

基于 CRISPR/Cas9 技术构建严重联合免疫缺陷小鼠

赵亚¹, 李红武², 师长宏¹, 张彩勤¹, 赵勇¹, 刘佩娟¹, 白冰¹, 唐娟³, 白杰英⁴, 张海^{1*}

(1. 第四军医大学实验动物中心, 西安 710032; 2. 北京艾德摩生物技术有限公司, 北京 101111;
3. 第四军医大学细胞工程中心, 西安 710032; 4. 军事医学科学院实验动物中心, 北京 100071)

【摘要】 目的 应用 CRISPR/Cas9 技术靶向敲除编码小鼠 T、B 细胞的 Rag2 基因及编码 NK 细胞的 IL2rg 基因, 构建 T、B 细胞及 NK 细胞联合免疫缺陷小鼠。方法 根据 Genbank 报道的 Rag2 及 IL2rg 基因序列, 分别针对其外显子设计 25 bp 左右的 sgRNA 并进行合成, sgRNA 退火后克隆入 pX330 载体。Rag2-sgRNA、IL2rg-sgRNA 及 Cas9 重组质粒体外转录为 mRNA 后显微注射入 BALB/c 小鼠受精卵细胞, 受精卵细胞移植到受体动物获得子代小鼠, 首建鼠(F0)与野生型小鼠交配获得 F1 代小鼠, 突变的 F1 代小鼠互交后筛选 F2 代纯合子小鼠。通过基因测序、流式细胞技术及接种人源性肿瘤细胞系方法检测子代小鼠基因型和表型。结果 成功构建了 Rag2-sgRNA、IL2rg-sgRNA 重组质粒并对其进行了体外转录, mRNA 显微注射并移植后获得 57 只 F0 小鼠。连续交配后, 获得 F2 代纯合子小鼠。序列分析表明子代小鼠中 IL2rg 有两个基因型, 分别是 10 bp 和 11 bp 的缺失突变; 而 Rag2 只有一个基因型, 为 8 bp 的缺失突变。与野生型 BALB/c 小鼠相比, 小鼠外周血中 CD3、B220 及 NKp46 阳性细胞数量明显降低。接种人乳腺癌细胞系 SKBR-2HL 后, 肿瘤生长良好, 且随着时间延长肿瘤组织逐渐增大。结论 利用 CRISPR/Cas9 技术可有效实现 BALB/c 小鼠体内 Rag2、IL2rg 基因突变, 并导致小鼠 T、B 及 NK 细胞功能异常。

【关键词】 CRISPR/Cas9; 基因敲除; 免疫缺陷小鼠

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2016)04-0339-05

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2016.04.002

Construction of severe combined immunodeficiency mice based on CRISPR/Cas9 technology

ZHAO Ya¹, LI Hong-wu², SHI Chang-hong¹, ZHANG Cai-qin¹, ZHAO Yong¹,
LIU Pei-juan¹, BAI Bing¹, TANG Juan³, BAI Jie-ying⁴, ZHANG Hai^{1*}

(1. Laboratory Animal Center, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China;
2. Beijing IDMO Co., Ltd, Beijing 101111; 3. Cell Engineering Research Center, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032; 4. Laboratory Animal Center, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071)

【Abstract】 Objective To knockout Rag2 and IL2rg genes and construct severe combined immunodeficiency mice based on CRISPR/Cas9 technology. **Method** Design and synthesis of 25 bp sgRNA were made according to the Rag2 and IL2rg sequences in Genbank. After annealing, sgRNA was cloned into pX330 vector. Recombination plasmid Rag2-sgRNA, IL2rg-sgRNA and Cas9 were then transcribed into RNA, these RNA were microinjected into zygotes and the zygotes were transplanted into recipient ICR mice. F0 founders were born and mutated F0 founders mated with wild type mice to obtain F1 generation heterozygous mice. Mutated F1 mice were crossed and got F2 generation homozygous mice. Genotype and phenotype of the knockout mice were identified by sequencing, flow cytometry and xenograft model. **Results** Rag2-sgRNA and IL2rg-sgRNA recombination plasmids were constructed and transcribed into RNA. After microinjection and mat-

[基金项目] 军队重点研究课题(NO: BWS14J058); 国家自然科学基金面上项目(NO: 81272385); 陕西省科技资源统筹项目(NO: 2014FWPT-11)。

[作者简介] 赵亚(1988-), 女, 技术员。研究方向: 动物模型。E-mail: 1587041791@qq.com

[通讯作者] 张海(1971-), 副教授, 研究方向: 动物模型。E-mail: hzhang@fmmu.edu.cn

ing, F0 founders were born and F2 homozygous mice were obtained. The results of sequencing showed that there were two types of genotype in IL2rg gene, 10 bp or 11 bp deletion; however, there was only one genotype in Rag2 gene, which was 8 bp deletion. Compared with wild-type BALB/c mice, the number of CD3⁺, B220⁺ and NKp46⁺ cells in peripheral blood of the knockout mice was reduced significantly. After inoculation of human breast cancer cell line SKBR-2HL cells, tumor size in the xenograft mouse model was increased gradually along with time extension. **Conclusion** CRISPR/Cas9 is an efficient way to mutate Rag2 and IL2rg gene in mice *in vivo*, leading to aberrant T cells, B cells and NK cells.

[Key words] CRISPR/Cas9; Knockout; Severe combined immunodeficiency mice

Corresponding author: ZHANG Hai. E-mail: hzhang@fmmu.edu.cn

1966 年, 研究者发现 Foxn1 基因突变后小鼠 T 细胞功能障碍, 不能产生细胞特异性免疫反应, 由此开辟了自发性免疫缺陷动物研究的先河^[1]。随之 B 细胞缺陷的 Beige 小鼠、T 细胞及 B 细胞联合缺陷 SCID 小鼠也相继被发现并在生物医学研究多个领域得到广泛应用^[1]。尽管 T 细胞和/或 B 细胞功能障碍后形成的免疫缺陷小鼠在生物医学研究中取得了很多重大研究成果, 但其体内残存的 NK 细胞、巨噬细胞、中性粒细胞等介导的先天性免疫应答反应仍然会对移植物产生免疫排斥反应, 从而影响肿瘤在其体内存活。近年来, 研究者进行了许多努力, 试图找到免疫缺陷程度更高、免疫包容性更强的实验用小鼠以替代裸鼠或 SCID 小鼠。随着体外同源重组技术和胚胎干细胞技术的不断完善, 尤其是随着 TALEN 技术和 CRISPR/Cas9 技术的诞生使得这种可能成为现实^[3]。

Rag2 (recombination activating gene 2) 基因缺失或突变后, 阻滞 T 细胞和 B 细胞发育, 从而影响 T 细胞和 B 细胞功能^[4]。而 IL2rg (interleukin 2 receptor gamma chain) 基因与 NK 细胞功能有关, 当其缺失或突变后, NK 细胞功能发生障碍^[5]。本研究以 CRISPR/Cas9 技术为基础, 分别设计针对 Rag2 和 IL2rg 基因的 sgRNA, 体外转录后与 Cas9 mRNA 共同显微注射 BALB/c 小鼠受精卵以期获得 T 细胞、B 细胞及 NK 细胞功能联合缺陷的基因修饰动物。

1 材料与方法

1.1 材料

120 只 SPF 级 BALB/c 小鼠和 ICR 小鼠, 6~8 周龄, 雌雄各半, 由第四军医大学实验动物中心提供 [SCXK(陕)2014-002], 饲养于该单位屏障设施 [SYXK(陕)2014-001]。RNA 体外转录试剂盒购自 Ambion 公司, DNA 凝胶回收试剂盒购自天根生物科技有限公司。LongAmp Taq DNA 聚合酶由 NEB 公司提供。小鼠 FITC-CD3、PE-NKp46 及 APC-

B220 抗体由 Biolegend 公司提供。鼠尾基因组 DNA 提取试剂盒购自于成都福际生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 寡核苷酸合成及质粒构建

根据 Genbank 报道的 Rag2 (NM_009020) 和 IL2rg (NM_013563) 基因序列, 应用 <http://crispr.mit.edu/> 网站工具进行分析, 分别针对 IL2rg 基因第 1 外显子和 Rag2 基因第 2 外显子设计两个各 25 bp 左右的 sgRNA 用于基因打靶 (图 1, 下划线为靶序列, 大写为 PAM 区)。sgRNA 合成后退火, 以 T4 连接酶克隆入经 *Bbs* I 酶切线性化的 pX330 载体, 构建含有 sgRNA 的 pX330 重组质粒。测序正确后, 扩大培养并提取质粒用于体外转录模板。

1.2.2 体外转录

以 pX330-Rag2-sgRNA 和 pX330-IL2rg-sgRNA 重组质粒为模板, PCR 法克隆含 T7 启动子的 Rag2-sgRNA 和 IL2rg-sgRNA。相同方法克隆 Cas9 基因, 纯化后回收, DNA 溶于 DEPC 水中保存。分别取 200 ng 的 Rag2-sgRNA、IL2rg-sgRNA 及 Cas9 纯化后产物进行体外转录, 定量后 -80℃ 保存。

1.2.3 mRNA 显微注射及受精卵细胞移植

8 周龄 BALB/c 小鼠雄性与雌性小鼠使用前一天合笼, 24 h 后取见栓的雌性小鼠解剖, 在输卵管部位获取受精卵细胞。分别取已转录好的 20 μg/μL Rag2-sgRNA 及 10 μg/μL IL2rg-sgRNA 和 5 μg/μL Cas9 mRNA 混合, 以 Eppendorf NK2 显微注射仪注射到受精卵细胞胞质中。受精卵细胞在 37℃ 5% CO₂ 培养箱中继续培养 2~3 h, 取生长状态良好, 发育至 2 细胞期受精卵细胞移植到 ICR 假孕鼠输卵管部位。

1.2.4 基因敲除小鼠品系建立及基因型鉴定

取出生 1 周左右的小鼠尾组织, 裂解后以试剂盒提取小鼠基因组 DNA, PCR 方法克隆 F0 代小鼠 Rag2 和 IL2rg 基因。PCR 反应条件为: 94℃ 预变性 3 min, 94℃ 变性 30 s, 50℃ 退火 40 s, 65℃ 延伸

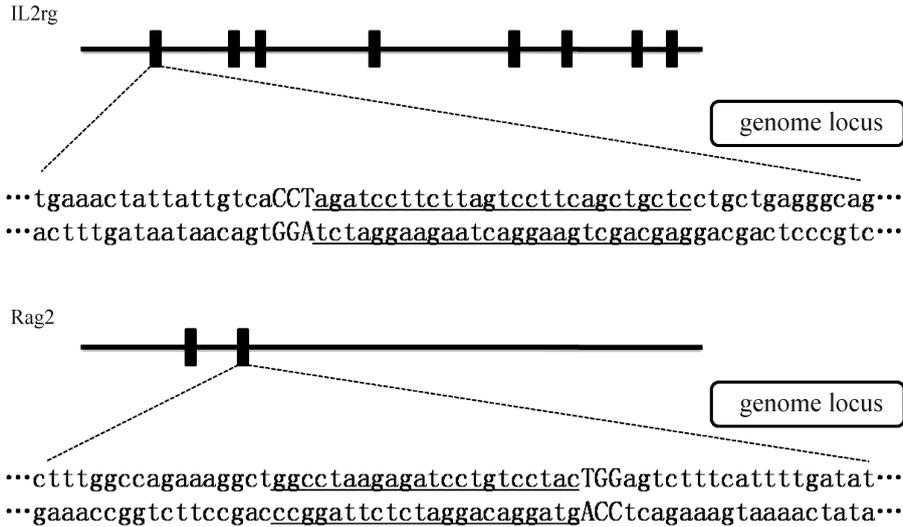


图 1 sgRNA 序列设计示意图

Fig. 1 Diagram of the design of sgRNA sequence

40 s, 共进行 35 个循环。循环结束后以 65℃ 延伸 6 min。取 10 μL PCR 产物进行电泳, 大小正确后进行测序。突变的 F0 代小鼠与野生型小鼠交配, 获得 F1 代杂合子小鼠, F1 代杂合子小鼠互交即可获得双基因突变的纯合子小鼠。

1.2.5 流式细胞术鉴定小鼠表型

通过剪尾方法取 50 μL F0 代小鼠外周血, 红细胞裂解液裂解后以 FACS 缓冲液洗脱, 加入 1:1000 稀释的 FITC-CD3、PE-NKp46 及 APC-B220 抗体室温避光染色 30 min。FACS 缓冲液洗脱后上机检测小鼠外周血白细胞中 CD3、B220 及 NKp46 的表达情况。

1.2.6 肿瘤移植模型鉴定小鼠表型

SKBR-2HL 人乳腺癌细胞培养至对数生长期, 消化后取 1×10^7 个细胞接种至 4 周龄 F0 代小鼠腹外侧皮下, 接种肿瘤细胞的 F0 代小鼠继续饲养 3 周, 期间在不同时间观察瘤体大小。

2 结果

2.1 质粒构建及 RNA 转录

根据 Genbank 报道的 Rag2 和 IL2rg 基因序列, 分别针对 Rag2 基因第 2 个外显子及 IL2rg 基因第 1 个外显子设计具有靶向作用的 sgRNA, sgRNA 序列见表 1。sgRNA 合成后经退火, 连入 pX330 载体, 构建含有 sgRNA 的 pX330 重组质粒。质粒小提并经测序后表明质粒构建正确。sgRNA 及 Cas9 克隆后, 在 T7 启动子作用下进行体外转录, 转录产物经电泳鉴定后为单一条带, 且 $A_{260/280} > 1.9$, $A_{260/230} > 2.3$ 。

表 1 sgRNA 靶点及寡核苷酸序列

Tab. 1 Target sites of the sgRNA and oligonucleotide sequences

sgRNA 名称 Name of sgRNA	sgRNA 寡核苷酸序列 sgRNA oligonucleotide sequences
Rag2-up	5' -caccggcctaagagatcctgtcctac-3'
Rag2-down	5' -aaacttaggacaggatccttaggccc-3'
IL2rg-up	5' -caccggagcagctgaaggactaaga-3'
IL2rg-down	5' -aaactttagtccttcagctgctcc-3'

2.2 基因敲除小鼠品系的建立及基因型鉴定

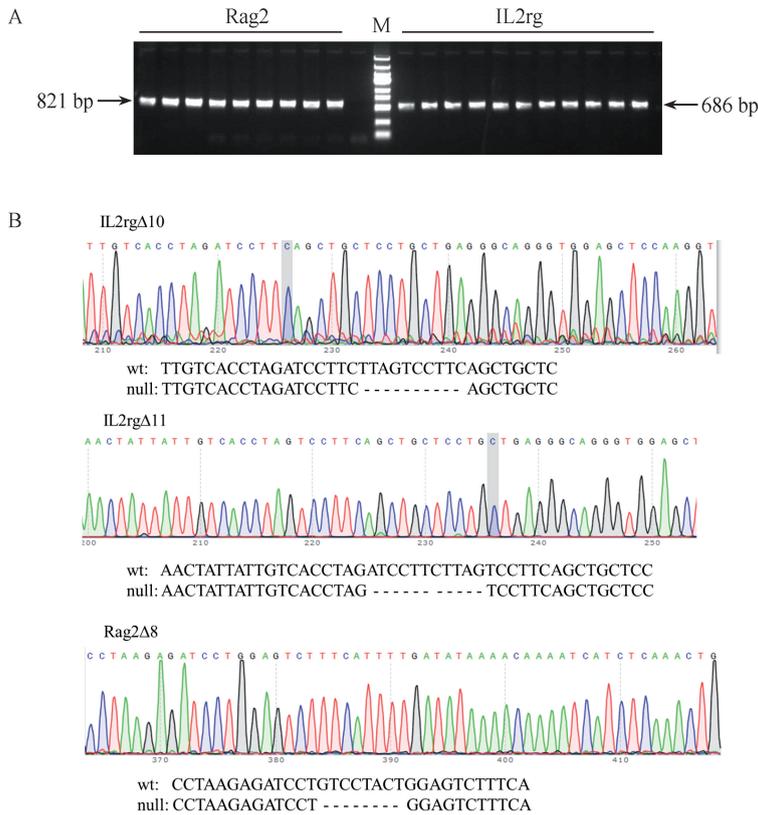
共收集 BALB/c 小鼠胚胎数 740 枚, 其中 609 枚为受精卵细胞, 显微注射后有 249 枚存活, 移植到 ICR 受体鼠后制备 F0 代首建鼠。测序后取 F0 代突变小鼠与野生型 BALB/c 小鼠交配获得 F1 代小鼠, 突变的 F1 代小鼠互交后获得 Rag2 和 IL2rg 双基因突变的 F2 代纯合子小鼠。F0、F1 及 F2 代小鼠出生约 1 周后, 剪取小鼠尾尖 3~5 mm 组织用于基因组 DNA 提取。取 1 μL DNA 为模板进行 PCR 反应, 1% 凝胶电泳鉴定后发现 Rag2 基因片段大小为 821 bp, IL2rg 片段大小为 686 bp, 与预期大小相符 (图 2A)。测序结果表明 F0、F1 及 F2 代小鼠 IL2rg 基因有两个突变型, 分别是 10 bp 和 11 bp 的缺失突变; 而 Rag2 基因只有一个突变型, 为 8 bp 的缺失突变 (图 2B)。

2.3 基因敲除小鼠表型鉴定

突变小鼠尾尖处取血 50 μL 进行流式分析。与正常野生型小鼠比较, 基因敲除小鼠 CD3⁺T 细胞、B220⁺B 细胞及 NKp46⁺NK 细胞数量下降明显 (图 3A), 表明 CRISPR/Cas9 技术对 Rag2 和 IL2rg 基因进行编辑后影响到这两个基因编码的生物学功能,

导致 T 细胞、B 细胞及 NK 细胞数量降低。进一步通过复制人肿瘤模型验证基因敲除小鼠生物学特性,人乳腺癌细胞 SKBR-2HL 分别接种 3 只基因敲除小鼠,1 周后可见肿瘤细胞在小鼠体内生长,且

随着时间延长,肿瘤体积不断增大(图 3B)。结合流式检测结果,我们认为 Rag2 和 IL2rg 基因敲除小鼠不仅 T 细胞、B 细胞及 NK 细胞数量下降,而且其免疫功能缺陷,移植植物可在其体内增殖。



注:A. 突变小鼠 PCR 鉴定;B. 靶基因测序结果。

图 2 基因敲除小鼠基因型鉴定

Note. A. PCR identification of the mutant mice. B. Sequence results of the target gene

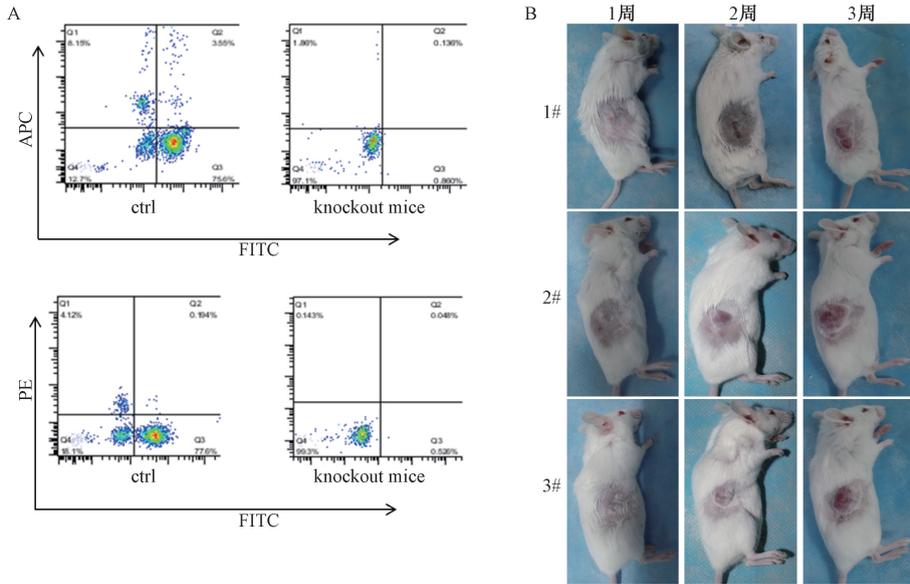
Fig.2 Identification of the genotype of knockout mice

3 讨论

BALB/c 小鼠由于其生物学特性明确,是目前免疫学、微生物学等研究领域常用的近交系小鼠。*nude* 基因导入 BALB/c 小鼠后可培育成传统的免疫缺陷小鼠品系 BALB/c-nu/nu, 该类小鼠 T 细胞缺陷,因而 T 细胞介导的细胞免疫功能严重下降^[6]。但该类小鼠 B 细胞及其他免疫细胞正常,这些细胞介导的免疫反应常会影响动物模型复制效果。如人类肿瘤模型复制时,一些人类肿瘤模型难以在 BALB/c-nu/nu 裸鼠中建立,除过肿瘤细胞致瘤性外, BALB/c-nu/nu 裸鼠免疫细胞状态也是影响肿瘤模型复制的关键因素之一。为了克服以上弊端,有必要研究出免疫缺陷程度更高、免疫包容性更强、且遗传背景来源于 BALB/c 小鼠的动物用于免疫学、

微生物学、肿瘤学等领域研究。基于此目的,本研究以 BALB/c 小鼠为对象,通过 CRISPR/Cas9 技术对其进行遗传修饰,研究制备出免疫缺陷程度更高的 BALB/c 小鼠。

超数排卵是获取受精卵细胞的常用技术方法,但 BALB/c 小鼠对 PMSG 和 hCG 不敏感,难以用这两种激素对其进行超排^[7]。本研究中我们采用 8 周龄 BALB/c 雌性小鼠与 7 周龄雄性小鼠进行自然交配,尽管在交配前挑取雌性发情小鼠,但获取小鼠受精卵细胞数量仍然很低,平均每只小鼠只能收获 2 个细胞,因此在以后研究中需摸索出最佳交配条件以提高 BALB/c 小鼠卵细胞收集率。收集的卵细胞生长状态良好,740 枚卵细胞中有 609 枚为受精卵细胞,受精率 82%,显微注射后有 249 枚受精卵细胞存活,存活率为 41%,移植到 12 只 ICR 受体鼠



注:A. 流式细胞检测 T 细胞、B 细胞及 NK 细胞数量; B. 基因敲除小鼠接种 SKBR-2HL 细胞后肿瘤生长情况。

图 3 基因敲除小鼠表型鉴定

Note. A: Flow cytometry to detect the T, B and Nk cells. B: Tumor growth of the knockout mice after implantation of SKBR-2HL cells.

Fig. 3 Identification of the phenotype of the knockout mice

后出生 57 只 F0 代首建鼠, 每只小鼠平均产仔 4.8 只。这些数据表明尽管通过自然交配方式获取 BALB/c 小鼠卵细胞数量少, 但这种方式获取的受精卵细胞能完全满足基因修饰动物的构建。

传统基因敲除主要是应用同源重组原理通过插入突变和基因靶向技术使目的基因功能丧失, 但这些方法对技术要求高, 制作周期长, 只能在一些专业实验室才能完成。CRISPR/Cas9 技术就是利用 sgRNA 与同源性的 DNA 能特异性结合的原理, sgRNA 发挥靶向作用, 引导核酸内切酶 Cas9 在靶点处进行切割, 从而达到基因修饰的目的^[8]。因此与特定位点同源的 sgRNA 和核酸内切酶 Cas9 是 CRISPR/Cas9 技术中不可或缺的两个要素。Rag2 和 Il2rg 基因序列分析表明, 这两个基因紧邻其上、下游分子, 且有部分重叠, 如对其进行大片段缺失突变将会影响到上、下游分子表达。针对这种情况, 本研究以 Rag2 和 Il2rg 基因外显子为靶点进行小片段突变, 这种突变不仅可导致 Rag2 和 Il2rg 基因功能失活, 而且也对其上、下游基因表达无明显影响。与传统基因敲除方法相比, CRISPR/Cas9 技术具有快速、可靠及敲除效率高等特点, 本研究采用 CRISPR/Cas9 技术一步敲除了两个不同基因, 敲除后 T 细胞、B 细胞及 NK 细胞不仅数量下降明显, 而且细胞功能也发生障碍, 接种人乳腺癌细胞系后肿瘤细胞生长良好, 表现出与传统免疫缺陷动物相似的生物

学特性。

参 考 文 献

- [1] Baxter RM, Brissette JL. Role of the nude gene in epithelial terminal differentiation [J]. *J Invest Dermatol*, 2002, 118(2): 303-309.
- [2] Romano R, Palamaro L, Fusco A, et al. From murine to human nude/SCID: the thymus, T-cell development and the missing link [J]. *Clin Dev Immunol*, 2012, 2012: 467101.
- [3] Pattanayak V, Guilinger JP, Liu DR. Determining the specificities of TALENs, Cas9, and other genome-editing enzymes [J]. *Methods Enzymol*, 2014, 546: 47-78.
- [4] Lavender KJ, Pang WW, Messer RJ, et al. BLT-humanized C57BL/6 Rag2^{-/-} gammac^{-/-} CD47^{-/-} mice are resistant to GVHD and develop B- and T-cell immunity to HIV infection [J]. *Blood*, 2013, 122(25): 4013-4020.
- [5] Chung YS, Son JK, Choi B, et al. Co-transplantation of human fetal thymus, bone and CD34(+) cells into young adult immunodeficient NOD/SCID IL2Rgamma(null) mice optimizes humanized mice that mount adaptive antibody responses [J]. *Clin Immunol*, 2015, 157(2): 156-165.
- [6] Croy BA, Linder KE, Yager JA. Primer for non-immunologists on immune-deficient mice and their applications in research [J]. *Comp Med*, 2001, 51(4): 300-313.
- [7] Luo C, Zuniga J, Edison E, et al. Superovulation strategies for 6 commonly used mouse strains [J]. *J Am Assoc Lab Anim Sci*, 2011, 50(4): 471-478.
- [8] 杜建勇, 邓然, 高虹, 等. 一种 gRNA 快速合成及检测方法的建立 [J]. *中国实验动物学报*, 2015, 23(03): 267-271.

[收稿日期] 2016-05-06