

骨 科 学

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.002235

利用 CRISPR/Cas9 系统构建 Lrtm1 基因敲除的 C2C12 细胞系

李浩可,何衍信,时迎旭,杨 丹,尹 凤,高彦飞,聂 茂,邓忠良

(重庆医科大学附属第二医院骨科,重庆 400014)

【摘要】目的:利用 CRISPR/Cas9 技术构建稳定敲除 Lrtm1(leucine-rich repeats and transmembrane domains 1)基因的 C2C12 细胞系,为研究 Lrtm1 基因的作用提供实验基础。**方法:**设计 3 对针对 Lrtm1 基因的向导 RNA(sgRNA),将 sgRNA 插入载体 pCRISPR-LvSG06 中;利用慢病毒包装系统包装含有 sgRNA 的重组质粒 pCRISPR-LvSG06;将病毒感染 C2C12 细胞,并加入嘌呤霉素筛选,将筛选嘌呤霉素阳性的细胞提取 RNA,逆转录成 cDNA;设计 Cas9 引物,利用 cDNA 为模版,PCR 验证 C2C12 细胞中 Cas9 的表达,确认慢病毒成功感染 C2C12 细胞;利用 96 孔板挑选单克隆细胞的方法筛选得到单克隆细胞;将扩增的单克隆细胞提取基因组 DNA,测序 Lrtm1 基因相关序列并与野生型 Lrtm1 基因进行对比,确认敲除成功的克隆细胞株;诱导敲除 Lrtm1 稳定细胞株成肌分化,检测成肌分化标志因子 Myosin 的蛋白表达,RT-PCR 检测转录因子 PAX7 的 mRNA 表达,Western blot 检测 H3K27me3 蛋白水平。**结果:**测序结果显示向导 RNA(sgRNA)成功插入载体质粒;将单克隆细胞 DNA 测序结果显示 A 和 C 克隆成功敲除 Lrtm1 基因;敲除 Lrtm1 基因后成肌分化标志因子 Myosin 蛋白表达降低,成肌转录因子 PAX7 mRNA 的表达降低,在分化 72 和 96 h 组,H3K27me3 蛋白水平较野生型组增高。**结论:**利用 CRISPR/Cas9 技术成功敲除 Lrtm1 基因,稳定敲除 Lrtm1 基因的 C2C12 细胞系构建成功;敲除 Lrtm1 后能抑制 C2C12 细胞成肌分化,并且抑制成肌转录因子 PAX7 的 mRNA 表达,PAX7 mRNA 表达降低的原因可能为 H3K27me3 水平增高。

【关键词】Lrtm1;CRISPR/cas9;基因敲除;C2C12**【中图分类号】**R34**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2019-03-01

Construction of Lrtm1 gene knockout C2C12 cell line using the CRISPR/Cas9 system

Li Haoke, He Yanxi, Shi Yingxu, Yang Dan, Yin Feng, Gao Yanfei, Nie Mao, Deng Zhongliang

(Department of Orthopedics, Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To construct Leucine-rich repeats and transmembrane domains 1 (Lrtm1) gene knockout C2C12 cell line using the CRISPR/Cas9 technique and to provide an experimental basis for studying the functions of the Lrtm1 gene. **Methods:** Three pairs of small guide RNA (sgRNA) targeting the Lrtm1 gene were designed and inserted into the vector pCRISPR-LvSG06, and the recombinant plasmid pCRISPR-LvSG06 containing sgRNA was packaged by the lentiviral packaging system. Then the C2C12 cells were infected with the virus and screened by puromycin, and RNA was extracted from the screen-positive cells and reversely transcribed into cDNA. The Cas9 primer was designed using the cDNA as the template to verify the expression of Cas9 in C2C12 cells by PCR and to confirm that the C2C12 cells were successfully infected by the virus. Monoclonal cells were collected by the 96-well plate method, and the amplified monoclonal cells were used to extract genomic DNA and investigate the Lrtm1 gene-related sequences for comparison with the wild-type Lrtm1 gene, so as to identify the monoclonal cell line with successful gene knockout. After that, the stable Lrtm1 gene knockout cell line was induced to differentiate into myoblasts and its expression of myosin, which was the marker of successful myogenic differentiation, was determined. Besides, the expression of transcription factor PAX7 mRNA and H3K27me3 protein was determined by RT-PCR and Western blot, respectively. **Results:** The sequencing results showed the successful insertion of

作者介绍:李浩可,Email:408410179@qq.com,

研究方向:骨骼肌再生。

通信作者:邓忠良,Email:zhongliang.deng@qq.com。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:81501867)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20190708.1453.004.html>

(2019-07-09)

the sgRNA into the plasmid vector and Lrtm1 gene knockout in clones A and C. The expression of both myosin protein as the myogenic differentiation marker and PAX7 mRNA as the myogenic transcription factor decreased, while the expression levels of H3K27me3 protein in both the 72-hour and 96-hour differ-

entiation groups were higher than those in the wild-type group. **Conclusion:** The CRISPR/Cas9 technique can be used for *Lrtm1* gene knockout and successfully constructing the *Lrtm1* gene knockout C2C12 cell line. *Lrtm1* gene knockout can inhibit the myogenic differentiation of C2C12 cells and the expression of PAX7 mRNA, and the reason for the reduced expression of PAX7 mRNA may be attributed to the increased level of H3K27me3.

【Key words】*Lrtm1*; CRISPR/Cas9; gene knockout; C2C12

基因编辑技术是指通过识别细胞 DNA 片段中靶点的核苷酸序列,利用核酸内切酶对 DNA 靶点序列进行切割,完成对细胞 DNA 靶点基因的敲除、加入等过程^[1]。目前利用核酸酶的靶向基因编辑技术被越来越多的生物学者使用,这种技术的广泛使用是由于成簇的规律间隔的短回文重复序列 (clustered regularly interspaced short palindromic repeat, CRISPR) 系统的发现^[2]。CRISPR/Cas 系统是细菌或古细菌中的一种适应性免疫系统,用以抵御外来质粒或噬菌体的入侵^[3-4]。CRISPR/Cas 目前主要分为 2 大类共 5 种类型,其中 II 型是最广泛用于基因工程的类型^[5-6]。该系统主要包含非特异性 Cas9 核酸酶和 sgRNA 两部分^[7],其中 sgRNA 具有引导作用。Cas9 是一种 RNA 依赖的 DNA 核酸内切酶,利用单一向导 RNA (sgRNA) 使双链 DNA 断裂^[8]。断裂的细胞 DNA 在修复过程中产生缺失突变,改变了目的基因编码的开放阅读框,提前终止蛋白的翻译^[9]。

肌卫星细胞是骨骼肌具有极强再生能力的关键。肌卫星细胞位于骨骼肌纤维浆膜和基底膜之间,生理状态下处于静息状态。当骨骼肌损伤后,静息的肌卫星细胞被激活,重新进入细胞周期,继而大量增殖、分化、成熟并融合形成新的肌纤维^[10]。骨骼肌干细胞 (肌卫星细胞) 向骨骼肌的定向分化过程受多种成肌转录因子的层级调控,包括 Pax7、MyoD、Myf5、Myogenin 等^[11]。相关文献报道, PAX7 在卫星细胞的存活以及调节卫星细胞向肌源性方向转变中起到关键作用^[12-13],并能抑制下游成肌转录因子 MyoD 的表达^[14],从而抑制骨骼肌分化。相关报道^[15]证明组蛋白 3 的第 27 位赖氨酸的三甲基化 (H3K27me3) 能抑制基因的表达。H3K27 的甲基化由 Polycomb-repressive complexes 2 (PRC2) 复合物催化, PRC2 复合物包含甲基转移酶活性的亚基 EZH2 或者 EZH1^[16]。Palacios 等^[17]报道在成肌分化过程当中,含有 EZH2 亚基的 PRC2 复合物能结合到

PAX7 的启动子区域,提高该区域 H3K27me3 水平,从而抑制 PAX7 的表达。

目前对于 *Lrtm1* (leucine-rich repeats and transmembrane domains 1) 相关报道较少, Samata 等^[18]报道, *Lrtm1* 可作为神经细胞表面标记因子。Lopez Jimenez 等^[19]报道,在膈肌发育异常的小鼠中, *Lrtm1* 表达减少,提示 *Lrtm1* 可能参与成肌分化。目前关于 *Lrtm1* 基因对于成肌分化的影响报道较少,本课题组在前期研究中发现过表达 *Lrtm1* 可以抑制 C2C12 细胞成肌分化^[20],但对成肌分化的影响机制不明确。本文利用 CRISPR/Cas9 技术,将 C2C12 细胞中 *Lrtm1* 基因敲除,构建稳定敲除 *Lrtm1* 基因的 C2C12 细胞系。诱导细胞成肌分化, Western blot 检测成肌标志因子 Myosin 的蛋白在敲除 *Lrtm1* 后表达降低,表明敲除 *Lrtm1* 后能抑制 C2C12 细胞的成肌分化。为探究敲除 *Lrtm1* 后成肌分化受到抑制的原因。RT-PCR 检测上游成肌转录因子 PAX7 的 mRNA 水平在敲除 *Lrtm1* 后表达明显降低,并且敲除 *Lrtm1* 后细胞分化时 H3K27me3 蛋白水平在分化 72 和 97 h 组明显增加。初步认定敲除 *Lrtm1* 后 H3K27me3 水平增高可能抑制转录因子 PAX7 mRNA 表达,具体机制有待进一步验证。本实验利用 CRISPR/Cas 系统成功构建 *Lrtm1* 敲除的 C2C12 小鼠成肌细胞系,为进一步研究 *Lrtm1* 的作用机制奠定实验基础。

1 材料与方法

1.1 细胞及主要试剂

C2C12 细胞株购于中国科学院细胞库; HEK293T 细胞购于中国科学院细胞库; 高糖 DMEM 培养基、0.25% 胰蛋白酶购于 Hyclone 公司; Genloci 基因抽提试剂盒和 Cruiser™ 酶 (江苏吉锐生物有限公司); *EcoR* I、*Nhe* I 内切酶 (NEB); psPAX2、pVSVG 质粒 (森灵生物); Polybrene (Santa Cruz); Fu-gene 转染试剂 (Progenia)。

1.2 细胞培养

C2C12 成肌细胞与 HEK293T 细胞均采用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基培养。所有细胞均置于 37 °C 恒温和 5% CO₂ 气体的饱和湿度培养箱中。

1.3 C2C12 细胞成肌分化诱导

将 C2C12 细胞培养于生长培养基中 GM (10% FBS + DMEM), 当细胞密度达到 80% 左右时, PBS 漂洗 2 次, 更换分化培养基 DM (2% 马血清 + DMEM)。分化培养基每间隔 24 h 更换 1 次。分不同时间点收取细胞。

1.4 Western blot 检测蛋白表达水平

诱导 C2C12 细胞成肌分化 96 h, 分别收取 0、72、96 h 组细胞, 进行 Western blot 检测。5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h 后加入一抗 anti-Myosin (eBioscience 1:1 000)、anti-H3K27me3 (CST 1:1 000)、anti-Tubulin (santa 1:1 000) 室温 1 h, 二抗室温 1 h。

1.5 qRT-PCR 检测基因表达水平

提取分化后不同时间点 C2C12 成肌细胞, 提取细胞 RNA。将 RNA 逆转录为 cDNA。逆转录条件: 37 °C 15 min, 85 °C 5 s。随后以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。PCR 反应条件: 95 °C 10 s, 55 °C 20 s, 60 °C 5 s, 40 个循环。基因表达水平用 2^{-ΔΔCt} 方法分析。引物序列 PAX7, 正向引物 (5'-3'): AAAGGGAACGTCTGGATG; 反向引物 (5'-3'): CTCGGCTGTG-AACGTGCT。

1.6 慢病毒包装

将 HEK293T 细胞铺于 6 孔板, 当细胞密度达到 60%~70% 时, 按照脂质体转染试剂说明书, 将重组质粒 pCRISPR-LvSG06、psPAX2、pVSVG 3 种质粒按照 2:2:1 的比例在转染试剂的辅助下共同转于 HEK293T 细胞中, 72 h 后收取培养基包含病毒的上清, 置于 4 °C 保存。

1.7 统计学处理

采用 SPSS 22.0 统计软件进行分析, 两两比较采用 *t* 检验; 检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 Lrtm1 基因敲除靶点设计

Lrtm1 基因位于小鼠 14 号染色体, 基因全长 15 437 个碱基, 含有 3 个外显子, 位置分别位于 360~404、3 417~4 012、9 120~9 549。根据碱基特异性在 1 号和 2 号外显子上共设计 3 段 sgRNA 靶点序列 (图 1)。并且分别在 sgRNA 靶点序列 5' 和 3' 端设计两个酶切位点序列 *EcoR* I 和 *Nhe* I (表 1)。将合成好的 sgRNA 核苷酸序列进行程序退火, 使其形成双链。

2.2 pCRISPR-Lrtm1-sgRNA 载体构建

选用 pCRISPR-LvSG06 载体质粒, 使用 *EcoR* I 和 *Nhe* I 限制性内切酶分别和共同酶切载体质粒。将 *EcoR* I 和 *Nhe* I 同时切开的载体片段回收, 使用 T4 连接酶将回收后的载体片段与退火后的 sgRNA 连接。将载体与 sgRNA 连接后的产

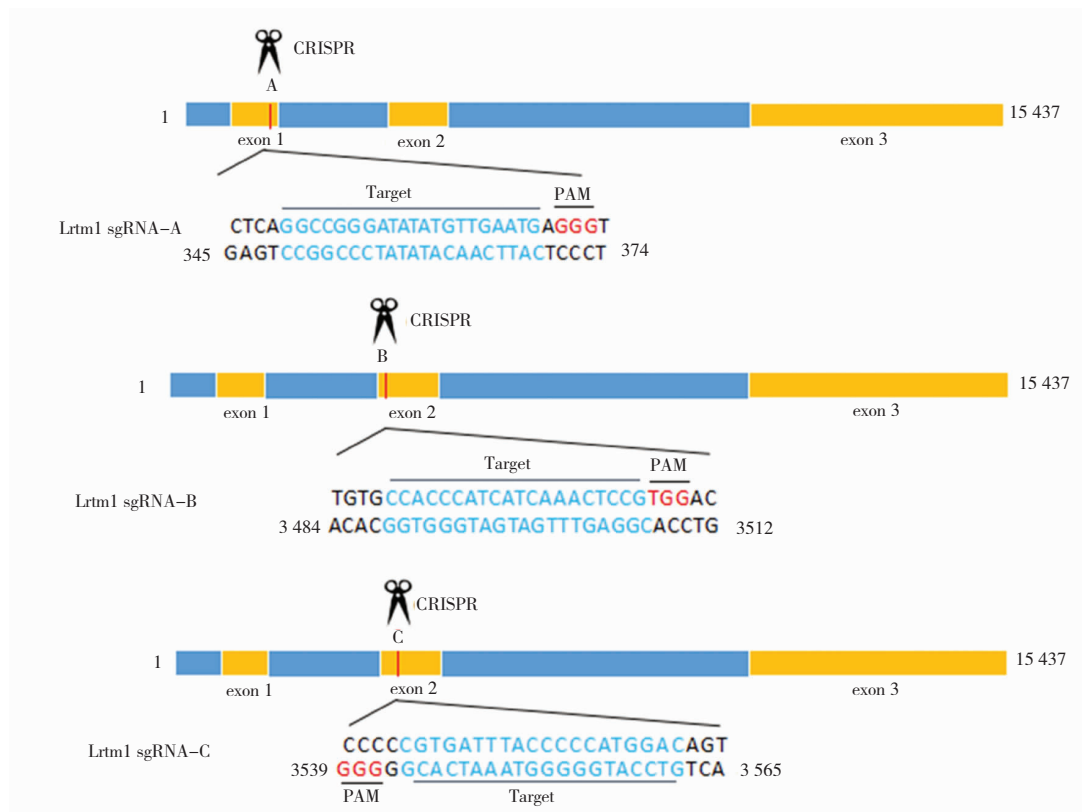


图 1 Lrtm1 基因 sgRNA 靶点设计

表 1 sgRNA 靶点寡核苷酸序列

sgRNA	正向引物(5'-3')	反向引物(5'-3')
Lrtm1-sgRNA A	ggattcGCCGGGATATATGTTGAATG	gctagcCATTCAACATATATCCCGGC
Lrtm1-sgRNA B	ggattcCCACCCATCATCAAAC TCCG	gctagcCGGAGTTTGATGATGGGTGG
Lrtm1-sgRNA C	ggattcGTCCATGGGGGTAAATCAGC	gctagcCGTGATTACCCCCATGGAC

物转化,提取质粒。将提取后的质粒从载体 U6 启动子后开始测序,测序结果与 sgRNA 靶点序列进行比对(图 2),结果显示 A、B、C 3 组载体质粒均构建成功。

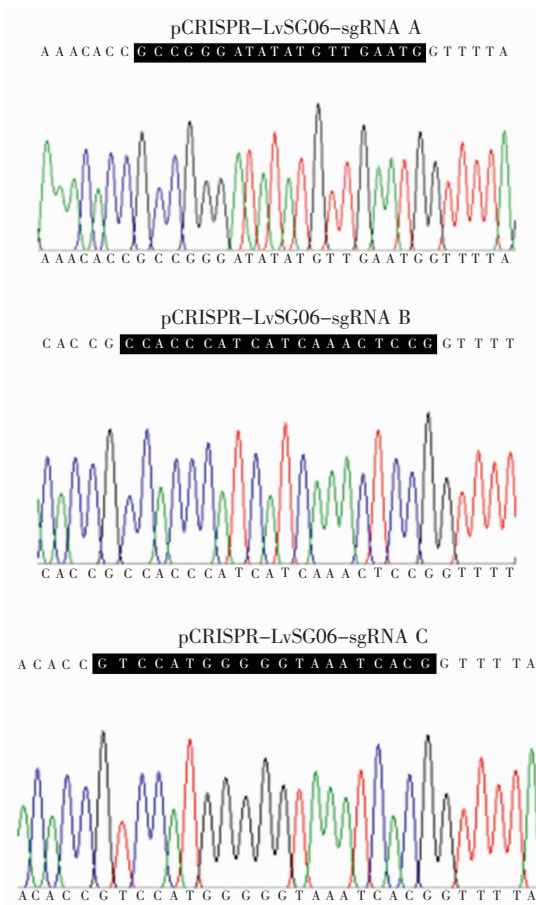
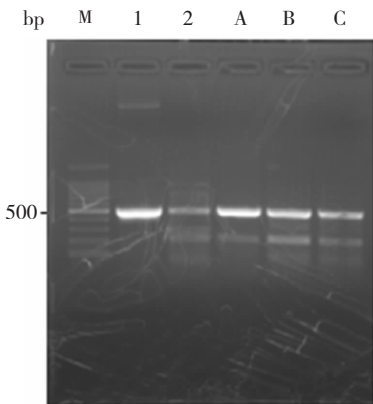


图 2 pCRISPR-LvSG06-sgRNA 测序图

2.3 包装慢病毒感染 C2C12 细胞

将构建成功的载体质粒 pCRISPR-LvSG06 A、B、C 3 个质粒分别分别与病毒包装质粒 psPAX2、pVSV-G 共同转染到 HEK293T 细胞当中,72 h 后收取含有病毒的细胞培养上清。将含有病毒的上清加入 C2C12 细胞中并加入 Polybrene,感染 48 h 后。加入终浓度为 2 $\mu\text{g/mL}$ 嘌呤霉素筛选。将抗嘌呤霉素阳性细胞,提取细胞 RNA,逆转录为 cDNA。设计 Cas9 核苷酸序列引物,Cas9 引物扩增片段长度为 495 bp,以 cDNA 为模版 PCR 验证 Cas9 基因是否在慢病毒感染后的 C2C12 细胞中表达。结果显示 A、B、C 3 组在 500 bp 位置附近均有明显条带,证明慢病毒感染后的 C2C12 细胞成功表达 Cas9 (图 3),提示慢病毒已成功感染 C2C12 细胞。

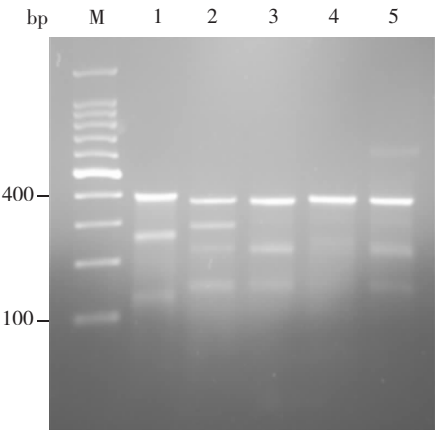


注:M 为 marker;1 泳道为阳性对照;2 泳道为阴性对照

图 3 C2C12 细胞 Cas9 的表达

2.4 Cruiser™ Enzyme 酶切筛选阳性克隆

将构建成功的载体质粒 pCRISPR-LvSG06 A、B、C 3 个质粒分别分别与病毒包装质粒 psPAX2、pVSV-G 共同转染到 HEK293T 细胞当中,72 h 后收取含有病毒的细胞培养上清。将含有病毒的上清加入 C2C12 细胞中并加入 Polybrene,感染 48 h 后。加入终浓度为 2 $\mu\text{g/mL}$ 嘌呤霉素筛选。将抗嘌呤霉素阳性的细胞挑选单克隆,单克隆细胞增殖后提取基因组 DNA。分别设计 Lrtm1 基因中 A、B、C 3 组 sgRNA 靶点理论敲除位置上下游引物 PCR 扩增,并使用 Cruiser™ Enzyme 酶切片段,能出现 3 个条带的即为可疑阳性克隆(图 4)。



注:M 为 marker;1 泳道为阳性对照;2~5 泳道分别表示不同 C2C12 细胞单克隆经 Cruiser™ Enzyme 酶切后所获得的条带

图 4 Lrtm1 基因的 Cruiser™ Enzyme 酶切鉴定

2.5 单克隆测序检测 Lrtm1 基因敲除

将 Lrtm1 基因中 sgRNA 敲除靶点核苷酸序列测序(图5)。Lrtm1-sgRNA A 和 Lrtm1-sgRNA C 组在敲除靶点测序结果显示为套峰,说明 A、C 2 组 Lrtm1 基因敲除成功。Lrtm1-sgRNA A 组 Lrtm1 基因缺失 9 个碱基,Lrtm1-sgRNA C 组 Lrtm1 基因缺失 13 个碱基,造成 Lrtm1 基因移码突变,Lrtm1 不能正确翻译蛋白,稳定敲除 Lrtm1 基因的 C2C12 细胞系构建成功。但是 Lrtm1-sgRNA B 组测序结果显示靶点序列与野生型 Lrtm1 一致,说明 Lrtm1-sgRNA B 组基因敲除不成功。

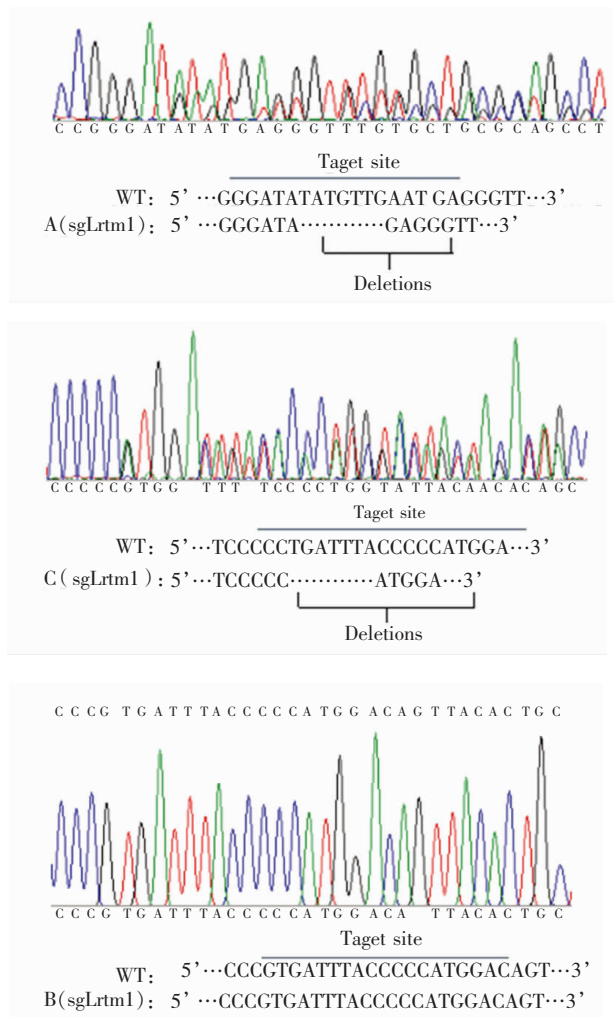


图5 Lrtm1 基因敲除 C2C12 细胞系的单克隆测序

2.6 敲除 Lrtm1 基因后抑制 C2C12 细胞成肌分化

为研究敲除 Lrtm1 基因后对细胞成肌分化的影响,诱导敲除 Lrtm1 基因的 C2C12 稳定细胞系分化,检测成肌分化标志因子 Myosin 的蛋白表达。结果显示(图6),在野生型组诱导细胞分化 72 和 96 h 组能检测到 Myosin 蛋白表达,表明成肌分化体系建立成功,在敲除 Lrtm1 基因后能明显抑制 Myosin 的蛋白表达,表明敲除 Lrtm1 后能抑制 C2C12 细胞成肌分化。

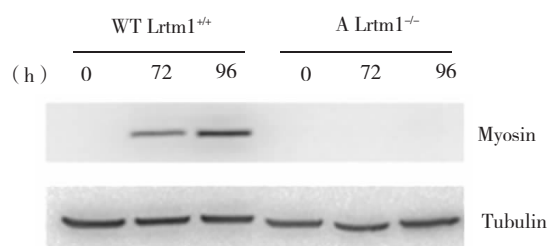
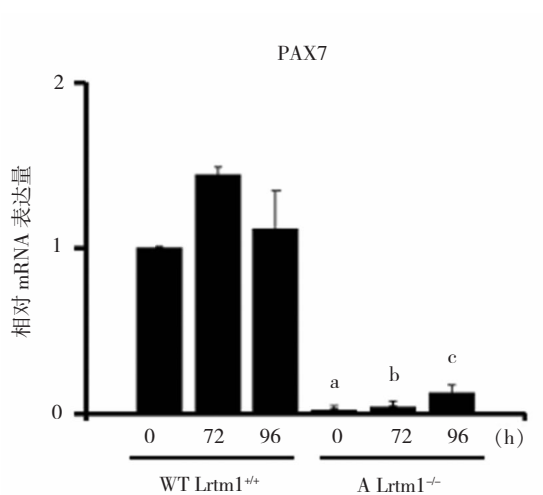


图6 Western blot 检测成肌分化时 Myosin 的蛋白表达

2.7 敲除 Lrtm1 基因后 PAX7 mRNA 表达减少

为研究敲除 Lrtm1 后成肌分化受到抑制的原因,诱导敲除 Lrtm1 基因的稳定细胞系和野生型 C2C12 细胞分化,分别收集 0、72、96 h 组细胞。提取 RNA,RT-PCR 检测成肌转录因子 PAX7 的 mRNA 表达。结果显示在敲除 Lrtm1 基因后,PAX7 的 mRNA 水平与对照组相比明显减少($P<0.05, n=3$) (图7)。证明在 C2C12 细胞中,敲除 Lrtm1 基因后抑制 PAX7 的表达。

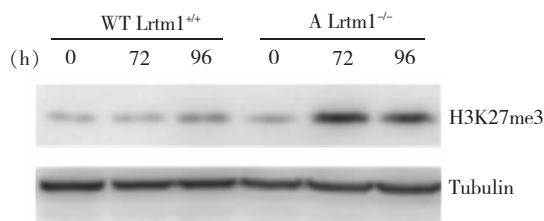


注:a,与 WT 0 h 组比较, $P=0.000$;b,与 WT 72 h 组比较, $P=0.000$;c,与 WT 96 h 组比较, $P=0.002$

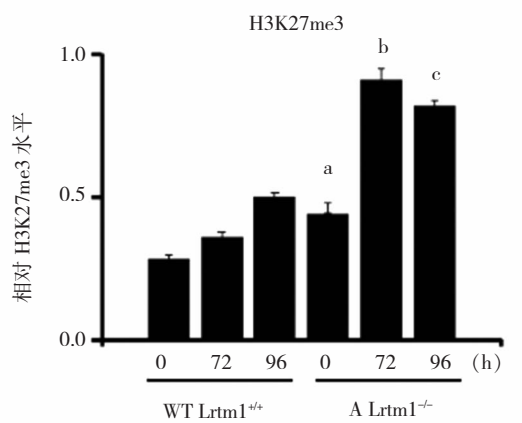
图7 RT-PCR 检测 PAX7 的 mRNA 表达

2.8 敲除 Lrtm1 后 H3K27me3 表达在分化时增加

在哺乳动物中 H3K27me3 能抑制基因的表达^[5],并且转录因子 PAX7 启动子区域的 H3K27me3 能抑制该基因的表达^[17]。为探究敲除 Lrtm1 后 PAX7 mRNA 表达减少的原因。Western blot 检测敲除 Lrtm1 后的 H3K27me3 表达水平。结果显示敲除 Lrtm1 后,诱导细胞分化,H3K27me3 的表达在分化 72 和 96 h 组明显高于野生型 C2C12 细胞(图8)。证明敲除 Lrtm1 基因后,PAX7 mRNA 表达降低的原因可能为 H3K27me3 表达水平增加。



A. Western blot 检测结果



B. H3K27me3 水平半定量结果

注:a,与 WT 0 h 组比较, $P=0.002$;b,与 WT 72 h 组比较, $P=0.000$;
c:与 WT 96 h 组比较, $P=0.000$

图 8 Western blot 检测 H3K27me3 的表达

3 讨论

目前对于 *Lrtm1* 基因的研究报道较少, Samata 等^[18]报道,在先天发育异常的小鼠膈肌中, *Lrtm1* 的表达减少。提示 *Lrtm1* 可能参与成肌分化的调节。 *Lrtm1* 主要分布于细胞膜上,含有 1 个跨膜序列和 5 个重复 LRR 结构域。细胞外信号通路可能会影响细胞增殖、分化、凋亡。 *Lrtm1* 可能通过影响细胞膜受体与外源因子的结合,导致某种信号传递到细胞内,从而调节细胞的成肌分化。本课题前期研究发现在 C2C12 细胞中过表达 *Lrtm1* 基因,能抑制 C2C12 细胞的成肌分化^[20],但其机制尚不明确,需进一步研究。

探究一个基因的功能,通常需要抑制该基因的表达^[21]。在 CRISPR/Cas9 技术出现以前, RNA 介导的干扰 (RNAi) 大多使用小 RNA 干扰 (siRNAs) 或短发夹 RNAs (shRNAs),这是真核生物中特异性基因抑制的一种主要方法^[22]。尽管 RNA 干扰是研究基因

功能比较方便的工具,但通过 mRNA 与 siRNA 或 shRNA 之间的碱基配对从而抑制转录效率较低,且特异性不高^[23]。细菌 CRISPR-Cas 系统的发现促进了 DNA 特异性靶向编辑技术新方法的发展。 II 型 CRISPR 系统使用核酸酶 Cas9,由向导 RNA (sgRNA) 引导 Cas9 特异性识别目的基因并诱导 DNA 双链断裂 (DSB)^[3,24-26],从而抑制目的基因的表达。 CRISPR/Cas9 系统目前已成为简单高效的基因编辑技术,广泛应用于人、鼠、斑马鱼 (斑马鱼)、细菌、果蝇、酵母、线虫和农作物细胞的基因编辑^[27]。

本实验选用常见的成肌分化模型细胞 C2C12 小鼠成肌细胞,因为 C2C12 细胞能典型的模拟体外骨骼肌分化^[28]。利用 CRISPR/Cas9 技术,设计向导 RNA (sgRNA) 特异性识别基因组上 C2C12 细胞 *Lrtm1* 基因的第 1 个和第 2 个外显子区域的部分序列。将向导 RNA (sgRNA) 插入 pCRISPR-LvSG06 载体中,成功构建 CRISPR 载体质粒,将质粒包装病毒后感染 C2C12 细胞。 PCR 确认 Cas9 基因在细胞中成功表达,嘌呤霉素筛选细胞后挑选单克隆细胞。提取单克隆基因组 DNA,测序结果显示 A 组和 C 组确认 *Lrtm1* 基因敲除成功。 A 组和 C 组与野生型 *Lrtm1* 基因相比分别缺失 9 bp 和 13 bp 碱基。 A 组从第 1 个起始密码子开始发生碱基缺失,所以不能翻译出正常蛋白。 C 组由于缺失 13 个碱基,造成了缺失突变,改变了 *Lrtm1* 基因的开放阅读框,导致翻译提前终止。 B 组 *Lrtm1* 基因测序结果为野生型,可能因为 B 组中向导 RNA 并没有特异性识别 *Lrtm1* 基因。因对 *Lrtm1* 基因研究较少,目前无有效抗体,所以本实验尚未检测 *Lrtm1* 的蛋白表达。敲除 *Lrtm1* 后成肌分化标志因子 Myosin 表达降低,细胞成肌分化受到抑制。为探究成肌分化受到抑制的原因, RT-PCR 检测成肌转录因子 PAX7 的 mRNA 表达,发现 PAX7 的 mRNA 表达在敲除 *Lrtm1* 降低。相关文献报道 PRC2 复合物能结合到 PAX7 的启动子区提高该区域 H3K27me3 水平,并抑制 PAX7 的表达,本课题组检测敲除 *Lrtm1* 后细胞在分化过程中 H3K27me3 水平增高,提示在敲除 *Lrtm1* 后 PAX7 的 mRNA 表达降低原因可能为 H3K27me3 水平增加导致,但具体机制有待进一步验证。目前对于 *Lrtm1* 基因的研究较少, *Lrtm1* 在成肌分化过程中如何影响 H3K27me3 水平尚不明确。可能方式为 *Lrtm1* 将细胞外某种信号传导进入细胞内,影响 PRC2 复

合物活性,从而影响 H3K27me3 水平,接下来将进一步研究 Lrtm1 是如何影响 PRC2 复合物的具体机制。本实验成功构建了 Lrtm1 敲除的 C2C12 小鼠成肌细胞系,为进一步研究 Lrtm1 的作用机制奠定实验基础。

参 考 文 献

- [1] Musunuru K. Genome editing; the recent history and perspective in cardiovascular diseases[J]. J Am Coll Cardiol, 2017, 70(22): 2808–2821.
- [2] Deltcheva E, Chylinski K, Sharma CM, et al. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III[J]. Nature, 2011, 471(7340): 602–607.
- [3] Garneau JE, Dupuis MÈ, Villion M, et al. The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA[J]. Nature, 2010, 468(7320): 67–71.
- [4] Mali P, Esvelt KM, Church GM. Cas9 as a versatile tool for engineering biology[J]. Nat Methods, 2013, 10(10): 957–963.
- [5] Makarova KS, Wolf YI, Alkhnbashi OS, et al. An updated evolutionary classification of CRISPR–Cas systems[J]. Nat Rev Microbiol, 2015, 13(11): 722–736.
- [6] Bolukbasi MF, Liu P, Luk K, et al. Orthogonal Cas9–Cas9 chimeras provide a versatile platform for genome editing[J]. Nat Commun, 2018, 9(1): 4856.
- [7] Barrangou R, Birmingham A, Wiemann S, et al. Advances in CRISPR–Cas9 genome engineering; lessons learned from RNA interference[J]. Nucleic Acids Res, 2015, 43(7): 3407–3419.
- [8] Karkute SG, Singh AK, Gupta OP, et al. CRISPR/Cas9 mediated genome engineering for improvement of horticultural crops[J]. Front Plant Sci, 2017, 8: 1635.
- [9] Gratz SJ, Cummings AM, Nguyen JN, et al. Genome engineering of Drosophila with the CRISPR RNA–guided Cas9 nuclease[J]. Genetics, 2013, 194(4): 1029–1035.
- [10] Chang NC, Rudnicki MA. Satellite cells: the architects of skeletal muscle[J]. Curr Top Dev Biol, 2014, 107: 161–81.
- [11] Bentzinger CF, Wang YX, Rudnicki MA. Building muscle: molecular regulation of myogenesis[J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2012, 4(2): a008342.
- [12] McKinnell IW, Ishibashi J, Le GF, et al. Pax7 activates myogenic genes by recruitment of a histone methyltransferase complex[J]. Nat Cell Biol, 2008, 10(1): 77–84.
- [13] Lepper C, Conway SJ, Fan CM. Adult satellite cells and embryonic muscle progenitors have distinct genetic requirements[J]. Nature, 2009, 460(7255): 627–631.
- [14] Kumar D, Shadrach JL, Wagers AJ, et al. Id3 is a direct transcriptional target of Pax7 in quiescent satellite cells[J]. Mol Biol Cell, 2009, 20(14): 3170–3177.
- [15] Bosselut R. Pleiotropic functions of H3K27Me3 demethylases in immune cell differentiation[J]. Trends Immunol, 2016, 37(2): 102–113.
- [16] Margueron R, Reinberg D. The polycomb complex PRC2 and its mark in life[J]. Nature, 2011, 469(7330): 343–349.
- [17] Palacios D, Mozzetta C, Consalvi S, et al. TNF/p38 α /polycomb signaling to Pax7 locus in satellite cells links inflammation to the epigenetic control of muscle regeneration[J]. Cell Stem Cell, 2010, 7(4): 455–469.
- [18] Samata B, Doi D, Nishimura K, et al. Purification of functional human ES and iPSC–derived midbrain dopaminergic progenitors using LRTM1[J]. Nat Commun, 2016, 7: 13097.
- [19] LopezJimenez N, Gerber S, Popovici V, et al. Examination of FGFR1 as a candidate gene for diaphragmatic defects at chromosome 4p16.3 shows that Fgfr1 null mice have reduced expression of Tpm3, sarcomere genes and Lrtm1 in the diaphragm[J]. Hum Genet, 2010, 127(3): 325–336.
- [20] 熊雷, 李浩可, 聂茂, 等. Lrtm1 基因在成肌分化过程中的功能探索[J]. 重庆医科大学学报, 43(10): 1292–1298.
- [21] Dominguez AA, Lim WA, Qi LS. Beyond editing: repurposing CRISPR–Cas9 for precision genome regulation and interrogation[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2016, 17(1): 5–15.
- [22] Mohr SE, Smith JA, Shamu CE, et al. RNAi screening comes of age: improved techniques and complementary approaches[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2014, 15(9): 591–600.
- [23] Jackson AL, Bartz SR, Schelter J, et al. Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi[J]. Nat Biotechnol, 2003, 21(6): 635–637.
- [24] Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes[J]. Science, 2007, 315(5819): 1709–1712.
- [25] Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity[J]. Science, 2012, 337(6096): 816–821.
- [26] Gasiunas G, Barrangou R, Horvath P, et al. Cas9–crRNA ribonuclease complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2012, 109(39): E2579–2586.
- [27] Ran FA, Hsu PD, Wright J, et al. Genome engineering using the CRISPR–Cas9 system[J]. Nat Protoc, 2013, 8(11): 2281–2308.
- [28] Chen JF, Mandel EM, Thomson JM, et al. The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation[J]. Nat Genet, 2006, 38(2): 228–233.

(责任编辑: 张辉洁)