

DOI:10.3724/SP.J.1008.2015.00256

## 应用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术建立 miRNA-301a 敲除小鼠

刘 宣<sup>1</sup>, 季 青<sup>1</sup>, 李 文<sup>2</sup>, 周利红<sup>1</sup>, 王 璇<sup>2</sup>, 江海丽<sup>1</sup>, 陈 静<sup>1</sup>, 畅立圣<sup>1</sup>, 李 琦<sup>1\*</sup>

1. 上海中医药大学附属曙光医院肿瘤科, 上海 201203
2. 上海中医药大学附属上海市中医医院肿瘤科, 上海 200071

**[摘要]** **目的** 利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术建立 miRNA 敲除小鼠模型。**方法** 根据 miRNA 基因序列, 设计针对 miR-301a 的 gRNA 引物序列 (双靶点), PCR 扩增获得针对 miR-301a 的体外转录模板 DNA 和构建 Cas9 体外转录模板, 然后进行 Cas9 和 gRNA 体外转录。利用体外转录的 gRNA/Cas9 mRNA 对小鼠受精卵显微注射, 并利用 T7E1 酶切和基因测序对 miR-301a 突变进行检测和鉴定。**结果** PCR 扩增、凝胶电泳和基因测序鉴定证实, 获得序列正确的用于体外转录的模板 DNA; 体外转录获得 gRNA/Cas9 mRNA, 顺利完成对小鼠受精卵的显微注射; 利用 T7E1 酶切对 miR-301a 突变进行检测, 发现 8 只新生小鼠中有 7 只 (87.5%) 被鉴定在 miR-301a 位点携带突变; 基因测序结果显示, 各小鼠均有不同程度的碱基插入或缺失突变, 其中缺失碱基数目最多的 4 号小鼠产生 31 个碱基缺失。**结论** 成功建立 miR-301a 基因高效敲除小鼠模型。

**[关键词]** CRISPR/Cas9; 基因编辑; miR-301a; 基因敲除小鼠

**[中图分类号]** R-332 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2015)03-0256-05

## Application of CRISPR/Cas9 gene targeting technology for establishing miRNA-301a knockout mouse model

LIU Xuan<sup>1</sup>, JI Qing<sup>1</sup>, LI Wen<sup>2</sup>, ZHOU Li-hong<sup>1</sup>, WANG Xuan<sup>2</sup>, JIANG Hai-li<sup>1</sup>, CHEN Jing<sup>1</sup>, CHANG Li-sheng<sup>1</sup>, LI Qi<sup>1\*</sup>

1. Department of Oncology, Shuguang Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China
2. Department of Oncology, Shanghai Municipal Hospital of Traditional Chinese Medicine, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200071, China

**[Abstract]** **Objective** To establish miRNA knockout mouse model using CRISPR/Cas9 gene targeting technology. **Methods** According to the gene sequence of miRNA, we designed the primers of the gRNA targeting miR-301a (two targets) and obtained DNA template for *in vitro* transcription using PCR amplification; then we constructed Cas9 template for *in vitro* transcription, followed by *in vitro* transcription for gRNA of Cas9. *In vitro* transcribed gRNA/Cas9 mRNA was microinjected into the mouse zygote. T7E1 digestion and gene sequencing were used to detect and characterize the mutation of miRNA. **Results** PCR amplification, gel electrophoresis and gene sequencing proved that we had obtained the correct DNA template targeting miR-301a for *in vitro* transcription. By *in vitro* transcription we obtained gRNA/Cas9 mRNA, which was successfully microinjected into mouse zygote. The miR-301a mutants were detected by digestion with T7E1, and it was found that 7 of the 8 (87.5%) neonatal mice were found carrying mutations in miR-301a sites. Gene sequencing results showed that all mice had different levels of nucleotide insertion or deletion mutation, with the maximum number of 31 bases deletion found in No. 4 mouse. **Conclusion** We have successfully established a mouse model with miR-301a gene knocked out, which lays a solid foundation for related future research.

**[Key words]** CRISPR/Cas9; gene editing; miR-301a; knockout mice

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2015, 36(3): 256-260]

**[收稿日期]** 2014-12-04 **[接受日期]** 2015-01-29

**[基金项目]** 国家自然科学基金 (81273958, 81303102, 81473478, 81303103), 上海市科委科技发展基金实验动物专项基金 (13140902500, 14140901402), 上海市优秀学科带头人计划 (XBR2011061), 上海市教委创新项目 (12ZZ118, 13YZ045), 上海市教育发展基金会晨光计划 (13CG47), 上海市卫生局科研基金 (20114Y001). Supported by National Natural Science Foundation of China (No. 81273958, 81303102, 81473478, 81303103), Experimental Animal Special Fund of Science and Technology Commission of Shanghai (No. 13140902500, 14140901402), Outstanding Subject Leaders Plan of Shanghai (No. XBR2011061), Innovation Program of Shanghai Municipal Education Commission (No. 12ZZ118, 13YZ045), "Chen Guang" Project of Shanghai Municipal Education Commission and Shanghai Education Development Foundation (No. 13CG47), and Shanghai Municipal Health Bureau (No. 20114Y001).

**[作者简介]** 刘 宣, 博士生. E-mail: lxtw@hotmail.com

\* 通信作者 (Corresponding author). Tel: 021-20256533, E-mail: Lzwf@hotmail.com

胃癌作为世界范围内最常见的恶性肿瘤之一,每年导致数以百万计的患者死亡<sup>[1-3]</sup>,其中在中国,胃癌死亡率一直居恶性肿瘤的首位<sup>[4-5]</sup>。胃癌是多因素交叉作用后引起的病理性疾病,与许多癌基因和抑癌基因都有着密切的联系<sup>[6-8]</sup>。随着对肿瘤相关基因研究的不断深入,基因敲除动物模型在肿瘤研究中的应用也越发受到重视<sup>[9-10]</sup>。基于基因敲除动物模型在胃癌发病机制研究中有独特的优势,本课题旨在利用国际上最为先进,并且方便、快捷、高效的 CRISPR/Cas9 基因编辑技术<sup>[11-16]</sup>,以 miR-301a 为例,建立 miRNA 基因敲除小鼠模型,为后续研究 miRNA 在胃癌发病过程中的作用提供重要的研究工具。

## 1 材料和方法

1.1 动物及试剂 C57BL/6 小鼠,4~6 周龄,SPF 级,购自上海斯莱克实验动物有限责任公司,许可证号 SCXK(沪)2012-0002。小鼠饲养于上海中医药大学实验动物室 12 h : 12 h 照明节律、食物与饮水充足的 SPF 环境。NcoI 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、Q5 PCR 聚合酶、T7 endonuclease I、dNTPs 均购自

NEB 公司;mMESSAGE mMACHINE® SP6 体外转录试剂盒购自 Life Technologies 公司;体外转录 T7 试剂盒购自 TaKaRa 公司;DH5 $\alpha$  感受态细胞购自天根公司;pEASY-Blunt 克隆载体购自北京全式金公司;蛋白酶 K 购自 Calbiochem 公司;氨苄青霉素、琼脂 A 粉末、Tris、SDS、EDTA 购自上海生工生物工程有限公司;蛋白胨、酵母提取物购自 Sigma 公司;pX260 载体由华东师范大学生命医学研究所惠赠;PCR 仪购自 Applied Biosystems 公司;MX3005 型 real-time PCR 仪购自 Stratagene 公司;DNA 电泳系统购自 Bio-Rad 公司;凝胶成像分析系统购自天能公司。

1.2 引导 RNA (guideRNA, gRNA) 体外转录模板 DNA 的获得 针对 miR-301a 靶向敲除靶点,设计并合成 2 条引物,其中 1 条引物序列含有用于体外转录的 T7 启动子序列(蓝色)、靶点特异性序列(绿色)以及 gRNA 骨架序列的前一部分(青色),另一条引物含有 gRNA 骨架序列的其余部分(图 1)。两条引物的 3' 端存在互补配对序列。利用这对引物进行 PCR 扩增即可得到用来体外转录的模板 DNA。



图 1 guideRNA 体外转录模板的构建示意图

Fig 1 Construction diagram of *in vitro* transcription template of guideRNA

1.3 Cas9 体外转录模板的构建 由于质粒 pX260 中 Cas9 起始密码子 ATG 恰好是位于此处的 Nco I (CCATGG) 酶切位点的一部分,因此可以通过该酶切位点引入用于体外转录 Cas9 的 SP6 启动子序列。通过合成带有 5' 磷酸基团的如下两段引物: Nco I-SP6-Sense: CATGG ATTTAGGTGACACTAT-AGAAGAG C, Nco I-SP6-Antisense: CATGG CTCT-TCTATAGTGTACCTAAAT C。下划线部分代表 Nco I (CCATGG) 酶切位点。经过等比例混合,退火后即可形成两端各带有 Nco I 黏性末端,中间序列为 SP6 启动子的双链 DNA。同时用 Nco I 处理 pX260 质粒,并去磷酸化,而后与上述退火产物进行连接、转化,经测序鉴定方向,即可得到可被 SP6 体外转录试剂盒作为模板的 Cas9 质粒。

1.4 Cas9 及 gRNA 的体外转录 PCR 产物形式的 gRNA 模板通过酚-氯仿抽提和乙醇沉淀进行纯

化,使用体外转录 T7 试剂盒进行转录,并通过酚-氯仿抽提和异丙醇沉淀进行回收。使用 Not I 处理带有 SP6 启动子序列的 pX260 质粒(该质粒只有 1 个 Not I 酶切位点,位于 Cas9 下游的 polyA 序列之后),mMESSAGE mMACHINE® SP6 体外转录试剂盒进行体外转录,氯化锂沉淀进行纯化回收。

1.5 gRNA/Cas9 mRNA 的显微注射 显微注射所使用的受精卵来自与同品系雄鼠交配后超排的母鼠。注射前将受精卵培养在 KSOM 胚胎培养基当中。利用显微注射用 TE 缓冲液(无核酸酶)将针对 miR-301a 的 gRNA 与 Cas9 mRNA 混合并稀释至 12.5 ng/ $\mu$ L 的 gRNA 以及 25 ng/ $\mu$ L 的 Cas9。使用 Eppendorf TransferMan NK2 显微操作装置将上述溶液通过显微注射针头注入单细胞期的受精卵胞质中。注射后的受精卵被立即或经 KSOM 过夜培养后移植进假孕 C57BL/6 母鼠。

1.6 小鼠基因组 DNA 的提取及 PCR 扩增 新生小鼠出生约 1 周后,剪下脚趾,55℃ 水浴消化过夜后,苯酚-氯仿法提取基因组 DNA。PCR 反应条件:94℃ 3 min; 94℃ 30 s; 56℃ 30 s; 72℃ 45 s; 72℃ 8 min, 30 个循环。

1.7 利用 T7E1 酶切对突变进行检测 PCR 产物吸 5 μL 点样,琼脂糖凝胶(1.5%)电泳观察有无目的条带。另外吸 10 μL, T7E1 酶切(酶切体系 15 μL: DNA 10 μL, T7E1 0.1 μL, 10×buffer 1.5 μL, H<sub>2</sub>O 3.4 μL), 37℃ 60 min, 点样,挑选突变测序。

```

Target site 1          PAM
TTCCTTTCTGCTCACTCCTGCTAA CCGCTGCTCTGACTTTATTGCACTACTGTACTTTACAGCGAGCAGTGC
AATAGTATTGTCAAAGCATCCGCGAGCAGGTTGCACACCTTTCCTGGTTCT
          PAM          Target site 2
  
```

图 2 针对 miR-301a 的 gRNA 序列 (双靶点)

Fig 2 Sequence of gRNA targeting miR-301a (two targets)

PAM: Protospacer adjacent motif

2.2 PCR 扩增获得针对 miR-301a 体外转录的模板 DNA 片段 PCR 扩增和凝胶电泳检测结果表明:获得预期大小(732 bp)的 DNA 片段(图 3),并经测序确认。

2.3 Cas9 体外转录模板的构建及 Cas9 和 gRNA 的体外转录 基于 PCR 扩增获得体外转录的模板 DNA 序列和实验室构建好的 Cas9 体外转录模板(图 4),体外转录并通过氯化锂沉淀进行纯化回收,顺利获得用于显微注射的 mRNA。

2.4 利用 T7E1 酶切对突变进行检测 通过 T7E1 鉴定发现 8 只新生小鼠中有 7 只(87.5%)被鉴定在 miR-301a 位点携带突变,除 #5 为 WT 外,其余都携带突变(图 5)。初步证明通过向小鼠受精卵显微注射经体外转录的 Cas9 mRNA 以及靶点特异性的

## 2 结果

2.1 设计针对 miR-301a 的 gRNA 序列 PAM (protospacer adjacent motif)是 Cas9 蛋白识别序列的必要条件,其能够聚集到 PAM 区域进行识别切割。利用 CRISPR/Cas9 gene targeting 技术,构建针对 miR-301a 基因的 gRNA,指导 Cas9 蛋白在特定位点剪切 DNA 双链;由于 miR-301a 为非编码区,且序列较短,故选择设计合适靶点即可,但考虑到靶点效率及后期鉴定,选择设计双靶点(图 2)。

guideRNA 能够对小鼠基因进行高效突变。

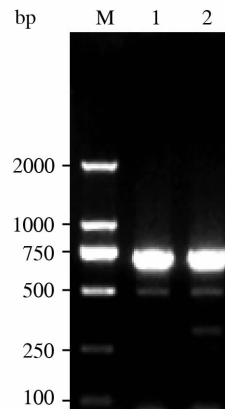


图 3 凝胶电泳检测 PCR 扩增条带

Fig 3 Gel electrophoresis assay for PCR amplification products

M: Marker; 1,2: Amplified DNA fragment targeting miR-301a

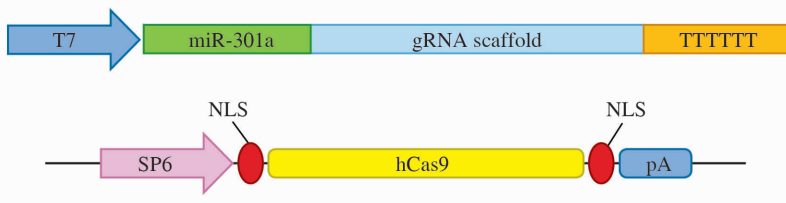


图 4 用于体外转录的 Cas9/RNA 表达载体系统

Fig 4 Cas 9/RNA expression vector system for *in vitro* transcription

T7, SP6 refers to promoter sequence for *in vitro* transcription, respectively; Target+gRNA scaffold refers to the artificial fusion crRNA-tracrRNA complex under native conditions, in which the Target is the target-specific sequence, and the six consecutive T bases in 3' end is the transcription termination signals; hCas9 refers to the coding sequence of Cas9 by codon optimization; NLS: Nuclear localization signal; pA: Transcription termination signal

2.5 基因测序鉴定突变 结果显示,大约以 PAM 区域为中心,各小鼠均有不同程度的碱基插入或缺失突变,其中缺失碱基数目最多的 #4 F0 代小鼠中产生了 31 个碱基缺失,表明 miR-301a 在 F0 代小鼠体内已经实现了高效敲除。

2.6 建立 miR-301a 敲除小鼠 将上述经鉴定过的 F0 代小鼠 #4 与野生型小鼠进行交配,产生 8 只 F1 代小鼠。对 F1 代产生的小鼠进行 PCR 扩增和基因型鉴定,结果表明, #3、#4、#5、#7 为 miR-301a 杂合子小鼠(图 6A)。将 #4 与 #5 小鼠进行交配,繁殖出 6 只 F2 代小鼠,鉴定结果表明, #1 和 #5 为 miR-301a 基因敲除小鼠(图 6B)。

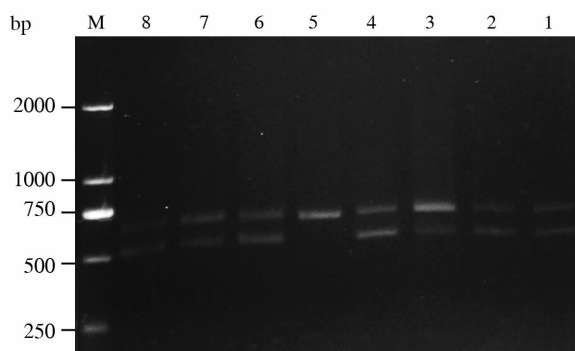


图 5 T7E1 酶切检测 miR-301a 基因突变情况

Fig 5 T7E1 enzyme digestion for detecting mutations of miR-301a  
M:Marker; 1-4, 6-8:miR-301a carrying the mutated sites;  
5: miR-301a carrying no mutated sites

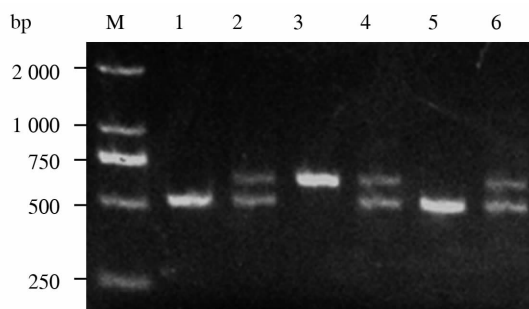
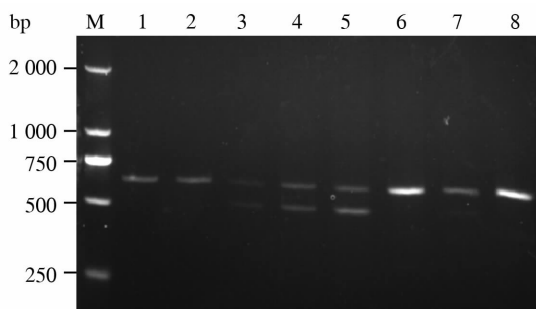


图 6 miR-301a F1 代(A)及 F2 代(B)小鼠鉴定

Fig 6 Identification of miR-301a F1 pup mice (A) and F2 pup mice (B)

In Fig A, M: Marker; 1,2,6,8: Wildtype mice; 3-5,7: miR-301a heterogenous mice. In Fig B, M: Marker; 3: Wildtype mice;2,4,6: miR-301a heterogenous mice; 1,5: miR-301a knockout mice

### 3 讨论

胃癌是多因素、多步骤作用后引起的病理性疾病,其发病机制与许多癌基因或抑癌基因都有着紧密联系<sup>[6-8]</sup>。随着对肿瘤发病机制研究的不断深入,基因敲除动物模型在肿瘤基础研究中发挥的作用也越来越大<sup>[9-10]</sup>。基因敲除动物可以有很多应用,包括探讨化学药物与基因或蛋白表达产物的关系,幽门螺杆菌等在胃癌形成中的作用机制<sup>[17-18]</sup>。

CRISPR/Cas 系统是细菌和古细菌中用来抵御噬菌体和质粒等外源 DNA 片段入侵而建立起来的防御机制<sup>[11-12]</sup>,由 Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) 和 CRISPR-associated (CAS) 基因组成。CRISPR 系统的免疫干扰过程主要包括 3 个阶段:适应、表达和干扰。在适应阶段,CRISPR 系统会将来自噬菌体或质粒的 DNA 短片段整合到前导序列和第一段重复序列之

间,每次整合都伴随着重复序列的复制,进而形成新的重复-间隔序列单元。在表达阶段,CRISPR 基因座会被转录成一段 CRISPR RNA 前体 pre-crRNA,该前体在 Cas 蛋白和 tracrRNA 的存在下会在重复序列处被进一步加工成小的 crRNA,成熟的 crRNA 与 Cas 蛋白形成 Cas/crRNA 复合物。在干扰阶段,crRNA 通过其与靶序列互补的区域引导 Cas/crRNA 复合物寻找靶点,并在靶点位置通过 Cas 蛋白的核酸酶活性造成靶点位置双链 DNA 断裂,从而使靶标 DNA 失去功能。

通过人工构建模拟 crRNA-tracrRNA 复合体的单链嵌合体引导 RNA (guide RNA),可有效介导 Cas9 蛋白对靶点的识别和切割,从而为在目标物种中利用 CRISPR 系统对目标 DNA 进行修饰提供了广阔前景<sup>[13-16]</sup>。总之,CRISPR/Cas9 具有许多技术优越性:克服现有技术在构建基因敲除小鼠技术中存在的周期长、工作量大、难度高、效率低等不足;免

去了构建以及优化筛选 ZFN 和 TALEN 串联碱基识别模块组合的过程;可供靶向序列相对于 ZFN 或者 TALEN 有着更高的出现频率及更大的灵活性,从而为精确的基因组编辑提供了更多选择。

本课题利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术,以 miR-301a 为靶点,通过向小鼠受精卵内显微注射 CRISPR/Cas9 系统有关的 RNA 来实现对目的基因 miRNA 的靶向切割与破坏。该模型的建立,为后续研究 miR-301a 及其他 miRNAs 在胃癌发病过程中的作用机制提供重要的工具,也为其他重要基因体内功能研究提供了技术借鉴。

#### 4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

#### [参考文献]

- [1] Venerito M, Nardone G, Selgrad M, Rokkas T, Malfertheiner P. Gastric cancer-epidemiologic and clinical aspects [J]. *Helicobacter*, 2014, 19: 32-37.
- [2] Al Dulaimi D. Recent advances in oesophageal diseases [J]. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench*, 2014, 7: 186-189.
- [3] Pinheiro D D, Ferreira W A, Barros M B, Araújo M D, Rodrigues-Antunes S, Borges B D. Perspectives on new biomarkers in gastric cancer: Diagnostic and prognostic applications [J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20: 11574-11585.
- [4] 徐 飏, 王建明. 胃癌流行病学研究[J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2006, 13: 1-7.
- [5] 王 妍, 王晶桐. 429 例胃癌流行病学资料分析[J]. *胃肠病学和肝病学杂志*, 2007, 6: 525-527.
- [6] Shen X B, Wang J, Li P F, Ren X F, Yan X L, Wang F. Screening of susceptibility genes and multi-gene risk analysis in gastric cancer [J]. *Med Oncol*, 2014, 31: 196.
- [7] D'Angelo G, Di Rienzo T, Ojetti V. Microarray analysis in gastric cancer: A review [J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20: 11972-11976.
- [8] Liu H S, Xiao H S. MicroRNAs as potential biomarkers for gastric cancer [J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20: 12007-12017.
- [9] Gerlai R. Gene-targeting studies of mammalian behavior: is it the mutation or the background genotype? [J]. *Trends Neurosci*, 1996, 19: 177-181.
- [10] Wolfner D P, Crusio W E, Lipp H P. Knockout mice: simple solutions to the problems of genetic background and flanking genes [J]. *Trends Neurosci*, 2002, 25: 336-340.
- [11] Makarova K S, Grishin N V, Shabalina S A, Wolf Y I, Koonin E V. A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes; computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action [J]. *Biol Direct*, 2006, 1: 7.
- [12] Wiedenheft B, Sternberg S H, Doudna J A. RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea [J]. *Nature*, 2012, 482: 331-338.
- [13] Mali P, Yang L, Esvelt K M, Aach J, Guell M, DiCarlo J E, et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9 [J]. *Science*, 2013, 339: 823-826.
- [14] Cong L, Ran F A, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems [J]. *Science*, 2013, 339: 819-823.
- [15] Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna J A, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity [J]. *Science*, 2012, 337: 816-821.
- [16] Qiu Z, Liu M, Chen Z, Shao Y, Pan H, Wei G, et al. High-efficiency and heritable gene targeting in mouse by transcription activator-like effector nucleases [J]. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41: e120.
- [17] Takaishi S, Wang T C. Gene expression profiling in a mouse model of Helicobacter-induced gastric cancer [J]. *Cancer Sci*, 2007, 98: 284-293.
- [18] Taketo M M. Mouse models of gastrointestinal tumors [J]. *Cancer Sci*, 2006, 97: 355-361.

[本文编辑] 贾泽军