[文章编号] 1003－4684(2025)02-0055-07

基于慢病毒感染技术敲低 *CTNNB1* 基因的 H1299 细胞系构建

沈 齐[1]，金玉玲[1]，曹金金[1]，张玲芳[1]，汪 洋[1]，胡 翰[1]，刘滨磊[1,2]
(1 湖北工业大学生物工程与食品学院，湖北 武汉 430068；2 武汉滨会生物科技股份有限公司，湖北 武汉 436030)

[摘 要] 为构建 β-连环蛋白编码基因 *CTNNB1* 稳定敲低的肺癌 H1299 细胞模型，以深入探讨其在肺癌转移复发及耐药性中的作用机制。通过筛选功能性 siRNA 序列，构建 pLKO.1-*CTNNB1*-shRNA-EGFP-puro 重组表达载体，基因测序证实 shRNA 序列正确插入载体，经 293T 细胞包装获得慢病毒颗粒。采用慢病毒感染 H1299 细胞后，通过嘌呤霉素筛选获得阳性细胞群体，结合有限稀释法成功分离单克隆细胞系。流式细胞术检测显示单克隆细胞 EGFP 阳性率达 99%。RT-qPCR 及 Western blot 分析表明，*CTNNB1* 在 mRNA 和蛋白表达水平分别下降至对照组的 54 %和 60 %。实验成功建立 *CTNNB1* 基因稳定敲降的 H1299 细胞模型，该模型为后续研究 β-catenin 信号通路在肺癌恶性进展中的调控机制提供了可靠的细胞平台。

[关键词] H1299 细胞；慢病毒；*CTNNB1* 基因；敲低细胞系
[中图分类号] R153 [文献标识码] A

由 *CTNNB1* 基因编码的 β-catenin 是经典 Wnt 信号通路中的核心因子，它在肺癌得到诱导和调控中发挥着关键作用，同时也在肺癌化疗耐药、细胞增殖和细胞凋亡等方面具有重要影响[1-2]。当 Wnt 配体存在时，它与细胞膜表面的受体结合，诱导蓬松蛋白(Dvl)的活化，进而促进 APC/Axin/GSK-3β 复合体与受体结合。随后，GSK-3β 的磷酸化和抑制导致胞质 β-catenin 蛋白浓度升高。未磷酸化的 β-catenin 向细胞核累积，与 T 细胞特异性因子(TCF)/淋巴增强子结合因子(LEF)相互作用，触发 Wnt 靶基因如 MYC，细胞周期蛋白 D1 和 MMPs 等的转录激活，从而诱导肿瘤转移和耐药。因此，构建稳定敲低 *CTNNB1* 基因的 H1299 肺癌细胞系，对于深入探究 β-catenin 在肺癌细胞转移复发和细胞耐药相关特征中的作用机制具有重要的现实意义。

RNA 干扰(RNA interfering，RNAi)是一种创新性的选择性和特异性基因沉默技术。在该途径中，由双链小干扰 RNA(siRNA)形成的 RNA 诱导的沉默复合物(RISC)能够降解靶 mRNA 并抑制蛋白质合成[3-4]。然而，通过脂质体法和电穿孔法等传统的 siRNA 转染细胞的方法存在转染不彻底性和效果瞬时等局限性，且运送到细胞内的 siRNA 极易被降解，无法保证 RNA 干扰的稳定性，从而影响对基因功能的研究[5]。此外 siRNA 作为长度为 21～25 bp 的双链 RNA 分子，无法携带荧光和耐药基因，使得转染效率的初步验证以及后续阳性细胞的筛选变得困难。因此，需要特定的载体介导才能有效发挥 siRNA 的生物学效应，进而实现 *CTNNB1* 基因最大效率的敲低[6]。

短发夹 RNA(short hairpin，shRNA)是利用 RNAi 的另一种常见方法，它利用内源性 microRNA 机制来处理功能性 RNAi 的合成非编码 RNA[7]。与 siRNA 相比，shRNA 可以通过慢病毒载体递送和实现稳定的基因组整合，从而避免转染效率低和暂时敲低的缺点[8]。慢病毒载体作为新型的介导 shRNA 干扰基因表达的载体，能够感染多种分裂和非分裂细胞，稳定地整合到宿主基因组中，并导致转基因的长期表达[9]。

该研究拟利用慢病毒构建稳定敲低 *CTNNB1* 基因的 H1299 细胞系，旨在为研究 β-catenin 与肺癌细胞的转移复发和耐药之间相关性以及分子机制提供坚实的基础。

[收稿日期] 2023－11－07
[第一作者] 沈 齐(1998－)，湖北洪湖人，湖北工业大学硕士研究生，研究方向为肿瘤生物治疗。
[通信作者] 刘滨磊(1962－)，湖北武汉人，湖北工业大学教授，研究方向为肿瘤免疫治疗、生物制药与溶瘤病毒。

1 实验条件

1.1 细胞与培养基

1.1.1 细胞 H1299 细胞、293T 细胞，北京协和医院中心；大肠杆菌 DH5α。

1.1.2 培养基 DMEM 高糖培养基；LB 细菌培养基。

1.1.3 培养基添加剂 胎牛血清，四季青；嘌呤霉素，氨苄青霉素，Polybrene。

1.2 质粒与试剂

1.2.1 质粒 pLKO.1-EGFP-puro 质粒，Addgene；psPAX2 质粒；pMD2.G 质粒。

1.2.2 试剂盒 PCR 试剂盒，诺唯赞；质粒提取试剂盒，康为世纪；胶回收试剂盒，诺唯赞；RNA 抽提试剂盒，诺唯赞；反转录试剂盒，诺唯赞。

1.2.3 酶类 AgeI 和 EcoRI 内切酶；重组酶。

1.3 实验耗材与试剂

1.3.1 转染试剂 Lipo8000 转染试剂，碧云天。

1.3.2 检测试剂 三抗；SYBR Green 荧光染料，诺唯赞；蛋白上样缓冲液；转膜液。

1.3.3 抗体 β-catenin 抗体，Proteintech；β-actin 抗体，Proteintech。

1.4 实验设备

1.4.1 细胞分析设备 流式细胞检测仪，BD。

1.4.2 显微镜 体式荧光显微镜，Nikon；倒置荧光显微镜，EVIDENT。

1.4.3 分子生物学设备 荧光定量 PCR 仪，赛默飞；多功能酶标仪，赛默飞。

1.5 质粒测序服务

由北京擎科生物科技股份有限公司完成。

2 实验方法

2.1 *CTNNB*1 基因的 siRNA 靶点设计以及功能验证

遵循 shRNA(short hairpin RNA)设计的一般原则，利用 Life Technologies 公司提供的 BLOCK-iTM RNAi Designer 软件(https://rnaidesigner.thermofisher.com/rnaiexpress/)在线设计了针对 *CTNNB*1 外显子的 siRNA(small interfering RNA)靶点，旨在获得干扰效率超过 90%的 siRNA 序列。所设计的 siRNA 序列正义链为 CAGTCTTACCTGGACTCTG，反义链为 CAGAGTCCAGGTAAGACTG。随后，该序列通过擎科生物科技公司进行合成。作为阴性对照，选用了与哺乳动物基因均无同源性的通用 siRNA 序列(NC-siRNA)。

为了验证所设计的 *CTNNB*1-siRNA 序列对 *CTNNB*1 基因的干扰效率，将完全培养基培养的 293T 细胞铺于六孔板中。待细胞密度生长至 80%时，将合成的 *CTNNB*1-siRNA、NC-siRNA 以及转染试剂 Lipo8000 按不同剂量转染至 293T 细胞中，转染后 48 h，收取 293T 细胞的 RNA 以及蛋白样本，分别进行蛋白免疫印迹和实时荧光定量 PCR 检测，以评估 β-catenin 蛋白表达水平以及 *CTNNB*1 基因得到转录水平。荧光定量 PCR 所用的引物序列见表 1。

表 1 荧光定量 PCR 引物序列

序列名称	引物序列
*CTNNB*1-F	CATCTACACAGTTTGATGCTGCT
*CTNNB*1-R	GCAGTTTTGTCAGTTCAGGGA
18S *rRNA*-F	ACAGGATTGACAGATTGA
18S *rRNA*-R	TATCGGAATTAACCAGACA

2.2 构建 *CTNNB*1 基因的重组干扰载体 pLKO.1-*CTNNB*1-shRNA-EGFP-puro

经过 siRNA 序列验证确认后，在干扰片段上游链(top strand)的 5'端添加了 CCGG 碱基，同时在下游链(bottom strand)的 5'端添加了 AATTCAAAAA 碱基。随后，设计并合成了相应的引物，并通过引物退火形成了带有黏性末端的双链引物二聚体片段。*CTNNB*1 特异性干扰序列如表 2 所示。

表 2 shRNA 引物序列

序列名称	引物序列	限制性内切酶
sh-*CTNNB*1(F)	CCGGAACAGTCTTACCTGGACTCTGCTCGAGCAGAGTCCAGGTAAGACTGTTTTTTTG	AgeI
sh-*CTNNB*1(R)	AATTCAAAAAAACAGTCTTACCTGGACTCTGCTCGAGCAGAGTCCAGGTAAGACTGTT	EcoRI

同时，采用了 AgeI 和 EcoRI 内切酶对 pLKO.1-EGFP-puro 载体质粒进行双酶切处理，并通过胶回收技术将酶切后的线性载体进行了纯化。之后，将胶回收得到的目的载体与退火后形成的干扰片段进行同源臂连接，连接产物通过大肠杆菌 DH 5α 感受态细胞进行转化，并涂布在含有氨苄抗性的细菌培养皿中，倒置放置于细菌培养箱中培养 12 h。培养结束后，挑选出阳性单克隆菌落，并进行菌落 PCR 鉴定。随后将阳性单克隆菌液送测序公司测序，测序结果用 snapgene 软件进行分析比对，最终对测序比对确认的单克隆阳性菌进行质粒提取。

2.3　慢病毒包装

铺皿前，先在 10 cm 细胞培养皿中加入 5 mL 的 1%明胶-无菌水溶液，于 37℃环境中放置 10 min 后，弃去 1%明胶-无菌水溶液，并用无血清培养基润洗一遍，以促进细胞更好地贴壁生长。

之后，将常规培养的 293T 细胞（使用 10% FBS-DMEM 培养基）铺皿。待细胞密度生长至 80%时，更换为 10 mL 新鲜的 10% FBS-DMEM 培养基。

将构建好的 pLKO.1-*CTNNB1*-shRNA-EGFP-puro 慢病毒主质粒、psPAX2 包装质粒、pMD2.G 包膜质粒以及 Lipo8000 转染试剂按比例转染至 293T 细胞中。具体的转染比例（针对直径 10 cm 的培养皿）为：主质粒，10 μg；psPAX2 包装质粒，7.5 μg；pMD2.G 包膜质粒，2.5 μg；Lipo8000 转染试剂，60 μL；MEM 培养基，700 μL。配制完成后，将转染体均匀滴加至培养皿内。

在转染 48 h 和 72 h 后分别收集病毒上清，并将两次收集的上清混合于 50 mL 离心管中，通过 0.22 μm滤膜去除上清中的细胞碎片。

最后，通过病毒上清感染 96 孔板中的 293T 细胞，以计算慢病毒滴度。在感染 48 h 后，通过体式荧光显微镜观察 293T 细胞荧光百分比，并根据公式“滴度（TU/mL）＝荧光百分比×293T 细胞数量/病毒添加量”计算慢病毒滴度。

2.4　慢病毒感染 H1299 细胞

将常规培养的 H1299 细胞（使用 10% FBS-DMEM 培养基）接种至六孔板中，待细胞长满后，对计数孔中的细胞进行胰酶消化并计数，以确定慢病毒感染复数 MOI＝1 时，所需加入的慢病毒上清体积。同时，每孔加入 60 ng 聚凝胺以增强转导效率。在感染 24 h 后，以相同体系进行第 2 次感染，以进一步提高感染效率。第 2 次感染 24 h 后，将六孔板置于体式荧光显微镜下，观察并评估感染率。

实验分为 3 组：第一组为未经慢病毒感染的 H1299 细胞，作为未感染组；第二组为感染 shRNA-Vec空载慢病毒组的 H1299 细胞，作为感染空载慢病毒组；第三组为感染 shRNA-*CTNNB1* 慢病毒的 H1299 细胞，作为感染 shRNA 慢病毒组[10]。

2.5　筛选敲低 *CTNNB1* 基因的 H1299 细胞系

将 H1299 细胞以 1.5×10^5 个/孔的细胞密度接种至 24 孔板中，置于 37℃，5% CO_2 的细胞培养箱中培养 12 h，待其贴壁长满。

在 10 个不同的细胞孔中分别加入 1～10 μg/mL 梯度浓度含嘌呤霉素的完全培养基。之后每 24 h观察细胞贴壁百分比并更换培养基，直到最低嘌呤霉素浓度的细胞孔中的细胞全部死亡。选择第 4 天时细胞全部死亡的嘌呤霉素浓度作为最低致死浓度[11]。然后，将感染 shRNA-Vec 空载慢病毒以及感染 shRNA-*CTNNB1* 慢病毒 48 h 后的 H1299 细胞，以最低嘌呤霉素致死浓度进行筛选，之后持续每 24 h 更换同样浓度嘌呤霉素的新鲜培养基。待所剩细胞基本均表达 GFP 时，将感染 shRNA-Vec 空载慢病毒的 H1299 细胞命名为 shRNA-Vec-H1299 细胞。同时，对感染 shRNA-*CTNNB1* 慢病毒的 H1299 细胞进行单克隆挑选。将细胞消化下来后计数，通过梯度稀释调整细胞浓度至 500 个/mL 后，以 2 μL/孔接种至预加了 100 μL/孔培养基的 96 孔板中。将 96 孔板放入细胞培养箱中培养24 h待其贴壁，然后在显微镜下记录只有单个细胞的细胞孔，之后每天持续更换新鲜培养基。

待克隆形成后，在倒置荧光显微镜下判断 GFP 表达情况，挑选出表达 GFP 的单克隆细胞扩大培养，将挑选出来的单克隆命名为 shRNA-*CTNNB1*-H1299 细胞。依次将细胞扩培在 24 孔板、12 孔板、6 孔板和 T25 培养瓶中。

经过细胞消化和终止消化后，将挑选出的 shRNA-*CTNNB1*-H1299 细胞以及空白组 H1299 细胞调整其细胞浓度至 4×10^6 个/mL，取 500 μL 细胞悬液于 1.5 mL 的 EP 管中，以 500×g 转速离心 5 min 后，弃去上清，将细胞沉淀用 500 μL PBS 清洗 3 次后，将细胞悬液经 200 目滤网过滤后转移至流式细胞管。同时设置流式细胞仪通道为 GFP，设置上样量为 1×10^6 个，然后将细胞悬液上机检测，收集数据。

2.6　鉴定敲低 *CTNNB1* 基因的 H1299 细胞系

将感染后的单克隆阳性细胞继续培养到 T75 细胞培养瓶中。待细胞生长密度达到 90%左右时，将 80%的细胞扩培至 T175 细胞培养瓶中，剩下的 20%细胞继续在 T75 传代培养。待 T175 培养瓶中的细胞长满后，进行冻存备用。

将野生型 H1299 细胞、shRNA-Vec-H1299 细胞以及 shRNA-*CTNNB1*-H1299 细胞接种至六孔板中，待细胞贴壁 12 h 后，加入 Trizol 裂解液对细胞进行裂解，之后提取 RNA 并反转录成 cDNA。之后，通过实时荧光定量 PCR，对敲低 *CTNNB1* 基因后的 H1299 单克隆细胞系进行鉴定。同时，以相同条件接种另一组六孔板。12 h 后，加入 500 μL含蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液对细胞进行裂解，提取蛋白。将蛋白液转移至 1.5 mL 的 EP 管中，并通过 BCA 法检测蛋白浓度，将空白组与单

克隆细胞组的蛋白浓度调整至一致。随后，加入 SDS 缓冲液，于 100℃煮沸 15 min，进行 SDS-PAGE 电泳。电泳结束后，将蛋白转移至 NC 膜上，用 5%脱脂奶粉室温封闭 1 h，然后用 anti-β-catenin 抗体 4℃过夜孵育。之后，用 TBST 洗膜 3 次，再加入二抗室温孵育 1 h，再次用 TBST 洗膜 3 次.最后，使用 ECL 化学发光液进行显影。对 *CTNNB1* 基因表达蛋白 β-catenin 的敲低进行蛋白水平的验证。

2.7 统计学处理

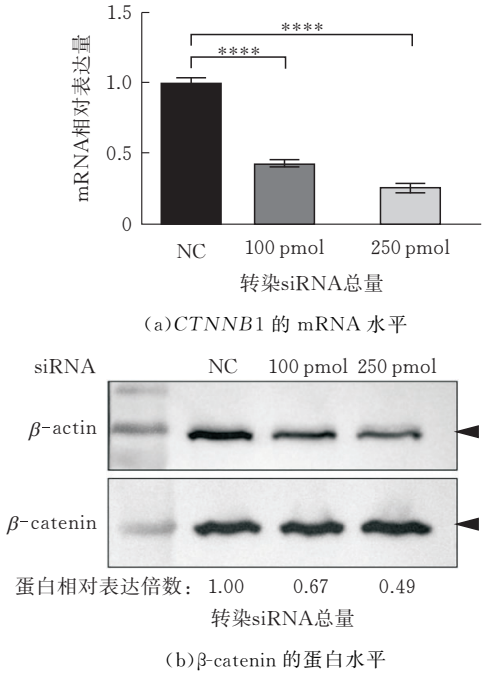
实验数据采用 GraphPad Prism 8 软件进行分析处理，运用 t 检验方法对实验数据进行统计学检验。数据结果以平均值±标准差的形式进行表示，其中 ns 表示无差异，$^{*}P<0.05$ 具有显著性差异，$^{**}P<0.01$ 表示差异极显著，$^{***}P<0.001$ 表示差异非常显著，$^{****}P<0.0001$ 表示差异极其显著。

3 结果

3.1 *CTNNB1* 靶点 siRNA 序列功能验证

将合成的 *CTNNB1*-siRNA 及阴性对照 NC 以 1×10^{10} pmol 和 2.5×10^{10} pmol 的浓度转染至 293T 细胞，经过 48 h 的培养后，收集 293T 细胞的 RNA，并通过实时荧光定量 PCR 技术检测 *CTNNB1* 基因转录水平。结果如图 1a 所示，与转染阴性对照 NC 相比，转染 *CTNNB1*-siRNA 后 293T 细胞的 *CTNNB1* 基因转录水平显著降低。

同时，在图 1b 中，以同样的条件转染 *CTNNB1*-siRNA 至 293T 细胞中，并检测了 *CTNNB1* 基因表达蛋白 β-catenin 的蛋白水平。结果显示，转染 *CTNNB1*-siRNA 后，293T 细胞中 β-catenin 的蛋白水平也受到了显著的抑制。



(a)*CTNNB1* 的 mRNA 水平

(b)β-catenin 的蛋白水平

图 1 转染 siRNA 48 h 后检测 293T 细胞中 *CTNNB1* 的 mRNA 和蛋白水平

3.2 pLKO.1-*CTNNB1*-shRNA-EGFP-puro 重组干扰载体的构建

根据功能验证后的 siRNA 序列，设计了相应的寡核苷酸链引物，并通过测序退火，使其形成双链片段。采用 AgeI 和 EcoRI 两种内切酶对 pLKO.1-EGFP-puro 载体进行双酶切处理，以获得线性化的载体。之后，将目的片段与线性载体进行同源臂连接，构建出重组质粒。将重组质粒转化至感受态细胞中，并涂板进行单克隆挑选，经过摇菌培养后，将样本送往测序公司进行测序验证。测序结果显示，pLKO.1-*CTNNB1*-shRNA-EGFP-puro 重组干扰载体构建成功(图 2)。

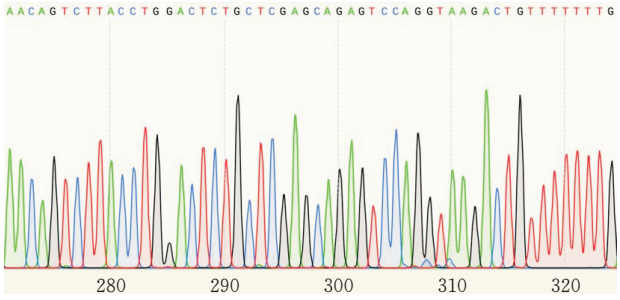


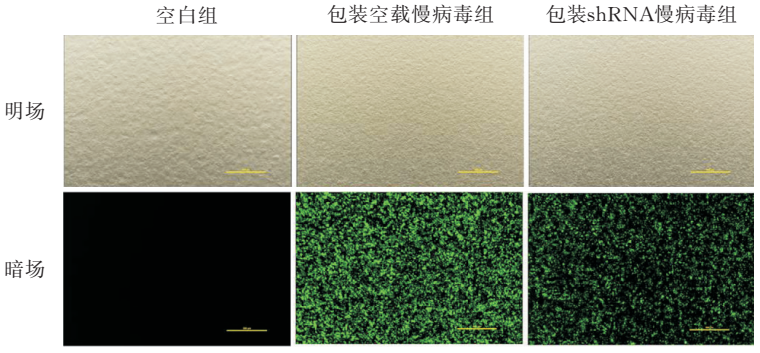
图 2 pLKO.1-*CTNNB1*-shRNA-EGFP-puro 测序结果

3.3 *CTNNB1*-shRNA 慢病毒包装以及滴度检测

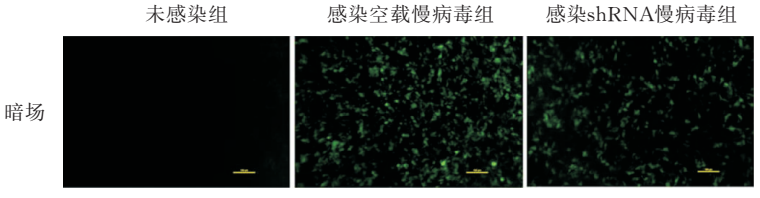
将主质粒、psPAX2 和 pMD2.G 按照 10∶7.5∶2.5 的质量比转染至 293T 细胞中，转染 48 h 后，通过体式荧光显微镜观察 293T 细胞的荧光强度，结果如图 3a 所示。

将收集 48 h 和 72 h 的病毒上清，以每孔 10 μL 感染 96 孔板中的 293T 细胞。在感染前，对计数孔中的 293T 细胞进行计数。感染 48 h 后，观察 96 孔板中的 293T 细胞荧光百分比，约为 15%，结果如图 3b 所示。最后，通过公式“滴度=荧光百分比

×293T 细胞数量/病毒添加量”计算出 *CTNNB*1-shRNA 慢病毒滴度为1.09×10^6 TU/mL。



(a)转染主质粒、包装质粒和包膜质粒荧光拍照



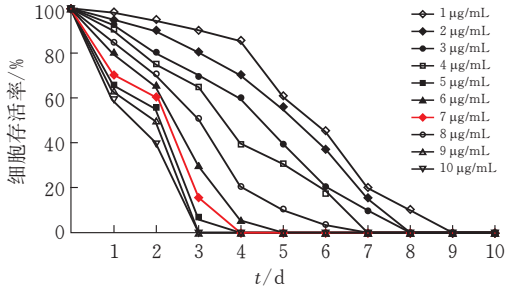
(b)上清感染 293T 细胞后荧光拍照

图 3　shRNA-*CTNNB*1 慢病毒包装以及慢病毒滴度检测

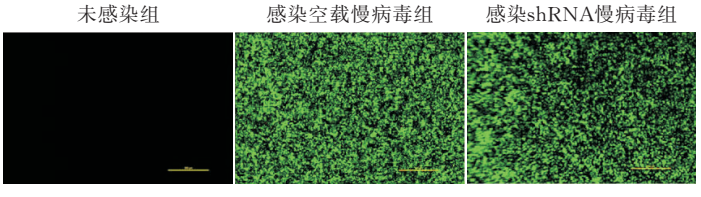
3.4　*CTNNB*1-shRNA 慢病毒转导 H1299 细胞以及初步筛选

为了后期阳性细胞的筛选，采用 1～10 μg/mL 梯度浓度的含嘌呤霉素完全培养基孵育 H1299 细胞。通过观察，选择第 4 天时细胞全部死亡的嘌呤霉素浓度为最低致死浓度。结果显示，H1299 细胞嘌呤霉素最低致死浓度为 7 μg/mL(图 4a)。

以感染复数 MOI=1 时的条件，加入相应体积的慢病毒上清感染 H1299 细胞，并同时每孔加入 60 ng聚凝胺以提高转导效率。感染 48 h 后，通过体式荧光显微镜观察，细胞荧光为 80%左右(图 4b)。之后，以嘌呤霉素的最低致死剂量对感染后的 H1299 细胞孵育 7 d，每 24 h 更换新鲜培养基，并持续筛选。



(a)1～10 μg/mL 梯度浓度嘌呤霉素孵育的 H1299 细胞

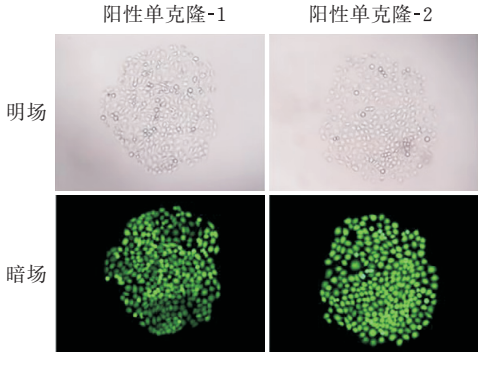


(b)上清感染 H1299 细胞后荧光拍照

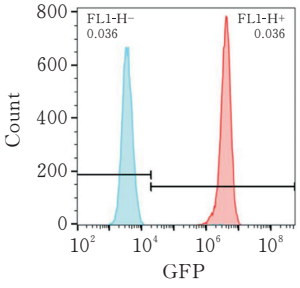
图 4　H1299 细胞嘌呤霉素最低致死量筛选以及 shRNA 转导 H1299 细胞

3.5　shRNA-*CTNNB*1-H1299 细胞系单克隆挑选

通过梯度稀释将细胞浓度调整至 500 个/mL 后，以 2 μL/孔接种至预加了 100 μL/孔培养基的 96 孔板中。在显微镜下记录只有单个细胞的孔，并在培养过程中持续以嘌呤霉素最低致死剂量进行筛选，待克隆形成后，于倒置荧光显微镜下观察并判断 GFP 表达情况(图 5a)。之后，将单克隆细胞逐步扩培，并取部分细胞通过流式细胞仪的 GFP 通道进行检测，结果显示单克隆阳性率为 99%(图 5b)。



(a)shRNA-*CTNNB*1-H1299 阳性单克隆细胞系中 GFP 的表达



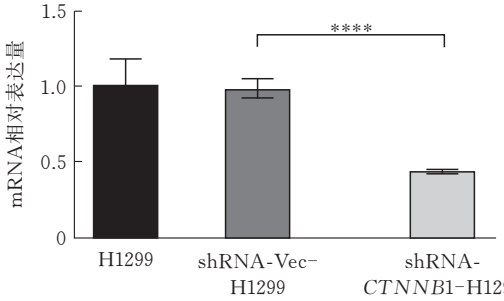
(b)shRNA-*CTNNB*1-H1299 阳性克隆细胞系纯度检测

图 5 阳性单克隆细胞系挑选以及流式细胞仪检测阳性率

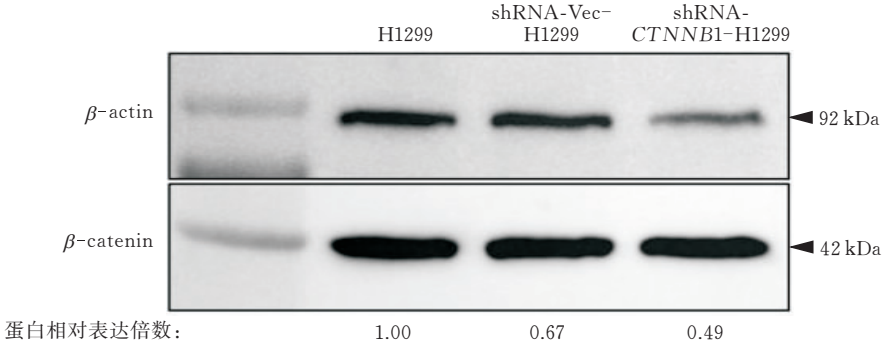
3.6 *CTNNB*1 稳定敲低 H1299 细胞系敲低效率鉴定

为验证 shRNA 慢病毒对 H1299 细胞中 CTNNB1 基因的转录和蛋白表达的抑制作用，将 shRNA-*CTNNB*1-H1299 细胞持续传代培养 15 代。之后，通过实时荧光定量 PCR 以及 Western blot 实验，对细胞系 CTNB1 基因敲低情况进行了检测。

与对照组 shRNA-Vec-H1299 细胞相比，shRNA-*CTNNB*1-H1299 细胞中的 *CTNNB*1 基因表达明显降低，敲低效率达到 54%(图 6a)。与之对应的，β-catenin 蛋白表达也显著降低，敲低效率达到 60%，差异具有显著性意义(图 6b)。同时，将敲低成功的 H1299 细胞株冻存后，再进行复苏、培养和鉴定，结果也得到基本一致的结论。



(a)shRNA-*CTNNB*1-H1299 细胞系中 *CTNNB*1 转录水平



(b) shRNA-*CTNNB*1-H1299 细胞中 β-catenin 蛋白表达水平

图 6 shRNA-*CTNNB*1-H1299 细胞系中 *CTNNB*1 基因敲低效率检测

4 结束语

传统的 siRNA 转染细胞的方法效率低下且不可持续。而此项研究成功构建了 *CTNNB*1-shRNA 干扰慢病毒载体，利用慢病毒感染成功建立 shRNA-*CTNNB*1-H1299 稳转细胞株。该实验中慢病毒载体带有嘌呤霉素抗性基因和绿色荧光信号，这不仅可以通过抗嘌呤霉素的特性初步筛选出阳性细胞，还能根据绿色荧光信号挑选阳性单克隆细胞，最大程度提升了细胞的感染效率，最后通过流式细胞仪检测单克隆细胞的阳性率。为验证 shRNA-*CTNNB*1-H1299 细胞株是否构建成功，通过 RT-PCR 和 Western blot 双重验证了 shRNA-*CTNNB*1-H1299 细胞系 *CTNNB*1 基因敲低的效率，结果显示 *CTNNB*1 基因的 mRNA 和蛋白表达水平均显著降低，敲低效率分别为 54%和 60%，表明筛选后的 shRNA-*CTNNB*1-H1299 细胞构建成功。

本研究成功构建了 *CTNNB*1-shRNA 干扰慢病毒载体，并成功构建 shRNA-*CTNNB*1-H1299 稳转细胞株，为今后深入研究 β-catenin 与肺癌细胞的转移复发和耐药之间相关性以及分子机制研究提供了基础。

[参 考 文 献]

[1] STEWART D J, Wnt signaling pathway pharmacogenetics in non-small cell lung cancer[J]. J Natl Cancer

Inst，2014，106(01)：509-522.
[2] KRISHNAMURTHY N，KURZROCK R，Targeting the Wnt/beta-catenin pathway in cancer：Update on effectors and inhibitors[J]. Cancer Treat Rev，2018，62：50-60.
[3] FIRE A，XU S，MONTGOMERY M K，et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans[J]. Nature，1998，391(6669)：806-11.
[4] PLASTERK R H. RNA silencing：the genome's immune system[J]. Science 2002，296(5571)：1263-5.
[5] DEVROE E，SILVER P A，Retrovirus-delivered siRNA[J]. BMC Biotechnol，2002，2：15.
[6] 周远非，金勇，金光玉，等. 癌症治疗中小干扰 RNA 治疗方法及载体的研究概况[J]. 中国医院药学杂志，2021，41(22)：2379-2384.
[7] RAO D D，VORHIES J S，SENZER N，et al. siRNA vs. shRNA：similarities and differences[J]. Adv Drug Deliv Rev，2009，61(09)：746-59.
[8] FELLMANN C，LOWE S W. Stable RNA interference rules for silencing[J]. Nat Cell Biol，2014，16(01)：10-8.
[9] SINGER O，VERMA I M. Applications of lentiviral vectors for shRNA delivery and transgenesis[J]. Curr Gene Ther，2008，8(06)：483-8.
[10] 刘伟，郭佩东，贾楠楠，等. RPL11 基因稳定敲低细胞系的构建及验证[J]. 中国细胞生物学学报，2021，43(06)：1241-1248.
[11] 朱帅旗，张帆，詹思建，等. 稳定表达 CD19 的非小细胞肺癌细胞系的构建[J]. 湖北工业大学学报，2023，38(02)：52-56.

Lentivirus Infection-based Construction of the H1299 Cell Line Knocking down *CTNNB*1 Gene

SHEN Qi[1]，JIN Yuling[1]，CAO Jinjin[1]，ZHANG Lingfang[1]，WANG Yang[1]，HU Han[1]，LIU Binlei[1,2]
(1 *Biological Engineering and Food，Hubei Univ. of Tech.，Wuhan* 430068，*China*；
2 *Wuhan Binhui Biotechnology Co.，Ltd，Wuhan* 436030，*China*)

Abstract：This study aims to establish a lung cancer H1299 cell model with stable knockdown of the β-catenin-encoding gene *CTNNB*1，in order to further investigate its mechanism of action in lung cancer metastasis，recurrence，and drug resistance. By screening functional siRNA sequences，a recombinant expression vector pLKO.1-*CTNNB*1-shRNA-EGFP-puro was constructed. Gene sequencing confirmed that the shRNA sequence was correctly inserted into the vector，and lentiviral particles were obtained through packaging in 293T cells. After infection of H1299 cells with lentivirus，a positive cell population was obtained through puromycin selection，and a monoclonal cell line was successfully isolated using the limiting dilution method. Flow cytometry analysis showed that the positive rate of monoclonal cell EGFP was 99%. RT-qPCR and Western blot analysis showed that the mRNA and protein expression levels of *CTNNB*1 decreased to 54% and 60% of the control group，respectively. The experiment successfully established a H1299 cell model with stable knockdown of *CTNNB*1 gene，which provides a reliable cell platform for subsequent research on the regulatory mechanism of β-catenin signaling pathway in the malignant progression of lung cancer.

Keywords：H1299 cells；lentivirus；*CTNNB*1；knockdown cell lines

[责任编校：张　众]