

CRISPR/Cas9 介导的小鼠 BRCA1/BRCA2/CDH1 基因乳腺特异性修饰研究

陈茜^{1,3,4}, 向熙², 杨漫漫^{2,4}, 张婷婷^{3,4}, 陈文彬¹, 李林^{3,4},
魏强^{2,4}, 李勇^{1,2,4*}

(1. 深圳华大方舟生物技术有限公司, 深圳 518000; 2. 深圳华大生命科学研究院, 深圳 518000; 3. 中国科学院大学华大教育中心, 深圳 518000; 4. 深圳动物基因组辅助育种工程实验室, 深圳 518000)

【摘要】 目的 应用 CRISPR/Cas9 系统构建 BRCA1、BRCA2 和 CDH1 三基因乳腺特异性修饰小鼠模型。方法 针对小鼠 BRCA1、BRCA2 和 CDH1 基因分别设计并合成 sgRNA, 构建 pX330-spCas9-U6-gRNA 共表达载体, 将共表达载体中 CBh 启动子替换为乳腺组织特异性启动子 WAP。利用小鼠受精卵原核注射的方法制备转基因小鼠。结果 共注射受精卵 190 枚, 得到活性受精卵 130 枚, 移植 4 只受体鼠。产下 F0 代仔鼠 42 只, 鉴定出 11 只转基因阳性小鼠, 阳性率为 26.19%。F0 代阳性鼠繁育后得到 39 只 F1 代仔鼠, 其中 9 只为 F1 代转基因阳性鼠。结论 通过构建乳腺组织特异表达 Cas9 载体成功制备了转基因阳性鼠。

【关键词】 乳腺癌; CRISPR/Cas9 系统; 基因组编辑; 基因敲除小鼠

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2018) 08-0062-08

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2018.08.012

Mammary tissue-specific modification of mouse BRCA1/BRCA2/CDH1 genes using CRISPR/Cas9

CHEN Xi^{1,3,4}, XIANG Xi², YANG Manman^{2,4}, ZHANG Tingting^{3,4}, CHEN Wenbin¹,
LI Lin^{3,4}, WEI Qiang^{2,4}, LI Yong^{1,2,4*}

(1. BGI Ark Biotechnology Co. LTD, Shenzhen 518000, China; 2. BGI-Shenzhen, Shenzhen 518000;
3. BGI Education Center, University of Chinese Academy of Sciences, Shenzhen 518000;
4. Shenzhen Engineering Laboratory for Genomics-Assisted Animal Breeding, Shenzhen 518000)

【Abstract】 **Objective** To construct a mouse model with mammary tissue-specific modification of the BRCA1, BRCA2, and CDH1 genes using the CRISPR/Cas9 system. **Methods** Single-stranded RNAs (sgRNAs) targeting the exons of the mouse BRCA1, BRCA2, and CDH1 genes were designed and synthesized, and the biological function of each sgRNA was validated in HEPA cells. Three sgRNAs were successively linked to the pX330-spCas9-U6-gRNA coexpression vector, and the CBh promoter was replaced by the mammary tissue-specific promoter WAP. The obtained final vector was linearized by the restriction endonuclease SbfI, after which it was injected into mouse zygotes to generate transgenic mice. **Results** A total of 190 zygotes were injected and 130 positive zygotes were implanted into four recipient mice. There were 42 offspring of F₀ mice, while 11 mice were identified to have modified transgenes; the positive rate of transgenic mice was

[基金项目] 深圳市知识创新计划基础研究项目(JCYJ20140717153620436); 深圳市基因组辅助育种工程实验室提升项目

[作者简介] 陈茜(1991—), 女, 硕士研究生, 专业: 基因组学。E-mail: chenxi3@genomics.cn

[通信作者] 李勇(1981—), 男, 硕士研究生, 研究方向: 动物生物技术。E-mail: liyong3@genomics.cn

26.19%。A total of 39 F_1 mice were obtained by F_0 generation breeding and 9 F_1 transgenic mice were detected.

Conclusions Transgenic mice were successfully generated by constructing a mammary tissue-specific coexpression vector.

【Keywords】 breast cancer; CRISPR/Cas9 system; genome editing; knockout mice

乳腺癌是女性常见的主要恶性肿瘤之一^[1-2]。我国虽然属乳腺癌低发国家,但人口基数大,乳腺癌已然成为我国女性发病率最高的癌症,严重威胁了广大女性的生命健康^[3]。BRCA1 (breast cancer susceptibility gene1)是最先被发现的高共显乳腺癌易感基因。研究发现,有乳腺癌家族史的妇女中,BRCA1 的基因突变比例可达 15%~20%;在同时具有乳腺癌和卵巢癌家族史的妇女中,BRCA1 的基因突变比例更高,甚至高达 60%~80%^[4]。除了 BRCA1 外,BRCA2 (breast cancer susceptibility gene 2)和 CDH1 (cadherin gene 1)也是迄今为止发现重要乳腺癌易感基因。大规模乳腺癌群体的高通量测序及分析研究也证实,BRCA1、BRCA2 和 CDH1 三个基因结构和功能的异常与乳腺癌的发病密切相关^[5]。

为了探索乳腺癌的发病机制和探讨新的治疗方法,国内外研究者需借助更贴近于人类的原发性乳腺癌动物模型,而制备 BRCA1/BRCA2/CDH1 基因乳腺特异性修饰小鼠是建立该模型的有效途径。虽然基于基因敲除的小鼠模型在肿瘤发病机制研究中有独特的优势,但部分肿瘤驱动基因在动物体内的全身性纯合敲除具有胚胎致死性,很难进行后续的机理药理研究,典型的如 BRCA1 和 BRCA2^[6]。对于这些致死性基因的失活,多采用组织特异性敲除的方法,其原理是利用同源重组的方法在敲除区域两侧插入 loxp 片段 (floxp),随后 floxp 小鼠与组织特异性表达 Cre 重组酶的小鼠杂交,Cre 重组酶可识别并折叠剪切 loxp 中间的片段,达到组织特异性敲除特定基因的目的^[7]。但该方法步骤繁琐,失败率高,周期长,不利于科研的开展。利用组织特异性启动子启动 CAS9 蛋白的表达,并结合全身性 single guide RNA 的表达,能在动物个体的特定组织或细胞群中结合成 CRISPR/Cas9 RNP (ribonucleoproteins)复合物,实现靶基因的组织特异性编辑。该方法大大缩短了组织特异性敲除动物的制备周期和难度,已在斑马鱼^[8]、果蝇^[9]、小鼠^[10]等模式动物中得到很好的应用。

本研究选取 BRCA1、BRCA2 和 CDH1 三个乳腺癌高频易感基因为靶基因位点,以 CRISPR/Cas9 基因编辑技术为基础,构建乳腺组织特异性的 CAS9

蛋白以及三条 sgRNA 共表达载体,通过原核注射的方式将载体序列整合到小鼠基因组中,制备转基因小鼠,使整个表达框在个体中稳定表达,从而实现乳腺组织特异性的多基因敲除。与传统的同源重组及 Cre-loxp 的方法相比,本实验的周期与成本可以缩短至三分之一,方便快捷地构建出乳腺组织特异性敲除小鼠,对其进行深入研究将对遗传性乳腺癌的发生机制、早期诊断及治疗有着重要的理论意义和实际应用价值。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级 C57BL/6 小鼠,体重 25~30 g,7~8 周龄,雌性 30 只,雄性 5 只。购于中国医学科学院医学实验动物研究所 [SCXK(京)2013-0002],转基因动物的构建及饲养在中国医学科学院医学实验动物研究所进行 [SYXK(京)2013-0014]。伦理审查号: BGI-IRB17213。

1.2 主要材料

HEPA 细胞(小鼠肝癌细胞)购自上海研域生物工程公司;CRR 质粒(可单独表达 sgRNA 的载体,由本实验室设计并合成);pCMV-spCas9 质粒(可单独表达 Cas9 的载体,由本实验室设计并合成);pX330-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9 载体购自 Biovector 公司。

无内毒素质粒提取试剂盒购自 Omega 公司;Lipofectamine2000 转染试剂购自 Thermo Fisher Scientific;Trizol 试剂购自 Invitrogen 公司;反转录试剂盒购自北京金式金生物技术有限公司;premix ExTaq、T7 核酸内切酶 I、普通质粒提取试剂盒、DNA 提取试剂盒、In-Fusion HD Cloning kits、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒购自大连宝生物公司;限制性内切酶均购自 NEB 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 sgRNA 设计及活性鉴定

针对小鼠 BRCA1 基因序列 (Gene ID:12189),利用 sgRNA 在线设计网站 (<http://crispr.mit.edu/>)在其第 10 外显子设计并合成了 1 条特异识别靶序列 DNA 的 sgRNA。合成的 sgRNA 及互补链经变性退火 (程序为:95°C 10 min; 25°C 30 min),形成带

有粘性末端的双链核苷酸,再连入经 Bbs I 酶切回收的 pX330 载体骨架中,命名为 pX330 (B1)。BRCA2 及 CDH1 基因位点的 sgRNA 则是根据文献报道各选取一条具有活性的 gRNA 直接合成^[11-12],将 BRCA2 sgRNA、CDH1 sgRNA 分别连入经 BsaI 酶切回收的 CRR 载体骨架中,命名为 CRR (B2) 和 CRR (C1)。构建好的表达载体经测序验证连接正确后,提取无内毒素质粒用于细胞转染。

pX330 (B1) 质粒直接转染 HEPA 细胞,CRR (B2) 载体和 CRR (C1) 载体与 pCMV-spCas9 质粒共转染 HEPA 细胞(CRR 载体与 pCMV-spCas9 质粒质量比为 1:1)。当 24-well HEPA 细胞汇合度达到 50%~70% 时进行脂质体转染,48 h 后分别收集细胞并提取基因组 DNA,PCR 扩增 sgRNA 切割靶点上下游 DNA 片段(如图 1 A),产物经 T7 程序变性退火后再经 T7 核酸内切酶 I 酶切。引物信息见表 1,反应体系如下:

PCR 扩增体系:细胞基因组 DNA 0.1 μg, premix ExTaq 10 μL,上、下游引物(10 μmol/L)各 0.4 μL,灭菌蒸馏水补至 20 μL。PCR 反应条件:(98℃ 15 s;55℃ 30 s;72℃ 1 min) × 32 cycles。

T7 变性程序:95℃ 10 min;95℃~85℃ (-2.0℃/s);85℃~25℃ (-0.3℃/s);25℃ 1 min。

T7 酶切反应体系:PCR 产物 18 μL,NEBuffer2 2 μL,T7EI 0.2 μL。反应条件:37℃ 45 min。

1.3.2 WAP 启动子的扩增

为确保 Cas9 基因在小鼠乳腺组织中特异性表达,根据小鼠基因组序列扩增乳腺组织特异性表达的 WAP 启动子,并在两端加入 pX330 骨架同源序列,与去除 CBh 启动子的 pX330 质粒骨架连接(KpnI 和 AgeI 双酶切),重组质粒命名为 pX330(WAP-Cas9-U6-B1)。

1.3.3 共表达载体的构建

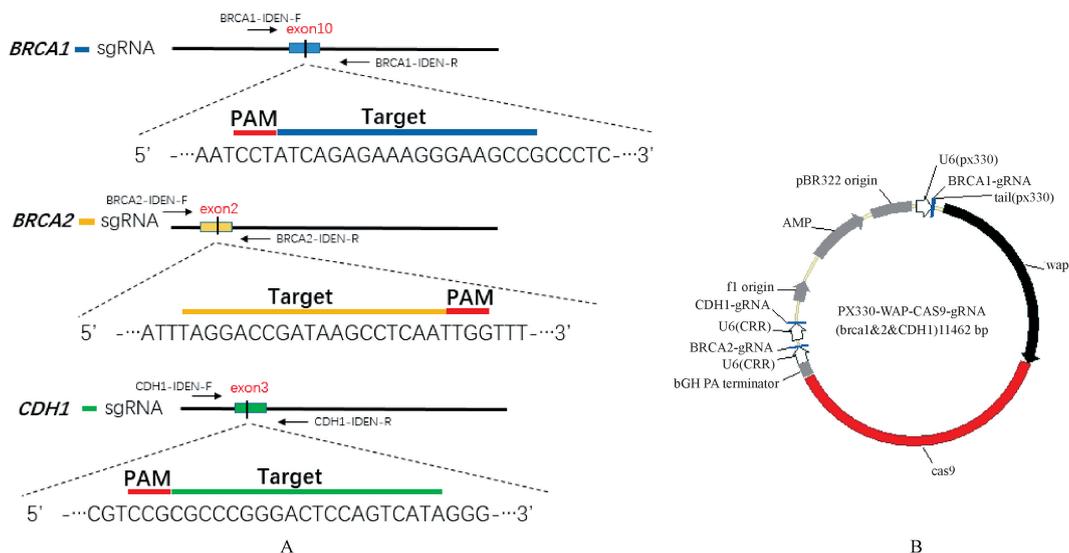
扩增 CRR (B2) 载体上 U6-BRCA2sgRNA 表达框,连入经 NotI 酶切后的 pX330(WAP-Cas9-U6-B1) 骨架,命名为 pX330(WAP-Cas9-U6-B1B2)。扩增 CRR (C1) 载体上 U6-CDH1sgRNA 表达框,连入经 NotI 酶切后的 pX330(WAP-Cas9-U6-B1B2) 骨架,通过限制性核酸内切酶 SbfI 酶切鉴定重组后的质粒,将终载体命名为 pX330(WAP-Cas9-U6-B1B2C1) (如图 1B),并回收线性化质粒,制备原核显微注射液。构建共表达载体所需引物信息如表 2。

表 1 sgRNA 设计及活性鉴定引物
Table. 1 The primers for sgRNAs and identification of their activity

	引物名称 Primer name	引物序列(5'~3') Primer sequence
sgRNA 序列 sgRNA sequence	BRCA1-pX330-gF	CACCGCGCTTCCCTTTCTCTGAT
	BRCA1-pX330-gR	AAACATCAGAGAAAGGGAAGCCGC
	BRCA2-CRR-gF	ACCGTAGGACCGATAAGCCTCAATG
	BRCA2-CRR-gR	AAAACATTGAGGCTTATCGGTCCTA
鉴定引物序列 Identification primer sequence	CDH1-CRR-gF	ACCGTATGACTGGAGTCCCGGGCGG
	CDH1-CRR-gR	AAAACCGCCCGGACTCCAGTCATA
	BRCA1-IDEN-F	TGAGACCAGCAGTTTATTG
	BRCA1-IDEN-R	CTTCTCCTCAGCCTATT
	BRCA2-IDEN-F	TCACGAGTTTCTCCGTGTCA
	BRCA2-IDEN-R	GCTCTGGCTGTCTCGAAGCTT
	CDH1-IDEN-F	CCAGACTCCAATGTCAAGTT
	CDH1-IDEN-R	CCACAGAACCACAGCAAA

表 2 载体构建引物
Table. 2 The primers for vector construction

引物名称 Primer name	引物序列(5'~3') Primer sequence
WAP-infusion-F	CAAAATGGCTCTAGAGGTACCCTCTAAGTAGAGGGGAAGAAA
WAP-infusion-R	CCATGGTGGCACCGGTGTACCGGTCTCAGGCAAGTG
BRCA2-infusion-F	CAGGCATGCTGGGAGCAAGGTCGGGCAGGAAGAGGGCCT
BRCA2-infusion-R	CTAGGGGTTCTCGGCCGCAAAAAAAGCACCGACTCGGTGCC
CDH1-infusion-F	TCGGTCTTTTTTTCGAAGGTCGGGCAGGAAGAGGGCCT
CDH1-infusion-R	AGGGGTTCTCGGCCAAAAAAAGCACCGACTCGGTGCC



注:A:BRCA1、BRCA2 和 CDH1 三基因 sgRNA 及鉴定引物设计示意图;B:共表达载体结构示意图,包含 WAP 启动子、U6-BRCA2-sgRNA、U6-CDH1-sgRNA。

图 1 BRCA1、BRCA2 和 CDH1 三基因 sgRNA 及共表达载体结构示意图

Note. A: Schematic diagram of sgRNAs in BRCA1, BRCA2 and CDH1 gene and the primers for identification. B: Schematic diagram of the final carrier structure, including WAP promoter, U6-BRCA2-sgRNA, U6-CDH1-sgRNA.

Figure. 1 Schematic diagram of sgRNAs for BRCA1, BRCA2, and CDH1 genes and the structure of the final carrier

1.3.4 转基因小鼠制备

实验第 1 天 8:00 小鼠腹腔注射每只 PMSG 7.5 IU。48 h 后,实验第 3 天小鼠腹腔注射每只 HCG 7.5 IU,注射后立即与雄鼠 1:1 合笼。实验第 4 天 8:00~9:00 检查阴道栓,有阴道栓的小鼠备注日期和阳性,对阳性小鼠进行受精卵收集。向受精卵雄性原核注入显微注射液后,移植到假妊娠小鼠输卵管中,每只移入 25~35 枚合子。移植后将小鼠置于安静的环境下饲养,19~21 d 分娩产仔。

1.3.5 转基因阳性小鼠的鉴定

剪取出生 1 周新生小鼠尾巴,通过试剂盒提取小鼠基因组 DNA,具体提取方法按试剂盒说明书进行。根据转基因载体上的特异 DNA 序列进行 PCR 检测。PCR 鉴定产物跨 WAP 启动子和 Cas9 基因,引物见表 3。PCR 反应体系同 1.3.1。

转基因阳性母鼠受孕分娩后,于哺乳后期采集母鼠乳腺、肾、胃、脑、脂肪和肝组织,并采集非哺乳期的母鼠乳腺、肾、胃、脑、脂肪和肝组织作为对照。Trizol 法提取组织 RNA 后进行反转录,得到的 cDNA 用反转录引物扩增鉴定,引物见表 3。

GAPDH 引物作为内参引物,同时扩增乳腺、肾、

胃、脑、脂肪和肝组织,引物序列见表 3。

反转录体系:总 RNA 1 μg, Oligo (dT)₁₈ 1 μL, 2X TS Reaction Mix 10 μL, TransScript RT/RI Enzyme Mix 1 μL, RNase-free Water 补至 20 μL。

反转录反应条件:42℃ 反应 30 min, 85℃ 加热 5 s 失活 TransScript RT。

RT-PCR 扩增体系:cDNA 2 μL, premix ExTaq 5 μL, 反转录上下游引物(10 μmol/L)各 0.2 μL, 灭菌蒸馏水补至 10 μL。

RT-PCR 反应条件:(98℃ 10 s; 60℃ 30 s; 72℃ 20 s) × 35 cycles。

GAPDH 引物 PCR 反应条件同上。

同时,试剂盒法提取这 6 个组织的基因组 DNA, PCR 分别扩增共表达载体上 sgRNA 切割靶点上下游 DNA 片段,产物经 T7 程序变性退火后再经 T7 核酸内切酶 I 酶切。引物信息见表 4。

PCR 扩增体系:基因组 DNA 0.1 μg, premix ExTaq 10 μL, 上、下游引物(10 μmol/L)各 0.4 μL, 灭菌蒸馏水补至 20 μL。

PCR 反应条件:(98℃ 15 s; 55℃ 30 s; 72℃ 1 min) × 32 cycles。

T7 变性程序和 T7 酶切反应体系见 1.3.1。

表 3 转基因鉴定引物及反转录鉴定引物

Table 3 The primers for identifying transgenes and reverse transcription

引物名称 Primer name	引物序列(5'~3') Primer sequence
WAP-Cas9-F	TTTGGAGCTCAGAATTGCCT
WAP-Cas9-R	TGTTTCGCCGCTGTGGAA
RT-CAS9-PCR-F	AGGCTGACTTGC GGTTGA
RT-CAS9-PCR-R	CCGAGTGACAGGGCGATA
GAPDH-F	AACTTTGGCATTGTGGAAGG
GAPDH-R	ACACATTGGGGGTAGGAACA

表 4 共表达载体活性鉴定引物

Table 4 The primers for identifying coexpression vector activity

引物名称 Primer name	引物序列(5'~3') Primer sequence
BRCA1-Iden-F	GCAGAAGACCTGGGTTTGAT
BRCA1-Iden-R	GCTGGCTGTTGGTTGGAAT
BRCA2-Iden-F	CTGAAGACCGCTTTGACATC
BRCA2-Iden-R	AGCTGTGGTTCATAACCGTG
CDH1-Iden-F	CCGATAGAGGCACATTACCACAT
CDH1-Iden-R	CATGTAGAGGTGCATTCCGAC

2 结果

2.1 CRISPR 载体构建及活性鉴定结果

BRCA1、BRCA2 和 CDH1 三个基因的 sgRNA 分

别连入载体骨架后,进行测序验证,结果表明三条 sgRNA 均成功连入载体中(图 2)。三套 CRISPR 系统分别转染 HEPA 细胞后进行 sgRNA 活性验证,结果显示三条 sgRNA 均有活性(图 3),T7 酶切后目的条带与预期一致:BRCA1:979 bp = 440 bp + 539 bp; BRCA2:408 bp = 329 bp + 79 bp; CDH1:731 bp = 348 bp + 369 bp。

2.2 共表达载体鉴定

BRCA1sgRNA 连入 pX330 骨架, BRCA2sgRNA 和 U6-CDH1sgRNA 整个表达框依次连入 pX330 (WAP-Cas9-U6-B1) 酶切骨架和 pX330 (WAP-Cas9-U6-B1 B2) 酶切骨架。并成功将 CBh 启动子替换为 WAP 启动子。重组后的质粒 pX330(WAP-Cas9-U6-B1 B2 C1) 经 SbfI 酶切鉴定条带大小正确(图 4)。

2.3 转基因小鼠的制备及转基因阳性鉴定

通过原核注射的方法制备转基因小鼠,共注射受精卵 190 枚,4 只受体鼠移植卵共 130 枚,最终一共产下仔鼠 42 只。通过检测鉴定 11 只为转基因阳性鼠,阳性率为 26.19%。将 F0 代阳性鼠与野生型小鼠交配,得到 39 只 F1 代仔鼠,经鉴定共得到 9 只 F1 代转基因阳性鼠(图 5)。

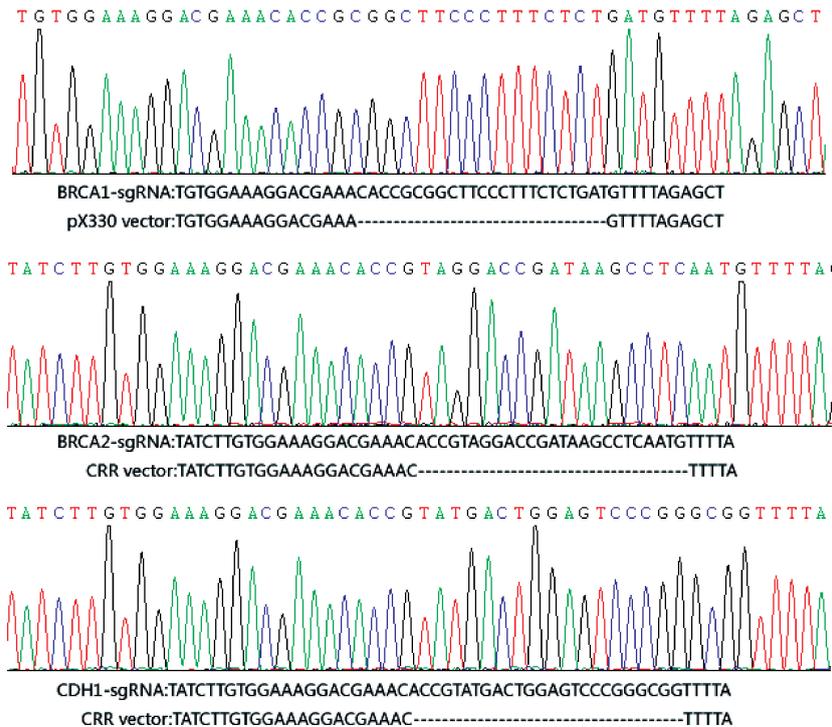


图 2 BRCA1、BRCA2 及 CDH1 gRNA 测序验证

Figure 2 gRNAs for BRCA1, BRCA2, and CDH1 sequencing

2.4 Cas9 基因表达情况鉴定

Cas9 基因的表达鉴定结果显示阳性母鼠乳腺组织 cDNA 扩增产物大小跟预期一致,为 298 bp,但胃和肝中也扩增出微弱的目的条带,见图 6。同时,我们在非泌乳期母鼠乳腺、肾、胃、脑、脂肪、肝等组织中未检测到该基因的表达,这一实验结果表明 WAP 启动子调控的 Cas9 基因主要在泌乳期乳腺组织中表达。

2.5 T7 酶切活性鉴定

提取阳性及野生母鼠乳腺、肾、胃、脑、脂肪、肝组织 DNA,分别用鉴定引物扩增,T7 酶切鉴定靶基因的剪切效果。结果显示 CDH1 基因有剪切活性,且仅在阳性母鼠乳腺组织发生剪切,T7 酶切后目的

条带与预期一致:1231 bp = 570 bp + 661 bp(图 7)。BRCA1 和 BRCA2 两个基因 T7 酶切后没有出现剪切后条带,有可能这两个基因的剪切效率较低,未能通过 T7 酶切方法检测出。

3 讨论

乳腺癌在世界范围内已成为女性的头号恶性肿瘤。乳腺癌的发生发展是多基因共同作用的结果,探讨它们的作用机制有助于乳腺癌预防、早期诊断及为临床治疗提供新的靶点。统计资料表明

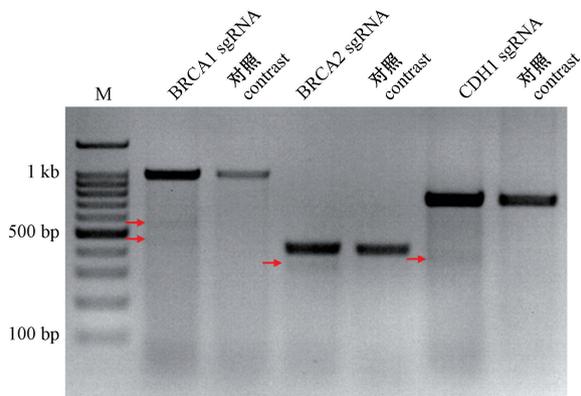


图 3 BRCA1、BRCA2 及 CDH1 gRNA 活性鉴定结果

Figure. 3 Identification of activity of three gRNAs

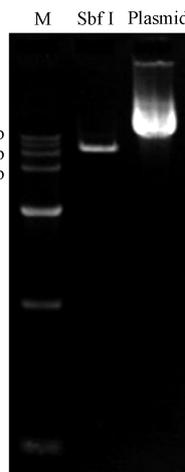


图 4 pX330(WAP-Cas9-U6-B1B2C1) 载体限制性内切酶酶切验证结果

Figure. 4 Restriction enzyme digestion identification of pX330 (WAP-Cas9-U6-B1B2C1)



A1



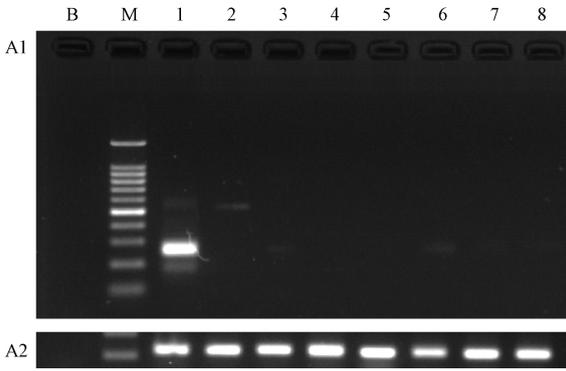
A2

注:A1:F0 代小鼠 PCR 鉴定结果;M:200 bp marker,1~42:42 只 F0 小鼠样品,其中 11 只为转基因阳性鼠;P:质粒阳性对照;N:阴性对照;B:空白对照;A2:F1 代小鼠 PCR 鉴定结果;M:200 bp marker,1~39:39 只 F1 小鼠样品,其中 9 只为转基因鼠。

图 5 转基因小鼠鉴定

Note. A1:PCR analysis of F0 mice. M: 200 bp marker. 1-42:42 Samples which include 11 transgenic mice. P: Positive control with plasmid. N: Negative control with wild mouse. B: blank control with H₂O, the same below. A2: PCR analysis of F1 mice. M: 200 bp marker. 1-39:39 Samples which include 9 transgenic mice.

Figure. 5 Identification of transgenic mice

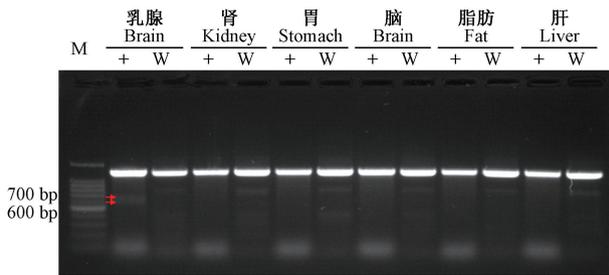


注:A1;RT-Cas9-PCR 引物鉴定 Cas9 表达结果;B:空白;M: 100 bp marker;1~6:阳性母鼠乳腺、肾、胃、脑、脂肪和肝组织的 cas9 表达情况;A2:GAPDH 扩增结果。

图 6 Cas9 基因表达情况鉴定

Note. A1;RT-Cas9-PCR to identify Cas9 expression results. B: Negative control with H₂O. M: 100 bp Marker. 1-6: The cas9 expression of breast tissue, kidney, stomach, brain, fat, liver in positive mice. A2;GAPDH PCR results.

Figure. 6 Identification of Cas9 gene expression



注:M:100 bp marker;+:阳性小鼠;W:野生小鼠。

图 7 CDH1 基因 T7 酶活性鉴定结果

Note. M: 100 bp marker. +: Positive mice. W: Wild mice.

Figure. 7 Results for identifying CDH1 gene T7 enzyme activity

5%~10%的乳腺癌和遗传易感性相关,这其中最常见的乳腺癌易感基因是 BRCA1 和 BRCA2,其次还有 CDH1、P53、PTEN、STK11/LKB1 等^[13]。研究表明 BRCA1 和 BRCA2 基因的突变可以显著提高乳腺、前列腺、卵巢癌的发病率。据统计 5%~10%的乳腺癌属于单基因导致的,而 BRCA1 和 BRCA2 双基因突变可以显著提高肿瘤外显性,占总体乳腺癌发病率的 30% 左右^[14]。BRCA1 和 BRCA2 基因与细胞内 DNA 损伤修复有关,它们的突变可导致基因结构不稳定,促进细胞增殖,阻止细胞正常分化,最终诱发了肿瘤的发生^[15]。CDH1 是一类细胞粘附相关因子,抑制肿瘤细胞的浸润和转移,该基因的突变是乳腺小叶癌的主要成因^[16]。尽管有非常多关于 BRCA1、BRCA2、CDH1 和乳腺癌相关的研究,

然而由于这些基因突变都是胚胎致死性,需要通过组织特异性的敲除才能很好的研究这些基因在乳腺癌发生、发展过程中的作用。

CRISPR/Cas9 技术是近几年快速发展的基因组编辑新技术,和锌指核酸酶 (zinc finger endonuclease, ZFN)、转录激活因子样效应物核酸酶 (transcription activator-like effector nuclease, TALEN) 一样,都可以定向编辑细胞和个体的基因组序列。与其它两项技术相比,CRISPR/Cas9 具有构建方便,高效,更多的可供靶向位点等优点^[17-19]。此外,CAS9 基因在特异性启动子的介导下,可以进行时空特异性的基因组编辑或基因调控,这为基因组织特异性编辑或调控提供了可能。传统组织特异性敲除主要依赖特异性表达 CRE 酶介导的基因片段删除,早期人们利用这种方法制备出多种乳腺特异性敲除小鼠模型^[20],然而该技术需要进行多轮的杂交试验才能实现,尤其是多基因删除,需要更长的时间与大的实验群体才能得到。本实验应用 CRISPR / Cas9 技术,以 pX330 质粒为骨架,将体外鉴定过能有效编辑 BRCA1、BRCA2 和 CDH1 三个基因的 sgRNAs 表达框同时连入一个表达载体,构建出可以同时编辑三个基因的共表达载体系统,并与乳腺组织特异性启动子-WAP 启动子调控的 CAS9 表达框一起形成多基因组织特异性表达系统。因此,本研究利用该技术可一次性获得 3 个基因修饰的小鼠,避免了多轮杂交的过程,节省了时间和成本。

本次实验通过原核注射的方法获得了 11 只 F0 代的转基因阳性小鼠,其中 3 只为雌性小鼠。随后将 F0 代阳性鼠进行扩繁,采集部分泌乳期阳性小鼠不同组织样本,并检测 CAS9 基因表达与靶基因编辑情况,结果表明泌乳期乳腺组织能高表达 CAS9 基因,且 CDH1 基因产生了乳腺特异性剪切。而 WAP 启动子在泌乳期的其他组织也有微量表达,这与之前的研究类似^[21]。本研究成功获得了乳腺组织特异性多基因编辑小鼠模型,与 CRE 酶介导 BRCA1、BRCA2 条件性敲除类似,该模型主要依赖于乳腺特异性启动子-WAP 启动子的活性^[22]。先前研究表明,在第一个妊娠期之前检测不到 WAP 启动子活性,而在妊娠中期 (d15-d17) 表达量激增^[23-24],因此至少要经过一个妊娠泌乳期才能启动基因的表达^[25-26]。尽管这会导致乳腺癌模型的制备周期延长,但这种体细胞累积性突变更加接近人类乳腺癌的发生、发展过程。我们知道绝大部分人

类肿瘤的发生是靶组织中体细胞基因突变不断积累的结果,人们很难通过人体自身阐述肿瘤发生、发展的过程,这必须借助于实验动物。WAP 启动子介导的 CAS9 基因表达,在特定期乳腺的体细胞中不断累积 BRCA1、BRCA2 和 CDH1 基因突变,很好的模拟了乳腺癌的发生、发展的过程,为我们阐述乳腺癌的形成机理奠定了基础。此外,利用该方法制备的乳腺癌模型为药物靶点及靶向药物治疗提供了有利支持。

参考文献:

[1] Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012 [J]. *Int J Cancer*, 2015, 136 (5): E359-E386.

[2] DeSantis C, Ma J, Bryan L, et al. Breast cancer statistics, 2013 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2014, 64(1): 52 - 62.

[3] Fan L, Strasser-Weippl K, Li JJ, et al. Breast cancer in China [J]. *Lancet Oncol*, 2014, 15(7): e279-e289.

[4] Peto J, Collins N, Barfoot R, et al. Prevalence of BRCA1 and BRCA2 gene mutations in patients with early-onset breast cancer [J]. *J Natl Cancer Inst*, 1999, 91(11): 943 - 949.

[5] Chandler MR, Bilgili EP, Memer ND. A review of whole - exome sequencing efforts toward hereditary breast cancer susceptibility gene discovery [J]. *Hum Mutat*, 2016, 37 (9): 835 - 846.

[6] Evers B, Jonkers J. Mouse models of BRCA1 and BRCA2 deficiency: past lessons, current understanding and future prospects [J]. *Oncogene*, 2006, 25(43): 5885 - 5897.

[7] Harno E, Cottrell EC, White A. Metabolic pitfalls of CNS Cre-based technology [J]. *Cell Metab*, 2013, 18(1): 21 - 28.

[8] Ablain J, Durand EM, Yang S, et al. A CRISPR/Cas9 vector system for tissue-specific gene disruption in zebrafish [J]. *Dev Cell*, 2015, 32(6): 756 - 764.

[9] Sebo ZL, Lee HB, Peng Y, et al. A simplified and efficient germline-specific CRISPR/Cas9 system for Drosophila genomic engineering [J]. *Fly (Austin)*, 2014, 8(1): 52 - 57.

[10] Beil-Wagner J, Dössinger G, Schober K, et al. T cell-specific inactivation of mouse CD2 by CRISPR/Cas9 [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 21377.

[11] Maresch R, Mueller S, Veltkamp C, et al. Multiplexed pancreatic genome engineering and cancer induction by transfection-based CRISPR/Cas9 delivery in mice [J]. *Nat Commun*, 2016, 7: 10770.

[12] Chen S, Lee B, Lee AYF, et al. Highly efficient mouse genome editing by CRISPR ribonucleoprotein electroporation of zygotes

[J]. *J Biol Chem*, 2016, 291(28): 14457 - 14467.

[13] Claus EB, Schildkraut JM, Thompson WD, et al. The genetic attributable risk of breast and ovarian cancer [J]. *Cancer*, 1996, 77(11): 2318 - 2324.

[14] Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, et al. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1 [J]. *Science*, 1994, 266(5182): 66 - 71.

[15] Slavin TP, Maxwell KN, Lilyquist J, et al. The contribution of pathogenic variants in breast cancer susceptibility genes to familial breast cancer risk [J]. *NPJ Breast Cancer*, 2017, 3: 22.

[16] Guilford P, Hopkins J, Harraway J, et al. E-cadherin germline mutations in familial gastric cancer [J]. *Nature*, 1998, 392(6674): 402 - 405.

[17] Shen B, Zhang J, Wu H, et al. Generation of gene-modified mice via Cas9/RNA-mediated gene targeting [J]. *Cell Res*, 2013, 23(5): 720 - 723.

[18] 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.

[19] Cong L, Ran FA, Cox D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems [J]. *Science*, 2013, 339(6121): 819 - 823.

[20] Evers B, Jonkers J. Mouse models of BRCA1 and BRCA2 deficiency: past lessons, current understanding and future prospects [J]. *Oncogene*, 2006, 25(43): 5885 - 5897.

[21] Kawamata Y, Ishijima J, Tanaka S, et al. Quantitative Analysis of the Expression of Whey Acidic Protein (WAP) mRNA in the Prolactin-Responsive Mouse Mammary Gland Epithelial Cell Line, HC11 [J]. *J Reprod Dev*, 2001, 41(4): 331 - 338.

[22] Moynahan ME. The cancer connection: BRCA1 and BRCA2 tumor suppression in mice and humans. *Oncogene* 21, 8994 - 9007 [J]. *Oncogene*, 2003, 21(58): 8994 - 9007.

[23] Hennighausen L. The mammary gland as a bioreactor: production of foreign proteins in milk [J]. *Protein Expr Purif*, 1990, 1(1): 3 - 8.

[24] Burdon T, Sankaran L, Wall RJ, et al. Expression of a whey acidic protein transgene during mammary development. Evidence for different mechanisms of regulation during pregnancy and lactation [J]. *J Biol Chem*, 1991, 266(11): 6909 - 6914.

[25] Wagner KU, Wall RJ, St-Onge L, et al. Cre-mediated gene deletion in the mammary gland [J]. *Nucleic Acids Res*, 1997, 25(21): 4323 - 4330.

[26] Hennighausen LG, Sippel AE, Hobbs AA, et al. Comparative sequence analysis of the mRNAs coding for mouse and rat whey protein [J]. *Nucleic Acids Res*, 1982, 10(12): 3733 - 3744.