

实验方法

应用CRISPR/Cas9技术制备*Ace2*基因敲除小鼠模型及基因型的鉴定

刘婵¹, 陈春艳^{1,2}, 商黔惠^{1,2,*}, 刘娟¹遵义医学院附属医院¹临床医学研究所, 心血管病研究所, 高血压研究室; ²心血管内科, 遵义 563003

摘要: 本研究旨在应用CRISPR/Cas9技术高效构建*Ace2* (angiotensin-converting enzyme 2)基因敲除小鼠模型, 并繁殖、鉴定及验证*Ace2*基因敲除小鼠。通过构建靶向敲除*Ace2*基因的载体, 体外将Cas9 mRNA和向导RNA (guide RNA, gRNA)显微注射到小鼠受精卵中, 通过PCR和TA克隆测序对小鼠*Ace2*基因的第3至18号外显子删除情况进行检测和鉴定, 繁育*Ace2*基因敲除小鼠并利用qRT-PCR和Western blot方法验证获得的*Ace2*^{-/-}小鼠主要脏器中*Ace2* mRNA和蛋白表达情况。结果显示, 顺利构建表达gRNA载体并体外转录, 成功将有活性的gRNA和Cas9 mRNA直接注射入受精卵, 获得6只阳性F0代初建鼠, PCR和基因测序鉴定表明成功删除了小鼠*Ace2*基因的第3至18号外显子; F0代鼠与野生型鼠回交, 得到3只阳性F1代鼠, 再与野生型鼠相交配得到的后代为F2代, 在F2代中选择*Ace2*^{+/-}雌性杂合子鼠与野生型鼠交配, 获得F3代*Ace2*^{-/-}雄性纯合子小鼠。qRT-PCR和Western blot结果表明, F3代*Ace2*^{-/-}小鼠肾脏和肺中未检测到*Ace2* mRNA和蛋白表达。本方法通过CRISPR/Cas9技术成功制备了*Ace2*基因敲除小鼠模型, 为进一步研究*Ace2*基因功能奠定了基础。

关键词: *Ace2*; 基因敲除小鼠; CRISPR/Cas9; 鉴定**中图分类号:** R332; Q75

Establishment of *Ace2* knockout mouse model with CRISPR/Cas9 gene targeting technology

LIU Chan¹, CHEN Chun-Yan^{1,2}, SHANG Qian-Hui^{1,2,*}, LIU Juan¹¹Institute of Clinical Medicine & Institute of Cardiovascular Disease & Hypertension Laboratory; ²Cardiovascular Department, the Affiliated Hospital of Zunyi Medical College, Zunyi 563003, China

Abstract: The aim of the study was to establish *Ace2* (angiotensin-converting enzyme 2) knockout mouse model with CRISPR/Cas9 gene targeting technology. A vector targeting *Ace2* gene knockout was constructed with the primers of single-guide RNA (gRNA), and then transcribed gRNA/Cas9 mRNA was micro-injected into the mouse zygote. The deletion of exons 3 to 18 of *Ace2* gene in mice was detected and identified by PCR and gene sequencing. The *Ace2* gene knock-out mice were bred and copulated. *Ace2* protein and mRNA expression were detected by Western blot and qRT-PCR in F3 progeny knock-out male mice. The gRNA expression vector was successfully constructed and transcribed *in vitro*, and active gRNA and Cas9 mRNA were injected directly into zygote. The deletion of exons 3 to 18 of *Ace2* gene in six positive founder mice as the F0 generation were confirmed by PCR and gene sequencing. Six founder mice were mated with wild-type mice, then achieved F1 generation were mated and produced F2 generation. The female positive mouse of F2 was selected to mate with wild-type mice and produce *Ace2*^{-/-} mice of F3 generation. *Ace2* mRNA and protein were not detected in tissues of these *Ace2*^{-/-} mice. In conclusion, a mouse model with *Ace2* deficiency has been successfully established with CRISPR/Cas9 technique, which shall lay a foundation for future investigation of *Ace2*.

Key words: *Ace2*; gene knockout mice; CRISPR/Cas9; identification

Received 2018-10-30 Accepted 2019-02-13

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81460077, 81160041) and the Provincial Governor's Special Fund for Excellent Scientific and Technological Education Talents in Guizhou Province, China [Guizhou Special Character (2012) 15].

*Corresponding author. E-mail: qhshang60@126.com

CRISPR/Cas 系统是一种原核生物的免疫系统,用来抵抗外源遗传物质的入侵,比如噬菌体病毒和外源质粒。CRISPR/Cas 系统拥有多种类别,其中CRISPR/Cas9 系统是研究最深入、应用最成熟的一种类别,它可以识别出外源 DNA,并将它们切断,沉默外源基因的表达,正是由于这种精确的靶向功能,CRISPR/Cas9 系统被开发成一种高效的基因编辑工具。CRISPR/Cas9 是继锌指核酸内切酶、类转录激活因子效应物核酸酶之后出现的第三代“基因组定点编辑技术”。如果在基因的上下游各设计一条向导 RNA (guide RNA, gRNA), 将其与含有 Cas9 蛋白编码基因的质粒一同转入细胞中, gRNA 通过碱基互补配对可以靶向前间区序列邻近基序 (protospacer adjacent motif, PAM) 附近的目标序列, Cas9 蛋白会使该基因上下游的 DNA 双链断裂,生物体本身存在着 DNA 损伤修复的应答机制,会将断裂上下游两端的序列连接起来,从而实现了细胞中目标基因的敲除。对受精卵细胞进行基因编辑,并将其导入代孕母体中,可以实现基因编辑动物模型的构建^[1]。2013 年初,两个实验组将 CRISPR/Cas9 技术成功地在小鼠以及人细胞内实现精确的基因编辑^[2,3]。随后引发了 CRISPR/Cas9 井喷式发展,在基因编辑领域表现出巨大潜力和广阔应用前景。

血管紧张素转化酶 2 (angiotensin converting enzyme 2, ACE2) 是内源性降解血管紧张素 II (angiotensin II, AngII) 的特异性催化酶^[4], ACE2 与 ACE 作用相反,主要降解 AngII 生成 Ang(1-7), Ang(1-7) 具有扩张血管、降低血压、抗细胞增殖和纤维化作用。ACE2、Ang(1-7) 和受体 Mas 被认为是肾素-血管紧张素系统 (renin-angiotensin system, RAS) 的新成员,共同构成 ACE2-Ang(1-7)-Mas 轴,被视为 ACE-AngII-AT1R 经典轴的反向调节轴。Zhong 等^[5,6] 研究也进一步证实, AngII 可诱导小鼠心脏、肾脏纤维化和 *Ace2* 表达下调, *Ace2* 基因缺失可加剧 AngII 介导的心肾纤维化,而过表达 *Ace2* 基因可减弱 AngII 介导的心肾纤维化,表明 *Ace2* 是 AngII 介导心肾纤维化的内源性负性调节剂。Crackower 等^[7] 的报道显示 *Ace2* 基因敲除小鼠心血管功能发生严重损伤。ACE2 表达和活性增加可改善大鼠左心室重构^[8], 并且对高血压具有一定的主动脉保护功效^[9], 因此,探讨 ACE2 发挥负性调节作用的具体机制,可能会为心血管病防治策略提供新的切入点。

本研究旨在通过 CRISPR/Cas9 技术对小鼠 *Ace2* 基因进行靶向敲除,并从基因组、转录 (mRNA) 和蛋白三个水平对 *Ace2* 基因敲除小鼠进行鉴定和验证,为后续研究 *Ace2* 基因生物学功能及机制提供动物模型。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 利用 CRISPR/Cas9 技术构建 *Ace2* 基因敲除小鼠模型,对显微注射后出生的小鼠进行 PCR 和测序鉴定获得阳性 F0 代初建鼠 6 只 (4 雄 2 雌), 品系为 C57BL/B6J, SPF 级, 购自南京大学-南京生物医药研究院。野生型 (wild type, WT) C57BL/B6J 小鼠由南京大学-南京生物医药研究院提供, 生产许可证号: SCXK (苏) 2015-0001, 使用许可证号: SYXK (黔) 2014-003, SPF 级条件饲养。本实验方案遵循动物福利和伦理原则, 经过遵义医学院动物实验伦理会审查 [编号: 伦审 (2018) 2-127 号], 符合伦理规范要求。

1.1.2 主要试剂及仪器 动物组织/细胞基因组 DNA 提取试剂盒 (北京 Solarbio 科技有限公司, 批号: 20171213); PGK1.1 linear vector (南京大学-南京生物医药研究院提供); 2 × Taq Master Mix (Dye Plus) (南京 Vazyme 生物科技有限公司, 批号: 7E162J7); PrimeScript™ RT-PCR Kit (大连 TaKaRa 公司); 琼脂糖 (德国 Biofroxx, 批号: EZ1609D314); 6 × Loading buffer (武汉 Biosharp 生物技术有限公司, 批号: 6601783); GoldView I 型核酸染色剂 (北京 Solarbio 科技有限公司, 批号: 20170406); DNA 纯化试剂盒 (TransGen Biotech); DNA Marker (北京 TransGen 生物科技有限公司, 批号: K10315); TA 克隆系统试剂盒 (美国 Invitrogen, 货号: K202020); ACE2 一抗 (Proteintech, 货号: 21115-1-AP); PCR 扩增仪 (美国 Bio-Rad 公司); 水平电泳仪 (北京柏奥易杰科技有限公司); 化学发光凝胶成像系统 (美国 BIO-RAD 公司)。

1.2 方法

1.2.1 CRISPR/Cas9 技术构建 *Ace2* 基因敲除小鼠

小鼠 *Ace2* 基因定位于性染色体 X 上 (Chromosome X: 164,139,332-164,188,420), 全长 49 089 bp, 包含 19 个外显子 (1..3566)。编码区 (CDS) 331..2748, 包括外显子 3 至外显子 18 区间, 表达蛋白全长包含 805 个氨基酸残基^[10]。根据 gRNA 靶基因的设计原

则, 选择*Ace2*基因转录起始密码子附近第3个外显子及下游第18个外显子作为设计靶位点(图1), 利用CRISPR Design软件(<http://crispr.mit.edu/>)设计筛选得到2对gRNA(表1)。将设计*Ace2*的gRNA寡核苷酸单链退火形成双链, 然后和线性化载体PGK1.1 linear vector连接, 连接产物可直接转化DH5 α 高效感受态细胞, 转染前进行质粒大提, 确保质粒浓度 $\geq 2 \mu\text{g}/\mu\text{L}$, 再取4~7 μg 电转染靶细胞, PCR鉴定阳性克隆产物, 完成gRNA载体构建。制备gRNA与Cas9转录模板后进行体外转录, 向小鼠受精卵显微注射经体外转录的Cas9 mRNA以及靶点特异性的gRNA, 将存活的受精卵移植进同品系雄鼠交配后超排的母鼠内, 最终生产21只F0代小鼠。

1.2.2 *Ace2*基因敲除小鼠饲养和繁育 F0代初建鼠饲养于遵义医学院药理SPF级实验动物中心。将经鉴定后的阳性F0代小鼠和C57BL/B6J小鼠回交得到的后代小鼠称为F1代。F1代小鼠需要根据PCR和测序鉴定删除片段的大小, 确定阳性F1代小鼠并分别保种建系(line)。小鼠的性成熟期约为8周, 母鼠妊娠期约为21 d。将性成熟阳性F1代小鼠和C57BL/B6J小鼠相互交配, 得到F2代鼠并进一步鉴定; 选取雌性F2代杂合子小鼠与C57BL/B6J小鼠相互交配, 得到雄性F3代纯合子小鼠。

1.2.3 基因型鉴定

1.2.3.1 鼠尾基因组DNA的提取 按照动物组织/细

胞基因组DNA提取试剂盒提取小鼠DNA。剪取小鼠尾尖0.3~0.5 cm, 置于0.2 mL PCR管中, 匀浆器匀浆, 预冷的PBS悬浮, 离心, 除去上清, 加200 μL 溶液A, 振荡至彻底混匀; 向悬浮液中加入20 μL RNase A, 55 $^{\circ}\text{C}$ 放置15 min; 加入20 μL 的蛋白酶K, 55 $^{\circ}\text{C}$ 水浴消化, 加入200 μL 溶液B和200 μL 无水乙醇, 充分颠倒混匀, 将溶液加入吸附柱中, 12 000 r/min离心1 min, 弃废液, 漂洗液洗脱2次后, 向吸附膜中央悬空滴加50 μL 经65 $^{\circ}\text{C}$ 水浴预热的洗脱液, 离心, 即可得到基因组DNA。

1.2.3.2 PCR扩增反应 引物由南京生物医药研究院设计, 上海生工生物工程股份有限公司合成, 引物序列如下, WT引物: *Ace2*-WT-tF1 5'-TG-GTAGTGGTTGGCATCATCAT-3', *Ace2*-out-tR2 5'-GTCAGTCCCTGGTGATTAAGC-3'; Mutant引物: *Ace2*-in-tF1 5'-ATTCCTGCCCTAAC-CATG-3', *Ace2*-in-tR1 5'-GAGTAGTAGTTTGAAG-CACCTCA-3'。PCR反应体系为25 μL : 2 \times Taq Master Mix 12.5 μL , 上下游引物各1.0 μL , 模板DNA 1.0 μL , ddH₂O 9.5 μL ; 采用降落PCR程序(如表2所示)。

1.2.3.3 琼脂糖凝胶电泳 取PCR扩增产物5 μL , 加入6 \times Loading buffer 1.0 μL , 在1.2%凝胶中120 V恒压电泳约30 min, 使用BIO-RAD凝胶分析系统拍照观察。

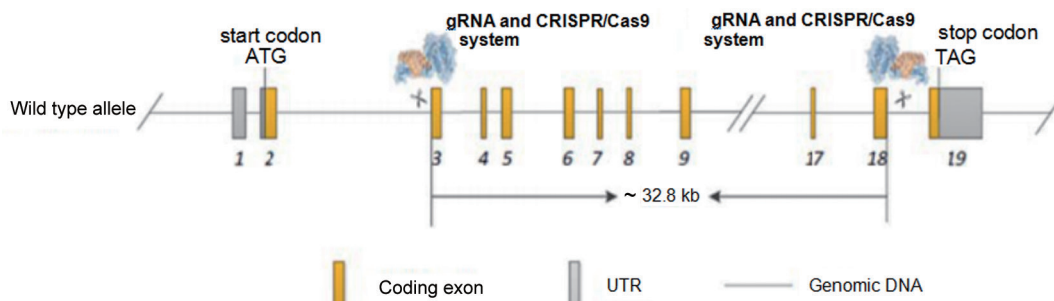


图 1. 小鼠*Ace2*基因敲除策略

Fig. 1. Overview of *Ace2* targeting knockout strategy in mice.

表1. gRNA序列信息

Table 1. The sequence of gRNA

gRNA	gRNA sequence (5'–3')	PAM
gRNA-3F	CCCTTGGGAAACTAGGCAC	TGG
gRNA-3R	AAGGGTCTGTCCCAAGAAC	TGG
gRNA-18F	GTGAGCTTGCTAGTAAGGTA	AGG
gRNA-18R	AGCATCTGACAAGATTCTAT	GGG

1.2.3.4 基因型结果判定 如果CRISPR/Cas9技术修饰*Ace2*基因相应位点导致其突变, WT引物PCR产物将消失, 代之以缩短或增长的异常表达片段。*Ace2* Mutant引物扩增产物长度为450 bp, 仅450 bp条带存在为*Ace2*敲除纯合子小鼠; WT引物扩增产物长度为549 bp, 仅549 bp条带存在为WT小鼠;

表2. 降落PCR程序

Table 2. The procedure of touchdown PCR

Seg.	Temperature	Time	Cycle	±Temperature/cycle
1	95 °C	5 min		
2	98 °C	30 s		
3	65 °C	30 s		-0.5 °C
4	72 °C	45 s	2-4, 20×	
5	98 °C	30 s		
6	55 °C	30 s		
7	72 °C	45 s	5-7, 20×	
8	72 °C	5 min		
9	10 °C	Hold		

450 bp和549 bp两条电泳条带均出现为*Ace2*^{-/-}杂合子雌鼠。

1.2.4 利用qPCR技术在mRNA水平验证*Ace2*基因敲除

将大鼠组织置于TRIzol中匀浆, 采用酚-氯仿混合液抽提RNA。按照逆转录说明书要求进行操作, 将RNA逆转录成cDNA, 再进行qRT-PCR。引物由南京生物医药研究院设计, 上海生物工程股份有限公司合成, *Ace2*-RT-QTF1: 5'-TATGAAGCAGAGGGAGCAGATGG-3', *Ace2*-RT-QTR1: 5'-GCATGAAGATGCTCATAACAATGGC-3', 引物*Ace2*-RT-QTF1位于外显子6, *Ace2*-RT-QTR1位于外显子7, 如图2所示。PCR反应体系为15 μL: SYBR Green II 7.5 μL, 上下游引物各0.5 μL, 模板cDNA 3.0 μL, ddH₂O 3.5 μL; PCR程序: 95 °C, 3 min; 95 °C, 30 s, 60 °C, 30 s, 72 °C, 30 s, 共计40个循环; 4 °C保持。结果判定: 如纯合子小鼠 qPCR无信号, 即可判定*Ace2*基因不表达, *Ace2*基因成功敲除。

1.2.5 TA克隆测序 从电泳板上切割含目的DNA片段的凝胶块, 按照DNA纯化试剂盒操作程序回收、纯化PCR产物。将纯化后产物进行TA克隆连

接反应, 按照TA克隆系统试剂盒操作说明进行, 将连接产物转化感受态细菌, 取适量菌液均匀涂抹于LB平板中, 放入 37 °C恒温细菌培养箱, 至长出单克隆菌落。挑取单克隆菌落至含有 LB培养基的5 mL EP管中, 振荡培养, 取1 μL菌液作为模板进行PCR反应, 反应条件同前, 将菌液PCR产物行琼脂糖凝胶电泳分离, 取阳性反应的菌液送南京大学-南京生物医药研究院测序。

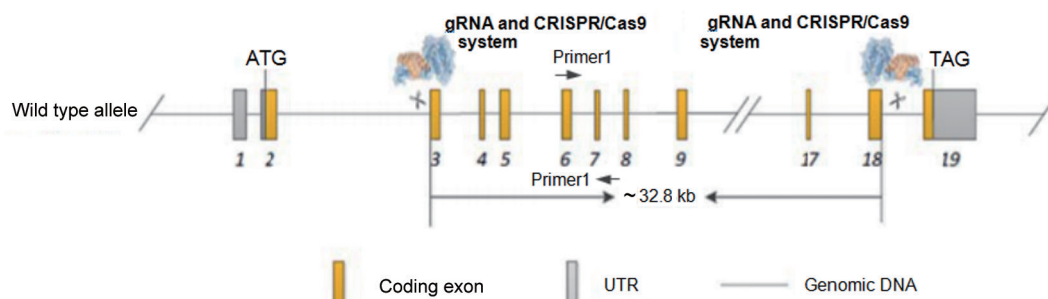
1.2.6 利用Western blot技术在蛋白水平验证*Ace2*基因敲除

在含有蛋白酶抑制剂的RIPA匀浆中提取组织总蛋白, 测定蛋白浓度, 配制10%的分离胶及4%的浓缩胶, 各样本取相同的蛋白量(50 μg)上样, 80 V恒压电泳, 当溴酚蓝指示剂到达胶板的底部停止电泳。将胶上蛋白电转到0.45 μm聚偏二氟乙烯膜, 室温下5%脱脂牛奶封闭1 h, TBST洗膜3次, 4 °C冰箱ACE2一抗(识别ACE2的第392~744位氨基酸)孵育过夜, 洗膜, 山羊抗兔二抗室温孵育1 h, 洗膜, 将 ECL化学发光试剂加在膜表面后, 使用BIO-RAD凝胶分析系统曝光检测蛋白表达。结果判定: 如纯合子小鼠目标蛋白处无条带, 则可判定*Ace2*蛋白不表达, 基因敲除成功。

2 结果

2.1 成功构建*Ace2*大片段基因敲除F0代小鼠

向小鼠受精卵显微注射经体外转录的 Cas9 mRNA 以及靶点特异性的 gRNA 混合物, 将存活的受精卵移植进同品系雄鼠交配后超排的 C57BL/6J 母鼠内, 最终生产得到 21 只 F0 代小鼠。提取 F0 代 21 只小鼠基因组 DNA 后, 进行 PCR 扩增, 并利用琼脂糖凝胶电泳分离, 鉴定结果如图 3 所示。鉴定结果表明, 与 WT C57BL/6J 小鼠基因型相比, 1[#]、5[#]、9[#]、14[#]、18[#]、21[#] 共 6 只小鼠发生了碱基

图 2. 小鼠*Ace2*基因qPCR上下游引物设计位点Fig. 2. Upstream and downstream primer design sites for qPCR of *Ace2* gene in mice.

的缺失, 其余小鼠可能仍为 WT 基因型, 初步证明通过向小鼠受精卵显微注射经体外转录的 Cas9 mRNA 以及靶点特异性的 gRNA 能够对小鼠 *Ace2* 基因进行突变。

对上述阳性样本的 PCR 产物进行 TA 克隆测序, 结果显示 1[#] (♂)、5[#] (♀)、9[#] (♂)、14[#] (♂)、18[#] (♂)、21[#] (♀) 为删除了 *Ace2* 外显子 3~18 的阳性敲除 F0 代小鼠 (表 3), 表明 *Ace2* 在 F0 代小鼠体内已经实现了高效敲除。

2.2 成功建立 *Ace2*^{-Y} 敲除小鼠模型

将上述阳性 F0 代鼠与 C57BL/B6J 背景的野生

型小鼠进行回交获得 F1 代。经 PCR 和测序鉴定 (图 4、表 3), 得到 3 只阳性 F1 代小鼠 22[#] (♂)、23[#] (♂)、25[#] (♀), F1 代小鼠可用于保种建系 (图 4)。

为了获得尽可能多的 *Ace2*^{-Y} 小鼠用于后续实验, 将性成熟阳性 F1 代小鼠和 C57BL/B6J 小鼠相互交配, 选取 F2 代雌性 *Ace2*^{+/-} 杂合鼠 29[#]~34[#]、40[#]、41[#] 共 8 只 (图 5) 与野生型小鼠交配, 获得 F3 代 *Ace2*^{-Y} 雄性小鼠 13 只, 分别为 74[#]、75[#]、77[#]~86[#]、88[#] (图 6)。

2.3 *Ace2* 基因敲除小鼠 *Ace2* mRNA 和蛋白表达情况

选取经 PCR 鉴定获得的 WT 小鼠和 *Ace2*^{-Y} 小

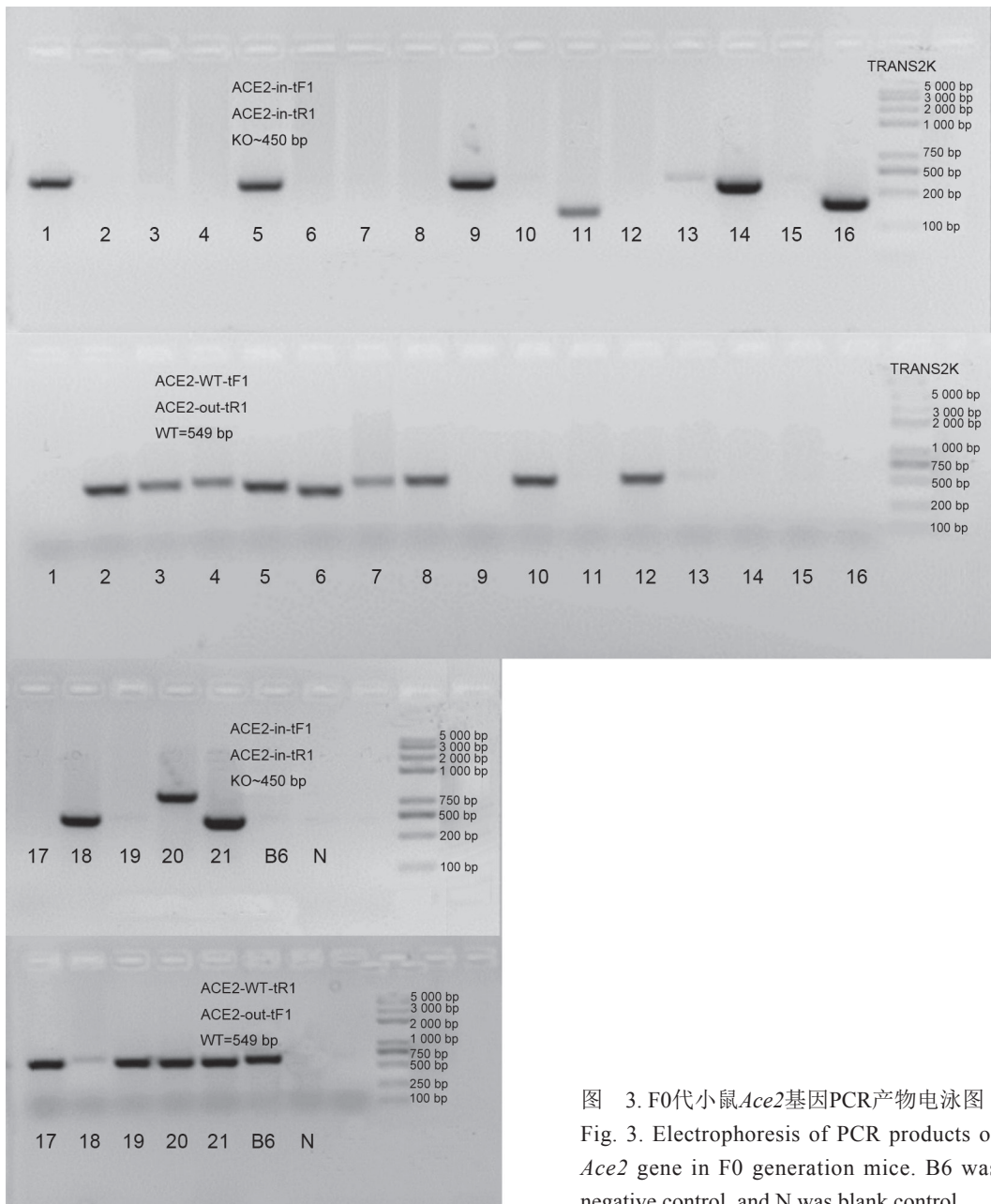


图 3. F0代小鼠 *Ace2* 基因 PCR 产物电泳图
Fig. 3. Electrophoresis of PCR products of *Ace2* gene in F0 generation mice. B6 was negative control, and N was blank control.

表3. F0、F1代小鼠TA克隆测序结果
Table 3. TA cloning and gene sequencing results in F0 and F1 generation mice

Number	Delete sequence	Delete exons
F0	1 ttacttcagtt--1bp--ttgggacagga//gaaaactagg--33082bp--gaatctgtca//ctagcagtac--5bp--cttactagcaag	Exons 3-18
	5 tgtgagaatttacttc--33154bp--caagctcacatattataga	Exons 3-18
	9 tgtgagaatttac--33154bp-- tagcaagctcacatatt//agcctgaggtt--1bp--attgggatgctgt	Exons 3-18
	14 actgaggccataagttc--33201bp--acatattatagatg	Exons 3-18
	18 tgtgagaatttac--33154bp--tagcaagctcacatatt	Exons 3-18
	21 tgtgagaatttacttcag--(-33144bp,+3bp)--ttactagcaagtcacatac	Exons 3-18
F1	22 ttatctgtgagaatttacttc--33154bp--caagctcacatattatagatgtct	Exons 3-18
	23 ttatctgtgagaatttacttc--33154bp--caagctcacatattatagatgtct	Exons 3-18
	25 ttatctgtgagaatttacttc--33154bp--caagctcacatattatagatgtct	Exons 3-18

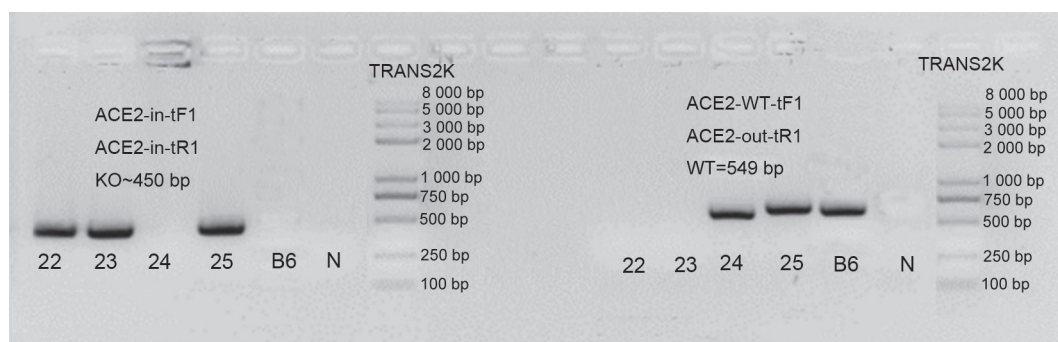


图 4. F1代小鼠*Ace2*基因PCR产物电泳图

Fig. 4. Electrophoresis of PCR products of *Ace2* gene in F1 generation mice. B6 was negative control, and N was blank control.

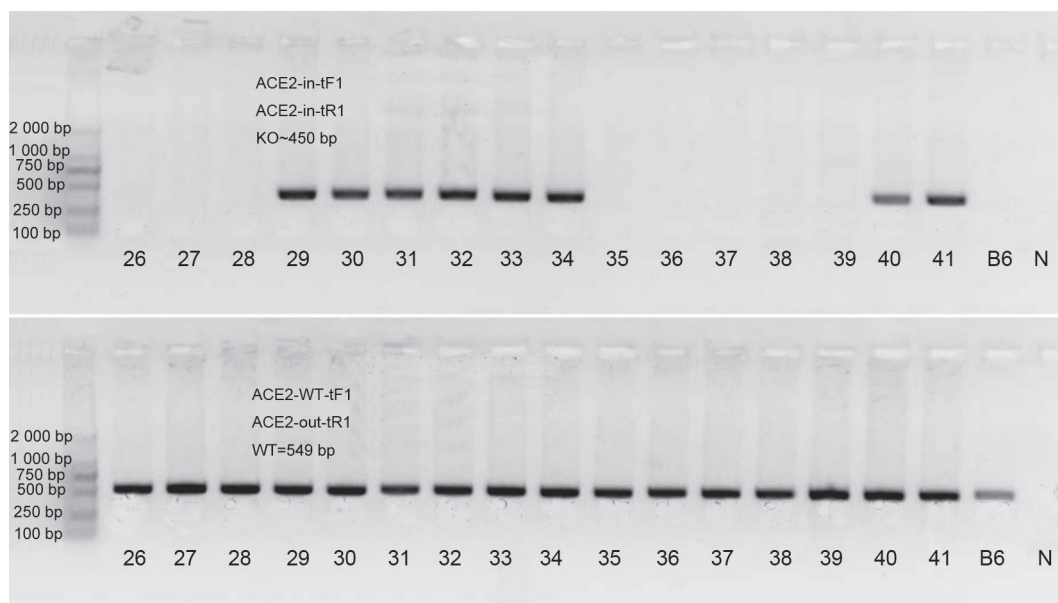


图 5. F2代雌性小鼠*Ace2*基因PCR产物电泳图

Fig. 5. Electrophoresis of PCR products of *Ace2* gene in F2 generation mice. B6 was negative control, and N was blank control.

鼠，进一步使用 qRT-PCR 和 Western blot 方法检测 *Ace2* mRNA 和蛋白在小鼠肺和肾脏组织中的表达

情况。如图 7 所示，*Ace2*^{-/-} 小鼠肺和肾脏组织中 qPCR 无信号 (红色曲线)，而 WT 小鼠肺和肾脏组

组织中 *Ace2* mRNA 表达 Ct 值约 20 (绿色曲线), 结果表明 *Ace2*^{-/-} 小鼠肾脏、肺中未检测到 *Ace2* mRNA 表达。以 GAPDH 为内参, 通过 Western blot 检测

ACE2 蛋白表达情况。结果显示, 在 WT 小鼠肺和肾脏组织中可见分子量为 92 kDa 的 ACE2 蛋白表达, 而在 *Ace2*^{-/-} 小鼠肾脏、肺中未检测到 ACE2

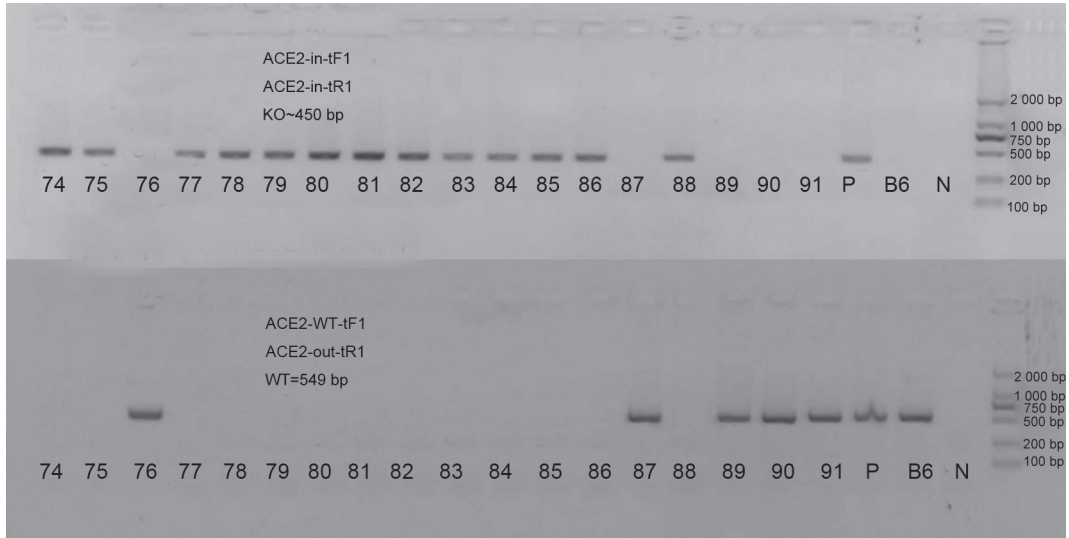


图 6. F3代雄性小鼠*Ace2*基因PCR产物电泳图

Fig. 6. Electrophoresis of PCR products of *Ace2* gene in F3 generation mice. B6 was negative control and N was blank control.

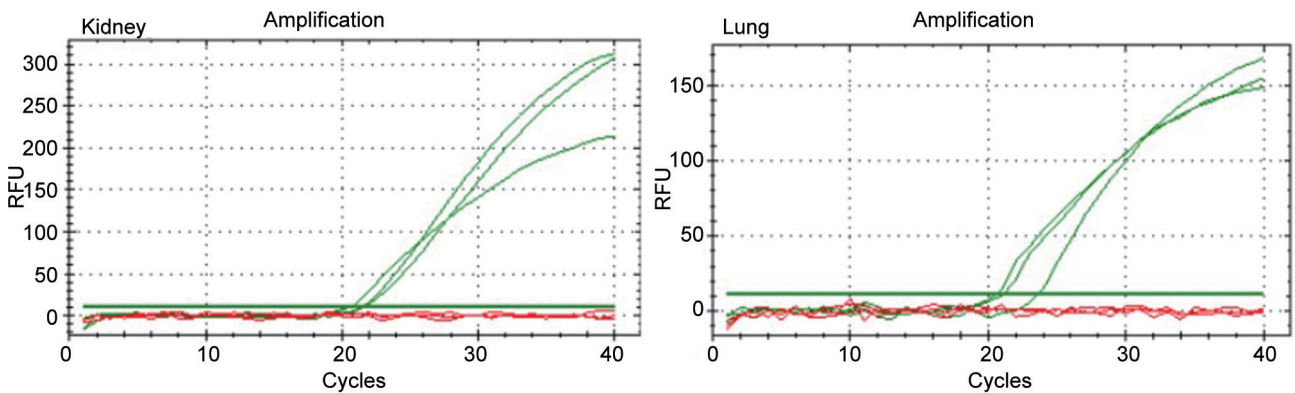


图 7. 野生型和*Ace2*^{-/-}小鼠肾脏、肺中*Ace2* mRNA 表达

Fig. 7. *Ace2* mRNA expression in kidney and lung of *Ace2*^{-/-} and wild-type mice examined by qPCR. Green lines represent wild type mice, and red lines represent *Ace2*^{-/-} mice.

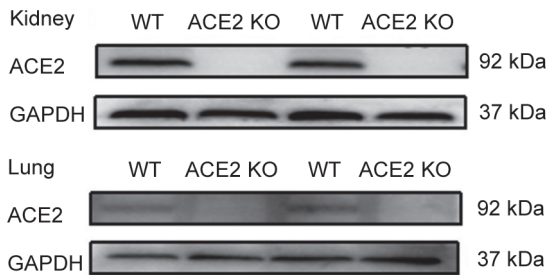


图 8. 野生型和*Ace2*^{-/-}小鼠肾脏、肺中ACE2蛋白表达

Fig. 8. ACE2 protein expression in kidney and lung of *Ace2*^{-/-} mice and wild-type mice examined by Western blot analysis.

蛋白表达 (图 8), 表明 *Ace2*^{-/-} 小鼠构建成功, 可用于后续动物实验。

3 讨论

2000 年, Donoghue 等^[4] 从人淋巴瘤和心力衰竭患者 cDNA 库克隆出人类 *ACE* 第一个同源基因 *Ace2*, 与 *ACE* 基因前 17 个外显子结构相似, 其编码的蛋白是一个由 805 个氨基酸残基组成的跨膜结合糖蛋白。*Ace2* 在抑制高血压及靶器官保护中起着重要作用, 为高血压以及其他相关疾病的防治提供

了新的靶点^[11-13]。Tikellis等^[14]研究发现,自发性高血压大鼠开始出现高血压时肾小管ACE2表达和活性均较出生时下降,且在成年自发性高血压大鼠中持续降低。病毒转染过表达*Ace2*,其可通过升高心肌Ang(1-7)浓度,降低ACE和AngII表达,抑制胶原沉积,改善糖尿病大鼠左室重构与功能^[15,16]。既往研究显示,*Ace2*作为一种重要的负向调节因子,能对抗AngII介导的多种心血管疾病的发生。然而,关于*Ace2*发挥作用的分子机制尚未完全阐明。因此,构建*Ace2*敲除小鼠模型进行后续研究就显得极为重要。

目前,研究中运用的*Ace2* KO小鼠(B6;129S5-*Ace2*^{tm1 Lex/Mmcd})主要来源于MMRRC(Mutant Mouse Regional Resource Centers)^[17],其利用同源重组技术靶向*Ace2*基因外显子1构建*Ace2* KO敲除小鼠。CRISPR/Cas9技术作为基因编辑工具,相较于传统基因编辑技术具有成本低廉、操作方便、效率高等优点^[18]。CRISPR/Cas9技术利用与目的基因同源的gRNA,特异性结合靶细胞基因组的DNA,形成杂合双链,之后Cas9可对该双链进行切割,使得此段DNA双链断裂(double-strand breaks,DSB)。DSB可诱导产生位点特异性核酸酶,通过错误倾向的非同源末端连接进行修复,该修复将在断裂位点造成插入或缺失,使得基因编辑变得简便并且高效。

本研究选择小鼠*Ace2*基因转录起始密码子附近第3个外显子及下游第18个外显子作为gRNA靶基因设计靶位点,并将gRNA和Cas9 mRNA混合物注入受精卵移植进同品系雄鼠交配后超排的母鼠内,最终生产21只小鼠。对于利用CRISPR/Cas9介导的非同源末端连接途径获得的敲除小鼠,由于非同源末端连接DNA修复的结果是随机发生的,所以每一只敲除初建小鼠、甚至一只初建小鼠中每个细胞的基因型都有可能不同,可能出现多种删除的情况,因此我们通过PCR及测序(TA克隆测序)的方式进行筛选,最终获得6只删除了外显子3~18(约33154bp)的阳性F0代初建小鼠,原则上F0代雌雄小鼠之间不能相互交配。为了确保产生的移码突变能整合进生殖系并稳定遗传,将其与同背景的野生型小鼠进行回交,选择其中产生移码突变的后代进行进一步繁育。

该实验将F0代初建小鼠与WT小鼠交配,经PCR和测序鉴定后获得3只基因型明确的F1子代*Ace2*敲除小鼠。为了获得尽可能多的*Ace2*^{-/-}雄性

小鼠用于后续实验,将性成熟阳性F1代小鼠再与WT小鼠交配,获得F2子代,选取F2子代雌性*Ace2*^{+/-}杂合鼠与野生型*Ace2*^{+/+}小鼠交配,获得F3子代*Ace2*^{-/-}小鼠。为了验证所得的*Ace2*^{-/-}纯合子雄性小鼠,除了PCR鉴定其基因组表达水平外,亦通过qRT-PCR和Western blot进行了*Ace2* mRNA和蛋白检测,因为我们选择*Ace2*基因转录起始密码子附近第3个外显子及下游第18个外显子作为删除靶点,因此N端会有62个氨基酸残留,所以在进行*Ace2*^{-/-}小鼠蛋白表达检测时选用的*Ace2*一抗识别肽片段为第392~744位氨基酸,而且鉴定*Ace2*^{-/-}小鼠*Ace2* mRNA表达情况时,我们设计的引物*Ace2*-RT-QTF1位于外显子6、*Ace2*-RT-QTR1位于外显子7,验证*Ace2*蛋白和mRNA表达的抗体与引物识别均在删除片段中。结果显示,在*Ace2*^{-/-}小鼠的肾脏、肺中未检测到*Ace2* mRNA和蛋白表达,表明*Ace2*^{-/-}小鼠构建成功。通过一段时间的饲养鉴定、繁殖,目前已获得了一定数量的*Ace2*^{-/-}基因敲除小鼠,这为深入研究*Ace2*相关机制提供了较好的模型,对整体实验具有重要意义。

参考文献

- 1 Wang HX, Li MQ, Lee CM, Chakraborty S, Kim HW, Bao G, Leong KW. CRISPR/Cas9-based genome editing for disease modeling and therapy: Challenges and opportunities for nonviral delivery. *Chem Rev* 2017; 117(15): 9874-9906.
- 2 Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, Hsu PD, Wu X, Jiang W, Marraffini LA, Zhang F. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* 2013; 339: 819-823.
- 3 Mali P, Yang L, Esvelt KM, Aach J, Guell M, DiCarlo JE, Norville JE, Church GM. RNA-Guided human genome engineering via Cas9. *Science* 2013; 339: 823-826.
- 4 Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, Godbout K, Gosselin M, Stagliano N, Donovan M, Woolf B, Robison K, Jeyaseelan R, Breitbart RE, Acton S. A novel angiotensin-converting enzyme related carboxypeptidase (*Ace2*) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circ Res* 2000; 87(5): E1-E9.
- 5 Zhong JC, Ye JY, Jin HY, Yu X, Yu HM, Zhu DL, Gao PJ, Huang DY, Shuster M, Loibner H, Guo JM, Yu XY, Xiao BX, Gong ZH, Penninger JM, Oudit GY. Telmisartan attenuates aortic hypertrophy in hypertensive rats by the modulation of *Ace2* and profilin-1 expression. *Regul Pept* 2011; 166(13): 90-97.
- 6 Zhong JC, Basu R, Guo D, Chow FL, Byrns S, Schuster M, Loibner H, Wang XH, Penninger JM, Kassiri Z, Oudit GY.

- Angiotensin-converting enzyme 2 suppresses pathological hypertrophy, myocardial fibrosis, and cardiac dysfunction. *Circulation* 2010; 122(7): 717–728.
- 7 Crackower MA, Sarao R, Oudit GY, Yagil C, Kozieradzki I, Scanga SE, Oliveira-dos-Santos AJ, da Costa J, Zhang L, Pei Y, Scholey J, Ferrario CM, Manoukian AS, Chappell MC, Backx PH, Yagil Y, Penninger JM. Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function. *Nature* 2002; 417(6891): 822–828.
 - 8 Ren YL (任亚丽), Xu JL, Yu Y, Meng GL, Zhao X, Wu F. Effects of benazepril and irbesartan on angiotensin II receptor and *Ace2* in chronic heart failure rats during cardiac remodeling. *Chin Pharmacol Bull (中国药理学通报)* 2008; 24(12): 1582–1586 (in Chinese with English abstract).
 - 9 Jin HY (金海燕), Zhong JC, Song B, Ye JY, Zhang LH, Li YL, Yu X, Xu XD, Lin GZ. Effects of Telmisartan on vascular *Ace2* expression and oxidative stress levels in spontaneously hypertensive rats. *Chin Pharmacol Bull (中国药理学通报)* 2012; 28(1): 54–58 (in Chinese with English abstract).
 - 10 Lin CI, Tsai CH, Sun YL, Hsieh WY, Lin YC, Chen CY, Lin CS. Instillation of particulate matter 2.5 induced acute lung injury and attenuated the injury recovery in *Ace2* knockout mice. *Int J Biol Sci* 2018; 14(3): 253–265.
 - 11 Liu Z, Huang XR, Chen HY, Fung E, Liu J, Lan HY. Deletion of angiotensin-converting enzyme-2 promotes hypertensive nephropathy by targeting Smad7 for ubiquitin degradation. *Hypertension* 2017; 70(4): 822–830.
 - 12 Ramchand J, Patel SK, Srivastava PM, Farouque O, Burrell LM. Elevated plasma angiotensin converting enzyme 2 activity is an independent predictor of major adverse cardiac events in patients with obstructive coronary artery disease. *PLoS One* 2018; 13(6): e0198144.
 - 13 Rathinasabapathy A, Bryant AJ, Suzuki T, Moore C, Shay S, Gladson S, West JD, Carrier EJ. rh*Ace2* therapy modifies bleomycin-induced pulmonary hypertension via rescue of vascular remodeling. *Front Physiol* 2018; 9: 271–281.
 - 14 Tikellis C, Cooper ME, Bialkowski K, Johnston CI, Burns WC, Lew RA, Smith AI, Thomas MC. Developmental expression of *Ace2* in the SHR kidney: A role in hypertension. *Kidney Int* 2006; 70(1): 34–41.
 - 15 Dong B, Yu QT, Dai HY, Gao YY, Zhou ZL, Zhang L, Jiang H, Gao F, Li SY, Zhang YH, Bian HJ, Liu CX, Wang N, Xu H, Pan CM, Song HD, Zhang C, Zhang Y. Angiotensin-converting enzyme-2 over-expression improves left ventricular remodeling and function in a rat model of diabetic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 2012; 59: 739–747.
 - 16 Bodiga S, Zhong JC, Wang W, Basu R, Lo J, Liu GC, Guo D, Holland SM, Scholey JW, Penninger JM, Kassiri Z, Oudit GY. Enhanced susceptibility to biomechanical stress in *Ace2* null mice is prevented by loss of the p47phox NADPH oxidase subunit. *Cardiovasc Res* 2011; 91: 151–161.
 - 17 Hung YH, Hsieh WY, Hsieh JS, Liu FC, Tsai CH, Lu LC, Huang CY, Wu CL, Lin CS. Alternative roles of STAT3 and MAPK signaling pathways in the MMPs activation and progression of lung injury induced by cigarette smoke exposure in ACE2 knockout mice. *Int J Biol Sci* 2016; 12(4): 454–465.
 - 18 Fu Y, Foden JA, Khayter C, Maeder ML, Reyon D, Joung JK, Sander JD. High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. *Nat Biotechnol* 2013; 31(9): 822–826.