



利用CRISPR/Cas9系统构建Tiki1基因 修饰猪模型*

吴彩霞^{1,2)} 刘朝明^{1,2)} 颜泉梅^{2)**} 张全军²⁾ 赵宇²⁾ 欧阳振²⁾ 樊娜娜²⁾ 赖良学^{1,2)**}⁽¹⁾ 吉林大学动物医学学院, 长春 130062; ⁽²⁾ 中国科学院广州生物医药与健康研究院, 广州 510530

摘要 Tiki1 基因是哈佛大学儿童医学院贺熹教授实验室发现的一个对蛙头部的诱导起到决定性作用的新基因, 但 Tiki1 基因在小鼠等啮齿类动物中缺失, 因此无法利用小鼠等小动物来研究其在哺乳动物中的作用. 本文利用 CRISPR/Cas9 系统结合体细胞克隆技术构建 Tiki1 基因修饰猪模型, 研究 Tiki1 基因在猪发育中的作用. 我们利用贺熹教授团队提供的人 Tiki1 基因序列, 在猪的基因组数据库中对出与其同源性最高的一段序列设计 2 个靶位点 (g1 和 g2). 以设计的靶位点构建打靶质粒转染猪胎儿成纤维细胞, 经细胞筛选、PCR 扩增及测序共鉴定了 52 个单细胞克隆株. 最终选择靶位点 g1 为纯合双敲的 5 个单细胞克隆株和靶位点 g2 为纯合双敲的 3 个单细胞克隆株作为构建 Tiki1 基因敲除猪的核供体. 我们共计构建了 720 个重组胚胎, 分别植入 3 头代孕母猪, 其中有 1 头经 B 超检测成功怀孕并妊娠到期产下 13 头发育正常的克隆猪, 经测序鉴定其中 12 头为 Tiki1 基因双敲除猪模型, Tiki1 基因敲除克隆猪健康存活至今. 结果表明 Tiki1 基因对于猪早期发育的作用机理不同于蛙, 其在猪早期发育的过程中的具体作用机理有待后续进一步的深入研究.

关键词 CRISPR/Cas9, Tiki1, 基因打靶, 猪模型

中图分类号 Q789, Q95-33, Q812

DOI: 10.16476/j.pibb.2018.0307

Wnt 信号通路在动物的生长发育过程中, 决定细胞的极性、命运、前体细胞的增殖、体轴的建立, 以及细胞的不对称分裂等^[1]. Wnt 信号通路的抑制因子和激活因子对于脊椎动物的前后轴形成、尾部和头部结构的特化是必不可少的. Wnt 信号通路分泌性抑制因子 DKK-1 蛋白 (Dickkopf1, DKK1) 是 Wnt 信号通路的抑制因子之一, 在爪蟾中过表达 DKK1, 可以抑制包括 Wnt8、wnt1、Wnt3a 等在内的所有通过 β -catenin 传导的 Wnt 信号途径, 在爪蟾胚胎中过表达 DKK1 可以引起巨大头部结构^[2-4]. 小鼠中敲除 DKK1 基因, 导致胚胎中脑的前端结构的缺失及趾端的相互融合, 证明 DKK1 基因对小鼠的头部和四肢发育具有重要的作用^[5]. 在 2012 年, 哈佛大学儿童医学院贺熹教授团队^[6] 在爪蟾上发现了一个表达模式和功能与 DKK1 非常相似的基因, 他们将其命名为 Tiki1 基因. Tiki1 在爪蟾中过表达会导致一个巨大的头部, 而缺失则发育为一个缺失头部的畸形胚胎. 蛙和小鼠上 DKK1 基因的缺失都会导致头部发育畸形, 但

Tiki1 基因在小鼠和大鼠等啮齿类动物中缺失^[7], 因而无法利用啮齿类动物模型研究 Tiki1 基因在哺乳动物发育过程中的作用. 相比于小鼠模型, 猪表达 Tiki1 基因, 具有繁殖周期短、生产力高、资源丰富、价格便宜等优点, 并且猪在体型大小、生理条件、器官发育和疾病发展等方面与人类相似, 猪是理想的研究 Tiki1 基因的实验动物模型. 近年来随着基因打靶技术的发展, ZFN、TALEN 技术, 尤其是 CRISPR/Cas9 技术的出现解决了大动物上基因敲除难的问题. 我们实验室以 CRISPR/Cas9 技术结合体细胞克隆技术建立一套高效快速的基因编辑技术体系, 构建了多种基因编辑猪模型^[8-10].

* 国家重点研发计划-神经疾病大动物模型的建立及干细胞治疗评价(2017YFA0105100)和国家重点基础研究发展计划(973)-发育与生殖重要哺乳动物模型的建立(2011CB944200)资助.

** 通讯联系人.

赖良学. Tel: 020-32015304, E-mail: lai_liangxue@gibh.ac.cn

颜泉梅. Tel: 020-32015304, E-mail: yan_quanmei@gibh.ac.cn

收稿日期: 2019-03-22, 接受日期: 2019-07-24

为了研究 Tiki1 基因在哺乳动物发育中的作用, 本文选择猪为动物模型, 采用 CRISPR/Cas9 技术和体细胞克隆技术构建 Tiki1 基因敲除的猪模型, 分析猪体敲除 Tiki1 基因是否会导致猪胚胎缺失脑部结构或其他异常表型, 为挖掘 Tiki1 基因在哺乳动物发育过程中的功能提供一定的参考依据.

1 材料与方法

1.1 实验材料

分子实验相关试剂无特殊说明均购于 Takara 公司, 细胞培养相关试剂无特殊说明均为 Gibco 公司产品, 化学试剂无特殊说明均购自 Sigma 公司. 实验猪均来自中国科学院广州生物医药与健康研究院医用猪大动物基地, 所用细胞均由中国科学院广州生物医药与健康研究院赖良学实验室自行分离冻存. 所用卵均从广州市屠宰场取回后由本实验室体外培养成熟. 所有动物的饲养管理和使用都符合公共卫生服务条例, 动物福利法规以及中国科学院广州生物医药与健康研究院关于保护和使用实验动物的相关政策 (国际 AAALAC 标准). 所有的动物实验均按照实验动物使用操作规程进行操作. 实验动物饲养和使用均得到中国科学院广州生物医药与健康研究院实验动物管理委员会和实验动物福利和管理委员会的许可, 实验动物许可证: #A5748-01.

1.2 实验方法

1.2.1 Tiki1 基因靶位点的选择及 gRNA 的制作

a. 靶位点的选择

基因靶位点的选择遵循 GGN (17~18) NGG (N 为任意碱基) 的序列要求, 其中 GGN (17~18) 是与靶基因结合的位点, NGG 是 Cas9 蛋白切割所必需的 PAM (protospacer-adjacent motif) 区. 因为我们实验室所用的 pT7-gRNA 体外转录载体是 T7 启动子, 所以要求第二位碱基也为 G; 若是选择其他启动子则第二位碱基可任意修改. 此外, 可在正义链或反义链上选择靶位点.

b. 靶位点退火成含黏性末端的小片段

选择了合适的靶位点之后, 根据靶位点合成 2 条 oligo (均为 24 nt, S 序列与靶序列同向, AS 反向). S 引物序列为: 5'-CACC-GN19-3'; AS 引物序列为: 5'-AAAC-GN19-3' (含第一个 G, 反向互补).

用一个 1 L 的烧杯装满水, 微波炉加热至沸腾后, 把配置好的反应液置入烧杯中, 继续中火加热 10 min, 取出大烧杯自然冷却至室温后取出 1.5 ml

于 EP 管瞬时离心备用.

c. 空载体 (pT7-gRNA) 的线性化

pT7-gRNA 质粒含有 2 个 *Bbs* I 酶切位点, 经 *Bbs* I 内切酶酶切成含黏性末端的线性化 gRNA (L-gRNA), 在 1.5 ml EP 管中配置反应液混匀后, 37°C、4 h, 电泳回收 L-gRNA 后, 用 40 μ l ddH₂O 溶解.

d. L-gRNA 与退火靶位点的连接

L-gRNA 与退火靶位点的连接用 TAKARA 公司提供的 solution I, 在 PCR 管中配置反应液混匀后, 然后 16°C, 30 min 转化, 涂氨苄抗性的平板, 第 2 d 后挑取 4 个菌落扩大培养提取质粒送测序, 测序正确的 gRNA 质粒备用.

具体步骤如下: 10 μ l 连接产物+50 μ l Top 10 感受态细胞→混匀后, 冰上放置 30 min→42°C, 90 s→冰上冷却约 3 min→加入 500 μ l 无抗性 LB 培养基, 37°C 摇床中摇 30 min→取 250 μ l 涂氨苄平板, 过夜培养→挑取单个菌落.

实验室使用的 Cas9a 质粒 (货号 41815) 购自 Addgene 官网. 测序正确的 gRNA 和 Cas9 质粒大量制备质粒, 质粒浓度在 1g/L, A_{260}/A_{280} 值在 1.8 左右的质粒方可进行下一步的细胞转染用.

1.2.2 猪胎儿成纤维细胞的分离培养及冻存和复苏

a. 分离培养: 本实验用猪胎儿样品取自自然交配, 怀孕 35 d 的母猪, 通过手术将整个子宫取出, 置于冰上, 带回实验室. 在无菌细胞间条件下, 将胎儿从尿囊中剥离出来, 放在 10 cm 培养皿中, 用含有抗生素的 PBS 清洗 3 遍. 在超净工作台上, 用灭菌的剪刀将胎儿的内脏、头部和四肢剪掉, PBS 再清洗 3 遍. 将胎儿的躯干转移到新的 10 cm 培养皿中, 用眼科剪将猪胎儿剪碎成非常小的组织块, 加入 12 ml 胶原酶消化液, 在 37°C 细胞培养箱中消化 2~3 h. 消化完成后, 收集消化液至 15 ml 离心管中, 200 g、离心 4 min, 去上清, 再加入适量培养基重悬, 同样条件离心, 将胶原酶去除干净. 离心后去除上清, 用培养基重悬后接种到新的 10 cm 培养皿中 (一个胎儿 3 个 10 cm 培养皿, 每个培养皿中加 10 ml 培养基), 37°C、5% CO₂ 细胞培养箱培养过夜.

b. 细胞冻存: 第 2 d 观察细胞生长状态并更换新鲜的细胞培养基. 待细胞长满培养皿时, 准备冻存细胞. 首先吸掉皿中培养基, PBS 清洗 2 遍, 加入 1.5 ml 0.05% 胰酶 37°C 消化 3 min. 镜下观察有少部分细胞开始漂起时加入 2 ml 培养基终止消化,

用1 ml 移液枪轻轻吹打,使所有细胞脱离培养皿,然后将全部消化液收集到15 ml离心管中,200 g,离心4 min,去上清,加入适量的冻存液重悬细胞,每个长满的10 cm培养皿冻存4管,每管0.5 ml分装,记为P0代,将分装好的冻存管迅速转移到程序降温盒中,-80℃过夜后,转移到液氮罐中长期保存.

c. 细胞复苏:将要复苏的细胞从液氮中取出,待液氮挥发完毕后,将冻存管置于37℃水浴锅内融化,冻存管盖要保持在水面以上.待细胞悬液融化后,将冻存管在超净工作台内打开,将悬液移于15 ml离心管内,逐滴加入培养基,边加边震荡混匀,200 g离心5 min.去上清,加入1~2 ml培养基,用1 ml移液枪吹打均匀,把细胞重悬后移入合适的培养皿或者培养板中.用于细胞筛选的细胞移入10 cm培养皿,加入10 ml培养基进行培养,培养条件为38.5℃,5% CO₂.用于体细胞核移植的细胞移入2个24孔板,加入1 ml培养基进行培养.次日给细胞换液,之后可每隔2 d换液.

1.2.3 细胞转染筛选及鉴定

a. 电穿孔转染

分离后冻存的野生型猪胎儿成纤维细胞于10 cm培养皿中复苏,长满90%以上时,可用于细胞筛选.

① 转染前一天,将分离的猪胎儿成纤维细胞复苏培养,更换新培养基.

② 转染当天,去除培养基,PBS清洗2遍,用0.05%胰酶于38℃消化3 min.后用PFF培养基终止消化.

③ 将消化后的细胞连同培养基收集至15 ml离心管,300 g离心5 min,去除上清,用PBS重悬并再次离心清洗细胞,室温条件下300 g离心3 min.

④ 去掉上清,用PBS重悬细胞,并调整细胞浓度至 1×10^6 .

⑤ 取300 μ l细胞移入电转杯,把准备好的质粒加入电转杯的细胞悬液中,轻轻混匀.把电转杯置于电穿孔仪上,在230 V/cm和500 μ F的条件下进行细胞转染.

⑥ 电转结束后,将细胞平均转移至15个10 cm盘中,加入适量PFF培养基,于CO₂培养箱中恢复培养24 h.

b. 细胞筛选

电击完成后静置电击杯1 min,然后将细胞分

至到15个10 cm培养皿中,隔天换为含G418(800 mg/L)的细胞培养基,每隔2 d换液,筛选8~10 d后在显微镜下用笔圈出单细胞克隆,然后用克隆圈挑取细胞克隆.将消化的细胞转移到48孔板,待48孔板中细胞长满传代到24孔板,并取出约1/5的细胞裂解后作为DNA模板用于PCR鉴定,筛选出的阳性克隆待24孔板长满后传到12孔板,后冻存备用.

c. 挑取细胞克隆

准备洗净消毒好的克隆环,用PBS洗3遍后泡在PBS中备用.取出细胞,去除培养基,用PBS洗2遍,根据画好克隆的位置放置克隆环.在克隆环中加胰酶覆盖底部,室温下消化5 min,把克隆环中加满培养基终止反应.将每个克隆环中的细胞尽量全部移入48孔板的一个孔中培养,第2 d换液.

d. 克隆的传代

培养于48孔板中的细胞克隆长满后需传代并取细胞进行鉴定.具体方法:去除培养基,用PBS洗2遍,加100 μ l胰酶,38℃,消化3 min,加500 μ l培养基终止反应.用移液枪头轻轻吹打,混匀孔中细胞,取60 μ l细胞于1.5 ml离心管中用于克隆鉴定,剩余的细胞移入24孔板的一个孔中培养,第2 d换液.

e. 阳性细胞克隆的鉴定

取上述装有细胞的1.5 ml离心管,10 000 r/min,离心5 min,尽量去尽上清.加入10 μ l NP40裂解液,涡旋振荡10 s后瞬时离心,置于烘箱中裂解,56℃、1.5 h,95℃、15 min,取出置于-20℃冰箱冷却.

以细胞裂解混合物作为模版进行PCR,PCR产物送华大基因测序,测序结果出现基因敲除或者插入的则为阳性克隆.

1.2.4 基因敲除猪的制备

a. 供体细胞的准备

从液氮罐中取出待进行体细胞核移植的阳性细胞克隆;复苏细胞.在显微操作前消化细胞;收集细胞到15 ml离心管中;离心,用1 ml细胞培养基重悬,备用.

b. 猪卵母细胞的体外成熟

从屠宰场收集猪卵巢置于39℃加有青霉素,链霉素的0.9%的生理盐水中,保温带回实验室.39℃、0.9%的生理盐水冲洗后,将卵巢置于盛有少量生理盐水的烧杯中,39℃水浴保温.使用带有12号针头的10 ml注射器将卵巢卵泡中的卵泡液吸

出于50 ml的离心管中, 39℃水浴保温. 全部卵巢吸完后, 将吸出的卵泡液带入无菌细胞培养室, 静置4 min, 使卵丘卵母细胞复合物及杂质沉降离心管底部, 弃上清, 加入洗卵液.

静置沉降等待的过程中, 准备手吸管, 取外径2.5 mm, 内径2.0 mm的玻璃管, 在酒精灯的外焰烧至熔化变软, 边将玻璃管离开火焰, 边迅速从两端拉玻璃管, 将玻璃管熔化部分拉制成外径200~300 μm 的毛细管, 用砂轮将毛细管断开并抛光, 将玻璃管粗的一端固定于胶头滴管帽上, 手吸管制作完毕. 用洗卵液洗沉降物2遍后, 再用15 ml洗卵液重悬沉降物, 将其转移入60 mm的培养皿中, 在配有热台(热台温度调至39℃)的体式镜下用手吸管捡取卵丘卵母细胞复合物, 捡取的卵母细胞外围包裹的卵丘细胞应大于3层.

捡取的卵丘卵母细胞复合物用洗卵液和成熟液各洗1次后, 转移至提前平衡好的成熟液中培养(5% CO_2 , 饱和湿度, 39℃). 每孔放置40~70枚卵丘卵母细胞复合物. 体外成熟培养42~44 h后, 将卵丘卵母细胞复合物转移入39℃去卵丘操作液, 涡旋震荡5 min, 至卵丘细胞脱落. 将消化后的卵母细胞转移入盛有操作液的35 mm皿中, 体式镜下挑取排放第一极体的卵母细胞于另一盛有操作液的35 mm皿中, 39℃保存, 待用. 卵母细胞成熟液: TCM-199 (Gibco) 加3.05 mmol/L D-葡萄糖 (Sigma, G7021), 0.91 mmol/L 丙酮酸钠 (Sigma, P4562), 0.1% PVA (Sigma, P8136), 75 mg/L 青霉素 (Sigma, P3032), 50 mg/L 链霉素 (Sigma, S1277), 0.5 mg/L 黄体化激素 (Luteinizing hormone, LH, Sigma L5269), 10 $\mu\text{g}/\text{L}$ 表皮生长因子 (EGF, Sigma, S4127), 0.5 mg/L 促卵泡成熟激素 (follicle stimulating hormone, FSH, Sigma, F2293), 0.57 mmol/L 半胱氨酸 (Sigma, C8152), 10% 卵泡液.

c. 制作核移植操作滴

取60 mm培养皿, 在皿盖中滴上50 μl 去核操作滴, 排成中间一点、外圈包围5点的形状, 另外在外圈滴上2小滴10% PVP, 在皿中轻柔加入石蜡油, 直至覆盖所有液滴.

d. 固定针和注射针的准备

注射针: 取外径1.0 mm, 内径0.8 mm的玻璃管固定于已调好参数的拉针仪上, 按STRAT键, 拉针仪将玻璃管拉开, 拉制的玻璃管形变部位到尖端距离约1 cm. 取下拉制好的玻璃管, 固定于断针

仪上, 调整玻璃管位置, 使其尖端直径20 μm 处与玻璃球相切, 加热玻璃球, 玻璃管尖端轻微颤抖时停止加热, 玻璃管即在20 μm 处平端断开. 将断好的玻璃管固定于磨针仪上, 调整玻璃管与磨石的角度为45°, 调整粗调螺旋, 使玻璃管尖端靠近磨石, 再调整细调螺旋, 使玻璃管轻轻下压, 使玻璃管细段呈现一定弧度压在磨石上, 调整磨石转速到最大, 磨制约10 min后, 将针取下, 在断针仪上进行检查, 磨好的针前段斜口呈椭圆形. 将磨好的针在1%的氢氟酸中吹吸清洗, 洗掉磨针过程中产生的玻璃碎屑, 再用75%酒精清洗, 以洗掉氢氟酸. 洗完的针固定于断针仪上, 调整玻璃管位置, 使其斜面背对自己靠近玻璃球. 加热玻璃球, 并调整加热温度, 使玻璃针斜面轻轻接触玻璃球. 玻璃针斜面顶端开始熔化时, 将玻璃针拉离玻璃球即在玻璃针斜面顶端形成一个小尖, 再将玻璃针距顶端5 mm处靠近玻璃球, 加热, 当毛细管前段因加热向玻璃球弯曲30°~40°时, 停止加热, 注射针制作完毕.

固定针: 取外径1.0 mm, 内径0.6 mm的玻璃管, 在自制小酒精灯的外焰烤至熔化变软, 边将玻璃管离开火焰, 边迅速从两端拉玻璃管. 将玻璃管熔化部分拉制成外径150~200 μm 的毛细管, 用砂轮将毛细管断开. 在断针仪上将毛细管断开部位靠近铂金丝上的玻璃球, 加热烤钝抛光, 并将内径烤制成20 μm , 再将毛细管距顶端5 mm处靠近玻璃球, 加热, 当毛细管前段因加热向玻璃球弯曲30°~40°时, 停止加热, 固定针制作完毕.

e. 卵母细胞去核和供体细胞卵周隙注射

准备工作: 将固定针和注射针分别固定到相对应的操作臂上, 在镜下调整好位置后, 升起固定针, 将核移植操作滴所在的60 mm皿盖置于镜下, 将注射针转移到10% PVP滴中, 不断吸吐近10次, 将注射针清洗干净, 使石蜡油和液体在针内流畅地流动.

卵母细胞去核和供体细胞卵周隙注射: 将50~80个卵用手吸管转移到去核操作滴中, 将供体细胞加到中间的去核操作滴中, 用注射针挑选形态规则、相差较大的细胞, 吸到针内备用. 固定针轻轻吸住卵母细胞, 用注射针拨动卵母细胞寻找极体, 最后将极体定位到4、5点钟方向, 注射针在3点钟方向进针, 吸出极体以及周围的部分胞质, 再将一个供体细胞沿刚才的针孔注入卵周隙中, 抽出注射针, 轻轻挤压卵母细胞, 使卵母细胞和供体细胞接

触. 松开处理过的卵, 固定下一个未处理过的卵, 重复以上步骤. 整个过程在 38.5℃ 热台上操作.

f. 卵母细胞和供体细胞融合以及重构胚胎激活

将去核卵母细胞-供体细胞复合物转移至操作液中, 取 30~50 个置于含融合液的小皿中平衡, 去核卵母细胞-供体细胞复合物首先飘起到液面, 之后慢慢沉到皿底, 表明平衡完成. 同时, 打开融合仪, 设置参数为 120 V/mm、30 μs、2 次, 将两个电极夹到融合槽的两极, 加入融合液冲洗 1 次融合槽, 最后置于 60 mm 培养皿中, 加入融合液, 直至融合液没过融合槽的两个平行电极之间的空隙, 两条电极之间间隔为 1 mm.

将平衡好的卵母细胞-供体细胞复合物置于两个电极中间, 用新做的拨卵针拨动卵母细胞-供体细胞复合物, 使去核卵母细胞和供体细胞的接触面平行于两个电极, 最后按开关进行电脉冲处理. 将处理过的卵母细胞-供体细胞复合物转移至操作液滴中, 静置 15~20 min 后, 在体视镜下, 用拨卵针挑选出融合的重构胚.

g. 重构胚胎的体外培养

PZM-3 培养基平衡: 将 PZM-3 培养基按每孔 0.5 ml 加入四孔板中, 加入石蜡油覆盖液体表面, 另取小皿两个, 在皿底滴上 300 μl PZM-3 培养基液滴 3 个, 加入石蜡油覆盖表面, 将四孔板和小皿置于 5% CO₂、38.5℃、100% 湿度的恒温培养箱平衡过夜.

重构胚胎培养: 将挑选的融合重构胚在小皿滴中洗涤 3 遍后, 将重构胚胎加入四孔板中, 置于 5% CO₂、38.5℃、100% 湿度的恒温培养箱中培养.

h. 卵裂率、囊胚率以及囊胚细胞数检测方法

卵裂率: 重构胚胎培养 48 h 后, 在显微镜下观察, 记录卵裂胚胎个数, 其与培养重构胚的比例即为卵裂率. **囊胚率:** 在显微镜下观察, 记录重构胚胎发育到囊胚的个数, 其与培养重构胚的比例即为囊胚率. **囊胚细胞数检测:** 取一洁净的手吸管, 在体视镜下将囊胚从 PZM-3 培养基中吸出后, 转移到 4% 的多聚甲醛溶液中固定 5~10 min, 在操作液中清洗一遍后将囊胚转移到 Hoechst 33342 染液中, 染色 10 min, 最后将囊胚从 Hoechst 33342 转移到操作液中, 用锡纸包住 48 孔板, 4℃ 过夜, 以保证洗去背景染色. 第二天, 取洁净的载玻片, 在中央滴

5 μl 的抗荧光淬灭封片液, 将囊胚转移到封片液中, 在囊胚所在位置用记号笔标记. 打开电脑、显微镜以及荧光激发器, 打开荧光成像软件, 调整焦距, 拍下囊胚荧光图片, 再打开明场, 拍下明场照片, 再用画图软件打开荧光照片, 记录每个囊胚细胞数.

i. 胚胎移植

待受体猪呼吸平稳进入深度麻醉状态时进行手术. 在倒数第一对和倒数第二对乳头之间开口 8 cm 左右, 将卵巢输卵管慢慢牵出腹腔, 观察卵巢排卵情况, 并找到输卵管的伞部用镊子进行固定. 将装好的胚胎移植管, 从输卵管伞部慢慢伸入输卵管. 胚胎移植完成后, 将输卵管伞重新包回卵巢, 将卵巢输卵管送回腹腔. 以生理盐水冲洗创口后进行缝合.

j. 代孕受体的妊娠诊断

胚胎移植后 24~26 d 进行 B 超监测妊娠情况, 并对怀孕受体每隔 1 周进行一次 B 超监测, 追踪核移植胚胎发育情况.

k. 新生克隆猪的基因型鉴定

新生克隆猪在出生后 1 周剪取耳组织, 利用组织基因组提取试剂盒 (天根生化科技有限公司) 提取克隆猪基因组 DNA, 基因组提取见试剂盒说明书. 以提取的基因组为模板, 进行 PCR, PCR 产物进一步酶切和测序鉴定.

2 结果与分析

2.1 Tiki1 基因靶位点的选择

我们根据贺熹教授团队提供的人 Tiki1 基因的完整的 cDNA 序列, 在猪的基因组数据库里比对, 发现预测的猪 Tiki1 基因位于第 3 号染色体上, 其预测的外显子 4 序列与人 Tiki1 基因的同源性最高, 因此我们在预测的猪 Tiki1 基因外显子 4 上选择 2 个靶位点进行猪 Tiki1 基因的敲除: 以下序列为预测的猪 Tiki1 基因的整个外显子 4, 带下划线的碱基序列为靶位点序列, 斜体加粗标记的碱基为 PAM 区 (图 1); 其中 **GCGATCCGTGTCCGTACACCCGG** 命名为靶位点 g1, **GCCCCAGGGTGAGAACCTCCAGG** 命名为靶位点 g2.

TGCTCAAGTTCCTGACCCTCCCTAGCATATCTCCATGTTGTCACTTTTCCTTTTAGCAAAGTGAATTGAATTCCTTCTTG
 GACCATCAAGCGAGACCCACCGTCTTACTTCTTTAGCGCGATCCCGTGTCCGTACACCCGGGTTTGGGACTTCATCCCTG
 ACAACTCCAAGGAGGCTTCCGGCAGAGCTGGACCTCATGGACCCCTACCATCTCAGCTCTCACCAGCTGTGAGATGC
 TGCCCCAGGGTGAGAACCTCCAGGACATGCTCCCCAGGGACATCTACTGCCATCTCAAGCGCCACCTAGAGAACGTCA
 AGCTCATGATGCCCTCATGGATGACTCCTGACCAGCGCCGGAAGGGTCTCTATGCAGACTACCTTCTCAGTGCCATTGCTG
 GAACTGGGAGTGGAAGAGGCCATCTGGATCATGCTCATGATCAACTCCCTGACCGAAGCGTACACCAAGTCCCGTGG
 GGTGCCCGTCTTAGACCTGTGCCTTGCCAGGAGGCCAAGCGGCTGAGGAAACAGACGGGGCAGTGAGAAAGGTGGA
 AGAGCAGTGTATCCCTGAATGGGCTGAACTTTTCGCAAGAAAGATCCTTCTTGTTCAGGACTTGGTGGCAGTTGAT
 GGTGTAGCTGGGCCTATTGC

Fig. 1 Target site of Tiki1 gene

2.2 Tiki1基因打靶细胞的转染和筛选

分别将大提好的 Cas9 质粒和 gRNA-g1 或者 gRNA-g2 质粒各 25 μg 混合后共转染原代巴马猪胎儿成纤维细胞 PFF 中, 进行为期 10 d 左右的 G418 筛选, 挑取一定数量的细胞克隆进行 PCR 扩增后测序鉴定. 针对靶位点 g1, 我们总共挑取了 22 个细胞克隆, PCR 测序鉴定了 22 个, 选择其中测序结果为单峰且无野生型序列 (表明细胞只有一种敲除

方式, 称为纯合双敲除) 的 5 个阳性细胞克隆冻存备用; 针对靶位点 g2, 我们总共挑取了 30 个细胞克隆, PCR 测序鉴定了 28 个, 选择其中测序结果为纯合双敲除的 3 个阳性细胞克隆冻存备用. 以上选择冻存备用的 8 个阳性细胞克隆的具体突变方式见图 2, 其突变范围从 1 bp 的插入到 8 bp 的缺失不等. 带下划线的碱基序列为靶位点序列, 斜体加粗标记的碱基为 PAM 区, 空心字母代表插入的碱基.

WT-1	CACCGTCTTACTTCTTTAGCGCGATCCCGTGTCCGTACACCCGGGTTTGGGACTTCATC	Target-g1
1-1	CACCGTCTTACTTCTTTAGCGCGATCCCGTGTCCGTAC-CCCGGGTTTGGGACTTCATC	-1 bp
1-2	CACCGTCTTACTTCTTTAGCGCGATCCCGTGTCCGTACCCACCCGGGTTTGGGACTTCATC	+1 bp
1-8	CACCGTCTTACTTCTTTAGCGCGATCCCGTGTCCGT--ACCCGGGTTTGGGACTTCATC	-2 bp
1-12	CACCGTCTTACTTCTTTAGCGCGATCCCGT-----CCCGGGTTTGGGACTTCATC	-8 bp
1-19	CACCGTCTTACTTCTTTAGCGCGATCCCGTGC---CACCCGGGTTTGGGACTTCATC	-4 bp
WT-2	CTCACCAGCTGTCAGATGCTGCCCGAGGGTGAGAACCTCCAGGACATGCTCCCCAGGG	Target-g2
2-2	CTCACCAGCTGTCAGATGCTGCCCGAGGGTGAGAA--TCCAGGACATGCTCCCCAGGG	-2 bp
2-10	CTCACCAGCTGTCAGATGCTGCCCGAGGGTGAGAA--TCCAGGACATGCTCCCCAGGG	-2 bp
2-28	CTCACCAGCTGTCAGATGCTGCCCGAGGGTGAGAAC-TCCAGGACATGCTCCCCAGGG	-1 bp

Fig. 2 Sequencing results of positive cell clones screened

2.3 Tiki1基因打靶克隆猪的生产

我们将筛选到的 Tiki1 基因打靶阳性细胞进行体细胞核移植, 过夜培育后将重组胚移植入代孕母猪, 自然妊娠约 114 d 后产仔. 我们总共移植了 720 个重组胚胎, 分别植入 3 头代孕母猪 (移植统计表 1). CRISPR/Cas9 系统存在一定的脱靶效应, 但是因为筛选到的阳性细胞克隆其体外扩增有限, 无法获得足量的基因组进行潜在脱靶位点的检测, 因

此我们通过筛选到的靶位点 g1 (5 个阳性细胞克隆) 和 g2 (3 个阳性细胞克隆) 的不同阳性克隆的细胞进行核移植获得重组胚胎, 以混合方式移植代孕母猪, 以降低某些细胞克隆因潜在的脱靶效应可能导致无法获得存活个体的概率. 其中代孕母猪耳号为 927 母猪, 经 B 超检测成功怀孕到期, 并产下总共 13 头克隆仔猪其中包括 10 头成活的克隆猪和 3 头死胎 (图 3), 3 头死胎外观没有任何缺陷, 解

Table 1 Statistical results of embryonic transplantation of the target cloning pig with Tiki1 gene

ID of recipients	Cell colonies	Transferred embryos	Born number
927	Tiki1 (1-1, 1-2, 1-8, 1-19, 2-2, 2-10, 2-28)	226	13
176	Tiki1 (1-1, 1-2, 2-2)	235	0
950	Tiki1 (1-1, 1-8, 2-28)	259	0



Fig. 3 Target cloning pigs with Tiki1 gene

剖后观察期内部生理解剖均无异常，10头存活仔猪均无外观异常及其他生理缺陷，截至写稿日，已健康存活1年多；另外2头代孕母猪在移植后26天进行B超检测均未发现妊娠现象。

2.4 Tiki1基因打靶克隆猪测序结果

我们对新生的13头克隆猪在出生后剪取耳组

织，利用组织基因组提取试剂盒（天根生化科技有限公司）提取克隆猪基因组DNA，基因组提取见试剂盒说明书。以提取的基因组为模板，进行PCR，PCR产物进一步测序鉴定。测序结果见图4。其中#1、3、5、6、8、10和13克隆仔猪的Tiki1基因敲除位点在靶位点g1处，克隆猪#1和10敲除方式同阳性细胞克隆1-1、克隆猪#3和13敲除方式同阳性细胞克隆1-8、克隆猪#5、6和8敲除方式同阳性细胞克隆1-2；除了#7号为野生型外，其余的#2、4、9、11和12号克隆仔猪的Tiki1基因敲除位点在靶位点g2处，其敲除方式均同阳性细胞克隆2-10。说明构建的克隆猪确实来自筛选的阳性细胞克隆。从实验结果，我们可以看出，筛选到的阳性单细胞克隆仍混有一定的野生型细胞，此外，阳性细胞克隆1-12、1-19、2-2和2-28均未获得克隆猪。带下划线的碱基序列为靶位点序列，红色标记的碱基为PAM区，蓝色字母代表插入的碱基。

Target-g1	CACCGTCTTACTTCTTTAGCGCGATCCGTGTCCGTACACCCGGGTTTGGGACTTCATC	WT
Target-g2	CTCACCAGCTGTCAGATGCTGCCCCAGGGTGAGAACCTCCAGGACATGCTCCCCAGGG	WT
#1	CACCGTCTTACTTCTTTAGCGCGATCCGTGTCCGTAC-CCCGGTTTGGGACTTCATC	-1 bp
#2	CTCACCAGCTGTCAGATGCTGCCCCAGGGTGAGAA--TCCAGGACATGCTCCCCAGGG	-2 bp
#3	CACCGTCTTACTTCTTTAGCGCGATCCGTGTCCGT--ACC CGGTTTGGGACTTCATC	-2 bp
#4	CTCACCAGCTGTCAGATGCTGCCCCAGGGTGAGAA--TCCAGGACATGCTCCCCAGGG	-2 bp
#5	CACCGTCTTACTTCTTTAGCGCGATCCGTGTCCGTAC CACCCGGGTTTGGGACTTCATC	+1 bp
#6	CACCGTCTTACTTCTTTAGCGCGATCCGTGTCCGTAC CACCCGGGTTTGGGACTTCATC	+1 bp
#7	CACCGTCTTACTTCTTTAGCGCGATCCGTGTCCGTACACCCGGGTTTGGGACTTCATC	WT
#8	CACCGTCTTACTTCTTTAGCGCGATCCGTGTCCGTAC CACCCGGGTTTGGGACTTCATC	+1 bp
#9	CTCACCAGCTGTCAGATGCTGCCCCAGGGTGAGAA--TCCAGGACATGCTCCCCAGGG	-2 bp
#10	CACCGTCTTACTTCTTTAGCGCGATCCGTGTCCGTAC-CCC GGTTTGGGACTTCATC	-1 bp
#11	CTCACCAGCTGTCAGATGCTGCCCCAGGGTGAGAA--TCCAGGACATGCTCCCCAGGG	-2 bp
#12	CTCACCAGCTGTCAGATGCTGCCCCAGGGTGAGAA--TCCAGGACATGCTCCCCAGGG	-2 bp
#13	CACCGTCTTACTTCTTTAGCGCGATCCGTGTCCGT--ACC CGGTTTGGGACTTCATC	-2 bp

Fig. 4 Sequencing results of target cloning pigs with Tiki1 gene

3 讨 论

目前关于Tiki1基因研究的报道还非常少，最先是2012年由贺熹团队在《细胞》杂志（Cell）杂志上报道的。他们在爪蟾上的研究发现，Tiki1基因缺失导致爪蟾胚胎缺失头部、胚胎致死、无法获得存活个体，其表达模式和功能与Wnt信号通路的抑制因子DKK1非常相似；他们进一步证明了Tiki1也是Wnt信号通路的抑制因子，通过切割Wnt蛋白氨基端区域使特定的Wnt配体失活^[6]。在本研究

中，敲除Tiki1基因不仅没有出现猪胚胎头部缺失等发育异常和胚胎致死等表型，而且可以获得存活的健康基因敲除猪模型，这与爪蟾上的研究结果不一致。以上结果表明，Tiki1基因缺失不会影响猪的胚胎发育，其在哺乳动物猪上的功能不同于其在爪蟾上的功能，猜测可能是Tiki1基因在物种进化上的不保守性造成的。虽然在爪蟾上的研究结果表明Tiki1基因的功能类似DKK1，但Tiki1基因在小鼠等啮齿类动物中天然缺失，而DKK1基因不但存在于小鼠中，而且功能与在爪蟾上的一致，都对头部诱导起决定作用，其缺失都导致胚胎致死^[2-3]，这

至少说明 Tiki1 基因在哺乳动物的功能与 DKK1 的功能是有差异的, 这也许是解释 Tiki1 基因敲除猪表型正常的一个潜在理由。

Tiki1 基因缺失在爪蟾和猪上表型的不一致现象, 与 Cerberus 基因缺失在爪蟾上和其同源基因 Cer-1 缺失在小鼠上的表型不一致现象非常相似。Cerberus 蛋白在爪蟾上被证明为 Wnt 信号通路的抑制因子, 对爪蟾的头部形成具有重要作用, 当把小鼠的该同源基因 (mouse Cerberus like, mCer-1) 的 mRNA 注射到爪蟾胚胎中, 可以诱导巨大的背前结构和短小的体轴结构, 其功能类似爪蟾的 Cerberus 基因^[11-12]。但是在小鼠上的研究结果发现, mCer-1 蛋白并非 Wnt 信号通路的抑制因子, 而是 Nodal 和 BMP 信号通路的抑制因子。此外, mCer-1 基因缺失小鼠的胚胎可以正常发育, 这不同于爪蟾中 Cerberus 基因缺失导致的头部发育异常和胚胎致死等表型, 并且 mCer-1 基因缺失纯合小鼠具有正常的繁殖力, 可繁殖出健康后代^[13-14]。虽然到目前为止还没找到导致这种基因在不同物种功能差异的分子机制, 但 Tiki1 基因在爪蟾等低等动物和哺乳动物中的功能模式有可能与 Cerberus 相同。还有一种导致 Tiki1 基因缺失但不会造成猪表型异常的原因, 可能是在猪等哺乳动物中存在其他可以替代 Tiki1 基因功能或者弥补 Tiki1 基因缺失的基因, 就像 BMP 信号通路中 chordin 和 noggin 间的相互补偿作用一样^[15]。关于 Tiki1 基因在哺乳动物中的具体功能和机理, 有待于在我们利用 CRISPR/Cas9 系统构建的 Tiki1 基因修饰猪模型的基础上继续开展进一步的研究。

参 考 文 献

- [1] Lewis S L, Khoo P L, Andrea De Young R, *et al.* Genetic interaction of Gsc and Dkk1 in head morphogenesis of the mouse. *Mechanisms of Development*, 2007, **124**(2): 157-165
- [2] Glinka A, Wu W, Delius H, *et al.* Dickkopf-1 is a member of a new family of secreted proteins and functions in head induction. *Nature*, 1998, **391**(6665): 357-362
- [3] Kazanskaya O, Glinka A, Niehrs C. The role of *Xenopus dickkopf1* in prechordal plate specification and neural patterning. *Development (Cambridge, England)*, 2000, **127**(22): 4981-4992
- [4] Wu W, Glinka A, Delius H, *et al.* Mutual antagonism between dickkopf1 and dickkopf2 regulates Wnt/beta-catenin signalling. *Current Biology: CB*, 2000, **10**(24): 1611-1614
- [5] Mukhopadhyay M, Shtrom S, Rodriguez-Esteban C, *et al.* Dickkopf1 is required for embryonic head induction and limb morphogenesis in the mouse. *Dev Cell*, 2001, **1**(3): 423-434
- [6] Zhang X, Abreu J G, Yokota C, *et al.* Tiki1 is required for head formation via Wnt cleavage-oxidation and inactivation. *Cell*, 2012, **149**(7): 1565-1577
- [7] Reis A H, Macdonald B, Feistel K, *et al.* Expression and evolution of the Tiki1 and Tiki2 genes in vertebrates. *Int J Dev Biol*, 2014, **58**(5): 355-362
- [8] Zhou X, Xin J, Fan N, *et al.* Generation of CRISPR/Cas9-mediated gene-targeted pigs *via* somatic cell nuclear transfer. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 2015, **72**(6): 1175-1184
- [9] Han K, Liang L, Li L, *et al.* Generation of Hoxc13 knockout pigs recapitulates human ectodermal dysplasia-9. *Human Molecular Genetics*, 2017, **26**(1): 184-191
- [10] Wang K, Jin Q, Ruan D, *et al.* Cre-dependent Cas9-expressing pigs enable efficient *in vivo* genome editing. *Genome Research*, 2017, **27**(12): 2061-2071
- [11] Bouwmeester T, Kim S, Sasai Y, *et al.* Cerberus is a head-inducing secreted factor expressed in the anterior endoderm of Spemann's organizer. *Nature*, 1996, **382**(6592): 595-601
- [12] Belo J A, Bouwmeester T, Leyns L, *et al.* Cerberus-like is a secreted factor with neutralizing activity expressed in the anterior primitive endoderm of the mouse gastrula. *Mechanisms of Development*, 1997, **68**(1-2): 45-57
- [13] Belo J A, Bachiller D, Agius E, *et al.* Cerberus-like is a secreted BMP and nodal antagonist not essential for mouse development. *Genesis (New York, NY: 2000)*, 2000, **26**(4): 265-270
- [14] Shawlot W, Min Deng J, Wakamiya M, *et al.* The cerberus-related gene, *Cerr1*, is not essential for mouse head formation. *Genesis (New York, NY: 2000)*, 2000, **26**(4): 253-258
- [15] Bachiller D, Klingensmith J, Kemp C, *et al.* The organizer factors Chordin and Noggin are required for mouse forebrain development. *Nature*, 2000, **403**(6770): 658-661

Construction of Tiki1 Gene Modified Pig Model by CRISPR/Cas9 System*

WU Cai-Xia^{1,2)}, LIU Zhao-Ming^{1,2)}, YAN Quan-Mei^{2)**}, ZHANG Quan-Jun²⁾, ZHAO Yu²⁾,
OUYANG Zhen²⁾, FAN Na-Na²⁾, LAI Liang-Xue^{1,2)**}

¹⁾College of Veterinary Medicine, Jilin University, Changchun 130062, China;

²⁾Guangzhou Institutes of Biomedicine and Health, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510530, China)

Abstract Tiki1 gene, found and named by Professor He Xi's team from Boston Children's Hospital, Harvard Medical School, plays a key role in the formation of head in *Xenopus*. However, as Tiki1 gene is absent in rodents such as mice, it is impossible to use mice or rat to study its role in mammals. In this study, we generated Tiki1 gene modified pigs using CRISPR/Cas9 system combined with somatic cell cloning technology to study the role of Tiki1 gene in pig development. Aligned the human Tiki1 mRNA sequence provided by professor He Xi's team with the pig genome database, we selected two target sites (g1 and g2) with the top 2 highest sequence identity at the predicted pig Tiki1 gene locus. The sgrRNA plasmid was constructed to transfect porcine fetal fibroblasts, and 52 single cell clones were screened and sequenced. We finally selected 5 single-cell clones with biallelic knockout mutations at target site g1 and 3 single-cell clones with biallelic knockout mutations at target site g2 as nuclear donors for constructing Tiki1 knockout pigs. A total of 720 recombinant embryos were constructed and transferred into three surrogate sows and one of them was successfully pregnant monitored by B ultrasound. A total of 13 cloned piglets (ten living piglets and 3 dead piglets) were produced, and 12 of them were biallelic knockout mutations at Tiki1 locus. Both the living and dead Tiki1 gene knockout cloned piglets were developed normally and the living piglets have survived healthy till now. The results indicate that the role of Tiki1 gene on early development of pigs is different from that of frogs. The specific role of Tiki1 gene in the early development of pigs needs to be further investigated.

Key words CRISPR/Cas9, Tiki1, gene targeting, pig model

DOI: 10.16476/j.pibb.2018.0307

* This work was supported by the National Key Research and Development Program of China Stem Cell and Translational Research (2017YFA0105100) to LL and National Basic Research Program of China (2011CB944200) to LL.

** Corresponding author.

LAI Liang-Xue. Tel: 86-20-32015304, E-mail: lai_liangxue@gibh.ac.cn

YAN Quan-Mei. Tel: 86-20-32015304, E-mail: yan_quanmei@gibh.ac.cn

Received: March 22, 2019 Accepted: July 24, 2019