

网络出版时间: 2020-5-8 15:45 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20200507.0934.029.html>

◇技术与方法◇

基于 CRISPR-Cas9 技术构建 *gpr41* 基因敲除的 RAW264.7 细胞系

苏丛¹ 徐方明² 伍婷² 张鹏飞^{2,3} 陈昊然³ 刘艳艳^{2,3,4} 兰燕虎³ 李家斌^{1,2,3,4}, 律娜²

摘要 采用 CRISPR-Cas9 基因编辑技术, 构建 G-蛋白偶联受体 41(*gpr41*) 基因敲除的 RAW264.7 细胞系。利用慢病毒转染, 构建稳定表达 Cas9 蛋白的巨噬细胞株。针对 *gpr41* 基因作用的功能区域, 设计靶向 *gpr41* 基因的向导 RNA(gRNA), 构建 pLenticrisprV2 重组质粒转化 DH5α 感受态细胞, 筛选出重组子测序验证 gRNA 的有效性。鉴定成功的 pLenticrisprV2-gpr41-gRNA 重组质粒采用转染试剂转染巨噬细胞系 RAW264.7。筛选阳性单克隆细胞株, Western blot 检测 *gpr41* 基因的表达。测序结果证实 pLenticrisprV2-gpr41-gRNA 重组质粒构建成功; Western blot 筛选出重组质粒 pLenticrisprV2-gpr41-gRNA3 转染 RAW264.7 细胞 13 号单克隆株的 GPR41 蛋白不表达。利用 CRISPR-Cas9 基因编辑技术成功构建了 *gpr41* 基因敲除的巨噬细胞株, 为研究 *gpr41* 基因在 RAW264.7 细胞中的作用机制奠定基础。

关键词 CRISPR-Cas9 技术; *gpr41*; 巨噬细胞; 基因敲除

中图分类号 R 394

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2020)05-0800-04

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.05.029

CRISPR-Cas9 基因敲除策略是目前最便利的一种基因编辑技术, 其原理是将 tracrRNA(trans-activating crRNA) 和 crRNA(CRISPR RNA) 整合成一个复合体, 即 tracrRNA/crRNA 复合体, 一种具有引导功能的向导 RNA(guide RNA, gRNA); 利用外源表达 Cas9 蛋白与人工设计的 gRNA 形成蛋白核酸复合物。其中 gRNA 5' 端与靶 DNA 的 20 个核苷酸特异性结合, 3' 端可以结合并激活核酸内切酶 Cas9, 引导

2019-09-24 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81673242、81973983); 安徽高校自然科学研究项目(编号: KJ2018A0193); 安徽省高校优秀青年人才支撑计划(编号: gxyq2018010)

作者单位: ¹安徽医科大学附属巢湖医院感染病科, 巢湖 238000

²安徽医科大学第一附属医院感染病科, 合肥 230022

³安徽省细菌耐药性监控中心, 合肥 230022

⁴安徽医科大学细菌耐药研究所, 合肥 230022

作者简介: 苏丛, 女, 硕士研究生;

兰燕虎, 男, 博士, 责任作者, E-mail: zixinhu@163.com;

李家斌, 男, 教授, 主任医师, 博士生导师, 责任作者, E-mail: lijiabin@ahmu.edu.cn

Cas9 对 DNA 进行定点切割, 从而实现对目的基因的特异性剪切^[1]。

巨噬细胞广泛分布于人和动物体内, 是一种重要的固有免疫细胞^[2]。短链脂肪酸(short-chain fatty acid, SCFAs)主要是肠道微生物群发酵的产物, 可以抑制中性粒细胞、单核细胞和巨噬细胞中促炎因子的产生, 具有抗多种炎症性疾病的治疗潜力^[3-4]。G-蛋白偶联受体 41(G protein-coupled receptor 41, GPR41)在中性粒细胞、肥大细胞、巨噬细胞、淋巴细胞上均有表达。一般认为, GPR41 和 GPR43 的激活以及组蛋白去乙酰化酶的抑制是 SCFAs 抗感染作用的基础^[5-6]。现利用 CRISPR-Cas9 技术构建 *gpr41* 基因敲除的巨噬细胞系, 为进一步探讨 *gpr41* 基因在巨噬细胞中的功能及机制研究提供细胞模型。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株、菌种和质粒 小鼠巨噬细胞系 RAW264.7 细胞与 HEK293T 细胞由安徽省细菌耐药性监控中心保存; 感受态细胞 DH5α 由安徽省细菌耐药性监控中心保存; 真核表达载体 pLenticrisprV2 及 pMD2.G、psPAX2 慢病毒载体包装质粒均购自优宝生物科技有限公司(上海)。

1.1.2 材料与试剂 Bsmb I 限制性内切酶、T4 PNK、T4 DNA 连接酶、酶切缓冲液均购自美国 New England Biolabs 公司; 脂质体 2000(Lipofectamine 2000)购自美国 Invitrogen 公司; 高糖 DMEM 细胞培养液及胎牛血清均购自美国 Gibco 公司; 胶回收试剂盒和质粒小提试剂盒均购自天根生化科技(北京)有限公司; β-actin 抗体购自美国 Santa Cruz 公司; GPR41 抗体购自英国 Abcam 公司; 二抗山羊抗 IgG/辣根酶标记购自北京中杉金桥公司。引物和测序均由通用生物系统(安徽)有限公司完成。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 37 °C 水浴复苏小鼠巨噬细胞系

RAW264.7 细胞和 HEK293T 细胞 转移至 T25 培养瓶中 ,用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基培养 ,置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中。

1.2.2 gRNA 的设计和寡链核苷酸的合成 利用在线设计工具 (<http://www.rgenome.net/casdesigner/>) 根据 CRISPR/Cas9 靶点设计原则 ,设计了靶向 *gpr41* 外显子 3 的上下游的 3 对 gRNA ,分别命名为 gRNA1、gRNA2、gRNA3。详见表 1。

1.2.3 构建含有 gRNA 的重组质粒载体 BsmbI 酶切 pLenticrisprV2 质粒 ,酶切产物通过 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。见图 1。根据胶回收试剂盒说明书切胶后回收并纯化 ,测定 DNA 浓度 (大约 50 ng/μl)。随后将切胶后回收的 DNA 质粒与退火形成双链的 gRNA 混合 ,加入 T4 连接酶 ,室温过夜连接。将连接产物转化至 DH5α 感受态细胞 ,通过氨苄抗性平板涂板筛选 ,挑取单菌落至氨苄抗性 (100 mg/ml) 的 LB 肉汤培养基中过夜扩大培养 ,提取质粒后 ,送公司测序鉴定 ,将构建成功的重组质粒命名为 pLenticrisprV2-gpr41-gRNA。并将获取的正确的质粒分别命名为 GPR41-gRNA1、GPR41-gRNA2 和 GPR41-gRNA3 质粒。

1.2.4 慢病毒包装与细胞转染 取 1 μg pLenticrisprV2-gpr41-gRNA 质粒、750 ng 的 psPAX2 质粒和 250 ng 的 pMD2.G 混匀 ,加入 Lipofectamine 2000 5 μl 室温放置 25 min 后病毒包装辅助质粒共转染 HEK293T 细胞 48 h 后收集 HEK293T 细胞的培养基 2 000 r/min、4 °C 离心 10 min ,吸取上清液并用 0.45 mm 过滤器纯化病毒 ,于 -80 °C 保存。取对数生长期的 RAW264.7 细胞 ,制成单细胞悬液 ,接种在 6 孔培养板中 ,细胞密度以铺满 40% 板面的饱和度适宜。细胞贴壁后 ,将纯化的病毒呈梅花状加至 RAW264.7 中 ,同时按 1 : 1 000 的比例加入 Polybrene ,帮助病毒进入细胞 ,1 h 后更换新鲜培养基。第 2 天换液并用 1 × PBS 洗 2 次 ,加入新鲜培养基。第 3 天起用含有嘌呤霉素的培养液继续培养 2 d ,每天以相同浓度进行换液培养 ,杀死未转染成功的细胞 ,用等量的空白质粒做阴性对照。

1.2.5 筛选稳定敲除细胞株 经嘌呤霉素筛选存活的细胞即为可能成功转入 pLenticrisprV2-gpr41-gRNA 质粒的细胞。经胰酶消化后稀释 ,接种至 96 孔板进行培养 ,每孔 3 ~ 5 个细胞。继续培养 10 d 后 ,挑单克隆细胞至 24 孔板继续培养。

1.2.6 Western blot 检测基因稳定敲除细胞系 当细胞长满 24 孔培养板时 ,取部分细胞用 RIPA 裂解

液提取蛋白 ,每个样取 30 μl 和上样缓冲液混合后金属浴煮沸 10 min 变性 ,制备蛋白样品后进行 SDS-PAGE 电泳 ,电泳结束后将蛋白转至经甲醇浸泡数分钟且适当大小的 PVDF 膜上 ,冰上转膜 1 ~ 2 h 后用 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h。用 β-actin 抗体 (1 : 5 000) 和 GPR41 抗体 (1 : 500) 于 4 °C 冰箱中过夜孵育 ,之后用洗脱液漂洗 3 次 ,再用相应的山羊抗兔或山羊抗鼠的二抗 (1 : 10 000) 孵育 2 h ,洗脱 3 次后用成像系统进行扫描 ,观察 GPR41 蛋白是否表达 ,以判断 *gpr41* 基因是否敲除成功。

2 结果

2.1 gRNA 寡链核苷酸的合成结果 按照 CRISPR/Cas9 靶点设计原则 ,利用在线设计工具设计 3 对 *gpr41* gRNA 上下游引物序列 ,见表 1。

表 1 *gpr41* gRNA 序列

gRNA	正向引物 (5'-3')	反向引物 (3'-5')
1	CACCGTCCCACGGAGAACACCAAC	AAACGTTGGCTTCCTCGTGGGAC
2	CACCGCACCAAGGGCCATCACGTGA	AAACTCAACGTGATGCCCTGGTGC
3	CACCGCTTGCCCCACGAAGACCACCA	AAACTGGTGGCTTCGTGGCAAGC

2.2 pLenticrisprV2 质粒酶切产物琼脂糖凝胶电泳鉴定 利用琼脂糖凝胶电泳的方法检测 pLenticrisprV2 质粒是否被酶切开 ,电泳结果显示 ,对照组仅有一条没有切开的条带 ,而酶切成功的质粒在相应位置出现两条明显的亮条带 ,见图 1。

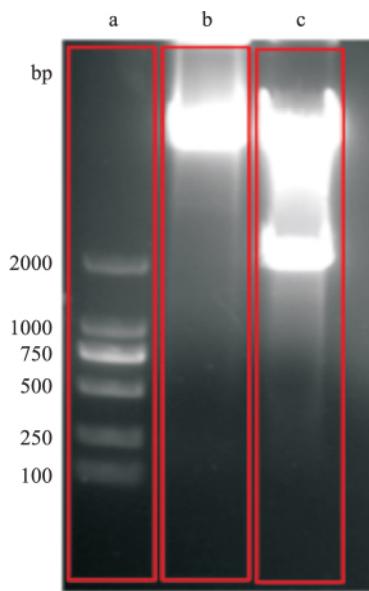


图 1 pLenticrisprV2 质粒酶切图
a: marker; b: 对照组; c: 已酶切 pLenticrisprV2 质粒

2.3 *gpr41* 基因敲除验证 选择野生型细胞系和敲除型细胞系在蛋白水平上检测 GPR41 表达情况。

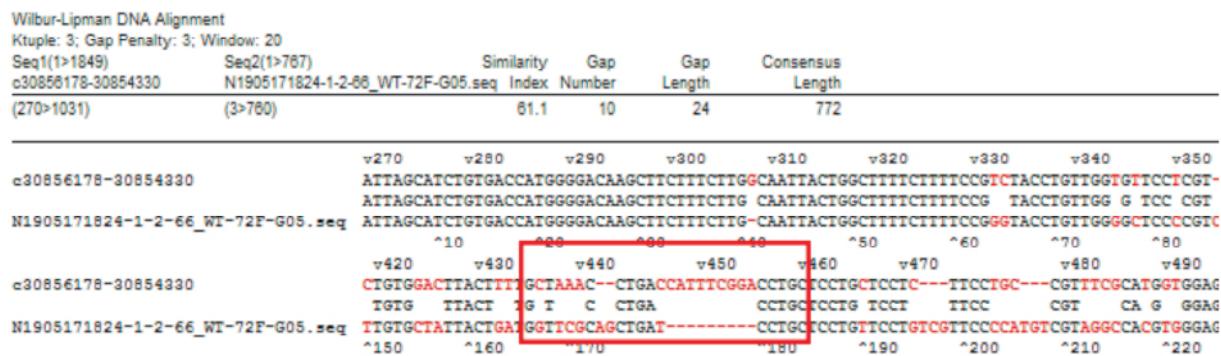
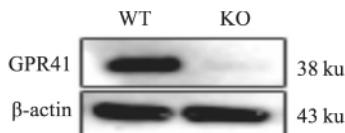


图 3 gpr41 基因敲除 RAW264.7 细胞系的单克隆测序

Western blot 结果显示,野生型细胞中 GPR41 蛋白正常表达,而敲除型细胞中检测不到 GPR41 蛋白的表达(图 2)。

图 2 GPR41 蛋白水平检测
WT: 野生型细胞; KO: 敲除型细胞

2.4 单克隆测序检测 gpr41 基因 将 gpr41 基因中 gRNA 敲除靶点核苷酸序列测序(图 3)。gpr41 基因缺失 9 个碱基,造成 gpr41 基因突变,证明对细胞进行了成功敲除。

3 讨论

巨噬细胞是形成先天免疫系统的骨干,几乎存在于每一个组织中,在维持组织的稳态和协调细胞对组织损伤的反应中起着至关重要的作用^[7-8]。

GPR41 表达于巨噬细胞、T 细胞上,是 SCFAs 的受体蛋白。SCFAs 是肠道微生物群发酵的最终产物,在减轻炎症和改善宿主代谢方面发挥作用,是宿主重要的能量来源。SCFAs 结合并激活 GPR41,抑制 cAMP 的产生和 ERK 的级联激活^[9]。此外,SCFAs 对 T 细胞的直接作用可以在自身免疫性脑炎中促炎,而缺乏 GPR41 的小鼠对自身免疫性脑炎发病机制更具抗性^[10]。可见 短链脂肪酸及其受体对机体具有一定的保护作用。

本实验利用 CRISPR-Cas9 技术,通过慢病毒转染,首先使 RAW264.7 细胞可以稳定表达 Cas9 蛋白。通过凝胶电泳和测序结果可以看到,gRNA 已成功连接到 pLenticrisprV2 载体上,证明已成功构建了 pLenticrisprV2-gpr41-gRNA 载体。通过 Western

blot 及核苷酸测序结果可以看出,经过脂质体转染后,RAW264.7 细胞中 GPR41 蛋白已不再表达,说明 gpr41 基因已经被敲除。GPR41 是将 SCFAs 与巨噬细胞相联系的桥梁之一,但 gpr41 基因在巨噬细胞中的作用机制并不十分明确,且 SCFAs 能否通过 gpr41 调控巨噬细胞相关反应以及 gpr41 基因敲除之后对巨噬细胞系功能的影响均不清楚,仍需进一步的研究探索。采用 CRISPR-Cas9 基因编辑技术成功构建的 gpr41 基因敲除巨噬细胞模型更有利探索以上科学问题。

参考文献

- [1] Mali P, Esvelt K M, Church G M. Cas9 as a versatile tool for engineering biology [J]. Nat Methods, 2013, 10(10): 957-63.
- [2] 薛雅蓉, 庄重, 候冬霞, 等. 巨噬细胞: 一种理想的细胞骨架观察教学材料 [J]. 中国细胞生物学学报, 2019, 41(9): 1793-96.
- [3] Vinolo M A, Rodrigues H G, Hatanaka E, et al. Suppressive effect of short-chain fatty acids on production of proinflammatory mediators by neutrophils [J]. J Nutr Biochem, 2011, 22(9): 849-55.
- [4] Cox M A, Jackson J, Stanton M, et al. Short-chain fatty acids act as antiinflammatory mediators by regulating prostaglandin E(2) and cytokines [J]. World J Gastroenterol, 2009, 15(44): 5549-57.
- [5] Candido E P, Reeves R, Davie J R. Sodium butyrate inhibits histone deacetylation in cultured cells [J]. Cell, 1978, 14(1): 105-13.
- [6] Sealy L, Chalkley R. The effect of sodium butyrate on histone modification [J]. Cell, 1978, 14(1): 115-21.
- [7] Guerriero J L. Macrophages: the road less traveled, changing anti-cancer therapy [J]. Trends Mol Med, 2018, 24(5): 472-89.
- [8] Wood W, Martin P. Macrophage functions in tissue patterning and disease: new insights from the fly [J]. Dev Cell, 2017, 40(3): 221-33.
- [9] Le Poul E, Loison C, Struyf S, et al. Functional characterization

- of human receptors for short chain fatty acids and their role in polymorphonuclear cell activation [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(28):25481–9.
- [10] Park J, Wang Q, Wu Q, et al. Bidirectional regulatory potentials of short-chain fatty acids and their G-protein-coupled receptors in autoimmune neuroinflammation [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1):8837.

Construction of RAW264.7 cell line with *gpr41* gene knockout based on CRISPR-Cas9 technology

Su Cong¹, Xu Fangming², Wu Ting², et al

(¹*Dept of Infectious Diseases, The Chaohu Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 238000;*

²*Dept of Infectious Diseases, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)*

Abstract To construct RAW264.7 cell line with G-protein-coupled receptor 41 (*gpr41*) gene knockout by CRISPR-Cas9 gene editing technique. Lentivirus was used to transfet Cas9 protein into macrophages. gRNA targeting *gpr41* gene was designed to target the functional region of *gpr41* gene, and pLenticrisprV2 recombinant plasmid transformed DH5α competent cells were constructed to screen out recombinant sequencing to verify the effectiveness of gRNA. The plenticrisprV2-*gpr41*-gRNA recombinant plasmid was transfected with the macrophage line RAW264.7 using transfection reagent. The expression of *gpr41* gene was detected by Western blot. Sequencing results confirmed the successful construction of pLenticrisprV2-*gpr41*-gRNA recombinant plasmid. Western blot selection of recombinant plasmid pLenticrisprV2-*gpr41*-gRNA 3 transfected RAW264.7 cell No. 13 monoclonal strain showed no expression of GPR41 protein. CRISPR-Cas9 gene editing technique was used to successfully construct a macrophage line with *gpr41* gene knockout, which laid the foundation for studying the mechanism of *gpr41* gene in RAW264.7 cells.

Key words CRISPR-Cas9 technology; *gpr41*; macrophages; gene knockout

(上接第799页)

children with acute lymphoblastic leukemia(ALL) , and to explore its correlation with the treatment outcome and prognosis for ALL children. **Methods** The SOCS3 mRNA and methylation levels in bone marrow mononuclear cells were detected in 83 cases of newly diagnosed ALL at initial diagnosis , completely remission , relapse and 21 healthy control children through reverse transcription quantitative polymerase chain reaction(qRT-PCR) and methylation-specific PCR , respectively. SPSS 17.0 software was employed for statistical analysis to analyze the relationship between the level of SOCS3 mRNA expression and the methylation level of SOCS3 gene , the relationship between the methylation level of SOCS3 and the treatment outcome of the children with ALL. Meanwhile , The methylation level of SOCS3 gene in children with ALL was classified into high or low level group by the median method. The correlations of SOCS3 methylation status with the cumulative incidence of relapse rate(CIR) and overall survival rate(OS) were compared. **Results** The SOCS3 mRNA expression levels in initial diagnosis group and relapse group were remarkably lower than that in healthy control group($P < 0.05$) . The methylation level of SOCS3 in ALL children was evidently higher than that in healthy control group($P < 0.05$) . The results of 42 months follow-up showed that the CIR in high level group was dramatically higher than that in low level group($P < 0.05$) , but there was no significant difference in the OS between these two groups($P > 0.05$) . **Conclusion** SOCS3 methylation leads to low expression of SOCS3 , and monitoring the SOCS3 methylation level can help to understand the treatment outcome and prognosis for ALL children.

Key words children; acute lymphoblastic leukemia; cytokine signaling 3; methylation; therapeutic response; prognosis