

MTMR14 稳定敲减细胞株的建立及表型分析

沈金花 周 婉

(中南民族大学 生命科学学院 医学生物研究所 & 武陵山区特色资源植物种质保护与利用
湖北省重点实验室 武汉 430074)

摘 要 目的: 为研究 *MTMR14* 基因在肺癌细胞中的功能.方法: 运用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术得到基因敲减的人胚肾细胞株(293T), 筛选了 1 对具有编辑作用的 sgRNA 作用于腺癌人类肺泡基底上皮细胞(A549) 获得了基因敲减的 A549 细胞株, 并对野生型和敲减型细胞进行一系列表型分析.结果: 在非同步情况下, 野生型和敲减型细胞周期无明显变化, 但敲减细胞中 *CyclinD1* 和 *CyclinE* 的 mRNA 表达量显著升高, *P21* 和 *P27* 的 mRNA 表达量显著降低.结论: *MTMR14* 基因表达的减少能促进细胞增殖.

关键词 CRISPR/Cas9; *MTMR14*; 细胞增殖

中图分类号 Q2-33 文献标识码 A 文章编号 1672-4321(2018)04-0022-05

Establishment of *MTMR14* Stable Knockdown Cell Line and Phenotype Analysis

Shen Jinhua, Zhou Wan

(Institute for Medical Biology & Hubei Provincial Key Laboratory for Protection and Application of Special Plant Germplasm in Wuling Area of China, College of Life Sciences, South-Central University for Nationalities, Wuhan 430074, China)

Abstract Objective: To study the function of *MTMR14* gene in lung cancer cells. Method: CRISPR/Cas9 gene editing technique was used to obtain a gene knockdown human embryonic kidney cell line (293T) and this pair of edited sgRNAs was selected to act on adenocarcinoma human alveolar basal epithelium cells (A549) to get a gene knockdown A549 cell line, followed by a series of phenotypic analysis of wild-type and the knockdown cells. Results: In the absence of synchronization, there was no significant change in the wild-type and knockdown cell cycle. However, the mRNA expression levels of *CyclinD1* and *CyclinE* in the knockdown cells significantly increased, while the mRNA expression levels of *P21* and *P27* significantly decreased. Conclusion: The decrease of *MTMR14* gene expression can promote cell proliferation.

Keywords CRISPR/Cas9; *MTMR14*; cell proliferation

CRISPR/Cas 系统是细菌在抵抗外源 DNA 过程中进化而来的自我防御系统,当细菌遭遇攻击时会作出破坏外源 DNA 为目标的防御反应.研究发现:在细菌和古细菌的基因组中广泛存在一些高度保守、成簇排列的 DNA 序列,间隔序列隔开这些重复序列.这些间隔序列与质粒序列或噬菌体序列存在同源性^[1],甚至有一些与噬菌体的基因组序列有 100%的同源性^[2].这些间隔序列转录形成的 crRNA 与细菌自身的 Cas 核酸酶形成复合体,指导 Cas 核

酸酶进行靶向切割.当外源 DNA 序列与 crRNA 序列一致时,Cas 蛋白就能对该序列进行靶向切割,破坏外源 DNA,实现自我防御^[3].经人为改造后,II 型 CRISPR/Cas9 是目前应用的最广泛的系统,因其设计简单、效率高、耗时短而成为目前最受欢迎的基因编辑系统.2013 年,张锋实验室运用该技术成功地编辑了人类和小鼠的细胞^[4,5],表明它可以在真核生物细胞中实现特异且高效的基因编辑,为在细胞

收稿日期 2018-02-06

作者简介 沈金花(1975-),女,教授,博士后,研究方向:疾病相关基因的功能研究,E-mail: shenjinhua2013@163.com

基金项目 国家自然科学基金资助项目(31771274);中央高校基本科研业务费专项资金资助项目(CZY18020)

中研究基因功能提供了一种新的思路^[6]。

MTMR14 是近年来发现的一种磷酸肌醇磷酸酶,其特异性底物不是蛋白质而是磷酸肌醇。*MTMR14* 在中央核肌病(CNM)、钙离子调节、自噬调节中具有重要作用^[7],本文拟通过 CRISPR/Cas9 技术构建基因敲除细胞系,研究 *MTMR14* 基因对肺癌细胞增殖的影响。

1 材料与方法

1.1 材料和仪器

人胚肾细胞株(293T)购自武汉大学细胞库;肺癌细胞(A549)购自 Procell 公司;PX458 质粒、Stb13 感受态、10X T4 Ligation Buffer、T4 连接酶(武汉森灵生物);Fast AP、Fast Digest BpiI、10X Fast Digest Buffer、逆转录试剂盒(Thermo Scientific);T4 PNK、dNTP、rTaq、10X PCR Buffer (TaKaRa);DTT (Biosharp);去内毒素小提试剂盒(Omega Bio-Tek);胶回收试剂盒 AxyPrep DNA Gel Extraction Kit (AxyGen);RPMI-1640 培养基(HyClone);胰酶、双抗、Lipo-2000(Invitrogen);血清(ScienceII)BCA 蛋白浓度测定试剂盒、SDS-PAGE 凝胶快速配制试剂盒(碧云天);anti-*MTMR14*(Abcam);HRP-goat anti mouse IgG、HRP-goat anti rabbit IgG(EarthOx);引物合成和测序由武汉擎科生物有限公司完成。

超微量分光光度计(Nanodrop 2000, Thermo Fisher Scientific);酶标仪(Infinite200 型,TECAN);Real-Time PCR System(7500fast 型,Applied Biosystems)。

1.2 构建基因敲减的 293T 细胞

1.2.1 sgRNA 序列的设计和载体的选择

利用 CRISPR 在线设计工具网站 <http://crispr.mit.edu/> 在 *MTMR14* 的外显子设计 sgRNA,根据评分从高到低选择 4 对 sgRNA 序列(见表 1)。实验使用 PX458 载体,其序列分析见图 1。

表 1 *MTMR14* sg-RNA 引物序列

Tab.1 Primer sequences of *MTMR14* sg-RNA

基因名称	引物序列(5'-3')
S1-F	<u>CACCGGAGTGAAGTCGGCATAGCGC</u>
S1-R	<u>AAACGCGCTATGCCGACTTCACTCC</u>
S2-F	<u>CACCGAGTGAAGTCGGCATAGCGCT</u>
S2-R	<u>AAACAGCGCTATGCCGACTTCACTC</u>
S3-F	<u>CACCGCGGTGATTCCAAACACGAAT</u>
S3-R	<u>AAACATTCGTGTTTGAATCACGCC</u>
S4-F	<u>CACCGACACGATGTGCCGGGATAG</u>
S4-R	<u>AAACCTATCCCGGCACATCGTGT</u>

注:标有下划线的部分代表加入的酶切位点序列

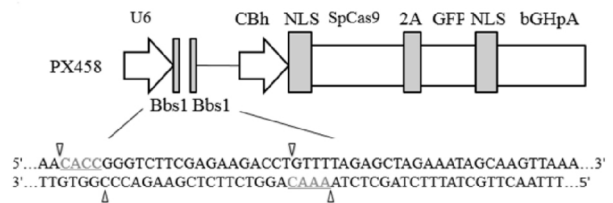


图 1 PX458 质粒结构分析

Fig.1 Structure analysis of PX458 plasmid

1.2.2 PX458-sgRNA 表达载体的构建和鉴定

用 Fast Digest BpiI 酶切质粒 PX458,将 sgRNA 寡核苷酸链退火为双链,与切开的 PX458 连接,转化至 stb13 感受态中,30 °C 过夜培养,挑取菌落做菌落 PCR^[8] 送测序验证载体是否构建成功。

1.2.3 细胞转染及流式细胞仪分选

取出前 1 d 已铺好的 6 孔板于显微镜下观察细胞密度,达到 70%~80%的汇合度时,按照 Lipo-2000 的说明书将 PX458-sgRNA 表达载体转染至 293T 细胞中,继续培养 48 h,用流式细胞仪分选,将成功转入载体的细胞单个分选到 96 孔板中,待细胞密度长到 70%~80%后扩大规模培养。

1.2.4 基因敲除细胞系的鉴定

对每一株细胞进行测序鉴定,看基因是否被编辑。将基因组被编辑的细胞系提蛋白,用 Western Blotting 检测 *MTMR4* 蛋白的表达。

1.3 构建基因敲减的 A549 细胞

选取 A549 细胞作为研究的肺癌细胞株。将 293T 细胞中有作用的 PX458-sgRNA 表达载体转染至 A549 细胞中,用流式细胞仪进行分选,并对每一株细胞进行测序鉴定及 Western Blotting 检测 *MTMR4* 蛋白的表达。

1.4 MTT 分析

分别接种 1000 个生长状态较好的 A549 细胞于 96 孔板中,每组重复 6 个,连续检测 5 d。培养终止前 4 h 加入 20 μL 5 mg/mL 的 MTT 于孔中,无需换液。4 h 后完全吸去培养基,加入 150 μL DMSO,酶标仪振荡 10 min,490 nm 检测其 OD 值。

1.5 流式细胞仪分析

用 15 mL 离心管收集一个中皿的细胞,先用预冷的 PBS 洗 1 次,再用冷的 PBS 重悬细胞,加入 3 mL 冷的无水乙醇后将细胞吹成单细胞,4 °C 过夜固定细胞。染色前补加 5 mL 预冷的 PBS 至固定的细胞中,1500 r/min 离心 5 min,弃上清,加入新鲜配制的 PI 染色液,37 °C 避光反应 30 min 后用流式细胞仪检测其细胞周期。

1.6 RT-PCR

分别提取野生型细胞和 MTMR14 基因敲减的 A549 细胞的 RNA ,按照说明上的步骤逆转录成 cDNA ,在 Real-Time PCR 仪上进行 RT-PCR 反应^[9] .

1.7 Western Blotting

分别提取野生型细胞和 MTMR14 基因敲减的 A549 细胞的蛋白 ,准备好 SDS-PAGE 胶后 ,80 V 40 min 分离胶 100 V 1.5 h ,然后转膜 ,100 V 转 1.5 h , TBST 洗 3 次 ,每次 10 min ,5%的脱脂奶粉封闭 1 h , 孵一抗 ,4 ℃ 过夜 .第 2 d 用 TBST 洗 3 次 ,每次 10 min ,室温孵二抗 1 h ,TBST 洗 3 次 ,每次 10 min ,TBS 洗 2 次 ,每次 10 min 最后 ECL 显影 .

1.8 统计分析

采用 Microsoft office 和 CorelDRAW X4 SP2 绘图 ,采用 t-test 统计数据 .

2 结果

2.1 PX458-sgRNA 表达载体的构建和鉴定

将 sgRNA 退火后形成的双链与酶切后的 PX458 连接得到的产物 转化到感受态 stb13 中 挑

取单克隆菌落 进行菌落 PCR 鉴定 然后送测序 .测序结果显示 ,4 对 sg-RNA 都与 PX458 载体正确连接 .

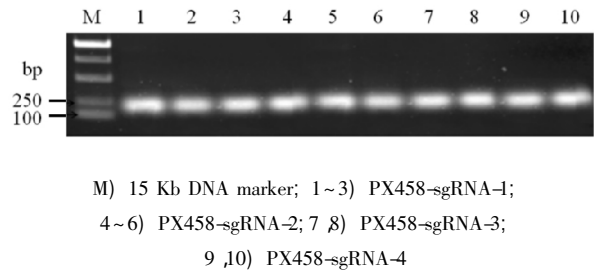
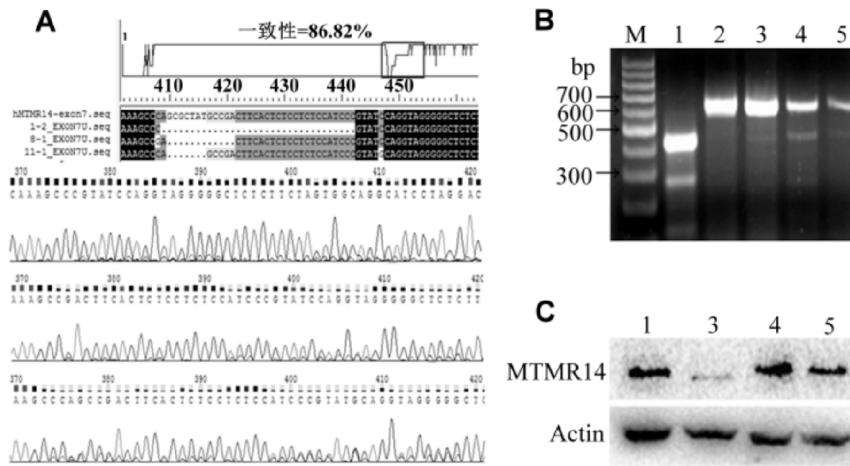


图 2 构建敲除表达载体的菌落 PCR 和测序结果

Fig.2 Colony PCR and sequencing results of constructed expression vectors

2.2 构建 MTMR14 基因敲除的 293T 细胞系

将测序正确的 PX458-sgRNA 表达载体转染至 293T 细胞中 ,分选单细胞到 96 孔板 ,待其扩大培养后 ,用测序和错配酶酶切的方法对细胞的基因组序列进行分析鉴定 ,用 Western Blotting 检测 MTMR14 蛋白的表达 ,结果见图 3 .由图 3 可见 : sgRNA-H1-2 , sgRNA-H8-1 , sgRNA-H11-1 这 3 株细胞的基因均被编辑了 ,且均能被错配酶切开 ,但仅 sgRNA-H1-2 的 MTMR14 的表达明显减少了 ,sgRNA-H8-1 , sgRNA-H11-1 均无明显变化 .



A) 分选细胞的测序比对; B) 分选细胞的错配酶鉴定: M) 100 bp DNA marker ,1) 阳性对照 2) 阴性对照 , 3~5) 分别为 sgRNA-H1-2 , sgRNA-H8-1 , sgRNA-H11-1; C) 分选细胞 Western Blotting 检测 MTMR14 的表达

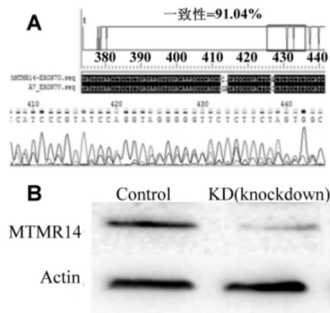
图 3 分选的 293T 细胞的基因序列和蛋白表达分析鉴定

Fig.3 Gene sequencing and protein expression analysis of sorted 293T cells

2.3 构建敲除 MTMR14 基因的 A549 细胞株

用工具细胞 293T 构建基因敲除细胞 ,建立基因敲除细胞系的平台并筛选有效的 sgRNA ,为研究 MTMR14 基因在肺癌细胞中的作用 ,以 A549 肺癌细胞为研究对象 ,分选 A549 细胞的基因序列和蛋白表达分析鉴定结果见图 4 .由图 4 可知 : PX458-

sgRNA-2 能使 MTMR14 蛋白的表达量减少 ,故用 PX458-sgRNA-2 表达载体转染至 A549 细胞中 ,通过流式细胞仪将单个带绿色荧光的细胞筛选至 96 孔板中 ,通过测序及 Western Blotting 检测获得了一株基因敲减的 A549 细胞 .



A) 分选 A549 细胞的测序比对;
 B) 分选细胞 Western Botting 检测 MTMR14 的表达
 图 4 分选的 A549 细胞的基因序列和蛋白表达分析鉴定
 Fig.4 Gene sequencing and protein expression analysis of sorted A549 cells

2.4 *MTMR14* 表达量的减少促进 A549 的增殖

研究表明: 在 MEFs(小鼠胚胎成纤维细胞)^[10] 和小鼠成肌细胞^[11] 中, *MTMR14* 的缺失会促进细胞的增殖. 推测在 A549 细胞中, *MTMR14* 表达量的减少影响细胞增殖, 故设计了 MTT 实验进行验证, 结果见图 5. 由图 5 可知: *MTMR14* 表达量的减少促进了 A549 细胞的增殖.

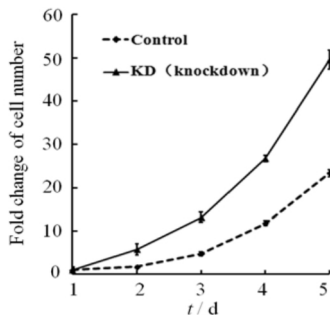


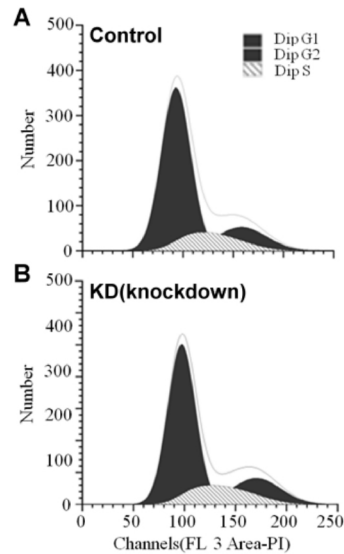
图 5 *MTMR14* 表达量的减少促进 A549 细胞的增殖
 Fig.5 Reduction of *MTMR14* expression promotes the proliferation of A549 cells

2.5 流式细胞术检测非同步化 A549 细胞周期

细胞增殖的快慢与细胞周期的进程密切相关^[12], 采用流式细胞仪进一步检测 *MTMR14* 表达的减少对 A549 细胞周期进程的影响, 结果见图 6 和表 2. 由图表可知: 在非同步情况下, 两组处于各时期细胞的比例基本相当, 细胞周期无明显变化.

表 2 流式分析细胞周期
 Tab.2 Flow analysis of cell cycle

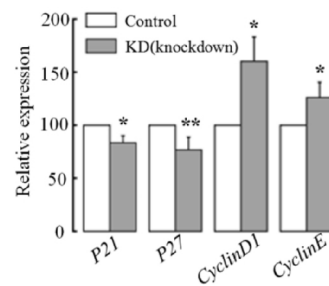
不同分组	不同细胞周期细胞百分比/%			
	G1	G2	S	G1/ G2
Control	68.77	18.42	12.81	1.70
KD	64.27	18.45	17.28	1.75



A) 对照组; B) 敲减组
 图 6 流式细胞仪检测非同步化的 A549 细胞的细胞周期
 Fig. 6 Flow cytometry analysis to detect the cell cycle of asynchronous A549 cells

2.6 Real-time PCR 检测细胞周期关键性调控因子转录水平

细胞周期的进程受到细胞周期调控因子的严密调控, 分别选择 *CyclinD1* 和 *CyclinE* 这 2 个正调控因子, *P21* 和 *P27* 这 2 个负调控因子, Real-time PCR 检测其 mRNA 表达水平. 结果见图 7. 如图 7 所示: 细胞周期正调控因子 *CyclinD1*, *CyclinE* mRNA 表达水平显著增加, 细胞周期负调控因子 *P21*, *P27* mRNA 表达水平显著降低.



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs Control
 图 7 两组细胞中细胞周期调控因子的 mRNA 表达
 Fig.7 mRNA expression of cell cycle regulatory factors in two groups of cells

3 讨论

CRISPR/Cas9 技术是近年来备受关注的一项基因编辑技术, 相对于之前的锌指核酸内切酶 (ZFN) 及类转录激活因子效应物核酸酶 (TALEN), CRISPR/Cas9 技术编辑效率更高效, 操作更简单,

成本更低.它只需针对目的基因设计对应的 sgRNA,将其连接到一个载体上,转入研究对象中,再对其进行 PCR 和 Western Blotting 检测.以上这些优点使得 CRISPR/Cas9 技术得到广泛的应用.本文采用 CRISPR/Cas9 技术和流式细胞分选结合的方法,避开了病毒感染和有限稀释,确保了实验安全,能够更快速、轻松、高效地获得基因敲除细胞.

MTMR14 是一种新型的磷酸肌醇磷酸酶,研究表明: MTMR14 缺失会导致小鼠骨骼肌细胞肌质网 Ryanodine 通道开放,促进内钙释放,引起许多肌肉疾病,如中央核肌病、肌无力、肌肉疲劳和骨骼肌细胞衰老等^[13,14]. MTMR14 对细胞自噬和调节衰老有一定作用^[10,15,16], MTMR14 缺失会促进 MEFs 细胞增殖^[10]. 基于以上研究,本文先利用 CRISPR/Cas9 技术构建了基因敲除的 293T 细胞, 293T 是一个工具细胞,易于转染和操作;再以肺癌细胞 A549 为研究对象,构建了 *MTMR14* 基因敲减的 A549 细胞系,并对野生型和 MTMR14 敲减的 A549 细胞进行一系列表型分析.结果表明: MTMR14 表达减少明显地促进 A549 细胞增殖,野生型和敲减型细胞在各时期所占的细胞比无差异,说明在非同步化的情况下, MTMR14 的减少对细胞周期无明显影响.通过 Real-time PCR 检测发现细胞周期正调控因子 *CyclinD1*, *CyclinE* mRNA 表达水平显著增加,细胞周期负调控因子 *P21*, *P27* mRNA 表达水平显著降低.

综上所述,本文构建了 *MTMR14* 基因敲减的细胞系,为基因功能研究提供了工具和方法;初步发现在肺癌细胞中 MTMR14 的减少促进了细胞增殖,为后续深入研究其功能奠定了基础.

参 考 文 献

- [1] Bolotin A, Quinquis B, Sorokin A, et al. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin [J]. *Microbiology*, 2005, 151(8): 2551-2561.
- [2] Horvath P, Romero DA, Coute-Monvoisin AC, et al. Diversity, activity, and evolution of CRISPR loci in *Streptococcus thermophilus* [J]. *J Bacteriol*, 2008, 190(4): 1401-1412.
- [3] Hale C R, Zhao P, Olson S, et al. RNA-guided RNA cleavage by a CRISPR RNA-Cas protein complex [J]. *Cell*, 2009, 139(5): 945-956.
- [4] Cong L, Ran F A, Cox D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems [J]. *Science*, 2013, 339(6121): 819-823.
- [5] Jiang W, Bikard D, Cox D, et al. RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems [J]. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(3): 233-239.
- [6] Doudna J A, Charpentier E. Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9 [J]. *Science*, 2014, 346(6213): 1258096.
- [7] Amoasii L, Hnia K, Laporte J. Myotubularin phosphoinositide phosphatases in human diseases [J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2012, 362: 209-233.
- [8] 陈恒玲, 许杰, 黄玉莲, 等. 一种新型的构建 CRISPR/Cas9 KnockOut 载体的方法 [J]. *中南民族大学学报(自然科学版)*, 2018, 38(3): 68-71.
- [9] 沈金花, 陈剑霖. Linifanib 和 Tivozanib 对肺癌细胞增殖的影响 [J]. *中南民族大学学报(自然科学版)*, 2017, 36(4): 36-39, 83.
- [10] Liu J, Lv Y, Liu Q H, et al. Deficiency of MTMR14 promotes autophagy and proliferation of mouse embryonic fibroblasts [J]. *Mol Cell Biochem*, 2014, 392(1/2): 31-37.
- [11] 于孟飞, 杨潇, 沈金花. *MTMR14* 基因缺失促进小鼠成肌细胞增殖和分化 [J]. *中南民族大学学报(自然科学版)*, 2016, 35(1): 34-38.
- [12] Shaw A, Olivares-Chauvet P, Maya-Mendoza A, et al. S-phase progression in mammalian cells: modelling the influence of nuclear organization [J]. *Chromosome Res*, 2010, 18(1): 163-178.
- [13] Shen J, Yu W M, Brotto M, et al. Deficiency of MIP/MTMR14 phosphatase induces a muscle disorder by disrupting Ca²⁺ homeostasis [J]. *Nat Cell Biol*, 2009, 11(6): 769-776.
- [14] Vergne I, Roberts E, Elmaoued R A, et al. Control of autophagy initiation by phosphoinositide 3-phosphatase Jumpy [J]. *EMBO J*, 2009, 28(15): 2244-2258.
- [15] Romero-Suarez S, Shen J, Brotto L, et al. Muscle-specific inositolide phosphatase (MIP/MTMR14) is reduced with age and its loss accelerates skeletal muscle aging process by altering calcium homeostasis [J]. *Aging*, 2010, 2(8): 504-513.
- [16] Hnia K, Kretz C, Amoasii L, et al. Primary T-tubule and autophagy defects in the phosphoinositide phosphatase Jumpy/MTMR14 knockout mice muscle [J]. *Adv Biol Regul*, 2012, 52(1): 98-107.

(责任编辑 刘 钊)