分至3个96孔板。孵育10天后从中各挑选10个单克隆,分别取少量细胞提取基因组DNA并进行PCR鉴定。结果如图5所示,共有12个细胞克隆为去除新

霉素抗性标记的阳性克隆。最终挑取其中3个阳性克隆消化并分两份至6孔板中,其中一份加新霉素筛选,另一份作为对照正常培养。10日后,3株阳性克隆细胞经新霉素筛选后2株死亡,因此获得2株第一条链打靶成功的细胞株。

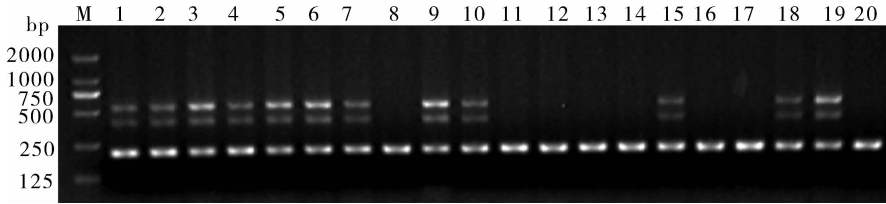


图5 PCR鉴定去除新霉素抗性标记的阳性细胞克隆

5. Western blotting 鉴定:裂解细胞并提取蛋白质进行Western blotting验证。结果如图6所示,2株细胞均可在43kDa附近检测到融合FLAG和SBP标签的内源RHBDD1的表达,而在34kDa附近可检测到未打靶的内源RHBDD1的表达。以上实验结果表明成功构建了两株RHBDD1内源敲入FLAG和SBP双标签的HCT116结直肠癌细胞株。

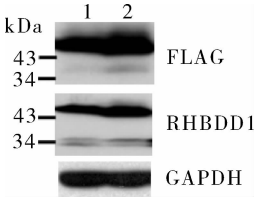


图6 Western blotting 鉴定 HCT116 细胞中 RHBDD1-FLAG-SBP 融合蛋白的内源表达情况

讨 论

体细胞基因敲除/敲入技术是基因打靶技术在生命科学领域的又一应用。该技术通过同源重组

介导的基因打靶技术在人源细胞系中靶向敲除目的基因或将标签序列等引入内源基因^[3]。由于体细胞

敲除或敲入需要反复打靶,因此选择具有稳定染色体组的二倍体细胞,如结直肠癌细胞系 HCT116、RKO 和 DLD1 等。本研究采用 Zhang 等^[4]报道的改良体细胞基因敲入技术,成功在 HCT116 细胞中将 RHBDD1 等位基因中的一条链靶向敲入 FLAG 和 SBP 双标签,为进一步的实验研究如串联亲和纯化结合质谱(TAP-MS)寻找相互作用蛋白质等打下良好基础。目前,过表达稳定细胞株是串联亲和纯化常用的细胞株。与基因敲入细胞株相比,过表达稳定细胞株具有制备简便快捷,成本较低且表达量高等优点。但过表达细胞中靶蛋白的表达为非生理状态下的过量表达,因此串联亲和纯化结合质谱检测时假阳性率较高,为后续的实验验证带来不便。而内源基因敲入细胞可以在保证目的蛋白生理性表达的同时进行串联亲和纯化,能够真实反映细胞内蛋白质之间的生理性相互作用模式,这是过表达稳定细胞无法替代的。

将打靶载体转入目的细胞进行同源重组是体细胞基因敲入的关键步骤之一,使用的方法主要包括载体电穿孔转化法和腺相关病毒感染法等^[5,6]。腺相关病毒感染法是目前常用的体细胞基因打靶方法,其优点是特异位点整合效率高且病毒感染受体细胞的范围广^[7]。本研究在 293T 细胞中成功包装 RHBDD1 的打靶重组腺相关病毒并感染 HCT116 细胞系。从阳性细胞克隆的初步筛选结果来看,打靶阳性率在 12.5% 左右,而进一步进行左右臂验证后均为阳性,说明该方法的打靶效率较高,且获得的阳性细胞克隆可以满足后续实验要求。经 cre 病毒感染后随机挑选 20 个单克隆细胞进行 PCR 鉴定,结果有 12 个细胞克隆为去除新霉素抗性基因的阳性克隆,阳性率高达 60%,为下一步的结果验证提供了更多的细胞选择。本研究最终通过 Western blotting 在蛋白质水平证明 HCT116 细胞中的 RHBDD1 基因内源敲入了 FLAG 和 SBP 双标签。该细胞株的获得为 RHBDD1 的功能研究提供了便捷,使免疫沉淀、免疫荧光和

ChIP-chip 等实验方法可以直接用于 RHBDD1 的机制研究,从而克服了上述实验方法对抗体要求较高的缺点。

体细胞基因敲入的优点很多,首先,通过同源重组将标签敲入目的基因末端,使重组蛋白质在生理状态下表达;其次,基因敲入技术无需扩增目的基因的全长 cDNA,因此基因敲入是否成功与基因大小无关;再次,3 × FLAG 标签是通用标签,因此检测方法可以标准化等。尽管体细胞基因敲入技术有独特的优势,但其应用也有着明显的局限性。该项技术大多应用于培养的人肿瘤细胞,而不同肿瘤细胞系的遗传背景不同,并且与正常细胞有着明显的差别,因此选择遗传稳定的细胞系显得尤为重要。相信随着体细胞基因敲入技术的不断发展成熟,一定会有更多的细胞系可用于目的基因的敲入,从而促进该技术在基因型和表型研究中的广泛应用。

参考文献

- 1 Bunz F. Human cell knockouts[J]. Curr Opin Oncol, 2002,14(1): 73-78
- 2 Nour-Eldin H H, et al. Advancing uracil-excision based cloning towards an ideal technique for cloning PCR fragments[J]. Nucleic Acids Res, 2006. 34(18):122
- 3 Rago, C B. Vogelstein B, Bunz F. Genetic knockouts and knockins in human somatic cells[J]. Nat Protoc, 2007,2(11):2734-2746
- 4 Zhang X, et al. Epitope tagging of endogenous proteins for genome-wide ChIP-chip studies[J]. Nat Methods, 2008,5(2):163-165
- 5 Chan, T A, et al. 14-3-3Sigma is required to prevent mitotic catastrophe after DNA damage[J]. Nature, 1999,401(6753):616-20
- 6 Hirata R, et al. Targeted transgene insertion into human chromosomes by adeno-associated virus vectors[J]. Nat Biotechnol, 2002,20(7): 735-738
- 7 Topaloglu O, et al. Improved methods for the generation of human gene knockout and knockin cell lines[J]. Nucleic Acids Res, 2005,33(18):158

(收稿:2011-06-24)

(修回:2011-06-28)

欢迎订阅 2012 年《医学研究杂志》

《医学研究杂志》每册定价:10 元,全年 120 元(含邮费)。每月 25 日出版,国内外公开发行人。邮发代号:2-590。全国各地邮局均可订阅,也可通过编辑部订阅。