

利用 CRISPR/Cas 系统快速高效构建血友病乙小鼠模型

汪启翰¹, 怀聪¹, 孙瑞林², 庄华², 陈红岩¹, 费俭², 卢大儒¹

1. 复旦大学生命科学学院, 遗传工程国家重点实验室, 上海 200433;

2. 上海南方模式生物研究中心, 上海 201203

摘要: 血友病乙是由凝血因子 IX (Factor IX, FIX) 缺乏或功能缺陷导致的出血性疾病, 为伴 X 染色体隐性遗传病。小鼠模型对于血友病乙的研究具有十分重要的意义, 而基因组编辑技术又为小鼠模型的构建提供了一种快捷而且高效的途径。本文利用 CRISPR/Cas 系统, 在小鼠 *FIX* 基因第 8 外显子上选择靶位点, 将 Cas9 mRNA 和带有靶位点的 sgRNA 显微注射到 C57BL/6 品系小鼠的受精卵中, 获得基因修饰的小鼠。利用高分辨率熔解曲线分析 (High resolution melting, HRM) 技术进行精确基因分型, 并通过测序验证, 在 60 只小鼠中, 总共有 51 只小鼠的靶位点发生了突变, 突变率高达 85%, 其中雄鼠的突变率为 79.5%, 雌鼠的突变率为 95.2%; 未检测到非目标位置的基因编辑脱靶。凝血活性实验显示, 突变小鼠的 *FIX* 活性值 (Factor IX coagulant activity, FIX: C) 是非突变小鼠的 6.82%, 大大低于非突变小鼠, 表明突变小鼠的凝血活性缺失。本研究表明, 利用 CRISPR/Cas 系统成功构建了人类血友病乙遗传病小鼠模型。

关键词: 血友病乙; CRISPR/Cas 系统; 基因组编辑; 小鼠模型

A quick and efficient method to generate hemophilia B mouse models by the CRISPR/Cas system

Qihan Wang¹, Cong Huai¹, Ruilin Sun², Hua Zhuang², Hongyan Chen¹, Jian Fei², Daru Lu¹

1. State Key Laboratory of Genetic Engineering, School of Life Science, Fudan University, Shanghai 200433, China;

2. Shanghai Research Center for Model Organisms, Shanghai 201203, China

Abstract: Hemophilia B, or the Christmas disease, is a common human disease caused by coagulation factor IX

收稿日期: 2015-03-22; 修回日期: 2015-06-29

基金项目: 国家自然科学基金项目 (编号: 31571371) 资助

作者简介: 汪启翰, 硕士在读, 专业方向: 生物工程。Tel: 021-51630621; E-mail: zgzhfhwqh@gmail.com;

怀聪: 博士在读, 专业方向: 人类医学分子遗传学。E-mail: huaic@fudan.edu.cn;

孙瑞林: 博士, 专业方向: 基因功能的模式生物研究。E-mail: rlsun@126.com;

汪启翰、怀聪和孙瑞林同为第一作者。

通讯作者: 卢大儒, 博士, 教授, 研究方向: 人类医学分子遗传学。E-mail: drlu@fudan.edu.cn

费俭, 博士, 教授, 研究方向: 基因功能的模式生物研究。E-mail: Jfei@tongji.edu.cn

DOI: 10.16288/j.ycz.15-117

网络出版时间: 2015-9-1 11:14:06

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20150901.1114.004.html>

(FIX) deficiency. It is an X-linked recessive hereditary disease. Here we obtained *FIX*-knockout mouse strains with phenotype of hemophilia B with the CRISPR/Cas system efficiently. We chose the 8th exon as the target locus, and co-injected codon-optimized Cas9 mRNA with sgRNA of *FIX* into C57BL/6 mice zygotes. We obtained 60 mice in total and genotyped them by high resolution melting (HRM) and sequencing. The results showed the mutation rate was 85.0% in total, and 79.5% and 95.2% in males and females, respectively. No off-targets were detected in the similar locus by HRM. We future measured the FIX activity of each mice. The FIX: C of mutant mice were significantly below the normal level and reduced to 6.82% of wild-type mice. The activity assay demonstrated that all the mutant mice were lack of FIX. In summary, we have generated hemophilia B model mice with extreme efficiency, using the RNA-guided Cas9 nuclease gene editing system.

Keywords: hemophilia B; CRISPR/Cas system; genome editing; mouse model

血友病乙是由凝血因子 (Factor , F)缺乏或功能缺陷所引起的一种常见的伴 X 染色体隐性遗传病。在中国人群中,男性的发病率约为 1/25000^[1,2]。该病的临床特征是凝血功能障碍导致自发出血不止,或者凝血时间过长。目前,治疗血友病乙的唯一有效疗法为替代疗法,即使用浓缩血浆、重组人凝血因子 制剂、凝血酶原复合物进行输血治疗。随着病毒灭活技术的不断改进和重组蛋白的表达,替代疗法的安全性得到了保障。但由于 F 的半衰期短及反复输血导致患者的血管硬化等并发症,同时 2%~4% 的患者还会产生 F 抑制物,限制了替代治疗的有效性^[2,3]。只有基因治疗才能根治遗传病,而通过构建小鼠模型来模拟人类疾病也成为深入研究和模拟基因治疗的有效途径。传统的小鼠模型构建过程繁琐,通常将含有突变型目的基因的质粒转入小鼠的胚胎干细胞(Embryo stem cells, ES cells)中,利用自发同源重组进行基因的置换,再将胚胎干细胞与受精卵融合后进行纯合突变小鼠的筛选^[3,4]。该方法不仅效率低(ES 同源重组的效率仅为 10^{-2} ~ 10^{-5}),而且筛选纯合小鼠过程耗时长,一般需要 1 年的时间才能得到疾病模型小鼠。此外,该方法无法实现精确位点的改造。

型 CRISPR/Cas9(Clustered regularly interspaced short palindromic repeat sequences/Cas9)系统是近几年发展极快的一种基因组编辑技术。该技术由一条短的单导向 RNA(Single-guide RNA, sgRNA)引导 Cas9 核酸酶^[5~7]在靶标 DNA 位置上进行精确的识别,造成 DNA 断裂并诱发细胞内 DNA 损伤修复。通过非同源末端连接(Non-homologous end joining, NHEJ)的修复方式,DNA 断裂位点可能剪切或者随机插入

若干碱基,从而造成断裂位点的基因突变,达到基因敲除的目的;或者当同源模板存在时,通过同源重组(Homologous recombination, HR)的修复方式,对目的基因进行碱基替换或者片段的插入,实现精确修改或者基因的敲入^[6,7]。CRISPR/Cas9 系统中的 sgRNA 通过碱基互补配对与 DNA 结合,决定了靶向的基因编辑的位置,而该系统对靶位点的唯一要求是在靶位点的 3' 端要具有 NGG 序列,即 PAM(Protospacer adjacent motif)区^[5~8]。因此根据靶位点对 sgRNA 进行特异性地设计,就能对基因组中的任意位点进行精确且高效地编辑,具有很高的自主性。因此,本文通过 CRISPR/Cas9 技术进行 F 基因敲除,快速、高效地构建血友病乙模型小鼠,以期血友病乙的研究提供更加便捷的途径。

1 材料和方法

1.1 材料

本实验所用小鼠品系为 C57BL/6,由南方模式动物中心提供,于 SPF(Specific pathogen free, SPF)级环境饲养。根据哺乳动物进行密码子优化的 Cas9 和 sgRNA 转录模板质粒为复旦大学姚纪华实验室惠赠。体外转录试剂盒购自 Life Technologies 公司,使用 mMESSAGE mMACHINE[®] T7 Kit(AM1344)对 Cas9 mRNA 进行转录,使用 MEGA shortscript[™] T7 Transcription Kit(AM1354)对 sgRNA 进行转录。

1.2 方法

1.2.1 靶位点的选择

利用 CRISPR/Cas9 系统进行小鼠 F 基因的靶向编辑,编辑位点的选择按照以下原则:(1)靶序列

20 bp 后含有 NGG 的 PAM 序列; (2)靶位点编码具有核心作用的氨基酸; (3)由于本研究目的是构建模拟人类血友病乙的小鼠模型, 因此选择与人基因组同源性高、在人类疾病中常见的突变位置作为靶序列。此外, 为了减少非靶向位置的结合和编辑(脱靶效应), 将靶位点序列在 NCBI 序列比对数据库 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 中进行全基因水平的比对, 确保其具有高度唯一性。

1.2.2 受精卵显微注射

根据选择的 *F* 位点, 通过 PCR 法制备 *F* - sgRNA 转录模板, 体外转录获得用于 DNA 靶向切割的 sgRNA; 以线性化质粒为模板, 体外转录得到 Cas9 mRNA。将 50 ng/ μ L Cas9 mRNA、20 ng/ μ L sgRNA 显微注射到小鼠受精卵细胞的细胞质, 将注射之后存活的受精卵进行移植, 至母鼠生产得到 F_0 代小鼠。

将 F_0 代小鼠与野生型小鼠交配获得 F_1 、 F_2 代小鼠。

1.2.3 基因分型与基因检测

剪取 F_0 代及其子代小鼠尾尖组织 0.5 cm, 抽提基因组 DNA。以基因组 DNA 为模板, 用扩增引物 HRM-F(5'-TGCCTTAGTCCACAACATT-3')和 HRM-R(5'-GCATTATTAGCTGGGTGAA-3')对包含靶标位置的 DNA 区域进行扩增, 获得约 150 bp 的 DNA, 利用高分辨率溶解曲线分析法(High resolution melting analysis, HRMA)对小鼠 *F* 基因靶标位置进行基因分型, 高分辨率溶解曲线分析使用 Roche 480。

根据 DNA 变性的动力学原理, 不同的基因序列其溶解温度(Melting-temperature, T_m)以及溶解曲线的峰型都不相同, 因此对比野生型小鼠 DNA 样品的溶解曲线图, 可以对靶标位置是否发生 DNA 突变进行精确检测^[9,10]。同时, 为了区分 *F* 靶标位置是否为纯合突变, 将等量野生型小鼠的基因组 DNA 与待测小鼠 DNA 混合后进行扩增, 并进行 HRMA 综合分析(图 1)。

以测序法验证和确认 F_0 及子代小鼠基因型。

1.2.4 脱靶效应检测

研究表明, 当目标 DNA 序列与 sgRNA 识别序列 3'端的 12 个核苷酸有高度同源性时, CRISPR/Cas9 系统可能会错误结合并切割^[11], 因此利用 NCBI 数

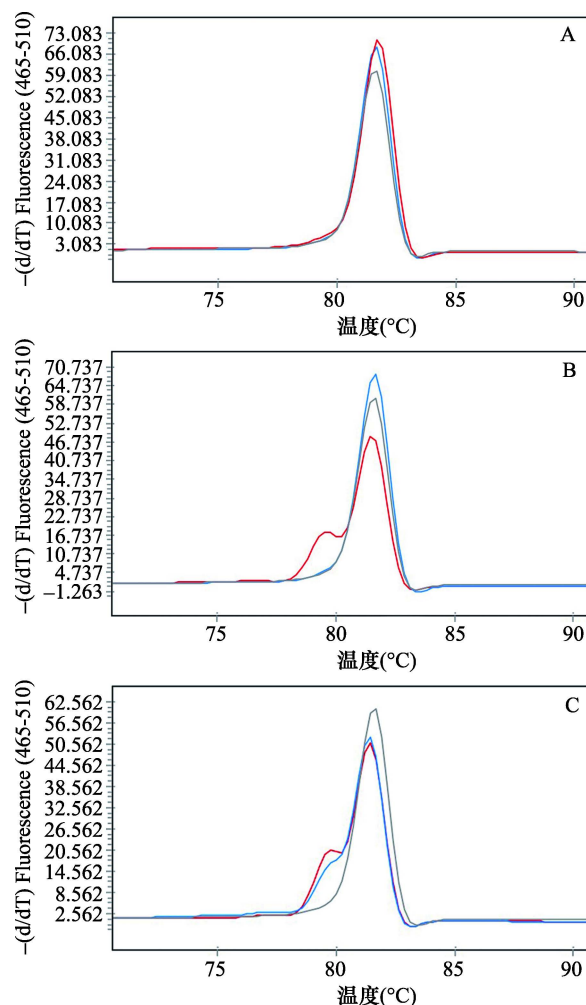


图 1 HRM 基因分型检测

A: 非突变小鼠的溶解曲线; B: 纯合突变小鼠的溶解曲线; C: 杂合突变小鼠的溶解曲线。灰色代表对野生型小鼠的基因组靶位点进行 HRMA 检测得到的溶解曲线, 蓝色代表对 F_0 代待测小鼠基因组(未混入野生型基因组 DNA)进行直接 PCR 后检测得到的溶解曲线, 红色代表在 F_0 代待测小鼠基因组中混入等量野生型基因组 DNA 后, 再进行 HRMA 检测得到的溶解曲线。利用 PCR 产物的 T_m 值能够通过溶解曲线的拐点来估算, 以此对不同的基因进行分型。

据库对 *F* -sgRNA 进行可能的脱靶位点进行分析, 并利用 HRMA 进行脱靶效应检测。

1.2.5 模型小鼠凝血表型检测

腹腔注射苯巴比妥将 F_0 代待测小鼠麻醉, 断尾取血并加入 1/10 体积 109 mmol/L 枸橼酸钠抗凝, 4、3000 r/min 离心 20 min 得到血浆, 并在 ACL TOP 700 LAS 凝血分析仪(Hemostasis analyzer)上进行检测凝血活性检测^[12]。

2 结果与分析

2.1 靶位点的选择

敲除基因需要选择关键的靶向位点，通过序列的突变而造成基因功能的缺失。*F* 基因包含 8 个外显子，共编码 6 个主要结构域。研究表明，人类血友病乙患者中第 8 外显子所编码的氨基酸突变率最高^[1]，而且第 8 外显子也是内源性凝血途径中的关键性催化区域^[1,2]。通过序列比对发现，人与小鼠在 *F* 基因的这个区域具有高度的同源性。因此本研究在小鼠 *F* 基因的第 8 外显子上选取了高特异性的靶向编辑位点，序列为 GGAGGCAAAGATTC-GTGTGA(AGG)。

2.2 突变小鼠的获得

将 Cas9 mRNA 与 sgRNA 混合后，显微注射到小鼠受精卵的细胞质，将存活的 280 枚受精卵移植至 14 只假孕 C57BL/6 雌鼠，每个假孕雌鼠体内移植 20 枚受精卵。约 3 周后小鼠出生，共获得 60 只 *F*₀ 小鼠，出生率 21.42%，其中雄鼠 39 只，雌鼠 21 只(表 1)。

2.3 小鼠基因分型结果

对 60 只 *F*₀ 代小鼠的基因组 DNA 进行 HRM 分型，结果显示 51 只小鼠在靶标位置发生 DNA 突变，即利用 CRISPR/Cas9 系统进行基因打靶的效率为 85.0%(51/60)，其中雄性小鼠的突变率为 79.5%，雌性小鼠的突变率高达 95.2%(表 1)。纯合突变率 51.67%，杂合突变率 33.33%。

同时，测序结果证实 CRISPR/Cas9 系统可产生高的基因编辑效率，靶位点的具体碱基变化见图 2。

表 1 小鼠基因分型

	雄性		雌性		总计
	纯合子	嵌合体	纯合子	杂合子	
出生(只)	39		21		60
突变(只)	31		20		51
突变率(%)	(79.5)		(95.2)		(85.0)
基因分型(只)	24	7	7	13	

总的 X 染色体的突变率为 79%，其中缺失型基因型占 89.8%，远高于 10.2%的插入型突变。另外，在 5 只突变的小鼠中检测到在靶位点发生约 100 bp 的重复插入，这可能跟 DNA 的损伤修复有关，其确切的作用机制还有待进一步研究。将其中 5 只突变小鼠与野生型小鼠交配传代，测序验证子代与亲代具有相同的基因型，证实突变的可遗传性。

2.4 脱靶效应检测结果

通过在 NCBI 数据库比对，本文得到 5 个潜在的高风险脱靶位点(表 2)，利用 HRMA 对这 5 个位置进行基因突变检测及测序，没有检测出脱靶效应(附图 1)。

2.5 凝血活性检测

在 *F*₀ 代小鼠中，有 30 只小鼠在实验及饲养过程中因为流血不止而死亡。本文只对剩下的 30 只小鼠的凝血活性进行检测，包括 9 只非突变小鼠和 21 只突变小鼠，结果如图 3 所示。突变小鼠的 *F* : C 显著低于临床标准正常值(50%~150%)，为非突变小鼠平均凝血活性的 6.82%(*P*<0.001)。其中非突变小鼠 *F* 活性为 113.55 ± 11.44% (n=9)，雌性纯合突变小鼠活性为 9.21 ± 0.76% (n=4)，雌性杂合突变小鼠

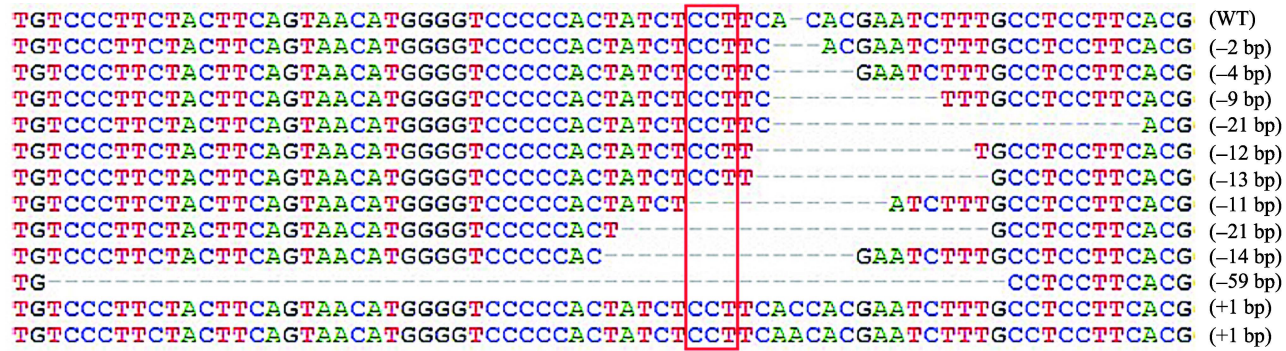


图 2 部分突变小鼠的测序结果
框内为 PAM 区，即 NGG 序列。

表 2 潜在的脱靶位点

相似位点	序列(5'→3')
靶位点序列	GGAGGCAAAGATTCGTGTGAAGG
相似位点 1 序列	AGAGGCAAAGATTCGTGTCCTTG
靶位点序列	GGAGGCAAAGATTCGTGTGAAGG
相似位点 2 序列	GATCCTGTAGATTCGTGTGAAGG
靶位点序列	GGAGGCAAAGATTCGTGTGAAGG
相似位点 3 序列	AAATATTTAGATTCGTGTGAAGG
靶位点序列	GGAGGCAAAGATTCGTGTGAAGG
相似位点 4 序列	ATGGCCAGAGATTCGTGTGATGG
靶位点序列	GGAGGCAAAGATTCGTGTGAAGG
相似位点 5 序列	GTATGTTTAGATTCGTGTGAGGG

注：下划线部分为与凝血因子Ⅸ靶位点不同的碱基序列，加粗的碱基为靶位点的 PAM 区序列。

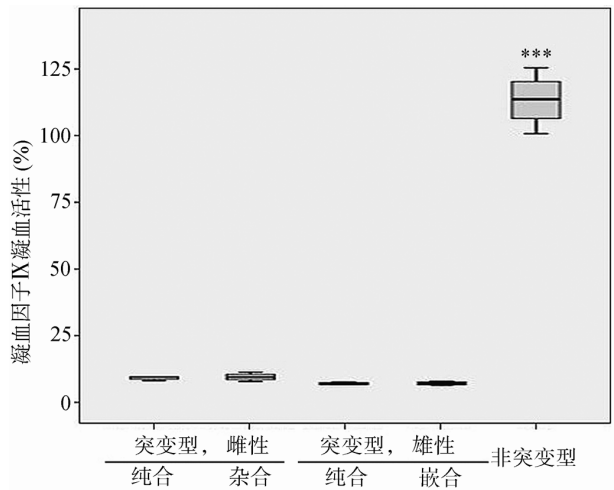


图 3 凝血活性检测
纯合突变和杂合突变的小鼠其凝血活性都大大低于非突变小鼠，
*** $P < 0.001$ 。

为 $9.13 \pm 1.53\%$ ($n=6$)，雄性纯合子小鼠活性为 $6.87 \pm 0.56\%$ ($n=7$)，雄性嵌合体小鼠为 $7.14 \pm 0.69\%$ ($n=4$)。此外，无论突变小鼠是否为移码突变，所有被检测的突变小鼠的 F : C 均有所下降。

由于小鼠 F 的第 414 位氨基酸为 F 前体激活的关键磷酸化位点，而上述小鼠该位点均发生了缺失或突变，因此本文推测该位点的基因改变影响了小鼠内源性凝血的途径，导致上述移码及非移码小鼠的凝血活性均变低。

3 讨 论

以往构建基因缺陷小鼠模型的方法是在小鼠的受精卵中显微注射凝血因子 大片段敲除的质粒，通

过同源重组的方法来获得基因敲除小鼠，但是效率只有 5% [3]，并且通过大片段敲除导致的基因缺失与人类血友病乙的基因突变类型为单碱基或者小片段突变的基因突变类型不同 [1]，因此无法精确地模拟人类血友病 B 疾病的基因型。本文利用 CRISPR/Cas9 系统能够高效地将特异性靶位点的 DNA 双链打断，通过 NHEJ 修复方式，在断裂处随机引入碱基的缺失或者插入，使基因产生移码突变。但为了更好地模拟在外显子序列中由错义突变引起的人类遗传疾病，例如大部分人类血友病 B 的基因型，理论上可以显微共注射 DNA 同源模板，即利用 HR 方法，更加精确地构建特定基因型的小鼠模型。

对基因治疗来说，同样也是利用 HR 的修复方式，将错误的序列替换为正常序列。本文也成功地对血友病乙小鼠在受精卵水平上进行了初步的基因纠正。但是，目前 HR 的修复方式相比 NHEJ 的修复方式效率要低，因此对于如何提高 HR 的效率研究也具有十分重要的意义。另外，在 CRISPR/Cas9 系统应用中脱靶效应是人们所关注的重点之一。研究发现通过对 Cas9 核酸酶蛋白的切割域进行突变，利用修饰型的 Cas9 核酸酶可以使 DNA 双链的其中一条链断裂 [6]，从而大大降低脱靶效应的产生。

本研究通过 CRISPR/Cas9 系统成功构建了血友病乙小鼠模型，未来将会利用 CRISPR/Cas9 系统构建精确碱基修改的突变类型的血友病乙小鼠模型，以及利用 CRISPR/Cas9 系统在生殖细胞和体细胞水平对所构建的血友病乙小鼠进行基因修复。

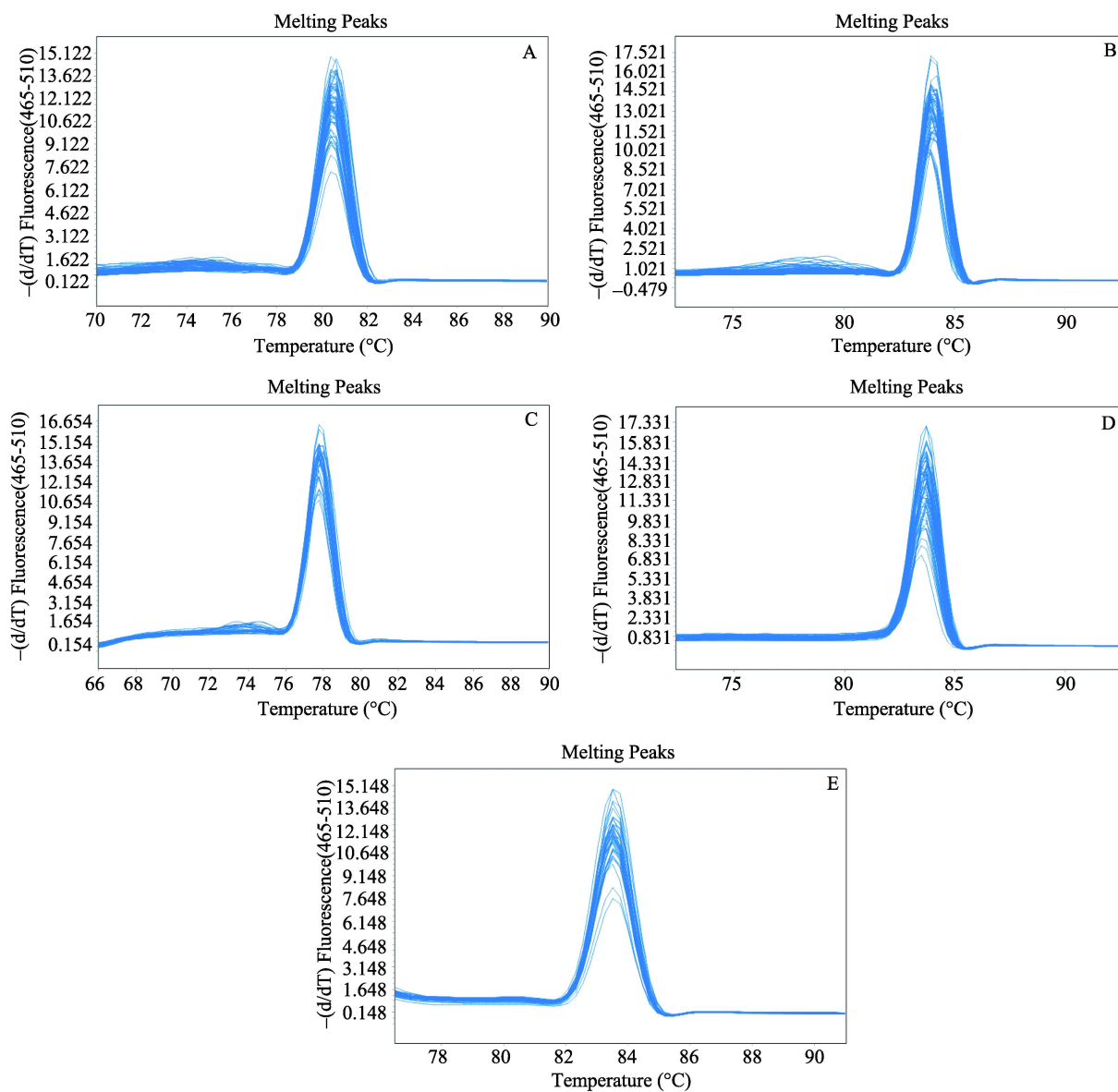
附录：附图见文章电子版：www.Chinagene.cn。

参考文献

[1] Giannelli F, Green PM, Sommer SS, Poon MC, Ludwig M, Schwaab R, Reitsma PH, Goossens M, Yoshioka A, Figueiredo MS, Brownlee GG. Haemophilia B: Database of point mutations and short additions and deletions-eighth edition. *Nucleic Acids Res*, 1998, 26(1): 265-268.[DOI]
[2] Kurachi K, Kurachi S, Furukawa M, Yao SN. Biology of factor . *Blood Coagul Fibrinolysis*, 1993, 4(6): 953-973. [DOI]
[3] Wang LL, Zoppè M, Hackeng TM, Griffin JH, Lee KF, Verma IM. A factor -deficient mouse model for hemophilia B gene therapy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997,

- 94(21): 11563–11566. [DOI]
- [4] Lin HF, Maeda N, Smithies O, Straight DL, Stafford DW. A coagulation factor α_2 -deficient mouse model for human hemophilia B. *Blood*, 1997, 90(10): 3962–3966. [DOI]
- [5] Shen B, Zhang J, Wu HY, Wang JY, Ma K, Li Z, Zhang XG, Zhang PM, Huang XX. Generation of gene-modified mice via Cas9/RNA-mediated gene targeting. *Cell Res*, 2013, 23(5): 720–723. [DOI]
- [6] 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): 816–821. [DOI]
- [7] Cong L, Ran FA, Cox D, Lin SL, Barretto R, Habib N, Hsu PD, Wu XB, Jiang WY, Marraffini LA, Zhang F. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 2013, 339(6121): 819–823. [DOI]
- [8] Wang HY, Yang H, Shivalila CS, Dawlaty MM, Cheng AW, Zhang F, Jaenisch R. One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell*, 2013, 153(4): 910–918. [DOI]
- [9] Dahlem TJ, Hoshijima K, Jurynek MJ, Gunther D, Starker CG, Locke AS, Weis AM, Voytas DF, Grunwald DJ. Simple methods for generating and detecting locus-specific mutations induced with TALENs in the zebrafish genome. *PLoS Genet*, 2012, 8(8): e1002861. [DOI]
- [10] 曹春鸽, 孙海燕, 周芳芳, 王诗铭, 陈红岩, 卢大儒. 应用 HRM 技术对 *CYP2C19*2* 和 *CYP2C19*3* 进行双重 SNP 分型. *遗传*, 2013, 35(7): 923–930. [DOI]
- [11] Fu YF, Foden JA, Khayter C, Maeder ML, Reyon D, Joung JK, Sander JD. High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(9): 822–826. [DOI]
- [12] Over J. Methodology of the one-stage assay of factor VIII (VIII: C). *Scand J Haematol*, 1984, 33(S41): 13–24. [DOI]

(责任编辑: 徐湘民)



附图 1 相似位点的 HRM 分型结果图

A~E 分别对应相似位点 1~5 分型图。