

张雨,郭中坤,付彬,等. 利用 CRISPR/Cas9 技术构建 *Bpi* 基因敲除小鼠 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(6): 39-46.  
Zhang Y, Guo ZK, Fu B, et al. Construction of *Bpi* gene-knockout mice using CRISPR/Cas9 [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(6): 39-46.  
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2020.06.006

# 利用 CRISPR/Cas9 技术构建 *Bpi* 基因敲除小鼠

张雨<sup>1,2</sup>, 郭中坤<sup>1,2</sup>, 付彬<sup>2</sup>, 雷战<sup>2</sup>, 聂爱蕊<sup>1</sup>, 庄峰锋<sup>2</sup>, 王可洲<sup>1,2\*</sup>

(1. 济南大学/山东省医学科学院 医学与生命科学学院, 济南 250200; 2. 山东省实验动物中心, 山东第一医科大学 (山东省医学科学院), 济南 250002)

**【摘要】** 目的 利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术高效构建 *Bpi* 基因敲除的小鼠模型, 并继续繁殖、鉴定及建立稳定遗传的 *Bpi* 基因敲除小鼠品系。方法 针对 C57BL/6 小鼠 *Bpi* 基因的第 2~3 外显子两端设计敲除靶点, 筛选高活性 gRNA (guide RNA) 靶点, 体外转录得到 sgRNA (small guide RNA) 并与 Cas9 mRNA 一起显微注射到 C57BL/6 小鼠的受精卵内, 经胚胎移植至代孕母鼠体内, 获得 F0 代小鼠后, 通过基因型鉴定和 DNA 测序获得基因突变的阳性子代鼠。结果 筛选到高活性 gRNA 靶点并成功获得体外转录产物 sgRNA; 与 Cas9 mRNA 一起通过显微注射的方式获得了 64 枚状态良好的受精卵并成功移植到 2 只代孕母鼠体内; 获得了 22 只 F0 代小鼠, 经 PCR 鉴定和 DNA 测序后选择一只单链缺失 708 bp 碱基的阳性小鼠进行扩繁, 并在 F1、F2 代检测到该突变, 且 F2 代成功繁育出纯合子小鼠。结论 成功构建 *Bpi* 基因敲除小鼠模型, 为进一步研究 *Bpi* 基因及其表达产物的生物学功能奠定了基础。

**【关键词】** *Bpi*; 基因敲除小鼠; CRISPR/Cas9 技术; 基因型鉴定

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2020)06-0039-08

## Construction of *Bpi* gene-knockout mice using CRISPR/Cas9

ZHANG Yu<sup>1,2</sup>, GUO Zhongkun<sup>1,2</sup>, FU Bin<sup>2</sup>, LEI Zhan<sup>2</sup>, NIE Airui<sup>1</sup>, ZHUANG Fengfeng<sup>2</sup>, WANG Kezhou<sup>1,2\*</sup>

(1. School of Medicine and Life Science, University of Jinan & Shandong Academy of Medical Science, Jinan 250200, China.  
2. Shandong Laboratory Animal Center, Shandong First Medical University & Shandong Academy of Medical Sciences, Jinan 250002)

**【Abstract】 Objective** To use CRISPR/Cas9 gene editing technology to efficiently construct *Bpi* gene-knockout mouse models and continue to breed, identify and establish stable genetic *Bpi* gene-knockout mouse strains. **Methods** Knockout targets were designed at the two ends of exons 2-3 of the *Bpi* gene in C57BL/6 mice, and high activity guide RNA (gRNA) targets were selected. The small guide RNA (sgRNA) was transcribed in vitro and microinjected into fertilized eggs of C57BL/6 mice together with Cas9 mRNA. F0 mice were obtained after embryo transfer into the surrogate mice. Positive mice with gene mutation was confirmed via genotype identification and DNA sequencing. **Results** Microinjection with Cas9 mRNA yielded highly active sgRNA and 64 fertilized eggs in good condition, which were successfully transplanted into 2 surrogate mice, yielding 22 F0 mice. After PCR identification and DNA sequencing, a mouse that was positive for a 708 bp single-strand deletion was selected to be propagated. The deletion was detected in the F1 and F2 generations, and homozygous mice were obtained in the F2 generation. **Conclusions** *Bpi*-knockout mouse models were successfully constructed, laying a foundation for further study of the biological functions of the *Bpi* gene and its expression products.

**【Keywords】** *Bpi*; knockout mice; CRISPR/Cas9 technology; genotyping

**【基金项目】** 山东省医学科学院医药卫生科技创新工程、国家重点研发计划 (2017YFD050160202); 山东省自然科学基金 (ZR2015YL036); 山东省自然科学基金 (ZR2016CP18)。

**【作者简介】** 张雨 (1996—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 抗炎免疫药理学。E-mail: yu15611408036@163.com

**【通信作者】** 王可洲 (1974—), 男, 副研究员, 硕士生导师, 从事药理毒理学研究。E-mail: wangkezhou\_cn@163.com

杀菌/通透性增加蛋白 (bactericidal/permeability-increasing protein, *Bpi*), 最早在 1978 年由英国科学家 Weiss 等<sup>[1]</sup>在人中性粒细胞中分离纯化而得到, 存在于人、牛、猪等哺乳动物嗜中性粒细胞中。成熟的 *Bpi* 是由 456 个氨基酸残基组成的一种阳离子抗菌蛋白, 由氨基端、羧基端和富含脯氨酸的 21 个氨基酸残基形成的中间连接单位三部分组成, 相对分子质量为  $55 \times 10^3$ 。其经胰蛋白酶水解, 可裂解为  $30 \times 10^3$  的氨基部分和  $20 \times 10^3$  的羧基部分<sup>[2]</sup>。这两个部分在杀菌过程中所承担的角色也不相同<sup>[3]</sup>: 氨基部分主要起杀菌作用, 而羧基部分起调理素的作用, 可促使吞噬细胞吞噬入侵的细菌。研究发现, *Bpi* 兼具有广谱杀伤革兰氏阴性菌和中和内毒素的作用<sup>[4]</sup>, 其主要生物学功能为协助嗜中性粒细胞抑制细菌生长, 发挥抗感染免疫保护作用<sup>[5]</sup>。

CRISPR/Cas9 系统是近年来兴起的一种新型基因编辑技术。它是一种原核生物免疫系统, 被用来抵抗噬菌体病毒和外源质粒等外来遗传物质的入侵<sup>[6]</sup>。它能够识别并切断外源 DNA<sup>[7]</sup>, 正是由于如此精确的靶向功能, 使得外源基因的表达被沉默。CRISPR/Cas9 系统在基因编辑过程中主要依赖于 sgRNA 和靶序列 DNA 的互补配对<sup>[8]</sup>。因此, 只需要根据目标基因靶点识别的前间区序列邻近基序 (protospacer adjacent motif, PAM) 设计一段 20~24 bp 的引物序列 sgRNA, 识别并结合到基因序列上, Cas9 核酸内切酶就会在靶序列位置切割基因序列, 从而会引起自身修复系统对 DNA 进行修复<sup>[9]</sup>, 如同源重组修复机制 (homology directed repair, HDR) 或非同源末端连接修复机制 (non-homologous end joining, NHEJ), 最终使基因组 DNA 缺失、插入或发生移码突变<sup>[10]</sup>, 从而对目的基因进行有效的敲除、敲入或修饰等, 完成基因编辑。通过编辑小鼠受精卵细胞的基因<sup>[11]</sup>, 并引入代孕母鼠体内, 从而实现基因编辑小鼠模型的构建。2013 年初, 已有实验组<sup>[12]</sup>将 CRISPR/Cas9 技术成功地运用在小鼠和人细胞中并实现了精确的基因编码, 随之而来的便是 CRISPR/Cas9 技术的迅速发展, 其在基因编辑领域发挥着巨大的发展潜力。

本研究利用 CRISPR/Cas9 技术剪切 *Bpi* 蛋白的基因编码区, 小鼠受精卵细胞通过 NHEJ 的 DNA 修复, 在蛋白编码区产生片段删除, 使得 *Bpi* 蛋白失活, 从而实现 *Bpi* 基因敲除的目的。成功构建的

*Bpi* 基因敲除小鼠为后续研究其基因生物学功能及其机制提供了动物模型。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

SPF 级 C57BL/6 雌鼠 30 只, 体重 14~15 g, 4 周龄; SPF 级 C57BL/6 雄鼠 15 只, 体重 20~21 g, 8~12 周龄; SPF 级 ICR 结扎雄鼠 15 只, 体重 26~28 g, 8~12 周龄; SPF 级 ICR 雌鼠 15 只, 体重 30~32 g, 8~12 周龄, 均购自北京唯尚立德生物科技有限公司 [SCXK(京)2016-0009]。本研究实验动物先后在北京唯尚立德生物科技有限公司 [SYXK(京)2016-0039] 和山东省实验动物中心 [SYXK(鲁)2019-0007] IVC 笼具内饲养。经山东省实验动物中心审批 (20181224-01), 并严格遵循实验动物使用的 3R 原则。

### 1.2 主要试剂与仪器

金牌 mix (green) (北京擎科生物科技有限公司, LOT: TSE101); 引物序列合成 (上海生工生物工程股份有限公司合成, LOT: 240038139); 动物组织/细胞基因组 DNA 提取试剂盒 (北京君诺德生物技术有限公司, LOT: 0180331AX); Cas9 mRNA、Cas9/gRNA 靶点效率检测试剂盒 (北京唯尚立德生物科技有限公司, LOT: VK007); 注射用人绒毛膜促性腺激素 (hCG) (宁波第二激素厂, LOT: 181223); 注射用血促性素 (PMSG) (宁波第二激素厂, LOT: 1905152); OTOPO 零背景 PCR 平末端克隆试剂盒 (北京华恒健生物科技有限公司, LOT: HHK826); HiScribe T7 ARCA mRNA 试剂盒 (NEB 公司, LOT: E2065S)。

体视显微镜 (Nikon SMZ745T, 日本); 显微注射用显微镜 (Nikon ECLIPSE Ts2, 日本); 拉针仪 (NARISHIGE PN-31, 日本); PCR 扩增仪 (Eppendorf Mastercycler 50x, 德国); 高速冷冻离心机 (Eppendorf 5424R, 德国); 水平电泳仪 (北京君意 JY600C, 中国); 凝胶成像系统 (UVP EC3Chemi, 美国) 等。

### 1.3 实验方法

1.3.1 根据 *Bpi* 序列结构, 分析 CRISPR/gRNA 靶点设计位置

通过 NCBI 和 Ensembl 网站查询当前 *Bpi* 基因数据 (NCBI: Gene ID: 329547, Ensembl, Gene: *Bpi* ENSMUSG00000052922), 对其转录产物及其保守区域进行分析, 以设计 CRISPR/gRNA 靶点设计位置。

### 1.3.2 sgRNA 和 Cas9 mRNA 的体外转录与靶点活性检测

使用北京唯尚立德 Cas9/gRNA 靶点效率检测试剂盒将设计的 gRNA 靶点体外转录成 sgRNA 并检测转录产物活性,检测原理及具体方法参见唯尚立德 VK007 试剂盒说明书。同时进行 Cas9 mRNA 的体外转录用于后续的显微注射,具体方法参见 NEB-E2065S 试剂盒说明书。

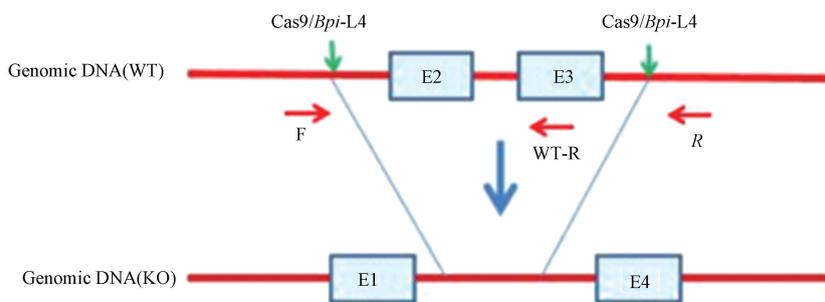
### 1.3.3 小鼠超数排卵、受精卵注射以及胚胎移植

向预先准备好的 4 周龄左右的 C57BL/6 雌鼠腹腔注射血促性素和人绒毛膜促性腺激素,每只注射剂量约为 5 U,两次注射间隔 48 h。在给药 18 h 后,将注射激素后的 C57BL/6 雌鼠以及 1 只 8~12 周龄 C57BL/6 雄鼠处死,分别取出雌鼠的输卵管膨大部以及雄鼠的附睾,在体视显微镜下分别收集卵子和精子。使精子在获能液中获能,取液体边缘的

精子滴加到短暂培养的卵细胞中,体外受精 3~4 h。将体外转录成功的 sgRNA 与 Cas9 mRNA 分别用无 RNA 酶水稀释到 25 ng/ $\mu$ L 和 50 ng/ $\mu$ L,通过显微注射的方式导入到小鼠受精卵细胞质中,将存活的状态良好的受精卵移植到与结扎雄鼠合笼后见栓的 ICR 雌鼠输卵管膨大部,缝合,将代孕雌鼠饲养于 IVC 环境。

### 1.3.4 F0 代小鼠的基因型鉴定和 DNA 测序

F0 代鼠出生后约一周龄剪取小鼠脚趾并编号,使用动物组织/细胞基因组 DNA 提取试剂盒提取小鼠 DNA。根据被敲除的序列位置设计鉴定用 PCR 扩增引物,基因敲除示意图及引物信息分别如图 1、表 1 所示,PCR 扩增体系及反应程序如表 2 所示。对 PCR 扩增产物进行 T-A 克隆(具体方法参见华恒建 HHK826 试剂盒说明书),并进行 DNA 测序。



注: E2/E3 分别代表外显子 2/外显子 3;绿色箭头分别表示 gRNA 靶点 *Bpi-L4* 和 *Bpi-R4* 切割位置。

图 1 *Bpi* 基因敲除示意图

Note. E2/E3 represent exon 2/exon 3, respectively. The green arrows indicate the cutting positions of the gRNA targets *Bpi-L4* and *Bpi-R4*, respectively.

Figure 1 *Bpi* gene knockout diagram

表 1 引物名称及其序列

Table 1 Primer name and sequence

引物设计 Primer design	引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence	PCR 产物大小 PCR product length
突变型鉴定 Identification of mutants	F	GCTCTCTGCTTCTGCGTCC	KO: 550 bp WT: 1258 bp
	R	GGCAGGGGACAGGAATGT	
野生型鉴定 Identification of wild type	F	GCTCTCTGCTTCTGCGTCC	WT: 688 bp
	WT-R	CATCTCGATCTTGGGATTAGG	

表 2 PCR 扩增体系及反应程序

Table 2 PCR amplification system and reaction procedure

组分 Component	用量 Consumption	温度 Temperature	时间 Time	循环数 Cycle numbers
TSE101mix	10 $\mu$ L	98 $^{\circ}$ C	3 min	35 Cycles
Forward primer	0.5 $\mu$ L	98 $^{\circ}$ C	30 s	
Reverse primer	0.5 $\mu$ L	60 $^{\circ}$ C	30 s	
DNA	1 $\mu$ L	72 $^{\circ}$ C	30 s	
		72 $^{\circ}$ C	5 min	
Total	12 $\mu$ L	4 $^{\circ}$ C	hold	

### 1.3.5 F0 代小鼠的饲养与扩繁

经过对 F0 代小鼠的基因型鉴定及 DNA 测序,筛选出成功发生基因突变的阳性首建鼠与 C57BL/6 野生型小鼠进行交配,待 F1 代小鼠出生后,再次利用上述鉴定方法对敲除情况进行鉴定,筛选出敲除情况相同且性别不同的 F1 代小鼠进行近交,F2 代小鼠继续进行基因型鉴定,以建立稳定遗传 *Bpi* 基因型敲除小鼠品系。

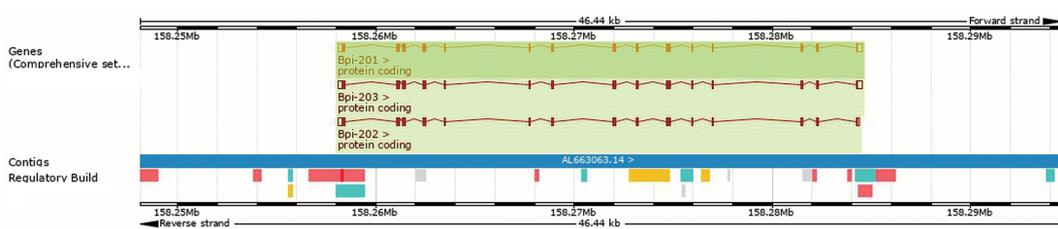
## 2 结果

### 2.1 CRISPR/gRNA 靶点设计

查询 *Bpi* 基因组数据得,该基因存在 3 个转录

产物,且对 *Bpi* 基因的蛋白功能保守区域进行分析,如图 2、图 3 所示。根据 *Bpi* 基因组结构和蛋白功能保守区,选取 *Bpi*-201 进行设计,其中外显子 2 和外显子 3(44~125 aa)为公共外显子,蛋白编码区的碱基数为 244 bp 是非 3 的倍数,在保守功能区 *Bpi* superfamily 的 N 端。在删除外显子 2~3 后 mRNA 重新剪拼形成新的 mRNA,其编码的蛋白将会发生移码突变,使蛋白失活。因此决定在外显子 2 和外显子 3 的两端设计靶点,如图 4 所示。

根据 *Bpi* 基因组结构和蛋白功能保守区,设计了如下 gRNA 靶点,如表 3 所示:

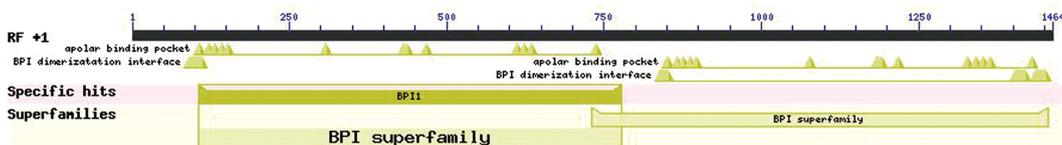


注:3 种转录途径(*Bpi*-201、202、203)编码蛋白长度分别为 486 aa、483 aa、482 aa,差异区域位于第 9~10 个外显子(Ensembl, Gene, *Bpi* ENSMUSG00000052922)。

图 2 *Bpi* 基因的 3 种转录途径

Note. The length of three transcription pathways (*Bpi*-201, 202, 203) is 486 aa, 483 aa, 482 aa, respectively, the difference region is located in exon 9~10 (Ensembl, Gene, *Bpi* ENSMUSG00000052922).

Figure 2 Three transcripts of *Bpi* gene



注:第 2~3 外显子(130~373 bp)位于保守区域 BPI superfamily(106~777 bp)的 N 端。

图 3 *Bpi* 基因的保守区域

Note: Exon 2~3 (130~373 bp) is located in the N-terminal of the conservative BPI superfamily (106~777 bp).

Figure 3 Conservative domain of *Bpi* gene



注:绿色箭头表示 gRNA 靶点切割位置。

图 4 转录产物 *Bpi*-201 的基因组结构

Note. The green arrows indicate the cutting positions of gRNA targets.

Figure 4 Genome structure of transcription product *Bpi*-201

## 2.2 高活性 Cas9/gRNA 敲除靶点筛选

使用 Cas9/gRNA 靶点效率检测试剂盒检测以上设计的 gRNA 靶点活性, Cas9/gRNA 体外酶切结果及 gRNA 靶点活性数据分析如图 5 所示。靶点活性评价标准详见唯尚立德 VK007 试剂盒说明书。根据体外酶切结果分析得出:除 *Bpi-L5*、*Bpi-R1*、*Bpi-R2*、*Bpi-R3* 外, gRNA 靶点的活性均在 85% 以上。我们选择 *Bpi-L4*、*Bpi-R4* 一对 gRNA 靶点进行体外转录用于小鼠受精卵的注射。

## 2.3 F0 代小鼠的鉴定及子代繁育

显微注射后, 收获了 64 枚受精卵, 将这些卵移植至 2 只见栓代孕 ICR 雌鼠的两侧输卵管膨大部。待其生产后, 共获得 F0 代仔鼠 22 只, 对其进行基因型鉴定和 DNA 测序后, 选取一只单链缺失 708 bp 碱基的阳性首建鼠 3 号雄鼠, 其 PCR 鉴定结果及 T-A 克隆测序峰图如图 6 所示。将 3 号杂合子阳性首建鼠与 C57BL/6 野生型小鼠进行交配, 所得 8 只 F1 代仔鼠基因型 PCR 鉴定结果如图 7 所示, 突变型小鼠电泳结果在 550 bp 位置出现清晰条带, 且测序结果分析得出同样碱基缺失 708 bp, 证明该缺失可被稳定遗传(在 F 和 R 一对引物用于杂合子小鼠的鉴定过程中, 由于 PCR 条件的原因出现 1258 bp 野生型条带的情况是偶然性的, 说明 F 和 R 这对引物不适合用于杂合子小鼠的野生型鉴定, 故单独设计 WT-R 用来做野生型鉴定)。F1 代杂合子小鼠间进行近交。出生的 11 只 F2 代小鼠中, 有 4 只小鼠出现清晰突变型条带, 并且未出现野生型条带, 且 PCR 扩增产物测序结果表明同样碱基缺失 708 bp, 证明成功获得 F2 代 *Bpi* 基因敲除纯合子小鼠, 基因型 PCR 鉴定结果如图 8 所示, F1 代和 F2 代小鼠基

因型总数统计结果如表 4 所示。

## 3 讨论

### 3.1 *Bpi* 基因敲除小鼠遗传稳定品系的建立

本研究利用 Cas9 技术最终获得 22 只 F0 代小鼠。通过基因型鉴定及 DNA 测序的方式进行筛选, 最终获得 5 只基因片段删除的 F0 代阳性首建鼠。为了确保产生的基因突变能够稳定遗传, 将 F0 代小鼠与同品系同背景的野生型小鼠进行交配, 选择其中稳定产生基因突变的后代进行下一步的繁育。该实验为了获得尽可能多的 *Bpi* 基因敲除小鼠用于下一步的实验研究, 将性成熟的 F1 代阳性鼠之间进行近交, 获得 F2 代小鼠, 其中包括 4 只 *Bpi* 基因敲除纯合子小鼠。将 F2 代阳性小鼠之间雌鼠与雄鼠 1:2 合笼, 经过一段时间的饲养、繁殖与鉴定, 目前已获得了一定数量的 *Bpi* 基因敲除小鼠。这为深入研究 *Bpi* 基因的相关生物学功能及其机制提供了良好的实验模型, 对整体实验研究的开展具有重要的意义。

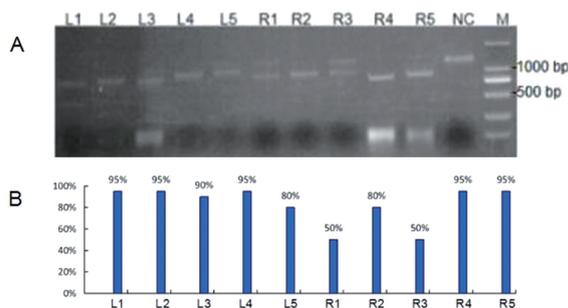
### 3.2 CRISPR/Cas9 技术基因敲除小鼠的脱靶风险

在现代医药生物领域中, 借助 CRISPR/Cas9 基因编辑技术, 构建基因敲除小鼠模型的试验研究有很多, 其作为一种新型的基因编辑工具, 相较于传统基因编辑技术具有操作便捷、低成本、高效率等优点。然而, 此系统存在的潜在脱靶风险仍需要谨慎对待。多项研究认为, sgRNA 序列、PAM 序列以及 Cas9 均为引起脱靶效应的可能性因素<sup>[13]</sup>, 且有研究发现, 通过增强 sgRNA 的特异性、控制 Cas9-sgRNA 的用量、优化 Cas9 核酸酶或选择合适的 Cas9 递送载体等方法可以不同程度地降低脱靶效应。

表 3 gRNA 靶点名称及序列

Table 3 Name and sequence of gRNA target

靶点名称 Target name	靶点序列(5'-3', 标灰为 PAM 序列) Target sequence (5'-3', The gray part is PAM sequence)
<i>Bpi-L1</i>	GAAGCTCAGCTCACAAAGCAGGG
<i>Bpi-L2</i>	CTGGCTGTCTGAAGATGCAGG
<i>Bpi-L3</i>	GGAGTGGCATAACAGGATGGGG
<i>Bpi-L4</i>	TCTTTATCTCTGTGCATCGG
<i>Bpi-L5</i>	TGTTACACAGAGCAGTGCTGGG
<i>Bpi-R1</i>	CTCATGCCGAAGGGTTGCTGG
<i>Bpi-R2</i>	CGAGAGTGGTGCCTCCAGGG
<i>Bpi-R3</i>	GGACTTTCCACCACCCTGGG
<i>Bpi-R4</i>	AGAGACATGTGTCAACAGG
<i>Bpi-R5</i>	TGTCACAACAGGGTTTCTGGG

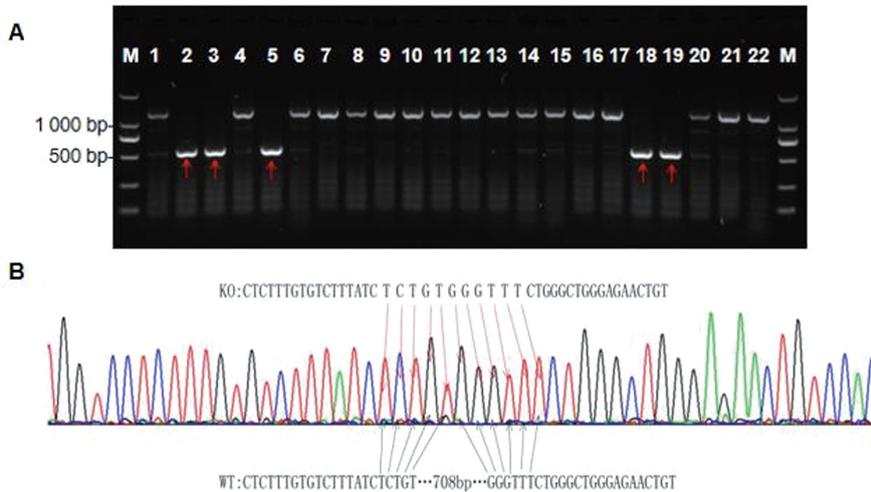


注: A: Cas9/gRNA 体外酶切结果 (NC 为阴性对照); B: gRNA 靶点活性数据分析。

图 5 Cas9/gRNA 靶点活性检测结果

Note. A, Results of Cas9/gRNA enzyme digestion *in vitro* (NC is negative control). B, Analysis of activity data of gRNA target.

Figure 5 Detection results of Cas9 / gRNA target activity

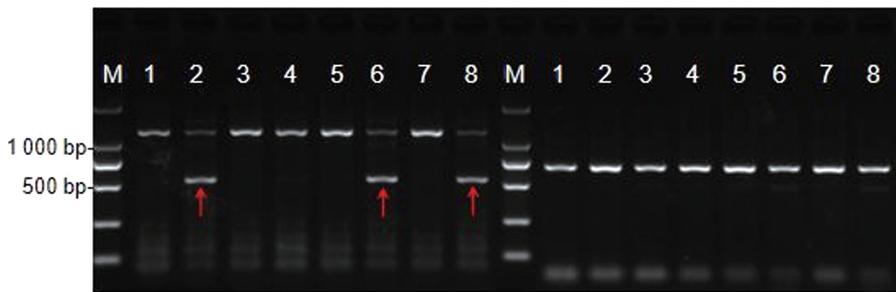


注:A:基因型鉴定结果(引物:F和R,M:DL2000 Marker,如图红色箭头所指条带即为突变条带);B:F0代3号雄鼠测序峰图(碱基缺失708 bp)。

图6 *Bpi* 敲除小鼠 F0 代仔鼠 1-22 号基因型鉴定结果及 T-A 克隆测序峰图

Note. A, Genotyping results showing the mutant strip indicated with red arrows (Primers, F and R, M, DL2000 Marker). B, Sequencing peak map of F0 offspring rat No.3 male (Base deletion, 708 bp).

Figure 6 Genotyping of 1-22 in F0 offspring of *Bpi* knockout mice and peak map of T-A cloning and sequencing

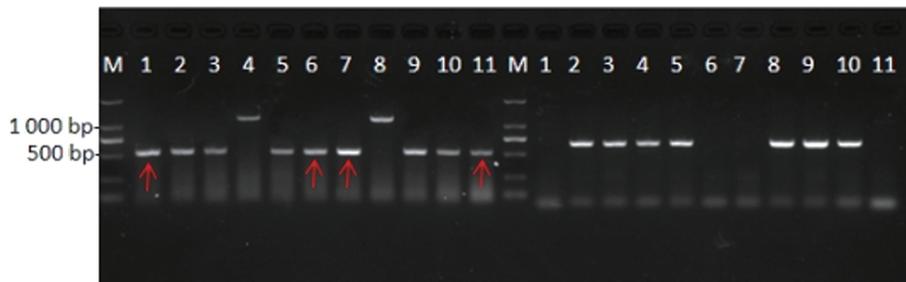


注:左右分别为 KO 鉴定(引物:F和R)和 WT 鉴定(引物:F和WT-R),M:DL2000 Marker,如图红色箭头所指条带即为突变型条带。

图7 *Bpi* 敲除小鼠 F1 代仔鼠 1-8 号基因型鉴定结果

Note. Knockout identification shown by red arrow-indicated mutant strip (Primers, F and R) and WT identification (Primers, F and WT-R) on the left lanes 1-8 and right lanes 1-8, respectively. M, DL2000 Marker.

Figure 7 Genotyping of 1-8 in F1 offspring of *Bpi* knockout mice



注:左右分别为 KO 鉴定(引物:F和R)和 WT 鉴定(引物:F和WT-R),M:DL2000 Marker,如图红色箭头所指条带即为纯合子条带。

图8 *Bpi* 敲除小鼠 F2 代仔鼠 1-11 号基因型鉴定结果

Note. Knockout identification shown by red arrow-indicated mutant strip (Primers, F and R) and WT identification (Primers, F and WT-R) on the left lanes 1-11 and right lanes 1-11, respectively. M, DL2000 Marker.

Figure 8 Genotyping of 1-11 in F2 offspring of *Bpi* knockout mice

表 4 子代鼠各基因型数量统计  
Table 4 The number of genotypes in offspring

<i>Bpi</i> 小鼠 <i>Bpi</i> mice	亲本信息 Parent information	纯合子(只) Homozygote (Number)	杂合子(只) Heterozygote (Number)	野生型(只) Wild type (Number)
F1 generation	<i>Bpi</i> (+/-) 3 ♂ x WT ♀	0	3	5
F2 generation	<i>Bpi</i> (+/-) ♂ x <i>Bpi</i> (+/-) ♀	4	5	2

尽管如此,CRISPR/Cas9 技术的脱靶问题仍然不能完全避免。因此,为保证成功构建出 *Bpi* 基因敲除小鼠模型,对基因敲除小鼠进行基因型 PCR 鉴定和 DNA 测序,这也是必不可少的一步。

### 3.3 *Bpi* 基因敲除小鼠的表型变化

本研究所构建的 *Bpi* 基因敲除小鼠,纯合子小鼠与野生型小鼠在毛色、胎仔数量、仔鼠 8 W 内存活率等表型方面均无明显差异,通过提取 *Bpi* 基因敲除小鼠睾丸组织 RNA,进行 RT-PCR 扩增,未见 *Bpi* 基因外显子转录水平表达。*Bpi* 基因敲除小鼠在 mRNA 水平、蛋白质水平表型鉴定及其免疫因子、激素水平方面的变化与数据分析,将在后续研究中进行更加深入的探讨。经编辑后的 *Bpi* 基因在 F1 代基因组中实现稳定的生殖系专递,并在 F2 代中获得纯合子小鼠。纯合子小鼠在毛色、外形等外观表型上没有明显变化。

### 3.4 构建 *Bpi* 基因敲除小鼠的意义

*Bpi* 作为一类杀菌性蛋白,其对革兰氏阴性菌如大肠杆菌、沙门氏菌、志贺痢疾杆菌、绿脓杆菌、变形杆菌和奈瑟球菌等均有抑制和杀伤作用<sup>[14]</sup>,关于 *Bpi* 的作用机制,目前研究解释为带正电荷的阳离子 *Bpi* 蛋白与革兰氏阴性菌表面 LPS(脂多糖)结合后,LPS 在菌细胞膜上的正常排列被破坏,从而导致细胞渗透性显著增强进而引起细菌细胞的裂解<sup>[15]</sup>,使细菌的生长受到抑制甚至最终导致细菌裂解死亡。有研究发现,*Bpi* 不仅承担杀菌作用和中和内毒素的作用,其对于促进伤口愈合也具有积极的作用<sup>[16]</sup>。另外,在正常情况下,*Bpi* 在小鼠的睾丸和附睾中被检测到高水平表达<sup>[17]</sup>,这也提示了 *Bpi* 亦有可能对精子的发生与成熟等生殖功能具有影响作用。*Bpi* 的杀菌机制及其它可能存在的未知生物学功能亟待被探索和发现。目前,在科学领域对 *Bpi* 的相关研究较少,本课题构建小鼠 *Bpi* 基因敲除小鼠模型,为今后对 *Bpi* 功能更为深入的探索和发现奠定了基础。

### 3.5 *Bpi*——潜在的新型抗菌药物

抗生素的滥用导致了大量耐药菌株的出现,寻找一类新型的特异性药物来对抗某些耐药菌已成

为当务之急。有研究发现,*Bpi* 作为生物体内一类能够特异性杀伤革兰氏阴性菌的抗菌性蛋白,将其主要发挥抗菌作用和结合内毒素功能的氨基端与其它生物活性因子结合,重组成一种新型的融合蛋白,有助于研制一类新型的抗菌多肽类药物。目前已有报道对 *Bpi* 蛋白进行原核或真核重组表达<sup>[18-19]</sup>,为开发出一种既能在促进伤口愈合的同时又能避免细菌感染的双功能新型多肽类药物打下基础。另外,*Bpi* 除用于治疗革兰氏阴性菌感染性疾病外,还被开发出一系列 *Bpi* 衍生肽,如抗真菌药,抗血管形成类药等。*Bpi* 作为一类潜在的新型药物,必然会在不久的将来被广泛地应用于临床医学、农业、养殖业等生物学领域,为许多疾病的治疗带来新的希望。

#### 参考文献:

- [1] 胡伶俐. 牛杀菌-通透性增加蛋白和防御素基因融合质粒的构建及其在大肠杆菌中表达 [D]. 湖北: 华中农业大学; 2010.
- [2] 戴超辉, 董文华, 吴嘉韵, 等. 猪杀菌性/通透性增强蛋白 (BPI) 的功能及其在抗病育种中应用的研究进展 [J]. 中国畜牧兽医, 2016, 43(10): 2736-2741.
- [3] Ding L, Lu S, Wang Y, et al. BPI-3016, a novel long-acting hGLP-1 analogue for the treatment of Type 2 diabetes mellitus [J]. Pharmacol Res, 2017, 122: 130-139.
- [4] Majedi H, Dehghani SS, Soleyman-Jahi S, et al. Validation of the persian version of the brief pain inventory (BPI-P) in chronic pain patients [J]. J Pain Symptom Manage, 2017, 54(1): 132-138.
- [5] kanta F, Procházková P, Roubalová R, et al. LBP/BPI homologue in Eisenia andrei earthworms [J]. Dev Comp Immunol, 2016, 54(1): 1-6.
- [6] 孙毓, 刘丹, 施明, 等. 基于 CRISPR/Cas9 技术构建多重 sgRNA 实现在人原代 T 细胞中敲除 ADRB2 基因 [J]. 中国实验血液学杂志, 2019, 27(5): 1682-1690.
- [7] 王韶嵘, 高兴春, 陈芳妮, 等. CRISPR/Cas9 基因编辑技术在肿瘤研究及治疗中的应用 [J]. 实用癌症杂志, 2019, 34(7): 1216-1218.
- [8] Redman M, King A, Watson C, et al. What is CRISPR/Cas9? [J]. Arch Dis Child Educ Pract Ed, 2016, 101(4): 213-215.
- [9] Savić N, Schwank G. Advances in therapeutic CRISPR/Cas9 genome editing [J]. Transl Res, 2016, 168: 15-21.
- [10] Makarova KS, Koonin EV. Annotation and classification of

- CRISPR-Cas systems [J]. *Methods Mol Biol*, 2015, 1311: 47-75.
- [11] Ma Y, Zhang L, Huang X. Genome modification by CRISPR/Cas9 [J]. *FEBS J*, 2014, 281(23): 5186-5193.
- [12] Cong L, Ran FA, Cox D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems [J]. *Science*, 2013, 339(6121): 819-823.
- [13] Fu Y, Foden JA, Khayter C, et al. High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells [J]. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(9): 822-826.
- [14] Hu B, Wen C, Zhang M, et al. Identification and characterization of two LBP/BPI genes involved in innate immunity from *Hyriopsis cumingii* [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2017, 60: 436-446.
- [15] Baron OL, Deleury E, Reichhart JM, et al. The LBP/BPI multigenic family in invertebrates: Evolutionary history and evidences of specialization in mollusks [J]. *Dev Comp Immunol*, 2016, 57: 20-30.
- [16] 张欣然, 刘翠, 钱智勇, 等. BPI-BD3 融合抗菌肽修饰 C3H10T1/2 细胞对小鼠感染创面愈合的影响 [J]. *解放军医学杂志*, 2015, 40(9): 722-726.
- [17] 郭玲, 许晴, 吕喆, 等. 杀菌/渗透增强蛋白在小鼠组织器官和细胞中的分布 [J]. *首都医科大学学报*, 2009, 30(5): 671-676.
- [18] 高北. 鱼类来源的两种抗菌肽 BPI 和 LEAP2 的 cDNA 克隆及重组表达载体的构建 [D]. 上海: 上海海洋大学; 2013.
- [19] 彭海英, 朱家勇. 杀菌蛋白 rBPI23 与 haFGF 融合基因及真核表达质粒的构建 [J]. *临床和实验医学杂志*, 2009, 8(12): 8-11.
- [收稿日期] 2019-11-28

### (上接第 30 页)

- [10] Chen B, Huang S, Su Y, et al. Macrophage Smad3 protects the infarcted heart, stimulating phagocytosis and regulating inflammation [J]. *Circ Res*, 2019, 125(1): 55-70.
- [11] Zhou Q, Huang XR, Yu J, et al. Long noncoding RNA Arid2-IR is a novel therapeutic target for renal inflammation [J]. *Mol Ther*, 2015, 23(6): 1034-1043.
- [12] 魏海霞, 孔伟, 巩萍. 异甘草素的药效学研究进展 [J]. *药物生物技术*, 2019, 26(5): 467-470.
- [13] Traboulsi H, Cloutier A, Boyapelly K, et al. The flavonoid isoliquiritigenin reduces lung inflammation and mouse morbidity during influenza virus infection [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2015, 59(10): 6317-6327.
- [14] Chen X, Cai X, Le R, et al. Isoliquiritigenin protects against sepsis-induced lung and liver injury by reducing inflammatory responses [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 496(2): 245-252.
- [15] Ma ZN, Li YZ, Li W, et al. Nephroprotective effects of saponins from leaves of *panax quinquefolius* against cisplatin-induced acute kidney injury [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(7): 1407.
- [16] Rabb H, Griffin MD, McKay DB, et al. Inflammation in AKI: current understanding, key questions, and knowledge gaps [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2016, 27(2): 371-379.
- [17] Ramalingam M, Kim H, Lee Y, et al. Phytochemical and pharmacological role of liquiritigenin and isoliquiritigenin from *radix glycyrrhizae* in human health and disease models [J]. *Front Aging Neurosci*, 2018, 10: 348.
- [18] Peng F, Du Q, Peng C, et al. A review: the pharmacology of isoliquiritigenin [J]. *Phytother Res*, 2015, 29(7): 969-977.
- [19] 纪保超. 基于 NF- $\kappa$ B 及 RANKL-RANK-TRAF6 信号通路探究异甘草素对骨关节炎的作用及机制 [D]. 乌鲁木齐: 新疆医科大学, 2018.
- [20] 金亮, 金爱, 赵立智. 长链非编码 RNA LINC00152 对人脑胶质瘤裸鼠移植瘤生长的影响及机制探讨 [J]. *中国比较医学杂志*, 2019, 29(11): 28-33, 49.
- [21] Pang X, Feng G, Shang W, et al. Inhibition of lncRNA MEG3 protects renal tubular from hypoxia-induced kidney injury in acute renal allografts by regulating miR-181b/TNF- $\alpha$  signaling pathway [J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(8): 12822-12831.
- [22] Yu TM, Palanisamy K, Sun KT, et al. RANTES mediates kidney ischemia reperfusion injury through a possible role of HIF-1 $\alpha$  and lncRNA PRINS [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 18424.
- [23] Geng X, Xu X, Fang Y, et al. Effect of long non-coding RNA growth arrest-specific 5 on apoptosis in renal ischaemia/reperfusion injury [J]. *Nephrology (Carlton)*, 2019, 24(4): 405-413.
- [24] Xiao H, Yang H, Zeng Y. Long non-coding RNA Arid2-IR affects advanced glycation end products-induced human retinal endothelial cell injury by binding to Smad3 [J]. *Int Ophthalmol*, 2020, 40(5): 1123-1133.
- [收稿日期] 2020-02-07