

CRISPR/Cas9 联合 Cre-Loxp 系统建立 VASN 条件敲除的小鼠肝细胞系*

甘 暨¹, 杨丽超^{1,Δ}, 张 起¹, 孙俊铭¹, 张 俊¹, 何 敏^{1,2,3,Δ}

(广西医科大学 1. 实验动物中心; 2. 公共卫生学院; 3. 区域性高发肿瘤早期防治研究重点实验室, 南宁 530021)

摘要 目的: 利用 CRISPR/Cas9 技术联合 Cre-Loxp 系统的条件性敲除策略构建 *VASN* 基因敲除的 AML12 小鼠肝细胞株。**方法:** 在 *VASN* 基因第二外显子上下游设计靶点并合成 gRNA 序列, 构建 2 个 CRISPR/Cas9 重组载体; 设计构建 *VASN* 上下游分别带有 Loxp 序列和旁侧同源序列的供体载体 donor DNA 质粒; 将 3 个质粒共转染至小鼠肝细胞 AML12 中, 分离单克隆, 提取基因组 DNA, 经 PCR 及测序鉴定获得稳定敲入 Loxp 序列的单克隆细胞株 AML12-Loxp; 将 pALB-Cre 质粒转染至 AML12-Loxp, 筛选建立敲除 *VASN* 基因的细胞系。**结果:** 成功构建 2 个靶向敲除 *VASN* 基因的 pX459-gRNA-*VASN*-1 和 pX459-gRNA-*VASN*-2 重组载体及一个供体载体; 转染药筛后获得 12 个单细胞克隆, 经测序, 5 个单克隆细胞实现 *VASN* 基因上下游精确敲入 Loxp 序列; 同源重组敲入效率为 41.6%; pALB-Cre 质粒转染后获得 20 个单细胞克隆, 经 PCR 和测序获得 12 个 *VASN* 基因敲除的单克隆细胞, 敲除效率为 60%。**结论:** 利用 CRISPR/Cas9 技术联合 Cre-Loxp 系统成功构建了 *VASN* 基因敲除的 AML12 细胞, 为后续体外研究 *VASN* 在肝细胞中的功能及在动物体内实现 *VASN* 的条件性敲除奠定了分子基础。

关键词 VASN; CRISPR/Cas9; Cre-Loxp 系统; 条件性敲除; AML12 细胞

中图分类号: R-33 文献标志码: A 文章编号: 1005-930X(2023)02-0173-09

DOI: 10.16190/j.cnki.45-1211/r.2023.02.001

Establishment of mouse liver cell line with VASN conditional knockout using CRISPR/Cas9 and Cre-Loxp system

Gan Ji¹, Yang Lichao¹, Zhang Qi¹, Sun Junming¹, Zhang Jun¹, He Min^{1,2,3}. (1. Laboratory Animal Center; 2. School of Public Health; 3. Guangxi Key Laboratory of Early Prevention and Treatment for Regional High Frequency Tumor, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China)

Abstract Objective: To construct a *VASN* knockout AML12 mouse liver cell line using CRISPR/Cas9 technology combined with the conditional knockout strategy of Cre-Loxp system. **Methods:** Two recombinant CRISPR/Cas9 vectors were constructed by designing targets upstream and downstream of the second exon of *VASN* gene and synthesizing gRNA sequences. Donor vector donor DNA with Loxp sequence and side homologous sequence in upstream and downstream of *VASN* was designed and constructed. The three plasmids were co-transfected into mouse liver cells AML12, and the monoclonal cell line AML12-Loxp with stable Loxp sequence was obtained by PCR and sequencing detection. pALB-Cre plasmid was transfected into AML12-Loxp, and *VASN* knockout cell lines were screened and established. **Results:** Two recombinant vectors of pX459-gRNA-*VASN*-1 and pX459-gRNA-*VASN*-2 targeting for knockout of *VASN* gene and one donor vector were successfully constructed. Twelve single cell clones were obtained after transfection with drug sieve, and 5 monoclonal cells were sequenced to accurately tap into Loxp sequence upstream and downstream of *VASN* gene. The knockin efficiency of homologous recombination was 41.6%. Twenty single cell clones were obtained after transfection with pALB-Cre plasmid, and 12 *VASN* gene knockout

*基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No. 32000865);

广西高校中青年教师科研基础能力提升项目

(No. 2021KY0093)

Δ通信作者, 何敏, E-mail: 1621701855@qq.com;

杨丽超, E-mail: yang_lichao@qq.com

收稿日期: 2022-12-28

monoclonal cells were obtained by PCR and sequencing detection. The knockout efficiency was 60%. **Conclusion:** AML12 cells with *VASN* gene knockout are successfully constructed using CRISPR/Cas9 technology combined with Cre-Loxp system, which lays a molecular foundation for the subsequent *in vitro* study of the function of *VASN* in liver cells and the realization of the conditional knockout of *VASN* in animals.

Keywords *VASN*; CRISPR/Cas9; Cre-Loxp system; conditional knockout; AML12 cells

Vasorin (*VASN*) 是一个由 673 个氨基酸编码的高度保守的跨膜糖蛋白。*VASN* 在血管疾病^[1]和多种类型的癌症 (包括肝癌^[2]、乳腺癌^[3]、胶质瘤^[4-5]和甲状腺癌^[6]) 中异常表达。在肝癌的研究中, RNA 干扰和过表达分析证实, *VASN* 促进细胞增殖和迁移, 并抑制细胞凋亡^[2]。肝癌细胞中高表达的 *VASN* 促进了人脐静脉内皮细胞的迁移^[7]。然而, *VASN* 在肝癌发生发展过程中的作用机制尚不完全清楚。为研究 *VASN* 在肝癌细胞中的作用, 反向敲除验证表型变化是研究其功能和作用最有效的手段。目前常用的敲除策略有完全性敲除和条件性敲除。完全性敲除通过一次转染、耗时较短但无法做到在动物体内的条件性时空控制^[8], 在体外细胞使用条件性敲除策略实现对靶基因的精准敲除可为后续在动物体内建立组织条件性敲除和时间条件性动物模型奠定基础^[9]。目前, 条件性敲除主要基于 Cre/Loxp 系统, 通过构建带有 2 个 Loxp 序列且与靶基因同源的供体载体, 利用同源重组的方法将 Loxp 序列插入靶基因上下游旁侧, 但重组效率较低。利用 CRISPR/Cas9 介导的基因编辑技术使基因组 DNA 断裂, 在供体载体存在的基础上同源重组的概率则显著提高^[10]。本研究采用了 CRISPR/Cas9 介导的基因编辑技术, 通过同源重组途径, 并结合 Cre/Loxp 系统的条件敲除策略在小鼠肝细胞 AML12 构建了 *VASN* 基因敲除的细胞系, 为后续体外研究 *VASN* 在肝细胞中的功能及在动物体内实现 *VASN* 的条件性敲除奠定了分子基础^[11]。

1 材料和方法

1.1 材料

小鼠 AML12 细胞 (购于中科院); pX459 质粒 (来源于张峰实验室, 购买自 Addgene); pUC57 质粒 (上海生工); 大肠杆菌感受态细胞 DH5 α 菌株 (全式金) 试剂: DMEM/F12 (普诺赛); 胎牛血清 (Gibco); 营养琼脂 LA 培养基 (杭州百思生物公司); LB 培养基 (杭州百思生物公司); 限制性内切核酸酶 BbsI

(NEB); T4 连接酶 (NEB); T7 核酸内切酶 (NEB); 基因组 DNA 提取试剂盒 (全式金); 转染试剂 Lipofectamine 3000 (Invitrogen 公司); PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser 试剂 (TaKaRa); 氨苄青霉素 (上海生工); 遗传霉素 (上海生工); SanPrep 去内毒素质粒 DNA 小量抽提试剂盒 (上海生工); SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒 (上海生工); SanPrep 柱式 PCR 产物纯化试剂盒 (上海生工); 引物合成 (表 1)、基因测序均由上海生物工程公司完成。

1.2 gRNA 序列设计及合成对应的 Oligo

利用网站 (<http://crispor.tefor.net/>) 设计切割 *VASN* 基因序列的 gRNA。选择合适的 2 对序列作为靶点序列 (表 1), 送往上海生工公司合成。

1.3 pX459-*VASN*-gRNA 质粒构建、验证及有效性鉴定

1.3.1 pX459 质粒酶切 用限制性核酸内切酶 Bbs I 将 pX459 质粒酶切线性化并进行胶回收。将酶切胶回收产物置于 -20 °C 冰箱保存供后续连接用。

1.3.2 *VASN*-gRNA Oligo 序列退火形成双链 DNA

将 gRNA 寡核苷酸链按照管壁说明加入 ddH₂O 稀释成 100 μ mol/L 室温静置 5 min。取 1 μ L 的正反链 gRNA Oligo 溶液, 加 1 μ L T4 ligation buffer, 并加 ddH₂O 使其终体积为 10 μ L。混匀后, 95 °C 5 min, 自然冷却至室温, 形成双链 DNA。取退火后的引物 1 μ L 溶于 199 μ L ddH₂O 中, -20 °C 冰箱保存备用。

1.3.3 pX459-*VASN*-gRNA 连接和鉴定 取线性化的 pX459 载体和 1 μ L 退火后的双链 DNA, 加 1 μ L T4 连接酶和 1 μ L T4 ligation buffer 再加 ddH₂O 使终体积为 10 μ L。16 °C 连接过夜, 第 2 天将连接物转化到 DH5 α 感受态细胞中, 然后进行涂板, 37 °C 孵箱培养过夜。次日挑取单克隆菌, 加入到含有氨苄抗性的 LB 培养基, 37 °C 恒温箱振荡培养。12 h 后提取质粒, 用设计好的引物 (表 1) 进行 PCR 扩增, 取一部分 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳检测, 剩余产物送公司测序。

1.3.4 pX459-*VASN*-gRNA 有效性验证 Lipofectamine 3000 试剂盒将构建好的质粒 pX459-

VASN-gRNA-1、pX459-*VASN*-gRNA-2 分别转染到 AML12 细胞中,培养 8 h 后弃掉转染培养基换含有 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 嘌呤霉素的完全培养基进行加压筛选。待

细胞融合度达 80%~90% 时提取基因组 DNA。设计 gRNA 对应切除基因片段上下游引物(表 1)进行 PCR 扩增,并送样测序验证。

表 1 引物名称与序列

名称	序列(5'~3')	作用
<i>VASN</i> -gRNA-1F	CACCGATGTGATCATAACACGACGG	退火形成 gRNA 双链
<i>VASN</i> -gRNA-1R	AAACCCGTCGTGGTATGATCACATC	退火形成 gRNA 双链及 PCR 鉴定
<i>VASN</i> -gRNA-2 F	CACCGCAAGATGGCAGGCGCTGTAC	退火形成 gRNA 双链
<i>VASN</i> -gRNA-2 R	AAACGTACAGCGCCTGCCATCTTGC	退火形成 gRNA 双链及 PCR 鉴定
U6 通用测序引物 F	ATGGACTATCATATGCTTACCGTA	CRISPR/Cas9 重组载体 PCR 鉴定
P1-F	CTGTTACGGTGAGGACAATGT	CRISPR/Cas9 重组载体有效性验证及同源臂构建
P1-R	TCTCGTGACAGTTTGTGGCA	CRISPR/Cas9 重组载体有效性验证
P2-F	AATGCCACCTATTCTATCTGTGT	CRISPR/Cas9 重组载体有效性验证
P2-R	ATGGCTAGAGCATTCTAATGGC	CRISPR/Cas9 重组载体有效性验证及同源臂构建
P3-R	GTGGTGTGTCATGAATGAACAC	同源臂构建
P4-F	CGTCGTGGTATGATCACATA	同源臂构建
P4-R	TGTACTGGATGCACTGGCGG	同源臂构建
P5-F	GCGCCTGCCATCTTGTGCAA	同源臂构建
P6-F	TAAGCTAGCCTCCACATGATCAG	Loxp 序列敲入鉴定
P6-R	ACTAGAGCCCAGAACGTGTG	Loxp 序列敲入鉴定
P7-F	TCTCATCTGTAAGCTGCTACAGC	VASN 敲除鉴定
P7-R	CACTGGTTACCAGACTCCATGGT	VASN 敲除鉴定
<i>GAPDH</i> -F	GGTTGTCTCTGCGACTTCA	RT-qPCR
<i>GAPDH</i> -R	TGGTCCAGGGTTTCTTACTCC	RT-qPCR
<i>VASN</i> -F	CACCGTACTATCGACTGCCC	RT-qPCR
<i>VASN</i> -R	AGTACAGGCCAATGAAGCCC	RT-qPCR

1.3.5 donor DNA 质粒构建及鉴定 通过 Genbank 获得小鼠 *VASN* 基因序列再根据 gRNA 切割位点选择合适的 loxp 序列敲入位点。在第 1 个 loxp 序列敲入位点上游选择 609 bp 碱基作为 5' 端同源臂,在第 2 个 loxp 序列敲入位点下游选择 464 bp 碱基作为 3' 端同源臂。提取正常组 AML12 细胞基因组用作扩增 5' 端同源臂、3' 端同源臂以及同源臂间 *VASN* 序列的模板。通过无缝克隆技术将 5 端同源臂、loxp 序列、3 端同源臂以及同源臂间的 *VASN* 序列连接起来形成同源供体 Donor DNA。将 Donor DNA 与克隆载体 pUC57 连接并转化到 DH5 α 感受态细胞中。挑取单克隆菌,加入到含有氨苄抗性的 LB 培养基,37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱振荡培养。12 h 后提取质粒,用设计好的引物(表 1)进行 PCR 扩增,取一部分 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳检测,剩余产物送公司测序。

1.3.6 细胞培养 将 AML12 细胞接种于含有 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 完全培养基中,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、

5% CO_2 恒温培养箱中培养,取对数生长期细胞用于后续实验。后续的 Loxp 序列敲入细胞系、VASN 敲除细胞系均以相同方法培养。

1.3.7 单克隆细胞的筛选 细胞转染 8 h 后弃掉培养基,PBS 清洗后更换新鲜的完全培养基培养,直至细胞融合度达 80%~90%。将转染的细胞通过稀释至 100 个细胞/mL,接种到 96 孔板,每孔 100 μL 。显微镜下观察并标记只有 1 个细胞的孔,待细胞融合度到 80%~90% 后,扩大至 24 孔板上培养,至细胞融合度到 80%~90% 时,扩大至 6 孔板上培养。以此类推,直至细胞量达到实验的需求。

1.3.8 Loxp 序列敲入细胞系的构建及鉴定 将 AML12 细胞以 1×10^5 个/孔接种至 6 孔板中培养至细胞汇合度达到 80%-90%,用 lipofectamine 3000 试剂盒将 pX459-*VASN*-gRNA-1、pX459-*VASN*-gRNA-2 以及 donor DNA 质粒载体共转入细胞中。培养 8 h 后弃掉转染培养基换含有 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 嘌呤霉素的完全

培养基进行药筛。筛选 72 h 后挑选单克隆细胞进行扩大培养。待细胞长到 80%~90% 提取基因组 DNA 在 *Loxp* 敲入位点上下游设计引物(表 1)进行 PCR 扩增,取一部分 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳检测,剩余产物送公司测序。

1.3.9 Cre-*Loxp* 系统敲除 VASN 细胞系的构建及鉴定 将敲入 *Loxp* 序列的单克隆 AML12 细胞以 1×10^5 个/孔接种至 6 孔板中培养至细胞汇合度达到 80%~90%,用 lipofectamine 3000 试剂盒将 pALB-Cre 真核表达载体质粒转入细胞中。培养 8 h 后弃掉转染培养基换含有 1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 遗传霉素的完全培养基进行加压筛选。筛选 72 h 后挑选单克隆细胞进行扩大培养。待细胞长到 80%~90% 提取基因组 DNA 在 *Loxp* 敲入位点上下游设计引物(表 1)进行 PCR 扩增,取一部分 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳检测,剩余产物送公司测序。

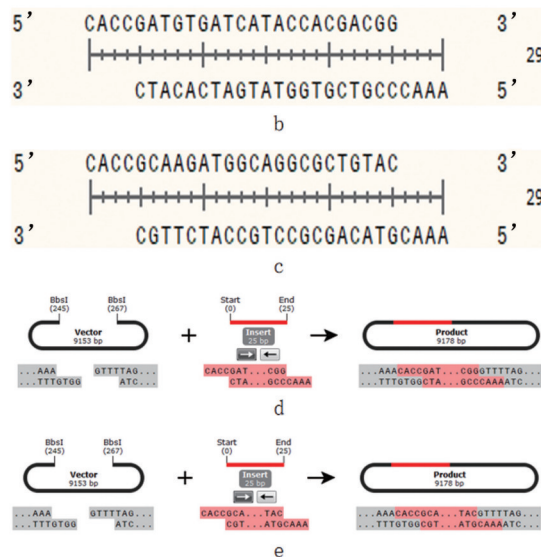
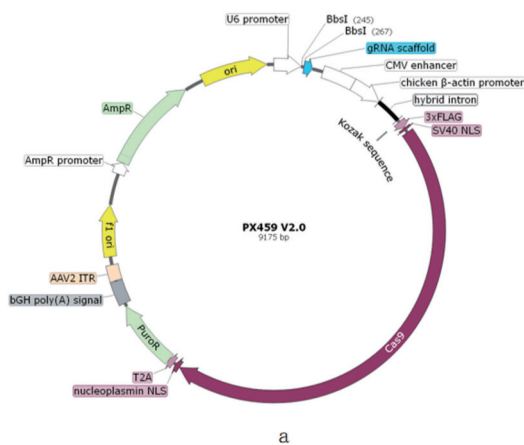
1.3.10 实时荧光定量聚合酶链式反应(RT-qPCR)检测敲除细胞株中 VASN mRNA 水平 将 pALB-cre 质粒转染入已经敲入 *loxp* 序列的 AML12 细胞中,挑取单克隆。使用 TRIZol 法提取总 RNA,用 gDNA Eraser 试剂去除 DNA,取 10 μL 去除了 DNA 的反应液进行逆转录合成 cDNA,对逆转录好的 cDNA 设计引物(表 1)进行 RT-qPCR。使用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法计算目的基因相对表达量。

1.4 统计学方法 采用 SPSS 22.0 软件对数据进行分析,符合正态分布的计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采用 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析,进一步组间两两比较采用 SNK-*q* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

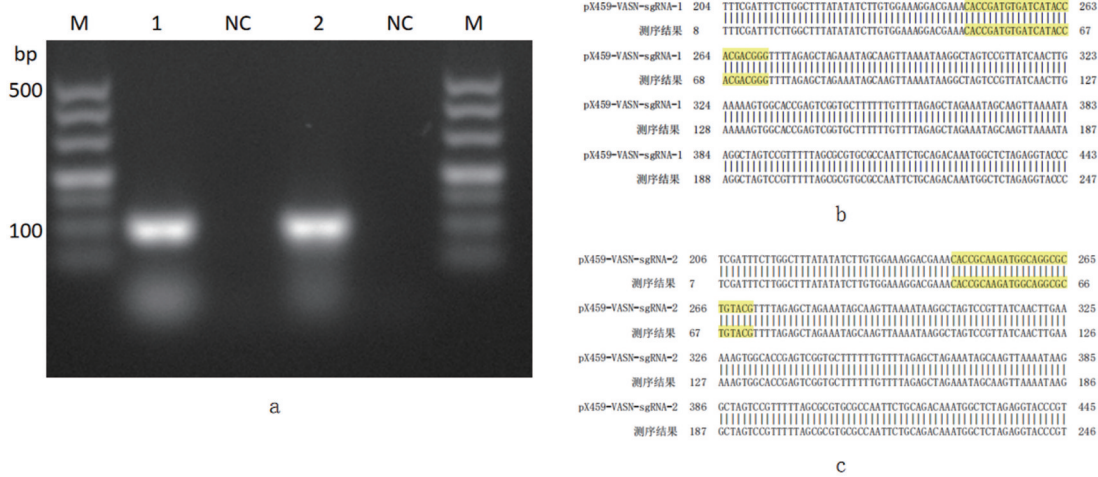
2.1 pX459-VASN-gRNA 连接鉴定

通过查阅资料,得到 pX459 v2.0 质粒的结构图,根据说明设计将 gRNA 引物连入 gRNA scaffold 中(图 1a)。依照质粒结构和靶点设计,合成了 VASN-gRNA-1 F/R 和 VASN-gRNA-2 F/R 两对 gRNA 引物,退火形成双链(图 1b、图 1c)。利用互补粘性末端将 pX459 v2.0 质粒与 gRNA 连接得到重组质粒,见图 1d 和图 1e。PCR 鉴定结果显示重组质粒可扩增得到预计的 102 bp 产物,而空载体无扩增产物,证明重组有效(图 2a)。重组质粒质粒委托上海生物工程公司进行 DNA 测序。测序结果显示重组质粒序列与设计相符,VASN-gRNA-1、VASN-gRNA-2 成功重组到 PX459 表达载体中(图 2b、图 2c)。以上结果证明 pX459-VASN-gRNA-1 和 pX459-VASN-gRNA-2 真核质粒表达载体已被成功构建,序列与设计一致。



a: pX459 v2.0 质粒结构图; b: 加了 Bbs I 酶切位点的 gRNA-1; c: 加了 Bbs I 酶切位点的 gRNA-2; d: pX459 v2.0 与加了 Bbs I 酶切位点的 gRNA-1 连接示意图; e: pX459 v2.0 与加了 Bbs I 酶切位点的 gRNA-2 连接示意图。

图 1 PX459 v2.0 质粒结构及连接示意图



a: pX459-*VASN*-gRNA 电泳结果; b: pX459-*VASN*-gRNA-1 测序结果; c: pX459-*VASN*-gRNA-2 测序结果。黄色高亮部分为 gRNA 连接位置; M: DL500 marker; 1: pX459-*VASN*-gRNA-1, 引物为 U6 通用测序引物 F、*VASN*-gRNA-1R; 2: pX459-*VASN*-gRNA-2, 引物为 U6 通用测序引物 F、*VASN*-gRNA-2R; NC: pX459 质粒, 引物分别为 U6 通用测序引物 F、*VASN*-gRNA-1R、*VASN*-gRNA-2R。

图2 pX459-*VASN*-gRNA 鉴定结果

2.2 pX459-*VASN*-gRNA 有效性验证

当 pX459-*VASN*-gRNA 具有切割目的序列的能力时, 会导致 gRNA 结合位点附件出现碱基的置换、缺失。将纯化后的 PCR 扩增片段委托上海生物工程公司进行 DNA 测序。测序结果显示, 转染了 pX459-*VASN*-gRNA-1 和 pX459-*VASN*-gRNA-2 质粒的 AML12 细胞在 gRNA 结合位置均出现碱基的置换、缺失(图 3a、图 3b) 实验结果证明设计的 2 个 gRNA 均有切割能力。

2.3 donor DNA 质粒构建及鉴定结果

PCR 电泳鉴定结果显示, donor DNA 质粒可扩增得到预计的 3 564 bp 产物, 而空载体无扩增产物, 证明重组有效, 扩增条带与预期设计相吻合(图 4a)。重组质粒委托上海生物工程公司进行 DNA 测序。测序结果显示, 重组质粒序列与设计相符, 同

源供体 donor DNA 成功重组到 pUC57 质粒中(图 4b)。以上结果证明 donor DNA 质粒载体已被成功构建, 序列与设计一致。

2.4 Loxp 序列敲入 AML12 细胞系鉴定结果

PCR 电泳鉴定结果显示 1 号泳道可扩增得到预计的 184 bp 条带、2 号泳道可扩增得到预计的 150 bp 条带、3 号泳道可扩增得到预计的 205 bp 条带、4 号泳道可扩增得到预计的 171 bp 条带, 证明重组有效(图 5a)。纯化后的 PCR 产物委托上海生物工程公司进行 DNA 测序, 测序结果显示, PCR 产物序列与设计相符, 2 个 Loxp 序列成功重组到 *VASN* 基因第二外显子两端(图 5b、图 5c)。以上结果证明 *VASN* 基因第二外显子上下游敲入 loxp 序列, 序列与设计一致。



a: 转染 pX459-*VASN*-gRNA-1 PCR 产物测序结果; b: 转染 pX459-*VASN*-gRNA-2 PCR 产物测序结果。黄色高亮部分为碱基置换、缺失位置; a 中所用引物为 P1-F、P1-R; b 中所用引物为 P2-F、P2-R。

图3 pX459-*VASN*-gRNA 有效性鉴定结果

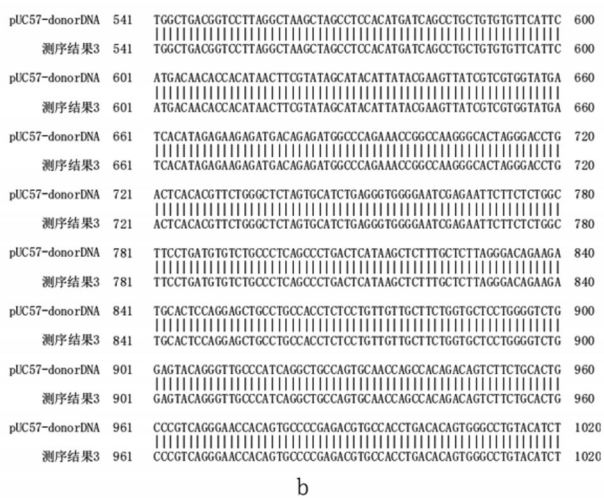
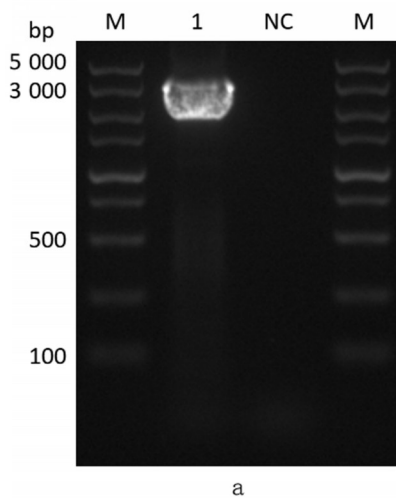
2.5 Cre-Loxp系统条件性敲除 *VASN* 基因细胞系鉴定结果

Cre-Loxp 系统联合 CRISPR/Cas9 技术可达到条件敲除特定基因的目的,其敲除原理见图 6a。*VASN* 基因的序列未被敲除时,扩增产物应为 3 564 bp,当 *VASN* 基因序列被敲除后,则扩增产物应为 1 126 bp。PCR 电泳鉴定结果显示 1 号泳道在 3 564 bp 和 1 126 bp 处出现条带,证明转染 pALB-Cre 质粒的单克隆细胞株 AML12-Loxp 发生基因敲

除。2 号泳道在 3 564 bp 出现条带证明转染 pALB-Cre 质粒的 AML12 细胞未发生敲除(图 6b)。以上结果证明成功建立利用 CRISPR/Cas9 技术联合 Cre-Loxp 系统成功构建了 *VASN* 基因敲除的 AML12 细胞。

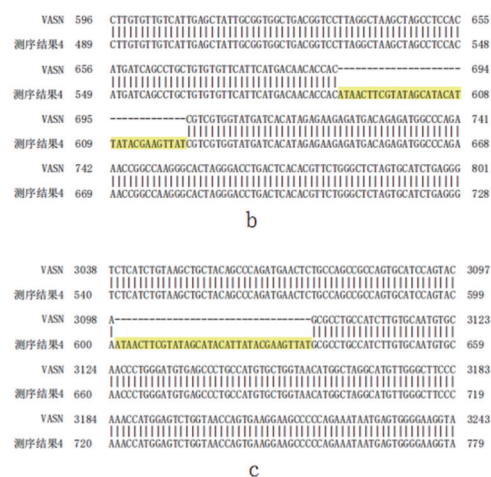
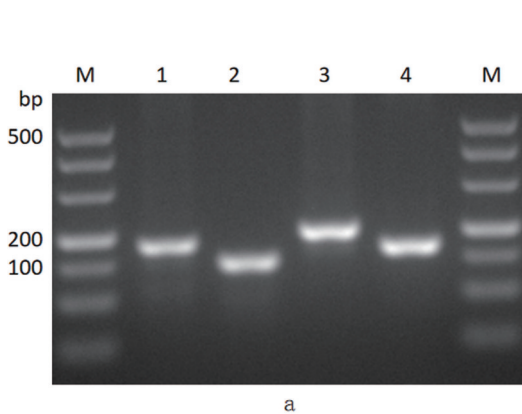
2.6 RT-qPCR 鉴定 *VASN* 稳定敲除的单克隆细胞株

RT-qPCR 结果显示 *VASN*-KO 组细胞与 WT 正常组细胞相比 *VASN* mRNA 水平显著降低,差异具有统计学意义($P < 0.05$),见图 7。



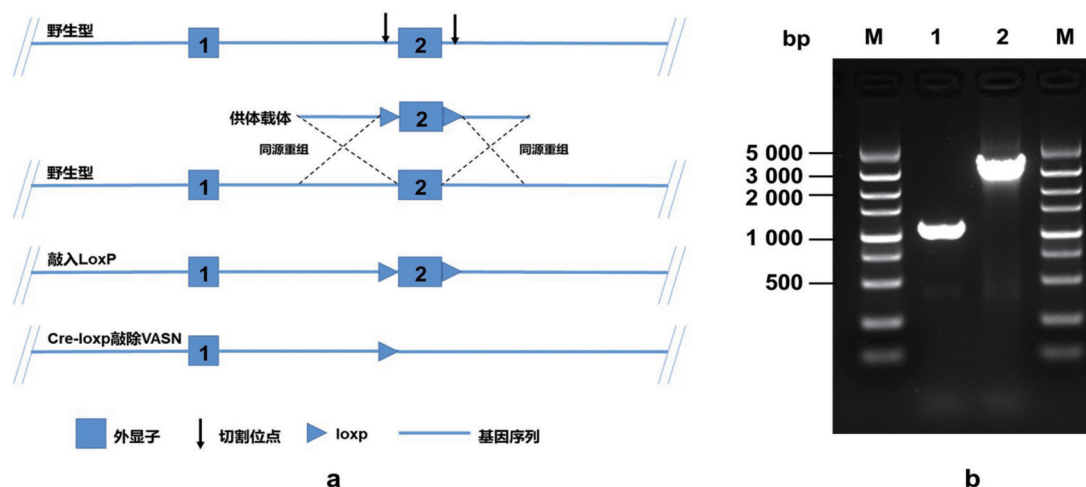
a: donor DNA 质粒电泳结果;b: donor DNA 质粒测序结果。M: DL5 000 marker; 1: donor DNA 质粒,引物为 *P1-F*、*P2-R*; NC: pUC57 质粒,引物为 *P1-F*、*P2-R*; 扩增 5' 端同源臂引物为 *P1-F*、*P3-R*; 扩增 3' 端同源臂引物为 *P4-F*、*P4-R*; 扩增同源臂间的 *VASN* 序列引物为 *P5-F*、*P2-R*。

图4 donor DNA 质粒鉴定结果



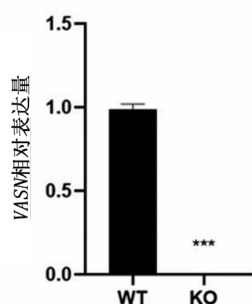
a: PCR 产物电泳结果;b: 转染 3 质粒的 AML12 细胞上游 gRNA 两端基因序列测序结果;c: 转染 3 质粒的 AML12 细胞下游 gRNA 两端基因序列测序结果。M: DL500 marker; 1: 转染 3 质粒的 AML12 细胞上游 gRNA 两端基因序列,引物为 *P6-F*、*P6-R*; 2: 正常组 AML12 细胞上游 gRNA 两端基因序列,上游引物为 *P6-F*、*P6-R*; 下游引物为 *P7-F*、*P7-R*; 3: 转染 3 质粒 AML12 细胞下游 gRNA 两端基因序列,引物为 *P7-F*、*P7-R*; 4: 正常组细胞下游 gRNA 两端基因序列,下游引物为 *P7-F*、*P7-R*; 黄色高亮部分为敲入的 loxp 序列。

图5 Loxp 序列敲入 AML12 细胞系鉴定结果



a: *VASN* 基因敲除示意图; b: *VASN* 基因敲除电泳结果。M: DL5 000 marker; 1: 单克隆细胞株 AML12-Loxp (转染 pALB-Cre 质粒); 2: 正常组 AML12 细胞 (转染 pALB-Cre 质粒); 1、2 泳道所用引物为 P1-F、P2-R。

图6 *VASN* 条件敲除示意图及电泳结果



WT: 正常组 AML12 细胞; KO: 敲除 *VASN* 的 AML12 细胞; 扩增内参基因引物为 *GAPDH*-F、*GAPDH*-R; 扩增 *VASN* 引物为 *VASN*-F、*VASN*-R。与 WT 组比较, *** $P < 0.001$ 。

图7 RT-qPCR 检测稳定敲除细胞株的 mRNA 表达水平

3 讨论

VASN 是一种重要的跨膜蛋白^[12], 其表达异常发生在多种疾病中, 尤其是肝癌。为深入探讨 *VASN* 基因在肝脏中的生物学功能及其分子机制需要对该基因进行敲除但是 *VASN* 基因系统性敲除无法准确研究其在肝脏中的作用。因此, 条件性敲除成为深入研究 *VASN* 基因的一种方法。

目前能实现条件性敲除的技术有 Cre-loxp 系统、FLPI 系统等。Cre-loxp (Cyclization Recombination Enzyme-Locus of X (cross)-overinP1) 系统应用最普遍, 由 Cre 重组酶和 loxp 位点组成。Cre 重组酶是大肠杆菌噬菌体 P1 中 *CRE* 基因编码表达的由 343 个氨基酸组成的相对分子质量为 38 000 的蛋白质^[13] 能特异性识别 DNA 上的 loxp 序列^[14]。Loxp 序

列是长 34 bp 的碱基序列, 由两个 13 bp 的反向重复序列和中间 8 bp 的间隔序列组成。Cre 重组酶根据 loxp 序列的位置和 loxp 序列之间的关系介导不同的特异性重组反应^[15]。目前, 利用 Cre-loxp 系统进行条件性敲除也存在着许多不足之处, 比如 loxp 序列敲入位点难以选择、同源供体载体构建困难以及耗费时间长等缺点。

CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats) 系统^[16] 是细菌体内的一种免疫防御系统, 普遍存在于各类细菌中, 能特异性降解外源 DNA^[17]。目前已经发现 3 种类型的 CRISPR/Cas 系统: I 型、II 型和 III 型^[18]。其中 II 型系统组分较为简单, 主要依赖的是 Cas9 核心蛋白, 在 RNA 的介导下, Cas9 蛋白能够识别靶序列进行切割造成 DNA 的双链断裂 (double-strand breaks, DSB)。在此基础上, 人们对基因组的特定位点进行基因编辑。虽然 CRISPR/cas9 可以对基因组进行高效、精准地定点敲除但是其脱靶效应仍不可避免。

本研究利用网站 (<http://crispor.tefor.net/>) 设计针对 *VASN* 基因序列的 gRNA, 通过对 pX459-*VASN*-gRNA 质粒进行 PCR 扩增和测序, 可以看到 PCR 电泳图出现预期条带, 测序结果显示 gRNA 成功连接到 pX459 载体上, 表明我们成功构建了 pX459-*VASN*-gRNA 载体质粒。利用 CRISPR/cas9 基因编辑技术定点造成 DNA 双链断裂后细胞启动自我修复。常见的修复方式有 NHEJ 和 HDR, 其中 NHEJ

可发生在任何时期而HDR一般只发生在细胞有丝分裂的S期和G2期^[19]。CRISPR/cas9切割后通过NHEJ进行基因修饰的成功率为20%~60%，HDR进行基因同源重组的成功率为0.5%~20%^[20]。因此，将除了Loxp序列之外，其余都是同源序列的供体载体转染入细胞。这不仅允许HDR在两个切割断点发生，还允许在片段切除后的两个残端之间发生，增加了重组效率^[21]。提高了获得敲入loxp序列单克隆细胞的概率。通过提取pX459-*VASN*-gRNA-1、pX459-*VASN*-gRNA-2以及donor DNA质粒载体共转染细胞的基因并进行PCR扩增和测序，可以看到转染3个质粒的AML12细胞比正常组AML12细胞扩增的片段要长。测序结果显示2个Loxp序列成功重组到*VASN*基因第二外显子两端。通过对转染pALB-Cre质粒的单克隆细胞株AML12-Loxp细胞提取DNA进行PCR琼脂糖凝胶电泳及测序验证，PCR结果显示，在电泳图上出现了2种目的条带，而正常组只出现一种目的条带，证明单克隆细胞株AML12-Loxp中部分细胞的*VASN*基因被敲除而转染pALB-Cre质粒的AML12细胞未发生敲除。通过RT-qPCR进一步验证敲除效果，结果显示单克隆细胞中*VASN*基因的mRNA不再表达，进一步证明*VASN*基因被成功敲除。

综上所述，本研究利用CRISPR/cas9基因编辑技术成功将loxp序列引入AML12细胞*VASN*基因两侧，再通过Cre重组酶敲除*VASN*基因，为后续建立*VASN*时空表达模型奠定基础。

参考文献：

- [1] IKEDA Y, IMAI Y, KUMAGAI H, et al. Vasorin, a transforming growth factor beta-binding protein expressed in vascular smooth muscle cells, modulates the arterial response to injury in vivo [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101(29): 10732-10738.
- [2] LI S, LI H, YANG X, et al. Vasorin is a potential serum biomarker and drug target of hepatocarcinoma screened by subtractive-EMSA-SELEX to clinic patient serum [J]. Oncotarget, 2015, 6(12): 10045-10059.
- [3] MALAPEIRA J, ESSELENS C, BECH-SERRA J J, et al. ADAM17 (TACE) regulates TGF β signaling through the cleavage of vasorin[J]. Oncogene, 2011, 30(16): 1912-1922.
- [4] MAN J, YU X, HUANG H, et al. Hypoxic induction of Vasorin regulates Notch1 turnover to maintain glioma stem-like cells [J]. Cell Stem Cell, 2018, 22(1): 104-118.
- [5] LIANG W, GUO B, YE J, et al. Vasorin stimulates malignant progression and angiogenesis in glioma [J]. Cancer Sci, 2019, 110(8): 2558-2572.
- [6] BHANDARI A, GUAN Y, XIA E, et al. VASN promotes YAP/TAZ and EMT pathway in thyroid carcinogenesis in vitro [J]. Am J Transl Res, 2019, 11(6): 3589-3599.
- [7] HUANG A, DONG J, LI S, et al. Exosomal transfer of vasorin expressed in hepatocellular carcinoma cells promotes migration of human umbilical vein endothelial cells [J]. Int J Biol Sci, 2015, 11(8): 961-969.
- [8] SAVIĆ N, SCHWANK G. Advances in therapeutic CRISPR/Cas9 genome editing [J]. Transl Res, 2016, 168: 15-21.
- [9] 孔维健, 常宇鑫, 咎春芳, 等. 基于Cre-loxP系统条件性基因敲除小鼠的构建及其应用进展 [J]. 中国实验诊断学, 2017, 21(12): 2208-2211.
- [10] KONG W J, CHANG Y X, ZAN C F, et al. Construction and application progress of conditional gene knockout mice based on Cre-loxP system [J]. Chinese Journal of Laboratory Diagnosis, 2017, 21(12): 2208-2211.
- [10] 徐 铭, 徐宏治, 陈峻骞, 等. 利用CRISPR/Cas9技术将LoxP序列靶向引入小鼠Alk1基因 [J]. 中国临床神经科学, 2015, 23(6): 615-623.
- [10] XU M, XU H Z, CHEN J R, et al. Targeted insertion of Lox P sequences into Alk1 gene in mice by using CRISPR/Cas9 [J]. Chinese Journal of Clinical Neurosciences, 2015, 23(6): 615-623.
- [11] 任晓楠, 任蓉蓉, 刘 雪, 等. Alb-cre/DTR小鼠可诱导性肝损伤模型的建立 [J]. 中国实验动物学报, 2016, 24(2): 134-138.
- [11] REN X N, REN R R, LIU X, et al. Establishment of an Alb-cre/DTR mouse model of inducible liver injury [J]. Acta Laboratorium Animalis Scientia Sinica, 2016, 24(2): 134-138.
- [12] 耿 介, 王超男, 李少华, 等. Vasorin基因稳定敲除HepG2细胞株的建立及其生物学功能研究 [J]. 生物技术通讯, 2018, 29(2): 162-167.
- [12] GENG J, WANG C N, LI S H, et al. Establishment and biological function of Vasorin (VASN) gene stably knock-out HepG2 cell lines [J]. Letters in Biotechnology, 2018, 29(2): 162-167.
- [13] VAN DUYN G D. Cre Recombinase [J]. Microbiol Spectr, 2015, 3(1): MDNA3-0014-2014.

- [14] KOS C H. Cre/loxP system for generating tissue-specific knockout mouse models [J]. *Nutr Rev*, 2004, 62(6 Pt 1): 243-246.
- [15] SCHOOK L B, RUND L, BEGNINI K R, et al. Emerging Technologies to Create Inducible and Genetically Defined Porcine Cancer Models [J]. *Front Genet*, 2016, 7: 28.
- [16] MANGHWAR H, LINDSEY K, ZHANG X, et al. CRISPR/Cas System: Recent Advances and Future Prospects for Genome Editing [J]. *Trends Plant Sci*, 2019, 24(12): 1102-1125.
- [17] CHARPENTIER E, MARRAFFINI L A. Harnessing CRISPR-Cas9 immunity for genetic engineering [J]. *Curr Opin Microbiol*, 2014, 19: 114-119.
- [18] MAKAROVA K S, KOONIN E V. Annotation and Classification of CRISPR-Cas Systems [J]. *Methods Mol Biol*, 2015, 1311: 47-75.
- [19] ANDERS C, NIEWOEHNER O, DUERST A, et al. Structural basis of PAM-dependent target DNA recognition by the Cas9 endonuclease [J]. *Nature*, 2014, 513(7519): 569-573.
- [20] WANG H, YANG H, SHIVALILA C S, et al. One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering [J]. *Cell*, 2013, 153(4): 910-918.
- [21] SASAKI H, YOSHIDA K, HOZUMI A, et al. CRISPR/Cas9-mediated gene knockout in the ascidian *Ciona intestinalis* [J]. *Dev Growth Differ*, 2014, 56(7): 499-510.

本文引用格式:

甘 暨,杨丽超,张 起,等. CRISPR/Cas9联合Cre-Loxp系统建立 VASN 条件敲除的小鼠肝细胞系[J]. *广西医科大学学报*, 2023, 40(2): 173-181. DOI:10.16190/j.cnki.45-1211/r.2023.02.001

GAN J, YANG L C, ZHANG Q, et al. Establishment of mouse liver cell line with VASN conditional knockout using CRISPR/Cas9 and Cre-Loxp system [J]. *Journal of Guangxi Medical University*, 2023, 40(2):173-181. DOI: 10.16190/j.cnki.45-1211/r.2023.02.001