

基于 CRISPR/Cas9 系统和增强 ssODN 重组建立 tau-V337M 小鼠模型

陈丽娇^{1,2}, 邓莉^{1,2}, 孙文杰^{1,2}, 刘杰^{1,2}, 张婷^{1,2}, 李善刚^{1,2*}

1 昆明理工大学灵长类转化医学研究院 省部共建非人灵长类生物医学国家重点实验室, 云南 昆明 650500

2 云南中科灵长类生物医学重点实验室, 云南 昆明 650500

陈丽娇, 邓莉, 孙文杰, 刘杰, 张婷, 李善刚. 基于 CRISPR/Cas9 系统和增强 ssODN 重组建立 tau-V337M 小鼠模型[J]. 生物工程学报, 2023, 39(7): 3003-3014.

CHEN Lijiao, DENG Li, SUN Wenjie, LIU Jie, ZHANG Ting, LI Shangang. Development of a tau-V337M mouse model using CRISPR/Cas9 system and enhanced ssODN-mediated recombination[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(7): 3003-3014.

摘要: 利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术建立 tau-V337M 突变的阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)小鼠模型。通过设计和体外合成单向导 RNAs (single guide RNAs, sgRNA)及单链寡核苷酸(single-stranded oligonucleotides, ssODN), 将 sgRNA、Cas9 蛋白、ssODN 注射到小鼠受精卵内, 利用 DNA 切割和重组产生突变。为了提高重组效率, 又在注射时添加 Rad51 蛋白。使用自然交配的雌鼠作为受体, 将 2 细胞期的编辑胚胎进行单侧输卵管移植。研究发现通过添加 Rad51 蛋白可以获得较高的突变效率, 在 F0 小鼠中获得了 tau-V337M 小鼠并进行扩繁, F0 代 tau-V337M 小鼠可以将突变遗传给 F1 代。综上所述, 本研究利用 Cas9、ssODN 和 Rad51 成功建立了首个 tau-V337M 基因位点突变的小鼠模型, 为 AD 的研究和点突变模型制作提供了模型和方法基础。

关键词: 阿尔茨海默症; tau-V337M; Cas9; DNA 重组; 单侧输卵管移植; Rad51

资助项目: 国家自然科学基金(31960215)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31960215).

*Corresponding author. E-mail: lis101@163.com

Received: 2022-12-30; Accepted: 2023-03-02

Development of a tau-V337M mouse model using CRISPR/Cas9 system and enhanced ssODN-mediated recombination

CHEN Lijiao^{1,2}, DENG Li^{1,2}, SUN Wenjie^{1,2}, LIU Jie^{1,2}, ZHANG Ting^{1,2}, LI Shangang^{1,2*}

1 State Key Laboratory of Primate Biomedical Research, Institute of Primate Translational Medicine, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500, Yunnan, China

2 Yunnan Key Laboratory of Primate Biomedical Research, Kunming 650500, Yunnan, China

Abstract: The generation of a tau-V337M point mutation mouse model using gene editing technology can provide an animal model with fast disease progression and more severe symptoms, which facilitate the study of pathogenesis and treatment of Alzheimer's disease (AD). In this study, single guide RNAs (sgRNA) and single-stranded oligonucleotides (ssODN) were designed and synthesized *in vitro*. The mixture of sgRNA, Cas9 protein and ssODN was microinjected into the zygotes of C57BL/6J mice. After DNA cutting and recombination, the site homologous to human 337 valine (GTG) in exon 11 was mutated into methionine (ATG). In order to improve the efficiency of recombination, a Rad51 protein was added. The female mice mated with the nonvasectomy male mice were used as the surrogates. Subsequently, the 2-cell stage gene edited embryos were transferred into the unilateral oviduct, and the F0 tau-V337M mutation mice were obtained. Higher mutation efficiency could be obtained by adding Rad51 protein. The F0 tau-V337M point mutation mice can pass the mutation on to the F1 generation mice. In conclusion, this study successfully established the first tau-V337M mutation mouse by using Cas9, ssODN and Rad51. These results provide a new method for developing AD mice model which can be used in further research on the pathogenesis and treatment of AD.

Keywords: Alzheimer's disease; tau-V337M; Cas9; DNA recombination; unilateral oviduct transplantation; Rad51

阿尔兹海默症(Alzheimer's disease, AD)是目前发病率最高的神经退行性疾病,以进行性记忆力下降、认知功能障碍、行为异常和人格失常为主要临床表现^[1-2]。作为一种目前无法治疗的疾病,AD已成为当今生物医学的主要挑战之一^[3-4]。AD的主要病理学改变包括神经元丢失、 β -淀粉样蛋白沉淀,以及 tau 蛋白过度磷酸化形成的神经纤维缠结^[5]。tau 蛋白是一种微管相关蛋白,由位于 17 号染色体上的微管相关蛋白基因(microtubule-associated protein genes, MAPT)编码,其定位于轴突上,在微管的稳定和运输中发挥重要作用^[6-8]。tau 蛋白病变被认为是 AD 的

主要病理特征之一,与认知功能降低和神经元丢失有极高的相关性^[9]。tau 蛋白转基因动物模型及人类 tau 基因敲入小鼠模型可模拟 AD 及其他 tau 蛋白病的一些疾病特征,因而被广泛应用于相关研究中。但是,已有研究表明,现有的 tau 蛋白小鼠模型存在不足之处:其一,tau 蛋白转基因小鼠模型中表达的外源性 tau 蛋白是内源性 tau 的 13 倍^[10],其主要的病理表型依赖于过量表达的外源性 tau 蛋白;且 tau 蛋白转基因小鼠模型,如 rtg4510,在评估其 tau 病理时受遗传背景的影响^[10-11];其二,已有的 tau 基因敲入小鼠模型,无法形成磷酸化 tau 蛋白和神经元纤维

缠结。因此, 现有的小鼠模型并不能满足对于 AD 等 tau 蛋白病的相关机制研究需要^[12]。最近基于类脑器官的研究表明, tau-V337M 突变较其他突变类型有更为严重的病理表型^[13], 因此, 亟待建立 tau-V337M 小鼠模型开展相关研究。

胞嘧啶碱基编辑器(cytosine base editor, CBE)和腺嘌呤碱基编辑器(adenine base editor, ABE)是目前最常用的单碱基编辑工具, CBE 是 Cas9 突变体与胞嘧啶脱氨酶组成的融合蛋白, 在单向导 RNAs (single guide RNAs, sgRNA) 指引下到达基因组目的位点, 在 4-7 位编辑窗口实现 C•G 到 T•A 的转换^[14]; ABE 是 Cas9 突变体与腺嘌呤脱氨酶融合成融合蛋白, 可以在 sgRNA 指引下在 4-7 位编辑窗口实现 A•T 到 G•C 的转换^[15]。通过序列分析发现小鼠 V337M 这个位点需要将编码缬氨酸的密码子(GTG)点突变为蛋氨酸(ATG), 然而这个突变位点不在 CBE 编辑窗口内, 所以不能通过碱基编辑实现。因此尝试使用 Cas9 切割和单链寡核苷酸(single-stranded oligonucleotides, ssODN)重组来实现基因定点突变。Cas9 系统因其快速、高效、便捷等特点, 广泛应用于基因功能、基因治疗、基因工程、动物模型构建及功能基因筛选等研究领域^[16-18], Cas9 能够在 gRNA 的引导下对目的基因进行切割, 产生双链断裂(double strand break, DSB), 进而触发非同源末端连接(non-homologous end joining, NHEJ)修复和 DNA 同源依赖的同源定向修复^[19](homology directed repair, HDR)。在发生 HDR 时, 利用已经设计好的单链 DNA 寡核苷酸 ssODN, 可实现目的位点的敲入(knock in, KI)。已有报道 CRISPR/Cas9 系统结合 ssODN, 产生了 ATP7B 位点定向点突变(p.Arg778Leu)兔, 以模拟患有肝豆状核变性病(Wilson disease, WD)的亚洲人的主要突变类型^[20], 但是对于基因及位点的不同, 该方法的效率存在很大的差异。Rad51 是一种链交换蛋白^[21-22], 在同源重组(homologous recombination, HR)中起核心作用, 已有研究表明将 Rad51 与 Cas9 系统及 ssODN 供体模板联合使用时, 可显著增强 HDR^[23]。本研究通过上述各项技术的联合使用, 最终获得 tau-V337M 小鼠, 为 AD 的研究提供了新的模型。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

实验小鼠及后代饲养在昆明理工大学实验动物中心屏障环境内[SYXK(滇) K2018-0008]; ICR 与 C57BL/6J 小鼠购自昆明医科大学实验动物学部[SCXK(滇) K2020-0004]; 小鼠自由饮水和采食(生长繁殖饲料由苏州双狮实验动物饲料科技有限公司提供), 环境温度为 18-23 °C。本研究的设计以及小鼠的超数排卵, 麻醉、结扎、胚胎移植和取样检测操作等均由昆明理工大学实验动物伦理委员会审核批准[PZWH(滇) K2019-0003]。

1.1.2 实验材料

GeneArtTM Precision gRNA Synthesis Kit 试剂盒、Distilled water、Cas9 蛋白、Phospho-Tau (Ser202, Thr205) Monoclonal Antibody (AT8) 抗体购自 Thermo Fisher Scientific; NeuN 抗体购自 Cell Signaling Technology 公司; 小鼠囊胚培养液 KSOM 购自 Millipore 公司; 透明质酸酶、M2、培养用油购自 Sigma-Aldrich; Rad51 蛋白购自上海睿铂赛生物科技有限公司; 单细胞提取试剂盒(Single Cell WGA Kit)、TA 克隆试剂盒(5 min TA/Blunt-Zero Cloning Kit)购自南京诺唯赞生物科技有限公司; DNA 凝胶快速纯化试剂盒(Easy Pure Quick Gel Extraction Kit)购自北京全式金生物技术股份有限公司; 4',6-二脒

基-2-苯基吲哚 DAPI (4,6-diamino-2-phenyl indole, DAPI)购自 Biotium 公司; ribbit568、Donkey Anti-Mouse IgG H&L (Alexa Fluor[®] 488)购自 abcam 公司; 注射用血促性素(pregnant mare serum gonadotropin, PMSG)和注射用绒促性素(human chorionic gonadotropin, HCG)购自宁波第二激素厂; 黏附载玻片、盖玻片购自江苏世泰实验器材有限公司。

1.2 方法

1.2.1 sgRNA 的设计和体外转录

NCBI 网站下载人和小鼠 MAPT 蛋白的氨基酸序列。将从 GenBank 上获得的小鼠的 *Mapt* 基因序列(Gene ID: 17762), 使用 sgRNA 设计网站(<http://www.rgenome.net/cas-designer/>)针对目标位点设计 sgRNA。ssODN 由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。sgRNA 使用 GeneArt[™] Precision gRNA Synthesis Kit 试剂盒进行体外转录。

1.2.2 小鼠受精卵获取

小鼠的超排和受精卵的获得参考 2019 年常秋荣等发表的方法^[24]。

1.2.3 受精卵胞质内注射

借助装配有 PiezoXpert (Eppendorf)的 Leica DMI3000B 显微注射仪(Leica), 使用口径为 2–3 μm 的显微注射针将混合液注入小鼠受精卵胞质内, 并将仅注射蒸馏水的受精卵作为空白对照。根据实验设计将 Cas9 蛋白(10 ng/ μL), tau337 sgRNA (10 ng/ μL), tau-ssODN (40 ng/ μL), 以及 Rad51 (10 ng/ μL)按照相应比例组合后(溶剂为蒸馏水), 注入小鼠受精卵胞质内。注射完成后, 等待胚胎恢复 10 min, 将胚胎移入 KSOM (potassium-enriched simplex optimized medium, KSOM)液滴中。通过反复移滴洗去操作液。清洗完成后, 将 KSOM 液滴放入二氧化碳培养箱(Thermo Fisher)中进行培养(37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2)。

1.2.4 sgRNA 切割效率检测

将基因编辑后的胚胎在体外培养 3–4 d, 并

收集发育至囊胚的胚胎(1 个/管), 利用单细胞基因组提取试剂盒(Single Cell WGA Kit)提取 DNA。针对小鼠 tau337 位点设计鉴定引物(上游引物 Mouse-tau-F: 5'-CCATGCTTCCTGTAC CACTGA-3'; 下游引物 Mouse-tau-R: 5'-GGATA TGATGATATGCTACCTCCAA-3')。将基因组 DNA 进行 PCR 扩增后, 对 PCR 产物进行 Sanger 测序分析, 以确定突变类型。

1.2.5 TA 克隆检测

收集发育至囊胚期的基因编辑胚胎(10 个/管), 利用单细胞提取试剂盒进行 DNA 提取和 PCR 扩增。扩增后的产物使用 PCR 产物纯化回收试剂盒进行纯化, 取纯化后的 PCR 产物 2 μL , 加入 1 μL 5 \times TA/Blunt-Zero Cloning Mix 和 2 μL ddH₂O, 获得总体积 5 μL 的连接液, 将连接液加入 50 μL 感受态细胞转化后再加入 300 μL 不含抗生素的 LB 培养基, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 振荡培养 10 min 后, 进行菌液涂板, 37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱内过夜培养后, 挑菌落于试管中振荡培养后, 每组胚胎样本挑 40 个菌样进行 Sanger 测序。

1.2.6 小鼠胚胎单侧输卵管移植

将自然发情的受体雌鼠与未结扎的雄鼠进行交配, 在阴道见栓的当天麻醉受体雌鼠, 并在体视镜下使用预先准备好的胚胎移植针(内径 $\geq 120 \mu\text{mol/L}$)将二细胞期胚胎移植入受体雌鼠输卵管膨大部一侧, 将另一侧输卵管膨大部找出并划破, 释放受精卵以减少自然胚胎数目。随后将预热好的生理盐水滴入小鼠腹腔以弥补手术过程中的体液损耗并缝合伤口。待小鼠恢复运动能力后, 单笼置于安静环境中饲养。

1.2.7 新生小鼠基因型鉴定

基因编辑小鼠 F0 和 F1 代出生后的 7–9 d, 剪取新生鼠尾尖置于 50 mmol/L NaOH (100 μL) 溶液中裂解(95 $^{\circ}\text{C}$, 30 min)。当液体温度降至室温后, 加入 1 mol/L Tris HCl (10 μL)中和裂解

液。离心后的上清用于 PCR 扩增，产物经琼脂糖凝胶电泳分离、回收目的片段进行测序鉴定。

1.2.8 点突变小鼠脱靶检测

使用 CRISPOR 脱靶预测软件对 tau337 sgRNA 的潜在脱靶位点进行预测，选择位于外显子上且≤3个碱基错配位点的序列进行引物设计及脱靶检测。将基因型确定为 tau-V337M 点突变的小鼠基因组用脱靶引物进行 PCR 扩增和测序鉴定。

1.2.9 F0 代模型鼠脑组织切片免疫荧光染色

将冰冻切片后的模型鼠脑片用 AT8 (鼠抗)及 NeuN (兔抗)进行共染，待 Donkey Anti-Mouse IgG H&L (Alexa Fluor[®] 488)、rabbit568 和 DAPI 孵育结束后用尼康 AXR 激光共聚焦显微镜对样本进行拍照。

2 结果与分析

2.1 设计针对 tau-V337M 突变的 sgRNA 和 ssODN

通过比对后发现，人和小鼠的 MAPT 蛋白氨

基酸序列高度同源(同源率为 89%)，自第 180 位氨基酸以后，人和小鼠的氨基酸序列基本相同。人的 337 号位点与小鼠的第 326 号氨基酸同源，均为缬氨酸(Val) (图 1A)，其对应的外显子为 11 号外显子。比较后发现，人和小鼠第 11 号外显子的氨基酸序列同源性高达 100%。据此推测，将小鼠第 326 位缬氨酸(Val)突变为蛋氨酸(Met)，将可以模拟人的 V337M 突变，产生表型明显的神经元纤维缠结的 AD 小鼠模型。为了将小鼠第 11 号外显子上编码第 326 位缬氨酸的密码子 (GTG)点突变为蛋氨酸(ATG)，本研究在反义链上对 ssODN 进行替换设计，这条 ssODN 片段包含突变位点互补碱基，两侧是 46 bp 的同源序列(图 1B)。

2.2 tau337 sgRNA 切割效率检测

为了检测实际切割效率以保证后期重组的发生，将显微注射了 Cas9 和 sgRNA 并发育至囊胚期的胚胎进行基因组提取，PCR 扩增后各取 5 μL 进行 2%琼脂糖凝胶电泳分析，获得了长度为 226 bp 的扩增片段。PCR 产物测序结果

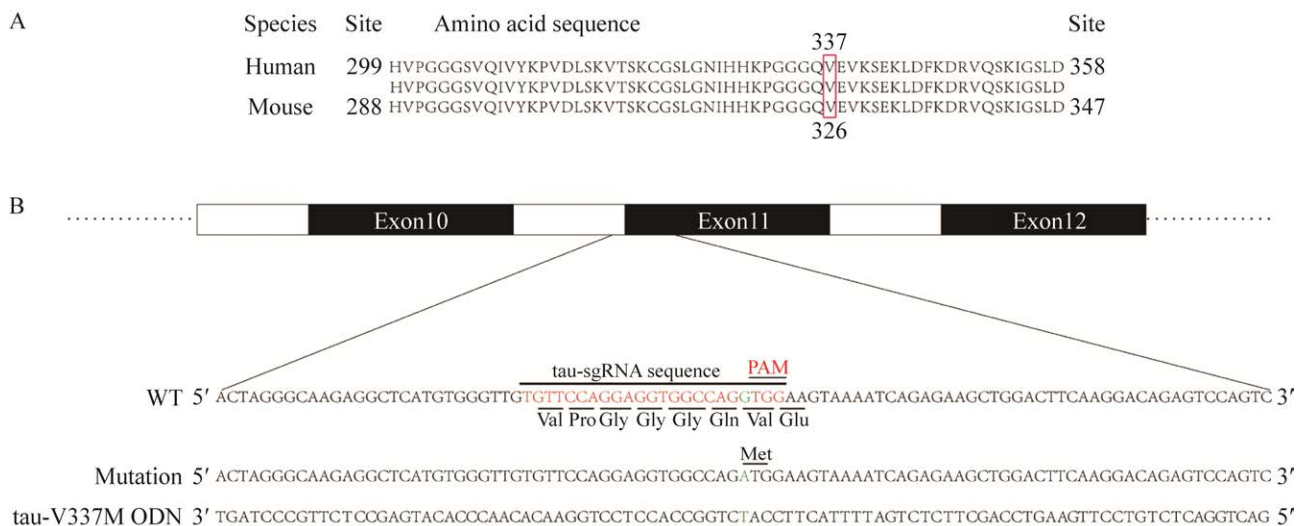


图 1 人 tau-V337M 在小鼠对应序列的 sgRNA 及 ssODN 设计

Figure 1 Design of the sgRNA and ssODN targeting the corresponding human tau-V337M in mice. A: Alignment of the amino acid sequence of human and mouse MAPT proteins. The amino acid valine 337 in human and corresponding residue valine 326 in mouse were indicated in red box. B: Design of sgRNA and ssODN.

显示, 在 9 个胚胎中, 有 6 个胚胎发生 indel, 切割效率为 66.7%, 其中有 5 条染色体(41.7%)发生碱基缺失; 3 条染色体(25.0%)产生碱基插入; 1 条染色体(8.3%)发生碱基替换。此外, 还有 3 条染色体未发生切割(表 1)。

2.3 基因编辑对发育率的影响

为了解基因编辑是否会对胚胎发育造成影响, 研究对比了不同处理与囊胚率的关系。结果表明, 与对照组相比, 其他两组的囊胚率都有不同程度的降低, 这说明注射 Cas9 系统和 ssODN 会影响胚胎的发育, 而进一步加入 Rad51 并不会加重对胚胎早期发育的不良影响(表 2)。

2.4 tau-V337M 基因编辑囊胚 TA 克隆分析

为比较 sgRNA+Cas9+ssODN 组及 sgRNA+Cas9+ssODN+Rad51 组在目的位点敲入(KI A>G)效率之间的差异, 以及确定每组中不同突变所占比例, 将目的片段重组到 T 载体中, 进行 Sanger 测序后发现, 在 sgRNA+Cas9+ssODN 组中没有发生目的位点敲入(图 2A), 而 sgRNA+Cas9+ssODN+Rad51 组有 19 个样本发生目的位点敲入(KI A>G), 目的位点敲入率为 54%(图 2B); 在上述 19 个样本中, 有 13 个样本为目的位点精确敲入, 占比 37%; 其余 6 个样本除目的位

表 1 tau-sgRNA 切割效率检测

Table 1 Detection of tau sgRNA cutting efficiency

Mutation type	Number of chromosomes carrying mutations	Ratio (%)
Deletion	5	41.7
A>G replacement	1	8.3
Insert	3	25.0
WT	3	25.0

表 2 不同组合对囊胚率的影响

Table 2 Effect of different combinations on blastocyst rate

Group	Number of injected zygotes	Blastocyst (blastocyst rate)
Control	26	22 (85%)
sgRNA+Cas9+ssODN	18	10 (56%)*
sgRNA+Cas9+ssODN+Rad51	19	11 (58%)*

*: Significant difference ($P<0.05$).

点敲入外, 还存在其他位点突变, 占比为 17%(图 2B)。对比 sgRNA+Cas9+ssODN 组产生的 4 种突变类型, sgRNA+Cas9+ssODN+Rad51 组产生了 7 种突变类型, 表明由于 Rad51 的加入使切割模式更复杂(图 2A、2B)。

2.5 tau-V337M 小鼠的获得及分子生物学鉴定

通过将 20 个二细胞胚胎移植到自然交配的 1 只受体雌鼠, 经过 19.5 d 的妊娠期, 获得

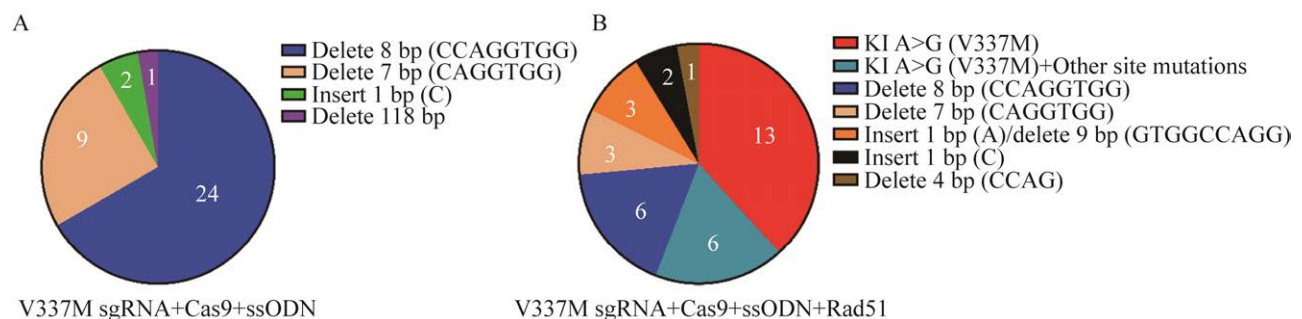


图 2 Tau-V337M 基因编辑囊胚 TA 克隆分析

Figure 2 TA cloning and analysis of tau-V337M gene editing. A: TA clone of blastocyst in sgRNA+Cas9+ssODN group. B: TA clone of blastocyst in sgRNA+Cas9+ssODN+Rad51 group.

2 只后代(图 3B)。7-9 d 时将仔鼠进行编号和组织取材,经 PCR 产物测序分析,发现获得的 2 只 F0 代包括 2 种类型的突变(图 3A、3C)。具体类型如下:在获得的 F0-1 号小鼠中,检测到 1 种类型的突变(图 3C),相当于在第 337 位缬氨酸(GTG)对应的碱基位点突变为编码蛋氨酸(ATG)的碱基;在 F0-2 号小鼠发生 8 bp 的碱基缺失(缺失的碱基为 CCAGGTGG) (图 3C),这

种突变类型也是在囊胚单克隆测序中发生率最高的类型。

2.6 tau-V337M 小鼠模型的扩群

在获得的 F0 代突变个体中,仅有 1 号雌性小鼠携带目的突变。因该突变位点发病早、症状重,为避免发生模型鼠因症状过重无法带仔鼠的情况,将 C57 野生型雄鼠与基因突变雌鼠按照 1:1 的比例进行合笼,再额外加入一只 C57

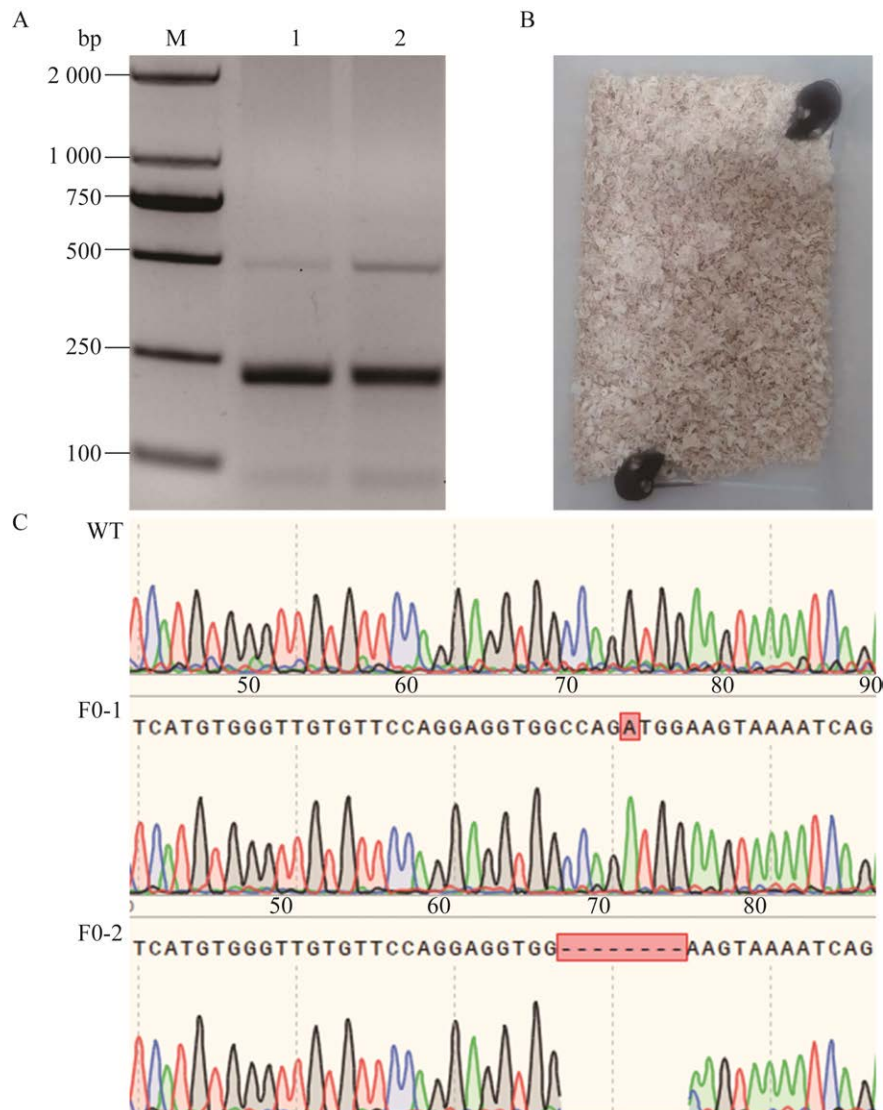


图 3 F0 代小鼠和基因型分析

Figure 3 Founder mouse and genotype analysis. A: Agarose gel electrophoresis identification of two founders, the length of the target fragment is 226 bp. M: DL2000 DNA Marker. B: Two four weeks old founder V337M gene mutation mice. C: Sanger sequencing map of two gene mutation mice.

野生型健康雌鼠来帮助带仔鼠,共获得 14 只小鼠(图 4A、4B)。对 14 只小鼠进行 Sanger 测序分析后,确定有 3 只为杂合子后代(图 4C)。

2.7 tau-V337M 点突变模型小鼠脱靶检测

由于基因组的复杂性可能引起 sgRNA 在非预期位点错误地识别碱基序列,进而导致脱靶的产生,sgRNA 脱靶与 indel 的发生成正比关系,如果 indel 发生在关键基因的外显子处,可能会对动物表型产生影响。本研究利用 CRISPOR 脱靶预测软件分析发现,≤3 个错配位点的潜在脱靶序列在外显子上有 3 个,其脱靶位点基因、位置信息、错配位点及引物序列见表 3。为保证获得模型的准确性,将基因型确定为 tau-V337M 点突变的小鼠(F0-1、F1-9、F1-11、F1-12)及一只野生

型(wild type, WT)小鼠的基因组用脱靶引物进行 Sanger 测序分析。结果显示与 WT 相比,4 只模型鼠在 3 个脱靶位点处均未发生脱靶(图 5)。

2.8 F0 代模型鼠脑组织切片免疫荧光染色

分子水平的验证已经说明获得了 tau-V337M 模型鼠,为了解该突变对 tau 磷酸化的影响,初步对 6 月龄的 F0 代模型鼠进行病理学分析。通过对鼠脑运动皮层组织切片进行磷酸化 tau 蛋白特异抗体 AT8 和神经元特异抗体 Neun 免疫荧光染色过后发现,与同龄野生小鼠相比,tau-V337M 点突变的小鼠神经元富集区已经出现 tau 蛋白过度磷酸化形成的神经纤维缠结丝,且数量较多(图 6),该结果说明 tau-V337M 突变对 tau 磷酸化有促进作用。

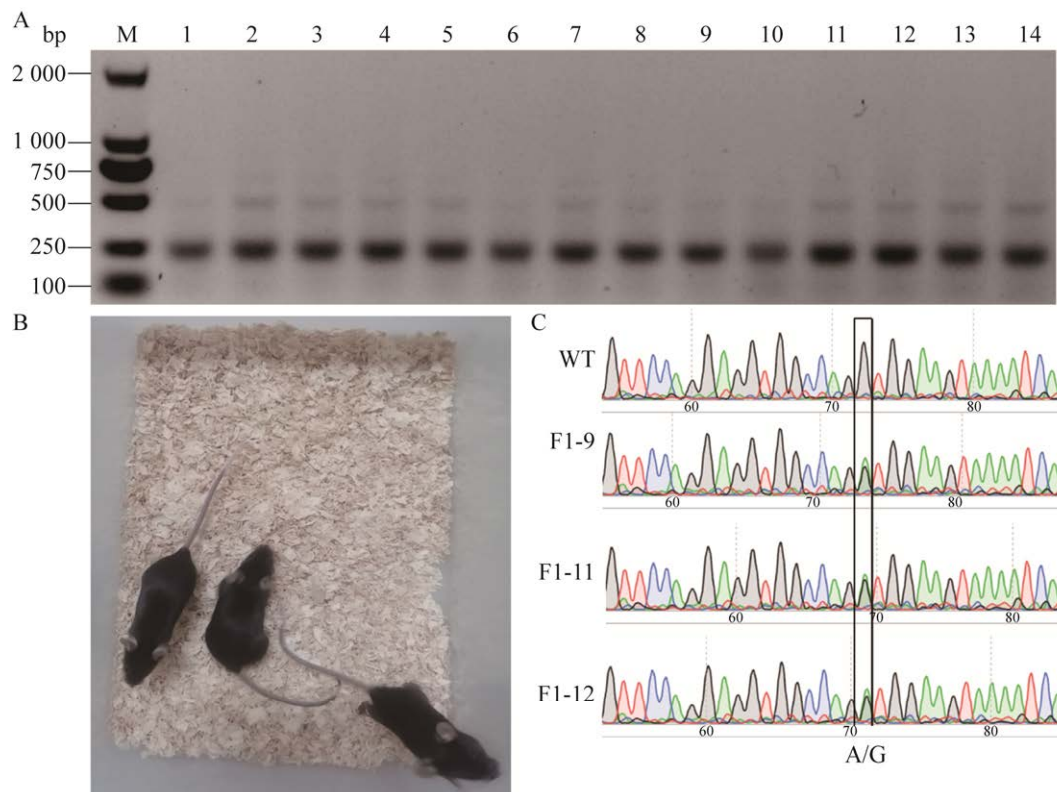


图 4 F1 代小鼠和基因型

Figure 4 F1 generation mouse and genotype. A: The agarose gel electrophoresis of the three F1 identified that the target fragment was 226 bp long. M: DL2000 DNA Marker. B: Three 8-weeks old V337M F1 mice. C: Sanger sequencing map of three F1 gene mutation mice.

表 3 脱靶位点及引物设计

Table 3 Off-target site and primer design

Name	POT	Off-target (5'→3')	Primer sequence (5'→3')
Gm5884	exon_Gm5884_chr6	TGTTCCAGGAGATGGTCTGGGGG	TGCTGATCGACTTCCCAACC TCATCGTCCTTCTCCTGGGT
Fbxo39	exon_Fbxo39_chr11	TGTTCCGGAAGGTGGGCAGGAGG	CGGATCTTGCTGCAGGAGAT GACTCGCTACTCACCTGCAG
Nsd1	exon_Nsd1_chr13	TTTTCCAGGTGGTGGCCAGCTGA	CCCAACCCCAACTCATGT AGAGGGAACAGCTCGAGGAT

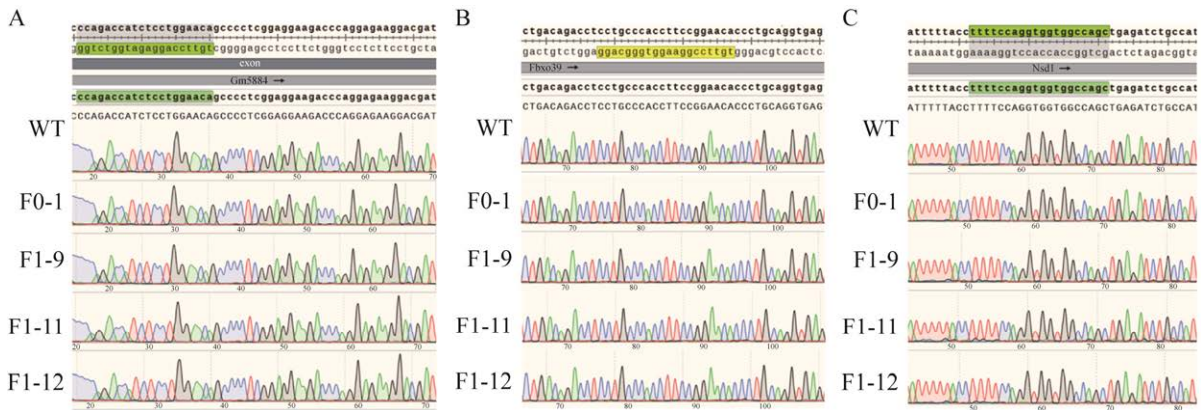


图 5 tau-V337M 点突变模型小鼠脱靶测序

Figure 5 Off-target sequencing of mouse with tau-V337M point mutation model. A: Gm5884. B: FBXO39. C: Nsd1.

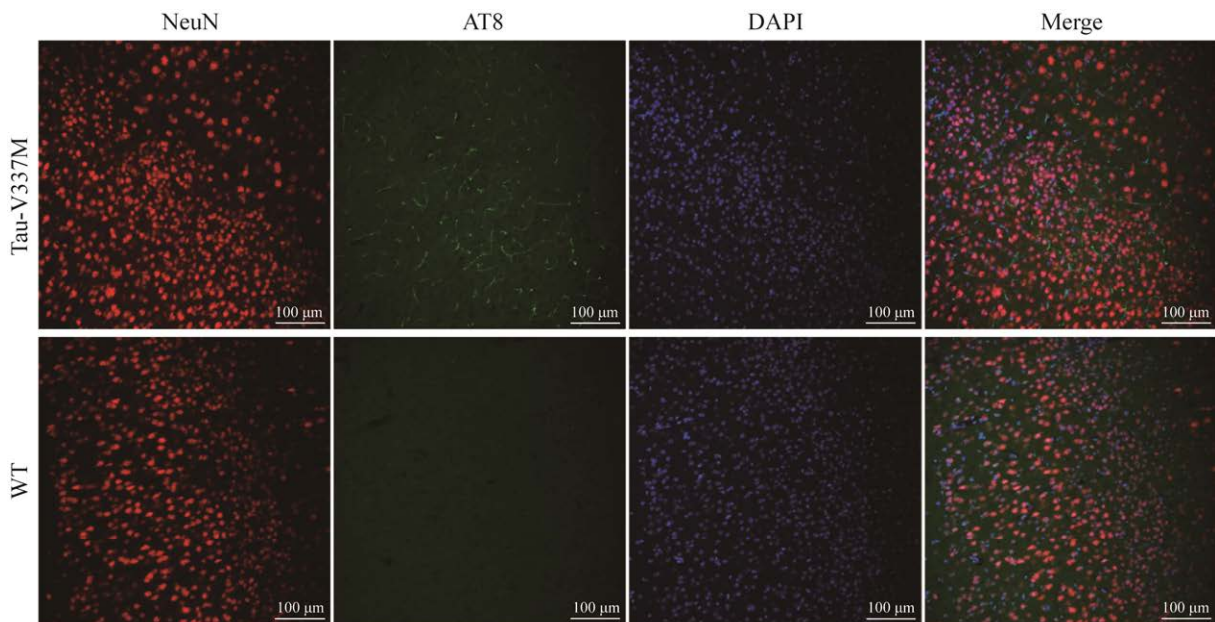


图 6 F0 代模型鼠脑组织切片免疫荧光染色

Figure 6 Immunofluorescence staining of brain tissue sections of F0 generation model mouse.

3 讨论与结论

阿尔兹海默症给患者、家庭及社会造成了负担。至今还没有药物能够治愈该病，因此与之相关的疾病动物模型在相关机制研究及药物研发方面具有重要意义。本研究以在 *tau* 基因上进行精确突变为目标，使用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术，并联合 ssODN 及 Rad51 蛋白，在小鼠 MAPT 基因第 11 号外显子的 326 号位点进行精确编辑，成功地将 A>G 的错义突变导入小鼠基因组中，获得了对应人 tau-V337M 基因定点突变小鼠，并且该小鼠可以将突变稳定地遗传给后代。

利用 ssODN 作为供体模板与工程化核酸酶联合用于基因 KI 动物模型的构建已有报道，且有研究表明，反义单链寡核苷酸比正义单链寡核苷酸显示出更高的插入效率^[25]。因此在使用 ssODN 作为供体模板时也选择了 gRNA 的反义链，将一个碱基的改变包含在 ssODN 的中央，并在两端各包含 46 bp 的同源序列，实验证明这种设计是成功的。

在小鼠胚胎移植时，本研究对移植方法做了优化，将自然发情的受体雌鼠与未接扎雄鼠进行交配，隔天将见阴道栓雌鼠作为受体。移植时，将胚胎移入一侧输卵管膨大部，并将另一侧输卵管膨大部划破以释放自然受精卵。通过一次胚胎注射实验，移植 1 只受体就获得 tau-V337M 基因定点突变小鼠，这既说明 Cas9 基因编辑技术在制作 KI 动物模型的高效性，也说明自然胚胎有利于帮助发育差的胚胎移植后建立妊娠。这项技术改进可以有利于解决基因编辑后胚胎发育率低所导致的难以获得突变品系的问题。

链交换蛋白 Rad51 在同源重组中起核心作用，可促进 ssODN 与同源双链 DNA 模板之间

形成物理连接，诱导异源双链 DNA 的产生。有研究表明，Rad51 激活剂 RS-1 的体外应用可将不同基因座的敲入效率提高 2 至 5 倍^[26]；David R. Liu 团队研究表明，将单切口酶与 hRad51 变体融合产生的 hRad51-Cas9 (D10A) 融合物，可介导 HDR 同时降低 indel^[27]。本研究的数据表明，Rad51 可显著增强重组效率，提高基于 ssODN 的 HDR。同时，研究还发现 Rad51 的加入不仅能提高效率，还会增加 Cas9 切割造成的删除、插入突变类型的复杂程度，其中具体的机制还需要深入研究。

脱靶是 Cas9 技术的固有技术缺点，会对动物表型的鉴定带来潜在的不利影响。在软件预测的基础上选择 3 个潜在脱靶位点进行分析，结果显示在 F0 和 F1 代模型鼠上均未发现脱靶。后续将继续把模型小鼠与野生型杂交繁殖 3 代，稀释其他潜在脱靶对动物表型的影响。

F0 代模型鼠病理学分析结果显示，在 6 月龄的 tau-V337M 点突变小鼠模型已出现 tau 蛋白过度磷酸化形成的神经纤维缠结细丝，且数量较多，这为获得的模型鼠的价值提供了佐证，通过繁殖有望获得发病早、症状重的 AD 小鼠模型。

本研究将 Cas9、ssODN 和 Rad51 组合，成功获得了 tau-V337M 突变小鼠模型。本研究的结果将为 AD 的研究提供新的动物模型，也为其他小鼠模型的建立提供参考。

REFERENCES

- [1] ZHANG TM, MA SH, LV JK, WANG XY, AFEWERKY HK, LI H, LU YM. The emerging role of exosomes in Alzheimer's disease[J]. Ageing Research Reviews, 2021, 68: 101321.
- [2] SORIA LOPEZ JA, GONZÁLEZ HM, LÉGER GC. Alzheimer's Disease[M]//Handbook of Clinical Neurology. Amsterdam: Elsevier, 2019: 231-255.
- [3] DeLa ROSA A, OLASO-GONZALEZ G, ARC-

- CHAGNAUD C, MILLAN F, SALVADOR-PASCUAL A, GARCÍA-LUCERGA C, BLASCO-LAFARGA C, GARCIA-DOMINGUEZ E, CARRETERO A, CORREAS AG, VIÑA J, GOMEZ-CABRERA MC. Physical exercise in the prevention and treatment of Alzheimer's disease[J]. *Journal of Sport and Health Science*, 2020, 9(5): 394-404.
- [4] Alzheimer's Association. 2021 Alzheimer's disease facts and figures[J]. *Alzheimer's & Dementia*, 2021, 17(3): 327-406.
- [5] BAJRACHARYA R, BRICI D, BODEA LG, JANOWICZ PW, GÖTZ J, NISBET RM. Tau antibody isotype induces differential effects following passive immunisation of tau transgenic mice[J]. *Acta Neuropathologica Communications*, 2021, 9(1): 1-13.
- [6] SINSKY J, PICHLEROVA K, HANES J. Tau protein interaction partners and their roles in Alzheimer's disease and other tauopathies[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(17): 9207.
- [7] CAMARGO LC, HONOLD D, BAUER R, SHAH NJ, LANGEN KJ, WILLBOLD D, KUTZSCHE J, WILLUWEIT A, SCHEMMERT S. Sex-related motor deficits in the tau-P301L mouse model[J]. *Biomedicines*, 2021, 9(9): 1160.
- [8] KEVIN H STRANG, TODD E GOLDE, BENOIT I GIASSON. MAPT mutations, tauopathy, and mechanisms of neurodegeneration[J]. *Laboratory Investigation*, 2019, 99(7): 912-928.
- [9] PAMPA SAHA, NILKANTHA SEN. Tauopathy: a common mechanism for neurodegeneration and brain aging[J]. *Mechanisms of Ageing and Development*, 2019, 178: 72-79.
- [10] YANAGISAWA D, HAMEZAH HS, PAHRUDIN ARROZI A, TOOYAMA I. Differential accumulation of tau pathology between reciprocal F1 hybrids of rTg4510 mice[J]. *Scientific Reports*, 2021, 11: 9623.
- [11] YANAGISAWA D, HAMEZAH HS, DURANI LW, TAGUCHI H, TOOYAMA I. Study of tau pathology in male rTg4510 mice fed with a curcumin derivative Shiga-Y5[J]. *PLoS One*, 2018, 13(12): e0208440.
- [12] KITAZAWA M, MEDEIROS R, LAFERLA FM. Transgenic mouse models of Alzheimer disease: developing a better model as a tool for therapeutic interventions[J]. *Current Pharmaceutical Design*, 2012, 18(8): 1131-1147.
- [13] BOWLES KR, SILVA MC, WHITNEY K, BERTUCCI T, BERLIND JE, LAI JD, GARZA JC, BOLES NC, MAHALI S, STRANG KH, MARSH JA, CHEN C, PUGH DA, LIU YY, GORDON RE, GODERIE SK, CHOWDHURY R, LOTZ S, LANE K, CRARY JF, et al. ELAVL4, splicing, and glutamatergic dysfunction precede neuron loss in MAPT mutation cerebral organoids[J]. *Cell*, 2021, 184(17): 4547-4563.e17.
- [14] KOMOR AC, KIM YB, PACKER MS, ZURIS JA, LIU DR. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage[J]. *Nature*, 2016, 533(7603): 420-424.
- [15] GAUDELLI NM, KOMOR AC, REES HA, PACKER MS, BADRAN AH, BRYSON DI, LIU DR. Programmable base editing of A•T to G•C in genomic DNA without DNA cleavage[J]. *Nature*, 2017, 551(7681): 464-471.
- [16] 董战旗, 秦琪, 张新铃, 李柯洁, 陈鹏, 潘敏慧. 家蚕 CRISPR/Cpf1 基因编辑系统建立[J]. *生物工程学报*, 2021, 37(12): 4342-4350.
- DONG ZQ, QIN Q, ZHANG XL, LI KJ, CHEN P, PAN MH. Development of a CRISPR/Cpf1 gene editing system in silkworm *Bombyx mori*[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2021, 37(12): 4342-4350 (in Chinese).
- [17] 尚利青, 宋绍征, 张婷, 严坤宁, 蔡何清, 袁玉国, 成勇. MSTN 基因突变纯合子兔的繁育和表型分析[J]. *生物工程学报*, 2022, 38(5): 1847-1858.
- SHANG LQ, SONG SZ, ZHANG T, YAN KN, CAI HQ, YUAN YG, CHENG Y. Propagation and phenotypic analysis of mutant rabbits with MSTN homozygous mutation[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2022, 38(5): 1847-1858 (in Chinese).
- [18] 曹颖, 钱若兰, 杨晨, 王存, 覃文新. CRISPR-Cas9 功能基因筛选技术在肝癌研究中的应用[J]. *中国细胞生物学学报*, 2022, 44(4): 663-671.
- CAO Y, QIAN RL, YANG C, WANG C, QIN WX. Application of CRISPR-Cas9 functional genetic screens in liver cancer[J]. *Chinese Journal of Cell Biology*, 2022, 44(4): 663-671 (in Chinese).
- [19] XUE CY, GREENE EC. DNA repair pathway choices in CRISPR-Cas9-mediated genome editing[J]. *Trends in Genetics*, 2021, 37(7): 639-656.
- [20] JIANG WH, LIU LL, CHANG QR, XING FY, MA ZW, FANG ZF, ZHOU J, FU L, WANG HY, HUANG XX, CHEN XJ, LI Y, LI SG. Production of Wilson disease model rabbits with homology-directed precision point mutations in the ATP7B gene using the CRISPR/Cas9 system[J]. *Scientific Reports*, 2018, 8: 1332.

- [21] GALLAGHER DN, PHAM N, TSAI AM, JANTO NV, CHOI J, IRA G, HABER JE. A Rad51-independent pathway promotes single-strand template repair in gene editing[J]. *PLoS Genetics*, 2020, 16(10): e1008689.
- [22] FERETZAKI M, POSPISILOVA M, VALADOR FERNANDES R, LUNARDI T, KREJCI L, LINGNER J. RAD51-dependent recruitment of TERRA lncRNA to telomeres through R-loops[J]. *Nature*, 2020, 587(7833): 303-308.
- [23] WILDE JJ, AIDA T, del ROSARIO RCH, KAISER T, QI PM, WIENISCH M, ZHANG QG, COLVIN S, FENG GP. Efficient embryonic homozygous gene conversion *via* RAD51-enhanced interhomolog repair[J]. *Cell*, 2021, 184(12): 3267-3280.e18.
- [24] 常秋荣, 刘丽丽, 王会阳, 付丽, 邢凤英, 李垚, 陈学进, 李善刚. 利用 CRISPR-Cas9 敲除 Tyr 基因制作白化 C57BL/6N 小鼠[J]. *中国实验动物学报*, 2019, 27(4): 493-500.
- CHANG QR, LIU LL, WANG HY, FU L, XING FY, LI Y, CHEN XJ, LI SG. The albino C57BL/6N mice were produced by using CRISPR-Cas9 to knock out *Tyr* gene[J]. *Chinese Journal of Experimental Animals*, 2019, 27(4): 493-500 (in Chinese).
- [25] OKAMOTO S, AMAISHI Y, MAKI I, ENOKI T, MINENO J. Highly efficient genome editing for single-base substitutions using optimized ssODNs with Cas9-RNPs[J]. *Scientific Reports*, 2019, 9(1): 4811.
- [26] SONG J, YANG DS, XU J, ZHU TQ, CHEN YE, ZHANG JF. RS-1 enhances CRISPR/Cas9- and TALEN-mediated knock-in efficiency[J]. *Nature Communications*, 2016, 7: 10548.
- [27] REES HA, YEH WH, LIU DR. Development of hRad51-Cas9 nickase fusions that mediate HDR without double-stranded breaks[J]. *Nature Communications*, 2019, 10: 2212.

(本文责编 郝丽芳)