

领域前沿 · 中国



季维智, 研究员。现任生物医学动物模型国家地方联合工程研究中心主任, 云南中科灵长类生物医学动物重点实验室理事长。“国家干细胞研究指导协调委员会”专家, “国家重大科学研究计划生殖与发育专家组”成员, “国家实验动物研究委员会”专家组成员和973项目首席科学家。1985~1987年赴美国俄勒冈灵长类研究中心和华盛顿史密研究院从事神经生殖内分泌和胚胎移植研究。1995~1997年任美国威斯康星大学动物医学与生物化学系客座教授。1996年与威斯康星灵长类研究中心在中国科学院昆明动物研究所共建了中-美灵长类生物学联合实验室。1996~2005年任中国科学院昆明动物研究所所长。

多年来, 一直从事灵长类生殖发育生物学和干细胞的研究, 作为负责人承担了包括863、973在内的多项国家及省部级重大科研项目。主要的研究方向包括: (1)灵长类卵成熟和胚胎发育的分子调控机制; (2)灵长类干细胞生物学; (3)人类重大疾病的非人灵长类动物模型。在Cell、Cell Stem Cell、Proc Natl Acad Sci USA、Cell Res、Stem Cell、J Biol Chem、Biol Rep、Human Rep等杂志上发表论文90余篇。

通过CRISPR/Cas9和TALENs介导的基因打靶技术获得基因修饰的猴模型

陈永昌 牛昱宇 季维智*

(云南中科灵长类生物医学重点实验室, 昆明 650500)

1 研究背景

灵长类动物, 如猕猴和食蟹猴, 在遗传和生理特性上与人类具有很高的相似性, 是研究人类疾病、发育和临床前治疗等方面最为理想、有时甚至是唯一的实验动物^[1]。通过遗传修饰的方法获得灵长类动物模型对探讨疾病的致病机理和治疗有重大的意义, 因此科学家一直在努力构建理想的灵长类动物模型。来自美国、日本和中国的科学家们先后获得了利用逆转录病毒或慢病毒介导的转基因猴^[2-5], 但这些通过外源基因的随机插入和过量表达来实现对基因组的修饰, 无法对确定的目的基因进行修饰和控制, 所获得的动物模型具有一定的局限性和不确定性。最近发展起来的锌指核酸酶(zinc-finger nucleases, ZFNs)、转录激活因子样

效应物核酸酶(transcription activator-like effectors nucleases, TALENs)和规律成簇的间隔短回文重复序列(clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR)等系统是利用特异的核酸内切酶, 通过碱基配对的原理, 与基因组的靶位点结合, 形成二聚体发挥内切酶活性, 引起双链DNA断裂(double-strand breaks, DSB), 从而诱发DNA损伤修复机制。细胞可以通过非同源性末端接合机制(non-homologous end joining, NHEJ)修复DNA。NHEJ修复机制并不精确, 极易发生错误(缺失/插入), 从而造成移码突变, 达到基因敲除的目的^[6-7]。或者利用同源重组修复(homology-directed repair)机制, 利用细胞自身的修复机制对DNA进行遗传学修饰。ZFNs因脱靶效应严重, 而且很难完全找到符合条件的匹配3连子锌指, 因而限制了该技术的发展和推广^[8]。

相对于ZFNs技术, TALENs具有经济、高效、可以靶向更长的基因序列以及相对更容易构建等优

*通讯作者。Tel: 0871-65952801, E-mail: wji@kbimed.com

*Corresponding author. Tel: +86-871-65952801, E-mail: wji@kbimed.com

网络出版时间: 2014-04-29 15:58

URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.05.9001.html>

势。TALENs已广泛应用于动物及植物的基因修饰研究,然而尚未见在灵长类动物中的研究报道。与同济大学孙毅教授研究团体合作,我们选用X-连锁的、突变及缺失可导致雷特综合征(Rett syndrome, RTT)的甲基CpG结合蛋白2(methyl CpG binding protein 2, *MECP2*)基因^[9],构建*MECP2*靶向TALEN质粒并注射到猕猴及食蟹猴的1细胞期胚胎。最终获得了高效打靶并符合RTT表型特征的猕猴模型组织材料及食蟹猴模型个体。首次证明TALENs技术可以用于灵长类基因修饰动物模型的构建^[10]。

CRISPR/Cas9因其操作简便、高效、特异性高、可同时操作多个基因等特性,被认为是有力的真核基因组遗传修饰工具^[11]。目前,该系统已广泛应用在哺乳动物细胞系和多个物种,包括小鼠和大鼠等^[12-14],然而能否成功应用在灵长类动物中尚不清楚。因此,与南京医科大学沙家豪教授和南京大学黄行许教授研究团队合作,我们选定3个目的基因 [*Nr0b1*(nuclear receptor subfamily 0 group B member 1,参与调节肝细胞的干性以及参与调节动物性别决定); *Ppar-γ*(peroxisome proliferator-activated receptor gamma,帮助调节新陈代谢); *Rag1*(recombination

activating gene 1,与健康的免疫功能相关)],将Cas9 mRNA及3个基因特定的向导RNA混合物注射到食蟹猴1细胞期胚胎的卵胞质中。成功获得了2个基因 (*Ppar-γ*和*Rag1*)同时被敲除的食蟹猴^[15]。

2 TALENs构建遗传修饰灵长类动物模型

2.1 TALENs的设计及实验流程

与人和小鼠类似,猴*MECP2*基因包含4个外显子,其中外显子3包含351个核苷酸,是最为重要和非常保守的功能区域,我们针对该外显子设计了3对TALEN靶向序列(图1A)。

为了验证TALENs的有效性,我们利用构建的质粒转染了293T细胞、食蟹猴间充质细胞以及人间充质细胞,均发现了突变剪切的发生。并将单对TALEN和3对TALEN的超螺旋环状质粒DNA组合或对应转录后的mRNA,连同可以促进DNA修复的RAD51一起以5 pL每个胚胎(2 ng/μL)的量注射到1细胞期胚胎,结果发现3对TALENs的质粒对基因组的编辑效果很好,对8细胞到囊胚阶段的胚胎检测发现,40%~50%胚胎的*MECP2*基因发生了突变。之后,在猕猴和食蟹猴上开展了胚胎移植,并获得了

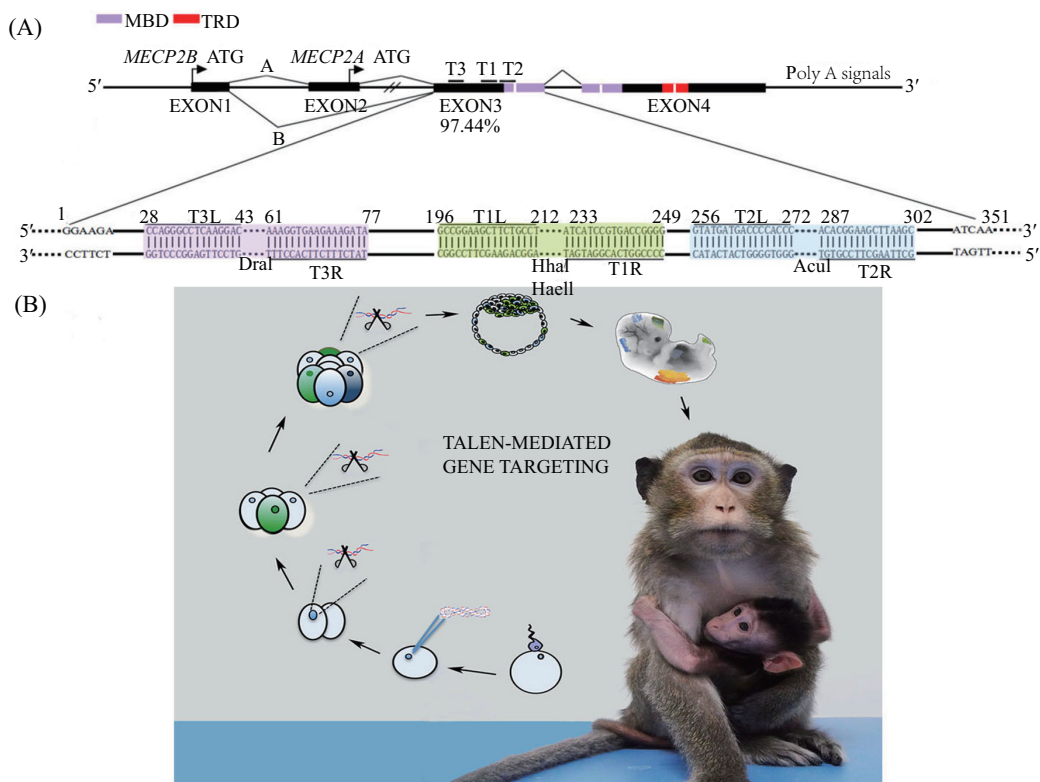


图1 TALENs的设计及*MECP2*基因修饰猴构建实验流程示意图(根据参考文献[10]修改)

Fig.1 The design of TALEN-targeting sites within monkey *MECP2* and schematic map of experimental procedure (modified from reference [10])

TALENs介导的基因修饰猴。实验步骤见图1B。

2.2 TALENs介导的猴模型构建结果

X染色体连锁基因*MECP2*的突变可引起RTT综合征, 该病是雄性致死的, 患者基本是雌性。我们的实验结果发现, 在怀孕中期流产的胎儿均为雄性, 而正常出生的新生猴为雌性。经PCR、T7EN1酶切和测序等检测, 流产雄性胎儿及出生的雌性均存在基因突变, 符合RTT的性别表型特征。经过对父母本单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)分析, 这些突变并不是由SNP引起的, 而是由TALENs介导的。这些结果表明, TALENs系统利用超螺旋的环状质粒DNA对猕猴及食蟹猴的基因组进行定向遗传改造是高效而可行的。

3 CRISPR/Cas9构建遗传修饰灵长类动物模型

3.1 Cas9/sgRNA的设计

我们选取了3个目的基因: *Nr0b1*、*Ppar-γ*和*Rag1*。这几个基因不会影响胚胎发育, 无致死性, 多个基因的缺失或突变不会导致某种综合征, 相互之间不存在相互调节或上下游关系。实验的第一步是设计sgRNA, 针对*Nr0b1*基因设计了2条sgRNA, 中间有117个碱基相隔; *Ppar-γ*的2条sgRNA被49个碱基相隔; 而*Rag1*基因只设计了1条sgRNA。

3.2 CRISPR/Cas9构建基因修饰猴的实验流程及结果

为了验证这些sgRNA的有效性, 首先将它们与*Cas9* mRNA混合, 并共转染进非洲绿猴肾脏COS-7细胞系中, 72 h后, 收集并提取细胞的基因组DNA, 通过PCR扩增、T7EN1酶切分析等检测了特异位点基因修饰的效率, 并做了进一步的测序分析。结果发现, 5个目标打靶位点均实现了突变(包括碱基插入、缺失和替换等), 突变效率在10%~25%之间。之后, 我们将*Cas9* mRNA(20 ng/μL)与sgRNA的混合物(分别为5 ng/μL)注射到22个食蟹猴的1细胞期原核胚中, 其中15个胚胎发育到了桑葚胚或囊胚阶段。同样利用PCR、T7EN1及测序的办法进行了检测。结果发现, *Nr0b1*、*Ppar-γ*和*Rag1*基因突变的效率分别是26.7%、46.7%和60%; 而且40%的胚胎中*Ppar-γ*和*Rag1*基因同时突变, 13.3%的胚胎中*Nr0b1*和*Rag1*基因同时突变。表明CRISPR/Cas9系统在猴胚胎中可正常发挥基因修饰的功能。我们随后开展了基因

修饰猴胚胎移植的实验, 并获得了1对双胞胎后代, 对胎盘、脐带以及耳朵皮肤的检测结果显示, 这对双胞胎实现了*Ppar-γ*和*Rag1*两个基因的同时突变。实验的主要流程见图2。

4 脱靶效应和嵌合情况分析

对TALENs系统和CRISPR/Cas9系统是否存在脱靶效应进行了检测。对TALENs小猴的胎盘、脐带、耳朵皮肤及其父母本基因组, 流产胎儿的脑组织、睾丸、其他组织及其父母本基因组等, 共计1 882个样品或PCR产物的测序结果分析发现, 没有脱靶效应的存在。此外, 在基因修饰猴所有材料的基因组内并未发现TALENs质粒的整合情况。这些结果表明, TALENs是可靠的可用于开展灵长类动物基因修饰研究的工具。

人们对CRISPR/Cas9体系开展基因遗传修饰较为关心的问题之一是脱靶效应的存在。我们提取了出生猴的脐带并提取了基因组DNA, 筛选了针对3个基因的84个可能存在的脱靶位点, 通过PCR扩增、T7EN1酶切、TA克隆序列分析等, 并未发现脱靶突变的存在。由于脱靶效应与位点的选择、sgRNA的设计等密切相关^[16]。我们的结果也说明只要优化相关操作程序, CRISPR/Cas9系统是可应用于灵长类动物的可靠的基因修饰工具。

实验还发现, 无论是体外培养的早期胚胎, 还是获得的基因修饰猴, TALENs和CRISPR/Cas9系统获得的基因修饰猴基因组测序结果都发现具有多种基因型, 表明所获得的1只TALENs介导的基因修饰猴和一对CRISPR/Cas9介导的基因修饰猴都是嵌合体。类似的结果也在其他物种中得到印证^[17-18]。希望未来获得并分析更多数量的基因修饰猴, 深入了解经TALENs或Cas9/RNA系统获得的基因修饰猴的遗传学特性。

5 结论与展望

我们首次利用CRISPR/Cas9和TALENs系统分别实现了灵长类动物的基因修饰, 并获得起始精准遗传修饰的灵长类动物, 说明在猴的1细胞期胚胎注射*Cas9* mRNA/sgRNA或TALENs质粒DNA是可行的开展基因修饰的操作方法, 还可实现同时开展多个基因的修饰操作, 并可有效避免脱靶效应。这两种强有力的遗传操作技术体系有望未来为开展人类重大疾病的发病机理研究及探索新的治疗方案建立更多基因修饰的灵长类动物模型。

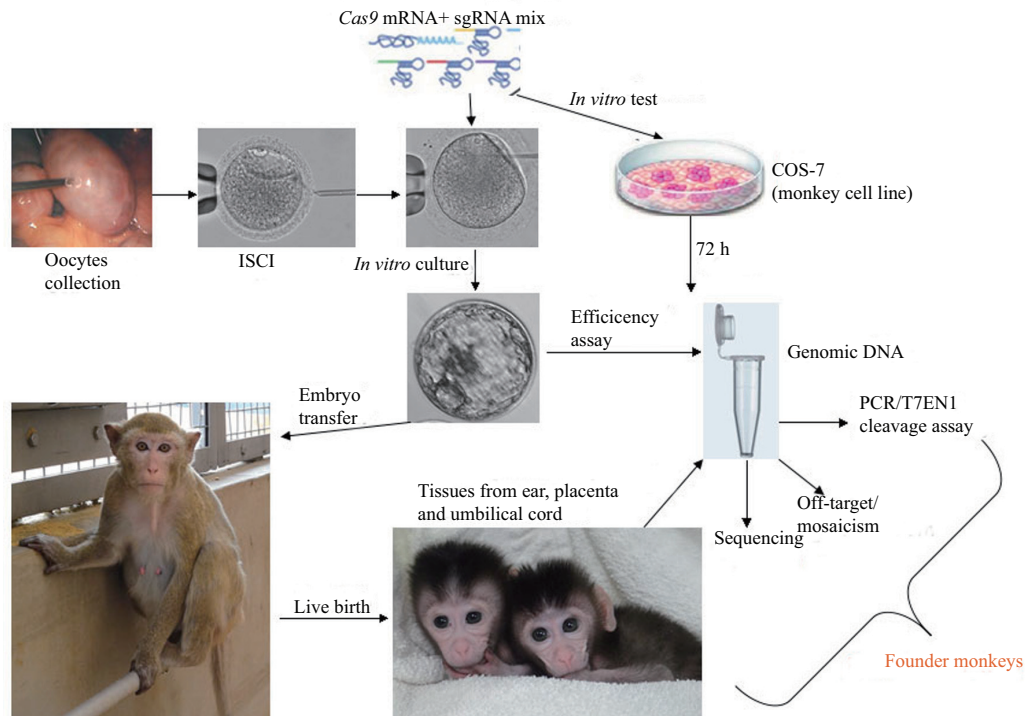


图2 获得CRISPR/Cas9基因修饰食蟹猴的操作流程(根据参考文献[15]修改)

Fig.2 Schematic diagram of generation of CRISPR/Cas9 mediated genetic modified cynomolgus monkeys (modified from reference [15])

参考文献 (References)

- Chan AW. Progress and prospects for genetic modification of nonhuman primate models in biomedical research. *ILAR J* 2013; 54(2): 211-23.
- Chan AW, Chong KY, Martinovich C, Simerly C, Schatten G. Transgenic monkeys produced by retroviral gene transfer into mature oocytes. *Science* 2001; 291(5502): 309-12.
- Yang SH, Cheng PH, Banta H, Piotrowska-Nitsche K, Yang JJ, Cheng EC, *et al.* Towards a transgenic model of Huntington's disease in a non-human primate. *Nature* 2008; 453(7197): 921-4.
- Sasaki E, Suemizu H, Shimada A, Hanazawa K, Oiwa R, Kamioka M, *et al.* Generation of transgenic non-human primates with germline transmission. *Nature* 2009; 459(7246): 523-7.
- Niu Y, Yu Y, Bernat A, Yang S, He X, Guo X, *et al.* Transgenic rhesus monkeys produced by gene transfer into early-cleavage-stage embryos using a simian immunodeficiency virus-based vector. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107(41): 17663-7.
- Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 2012; 337(6096): 816-21.
- Shen B, Zhang J, Wu H, Wang J, Ma K, Li Z, *et al.* Generation of gene-modified mice via Cas9/RNA-mediated gene targeting. *Cell Res* 2013; 23(5): 720-3.
- Gaj T, Gersbach CA, Barbas CF 3rd. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends Biotechnol* 2013; 31(7): 397-405.
- Hagberg B, Aicardi J, Dias K, Ramos O. A progressive syndrome of autism, dementia, ataxia, and loss of purposeful hand use in girls: Rett's syndrome: Report of 35 cases. *Ann Neurol* 1983; 14(4): 471-9.
- Liu H, Chen Y, Niu Y, Zhang K, Kang Y, Ge W, *et al.* TALEN-mediated gene mutagenesis in rhesus and cynomolgus monkeys. *Cell Stem Cell* 2014; 14(3): 323-8.
- Mali P, Yang L, Esvelt KM, Aach J, Guell M, DiCarlo JE, *et al.* RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science* 2013; 339(6121): 823-6.
- Wang H, Yang H, Shivalila CS, Dawlaty MM, Cheng AW, Zhang F, *et al.* One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell* 2013; 153(4): 910-8.
- Li W, Teng F, Li T, Zhou Q. Simultaneous generation and germline transmission of multiple gene mutations in rat using CRISPR-Cas systems. *Nat Biotechnol* 2013; 31(8): 684-6.
- Ma Y, Zhang X, Shen B, Lu Y, Chen W, Ma J, *et al.* Generating rats with conditional alleles using CRISPR/Cas9. *Cell Res* 2014; 24(1): 122-5.
- Niu Y, Shen B, Cui Y, Chen Y, Wang J, Wang L, *et al.* Generation of gene-modified cynomolgus monkey via Cas9/RNA-mediated gene targeting in one-cell embryos. *Cell* 2014; 156(4): 836-43.
- Ran FA, Hsu PD, Lin CY, Gootenberg JS, Konermann S, Trevino AE, *et al.* Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell* 2013; 154(6): 1380-9.
- Sung YH, Baek IJ, Kim DH, Jeon J, Lee J, Lee K, *et al.* Knockout mice created by TALEN-mediated gene targeting. *Nat Biotechnol* 2013; 31(1): 23-4.
- Tesson L, Usal C, Ménoret S, Leung E, Niles BJ, Remy S, *et al.* Knockout rats generated by embryo microinjection of TALENs. *Nat Biotechnol* 2011; 29(8): 695-6.