

在微孔板读板机上使用成像和免疫印迹检测法验证 CRISPER 编辑的细胞

简介

基因组编辑已被广泛应用于基因表达和蛋白质功能的研究，但这些方法中有许多是复杂的和不准确的^[1]。CRISPR (成簇的规律间隔的短回文重复序列) / Cas9 系统由于其较高的准确性和易操作性，已经成为一种非常流行的基因编辑工具^[2]。它起源于细菌和古细菌先天免疫系统的一部分，被用来抵御外来的 DNA^[3,4]。已知的外源 DNA 短序列被表达为 CRISPR 靶向 RNA (crRNA)，引导 Cas9 酶切割任何含有类似序列的外源 DNA。通过利用这一系统，研究人员可以研究基因沉默和转录调控的效果，并有可能减轻患病细胞的遗传疾病^[5]。

一个与 crRNA 相似的向导 RNA (gRNA) 被设计针对基因的某一段区域，Cas9 酶可以在宿主细胞基因组的指定区间制造双链断裂 (图 1)。双链断裂后，细胞会经历两种修复途径；非同源末端连接 (NHEJ) 途径和同源定向重组 (HDR) 途径。NHEJ 途径是通常被用于破坏基因，通过插入或删除 (位点)，而 HDR 途径可以被用于敲除报告基因或通过两个相似或相同的序列之间交换序列而编辑的序列^[6]。

基因编辑的确认是必要的，为了确定引入的变化是否破坏了感兴趣的基因。通常会用染色体 PCR 和基因的测序来确认是否成功的删除或插入，然而检测蛋白的表达是基因敲除更好的检测方式，避免结构内删除 / 突变^[7]。

这里我们展示了如何利用 SpectraMax i3x 多功能微孔板读板机和 ScanLater 免疫印迹检测卡盒鉴定 CRISPR/Cas9 基因编辑。我们使用 Origene 公司的 ATG5 人源基因敲除试剂盒通过 CRISPR 试剂盒敲除 HEK293 细胞中自噬相关的 ATG5 蛋白表达并插入绿色荧光蛋白 (GFP) 和抗嘌呤霉素基因。敲除是使用 ScanLater 免疫印迹鉴定。

优势

- GFP 阳性细胞 Vs 未转染细胞精确判断转染效率
- 使用免疫印迹分析蛋白条带方式验证 CRISPR 介导基因敲除技术
- 获得高质量 Western Blot 图像

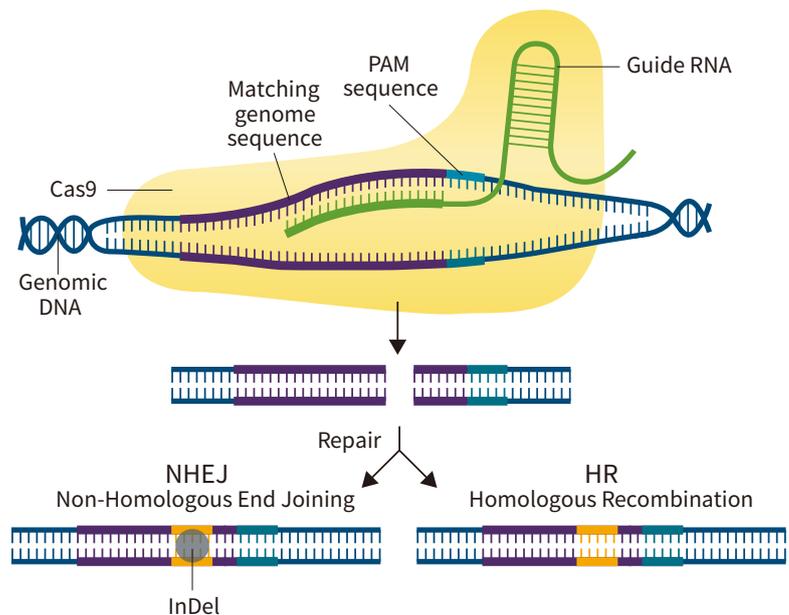


图 1 CRISPER/Cas9 机制。 Cas9 酶被首先结合的向导 RNA 激活，然后结合到包含 3-核苷酸 PAM 序列的匹配的基因上。Cas9 酶随后创建了一个双链断裂，通过 NHEJ 和 HDR 途径修复基因，生成一个编辑后的基因序列。

材料

- ATG5 Human CRISPR Knockout kit via CRISPR (Origene cat. #KN210563)
- FUGENE HD Transfection Reagent (Promega cat. #E2311)
- Opti-MEM Reduced Serum Media (ThermoFisher cat. #31985062)
- Rabbit Polyclonal Antibody against ATG5 (Origene cat. #TA301481)
- ATG5 HEK293T cell transient overexpression lysate (Origene cat. #LC401532)
- pCas-Guide-EF1a-GFP Plasmid (Origene cat. #GE100018)
- HEK293 细胞(ATCC cat. #CRL-1573)
- SpectraMax[®] i3x 多功能微孔板读板机 (Molecular Devices cat. #i3x)
- ScanLater™ Western Blot 检测系统 (Molecular Devices cat. #0200-7027)
- SpectraMax[®] MiniMax™ 300 细胞成像系统 (Molecular Devices cat. #5024062)
- ScanLater: Eu-Streptavidin Evaluation Kit (Molecular Devices cat. #R8200)
- ScanLater: Anti-Mouse Evaluation Kit (Molecular Devices cat. #R8201)
- Pierce BCA Protein Assay Kit (ThermoFisher cat. #23225)
- Puromycin (InvivoGen cat. #ant-pr)
- TGX 12% SDS-PAGE Gel (Bio-Rad cat. #1620174)
- TransBlot Turbo Mini-size LF PVDF membranes (Bio-Rad cat. #1620174)
- Trans-Blot[®] Turbo™ system (Bio-Rad cat. #1704150)

CRISPER 工作流程

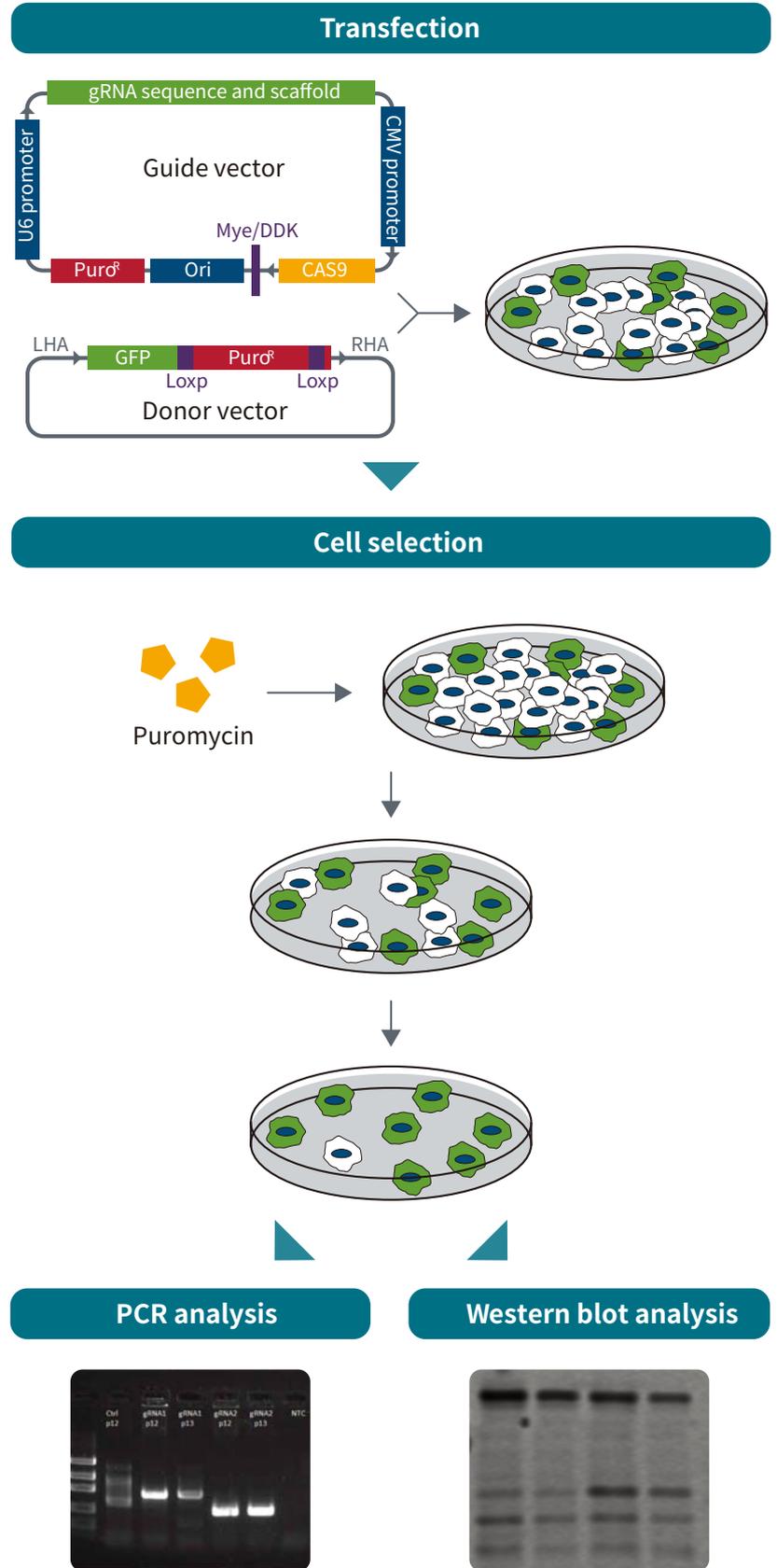


图2 CRISPER/Cas9 实验流程。HEK293 细胞被向导和供体载体转染。使用 1.0 µg/mL 嘌呤霉素选择富集基因插入的细胞。在被选择的细胞里收集细胞的 DNA 和蛋白，基因组 PCR 和免疫印迹分别用于鉴别基因的插入和敲除。

方法

细胞转染

将 HEK293 细胞以每孔 300,000 个细胞的密度种在 Costar 6 孔组织培养板中。细胞 (1) 被向导载体 (AAGATGTGCTTCGAGATGTG) 和包含嘌呤霉素抗性和 GFP 的供体载体转染。平行的, 三个孔的细胞被 pCas-Guide-EF1a-GFP 载体转染, 该载体瞬时表达 GFP 作为转染控制。6 μ L FUGENE HD 转染试剂和 2 μ g 总 DNA (3:1) 用于转染细胞。然后将细胞放置在 37°C 孵育过夜。表达 GFP 的被转染的细胞可以通过 MiniMax cytometer 的绿色荧光通道鉴定和计算。细胞的总数可以通过免染分析被计算, 转染效率可以通过 SoftMax Pro 软件计算 GFP 阳性的细胞数与总细胞数的比值。

细胞挑选

转染的细胞被培养在含有 1.0 μ g/mL 嘌呤霉素的培养基当中以挑选插入嘌呤霉素抗性基因的细胞。然后, 裂解细胞, 收集基因组 DNA 和总蛋白。基因组 DNA 被送去 GENEWIZ 做 PCR 分析鉴定基因插入的正确性, 使用 Pierce BCA 实验在 SpectraMax i3x 读板机上定量蛋白浓度, 并使用 SoftMax Pro 软件中的一个预置模板分析结果。

免疫印迹

在 Laemmli 样品缓冲液中稀释细胞裂解物, 在 100°C 下煮沸 10 分钟, 从 CRISPR 编辑的细胞和未被编辑的细胞中收集 5 μ g 和 10 μ g 的总蛋白。上样品至 4-20% 的预制凝胶上, 做 SDS-PAGE。然后使用 Trans-Blot Turbo 的半干法, 将蛋白转移至 PVDF 膜上。

将膜放在 ScanLater 封闭缓冲液中室温孵育 1 小时。膜上的对照, 参比和 ATG5 条带被剪切成独立片放在各自的一抗 (见表 1) 中 4°C 孵育过夜。用 ScanLater 清洗缓冲液洗三遍以后, 再放入 ScanLater Eu 标记的二抗溶液中室温孵育 1 小时。对应的抗体和稀释见表 1。

二抗孵育过后, 用 ScanLater 清洗缓冲液洗 3 遍, 干燥, 重新拼接后用 ScanLater 免疫印迹检测系统读板。

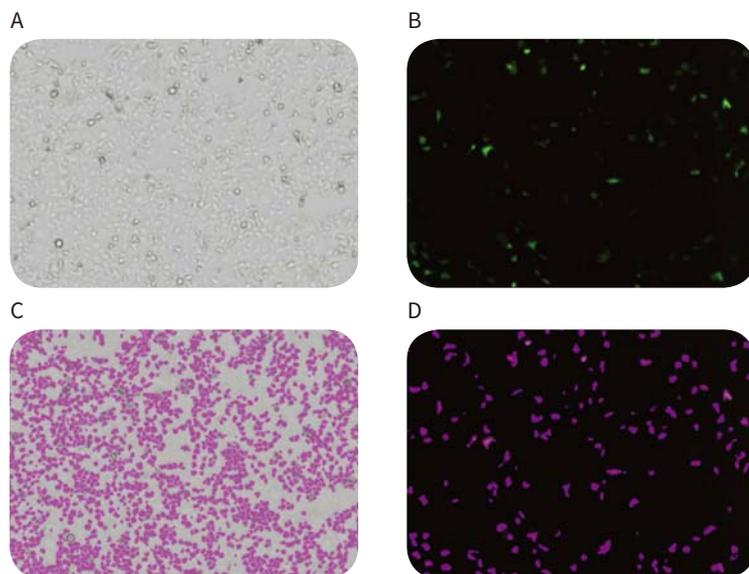


图 3 细胞转染图像。 HEK293 细胞被 pCas-Guide-EF1a-GFP 载体和 CRISPR/Cas9 平行转染来计算转染效率。MiniMax cytometer 用于在明场通道 (A) 和绿色荧光通道 (B) 获取细胞的图像。SoftMax Pro 软件在两通道内鉴定和计算 (C 和 D), 通过计算 GFP 阳性细胞与总细胞数的比值算出转染效率为 13%。



图 4 ATG5 免疫印迹实验。 ATG5 蛋白在 CRISPR 编辑细胞内的表达表达明显低于非编辑细胞。10 μ g 和 5 μ g 样本被上样到 SDS-PAGE 胶上计算过量 / 低量样本。Vinculin 作为对照上样使不同的样本上样量标准化。免疫印迹图片被导出到 Image J 软件计算条带的亮度。

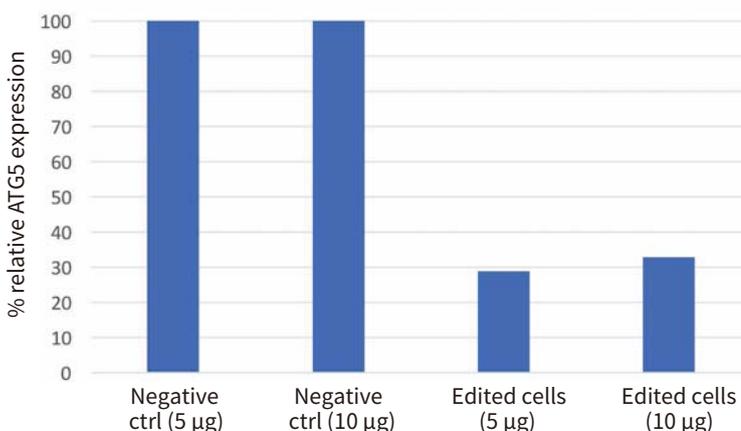


图 5 ATG5 蛋白相对表达。 图 4 中的免疫印迹图片被导出到 Image J 软件中, 分析条带亮度。ATG5 蛋白条带的亮度标准化到他们各自的上样对照。CRISPR 编辑的细胞中的 ATG5 表达一致低于非编辑细胞。

数据分析

数据从 SoftMax Pro 软件中导出至 Image J 软件, 通过条带亮度定量 ATG5 蛋白的相对表达。Vinculin 是一种 117-kDa 的细胞骨架蛋白, 与细胞-细胞和细胞-基质连接有关。该蛋白作为上样对照使样品上样差异标准化。

结果

MiniMax cytometer 获取转染和非转染细胞的高质量的图片, SoftMax Pro 软件可以定量 GFP 阳性的细胞数量和总的细胞数量。计算得出 13% 的转染效率 (图 3)。PCR 分析基因组 DNA 样品表明, 在 HEK293 细胞基因组的 ATG5 区域进行了正确大小的插入 (数据未显示)。在免疫印迹图像中, CRISPER 编辑的细胞与非编辑的细胞 (阴性对照) 样品在 ATG5 区域显示出明显较弱的条带亮度 (图 4)。使用 Image J 软件计算蛋白条带的亮度, 与非编辑的细胞相比, CRISPER 编辑的细胞的 ATG5 蛋白表达下调 60% (图 5)。

总结

CRISPER 基因编辑技术需要对整个过程进行细致的监控以确保实验结果。SpectraMax i3x 多功能微孔板读板机为结果的分析提供了完整的解决方案。从最初的转染到蛋白敲除的确认。使用 MiniMax cytometer, 研究人员可以通过比对未标记的细胞总数和表达荧光的转染细胞数评估转染效率。ScanLater 免疫印迹检测系统可以对对照蛋白和 CRISPER 编辑的细胞进行敏感检测和定量分析。

	一抗	一抗
样品	1:2500 rabbit anti-ATG5	1:10000 Goat Anti-Rabbit
对照	1:10000 rabbit anti-Vinculin	1:10000 Goat Anti-Rabbit
ScanLater 免疫印迹蛋白 Ladder		1:10000 Eu-Streptavidin

参考文献

- [1] Lombardo, A et al. Gene editing in human stem cells using zinc finger nucleases and integrase-defective lentiviral vector delivery. *Nature Biotechnology* 25.11 (2007): 1298.
- [2] Barrangou, R. Cas9 targeting and the CRISPR revolution. *Science* 344.6185 (2014): 707-708.
- [3] Ishino, Y et al. Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *Journal of Bacteriology* 169.12 (1987): 5429-5433.
- [4] Barrangou, R et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science* 315.5819 (2007): 1709-1712.
- [5] Barrangou, R et al. Applications of CRISPR technologies in research and beyond. *Nature Biotechnology* 34.9 (2016): 933-941.
- [6] Liang, F et al. Homology-directed repair is a major double-strand break repair pathway in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of*

Sciences 95.9 (1998): 5172-5177. [7] Estep, JA et al. Immunoblot screening of CRISPR/Cas9-mediated gene knockouts without selection. *BMC molecular biology* 17.1 (2016): 9.



更多精彩内容
尽在官方微信

美谷分子仪器 (上海) 有限公司

全国咨询服务热线: 400-820-3586
上海 电话: 86-21-3372 1088
北京 电话: 86-10-6410 8669
成都 电话: 86-28-6558 8820
台北 电话: 886-2-2656 7585
香港

www.MolecularDevices.com.cn
Email: info.china@moldev.com
传真: 86-21-3372 1066
传真: 86-10-6410 8601
传真: 86-28-6558 8831
传真: 886-2-2894 8267
传真: 852-2289 5385

地址: 上海市长宁区福泉北路 518 号 1 座 501 室 200335
地址: 北京市朝阳区广渠东路 3 号中水电国际大厦 612 & 613 室 100124
地址: 成都市锦江区东御街 18 号百扬大厦 2208 室 610016
地址: 台北市内湖区堤顶大道二段 89 号 3 楼
地址: 香港中环皇后大道中 15 号置地广场 公爵大厦 21 楼

