

利用 CRISPR/Cas9 技术制备 ApoE^{-/-} 兔

袁婷婷¹, 周敏雅², 卢瑶瑶¹, 陆睿², 张婷², 孙雨婷¹, 钟港¹, 王梦恬¹,
黄俊杰², 胡艳华², 梁景岩¹, 成勇²

(1.扬州大学医学院 江苏省中西医结合老年病防治重点实验室,江苏省扬州市 225001;

2.扬州大学兽医学院 江苏省转基因动物制药工程研究中心,江苏省扬州市 225009)

[关键词] 载脂蛋白 E; 基因敲除; 规律成簇间隔短回文重复序列; 新西兰兔; 血脂

[摘要] 目的 制作载脂蛋白 E(ApoE)基因敲除(ApoE^{-/-})兔,为研究动脉粥样硬化提供优良动物模型。方法 应用 CRISPR/Cas9 系统编辑新西兰兔的 ApoE 基因,制作 F0 代 ApoE^{-/-}兔,利用 PCR、TA 克隆、Sanger 测序、Western blot 和血脂检测鉴定 ApoE 靶向敲除的效率和效果,并通过传代获得 ApoE^{-/-}兔。结果 Sanger 测序结果显示成功靶向敲除兔 ApoE 基因,血清脂蛋白含量在正常饮食状态下相对于野生型兔有升高,且可稳定遗传。结论 成功建立了 ApoE^{-/-}兔,为进一步研究动脉粥样硬化和其他相关疾病提供了良好的动物模型。

[中图分类号] R-332

[文献标识码] A

ApoE^{-/-} rabbit mediated by CRISPR/Cas9 technology

YUAN Tingting¹, ZHOU Minya², LU Yaoyao¹, LU Rui², ZHANG Ting², SUN Yuting¹, ZHONG Gang¹, WANG Mengtian¹, HUANG Junjie², HU Yanhua², LIANG Jingyan¹, CHENG Yong²

(1.Jiangsu Key Laboratory of Senile Diseases Control and Prevention with Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Medical College of Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu 225001; 2.Jiangsu Provincial Research Center for Animal Transgenesis and Biopharming, College of Veterinary Medicine Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu 225009, China)

[KEY WORDS] apolipoprotein E; gene knockout; CRISPR/Cas9; New Zealand rabbit; serum lipid

[ABSTRACT] **Aim** To provide an excellent animal model for the study of atherosclerosis, it generated apolipoprotein E gene knockout (ApoE^{-/-}) rabbit. **Methods** ApoE gene of New Zealand rabbits were edited and F0 ApoE^{-/-} rabbits were created by applying CRISPR/Cas9 system. The efficiency and effect of ApoE gene targeted knockout was determined through PCR, TA cloning, Sanger sequencing, Western blot and lipid assay. ApoE^{-/-} rabbits were obtained through transmitting by germline. **Results** Sanger sequencing results showed that ApoE gene was successfully targeted knockout. Serum lipoprotein content of ApoE^{-/-} rabbits increased in normal diet compared with wild type rabbits and can be transmitted by germline. **Conclusion** The successful establishment of ApoE^{-/-} rabbit provided a good animal model for the further study of atherosclerosis and other related diseases.

动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)是导致急性临床事件的多数心血管疾病的共同病理基础,主要累及全身的大中型动脉。引起动脉粥样硬化的众多因素中,血脂异常是重要原因,而载脂蛋白 E (apolipoprotein E, ApoE)是血浆脂蛋白的重要组成部分,主要在肝脏和脑中合成,在脂质代谢调节中

发挥着主要作用。长期以来,众多学者也是一直通过动物模型来研究 ApoE 在动脉粥样硬化中的分子调节机制,如早期 Zhang 等^[1]成功制作出 ApoE 基因敲除(ApoE gene knockout, ApoE^{-/-})小鼠并且在无需高脂诱导下自发产生 As,到近期 Wei 等^[2]采用转录激活子样效应因子核酸酶技术(transcription

[收稿日期] 2018-03-15

[修回日期] 2018-05-02

[基金项目] 国家重点研发计划(2016YFE0126000);国家自然科学基金(81570392);扬州大学研究生科研创新计划项目(XKYCX17_069)

[作者简介] 袁婷婷,硕士研究生,研究方向为心血管疾病之动脉粥样硬化,E-mail 为 m160825@yzu.edu.cn。通信作者梁景岩,博士,教授,硕士研究生导师,研究方向为心血管疾病与动脉粥样硬化,E-mail 为 jyliang@yzu.edu.cn。通信作者成勇,博士,教授,博士研究生导师,研究方向为胚胎学与基因工程,E-mail 为 chengyong@yzu.edu.cn。

activator-like effectors nucleases, TALEN) 构建了 ApoE^{-/-}大鼠模型。相较于小鼠和大鼠,兔的脂质代谢特点更接近于人体,如兔体内低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)含量高,且兔的肝脏不能编码载脂蛋白 B48 mRNA,只能合成载脂蛋白 B100 等^[3],与人类类似,因此将兔作为制作 ApoE^{-/-}的动物选择对象能更好地研究 ApoE 在 As 中的作用。近几年新兴的 CRISPR/Cas9 (clustered regularly interspersed short palindromic repeats/CRISPR association protein 9) 技术作为基因编辑工具,相比较于 ZENS^[3-5]、TALEN^[6]具有操作简单、敲除效率高、多位点同时进行等优点^[7],采用 CRISPR/Cas9 技术可以在短时间内成功构建基因修饰动物模型。

1 材料和方法

1.1 动物

普通级别新西兰白兔,饲养条件:室温 18~25℃,湿度 40%~50%,换气良好,光照适宜。

1.2 主要仪器和试剂

1.2.1 试剂 CRISPR/Cas9 二合一质粒试剂盒及 Annealing Buffer(南京尧顺禹生物科技有限公司,中国), T4 DNA Ligase (Promega 公司), Phanta Super-Fidelity DNA polymerase (南京诺唯赞生物科技有限公司,中国), Endo-free Plasmid Mini Kit I (OMEGA, 美国), Script MAX Thermo T7 Transcription Kit (东洋纺生物科技有限公司,中国), 抗-反向帽类似物 (ARCA), poly(A) 聚合酶 (NEB, 中国), EasyPure PCR Purification Kit 及 E.coli Trans5α 感受态细胞 (全式金生物技术有限公司,中国), M2 及 M16 (Sigma, 美国)。

1.2.2 仪器 体视显微镜(厦门麦克奥迪公司, Japan), 荧光倒置显微镜和显微操作仪(Leica 公司, 德国), 拉针仪 (MODEL P-97, INSTRUMENT, USA), CO₂ 培养箱 (Thermo Forma, 美国), 基因扩增仪 S1000 型 (BIO-RAD 公司, 美国), 超净工作台 (苏州净化仪器设备厂, 中国), DNA 电泳仪和电泳槽 (DYY-6B 型, 南京新校园生物技术研究, 中国), 核酸蛋白定量分析仪 (上海仪涛生物仪器有限公司, 中国)。

1.3 质粒构建

在 NCBI 网站(美国国立生物技术信息中心), 获得新西兰兔 ApoE 的 DNA 及 mRNA 序列, 锚定第一外显子为靶敲位点, 经过筛选, 确定 2 个 sgRNA 靶位点, 在 <http://crispr.mit.edu/> 网站中, 进行

sgRNA 的设计, 分别命名为 sgRNA1 和 sgRNA2, 合成两对寡聚核苷酸链, sgRNA1: AAGACTGACCAAC-CGCAGCGCGG 和 CCCGCCTGCGGTTGGTCAGTCTT; sgRNA2: GGTGTGGTGGGCTGTGTTGGCGG 和 CCGC-CAACACAGCCCACCACACC, 然后用 T4 DNA Ligase 将退火产物与线性化的 CRISPR/Cas9 二合一质粒-PYSY-Cas9[该质粒由南京尧顺禹生物科技有限公司提供, 由于知识产权等相关问题, 该质粒的载体及引物(引物 1、引物 2、引物 3、引物 4)序列暂不公开]连接, 构建 sgRNA 和 Cas9 表达载体。将连接好的 CRISPR/Cas9 二合一质粒转化 Trans5α 感受态大肠杆菌进行克隆, 选择阳性克隆经测序验证后进行扩大培养以用来后续小量提取质粒及保存菌种用。

1.4 体外转录

分别制备 sgRNA1 和 sgRNA2 转录模板: 用 Vazyme Phanta Super-Fidelity DNA polymerase 进行 PCR 反应, 所用引物为引物 3、引物 4。PCR 反应条件: 95℃ 预变性 30 s; 95℃ 变性 5 s, 52℃ 退火 10 s, 72℃ 延伸 5 s, 重复 30 个循环; 72℃ 再延伸 5 min; 结束反应。

制备 Cas9 转录模板: 用 Vazyme Phanta Super-Fidelity DNA polymerase 进行 PCR 反应, 所用引物为引物 1、引物 2。PCR 反应条件: 95℃ 预变性 30 s; 95℃ 变性 10 s, 56℃ 退火 15 s, 72℃ 延伸 68 s, 重复 34 个循环; 72℃ 再延伸 5 min; 结束反应。

用 TRANSGEN PCR 纯化试剂盒分别纯化 sgRNA1、sgRNA2 和 Cas9 转录模板后进行体外转录, 转录所用试剂盒均为 ScriptMAX Thermo T7 Transcription Kit (TSK-101), 其中 Cas9 转录后用 E.coli polymerase 试剂盒进行加尾, 所有操作均按说明书进行, 纯化转录产物后 -80℃ 备用。

1.5 供受体的准备

选 6~8 月龄的健康未发情雌性新西兰兔作为供体兔, 分 6 次肌肉注射 50 U 卵泡刺激素 (follicle stimulating hormone, FSH), 耳缘静脉注射 100 U 人绒毛膜促性腺激素 (human chorionic gonadotropin, HCG) 后与健康成年雄性兔人工辅助交配, 在供体兔配种的同时, 挑取自然发情的成年母兔作受体兔, 同样耳缘静脉注射 HCG 100 U/只, 以备次日手术移植^[8]。母兔发情的主要标志为阴道黏膜呈潮红色。供体兔注射 HCG 后 17 h, 仰卧保定, 全身麻醉后, 无菌打开腹腔, 充分暴露卵巢和输卵管连同子宫, 用冲卵液从子宫方向朝输卵管喇叭口方向冲胚, 回收受精卵细胞, 在体视显微镜下计数观察后

移至 M16 培养液中,置于 38 ℃、5%CO₂ 饱和湿度培养箱中培养备用。

1.6 Cas9/sgRNA 的显微注射

将纯化后的转录产物 sgRNA (26.6 mg/L) 和 Cas9 mRNA (40 mg/L) 混合物显微注射至受精卵的胞质中,培养 30 min 后手术移植到同步发情的假孕受体母体输卵管内,待孕。

1.7 PCR 及 TA 克隆、测序

在仔兔出生 4 周时,剪下小块兔耳组织,在蛋白酶 K 和组织裂解液的作用下 55 ℃ 过夜消化,用酚氯仿方法提取基因组 DNA,溶于 0.1×TE 中,用软件 Primer5.0 设计的检测引物扩增包含敲除位点在内的基因片段。引物序列如下 Sense: 5'-GGGGAGACTGGAGCAGACAA-3'; Anti-sense: 5'-GTGCGGGA GCAAAGTGGT-3',产物大小为 560 bp。PCR 参数为:95 ℃ 预变性 5 min;94 ℃ 变性 40 s,60 ℃ 退火 40 s,72 ℃ 延伸 45 s,共 30 个循环;最后 72 ℃ 延伸 8 min。

将扩增产物送上海生工公司测序,进行 PCR 测序鉴定。选取 PCR 测序结果出现套峰的幼仔编号,进行 TA 克隆实验来进一步鉴定其突变情况和基因型。根据 T 载体说明书,扩增 PCR 片段,引物同 PCR 检测;产物纯化后将该片段连接 pMD™-19T 载体,转化感受态 DH50α,经蓝白斑筛选出成功插入 T 载体中的克隆。挑取 5~10 个克隆,摇菌扩增后将菌液送上海生工进行测序分析。测序结果与新西兰兔 ApoE 基因野生型序列进行比对,进而确定其基因型。

1.8 脱靶检测

针对每条 sgRNA 我们在网站 <http://crispr.mit.edu/> 进行脱靶位点预测,并对潜在脱靶位点 (POTS) 进行 PCR 测序检测,确定是否发生脱靶。

1.9 Western blot 检测血清 ApoE 蛋白的表达

分别取 ApoE^{-/-} 兔和正常兔静脉血,4000 r/min 离心 20 min 分离其血清,应用 Western blot 方法检测血清中 ApoE 蛋白的表达水平。

1.10 血脂检测

血清总胆固醇 (total cholesterol, TC)、甘油三酯 (triglyceride, TG)、低密度脂蛋白胆固醇 (low density lipoprotein cholesterol, LDLC)、高密度脂蛋白胆固醇 (high density lipoprotein cholesterol, HDLC) 采用全自动生化分析仪 (Beckman Coulter AU 480) 测定。

1.11 统计学处理

采用 SPSS19.0 统计软件进行统计分析。计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 *t* 检验, *P* < 0.05 表示差异有显著性。

2 结果

2.1 sgRNA 的设计

靶位点在兔 ApoE 基因第一外显子上的相对位置如图 1,依据文献报道的 sgRNA 的作用靶点设计方法,在 <http://crispr.mit.edu/> 网站中设计 sgRNA。本文中,我们针对 ApoE 基因设计了两条 sgRNA 作用靶点。

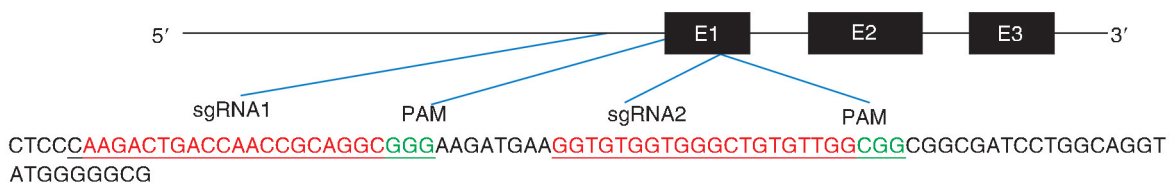


图 1. 靶位点在 ApoE 基因中的相对位置 E 代表外显子,红色代表 sgRNA 的序列,绿色代表 PAM 序列 (NGG)。

Figure 1. Relative position of the target site in the ApoE gene

2.2 基因测序

通过对 3 只供体兔超数排卵获得 102 枚受精卵,状态良好,因此对 102 枚受精卵全部进行显微注射,将 1.5 μL sgRNA1 (80 mg/L) 及 1.5 μL sgRNA2 (80 mg/L) 和 5 μL Cas9 mRNA (80 mg/L) 混合物显微注射至受精卵的胞质中 (图 2),培养 30 min 后选择状态良好的 100 枚受精卵移植到 3 只同步发情的母兔输卵管中,其中 1 只怀孕,妊娠 30 天后出生 2

只仔兔,其中 1 只为死胎。经 PCR 及产物 TA 克隆测序,该兔为突变兔 (F0),即雄性 ApoE^{-/-} 兔 (图 3),敲除效率见表 1。为了证明利用该技术所造成的缺失是否可以稳定遗传,将该公兔于适宜环境下饲养 8 个月后与正常母兔配种,获得 F1 代兔 10 只,经 PCR 测序鉴定后,有 4 只为 ApoE^{+/-} 兔,即表明可稳定遗传 (图 3、图 4 和图 5)。

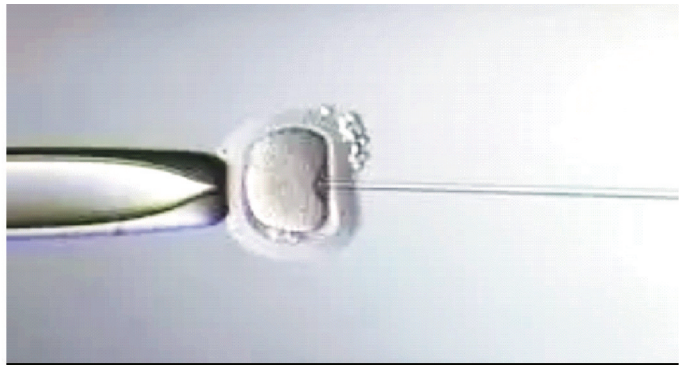


图 2. 兔受精卵的胞质显微注射 将 sgRNA 和 Cas9 mRNA 混合物在荧光倒置显微镜和显微操作仪下显微注射至受精卵的胞质中。

Figure 2. Cytoplasm microinjection of rabbit fertilized eggs

表 1. CRISPR/Cas9 系统对新西兰兔 ApoE 基因敲除效率统计

Table 1. The efficacy of CRISPR/Cas9-mediated gene targeting in ApoE gene of New Zealand rabbit

注射 sgRNA 类型	受体兔 (只)	超排卵数 (枚)	显微注射 卵数(枚)	移植胚 胎数(枚)	供体兔 (只)	怀孕兔 (只)	出生仔兔 (只)	单等位基因 突变兔(只)	双等位基因 突变兔(只)	怀孕率 (%)	突变率 (%)
sgRNA1 sgRNA2	3	102	102	100	3	1	2	0	2	33.3	100

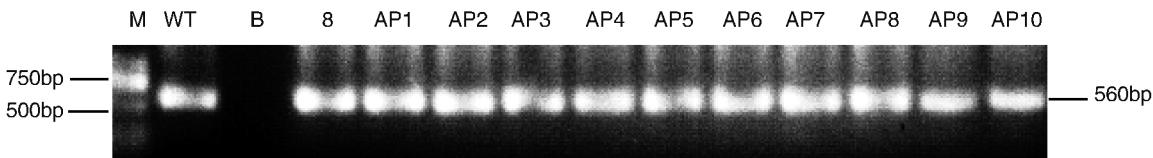


图 3. F0 代兔和 F1 子代兔 ApoE 基因 PCR 产物电泳图 M 为 DL2000 DNA Marker, WT 为野生型家兔基因组, B 为加双蒸水的空白对照组, 8 为原代兔(F0)基因组, AP1~AP10 为 F1 代仔兔基因组。

Figure 3. The PCR products electrophoresis of ApoE gene in F0 and F1 rabbits

2.3 脱靶预测与检验

在网站 <http://crispr.mit.edu/> 进行脱靶位点预测, 纳入的标准是与 sgRNA 靶位点错配数不大于 6 的 23 个碱基序列, 近 PAM 的 8 个碱基保守、PAM

为 NAG 或 NGG。针对两条 sgRNA 共设计了 10 个潜在脱靶位点(POTS)。通过 PCR 测序鉴定结果显示没有套峰出现, 说明在我们预测的脱靶位点内并未发生脱靶(表 2)。

表 2. ApoE 的潜在脱靶位点预测

Table 2. Prediction of potential off-target sites in ApoE

POTS	Sequence	Primer sequence	Product length
sgRNA1	5'-AAGACTGACCAACCGCAGGCGGG-3'		
POTS1T1	5'-CAGCCTGGCCACCCGCAGGCAGG-3'	F: 5'-GAGGGACAGTGAGAAAGAACG-3' R: 5'-CAGGAGACTTATCCAGGAGACA-3'	451 bp
POTS1T2	5'-GTCACTGACCAGCCGCAGGCTGG-3'	F: 5'-GATAGATTTCCTTGCTTA-3' R: 5'-CAGGAGGAAGAAAGATGG-3'	573 bp
POTS1T3	5'-GGGACTGAGCGACCGCAGGCCAG-3'	F: 5'-TGCCCACTGCTCCAAATC-3' R: 5'-TGTCCGTGCTGCCTCTGT-3'	558 bp
POTS1T4	5'-AAGGCTGGCTGACCGCAGGCAGG-3'	F: 5'-AACTGTAAGCCCTGGAAG-3' R: 5'-GCTCTGGGAAATGGAATC-3'	697 bp
POTS1T5	5'-CATACTGACGAGCCGCAGGCGGG-3'	F: 5'-GGGGTTTCTGTGACTGGAGC-3' R: 5'-TGCGAGGCAGGAAGGTGA-3'	373 bp
sgRNA2	5'-GGTGTGCTGGGCTGTGTTGGCGG-3'		
POTS2T1	5'-GGGGTGGTGGGCTGTGCTGGCAG-3'	F: 5'-TGTGGGCACTGCTACTGGG-3' R: 5'-TTTGCTGGGACGCTCTGG-3'	553 bp

续表

POTS	Sequence	Primer sequence	Product length
POTS2T2	5'-ACTATGGTGGGCTGTGTTGGAG-3'	F: 5'-TGACAAACCGACAAGAGG-3' R: 5'-GGGCAACACTGTGGCTAA-3'	618 bp
POTS2T3	5'-GACTTGGTGGGCTGTGTTGGAGG-3'	F: 5'-CCATCTTCCACTGCTTTTC-3' R: 5'-CCTTCCTCCCTCCTCCTC-3'	461 bp
POTS2T4	5'-GGTGTCTTGGGCTGTGTTGGGGG-3'	F: 5'-GAAGACAGGGCAGCAGAT-3' R: 5'-AGGCAGGACAGCACAAAC-3'	477 bp
POTS2T5	5'-GAGGTGCTGGGCTGTGTTGGAAG-3'	F: 5'-TGGAACAGAAGCGGAGAA-3' R: 5'-TGAGCACAGGAGGGCAGT-3'	673 bp

注:单下划线代表与 sgRNA 相同的碱基,双下划线代表 PAM 结构。

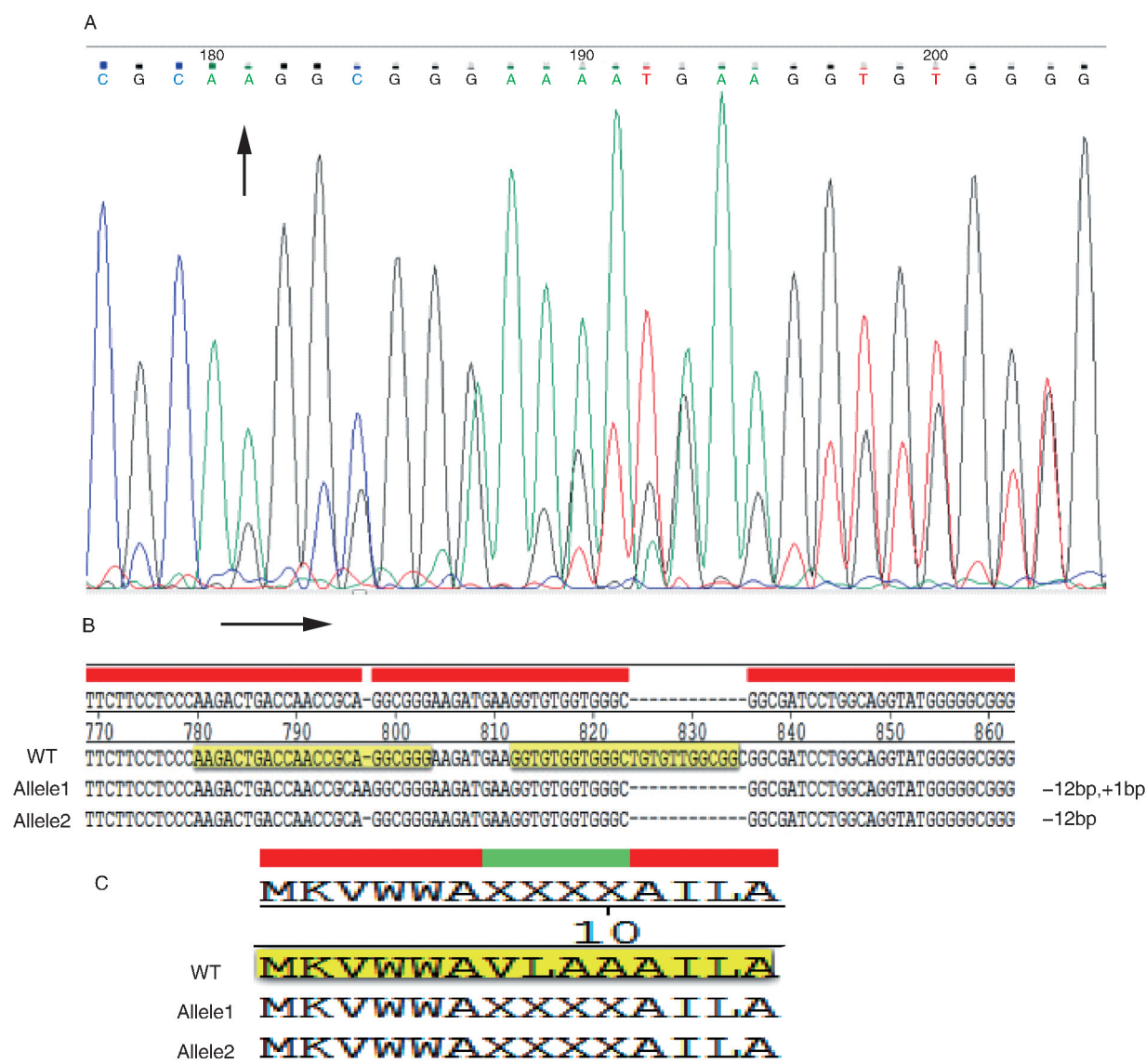


图 4. F0 代 $ApoE^{-/-}$ 兔的基因突变及编码氨基酸分析 A 为 PCR 产物测序峰图;F0 代仔兔 $ApoE$ 基因组 PCR 产物测序,结果显示从上图箭头处开始出现叠峰,且此处位于第一外显子中的 sgRNA1 的识别处,根据出现重叠峰的情况可初步说明 $ApoE$ 基因在该处发生突变,“—”表示出现突变的位置。B 为 TA 克隆后进一步分析 F0 代仔兔两条染色体的突变情况序列比对;黄色字体为靶位点 sgRNA1、sgRNA2,“-”表示碱基缺失,“+”等表示碱基增添,通过比对发现该兔一条染色体缺失 12 bp 碱基,另一条染色体缺失 12 bp 碱基且增加 1 个 A 碱基。C 为编码氨基酸分析:通过对 $ApoE^{-/-}$ 兔的基因序列进行翻译,发现其在敲除区并未发生阅读框移码突变,而只是缺失了 4 个氨基酸,即缬氨酸、亮氨酸、丙氨酸、丙氨酸。

Figure 4. Analysis of gene mutations and encoded amino acids in F0 $ApoE^{-/-}$ rabbits

8: TCTTCCTCCCAAGACTGACCAACCGCAAGGCGGGAAGATGAAGGTGTGGTGGGC-----GGCGATCCTGGCAGGTATGGGGGCGG -12bp, +1bp
TCTTCCTCCCAAGACTGACCAACCGCAGGCGGGAAGATGAAGGTGTGGTGGGC-----GGCGATCCTGGCAGGTATGGGGGCGG -12bp
AP1: TCTTCCTCCCAAGACTGACCAACCGCAGGCGGGAAGATGAAGGTGTGGTGGGCTGTGTTGGCGGCGGCGATCCTGGCAGGTATGGGGGCGG
TCTTCCTCCCAAGACTGACCAACCGCAAGGCGGGAAGATGAAGGTGTGGTGGGC-----GGCGATCCTGGCAGGTATGGGGGCGG -12bp, +1bp
AP2: TCTTCCTCCCAAGACTGACCAACCGCAGGCGGGAAGATGAAGGTGTGGTGGGCTGTGTTGGCGGCGGCGATCCTGGCAGGTATGGGGGCGG
TCTTCCTCCCAAGACTGACCAACCGCAAGGCGGGAAGATGAAGGTGTGGTGGGC-----GGCGATCCTGGCAGGTATGGGGGCGG -12bp, +1bp
AP3: TCTTCCTCCCAAGACTGACCAACCGCAGGCGGGAAGATGAAGGTGTGGTGGGCTGTGTTGGCGGCGGCGATCCTGGCAGGTATGGGGGCGG
TCTTCCTCCCAAGACTGACCAACCGCAAGGCGGGAAGATGAAGGTGTGGTGGGC-----GGCGATCCTGGCAGGTATGGGGGCGG -12bp, +1bp
AP4: TCTTCCTCCCAAGACTGACCAACCGCAGGCGGGAAGATGAAGGTGTGGTGGGCTGTGTTGGCGGCGGCGATCCTGGCAGGTATGGGGGCGG
TCTTCCTCCCAAGACTGACCAACCGCAAGGCGGGAAGATGAAGGTGTGGTGGGC-----GGCGATCCTGGCAGGTATGGGGGCGG -12bp, +1bp

图 5. F0 代 ApoE^{-/-}兔传代突变情况 8 号为 F0 代 ApoE^{-/-}兔, AP1、AP2、AP3、AP4 为 F0 代 ApoE^{-/-}兔与野生型兔交配产生的 4 个子代突变兔。

Figure 5. The mutation of F0 ApoE^{-/-} rabbit offspring

2.4 血清 ApoE 表达

Western blot 结果显示,在 ApoE^{-/-}兔的血清中,无 ApoE 表达,而在野生型兔中可见 ApoE 的表达,说明该模型实现了 ApoE 基因在表达水平的成功敲除(图 6)。

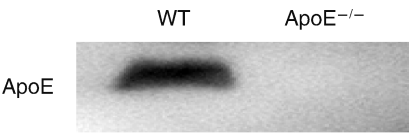


图 6. ApoE^{-/-}兔及野生型兔血清中 ApoE 蛋白的表达
Figure 6. Serum ApoE protein expression in ApoE^{-/-} rabbit and wild-type rabbit

2.5 血脂含量

将经测序验证的 ApoE^{-/-}雄性兔和同龄正常家兔于室温 18~25℃、湿度 40%~50%、换气良好、光照适宜、正常普通饮食的环境中饲养,从第 10 周龄开始取该只 ApoE^{-/-}雄性兔和 3 只同龄野生型兔每隔 4 周进行一次血脂检测,连续 4 次,即将 ApoE^{-/-}兔和正常家兔空腹 12 h 后,经耳静脉抽取 2 mL 的静脉血于 0.5 mol/L EDTA 抗凝管中,4000 r/min 离心 20 min,离心后取血清,采用自动生化分析仪(Beckman Coulter AU 480)测定血清 TC、TG、LDLC、HDLc 等含量,结果发现 ApoE^{-/-}兔的 TC 含量(3.89±0.73 mmol/L)高于野生型兔(1.68±0.65 mmol/L, P<0.05),LDLC 含量(1.36±0.12 mmol/L)明显高于野生型兔(0.51±0.15 mmol/L, P<0.01,表 3)。

表 3. 不同周龄 ApoE^{-/-}兔与同龄野生型兔血脂含量比较 (mmol/L)

Table 3. Comparison of serum lipids between different ages of ApoE^{-/-} rabbits and the age-matched WT rabbit (mmol/L)

周龄	兔编号	TC	TG	HDLc	LDLC
10 周	ApoE ^{-/-}	4.7	1.30	1.12	1.26
	WT	2.4	1.37	0.92	0.67
14 周	ApoE ^{-/-}	3.69	0.45	1.39	1.49
	WT	1.52	0.65	0.93	0.51
17 周	ApoE ^{-/-}	3.28	0.27	1.23	1.33
	WT	1.12	0.57	0.71	0.37
$\bar{x}\pm s$	ApoE ^{-/-}	3.89±0.73 ^a	0.67±0.55	1.24±0.14	1.36±0.12 ^b
	WT	1.68±0.65	0.86±0.44	0.85±0.12	0.51±0.15

a 为 P<0.05, b 为 P<0.01, 与同龄野生型兔比较。

3 讨 论

兔是研究人类不同领域疾病的首选模型系统,如高血压和动脉粥样硬化,因为它与人类生理学很相似。它的体积比啮齿动物大,便于生理和外科操作以及成像。王粮山等^[9]人利用金刚砂磨针磨除新西兰兔左颈总动脉内膜建立起兔动脉剥脱模型,从而可模拟冠状动脉内膜剥脱术(coronary endarterectomy, CE)术后血管腔内的病理过程。基因编辑技术的迅速发展,使兔的基因组能够像老鼠一样容易被设计出来,为应用兔模型进行医学研究提供了机会。目前已经产生了多种基因修饰兔模型,如人 ApoE2 转基因兔出现Ⅲ型高脂血症和动脉粥样硬化^[10],胆固醇酯转移蛋白(CETP)转基因兔血浆 HDLC 含量显著低于非转基因兔^[11]。虽然已有多

例转基因兔模型建立,但是由于兔胚胎干细胞的缺乏,使得基因敲除的发展受到阻碍。而 CRISPR/Cas9 技术的横空出现无疑给基因敲除兔模型的建立提供了有力工具。

人成熟载脂蛋白 E (ApoE) 由 299 个氨基酸组成,相对分子质量为 34 kDa,主要由肝脏和脑合成,存在于乳糜微粒 (chylomicron, CM)、极低密度脂蛋白 (very low density lipoprotein, VLDL) 等多种血浆脂蛋白中,是一种富含精氨酸的碱性蛋白^[12]。ApoE 具有受体功能域、肝素结合功能域、脂质和脂蛋白结合域四个功能域,其分子可以被凝血酶水解为两个区域^[13-14],即 N 端区和 C 端区,其间由一铰链区连接^[15]。C 端的稳定区是主要的脂蛋白脂类结合区,此区没有与 LDL 受体结合的活性^[16]。而 N 端区具有很强的与 LDL 受体结合的能力,此区发生突变极易引起 ApoE 蛋白构象的改变,影响功能域的作用,进而改变体内残余脂蛋白的清除能力。ApoE 可通过 LDL 受体及相关受体由肝脏摄取胆固醇酯残粒,从而发挥对脂蛋白残粒的清除作用, ApoE 功能异常可发生 III 型高脂血症和早期动脉粥样硬化,而注射 ApoE 蛋白或在肝中过表达 ApoE 基因都会对动脉粥样硬化有保护作用^[17]。目前对 ApoE 基因功能的研究主要是利用转基因动物或者基因敲除或突变的动物,通过建立相关的动物模型,来探索 ApoE 基因与相关疾病的内在联系。

CRISPR/Cas9 系统是基于细菌和古细菌的获得性免疫系统改造而来的一种定向基因组编辑系统,该系统通过向导 RNA (sgRNA) 介导的 Cas 蛋白,特异性地切割 DNA 序列,形成双链 DNA 断裂 (double strand break, DBS),然后借助自身的同源重组机制 (homology directed repair, HDR) 或者非同源末端连接机制 (non-homologous end joining, NHEJ) 对断裂的 DNA 进行修复。同源重组一般通过供体 DNA 与基因组 DNA 之间的同源重组将切割后的靶位点进行纠正或者靶向插入外源基因。而非同源末端连接常使得切割区域发生基因突变,导致编码的基因功能缺失或改变,这为基因工程及应用领域带来了突破性进展^[18-19]。同时为了检测该系统中 sgRNA 的活性,刘燕等^[20]人利用体内和体外两种检测方法发现两者并不能互为替代,这也就提醒我们在体外活性很高的 sgRNA 未必在体内就会产生很高的切割效率。本研究应用 CRISPR/Cas9 系统定向编辑新西兰兔的 ApoE 基因组,造成 ApoE 基因的第一外显子处发生碱基缺失,导致所编码的 ApoE 蛋白分子 N 端区缺失 4 个氨基酸,进而可能影响

ApoE 与 LDLR 及相关受体的特异性结合,从而在正常饮食状态下出现血清 TC 和 LDLC 的升高,与 Nii-mi^[21]团队报道的结果一致。

CRISPR/Cas9 系统存在的主要问题是脱靶效应^[22],即短序列的向导 RNA 除了可特异性识别目标 DNA 序列,还会同基因组中与目标序列相似的一些区域结合,产生非靶向 DNA 的双链断裂,导致基因组不稳定,影响正常基因的表达。脱靶检测结果显示,在我们所预测的范围内并未发生脱靶,一方面有可能是我们预测范围太窄以致即使存在脱靶但未检测到,另一方面便是并未出现脱靶。近年来,已有多个研究团队致力于优化 CRISPR/Cas9 系统的脱靶问题。如:提高种子序列 (seed sequence) 的保守性^[18,22-24],缩短向导 RNA 的长度^[25],在原有的 gRNA 序列前增加两个鸟嘌呤核苷酸 (GG)^[26]。从所得到的 F1 代 ApoE^{+/-}来看,该系统所获得 ApoE 基因突变可以稳定遗传,为下一步研究奠定了基础。

4 结 论

本研究借助第三代基因编辑工具 CRISPR/Cas9 系统成功敲除新西兰兔的 ApoE 基因,获得了 ApoE^{-/-}兔,而且在 ApoE^{-/-}兔中我们发现其血脂尤其是 TC、LDLC 的含量较野生型高,并且可以稳定遗传,为研究心血管疾病提供了新的动物模型。

[参考文献]

- [1] Zhang SH, Reddick RL, Piedrahita, et al. Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E[J]. Science, 1992, 258(5081): 468-471.
- [2] Wei S, Zhang Y, Su L, et al. Apolipoprotein E-deficient rats develop atherosclerotic plaques in partially ligated carotid arteries [J]. Atherosclerosis, 2015, 243(2): 589-592.
- [3] Fan J, Kitajima S, Watanabe T, et al. Rabbit models for the study of human atherosclerosis: From pathophysiological mechanisms to translational medicine[J]. Pharmacol Ther, 2015, 146: 104-119.
- [4] Ramirez CL, Foley JE, Wright DA, et al. Unexpected failure rates for modular assembly of engineered zinc fingers [J]. Nat Methods, 2008, 5(5): 374-375.
- [5] Persikov A V, Osada R, Singh M. Predicting DNA recognition by Cys2His2 zinc finger proteins[J]. Bioinformatics, 2009, 25(1): 22-29.
- [6] Christian M, Cermak T, Doyle EL, et al. Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases[J]. Nat

- Genet, 2010, 186(2): 757-761.
- [7] Cho SW, Kim S, Kim JM, et al. Targeted genome engineering in human cells with the Cas9 RNA-guided endonuclease[J]. Nat Biotechnol, 2013, 31(3): 230-232.
- [8] 宋绍征, 葛欣, 张利清, 等. 家兔超数排卵和胚胎移植妊娠率的影响因素分析[J]. 畜牧与兽医, 2013, 45(8): 14-18.
- [9] 王粮山, 李波, 刘长城, 等. 兔动脉内膜剥脱模型的建立及血栓检测[J]. 心肺血管病杂志, 2016, 35(1): 56-58.
- [10] Fan J, Ji ZS, Huang Y, et al. Increased expression of apolipoprotein E in transgenic rabbits results in reduced levels of very low density lipoproteins and an accumulation of low density lipoproteins in plasma[J]. J Clin Invest, 1998, 101(10): 2151-2164.
- [11] 高守翠, 成大欣, 赵四海, 等. 胆固醇酯转移蛋白转基因家兔制作及生物学特性分析[J]. 中国实验动物学报, 2015, 23(4): 331-335.
- [12] Morrow JA, Arnold KS, Weisgraber KH. Functional characterization of apolipoprotein E isoforms overexpressed in Escherichia coli[J]. Protein Expr Purif, 1999, 16(2): 224-230.
- [13] Aggerbeck LP, Wetterau JR, Weisgraber KH, et al. Human apolipoprotein E3 in aqueous solution. II. Properties of the amino- and carboxyl-terminal domains[J]. J Biol Chem, 1988, 263(13): 6249-6258.
- [14] Wetterau JR, Aggerbeck LP, Rall SC Jr, et al. Human apolipoprotein E3 in aqueous solution. I. Evidence for two structural domains[J]. J Biol Chem, 1988, 263(13): 6240-6248.
- [15] Wilson C, Wardell MR, Weisgraber KH, et al. Three-dimensional structure of the LDL receptor-binding domain of human apolipoprotein E[J]. Science, 1991, 252(5014): 1817-1822.
- [16] Weisgraber KH. Apolipoprotein E distribution among human plasma lipoproteins: role of the cysteine-arginine interchange at residue 112[J]. J Lipid Res, 1990, 31(8): 1503-1511.
- [17] Linton MF, Fazio S. Macrophages, lipoprotein metabolism, and atherosclerosis: insights from murine bone marrow transplantation studies[J]. Curr Opin Lipidol, 1999, 10(2): 97-105.
- [18] Cong L, Ran FA, Cox D, et al. Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems[J]. Science, 2013, 339(6121): 819-823.
- [19] Mali P, Yang L, Esvelt KM, et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9[J]. Science, 2013, 339(6121): 823-826.
- [20] 刘燕, 任卫红, 王绿娅, 等. CRISPR/Cas9 基因编辑系统中两种 gRNA 活性检测方法比较[J]. 心肺血管病杂志, 2016, 35(7): 563-568.
- [21] Niimi M, Yang D, Kitajima S, et al. ApoE knockout rabbits: A novel model for the study of human hyperlipidemia[J]. Atherosclerosis, 2016, 245: 187-193.
- [22] Pattanayak V, Lin S, Guilinger JP, et al. High-throughput profiling of off-target DNA cleavage reveals RNA-programmed Cas9 nuclease specificity[J]. Nat Biotechnol, 2013, 31(9): 839-843.
- [23] Fu Y, Foden JA, Khayter C, et al. High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells[J]. Nat Biotechnol, 2013, 31(9): 822-826.
- [24] Hsu PD, Scott DA, Weinstein JA, et al. DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases[J]. Nat Biotechnol, 2013, 31(9): 827-832.
- [25] Fu Y, Sander JD, Reyon D, et al. Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs[J]. Nat Biotechnol, 2014, 32(3): 279-284.
- [26] Cho SW, Kim S, Kim Y, et al. Analysis of off-target effects of CRISPR/Cas-derived RNA-guided endonucleases and nickases[J]. Genome Res, 2014, 24(1): 132-141.
- (此文编辑 许雪梅)