

· 基础研究 ·

## GGTA1/ $\beta$ 4GalNT2 双基因敲除近交系五指山小型猪的建立

李 楚<sup>1</sup>,任雪洋<sup>1</sup>,李 琳<sup>1</sup>,厉小雪<sup>1</sup>,金 永<sup>1</sup>,张曼玲<sup>1</sup>,刘晓蕊<sup>1</sup>,熊 强<sup>1</sup>,张立宁<sup>1</sup>,王 盈<sup>1</sup>,李荣凤<sup>1</sup>,杨海元<sup>1</sup>,冯书堂<sup>2</sup>,戴一凡<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>南京医科大学江苏省异种移植重点实验室,江苏 南京 211166;<sup>2</sup>北京盖兰德生物科技有限公司,北京 100010

**[摘要]** 目的:利用CRISPR/Cas9技术建立五指山小型猪近交系GGTA1/ $\beta$ 4GalNT2双基因敲除克隆猪。方法:设计合成靶向猪GGTA1和 $\beta$ 4GalNT2基因的单导向RNA(single guide RNA,sgRNA),以pX330质粒为骨架,分别构建GGTA1和 $\beta$ 4GalNT2的Cas9打靶载体,转染至近交系五指山小型猪胎儿成纤维细胞(porcine fetal fibroblast,PFF)中,通过G418药物筛选和测序鉴定获得双基因敲除的单细胞克隆,然后利用体细胞克隆技术(somatic cell nuclear transfer,SCNT)获得双基因敲除的近交系五指山小型猪,并利用流式细胞技术检测克隆猪外周血单核细胞(peripheral blood mononuclear cell,PBMC)中 $\alpha$ Gal和Sd(a)抗原的表达。结果:成功构建GGTA1和 $\beta$ 4GalNT2基因的Cas9/sgRNA表达载体,转染后获得双基因敲除的近交系五指山小型猪PFF细胞克隆9个。SCNT成功获得了10只五指山小型猪近交系双基因敲除的克隆猪,其PBMC无 $\alpha$ Gal和Sd(a)抗原的表达。结论:CRISPR/Cas9技术可以实现对猪GGTA1/ $\beta$ 4GalNT2基因的编辑。本实验首次成功制备了GGTA1/ $\beta$ 4GalNT2双基因敲除的近交系五指山型猪,为异种器官移植研究与应用提供了新的供体材料。

**[关键字]** 近交系五指山小型猪;GGTA1/ $\beta$ 4GalNT2;CRISPR/Cas9;异种移植

**[中图分类号]** Q813

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2019)06-835-06

**doi:**10.7655/NYDXBNS20190609

## Generation of inbred Wuzhishan miniature pigs with GGTA1/ $\beta$ 4GalNT2 double gene knockout

Li Chu<sup>1</sup>, Ren Xueyang<sup>1</sup>, Li Lin<sup>1</sup>, Li Xiaoxue<sup>1</sup>, Jin Yong<sup>1</sup>, Zhang Manling<sup>1</sup>, Liu Xiaorui<sup>1</sup>, Xiong Qiang<sup>1</sup>, Zhang Lining<sup>1</sup>, Wang Ying<sup>1</sup>, Li Rongfeng<sup>1</sup>, Yang Haiyuan<sup>1</sup>, Feng Shutang<sup>2</sup>, Dai Yifan<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Jiangsu Key Laboratory of Xenotransplantation, Nanjing Medical University, Nanjing 211166; <sup>2</sup>Grand Life Science & Technology Ltd., Beijing 100010, China

**[Abstract]** **Objective:** This study aims to build inbred Wuzhishan miniature pigs with GGTA1/ $\beta$ 4GalNT2 double gene knockout by CRISPR/Cas9 mediated targeting. **Methods:** Single-guide RNAs (sgRNAs) specific for the pig GGTA1 and  $\beta$ 4GalNT2 were designed and synthesized, then cloned into the pX330 plasmid containing a Cas9 skeleton, respectively. The resulting targeting vectors for GGTA1 and  $\beta$ 4GalNT2 were transfected into the primary porcine fetal fibroblasts (PFFs) derived from Wuzhishan miniature inbred pigs. G418 drug screening and Sanger sequencing were used to identify the monoclonal cells with GGTA1/ $\beta$ 4GalNT2 double gene knockout. Somatic cell nuclear transfer (SCNT) was employed to generate Wuzhishan miniature inbred pigs using the obtained colonies as donor cells. Flow cytometry analysis was conducted to examine the  $\alpha$ Gal and Sd(a) antigen expression in peripheral blood mononuclear cell (PBMC) of the cloned piglets. **Results:** Cas9/sgRNA expression vectors targeting pig GGTA1 and  $\beta$ 4GalNT2 genes were successfully constructed. After transfection into PFFs, 9 cell colonies were obtained with biallelic modifications in both GGTA1 and  $\beta$ 4GalNT2 loci. Ten cloned piglets were produced by SCNT. The expression of  $\alpha$ Gal and Sd(a) antigens on these cloned knockout piglets was negative. **Conclusion:** The CRISPR/Cas9 system showed high efficiency in pig gene targeting. The GGTA1/ $\beta$ 4GalNT2 double gene knockout inbred Wuzhishan miniature pigs were successfully produced in the present study, which could serve as newly ideal materials for xenotransplantation.

**[Key words]** Wuzhishan miniature inbred pigs; GGTA1/ $\beta$ 4GalNT2; CRISPR/Cas9; xenotransplantation

[J Nanjing Med Univ, 2019, 39(06):835-840]

**[基金项目]** 国家重点研发计划(2017YFC1103701)

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

器官移植是治疗终末期器官衰竭的有效方法,但器官供体严重匮乏制约了其临床应用,因而异种器官移植受到了广泛重视。猪由于其器官形状和大小适宜,生理学和解剖学上与人相近,被视为异种器官移植的理想供体。然而,异种器官移植首先面临的困难就是人体的免疫排斥反应,其中最严重的是超急性排斥反应(hyperacute rejection, HAR)。HAR是由于人体内的大量天然抗体与异种器官血管内皮细胞表面抗原相结合,引发补体系统的链式激活导致的。能够被人天然抗体识别的异种抗原主要是 $\alpha$ -1,3-半乳糖( $\alpha$ Gal)表位。人在进化过程中失去了由GGTA1基因编码合成的细胞表面 $\alpha$ Gal抗原,所以人类血液中存在大量抗 $\alpha$ Gal抗体,若将带有 $\alpha$ Gal抗原的猪器官移植进入人体后,会迅速发生HAR,从而导致移植失败。GGTA1基因敲除猪的培育成功,克服了猴和人对猪器官的HAR难题<sup>[1]</sup>。但仅去除猪供体器官中的 $\alpha$ Gal抗原,仍无法完全克服抗体介导的排斥反应<sup>[1]</sup>,揭示有 $\alpha$ Gal以外的异种抗原的存在。近来,Sd(a)抗原被证实和猪器官免疫原性相关<sup>[2]</sup>。Sd(a)抗原由猪 $\beta$ -1,4-N-乙酸氨基半乳糖转移酶( $\beta$ -1,4-N-acetylgalactosaminyltransferase 2,  $\beta$ 4GalNT2)催化合成,能够被人类和大多数非灵长类哺乳动物的抗体识别。Estrada等<sup>[3]</sup>发现敲除 $\beta$ 4GalNT2基因可以减少猪外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)与人免疫球蛋白M(immunoglobulin M, IgM)和人免疫球蛋白G(immunoglobulin G, IgG)结合。

近年来,CRISPR/Cas9基因编辑技术由于操作简便、基因编辑效率高而受到广泛关注,已经成功应用于基因修饰的猪等大动物模型构建<sup>[4-5]</sup>。五指山小型猪是中国特有的小型猪品种,目前已经广泛用于烧伤、冠状动脉硬化等动物模型的建立,是异种移植研究与应用的理想候选材料,更适用于异种移植动物模型的建立。本实验拟利用CRISPR/Cas9将五指山小型猪GGTA1和 $\beta$ 4GalNT2基因敲除,再用体细胞克隆技术,制备五指山小型猪近交系GGTA1/ $\beta$ 4GalNT2双基因敲除克隆猪,对进一步培育适宜异种移植人源化基因修饰新品系,具有潜在、重要的理论和实践意义。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

近交系野生型五指山小型猪(Wuzhishan pig, WZSP)由北京盖兰德生物科技有限公司培育。受

体大白猪购自江苏正大苏垦猪业有限公司,饲养于南京医科大学江苏省异种移植重点实验室大动物实验基地,自由采食。所有动物实验得到南京医科大学动物伦理委员会批准。pX330(423230, Addgene公司,美国);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);DNA Marker DL2000、pMD18-T载体(TaKaRa公司,日本);胶回收试剂盒(Qiagen公司,德国);DMEM培养液、胎牛血清、胰酶、青/链霉素双抗和PBS缓冲液(Gibco公司,美国);胎牛血清(FBS)(PAN-Biotech公司,德国);Bbs I限制性内切酶(New England Biolabs公司,美国);Basic Nucleofector™ Kit和细胞电转仪(Lonza公司,德国);Mix Taq酶(南京诺唯赞公司);GGTA1检测抗体(Thermo Fisher Scientific公司,美国); $\beta$ 4GalNT2检测抗体(Vector Laboratories公司,美国);FACSCalibur流式细胞仪(BD公司,美国)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 sgRNA的设计与CRISPR/Cas9载体构建

根据NCBI数据库中猪GGTA1(Gene ID: 396733)、 $\beta$ 4GalNT4(Gene ID: 2100621328)基因的序列,使用sgRNA在线设计软件(<http://crispr.mit.edu/>),根据Cas9靶点设计原则(5'端为G,3'端为PAM序列NGG)分别在第3个和第8个外显子设计合成靶向sgRNA,序列见表1,进行5'端磷酸化修饰,并在sgRNA两端加上能与Bbs I酶切位点相连接的黏性末端(由南京擎科生物公司合成)。经过引物退火、用Bbs I酶切回收pX330载体、线性化pX330与sgRNA连接后即构建好CRISPR/Cas9载体。将载体转化进入大肠杆菌后,涂布于细菌培养皿进行培养,得到并挑取单克隆菌落,扩增培养后提取质粒送测序。根据sgRNA设计引物(由南京擎科生物公司合成),对PCR产物测序,验证是否连接正确,反应体系20  $\mu$ L,反应条件:95  $^{\circ}$ C 5 min;95  $^{\circ}$ C 30 s,退火温度30 s,72  $^{\circ}$ C 30 s,35个循环;72  $^{\circ}$ C 7 min;4  $^{\circ}$ C保存。

#### 1.2.2 胚胎成纤维细胞的制备以及单细胞克隆的获得与鉴定

收集WZSP近交系35 d的胎猪,取皮肤剪碎后加入4~5 mL胶原酶消化液,消化30 min后,38  $^{\circ}$ C培养。得到胎猪成纤维细胞后,将sgRNA表达载体GGTA1-sgRNA和 $\beta$ 4GalNT2-sgRNA与SV-40-NeoR质粒共转染野生型WZSP胎儿成纤维细胞,将细胞以每视野下40~50个细胞(4倍视野)的浓度铺板,并用含有1 mg/mL G418和16%胎牛血清的DMEM培

表1 GGTA1和 $\beta$ 4GalNT2基因sgRNA寡核苷酸序列  
Table 1 sgRNA sequences of GGTA1 and  $\beta$ 4GalNT2

名称	序列(5'→3')
GGTA1-sgRNA-F	GAAAATAATGAATGTCAA
GGTA1-sgRNA-R	TTGACATTCATTATTTTC
$\beta$ 4GalNT2-sgRNA-F	GGTAGTACTCACGAACACTC
$\beta$ 4GalNT2-sgRNA-R	GAGTGTTCGTGAGTACTACC

退火温度 58 °C。

养液来进行抗药筛选去除阴性细胞,培养 2~3 d 后逐天降低 G418 的浓度,用 0.3 mg/mL 浓度维持培养,经过 11 d 左右的培养获得单细胞克隆。将克隆环放置在单细胞克隆的位置,用 PBS 洗 1 遍后,使用 0.05% 胰蛋白酶消化 1~3 min,挑取到 48 或 24 孔板中继续培养,48 孔板中的细胞长满皿底后传代至 24 孔板,24 孔板长满后留取 1/3 细胞于原孔、2/3 传代于 12 孔板,12 孔板长满后,视细胞状态冻存,24 孔板内的细胞消化下来,用 NP40 裂解提取基因组。经 PCR 扩增后进行第一步测序,引物序列见表 2,将野生型、不会出现移码突变的基因组剔除后,选出 GGTA1 和  $\beta$ 4GalNT2 都是非野生型的基因组进行 PCR 产物纯化和 TA 克隆,每个细菌培养皿上挑取 12~15 个菌落测序。反应体系 50  $\mu$ L,反应条件:95 °C 5 min;95 °C 30 s,退火温度 30 s,72 °C 30 s,35 个循环;72 °C 7 min;保存 4 °C。

### 1.2.3 GGTA1/ $\beta$ 4GalNT2 双基因敲除 WZSP 的制备与鉴定

选择 3 个 1.2.2 中获得的阳性克隆细胞进行体细胞核移植(somatic cell nuclear transfer, SCNT)。将 SCNT 获得的重构胚培养 20~24 h,选取发育良好的重构胚移植到初情期的大白母猪体内。胚胎移植后 1 个月左右,即可用 B 超观察受体猪是否怀孕。

剪取 6 月龄仔猪的耳组织,用试剂盒提取基因组,PCR 扩增目的序列后进行 TA 克隆、测序来鉴定 GGTA1 和  $\beta$ 4GalNT2 基因突变类型。

表2 GGTA1和 $\beta$ 4GalNT2基因型鉴定引物

Table 2 The primers for genotyping of GGTA1 and  $\beta$ 4GalNT2

引物	序列(5'→3')
GGTA1-F	CCTAGTATCCTTCCCAACCCAGAC
GGTA1-R	GCTTTCTTTACGGTGTCACTGAATCC
$\beta$ 4GalNT2-F	CCCAAGGATCCTGCTGCC
$\beta$ 4GalNT2-R	CGCCGTGTAAGAAACCTCC

退火温度 62 °C。

### 1.2.4 GGTA1和 $\beta$ 4GalNT2抗原表达鉴定

用无菌注射器对 6 月龄仔猪进行静脉采血,置于抗凝管中。取 100~200  $\mu$ L 抗凝血,加入 3 倍体积的红细胞裂解液(用去离子水稀释 10 倍),室温静置 10 min 后,离心(5 000 r/min, 5 min),弃去上清,用 600  $\mu$ L PBS 漂洗 3 遍,获得外周血单核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)沉淀,用抗体稀释液将抗体稀释至合适的浓度,取 100  $\mu$ L 直标抗体重悬 PBMC 沉淀,冰上孵育 30 min 后,用 PBS 漂洗 3 遍,用 200  $\mu$ L PBS 重悬,用 BD 流式细胞仪检测 PBMC 上的抗原表达情况。

### 1.3 统计学方法

利用 SPSS17.0 对猪 PBMC 中  $\alpha$ Gal 和 Sd(a) 抗原阳性细胞数量的比例进行统计学分析。应用独立样本的双侧 *t* 检验,  $P \leq 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 CRISPR/Cas9 敲除位点选择和打靶载体构建

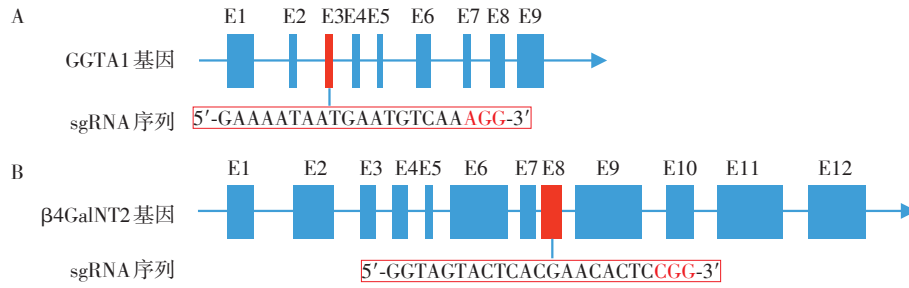
使用 sgRNA 在线设计软件(<http://crispr.mit.edu/>)设计 sgRNA,分别选取 GGTA1、 $\beta$ 4GalNT2 基因的第 3 外显子、第 8 外显子作为 CRISPR/Cas9 的靶点进行 sgRNA 的设计位点(图 1),构建完成的打靶载体进行测序,经过比对序列正确。

### 2.2 GGTA1和 $\beta$ 4GalNT2双基因敲除克隆的获得与鉴定

G418 筛选后得到 68 个单细胞克隆,PCR 产物测序筛选后剩余 29 个细胞基因组,对其进行 TA 克隆测序,9 个克隆鉴定为 GGTA1/ $\beta$ 4GalNT2 双基因敲除,基因型见图 2,双基因突变效率为 13.24%(野生型 GGTA1 靶点序列为 5'-GAGAAAATAATGAATGTCAAAGGAAGAGTGGTTCT-3',野生型  $\beta$ 4GalNT2 靶点序列为 5'-GGTCTGGTAGTACTCACGAACACTCCCGAG-3')。

### 2.3 GGTA1<sup>-/-</sup> $\beta$ 4GalNT2<sup>-/-</sup> WZSP 的制备与鉴定

选择 13 号、20 号、45 号 3 个单克隆冻存的细胞混合培养后为供体细胞进行核移植,构建双基因敲除克隆胚胎,先后将 2 774 枚胚胎移植 8 头受体猪,平均每头移植(346.75  $\pm$  6.05)枚,其中 4 头 B 超妊娠(50%),其中 1 头流产、1 头妊娠母猪在 37 d 取胎猪制作胎猪成纤维细胞(1~4 号胎),成功建立 GGTA1<sup>-/-</sup> $\beta$ 4GalNT2<sup>-/-</sup> WZSP 细胞系,2 头妊娠母猪产仔 11 头活仔、1 头木乃伊。部分仔猪见图 3。对 6 月龄 6 头存活仔猪及 1~4 号胎猪进行基因型鉴定,均为双基因敲除,结果如图 4。



A: GGTA1 基因结构信息与相应 sgRNA 序列; B:  $\beta$ 4GalNT2 基因结构与相应 sgRNA 序列; sgRNA 序列中的红色标记为 PAM 序列。

图1 GGTA1和 $\beta$ 4GalNT2 基因 sgRNA 靶点设计

Figure 1 Schematic design for the sgRNA-targeting sites in GGTA1 and  $\beta$ 4GalNT2

GGTA1		$\beta$ 4GalNT2	
GAGAAAATAATGAATGTCAAAGG	AAGAGTGGTTCT (WT)	GGTCTGGGTAGTACTCACGAACACTCCGGAG	(WT)
4# GAGAAAATAATGAATGTCAAAGGAAGAGTGGTTCT	+1	GGTCTGGGTAGTACTCACGAACAaCTCCGGAG	+1
-----//-----ATGT-AAAGGAAGAGTGGTTCT	-14	GGTCTGGGTAGTACTCACGAAC--TCCGGAG	-2
13# GAGAAAATAATGAATGTCAAAGGAAGAGTGGTTCT	+1	GGTCTGGGTAGTACTCACG---CTCCGGAG	-4
18# GAGAAAATAATGA---TCAAAGGAAGAGTGGTTCT	-3	GGTCTGGGTAGTACTCACGAAC-CTCCGGAG	-1
20# -----CAAAGGAAGAGTGGTTCT	-17	GGTCTGGGTAGTACTCACGAACAaCTCCGGAG	+1
		GGTCTGGGTAGTACTCACGAACAaCTCCGGAG	+1
		GGTCTGGGTAGTACTCACGAACgACTCCGGAG	+1
		GGTCTGGGTAGTACTCACGAACCTCCGGAG	-1
		GGTCTGGGTAGTACTCACGAACAagtaCTCC	+5
37# -----//-----ATGT-AAAGGAAGAGTGGTTCT	-33	GGTCTGGGTAGTACTC-----CGGAG	-10
GAGAAAATAATGAAT-----//-----	-26	GGTCTGGGTAGTACTCACGAACAaCTCCGGAG	+1
GAGAAAATAATGAATGTCAAAGGAAGAGTGGTTCT	+1		
GAGAAAATA-----GTG---//---	-26		
40# GAGAAAATAATGAATGTCAAAGGAAGAGTGGTTCT	+1	GGTCTGGGTAGTACTCACGAACAaCTCCGGAG	+1
		GGTCTGGGTAGTACTCACGAAC-CTCCGGAG	-1
43# GAGAAAATAATGAATGTCAAAGGAAGAGTGGTTCT	+1	GGTCTGGGTAGTACTCACGAAC---CGGAG	-4
		GGTCTGGGTAGTACTC-----CGGAG	-10
		GGTCTGGGTAGTACTCACGA---CTCCGGAG	-3
45# GAGAAAATAATGAATGTCAAAGGAAGAGTGGTTCT	+1	GGTCTGtcaagt-----CTC	+6/-17
56# GAGAAAATAATGAATGTCAAAGGAAGAGTGGTTCT	+1	GGTCTGGGTAGTACTCACGAAC--TCCGGAG	-2

蓝色标记为 PAM 序列; 红色标记为插入碱基; +: 增加碱基; -: 删除碱基。

图2 GGTA1<sup>-/-</sup> $\beta$ 4GalNT2<sup>-/-</sup> 五指山小型猪单细胞克隆基因型

Figure 2 Genotypes of WZSP GGTA1<sup>-/-</sup> $\beta$ 4GalNT2<sup>-/-</sup> colonies

### 2.4 WZSP 克隆猪体内 $\alpha$ Gal 和 Sd(a) 抗原表达鉴定

利用流式细胞仪检测了 6 头 6 月龄 WZSP 克隆猪的 PBMC 中  $\alpha$ Gal 和 Sd(a) 的抗原表达 (图 5、6)。GGTA1<sup>-/-</sup> $\beta$ 4GalNT2<sup>-/-</sup> WZSP 的 PBMC 中  $\alpha$ Gal 和 Sd(a) 抗原阳性细胞数量的平均百分比分别为 15.17% 和 5.24%, 而野生型五指山小型猪近交系 PBMC 中  $\alpha$ Gal 和 Sd(a) 抗原阳性细胞数量的平均百分比分别为 78.84% 和 94.14%, 实验组与对照组存在显著性差异 [ $\alpha$ Gal:  $P=0.001$ , Sd(a):  $P<0.001$ ], 表明本研究中获得 WZSP 克隆猪的 GGTA1 和  $\beta$ 4GalNT2 基因被成功敲除。

## 3 讨论

### 3.1 近交系五指山双基因敲除猪首次克隆成功, 具有较大的应用优势

有关 GGTA1/ $\beta$ 4GalNT2 单基因或双基因敲除克隆猪虽有报道<sup>[2,6-7]</sup>, 但本研究以拥有我国自主知识产权的五指山小型猪近交系为材料, 首次培育出了近交系 GGTA1/ $\beta$ 4GalNT2 双基因敲除克隆猪, 具有



图3 GGTA1<sup>-/-</sup> $\beta$ 4GalNT2<sup>-/-</sup> 五指山小型克隆猪

Figure 3 Cloned GGTA1<sup>-/-</sup> $\beta$ 4GalNT2<sup>-/-</sup> WZSP

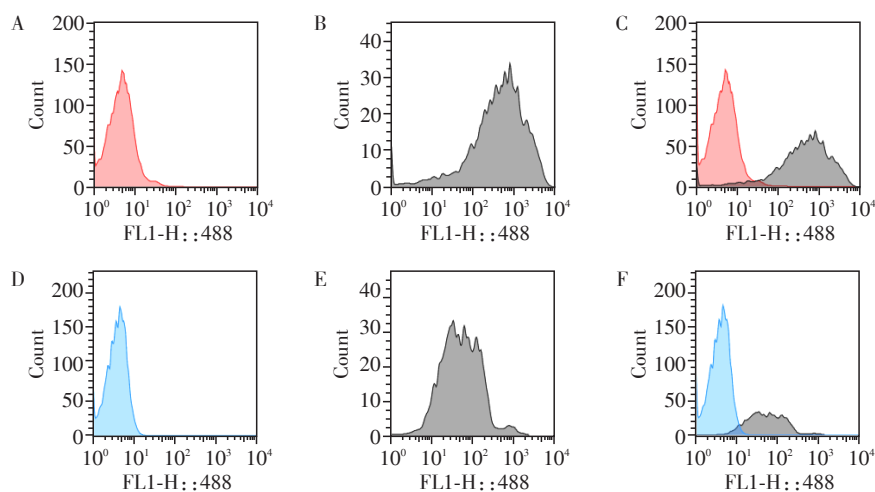
较大的应用优势。该品系耐近交、获得少量人源化基因修饰猪, 便可规模化生产, 便于 SPF 净化培育; 其次遗传稳定性更高, 子代中的个体差异小, 更有利于移植供体的质控, 也有利于对异种移植后产生的免疫反应进行控制。作为今后异种移植研发材料的供体, 还具有诸多优点, 如其解剖学研究发现五指山小型猪相较于其他猪模型与人器官的大体形态、位置有更高的相似性, 从解剖学角度看, 成年的近交系五指山小型猪的脏器更适合于异

GGTA1		$\beta$ 4GalNT2	
	GAGAAAATAATGAATGTCAAAGGAAGAGTGGTTCT (WT)		GGTCTGGGTAGTACTCACGAACACTCCGGAG (WT)
1#	GAGAAAATAATGAATGTCAAAGGAAGAGTGGTTCT +1	GGTCTGttcagt-----CTC	+6/-17
2#	GAGAAAATAATGAATGTCAAAGGAAGAGTGGTTCT +1	GGTCTGttcagt-----CTC	+6/-17
		GGTCTGGGTAGTACTC-----CGGAG	-10
		GGTCTGGGTAGTACTCACGAACAActCCGGAG	+1
3#	GAGAAAATAATGAATGTCAAAGGAAGAGTGGTTCT +1	GGTCTGttcagt-----CTC	+6/-17
		GGTCTGGGTAGTACTC-----CGGAG	-10
		GGTCTGGGTAGTACTCAC-----CTC	+6/-17
		GGTCTGGGTAGTACTCACGAACA-----CGGAG	-4
4#	GAGAAAATAATGAATGTCAAAGGAAGAGTGGTTCT +1	GGTCTGGGTAGTACTCAC-----CTC	-143
		GGTCTGGGTAGTACTCACGAAC-CTCCGGAG	-1
205#	GAGAAAATAATGAATGTCAAAGGAAGAGTGGTTCT +1	GGTCTGGGTAGTACTCACGAAC-----CGGAG	-4
207#	GAGAAAATAATGAATGTCAAAGGAAGAGTGGTTCT +1	GGTCTGGGTAGTACTC-----CTCCGGAG	-4
		GGTCTGGGTAGTACTC-----CTCCGGAG	-2
209#	GAGAAAATAATGAATGTCAAAGGAAGAGTGGTTCT +1	GGTCTGGGTAGTACTCACGAAC--TCCGGAG	-2
211#	GAGAAAATAATGAATGTCAAAGGAAGAGTGGTTCT +1	GGTCTGGGTAGTACTCACGAAC--TCCGGAG	-2
		GGTCTGGGTAGTACTC-----CGGAG	-10
		GGTCTGGGTAGTACTCACGAACt-----GGAG	+1/-5
213#	GAGAAAATAATGAATGTCAAAGGAAGAGTGGTTCT +1	GGTCTGGGTAGTACTC-----CGGAG	-10
219#	GAGAAAATAATGAATGTCAAAGGAAGAGTGGTTCT +1	GGTCTGGGTAGTACTC-----CGGAG	-10
		GGTCTGGGTAGTACTCACGAAC-CTCCGGAG	-1

蓝色标记为PAM序列;红色标记为插入碱基;+:增加碱基;-:删除碱基。

图4 五指山小型克隆猪基因型鉴定结果

Figure 4 Genotypes of cloned GGTA1<sup>-/-</sup>  $\beta$ 4GalNT2<sup>-/-</sup> WZSP



A: 红色部分为209号仔猪中 $\alpha$ Gal阴性的PBMC数量;B:野生型2号猪中 $\alpha$ Gal阳性的PBMC数量;C:A、B图的对比如;D:209号仔猪中Sd(a)阴性的PBMC数量;E:野生型2号猪Sd(a)阳性的PBMC数量;F:D、E图的对比如。

图5 野生型与GGTA1<sup>-/-</sup> $\beta$ 4GalNT2<sup>-/-</sup>五指山小型猪的PBMC中 $\alpha$ Gal、Sd(a)抗原阳性细胞数量

Figure 5 Antigen expression of PBMC in WT and GGTA1<sup>-/-</sup>  $\beta$ 4GalNT2<sup>-/-</sup> WZSP

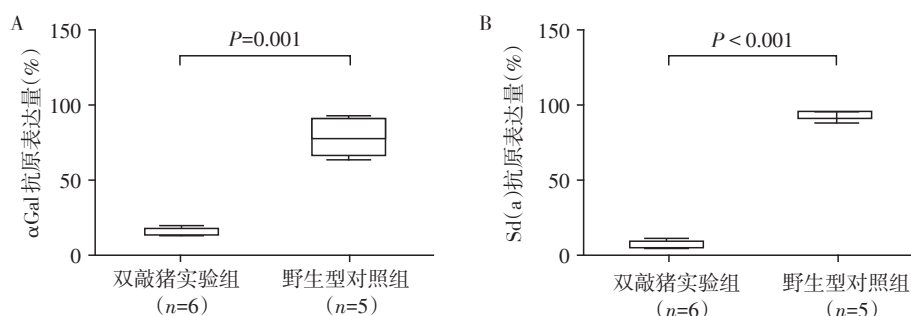


图6 野生型和GGTA1<sup>-/-</sup> $\beta$ 4GalNT2<sup>-/-</sup>五指山小型猪的PBMC中 $\alpha$ Gal、Sd(a)抗原表达百分统计图

Figure 6 Statistical charts of  $\alpha$ Gal、Sd(a) antigen expression of PBMCs of GGTA1<sup>-/-</sup>  $\beta$ 4GalNT2<sup>-/-</sup> WZSP and WT controls

种移植,其心冠状动脉前降支分布与中国人的相似度高达90%,在生理生化指标上与人相比绝大多数指标也相类似,还具有较强的伤口愈合能力,无

恶性传染特点,是比较理想的异种移植供体,也是较为理想的实验动物模型。目前五指山小型猪近交系已经广泛应用在了人类疾病模型、新药监测、

食品安全检测、生物制品等方面,如烧伤、修复补片、疝生物补片等,2013年猪—藏西猴肝脏异种器官移植成功也标志着中国异种器官移植研究跨入了更高阶梯<sup>[8]</sup>。

虽然猪作为潜在的异种移植供体已经得到了广泛的认可,但是免疫排斥反应依旧是灵长类动物与猪之间的阻碍<sup>[9-10]</sup>,面对的免疫排斥反应主要有:HRA、急性体液异种移植排斥反应(acute humoral xenograft rejection, AHXR)和急性细胞排斥反应(acute cellular rejection, ACR),还有血栓性微血管病和慢性排斥反应。目前解决排斥反应的最有效的方法就是基因修饰,通过敲除异种抗原来延长供体在受体中的存活时间<sup>[11]</sup>。GGTA1基因敲除猪、GGTA1和 $\beta$ 4GalNT2、CMAH基因敲除猪<sup>[12]</sup>先后问世,都被证明对超急性和急性排斥反应有抑制作用。本研究对GGTA1<sup>-/-</sup> $\beta$ 4GalNT2<sup>-/-</sup>近交系WZSP的PBMC中 $\alpha$ Gal、Sd(a)抗原进行了流式检测,结果显示GGTA1<sup>-/-</sup> $\beta$ 4GalNT2<sup>-/-</sup>双基因敲除组的抗原表达显著低于野生组( $P < 0.001$ ),表明近交系WZSP的GGTA1/ $\beta$ 4GalNT2双基因敲除去除了其细胞表面的 $\alpha$ Gal和Sd(a)抗原。本研究中获得WZSP克隆猪已长到6月龄,体型、体重和同龄野生型对照无明显差异,但GGTA1/ $\beta$ 4GalNT2双基因敲除是否会影响WZSP的其他生理指标,我们将在后续实验中进一步研究。近交系WZSP的GGTA1/ $\beta$ 4GalNT2双基因敲除猪模型的成功建立,对异种器官移植的临床医学发展有着重要意义。

### 3.2 CRISPR/Cas9一次性编辑2个基因

之前有一些研究通过其他方法得到基因敲除猪模型,如胚胎注射一步法<sup>[6]</sup>、体细胞LOH突变法等<sup>[2]</sup>,效率低且周期长。唐雨婷等<sup>[7]</sup>在一个基因敲除的基础上再进行另一个基因的敲除,在其研究过程中是使用单细胞培养的方法得到单细胞克隆,效率远低于药筛得到单克隆的方法,而且先敲除GGTA1基因再敲除 $\beta$ 4GalNT2基因的方法在实验周期上至少延长1倍,效率并没有提高。本研究使用2个基因靶点一次性敲除的方法,效率达到了13.24%,高效地得到了双等位基因敲除的细胞系,得到的子代基因型中存在多种 $\beta$ 4GalNT2基因型,推测可能是因为五指山小型猪中存在多个 $\beta$ 4GalNT2基因的拷贝,但对于其具体的拷贝数还需要进一步研究。对仔猪进行基因型鉴定,均为双基因敲除。最后,使用流式细胞仪对PBMC进行抗原表达检测,结果也

显示敲除组的抗原表达远低于野生组,表达量具有显著差异,研究结果表明,近交系猪双基因GGTA1、 $\beta$ 4GalNT2一次性敲除法效果较好。

综上所述,本研究使用一次性双基因敲除法首次制备了GGTA1<sup>-/-</sup> $\beta$ 4GalNT2<sup>-/-</sup>的近交系五指山小型猪模型,为以后的实验奠定了基础,为异种移植提供了优质的动物模型。

### [参考文献]

- [1] Dai Y, Vaught TD, Boone J, et al. Targeted disruption of the alpha 1, 3-galactosyltransferase gene in cloned pigs [J]. *Nat Biotechnol*, 2002, 20(3): 251-255
- [2] Byrne GW, Du Z, Stalboerger P, et al. Cloning and expression of porcine  $\beta$ 1, 4 N-acetylgalactosaminyl transferase encoding a new xenoreactive antigen [J]. *Xenotransplantation*, 2014, 21(6):543-554
- [3] Estrada JL, Martens G, Li P, et al. Evaluation of human and non-human primate antibody binding to pig cells lacking GGTA1/CMAH/ $\beta$ 4GalNT2 genes [J]. *Xenotransplantation*, 2015, 22(3):194-202
- [4] 王俊政,李艳如,赵丽华,等. CRISPR/Cas9介导的猪Six1和Six4基因敲除细胞系的建立[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2018, 38(2):143-148
- [5] 曾华沙,姚俊,王红顺,等. 人/猪OSBPL2同源性及猪PFFs靶基因敲除细胞系的建立[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2018, 38(2):149-154
- [6] 尹智,袁雪薇,吕嘉伟,等. CRISPR/Cas9系统介导的一步法胚胎注射获得猪GGTA1敲除胚胎[J]. *畜牧与兽医*, 2016, 48(4):15-18
- [7] 唐雨婷,高景波,龙川,等. CRISPR/Cas9介导的 $\beta$ 4GalNT2基因敲除猪制备[J]. *农业生物技术学报*, 2017, 25(10):1697-1705
- [8] 冯书堂,李奎,刘岚,等. 小型猪近交系新品种的培育与开发利用[J]. *农业生物技术学报*, 2015, 23(2):274-280
- [9] 张青,周翠冰,戴一凡,等. 神经细胞异种移植的研究进展[J]. *器官移植*, 2017, 8(4):328-332
- [10] 周明,邓阳阳,戴一凡,等. 猪肺异种移植的研究进展与发展方向[J]. *器官移植*, 2017, 8(6):476-479
- [11] 宋宗培,郭蝶,蔡志明,等. 异种器官移植免疫生物学研究进展[J]. *器官移植*, 2018, 9(3):236-238
- [12] Zhang RJ, Wang Y, Chen L, et al. Reducing immunoreactivity of porcine bioprosthetic heart valves by genetically-deleting three major glycan antigens, GGTA1/ $\beta$ 4GalNT2/CMAH [J]. *Acta Biomater*, 2018, 72: 196-205

[收稿日期] 2018-09-07