

Construction of *MARCH2* KO Cell Line by CRISPR/Cas9 Technology

Dan Xia

Pathology Department of Shandong Medical College, Linyi Shandong
Email: mary3515813@163.com

Received: Mar. 6th, 2019; accepted: Mar. 22nd, 2019; published: Mar. 29th, 2019

Abstract

CRISPR/Cas9 system is the state-of-the-art genome-editing technology through constitutive expression of nucleases Cas9, which binds to a specific site in the genome mediated by single guide RNA (sgRNA) and induces double-strand breaks (DSBs) at desired genomic loci. DSBs induced by these site-specific nucleases can be repaired by error-prone nonhomologous end joining (NHEJ) or homologous recombination, to generate gene-specific knockout (KO) or knock-in cells. The membrane associated RING-CH (MARCH) family comprises a structurally related protein family. Currently, there are at least eleven known MARCH genes (MARCH-1-11) in the human genome. *MARCH2* is involved in the regulation of vesicle trafficking, and thus refers to the formation, intracellular movement, exocytosis, and endocytosis of synaptic vesicles. In this study, two sgRNAs targeting the Exon2 of *MARCH2* gene were designed, and their gene targeting efficiency was assessed via the western blot analyses. Through dilution plating, a monoclonal *MARCH2* KO cell line was isolated and subjected to the sequence analysis, which revealed that it contained frameshift mutations in both *MARCH2* alleles. The results obtained demonstrate the successful application of the CRISPR/Cas9 system to the construction of the *MARCH2* KO cell line, and strongly suggest that it is a promising tool for studying the functions and related mechanisms of *MARCH2*.

Keywords

MARCH2, CRISPR/Cas9, Gene Knockout, Frameshift Mutation

应用CRISPR/Cas9基因编辑技术构建沉默 *MARCH2*的细胞系

夏丹

山东医学高等专科学校病理教研室, 山东 临沂
Email: mary3515813@163.com

摘要

CRISPR/Cas9系统是一种先进的基因编辑技术,人工设计先导RNA (single-guide RNA, sgRNA)介导外源表达的Cas9蛋白特异性的结合、切割基因组靶点,切割后的DNA有非同源末端连接(non-homologous end joining, NHEJ)和同源重组(homologous recombination)两种修复方式,以构建基因特异性敲除或敲入细胞。The membrane associated RING-CH (MARCH)家族由一系列结构相关的蛋白组成,目前,在人类基因组中至少有11个已知成员(MARCH-1-11)。MARCH2参与囊泡运输的调节,如突触囊泡的形成、细胞内运动、胞外分泌和吞噬。在本研究中,我们针对MARCH2基因第二外显子设计了CRISPR/Cas9干扰靶序列,并应用蛋白质印迹方法对其基因剔除的有效性进行了验证,结果显示在两个MARCH2等位基因都含有移码突变,证实我们应用CRISPR/Cas9系统成功构建了MARCH2敲除的细胞系,这将是MARCH2功能及相关机制研究的强有力的工具。

关键词

MARCH2, CRISPR/Cas9, 基因敲除, 移码突变

Copyright © 2019 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeat)是一段串联重复序列,先后在原核生物大肠杆菌基因组中以及细菌和古细菌中发现 CRISPR 的存在,并且 CRISPR 具有抵御外来噬菌体入侵的功能[1] [2]。CRISPR 中重复序列和间隔可变序列分别 21~48 bp、21~72 bp, CRISPR 基因座转录加工为成熟的 crRNA。CAS 基因定位在 CRISPR 基因座附近的区域,编码具有核酸酶和解旋酶活性的蛋白,与 crRNA 形成的蛋白核酸复合物可以识别 DNA 序列上的 PAM (protospacer adjacent motif)区域,特异性切割 DNA 双链,发挥免疫防御功能[3] [4]。利用此特性可将其用作人工核酸内切酶,对基因组特定位点进行遗传修饰,精确编辑基因组[5]。CRISPR/Cas9 系统就是基于此原理人为优化的基因组编辑系统,人工设计先导 RNA (single-guide RNA, sgRNA)介导外源表达的 Cas9 蛋白特异性的结合、切割基因组靶点[6],切割后的 DNA 有非同源末端连接(non-homologous end joining, NHEJ)和同源重组(homologous recombination)两种修复方式。在无外源的同源 DNA 存在时,切割的 DNA 可通过 NHEJ 连接结合,这样在切割位点就会引入插入或缺失序列,进而引发目的基因编码的蛋白产生移码突变以实现对目的基因的敲除。如果有同源片段存在,切割的 DNA 则发生同源重组,将外源片段整合到基因组中,以实现基因的敲除、敲入或突变等。

MARCH2 (membrane associated RING-CH protein 2)是 MARCH 家族成员之一,含有 RING 结构域,具有 E3 泛素连接酶活性,调节多种细胞活动如细胞运输、DNA 修复和信号转导[7]。MARCH2 作为跨膜泛素连接酶家族成员之一,近来被报道与病毒免疫逃逸蛋白有密切关系[8]。MARCH2 最初的作用主要是通过 syntaxin 6 (STX6)相互作用参与囊泡运输[9]。泛素化过程被广泛称为蛋白的“死亡之吻”,因为

如果将一个小分子泛素附在蛋白上,就会使此蛋白失去活性,这个小分子泛素就是一个标签,它向蛋白运输载体发出信号使其运输蛋白到蛋白酶体以降解之。作为 E3 泛素连接酶家族成员之一, *MARCH2* 可以泛素化几种底物,如 DLG1 [10], β 2AR [11], 和 CFTR [12]。

我们选用目前最先进 CRISPR/Cas9 基因编辑技术来构建稳定敲除 *MARCH2* 的细胞系作为 *MARCH2* 功能研究更有效的工具。

2. 材料和方法

2.1. 材料和试剂

兔抗人 *MARCH2* 多克隆抗体购自美国 Abcam 公司; ACTB/b-actin 抗体购自 Tianjin Sungene 公司; Megatran 1.0 转染试剂购自 Biotum 公司; 细胞和组织基因组 DNA 提取试剂盒购自华中海威公司; PX330-*MARCH2*-sgRNA 质粒购自上海南方模式生物科技发展有限公司; *MARCH2* DNA 引物购自 Invitrogen 公司。

2.2. 合成 sgRNA 寡核苷酸序列并构建载体

由上海南方模式生物科技发展有限公司设计 CRISPR 干扰靶序列,并针对人类的 *MARCH2* 基因构建 CRISPR-Cas9 表达载体。

Guide RNA 靶序列如下:

Guide RNA target site 1: GCCCGTAGCCTCCACGACCT TGG

Guide RNA target site 2: TCCAAGGTCGTGGAGGCTAC GGG

载体构建:载体 PX330-GFP 使用 Bbs I 酶切电回收,分别与 *MARCH2*-V-Gui-F/R, *MARCH2*-V-Gui-F2/R2 退火产物连接转化,涂布于氨苄平板上,37°C 培养过夜。次日,分别挑取 3 个单克隆,使用引物 u6-gui-id-f 测序。

质粒纯化:测序正确的克隆接种 4 ml LB,使用 QIAGEN Plasmid Midi Kit 抽提质粒,溶于 Nuclease-Free Water 中,−30°C 保存待用。

2.3. PX330-*MARCH2*-sgRNA 质粒转染细胞

正常培养 HCT116 细胞至密度为 60%~70%,用 Megatran 1.0 作为转染试剂,将质粒 PX330-*MARCH2*-1-sgRNA 和 PX330-*MARCH2*-2-sgRNA 转染细胞。在荧光显微镜下观察发现,转染了 PX330-*MARCH2*-sgRNA 的细胞多数表达绿色荧光,表明质粒转染细胞成功。

2.4. 单克隆筛选、DNA 提取及 PCR

细胞转染 PX330-*MARCH2*-sgRNA 质粒后,正常培养 48 小时后,收细胞,进行流式分选,铺 96 孔板,每孔一个细胞。待 2 周左右,单个细胞长成克隆时,显微镜下仔细观察每一个孔的细胞,若发现非单克隆的细胞需要将其标注出来剔除筛选之外。传两代后,取出单个克隆的一部分细胞提取基因组 DNA。按照试剂盒操作步骤进行操作,以 2 μ l DNA 作为模板进行 PCR 扩增,送公司测序及分析。*MARCH2* DNA 的上游引物为 5'-AGA TGG TGC AAA CTG AGG CT-3',下游引物 5'-AAC TAG CCA GGT GTG GTG AC-3' [13]。

2.5. Western blot 鉴定

为检测 CRISPR/Cas9 系统对内源基因表达水平的影响,将测序结果为阳性单克隆的细胞培养 48 h 后,

收取蛋白样品进行 Western blot 检测。比较野生型 HCT116 细胞与转染 Cas9-*MARCH2* 质粒的细胞的 *MARCH2* 蛋白表达水平, 鉴定利用 CRISPR/Cas9 系统敲除细胞内源 *MARCH2* 的效率。

3. 结果

3.1. 应用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术构建沉默 *MARCH2* 的细胞系

CRISPR/Cas9 系统通过引进插入或缺失可以精确敲除靶基因, 为观察缺失整个蛋白后的表型提供必要工具。为了进一步证实 *MARCH2* 的功能, 我们应用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术构建敲除 *MARCH2* 基因的 HCT116 细胞系。我们针对 *MARCH2* 基因第二外显子设计的 CRISPR/Cas9 干扰靶序列为 TCC AAG GTC GTG GAG GCT ACG GG, 通过载体构建、质粒纯化、转染、流式分选、单克隆培养、测序、分析、鉴定得到了敲除 *MARCH2* 基因的细胞系。

经过一系列克隆筛选, 我们得到了 4 个 Cas9-*MARCH2* 克隆。序列分析显示这些突变大多导致移码, 提前出现终止密码子(TGA), 翻译提前终止使得 *MARCH2* 的 RING domain 和 PDZ domain 缺失, 不能行使其功能(图 1A~D)。简单描述这些突变如下: 克隆 1: GT → GCT; 克隆 2: AGGTCG → AG; 克隆 3: TCGTGG → C; 克隆 4: 缺失性突变(No. 28~35 GCTACGGCCTCGGACCGCCCCAG)和点突变(No. 54 GCC → ACC)。

3.2. 沉默 *MARCH2* 的细胞系的 Western blot 鉴定

Western blot 鉴定结果显示, CRISPR/Cas9 靶向敲除 *MARCH2* 导致 *MARCH2* 蛋白表达水平消失(图 2)。

4. 讨论

基因编辑技术是基因功能研究的工具。早期, 同源重组技术用于基因编辑, 但效率非常低。人工核苷酸技术的出现提高了基因编辑的效率。除了 CRISPR/Cas9 系统之外, 人工核苷酸系统也包括锌指核苷酸 zinc finger nuclease (ZFN)和激活转录因子效应核酶 activating transcription factor effector nuclease (TALEN) [14]。ZFN 和 TALEN 通过 DNA 蛋白识别特异靶点: ZFN 上的锌指结构单元能识别三个基本序列; TALEN 通过重复可变区 repeat variable diresidue (RVD)能识别特异碱基, 根据 ZFN 结构或 RVD 组合, 可以设计分子蛋白结合任何基因组中的 DNA 序列, 因而能识别并剪切特异的 DNA 序列[15] [16]。CRISPR/Cas9 系统是蛋白和核酸组成的蛋白核酸复合体, 应用先导 RNA 识别 DNA 序列[17] [18]。因此, Cas9 蛋白被用于切割靶序列。基因组的大小决定靶标 DNA 序列通常超过 10 bp。因而, ZFN 或 TALEN 系统必须依赖 ZFN 蛋白单位的目的序列或 RVD 排列和组合, 使得质粒构建过程耗时费力。同时, CRISPR/Cas9 系统的识别依赖单导 RNA 和目的 DNA 的碱基互补配对, 只需要 23 bp 大小的单导 RNA 对应不同的靶标即可, 这样显著简化了质粒构建的任务。

在 CRISPR/Cas9 基因编辑技术出现之前, 细胞水平基因功能研究主要依靠 RNA 干扰技术, 为基因功能和机制的分析提供了不小帮助。然而, RNA 干扰的短暂性和不完全性可能影响基因功能的正确判断。CRISPR/Cas9 技术在基因水平上能引起移码框突变, 因此, 目的基因被敲除。它是比 RNA 干扰技术更有效的研究基因功能的工具。在近来的研究报道中, 通过 CRISPR/Cas9 全基因组文库进行的黑色素瘤耐药基因的筛选提供了 RNA 干扰文库相关的这些基因的成功识别[19]。

MARCH2 是二次跨膜蛋白, 由 N 端 RING domain 中间的二次跨膜区和 C 端的 PDZ domain 构成。已有功能研究证明, *MARCH2* 是高尔基体和内体之间运输的调节分子[9], *MARCH2* 作为 E3 连接酶能降解细胞表面受体如转铁蛋白受体(TfR, transferrin receptor)和共刺激分子 B7.2 (CD86), 能与 β_2AR 相互

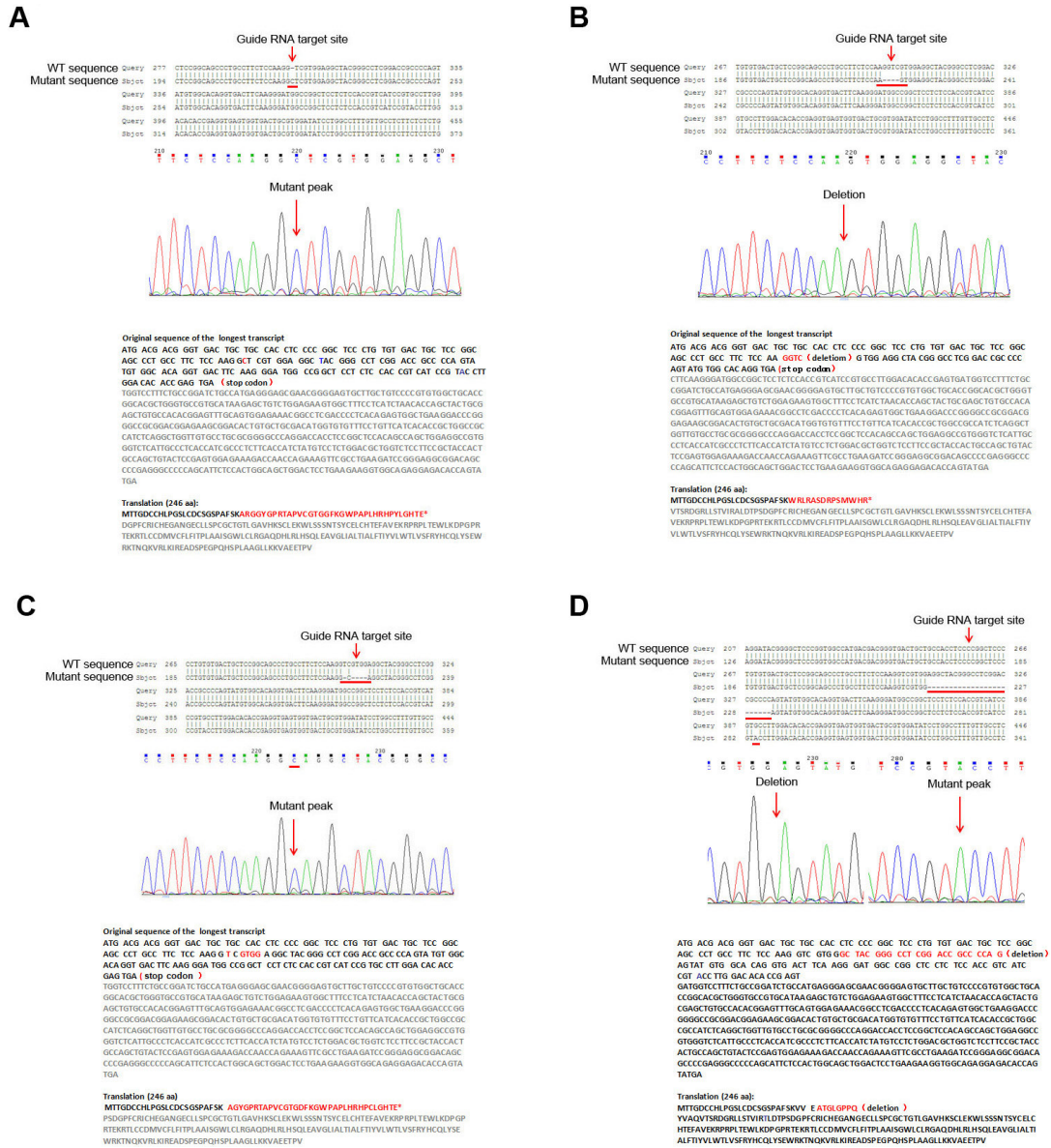


Figure 1. MARCH2 CRISPR/Cas9 KO sequence diagram. A: Clone 1 sequence diagram, GT → GCT; B: Clone 2 sequence diagram, AGGTCG → AG; C: Clone 3 sequence diagram, TCGTGG → C; D: Clone 4 sequence diagram, deletion mutation (No. 28~35 GCTACGGGCTTCGGACCGCCCCAG) and point mutation (No. 54 GCC → ACC)

图 1. CRISPR/Cas9 敲除 MARCH2 基因序列图 A 克隆 1 的序列图 GT → GCT; B: 克隆 2 的序列图 AGGTCG → AG; C: 克隆 3 的序列图 TCGTGG → C; D: 克隆 4 的序列图, 缺失性突变(No. 28~35 GCTACGGGCTTCGGACCGCCCCAG) 和点突变(No. 54 GCC → ACC)

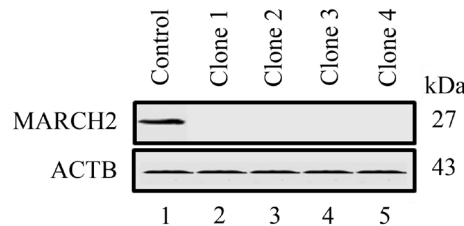


Figure 2. The endogenous expression of MARCH2 protein in Cas9-MARCH2 cells were detected by the Western blot

图 2. Western blot 检测 Cas9-MARCH2 细胞的内源性 MARCH2 表达

作用, 促进 β_2 AR 的内吞和溶酶体降解[11]。MARCH2 也能定位在 HEK293T 细胞细胞膜上, 通过其 PDZ motif 与 DLG1 (discs large homolog 1, scribble cell polarity complex component) 相互作用促进 DLG1 泛素化, 减弱 DLG1 在细胞连接点的表达, 影响细胞的极性[10]。最近的研究发现, 在 CFBE 细胞(囊性纤维化支气管上皮细胞, Cystic fibrosis bronchial epithelial cell line)中 MARCH2 通过与 CAL (CFTR 相关的配体)和 STX6 结合泛素化并降解 CFTR [12]。MARCH2 在 HIV-1 感染中表达升高, 通过包膜蛋白易位和降解抑制 HIV-1 产物, 在监管和调节 HIV-1 感染相关的过程中发挥举足轻重的作用[20] [21]。我们前期的研究发现 MARCH2 参与了肿瘤的发生和进展, 但其作用机制尚不清楚, 本研究应用先进的 CRISPR/Cas9 基因编辑技术成功建立沉默 MARCH2 的细胞系, 将为 MARCH2 的功能和机制的研究提供有效的工具。

基金项目

本研究由国家自然科学基金项目(81702776); 山东省高等学校科技计划项目(J17KA238); 山东省医药卫生科技发展计划项目(2016WS0569)资助。

参考文献

- [1] Ishino, Y., *et al.* (1987) Nucleotide Sequence of the *iap* Gene, Responsible for Alkaline Phosphatase Isozyme Conversion in *Escherichia coli*, and Identification of the Gene Product. *Journal of Bacteriology*, **169**, 5429-5433. <https://doi.org/10.1128/jb.169.12.5429-5433.1987>
- [2] Barrangou, R., *et al.* (2007) CRISPR Provides Acquired Resistance against Viruses in Prokaryotes. *Science*, **315**, 1709-1712. <https://doi.org/10.1126/science.1138140>
- [3] Deveau, H., Garneau, J.E. and Moineau, S. (2010) CRISPR/Cas System and Its Role in Phage-Bacteria Interactions. *Annual Review of Microbiology*, **64**, 475-493. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.112408.134123>
- [4] Kunin, V., Sorek, R. and Hugenoltz, P. (2007) Evolutionary Conservation of Sequence and Secondary Structures in CRISPR Repeats. *Genome Biology*, **8**, R61.
- [5] Hwang, W.Y., *et al.* (2013) Efficient Genome Editing in Zebrafish Using a CRISPR-Cas System. *Nature Biotechnology*, **31**, 227-229. <https://doi.org/10.1038/nbt.2501>
- [6] Mali, P., Esvelt, K.M. and Church, G.M. (2013) Cas9 as a Versatile Tool for Engineering Biology. *Nature Methods*, **10**, 957-963. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2649>
- [7] Barteel, E., *et al.* (2004) Downregulation of Major Histocompatibility Complex Class I by Human Ubiquitin Ligases Related to Viral Immune Evasion Proteins. *Journal of Virology*, **78**, 1109-1120. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.3.1109-1120.2004>
- [8] Boutell, C., Sadis, S. and Everett, R.D. (2002) Herpes Simplex Virus Type 1 Immediate-Early Protein ICP0 and Its Isolated Ring Finger Domain Act as Ubiquitin E3 Ligases *In Vitro*. *Journal of Virology*, **76**, 841-850. <https://doi.org/10.1128/JVI.76.2.841-850.2002>
- [9] Nakamura, N., *et al.* (2005) MARCH-II Is a Syntaxin-6-Binding Protein Involved in Endosomal Trafficking. *Molecular Biology of the Cell*, **16**, 1696-1710. <https://doi.org/10.1091/mbc.e04-03-0216>
- [10] Cao, Z., *et al.* (2008) DLG1 Is an Anchor for the E3 Ligase MARCH2 at Sites of Cell-Cell Contact. *Cell Signal*, **20**, 73-82. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2007.08.019>
- [11] Han, S.O., *et al.* (2012) MARCH2 Promotes Endocytosis and Lysosomal Sorting of Carvedilol-Bound Beta(2)-Adrenergic Receptors. *The Journal of Cell Biology*, **199**, 817-830. <https://doi.org/10.1083/jcb.201208192>
- [12] Cheng, J. and Guggino, W. (2013) Ubiquitination and Degradation of CFTR by the E3 Ubiquitin Ligase MARCH2 through Its Association with Adaptor Proteins CAL and STX6. *PLoS ONE*, **8**, e68001.
- [13] Bauer, D.E., *et al.* (2015) Generation of Genomic Deletions in Mammalian Cell Lines via CRISPR/Cas9. *Journal of Visualized Experiments*, **95**, e52118.
- [14] Mussolino, C. and Cathomen, T. (2013) RNA Guides Genome Engineering. *Nature Biotechnology*, **31**, 208-209. <https://doi.org/10.1038/nbt.2527>
- [15] Geurts, A.M., *et al.* (2009) Knockout Rats via Embryo Microinjection of Zinc-Finger Nucleases. *Science*, **325**, 433.
- [16] Cermak, T., *et al.* (2011) Efficient Design and Assembly of Custom TALEN and Other TAL Effector-Based Constructs for DNA Targeting. *Nucleic Acids Research*, **39**, e82.

-
- [17] Cong, L., *et al.* (2013) Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems. *Science*, **339**, 819-823. <https://doi.org/10.1126/science.1231143>
- [18] Mali, P., *et al.* (2013) RNA-Guided Human Genome Engineering via Cas9. *Science*, **339**, 823-826. <https://doi.org/10.1126/science.1232033>
- [19] Mandal, P.K., *et al.* (2014) Efficient Ablation of Genes in Human Hematopoietic Stem and Effector Cells Using CRISPR/Cas9. *Cell Stem Cell*, **15**, 643-652. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2014.10.004>
- [20] Zhang, Y., *et al.* (2018) *MARCH2* Is Upregulated in HIV-1 Infection and Inhibits HIV-1 Production through Envelope Protein Translocation or Degradation. *Virology*, **518**, 293-300.
- [21] Zhang, Y., *et al.* (2019) Membrane-Associated RING-CH (MARCH) 1 and 2 Are MARCH Family Members That Inhibit HIV-1 Infection. *The Journal of Biological Chemistry*, **294**, 3397-3405.

知网检索的两种方式:

1. 打开知网页面 <http://kns.cnki.net/kns/brief/result.aspx?dbPrefix=WWJD>
下拉列表框选择: [ISSN], 输入期刊 ISSN: 2161-8712, 即可查询
2. 打开知网首页 <http://cnki.net/>
左侧“国际文献总库”进入, 输入文章标题, 即可查询

投稿请点击: <http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱: acm@hanspub.org