

· 基础研究 ·

利用CRISPR/Cas9技术建立RelB敲除小鼠模型

徐 帆¹, 孙文博², 张妍妍², 许 勇^{2*}, 唐金海^{1*}

¹南京医科大学第一临床医学院, 江苏 南京 210029; ²南京医科大学附属肿瘤医院, 江苏 南京 210009

[摘要] 目的: 利用CRISPR/Cas9技术敲除C57BL/6小鼠中的RelB基因, 为核因子(nuclear factor, NF)- κ B转录因子蛋白家族的RelB基因与肿瘤转移等方面的研究提供RelB基因敲除实验动物模型。方法: 利用基因编辑技术CRISPR/Cas9系统, 设计并构建针对目的基因RelB第4外显子sgRNA, 同时利用T7 RNA聚合酶体外转录Cas9 mRNA。取C57BL/6小鼠受精卵体外注射sgRNA和Cas9 mRNA后, 进行胚胎移植, 实现靶基因敲除。待小鼠出生后提取DNA并进行PCR鉴定, 获得F0代, 后与野生型交配后繁殖, 取样提取DNA, 测序分析鉴定后获得F1代小鼠, 并在蛋白质水平和基因组水平分别验证敲除效果。结果: 获得了4个在RelB基因突变的首建鼠, 并得到了稳定遗传的RelB基因敲除小鼠。基因组测序结果显示, 敲除实验组中RelB的mRNA出现无义突变, 令其mRNA翻译终止。与对照组相比, 敲除实验组检测不到RelB蛋白表达。同时, Western blot结果显示, NF- κ B家族中其他成员RelA、p50和p52的蛋白表达不受影响。结论: 成功获得特异性敲除RelB的C57BL/6小鼠, 为RelB在肿瘤转移、耐药中的研究提供了重要工具。

[关键词] RelB; CRISPR/cas9; 基因敲除; C57BL/6小鼠

[中图分类号] R394-33

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2019)03-313-07

doi: 10.7655/NYDXBNS20190301

Establishment of RelB knockout mouse models by the CRISPR/Cas9 system

Xu Zhi¹, Sun Wenbo², Zhang Yanyan², Xu Yong^{2*}, Tang Jinhai^{1*}

¹First Clinical School, NMU, Nanjing 210029; ²the Affiliated Cancer Hospital of NMU, Nanjing 210009, China

[Abstract] **Objective:** To evaluate the relationship between the nuclear factor - κ B (NF - κ B) family member RelB and tumor metastasis, we established a RelB knockout mouse model by CRISPR/Cas9 system. **Methods:** The RelB specific single-guide RNAs targeted exon4 were designed for CRISPR/Cas9 system. The Cas9 and sgRNAs were transcribed by T7 RNA polymerase and microinjected into the mouse zygote. C57BL/6 mouse fertilized eggs injected with sgRNA and Cas9 mRNA *in vitro* were transplanted into mouse uterus. F1 generation was obtained by mating F0 generation with wild type. PCR and gene sequencing were performed to identify the RelB phenotype of F0 and F1 generation mice. The expression of RelB in F0 and F1 generation mice was evaluated in gene level and protein level. **Results:** We obtained four RelB^{-/-} F0 mice and stable inherited RelB^{-/-} offspring. The results of genome sequencing showed that there was a nonsense mutation in the mRNA of RelB in the knockout group, which caused the mRNA translation to terminate. Compared with the control group, the expression of Relb protein was not detected in the knockout group. Meanwhile, the results of Western blot showed that there was no significant difference between knockout group and control group in the expression of NF- κ B family members (RelA, p50 and p52). **Conclusion:** The RelB knockout C57BL/6 mouse model was successfully established, which provided an important tool for the study of RelB in tumor metastasis and drug resistance.

[Key Words] RelB; CRISPR/cas9; gene knockout; C57BL/6 mice

[Acta Univ Med Nanjing, 2019, 39(03):313-319]

[基金项目] 国家自然科学基金(81872365); 国家重点研发计划(2016YFC0905900)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: yxu4696@njmu.edu.cn; jhtang@njmu.edu.cn

核因子(nuclear factor, NF)- κ B是一种转录因子,它不仅可以参与调节免疫反应、细胞凋亡和增殖,同时在肿瘤细胞的侵袭、转移和耐药中也发挥着极为重要的作用^[1]。其家族成员以同源或异源二聚体形式存在: NF- κ B1(p50/p105)、NF- κ B2(p52/p100)、RelA(p65)、RelB和c-Rel。NF- κ B可通过经典和(或)非经典途径触发,这些途径分别基于p50/RelA和p52/RelB二聚体的核易位,从而进一步调节参与免疫和炎症反应的靶基因^[2]。NF- κ B信号通路的激活会导致肿瘤对化疗及放疗产生抵抗^[3-5]。因此,抑制NF- κ B一直被视为提高常规放化疗疗效的有效方法^[6]。其中以RelA及RelB的作用为主,RelA发现较早且机制研究较为透彻,而RelB介导的非经典通路的激活报道较少。已有文献报道,RelB在肿瘤的发生、耐药、转移等多个方面起到重要作用,但其机制目前尚未明确^[7-9]。

基因编辑技术,是指针对DNA中的核苷酸进行删除、置换和插入等操作,从而特异性地改写DNA图谱;是研究基因功能的重要手段,也是分子生物学和遗传学的重要研究方向。在过去几十年中,基因编辑技术得到了长足发展,其中,ZFN(zinc finger nucleases)技术^[10]和TALEN(transcription activator like effector nucleases)技术^[11]是基因编辑技术中的重大突破,实验者可以通过这两种技术针对特定的DNA序列,设计识别蛋白,完成相应序列的编辑操作。CRISPR/Cas9(clustered regulatory interspaced short palindromic repeats/CRISPR associated endonuclease cas9)技术^[12]是近几年发展起来的一种新基因编辑技术,它是古细菌和细菌在长期选择性压力下形成的适应性免疫防御,可以有效抵御病毒及外源性DNA的入侵。CRISPR/Cas9技术原理是利用一段guide RNA(gRNA),指导Cas9对靶序列进行特异性切割^[13];相比ZFN和TALEN,CRISPR/Cas9系统细胞毒性小、操作简洁、成功率高,因此被越来越多地应用于分子生物学研究^[14]。本研究拟利用CRISPR/Cas9技术对小鼠RelB基因第4外显子进行精确修饰,实现对小鼠RelB基因的敲除,以期利用RelB基因敲除小鼠构建相应肿瘤模型,研究肿瘤转移与耐药等机制。

1 材料和方法

1.1 材料

本研究所用小鼠品系为C57BL/6,该品系源自Abby Lathrop小鼠株的近交品系实验鼠,代孕母鼠

品系为FVB/N,源自远交系Swiss鼠,均购自北京维通利华实验动物技术有限公司。动物实验符合南京医科大学动物伦理委员会的规定并被授权。大肠杆菌感受态细胞DH5 α 菌株(南京诺维赞公司),质粒抽提试剂盒(Qiagen公司,美国),质粒转染试剂盒、DNA Marker、限制性内切核酸酶T7E1、PCR试剂盒(Sigma公司,美国);细胞培养所需胎牛血清、培养基(Gibco公司,美国)。本实验中的引物合成、基因测序、动物繁殖、受精卵显微注射均和上海邦耀生物科技有限公司合作完成。

1.2 方法

1.2.1 RelB基因序列分析和基因敲除靶点序列设计合成

通过NCBI获取小鼠RelB基因组序列NC000073.6(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/19698>), Mouse Genome Informatics网站检测RelB基因是否有胚胎致死性。小鼠RelB基因包含12个外显子,本研究选择在小鼠RelB基因(Gene ID: 19698)第4外显子设计靶位点,经美国麻省理工学院CRISPR Design软件(<http://crispr.mit.edu/>)进行脱靶率预测并筛选出平均得分最高的两个位点进行设计: RelB-gRNA1: 5'-GCTGAGTGAGATGCCGCGCCTGG-3'; RelB-gRNA2: 5'-CCACGGCCGTACCTGGTCATCAC-3'。

将由公司合成的gRNA单链复性形成双链,与CRISPR/Cas骨架质粒互补的线性化黏性末端进行连接,合成Oligo二聚体^[15]。合成条件: 95℃ 3 min, 缓慢冷却至25℃(-0.05℃/s), 16℃ 5 min。将产物加入感受态细菌*E.coli* DH5 α 用于转化,挑取单克隆菌落进行摇菌扩增,提取质粒后进行测序。

1.2.2 细胞转染及sgRNA体外活性检测

用含10%胎牛血清的DMEM培养基培养人乳腺癌细胞MCF-7,待细胞密度达80%时传代铺6孔板。次日取1.2.1中获得的质粒2 μ g与4 μ L DNAdfectin(ABM公司,加拿大)在无血清无双抗的DMEM中混合,室温静置15 min后,加入6孔板中(以上为每孔所需试剂与质粒数量)。转染48 h后提取细胞DNA,分3组(转染sgRNA1质粒、转染sgRNA2质粒、转染空载质粒)。将细胞DNA以T7E1引物(上游5'-CTCCCCAGCCTCACGGGTC-3',下游5'-AGCAGCA-CAACACGCACCT-3')行PCR扩增、并退火形成同源双链核酸分子,后按T7核酸内切酶1(T7E1)说明书步骤进行酶切反应,将酶切后产物行琼脂糖凝胶电泳。

1.2.3 Cas9 mRNA 体外转录和 CRISPR/Cas9 的显微注射

将Cas9表达质粒和上述gRNA表达载体经Xba I内切酶酶切线性化处理后进行纯化,溶于无核酶水中作为体外转录模板进行体外转录(扩增程序:94 °C 5 min;94 °C 30 s,56 °C 30 s,72 °C 50 s,40个循环;72 °C 10 min)。

将上述sgRNA(25 ng/μL, 20 μL)、Cas9 mRNA(100 ng/μL, 10 μL)混匀,加3 μL乙酸钠(3 mol/L),调定pH值至5.2,加入无水乙醇得到沉淀,再用无酶水重悬。通过显微注射仪器将溶液注射入体外受精小鼠受精卵的胞浆部分,构建形成特定的小鼠胚胎细胞(受精卵)。体外培养1~2 h后,将存活的受精卵移植入假孕FVB/N母鼠输卵管,将孕母鼠单笼饲养,20 d左右母鼠生产获得首建鼠F0代。

1.2.4 小鼠基因型鉴定

待上述步骤所得F0代小鼠长至1周龄,剪小鼠脚趾约0.5 cm,利用试剂盒提取基因组DNA,使用RelB特定引物(表1)进行PCR扩增,PCR产物测序鉴定基因型。将目标基因RelB发生敲除的小鼠分别与野生型小鼠杂交繁殖,对小鼠鉴定基因型,可得到RelB^{-/-}小鼠F1代(杂合子),取部分小鼠冷冻精子保种,余继续繁殖。

1.2.5 Western blot 验证

取野生型(wild type, WT)和RelB^{-/-}小鼠的皮肤、肌肉、肝脏、骨组织在含有蛋白酶抑制剂的裂解液中匀浆,提取总蛋白,经SDS-PAGE胶分离,湿转法转至PVDF膜上,用含5%BSA的TBST室温封闭1 h,经

表1 引物序列

Table 1 Sequences of primers

| 基因名称 | 引物序列(5'→3') |
|---------|------------------------------|
| β-actin | 上游CACCTTCTACAATGAGCTGCGTGTG |
| | 下游ATAGCACAGCCTGGATAGCAACGTAC |
| RelB-1 | 上游TAACAACCTGGGCATCCAGT |
| | 下游CGCAGCTCTGATGTGTTTGT |
| RelB-2 | 上游GAACCAAGCAGGAAAACG |
| | 下游TAGTGGCGAAATGGGAGGT |

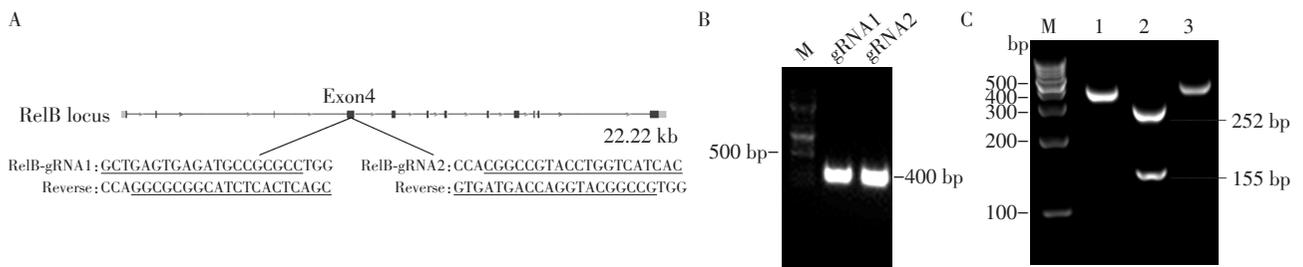
RelB、RelA、p50、p52、cRel一抗(Santa Cruz公司,美国)4 °C孵育过夜,TBST洗膜后室温孵育二抗(羊抗兔或羊抗鼠)2 h,TBST洗膜后,经化学发光显影液在化学发光仪(BioRAD)中显影成像,检测蛋白表达情况。

2 结果

2.1 小鼠RelB基因修饰靶点gRNA设计及表达载体构建

基因敲除的关键在于靶点选择,作用于正确靶点可通过序列突变使基因功能缺失。通过分析小鼠RelB基因结构,该基因共有12个外显子(蛋白翻译起始于第1外显子,终止于第12外显子)及2个已证实的转录本。针对2个转录本同源序列中的第4外显子序列设计gRNA,挑选MIT分数最高的gRNA及另1个离atg最近且分数较高的gRNA,并合成相应片段(图1A)。

利用引物扩增gRNA,用1%的琼脂糖凝胶电泳检测,得到gRNA目的条带与设计的一致,表明gRNA载体构建成功(图1B)。



A:小鼠RelB基因结构图,针对第4外显子序列设计2个gRNA;B:gRNA经PCR扩增后电泳,得到与设计一致的目的条带,表明gRNA载体构建成功;C:酶切法验证sgRNA活性。M:Marker;1:转染sgRNA1质粒;2:转染sgRNA2质粒;3:转染空载质粒。

图1 小鼠RelB基因修饰靶点设计结果

Figure 1 Design process and results of RelB gene modification target in mice

2.2 小鼠RelB基因sgRNA活性筛选结果

T7核酸内切酶(T7E1)能够识别不完全配对的双链DNA,并进行切割,如果CRISPR/Cas9对靶点造成了突变,将能够被该酶识别,并造成双链DNA断

裂。细胞转染质粒后行T7E1酶切,结果显示,与转染空载质粒的细胞比较,转染sgRNA2质粒的细胞T7E1酶切后产物存在多个条带(图1C),说明其退火产物能够被T7E1识别并切割,表明sgRNA2设计

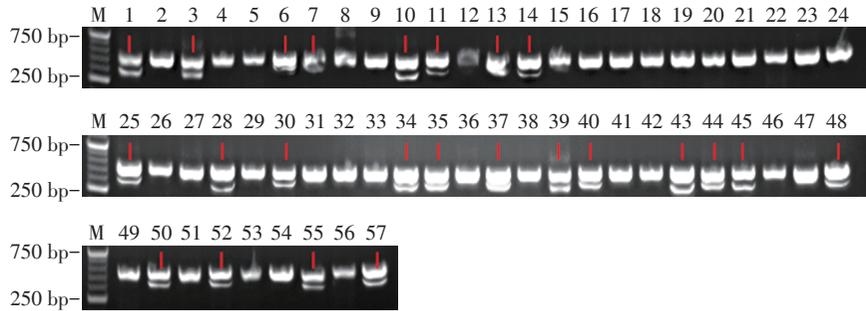
正确具有活性,能够造成靶点DNA序列突变。

2.3 RelB^{-/-}小鼠基因型鉴定

将转录的sgRNA和Cas9 mRNA混合物注射到400颗受精卵,1~2 h后挑选存活且状态良好的304颗受精卵移植到20只假孕FVB母鼠体内,F0代20 d左右出生,共获得57只F0代,出生率为18.8%。提取F0代小鼠基因组DNA,PCR扩增后琼脂糖凝胶

电泳与WT小鼠基因组DNA PCR产物进行比对(图2),并对F0代小鼠进行RelB敲除情况统计。凝胶电泳结果显示,57只F0代小鼠中33例为野生型,24例(42.1%)为杂合子(其中8例为杂合双等位基因敲除)。将杂合双等位基因敲除小鼠基因组送测序,部分原始测序序列比对与峰图见图3。

杂合双等位基因敲除小鼠中雄鼠共3只,选择



小鼠组织基因组PCR产物的琼脂糖电泳凝胶结果显示:F0代小鼠中共有24只杂合子(出现双条带的即为杂合子,红色箭头指出的位置)。

图2 F0代小鼠基因型鉴定结果

Figure 2 Identification of genotype in RelB^{-/-} F0 mice



A:部分小鼠的原始测序峰图;B:部分小鼠的序列比对结果。

图3 部分杂合子F0代小鼠DNA基因组测序结果

Figure 3 The genome sequences of some RelB^{-/-} F0 mice

发育良好且活力强的F0代39#雄鼠与野生型杂交,共出生10只F1代(图4A),提取基因组DNA予PCR后电泳,根据电泳结果挑选其中的1#♀、2#♀、3#♂、7#♀号互相交配传代,余雄鼠取精子冷冻保种。得到F2代小鼠18只,提取小鼠基因组DNA,行PCR扩增后电泳,验证F2代小鼠中:纯合子3只,杂合

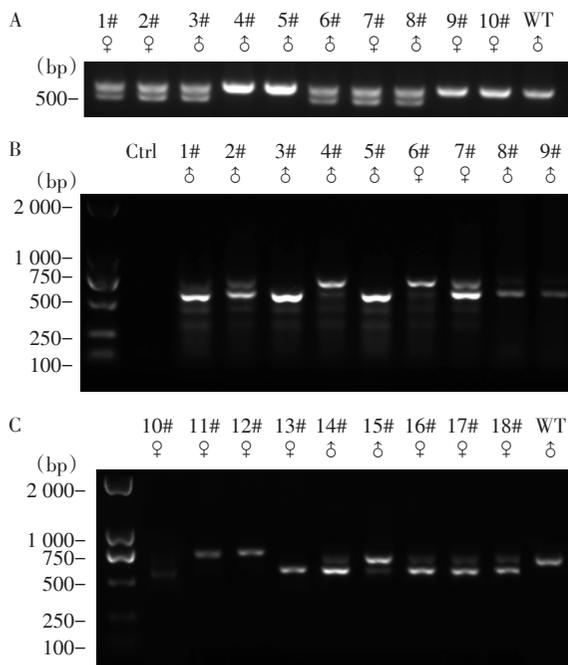
子13只,野生型2只(图4B、C)。

2.4 RelB^{-/-}小鼠Western blot结果

通过Western blot检测WT和RelB^{-/-}小鼠(F2代3#雄鼠)皮肤、肌肉、肝脏、骨骼中RelB蛋白表达情况,以β-actin为内参(图5A)。结果表明,在RelB^{-/-}小鼠的皮肤、肌肉、肝脏、骨骼中未检测到大小为65 kDa

的RelB蛋白表达,表明RelB^{-/-}小鼠构建成功,可以用于后续分析。

同时,本研究检测了NF-κB家族中其他转录因子在WT和RelB^{-/-}小鼠皮肤中的蛋白表达情况(图5B)。Western blot结果提示与WT小鼠相比,RelB^{-/-}小鼠组织中NF-κB家族中其他转录因子(RelA、p50、p52、cRel)mRNA及蛋白水平无明显差异。



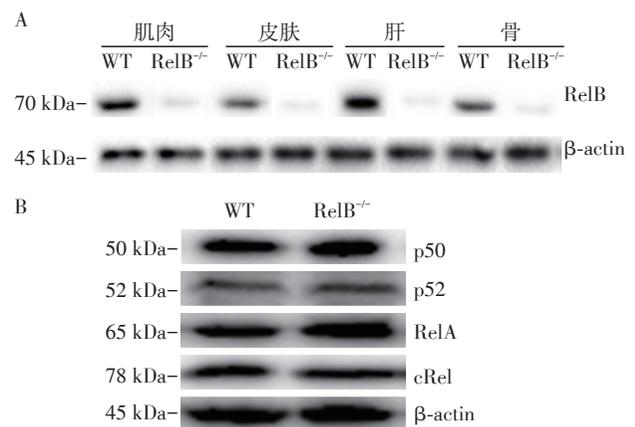
A: F1代小鼠共出生10只(5雄5雌),在1周内剪趾提取基因组DNA,经PCR后行琼脂糖电泳。其中杂合子6只(1~3#、6~8#),野生型4只(4#、5#、9#、10#)。B、C:F2代小鼠共出生18只(9雄9雌),在1周内剪趾提取基因组DNA,经PCR后行琼脂糖电泳。其中纯合子3只(3#、5#、13#),野生型2只(11#、12#),杂合子13只。

图4 F1代和F2代RelB^{-/-}小鼠基因型鉴定结果

Figure 4 Identification of genotype in RelB^{-/-} F1 and F2 mice

3 讨论

大多数遗传修饰小鼠的构建都是为了研究基因表达缺失、增加或靶基因序列变化对机体功能等的影响;也可通过设计基因修饰小鼠来标记特定细胞群(报告基因染色),监测生物过程(报告基因株),或允许特定细胞类型的Cre重组(Cre-驱动株)等^[15]。以往制备遗传基因修饰动物模型的方法主要依赖于ZEN和TALEN技术,而CRISPR/Cas9是最近发展起来的新一代基因编辑技术。本研究构建RelB基因敲除小鼠模型时,考虑了多方面因素,最后选择了更为简便、高效的CRISPR/Cas9技术。一方面,ZEF和TALEN系统需要借助蛋白完成对DNA



A: Western blot结果显示:与WT小鼠相比,RelB^{-/-}小鼠在皮肤、肌肉、肝脏、骨骼这4种组织中未检测到RelB蛋白的表达。B: Western blot结果提示,与WT小鼠相比,RelB^{-/-}小鼠皮肤组织中NF-κB家族中其他转录因子(RelA、p50、p52、cRel)蛋白水平无明显差异。

图5 Western blot检测RelB^{-/-}F2代小鼠组织中蛋白表达情况
Figure 5 The relative expressions of proteins in multiple tissues of RelB^{-/-} F2 mice detected by Western blot

序列的识别,识别蛋白的分子量大、表达质粒的构建难度高;而CRISPR/Cas9系统只需依据目的基因DNA的序列设计一段与之互补的长度在20 bp左右的sgRNA序列,即可实现对基因组DNA的打靶^[16]。另一方面,CRISPR/Cas9系统的打靶效率远高于另外两个系统(ZFN系统1%~30%,TALEN系统30%左右,CRISPR/Cas9系统20%~50%),最近更有研究报道在小鼠胚胎干细胞中,CRISPR/Cas9系统的打靶效率高达78%^[17-19]。CRISPR/Cas9系统的高效也在本实验中得以证实。在未进行设计方案特殊优化的情况下,本实验获得RelB双等位基因敲除小鼠的成功率在33%左右,高于另外两种基因编辑技术的平均打靶水平。由于CRISPR/Cas9设计便捷,步骤简单,试验周期短,且可以在细胞内同时进行多个基因编辑操作等诸多优势^[20],正逐渐替代ZEN和TALEN技术,对生物学领域的发展起到了深远影响。

RelB作为NF-κB非经典信号通路活化的主要转录因子,在肿瘤发生发展中扮演了重要角色。例如,RelB在间充质胶质瘤中发挥了癌症驱动因子的作用,其表达上调与肿瘤进展速度和不良预后有着密切相关性^[21]。而在乳腺癌中,RelB可以通过被STAT3激活而结合IDO启动子区,调控髓系来源抑制细胞的抗肿瘤免疫活性^[22]。另有研究显示,RelB高表达高度提示非小细胞肺癌的预后不良,可作为独立的预后因子^[23]。许多文献报道,当NF-κB信号通路pP65、IκBα、IKKα、IKKβ和NEMO(NF-κB essential modulator)被敲除时,均有小鼠胚胎致

死效应^[24-28]。由于并未检索到有关 RelB 敲除鼠的报道,故在 Mouse Genome Informatics 网站中预测了敲除 RelB 后对胚胎产生的影响。该网站提示在 RelB^{-/-}纯合子中,胚胎存在早期致死、致畸可能,并可能存在器官炎细胞浸润、免疫失调、上皮增生等表型。本研究并未对质粒进行额外处理,小鼠出生后也暂时未观察到显著的表型或生理缺陷。但在一般情况下,在构建胚胎致死性的基因工程鼠时,可以采用 TeT-on/off 系统结合 loxp 序列完成 CRISPR 的时间特异性表达,或者在构建质粒时于 promoter/enhancer 区域加入组织特异性转录因子的结合位点^[29]。

本研究借助 CRISPR Design 软件设计小鼠 RelB 基因修饰靶点,并利用 CRISPR/Cas9 系统通过显微注射操作成功构建了 RelB 基因敲除小鼠模型。但是尚未对可能存在的脱靶位点进行检测,其工作有待进一步完善。本研究结果为后续探究乳腺癌中 RelB 基因对骨转移及肿瘤耐药相关癌症小鼠模型的作用奠定了基础,以期为癌症发生的分子机制、癌症信号通路的激活研究和癌症临床治疗提供手段。

[参考文献]

- [1] Perkins ND. The diverse and complex roles of NF-kappa B subunits in cancer[J]. Nat Rev Cancer, 2012, 12(2): 121-132
- [2] Bonizzi G, Karin M. The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity [J]. Trends Immunol, 2004, 25(6): 280-288
- [3] Peng Q, Liu HJ, Shi SH, et al. Lycium ruthenicum polysaccharide attenuates inflammation through inhibiting TLR4/NF-B-kappa signaling pathway[J]. Int J Biol Macromol, 2014, 67(3): 330-335
- [4] Ghotra VP, Danen EH. Targeted radiosensitization in PCa [J]. Curr Pharm Des, 2013, 19(15): 2819-2828
- [5] Rezayat SM, Dehpour AR, Motamed SM, et al. Foeniculum vulgare essential oil ameliorates acetic acid-induced colitis in rats through the inhibition of NF-κB pathway [J]. Inflammopharmacology, 2018, 26(3): 851-859
- [6] Baik S, Sekai M, Hamazaki Y, et al. Relb acts downstream of medullary thymic epithelial stem cells and is essential for the emergence of RANK (+) medullary epithelial progenitors[J]. Eur J Immunol, 2016, 46(4): 857-862
- [7] 刘 骞,朱朝阳,李晓东,等. 核转录因子-κB 在膀胱癌组织中的表达及其临床意义[J]. 中国临床药理学杂志, 2017, 33(3): 229-231
- [8] 陈 昊,戴茵珏,徐晶晶,等. 胃肠间质瘤中 RelA 和 RelB 表达、c-Kit/PDGFRA 基因突变及其临床意义[J]. 临床肿瘤学杂志, 2018, 23(3): 216-223
- [9] 玛依拉·卡米力江,哈丽丹·热依木,阿丽叶古丽·艾皮热木,等. 宫颈癌发生与血浆 RelB 和 PSMD10 蛋白质表达调控的关系及临床意义[J]. 医学研究杂志, 2017, 46(5): 28-31
- [10] Yang S, Ding SF, Xu QH, et al. Genetic manipulation by zinc-finger nucleases in rat-induced pluripotent stem cells [J]. Cell Reprogram, 2017, 19(3): 180-188
- [11] Yang L, Liu Y, Zhang N, et al. Novel impact of the DN-MT3A R882H mutation on GSH metabolism in a K562 cell model established by TALENs [J]. Oncotarget, 2017, 8(18): 30395-30409
- [12] Xue W, Chen S, Yin H, et al. GRISPR-mediated direct mutation of cancer genes in the mouse liver [J]. Nature, 2014, 514(7522): 380-384
- [13] Hsu PD, Lander ES, Zhang F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering [J]. Cell, 2014, 157(6): 1262-1278
- [14] Mou H, Kennedy Z, Anderson DG, et al. Precision cancer mouse models through genome editing with CRISPR-Cas9 [J]. Genome Med, 2015, 7(1): 53
- [15] Abe T, Fujimori T. Reporter mouse lines for fluorescence imaging [J]. Dev Growth Differ, 2013, 55: 390-405
- [16] Gaj T, Gersbach CA, Barbas CF. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas - based methods for genome engineering [J]. Trends Biotechnol, 2013, 31(7): 397-405
- [17] Ochiai H, Yamamoto T. Construction and evaluation of zinc finger nucleases [J]. Methods Mol Biol, 2017, 1630: 1-24
- [18] Zhang JL, Yin ZC, White F. TAL effectors and the executor R genes [J]. Front Plant Sci, 2015, 6: 641
- [19] Zhou J, Wang J, Shen B, et al. Dual sgRNAs facilitate CRISPR/Cas9 mediated mouse genome targeting [J]. FEBS J, 2014, 281(7): 1717-1725
- [20] Al-Attar S, Westra ER, Van Der Oost J, et al. Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPRs): the hallmark of an ingenious antiviral defense mechanism in prokaryotes [J]. Biol Chem, 2011, 392(4): 277-289
- [21] Lee DW, Ramakrishnan D, Valenta J, et al. The NF-kappaB RelB protein is an oncogenic driver of mesenchymal glioma [J]. PLoS One, 2013, 8(2): e57489
- [22] 于津浦,王 越,杨莉莉,等. STAT3/NF-κB/IDO 途径调控乳腺癌髓系来源抑制细胞(MDSC)的抗肿瘤免疫活性:第九届全国免疫学学术大会论文集[C]. 北京:中国免疫学会, 2014
- [23] Qin HL, Zhou J, Zhou P, et al. Prognostic significance of RelB overexpression in non-small cell lung cancer patients [J]. Thoracic Cancer, 2016, 7(4): 415-421
- [24] Beg AA, Sha WC, Bronson RT, et al. Embryonic lethality

- and liver degeneration in mice lacking the RelA component of NF-kappa B[J]. *Nature*, 1995, 376(6536): 167-170
- [25] Klement JF, Rice NR, Car BD, et al. I kappa B alpha deficiency results in a sustained NF-kappa B response and severe widespread dermatitis in mice [J]. *Mol Cell Biol*, 1996, 16(5): 2341-2349
- [26] Takeda K, Takeuchi O, Tsujimura T, et al. Limb and skin abnormalities in mice lacking IKKalpha [J]. *Science*, 1999, 284(5412): 271-273
- [27] Li Q, Antwerp DV, Mercurio F, et al. Severe liver degeneration in mice lacking the Ikappa B kinase 2 gene [J]. *Science*, 1999, 284(5412): 321-325
- [28] Rudolph D, Yeh WC, Wakeham A, et al. Severe liver degeneration and lack of NF-kappaB activation in NEMO/IKKgamma-deficient mice [J]. *Genes Dev*, 2000, 14(7): 854-862
- [29] Schonig, K, Bujard H. Generating conditional mouse mutants *via* tetracycline-controlled gene expression [J]. *Methods Mol Biol*, 2003, 209: 69-104
- [收稿日期] 2018-04-18

诚聘医学杂志编辑

《Journal of Biomedical Research》是由南京医科大学主办,面向全球发行的英文学术双月刊,旨在增进各国生物医学研究者间的交流沟通。本刊现诚聘编辑一名,职责如下:

- 独立完成日常稿件处理工作;
- 协助执行主编处理编辑部日常事务;
- 与作者联络,负责跟进稿件及投稿咨询;
- 邀请专家同行评审,与评审人约定稿件返回日期。向作者反馈同行评审意见,确保作者按要求修改稿件;
- 按排版格式要求及时进行文章的编辑加工;
- 与作者沟通校对稿及修改事宜,确保稿件及时修回;
- 在重点研究领域积极拓展文章选题;
- 协助执行主编与顶尖专家开展视频专访,准备相关问题,安排访谈日程;
- 确保出版内容与预期目标和日程相符;
- 在公开场合(如学术会议)中推广本刊。

应聘人员须具有博士学位,临床医学或生物医学专业为佳;具有良好的英语写作能力;能与同事高效合作,头脑冷静,方法灵活。有编辑经验者优先考虑,无经验亦可,由编辑部提供相关培训。工作地点为《Journal of Biomedical Research》编辑部(南京医科大学江宁校区),享受标准福利待遇,进编。应聘者请提交简历及求职信至邮箱 xihan@njmu.edu.cn,咨询电话 025-86869291。