

利用 CRISPR/Cas9 技术构建 miRNA-29b1 基因敲除小鼠

赵 勇¹, 师长宏¹, 赵 亚¹, 辛智倩¹, 刘佩娟¹, 张彩勤¹,
白 冰¹, 白杰英², 王 华³, 张 海¹

(1. 第四军医大学实验动物中心, 西安 710032; 2. 军事医学科学院实验动物中心, 北京 100071;
3. 安徽医科大学第一附属医院肿瘤科, 合肥 230022)

【摘要】 目的 应用 CRISPR/Cas9 技术构建 miRNA-29b1 基因敲除小鼠。方法 针对 miRNA-29b1 基因设计一段 sgRNA, sgRNA 和 Cas9 体外转录后显微注射至 C57BL/6 小鼠受精卵细胞。小鼠出生后取其基因组 DNA 进行测序以鉴定基因型, 同时取小鼠心、肝、脾、肺、肾等脏器研磨后提取总 RNA, 通过 real-time PCR 分析 miRNA-29b1 在这些脏器中的表达。结果 设计了 20 bp 的 miRNA-29b1 sgRNA 并与 Cas9 一起进行了体外转录, 显微注射小鼠受精卵细胞后获得 miRNA-29b1 基因突变小鼠。测序结果表明突变小鼠有两种基因型, 一种为 10 bp 的缺失突变; 另一种为 22 bp 的缺失突变, 同时伴有 3 bp 的插入突变。与野生型小鼠相比, 基因突变小鼠心、肝、脾、肺、肾等组织中 miRNA-29b1 表达量下降明显。结论 应用 CRISPR/Cas9 技术成功构建 miRNA-29b1 基因敲除小鼠。

【关键词】 CRISPR/Cas9; miRNA-29b1; 基因敲除小鼠

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016) 12-0001-04

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.12.001

Construction of miRNA-29b1 knockout mice based on CRISPR/Cas9 technology

ZHAO Yong¹, SHI Chang-hong¹, ZHAO Ya¹, XIN Zhi-qian¹, LIU Pei-juan¹,
ZHANG Cai-qin¹, BAI Bing¹, BAI Jie-ying², WANG Hua³, ZHANG Hai¹

(1. Laboratory Animal Center, The Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China;

2. Laboratory Animal Center, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071;

3. Department of Oncology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

【Abstract】 Objective To construct miRNA-29b1 gene knockout mice based on CRISPR/Cas9 technology. **Methods** To design and synthesize sgRNA according to the miRNA-29b1 sequence in Genbank. sgRNA and Cas9 were transcribed to RNA in vitro, these RNA were then microinjected into zygotes of C57BL/6 mice. After mouse birth, the genome DNA was extracted and sequenced to identify its genotype; meanwhile, real-time PCR was used to assay the expression of miRNA-29b1 in the heart, liver, spleen, lung and kidney of mutated mice. **Result** A 20 bp sgRNA targeted on miRNA-29b1 was synthesized and transcribed to RNA with Cas9. After microinjection, miRNA-29b1 gene-mutated mice were obtained. The sequencing results showed that there were two types of genotype for the mutated mice, one was 10 bp

【基金项目】 国家自然科学基金优秀青年基金项目 (NO. 81522009); 国家自然科学基金面上项目 (NO. 8137257, 81272385); 军队重点项目 (NO. BWS14J058)。

【作者简介】 赵勇 (1984 -), 男, 硕士研究生, 专业: 动物模型。E-mail: zhaoyong8@aliyun.com。

【通讯作者】 张海 (1971 -), 男, 副教授, 研究方向: 动物模型。E-mail: hzhang@fmmu.edu.cn。王华 (1978 -), 男, 教授, 研究方向: 肝损伤与修复。E-mail: wanghua@ahmu.edu.cn。

deletion, and another was 23 bp deletion accompanied with a 3 bp insertion. Compared with the wild-type mice, the expression of miRNA-29b1 in the heart, liver, spleen, lung and kidney was reduced significantly. **Conclusions** miRNA-29b1 gene knockout mice are constructed successfully by using CRISPR/Cas9 technology.

【Key words】 CRISPR/Cas9; miRNA-29b1; Gene knockout mice

miRNA 是一段小的非编码 RNA 分子,与靶基因结合后可通过抑制一系列机制调控基因表达。近年来研究表明许多 miRNA 分子参与肝纤维化的调控,如 miRNA-122, miRNA-214, miRNA-221 等^[1-3]。miRNA-29 是新近发现的与纤维化疾病密切相关的调控分子,miRNA-29 可通过直接抑制多种细胞外基质蛋白表达和调控多种与纤维化相关的信号通路参与纤维化过程,因此 miRNA-29 表达变化与纤维化密切相关^[4]。miRNA-29 分子包括 miRNA-29a, miRNA-29b 和 miRNA-29c 三个亚型,这三个亚型分别由 7 号染色体和 1 号染色体上的基因转录和编码,仅在 2~3 个主要位点有所不同^[5]。

在前期的研究中本课题组通过动物实验不仅发现 miRNA-29b1 在酒精肝中表达改变,而且观察到 miRNA-29b1 影响血管内皮细胞功能,其机制可能是 miRNA-29b1 提高血管内皮细胞通透性参与动脉粥样硬化的病理过程^[5]。由于酒精性肝纤维化对人危害大,目前尚无有效方法对其预防和治疗,同时鉴于 miRNA-29b1 在酒精性肝损伤肝纤维化发病中的机制不明,本研究拟以 CRISPR/Cas9 技术敲除 C57BL/6 小鼠中 miRNA-29b1 基因,以研究 miRNA-29b1 基因在酒精性肝损伤及纤维化中功能。

1 材料和方法

1.1 动物及试剂

SPF 级 C57BL/6 小鼠,4~6 周龄,由第四军医

大学实验动物中心提供(许可证号 SCXK(军)2012-0007),6~8 周龄 ICR 小鼠购自于北京维通利华公司,两种小鼠均饲养于屏障级设施。RNA 体外转录试剂盒及纯化试剂盒购自于 Ambion 公司。sgRNA 体外转录试剂盒由北京唯尚立德生物科技有限公司提供。Bbs I 限制性内切酶购自于 NEB 公司,T4 DNA 连接酶、dNTPs 购自于 TaKaRa 公司。pX330 质粒由北京艾德摩公司馈赠。小鼠基因组 DNA 提取试剂盒由成都嘉诚生物科技有限公司提供,PCR 产物纯化试剂盒购自于天根生物公司。

1.2 sgRNA 设计及重组质粒构建

根据 Genbank 上报道的小鼠 miRNA-29b1 序列,将待敲除序列利用 <http://crispr.mit.edu> 网站进行分析,设计 20 bp 的 sgRNA 靶向序列(图 1,大写为 miRNA-29b1 成熟区序列,涂红序列为 PAM 区)。以此为依据,合成一对引物(mir29b-pX330-F: CACCgaggaagctggtttcatatgg, mir29b-pX330-R: AAACccatgaaaccagcttctc)进行重组质粒构建。各取 2 μL 上下游引物,以水补齐至 20 μL,95℃ 作用 5min 进行退火,pX330 质粒 Bbs I 单切后回收,退火产物以 T4 连接酶克隆至 pX330 质粒。

1.3 sgRNA 和 Cas9 体外转录及纯化

以上述 pX330 重组质粒为模板,通过含 T7 启动子的上下游引物(mir29b-3at-F: tTAATACGACT CACTATAGGgaggaagctggtttcatatggG, mir29b-3at-R: A AAAGcaccgactcgggtgc)进行 PCR 反应克隆 sgRNA 基因序列,sgRNA 基因序列以体外转录试剂盒进行转

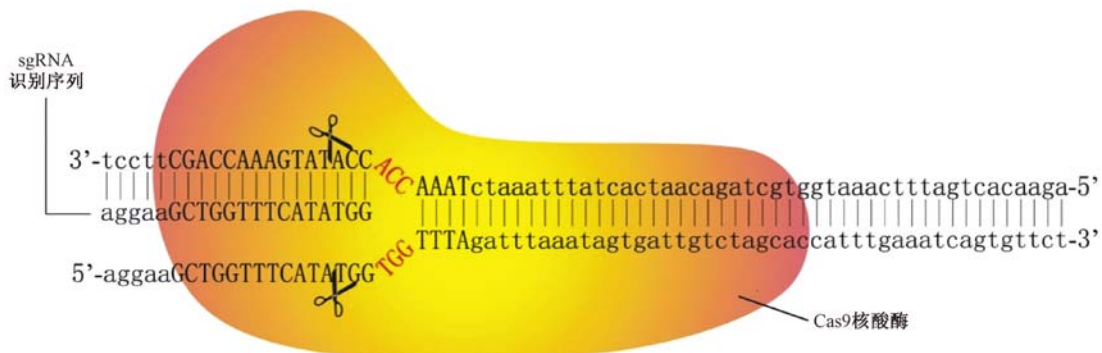


图1 sgRNA 设计

Fig.1 Diagram of sgRNA design

录、纯化。同时以 pX330 质粒为模板,通过 PCR 反应克隆 Cas9 基因,PCR 产物纯化后进行体外转录,转录方法按试剂盒说明书进行。RNA 转录产物经琼脂糖凝胶电泳鉴定后 -80°C 保存备用。

1.4 显微注射及受精卵细胞移植

雌性 C57BL/6 小鼠超数排卵后收集受精卵细胞。Cas9 和 sgRNA 转录产物按 2:1 比例混合,稀释后使其终浓度含 $100\text{ ng}/\mu\text{L}$ 的 Cas9 和 $50\text{ ng}/\mu\text{L}$ 的 sgRNA。以 Eppendorf TransferMan NK2 显微操作装置将上述混合物注入收集的受精卵细胞胞质。注射后的受精卵细胞 37°C 培养 2 h 后移植到假孕的 ICR 母鼠。

1.5 敲除小鼠基因型鉴定

剪取出生 1 周新生小鼠尾巴,加入消化液后 65°C 作用 30min 进行小鼠基因组 DNA 提取,具体提取方法按试剂盒说明书进行。取 100 ng 基因组 DNA 进行 PCR 反应以鉴定小鼠基因型。PCR 反应条件为 98°C 预变性 3 min, 98°C 10 s, 60°C 10 s, 72°C 20 s, 72°C 3 min, 共 30 个循环。

1.6 Real time PCR 鉴定 miRNA-29b1 在敲除小鼠体内的表达

颈椎脱臼法处死小鼠,取心、肝、脾、肺、肾等组织匀浆后提取总 RNA,反转录后以 Real time PCR 进行 miRNA-29b1 表达检测。cDNA 合成引物为 GTTGGCTCTGCTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCAC CAGAGCCAACtaaacc, Real time PCR 反应上游引物 GATCgctggtttcatatggtgg, 下游引物 GTGCAGGGTCC GAGGT。

2 结果

2.1 sgRNA 及 Cas9 体外转录

以 pX330 重组质粒为模板,sgRNA 上下游引物进行扩增反应,可得到大小约为 120 bp 的 PCR 产物(图 2A),同时通过 Cas9 引物也可扩增到 4 200 bp 的 PCR 产物(图 2B)。上述两种 PCR 产物纯化后在 T7 启动子介导下进行体外转录反应,转录产物经紫外分光光度计检测后 $\text{OD}_{260/280} > 1.9$, $\text{OD}_{260/230} > 2.0$ 。

2.2 miRNA-29b1 敲除小鼠基因型鉴定

注射 sgRNA 及 Cas9 mRNA 的小鼠受精卵细胞移植受体 ICR 小鼠后,获得 F0 代首建鼠,F0 代突变小鼠与野生型 C57BL/6 小鼠交配,获得 F1 代小鼠,F1 代突变小鼠互交后获得两种基因型纯合子小鼠。

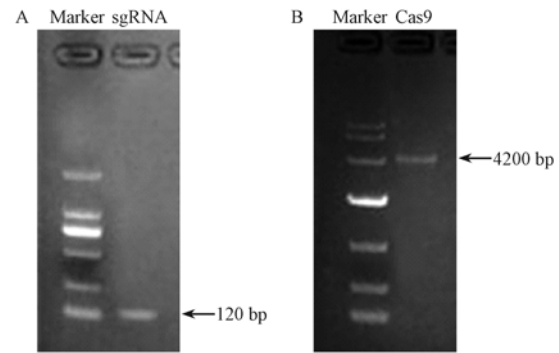


图 2 sgRNA 及 Cas9 PCR 产物

A: sgRNA PCR 产物 B: Cas9 PCR 产物

Fig. 2 PCR product of the sgRNA and Cas9

提取小鼠基因组 DNA 进行测序鉴定,结果发现 F0 代有两种基因型,一种是 10 bp 缺失突变;另一种是 22 bp 缺失突变,同时伴有 3 bp 插入突变。两种基因型突变均发生在 miRNA-29b1 序列成熟区(图 3)。

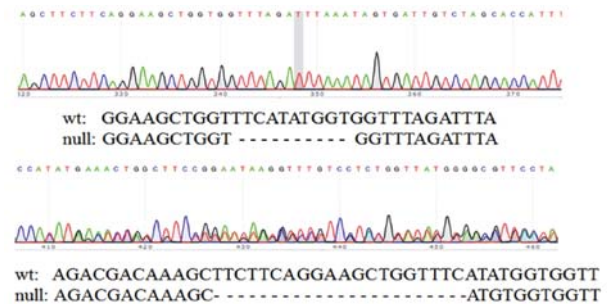


图 3 miRNA-29b1 敲除小鼠基因型

Fig. 3 Genotype of the miRNA-29b1 knockout mice

2.3 miRNA-29b1 在敲除小鼠体内表达

取 F2 代纯合子小鼠的心、肝、脾、肺、肾等组织,匀浆后提取细胞总 RNA,反转录后以 real-time PCR 进行分别检测 miRNA-29b1 在上述脏器中的表达。结果如图 4 所示,与野生型 C57BL/6 小鼠相比,miRNA-29b1 在 F2 代纯合子小鼠心、肝、脾、肺、肾等组织中的表达明显下降,表明成功构建 miRNA-29b1 基因敲除小鼠。

3 讨论

CRISPR/Cas9 是细菌和古细菌为应对病毒和质粒不断攻击而演化来的获得性免疫防御机制。在这一系统中,crRNA 通过碱基配对与 tracrRNA 结合形成双链 RNA,此 tracrRNA/crRNA 二元复合体指导 Cas9 蛋白在 crRNA 引导序列靶定位点切断双链 DNA^[7]。在基因组编辑过程中,tracrRNA 和 crRNA

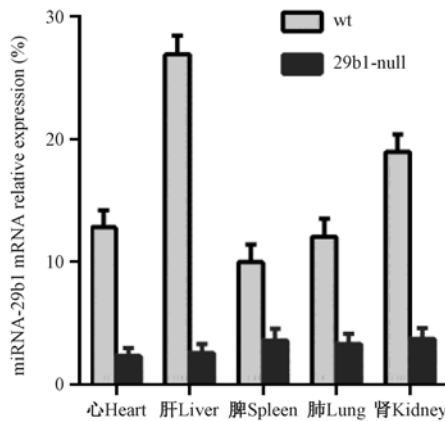


图 4 miRNA-29b1 在敲除小鼠体内表达

Fig. 4 Expression of miRNA-29b1 in knockout mice

可以融合成为 1 条具有靶向作用的 RNA (sgRNA) 表达, 该 sgRNA 同样可以起到靶向剪切的作用。CRISPR/Cas9 的优点是操作简单, 对基因组的效率高, 需要对某一个靶位点编辑的时候, 只需要表达相应的 sgRNA 即可, 不需要对 Cas9 核酸酶进行改造, 它可对任何物种的基因组进行高效率的定向编辑^[8]。本研究中我们体外合成一条 sgRNA, 该 sgRNA 具有良好的靶向作用, 可引导 Cas9 蛋白发挥核酸酶作用, 在特定的 PAM 区上游对 miRNA-29b1 进行定向编辑。sgRNA 和 Cas9 转录产物注射供体小鼠受精卵细胞后, 共得到 33 只 F0 代小鼠, 测序结果表明 9 只小鼠 miRNA-29b1 基因发生缺失突变, 阳性率为 27%, 明显高于 ES 细胞打靶技术, 由此证明 CRISPR/Cas9 技术是一个简单、高效的基因编辑工具, 可用于基因修饰动物研究。

miRNA-29 家族中各个成员序列高度同源, 仅有 2 ~ 3 个主要位点有所不同。miRNA-29a 和 miRNA-29c 均含有 22 个核苷酸, 二者之间仅 5' 端的第 10 个核苷酸不同; miRNA-29b 含有 23 个核苷酸, 与 miRNA-29a/c 不同的是, miRNA-29b 的 3' 端具有 AGUGUU 序列, 该序列具有核定位作用, 因此 miRNA-29b 主要位于细胞核^[9]。miRNA-29 序列的特殊性决定各个成员具有不同的生物学功能, miRNA-29a/b1 与某些疾病的发生有关, 而 miRNA-29b2/c 与免疫反应和调节相关。CCl₄ 肝纤维化小鼠模型 miRNAs 表达谱结果显示有 31 种 miRNAs 表达发生变化, miRNA-29 家族表达减少, 其中 miRNA-29b 下降最为显著, 而在正常肝组织中 miRNA-29b 高表达, 提示 miRNA-29b 可能与肝纤维化疾病有关^[10]。miRNA-29b1 在多种器官纤维化的调控中发

挥着重要作用, 研究表明 TGF- β 1 可下调 miRNA-29b1 表达, 减轻其对 TGF- β 1/Smad 信号通路的抑制作用, 最终导致纤维化的发生^[11]。这提示我们如果敲除 miRNA-29b1 基因后, 纤维化发生时间会提前, 纤维化发生程度可能会加重, 因此通过敲除 miRNA-29b1 基因复制酒精性肝纤维化动物模型可克服以往动物模型的缺点。本研究构建的 miRNA-29b1 基因敲除小鼠, 将为酒精性肝纤维化提供良好的动物模型, 尤其对研究 miRNA-29b1 在酒精性肝纤维化发病机制提供良好的研究条件。

参考文献:

- [1] Iizuka M, Ogawa T, Enomoto M, et al. Induction of microRNA-214-5p in human and rodent liver fibrosis [J]. *Fibrogenesis Tissue Repair*, 2012, 5(1): 12.
- [2] Kida K, Nakajima M, Mohri T, et al. PPARalpha is regulated by miR-21 and miR-27b in human liver [J]. *Pharm Res*, 2011, 28(10): 2467-2476.
- [3] Gui J, Tian Y, Wen X, et al. Serum microRNA characterization identifies miR-885-5p as a potential marker for detecting liver pathologies [J]. *Clin Sci (Lond)*, 2011, 120(5): 183-193.
- [4] Hyun J, Choi S S, Diehl A M, et al. Potential role of Hedgehog signaling and microRNA-29 in liver fibrosis of IKKbeta-deficient mouse [J]. *J Mol Histol*, 2014, 45(1): 103-112.
- [5] Mott JL, Kobayashi S, Bronk SF, et al. miR-29 regulates Mcl-1 protein expression and apoptosis [J]. *Oncogene*, 2007, 26(42): 6133-6140.
- [6] Zhu HQ, Li Q, Dong LY, et al. MicroRNA-29b promotes high-fat diet-stimulated endothelial permeability and apoptosis in apoE knock-out mice by down-regulating MT1 expression [J]. *Int J Cardiol*, 2014, 176(3): 764-770.
- [7] Terao M, Tamano M, Hara S, et al. Utilization of the CRISPR/Cas9 system for the efficient production of mutant mice using crRNA/tracrRNA with Cas9 nickase and FokI-dCas9 [J]. *Exp Anim*, 2016, 65(3): 275-283.
- [8] Dang Y, Jia G, Choi J, et al. Optimizing sgRNA structure to improve CRISPR-Cas9 knockout efficiency [J]. *Genome Biol*, 2015, 16: 280.
- [9] Hwang HW, Wentzel EA, Mendell JT. A hexanucleotide element directs microRNA nuclear import [J]. *Science*, 2007, 315(5808): 97-100.
- [10] Roderburg C, Urban GW, Bettermann K, et al. Micro-RNA profiling reveals a role for miR-29 in human and murine liver fibrosis [J]. *Hepatology*, 2011, 53(1): 209-218.
- [11] Cushing L, Kuang PP, Qian J, et al. miR-29 is a major regulator of genes associated with pulmonary fibrosis [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2011, 45(2): 287-294.