运用CRISPR/Cas9技术构建PCSK9点突变家兔模型

严坤宁¹, 张 婷², 查艺闻¹, 梁景岩¹, 成 勇²

1. 扬州大学医学院 转化医学研究院 江苏省中西医结合老年病防治重点实验室, 江苏 扬州 225001
2. 扬州大学兽医学院 江苏省转基因动物制药工程研究中心, 江苏 扬州 225009

[摘 要] 目的:运用CRISPR/Cas9基因编辑技术构建前蛋白转化酶枯草溶菌素9(PCSK9)点突变家兔模型。方法:根据PubMed基因蛋白数据对人和兔的PCSK9蛋白功能区进行Blast分析,发现人PCSK9基因的386S(丝氨酸)氨基酸功能区与兔PCSK9基因的485S同源。根据家兔PCSK9基因的485S对应的碱基替换位置及序列分析结果设计3条单链向导RNA和1条单链寡核苷酸供体模板。将合成的单链向导RNA、Cas9 mRNA和单链寡核苷酸供体共同注射入家兔受精卵细胞质内并将胚胎移植入待孕母兔体内。对获得的F0代兔进行PCR、TA克隆、脱靶检测以鉴定PCSK9^{S386A}是否突变成功。利用获得的PCSK9^{S386A}基因点突变家兔进行繁殖,扩大群体。结果:共获得15只F0代兔,其中1只为PCSK9^{S386A}点突变纯合子,2只为PCSK9^{S386A}点突变杂合子,且该突变可以稳定遗传。结论:利用CRISPR/Cas9技术成功构建了PCSK9^{S386A}点突变家兔模型,为探究PCSK9功能减弱的分子机制,开发可靠、有效的诊断和治疗措施提供了良好的动物模型。

[关键词] 前蛋白转化酶枯草溶菌素9;点突变;CRISPR/Cas9;动物模型;新西兰兔
[中图分类号] R332 [文献标志码] A

Construction of PCSK9 point mutation rabbits using CRISPR/Cas9

YAN Kunning¹, ZHANG Ting², ZHA Yiwen¹, LIANG Jingyan¹, CHENG Yong²
(1. Key Laboratory of Geriatric Disease Prevention and Control of Jiangsu Province, Institute of Translational Medicine, School of Medicine, Yangzhou University, Yangzhou 225001, Jiangsu Province, China; 2. Jiangsu Provincial Research Center for Animal Transgenesis and Biopharming, College of Veterinary Medicine, Yangzhou University,

收稿日期:2020-11-09 接受日期:2021-03-30

基金项目:国家重点研发计划(2016YFE0126000);扬州大学大学生科技创新基金(X20190728)

第一作者:严坤宁,硕士研究生,主要从事动脉粥样硬化研究;E-mail: yankunning@126.com; <https://orcid.org/0000-0002-2447-1371>

通信作者:梁景岩,教授,博士生导师,主要从事心血管疾病研究;E-mail: jyliang@yzu.edu.cn; <https://orcid.org/0000-0002-9674-0235>. 成 勇,教授,博士生导师,主要从事胚胎学与基因工程研究;E-mail: chengyong@yzu.edu.cn; <https://orcid.org/0000-0001-5336-4893>

Yangzhou 225009, Jiangsu Province, China)

Corresponding authors: LIANG Jingyan, E-mail: jyliang@yzu.edu.cn, <https://orcid.org/0000-0002-9674-0235>; CHENG Yong, E-mail: chengyong@yzu.edu.cn, <https://orcid.org/0000-0001-5336-4893>

[**Abstract**] **Objective:** To establish a rabbit model of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) point mutation with CRISPR/Cas9 gene editing technique. **Methods:** According to the PubMed gene protein data, the PCSK9 protein functional regions of human and rabbit were analyzed by Blast. The 386S (Ser) amino acid functional region of human PCSK9 gene was homologous to the 485S of rabbit PCSK9 gene. Three small guide RNAs and one single-stranded donor oligonucleotide were designed according to the 485S base substitution position and sequence analysis of rabbit PCSK9 gene. The synthetic small guide RNAs, Cas9 mRNA and single-stranded donor oligonucleotide were co-injected into the cytoplasm of rabbit fertilized eggs and the embryos were transferred into the pregnant rabbits. PCR, TA cloning and off-target analysis were performed on the F0 rabbits to identify whether the PCSK9^{S386A} mutation was successful. **Results:** Fifteen F0 rabbits were obtained. The sequencing results showed that one of them was PCSK9^{S386A} point mutation homozygote and two of them were PCSK9^{S386A} point mutation heterozygotes, and the mutation could be stably inherited. **Conclusion:** The rabbit model of PCSK9^{S386A} point mutation was successfully constructed by CRISPR/Cas9 technique, which provides an animal model for exploring the molecular mechanism of impaired PCSK9 function and developing reliable and effective diagnosis and treatment measures.

[**Key words**] Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9; Point mutation; CRISPR/Cas9; Animal model; New Zealand rabbit

[J Zhejiang Univ (Med Sci), 2021, 50(2): 229-238.]

[**缩略语**] 前蛋白转化酶枯草溶菌素(proprotein convertase subtilisin/kexin, PCSK); 成簇的规律间隔的短回文重复序列(clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR); CRISPR关联(CRISPR associated, Cas); 寡核苷酸链(oligonucleotide chain, Oligo); 小向导核糖核酸(small guide RNA, sgRNA); 聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)

动脉粥样硬化是一种影响动脉壁的炎症性疾病,血脂异常是导致动脉粥样硬化性心血管疾病的重要原因之一^[1]。PCSK9是原蛋白转化酶家族中的第9个成员,其通过竞争肝表面的低密度脂蛋白受体抑制循环中低密度脂蛋白胆固醇的清除代谢,最终导致动脉粥样硬化形成^[2-3]。已有研究证明,PCSK9^{S386A}功能缺失型突变可以提高肝表面低密度脂蛋白受体的数量、减少低密度脂蛋白的内化^[4-6],但目前还缺少相关动物模型。家兔的解剖结构、循环生理功能、脂质代谢与人类类似,在心

血管研究中占据重要地位^[7-8]。本研究通过CRISPR/Cas9基因编辑工具,在家兔PCSK9基因上引入S386A这一功能缺失型突变,建立PCSK9^{S386A}点突变家兔模型,为研究PCSK9功能减弱对动脉粥样硬化发生发展的影响奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物

普通级新西兰白兔40只,雌兔5~12月龄,雄兔6~12月龄,体重2.5~3.5 kg,均购自江苏省扬州

市施桥镇运河种兔场。饲养条件:室温18~25℃,通风良好,相对湿度为40%~45%,光照适宜,喂颗粒饲料早晚各1次,饮水自由。所有实验用兔购买14 d后方可进行实验。本研究所用实验动物在苏州市君圣实验动物设备有限公司不锈钢笼具内饲养,经江苏省科学技术厅审批[SYXK(苏)2017-0044],所有实验操作均严格遵守实验动物使用标准操作规程和伦理道德。

1.2 主要试剂和仪器

CRISPR/Cas9二合一质粒试剂盒和RNA退火缓冲液为南京尧顺禹生物科技有限公司产品;无内毒素质粒小量提取试剂盒I和PCR纯化试剂盒为美国Omega公司产品;T4连接酶、pMD19-T载体和Solution I连接酶为日本TaKaRa公司产品;超保真DNA聚合酶为南京诺唯赞生物科技股份有限公司产品;体外转录试剂盒(TSK-101)为东洋纺(上海)生物科技有限公司产品;HiScribe T7 ARCA mRNA试剂盒为NEB(北京)有限公司产品;大肠埃希菌Trans 5α感受态细胞购自北京全式金生物技术有限公司;卵泡刺激素购自扬州市苏北人民医院。

荧光倒置显微镜和显微操作仪为德国Leica公司产品;拉针仪为美国Instrument公司产品;体视显微镜为麦克奥迪(厦门)医疗诊断系统有限公司产品;PCR基因扩增仪为美国Bio-Rad公司产品;DNA电泳仪和电泳槽为南京新校园生物技术研究产品;隔水式电热恒温培养箱为上海跃进医疗器械公司产品;核酸蛋白定量分析仪为杭州奥盛仪器有限公司产品;超净工作台为苏州净化仪器设备有限公司产品。

1.3 sgRNA及单链寡核苷酸的设计

根据PubMed基因蛋白数据对人和兔的PCSK9蛋白功能区进行Blast分析,发现人PCSK9的386S(丝氨酸)氨基酸功能区与兔PCSK9的485S同源。根据兔PCSK9的485S对应的碱基替换位置及序列分析结果设计3条sgRNA(sgRNA1、sgRNA2、sgRNA3)和1条提供替换碱基的单链寡核苷酸。根据确定的3个CRISPR序列,设计对应的3对互补引物,分别标记为引物1、引物2、引物3。

1.4 构建同时表达sgRNA和Cas9的二合一质粒

引物退火:将1 μL引物Oligo F、1 μL Oligo R和8 μL 1×退火缓冲液混合于PCR管内,在PCR仪中以每分钟1.5℃逐渐从95℃降至22℃,得到3

个sgRNA片段。连接:用T4 DNA连接酶将退火产物与YSY线性化二合一CRISPR/Cas9质粒(质粒引物为引物1、引物2、引物3,质粒载体序列暂不公开)连接,构建sgRNA/Cas9表达载体。转化:将10 μL连接产物用100 μL大肠埃希菌Trans 5α感受态细胞(至少 10^8 pfu)进行转化,然后涂布于含氨苄(50 μg/mL)的LB板,37℃下倒置培养过夜。转化子验证:用10 μL无菌枪头随机挑选8个克隆,放入含20 μL LB的EP管中,合盖后快速涡旋混匀,用作PCR的模板。PCR验证:将菌液、Oligo F、YSY验证反向引物(YSY验证反向引物为通用引物,由南京尧顺禹生物科技有限公司提供)等混合组成10 μL验证体系进行验证(引物位于向导RNA骨架3'端最后20个碱基),PCR反应条件为预变性95℃ 3 min;变性95℃ 30 s,退火55℃ 30 s,延伸72℃ 30 s,30个循环;最后延伸72℃ 10 min,并进行琼脂糖凝胶电泳。将验证正确的阳性克隆菌液送至金斯瑞生物科技有限公司进行测序。将测序鉴定阳性的菌液扩大培养,使用小量提取试剂盒提取其质粒。

1.5 sgRNA和Cas9 mRNA的体外转录

制备sgRNA1、sgRNA2、sgRNA3转录模板,根据超保真DNA聚合酶试剂盒说明书中的体系进行PCR。PCR条件为预变性95℃ 30 s;变性95℃ 5 s,退火52℃ 10 s,延伸72℃ 5 s,30个循环;最后延伸72℃ 5 min。制备Cas9转录模板,PCR所用试剂盒同上。PCR条件为预变性95℃ 30 s;变性95℃ 10 s,退火56℃ 15 s,延伸72℃ 58 s,34个循环;最后延伸72℃ 5 min。通过琼脂糖凝胶电泳确定转录模板产物条带是否正确。

按照PCR纯化试剂盒操作步骤纯化上述3条sgRNA和Cas9的转录模板,随后采用TSK-101转录试剂盒进行体外转录。将2 μL 10×基础反应缓冲液、4 μL 5×加速反应液、4.5 μL核糖核苷三磷酸混合物、0.5 μL核糖核酸酶抑制剂、2 μL PCR产物(即上述的sgRNA和Cas9转录模板)、1 μL T7 RNA聚合酶、6 μL无核酸酶水组成20 μL反应体系,混匀后37℃水浴4 h,加1 μL脱氧核糖核酸酶,混匀后37℃水浴15 min,然后用氯化锂沉淀法纯化上述转录产物。Cas9转录后完成用多腺苷酸聚合酶加尾试剂盒进行加尾以增加转录产物的稳定性和可译性。

检测转录后Cas9 mRNA和sgRNA的浓度和

吸光度值,稀释分装,置于 -80°C 保存。

1.6 家兔超数排卵、显微注射以及胚胎移植

选择6~8月龄未发情的母兔(外阴发白、略干燥)作为供体兔,以注射剂量递减的方式肌肉注射卵泡刺激素,共注射6次,总剂量为50 U^[9]。于手术前1 d傍晚通过耳缘静脉给予供体兔100 U的人绒毛膜促性腺激素,然后辅助其与成年健康公兔交配。同时挑选发情的母兔(外阴肿大、潮湿、呈现粉红色或鲜红色、有一定气味)作为受体,通过耳缘静脉给其注射100 U人绒毛膜促性腺激素,以备次日手术使用。

给供体兔注射人绒毛膜促性腺激素17 h后,将其麻醉、绑定、备皮,于无菌环境下打开腹腔暴露输卵管,将冲卵管的一端插入输卵管伞部,从另一端用冲卵液冲卵以收集受精卵。在体式显微镜下观察是否受精、受精卵质量并计算受精卵数量,随后将冲卵液中的受精卵移至培养液中,置于 37°C 培养箱中备用。

将前期纯化的3条sgRNA、Cas9 mRNA和链寡核苷酸的混合物(sgRNA1、sgRNA2、sgRNA3浓度均为10 ng/ μL , Cas9 mRNA浓度为40 ng/ μL , 链寡核苷酸浓度为20 ng/ μL)显微注射至受精卵细胞质内,如图1所示,培养30 min后将其移植入受体兔体内,待孕。

图1 兔受精卵细胞质显微注射图

Figure 1 Microinjection into cytoplasm of rabbit fertilized eggs

1.7 F0代家兔的基因型鉴定和DNA测序

在仔兔出生4周时对其进行编号和剪耳,往兔耳组织中加入蛋白酶K和组织裂解液并将混合物放入 58°C 消化炉内消化,EP管内未见成块的组织表明消化完毕。用酚氯仿法提取基因组DNA,通过PCR技术扩增目的片段。正向引物序列为

5'-GTTTGCCCAGGGACTTGC-3',反向引物序列为5'-ACGCCTTCCATCCACCAG-3';PCR条件为预变性 95°C 5 min;变性 94°C 50 s,退火 59°C 50 s,延伸 72°C 1 min,32个循环;最后延伸 72°C 10 min。

将扩增产物送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序鉴定,选取测序峰图出现套峰的仔兔DNA进行TA克隆;扩增PCR片段,反应条件与所用引物同PCR检测,用Solution I连接酶将1 μL PCR产物与0.5 μL pMD19-T载体连接,用50 μL 感受态细胞将5 μL 连接产物进行转化,将转化物加入500 μL 无抗LB中,在 37°C 、200 r/min的条件下摇菌40 min,将180 μL 菌液、50 μL 5-溴-4-氯-3-吡啶 β -D-半乳糖苷和25 μL 异丙基 β -D-硫代半乳糖苷涂布于含氨苄(50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的LB板, 37°C 培养过夜,经蓝白斑筛选出成功插入T载体中的克隆,用10 μL 无菌枪头随机挑选6个克隆,放入含6 mL LB的EP管中摇菌扩增, 37°C 过夜。第二天提取质粒送生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序分析。将经测序得到的F0代兔的序列与新西兰兔PCSK9基因的正常序列进行比对,从而确定其基因型。

1.8 脱靶检测

CRISPR/Cas9系统在切割过程中会对与目标序列相似的基因序列进行切割从而导致脱靶,为了验证脱靶效应,通过<http://crispor.tefor.net/>网站设计脱靶引物(表1),并采用PCR测序进行鉴定,确定是否发生脱靶。

1.9 家兔的饲养与繁殖

经过对F0代家兔的基因型鉴定及DNA测序,成功筛选出S386A突变的家兔,将其与正常家兔配种、传代,待F1代仔兔出生后,再次通过上述基因型鉴定方法对F1代仔兔的突变情况进行鉴定,扩大群体,获得足够数量的杂合子及纯合子转基因家兔。

2 结 果

2.1 sgRNA、单链寡核苷酸和寡核苷酸对的设计结果

根据兔PCSK9的485S对应的碱基替换位置及序列分析结果设计的sgRNA和单链寡核苷酸序列如图2所示。根据设计好的sgRNA模板,分别设计相对应的引物Oligo,如表2所示。

表 1 脱靶检测引物序列
Table 1 The primers of potential off-target sites

名 称	位 置	引物序列 (5'-3')
S1T1	chr7_156883515	正向:TCGTCGGCAGCGTCAGGCTGAGACAGGACAGGAG 反向:GTCTCGTGGGCTCGGCTCTCCGCTGATGCCTACAG
S1T2	chr10_47679129	正向:TCGTCGGCAGCGTCCTGCTGCTCACTTGCTGTCA 反向:GTCTCGTGGGCTCGGACATACTACAGGGCTTGGCG
S1T3	chr16_58941793	正向:TCGTCGGCAGCGTCATGACACATGGAGCATACGC 反向:GTCTCGTGGGCTCGGGCAGTGGCCTCCATGTATGT
S1T4	chr1_37449713	正向:TCGTCGGCAGCGTCGCATGTTCTTCCACACTCGC 反向:GTCTCGTGGGCTCGGAGTGGTGTATGTGTTGCC
S1T5	chr10_80170552	正向:TCGTCGGCAGCGTCTGTCTGGGAGTTTCTGCGC 反向:GTCTCGTGGGCTCGGATGTCAACACCCCAATGAGC
S2T1	chr11_93745195	正向:TCGTCGGCAGCGTCACAGCCCTGCCCCATATTTT 反向:GTCTCGTGGGCTCGGAGACGAGGAGAATGGGGAGT
S2T2	chr9_116975159	正向:TCGTCGGCAGCGTCGGCTGAGGGGATCTCTGTAT 反向:GTCTCGTGGGCTCGGTGAGTGTGGGGCAGGGC
S2T3	Chr8_19296996	正向:TCGTCGGCAGCGTCCCAGCTGTGCTCTCCCTAAT 反向:GTCTCGTGGGCTCGGGTGAGGGGAGTGTGAGCTC
S2T4	chr3_85690200	正向:TCGTCGGCAGCGTCGCCCTAAAATCCACTCTGGCT 反向:GTCTCGTGGGCTCGGTGTGACATGCAATGCAGTGG
S2T5	chr7_51533889	正向:TCGTCGGCAGCGTCACACTGCTACTGAGAGCCCT 反向:GTCTCGTGGGCTCGGTGGGAGACAGAAATGTTGAGT
S3T1	chr17_78967103	正向:TCGTCGGCAGCGTCTGCTTGGGAACAGCATCCTT 反向:GTCTCGTGGGCTCGGCCCTGTAAAACAAGGTCTCAG
S3T2	chr1_117024822	正向:TCGTCGGCAGCGTCGGTTGGGTGAAGGTGAGGTC 反向:GTCTCGTGGGCTCGGGGCATGGATGTGTTGAAGGA
S3T3	chr13_25314354	正向:TCGTCGGCAGCGTCCCCTGGCATACTTCCCAAG 反向:GTCTCGTGGGCTCGGACACAACAGACAGGAGCGAG
S3T4	chr16_2578548	正向:TCGTCGGCAGCGTCACAGCAGGAAGTGAAGTGG 反向:GTCTCGTGGGCTCGGGTGCCTTGAGAGCAGAGAGG
S3T5	chr8_144333462	正向:TCGTCGGCAGCGTCCTTCGGTCCAGCCTGCATC 反向:GTCTCGTGGGCTCGGTAACCTGAATGCTGGGCTGG

图 2 点突变位点、sgRNA序列、单链寡核苷酸序列设计示意图

Figure 2 Schematic diagram of point mutation site, sgRNA sequence and donor sequence design

2.2 sgRNA和Cas9的二合一质粒验证结果 测序比对结果如图4所示,通过该序列比对可确定
PCR验证克隆结果如图3所示,阳性克隆菌液 目标质粒构建成功。

表 2 sgRNA引物寡核苷酸链序列
Table 2 sgRNA primer oligonucleotide chain sequence

名 称	引物序列 (5'-3')
PCSK9-1 Oligo序列	正向:TATAGCCTGCTTTATGTTGCAGAGT 反向:AAACACTCTGCAACATAAAGCAGGC
PCSK9-2 Oligo序列	正向:TATAGTTGCAGAGTGGGACATCGC 反向:AAACGCGATGTCCCACTCTGCAAC
PCSK9-3 Oligo序列	正向:TATAGGGGGCTCACCGGCCACGT 反向:AAACACGTGGCCGTGAGCCCCC

sgRNA:小向导核糖核酸;PCSK:前蛋白转化酶枯草溶菌素;
Oligo:寡核苷酸链.

2.3 F0代家兔的获得及基因型鉴定

通过对家兔超数排卵共获得440枚状态良好的受精卵,将3条sgRNA、单链寡核苷酸和Cas9 mRNA的混合物注射至受精卵细胞质内,将培养

后的362枚状态良好的受精卵移植到17只受体兔体内,共出生22只仔兔。

将存活下来的15只仔兔编号为P1~P15,家兔P1、P8、P10编号后不久即死亡,遂只有12只仔兔纳入后续研究。基因型鉴定发现,所有F0代兔均发生了突变,突变类型有碱基插入、缺失和替换,以碱基缺失和替换为主。比对P4 PCR产物序列和正常兔PCSK9基因序列,确定485位点对应P4扩增片段的第290个碱基,该位点的碱基由T变为G且未出现套峰,说明P4为点突变纯合子,其峰图结果如图5所示。除P4为S386A点突变纯合子外,P9和P14为S386A点突变杂合子,3只突变兔的碱基序列和氨基酸序列如图6所示,其余兔的485-Ser突变情况如表3所示。

左图中奇数泳道为pYSY-T7-Cas9-T7-PCSK9-sgRNA1克隆,偶数泳道为pYSY-T7-Cas9-T7-PCSK9-sgRNA2克隆;右图为pYSY-T7-Cas9-T7-PCSK9-sgRNA3 克隆。图中约100 bp条带的为阳性克隆。M:DNA标记;sgRNA:小向导核糖核酸。

图 3 sgRNA质粒鉴定结果

Figure 3 Identification of sgRNA plasmids

图 4 阳性菌液测序比对结果

Figure 4 Sequence comparison of positive bacterial liquid

红色箭头指示485位点对应的碱基。

图 5 F0代家兔P4 PCR产物测序峰图

Figure 5 Sequencing of PCR product in the F0 rabbit P4

图 6 F0代家兔P4、P9、P14的碱基序列和氨基酸序列

Figure 6 Base sequences and amino acid sequences of F0 rabbits P4、P9 and P14

表 3 F0代家兔485-Ser突变情况

Table 3 485-Ser mutations in F0 rabbits

编 号	等位基因1	等位基因2
P2	Ser缺失	Ser未突变并引入移码突变
P3	突变位于内含子上	突变位于内含子上
P4	Ser→Ala	Ser→Ala
P5	Ser缺失	Ser→Pro并引入移码突变
P6	Ser→Ala并引入移码突变	Ser→Arg
P7	Ser未突变并引入移码突变	Ser→Pro并引入移码突变
P9	Ser→Ala	Ser→Pro并引入移码突变
P11	Ser缺失	Ser→Cys
P12	Ser→Asn并引入移码突变	Ser→Asn并引入移码突变
P13	Ser未突变并引入移码突变	Ser未突变并引入移码突变
P14	Ser→Ala	Ser未突变并引入移码突变
P15	Ser未突变	Ser未突变

F0代家兔P1、P8、P10编号后不久即死亡,未纳入后续研究。Ser:丝氨酸;Ala:丙氨酸;Pro:脯氨酸;Asn:天冬酰胺;Arg:精氨酸;Cys:半胱氨酸。

2.4 脱靶位点预测与检验

PCR测序结果显示未出现套峰(图7),表明sgRNA在预测的脱靶位点内未发生脱靶。

2.5 F1代兔的基因检测

为了验证利用CRISPR/Cas9技术引入的突变是否可以稳定遗传,将F0代兔中标号为P14的公兔在正常饲养环境下生长7个月后与两只野生型母兔配种、待产,共获得6只F1代兔,将其编号为F1-1至F1-6。F1代基因型检测方法与F0代一致,获得的6只F1代兔中有3只为S386A^{PCSK9}兔,突变情况如图8所示,表明这种突变可以稳定遗传。

3 讨 论

2003年,Abifadel等^[10]在常染色体显性高胆固醇血症家族中发现了2例*PCSK9*突变病例,从而发现了继低密度脂蛋白受体和载脂蛋白B之后第3个与家族性高胆固醇血症相关的基因——*PCSK9*。*PCSK9*是一种主要在肝脏中合成的相对分子质量为75 000的前蛋白,其在去除信号肽(1~30氨基酸)之后会产生一个分泌性的具有3个结构域的异源二聚体蛋白:前结构域(31~152氨基酸)、催化结构域(153~454氨基酸)和羧基端结构

图7 脱靶检测PCR产物测序峰图

Figure 7 Results of off-target analysis

F1代兔氨基酸序列:

	野生型:	AASDCDPCFMLQSGTSQAAAHVAGIAAMMLASTPGLSPAELRHRLIHFSKDVINETCF	
F1-1	等位基因 1:	AASDCDPCFMLQSGTSQAAAHVAGIAAMMLASTPGLSPAELRHRLIHFSKDVINETCF	
	等位基因 2:	AASDCDPCFMLQSGT A QAAAHVAGIAAMMLASTPGLSPAELRHRLIHFSKDVINETCF	△1
F1-2	等位基因 1:	AASDCDPCFMLQSGTSQAAAHVAGIAAMMLASTPGLSPAELRHRLIHFSKDVINETCF	
	等位基因 2:	AASDCDPCFMLQSGT A QAAAHVAGIAAMMLASTPGLSPAELRHRLIHFSKDVINETCF	△1
F1-3	等位基因 1:	AASDCDPCFMLQSGTSQAAAHVAGIAAMMLASTPGLSPAELRHRLIHFSKDVINETCF	
	等位基因 2:	AASDCDPCFMLQWPASQP-	
F1-4	等位基因 1:	AASDCDPCFMLQSGTSQAAAHVAGIAAMMLASTPGLSPAELRHRLIHFSKDVINETCF	
	等位基因 2:	AASDCDPCFMLQWPASQP-	
F1-5	等位基因 1:	AASDCDPCFMLQSGTSQAAAHVAGIAAMMLASTPGLSPAELRHRLIHFSKDVINETCF	
	等位基因 2:	AASDCDPCFMLQSGT A QAAAHVAGIAAMMLASTPGLSPAELRHRLIHFSKDVINETCF	△1
F1-6	等位基因 1:	AASDCDPCFMLQSGTSQAAAHVAGIAAMMLASTPGLSPAELRHRLIHFSKDVINETCF	
	等位基因 2:	AASDCDPCFMLQWPASQP-	

“△”代表替换,“-”代表缺失. 红色字体代表丝氨酸(Ser)成功突变为丙氨酸(Ala).

图8 F1代兔的氨基酸序列

Figure 8 Amino acid sequences of F1 rabbits

域(455~692氨基酸)。PCSK9发生的功能缺失型突变主要包括加工功能受损(如S386A)、转运功能受损(如R46L)和分泌功能受损(如S462P)三种类型^[11]。

近年来,针对PCSK9功能缺失型突变已有大量研究,Genga等^[12]发现PCSK9功能缺失型突变有助于降低脓毒症患者1年内死亡或重新感染的概率。多项研究发现,PCSK9功能缺失型突变与脂蛋白a和载脂蛋白B水平降低有关^[13-14]。此外,有研究证明PCSK9功能缺失型变异体的过表达在正常的稳态条件下不会导致未折叠蛋白反应的激活,因此阻断PCSK9在内质网中的自催化裂解的治疗策略是减少循环PCSK9的可行策略^[15],这不仅提示了预防心血管疾病的方法,也进一步验证了PCSK9抑制剂保护心血管疾病的有效性。目前,用于动脉粥样硬化相关研究的PCSK9模型主要以PCSK9敲除为主。PCSK9^{S386A}是PCSK9多种

功能缺失型突变之一,目前已有通过转染质粒建立HepG2细胞和小鼠肝细胞S386A模型的报道^[4,15-16],但未有相关动物模型建立的报道。因此,本研究建立PCSK9^{S386A}点突变家兔模型,可以为进一步探索PCSK9功能缺失型突变对脂质代谢和相关疾病的影响以及PCSK9抑制剂对心血管疾病的保护作用提供支持。

动物模型是研究人类疾病的发病原因、病理机制和寻找治疗靶点的有力工具。目前用于制备动脉粥样硬化模型的动物主要是啮齿类动物,包括小鼠、大鼠和仓鼠。啮齿类动物饲养成本低廉且易于繁殖,但其在脂蛋白组成、脂质转运等脂蛋白代谢方面与人类差异很大。家兔不仅体型适中、易于操作,更重要的是其在循环生理功能、解剖结构、脂质代谢等方面与人类相似,是研发调脂类抗动脉粥样硬化药物的理想动物模型^[17]。

CRISPR/Cas9系统是存在于细菌及古生菌中

的一种有效抵御外来噬菌体或质粒侵袭的获得性免疫系统,在组成上分为两个部分——识别基因组中目标序列的sgRNA和切割DNA双链的Cas9蛋白。CRISPR自2013年开创以来,因其独特的优势在生物工程、医学、农业、环境等多领域得到广泛应用^[18-20]。虽然CRISPR/Cas9系统优势明显,但将其用于人体治疗仍面临一些挑战。一是脱靶效应。已有研究表明通过提高sgRNA特异性、控制Cas9-sgRNA用量、选择合适的递送载体、运用Cas9酶的“关闭开关”等方法可以降低CRISPR/Cas9的脱靶效应^[21]。二是缺乏安全有效的给药系统。近年来,研究人员开发了多种运输系统,如基于质粒的运输系统、基于小干扰RNA的运输系统等^[22]来验证能否将CRISPR-Cas9基因编辑系统安全高效地输送到人体靶细胞。三是伦理问题。这与基因工程和基因治疗的伦理问题相似,主要针对是否应该对人类胚胎进行基因编辑研究,目前国际上对于伦理问题的认识存在一定差异。相信随着CRISPR/Cas9技术的愈加成熟,以及合理、谨慎、安全、有效地运用,在不久的将来CRISPR/Cas9技术定能造福人类。

本研究通过CRISPR/Cas9技术在家兔PCSK9基因上引入S386A这一位点的突变,构建了PCSK9功能缺失型突变家兔模型,为更好地理解PCSK9功能减弱的分子机制,开发可靠、有效的诊断和治療措施提供支持。但由于当前模型家兔数量有限,未能提取肝组织的RNA进行实时荧光定量分析。今后将利用获得的PCSK9^{S386A}杂合子兔进行繁殖、扩大群体,考察野生型、杂合子和纯合子后代的表型差异,为进一步研究PCSK9^{S386A}这一功能缺失型突变的作用奠定基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] DE BACKER G G. Prevention of cardiovascular disease: much more is needed[J]. *Eur J Prev Cardiol*, 2018, 25(10): 1083-1086.
- [2] TANG Z H, LI T H, PENG J, et al. PCSK9: a novel inflammation modulator in atherosclerosis?[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(3): 2345-2355.
- [3] LIN X L, XIAO L L, TANG Z H, et al. Role of PCSK9 in lipid metabolism and atherosclerosis[J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 104: 36-44.
- [4] CAMERON J, HOLLA Ø L, RANHEIM T, et al. Effect of mutations in the PCSK9 gene on the cell surface LDL receptors[J]. *Hum Mol Genet*, 2006, 15(9): 1551-1558.
- [5] GREFFHORST A, MCNUTT M C, LAGACE T A, et al. Plasma PCSK9 preferentially reduces liver LDL receptors in mice[J]. *J Lipid Res*, 2008, 49(6): 1303-1311.
- [6] BOTTOMLEY M J, CIRILLO A, ORSATTI L, et al. Structural and biochemical characterization of the wild type PCSK9-EGF(AB) complex and natural familial hypercholesterolemia mutants[J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(2): 1313-1323.
- [7] HALLERMAYER G. Animal models of atherosclerosis [J]. *Diabetologia Croatica*, 1982, 11(Suppl. 3): 7-15.
- [8] LEE Y T, LAXTON V, LIN H Y, et al. Animal models of atherosclerosis[J]. *BioMed Rep*, 2017, 6(3): 259-266.
- [9] 宋绍征, 葛欣, 张利清, 等. 家兔超数排卵和胚胎移植妊娠率的影响因素分析[J]. *畜牧与兽医*, 2013, 45(8): 14-18.
- SONG Shaozheng, GE Xin, ZHANG Liqing, et al. Investigation on superovulation and pregnancy rates by embryo transferring in rabbits[J]. *Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2013, 45(8): 14-18. (in Chinese)
- [10] ABIFADEL M, VARRET M, RABÈS J P, et al. Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia[J]. *Nat Genet*, 2003, 34(2): 154-156.
- [11] SHAPIRO M D, TAVORI H, FAZIO S. PCSK9: from basic science discoveries to clinical trials[J]. *Circ Res*, 2018, 122(10): 1420-1438.
- [12] GENGA K R, LO C, CIRSTEAN M S, et al. Impact of PCSK9 loss-of-function genotype on 1-year mortality and recurrent infection in sepsis survivors[J]. *EBioMedicine*, 2018, 38: 257-264.
- [13] SUN X M, EDEN E R, TOSI I, et al. Evidence for effect of mutant PCSK9 on apolipoprotein B secretion as the cause of unusually severe dominant hypercholesterolemia[J]. *Hum Mol Genet*, 2005, 14(9): 1161-1169.
- [14] MEFFORD M T, MARCOVINA S M, BITTNER V, et al. PCSK9 loss-of-function variants and Lp(a) phenotypes among black US adults[J]. *J Lipid Res*, 2019, 60(11): 1946-1952.
- [15] LEBEAU P, PLATKO K, AL-HASHIMI A A, et al. Loss-of-function PCSK9 mutants evade the unfolded protein response sensor GRP78 and fail to induce endoplasmic reticulum stress when retained[J]. *J Biol Chem*, 2018, 293(19): 7329-7343.
- [16] MCNUTT M C, LAGACE T A, HORTON J D. Catalytic activity is not required for secreted PCSK9 to reduce low density lipoprotein receptors in HepG2 cells[J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(29): 20799-20803.
- [17] FAN J, CHEN Y, YAN H, et al. Principles and

- applications of rabbit models for atherosclerosis research[J]. **J Atheroscler Thromb**, 2018, 25(3): 213-220.
- [18] YANG D, XU J, ZHU T, et al. Effective gene targeting in rabbits using RNA-guided Cas9 nucleases[J]. **J Mol Cell Biol**, 2014, 6(1): 97-99.
- [19] XIE F, YE L, CHANG J C, et al. Seamless gene correction of β -thalassemia mutations in patient-specific iPSCs using CRISPR/Cas9 and *piggy Bac* [J]. **Genome Res**, 2014, 24(9): 1526-1533.
- [20] XU L, PARK K H, ZHAO L, et al. CRISPR-mediated genome editing restores dystrophin expression and function in mdx mice[J]. **Mol Ther**, 2016, 24(3): 564-569.
- [21] 郭全娟, 韩秋菊, 张 建. CRISPR/Cas9技术的脱靶效应及优化策略[J]. **生物化学与生物物理进展**, 2018, 45(8): 798-807.
- GUO Quanjian, HAN Qiuju, ZHANG Jian. Off-target effect of CRISPR/Cas9 and optimization[J]. **Progress in Biochemistry and Biophysics**, 2018, 45(8): 798-807. (in Chinese)
- [22] LIU C, ZHANG L, LIU H, et al. Delivery strategies of the CRISPR-Cas9 gene-editing system for therapeutic applications[J]. **J Control Release**, 2017, 266: 17-26.
- [本文编辑 余 方 刘丽娜]

· 学术动态 ·

段树民教授团队揭示溶酶体蛋白水解酶cathepsin D具有酸碱度和构象依赖的双重酶活性

2021年1月29日,段树民教授团队在《细胞研究》(*Cell Research*)在线发表了题为“The noncanonical role of the protease cathepsin D as a cofilin phosphatase”的研究论文(<https://doi.org/10.1038/s41422-020-00454-w>)。

研究人员利用纯化重组蛋白进行体外酶活性分析,同时构建果蝇和小鼠研究模型,对cathepsin D的非蛋白水解功能进行深入研究。结果发现中性酸碱度环境中未成熟的cathepsin D具有非经典的磷酸酶活性。在细胞微丝骨架发生迅速重组时,未成熟的cathepsin D直接去磷酸化并激活丝切蛋白,调控细胞微丝骨架组装。当cathepsin D的磷酸酶活性缺失后,细胞质分裂停滞,产生畸形的多核巨细胞,进而抑制细胞增殖。研究表明,cathepsin D在成熟前后分别具有中性酸碱度依赖的磷酸酶活性和酸性酸碱度依赖的蛋白酶活性,且尚未成熟的cathepsin D可以通过磷酸酶活性调控微丝骨架重组和细胞分裂增殖。

刘怿君和张婷博士为论文第一作者。研究得到国家重点研发计划、国家自然科学基金、浙江省重点研发计划、广东省科技计划等资助。

李学坤教授、易文教授和舒强教授团队合作研究成果揭示糖基化调控成体神经发生的分子机制

2021年3月30日,《细胞报告》(*Cell Reports*)在线发表了浙江大学李学坤教授、易文教授和舒强教授团队合作研究成果“Ogt controls neural stem/progenitor cell pool and adult neurogenesis through modulating notch signalling”([https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2211-1247\(21\)00219-9](https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2211-1247(21)00219-9))。该研究首次揭示了O-糖基化修饰对成年小鼠神经干细胞、神经发生和学习记忆能力的重要调控作用及相关分子机制。

研究人员发现O-糖基化修饰转移酶Ogt及其介导的O-糖基化修饰存在于成年小鼠海马组织、成体神经干细胞、神经元和星形胶质细胞。Ogt缺失的神经干细胞O-糖基化修饰水平下降,自我更新能力受损,分化过程异常启动。神经干细胞池无法长期维持,最终导致成体神经发生水平下降,小鼠的学习记忆能力受损。进一步研究发现O-糖基化修饰可以避免Notch1分子的泛素化降解,从而对维持Notch1信号通路的活性发挥重要调节作用。

陈峻琛博士研究生为论文第一作者。该研究得到了国家自然科学基金和国家儿童健康与疾病临床医学中心开放项目的资助。