

CRISPR/Cas9 高效敲除突触结合蛋白 I 的电生理学研究*

杨 博 郑 毅 卢思瑶 姚 骏**

(清华大学生命科学学院, 北京 100084)

摘要 研究一种蛋白质在神经元中的功能, 最有效的方法之一是在该基因敲除动物的神经元中确认其表型. 传统的用胚胎干细胞建立基因敲除动物模型的方法虽然稳定, 但是复杂、耗时. 近几年来, 一种新型基因组编辑技术——CRISPR/Cas9, 能够在不分裂的神经元中高效特异地敲除目的基因. 本文研究了用 CRISPR/Cas9 系统敲除突触结合蛋白 I (synaptotagmin I, Syt1) 基因后的小鼠海马培养神经元的电生理学特性. 我们设计并构建了 Syt1 单导向 RNA (Syt1 sgRNA) 的慢病毒载体质粒, 并用编码 Cas9 和 Syt1 sgRNA 的慢病毒感染培养的小鼠海马神经元, 急性敲除神经元中 Syt1 基因 (Syt1 sgRNA 组), 并用不靶向任何基因的 Scramble sgRNA 感染神经元作为阴性对照 (Scramble 组). 通过全细胞膜片钳的方法检测单动作电位诱发的兴奋性突触后电流 (single AP-eEPSC)、微小兴奋性突触后电流 (mEPSCs)、高糖反应测量的即刻可释放囊泡池 (RRP) 以及 10 Hz 串刺激测量的囊泡释放概率 (P_r). 结果显示, Syt1 sgRNA 组神经元丧失了 Syt1 的功能, 并且与 Syt1 敲除 (Syt1 KO) 小鼠神经元的突触传递表型相似, 而 Scramble 组神经元的各参数和野生型 (WT) 小鼠神经元相比没有显著性差异. 本文为 CRISPR/Cas9 技术应用于神经元中基因的急性修饰提供了依据.

关键词 CRISPR/Cas9, 基因编辑, Synaptotagmin I, 突触传递

学科分类号 Q424

DOI: 10.16476/j.pibb.2017.0002

基因敲除技术对于人们认识基因功能有非常重要的作用. 早期的基因敲除主要依赖同源重组的方式删除目的基因, 从而获得基因敲除动物, 得到基因敲除组织和细胞^[1]. 这种技术有很多不利因素, 例如成本高、繁琐、周期长等. 近几年来, 基因组编辑技术逐渐兴起, 这些技术不仅可以对目的基因进行定点修饰, 同时操作成本大幅降低、操作方法更加简单、周期也大幅缩短^[2].

规律成簇间隔短回文重复序列 (CRISPRs) / CRISPR-associated (CRISPR 相关) 系统是继锌指核酸酶 (ZFNs)^[3] 和类转录激活因子效应物核酸酶 (TALENs)^[4] 之后的第三代基因组编辑技术, 最早发现于细菌的获得性免疫系统^[5]. CRISPR/Cas9 系统通过使用一段具有序列特异性的向导 sgRNA (single guide RNA) 引导核酸内切酶 Cas9 到目标靶点, 引起 DNA 双链断裂^[6], 从而激活细胞自身的两种修复机制: 同源重组 (homologous recombination, HR) 和非同源末端连接 (non-homologous end joining, NHEJ)

对目的基因进行修复^[7-8], 从而对其进行定点编辑. 目前此技术已被成功应用于多种细胞、组织和物种^[6-7, 9-12] 的基因组定点编辑. Incontro 等^[13] 研究也表明该系统可用于研究 NMDA 受体和 AMPA 受体等突触蛋白的功能, 但其在神经元这种非分裂细胞中的应用报道还较少.

突触结合蛋白 I (synaptotagmin I, Syt1) 是一种突触囊泡膜蛋白, 它可以与钙离子结合, 并通过与 SNARE 蛋白相互作用从而在突触传递中扮演重要的角色^[14]. 通过同源重组的方式构建的 Syt1 敲除 (Syt1 KO) 小鼠系, 为确定 Syt1 在神经元中的作用做出了非常重要的贡献. 研究表明, Syt1 是快相同步释放 (fast synchronous release) 的钙离子感受器

* 国家自然科学基金面上项目 (31471020) 资助.

** 通讯联系人.

Tel: 010-62797147, E-mail: jyao@mail.tsinghua.edu.cn

收稿日期: 2017-01-02, 接受日期: 2017-05-15

(calcium sensor)^[15-16]. Syt1 KO 神经元和 WT 神经元相比有非常明显的突触传递特征的变化, 例如, Syt1 KO 神经元的单动作电位诱发的兴奋性突触后电流(single action potential evoked excitatory postsynaptic current, single AP-eEPSC)的幅值降低、电荷转移量减少^[17]、微小兴奋性突触后电流(miniature excitatory postsynaptic currents, mEPSCs)的频率增加^[18]、即刻可释放囊泡池(readily releasable vesicle pool, RRP)减小、囊泡释放概率(release probability, P_r)降低^[17]等.

为了研究 CRISPR/Cas9 系统是否能在非分裂的神经元细胞中对目的基因进行快速、高效、稳定地敲除, 并产生和基因敲除小鼠系的神经元同样的特性, 我们选取 Syt1 为靶标基因, 构建能与小鼠 Syt1 基因特异性结合的 sgRNA, 将其插入慢病毒载体, 对培养的小鼠海马神经元进行 Syt1 急性敲除; 同时将不靶向任何基因的 Scramble sgRNA 构建入慢病毒载体并用其感染神经元作为阴性对照. 然后通过电生理学的方法比较了 Syt1 sgRNA 敲除 Syt1 的神经元与 Syt1 KO 小鼠神经元的突触传递相关特性, 来为 CRISPR/Cas9 系统在神经元基因敲除中的应用提供依据.

1 材料与方法

1.1 材料

胰酶(trypsin)、DMEM、FBS、B27、Neurobasal-A、谷氨酰胺(glutamax)、PS、PEI、OPTI-MEM、多聚赖氨酸(poly-D-lysine)购自 Invitrogen 公司; 蔗糖(sucrose)、TTX、Bicuculine、D-AP5、氯化钠(NaCl)、氯化钾(KCl)、氯化钙(CaCl_2)、氯化镁(MgCl_2)、HEPES、葡萄糖(glucose)购自 Sigma 公司; Syt1 KO 小鼠由美国威斯康星大学麦迪逊分校 Edwin R. Chapman 实验室惠赠.

1.2 Syt1 sgRNA 和 Scramble sgRNA 慢病毒载体质粒的构建

在选取 SpCas9 的目标靶点和设计 Syt1 单导向 RNA(sgRNA)时, 我们选择了转录子 5'端在前间区序列邻近基序(proto-spacer-adjacent motif (PAM) sequence)NGG 前的组成性外显子中的一段 20 nt 靶序列. 为了尽量减小脱靶效应, 使用了 CRISPR 在线设计工具(<http://crispr.mit.edu/>). Syt1 sgRNA 序列: 5' GACTAGAAGGACCGCAACTA 3'. Scramble sgRNA 序列: 5' GCGCCAAACGTGCCCTGACG 3'. 慢病毒载体选用张锋实验室^[19-20]发展的

lentiCRISPRv2 质粒, 购自 Addgene.

1.3 神经元的原代培养

取 12 h 内出生的 B57 野生型或 Syt1 KO 小鼠, 断头取脑, 剥离出海马, 在 0.25%胰酶中消化 15 min, 用含 2% FBS 的 DMEM 培养基终止消化. 用含 1% glutamax 和 2% B27 的 Neurobasal-A 培养基轻轻吹打组织, 使其成密度为 10^6 个/ml 的细胞悬液, 在 24 孔板的一个孔中接种 0.5 ml(培养皿中放置已用 poly-D-lysine 包被的小玻片), 于 37°C CO₂ 孵箱中培养.

1.4 慢病毒的包装及神经元的感染

待 HEK 293FT 细胞铺满 10 cm 培养皿底面积的 60%~80%时, 进行目的基因转染. 将含有目的基因 Syt1 sgRNA 的慢病毒载体质粒(或 Scramble sgRNA 慢病毒载体质粒)和包装质粒 pV-SVG、p Δ 8.9 以 20 μg 、10 μg 、15 μg 的比例加入 150 μl PEI 试剂中, 混匀后加入 2 ml OPTI-MEM 培养基, 静置 5 min 后, 将混合液加入细胞培养皿中, 4 h 后将培养基更换为 DMEM+10% FBS+1% PS. 将细胞在 CO₂ 孵箱中培养 48 h~72 h 后, 收集含有病毒的上清培养液, 20 000 r/min 离心 2 h, 弃上清, PBS 重悬病毒, 分装后 -80°C 保存. 在神经元培养 3~5 天后(DIV 3~5), 将病毒加入神经元中进行感染.

1.5 电生理实验

神经元 DIV 14~17, 进行电生理实验. 采用美国 Axon 膜片钳放大器 Multiclamp 700B, 以全细胞方式进行神经元电流记录. 细胞外液采用标准台式液(mmol/L: NaCl 140, KCl 5, HEPES 10, glucose 10, MgCl_2 1, CaCl_2 2 或 5, pH 7.3). 诱发兴奋性突触后电流(eEPSCs)的记录, 在细胞外液中加入 50 $\mu\text{mol/L}$ D-AP5, 20 $\mu\text{mol/L}$ Bicuculine, 记录微小兴奋性突触后电流(mEPSCs)时再加入 1 $\mu\text{mol/L}$ TTX; 记录即刻可释放囊泡池(RRP)时, 在台式液中进行细胞封接, 之后采用高糖溶液(台式液 +500 mmol/L 蔗糖)进行灌流, 5 s 后, 再换回台式液灌流. 电极充灌内液(mmol/L: K-gluconate 130, Na-phosphocreatine 5, Mg-ATP 2, Na₂-GTP 0.3, EGTA 1, HEPES 10, pH 7.3); 记录 eEPSCs 时, 另加入 5 mmol/L QX-314. 电极入液后阻抗为 4~7 M Ω . 于室温下(20°C~25°C)用 Clampex 10.5 软件采集数据, 储存于电脑, 作脱机分析. mEPSCs 分析使用 MiniAnalysis 6.0 软件.

1.6 数据统计和分析

数据分析作图采用 Clampfit 10.5、Excel 2013、Sigma plot 12.5、Adobe Illustrator 等软件. 结果数据以 Mean $\pm$ SEM 表示, 各参数采用单因素方差分析(one-way ANOVA), 并用 LSD 检验进行之后的组间比较, $P < 0.05$ 时认为两样本间的差异具有显著性.

2 结 果

2.1 单动作电位诱发的兴奋性突触后电流(single AP-eEPSC)的比较

Syt1 被认为是神经元快相同步释放的钙离子感受器^[14], 当 Syt1 被敲除后, 神经元快相同步释放减少, 因此, 我们首先比较了这两种 Syt1 敲除状态下的单动作电位诱发的释放. 按照 Liu 等^[17]的方法, 将一个双极电极接触神经元的胞体, 并给予一个 20V~30V、持续 1 ms 的电压来引发一个动作电位. 这个动作电位引起的突触囊泡的释放会通过与其连接的另一个神经元上的记录电极进行记录, 记为一个突触后电流(eEPSC). WT 神经元记录到的为一个单峰的电流, 并有平滑的衰减动力学曲线(图 1a), Syt1 KO 神经元记录到的为慢速的长时程

非同步的释放(图 1a), 均与以前的报道一致^[17]. Syt1 sgRNA 急性敲除 Syt1 的神经元, 记录到的也为慢速、幅值较小的长时程非同步电流(图 1a), 特征与 Syt1 KO 神经元 single AP-eEPSC 相似. 而作为阴性对照的 Scramble 组神经元(感染 Scramble sgRNA 慢病毒的神经元, Scramble sgRNA 为不靶向任何基因的 sgRNA)记录到的也为单峰的电流, 即快速的同步释放, 与 WT 神经元的 single AP-eEPSC 特征相一致. One-way ANOVA 显示 4 组之间幅值($F_{(3, 77)} = 43.253$, $P < 0.001$)和转移电荷量($F_{(3, 77)} = 21.520$, $P < 0.001$)都有显著性差异, Syt1 KO 神经元和 Syt1 sgRNA 急性敲除 Syt1 的神经元与 WT 神经元相比, 幅值均减小($P < 0.001$), 约为 WT 神经元的 1/3(图 1b); 转移的电荷量与 WT 相比也均减少(图 1c, $P < 0.001$); 而 Scramble 组和 WT 组相比没有显著性差异(幅值, $P = 0.362$; 转移电量, $P = 0.874$), 2 个 Syt1 敲除组相比也没有显著性差异(幅值, $P = 0.818$; 转移电量, $P = 0.791$); Syt1 sgRNA 组和 Scramble 组相比 single AP-eEPSC 幅值($P < 0.001$)和转移电量($P < 0.001$)均显著减小, 说明是 Syt1 sgRNA 特异改变了神经元的 single AP-eEPSC 特性(图 1b, c).

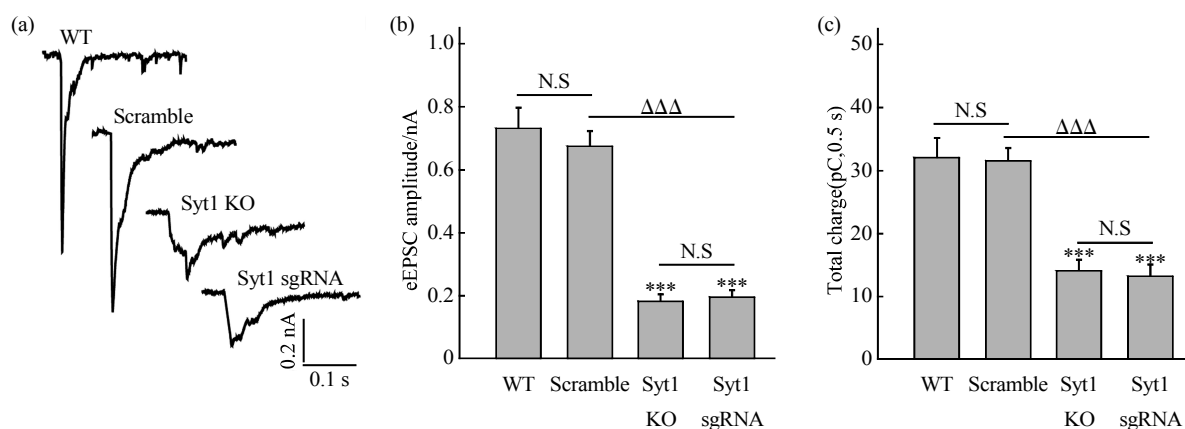


Fig. 1 Deletion of fast synchronous release by CRISPR/Cas9 knockout of Syt1

(a) Sample traces of single action-potential evoked excitatory postsynaptic currents (single AP-eEPSCs) from a WT neuron, WT neuron infected with Scramble sgRNA, Syt1 KO neuron and WT neuron infected with Syt1 sgRNA. (b) Bar graph showing the average eEPSC amplitude of WT, (0.73 ± 0.06) nA, $n = 22$; Scramble, (0.67 ± 0.05) nA, $n = 19$; Syt1 KO, (0.18 ± 0.02) nA, $n = 20$; Syt1 sgRNA, (0.20 ± 0.02) nA, $n = 20$. *** $P < 0.001$, WT vs. Syt1 KO, WT vs. Syt1 sgRNA; N.S., $P > 0.05$, WT vs. Scramble, Syt1 KO vs. Syt1 sgRNA; $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$, Scramble vs. Syt1 sgRNA. (c) Bar graph showing the average eEPSC transfer charge of WT, (31.97 ± 2.88) pC, $n = 22$; Scramble, (31.46 ± 2.01) pC, $n = 19$; Syt1 KO, (14.04 ± 1.69) pC, $n = 20$; Syt1 sgRNA, (13.18 ± 1.83) pC, $n = 20$; *** $P < 0.001$, WT vs. Syt1 KO, WT vs. Syt1 sgRNA; N.S., $P > 0.05$, WT vs. Scramble, Syt1 KO vs. Syt1 sgRNA; $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$, Scramble vs. Syt1 sgRNA.

2.2 微小兴奋性突触后电流(mEPSCs)的比较

有报道表明, Syt1 可以作为膜泡融合的钙离子钳^[18], 在 Syt1 敲除后, 神经元自发的神经递质释放增加. 因此, 我们检测了 WT 组、Scramble 组、Syt1 KO 组和 Syt1 sgRNA 组神经元的 mEPSCs. One-way ANOVA 结果显示 4 组之间频率有显著性差异($F_{(3, 44)} = 13.094$, $P < 0.001$). Syt1 KO 组神经元的 mEPSCs 频率和 WT 组神经元相比显著增加($P < 0.001$), 约增加了 2 倍(图 2b), 与以前的报道

相似^[18]. Syt1 sgRNA 组神经元的 mEPSCs 频率和 WT 组神经元相比也约增加了 2 倍($P < 0.001$, 图 2b), 和 Scramble 组神经元的 mEPSCs 频率相比也显著增加($P < 0.001$), 而与 Syt1 KO 组神经元相比无显著性差异($P = 0.922$, 图 2b). Scramble 组神经元的 mEPSCs 频率和 WT 组神经元相比无显著性差异($P = 0.780$, 图 2b). 4 组 mEPSCs 的幅值大小无显著性差异($F_{(3, 44)} = 1.099$, $P = 0.360$, 图 2c).

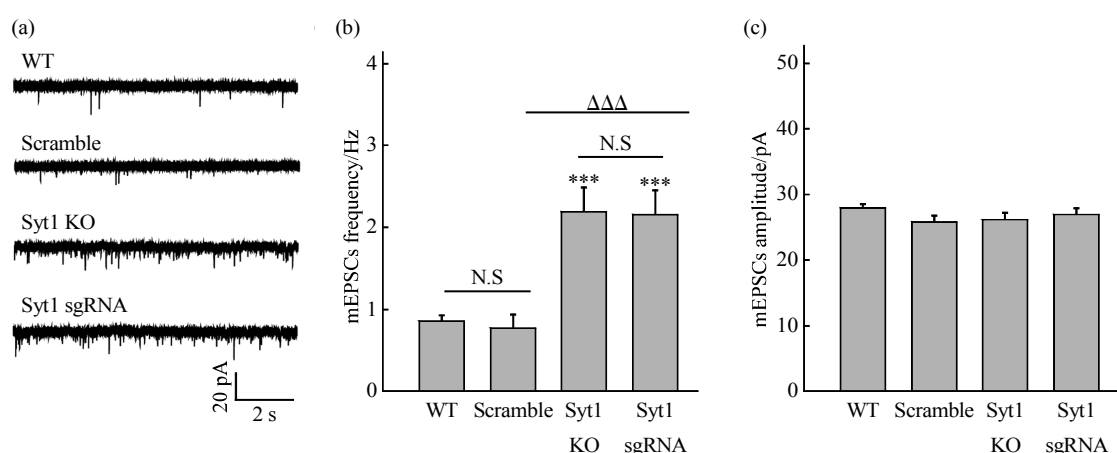


Fig. 2 Deletion of Syt1 by CRISPR/Cas9 increased mEPSCs frequency

(a) Sample traces of miniature excitatory postsynaptic currents (mEPSCs) from a WT neuron, WT neuron infected with Scramble sgRNA, Syt1 KO neuron and WT neuron infected with Syt1 sgRNA. (b) Bar graph showing the average mEPSCs frequency of WT, (0.86 ± 0.07 Hz, $n = 15$); Scramble, (0.78 ± 0.16 Hz, $n = 12$); Syt1 KO, (2.19 ± 0.30 Hz, $n = 11$); Syt1 sgRNA, (2.16 ± 0.29 Hz, $n = 10$), *** $P < 0.001$, WT *vs.* Syt1 KO, WT *vs.* Syt1 sgRNA; N.S., $P > 0.05$, WT *vs.* Scramble, Syt1 KO *vs.* Syt1 sgRNA; $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$, Scramble *vs.* Syt1 sgRNA. (c) Bar graph showing the average mEPSCs amplitude of WT, (27.83 ± 0.55) pA, $n = 15$; Scramble, (25.77 ± 1.02) pA, $n = 12$; Syt1 KO, (26.15 ± 1.05) pA, $n = 11$; Syt1 sgRNA, (26.92 ± 0.98) pA, $n = 10$.

2.3 即刻可释放囊泡池(RRP)的比较

Syt1 KO 神经元还有一个重要的特征是 RRP 减少^[17]. 为了检测 Syt1 sgRNA 急性敲除 Syt1 是否具有同样的特征, 我们运用了高渗透压 (800 ~ 850 mOsm) 的蔗糖溶液来测定 RRP 的大小. 4 组神经元的高糖反应都显示出快相成分的释放, 之后跟随着慢速的稳定的释放(图 3a), 后者可能归功于 RRP 的再更新^[17]. 快相成分的整合电量即为 RRP

的大小^[17]. One-way ANOVA 结果显示 4 组神经元 RRP 的大小有显著性差异($F_{(3, 53)} = 11.912$, $P < 0.001$). Syt1 sgRNA 组神经元的 RRP 与 WT 神经元的 RRP 大小相比显著减少($P < 0.001$), 和 Scramble 组神经元的 RRP 大小相比也显著减少($P < 0.01$), 与 Syt1 KO 神经元的 RRP 大小相比没有显著性差异($P = 0.474$, 图 3b). Scramble 组神经元的 RRP 大小和 WT 组神经元相比无显著性差异($P = 0.115$, 图 3b).

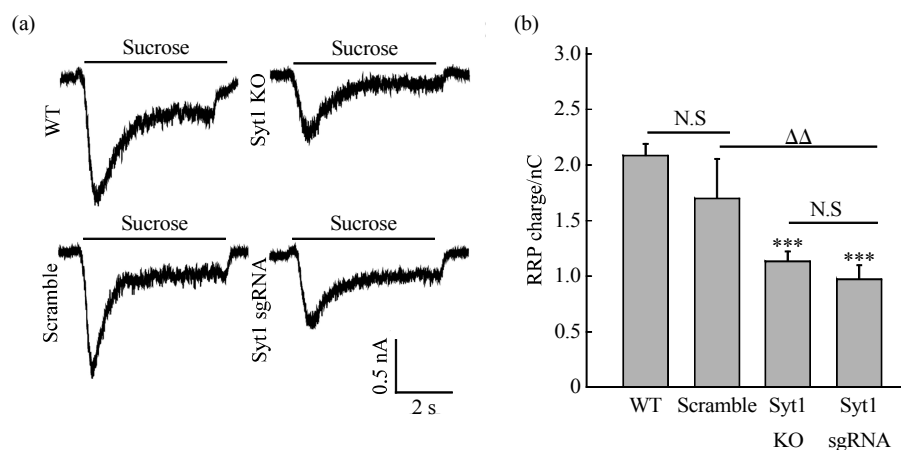


Fig. 3 Deletion of Syt1 by CRISPR/Cas9 reduced RRP size

(a) Representative traces of sucrose responses from a WT neuron, WT neuron infected with Scramble sgRNA, Syt1 KO neuron and WT neuron infected with Syt1 sgRNA. (b) Bar graph showing the average total charge transfer of WT, (2.09 ± 0.10) nC, $n = 19$; Scramble, (1.70 ± 0.35) nC, $n = 9$; Syt1 KO, (1.13 ± 0.09) nC, $n = 16$; Syt1 sgRNA, (0.97 ± 0.13) nC, $n = 13$; *** $P < 0.001$, WT *vs.* Syt1 KO, WT *vs.* Syt1 sgRNA; N.S., $P > 0.05$, WT *vs.* Scramble, Syt1 KO *vs.* Syt1 sgRNA; ΔΔ $P < 0.01$, Scramble *vs.* Syt1 sgRNA.

2.4 串动作电位诱发的兴奋性突触后电流(train AP-eEPSCs)的比较

此外, 在 Syt1 KO 神经元中, 囊泡释放概率 (P_r)降低^[17]. P_r 定义为一个动作电位可以引起的 RRP 中释放出的囊泡所占 RRP 总囊泡数的比值^[17]. P_r 被认为由具备竞争力的融合囊泡的数量和单个囊泡释放递质的概率决定^[21-23]. 另外, P_r 被证明和 RRP 的大小相关, 且决定了突触传递的平均强度^[24]. 为了直接比较 2 个联结的神经元的 P_r , 我们

记录了一串高频动作电位(40 APs/10 Hz)诱发的兴奋性突触后电流, 并通过其计算 10 Hz-RRP 的大小和第一个动作电位诱发的电荷释放量. 将第 30 个到第 40 个 EPSC 之间累积的 EPSC 面积进行线性拟合来估算 10 Hz-RRP(y -截距, 图 4b 直线所示). One-way ANOVA 结果显示 4 组之间 P_r 有显著性差异($F_{(3, 47)} = 18.348$, $P < 0.001$). 与前人报道相同, Syt1 KO 神经元中 P_r 与 WT 神经元相比显著降低($P < 0.001$, 图 4c); Syt1 sgRNA 组神经元 P_r

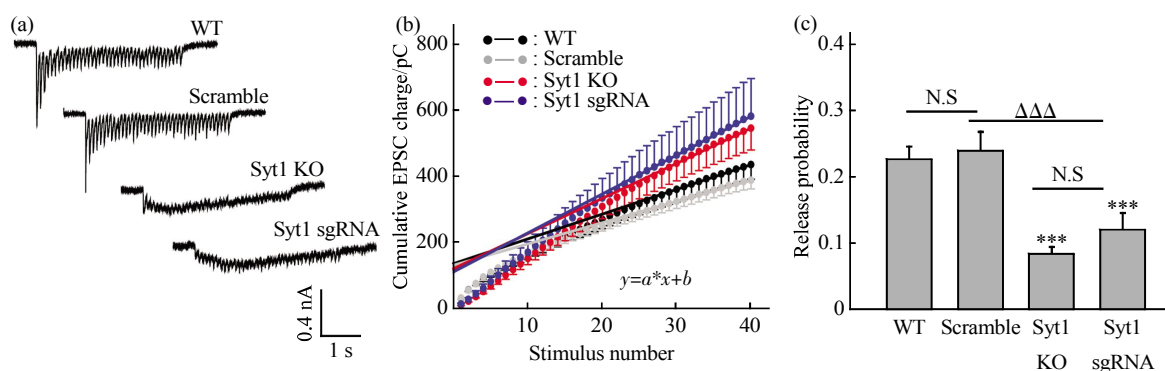


Fig. 4 Deletion of Syt1 by CRISPR/Cas9 reduced the release probability (P_r)

(a) Representative traces of train APs (40 APs/10 Hz) evoked excitatory postsynaptic currents (train AP-eEPSCs) from WT neurons, WT neurons infected with Scramble sgRNA, Syt1 KO neurons and neurons of Syt1 sgRNA group. (b) Plot of average cumulative EPSCs charge from each neuron versus stimulus number. Lines represent linear function (inset) fit to data points between the 30th to the 40th EPSCs to estimate the RRP size (y -intercepts) (WT, black line; Scramble, grey line; Syt1 KO, red line; Syt1 sgRNA, blue line). (c) Bar graph showing the release probability of WT, (0.23 ± 0.02), $n = 12$; Scramble, (0.25 ± 0.02), $n = 11$; Syt1 KO, (0.08 ± 0.01), $n = 19$; Syt1 sgRNA, (0.12 ± 0.02), $n = 9$; *** $P < 0.001$, WT *vs.* Syt1 KO, WT *vs.* Syt1 sgRNA; N.S., $P > 0.05$, WT *vs.* Scramble, Syt1 KO *vs.* Syt1 sgRNA; ΔΔΔ $P < 0.001$, Scramble *vs.* Syt1 sgRNA. The release probability is calculated by the first evoked EPSC charge divided by the RRP size (y -intercepts).

与 WT 神经元和 Scramble 组神经元相比都显著降低 ($P < 0.001$), 而与 Syt1 KO 组相比无显著性差异 ($P = 0.207$, 图 4c); Scramble 组神经元 P_r 与 WT 神经元相比无显著性差异 ($P = 0.456$, 图 4c).

3 讨 论

CRISPR/Cas9 系统中 2 个非常重要的元件是具有靶点指向作用的 sgRNA 和 Cas9 核酸内切酶. 因此, 在这种新兴的基因组编辑技术中, sgRNA 对目的基因的定点识别至关重要. 本实验选用张锋实验室 2013 年^[19-20]发展的 lentiCRISPRv2 载体, 将设计的 Syt1 sgRNA 序列插入其中, 有效地敲除了小鼠海马神经元中的 Syt1 基因.

Synaptotagmin I 是一种参与神经元之间突触传递的重要蛋白^[14]. 人们利用 Syt1 KO 小鼠对 Syt1 KO 神经元的电生理学特性有非常明确的研究^[14, 17-18]. 因此, 本实验选取 Syt1 为目的基因, 通过比较 Syt1 sgRNA 急性敲除 Syt1 基因的神经元和 Syt1 KO 小鼠神经元的突触传递特征, 来检测我们构建的 sgRNA 在敲除神经元内源基因时的有效性.

通过全细胞膜片钳的方法对各组神经元的 single AP-eEPSC、mEPSCs、RRP 和 P_r 进行评测, 比较各突触传递指标的组间差异, 我们发现, Syt1 sgRNA 组神经元与 Syt1 KO 小鼠神经元在各方面都非常类似. 与 WT 神经元相比, 这 2 组 Syt1 缺陷型神经元的 single AP-eEPSC 的幅值和转移电荷量均减小, 且二者之间的减幅没有显著性差异; mEPSCs 的频率均增加, 且二者之间增幅没有显著性差异; 高糖反应测定的 RRP 均减小, 且二者相比减幅没有显著性差异; train AP-eEPSCs 测出的 P_r 均减小, 且二者相比减幅差异不显著. 而作为阴性对照的感染了 Scramble sgRNA 的神经元与 WT 神经元相比, 各项参数均没有显著性差异. 我们的实验发现, 用高渗溶液测出的 RRP 比 10 Hz 串动作电位刺激测出的 10 Hz-RRP 要大很多, 这是由于在混合培养的海马神经元中一个神经元可以接收很多神经元的突触输入, 高糖刺激则可以引起所有这些神经元的递质释放; 而在双电极成对记录时, 则只对与其联结的一个神经元的递质释放进行了测量^[17]. 因此, 两种方式测出的 RRP 大小有量级上的差异. 另外, 在我们的实验中, 10 Hz train AP-eEPSCs 测出的 Syt1 KO 神经元的 RRP 和 WT 相比虽有减小, 但较之 Liu 等^[17]使用 20 Hz 串刺激测出的 RRP 减小程度较弱, 可能是由于刺激频率

不同所致(本文, 10 Hz; Liu 等, 20 Hz). 综上所述, 我们认为这种 Syt1 sgRNA 在急性敲除神经元中的 Syt1 基因之后, 与传统的 Syt1 KO 小鼠神经元的电生理学表型无差异. 因此, 这种方法可以对神经元的内源基因进行快速高效的敲除, 用这种方法敲除掉内源基因的神经元可以用来研究此种内源基因在神经元的突触传递中所扮演的作用.

因此, 本实验成功构建了针对神经元内源基因 Syt1 的 sgRNA, 并证明了 CRISPR/Cas9 敲除系统在敲除神经元内源基因时的有效性和实用性, 为其今后快速高效敲除神经元内源基因的应用提供了依据.

参 考 文 献

- [1] 周金伟, 徐绮斌, 姚 婧, 等. CRISPR/Cas9 基因组编辑技术及其在动物基因组定点修饰中的应用. 遗传, 2015, **37** (10): 1011-1020
Zhou J W, Xu Q B, Yao J, *et al.* Hereditas, 2015, **37** (10): 1011-1020
- [2] 李金环, 寿 佳, 吴 强. CRISPR/Cas9 系统在基因组 DNA 片段编辑中的应用. 遗传, 2015, **37**(10): 992-1002
Li J H, Shou J, Wu Q. Hereditas, 2015, **37**(10): 992-1002
- [3] Bibikova M, Beumer K, Trautman J K, *et al.* Enhancing gene targeting with designed zinc finger nucleases. Science, 2003, **300**(5620): 764
- [4] Shan Q, Wang Y, Chen K, *et al.* Rapid and efficient gene modification in rice and Brachypodium using TALENs. Molecular Plant, 2013, **6**(4): 1365-1368
- [5] Gaj T, Gersbach C A, Barbas C F 3rd. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. Trends in Biotechnology, 2013, **31**(7): 397-405
- [6] Shalem O, Sanjana N E, Hartenian E, *et al.* Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells. Science, 2014, **343**(6166): 84-87
- [7] Mali P, Yang L, Esvelt K M, *et al.* RNA-guided human genome engineering via Cas9. Science, 2013, **339**(6121): 823-826
- [8] Dianov G L, Hubscher U. Mammalian base excision repair: the forgotten archangel. Nucleic Acids Research, 2013, **41**(6): 3483-3490
- [9] Laughery M F, Hunter T, Brown A, *et al.* New vectors for simple and streamlined CRISPR-Cas9 genome editing in Saccharomyces cerevisiae. Yeast, 2015, **32**(12): 711-720
- [10] Zhang C, Meng X, Wei X, *et al.* Highly efficient CRISPR mutagenesis by microhomology-mediated end joining in Aspergillus fumigatus. Fungal Genetics and Biology: FG & B, 2016, **86**: 47-57
- [11] Dicarlo J E, Norville J E, Mali P, *et al.* Genome engineering in Saccharomyces cerevisiae using CRISPR-Cas systems. Nucleic Acids Research, 2013, **41**(7): 4336-4343
- [12] Chang N, Sun C, Gao L, *et al.* Genome editing with RNA-guided

- Cas9 nuclease in zebrafish embryos. *Cell Research*, 2013, **23**(4): 465–472
- [13] Incontro S, Asensio C S, Edwards R H, *et al.* Efficient, complete deletion of synaptic proteins using CRISPR. *Neuron*, 2014, **83**(5): 1051–1057
- [14] Chapman E R. How does synaptotagmin trigger neurotransmitter release? *Annual Review of Biochemistry*, 2008, **77**: 615–641
- [15] Yoshihara M, Littleton J T. Synaptotagmin I functions as a calcium sensor to synchronize neurotransmitter release. *Neuron*, 2002, **36**(5): 897–908
- [16] Koh T W, Bellen H J. Synaptotagmin I, a Ca^{2+} sensor for neurotransmitter release. *Trends in Neurosciences*, 2003, **26**(8): 413–422
- [17] Liu H, Dean C, Arthur C P, *et al.* Autapses and networks of hippocampal neurons exhibit distinct synaptic transmission phenotypes in the absence of synaptotagmin I. *The Journal of Neuroscience: the Official Journal of the Society for Neuroscience*, 2009, **29**(23): 7395–7403.
- [18] Chicka M C, Hui E, Liu H, *et al.* Synaptotagmin arrests the SNARE complex before triggering fast, efficient membrane fusion in response to Ca^{2+} . *Nature Structural & Molecular Biology*, 2008, **15**(8): 827–835
- [19] Cong L, Ran F A, Cox D, *et al.* Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 2013, **339**(6121): 819–823
- [20] Ran F A, Hsu P D, Wright J, *et al.* Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nature Protocols*, 2013, **8**(11): 2281–2308
- [21] Sudhof T C. The synaptic vesicle cycle: a cascade of protein-protein interactions. *Nature*, 1995, **375**(6533): 645–653
- [22] Sudhof T C. The synaptic vesicle cycle revisited. *Neuron*, 2000, **28**(2): 317–320
- [23] Sudhof T C. The synaptic vesicle cycle. *Annual Review of Neuroscience*, 2004, **27**: 509–547
- [24] Dobrunz L E. Release probability is regulated by the size of the readily releasable vesicle pool at excitatory synapses in hippocampus. *International Journal of Developmental Neuroscience: the Official Journal of The International Society for Developmental Neuroscience*, 2002, **20**(3–5): 225–236

Electrophysiological Study of Synaptotagmin I Deletion Using CRISPR/Cas9*

YANG Bo, ZHENG Yi, LU Si-Yao, YAO Jun**

(School of Life Sciences, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract One of the effective methods to study the functions of a protein in neurons is to identify the phenotypes of cultured neurons from animals with genes knocked out. Traditional methods which use embryonic stem cells to establish gene knock-out animal models are stable, but complicated and time-consuming. Recently, the new genome editing technology, CRISPR/Cas9, can specifically and efficiently delete target genes in post-mitotic neurons. Here we investigated the electrophysiological phenotypes of the cultured mouse hippocampal neurons with the synaptotagmin I (Syt1) gene deleted by lentiviral introduction of CRISPR/Cas9. Syt1 single guide RNA (sgRNA) was designed and constructed into the lentiCRISPR vector. Mouse hippocampal neurons are infected with lentivirus encoding Cas9 and Syt1 sgRNA to acutely delete the Syt1 gene (Syt1 sgRNA group). And Scramble sgRNA, which has no gene target, was used as a negative control (Scramble group). Whole-cell patch-clamp recordings were used to test single action-potential evoked excitatory postsynaptic current (single AP-eEPSC), miniature excitatory postsynaptic currents (mEPSCs), sucrose responses measured readily releasable pool (RRP) and 10 Hz train stimulation measured release probability (P_r). Our results indicated that the Syt1 sgRNA group showed loss of function of Syt1, and had the similar synaptic transmission phenotypes compared to the neurons of Syt1 knock-out (KO) mice; and all the parameters tested had no significance between Scramble group neurons and wild-type (WT) neurons. This study provided evidence for the application of CRISPR/Cas9 technology in acute gene modification in neurons.

Key words CRISPR/Cas9, gene editing, synaptotagmin I, synaptic transmission

DOI: 10.16476/j.pibb.2017.0002

*This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China (31471020).

**Corresponding author.

Tel: 86-10-62797147, E-mail: jyao@mail.tsinghua.edu.cn

Received: January 2, 2017 Accepted: May 15, 2017