



利用 CRISPR/Cas9 系统构建稳定敲除 *anxa6* 基因的 Caco-2 细胞株

陈汉宗¹, 梁颂¹, 黎新月¹, 方宇婷¹, 彭悦景¹, 张宝^{1,3}, 赵卫^{1,3}, 华颖^{2,3*}, 万成松^{1,3*}

1 南方医科大学公共卫生学院 生物安全研究中心, 广东 广州 510515

2 南方医科大学南方医院检验医学科, 广东 广州 510515

3 南方医科大学公共卫生学院 广东省热带病研究重点实验室 BSL-3 实验室, 广东 广州 510515

陈汉宗, 梁颂, 黎新月, 方宇婷, 彭悦景, 张宝, 赵卫, 华颖, 万成松. 利用 CRISPR/Cas9 系统构建稳定敲除 *anxa6* 基因的 Caco-2 细胞株[J]. 微生物学报, 2023, 63(3): 1217-1229.

CHEN Hanzong, LIANG Song, LI Xinyue, FANG Yuting, PENG Yuejing, ZHANG Bao, ZHAO Wei, HUA Ying, WAN Chengsong. Knockout of human *anxa6* gene in Caco-2 cells by CRISPR/Cas9 system[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(3): 1217-1229.

摘要: 【目的】利用 CRISPR/Cas9 系统构建稳定敲除 *anxa6* 基因的 Caco-2 细胞株, 为研究大肠杆菌 O157:H7 效应蛋白 EspF 与宿主膜联蛋白 A6 (ANXA6) 相互作用及其致病机制奠定基础。

【方法】根据 CRISPR/Cas9 靶向原理设计并合成 3 个特异性识别 *anxa6* 基因的向导 RNA (single guide RNA, sgRNA), 基于 LentiCRISPRv2 载体构建 LentiCRISPRv2-sgRNA 重组质粒, 转入 293T 细胞中, 制备 sgRNA-Cas9 慢病毒, 将慢病毒感染 Caco-2 细胞, 经嘌呤霉素筛选阳性细胞, 有限稀释法分离培养单克隆细胞, 提取单克隆细胞基因组 DNA, 并对敲除位点附近的 DNA 片段进行 PCR 扩增, 测序并进行脱靶效应评估; 免疫印记法检测 ANXA6 蛋白表达情况, 细胞计数试剂盒 8 (cell counting kit 8, CCK8) 试剂盒检测细胞增殖能力, 免疫荧光法检测细胞紧密连接分布情况。

【结果】Western blotting 及序列测序表明 *anxa6* 基因敲除单克隆细胞构建成功; 脱靶效应评估结果显示预测的 10 个脱靶位点均无脱靶现象; 基因敲除对细胞增殖能力无明显影响; 免疫荧光结

资助项目: 广东省自然科学基金(2018B030311063); 广东省基础与应用基础研究基金(2021A1515011240); 国家自然科学基金(32100143)

This work was supported by the Natural Science Foundations of Guangdong Province (2018B030311063), the Guangdong Basic and Applied Basic Research Foundation (2021A1515011240), and the National Natural Science Foundation of China (32100143).

*Corresponding authors. HUA Ying, Tel/Fax: +86-20-62787683, E-mail: hying615@smu.edu.cn;

WAN Chengsong, Tel/Fax: +86-20-61648058, E-mail: gzwcs@smu.edu.cn

Received: 2022-07-22; Accepted: 2022-09-05; Published online: 2022-09-14

果显示, Caco-2 及 Caco-2^{*anxa6*^{-/-}} 细胞紧密连接蛋白 ZO-1 均沿细胞膜连续分布, 结构完整, 转染 EspF 质粒后出现分布不完整、缺口等现象。【结论】成功构建 *anxa6* 基因稳定敲除的 Caco-2 细胞株, 初步探索 ANXA6 蛋白在紧密连接分布中的作用, 为进一步研究大肠杆菌 O157:H7 通过 EspF-ANXA6 互作介导宿主肠屏障损伤分子机制提供技术支撑。

关键词: CRISPR/Cas9 系统; *anxa6*; EspF 蛋白; Caco-2 细胞; 紧密连接

Knockout of human *anxa6* gene in Caco-2 cells by CRISPR/Cas9 system

CHEN Hanzong¹, LIANG Song¹, LI Xinyue¹, FANG Yuting¹, PENG Yuejing¹,
ZHANG Bao^{1,3}, ZHAO Wei^{1,3}, HUA Ying^{2,3*}, WAN Chengsong^{1,3*}

1 Center for Biosafety Research, School of Public Health, Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong, China

2 Department of Laboratory Medicine, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong, China

3 BSL-3 Laboratory, Guangdong Provincial Key Laboratory of Tropical Disease Research, School of Public Health, Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong, China

Abstract: [Objective] To study the interaction between *Escherichia coli* O157:H7 effector protein EspF and host ANXA6 protein and its pathogenic mechanism, we constructed a stable Caco-2 cell line with the knockout of *anxa6* using CRISPR/Cas9 system. [Methods] We designed and synthesized three small guide RNA (sgRNA) which can specifically recognize *anxa6* gene. We constructed Lenticrisprv2-sgRNA recombinant plasmid and transfected it into 293T cells to prepare sgRNA-Cas9 lentivirus. Then we infected Caco-2 cells with lentivirus, and applied puromycin to screen the positive cells. We isolated the monoclonal cells by limiting dilution and sequenced the cells to evaluate the knock-out of gene *anxa6* and the off-target effect. Western blotting was employed to detect the expression level of ANXA6, cell counting kit 8 (CCK8) assay to determine cell proliferation, and immunofluorescence to detect the distribution of tight junction protein ZO-1. [Results] The *anxa6* gene in Caco-2 cell line was knocked out, and no off-target effect in the 10 predicted sites was found. The knockout of *anxa6* had no significant effect on cell proliferation. ZO-1 of Caco-2 and Caco-2^{*anxa6*^{-/-}} cells displayed continuous distribution along the cell membrane, with complete structure. After transfection with EspF plasmids, the distribution of tight junction was incomplete with clear gaps and crack-like appearance. [Conclusion] We successfully constructed the Caco-2 cell line with the knock-out of *anxa6*. The cell line was used to preliminarily explore the role of ANXA6 protein in distribution of tight junction protein. This study provides an effective tool for exploiting the molecular mechanism of O157:H7 in mediating intestinal barrier injury through EspF-ANXA6 interaction.

Keywords: CRISPR/Cas9 system; *anxa6*; EspF proteins; Caco-2 cells; tight junction

膜联蛋白(annexins, ANXs)是一种对细胞运动具有重要支架功能的蛋白家族,其模块化结构域组织可以支持蛋白质-蛋白质和蛋白质-脂质之间的相互作用^[1-4]。ANXs 有一个共同的羧基膜结合结构域,由 70 个保守的氨基酸重复序列循环排列而成^[5-6]。该膜结合结构域具有轻微弯曲的菱形,具有凸出的膜结合面,其中钙(Ca^{2+})结合环暴露,凹面突出氨基端结构域。氨基末端在大小上可变,被认为是 ANXs 功能特异性的原因^[3,5-7]。膜联蛋白 A6 (ANXA6)属于高度保守的蛋白质家族,其特征在于与 Ca^{2+} 和脂质的依赖性结合^[8]。ANXA6 是膜联蛋白家族中最大的成员,在大多数组织中均高表达^[1-4]。ANXA6 主要位于质膜和内吞体腔室,与多种蛋白质和脂质相互作用,形成膜结构域、信号复合物,介导瞬时膜-肌动蛋白相互作用,维持细胞内胆固醇稳态^[9-10]。ANXA6 被认为是脂筏的组织者,负责调节胆固醇平衡、受体定位和信号转导^[11]。在一些细胞和动物模型中,ANXA6 和其他一些膜联蛋白被证明对膜修复至关重要^[12-14]。

大肠杆菌 O157:H7 是一种食源性致病菌,能在家禽肠道内定殖,通过食品感染人类,导致出血性腹泻、出血性结肠炎、溶血性尿毒综合征(hemolytic uremic syndrome, HUS)等^[15],严重时危及生命。大肠杆菌 O157:H7 感染人体后,通过消化道进入,并黏附于肠黏膜上皮细胞,一方面产生志贺毒素 Stx1、Stx2^[16],破坏黏膜上皮细胞,造成局部病变,是 HUS 发生的基础;另一方面黏附到宿主肠上皮细胞,产生黏附-抹去损伤^[17],经三型分泌系统(type III secretion system, TTSS)将一系列毒力蛋白注入宿主体内,共同发挥致病作用。EspF 蛋白是经 TTSS 注入宿主细胞的一个多功能效应蛋白,能够靶向结合细胞线粒体、核仁,使线粒体功能障碍,并破坏核仁,与细胞内 N-WASP、SNX9、Abcf2、

CK18 等蛋白分子结合,破坏肠上皮细胞紧密连接,抑制吞噬作用,导致肠上皮细胞紧密连接破坏、微绒毛消失、细胞骨架发生重排、细胞凋亡等^[18]。前期,本课题组筛选并验证宿主蛋白 ANXA6 与大肠杆菌 O157:H7 EspF 蛋白相互作用^[19],发现 EspF 或 ANXA6 的组成型表达和 EspF-ANXA6 的共表达均可降低紧密连接(tight junction, TJ)蛋白 ZO-1 和 occludin 的水平,破坏 ZO-1 的分布^[20]。但 ANXA6 蛋白在紧密连接破坏过程中的作用还不清楚。

CRISPR/Cas9 系统是基于细菌或者古生菌的获得性免疫系统而发展起来的一种快速、高效和稳定的基因编辑技术^[21]。利用 CRISPR/Cas9 系统,借助慢病毒载体敲除 Caco-2 细胞株的 *anxa6* 基因,为深入研究 ANXA6 蛋白功能及其与 EspF 蛋白互作介导肠屏障损伤的作用机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

人结直肠腺癌细胞 Caco-2、人胚肾细胞 HEK293T 细胞(实验室保存); LentiCRISPR-v2 质粒、慢病毒包装辅助载体 pCD、pVSVg 质粒(由本实验室张宝教授惠赠);质粒小中提试剂盒(广州美基生物科技有限公司); BsmB I酶、T4 多聚核苷酸激酶、快速 T4 连接酶(NEB 公司);细胞基因组 DNA 提取试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司]; DMEM 培养基、胎牛血清(Gibco 公司);聚凝胺(polybrene) [翌圣生物科技(上海)股份有限公司]; RIPA 裂解液、嘌呤霉素、4% 多聚甲醛、抗荧光淬灭剂(上海碧云天生物科技有限公司);脂质体转染试剂(lipofectamine @ 3000 transfection reagent, Invitrogen 公司); ANXA6 抗体、ZO-1 抗体(Abcam 公司); β -actin、Goat Anti-rabbit IgG、Goat Anti-Mouse IgG (Bioss 公司); PVDF 膜(Millipore 公司); ECL 化

学发光液(Bioworld 公司); CCK8 试剂盒(杭州弗德生物科技有限公司); Triton X-100 (北京索莱宝科技有限公司); Goat anti-Rabbit IgG Alexa 594 (Proteintech 公司); DAPI (上海贝博科技有限公司)。

1.2 向导 RNA (single guide RNA, sgRNA)靶点选择及寡核苷酸链设计合成

在 NCBI 网站上查找到 *anxa6* 基因的外显子序列, 根据 CRISPR/Cas9 靶向原理, 利用 CRISPR 在线设计工具(<http://crispr.mit.edu/>), 选择 3 条分数较高的针对 *anxa6* 外显子的 sgRNA 序列, 在正义链模板的 5'端添加 CACC, 反义链模板的 5'端添加 AAAC, 与 *BsmB* I 酶切后形成的黏性末端互补。具体结果如表 1 所示。

1.3 LentiCRISPRv2-sgRNA 载体构建

LentiCRISPRv2-sgRNA 重组表达质粒构建步骤: (1) sgRNA 的退火。将合成的 sgRNA 引物粉末稀释成 100 $\mu\text{mol/L}$, 每对引物的正、反链各取 1 μL , 并加入 T4 连接酶 0.5 μL , T4 缓冲液(buffer) 1 μL 与 ddH₂O 6.5 μL 按如下体系进行退火处理: 37 $^{\circ}\text{C}$ 30 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 梯度降温至 25 $^{\circ}\text{C}$, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。(2) 利用 *BsmB* I 内切酶酶切 LentiCRISPRv2 载体。反应体系如下: LentiCRISPRv2 载体 5 μg , *BsmB* I 0.5 μL , 10 $\times$ buffer 5 μL , FastAP 3 μL , DTT 0.6 μL , 加 ddH₂O 至 50 μL 。55 $^{\circ}\text{C}$ 酶切 1 h。转化回收酶切片段。(3) 酶切载体与 sgRNA 的连接。LentiCRISPRv2 酶切产物 50 ng, 2 $\times$ 快速连接反应缓冲液 5 μL , 退火 sgRNA 1 μL , 加 ddH₂O

至 10 μL , 最后加入 1 μL 快速 T4 连接酶, 室温下孵育 10 min。(4) LentiCRISPRv2-sgRNA 连接产物转化。将连接产物转化至 *Stb13* 感受态细胞, 菌液 PCR 后经琼脂糖凝胶电泳验证, 然后小提质粒送样测序(测序引物: pRNA-U6 forward: 5'-TACGATACAAGGCTGTAG-3', pRNA reverse: 5'-ACATCACTTTCCAGTTT AC-3', 由广州艾基生物技术有限公司完成)。

1.4 293T 细胞培养与慢病毒制备

将 293T 细胞用含 10%血清的 DMEM 培养基常规培养, 转染前细胞密度为 60%–80%。将 LentiCRISPRv2-sgRNA 质粒和慢病毒包装辅助载体 pCD、pVSVg 质粒按照 LentiCRISPRv2-sgRNA:pCD:pVSVg 为 4:4:1 的比例混合, 将混合好的慢病毒表达系统按照 Lipofectamine @ 3000 转染试剂说明书转入 293T 细胞内, 转染 48–72 h 后收集细胞上清并保存于 -80°C 。

1.5 Caco-2 细胞培养与慢病毒侵染

Caco-2 细胞用含 10%血清的 DMEM 培养基常规培养, 侵染前将细胞接种至 6 孔板, 当细胞密度生长为 80%左右, 每孔加入适量 sgRNA-Cas9 慢病毒进行感染, 同时加入 polybrene 使其终浓度为 8 $\mu\text{g/mL}$, 侵染 56–72 h 后改换为 DMEM 培养基继续培养。

1.6 *anxa6* 基因敲除细胞株的单克隆筛选

sgRNA-Cas9 慢病毒侵染 Caco-2 细胞后, 更换含 10 $\mu\text{g/mL}$ 嘌呤霉素的 DMEM 培养基连续筛选 10–15 d, 将带有抗性的细胞采用有限稀

表 1 *Homo-ANXA6*-sg2 核酸片段

Table 1 *Homo-ANXA6*-sg2 oligo

Names	Target sites (5'→3')
Homo-ANXA6-sg2-1 Forward	CACCGTACTGGACATAATCACCTCAGTTT
Reverse	AAACTGAGGTGATTATGTCCAGTACGGTG
Homo-ANXA6-sg2-2 Forward	CACCGTCTTTGGCATCACAATAGGCGTTT
Reverse	AAACGCCTATTGTGATGCCAAAGACGGTG
Homo-ANXA6-sg2-3 Forward	CACCGCTTTGTATGCTGCCACCAGCGTTT
Reverse	AAACGCTGGTGGCAGCATACAAAGCGGTG

释法接种至 96 孔板。具体操作步骤如下: 0.25% 胰蛋白酶消化细胞并计数, 采用梯度稀释法稀释至每 100 μL 培养基含 1 个细胞, 按每孔 100 μL 细胞稀释液铺于 96 孔板中。待细胞形成单克隆集落后, 用枪头吸取吹散于 24 孔板内, 长满后接种至 6 孔板培养。

1.7 *anxa6* 基因敲除细胞株的鉴定及脱靶验证

将 6 孔板内细胞一部分保种, 另一部分继续培养, 待长满后加入 RIPA 裂解液提取细胞蛋白进行 SDS-PAGE 电泳, 结束后转移至 PVDF 膜, 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h, ANXA6 抗体稀释成适当浓度并于 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, TBST 洗膜, 山羊抗兔 (goat anti-rabbit) IgG 室温孵育 1 h, TBST 洗膜, ECL 化学发光液进行显影、曝光。经免疫印记检测, 提取 ANXA6 蛋白未完全表达的 Caco-2 细胞基因组 DNA, 经 PCR 扩增后将产物交付公司测序 [由生工生物工程(上海)股份有限公司完成]。

根据已设计好的 sgRNA 序列, 利用在线脱靶效应评估工具 Off-Spotter (<https://cm.jefferson.edu/Off-Spotter/>)^[22], 获得 10 个潜在脱靶位点, 提取 Caco-2^{*anxa6*-/-} 细胞基因组 DNA, 通过 PCR 扩增这 10 个位点序列后测序, 再利用 BioEdit 软件将扩增的序列与野生型基因序列比对, 验证是否存在脱靶效应。

1.8 CCK8 细胞增殖实验

将 Caco-2 细胞和 Caco-2^{*anxa6*-/-} 细胞按正常条件培养, 长至合适密度时经胰酶消化后离心计数, 按每孔 100 μL 细胞悬液共计 2 000 个细胞分别加入 96 孔板中, 每组实验设计 5 个复孔, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 细胞培养箱中培养, 分别于 24、48、72 h 进行 CCK8 细胞增殖实验, 每孔加入 10 μL CCK8 试剂, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中孵育 2 h。使用多功能微孔板检测仪于 450 nm

波长处检测吸光度 (OD_{450}), 每个复孔测 3 次取平均值, 然后进行统计学分析。

1.9 免疫荧光检测紧密连接结构分布情况

将 Caco-2 细胞和 Caco-2^{*anxa6*-/-} 细胞以 1×10^6 cell/孔接种于共聚焦皿, 待细胞生长至合适密度时进行转染, 将质粒 pEGFP、pEGFP-EspF (课题组前期构建)^[20] 按照 Lipofectamine @ 3000 转染试剂说明书转入细胞内, 转染 48 h 后弃去旧培养基, PBS 洗后加入 4% 多聚甲醛固定; 用含 0.5% Triton-100 的 PBS 进行通透; 加入 10% 山羊血清进行封闭; 去除封闭液, PBST 洗后加入 anti-ZO-1 一抗, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜; 次日 PBST 洗后加入 Alexa Fluor 594 标记的荧光二抗, 室温孵育 30 min; PBST 洗后加入 DAPI, 室温孵育 5 min; PBST 洗后加入防荧光猝灭封片剂, 于共聚焦激光扫描显微镜采集图像 (60 $\times$ 油镜), 通过 ImageJ 软件分析荧光强度。

1.10 统计学处理

采用 SPSS 26.0 和 GraphPad Prism 8.0 软件进行统计学分析, 计量资料采用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用独立样本 t 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 sgRNA 靶点的选择及寡核苷酸链设计

为了能够敲除 *anxa6* 基因, 针对 *anxa6* 基因的外显子 4、5、6 分别设计 sgRNA (图 1), 并在 5'端和 3'端添加相应碱基, 送生工生物工程(上海)股份有限公司进行寡核苷酸链合成。

2.2 重组慢病毒表达载体 LentiCRISPRv2-sgRNA 的构建与鉴定

LentiCRISPRv2 质粒经 *BsmB* I 酶切与设计好的 sgRNA 双链连接, 转化进 *Stbl3* 感受态细胞中摇菌培养后进行菌液 PCR 反应, 再用琼脂糖凝胶电泳验证。由图 2A 所示, 分别挑取转

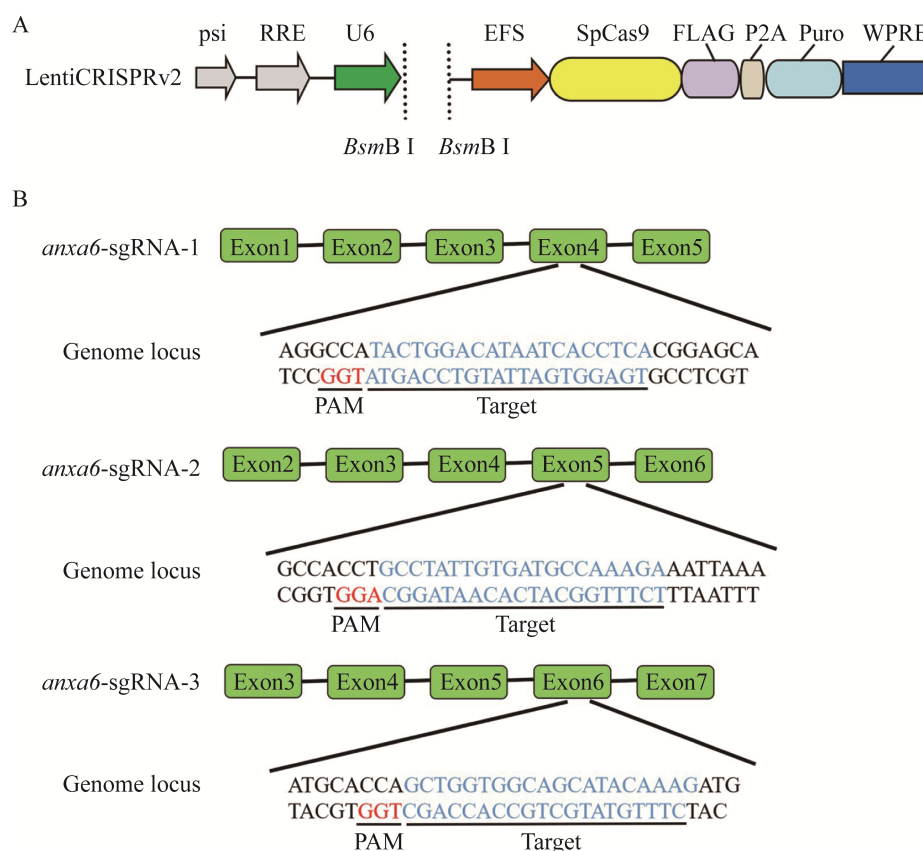


图 1 靶向 *anxa6* 基因的 sgRNA 的设计 A: LentiCRISPRv2 质粒的结构. B: 设计 3 条 sgRNA 分别靶向外显子 4、5、6, 识别相应的序列(PAM: 前间隔序列邻近基序; Target: 目标序列)

Figure 1 Design of sgRNA targeting *anxa6* gene. A: Structure of LentiCRISPRv2 plasmid. B: Recognition sequences targeting exons 4, 5 and 6 (PAM: Protospacer adjacent motif; Target: Target sequence).

化进 3 组不同重组质粒的单克隆菌落验证皆出现了阳性克隆。将设计好的 sgRNA 进行程序退火形成双链, 用 *BsmB* I 酶切 LentiCRISPRv2 质粒, T4 连接酶将 sgRNA 与酶切后的质粒连接。连接产物经转化、挑菌、摇菌、进行菌液 PCR, 用琼脂糖凝胶电泳验证, 并小提质粒, 将质粒送往广州艾基生物技术有限公司进行测序, 结果显示 Homo-ANXA6-sg1、Homo-ANXA6-sg2、Homo-ANXA6-sg3 序列均正确插入 LentiCRISPRv2, 插入序列的位置、方向及序列与预期相符, 表明 LentiCRISPRv2-sgRNA 表达载体构建成功。

2.3 免疫印迹法检测细胞内 ANXA6 蛋白表达水平

分别用 sgRNA1-Cas9、sgRNA2-Cas9、sgRNA3-Cas9 慢病毒侵染 Caco-2 细胞后, 加入 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 嘌呤霉素连续筛选 10 d, 结果在用 sgRNA1-Cas9 和 sgRNA2-Cas9 慢病毒侵染的 Caco-2 细胞中出现抗嘌呤霉素的阳性细胞, 将阳性细胞稀释至单克隆, 取其中 4 个经 sgRNA1-Cas9 慢病毒侵染的 Caco-2 单克隆细胞, 用 Western blotting 印迹法检测 ANXA6 蛋白的表达情况(图 3), 由图可见敲除 *anxa6* 基因后其相应蛋白表达很少或几乎无表达。

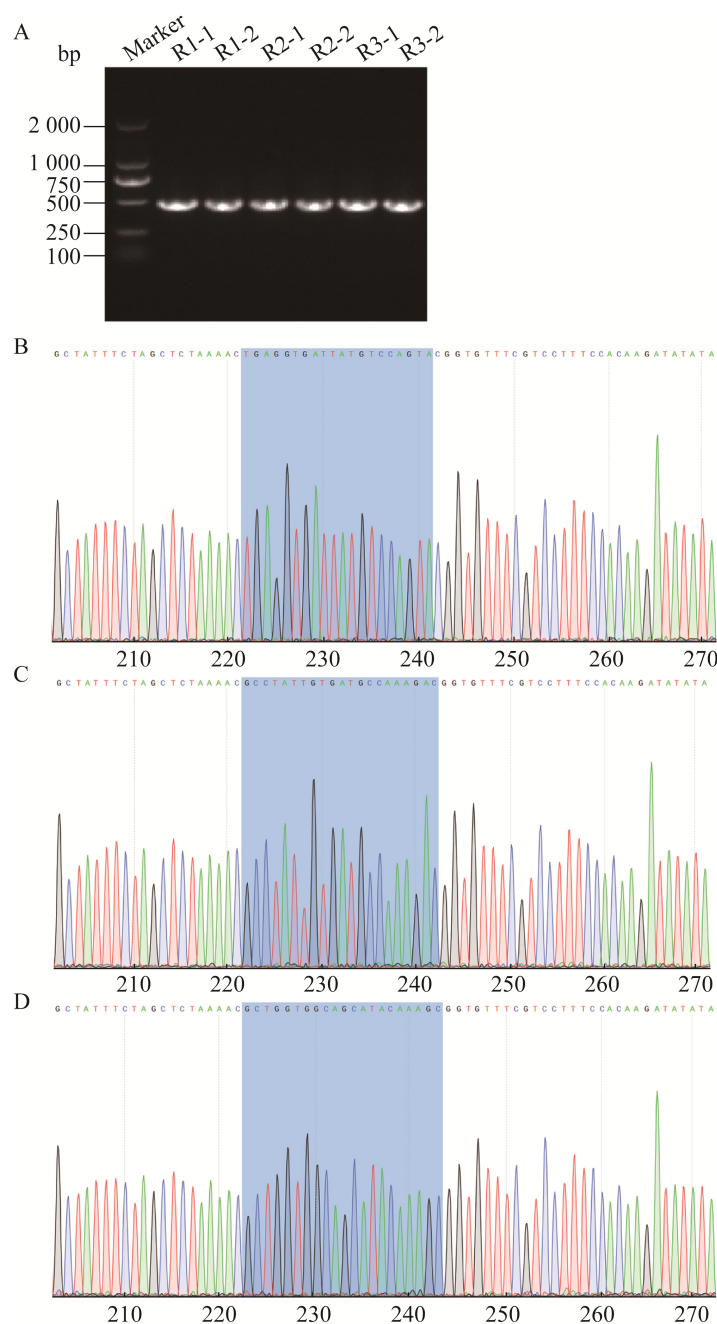


图 2 LentiCRISPRv2-sgRNA 载体验证结果 A: 含重组质粒的 *Stb13* 菌液 PCR 琼脂糖凝胶验证. Marker: DL2000 DNA 分子量标准; R1-1–R3-2 分别表示转化进了 3 种重组 LentiCRISPRv2-sgRNA 质粒对应挑取的不同菌落克隆. B: Homo-ANXA6-sg1 测序鉴定结果. C: Homo-ANXA6-sg2 测序鉴定结果. D: Homo-ANXA6-sg3 测序鉴定结果

Figure 2 LentiCRISPRv2-sgRNA vector validation results. A: PCR agarose gel validation of *Stb13* bacterial broth containing recombinant plasmids. Marker: DL2000 DNA molecular weight standard; R1-1–R3-2 indicate different colony clones corresponding to the three recombinant LentiCRISPRv2-sgRNA plasmids were transformed into each of them. B–D: The sequence results of Homo-ANXA6-sg1, Homo-ANXA6-sg2 and Homo-ANXA6-sg3.

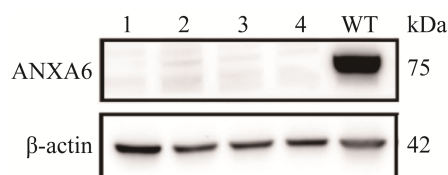


图 3 免疫印迹验证 ANXA6 蛋白表达情况 1–4: sgRNA1-Cas9 慢病毒侵染的 Caco-2 单克隆细胞; WT: 正常 Caco-2 细胞

Figure 3 Western blotting to verify the expression of ANXA6 protein. Lane 1–4: sgRNA1-Cas9 lentivirus-infected Caco-2 monoclonal cells; WT: Normal Caco-2 cells.

2.4 稳定敲除 *anxa6* 基因的 Caco-2 细胞株的鉴定

将 1 号细胞株的细胞提取基因组 DNA, 进行 PCR 鉴定, PCR 产物测序, 通过与 *anxa6* 基因原序列比对发现, ANXA6-sgRNA1-1 出现了 5 个碱基的缺失突变, 缺失位点与 Homo-ANXA6-sg1 的识别位点一致(图 4), 此突变能改变 *anxa6* 基因编码的开放阅读框, 进而终止 ANXA6 蛋白的翻译。结果表明稳定敲除 *anxa6* 基因的 Caco-2 细胞株(Caco-2^{*anxa6*-/-})构建成功。

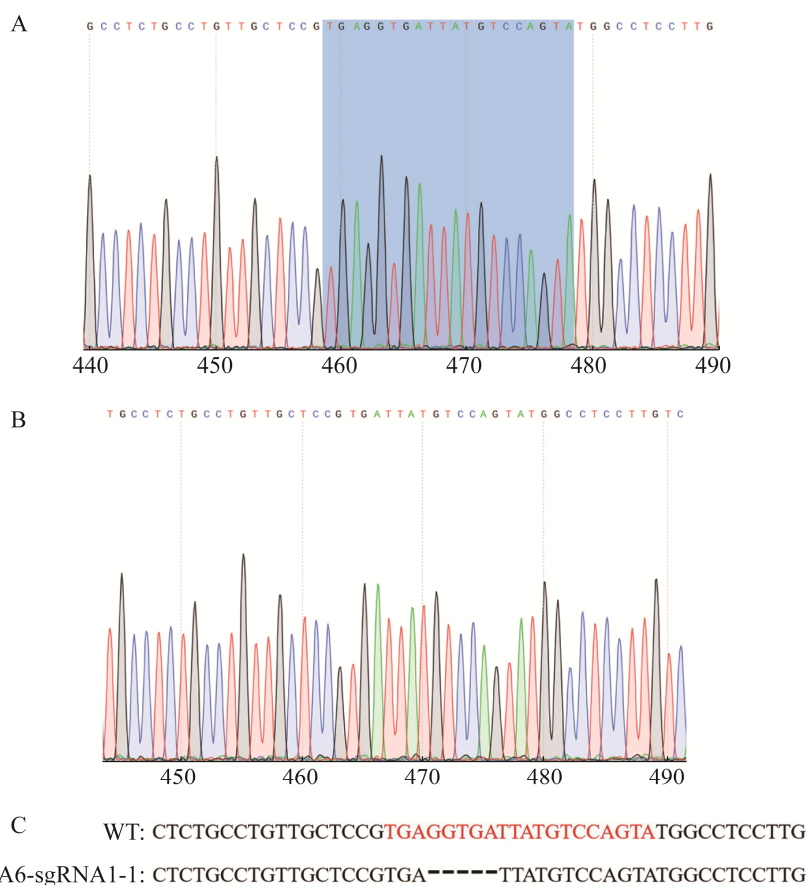


图 4 DNA 测序结果 A: 正常 Caco-2 细胞的测序结果. B: ANXA6-sgRNA1-1 的测序结果. C: 单克隆细胞 *anxa6* 基因在 Caco-2 细胞中的缺失突变. 红色标记为初始设计的 sgRNA 序列, “-”为突变后缺失的碱基

Figure 4 DNA sequencing results. A: Sequencing results of normal Caco-2 cells. B: Sequencing results of ANXA6-sgRNA1-1. C: Deletion mutation of monoclonal cellular *anxa6* gene in Caco-2 cells. Red markers are the initially designed sgRNA sequences; “-” represents the bases missing after mutation.

2.5 脱靶效应评估

选择 Off-Spotter 预测的 10 个潜在脱靶位点, 提取 *Caco-2^{anxa6-/-}* 细胞基因组后进行 PCR 扩增, 分别与野生型细胞基因组比对, 结果显示 10 个位点序列与野生型细胞基因序列完全一致(表 2), 表明 sgRNA 没有产生脱靶效应。

2.6 敲除 *anxa6* 基因的 *Caco-2* 细胞增殖能力检测

为了检测 *anxa6* 基因敲除后对 *Caco-2* 细胞增殖的影响, 运用 CCK8 试剂盒分别检测

Caco-2 细胞和 *Caco-2^{anxa6-/-}* 细胞的增殖情况。结果显示, 在相同的培养条件下, *Caco-2* 细胞和 *Caco-2^{anxa6-/-}* 细胞生长速率在 0–48 h 之间几乎没有差异, 在 48–72 h 之间 *Caco-2^{anxa6-/-}* 细胞较 *Caco-2* 细胞增殖稍快(图 5), 但差异无统计学意义($P>0.05$), 表明 *anxa6* 基因敲除后对 *Caco-2* 细胞的生长无显著影响。

2.7 免疫荧光检测紧密连接结构分布情况

将融合蛋白真核表达载体 pEGFP (E), pEGFP-EspF (EE)转染 *Caco-2* 和 *Caco-2^{anxa6-/-}* 细

表 2 脱靶效应评估

Table 2 Evaluation of off-target effects

ID	Sequence alignment	Chromosome	Gene ID	Position
1	WT: CCTTACTGGACATATACACGTTAAG KO: CCTTACTGGACATATACACGTTAAG sgRNA: -----TACTGGACATAATCACCTCA----	chr4	7 363	UGT2B4
2	WT: CCCTACTGGAGAAAATCACATAACC KO: CCCTACTGGAGAAAATCACATAACC sgRNA: -----TACTGGACATAATCACCTCA----	chrX	11 043	MID2
3	WT: GAATCAGGTGATGAAGTTCAGTATG KO: GAATCAGGTGATGAAGTTCAGTATG sgRNA: -----TGAGGTGATTATGTCCAGTA----	chr4	23 022	PALLD
4	WT: ATCTGACCTGGTAATGTCCAGTACG KO: ATCTGACCTGGTAATGTCCAGTACG sgRNA: -----TGAGGTGATTATGTCCAGTA----	chr1	200 150	PLD5
5	WT: AAATGAAATGATGAAGTCCAGTAAG KO: AAATGAAATGATGAAGTCCAGTAAG sgRNA: -----TGAGGTGATTATGTCCAGTA----	chr4	80 333	KCNIP4
6	WT: AAATGAGTTGACTCTGGCCAGTAGG KO: AAATGAGTTGACTCTGGCCAGTAGG sgRNA: -----TGAGGTGATTATGTCCAGTA----	chr1	24	ABCA4
7	WT: TTCTGAGGAGTTAATGTACAGTATG KO: TTCTGAGGAGTTAATGTACAGTATG sgRNA: -----TGAGGTGATTATGTCCAGTA----	chrX	10 800	CYSLTR1
8	WT: CCATACTGGACATAAACAGTTATGA KO: CCATACTGGACATAAACAGTTATGA sgRNA: -----TACTGGACATAATCACCTCA----	chr17	22 843	PPM1E
9	WT: CCCTACTGAACATCATCACTTAGCC KO: CCCTACTGAACATCATCACTTAGCC sgRNA: -----TACTGGACATAATCACCTCA----	chr16	54 715	RBFOX1
10	WT: TAAGCAGGTGGAGATGTCCAGTAGG KO: TAAGCAGGTGGAGATGTCCAGTAGG sgRNA: -----TGAGGTGATTATGTCCAGTA----	chr1	127 428	TCEANC2

WT: *Caco-2*; KO: *Caco-2^{anxa6-/-}*.

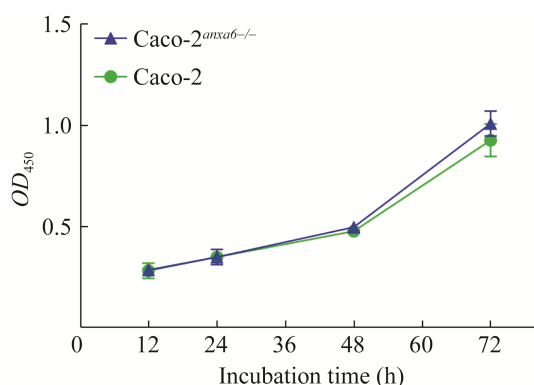


图5 *anxa6* 基因敲除对 Caco-2 细胞增殖的影响
Figure 5 Effect of *anxa6* knockdown on the proliferation of Caco-2 cells.

胞,以未处理的 Caco-2 和 Caco-2^{*anxa6*^{-/-}} 细胞作为对照,通过免疫荧光观察细胞中紧密连接蛋白 ZO-1 的定位和分布情况。免疫荧光结果显示,未处理的 Caco-2 和 Caco-2^{*anxa6*^{-/-}} 细胞的 ZO-1 蛋白沿细胞膜连续分布,紧密连接结构完整;转染 pEGFP 质粒后的 Caco-2 和 Caco-2^{*anxa6*^{-/-}} 细胞的 ZO-1 蛋白沿细胞膜连续分布,荧光强度稍弱,但差异无统计学意义($P>0.05$);转染 EspF 质粒后 Caco-2 细胞和 Caco-2^{*anxa6*^{-/-}} 细胞均出现不同程度的紧密连接分布不完整现象,甚至出现缺口(图 6)。表明 EspF 蛋白破坏细胞紧密连接的分布,ANXA6 蛋白的缺失表达对紧密连接的分布影响不大。

3 讨论与结论

大肠杆菌 O157:H7 是一种重要的食源性致病菌,它可以导致宿主血性腹泻、出血性结肠炎,严重者可导致溶血性尿毒综合征,甚至危及生命。大肠杆菌 O157:H7 黏附于肠上皮细胞刷状缘,利用 TTSS 将 41 个效应蛋白注入宿主细胞^[23],感染宿主后通过其毒力蛋白与宿主蛋白相互作用并发挥生物学效应,从而引起疾病的发生。EspF 蛋白是大肠杆菌 O157:H7 最重要的毒力因子之一。EspF 蛋白 N 端包含一个分泌

信号,帮助 EspF 蛋白分泌进入宿主细胞。在此前的研究中,课题组通过荧光共振能量转移和免疫共沉淀方法,验证了 EspF 蛋白通过其 C 端结构域与宿主 ANXA6 蛋白相互作用^[20],降低紧密连接蛋白的表达,破坏紧密连接的分布。紧密连接是肠屏障重要的机械屏障^[24],紧密连接的破坏是否会进一步导致肠屏障损伤及其机制还不清楚,因此构建稳定敲除 *anxa6* 基因的 Caco-2 细胞株,对于后续研究 EspF 蛋白与 ANXA6 蛋白互作在肠屏障损伤中的作用具有重要意义。

CRISPR/Cas9 技术利用 sgRNA 引导 Cas9 核酸酶在靶位点进行 DNA 特异性剪切,从而实现基因敲除^[25]。该编辑系统相对于锌指核酸酶、转录激活因子样效应核酸酶等传统基因编辑方法具有设计简单,切割效率高,成本低等优点^[26],已被研究人员广泛使用^[27-28]。本研究中,我们针对 *anxa6* 基因设计 sgRNA,构建 sgRNA-Cas9 慢病毒表达载体,收集病毒感染 Caco-2 细胞,经筛选后得到具有抗嘌呤霉素单克隆细胞株,经测序发现 *anxa6* 基因发生了 5 个碱基的缺失突变,免疫印迹鉴定结果也证实该细胞株中 ANXA6 蛋白的表达缺失成功。针对 CRISPR/Cas9 技术因脱靶效应而导致的错误位置基因编辑^[29],我们对预测的 10 个脱靶效应位点进行测序,经比对发现没有发生脱靶现象,表明该 sgRNA 对其他基因没有影响。

为明确 *anxa6* 基因敲除对 Caco-2 细胞生长等方面的影响,我们运用 CCK8 实验检测了 Caco-2 细胞和 Caco-2^{*anxa6*^{-/-}} 细胞的增殖情况,结果表明 *anxa6* 基因对 Caco-2 细胞的生长影响不大。我们还通过免疫荧光技术检测紧密连接结构分布情况,发现转染 EspF 组相对于 NC 组 ZO-1 蛋白在细胞膜上的分布松散、断裂、出现裂隙状,而 Caco-2^{*anxa6*^{-/-}} 组 ZO-1 蛋白分布正常,荧光强度略低,提示 *anxa6* 基因敲除后对 Caco-2

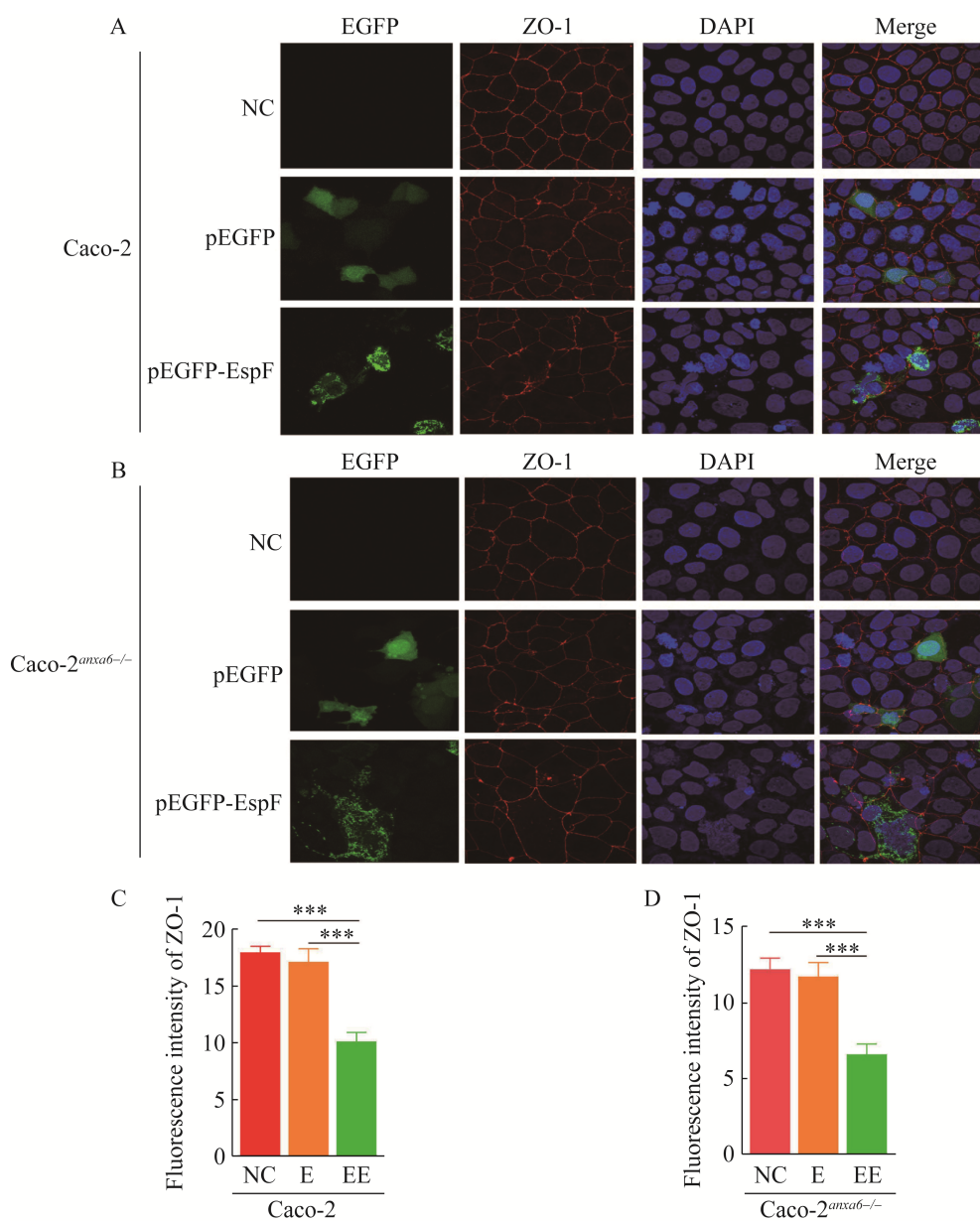


图 6 EspF 蛋白破坏紧密连接蛋白 ZO-1 分布图(60×油镜) 绿色为质粒所表达的荧光；红色为 ZO-1 蛋白；蓝色为 DAPI 染核. A: 用 pEGFP (E)、pEGFP-EspF (EE)质粒转染 Caco-2 细胞后 ZO-1 分布图. B: 用 pEGFP (E)、pEGFP-EspF (EE)质粒转染稳定敲除 *anxa6* 基因的 Caco-2 细胞后 ZO-1 分布图. C: Caco-2 细胞 ZO-1 的荧光强度分析图. D: 稳定敲除 *anxa6* 基因的 Caco-2 细胞 ZO-1 的荧光强度分析图

Figure 6 Distribution of EspF protein disrupting tight junction protein ZO-1 (60×oil microscope). Green is the fluorescence expressed by plasmid, red is ZO-1 protein, blue is DAPI-stained nucleus. A: ZO-1 distribution after transfection of Caco-2 cells with pEGFP (E) and pEGFP-EspF (EE) plasmids. B: ZO-1 distribution of Caco-2 cells stably knocked down with pEGFP (E) and pEGFP-EspF (EE) plasmids after transfection with pEGFP (E) and pEGFP-EspF (EE) plasmids. C: Fluorescence intensity analysis of ZO-1 in Caco-2 cells. D: Fluorescence intensity analysis of ZO-1 in Caco-2 cells stably knocked down with *anxa6* gene. Error bars represent means±SD from three independent experiments; Asterisks indicate *P* values (***: *P*<0.001).

细胞紧密连接的分布影响不大。前期研究中,课题组证实 EspF-ANXA6 蛋白互作可降低紧密连接蛋白表达水平,破坏紧密连接分布^[20],结合本实验结果,表明在 EspF-ANXA6 互作中,对紧密连接的破坏作用主要由 EspF 蛋白介导,ANXA6 蛋白可能与 EspF 蛋白互作后或被 EspF 蛋白激活后才能发挥其作用,ANXA6 蛋白在破坏紧密连接中的作用及对肠屏障的影响仍有待继续探究。

同样的, Wang 等利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术成功实现了对 Caco-2 细胞的基因编辑^[30]。Caco-2 细胞被认为是模拟单层肠上皮细胞的最佳模型^[31],目前 *anxa6* 基因在其中的作用还未见报道。ANXA6 是一个多功能支架蛋白,前期研究中,课题组已证实大肠杆菌 O157:H7 关键效应蛋白 EspF 可与 ANXA6 蛋白互作^[19],ANXA6 蛋白可能是大肠杆菌 O157:H7 与宿主“对话”的关键分子。ANXA6 蛋白不仅在招募信号蛋白,调节胆固醇和膜转运,调控肌动蛋白动力学等方面起着关键作用,而且参与细胞增殖、存活、分化、炎症,膜修复和病毒感染等生物学过程^[8]。近期,ANXA6 蛋白被检测出在结直肠癌腺癌患者的粪便中富集,可作为结直肠癌腺癌和结直肠癌早期无创筛查的潜在生物标记物^[32]。

总之,本研究利用 CRISPR/Cas9 系统构建稳定敲除 *anxa6* 基因的 Caco-2 细胞株,不仅为进一步研究 EspF-ANXA6 互作介导肠屏障损伤奠定基础,而且为阐明 ANXA6 蛋白在结直肠癌细胞中的作用及其潜在致癌性提供细胞模型。

参考文献

- [1] HOQUE M, RENTERO C, CAIRNS R, TEBAR F, ENRICH C, GREWAL T. Annexins—scaffolds modulating PKC localization and signaling[J]. *Cellular Signalling*, 2014, 26(6): 1213-1225.
- [2] GREWAL T, ENRICH C. Annexins—modulators of EGF receptor signalling and trafficking[J]. *Cellular Signalling*, 2009, 21(6): 847-858.
- [3] GERKE V, CREUTZ CE, MOSS SE. Annexins: linking Ca^{2+} signalling to membrane dynamics[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2005, 6(6): 449-461.
- [4] GERKE V, MOSS SE. Annexins: from structure to function[J]. *Physiological Reviews*, 2002, 82(2): 331-371.
- [5] MOSS SE, MORGAN RO. The annexins[J]. *Genome Biology*, 2004, 5(4): 219.
- [6] HUBER R, RÖMISCH J, PAQUES EP. The crystal and molecular structure of human annexin V, an anticoagulant protein that binds to calcium and membranes[J]. *The EMBO Journal*, 1990, 9(12): 3867-3874.
- [7] SWAIRJO MA, ROBERTS MF, CAMPOS MB, DEDMAN JR, SEATON BA. Annexin V binding to the outer leaflet of small unilamellar vesicles leads to altered inner-leaflet properties: 31P- and 1H-NMR studies[J]. *Biochemistry*, 1994, 33(36): 10944-10950.
- [8] GREWAL T, HOQUE M, CONWAY JRW, REVERTER M, WAHBA M, BEEVI SS, TIMPSON P, ENRICH C, RENTERO C. Annexin A6-A multifunctional scaffold in cell motility[J]. *Cell Adhesion & Migration*, 2017, 11(3): 288-304.
- [9] GREWAL T, KOESE M, RENTERO C, ENRICH C. Annexin A6-regulator of the EGFR/Ras signalling pathway and cholesterol homeostasis[J]. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2010, 42(5): 580-584.
- [10] ENRICH C, RENTERO C, de MUGA SV, REVERTER M, MULAY V, WOOD P, KOESE M, GREWAL T. Annexin A6—linking Ca^{2+} signaling with cholesterol transport[J]. *Biochimica et Biophysica Acta: Biomolecular Cell Research*, 2011, 1813(5): 935-947.
- [11] TAKEDA M, LESER GP, RUSSELL CJ, LAMB RA. Influenza virus hemagglutinin concentrates in lipid raft microdomains for efficient viral fusion[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003, 100(25): 14610-14617.
- [12] SWAGGART KA, DEMONBREUN AR, Vo AH, SWANSON KE, KIM EY, FAHRENBACH JP, HOLLEY-CUTHRELL J, ESKIN A, CHEN ZG, SQUIRE K, HEYDEMANN A, PALMER AA, NELSON SF, MCNALLY EM. Annexin A6 modifies muscular dystrophy by mediating sarcolemmal repair[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2014, 111(16): 6004-6009.
- [13] DEMONBREUN AR, QUATTROCELLI M, BAREFIELD DY, ALLEN MV, SWANSON KE, MCNALLY EM. An actin-dependent annexin complex mediates plasma membrane repair in muscle[J]. *The Journal of Cell Biology*, 2016, 213(6): 705-718.

- [14] BABIYCHUK EB, MONASTYRSKAYA K, POTEZ S, DRAEGER A. Intracellular Ca^{2+} operates a switch between repair and lysis of streptolysin O-perforated cells[J]. Cell Death & Differentiation, 2009, 16(8): 1126-1134.
- [15] BRUYAND M, MARIANI-KURKDJIAN P, GOUALI M, de VALK H, KING LA, HELLO SL, BONACORSI S, LOIRAT C. Hemolytic uremic syndrome due to Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection[J]. Médecine et Maladies Infectieuses, 2018, 48(3): 167-174.
- [16] EPPINGER M, CEBULA TA. Future perspectives, applications and challenges of genomic epidemiology studies for food-borne pathogens: a case study of enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) of the O157:H7 serotype[J]. Gut Microbes, 2015, 6(3): 194-201.
- [17] JERSE AE, YU J, TALL BD, KAPER JB. A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture cells[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1990, 87(20): 7839-7843.
- [18] DEAN P, SCOTT JA, KNOX AA, QUITARD S, WATKINS NJ, KENNY B. The enteropathogenic *E. coli* effector EspF targets and disrupts the nucleolus by a process regulated by mitochondrial dysfunction[J]. PLoS Pathogens, 2010, 6(6): e1000961.
- [19] HUA Y, JU JW, WANG XY, ZHANG B, ZHAO W, ZHANG QW, FENG YZ, MA WB, WAN CS. Screening for host proteins interacting with *Escherichia coli* O157:H7 EspF using bimolecular fluorescence complementation[J]. Future Microbiology, 2018, 13: 37-58.
- [20] HUA Y, WU JL, FU MQ, LIU JY, LI XX, ZHANG B, ZHAO W, WAN CS. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* effector protein EspF interacts with host protein ANXA6 and triggers myosin light chain kinase (MLCK)-dependent tight junction dysregulation[J]. Frontiers in Cell and Developmental Biology, 2020, 8: 613061.
- [21] ZHANG F. CRISPR-cas9: prospects and challenges[J]. Human Gene Therapy, 2015, 26(7): 409-410.
- [22] PLIATSIKA V, RIGOUTSOS I. "Off-Spotter": very fast and exhaustive enumeration of genomic lookalikes for designing CRISPR/Cas guide RNAs[J]. Biology Direct, 2015, 10(1): 4.
- [23] GAYTÁN MO, MARTÍNEZ-SANTOS VI, SOTO E, GONZÁLEZ-PEDRAJO B. Type three secretion system in attaching and effacing pathogens[J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2016, 6: 129.
- [24] DEY P. Targeting gut barrier dysfunction with phytotherapies: effective strategy against chronic diseases[J]. Pharmacological Research, 2020, 161: 105135.
- [25] ZHANG F, WEN Y, GUO X. CRISPR/Cas9 for genome editing: progress, implications and challenges[J]. Human Molecular Genetics, 2014, 23(R1): R40-R46.
- [26] TREVINO AE, ZHANG F. Genome editing using Cas9 nickases[J]. Methods in Enzymology, 2014, 546: 161-174.
- [27] 苏丛, 徐方明, 伍婷, 张鹏飞, 陈昊然, 刘艳艳, 兰燕虎, 李家斌, 律娜. 基于 CRISPR-Cas9 技术构建 *gpr41* 基因敲除的 RAW_{264.7} 细胞系[J]. 安徽医科大学学报, 2020, 55(5): 800-803.
- SU C, XU FM, WU T, ZHANG PF, CHEN HR, LIU YY, LAN YH, LI JB, LV N. Construction of RAW_{264.7} cell line with *gpr41* gene knockout based on CRISPR-Cas9 technology[J]. Acta Universitatis Medicinalis Anhui, 2020, 55(5): 800-803 (in Chinese).
- [28] 姚叶豹, 王广菲, 董钦才, 曹诚, 刘莹. 利用 CRISPR/Cas9 系统构建 HeLa 细胞 *Cdc25C* 基因敲除稳定细胞株[J]. 军事医学, 2017, 41(5): 359-362.
- YAO YB, WANG GF, DONG QC, CAO C, LIU X. Construction of stable *Cdc25C* knockout HeLa cell strains using CRISPR/Cas9 gene editing system[J]. Military Medical Sciences, 2017, 41(5): 359-362 (in Chinese).
- [29] NAEEM M, MAJEED S, HOQUE MZ, AHMAD I. Latest developed strategies to minimize the off-target effects in CRISPR-cas-mediated genome editing[J]. Cells, 2020, 9(7): 1608.
- [30] 王远微, 刘雄. 基于 CRISPR/Cas9 技术构建 TRPV1 基因敲除的 CACO-2 稳定细胞系[J]. 西南民族大学学报(自然科学版), 2020, 46(3): 241-249.
- WANG YW, LIU X. Construction of TRPV1 gene knockout Caco-2 stable cell line based on CRISPR/Cas9 technology[J]. Journal of Southwest Minzu University (Natural Science Edition), 2020, 46(3): 241-249 (in Chinese).
- [31] van BREEMEN RB, LI YM. Caco-2 cell permeability assays to measure drug absorption[J]. Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology, 2005, 1(2): 175-185.
- [32] KOMOR MA, BOSCH LJ, COUPÉ VM, RAUSCH C, PHAM TV, PERSMA SR, MONGERA S, MULDER CJ, DEKKER E, KUIPERS EJ, van de WIEL MA, CARVALHO B, FIJNEMAN RJ, JIMENEZ CR, MEIJER GA, de WIT M. Proteins in stool as biomarkers for non-invasive detection of colorectal adenomas with high risk of progression[J]. The Journal of Pathology, 2020, 250(3): 288-298.