DOI:10.16016/j.1000-5404.201506008

利用 Crispr/Cas9 构建 POMP 基因组原位荧光报告系统及其应用

赵湘湘[1],沈俊杰[2],彭 维[2],蒋璐频[2],钱 程[2] (310018 杭州,浙江理工大学生命科学学院[1];400038 重庆,第三军医大学西南医院全军临床病理学研究所[2])

[摘要] **目的** 利用 Crispr/Cas9 系统建立蛋白酶体成熟蛋白(proteasome maturation protein,POMP)基因组原位荧光报告系统。**方法** 构建 POMP-2A-mCherry-T 载体并转染 HEK293(human embryonic kdiney 293 cell)细胞;流式细胞仪分选获取 mCherry 阴阳性细胞;实时荧光定量 PCR(real-time fluorescent quantitative PCR)检测 mCherry 阴阳性细胞中 POMP 基因转录水平表达差异;Western blot 检测 mCherry 阴阳性细胞中 POMP 蛋白表达差异以及 Huh7 细胞中 JNK1/JNK2 磷酸化水平;蛋白酶体活性试剂盒检测 mCherry 阴阳性细胞中蛋白酶体活性差异。**结果** mCherry 阳性细胞 POMP 蛋白表达水平比 mCherry 阴性细胞高 1.3 倍($P<0.01$),但其基因转录水平差异并不显著($P>0.05$);同时 mCherry 阴性细胞中泛素化水平比 mCherry 阳性细胞高 1.2 倍($P<0.01$);另外 mCherry 阳性细胞中蛋白酶体活性也显著高于阴性细胞($P<0.01$);低表达 POMP 的 Huh7 细胞中,JNK1 和 JNK2 的磷酸化水平分别升高 1.5 倍和 1.4 倍($P<0.01$)。**结论** 成功构建 POMP 荧光报告系统;将该系统用于 Huh7 细胞,发现 POMP 可改变 JNK1、JNK2 磷酸化水平,其可能通过 JNK 信号通路来影响细胞的增殖以及凋亡。

[关键词] Crispr/Cas9;蛋白酶体成熟蛋白;mCherry;HEK293

[中图法分类号] R341;R394-33;R394.2 [文献标志码] A

Construction of mCherry reporter system of POMP by Crispr/Cas9 and its application

Zhao Xiangxiang[1], Shen Junjie[2], Peng Wei[2], Jiang Lupin[2], Qian Cheng[2]([1]College of Life Science, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou, Zhejiang Province, 310018; [2]Institute of Clinical Pathology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To construct mCherry reporter system of proteasome maturation protein (POMP) by Crispr/Cas9 and study the impact of POMP on cancer cells. **Methods** POMP-2A-mCherry-T vector was constructed and transferred into human embryonic kidney 293 cells (HEK293 cells). The mCherry-positive cells and mCherry-negative cells were sorted by flow cytometry. Real-time quantitative PCR (RT-qPCR) was used to detect the POMP gene transcription level in the mCherry-positive cells and mCherry-negative cells. Western blotting was adopted to detect the POMP protein expression and JNK1/2 phosphorylation in Huh7 cells. Proteasome activity of mCherry-positive cells and mCherry-negative cells was detected with proteasome activity detection kit. **Results** The protein expression of POMP in the mCherry-positive cells was increased by 1.3 times ($P<0.01$) compared with the mCherry-negative cells, but the POMP gene transcription level had no significant difference between the 2 kinds of cells ($P>0.05$). The level of ubiquitin in the mCherry-negative cells was obviously elevated by 1.2 times than that of mCherry-

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81472292)

[通信作者] 钱 程,E-mail:cqian8634@gmail.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20151127.0853.011.html(2015-11-27)

positive cells ($P<0.01$). The proteasome activity was relatively high in the mCherry-positive cells ($P<0.01$). The JNK1 and of JNK2 phosphorylation levels were increased by 1.5 times and 1.4 times, respectively, in the Huh7 cells with low expression of POMP ($P<0.01$). **Conclusion** The POMP luciferase reporter system is successfully constructed. After the system is applied to Huh7 cells, POMP can change JNK1/2 phosphorylation levels, so it may affect the cell proliferation and apoptosis through JNK signaling pathway.

[**Key words**] Crispr/Cas9; proteasome maturation protein; mCherry; HEK293

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81472292). Corresponding author: Qian Cheng, E-mail: cqian8634@gmail.com

泛素化蛋白酶体系统(ubiquitin-proteasome system, UPS)是细胞内主要降解蛋白质的途径,参与了大多数蛋白质的降解。该系统由一系列蛋白质共同参与,其核心为蛋白酶体,是由1个20S核心亚基和2个19S调节亚基组成的多亚基复合体。蛋白酶体参与了许多细胞进程如:细胞周期的调控[1]、细胞凋亡[2]、细胞分化[3]、信号传导[4-6]等。蛋白酶体还被认为与自身免疫性疾病和炎症反应相关[7-8]。其活性改变参与了许多疾病的发生、发展,例如:多发性骨髓瘤[9]、胰腺癌[10-11]、结直肠癌[12]、神经性胶质瘤[13]等,因此,监测其活性具有一定的必要性。而蛋白酶体成熟蛋白(proteasome maturation protein, POMP)已被证实,在蛋白酶体装配以及成熟过程发挥关键作用,由此可作为指示蛋白酶体活性水平的指标[14]。Crispr/Cas9系统[15]已成为近期基因编辑的通用工具。本研究通过使用该系统,在模式细胞HEK 293细胞的基因组POMP基因表达框下游,定点插入自剪切多肽2A和mCherry红色荧光蛋白基因,从而可通过流式细胞仪分选mCherry,并获得POMP高表达的细胞,进而为研究POMP对蛋白酶体的影响,以及蛋白酶体在不同肿瘤细胞中的作用提供了更简便的方法。

1 材料与方法

1.1 材料

HEK293细胞购自美国标准生物品收藏中心(ATCC);Huh7细胞由本室提供;表达质粒px330购买于Addgene;大肠杆菌Top10菌株由本室长期保存;限制性内切酶*Dpn* Ⅰ购自Fermentas;*Taq* DNA ligase, Phusion DNA polymerase, *Bbs* Ⅰ购自NEB公司;T5 exonuclease购自Epicentre; RNAiso Plus, SYBR, PrimeScript RT-PCR Kit, T-Vector pMD19 (Simple), DNA Marker购自大连宝生物(TaKaRa)公司;DEPC购自碧云天;KOD Fx, T_4 DNA连接酶购自TOYOBO公司;蛋白酶体活性检测试剂盒,胶回收试剂盒均购于Promega公司;胎牛血清购自Biological Industries公司;DMEM培养基购自Gibco公司;QIAamp DNA Mini and Blood Mini,转染试剂Effectene Transfection Reagent购自QIAGEN;0.45 m NC膜购自Merck Millipore公司;鼠抗Ub单抗购自Santa cruz公司;兔抗POMP多抗购自Sigma;内参GAPDH抗体购自Cell signaling technology公司;兔抗JNK1 + JNK2磷酸化多抗购自Abcam公司;辣根酶标记山羊抗兔IgG,辣根酶标记山羊抗鼠IgG抗体,一抗稀释液购自中杉金桥;其他分析纯试剂均购于生工生物公司。

1.2 px330质粒的改造

将载体px330用限制性内切酶*Bbs* Ⅰ消化,经琼脂糖凝胶电泳回收后,-20 ℃下保存备用。通过软件[16]设计与人类POMP基因组终止密码子后含有NGG的前20个碱基互补的核苷酸序列(single guide RNAs, sgRNAs),并添加*Bbs* Ⅰ的酶切位点。见表1。将这对互补序列以浓度为10 mol/L等体积混合,95 ℃保温2 min后以0.08 ℃/s缓慢降温直至4 ℃。取5 L退火产物与px330载体酶切产物进行连接并转化Top10感受态细胞,次日挑取单菌落进行LB液体培养,提取质粒,用U6测序引物做PCR鉴定,阳性克隆质粒送南京金斯瑞生物科技公司测序,经改造后的载体命名为px330-POMP-gRNA。

表1 POMP-gRNA PCR序列与长度

引物	序列	长度(bp)
POMP-gRNA正义链	5′-CACCCCATCACAAAGCGAAGTCAT-3′	24
POMP-gRNA反义链	5′-AAACATGACTTCGCTTTGTGATGG-3′	24

1.3 POMP-2A-mCherry-T的构建

以上述POMP的gRNA靶向序列为中心,分别设计PCR引物,扩增其两侧各约1 000 bp的基因组作为

后续重组的同源臂,并在上下游同源臂中间设计插入2A-mCherry序列。扩增方法利用Gibson克隆技术,在引物设计上,不同扩增片段之间保留适当的重叠区,其引物序列见表2。其中POMP上游同源臂正义链,POMP下游同源臂反义链,2A-mCherry正义链和2A-mCherry反义链,分别含有20个与mCherry编码框以及POMP基因组的重叠序列。以同理设计T载体引物,T载体正义链及其反义链见表2,且引物中含有20个与POMP基因组的重叠序列。扩增获得4个PCR产物,按相等比例加入Gibson反应体系中,50 ℃保温30 min,转化Top10感受态细胞,次日挑取单菌落进行液体培养,提取质粒,用T载体测序引物M13做PCR鉴定,阳性克隆质粒送测序,构建获得的载体命名为POMP-2A-mCherry-T。

表2 POMP同源臂扩增引物序列与长度

引物	序列	长度(bp)
POMP-upstream 正义链	5′-AACTCAGATTTGCTGTAGTGACCCT-3′	25
POMP-upstream 反义链	5′-AAGTTAGTAGCTCCGCTTCCCAGTAAACCA-AGTTTATATTC-3′	41
POMP-downstream 正义链	5′-ACCGGCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTA-ATGTGCTGTTCATGGAAACCGAGGGCTGCA-3′	59
POMP-downstream 反义链	5′-CAAAGATGTTCCTAAGAAACTGATA-3′	25
2A-mCherry 正义链	5′-GAATATAAACTTGGTTTACTGGGAAGCG-GAGCTACTAACTT-3′	41
2A-mCherry 反义链	5′-TGCAGCCCTCGGTTTCCATGAACAGCACA-TTACTTGTACAGCTCGTCCATGCCGCCGGT-3′	59
T-vector 正义链	5′-TATATTTTGATTATCAGTTTCTTAGGAACA-TCTTTGATCGTCGAACGGCAGGCGTGCAA-3′	59
T-vector 反义链	5′-ATTGAGGGTCACTACAGCAAATCTGAGTTT-CTCTGGAAGATCCGCGCGTACCGAGTTCT-3′	59

1.4 构建质粒转染HEK293细胞

HEK293细胞在10% FBS的DMEM培养基,5% CO_2,37 ℃条件下培养。取对数生长期的HEK293细胞以4.5×10^4 ~5×10^4/孔接种于24孔板,待细胞汇合度到40% ~80%,将px330-POMP-gRNA与POMP-2A-mCherry各0.1 g,按1∶1比例转染细胞,继续培养12 h后,去除含有转染试剂的培养基,加入新鲜的10% FBS的DMEM培养基,继续培养60 h,流式细胞仪分选mCherry阳性的HEK293细胞。

1.5 实时荧光定量PCR检测POMP基因转录水平及mCherry基因组整合情况

流式细胞仪分选获得mCherry阳性和阴性的HEK293细胞,抽提细胞总RNA,并进行反转录。采用实时定量PCR仪进行扩增,用SYBR-Green检测,以GAPDH为内参,检测各组细胞内mRNA的表达水平,引物序列见表3。利用获得的cDNA以POMP上游和mCherry下游引物序列鉴定mCherry在基因组中的整合情况。PCR扩增程序为:94 ℃预变性2 min;94 ℃变性30 s,60 ℃退火30 s,72 ℃延伸30 s,45个循环;72 ℃延伸5 min。每个样本中POMP和GAPDH重复3次。反应结束后,由熔解曲线判断PCR反应的特异性。

1.6 Western blot检测

提取细胞总蛋白,进行SDS-PAGE电泳,具体如下:配制10%分离胶和5%浓缩胶,制成胶板。样本上样,进行电泳,电泳结束将凝胶转入转膜缓冲液中,将蛋白质转移至NC膜上。NC膜经5%脱脂奶粉室温封闭2 h。一抗孵育4 ℃过夜。PBST洗膜3次,每次10 min,加入二抗,室温孵育2 h。PBST洗膜3次,每次10 min。室温显色。

表3 RT-PCR引物序列与长度

引物	序列	长度(bp)
POMP-RT 正义链	5′-TTCCAGCTCAACCAAGATAA-3′	20
POMP-RT 反义链	5′- ATCCAATAGTCTCATCATTACCCCT-3′	25
mCherry-RT 反义链	5′-TTCAAGTAGTCGGGGATGTCGGC-3′	23
GAPDH-RT 正义链	5′- ACCCACTCCTCCACCTTTGA-3′	20
GAPDH-RT 反义链	5′- TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3′	20

1.7 蛋白酶体活性检测

流式分选获得的mCherry阳性和阴性HEK293细胞,以2 000个/孔的接种到96孔板,待细胞贴壁后,将Promega公司蛋白酶体活性检测试剂盒中的3种底物分别与PBS按1∶1比例混匀,每孔加入200 L混合液,室温反应15 min,酶标仪检测其类胰蛋白酶、类糜蛋白酶和类天冬氨酸酶3种蛋白酶体活性。

1.8 POMP基因组原位荧光报告系统的应用

将px330-POMP-gRNA与POMP-2A-mCherry各0.1 g,按1∶1比例转染Huh7细胞,继续培养12 h后,去除含有转染试剂的培养基,加入新鲜的10% FBS的DMEM培养基,继续培养60 h后,连续进行3轮分选纯化并扩大培养得到充足的mCherry阳性的Huh7细胞,然后Western blot检测mCherry阴性及阳性的Huh7细胞中JNK1和JNK2的磷酸化水平。

1.9 实验设计方案

实验设计方案见图1。

1.10 统计学分析

数据以$\bar{x}\pm s$表示,采用SPSS 19.0统计软件进行方差分析及t检验。

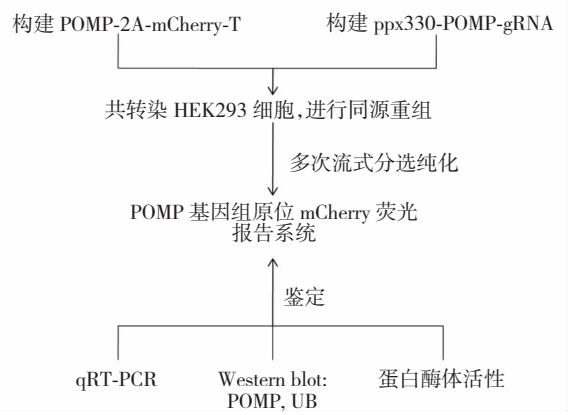
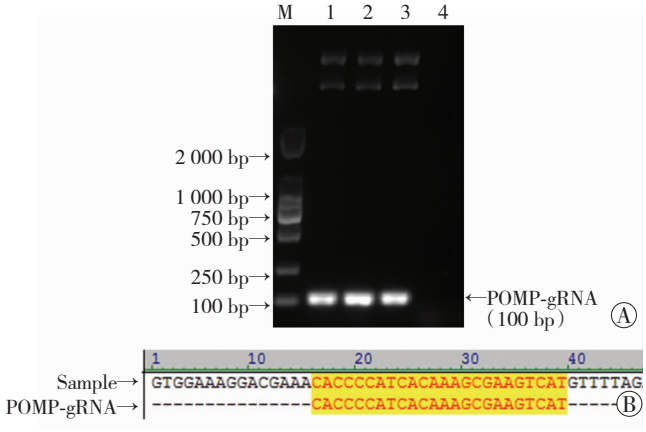


图 1 实验设计方案示意图

2 结果

2.1 表达载体 px330-POMP-gRNA PCR 鉴定及测序

POMP-gRNA 成功地插入到 px330 质粒中时,原质粒带有的 U6 启动子,以及 gRNA 下游可作为 PCR 验证引物。如果构建成功,则 px330-POMP-gRNA PCR 可以扩增出约 100 bp 大小的条带(图 2A);若构建失败,则无扩增条带。将阳性克隆测序(图 2B),结果表明,POMP-gRNA 成功的插入到 px330 质粒中。

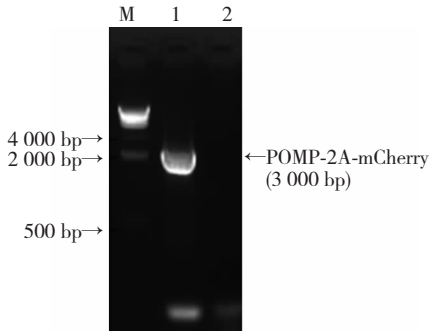


A:POMP-gRNA 的 PCR 产物凝胶电泳鉴定结果;M: DL 2000 DNA 标准;1 – 3:px330-POMP-gRNA PCR 产物;4:阴性对照;B:px330-POMP-gRNA PCR 产物测序对比

图 2 px330-POMP-gRNA PCR 鉴定以及测序结果

2.2 POMP-2A-mCherry-T 载体的鉴定及测序

将 POMP-2A-mCherry 连接到 T 载体上,并用 T 载体通用测序引物 M13 进行 PCR 鉴定。如果构建成功,则 PCR 可以扩增出大约 3 000 bp 大小的条带(图 3);若构建失败,则 PCR 产物为小于 100 bp 条带。将阳性克隆送检测序,比对结果表明,与 POMP-2A-mCherry 的实际序列完全相符,即成功地插入到 T 载体中。

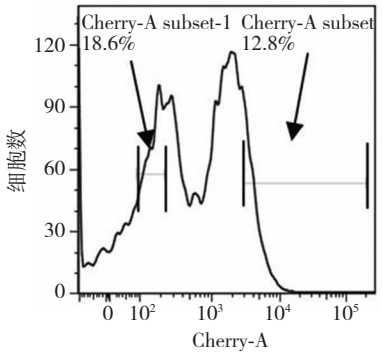


M:*Hind*Ⅲ DNA 标准;1:POMP-2A-mCherry 的 PCR 扩增产物;2:阴性对照

图 3 POMP-2A-mCherry-T PCR 鉴定结果

2.3 mCherry 阳性与阴性细胞的分选

px330-POMP-gRNA 和 POMP-2A-mCherry-T 共同转染 HEK293 细胞,培养 72 h,流式细胞仪检测其同源重组效率,结果显示,mCherry 阳性比例仅为 1%。为得到充足的阳性细胞进行后续实验,我们对这些 mCherry 阳性细胞进行 3 轮分选、传代扩大培养。流式检测结果显示此时细胞中 mCherry 阳性细胞比例达到了 45.6%。为保证流式分选纯度,我们分别分选其中 10% ~20% 的 mCherry 强阳性细胞和阴性细胞,用于后续研究(图 4)。



Cherry-A subset-1:mCherry 阴性细胞;Cherry-A subset:mCherry 阳性细胞

图 4 流式分选 mCherry 阴阳性细胞

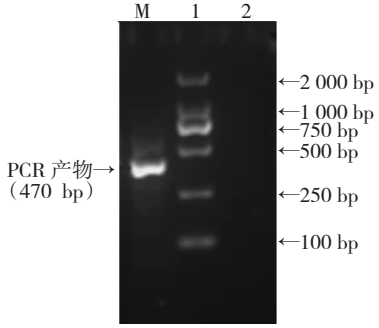
2.4 mCherry 的基因组整合分析

通过 PCR 技术,检测 mCherry 在基因中的整合情况,将 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳,结果显示,扩增产物条带单一明亮,大小约为 470 bp(图 5),与实际相符,并将产物送测序,序列比对结果表明 mCherry 准确的整合到 POMP 基因组中。

2.5 mCherry 阴阳性细胞中的 POMP 基因转录水平差异

通过实时荧光 PCR 技术,检测 POMP 基因在

mCherry 阴性和阳性细胞中的 RNA 表达水平差异。扩增结果显示,扩增动力学曲线呈 1 条平滑的 S 曲线,背景信号阶段未出现拐点;溶解曲线峰单一且尖锐,扩增产物的 Tm 值也很均一,表明目的基因和内参基因并未产生非特异性的扩增以及引物二聚体。实验结果显示,在 mCherry 阳性细胞中,POMP 基因的 RNA 表达水平(1.08 ±0.33)相较于阴性细胞(0.88 ±0.26),差异无统计学意义($P>0.05$)。



1:POMP-mCherry 的 PCR 扩增产物;2:阴性对照;
M:DL 2000 DNA 标准

图 5 mCherry 整合情况的 PCR 鉴定结果

2.6 mCherry 阴阳性细胞中 POMP 蛋白水平表达差异

Western blot 检测结果显示,POMP 蛋白在 mCherry 阴性和阳性细胞中的表达量差异显著,在 mCherry 阳性细胞中高于 mCherry 阴性细胞 1.3 倍($P<0.01$),而且其泛素化水平则恰好相反,mCherry 阴性细胞高于阳性细胞 1.2 倍($P<0.01$,图 6)。

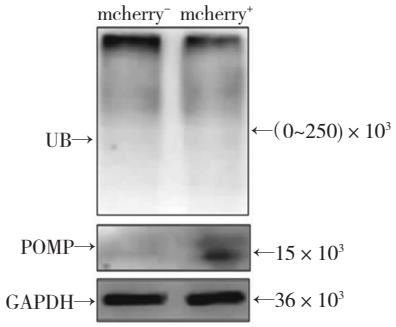
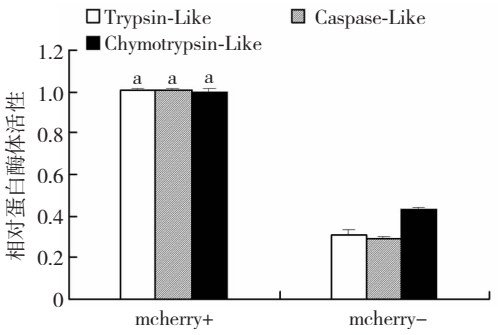


图 6 mCherry 阴阳性细胞 POMP 以及 UB 蛋白水平

2.7 mCherry 阴阳性细胞中蛋白酶体活性差异

蛋白酶体活性检测结果显示,mCherry 阳性细胞中蛋白酶体的 3 种蛋白酶活性,类胰蛋白酶(trypsin-like)、类糜蛋白酶(chymotrypsin-like)、类天冬氨酸酶(caspase-like)均显著高于 mCherry 阴性细胞($P<0.01$,图 7)。



a:$P<0.01$,与对应 mcherry-比较

图 7 mCherry 阴阳性细胞的蛋白酶体活性

2.8 POMP 基因组原位荧光报告系统在 Huh7 细胞中的应用

我们将该构建成功的荧光报告系统用于研究 Huh7 细胞中 POMP 的作用,Western blot 检测结果显示,低表达 POMP 的 Huh7 细胞中,JNK1 和 JNK2 的磷酸化水平均升高(JNK1 磷酸化升高 1.5 倍,JNK2 磷酸化升高 1.4 倍($P<0.01$,图 8)。这说明 POMP 可影响 JNK 信号通路,其可能与 Huh7 细胞的增殖及凋亡相关。

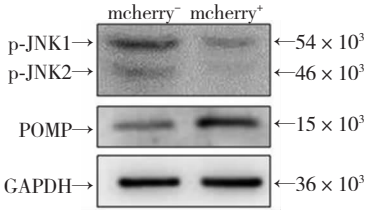


图 8 mCherry 阴阳性的 Huh7 细胞中 JNK 磷酸化水平

3 讨论

Crispr/Cas9 最先发现于细菌以及古生物菌中,具有抵抗外界病毒以及 DNA 入侵的免疫防御能力。随着研究的不断深入,人们发现将 tracrRNA(trans-activating RNA):crRNA(CRISPR-derived RNA)作为引导 RNA(gRNA),通过该 gRNA 的导向作用,可将核酸酶 Cas9 蛋白定位于靶 DNA 序列,对 DNA 进行定点切割,从而实现基因组的定向编辑[16-17]。此外,由于 Crispr/Cas9 系统有着设计操作简便、编辑效率高及应用范围广等优势,使其成为新一代基因组编辑技术,也是基因组改造调控和应用上的革命性突破。虽然这种技术的优点很多,但其也受到很多因素的影响,比如引导 gRNA 的选择、靶 DNA 序列的设计、Cas9 与 gRNA 的表达与定位以及提高打靶特异性的策略等[18]。基于 Crispr/Cas9 系统的基因组编辑技术已被应用于多

种生物,包括人、植物、鼠、斑马鱼、线虫及细菌。同时该技术应用范围广泛,如对细胞系进行特定基因的敲除和基因敲除动物模型的构建[19-20]、新作物种子的培育以及改良化学或药学制品的生产技术等。随着该技术的不断发展,出现多种应用方式,例如可以用多个gRNA序列同时靶向基因组上多个不同位点进行编辑;也可以通过结合不同转录调控蛋白,对特定基因的转录进行激活或抑制以及基因组的动态控制[21]。当然Crispr/Cas9系统除了可以用于基因组定向编辑,也可以用于内源基因转录与表观遗传的调控、标记特定染色体位点以及基因组的功能筛选等[22]。本研究通过该技术构建POMP基因组原位荧光报告系统,以此作为研究平台并为今后POMP在各种肿瘤细胞中的作用研究打下基础。

本研究通过分别构建px330-POMP-gRNA和POMP-2A-mCherry-T并共转染HEK293细胞进行同源重组,再经过多次流式分选纯化的长时间筛选,从而获得POMP基因组原位mCherry荧光报告系统。接下来我们又进行了对该系统的鉴定。通过PCR及测序结果显示,mCherry准确的整合到POMP基因组中。但具体整合情况是全整合还是半整合,我们并没有鉴定。mCherry基因的整合情况与POMP的转录是有相关联的,并且可以通过PCR进行鉴定。若为全整合,则显示扩增出大小相同的一条带;若为半整合,则显示扩增出大小不同的两条带,而且mCherry蛋白表达不能完全反映POMP的转录水平。根据我们的结果,该系统中mCherry基因的整合情况可能是半整合,当然这需要我们将来进行详细验证。实时荧光定量PCR结果显示,POMP基因在mCherry阴阳性细胞中RNA表达水平并无明显差异。但其蛋白水平差异明显,这可能是由于mRNA转录后调控及其与蛋白质的半衰期不同产生,mRNA极易降解,而翻译成蛋白质后较为稳定,而且蛋白质是行使功能的基本单位,所以通过蛋白水平的变化可以判断其对相应功能的影响。mCherry-POMP蛋白是一个融合蛋白,mCherry不自带启动子,而是由POMP启动子激活,随着POMP的转录翻译而进行转录翻译,所以mCherry蛋白表达与POMP蛋白表达呈正相关,而且我们的结果也与之相符。蛋白酶体活性检测结果也表明,mCherry阳性细胞中蛋白酶体活性明显高于阴性细胞,这说明mCherry荧光蛋白的表达水平可表示细胞内源性POMP的表达水平,即成功的构建了POMP荧光报告系统。成功构建POMP荧光报告系统之后,我们将其应用于Huh7细胞POMP的作用研究,其中结果显示,POMP的改变可影响JNK1、JNK2磷酸化水平,从而通过JNK信号通路影响细胞的增殖以及凋亡。细胞中高表达POMP促进蛋白降解,不利于JNK磷酸化的稳定。此外,蛋白酶体高活性状态可加速降解I-κB,使NF-κB活性增加,抑制JNK介导的细胞凋亡[23]。

蛋白酶体能调节细胞的生长,但当它的活性超出正常生理作用时,就可能引发各种肿瘤。高活性的蛋白酶体可以减弱对肿瘤细胞的生长抑制,并减少肿瘤细胞的凋亡。而已有大量文献报道肿瘤干细胞中蛋白酶体活性处于低表达状态,因此POMP作为指示细胞内蛋白酶体活性的指标,即可结合本研究分选得到不同蛋白酶体活性的细胞,进一步研究蛋白酶体对肿瘤细胞生长以及凋亡等方面的作用机制。

参考文献:

[1] Lonjedo M, Poch E, Mocholi E, *et al*. The Rho family member RhoE interacts with Skp2 and is degraded at the proteasome during cell cycle progression[J]. J Biol Chem, 2013, 288(43): 30872-30882. DOI:10.1074/jbc.M113.511105

[2] Paniagua-Soriano G, De-Bruin G, Overkleeft H S, *et al*. Toward understanding induction of oxidative stress and apoptosis by proteasome inhibitors[J]. Antioxid Redox Sign, 2014, 21(17): 2419-2443. DOI:10.1089/ars.2013.5794

[3] Imai F, Yoshizawa A, Fujimori-Tonou N, *et al*. The ubiquitin proteasome system is required for cell proliferation of the lens epithelium and for differentiation of lens fiber cells in zebrafish[J]. Development, 2010, 137(19): 3257-3268. DOI:10.1242/dev.053124

[4] Chen J J, Lin F, Qin Z H. The roles of the proteasome pathway in signal transduction and neurodegenerative diseases[J]. Neurosci Bull, 2008, 24(3): 183-194. DOI:10.1007/s12264-008-0183-6

[5] Portbury A L, Ronnebaum S M, Zungu M, *et al*. Back to your heart: ubiquitin proteasome system-regulated signal transduction[J]. J Mol Cell Cardiol, 2012, 52(3): 526-537. DOI:10.1016/j.yjmcc.2011.10.023

[6] Wertz I E. TNFR1-activated NF-kappaB signal transduction: regulation by the ubiquitin/proteasome system[J]. Curr Opin Chem Biol, 2014, 23: 71-77. DOI: 10.1016/j.cbpa.2014.10.011

[7] Mao X, Pan X, Peng X, *et al*. Inhibition of titanium particle-induced inflammation by the proteasome inhibitor bortezomib in murine macrophage-like RAW 264.7 cells[J]. Inflammation, 2012, 35(4): 1411-1418. DOI:10.1007/s10753-

012-9454-5

[8] El-Hashim A Z, Renno W M, Abduo H T, *et al*. Effect of inhibition of the ubiquitin-proteasome-system and IkappaB kinase on airway inflammation and hyperresponsiveness in a murine model of asthma[J]. Int J Immunopathol Pharmacol, 2011, 24(1): 33 - 42.

[9] Pratt G. An oral proteasome inhibitor for multiple myeloma [J]. Lancet Oncol, 2014, 15(13): 1417 - 1418. DOI:10.1016/S1470-2045(14)70372-9

[10] Matsuo Y, Sawai H, Ochi N, *et al*. Proteasome inhibitor MG132 inhibits angiogenesis in pancreatic cancer by blocking NF-kappaB activity[J]. Dig Dis Sci, 2010, 55(4): 1167 - 1176. DOI:10.1007/s10620-009-0814-4

[11] Frasco M F, Almeida G M, Santos-Silva F, *et al*. Transferrin surface-modified PLGA nanoparticles-mediated delivery of a proteasome inhibitor to human pancreatic cancer cells [J]. J Biomed Mater Res A, 2015, 103(4): 1476 - 1484. DOI:10.1002/jbm.a.35286

[12] Wu W K, Sung J J, Wu Y C, *et al*. Bone morphogenetic protein signalling is required for the anti-mitogenic effect of the proteasome inhibitor MG-132 on colon cancer cells[J]. Br J Pharmacol, 2008, 154(3): 632 - 638. DOI: 10.1038/bjp.2008.115

[13] Yoo J Y, Hurwitz B S, Bolyard C, *et al*. Bortezomib-induced unfolded protein response increases oncolytic HSV-1 replication resulting in synergistic antitumor effects[J]. Clin Cancer Res, 2014, 20(14): 3787 - 3798. DOI:10.1158/1078-0432.CCR-14-0553

[14] Fricke B, Heink S, Steffen J, *et al*. The proteasome maturation protein POMP facilitates major steps of 20S proteasome formation at the endoplasmic reticulum[J]. EMBO Rep, 2007, 8(12): 1170 - 1175. DOI:10.1038/sj.embor.7401091

[15] Cong L, Zhang F. Genome engineering using CRISPR-Cas9 system[J]. Methods Mol Biol, 2015, 1239: 197 - 217. DOI:10.1007/978-1-4939-1862-1_10

[16] Hsu P D, Scott D A, Weinstein J A, *et al*. DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases[J]. Nat Biotechnol, 2013, 31(9): 827 - 832. DOI:10.1038/nbt.2647

[17] Zhang F, Wen Y, Guo X. CRISPR/Cas9 for genome editing: progress, implications and challenges[J]. Hum Mol Genet, 2014, 23(R1): R40 - R46. DOI:10.1093/hmg/ddu125

[18] 郑小梅, 张晓立, 于建东,等. CRISPR-Cas9 介导的基因组编辑技术的研究进展[J]. 生物技术进展, 2015, 5(1): 1 - 9. DOI:10.3969/j.issn.2095-2431.2015.10.01

[19] Heckl D, Kowalczyk M S, Yudovich D, *et al*. Generation of mouse models of myeloid malignancy with combinatorial genetic lesions using CRISPR-Cas9 genome editing[J]. Nat Biotechnol, 2014, 32(9): 941 - 946. DOI:10.1038/nbt.2951

[20] Cheng R, Peng J, Yan Y, *et al*. Efficient gene editing in adult mouse livers via adenoviral delivery of CRISPR/Cas9 [J]. FEBS Lett, 2014, 588(21): 3954 - 3958. DOI:10.1016/j.febslet.2014.09.008

[21] Konermann S, Brigham M D, Trevino A E, *et al*. Optical control of mammalian endogenous transcription and epigenetic states[J]. Nature, 2013, 500(7463): 472 - 476. DOI:10.1038/nature12466

[22] Nishimasu H, Ran F A, Hsu P D, *et al*. Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA[J]. Cell, 2014, 156(5): 935 - 949. DOI:10.1016/j.cell.2014.02.001

[23] Tang G, Minemoto Y, Dibling B, *et al*. Inhibition of JNK activation through NF-kappaB target genes [J]. Nature, 2001, 414(6861): 313 - 317. DOI:10.1038/35104568

(收稿:2015-06-03;修回:2015-08-06)

(编辑 张 维)