

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.17.001

· 基础研究 ·

基于 CRISPR/Cas9 技术构建 CELF6 基因敲除细胞系并探讨 CELF6 与 p53 基因的关系 *

柳 刚^{1,2} 张倩文^{1,2} 夏 丽² 蔡 锦² 许乃寒^{1,2Δ}

(1 清华大学生命科学学院 北京 100084; 2 清华大学深圳研究生院 广东 深圳 518055)

摘要 目的:构建 CELF6 基因敲除细胞系并探讨 CELF6 与 p53 基因之间的关系。**方法:**CRISPR/Cas9 双载体慢病毒系统通过两个慢病毒载体分别向细胞中导入 Cas9 蛋白和 sgRNA 序列表达框,从而实现对 CELF6 基因的敲除。通过 Surveyor(错配酶法)检测 sgRNA 活性并利用 Western blot(蛋白质免疫印迹)检测 CELF6 的敲除效率。进一步利用 CCK-8 试剂盒检测敲除 CELF6 和过表达 CELF6 对细胞增殖的影响。利用公开可用的癌症基因组图谱(TCGA)数据库分析 CELF6 在多种肿瘤组织中的表达情况。**结果:**CELF6 基因敲除的 HCT116 细胞系成功构建。Western blot 检测发现 CELF6 基因敲除的细胞系中 p53、p-RB 蛋白的表达水平显著下调,而 CELF6 过表达的细胞中 p53、p-RB 蛋白的表达水平明显上调。CCK-8 实验结果显示敲除 CELF6 基因后,细胞增殖活性显著增强;而过表达 CELF6 后,细胞的增殖活性受到明显抑制。生物信息学分析发现 CELF6 在结肠癌、胶质母细胞瘤、子宫内膜癌、肾嫌色细胞瘤、乳腺癌、甲状腺癌等肿瘤组织中显著低表达。**结论:**推测 CELF6 是一种新的潜在肿瘤抑制基因,其可能在肿瘤的发生、发展过程中发挥重要作用。

关键词:CRISPR/CAS9; CELF6; p53; 细胞增殖; 肿瘤抑制基因

中图分类号:R-33; Q78; R730.231 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2019)17-3201-07

Construction of CELF6 Knockout Cell Line Based on CRISPR / Cas9 Technique and Investigation of the Relationship between CELF6 and p53 Gene*

LIU Gang^{1,2}, ZHANG Qian-wen^{1,2}, XIA Li², CAI Jin², XU Nai-han^{1,2Δ}

(1 School of Life Sciences, Tsinghua University, Beijing, 100084, China;

2 Graduate School at Shenzhen, Shenzhen, Guangzhou, 518055, China)

ABSTRACT Objective: Construction of CELF6 knockout cell line and investigation of the relationship between CELF6 and p53 genes. **Methods:** The CRISPR/Cas9 dual vector lentiviral system introduces the Cas9 protein and sgRNA sequence expression box into cells through two lentiviral vectors, thereby knocking out the CELF6 gene. The sgRNA activity was detected by Surveyor method and the knockout efficiency of CELF6 was detected by Western blot. The effect of knockout CELF6 and overexpression of CELF6 on cell proliferation was further examined using the CCK-8 kit. The expression of CELF6 in various tumor tissues was analyzed using the publicly available Cancer Genome Atlas (TCGA) database. **Results:** The CELF6 knockout HCT116 cell line was successfully constructed. Western blot analysis showed that the expression levels of p53 and p-RB proteins in CELF6 knockout cell line was significantly down-regulated, while the expression levels of p53 and p-RB proteins in CELF6 overexpressing cell was significantly up-regulated. The results of CCK-8 showed that the cell proliferation activity was significantly enhanced in CELF6-KO cell lines, while in CELF6 overexpression cells, cell proliferation was significantly inhibited. Bioinformatics analysis found that CELF6 was significantly down-regulated in colon adenocarcinoma, glioblastoma multiforme, uterine corpus endometrial carcinoma, chromophobe cell carcinoma, breast invasive carcinoma, thyroid carcinoma and other tumor tissues. **Conclusions:** It is speculated that CELF6 is a new potential tumor suppressor gene, which may play an important role in the occurrence and development of tumors.

Key words: CRISPR/Cas9; CELF6; p53; Cell proliferation; Tumor suppressor gene

Chinese Library Classification(CLC): R-33; Q78; R730.231 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2019)17-3201-07

* 基金项目:国家自然科学基金面上项目(31571418)

作者简介:柳刚(1988-),硕士研究生,主要研究方向:细胞生物学, E-mail: lg16@mails.tsinghua.edu.cn, 电话:13671327037

Δ 通讯作者:许乃寒,博士生导师,副教授,主要研究方向:细胞生物学, E-mail: xu.naihan@sz.tsinghua.edu.cn, 电话:0755-26036357

(收稿日期:2019-03-27 接受日期:2019-04-17)

前言

RNA 是所有生物体的重要组成部分,也是解码每个细胞遗传信息的核心^[1]。RNA 加工对于产生蛋白质多样性和调节蛋白质表达水平是非常重要的。RNA 结合蛋白(RNA-binding proteins, RBPs)决定 RNA 从合成到衰减的命运^[2,3]。RNA 结合蛋白是 RNA 代谢的关键组分,调节 RNA 在时间、空间的分布和其动态的功能,改变 RBPs 的表达对细胞生理学具有深远影响,影响从 mRNA 前体剪接到蛋白质翻译的 RNA 过程^[4]。CELF(CUGBP Elav-like family member)蛋白家族为 RNA 结合蛋白,存在于细胞核和细胞质中,它们调控基因表达的多个方面,包括前体 mRNA 的选择性剪接, RNA 编辑(C to U editing), 脱腺苷酸化, mRNA 的稳定性和翻译等^[5,6]。在细胞核中, CELF 蛋白通过与内含子中 U/G 富集序列结合并通过一些尚未未知的机制与基础剪接机器"剪接体"进行交流来调节转录子集的前体 mRNA 选择性剪接^[7-10]。在细胞质中, CELF 蛋白可以通过与靶 mRNA 的 3' 非翻译区(3'UTR)中富含 A/U 的序列相互作用来调节转录本的稳定性和翻译^[11,12]。富含 A/U 的元件在基因表达的转录后控制中充当关键的顺式作用因子,涉及此通路的异常可能会导致癌症等多种疾病的发生^[13]。

CELF6(CUGBP Elav-like family member 6)是 RNA 结合蛋白 CELF (CUG-BP, Elav-like family) 家族的成员, 人类 CELF6 基因位于 15 号染色体上,有 14 个外显子。截至目前为止,有关 CELF6 的文献报道极少,在 NCBI(National Center for Biotechnology Information) 上能够检索出来的文献只有区区几篇。有研究指出 CELF6 与肌肉特异性剪接增强子依赖性的选择性剪接有关^[7,9]。也有研究发现 CELF6 基因断裂的小鼠表现出一些自闭症相关的行为和脑血清素水平异常的症状^[14]。最近一篇文献揭示下丘脑细胞核中 CELF6 表达的破坏可能影响下游的各种神经调节活动,例如神经调节递质的破坏可能对整体大脑的活动产生深远影响^[15]。除以上之外,再无关于 CELF6 研究的更多信息,为了更好的研究 CELF6 的功能及其作用机制,构建 CELF6 基因敲除的稳定细胞系是非常有必要的,这将为后续 CELF6 的功能研究提供一定的帮助。

本研究基于 CRISPR/Cas9 双载慢病毒技术构建 CELF6 基因敲除的人源结肠癌 HCT116 稳定细胞系,并在此基础上研究 CELF6 与 p53 基因可能的关系以及 CELF6 对细胞增殖活性的影响,并结合生物信息学分析 CELF6 在多种肿瘤组织中的表达情况,将进一步加深我们了解 CELF6 在肿瘤发生、发展中的重要作用,而这将对拓展 CELF6 的后续研究起到积极的推动作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株、质粒 本研究中用到的 HCT116 细胞来自美国典型培养物保藏中心(ATCC)。GFP-CELF6 过表达质粒由本实验室构建合成,具体是以 pEGFP-C1 为空载实施,在设计引物时在 ATG 前加入了 Kozak 序列 GCCACC,也多加入了 GC 两个无关碱基,以凑成 3 的整数倍,防止融合蛋白产生移码突变,质粒中酶切位点为 *Hind* III+ *Bam* H I。

1.1.2 试剂 RPMI-1640 培养基、胎牛血清(FBS)、PBS 磷酸盐缓冲液、2.5%胰酶(10×)、抗菌-抗真菌剂(Antibiotic-Antimy-

cotic)(100X)三抗、嘌呤霉素均购买自 Gibco 公司。细胞冻存常用试剂二甲基亚砜(DMSO)购自 Sigma 公司。Lipofectamine 3000、无血清培养基 Opti-MEM 均购买自 Life Technologies 公司。

甘氨酸、40%丙烯酰胺:甲叉双丙烯酰胺、NaCl、四甲基乙二胺(TEMED)、甘油、Tris、TritonX-100、尿素、十二烷基硫酸钠(SDS)、Tween-20 购买自生工生物公司,过硫酸铵(AP)购买自 Sigma 公司,蛋白酶抑制剂 cocktail 片剂购买自罗氏生物公司,预染蛋白 marker 购买自 Thermo Fisher 公司,考马斯亮蓝 G250 购买自碧云天生物技术公司,无水甲醇、盐酸、异丙醇购买自西陇化工生物公司, β -巯基乙醇和溴酚蓝购买自 BioBasic 公司,脱脂奶粉购买自新晋生物公司。

1.1.3 耗材 显影液与定影液购买自乐凯公司,ECL 化学发光液购买自 Life 生物公司,硝酸纤维 NC 膜购买自优宁维公司,转膜用滤纸购买自新晋生物公司,胶片购买自富士胶片公司。

1.1.4 抗体 CELF6 一抗购买自 Abcam 公司,p53、CRISPR-Cas9、GAPDH、His 一抗均购买自 Proteintech 公司,p-RB 一抗购买自 CST 公司。酶联鼠二抗、兔二抗购买自 KPL 公司。

1.2 方法

1.2.1 CELF6-sgRNA-EGFP 表达慢病毒的构建 针对 CELF6 基因序列,设计 sgRNA 干扰靶点序列,具体 CELF6-sgRNA 靶点位置信息见 Fig. 1,CELF6-sgRNA 序列信息见表 1,特异性引物交由吉凯基因公司合成,其两端含酶切位点粘端,经退火处理形成双链 DNA,连入 GV371 载体。将连接好的产物经 TOP10 感受态转化,菌落 PCR 得到阳性克隆后测序,从而得到序列正确的表达 sgRNA 的慢病毒质粒。以上慢病毒包装过程由吉凯基因公司具体实施完成,Cas9 慢病毒也购自吉凯基因公司。Cas9 慢病毒质粒图谱信息见 Fig. 2A,sgRNA 慢病毒质粒图谱信息见 Fig. 2B。

1.2.2 Cas9 细胞株的构建 培养生长状态良好的 HCT116 细胞,待细胞完全贴壁;根据慢病毒感染预实验结果确定感染条件为 Polybrene (助感染试剂,工作浓度 5 μ g/mL)+Eni.S. (Enhanced Infection Solution,感染增强剂),细胞 MOI 值(复感染指数)确认 HCT116 细胞为 20,按照吉凯基因提供的慢病毒操作手册进行病毒转染操作;根据预实验结果 HCT116 细胞 Puromycin(嘌呤霉素)筛选终浓度为 1 μ g/mL,加入 Puromycin 筛选 3 天;取部分细胞裂解,制成细胞裂解液,进行 WB(Western Blot,蛋白质免疫印迹)检测,可在 160 kDa 大小条带位置处孵育出 Cas9 蛋白(见 Fig. 3A),表明 Cas9 慢病毒成功导入细胞,得到稳定表达 Cas9 蛋白的 HCT116 细胞株;及时冻存 Cas9 细胞株,之后维持较低浓度的 Puromycin 继续培养为后续实验所需。

1.2.3 CELF6-sgRNA-EGFP 慢病毒转染 Cas9 细胞株 培养生长状态良好的稳定表达 Cas9 蛋白的 HCT116 细胞株,待细胞完全贴壁;根据慢病毒感染预实验结果确定感染条件为 Polybrene (助感染试剂,工作浓度 5 μ g/mL)+Eni.S. (Enhanced Infection Solution,感染增强剂),细胞 MOI 值(复感染指数)确认 HCT116 细胞为 20,按照吉凯基因慢病毒操作说明加入合适量的 CELF6-sgRNA-EGFP 慢病毒;感染第二天观察细胞的生长情况:如果没有细胞死亡,则继续培养;如果有大量细胞死亡,则及时更换培养基;2 天后,荧光显微镜下观察 GFP 表达情况,荧光率达到 80%以上(见 Fig. 4),进行后续实验。

1.2.4 CELF6 基因敲除单克隆细胞系的筛选 培养生长状态良好的转染了 sgRNA 慢病毒的 HCT116-Cas9 细胞,用有限稀释取 100 个细胞制成总体积 10 mL 的细胞悬液,充分混匀加到 96 孔板中,每孔 100 μ L,这样理论下每孔 1 个细胞,可每个 sgRNA 克隆两块 96 孔板;96 孔板 37 $^{\circ}$ C 5% CO₂ 培养箱培养 5 到 7 天后(在未标记单克隆细胞团之前不要补加培养基或更换培养基以免培养基冲散细胞团,对后续操作造成干扰),荧光显微镜下观察明场和荧光下 96 孔板里细胞团情况,有且仅有一个细胞团,明场和荧光观察下细胞团位置完全重合,则说明该细胞团为单克隆细胞团,在 96 孔板上作上标记,待 96 孔板里细胞生长到 80%左右时,及时转移到 24 空板培养,24 孔板生长到一定程度后可转移到 6 孔板继续扩大培养。若克隆的整块 96 孔板里均未观察到单克隆细胞团,重复以上步骤,直至筛到单克隆细胞团为止;待筛选出的单克隆细胞团扩增到一定数量时,收集细胞制成细胞裂解液,做 WB 检测,若检测结果直接为敲除,则进入下一步实验环节;若检测结果只有敲低效果,则在此细胞基础上进行第二次单克隆筛选,直至完全敲除为止;若检测结果未有任何敲低迹象,则整个实验重新实施。筛选出的单克隆细胞系 WB 检测结果见 Fig. 3B。

1.2.5 Surveyor 法(错配酶法)检测 sgRNA 活性 CELF6 基因经过 Cas9/sgrNA 切割后由于缺乏修复模板,将主要以非同源

重组的方式进行修复。因此将靶序列 PCR 扩增后经过变性,退火,将形成错配。错配酶将识别错误配对的杂合双链并且进行剪切。产物跑 DNA 电泳,比较切割条带与未切割条带的比例,即可反映出 Cas9/sgrNA 的活性^[22-26]。收集 1.2.4 步骤中筛选出的单克隆细胞系,用基因组 DNA 提取试剂盒抽提样品基因组;设计好 PCR 扩增引物(引物设计需包含切割靶位点),PCR 引物信息见表 2,以筛选出的单克隆细胞系基因组为模板,按照吉凯基因提供的《基因敲除和突变检测试剂盒》里的操作步骤进行 PCR 反应,获得杂交 DNA 产物。具体 PCR 反应程序为:94 $^{\circ}$ C 5 min,94 $^{\circ}$ C 30 s,60 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 1 min,后三步重复 39 个循环,72 $^{\circ}$ C 5 min。

将杂交 DNA 产物跑 DNA 电泳,切胶回收纯化扩增条带,以排除 PCR 体系中抑制 Detecase 的成分;回收成分 98 $^{\circ}$ C 孵育 5 min,然后室温冷却至 30 $^{\circ}$ C 左右。本步骤中的实验组与阴性对照组均需与野生型细胞基因组以 1:1 混合后作为酶切的底物。

Cruiser 酶切筛选单克隆

在灭菌 PCR 管中配置如表 3 反应体系(此反应体系参考吉凯基因《基因敲除和突变检测试剂盒》),45 $^{\circ}$ C 反应 20 min。

酶切结束后,加入终止液终止反应,随后进行 DNA 凝胶电泳。此实验过程中需要特别注意电泳电压 100 V、25-30 min 即可,时间不要太长,最好更换新鲜电泳液,以免条带模糊影响判断。

UCSC CELF6 cDNA NM_052840

Unit: bp

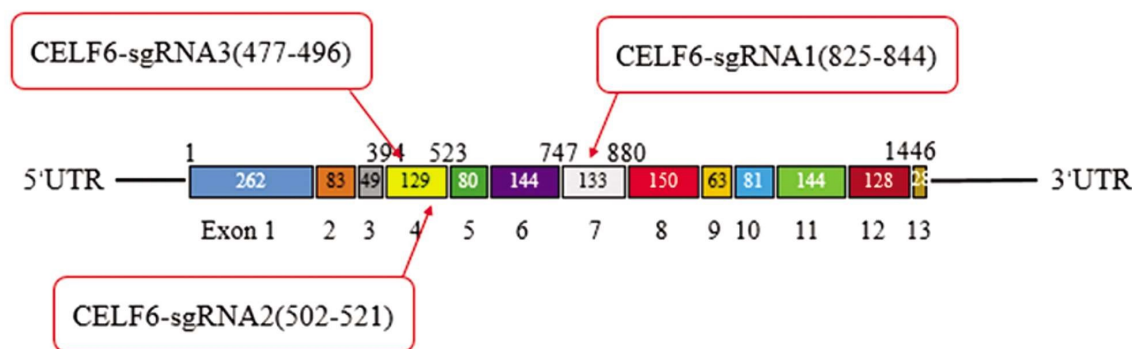


图 1 CELF6-sgRNA 靶点位置信息

Fig.1 CRISPR target sites of CELF6 gene

Three CRISPR targets were designed on the exon of CELF6 gene. The targets sgRNA3 (477-496 bp) and sgRNA2 (502-521 bp) were located in the fourth exon region, and the targets sgRNA1 (825-844 bp) were located in the seventh exon region.

表 1 CELF6-sgRNA 序列信息

Table 1 CELF6-sgRNA oligos information

Target name	sgRNA Sequence	Chain of target(+/-)	The position exon of target
CELF6-sgRNA1	AGGCCGCCACGTGTTGCATC	-	Exon 7
CELF6-sgRNA2	GGACCGTGCACTCCTCGATG	-	Exon 4
CELF6-sgRNA3	AGTCCTGACGGCACCAGTAA	+	Exon 4
Negative Ctrl	CGCTTCCGCGGCCCGTTCAA		

1.2.6 单克隆细胞系测序 根据 CELF6-sgRNA 序列设计 PCR 引物(同表 2)以筛选出的单克隆细胞系基因组为模板进行 PCR 扩增,送 PCR 产物到华大基因测序。

1.2.7 Western Blot 检测实验 在 HCT116 细胞中转染

GFP-CELF6 过表达质粒,12 h 后更换新鲜培养基,48 h 后收集细胞制成细胞裂解液,同时收集并制备 CELF6-KO 的 HCT116 细胞系的裂解液,蛋白质免疫印迹分析 p53、pRB 蛋白的表达情况。

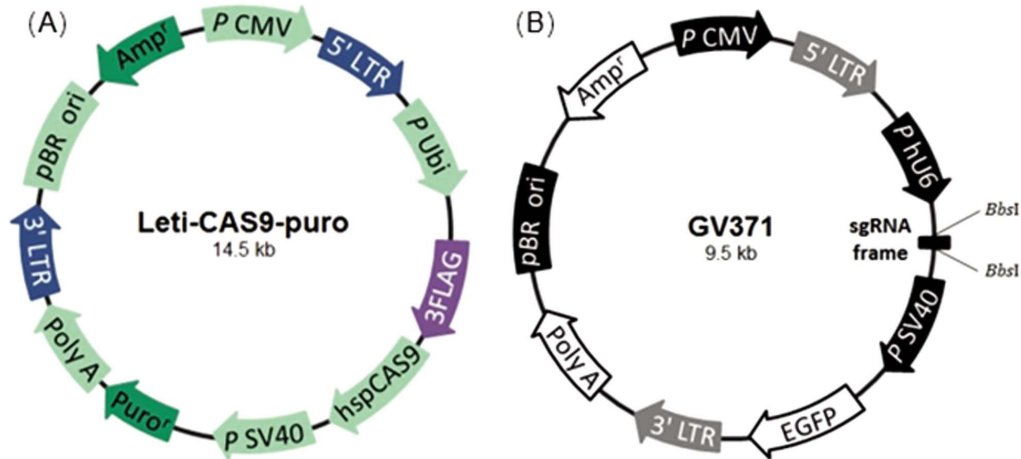


图2 CRISPR/CAS9 双载慢病毒系统

Fig.2 CRISPR/CAS9 dual carrier system

(A) Plasmid profile of Lenti-CAS9-puro. (B) Plasmid profile of GV371, element sequence: U6-sgRNA-SV40-EGFP.

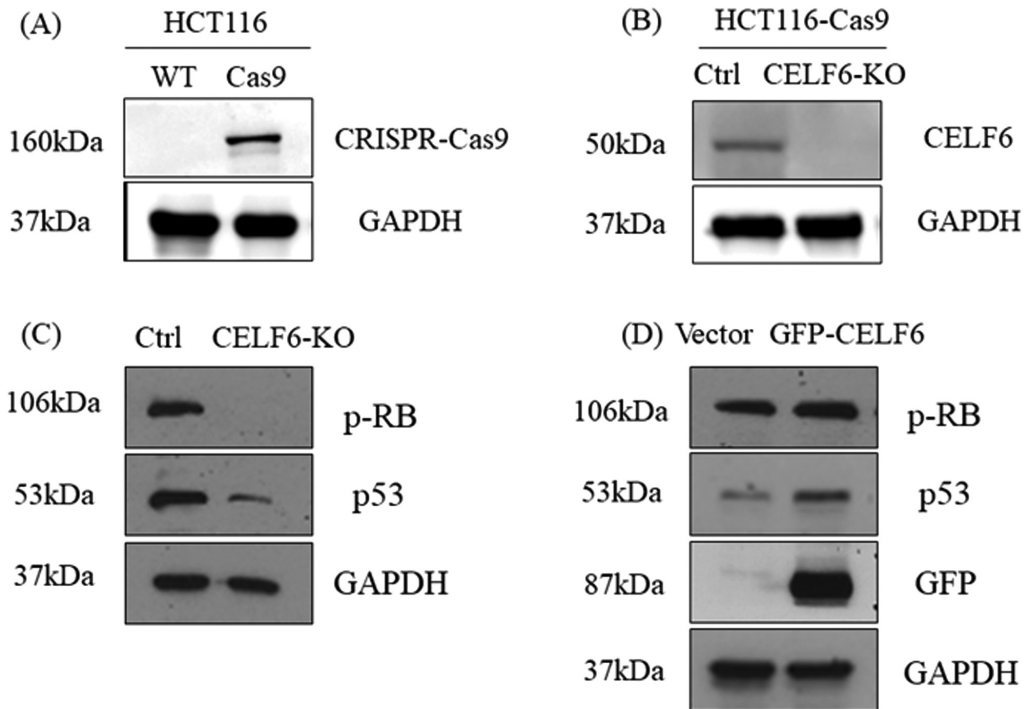


图3 蛋白质免疫印迹实验结果

Fig.3 The results of western blot

(A) Western blot detects Cas 9 cell line using CRISPR/Cas 9 antibody. (B) CELF6 antibody was used to verify the knockout effect of CELF6-KO cell line.

(C) Western blot was used to detect the expression levels of p53 and p-RB in CELF6-KO cell line. (D) Western blot was used to detect the expression levels of p53 and p-RB in CELF6-overexpression cell.

1.2.8 CCK-8 试剂盒检测细胞增殖 在 96 孔板中接种细胞悬液(3×10^3 个/100 μ L/孔),接种 4 块 96 孔板,将 96 孔板置于 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 恒温培养箱中培养;24 h、48 h、72 h、96 h 后分别取一块 96 孔板,向每孔加入 10 μ L 的 CCK-8 试剂,将培养板置于培养箱内孵育 2 h;用酶标仪测定在 450 nm 处的 OD 值;记录并统计 4 天测得的 OD 值,利用 GraphPad Prism7.00 软件绘制细胞增殖曲线。

1.2.9 统计学分析 利用 GraphPad Prism7.00 软件对实验数据进行统计学分析。每次实验均重复 3 次,数据以均值 $\pm$ 标准差表示。多组间比较采用双因素方差分析,两两比较采用 Multiple t tests,当 $P < 0.05$ 时,表示有显著性差异,具有统计学

意义。

2 结果

2.1 CELF6 基因敲除的 HCT116 细胞系成功构建

Cruiser 酶切结果显示(Fig. 5),与 Ctrl 组相比,KO 组在预测位置处出现了切割条带,表明 CELF6 基因被成功突变。单克隆细胞系测序结果显示(Fig. 6),KO 细胞系与阴性对照细胞系比对经 NCBI BLAST 在 CELF6 第四个外显子上第 432 号碱基和 473 号碱基之间既有小片段删除也有大量碱基突变,导致编码的蛋白中第 144 位氨基酸往后产生移码突变,对应靶点编号为 CELF6-sgRNA3。

Western Blot 结果显示(Fig. 3B)在 KO 细胞系中已经检测不到 CELF6 蛋白, 更进一步说明 CELF6 基因敲除的 HCT116 细胞系被成功构建。

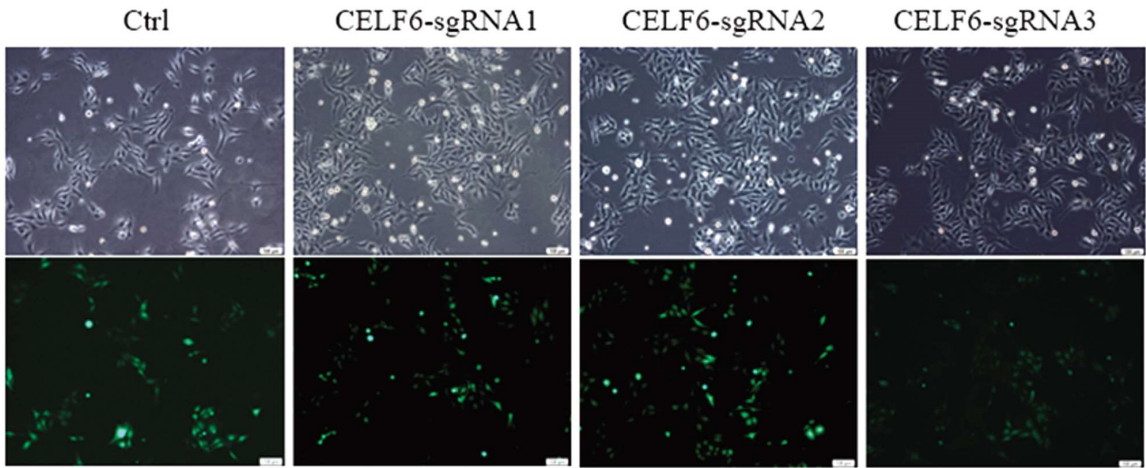


图 4 人结肠癌细胞 HCT116 在 ENLS.+Polybrene 条件下感染效果,复感染指数 MOI=20

Fig.4 Infection effect of HCT116-Cas9 cells under ENLS.+Polybrene conditions, MOI=20, 100×

Fluorescence images showed that three sgRNA of CELF6 and negative control Ctrl were successfully imported into hct116-cas9 cell lines. According to preliminary statistics, the green fluorescence rate reached more than 80%.

表 2 PCR 引物信息

Table 2 Primer details for PCR

Primer number	Primer sequences	Amplification fragment size (bp)	Size of fragment 1 after enzyme digestion (bp)	Size of fragment 2 after enzyme digestion (bp)
Forward 1	CCTCCACTCTCGCCCATCTTTC	356	111	245
Reverse 1	GCTGGCCATTGGTCTGGGGGGTC	356	111	245
Forward 2	TCATTCTGGCTTTGTCCCCAG	371	107	264
Reverse 2	CCTCACCTCAGCCAGGGAACC	371	107	264
Forward 3	TCATTCTGGCTTTGTCCCCAG	371	146	225
Reverse 3	CCTCACCTCAGCCAGGGAACC	371	146	225

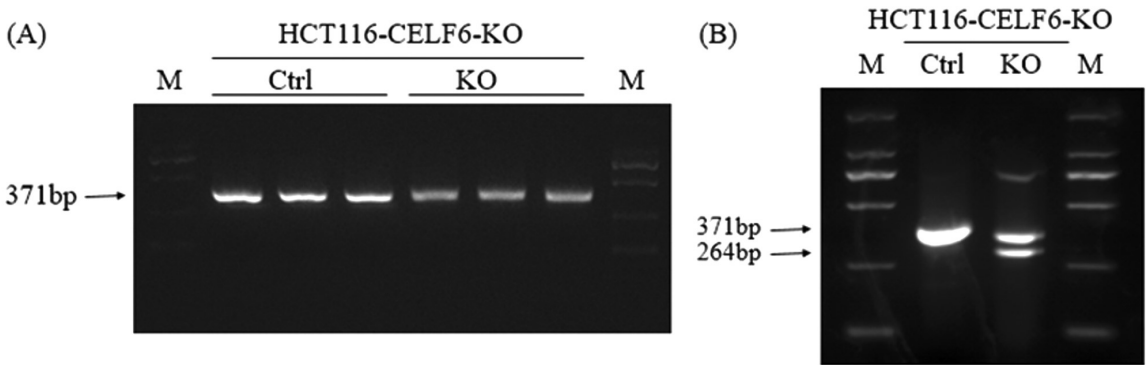


图 5 sgRNA 活性检测

Fig.5 Detection of sgRNA activity

(A) Results of monoclonal cell line PCR. (B) Cruiser enzyme digestion test results. M lane, DL2000 maker, the bands from small to large are 100bp, 250bp, 500bp, 750bp, 1000bp and 2000bp respectively; Ctrl lane, negative control.

2.2 CELF6 与 p53 基因的关系

为了探讨 CELF6 与 p53 基因的关系, 我们检测了 CELF6 基因敲除的细胞系中 p53、p-RB 蛋白的表达情况, western blot 结果(Fig. 3C, 3D)表明 CELF6-KO 细胞系中 p53、p-RB 蛋白的

表达水平显著下调, 同时也构建了 CELF6 过表达质粒, 发现 CELF6 过表达的细胞中 p53、p-RB 蛋白的表达水平明显上调。以上结果预示着 CELF6 可能参与 p53 信号通路的某些调控。

2.3 CELF6 对细胞增殖活性的影响

CCK-8 实验结果显示(Fig. 7)敲除 CELF6 基因后,细胞的增殖活性显著增强;而过表达 CELF6 后,细胞的增殖受到明显抑制。

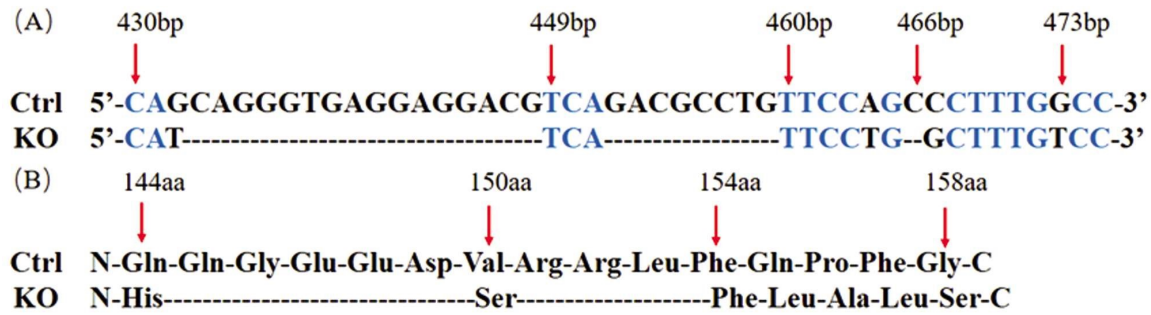


图 6 CELF6-KO 细胞系测序结果
Fig.6 Sequencing results of CELF6-KO cell line

(A) Mutations occurred between 432bp and 473bp bases on the fourth exon of CELF6. (B) CELF6 protein has a frameshift mutation from the 144th amino acid.

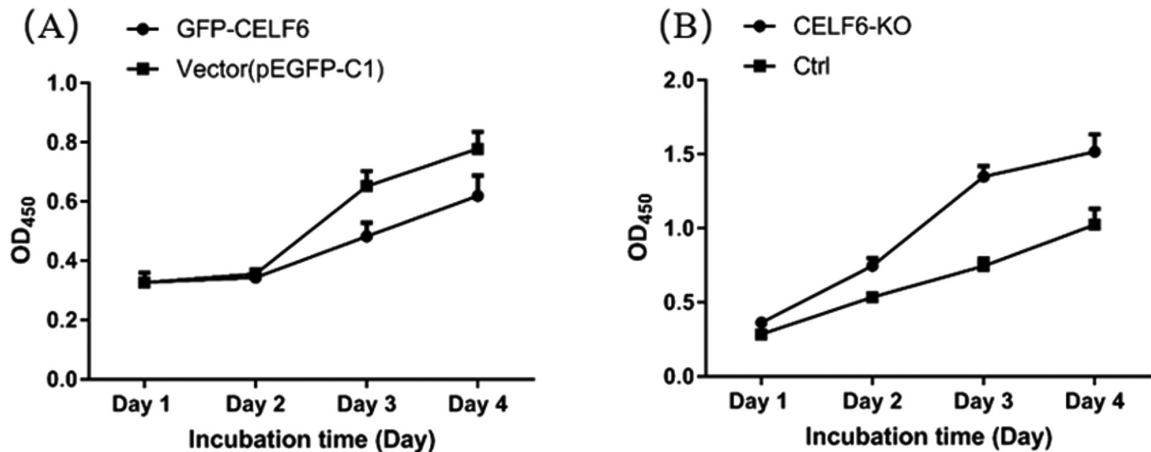


图 7 CCK-8 试剂盒检测细胞增殖活性
Fig.7 Detection of cell proliferation activity by CCK-8 Kit

(A) Detection of proliferation of CELF6-overexpression cell by CCK-8 Kit. (B) Detection of proliferation of CELF6-KO cell by CCK-8 Kit.

表 3 酶切反应体系

Table 3 Cruiser enzyme digestion reaction system

Reagent	Dosage
Purified PCR products	5 μ L(>500 ng)
Detecase Buffer	2 μ L
Detecase	1 μ L
Add ddH ₂ O to	10 μ L

3 讨论

CRISPR/Cas9 是一种能够对任何物种基因组的特定位点进行精确编辑的技术^[16]。使用该技术能够在细胞水平进行单基因或多基因的敲除。其原理是核酸内切酶 Cas9 蛋白通过导向性 RNA (guide RNA, gRNA) 识别特定基因组位点并对双链 DNA 进行切割^[17,18]。

CRISPR/Cas9 双载体慢病毒通过两个慢病毒分别向细胞导入 Cas9 蛋白和 sgRNA 序列表达框,从而实现对目的基因的敲除^[19-21]。Cas9 蛋白载体带有嘌呤霉素标记,sgRNA 带有绿色荧光标记,方便对成功感染的细胞进行标记筛选。本论文中用到的是双载体慢病毒系统,先转染 Cas9 慢病毒,使 Cas9 蛋白

在细胞系中稳定表达,然后转染多个不同的 sgRNA 慢病毒载体,这种方法相对于传统的基因组编辑技术锌指核酸酶(ZFNs)和转录激活因子效应物核酸酶(TALEs)而言,更适用于靶向多个 sgRNA,成功率高,细胞系应用更为广泛^[27],另外 sgRNA 慢病毒载体中所带的 EGFP 荧光标记有助于单克隆细胞系的筛选,使筛选过程更为直观、方便且有效。

本研究中的对象 CELF6 基因表达出的蛋白是一种 RNA 结合蛋白(RBPs),RNA 结合蛋白是细胞生长和增殖的调节剂,它们的表达和功能缺失与包括神经病变、肌肉萎缩、代谢紊乱和癌症等多种疾病相关^[4,28]。一般来说,RBPs 表达改变是否是癌症发生的原因或后果并不明显,但有可能是导致癌症的直接原因,因而需要进一步的研究来确定 RBP 表达的改变与癌症之间的因果关系。STAR (信号转导与 RNA 活化蛋白) 家族 RBPs 的成员在细胞分化和增殖中发挥重要作用,其在癌症中的表达发生改变。例如,Sam68 (the Src-Associated substrate in Mitosis of 68 kDa)在乳腺癌和前列腺癌细胞中过表达,而 QKI 在胶质瘤中表达下调^[4]。鉴于 RBPs 的重要生物学功能,可以想象的是,RBP 表达的改变对细胞周期进程,细胞存活和细胞死亡具有深远影响^[29]。我们的 CCK-8 实验结果显示在敲除 CELF6 基因后,细胞的增殖活性显著增强;而过表达 CELF6 后,细胞的增殖受到明显抑制。说明 CELF6 与细胞周期调控密

切相关。

另根据 UALCAN 网站上 (<http://ualcan.path.uab.edu/index.html>) 现成的资源, 查询各种癌症转录组数据分析发现, CELF6 基因在结肠癌、胶质母细胞瘤、子宫内膜癌、肾嫌色细胞瘤、乳腺癌、甲状腺癌等多种肿瘤组织中显著低表达, 在正常组织中相对高表达, 而且也有文献报道人源 CELF6 基因在肾、脑、睾丸和卵巢中特异性表达, 且在肿瘤组织中 CELF6 蛋白表达水平普遍低于正常组织^[15]。同时蛋白质免疫印迹发现 CELF6 与 p53 和 p-RB 蛋白在结肠癌细胞中的表达趋势具有相似性, 而细胞周期调控的一个关键检验点是 G1 期向 S 期的转换, RB 蛋白的磷酸化状态时调控该检验点的重要一环^[30], 且 p53、RB 都是已经被广泛研究和熟知的肿瘤抑制基因^[31]。据此, 我们得出结论: CELF6 是一种新的潜在肿瘤抑制基因, 其可能在肿瘤的发生、发展过程中扮演着重要角色。后续我们将在 CELF6 具体的抑制肿瘤的作用机理和动物水平上开展研究, 进一步证实我们的结论。

参考文献(References)

- [1] Gerstberger S, Hafner M, Ascano M, et al. Evolutionary conservation and expression of human RNA-binding proteins and their role in human genetic disease[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2014, 825(1): 1-55
- [2] Glisovic T, Bachorik J L, Yong J, et al. RNA-binding proteins and post-transcriptional gene regulation [J]. *FEBS Lett*, 2008, 582(14): 1977-1986
- [3] Castello A, Fischer B, Eichelbaum K, et al. Insights into RNA biology from an atlas of mammalian mRNA-binding proteins [J]. *Cell*, 2012, 149(6): 1393-1406
- [4] Lukong K E, Chang K W, Khandjian E W, et al. RNA-binding proteins in human genetic disease[J]. *Trends Genet*, 2008, 24(8): 416-425
- [5] Barreau C, Paillard L, Mereau A, et al. Mammalian CELF/Bruno-like RNA-binding proteins: molecular characteristics and biological functions[J]. *Biochimie*, 2006, 88(5): 515-525
- [6] Dasgupta T, Ladd A N. The importance of CELF control: molecular and biological roles of the CUG-BP, Elav-like family of RNA-binding proteins[J]. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 2012, 3(1): 104-121
- [7] Ladd A N, Charlet N, Cooper T A. The CELF family of RNA binding proteins is implicated in cell-specific and developmentally regulated alternative splicing[J]. *Mol Cell Biol*, 2001, 21(4): 1285-1296
- [8] Ladd A N, Cooper T A. Multiple domains control the subcellular localization and activity of ETR-3, a regulator of nuclear and cytoplasmic RNA processing events [J]. *J Cell Sci*, 2004, 117 (Pt 16): 3519-3529
- [9] Ladd A N, Nguyen N H, Malhotra K, et al. CELF6, a member of the CELF family of RNA-binding proteins, regulates muscle-specific splicing enhancer-dependent alternative splicing [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(17): 17756-17764
- [10] Brimacombe K R, Ladd A N. Cloning and embryonic expression patterns of the chicken CELF family [J]. *Dev Dyn*, 2007, 236 (8): 2216-2224
- [11] Timchenko N A, Iakova P, Cai Z J, et al. Molecular basis for impaired muscle differentiation in myotonic dystrophy[J]. *Mol Cell Biol*, 2001, 21(20): 6927-6938
- [12] Mukhopadhyay D, Houchen C W, Kennedy S, et al. Coupled mRNA stabilization and translational silencing of cyclooxygenase-2 by a novel RNA binding protein, CUGBP2 [J]. *Mol Cell*, 2003, 11 (1): 113-126
- [13] Khabar K S. Post-transcriptional control of cytokine gene expression in health and disease [J]. *J Interferon Cytokine Res*, 2014, 34 (4): 215-219
- [14] Dougherty J D, Maloney S E, Wozniak D F, et al. The disruption of CelF6, a gene identified by translational profiling of serotonergic neurons, results in autism-related behaviors [J]. *J Neurosci*, 2013, 33(7): 2732-2753
- [15] Maloney S E, Khangura E, Dougherty J D. The RNA-binding protein CelF6 is highly expressed in diencephalic nuclei and neuromodulatory cell populations of the mouse brain [J]. *Brain Struct Funct*, 2016, 221 (4): 1809-1831
- [16] Ran F A, Hsu P D, Lin C Y, et al. Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity[J]. *Cell*, 2013, 154(6): 1380-1389
- [17] Ran F A, Hsu P D, Wright J, et al. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system[J]. *Nature Protocols*, 2013, 8(11): 2281-2308
- [18] Doudna J A, Charpentier E. Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9 [J]. *Science*, 2014, 346 (6213): 1258096-1
- [19] Mali P, Yang L, Esvelt K M, et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9[J]. *Science*, 2013, 339(6121): 823-826
- [20] Sampson T R, Saroj S D, Llewellyn A C, et al. A CRISPR/Cas system mediates bacterial innate immune evasion and virulence [J]. *Nature*, 2013, 497(7448): 254-257
- [21] Qi L S, Larson M H, Gilbert L A, et al. Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression[J]. *Cell*, 2013, 152(5): 1173-1183
- [22] Shen B, Zhang J, Wu H, et al. Generation of gene-modified mice via Cas9/RNA-mediated gene targeting[J]. *Cell Res*, 2013, 23(5): 720-723
- [23] Chang N, Sun C, Gao L, et al. Genome editing with RNA-guided Cas9 nuclease in zebrafish embryos[J]. *Cell Res*, 2013, 23(4): 465-472
- [24] Hwang W Y, Fu Y, Reyon D, et al. Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system [J]. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(3): 227-229
- [25] Shalem O, Sanjana N E, Hartenian E, et al. Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells [J]. *Science*, 2014, 343(6166): 84-87
- [26] Wang T, Wei J J, Sabatini D M, et al. Genetic screens in human cells using the CRISPR-Cas9 system[J]. *Science*, 2014, 343(6166): 80-84
- [27] Kim H and Kim J S. A guide to genome engineering with programmable nucleases[J]. *Nat Rev Genet*, 2014, 15: 321-334
- [28] Cooper T A, Wan L, Dreyfuss G. RNA and disease [J]. *Cell*, 2009, 136(4): 777-793
- [29] Zhang J, Chen X. Posttranscriptional regulation of p53 and its targets by RNA-binding proteins[J]. *Curr Mol Med*, 2008, 8(8): 845-849
- [30] Pal D, Sur S, Mandal S, et al. Prevention of liver carcinogenesis by amarogentin through modulation of G1/S cell cycle check point and induction of apoptosis[J]. *Carcinogenesis*, 2012, 33(12): 2424-2431
- [31] Hangaishi A, Ogawa S, Imamura N, et al. Inactivation of multiple tumor-suppressor genes involved in negative regulation of the cell cycle, MTS1/p16INK4A/CDKN2, MTS2/p15INK4B, p53, and Rb genes in primary lymphoid malignancies[J]. *Blood*, 1996, 87(12): 4949-4958