

# 利用CRISPR/Cas9技术进行Adcy3基因编辑小鼠模型的构建与鉴定

杨景<sup>1</sup>, 周建丽<sup>1</sup>, 曾文滔<sup>1,2\*</sup>, 赖娅娜<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>南京医科大学医药实验动物中心, 江苏 南京

<sup>2</sup>南京医科大学生殖医学国家重点实验室, 江苏 南京

收稿日期: 2022年11月24日; 录用日期: 2022年12月22日; 发布日期: 2022年12月29日

## 摘要

目的: 利用CRISPR/Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR-Associated 9)技术构建成功Adcy3 (Cyclic Adenosine-3',5'-Monophosphate, cAMP)下游插入mCherry基因小鼠品系, 为深入研究该基因的功能及相关疾病的治疗提供条件。方法: 设计Adcy3基因sgRNA和mCherry供体, 通过显微注射方式将Cas9mRNA、sgRNA和mCherry供体一同注射到C57BL/6小鼠受精卵中, 获得Adcy3基因编辑小鼠。经过pcr鉴定和Sanger测序, 对获得的子代小鼠, 进行基因型的鉴定。结果: Adcy3基因编辑鼠构建成功, 且能够通过正常繁育得到能够稳定遗传的子代小鼠。结论: 建立了Adcy3-基因编辑小鼠模型, 为小鼠体内Adcy3基因功能研究提供了新的小鼠模型。

## 关键词

CRISPR/Cas9, Adcy3, 融合蛋白

# Construction and Confirmation of Adcy3 Gene Editing Mouse Model by CRISPR/Cas9 Technology

Jing Yang<sup>1</sup>, Jianli Zhou<sup>1</sup>, Wentao Zeng<sup>1,2\*</sup>, Yana Lai<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Animal Core Facility, Nanjing Medical University, Nanjing Jiangsu

<sup>2</sup>State Key Laboratory of Reproductive Medicine, Nanjing Medical University, Nanjing Jiangsu

Received: Nov. 24<sup>th</sup>, 2022; accepted: Dec. 22<sup>nd</sup>, 2022; published: Dec. 29<sup>th</sup>, 2022

\*通讯作者。

文章引用: 杨景, 周建丽, 曾文滔, 赖娅娜. 利用 CRISPR/Cas9 技术进行 Adcy3 基因编辑小鼠模型的构建与鉴定[J]. 生物过程, 2022, 12(4): 257-263. DOI: 10.12677/bp.2022.124030

## Abstract

**Objective:** A mouse strain with mCherry gene inserted downstream of Adcy3 was successfully constructed by CRISPR/Cas9 Technology, which provided a convenient animal models for in-depth study of the function of this gene and treatment of related diseases. **Methods:** Adcy3 gene sgRNA and mCherry donors were designed. Cas9 mRNA, sgRNA and mCherry donors were microinjected into the fertilized eggs of C57BL/6 mice to obtain Adcy3 gene editing mice. After pcr identification and Sanger sequencing, the obtained offspring mice were genotyped. **Results:** Adcy3 gene editing mice were successfully constructed, and could obtain stable offspring mice through normal breeding. **Conclusions:** It was confirmed that the Adcy3-mCherry mouse line was generated successfully, which provided a new mouse model for future studies of Adcy3 function research *in vivo*.

## Keywords

CRISPR/Cas9, Adcy3, Fusion Protein

Copyright © 2022 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

Adcy3 是一种在人体组织分布广泛的膜相关蛋白, 催化腺苷三磷酸形成环磷酸腺苷, 环磷酸腺苷是第二信使。腺苷酸环化酶家族由 10 个成员组成, 在催化位点显示出高度的一级序列相似性[1]。Adcy3 基因最初在嗅神经上皮细胞和人胰岛细胞中被鉴定[2] [3]。Adcy3 基因突变小鼠表现出外周和行为性嗅觉障碍[4]。

2018 年 1 月, 在《Nature Genetics》同一期上登出了三篇 Adcy3 基因的研究论文。Adcy3 基因以往被认为是下丘脑调节机制中的一部分, 可以帮助调节多种激素, 而这些激素则参与多种生物功能的调节[5]。在关于小鼠的研究表明发现, 黑色素皮质素受体(melanocortin 4 receptor, MC4R)与 Adcy3 共定位在初级纤毛上。特异性地阻断含有 MC4R 神经元纤毛上的 Adcy3, 会导致小鼠肥胖, 预示着人类肥胖可能也与 Adcy3 蛋白有关。而另外两项人类遗传学的研究另外两项人类研究证实了关于小鼠实验的研究结果, Adcy3 功能缺陷的遗传变异会增加个体患肥胖和 2 型糖尿病风险, 是导致单基因遗传严重肥胖的主因, 在特定研究人群(巴基斯坦地区的儿童)中有超过 30%的肥胖和 Adcy3 基因的隐形突变有关[6]。一项关于胃癌组织样本基因转录本分析提示, 在癌组织中的 Adcy3 表达同样发生了特异性改变。之后作者从细胞学水平上研究了 Adcy3 的过度表达对肿瘤的促进作用, 并证实了 Adcy3 的上调与 Lauren 的肠型胃癌之间的显著相关性。Adcy3 的过度表达增加了 HEK293 细胞的迁移、侵袭、增殖和克隆性; 相反, SNU-216 细胞中 Adcy3 的沉默表达降低了这些表型[7]。这些结果都预示着深入了解 Adcy3 对肿瘤发生和发展机理的研究中也极为重要。目前很多疾病没有有效治疗药物的重要原因在于, 对大多数疾病缺乏分子生物学机制的认识以及缺乏有效的药物作用靶点。无论是肥胖还是肿瘤都是目前非常热门的研究领域, 可以预计, 在今后的一段时间内 Adcy3 将会成为一个研究热点。

基因修饰小鼠是目前研究人类基因功能最重要的模式生物。本研究采用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术

开发一种新的 Adcy3 基因小鼠模型,为 Adcy3 基因在代谢性疾病、肿瘤发生发展中作用及机制奠定基础。

## 2. 材料与方法

### 2.1. 试剂、材料和动物

#### 2.1.1. 质粒和动物

pX330-U6-Chimeric\_BB-CBh-hSpCas9 质粒(Plasmid #42230)、H2B-mCherry (Plasmid #20972)由美国 Addgene 公司提供、C57BL/6 小鼠由南京医科大学动物中心提供。

#### 2.1.2. 主要试剂

MESSAGE mMACHINE T7 Ultra Kit 试剂盒(AM1345)购自美国 Ambion 公司,HiScribe™ T7 High yield RNA Synthesis Kit 试剂盒(E2040S)、各种限制性内切酶、T4DNA 连接酶购自英国 NEB 公司,长链 Taq 酶、高保真酶、胶回收及片段回收试剂盒由日本 takara 公司提供,小鼠组织 DNA 抽提试剂盒购自南京 Vazyme 公司。

### 2.2. 实验设计

#### 2.2.1. CRISPR 敲入方案的设计

针对小鼠 Adcy3 基因结构(图 1),将 mCherry 基因敲入到小鼠 Adcy3 基因的 3'端,通过 Adcy3 基因的 3'端与 mCherry 的 5'端连接,形成 Adcy3-mCherry 融合蛋白。通过在线 sgRNA 设计软件(<http://crispor.tefor.net>),针对最后一个外显子在靠近终止密码子 TGA 的位置附近设计 sgRNA 识别靶点(sgRNA 序列和 PAM 序列见表 1)。

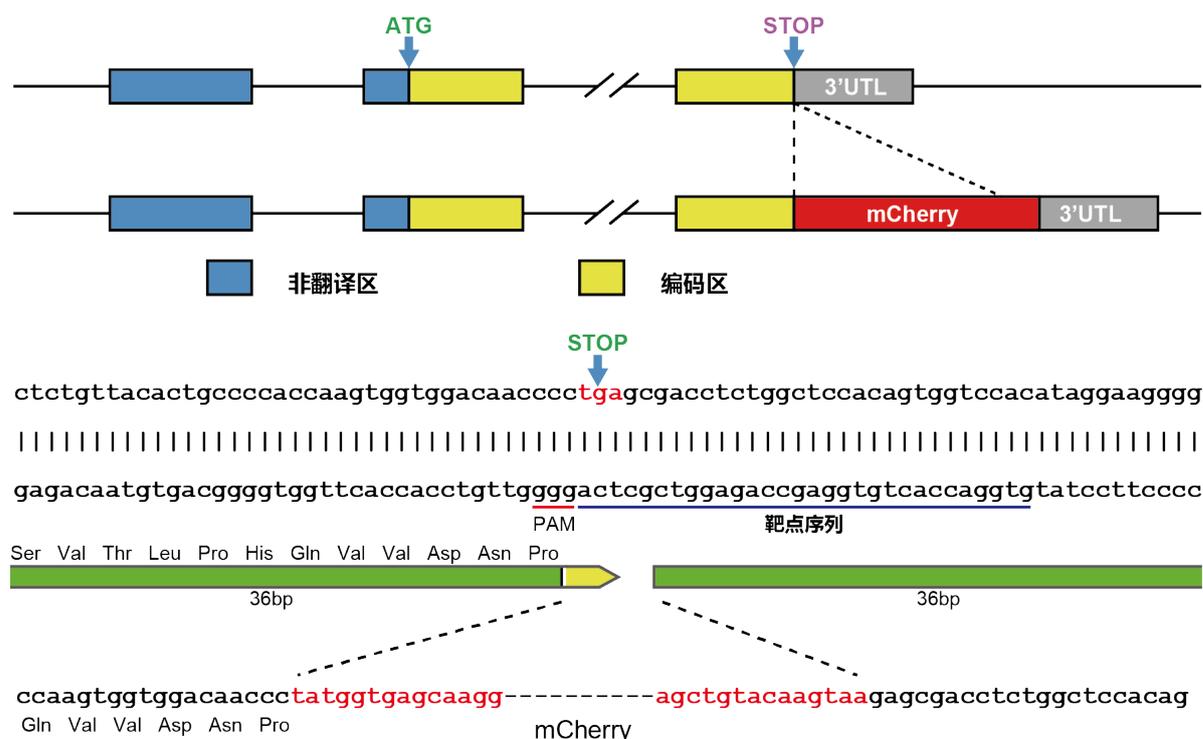


Figure 1. Gene editing strategy for mouse Adcy3

图 1. 小鼠 Adcy3 基因编辑策略

**Table 1.** Target Information for mouse *Adcy3***表 1.** *Adcy3* 基因目标靶点信息

sg 名称	sgRNA + PAM	MIT Spec. score	CFD Spec. score	AVERAGE
sgRNA1/ rev	TGTGGAGCCAGAGGTCGCTC <u>AGG</u>	87	90	88.5
sgRNA2/rev	GTGGAGCCAGAGGTCGCTCA <u>GGG</u>	86	92	89
sgRNA3/rev	TGGAGCCAGAGGTCGCTCAG <u>GGG</u>	74	83	78.5

### 2.2.2. mCherry Donor 的设计

根据 H2B-mCherry 质粒中 mCherry CDS 区的完整序列, 针对 sgRNA2 的作用位点, 在 mCherry CDS 区 5' 和 3' 末端分别增加 36 bp 的同源臂, 得到 mCherry Donor 序列。

### 2.2.3. 鉴定方案的设计

在 Donor 同源臂外侧 50 bp 以外, 利用 Vector NTI 软件分别生成 2 对 PCR 巢式扩增引物。在 mCherry CDS 区内部生成一对短链鉴定引物。鉴定示意图见图 2。

**Figure 2.** Mouse identification strategy for *Adcy3***图 2.** *Adcy3* 基因编辑小鼠鉴定方案

## 2.3. 实验方法

### 2.3.1. sgRNA 的合成

针对 3 个 sgRNA 靶位点, 选取靶点特异性 MIT Specificity Score 和 CFD Spec. score 平均值最高的 sgRNA2 合成相应的 Oligo DNA, CFD off-target score 显示, 该靶点在 12 号染色体的外显子上不具备脱靶位点。采用重叠 PCR 制备 sgRNA 的 T7 转录模板, 用在线软件(<http://crispor.tefor.net>)生成 sgRNA2 对应的重叠 PCR 扩增引物(sgRNA2-T7fw 和 T7rev common), 见表 2。PCR 条件为: 95°C 预变性 5 min; 95°C 变性 20 s, 60°C 退火复性 20 s, 72°C 延伸 20 s, 扩增 35 个循环。PCR 产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测。利用 PCR 纯化试剂盒纯化 PCR 扩增产物, 溶于无核酸酶的水中作为 sgRNA T7 转录模板。使用 HiScribe TM T7 High Yield RNA Synthesis Kit 试剂盒转录及回收 sgRNA, 浓度测定后浓度调整到 1000 ng/ul, 分装保存于 -80°C 备用。

**Table 2.** Primer details**表 2.** 引物详细信息

引物名称	引物序列
sgRNA2-T7fw	GAAATTAATACGACTCACTATAGtggagccagaggtcgctcaGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG
T7rev common	AAAAGCACCGACTCGGTGCCACTTTTTCAAGTTGATAACGGACTAGCCTTATTTTAACTTGCTATTTCTAGCTCTA
CAS9-T7F	GAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGAATGGACTATAAGGACCACGAC
CAS9-T7R	GCGAGCTCTAGGAATTCTTAC
Adcy3-mCherry-F	ctctgttacactgccccaccaagtgtgggacaacctTATGGTGAGCAAGGGCGAGGA
Adcy3-mCherry-R	ccccttctatgtggaccactgtggagccagaggtcTTACTTGTACAGCTCGTCCA

**Continued**

mCherry-HK13 F	CACGAGTTCGAGATCGAGGG
mCherry-HK14 R	GGTGTAGTCCTCGTTGTGGG
Adcy3-Outer-F	CCATGTACAGGTGGTAGAAGAG
Adcy3-Outer-R	TGGAATGTGCGCTTCAATAA
Adcy3-Inner-F	CCTTCGAGAGTACGGCTTCC
Adcy3-Inner-R	GGAACACCAGGACTTGGTCA

**2.3.2. Cas9 mRNA 体外转录**

以 pX330-U6-Chimeric\_BB-CBh-hSpCas9 质粒为模版, 用长链 Taq 酶(takara)以引物 CAS9-T7F 和 CAS9-T7R 扩增, PCR 条件为: 94℃预变性 5 min; 94℃变性 30 s, 55℃退火复性 30 s, 72℃延伸 5 min, 扩增 35 个循环, 产物大小 4289 bp。切胶回收目的片段以无酶水洗脱获得 Cas9 mRNA 体外转录模板。体外转录并回收 Cas9 mRNA, 浓度测定后调整到 1000 ng/ul, 分装保存于-80℃备用。

**2.3.3. mCherry Donor 的设计与制备**

用高保真酶(PrimerSTAR Max DNA Polymerase, Takara 公司)以引物 Adcy3-mCherry-F 和 Adcy3-mCherry-R PCR 扩增 H2B-mCherry 质粒(美国 Addgene 公司提供), 产物大小 781 bp。PCR 条件为: 98℃变性 10 s, 55℃退火复性 10 s, 68℃延伸 1 min, 扩增 35 个循环。切胶回收目的片段, 溶于无核酸酶的水, 浓度测定后调整到 1000 ng/ul, 分装保存于-80℃备用。

**2.3.4. 小鼠受精卵显微注射**

将体外转录好的 Cas9 mRNA、sgRNA 和 mCherry Donor 加入无酶水中, 分别调整至终浓度 50 ng/ul、20 ng/ul 和 5 ng/ul。通过显微注射法将混合物注射到小鼠受精卵胞质中, 次日将存活的受精卵移植到假孕受体母鼠内, 至母鼠生产。

**2.3.5. F0 代小鼠的基因型鉴定**

受精卵移植的假孕母鼠单笼饲养 20 d 后, 观察出生情况。小崽长至 7 天, 趾标法进行小鼠编号。剪下的脚趾以鼠尾组织标本试剂盒(Vazyme)提取基因组 DNA。以 mCherry-HK13 F 和 mCherry-HK14 R 进行短链初筛, PCR 条件为: 95℃预变性 5 min; 95℃变性 30 s, 55℃退火复性 30 s, 72℃延伸 1 min, 扩增 35 个循环, 小鼠扩增产物为 555 bp。出现目的片段的样品以外侧引物(Adcy3-Outer-F 和 Adcy3-Outer-R)和内侧引物(Adcy3-Inner-F 和 Adcy3-Inner-R)进行巢式 pcr, PCR 条件为: 94℃预变性 5 min; 94℃变性 30 s, 55℃退火复性 30 s, 72℃延伸 1 min, 扩增 35 个循环, 正确的基因编辑基因型终产物大小为 965 bp (wt 为 259 bp)。扩增产物以 Adcy3-Inner-F 和 Adcy3-Inner-R 送测序公司进行双向测序, 确认插入序列的正确性。

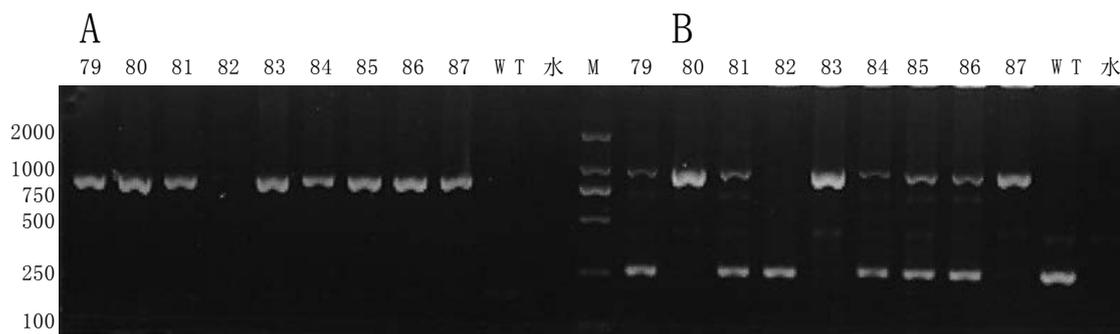
**2.3.6. F2 代纯合子小鼠的获得和基因型鉴定**

F0 代首建小鼠性成熟后与 C57BL/6 野生型小鼠交配, 获得可稳定遗传的 Adcy3-mCherry F1 代杂合子小鼠, 再通过杂合子小鼠自交获得 F2 代 Adcy3-mCherry 基因敲除纯合子小鼠模型。鉴定引物与 F0 代小鼠的基因型鉴定方法相同。判定 F2 代纯合子的标准为巢式 pcr 无法扩增得到 259 bp 的目的片段。

**3. 结果****Adcy3-mCherry 基因小鼠的获得**

Adcy3 基因位于 12 号染色体上, 包含 21 个外显子; 4.41 kb mRNA 转录物能够被翻译成 129 kda 蛋

白。Adcy3 基因小鼠构建策略如图 1 所示, 通过显微注射方式将 Cas9 mRNA、sgRNA 和 mCherry Donor 注射到 C57BL/6 小鼠受精卵中, 用体外转录获得的 Cas9 mRNA 和 sgRNA 共注射了 120 枚受精卵, 注射后的受精卵移植到 5 只假孕鼠中, 其中 3 只小鼠妊娠并出生 14 只小鼠(出生率为 11.6%), 其中 1 只小鼠 pcr 鉴定正确。对应的 Sanger 测序显示 Cas9/sgRNA 复合物可将 Adcy3 基因终止密码子删除, 细胞在 mCherry Donor 的同源臂为模版进行同源重组修复后, 内源基因 Adcy3 的 3'端在终止密码子与 mCherry 的 5'端(ATG)正确连接, 同时 mCherry 整个 CDS 区未见突变。当 Adcy3-mCherry 基因首建鼠生长至 10 周龄时与 2 至 3 月周龄 C57BL/6 雌鼠交配, F1 代阳性小鼠 Adcy3-mCherry 基因型分析结果均和 F0 代相同。F1 代杂合子小鼠经自交获得 F2 代纯合子小鼠, F2 代小鼠基因型鉴定结果如图 3 所示。当检测不到野生型目的片段时(野生型为 259 bp)可判断为纯合子, 其中编号为 80、83、87 的三只小鼠为纯合子小鼠。



A: F2 代小鼠短链筛选电泳图, B: F2 代小鼠纯合鉴定电泳图。

**Figure 3.** Identification results of Adcy3-mCherry gene knock in mice  
**图 3.** Adcy3-mCherry 基因敲入小鼠鉴定结果

#### 4. 讨论

随着生物学研究的发展, 基因组编辑技术为探究特定基因功能提供了强有力的技术手段。CRISPR/Cas9 基因编辑系统以绝对的优势取代了锌指核酸内切酶(zinc finger endonuclease, ZFN)和类转录激活因子的效应物核酸酶(transcription activator-like effector nuclease, TALEN) [8]。本研究应用 CRISPR/Cas9 技术, 在制备 sgRNA 时采用重叠 PCR 的方法快速扩增得到转录模版, 相对于传统方法, 这种方法简单、快捷。传统的构建 sg 载体方法, 经过构建载体、抽质粒测序及质粒模版扩增等一系列繁琐的操作, 制备转录模版最快也要 3~4 天。而采用重叠 PCR 扩增, 仅需 3 个小时就可以制备好转录模版进行转录操作[9]。

在应用 CRISPR/Cas9 技术时, 设计靶位点的软件有很多, 本研究选用的是加州大学提供的在线 sgRNA 设计软件, 这款软件的靶点输出界面支持靶点特异性分值(依据 MIT 特异性及 CFD 特异性算法预测)和切割效率进行分别排序, 而且还可以非常简洁的方式筛选出靶点所在染色体的外显子上是否存在脱靶情况。关于特异性的预测, 大多数的设计软件采用的是 2013 年麻省理工大学的算法, 而根据 Doench 和 Tycko 等分别在 2016 年和 2019 年发表的论文显示, CFD 特异性分值比 MIT 特异性峰值具有更高的准确性[10] [11] [12]。本研究中, sgRNA2 的 CFD 特异性得分也是三条候选靶点中最高的。

利用 CRISPR/Cas9 技术在靶点处引入精准插入目的序列的实验策略, 需要考虑的一个重要因素就是 donor 该如何设计。根据 Alexandre 等人的研究结果, 研究人员发现长度为 33~38 nt 的同源臂的 PCR 片段可以作为小鼠胚胎和人类细胞基因组编辑的有效供体, 最佳的同源臂长度大约为 35 nt [13]。作者指出线性 DNA 片段更适合作为供者 DNA, 而且它们在人细胞中编辑 DNA 的效率比环状质粒 DNA 高 2~5 倍,

而且线性 DNA 通过 PCR 扩增法就可以直接制备, 方法简单。对长度范围在 57~993 nt 的供者 DNA 序列测试得出的编辑成功率在 10%~50%, 相对而言短的供者 DNA 要比更长的供者 DNA 得到更高的编辑成功率, 插入片段超过 1000 nt 供者 DNA 具有非常低的插入成功率。本研究插入的外源基因片段满足长度低于 781 nt, 采用 36 bp 的同源臂设计供体 DNA, 阳性率 7.14% (1/14), 与 Alexandre 等人的研究结果一致。本研究通过选用得到了 1 只首建鼠用于其后的建系并成功繁育得到纯合子后代, 这一结果不仅为 Adcy3 基因在代谢性疾病、肿瘤发生发展中作用及机制的研究提供了动物模型, 更为构建其他类似基因编辑动物模型提供了可借鉴的成功案例。

## 基金项目

江苏省自然科学基金(BE2019730), 国家重点研发计划(2021YFF0702500)。

## 参考文献

- [1] Defer, N., Best-Belpomme, M. and Hanoune, J. (2000) Tissue Specificity and Physiological Relevance of Various Isoforms of Adenylyl Cyclase. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, **279**, 400-416. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.2000.279.3.F400>
- [2] Bakalyar, H.A. and Reed, R.R. (1990) Identification of a Specialized Adenylyl Cyclase that May Mediate Odorant Detection. *Science*, **250**, 1403-1406. <https://doi.org/10.1126/science.2255909>
- [3] Yang, B., He, B., Abdel-Halim, S.M., Tibell, A., Brendel, M.D., Bretzel, R.G., Efendic, S. and Hillert, J. (1999) Molecular Cloning of a Full-Length cDNA for Human Type 3 Adenylyl Cyclase and Its Expression in Human Islets. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **254**, 548-551. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1998.9983>
- [4] Wong, S.T., Trinh, K., Hacker, B., et al. (2000) Disruption of the Type III Adenylyl Cyclase Gene Leads to Peripheral and Behavioral Anosmia in Transgenic Mice. *Neuron*, **27**, 487-497. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)00060-X](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)00060-X)
- [5] Siljee, J.E., Wang, Y., Bernard, A.A., et al. (2018). Subcellular Localization of MC4R with Adcy3 at Neuronal Primary Cilia Underlies a Common Pathway for Genetic Predisposition to Obesity. *Nature Genetics*, **50**, 180-185. <https://doi.org/10.1038/s41588-017-0020-9>
- [6] Saeed, S., Bonnefond, A., Tamanini, F., et al. (2018) Loss-of-Function Mutations in Adcy3 Cause Monogenic Severe Obesity. *Nature Genetics*, **50**, 175-179. <https://doi.org/10.1038/s41588-017-0023-6>
- [7] Hong, S.H., Goh, S.H., Lee, S.J., et al. (2013) Upregulation of Adenylate Cyclase 3 (Adcy3) Increases the Tumorigenic Potential of Cells by Activating the CREB Pathway. *Oncotarget*, **4**, 1791-1803. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.1324>
- [8] Ran, F.A., Hsu, P.D., Lin, C.Y., et al. (2013) Double Nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for Enhanced Genome Editing Specificity. *Cell*, **154**, 1380-1389. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.08.021>
- [9] Bassett, A.R., Tibbit, C., et al. (2013) Highly Efficient Targeted Mutagenesis of *Drosophila* with the CRISPR/Cas9 System. *Cell Reports*, **4**, 220-228. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.06.020>
- [10] Hsu, P.D., Scott, D.A., Weinstein, J.A., et al. (2013) DNA Targeting Specificity of RNA-Guided Cas9 Nucleases. *Nature Biotechnology*, **31**, 827-832. <https://doi.org/10.1038/nbt.2647>
- [11] Doench, J.G., Fusi, N., Sullender, M., et al. (2016) Optimized sgRNA Design to Maximize Activity and Minimize Off-Target Effects of CRISPR-Cas9. *Nature Biotechnology*, **34**, 184-191. <https://doi.org/10.1038/nbt.3437>
- [12] Tycko, J., Wainberg, M., Marinov, G.K., et al. (2019) Mitigation of Off-Target Toxicity in CRISPR-Cas9 Screens for Essential Non-Coding Elements. *Nature Communications*, **10**, Article No. 4063. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11955-7>
- [13] Paix, A., Folkmann, A., Goldman, D.H., et al. (2017) Precision Genome Editing Using Synthesis-Dependent Repair of Cas9-Induced DNA Breaks. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **114**, E10745-E10754. <https://doi.org/10.1073/pnas.1711979114>