探索・发现

利用TALEN技术建立Mon1a基因敲除 细胞系及其表型分析

朱伟萍1,2 李华顺1,3*

('中国科学院上海高等研究院, 上海 201210; '中国科学院大学, 北京 100039; '同济大学医学院, 上海 200092)

摘要 为了研究囊泡运输蛋白Monla(Monl secretory trafficking family member A)在细胞中的作用,该文利用类转录激活因子效应物核酸酶(transcription activator-like effector nuclease, TALEN)打靶技术构建了针对Monla基因的特定TALEN质粒对,转染后筛选获得Monla基因敲除的HEK293T稳定细胞系。进一步从细胞增殖能力、迁移能力以及小鼠皮下成瘤能力等方面研究了Monla缺失对HEK293T细胞的影响。结果表明, Monla在细胞增殖、迁移和成瘤等过程中起到重要作用。

关键词 类转录激活因子效应物核酸酶; Mon1a; 基因敲除

Construction *Mon1a* Gene Knock-out HEK293T Stable Cell Line by TALEN and Phenotype Analysis

Zhu Weiping^{1,2}, Li Huashun^{1,3*}

(¹Shanghai Advanced Research Institute, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201210, China; ²University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China; ³Tongji University School of Medicine, Shanghai 200092, China)

Abstract In order to investigate the function of vesicular traffic protein Mon1a (Mon1 secretory trafficking family member A) in cells, we utilized TALEN (transcription activator-like effector nuclease) targeting technology to construct a pair of TALEN plasmids that aim at *Mon1a* gene. After transfection, we successfully got the *Mon1a* gene knock-out HEK293T stable cell line by screening. Then we detected the effects of Mon1a in HEK293T cell through the ability of proliferation, migration and the mice subcutaneous tumor formation by corresponding experiments. The results showed that loss of Mon1a would inhibit cell proliferation, cell migration and tumor formation.

Keywords transcription activator-like effector nuclease; Mon1a; gene knock-out

学者们在酿酒酵母细胞中定义了Mon1蛋白质, 并命名为YMon1, YMon1蛋白质与Ccz1蛋白质作为 囊泡融合核心机制cis-SNARE的组成部分, 共同参

收稿日期: 2015-11-05 接受日期: 2016-01-20

国家重点基础研究发展计划(973计划)(批准号: 2014CB964600)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0512-62608997, E-mail: huashunli2011@163.com

Received: November 5, 2015 Accepted: January 20, 2016

This work was supported by the National Basic Research Program of China (973 Program) (Grant No.2014CB964600)

*Corresponding author. Tel: +86-512-62608997, E-mail: huashunli2011@163.com

网络出版时间: 2016-03-16 17:12:21 URL: http://www.enki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20160316.1712.004.html

与酿酒酵母细胞的液泡融合过程^[1-4]。YMon1的缺 失将会引起液泡融合的缺陷。在秀丽隐杆线虫中发 现了Mon1的同源蛋白SAND-1,其参与内体早期到 晚期的成熟以及内吞过程^[5-6]。同时,在哺乳动物中 发现了Mon1的两种同源蛋白:Mon1a和Mon1b,它们 都有一个SAND结构域,其他结构同源性较低,并且 其细胞功能有较大差异。已有研究表明,Mon1a的 主要功能是参与细胞囊泡运输,Mon1a的减少会导 致高尔基体形态异常,高尔基体重组被延迟^[7-10]。此 外,Mon1a还在内质网到高尔基体、高尔基体到质 膜的蛋白质运输过程中发挥着重要作用。Mon1a作 为囊泡运输相关蛋白质,对维持细胞的正常功能有 着重要作用^[7-10]。但Mon1a在细胞增殖、迁移和成 瘤过程中的功能尚不明确。

TALEN(transcription activator-like effector nuclease)打靶技术是近几年兴起的DNA水平上的 基因打靶技术,已经在小鼠、人、大鼠、斑马鱼等 物种的基因敲除中成功应用[11-13]。相较于ZFN(zinc finger nuclease)敲除技术, TALEN技术有效解决了敲 除中的脱靶问题^[14-16]。同时,由于是基于DNA水平上 的操作,从而解决了通过RNA干扰技术筛选的稳定 株表型回复问题。TALEN技术的核心是可单碱基识 别的TALE单元,按照识别序列将相应的识别单元组 装构建TALE识别串联重复序列(TALE repeats), 即为 DNA结合结构域。由于Fok I核酸内切酶需要以二聚 体的形式发挥功能,因此需要设计左臂、右臂两种 TALEN质粒。为提高打靶活性避免重复实验,我们 采用3×2组合方式设计质粒对,经过活性验证后选出 活性最强的质粒对进行基因敲除。本文利用TALEN 技术在细胞中高效、特异性敲除Monla基因,研究了 Mon1a在细胞生理功能中的重要作用,为日后Mon1a 通过囊泡运输影响细胞功能的机制研究提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

本研究中的HEK293T细胞购自中国科学院

上海细胞库。DMEM高糖培养基、PBS、FBS、 Penicillin-Streptomycin购自Hyclone公司。Trypsine 5% EDTA购自Gibco公司。megatran 1.0购自 OriGene公司。TALEN试剂盒购自上海斯丹赛生物 技术有限公司。RIPA细胞裂解液、WST-1细胞增 殖检测试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司。 Mon1a抗体购自Novus Biologicals公司。GAPDH抗 体购自Proteintech公司。Luminata Classico Western HRP Substrate购自Millipore公司。辣根过氧化物酶 标记的抗绵羊二抗以及抗鼠二抗购自Cell Signaling Technology公司。PageRuler Prestained Protein Ladder购自Fermentas(Thermo)公司。基因组DNA 提取试剂盒与质粒小提试剂盒购自天根生化科技 (北京)有限公司。无内毒素质粒提取试剂盒购自 Macherey-Nagel公司。BamH I、Pst I核酸内切酶购 自New England BioLabs公司。Puromycin购自Sigma 公司。BALB/c裸鼠(5周龄, 雌性)购自上海斯莱克实 验动物有限公司。基因测序由上海赛音公司完成。 引物合成由英潍捷基贸易有限公司完成。

1.2 方法

1.2.1 *Mon1a*敲除TALEN质粒的构建 采用上海 斯丹赛生物技术有限公司的Fast TALE[™] TALEN试 剂盒构建TALEN质粒。首先,设计TALEN识别序列: 人的*Mon1a*基因存在三个转录本,在三个转录本的 共同CDS(coding sequence)区设计了一个3×2组合的 TALEN质粒对(图1),该TALEN左右臂序列及相对应 的载体如表1所示。根据上述TALEN识别序列,选 择TALEN试剂盒中相应模块加样用PCR仪进行连接 反应,连接反应体系如下:每个模块取1.5 µL,9个模 块共13.5 µL,左臂或右臂TALEN骨架载体1.5 µL,溶 液III 2 µL,溶液I 1 µL,溶液II 1 µL,ddH₂O 1 µL。总 体积为20 µL。反应条件: 37 ℃ 5 min, 16 ℃ 10 min, 15个循环; 80 ℃ 10 min; 12 ℃ 1 min。连接反应产



图1 针对Mon1a基因CDS区设计的3×2 TALEN识别序列模式图 Fig.1 The model of 3×2 TALEN recognition sequences for gene Mon1a

Table 1 The seq	uences and vectors of 5~2 TALEN	plasinius
质粒名称	序列(5'→3')	载体
Plasmid name	Sequences $(5' \rightarrow 3')$	Vector
L1	GCC TTG ATG GCA CAT TGA C	L58
L2	GCC TTG ATG GCA CAT TG A	L56
L3	GCC TTG ATG GCA CAT T G	L59
R1	CTC AGC TCT CTC CAT AC T	R52

CTC AGC TCT CTC CAT ACT C

R53

R2

表1 TALEN 3×2质粒对左右臂序列及对应载体 Table 1 The sequences and vectors of 3×2 TALEN plasmi

物转化DH5α感受态细胞,涂布于含20 μg/mL卡那霉素的LB琼脂平板,37 ℃过夜培养。挑取TALEN质粒单克隆,接种于含20 μg/mL卡那霉素的5 mL LB培养液中,37 ℃ 250 r/min过夜培养,用常规质粒小抽试剂盒提取质粒并使用限制性内切酶BamH I、Pst I双酶切进行鉴定,根据电泳条带大小,选择符合条件(2 000 bp左右)的质粒进行测序。测序结果经过BLAST比对,选取序列完全正确的单克隆质粒,扩大培养并用无内毒素质粒中提试剂盒提取目的质粒,用于下一步转染实验。

1.2.2 TALEN质粒活性检测与克隆筛选 **HEK293T** 细胞使用含10% FBS的DMEM培养液,于37 ℃、5% CO2培养箱中培养。取对数生长期的HEK293T细 胞,按1×10%孔的密度接种于6孔板中,24h后转染 TALEN质粒对, 左臂和右臂质粒两两组合成6对质 粒对。利用MegaTran 1.0转染左右臂质粒各2 μg, 对照组不转染,方法参见MegaTran 1.0的说明书。 转染24 h后, 加入2 µg/mL的puromycin进行筛选, 当 对照组细胞全部死亡时(约3 d), 收集实验组细胞并 提取基因组DNA,用PCR仪扩增目的条带后测序。 引物序列如下: P1: 5'-GTG AAA GAT CCT GAA TGG TAG-3'; P2: 5'-GAG CAG CAT AAC ATG AAG TG-3'。查看测序结果峰图,选取其中套峰最 多的质粒对作为活性最强质粒对并用于克隆筛选 实验。转染步骤同上,转染24 h后以TALEN质粒表 达的绿色荧光蛋白作为筛选条件,利用流式细胞仪 分选出转染成功的细胞到96孔板中培养,待单克隆 形成后,进一步在24孔板、6孔板中进行扩大培养。 收集细胞,提取基因组DNA并用PCR仪扩增测序, 根据序列比对结果确定基因,得到敲除的稳定细胞 株。

 1.2.3 Western blot检测Mon1a的表达 离心(1000 r/min 5 min)收集细胞,利用RIPA裂解液提取总蛋白,每孔 上样50 μg蛋白样品进行SDS-PAGE电泳,然后转移 到PVDF膜上, 5%脱脂牛奶室温封闭1 h, anti-Mon1a 抗体按1:2 000稀释, anti-GAPDH抗体按1:4 000稀释, 4 ℃孵育过夜, PBST洗涤3次, 每次10 min。HRP标 记的抗绵羊和抗鼠二抗按1:5 000稀释, 室温孵育1 h, PBST洗涤3次, 每次10 min, 辣根过氧化酶底物显色, 胶片曝光。

1.2.4 WST-1实验检测细胞增殖 标准曲线绘制: 将处于对数生长期的细胞按1 000、2 000、3 000/孔 接种于96孔板(100 μL)中,每组细胞设置3个复孔,4 h 后每孔加入10 μL WST-1溶液,培养箱孵育2 h后,利 用酶标仪测定D₄₅₀值,绘制D₄₅₀值与细胞数的标准曲 线。实验组:1×10³/孔接种于5板96孔板(100 μL)中, 每组细胞设置5个复孔,每隔12 h取其中1板,每孔加 入10 μL WST-1溶液,培养箱孵育2 h后,酶标仪测定 D₄₅₀值,根据标准曲线计算细胞增长倍数。

1.2.5 细胞周期检测 调整细胞使细胞生长周期 同步,收集1×10⁶细胞,用预冷的PBS缓冲液将细胞洗 涤2次,用预冷的75%乙醇将其重悬,在-20 ℃冰箱中 固定1 h,离心后用400 µL PBS重悬,加入20 µL RNase A于37 ℃水浴30 min,400目筛网过滤细胞。过滤后 的细胞中加入400 µL PI染液,轻轻混匀后于4 ℃孵 育30 min。流式细胞术检测细胞周期。

 1.2.6 细胞早期凋亡检测 用不含EDTA的胰酶 消化收集1×10⁶细胞,用预冷的PBS缓冲液将细胞洗 涤2次,用100 μL Binding Buffer重悬细胞,加入5 μL Annexin V-FITC和5 μL PI Staining Solution轻轻混匀, 避光室温孵育10 min,加入400 μL Binding Buffer混 匀,并用流式细胞术检测细胞早期凋亡。

1.2.7 IncuCyte检测细胞迁移 将处于对数生长期的细胞按1×10⁵/孔接种于96孔板(100 μL)中,每组细胞设置4个复孔,待细胞铺满后,用配套的IncuCyte 划痕器划痕,放置在IncuCyte监测培养箱中,每隔2 h 自动拍照记录,计算细胞相对迁移率。

1.2.8 裸鼠皮下肿瘤生长实验 选取同一批次的 5周龄雌性裸鼠5只,将对数生长期的细胞消化并用 PBS缓冲液重悬为7×10⁶/100 μL,腋下注射,对照组 细胞(wide type, WT)注射在右腋下, *Mon1a*基因敲除 细胞(knock out, KO)注射在左腋下。观察并测量肿 瘤大小, 17 d后将裸鼠处死取瘤并称重。

1.3 统计学分析

实验至少重复3次,采用R i386统计学软件进行 统计学分析,实验数据表达为mean±S.E.M,两样本



A: 质粒序列BLAST对比图; B: L2、R1质粒转染的细胞DNA测序图。
A: sequence confirmed of TALEN vectors; B: TALEN efficiency detection by DNA sequencing peak chart.
图2 TALEN质粒序列比对及活性鉴定

Fig.2 Sequence confirmed and efficiency detection of TALEN vectors

 (Λ)

均数比较采用t检验, P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TALEN质粒序列比对及活性鉴定

构建的TALEN质粒经酶切鉴定,选择含有2000 bp 条带的质粒进行基因测序。测序结果经过BLAST 比对,保证正向测序比对结果与反向测序比对结果 序列一致性为100%(图2A),以L3质粒为例,基因序 列编码的氨基酸重叠且序列完全一致,说明TALEN 左臂质粒L3构建成功,其他质粒以相同方法分析,结 果与L3质粒类似(图略)。测序正确的质粒用于转染 HEK293T细胞,并提取转染后的细胞基因组用于扩 增测序,获得测序峰图,比较套峰密度以及数量可判 断,L2与R1质粒组合套峰多且密,为活性最强质粒 对(图2B),下一步实验中选取该质粒对作为单克隆 敲除质粒对。

2.2 Mon1a基因敲除HEK293T细胞系构建

利用L2与R1质粒对转染HEK293T细胞,利用 流式细胞仪分选出表达绿色荧光蛋白的细胞,培养 获得单克隆细胞。将获得的单克隆细胞提取基因 组DNA并测序,得到基因型敲除的HEK293T稳定细 胞系(图3A),该单克隆在TALEN打靶位置有14 bp长 度的碱基缺失——GAC TCC TTC TGA TG。14个 碱基缺失会造成编码框发生改变从而形成移码突 变,该单克隆无法合成正确的Mon1a蛋白。进一步 通过Western blot在蛋白质水平上验证敲除效果,结

(A)									
Range 1:5 to 571 Graphics									
Score 972 bits (526)		Expect	Identities Gaps 566/582 (97%) 15/582 (20		9				
<u>572 018 (520)</u> 0.0 500/502 (77/0) 15/502 (2/0)									
Query	31	GATATTTCTT	CTACTTTTCTGT	GCTTTCCAAGTCtttttttACAAT	GAATATGTCTTC	90			
Sbjct	5	GATTTTTCTT	CTACTTTTCTGT	GCTTTCC-AGTCTTTTTTTTACAAT	GAATATGTCTTC	63			
Query	91	CTTTTATAATO	AGAAAAGGAACA	GTATATAttttttGAAAGGAATTC	TCAGAATCCATT	150			
Sbjct	64	CTTTTATAATO	CAGAAAAGGAACA	GTATATATTTTTTTGAAAGGAATTC	TCAGAATCCATT	123			
Query	151	TTCTAGAGATI	TGAGTTAGTGGA	GTCCTGATAAAGGACACTTTCCTGT	ACTTACTACCAC	210			
Sbjct	124	TTCTAGAGATI	TGAGTTAGTGGA	GTCCTGATAAAGGACACTTTCCTGT	ACTTACTACCAC	183			
Query	211	TGTTGATTAT	CCTGTGACCCTG	CCAAAAGCCATCGATGTTGCATTTG	TTTGCCCCACAG	270			
Sbjct	184	TGTTGATTAT	SCCTGTGACCCTG	CCAAAAGCCATCGATGTTGCATTTG	TTTGCCCCACAG	243			
Query	271	GAGAGCTCAA	GGATGGCTACTG	ACATGCAGAGGAAGAGAAGCAGCGA	ATGCCTTGATGG	330			
Sbjct	244	GAGAGCTCAA	AGGATGGCTACTG	ACATGCAGAGGAAGAAGCAGCGA	ATGCCTTGATGG	303			
Query	331	CACATTGACTO	CTTCTGATGGAC	AGAGTATGGAGAGAGCTGAGAGCCC	CACACCAGGAAT	390			
Sbjct	304	CACATT	GAC	AGAGTATGGAGAGAGCTGAGAGCCC	CACACCAGGAAT	349			
Query	391	GGCCCAGGGA	TGGAGCCAGGTA	TGGGCAAGTGTACAGCCTCAGCCAG	CTGCCAACCAGA	450			
Sbjct	350	GGCCCAGGGA	TGGAGCCAGGTA	TGGGCAAGTGTACAGCCTCAGCCAG	CTGCCAACCAGA	409			
Query	451	GCAGTCTCCAG	GGGGGAATTAGGA	TTCCCAACCACTTTTTCCTTTCCAC	TTATTCATGCAT	510			
Sbjct	410	GCAGTCTCCAG	GGGGGAATTAGGA	TTCCCAACCACTTTTTCCTTTCCAC	TTATTCATGCAT	469			
Query	511	TTGTCAGTCA	TCATTGGATATT	TGTCAGGTTCTGGGGATAAGGCAGG	AGGCCAGGCTCA	570			
Sbjct	470	TTGTCAGTCAG	CTCATTGGATATT	TGTCAGGTTCTGGGGATAAGGCAGG	AGGCCAGGCTCA	529			
Query	571	TTCTGCATCT	GCTTTCCTCTCC.	ACTTCATGTTATGCTGCTC 612					
Sbjct	530	TTCTGCATCT	GCTTTCCTCTCC.	ACTTCATGTTATGCTGCTC 571					
(B)									



A: 单克隆打靶位点的序列比对图。B: Mon1a的蛋白印迹结果图。 WT: 野生型; KO: 基因敲除。

A: alignment of the genomic sequence of mutant at the TALEN target site. B: Western blot analysis of Mon1a protein of knockout and widetype HEK293T cells. WT: wide type; KO: knock out.

图3 在基因水平及生化水平验证单克隆细胞系敲除结果 Fig.3 Confirm of the knock out cell in DNA level and biochemical results





果如图3B所示,与未敲除的HEK293T细胞系相比, Mon1a基因敲除的细胞系中未检测到Mon1a蛋白的 表达。结果表明,我们成功构建了Monla基因敲除 的HEK293T稳定细胞系。

2.3 Mon1a蛋白质缺失对HEK293T细胞增殖的 影响

本研究进一步通过WST-1实验对敲除细胞的 增殖能力进行检测,结果如图4所示。以0h细胞数 目为基准,按增长倍数计算。我们可以看到, Mon1a 缺失的HEK293T细胞系,在所测时间点上,增长倍 数皆与对照组的HEK293T细胞系有显著的差异 (P<0.05), 增殖能力与对照细胞系相比明显下降。因 此, Mon1a的缺失, 在一定程度上影响了细胞的正常



图5 Mon1a对HEK293T细胞周期的影响 Fig.5 The effect of Mon1a on cell cycle in HEK293T cells



**P<0.01 vs WT group.

图6 Mon1a缺失对HEK293T细胞早期凋亡的影响 Fig.6 The effect of Mon1a on early apoptosis in HEK293T cells



图7 Mon1a缺失对HEK293T细胞迁移能力的影响

Fig.7 The effect of Mon1a on cell migration in HEK293T cells



A:小鼠成瘤情况(第17 d),小鼠右腋下为对照细胞系,左腋下为敲除细胞系; B:肿瘤大小情况(第17 d),上排为对照细胞系成瘤,下排为敲除细胞系成瘤; C:肿瘤生长曲线图; D:肿瘤重量图。**P<0.01, ***P<0.001, 与野生型组比较。

A: nude mice injected with HEK293T cells (right site) and *Mon1a* knockout HEK293T cells (left site); B: tumor of nude mice injected with HEK293T cells (the first row) and *Mon1a* knockout HEK293T cells (the second row); C: tumor volume in nude mice; D: weigh of tumor. ***P*<0.01, ****P*<0.001 *vs* WT group.

图8 Mon1a缺失对HEK293T细胞成瘤能力的影响 Fig.8 The effect of Mon1a on the ability of tumor formation in nude mice in HEK293T cell

增殖,使其增殖相对变慢。

2.4 Mon1a蛋白质缺失对HEK293T细胞周期的 影响

通过PI染色,获得了处于不同细胞周期的细胞 比例,结果如图5所示。G₀/G₁期和S期细胞比例未见 明显差别,而Mon1a缺失细胞系处于G₂/M期的细胞 比例显著大于对照细胞系(*P*<0.05)。以上结果表明, Mon1a缺失的细胞系,其细胞周期在G₂/M期发生阻 滞,不易进入下一个细胞周期循环。

2.5 Mon1a蛋白质缺失影响HEK293T细胞的早期周亡

通过FlowJo软件计算得到早期凋亡细胞所占总 细胞比例,结果如图6所示。由图6可知, Mon1a缺失细 胞系的早期凋亡显著高于对照组细胞系(P<0.01)。

2.6 Mon1a蛋白质缺失影响HEK293T细胞的迁移

通过IncuCyte仪器实时拍照观察,每隔2h拍照测定细胞迁移能力,得到细胞相对迁移能力图(图7)。 由图7可知,6h之后,Monla缺失细胞系在迁移能力上 明显慢于对照组细胞,并且随着时间的增加,愈伤能力 与对照组细胞的差距也随之增大。12 h之后在相对愈伤密度趋于稳定时, Monla缺失细胞系愈伤密度仍低于对照组细胞系。以上结果表明, Monla缺失细胞系不仅迁移能力变慢, 而且其愈伤能力也变弱(P<0.05)。

2.7 Mon1a蛋白质缺失对HEK293T细胞成瘤能 力的影响

预实验结果表明, Mon1a缺失的细胞系成瘤能 力较弱, 在注射低浓度的细胞数量时几乎不能形成 肿瘤, 因此本研究中选用7×10⁶细胞用于皮下成瘤实 验。裸鼠皮下成瘤实验结果如图8显示, 分别在小鼠 右腋下和左腋下注射对照组细胞和Mon1a基因敲除 细胞系后, 对照组细胞肿瘤产生得更快, 在第6 d首次 测量肿瘤大小时, 两种细胞系形成的肿瘤大小就有 非常显著的差异(P<0.001), Mon1a蛋白缺失细胞形成 的肿瘤更小。而随着时间推移, 两种肿瘤差异越来越 大, 对照组细胞形成的肿瘤已经达到小鼠承受极限 (3.38±0.32) cm³, 而Mon1a缺失细胞系肿瘤大小仅为 (0.43±0.26) cm³, 两者差异极为显著(P<0.001)。同时, 两种肿瘤重量差异也极为显著(P<0.001)。这一结果 与细胞增殖实验结果相符。以上结果表明, Mon1a的缺失显著降低了HEK293T细胞的成瘤能力。

3 讨论

TALEN技术操作简单、周期短,虽然阳性率低 (挑取50个单克隆鉴定,仅有3个是敲除细胞系),但 敲除细胞系脱靶率低、基因型稳定、可稳定连续传 代。由于TALEN质粒的识别单位是重复的34个氨 基酸序列,仅第12、13位双联氨基酸不同且与A、T、 C、G碱基有恒定对应关系,所以在构建TALEN载体 时,保证识别序列的100%正确性是非常关键的。在 质粒活性检测实验中,有多对质粒对组合转染的细 胞基因组并未发生明显的基因突变。因此,为提高 打靶效率,降低前期重复实验,采取设计3×2质粒对 的模式是非常有必要的。

Mon1a作为囊泡运输相关蛋白,对细胞的正常 生长和增殖发挥非常重要的作用。囊泡运输是保证 细胞物质信息交流的重要基础[17],生长因子和激素 分泌、神经递质的释放、信号转导、细胞生长、分 化和稳态维持等重要生命活动均依赖高效精确的囊 泡运输[18]。运输障碍会导致细胞功能紊乱,并与许 多人类重大疾病如神经退行性疾病、发育疾病、代 谢性疾病、感染与免疫缺陷等的发生发展密切相 关^[19-20]。本文通过在DNA水平构建敲除Monla基因 的HEK293T稳定株,并结合基因型鉴定和Western blot鉴定方法证明了基因敲除效果。并进一步在细 胞增殖、细胞迁移以及细胞成瘤能力等方面进行 Mon1a基因功能验证。本文结果提示,缺失了Mon1a 的HEK293T细胞系,细胞表型发生了比较大的变化。 表现在: 48 h后, 细胞增殖倍数仅为(11.61±0.38)倍, 对 照组为(14.71±0.43)倍;细胞早期凋亡为(5.11±0.89)%, 对照组为(2.23±0.58)%; 24 h后细胞相对愈伤密度为 (64.66±5.00)%, 对照组为(84.14±2.57)%; 17 d后细胞 成瘤大小为(0.43±0.26) cm³, 对照组为(3.38±0.32) cm³, 细胞成瘤质量为(0.32±0.16)g,对照组为(2.16±0.41)g。 以上数据皆具有统计学差异。同时, 敲除Mon1a基 因的细胞其增殖能力降低,细胞周期在G₂/M期发生 阻滞,无法高效进入下一个细胞周期循环,并且细胞 早期凋亡增多,以上结果可能是导致敲除Monla基 因的细胞在裸鼠体内成瘤能力变弱以及肿瘤生长较 缓慢的原因。以往的研究表明,用RNA干扰的方法 敲降Monla基因,会造成高尔基体的形态改变以及 影响蛋白的正常分泌^[10],本文的研究结果与已有报 道一致,推测Monla的缺失导致细胞蛋白分泌过程 紊乱,使得细胞活力降低,进而降低细胞的增殖、迁 移和成瘤能力,但该过程涉及的信号通路与分子机 制尚未明了,需要进一步研究。

在内吞体的成熟过程中,内吞体上Rab5的解离 以及Rab7的结合,能够促进内吞体由早期到晚期的 成熟。而在Poteryaev等[8]的研究中, SAND-1/Mon1 对内吞体上Rab5和Rab7的置换有着决定性作用。首 先, Mon1被招募到早期内吞体上, 并将Rab5置换下 来; 然后, Mon1与Ccz1共同作用招募Rab7到内吞体 上,从而引导早期内吞体向晚期内吞体成熟[7-8]。在 Sand-1基因突变的线虫体内, Rab5和Rab7的蛋白质 总量均比正常线虫体内的蛋白多^[6]。Rab是囊泡运输 的调控因子,是小GTP酶家族最大的家庭成员,其与 肿瘤发生发展之间的关系已被广泛的研究, Rab7能 影响前列腺癌、乳腺癌以及黑色素瘤等多种肿瘤细 胞的增殖迁移等能力^[21-23]。因此, Rab7被认为是肿瘤 的负调控蛋白,即具有肿瘤抑制蛋白的功能[23-24]。因 此我们提出假设, Monla的缺失将导致细胞内Rab7 表达量升高,进而抑制了细胞的增殖迁移等能力,使 得细胞增殖变慢,成瘤能力减弱。我们在后续的实 验中会检测细胞内的Rab5及Rab7的蛋白质含量,以 验证我们的假设。

Bagley等^[10]的研究中指出, Mon1a的缺失会导 致细胞内高尔基体碎裂、内质体向高尔基体及高 尔基体向质膜的顺式囊泡运输被延迟、ERGIC-53 活性的囊泡形成被阻碍。根据以上研究,我们重点 关注囊泡转运蛋白p115(vesicular transport protein)。 p115主要存在于内质网、高尔基体以及内质网高尔 基体中间体(endoplasmic reticulum-golgi intermediate compartment, ERGIC)上^[25], 主要参与高尔基体的合 成以及囊泡运输^[26-28]。而p115的缺失或断裂会导致 高尔基体碎裂^[27,29],因此,p115具有维持高尔基体形 态结构稳定的作用。p115缺失的细胞系高尔基体 虽然碎裂,但细胞的囊泡运输并没有被中断,只是 被相对延迟^[29]。同时, p115碎裂引起的高尔基体的 碎裂会引发抑癌基因p53介导的细胞凋亡^[30]。我们 的研究发现, Mon1a缺失导致细胞早期凋亡的增加, 与p115缺失表型一致。而在胃癌等细胞当中,降低 p115蛋白的表达,会明显抑制肿瘤细胞的增殖、迁 移及侵袭能力^[31-33], 这与本研究Monla缺失导致肿瘤

成瘤能力减弱的表型相一致。因此我们推测, Monla 的缺失可能影响了p115的表达, 导致细胞生命活力 降低; 也可能是细胞分泌途径参与蛋白质的缺失导 致高尔基体碎裂, 从而诱发细胞的凋亡现象, 最终导 致细胞的活力降低。具体的作用机制尚未清楚, 接 下来有待检验缺失Monla的细胞内p115、p53蛋白质 含量, 从而进一步研究Monla引起的细胞活力降低、 肿瘤增殖、迁移、成瘤能力减弱等的作用机制。

参考文献 (References)

- Wang CW, Stromhaug PE, Kauffman EJ, Weisman LS, Klionsky DJ. Yeast homotypic vacuole fusion requires the Ccz1-Mon1 complex during the tethering/docking stage. J Cell Biol 2003; 163(5): 973-85.
- 2 Hoffman-Sommer M, Kucharczyk R, Piekarska I, Kozlowska E, Rytka J. Mutations in the Saccharomyces cerevisiae vacuolar fusion proteins Ccz1, Mon1 and Ypt7 cause defects in cell cycle progression in a num1Delta background. Eur J Cell Biol 2009; 88(11): 639-52.
- 3 Kucharczyk R, Hoffman-Sommer M, Piekarska I, von Mollard GF, Rytka J. The Saccharomyces cerevisiae protein Ccz1p interacts with components of the endosomal fusion machinery. FEMS Yeast Res 2009; 9(4): 565-73.
- 4 Hoffman-Sommer M, Migdalski A, Rytka J, Kucharczyk R. Multiple functions of the vacuolar sorting protein Ccz1p in Saccharomyces cerevisiae. Biochem Biophys Res Commun 2005; 329(1): 197-204.
- 5 Poteryaev D, Spang A. A role of SAND-family proteins in endocytosis. Biochem Soc Trans 2005; 33(Pt 4): 606-8.
- 6 Poteryaev D, Fares H, Bowerman B, Spang A. Caenorhabditis elegans SAND-1 is essential for RAB-7 function in endosomal traffic. EMBO J 2007; 26(2): 301-12.
- 7 Kinchen JM, Ravichandran KS. Identification of two evolutionarily conserved genes regulating processing of engulfed apoptotic cells. Nature 2010; 464(7289): 778-82.
- 8 Poteryaev D, Datta S, Ackema K, Zerial M, Spang A. Identification of the switch in early-to-late endosome transition. Cell 2010; 141(3): 497-508.
- 9 Wang F, Paradkar PN, Custodio AO, McVey Ward D, Fleming MD, Campagna D, *et al.* Genetic variation in Mon1a affects protein trafficking and modifies macrophage iron loading in mice. Nat Genet 2007; 39(8): 1025-32.
- 10 Bagley DC, Paradkar PN, Kaplan J, Ward DM. Mon1a protein acts in trafficking through the secretory apparatus. J Biol Chem 2012; 287(30): 25577-88.
- 11 Zhu P, Liu Q, Liu S, Su X, Feng W, Lei X, *et al.* Generation of Foxo3-targeted mice by injection of mRNAs encoding transcription activator-like effector nucleases (TALENs) into zygotes. Reprod Domest Anim 2015; 50(3): 474-83.
- 12 Keßler M, Rottbauer W, Just S. Recent progress in the use of zebrafish for novel cardiac drug discovery. Expert Opin Drug Discov 2015; 21: 1-11.
- 13 van Nieuwenhuysen T, Naert T, Tran HT, Van Imschoot G, Geurs S, Sanders E. TALEN-mediated apc mutation in *Xenopus* tropicalis phenocopies familial adenomatous polyposis. Oncoscience 2015;

2(5): 555-66.

- 14 Gaj T, Gersbach CA, Barbas CF 3rd. ZFN, TALEN, and CRISPR/ Cas-based methods for genome engineering. Trends Biotechnol 2013; 31(7): 397-405.
- 15 Nemudryi AA, Valetdinova KR, Medvedev SP, Zakian SM. TALEN and CRISPR/Cas genome editing systems: Tools of discovery. Acta Naturae 2014; 6(3): 19-40.
- 16 Mahfouz MM, Piatek A, Stewart CN Jr. Genome engineering via TALENs and CRISPR/Cas9 systems: Challenges and perspectives. Plant Biotechnol J 2014; 12(8): 1006-14.
- 17 张程,牛洋,刘佳佳. 囊泡运输的功能与调控机制. 中国细胞 生物 学学报(Zhang Cheng, Niu Yang, Liu Jiajia. Functions and regulatory mechanisms of vesicular transport. Chinese Journal of Cell Biology) 2014; 6(9): 1218-26.
- 18 Lin F, Hiesberger T, Cordes K, Sinclair AM, Goldstein LS, Somlo S, et al. Kidney-specific inactivation of the KIF3A subunit of kinesin-II inhibits renal ciliogenesis and produces polycystic kidney disease. Proc Natl Acad Sci USA 2003; 100(9): 5286-91.
- 19 Reid E, Kloos M, Ashley-Koch A, Hughes L, Bevan S, Svenson IK, et al. A kinesin heavy chain (KIF5A) mutation in hereditary spastic paraplegia (SPG10). Am J Hum Genet 2002; 71(5): 1189-94.
- 20 Xia CH, Roberts EA, Her LS, Liu X, Williams DS, Cleveland DW, et al. Abnormal neurofilament transport caused by targeted disruption of neuronal kinesin heavy chain KIF5A. J Cell Biol 2003; 161(1): 55-66.
- 21 Wang Z, Zhou Y, Hu X, Chen W, Lin X, Sun L, *et al.* RILP suppresses invasion of breast cancer cells by modulating the activity of RalA through interaction with RalGDS. Cell Death Dis 2015; 6: e1923.
- 22 Alonso-Curbelo D, Osterloh L, Cañón E, Calvo TG, Martínez-Herranz R, Karras P, *et al.* RAB7 counteracts PI3K-driven macropinocytosis activated at early stages of melanoma development. Oncotarget 2015; 6(14): 11848-62.
- 23 Steffan JJ, Dykes SS, Coleman DT, Adams LK, Rogers D, Carroll JL, *et al.* Supporting a role for the GTPase Rab7 in prostate cancer progression. PLoS One 2014; 9(2): e87882.
- Edinger AL. Growth factors regulate cell survival by controlling nutrient transporter expression. 2005 Biochem Soc Trans 2005; 33(Pt 1): 225-7.
- 25 Nelson DS, Alvarez C, Gao YS, Garcia-Mata R, Fialkowski E, Sztul E. The membrane transport factor TAP/p115 cycles between the Golgi and earlier secretory compartments and contains distinct domains required for its localization and function. J Cell Biol 1998; 143(2): 319-31.
- 26 Cecilia Alvarez, Hideaki Fujita, Ann Hubbard, Elizabeth Sztul. ER to Golgi transport: Requirement for p115 at a Pre-Golgi VTC stage. J Cell Biol 1999; 147(6): 1205-22.
- 27 Puthenveedu MA, Linstedt AD. Evidence that Golgi structure depends on a p115 activity that is independent of the vesicle tether components giantin and GM130. J Cell Biol 2001; 155(2): 227-38.
- 28 Kondylis V, Rabouille C. A novel role for dp115 in the organization of tER sites in *Drosophila*. J Cell Biol 2003; 162(2): 185-98.
- 29 Puthenveedu MA, Linstedt AD. Gene replacement reveals that p115/SNARE interactions are essential for Golgi biogenesis. Proc Natl Acad Sci USA 2004; 101(5): 1253-6.

- 30 How PC, Shields D. Tethering function of the Caspase cleavage fragment of golgi protein p115 promotes apoptosis via a p53dependent pathway. J Biol Chem 2011; 286(10): 8565-76.
- 31 Li XJ, Luo Y, Yi YF. P115 promotes growth of gastric cancer through interaction with macrophage migration inhibitory factor. World J Gastroenterol 2013; 19(46): 8619-29.
- 32 屈玉玲, 易永芬, 邓 玮, 文 雪, 闫田静. 高尔基体囊泡转运 蛋白P115基因沉默对胃癌细胞调亡的影响及其机制. 中国 生物制品学杂志(Qu Yuling, Yi Yongfen, Deng Wei, Wen Xue,

Yan Tianjing. Effect of Golgi body vesicular transporter P115 gene silencing on apoptosis of gastric cancer cells and relevant mechanism. Chin J Biologicals) 2012; 25(3): 276-80,289.

33 闫田静, 易永芬, 邓 玮, 文 雪, 屈玉玲. p115基因沉默对人胃 癌BGC-823细胞迁移及侵袭能力的影响及其机制. 中国生物 制品学杂志(Yan Tianjing, Yi Yongfen, Deng Wei, Wen Xue, Qu Yuling. Effect of p115 gene silence on migration and invasion abilities of human gastric cancer BGC-823 cells and relevant mechanism. Chin J Biologicals) 2012; 25(4): 412-7.