

文章编号 1006-8147(2023)04-0372-07

论著

利用 CRISPR/Cas9 技术构建 *Aff4* 基因敲除 B16-F10 细胞系及 AFF4 的多克隆抗体制备

张佳慧, 阎晗, 胡德庆

(天津医科大学基础医学院细胞生物学系, 天津 300070)

摘要 目的: 利用 CRISPR/Cas9 技术构建 ALF 转录伸长因子 4(AFF4) 基因敲除的小鼠黑色素瘤细胞(B16-F10), 自主制备特异的 AFF4 多克隆抗体。方法: 设计一对分别靶向小鼠 *Aff4* 基因第 3 个外显子和第 4 个内含子的向导 RNA(sgRNA)。将构建成功的重组质粒转染至 B16-F10 细胞中, 并利用抗性筛选出单克隆细胞, 进行基因型鉴定和 AFF4 表达水平检测。验证自主制备的 AFF4 多克隆抗体的特异性。结果: 通过基因组 DNA 鉴定获得两株正确的单克隆细胞系, 其 *Aff4* 基因 mRNA 水平($t=53.08$, $P<0.001$)和 AFF4 蛋白表达水平($t=15.17$, $P<0.001$)显著降低。免疫共沉淀实验和蛋白免疫印迹实验证明自主制备的抗人/鼠 AFF4 多克隆抗体特异性良好($t=264.7$, $P<0.0001$)。结论: 成功构建了 *Aff4* 基因敲除的 B16-F10 稳定细胞系, 并且成功制备抗 AFF4 蛋白的多克隆抗体。

关键词 AFF4; CRISPR/Cas9; 表观遗传; 原核表达; 多克隆抗体

中图分类号 R3

文献标志码 A

Aff4 gene knockout stable B16-F10 cell line generation with CRISPR/Cas9 system and anti-AFF4 polyclonal antibody preparation

ZHANG Jia-hui, YAN Han, HU De-qing

(Department of Cell Biology, School of Basic Medical Sciences, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

Abstract **Objective:** ALF transcription elongation factor 4(AFF4) gene knockout mouse melanoma cells(B16-F10) were constructed using CRISPR/Cas9 technology, and the specific AFF4 polyclonal antibody was prepared independently. **Methods:** A pair of guide RNA (sgRNA) targeting the third exon and the fourth intron of mouse *Aff4* gene were designed. The successfully constructed recombinant plasmid was transfected into B16-F10 cells, and monoclonal cells were selected by resistance screening. The genotype was identified and the expression level of AFF4 was detected. The specificity of self-prepared AFF4 polyclonal antibody was verified. **Results:** Two correct monoclonal cell lines were obtained by genomic DNA identification, and their *Aff4* mRNA level ($t=53.08$, $P<0.001$) and AFF4 protein expression level($t=15.17$, $P<0.001$) were significantly decreased. Protein immunoprecipitation and Western blotting showed that the self-prepared anti-human/mouse AFF4 polyclonal antibody had good specificity ($t=264.7$, $P<0.0001$). **Conclusion:** Two *Aff4* knockout B16-F10 cell lines are successfully established. The polyclonal antibody of AFF4 protein is successfully prepared.

Key words AFF4; CRISPR/Cas9; epigenetic; prokaryotic expression; polyclonal antibody

ALF 转录伸长因子 4(ALF transcription elongation factor 4, AFF4)最初是作为混合谱系白血病(mixed-lineage leukemia, MLL)的异位伴侣基因被发现的, 可以与 MLL 发生基因重排形成融合蛋白, 进而激活下游基因转录, 导致白血病的发生、发展^[1]。AFF4 作为 AF4/FMR2 家族成员之一, 是组成超级转录延伸复合物(the super elongation complex, SEC)的核心组分, 调节下游靶基因的表达^[2-3]。AFF4 作为重要的基因转录调节因子, 参与胚胎发育、细胞分化和细胞代谢等诸多重要生物过程, 并与多种疾病的发

生、发展相关。本研究通过 CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats)/Cas (CRISPR-associated)9 系统建立 *Aff4* 基因敲除的稳定 B16-F10 小鼠黑色素瘤细胞系, 并使用自主制备的抗人/鼠 AFF4 蛋白的多克隆抗体进行鉴定, 最终获得两株 *Aff4* 基因敲除的稳定细胞系。本研究为进一步探究 AFF4 生物功能及其作用机制提供了细胞模型, 为针对 AFF4 的进一步研究奠定了重要实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料 本研究中 CRISPR/Cas9 质粒 PX459 载体, pET-16b 表达载体及 B16-F10 细胞和 293T 细胞由本实验室保存, pSinflag-Aff4 过表达载体为本

基金项目 国家自然科学基金资助项目(31872825)

作者简介 张佳慧(1998-), 女, 硕士在读, 研究方向: 医学细胞生物学; 通信作者: 胡德庆, E-mail: hudq@tmu.edu.cn。

实验室构建保存。

Fast Digest Bbs I、Fast Digest BamH I、Fast Digest Nde I、10×Fast Digest Buffer 购买于 Thermo Fisher Scientific 公司;T4 ligase、10×T4 Ligation Buffer 购买于 NEB 公司;PEI 转染试剂购买于 Polysciences 公司;兔源 β -Tubulin 抗体、兔源 Flag 抗体购买于 CST 公司。

1.2 利用 CRISPR/Cas9 技术构建 *Aff4* 基因敲除的 B16-F10 稳定细胞系方法

1.2.1 向导 RNA (sgRNA) oligo 序列的设计

应用 <https://genome.ucsc.edu/> 网站预估 sgRNA 序列得分,MIT Specificity 得分代表 sgRNA 特异性,其得分越高表示该 sgRNA 特异性越好,脱靶率越低;Efficiency 得分代表 sgRNA 对靶序列的切割效率,其得分越高表示该 sgRNA 切割效率越高;Out-of-Frame 得分表示 sgRNA 切割靶基因产生的突变破坏该基因编码的开放阅读框的概率,其得分越高表示该 sgRNA 造成移码突变的概率越高。综合以上得分后选择外显子 3 中的 sgRNA1,内含子 4 中的 sgRNA2 这两条预估结果显示特异性较好的 sgRNA(图 1),并在其 5'端加入 CACC/AAAC,与经 Fast Digest Bbs I 酶切 PX459 质粒后形成的黏性末端互补。若每条 sgRNA 序列 F 链的 5'端起始第一个碱基不是 G,则在 5'端 CACC 后添加一个碱基 G,对应 R 链的 3'端添加一个碱基 C(表 1)。

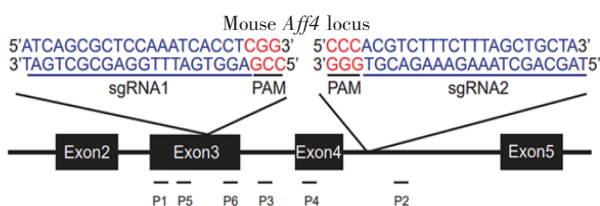


图 1 CRISPR/Cas9 技术敲除 *Aff4* 基因的策略

Fig 1 Strategies for knocking out *Aff4* gene using CRISPR/Cas9

表 1 *mAff4* sgRNA 序列

Tab 1 The sequences of *mAff4* sgRNA

名称	构建用 sgRNA(5'→3')
sgRNA1	sgRNA1-F: <u>CACCGATCAGCGCTCCAAATCACCT</u> sgRNA1-R: <u>AAACAGGTGATTGAGCGCTGATC</u>
sgRNA2	sgRNA2-F: <u>CACCGTAGCAGCTAAAGAAAGACGT</u> sgRNA2-R: <u>AAACACGCTCTTTCTTTAGCTGCTAC</u>

注:*mAff4*:小鼠 ALF 转录伸长因子 4 基因;在 sgRNA 序列两端添加的碱基用下划线表示

1.2.2 PX459-*Aff4*-sgRNA 重组质粒的构建和鉴定

对于 PX459 质粒载体用 Fast Digest Bbs I 限制性内切酶进行酶切,凝胶电泳并纯化回收线性化载体。将 sgRNA1、sgRNA2 分别进行退火。用 T4

ligase 将其分别与纯化的线性化 PX459 质粒载体室温连接,转化 Stbl3 感受态细胞,过夜培养后挑取单克隆菌落,扩增后进行测序,测序引物是 U6 启动子的正向引物序列,5'-ATACGATACAAGGCTGTTA-GAGAGATA-3'。测序结果正确后提取重组质粒 PX459-sg*Aff4*-1 和 PX459-sg*Aff4*-2 (分别对应 sgRNA1 和 sgRNA2)。

1.2.3 细胞转染

将 B16-F10 细胞接种于 6 孔板,24 h 后,细胞密度达到 70% 左右即可转染。按常规 PEI 转染方法进行,转染体系为:DMEM 100 μ L 和 PEI 15 μ L 混合,DMEM 100 μ L 和重组质粒 PX459-sg*Aff4*-1 和 PX459-sg*Aff4*-2 各 2 μ g 混合。细胞转染 8 h 后更换新鲜完全培养基,继续培养 48 h。

1.2.4 细胞抗性筛选及单克隆细胞分离

成功转染 PX459 重组载体的细胞将具备嘌呤霉素抗性。细胞转染 48 h 后换液,利用终浓度为 2 μ g/mL 的嘌呤霉素的培养基进行筛选,48 h 后将存活细胞消化,计数 2 000 个细胞接种于 10 cm 细胞培养皿继续培养,7 d 后待细胞长成适宜大小单克隆群,在光学显微镜低倍镜视野下挑取单克隆细胞于 24 孔板培养。

1.2.5 单克隆细胞系基因组 DNA 鉴定培养

10 d 左右收集细胞,提取相应单克隆细胞基因组 DNA,在重组质粒 PX459-sg*Aff4*-1 和 PX459-sg*Aff4*-2 靶向的基因组序列上下游设计外部引物(P1、P2)、内部引物(P3、P4),进行 genotyping PCR,又针对 PX459-sg*Aff4*-1 靶向基因组序列上下游设计测序引物(P5、P6),PCR 产物经电泳回收后,进行测序,测序引物为 P5(图 1,表 2)。

1.2.6 实时定量 PCR (quantitative real-time PCR, qPCR)检测 *Aff4* 基因的敲除效果

收集野生型 B16-F10 细胞和经基因型鉴定正确的单克隆细胞,提取细胞总 RNA,经反转录获得 cDNA,以 *Actin* 为内参基因,进行 qPCR 检测 *Aff4* 基因的 mRNA 水平变化。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法分析基因的相对表达量,引物见表 3。

表 2 *Aff4* genotyping 及测序引物序列

Tab 2 The sequences of *Aff4* genotyping and sequencing primer

引物名称	序列(5'→3')	产物大小(bp)
P1	TCTCAGAAACGCTCTCTGTC	4 001
P2	CCAAAGGAAGTGGGAAAGGC	
P3	ACAGAGGCTCAGTGTTTCAG	450
P4	CATCACCAGAAACCGATGCC	
P5	GCATGACCGTGACTCTTACA	265
P6	CAAAGAAGGTGGGAAAGACTGAC	

表 3 实时荧光定量 PCR 引物

Tab 3 Quantitative real-time PCR primer

引物名称	序列(5'→3')	产物(bp)
Actin	F:AACAGTCCGCCTAGAAGCAC	281
	R:CGTTGACATCCGTAAAGACC	
mAff4	F:GTACTCAGACACGGTGGAGC	113
	R:ACTGGCATCTCAGGCAAAGT	

注:mAff4:小鼠 ALF 转录伸长因子 4 基因;Actin:内参基因

1.2.7 蛋白免疫印迹法(Western 印迹)检测 *Aff4* 基因的敲除效果 收集野生型 B16-F10 细胞和经基因型鉴定正确的单克隆细胞,用 MRIPA 溶液裂解细胞提取细胞全蛋白,加入蛋白裂解液并用 95℃ 金属浴煮沸 10 min 后,离心取上清,以野生型的 B16-F10 细胞的裂解液作为对照,进行聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳,利用分离胶浓度为 6%、浓缩胶浓度为 4%的胶,每孔上样 10 μL (约 2×10⁵ 个细胞),经恒流 300 mA 湿式转膜 2 h 转印至硝酸纤维素膜后,5%脱脂牛奶室温封闭 1 h,4℃过夜孵育一抗[AFF4(1:1 000)、Tubulin(1:5 000)]、室温 1 h 孵育二抗(1:10 000),加入 ECL 化学发光液进行曝光,利用 Image J 定量分析。

1.3 AFF4 多克隆抗体制备方法

1.3.1 AFF4 基因片段的选择不与合成 根据 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> 分析人和鼠的 AFF4 蛋白序列,结果表明人和鼠的 AFF4 蛋白序列具有高度同源性,因此选择人 AFF4 蛋白(NP_055238.1)的 fasta 格式,利用 <https://www.iedb.org/> 预测抗原表位,并在 Uniprot(<https://www.uniprot.org/>)分析其疏水性,选择免疫原性较好和水溶性较强的蛋白片段作为抗原表位,最终确定人 AFF4 蛋白 N 端 1-150aa 序列作为抗原片段 hAFF4 F1。根据 pET-16b 载体在 *BamH* I 和 *Nde* I 酶切位点的序列,在 hAFF4 F1 序列两端分别设计同源臂引物(表 4)。使用 TRIzol 等试剂提取 Jurkat 细胞总 RNA,反转录为 cDNA。以 cDNA 2 μL 为模板进行 PCR 扩增获得 hAFF4 F1 目的片段。PCR 反应程序设定为:98℃,3 min→98℃,30 s→52℃,20 s→72℃,30 s,33 个循环;72℃终延伸 10 min,4℃保存。PCR 产物进行电泳检测,经鉴定后纯化回收条带位置正确的 hAFF4 F1 目的片段。

表 4 hAFF4 F1 引物序列

Tab 4 The sequences of hAFF4 F1 primer

引物名称	序列(5'→3')	产物(bp)
hAFF4-F1-pET-16b-Nde I -F	TCGAAGGTCGTCATATGATGAACCGTGAAGACCGGAA(37bp)	450
hAFF4-F1-pET-16b-BamH I -R	GTTAGCAGCCGGATCCTACCTCTGACCACTACTGTTA(37bp)	

注:hAFF4:人类 ALF 转录伸长因子 4 基因

1.3.2 hAFF4 F1 基因片段表达载体的构建与克隆 将 pET-16b 质粒用限制性内切酶 Fast Digest *BamH* I、Fast Digest *Nde* I 进行双酶切,经电泳后纯化回收,将其与先前获得的 hAFF4 F1 目的片段连接,转化 Trans5α 感受态细胞。过夜培养后挑取单克隆菌落置于含有氨苄西林抗性的溶菌肉汤(Luria-Bertani, LB)培养基中,在 37℃摇床内 220 r/min 震荡培养 4 h 后进行 PCR 验证,验证正确后进行测序,测序引物为 T7 通用引物:TAATACGACTCACTATAGGG,经验证正确的单克隆菌株提取重组质粒,重组质粒命名为 pET-16b-hAFF4-F1。将构建成功的重组质粒转化 Rosetta 感受态细胞中,获得阳性克隆。

1.3.3 阳性克隆的诱导表达及考马斯亮蓝染色检测 挑取阳性克隆接种于含有相应抗性的 5 mL LB 液体培养基中,37℃,220 r/min 条件培养 OD₆₀₀ 值至 0.4~0.6 后,添加异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)至终浓度 200 μmol/L,于 16℃,180 r/min 条件下继续培养 12 h,以不加 IPTG 为对照。培养后,一部分菌液 3 900 r/min 离心 3 min,弃上清,用 80 μL H₂O+20 μL 裂解液重悬;另一部分菌液离心弃上清后,利用 Lysis Buffer 溶液(50 mmol/L NaH₂PO₄,300 mmol/L Na-Cl,10 mmol/L 咪唑)重悬,用超声破碎法裂解,4℃,13 500 r/min 离心 20 min,取 80 μL 上清为粗提取液,沉淀用 80 μL H₂O 重悬,各加 20 μL 裂解液。之后 95℃金属浴煮沸 10 min,进行 SDS-PAGE 电泳,电泳完毕后用考马斯亮蓝染液进行染色,检测 hAFF4 F1 片段蛋白是否被诱导表达以及蛋白可溶性情况。

1.3.4 表达蛋白的提取与纯化 为获得纯化的 hAFF4 F1 蛋白,16℃,180 r/min 条件下诱导 1 L 菌体。离心收集菌体分装于 4 个 50 mL 离心管,各加 30 mL Lysis Buffer 溶液重悬,超声裂解,超声条件为振幅 40%,超 30 s,停 30 s,待溶液澄清即认为超声完毕。4℃,13 500 r/min 离心 20 min 后,将上清液采用镍珠纯化获得目的蛋白 hAFF4 F1,通过 SDS-PAGE 分析其纯度并利用牛血清白蛋白(BSA)定量。

1.3.5 抗体制备和 Western 印迹检测 联系抗体公司将大于 1 mg 的纯化的目的蛋白送至公司,作为免疫原免疫新西兰大白兔,免疫过程结束后提取兔血清制备抗人/鼠 AFF4 蛋白多克隆抗体。得到多克

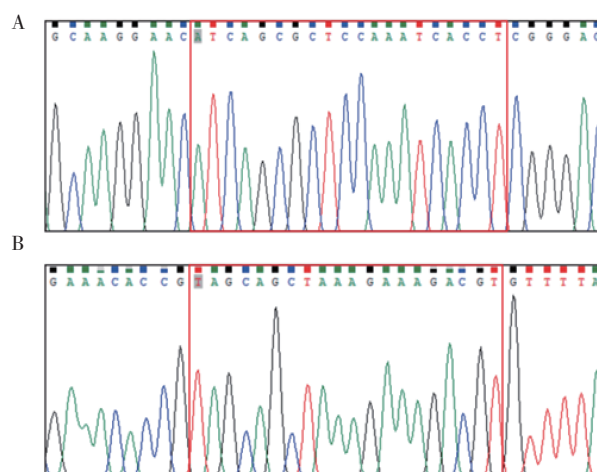
隆抗体后利用 Western 印迹检测野生型细胞和 *Aff4* 敲除细胞中 AFF4 蛋白水平来评价抗体特异性。利用蛋白质免疫沉淀进一步验证其特异性,以过表达载体 pSinflag-*Aff4* (包含 FLAG 标签的鼠 AFF4 融合蛋白) 转染 HEK293T 细胞,24 h 后提取总蛋白,将 IgG 和制备的抗人/鼠 AFF4 蛋白的多克隆抗体分别与 4℃ 过夜孵育结合,之后用 Flag 抗体作为一抗进行 Western 印迹分析。

1.4 统计学处理 利用 Image J 和 GraphPad Prism 9 软件进行统计分析与作图,全部数据经正态性检验,符合正态分布的计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用独立样本 *t* 检验, $P < 0.05$ 表示具有统计学差异。

2 结果

2.1 重组质粒 PX459-sg*Aff4*-1 和 PX459-sg*Aff4*-2 的构建 重组质粒测序结果显示,在 Fast Digest Bbs I 酶切位点之间插入片段后,构成的重组质粒序列与预期完全一致,说明 sgRNA1、sgRNA2 正确插入 PX459 质粒载体,重组质粒构建成功(图 2)。

2.2 单克隆细胞株基因组 DNA 的鉴定 野生型 *Aff4* 基因片段经 P1 和 P2 扩增后预期片段大小为 4 001 bp (片段太长可能不会通过 PCR 产生),经 P3 和 P4 扩增后预期产生大小为 451 bp 的片段。若 sgRNA1+sgRNA2 成功切割 *Aff4* 基因,则基因组 DNA 会产生 3 551 bp 的片段缺损。因此,经 P1 和 P2 扩增后预期片段变为 450 bp,由 P3 和 P4 扩增的 451 bp 大小条带消失。经 sgRNA1 和 sgRNA2 打靶敲除,提取单克隆细胞基因组 DNA,以单克隆细胞相应基因组 DNA 为模板,野生型 B16-F10 细胞基



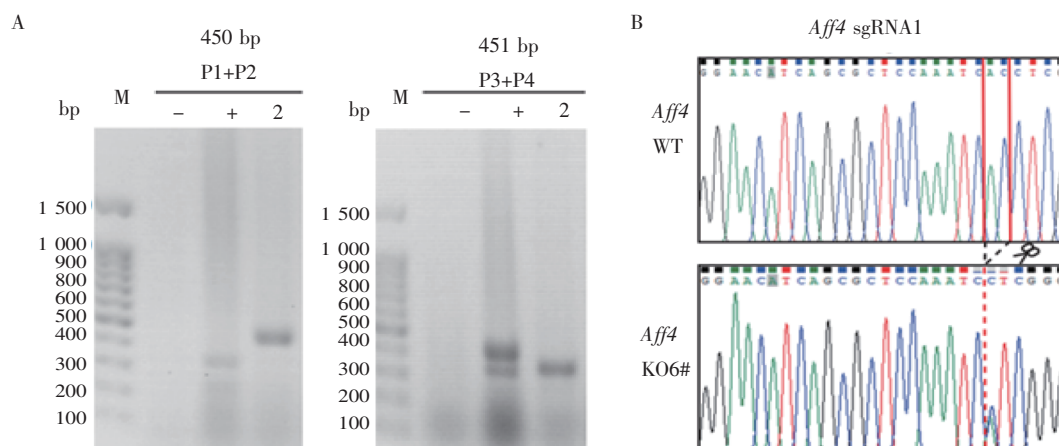
注:A:PX459-sg*Aff4*-1 重组质粒测序结果;B:PX459-sg*Aff4*-2 重组质粒测序结果,红框部分为 *Aff4* sgRNA 序列;*Aff4*:小鼠 ALF 转录因子 4 基因

图 2 PX459-sg*Aff4*-1 和 pX459-sg*Aff4*-2 重组质粒的构建

Fig 2 Construction of PX459-sg*Aff4*-1 and pX459-sg*Aff4*-2 recombinant plasmid

因组 DNA 为对照,分别经 P1、P2 和 P3、P4 扩增后琼脂糖凝胶电泳结果如图 3A 显示:*Aff4* KO2# 为双等位基因缺失单克隆细胞株。之后经 P5、P6 扩增后,PCR 产物经电泳后纯化回收,进行测序,测序引物 P5,将 *Aff4* KO6# 的测序结果与 *Aff4* 的全基因组序列比对,结果显示 *Aff4* KO6# 在 sgRNA1 靶位点附近出现了 2 个碱基(AC)的缺失突变,见图 3B。*Aff4* KO6# 测序结果显示,靶位点附近均为单一峰,无杂峰,测序结果良好,*Aff4* KO6# 在靶位点成功造成缺失 2 个碱基的移码突变,此突变能改变 *Aff4* 基因编码的开放阅读框,进而提前终止 AFF4 蛋白的翻译。

2.3 AFF4 表达水平检测 利用 RT-qPCR 检测野

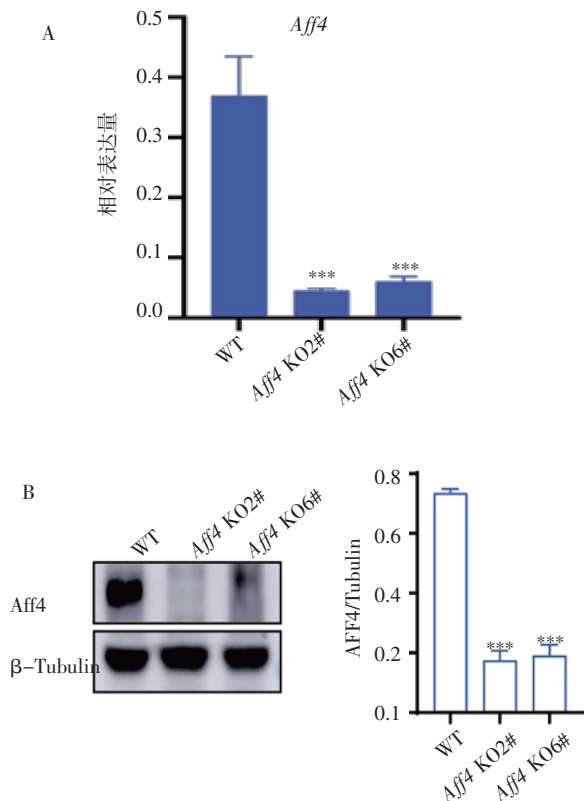


注:A:*Aff4* KO2# 单克隆细胞基因组 PCR 鉴定结果;M:DNA marker 100 bp;-:阴性对照;+:野生型 B16-F10 细胞;2:敲除 *Aff4* 基因的单克隆细胞 *Aff4* KO2#;B:*Aff4* KO6# 单克隆细胞 *Aff4* 基因外显子 3 靶标序列测序结果

图 3 单克隆细胞的鉴定

Fig.3 Identification of monoclonal cells

生型和 AFF4 基因敲除型 B16 细胞的 *Aff4* mRNA 水平, 结果发现, *Aff4* KO2#、*Aff4* KO6# 中 AFF4 的表达水平显著低于野生型 B16 细胞($t=53.08, P<0.001$), 如图 4A; 经 Western 印迹检测, 与野生型 B16-F10 细胞相比, *Aff4* KO2#、*Aff4* KO6# 单克隆细胞内源性 AFF4 蛋白表达几乎完全消失($t=15.17, P<0.001$), 见图 4B。



注: A: RT-qPCR 检测 *Aff4* 敲除效率; B: Western 印迹检测 *Aff4* 敲除效率; WT 为野生型 B16 细胞, *Aff4* KO2#、*Aff4* KO6# 为 *Aff4* 基因敲除 B16 细胞系; AFF4: ALF 转录伸长因子 4; β -Tubulin: 内参蛋白; *** $P<0.001$

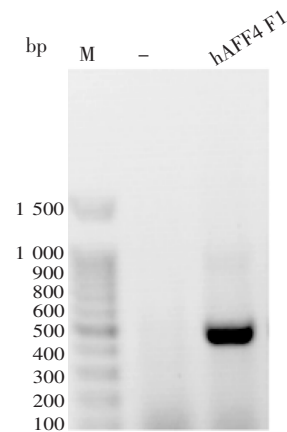
图 4 AFF4 表达水平的检测

Fig 4 Determination of AFF4 expression level

2.4 人类 ALF 转录伸长因子 4 基因 F1 (hAFF4 F1) 片段表达载体的构建与鉴定 将抗原 hAFF4 F1 片段插入到 pET-16b 表达载体上, 经菌液 PCR 鉴定阳性克隆 (450 bp) 后提取重组质粒 pET-16b-hAFF4-F1 (图 5) 进行测序。

2.5 hAFF4 F1 抗原蛋白的表达与纯化 经过蛋白纯化预实验, 发现该重组蛋白主要以可溶的形式存在于粗提上清中 (图 6A)。对上清中诱导产生的目的蛋白进行纯化, 获得终体积 500 μ L 的目的蛋白, BSA 定量结果显示, 纯化后目的蛋白相对分子量约为 18 (图 6B), 并且足够 1 mg 可以进行后续免疫过程。

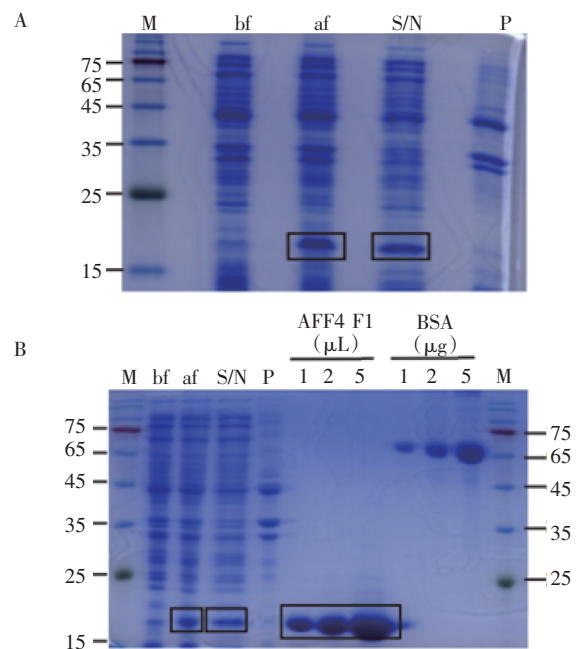
2.6 多克隆抗体对 AFF4 的特异性检测 将自主制备的 AFF4 多克隆抗体作为一抗, 野生型、*Aff4* KO2#、*Aff4* KO6# B16-F10 细胞分别提取总蛋白作为样品进行 Western 印迹分析, 如图 7A 显示, 在含 AFF4 蛋白的野生型 B16-F10 细胞中可以检测到大小约为 150 kD 的条带, 与 AFF4 蛋白的预期大小一致, 而不含有 AFF4 蛋白的敲除细胞 *Aff4* KO2#、*Aff4* KO6# 中不能检测到该条带($t=264.7, P<0.001$)。对过表达 AFF4 的 HEK293T 细胞的 IP 实验结果显示, pSinflag-AFF4 表达成功, AFF4 多克隆抗体能够



注: M: DNA marker 100bp; -: 阴性对照; hAFF4 F1: hAFF4 F1 基因

图 5 AFF4 F1 基因的 PCR 扩增

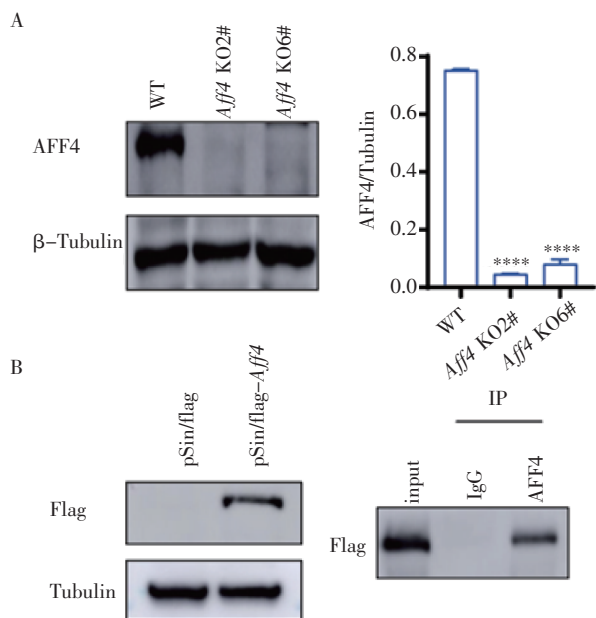
Fig 5 PCR amplification of AFF4 F1 gene



注: A: AFF4 F1 蛋白的可溶性分析; M: 蛋白 marker; bf: 未经 IPTG 诱导的重组载体; af: 经 IPTG 16 $^{\circ}$ C 诱导 12 h 的重组载体; S/N: 诱导后目的蛋白表达产物的上清; P: 诱导后目的蛋白表达产物的沉淀; B: AFF4 F1 蛋白的表达与纯化; M、bf、af、S/N、P 同前, hAFF4 F1 蛋白浓度约为 2.5 mg/mL

图 6 AFF4 F1 重组蛋白的纯化

Fig 6 Purification of AFF4 F1 recombinant protein



注:A:Western 印迹检测 AFF4 多克隆抗体的特异性;B:IP 实验检测 AFF4 多克隆抗体的特异性;WT 为野生型 B16 细胞, *Aff4* KO2#、*Aff4* KO6# 为 *Aff4* 基因敲除 B16 细胞系;AFF4:ALF 转录伸长因子 4; Flag:Flag 标签蛋白;Tubulin:内参蛋白;pSin/flag:过表达空载体;pSin/flag-*Aff4*:过表达小鼠 *Aff4* 蛋白载体;IgG:对照免疫前血清;**** $P<0.0001$

图 7 Western 印迹鉴定 AFF4 多克隆抗体的特异性

Fig 7 The specificity of polyclonal antibodies of AFF4 protein detected by Western blotting analysis

特异性识别并结合过表达的 AFF4 蛋白(图 7B)。

3 讨论

CRISPR/Cas9 技术是基于细菌演化过程中,形成的抵御外源 DNA 的天然免疫防御机制所设计开发^[4],是一种新兴的基因编辑工具。并且,该技术在现有的基因编辑和基因修饰技术中可操作性最强、效率最高、成本最低,是当今主流的基因编辑系统^[5]。CRISPR/Cas9 基因编辑系统以具有核酸内切酶功能的 Cas9 蛋白(或其他 Cas9 同源蛋白)和向导 RNA (single guide RNA, sgRNA)为核心构成。Cas9/sgRNA 复合体靶向结合到基因组 DNA 的特定位点,并在 5'-NGG-3'PAM 序列上游三个碱基处进行切割,使得 DNA 双链断裂(double-strand breaks, DSB)。DSB 是一种极为严重的 DNA 损伤,需要复杂的修复机制,即重组修复来进行对 DNA 双链断裂的修复。重组修复根据其修复机制不同,可分为自主非同源末端连接(non-homologous end joining, NHEJ)和同源重组(homology-directed repair, HR),并可在修复过程中发生碱基突变。NHEJ 是一种在哺乳动物细胞中常见的 DNA 错配修复的机制,既可以作为一种 DNA 损伤修复的方式,也可以作为一种基因重组的策略。已有研究表明,在细胞分裂的各个

时期中,细胞通常会利用 NHEJ 进行高效的 DNA 损伤修复和连接一些基因片段形成新组合,如免疫细胞的基因重排等^[6],因此, Cas9/sgRNA 复合体切割位点周围易发生碱基插入或缺失进而造成基因移码突变。

利用 CRISPR-Cas9 系统进行细胞全基因组筛选后,可产生大量基因突变的细胞群,对该细胞群进行 RNA-seq、scRNA-seq,进而研究突变细胞的表型变化是否与遗传因素相关^[7]。CRISPR-Cas9 系统的基因组筛选具有两大突出优势:高特异性和不可逆性,因此广泛应用于基础研究与临床药物筛选,主要包含对临床化疗药物产生抑制作用的基因、影响肿瘤进展的基因以及构建针对性的基因筛选文库对潜在基因进行大范围筛选等^[8-9]。此外,CRISPR 技术在医学方面也有很大的应用前景。2016 年四川大学华西医学院首次将 CRISPR 系统用于癌症治疗的临床试验,由参与基因编辑癌症治疗的转移性非小细胞肺癌患者提供外周血淋巴细胞,在体外利用 CRISPR/Cas9 技术敲除 T 细胞的 PD-1 基因^[10]。筛选基因编辑后的淋巴细胞并扩大培养,然后重新注入患者体内,取得了良好疗效。

利用 CRISPR/Cas9 技术进行基因编辑的传统方法具有颇多不足,本研究分别在 sgRNA 的设计策略与单克隆的获取两方面进行改进。在 sgRNA 的设计策略上本研究采用 UCSC 网站提供的各项得分对 sgRNA 效率进行综合评估,并将传统的单个 sgRNA 转染改为双 sgRNA 共转染,以期获得片段性敲除的单克隆细胞系,这样的细胞系对基因的敲除效果最好,后期发生重组修复的概率较低;在单克隆细胞的获取上,本研究采用稀释后挑取单克隆的方法代替传统的梯度稀释法,大倍数的稀释保证每个单克隆群落都是由单个细胞增殖而来,互不干扰,避免了细胞间的污染,挑取单克隆细胞培养一定程度上也避免了细胞间的污染。

超级延伸复合物(the super elongation complex, SEC)与转录延伸相关,对基因转录具有重要影响, AFF4 是组成 SEC 的骨架蛋白,在胚胎发育和细胞分化过程中发挥重要调控作用。Isnardon 等^[11]发现 AFF4 是淋巴细胞发育和分化所必需的。在 AFF4 基因敲除的小鼠体内, T 细胞和 B 细胞的发育均受到影响。另外, Izumi 等^[12]发现 *Aff4* 突变会导致发育疾病 CHOPS 综合征(cognitive impairment and coarse facies, heart defects, obesity, pulmonary involvement, and short stature and skeletal dysplasia, CHOPS)。研究发现,与 *Aff4* 表达正常的野生型小鼠相比, *Aff4* 基

因缺失的小鼠胚胎发育迟缓,甚至因胚胎发育不良导致死亡等,仅有13%的 *Aff4* 缺陷小鼠能正常发育,表明 *Aff4* 在小鼠的胚胎发育过程中发挥重要作用^[13-14]。此外, *AFF4* 功能异常和多种肿瘤的发生、发展都有密切关系^[15-16]。研究显示, *AFF4* 促进某些癌细胞的增殖和转移^[17]。 *AFF4* 在 RNA 聚合酶 II (RNA Pol II) 从启动子前端释放中起到了关键作用,从而通过促进转录延伸和染色质的重新组装调控基因表达。Liang 等^[18]利用小鼠异种移植瘤模型发现 SEC 抑制剂能在两种层面上调控基因转录:抑制 RNA Pol II 暂停到释放的转换与抑制转录延伸过程的延伸速度。同时在该研究还发现 SEC 抑制剂抑制了 *MYC* 基因的转录,使得 *MYC* 下游靶基因如 RNA 剪辑因子^[19]转录抑制,从而使 *MYC* 驱动癌症进程延缓。 *AFF4* 还通过直接调控转录因子 c-*MYC* 的转录活性,并通过与 *MYC* 上游的 NF- κ B 形成调控网络促进膀胱癌细胞的增殖、转移^[20]。因此,本研究构建的 *Aff4* 基因敲除的稳定 B16-F10 细胞系为进一步探讨 *AFF4* 调控肿瘤细胞基因转录的机制,从表观遗传方向对 *Aff4* 基因敲除后肿瘤微环境改变的机制进行研究提供了模型。

利用本研究构建的 *Aff4* 基因敲除的稳定 B16-F10 细胞系,制备的特异抗人/鼠 *AFF4* 蛋白多克隆抗体,为之后深入研究 *Aff4* 基因在肿瘤细胞基因转录中的功能及作用机制提供了科研工具。

参考文献:

- [1] TAKI T, KANO H, TANIWAKI M, et al. AF5q31, a newly identified AF4-related gene, is fused to MLL in infant acute lymphoblastic leukemia with ins (5;11)(q31;q13q23)[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999, 96(25): 14535-14540.
- [2] GUO C, CHE Z, YUE J, et al. ENL initiates multivalent phase separation of the super elongation complex (SEC) in controlling rapid transcriptional activation[J]. *Sci Adv*, 2020, 6(14): eaay4858.
- [3] CHEN Y, VOS S M, DIENEMANN C, et al. Allosteric transcription stimulation by RNA polymerase II super elongation complex [J]. *Mol Cell*, 2021, 81(16): 3386-3399.
- [4] YU Z, JIANG S, WANG Y, et al. CRISPR-Cas adaptive immune systems in Sulfolobales: genetic studies and molecular mechanisms [J]. *Sci China Life Sci*, 2021, 64(5): 678-696.
- [5] HILLE F, RICHTER H, WONG S P, et al. The biology of CRISPR-Cas: backward and forward [J]. *Cell*, 2018, 172(6): 1239-1259.
- [6] CHANG H H Y, PANNUNZIO N R, ADACHI N, et al. Non-homologous DNA end joining and alternative pathways to double-strand break repair [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2017, 18(8): 495-506.
- [7] MACLEOD G, BOZEK D A, RAJAKULENDRAN N, et al. Genome-wide CRISPR-Cas9 screens expose genetic vulnerabilities and mechanisms of temozolomide sensitivity in glioblastoma stem cells [J]. *Cell Rep*, 2019, 27(3): 971-986.
- [8] ZHAN T, RINDTORFF N, BETGE J, et al. CRISPR/Cas9 for cancer research and therapy [J]. *Semin Cancer Biol*, 2019, 55: 106-119.
- [9] SHIFRUTE E, CARNEVALE J, TOBIN V, et al. Genome-wide CRISPR screens in primary human T cells reveal key regulators of immune function [J]. *Cell*, 2018, 175(7): 1958-1971.
- [10] CYRANOSKI D. CRISPR gene-editing tested in a person for the first time [J]. *Nature*, 2016, 539(7630): 479.
- [11] ISNARD P, CORÉ N, NAQUET P, et al. Altered lymphoid development in mice deficient for the mAF4 proto-oncogene [J]. *Blood*, 2000, 96(2): 705-710.
- [12] IZUMI K, NAKATO R, ZHANG Z, et al. Germline gain-of-function mutations in *AFF4* cause a developmental syndrome functionally linking the super elongation complex and cohesin [J]. *Nat Genet*, 2015, 47(4): 338-344.
- [13] URANO A, ENDOH M, WADA T, et al. Infertility with defective spermiogenesis in mice lacking AF5q31, the target of chromosomal translocation in human infant leukemia [J]. *Mol Cell Biol*, 2005, 25(15): 6834-6845.
- [14] ETCHEGARAY J P, ZHONG L, LI C, et al. The histone deacetylase SIRT6 restrains transcription elongation via promoter-proximal pausing [J]. *Mol Cell*, 2019, 75(4): 683-699.
- [15] BACON C W, D'ORSO I. CDK9: a signaling hub for transcriptional control [J]. *Transcription*, 2019, 10(2): 57-75.
- [16] LLOYD S M, LEON D B, BRADY M O, et al. CDK9 activity switch associated with *AFF1* and *HEXIM1* controls differentiation initiation from epidermal progenitors [J]. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 4408.
- [17] LIANG K, VOLK A G, HAUG J S, et al. Therapeutic targeting of mll degradation pathways in mll-rearranged leukemia [J]. *Cell*, 2017, 168(1-2): 59-72.e13.
- [18] LIANG K, SMITH E R, AOI Y, et al. Targeting processive transcription elongation via SEC disruption for MYC-induced cancer therapy [J]. *Cell*, 2018, 175(3): 766-779.
- [19] HSU T Y, SIMON L M, NEILL N J, et al. The spliceosome is a therapeutic vulnerability in MYC-driven cancer [J]. *Nature*, 2015, 525(7569): 384-388.
- [20] CHENG M, SHENG L, GAO Q, et al. The m(6)A methyltransferase METTL3 promotes bladder cancer progression via *AFF4*/NF- κ B/*MYC* signaling network [J]. *Oncogene*, 2019, 38(19): 3667-3680.

(2022-12-16 收稿)