

夏一鸣,黄晓玲,仝慧慧,等. 中枢神经系统 TauT 基因敲除大鼠的构建及对线粒体 DNA 氧化损伤影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(8): 38-47.

Xia YM, Huang XL, Tong HH, et al. Construction of TauT gene knockout in the central nervous system of rats and its effect on oxidative damage of mitochondrial DNA [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(8): 38-47.

doi: 10. 3969/j.issn.1671-7856. 2021. 08. 006

中枢神经系统 TauT 基因敲除大鼠的构建及对线粒体 DNA 氧化损伤影响

夏一鸣¹,黄晓玲¹,仝慧慧¹,齐浩铭¹,莫丽冬²,王 辰²,范维佳²,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 和 Cre-loxP 技术相结合构建牛磺酸转运体(taurine transporter, TauT)在中枢神经系统中条件性敲除大鼠,并对其脑组织线粒体 mtDNA 及线粒体呼吸链酶活性进行初步研究。**方法** 利用 CRISPR/Cas9 和 Cre-loxP 技术获得 TauT 基因第 5 外显子两端含有 loxP 位点的杂合子大鼠(TauT^{loxP/WT})。将获得的 TauT^{loxP/WT}大鼠与 Nestin-Cre 大鼠交配,经繁殖和鉴定最终获得神经特异性 TauT 基因敲除大鼠(TauT^{loxP/loxP/Cre+})。通过 Real-time PCR、Western blot、免疫组化对 TauT^{loxP/loxP/Cre+} 大鼠进行基因和蛋白表达检测,用 HE 染色观测其脑组织形态,并对脑组织 mtDNA 拷贝数和线粒体呼吸链酶(I / II / III / IV / V)活性进行检测。**结果** 与野生型大鼠相比, TauT^{loxP/loxP/Cre+} 大鼠脑组织中 TauT 基因和蛋白表达显著降低, TauT 基因在中枢神经系统被成功敲除,模型构建成功; HE 染色显示 TauT^{loxP/loxP/Cre+} 大鼠脑细胞数量和密度有所降低,而老年 TauT^{loxP/loxP/Cre+} 大鼠脑中细胞病变更加明显。此外,与野生型大鼠相比, TauT^{loxP/loxP/Cre+} 大鼠脑组织线粒体呼吸链复合酶 I、III、IV、V 酶活性显著降低,但 mtDNA 拷贝数却明显上升。**结论** 利用 CRISPR/Cas9 和 Cre-loxP 技术成功了构建中枢神经系统 TauT 基因敲除大鼠模型,并初步验证了此模型对脑组织及其线粒体呼吸链酶和 mtDNA 的影响,为研究牛磺酸及 TauT 对脑组织的分子机制提供了新的模型平台。

【关键词】 TauT 基因;条件敲除;CRISPR/Cas9;Cre-loxP;大鼠;线粒体

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2021) 08-0038-10

Construction of TauT gene knockout in the central nervous system of rats and its effect on oxidative damage of mitochondrial DNA

XIA Yiming¹, HUANG Xiaoling¹, TONG Huihui¹, QI Haoming¹, MO Lidong², WANG Chen²,
FAN Weijia², 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 and Cre-loxP were used to construct the conditional knockout of taurine transporter (TauT) in the central nervous system of rats. The mitochondrial mtDNA and mitochondrial respiratory chain enzyme activities in brain tissues were studied. **Methods** CRISPR/Cas9 and Cre-loxP techniques were used to obtain

【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】夏一鸣(1995—),男,硕士研究生,研究方向:生物化学与分子生物学。E-mail: 1565215506@qq.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

heterozygous rats ($TauT^{loxP/WT}$) with loxP at both ends of exon 5 of the $TauT$ gene. The obtained $TauT^{loxP/WT}$ rats were mated with Nestin-Cre rats. After breeding and identification, neural-specific $TauT$ gene knockout rats ($TauT^{loxP/loxP/Cre+}$) were obtained. The gene and protein expressions of $TauT^{loxP/loxP/Cre+}$ rats were detected by Real-time PCR, Western blot, and immunohistochemistry. The morphology of brain tissue was observed by hematoxylin-eosin staining. The mtDNA copy number and mitochondrial respiratory chain enzyme (I/II/III/IV/V) activity in brain tissue were examined. **Results** Compared with wild-type rats, $TauT$ gene and protein expressions in $TauT^{loxP/loxP/Cre+}$ rat brain tissues were significantly decreased, and the $TauT$ gene was successfully knocked out in the central nervous system indicating the knockout model was successfully constructed. Hematoxylin-eosin staining showed that the number and density of brain cells were decreased in $TauT^{loxP/loxP/Cre+}$ rats and cytopathic changes more obvious in the brains of old $TauT^{loxP/loxP/Cre+}$ rats. In addition, compared with wild-type rats, the activities of mitochondrial respiratory chain complex enzymes I, III, IV, and V were significantly decreased, but the copy number of mtDNA was significantly increased. **Conclusions** The model of $TauT$ gene knockout in the central nervous system of rats was successfully constructed using CRISPR/Cas9 and Cre-loxP technology. The effects of $TauT$ knockout in the central nervous system on brain tissues, respiratory chain enzymes, and mtDNA of mitochondria were verified, providing a new model platform for the study of the molecular mechanisms of taurine and $TauT$ in brain tissues.

[Keywords] $TauT$ gene; conditional knockout; CRISPR/Cas9; Cre-loxP; rat; mitochondria

基因敲除技术是通过同源重组将靶基因的某些重要外显子或功能结构域、甚至所有外显子敲除掉,导致靶基因的表达失败。而条件性基因敲除技术可以对感兴趣的特异性组织或细胞中的细胞进行时空特异性的敲除,却不造成生物本身的死亡。自从 1994 年 Gu 等^[1]第一次报道了利用噬菌体 P1 的 I 型拓扑异构酶 Cre 重组酶条件性敲除 DNA 聚合酶 β 片段后,在新型基因打靶中,Cre-loxP 重组系统获得广泛应用,成为条件性打靶技术、诱导性基因打靶、时空特异性基因打靶策略核心。随着 CRISPR/Cas9 技术的迅速崛起,使用 CRISPR/Cas9 技术和 Cre-loxP 技术条件性敲除小鼠或大鼠已成为基因敲除研究的新型方式。

牛磺酸(taurine, Tau)是一种内源性的含硫 β -氨基酸,化学结构式为 $H_2N-CH_2-CH_2-SO_3H$ 。 Tau 虽不参与蛋白质的合成,但是具有非常广泛的营养生理作用^[2]。 Tau 能够改善低蛋白孕鼠甲状腺功能,可以促进大脑的发育^[3-4]。在脑组织中, Tau 含量水平非常高,高达 40 mmol/L ^[5]。研究表明:长期缺乏 Tau 将导致脑萎缩、心力衰竭、视网膜病或免疫缺陷^[6-7]。文献报道以及我们的前期研究显示: Tau 对维持机体正常功能有广泛的生物学作用,对神经组织缺血、缺氧及缺血再灌注损伤具有明显的防治作用^[8]。

Tau 主要是通过细胞膜上高亲和性的牛磺酸转运体(taurine transporter; $TauT$; $slc6a6$)逆浓度梯度主动跨膜转运,以维持脑细胞内的 Tau 高浓度(胞内浓度约为细胞外的 400 倍),调节脑细胞渗透压^[9]。

$TauT$ 由 621 个氨基酸组成,分子质量约为 70×10^3 ,存在于细胞膜上,包含 12 个跨膜螺旋结构域。一个分子的 Tau 的主动摄取需要 2~3 个钠离子和 1 个氯离子转运进细胞质^[10]。 $TauT$ 的活性对 Tau 的转运起着至关重要的作用。

我们的课题一直关注 Tau 对神经疾病后线粒体功能的影响,我们的研究和文献报道也证实: Tau 对线粒体功能稳定具有重要的保护作用^[11-12]。线粒体(mitochondrion)被称为细胞的氧化中心和“动力工厂”,为有机体提供约 90% 的能量。线粒体参与很多疾病的生理、病理过程。一方面, Tau 是线粒体 tRNA 的组成部分,线粒体 tRNA 中缺乏 Tau 修饰会引起线粒体疾病^[13-14]。另一方面,它可抑制多种刺激下介导的细胞凋亡^[15-16], Tau 的缺乏会引起线粒体呼吸链复合酶 I、III 活性降低,ATP 生成减少、超氧化物生成增加和自噬的缺陷^[17-18]。

传统 Tau 缺乏模型的构建基本采用加入胍基乙烷磺酸盐等 $TauT$ 抑制剂,或者通过喂养不含 Tau 食物的饲料来抑制 Tau 的摄入^[19-20]。在本课题中,我们首次利用 Cre-loxP 技术和 CRISPR/Cas9 技术构建神经特异性敲除 $TauT$ 基因大鼠模型($TauT^{loxP/loxP/Cre+}$),使得 $TauT$ 基因能够在大鼠脑组织中稳定敲除,克服了传统 Tau 缺乏模型的不稳定、持续时间短等缺点。这为研究 Tau 对神经系统中的作用提供了新的长久模型,并可以在此平台下研究 $TauT$ 在各种神经疾病治疗和诊断中的作用及分子机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物

神经特异性表达 Nestin-Cre 雄性大鼠, SPF 级, 1 只, 体重 200 g (购自中国医学科学院医学实验动物研究所[SCXK(京)2019-0011]); $TauT^{loxP/WT}$ 大鼠雌雄各 1 只, 体重 200 g, 委托中国医学科学院医学实验动物研究所基因工程创制平台构建; 实验所用的条件性敲除大鼠 ($TauT^{loxP/loxP/Cre+}$ 大鼠) 为 Nestin-Cre 大鼠和 $TauT^{loxP/WT}$ 大鼠杂交后获得。实验中所用 $TauT^{loxP/loxP/Cre+}$ 大鼠、野生型 SD 大鼠 (WT 大鼠, 北京华阜康生物科技股份有限公司购买[SCXK(京)2019-0008]) 均为 SPF 级健康雄性大鼠, 2 月龄大鼠每组各 24 只, 体重 (250 ± 30) g。12 月龄大鼠每组各 2 只, 体重 (850 ± 30) g。

$TauT^{loxP/WT}$ 和 Nestin-Cre 大鼠以及 WT 大鼠均在中国医学科学院放射医学研究所实验动物中心 SPF 环境中饲养[SYXK(津)2019-0002], 温度 25℃ 左右、空气湿度保持在 50%、明暗循环 12 h/d。实验研究的全部动物均遵守 3R 原则且通过中国医学科学院放射医学研究所实验动物伦理委员审查 (DWLL-20180916 和 DWLL-20180917)。

1.2 主要试剂与仪器

体外转录试剂盒 (美国 Invitrogen 公司, Am1345); EasyPure Genomic DNA Kit (北京全式金生物技术有限公司, EE101-12); $2 \times Taq$ PCR StarMix、总 RNA 提取试剂盒、FastKing gDNA Dispelling RT SuperMix、SuperReal PreMix Plus (SYBR Green) (天根生化科技(北京)有限公司, KT201、DP419、KR118、FP205); 高效 RIPA 裂解液 (北京索莱宝科技有限公司, R0010); PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (美国 Thermo 公司, 26619); Millipore Western blot ECL (德国 Merck 公司, WBKLS0500); TauT 一抗 (英国 St John's Laboratory, STJ95923); GAPDH 一抗 (美国 Proteintech 公司, 60004-1-Ig); HRP 标记的山羊抗小鼠二抗、抗兔二抗 (北京中杉金桥生物技术有限公司, ZB-2305、ZB-2301); Bradford 蛋白浓度测定试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司, P0006); 动物细胞/组织活性线粒体分离试剂盒、线粒体呼吸链复合物 I (NADH-辅酶 Q 还原酶, Complex I)、线粒体呼吸链复合物 II (琥珀酸-辅酶 Q 还原酶, Complex II)、线粒体呼吸链复合物 III (辅酶 Q-细胞

色素 C 还原酶, Complex III)、线粒体呼吸链复合物 IV (正铁细胞色素 C-氧化还原酶, Complex IV)、线粒体呼吸链复合物 V (F₀F₁-ATP 酶/ATP 合成酶, Complex V) 的活性比色法定量检测试剂盒 (上海杰美基因医药科技有限公司, GMS10006.2、GMS50007、GMS50008、GMS50009、GMS50010、GMS50083); 高电流电泳仪 PowerPac™ HC (美国 Bio-RAD 公司, 1645052); 多功能成像系统 (法国 Vilber 公司, HC006); PCR 仪 (杭州博日科技股份有限公司, TC-96/G/H(b)); 荧光定量 PCR 仪 (瑞士 Roche 公司, LC480); 显微镜 (日本 OLYMPUS 公司, BX53); 全自动免疫组化仪 (德国 Leica 公司, BOND-III); 紫外/可见分光光度计 (英国 JENWAY 公司, 6850)。

1.3 实验方法

1.3.1 $TauT^{loxP/loxP/Cre+}$ 大鼠的构建

$TauT^{loxP/loxP/Cre+}$ 大鼠模型构建首先需要利用 CRISPR/Cas9 技术构建 $TauT^{loxP/WT}$ 杂合子大鼠。一方面针对 TauT 基因第 5 外显子 390 bp 序列两端设计两个不同的 sgRNA 序列 (Rat-TauT-gRNA-up: 5'-TAGGCCCCCTTTGTCCCACAGAC-3', Rat-TauT-gRNA-down: 5'-AAACGTCTGTGGGACAAAGGGG-3'; R-TauT-gRNA-up: 5'-TAGGGACAGACCCTGTCTCTGG-3', R-TauT-gRNA-down: 5'-AAACCCAGAGACAGG GTCTGTC-3'), 合成的 sgRNA 单链通过退火复性结合成小片段, 连接到 BsaI 酶处理的线性化的表达质粒 (pUC57-sgRNA) 中, 经质粒的连接、转化后再通过 Dra I 内切酶线性化后转录出 sgRNA。另一方面构建 Cas9 表达载体 (pST1374-NLS-flag-linker-Cas9), 再用 Age I 内切酶线性化转录出 Cas9 mRNA。通过将体外转录的 sgRNA 和 Cas9 mRNA 以及 TauT 基因第 5 外显子两端各含有一个 loxP 序列的供体通过显微注射法注射进 SD 大鼠受精卵, 利用同源重组获得 F0 代 $TauT^{loxP/WT}$ 杂合子大鼠 (图 1 所示)。

将获得的 $TauT^{loxP/WT}$ 大鼠杂交繁殖得到 $TauT^{loxP/loxP}$ 纯合子大鼠, 并和 Nestin-Cre 大鼠进行杂交, 获得 $TauT^{loxP/WT/Cre+}$ 转基因大鼠, 再由 $TauT^{loxP/WT/Cre+}$ 大鼠和 $TauT^{loxP/loxP}$ 大鼠杂交得到神经特异性 $TauT^{loxP/loxP/Cre+}$ 基因敲除大鼠。

1.3.2 $TauT^{loxP/loxP/Cre+}$ 大鼠 PCR 鉴定

将出生 21 d 左右的大鼠, 剪趾编号并提取基因组总 DNA, PCR 扩增目的条带, 电泳成像分析。根

据两个 loxP 外端基因序列设计引物。loxP 上游引物: 5'-ATTTCAGTCACTCATCCGTCCCT-3', 下游引物: 5'-TCTGACAGTTAAAGAATCTAAGGCTCA-3', 片段大小为 712 bp。Cre 鉴定上游引物: 5'-TACTGACGGTGGGAGAATG-3', 下游引物: 5'-CTGTTTCACTATCCAGGTTACG-3', 片段大小为 432 bp。将鉴定的 $TauT^{loxP/loxP/Cre+}$ 大鼠, 提取脑组织 DNA 进一步 PCR 鉴定, $TauT^{loxP/loxP/Cre+}$ 大鼠在脑组织中 loxP 引物扩增条带为 290 bp。

1.3.3 实时荧光定量 PCR 检测 $TauT^{loxP/loxP/Cre+}$ 、WT 大鼠脑及各器官 TauT 基因表达量

2 月龄 $TauT^{loxP/loxP/Cre+}$ 大鼠、WT 雄性大鼠脑及各脏器组织研磨后取 100 mg 左右, 提取总 RNA, 接着反转录成 cDNA 后, 进行实时荧光定量 PCR (qPCR)。TauT 目的基因引物序列: 上游 5'-GAGGTCATCATAGGCCAGTAC-3'; 下游 5'-GTACACATTCAGGAGGGACAC-3', 片段大小为 120 bp。GAPDH 内参引物序列: 上游 5'-AACTCCCA TTCTTCCACC-3'; 下游 5'-ACCACCCTGTTGCT GTAG-3', 片段大小为 100 bp。20 μ L PCR 反应体系: 2 $\times$ SuperReal PreMix Plus 10 μ L, ddH₂O 7.8 μ L, 引物各 0.6 μ L, cDNA 模板 1 μ L。qPCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 15 min 预变性, 95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 1 min, 40 个循环。

qPCR 相对定量分析: $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法, 其中 $[\Delta\Delta Ct = (\text{待测目的基因平均 Ct 值} - \text{待测内参基因平均 Ct 值}) - (\text{对照组目的基因平均 Ct 值} - \text{对照组内参基因平均 Ct 值})]$ 。

1.3.4 Western blot 检测 $TauT^{loxP/loxP/Cre+}$ 、WT 大鼠脑及各器官 TauT 蛋白表达

2 月龄 $TauT^{loxP/loxP/Cre+}$ 大鼠、WT 雄性大鼠脑组织及心、肝、肾, 匀浆裂解后, 11430 r/min 离心 10 min, 取上清, Bradford 法测定蛋白浓度。上样总蛋白浓度为 40 μ g, SDS-PAGE 电泳, 70 V, 40 min 后转 120 V 至溴酚蓝条带到底部, 300 mA 转膜 90 min, 5% 脱脂奶粉封闭 2 h, TauT 一抗 (1:1000)、GAPDH 一抗 (1:10000), 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, TBST 洗膜 3 次, TauT 用山羊抗兔二抗 (1:10000) 和 GAPDH 使用的山羊抗小鼠二抗 (1:10000) 常温孵育 2 h, TBST 洗膜 3 次, 显影、成像。

1.3.5 免疫组化及 HE 染色

选取 2 月龄、12 月龄 $TauT^{loxP/loxP/Cre+}$ 大鼠和 WT 大鼠各 2 只, 用 PBS 心脏灌注至血液流尽后, 换 4%

多聚甲醛继续灌注至大鼠身体僵硬, 取脑, 4% 多聚甲醛固定 24 h, 脱水, 石蜡包埋, 切片脱蜡至水后, 分别做 HE 染色和免疫组化。HE 染色: 苏木精染色, 水洗, 伊红染色, 水洗, 脱水封片, 镜下观察。免疫组化: 取 2 月龄大鼠的切片脱蜡至水后, 封闭、TauT 一抗 (1:100)、冲洗、TauT 二抗孵育、冲洗、DAB 染色、苏木精复染、脱水透明、封片, 镜下观察并分析。

1.3.6 $TauT^{loxP/loxP/Cre+}$ 、WT 大鼠脑组织 mtDNA 拷贝数检测

2 月龄 $TauT^{loxP/loxP/Cre+}$ 大鼠、WT 雄性大鼠脑组织研磨后取 100 mg 左右, 提取总 DNA, 使用 40 ng DNA 作为起始量, 进行实时荧光定量 PCR。目的基因 COX I 上游基因引物: 5'-TAATTCGAGCTGAA CTAGGAC-3', 下游引物: 5'-TACAAGTCAGTTC CCGAAGC-3'; 片段大小 143 bp。内参基因 Rpl4 上游基因: 5'-CACGCAAGAAGATTCATCGC-3', 下游引物 5'-AACAATCTTCTCCGATTGTC-3'; 片段大小 194 bp。20 μ L PCR 反应体系: 2 $\times$ SuperReal PreMix Plus 10 μ L, ddH₂O 7.8 μ L, 引物各 0.6 μ L, 模板 1 μ L。qPCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 15 min 预变性, 95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 1 min, 40 个循环。计算方法同 1.3.3。

1.3.7 $TauT^{loxP/loxP/Cre+}$ 、WT 大鼠脑组织线粒体呼吸链复合酶活性测定

线粒体呼吸链复合酶活力的测定, 均根据试剂盒说明书操作执行。简单来说, 将 2 组大鼠脑组织剪碎匀浆后, 1430 r/min, 10 min 取上清, 再 9525 r/min, 10 min 取沉淀, 反复冻融破碎线粒体后, Bradford 法测蛋白浓度, 然后使用紫外/可见分光光度计进行线粒体呼吸链酶活性测定。Complex I、II、III、IV、V 分别在 340 nm、600 nm、550 nm、550 nm、340 nm 波长下测吸光度。酶活力计算公式: $[(\text{样品读数} - \text{背景读数}) \times \text{体系容量 (mL)} \times \text{样品稀释倍数}] \div [\text{样品容量 (mL)} \times \text{毫摩尔吸光系数} \times \text{反应时间 (min)}] = \text{单位/毫升} \div (\text{样品蛋白浓度}) \text{毫克/毫升} = \text{单位/毫克}$ 。Complex I/II/III/IV/V 结果单位分别为: $\mu\text{mol NADH}/(\text{min} \cdot \text{mg})$; $\mu\text{mol DCPIP}/(\text{min} \cdot \text{mg})$; $\mu\text{mol CoQH}_2/(\text{min} \cdot \text{mg})$; $\mu\text{mol CytC}/(\text{min} \cdot \text{mg})$; $\mu\text{mol NADH}/(\text{min} \cdot \text{mg})$ 。

1.4 统计学方法

应用 SPSS 17.0 和 GraphPad Prism 8 软件进行数据分析。实验结果数据均以平均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用独立 t 检验, $P < 0.05$ 时表示

组间具有显著差异, $P<0.01$ 表示差异极显著。

2 结果

2.1 大鼠构建及遗传分析

基因测序和序列比对结果显示 loxP 序列被成功插入在第 5 外显子两端(图 2A、2B)。我们对插入的 loxP 序列进行遗传分析。TauT^{loxP/WT}×WT 出生的 F1 代中只有阴性和杂合子;TauT^{loxP/WT} × TauT^{loxP/WT} 出生的 F2 代 TauT^{loxP/loxP} 大鼠比例为 22.2%; TauT^{loxP/WT} × TauT^{loxP/loxP} 出生的 F3 代中

TauT^{loxP/loxP} 大鼠比例为 52.4%。综上,loxP 插入 TauT 基因第 5 外显子两端后能够稳定的遗传,且符合孟德尔遗传定律,结果如表 1 所示。

2.2 基因型鉴定结果

新生大鼠脚趾 DNA 的 PCR 鉴定结果如图 3: TauT^{loxP/loxP} 纯合子为一条带,712 bp;TauT^{loxP/WT} 杂合子为两条带,712 bp 和 632 bp;TauT^{WT/WT} 阴性为一条带,632 bp(图 3A);Cre 为一条带,437 bp(图 3B);TauT^{loxP/loxP/Cre+} 大鼠脑组织 TauT 基因被敲除后条带大小为 290 bp(图 3C)。

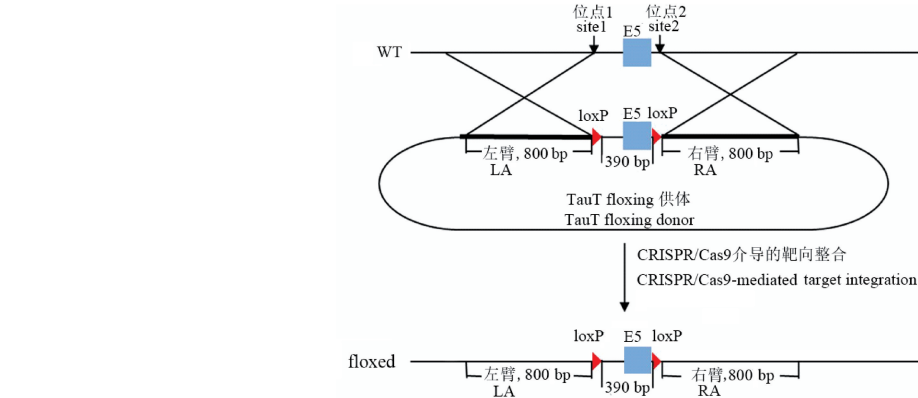
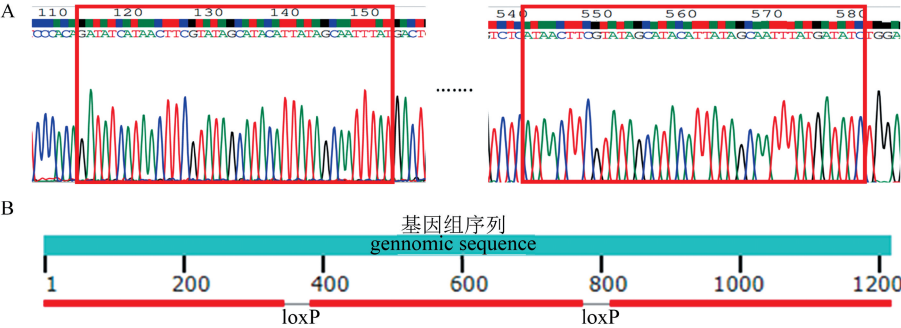


图 1 利用 CRISPR/Cas9 技术构建 TauT^{loxP/WT} 大鼠示意图

Figure 1 TauT^{loxP/WT} rat schematic diagram constructed by CRISPR/Cas9 technology



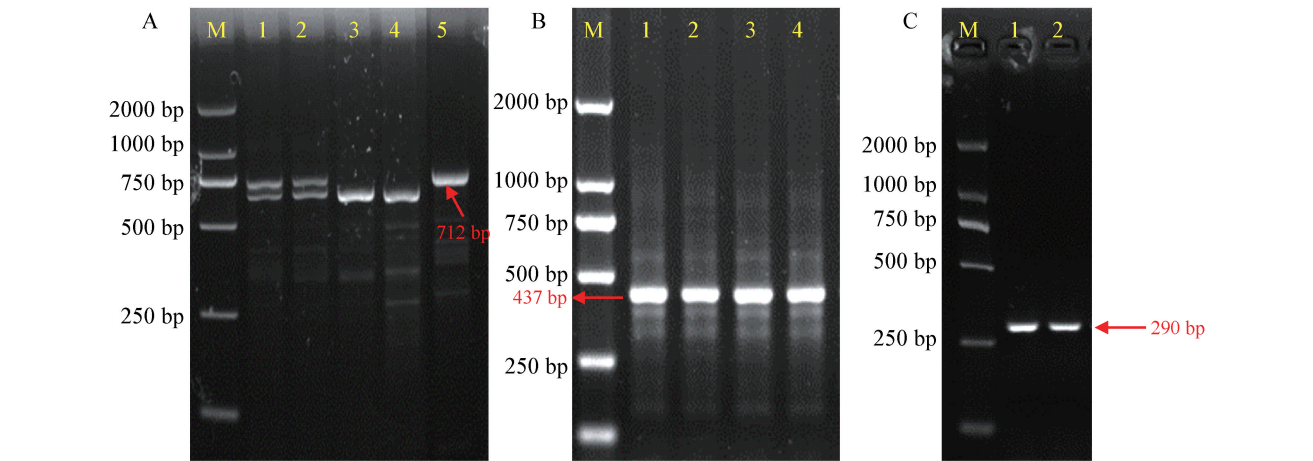
注:A;基因测序结果显示第 5 外显子两端插入 loxP 序列(红色框);B;与基因组序列比对结果显示第 5 外显子两端 loxP 序列被插入。

图 2 loxP 基因序列比对结果

Note. A, Gene sequencing results showed that loxP sequences were inserted at both ends of the fifth exon(red box). B, Comparison with the genome sequence showed that loxP sequences were inserted at both ends of the fifth exon.

Figure 2 loxP gene sequence alignment results

表 1 F1~F3 代大鼠繁殖情况							
Table 1 Reproduction of F1~F3 generation rats							
代数	出生大鼠只数	雄性大鼠只数	雌性大鼠只数	TauT ^{WT/WT} 只数	TauT ^{loxP/WT} 只数	TauT ^{loxP/loxP} 只数	纯合率(%)
Generations	Number of born rats	Number of male rats	Number of female rats	Number of TauT ^{WT/WT}	Number of TauT ^{loxP/WT}	Number of TauT ^{loxP/loxP}	Homozygote rate
F1	43	23	20	22	21	0	0
F2	18	10	8	6	8	4	22.2
F3	21	8	13	0	10	11	52.4



注:M;DNA 标记;A:1、2: TauT^{loxP/WT};3、4: TauT^{WT/WT};5: TauT^{loxP/loxP};B:1、2、3、4: Cre 阳性;C:1: 大脑 TauT 基因敲除结果;2: 小脑 TauT 基因敲除结果。

图3 条件性基因敲除大鼠部分 PCR 鉴定结果

Note. M, DNA marker. A, 1/2, TauT^{loxP/WT}. 3/4, TauT^{WT/WT}. 5, TauT^{loxP/loxP}. B, 1, 2, 3 and 4, Cre positive. C, 1, Result of brain TauT gene knockout. 2, Result of cerebellar TauT gene knockout.

Figure 3 Partial PCR identification results of conditional gene knockout rats

此外,通过 RT-PCR 显示: TauT^{loxP/loxP/Cre+} 大鼠大脑和肾组织 TauT mRNA 表达量相比较 WT 组显著降低;而在心、肝组织中 TauT mRNA 表达量没有显著差异(如图 4)。

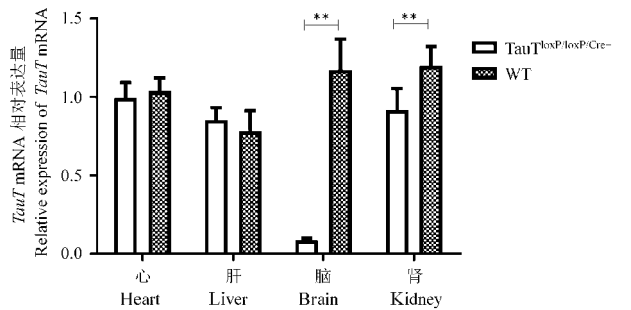
2.3 Western blot 及免疫组化检测 TauT^{loxP/loxP/Cre+}、WT 大鼠脑组织及各器官 TauT 蛋白的表达

免疫印迹实验结果显示: TauT^{loxP/loxP/Cre+} 大鼠 TauT 蛋白在脑组织中表达显著降低,而在心、肝、肾组织中和 WT 大鼠蛋白表达量并无明显差异(如图 5A、5B)。

此外,通过免疫组化观察 TauT^{loxP/loxP/Cre+} 大鼠大脑皮层和海马(CA3 区)和小脑中 TauT 蛋白表达与 WT 组大鼠相比明显减少,而在心、肝、肾组织两者无明显差异。这与免疫印迹结果一致(如图 6)。

2.4 TauT^{loxP/loxP/Cre+}、WT 大鼠脑组织 HE 染色结果

从 HE 染色结果显示: 2 月龄 TauT^{loxP/loxP/Cre+} 大鼠与 WT 大鼠相比,大脑皮质和海马 DG 区细胞数量和密度有所减少(图 7A/7B、7A1/7B1)。而 12 月龄的 TauT^{loxP/loxP/Cre+} 大鼠与 WT 大鼠相比,大脑皮质和海马 DG 区细胞极性消失,结构排列疏松紊乱,细胞核胞浆分界模糊(图 7C/7D、7C1/7D1)。此外,12 月龄大鼠脑皮质和海马 DG 区与 2 月龄大鼠相比,细胞结构疏松,细胞排列不规则,这种



注: TauT^{loxP/loxP/Cre+} 大鼠和 WT 大鼠 TauT mRNA 表达相对定量分析比较。与 WT 组比较, ** $P < 0.01$ 。

图4 TauT^{loxP/loxP/Cre+} 和 WT 大鼠脑组织及各器官 TauT mRNA 表达情况($n=6$)

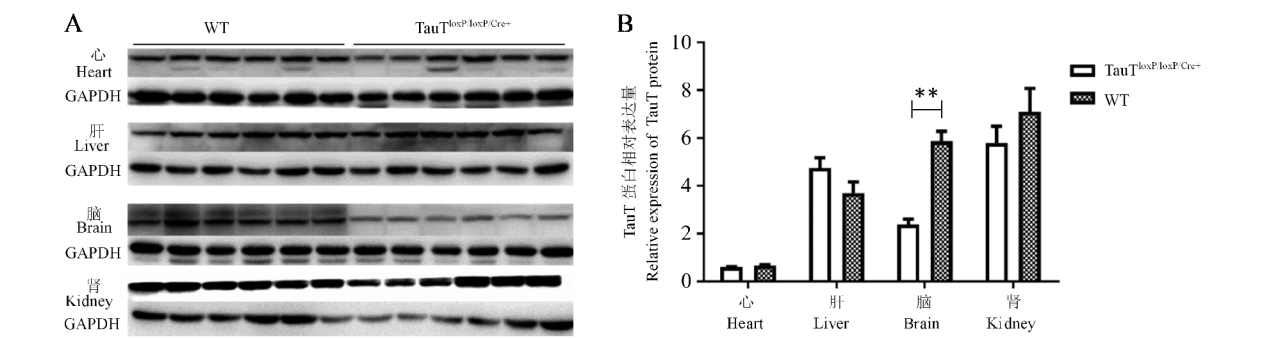
Note. TauT mRNA expression in TauT^{loxP/loxP/Cre+} rats and WT rats was compared quantitatively. Compared with WT group, ** $P < 0.01$.

Figure 4 TauT mRNA expression in brain tissues and organs of TauT^{loxP/loxP/Cre+} rats and WT rats

现象在 12 月龄的 TauT^{loxP/loxP/Cre+} 大鼠中更加明显(如图 7)。

2.5 TauT^{loxP/loxP/Cre+}、WT 大鼠脑组织线粒体呼吸链复合物酶活性和 mtDNA 相对表达量检测

结果显示:和 WT 大鼠相比, TauT^{loxP/loxP/Cre+} 大鼠线粒体呼吸链复合物 I、III、IV、V 均显著低于 WT 组酶活性,而只有线粒体复合酶 II 没有受到影响(如图 8A;表 2)。此外, TauT^{loxP/loxP/Cre+} 大鼠脑组织 mtDNA 表达量比 WT 大鼠显著升高(如图 8B)。

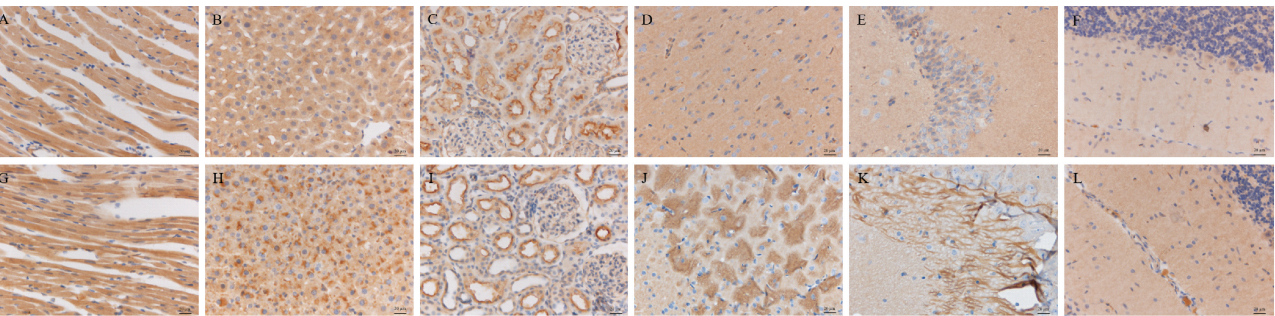


注:A: TauT^{loxP/loxP/Cre+} 大鼠和 WT 大鼠心、肝、脑、肾 TauT 蛋白表达情况; B: TauT^{loxP/loxP/Cre+} 大鼠和 WT 大鼠组蛋白表达相对定量分析比较。与 WT 组比较, ** $P < 0.01$ 。

图 5 TauT^{loxP/loxP/Cre+} 大鼠和 WT 大鼠大鼠脑组织及其它器官 TauT 蛋白表达情况 ($n = 6$)

Note. A, Expression of TauT protein in heart, liver, brain and kidney of TauT^{loxP/loxP/Cre+} rats and WT rats. B, Relative quantitative analysis of TauT protein expression in the TauT^{loxP/loxP/Cre+} and WT groups. Compared with WT group, ** $P < 0.01$.

Figure 5 TauT protein expression in brain tissues and other organs of TauT^{loxP/loxP/Cre+} rats and WT rats

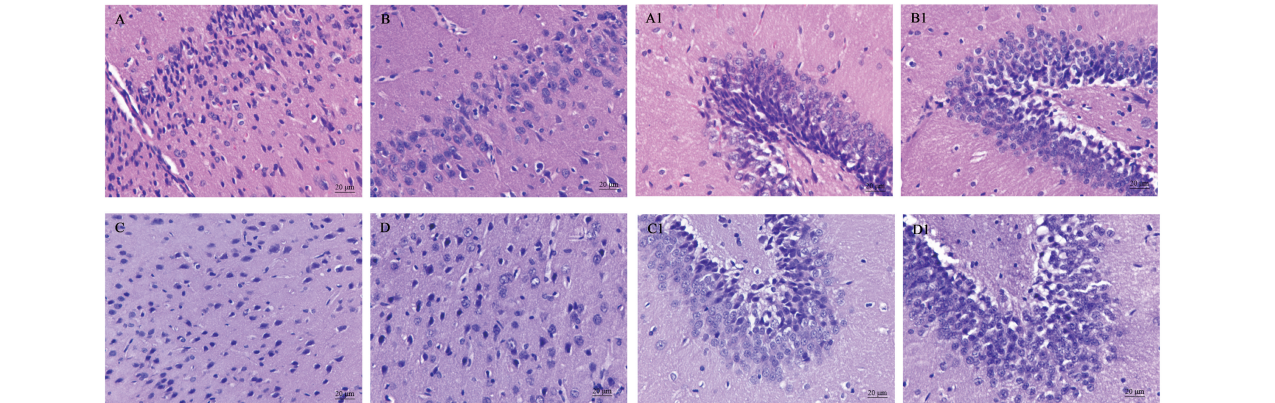


注:A、B、C、D、E、F: TauT^{loxP/loxP/Cre+} 大鼠心、肝、肾、皮质、海马 (CA3)、小脑; G、H、I、J、K、L: WT 大鼠心、肝、肾、皮质、海马 (CA3)、小脑。

图 6 TauT^{loxP/loxP/Cre+} 大鼠和 WT 大鼠在心、肝、肾、皮层、海马和小脑免疫组化结果比较

Note. A/B/C/D/E/F, TauT^{loxP/loxP/Cre+} rat heart, liver, kidney, cortex, hippocampus (CA3), cerebellum. G/H/I/J/K/L, WT rat heart, liver, kidney, cortex, hippocampus, cerebellum.

Figure 6 Comparison of immunohistochemical results in the heart, liver, kidney, cortex, hippocampus and cerebellum of TauT^{loxP/loxP/Cre+} and WT rats

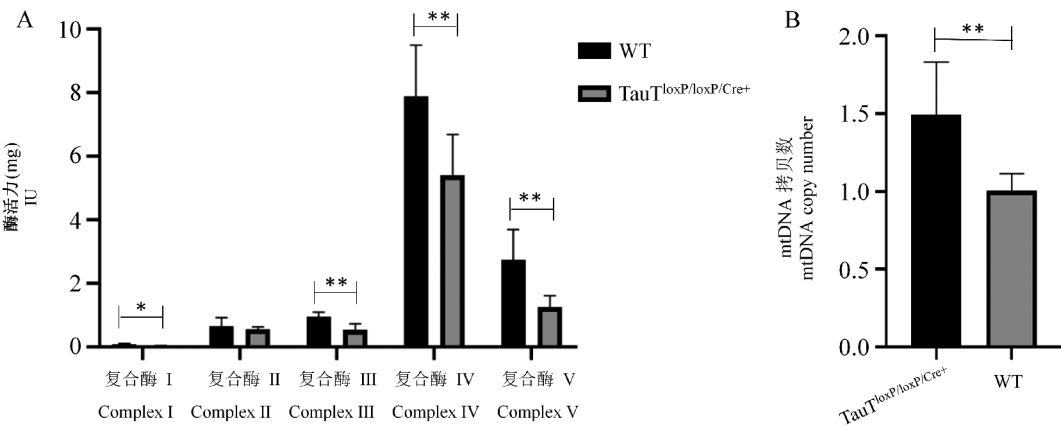


注:A、A1: 2 月龄 WT 大鼠皮质、海马; B、B1: 2 月龄 TauT^{loxP/loxP/Cre+} 大鼠皮质、海马; C、C1: 12 月龄 WT 大鼠皮质、海马; D、D1: 12 月龄 TauT^{loxP/loxP/Cre+} 大鼠皮质、海马。

图 7 不同月龄 TauT^{loxP/loxP/Cre+} 大鼠和 WT 大鼠脑皮质、海马 HE 染色

Note. A/A1, Cortex and hippocampus of 2-month-old WT rats. B/B1, Cortex and hippocampus of 2-month-old TauT^{loxP/loxP/Cre+} rats. C/C1, Cortex and hippocampus of 12-month-old WT rats. D/D1, Cortex and hippocampus of 12-month-old TauT^{loxP/loxP/Cre+} rats.

Figure 7 HE staining of cerebral cortex and hippocampus in TauT^{loxP/loxP/Cre+} rats and WT rats of different months of age



注:A: TauT^{loxP/loxP/Cre+}大鼠和 WT 大鼠脑组织线粒体呼吸链复合物酶活性;B: TauT^{loxP/loxP/Cre+}大鼠和 WT 大鼠脑组织 mtDNA 相对表达量。与 WT 组比较, * P<0.05, ** P<0.01。

图 8 TauT^{loxP/loxP/Cre+}大鼠和 WT 大鼠脑组织线粒体呼吸链复合物酶活性和 mtDNA 相对表达量 (n=6)
Note. A, Activity of mitochondrial respiratory chain complex in brain tissue of TauT^{loxP/loxP/Cre+} rats and WT rats. B, Relative expression levels of mtDNA in brain tissues of TauT^{loxP/loxP/Cre+} rats and WT rats. Compared with WT group, * P<0.05, ** P<0.01.

Figure 8 Activity of mitochondrial respiratory chain complex enzyme in TauT^{loxP/loxP/Cre+} rat and WT rat brain tissues

表 2 TauT^{loxP/loxP/Cre+}大鼠和 WT 大鼠脑组织线粒体呼吸链复合物酶活性测定 (x̄±s, n=6)

Table 2 Activity of mitochondrial respiratory chain complex enzymes in brain tissues of TauT ^{loxP/loxP/Cre+} rats and WT rats					
分组 Groups	复合酶 I Complex I	复合酶 II Complex II	复合酶 III Complex III	复合酶 IV Complex IV	复合酶 V Complex V
TauT ^{loxP/loxP/Cre+}	0.04±0.00*	0.55±0.08	0.53±0.18**	5.41±1.18**	1.25±0.33**
WT	0.08±0.01	0.64±0.26	0.94±0.14	7.90±1.50	2.74±0.87

注:与 WT 组比较, * P<0.05, ** P<0.01。
Note. Compared with WT group, * P<0.05, ** P<0.01.

3 讨论

传统的条件性敲除技术需要使用胚胎干细胞的同源重组、胚胎操作、显微注射和辅助生殖技术^[21],操作繁琐,实验周期长^[22]。目前,对于 TauT 敲除模型的研究,一般通过敲除 TauT 第 1 外显子或者第 2~5 外显子形成 TauT 全身性敲除小鼠, TauT 的全身性敲除会引起心肌功能的损伤和视网膜变形以及运动能力的减弱^[23-24]。众所周知,大鼠提供的人类疾病模型,尤其是神经疾病的行为学和药理学上,大鼠比小鼠提供更有效的生理学指标^[25-26]。本文我们用 SD 大鼠,选择 TauT 第 5 外显子,运用 CRISPR/Cas9 技术在基因组中产生精确的双链断裂,提高了基因打靶的效率,同时利用同源重组机制,整合转染的同源 DNA 模板^[27-28]。结合 Cre-loxP 技术,构建 TauT 在中枢神经系统中特异性敲除大鼠模型。查阅文献,这是在国际上 Tau 领域中第一次利用大鼠的 TauT 基因的条件性敲除报道,进一步证明 CRISPR/Cas9 技术介导目的基因的条件性敲除

是一种十分可靠的方法^[22]。

本实验成功构建了 TauT^{loxP/loxP/Cre+} 大鼠模型,从大鼠繁殖情况来看,插入的 loxP 序列可以稳定遗传,且符合孟德尔遗传定律。通过 RT-PCR 结果显示:与 WT 大鼠比较, TauT^{loxP/loxP/Cre+} 大鼠在脑组织中 TauT mRNA 表达水平显著降低,表明 TauT 基因的确被明显敲除。免疫印迹显示:与 WT 相比, TauT^{loxP/loxP/Cre+} 大鼠 TauT 表达在脑中显著降低,而在心、肝和肾中 TauT 表达并无显著差异,这与大脑组织的免疫组化结果一致。对提取 TauT^{loxP/loxP/Cre+} 大鼠的小脑做免疫组化结果也表明了 TauT 蛋白的敲除。但是在本实验中发现大脑组织仍有少量的 TauT 的基因和蛋白表达,这可能与 Nestin-Cre 大鼠有关。为了实现中枢神经系统 TauT 基因的特异性敲除, Cre 重组酶的表达受大鼠 Nestin 启动子和内含子 2 增强子控制。Nestin 是神经干细胞特征性标志物,在胚胎发育早期的神经上皮中表达,对神经元分化具有重要作用。由于 Nestin 神经特异性启动只在神经干细胞中表达,而我们的样本是取自大鼠

半脑,这其中包含着大量的细胞类型,可能包含着 TauT 表达的细胞,从而导致产生了少量的 TauT 表达。

有趣的是,在对心、肝和肾组织的 TauT mRNA 表达水平研究发现: TauT^{loxP/loxP/Cre+} 大鼠的心和肝组织 TauT mRNA 表达水平没有受到影响,肾组织中 TauT mRNA 表达水平却显著降低,但不影响其 TauT 蛋白表达。这种结果表明: Nestin-Cre 介导的重组不仅发生在神经外胚层,也发生在肾细胞类型中。这也证实了 Dubois 研究 Nestin-Cre 大鼠在肾中表达的结果^[29]。本实验中我们多次实验证实大鼠肾的 TauT mRNA 基因下降而蛋白质表达不变,表明对于肾,中枢神经 TauT 敲除只是影响其转录水平,还未出现翻译水平的变化即蛋白功能的变化。这可能是由于 mRNA 表达量的下调不足以引起蛋白表达量的变化。一般而言,真核生物中基因表达的转录和翻译两个水平所发生时间和位点存在时空间隔,后者因磷酸化等一系列转录后修饰,对蛋白功能的调控比较复杂。由于不同的半衰期, mRNA 和蛋白质水平有时不能直接相关,有时会有相反的结果。

从基因敲除大鼠表型上观察,我们很难判断 TauT^{loxP/loxP/Cre+} 大鼠和 WT 大鼠之间的区别。观察其生长 1~6 月龄体重变化过程中, TauT^{loxP/loxP/Cre+} 大鼠并没有显示出明显的不同,出生也没有出现致死现象,其脑、心、肝、肾、肺、脾等脏体系数的比较也无明显区别(数据未列出)。这与我们同期所构建的 TauT 全身性敲除大鼠会体重减轻有所不同^[30]。对 TauT^{loxP/loxP/Cre+} 大鼠的核磁共振检测,也未发现实验大鼠脑部无明显病变,核磁波谱也显示 ROI 区的 Tau 水平无明显差异(数据未列出)。但 HE 染色显示: TauT^{loxP/loxP/Cre+} 大鼠脑皮质、海马 DG 区细胞数量和致密度有所减低,这可能是由于 TauT 的敲除会导致 Tau 供给不足,使脑组织细胞体积调节能力降低,从而影响了脑组织细胞形态、数量的变化。此外, TauT 敲除在脑中可能出现时间累积效应。与年老的 WT 大鼠相比,年老大鼠 TauT^{loxP/loxP/Cre+} 大鼠脑皮质和海马 DG 区细胞出现极性消失,结构排列疏松、紊乱以及细胞核胞浆分界模糊等现象,这些结果表明 TauT 敲除会加速大鼠的衰老。

利用我们所构建的 TauT^{loxP/loxP/Cre+} 大鼠模型,我们初步研究了脑组织线粒体的 mtDNA 和线粒体呼吸链复合酶 I、II、III、IV、V 活性。发现中枢神经系统的 TauT 的条件性敲除会抑制脑组织线粒体呼吸

链复合酶 I、III、IV、V 活性,而复合酶 II 的活性没有收到影响。我们分析,这可能与 Tau 的抗氧化特性和阻止线粒体渗透性的转变有关^[11], TauT 敲除抑制了 Tau 的摄取,从而导致线粒体抵抗细胞内的氧化应激和渗透性转变能力降低,线粒体呼吸链复合酶活性降低, ATP 合成的减少。而大鼠脑组织 mtDNA 的拷贝数可能是对其线粒体 ATP 减少所做的代偿性的增加^[31]。后期我们进一步实验进行论证。

综上所述,我们用 CRISPR/Cas9 和 Cre-loxp 技术成功构建了中枢神经系统 TauT 敲除大鼠模型,发现 TauT 的敲除对脑组织的形态、线粒体呼吸链复合酶活性及 mtDNA 拷贝数都有着较显著影响,为研究 Tau 及 TauT 在中枢神经系统中的作用提供一种有效的实验平台,为进一步研究 Tau 治疗神经疾病的机理提供了一种稳定而有力的工具。

参考文献:

- [1] Gu H, Marth JD, Orban PC, et al. Deletion of a DNA polymerase beta gene segment in T cells using cell type-specific gene targeting [J]. Science, 1994, 265(5168): 103-106.
- [2] Rippes H, Shen W. Review: taurine: a "very essential" amino acid [J]. Mol Vis, 2012, 18: 2673-2686.
- [3] 李平丽, 吴晓, 杨建成. 牛磺酸对宫内生长受限孕鼠生长轴激素与基因的影响 [J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(3): 345-350.
- [4] Tochitani S. Functions of maternally-derived taurine in fetal and neonatal brain development [J]. Adv Exp Med Biol, 2017, 975(1): 17-25.
- [5] Pasantes-Morales H, Hernández-Benítez R. Taurine and brain development: trophic or cytoprotective actions? [J]. Neurochem Res, 2010, 35(12): 1939-1943.
- [6] Ansar M, Ranza E, Shetty M, et al. Taurine treatment of retinal degeneration and cardiomyopathy in a consanguineous family with SLC6A6 taurine transporter deficiency [J]. Hum Mol Genet, 2020, 29(4): 618-623.
- [7] Dong JF, Zheng XQ, Rui HB. Effect of taurine on immune function in mice with T-cell lymphoma during chemotherapy [J]. Asian Pac J Trop Med, 2017, 10(11): 1090-1094.
- [8] Wang Q, Fan W, Cai Y, et al. Protective effects of taurine in traumatic brain injury via mitochondria and cerebral blood flow [J]. Amino acids, 2016, 48(9): 2169-2177.
- [9] Oja SS, Saransaari P. Significance of taurine in the brain [J]. Adv Exp Med Biol, 2017, 975(1): 89-94.
- [10] Lambert IH. Regulation of the cellular content of the organic osmolyte taurine in mammalian cells [J]. Neurochem Res, 2004, 29(1): 27-63.
- [11] Ahmadi N, Ghanbarinejad V, Ommati MM, et al. Taurine

- prevents mitochondrial membrane permeabilization and swelling upon interaction with manganese; Implication in the treatment of cirrhosis-associated central nervous system complications [J]. J Biochem Mol Toxicol, 2018, 32(11): e22216.
- [12] 范维佳, 黄慧玲, 蔡英, 等. 牛磺酸对重型颅脑创伤大鼠线粒体呼吸链酶活性的影响 [J]. 中华创伤杂志, 2015, 31(3): 254-258.
- [13] Suzuki T, Suzuki T, Wada T, et al. Taurine as a constituent of mitochondrial tRNAs: new insights into the functions of taurine and human mitochondrial diseases [J]. EMBO J, 2002, 21(23): 6581-6589.
- [14] Suzuki T, Nagao A, Suzuki T. Human mitochondrial diseases caused by lack of taurine modification in mitochondrial tRNAs [J]. Wiley Interdiscip Rev RNA, 2011, 2(3): 376-386.
- [15] Wu G, Yang J, Lv H, et al. Taurine prevents ethanol-induced apoptosis mediated by mitochondrial or death receptor pathways in liver cells [J]. Amino Acids, 2018, 50(7): 863-875.
- [16] Li K, Inam-U-Llah, Shi X, et al. Anti-apoptotic effect of taurine on schwann cells exposed to high glucose *in vitro* [J]. Adv Exp Med Biol, 2019, 1155: 787-799.
- [17] Jong CJ, Ito T, Schaffer SW. The ubiquitin-proteasome system and autophagy are defective in the taurine-deficient heart [J]. Amino Acids, 2015, 47(12): 2609-2622.
- [18] Lambert IH, Kristensen DM, Holm JB, et al. Physiological role of taurine--from organism to organelle [J]. Acta Physiol (Oxf), 2015, 213(1): 191-212.
- [19] Gaucher D, Arnault E, Husson Z, et al. Taurine deficiency damages retinal neurones: cone photoreceptors and retinal ganglion cells [J]. Amino Acids, 2012, 43(5): 1979-1993.
- [20] Miyazaki T, Sasaki SI, Toyoda A, et al. Influences of taurine deficiency on bile acids of the bile in the cat model [J]. Adv Exp Med Biol, 2019, 1155: 35-44.
- [21] Thomas KR, Capecchi MR. Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells [J]. Cell, 1987, 51(3): 503-512.
- [22] Kudyba HM, Cobb DW, Florentin A, et al. CRISPR/Cas9 gene editing to make conditional mutants of human malaria Parasite *P. falciparum* [J]. J Vis Exp, 2018, 139: 57747.
- [23] Heller-Stilb B, van Roeyen C, Rascher K, et al. Disruption of the taurine transporter gene (*taut*) leads to retinal degeneration in mice [J]. FASEB J, 2002, 16(2): 231-233.
- [24] 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): 927-937.
- [25] Carreira JC, Jahanshahi A, Zeef D, et al. Transgenic rat models of huntington's disease [J]. Curr Top Behav Neurosci, 2015, 22: 135-147.
- [26] Smalley E. CRISPR mouse model boom, rat model renaissance [J]. Nat Biotechnol, 2016, 34(9): 893-894.
- [27] Shen B, Zhang J, Wu H, et al. Generation of gene-modified mice via Cas9/RNA-mediated gene targeting [J]. Cell Res, 2013, 23(5): 720-723.
- [28] Ma Y, Zhang X, Shen B, et al. Generating rats with conditional alleles using CRISPR/Cas9 [J]. Cell Res, 2014, 24(1): 122-125.
- [29] Dubois NC, Hofmann D, Kaloulis K, et al. Nestin-Cre transgenic mouse line Nes-Cre1 mediates highly efficient Cre/loxP mediated recombination in the nervous system, kidney, and somite-derived tissues [J]. Genesis, 2006, 44(8): 355-360.
- [30] 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.
- [31] Otten AB, Smeets HJ. Evolutionary defined role of the mitochondrial DNA in fertility, disease and ageing [J]. Hum Reprod Update, 2015, 21(5): 671-689.

[收稿日期]2020-12-25