

人大肠癌细胞系 HCT116 中 Sirt 1 基因敲除细胞株的构建

贾一帆 张慧慧 王卫星 杜润蕾

摘要 目的 利用 AAV 介导的体细胞基因敲除技术,在人大肠癌细胞系 HCT116 中对靶基因 Sirt 1 进行敲除,达到基因沉默的目的。方法 构建 Sirt1 打靶载体,通过病毒包装、感染、药物筛选、PCR 鉴定、Western blotting 鉴定等步骤获得 Sirt 1 基因敲除的细胞株。结果 经过筛选和鉴定后获得两个 Sirt1^{-/-} 阳性克隆,成功构建 HCT116 Sirt1^{-/-} 细胞系。结论 通过体细胞敲除技术,我们成功地获得 Sirt1 敲除肠癌细胞株。

关键词 体细胞基因敲除 同源重组 Sirt 1

Construction of Sirt1^{-/-} Cell Line in HCT116. Jia Yifan, Zhang Huihui, Wang Weixing, Du Runlei. College of Life Sciences and Renmin Hospital, Wuhan University, Hubei 430060, China

Abstract Objective To construct of Sirt 1^{-/-} cell line in HCT116 using the AAV knockout system. **Methods** We constructed targeting vector of Sirt1. After virus packaging, infecting, drug screening, PCR verification and western blotting, we got HCT116 Sirt^{-/-} cell line. **Results** we constructed HCT116 Sirt 1^{-/-} cell line successfully. **Conclusion** We successfully constructed the Sirt1 - knock-out cell line in HCT116.

Key words Somatic cell line gene knockout; Homologous recombination; Sirt1

升高和(或)降低基因的表达是研究基因功能最为常用的两种手段。小鼠基因敲除技术作为基因功能研究技术平台,在基因组结构和功能的研究,人类疾病动物模型的建立和基因治疗等方面都起到很大贡献。与小鼠基因敲除相比,由于人类体细胞同源重组效率低,从而限制了基因敲除技术人类体细胞系中的应用^[1,2]。研究发现 rAAV 载体中的外源 DNA 序列整合进染色体同源位点的效率较高,有证据证明其效率比质粒载体高 25 倍^[3,4]。本研究拟通过 AAV 介导的同源重组技术,在肠癌细胞系中建立体细胞基因敲除技术。SIRT1 是多功能的 NAD⁺ 依赖性的蛋白脱乙酰酶,它与众多肿瘤细胞以及人体细胞衰老过程相关。通过对人直肠癌细胞系的基因组进行改造,使 sirt1 基因沉默,可以深入研究 sirt1 基因在肿瘤发生发展中的作用。

材料与方法

1. 材料:(1)载体构建:pAAV-RC, pHelper 和 pTK-loxp

基金项目:国家重大研究计划项目:科技部“973”基金资助项目(2011CB944404);湖北省自然科学基金资助项目(2010CDB08704)

作者单位:430060 武汉大学人民医院麻醉科(贾一帆、王卫星);430072 武汉大学生命科学学院(张慧慧、杜润蕾)

通讯作者:王卫星,电子邮箱:sate.llite@163.com

- Neo - AAV 为 Case Western Reserve University Zhenghe Wang 博士赠送,本实验室保存。限制性内切酶购买自 ferment 公司,rTaq 酶、Exo III 购买自 Takara 公司,高保真 pfu 购自 Invitrogen 公司。(2)细胞培养:293T 和 HCT116 为本实验室保存。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:Sirt1 抗体购自 proteintech group 公司,山羊抗兔 IgG、 β -actin 抗体购自 cell signaling technology 公司,

2. 方法:(1)载体构建:①根据 Sirt1 的基因组序列信息及其功能域分析,设计相关引物,分别为 Sirt1 基因敲除的左臂引物、右臂引物、CRE 引物、筛选引物。引物序列信息如下:左臂上游引物 LF:5'-CATGAAGTCTGATCGCCTGTTGTATCCTTCCTGAC-3',左臂下游引物 LR:5'-CTATACGAAGTTATGTTAAAGAGATGGCTGGAATTGTCC-3',右臂上游引物 RF:5'-CCGCGGCCTAGGGATAGCCTTGTCTCAGATAAGGAAG-3',右臂下游引物 RR:5'-ATCGATAAGCTTGATACCTTAGCTCGGCAGTTCTT-3',CRE 上游引物 CF:5'-TAGGTGTGTGTGCGCATCCAT-3',CRE 下游引物 CR:5'-CCTGTTCACGCGTGTCTATGT-3',筛选上游引物 SF:5'-GAAAGTTCCCCACATCTGCT-3',筛选下游引物 SR:5'-TCACTCCTC-CAGGGCTAAAA-3',Neomycin 正向筛选引物 NF:5'-TCTG-GATTCATCGACTGTGG-3'和 Neomycin 反向筛选引物 NR:5'-GTTGTGCCCAGTCATAGCCG-3';②通过 PCR 方法从

HCT116 基因组中扩增并用玻璃奶回收打靶片段;③使用 USER 连接系统进行连接并转化大肠杆菌^[5];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转染前一天将 293T 细胞传至 60mm 培养皿中,16~18h 内密度达到 60%~80% 即可进行转染;②将 9 μ g DNA 质粒(3 μ g 载体 + 3 μ g 包装质粒 PAAV-RC + 3 μ g 包装质粒 PHELP)与 18 μ l Eugene 转染试剂混合孵育并均匀滴加至 293T 细胞中,轻轻混匀后置于 37 $^{\circ}$ C 孵箱;③72h 后收集 293T 细胞,离心弃上清,加 1ml PBS 重悬,混匀,置于干冰和 37 $^{\circ}$ C 水浴反复冻融 3~4 次,离心取上清,分装后 -80 $^{\circ}$ C 保存。(3)感染:①将 HCT116 细胞消化并传至 24 孔板培养,使 24h 后密度为 60%~80%;②次日吸去培养基,重新加入 1ml 培养基并加入病毒 100 μ l,轻轻摇匀,37 $^{\circ}$ C 培养;③感染 48h 后胰酶消化细胞,用含有 0.5mg/ml G418 的 DMEM 培养基将感染细胞按梯度分至 5 个 96 孔板,37 $^{\circ}$ C 培养 12~15 天。(4)筛选:①在显微镜下挑取 96 个单克隆,消化后转移至新 96 孔板;②第 2 天消化细胞,少量细胞提基因组,其余细胞重新种回原 96 孔板,37 $^{\circ}$ C 培养;③以提取的基因组 DNA 为模板,通过 PCR 鉴定右臂是否打靶成功;④将得到的阳性克隆提基因组,通过 PCR 同时对左右臂同时验证,同时将细胞转至 24 孔板,37 $^{\circ}$ C 培养。(5)CRE 病毒感染和筛选:①挑出 24 孔中的 1 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。其余的阳性克隆转至 6 孔板,细胞密度达到 80% 后 -80 $^{\circ}$ C 保存;②24h 后加 10 μ l CRE 病毒。24h 后,胰酶消化细胞,细胞计数后取 1000 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 24 个单克隆,消化后转至 96 孔板,等 24h 后提取基因组 DNA,通过 PCR 鉴定阳性克隆;④挑取 6 个阳性克隆消化,转至 24 孔板培养,待密度约为 50% 时,挑取 3 个阳性克隆消化,分两份至 6 孔板中,使次日细胞密度为 10%~20%。第 2 天,一孔按 1:100 加 50mg/ml G418 筛选,10 日后,加入 G418 死亡的克隆,则为第一条链打靶细胞株。将阳性克隆(未加 G418)消化,1/2 转到 100mm 培养皿培养,余下的 1/2 仍在 6 孔板培养,用来进行第二轮打靶。(6)第 2 轮打靶完成后,提取蛋白进行 Western blotting 验证:10% SDS-PAGE 电泳分离蛋白质后,转印蛋白至 PVDF 膜,TBS-T(TBS 缓冲液 + 1% Tween 20)配制 5% 脱脂奶粉室温封闭 1h;Sirt1 抗体以 1:800 稀释, β -actin 抗体以 1:4000 稀释,4 $^{\circ}$ C 下反应过夜;二抗以 1:5000 稀释,室温 1h;化学发光法(ECL)曝光。

结 果

1. 构建打靶载体:根据 Sirt1 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)。以 HCT116 基因组为模板,分别扩增 Sirt1 同源打靶的左臂和右臂片段(图 2)。回收片段后参考 zhang^[4]等建立的 USER 酶连接系统一步构建 pTK-loxp-Neo-AAV-Sirt1-KO 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。

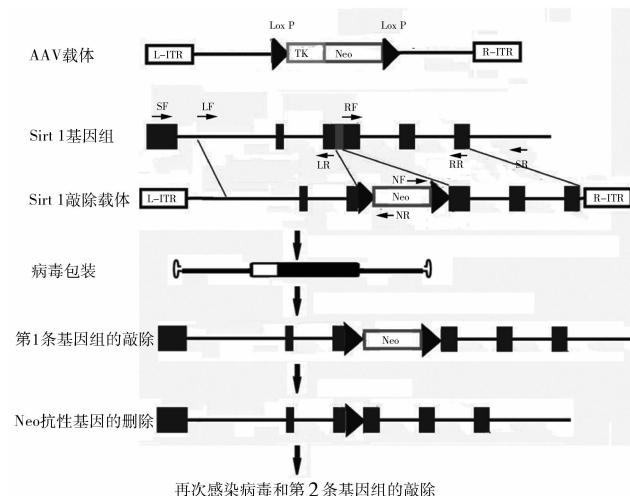


图 1 Sirt1 体细胞基因敲除流程图

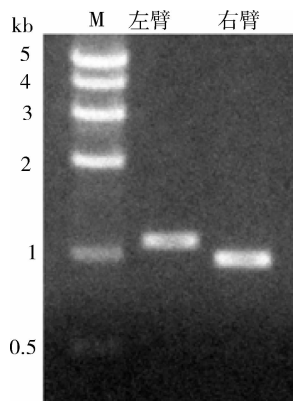


图 2 人基因组 DNA 中扩增 Sirt1 同源打靶的左、右臂

2. 包装病毒并感染 HCT116 细胞系:将包装质粒 pAAV-RC、pHepler 和打靶质粒按 1:1:1 比例转染 293T 细胞。72h 通过反复冻融法收获病毒。病毒感染 HCT116 细胞系,48h 后用含 G418 的培养基将感染细胞按倍比稀释法分到 5 个 96 孔板中,37 $^{\circ}$ C 培养。

3. 筛选阳性克隆:12~15 天后,挑选 96 个单克隆,转至新的 96 孔板,少量细胞用于提取基因组 DNA,其余细胞继续培养。通过 Neomycin 上的正向引物 NF 和右臂下游反向引物 SR 配对进行 PCR 筛选。结果如图 3 所示,共筛选得到 14 个打靶阳性克隆,对所获得的阳性克隆进一步验证获得 8 个阳性。

4. 抗性基因的去除:挑选 2 个阳性克隆传至 24 孔板,经 CRE 病毒感染后各取 1000 个细胞分到 3 个 96 孔板。培养 10 天后从中各挑选 12 个单克隆,提取基因组 DNA 并进行 PCR 鉴定。结果如图 4 所示,两条带的为阳性克隆,最终挑取其中 3 个阳性克隆分

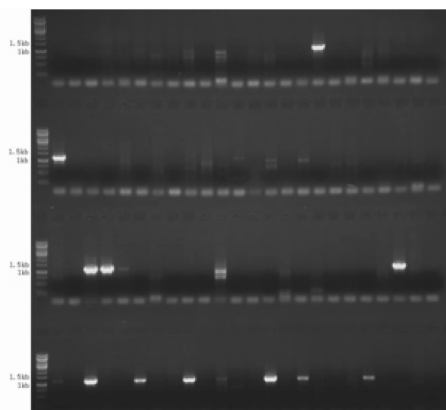


图3 Sirt1基因敲除第1轮PCR筛选

两份至6孔板中,其中一份加G418筛选,另一份作为对照正常培养。7天后,2个克隆死亡,因此获得2株第1条链打靶成功的细胞株。

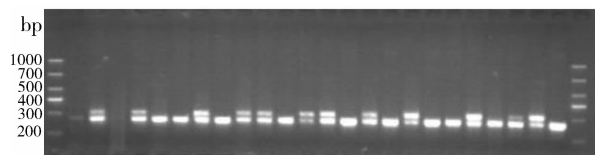


图4 PCR鉴定去除G418抗性的阳性细胞克隆

5. 第2轮打靶:获得的两个细胞株分到6孔板中,调整密度,使24h后为60%~80%,第2天用200 μ l病毒感染,48h后用含G418的培养基将感染细胞按倍比稀释法分到5个96孔板中,37 $^{\circ}$ C培养。

6. 第2轮筛选:15天后挑选300~400个单克隆,转至新的96孔板,转至新的96孔板,提取基因组DNA,用CRE引物进行PCR筛选,由于敲出的靶基因序列上有loxP等序列,故大带为完全敲除后的基因带型。结果如图5所示,共筛选得到2个打靶阳性克隆。

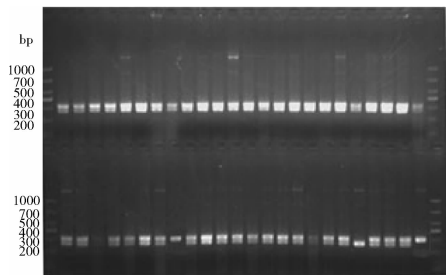


图5 PCR鉴定第2轮阳性细胞克隆

7. 抗性基因的去除:将2个阳性克隆传至24孔板,经CRE病毒感染后各取1000个细胞分到3个96孔板。培养10天后从中各挑选12个单克隆转到24

孔板,细胞密度达到50%,挑选6个克隆到6孔板,分成两份,一份加G418筛选。7天后两个克隆死亡,对应的即为第2轮阳性克隆细胞株。

8. Western blotting验证: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Sirt1^{-/-}在118kDa附近检测不到Sirt1的表达,而在WT和Sirt1^{+/+}附近可检测到内源性Sirt1的表达。以上实验结果表明成功构建了两株Sirt1^{-/-}HCT116细胞株。

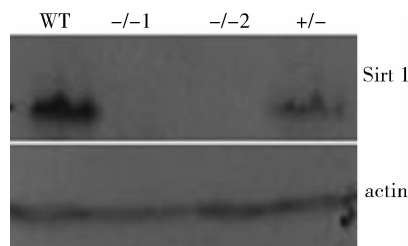


图6 Western blotting鉴定Sirt1基因敲除

讨 论

体细胞基因敲除技术是基因打靶技术在生命科学研究领域的又一应用。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^[5]。由于体细胞敲除需要反复打靶,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。本研究采用改良体细胞基因敲入技术,成功在HCT116细胞中将Sirt1等位基因中的两条链靶向敲除,为进一步的实验研究打下良好基础。目前,基因沉默一般是通过siRNA、shRNA等手段降低基因的表达量,与基因敲除相比,RNAi快速、相对便宜、适合高通量研究等优点。但RNAi细胞中靶蛋白仍有一定的表达,为后续的实验带来不便。而基因敲除细胞可以保证目的蛋白完全不表达,这是RNAi细胞无法达到的。

体细胞基因敲入的关键步骤之一是将打靶载体转入目的细胞进行同源重组,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^[6,7]。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^[8]且病毒感染受体细胞的范围广。本研究在293T细胞中成功包装Sirt1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,第1轮打靶阳性率在14.5%左右,而进一步进行左右臂验证后57%为阳性;第2轮打靶阳性率接近1%,且获得的阳性细胞克隆数充足,可以满足后续实验要求,为下一步的

结果验证提供了更多的选择。本研究最终通过 Western blotting 在蛋白质水平证明 HCT116 细胞中的 Sirt 1 基因完全敲除。该细胞株的获得为 Sirt 1 的功能研究提供了条件。

参考文献

- 1 Bunz F. Human cell knockouts [J]. Curr Opin Oncol, 2002, 14(1): 73 - 78
- 2 Sedivy JM, Dutriaux A. Gene targeting and somatic cell genetics - a rebirth or a coming of age? [J]. Trends Genet, 1999, 15(3): 88 - 90
- 3 Dong JY, Fan PD, Frizzell RA. Quantitative analysis of the packaging capacity of recombinant adeno - associated virus [J]. Hum Gene Ther, 1996, 7(17): 2101 - 2112
- 4 Zhang X, Guo C, Chen Y, et al. Epitope tagging of endogenous pro-

- teins for genome - wide ChIP - chip studies [J]. Nat Methods, 2008, 5(2): 163 - 165
- 5 Rago C, Vogelstein B, Bunz F. Genetic knockouts and knockins in human somatic cells [J]. Nat Protoc, 2007, 2(11): 2734 - 2746
- 6 Chan TA, Hermeking H, Lengauer C, et al. 14 - 3 - 3Sigma is required to prevent mitotic catastrophe after DNA damage [J]. Nature, 1999, 401(6753): 616 - 620
- 7 Hirata R, Chamberlain J, Dong R, et al. Targeted transgene insertion into human chromosomes by adeno - associated virus vectors [J]. Nat Biotechnol, 2002, 20(7): 735 - 738
- 8 Topaloglu O, Hurley PJ, Yildirim O, et al. Improved methods for the generation of human gene knockout and knockin cell lines [J]. Nucleic Acids Res, 2005, 33(18): e158 (收稿: 2011 - 10 - 17) (修回: 2012 - 10 - 20)

HCV 协同感染因子 La 自身抗原、33kDa 人类囊相关膜蛋白和真核细胞翻译起始因子第三亚单位特异性 siRNAs 的筛选

王美霞 金 铭 段 瑾 傅晓晴 徐 斌

摘 要 **目的** 筛选 Huh7 细胞内 La 自身抗原、33kDa 人类囊相关膜蛋白(hVAP - 33)和真核细胞翻译起始因子第三亚单位(eIF2Bgamma)的特异性 siRNAs。**方法** 根据 Genebank 中的序列设计 3 种基因的特异性引物,在 Huh7 细胞中通过荧光定量 PCR 方法检测上述 3 种分子;根据 siRNA 设计原则针对每种基因设计合成 3 条 siRNAs;分别将不同序列 siRNA 转染 Huh7 细胞,利用荧光定量 PCR 方法并计算 $\Delta\Delta CT$ 值筛选出针对每种基因抑制效率最高的一条 siRNA。**结果** 荧光定量 PCR 方法检测到了上述 3 种分子的存在;每种基因的 3 条不同 siRNA 对相应基因具有不同程度的沉默作用,通过 $\Delta\Delta CT$ 值的计算找出其中效率最高的一条。**结论** Huh7 细胞内可以检测到 La 自身抗原、hVAP - 33 和 eIF2Bgamma 基因,其特异性 siRNAs 可以沉默相应基因表达。

关键词 RNA La 自身抗原 33kDa 人类囊相关膜蛋白 真核细胞翻译起始因子第三亚单位

Screening for HCV Infection Co - factors La Autoantigen, hVAP - 33 and eIF2B Gene Specific siRNAs in Huh7 Cell Line. Wang Meixia, Jin Ming, Duan Jin, et al. Beijing Youan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100069, China

Abstract Objective To screen La autoantigen, hVAP - 33 (the human homologue of the 33 - kDa vesicle - associated membrane protein - associated protein) and eIF2B (subunit gamma of human eukaryotic initiation factors 2B) specific siRNAs. **Methods** The three genes were detected in Huh7 by RT - PCR using the primers synthesized based on the Genebank sequences. Then three different siRNAs related to each gene were designed and chemical synthesized according to the siRNA designing principle respectively. The three genes were detected again by RT - PCR after the siRNAs above were transfected by lipofectmin into Huh7 cells. The sequences of the highest silencing efficacy were selected through calculating $\Delta\Delta CT$ value of each target gene after silence. **Results** The results proved that the above 3 genes can be detected in Huh7 cells. The genes specific siRNAs appeared the different efficacies in gene silence. **Conclusion** La autoan-

基金项目:国家自然科学基金青年基金资助项目(30500426)

作者单位:100069 首都医科大学附属北京佑安医院(王美霞、金铭、段瑾、徐斌);310021 浙江中医药大学附属杭州市第六人民医院(傅晓晴)

通讯作者:徐斌,副主任医师,副教授,电子信箱:xubin1016@yahoo. cn