

应用 CRISPR/Cas9 技术构建 IL-15 敲除的 MGC-803 胃癌细胞株

俞 静¹, 孙 丽¹, 孙晓仙¹, 陈志红³, 钱 晖¹, 许文荣^{1,2}, 朱 伟^{1*}

(¹ 江苏大学医学院检验系, 江苏 镇江 212013; ² 江苏大学附属医院检验科, 江苏 镇江 212001; ³ 江苏大学附属人民医院外科, 江苏 镇江 212001)

[摘要] 目的: 运用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术, 建立 IL-15 基因敲除的 MGC-803 胃癌细胞株。方法: 针对 IL-15 基因作用的功能域, 设计了靶向 IL-15 基因 Exon2 的 gRNA。构建 PX458-gRNA 重组质粒并转化感受态细胞 Stbl3, 筛选出重组子后进行测序, 通过测序确认了所设计的 gRNA 的有效性。并进一步通过流式细胞分选以及 ELISA 法检测筛选出的 MGC-803 胃癌细胞株 IL-15 基因的表达水平。结果: 测序结果显示敲除质粒构建成功, 与阴性对照组相比, 转染 PX458-IL-15-gRNA 质粒组 IL-15 的表达水平明显低于阴性对照组, 差异具有统计学意义 ($P < 0.001$)。结论: 利用 CRISPR-Cas9 系统成功构建了 IL-15 基因敲除的 MGC-803 细胞, 为后续研究 IL-15 在肿瘤中的作用机制和功能奠定了基础。

[关键词] IL-15; CRISPR/Cas9 系统; 基因敲除

[中图分类号] R735.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2016)02-140-04

doi: 10.7655/NYDXBNS20160203

Constration of IL-15 knockout MGC-803 cell line by CRISPR/Cas9 technology

Yu Jing¹, Sun Li¹, Sun Xiaoxian¹, Cheng Zhihong³, Qian Hui¹, Xu Wenrong^{1,2}, Zhu Wei^{1*}

(¹Department of Clinical Laboratories, School of Medical Technology, Jiangsu University, Zhenjiang 212013; ²Department of Clinical Laboratories, the Affiliated Hospital of Jiangsu university, Zhenjiang 212001; ³Department of General Surgery, the Affiliated People Hospital of Jiangsu university, Zhenjiang 212001, China)

[Abstract] **Objective:** To construct IL-15 knockout MGC-803 cells by using CRISPR/Cas9 genome engineering technology. **Methods:** Guid RNA was designed by trargeting the second exon of IL-15 gene, which encoded its homeodomains. PX458-gRNA recombinant plasmid was constructed and transformed into competent Stbl3. To confirm the effictiveness of designed gRNA, the recombinan was screened and sequenced. The expression of IL-15 gene of MGC-803 cells sorted through FACS was detected by ELISA, and the cell cycle was detected by FACS. **Results:** Compared with negative control group, the expression of IL-15 transfected with PX458-IL-15-gRNA plasmid was significantly lower ($P < 0.001$). **Conclusion:** The IL-15 konctout gastric cancer cell line (MGC-803 cells) had been successfully constructed by using CRISPR/Cas9 system, which lays the foundation for further study of the mechanism and founction of IL-15 in tumors.

[Key words] IL-15; CRISPR/Cas9 system; gene knockdown

[Acta Univ Med Nanjing, 2016, 36(02): 140-143]

肿瘤的发生发展是缓慢而持续的过程, 由多基因共同参与且涉及多条信号通路。免疫刺激因子 IL-15 是公认的最有前景的肿瘤治疗药物之一, 在临床上可以单独使用或者作为治疗某些转移瘤的辅佐成分^[1]。然而, 在慢性炎症时 IL-15 可能与肿瘤的发生发展有关^[2], IL-15 在肿瘤发生发展过程中的具

体机制仍然需要进一步的研究。CRISPR/Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR-associated 9) 以细菌保护自身不受病毒感染的系统为基础, 在细菌、斑马鱼、小鼠以及人类细胞中都表现出较强的基因组编辑活性^[3-6]。CRISPR/Csa9 具有易于设计、更高的靶向效率以及适用于多种基因组编辑的优点。本研究采用了 CRISPR/Cas9 介导的基因组编辑技术构建了 IL-15 敲除的 MGC-803 细胞株, 为后续进一步研究 IL-15

[基金项目] 国家自然科学基金资助(81472334, 81270214)

*通信作者 (Corresponding author), E-mail: zhuwei@ujs.edu.cn

在胃癌中的作用机制和功能奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

MGC-803 细胞(中科院上海细胞库); 低血清 Opti-MEM 培养基和 DMEM 高糖营养液(Gibco 公司, 美国), 胎牛血清(Excel 公司, 美国); Stb13 感受态细胞(Life Technologies 公司, 美国), PX458 质粒(Addgene 公司, 美国), pGEM-T Easy Vector System (Promega 公司, 美国); AxyPrep 无内毒素质粒中提试剂盒(Axygen 公司, 美国), 转染试剂 Lipofectamine 2000(Life Technologies 公司, 美国), 限制性内切酶 *Bbs* I (Fermentas/Thermo Scientific 公司, 美国), T4 连接酶(New England BioLabs 公司, 美国); 流式分选仪器(BD 公司, 美国), ELISA 试剂盒(AD 公司, 美国); 所有引物和寡核苷酸链均由美国 Invitrogen 公司合成。

1.2 方法

1.2.1 gRNA 的设计和寡核苷酸链合成

针对人 IL-15 作用的功能域, 即第二外显子, 设计 CRISPR/Cas9 作用靶点, 构建 gRNA 的表达质粒。gRNA 序列的设计则参考哈佛大学张峰实验室提供的网站(<http://crispr.mit.edu/>)。针对 gRNA 的设计需要考虑 2 个主要的因素: ① Cas9 5'-NGG PAM; ② 最低的脱靶效率。根据网站所给信息评估序列并挑选出敲减效率高、脱靶可能性低的 gRNA。根据设计出来的 gRNA 序列, 在正义链模板的 5' 添加 CACCG, 反义链模板的 5' 添加 AAAC, 均可与 *Bbs* I 酶切后形成的黏性末端互补, 将 gRNA 的正义链和反义链退火后形成双链 DNA。

1.2.2 载体构建

gRNA 寡核苷酸退火成双链: 取等量的上游链和下游链混合(终浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$)。程序如下: 37 $^{\circ}\text{C}$ 30 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min, 降至 25 $^{\circ}\text{C}$ (-1 $^{\circ}\text{C/s}$), 1:200 稀释。连接体系: *Bbs* I 酶切 PX458 质粒, 稀释后的 gRNA 寡核苷酸双链 1 μL , 10 \times T4 DNA 连接酶缓冲液 1 μL , T4 连接酶 1 μL , 加入 6 μL 双蒸水混匀, 4 $^{\circ}\text{C}$ 连接过夜。连接产物转化感受态细胞 Stb13, 氨苄抗性平板筛选, 挑克隆菌落测序。验证后用无内毒素的质粒中提试剂盒进行质粒提取。

1.2.3 细胞培养和细胞转染

用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基培养胃癌细胞株 MGC-803 细胞, 37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 恒温培养。转染前将 MGC-803 细胞种于 6 孔板中, 待细胞密度达

到 60%~70% 时进行转染, 其中转染试剂为 Lipofectamine 2000, 而质粒终浓度为 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。以等量空白载体 PX458 为阴性对照。过程如下: 预热的 PBS 洗涤, 加 500 μL /孔的 Opti-MEM, 放入培养箱 30 min; 配置溶液 A: 每孔 5 μL Lipofectamine 2000+150 μL Opti-MEM 混匀, 静置 5 min, 溶液 B: 2 μg 质粒+150 μL Opti-MEM 混匀, 将 A 液加到 B 液中, 混匀, 静置 20 min 后加入 6 孔板中各相应组, 放入培养箱 5 h 后换上正常营养液继续培养。

1.2.4 ELISA 法检测

将 PX458-IL-15-gRNA 质粒转染 MGC-803 细胞 48 h 后, 采用流式分选出带有绿色荧光蛋白标记的细胞, 重新接种于细胞培养瓶中并加入链霉素和青霉素进行培养。然后对细胞进行单克隆培养, 待细胞长至 60%~70% 给细胞换液, 收集 48 h 后的上清, 进行 ELISA 检测。严格按试剂盒说明操作。

1.3 统计学方法

采用 GraphPad Prism 5 软件进行统计学分析, 计量数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 采用 *t* 检验分析两样本数据的差异, 以 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 gRNA 寡核苷酸序列

gRNA 序列为 5'-TCCTAAAACAGAAGCCAAC T-3', 其单链 DNA 模板序列见表 1。

表 1 寡核苷酸链合成序列

Table 1 oligos to synthesize

名称	序列(5'→3')
IL-15-gRNA F	CACCGTCCTAAAACAGAAGCCAAC T
IL-15-gRNA R	AAACAGTTGGCTTCTGTTTTAGGAC

2.2 PX458-gRNA 质粒构建测序结果

经测序结果为 5'-CACCGTCCTAAAACAGAA GCCACTGTTTT-3', 插入序列与预期相符, 无碱基突变, 证明敲减质粒构建成功(图 1)。

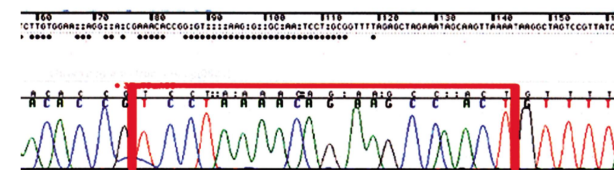


图 1 PX458-IL-15-gRNA2 测序图谱

Figure 1 The sequence of PX458-IL-15-gRNA

2.3 PX458-IL-15-gRNA 质粒转染 MGC-803 细胞

PX458-IL-15-gRNA 质粒转染 MGC-803 细胞 24 h 后拍照检测绿色荧光蛋白的表达水平。其中以空白

载体 PX458 作为阴性对照。转染 PX458-IL-15-gRNA 组有绿色荧光细胞(图 2),表明该质粒已成功转染 MGC-803 细胞。

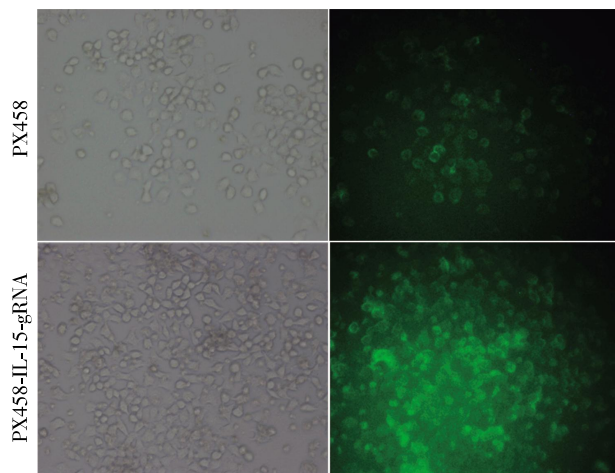


图 2 MGC-803 细胞转染前后荧光镜下观察($\times 100$)

Figure 2 Observation in fluorescence microscope after transfectio($\times 100$)

2.4 流式分选

为了进一步获得高转染效率的细胞,采用流式分选之前阴性对照组和 PX458-IL-15-gRNA 质粒转染组细胞,结果表明分选之后带有绿色荧光蛋白标记的细胞阳性率分别为 94.9%和 95.3%。

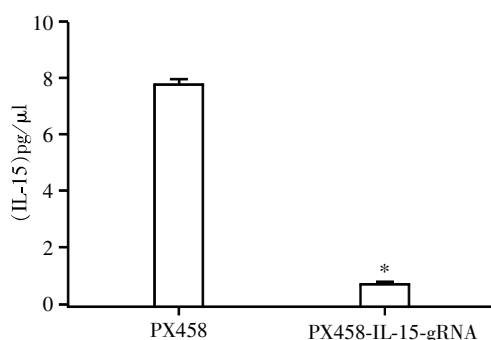
2.5 IL-15 基因敲除细胞株的鉴定

通过 ELISA 试剂盒检测收集阴性对照组和转染 PX458-IL-15-gRNA 质粒组 MGC-803 细胞上清中 IL-15 的表达水平。与阴性对照组相比,转染 PX458-IL-15-gRNA 质粒组的 IL-15 表达水平明显低于阴性对照组,差异具有统计学意义($P < 0.001$,图 3),说明通过 CRISPR/Cas9 系统成功获得了一个稳定敲除 IL-15 的 MGC-803 胃癌细胞株。

3 讨论

IL-15 调节先天性和适应性免疫细胞的发生、存活和增殖,在肿瘤的发生发展中也起着重要作用^[7]。目前已有研究表明,在肾细胞癌模型中,IL-15 能够直接使肿瘤干细胞分化(CSCs)^[8]。此外在 TRAMP-C2 肿瘤模型中,有研究表明用 IL-15 与其他治疗方法共同作用时能够更有效地发挥肿瘤抑制作用^[9]。在乳腺癌中高表达的 IL-15 通过作用于 NK1.1⁺ 细胞能够促进肿瘤的破坏并抑制其转移^[10]。也有文献报道 IL-15 能够发挥促肿瘤的作用^[11-12],但是其作用机制仍不清楚,有待进一步的研究。

CRISPR/Cas9 系统对特定基因组 DNA 序列进



与 PX458 组相比, * $P < 0.001$, $n=3$ 。

图 3 ELISA 法检测 MGC-803 细胞敲除后 IL-15 的表达水平

Figure 3 The expression of IL-15 in MGC-803 cells

行识别并使其双键断裂(DNA doublestranded break DSB),DSB 借助于自身的修复系统来进行修复^[13],如:非同源末端连接(non-homologous end joining, NHEJ)或同源重组(homology directed repair, HDR),最终实现基因的敲除与插入。在本研究中,通过 CRISPR/Cas9 系统获得了基因编辑的 IL-15 敲除的 MGC-803 细胞,包括选择一个靶区域,构建 CRISPE-gRNA,优化转染等。与其他设计的核酸技术相比,比如:锌指核酸内切酶(zinc finger endonuclease, ZFN)^[14]、类转录激活因子效应物核酸酶(transcription activator-like effector nuclease, TALEN)^[15-16],CRISPR/Cas9 对甲基化的敏感性要低于 TALEN 和 ZFN,且更易于操作、成本低、可同时沉默任意数量的单个基因等优点。此外,基因编辑技术的应用所存在的最大问题就是脱靶^[17],在这一方面 CRISPR/Cas9 技术与 TALEN 和 ZFN 技术相比也具有一定的优越性。在 CRISPR/Cas9 系统中,Cas9 蛋白特异性地剪切 DNA 主要通过设计的特异的 gRNA^[18],这种特异性的不同主要来源于 gRNA 本身,目前的挑战主要是预测出具有最小脱靶比率的 gRNA。此外为了提高转染效率,本研究发现 Opti-MEM 可以作为一个有效地转染介质,从而简化转染程序。本研究采用的转染试剂是 Lipofectamine 2000,是一种常用的阳离子脂质体转染试剂,在多种细胞系中能以简单有效的方式实现最佳的核酸导入效果,但是对于不同细胞类型,其转染条件和转染效率不同^[19]。大部分细胞系所使用的 DNA(μg)与 Lipofectamine 2000(μL)的比值为 1:2 到 1:3,转染高密度细胞可以获得高转染效率和高表达水平,由于 Lipofectamine 2000 对细胞具有一定毒性,本研究选用的质粒与 Lipofectamine 2000 的比例($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)为 1:2.5。另外,

Lipofectamine 2000可使目的基因短时间表达,较慢病毒等载体转染相比,它不能让Cas9蛋白长期在细胞内表达,这样可以减少Cas9蛋白的非特异剪切。

CRISPR/Cas9介导的基因组编辑技术一度成为研究热点,它在简易克隆和多重基因组编辑方面有着很大优势,为基因疗法治疗疾病提供了新方法。随着人们对其不断探索和深入研究,CRISPR/Cas9系统一定会在基因研究领域有着更广阔的发展空间。

[参考文献]

- [1] Cheever MA. Twelve immunotherapy drugs that could cure cancers[J]. *Immunol Rev*, 2008, 222: 357-368
- [2] Bahri R, Pateras IS, D'Orlando O, et al. IL-15 suppresses colitis-associated colon carcinogenesis by inducing anti-tumor immunity[J]. *Oncoimmunology*, 2015, 4(9): e1002721
- [3] Wiedenheft B, Sternberg SH, Doudna JA. RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea[J]. *Nature*, 2012, 482(7385): 331-338
- [4] Ramalingam S, Annaluru N, Chandrasegaran S. A CRISPR way to engineer the human genome[J]. *Genome Biol*, 2013, 14(2): 107
- [5] Chang N, Sun C, Gao L, et al. Genome editing with RNA-guided Cas9 nuclease in zebrafish embryos[J]. *Cell Res*, 2013, 23(4): 465-447
- [6] Ma Y, Zhang X, Shen B, et al. Generating rats with conditional alleles using CRISPR /Cas9 [J]. *Cell Res*. 2014, 24(1): 122-125
- [7] Steel JC, Waldmann TA, Morris JC. Interleukin-15 biology and its therapeutic implications in cancer[J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2012, 33(1): 35-41
- [8] Azzi S, Bruno S, Giron-Michel J, et al. Differentiation therapy: targeting human renal cancer stem cells with interleukin 15[J]. *J Natl Cancer Inst*, 2011, 103(24): 1884-1898
- [9] Zhang M, Ju W, Yao Z, et al. Augmented IL-15 α expression by CD40 activation is critical in synergistic CD8⁺ T cell-mediated antitumor activity of anti-CD40 antibody with IL-15 in TRAMP-C2 tumors in mice[J]. *J Immunol*, 2012, 188(12): 6156-6164
- [10] Gillgrass AE, Chew MV, Krneta T, et al. Overexpression of IL-15 promotes tumor destruction via NK1.1⁺ cells in a spontaneous breast cancer model [J]. *BMC Cancer*, 2015, 15: 293
- [11] Hodge DL, Yang J, Buschman MD, et al. Interleukin-15 enhances proteasomal degradation of bid in normal lymphocytes; implications for large granular lymphocyte leukemias[J]. *Cancer Res*, 2009, 69(9): 3986-3994
- [12] Shah MV, Zhang R, Irby R, et al. Molecular profiling of LGL leukemia reveals role of sphingolipid signaling in survival of cytotoxic lymphocytes[J]. *Blood*, 2008, 112: 770-781
- [13] Xu T, Li Y, Van Nostrand JD, et al. Cas9-based tools for targeted genome editing and transcriptional control [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2014, 80(5): 1544-1552
- [14] Sander JD, Dahlborg EJ, Goodwin MJ, et al. Selection-free zinc-finger-nuclease engineering by context-dependent assembly (CoDA) [J]. *Nat Methods*, 2011, 8(1): 67-69
- [15] Sanjana NE, Cong L, Zhou Y, et al. A transcription activator-like effector toolbox for genome engineering[J]. *Nat Protoc*, 2012, 7(1): 171-192
- [16] Voytas DF. Plant genome engineering with sequence-specific nucleases [J]. *Annu Rev Plant Biol*, 2013, 64: 327-350
- [17] Kuscu C, Arslan S, Singh R. et al. Genome-wide analysis reveals characteristics of off-target sites bound by the Cas9 endonuclease [J]. *Nat Biotechnology*, 2014, 32(7): 677-683
- [18] Nishimasu H, Ran FA, Hsu PD, et al. Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA [J]. *Cell*, 2014, 156(5): 935-949
- [19] Karmali PP, Chaudhuri A. Cationic liposomes as non-viral carriers of gene medicines: resolved issues, open questions, and future promise [J]. *Med Res Rev*, 2007, 27(5): 696-722

[收稿日期] 2016-01-03