

利用 CRISPR-Cas9 系统敲除小鼠黑色素瘤细胞系 *MATP* 基因的初步研究

殷慧慧, 李 丹, 李 钰, 孙 菲, 董施施, 孔江峰, 王洪宝,
曾 林, 法云智, 孙兆增

(军事医学科学院实验动物中心, 北京 100071)

【摘要】 目的 利用 CRISPR/Cas9 系统, 敲除小鼠黑色素瘤细胞系的 *MATP* 基因, 为 *MATP* 基因的功能研究奠定基础。**方法** 利用 <http://crispr.mit.edu/> 网站, 设计针对 *MATP* 的特异性引物, 并将引物链接到 pCAS9/gRNA1 载体。将阳性载体转染小鼠黑色素瘤细胞系 B16F10, 利用无限稀释的方法获得转染后的单克隆细胞株。提取不同细胞株的基因组, 通过测序的方法进一步筛选出发生 *MATP* 基因切割的细胞株, 并利用 Western-blot 的方法验证 *MATP* 的表达情况。**结果** 成功获得了 3 株 *MATP* 基因敲除的细胞株, Western-blot 结果表明, 该细胞株不表达 *MATP* 蛋白。**结论** 利用 pCAS9/gRNA1 载体, 可以实现 B16F10 细胞系 *MATP* 基因的敲除。

【关键词】 CRISPR-Cas9; 黑色素瘤细胞; *MATP*; 研究

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2017) 04-0052-04

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2017.04.009

A preliminary study on the *MATP* gene knockout in a mouse melanoma cell line using CRISPR-Cas9 system

YIN Hui-hui, LI Dan, LI Yu, SUN Fei, DONG Shi-shi, KONG Jiang-feng,

WANG Hong-bao, ZENG Lin, FA Yun-zhi, SUN Zhao-zeng

(Laboratory Animal Center of the Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China)

【Abstract】 Objective To knockout the *MATP* gene of mouse melanoma cell line B16F10 using CRISPR/Cas9 system, and to lay foundation for the functional study of *MATP* gene. **Methods** Specific primers of *MATP* were designed according to the report in <http://crispr.mit.edu/> website. The primers were linked to pCAS9/gRNA1 vector. Then the positive vector was transfected into mouse melanoma B16F10 cells, and monoclonal cell lines were obtained by the infinite dilution method. After the genomes of different monoclonal cell lines were extracted and sequenced, the cell lines with *MATP* gene cleavage were screened, and the expression of *MATP* in these cell lines was verified by Western-blot analysis.

Results Three *MATP* gene knockout cell lines were successfully obtained. The western-blot results showed that the cell lines did not express *MATP* protein. **Conclusions** The knockout of *MATP* gene in B16F10 cell line can be successfully achieved using the pCAS9/gRNA1 vector.

【Key words】 CRISPR-Cas9; Melanoma cells; *MATP*; Mouse melanoma cell lines

【基金项目】 国家自然科学基金 31272387, 全军实验动物专项课题 SYDW[2014]006。

【作者简介】 殷慧慧(1990 -)女, 硕士研究生, 研究方向为实验动物疾病模型。E-mail: yinhuhui2014@163.com。

【通讯作者】 孙兆增(1977 -)男, 研究员, 硕士生导师, 研究方向: 实验动物疾病模型。E-mail: laxszz@aliyun.com。

眼皮肤性白化病是由于不同黑色素合成或转运相关基因突变而导致的具有相同或相似临床症状的一类遗传性疾病的总称^[1],根据涉及基因的不同,*OCA*(oculocutaneous albinism)可以分为 4 个常见类型,即 *OCA1-OCA4*^[2]。*OCA4* 是一种发现较晚的眼皮肤白化病,它是由编码膜相关转运蛋白 *MATP* (membrane-associated transporter protein, *MATP*) 基因突变而导致的白化类型^[3]。*MATP* 基因为膜相关转运蛋白,该基因定位于 5 号染色体,由 7 个外显子和 6 个内含子组成,共有 530 个氨基酸残基^[4]。通过分析膜相关转运蛋白的结构,推测其可能存在转运功能。

CRISPR/Cas9 是一种来源于细菌的由 RNA 指导 Cas9 蛋白对基因进行编辑和修饰的新技术^[5]。这种核酸酶活性仅仅需要一种非编码 RNA (sgRNA) 介导下即可实现定向基因打靶,CRISPR/Cas9 系统是相对于 ZFNs 和 TALENs 更为简便、快速的基因组编辑技术^[6],在细菌、哺乳动物细胞以及斑马鱼、小鼠、大鼠等都表现出很强的基因组编辑活性^[7,8]。因此本研究拟利用 CRISPR/Cas9 技术,实现对小鼠黑色素瘤细胞系 B16F10 细胞系 *MATP* 基因的敲除。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂:pCAS9/gRNA1 质粒,由北京英茂盛业生物科技有限公司提供。常用的分子生物学试剂和细胞培养液等分别购自 TAKARA、NEB 和 GE Healthcare 等公司。*MATP* 抗体(ab57270),购自 Abcam 公司;Beta actin 抗体(TA-09),购自中山金桥公司。

1.1.2 菌种及细胞株:实验中所用的大肠杆菌感受态 DH5 α 和小鼠黑色素瘤细胞系 B16F10,由本实验室保存。

1.2 方法

1.2.1 *MATP* 特异性引物的设计:根据 *MATP* 第 1 个外显子的序列,利用 <http://crispr.mit.edu/> 网站设计两对特异性引物 (Score 值在 80 以上)。根据 pCAS9/gRNA1 载体的要求,设计两对引物,*MATP1* 上下游引物序列分别为:5-acaccgCCGAGAGTTT TGCTATGCGGgttttagagctagaatagcaagttaaataaggctagtc cgtt-3 (其中大写字母为 *MATP* 特异性序列,其余为载体序列,下同。)和 5-aacggactagcctattttaactgtct

atttctagctctaaacCCGCATAGCAAACT CTCGGcggtgt-3;*MATP2* 上下游引物序列分别为:5-acaccgTTAGCC GAGGATTGCCCCCTTgttttagagctagaatagcaagttaaataagg ctatgccgtt-3 和 5-aacggactagcctattttaactgtctatttctagctctaaacAAGGGGCAATCCTCGGCTAAcgggtgt-3。

1.2.2 pCAS9/gRNA1-MATP 载体的构建:将 *MATP1* 上和 *MATP1* 下以及 *MATP2* 上和 *MATP2* 下两对引物分别进行退火,合成双链寡核苷酸。利用 *EcoRV* 将 2 μ g pCAS9/gRNA1 质粒(图 1)线性化,回收线性化的质粒并定量。用水将退火后的双链寡核苷酸稀释 100 倍,利用 T4 连接酶将上述 2 种寡核苷酸连接到线性化的 pCAS9/gRNA1 质粒。

1.2.3 pCAS9/gRNA1-MATP 载体转化和阳性克隆的筛选:连接后产物转化大肠杆菌感受态细胞 DH5 α ,挑取多个菌落至氨苄抗性的培养基中培养后进行鉴定。鉴定所用的引物,gRNA-F:GACTATCATATGCTTACCGTAACT, gRNA-R:GACTATCATATGCTTACCGTAACT。直接利用菌液 PCR 的方法进行鉴定,阳性质粒分别命名为:pCAS9/gRNA1-MATP1 和 pCAS9/gRNA1-MATP2。

1.2.4 pCAS9/gRNA1-MATP1 和 pCAS9/gRNA1-MATP2 两种质粒的转染:将 B16F10 细胞传代至 6 孔培养板,在细胞密度达到 80% 时,利用 lipofectamine 2000 转染试剂进行细胞转染,两种质粒的用量都是 1 μ g。换新鲜培养基培养 72 h,利用胰酶进行消化。收获细胞后,按照 10^7 倍稀释细胞,并接种到 96 孔板。由于 B16F10 细胞能够产生大量的黑色素,在显微镜下能够明显观察到黑色素的聚集,并且在细胞浓度较高时,培养液染色很快会发生变化。因此利用 B16F10 细胞的这种特性,可以筛选到与野生细胞株不同的单克隆细胞株。筛选到单克隆细胞后,提取细胞的基因组,利用 PCR 的方法扩增 *MATP* 基因第 1 个外显子的序列,通过测序的方法进一步确定 *MATP* 基因的敲除情况。

1.2.4 *MATP* 基因敲除细胞株中 *MATP* 蛋白的表达情况检测:利用 Western-blot 实验检测 *MATP* 蛋白的表达情况:收取的细胞沉淀中加入 RIPA 裂解液裂解,并进行 SDS-PAGE 电泳。恒流 250 mA 转膜后,利用 *MATP* 抗体检测 *MATP* 蛋白的表达情况, β -actin 作为实验的阳性对照。

2 实验结果

2.1 pCAS9/gRNA1-MATP1 和 pCAS9/gRNA1-

MATP2 质粒的筛选结果

挑取 24 个转化 pCAS9 /gRNA1-MATP1 质粒的单菌落,培养后利用菌液 PCR 筛选阳性克隆,共筛选到 5 个阳性克隆,见图 2。

挑取 23 个转化 pCAS9 /gRNA1-MATP2 质粒的单菌落,共筛选到 8 个阳性克隆,见图 3。从阳性菌株中提取质粒,送测序公司进行序列测定。

2.2 B16F10 细胞 MATP 基因敲除情况分析结果

通过黑色素的产生和培养液的变化情况,共筛选到 8 株疑似 MATP 基因敲除的细胞克隆。提取这 8 株细胞的基因组,利用 PCR 的方法获得 MATP 基因第 1 个外显子的序列,分别进行了测序。其中 3 株细胞株发生了 MATP 基因的移码突变,其中 2 个细胞株为编码框 35 位的 C 碱基缺失,1 个细胞株为 36 位的 G 碱基缺失。

2.3 MATP 基因敲除细胞株 MATP 蛋白的表达情况检测结果

利用 Western-blot 检测结果表明,发生了 MATP

基因移码突变的 3 株细胞株,检测不到 MATP 蛋白的表达,结果见图 4,说明成功实现了 B16F10 细胞 MATP 基因的敲除。

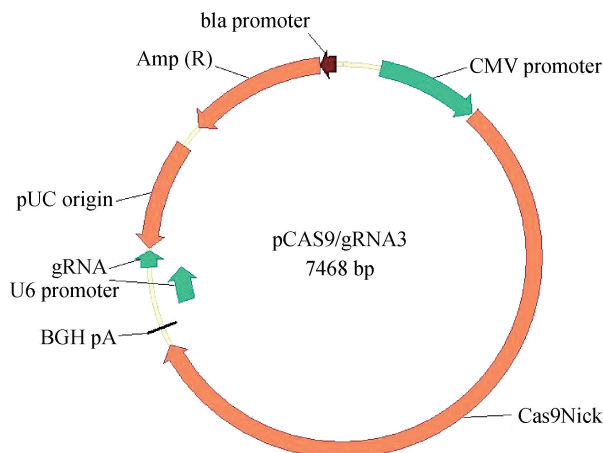
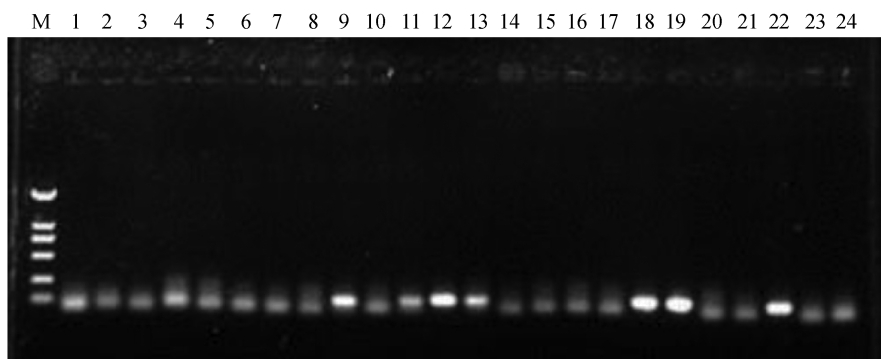


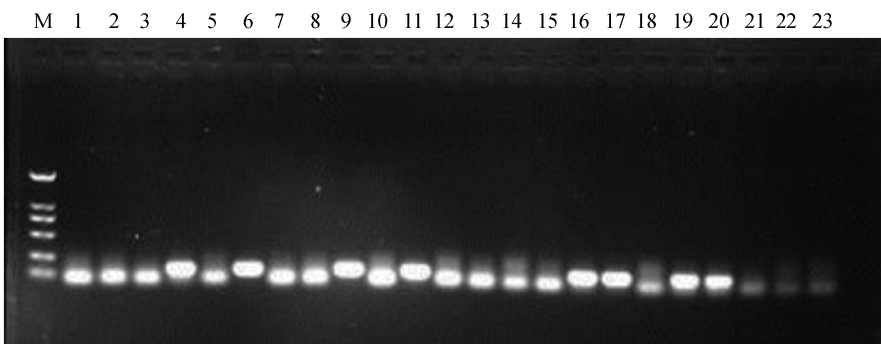
图 1 pCAS9/gRNA1 质粒示意图
Fig. 1 Diagram of the pCAS9/gRNA1 plasmid



M: DNA 分子量标准; 9, 12, 18, 19, 22 为阳性; 其余为阴性

图 2 pCAS9 /gRNA1-MATP1 质粒阳性菌株的筛选

Fig. 2 Screening of pCAS9/gRNA1-MATP1 plasmid-positive strains. M: DNA molecular weight markers; 9, 12, 18, 19, and 22 are positive. The others are negative.



M: DNA 分子量标准; 4, 6, 9, 11, 16, 17, 19, 20 为阳性; 其余为阴性

图 3 pCAS9 /gRNA1-MATP2 质粒阳性菌株的筛选

Fig. 3 Screening of pCAS9/gRNA1-MATP2 plasmid-positive strains. M: DNA molecular weight markers; 4, 6, 9, 11, 16, 17, 19, and 20 are positive; The others are negative.

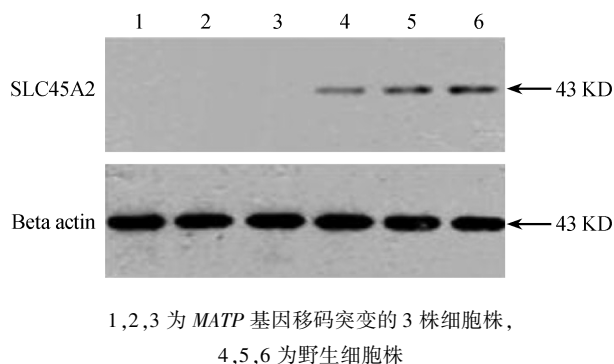


图 4 *MATP* 蛋白表达的 Western-blot 检测结果

Fig.4 Western-blot detection of the *MATP* protein expression.

1, 2, 3 are the cell lines with the frameshift mutation of *MATP* gene; 4, 5, 6 are the wild-type cell lines.

3 讨论

由于其具有特异性高,分子构建简单,流程短的特点,近年来 CRISPR/Cas9 技术获得了快速发展。使用 CRISPR/Cas9 技术进行基因敲除需要两个关键因素,首先是有有效的 sgRNA 引导序列,再就是 Cas9 蛋白的存在^[9]。因此在利用 CRISPR/Cas9 技术进行基因敲除,需要两个质粒,并且需要将 sgRNA 序列和 Cas9 序列在体外转录成 RNA。而 pCAS9/gRNA1 质粒,在同一个质粒中表达 Cas9 蛋白和 sgRNA,实现单独转染一个质粒即可产生基因敲除效果,操作更为简单,并且在哺乳动物细胞中具有较高的敲除效率。本实验利用该 pCAS9 / gRNA1 质粒,成功实现了 B16F10 细胞 *MATP* 基因的敲除,进一步证实单一质粒敲除的有效性。

B16F10 细胞是小鼠黑色素瘤高转移细胞,在体外培养时可以产生大量的黑色素^[10]。细胞产生的大量黑色素可以在显微镜下清楚的观察到,并且黑色素的产生可以使培养基很快变色,这种特点在在研究黑色素形成相关基因尤其有用^[11]。B16F10 细胞的 *MATP* 基因敲除后,黑色素的形成能力受到较大的影响,因此通过细胞黑色素形成的差异,能够比较容易的筛选到基因敲除的细胞株。本实验利用这个特点筛选到 8 个疑似 *MATP* 基因敲除细胞株,通过基因克隆测序的方法证实确有 3 株细胞株发生了 *MATP* 基因的敲除。该实验为黑色素相关基因的功能研究提供了一些有用的参考。

参考文献:

- [1] Lekalakala PT, Khammissa RA, Kramer B, et al. Oculocutaneous albinism and squamous cell carcinoma of the skin of the head and neck in Sub-Saharan Africa [J]. J Skin Cancer, 2015, 2015 (6). Article ID 167847.
- [2] Shakil M, Ullah MI, Hussain S, et al. Homozygosity mapping of a consanguineous Pakistani family affected with oculocutaneous albinism to tyrosinase gene [J]. Int J Ophthalmol, 2016, 9 (5): 794 - 796.
- [3] 吴立娟, 彭晓霞, 梁小云, 等. 眼皮皮肤白化病遗传基因研究进展 [J]. 广州医学院学报, 2006, 34 (4): 58 - 61.
- [4] Kamaraj B, Purohit R. Mutational analysis on membrane associated transporter protein (*MATP*) and their structural consequences in oculocutaneous albinism type 4 (*OCA4*) — A molecular dynamics approach [J]. J Cell Biochem, 2016, 117 (11): 2608 - 2619.
- [5] Ding Y, Hong L, Chen LL, et al. Recent advances in genome editing using CRISPR/Cas9 [J]. Front Plant Sci, 2016, 7: 703.
- [6] He Z, Proudfoot C, Whitelaw CBA, et al. Comparison of CRISPR/Cas9 and TALENs on editing an integrated EGFP gene in the genome of HEK293FT cells [J]. Springerplus, 2016, 5 (1): 1 - 12.
- [7] Ceasar SA, Rajan V, Prykhodzhiy SV, et al. Insert, remove or replace: A highly advanced genome editing system using CRISPR/Cas9 [J]. Biochim Biophys Acta (BBA) - Mol Cell Res, 2016, 1863 (9): 2333 - 2344.
- [8] 马云武, 张连峰. 利用 CRISPR/Cas9 技术实现快速、经济的大鼠条件基因敲除技术 [J]. 中国比较医学杂志, 2014, 24 (3): 66 - 66.
- [9] 周金伟, 徐绮婷, 姚婧, 等. CRISPR/Cas9 基因编辑技术及其在动物基因组定点修饰中的应用 [J]. 遗传, 2015, 37 (10): 1011 - 1020.
- [10] Baishya R, Nayak D K, Kumar D, et al. Ursolic acid loaded PLGA nanoparticles: in vitro and in vivo evaluation to explore tumor targeting ability on B16F10 melanoma cell lines [J]. Pharmaceut Res, 2016, 33 (11): 2691 - 703.
- [11] Shin DH, Kim OH, Jun HS, et al. Inhibitory effect of capsaicin on B16-F10 melanoma cell migration via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/Rac1 signal pathway [J]. Exp Mol Med, 2008, 40 (5): 486 - 494.

[修回日期] 2016 - 12 - 08