

- 因子的关系研究进展 [J]. 沈阳药科大学学报, 2008, 25(12): 1016-1020
- 6 金奇, 毕胜利, 陈继明. 医学分子病毒学 [M]. 北京: 科学出版社, 2001: 461-479
- 7 董莉娟, 李华, 蒋蕊鞠, 等. 人呼吸道合胞病毒不同纯化方法的比较研究 [J]. 医学研究杂志, 2011, 40(4): 73-76
- 8 李光, 井申荣. 呼吸道合胞病毒蛋白的研究进展 [J]. 中国生物制品杂志, 2006, 19(5): 541-547
- 9 Brewer JM, Conacher M, Satoskar A, et al. In interleukin-4-deficient mice, alum not only generates T helper 1 responses equivalent to Freund's complete adjuvant, but continues to induce T helper 2 cytokine production [J]. EUR J Immunol, 1996, 26(9): 2062-2066
- 10 Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, et al. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins [J]. J Immunol, 1986, 136(7): 2348

- 2357
- 11 Levitz R, Wattier R, Phillips P, et al. Induction of IL-6 and CCL5 (RANTES) in human respiratory epithelial (A549) cells by clinical isolates of respiratory syncytial virus is strain specific [J]. Virol, 2012, 190(9): 1-9
- 12 Pribul PK, Harker J, Wang B, et al. Alveolar macrophages are a major determinant of early responses to viral lung infection but do not influence subsequent disease development [J]. J Virol, 2008, 82(9): 4441-4448
- 13 Choi J, Callaway Z, Kim HB, et al. The role of TNF- α in eosinophilic inflammation associated with RSV bronchiolitis [J]. Pediatric Allergy Immunology, 2010, 21: 474-479

(收稿日期: 2013-12-25)

(修回日期: 2013-12-30)

人结直肠癌细胞 Drosha 基因敲除细胞模型的构建

李芸侨 李尚泽 宋伟 王任先 张晓东 王琳芳

摘要 目的 为研究核酸酶 Drosha 与结直肠癌的关系, 利用腺相关病毒 (AAV) 介导的染色体同源重组技术, 构建 Drosha 基因敲除的 HCT116 结直肠癌细胞模型。**方法** 设计引物通过 PCR 扩增 Drosha 基因的同源臂, 构建 Drosha 的 AAV 病毒打靶载体, 通过病毒的包装、感染、抗生素新霉素 (G418) 药物筛选、PCR 以及 Western blot 鉴定获得基因敲除阳性细胞株, 通过 Cre 病毒感染去除抗性基因, 最终建立敲除 Drosha 基因的结直肠癌细胞模型。**结果** 经过两轮打靶, 分别将 DNA 双链上的 Drosha 基因去除并经 Western blot 鉴定, 获得 Drosha -/- 阳性的 HCT116 细胞株。**结论** 通过 AAV 病毒介导的染色体同源重组技术, 成功构建 Drosha 基因敲除的 HCT116 细胞系。

关键词 基因敲除 Drosha 同源重组 结直肠癌

[中图分类号] R735

[文献标识码] A

Establishment of Drosha -/- cell Model in HCT116. Li Yunqiao, Li Shangze, Song Wei, et al. State Key Laboratory of Medical Molecular Biology, Institute of Basic Medical Sciences, CAMS and School of Basic Medicine, PUMC, Beijing 100005, China

Abstract Objective To investigate the role of Drosha involved in colorectal tumorigenesis, the AAV-mediated homologous recombination technology was developed to construct a human colorectal cell in which Drosha is completely deleted. **Methods** The homologous arms for AAV-targeted deletion of Drosha were amplified by PCR from HCT116 genomic DNA and cloned into the AAV expression vectors, which were packaged into 293T cells to produce the live viruses. HCT116 cells were infected by the viruses and the positive cells were identified by G418 selection, PCR screening and Western blot. Finally, the neomycin gene in the identified cells was removed by the Cre virus. **Results** Drosha -/- positive cell clones were successfully constructed after G418 selection, PCR screening, Western blot and Cre virus infection. **Conclusion** The HCT116 Drosha -/- cell was successfully established by AAV-mediated deletion technology.

Key words Knock out; Drosha; Homologous recombination; Colorectal cancer

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81372661); 国家重点实验室专项基金资助项目(2060204)

作者单位: 100005 中国医学科学院基础医学研究所/北京协和医学院基础学院、医学分子生物学国家重点实验(李芸侨、宋伟、王任先、王琳芳); 430072 武汉大学生命科学学院细胞与发育生物学系(李尚泽、张晓东)

通讯作者: 王琳芳, 电子信箱: wang.linfang@imicams.ac.cn

随着世界环境的恶化以及各种诱发因素的增加, 癌症的发生率逐年升高, 目前癌症已成为发达国家人口死亡原因的第 1 位, 发展中国家人口死亡原因的第 2 位^[1]。结直肠癌作为近年来发生率和病死率上升最快的肿瘤之一, 已经越来越受到人们的广泛关注^[2]。因此, 从细胞、分子水平探讨结直肠癌的发病

机制,寻找其治疗与诊断的理想分子靶标具有重要意义。

Drosha 是一种存在于细胞核内的 RNase III 样蛋白,在 miRNA 合成过程中起到剪切 pri - miRNA 的重要作用^[3]。miRNA 不仅可以介导转录后的基因沉默效应,还可以通过靶向基因的启动子位点来介导转录水平的基因沉默效应,可以调控细胞的自我更新、增殖、分化等生物过程,在多种疾病的发生过程起重要作用。miRNA 水平的改变可能是诱发癌症的重要因素之一^[4]。现有研究证明 Drosha 的表达水平的改变与卵巢癌、乳腺癌、肝癌等多种癌症的发生与发展密切相关^[5-7],而与结直肠癌关系的研究则鲜有报道。因此,建立 Drosha 基因敲除的结直肠癌细胞模型对研究该蛋白在结直肠癌发生发展中的作用机制具有十分重要的意义。本研究采用体细胞基因敲除打靶技术,建立了敲除 Drosha 的 HCT116 细胞系,为研究 Drosha 在结直肠癌发生中的功能提供细胞模型。

材料与方法

1. 材料:pTK - loxp - Neo - AAV 载体质粒, pAAV - RC 质粒和 pHelper 病毒质粒为张晓东教授实验室保存。限制性内切酶、rTaq 酶均购自 TaKaRa 公司, USER 酶和高保真 pfu DNA 聚合酶均购自 NEB 公司。293T 和 HCT116 细胞系为本实验室保存。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 公司, 抗生素新霉素(G418)购自 GIBCO 公司。Drosha 抗体购自 Sigma 公司, 山羊抗兔 IgG、GAPDH、兔抗小鼠 IgG 购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

2. 载体构建:根据 Drosha 的基因组序列信息设计 5 对引物,包括打靶的左、右同源臂引物,筛选引物,CRE 引物和新霉素测序引物。引物信息如下:左臂上游引物:5' - GG - GAAAGUGCTTGCCCTGGTCTAGATGC - 3';左臂下游引物:5' - GGAGACAUTCATTATGCTAACCTCCTCTTCAGA - 3';右臂上游引物:5' - GGTCCCACUTATCGGACTGCCATTGTTCA - 3';右臂下游引物:5' - GGCATAGUTCACAGAACATGGG - TAGCATC - 3';CRE 上游引物:5' - GAGCCACAGACAGAACATGTCG - 3';CRE 下游引物:5' - GCAGAACAGACATGTCAGACG - 3';筛选上游引物:5' - GGCTGGTGTCTGTCCTGT - 3';筛选下游引物:5' - AAGAGCCACCATTCTGCCCTA - 3';新霉素测序上游引物:5' - TCTGGATTTCATCGACTGTGG - 3';新霉素测序下游引物:5' - GTTGTGCCAGTCATAGCCG - 3'。经 PCR 扩增后,将同源臂与 knock out 载体 pTK - loxp - Neo - AAV 质粒相连接构建打靶载体并转化大肠杆菌提取质粒。

3. 病毒包装及收获:转染前 1 天,在 6cm 培养皿中接种 293T 细胞,待细胞密度达 60% ~ 70%,约 16 ~ 18h,进行转染。将 2μg 打靶质粒、2μg pAAV - RC 和 2μg pHelper 质粒与 12μl

Fugene 转染试剂按照说明书混合孵育后均匀滴加至种有 293T 细胞的培养皿中,轻轻摇匀。置于 37°C 的二氧化碳培养箱中培养 60 ~ 72h 后离心收集 293T 细胞。加 500ml PBS 重悬, vortex 轻柔混匀后,交替置于液氮与 37°C 水浴反复冻融 3 ~ 4 次,离心取上清于 -80°C 冻存。

4. 病毒感染及细胞筛选:将 HCT116 细胞传至 24 孔板内培养,待 24h 后细胞密度为 60% ~ 80%,取 50μl 病毒加入 24 孔板中。48h 后用胰酶消化细胞,梯度稀释至 4 ~ 6 个 96 孔板中,并用含有 0.5mg/ml G418 的培养基进行培养,10 ~ 15 天后在显微镜下挑选单克隆细胞。将单克隆从原 96 孔板转移至新 96 孔板内,用无 G418 培养基培养 2 ~ 3 天后,取少量细胞提取基因组。以此为模板,PCR 筛选阳性克隆,并将其转移至 24 孔板内继续培养,以便进行下一步筛选。

5. Cre 病毒感染去除新霉素抗性标记及筛选:将以上的阳性细胞株种于 24 孔板内,至 24h 后病毒感染时,细胞密度应为 60% ~ 80%。加入 10μl Cre 病毒,24h 后观察荧光(有荧光即可)。用胰酶消化后数 600 ~ 1000 个细胞并平均分至 3 个 96 孔板内,用正常培养基培养 10 ~ 14 天。挑选单克隆细胞并转移至新 96 孔板内,取少量细胞提取基因组 DNA 作为模板,通过 PCR 方法筛选成功去除抗性标记的阳性克隆。将剩余的鉴定为阳性的细胞分为两份,一份用含有 G418 的培养基培养,一份用正常培养基培养。10 天后,若用含有 G418 的培养基培养的细胞死亡,则表明确实去除了新霉素抗性标记,正常培养基培养的细胞即为阳性克隆。

6. Western blot: 经过两轮打靶后,取一小部分最终 PCR 验证阳性的细胞提取总蛋白,用 10% SDS - PAGE 电泳分离蛋白后,转印至 PVDF 膜。以 TBST (TBS 缓冲液 + 1% Tween20) 配置的 5% 脱脂奶粉室温封闭 1h。1:1000 稀释兔抗 Drosha 抗体,1:4000 稀释小鼠抗 GAPDH 抗体,4°C 孵育过夜。TBST 洗膜后以 1:10000 稀释的山羊抗兔的 IgG 和兔抗小鼠的 IgG 室温反应 1h,再次洗膜后化学发光显影。

结 果

1. 载体构建与病毒包装:以左臂上游引物、左臂下游引物作为配对引物,以右臂上游引物、右臂下游引物作为配对引物,以人基因组为模板,通过 PCR 扩增并回收相应的左右同源臂打靶序列。使用 USER 酶将 pTK - loxp - Neo - AAV 载体质粒与同源臂序列进行连接并将产物转化大肠杆菌。经过菌落 PCR 鉴定阳性,且测序验证正确后确认载体构建成功。将构建好的 knock out 质粒与 pAAV - RC、pHelper 质粒共转至 293T 细胞中,48h 后成功收获病毒。

2. 第一轮基因打靶:由于人体内染色体同源重组是成对出现的,这使得 Drosha 基因在染色体双链上均有拷贝,因此需要进行两轮基因打靶,每一次打靶同源重组去除一条链上的 Drosha 基因。将上一步获得的病毒感染 HCT116 后,挑选单克隆取少量细胞提

取基因组,以筛选上游引物和新霉素测序下游引物配对进行目的基因同源左臂 PCR 筛选,共筛选到 8 个 Drosha 杂合缺失体细胞的阳性克隆,结果如图 1 所示(方框标注的为阳性结果)。经筛选下游引物与新霉素测序上游引物配对进行目的基因同源右臂的复检均为阳性,从中选择两个生长状态良好的阳性克隆进行下一步打靶。

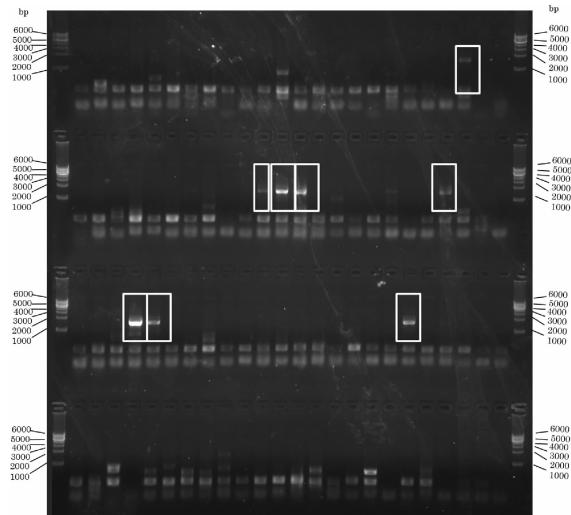


图 1 PCR 扩增筛选第一轮打靶阳性细胞克隆

3. 第一轮抗性基因去除:以上挑选的两个阳性克隆传至 24 孔板,经 Cre 病毒感染后挑选 6 个单克隆,取少量细胞提取基因组作为模板,以 CRE 上、下游引物组合进行 PCR 筛选,结果如图 2 所示,出现大小差异的两条带型的细胞为去除抗性的阳性克隆。将得到的阳性克隆分成两份,一份用来进行 G418 筛选再验证,另一份作为细胞种进行备份保存。8~10 天后,两个阳性细胞克隆经 G418 杀死验证确实为成功去除 G418 抗性标记的打靶阳性细胞系。

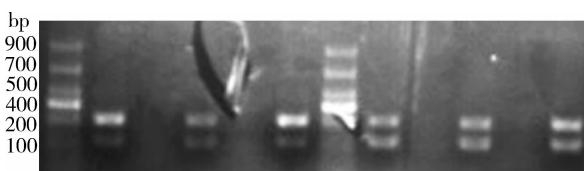


图 2 第一轮 PCR 筛选去除新霉素抗性标记得到的阳性细胞克隆

4. 第二轮基因打靶:因为第一轮基因打靶发生在一对染色体上的一条染色体中,另一条染色体仍是野生型,因此笔者得到的是 Drosha + / - 杂合体细胞。为得到稳定遗传的纯合缺失体细胞,笔者对杂合缺失体细胞进行了另一条染色体的打靶。用之前包装的

病毒再次打靶以上筛选到的 HCT 116 杂合缺失体细胞,在 96 孔板内用含有 G418 的培养基培养 10~15 天后,共挑选出 96 个单克隆细胞并将其转移至新 96 孔板内,取少量细胞提取基因组作为模板,用 CRE 上、下游引物进行 PCR 筛选。如图 3 所示,在出现条带差异的 2 条带型中,仅出现大带型的细胞为第二轮打靶阳性克隆,最终成功挑选出 1 个打靶阳性克隆。

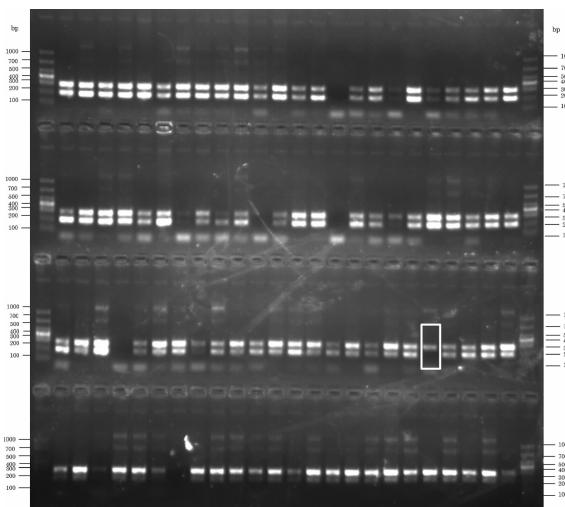


图 3 PCR 扩增筛选第二轮打靶阳性细胞克隆

5. 第二轮抗性基因去除:将以上筛选出的阳性单克隆细胞进行 Cre 病毒感染,分至 96 孔板内培养 10 天,挑选 8 个单克隆并将细胞等分成两份,一份用于 G418 筛选,另一份扩大培养。最终筛选到了去除 G418 抗性标记的 Drosha 纯合缺失体 HCT116 细胞。

6. Western blot 验证:基因敲除的最终目的是使该基因不表达,因此笔者通过 Western blot 实验在蛋白水平上最终验证基因打靶的情况。结果如图 4 所示,HCT116 野生型细胞(Drosha + / +)正常表达 Drosha 蛋白,杂合缺失体细胞(Drosha + / -)表达 Drosha 蛋白的量约为野生型的一半,纯合缺失体细胞(Drosha - / -)不再表达 Drosha 蛋白。以上实验结果表明已成功构建了 Drosha - / - HCT116 细胞株。

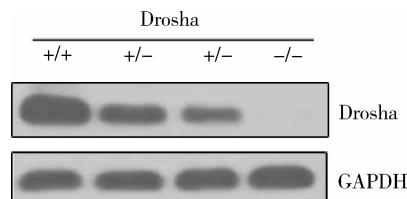


图 4 Western blot 验证打靶阳性细胞克隆

讨 论
小鼠基因敲除技术作为基因功能研究的平台,在

人类疾病动物模型的建立、基因治疗以及基因功能研究上均做出了重大贡献。然而与动物基因敲除相比，人类体细胞同源重组率低限制了体细胞基因敲除技术的应用^[8,9]。本实验采用的体细胞基因敲除技术是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。采用改良体细胞基因敲除技术，通过以腺相关病毒作为载体，从而提高基因同源重组率，大大提高阳性率，从结果看，两轮基因打靶阳性结果均大于1%，且获得的阳性细胞克隆数充足，可以满足后续实验要求，为进一步研究Drosha在结直肠癌中的作用提供了有利条件。

目前常用的基因沉默一般是通过siRNA、shRNA等手段，通过调节基因转录后水平降低基因表达量，与基因敲除技术相比，RNAi具有快速、相对便宜、适合高通量研究等优点^[10]。然而，由于RNAi后的细胞中仍有部分目标蛋白表达，可能会干扰后续实验结果。RNAi也可能造成脱靶效应，从而影响实验结果。此外RNAi是通过细胞转染完成的，是一个瞬时的反应，难以观察基因的长期效应^[11,12]。作为基因敲除技术则从基因水平完全阻止目的蛋白的表达，并且基因敲除后的细胞作为一个稳定的细胞系可以观察敲除基因对细胞功能的长久影响，这是RNAi技术所无法达到的^[13,14]。

综上所述，通过体细胞基因敲除技术，本研究成功的建立了敲除Drosha的HCT116结直肠癌细胞模型，为研究Drosha基因在结直肠癌中的功能奠定了基础。

参考文献

- 1 Markowitz SD, Bertagnolli MM. Molecular origins of cancer: Molecular basis of colorectal cancer[J]. N Engl J Med, 2009, 361:2449–2460
- 2 Bray JA, Center F, Ferlay MM, et al. Global cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin, 61(2):69–90

- 3 Knuckles P, Vogt MA, Lugert S, et al. Drosha regulates neurogenesis by controlling neurogenin 2 expression independent of microRNAs [J]. Nature Neuroscience, 2012, 15:962–969
- 4 Linsen SE, de Wit E, Janssens G, et al. Limitations and possibilities of small RNA digital gene expression profiling[J]. Nature Methods, 2009, 6:474–476
- 5 Vaksman O, Hetland TE, Trope CG, et al. Argonaute, Dicer, and Drosha are up-regulated along tumor progression in serous ovarian carcinoma[J]. Human Pathology, 2012, 43:2062–2069
- 6 Khoshnaw SM, Rakha EA, Abdel-Fatah T, et al. The microRNA maturation regulator Drosha is an independent predictor of outcome in breast cancer patients[J]. Breast Cancer Research and Treatment, 2013, 137:139–153
- 7 Callegari E, Elamin BK, Sabbioni S, et al. Role of microRNAs in hepatocellular carcinoma: a clinical perspective[J]. Onco Targets Therapy, 2013, 6:1167–1178
- 8 Liu PQ, Chan EM, Cost GJ, et al. Generation of a triple-gene knockout mammalian cell line using engineered zinc-finger nucleases[J]. Biotechnology Bioengineering, 2010, 106:97–105
- 9 Huang Z, Li S, Song W, et al. Lysine-specific demethylase 1 (LSD1/KDM1A) contributes to colorectal tumorigenesis via activation of the Wnt/B-catenin pathway by down-regulating dickkopf-1 (DKK1)[J]. PLoS One, 2013, 8:e70077
- 10 Kaelin WG. Use and abuse of RNAi to study mammalian gene function[J]. Science, 2012, 337:421–422
- 11 Chang K, Marran K, Valentine A, et al. RNAi in cultured mammalian cells using synthetic siRNAs[J]. Cold Spring Harb Protoc, 2012, 9:957–961
- 12 Braun CJ, Hemann MT. Unraveling tumor suppressor networks with in vivo RNAi[J]. Cell Stem Cell, 2013, 12:639–641
- 13 Fan L, Kadura I, Krebs LE, et al. Improving the efficiency of CHO cell line generation using glutamine synthetase gene knockout cells[J]. Biotechnology Bioengineering, 2012, 109:1007–1015
- 14 Kim YK, Wee G, Park J, et al. TALEN-based knockout library for human microRNAs[J]. Nature Structural Molecular Biology, 2013, 20:1458–1464

(收稿日期:2013-12-13)

(修回日期:2014-01-07)

《医学研究杂志》启用远程稿件处理系统的启事

《医学研究杂志》目前已经启用远程稿件处理系统，请各位作者登陆《医学研究杂志》网站：<http://www.yx-yjzz.cn>，登陆注册投稿系统，填写作者相关信息后进行投稿。咨询电话：010-52328679（单政编辑）。

《医学研究杂志》编辑部