

# 利用 CRISPR/Cas9 AAV 系统构建纹状体 *Slc20a2* 基因敲除小鼠模型

林珉婷<sup>1,2</sup>, 赖璐璐<sup>1</sup>, 赵森<sup>1</sup>, 林必玮<sup>1</sup>, 姚香平<sup>1,3</sup>

1. 福建医科大学附属第一医院神经内科, 福州 300005
2. 福建医科大学神经科学研究院, 福州 300004
3. 福建省分子神经病学重点实验室, 福州 300005

**摘要:** 原发性家族性脑钙化症(primary familial brain calcification, PFBC)是慢性进展性的神经系统遗传病, 临床症状主要包括运动障碍、认知障碍及精神障碍等, 其致病机制尚未完全明确。研究表明 *SLC20A2* 是该病最主要的致病基因。由于 *Slc20a2* 基因全身性敲除小鼠模型会导致胎儿生长受限, 为更好地研究 PFBC 发病机制, 本研究应用 CRISPR/Cas9 技术构建了纹状体 *Slc20a2* 基因条件性敲除小鼠模型。首先, 针对 *Slc20a2* 基因编码区, 设计 3 条靶向 exon3 的 sgRNA (single guide RNA), 通过构建质粒、转染细胞、Surveyor assay 等实验验证 sgRNA 的活性。其次, 选取活性较高的 sgRNA 重组包装 AAV-Cre 病毒, 应用立体定位将 AAV 病毒定点注射于小鼠纹状体。体外实验结果表明设计的 3 条 sgRNA 均能够有效地介导 Cas9 切割靶 DNA。细胞免疫荧光实验结果证实 AAV-Cre 病毒具有 Cre 重组酶活性。最后, 通过小鼠脑部组织免疫组化、TA-克隆、高通量测序及 Western blot 方法检测 *Slc20a2* 基因敲除效率, 发现实验组小鼠纹状体组织 *Slc20a2* 表达明显降低。本研究成功设计了 3 条能够敲除 *Slc20a2* 的功能 sgRNA, 并应用 CRISPR/Cas9 技术成功构建了纹状体 *Slc20a2* 基因条件性敲除小鼠, 为研究 PFBC 的发病机制提供了有效的动物模型。

**关键词:** CRISPR/Cas9; *Slc20a2*; sgRNA; 基因敲除; 小鼠模型

## Construction of a striatum-specific *Slc20a2* gene knockout mice model by CRISPR/Cas9 AAV system

Minting Lin<sup>1,2</sup>, Lulu Lai<sup>1</sup>, Miao Zhao<sup>1</sup>, Biwei Lin<sup>1</sup>, Xiangping Yao<sup>1,3</sup>

1. Department of Neurology, the First Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350005, China
2. Institute of Neurosciences, Fujian Medical University, Fuzhou 350004, China
3. Fujian Key Laboratory of Molecular Neurology, Fuzhou 350005, China

**Abstract:** Primary familial brain calcification (PFBC) is a chronic progressive neurogenetic disorder. Its clinical

收稿日期: 2020-05-18; 修回日期: 2020-08-18

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目(编号: 81801129)和福建医科大学启航基金项目(编号: 2017XQ1071, 2018QH2035)资助

[Supported by the National Natural Science Foundation of China (No.81801129), and Startup Fund for Scientific Research of Fujian Medical University (Nos.2017XQ1071, 2018QH2035)]

作者简介: 林珉婷, 本科, 助理研究员, 研究方向: 神经系统遗传病。E-mail: mintinglin@fjmu.edu.cn

通讯作者: 姚香平, 博士, 主治医师, 硕士生导师, 研究方向: 神经系统遗传病分子机制。E-mail: 119373522@qq.com

DOI: 10.16288/j.ycz.20-138

网络出版时间: 2020/10/13 16:04:24

URI: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20201012.1713.002.html>

symptoms mainly include dyskinesia, cognitive disorder and mental impairment; and the pathogenesis remains unclear. Studies have shown that *SLC20A2* is the most common pathogenic gene of the disease. Since the *Slc20a2* gene knockout mouse model could result in fetal growth restriction, in order to better understand the pathogenesis of PFBC, the present study used the CRISPR/Cas9 technology to construct a conditional knockout model of *Slc20a2* gene in the striatum of mice. First, three sgRNAs (single guide RNAs) were designed to target the exon3 of *Slc20a2* gene. The activity of the respective sgRNA was verified by constructing expression plasmids, transfecting cells and Surveyor assay. Second, the SgRNA with the highest activity was selected to generate the recombinant AAV-Cre virus, which was injected into the striatum of mice by stereotactic method. *In vitro* experiments showed that the three sgRNAs could effectively mediate Cas9 cleavage of the respective target DNA. The activity of Cre recombinase of the AAV-Cre was confirmed by immunofluorescence assay. Immunohistochemistry, TA clone, high-throughput sequencing and Western blot were used to detect and evaluate the efficiency of *Slc20a2* gene knockout. The results showed that the *Slc20a2* expression in the striatum of mice in the experimental group decreased significantly. In this study, three sgRNAs capable of knockout of *Slc20a2* were successfully designed, and the conditional knockout of the *Slc20a2* gene in the striatum of mouse was successfully established by the CRISPR/Cas9 technology, thereby providing an effective animal model for studying the pathogenesis of PFBC.

**Keywords:** CRISPR/Cas9; *Slc20a2*; sgRNA; gene knockout; mice model

原发性家族性脑钙化症(primary familial brain calcification, PFBC)是以纹状体、丘脑、小脑、皮层等部位对称性钙化为特征的神经系统遗传病<sup>[1]</sup>。临床主要表现为运动障碍、精神症状、认知障碍、癫痫、头痛等症状。目前 PFBC 发病机制尚不明确,且具有高度遗传异质性<sup>[2]</sup>。迄今为止,已明确有 6 个 PFBC 致病基因: *SLC20A2*、*PDGFRB*、*PDGFB*、*XPR1*、*MYORG* 和 *JAM2*<sup>[3-8]</sup>。其中, *SLC20A2* 基因被认为是 PFBC 最常见的致病基因,该基因编码 III 型钠-磷协同转运体 2 (PiT2), 突变后严重影响磷的摄取功能,引起细胞外磷酸根离子聚集,进而导致钙磷沉积<sup>[9,10]</sup>。虽然已克隆多个 PFBC 致病基因,但该病仍缺乏有效的治疗手段,具体的发病机制及治疗方法仍需进一步探讨。

动物模型是模拟疾病表型、研究疾病机制及探索治疗手段的良好工具。*SLC20A2* 为管家基因,在体内广泛表达。*Slc20a2* 基因纯合敲除小鼠表现为胚胎生长受限,且部分新生小鼠会在断奶前死亡<sup>[11,12]</sup>。PFBC 患者的病理性钙化可以累及脑区各个位置,但是纹状体是最为常见的受累部位。因此,构建纹状体 *Slc20a2* 基因敲除小鼠模型,不但可以解决 *Slc20a2* 基因全身敲除小鼠胚胎生长受限的困境,而且能够特异性地研究纹状体区域脑钙化具体机制。

CRISPR/Cas9 系统由于具备效率高、设计简单

等优势,是目前最为广泛运用的基因编辑技术。CRISPR/Cas9 系统包含两大组分:一是行使剪切功能的 Cas9 蛋白;另一个是特异性引导 Cas9 蛋白至靶 DNA 序列的 sgRNA(single guide RNA)。由于 Cas9 蛋白分子量较大,且血脑屏障的存在使得 Cas9 蛋白病毒载体在神经系统中不易于表达。LSL-Cas9-EGFP 小鼠是 *Cas9* 基因、*EGFP* 基因敲入小鼠,可以条件性表达 Cas9 蛋白和 EGFP 蛋白<sup>[13]</sup>。通过向小鼠脑区或者核团注射 sgRNA 和 Cre,可以激活 LSL-Cas9-EGFP 小鼠表达 Cas9 蛋白,从而实现定点基因的敲除。本研究运用 CRISPR/Cas9 技术,基于 LSL-Cas9-EGFP 小鼠,进行纹状体 *Slc20a2* 基因条件性敲除,为 PFBC 的发病机制及药物研究提供良好的动物模型。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

实验中所用小鼠为条件性表达 Cas9 及 EGFP 蛋白小鼠(LSL-Cas9-EGFP 小鼠, B6; 129-Gt(ROSA)26Sortm1(CAG-Loxp-Stop-Loxp-Cas9, -EGFP)Fehz/J), 由美国 The Jackson Laboratory 实验室引进。AAV 病毒表达载体(60229, AAV:ITR-U6-sgRNA-backbone-

pCBh-Cre-WPRE-hGHpA-ITR) 购于美国 Addgene 公司, 含 Cre 位点以及两个 *Sap I* 酶切位点。Reporter 质粒(20299, pAAV-EF1a-double floxed-mCherry-WPRE-HGHpA) 购于美国 Addgene 公司, 其中两个 flox 序列是反向插入, 可条件性表达红色荧光蛋白。实验室常规保存质粒 px458(Cas9/sgRNA/EGFP 共同表达质粒) 含 *Bbs I* 酶切位点。引物由生工生物工程(上海) 股份有限公司合成。T4 DNA 连接酶、*Sap I*、*Bbs I* 等核酸内切酶购于美国 NEB 公司, 细胞株为小鼠神经瘤母细胞 N2A 细胞、293T 细胞。

## 1.2 sgRNA 设计和寡核苷酸链合成

根据 CRISPR/Cas9 系统 sgRNA 设计原则, 使用 Zhang lab 网站(<http://crispr.mit.edu>) 对鼠源 *Slc20a2* 基因(Gene ID: 20516) 第 3 外显子(290~429 bp) 设计靶点, 选择敲除效率分数最高的 3 个 sgRNA (sgRNA1、sgRNA2、sgRNA3), 具体信息见表 1。sgRNA 序列若不以 G 碱基开头, 可添加 1 个 G 碱基以便 U6 启动子转录。在合成 sgRNA 时需在序列里添加 5'-cacc-3' 和 5'-aac-3' (表 1), 使其退火后形成可与 *Bbs I* 酶切位点互补的粘性末端。根据靶位点设计扩增引物, 分别为 E3F:5'-TGACTCATCATTGG-CACAGG-3' 和 E3R:5'-TAAGGCTCTTCTTCACGT-GG-3', 扩增长度为 650 bp。sgRNA1、sgRNA2 和 sgRNA3 切割后产物大小分别约为 297 bp 和 353 bp、288 bp 和 362 bp、248 bp 和 402 bp。

## 1.3 构建 *Slc20a2* 基因 px458-sgRNA 打靶载体

实验所用质粒载体为 px458, 使用 *Bbs I* 限制性

内切酶酶切, 37°C 水浴 1 h, 按照胶回收试剂盒说明书回收约 9300 bp 长度的 DNA 片段。将合成的 sgRNA 的上游(F)和下游(R)引物用退火缓冲液稀释至 9 mmol/L, 用 PCR 仪退火, 程序为 95°C 5 min, 72°C 10 min, 37°C 20 min, 即退火为双链 DNA, 用于后续连接反应。退火后的 sgRNA 寡核苷酸双链与回收的 px458 载体片段在 T4 DNA 连接酶作用下 16°C 过夜连接, 连接产物转化至 DH5 $\alpha$  感受态, 挑取单克隆菌落并提取质粒 px458-sgRNA1、px458-sgRNA2 和 px458-sgRNA3, 通过一代测序验证将 sgRNA 序列克隆到 px458 质粒中。

## 1.4 sgRNA 活性检测

将 4  $\mu$ g 质粒 px458-sgRNA 用脂质体 lipo3000 (L3000-015, 美国 Invitrogen 公司) 转染至汇合度达到 60%~80% 的 N2A 细胞, 对照为转染 px458 空载质粒(空白对照), 混匀, 置于 5% CO<sub>2</sub>、37°C 孵箱中培养。转染 72 h 后提取细胞 DNA。弃除细胞培养基, 加 1 mL PBS 将细胞吹散, 收于 1.5 mL EP 管中, 12,000 r/min 离心 1 min, 去上清, 留沉淀。用血液/细胞/组织基因组 DNA 提取试剂盒(北京天根公司) 提取基因组 DNA。然后吸取 2  $\mu$ L DNA 作为模板, 引物为 E3F 和 E3R, 用 KOD 酶(TOYOBO 公司, 日本) 体系进行 PCR 扩增。扩增程序: 95°C 5 min; 94°C 30 s, 60°C 30 s, 68°C 30 s, 35 个循环; 68°C 5 min。用纯化试剂盒纯化 PCR 产物, 然后进行变性、复性, 其程序为 95°C 5 min, 在 95°C 降至 85°C 期间, 以每秒 2°C 退温, 在 85°C 降至 25°C 期间, 以每秒 0.1°C 退温, 最后产物于 4°C 放置 10 min。按照 Surveyor 突变检测试剂盒(Transgenomic 公司, 美国), 分别加入 1  $\mu$ L Surveyor Nuclease S、1  $\mu$ L Surveyor Enhancer S、0.15 mol/L MgCl<sub>2</sub> 2  $\mu$ L 和 20  $\mu$ L DNA, 混匀后 42°C 放置 1 h, 加入 1/10 体积的终止液混匀后, 进行聚丙烯酰胺凝胶电泳分离。根据编辑效率公式  $fcut = (b+c)/(a+b+c)$  和  $indel(\%) = 100 \times (1 - fcut)$  进行计算来评估 CRISPR/Cas9 的编辑效率。

## 1.5 构建 AAV-sgRNA-Cre 载体及其 Cre 重组酶活性验证

AAV-Cre 病毒表达载体(60229, 美国 Addgene

表 1 sgRNA 序列

Table 1 sgRNA sequence used in this study

引物名称	碱基序列(5'→3')
sgRNA1	F:caccGCTCGTGGCGATTGCCCCGAA
	R:aaacTTCGGGCCAATCGCCACGAGC
sgRNA2	F:caccGGCTTCTCACTCGTGGCGAT
	R:aaacATCGCCACGAGTGAGAAGCC
sgRNA3	F:caccGTCGGGGACTCACTGCATCGT
	R:aaacACGATGCAGTGAGTCCCCGAC

合成 sgRNA 时需在序列里添加 5'-cacc-3' 和 5'-aac-3', 以与 *Bbs I* 酶切位点的粘性末端互补。

公司)<sup>[13]</sup>, 使用 *Sap* I 限制性内切酶酶切, 37°C 水浴 1 h, 按照胶回收试剂盒说明书回收约 6400 bp 长度的 DNA 片段。将筛选出活性最高的 sgRNA 退火后(方法见 1.3)与酶切回收的 AAV 病毒表达载体片段连接, 转化至 DH5 $\alpha$  感受态, 挑取单克隆菌落并提取质粒进行测序, 验证 sgRNA 序列重组到 AAV-Cre 载体上。将重组后的 AAV-Cre 质粒和红色荧光蛋白报告基因质粒(AAV-double-floxed-mcherry)共转检测 Cre 重组酶活性。实验分成 5 组, 分别为转染 Cre-GFP 质粒(阳性对照)、转染红色荧光蛋白报告基因质粒(报告质粒)、转染 AAV-Cre 质粒(实验组)、共转阳性对照和报告质粒以及共转实验组和报告质粒。转染前 24 h, 消化 293T 细胞铺板 24 孔板, 每孔接种细胞  $1 \times 10^5$  个。转染质粒总量为 1  $\mu$ g, 转染试剂为 Lipofectin 3000。转染后 6 h 进行细胞换液, 弃去培养盘中原有培养基, 加入 0.5 mL 完全培养基。转染 48 h 后观察荧光, 进行拍照。将重组后的 AAV-Cre 由上海泰廷生物科技有限公司进行病毒包装、纯化和浓缩。

### 1.6 立体定位法注射 AAV-sgRNA-Cre 病毒

LSL-Cas9-EGFP 成年鼠随机分为 GFP 病毒注射组(CON 组)和 AAV-Cre 病毒注射组(KO 组)。用戊巴比妥钠 60~80 mg/kg 腹腔注射麻醉成年小鼠。将小鼠两侧外耳道及牙齿固定在脑立体定向仪(Stoelting 公司, 美国), 常规备皮消毒后进行头部剪毛, 剪去表层皮肤暴露前囟并标记前囟位置。根据坐标点调整好钻孔位置, 确立右侧纹状体坐标: 前囟后 0.46 mm, 中线侧旁开 2.00 mm, 硬膜下 4.00 mm。调整游标卡尺对应其坐标点, 用牙科钻孔器钻孔。用微量注射器(上海高鸽工贸有限公司)进针, 缓慢注射。注射速度 0.2  $\mu$ L/min, 注射病毒量 0.5~2.0  $\mu$ L。注射完毕停 10 min 后缓慢退针、缝皮、消毒、解除固定。给予光照为小鼠保暖, 等待小鼠苏醒。注射过程及结束后均需要观察动物的反应及有无死亡。注射后 1 月、2 月时分别处死小鼠, 进行全脑冰冻切片。注射 6 月后处死小鼠, 提取注射部位的纹状体组织, 留取标本。

### 1.7 免疫组化验证

分别在注射后的每个时间点取脑组织。用戊巴

比妥钠 60~80 mg/kg 腹腔注射麻醉小鼠, 固定于平板上。依次打开腹腔、胸腔、暴露心脏, 用眼科剪剪破右心耳, 用注射针尖刺入左心室。先用 50 mL 生理盐水灌注, 直至肝脏变白, 接着用 50 mL 的 4% 多聚甲醛进行灌注。待鼠尾巴及身体完全僵硬后, 取出小鼠的大脑组织。将取出的大脑组织置于 4% 多聚甲醛固定 24 h, 接着用 30% 的蔗糖脱水, 待大脑沉入容器底部行冰冻切片。用冰冻切片(Leica 公司, 德国)进行冠状位切片, 切片厚度为 40  $\mu$ L。用 GFP、Cre 抗体进行脑片免疫组化。用封闭液配一抗 GFP (1:2000, 美国 Invitrogen 公司)和 Cre (1:2000, 美国 Milipore 公司), 4°C 孵育一抗过夜。次日用 1 $\times$ PBS 轻轻洗涤 3 次, 各 5 min。用封闭液配相应的二抗, 于室温下避光 120 min, 1 $\times$ PBS 轻轻洗涤 3 次。用 DAPI (1:5000, 上海碧云天生物技术有限公司)覆盖细胞表面, 1 $\times$ PBS 洗涤 3 次。在载玻片上滴一滴封片剂, 将爬片的细胞面扣在封片剂上。于共聚焦显微镜(Zeiss 公司, 德国)下观察, 并拍照。

### 1.8 流式分选富集 *Slc20a2* 基因点突变细胞

取 AAV-sgRNA-Cre 病毒注射 6 个月的 LSL-Cas9-EGFP 小鼠, 用戊巴比妥钠麻醉处死后断颈, 取出右侧纹状体。充分剪碎后, 加入胰酶消化并吹打数次。置于 37°C 10 min。待充分消化后, 加入含 FBS 培养基终止消化, 离心 1000 r/min 5 min。用细胞培养基重悬细胞, 于流式细胞仪(Beckman 公司, 美国)筛选带 GFP 细胞。提取筛选后细胞的基因组, 由于组织量较少, 需用 KAPA 快速 DNA 提取试剂盒(KAPA 公司, 上海)进行 DNA 提取。Nested-PCR 扩增获取 *Slc20a2* 基因, 第一次扩增引物为上述的 E3F、E3R。第二次扩增引物为 F:5'-GTACATTGTCGAT-GCTCTCC-3'; R:5'-GAAAGGGTGGCGTTAAACCTG-3'。第二次扩增后的产物经 2% 琼脂糖胶电泳, 鉴定单一特异性条带后送公司测序评估基因编辑效果。测序峰图上在 sgRNA 识别的 NGG 序列附近如果出现多层套叠峰时, 表明该注射病毒的脑区发生基因编辑。将上述检测到发生突变的 PCR 产物连接 pMD-18T 载体中, 转化涂板。培养过夜后, 挑单克隆(r1~r7 等)进行测序鉴定获得具体的基因编辑后的突变类型。

## 1.9 高通量扩增子测序

取 AAV-sgRNA-Cre 病毒注射后 6 个月的 LSL-Cas9-EGFP 小鼠, 用戊巴比妥钠麻醉处死后断颈, 取出脑组织。分为左侧大脑半球(自身对照组)和右侧大脑半球(实验组)两个部分。待充分剪碎后, 提取组织 DNA, 扩增获取 *Slc20a2* 基因。第一次扩增引物为 F1:5'-GCCAGGTGGCTAAGACTG-3'和 R1:5'-CCTTGCTCCGTTGCCTATAC-3'。为进行后续的二代测序, 需进行二次扩增, 在引物 5'端加接头。左半球脑组织的第二次扩增引物为 F2:5'-GAATTCTC-AATGCCGGATCCGCCAGGTGGCTAAGACTG-3'和 R2:5'-GAATTCTGCGATAGGATCCCCTTGCT-CCGTTGCCTATAC-3', 右半球脑组织的第二次扩增引物为 F3:5'-GAATTCCAAGCACCGGATCCGCCA-GGTGGCTAAGACTG-3'和 R3:5'-GAATTCTTT-CGACGGGATCCCCTTGCTCCGTTGCCTATAC-3'。扩增后的产物经 2% 琼脂糖胶鉴定单一特异性条带后送金唯智公司进行高通量扩增子测序。使用 MiSeq 平台测序 DNA 文库混合后, 按 Illumina MiSeq (Illumina 公司, 美国) 仪器使用说明书进行 2×250/2×250 bp 双端测序(PE), 由 MiSeq 自带的 MiSeq Control Software (HCS)+OLB+GAPipeline-1.6 读取序列信息。使用 fastp(v0.19.6)软件的默认参数对双端 250 bp 的测序原始数据进行去除测序接头和过滤低质量 reads 的处理。随后, 根据样本的 barcode 信息对上一步得到的 FASTQ 文件(clean reads)进行拆分。双端 reads 的拼接、比对以及比对后结果的统计使用 CRISPResso2 软件的默认参数完成。

## 1.10 Western blot 检测

戊巴比妥钠麻醉分别处死实验组小鼠(KO 组)、对照组小鼠(CON 组)、未注射病毒的空白组小鼠(WT 组)。取出右侧纹状体, 充分剪碎后, 加入 800  $\mu$ L LBA150 裂解缓冲液(30 mmol/L Tris-HCl pH 7.4、150 mmol/L NaCl、0.5% NP40、10% glycerinum、1 mmol/L EDTA、1 mmol/L EGTA、1 mmol/L PMSF、1 mmol/L Cocktail、1 mmol/L NaF、1 mmol/L  $\text{Na}_2\text{NO}_3$ )。继续研磨至无明显组织形态的溶液状, 于冰上裂解 30 min。转至新的 EP 管中, 4°C 12,000 r/min 离心 30 min。取上清做好标记部分保存于-80°C。取适量

用于蛋白浓度的测定, 按照 BCA 法(上海碧云天生物技术有限公司)蛋白浓度。加入 5×SDS Loading Buffer, 100°C 水浴 10 min, 14,000 r/min 离心 5 min, 在 12% 浓度分离胶的 SDS-PAGE 胶中电泳。电泳结束后小心剥下凝胶, 采用湿转法将蛋白转移到 PVDF 膜上, 室温封闭 1 h。4°C 孵育一抗(Anti-PiT2, 英国 Abcam 公司)过夜。孵育完毕用 TBST 洗膜 3 次, 随后室温孵育二抗 1 h, 孵育完毕用 TBST 洗膜 3 次, 采用 ECL 法在化学发光自显影仪检测蛋白条带并拍照。

## 2 结果与分析

### 2.1 CRISPR/Cas9 打靶载体的活性检测, 筛选高效 sgRNA

根据 CRISPR/Cas9 靶点设计原则, sgRNA 序列选在 *Slc20a2* 基因的 E3 外显子(图 1 A), 将选择后的 3 条 sgRNA 序列重组至 px458 质粒上。经 Sanger 测序验证, 成功构建 *Slc20a2* 基因的 Cas9 打靶质粒(图 1, B-D)。将构建好的 CRISPR/Cas9 打靶质粒 px458-sgRNA1、px458-sgRNA2 和 px458-sgRNA3 及阴性对照质粒 px458 转染 N2A 细胞, 按照 Surveyor 突变检测试剂盒说明书进行检测, 发现均出现两条及以上的新条带(图 1E)。sgRNA1 酶切后的新片段长度预测约为 297 bp 和 353 bp, sgRNA2 约为 288 bp 和 362 bp, sgRNA3 约为 248 bp 和 402 bp。根据文献[13]的编辑效率公式, 对条带灰度值进行计算, 结果表明 3 条 sgRNA 均靶向敲除成功, 其切割效率分别为 52.2%、42.3% 和 46.8%, 其中 sgRNA1 活性最强, 可用于后续实验。

### 2.2 体外鉴定病毒载体 Cre 重组酶活性

将筛选出来的 sgRNA 序列重组至 AAV-Cre 病毒载体上, 通过与红色荧光蛋白报告基因质粒(AAV-double-floxed-mCherry)共同转染 293T 细胞, 检测其 Cre 重组酶的活性。结果发现分别单转阳性对照(Cre-GFP)、报告质粒和实验组(AAV-Cre)时均未观察到红色荧光, 当实验组和阳性对照分别与报告质粒共同转染时均可观察到红色荧光, 表明实验组病毒载体具备 Cre 重组酶活性(图 2)。

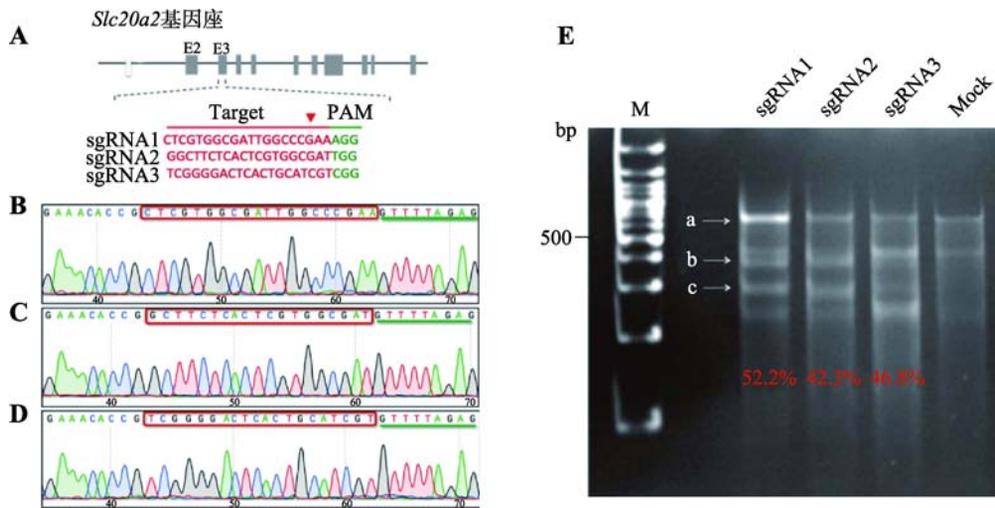


图 1 体外打靶效率检测

Fig. 1 Detection of target efficiency *in vitro*

A: 打靶质粒靶点示意图(靶点序列为红色标记, 绿色标记的是 PAM 序列); B~D: 重组测序图(靶点 sgRNA 序列为红色标记, 绿色标记的是 px458 质粒上的 sgRNA scaffold 序列的部分); E: 打靶效率检测(a 为 PCR 扩增的主带, 大约 650 bp; b、c 分别是主带切割形成的预期大小的条带)。M 为 DNA Maker; Mock 为空白对照。

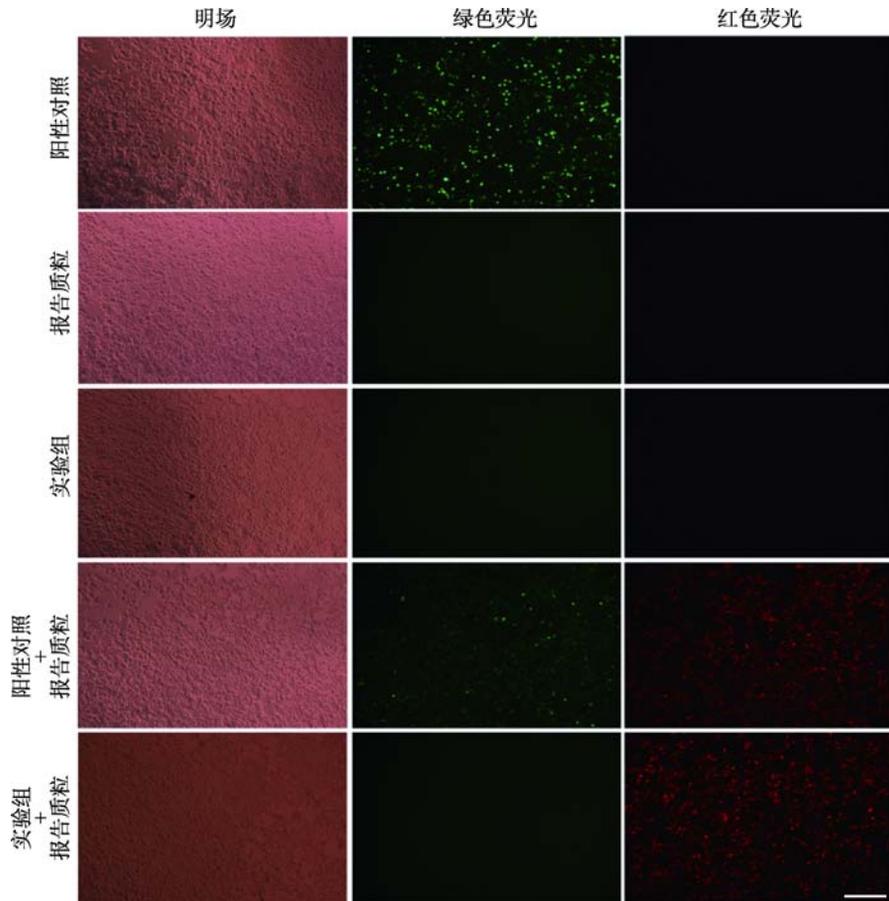


图 2 Cre 重组酶活性体外实验验证

Fig. 2 Cre recombinase activity verification *in vitro*

实验组与报告质粒共转染时可观察到红色荧光, 表明实验组 AAV-Cre 病毒载体具备 Cre 重组酶活性。标尺=100  $\mu$ m。

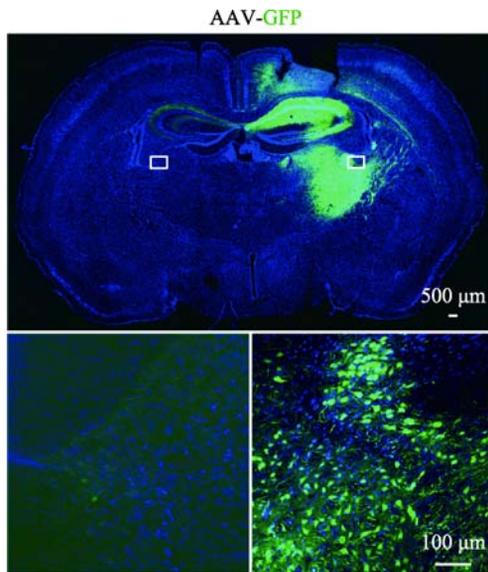


图 3 对照组脑组织免疫荧光图

**Fig. 3 Immunofluorescence staining of brain tissue in the control group**

上图为对照组小鼠在注射 AAV-GFP 病毒 2 周后的脑组织免疫荧光图, 注射部位出现绿色荧光。标尺=500  $\mu\text{m}$ ; 下图为上图白色小方框的放大示意图, 标尺=100  $\mu\text{m}$ 。

### 2.3 纹状体 *Slc20a2* 基因敲除小鼠模型构建

取 2~3 月的 LSL-Cas9-EGFP 小鼠进行右侧纹状体病毒注射。对照组注射 AAV-GFP 病毒, 实验组注

射 AAV-Cre 病毒。在病毒注射后 2 周、1 个月、2 个月分别进行免疫组化检测, 发现 AAV-GFP 对照组右侧纹状体部位出现 GFP 荧光, 弥散分布于纹状体大部分, 蔓延至脑室(图 3)。AAV-Cre 实验组可以观察到注射部位出现表达 Cre 重组酶的红色荧光和表达 Cas9-EGFP 蛋白的绿色荧光(图 4)。在病毒注射后 6 个月, 提取小鼠的右侧纹状体组织, 进行流式分选 GFP 阳性细胞。通过 PCR 扩增 *Slc20a2* 基因靶点区域, 经测序显示靶点区域出现套峰(图 5A), 说明 *Slc20a2* 基因被编辑。进一步进行 TA 克隆观察到在靶点区域出现碱基的随机插入、缺失或替换, 编辑效率约为 52.78% (19/36) (图 5B)。通过提取 AAV-Cre 病毒注射 6 个月后的鼠脑组织, 扩增靶点区域后进行高通量扩增子测序, 结果显示右侧大脑半球的基因编辑效率为 5.99%, 明显高于左侧大脑半球的基因编辑效率(0.36%) (图 5C)。右侧大脑半球在 sgRNA 结合的序列附近出现较高频率的碱基插入、缺失或替换。通过提取实验组小鼠右侧纹状体组织, Western blot 结果显示, 实验组(KO)PiT2 蛋白表达显著低于对照组(CON)与空白组(WT), 约为对照组的 21% (图 5, D 和 E)。通过对 AAV-Cre 病毒注射 6 个月后的鼠进行微型 CT 检查和病理切片染色, 均未检测到病理性的脑钙化结节。

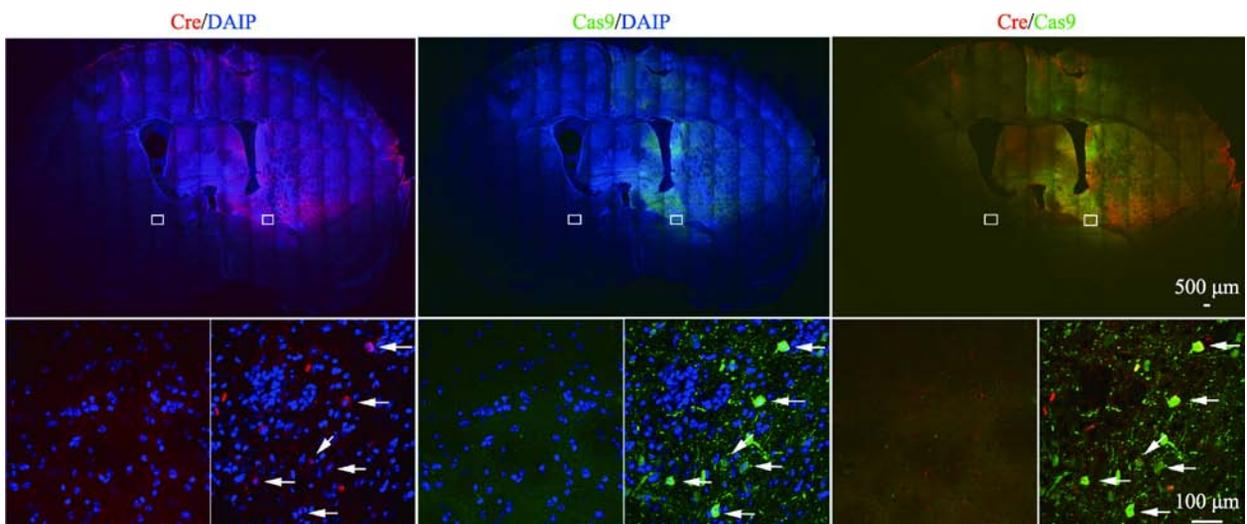
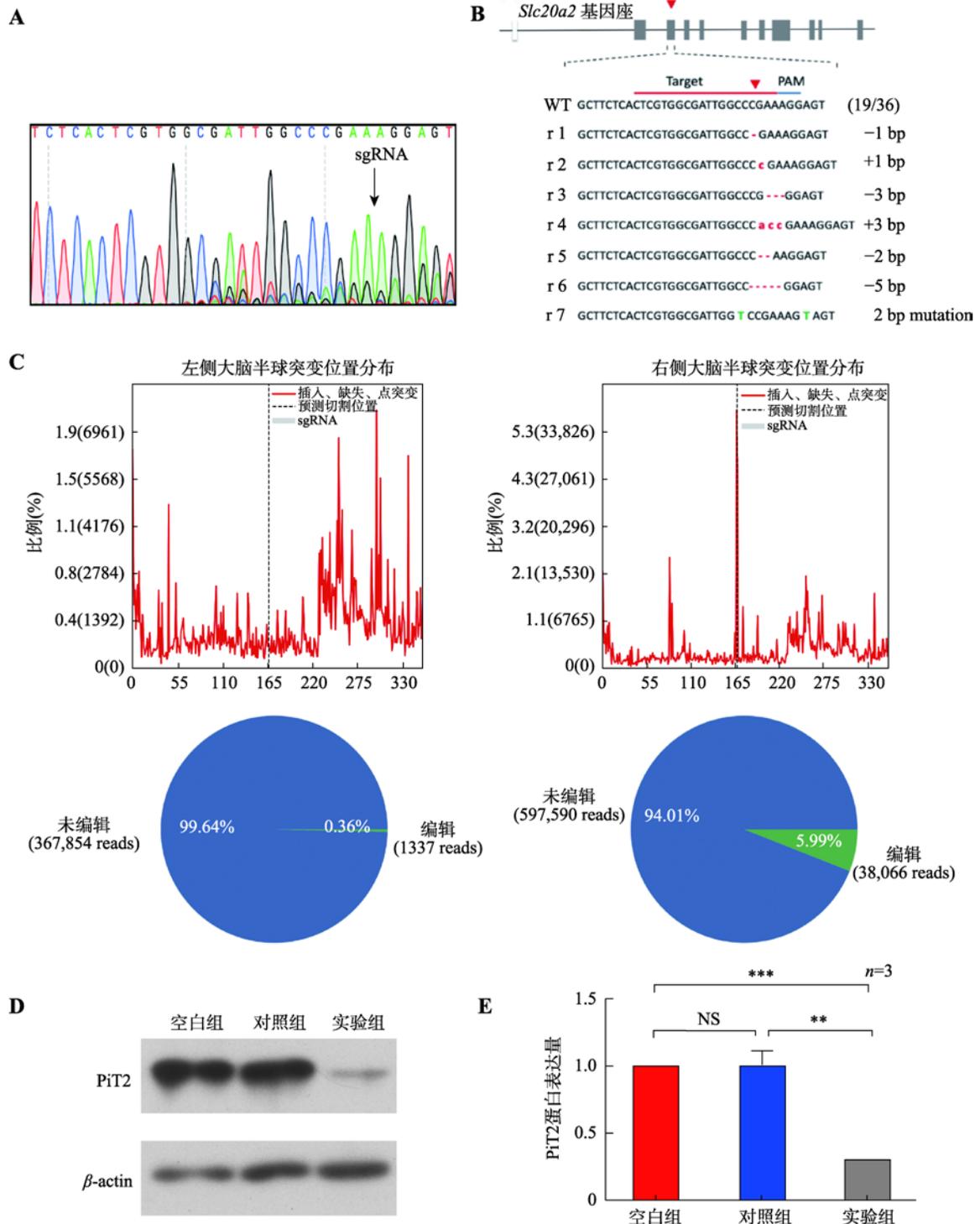


图 4 实验组脑组织免疫荧光图

**Fig. 4 Immunofluorescence staining of brain tissue in the experimental group**

上图为实验组小鼠在注射 AAV-Cre 病毒 2 周后的脑组织免疫荧光图, 注射部位出现红色荧光和绿色荧光。标尺=500  $\mu\text{m}$ 。下图为上图白色小方框的放大示意图。图中的箭头分别表示可观察到表达 Cre 重组酶的红色荧光、表达 Cas9-EGFP 蛋白的绿色荧光以及同时表达两者的荧光。标尺=100  $\mu\text{m}$ 。

图 5 纹状体 *Slc20a2* 基因敲除验证**Fig. 5** Verification of *Slc20a2* gene knockout in striatum tissue

A: 实验组小鼠右侧纹状体组织经 GFP 抗体筛选后的 PCR 测序图显示 sgRNA 序列附近出现套峰; B: 实验组小鼠右侧纹状体组织经 GFP 抗体筛选后的 TA 克隆基因型显示 PAM 序列附近碱基的随机插入或缺失; C: 实验组左右大脑半球高通量扩增子测序结果比较, 右侧大脑半球有更高的基因编辑效率; D: 实验组、对照组及空白组小鼠的右侧纹状体组织 PiT2 蛋白免疫印迹图; E: 图 D 的结果统计图。实验组 PiT2 蛋白的表达显著低于对照组、空白组。图中数值给出的是平均值 $\pm$ 标准误,  $n=3$ 。\*\*:  $P<0.01$ ; \*\*\*:  $P<0.001$ ; NS 表示无统计学意义。

### 3 讨论

目前, 有研究报道关于 *Slc20a2* 基因全身性敲除小鼠模型, 表现颅脑钙化的同时多合并其他的症状, 如胚胎生长受限、视神经钙化、脑积水<sup>[12,14,15]</sup>。推测可能的机制是纯合型 *Slc20a2*<sup>-/-</sup> 的临床表型比杂合型 *Slc20a2*<sup>+/-</sup> 明显。*SLC20A2* 作为致病基因为常染色体显性遗传, 临床上除了一例报道复合杂合突变的患者临床症状较其父母(均携带 *SLC20A2* 杂合突变)严重许多外<sup>[3]</sup>, 其余 PFBC 患者均为 *SLC20A2* 杂合突变。*SLC20A2* 基因致病的机制是由于编码的 PiT2 突变后降低细胞对无机磷的摄取, 推测杂合突变导致单倍体剂量不足而致病。*SLC20A2* 基因作为管家基因, 不仅参与大脑的磷代谢过程, 在身体其他部位的磷代谢中也起重要作用<sup>[16-18]</sup>。所以由于 *Slc20a2* 基因全身性敲除小鼠模型的局限性, 组织特异性的 *Slc20a2* 基因敲除小鼠成为研究 PFBC 的关键。

本研究通过 CRISPR/Cas9 技术构建纹状体 *Slc20a2* 基因敲除小鼠, 不仅可以解决 *Slc20a2* 全基因敲除小鼠致死或发育不良的困境, 而且能够特异性地研究纹状体钙化的具体机制。TA 克隆的基因型分析发现 Cas9 蛋白对靶点进行切割后, 细胞对其修复的过程中导致碱基随机的插入或缺失, 导致 *Slc20a2* 基因突变, 从而模拟临床 PFBC 的发病过程。通过对病毒注射部位行流式分选 GFP 阳性细胞, 由于可以富集经基因编辑的细胞, 编辑效率明显高于在体的编辑效率。但本研究中的小鼠脑区基因编辑效率很可能被低估, 原因在于病毒的注射部位局限于小鼠的右侧纹状体组织, 而进行高通量测序时采用的样品为一侧大脑半球。从免疫荧光(图 3, 图 4)结果可以看出病毒高度集中在注射部位, 标本的选择是导致基因编辑效率被低估的关键。本研究在体基因编辑效率仍有待于提高, 造成这种情况的原因主要是立体定位注射技术操作难度大、AAV 病毒浓度的调整、AAV 病毒 Cre 重组酶的活性等都是非常重要的因素。

本研究结合 Cre-LoxP 系统和 CRISPR/Cas9 技术, 采用立体定位的方法将 AAV-Cre 病毒注射至 LSL-Cas9-EGFP 小鼠的右侧纹状体。当病毒的 Cre 重组酶表达后切除 CAG 启动子下游 loxP 位点之间的 stop

序列, 激活 Cas9-EGFP 的表达。表达后的 Cas9 蛋白进而在 sgRNA 的引导下产生基因编辑作用。而常见的 Cre-LoxP 条件性敲除的 Cre 重组酶往往被置于某特定基因启动子的下游, 目的基因的两端分别含有一个 loxP 位点, 从而实现较高的组织和细胞特异性。传统的条件性敲除往往需要较长的实验周期、操作复杂<sup>[19]</sup>, 而本研究的模型构建方法设计较为巧妙, 更为简便、有效。CRISPR/Cas 系统由于脱靶率高在一定程度上限制了其应用<sup>[20]</sup>。结合 AAV-Cre 病毒的定点注射在实现组织特异性敲除的同时可以有效地避免非靶细胞编辑的脱靶效应。实验组的 PiT2 蛋白表达量比对照组明显降低, 进一步证实纹状体 *Slc20a2* 基因被敲减。但半年后对实验组小鼠进行病理切片染色或微型 CT 检查, 未显示出病理性的脑钙化结节, 推测可能的原因是形成病理性的钙化结节需要一定的时间。有研究表明 *Slc20a2* 全基因敲除小鼠需要至少 5 个月甚至更长的时间<sup>[21]</sup>, 且钙化病灶往往随着年龄的增长而增大。*Slc20a2* 基因敲减后是否出现与疾病相似的表型需要更长的时间, 有待于后续实验进一步研究。

小鼠纹状体 *Slc20a2* 基因敲除的模型构建在国内外未见报道, 本研究利用 CRISPR/Cas9 技术联合 Cre-LoxP 系统成功构建了 *Slc20a2* 基因条件性敲除小鼠, 为今后探究 PFBC 的钙磷代谢机制及可能存在的治疗研究提供良好的模型。

### 参考文献(References):

- [1] Nicolas G, Pottier C, Charbonnier C, Guyant-Marechal L, Le Ber I, Pariente J, Labauge P, Aygnac X, Defebvre L, Maltete D, Martinaud O, Lefaucheur R, Guillin O, Wallon D, Chaumette B, Rondepierre P, Derache N, Fromager G, Schaeffer S, Krystkowiak P, Verny C, Jurici S, Sauvee M, Verin M, Lebouvier T, Rouaud O, Thauvin-Robinet C, Rousseau S, Rovelet-Lecrux A, Frebourg T, Champion D, Hannequin D. Phenotypic spectrum of probable and genetically-confirmed idiopathic basal ganglia calcification. *Brain*, 2013, 1369(11): 3395-3407. [DOI]
- [2] Oliveira JRM, Spiteri E, Sobrido MJ, Hopfer S, Klepper J, Voit T, Gilbert J, Wszolek ZK, Calne DB, Stoessl AJ, Hutton M, Manyam BV, Boller F, Baquero M, Geschwind

- DH. Genetic heterogeneity in familial idiopathic basal ganglia calcification (Fahr disease). *Neurology*, 2004, 63(11): 2165–2167. [DOI]
- [3] Wang C, Li YL, Shi L, Ren J, Patti M, Wang T, de Oliveira JRm, Sobrido MJ, Quintáns B, Baquero M, Cui XN, Zhang XY, Wang LQ, Xu HB, Wang JH, Yao J, Dai XH, Liu J, Zhang L, Ma HY, Gao Y, Ma XX, Feng SL, Liu MG, Wang QK, Forster IC, Zhang X, Liu JY. Mutations in *SLC20A2* link familial idiopathic basal ganglia calcification with phosphate homeostasis. *Nat Genet*, 2012, 44(3): 254–256. [DOI]
- [4] Nicolas G, Pottier C, Maltete D, Coutant S, Rovelet-Lecrux A, Legallic S, Rousseau S, Vaschalde Y, Guyant-Marechal L, Augustin J, Martinaud O, Defebvre L, Krystkowiak P, Pariente J, Clanet M, Labauge P, Ayrignac X, Lefaucheur R, Le Ber I, Frébourg T, Hannequin D, Champion D. Mutation of the *PDGFRB* gene as a cause of idiopathic basal ganglia calcification. *Neurology*, 2013, 80(2): 181–187. [DOI]
- [5] Keller A, Westenberger A, Sobrido MJ, Garcia-Murias M, Domingo A, Sears RL, Lemos RR, Ordoñez-Ugalde A, Nicolas G, da Cunha JE, Rushing EJ, Hugelshofer M, Wurnig MC, Kaech A, Reimann R, Lohmann K, Dobričić V, Carracedo A, Petrović I, Miyasaki JM, Abakumova I, Mäe MA, Raschperger E, Zatz M, Zschiedrich K, Klepper J, Spiteri E, Prieto JM, Navas I, Preuss M, Dering C, Janković M, Paucar M, Svenningsson P, Saliminejad K, Khorshid HR, Novaković I, Aguzzi A, Boss A, Le Ber I, Defer G, Hannequin D, Kostić VS, Champion D, Geschwind DH, Coppola G, Betsholtz C, Klein C, Oliveira JR. Mutations in the gene encoding PDGF-B cause brain calcifications in humans and mice. *Nat Genet*, 2013, 45(9): 1077–1082. [DOI]
- [6] Legati A, Giovannini D, Nicolas G, López-Sánchez U, Quintáns B, Oliveira JR, Sears RL, Ramos EM, Spiteri E, Sobrido MJ, Carracedo A, Castro-Fernández C, Cubizolle S, Fogel BL, Goizet C, Jen JC, Kirdlar S, Lang AE, Miedzybrodzka Z, Mitarnun W, Paucar M, Paulson H, Pariente J, Richard AC, Salins NS, Simpson SA, Striano P, Svenningsson P, Tison F, Unni VK, Vanakker O, Wessels MW, Wetchaphanphesat S, Yang M, Boller F, Champion D, Hannequin D, Sitbon M, Geschwind DH, Battini JL, Coppola G. Mutations in *XPR1* cause primary familial brain calcification associated with altered phosphate export. *Nat Genet*, 2015, 47(6): 579–581. [DOI]
- [7] Yao XP, Cheng XW, Wang C, Zhao M, Guo XX, Su HZ, Lai LL, Zou XH, Chen XJ, Zhao YY, Dong EL, Lu YQ, Wu S, Li XJ, Fan GF, Yu HJ, Xu JF, Wang N, Xiong ZQ, Chen WJ. Biallelic mutations in *MYORG* cause autosomal recessive primary familial brain calcification. *Neuron*, 2018, 98(6): 1116–1123.e5. [DOI]
- [8] Cen ZD, Chen Y, Chen S, Wang H, Yang DH, Zhang HM, Wu HW, Wang LB, Tang SY, Ye J, Shen J, Wang HT, Fu F, Chen XH, Xie F, Liu P, Xu X, Cao JZ, Cai P, Pan QQ, Li JY, Yang W, Shan PF, Li YZ, Liu JY, Zhang BR, Luo W. Biallelic loss-of-function mutations in *JAM2* cause primary familial brain calcification. *Brain*, 2020, 143(2): 491–502. [DOI]
- [9] Lemos RR, Ramos EM, Legati A, Nicolas G, Jenkinson EM, Livingston JH, Crow YJ, Champion D, Coppola G, Oliveira JRM. Update and mutational analysis of *SLC20A2*: a major cause of primary familial brain calcification. *Hum Mutat*, 2015, 36(5): 489–495. [DOI]
- [10] Yamada M, Tanaka M, Takagi M, Kobayashi S, Taguchi Y, Takashima S, Tanaka K, Touge T, Hatsuta H, Murayama S, Hayashi Y, Kaneko M, Ishiura H, Mitsui J, Atsuta N, Sobue G, Shimosawa N, Inuzuka T, Tsuji S, Hozumi I. Evaluation of *SLC20A2* mutations that cause idiopathic basal ganglia calcification in Japan. *Neurology*, 2014, 82(8): 705–712. [DOI]
- [11] Jensen N, Schröder HD, Hejbøl EK, Füchtbauer EM, de Oliveira JR, Pedersen L. Loss of function of *Slc20a2* associated with familial idiopathic basal ganglia calcification in humans causes brain calcifications in mice. *J Mol Neurosci*, 2013, 51(3): 994–999. [DOI]
- [12] Wallingford MC, Gammill HS, Giachelli CM. *Slc20a2* deficiency results in fetal growth restriction and placental calcification associated with thickened basement membranes and novel CD13 and laminin $\alpha$ 1 expressing cells. *Reprod Biol*, 2016, 16(1): 13–26. [DOI]
- [13] Platt RJ, Chen SD, Zhou Y, Yim MJ, Swiech L, Kempton HR, Dahlman JE, Parnas O, Eisenhaure TM, Jovanovic M, Graham DB, Jhunjhunwala S, Heidenreich M, Xavier RJ, Langer R, Anderson DG, Hacohen N, Regev A, Feng GP, Sharp PA, Zhang F. CRISPR-Cas9 knockin mice for genome editing and cancer modeling. *Cell*, 2014, 159(2):

- 440–455. [DOI]
- [14] Wallingford MC, Chia JJ, Leaf EM, Borgeia S, Chavkin NW, Sawangmake C, Marro K, Cox TC, Speer MY, Giachelli CM. *SLC20A2* deficiency in mice leads to elevated phosphate levels in cerebrospinal fluid and glymphatic pathway-associated arteriolar calcification, and recapitulates human idiopathic basal ganglia calcification. *Brain Pathol*, 2017, 27(1): 64–76. [DOI]
- [15] Bezerra DP, Oliveira JRM. New studies on knockout mouse for the *SLC20A2* gene show much more than brain calcifications. *J Mol Neurosci*, 2016, 59(4): 565–566. [DOI]
- [16] Forster I, Hernando N, Sorribas V, Werner A. Phosphate transporters in renal, gastrointestinal, and other tissues. *Adv Chronic Kidney Dis*, 2011, 18(2): 63–76. [DOI]
- [17] Villa-Bellosta R, Ravera S, Sorribas V, Stange G, Levi M, Murer H, Biber J, Forster IC. The Na<sup>+</sup>-Pi cotransporter PiT-2 (*SLC20A2*) is expressed in the apical membrane of rat renal proximal tubules and regulated by dietary Pi. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2009, 296(4): F691–699. [DOI]
- [18] Villa-Bellosta R, Sorribas V. Compensatory regulation of the sodium/phosphate cotransporters NaPi-IIc (*SCL34A3*) and Pit-2 (*SLC20A2*) during Pi deprivation and acidosis. *Pflugers Arch*, 2010, 459(3): 499–508. [DOI]
- [19] Wang JP, Zhang YM. The application of Red/ET recombination to high efficient gene-targeting vector construction. *Hereditas (Beijing)*, 2005, 27(6): 953–958. 王军平, 张友明. Red/ET 重组在基因打靶载体快速构建中的应用. *遗传*, 2005, 27(6): 953–958. [DOI]
- [20] He XB, Gu F. Genome-editing: focus on the off-target effects. *Chin J Biotechnol*, 2017, 33(10): 1757–1775. 何秀斌, 谷峰. 基因组编辑脱靶研究进展. *生物工程学报*, 2017, 33(10): 1757–1775. [DOI]
- [21] Jensen N, Schröder HD, Hejbøl EK, Thomsen JS, Brüel A, Larsen FT, Vinding MC, Orłowski D, Füchtbauer EM, Oliveira JRM, Pedersen L. Mice knocked out for the primary brain calcification-associated gene *Slc20a2* show unimpaired prenatal survival but retarded growth and nodules in the brain that grow and calcify over time. *Am J Pathol*, 2018, 188(8): 1865–1881. [DOI]

(责任编辑: 谷峰)