

赵宣,王晓亚,刘莉,等. 利用双重 sgRNAs 构建 miR-223 全基因敲除小鼠[J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(6): 27 - 31.
Zhao X, Wang XY, Liu L, et al. Construction of miR-223 full-sequence-knockout mice with dual sgRNAs [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(6): 27 - 31.
doi: 10. 3969/j.issn.1671-7856. 2019. 06. 005

利用双重 sgRNAs 构建 miR-223 全基因敲除小鼠

赵 宣^{1, 2}, 王晓亚^{1, 2}, 刘 莉^{1, 3}, 刘佩娟¹, 辛智倩¹,
师长宏¹, 张彩勤¹, 白 冰¹, 黄 勇^{2*}, 张 海^{1*}

(1. 空军军医大学实验动物中心, 西安 710032; 2. 西北农林科技大学动物医学院, 陕西 杨凌 712100;
3. 西北工业大学生命学院, 西安 710068)

【摘要】 目的 利用双重 sgRNAs 构建 miR-223 全基因敲除小鼠。**方法** 针对 miR-223 基因设计双重 sgRNAs, 将体外转录的 sgRNAs 和 Cas9 mRNA 共同显微注射入 C57BL/6 小鼠受精卵细胞。小鼠出生后取其基因组 DNA 进行 PCR 扩增和测序以鉴定基因型, 同时取小鼠肝脏研磨后提取总 RNA, 通过 real-time PCR 分析 miR-223 在肝脏中的表达。**结果** 设计了 miR-223 基因双重 sgRNAs 并对其进行了体外转录, 纯化后显微注射小鼠受精卵细胞获得 miR-223 基因突变小鼠。测序结果表明突变小鼠有 3 种基因型, 一种为 6 bp 的缺失突变, 但未对 miR-223 序列产生影响; 另外两种为 162 bp 和 168 bp 的缺失突变, 完全删除 miR-223 前体和成熟区序列。与野生型相比, 这两种小鼠肝组织中几乎不能检测到 miR-223 的表达。**结论** 设计双重 sgRNAs 并应用 CRISPR/Cas9 技术成功构建 miR-223 全基因敲除小鼠。

【关键词】 双重 sgRNAs; CRISPR/Cas9; miR-223; 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(2019) 06-0027-05

Construction of miR-223 full-sequence-knockout mice with dual sgRNAs

ZHAO Xuan^{1, 2}, WANG Xiaoya^{1, 2}, LIU Li^{1, 3}, LIU Peijuan¹, XIN Zhiqian¹, SHI Changhong¹, ZHANG Caiqin¹,
BAI Bing¹, HUANG Yong^{2*}, ZHANG Hai^{1*}

(1. Laboratory Animal Center, Air Force Medical University, Xi'an 710032, China. 2. College of Veterinary Medicine, Northwest A&F University, Yangling 712100. 3. School of Life Sciences, Northwestern Polytechnical University, Xi'an 710068)

【Abstract】 Objective To construct miR-223 full-sequence-knockout mice with dual sgRNAs. **Methods** Dual sgRNAs were designed and transcribed *in vitro*, then microinjected into zygotes of C57BL/6 mice with Cas9 mRNA. After the mice were born, genomic DNA was subjected to PCR and sequenced to identify their genotypes. In addition, total RNA was extracted from the livers of mice, and expression of miR-223 in the liver tissues was analyzed by real-time PCR. **Results** Dual miR-223 sgRNAs were designed and transcribed *in vitro*. After purification, mouse zygotes were microinjected to obtain miR-223 mutant mice. Sequencing result revealed that the mutant mice had three genotypes: one with a 6-bp deletion that did not affect the miR-223 sequence, and two with 162-bp and 168-bp deletions, respectively, resultings in full-sequence-deletion of miR-223. Compared with wild-type mice, miR-223 expression was barely detected in liver tissues of the two full-deletion mice. **Conclusions** miR-223 full-sequence-knockout mice are successfully generated using dual sgRNAs.

【Keywords】 Dual sgRNAs; CRISPR/Cas9; miR-223; gene-knockout mice

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(31672535); 全军实验动物专项课题(SYDW(2016)001)。
[作者简介] 赵宣(1992—), 女, 硕士研究生, 专业: 基础兽医学。E-mail: 2220288389@qq.com
[通信作者] 张海(1971—), 男, 副教授, 研究方向: 动物模型。E-mail: hzhang@fmmu.edu.cn。
黄勇(1975—), 男, 教授, 研究方向: 病理免疫。E-mail: huangyong@nwsuaf.edu.cn。* 共同通信作者

miR-223 定位于 X 染色体 q12, 前体全长为 110 个核苷酸(nt), 成熟体位于前体茎环结构的 3' 端, 长度为 22 nt^[1]。miR-223 在髓系发育中有重要作用, 是造血系统特异性 microRNA 分子, 与粒细胞的分化有重要关系, 同时 miR-223 也可抑制红细胞分化^[2-3]。研究表明肝癌和淋巴瘤中 miR-223 的表达被抑制, 但 miR-223 在胃粘膜相关淋巴组织结外边缘区淋巴瘤和复发的宫颈癌中表达增高^[4-6]。在部分肿瘤组织中, miR-223 表达的下调与肿瘤发生和不良预后有关^[7]。最新研究表明 miR-223 也可靶向于 ATG16L1 分子抑制自噬从而促进中枢神经系统炎症的发生^[8]。

规律成簇间隔短回文重复序列 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR) 是细菌抵抗入侵噬菌体的先天性免疫防御机制, CRISPR 的转录产物 crRNA 和 tracrRNA 与 Cas9 蛋白形成复合物, 引导 Cas9 在特定序列 PAM 区上游 3~4 bp 对目的 DNA 进行切割, 从而达到免疫防御的目的。在此基础上, 研究者将 crRNA 和 tracrRNA 嵌合后形成更为方便的 short guide RNA (sgRNA), 从此利用 Cas9 和 sgRNA 可对靶基因进行剪切的原理而发展的基因编辑系统已在多个物种中实现基因敲除、基因敲入, 可广泛用于基因功能和人类疾病动物模型研究, 但这种方法只能在靶向区域产生短片段的缺失或插入突变(indel 突变)。为更好地研究 miR-223 的功能, 本研究, 根据双重 sgRNAs (dual sgRNAs) 的设计策略, 在 miR-223 序列上下游各设计了一条 sgRNA, 在 C57BL/6 小鼠中完整敲除 miR-223 分子前体和成熟区序列, 构建了 miR-223 基因完全缺失的基因工程小鼠, 克服以往单一 sgRNA 只能引起 indel 突变的弊端, 这为研究 miR-223 分子的功能提供了良好工具。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级 4~6 周龄 C57BL/6 雌鼠 30 只, 体重 15~18 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 雌鼠 20 只购自于北京维通利华公司[SCXK(陕)2014-002], 小鼠均饲养于屏障级设施[SYXK(陕)2014-001]。动物使用的伦理审批号(20171207), 在实验过程中严格贯彻 3R 原则。

1.2 主要试剂

RNA 体外转录试剂盒 (cat: AM1354) 和纯化试剂盒 (cat: AM1908) 均购自于 Thermo Fisher 公司,

DNA 凝胶回收试剂盒 (cat: DP214-02) 和总 RNA 提取试剂盒 (cat: DP419) 购自天根生物科技有限公司。PCR Mix (cat: TSE101) 由擎科生物技术有限公司提供。小鼠基因组 DNA 提取试剂盒 (cat: DE-05213) 购自成都嘉诚生物科技有限公司。Cas9 mRNA (cat: Cas9-102) 和 Cas9-NLS (cat: M0646T) 蛋白分别购自百奥迈科生物技术有限公司和 NEB 公司。pX330 质粒由本中心保存。

1.3 实验方法

1.3.1 双重 sgRNAs 设计和转录

分别将小鼠 miR-223 分子前体基因上、下游各 200 bp 序列放入 <http://crispr.mit.edu> 网站进行分析, 根据分析结果在上、下游序列中各选取 1 条得分较高的 20 bp 寡核苷酸作为 sgRNA 靶向序列, 上游 sgRNA 序列为 mir223-TS1 (下划线为 sgRNA 靶向序列): tTAATACGACTCACTATAggCATGCTGGAAGATGTGCAACGTTTTAGAGCTAGAAATAGC; 下游 sgRNA 序列为 mir223-TS2 (下划线为 sgRNA 靶向序列): tTAATACGACTCACTATAggTATGTGCTCTGTCTCTGGA CCGTTTTAGAGC TAGAAATAGC。sgRNA 反向引物序列为: AGCACCGACTCGGTGCCACT。上述序列由擎科生物技术有限公司合成后, 以 pX330 为模板进行 PCR 扩增, 扩增产物纯化后以 MEGAshortscript™ T7 转录试剂盒体外转录, 转录产物纯化后定量, -80℃ 保存备用。

1.3.2 sgRNA 体外切割效率

取正常小鼠鼠尾组织, 加入消化液后 65℃ 作用 30 min 提取小鼠基因组 DNA, 具体提取过程按试剂盒说明书进行。以基因组 DNA 为模板, 通过 miR223-seq-F: GGCCACCAGAATCTCCAGAC, miR223-seq-R: GCAGTCCATGGCATTTCACA 上、下游引物进行 PCR 反应扩增底物 DNA。纯化后, 500 ng 的底物 DNA 中分别加入 mir223-TS1、mir223-TS2 sgRNA 转录产物和 Cas9-NLS 蛋白, 37℃ 作用 30 min, 具体反应体系见表 1。然后加入浓度为 20 mg/mL 蛋白酶 K 1 μL, 37℃ 作用 15 min, 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.3.3 显微注射及受精卵细胞移植

4~6 周龄的雌性 C57BL/6 小鼠超数排卵后收集受精卵细胞。Cas9 和 sgRNA 转录产物按 2:1 比例混合, 稀释后使其终浓度含 100 ng/μL 的 Cas9 和 50 ng/μL 的 sgRNA。将上述 RNA 混合物注射到受精卵细胞胞质中。注射后的受精卵细胞 37℃ 培养 24 h 后移植到假孕的 ICR 母鼠输卵管壶腹部。

表 1 sgRNA 体外切割效率检测

加入成分 Added components	反应体系 Reaction system
10× Cas9 nuclease reaction buffer	2 μL
sgRNA (100 ng/μL)	2 μL
Cas9 NLS (1 mol/L)	2 μL
去核酸酶水	12 μL
底物 DNA (500 ng)	2 μL

1.3.4 敲除小鼠基因型鉴定

取出生 1 周左右新生小鼠尾组织,同上法提取小鼠基因组 DNA。小鼠基因组 DNA 定量后,取 100 ng DNA 作为模板,以 miR223-seq-F 和 miR223-seq-R 为上、下游引物进行 PCR 反应。PCR 反应条件为 98℃ 预变性 3 min,98℃ 10 s, 60℃ 10 s,72℃ 20 s, 72℃ 3 min,共 30 个循环。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定正确后送擎科生物技术有限公司测序,测序结果以 SnapGene 软件进行分析。

1.3.5 Real time PCR 鉴定 miR-223 在敲除小鼠体内的表达

颈椎脱臼法处死小鼠,取肝脏组织匀浆后提取总 RNA,RNA 提取按参考文献进行^[9]。分别建立 miR-233-3p、miR-223-5p 及相对应的 RNU6B 内参 Real time PCR 检测体系,基因定量采用 2^{-ΔΔCT} 方法。反转录及 Real time PCR 引物如表 2 所示。

2 结果

2.1 双重 sgRNAs 转录

根据双重 sgRNAs 的设计策略,将 miR-223 前体基因上下游各 200 bp 序列分析后在其上游 50 bp、下游 30 bp 处各得到一条活性较高,脱靶较低的 sgRNA (TS1、TS2),用此策略打靶可将 miR-223 茎环区序列完全删除,包括其 5P 和 3P 基因(图 1A)。分别以 miR223-TS1、miR223-TS2 和 sgRNA 反向引物进行 PCR 扩增,获得两条大小约为 120 bp 的扩增产物,扩增产物纯化后在 T7 启动子介导下进行

体外转录反应,转录产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定后大小约为 120 bp(图 1B),紫外分光光度计检测后 OD260/280 = 1.81,OD260/230 = 2.3。体外切割实验表明 miR223-TS1、miR223-TS2sgRNA 转录产物具有较强的活性,可介导 Cas9 蛋白对靶向序列进行切割(图 1C)。

2.2 miR-223 敲除小鼠基因型鉴定

剪取出生 1 周左右 F0 代首建鼠尾组织,提取基因组 DNA 后进行 PCR 反应后发现, #3 号和#15 号小鼠扩增出两条带,一条带与野生型小鼠大小一致,另一条带明显小于野生型小鼠;而#9 号和#11 号小鼠只扩增出小于野生型小鼠的单一条带(图 2A),表明#3 号、#9 号、#11 号和#15 号小鼠可能在靶向区域发生突变。PCR 产物测序后发现#3 号和#15 号小鼠只在靠近 TS1 区发生 6 bp 的缺失,未对 miR-223 序列产生影响,而#9 号和#11 号小鼠在 TS1 区后分别发生了 162 bp 和 168 bp 的纯合缺失突变(图 2B),导致 miR-223 前体和成熟区序列删除。

2.3 miR-223 在敲除小鼠体内表达

#9 号和#11 号小鼠肝组织提取 RNA 后以 miR-223-5P 和 3P 特异性引物进行 Real time PCR 后发现,与野生型相比,两只小鼠肝组织中几乎不能检测到 miR-223 的表达(图 3),结合小鼠基因组测序结果,表明#9 号和#11 号不仅完整敲除 miR-223 基因序列,而且导致 miR-223 表达完全抑制。

3 讨论

常规 CRISPR/Cas9 基因编辑系统只需在靶向区域设计一条 sgRNA 即可实现基因打靶,这样形成小片段的 indel 突变尽管也可导致目的基因读码框改变,从而导致基因表型的失活,但这种方法造成的 indel 突变片段一般不会超过 100 bp^[10],这严重阻碍 CRSIPR/Cas9 技术的应用。miRNA 是一类由内源基因编码的非编码单链 RNA 分子,参与基因转

表 2 反转录及 real-time PCR 引物
Table 2 Primers for reverse transcription and real-time PCR

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence
miR223-5p RT primer	GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCCACCAGAGCCAACcaactca
miR223-5p FW	cggcCGTGTATTTGACAAGCT
miR223-3p RT primer	GTTGGCTCTGCTGCAGGCTCCGAGGTATTTCGCCACCAGAGCCAACtgggggt
miR223-3p FW	CTGTGTCAGTTTGCAAAAT
Reverse prime	GTGCAGGCTCCGAGGT
RNU6B RT primer	GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCCACCAGAGCCAACaaaaatat
RNU6B FW	TTCTCCGCAAGGATGACACGC

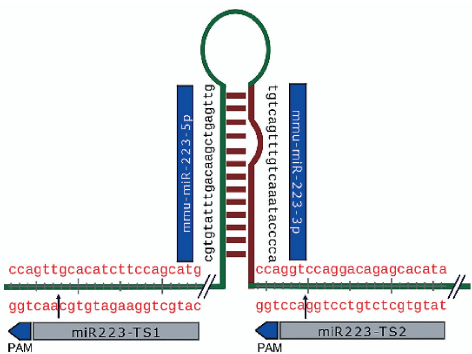


图 1A 双重 sgRNAs 设计策略图

Figure 1A Diagram of the dual sgRNAs

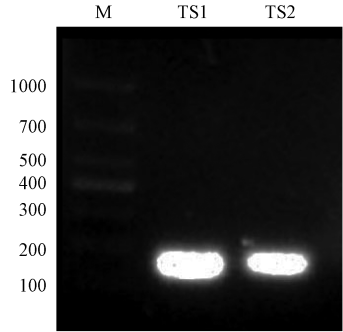
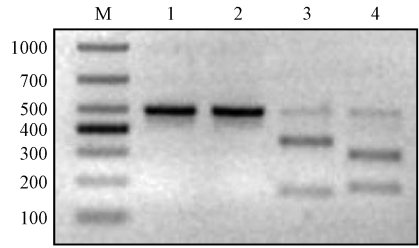


图 1B 1%琼脂糖凝胶电泳鉴定 sgRNAs 转录产物

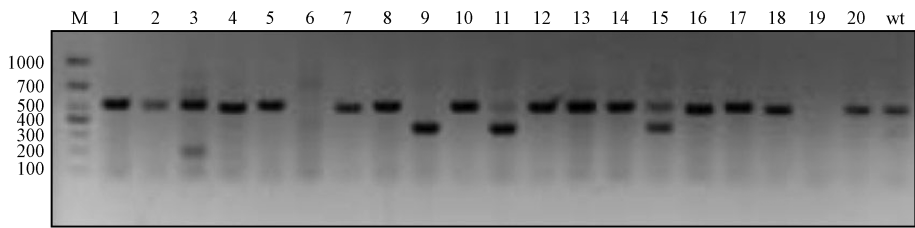
Figure 1B Identification of the sgRNAs transcripts by 1% agarose gel electrophoresis



注: M. DL1000 marker; 1. 底物 DNA; 2. 底物 DNA+Cas9-NLS; 3. 底物 DNA+Cas9-NLS + miR223-TS1; 4. 底物 DNA + Cas9-NLS + miR223-TS2。

图 1C sgRNA 体外切割效率检测
Note. M: DL1000 marker. 1: Substrate DNA. 2: Substrate DNA + Cas9-NLS. 3: Substrate DNA + Cas9-NLS + miR223-TS1. 4: Substrate DNA + Cas9-NLS + miR223-TS2.

Figure 1C sgRNA in vitro cleavage efficiency assay



注: M: DL1000 marker; 1~20: 小鼠编号; wt: 野生型小鼠。

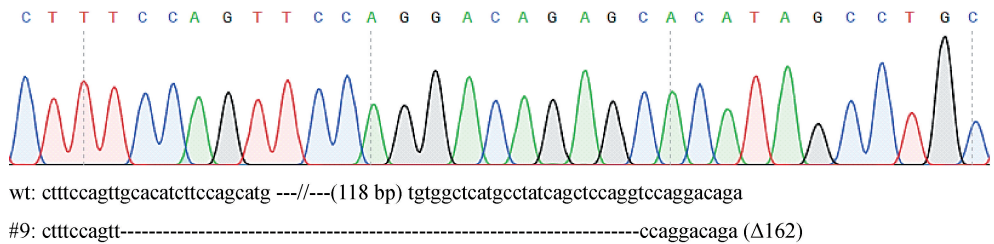
图 2A 1%琼脂糖凝胶电泳鉴定小鼠基因型

Note. M: DL1000 marker. 1~20: Serial numbers of the mice. wt: wild type mice.

Figure 2A Identification of mouse genotypes by 1% agarose gel electrophoresis

#9号小鼠测序结果

sequencing results of the #9 mouse



#11号小鼠测序结果

Sequencing results of the #11 mouse

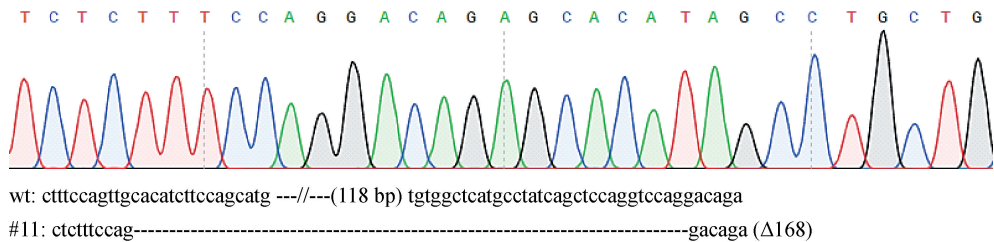
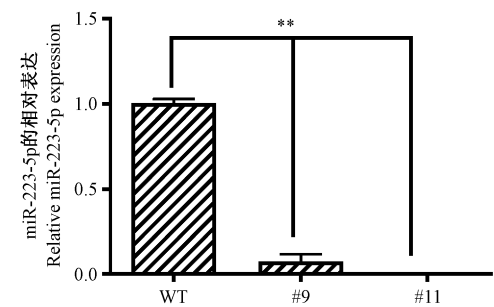


图 2B #9 和#11 号小鼠突变区测序结果

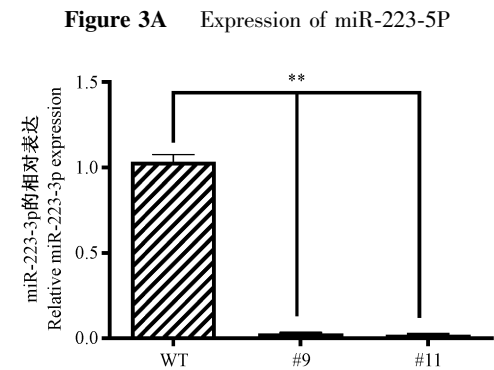
Figure 2B Sequencing results of the mutation regions of #9 and #11 mice



注:与野生型小鼠比较, ** $P < 0.01$ 。

图 3A miR-223-5P 表达水平

Note. Compared with the wild type mice, ** $P < 0.01$.



注:与野生型小鼠比较, ** $P < 0.01$ 。

图 3B miR-223-3P 表达水平

Note. Compared with the wild type mice, ** $P < 0.01$.

Figure 3B Expression of miR-223-3P

录后表达调控。miRNA 存在多种形式,最原始的是 pri-miRNA,长度大约为 300~1000 nt, pri-miRNA 经过一次加工后,成为 pre-miRNA 即 microRNA 前体,长度大约为 70~90 nt; pre-miRNA 再经过 Dicer 酶酶切后,成为长约 20~24 nt 的成熟 miRNA。在前期的研究中,研究人员设计一条 sgRNA,利用 CRISPR/Cas9 技术敲除 C57BL/6 小鼠 pre-miR29b1 分子 3' 和成熟体 5' 部分基因^[11],小鼠饲喂酒精后未诱导出文献报道的酒精肝肝纤维化模型,推测原因可能与 miR-29b1 基因未完全敲除有关,残留的前体和成熟体基因仍可能保留原有生物学活性,从而影响敲除 miR-29b1 基因后功能的发挥。因此在 miR 分子的研究中有必要将其全部基因进行敲除,以最大程度消除残留基因的影响。

与常规 sgRNA 不同,双重 sgRNAs 是在靶向区域上下游各设计一条 sgRNA,在双重 sgRNAs 的引导下,Cas9 在两条 sgRNA 之间序列进行有目的切割,根据双重 sgRNAs 距离的远近从而实现不同长度片段的敲除。在本研究中利用双重 sgRNAs 的策略,在 miR-223 的前体基因上、下游处各设计了一条

sgRNA,miR-223 特异性双重 sgRNAs 与 Cas9 mRNA 共同显微注射后,将 miR-223 基因前体和成熟体基因完全删除,在目的区域造成 162 bp 和 168 bp 缺失。此外随机选取 20 个 sgRNAs 靶序列潜在的脱靶位点,PCR 扩增后测序结果表明未发生脱靶效应。因此双重 sgRNAs 是一种简便、有效实现较大片段基因突变的方法,而这为研究 miR-223 功能提供重要的研究工具。

参考文献:

[1] Fukao T, Fukuda Y, Kiga K, et al. An evolutionarily conserved mechanism for microRNA-223 expression revealed by microRNA gene profiling [J]. Cell, 2007, 129(3) : 617-631.

[2] Sun W, Shen W, Yang S, et al. miR-223 and miR-142 attenuate hematopoietic cell proliferation, and miR-223 positively regulates miR-142 through LMO2 isoforms and CEBP- β [J]. Cell Res, 2010, 20(10) : 1158-1169.

[3] Yuan JY, Wang F, Yu J, et al. MicroRNA-223 reversibly regulates erythroid and megakaryocytic differentiation of K562 cells [J]. J Cell Mol Med, 2009, 13(11-12) : 4551-4559.

[4] Wong QW, Lung RW, Law PT, et al. MicroRNA-223 is commonly repressed in hepatocellular carcinoma and potentiates expression of Stathmin1 [J]. Gastroenterology, 2008, 135(1) : 257-269.

[5] Eyholzer M, Schmid S, Schardt Ja, et al. Complexity of miR-223 regulation by CEBPA in human AML [J]. Leuk Res, 2010, 34(5) : 672-676.

[6] Liu TY, Chen SU, Kuo SH, et al. E2A-positive gastric MALT lymphoma has weaker plasmacytoid infiltrates and stronger expression of the memory B-cell-associated miR-223: possible correlation with stage and treatment response [J]. Mod Pathol, 2010, 23(11) : 1507-1517.

[7] Stamatoopoulos B, Meuleman N, Haibe-Kains B, et al. microRNA-29c and microRNA-223 down-regulation has in vivo significance in chronic lymphocytic leukemia and improves disease risk stratification [J]. Blood, 2009, 113(21) : 5237-5245.

[8] Li Y, Zhou D, Ren Y, et al. Mir223 restrains autophagy and promotes CNS inflammation by targeting ATG16L1 [J]. Autophagy, 2018, 15(3) : 478-492.

[9] 田胜男,苏静芬,向志光,等. 两种核酸提取方法对小鼠诺如病毒 RNA 提取效能的比较 [J]. 中国比较医学杂志, 2013, 23(9) : 57-60.

[10] Chen X, Xu F, Zhu C, et al. Dual sgRNA-directed gene knockout using CRISPR/Cas9 technology in Caenorhabditis elegans [J]. Sci Rep, 2014, 4: 7581.

[11] 赵勇,师长宏,赵亚,等. 利用 CRISPR/Cas9 技术构建 miRNA-29b1 基因敲除小鼠 [J]. 中国比较医学杂志, 2016(12) : 1-4.