

应用CRISPR/Cas9技术敲除小鼠海马神经元中 *Pura*基因可减弱神经元对DNA损伤的修复作用

张冰莹^{1,2} 郭姗姗¹ 石晓光¹ 何文欣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 人转录活化因子*Pura*是体内重要的转录因子, 在体内多个环节中都发挥着重要的作用, 尤其是在神经系统中, 它与神经元的发育, 突触形成都有很密切的关系。该文通过构建*Pura*基因敲除的小鼠海马神经元细胞系来观察其在DNA损伤修复中的作用。根据目的基因靶向删除外显子的位置设计相应的sgRNA序列, 合成相应的寡核苷酸后克隆在pSpCas9(BB)-2A-Puro(PX459)V2.0质粒载体相应位点上, 从而构建能对*Pura*基因进行敲除的CRISPR/Cas9质粒, 将构建好的质粒通过酶切和测序进行鉴定, 将经过鉴定证实相位正确及在有sgRNA序列插入的阳性质粒转染到小鼠海马神经元(HT22)细胞中, 加入嘌呤霉素进行抗性筛选, 保留正常生长的细胞进行培养, 从而建立能稳定地进行*Pura*基因敲除的细胞系。通过Real-time PCR和Western blot技术分别在转录和翻译水平上检测*Pura*基因的表达情况, 从而来判定*Pura*基因的敲除效率; 将所构建的*Pura*基因敲除的细胞用羟基脲(HU)进行处理来建立细胞DNA损伤的实验模型, 通过Western blot、脉冲电场反转凝胶电泳实验及细胞毒性实验观察*Pura*在DNA损伤修复中的作用。实验结果证实, 所插入片段相位正确。通过TA克隆测序和T7E1酶切证实所构建的质粒具有良好的CRISPR/Cas9活性, 可导致基因组碱基发生突变, Real-time PCR和Western blot实验结果证实, *Pura*基因敲除组的*Pura*基因表达明显降低。*Pura*基因敲除后, 细胞对HU引起的DNA损伤极为敏感, 说明*Pura*在维持基因组DNA的完整性方面发挥着重要的作用, 是细胞中一种不可或缺的蛋白质。该实验结果还提示, 利用CRISPR/Cs9技术可以有效地对目的基因进行敲除, 同时由于该质粒携带有嘌呤霉素抗性基因, 利用这一特点, 可以方便地建立稳定的细胞系, 该细胞系可用作研究*Pura*基因在神经元中的生物学功能的细胞模型。

关键词 CRISPR/Cas9; *Pura*; 基因敲除; 羟基脲; 细胞损伤修复

Knock Out *Pura* Gene in Mouse Hippocampus Neuronal Cells with CRISPR/Cas9 Techniques Could Deteriorate Its DNA Repair Effects of the Neuron

Zhang Bingying^{1,2}, Guo Shanshan¹, Shi Xiaoguang¹, He Wenxin¹, 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)

收稿日期: 2017-11-16 接受日期: 2018-02-07

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: 15296900235, E-mail: jianqi@gmail.com

Received: November 16, 2017 Accepted: February 7, 2018

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

*Corresponding author. Tel: +86-15295130235, E-mail: jianqi@gmail.com

网络出版时间: 2018-05-15 18:16:38

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20180515.1816.030.html>

Abstract Human transcriptional activator Pura is an important transcriptional factor in the body and plays important roles in many aspects, especially in the nervous system. Pura is closely associated with the neuronal development and the formation of the synaptic plasticity. With establishment of stable Pura gene knock-out mouse hippocampus neuronal cell lines, the current study observed the effects of Pura on damaged DNA repair. According to the exon position in the targeted gene, the oligonucleotides with corresponding sgRNA sequences were designed, and the synthesized oligonucleotides were cloned into the corresponding cloning sites of the pSpCas9 (BB)-2A-Puro (PX459) V2.0 plasmid so that Pura gene knocked out plasmids were established. The positive clones were selected and identified with endonuclease cutting and sequencing analysis and then the plasmids with correct ORF and sgRNA insert were transferred into mouse hippocampus neuronal cells (HT22), and selected with purimycin, the survived cells were kept for the further cultivation and the stable cell lines with Pura gene knocked out were established. The Real-time PCR and Western blot analysis were employed to check the expression levels of Pura gene in transcriptional and translational levels respectively so that the efficiency of Pura gene knock out were evaluated. The established cell lines were treated with HU to build the experimental model of DNA damage. The effects of Pura on DNA damage were observed with Western blot assay, pulse field reverse electrophoresis as well as the cellular proliferation and cytotoxicity test analysis. The experimental results demonstrated that the inserted fragment with correct ORF. The TA cloning sequences and T7E1 endonuclease cutting proved that the constructed plasmids possesses the ideal and effective CRISPR/Cas9 activities and could cause the base mutation of the genomic DNA, the results of Real-time PCR and Western blot assay confirmed that Pura gene expression decreased remarkably in the gene knock out cells. The cells were much more sensitive to HU induced DNA damage when Pura gene has been knocked out. It indicated that that the Pura plays an important roles in the maintenance of integrity of genomic DNA. It might be an indispensable protein in the cells. The current results suggested that the targeted gene could be effectively knocked out with CRISPR/Cas9 techniques and at the meantime, since the plasmid carries the purimycin resistance gene. It is easy and convenient to establish the stable cell line with this characteristics. The established cell line could be used as an effective cell model for the investigation of the biological effects of Pura gene in neuronal cells.

Keywords CRISPR/Cas9; Pura; gene knock out; HU; DNA damage and repair

Pura是一种广泛存在于体内,并且能与核酸结合的蛋白质。最初的研究发现,Pura结合于小鼠髓磷脂碱性蛋白(myelin basic protein, MBP)基因启动子的DNA特异序列上,根据这个特性,人们首先从小鼠的大脑中纯化到这种蛋白质^[1-2]。Pura的氨基酸序列十分保守,人类Pura含有322个氨基酸,与小鼠Pura蛋白质序列相比仅有两个氨基酸不同^[3-5]。Pura几乎在所有后生动物组织中表达^[6],它是一种多功能蛋白质,既能与DNA结合,也可以与RNA结合,在DNA复制、mRNA转录和蛋白质翻译等过程中都发挥着不同程度的作用^[6-9]。此外,近来研究还发现,Pura在DNA损伤修复方面也发挥着一定的作用^[10-12],这在维持神经系统基因组的稳定性方面有着一定的意义。体内由于DNA损伤无法修复或者修复能力不足,使得细胞内的损伤堆积,从而刺激细胞重新进入

细胞周期。神经细胞是有丝分裂后的细胞,由于缺乏相应的细胞周期蛋白和细胞周期蛋白激酶,无法完成细胞周期过程,重新进入细胞周期的神经元的命运只有一个,细胞凋亡,这也是神经变性型疾病产生的原因之一^[10]。

Pura蛋白质在神经系统的发育过程中发挥着重要的作用,尤其是和神经元的发育以及突触可塑性的形成都有着密切的关系^[9],Pura的缺乏或基因的突变可引起神经系统的发育不良,并导致许多先天性神经系统疾病的发生,譬如5q31.3微缺失综合征和X-脆性综合征^[9,13-16]。已经有两个不同的实验室分别报道了Pura基因敲除的基因鼠的构建^[17-18],但遗憾的是两个实验模型却不尽相同且多有矛盾之处,Khalili等^[17]的报道发现,Pura基因敲除之后小鼠在出生后4周死亡。而Hokkanen等^[18]却发现,Pura

基因敲除的动物会产生巨脑症, 却不会死亡。但都一致认为, *Pura* 的缺乏对神经系统的发育产生明显的影响^[17-18]。目前关于 *Pura* 在DNA损伤与修复中的作用机制的研究并不多见, 特别是在中枢神经系统中。Wang等^[11-12]使用小鼠胚胎成纤维细胞(mouse embryonic fibroblast, MEFs)的模型, 提供了 *Pura* 涉及到应答DNA复制应激中的作用的证据以及 *Pura* 蛋白在DNA同源重组修复中的作用, 但 *Pura* 在神经元中对DNA损伤的修复作用的机制未见报道。

本研究利用CRISPR/Cas9技术, 成功地构建了用于 *Pura* 基因敲除的pSpCas9(BB)-2A-Puro(PX459)V2.0质粒载体, 根据 *Pura* 基因序列及蛋白质特点, 在其蛋白质保守区对应的外显子前1/3区域设计了三段sgRNA, 并将其成功插入到载体中, 鉴定成功后又转染到小鼠海马神经元细胞(HT22)中, 通过嘌呤霉素筛选, 成功构建了稳定的 *Pura* 基因敲除的小鼠海马神经元细胞系。利用羟基脲对该细胞系进行处理, 建立了体外神经元DNA损伤的模型; 然后通过一系列的实验分析, 在分子水平和细胞水平上观察了 *Pura* 蛋白在损伤的DNA修复中的作用, 初步探讨了 *Pura* 蛋白质对维持中枢神经系统基因组的稳定性以及神经变性型疾病的发病机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒、细胞和菌株 pSpCas9(BB)-2A-Puro(PX459)V2.0质粒购自addgene.org。HT22细胞为本实验室保存。感受态细胞DH5 α 购自北京聚合美生物科技有限公司。细胞培养所用的DMEM培养液以及小牛血清、青霉素、链霉素、双抗均购自BioInd公司。细胞培养于37 °C、5% CO₂的细胞培养箱中。所有细胞培养过程中的操作均在装备有层流无菌系统的超净工作台内进行。

1.1.2 试剂 Fast Digest *Bbs* I购自Fermentas公司。T4 Ligase购自NEB公司。质粒提取试剂盒、Total RNA提取试剂盒及全基因组DNA提取试剂盒购自Omega Bio-tek公司。DNA凝胶回收试剂盒购自北京康为世纪生物科技有限公司。Lipofectamine™ 2000转染试剂购自Invitrogen公司。Opti-MEM培养基购自ThermoFisher公司。兔源 *Pura* 抗体购自Abcam公司。鼠源GAPDH、抗鼠、兔荧光二抗购自北京中杉金桥生物技术有限公司。RNA逆转录试剂盒购自ABM公司。Real-time PCR荧光Mix购自DBI公司。

1.2 引物设计及测序

本实验的引物分别由苏州金维智生物科技有限公司和生工生物工程股份有限公司合成, 测序由苏州金维智公司完成。

1.2.1 sgRNA的设计 *Pura* 基因只有一个转录本, 并且只有两个外显子, 第一个外显子不编码蛋白质, 第二个外显子的中间一段序列为CDS区(966 bp), 编码蛋白质(321 aa), 分析蛋白质保守区域, 在保守区域选择三段不同的CDS序列作为CRISPR的靶点(Oligo-1、Oligo-2和Oligo-3)sgRNA结构模式(20 nt)为G(A)NN……NNN(NGG), 选择分值高的sgRNA序列, 在其两端加上酶切位点。在每条sgRNA序列的F链5'端加上CACCG, R链5'端加上AAAC, 3'端添加一个C(表1)。

1.2.2 插入或者缺失序列突变(insertion-deletion, Indel)检测引物设计 为了检测我们所设计的用于 *Pura* 基因敲除的sgRNA序列是否有效, 我们根据sgRNA位于基因组DNA上的位置, 分别设计了短链PCR引物(用于TA克隆和序列分析以检测是否有突变产生, 目的产物的长度约300 bp)和长链PCR引物(用于T7E1酶切, 长度约600 bp)。

1.3 敲除质粒的构建

1.3.1 CRISPR/Cas9-*Pura*质粒的构建 将

表1 *Pura* sgRNA寡核苷酸序列

Table 1 The oligonucleotide sequences of *Pura* sgRNA

名称 Name	DNA序列(5'→3') Sequences DNA (5'→3')
Oligo-1	Oligo-1-F: CAC CGC GTG GAG TTC CGC GAC TACC
	Oligo-1-R: AAA CGG TAG TCG CGG AAC TCC ACG
Oligo-2	Oligo-2-F: CAC CGC ATC GAG TTC CGT GAC GCTC
	Oligo-2-R: AAA CGA GCG TCA CGG AAC TCG ATG
Oligo-3	Oligo-3-F: CAC CGG CTC ATC GAC GAC TAT GGAG
	Oligo-3-R: AAA CCT CCA TAG TCG TCG ATG AGCG

表2 检测Indel突变的PCR引物

Table 2 The PCR primer for detection of Indel mutation

名称 Name	DNA序列(5'→3') Sequences DNA (5'→3')
Short-chain	
Pura-1-F	GTG ATG GAG TTG CGG TAG
Pura-1-R	CTC AAG AGC GAG TTC CTG
Pura2&3-F	TTG ACT GTC TGG CGG ATG
Pura2&3-R	CTA CCT GGA CGT GAA GCA
Long-chain	
Pura2&3-F	AGT TGG TGG AGG TTC TGT
Pura2&3-R	GTA CTA CAT GGA TCT CAA GGA

pSpCas9(BB)-2A-Puro(PX459)V2.0质粒载体用*Bbs* I酶切,回收纯化后分别与设计的且经过退火处理后的三组寡核苷酸片段按1:5的比例用T4连接酶,在16 °C过夜连接,连接后将连接产物转化到DH5 α 感受态中,铺板培养。

1.3.2 CRISPR/Cas9-Pura α 质粒的鉴定 由于PX459载体质粒上有两个*Bbs* I内切酶位点,用*Bbs* I酶切后会形成非黏性末端,从而不会产生自环化,因此平板上长出的克隆基本上都是阳性克隆。挑取平板上的单克隆菌落培养,提取质粒,为了慎重起见,我们仍然通过酶切和序列分析进行鉴定,以确保sgRNA寡核苷酸片段均正确地插入在相应的酶切位点上。

1.3.3 Indel突变检测 TA克隆序列分析:将所构建的质粒经用Lipofectamine™ 2000转染进HT22细胞中,转染方法按试剂说明书进行。转染48 h后,提取全基因组DNA。用所提取的基因组DNA做模板,用相应的短链PCR引物进行扩增,将所扩增的产物进行纯化,并在其末端添加腺嘌呤核苷酸后(加A)与PUC-T载体连接,转化,铺板培养。通过蓝斑筛选挑取阳性克隆,每组挑选至少20个阳性克隆进行培养,提取质粒进行测序分析,检查有否突变。

T7E1酶切鉴定:如上所述,用所提取的基因组DNA做模板,用相应的长链PCR引物进行扩增,将所扩增的产物进行纯化,退火处理后,用T7E1酶进行酶切,然后通过琼脂糖凝胶电泳进行鉴定。

1.4 建立稳定的Pura基因敲除的细胞系

转染前24 h,将HT22细胞以每孔 2.5×10^5 个细胞的密度接种于6孔板,使得在转染当天细胞汇合度(confluence)为70%~90%,转染过程按Lipofectamine™ 2000说明书进行操作。转染四组分别为PX459(对照组)、CRISPR/Cas9-Pura-1、

CRISPR/Cas9-Pura-2、CRISPR/Cas9-Pura-3(*Pura*基因敲除组)。转染48 h后,加入适当浓度的嘌呤霉素进行筛选。根据前期实验,使用浓度为8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的嘌呤霉素处理7天可将未转染的细胞全部杀死,所以本研究使用终浓度为8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的嘌呤霉素来进行转染筛选。将经过筛选后生存稳定的细胞进行有限稀释,以每孔大约一个细胞的密度铺在96孔板中,置于培养箱中,待细胞长满后,进行传代,使用含6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的培养基扩大培养以及用于后续的实验。

1.5 总RNA提取、RNA逆转录及Real-time PCR测定Pura的表达

1.5.1 总RNA的提取 用Ambion公司生产的TRIZOL结合Omega Bio-tek公司生产的RNA提取试剂盒来提取总RNA。提取RNA后测定浓度及RNA纯度, D_{260}/D_{280} 在2.0左右可以进行后续逆转录实验。

1.5.2 RNA逆转录获取cDNA 使用ABM公司生产的逆转录试剂盒进行cDNA的第一条链的合成。将反应物混匀,置于Bio-Rad S1000 PCR仪中反应42 °C 1 h; 70 °C 5 min,得到反应产物cDNA可立即用于Real-time PCR实验,也可保存在-80 °C冰箱备用。

1.5.3 Real-time PCR 使用DBI Bioscience公司的Bestar qPCR Master Mix SYBR GREEN试剂和上述合成的用DNase-free水稀释后的cDNA使用Bio-Rad CF96实时荧光定量PCR仪进行PCR扩增(表3)。

1.6 Western blot

从所构建的*Pura*敲除的细胞系(Pura-3-2,经检测此细胞系的*Pura*基因敲除的效果为最好,所有实验均以此细胞系来进行)及相应的对照HT22细胞中提取总蛋白质,去除细胞培养液,加入PBS洗涤细胞,然后加裂解液裂解细胞,每隔5 min震荡30 s,5次

表3 用于检测细胞中*Pura*表达水平的Real-time PCR引物序列Table 3 The primer sequences of Real-time PCR to detect the expression of *Pura* in cells

名称 Name	序列(5'→3') Sequences (5'→3')
Pura-F	CGT GTT TAT GCG AGT GAG
Pura-R	CCT CTG CTT CTC TTG AATC
GAPDH-F	GAG TCA ACG GAT TTG GTC GT
GAPDH-R	GAC AAG CTT CCC GTT CTC AG

后以15 000 r/min离心15 min, 收集上清。测定蛋白质浓度(保证相关系数在0.99以上为准)后, 将蛋白质按比例与蛋白质上样Loading buffer和水混合后置于100 °C金属浴5 min使蛋白变性, 然后进行Western blot, 每孔上样蛋白质为50 μg。电泳结束后, 转膜, 用含5%脱脂奶粉的TBS溶液进行封闭1 h, 然后加入用5%脱脂奶粉的TBS液稀释的一抗(1:1 000)于4 °C孵育过夜, 次日用TBS液洗膜, 然后加荧光二抗常温孵育2 h后, 在Odyssey CLX仪器上进行灰度扫描。

1.7 DNA损伤模型的构建

将所构建的*Pura*基因敲除的细胞系和其相对应的野生型细胞系分别种在8个60 mm平皿中, 次日换成含0.5%血清的培养基继续培养16 h以使细胞同步化, 同步化后换成正常的细胞培养液并加入终浓度为2 mmol/L的羟基脲对细胞进行处理。分别取处理后0、3、6、9 h的细胞, 提取细胞总蛋白质, 通过Western blot检测DNA损伤标志蛋白质γH2AX的变化, 来观察*Pura*在DNA损伤修复中的作用。

1.8 脉冲电场反转凝胶电泳

将所构建的*Pura*基因敲除的细胞系和其相对应的野生型细胞系分别种在8个60 mm平皿中, 次日换成含0.5%血清的培养基培养16 h对细胞进行同步化, 第3天换成正常的细胞培养液并加入羟基脲使终浓度为2 mmol/L, 分别取处理后0、3、6、9 h的细胞, 提取全基因组DNA。进行脉冲电场反转凝胶电泳, 方法见参考文献[33]。观察基因组DNA损伤后所释放的游离DNA片段(the fraction of DNA released, FDR)。

1.9 CCK-8细胞增殖与细胞毒性检测

在96孔板中配置100 μL的细胞悬液(1×10^4 /孔)。将培养板在培养箱预培养24 h(37 °C、5% CO₂); 向细胞内加入10 μL HU溶液使得终浓度分别为0、0.25、0.50、1.00、1.50、2.00、3.00 mmol/L, 然后置于培养箱继续培养。培养18 h后加入10 μL

CCK-8溶液继续培养1 h, 然后于波长450 nm处检测吸光度, 从而确定细胞增殖情况。

1.10 数据处理及统计学分析

每次实验至少重复3次, Real-time PCR结果将CQ值转换为 $2^{-\Delta\Delta Cq}$ 值后进行比较, Western blot结果用ImageJ软件处理, 测定灰度值用内参校正, 分析测定灰度值后进行统计学处理。应用GraphPad Prism软件进行统计学分析并作图, $P < 0.05$ 为具有统计学意义。

2 结果

2.1 CRISPR/Cas9-*Pura*基因敲除质粒构建和鉴定

pSpCas9(BB)-2A-Puro(PX459)V2.0质粒载体(简称PX459)的结构中多克隆位点所含的*Bbs* I酶切位点的特点已如上文所述。将实验所选取的阳性克隆, 通过酶切鉴定和测序分析, 确定了CRISPR/Cas9-*Pura*质粒构建成功。根据所插入片段序列的特异性, 我们对其进行相应的酶切(CRISPR/Cas9-*Pura*-1用*Dra* III酶切, CRISPR/Cas9-*Pura*-2用*Bbs* I酶切, CRISPR/Cas9-*Pura*-3用*Bsr*F I酶切), 利用这些特点, 我们首先用相应的内切酶对所挑选的阳性克隆进行初步筛选, 以确定所挑克隆的正确, 然后进一步通过序列分析来做最后的确认, 通过酶切分析和序列分析, 我们所构建的3个*Pura*基因敲除的CRISPR/Cas9质粒序列完全正确(图1)。

2.2 sgRNA活性检测

为了检测我们所设计的sgRNA的有效性, 我们利用CRISPR/Cas9在基因编辑方面的作用原理, 即sgRNA引导Cas9酶在对靶向基因切除的过程中, 体内会产生非同源末端连接, 在此过程中会形成基因的缺失或突变。我们设计了两组不同的PCR引物, 来进行横跨突变区的长链和短链PCR扩增以检测有无Indel。经过短链PCR所扩增的产物克隆到TA克隆载体中, 通过序列分析来检查有否突变存在, 长链

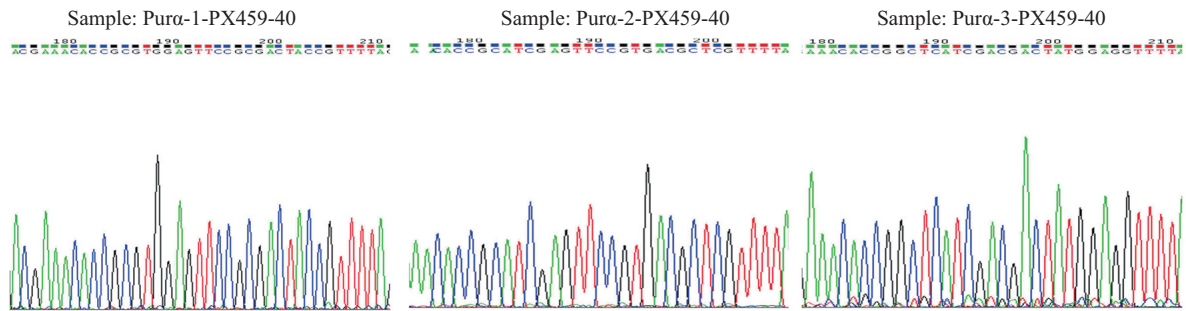


图1 CRISPR/Cas9-Pura-1、-2、-3质粒测序鉴定

Fig.1 The results of sequencing analysis for CRISPR/Cas9-Pura-1, -2, -3 plasmids

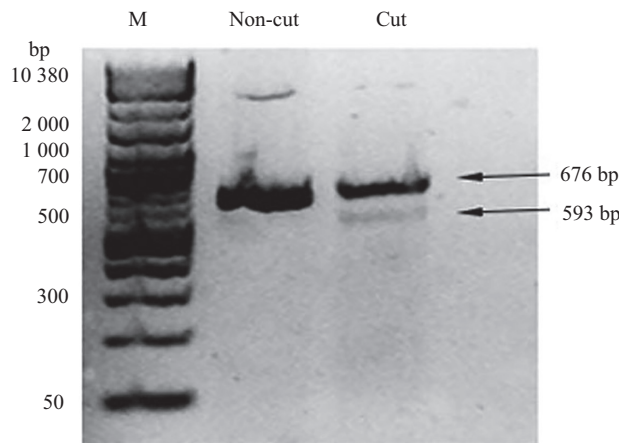
Sequence ID: NC_000084.6

Forward: CGATTCTACCTGGACGTGAAGCAGAACGCTAAGGGCCGTTTCCTGAAGATCGCAGAGGTG
CGTTTCTACCTGGACGTGAAGCAGAACGCTAAGGGCCGTTTCCTGAAGATCGCAGAGGTG

Reverse: TGGCATCTTCAGGAAACGGCCCTTAGCGTTCTGCTTCACGTCCAGGTAGAAATCG
TGGCATCTTCAGGAAACGGCCCTTAGCGTTCTGCTTCACGTCCAGGTAGAAACG

图2 Indel突变测序结果

Fig.2 The results of sequencing analysis for Indel mutation



M: 标准。
M: marker.

图3 T7E1酶切结果

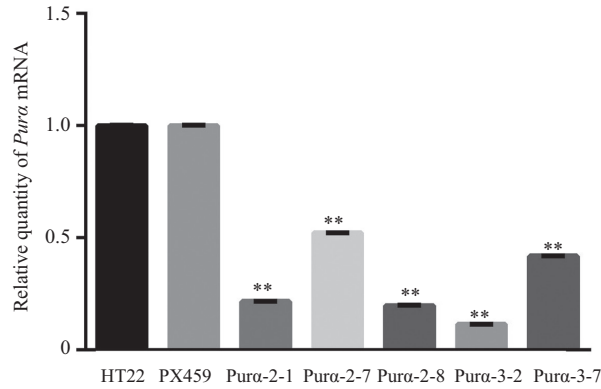
Fig.3 The result of T7E1 enzyme digestion

PCR产物可以通过T7E1酶切来进行分析, T7E1酶可以特异性地识别由正常链和突变链所形成的杂合双链, 所以将长链PCR产物进行退火后, 再用T7E1酶切, 即可检测是否有突变体的形成。实验结果证实, 短链PCR产物经过TA克隆后测序分析发现, 有A/T的突变形成(图2)。长链PCR产物经过退火后用T7E1酶切分析, 同样检测到了突变的存在(图3)。

2.3 细胞系中Pura基因敲除效率检测

从构建好的CRISPR/Cas9-Pura细胞系以及其

对照PX459和HT22细胞中中提取细胞总RNA和细胞总蛋白质, 分别进行Real-time PCR和Western blot实验来检测细胞内Pura基因的表达情况。Real-time PCR的实验结果表明, 与对照组相比, Pura基因敲除的细胞系中Pura mRNA水平明显降低, 其中以CRISPR/Cas9-Pura-3-2效率最好(图4)。Western blot实验结果证实, Pura蛋白质水平与RNA水平检测的结果一致(图5), 说明所构建的细胞系Pura基因敲除效率良好。

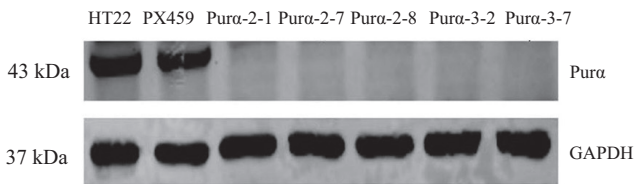


** $P < 0.05$, 与对照组HT22相比, $n = 3$ 。

** $P < 0.05$ vs control group (HT22 group), $n = 3$ 。

图4 Real-time PCR测定CRISPR/Cas9-*Pura*细胞系*Pura* mRNA水平

Fig.4 The level of *Pura* mRNA in CRISPR/Cas9-*Pura* cell lines by Real-time PCR

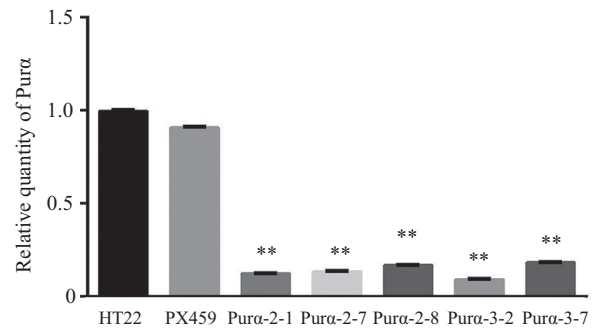


** $P < 0.05$, 与对照组HT22相比, $n = 3$ 。

** $P < 0.05$ vs control group (HT22 group), $n = 3$ 。

图5 CRISPR/Cas9-*Pura*细胞系Western blot结果

Fig.5 The level of *Pura* protein in the different cell lines by Western blot



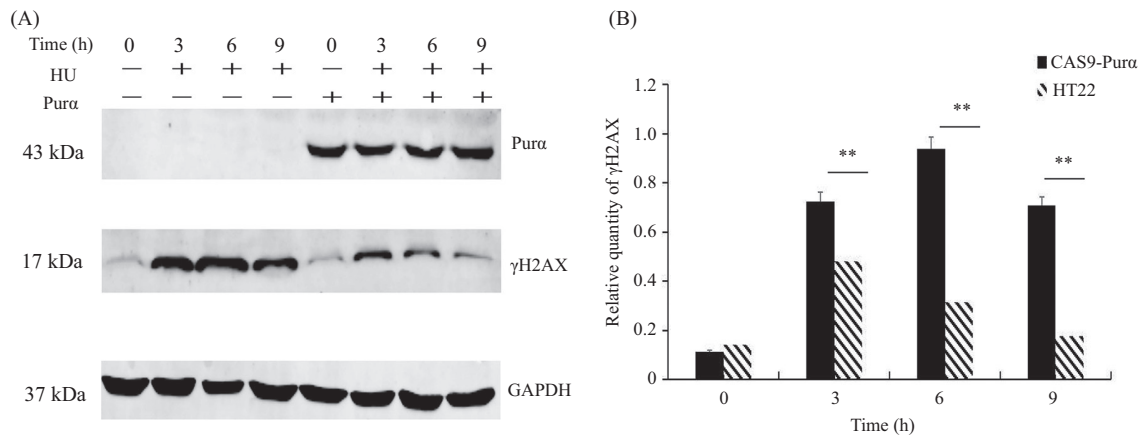
2.4 *Pura*在DNA损伤修复中的作用

为了观察*Pura*在DNA损伤修复中的作用,用羟基脲(HU)处理细胞,造成DNA损伤的模型。HU可抑制核糖核苷酸还原酶来耗竭DNA合成所需的三磷酸脱氧核苷池(dNTPs),结果导致DNA复制的终止,长期处理可能会引起复制叉崩塌,从而间接引起DNA损伤。然后,观察在正常的小鼠海马神经元细胞和将*Pura*基因敲除的小鼠海马神经元细胞中,在不同的时间点, DNA损伤的改变。首先我们检测了DNA损伤标志性蛋白质 γ H2AX的表达情况。结果发现,在0 h时间点,未用羟基脲处理的对照组HT22细胞和*Pura*敲除组细胞系中, DNA损伤标志蛋白质含量很低;而随着损伤时间的延长, *Pura*基因敲除组细胞中 γ H2AX的含量在各个不同的时间点都要比其正常对照组的含量增多,说明*Pura*基因敲除后,细胞对羟基脲所造成的DNA损伤更为敏感(图6)。这就表明, *Pura*蛋白质对羟基脲造成的DNA损伤有保护

作用。脉冲电场反转凝胶分析(pulse field inversion gel analysis)结果同样表明, *Pura*基因敲除后,细胞经羟基脲处理之后,所释放的DNA片段(fraction of DNA released, FDR)要明显多于对照组,说明*Pura*基因敲除后,当用羟基脲处理细胞后,细胞基因组中的DNA双链断裂(double stranded DNA breaks, DSBs)明显增多(图7)。CCK-8细胞增殖与细胞毒性实验也表明,与对照组相比,当*Pura*基因敲除后,细胞的活力明显下降(图8),而且增殖速度明显减缓。所有这些结果都表明, *Pura*蛋白质在维持基因组DNA的稳定性方面发挥着极为重要的作用。

3 讨论

*Pura*是一种多功能蛋白质,它可以一种序列特异性的方式结合于单链核酸上,同时,在整个进化过程中,包括从细菌到人, *Pura*在结构上都非常保守,人与小鼠仅有两个氨基酸不同^[7]。通常认为, *Pura*

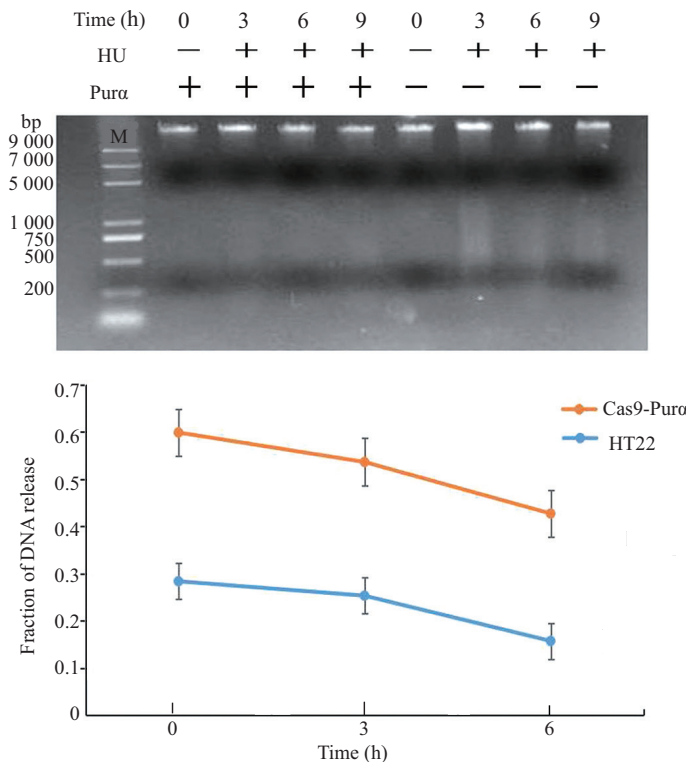


A: Western blot检测2.00 mmol/L羟基脲处理的细胞中 γ H2AX水平; B: Western blot分析统计结果, ** $P < 0.05$, 与对照组HT22相比, $n = 3$ 。

B: the contents of γ H2AX in 2.00 mmol/L HU treated cells detected by Western blot; B: statistical analysis of Western blot results, ** $P < 0.05$ vs control group (HT22 group), $n = 3$.

图6 Pura在DNA损伤修复中的作用

Fig.6 The effects of Pura in the damaged DNA repair



A: 脉冲电场反转凝胶分析DNA修复的动力学变化。Pura基因敲除细胞和正常对照组细胞用2.00 mmol/L羟基脲处理后, 然后按图示不同的时间点收集细胞进行脉冲电场反转凝胶分析。B: 灰度分析结果。每个孔所释放的游离片段(FDR)代表着DNA双链断裂的情况。

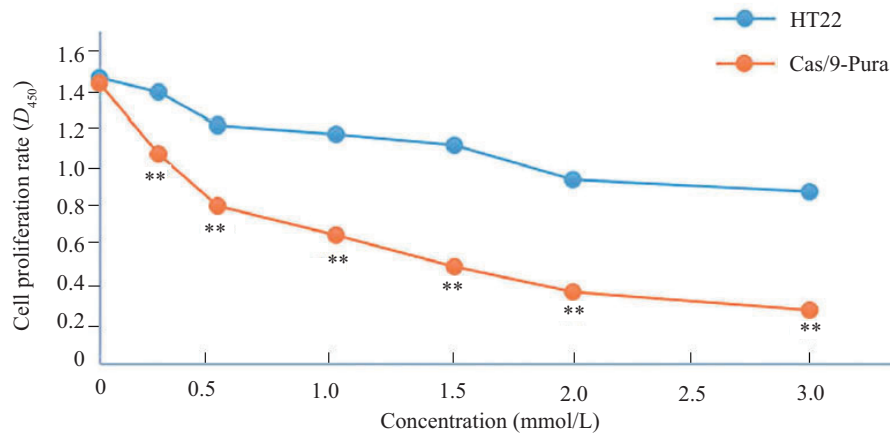
A: pulse field inversion gel analysis of DNA repair kinetics in Pura knock out cells and control HT22 cells when treated with 2.00 mmol/L HU and collected in the indicated time points. B: the results of its densitometry analysis. The fraction of genomic DNA released (FDR) from the well into gel represents the measure of DSBs.

图7 脉冲电场反转凝胶分析检测羟基脲处理过的细胞中DNA损伤

Fig.7 Pulse field inversion gel analysis to detect the DNA damage in the cells treated with HU

是一种序列特异性单链DNA和RNA结合蛋白质, 利用此特性, 最初根据它与单链DNA上GGNGGN序列有很高的亲合性而将其克隆出来^[3-4]。Pura在DNA复制和基因转录方面发挥着很重要的作用^[6-8,25], 同

时也有研究发现, Pura在海马神经元树突中将目标mRNA转运到特定的蛋白质翻译区域发挥着重要的作用^[26]。虽然, Pura在体内广泛表达, 但它却表现了对发育和组织特异性的调控功能^[1,17]。譬如在



** $P < 0.01$, 与对照组(0 mmol/L)比较, $n=3$ 。

** $P < 0.01$ vs control group (0 mmol/L), $n=3$ 。

图8 CCK-8细胞增殖与细胞毒性实验结果

Fig.8 The results of CCK-8 cell proliferation and cytotoxicity test

胚胎发育期间,小鼠大脑中的Pura的表达水平维持在一个比较低的水平,但在出生后的第一周,Pura的表达水平急剧升高,在出生后的第18天达到峰值,然后Pura就保持在一个相对比较高的水平,直到成年。也有研究发现,Pura除了在核内发挥重要作用之外,在神经元的胞质中,也检测到了大量的Pura蛋白质的存在,Pura与多核糖体,核不均一核糖核蛋白(heterogeneous nuclear ribonucleoproteins, hnRNP)以一种复合物的形式存在于树突的分枝点处^[27]。Pura在维持基因组DNA的稳定性方面也发挥着重要的作用,而且在一些特定的组织有特异性的表达。在中枢神经系统,已证实Pura主要参与mRNA翻译与转运等具体机制^[28-29]。还有研究发现,Pura基因的突变可引起一种叫做5q31.3微缺失综合征的遗传性疾病,表现为严重的新生儿肌张力减退、癫痫和脑病^[30]。Hunt等^[31]通过家系的全基因组测序,发现了一种新的Pura基因突变可引起严重的神经发育方面的迟滞、学习障碍、新生儿肌张力减弱、吞食困难、运动异常以及癫痫发生,帮助我们澄清了在上述的5q31.3微缺失综合征中Pura蛋白质所起的作用。也有文献报道,Pura与前列腺癌患者的内质网应激和细胞分化有关^[32]。作为一种核转录因子,Pura还可以与神经细胞中的RNA颗粒结合,从而抑制蛋白质翻译^[1]。我们以前的研究也发现,在体外培养的人神经胶质瘤细胞(U87MG)中过表达Pura,可以增强细胞抵抗外源性基因毒剂所致的DNA损伤^[33]。以上说明Pura是一种多功能的转录因子,在体内多个环节都以挥着重要的作用,特别是在神经系统的作用越

来越引起人们的重视^[9]。

本研究利用CRISPR/Cas9技术,首次成功地在细胞水平上敲出了Pura基因,并在小鼠海马神经元细胞系HT22中成功地建立了稳定的Pura基因敲除的细胞系,同时也观察了在DNA损伤毒性剂羟基脲所造成的细胞DNA损伤模型中Pura对细胞的保护作用,这是十分有意义的。长期以来,由于Pura基因敲除小鼠的表型存在着不一致的现象^[17-18],有关Pura对神经元的DNA损伤和修复的作用机制也不是十分清楚^[10],加之神经系统来源的细胞难于用实验室一般常用的化学转染的方法进行外源基因的导入和敲除,RNAi技术也存在着效率和转染等方面的难题,所以选择合适的模型和基因修饰的手段则对目的基因进行修饰直接影响着实验的难度以及实验结果的可信度。所以,CRISPR/cas9技术的出现使这一切都成为可能。我们利用这一技术,成功地构建了对Pura基因进行敲除的CRISPR/Cas9的二合一质粒,并在小鼠海马神经元细胞中实现了对Pura基因的敲除,并建立了稳定的Pura基因敲除的细胞系,可以在细胞水平上,尤其是神经元中来研究Pura的功能,迄今为止,我们还未见到类似的报道。

研究基因功能的重要手段之一是基因定点修饰,也可以用于人类的遗传疾病的治疗,因此这类技术成为了现代分子生物学的研究热点。在CRISPR/Cas9的系统中,sgRNA引导Cas9基因组靶位点进行特异切割后,DNA修复有两种方式:同源重组(homologous recombination, HR)修复和非同源末端连接(non-homologous end joining, NHEJ)修复^[22]。当

不存在同源的DNA时,切割后的DNA会通过非同源末端连接,并在切割位点造成Indel,引发目的基因编码的蛋白发生移码突变以达到对目的基因的敲除。而当有同源DNA片段的存在时,切割后的DNA会发生同源重组,会把外源片段整合到靶基因组的特地位点中,以达到基因敲入、敲除的目的^[23]。因此,本研究尝试使用CRISPR/Cas9系统,设计并筛选出具有高活性的sgRNA,插入敲除载体中,并构建稳定表达的HT22细胞系。

在通常情况下,神经系统来源的细胞,例如HT22细胞,脂质体转染效率不是很高,从而使得有些实验不能达到预期的目的。电转染的效果要比脂质体转染效果好一些,但是实验条件需要反复摸索,而且大部分细胞在电击以后死亡,从根本上影响了实验的进行,所以我们采用脂质体转染后用嘌呤霉素筛选得到细胞系,既可以稳定表达,又排除了细胞死亡带来的影响,有利于后续实验的进行。

在我们以前的研究中发现,Pura对淀粉样前体蛋白基因的表达有抑制作用,间接地降低 β 淀粉样多肽(amyloid β)的形成,这可能在阿尔兹海默病的发生中有一定的作用^[24]。目前,Pura基因敲除小鼠已经建立成功,然而Pura基因敲除的小鼠在出生后3至4周即死亡^[17],这样对于Pura在神经系统中的作用机制的研究方面带来了困难。本研究利用CRISPR/Cas9技术对Pura基因进行敲除并成功建立稳定表达的细胞系,成功地解决了研究Pura在神经系统中的作用机制的研究中所遇到的困难,为本实验室研究Pura在DNA损伤修复中的作用打下了良好的基础。本研究结果证实,在Pura基因敲除之后,小鼠神经元细胞对羟基脲所引起的DNA损伤,相比较于没有进行基因敲除的野生组海马神经元细胞,其DNA损伤标志性蛋白质含量明显增加,说明Pura基因敲除后,细胞本身的DNA修复能力大为减弱。当DNA损伤后,无论是外源的还内源的机制所产生的双链DNA断裂,总会伴随着组蛋白H2AX的磷酸化。H2A是组蛋白H2A家族的变异体,它是核小体中组蛋白八聚体的成分之一。在DNA损伤后,它可以通过PI3K通路中的如ATM和ATR这样的激酶发生磷酸化而形成磷酸化的H2AX,这种磷酸化的H2AX也被称为 γ H2AX,它是DNA损伤后细胞内DNA修复系统在DNA损伤部位所募集的第一个蛋白,所以通常也被认为是DNA损伤的标志性蛋白质。本实验选择

羟基脲作为DNA毒性试剂来建立DNA损伤的模型。羟基脲是一种核苷二磷酸还原酶抑制剂,可以阻止核苷酸还原为脱氧核苷酸,因而选择性地抑制DNA的合成,能抑制胸腺嘧啶核苷酸掺入DNA,并能直接损伤DNA,但对RNA及蛋白质的合成并无抑制作用。羟基脲作用于S期,并能使部分细胞阻滞在G₁/S期的边缘^[35]。我们通过脉冲电场反转凝胶分析实验也证明,在敲除了Pura的细胞中,其基因组DNA中所释放出的损伤DNA片段要明显多于相应的野生型对照组细胞,同样,细胞毒性和增殖实验也证实了Pura在DNA修复中的作用。这些结果都证实,Pura在细胞的DNA损伤和修复方面发挥着重要的作用,它可以促进损伤的DNA快速修复,从而使细胞免于由于双链DNA的断裂而导致的细胞死亡或凋亡。目前,我们只是初步观察了Pura在细胞DNA损伤和修复中的作用,而其详细的分子机制有待于进一步深入的研究。而且我们相信,通过该技术的运用,对以后研究Pura在神经系统中的其他作用方面遇到的难题都会有所帮助。

参考文献 (References)

- 1 Haas S, Gordon J, Khalili K. A developmentally regulated DNA-binding protein from mouse brain stimulates myelin basic protein gene expression. *Mol Cell Biol* 1993; 13(5): 3103-12.
- 2 Haas S, Thatikunta P, Steplewski A, Johnson EM, Khalili K, Amini S. A 39-kD DNA-binding protein from mouse brain stimulates transcription of myelin basic protein gene in oligodendrocytic cells. *J Cell Biol* 1995; 130(5): 1171-9.
- 3 Bergemann AD, Ma ZW, Johnson EM. Sequence of cDNA comprising the human Pur gene and sequence-specific single-stranded-DNA-binding properties of the encoded protein. *Mol Cell Biol* 1992; 12(12): 5673-82.
- 4 Ma ZW, Bergemann AD, Johnson EM. Conservation in human and mouse Pur alpha of a motif common to several proteins involved in initiation of DNA replication. *Gene* 1994; 149(2): 311-4.
- 5 Liu H, Johnson EM. Distinct proteins encoded by alternative transcripts of the PURG gene, located contrapodal to WRN on chromosome 8, determined by differential termination/polyadenylation. *Nucleic Acids Res* 2002; 30(11): 2417-26.
- 6 Johnson EM. The Pur protein family: clues to function from recent studies on cancer and AIDS. *Anticancer Res* 2003; 23(3A): 2093-100.
- 7 Gallia GL, Johnson EM, Khalili K. Puralpha: a multifunctional single-stranded DNA- and RNA-binding protein. *Nucleic Acids Res* 2000; 28(17): 3197-205.
- 8 White MK, Johnson EM, Khalili K. Multiple roles for Puralpha in cellular and viral regulation. *Cell Cycle* 2009; 8(3): 1-7.
- 9 Yuan C, Li P, Guo S, Zhang B, Sun T, Cui J. The role of Pur α in neuronal development, the progress in the current researches. *J*

- Neurol Neurosci 2016; 7(5): 152.
- 10 Chai J, Li Y, Wang H, Cui J. DNA Damage and repair, neurodegeneration and the role of Pura in DNA repair. Arch Med 2015; 7(4): 5.
 - 11 Wang H, Wang M, Reiss K, Darbinian-Sarkissian N, Johnson EM, Iliakis G, *et al.* Evidence for the involvement of Puralpha in response to DNA replication stress. Cancer Biol Ther 2007; 6(4): 596-602.
 - 12 Wang H, White MK, Kaminski R, Darbinian N, Amini S, Johnson EM, *et al.* Role of Puralpha in the modulation of homologous recombination-directed DNA repair by HIV-1 Tat. Anticancer Res 2008; 28(3A): 1441-7.
 - 13 Shimojima K, Isidor B, Le Caignec C, Kondo A, Sakata S, *et al.* A new microdeletion syndrome of 5q31.3 characterized by severe developmental delays, distinctive facial features, and delayed myelination. Am J Hum Genet Part A 2011; 155A(4): 732-36.
 - 14 Marenzi C, Migeon BR. Fragile X syndrome: search for phenotypic manifestations at loci for hypoxanthine phosphoribosyltransferase and glucose-6-phosphate dehydrogenase. Am J Hum Genet 1981; 33(5): 752-61.
 - 15 Hagerman PJ, Hagerman RJ. Fragile X-associated tremor/ataxia syndrome (FXTAS). Ment Retard Dev Disabil Res Rev 2004; 10: 25-30.
 - 16 Hagerman RJ, Leavitt BR, Farzin F, Jacquemont S, Greco CM, Brunberg JA, *et al.* Fragile-X-associated tremor/ataxia syndrome (FXTAS) in females with the FMR1 premutation. Am J Hum Genet 2004; 74: 1051-6.
 - 17 Khalili K, Del Valle L, Muralidharan V, Gault WJ, Darbinian N, Otte J, *et al.* Puralpha is essential for postnatal brain development and developmentally coupled cellular proliferation as revealed by genetic inactivation in the mouse. Mol Cell Biol 2003; 23(19): 6857-75.
 - 18 Hokkanen S, Feldmann HM, Ding H, Jung CK, Bojarski L, Renner-Müller I, *et al.* Lack of Pur-alpha alters postnatal brain development and causes megalencephaly. Hum Mol Genet 2012; 21(3): 473-84.
 - 19 Gupta A, Hall VL, Kok FO, Shin M, McNulty JC, Lawson ND, *et al.* Targeted chromosomal deletions and inversions in zebrafish. Genome Res 2013; 23(6): 1008-17.
 - 20 Mussolino C, Cathomen T. RNA guides genome engineering. Nat Biotechnol 2013; 31(3): 208-9.
 - 21 Walsh RM, Hochedlinger K. A variant CRISPR-Cas9 system adds versatility to genome engineering. Proc Natl Acad Sci USA 2013; 110(39): 15514-5.
 - 22 Ran FA, Hsu PD, Lin CY, Gootenberg JS, Konermann S, Trevino AE, *et al.* Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. Cell 2013; 154(6): 1380-9.
 - 23 Sander JD, Joung JK. CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. Nat Biotechnol 2014; 32(4): 347-55.
 - 24 Darbinian N, Cui J, Basile A, Del VL, Otte J, Miklossy J, *et al.* Negative regulation of AβPP gene expression by Pur-alpha. J Alzheimers Dis 2008; 15(1): 71-82.
 - 25 Johnson EM, Daniel DC, Gorden J. The Pur protein family: genetic and structure features in development and disease. J Cell Physiol 228: 930-7.
 - 26 Johnson EM, Kinoshita Y, Weinreb DB, Wortman MJ, Simon R, Khalili K, *et al.* Role of Pur alpha in targeting mRNA to site of translation in hippocampal neuronal dendrites. J Neurosci Res 2006; 83(6): 929-43.
 - 27 Kanai Y, Dohmae N, Hirokawa N. Kinesin transports RNA: isolation and characterization of an RNA-transporting granule. Neuron 2004; 43(4): 513-25.
 - 28 Jin P, Duan R, Qurashi A, Qin Y, Tian D, Rosser TC, *et al.* Pur alpha binds to rCGG repeats and modulates repeat-mediated neurodegeneration in a Drosophila model of fragile X tremor/ataxia syndrome. Neuron 2007; 55(4): 556-64.
 - 29 Sofola OA, Jin P, Qin Y, Duan R, Liu H, de Haro M, *et al.* RNA-binding proteins hnRNP A2/B1 and CUGBP1 suppress fragile X CGG permutation repeat-induced neurodegeneration in a Drosophila model of FXTAS. Neuron 2007; 55(4): 565-71.
 - 30 Lalani SR, Zhang J, Schaaf CP, Brown CW, Magoulas P, Tsai AC, *et al.* Mutations in PURA cause profound neonatal hypotonia, seizures, and encephalopathy in 5q31.3 microdeletion syndrome. Am J Hum Genet 2014; 95(5): 579-83.
 - 31 Hunt D, Leventer RJ, Simons C, Taft R, Swoboda KJ, Gawn-Cain M, *et al.* Whole exome sequencing in family trios reveals *de novo* mutations in PURA as a cause of severe neurodevelopmental delay and learning disability. J Med Genet 2014; 51(12): 806-13.
 - 32 Sekiguchi J, Ferguson DO, Chen HT, Yang EM, Earle J, Frank K, *et al.* Genetic interactions between ATM and the nonhomologous end joining factors in genomic stability and development. Proc Natl Acad Sci USA 2001; 98(6): 3243-8.
 - 33 Chai J, Li Y, Jia Z, Yuan C, Li, P, Ma L, *et al.* Establishment of EGFP-Pura fusion fluorescent protein cell lines and stable expression of Pura protects cells from DNA damage. J Neurol Neurosci 2015; 6(3): 21.
 - 34 Kuo LJ, Yang LX. Gamma-H2AX—a novel biomarker for DNA double-strand breaks. In Vivo 2008; 22(3): 305-9.
 - 35 Koç A, Wheeler LJ, Mathews CK, Merrill GF. Hydroxyurea arrests DNA replication by a mechanism that preserves basal dNTP Pools. J Biol Chem 2004; 279(1): 223-30.