

# *PGRN* 和 *Rev-erbβ* 双基因敲除 HEK 293 细胞系的构建及应用

陈芳<sup>1,2</sup>, 杨沛艳<sup>2</sup>, 朱久玲<sup>2</sup>

1 安康学院 现代农业与生物科技学院, 陕西 安康 725000

2 陕西师范大学 生命科学学院基因治疗研究室, 陕西 西安 710062

陈芳, 杨沛艳, 朱久玲. *PGRN* 和 *Rev-erbβ* 双基因敲除 HEK 293 细胞系的构建及应用. 生物工程学报, 2018, 34(10): 1679–1692.

Chen F, Yang PY, Zhu JL. Construction and application of *PGRN* and *Rev-erbβ* double genes knockout HEK293 cell lines. Chin J Biotech, 2018, 34(10): 1679–1692.

**摘要:** 为研究 *PGRN* 与 *Rev-erbβ* 相互作用可能存在的分子机理及其生理意义, 在前期构建的 *Rev-erbβ* 基因敲除 HEK293 C3-6 细胞系的基础上, 利用 CRISPR/Cas9 技术构建 *PGRN* 和 *Rev-erbβ* 双基因敲除的 HEK293 细胞系。首先, 针对 *PGRN* 基因设计了 4 个不同的 sgRNA, 经筛选将活性较高的 *PGRN* sgRNA 2 和 sgRNA 3 串联, 构建携带双 *PGRN* sgRNA 和 Cas9 的慢病毒打靶载体 pLenti/CMV-Loxp-Cas9-sgRNA2-U6-sgRNA3-U6-Loxp-EF1 $\alpha$ -Puro。再将包装的携带 Cas9 和双 *PGRN* sgRNA 的慢病毒感染 HEK293 (*Rev-erbβ*<sup>-/-</sup>) 细胞, 通过筛选、克隆化及测序分析获得双基因敲除的 HEK293 C3-6/23 (*Rev-erbβ*<sup>-/-</sup>; *PGRN*<sup>-/-</sup>) 单克隆细胞系, 并用 qRT-PCR 和 Western blotting 检测 HEK293 (C3-6/23) 细胞中 *PGRN* mRNA 和蛋白质的表达。最后, 在双基因敲除 HEK293 (C3-6/23) 细胞系中, 通过回补基因方式研究 *PGRN* 介导 *Rev-erbβ* 对靶基因启动子转录活性调控研究。在 *PGRN* 和 *Rev-erbβ* 双基因敲除的 HEK293 (C3-6/23) 细胞系中, *PGRN* 基因的两条 DNA 链均为缺失突变型, *PGRN* mRNA 和蛋白质的表达均未达到检测水平。同时在 HEK293 (C3-6/23) 细胞系中研究发现 *PGRN* 与 *Rev-erbβ* 相互作用, 可以增强 *Rev-erbβ* 对靶基因启动子转录的调控。利用 CRISPR/Cas9 系统, 成功构建了双基因敲除的 HEK293 (*Rev-erbβ*<sup>-/-</sup>; *PGRN*<sup>-/-</sup>) C3-6/23 单克隆细胞系。利用该敲除细胞系研究发现 *PGRN* 可以影响 *Rev-erbβ* 对靶基因启动子转录的调控, 但 *PGRN* 参与介导 *Rev-erbβ* 转录调控的机制还有待进一步研究。

**关键词:** *PGRN*, *Rev-erbβ*, CRISPR/Cas9, 双基因敲除, 慢病毒打靶载体

**Received:** January 19, 2018; **Accepted:** April 10, 2018

**Supported by:** National Natural Science Foundation of China (No. 81471772), Ankang Municipal Science and Technology Bureau Science and Technology Research Foundation (No. 2017AK02-17), Ankang University Research Program of High-level Personnel (No. 2017AYQDZR05).

**Corresponding author:** Fang Chen. Tel: +86-915-3358005; E-mail: nsy\_cf@aku.edu.cn

国家自然科学基金 (No. 81471772), 安康市科技局科学技术研究项目 (No. 2017AK02-17), 安康学院高层次人才专项 (No. 2017AYQDZR05) 资助。

网络出版时间: 2018-05-19

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20180516.1027.001.html>

# Construction and application of *PGRN* and *Rev-erb $\beta$* double genes knockout HEK293 cell lines

Fang Chen<sup>1,2</sup>, Peiyan Yang<sup>2</sup>, and Jiuling Zhu<sup>2</sup>

<sup>1</sup> School of Modern Agriculture and Biotechnology, Ankang University, Ankang 725000, Shaanxi, China

<sup>2</sup> Gene Therapy Laboratory, College of Life Sciences, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, Shaanxi, China

**Abstract:** In order to study the molecular mechanism and physiological significance of the interaction between *PGRN* and *Rev-erb $\beta$* , the *PGRN* gene in HEK293 (*Rev-erb $\beta$ <sup>-/-</sup>*) marked as C3-6 cell lines was knocked out by CRISPR/Cas9 system to generate the *Rev-erb $\beta$*  and *PGRN* double genes knockout HEK293 cell lines. First, four sgRNAs were designed for *PGRN* gene, and *PGRN* sgRNA2 and sgRNA3 with the higher activity were used to construct the Lentiviral vector, pLenti/CMV-Loxp-Cas9-sgRNA2-U6-sgRNA3-U6-Loxp-EF1 $\alpha$ -Puro. Then, the lentivirus vector carrying Cas9 and double *PGRN* sgRNA were used to infect HEK293 C3-6 cells. Through drug screening, cloning and sequencing, we obtained the monoclonal HEK293 (*Rev-erb $\beta$ <sup>-/-</sup>*; *PGRN<sup>-/-</sup>*) marked as C3-6/23 cell lines. Using qRT-PCR and Western blotting, we detected *PGRN* mRNA and protein expression in C3-6/23 cell lines. Finally, genetic complementation was used to study the effect of *PGRN*-mediated *Rev-erb $\beta$*  on the regulation of the target gene promoter transcriptional activity in the C3-6/23 cell lines. In HEK293 C3-6/23 cell lines, the two DNA chains of *PGRN* gene were both deletion mutagenesis, and the expression mRNA and protein of *PGRN* did not reach the detection level. At the same time, the interaction between *PGRN* and *Rev-erb $\beta$*  enhanced the regulation of *Rev-erb $\beta$*  on the transcription of target gene promoter in the cell lines. Using CRISPR/Cas9 system, we successfully constructed the double knockout HEK293 (*Rev-erb $\beta$ <sup>-/-</sup>*; *PGRN<sup>-/-</sup>*) monoclonal cell lines. The study found that *PGRN* could affect *Rev-erb $\beta$*  on the regulation of target gene promoter transcription in the C3-6/23 cell lines; however, the mechanism of *PGRN* involvement in mediating *Rev-erb $\beta$*  in transcriptional regulation remains to be further studied.

**Keywords:** *PGRN*, *Rev-erb $\beta$* , CRISPR/Cas9, double knockout, lentivirus targeting vector

对目的基因组特定位点进行打靶修饰技术, 也称靶向基因组编辑技术, 是基因工程研究的重点, 也是研究基因功能的主要手段之一。目前, 该技术被广泛有效地应用于构建细胞和动物疾病模型、培育动植物新品种以及治疗单基因遗传性疾病。靶向基因组编辑技术最早由 Mario Capecchi 于 20 世纪 80 年代提出的<sup>[1]</sup>, 是基于自然状态下 DNA 同源重组 (Homologous recombination, HR) 方式可以对基因进行定点编辑 (敲除或敲入) 的作用, 由于在自然状态下同源重组的效率低、大约只有百万分之一, 因此很大程度上限制了此项技术的应用。自 21 世纪以来, 科学家相继研发出了多种核酸酶来介导靶向基因组编辑技术的高效运行。其中较早应用的基因组编辑核酸酶有锌指核酸酶 (Zinc finger nuclease, ZFN) 技术和转录激活因子样效应物核酸酶 (Transcription

activator-like effector nucleases, TALEN) 技术<sup>[2-5]</sup>。利用这两种核酸酶在基因组上对靶位点进行特异性切割导致双链 DNA 的断裂, 进而会引发细胞的同源重组或非同源末端连接 (Non-homologous end joining, NHEJ) 的方式修复受损 DNA, 来实现基因定点的缺失 (敲除)、插入 (敲入) 以及基因修正等多种突变, 极大地提高了靶向基因组编辑的效率, 并使基因组编辑技术得到了迅速发展。2013 年初, 出现的规律成簇间隔短回文重复序列/Cas 核酸酶 (Clustered regularly interspaced short palindromic repeats/associated nuclease9, CRISPR/Cas9) 系统, 是一种不依赖于 *Fok I* 核酸酶的新型基因组编辑技术<sup>[6-7]</sup>。该技术是由古菌和细菌基因组中串联重复序列 (CRISPR/Cas) 获得性免疫系统发展而来的<sup>[8]</sup>。经科研人员改造后的 CRISPR/Cas9 系统只需将 Cas9 和单链引导 RNA (single

guide RNA, sgRNA)两种成分导入哺乳动物细胞中就可进行基因组的精确编辑,以实现靶基因定点的插入、缺失等突变修饰作用。CRISPR/Cas9 技术具有构建容易、操作简单和周期短等明显的优势,作为一种新型有效的靶向基因组编辑技术,近年来有许多关于 CRISPR-Cas9 技术在多种细胞和生物个体中成功实现了基因组编辑操作<sup>[9-15]</sup>。目前,CRISPR/Cas9 靶向基因组编辑技术不仅广泛应用于模式生物(如细菌、酵母、果蝇、斑马鱼、小鼠、大鼠、猪和猴等)的基因编辑中,而且也应用于许多哺乳动物正常和肿瘤细胞系的基因研究中,具体研究内容涉及细胞或动物模型的构建、基因功能研究、基因转录调节及基因治疗研究等,已成为基因功能研究、寻找药物作用靶点的重要工具<sup>[12,16-22]</sup>。

颗粒蛋白前体 (Progranulin, 简称 PGRN), 又被称为蛋白内皮素前体 (Granulin-epithelin precursor, GEP)、PC 细胞源的生长因子 (PC cell derived growth factor, PCDGF) 和内皮素前体 (Proepithelin)等,是由 593 个氨基酸残基组成的多功能分泌性糖蛋白分子<sup>[23-25]</sup>。PGRN 作为一种多功能细胞生长因子,广泛参与机体多种生理、病理调节功能,如生长发育、组织损伤修复、炎症反应、糖脂代谢以及肿瘤的发生等过程<sup>[26-28]</sup>。大量研究表明,PGRN 不仅是一个多功能的免疫调节因子,在炎症反应中参与调节多种信号通路发挥促炎症或抗炎症的作用<sup>[29]</sup>;PGRN 还是一种重要的脂肪细胞因子,在脂肪组织中参与调节白细胞介素 6 (IL6) 进而介导高脂诱导小鼠产生胰岛素抵抗,并促进糖尿病、肥胖等疾病发生<sup>[30]</sup>;另外,PGRN 还是一个肿瘤调节因子,在许多肿瘤细胞中过度表达,参与肿瘤细胞的增殖、浸润以及血管生成等过程。但截至目前 PGRN 参与机体生理、病理调节功能的机制研究还不完善<sup>[27,31]</sup>。因此,为了深入研究 PGRN 生物学功能,前期利

用酵母双杂交系统 (Yeast two-hybrid systems) 筛选实验研究发现 PGRN 可能与核受体 Rev-erb $\beta$  分子存在相互作用。Rev-erb $\beta$  是核受体 Rev-erbs 家族成员之一,它作为机体重要的转录因子可以直接结合在靶基因启动子 RORE (puG/AGGTCA) 位点上,对靶基因转录进行调控。已有研究表明,脂肪代谢有关因子 Srebp-1c 和载脂蛋白 ApoCIII 等都是核受体 Rev-erb $\beta$  的靶基因<sup>[32-33]</sup>。为研究 PGRN 与 Rev-erb $\beta$  相互作用可能存在的生理意义,本实验利用 CRISPR/Cas9 基因打靶技术尝试构建 PGRN 和 Rev-erb $\beta$  双基因敲除的 HEK293 细胞系,并在该细胞系中初步研究 PGRN 和 Rev-erb $\beta$  相互作用是否影响 Rev-erb $\beta$  对靶基因转录的调控。总之,构建的 PGRN 和 Rev-erb $\beta$  双基因敲除 HEK293 细胞系为进一步深入研究 PGRN 与 Rev-erb $\beta$  相互作用的生理意义提供了必要的研究工具。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 质粒与细胞株

大肠杆菌 *Escherichia coli* 1-T1 感受态细胞由陕西师范大学基因治疗研究室制备并保存;克隆载体 pGEM-T Easy 购自 Promega 公司;Cas9 表达载体质粒购自 Addgene 公司。慢病毒 pLenti/CMV-Loxp-Linker-Loxp-EF1 $\alpha$ -Puro、pLenti/CMV-Cre-Hygromycin 的骨架质粒载体由本实验室构建保存。HEK 293 人胚肾细胞株购自美国典型培养物保藏中心 (American type culture collection, ATCC)。Rev-erb $\beta$  基因敲除的 HEK293(Rev-erb $\beta$ <sup>-/-</sup>) C3-6 细胞系由本实验室构建并保存。

#### 1.1.2 试剂与仪器

质粒 DNA 小提中量提取试剂盒、血液/细胞/组织基因组提取试剂盒均购自天根生化试剂公司;DNA 回收试剂盒 (AXYPrep DNA Gel

Extraction Kit) 购自 Corning 公司; X-treme GENE HP DNA Transfection 转染试剂购自 Roche 公司; Prime Script™ RT Reagent Kit (Perfect Real Time) 反转录试剂盒、SYBR® Premix EX Taq™ II RT-PCR 试剂盒以及实验用到的限制性核酸内切酶、T7E1 酶、LATAq DNA 聚合酶购自 TaKaRa 公司; 兔抗人 PGRN 单克隆抗体(mAb) 购自 Abcam 公司; 小鼠抗人源 GAPDH 单克隆抗体购自 Proteintech 公司; 实验中所用到的引物合成、核酸序列测序均由杭州金唯智公司完成; Mastercycler PCR 仪、微量移液器、5415D 微型高速离心机购自 Eppendorf 公司; 蛋白、核酸电泳系统、785 型半干法转膜仪购自 Bio-Rad 公司; 超低温 -80 °C 冰箱、CO<sub>2</sub> 培养箱、1285 型生物安全柜购自 Thermo 公司; E-25 型细菌培养摇床购自美国 NBS 公司; 生化培养箱购自上海精宏实验仪器公司; 凝胶成像仪购自上海复日公司; 全自动化学发光成像系统购自上海天能公司; 高压灭菌锅购自日本 SANYO 公司; Thermo Scientific Varioskan

Flash 全波长多功能酶标仪购自美国 Thermo 公司。

## 1.2 方法

### 1.2.1 相关引物设计与合成

依据 PGRN 蛋白质的结构功能域, 用 (<http://crispr.mit.edu>) 网站在 PGRN 基因第 5、6 个外显子的区域中设计了 4 个不同的针对 PGRN 基因的 sgRNA, 即 PGRN sgRNA1-4。并在每条 PGRN sgRNA 序列中的正义链 5'端添加上 ACCG, 反义链的 5'端添加上 AAAC, 使其分别能与经 *Bsa* I 酶切的 pU6-sgRNA back bone 表达载体 (sgRNA 表达载体) 形成互补的黏性末端。所设计的 PGRN sgRNA 寡核苷酸序列结果见表 1。这 4 个 PGRN sgRNA 主要针对于 PGRN 基因 G、F、B 功能域。并根据 PGRN 的打靶序列片段(Target sequence fragment, TSF)设计出了 4 条打靶鉴定引物, PCR 外巢检测引物 sp1/sp2 和内巢检测引物 sp3/sp4, 具体引物序列见表 1。

表 1 PGRN sgRNA 寡核苷酸及用于打靶检测 PCR 引物序列

Table 1 The oligonucleotide sequences of PGRN sgRNA and PCR amplification primers for knock-out PGRN detection

Primer name	Primer sequence (5'-3')	Size (bp)
PGRN sgRNA1 for	ACCGTCCACAGGTAACAACCTCCG	23
PGRN sgRNA1 reverse	AAACCGGAGTTGTTACCTGTGGA	23
PGRN sgRNA2 for	ACCGCGTGCTGTGTTATGGTCGA	23
PGRN sgRNA2 reverse	AAACTCGACCATAACACAGCACG	23
PGRN sgRNA3 for	ACCGCACGGTGCCTTCTGCGACC	23
PGRN sgRNA3 reverse	AAACGGTCGCAGAAGGCACCGTG	23
PGRN sgRNA4 for	ACCGGGTCATGTGTCCGGACGCA	23
PGRN sgRNA4 reverse	AAACTGCGTCCGGACACATGACC	23
Detection nest for/sp1	TTGCTGAGGGAGGGACTGGATTGT	24
Detection nest reverse/sp2	TGTGCTACTGAGCCTGGAAG	20
Detection for/sp3	TGTGTGATGGGGGAGTCACCTT	22
Detection reverse/sp4	TGAGTGAGGGGCTGGAGCCAGC	22
PGRN RT-for/sp5	ACCGCCAGGGCGTCTGTTGT	22
PGRNRT-reverse/sp6	GGCCTC CCTGCGCAAACACT	20

Note: the black bases refer to *Bsa* I sticky complementary ends.

### 1.2.2 pU6-PGRN sgRNA1-4 载体的构建及 PGRN sgRNA 活性筛选

#### 1) pU6-PGRN sgRNA1-4 载体构建

将金唯智公司合成的特异的 PGRN sgRNA1-4 寡核苷酸序列,各取 15  $\mu$ L 两两配对、混匀,室温放置 1-2 h 变性退火。取退火后的产物 4.5  $\mu$ L 与经 *Bsa* I 酶切的 pU6-sgRNA 骨架载体相连,获得 pU6-PGRN sgRNA1-4 表达载体。将获得的阳性质粒载体送金唯智公司测序、正确后,可用于后续 PGRN sgRNA 打靶效率的检测。

#### 2) pU6-PGRN sgRNA1-4 活性检测

将上述构建成功的 4.0  $\mu$ g 的 PGRN sgRNA 表达载体和对照载体,分别与 6.0  $\mu$ g 的 Cas9 表达载体用脂质体转染法共转染到 HEK293 细胞,72 h 后收集转染细胞,提取细胞基因组。用提取的基因组为模板,用 LA *Taq* 酶进行 PCR 扩增 PGRN 的 TSF 区域 (PCR 外巢扩增引物 sp1/sp2,内巢扩增引物 sp3/sp4,PCR 扩增程序和条件参考文献[34]),PCR 扩增产物再经变性退火、凝胶回收获得 PGRN 打靶区 DNA 片段。取 500 ng 上述回收的 DNA 片段,用 0.5  $\mu$ L 的 T7E1 酶 (约 5 U 活力单位),37  $^{\circ}$ C 酶切 20 min,酶切产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分析 sgRNA 活性。

### 1.2.3 携带 Cas9 和 PGRN 双 sgRNA 的慢病毒打靶载体的构建

依据上述 PGRN sgRNA 活性检测的结果,参照文献[15]将 2 个有活性的 sgRNA 串联到一起可以显著提高打靶效率。用文献[15]的方法,选择 2 个具有较高打靶活性的单个 PGRN sgRNA,构建出携带 PGRN 双 sgRNA 的 pU6-PGRN-double

sgRNA 的表达载体。用 *Spe* I 和 *Not* I 酶切 PGRN 双 sgRNA 表达载体 (pU6-PGRN-double sgRNA),获得 PGRN-double sgRNA 酶切片段,用 *Cla* I 和 *Spe* I 酶切 Cas9 表达载体质粒获得 Cas9 基因片段。将上述片段先后与 *Nhe* I 和 *Not* I 酶切以及 *Sfu* I 和 *Xba* I 酶切的慢病毒 pLenti/CMV-Loxp-Linker-Loxp-Puro 骨架载体相连,获得含重组 hCas9 和 PGRN double sgRNA 的慢病毒载体(具体载体中的主要元件为 pLenti/CMV-Loxp-Cas9-sgRNA2-U6-sgRNA3-U6-Loxp-EF1 $\alpha$ -Puro,图 1)。

### 1.2.4 细胞培养及转染

HEK293 细胞、HEK293 C3-6 细胞均用 DMEM 培养基进行培养,另外添加 10% 的胎牛血清、10 g/L L-谷氨酸、丙酮酸钠、100  $\mu$ g/mL 链霉素和 100 IU/mL 青霉素。37  $^{\circ}$ C、5.0% CO<sub>2</sub> 的培养箱中静置培养。将 HEK293 细胞或 HEK293 C3-6 细胞接种至 24 孔细胞培养板中培养,当细胞密度达到 70%-80% 时,用 X-treme GENE HP DNA Transfection 转染试剂转染目的质粒 DNA 到细胞中,转染具体的操作方法参照产品说明书。

### 1.2.5 PGRN 稳定敲除的 HEK293 细胞系的建立

在文献[34] Rev-erb $\beta$  基因敲除的 HEK293 (Rev-erb $\beta^{-/-}$ )C3-6 细胞系的基础上,利用携带 Cas9 和 PGRN double sgRNA 的慢病毒对 PGRN 基因进行打靶敲除。首先,将构建成功的含重组 Cas9 和 PGRN double sgRNA 的慢病毒载体 (pLenti/CMV-Loxp-Cas9-sgRNA2-U6-sgRNA3-U6-Loxp-EF1 $\alpha$ -Puro) (图 1),转染到 HEK293T 细胞中进行慢病毒包装。再取包装后 48 h 的细胞培养液上清,感染 Rev-erb $\beta$  基因敲除的 HEK293

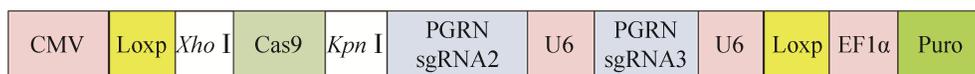


图 1 PGRN 慢病毒打靶载体结构示意图<sup>[35]</sup>

Fig. 1 Schematic illustration of the targeting vector for knock-out of human PGRN<sup>[35]</sup>.

(Rev-erb $\beta$ <sup>-/-</sup>)细胞。感染 48 h 后,用 1.2  $\mu$ g/mL 嘌呤霉素筛选,待筛选稳定后 (7–14 d),收细胞基因组进行打靶检测。然后,用 pLenti/CMV-Cre-Hyg 慢病毒感染有打靶效果的细胞 (以除去整合到打靶细胞基因组中 Loxp-Cas9-sgRNA2-U6-sgRNA3-U6-Loxp)。再用 (0.2  $\mu$ g/mL 潮霉素 B) 筛选,待细胞筛选稳定后,收集打靶细胞的基因组。采用 PCR 扩增重组到基因组中的 Cas9 基因,检测打靶细胞中 Cas9 基因的清除情况,并对清除完全的打靶细胞进行克隆化操作。提取阳性单克隆细胞的基因组,用外、内巢 PCR 检测引物 P1/P2 和 P3/P4,PCR 扩增 TSF 区基因片段,将获得扩增目的片段与野生型 TSF 区序列相比较,并分析打靶细胞的 PGRN 基因突变类型。将 PCR 扩增的产物含有突变型的 (PGRN TSF) 序列进行测序,由测序结果确定阳性克隆细胞是否是基因敲除 (插入、缺失) 的单克隆 (PGRN<sup>-/-</sup>) 细胞株。

### 1.2.6 PGRN 基因敲除的 HEK293 细胞系的鉴定

#### 1) PCR 对 PGRN 基因敲除细胞系的鉴定

取对照 HEK293 C3-6 细胞和 PGRN 基因敲除的 HEK293 细胞,用基因组提取试剂盒分别提取上述细胞的基因组。以提取的基因组为 PCR 扩增模板和特异的外、内巢引物 P1/P2、P3/P4 为打靶鉴定的 PCR 引物,采用巢式 PCR 对 PGRN 基因打靶区 (TSF 区) 基因片段进行扩增,PCR 反应及扩增条件参见文献[34]略有改动。取少量 PCR 扩增产物,用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳初步检测分析打靶敲除后 PGRN 基因 TSF 区基因突变型类型。并将 PGRN 基因敲除的 HEK293 细胞不同的 PCR 扩增产物分别进行凝胶回收、纯化,连接 pGEM-T 载体,提取阳性克隆质粒送测序。再将 PGRN TSF 序列片段的测序结果与对照细胞 PGRN TSF 序列进行比对,来对 PGRN 基因敲除细胞系的 PGRN 基因的突变类型进行鉴定分析。进一步确定 PGRN 基因敲除单克隆阳性细胞系 PGRN 基因的

突变类型。

#### 2) qRT-PCR 检测 PGRN mRNA 水平

取一定量对照和 PGRN 基因敲除的 HEK293 细胞,用 TRIzol 处理分别提取细胞的总 RNA。取 500 ng 细胞总 RNA 作模板,用 TaKaRa 公司的反转录试剂盒反转录成 cDNA。再用 SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq 试剂和特异的 PGRN RT-PCR 引物 sp5/sp6 扩增不同细胞的 PGRN 基因,以甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 为内参,每个反应设 3 次重复。根据 qRT-PCR 检测结果,通过比较基因敲除细胞与对照细胞的 PGRN mRNA 表达水平的变化,确定 PGRN 基因敲除细胞系的 PGRN mRNA 表达水平的变化。

#### 3) Western blotting 检测 PGRN 蛋白质水平

取对照、PGRN 基因敲除 HEK293 细胞 60 mm 平皿各一盘,用 200  $\mu$ L RIPA (含蛋白酶抑制剂) 的细胞裂解液提取细胞总蛋白质。用二辛可宁酸 (Bicinchoninic acid, BCA) 定量试剂盒测定细胞总蛋白质浓度。分别取 50  $\mu$ g 总蛋白量的对照和 PGRN 敲除细胞蛋白质提取液上样,经 10% SDS-PAGE 分离。再经转移电泳将电泳分离的蛋白条带转移到 PVDF 膜上,PVDF 膜用 5% BSA (W/V) 的 PBST 溶液室温封闭 1.0–1.5 h;用兔抗人源 PGRN 单克隆抗体 (1 : 1 000) 和小鼠抗人源 GAPDH 单抗 (1 : 500) 分别与印迹膜室温共孵育 1–1.5 h;1 $\times$ PBST 洗涤孵育后的 PVDF 膜 3 次 (5 min/次);然后用 HRP 标记的山羊抗兔 IgG (1 : 10 000 稀释) 和山羊抗小鼠 IgG (1 : 10 000 稀释) 的二抗孵育液与 PVDF 膜室温孵育 1 h;分别用 1 $\times$ PBST 和 1 $\times$ PBS 彻底洗涤印迹膜 3 次 (5 min/次);最后用化学发光法检测目的蛋白质的印迹条带,确定 PGRN 基因敲除细胞系中 PGRN 蛋白质的表达水平。

### 1.2.7 PGRN 介导 Rev-erb $\beta$ 对靶基因启动子转录活性调控的检测

在 PGRN 和 Rev-erb $\beta$  双基因敲除 HEK293 C3-6/C23 细胞系中, 通过回补 PGRN 和 Rev-erb $\beta$  来研究 PGRN 介导 Rev-erb $\beta$  对靶基因启动子 ApoCIII 和 Srebp-1c 转录活性调控的具体作用。操作方法如下: 将实验室前期构建的 Rev-erb $\beta$  靶基因启动子荧光素酶报告基因载体 pGL3-hApoCIII promoter-Luci 和 pGL3-hSrebp-1c promoter-Luci 150 ng 分别与 100 ng pAd5 E1-CMV-hPGRN 质粒 (人源 PGRN 真核表达载体) 或/和 100 ng pAd5 E1-CMV-hRev-erb $\beta$  质粒 (人源 Rev-erb $\beta$  真核表达载体) 以及 20 ng pRL-CMV-Renilla Luci 质粒 (内参载体) 共转染到 24 孔 PGRN 和 Rev-erb $\beta$  双基因敲除细胞系中, 用空载体 pAd5-E1 质粒补充使每组实验转染的质粒总量为 370 ng, 转染后 48 h 收集细胞总蛋白。另外以转染同样量的 pAd5-E1 空载体作为对照组。用双荧光素酶 (Dual-luciferase) 试剂和全波长多功能酶标仪检测各实验组的荧光素酶相对活性, 反映出 PGRN 与 Rev-erb $\beta$  相互作用介导 Rev-erb $\beta$  对 hApoCIII 和 hSrebp-1c 启动子启动荧光素酶转录活性的影响情况。

## 2 结果与分析

### 2.1 PGRN sgRNA 活性检测与筛选

将 pU6-PGRN sgRNA1、pU6-PGRN sgRNA2、pU6-PGRN sgRNA3 和 pU6-PGRN sgRNA4 的表达载体和对照载体, 分别同重组 hCas9 表达载体共转染到 HEK293 细胞中, 72 h 后收集转染细胞, 提取其基因组。用 PCR 扩增 PGRN 打靶区 TSF 片段, 琼脂糖凝胶纯化、并回收目的 DNA 片段, 再用 T7E1 酶切回收的 DNA 片段, 经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分析得出 PGRN 4 个 sgRNA 的打靶活性 (图 2)。与对照质粒相比较, pU6-PGRN sgRNA2 和 pU6-PGRN sgRNA3 有明显的切开条带, 条带大小与预期的结果相一致, 表明 pU6-PGRN

sgRNA2 和 pU6-PGRN sgRNA3 有较高的打靶活性。将有活性的 PGRN sgRNA 2 和 sgRNA 3 串联, 构建携带双 PGRN sgRNA 和 Cas9 的 pLenti/CMV-Loxp-Cas9-sgRNA2-U6-sgRNA3-U6-Loxp-EF1 $\alpha$ -Puro 慢病毒载体, 对 HEK293 C3-6 细胞进行 PGRN 基因打靶操作。

### 2.2 PGRN 基因敲除的 HEK293 细胞系的建立与鉴定

用包装好的携带 Cas9 和 PGRN sgRNA2+sgRNA3 的慢病毒感染 HEK293 (Rev-erb $\beta$ <sup>-/-</sup>) 细胞对 PGRN 基因进行打靶敲除。病毒感染后 48 h, 向培养基中添加 1.2  $\mu$ g/mL 嘌呤霉素进行筛选, 筛选 10 d 细胞稳定后, 收细胞基因组进行打靶检测, 检测结果见图 3。由图 3 可知, 与对照细胞相比较, PGRN 基因敲除细胞打靶区 TSF 的 PCR 扩增产物除了有 660 bp 与野生型大小一致的野生型条带以外, 还含有一条较强的 470 bp 左右的 PGRN 基因敲除条带。上述结果说明携带 Cas9 和 PGRN sgRNA2+sgRNA3 的慢病毒已对 HEK293 C3-6 细胞 PGRN 基因进行有效的基因打靶敲除。

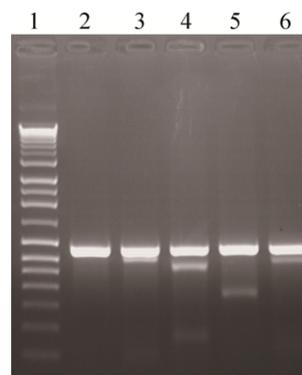


图 2 PGRN sgRNA 1-4 的生物活性检测

Fig. 2 Detection the activity of PGRN sgRNA1-4. Lane 1: DNA marker; lane 2: negative control (the product of T7E1 cut the TSF fragment from HEK293 transfected with control vector); lane 3-6: the product of T7E1 cut the TSF fragment from HEK293 transfected with PGRN TSF fragment from HEK293 transfected.

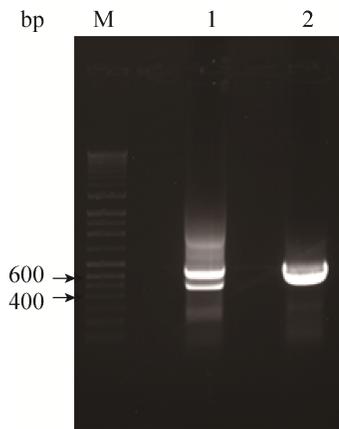


图3 PGRN 基因敲除打靶检测

Fig. 3 Detection the knockout of targeting PGRN gene. Lane M: DNA marker; lane 1: the PCR product of PGRN gene knockout TSF in HEK293 C3-6 cell; lane 2: the PCR product of TSF in control cell.

将上述 *PGRN* 基因打靶检测 TSF 区 PCR 扩增产物 660 bp 和 470 bp DNA 片段, 凝胶回收后送测序, 测序结果发现野生型 660 bp 条带和基因敲除 470 bp 条带的 DNA 片段均存在套峰。这说明通过慢病毒打靶敲除后 *PGRN* 基因 TSF 区 DNA 序列存在有多种基因型 (打靶敲除后筛选的 HEK293 C3-6 细胞不纯), 因此对该不纯的 HEK293 C3-6 细胞进行克隆化筛选。通过克隆化处理, 筛选到了 35 株阳性单克隆细胞株。提取 35 株阳性单克隆细胞的基因组, 用外、内巢打靶检测引物 P1/P2、P3/P4, PCR 扩增阳性单克隆细胞 *PGRN* TSF 区基因片段, 与野生型 TSF 序列相比较, 发现 35 株阳性克隆细胞均有打靶效果。

选取阳性克隆细胞中状态较好的 13 株细胞分析发现, 这 13 株阳性克隆细胞既存在与野生型 TSF 区大小一致 660 bp 的 DNA 条带, 又存在 400 bp 左右的基因敲除 DNA 条带 (图 4)。并将 13 株阳性单克隆细胞的 *PGRN* 基因打靶区 TSF PCR 扩增

产物 660 bp DNA 片段和 400 bp 左右的 DNA 片段凝胶回收、连接 pGEM-T 载体, 提取阳性质粒送测序。测序分析结果发现, HEK293 C3-6/C23 号阳性细胞为单克隆细胞系, 且该细胞的 *PGRN* 基因一条链在 *PGRN* 基因打靶区 TSF 中的 *PGRN* sgRNA2 与 sgRNA3 之间缺失 187 bp; 另一条链在 *PGRN* 基因打靶区 TSF 中的 *PGRN* sgRNA2 处缺失 7 bp (具体见图 5)。其他 12 株阳性单克隆细胞均为一条链为野生型, 另一条链在 *PGRN* 基因 sgRNA2 处或 sgRNA2 和 sgRNA3 处缺失 8–190 bp 碱基不等的单倍体基因缺失突变型 (具体分析略)。由上述鉴定结果可知, 经携带 Cas9 和 *PGRN* sgRNA2+sgRNA3 的慢病毒感染 HEK293 C3-6(Rev-erb $\beta$ <sup>-/-</sup>) 细胞进行 *PGRN* 基因打靶敲除, 再经克隆化筛选成功获得一株 *PGRN* 和 *Rev-erb $\beta$*  两个基因都完全敲除的 HEK293 C3-6/C23 细胞系。

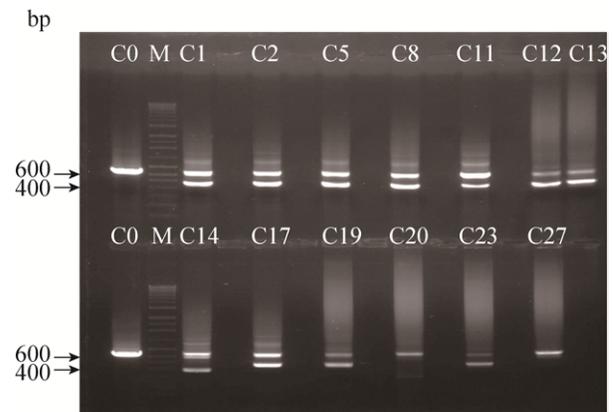


图4 PCR 鉴定 *PGRN* 基因打靶后筛选的阳性克隆

Fig. 4 PCR identification genotype of positive clone with *PGRN* gene knockout. Lane C0: PCR amplification the TSF of control HEK293 C3-6 cells; lane M: DNA marker; lane C1–C27: PCR amplification the TSF of the positive clones of the HEK293 C3-6/C1, C2, C5, C8, C11, C12, C13, C14, C17, C19, C20, C23, C27 cell lines with *PGRN* gene knockout.

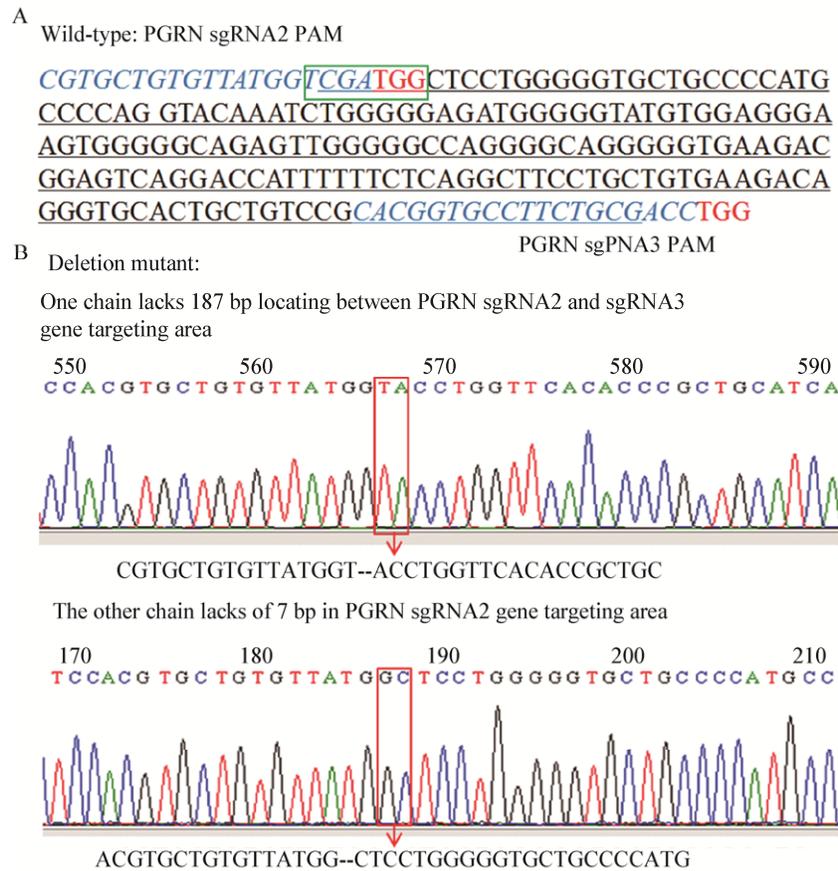


图 5 HEK293 C3-6/C23 基因敲除细胞系 *PGRN* 基因突变型分析

Fig. 5 Analysis of knockout *PGRN* gene mutants of HEK293 C3-6/C23. (A) The *PGRN* target sequence fragment (from *PGRN* sgRNA2 to sgRNA3) of wild-type. (B) The deletion mutant of *PGRN* target sequence fragment. One deletion mutant chain lacks of 187 bp locating between sgRNA2 and sgRNA3 gene targeting area (the 187 bp specific deletion base sequences are highlighted on the underlines of wild-type). And the other deletion mutation chain lacks of 7 bp in *PGRN* sgRNA2 gene targeting area (the 7 bp specific deletion base sequence are showed in green rectangle of wild-type).

### 2.3 *PGRN* mRNA 和蛋白质在 HEK293 C3-6/C23 细胞系中的表达水平

为了验证 *PGRN* 基因敲除后是否对 HEK293 C3-6/C23 细胞系的 *PGRN* mRNA、蛋白质表达水平有影响,采用 qRT-PCR 和 Western blotting 法分别检测在 HEK293 C3-6/C23 细胞系和对照 HEK293 C3-6 细胞系中的 *PGRN* mRNA、蛋白质表达水平。qRT-PCR 检测结果表明,与对照细胞系相比,*PGRN* 敲除细胞中的 *PGRN* mRNA 表达

水平呈现极显著的降低(图 6A);同样 Western blotting 检测结果显示,对照细胞系中有明显的 *PGRN* 蛋白质印迹条带,而在 *PGRN* 敲除细胞系 HEK293 C3-6/C23 中未检测到 *PGRN* 蛋白质的印迹条带(图 6B)。上述结果一致表明 *PGRN* mRNA 和蛋白质表达水平在 *PGRN* 敲除细胞系中呈极显著的下降趋势。因此进一步证实,成功构建并获得 *PGRN* 和 *Rev-erbβ* 双基因敲除的 HEK293 C3-6/C23 细胞系。

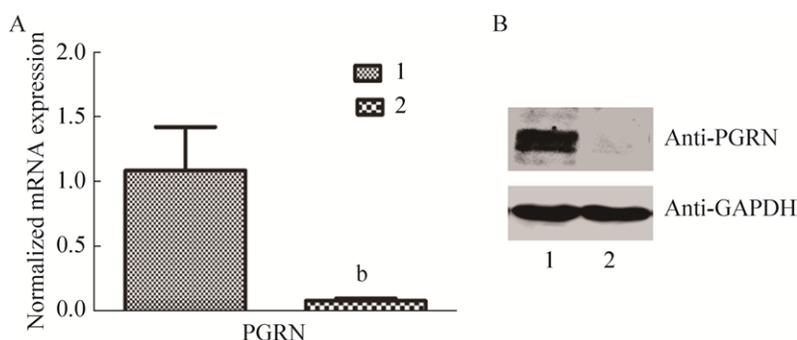


图6 RT-qPCR 和 Western blotting 检测不同细胞系 PGRN mRNA、蛋白质的表达水平

Fig. 6 RT-qPCR and Western blotting detection the PGRN mRNA and protein expression in different HEK293 cell lines. (A) The PGRN mRNA expression in PGRN knockout cell lines and control cells. 1: HEK293 C3-6 control cell lines; 2: the PGRN knockout cell lines of HEK293 C3-6/C23,  $^bP < 0.01$  vs control. (B) The PGRN protein expression level in PGRN knockout cell lines and control cells. 1: the cells lysate of HEK293 C3-6 control cell lines; 2: the cells lysate of HEK293 C3-6/C23 cell lines. The anti-PGRN antibody (1:1 000) was used to detect PGRN protein expression in different cell lines, and the anti-GAPDH is internal control.

#### 2.4 PGRN 介导 Rev-erb $\beta$ 对靶基因启动子转录调控的影响

将 Rev-erb $\beta$  靶基因启动子荧光素酶报告基因表达载体 pGL3-hApoCIII promoter-Luci 和 pGL3-hSrebp-1c promoter-Luci 分别同 PGRN、Rev-erb $\beta$  表达载体等共转染到 PGRN 和 Rev-erb $\beta$  双基因敲除 HEK293 C3-6/C23 细胞系中, 转染后 48 h 收细胞总蛋白, 用全波长多功能酶标仪检测各实验组荧光素酶的相对活性见图 7。由检测结果可知, 在 HEK293 C3-6/C23 细胞中回补 PGRN 不仅可以增强 Rev-erb $\beta$  对靶基因 ApoCIII 启动子转录的抑制作用 (图 7A), 还可以增强 Rev-erb $\beta$  对靶基因 Srebp-1c 启动子转录的激活作用 (图 7B)。这些结果说明, 在 HEK293 C3-6/C23 细胞内, PGRN 与 Rev-erb $\beta$  相互作用可以激活 Rev-erb $\beta$  对靶基因启动子转录的调控。

### 3 讨论

基因组编辑技术已被广泛有效地应用于构建细胞和动物疾病模型、培育生物新品种以及遗传性疾病的治疗研究上。人工核酸酶的出现极大地提高了基因组编辑的效率, 彻底改变了该项技术

的应用现状, 其中 CRISPR/Cas9 基因组编辑技术操作简单、省时省力、成本廉价等优点使它一出现就很快成为人们热捧的基因编辑技术。

截止目前, 已有很多研究团队使用 CRISPR/Cas9 系统成功开展细胞或动物基因编辑及疾病治疗相关研究。虽然与 ZFN 和 TALEN 技术相比, CRISPR/Cas9 系统只需将设计好的 20 bp 左右的 sgRNA 和重组的 Cas9 蛋白通过一定的方法导入细胞中就可以对细胞特定的基因进行靶向编辑修饰了, 但是该技术自最初提出以来一直处于不断改进和发展过程中的<sup>[36-39]</sup>。自 2013 年以来, 本实验室一直致力于利用 CRISPR/Cas9 系统开展基因组编辑相关的工作 (人源基因敲除细胞系、小鼠疾病模型构建等)<sup>[15,34,40]</sup>。前期基因打靶工作主要借鉴 Cho 等<sup>[41]</sup>提出的提高 sgRNA 与 Cas9 系统特异性和减少脱靶效应的策略, 通过脂质体共转染打靶载体 (含特异的有活性的 sgRNA 和重组 Cas9) 和供体载体 (携带靶基因上、下游同源臂) 到靶细胞内进行基因的敲除或敲入等编辑修饰操作。通过这种基因打靶操作方式, 一方面比较容易将正常基因或外源标记基因如 eGFP 导入靶细胞进行基因纠正或筛选基因敲除细胞系;

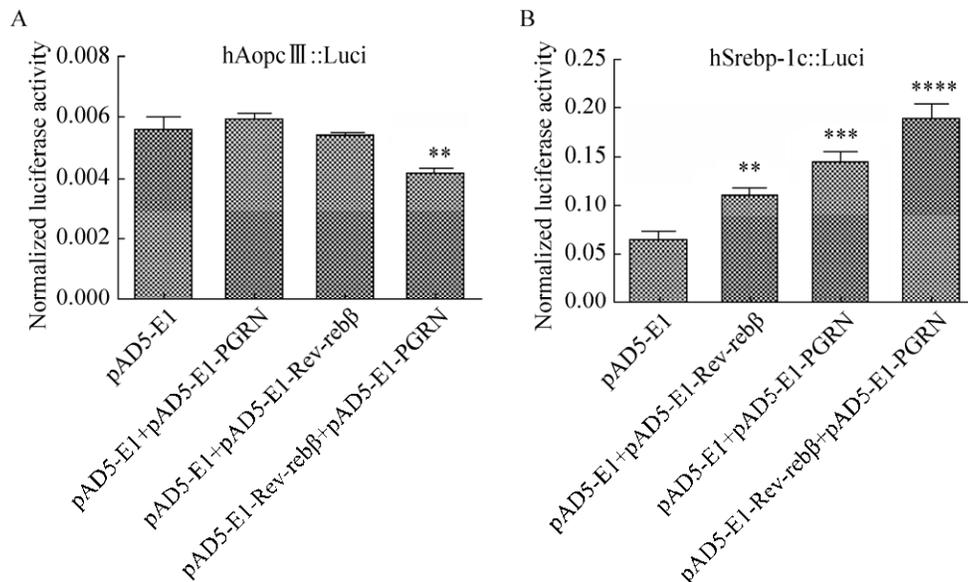


图 7 PGRN 介导 Rev-erb $\beta$  对靶基因启动子活性调控的影响

Fig. 7 Effect of PGRN mediating Rev-erb $\beta$  on the target gene promoter activity. (A) Effect of PGRN mediating Rev-erb $\beta$  on the hApoCIII promoter activity in HEK293 C3-6/C23 cells. B: Effect of PGRN mediating Rev-erb $\beta$  on the hSrebp-1c promoter activity in HEK293 C3-6/C23 cells. pAD5-E1 as control (150 ng pGL3-hApoCIII/hSrebp-1c promoter-Luciferase plasmid, 200 ng pAD5-E1 plasmid and 20 ng pRL-CMV-Renilla-Luciferase plasmid); pAD5-E1+pAD5-E1-PGRN (150 ng pGL3-hApoCIII/hSrebp-1c promoter-Luciferase plasmid, 100 ng pAD5-E1 plasmid, 100 ng pAD5-E1-PGRN plasmid and 20 ng pRL-CMV-Renilla-Luciferase plasmid); pAD5-E1+pAD5-E1-Rev-erb $\beta$  (150 ng pGL3-hApoCIII/hSrebp-1c promoter-Luciferase plasmid, 100 ng pAD5-E1 plasmid, 100 ng pAD5-E1-Rev-erb $\beta$  plasmid and 20 ng pRL-CMV-Renilla-Luciferase plasmid); pAD5-E1-PGRN+pAD5-E1-Rev-erb $\beta$  (150 ng pGL3-hApoCIII/hSrebp-1c promoter-Luciferase plasmid, 100 ng pAD5-PGRN plasmid, 100 ng pAD5-E1-Rev-erb $\beta$  plasmid and 20 ng pRL-CMV-Renilla-Luciferase plasmid). \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.005$ , \*\*\*\*  $P < 0.001$  vs control.

另一方面,当 sgRNA 引导 Cas9 对靶基因 DNA 进行特异切割时,导入的同源 DNA 模板将会大大提高基因打靶同源重组修复的效率,使切割的 DNA 发生同源重组,并将外源 DNA 片段整合到靶基因组特定位点上,从而实现基因的敲入、敲除突变。但是后来研究发现,上述基因打靶操作方式存在许多问题,首先是脂质体转染哺乳动物细胞,特别是一些肿瘤细胞系效率很低,使得最终的打靶效率不高;其次是这种基因打靶方式容易获得一条链为整合型突变,另一条链可能为野生型、缺失突变或整合型突变,三者各占 1/3 的几率。因此,要想获得两条 DNA 链都发生突变的细胞系概率非常小,往往需要通过增加基因打靶、筛选及克隆化等操作的工作量来实现。鉴于

实验室前期基因打靶方式存在诸多问题以及构建 PGRN 和 Rev-erb $\beta$  双基因敲除细胞系的实验目的,本实验重新设计构建了同时携带 Cas9 和 PGRN 双 sgRNA 的慢病毒打靶载体。利用慢病毒打靶载体对 HEK293 C3-6 细胞系的 PGRN 基因进行打靶敲除,药物筛选细胞稳定后,再用含 Cre 的慢病毒 pLenti/CMV-Cre-Hygromycin 感染有打靶效果的细胞(以除去整合到细胞基因组中的 Loxp-Cas9-sgRNA2-U6-sgRNA3-U6-Loxp),通过克隆化、基因测序鉴定等操作最终获得了 PGRN 和 Rev-erb $\beta$  双基因敲除 HEK293 C3-6/C23 细胞系。利用改进的慢病毒打靶载体进行基因打靶操作方式,直接用携带 Cas9 和 PGRN 双 sgRNA 的慢病毒感染细胞进行基因打靶,在打靶的同时由

于没有引入同源 DNA 片段, 故切割的 DNA 主要通过非同源末端连接方式进行 DNA 修复, 会在切割位点上引起插入或缺失突变, 从而引发目的基因编码蛋白质发生移码突变以达到目的基因敲除的目的。这种利用改良的慢病毒打靶载体进行基因打靶操作方式, 不仅通过提高打靶载体导入靶细胞的效率来提高打靶效率; 而且可以缩短和简化基因打靶、筛选及克隆化等操作的周期和过程。

本研究在前期构建携带外源基因 eGFP 的 *Rev-erb $\beta$*  基因敲除细胞系 (HEK293 C3-6) 的基础上, 利用携带重组 Cas9 和串联较高活性的 PGRN sgRNA2 和 sgRNA3 的慢病毒感染 HEK293 C3-6 细胞对 PGRN 基因进行打靶敲除, 再经药物筛选、克隆化和基因测序等操作, 成功获得一株 PGRN 和 *Rev-erb $\beta$*  双基因敲除的 HEK293 C3-6/C23 细胞系。所构建的 PGRN 和 *Rev-erb $\beta$*  双基因敲除 HEK293 C3-6/C23 细胞系, 彻底解决了传统 RNAi 技术的不彻底性和瞬时性对基因功能研究的不足。随后, 利用所构建的 HEK293 C3-6/C23 细胞系进行研究表明 PGRN 与 *Rev-erb $\beta$*  相互作用, 前者可以影响 *Rev-erb $\beta$*  对靶基因启动子转录的调控。总之, 这些研究为阐明 PGRN 介导 *Rev-erb $\beta$*  对靶基因转录调控的分子机制和生理意义奠定了坚实的基础和提供了有效的研究工具。

**致谢** 特别感谢陕西师范大学基因治疗室李雅博士提供的慢病毒打靶载体, 张伟锋博士对基因打靶提供的技术支持。

## REFERENCES

- [1] Thomas KR, Folger KR, Capecchi MR. High frequency targeting of genes to specific sites in the mammalian genome. *Cell*, 1986, 44(3): 419–428.
- [2] Urnov FD, Rebar EJ, Holmes MC, et al. Genome editing with engineered zinc finger nucleases. *Nat Rev Genet*, 2010, 11(9): 636–646.
- [3] Ji QZ, Fischer AL, Brown CR, et al. Engineered zinc-finger transcription factors activate *OCT4 (POU5F1)*, *SOX2*, *KLF4*, *c-MYC (MYC)* and miR302/367. *Nucleic Acids Res*, 2014, 42(10): 6158–6167.
- [4] Li T, Huang S, Zhao XF, et al. Modularly assembled designer TAL effector nucleases for targeted gene knockout and gene replacement in eukaryotes. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39(14): 6315–6325.
- [5] Sommer D, Peters AE, Wirtz T, et al. Corrigendum: efficient genome engineering by targeted homologous recombination in mouse embryos using transcription activator-like effector nucleases. *Nat Commun*, 2015, 6: 5927.
- [6] Cong L, Ran FA, Cox D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 2013, 339(6121): 819–823.
- [7] Mali P, Yang LH, Esvelt KM, et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*, 2013, 339(6121): 823–826.
- [8] Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 2012, 337(6096): 816–821.
- [9] Yang H, Wang HY, Shivalila CS, et al. One-step generation of mice carrying reporter and conditional alleles by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell*, 2013, 154(6): 1370–1379.
- [10] Wang HY, Yang H, Shivalila CS, et al. One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell*, 2013, 153(4): 910–918.
- [11] Wang T, Wei JJ, Sabatini DM, et al. Genetic screens in human cells using the CRISPR-Cas9 system. *Science*, 2014, 343(6166): 80–84.
- [12] Shalem O, Sanjana NE, Hartenian E, et al. Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells. *Science*, 2014, 343(6166): 84–87.
- [13] Cho SW, Kim S, Kim JM, et al. Targeted genome engineering in human cells with the Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nat Biotechnol*, 2013,

- 31(3): 230–232.
- [14] Mandal PK, Ferreira LM, Collins R, et al. Efficient ablation of genes in human hematopoietic stem and effector cells using CRISPR/Cas9. *Cell Stem Cell*, 2014, 15(5): 643–652.
- [15] Xiao D, Zhang WF, Li Y, et al. A novel luciferase knock-in reporter system for studying transcriptional regulation of the human Sox2 gene. *J Biotechnol*, 2016, 219: 110–116.
- [16] De La Fuente-Núñez C, Lu TK. CRISPR-Cas9 technology: applications in genome engineering, development of sequence-specific antimicrobials, and future prospects. *Integr Biol*, 2017, 9(2): 109–122.
- [17] Hwang WY, Fu YF, Reyon D, et al. Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(3): 227–229.
- [18] Shen B, Zhang J, Wu HY, et al. Generation of gene-modified mice via Cas9/RNA-mediated gene targeting. *Cell Res*, 2013, 23(5): 720–723.
- [19] Harms DW, Quadros RM, Seruggia D, et al. Mouse genome editing using the CRISPR/Cas system. *Curr Protoc Hum Genet*, 2014, 83: 15.7.1–27.
- [20] Niu YY, Shen B, Cui YQ, et al. Generation of gene-modified cynomolgus monkey via Cas9/RNA mediated gene targeting in one-cell embryos. *Cell*, 2014, 156(4): 836–843.
- [21] Konermann S, Brigham MD, Trevino AE, et al. Genome-scale transcriptional activation by an engineered CRISPR-Cas9 complex. *Nature*, 2015, 517(7536): 583–588.
- [22] Wu YX, Liang D, Wang YH, et al. Correction of a genetic disease in mouse via use of CRISPR-Cas9. *Cell Stem Cell*, 2013, 13(6): 659–662.
- [23] Xu K, Zhang Y, Ilalov K, et al. Cartilage oligomeric matrix protein associates with granulin-epithelin precursor (GEP) and potentiates GEP-stimulated chondrocyte proliferation. *J Biol Chem*, 2007, 282(15): 11347–11355.
- [24] Trinh DP, Brown KM, Jeang KT. Epithelin/granulin growth factors: extracellular cofactors for HIV-1 and HIV-2 Tat proteins. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, 256(2): 299–306.
- [25] Hu FH, Padukkavidana T, Vægter CB, et al. Sortilin-mediated endocytosis determines levels of the frontotemporal dementia protein, progranulin. *Neuron*, 2011, 68(4): 654–667.
- [26] Nguyen AD, Nguyen TA, Martens LH, et al. Progranulin: at the interface of neurodegenerative and metabolic diseases. *Trends Endocrinol Metab*, 2013, 24(12): 597–606.
- [27] DeMorrow S. Progranulin: a novel regulator of gastrointestinal cancer progression. *Transl Gastrointest Cancer*, 2013, 2(3): 145–151.
- [28] Suh HS, Gelman BB, Lee SC. Potential roles of microglial cell progranulin in HIV-Associated CNS pathologies and neurocognitive impairment. *J Neuroimmune Pharmacol*, 2014, 9(2): 117–132.
- [29] Tang W, Lu Y, Tian QY, et al. The growth factor progranulin binds to TNF receptors and is therapeutic against inflammatory arthritis in mice. *Science*, 2011, 332(6028): 478–484.
- [30] Matsubara T, Mita A, Minami K, et al. PGRN is a key adipokine mediating high fat diet-induced insulin resistance and obesity through IL-6 in adipose tissue. *Cell Metab*, 2012, 15(1): 38–50.
- [31] Gonzalez EM, Mongiat M, Slater SJ, et al. A novel interaction between perlecan protein core and progranulin: potential effects on tumor growth. *J Biol Chem*, 2003, 278(40): 38113–38116.
- [32] Wang JD, Liu NS, Liu ZL, et al. The orphan nuclear receptor Rev-erb $\beta$  recruits Tip60 and HDAC1 to regulate *apolipoproteinCIII* promoter. *Biochim Biophys Acta-Mol Cell Res*, 2008, 1783(2): 224–236.
- [33] Ramakrishnan SN, Lau P, Crowther LM, et al. Rev-erb beta regulates the *Srebp-1c* promoter and mRNA expression in skeletal muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 388(4): 654–659.
- [34] Chen F, Zhang WF, Zhao JL, et al. Construction of Rev-erb $\beta$  gene knockout HEK293 cell line with CRISPR/Cas9 system. *Chin J Cell Mol Immunol*, 2016, 32(11): 1446–1452 (in Chinese).  
陈芳, 张伟锋, 赵俊丽, 等. 应用 CRISPR/Cas9 系统构建 Rev-erb $\beta$  基因敲除的 HEK293 细胞系. *细胞*

- 与分子免疫学杂志, 2016, 32(11): 1446–1452.
- [35] Chen F. Verification of Rev-erb $\beta$  interacting molecules and Rev-erb $\beta$  function study[D]. Xi'an: Shaanxi Normal University, 2017 (in Chinese).  
陈芳. Rev-erb $\beta$  相互作用分子的验证及 Rev-erb $\beta$  功能研究[D]. 西安: 陕西师范大学, 2017.
- [36] Wright AV, Nuñez JK, Doudna JA. Biology and applications of CRISPR systems: harnessing nature's toolbox for genome engineering. *Cell*, 2016, 164(1/2): 29–44.
- [37] Jo YI, Suresh B, Kim H, et al. CRISPR/Cas9 system as an innovative genetic engineering tool: enhancements in sequence specificity and delivery methods. *Biochim Biophys Acta-Rev Cancer*, 2015, 1856(2): 234–243.
- [38] Koonin EV, Makarova KS, Zhang F. Diversity, classification and evolution of CRISPR-Cas systems. *Curr Opin Microbiol*, 2017, 37: 67–78.
- [39] Shmakov S, Smargon A, Scott D, et al. Diversity and evolution of class2 CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol*, 2017, 15(3): 169–182.
- [40] Zhang WF, Xiao D, Shan LL, et al. Generation of apoptosis-resistant HEK293 cells with CRISPR/Cas mediated quadruple gene knockout for improved protein and virus production. *Biotechnol Bioeng*, 2017, 114(11): 2539–2549.
- [41] Cho SW, Kim S, Kim Y, et al. Analysis of off-target effects of CRISPR/Cas-derived RNA-guided endonucleases and nickases. *Genome Res*, 2014, 24(1): 132–141.

(本文责编 陈宏宇)