

DOI: 10.19296/j.cnki.1008-2409.2024-05-005

· 论 著 ·

· ORIGINAL ARTICLE ·

靶向小鼠 *Star* 基因的 CRISPR/Cas9 系统构建与打靶效力评价

韦妙灵¹, 韦柳青¹, 杨惠元¹, 牧苏婉¹, 李夏², 李勇¹

(1. 桂林医学院智能医学与生物技术学院, 桂林 541199; 2. 桂林医学院广西脑与认知神经科学重点实验室, 桂林 541199)

摘要 目的 利用 CRISPR/Cas9 系统对小鼠 *Star* 基因进行精确编辑, 构建模拟人类 *STAR* 基因突变的细胞模型。方法 选择中国先天性类脂质性肾上腺皮质增生症 (CLAH) 患者的热点突变区域, 并设计相应的单导向 RNA (sgRNA)。构建表达 sgRNA 的重组质粒, 将其与慢病毒包装质粒共同转染至 HEK-293T 细胞并制备慢病毒颗粒以感染小鼠 TCMK 细胞。采用嘌呤霉素进行病毒感染后阳性细胞的筛选, 提取阳性细胞的基因组 DNA, 通过聚合酶链式反应 (PCR) 扩增目标位点的基因组 DNA 片段, 并利用 TA 克隆和 Sanger 测序技术, 对编辑位点与效率进行统计分析。结果 成功设计了有效的 sgRNA 序列, 并利用 CRISPR/Cas9 系统成功构建了编辑小鼠 *Star* 基因的细胞模型。结论 本研究通过精确编辑小鼠 *Star* 基因, 成功构建了模拟人类 *STAR* 基因突变的 CRISPR/Cas9 系统, 为深入研究 CLAH 的致病机制及探索潜在治疗方法提供有力工具, 具有重要的科学意义和应用价值。

关键词: 基因编辑; CRISPR/Cas9; 单导向 RNA; 小鼠 *Star* 基因; 先天性类脂质性肾上腺皮质增生症
中图分类号: R394.3 文献标志码: A 文章编号: 1008-2409(2024)05-0029-07

Construction of CRISPR/Cas9 system targeting mouse *Star* gene and evaluation of targeting efficacy

WEI Miaoling¹, WEI Liuqing¹, YANG Huiyuan¹, MU Suwan¹, LI Xia², LI Yong¹

(1. Intelligent Medicine and Biotechnology, Guilin Medical University, Guilin 541199, China; 2. Key Laboratory of Brain and Cognitive Neuroscience, Guilin Medical University, Guilin 541199, China)

Abstract Objective Using the CRISPR/Cas9 system to accurately edit the *Star* gene of mice, to simulate the mutation of the human *STAR* gene, and to construct an efficient gene editing model. **Methods** The

基金项目: 国家自然科学基金地区科学基金项目 (32260166); 广西科技计划青年创新人才科研专项项目 (2019AC20357); 国家级大学生创新训练项目 (202210601046, 202310601047)。

第一作者: 韦妙灵, 本科, 研究方向为系统生物学。

通信作者: 李勇, ly112019021@glmc.edu.cn。

hotspot mutation region of Chinese congenital lipid adrenal hyperplasia (CLAH) patients was selected and the corresponding single directed RNA (sgRNA) was designed. A recombinant plasmid expressing sgRNA was constructed. HEK-293T cells were co-transfected with recombinant plasmid expressing sgRNA and lentiviral packaging plasmid. Lentiviral particles were prepared, and mouse TCMK cells were infected. Puromycin was used to screen positive cells after viral infection, the genomic DNA of positive cells was extracted, the genomic DNA fragments of the target site were amplified through polymerase chain reaction (PCR). The editing site and efficiency were statistically analyzed by TA cloning and Sanger sequencing technology. **Results** The effective sgRNA sequences were successfully designed and a cell model for editing mouse *Star* genes using the CRISPR/Cas9 system was constructed. **Conclusion** In this study a CRISPR/Cas9 system that mimics human *STAR* gene mutations by accurately editing the mouse *Star* gene is successfully constructed. This provides a powerful tool for further studying the pathogenic mechanism of CLAH and exploring potential therapeutic methods and has important scientific significance and application value.

Keywords: gene editing; CRISPR/Cas9; single directional RNA; mouse *Star* gene; congenital lipid adrenal hyperplasia

近年来,CRISPR/Cas9系统因具有精确性和高效性的特点受到科学家青睐^[1-2],已被广泛应用于基因定点突变、敲除或修饰,助力探索基因功能。其中,sgRNA在系统中扮演关键角色,其设计合成是实现精确基因编辑的重要环节。此技术为遗传育种、疾病研究等多个领域提供了强大支持^[3-4]。

在激素诱导的类固醇生物合成过程中,类固醇生成急性调节蛋白(STAR蛋白)发挥着至关重要的作用^[5]。STAR蛋白的缺失或功能异常会引发一种罕见且极其严重的病症,即先天性类脂质肾上腺皮质增生症(congenital lipid adrenal hyperplasia, CLAH),这是一种常染色体隐性遗传病,被视为先天性肾上腺皮质增生症中最为严重的类型^[6]。CLAH的核心问题在于编码类固醇急性调控蛋白的基因(如*STAR*基因)发生了突变。这种突变会干扰肾上腺以及性腺类固醇激素的正常产生,进一步导致患者的肾上腺皮质功能衰退,同时阻碍性激素的合成^[7]。在中国CLAH患者中,c.707_708delAG ins CTT (p.K236Tfs*47)突变尤为常见,这已成为*STAR*基因的一个显著突变热点^[8]。该突变所引发的类固醇生成的遗传缺陷是核心病理机制,它会导

致肾上腺皮质中胆固醇酯的异常积累,进而对细胞造成显著损害。随着病情的发展,患者可能会表现出低钠血症、低血容量、高钾血症、酸中毒等一系列严重症状,这些症状甚至可能威胁到患者的生命^[9-10]。然而,通过皮质激素替代疗法,患者的预后可显著改善。基于此,利用CRISPR/Cas9系统对小鼠的*Star*基因进行精确编辑,构建模拟人类*STAR*基因突变的细胞模型,为深入研究CLAH的致病机制及探索潜在治疗方法提供科学基础,具有重要的科学意义和应用价值。

1 材料与方法

1.1 材料

人胚肾细胞HEK-293T、小鼠肾上皮细胞TCMK均由桂林医学院细胞与遗传实验室提供;cas9-LentiCRISPR v2质粒,PMD2.G、PsPAX.2表达质粒由皖南医学院基础医学院赵苗老师惠赠。

试剂包括质粒提取试剂盒(购自北京天根生化科技有限公司)和Lipofectamine™ 3000转染试剂(购自Thermo Fisher Scientific公司)^[11],实验仪器包括CO₂培养箱(购自美国Thermo Fisher公司)、4℃/-20℃

冰箱(购自康佳电器有限公司)、PCR 仪与凝胶成像系统(均购自美国 Bio-Rad 公司)、ND-2000 Nanodrop(购自日本 Panasonic 公司)、Nikon 高级研究型荧光正立显微镜(购自南京衡桥仪器有限公司)、恒温摇床(购自上海一恒科学仪器有限公司)等。引物合成及 Sanger 测序服务均是由广州艾基生物公司完成。

1.2 方法

1.2.1 sgRNA 设计及 sgRNA 表达载体的构建 为确定 *STAR* 基因中的致病突变位点,在 ClinVar 数据库进行 *STAR* 基因突变情况分析并与文献检索并选定突变热点,即 c.707_708delAG ins CTT (p.K236Tfs * 47),作为后续研究的靶点。

为获取人类 *STAR* 基因组序列,使用 NCBI 数据库进行检索,获得人类 *STAR* 的基因组序列。同样的方法获得小鼠 *Star* 基因的序列。利用 Ensembl 数据库,比较人类 *STAR* 基因和小鼠 *Star* 基因结构,确定人类基因中的 707-708 号位与小鼠基因中的 605-606 号位的对应关系。从 Ensembl 数据库中导出小鼠 *Star* 基因的序列。随后,利用 Snap Gene 软件对小鼠 *Star* 基因序列进行定位,并在编码序列附近设计出用于基因编辑的两个单向 RNA(包括 sgRNA5、sgRNA6)序列。

对两个 sgRNA 导向序列的 5'端进行了 ACCG 的添加,进而合成了正向寡核苷酸序列,分别命名为 sgRNA5“+”和 sgRNA6“+”。基于这些导向序列,在成功获取 DNA 互补链后,在这些链的 5'端进行了 AAAC 的添加,以此合成了反向寡核苷酸序列,即 sgRNA5“-”和 sgRNA6“-”。通过正向寡核苷酸序列与反向寡核苷酸序列进行退火反应得到带有黏性末端的双链 DNA 片段。退火产物经过 50 倍稀释后,在 -20 °C 条件下保存,以备后续实验使用。另一方面,利用 *Bsa* I 酶对目标载体 Lenti-U6-sgRNA 质粒进行了酶切处理,得到了酶切产物 Lenti-U6-sgRNA-*Bsa* I。

通过参考已有文献^[12],对双链 DNA 片段与酶切产物连接、转化和挑选。为确保克隆的准确性,将

筛选出的菌液送至专业公司进行测序。经过验证确认的阳性克隆,被置于含有氨苄抗性的 LB 液体培养基中。在 37 °C、220 r/min 的摇床工作条件下,进行过夜增殖培养。利用去内毒素质粒中提试剂盒提取重组质粒 sgRNA5-cas9-LentiCRISPR v2 和 sgRNA6-cas9-LentiCRISPR v2。

1.2.2 慢病毒制备与感染 人胚肾细胞 HEK-293T 在含有 10% 胎牛血清的 DMEM 完全培养基中培养^[13]。细胞转染采用 Lipofectamine™ 3000 转染试剂。在 HEK-293T 细胞中,共转染 sgRNA-cas9-LentiCRISPRv2、PMD2.G 与 PsPAX.2 质粒,转染量分别为 5、2.5、2.5 μg。转染 16 h 后使用 PBS 清洗细胞,并替换为新鲜的完全培养基。转染 48 h 后,收集含有病毒的细胞上清液,并通过 0.45 μm 过滤器进行过滤,以去除细胞碎片和其他杂质,病毒粗提液 -80 °C 储存备用。

TCMK 细胞使用 1640 培养基进行培养,当 TCMK 细胞的生长汇合度接近 80%~90%时,使用 0.25% 的胰蛋白酶进行消化处理,随后将细胞均匀分散并传代至 6 孔板中,以确保细胞在适宜的密度下继续生长。在无抗生素的培养基中培养 18~20 h 后,当细胞汇合度达到 60%~70%时,即可进行病毒感染。感染体系包含 polybrene(浓度为 8 μg/mL)、病毒上清液(6 mL)以及不含抗生素的完全培养基(6 mL),每个孔加入 2 mL。病毒感染 24 h 后,用 PBS 清洗细胞并更换新的病毒感染液。经过 48 h 的培养,再次使用 PBS 对细胞进行清洗,将细胞置于含有 1 μg/mL 嘌呤霉素的培养基中筛选出阳性感染细胞。

1.2.3 基因组 DNA 的提取与打靶位点 DNA 的 PCR 扩增 按基因组提取试剂盒推荐方法提取阳性细胞基因组 DNA,这些 DNA 将作为后续 PCR 扩增的模板,用于扩增打靶位点 DNA。然后,利用这两组细胞的基因组 DNA 作为模板,分别进行打靶位点 DNA 的 PCR 扩增。此外,上游引物的序列为 5'-CAGGTGCTTAGCCTATCAGTG-3',下游引物的序列

为 5'-CTGCTGGTTGTGGCTGGA-3'。

1.2.4 测序分析与 TA 克隆 为验证打靶位点是否发生基因编辑,采用 Sanger 测序分析 PCR 扩增产物。当测序结果呈现套峰现象时,初步判断基因编辑已发生。紧接着对这些初步判断为基因编辑成功的 PCR 产物进行了胶回收步骤。将胶回收得到的产物与 pMDTM19-T 载体进行连接、转化,并通过菌液 PCR 筛选阳性克隆。为确保结果的准确性,对筛选出的阳性克隆再次进行测序,以详细分析靶点基因型和打靶效力。TA 克隆反应体系: pMD19-T Vector 取 1 μL, 胶回收产物 1.5 μL, Solution I 取 2.5 μL, ddH₂O 加至 10 μL。反应在 16 °C 下进行,持

续时间为 1 h。

2 结果

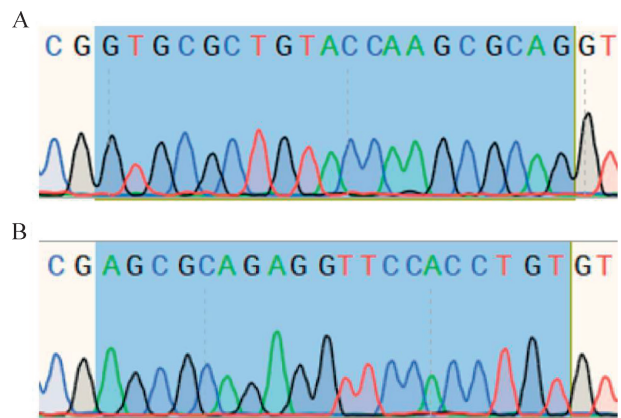
2.1 sgRNA 表达载体成功构建

从 Clinvar 在线数据库中,成功筛查出 *STAR* 基因的功能失活突变,并识别了 7 个特定的突变位点,结果如表 1 所示。为了更深入地理解这些突变对 *STAR* 基因功能的影响,及其与拼接位点突变导致的疾病情况,检索相关文献后确认一个关键的突变位点:(*STAR*) c.707_708delAG ins CTT (p.K236Tfs * 47)。此前,该位点被认定为我国 *STAR* 基因的一个突变热点。

表 1 Clinvar 数据库中 *STAR* 基因突变情况

序号	突变位点	蛋白质变化	是否致病	登记号
1	c.792G>A	(p.Gln264=)	疑似否	VCV000765428
2	c.433G>A	(p.Gly145Arg)	否	VCV000709261
3	c.441G>A	(p.Trp147Ter)	是	VCV001452094
4	c.422_423insTT	(p.Met141fs)	是	VCV001457197
5	c.667A>C	(p.Thr223Pro)	不确定	VCV001362022
6	c.719del	(p.Thr240fs)	是	VCV001076650
7	c.707_708delinsCTT	(p.Lys236fs)	是	VCV002101047

本研究设计的 sgRNA 针对 *STAR* 基因的靶序列严格遵循了 5'-NGG 的排布规律,并且该序列在 *STAR* 基因中具备独特的唯一性。经过筛选,得到两条 sgRNA 的核苷酸序列,包括 sgRNA5,其序列为 5'-GTGCGCTGTACCAAGCGCAG-3'; sgRNA6,其序列为 5'-AGCCGAG AGGTT CACCTGT-3'。随后,按照本研究的实验方案,构建了 Lenticrispr-v2-sgRNA 重组质粒,并对其进行测序分析,如图 1 所示。在所得的测序峰图中,阴影部分明确标识质粒中 sgRNA 的编码序列,这些序列与本研究设计的两条 sgRNA 序列相吻合,证明 sgRNA 表达载体初步构建成功。

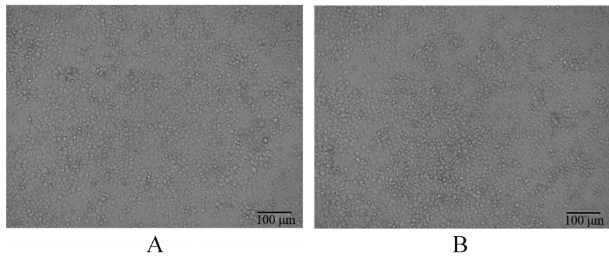


注: A. 阴影部分代表 Lenticrispr-v2-sgRNA5 质粒中的 sgRNA5 编码序列; B. 阴影部分代表 Lenticrispr-v2-sgRNA6 质粒中的 sgRNA6 编码序列。

图 1 sgRNA 表达质粒测序峰图

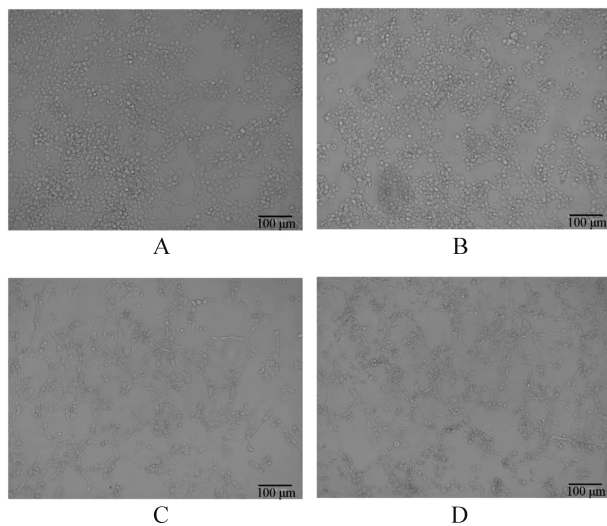
2.2 慢病毒颗粒及阳性细胞的获得

图 2 为转染 HEK-293T 48 h 后(病毒制备)的细胞状态图。在 TCMK 细胞的病毒感染过程中,采用嘌呤霉素作为筛选药物,以识别并筛选出 sgRNA 阳性感染细胞。嘌呤霉素筛选处理 48 h 后,sgRNA5 和 sgRNA6 组的细胞状态如图 3 所示。



注:A.sgRNA5 转染 48 h 后细胞图;B.sgRNA6 转染 48 h 后细胞图。

图 2 细胞转染图

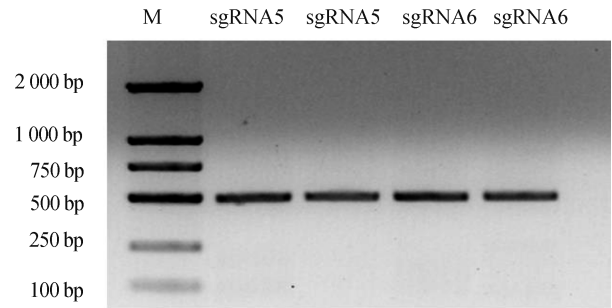


注:A.sgRNA5 感染细胞;B.sgRNA6 感染细胞;C.药筛 48 h 后 sgRNA5 阳性感染细胞;D.药筛 48 h 后 sgRNA6 阳性感染细胞。

图 3 细胞感染图

2.3 打靶位点 DNA 的 PCR 扩增

提取药物筛选阳性细胞基因组 DNA 后,对特定打靶位点进行 PCR 扩增,结果如图 4 所示,得到与预期相符的扩增条带(接近 500 bp),显示扩增效果良好且高效。因此,确认所提取的 DNA 适用于后续测序分析。



注:M 为 Marker,sgRNA5、sgRNA6 分别代表 sgRNA5-Cas9 感染型、sgRNA6-Cas9 感染型。

图 4 打靶位点 DNA 的 PCR 扩增电泳图

2.4 测序及打靶效果分析

为确认 sgRNA 打靶位点 DNA 的编辑情况,对 PCR 产物进行了测序,测序结果显示,sgRNA5 的特定靶点序列中显现出套峰现象,初步表明 *STAR* 基因编辑系统构建成功,结果如图 5 所示。为进一步确认这一结果并深入探究打靶位点的基因型信息与基因编辑效率,采用 TA 克隆技术,将单条 PCR 产物连接到载体上,结果如图 6 所示。测序分析结果显示,目标序列实现 3 个位点的编辑,本研究共送测 12 个样本,其中有 2 个样本发生突变,编辑效率为 16.67%,结果如表 2 所示。

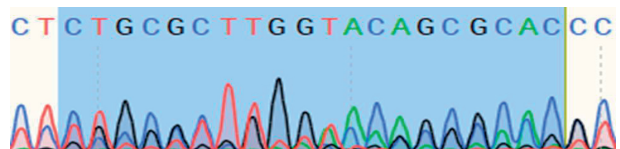
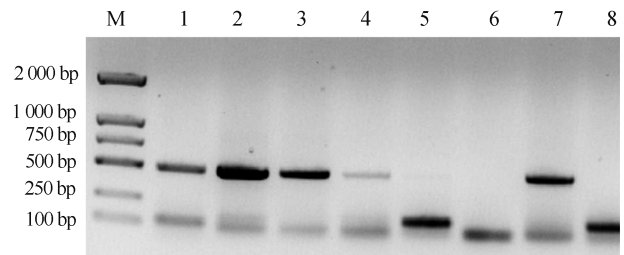


图 5 sgRNA5 打靶位点 DNA 的 PCR 扩增产物测序峰图



注:M 为 Marker;1-8 代表 TA 克隆的 8 种菌落序号。

图 6 sgRNA5 靶点 DNA TA 克隆的鉴定

表2 sgRNA5 靶点基因型分析

序列	插入或缺失突变
CCTGGTGGGGCCTCGAGACTTCGTGAGCGT GC GCTGTACCAAGCGCAGAGGTT	野生型
CCTGGcGGGGCCTCGAGACTTCGTGAGCGT GC GCTGTACCAAGCGCAGgGGTT	+2,2/12
CCTGGTGGaGCCTCGAGACTTCGTGAGCGT GC GCTGTACCAAGCGCAGAGGTT	+1,1/12

注:序列中加粗字体代表靶点序列,“+”代表插入,小写字母代表插入或替换的序列,N/N代表突变序列数量与送测数量的比例。

3 讨论

胆固醇是类固醇激素的前体,其向类固醇激素生成细胞的线粒体内膜的传递依赖于 STAR 蛋白,在线粒体内部,胆固醇在胆固醇侧链裂解酶的催化下转化为孕烯醇酮,这是类固醇激素合成的核心步骤^[14]。STAR 基因或编码胆固醇侧链裂解酶的 *CYP11A1*^[15-17] 基因的突变会干扰下游激素产物的生成,可能诱发 CLAH。在 STAR 基因功能受损时,细胞质内胆固醇和胆固醇酯会大量积聚^[18],导致肾上腺显著增大。由于 CLAH 的临床症状与其他肾上腺皮质功能异常的疾病相似,因此容易被误诊^[19-21]。

本研究基于 CRISPR-Cas9 系统设计了两个 sgRNA 导向序列。sgRNA 是 CRISPR-Cas9 基因编辑系统的重要组成部分,能够精确靶向特定的基因序列引起基因编辑(模拟疾病基因突变)^[22]。本研究采用病毒包装技术生产慢病毒颗粒,将外源基因片段稳定整合进细胞基因组中以实现基因编辑^[22-23],通过 sgRNA 设计、表达载体构建、病毒制备、阳性细胞筛选与编辑效率验证,成功构建了靶向小鼠 *Star* 基因的 CRISPR/Cas9 系统,并在体外实验中验证了其打靶效力。相比相关研究^[11-13] 结果的其他基因编辑体系,本体系操作简单,但编辑效率较低,这可能是由于本系统所采用的包装病毒滴度较低所致。在基因编辑效率检测方面,本研究采用的 TA 克隆技术,是一种检测基因编辑效率与基因碱基组成的简便方法^[11-13]。基因编辑的脱靶可能导致非目标区域的 DNA 错乱,从而诱发生物功能异常^[12]。因此,为精确的模拟小鼠 *Star* 基因突变,此编辑系统的脱靶情况分析仍然需要进一步开展。

4 结论

本研究成功地构建了靶向小鼠 *Star* 基因的 CRISPR/Cas9 系统,并在细胞水平验证了其编辑效能,为进一步探究 STAR 基因的生物学功能和 CLAH 的基因治疗奠定了基础。

参考文献

- [1] WANG S W, GAO C, ZHENG Y M, et al. Current applications and future perspective of CRISPR/Cas9 gene editing in cancer[J]. *Mol Cancer*, 2022, 21(1): 57.
- [2] 温后焯,陈婧,曾杰清,等.利用 CRISPR/Cas9 系统构建 SIRT1 基因敲除的 K562 细胞株[J]. *广东医科大学学报*, 2023, 41(5): 504-508.
- [3] 邹惠影,李俊良,朱化彬.引导编辑系统的研究与应用进展[J]. *畜牧兽医学报*, 2022, 53(11): 3721-3730.
- [4] 张硕,周雨潇,吴海波,等.长效 CRISPR/Cas9 基因编辑结局的动态追踪研究[J]. *畜牧兽医学报*, 2023, 54(10): 4196-4208.
- [5] KING S R, BHANGOO A, STOCCO D M. Functional and physiological consequences of StAR deficiency: role in lipid congenital adrenal hyperplasia[J]. *Endocr Dev*, 2011, 20: 47-53.
- [6] 谢婷,郑纪鹏,黄永兰,等.先天性类脂质性肾上腺皮质增生症临床特点及 StAR 基因突变分析[J]. *中国当代儿科杂志*, 2015, 17(5): 472-476.
- [7] AGHAEI S, FARROKHI E, SAFFARI-CHALESHTORI J, et al. New molecular insights into the A218V variant impact on the steroidogenic acute regulatory protein (STAR) associated with 46, XY disorders of sexual development[J]. *Mol Genet Genomics*, 2023, 298(3): 693-708.
- [8] 皮亚雷,张亚男,崇禾萌,等.先天性类脂质性肾上腺增生

- 症临床及 *StAR* 基因突变分析[J].河北医科大学学报, 2018,39(6):684-687.
- [9] 赵子辰,邓姗,田秦杰.*STAR* 基因缺陷致先天性肾上腺皮质增生一例[J].生殖医学杂志,2022,31(7):983-987.
- [10] 郑婉祺,段颖,肖冰,等.先天性类脂性肾上腺皮质增生症 33 例临床特点及 *StAR* 基因分析[J].中华儿科杂志, 2022,60(10):1066-1071.
- [11] 王蓉,陈圆圆,潘向和,等.靶向小鼠 *KRT5* 基因的 CRISPR/Cas9 系统设计与打靶效力分析[J].华夏医学, 2022,35(5):1-7.
- [12] 李欣怡,孙雪梅,付灿,等.靶向小鼠 *ATP7B* 基因的 CRISPR/Cas9 系统构建与评价[J].现代医药卫生, 2022,38(11):1801-1805.
- [13] 岳鹏鹏,郭俊璠,于鸿浩,等.基于 CRISPR/cas9 系统高效编辑小鼠 *Galt* 基因[J].生物技术通报,2020,36(8): 235-242.
- [14] 陈瑞敏,李云斐,袁欣.先天性肾上腺皮质增生症罕见类型[J].中华实用儿科临床杂志,2015,30(8):570-574.
- [15] 荣柳萍,宋文秀.先天性类脂性肾上腺增生症的研究进展[J].海南医学,2022,33(16):2153-2157.
- [16] 邓智,苏海浩.先天性类脂性肾上腺皮质增生症临床及基因突变特点:病例报告及文献复习[J].中国妇幼卫生杂志,2022,13(4):67-71.
- [17] 李国红,陈晓波,宋福英,等.先天性类脂性肾上腺皮质增生症的临床及基因突变特点并文献复习[J].中华妇幼临床医学杂志(电子版),2020,16(2):188-195.
- [18] 张迪华,曹大宁,刘振东,等.骨碎补总黄酮对去卵巢大鼠骨组织骨形态蛋白-2 和血清骨钙素表达的影响[J].现代生物医学进展,2008,8(9):1634-1636.
- [19] 廉怡华.先天性类脂性肾上腺皮质增生症临床表型与分子遗传学特点[D].石家庄:河北医科大学,2022.
- [20] 王丽红,王蕾,苏艳花,等.先天性类脂性肾上腺增生症 1 例报道并文献复习[J].中国医刊,2017,52(11): 92-96.
- [21] 邱文娟,叶军,韩蓓,等.先天性类脂性肾上腺增生症分子遗传学分析[J].中华儿科杂志,2004,42(8):585-588.
- [22] 朱新宇,何燕华,李晓娇,等.慢病毒介导的 CRISPR/Cas9 靶向 *ACTB* 基因 sgRNA 的设计及活性验证[J].广东畜牧兽医科技,2024,49(2):23-29.
- [23] 李晓娇,朱新宇,邹娴,等.慢病毒介导稳定表达 Cas9 蛋白的鸡成纤维细胞系构建及其活性验证[J].广东农业科学,2023,50(2):125-135.

[收稿日期:2024-07-10]

[责任编辑:郭海婷 英文编辑:周寿红]