

DOI: 10.13376/j.cblls/2015208

文章编号: 1004-0374(2015)12-1489-05

· 发现的历程 ·



**编者按:**小鼠单倍体胚胎干细胞系的建立为遗传学的正反向筛选提供了一种简便而又有效的工具。除此之外,孤雄单倍体胚胎干细胞能替代精子使卵母细胞“受精”这一特性,更是实现了从细胞水平向动物水平的完美转变。无论是从制备多基因遗传操作动物模型的角度,还是在小鼠个体水平遗传筛选的层面,孤雄单倍体胚胎干细胞的出现都将为基因功能学研究带来新的生命力。然而,孤雄单倍体的“受精”能力极其有限,其产生健康半克隆小鼠的效率仅约2%,这也成为孤雄单倍体在个体水平广泛应用所面临并且亟需突破的一大瓶颈。通过正反面的实验验证,中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所李劲松课题组发现,雄性印记区域 *H19-DMR* 和 *IG-DMR* 的异常去甲基化是半克隆小鼠发育异常的“祸根”。通过敲除这两个 *DMR*,成功将半克隆小鼠的出生效率提高至20%,为利用孤雄单倍体获得多基因遗传操作动物模型提供了最根本有力的保障。最后,结合 *CRISPR-Cas9* 技术,他们创建了孤雄单倍体的 *sgRNA* 文库,并成功将此“细胞文库”转化成携带基因突变的“小鼠文库”,由此创建了“个体水平”遗传筛选的新方法、新思路。

## “人造精子”与 *CRISPR-Cas9*

钟翠青\*, 李劲松

(中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所, 上海 200031)

近几年,小鼠单倍体胚胎干细胞的相关研究进行得如火如荼。2011年, Anton Wutz 和 Josef M. Penniger 两个研究团队相继建立了小鼠的孤雌单倍体胚胎干细胞,并成功将这种单倍体细胞运用于遗传学的正向和反向筛选<sup>[1-3]</sup>。随后,李劲松研究员和周琪研究员带领的研究团队先后在体外获得了小鼠的孤雄单倍体胚胎干细胞<sup>[4-5]</sup>。研究表明,这种孤雄单倍体可以通过卵母细胞注射的方法(称为 *ICAHCI* 技术)代替精子使卵母细胞发生“受精”,进而产生后代——半克隆小鼠(*SC* 小鼠)。因此,这种孤雄单倍体胚胎干细胞也被称作“人造精子”,这一技术也称为半克隆技术。众所周知,传统的基因打靶是在胚胎干细胞水平进行遗传操作,而后通过囊胚注射的方法实现生殖系的传递进而获得遗传修饰的动物模型。而体外建立的孤雄单倍体同样具有胚胎干细胞所具有的特性。因此,这种单倍体胚胎干细胞也可以在体外进行任意的遗传修饰,进而

通过卵母细胞注射的方法进一步得到遗传修饰的小鼠模型。利用此方法可以减少后代反复交配所耗费的时间和产生的工作量。然而,研究发现 *ICAHCI* 产生半克隆小鼠的效率极低,并且进行遗传操作之后孤雄单倍体的“受精”能力会进一步下降,这让孤雄单倍体在制备遗传操作小鼠上的运用遇到了一个无法逾越的障碍<sup>[4-6]</sup>。

与此同时, *CRISPR-Cas9* 技术的出现为实现基因编辑的高效性和简便性带来了光明,也大大推进了基因功能学研究的进程<sup>[7-9]</sup>。利用 *CRISPR-Cas9* 技术可以轻而易举地实现细胞水平上基因编辑的同时,也可以通过受精卵胞浆注射的方法快速获得遗传修饰的动物个体<sup>[10]</sup>。然而,利用 *CRISPR-Cas9* 制备动物模型也存在一些问题,例如遗传操作的动物模型在  $F_0$  代存在基因型的不确定性,存在很高

收稿日期: 2015-11-27

\*通信作者: E-mail: zhongcuiqing@sibcb.ac.cn

比例的基因型嵌合；此外，一次性制备多基因编辑的动物模型也较为困难和繁琐等。然而，利用孤雄单倍体干细胞的渠道，可以在胚胎干细胞水平对基因组进行任意的编辑，例如基因的敲除和敲入，然后通过 ICAHCI 技术将细胞水平上相应的基因修饰进一步转化成动物模型，尤其是在获得多基因敲入小鼠上的优势显现得更加突出。因为无论是利用传统的基因打靶还是 CRISPR-Cas9 的方法，都会在生殖系传递交配过程发生基因型分离。倘若能突破半克隆小鼠出生效率低的瓶颈，这将会大大简化和缩短获得无嵌合及多基因遗传修饰动物模型所需的操作流程和时间。

近期，CRISPR-Cas9 文库的产生及其细胞水平的大规模筛选将 CRISPR-Cas9 技术推向一个更高的层次<sup>[11-13]</sup>。研究者将 CRISPR-sgRNA 文库通过病毒的方式导入到细胞中，利用 sgRNA/Cas9 复合物对基因组的切割能力，在全基因组水平中实现基因的功能缺失，进而对细胞的生物学过程进行大规模的遗传学筛选。然而，假若生物学过程的研究能够从“平面”的细胞上升到“立体”的个体水平，即在个体的层面上进行生理过程的揭示和阐述，对还原生命的发生过程及其本质更具有指导意义。目前，CRISPR-Cas9 文库实现的种种筛选大部分仍只能停留在细胞水平的层面上，很难模拟生物个体中生物学过程发生的复杂性以及真实性。而 2015 年 3 月 Phillip Sharp 与张峰研究团队在 *Cell* 杂志上首次运用 CRISPR-Cas9 文库，以小鼠的肺癌为模型，进行动物组织水平的大规模遗传筛选，为 CRISPR-Cas9 在动物体内的遗传学筛选开启了新的大门<sup>[14]</sup>。研究者利用 Cas9 表达的小鼠为载体，其肺癌的发生和转移为研究目标，CRISPR-sgRNA 文库为手段，研究小鼠肺癌发生与转移的“制造者”。通过将突变的细胞文库移植到小鼠中，研究者时刻追踪小鼠的肿瘤形成以及转移情况，然后对形成的肿瘤所携带的 sgRNA 进行测序。最终，研究者获得了一些导致肺癌发生和转移的已知基因，同时挖掘出一些可能诱发肺癌发生和转移的未知基因。这些未知基因也通过小文库的方式得到了进一步的验证。很显然，这种动物组织水平的遗传筛选比细胞层面的筛选更有优势。首先，小鼠的肺癌发生和转移无法在体外进行模拟；其次，对于癌症的发生来说，生物个体的微环境极其重要。倘若能够运用 CRISPR-Cas9 文库实现一个小鼠个体的全文库或者小文库遗传学筛选，这将对生命科学的研究产生重要而又深远的影

响。目前，利用 CRISPR-Cas9 文库进行个体水平的遗传学筛选依旧是一个空白。因为仅采用目前的受精卵胞浆注射 sgRNA 文库的方法获得小鼠个体文库是非常耗时费力的。那么，如果能寻找到一个“中间体”，既能够携带 sgRNA 文库，又能将所携带的文库进一步转化成小鼠文库，那么就真正能够实现哺乳动物个体水平的遗传筛选，从而填补生命科学研究手段的一个空白。很显然，本实验室所建立的小鼠孤雄单倍体胚胎干细胞系将是一个极其有效的“媒介”。首先，这种细胞是胚胎干细胞，具有胚胎干细胞无限增殖和胚层分化的特性，因此可以在细胞水平进行 CRISPR-Cas9 文库的导入和筛选。除此之外，这种细胞系是“单倍体”，可以像精子一样让卵母细胞发生“受精”，如此，就能有效地将细胞水平的遗传操作传递给动物个体。

然而，无论是利用孤雄单倍体胚胎干细胞获得遗传操作模型，还是实现小鼠个体文库的遗传筛选，都应该以半克隆技术能高效产生小鼠为前提。因此，寻找到导致半克隆小鼠出生效率低以及建立提高小鼠出生率的对策迫在眉睫。

之前的研究结果已经提示了半克隆小鼠发育异常的原因：即 *H19*-DMR 区域的甲基化无论在细胞还是异常的半克隆小鼠中均出现异常的擦除<sup>[4]</sup>。而小鼠的孤雄单倍体胚胎干细胞所有的遗传物质来源于精子，并且部分保留了精子所具有的表现遗传特性，包括基因印记。*H19*-DMR 和 *IG*-DMR 是雄性印记中两个极其重要的印记区域<sup>[15-16]</sup>，其在父本中表现为 DNA 的甲基化状态，在母本中则相反。这两个甲基化差异区域 (DMR) 的甲基化异常能够阻碍小鼠的正常胚胎发育，之前的研究也进一步表明 *H19*-DMR 和 *IG*-DMR 的敲除可以有效提高孤雌小鼠的出生率<sup>[17-18]</sup>。实验结果显示，伴随着孤雄单倍体胚胎干细胞的建立和体外传代培养，*H19*-DMR 的甲基化出现异常的擦除，并且在发育到期的 SC 小鼠中，正常的 SC 小鼠 *H19*-DMR 的甲基化表现出正常的甲基化水平，而生长阻滞型的 SC 小鼠则无一例外地发生了异常的 DNA 去甲基化。*H19*-DMR 的去甲基化能够直接影响 *H19-Igf2* 印记簇 *H19* 和 *Igf2* 的正常表达，进而影响半克隆胚胎的正常发育。倘若将 *H19*-DMR 敲除，理论上可以部分模拟 *H19*-DMR 发生甲基化的状态。因此，本课题组从 *H19*-DMR 敲除的小鼠<sup>[19]</sup> 的精子中建立了 3 株 *H19*-DMR KO (*H19*<sup>ΔDMR</sup>) 的孤雄单倍体胚胎干细胞，并且通过 ICAHCI 技术产生半克隆小鼠。结果

表明: *H19*-DMR KO 的 AG-haESCs 能够提高正常 SC 小鼠的出生效率, 出生率在 4%~12% 之间浮动。实验还发现, 3 株 *H19*-DMR KO 的 AG-haESCs 产生 SC 小鼠的效率大相径庭。2 株 *H19*-DMR KO 的 AG-haESCs 产生 SC 小鼠的效率只有 4% 左右, 并且产生的 SC 小鼠中 1/2 为生长发育阻滞的小鼠, 即出生时或出生后 1 h 内死亡。而另外一株 *H19*-DMR KO 的 AG-haESCs 获得 SC 小鼠的效率高达 12%, 并且其早期代数产生的 SC 小鼠基本都是健康的, 但随着细胞传代次数增加, 逐渐出现生长阻滞型的 SC 小鼠。针对另一个重要的雄性印记 *IG*-DMR 进行甲基化分析, 结果发现 *H19*-DMR KO 的 AG-haESCs 其 SC 小鼠出生效率与 *IG*-DMR 的甲基化程度呈正相关。*H19*-DMR KO 的 AG-haESCs 其 *IG*-DMR 甲基化维持的越好对其产生 SC 小鼠越有利, 而细胞的不断传代和培养所导致的 *IG*-DMR 甲基化逐渐丢失, 会直接影响 SC 小鼠的正常发育。与此同时, 本课题组对这些发育异常的 SC 小鼠进行 *IG*-DMR 的甲基化分析, 以及对 SC 小鼠不同器官组织中 *IG*-DMR 在 *Dlk1*-*Dio3* 印记簇的相关印记基因进行表达水平分析, 结果发现: 异常小鼠的 *IG*-DMR 甲基化出现严重擦除, 伴随着相应印记基因的表达水平发生异常的上下调。这些结果表明: 在 *H19*-DMR 敲除的情况下, *IG*-DMR 的异常凸显出来, 进而阻碍半克隆胚胎的正常发育。因此, 本课题组采用 CRISPR-Cas9 的方法在 *IG*-DMR 的上下游分别设计一个 sgRNA 以实现 *IG*-DMR 的敲除。在获得这种 *H19*<sup>ΔDMR</sup>-*IG*<sup>ΔDMR</sup>-AGH (DKO-AG-haESCs) 双敲的孤雄单倍体胚胎干细胞之后, 进行 ICAHCI 实验以监测 SC 小鼠的出生情况。研究发现: SC 小鼠的出生效率提升至高达 20% 左右, 与球形精子进行卵细胞注射获得后代的效率 (26%) 较接近。为了进一步验证实验结果, 本课题组利用 *IG*-DMR KO 的小鼠精子<sup>[20]</sup> 建立 *IG*-DMR KO (*IG*<sup>ΔDMR</sup>) 的孤雄单倍体胚胎干细胞系, 然而其 SC 的出生效率只有 1%~2%。在此基础上, 采用相同的策略敲除 *H19*-DMR, 并在获得 *IG*<sup>ΔDMR</sup>-*H19*<sup>ΔDMR</sup>-AGH (DKO-AG-haESCs) 的孤雄单倍体胚胎干细胞后进行 ICAHCI, 其产生 SC 的效率也是 20% 左右。之前的研究表明: 后期代数并且进行基因打靶的孤雄单倍体很容易丧失产生 SC 小鼠的能力。因此通过 CRISPR-Cas9 方法, 对已经无法产生 SC 小鼠的 AG-haESCs 进行 *H19*-DMR 和 *IG*-DMR 的敲除, 发现其产生半克隆小鼠的能力获得恢复, 效率在 18%

左右。由此可见, *H19*-DMR 和 *IG*-DMR 的异常甲基化是孤雄单倍体胚胎干细胞高效产生半克隆小鼠的两大障碍<sup>[20]</sup>。同样, *H19*-DMR 和 *IG*-DMR 对于胚胎发育的重要性在本课题组后续的关于卵子来源孤雌单倍体胚胎干细胞高效产生半克隆小鼠的工作中得到进一步的证实<sup>[22]</sup>。

既然双敲的孤雄单倍体 (DKO-AG-haESCs) 具有高效产生 SC 小鼠的能力, 那么之前关于孤雄单倍体应用的所有设想都能得以实现。为了验证这些设想, 本课题组首先在 DKO-AG-haESCs 水平上进行多基因遗传操作。结合 CRISPR-Cas9 手段, 分别敲除 DKO-AG-haESCs 的 Tet 家族 (Tet1、2、3) 和 p53 家族 (p53、p63、p73), 然后通过 ICAHCI 一步获得 Tet 家族 (Tet1、2、3) 和 p53 家族 (p53、p63、p73) 三基因杂合敲除的 SC 小鼠。除此之外, 还尝试在 DKO-AG-haESCs 上实现精确基因编辑, 在 Tet 家族的成员 Tet1、2、3 末尾分别敲入不同的荧光报告蛋白, 并获得多基因敲入的 SC 小鼠。而且研究发现, 这些不同的基因编辑对 DKO-AG-haESCs 获得 SC 小鼠的效率并无影响。

最后, 为了实现 CRISPR-Cas9 所介导的动物个体水平遗传学筛选, 本课题组将 CRISPR sgRNA 文库通过慢病毒的方式导入到单倍体, 并尽量保证每个细胞携带一个针对不同基因的 sgRNA, 由此得到 CRISPR sgRNA 的细胞文库。为了实现基因突变, 通过细胞瞬转 Cas9 表达质粒的方法实现了 Cas9 在细胞的表达与基因突变, 然后通过 ICAHCI 的方法一步获得携带不同突变的杂合子小鼠文库。由于在遗传筛选过程中, 很多基因为隐性基因, 因此本课题组希望获得双等位基因突变的小鼠文库。为此, 采用将已经瞬转 Cas9 并发生突变的 sgRNA 单倍体文库进行 ICAHCI 获得半克隆胚胎, 并且通过在半克隆胚胎中注入 Cas9 mRNA 使卵母细胞的基因组 (sgRNA 来自于注入的单倍体细胞) 也发生突变, 进而一步得到双等位基因突变的 SC 小鼠文库。但是, 这种方法在操作上较为复杂。为了简化显微操作步骤, 首先建立 Cas9 稳定表达的单倍体细胞株, 并在此基础上感染 CRISPR sgRNA 的病毒文库, 获得 Cas9 和 sgRNA 均稳定表达的 DKO-AG-haESCs。由于注入卵母细胞的单倍体中携带 Cas9 和 sgRNA, 其能够进一步突变卵母细胞的基因组, 因此这种方法能够一步得到双等位基因的 SC 小鼠文库。

相比于目前已有获得遗传修饰小鼠模型的手段, 双敲的孤雄单倍体胚胎干细胞具有以下优势。

其一，遗传修饰的单倍体细胞可以进行预筛选和分析，以保证获得的 SC 小鼠是特定的目的遗传修饰，并且避免了 CRISPR-Cas9 受精卵浆注射所遇到的嵌合问题；其二，双敲的孤雄单倍体获得 SC 小鼠的效率和存活率很高，可以保证获得足够多的后代以满足表型的分析；其三，携带 CRISPR sgRNA 文库和 Cas9 表达的双敲单倍体细胞可以运用于个体水平的遗传学筛选。不同的 SC 小鼠可以通过同一对引物 PCR 测序的方法鉴定出其携带的 sgRNA，进一步通过分析该 sgRNA 针对的基因序列确定该小鼠是否发生基因突变。这类似于每个 SC 小鼠带有自己的“条形码”，只要知道这只小鼠携带的 sgRNA，就能分析出该小鼠携带何种基因突变。当然，目前利用单倍体干细胞与 CRISPR-Cas9 文库实现个体水平的遗传筛选也遇到了如下问题。(1) 获得的 SC 小鼠中双等位基因突变的效率还有待进一

步的提高。(2) 获得全基因的 SC 小鼠文库相当耗时费力，并且需要非常大的小鼠平台支持，对于单个实验室来说是不可行的。因此，建议采用小文库的方案会比较可行。(3) 后续的 SC 小鼠表现分析也较为复杂。除此之外，很多实验室需要一定的时间去掌握单倍体胚胎干细胞的培养和 ICAHCI 技术。总之，利用双敲孤雄单倍体胚胎干细胞产生多基因敲除或敲入的动物模型将会是一个很好的手段(图1)。尤其是，结合 CRISPR sgRNA 文库，双敲的单倍体可以作为一种强有力的“媒介”进行大规模筛选(包括研究发育、疾病发生等生物学过程)。

当然，最后，本课题组希望能够进一步揭示雄性印记区域 *H19*-DMR 和 *IG*-DMR 促进胚胎正常发育并高效产生 SC 小鼠的潜在机制，进而对印记基因存在的意义及其如何调控胚胎的发育有更加深刻的理解。

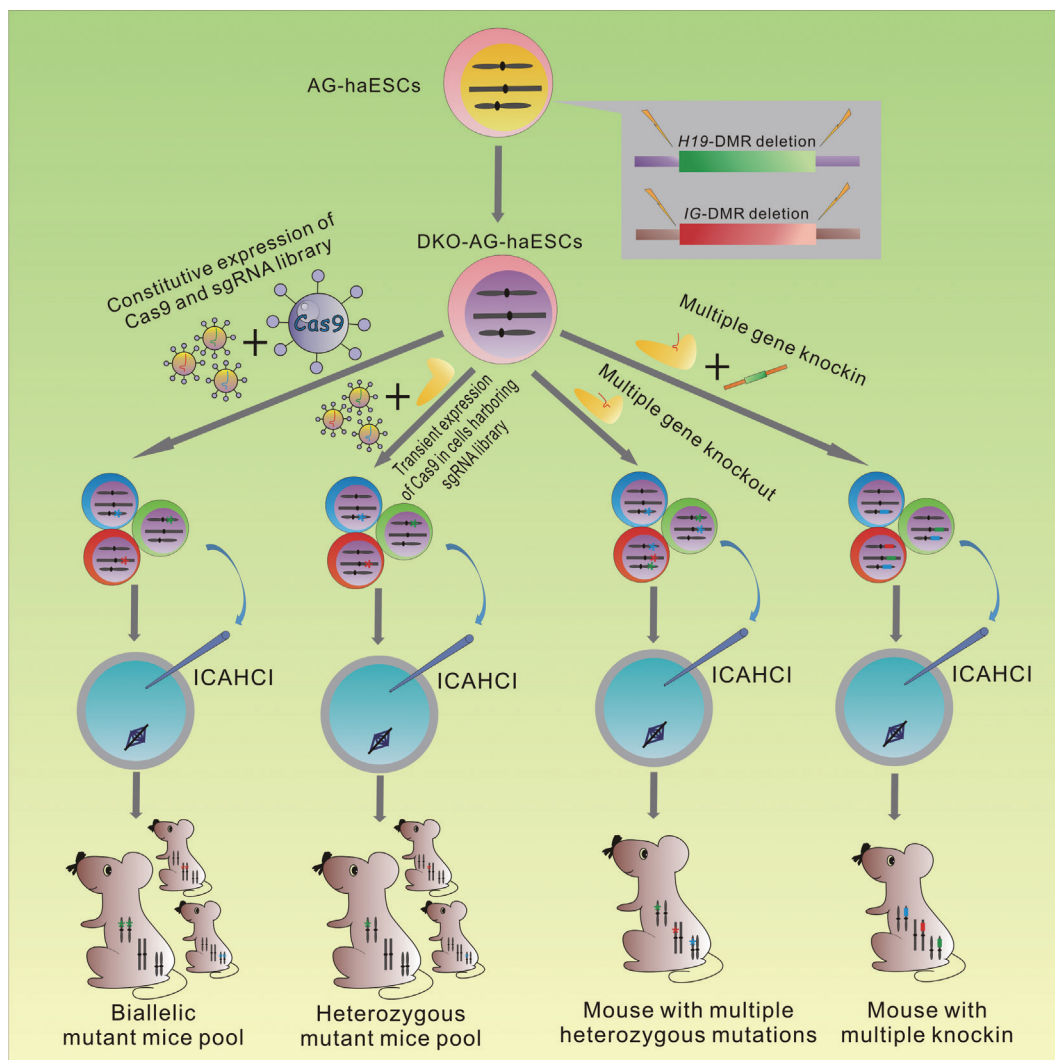


图1 双敲的孤雄单倍体胚胎干细胞有效运用于建立多基因遗传操作小鼠模型以及产生CRISPR-sgRNA小鼠文库

**致谢:** 感谢导师李劲松研究员, 感谢他为我的成长和课题进展倾注大量的心血。感谢实验室的副研究员吴宇轩老师、计算所的杨力研究员对工作的悉心指导与帮助。除此之外, 还需要感谢合作伙伴尹奇、谢振飞、白梅竹和董瑞, 正是我们之间相互默契的配合, 才使这项工作进展顺利并最终完成。

#### [参 考 文 献]

- [1] Leeb M, Wutz A. Derivation of haploid embryonic stem cells from mouse embryos. *Nature*, 2011, 479: 131-4
- [2] Elling U, Taubenschmid J, Wirnsberger G, et al. Forward and reverse genetics through derivation of haploid mouse embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*, 2011, 9: 563-74
- [3] Leeb M, Dietmann S, Paramor M, et al. Genetic exploration of the exit from self-renewal using haploid embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*, 2014, 14: 385-93
- [4] Yang H, Shi L, Wang BA, et al. Generation of genetically modified mice by oocyte injection of androgenetic haploid embryonic stem cells. *Cell*, 2012, 149: 605-17
- [5] Li W, Shuai L, Wan H, et al. Androgenetic haploid embryonic stem cells produce live transgenic mice. *Nature*, 2012, 490: 407-11
- [6] Shi L, Yang H, Li J. Haploid embryonic stem cells: an ideal tool for mammalian genetic analyses. *Protein Cell*, 2012, 3: 806-10
- [7] Doudna JA, Charpentier E. Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, 2014, 346: 1258-96
- [8] Cong L, Ran FA, Cox D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 2013, 339: 819-23
- [9] Mali P, Yang L, Esvelt KM, et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*, 2013, 339: 823-26
- [10] Wang H, Yang H, Shivalila CS, et al. One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell*, 2013, 153: 910-8
- [11] Shalem O, Sanjana NE, Hartenian E, et al. Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells. *Science*, 2014, 343: 84-7
- [12] Wang T, Wei JJ, Sabatini DM, et al. Genetic screens in human cells using the CRISPR-Cas9 system. *Science*, 2014, 343: 80-4
- [13] Koike-Yusa H, Li Y, Tan EP, et al. Genome-wide recessive genetic screening in mammalian cells with a lentiviral CRISPR-guide RNA library. *Nat Biotechnol*, 2014, 32: 267-73
- [14] Chen S, Sanjana NE, Zheng K, et al. Genome-wide CRISPR screen in a mouse model of tumor growth and metastasis. *Cell*, 2015, 160: 1246-60
- [15] Barlow DP, Bartolomei MS. Genomic imprinting in mammals. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2014, 6: a018382
- [16] Bartolomei MS. Genomic imprinting: employing and avoiding epigenetic processes. *Genes Dev*, 2009, 23: 2124-33
- [17] Kono T, Obata Y, Wu Q, et al. Birth of parthenogenetic mice that can develop to adulthood. *Nature*, 2004, 428: 860-4
- [18] Kawahara M, Wu Q, Takahashi N, et al. High-frequency generation of viable mice from engineered bi-maternal embryos. *Nat Biotechnol*, 2007, 25: 1045-50
- [19] Thorvaldsen JL, Mann MR, Nwoko O, et al. Analysis of sequence upstream of the endogenous H19 gene reveals elements both essential and dispensable for imprinting. *Mol Cell Biol*, 2002, 22: 2450-62
- [20] Lin SP, Youngson N, Takada S, et al. Asymmetric regulation of imprinting on the maternal and paternal chromosomes at the Dlk1-Gtl2 imprinted cluster on mouse chromosome 12. *Nat Genet*, 2003, 35: 97-102
- [21] Zhong C, Yin Q, Xie Z, et al. CRISPR-Cas9-mediated genetic screening in mice with haploid embryonic stem cells carrying a guide RNA library. *Cell Stem Cell*, 2015, 17: 1-12
- [22] Zhong C, Yin Q, Xie Z, et al. Parthenogenetic haploid embryonic stem cells efficiently support mice generation by oocyte injection. *Cell Res*, 2015 [Epub ahead of print]