

仝慧慧, 齐浩铭, 王辰, 等. CRISPR/Cas9 系统介导 *Slc6a6* 基因敲除大鼠的繁殖与鉴定 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(5): 44-50.

Tong HH, Qi HM, Wang C, et al. Reproduction and identification of *Slc6a6* knockout rats mediated by the CRISPR/Cas9 system [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(5): 44-50.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2019.05.007

CRISPR/Cas9 系统介导 *Slc6a6* 基因敲除大鼠的繁殖与鉴定

仝慧慧¹, 齐浩铭¹, 王辰², 莫丽冬², 范维佳², 徐立霞², 么秀华²,
夏一鸣¹, 黄慧玲^{2*}

(1. 天津医科大学, 天津 300070; 2. 天津市环湖医院, 天津市神经外科研究所,
天津市脑血管与神经变性重点实验室, 天津 300350)

【摘要】 目的 利用 CRISPR/Cas9 技术构建牛磺酸转运体基因 (solute carrier family 6 member 6, *Slc6a6*) 敲除大鼠, 繁殖并鉴定, 为研究牛磺酸缺失对神经系统疾病的影响提供稳定的大鼠模型。方法 针对 *Slc6a6* 基因第 5 外显子, 设计向导 RNA (single-guide RNA, sgRNA) 介导 Cas9 核酸酶与靶点 DNA 特异性结合, 并切割基因组 DNA, 被切割后的 DNA 进行重组修复, 从而实现基因的敲除。通过基因型鉴定和测序分析检测新生大鼠基因型。利用 Real-time PCR、Western blot 技术和免疫组化等方法, 分析大鼠脑组织的牛磺酸转运体 (taurine transporter, TauT) 的 mRNA 表达和蛋白表达, 建立 *Slc6a6* 基因敲除大鼠模型。结果 F3 代出现 21 只 *Slc6a6* 基因敲除纯合子 (TauT^{-/-}), 54 只杂合子 (TauT^{+/-}), 27 只阴性 (TauT^{+/+}), F3 代纯合率约为 20.59%, 基本符合孟德尔遗传定律。*Slc6a6* 基因敲除纯合子大鼠脑组织 mRNA 水平基本不表达, TauT 蛋白表达水平显著低于同窝阴性大鼠。结论 本研究利用 CRISPR/Cas9 系统定向敲除 *Slc6a6* 基因, 成功构建 *Slc6a6* 基因敲除大鼠模型。

【关键词】 大鼠; 基因敲除; CRISPR/Cas9 系统; *Slc6a6* 表达

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2019) 05-0044-07

Reproduction and identification of *Slc6a6* knockout rats mediated by the CRISPR/Cas9 system

TONG Huihui¹, QI Haoming¹, WANG Chen², MO Lidong², FAN Weijia², XU Lixia², YAO Xiuhua²,
XIA Yiming¹, HUANG Huiling^{2*}

(1. Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China. 2. Tianjin Huanhu Hospital, Neurosurgery Institute of Tianjin,
Tianjin Key Laboratory of Cerebrovascular and Neurodegenerative Diseases, Tianjin 300350)

【Abstract】 Objective CRISPR/Cas9 technology was used to construct a taurine transporter gene (solute carrier family 6 member 6, *Slc6a6*) knockout rat, which was used as a stable animal model to study the effects of taurine on neurological diseases. **Methods** For exon 5 of the *Slc6a6* gene, a single-guide RNA (sgRNA) mediated the specific binding of Cas9 nuclease to the target DNA and cleaved the genomic DNA, which underwent recombinant repair to generate the gene knockout. Newborn rat genotypes were detected by genotyping and sequencing analysis. The mRNA expression and

[基金项目] 天津市应用基础及前沿技术重点项目 (16JCZDJC35500); 国家自然科学基金面上项目 (81571216)。

[作者简介] 仝慧慧 (1992—), 女, 硕士研究生, 专业: 生物化学与分子生物学。E-mail: 13820696607@163.com

[通信作者] 黄慧玲 (1965—), 女, 研究员, 博士, 研究方向: 神经创伤修复与治疗。E-mail: huanghuiling@126.com

protein expression of TauT in rat brain tissues were analyzed by real-time PCR, Western blot and immunohistochemistry. The homozygous *Slc6a6* knockout rat was screened out. **Results** The F3 progeny had 21 *Slc6a6* knockout homozygotes ($\text{TauT}^{-/-}$), 54 heterozygous ($\text{TauT}^{+/-}$) and 27 wild-types ($\text{TauT}^{+/+}$). The homozygosity rate was about 20.59% in the F3 generation. The offspring showed a normal Mendelian ratio. No *Slc6a6* mRNA was observed in brain tissues from *Slc6a6* knockout homozygous rats and the expression level of TauT protein was significantly lower than that of littermate-negative rats. **Conclusions** In this study, the CRISPR/Cas9 system is used to knockout the exon of the *Slc6a6* gene, and the *Slc6a6* knockout rat model is successfully constructed.

【Keywords】 rat; gene knockout; CRISPR/Cas9 system; *Slc6a6* expression

牛磺酸 (taurine, Tau) 是一种含硫氨基酸,能调节细胞渗透压,防止细胞内钙超载,减少自由基产生,改善细胞膜的通透性,防止细胞肿胀变形^[1-2],是婴儿中枢神经系统发育期间的重要营养因子,有增强突触传递,缓解中风、癫痫、神经退行性疾病症状等神经保护作用^[3-4]。Tau 主要是由细胞膜上的牛磺酸转运体 (taurine transporter, TauT, *Slc6a6*, 序列参考号:NC_005103.4) 转运至细胞内,以维持细胞内 Tau 的高浓度,TauT 是由 621 个氨基酸残基组成的大小约 74×10^3 的蛋白质,包含 12 个跨膜螺旋区。在急性损伤发生后,细胞内的 Tau 可调节脑细胞渗透压,改善神经元肿胀。本课题组前期实验证实,颅脑创伤后,脑含水量和水通道蛋白 4 的表达升高,Tau 可以使其下调,改善神经元损伤等^[5]。

为研究 Tau 缺乏对机体的影响,研究人员通常选用补充 TauT 抑制剂如 β -丙氨酸等干扰 Tau 吸收的方法制作动物模型,但是这种一过式的抑制牛磺酸摄入的方法,短暂且不稳定,故急需一种更稳定有效的方法构建该动物模型。近几年发展的 CRISPR/Cas9 技术可以敲除特定基因位点,有靶向精确度高、实验周期短,无物种限制,且比 ZFN、TALEN 技术易操纵^[6-8]等优势,得以推广。

本研究利用 CRISPR/Cas9 系统,首次建立 *Slc6a6* 基因敲除大鼠模型 ($\text{TauT}^{-/-}$ 大鼠),并进行繁殖和鉴定,为进一步研究 Tau 对大鼠神经系统疾病模型的影响,提供可靠而稳定的基因工程模型,为阐明 Tau 对相关疾病的治疗作用等探究工作奠定基础。

1 材料和方法

1.1 实验动物

本实验所需野生型大鼠均选用 SPF 级 SD 大鼠,体重 240~260 g,购自北京华阜康生物科技股份有限公司[SCXK(京)2014-0004]; $\text{TauT}^{+/-}$ 大鼠委托中国医学科学院医学实验动物研究所构建,得到

F0 代 2 只(雌雄各 1 只)[SCXK 京 2013-0002],本课题组对 $\text{TauT}^{+/-}$ 大鼠进行饲养、配笼繁殖,并对纯合 $\text{TauT}^{-/-}$ 大鼠进行鉴定筛选,*Slc6a6* 基因表达鉴定实验所用大鼠:纯合子 ($\text{TauT}^{-/-}$ 大鼠)、阴性 ($\text{TauT}^{+/+}$ 大鼠)、野生型大鼠 (WT 大鼠) 均为 2 月龄 SPF 级雄性大鼠,每组各 6 只,体重 240~260 g。饲养和繁殖均在中国医学科学院放射医学研究所屏障环境中进行[SYXK(津)2014-0002],其温度、相对湿度、换气次数、明暗周期等均符合中华人民共和国国家标准(GB14925-2010)。本研究中涉及的全部动物实验方案,均参考中国医学科学院放射医学研究所实验动物伦理委员会有关实验动物使用的相关规定,满足实验动物福利要求,并遵照实验动物使用的 3R 原则给予人道关怀。相关动物实验伦理审查证明编号为:DWLL-20180916 和 DWLL-20180917。

1.2 主要试剂与仪器

Cas9 mRNA 合成试剂盒 T7 Ultra kit (美国 Ambion 公司,AM1345)、sgRNA 的体外转录试剂盒 MEGA shortscript Kit (美国 Ambion 公司,AM1345)、EasyPure Genomic DNA kit(北京全式金生物技术有限公司,EE101-12)、Genstar 2 × Taq PCR StarMix with Loading Dye (深圳辉诺生物科技有限公司,A112-10)、RNA simple Total RNA kit、RT-PCR kit (天根生化科技(北京)有限公司,DP419、KR118、FP205)、DAB 显色剂(美国 Sigma 公司,D8001)、TauT 抗体(E-10)(美国 Santa Cruz Biotechnology 公司,sc-166640)、IgG 抗体-Fab 段-HRP 多聚体(德国 Leica 公司,通用型)、兔抗小鼠辣根过氧化物酶标记二抗、 β -actin 二抗(北京中杉金桥生物技术有限公司,bs-10966R、ZB2301)、 β -actin 一抗(北京博奥森生物科技有限公司,bs-0061R)。显微注射仪(日本尼康公司,TE2000U)、凝胶成像系统(英国 Syngene 公司,Gene Genius)、ABI 一代测序仪(美国 ABI 公司,3500)、低温高速离心机(美国 Beckman 公司,J2-

21)、Mini-PROTEAN Tetra Cell 电泳系统、Mini Trans-Blot Cell 型转膜系统(美国 Bio-Rad 公司, 1658033、1703930)、荧光定量 PCR 仪(瑞士 Roche 公司, LC480)、徕卡全自动免疫组化仪(德国 Leica 公司, BOND-III)、显微镜(日本 Olympus 公司, BX3-CBH)。

1.3 实验方法

1.3.1 TauT^{-/-}大鼠的构建和繁殖

TauT^{-/-}大鼠模型,是采用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术,针对 TauT 基因第 5 外显子,选择 2 个不同 sgRNA 的作用靶点,合成两对寡聚核苷酸链(Rat-Slc6a6-gRNA1-up: TAGGCCCTTTGTCCCACAGAC 和 Rat-Slc6a6-gRNA1-down: AAACGTCTGTGGGACA AAGGGG; Rat-Slc6a6-gRNA2-up: TAGGGACAGACC CTGTCTCTGG 和 Rat-Slc6a6-gRNA2-down: AAACCC AGAGACAGGGTCTGTC),经退火,连入 BsaI 酶切回收的 pUC57-sgRNA 表达载体,同时构建 Cas9 表达载体(pST1374-NLS-flag-linker-Cas9, Addgene ID: 44758)。经测序验证构建的载体序列无误后,分别由 Dra I、Age I 酶切、抽提纯化,经体外转录获得 Cas9 mRNA 和 sgRNA,将其混合,调整浓度 Cas9 mRNA(20 ng/μL)和 sgRNA(10 ng/μL)后,通过显微注射法注射到 SD 大鼠受精卵的雄性胞核和细胞质中,再植入假孕大鼠体内,繁殖得到 founder 大鼠(F0 代)。

将 F0 代阳性大鼠与野生型 SD 大鼠合笼,得到 F1 代杂合子(TauT^{+/-}大鼠),再选择 F1 代 TauT^{+/-}大鼠与野生型 SD 大鼠合笼以扩充体系,得到 TauT^{+/-} F2 代大鼠,F2 代 TauT^{+/-}大鼠自交后,得到 TauT^{+/+}、TauT^{+/-}和 TauT^{-/-}三种 F3 代基因型大鼠。

1.3.2 基因组提取、扩增和测序

利用 CRISPR/Cas9 系统,将包括 *Slc6a6* 基因第五外显子的共约 390 bp 的片段靶向敲除,通过基因型鉴定,分析新生大鼠的基因分型。将出生 10-12 d 左右的大鼠,采用剪趾法编号,并提取大鼠基因组 DNA,经 PCR 扩增靶序列,鉴定所用上游引物:5'-TCATTGTCCTGTCCCCACTTCTT-3',下游引物:5'-TCCTCATCTGACAGTTAAAGAATCTAAGG-3'。PCR 的体系和条件参见 Genstar 试剂盒说明书。结果判断依据:阴性 TauT^{+/+}是一条带:702 bp,杂合子 TauT^{+/-}含有两条带,分别为 702 bp 和 312 bp,纯合子 TauT^{-/-}是一条带:312 bp。

提取 F1 代 TauT^{+/-}、F3 代 TauT^{+/+}和 TauT^{-/-}的

基因组,经 PCR 扩增,由上海生物工程公司测序后,再与 F0 代比对,以确定 CRISPR/Cas9 介导的基因敲除情况。

1.3.3 Real-time PCR 检测 TauT^{-/-}和 TauT^{+/+}大鼠脑组织中 *Slc6a6* 的表达

选取 TauT^{-/-}、野生型(WT)和 TauT^{+/+}大鼠雄性各 6 只,提取大脑组织总 RNA,反转录后,real-time PCR 检测 *Slc6a6* mRNA 表达。*Slc6a6* 基因引物序列:上游 5'-GAGGTCATCATAGGCCAGTAC-3';下游 5'-GTACACATTCAGGAGGGACAC-3',扩增产物为 120 bp。以 GAPDH 为内参:上游 5'-AACTCCATTCTCCACC-3';下游 5'-ACCACCCTGTTGCTGTAG-3'。扩增产物为 100 bp。PCR 反应体系:10 μL 的 2× SYBR Green Mix,上下游引物(10 μmol/L)各 1 μL,1 μL 的 cDNA,补充 ddH₂O 至 20 μL。PCR 反应条件:95℃ 预变性 5 min,94℃ 变性 15 s,60℃ 退火 15 s,72℃ 延伸 15 s,40 个循环,最后 72℃ 延伸 5 min。TauT、GAPDH 的退火温度分别是 60℃ 和 55℃。样本目的基因的相对表达量计算公式为:相对表达量 = 2^{-ΔΔCt} [ΔCt = Ct1 - Ct2; Ct1: 样品目的基因的临界循环数; Ct2: 样品管家基因的临界循环数。ΔΔCt = 每组 ΔCt 值 - (对照组 ΔCt 的平均值)]。

1.3.4 Western blot 技术检测 TauT^{-/-}和 TauT^{+/+}大鼠脑组织中 TauT 蛋白表达

选取 TauT^{-/-}和 TauT^{+/+}大鼠雄性各 6 只,麻醉处死,提取大脑组织,匀浆后,提取并测定总蛋白浓度,等质量上样,进行 SDS-PAGE 电泳,70 V,40 min,120 V,90 min。300 mA 湿转 120 min,5%脱脂奶粉封闭 2 h,加入 Santa Cruz TauT 一抗(1:200)、β-actin 一抗(1:1000),4℃ 孵育过夜,次日洗膜,孵 HRP 标记的二抗(1:1000)常温孵育 2 h,洗膜 3 次。加入显影剂,于成像系统进行图像采集。样本中目的蛋白的相对表达量是目的蛋白条带与内参 β-actin 蛋白条带灰度值的比值。

1.3.5 免疫组化检测 TauT^{-/-}和 TauT^{+/+}大鼠组织 TauT 蛋白的表达

心脏灌注 TauT^{-/-}和 TauT^{+/+}大鼠后,取脑组织,放入 10%中性福尔马林溶液,固定 24 h 之后,脱水,包埋制成蜡块,4 μm 切片,68℃ 烤箱烤片,再利用 Leica BOND-III 全自动免疫组化仪进行常规染色程序:脱蜡、水化、封闭、孵育 TauT 一抗(1:100)、冲洗、孵育二抗、冲洗、DAB 染色、苏木精复染,脱水透明、封片,光学显微镜下观察,图像采集、分析结果。

1.4 统计学方法

应用 SPSS 17.0 和 GraphPad Prism 5 软件分析数据。实验结果均以平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 时认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠的构建和繁殖情况

利用 CRISPR/Cas9 系统进行目的基因敲除,使 *Slc6a6* 基因发生移码突变,并提前产生了终止密码子,使翻译提前终止,造成蛋白功能障碍(图 1)。

历时约 15 个月, F1 和 F2 代共繁育出 23 窝, F1~F3 代总计 184 只, F3 代出现纯合子, 该代纯合率约为 20.59%。F3 代 TauT^{+/+}:TauT^{+/-}:TauT^{-/-} 的比例约为 1:2.57:1.28, 近似满足孟德尔遗传定律。繁殖过程中,成年鼠死亡 14 只,死亡率约为 7.61%。F1~F3 代大鼠繁殖情况见表 1, 多组 F2 代 TauT^{+/-}

大鼠自交情况统计见表 2。

2.2 基因型鉴定和测序结果

F0 代 TauT^{+/-} 大鼠与野生 SD 大鼠杂交, 得到 F1 代 TauT^{+/-} 和 TauT^{+/+} 大鼠, F1 代 TauT^{+/-} 与野生大鼠杂交继续扩充体系, F2 后代 TauT^{+/-} 自交, F3 代出现 TauT^{-/-} 大鼠。基因型鉴定结果如图 2: TauT^{-/-}: 一条带, 312 bp; TauT^{+/-}: 两条带, 为 702 bp 和 312 bp。TauT^{+/+}/WT: 一条带, 702 bp。

测序比对结果显示, TauT^{-/-} 或 TauT^{+/-} (包含的缺失链) 的基因缺失位点, 如图 3A。TauT^{-/-} 和 TauT^{+/+} 大鼠序列比对和靶点敲除情况, 如图 3B、3C。TauT^{+/+} 基因型大鼠和 TauT^{-/-} 基因型大鼠序列相差约 390 bp, 缺失靶点上下游序列对应一致。

由基因型鉴定和测序结果可知: 包含 TauT^{-/-} 大鼠的第 5 外显子的 390 bp 碱基被敲除, 并发生重组修复。

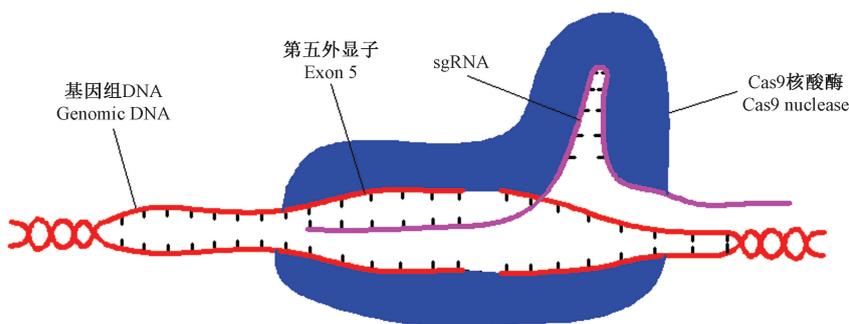


图 1 利用 CRISPR/Cas9 技术敲除 *Slc6a6* 第五外显子的示意图

Figure 1 Schematic diagram of the knockout of the fifth exon of *Slc6a6* by CRISPR/Cas9 technology

表 1 F1~F3 代大鼠繁殖情况

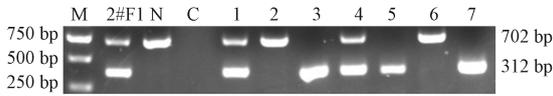
Table 1 Reproduction of F1-F3 generation rats

代数 Generations	出生大鼠只数 Number of born rats	雄性大鼠只数 Number of male rats	雌性大鼠只数 Number of female rats	阴性只数 Number of littermates	杂合子只数 Number of heterozygotes	纯合子只数 Number of homozygotes	纯合率(%) Homozygote rate
F1	9	5	4	5	4	0	0
F2	73	46	27	32	41	0	0
F3	102	57	45	27	54	21	20.59

表 2 F2 代不同种群大鼠的繁育结果

Table 2 Results of breeding of different populations of F2 generation rats

种群编号 Populations No.	配种方式(♀ × ♂) Breeding method (♀ × ♂)	各基因型子代大鼠只数 Number of progeny rats of each genotype			合计 Total	纯合率(%) Homozygote rate
		-/-	+/-	+/+		
1	+/- × +/-	3	6	2	11	27.27
2	+/- × +/-	10	17	13	40	25
3	+/- × +/-	2	9	6	17	11.76
4	+/- × +/-	2	5	4	11	18.18
5	+/- × +/-	2	8	1	11	18.18
6	+/- × +/-	2	9	1	12	16.67
合计 Total		21	54	27	102	20.59



注: M; DNA 分子量标记; 2#F1; $TauT^{+/-}$; C; 空白对照; N; WT; 孔道 3、5、7; $TauT^{-/-}$ 大鼠; 孔道 2、6; $TauT^{+/+}$ 大鼠; 孔道 1、4; $TauT^{+/-}$ 大鼠。

图 2 部分大鼠基因型 PCR 鉴定结果

Note. M, DNA molecular weight marker; 2#F1, $TauT^{+/-}$; C, Blank control; N, Wild type; Lanes 3, 5, and 7: $TauT^{-/-}$ rat; Lanes 2 and 6: $TauT^{+/+}$ rat; Lanes 1 and 4: $TauT^{+/-}$ rat.

Figure 2 Results of genotype identification of the rats by PCR

2.3 Real-time PCR 检测 $TauT^{-/-}$ 和 $TauT^{+/+}$ 大鼠脑组织 *Slc6a6* 的表达

$TauT^{-/-}$ 大鼠和同窝 $TauT^{+/+}$ 大鼠脑组织 *Slc6a6* mRNA 表达结果显示: $TauT^{-/-}$ 大鼠脑组织 *Slc6a6* mRNA 几乎不表达(如图 4C)。

2.4 Western blot 技术检测 $TauT^{-/-}$ 和 $TauT^{+/+}$ 大鼠脑组织 TauT 蛋白的表达

蛋白免疫印迹实验结果表明, $TauT^{-/-}$ 组大鼠大脑中 TauT 蛋白表达量与 $TauT^{+/+}$ 组大鼠相比, 显著降低(如图 4A、4B)。

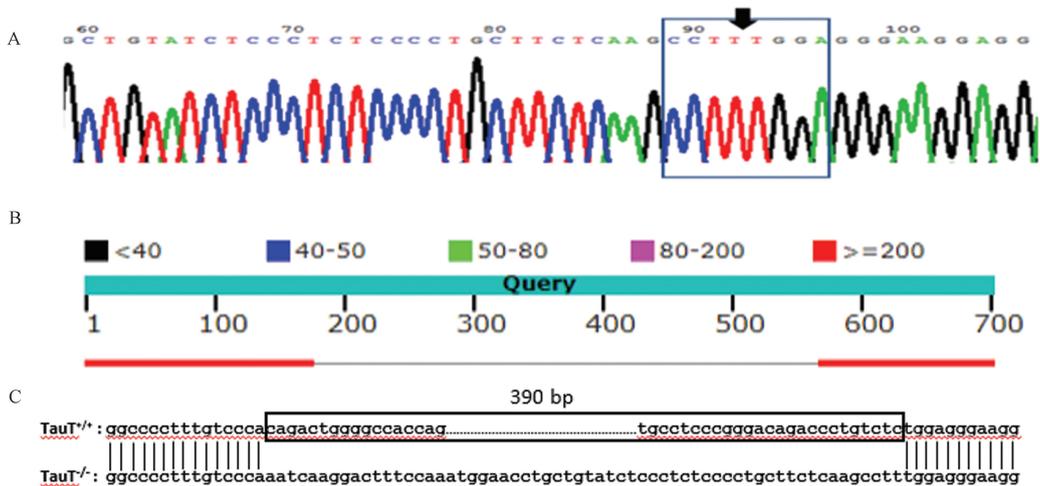
2.5 $TauT^{-/-}$ 和 $TauT^{+/+}$ 大鼠脑组织免疫组化结果观察 $TauT^{-/-}$ 大鼠和 $TauT^{+/+}$ 大鼠两组皮层和海

马区 TauT 蛋白表达的情况。如图 5 可见, $TauT^{-/-}$ 大鼠的海马和皮层区细胞膜上基本无 TauT 蛋白表达, 而 $TauT^{+/+}$ 鼠的海马和皮层区细胞膜上有 TauT 蛋白表达, 表明 *Slc6a6* 基因的敲除导致 $TauT^{-/-}$ 大鼠脑组织 TauT 蛋白基本不表达。

3 讨论

在研究人类中枢神经系统疾病方面, 大鼠与人更为接近, 在生理、行为、代谢方面比小鼠更有优势^[9]。大鼠广泛被用于: 奖励和惩罚实验、神经官能症等高级神经活动的研究。由于构建和繁殖基因敲除大鼠比小鼠困难, 2010 年才建立了第一个基于胚胎干细胞的 p53 基因敲除大鼠模型。据报道^[10-12], 自 2003 年 CRISPR/Cas9 系统发明以来, 已有超过 30 种不同的转基因大鼠实验模型被用于神经科学、内分泌学和癌症等领域。目前, 仅有关于 $TauT^{-/-}$ 小鼠模型的研究, 对于 *Slc6a6* 基因敲除的大鼠模型及其有关的病理生理研究尚无文献报道。

本课题组委托中国医学科学院医学实验动物研究所, 经专业技术人员精心设计, 选择了具有较低脱靶概率的靶点, 利用 CRISPR/Cas9 技术, 基于 *Slc6a6* 的第 5 外显子, 构建了 $TauT^{-/-}$ 大鼠模型。我们后续对 $TauT^{+/+}$ 大鼠进行饲养、配笼繁殖、鉴定筛

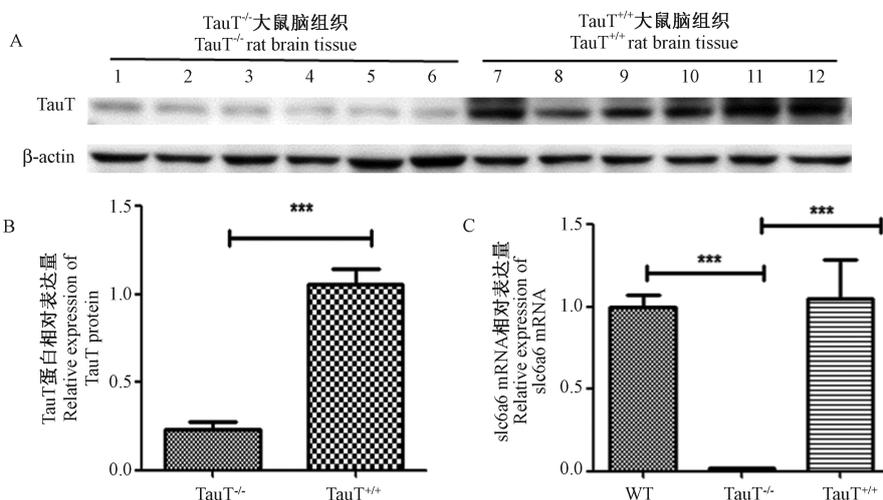


注: A; $TauT^{-/-}$ 大鼠测序结果, 在“TTTG”碱基中间敲除了约 390 bp; B; $TauT^{-/-}$ 和 $TauT^{+/+}$ 大鼠序列比对结果, $TauT^{-/-}$ 缺失 390 bp; C; $TauT^{+/+}$ 和 $TauT^{-/-}$ 大鼠碱基序列对比, 矩形框区域为包含 TauT 第 5 外显子的靶序列, 划线部分为 Cas9 核酸酶切割目的序列后重组修复随机添加的序列。

图 3 目的基因测序比对结果

Note. A, The results of $TauT^{-/-}$ rat sequencing that have about 390 bp bases knocked out in the middle of “TTTG”. B, The results of $TauT^{-/-}$ and $TauT^{+/+}$ rat sequence alignment; $TauT^{-/-}$ was missing about 390 bp. C, Base sequence comparison between $TauT^{+/+}$ and $TauT^{-/-}$ rats; the rectangular box region is the target sequence containing the Tau5 exon 5 after Cas9 nuclease cleaves the sequence of interest. The underlined portion is the recombinantly added sequence.

Figure 3 Results of target gene sequencing comparisons



注:A: $TauT^{-/-}$ 组与 $TauT^{+/+}$ 组 TauT 蛋白表达情况 ($n=6$); B: $TauT^{-/-}$ 组与 $TauT^{+/+}$ 组 TauT 蛋白表达相对定量分析, $***P < 0.001$ ($n=6$); C: $TauT^{+/+}$ 组、WT 组分别与 $TauT^{-/-}$ 组 *Slc6a6* mRNA 表达相对定量分析比较, $***P < 0.001$ ($n=6$)。

图 4 不同基因型大鼠脑组织 TauT 蛋白和 *Slc6a6* mRNA 表达的情况

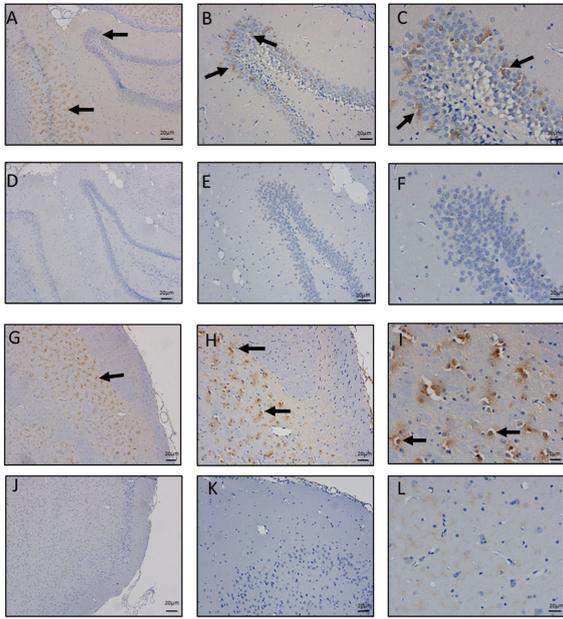
Note. A, TauT protein expression in the $TauT^{-/-}$ and $TauT^{+/+}$ groups ($n=6$). B, Relative quantitative analysis of TauT protein expression in the $TauT^{-/-}$ and $TauT^{+/+}$ groups. $***P < 0.001$ ($n=6$). C, *Slc6a6* mRNA expression in the $TauT^{+/+}$ and WT groups was compared with the $TauT^{-/-}$ group. $***P < 0.001$ ($n=6$).

Figure 4 Expression of *Slc6a6* mRNA and TauT protein in the brains of different genotypes of rats

选出 $TauT^{-/-}$ 大鼠, 该模型大鼠 *Slc6a6* 基因的第 5 外显子被敲除, 产生移码突变, 翻译提前终止。基因型鉴定结果显示: F3 代的 $TauT^{-/-}$ 大鼠的电泳结果与最初引进的 $TauT^{-/-}$ 大鼠电泳结果中的短链大小一致; 同时, 测序结果证实: $TauT^{-/-}$ 大鼠的第 5 外显子成功被敲除。F3 代 $TauT^{-/-}$ 缺失的片段和 F0 代杂合子的短链缺失片段一致。从繁殖情况来看, $TauT^{-/-}$ 大鼠出生后, 能够存活, 为基因和蛋白水平的鉴定实验提供了条件。F3 代的 $TauT^{+/+}$: $TauT^{-/-}$: $TauT^{-/-}$ 三种基因型大鼠的比例约为 1:2:1, 符合孟德尔遗传定律, 因此该 $TauT^{-/-}$ 大鼠不具有胚胎致死性。初步统计, 性别相同、月龄相近的 $TauT^{-/-}$ 大鼠比 $TauT^{+/+}$ 大鼠的体重低, 这与 Heller-Stilb 等^[13] 发现 $TauT^{-/-}$ 小鼠的体重比野生小鼠低的结果一致。同期, 观察到少量 $TauT^{-/-}$ 大鼠有性情稍暴躁、行动稍迟缓等现象, 对此我们会继续保持关注。Ito 等^[13-14] 通过同源重组技术敲除胚胎干细胞中 TauT 的第 1 或 2-5 个外显子, 构建了 $TauT^{-/-}$ 小鼠, 也发现 $TauT^{-/-}$ 模型小鼠体重降低, 同时, 心脏功能异常, 运动能力降低^[15-16]。Rikimaru 等^[17] 也证明了 $TauT^{-/-}$ 大鼠线粒体的整体功能不如 $TauT^{+/+}$ 大鼠, 关于 $TauT^{-/-}$ 大鼠线粒体功能受损情况, 我们后期也将开展相关实验研究。

本研究中 RT-PCR 实验结果显示: $TauT^{-/-}$ 大鼠

脑部 *Slc6a6* mRNA 几乎不表达, 基因测序也显示 TauT 第 5 外显子完全敲除, 其 TauT 蛋白表达量显著低于 $TauT^{+/+}$ 大鼠, 免疫组化结果显示 $TauT^{-/-}$ 大鼠皮层和海马区附近几乎没有 TauT 蛋白表达, 表明 *Slc6a6* 基因敲除大鼠模型构建成功。同时, 海马齿状回区域细胞体积有收缩的现象, 这可能与文献所报道 Tau 可诱导小鼠海马和纹状体突触传递增强有关^[18]。但本实验中, $TauT^{-/-}$ 组大鼠 Western blot 结果仍显示有少量蛋白表达。推测产生该现象的原因是不同抗原和抗体存在一定的交叉反应(非目的蛋白可能含有能与目的蛋白抗体结合的抗原表位): (1) 用 CRISPR/Cas9 系统敲除了第 5 外显子后, 发生移码突变, 提前产生终止密码子, 造成翻译提前终止, 形成无功能的肽链或蛋白, 相应的肽链或蛋白可能会与原有完整蛋白的抗体产生非特异性结合; (2) 理论上, 敲除某个外显子碱基序列后, 剩余核酸序列若含有 ATG 等起始密码子, 其后的编码序列还会翻译出一段氨基酸序列, 但这段序列不具备原有蛋白质的功能^[19-21]。无论是利用传统的 ES 细胞打靶还是利用近些年发展起来的基因编辑手段, 除非个别比较小的基因会选择全基因敲除, 大部分情况下, 都是选择上游的外显子或特定的功能区域外显子敲除, 造成移码突变或者是特定功能区丧失, 用于研究基因缺失和功能的关系。



注: A、B、C: TauT^{+/+}大鼠海马(分别为×40、×100、×200); D、E、F: TauT^{-/-}大鼠海马(分别为×40、×100、×200); G、H、I: TauT^{+/+}大鼠皮层(分别为×40、×100、×200); J、K、L: TauT^{-/-}大鼠皮层(分别为×40、×100、×200)。箭头所示为 TauT 表达位置举例。标尺 = 20 μm。

图5 TauT^{-/-}与 TauT^{+/+}鼠脑部皮层和海马区附近的免疫组化结果比较

Note. A, B, and C, the TauT^{+/+} rat hippocampus (×40, ×100, and ×200, respectively). D, E, and F, the TauT^{-/-} rat hippocampus (×40, ×100, ×200, respectively). G, H, and I, the TauT^{+/+} rat cortex (×40, ×100, ×200, respectively). J, K, and L, the TauT^{-/-} rat cortex (×40, ×100, ×200, respectively). The arrows show examples of TauT expression positions. Bars = 20 μm.

Figure 5 Comparison of immunohistochemistry results between TauT, TauT^{-/-} and TauT^{+/+} rat brain, cortex, and hippocampus

综上所述,本研究应用 CRISPR/Cas9 系统定向敲除大鼠 *Slc6a6* 基因第 5 外显子,成功构建 TauT^{-/-}大鼠模型并稳定遗传,为探究牛磺酸预防和治疗神经系统疾病的相关机制研究,提供良好的大鼠模型。

参考文献:

- [1] 白小琼,孔德义.牛磺酸研究进展[J].中国食物与营养,2011,17(5):78-80.
- [2] Tu S, Zhang X, Luo D, et al. Effect of taurine on the proliferation and apoptosis of human hepatocellular carcinoma HepG2 cells [J]. Exp Ther Med, 2015, 10(1): 193-200.
- [3] Schaffer S, Kim HW. Effects and mechanisms of taurine as a therapeutic agent [J]. Biomol Ther, 2018, 26(3): 225-241.
- [4] Menzie J, Prentice H, Wu JY. Neuroprotective mechanisms of taurine against ischemic stroke [J]. Brain Sci, 2013, 3(2): 877-907.

- [5] 张学斌,黄慧玲,常小丽,等.牛磺酸对急性重型颅脑创伤大鼠脑水肿的作用[J].中华创伤杂志,2010,26(10):941-943.
- [6] Riordan SM, Heruth DP, Zhang LQ, et al. Application of CRISPR/Cas9 for biomedical discoveries [J]. Cell Biosci, 2015, 5(1): 33-43.
- [7] Wang X, Wang Y, Wu X, et al. Unbiased detection of off-target cleavage by CRISPR-Cas9 and TALENs using integrase-defective lentiviral vectors [J]. Nat Biotechnol, 2015, 33(2): 175-178.
- [8] Shalem O, Sanjana NE, Hartenian E, et al. Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells [J]. Science, 2014, 343(6166): 84-87.
- [9] 王贵利,张连峰.基因工程大鼠研究进展[J].中国比较医学杂志,2013,23(3):71-76.
- [10] Sun J, Kouranova E, Cui X, et al. Regulation of dopamine presynaptic markers and receptors in the striatum of DJ-1 and Pink1 knockout rats [J]. Neurosci Lett, 2013, 557:123-128.
- [11] Nohmi T, Masumura K, Toyoda-Hokaiwado N. Transgenic rat models for mutagenesis and carcinogenesis [J]. Genes Environ, 2017, 39(1): 11-42.
- [12] 马云武,马婧,路迎春,等.利用 CRISPR/Cas9 敲除大鼠胰岛素受体底物 1 (Irs1) 基因 [J]. 中国比较医学杂志,2014,24(3):55-60.
- [13] Birgit HS, Claudia VR, Kristina R, et al. Disruption of the taurine transporter gene (taut) leads to retinal degeneration in mice [J]. FASEB J, 2002, 16(2): 231-248.
- [14] Ito T, Kimura Y, Uozumi Y, et al. Taurine depletion caused by knocking out the taurine transporter gene leads to cardiomyopathy with cardiac atrophy [J]. J Mol Cell Cardiol, 2008, 44(5): 920-937.
- [15] Ito T, Oishi S, Takai M, et al. Cardiac and skeletal muscle abnormality in taurine transporter-knockout mice [J]. J Biomed Sci, 2010, 17(S1): S20-S24.
- [16] Mele A, Mantuano P, De Bellis M, et al. A long-term treatment with taurine prevents cardiac dysfunction in mdx mice [J]. Transl Res, 2018, 9(4): 204-225.
- [17] Ito T, Hanahata Y, Kine K, et al. Tissue taurine depletion induces profibrotic pattern of gene expression and causes aging-related cardiac fibrosis in heart in mice [J]. Biol Pharm Bull, 2018, 41(10): 1561-1566.
- [18] Rikimaru M, Ohsawa Y, Wolf AM, et al. Taurine ameliorates impaired the mitochondrial function and prevents stroke-like episodes in patients with MELAS [J]. Intern Med, 2012, 51(24): 3351-3357.
- [19] Sergeeva OA, Chepkova AN, Doreulee N, et al. Taurine-induced long-lasting enhancement of synaptic transmission in mice: role of transporters [J]. J Physiol, 2003, 550(3): 911-919.
- [20] Warskulat U, Heller-Stilb B, Oermann E, et al. Phenotype of the taurine transporter knockout mouse [J]. Method Enzymol, 2007, 428(3): 439-458.
- [21] Zhang J, Zhao J, Zheng X, et al. Establishment of a novel hepatic steatosis cell model by Cas9/sgRNA-mediated DGK0 gene knockout [J]. Mol Med Rep, 2018, 17(2): 2169-2176.