

## CRISPR/Cas9介导的猪 *Six1* 和 *Six4* 基因敲除细胞系的建立

王俊政, 李艳如, 赵丽华, 刘曼菱, 张曼玲, 金 永, 陈俏羽, 王晨宇, 尤志欢, 李荣凤\*

南京医科大学江苏省异种移植重点实验室, 江苏 南京 211166

**[摘要]** 目的: 利用干细胞囊胚互补技术再生同种或异种动物器官已得到验证, 其重要的前提是需要构建出相应的器官缺失动物模型。本文拟通过 CRISPR/Cas9 基因编辑技术建立猪 *Six1* 单基因和 *Six1/Six4* 双基因敲除猪细胞系, 为构建肾脏发育缺陷和缺失猪模型奠定重要的研究基础。方法: 选取猪 *Six1* 基因和 *Six4* 基因第一外显子为敲除靶点, 分别设计并合成单导向 RNA (single guide RNA, sgRNA), 将其插入含有 Cas9 骨架的 PX330 质粒, 分别构建 *Six1* 基因和 *Six4* 基因敲除打靶载体 PX330-sgRNA1 和 PX330-sgRNA4; 用 T7EN1 酶验证打靶载体敲除效率后, 将高效打靶载体与含 G418 抗性的质粒 (pCMV-tdTomato) 共转染原代猪胎儿成纤维细胞 (porcine fetal fibroblasts, PFFs) 中, 并通过药物筛选获得单克隆细胞群落, 随后对单克隆细胞进行基因型鉴定。结果: 分别成功构建 *Six1* 和 *Six4* 基因的 Cas9/sgRNA 表达载体。转染 *Six1* 基因打靶载体经药物筛选后, 利用 PCR 方法鉴定所获得的 *Six1* 基因敲除单克隆细胞系 48 个, 其中 *Six1*<sup>-/-</sup> 细胞系 21 个。通过同样方法同时转染 *Six1* 基因和 *Six4* 基因打靶载体, 经药物筛选后共获得 44 个单克隆细胞系, 其中 *Six1*<sup>-/-</sup> *Six4*<sup>-/-</sup> 细胞系为 13 个。结论: 通过 CRISPR/Cas9 基因编辑技术可高效获得 *Six1* 单基因敲除细胞系和 *Six1/Six4* 双基因敲除细胞系, 为构建肾脏发育缺陷猪动物模型提供了基础, 并有助于研究 *Six1* 和 *Six4* 基因在猪肾脏发育中的功能。

**[关键词]** 猪; CRISPR/Cas9; *Six1* 基因敲除细胞系; *Six1/Six4* 基因敲除细胞系

**[中图分类号]** Q26

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2018)02-143-06

**doi:** 10.7655/NYDXBNS20180201

### Establishment of *Six1* and *Six4*-deficient pig cell lines via CRISPR/Cas9 targeting

Wang Junzheng, Li Yanru, Zhao Lihua, Liu Manling, Zhang Manling, Jin Yong, Chen Qiaoyu, Wang Chenyu, You Zhihuan, Li Rongfeng\*

Jiangsu Key Laboratory of Xenotransplantation, NMU, Nanjing 211166 China

**[Abstract]** **Objective:** The concept of animal organs regeneration via stem cells injection and blastocyst complementation has been proved. To apply this principle for organ regeneration, the specific organ-deficient large animals must be created firstly in order to make the specific organ 'developmental niche'. In this study, we attempt to generate the *Six1*-deficient and *Six1/Six4*-deficient pig cell lines by CRISPR/Cas9, in order to construct pig kidney-deficient model next step. **Methods:** The first exon of *Six1* and *Six4* gene was chosen for the target to design the sgRNA and the two sgRNAs were cloned into PX330 plasmids containing Cas9 skeleton respectively. The efficiency of PX330-sgRNA vector was tested by T7EN1 enzyme assay analysis, then, the efficient PX330-sgRNA was co-transfected with the G418 resistant plasmid (pCMV-tdTomato) into the primary porcine fetal fibroblasts (PFFs). The monoclonal cell populations were obtained through the G418 screening and the genotypes of monoclonal cells were identified by sequencing analysis. **Results:** Cas9/sgRNA expression vectors for *Six1* and *Six4* gene targeting were constructed successfully. Total 48 monoclonal cell populations with presumed *Six1* gene mutation were obtained and identified by PCR, among them 21 cell colonies showed *Six1* biallelic mutation (*Six1*<sup>-/-</sup>). By the same way, we obtained total 44 monoclonal cell populations for both *Six1* and *Six4* targeting and 13 of them showed *Six1*<sup>-/-</sup> *Six4*<sup>-/-</sup> genotypes. **Conclusion:** The *Six1*<sup>-/-</sup> and *Six1*<sup>-/-</sup> *Six4*<sup>-/-</sup> cell lines were obtained by highly efficient CRISPR/Cas9 targeting, which can provide the possibility in production of the pig kidney-deficient model and also be helpful for the function investigation of *Six1* and *Six4* genes in pig kidney development.

**[Key words]** pig; CRISPR/Cas9; *Six1*-deficient cell line; *Six1/Six4*-deficient cell line

[Acta Univ Med Nanjing, 2018, 38(02): 143-148]

**[基金项目]** 国家自然科学基金面上项目(31371487)

\*通信作者 (Corresponding author), E-mail: lirongfeng@njmu.edu.cn

肾脏疾病属于一个世界性的疾病问题,慢性肾脏疾病以及急性或慢性肾脏衰竭患者的数量正不断增加<sup>[1]</sup>。终末期肾病(end-stage renal disease, ESRD)患者虽然可以通过血液透析或用腹膜透析来代替肾脏排毒功能,但并不能取代肾脏在人体内重要的功能,如肾脏内分泌活动(肾素,促红细胞生成素和维生素D的活化)以及精细调节电解液<sup>[2]</sup>。肾脏移植是迄今为止恢复肾脏正常功能的最佳选择,但是人类供体器官来源非常有限且存在免疫排斥等问题。因此,利用患者来源的干细胞通过囊胚互补再造人源肾脏器官可能成为一个新的解决途径。

囊胚互补技术主要是利用基因敲除或其他基因调控策略,获得相应器官定向缺失的动物,利用体细胞核移植技术(somatic cell nuclear transfer, SCNT)产生器官再生所需的缺陷型胚胎,随后在相应器官缺失的囊胚中注入外源全能或多能干细胞,从而再生形成相应器官。目前,通过囊胚互补技术进行体外同种或异种器官再生研究已得到有效的验证。UsUi等<sup>[3]</sup>利用囊胚互补技术,在*Pdx1*<sup>-/-</sup>缺失的小鼠囊胚再生出大鼠来源的胰腺。Matsunari等<sup>[4]</sup>利用囊胚互补在胰腺发育受阻的转基因猪胚胎内再生出同种胰腺。综上,运用囊胚互补在动物体内再生人源化肾脏器官是可行的。

肾脏发育是个十分复杂的过程,需要多种基因调控,而*Six*基因家族在肾脏发育中至关重要。哺乳动物*Six*基因家族包括*Six1*~*6*共6个基因,其中*Six1*、*Six4*基因主要表达在肾脏发生的间质区,对肾脏发育具有重要作用。在肾脏发生过程中,输尿管芽和后肾间质是肾脏发育的重要结构,前者入侵后肾间质并不断分支形成肾脏的输尿管以及集合系统,后者分化形成肾脏的肾小球,近端小管,远端小管等结构。研究发现,在小鼠中敲掉*Six1*基因后输尿管芽则无法入侵后肾间质并不断分支形成集合系统,同时后肾间质区的面积相对于野生型明显变小<sup>[5]</sup>。*Six1*基因敲除小鼠肾脏也表现出单侧肾脏发育缺失现象。Kobayashi等<sup>[6]</sup>发现同时敲除*Six1*和*Six4*基因则会导致小鼠肾脏发育完全缺失,输尿管芽和后肾间质出现严重发育缺陷。

目前,还未见到猪肾脏缺失模型的相关研究报道。而预想运用囊胚互补在猪体内再生人源化肾脏器官,首先必须获得肾脏缺失的猪模型。本研究拟通过CRISPR/Cas9(clustered regularly interspaced short palindromic repeats/Cas9)基因编辑技术对原代猪胎儿成纤维细胞进行*Six1*单基因和*Six1/Six4*双基

因敲除,为下一步获得肾缺失猪模型奠定研究基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

35 d原代长白猪胎儿成纤维细胞(PFFs)由本组实验室培养。Dh5 $\alpha$ 感受态、质粒小提试剂盒、质粒中提试剂盒(北京天根生化科技公司);PX330质粒(Addgene 423230)、*Bbs1*限制性内切酶、Quick Ligase连接酶和T7EN1酶(New England Biolabs公司,美国);Plasmid Safe ATP-Dependent DNase 质粒链接去错酶(Epicentre公司,美国);Basic Nucleofector<sup>TM</sup> Kits和细胞电转仪(Lonza公司,德国);DMEM培养液,胎牛血清、胰酶、Penn/Strep双抗和PBS缓冲液(Gibco公司,美国);pMD18-T载体(TaKaRa公司,日本);引物序列和磷酸化的寡核苷酸序列由南京金斯瑞公司合成。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 sgRNA的设计和CRISPR/Cas9打靶载体的构建

在Genbank中查找猪源*Six1*基因(Gene ID: 100156847),*Six4*基因(Gene ID: 100153985),根据*Six1*、*Six4*基因序列分别在第一外显子两端设计引物序列并送合成(表1),以PFFs的基因组DNA为模板,利用PCR分别扩增*Six1*基因和*Six4*基因的第一外显子序列。反应体系:20  $\mu$ L,反应条件:95  $^{\circ}$ C 5 min;(95  $^{\circ}$ C 30 s, 62  $^{\circ}$ C 30 s, 72  $^{\circ}$ C 30 s)35个循环;72  $^{\circ}$ C 7 min;保存4  $^{\circ}$ C。通过琼脂糖凝胶电泳观察PCR产物长度,并送南京金斯瑞公司进行测序,进一步确认PFFs中*Six1*基因和*Six4*基因的序列情况。以测序获知的*Six1*基因序列为模板,利用CRISPR在线靶点设计工具(<http://crispr.mit.edu/>),根据Cas9靶点设计原则:5'端为G,3'端为PAM序列(NGG),在*Six1*基因的第一个外显子上设计一个20 bp的sgRNA寡核苷酸序列,并命名为sgRNA1,送南京金斯瑞公司合成5'末端磷酸化修饰的sgRNA1序列。同样,*Six4*基因也通过同样的方法在第一个外显子上设计一个sgRNA4,并进行相应修饰。

表1 *Six1*、*Six4* 第一外显子扩增引物

Table 1 The primers for amplification of *Six1* and *Six4*

Primers	Sequences (5'→3')
Exon1- <i>Six1</i> -F	GGCCCGAAAAGCTGCGGAGTGAG
Exon1- <i>Six1</i> -R	TTGGGGTGGTTGTGAGGCCGAGAA
Exon1- <i>Six4</i> -F	CCCCACCGGGCAGATTGC
Exon1- <i>Six4</i> -R	GCCAGGCGGTCCAGGTTG

CRISPR/Cas9打靶载体构建主要是通过引物退火、PX330载体酶切、线性化PX330载体与sgRNA连接等步骤组成。首先,将合成好的引物分别用高压灭菌的去离子水溶解成100 μmol/L。将正链引物与负链引物各吸取1 μL,加入8 μL去离子水中。将混合好的10 μL体系,在PCR仪中经过37 °C孵育30 min后,从95 °C 5 min后以每分钟降5 °C的速度,降至25 °C后4 °C保持。同时,按照说明书步骤,将PX330载体用 *Bbs1* 酶进行酶切使其线性化,再将线性化的PX330载体与退火的双链sgRNA用Quick Ligase连接酶进行连接。将连接产物利用Plasmid Safe ATP-Dependent DNase质粒链接去错酶处理后转化至大肠杆菌DH5α中,挑取单菌落进行菌株保存和测序,测序引物:5'-ACTATCATATCCTTACCGTAAC-3'。测序结果正确的菌株,分别命名为PX330-sgRNA1和PX330-sgRNA4。利用无内毒素质粒大提试剂盒,按照说明书步骤提取PX330-sgRNA1质粒、PX330-sgRNA4质粒以及带有G418抗性基因的pCMV-tdTomato质粒。

### 1.2.2 *Six1*, *Six4* 基因PX330-sgRNA载体打靶效率验证

在6 cm培养皿中用含15%胎牛血清的DMEM培养液培养原代PFFs,待细胞汇合度达到80%~90%时,用胰蛋白酶,消化并离心收集细胞。*Six1*, *Six4* PX330-sgRNA打靶载体各4 μg,参照Lonza成纤维细胞转染试剂盒中的操作,使用Lonza核转染仪U-023程序,分别转染至1×10<sup>6</sup>个细胞。转染48 h后提取混合细胞基因组DNA,通过PCR扩增sgRNA识别切割靶点区域,将PCR产物琼脂糖凝胶电泳后切胶回收。

胶回收产物利用T7EN1酶切验证打靶载体的敲除效率。取200 ng纯化产物,2 μL 10×Nebuffer,并用去离子水补足到19 μL,在PCR仪中进行退火反应。退火结束后,各分9.5 μL,其中一管作为实验组加入0.5 μL T7EN1酶,另一管加入0.5 μL去离子水作为对照组,37 °C孵育30 min。利用1.5%的琼脂糖凝胶,90 V电泳50 min后分析结果。

### 1.2.3 细胞转染和单克隆的筛选与鉴定

在6 cm培养皿中用含15%胎牛血清的DMEM培养液培养原代PFFs,当细胞在皿中生长混合度达到80%~90%左右,用0.05%胰酶消化细胞用于核转。将针对*Six1*打靶的PX330-sgRNA1载体与带有G418抗性质粒pCMV-tdTomato质粒以5:1的比例,参照Lonza成纤维细胞转染试剂盒中的操作,用U-

023程序转染PFFs。将转染后的细胞分盘至10 cm中,每盘密度为4倍镜视野下20~30个细胞,并用含有1 mg/mL G418浓度的15%胎牛血清的DMEM培养液来进行抗药筛选去除阴性细胞。

分盘后的细胞药筛至第七天时,进行单克隆的挑选。通过显微镜观察单克隆位置,并做出相应标记。弃掉10 cm中培养液,用PBS洗1遍后,将克隆环放置在皿底单克隆位置上,利用0.05%胰蛋白酶消化细胞,接种于24孔板中,当细胞长满后再传至6孔板中。6孔板中的细胞长满后1/5用于提取基因组做鉴定,剩余用于冻存备用。

利用NP40裂解液提取细胞基因组,对*Six1*基因敲除位点两端设计引物序列(表2),并进行PCR扩增。PCR反应体系:20 μL,PCR反应条件:95 °C 5 min;(95 °C 30 s,58 °C 30 s,72 °C 30 s)35个循环;72 °C 7 min;保存4 °C。PCR产物切胶纯化回收后连接至pMD18-T载体进行转化至大肠杆菌中,每板挑取15个菌落测序。测序结果与野生型序列比对,分析单克隆突变情况,即可得到*Six1*基因敲除猪单克隆细胞系。

利用上述方法,将*Six1*打靶的PX330-sgRNA1,*Six4*打靶的PX330-sgRNA4与抗性质粒pCMV-tdTomato质粒共同转染PFFs通过药筛,单克隆挑取与鉴定,来获得*Six1*和*Six4*双基因同时敲除的猪单克隆细胞系。

表2 *Six1*,*Six4* 基因型鉴定引物

Table 2 The primers for genotyping of *Six1*, *Six4*

Primers	Sequences (5'→3')
<i>Six1</i> -F	AGAGGCCCGAAAAGCTGCGGAGTGA
<i>Six1</i> -R	AGAGGCGGAGAGGGAGAGGAAGGAA
<i>Six4</i> -F	GCAGGAGAATGGGATGGAAA
<i>Six4</i> -R	TAGGCGGGCGACGAGAAAAC

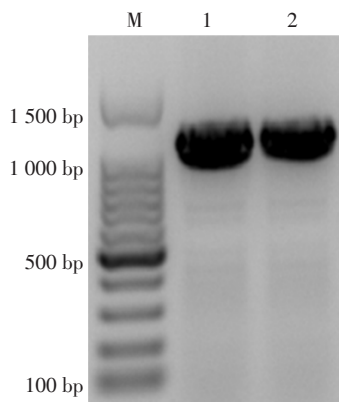
## 2 结果

### 2.1 *Six1*, *Six4* 基因序列扩增结果

根据NCBI中猪*Six1*,*Six4*基因序列在其两端设计引物,对*Six1*,*Six4*基因进行PCR扩增,经电泳鉴定长度分别为1 180 bp和1 100 bp处有条带,与目的片段长度相同(图1)。同时,将扩增产物送去测序,经过对比证明序列正确。

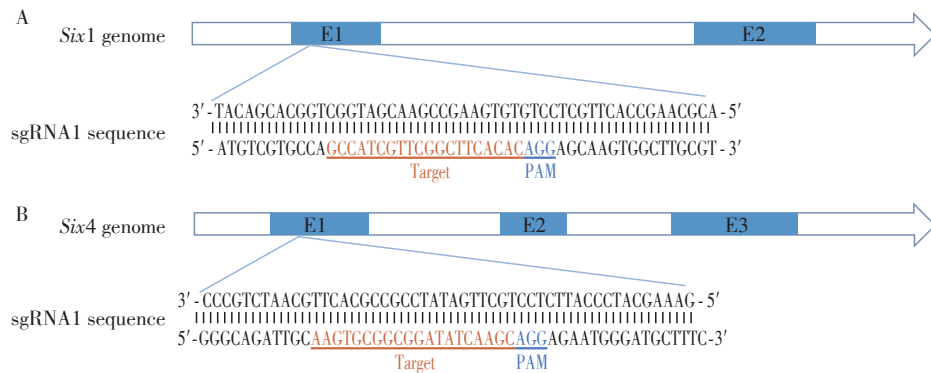
### 2.2 CRISPR/Cas9敲除位点选择和打靶载体构建

分别选取*Six1*和*Six4*基因的第一外显子作为CRISPR/Cas9的靶点设计sgRNA1和sgRNA4(图2),根据Cas9靶点设计原则:5'端为G,3'端为PAM序列



M: 100 bp DNA Ladder; 1: *Six1* 基因 PCR 扩增产物凝胶电泳结果; 2: *Six4* 基因 PCR 扩增产物凝胶电泳结果。

图1 *Six1* 基因和 *Six4* 基因 PCR 扩增产物凝胶电泳结果  
Figure 1 The results of PCR amplification products of *Six1* and *Six4*



A: *Six1* 基因结构信息以及 sgRNA1 打靶序列; B: *Six4* 基因结构信息以及 sgRNA4 打靶序列。

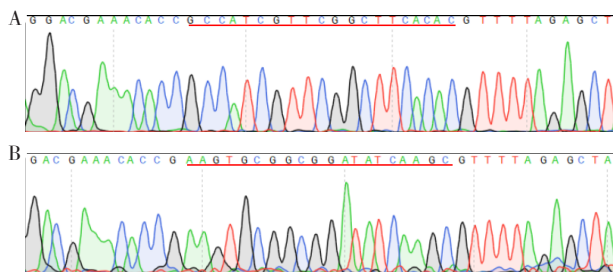
图2 *Six1*、*Six4* 基因 sgRNA 靶点设计

Figure 2 Schema for CRISPR/Cas9-mediated *Six1* and *Six4* knockout

表3 sgRNA 寡核苷酸序列

Table 3 The oligonucleotide sequence of sgRNA

sgRNA	Sequences (5'→3')
<i>Six1</i> -sgRNA1-F	caccGCCATCGTTCGGCTTCACAC
<i>Six1</i> -sgRNA1-R	aaacCGGTAGCAAGCCGAAGTGTG
<i>Six4</i> -sgRNA4-F	caccGAAGTGC GCGGATATCAAGC
<i>Six4</i> -sgRNA4-R	aaacCTTCACGCCCTATAGTTCC



A: *Six1* 打靶载体 PX330-sgRNA1 sgRNA 位点测序结果; B: *Six4* 打靶载体 PX330-sgRNA4 sgRNA 位点测序结果。

图3 重组载体测序验证

Figure 3 Verification of recombinant vector via sequencing

(NGG), 分别设计 sgRNA 并命名为 sgRNA1 和 sgRNA4。同时, 在 sgRNA 的两端加上能与 Bbs1 酶切位点相连接的粘性末端(表3)。sgRNA 寡核苷酸序列经退火形成双链与 Bbs1 酶切的 PX330 载体相连接, 转化到大肠杆菌后, 成功得到单克隆菌落。挑菌扩培后, 将提取的质粒送测序, 对比证明 PX330 载体分别成功与 sgRNA1 和 sgRNA4 重组(图3)。

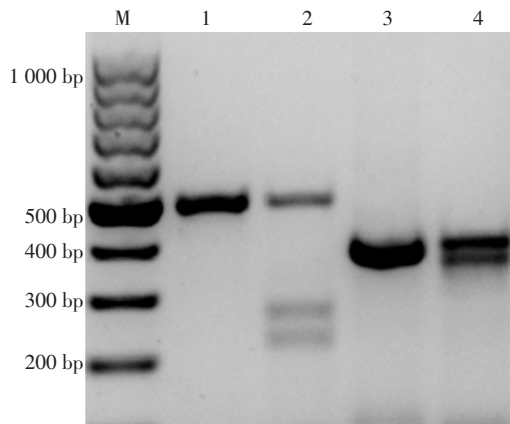
### 2.3 CRISPR/Cas9 重组载体打靶效率验证

提取分别转入 PX330 - sgRNA1 和 PX330 - sgRNA4 打靶载体的细胞基因组后, 经过 T7EN1 酶处理后, 跑胶电泳均证明 PX330-sgRNA1 和 PX330-sgRNA4 重组质粒可以成功打靶细胞(图4)。从图中可以看出, 1号 sgRNA1 为对照组, 2号为 T7EN1 酶处

理组共有3个条带。T7EN1 酶可以将两条错配 DNA 序列, 在错配位置进行剪切, 所以2号泳道 200 bp 到 300 bp 为错配 DNA 序列被剪切成的2个片段, 3、4号分别为 sgRNA4 的对照组、处理组, 4号泳道中 400 bp 左右有2个片段, 较小的为 T7EN1 酶剪切出来的片段。Six1 和 Six4 基因的 PCR 产物经过 T7EN1 酶处理后均能产生剪切片段, 说明 PX330-sgRNA1 和 PX330-sgRNA4 重组载体分别能够有效打靶 *Six1*, *Six4* 基因。

### 2.4 *Six1* 单基因和 *Six1*/*Six4* 双基因敲除猪细胞系的建立及鉴定结果

PX330-sgRNA1 和抗性质粒 pCMV -tdTomato 共同转染 PFFs 通过药筛后得到单克隆细胞系共 48 个(图5), TA 克隆测序结果显示在靶标区域有 40 个克隆发生基因突变。其中有 21 个克隆发现双等位基因突变(*Six1*<sup>-/-</sup>, biallelic mutation) PX330-sgRNA1 载体打靶效率为 44%, 且有 6 个克隆双等位基因突变情况



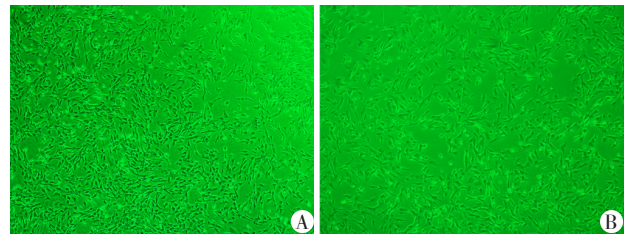
M: 100 bp DNA Ladder; 1、3: *Six1*, *Six4* 基因 PCR 产物不加 T7E1 酶对照组; 2、4: *Six1*, *Six4* 基因 PCR 产物 T7E1 酶处理组。

图4 sgRNA 敲除效率验证

Figure 4 Verification of sgRNA knocking-out efficiency

完全相同 (homozygous biallelic mutation, 图 6)。PX330-sgRNA1, PX330-sgRNA4 以及抗性质粒 pC-

MV -tdTomato 三个质粒共同转染得到单克隆细胞 44 个 (图 5), TA 克隆结果显示 *Six1* 和 *Six4* 基因同时发生突变有 30 个克隆。双等位基因突变克隆 (*Six1*<sup>-/-</sup>/*Six4*<sup>-/-</sup>) 共有 13 个 (biallelic mutation), 打靶效率为 30%。其中 *Six1* 等位基因和 *Six4* 等位基因突变分别相同 (homozygous biallelic mutation) 的有 6 个克隆 (图 6)。



A: *Six1*<sup>-/-</sup> 单个细胞系传代至 6 孔板 (x40) B: *Six1*<sup>-/-</sup>/*Six4*<sup>-/-</sup> 单个细胞系传代至 6 孔板 (x40)。

图5 *Six1* 单基因和 *Six1*/*Six4* 双基因敲除细胞系

Figure 5 The cell lines of *Six1* and *Six1*/*Six4* mutation

A	WT	ATGCTGCCATCGTTCGGCTTCACACAGGAGC	
	<i>Six1</i> <sup>-/-</sup> clone1	ATGCTGCCATCGTTCGGCTTCA-ACAGGAGC	-1
	<i>Six1</i> <sup>-/-</sup> clone2	ATGCTGCCATCGTTCGGCTT ----CAGGAGC	-4
	<i>Six1</i> <sup>-/-</sup> clone3	AGCTGCCATCGTTC ----T- A CACAGGAGC	-5
	<i>Six1</i> <sup>-/-</sup> clone4	ATGCTGC-----CACAGGAGC	-15
	<i>Six1</i> <sup>-/-</sup> clone5	ATGCTGC-----C	-23
	<i>Six1</i> <sup>-/-</sup> clone6	ATGCTGCCATCGTTCGGCTTTCACACAGGAGC	+1
B	WT	ATGCTGCCATCGTTCGGCTTCACACAGGAGC	TTGCAAGTGC GGCGGATATCAAGCAGGAGAAT
	<i>Six1</i> <sup>-/-</sup> / <i>Six4</i> <sup>-/-</sup> clone1	ATGCTGCCATCGTTCG ----- GC	-13 TTGCAAGTGC GGCG----- -31
	<i>Six1</i> <sup>-/-</sup> / <i>Six4</i> <sup>-/-</sup> clone2	ATGCTGCCATCGTTCGGCTTCA----GGAGC	-4 TTGCAAGTGC GGCGGATATCAAGCAGGAGAAT +1
	<i>Six1</i> <sup>-/-</sup> / <i>Six4</i> <sup>-/-</sup> clone3	ATGCTGCCATCGTTCGGCTTC-CACAGGAGC	-1 TTGCAAGTGC GGCGGATATCAAGCAGGAGAAT +1
	<i>Six1</i> <sup>-/-</sup> / <i>Six4</i> <sup>-/-</sup> clone4	ATGCTGCCATCGTTCGGCTT----- -20	TTGCAAGTGC GGCGGATATCAAGCAGGAGAAT +1
	<i>Six1</i> <sup>-/-</sup> / <i>Six4</i> <sup>-/-</sup> clone5	ATGCTGCCATCGTTCGGCTTC-CACAGGAGC	-1 TTGCAAGTGC GGCGGATATCA--GCAGGAGAAT -2
	<i>Six1</i> <sup>-/-</sup> / <i>Six4</i> <sup>-/-</sup> clone6	ATGCTGCCATCGTTCGGCT--ACACAGGAGC	-1 TTGCAAGTGC GGCGGATATC - AGCAGGAGAAT -1

A: *Six1* 基因纯合敲除单克隆突变基因型; B: *Six1*/*Six4* 双基因纯合敲除单克隆突变基因型。

图6 *Six1*<sup>-/-</sup>与 *Six1*<sup>-/-</sup>/*Six4*<sup>-/-</sup>敲除细胞系基因型

Figure 6 Genotypes of *Six1*<sup>-/-</sup> and *Six1*<sup>-/-</sup>/*Six4*<sup>-/-</sup> cell lines

### 3 讨论

肾脏发育是一个十分复杂的过程,其中输尿管芽入侵后肾间充质,二者相互作用引发间质向皮质转化最后发育形成成熟的肾脏。调节二者相互作用的基因有许多,主要包括 *Six1*, *Six4*, *Eya1*, *Gdnf*, *Pax2*, *Pax8* 等基因。*Six1* 基因敲除后肾脏发育不全且有单侧肾脏缺失, *Pax2*, *Six2*, *Sall1*, *Gdnf* 基因的表达明显降低。*Six1* 和 *Six4* 基因同时敲除后,小鼠肾脏发育完全缺失,且 *Pax2*, *Pax8* 和 *Gdnf* 基因的表达完全消失。说明 *Six1* 和 *Six4* 基因在肾脏发育中起到

重要作用,与肾脏发育的其他基因之间存在相互的调控关系。因此,本研究利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术选择 *Six1* 和 *Six4* 基因进行敲除,为构建肾脏缺失猪模型提供了可能性。同时,根据开放阅读框 (ORF) 分析显示,打靶位点后面不含有其他起始密码子,因此分别选取 *Six1* 和 *Six4* 基因的第一外显子为靶点进行基因敲除,能够使 *Six1* 和 *Six4* 基因在转录时尽早发生移码突变,从而导致蛋白质功能的缺失。

目前,CRISPR/Cas9 基因编辑技术已在哺乳类动物上得到广泛应用。Jinek 等<sup>[7]</sup> 研究将 crRNA 和 tracrRNA 改装成一个单向导 RNA (single guide

RNA, sgRNA), 这个sgRNA能够帮助Cas9内切酶对DNA进行定点切割, 使得CRISPR/Cas9基因敲除系统使用更加简便。通过将CRISPR/Cas9基因编辑技术和SCNT相结合, 大量的人类疾病模型及基因敲除猪模型已经产生。例如, Chen等<sup>[8]</sup>利用CRISPR/Cas9基因编辑技术敲除IgM基因, 获得B细胞缺失猪模型; Zhang等<sup>[9]</sup>利用CRISPR/Cas9基因编辑技术获得C3基因敲除猪; Li等<sup>[10]</sup>通过CRISPR/Cas9系统敲除猪TPH2基因来研究认知和情绪调节以及精神类疾病。不同基因敲除猪的产生更加说明CRISPR/Cas9基因编辑技术能够在猪细胞上进行有效的基因打靶。本实验中所设计的CRISPR/Cas9打靶载体具有较高的效率, *Six1*基因的打靶载体有效敲除效率为44%, *Six1*和*Six4*基因的载体同时打靶的有效敲除效率为30%, 所以本研究中高效的打靶载体能够大量制备所需的基因敲除细胞, 而SCNT则为大规模制备基因缺失型胚胎用于囊胚互补创造了很好的条件。

囊胚互补在动物体内再造人源肾脏, 其前提是需要得到合适的器官再造载体, 为外源互补多能干细胞提供发育所需微环境。猪与人类在解剖、代谢、生理学、器官大小、基因组和细胞周期特征等方面具有很高的相似性, 所以猪成为体外再造人类肾脏的理想动物模型<sup>[11]</sup>。目前, 猪全基因组测序的完成<sup>[12]</sup>, 以及SCNT在猪上的广泛应用<sup>[13]</sup>, 使得猪成为生物医学中最受关注的大动物模型之一, 也为在猪体内再造人类肾脏提供了技术支撑。以猪为模型利用囊胚互补再造同种外源器官已得到验证。Matsunari等<sup>[4]</sup>在*Pdx1*基因的启动子后面插入*Hes1*基因, *Hes1*基因的过表达使得胰腺的发育受到阻滞, 从而获得胰腺缺失的猪模型, 通过囊胚互补将外源猪胚胎干细胞注入插入*Hes1*基因的猪囊胚中成功再生出外源胰腺。因此, 本研究获得的*Six1*单基因和*Six1/Six4*双基因敲除猪细胞系可作为SCNT的供体细胞, 来获得肾脏缺陷模型, 进一步利用该模型作为器官再生的载体, 通过囊胚互补利用肾脏缺陷的猪囊胚来再生异种肾脏, 是具有可行性的。

综上所述, 本研究通过高效的CRISPR/Cas9打靶载体成功获得了*Six1*单基因和*Six1/Six4*双基因敲除猪细胞系, 为获得肾脏缺失的猪模型创造了前提条件。同时, 大型哺乳类动物肾脏发育是一个连续而又复杂的过程, *Six1*单基因敲除以及*Six1/Six4*双基因敲除有利于研究肾脏发育的相关信号通路。

## [参考文献]

- [1] Jha V, Garcia-Garcia G, Iseki K, et al. Chronic kidney disease: Global dimension and perspectives [J]. Lancet, 2013, 382(9888):260-272
- [2] Kemter E, Wolf E. Pigs pave a way to de novo formation of functional human kidneys [J]. PNAS, 2015, 112(42):12905-12906
- [3] Usui J, Kobayashi T, Yamaguchi T, et al. Generation of Kidney from Pluripotent Stem Cells via Blastocyst Complementation [J]. Am J Pathol, 2012, 180(6):2417-2426
- [4] Matsunari H, Nagashima H, Watanabe M, et al. Blastocyst complementation generates exogenic pancreas in vivo in apancreatic cloned pigs [J]. PNAS, 2013, 110(12):4557-4562
- [5] Nie X, Xu J, El-Hashash A, et al. Six1 regulates Grem1 expression in the metanephric mesenchyme to initiate branching morphogenesis [J]. Dev Biol, 2011, 352(1):141-151
- [6] Kobayashi H, Kawakami K, Asashima M, et al. Six1 and Six4 are essential for Gdnf expression in the metanephric mesenchyme and ureteric bud formation, while Six1 deficiency alone causes mesonephric - tubule defects [J]. Mech Dev, 2007, 124(4):290-303
- [7] Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity [J]. Science, 2012, 337(6096):816-821
- [8] Chen F, Wang Y, Yuan Y, et al. Generation of B cell-deficient pigs by highly efficient CRISPR/Cas9-mediated gene targeting [J]. J Genet Genomics, 2015, 42(8):437-444
- [9] Zhang W, Wang G, Wang Y, et al. Generation of complement protein C3 deficient pigs by CRISPR/Cas9-mediated gene targeting [J]. Scientific Reports, 2017, 7(1):5009
- [10] Li Z, Yang HY, Wang Y, et al. Generation of tryptophan hydroxylase 2 gene knockout pigs by CRISPR/Cas9-mediated gene targeting [J]. J Biomed Res, 2017, 31(5):445-452
- [11] Wu J, Platero Luengo A, Gil MA, et al. Generation of human organs in pigs via interspecies blastocyst complementation [J]. Reprod Domest Anim, 2016, 51(2):18-24
- [12] Groenen MA, Archibald AL, Uenishi H, et al. Analyses of pig genomes provide insight into porcine demography and evolution [J]. Nature, 2012, 491(7424):393-398
- [13] Lai L, Kolber-Simonds D, Park KW, et al. Production of alpha-1,3-galactosyl-transferase knockout pigs by nuclear transfer cloning [J]. Science, 2002, 295(5557):1089-1092

[收稿日期] 2017-11-23