

## 应用 CRISPR/Cas9 技术制备 Vasohibin-2 基因敲除小鼠模型及验证

代行龙,李 伟,涂 敏,刘 显,苗 毅,高文涛\*

(南京医科大学第一附属医院胰腺中心,江苏 南京 210029)

**[摘要]** 目的:利用 Cas9/RNA system gene targeting 技术高效构建 Vash2 基因敲除小鼠模型。方法:根据 Vash2 基因序列,设计 2 对 Vash2 基因的单链向导 RNA(single-guide RNA,sgRNA)引物序列并克隆进入 pU57-T7-GDNA 载体。利用 T7 RNA 聚合酶体外转录 sgRNA 和 Cas9 mRNA。将体外转录的 gRNA/Cas9 mRNA 显微注射入小鼠受精卵,通过 PCR 和基因测序对 Vash2 移码突变进行检测和鉴定。繁育 Vash2 基因敲除小鼠并分析后代突变情况。结果:顺利构建表达 sgRNA 载体并体外转录,成功将有活性的 sgRNA 和 Cas9 mRNA 直接注射入受精卵。基因测序鉴定获得 5 只 F0 代初建鼠。选取 5 号鼠与野生型鼠回交,得到 F1 代鼠,再相互交配得到 F2 代鼠。PCR 显示 F2 代鼠 Vash2 基因移码突变,成功建立 Vash2 基因敲除小鼠模型并传代繁育。结论:通过 Cas9/RNA system gene targeting 技术可以成功制备 Vash2 基因敲除鼠模型,是用于 Vash2 研究的有效工具。

**[关键词]** CRISPR/Cas9;Vasohibin-2;基因敲除鼠;sgRNA

**[中图分类号]** Q784

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2016)03-323-07

**doi:**10.7655/NYDXBNS20160314

## Establishment of Vasohibin-2 knockout mouse model with CRISPR/Cas9 gene targeting technology

Dai Xinglong, Li Wei, Tu Min, Liu Xian, Miao Yi, Gao Wentao\*

(Pancreas Center, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

**[Abstract]** **Objective:** To establish Vasohibin-2(Vash2) knockout mouse model with CRISPR/Cas9 gene targeting technology. **Methods:** A selected gene sequence of Vash2 was amplified with the primers of single-guide RNA (sgRNA), and then cloned into the plasmid pUC57-T7-GDNA. The Cas9 and sgRNAs were transcribed by T7 RNA polymerase *in vitro*. Transcribed gRNA/Cas9 mRNA was microinjected into the mouse zygote. The frame shifting mutation was validated by PCR and gene sequencing. Both the (F0 and F1 generation) knockout mice were analyzed. **Results:** The vector expressing sgRNA were successfully built. sgRNA and Cas9 mRNA were successfully transcribed and microinjected into mouse zygote. Five positive mice as the F0 generation were identified by gene sequencing. The No.5 mouse was selected to mate with wild-type mice, then achieved F1 generation were mated and produced F2 generation. The frame-shifted of Vash2 knockout mice (F2 generation) were evaluated by PCR and mutations were stably transmitted to the next generation. **Conclusion:** The Vash2 knockout mouse model was successfully built by Cas9/RNA system gene targeting technology, and it could be an efficient tool for Vash2 study.

**[Key words]** CRISPR/Cas9; Vasohibin-2; knockout mice; sgRNA

[Acta Univ Med Nanjing, 2016, 36(03): 323-329]

历史上最早的基因敲除小鼠模型是利用同源重组技术制备基因敲除小鼠 ES 细胞系,进一步通过囊胚注射制备基因敲除小鼠<sup>[1-2]</sup>。但这种方式具有复杂、耗时、成功率低等缺点。近年来新兴的 CRISPR/Cas9 系统,能够介导 RNA 导向的 DNA 识

别及编辑,使用一段序列特异性单链向导 RNA 分子(single-guide RNA,sgRNA)引导核酸内切酶到达相应靶点处,完成基因组的编辑与修饰。目前已经成功在细菌、水稻、小鼠、大鼠、斑马鱼、人等物种上得到运用<sup>[3-5]</sup>。本研究的具体原理是:crRNA (crispr RNA)通过碱基配对与tracrRNA (trans-activating RNA)结合形成双链 RNA。这一 tracrRNA:crRNA 二元复合体指导 Cas9 蛋白在 crRNA 引导序列靶标的特定位置

**[基金项目]** 国家自然科学基金(81172267)

\*通信作者(Corresponding author),E-mail:gao11@hotmail.com

点剪切双链 DNA, 打断目标基因, 再通过 NHEJ (nonhomologous end-joining) 修复机制, 随机插入或删除一定数量的碱基, 产生错误修复甚至移码突变, 而达到敲除靶基因的目的<sup>[6-7]</sup>。

Vasohibin-2 (Vash2) 基因属于 Vasohibin 家族的成员, 该基因家族由 Vash1 和 Vash2 共同组成。与 Vash1 不同的是, Vash2 在骨髓浸润的单核细胞中高表达, 不依赖血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 浓度调节, 不仅在孕中期的人胚胎组织内皮细胞中广泛表达, 还在肝癌、卵巢癌、乳腺癌等组织中表达较高并有促进肿瘤血管生成的作用<sup>[8-9]</sup>, 但具体作用机制不清, 可能是通过调控血管生成引起胚胎发育和肿瘤的发生和发展。本研究基于文献和本课题组前期的研究成果, 介绍了基于 CRISPR/Cas9 系统技术应用于 Vash2 基因敲除的实例, 成功制备了 Vash2 基因敲除小鼠, 为后续生物学功能研究奠定了基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

SPF 级 4~6 周龄 C57BL/6 背景小鼠 [许可证号: SCXK(苏)2005-0002]、大肠杆菌、PCR 纯化试剂盒、LB 琼脂平板、PEG4000、pUC57-T7-GDNA 表达载体、Cas9 表达载体、DNA 琼脂糖凝胶回收试剂均由南京大学模式动物研究所提供; 限制性内切酶 *Bsa* I、*Age* I、*Dra* I、T4 DNA 连接酶/T4 Buffer 连接酶、*Taq* 酶、dNTP 等 (NEB 公司, 美国), 质粒提取试剂 (Life Technologies 公司, 美国), T7 Ultra 试剂盒、MEGAshortscript Kit (Ambion 公司, 美国), 质粒中提

试剂 (Promega 公司, 美国); DH5 $\alpha$  感受态大肠杆菌 (北京天根公司); 氨苄青霉素、琼脂 A 粉末、Tris、SDS、EDTA (上海生工生物工程有限公司), 蛋白胨、酵母提取物 (Sigma 公司, 美国), 小鼠胚胎 KSOM 培养基 (Merck Millipore 公司, 美国); PCR 引物由美国 Invitrogen 公司合成, DNA 测序由深圳华大研究中心完成。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 sgRNA 设计和寡核苷酸链合成

根据 NCBI 上 Vash2 的基因序列, 定位于 1 号染色体的 1H6 区段 (Chromosome 1:190,947,648~190,979,296)。全长 4 021 bp, 有 8 个外显子, 表达蛋白全长 355 个氨基酸。选择转录起始密码子附近及下游 GN20GG 序列作为靶点。设计合成 2 条引物, 其中 1 条引物序列含有用于体外转录的 U6 启动子序列 (灰色)、靶点特异性序列 (绿色) 以及 sgRNA 骨架序列的前一部分, 另 1 条引物含有 sgRNA 骨架序列的其余部分 (图 1<sup>[10]</sup>)。根据在线设计 sgRNA 的软件 (<http://crispr.mit.edu/>) 设计合成 2 对 Vash2 基因的寡核苷酸链: ①正向序列 5'-CGCGTGGCTGCTCCGGATCGGG-3', 反向序列 5'-CGCCACCAGCGGGGGCTCCGAGG-3'; ②正向序列 5'-GCTCCGGGATCGGGTGCCTTTGG-3', 反向序列 5'-GTGAGCCTCGCCACCAGCGGGGG-3'。再用 PAGE 纯化寡核苷酸。将设计 Vash2 的 sgRNA 寡核苷酸单链按下述程序退火形成双链。95 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 1 min, -1 $^{\circ}$ C, 共计 22 个循环; 72 $^{\circ}$ C 30 min; 71 $^{\circ}$ C 1 min, -1 $^{\circ}$ C, 共计 46 个循环; 4 $^{\circ}$ C 保持。退火后的寡核苷酸立刻使用或者在 -20 $^{\circ}$ C 长期保存。

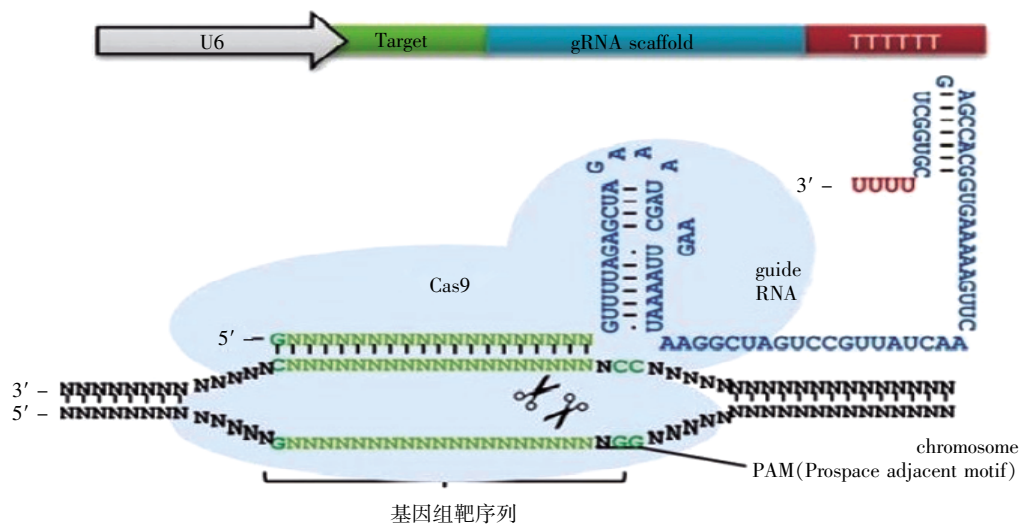


图 1 sgRNA 体外转录模板示意图

Figure 1 Template for transcription of sgRNA *in vitro*

### 1.2.2 sgRNA 表达载体构建和 PCR 鉴定

将 2 对 sgRNA 寡核苷酸双链稀释至 0.5  $\mu\text{mol/L}$ , 用 *Bsa* I 酶切 pUC57-T7-GDNA 质粒使其线性化并稀释至 50 mg/L, 两者分别进行混合连接。连接体系: 线性化的 pUC57-T7-GDNA 质粒载体 2  $\mu\text{L}$ , 稀释后的寡核苷酸双链 5  $\mu\text{L}$ , T4 DNA 连接酶 1  $\mu\text{L}$ , T4 缓冲液 1  $\mu\text{L}$ , 50%PEG4000 1  $\mu\text{L}$ , 共计 10  $\mu\text{L}$ 。反应条件: 22 $^{\circ}\text{C}$  30 min, 37 $^{\circ}\text{C}$  15 min, 16 $^{\circ}\text{C}$  6 h。用连接后产物转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞, 涂布于氨苄抗性的 LB 琼脂平皿上进行培养, 14~16 h 后在 LB 琼脂平板上挑选具有氨苄抗性的单克隆菌落, 溶于 LB 液并涡旋后, 将部分菌液接种到有氨苄抗性的 LB 液中摇菌培养, 另一部分菌液提取质粒 DNA, 进行 PCR 鉴定。阳性克隆鉴定产物大小为 190 bp, 阴性克隆无条带, 完成 sgRNA 载体构建。

### 1.2.3 Cas9 和 sgRNA 表达载体体外转录

Cas9 表达载体经 *Age* I 酶切线性化, sgRNA 的表达载体 pUC57-T7-GDNA-sgRNA 经 *Dra* I 酶切线性化, 两者均经酚-氯仿抽提和乙醇沉淀进行纯化, 溶于无核酸酶的水中, 作为模板用于体外转录。sgRNA 的体外合成利用 MEGA shortscript Kit 在体外通过 T7 RNA 聚合酶完成。Cas9 mRNA 的合成利用 T7 Ultra 试剂盒在体外通过 T7 RNA 聚合酶完成。

### 1.2.4 Cas9 mRNA/sgRNA 的原核注射

显微注射所使用的受精卵来自与同品系雄鼠交配后超排的母鼠。注射前将受精卵培养在 KSOM 胚胎培养基当中。显微注射用 TE 缓冲液(无核酸酶)将针对 *Vash2* 的 sgRNA 与 Cas9 mRNA 混合并稀释至 10 ng/ $\mu\text{L}$  和 20 ng/ $\mu\text{L}$ 。使用显微操作装置将上述溶液通过显微注射针头注入单细胞期的 C57BL/6 鼠受精卵中。注射后的受精卵被立即或经 KSOM 过夜培养后移植进假孕 C57BL/6 小鼠, 培育后得到 F0 代小鼠。

### 1.2.5 小鼠 *Vash2* 基因 PCR 鉴定及测序

新生小鼠出生 7~14 d 后, 剪下脚趾并标记编号, 取尾后应用苯酚-氯仿法提取基因组 DNA。设计 2 对包含 sgRNA 作用靶点的引物用于 PCR 扩增(977 bp): *Vash-GT-Tf1*: 5'-CCCTCGAGTCTTCTTGC-TACACA-3', *Vash-GT-tR1*: 5'-GGA-GGTAAAACAC-TCACGGA-3'。另一引物序列(324 bp): 42: 5'-CTAG-GCCACAGAATTGAAAGATCT-3', 43: 5'-GTAGGTG-GAAATTCTAGCATCATCC-3'。PCR 反应体系: 25  $\mu\text{L}$ , 采用降落 PCR 程序: 95 $^{\circ}\text{C}$  5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$  30 s, 68 $^{\circ}\text{C}$  30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$  60 s; 95 $^{\circ}\text{C}$  30 s, 58 $^{\circ}\text{C}$  30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$  60 s, 共计 40 个

循环; 72 $^{\circ}\text{C}$  5 min, 4 $^{\circ}\text{C}$  保存。用 PCR 纯化试剂纯化 PCR 产物, 通过 PCR 产物大小判断可能存在的阳性鼠。如果 CRISPR/Cas9 技术修饰 *Vash2* 基因相应位点导致其突变, 该 PCR 产物将消失、代之以缩短或增长的异常表达片段。为进一步验证突变情况, 将通过 TA 克隆、测序进一步检测确定突变(图 2)。

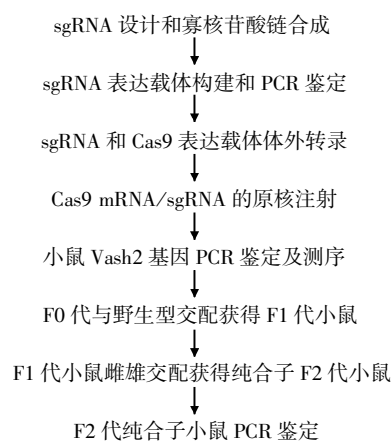


图 2 实验流程图

Figure 2 Flow chart

### 1.2.6 繁育 *Vash2* 基因敲除小鼠并分析后代突变情况

将出生的 F0 代鼠饲养于南京大学实验动物室的 SPF 环境(12 h:12 h 照明节律), 食物与饮水充足。依据 PCR 和 TA 克隆、测序, 挑选出删除 *Vash2* 基因片段较大的 F0 代鼠与同龄性成熟野生 B6 鼠回交得到 F1 代鼠。将性成熟 F1 代杂合子相互交配, 每只 F1 代孕鼠单独饲养繁育, 得到 F2 代鼠并进一步验证。设计 *Vash2* 引物序列(133 bp): *VASH2-F* 5'-CACCCAAAATCACCAAAGGC-3', *VASH2-R* 5'-GGAACCCGCTCTTGTTTCAC-3'。反应体系 20  $\mu\text{L}$ , PCR 程序: 94 $^{\circ}\text{C}$  5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$  30 s, 60 $^{\circ}\text{C}$  30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$  1 min, 40 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$  10 min; 4 $^{\circ}\text{C}$  保存。

## 2 结果

### 2.1 设计 *Vash2* 的 sgRNA 序列和表达载体的构建

利用 CRISPR/Cas9 gene targeting 技术, 在第 1 个和第 2 个编码外显子上面选择 sgRNA 靶点, 评估后选择高效的 sgRNA 进行注射, 考虑到靶点效率及后期鉴定, 因此选择设计双靶点(图 3)。经 *Bsa* I 酶切使 pUC57-T7-GDNA 质粒线性化, 设计的 sgRNA 寡核苷酸双链形成的黏性末端与 *Bsa* I 酶切的黏性末端相匹配。sgRNA 寡核苷酸双链分别与上述载体

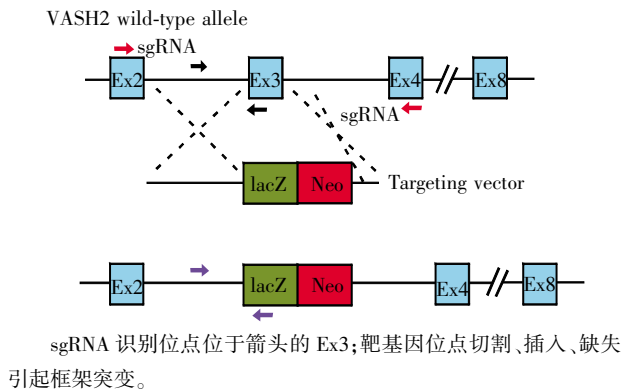


图 3 sgRNA 识别 Vash2 基因外显子示意图

Figure 3 Recognition sites of sgRNA in Vash2 exon

连接,成功构建 pU57-T7-GDNA-sgRNA 载体。经测序验证序列正确无误。

2.2 获得 F0 代 Vash2 基因敲除小鼠

sgRNA 表达载体 pUC57-T7-GDNA-sgRNA 和 Cas9 表达载体经体外转录,均匀混合 sgRNA 和 Cas9 mRNA 至 10 ng/μL 和 20 ng/μL,通过原核注

射法显微注射 B6 鼠的受精卵并将受精卵移植进 B6 假孕鼠,获得 F0 代小鼠共计 44 只(表 1)。

2.3 利用 PCR 检测和基因测序鉴定

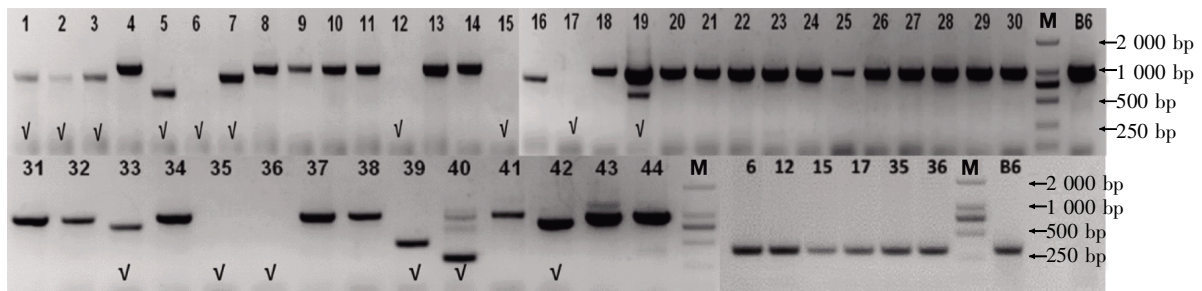
检测 44 只 F0 代小鼠,第 1 轮 PCR 结果(图 4),与野生型小鼠比较,PCR 产物大小发生明显变化,条带单一,大约以 PAM (prospace adjacent motif,NGG 基序)区域为中心,各小鼠均有不同程度的碱基插入或缺失突变,其中缺失碱基数目较多的有 1(♂)、2(♂)、3(♂)、5(♀)、7(♀)、19(♀)、33(♂)、39(♀)、40(♀)、42(♀)。其中 6、12、15、17、35、36 为疑似漂移样本。初步证明通过向小鼠受精卵显微注射经体外转录的 Cas9 mRNA 以及靶点特异性的 sgRNA 能够对小鼠 Vash2 基因进行高效突变。我们选取漂移样本的 PCR 产物进行 TA 克隆进一步测序确认。

第 2 轮 TA 克隆测序结果(表 2,图 5),其中 1(♂)、3(♂)、5(♀)、39(♀)为阳性移码突变的 F0 代小鼠,表明 Vash2 在 F0 代小鼠体内已经实现了高效敲除。

表 1 显微注射受精卵

Table 1 Zygote microinjection in vitro

日期	基因名称	项目背景	胚胎总数(枚)	存活数(枚)	移植数(枚)	移植受体(只)	妊娠数(只)	出生小鼠(只)	存活数(只)
2014-5-28	Vash2	B6	113	88	88	3	2	7	7
2014-5-28	Vash2	B6	115	75	75	3	3	13	13
2014-5-28	Vash2	B6	108	93	93	4	4	25	24



检测样本数 1~44。B6:对照组;M:DL2000 Marker;1、2、3、5、7、19、33、39、40、42:漂移样本;6、12、15、17、35、36:疑似漂移样本;√:选取做基因测序的阳性鼠。

图 4 F0 代基因敲除鼠 PCR 电泳结果

Figure 4 Electrophoretic results of F0 knockout mice after PCR

表 2 TA 克隆测序结果

Table 2 TA cloning and gene sequencing results

编号	删除区域	大小(bp)	判定
1	catcatgaccggctctgccgccgacctaccg—tggtgcacgttccaaggctcaccaccaga	169	可移码
2	ccccctgccgtgtgccctcatcatgaccggctc—aggggagagatggttaggcgccatcagaa	216	不能移码
3	gccccctgccgtgtgccctcatcatgaccggc—acgttgccaaggctcaccaccagaggggga	196	可移码
5	cgccccctgccgtgtgccctcatcatgaccgg—ctctgaggttgggctgagccaaatccatta	429	可移码
33	cgccccctgccgtgtgccctcatcatgacc—tgggagcggatgtggctgcacgttccaa	180	不能移码
39	atgcccctccccagctgcagctgggtgtg—gctgcacgttccaaggctcaccaccagag	483	可移码,翻译起始上游序列同 时也被部分删除

A

20401	ACTGCTTTCA GSCCCGGTGC GTGAGCGGG TCCCTTCGT GTGTCTACG GCCGCGAGAG TTAAGGCCA CCCAACCTC CCGCGGGGC CTGATCCCG
20501	GCGTGCCGC GTCTCCGCC CCTTGCCTG GTGCCCCA TCATGACCG CTCTGCCGC GACTCTACC GCTGCCCCA CCCAAAATC ACCAAGGCA
20601	CCCGATCCG GAGCAGCAC GCGCGGCCG TGAGCCTCG CACCAGCGG GGCTCCGAG AGGAGGACAA AGACGGCGG GTGCTGTTC ACGTGAACAA
20701	GAGCGGGTC CCGATCGATA GCCACACTG GGAGCGGATG TGGCTGCAG TTGCCAAGT CCACCCAGA GGGGAGAGA TGGTAGGCG CATCAGAAC
20801	GCTGCCCTC TGGCTAAGT CAGTGGCTT GCTGGAAGG GTGGGATGG ATGGCGGGT TGGCAGGAT GGGACTGCT CAGCCATCC TTGGCAGGC

B

20401	ACTGCTTTCA GSCCCGGTGC GTGAGCGGG TCCCTTCGT GTGTCTACG GCCGCGAGAG TTAAGGCCA CCCAACCTC CCGCGGGGC CTGATCCCG
20501	GCGTGCCGC GTCTCCGCC CCTTGCCTG GTGCCCCA TCATGACCG CTCTGCCGC GACTCTACC GCTGCCCCA CCCAAAATC ACCAAGGCA
20601	CCCGATCCG GAGCAGCAC GCGCGGCCG TGAGCCTCG CACCAGCGG GGCTCCGAG AGGAGGACAA AGACGGCGG GTGCTGTTC ACGTGAACAA
20701	GAGCGGGTC CCGATCGATA GCCACACTG GGAGCGGATG TGGCTGCAG TTGCCAAGT CCACCCAGA GGGGAGAGA TGGTAGGCG CATCAGAAC
20801	GCTGCCCTC TGGCTAAGT CAGTGGCTT GCTGGAAGG GTGGGATGG ATGGCGGGT TGGCAGGAT GGGACTGCT CAGCCATCC TTGGCAGGC

C

20201	TCCCTCTC ACCCCGGCT CTTGCAATG CTCGCCATC CCGAGTCAG CTGGGTGTA GGCTTCGTG CGTCTTCCA GCCGCCITG TAGGTAATG
20301	GCGGGGCTG AAGCTCGCT TAGTCTGAA GGTGGGTCT GGGGAGCGA GCGCGAACC CCCATGCTG TCTTATTAG CTGCAGTGC TGTCTTTCC
20401	ACTGCTTTCA GSCCCGGTGC GTGAGCGGG TCCCTTCGT GTGTCTACG GCCGCGAGAG TTAAGGCCA CCCAACCTC CCGCGGGGC CTGATCCCG
20501	GCGTGCCGC GTCTCCGCC CCTTGCCTG GTGCCCCA TCATGACCG CTCTGCCGC GACTCTACC GCTGCCCCA CCCAAAATC ACCAAGGCA
20601	CCCGATCCG GAGCAGCAC GCGCGGCCG TGAGCCTCG CACCAGCGG GGCTCCGAG AGGAGGACAA AGACGGCGG GTGCTGTTC ACGTGAACAA
20701	GAGCGGGTC CCGATCGATA GCCACACTG GGAGCGGATG TGGCTGCAG TTGCCAAGT CCACCCAGA GGGGAGAGA TGGTAGGCG CATCAGAAC
20801	GCTGCCCTC TGGCTAAGT CAGTGGCTT GCTGGAAGG GTGGGATGG ATGGCGGGT TGGCAGGAT GGGACTGCT CAGCCATCC TTGGCAGGC
20901	AGGAGAGA GAGCTCGCT TAGTCTGAA GGTGGGTCT GGGGAGCGA GCGCGAACC CCCATGCTG TCTTATTAG CTGCAGTGC TGTCTTTCC
21001	AATCCATTAT GTATTGAGT CCGTTCGCT GTGCCCCA TCATGACCG CTCTGCCGC GACTCTACC GCTGCCCCA CCCAAAATC ACCAAGGCA
21101	CCTATCTGC CTCGGTGGT GTTTTACCT CCCCCCACC CCCAGTCTC CCTAGCAAT GACTTATGA GTGAATTTG AATCAATCG CCAAGCTTC

D

20201	TCCCTCTC ACCCCGGCT CTTGCAATG CTCGCCATC CCGAGTCAG CTGGGTGTA GGCTTCGTG CGTCTTCCA GCCGCCITG TAGGTAATG
20301	GCGGGGCTG AAGCTCGCT TAGTCTGAA GGTGGGTCT GGGGAGCGA GCGCGAACC CCCATGCTG TCTTATTAG CTGCAGTGC TGTCTTTCC
20401	ACTGCTTTCA GSCCCGGTGC GTGAGCGGG TCCCTTCGT GTGTCTACG GCCGCGAGAG TTAAGGCCA CCCAACCTC CCGCGGGGC CTGATCCCG
20501	GCGTGCCGC GTCTCCGCC CCTTGCCTG GTGCCCCA TCATGACCG CTCTGCCGC GACTCTACC GCTGCCCCA CCCAAAATC ACCAAGGCA
20601	CCCGATCCG GAGCAGCAC GCGCGGCCG TGAGCCTCG CACCAGCGG GGCTCCGAG AGGAGGACAA AGACGGCGG GTGCTGTTC ACGTGAACAA
20701	GAGCGGGTC CCGATCGATA GCCACACTG GGAGCGGATG TGGCTGCAG TTGCCAAGT CCACCCAGA GGGGAGAGA TGGTAGGCG CATCAGAAC
20801	GCTGCCCTC TGGCTAAGT CAGTGGCTT GCTGGAAGG GTGGGATGG ATGGCGGGT TGGCAGGAT GGGACTGCT CAGCCATCC TTGGCAGGC

A:1号小鼠,Exon2共删除-169 bp, 可以导致移码突变;B:3号小鼠共删除196 bp, 可以导致移码突变;C:5号小鼠共删除429 bp, 其中Exon2 coding sequence 区域删除268 bp,可以导致移码突变;D:39号小鼠,共删除483 bp,Exon2 coding 区域删除200 bp,可以导致移码突变。

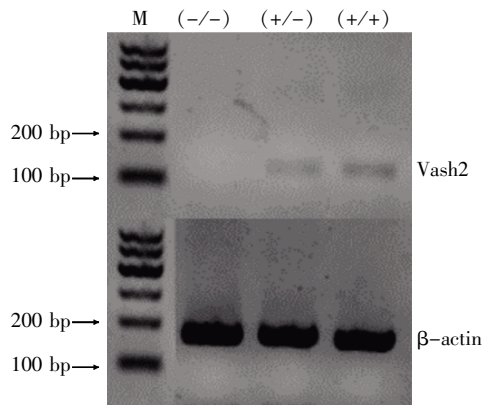
图 5 测序鉴定 F0 代鼠 1、3、5、39 基因型分析结果

Figure 5 Gene sequencing and analysis of F0 knockout mice (1,3,5,39)

2.4 建立 Vash2 敲除小鼠模型

将上述经鉴定过的 F0 鼠 1(♂)、3(♂)、5(♀)、39(♀) 与 B6 背景的野生型小鼠进行回交获得 F1 代。但我们主要选择了 Del 429 bp(Exon 删除268 bp) 的 5(♀)号小鼠进行繁育。原因是 5 号外显子敲除

片段较大,移码突变结果较可靠。同样的方法进一步验证来自同一个 5 号的 F1 代杂合子互配获得敲除 Vash2 基因的 F2 代纯合子。随机抽取 F2 代 Vash2 基因敲除小鼠进行 PCR 验证, 结果显示 Vash2 基因成功敲除(图 6)。



M: DL2000 Marker; (-/-): Vash2 基因敲除纯合子; (+/-): Vash2 基因敲除杂合子; (+/+): 野生型 C57BL/6 鼠。

图 6 F2 代鼠 Vash2 基因敲除 PCR 电泳结果

Figure 6 Electrophoretic results of F2 knockout mice after PCR

### 3 讨论

基因敲除技术是研究基因功能直接有效的方法之一。近年来新的基因靶向敲除技术不断出现,如锌指核酸酶(zinc finger nucleases,ZFN)技术<sup>[11-12]</sup>、转录激活子样效应因子核酸酶(transcription activator-like effector nucleases,TALENs)技术<sup>[13-15]</sup>和规律间隔的重复短回文序列簇(clustered regularly interspaced short palindromic repeats,CRISPR)/(crispr-associated,Cas)系统。CRISPR/Cas9 最早在细菌中发现,是细菌用来抵御入侵的噬菌体或病毒 DNA 等外源 DNA 片段入侵而建立的免疫防御机制<sup>[16]</sup>,依据主要的核心组成元件和序列,CRISPR/Cas 系统主要分为 I、II、III 型,而 II 型来源的 Cas9 蛋白,表现出非常强的 DNA 裂解活性。Cas9 包含有 1 个 HNH 基序和 3 个 RuvC 基序,分别同源与 HNH 和 RuvC 内切核酸酶,PAM 是 Cas9 蛋白识别序列的必要条件,使其能够聚集到 PAM 区域进行识别切割。CRISPR 能够转录产生前体 crRNA(Pre-CRISPR RNA,Pre-crRNA),Pre-crRNA 经过 Cas9-tracrRNA 复合物加工后生成成熟的 crRNA,crRNA 的 5' 端区域,能够与靶位点互补配对,而 3' 端区域能够与 tracrRNA 及 Cas9 形成复合物,从而引导 Cas9 蛋白结合于靶位点进行特异性切割使 DNA 双链断裂。这种核酸酶活性仅仅需要设计一种非编码 RNA 即小导向性 RNA (sgRNA),在其介导下即可实现定向基因打靶。最近研究也表明了 Cas9 能够在 sgRNA 的作用下,识别含有 PAM 靶序列,并实现靶 DNA 序列的双链断裂<sup>[17-18]</sup>。本研究依据文献报道,设计

sgRNA 的作用靶点,依赖于 crRNA 与 tracrRNA、Cas9 蛋白形成的核糖核蛋白复合物来识别靶序列上的 PAM 以及 Protospacer,最终实现对特定靶向修饰位点的修饰。该技术具有许多优越性:效率更高,易于操作,容易得到纯合子突变体,免去了构建以及筛选 ZFN 和 TALEN 串联碱基识别模块组合的过程,可供靶向序列有着更高的出现频率及更大的灵活性,从而为精确的基因组编辑提供了更多选择。但该系统是否有脱靶效应尚需进一步研究。

本研究将 sgRNA 和 Cas9 RNA 混合物注入 256 枚受精卵移植进 10 只假孕鼠,结果有 9 只小鼠妊娠,最终生产 44 只小鼠,通过 PCR 鉴定后获得 16 只阳性小鼠,突变率为 36.3%。因每只 F0 代小鼠的基因删除情况都不一样,故 1 个 F0 代小鼠称为一个 line。F0 代首建鼠会出现多种删除的情况,故原则上 F0 代小鼠之间不能相互交配。为了确保产生的移码突变能整合进生殖系并稳定传代,将其与同背景的野生型小鼠进行交配,选择其中产生移码突变的后代进行进一步繁育。本研究获得的 F0 代和 F1 代鼠均先通过 PCR 方法对基因片段的删除情况进行鉴定,然后将 PCR 产物连接 T 载体,再进行测序确认基因删除的具体片段和是否产生移码突变。对确认产生移码突变的来自于同一个 line 的 F1 代杂合子再通过其互配获得 Vash2 基因敲除的纯合子小鼠。为了验证所建鼠系,对纯合子子代亦进行了 PCR 鉴定,从而得到稳定传代的基因突变小鼠。

Vash2 基因是近期发现的属于 Vasohibin 家族的成员,与 Vash1 同源,有促进细胞增殖和血管生成的作用。随着对 Vash2 基因机制研究的不断深入,成功构建基因敲除动物模型,为抗血管生成和促血管生成治疗,阐明 Vash2 的基本机制,发挥了重要作用<sup>[19-20]</sup>。

本研究利用 Cas9/RNA system gene targeting 技术,以 Vash2 基因为靶点,通过向小鼠受精卵内显微注射 Cas9 mRNA 和高效 sgRNA 来实现对目的基因 RNA 的靶向切割与破坏。该模型的建立,为后续研究 Vash2 在癌症发病过程中的作用机制提供了重要工具,也为其他重要基因体内功能研究提供了技术借鉴。

### 【参考文献】

- [1] Thomas KR, Capecchi MR. Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells [J]. Cell, 1987, 51(3): 503-512

- [2] Mansour SL,Thomas KR,Capecci MR. Disruption of the proto-oncogene int-2 in mouse embryo-derived stem cells;a general strategy for targeting mutations to non-selectable genes[J]. *Nature*,1988,336(6197):348-352
- [3] Li W,Teng F,Li T,et al. Simultaneous generation and germline transmission of multiple gene mutations in rat using CRISPR-Cas systems[J]. *Nat Biotechnol*,2013,31(8):684-686
- [4] Hsu PD,Lander ES,Zhang F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering[J]. *Cell*,2014,157(6):1262-1278
- [5] Auer TO,Duroure K,De Cian A,et al. Highly efficient CRISPR/Cas9-mediated knock-in in zebrafish by homology-independent DNA repair[J]. *Genome Res*,2014,24(1):142-153
- [6] Burgess DJ. Technology:a CRISPR genome-editing tool[J]. *Nat Rev Genet*,2013,14(2):80
- [7] Jinek M,Chylinski K,Fonfara I,et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity[J]. *Science*,2012,337(696):816-821
- [8] Xue X,Gao W,Sun B,et al. Vasohibin 2 is transcriptionally activated and promotes angiogenesis in hepatocellular carcinoma[J]. *Oncogene*,2013,32(13):1724-1734
- [9] Kimura H,Miyashita H,Suzuki Y,et al. Distinctive localization and opposed roles of vasohibin-1 and vasohibin-2 in the regulation of angiogenesis[J]. *Blood*,2009,113(19):4810-4818
- [10] Mali P,Yang LH,Esvelt KM,et al. RNA-Guided human genome engineering via Cas9[J]. *Science*,2013,339(6121):823-826
- [11] Brown AJ,Fisher DA,Kouranova E,et al. Whole-rat conditional gene knockout via genome editing[J]. *Nat Methods*,2013,10(7):638-640
- [12] Geurts AM,Cost GJ,Freyvert Y,et al. Knockout rats via embryo microinjection of zinc-finger nucleases[J]. *Science*,2009,325(5939):433
- [13] Bedell VM,Wang Y,Campbell JM,et al. In vivo genome editing using a high-efficiency TALEN system[J]. *Nature*,2012,491(7422):114-118
- [14] Tesson L,Usal C,Ménoiret S,et al. Knockout rats generated by embryo microinjection of TALENs[J]. *Nat Biotechnol*,2011,29(8):695-696
- [15] Miller JC,Tan S,Qiao G,et al. A TALE nuclease architecture for efficient genome editing[J]. *Nat Biotechnol*,2011,29(2):143-148
- [16] Wiedenheft B,Sternberg SH,Doudna JA. RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea[J]. *Nature*,2012,482(7385):331-338
- [17] Cong L,Ran FA,Cox D,et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems[J]. *Science*,2013,339(6121):819-823
- [18] Chen S,Sanjana NE,Zheng K,et al. Genome-wide CRISPR screen in a mouse model of tumor growth and metastasis[J]. *Cell*,2015,160(6):1246-1260
- [19] 葛倩倩,涂 敏,高文涛,等.核型 VASH2 促进人胚胎组织细胞的增殖研究[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*,2015,35(5):600-606

[收稿日期] 2015-10-22

(上接第 292 页)

- for prognosis and therapeutic target in gastric cancer[J]. *Mol Biol (Mosk)*,2014,48(1):84-90
- [8] Zhen C,Chen L,Zhao Q,et al. Gankyrin promotes breast cancer cell metastasis by regulating Rac1 activity[J]. *Oncogene*,2013,32(29):3452-3460
- [9] Li JA,Knobloch TJ,Kresty LA,et al. Gankyrin,a biomarker for epithelial carcinogenesis,is overexpressed in human oral cancer[J]. *Anticancer Res*,2011,31(9):2683-2692
- [10] Vanguilder HD,Vrana KE,Freeman WM. Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis[J]. *Biotechniques*,2008,44(5):619-626
- [11] Krzywda S,Brzozowski AM,Higashitsuji H,et al. The crystal structure of gankyrin,an oncoprotein found in complexes with cyclin-dependent kinase 4,a 19 S proteasomal ATPase regulator,and the tumor suppressors Rb and p53[J]. *J Biol Chem*,2004,279(2):1541-1545
- [12] Wang WP,Yan XL,Wm L,et al. Clinicopathologic features and prognostic implications of Gankyrin protein expression in non-small cell lung cancer[J]. *Pathol Res Pract*,2015,211(12):939-947
- [13] Jing HB,Zhang GM,Meng LS,et al. Gradually elevated expression of Gankyrin during human hepatocarcinogenesis and its clinicopathological significance[J]. *Sci Rep*,2014,4:5503
- [14] Zhang JW,Yang YB,Zhang ZB,et al. Gankyrin plays an essential role in estrogen-driven and GPR30-mediated endometrial carcinoma cell proliferation via the PTEN/PI3K/AKT signaling pathway[J]. *Cancer Lett*,2013,339(2):279-287
- [15] Qiu ZH,Wu CT,Lao MF,et al. Growth suppression and immunogenicity enhancement of Hep-2 or primary laryngeal cancer cells by adenovirus-mediated co-transfer of human wild-type p53,granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and B7-1 genes[J]. *Cancer Lett*,2002,182(2):147-154

[收稿日期] 2015-09-21