

周珂,辛智倩,刘佩娟,等.骨形态发生蛋白9基因敲除小鼠的构建[J].中国实验动物学报,2019,27(3):311-315.

Zhou K, Xin ZQ, Liu PJ, et al. Construction of bone morphogenetic protein 9-knockout mice [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2019, 27(3):311-315.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2019.03.007

## 骨形态发生蛋白9基因敲除小鼠的构建

周珂<sup>1,2</sup>,辛智倩<sup>1</sup>,刘佩娟<sup>1</sup>,马翠<sup>1,2</sup>,师长宏<sup>1</sup>,王华<sup>2\*</sup>,张海<sup>1\*</sup>

(1.空军军医大学实验动物中心,西安 710032; 2.安徽医科大学药学院,合肥 230032)

**【摘要】目的** 运用 CRISPR/Cas9 技术敲除小鼠基因组中 *Bmp9* 基因片段,构建 *Bmp9* 基因敲除小鼠。**方法** 根据 *Bmp9* 基因的外显子序列,设计一段 sgRNA 并合成。sgRNA 体外转录后和 Cas9 mRNA 混合后显微注射受精卵细胞,注射后的受精卵细胞移植至受体动物获得子代小鼠。提取子代小鼠基因组 DNA 测序鉴定其基因型。基因型鉴定正确的小鼠与野生型交配后筛选纯合子小鼠。同时取纯合子小鼠心脏、肝、脾、肺、肾,匀浆后提取总 RNA 和总蛋白,通过 qPCR、WB 和免疫组化检测 BMP9 在各组织中的表达。**结果** 设计并合成 20 bp 的 sgRNA 并进行体外转录,显微注射并回植后得到基因突变小鼠,连续交配后得 F2 代纯合子。测序结果显示,突变小鼠存在两种基因型,一种为 5 bp 缺失突变,另一种为 13 bp 缺失并伴有 1 bp 插入突变。与野生型 C57BL/6 相比,qPCR、WB 和免疫组化结果均表明基因敲除小鼠肝中 BMP9 表达显著降低。**结论** 利用 CRISPR/Cas9 技术成功构建出了 BMP9 基因敲除小鼠。

**【关键词】** CRISPR/Cas9; BMP9; 基因敲除小鼠

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2019) 03-0311-05

## Construction of bone morphogenetic protein 9-knockout mice

ZHOU Ke<sup>1,2</sup>, XIN Zhiqian<sup>1</sup>, LIU Peijuan<sup>1</sup>, MA Cui<sup>1,2</sup>, SHI Changhong<sup>1</sup>,  
WANG Hua<sup>2\*</sup>, ZHANG Hai<sup>1\*</sup>

(1. Laboratory Animal Center, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China.

2. School of Pharmacy, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Corresponding author: WANG Hua. E-mail: wanghua@ahmu.edu.cn; ZHANG Hai. E-mail: hzhang@fmmu.edu.cn

**【Abstract】 Objective** To construct bone morphogenetic protein 9 (*Bmp9*)-knockout mice using CRISPR/Cas9 technology. **Methods** sgRNA were designed and synthesized according to the *Bmp9* sequence in Genbank. After *in vitro* transcription of *Bmp9* sgRNA, a Cas9 and sgRNA mixture was microinjected into zygotes of C57BL/6 mice, which were then transplanted into ICR mice. The offspring mice were identified with Sanger sequencing and mutant mice were mated with wild-type mice to screen for mice harboring a homozygous mutation. Meanwhile, qPCR, western blot, and immunohistochemistry were used to detect the expression of BMP9 in the heart, liver, spleen, lung, and kidney. **Results** A 20-bp sgRNA was synthesized and transcribed into RNA. After microinjection, transplantation, and mating, homozygous F2-generation mice were obtained. The results of sequencing revealed two genotypes: one with a 5-bp deletion and another with a 13-bp deletion and 1-bp insertion. Compared with the wild-type C57BL/6 mice, results of qPCR, western blot, and immunohistochemistry showed a marked decrease in BMP9 in the liver of *Bmp9*-knockout mice. **Conclusions** *Bmp9*-

**【基金项目】**国家自然科学基金优秀青年科学基金项目(81522009/H0317);全军实验动物专项课题(SYDW(2016)001)。

Funded by National Natural Science Foundation of China (81522009/H0317) and Special Fund for Military Laboratory Animals (SYDW (2016) 001).

**【作者简介】**周珂(1995—),女,硕士研究生,研究方向:肝脏药理。Email:472905720@qq.com

**【通信作者】**张海(1971—),男,副教授,博士,研究方向:动物模型。Email:hzhang@fmmu.edu.cn;

王华(1978—),男,教授,博士,研究方向:肝脏药理。Email:wanghua@ahmu.edu.cn。

\* 共同通信作者

knockout mice are successfully generated using CRISPR/Cas9 technology.

**【Keywords】** CRISPR/Cas9; BMP9; gene-knockout mice

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

骨形态发生蛋白 (bone morphogenetic proteins, BMPs) 属于转化生长因子 (transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ ) 超家族, 是一类多功能生长因子。到目前为止, 已发现超过 20 种 BMP 相关蛋白, 并根据其氨基酸序列及功能将其分为四种亚家族。其中, BMP9 和 BMP10 组成一种亚家族, 在胚胎干细胞分化、成骨形成、血管生成、糖脂代谢等方面中起到重要作用<sup>[1]</sup>。BMP9 作为成骨作用最强的 BMPs 家族成员也受到越来越多的关注。

BMP9 又称为生长分化因子 2 (growth and differentiation factor 2, GDF2), 主要由肝细胞产生, 且有研究发现其 mRNA 在中枢神经系统和骨骼肌中也有少量表达<sup>[2]</sup>。BMP9 不同于其他 BMPs 家族成员的是其对受体的选择性以及对信号调节的敏感性, 它与激活素受体样激酶 1 (activin receptor-like kinase 1, ALK1) 有高度亲和力<sup>[3]</sup>, 结合后能够激活 Smad 依赖性 BMP 信号通路, 从而影响细胞生长发育等生理过程<sup>[4]</sup>。近年来, 大量文献报道 BMP9 参与多种生物学进程, 当 BMP9 信号失调时, 能够诱发多种疾病, 如肺动脉高压、遗传性出血性毛细血管扩张症、肝疾病等<sup>[5-7]</sup>。研究发现, 在肝纤维化疾病进程中, 肌成纤维细胞的细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 蛋白合成增多是纤维化形成的一个重要机制, BMP9 能够通过 ALK1 或 ALK1 与 ALK5 复合体结合, 使 Smad1/5/8 磷酸化, 同时激活其他肝纤维化相关受体, 上调 ECM 蛋白的表达, 因此其具有促纤维化的功能<sup>[8]</sup>。但其具体发病机制尚不明确, 针对这些疾病的相应治疗也不完善。

随着 CRISPR/Cas9 技术的日益成熟, 用于各种疾病研究的动物模型也逐渐增多。通过构建基因敲除动物模型, 能够快速了解目的基因对疾病进程的作用, 帮助研究者明确其作用机制, 以此找到有效方法来预防和治疗疾病。为进一步研究 BMP9 对肝纤维化的影响, 本研究以 CRISPR/Cas9 技术为基础, 构建 BMP9 基因敲除小鼠。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验动物

6 周龄 SPF 级 C57BL/6 小鼠, 体重 20~22 g, 由

空军军医大学实验动物中心提供【SCXK(陕)2014-002】, 6~8 周龄 ICR 母鼠购于北京维通利华公司【SCXK(京)2012-0001】, 均饲养于屏障设施【SYXK(陕)2014-001】中。

#### 1.1.2 试剂与仪器

sgRNA 体外转录试剂盒及纯化试剂盒购自 Ambion 公司。Cas9 mRNA 购自南通百奥迈科公司。DNTPs 和 Taq 酶购自 Takara 公司。BMP9 抗体购自 Proteintech 公司。pX330 质粒由北京艾德摩公司提供。PCR 产物纯化试剂盒购自天根生物公司。小鼠基因组 DNA 提取试剂盒由福际生物公司提供。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 sgRNA 重组质粒的构建

根据 Genbank 报道的 *Bmp9* 基因序列, 确定 *Bmp9* 基因敲除的靶位点。应用 <http://crispr.mit.edu> 网站分析并设计 20 bp 的 sgRNA 序列, 再根据选择的 sgRNA 序列, 合成一对序列互补的 DNA Oligos。将 Oligos 退火后以 T4 连接酶连接到带有 T7 启动子的 pX330 质粒载体上, 构建含有 sgRNA 的重组质粒。

#### 1.2.2 体外转录

上述质粒和 pX330 为模板, 通过 PCR 反应扩增 sgRNA 序列, PCR 产物纯化后进行体外转录。转录按文献报道进行<sup>[9]</sup>, 转录产物纯化后于 -80℃ 保存备用。

#### 1.2.3 显微注射及胚胎移植

6 周龄 C57BL/6 雌性小鼠超数排卵后与雄鼠合笼, 挑选见栓雌鼠, 剖开腹腔, 在输卵管壶腹部收集受精卵细胞。将转录好 sgRNA 和 Cas9 以 2:1 混合, 运用 Eppendorf NK2 显微注射仪将混合物直接注射入受精卵细胞中, 于 5% CO<sub>2</sub>、37℃ 培养箱中培养 24 h, 挑选成活受精卵细胞移植入假孕 ICR 母鼠输卵管中。

#### 1.2.4 基因型鉴定和纯合子的筛选

待首建鼠发育至 1 周时, 剪取鼠尾, 加入裂解液后, 通过试剂盒提取基因组 DNA, 以此作为 PCR 模板, 进行基因突变鉴定。将突变的首建鼠与野生型 C57BL/6 交配, 得 F1 代杂合子, F1 代互交即可筛选出 F2 代纯合子。

### 1.2.5 BMP9 在肝组织中的表达

#### (1) Western Blot

处死小鼠后取肝组织,加入 RIPA 裂解液后匀浆,提取总蛋白。蛋白定量后,加入 RIPA 裂解液和 5×上样缓冲液配成样品,90℃水浴 10 min 使蛋白变性,通过聚丙烯酰胺凝胶电泳后,转膜至 PVDF 膜上,封闭 2 h,一抗为 BMP9 抗体,稀释比例为 1:500,4℃过夜孵育,二抗为山羊抗兔工作液,稀释比例 1:4000,室温孵育 2 h,ECL 发光,成像分析。

#### (2) qPCR

处死小鼠后取肝组织,加入 TRIzol 匀浆裂解,提取组织 RNA,反转录为 cDNA 后,通过 BMP9 特异性引物进行 qPCR 检测。扩增反应条件:95℃ 10 min,95℃ 15 s,60℃ 30 s,40 个循环。数据分析采用  $2^{-\Delta\Delta CT}$  值计算目的基因相对表达量,其中各组织中 *Bmp9* 表达量以心脏为对照,敲除小鼠体内 *Bmp9* 表达量以野生型小鼠为对照。

#### (3) 免疫组化

处死小鼠后取肝组织,使用 4%多聚甲醛固定,24 h 后石蜡包埋,切片。通过免疫组化检测 BMP9 表达。一抗为 BMP9 抗体,1:200 的比例稀释;二抗为山羊抗兔工作液。

## 2 结果

### 2.1 构建质粒及体外转录

参照 Genbank 报道的 *Bmp9* 序列,利用 <http://crispr.mit.edu> 网站设计针对 *Bmp9* 基因第 1 外显子的一段 sgRNA 序列,*Bmp9*-上游引物:5'-CACCgtgtacaagtcatgatgtac-3';*Bmp9*-下游引物:5'-AAACgtcatgatgatcgaactgtacac-3'。sgRNA 序列两端引入 Bbs I 酶切位点后交由公司合成两端互补序列。合成的 sgRNA 退火后克隆入 pX330 质粒。以此为模板,通过 PCR 大量扩增 sgRNA,纯化后的 sgRNA,在 T7 启动子的介导下进行体外转录,转录产物经过琼脂糖凝胶电泳检测为单一条带,得到大小约为 112 bp 的 PCR 产物(见图 1)。通过紫外分光光度计检测,得出 OD260/230=2.3,OD260/280=1.9。

### 2.2 基因型鉴定

Cas9 和 sgRNA 转录产物显微注射入供体受精卵细胞后,将其移植到假孕受体母鼠体内,分娩得到 F0 代小鼠。F0 代动物经过提取鼠尾 DNA 测序后,结果显示存在两种基因型的突变小鼠,一种为 13 bp 缺失并伴有 1 bp 插入突变(见图 2A),另一种

为 5 bp 缺失突变(见图 2B)。F0 代小鼠与野生型小鼠交配获得 F1 代杂合子,杂合子再经过互交筛选得到 F2 代纯合子。

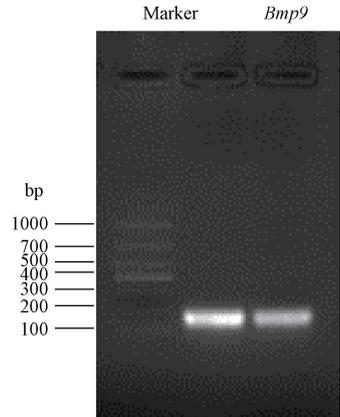


图 1 sgRNA 转录产物

Figure 1 Transcription products of sgRNA

#### A. $\Delta 13\text{Ins}1$ 基因型 ( $\Delta 13\text{Ins}1$ genotype)

Wild type: CCCAGTACATGATCGACTTGTACAACAGAT

Mutation: CCCA-----TTGTCCAACAGAT

#### B. $\Delta 5$ 基因型 ( $\Delta 5$ genotype)

Wild type: CCCAGTACATGATCGACTTGTACAACAGAT

Mutation: CCCA-----TGATCGACTTGTACAACAGAT

图 2 *Bmp9* 基因敲除小鼠的基因型

Figure 2 Genotype of the *Bmp9* knockout mice

### 2.3 BMP9 在敲除小鼠肝组织中的表达

#### 2.3.1 BMP9 mRNA 和蛋白在敲除小鼠中的表达

为了准确研究 BMP9 功能,我们首先检测野生型小鼠心脏、肝、脾、肺、肾等主要脏器中 BMP9 mRNA 的表达水平。结果发现 BMP9 主要在小鼠肝脏表达,其他脏器表达很低或不表达(图 3),这与文献报道一致<sup>[2]</sup>。因此在敲除小鼠表型鉴定中,我们只提取敲除小鼠肝脏的 mRNA 和蛋白进行分析,以 BMP9 特异性引物(上游引物序列为 5'-CCACCCAGTACATGATCGAC-3';下游引物序列为 5'-GGATGTGCTTCTGAAAGGGGA-3')。通过 qPCR 检测后发现小鼠肝脏中 mRNA 几乎不表达,Western blot 也证明 BMP9 蛋白表达水平很低(图 4、5)。这些结果表明 BMP9 已成功敲除。

#### 2.3.2 免疫组化

取 F2 代小鼠肝组织,在 4%多聚甲醛中固定,24 h 后石蜡包埋,切片,进行免疫组化。结果显示(见图 6)与野生型 C57BL/6 相比,BMP9 在基因敲除小鼠肝组织中的表达量显著下降。

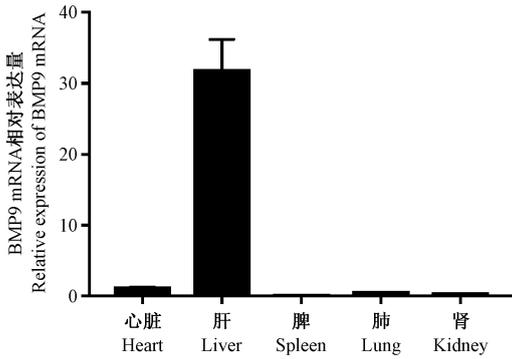


图 3 qPCR 检测 BMP9 在野生型小鼠各脏器中的表达

Figure 3 Expression of BMP9 in different organs of wide-type mice detected by qPCR

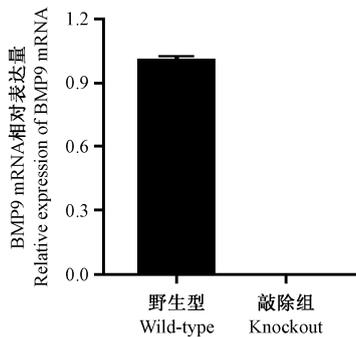


图 4 qPCR 检测 BMP9 在肝组织中的表达

Figure 4 Expression of BMP9 in the liver detected by qPCR

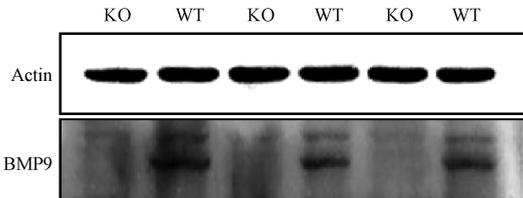


图 5 Western blot 检测 BMP9 在肝中的表达

Figure 5 Expression of BMP9 in the liver detected by Western blot

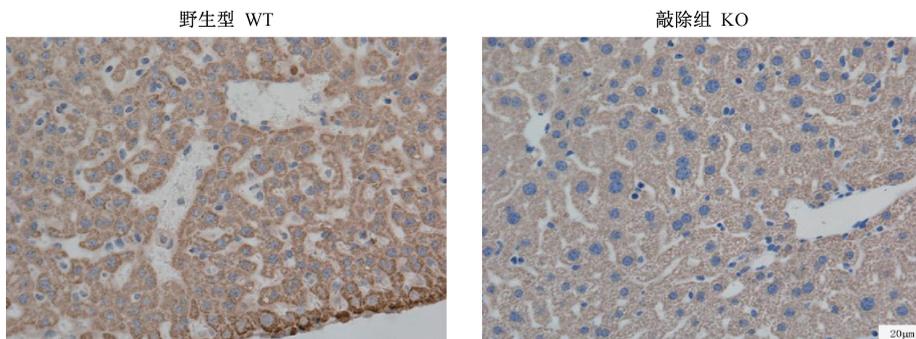


图 6 免疫组化检测 BMP9 在肝中的表达 (×40)

Figure 6 Expression of BMP9 in the liver detected by immunohistochemistry (×40)

### 3 讨论

CRISPR/Cas (Clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated proteins) 系统是一种原核生物的免疫系统, CRISPR 被称为“规律间隔成簇短回文重复序列”, 是在一些细菌基因组内存在的一系列成簇排列的 DNA 序列, 这些重复序列和很多能够侵入细菌的噬菌体的 DNA 序列相同。研究者发现, 噬菌体病毒或外源质粒入侵细菌时, CRISPR/Cas 系统能够识别这些外源 DNA, 这些序列在被转录成为 RNA 后, 能够和细菌产生的 CRISPR 关联蛋白形成复合体, 对 Cas9 蛋白起到导向作用, 因此这段 RNA 也被称为导向 RNA (gRNA)。当复合体检测到入侵的 DNA 和 gRNA 序列一致时, Cas9 蛋白就能够切割入侵的 DNA, 达到防御的目的。以此为基础衍生的 CRISPR/Cas9 基因编辑系统在基因治疗、动物模型等领域显现出良好的应用前景, 与传统基因打靶技术相比, CRISPR/Cas9 系统具有操作简单、效率高等优点, 目前应用 CRISPR/Cas9 技术可实现基因敲除、基因敲入等, 是构建基因修饰动物的重要工具。本研究我们针对 *Bmp9* 外显子设计 20 bp 的 sgRNA 序列, 体外转录后可介导 Cas9 在靶向区域定向切割, 引起 *Bmp9* 基因读码框移位, 从而导致 BMP9 蛋白表达水平改变, 证明 CRISPR/Cas9 基因编辑是构建基因敲除动物良好工具。

根据文献报道, BMP9 可以与 ALK1、BMPRII、内皮素等结合, 抑制内皮细胞, 激活 BMP 相关信号通路, 从而参与多种生理活动<sup>[10]</sup>。BMP9 早期的研究主要集中在血管生成领域, 如肺动脉高压、遗传性出血性毛细血管扩张症。随着对 BMP9 了解的深入, 研究者发现其在肿瘤、肝、神经系统等方面都有

着一定的影响, Maegdefrau 等<sup>[11]</sup>通过 RT-PCR 检测发现 BMP9 在肝细胞性肝癌 Hep3B 和 PLC/PRF/5 细胞中高表达, Herrera 等<sup>[12]</sup>发现 BMP9 可以促进肝癌细胞增殖, 激活 Smad1/5/8 磷酸化。这提示我们 *Bmp9* 基因敲除后, 可能会改善肝疾病进程, 因此通过敲除 *Bmp9* 基因构建肝疾病模型, 能够为后续研究提供良好的研究条件。

#### 参 考 文 献 (References)

- [ 1 ] Wagner DO, Sieber C, Bhushan R, et al. BMPs: from bone to body morphogenetic proteins [ J ]. *Sci Signal*, 2010, 3 (107): mr1.
- [ 2 ] Bidart M, Ricard N, Levet S, et al. BMP9 is produced by hepatocytes and circulates mainly in an active mature form complexed to its prodomain [ J ]. *Cell Mol Life Sci*, 2012, 69 (2): 313-324.
- [ 3 ] Herrera B, Dooley S, Breitkopf-Heinlein K. Potential roles of bone morphogenetic protein (BMP)-9 in human liver diseases [ J ]. *Int J Mol Sci*, 2014, 15(4): 5199-5220.
- [ 4 ] Miyazono K, Maeda S, Imamura T. BMP receptor signaling: transcriptional targets, regulation of signals, and signaling cross-talk [ J ]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2005, 16(3): 251-263.
- [ 5 ] Long L, Ormiston ML, Yang X, et al. Selective enhancement of endothelial BMPR-II with BMP9 reverses pulmonary arterial hypertension [ J ]. *Nat Med*, 2015, 21(7): 777-785.
- [ 6 ] Young K, Conley B, Romero D, et al. BMP9 regulates endoglin-dependent chemokine responses in endothelial cells [ J ]. *Blood*, 2012, 120(20): 4263-4273.
- [ 7 ] Bi J, Ge S. Potential roles of BMP9 in liver fibrosis [ J ]. *Int J Mol Sci*, 2014, 15(11): 20656-20667.
- [ 8 ] Muñoz-Félix JM, Cuesta C, Perretta-Tejedor N, et al. Identification of bone morphogenetic protein 9 (BMP9) as a novel profibrotic factor in vitro [ J ]. *Cell Signal*, 2016, 28(9): 1252-1261.
- [ 9 ] Ran FA, Hsu PD, Wright J, et al. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system [ J ]. *Nat Protoc*, 2013, 8(11): 2281-2308.
- [ 10 ] David L, Mallet C, Mazerbourg S, et al. Identification of BMP9 and BMP10 as functional activators of the orphan activin receptor-like kinase 1 (ALK1) in endothelial cells [ J ]. *Blood*, 2007, 109(5): 1953-1961.
- [ 11 ] Maegdefrau U, Bosserhoff AK. BMP activated Smad signaling strongly promotes migration and invasion of hepatocellular carcinoma cells [ J ]. *Exp Mol Pathol*, 2012, 92(1): 74-81.
- [ 12 ] Herrera B, García-Álvaro M, Cruz S, et al. BMP9 is a proliferative and survival factor for human hepatocellular carcinoma cells [ J ]. *PLoS One*, 2013, 8(7): e69535.

[ 收稿日期 ] 2018-11-01