

研究论文

基于AAVS1位点构建稳定表达Cas9蛋白的非小细胞肺癌细胞系

方未英 张啸宇 顾婷玉 陈跃磊 邵婷*

(中国科学院分子细胞科学卓越创新中心细胞库/干细胞库, 上海 200031)

摘要 该研究旨在利用CRISPR/Cas9介导的同源重组技术将Cas9基因序列整合入非小细胞肺癌A549细胞基因组中的AAVS1位点, 建立稳定表达Cas9蛋白的A549单克隆细胞系。该技术避免了Cas9基因随机整合进入基因组带来的潜在风险。通过PCR、Western blot、CCK-8、STR技术分别检测A549单克隆细胞系的插入位点、Cas9蛋白水平、细胞增殖能力、基因编辑能力以及细胞身份信息。上述结果显示, 在单克隆细胞系A549 Cas9-copGFP-1中Cas9基因准确插入至AAVS1安全位点并高表达Cas9蛋白, 细胞增殖能力未发生改变。此外, 该细胞还具有好的基因编辑能力, 细胞身份信息准确无误。总之, A549 Cas9-copGFP-1细胞可用于进一步的基因编辑, 为肺癌相关基因的高通量筛选和功能性研究提供一种有力工具。

关键词 CRISPR/Cas9; AAVS1位点; 非小细胞肺癌细胞系

Establishment of a Non-Small Cell Lung Cancer Cell Line Stably Expressing Cas9 Protein at AAVS1 Safe Harbor Locus

FANG Weiying, ZHANG Xiaoyu, GU Tingyu, CHEN Yuelei, SHAO Ting*

(Cell Bank/Stem Cell Bank, Center for Excellence in Molecular Cell Science, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

Abstract This study aimed to create an A549 monoclonal cell line with stable expression of Cas9 protein by knocking in a Cas9 expression cassette into the AAVS1 safe harbor locus of non-small cell lung cancer A549 cell line using CRISPR/Cas9-mediated homologous recombination technology. This technology avoided the potential risks of random Cas9 integration into the genome. The insertion site, Cas9 protein expression, cell proliferation, gene editing capability and cell identity of A549 monoclonal cell lines were validated by PCR, Western blot, CCK-8 and STR analyses, respectively. The above results showed that Cas9 cassette was successfully inserted into the AAVS1 safe harbor locus of the monoclonal cell line named A549 Cas9-copGFP-1, which highly expressed Cas9 protein without significant differences in cell viability compared to unmodified A549 cells. Moreover, this cell line had significant gene editing capability and correct STR profiles. Overall, A549 Cas9-copGFP-1 could be fur-

收稿日期: 2023-07-06

接受日期: 2023-08-30

科技部国家科技资源共享服务平台、中国科学院战略生物资源技术支撑体系专项(批准号: CZBZX-1)和中国科学院技术支撑人才专项资助的课题

*通讯作者。Tel: 021-54921439, E-mail: shaoting@sibcb.ac.cn

Received: July 6, 2023

Accepted: August 30, 2023

This work was supported by the National Science and Technology Infrastructure, the Biological Resources Program of Chinese Academy of Sciences (Grant No.CZBZX-1) and the Technical Talents Program of CAS

*Corresponding author. Tel: +86-21-54921439, E-mail: shaoting@sibcb.ac.cn

ther used for gene editing, providing a powerful tool for high-throughput screening and functional studies of lung cancer-related genes.

Keywords CRISPR/Cas9; AAVS1 locus; non-small cell lung cancer cell line

CRISPR(clustered regularly interspersed short palindromic repeat)是细菌和古细菌防御病毒或噬菌体入侵的免疫系统,可将外源DNA序列整合到CRISPR序列中。其中CRISPR/Cas9是目前使用最广泛的基因编辑系统,具有核酸内切酶活性的Cas9(CRISPR associated 9)蛋白与sgRNA组成复合体,靶向目标位点附近的PAM序列即可对外源DNA进行特异性切割,实现基因的高效编辑^[1-3],在肺癌^[4-7]、肝癌^[8-10]、乳腺癌^[11]等癌症及心血管疾病^[12]、艾滋病^[13]等疾病的研究、治疗中多有应用。常用的CRISPR/Cas9基因编辑方法有病毒载体法、非病毒载体法和物理方法(如显微注射、电穿孔法)等。然而病毒载体中的慢病毒载体随机整合入靶细胞基因组,可能造成内源基因和靶基因的未知改变,AAV载体的装载量有限,难以承载4 Kb多的Cas9基因序列,且病毒载体在转染过程中会产生病毒颗粒,操作风险较高。物理方法对操作技术和设备要求严格,容易造成细胞的机械损伤及死亡。如何建立一种高效、安全、便捷的细胞基因编辑方案成为整个技术研发过程中的重要步骤。AAVS1安全位点位于人类第19号染色体上,外源基因插入到该位点能在不影响细胞正常生命活动的情况下确保插入基因长期、稳定的表达^[14]。因此,采用基于该安全位点的基因定点插入技术,可有效降低随机插入给基因组带来的未知改变风险。

肺癌是全世界致死率最高的癌症之一,其五年生存率仅为15%。肺癌根据组织病理学可分为两大类:非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)(80%~85%)和小细胞肺癌(15%~20%)^[15]。NSCLC由于其发展和扩散相对缓慢,且早期缺乏典型的临床症状,通常被发现时已处于中晚期。非小细胞肺癌A549细胞是肺癌研究最常用的细胞系之一,在PubMed上已有近4万项研究。本研究使用CRISPR/Cas9技术将靶向AAVS1位点的切割质粒AAVS1-sgRNA-Cas9和Cas9供体质粒AAVS1-Cas9 donor转入非小细胞肺癌A549细胞。利用梯度稀释法构建了稳定表达Cas9蛋白的单克隆细胞系,并命名为A549 Cas9-copGFP-1。这为今后探究在NSCLC的发生、转移机制中的关键基因,以及进一步研发

新的治疗药物和治疗手段提供了一种有力的工具细胞。

1 材料与方法

1.1 细胞、菌种与质粒

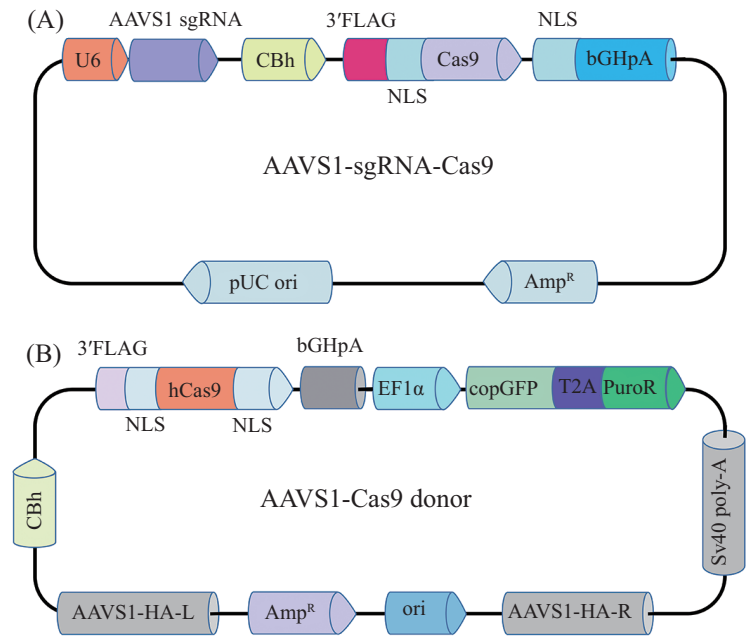
A549细胞来源于中国科学院细胞库/干细胞库;大肠杆菌trans-5 α 购自北京全式金生物技术股份有限公司;质粒AAVS1-sgRNA-Cas9、AAVS1-Cas9 donor(图1)均由GeneCopoeia公司构建。

1.2 试剂

F-12K培养基、Opti-MEM、Lipofectamine 3000购自美国Invitrogen公司;胎牛血清FBS购自美国Gibco公司;PBS、蛋白裂解液、氨苄、BSA、30%丙烯酰胺、N,N,N',N'-四甲基乙二胺、TAE、SDS、pH6.8 Tris-HCl、pH8.8 Tris-HCl、琼脂糖、电泳缓冲液、转移缓冲液购自生工生物工程(上海)股份有限公司;无内毒素质粒小提中量试剂盒、DNA marker购自天根生化科技(北京)有限公司;兔抗人CRISPR-Cas9多克隆抗体、辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔IgG抗体购自英国Abcam公司;兔抗人 β -Actin单克隆抗体购自美国CST公司;聚乙烯亚胺(polyethyleneimine, PEI)购自翌圣生物科技(上海)股份有限公司;QuickExtract™ DNA提取液购自美国LGC Biosearch Technologies公司;2 $\times$ Rapid Taq Master Mix购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司;BCA购自试剂盒购自美国Thermo Fisher公司;阴性对照sgRNA、阳性对照sgRNA试剂盒购自美国Dharmacon公司;嘌呤霉素购自上海索宝生物科技有限公司。

1.3 方法

1.3.1 质粒转染A549细胞 采用AAVS1-sgRNA-Cas9和AAVS1-Cas9 donor质粒分别转化大肠杆菌trans-5 α 感受态细胞,将菌液涂布于具有氨苄抗性的LB平板,筛选阳性重组质粒后小抽并测定质粒浓度。当A549细胞在6孔板中密度达到40%~50%时进行转染。将2 μ g AAVS1-sgRNA-Cas9质粒、2 μ g AAVS1-Cas9 donor质粒和5 μ L 1 mg/mL的PEI转染试剂混合在100 μ L无血清F-12K培养基中,室温静置20 min。



A: AAVS1-sgRNA-Cas9质粒图谱; B: AAVS1-Cas9 donor质粒图谱。
A: the AAVS1-sgRNA-Cas9 plasmid vector; B: the AAVS1-Cas9 donor plasmid vector.

图1 质粒图谱
Fig.1 Plasmid profile

再将混合物滴加到6孔板中2个孔，另设2个不加转染质粒的孔作为空白组。轻柔混匀后于37℃、5% CO₂培养箱中培养，24 h后更换为含10% FBS的F-12K培养液。

1.3.2 嘌呤霉素筛选浓度探索 将对数生长期的A549细胞按每孔4 000个细胞铺于96孔板中，待细胞贴壁后，每孔加入终浓度为0.062 5、0.125、0.25、0.5、1、2、4 μg/mL的嘌呤霉素，置于37℃、5% CO₂培养箱中培养48 h。每孔加入10 μL CCK8溶液37℃孵育1 h后使用酶标仪对待测样品进行波长为450 nm处的吸光度值的检测，计算细胞相对活力。

1.3.3 筛选A549 Cas9重组多克隆细胞 选择2 μg/mL的嘌呤霉素筛选转染后的A549细胞培养48 h，48 h后更换为1 μg/mL的嘌呤霉素持续培养5天至空白组细胞全部死亡。将转染组存活细胞收集、传代、扩增，取1/5细胞用于基因敲入验证。

1.3.4 筛选A549 Cas9单克隆细胞 用梯度稀释法将Cas9多克隆细胞分散于96孔板中，保证每孔不多于1个细胞。将96孔板放在37℃、5% CO₂培养箱中培养8天，显微镜下对含单群落的孔进行标记，用荧光显微镜观察单克隆细胞是否表达绿色荧光，得到两株A549 Cas9单克隆细胞株：A549 Cas9单克隆1#、A549 Cas9单克隆2#。对单克隆细胞进行扩增，待长

满T25瓶后，37℃消化至细胞自然脱落，1 000 r/min室温离心5 min，取T25瓶中1/3细胞进行传代，其余细胞用于后续基因组提取和总蛋白提取。

1.3.5 AAVS1位点基因敲入的验证 片段插入验证PCR的引物组合分别设在5'端AAVS1重组臂(5'AAVS1-HA-L)和3'端AAVS1重组臂(3'AAVS1-HA-R)的两端。引物序列如下。3'端验证引物正向引物：5'-AAG CTC ATC TGG TCT CCC TTC C-3'；反向引物：5'-TCC TGG GAT ACC CCG AAG AG-3'。5'端验证引物正向引物：5'-CCG GAA CTC TGC CCT CTA AC-3'；反向引物：5'-AGT AGG AAA GTC CCA TAA GGT CA-3'。

提取A549、A549 Cas9多克隆、A549 Cas9单克隆细胞的基因组DNA。采用2× Rapid Taq Master Mix分别对重组位点3'端、5'端重组臂进行PCR扩增。反应条件为：95℃预变性3 min；95℃变性15 s，60℃退火15 s，72℃延伸20 s，30个循环；72℃延伸5 min。对PCR产物进行琼脂糖凝胶电泳。

1.3.6 A549多克隆和单克隆细胞系Cas9蛋白表达情况的检测 收集稳定表达Cas9蛋白的A549 Cas9多克隆、A549 Cas9单克隆细胞，A549细胞为阴性对照，用100 μL蛋白裂解液裂解细胞，进行SDS-PAGE凝胶(4%~20%梯度胶)电泳分离目的蛋白，转膜，室温封闭

1 h, 4 °C过夜孵育 Anti-CRISPR-Cas9一抗(抗体稀释比例1:10 000)、 β -actin一抗(抗体稀释比例1:1 000), 二抗(抗体稀释比例1:2 000)室温孵育1 h, 扫膜。

1.3.7 A549 Cas9单克隆细胞系的STR鉴定 根据Cas9蛋白表达情况, 将Cas9蛋白表达量更高的A549 Cas9单克隆2#细胞命名为A549 Cas9-copGFP-1, 送至第三方上海天昊生物科技有限公司进行STR鉴定。利用荧光标记扩增产物长度多态分析方法对样本进行9个STR核心位点分型。得到的STR数据结果使用Cellosaurus CLASTR(<https://web.expasy.org/cellosaurus-str-search/>)数据库进行比对。

1.3.8 细胞增殖能力检测 将A549细胞和A549 Cas9-copGFP-1细胞于37 °C消化至自然脱落, 计数, 以每孔4 000个细胞的量铺于96孔板中, 将其放入37 °C、5% CO₂培养箱中培养48 h。每孔加入10 μ L CCK8溶液37 °C孵育1 h后使用酶标仪对待测样品进行波长为450 nm处的吸光度值的检测, 计算细胞相对活力。

1.3.9 检验单克隆细胞株的基因编辑能力 将A549细胞和A549 Cas9-copGFP-1细胞以每孔4 000个细胞的量铺于96孔板过夜, 第二天吸除原培养液, 每孔加入90 μ L 10% FBS的F-12K培养液。阴性对照和阳性对照sgRNA按照0 nmol/L、0.03 nmol/L、0.1 nmol/L、0.3 nmol/L和1 nmol/L浓度分别稀释在10 μ L Opti-MEM中, 每孔使用0.3 μ L Lipofectamine 3000室温孵育10~15 min, 分别转染A549细胞和A549 Cas9-copGFP-1细胞, 37 °C、5% CO₂培养箱中培养48 h后, 每孔加入10 μ L CCK8溶液37 °C孵育1 h后使用酶标仪对待测样品进行波长为450 nm处的吸光度值的检测, 计算细胞相对活力。

2 结果

2.1 嘌呤霉素对A549细胞杀伤浓度的探索

使用0.062 5、0.125、0.25、0.5、1、2、4 μ g/mL浓度梯度的嘌呤霉素探索其对靶细胞的最适杀伤浓度, 结果显示2 μ g/mL的嘌呤霉素作用48 h能杀死98.64%的A549细胞(图2), 因此, 本研究选取2 μ g/mL嘌呤霉素作为阳性细胞的筛选浓度, 1 μ g/mL嘌呤霉素作为阳性细胞的持续培养浓度。

2.2 A549 Cas9多克隆和单克隆细胞插入位点验证

通过同源重组位点PCR验证AAVS1-Cas9 donor供体载体装载的DNA片段是否被特异整合到A549

Cas9多克隆、A549 Cas9单克隆的AAVS1位点。A549细胞作为阴性对照没有扩增出特异性验证片段, A549 Cas9多克隆1#、2#, A549 Cas9单克隆1#、2#分别用3'端和5'端同源重组验证引物组合均扩增出特异性验证片段, 其中3'端PCR产物为1.2 Kb(图3A), 5'端PCR产物为1.1 Kb(图3B), 片段大小正确, 说明质粒片段正确插入AAVS1位点。A549 Cas9单克隆1#、2#细胞的3'端同源重组验证引物组合PCR产物条带相对于5'端较弱, 可能是3'端重组位点的染色体结构、修饰和该区域的序列影响了PCR的扩增效率。

2.3 A549多克隆和单克隆细胞Cas9蛋白表达验证

为检测A549多克隆和单克隆细胞Cas9蛋白表达情况, 我们收集细胞总蛋白进行Western blot检测。结果如图4所示, A549细胞作为阴性对照不表达Cas9蛋白, A549 Cas9多克隆1#、2#, A549 Cas9单克隆1#、2#均表达Cas9蛋白。其中, A549 Cas9单克隆2#的Cas9蛋白表达量要显著高于A549 Cas9单克隆1#。因此选择A549 Cas9单克隆2#作为构建细胞文库的候选细胞系, 并将其命名为A549 Cas9-copGFP-1。

2.4 荧光显微镜观察单克隆细胞的GFP表达

用荧光显微镜分别对A549细胞、A549 Cas9-copGFP-1细胞进行拍照。结果如图5所示, A549细胞不显示绿色荧光, A549 Cas9-copGFP-1细胞可观察到明显的绿色荧光。这说明AAVS1-Cas9 donor质粒被成功转入A549 Cas9-copGFP-1并稳定表达。

2.5 A549 Cas9-copGFP-1的STR鉴定

构建基因编辑单克隆细胞需要经历多种操作, 历时约1个月, 其间可能出现细胞的STR特征改变、细胞间交叉污染等现象。因此我们对构建的细胞株进行了STR检测。结果显示A549 Cas9-copGFP-1与A549细胞9个核心STR位点信息100%匹配(表1)。该结果说明所获得的A549 Cas9-copGFP-1细胞身份信息准确无误, 且在构建过程中未发生细胞间交叉污染。

2.6 A549 Cas9-copGFP-1的增殖活性检测

为了检验表达Cas9蛋白对A549细胞增殖能力是否造成影响, 将同等数量的A549细胞与A549 Cas9-copGFP-1细胞在相同培养条件下培养48 h进行细胞活力对比。实验结果显示, 两种细胞活力基本一致(图6), 说明A549 Cas9-copGFP-1细胞的增殖能力较A549细胞无明显差异, 稳定表达Cas9蛋白对

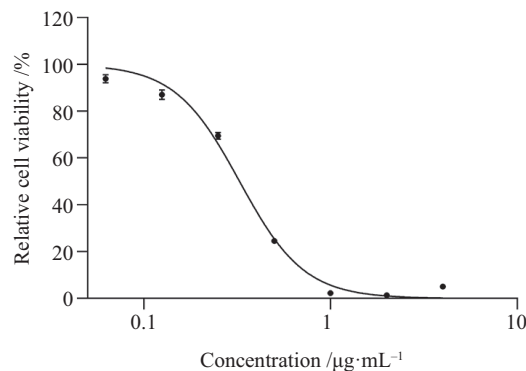
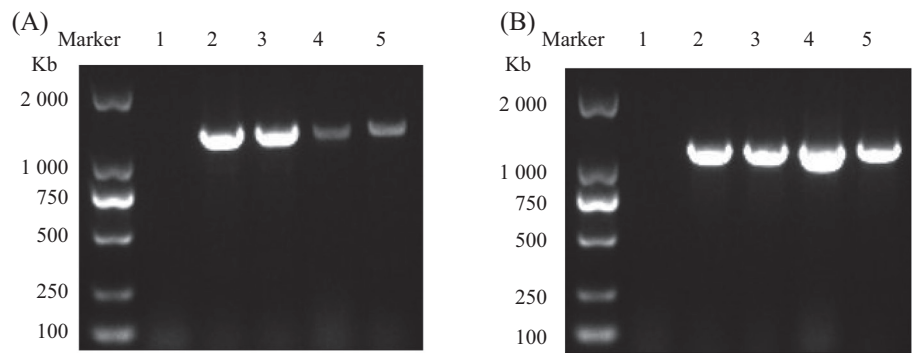


图2 嘌呤霉素作用A549细胞48 h的毒性曲线图

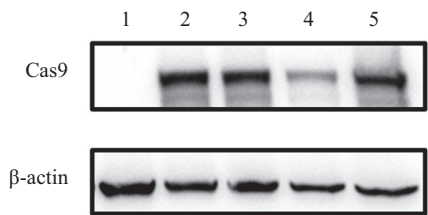
Fig.2 The killing curve of puromycin effect on A549 cells for 48 h



A: electrophoresis of 3' homologous arm PCR amplification products; B: electrophoresis of 5' homologous arm PCR amplification products. 1: unmodified A549 cells; 2: A549 Cas9 polyclon 1#; 3: A549 Cas9 polyclon 2#; 4: A549 Cas9 monoclon 1#; 5: A549 Cas9 monoclon 2#.

图3 PCR验证片段插入A549细胞AAVS1位点

Fig.3 PCR validation of fragment insertion into the AAVS1 locus in A549 cells



1: unmodified A549 cells; 2: A549 Cas9 polyclon 1#; 3: A549 Cas9 polyclon 2#; 4: A549 Cas9 monoclon 1#; 5: A549 Cas9 monoclon 2#.

图4 Western blot检测细胞Cas9蛋白的表达情况

Fig.4 Western blot detection of Cas9 protein expression

A549细胞的活性无影响。

2.7 A549 Cas9-copGFP-1基因编辑能力验证

阳性对照 sgRNA 可以靶向细胞基因组的多个位点, 造成 DNA 双链断裂, 激活细胞发生非同源末端链接, 引起碱基的随机插入或错配, 导致细胞发生死亡。在转染 48 h 内就可以明显观察到细胞死

亡、贴壁细胞数量减少等现象, 从而评估细胞活性。转染 48 h 后在倒置显微镜下观察, 发现阳性对照 sgRNA 浓度梯度依赖性地促进细胞死亡, 其中 0.03 nmol/L 阳性对照 sgRNA 使 54.26% 的细胞死亡, 1 nmol/L 阳性对照 sgRNA 使 81.90% 的细胞死亡。A549 Cas9-copGFP-1 转染阴性对照 sgRNA 后未引

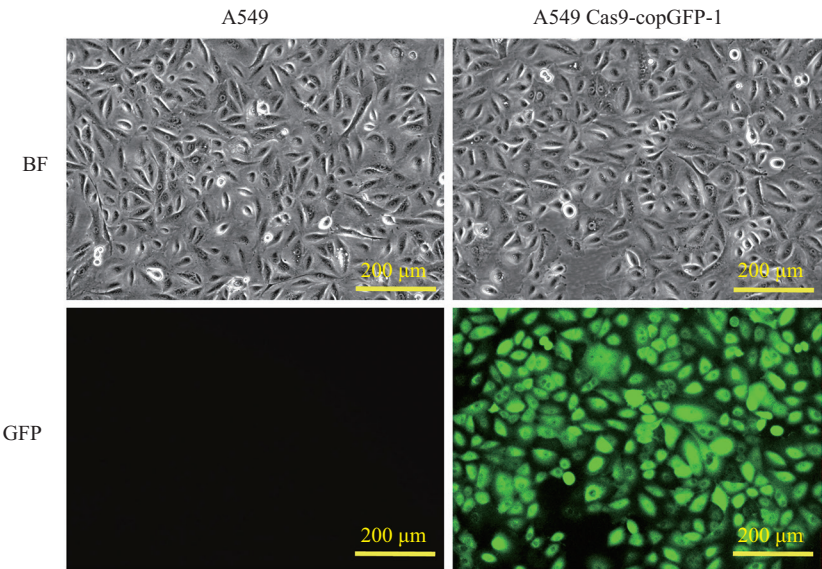
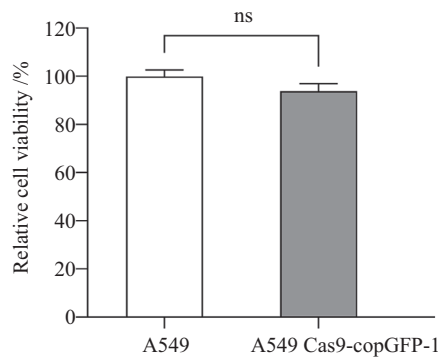


图5 A549和A549 Cas9-copGFP-1细胞的GFP表达情况
Fig.5 Detection of GFP in A549 and A549 Cas9-copGFP-1 cells

表1 A549 Cas9-copGFP-1 STR图谱
Table 1 STR profile of A549 Cas9-copGFP-1

匹配率 Match rate	细胞目录号 Cell serial	细胞名称 Cell name	位点名称 Locus names								
			D5S818	D13S317	D7S820	D16S539	VWA	TH01	AM	TPOX	CS-FIPO
100%	CCL-185	A549	11,11	11,11	8,11	11,12	14,14	8,9.3	X,Y	8,11	10,12
100%	IFO50153	A549	11,11	11,11	8,11	11,12	14,14	8,9.3	X,Y	8,11	10,12
100%	JCRB0076	A549	11,11	11,11	8,11	11,12	14,14	8,9.3	X,Y	8,11	10,12
100%	RCB0098	A549	11,11	11,11	8,11	11,12	14,14	8,9.3	X,Y	8,11	10,12

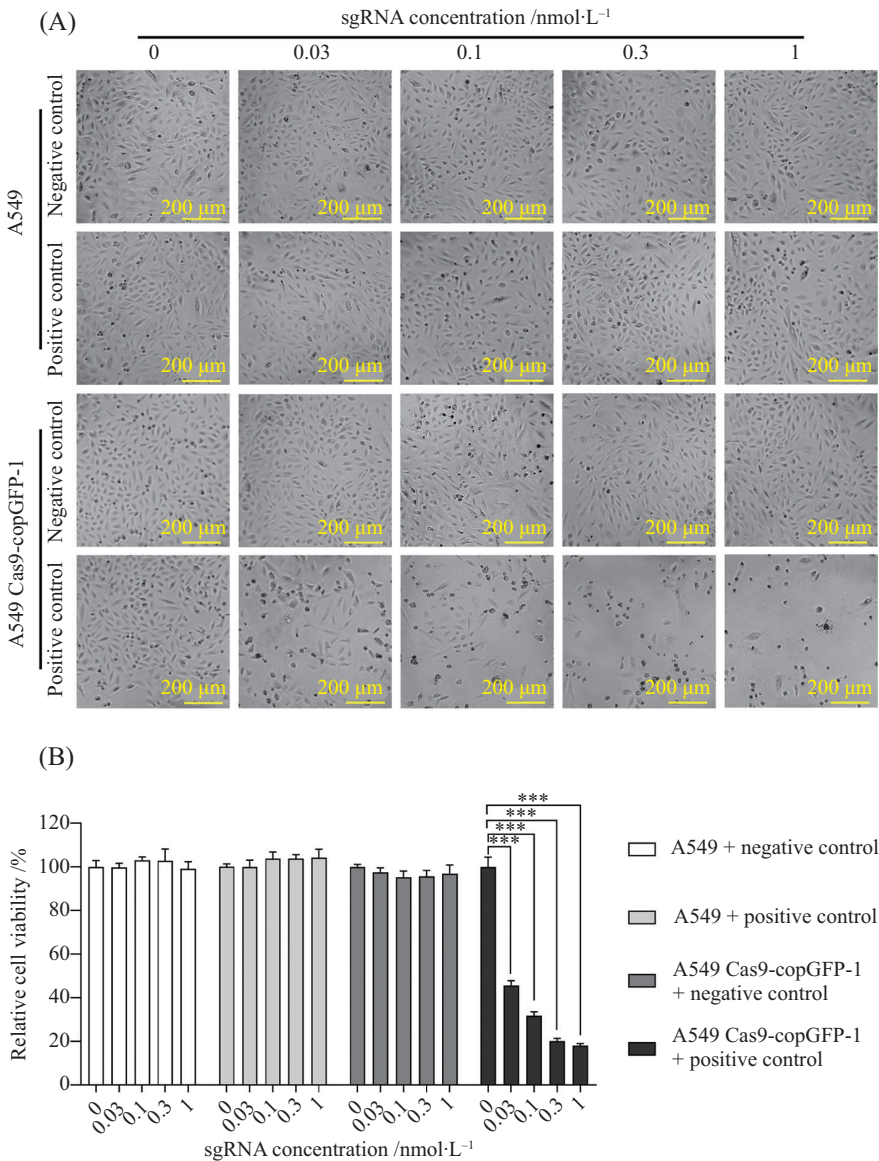


ns: 无统计学差异。
ns: no significance.

图6 表达Cas9蛋白对A549细胞活力影响的检测结果
Fig.6 Results of the effect of expression of Cas9 protein on A549 cell viability

起细胞活力变化。作为对照的A549细胞转染阴性对照和阳性对照sgRNA后对细胞活力均无影响(图7)。

3 讨论
肺癌作为一种常见肿瘤,具有恶性率高、生存率低的特点,其中NSCLC发生率最高。手术和放疗



A: 用0 nmol/L、0.03 nmol/L、0.1 nmol/L、0.3 nmol/L、1 nmol/L 阴性对照sgRNA和阳性对照sgRNA分别转染A549和A549 Cas9-copGFP-1细胞48 h后的细胞形态图; B: 细胞活力对比图。*** $P<0.001$ 。
A: cell morphology of A549 and A549 Cas9-copGFP-1 cells after transfected with 0 nmol/L, 0.03 nmol/L, 0.1 nmol/L, 0.3 nmol/L, 1 nmol/L negative control and positive control sgRNA for 48 h; B: comparative pictures of cell viability. *** $P<0.001$.

图7 A549 Cas9-copGFP-1细胞基因编辑能力检测
Fig.7 Gene editing ability assay of A549 Cas9-copGFP-1 cells

是肺癌的最佳治疗方法, 然而后续仍将面临高转移、易复发、预后差的挑战, 肺癌被认为是最难攻克的肿瘤之一。因此通过研究肺癌发生、转移机制, 筛选、研发潜在靶向药物及治疗手段显得尤为重要。肿瘤细胞系作为一种重要的实验材料可以在体外模拟肿瘤的增殖、迁移、侵袭等行为, 帮助研究者探索肿瘤发生、发展过程中的相关特异性基因, 为寻找安全有效的药物靶点提供更多可能性。A549是非小细胞肺癌研究最常用的细胞之一, 研究人员使

用CRISPR/Cas9技术构建同时携带sgRNA和Cas9序列的单一载体对A549细胞进行转染, 获得了一系列肿瘤相关基因敲除的A549细胞模型。例如, 敲除E盒结合锌指蛋白1(zinc finger E-box binding homeobox 1, *ZEB1*)、*ZEB2*后, 可以通过抑制肿瘤上皮-间充质转化进程, 降低A549细胞的增殖、转移能力^[16]; 迁移体标记基因4(tetraspanin 4, *TSPAN4*)的缺失则不会影响A549细胞的迁移能力^[17]; 泛素特异性肽酶15(ubiquitin specific peptidase 15, *USP15*)基因被敲除

后,关键肿瘤促进基因显著上调的同时多个肿瘤抑制基因明显下调,提示*USP15*负调节*TRAF6-BECN1*信号轴参与调控肿瘤发展进程^[18]。这些发现有效推进了NSCLC发展、迁移、侵袭过程中相关分子和细胞机制的研究。

目前常用慢病毒载体法构建表达Cas9蛋白的细胞株^[19-20],然而慢病毒载体介导的基因序列插入具有随机性,可能导致细胞出现未知的基因改变、插入点附近基因沉默或随机表达不相关基因等情况,给后续的细胞传代、实验结果重复等方面带来不利影响。具有高负载能力、高安全性和低免疫原性的非病毒载体开始得到关注,在CRISPR/Cas9递送中发挥重要作用。本文使用非病毒载体系统,将基因组切割质粒AAVS1-sgRNA-Cas9和Cas9序列供体质粒AAVS1-Cas9 donor共同转入A549细胞,在AAVS1位点进行特异性切割,造成DNA双链断裂,诱导同源重组修复途径发生,促使供体克隆上的DNA片段整合到基因组上的AAVS1安全位点。AAVS1位点在包括胚胎干细胞在内的许多细胞中长期、稳定表达,且该位点的插入不会引起任何已知的疾病,被认为是基因修饰的安全位点,在基因编辑技术中被广泛使用^[21-22]。

本研究构建的稳定表达Cas9蛋白的单克隆细胞系A549 Cas9-copGFP-1,与A549相比细胞活力没有明显差异,增殖能力未受影响,且具有良好的基因编辑能力,后续只需根据实验需求设计靶向sgRNA进行转染即可快速、简便地实现目标基因的特异性编辑,尤其适合sgRNA文库筛选。ZHANG等^[23]使用稳定表达Cas9蛋白的HT29细胞同时进行7万多条sgRNA的文库筛选,极大加速了寻找伤寒沙门氏菌引起肠道上皮细胞坏死的关键信号通路和相关基因的研究进程。此外,利用表达Cas9蛋白的目标细胞进行全基因组CRISPR/Cas9 sgRNA筛选,研究人员发现肿瘤抑制基因肝激酶B1(liver kinase B1, *LKB1*)是肺腺癌原发肿瘤中染色质可及性的主要调控基因,可以促进肿瘤的转移^[24],还提示参与嘌呤生物合成的磷酸核糖氨基咪唑琥珀酰胺合成酶(phosphoribosylaminoimidazole succinocarboxamide synthase, *PAICS*)可以作为治疗急性骨髓性白血病的潜在靶点^[25]。与早期需要针对每条sgRNA设计构建单一载体将Cas9和目标sgRNA转染入靶细胞的工作相比^[26],先将Cas9基因转入细胞中,构建出稳定表

达Cas9蛋白的细胞株,然后按需转入相应的sgRNA文库,转染效率更高、操作更简便,便于实现基因的高通量筛选。尽管我们的实验证明Cas9的稳定表达对A549细胞的增殖活力没有显著影响,但仍可能存在未知的影响。此外有报道称CRISPR/Cas9系统对目标基因进行编辑时可能存在杂合插入的情况:对猪睾丸细胞进行基因敲除时,发现纯合编辑率仅为27.6%^[27];在人诱导多能干细胞中进行基因编辑时发现杂合率可以达到50%^[28]。对造成这种现象的原因及改进方法也可以进行更深度的探索。后续我们还考虑在Cas9供体质粒AAVS1-Cas9 donor中增加四环素调控表达元件来特异性调控Cas9基因表达水平,减少Cas9持续表达给细胞带来的潜在影响。综上,本研究为肺癌相关基因的高通量筛选和功能性研究提供了一种背景均一的工具细胞株,为肿瘤机制研究及大规模药物筛选提供了有效的研究途径。

参考文献 (References)

- [1] JIANG F, DOUDNA J A. CRISPR-Cas9 structures and mechanisms [J]. *Annu Rev Biophys*, 2017, 46: 505-29.
- [2] JINEK M, CHYLINSKI K, FONFARA I, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity [J]. *Science*, 2012, 337(6096): 816-21.
- [3] MALI P, YANG L, ESVELT K M, et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9 [J]. *Science*, 2013, 339(6121): 823-6.
- [4] SHOHEI S, KENTARO I, YUTARO Y, et al. EGFR-independent autophagy induction with gefitinib and enhancement of its cytotoxic effect by targeting autophagy with clarithromycin in non-small cell lung cancer cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 461(1): 28-34.
- [5] LOK B H, GARDNER E E, SCHNEEBERGER V E, et al. PARP inhibitor activity correlates with SLFN11 expression and demonstrates synergy with temozolomide in small cell lung cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2017, 23(2): 523-35.
- [6] TOGASHI Y, MIZUUCHI H, TOMIDA S, et al. MET gene exon 14 deletion created using the CRISPR/Cas9 system enhances cellular growth and sensitivity to a MET inhibitor [J]. *Lung Cancer*, 2015, 90(3): 590-7.
- [7] LU Y, XUE J, DENG T, et al. Safety and feasibility of CRISPR-edited T cells in patients with refractory non-small-cell lung cancer [J]. *Nat Med*, 2020, 26(5): 732-40.
- [8] NAULT J C. Cancer gene discovery in hepatocellular carcinoma: the CRISPR/Cas9 accelerator [J]. *Gastroenterology*, 2017, 152(5): 941-3.
- [9] CHEN J, JIANG S, SHAO H, et al. CRISPR-Cas9-based genome-wide screening identified novel targets for treating sorafenib-resistant hepatocellular carcinoma: a cross-talk between FGF21 and the NRF2 pathway [J]. *Sci China Life Sci*, 2022, 65(10): 1998-2016.
- [10] ALI H S, BOSHRA M S, METEINI M S E, et al. lncRNA-RP11-156p1.3, novel diagnostic and therapeutic targeting via CRISPR/Cas9

- editing in hepatocellular carcinoma [J]. *Genomics*, 2020, 112(5): 3306-14.
- [11] DEEVER J W, LOPEZ S M, NGHIEM P P, et al. MCF7 human breast cancer cells engineered to stably overexpress DEPTOR via CRISPR/Cas9 to reduce anabolic capacity [J]. *FASEB J*, 2020, 34(S1): 1.
- [12] CHRISTIDI E, HUANG H M, BRUNHAM L R. CRISPR/Cas9-mediated genome editing in human stem cell-derived cardiomyocytes: applications for cardiovascular disease modelling and cardiotoxicity screening [J]. *Drug Discov Today Technol*, 2018, 28: 13-21.
- [13] HE J, ZHANG T, FU X. Using a novel cellular platform to optimize CRISPR/Cas9 technology for the gene therapy of AIDS [J]. *Protein Cell*, 2017, 8(11): 848-52.
- [14] ZOU J, SWEENEY C L, CHOU B K, et al. Oxidase-deficient neutrophils from X-linked chronic granulomatous disease iPS cells: functional correction by zinc finger nuclease-mediated safe harbor targeting [J]. *Blood*, 2011, 117(21): 5561-72.
- [15] PLANCHARD D, POPAT S, KERR K, et al. Metastatic non-small cell lung cancer: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up [J]. *Ann Oncol*, 2018, 29(4): 192-237.
- [16] MOHAMMADINEJAD R, SASSAN H, PARDAKHTY A, et al. ZEB1 and ZEB2 gene editing mediated by CRISPR/Cas9 in A549 cell line [J]. *Bratisl Lek Listy*, 2020, 121(1): 31-6.
- [17] 刘雁, 杜亚蓉, 孙坤. 基于CRISPR/Cas9基因编辑系统构建敲除TSPAN4基因的非小细胞肺癌细胞系[J]. *中国细胞生物学学报* (LIU Y, DU Y R, SUN K. Establishment of TSPAN4 gene knockout of non-small cell lung cancer [J]. *Chinese Journal of Cell Biology*), 2023, 45(2): 203-12.
- [18] KIM M J, MIN Y, JEONG S K, et al. USP15 negatively regulates lung cancer progression through the TRAF6-BECN1 signaling axis for autophagy induction [J]. *Cell Death Dis*, 2022, 13(4): 348.
- [19] 刘燕飞, 那雷, 王晓钧. 稳定表达Cas9蛋白的HeLa细胞系的建立[J]. *中国预防兽医学报* (LIU Y F, NA L, WANG X J. Establishment of a HeLa cell line stable expressing Cas9 protein [J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*), 2020, 42(9): 893-8.
- [20] 葛丽娟, 权冉, 陈俊贞, 等. 稳定表达Cas9蛋白的BHK-21单克隆细胞系的建立与鉴定[J]. *中国兽医杂志* (GE L J, QUAN R, CHEN J Z, et al. Establishment and identification of BHK-21 monoclonal cell lines stably expressing Cas9 protein [J]. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*), 2022, 58(9): 12-7.
- [21] GU J, ROLLO B, SUMER H, et al. Targeting the AAVS1 site by CRISPR/Cas9 with an inducible transgene cassette for the neuronal differentiation of human pluripotent stem cells [J]. *Methods Mol Biol*, 2022, 2495: 99-114.
- [22] ZHANG J, HU Y, YANG J, et al. Non-viral, specifically targeted CAR-T cells achieve high safety and efficacy in B-NHL [J]. *Nature*, 2022, 609(7926): 369-74.
- [23] ZHANG H, ZOUED A, LIU X, et al. Type I interferon remodels lysosome function and modifies intestinal epithelial defense [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2020, 117(47): 29862-71.
- [24] PIERCE S E, GRANJA J M, CORCES M R, et al. LKB1 inactivation modulates chromatin accessibility to drive metastatic progression [J]. *Nat Cell Biol*, 2021, 23(8): 915-24.
- [25] YAMAUCHI T, MIYAWAKI K, SEMBA Y, et al. Targeting leukemia-specific dependence on the *de novo* purine synthesis pathway [J]. *Leukemia*, 2022, 6(2): 383-93.
- [26] SHALEM O, SANJANA N E, HARTENIAN E, et al. Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells [J]. *Science*, 2014, 343(6166): 84-7.
- [27] 车晶晶, 徐奎, 张秀玲, 等. 基于CRISPR/Cas9技术的Wip1基因敲除ST细胞的建立[J]. *畜牧兽医学报* (CHE J J, XU K, ZHANG X L, et al. Establishment of Wip1-knockout ST cells mediated by CRISPR/Cas9 system [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*), 2021, 52(10): 2814-21.
- [28] PAQUET D, KWART D, CHEN A, et al. Efficient introduction of specific homozygous and heterozygous mutations using CRISPR/Cas9 [J]. *Nature*, 2016, 533(7601): 125-9.