

· 基础医学 ·

# 利用可诱导表达 Cas9 的 HeLa 细胞系进行顺铂耐药性基因筛选

陈红全<sup>1,2</sup>, 王建瑛<sup>2\*</sup><sup>1</sup>浙江大学医学院附属邵逸夫医院检验科, 浙江 杭州 310016; <sup>2</sup>南京医科大学生殖医学国家重点实验室, 江苏 南京 211166

**[摘要]** 目的: 利用 PiggyBac 转座子系统, 构建可诱导表达 Cas9 的稳定 HeLa 细胞系, 并针对人核受体基因构建 sgRNA 文库, 进行顺铂耐药性基因筛选。方法: 构建 PB-TRE-Cas9-NLS-IRES-hrGFP-Zeo 载体, 与 PB-CAG-rtTA 以及转座酶载体一同电转到 HeLa 细胞中, 通过药筛和挑选单克隆得到稳定细胞系; 构建核受体基因 sgRNA 病毒文库, 并感染可诱导表达 Cas9 的 HeLa 细胞系, 筛选对顺铂具有抵抗性的克隆, 并进行目的基因的测序鉴定。结果: 挑选出可诱导表达 Cas9 的 8E 单克隆细胞株, 在 5 个基因位点上可以进行高效编辑; 感染 sgRNA 文库之后, 挑选顺铂耐药的克隆, 并鉴定出大部分克隆含有 VDR sgRNA, 经测序发现这些克隆中的 VDR 基因发生突变。结论: 利用 PiggyBac 转座子系统, 构建了可诱导表达 Cas9 的稳定 HeLa 细胞系, 利用这个细胞系可以在多位点进行高效基因编辑, 并可用于高通量文库筛选顺铂耐药性基因。

**[关键词]** CRISPR/Cas9; PiggyBac 转座子; 可诱导表达; 文库筛选**[中图分类号]** R730.5**[文献标志码]** A**[文章编号]** 1007-4368(2021)10-1432-09**doi:** 10.7655/NYDXBNS20211002

## Screening of cisplatin resistance genes in HeLa cell line with inducible expression of Cas9

CHEN Hongquan<sup>1,2</sup>, WANG Jianying<sup>2\*</sup><sup>1</sup>Clinical Laboratory, Sir Runrun Shaw Hospital, School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310016; <sup>2</sup>State Key Laboratory of Reproductive Medicine, Nanjing Medical University, Nanjing 211166, China

**[Abstract]** **Objective:** Taking advantage of the PiggyBac transposon system to generate a stable HeLa cell line that can inducibly express Cas9, and to construct a sgRNA library for human nuclear receptor genes to screen for cisplatin resistance genes. **Methods:** PB-TRE-Cas9-NLS-IRES-hrGFP-Zeo vector was constructed and transferred into HeLa cells together with PB-CAG-rtTA and the transposase vectors. Stable cell lines were obtained by drug screening and picking up single clones. Constructed the sgRNA virus library targeting nuclear receptor genes to infect the stable cell line, screened the clones resistant to cisplatin, and carried out the sequencing and identification of the target genes. **Results:** Five gene loci were edited efficiently in the stable cell line. Clones resistant to cisplatin were obtained after infection of sgRNA library, and most clones harbored VDR sgRNA and mutant VDR gene. **Conclusion:** Using PiggyBac transposon system, stable HeLa cell line with inducible expression of Cas9 was successfully constructed. The cell line can be used for efficient gene editing at multiple sites and high-throughput library screening for cisplatin resistance genes.

**[Key words]** CRISPR/Cas9; PiggyBac transposon; inducible expression; library screening

[J Nanjing Med Univ, 2021, 41(10): 1432-1439, 1452]

耐药性仍然是治愈癌症的主要限制因素, 尽管多种化疗药物早期对肿瘤的治疗效果很好, 但随着耐药性的产生, 常导致癌症复发<sup>[1]</sup>, 对肿瘤细胞耐药机制的研究有助于更好地治疗癌症。RNA 干扰技

**[基金项目]** 南京医科大学自然科学基金(NMUB2019033)

\*通信作者 (Corresponding author), E-mail: wangjianying@njmu.edu.cn

术(RNA interference, RNAi)曾被应用于肿瘤细胞耐药基因的筛选, 但由于 RNAi 不能完全抑制基因表达, 而且存在广泛的脱靶效应, 影响对基因功能的判定。CRISPR-Cas9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats/Cas9) 系统具有高效、便捷等诸多优点, 为肿瘤细胞耐药性分子机制的解析提供了强大的工具<sup>[2]</sup>。

CRISPR-Cas系统是细菌和古细菌在长期演化过程中形成的免疫防御系统,用以对抗入侵的病毒及外源核酸<sup>[3]</sup>。目前,对II类CRISPR-Cas系统中来源于酿脓链球菌的 *Streptococcus pyogenes* Cas9(sp-Cas9)研究最为深入,Cas9蛋白作为核酸内切酶,在引导RNA的指导下识别目标DNA序列后激活Cas9蛋白的酶切活性<sup>[4]</sup>。正是由于这种靶向功能,CRISPR/Cas9系统已被广泛应用于多物种的基因编辑、基因调控、定位成像、细胞谱系追踪、高通量文库筛选以及病毒检测等领域<sup>[5]</sup>。目前该系统还存在诸多缺点,如Cas9表达载体过大,不容易被转染进细胞;Cas9载体长时间表达,会增加脱靶的风险<sup>[6]</sup>。因此,有必要构建一个可诱导表达Cas9的稳定细胞系,用以解决低效转染和因Cas9长时间表达而导致高脱靶风险的问题。

慢病毒常被用于稳定细胞系的构建,但是需要包装病毒颗粒,费时费力,并存在感染的风险,本研究利用便捷的PiggyBac转座子系统,成功构建了可诱导表达Cas9的稳定HeLa细胞系,并证明在多个位点可以高效切割基因组;同时,我们针对人核受体基因,设计了对应的sgRNA文库,在这个细胞系上进行了抗癌药物顺铂(Cisplatin)耐药性的筛选,以期为顺铂耐药机制的解析打下基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

HEK293T和HeLa细胞购自美国模式培养物集存库(American Type Culture Collection, ATCC);高糖DMEM(HyClone公司,美国),胎牛血清(FBS)(Gemini公司,美国),青链霉素(Gibco公司,美国);Lipofectamine 2000(Invitrogen公司,美国);强力霉素(Sigma公司,美国);Zeocin(Invitrogen公司,美国);嘌呤霉素(Merck公司,德国);高保真酶PrimeSTAR Max DNA Polymerase(TaKaRa公司,日本);限制性内切酶 *Bsa* I (NEB公司,美国); *Esp3* I (Fermentas公司,立陶宛);多聚赖氨酸(Sigma公司,美国);T7EN1(NEB公司,美国);T载体(TaKaRa公司,日本)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 质粒构建

pST1374-NLS-Flag-Cas9、pST1374-NLS-Flag-Cas9-NLS、pST1374-NLS-Flag-Cas9-NP、pST1374-Cas9-NLS和pST1374-Cas9-SP改自pST1374-NLS-flag-linker-Cas9(Addgene公司,美国)<sup>[7]</sup>。用于构建

针对人RAG1基因的sgRNA表达载体通过寡聚核苷酸(oligo)在体外退火,利用 *Bsa* I 位点插入pGL3-U6-sgRNA-PGK-Puro载体(Addgene公司,美国)<sup>[7]</sup>,所用oligo序列为hRag1-U6-Up: 5'-CCGGTGTCT-GCTTTGATGGACA-3';hRag1-U6-Down: 5'-AAACT-GTCCATCAAAGCAGACA-3'。

用于高通量构建sgRNA的表达载体pGL3-U6-ccdB-PGK-Puro改自pGL3-U6-sgRNA-PGK-Puro载体。以pGL3-U6-sgRNA-PGK-Puro为模板,利用前向特异引物和共用反向引物扩增出19N-sgRNA backbone,通过 *Esp3* I 酶切位点,插入pGL3-U6-ccdB-PGK-Puro载体。用于构建sgRNA文库的慢病毒载体pLKO.1-U6-ccdB-PGK-Puro改自pGL3-U6-ccdB-PGK-Puro。

针对47个核受体基因各设计2条sgRNA(表1)。共用的反向引物为T7 gRNA *Esp3*I Rev: 5'-TTA-CACCGTCTCGTTTATGCCTTCCGGCTCGTATG-3'。

PiggyBac转座子系统由刘澎涛教授惠赠<sup>[8]</sup>。NLS-Flag-Cas9-NLS和Cas9-NLS片段分别来自pST1374-NLS-Flag-Cas9-NLS和pST1374-Cas9-NLS,IRES-hrGFP片段扩增自pShuttle-IRES-hrGFP(Agilent Technologies公司,美国),Sv40 Pro-BleoR-pA片段扩增自pcDNA3.1-Zeo载体,以上片段通过酶切位点克隆至PiggyBac表达载体中,构建PB-TRE-NLS-Flag-Cas9-NLS-IRES-hrGFP-Zeo和PB-TRE-Cas9-NLS-IRES-hrGFP-Zeo载体。

#### 1.2.2 细胞培养和转染

HEK293T和HeLa细胞培养于高糖DMEM,10% FBS,1% 100×青链霉素中。

HEK293T细胞利用Lipofectamine 2000进行转染。在12孔板中,1 μg Cas9各载体和0.5 μg sgRNA载体被共转染到HEK293T中,72 h之后收集细胞用于下游分析。在24孔板中,0.5 μg PB-TRE-NLS-Flag-Cas9-NLS-IRES-hrGFP-Zeo和0.25 μg PB-CAG-rtTA载体被共转染到HEK293T中,24 h之后加入强力霉素(Dox)至2 μg/mL,72 h之后用于表达分析。

HeLa细胞利用电转(BioRad Gene Pulser XL)转染。4 μg PB-TRE-Cas9-NLS-IRES-hrGFP-Zeo、2 μg PB-CAG-rtTA和2 μg转座酶载体被共电转到2×10<sup>6</sup>个HeLa细胞中,48 h之后,加入100 μg/mL Zeocin筛选3代,然后用于单克隆的生长和挑选。对于挑出来的稳定表达可诱导Cas9的细胞株,电转2 μg sgRNA表达载体,24 h后加入Dox(2 μg/mL)和嘌呤霉素(1 μg/mL),72 h后收集细胞并提取DNA。

表1 构建sgRNA表达载体所用引物

Table 1 Sequences of primers for constructing sgRNA expression vectors

名称	序列(5'-3')
01THRA	atgCGTCTCaACCGGAGGTTCTTCTGGATTGTGgttttagagctagaaatagcaag
02THRA	atgCGTCTCaACCGCTGTCATATTTGCAGGAATgttttagagctagaaatagcaag
03THRB	atgCGTCTCaACCGCTGTAAGGCCATTTTCTAAgttttagagctagaaatagcaag
04THRB	atgCGTCTCaACCGAATATTGAGCTAGTCCAAGgttttagagctagaaatagcaag
05PPARa	atgCGTCTCaACCGACCACAGGATAAGTCAACCGgttttagagctagaaatagcaag
06PPARa	atgCGTCTCaACCGACTCCGTAATGATAGCCTGgttttagagctagaaatagcaag
07PPARb	atgCGTCTCaACCGGTGACAAAAGCCACTGCCGTgttttagagctagaaatagcaag
08PPARb	atgCGTCTCaACCGTCACTGTCATCAAGTTCCAgttttagagctagaaatagcaag
09PPARg	atgCGTCTCaACCGCAGCCCTGAAAGATGCGGAgtttagagctagaaatagcaag
10PPARg	atgCGTCTCaACCGGCTCCATAAAGTCACCAAgttttagagctagaaatagcaag
11RARa	atgCGTCTCaACCGCTCTCAGAGCACTCGGGCTgttttagagctagaaatagcaag
12RARa	atgCGTCTCaACCGTATTTGCCAGCTGGCAGAgtttagagctagaaatagcaag
13RARb	atgCGTCTCaACCGTTCCTGAATTTGTCCAGgttttagagctagaaatagcaag
14RARb	atgCGTCTCaACCGATCTTAATAATGCACTTGGgttttagagctagaaatagcaag
15RARg	atgCGTCTCaACCGGGCACCATCTCTCTGAGCgttttagagctagaaatagcaag
16RARg	atgCGTCTCaACCGCAGTACTGGCAGCGATTCCgttttagagctagaaatagcaag
17GR	atgCGTCTCaACCGCTTACATCTGGTCTCATGCgttttagagctagaaatagcaag
18GR	atgCGTCTCaACCGAGCACACCAGGCAGAGTTTgttttagagctagaaatagcaag
19MR	atgCGTCTCaACCGTCAGACATAAATGATCTCAgttttagagctagaaatagcaag
20MR	atgCGTCTCaACCGACACAGAGTTGATTCCAGCgttttagagctagaaatagcaag
21NR1H3	atgCGTCTCaACCGCGCTCCCTTGATGACGCTGgttttagagctagaaatagcaag
22NR1H3	atgCGTCTCaACCGACGCATGTAGGTGTCCATGgttttagagctagaaatagcaag
23NR1H2	atgCGTCTCaACCGTTTCCGAATCTTCTTCTFCgttttagagctagaaatagcaag
24NR1H2	atgCGTCTCaACCGTCTTGAGCCGCTGTTAGCgttttagagctagaaatagcaag
25NR1H4	atgCGTCTCaACCGCGAGTATGGTTCCAATTCCgttttagagctagaaatagcaag
26NR1H4	atgCGTCTCaACCGTTGGAATAATAGGATGACGgttttagagctagaaatagcaag
27HNF4a	atgCGTCTCaACCGCTGTTGGGCGGTTGAGGTgttttagagctagaaatagcaag
28HNF4a	atgCGTCTCaACCGGTTCTTCCGCAGCTCCTCgttttagagctagaaatagcaag
29HNF4g	atgCGTCTCaACCGTGGTATTCATACTTGTCTCgttttagagctagaaatagcaag
30HNF4g	atgCGTCTCaACCGCCATCAAATGTGCTTCTCgttttagagctagaaatagcaag
31VDR	atgCGTCTCaACCGATGCGGCAGTCCCGTTGAgtttagagctagaaatagcaag
32VDR	atgCGTCTCaACCGCAGTGGCGTCCGTTGTCTCgttttagagctagaaatagcaag
33RXRa	atgCGTCTCaACCGATGTCTCGCTGCTGCTGAgtttagagctagaaatagcaag
34RXRa	atgCGTCTCaACCGAAGGAAGCCATGTTTCCTGgttttagagctagaaatagcaag
35RXRb	atgCGTCTCaACCGGAGGAGCTGTCTGGGCTTCgttttagagctagaaatagcaag
36RXRb	atgCGTCTCaACCGGAGGGACTCCCTGGGGAAGgttttagagctagaaatagcaag
37RXRg	atgCGTCTCaACCGACTCGATATGGAGAGCCCAgttttagagctagaaatagcaag
38RXRg	atgCGTCTCaACCGCAACCAAGTTGATTCTTGgttttagagctagaaatagcaag
39NR2C1	atgCGTCTCaACCGTCAAGTGCTGCACAATCgttttagagctagaaatagcaag
40NR2C1	atgCGTCTCaACCGTTGTAAGGAAAACTTTCCgttttagagctagaaatagcaag
41NR2C2	atgCGTCTCaACCGTCAGGATGAACTGTGTTTgttttagagctagaaatagcaag
42NR2C2	atgCGTCTCaACCGAATATGAGTTGCTTGGCGCgttttagagctagaaatagcaag
43PGC	atgCGTCTCaACCGCCAAAACAGGCACCAAGAGCgttttagagctagaaatagcaag
44PGC	atgCGTCTCaACCGCTGTCTCCAACCTTGCACCgttttagagctagaaatagcaag
45AR	atgCGTCTCaACCGTCCCTGGCAGTCTCCAAACgttttagagctagaaatagcaag
46AR	atgCGTCTCaACCGGTGGAAGTAATAGTCAATgttttagagctagaaatagcaag
47NR4A1	atgCGTCTCaACCGGCTGAGGACGAGGATGTGGgttttagagctagaaatagcaag
48NR4A1	atgCGTCTCaACCGTCAGAGCCACTGGAGGACAgtttagagctagaaatagcaag
49NR4A2	atgCGTCTCaACCGGCATTTGGTACAAGCAAGGgttttagagctagaaatagcaag
50NR4A2	atgCGTCTCaACCGCGGCATCATCTCCTCAGACgttttagagctagaaatagcaag
51NR4A3	atgCGTCTCaACCGTGGTGATGGTGTAGGTAGCgttttagagctagaaatagcaag
52NR4A3	atgCGTCTCaACCGGACTGCTTGAAGTACATGGgttttagagctagaaatagcaag
53NR5A1	atgCGTCTCaACCGATCTTGCAGCTCTGGCTCTgttttagagctagaaatagcaag
54NR5A1	atgCGTCTCaACCGCATTTCTGGAAGCGGCAGAgtttagagctagaaatagcaag
55NR5A2	atgCGTCTCaACCGACACTTTATCTCCACACACgttttagagctagaaatagcaag
56NR5A2	atgCGTCTCaACCGCAAACCTTGCAGCTTTCACgttttagagctagaaatagcaag
57GCNF	atgCGTCTCaACCGGTATATATTGGTAATGTGGgttttagagctagaaatagcaag

(续表1)

名称	序列(5'-3')
58GCNF	atgCGTCTCaACCGATCCAGGCTGCGAGCTTGTgttttagagctagaaatagcaag
59NR0B1	atgCGTCTCaACCGCAGCGGTACAGGAGTGCCAgtttagagctagaaatagcaag
60NR0B1	atgCGTCTCaACCGGCCGTGCCTCGGGCGCTGCgttttagagctagaaatagcaag
61NR0B2	atgCGTCTCaACCGCAGCTGCCAGAAGGATGGCgttttagagctagaaatagcaag
62NR0B2	atgCGTCTCaACCGCACCGCAGCCAGGGAGGGCgttttagagctagaaatagcaag
63NR2E1	atgCGTCTCaACCGGCCACTTGTTCGGATGGgttttagagctagaaatagcaag
64NR2E1	atgCGTCTCaACCGCGGTGAAGAAGGCCGGCGCgttttagagctagaaatagcaag
65NR2E3	atgCGTCTCaACCGAGCCACCAGGACTCCGGCgttttagagctagaaatagcaag
66NR2E3	atgCGTCTCaACCGGTTTCAGCTGTATAAAGGCgttttagagctagaaatagcaag
67NR1D1	atgCGTCTCaACCGGAGCCGTCATCACTCAGGCgttttagagctagaaatagcaag
68NR1D1	atgCGTCTCaACCGTCCCATTATAGAAGGAGGgttttagagctagaaatagcaag
69NR1D2	atgCGTCTCaACCGGTCCGAGCTGTTCTTGGGCgttttagagctagaaatagcaag
70NR1D2	atgCGTCTCaACCGGGAATCCGTTCTCTCTgttttagagctagaaatagcaag
71NR2F1	atgCGTCTCaACCGGCCGAACCGGGCGGGCCgttttagagctagaaatagcaag
72NR2F1	atgCGTCTCaACCGTCCGATGGACAGTTCCTGTgttttagagctagaaatagcaag
73NR2F2	atgCGTCTCaACCGCAGGAAATATATCCGGACgttttagagctagaaatagcaag
74NR2F2	atgCGTCTCaACCGCCGAAGCGCGACGTGGGATgttttagagctagaaatagcaag
75NR2F6	atgCGTCTCaACCGAGGAGGCGGCCACGGCACgttttagagctagaaatagcaag
76NR2F6	atgCGTCTCaACCGCGTCCGGCCCGCCGACGGTgttttagagctagaaatagcaag
77RORA	atgCGTCTCaACCGTCAGCGGCTCAGCCTCTCCgttttagagctagaaatagcaag
78RORA	atgCGTCTCaACCGTGAAGTTCCGTCAGCCCGTgttttagagctagaaatagcaag
79RORB	atgCGTCTCaACCGCTTCTGCACCTCAGCATAcgttttagagctagaaatagcaag
80RORB	atgCGTCTCaACCGTTGTAATAACCCTCAGACTgttttagagctagaaatagcaag
81RORg	atgCGTCTCaACCGGCTCCGGCGGAAGAAGCCgttttagagctagaaatagcaag
82RORg	atgCGTCTCaACCGCGCCAGGCATTTTCGAGGgttttagagctagaaatagcaag
83PXR	atgCGTCTCaACCGCATGGTTCAGCTTTCCTTgttttagagctagaaatagcaag
84PXR	atgCGTCTCaACCGACATTGAAGTGATAGCCAGgttttagagctagaaatagcaag
85CAR	atgCGTCTCaACCGCTTTGCTCGCCGAATGCCgttttagagctagaaatagcaag
86CAR	atgCGTCTCaACCGGTGCCCATGTGGCGGGTGTgttttagagctagaaatagcaag
87ERb	atgCGTCTCaACCGGGCTTGTGGTCTGCCGACCgttttagagctagaaatagcaag
88ERb	atgCGTCTCaACCGATGGACCACTAAAGGAGAAgttttagagctagaaatagcaag
89ERRa	atgCGTCTCaACCGTGGCCTGGGAGGCAGCGAGgttttagagctagaaatagcaag
90ERRa	atgCGTCTCaACCGAAGGCTTTGCAGGCCTCACgttttagagctagaaatagcaag
91ERRb	atgCGTCTCaACCGACATGTACTCGCACTTGAgttttagagctagaaatagcaag
92ERRb	atgCGTCTCaACCGCACACGAGGCACAGGCGCTgttttagagctagaaatagcaag
93ERRg	atgCGTCTCaACCGGCATGGCATAGATCTTCTCgttttagagctagaaatagcaag
94ERRg	atgCGTCTCaACCGATAACCACCACTCTCGGTgttttagagctagaaatagcaag

HeLa8E 克隆细胞经扩增后加入 Dox, 以诱导 Cas9 的表达和对目标基因的编辑。分别加入 0.3、0.9、1.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  顺铂处理细胞 48 h, 在对照细胞(未加 Dox)全部死亡之后, 撤掉顺铂。由于 0.3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的顺铂不能使对照细胞全部死亡, 后续实验从 0.9  $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 1.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  两组中挑选单克隆进行。

### 1.2.3 免疫荧光染色

HEK293T 细胞培养在包被了多聚赖氨酸的盖玻片上, 转染 72 h 之后, 细胞直接用于拍照, 或者用 4% 的 PFA (paraformaldehyde) 室温固定 15 min, PBS 洗 2 次, 用含 0.2% Triton 100 的 PBS 处理 5 min 以增加细胞膜的渗透性, 然后用标准羊血清(武汉博士德公司)室温封闭 30 min。用加抗-Flag M2 (Sigma 公司, 美国)的封闭液室温孵育 2 h。PBS 洗 2 次后, 将 cy3-conjugated-goat-抗-mouse IgG (Jackson Immuno-

Research 公司, 美国)二抗和 Hoechst 33258 (Sigma 公司, 美国)加入 PBS, 并室温孵育细胞 1 h, PBS 洗 3 次后用 Vectashield Mounting medium (Vector Laboratories 公司, 日本)进行封片。所有免疫荧光图片用 Olympus Flueview 1000 激光共聚焦显微镜拍摄。

### 1.2.4 T7EN1 切割检测

收集的细胞用裂解液 (10  $\mu\text{mol}/\text{L}$  Tris-HCl, 0.4 mol/L NaCl, 2  $\mu\text{mol}/\text{L}$  EDTA, 1% SDS, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Proteinase K) 在 58  $^{\circ}\text{C}$  水浴锅中消化过夜, 用酚氯仿抽提裂解物, 然后用乙醇沉淀得到 DNA。目的 DNA 片段通过 PCR 从基因组中扩增出, PCR 产物用 PCR cleanup kit (Axygen 公司, 美国)纯化, 吸取 200 ng 纯化后的 PCR 产物, 在 20  $\mu\text{L}$  的 1 $\times$ NEBuffer 2 (NEB 公司, 美国)体系中退火, 退火程序为 95  $^{\circ}\text{C}$  5 min; 95  $^{\circ}\text{C}$ ~85  $^{\circ}\text{C}$ , 每秒降低 1  $^{\circ}\text{C}$ ; 85  $^{\circ}\text{C}$ ~25  $^{\circ}\text{C}$ , 每秒降 0.1  $^{\circ}\text{C}$ ; 4  $^{\circ}\text{C}$

保持。退火后的PCR产物用0.5 μL T7EN1在37℃水浴锅中处理30 min,然后在2.5%的琼脂糖凝胶中电泳。利用Image J软件对凝胶电泳图片进行光密度定量分析,采用之前报道的公式计算切割效率<sup>[9]</sup>,公式如下:切割效率= $\left(1 - \sqrt{1 - \frac{a+b}{a+b+c}}\right) \times 100$ 。a、b代表被切割片段的光密度值,c代表未被切割片段的光密度值,对于需要TA克隆和测序的样品,PCR产物克隆进T载体,挑取阳性克隆用M13-47通用引物测序。

PCR扩增引物hRAG1-For:5'-GTGAAAGCCATCACAGGGAGAC-3',hRAG1-Rev:5'-AGAATGCCTCCCAGCTCAAGC-3',扩增产物大小为623 bp;hERb lib-testF:5'-CTTCCTCTACAACCTGCAGTCAA-3',hERb lib-testR:5'-CGCAATCGTGCCATTATACTCCA-3',扩增产物大小为656 bp;hERRa lib-testF:5'-GCATTGAGCCTCTCTACATCAAG-3',hERRa lib-testR:5'-GGTACCCTGAACTCACTCACATC-3',扩增产物大小为522 bp;hERRb lib-testF:5'-GACTTCCCATTGTGTCCACAG-3',hERRb lib-testR:5'-CTGTCCAGTGCCAGAATGAGAAG-3',扩增产物大小为609 bp;hERRg lib-testF:5'-CACTACAGGACAGACGCTTCATT-3',hERRg lib-testR:5'-CTCGTTAGCTTACTGTCAGTA-3',扩增产物大小为684 bp。

### 1.2.5 顺铂耐药克隆sgRNA序列测定和目标基因验证

顺铂耐药克隆sgRNA序列扩增引物为pGL3 to PLKO Cla1 For:5'-CTCGACGGTATCGATCAGGAC-3',U6 array seq Rev-new:5'-CTGCCATTTGTCTCGAGGTCGAG-3',扩增产物大小为549 bp,利用pGL3 to PLKO Cla1 For引物进行测序。VDR基因编辑位点扩增引物为hVDR lib-testF:5'-GCTGAAGCAGGAGGATTACTTGA-3',hVDR lib-testR:5'-GACACCAACACACAGATCCTCAA-3',扩增产物大小为717 bp,利用hVDR lib-testF引物进行测序。

### 1.3 统计学方法

实验数据利用GraphPad Prism 7.0统计分析,数据以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用单因素方差分析,使用Tukey检验进行两组比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

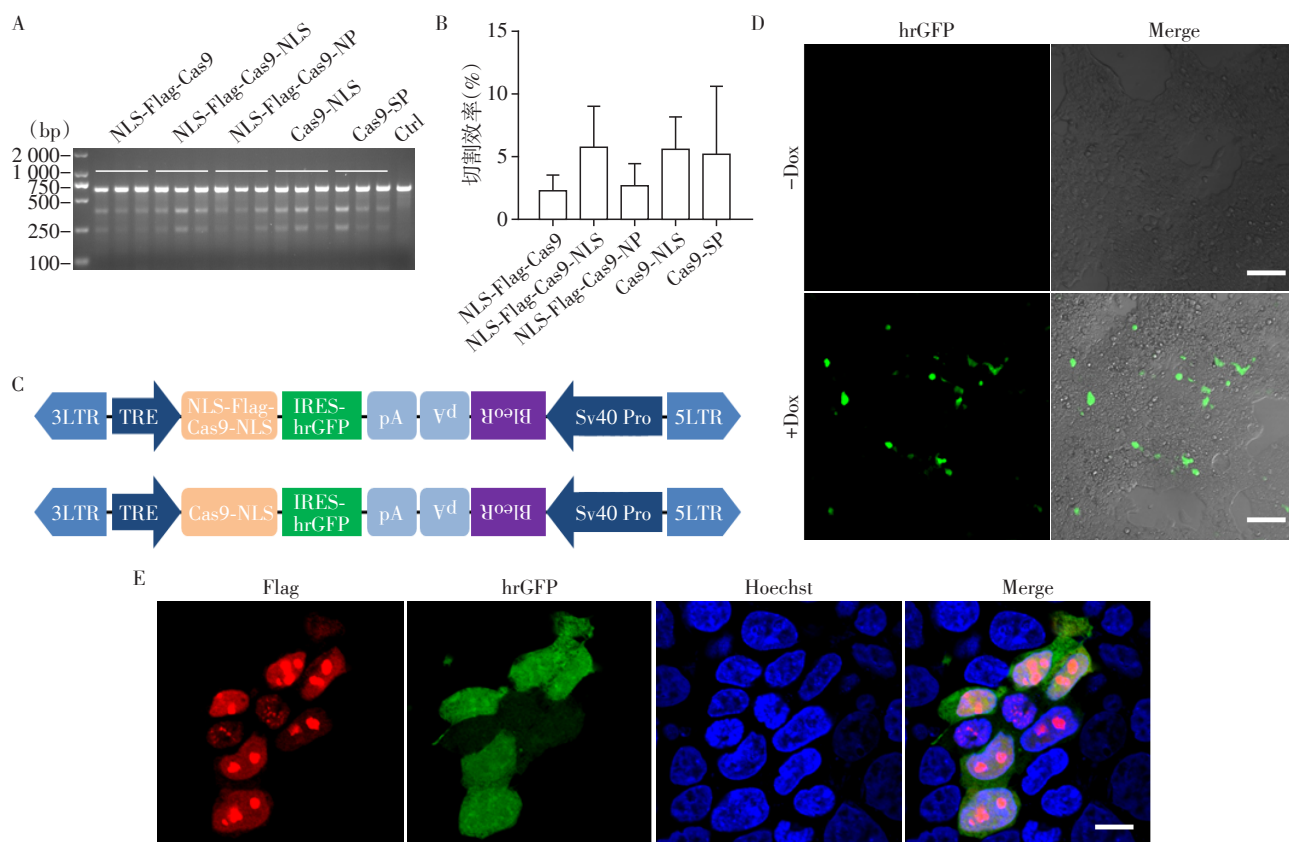
### 2.1 可诱导表达Cas9载体的构建和验证

来自不同实验室的Cas9载体各不相同,有的

NLS放置在Cas9的一端<sup>[10-11]</sup>,有的放置在两端<sup>[9]</sup>,有的利用了不同的NLS序列<sup>[9,11]</sup>,密码子优化的规则也各不相同<sup>[9-12]</sup>。我们将不同版本的Cas9和PGL3-U6-Rag1-sgRNA转染HEK293T细胞,利用T7EN1酶切来检测不同版本Cas9的切割效率。结果显示,NLS-Flag-Cas9-NLS和Cas9-NLS具有相对较高的切割效率,光密度定量分析也得出一致的结果,但不同Cas9版本之间的切割效率差异无统计学意义(图1A、B)。我们选择NLS-Flag-Cas9-NLS和Cas9-NLS这两个版本的Cas9进行PiggyBac转座子载体的构建,通过连接IRES-hrGFP来指示Cas9的表达情况,通过连接BleoR抗性基因,利用Zeocin药筛来获得稳定插入Cas9的细胞(图1C)。在瞬时共转染PB-TRE-NLS-Flag-Cas9-NLS和PB-CAG-rtTA的HEK293T细胞中加入Dox,可以成功诱导hrGFP的表达,而未加入Dox的对照组中未见阳性信号(图1D)。为了进一步检测Cas9是否表达,我们利用anti-Flag抗体进行染色,结果显示GFP阳性的细胞,同时也是Flag阳性的,并且Flag信号定位在细胞核中(图1E),说明Cas9蛋白成功表达和定位。有趣的是,Flag染色结果显示Cas9蛋白在核仁中富集,这和之前报道的现象一致<sup>[7]</sup>,最近的研究表明,Cas9含有核仁定位信号,突变核仁定位信号会导致Cas9蛋白均匀分布在细胞核中,但是其切割效率也会随之降低<sup>[13]</sup>。

### 2.2 可诱导表达Cas9的稳定细胞系的构建和验证

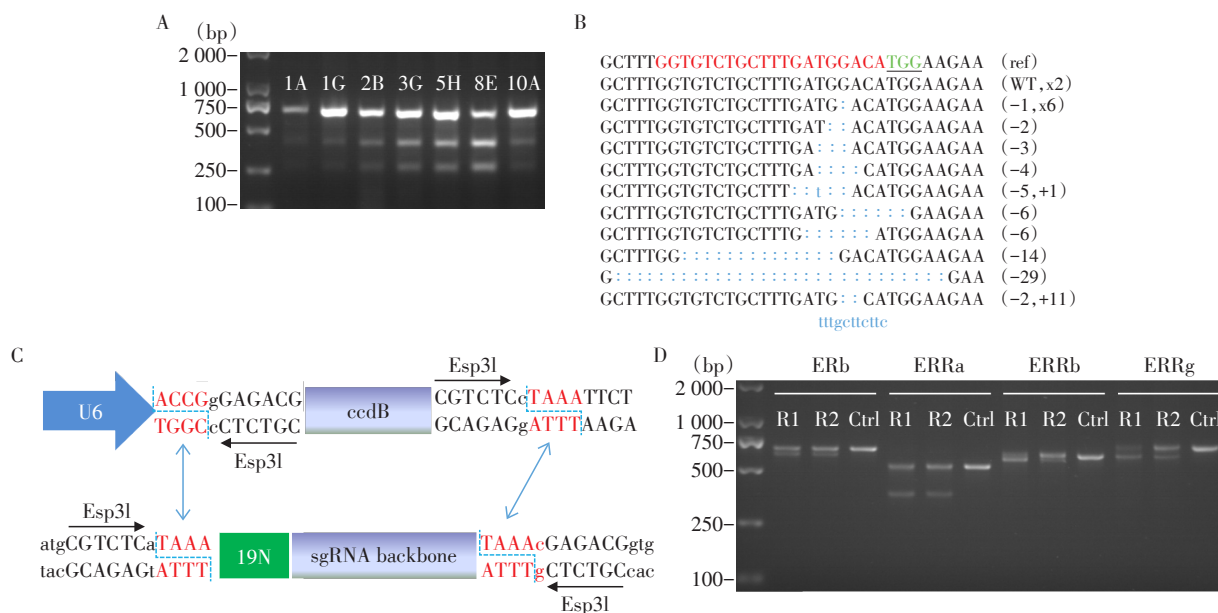
为了提高转座效率,我们使用插入片段较小的PB-TRE-Cas9-NLS-IRES-hrGFP-Zeo载体构建可诱导表达Cas9的稳定细胞系。PiggyBac转座子载体、PB-CAG-rtTA和转座酶载体共电转,加入Zeocin传代3次之后,挑选圆形的单克隆接种到96孔细胞板中继续培养,加入Dox之后,在荧光显微镜下挑选GFP阳性的克隆,共挑出7个GFP信号较强的克隆(1A、1G、2B、3G、5H、8E、10A)继续培养(图2A)。为了挑选效率最高的细胞系,我们在这7个细胞株中电转了PGL3-U6-Rag1-sgRNA,PCR扩增目的片段并进行T7EN1酶切,结果显示8E克隆具有较高的切割效果(图2A)。为了进一步检测切割效率,我们将PCR产物进行了TA克隆并测序,在17个成功测序克隆中检测到15个克隆含有突变,效率高达88.2%(15/17),其中76.5%(13/17)的克隆发生了碱基缺失,11.8%(2/17)的克隆同时发生了缺失和插入(图2B),这些结果说明我们成功构建了可诱导表达Cas9的稳定细胞系。



A: 不同版本Cas9在RAG1基因上的切割效率; B: 对A图的光密度定量分析, 数据以平均值±标准差呈现(n=3), 组间差异无统计学意义; C: 载体构建示意图; D: HEK293T细胞中, 转座子载体在Dox诱导下的GFP表达情况(×200), 标尺: 100 μm; E: PFA固定过的HEK293T细胞中, Cas9和GFP的表达情况(×1 800), 标尺: 10 μm。

图1 可诱导表达Cas9载体的构建和验证

Figure 1 Construction and verification of inducible Cas9 expression vector



A: 7株单克隆细胞在RAG1基因上的切割效率; B: 8E克隆中, RAG1-sgRNA切割效果的TA克隆测序结果。PAM(protospacer adjacent motif)序列用绿色加下划线表示; sgRNA作用靶点用红色表示; 突变处用蓝色加小写字母表示; -代表碱基缺失, +代表碱基插入; ×n代表TA克隆数; C: 高通量构建sgRNA载体示意图, 箭型代表Esp31 I内切酶的识别位点, 蓝色虚线代表内切酶切割位点, 19N代表sgRNA识别位点; D: 针对每个基因设计2条sgRNA, 共同电转8E细胞株, PCR扩增之后可以检测到片段缺失, R1和R2代表重复2次。

图2 可诱导表达Cas9的稳定细胞系的构建和验证

Figure 2 Generation and verification of a stable HeLa cell line with inducible expression of Cas9

为了检测 HeLa 8E 细胞株在其他基因位点的基因编辑效果,我们针对人 ERb、ERRa、ERRb 和 ERRg 4 个基因设计相应的 sgRNA,并检测切割效率。传统的 sgRNA 表达载体构建依赖 oligo 的退火然后连接到载体中,无法进行 sgRNA 表达载体的高通量构建,为了能在 HeLa 8E 细胞上进行高通量筛选,我们将 sgRNA 识别序列设计在前向引物上,以 sgRNA 的骨架为模板,和公共后向引物扩增出携带完整 sgRNA 序列的片段,利用二类限制性内切酶 *Esp3 I* 和 T4 DNA 连接酶,通过边切边连的方式,可以高通量地构建 sgRNA 表达载体(图 2C)。我们利用这种方法一次性构建了 8 条 sgRNA 表达载体,针对每个基因,等质量混合 2 条 sgRNA 载体,并电转 HeLa 8E 细胞系,PCR 扩增结果显示每个基因都出现了明显的片段缺失(图 2D)。以上结果证明我们构建的可诱导表达 Cas9 的稳定细胞系没有编辑位点的偏好性,可以在多个基因位点进行高效基因编辑,为下一步用于高通量 sgRNA 文库筛选打下了很好的基础。

### 2.3 顺铂耐药性核受体基因的筛选

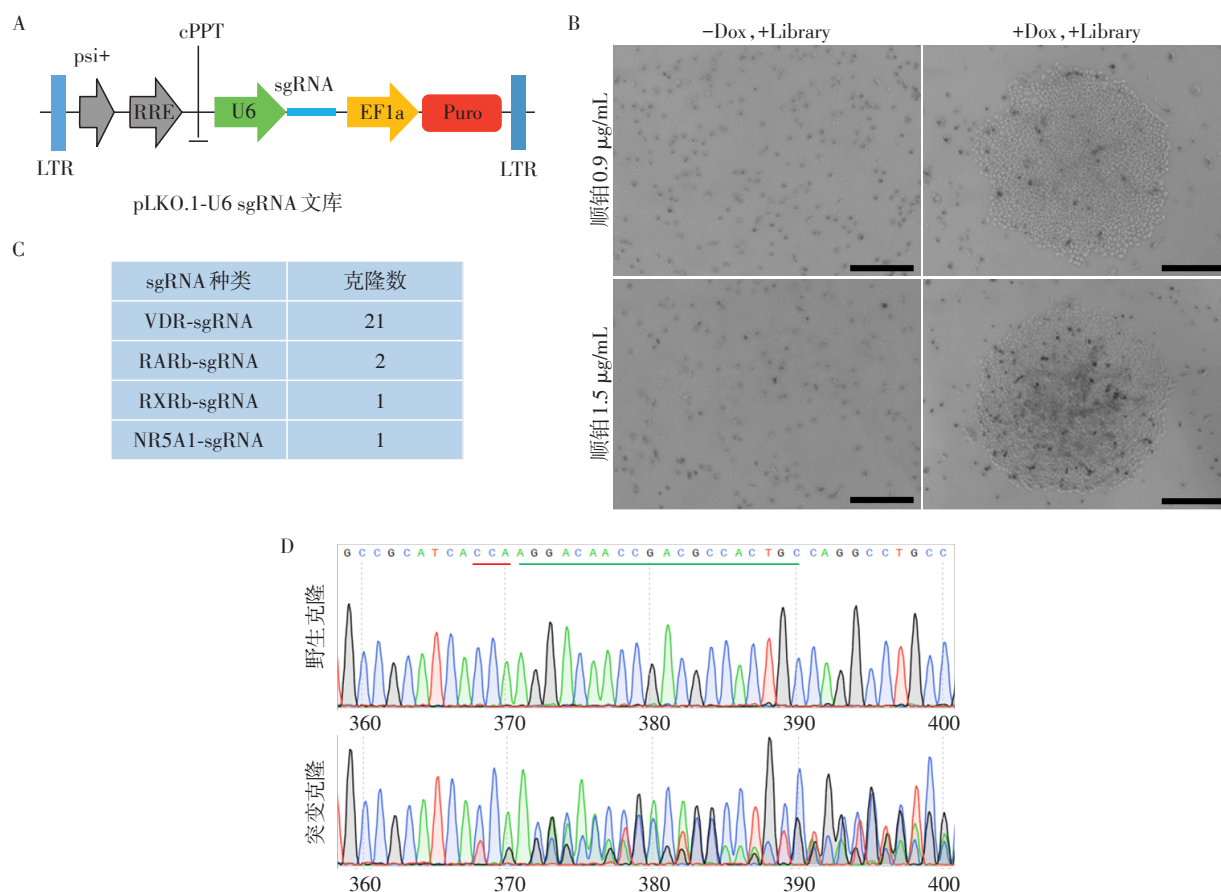
顺铂是一种含铂的抗癌药物,对恶性上皮肿瘤、淋巴瘤等都有治疗功效,长期使用这种药物会导致人体产生耐药性,但是耐药机制仍存在争议<sup>[1]</sup>。核受体超家族是配体激活的转录因子,共含有 48 个基因,在细胞分化、增殖和代谢中发挥不同作用,参与多种癌症的发生、发展<sup>[14]</sup>。核受体是重要的药物靶点,阻断乳腺癌患者雌激素受体(ERa)作用的药物或阻断前列腺癌患者雄激素受体(AR)作用的药物显著改善了患者的生存,但也伴随着严重的药物耐药性<sup>[14]</sup>。为了探究核受体超家族成员是否参与顺铂耐药性的发生,我们针对目前鉴定的 47 个人类核受体基因(由于 HeLa 细胞不表达 ERa<sup>[15]</sup>,所以排除此基因),设计了 94 条 sgRNA,组成了一个小型的 sgRNA 文库(图 3A),包装成病毒颗粒之后感染 HeLa 8E 细胞,利用嘌呤霉素筛选整合进 sgRNA 载体的细胞。在开始顺铂耐药性实验前 48 h,加入 Dox 以诱导 Cas9 的表达和对目标基因的编辑。我们设计了 3 个顺铂浓度梯度,在对照细胞全部死亡之后,撤掉顺铂。从 0.9  $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 1.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  两组中共长出 37 个单克隆(图 3B),挑选每个单克隆并扩增培养,提取基因组 DNA 之后 PCR 扩增包含 sgRNA 的序列,Sanger 测序结果发现 21 个克隆含有维生素 D 受体(vitamin D3 receptor, VDR)sgRNA,2 个克隆含有维甲酸受体 $\beta$ (retinoic acid receptor beta, RARb)sgRNA,含有视黄醇 X 受体(retinoid x receptor beta,

RXRb)和类固醇生成因子-1(nuclear receptor 5A1, NR5A1)sgRNA 各有 1 个克隆(图 3C),剩下 12 个克隆 sgRNA 位点显示乱峰,无法确定具体是哪个 sgRNA。为了进一步验证目标基因是否被编辑,我们对 21 个含有 VDR sgRNA 单克隆的 VDR 区域进行了测序,结果显示 20 个克隆的 sgRNA 识别区域发生了突变(图 3D)。

### 3 讨论

本研究利用 PiggyBac 转座子系统,成功构建了可诱导表达 Cas9 的稳定 HeLa 细胞系,并证明在多个位点可以高效切割基因组。同时,我们针对人核受体基因构建了 sgRNA 文库,在这个细胞系上进行了顺铂耐药性的筛选。之前有研究表明,PiggyBac 转座子在转座酶存在的情况下会发生再转座或者丢失的现象<sup>[16]</sup>,为了防止这种情况的出现,我们转座酶是瞬时表达的,不会持续性存在;同时,在培养 HeLa 8E 细胞株的过程中,也会定期加上 Zeocin 进行药筛,以排除 Cas9 丢失和被沉默的可能。除了通过诱导控制 Cas9 的表达,Cas9 切口酶/双 sgRNA<sup>[7]</sup>、截短 sgRNA<sup>[17]</sup>、高保真 Cas9 突变体<sup>[18-23]</sup>等策略也用于降低 CRISPR/Cas9 的脱靶效应。另外,多个比 sp-Cas9 小的同系物如 saCas9<sup>[24]</sup>、Cpf1<sup>[25]</sup>等也被发现,一定程度上解决了转导效率低的问题。关于 Cas9 在核仁中富集,之前的研究表明,一旦表达 sgRNA,Cas9 会均匀分布在细胞核中<sup>[7]</sup>,这种现象是很难用 Cas9 含有核仁定位信号来解释的<sup>[13]</sup>,可能是由于 Cas9/sgrNA 复合体的溶解性更好,亦有可能是其他机制导致,值得进一步的研究。

之前有文章报道核受体基因 ERb 的激动剂可以调节胶质母细胞瘤细胞对顺铂的敏感性<sup>[14]</sup>,鼓励我们去探究核受体超家族成员与顺铂耐药性的关系。在筛选的过程中,由于含有 RARb、RXRb 和 NR5A1 sgRNA 的克隆较少,我们没有进一步去验证对应的基因是否被编辑,以及有 12 个克隆含有多个 sgRNA,也没有进一步去验证具体是哪些基因被编辑,这些都值得继续探索。20 个含有 VDR sgRNA 克隆的测序结果显示,所有单克隆都携带相同的突变,提示这 20 个单克隆可能来源于同一个细胞,之前有文章报道维生素 D3 及其受体 VDR 调控机体的钙磷代谢稳态,对多种肿瘤细胞的增殖有抑制作用。因此,突变 VDR 可能会使 HeLa 8E 细胞的增殖加快,导致长出的克隆大部分含有 VDR 突变,当然,这也可能是顺铂耐药性发生的原因,需要进一步通



A: 慢病毒 sgRNA 文库示意图; B: Dox 诱导后, 感染 sgRNA 文库的细胞会有抵抗顺铂的单克隆长出, 未加 Dox 诱导的组无细胞存活( $\times 50$ ), 标尺:  $500 \mu\text{m}$ ; C: 单克隆细胞经测序鉴定出 sgRNA 序列; D: 对含有 VDR-sgRNA 的克隆进行目标基因的测序鉴定。sgRNA 识别位点绿色下划线标记, PAM 序列红色下划线标记。

图3 顺铂耐药性核受体基因的筛选

Figure 3 Screening of cisplatin-resistant nuclear receptor genes

过直接敲除或者过表达 VDR 进行正反验证, 具体的机制也值得我们深入去解析。

[参考文献]

- [1] VASAN N, BASELGA J, HYMAN D M. A view on drug resistance in cancer[J]. *Nature*, 2019, 575(7782): 299-309
- [2] SHALEM O, SANJANA N E, HARTENIAN E, et al. Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells[J]. *Science*, 2014, 343(6166): 84-87
- [3] MARRAFFINI L A, SONTHEIMER E J. CRISPR interference: RNA-directed adaptive immunity in bacteria and archaea[J]. *Nat Rev Genet*, 2010, 11(3): 181-190
- [4] JINEK M, CHYLINSKI K, FONFARA I, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity[J]. *Science*, 2012, 337(696): 816-821
- [5] GJ K, DOUDNA J A. CRISPR-Cas guides the future of genetic engineering[J]. *Science*, 2018, 361(645): 866-869
- [6] KIM S, KIM D, CHO S W, et al. Highly efficient RNA-guided genome editing in human cells via delivery of purified Cas9 ribonucleoproteins[J]. *Genome Res*, 2014, 24(6): 1012-1019
- [7] SHEN B, ZHANG W, ZHANG J, et al. Efficient genome modification by CRISPR-Cas9 nickase with minimal off-target effects[J]. *Nat Methods*, 2014, 11(4): 399-402
- [8] WANG W, YANG J, LIU H, et al. Rapid and efficient reprogramming of somatic cells to induced pluripotent stem cells by retinoic acid receptor gamma and liver receptor homolog 1[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108(45): 18283-18288
- [9] CONG L, RAN F A, COX D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems[J]. *Science*, 2013, 339(6121): 819-823
- [10] SHEN B, ZHANG J, WU H, et al. Generation of gene-modified mice via Cas9/RNA-mediated gene targeting[J]. *Cell Res*, 2013, 23(5): 720-723

(下转第 1452 页)

- [15] CHEN Q Q, ZHANG C, QIN M Q, et al. Inositol-requiring enzyme 1 alpha endoribonuclease specific inhibitor STF-083010 alleviates carbon tetrachloride induced liver injury and liver fibrosis in mice [J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9:1344
- [16] ZHAN F, ZHAO G, LI X, et al. Inositol-requiring enzyme 1 alpha endoribonuclease specific inhibitor STF-083010 protects the liver from thioacetamide - induced oxidative stress, inflammation and injury by triggering hepatocyte autophagy [J]. *Int Immunopharmacol*, 2019, 73:261-269
- [17] 徐璐, 刘雷, 张昆, 等. STF083010对大鼠肾脏缺血再灌注损伤的肾保护作用 [J]. *中华实用诊断与治疗杂志*, 2017, 31(10):955-959
- [收稿日期] 2021-02-24

(上接第1439页)

- [11] HWANG W Y, FU Y, REYON D, et al. Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system [J]. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(3):227-229
- [12] MALI P, YANG L H, ESVELT K M, et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9 [J]. *Science*, 2013, 339(6121):823-826
- [13] TAN R, DU W, LIU Y, et al. Nucleolus localization of spy-Cas9 affects its stability and interferes with host protein translation in mammalian cells [J]. *Genes Dis*, 2020, doi: 10.1016/j.gendis.2020.09.003
- [14] ZHAO L, ZHOU S, GUSTAFSSON J. Nuclear receptors: recent drug discovery for cancer therapies [J]. *Endocr Rev*, 2019, 40(5):1207-1249
- [15] MARINO M, DISTEFANO E, TRENALANCE A, et al. Estradiol-induced IP(3) mediates the estrogen receptor activity expressed in human cells [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2001, 182(1):19-26
- [16] YUSA K, RAD R, TAKEDA J, et al. Generation of transgene-free induced pluripotent mouse stem cells by the piggyBac transposon [J]. *Nat Methods*, 2009, 6(5):363-369
- [17] FU Y F, SANDER J D, REYON D, et al. Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs [J]. *Nat Biotechnol*, 2014, 32(3):279-284
- [18] SCHMID-BURGK J L, GAO L, LI D, et al. Highly parallel profiling of Cas9 variant specificity [J]. *Mol Cell*, 2020, 78(4):794-800
- [19] SLAYMAKER I M, GAO L, ZETSCHKE B, et al. Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity [J]. *Science*, 2016, 351(6268):84-88
- [20] KLEINSTIVER B P, PATTANAYAK V, PREW M S, et al. High-fidelity CRISPR-Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects [J]. *Nature*, 2016, 529(7587):490-495
- [21] CHEN J S, DAGDAS Y S, KLEINSTIVER B P, et al. Enhanced proofreading governs CRISPR-Cas9 targeting accuracy [J]. *Nature*, 2017, 550(7676):407-410
- [22] HU J H, MILLER S M, GEURTS M H, et al. Evolved Cas9 variants with broad PAM compatibility and high DNA specificity [J]. *Nature*, 2018, 556(7699):57-63
- [23] LEE J K, JEONG E, LEE J, et al. Directed evolution of CRISPR-Cas9 to increase its specificity [J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1):3048
- [24] RAN F A, CONG L, YAN W X, et al. *In vivo* genome editing using *Staphylococcus aureus* Cas9 [J]. *Nature*, 2015, 520(7546):186-191
- [25] ZETSCHKE B, GOOTENBERG J S, ABUDAYYEH O O, et al. Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system [J]. *Cell*, 2015, 163(3):759-771
- [收稿日期] 2020-11-13