

李昊,陈胜男,李松美,等. 利用 CRISPR/Cas9 技术产生肌肉特异表达 Cas9 的小鼠胚胎[J].中国实验动物学报, 2019, 27(3): 271 - 277.

Li H, Chen SN, Li SM, et al. Generation of muscle-specific gene-targeted mouse embryos expressing Cas9 protein [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2019, 27(3): 271 - 277.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2019.03.001

利用 CRISPR/Cas9 技术产生肌肉特异表达 Cas9 的小鼠胚胎

李昊,陈胜男,李松美,朴善花,安铁洙,王春生*

(东北林业大学生命科学学院 动物发育研究室,哈尔滨 150040)

【摘要】 目的 通过 CRISPR/Cas9 技术获得肌肉特异性表达 Cas9 蛋白小鼠胚胎,为建立肌肉特异表达 Cas9 小鼠动物模型奠定基础。**方法** 设计小鼠 *Rosa26* 位点 sgRNA 并通过体外酶切验证活性,同时使用同源重组构建肌肉特异性同源打靶载体;通过显微注射将 *Rosa26* sgRNA 与 Cas9 蛋白注射到小鼠胚胎,通过 PCR 及测序检测胚胎的编辑情况,同时移植到假孕母鼠体内,待其生产;将同源打靶载体与 *Rosa26* sgRNA 和 Cas9 一起注射到小鼠胚胎,通过 PCR 检测整合情况。**结果** 体外酶切实验表明,体外转录的 sgRNA 与 Cas9 蛋白联合可对靶位点产生编辑作用;成功构建了肌肉特异性同源打靶载体 Donor-SP-px459;通过原核注射获得 *Rosa26* 基因编辑胚胎,经移植获得 *Rosa26* 基因编辑小鼠;注射同源打靶载体后,成功获得肌肉特异表达 Cas9 蛋白的基因打靶小鼠胚胎。**结论** 利用 CRISPR/Cas9 技术,成功获得 *Rosa26* 基因编辑胚胎和小鼠,并获得了肌肉特异性表达 Cas9 蛋白小鼠胚胎,为利用基因打靶构建肌肉特异表达 Cas9 的小鼠动物模型奠定基础。

【关键词】 *Rosa26*; Cas9; 基因编辑; 肌肉特异; 基因打靶

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2019) 03-0271-07

Generation of muscle-specific gene-targeted mouse embryos expressing Cas9 protein

LI Hao, CHEN Shengnan, Li Songmei, PIAO Shanhua, AN Tiezhu, WANG Chunsheng*

(Laboratory of Developmental Biology, College of Life Science, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China)

Corresponding author: WANG Chunsheng. E-mail: wangchunsheng@163.com

【Abstract】 Objective To obtain gene-targeted mouse embryos expressing Cas9 protein specifically in muscle using CRISPR/Cas9, to lay the foundation for the construction of animal model expressing Cas9 protein specifically in muscle. **Methods** The sgRNA targeted *Rosa26* locus was designed and synthesized according to the sequence of the *Rosa26* gene in mice. The editing efficiency was tested by *in vitro* cleavage assay. *Rosa26* sgRNA and Cas9 protein were subsequently co-injected into mouse pronuclear-stage embryos to examine the editing efficiency *in vivo*. A mouse *Rosa26* locus homologous targeting vector for the muscle-specific expression of Cas9 protein was designed and constructed. Finally, gene-targeting embryos were obtained through co-injecting the homologous targeting vector and *Rosa26* sgRNA with Cas9 protein into mouse embryos. **Results** The sgRNA designed and synthesized according to the sequence of mouse *Rosa26* gene was effective at gene editing in the *in vitro* digestion experiments. The homologous targeting vector for the muscle-

【基金项目】中央高校基本科研业务费专项 C 类项目资金资助(2572016CA10);黑龙江省自然科学基金项目(C2016012)。

Funded by the Fundamental Research Funds for the Central Universities (2572016CA10), and Natural Science Foundation of Heilongjiang Province (C2016012).

【作者简介】李昊(1985—),男,博士,研究方向:动物转基因技术。Email:jayhaoli01@163.com

【通信作者】王春生(1979—),男,博士,副教授,硕士生导师,研究方向:动物体细胞重编程。Email:wangchunsheng79@163.com

specific expression of Cas9 protein, Donor-SP-px459, was successfully constructed by PCR and homologous recombination ligation. Mouse embryos injected with *Rosa26* sgRNA and Cas9 protein showed normal cleavage and supported blastocyst development. PCR and sequencing result demonstrated that gene editing occurred in the obtained embryos, after which the embryo grew into a *Rosa26* gene edited mouse. Mouse embryos for the muscle-specific expression of Cas9 protein were successfully obtained after co-injection of a homologous targeting vector and *Rosa26* sgRNA with Cas9 protein. **Conclusions** *Rosa26* gene-edited embryos and mice are obtained using the CRISPR/Cas9 system, and mouse embryos with muscle-specific expression of Cas9 protein are successfully obtained, laying the foundation for the construction of animal models expressing Cas9 protein specifically in muscle.

[Keywords] *Rosa26*; Cas9; gene editing; muscle-specific; gene targeting

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

肌肉生长抑制素 (myostatin, MSTN), 是一种骨骼肌细胞自分泌蛋白, 对肌肉生长发育具有负调控作用^[1]。MSTN 基因过量表达可导致动物或人肌肉萎缩, 而 MSNT 基因突变或敲除可使动物肌肉量增加^[2-4]。不过有研究表明, MSNT 基因不仅在骨骼肌中特异性表达, 在胚胎、乳腺^[5]、成体心脏、脂肪、脑^[6]、肝^[7]、肺、肾、舌、小肠以及骨髓中也检测到 MSTN mRNA 存在。敲除 MSNT 基因后, 虽然可以提高肌肉量的增加, 但同时也存在影响个体发育甚至是致死等问题。对 MSTN 基因的研究, 不仅可以获得具有优良性状的禽畜, 也可在医学上为肌肉萎缩症及有关疾病的改善和治疗提供可能性。因此, 如何避免 MSTN 基因研究中的副作用成为目前研究重点。

CRISPR/Cas9 系统主要由 Cas9 核酸酶和 sgRNA 构成, 其中, sgRNA 包含一段与靶点 PAM 序列 (NGG) 上游互补的序列, 可引导 Cas9 结合到靶位点并发挥作用。基因编辑过程是通过内源性的 DNA 双链断裂途径, 非同源末端连接 (NHEJ) 或同源定向修复 (HDR) 来实现。相比传统技术, CRISPR/Cas9 具有设计操作简单、成本低、特异性高和打靶效率高等优点, 因此成为当今热门研究手段之一, 靶向基因编辑已成为一种主流研究方法, 在基因改造和构建转基因动物研究中被广泛使用。近几年, 不断有利用 CRISPR/Cas9 技术产生基因编辑动物的报道^[8-10]。

为了建立肌肉特异表达 Cas9 小鼠动物模型, 进而研究成体水平上肌肉组织中 MSTN 的基因编辑。本研究, 选取 *Rosa26* 作为编辑和打靶位点, 通过显微注射构建了 *Rosa26* 位点基因编辑小鼠, 同时获得了肌肉特异性表达 Cas9 蛋白的小鼠打靶胚胎, 为后续产生肌肉特异表达 Cas9 蛋白小鼠动物模型奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物、菌株和载体

6~8 周龄 SPF 级雌性 ICR 小鼠 200 只, 体重 25~30 g, 购于辽宁长生生物技术股份有限公司【SCXK (辽) 2015-0001】; 8 周龄 SPF 级雄性 B6D2F1 小鼠 10 只, 体重 30~35 g, 购于北京维通利华实验动物技术有限公司【SCXK (京) 2016-0006】。饲养于东北林业大学生命科学学院 SPF 实验动物室【SYXK (黑) 2015002】。饲养环境: 昼夜各 12 h 交替, 温度 22~25℃, 湿度 35%~45%。饲养期间给予小鼠标准饲料及洁净饮用水。所有操作均符合实验动物伦理学要求。

大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞购于北京全式金生物技术有限公司。pMD19-Simple 载体购于宝生物工程 (大连) 有限公司, pMD19-SP 和 px459 载体为实验室自存载体。

1.1.2 实验试剂

Endo-free Plasmid Mini Kit II (Omega, D6950-01), Gel Extraction Kit (CW BIO, CW2302M), GeneJET Genomic DNA Purification Kit (Thermo, K0721), TranscriptAid T7 High Yield Transcription Kit (Thermo, K0441), TrueCut Cas9 Protein v2 (Invitrogen, A36497), QuickExtract (Lucigen, QE0905T), 限制性内切酶 (Promega), Taq 酶 (TAKARA), DNA 分子量标记 Marker (TianGen), 其他试剂如无特殊说明均购于 Sigma 公司。

1.1.3 实验仪器

梯度 PCR 仪 (Bio-Rad, 美国), 分光光度计 (Thermo, NanoDrop 2000, 美国), 拉针仪 (Narishige, PN-30, 日本), 锻熔仪 (Narishige, MF-900, 日本), 显微操作仪 (Eppendorf, TransferMan NK2, 德国), 倒

置荧光显微镜 (Carl Zeiss, Axiovert 200, 德国), CCD 成像系统 (Nikon, DS-Fi1, 日本)。

1.2 方法

1.2.1 小鼠 *Rosa26* 基因 sgRNA 的设计与获得

(1) sgRNA 的设计

设计 *Rosa26* 位点 sgRNA, 上游引物 mRosa26-gRNA-PCRF, 下游引物 mRosa26-gRNA-universal-PCRR, 引物序列详情见表 1, 引物送哈尔滨睿博兴科生物技术有限公司合成。

(2) 退火形成双链 DNA

反应组成: mRosa26-gRNA-PCRF (10 μ mol/L) 2.5 μ L, mRosa26-gRNA-universal-PCRR (10 μ mol/L) 2.5 μ L, 2 $\times$ Premix LA Taq 25 μ L, ddH₂O 20 μ L, 反应体系: 50 μ L。退火条件: 98 $^{\circ}$ C 2 min; 98 $^{\circ}$ C 10 s, 53 $^{\circ}$ C 20 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 20 个循环; 72 $^{\circ}$ C 5 min。

(3) sgRNA 的体外转录

反应组成: 双链 DNA 5 μ L, 5 $\times$ reaction buffer 4 μ L, GTP solution 2 μ L, UTP solution 2 μ L, CTP solution 2 μ L, T7 RNA polymerase mix 2 μ L, 补加 RNase-free H₂O 到 20 μ L, 反应体系: 20 μ L。混匀后, 37 $^{\circ}$ C 孵育 6 h, 然后加 DNase I 1 μ L, 37 $^{\circ}$ C 孵育 15 min; 纯化, 分装, -80 $^{\circ}$ C 保存。

1.2.2 sgRNA 和 Cas9 蛋白的体外酶切验证

(1) 小鼠 *Rosa26* 基因靶 DNA 的扩增

引物为上游 mRosa26-Xba-F1 和下游 mRosa26-Xba-R1, 引物序列详情见表 1。反应组成: 基因组 DNA 1 μ L (50 ng), mRosa26-Xba-F1 0.5 μ L, mRosa26-Xba-R1 0.5 μ L, 2 $\times$ LA Mix 10 μ L, 补加 ddH₂O 到 20 μ L, 反应体系: 20 μ L。扩增条件: 98 $^{\circ}$ C 5 min; 98 $^{\circ}$ C 30 s, 58 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 7 min。

(2) sgRNA 和 Cas9 蛋白的体外酶切

将 80 ng 的 *Rosa26* 靶 DNA 模板和 150 ng 的 Cas9 蛋白混合, 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min, 加 200 ng sgRNA, 1 μ L NEB Buffer 3 和 1 μ L 10 mmol/L BSA, 混合均匀, 37 $^{\circ}$ C 下作用 1.5 h, 酶切后进行琼脂糖凝胶电泳, 验证酶切效果。

1.2.3 小鼠 *Rosa26* 位点肌肉特异性同源打靶载体的构建

(1) SP-px459 载体构建

采用限制性内切酶 *KpnI* 和 *AgeI* 对 pMD19-SP 和 px459 载体进行酶切, 将回收的 SP 启动子和去除 CMV 启动子的 px459 载体大片段连接, 构建 SP-

px459 载体。

(2) SP-px459 载体的 PCR 扩增

设计引物 T-MluI-SP-F 和 T-BstBI-R, 并在上下游引物两端引入与 Donor 载体酶切位点两侧同源的 15 bp 序列, 引物序列详情见表 1。反应组成: SP-px459 3 μ L, T-MluI-SP-F 3 μ L, T-BstBI-R 3 μ L, 2 $\times$ Premix LA Taq 50 μ L, ddH₂O 41 μ L, 反应体系: 100 μ L。反应条件: 98 $^{\circ}$ C 1 min; 98 $^{\circ}$ C 10 s, 65 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 7 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 5 min。

(3) 同源臂载体的酶切

使用限制性内切酶 *MluI* 和 *BstBI* 对小鼠 ROSA26 Safe Harbor 基因敲入试剂盒中的 DC-DON-SH02 ROSA26 (Donor) 载体, 进行酶切, 胶回收大片段, 并置于 -20 $^{\circ}$ C 备用。

(4) Donor-SP-px459 载体的构建

取上述 PCR 胶回收产物 40 ng, Donor 酶切回收产物 50 ng, 加 1 μ L Exnase II, 2 μ L 的 5 $\times$ CE II Buffer, 补加 ddH₂O 到 10 μ L, 进行同源重组连接。

1.2.4 *Rosa26* 位点基因编辑小鼠胚胎的获得

选择 6~8 周大性成熟的雌性 ICR 小鼠, 间隔 48 h 分别注射 10 IU 的 PMSG 和 hCG, 并与雄性 B6D2F1 小鼠合笼, 见栓小鼠采用输卵管灌流收集原核期胚胎, 随后采用原核注射方式将 *Rosa26* sgRNA 和 Cas9 蛋白注射到受精卵的雄原核, 随后观察胚胎的卵裂和囊胚发育情况。

1.2.5 *Rosa26* 位点基因编辑小鼠胚胎的鉴定

(1) 囊胚收集处理

收集注射后囊胚加入快速 DNA 提取试剂, 每 10 μ L 裂解液放入 1 枚囊胚。随后进行变性处理, 变性程序: 68 $^{\circ}$ C 6 min, 98 $^{\circ}$ C 2 min。

(2) 两轮 PCR 扩增

以变性后的 DNA 作为模板, 以 mRosa26-Xba-F1 和 mRosa26-Xba-R1 为引物, 进行两轮 PCR。一轮 PCR 反应组成: 胚胎裂解液 10 μ L, mRosa26-Xba-F1 0.3 μ L, mRosa26-Xba-R1 0.3 μ L, 2 $\times$ Premix LA Taq 10 μ L, 反应体系: 20.6 μ L。二轮 PCR 反应组成: 一轮 PCR 产物 5 μ L, mRosa26-Xba-F1 0.3 μ L, mRosa26-Xba-R1 0.3 μ L, 2 $\times$ Premix LA Taq 10 μ L, ddH₂O 4.4 μ L, 反应体系: 20 μ L。PCR 反应条件为: 98 $^{\circ}$ C 3 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 58 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 45 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 7 min。

1.2.6 *Rosa26* 位点基因编辑小鼠的制作

原核注射后, 将发育到囊胚阶段的小鼠胚胎, 以

每侧 7~8 枚的数量,通过子宫移植的方法,移植到同步发情的 3.5 d 或 2.5 d 受体母鼠子宫,待其生产。

1.2.7 *Rosa26* 位点基因编辑小鼠的鉴定

取出生 4 周小鼠尾尖,提取小鼠尾尖 DNA,以 mRosa26-Xba-F1 和 mRosa26-Xba-R1 为引物进行 PCR 扩增,反应组成和扩增条件见 1.2.2。PCR 产物送生物公司进行测序。

1.2.8 *Rosa26* 位点肌肉特异性打靶胚胎的获得

采用 1.2.4 方法收集小鼠原核期胚胎,同样采

用原核注射方式将同源打靶载体 Donor-SP-px459 以质粒的形式与 *Rosa26* sgRNA 和 Cas9 蛋白一起注射到受精卵的雄原核中,随后观察胚胎的卵裂和囊胚发育情况。

1.2.9 *Rosa26* 位点肌肉特异性打靶胚胎的鉴定

使用小鼠 ROSA26 Safe Harbor 基因敲入试剂盒提供的通用鉴定引物 3'-Poly(A)-F 和 3'-Poly(A)-R 对打靶载体的整合情况进行鉴定,引物序列详情见表 1。两轮 PCR 反应组成和反应条件同 1.2.5。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences	
引物名称 Primers	序列(5'-3') Primer sequences (5'-3')
mRosa26-gRNA-PCRF	GAAATTAATACGACTCACTATAGGGACTCCACTCTTTCTAGAAGAGCTTTTAGAGCTAGAAATAGC
mRosa26-gRNA-universal-PCRR	AAAAGCACCGACTCGGTGCCACTTTTTCAAGTTGATAACGGACTAGCCTTATTTAACTTGCTATT TCTAGCTCTAAAAC
mRosa26-Xba-F1	CCAAAGTCGCTCTGAGTGTATCAGT
mRosa26-Xba-R1	GGAGCGGGAGAAATGGATATGAAG
T-MluI-SP-F	CTCCAGTCTTTCTAGACGCGTCGTTACATAACTTACGGTAAATGGC
T-BstBI-R	GGGATCCGATTTAAAGGCGAATCGAGGCTGATCAGCGAGC
3'-Poly(A)-F	GGTGCCTGAAATCAACCTCTGGA
3'-Poly(A)-R	TCAAGCCAGTCCAAGAGAAAGCA

2 结果

2.1 靶 DNA 扩增和 sgRNA 体外酶切验证

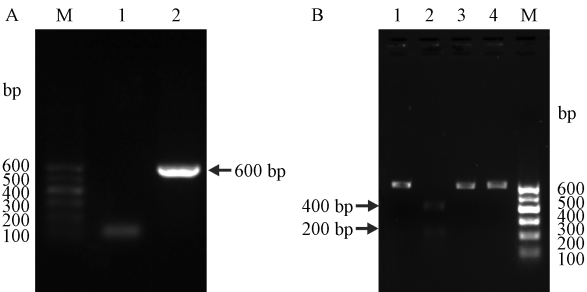
扩增的小鼠 *Rosa26* 基因靶 DNA 大小约为 600 bp,通过琼脂糖凝胶电泳,在 600 bp 左右可以观察到条带,说明扩增成功(图 1A)。sgRNA 和 Cas9 蛋白对靶 DNA 酶切后产生的条带大小约 200 bp 和 400 bp,通过琼脂糖凝胶电泳,结果显示,在体外酶切验证体系中同时加入 sgRNA 和 Cas9 蛋白,电泳后可在约 200 bp 和 400 bp 处观察到条带,说明酶切成功(图 1B),而未加入 sgRNA 和 Cas9 或单独加入 sgRNA 或 Cas9 蛋白时未观察到特定条带出现。

2.2 肌肉特异表达同源打靶载体的构建

构建的 SP-px459 载体的 PCR 产物大小约为 5000 bp,通过琼脂糖凝胶电泳,可以在约 5000 bp 左右观察到条带出现,说明载体构建成功(图 2A)。构建的同源打靶载体 Donor-SP-px459 的大小约为 13 000 bp 左右,琼脂糖凝胶电泳后,在约 13 000 bp 处观察到条带,说明载体构建成功(图 2B)。

2.3 小鼠 *Rosa26* 基因编辑胚胎的获得

注射了 *Rosa26* 的 sgRNA 和 Cas9 蛋白的胚胎可以正常卵裂并可发育到囊胚阶段(图 3)。在挑取了 94 个原核时期胚胎进行注射后,有 85 个胚胎存活,有 9 枚胚胎在注射后发生崩解;注射后观察细胞卵裂情况,其中有 78 枚胚胎分裂形成二细胞,卵裂率



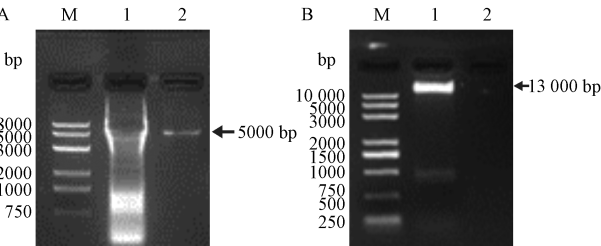
注:A,*Rosa26* 靶 DNA PCR 产物琼脂糖凝胶电泳图;M,Marker I DNA ladder;1,阴性对照;2,PCR 产物。B,*Rosa26* 靶 DNA 体外酶切验证琼脂糖凝胶电泳图;1,阴性对照;2,sgRNA + Cas9;3,sgRNA;4,Cas9;M,Marker I DNA ladder。

图 1 *Rosa26* 靶 DNA PCR 产物和 sgRNA 体外酶切验证琼脂糖凝胶电泳图

Note. A. Agarose gel electrophoresis result of *Rosa26* target DNA PCR product. M, Marker I DNA ladder. 1, Control. 2, PCR product. B. Agarose gel electrophoresis results of sgRNA *in vitro* cleavage assay products. 1, Control. 2, sgRNA + Cas9. 3, sgRNA. 4, Cas9. M, Marker I DNA ladder.

Figure 1 Results of agarose gel electrophoresis of *Rosa26* target DNA PCR and sgRNA *in vitro* cleavage assay products

为 91.8%;分裂后的胚胎最终由 40 枚发育到囊胚,囊胚率为 51.3%。注射后得到的囊胚(图 4A),经 PCR 扩增,电泳后,20 个囊胚中有 19 个出现了特异性扩增条带(图 4B);测序结果显示,在测序的 6 个样品中有 1 个发生了基因缺失编辑(图 4C,4D)。

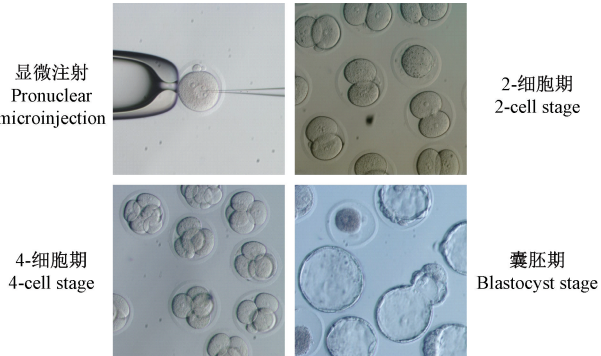


注:A,SP-px459 的 PCR 产物;M,DL 5000 Plus marker;1,阴性对照;2,PCR 产物。B,Donor-SP-px459 载体的琼脂糖凝胶电泳图;M,DL 2503 marker;1,Donor-SP-px459 载体;2,阴性对照。

图 2 SP-px459 PCR 产物和 Donor-SP-px459 的载体构建

Note. A. PCR products of SP-px459. M, DL 5000 Plus. 1, Control. 2, PCR Products. B. Agarose gel electrophoresis of donor-SP-px459 vector. M, DL 2503 marker. 1, Donor-SP-px459 vector. 2, Control.

Figure 2 PCR products of SP-px459 and vector construction of donor-SP-px459



注:注射 *Rosa26* sgRNA/Cas9 后小鼠胚胎发育过程($\times 200$)

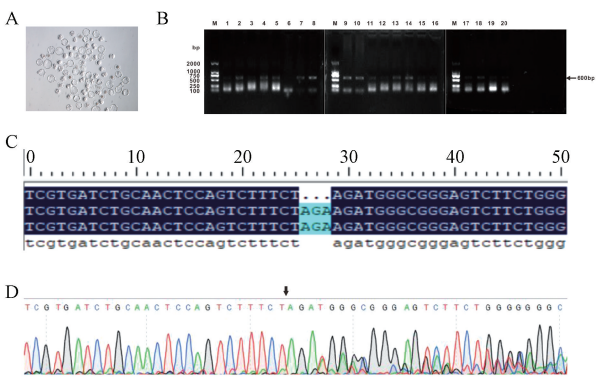
Figure 3 Process of embryos development after *Rosa26* sgRNA/Cas9 microinjection($\times 200$)

2.4 *Rosa26* 基因编辑小鼠的获得

采用子宫移植的方法,将 96 枚注射后的囊胚移植到同步发情的 6 只受体体内,其中 4 只没有观察到妊娠反应,最终有 1 只产下 3 只小鼠(图 5A)。鼠尾 DNA,PCR 扩增后经琼脂糖凝胶电泳检测,在 600 bp 左右出现目的条带(图 5B),测序结果显示,其中一只小鼠的 *Rosa26* 位点发生了点突变(图 5C,5D)。

2.5 肌肉特异表达 *Cas9* 蛋白小鼠胚胎的获得

打靶载体 Donor-SP-px459 与 *Rosa26* sgRNA 和 *Cas9* 蛋白联合注射后,胚胎可以正常卵裂并可发育到囊胚阶段(图 6)。注射打靶载体 Donor-SP-px459 的胚胎的卵裂率为 87.1%,囊胚率为 27.8%。注射了 Donor-SP-px459 的胚胎中未见有荧光(图 7)。注射了打靶载体的胚胎,PCR 扩增后,经琼脂糖凝胶电泳检测,在约 1400 bp 大小处扩增出特异性条带(图 8),说明同源打靶载体已成功整合到打靶位点。

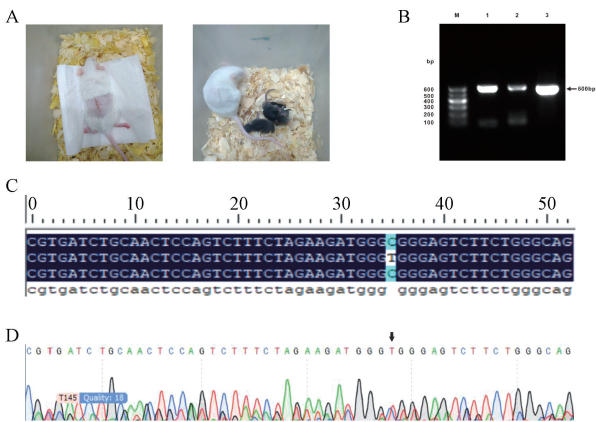


注:A,合子注射后形成的囊胚。B,囊胚 PCR 产物。C,序列比对结果。D,测序峰图结果。

图 4 小鼠 *Rosa26* 基因编辑胚胎的鉴定

Note. A, Blastocysts formed after zygotic injection. B, PCR products of blastulae. C, Sequence alignment. D, Sequencing peak map.

Figure 4 Identification of mouse *Rosa26* gene edited embryos



注:A,胚胎移植和获得的后代。B,基因组 PCR 产物电泳图;1~3:移植后产生的后代。C,序列比对结果。D,测序峰图结果。

图 5 *Rosa26* 基因编辑小鼠的鉴定

Note. A, Embryo transfer and acquired offsprings. B, Electropherogram of genomic PCR identification products, lane 1~3, offsprings after embryo transfer. C, Sequence alignment. D, Sequencing peak map.

Figure 5 Identification of *Rosa26* gene edited mice

3 讨论

由工程化核酸酶引发的 DNA 双链断裂(double-strain break,DSB)被认为是产生定向突变的强有力工具,例如锌指核酸酶(ZFN)和转录激活因子样效应物核酸酶(TALEN)等^[11-12],不过 CRISPR/Cas9 的出现,为基因的定点修饰提供了一个更加简单有效的方法^[13-14]。相比于传统转基因手段使用外源基因进行原核注射的方式生产转基因动物带来的

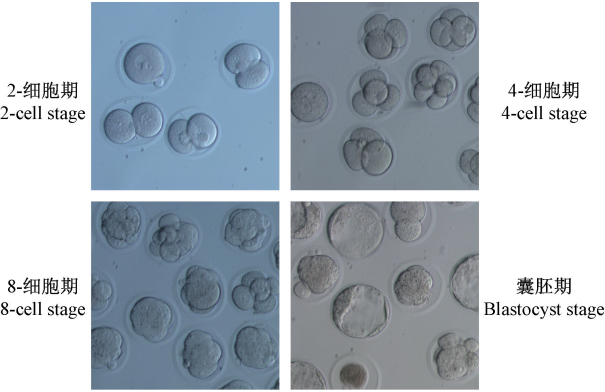


图 6 注射打靶载体 Donor-SP-px459 后小鼠胚胎发育过程(×200)
Figure 6 Process of embryos development after Donor-SP-px459 microinjection(×200)

整合位点和拷贝数不确定等问题,工程化核酸酶系统可以在基因靶位点上产生精准突变。*Rosa26* 位点最初是由基因诱捕载体 *Rosaβ-geo* 与 26 号转染 ES 细胞发生整合而被发现^[15]。并被广泛用于基于 ES 细胞的基因打靶操作。该基因位于小鼠基因组的第 6 号染色体上,由 3 个外显子组成,可在所有细胞类型和发育阶段实现广泛表达。*Rosa26* 的转录产物是一种非编码、非必需的核 RNA,不会翻译成为蛋白质^[16]。也因此,*Rosa26* 基因位点被称为“安全港”,常被用做外源基因整合位点来实现常规和条件性的基因表达。近几年,不断有利用 *Rosa26* 位点生产转基因动物的报道出现^[17-18]。本研究同样也采用了 *Rosa26* 位点作为基因打靶的位点。在 CRISPR/Cas9 体系中 sgRNA 的设计是基因编辑成功的关键,因此通常在注射之前,需要先在体外对靶 DNA 位点进行酶切来检验 sgRNA 可用性和 Cas9 蛋白的活性,本研究中设计构建的 *Rosa26* 的 sgRNA 的体外酶切实验结果表明,体外转录的 sgRNA 可以正常发挥编辑作用,可用于后续实验,在此基础上,我们进行了显微注射,并先后得到了 *Rosa26* 位点的基因编辑胚胎和定点突变小鼠,从而初步建立了基于 CRISPR/Cas9 的基因编辑体系,验证了整个体系的有效性。

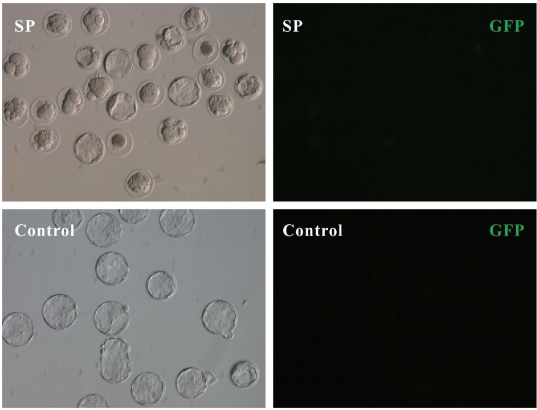
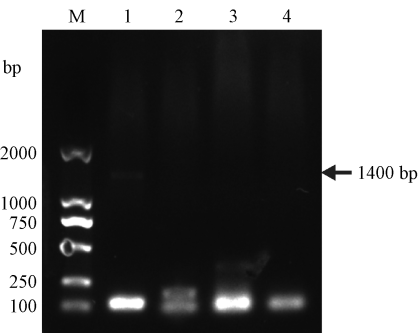


图 7 注射打靶载体后胚胎荧光蛋白表达情况
Figure 7 Expression of fluorescent protein after microinjection of targeting vector into the embryos

组织特异性表达外源基因在研究基因功能、细胞分化和再生医学等领域具有重要作用,通过制备转基因动物产生组织特异性动物模型是常用的研究方法之一。组织特异性启动子可以带动外源基因在特定组织中表达,因此,通过 *Rosa26* 位点打靶敲入肌肉特异性表达的 CRISPR/Cas9 载体,就可以实现在肌肉组织中特异表达 Cas9 蛋白,为后续产生肌肉特异性表达 Cas9 的动物模型及相关研究奠定基础。常用的骨骼肌特异性启动子有 α -actin 启动子和合成肌肉启动子 (synthetic muscle promoters SP),其中, α -actin 启动子在非骨骼肌细胞中没有活性,其组成结构包含 E-box 和 SRE 调控区,可以被 IGF-I 和 MyoG 直接或间接的激活;1999 年, Li 等^[19]根据骨骼肌 α -actin 的结构特性,对肌肉增强子进行分析并利用顺式作用元件和作用调控因子相对位置,人工设计了表达效率远高于天然肌源性启动子和病毒启动子的启动子序列-合成肌肉启动子 SP。SP 启动子由 SRE、TEF-1、MEF-1 和 MEF-2 等 4 种作用序列元件组成,由于这些元件的存在使得 SP 在已分化的肌肉组织中的转录能力得到极大增强。



注:1, DL 2000 Marker。2~4, 注射打靶载体胚胎 PCR 产物。
图 8 注射打靶载体胚胎的 PCR 鉴定
Note. 1, DL 2000 marker. 2~4, PCR identification products of embryos injected with targeting vectors.
Figure 8 PCR identification of embryos injected with targeting vectors

在研究室前期工作中,我们人工合成了 SP 启动子并连接到了克隆载体,在本研究中,我们将 SP 启动子与切除了 CMV 启动子的 px459 载体连接,随后又通过 PCR 和同源重组的方法将核心序列与同源臂载体 Donor 载体连接,并获得肌肉特异性的同源打靶载体 Donor-SP-px459,通过显微注射,最终获得了小鼠肌肉特异性打靶胚胎,同时进行了胚胎移植,但暂时未成功获得打靶个体。本研究中,注射了同源打靶载体的胚胎,每 6 个囊胚中就有 1 个胚胎发生整合,整合效率达到了 16.7%。这可能与同源臂大小的选择和商业化蛋白的使用有关。以往研究中,同源臂的大小一般几百到几千大小都有被使用的报道,但最近有报道称同源臂在 800 bp 左右时打靶效率最高^[20],为此我们也采用了 800 bp 的同源臂来构建打靶载体;此外,其他类似研究中多采用 Cas9 mRNA 和 sgRNA 的组合进行,本研究是采用商业化的 Cas9 蛋白进行的。

虽然通过基因敲除可以获得 MSNT 基因突变个体,但由 MSTN 基因缺失所导致的问题和不确定性尚未被解决,尤其是涉及到基因编辑动物的生物安全性问题。因此,如何在充分利用 MSTN 特性来获得优良性状的同时,又能兼顾生物安全性产生理想个体,是当下研究的方向和重点。因此,接下来我们将在现有打靶胚胎的基础上,通过胚胎移植获得肌肉特异表达 Cas9 的小鼠,并尝试在成体水平上通过病毒携带等方式实现对小鼠 MSTN 基因的编辑,从而达到使小鼠肌肉量增加的目的。

参 考 文 献(References)

- [1] Ramón R, Susana FN, Isabel C, et al. Differential response to exogenous and endogenous myostatin in myoblasts suggests that myostatin acts as an autocrine factor in vivo [J]. *Endocrinology*, 2004, 145(6): 2795–2803.
- [2] Kambadur R, Sharma M, Smith TPL, et al. Mutations in myostatin (GDF8) in double-muscling Belgian blue and Piedmontese cattle [J]. *Genome Res*, 1997, 7(9): 910–916.
- [3] Szabó G, Dallmann G, Müller G, et al. A deletion in the myostatin gene causes the compact (Cmpt) hypermuscular mutation in mice [J]. *Mamm Genome*, 1998, 9(8): 671–672.
- [4] Peiris HN, Mitchell MD. The expression and potential functions of placental myostatin [J]. *Placenta*, 2012, 33(11): 902–907.
- [5] Ji S, Losinski RL, Cornelius SG, et al. Myostatin expression in porcine tissues: tissue specificity and developmental and postnatal regulation [J]. *Am J Physiol*, 1998, 275(4 Pt 2): R1265–1273.
- [6] Roberts SB, Goetz FW. Differential skeletal muscle expression of myostatin across teleost species, and the isolation of multiple myostatin isoforms [J]. *Febs Lett*, 2001, 491(3): 212–216.
- [7] Radaelli G, Rowleson A, Mascarello F, et al. Myostatin precursor is present in several tissues in teleost fish: a comparative immunolocalization study [J]. *Cell Tissue Res*, 2003, 311(2): 239–250.
- [8] Haoyi W, Hui Y, Shivalila CS, et al. One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering [J]. *Cell*, 2013, 153(4): 910–918.
- [9] Qin WN, Dion SL, Kutny PM, et al. Efficient CRISPR/Cas9-mediated genome editing in mice by zygote electroporation of nuclease [J]. *Genetics*, 2015, 200(2): 423–430.
- [10] Yao X, Liu Z, Wang X, et al. Generation of knock-in cynomolgus monkey via CRISPR/Cas9 editing [J]. *Cell Res*, 2018, 28(3): 379–382.
- [11] Melanie M, Martin Hrabé DA, Wolfgang W, et al. Gene targeting by homologous recombination in mouse zygotes mediated by zinc-finger nucleases [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107(34): 15022–15026.
- [12] Wefers B, Panda SK, Ortiz O, et al. Generation of targeted mouse mutants by embryo microinjection of TALEN mRNA [J]. *Nat Protoc*, 2013, 8(12): 2355–2379.
- [13] Hsu P, Lander E, Zhang F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering [J]. *Cell*, 2014, 157(6): 1262–1278.
- [14] Hyongbum K, Jin-Soo K. A guide to genome engineering with programmable nucleases [J]. *Nat Rev Genet*, 2014, 15(5): 321–334.
- [15] Friedrich G, Soriano P. Promoter traps in embryonic stem cells: a genetic screen to identify and mutate developmental genes in mice [J]. *Gene Dev*, 1991, 5(9): 1513–1523.
- [16] Zambrowicz BP, Imamoto A, Fiering S, et al. Disruption of overlapping transcripts in the ROSA beta geo 26 gene trap strain leads to widespread expression of beta-galactosidase in mouse embryos and hematopoietic cells [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997, 94(8): 3789–3794.
- [17] Chu VT, Weber T, Graf R, et al. Efficient generation of Rosa26 knock-in mice using CRISPR/Cas9 in C57BL/6 zygotes [J]. *Bmc Biotechnol*, 2016, 16(1): 1–15.
- [18] Gu B, Posfai E, Rossant J. Efficient generation of targeted large insertions by microinjection into two-cell-stage mouse embryos [J]. *Nat Biotechnol*, 2018, 36(7): 632–637.
- [19] Li X, Eastman EM, Schwartz RJ, et al. Synthetic muscle promoters: activities exceeding naturally occurring regulatory sequences [J]. *Nat Biotechnol*, 1999, 17(3): 241–245.
- [20] Yao X, Wang X, Hu X, et al. Homology-mediated end joining-based targeted integration using CRISPR/Cas9 [J]. *Cell Res*, 2017, 27(6): 801–814.