

利用CRISPR/Cas9技术构建CREB基因敲除细胞系并探讨CREB对APP基因表达的调控作用

郭姗姗¹ 张冰莹² 何文欣¹ 石晓光¹ 刘昆梅¹ 孙涛¹ 崔建奇^{1,2*}

(¹宁夏医科大学宁夏颅脑疾病重点实验室, 省部共建国家重点实验室培育基地, 银川 750004;

²宁夏医科大学基础医学院生物化学与分子生物学系, 银川 750004)

摘要 环磷腺苷效应元件结合蛋白(cAMP responsive element-binding protein, CREB)是重要的核转录因子, 有研究表明, 在阿尔茨海默病患者中, CREB的表达降低, 但CREB对于淀粉样前体蛋白(amyloid precursor protein, APP)的作用机制尚不清楚。该研究通过设计sgRNA序列并合成相应的寡核苷酸, 将其克隆到pX459质粒中, 构建CREB基因敲除的CRISPR/Cas9二合一表达载体。将构建成功的载体转染到HT22细胞中, 通过TA克隆测序和T7E1酶切分析来验证sgRNA的活性。将构建的载体转染到HT22细胞中, 用嘌呤霉素进行药物筛选, 构建稳定的CREB基因敲除的细胞系。CREB对APP基因表达的调控作用通过检测其在正常HT22细胞和CREB基因敲除的HT22细胞系中的表达情况进行确认。结果显示, 成功构建了CRISPR/Cas9技术对CREB基因进行敲除的二合一表达载体, 所设计的sgRNA的插入序列和开放阅读框架完全正确, 经过酶切分析和序列测定, 所构建的载体与实验设计相一致。CREB基因敲除的HT22细胞系其敲除效率达到90%以上。通过Western blot分析检测CREB对APP表达的影响, 结果发现, 当CREB基因敲除后, APP表达增加, 而过表达CREB时, 则APP蛋白质表达水平下降。这提示, CREB对APP的表达有下调作用, 具体的机制还将继续研究。

关键词 CRISPR/Cas9; CREB; 基因敲除; APP基因表达; 阿尔茨海默病

The Establishment of Stable CREB Gene Knock Out Cell Lines with CRISPR/Cas9 Technique and the Regulatory Effects of CREB on APP Gene Expression

Guo Shanshan¹, Zhang Bingying², He Wenxin¹, Shi Xiaoguang¹, Liu Kunmei¹, Sun Tao¹, Cui Jianqi^{1,2*}

(¹Ningxia Key Laboratory of Cerebrocranial Diseases, Incubation Base of National Key Laboratory,

Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China; ²Department of Biochemistry and Molecular Biology,

School of Basic Medical Sciences, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China)

Abstract cAMP responsive element-binding protein (CREB) is an important nucleic transcriptional factor. It had been reported that the expression of CREB was suppressed in the patients with Alzheimer's disease, and at the meantime, the expression of amyloid precursor protein (APP) was increased. The mechanisms for the effects of CREB on APP gene expression is still unclear. In the current study, the specific sgRNA sequences for CREB gene were designed and the corresponding oligonucleotide were synthesized. The sgRNA were cloned into the *Bbs* I

收稿日期: 2017-06-08 接受日期: 2017-07-25

国家自然科学基金(批准号: 81260197)、宁夏脑计划项目(批准号: 2016BZ07)和宁夏医科大学2015年优势学科群建设科研项目(批准号: XY201511)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0951-6880697, E-mail: jianqi@gmail.com

Received: June 8, 2017 Accepted: July 25, 2017

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81260197), the Project of Ningxia Brain Plan (Grant No.2016BZ07) and Ningxia Medical University Scientific Research Project (Grant No.XY201511)

*Corresponding author. Tel: +86-951-6880697, E-mail: jianqi@gmail.com

网络出版时间: 2017-08-15 16:51:43 URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20170815.1651.014.html>

sites of pX459 plasmid to construct the 2-in-1 plasmid of CRISPR/Cas9 for *CREB* gene knock-out. The constructed plasmid was transfected into HT22 cells to evaluate the activities of sgRNA with TA cloning sequencing and *T7E1* endonuclease cutting. When CRISPR/Cas9 activities were confirmed, the constructed plasmids were transfected into HT22 cells and the transfected cells were cultivated under the suppression of puromycin. In this way the stable cell lines with *CREB* gene knock-out were established. The regulatory effects of *CREB* on *APP* gene expression were assessed with the Western blot assay to analyze the level of APP protein in the normal HT22 and *CREB* gene knock-out cell lines. The results demonstrated that the constructed 2-in-1 plasmid with CRISPR/Cas9 techniques for *CREB* gene knock-out was successful. The insert sgRNA sequence and the open reading frame were correctly identified by the endonuclease cutting and the DNA sequencing analysis. The constructed plasmid was consistent with the experimental design. The established stable cell lines had high efficacy for *CREB* gene knock-out and the efficiency reached over 90%. The results of Western blot assay illustrated that the level of APP protein increased when *CREB* gene had been knocked out and reduced when *CREB* gene overexpressed. Our work indicated that *CREB* could down regulate *APP* gene expression and the detailed mechanism for this was still under investigation.

Keywords CRISPR/Cas9; *CREB*; gene knock out; *APP* gene expression; Alzheimer's disease

环磷腺苷效应元件结合蛋白(cAMP responsive element-binding protein, CREB)是一种重要的核转录因子,对神经系统的生长发育以及突触可塑性的形成发挥着重要的作用^[1]。有研究发现,CREB对长时程记忆的形成有重要作用^[2]。此外,CREB还介导神经元的保护作用,促进神经元的存活^[3]。前脑缺乏CREB的小鼠在出生后表现出与年龄相关性的神经退行性病变^[4]。近来的研究还发现,CREB在阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)的发病过程中也扮演着极为重要的角色^[5]。

阿尔茨海默病是一种常见的神经系统退行性疾病,具有不可逆性。AD的一个重要病理特征就是由 β -淀粉样多肽(β -amyloid peptide, A β)所形成的老年斑(senile plaque)在神经组织中的沉积,从而对神经组织造成不可逆的损害,并进一步对记忆力造成损伤。A β 则源自于淀粉样前体蛋白(amyloid precursor protein, APP)的异常裂解^[6]。有研究已经证明,AD的进程与APP有关系^[7-8]。有研究发现,唐氏综合征(Down's syndrome)的患者体内有多余的APP基因拷贝,所以表现出早期发作的AD样病理改变^[7]。在有些AD病人大脑的某些区域还发现有APP过表达的现象^[8]。在AD患者中,CREB所介导的基因调控是异常的^[9]。在AD病人的大脑中和用A β 处理过的小鼠海马神经元中,CREB的表达量也是显著下降的^[10]。由此可见,CREB在AD的发病过程中起着重要的作用,尤其是对APP的基因表达可能存在着一定的调控作用。

簇状规律性间隔性短回文重复序列(clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR)/Cas9系统(CRISPR associated system)是一个特殊的DNA重复序列家族,广泛分布于细菌和古细菌基因组中。CRISPR位点通常由短的、高度保守的重复序列组成,重复序列的长度通常为21~48 bp,由于具有回文序列,可以形成发卡结构,重复次数最高达250次。重复序列之间被26~72 bp的间隔序列隔开,间隔序列长度与细菌种类和CRISPR位点有关。此外,在CRISPR位点的上游位置还有前导区,富含AT碱基^[11]。Cas9基因一般在CRISPR位点附近,该基因编码的蛋白具有解旋酶和核酸酶的作用,平时Cas9以无活性的形式存在,当与crRNA(CRISPR-derived RNA)结合后,其三维结构发生改变能够与相应DNA结合并对特定的DNA序列进行剪切^[12]。近年来,利用CRISPR/Cas9系统的这些特点,可以通过设计一段小RNA(small guide RNA, sgRNA,也称为小向导RNA),sgRNA能够与下游Cas9形成核糖核蛋白复合物,引导Cas9到相应的DNA位置,使Cas9发挥用来对目的基因进行编辑。这种技术已经成为一种高效和便利的基因编辑技术。

我们根据CREB基因的序列设计了特异性的sgRNA序列,并根据其序列合成了相应的正义链和反义链寡核苷酸。Addgene所提供的CRISPR/Cas9质粒pX459是一种二合一的质粒,在U6启动下,含有供sgRNA转录的结构(sgRNA scaffold),其中含有两个串联的Bbs I酶切位点,在其下游有CAG(CMV

early enhancer/chicken β actin promoter)启动子指导的Cas9基因以及与转录有关的一些其他元件, 如转录增强子和穿核序列。我们将两条寡核苷酸退火后插入到pX459质粒的Bbs I酶切位点, 从而构建了CREB特异性的CRISPR/Cas9基因编辑载体, 利用该载体含有嘌呤霉素抗性的特点, 构建了稳定的CREB基因敲除的小鼠海马神经元细胞系。利用该细胞系, 我们初步观察了CREB对APP基因表达的调控作用, 以期探讨CREB在AD发生中的作用。

1 材料与方法

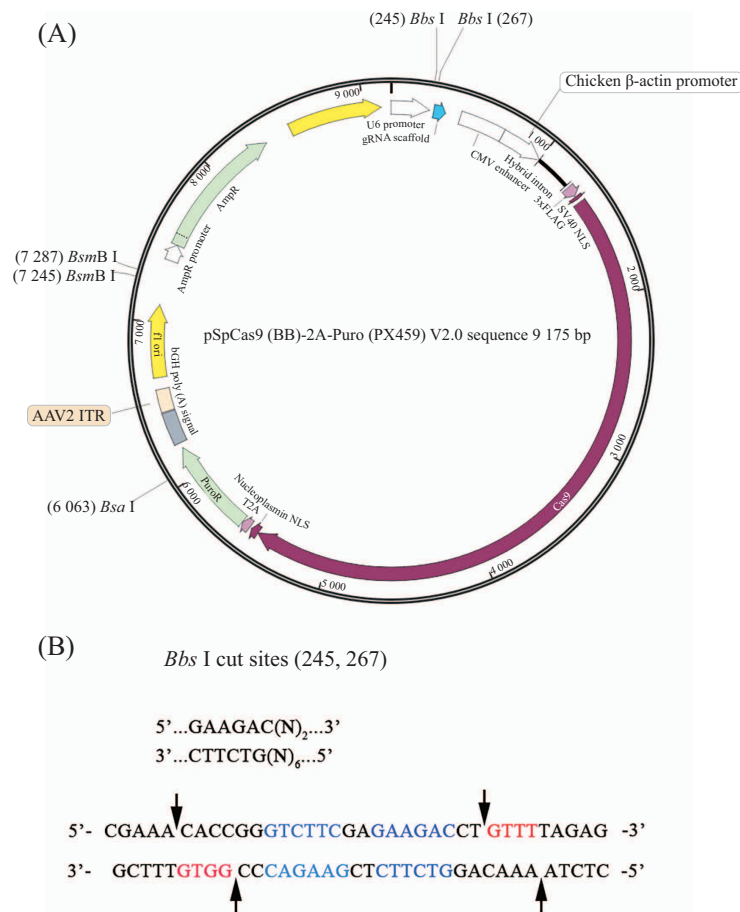
1.1 材料

pSpCas9(BB)-2A-Puro (pX459) V2.0购自Addgene(提供质粒的非盈利性组织)(图1A)。用于CREB基因敲除的sgRNA序列为我们自己设计, 与其

相对应的寡核苷酸由金唯智生物科技有限公司合成。HT22(小鼠海马神经元细胞系)细胞为本实验室保存。小鼠脑神经瘤细胞(Nuero-2A细胞)购自上海中乔新舟生物科技有限公司。CREB真核表达质粒为本实验室构建并保存。T7E1酶切试剂盒购自NEB公司。DNA提取试剂盒、RNA提取试剂盒均购自Omega公司。逆转录试剂盒购自ABM公司。qPCR荧光MIX购自DBI公司。用于检测CRISPR/Cas9基因敲除效率的PCR和qPCR引物由金唯智生物科技有限公司合成。

1.2 引物设计

小鼠的CREB1基因有11个转录本(ENSMUST0000087366.10), 8个外显子, 位于一号染色体上(64、432、819~64、604、548)。其中, 从第3个外显子开始至第8个外显子前面部分序列为CDS(coding



A: pX459质粒图, sgRNA结构位于U6启动子区后方, 同时含有两个Bbs I酶切位点; B: Bbs I酶切位点, 该酶能够识别GAAGAC后两位和相反链的后六位进行酶切。

A: schematic of pX459 plasmid, sgRNA scaffold is located under U6 promoter and contains 2 Bbs I endonuclease sites; B: Bbs I endonuclease site, which can recognize GAAGAC sequence and cut from the 2nd base after that sequence and the 6th base from the complimentary strand to form the specific cohesive terminus.

图1 pX459质粒图及Bbs I酶切位点

Fig.1 Schematic of pX459 plasmid and Bbs I endonuclease site

表1 CREB sgRNA核酸片段
Table 1 CREB sgRNA Oligo

名称 Name	序列 Sequence
CREB-sgRNA-1	5'-CAC CGA GCT GCA CTA AGG TTA CAG T-3' 3'-CTC GAC GTG ATT CCA ATG TCA CAA A-5'
CREB-sgRNA-2	5'-CAC CGT AAC TGA TTC CCA AAA ACG A-3' 3'-CAT TGA CTA AGG GTT TTT GCT CAA A-5'
CREB-sgRNA-3	5'-CAC CGA AAG GAT TTC CCT TCG TTT T-3' 3'-CTT TCC TAA AGG GAA GCA AAA CAA A-5'

sequence)区,通过蛋白质保守序列,选择第3个外显子和第4个外显子为对象进行靶点筛选。经过网站(<http://crispr.mit.edu/>)分析得出具体sgRNA得分后,选择得分较高的第三个外显子中的一个(CREB-sgRNA-1)和第四个外显子中两个(CREB-sgRNA-2和CREB-sgRNA-3)共三组作为备选序列。然后,根据pX459被*Bbs* I酶切后所得的黏性末端特点(图1B),在设计sgRNA两端分别在5'端前加上CACCG,反向链3'端加C,同时,5'端加前AAAC,和pX459酶切后的黏性末端相吻合,共设计6段Oligo序列,见表1。

1.3 CRISPR/Cas9-CREB质粒构建

1.3.1 CRISPR质粒酶切 将CRISPR/Cas9质粒pX459用限制性核酸内切酶*Bbs* I酶切,酶切之后进行琼脂糖凝胶电泳并进行酶切鉴定,回收酶切后线性化的质粒。回收后,再次进行琼脂糖凝胶电泳鉴定是否回收成功。留酶切回收产物供之后连接用。

1.3.2 Oligo退火形成双链DNA 将合成的Oligo稀释成浓度为10 $\mu\text{mol/L}$ 的溶液,取20 μL 的正反链Oligo溶液,加退火缓冲液20 μL ,并加双蒸水使其终体积为200 μL 。混匀后,置入水浴中煮沸5 min。然

后,使其逐渐降低到室温,形成双链DNA,用于之后的连接实验。

1.3.3 pX459-CREB克隆和鉴定 将1 μL 酶切回收的线性化的pX459载体和5 μL 退火后的双链DNA,加1 μL T4连接酶和buffer在16 $^{\circ}\text{C}$ 条件下连接过夜。将连接物转化到DH5 α 感受态细胞中,然后进行涂板,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵箱培养过夜。次日挑取单克隆菌,加入到具有氨苄抗性的LB培养基中培养,37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱振荡培养12 h后提取质粒。

纯化的质粒分别用*Eco*R I和*Bbs* I酶切鉴定,以确定供体DNA的插入,并同时进行DNA序列分析,以确定插入序列的正确。

1.3.4 sgRNA活性鉴定 我们将克隆的质粒pX459-CREB1、pX459-CREB2和pX459-CREB3转染到小鼠HT22细胞中,48 h后提取基因组DNA。我们设计了sgRNA对应切除基因片段上下游引物(表2和表3),进行PCR扩增,长链PCR产物为615 bp。将PCR产物再进行解链退火,然后用*T7E1*酶切,以确定设计的sgRNA所指导的CRISPR/Cas9的基因敲除活性,短链PCR产物为307 bp,纯化后将其克隆在TA克

表2 用于*T7E1*酶切分析的长链PCR引物

Table 2 PCR primers for long-chain PCR amplification and *T7E1* endonuclease cutting assay

名称 Name	序列 Sequence	PCR产物大小 The size of PCR product
Long-chain primer of CREB2&3	Forward: 5'-GAC ATC TCT ACC TGC CAA G-3' Reverse: 5'-TCC ACC TCT CTG ATA ACT CTA-3'	615 bp

表3 用于TA克隆的短链PCR引物

Table 3 PCR primers for short-chain PCR and used for TA cloning analysis

名称 Name	序列 Sequence	PCR产物大小 The size of PCR product
Short-chain primer of CREB2&3	Forward: 5'-ACA TCT CTA CCT GCC AAG TA -3' Reverse: 5'-ATC TTA GTG GTG TGG TTG TC-3'	307 bp

隆载体pUC-T之中, 选取阳性克隆, 提取质粒, 进行序列分析, 以检查突变形成情况(在后来的分析中, 我们发现, CREB-sgRNA-1位于3号外显子的一个重复序列, 合成的PCR引物无法扩增出相应的短链和长链PCR产物以进行sgRNA活性的鉴定)。CREB-sgRNA3是和CREB-sgRNA2序列重复且方向相反的一条寡核苷酸链, 所设计的长链和短链PCR引物可以通用, 所以在后面的实验中, 除非有特殊说明, 对于sgRNA活性的鉴定均是指CREB-sgRNA-2。

1.4 CREB敲除细胞系的构建

1.4.1 将pX459-CREB质粒转染到HT22细胞中将HT22细胞接种于6孔板中, 每孔 6×10^5 个细胞。第2 d待细胞长至80%融合时进行转染, 转染前2 h换成无血清、无双抗的培养基, 然后用Lipofectamine 2000进行转染, 转染过程严格按照说明书进行。转染8 h后换为含有10%血清的DMEM培养基。第3 d在培养基中添加嘌呤霉素, 使其终浓度为 $8 \mu\text{g}/\text{mL}$ 。在该浓度嘌呤霉素作用下, 未转染的细胞将会被杀死, 之后每天按照该浓度进行换液培养, 进行为期7 d的细胞筛选。前期实验已证明, 在5~7 d时, 无抗性细胞能被全部杀死。此时, 留下的细胞为已经成功转入克隆好的pX459-CREB质粒的细胞。

1.4.2 挑单克隆细胞 将每孔细胞消化下来, 进行无限稀释, 接种在96孔板中, 挑选每孔只有一个单细胞的进行培养, 培养基中嘌呤霉素的浓度可下调至 $6 \mu\text{g}/\text{mL}$ 。等细胞长成单克隆细胞团, 将其消化下来转入48孔板进行扩大培养, 直到最终转入培养瓶中细胞能够稳定生长。

1.5 CRISPR敲除效率检验

1.5.1 qPCR检验CREB的mRNA表达水平 从HT22细胞、各CREB敲除细胞系中提取RNA, 提取RNA之后测定浓度, D_{260}/D_{280} 在2.0左右, 立刻进行逆转录。逆转录体系为RNA总量为 $5 \mu\text{g}$, $5 \times \text{mix}$ $2 \mu\text{L}$, 其余用无酶水补齐, 共 $10 \mu\text{L}$ 。逆转录之后进

行qPCR, 每个因子平行3孔, 实验重复3次。小鼠CREB-qPCR引物和GAPDH-qPCR引物见表4, 将结果进行统计学分析。

1.5.2 Western blot检测CREB的蛋白表达水平 从HT22细胞和各CREB敲除细胞系中提取总蛋白, 加入裂解液裂解, 每5 min震荡1次, 5次后以 $15\ 000 \text{ r}/\text{min}$ 离心15 min, 收集上清。测定蛋白浓度后(保证相关系数在0.99以上为准)将蛋白按比例与蛋白Loading buffer和水混匀后置于 $100 \text{ }^\circ\text{C}$ 金属浴5 min变性, 然后进行Western blot, 每孔上样 $50 \mu\text{g}$ 总蛋白, 再进行聚丙烯酰胺凝胶电泳。电泳结束后, 转膜, 用5%的脱脂奶粉液进行封闭, 一抗 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 结合过夜, 荧光二抗常温孵育2 h后, 在Odyssey CLX扫描仪上进行扫描。然后进行数据化处理, 结果进行统计学分析。

1.6 利用Western blot检验CREB基因敲除对APP的影响

从CREB基因敲除细胞系和HT22细胞中分别提取蛋白, 进行Western blot, 测定蛋白质中CREB和APP蛋白质水平, 分析CREB对APP是否有调控作用。

将CREB真核表达质粒转染进Neuro-2A细胞中, 前1 d将Neuro-2A细胞接种到6孔板中, 每孔 5×10^5 个细胞, 第2 d转染前2 h换无血清、无双抗的培养基, 之后用Lipofectamine 2000进行转染, 转染步骤和用量按照说明书进行。8 h后换正常培养基, 48 h后与正常Neuro-2A细胞一起提取总蛋白, 观察CREB蛋白质和APP蛋白质的变化, 比较CREB过表达对APP基因是否有调控作用。

1.7 统计学方法

每次实验重复3次, qPCR结果将CQ值转换成 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 来进行比较, Western blot结果用Image J分析测定灰度值后进行统计分析。我们应用GraphPad Prism软件进行统计学分析并作图, 显著性分析以 $P < 0.05$ 为具有统计学意义。

表4 小鼠CREB qPCR引物
Table 4 The qPCR primer for mouse CREB

名称 Name	序列 Sequence
CREB-qPCR primer	Forward 5'-CAC CTT GCC TGA GAC TGA AT-3'
	Reverse 5'-CTG CCT TCC ACT TGA TGC TA-3'
GAPDH-qPCR primer	Forward 5'-GAG TCA ACG GAT TTG GTC GT-3'
	Reverse 5'-GAC AAG CTT CCC GTT CTC AG-3'

2 结果

2.1 pX459-CREB质粒鉴定

pX459质粒和三段oligo连接提取质粒之后,将质粒交由金唯智生物科技有限公司进行DNA测序。结果见图2, DNA测序结果证实,我们所克隆的pX459-CREB克隆有供体DNA的插入,其序列和相位与实验前的设计完全一致。

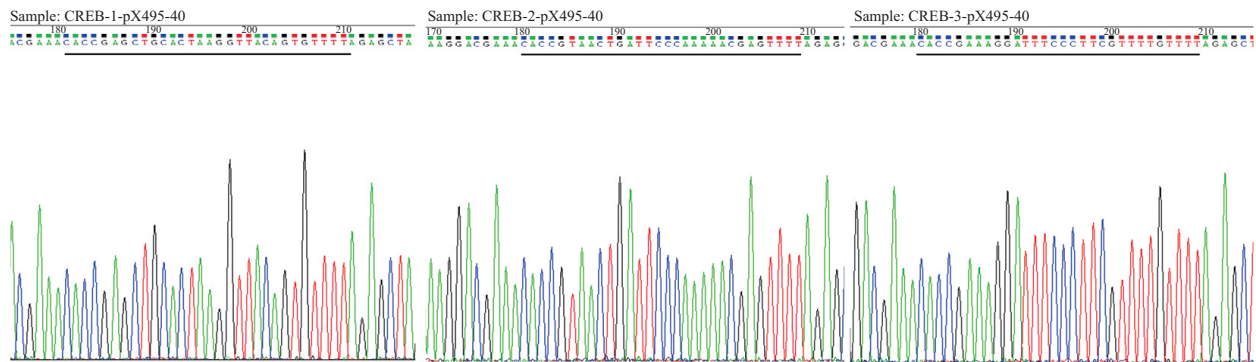
2.2 sgRNA活性鉴定

2.2.1 *T7E1*酶切分析 将鉴定成功的pX459-CREB2、pX459-CREB3用Lipofectamine 2000分别转染到HT22细胞中。转染后48 h提取基因组DNA,以其为模板进行PCR。PCR产物经退火后用*T7E1*酶切。结果表明,PCR产物大小为615 bp,用*T7E1*酶切后会生成一个529 bp和一个86 bp的片段(图3),说明我们所构建的sgRNA可以引导Cas9对*CREB*基因进行剪切。

2.2.2 短链PCR产物TA克隆分析 将短链PCR克隆到pUC-T克隆载体中,然后选取阳性克隆进行序列分析,以检查Indel(插入或缺失)突变。结果发现,在PCR产物中,我们检测到了两种不同形式的突变,一种是出现含有16个碱基的寡核苷酸的缺失(图4,序列A),而另一种则为单碱基的缺失(图4,序列B)。

2.3 检测所构建的稳定的*CREB*基因敲除小鼠海马神经元细胞系中*CREB*的表达

从所建立的稳定的*CREB*基因敲除细胞中提取细胞总RNA。同时,我们提取转染了pX459空载质粒的HT22细胞和正常的HT22细胞的总RNA作为对照,逆转录后,进行qPCR,检测各种细胞中*CREB* mRNA的表达情况。结果发现,在建立*CREB*基因敲除的稳定细胞系中,*CREB*的敲除效率都很好,其中,CREB1-2(C1-2)效率最好,敲除效率达到了94%,其

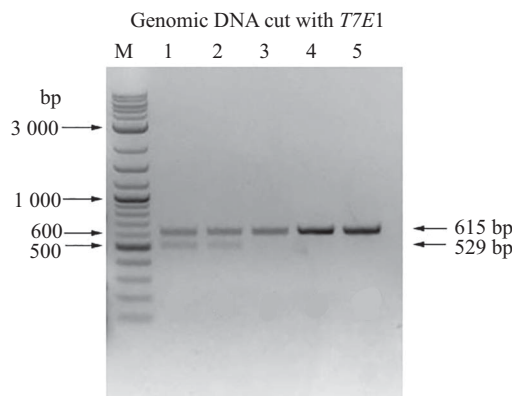


pX459-CREB DNA序列鉴定结果证明,该质粒已经插入了DNA并且有正确的开放阅读框。

DNA sequencing of pX459-CREB, the results demonstrated that all the plasmids had donor DNA insert with correct ORF.

图2 pX459-CREB鉴定结果

Fig.2 Identification of pX459-CREB



1、2: PCR产物用*T7E1*酶切; 3: 对照组,即HT22细胞全基因组DNA用相同引物扩增后退火并用*T7E1*酶切,没有切出短片段; 4、5: 没有酶切处理。Lane 1 and 2 were PCR products cut with *T7E1* enzyme; Lane 3 was the control group, the normal HT22 cell genomic DNA amplified with the same primers as pX459-CREB transfected HT22 cells and then annealing and cut with *T7E1*, there was no cutting fragments presented; Lane 4 and 5 were PCR product without cutting.

图3 *T7E1*酶切鉴定pX459-CREB的活性

Fig.3 Identification of pX459-CREB activities by *T7E1* cutting

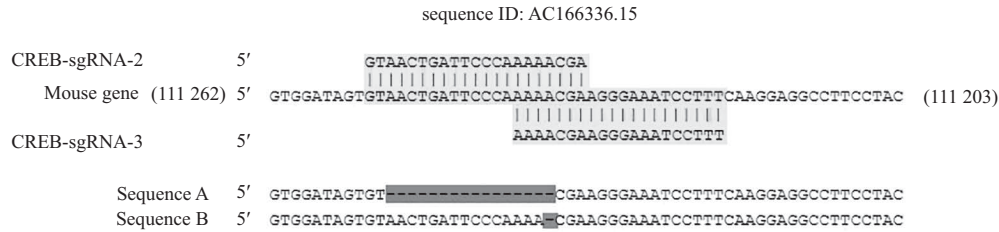
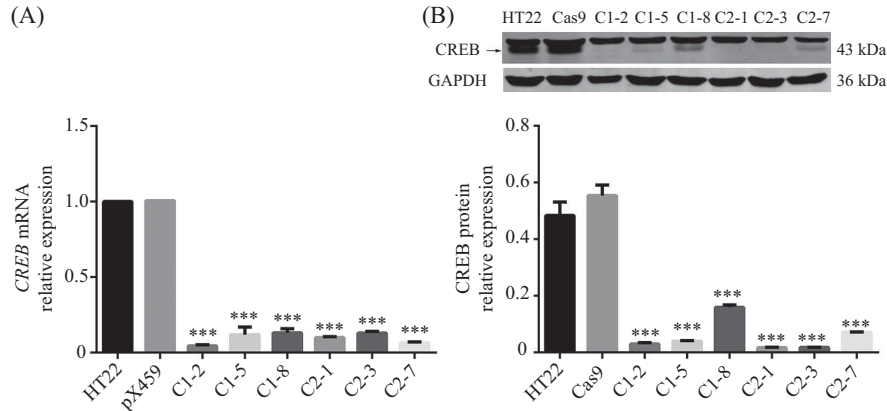


图4 TA克隆分析检测Indel突变

Fig.4 TA cloning analysis to identify Indel mutations



A: 通过qPCR评估CREB基因的表达情况, 结果与对照组(HT22)相比, CREB在细胞系中的mRNA水平明显低; B: Western blot验证CREB蛋白质表达水平与qPCR结果是一致的, 在CREB基因敲除细胞系中CREB蛋白质水平显著降低。*** $P < 0.001$, 与对照组(HT22)比较。

A: the CREB gene expression was assessed by qPCR and the results illustrated that the mRNA level of CREB in the established cell lines is much lower compared with the control (HT22) group. B: the CREB protein expression was evaluated by Western blot assay and the result is consistent with that of qPCR. It displayed that the CREB protein level is much lower in the stable CREB gene knock out cell lines. *** $P < 0.001$ vs control (HT22) group.

图5 CREB基因在CREB基因敲除细胞系中的表达水平

Fig.5 Evaluation of CREB gene expression in stable CREB gene knock out cell lines

他敲除效率也基本在85%以上(图5A)。Western blot实验结果与qPCR实验结果基本一致, 在CREB基因敲除的细胞系中, CREB的表达非常低(图5B), 说明所构建的供体DNA有比较好的效率, 而且所构建的细胞系表现出相当高的CREB基因敲除效率。

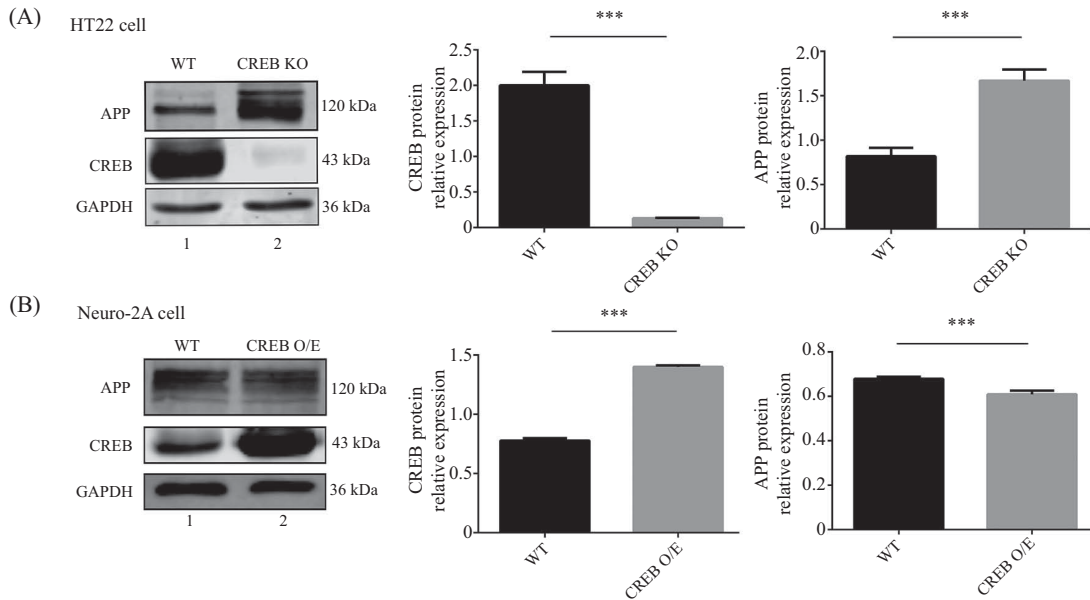
2.4 Western blot分析CREB基因敲除细胞中APP蛋白质水平

为了探讨CREB对APP基因表达的影响, 我们检测了CREB基因敲除的细胞系中APP蛋白质水平。结果表明, 与对照组相比, 当CREB基因被敲除后, 细胞中APP的表达明显增高(图6A), 两者之间有明显的统计学差异($P < 0.05$)。同时, 在Neuro-2A细胞中, 转染CREB真核质粒使CREB基因过表达之后, APP蛋白质水平也降低(图6B), 并且具有统计学差异($P < 0.05$)。由此, 可以推测, CREB对APP基因的表达起下调作用。

3 讨论

簇状规律性间隔性短回文重复序列(clustered

regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR)/Cas9系统(CRISPR associated system)是细菌和古细菌的天然免疫系统, 能够抵制病毒或其他外来基因的破坏^[13]。CRISPR/Cas9是CRISPR系统最简单的一种。2012年, Jinek等^[14]发现, 融合sgRNA能够引导Cas9蛋白质到指定位点, 在特定DNA位点进行切割, 从而将这个细菌自身免疫系统过渡到了DNA编辑工具。从此, CRISPR/Cas9技术开始被广泛应用并超越ZFN(zinc finger nuclease)、TALEN(transcription activator-like effector nuclease)技术。这三项技术都是通过识别特定DNA序列, 对其进行切割产生双链断裂(double strand break, DSB), 之后在非同源末端修复时产生碱基的插入或删除, 形成错配而将目的基因敲除^[15]。而ZFN、TALEN技术需要投入很大的人力、物力来构建DNA亲和区, 并且失败率较高^[16]。相比之下, CRISPR/Cas9技术以其灵活性、高效性、易操作和价格低的优势超越了以往的基因编辑技术, 成为定点基因编辑技术中前景最好的工具。近年来, 已经在多个领域表现出



A: Western blot分析在CREB基因敲除细胞系中APP蛋白质水平; B: Western blot分析APP在CREB基因在Neuro-2A细胞中过表达时的蛋白质水平。*** $P < 0.001$ 。

A: evaluation of APP protein expression in CREB gene knock out cell lines by Western blot; B: evaluation of APP protein level in CREB gene overexpression in Neuro-2A cell by Western blot. *** $P < 0.001$.

图6 CREB对APP表达的调节作用

Fig.6 The regulatory effects of CREB on APP expression

突出优势,目前,在细菌、酵母、线虫、斑马鱼等生物体中开始应用^[17]。

本研究利用CRISPR/Cas9技术将小鼠海马神经元细胞HT22中的CREB基因敲除,并在此基础上构建了稳定的CREB基因敲除的细胞系,以此来研究CREB对APP基因表达的调控作用。

AD的最大病理改变是A β 在神经组织中的沉积,而A β 则来自于APP蛋白的异常裂解。有研究已经发现,在AD患者的大脑中,CREB蛋白含量是降低的^[10],同时,APP与AD有及其密切的关系,提示CREB对APP的表达可能存在一定的调控作用,但具体机制并不清楚。CREB是一个转录调控因子,在HT22细胞中也有一定量的表达,为了研究CREB对APP基因表达的影响,我们利用CRISPR/Cas9技术将HT22细胞中CREB基因进行敲除,构建了CREB基因敲除的细胞系。通过观察在去除CREB的情况下,APP在细胞中的表达情况,从而来探讨CREB对APP基因表达的影响。我们的实验结果表明,在去除了CREB之后,小鼠海马神经元细胞中APP水平明显增高,在Neuro-2A细胞中,CREB过表达之后,APP水平也有所降低,并且具有统计学意义。这说明,CREB对APP基因的表达有下调作用,目前还未见有类似的实验报导。Pugazhenthii等^[10]的研究发现,在

AD病人的大脑中和用A β 处理的大鼠海马神经元中,CREB的表达是下调的。这说明,CREB在AD的发病过程中可能起着某种重要的作用。本研究的另一个发现,当去除小鼠海马神经元中的CREB时,APP的表达明显增高。由此可见,CREB对APP的表达有一定的下调作用,其详细的机制目前还不是十分清楚,仍然需要进一步的研究。

pX459质粒是目前应用比较广泛的一种二合一质粒,它将sgRNA的转录和Cas9的表达集于一身,在操作上有很大的方便性。sgRNA的转录是在U6启动子的控制下进行的,其sgRNA一般可以克隆在该启动子下游的两个Bbs I酶切位点之中,当用Bbs I酶对pX459载体进行线性化处理之后,它可以形成无法自环化的黏性末端,与sgRNA相对应的寡核苷酸的设计可以利用这个特点,在寡核苷酸的末端添加上与黏性末端互补的碱基,退火之后非常容易进行连接和克隆。此外,该质粒还含有嘌呤霉素抗性,这对于稳定的细胞系的构建也是非常有益的。本研究利用这一特点,将克隆成功的质粒转染到小鼠海马神经元细胞HT22中,并通过嘌呤霉素的筛选,构建了稳定的CREB基因敲除的细胞系,并且通过qPCR和Western blot实验验证了基因敲除的效率能达到90%以上,说明利用CRISPR/Cas9技术来实现目的基

因的敲除是一种非常方便且高效的方法。

参考文献 (References)

- 1 Wang L, Hu XH, Huang ZX, Nie Q, Chen ZG, Xiang JW, *et al.* Regulation of CREB functions by phosphorylation and sumoylation in nervous and visual systems. *Curr Mol Med* 2016; 16(10): 885-92.
- 2 Dash PK, Hochner B, Kandel ER. Injection of the cAMP-responsive element into the nucleus of Aplysia sensory neurons blocks long-term facilitation. *Nature* 1990; 345(6277): 718-21.
- 3 Bolotin A, Quinquis B, Sorokin A, Ehrlich SD. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Mol Neurobiol* 2011; 44(3): 330-49.
- 4 Mantamadiotis T, Lemberger T, Bleckmann SC, Kern H, Kretz O, Martin VA, *et al.* Disruption of CREB function in brain leads to neurodegeneration. *Nat Genet* 2002; 31(1): 47-54.
- 5 Teich AF, Nicholls RE, Puzzo D, Fiorito J, Purgatorio R, Fa M, *et al.* Synaptic therapy in Alzheimer's disease: A CREB-centric approach. *Neurotherapeutics* 2015; 12(1): 29-41.
- 6 Faivre E, Holscher C. Neuroprotective effects of D-Ala (2) GIP on Alzheimer's disease biomarkers in an APP/PS1 mouse model. *Alzheimers Res Ther* 2013; 5(2): 20.
- 7 Rumble B, Retallack R, Hilbich C, Simms G, Multhaup G, Martins R, *et al.* Amyloid A4 protein and its precursor in Down's syndrome and Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 1989; 320(22): 1446-52.
- 8 Johnson SA, McNeill T, Cordell B, Finch CE. Relation of neuronal APP-751/APP-695 mRNA ratio and neuritic plaque density in Alzheimer's disease. *Science* 1990; 248(4957): 854-7.
- 9 Satoh J, Tabunoki H, Arima K. Molecular network analysis suggests aberrant CREB-mediated gene regulation in the Alzheimer disease hippocampus. *Dis Markers* 2009; 27(5): 239-52.
- 10 Pugazhenth S, Wang M, Pham S, Sze CI, Eckman CB. Downregulation of CREB expression in Alzheimer's brain and in Abeta-treated rat hippocampal neurons. *Mol Neurodegener* 2011; 6: 60.
- 11 Bolotin A, Quinquis B, Sorokin A, Ehrlich SD. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology* 2005; 151(Pt 8): 2551-61.
- 12 Jinek M, Jiang F, Taylor DW, Sternberg SH, Kaya E, Ma E, *et al.* Structures of Cas9 endonucleases reveal RNA-mediated conformational activation. *Science* 2014; 343(6176): 1247997.
- 13 Horvath P, Barrangou R. CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. *Science* 2010; 327(5962): 167-70.
- 14 Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 2012; 337(6096): 816-21.
- 15 Urnov FD, Miller JC, Lee YL, Beausejour CM, Rock JM, Augustus S, *et al.* Highly efficient endogenous human gene correction using designed zinc-finger nucleases. *Nature* 2005; 435(7042): 646-51.
- 16 Sander JD, Joung JK. CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. *Nat Biotechnol* 2014; 32(4): 347-55.
- 17 Hwang WY, Fu Y, Reyon D, Maeder ML, Tsai SQ, Sander JD, *et al.* Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. *Nat Biotechnol* 2013; 31(3): 227-9.