

DOI: 10.13376/j.cbbls/2014048

文章编号: 1004-0374(2014)04-0325-04

· 发现的历程 ·



编者按: 早在 2001 年 1 月, 美国科学家在 *Science* 上报道了世界上第一只转基因恒河猴, 他们利用慢病毒转染法成功地将绿色荧光蛋白 (GFP) 转入恒河猴早期胚胎, 并通过胚胎移植获得了 GFP 整合和表达的转基因猴 ANDi, 这是转基因技术在非人灵长类上的首次成功尝试。2008 年, Shang-Hsun Yang 等人成功构建出了亨廷顿疾病 (HD) 的转基因恒河猴模型, 作者将 84 个 CAG 重复序列连接到人 HTT 基因第一个外显子上, 并将其包装成高滴度的慢病毒粒子 (滴度 >10<sup>9</sup> PFU/mL) 后, 在卵母细胞带下注射病毒后再进行单精注射受精和胚胎移植, 成功得到了第一个转基因非人灵长类疾病模型。然而, 通过慢病毒介导的方式产生的转基因动物, 外源基因的随机插入使得它的表达和功能的实现具有一定的不确定性。在灵长类动物中, 由于技术限制无法通过与大小鼠同样的技术路线获得精确基因修饰的动物。以 TANLENs、CRISPR/Cas9 技术为代表的人工核酸酶

介导的基因组编辑技术的诞生, 使得在灵长类动物中实现精确基因修饰成为可能。季维智研究员团队与南京医科大学沙家豪教授和南京大学黄行许教授团队密切合作, 成功运用 Crispr/Cas9 技术获得了世界上首例基因定向敲除食蟹猴, 证实了 CRISPR/Cas9 系统可以在灵长类动物中很好地工作, 并产生活体动物。这为灵长类疾病动物模型的发展奠定了良好的基础。

## 灵长类动物的基因定向修饰

### ——记运用 CRISPR/Cas9 技术获得基因定向敲除食蟹猴

牛显宇

(云南中科灵长类生物医学重点实验室, 昆明 650500)

动物转基因技术的诞生和发展为生物医学的基础与应用研究提供了新的途径。在生物医学的研究中, 已建立了数千种与发育和疾病相关的转基因小鼠, 这使得人们得以对基因在发育调控中的作用、疾病的认识以及新疗法的开发有了新的研究手段和平台。但是, 由于啮齿类与人类之间存在较大的种属差异, 这限制了其在模拟人类相关生长发育和疾病时的有效性。与小鼠比较而言, 非人灵长类, 如猕猴, 在生理、神经和基因序列等方面与人类有更高的相似性。猕猴大脑在解剖学上与人类有着极高的相似性, 因此它是许多复杂神经系统疾病最为适合并且不可替代的动物模型。2001 年在美国诞生的全球第一只转基因猕猴表明, 猕猴的基因组可以被进行人为修饰。这一标志性成果开创了应用转基因

因灵长类动物的新局面, 使人们能够获得遗传背景改变了的转基因灵长类动物, 从而使转基因灵长类动物在生理或基因组的层面上表现出人类疾病的症状<sup>[1]</sup>。转基因猕猴除了在了解发病机理方面有作用外, 还可以作为一种潜力巨大的动物模型, 用于疾病相关生物标志物的发现、新型药物治疗效果的评价和新的治疗手段的建立等。灵长类动物转基因技术是通过将特定的外源基因导入动物的受精卵, 再通过辅助生殖技术产生带有特定基因的动物。由此产生的转基因动物, 外源基因是随机插入到宿主的基因组当中, 它的表达和功能的实现具有一定的不

收稿日期: 2014-03-06; 修回日期: 2014-04-14

\*通信作者: E-mail: niuyy@kbimed.com

确定性,这就在一定程度上限制了动物模型的有效应用。在大小鼠中,通过基于胚胎干细胞的基因打靶技术或是体细胞核移植技术,已经可以获得对特定基因进行精确修饰的转基因动物,实现对目标基因的敲除或敲入。然而,在灵长类动物中,由于胚胎干细胞和体细胞核移植技术尚不成熟,因此无法通过同样的技术路线获得精确基因修饰的动物。

近几年来,科学家一直在寻求更加精确的方法对特定的基因进行敲除或者靶向修饰。2011年,人工核酸酶介导的基因组编辑技术被 *Nature Methods* 杂志评选为年度最受关注的技术成果,这其中包括已经得到广泛运用的锌指核酸酶(zinc finger nucleases, ZFNs)和转录激活因子样效应物核酸酶(transcription activator-like effector nucleases, TALENs)技术。在随后的2012年和2013年,TALENs技术和另一项全新技术CRISPR/Cas9被 *Nature* 杂志评选为年度十大技术突破。CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats)/Cas9(CRISPR-associated sequences)系统是一个天然存在的原核生物RNA干扰系统,其介导的基因组编辑是由向导RNA(guide RNA, gRNA)指导的,由Cas9蛋白实现对DNA的切割<sup>[2]</sup>。CRISPR/Cas9的构建仅仅需要设计与靶序列互补的RNA即可,过程相对于TALEN更为简单和廉价,普通的实验室也可以自行完成构建,这大大提高了基因操作的效率及简便性。

CRISPR/Cas9出现后,已经先后在人类细胞、斑马鱼和大小鼠等物种上被有效应用,基于此,我们不难想到,这是否为灵长类动物的基因修饰打开一扇新的大门?

灵长类动物,例如猕猴,由于其饲养繁殖较为困难,对设施的硬件要求和管理规范有较高的要求。此外,对于灵长类动物生殖生物学、发育生物学和生理学的系统研究远不如大小鼠上成熟,加之其成熟时间和繁殖周期长,因此决定了灵长类动物转基因研究是一项相对复杂的综合性科学。本课题组自2000年起开始猕猴生殖生物学的研究,先后建立了卵母细胞体外成熟、超数排卵、体外受精、胚胎体外培养、胚胎移植以及动物饲养繁殖等关键技术、实验体系和实验动物平台,并在2010年<sup>[1]</sup>首次报道了我国首例转基因猕猴,运用慢病毒为载体,成功将绿色荧光蛋白(GFP)基因转入到猕猴基因组内,获得了携带GFP基因的转基因猕猴。随后的几年里,我们不断地通过技术改进和设施建设提高灵长类转

基因实验研究平台的水平,这些积累使得我们得以顺利地将CRISPR/Cas9技术运用到灵长类动物中来。在本研究中,我们与南京医科大学沙家豪教授和南京大学黄行许教授团队密切合作,成功产生了CRISPR/Cas9技术获得基因定向敲除食蟹猴。

首先,我们需要选择将要进行靶向修饰的基因。在本次研究中,我们选择了Nr0b1 (nuclear receptor subfamily 0 group b member 1)、PPAR- $\gamma$  (peroxisome proliferator-activated receptor gamma)和Rag1 (recombination activating gene 1)三个基因,它们分别与性别决定、代谢系统和免疫系统疾病有密切关系。我们一共设计了5个gRNA,其中2个针对Nr0b1基因,2个针对PPAR- $\gamma$ 基因,1个针对Rag1基因。随后,在进行动物体内实验之前,我们需要对每个基因的CRISPR/Cas9的工作效率进行验证,这包括细胞水平和胚胎水平两个实验,实验的目的是确定所设计的CRISPR/Cas9是否能够有效作用于灵长类动物细胞,是否有较好的敲除效率。当CRISPR/Cas9系统作用于灵长类动物胚胎时,在保证一定的敲除效率的同时,是否对胚胎的着床前发育产生负面的影响?在细胞水平实验中,我们选择来自于非洲绿猴的cos-7细胞系作为对象,将三个基因的gRNA与Cas9 RNA共转染cos-7细胞,随后的分析确认,我们设计的CRISPR/Cas9系统是可以有效地在灵长类动物细胞中工作的,5个gRNA的突变效率分别是Nr0b1-sgRNA1 22.2%、Nr0b1-sgRNA2 20%、PPAR- $\gamma$ -sgRNA1 10%、PPAR- $\gamma$ -sgRNA2 25%和Rag1-sgRNA 23.8%。在证实了CRISPR/Cas9系统可以很好地作用于灵长类动物细胞后,我们需要进一步确认其在着床前胚胎的工作状态。我们将5个gRNA和Cas9 RNA混合后注射到22个食蟹猴一细胞胚胎中,经过约5~6 d的体外培养,其中15个胚胎最终发育至桑椹胚和囊胚阶段,从发育情况来看,这样的发育能力和正常未作处理的胚胎大致一致,说明注射CRISPR/Cas9系统并不影响胚胎本身的早期发育。随后我们对这15个胚胎进一步进行基因突变分析,结果发现不同的gRNA有着不同的敲除效率,总的来看,目标基因均出现缺失或是随机插入的现象,片段大小在-30 bp~6 bp之间。三个基因在胚胎水平的敲除效率分别是Nr0b1 26.7% (4/15), PPAR- $\gamma$  46.7% (7/15)和Rag1 60% (9/15)。同时我们还发现,在15个被检测的胚胎中,有6个胚胎发生了PPAR- $\gamma$ 和Rag1基

因被同时敲除，有 2 个胚胎 Nr0b1 和 Rag1 基因被同时敲除。这些证据说明 CRISPR/Cas9 系统可以很好地作用于灵长类动物着床前胚胎。

有了这些工作基础，我们就可以开始基因靶向修饰动物的工作。整个工作流程如图 1 所示，首先，通过单精注射的方式获得受精的食蟹猴一细胞胚胎，然后在体外培养大约 9 h 后，将三个靶基因的 5 种 gRNA 与 Cas9 RNA 同时注射到一细胞胚胎的细胞质内。随后，注射后的胚胎在体外培养 1~2 d，胚胎发育至 4~16 细胞时，我们会选择适合的受体动物进行胚胎移植，通常情况下，每三个胚胎会被移植到一个受体体内。胚胎移植后约 20 d，通过激素测定和超声波诊断来确认动物是否受孕成功，成功受孕的受体动物将经历 150 d 左右的妊娠期，直至小猴诞生。我们此次研究，一共进行了 186 枚胚胎的 CRISPR/Cas9 系统注射，随后将其中的 83 枚胚胎移植到 29 个受体动物。最终确认有 10 只动物怀孕成功，怀孕动物中有 3 个双胞胎，3 个三胞胎和 4 个单胎。截止文章发稿时，有一对双胞胎小猴顺利出生，我们第一时间对小猴的脐带、胎盘以及皮肤组织进行了分析，结果非常令人振奋，两只小猴均为阳性，并且实现了 PPAR- $\gamma$  和 Rag1 基因的双

敲除。在两个动物中我们都没有发现 Nr0b1 基因有被敲除的证据，这也和此前在胚胎水平突变效率较低的检测结果保持一致。

CRISPR/Cas9 系统存在的一定脱靶效应一直是研究人员关注的重点，此前的一些研究中也不断地证实这一系统存在一定的脱靶效率。为了确认新生小猴是否同样存在 CRISPR/Cas9 系统脱靶的情况，根据我们所设计的 gRNA 序列，我们对食蟹猴基因组进行了扫描分析，预测了 84 个可能的脱靶位点，随后我们对每一个位点进行相同的突变分析，并没有发现任何脱靶现象。这似乎也说明，脱靶现象是可以通过优化 CRISPR/Cas9 系统的设计来降低甚至避免的。

正如我们前面提到的，灵长类动物生长周期和繁殖周期较长，尽管我们已经确定新生的小猴是经过基因定点修饰的食蟹猴，然而，目前我们尚不能明确这些修饰是否会产生如同我们预想的效应，被敲除基因后动物是否会出现显著的疾病表型或是发育异常，随着动物的生长发育，这些都需要在接下来的工作中来一一解答。但不可否认，两只基因定点修饰小猴的诞生证实了 CRISPR/Cas9 系统可以在灵长类动物中很好地工作，并且可产生活体动物。

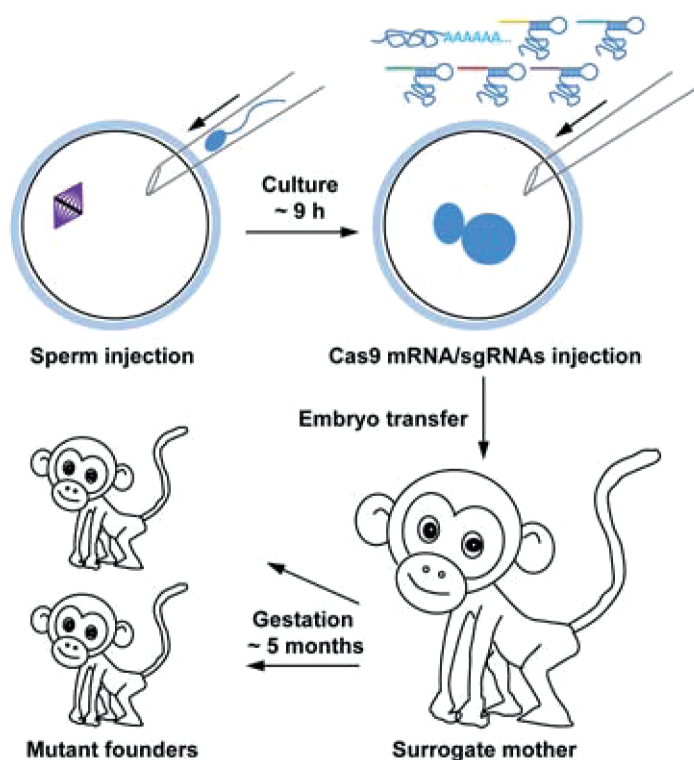


图1 运用CRISPR/Cas9系统获得基因靶向修饰食蟹猴技术路线图<sup>[4]</sup>

相信在不远的未来,我们可以利用此项技术建立准确模拟人类重大疾病的动物模型用于新药研发和疾病机理研究,或许基于这一技术的基因治疗也将会得以实现。

**致谢:**感谢季维智研究员、沙家豪教授和黄行许教授对本工作的悉心指导和支持。感谢陈永昌、沈彬、崔益强、康宇及所有工作人员的团结协作和不懈努力。

#### [参 考 文 献]

- [1] Chan AW, Chong KY, Martinovich C, et al. Transgenic monkeys produced by retroviral gene transfer into mature oocytes. *Science*, 2001, 291(5502): 309-12
- [2] Mali P, Esvelt KM, Church GM. Cas9 as a versatile tool for engineering biology. *Nat Methods*, 2013, 10(10): 957-63
- [3] Niu Y, Yu Y, Bernat A, 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
- [4] Niu Y, Shen B, Cui Y, et al. Generation of gene-modified cynomolgus monkey via Cas9/RNA-mediated gene targeting in one-cell embryos. *Cell*, 2014, 156(4): 836-43