



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111254161 A

(43)申请公布日 2020.06.09

(21)申请号 201811448435.7

(22)申请日 2018.11.30

(71)申请人 中国科学院大连化学物理研究所
地址 116023 辽宁省大连市沙河口区中山
路457-41号

(72)发明人 朴海龙 李同明

(74)专利代理机构 沈阳科苑专利商标代理有限
公司 21002

代理人 马驰

(51) Int. Cl.

C12N 15/867(2006.01)

C12N 15/90(2006.01)

C12N 5/10(2006.01)

权利要求书1页 说明书10页 附图2页

(54)发明名称

一种建立基于CRISPR的基因敲减肺癌细胞株的方法及细胞株

(57)摘要

本发明公开了一种肺癌细胞株的基因编辑方法。本发明基于CRISPR/Cas 9技术进行改良,通过构建表达效率更佳的重组质粒,建立一种稳定敲减肺癌基因细胞株的方法。所需shRNA通过引物合成的方式可以保证精准获得,退火后作为插入片段装入改造过的CRISPR载体中,构建成用于敲减的shRNA重组质粒。经包装慢病毒后与肺癌细胞共孵育,通过慢病毒介导将shRNA导入肺癌细胞中,对基因编辑后的肺癌细胞进行嘌呤霉素(Puromycin)抗性筛选同时进行单克隆化培养,最终获得基因敲减阳性的稳定肺癌细胞株。本方法为研究基因在肺癌发生发展中的分子机理提供了新的实验材料,对肺癌的相关建模提供参考。

1. 一种建立基于CRISPR的基因敲减肺癌细胞株的方法,其特征在于:以肺癌细胞作为靶细胞,利用慢病毒介导shRNA实现编辑肺癌细胞基因的目的,包括以下步骤:

1) shRNA的设计及选取:确定物种(如人或鼠)及要编辑的目标基因序列,对基因序列的结构进行解析,找到基因起始密码子处的序列或剪接体共有的外显子区域为靶位点,选取靶位点序列设计shRNA,或根据shRNA在线设计软件选取shRNA,或也可以参考现有技术中(已发表论文中)验证过的有效shRNA序列;

2) shRNA的制备及重组慢病毒质粒的构建:将两条短反向重复序列即shRNA序列按镜像方向排列,中间用茎环(loop)序列间隔,作为插入片段克隆至用BmsbI酶切好的去掉Cas9序列的LentiCRISPR V2载体中,获得重组shRNA质粒;

3) 对阳性重组质粒进行测序鉴定:将所得重组质粒转化到感受态Stb13菌株中,过夜培养,挑取单菌落,氨苄青霉素抗性LB培养基摇12-16小时;提取质粒,用BsmBI(或同工酶ESP3I酶)酶切鉴定,切下小于2000bp的片段表示有目的片段插入,后续将质粒用引物对:Lenti V2 5:CTTGGGTAGTTTGCAGTTTTA和Lenti V2 3:CTCCTTTCAAGACCTAGCTAG利用PCR扩增,再次扩增获得小于2000bp的条带,该PCR产物样品可以测序确认shRNA的序列(测序引物建议使用Lenti V2 3),测序序列中必须找到目的shRNA序列及茎环(loop)序列;测序正确的重组质粒可用于后续病毒包装;

4) 病毒包装:包装质粒PVSVG:PSPAX2:重组质粒=1:9:10的质量比例包装慢病毒;48-72小时收集病毒培养体系上清液;

5) 转染靶细胞:提前24-48小时将靶细胞根据需要铺板,将48-72小时收集到的含病毒培养液,用0.45微米的滤器过滤加入培养的靶细胞中,以8-10微升聚凝胺(polybrene)每10ml培养基的比例加入培养皿,继续培养24-48小时后,胰酶消化细胞后将细胞重新接种于新的培养皿中,依靶细胞种类加入2-10微克每毫升的嘌呤霉素进行阳性细胞株预筛选3-7天;

6) 细胞的单克隆化培养:将预筛选3-7天的细胞用胰酶消化后,以每孔1-2个细胞的密度重稀释后均匀接种至96孔板,培养至显微镜镜检能观察到细胞单克隆。

2. 按照权利要求1所述的方法,其特征在于:

基因敲减成功的阳性肺癌细胞株的鉴定:96孔板嘌呤霉素药筛预筛选3-7天后的细胞,获得细胞单克隆;将细胞单克隆用胰酶消化后依次经历24孔板、12孔板和6孔板,扩大培养。选取一部分细胞提取基因组DNA,用检测引物通过PCR检测该基因是否敲减成功,找到敲减成功的阳性克隆,分别采用1)对PCR片段测序,一代测序鉴定敲减掉的序列,并且2) Western Blot,鉴定阳性细胞基因组中基因的敲减效果以及靶蛋白表达量的降低,证明基因敲减的肺癌细胞株构建成功,最终获得敲减成功的细胞株。

3. 一种权利要求1或2所述构建方法获得的高效敲减基因的肺癌细胞株。

一种建立基于CRISPR的基因敲减肺癌细胞株的方法及细胞株

技术领域

[0001] 本发明涉及肺癌研究领域中的肿瘤细胞基因编辑范畴,具体来说,本发明涉及一种肺癌细胞株的基因编辑方法。

背景技术

[0002] 肺癌连续十年位居中国恶性肿瘤死亡率和发病率的榜首,俨然成为我国“第一癌”。在全世界范围内,肺癌的发病率也呈现持续上升趋势,吸烟、汽车尾气、空气污染、厨房油烟、职业粉尘等,共同促使肺癌成为“第一癌”。肺癌是一种基因异常疾病,在癌细胞中形成了数百或数千的突变,了解基因突变致癌的机理以及调控肺癌发生发展过程的重要基因功能,是肺癌研究的一个重大挑战。通常需要建立细胞模型将目标基因的表达做干扰处理,体外探讨相关基因干扰表达后的变化,从而了解该基因的功能。基因干扰和基因敲减均为研究基因生物学功能的重要技术,两者各有所长。

[0003] shRNA是short hairpin RNA的缩写,即“短发夹RNA”,是一段具有紧密发夹环的RNA序列。克隆到shRNA表达载体中的shRNA包括两个短反向重复序列,中间由一茎环(loop)序列分隔的,组成发夹结构,由pol III启动子调控。随后再连上5-6个T作为RNA聚合酶III的转录终止子。在细胞中,shRNA被加工成siRNA,发挥抑制特异mRNA表达的作用,这种装载了shRNA的载体可以通过筛选,稳定传递到子代细胞中去。载体介导shRNA表达技术能长期和稳定地抑制靶基因的表达,因此可用来构建理想的实验细胞模型,与化学合成siRNA法相比具有更大的应用潜力,因此shRNA表达载体技术成为肿瘤基因研究和治疗的强大工具。

[0004] 然而,现有的shRNA表达技术用于基因敲减存在shRNA表达效率较低的问题,由于发夹结构的特异性,不同发夹结构会使其表达效率存在很大差异,发夹结构在测序时有很大影响,制备的重组质粒较难通过测序检测序列的正确性,故多不利于实验室自行制备。

[0005] 本发明基于CRISPR/Cas 9技术进行改良,通过构建表达效率更佳的重组质粒,建立一种稳定敲减肺癌基因细胞株的方法。所需shRNA通过引物合成的方式可以保证精准获得,退火后作为插入片段装入改造过的CRISPR载体中,构建成用于敲减的shRNA重组质粒。本方法为研究基因在肺癌发生发展中的分子机理提供了新的实验材料,对肺癌的相关建模提供参考。

发明内容

[0006] 本发明的目的是建立一种基因敲减肺癌细胞株的构建方法,基因敲减肺癌细胞株可作为细胞模型,用于研究基因对肺癌的发生发展的调控机制。

[0007] 本发明通过基于CRISPR的骨架质粒去掉Cas9基因后作为母体载体构建shRNA重组质粒,能高效获得基因敲减的稳定肺癌细胞株。本发明的实验靶细胞适用于全部肺癌细胞株快速建立靶基因敲减的细胞株。由于是基于CRISPR V2质粒为骨架,将所需shRNA通过引物合成的方式获取,可以保证其精准性,引物退火后作为插入片段装入改造过的CRISPR载体中,构建成用于敲减的shRNA重组质粒。与传统用于基因敲减的质粒相比,传统方式存在

shRNA表达效率较低的问题,且多不利于实验室自行制备。因此本发明在敲减质粒构建时具有简便高效及可操作性好的优势。

[0008] 本发明提供了一种基因敲减肺癌细胞株的构建方法,包括如下步骤:

[0009] (1) CRISPR V2载体的改造。依据CRISPR V2空载体的序列,找到Cas9基因序列,在其上下游分别找到只有一个切点的一对限制性内切酶依次是XbaI和BamHI。用这对限制性内切酶切CRISPR V2空载体,去掉一个4.2KB片段(Cas9基因片段),剩余骨架胶回收备用。

[0010] 酶切体系是:总体积30ul,

10×FastDigest Buffer 3ul;

XbaI, 1ul;

[0011] BamHI, 1ul;

CRISPR V2 plasmid, 5ug;

ddH₂O to 30ul

[0012] 37℃酶切30min。

[0013] (2) 将上述线性骨架用T₄DNA Polymerase末端修补,修补体系如下:

[0014] 总体积30ul,

10×NEB Fast ligation Buffer 3ul;

dNTP, 2ul;

[0015] T₄ DNA Polymerase, 1ul;

CRISPR V2 plasmid (without Cas9), 24ul;

BSA standard solution 1ul。

[0016] 12℃连接30min。

[0017] (3) 将T₄DNA Polymerase末端修补后的CRISPR (without Cas9) 空骨架胶回收后自连。

[0018] 自连体系如下:

[0019] 总体积10ul,

[0020] 10×NEB Fast ligation Buffer 1ul;

[0021] CRISPR (without Cas9) 末端修补产物, 8ul;

[0022] T₄DNA Ligase, 1ul。

[0023] 25℃连接1.5h。

[0024] 获得改造后的CRISPR空骨架质粒。将该骨架转化至Stb13感受态中扩增质粒。

[0025] (4) 改造的CRISPR (without Cas9) 空骨架线性化:

[0026] 用BsmBI酶切CRISPR (without Cas9) 空骨架质粒,去掉2KB左右的插入序列。

[0027] (5) CRISPR (without Cas9) 质粒的酶切鉴定。提取CRISPR (without Cas9) 质粒,用BsmBI酶酶切鉴定质粒的正确性。重组质粒酶切后无2KB左右的序列片段。

[0028] (6) shRNA插入片段的合成:分为两条反向互补引物Sense和Antisense,

[0029] Sense序列:

[0030] CACCGAAACTGAAGTAGAACGGGTTGGTGAAGCCACAGATGCAACCCGTTCTACTTCAGTTTTTTTTT

[0031] Antisense序列:

[0032] AAACAAAAAAAAAACTGAAGTAGAACGGGTTGCATCTGTGGCTTCACCAACCCGTTCTACTTCAGTTTC

[0033] 其中,红色 (Sense序列开始的CACCG;Antisense序列开始的AAAC,结尾的C) 标记接头序列,连接于载体上。蓝色 (中间带灰度的,Sense序列的GTGAAGCCACAGATG;Antisense序列的CATCTGTGGCTTCAC) 表示“Loop”序列,每条序列中的两条19-21nt的序列是shRNA的短反向重复序列。

[0034] (7) 将Sense和Antisense序列退火,10ul体系为:

Sense (100 uM), 1 ul

Antisense (100 uM), 1 ul

[0035]

10X T4 Ligation Buffer (NEB), 1 ul

ddH₂O, 6.5 ul

[0036] T4 PNK (NEB M0201S), 0.5 ul

[0037] 退火程序:

[0038] 37°C 30min, 95°C 5min, 95°C 至 25°C 梯度降温,每分钟降温5°C。

[0039] (8) 重组质粒的获得:将步骤(4)的线性化CRISPR(without Cas9)空骨架与稀释100倍的步骤(7)退火后的shRNA片段做连接,连接体系为11微升:

BsmBI digested CRISPR (without Cas9) plasmid, 2 ul;

退火后的 shRNA 片段, 3 ul;

[0040]

2X Quick Ligase Buffer (NEB), 5 ul ;

Quick Ligase (NEB M2200S), 1 ul 。

[0041] (9) 将步骤(8)的重组质粒按1:10的比例转化至Stb13感受态中涂布转化后的菌液于氨苄青霉素抗性的LB固体培养皿中,37°C培养16h;次日挑取直径较大的单菌落,用1.5ml离心管震荡培养5h后,进行菌液PCR鉴定,将阳性菌用15ml离心管扩大培养,离心收集菌体,提取重组质粒,酶切质粒进行第二次鉴定。对鉴定阳性的质粒,采用自行设计的检测引物LV2-3进行一代测序,需在测序结果中存在设计的shRNA序列。测序引物LV2-3序列为:5'-CTCCTTTCAAGACCTAGCTAGC-3'。

[0042] (10) 细胞转染前24-48h,在100mm培养皿中接种1-10×10⁵个每毫升HEK293T细胞,待次日细胞汇合度达到50-70%用于转染。

[0043] (11) 细胞转染实验。采用包装慢病毒侵染的方法,将步骤(9)获得的阳性重组质粒与病毒包装质粒pVSVG及PSPA×2按照10:1:9的质量比例混合(总质量4-8μg),添加到500μl Opti-MEM基本培养基或无双抗无血清的DMEM培养基中,再按1:4(质粒质量:转染试剂)的比例加入转染试剂,混匀、室温静置30min;同时,将HEK293T细胞除去旧培养基,用5ml 1×PBS轻柔清洗1次,添加无双抗、无血清的DMEM培养基2-3ml,再将上述转染试剂及质粒的孵育液,逐滴添加到HEK293T细胞中,放入37°C 5%CO₂的培养箱中培养;3-6h后取出培养皿,补加8-10ml含1%双抗和10%血清的DMEM培养基,放入培养箱中继续培养。

[0044] (12) 培养48-72h,收集含有病毒的培养基,使用0.45μm无菌滤膜过滤培养基,获得的滤液即为病毒液。该病毒液可以直接使用或浓缩后使用,也可放置-80°C长期保存。

[0045] (13) 病毒侵染实验前24-48h,在60mm培养皿中接种肺癌细胞,接种量为 $6-10 \times 10^5$ 个细胞每毫升,次日细胞汇合度约50-70%。

[0046] (14) 病毒侵染。取出肺癌细胞培养皿,去除细胞培养基,更换为3ml含1%双抗和10%血清的DMEM培养基,将步骤(12)中获得的病毒液添加到上述肺癌细胞培养皿中,每皿添加4ml,加入6-10 μ l聚凝胺(polybrene),在37 $^{\circ}$ C、5%CO₂培养箱中继续培养24h。

[0047] (15) 次日从培养箱中取出上述培养皿,除去含有病毒的培养基,换用10ml含1%双抗和10%血清的DMEM培养基继续培养。

[0048] (16) 培养24-48h以后,在显微镜下可见细胞生长较为密集。用0.25%的胰蛋白酶1ml每10cm培养皿的比例将肺癌细胞消化下来,离心后全部重新接种在新的100mm培养皿中,在10ml含1%双抗和10%血清的DMEM培养基中添加终浓度为2 μ g/ml的嘌呤霉素(Puromycin)进行阳性细胞的筛选。每隔三天更换一次含有等浓度Puromycin的相同的DMEM培养基。连续筛选3-7天。

[0049] (17) 细胞单克隆的筛选。将预筛选3-7天的细胞(极低密度)用胰酶消化后,以每孔1-2个细胞的密度重稀释后均匀接种至96孔板,培养至显微镜镜检能观察到细胞单克隆。

[0050] (18) 阳性细胞株的鉴定。将细胞单克隆用胰酶消化后依次经历24孔板、12孔板和6孔板,扩大培养。选取一部分细胞采用Western Blot检测,鉴定靶蛋白表达量的降低,证明基因敲减的肺癌细胞株构建成功,最终获得敲减成功的细胞株。采用该方法,基因敲减效率可达70%以上,并且稳定性好。

[0051] (19) 与现有技术相比,本发明改造了CRISPR V2质粒,加载了shRNA序列,获得了稳定敲减基因的肺癌细胞株。该方法具有转染效率高、特异性好及能稳定的敲减目的基因的优点。本发明为研究基因在肺癌发生发展中的分子机理提供了新的实验材料,对肺癌的相关建模提供参考。

附图说明:

[0052] 图1:CRISPR V2质粒模式图。(模式图引自:http://www.youbio.cn/sites/default/files/product/images/vector/lenticrispr_v2_map.png)

[0053] 图中所示,对CRISPR V2质粒的改造是对其Cas9序列的删除及自连成新质粒。

[0054] 图2:XbaI和BamHI双酶切后的电泳图。

[0055] 图3:在肺癌A549细胞株中检测shRNA1和shRNA2的敲减FBXL17基因的效果。

[0056] 图4:在肺癌A549细胞株中检测shRNA1、shRNA2和shRNA3的敲减FBXL18基因的效果。

具体实施方式

[0057] 实施例1、在肺癌细胞株A549中建立FBXL17基因敲减的细胞株:

[0058] (1) CRISPR V2载体的改造。依据CRISPR V2空载体的序列,用一对限制性内切酶XbaI和BamHI酶切CRISPR V2空载体,去掉一个4.2KB片段(Cas9基因片段),剩余骨架胶回收备用。

[0059] 酶切体系是:总体积30 μ l,

- 10×FastDigest Buffer 3ul;
- XbaI, 1ul;
- [0060] BamHI, 1ul;
- CRISPR V2 plasmid, 15ul;
- ddH₂O 10ul
- [0061] 37℃酶切30min。胶回收去掉一个4.2KB片段后的酶切片段(线性骨架)。
- [0062] (2) 将上述线性骨架用T₄DNA Polymerase末端修补, 修补体系如下:
- [0063] 总体积30ul,
- 10×NEB Fast ligation Buffer 3ul;
- dNTP, 2ul;
- [0064] T₄ DNA Polymerase, 1ul;
- CRISPR V2 plasmid (without Cas9), 24ul;
- BSA standard solution 1ul。
- [0065] 12℃连接30min。
- [0066] (3) 将T₄DNA Polymerase末端修补后的CRISPR (without Cas9) 空骨架胶回收后自连。
- [0067] 自连体系如下:
- [0068] 总体积10ul,
- [0069] 10×NEB Fast ligation Buffer 1ul;
- [0070] CRISPR (without Cas9) 末端修补产物, 8ul;
- [0071] T₄DNA Ligase, 1ul。
- [0072] 25℃连接1.5h。
- [0073] 获得改造后的CRISPR空骨架质粒。将该骨架转化至Stb13感受态中扩增质粒。
- [0074] (4) 改造的CRISPR (without Cas9) 空骨架线性化:
- [0075] 用BsmBI酶切CRISPR (without Cas9) 空骨架质粒, 去掉2KB左右的插入序列。
- [0076] (5) CRISPR (without Cas9) 质粒的酶切鉴定。提取CRISPR (without Cas9) 质粒, 用BsmBI酶酶切鉴定质粒的正确性。重组质粒酶切后无2KB左右的序列片段。
- [0077] (6) shRNA插入片段的合成。设计2对FBXL17的敲减shRNA。分为两条反向互补引物Sense和Antisense:
- [0078] shRNA1:
- [0079] Sense序列:
- [0080] CACCGAGACAAGACCTATCAGTAAGTGAAGCCACAGATGTTACTGATAGGTCTTGCTTTTTTT
- [0081] Antisense序列:
- [0082] AAACAAAAAAGACAAGACCTATCAGTAACATCTGTGGCTTCACTTACTGATAGGTCTTGCTC
- [0083] shRNA2:
- [0084] Sense序列:
- [0085] CACCGGGAGAGAGCCTATCAGATGGTGAAGCCACAGATGCATCTGATAGGTCTCTCCTTTTTT

- [0086] Antisense序列:
- [0087] AAACAAAAAAGGAGAGAGCCTATCAGATGCATCTGTGGCTTCACCATCTGATAGGCTCTCTCCC
- [0088] Control shRNA (non-targeting) 序列:
- [0089] Sense序列:
- [0090] CACCGTCTCGCTTGGGCGAGAGTAAGGTGAAGCCACAGATGCTTACTCTCGCCCAAGCGAGATTTTTT
- [0091] Antisense序列:
- [0092] AAACAAAAATCTCGCTTGGGCGAGAGTAAGCATCTGTGGCTTCACCTTACTCTCGCCCAAGCGAGAC
- [0093] 其中,红色 (Sense序列开始的CACCG;Antisense序列开始的AAAC,结尾的C) 标记接头序列,连接于载体上。蓝色 (中间带灰度的,Sense序列的GTGAAGCCACAGATG;Antisense序列的CATCTGTGGCTTCAC) 表示“Loop”序列,每条序列中的两条19-21nt的序列是shRNA的短反向重复序列。
- [0094] (7) 将Sense和Antisense序列退火,10ul体系为:
- | | |
|---------------------|------|
| Sense (100 uM), | 1 ul |
| Antisense (100 uM), | 1 ul |
- [0095] 10X T₄ Ligation Buffer (NEB), 1 ul
- | | |
|----------------------|--------|
| ddH ₂ O, | 6.5 ul |
| T4 PNK (NEB M0201S), | 0.5 ul |
- [0096] 退火程序:
- [0097] 37°C 30min, 95°C 5min, 95°C 至 25°C 梯度降温,每分钟降温5°C。
- [0098] (8) 重组质粒的获得:将步骤(4)的线性化CRISPR (without Cas9) 空骨架与稀释100倍的步骤(7)退火后的shRNA片段做连接,连接体系为11微升:
- | | |
|---|-------|
| BsmBI digested CRISPR (without Cas9) plasmid, | 2 ul; |
| 退火后的 shRNA 片段, | 3 ul; |
- [0099] 2X Quick Ligase Buffer (NEB), 5 ul ;
- | | |
|----------------------------|--------|
| Quick Ligase (NEB M2200S), | 1 ul 。 |
|----------------------------|--------|
- [0100] (9) 将步骤(8)的重组质粒按1:10的比例转化至Stb13感受态中涂布转化后的菌液于氨苄青霉素抗性的LB固体培养皿中,37°C培养16h;次日挑取直径较大的单菌落,用1.5ml离心管震荡培养5h后,进行菌液PCR鉴定,将阳性菌用15ml离心管扩大培养,离心收集菌体,提取重组质粒,酶切质粒进行第二次鉴定。对鉴定阳性的质粒,采用自行设计的检测引物LV2-3进行一代测序,需在测序结果中存在设计的shRNA序列。测序引物LV2-3序列为:5'-CTCCTTTCAAGACCTAGCTAGC-3'。
- [0101] (10) 细胞转染前24h,在100mm培养皿中接种 7×10^5 个每毫升HEK293T细胞,待次日细胞汇合度达到60%用于转染。
- [0102] (11) 细胞转染实验。采用包装慢病毒侵染的方法,将步骤(9)获得的阳性重组质粒与病毒包装质粒pVSVG及PSPA×2按照10:1:9的质量比例混合(总质量4-8μg),添加到500μl Opti-MEM基本培养基或无双抗无血清的DMEM培养基中,再按1:4(质粒质量:转染试剂)的比例加入转染试剂,混匀、室温静置30min;同时,将HEK293T细胞除去旧培养基,用5ml 1×PBS

轻柔清洗1次,添加无双抗、无血清的DMEM培养基3ml,再将上述转染试剂及质粒的孵育液,逐滴添加到HEK293T细胞中,放入37℃5%CO₂的培养箱中培养;6h后取出培养皿,补加8ml含1%双抗和10%血清的DMEM培养基,放入培养箱中继续培养。

[0103] (12) 培养48h,收集含有病毒的培养基,使用0.45μm无菌滤膜过滤培养基,获得的滤液即为病毒液。该病毒液可以直接使用或浓缩后使用,也可放置-80℃长期保存。

[0104] (13) 病毒侵染实验前24h,在60mm培养皿中接种肺癌细胞A549,接种量为 7×10^5 个细胞每毫升,次日细胞汇合度约60%。

[0105] (14) 病毒侵染。取出肺癌细胞培养皿,去除细胞培养基,更换为3ml含1%双抗和10%血清的DMEM培养基,将步骤(12)中获得的病毒液添加到上述肺癌细胞培养皿中,每皿添加4ml,加入10μl聚凝胺(polybrene),在37℃、5%CO₂培养箱中继续培养24h。

[0106] (15) 次日从培养箱中取出上述培养皿,除去含有病毒的培养基,换用10ml含1%双抗和10%血清的DMEM培养基继续培养。

[0107] (16) 培养24h以后,在显微镜下可见细胞生长较为密集。用0.25%的胰蛋白酶1ml每10cm培养皿的比例将肺癌细胞消化下来,离心后全部重新接种在新的100mm培养皿中,在10ml含1%双抗和10%血清的DMEM培养基中添加终浓度为2μg/ml的嘌呤霉素(Puromycin)进行阳性细胞的筛选。每隔三天更换一次含有等浓度Puromycin的相同的DMEM培养基。连续筛选7天。

[0108] (17) 细胞单克隆的筛选。将预筛选7天的细胞(极低密度)用胰酶消化后,以每孔1.5个细胞的密度重稀释后均匀接种至96孔板,培养至显微镜镜检能观察到细胞单克隆。

[0109] (18) 阳性细胞株的鉴定。将细胞单克隆用胰酶消化后依次经历24孔板、12孔板和6孔板,扩大培养。选取一部分细胞采用Western Blot检测,鉴定阳性细胞靶蛋白表达量的降低,证明基因FBXL17敲减的肺癌细胞株A549构建成功,最终获得敲减成功的A549细胞株。采用该方法,基因敲减效率可达85%以上(图3),并且稳定性好。

[0110] 实施例2

[0111] 在肺癌细胞株A549中建立FBXL18基因敲减的细胞株:

[0112] (1) CRISPR V2载体的改造。依据CRISPR V2空载体的序列,用一对限制性内切酶XbaI和BamHI酶切CRISPR V2空载体,去掉一个4.2KB片段(Cas9基因片段),剩余骨架胶回收备用。

[0113] 酶切体系是:总体积30ul,

10×FastDigest Buffer 3ul;

XbaI, 1ul;

[0114] BamHI, 1ul;

CRISPR V2 plasmid, 15ul;

ddH₂O 10ul。

[0115] 37℃酶切30min。胶回收去掉一个4.2KB片段后的酶切片段(线性骨架)。

[0116] (2) 将上述线性骨架用T₄DNA Polymerase末端修补,修补体系如下:

[0117] 总体积30ul,

[0118] 10×NEB Fast ligation Buffer 3ul;

- dNTP, 2ul;
- [0119] T₄ DNA Polymerase, 1ul;
- CRISPR V2 plasmid (without Cas9) , 24ul;
- BSA standard solution 1ul。
- [0120] 12°C连接30min。
- [0121] (3) 将T₄DNA Polymerase末端修补后的CRISPR (without Cas9) 空骨架胶回收后自连。
- [0122] 自连体系如下:
- [0123] 总体积10ul,
- [0124] 10×NEB Fast ligation Buffer 1ul;
- [0125] CRISPR (without Cas9) 末端修补产物, 8ul;
- [0126] T₄DNA Ligase, 1ul。
- [0127] 25°C连接1.5h。
- [0128] 获得改造后的CRISPR空骨架质粒。将该骨架转化至Stb13感受态中扩增质粒。
- [0129] (4) 改造的CRISPR (without Cas9) 空骨架线性化:
- [0130] 用BsmBI酶切CRISPR (without Cas9) 空骨架质粒, 去掉2KB左右的插入序列。
- [0131] (5) CRISPR (without Cas9) 质粒的酶切鉴定。提取CRISPR (without Cas9) 质粒, 用BsmBI酶酶切鉴定质粒的正确性。重组质粒酶切后无2KB左右的序列片段。
- [0132] (6) shRNA插入片段的合成。设计3对FBXL18的敲减shRNA。分为两条反向互补引物Sense和Antisense:
- [0133] shRNA1:
- [0134] Sense序列:
- [0135] CACCGAAACTGAAGTAGAACGGGTTGGTGAAGCCACAGATGCAACCCGTTCTACTTCAGTTTTTTTTT
- [0136] Antisense序列:
- [0137] AAACAAAAAAACTGAAGTAGAACGGGTTGCATCTGTGGCTTCACCAACCCGTTCTACTTCAGTTTC
- [0138] shRNA2:
- [0139] Sense序列:
- [0140] CACCGACGTTTCAGAATCAGATCTGTGGTGAAGCCACAGATGCACAGATCTGATTCTGAACGTTTTTTTT
- [0141] Antisense序列:
- [0142] AAACAAAAAACGTTTCAGAATCAGATCTGTGCATCTGTGGCTTCACCACAGATCTGATTCTGAACGTC
- [0143] shRNA3:
- [0144] Sense序列:
- [0145] CACCGTGCAGTGCTTCAACATGTCTGGTGAAGCCACAGATGCAGACATGTTGAAGCACTGCATTTTTTT
- [0146] Antisense序列:
- [0147] AAACAAAAAATGCAGTGCTTCAACATGTCTGCATCTGTGGCTTCACCAGACATGTTGAAGCACTGCAC
- [0148] Control shRNA (non-targeting) 序列:
- [0149] Sense序列:
- [0150] CACCGTCTCGCTTGGGCGAGAGTAAGGTGAAGCCACAGATGCTTACTCTCGCCCAAGCGAGATTTTTTT

[0151] Antisense序列:

[0152] AAACAAAAAATCTCGCTTGGGCGAGAGTAAGCATCTGTGGCTTCACCTTACTCTCGCCCAAGCGAGAC

[0153] 其中,红色 (Sense序列开始的CACCG;Antisense序列开始的AAAC,结尾的C) 标记接头序列,连接于载体上。蓝色 (中间带灰度的,Sense序列的GTGAAGCCACAGATG;Antisense序列的CATCTGTGGCTTCAC) 表示“Loop”序列,每条序列中的两条21nt的序列是shRNA的短反向重复序列。

[0154] (7) 将Sense和Antisense序列退火,10ul体系为:

Sense (100 uM), 1 ul

Antisense (100 uM), 1 ul

[0155] 10X T₄ Ligation Buffer (NEB), 1 ul

ddH₂O, 6.5 ul

T₄ PNK (NEB M0201S), 0.5 ul。

[0156] 退火程序:

[0157] 37°C 30min, 95°C 5min, 95°C 至 25°C 梯度降温,每分钟降温5°C。

[0158] (8) 重组质粒的获得:将步骤(4)的线性化CRISPR (without Cas9) 空骨架与稀释100倍的步骤(7)退火后的shRNA片段做连接,连接体系为11微升:

BsmBI digested CRISPR (without Cas9) plasmid, 2 ul;

退火后的 shRNA 片段, 3 ul;

[0159] 2X Quick Ligase Buffer (NEB), 5 ul ;

Quick Ligase (NEB M2200S), 1 ul 。

[0160] (9) 将步骤(8)的重组质粒按1:10的比例转化至Stb13感受态中涂布转化后的菌液于氨苄青霉素抗性的LB固体培养皿中,37°C培养16h;次日挑取直径较大的单菌落,用1.5ml离心管震荡培养5h后,进行菌液PCR鉴定,将阳性菌用15ml离心管扩大培养,离心收集菌体,提取重组质粒,酶切质粒进行第二次鉴定。对鉴定阳性的质粒,采用自行设计的检测引物LV2-3进行一代测序,需在测序结果中存在设计的shRNA序列。测序引物LV2-3序列为:5'-CTCCTTTCAAGACCTAGCTAGC-3'。

[0161] (10) 细胞转染前24h,在100mm培养皿中接种 7×10^5 个每毫升HEK293T细胞,待次日细胞汇合度达到60%用于转染。

[0162] (11) 细胞转染实验。采用包装慢病毒侵染的方法,将步骤(9)获得的阳性重组质粒与病毒包装质粒pVSVG及PSPA×2按照10:1:9的质量比例混合(总质量4-8μg),添加到500μl Opti-MEM基本培养基或无双抗无血清的DMEM培养基中,再按1:4(质粒质量:转染试剂)的比例加入转染试剂,混匀、室温静置30min;同时,将HEK293T细胞除去旧培养基,用5ml 1×PBS轻柔清洗1次,添加无双抗、无血清的DMEM培养基3ml,再将上述转染试剂及质粒的孵育液,逐滴添加到HEK293T细胞中,放入37°C 5% CO₂的培养箱中培养;6h后取出培养皿,补加10ml含1%双抗和10%血清的DMEM培养基,放入培养箱中继续培养。

[0163] (12) 培养48h,收集含有病毒的培养基,使用0.45μm无菌滤膜过滤培养基,获得的滤液即为病毒液。该病毒液可以直接使用或浓缩后使用,也可放置-80°C长期保存。

[0164] (13) 病毒侵染实验前24h,在60mm培养皿中接种肺癌细胞A549,接种量为 7×10^5 个细胞每毫升,次日细胞汇合度约60%。

[0165] (14) 病毒侵染。取出肺癌细胞培养皿,去除细胞培养基,更换为3ml含1%双抗和10%血清的DMEM培养基,将步骤(12)中获得的病毒液添加到上述肺癌细胞培养皿中,每皿添加4ml,加入8 μ l聚凝胺(polybrene),在37 $^{\circ}$ C、5%CO₂培养箱中继续培养24h。

[0166] (15) 次日从培养箱中取出上述培养皿,除去含有病毒的培养基,换用10ml含1%双抗和10%血清的DMEM培养基继续培养。

[0167] (16) 培养24h以后,在显微镜下可见细胞生长较为密集。用0.25%的胰蛋白酶1ml每10cm培养皿的比例将肺癌细胞消化下来,离心后全部重新接种在新的100mm培养皿中,在10ml含1%双抗和10%血清的DMEM培养基中添加终浓度为2 μ g/ml的嘌呤霉素(Puromycin)进行阳性细胞的筛选。每隔三天更换一次含有等浓度Puromycin的相同的DMEM培养基,连续筛选7天。

[0168] (17) 细胞单克隆的筛选。将预筛选7天的细胞(极低密度)用胰酶消化后,以每孔1个细胞的密度重稀释后均匀接种至96孔板,培养至显微镜镜检能观察到细胞单克隆。

[0169] (18) 阳性细胞系的鉴定。将细胞单克隆用胰酶消化后依次经历24孔板、12孔板和6孔板,扩大培养。选取一部分细胞采用Western Blot检测,鉴定阳性细胞靶蛋白表达量的降低,证明基因敲减的肺癌细胞株构建成功,最终获得敲减成功FBXL18基因的肺癌A549细胞株。采用该方法,基因敲减效率可达70%以上(图4),并且稳定性好。

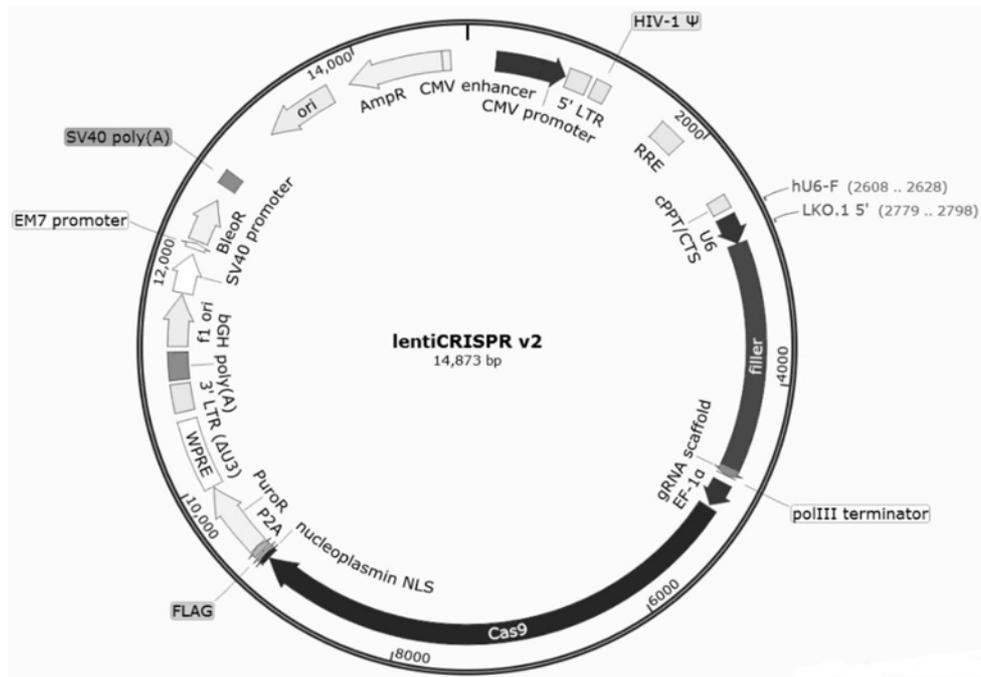


图1

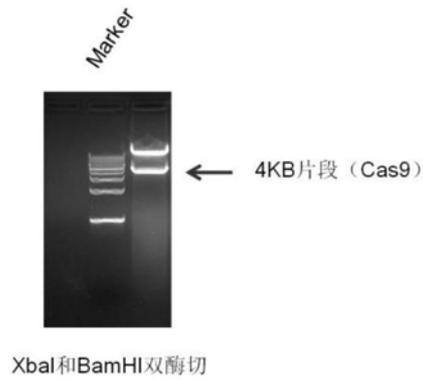


图2

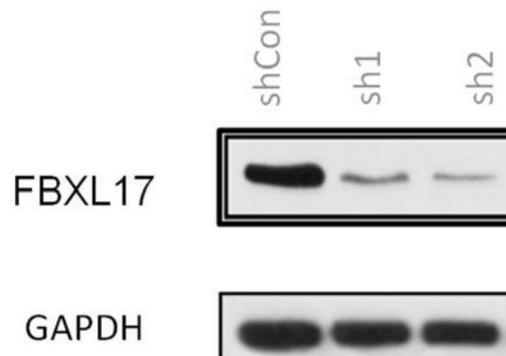


图3

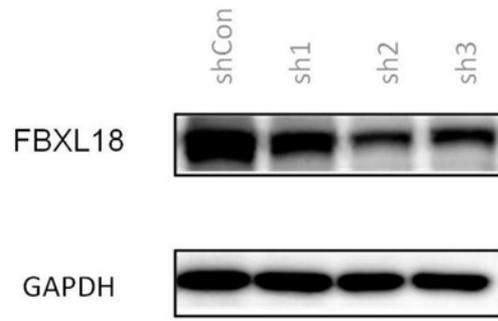


图4