

基于CRISPR/Cas9技术构建GP73基因 敲除小鼠模型及表型验证*

徐艺心¹, 甄 兰¹, 黄 庆¹, 莫运海¹, 吴飞翔^{1,2,3,Δ}

(1. 广西医科大学附属肿瘤医院肝胆外科, 南宁 530021; 2. 广西肝癌诊疗工程技术研究中心, 南宁 530021; 3. 区域性高发肿瘤早期防治研究教育部重点实验室, 南宁 530021)

摘要 目的:基于CRISPR/Cas9技术构建高尔基体73(GP73)基因敲除小鼠模型并对其表型进行初步验证。**方法:**利用非同源末端连接(NHEJ)修复引入突变的方式,造成GP73基因蛋白读码框移码,使其功能缺失,针对GP73基因外显子4设计sgRNA靶位点,体外转录获得sgRNA,与编码Cas9的mRNA混合后通过受精卵显微注射方法获得F0代阳性敲除小鼠,通过繁育及基因型鉴定获得GP73基因敲除纯合子小鼠(GP73^{-/-}小鼠)。采用实时荧光定量PCR(RT-qPCR)法检测肝、肾、皮下脂肪、棕色脂肪组织中GP73 mRNA表达,采用酶联免疫吸附试验(ELISA)法检测血清GP73蛋白水平。**结果:**与野生型(WT)小鼠相比,GP73^{-/-}小鼠肝、肾、皮下脂肪、棕色脂肪组织GP73 mRNA及蛋白表达水平降低,血清GP73蛋白水平降低(均 $P<0.05$)。**结论:**基于CRISPR/Cas9技术成功构建了GP73基因敲除小鼠。

关键词 CRISPR/Cas9; GP73; 基因敲除; 基因型鉴定

中图分类号: R392 文献标志码: A 文章编号: 1005-930X(2023)01-0107-05

DOI: 10.16190/j.cnki.45-1211/r.2023.01.017

Construction of GP73 knockout mouse model based on CRISPR/Cas9 technology and phenotype validation

Xu Yixin¹, Zhen Lan¹, Huang Qing¹, Mo Yunhai¹, Wu Feixiang^{1,2,3}. (1. Department of Hepatobiliary Surgery, Affiliated Tumor Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China; 2. Guangxi Liver Cancer Diagnosis and Treatment Engineering and Technology Research Center, Nanning 530021, China; 3. Key Laboratory of Early Prevention and Treatment for Regional High Frequency Tumor, Ministry of Education, Nanning 530021, China)

Abstract Objective: A Golgi 73 (GP73) knockout mouse model was constructed and its phenotype was initially validated based on CRISPR/Cas9 technology. **Methods:** Non-homologous endjoining (NHEJ) was used to repair and introduce a mutation that caused a read frame shift in the GP73 gene, resulting in a loss of function. The sgRNA target sites were designed for exon 4 of the GP73 gene, and sgRNA was obtained by *in vitro* transcription. After mixing with mRNA encoding Cas9, F0 generation positive knockout mice were obtained by microinjection of fertilized eggs, and GP73 knockout homozygous mice (GP73^{-/-} mice) were obtained by breeding and genotype identification; real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) was used to detect GP73 mRNA expression in liver, kidney, subcutaneous adipose tissue and brown adipose tissue, and serum GP73 protein level was detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Results:** Compared with wild-type (WT) mice, GP73 mRNA and protein expressions in liver, kidney, subcutaneous adipose tissue as well as brown adipose tissue and serum GP73 protein levels of GP73^{-/-} mice decreased (all $P<0.05$). **Conclusion:** GP73 knockout mouse models are successfully constructed based on CRISPR/Cas9 technology.

Keywords CRISPR/Cas9; Golgi 73; gene knock-out; genotype identification

*基金项目: 区域性高发肿瘤早期防治研究教育部重点实验室

室子课题(No. GKE2019-06; No. GEK-ZZ202004)

Δ通信作者, E-mail: wufx2013@163.com

收稿日期: 2022-10-14

高尔基体蛋白 73(GP73)最早是 2000 年由美国学者通过对患有成人巨细胞肝炎的患者肝脏进行 cDNA 文库差异筛选时发现的,是肝脏胆管上皮细胞表达的特异性膜蛋白^[1]。研究表明,GP73 在病毒性肝炎(乙肝、丙肝)和非病毒性原因(自身免疫性、酒精性、非酒精性)所引起的肝病中的表达升高^[2]。肝细胞癌(HCC)患者血清 GP73 水平显著升高,且 GP73 诊断 HCC 的灵敏度和特异度高于甲胎蛋白(AFP)^[3]。近年来,随着 GP73 分子机制研究的逐步深入,GP73 在代谢功能中的重要性也逐渐体现出来。研究发现,血中 GP73 受机体营养状态的调控,在饥饿时通过调节 cAMP-PKA-CREB 通路上调糖异生关键酶的表达,靶向肝细胞促进肝脏产糖^[4]。另有研究表明,GP73 参与内质网应激下的 SCAP/SREBPs 脂质代谢通路,上调脂质合成相关基因的表达,促进脂质堆积,引起脂代谢紊乱^[5]。此外,GP73 还是一种 GAP 酶,GP73 通过其 GAP 活性抑制极低密度脂蛋白(VLDL)从肝内向肝外输出,使肝脏中的脂类排出受阻,造成非肥胖型非酒精性脂肪肝(NAFLD)^[6]。以上研究结果均体现 GP73 在糖脂代谢中的重要地位,为了进一步阐明 GP73 在机体代谢中的作用,本研究通过 CRISPR/Cas9 技术构建 GP73 基因敲除小鼠模型,并对其表型进行初步验证。

1 材料与方法

1.1 实验动物

8 周龄 SPF 级雄性 C57BL/6 小鼠,体重 20~25 g,购自北京斯贝福公司,动物生产许可证号为:SCXK(京)2019-0010。本研究通过广西医科大学动物伦理委员会审批。

1.2 主要试剂

PCR 试剂盒购自 Bimake 公司;RNA 分离试剂购自德国 MACHEREY-NAGEL 公司;BCA 试剂盒购自赛默飞公司;RIPA 裂解液购自碧云天公司;小鼠 GP73 抗体购自博士德公司;内参 β -Tubulin 抗体购自 Abcam 公司;HRP 标记的山羊抗小鼠以及山羊抗兔抗体 IgG 均购自于中杉金桥;GP73 蛋白检测试剂盒购自武汉云克隆公司。

1.3 实验方法

1.3.1 sgRNA 设计 在 NCBI 网站查到小鼠 GP73 基因定位(gene ID:105348)于 13 号染色体上(Chromosome13:NC_000079.7),含有 11 个外显子,4 个转

录本。根据小鼠 GP73 基因的结构,通过在线 sgRNA 设计网站(<http://crispor.tefor.net/>),本研究敲除策略针对的转录本是 Ensembl 号:Golm1-201(ENSMUST00000022039.6),选择敲除区域为外显子 4(exon 4)区,在 exon 4 区上、下游序列中选择 sgRNA 靶位点,sgRNA 靶序列信息如下:sgRNA 1:5'-CTGGACAAGCCTTCATCCCTTGG-3',sgRNA 2:5'-TGCCTTCTGACCTTGGCCTGAGG-3'。

1.3.2 阳性基因敲除品系获得及鉴定 在高倍显微镜下,用显微操作器控制显微注射针向 C57BL/6 野生型(WT)小鼠的受精卵中注射 Cas9 mRNA 和 sgRNA,并将注射后的受精卵移植到假孕母鼠中,新出生的小鼠为 F0 代小鼠。由于受精卵早期卵裂速度很快,因此得到的 F0 代小鼠为嵌合体,不一定具备稳定遗传的能力,因此需要传代才可获得具有稳定遗传能力的 F1 代小鼠。通过 PCR 扩增及测序方法鉴别出阳性 F0 代小鼠,鉴定的上、下游引物序列如下:P1:5'-GTCACAACGAAGCCGACTGACCTACAT-3',P2:5'-GCGAGTTTCAGGACAGTTAAGGCTGC-3'。挑选出阳性 F0 代小鼠与 WT 小鼠交配,获得 GP73 敲除 F1 代杂合子(GP73^{+/})小鼠,鉴定方法同 F0 代阳性小鼠。PCR 反应程序为:94 °C 预变性 3 min;98 °C 变性 15 s,60 °C 退火 15 s,68 °C 延伸 1 min,共 35 个循环;最后 68 °C 延伸 5 min。将获得的 GP73^{+/}小鼠通过自交得到 F2 代基因敲除纯合子(GP73^{-/-})小鼠,并进行敲除验证和表型分析。

1.3.3 基因敲除小鼠基因型鉴定 随机选取 13 只 F2 代雄鼠,剪尾,行基因型鉴定,将剪取的鼠尾置于 1.5 mL EP 管中,每管加入新鲜配置的 100 μ L 鼠尾裂解液,55 °C 金属浴消化 1 h,95 °C 水浴 5 min,12 000 r/min 离心 5 min,取上清,作为 PCR 模板进行 PCR 琼脂糖凝胶电泳。腹腔注射戊巴比妥钠麻醉小鼠,取肝、肾、皮下脂肪、棕色脂肪,提取组织总 RNA,反转录为 cDNA 后进行 PCR 扩增。以 GAPDH 为内参,采用 2^{- Δ ACT} 法计算 GP73 mRNA 相对表达量。PCR 引物序列见表 3。

1.3.4 Western blotting 法检测组织 GP73 蛋白表达

腹腔注射戊巴比妥钠麻醉小鼠,取小鼠肝、肾、皮下脂肪、棕色脂肪,加入 RIPA 裂解液提取组织总蛋白,BCA 法进行蛋白定量;SDS-PAGE 电泳分离蛋白,将蛋白转移至 PVDF 膜,10%脱脂奶粉封闭 1 h;加入一抗 GP73(1:1 000)、GAPDH(1:10 000)

稀释液4℃孵育过夜,洗膜3次,每次5 min;加入HRP标记的二抗(1:10 000)室温孵育1 h,洗膜3次,每次5 min,ECL显色,暗室曝光显影。用Image J软件分析蛋白条带灰度值,以GP73蛋白条带灰度值与内参GAPDH条带灰度值的比值为GP73蛋白相对表达量。

表3 PCR引物序列

引物	序列(5'~3')
<i>GP73-KO</i>	上游 TTGCTTGTAGTAGGCCTCTTTGTC
	下游 ATCTCAGGTCACCGGGTTTAGCAG
<i>GP73</i>	上游 AGGTCGGTGTGAACGGATTTG
	下游 TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA
<i>GAPDH</i>	上游 AGGTCGGTGTGAACGGATTTG
	下游 TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA

1.3.5 血清GP73水平检测 麻醉小鼠后眼眶采血,室温静置2 h,3 000 r/min离心10 min,采用酶联免疫吸附试验(ELISA)法检测小鼠血清中GP73水平。

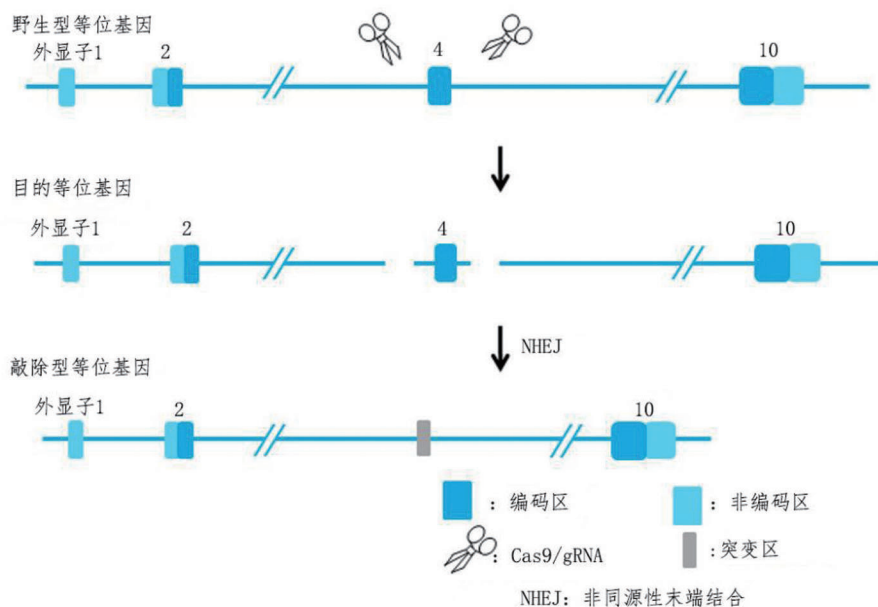
1.4 统计学方法

采用GraphPad Prism 8.0软件进行统计分析,计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用LSD-*t*检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 *GP73*基因敲除小鼠构建策略

*GP73*基因敲除小鼠由上海南模生物公司制备,构建方法如前所述,构建策略如图所示(图1)。

图1 *GP73*基因敲除小鼠构建示意图

2.2 基因敲除小鼠基因型鉴定结果 鼠尾DNA经PCR扩增后进行琼脂糖凝胶电泳,检测结果显示:仅扩增出单一的522 bp片段,为*GP73*^{-/-}纯合子小鼠;扩增出1 365 bp片段和522 bp片段,为*GP73*^{+/-}杂合子小鼠,见图2。

WT小鼠与*GP73*纯合子缺失(KO)小鼠比较,肝、肾、皮下脂肪、棕色脂肪中*GP73* mRNA相对表达量升高(均 $P < 0.05$),见图3。

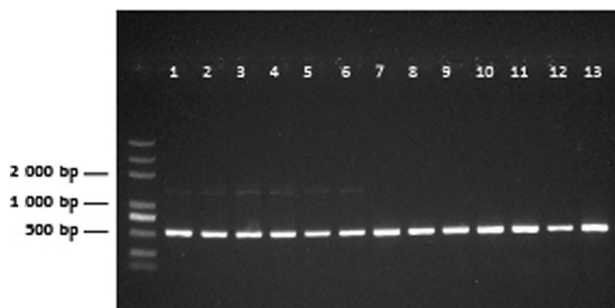
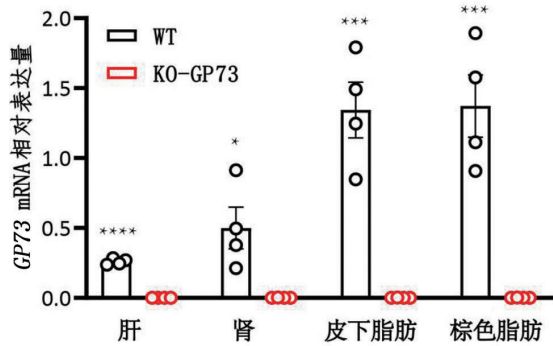
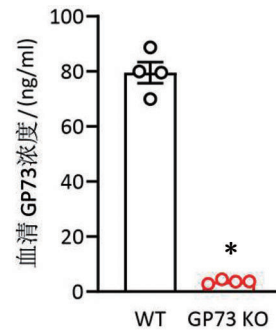


图2 基因敲除小鼠的DNA鉴定情况



与WT组比较, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ 。

图3 基因敲除小鼠各组织中 GP73 mRNA 表达水平



与WT组比较, * $P < 0.0001$ 。

图5 基因敲除小鼠血清 GP73 蛋白水平

2.3 基因敲除小鼠组织 GP73 蛋白表达 在 $GP73^{-/-}$ 纯合子小鼠各组织中几乎检测不到 GP73 蛋白表达,而在 $GP73^{+/+}$ 小鼠各组织中检测到 GP73 蛋白表达,尤其在棕色脂肪(BAT)中的表达较高(图4)。说明敲除 $GP73$ 基因的 exon 4 后,导致 GP73 蛋白读码框发生移码,提前终止翻译,GP73 蛋白无法表达。证明 $GP73$ 基因敲除小鼠模型构建成功。

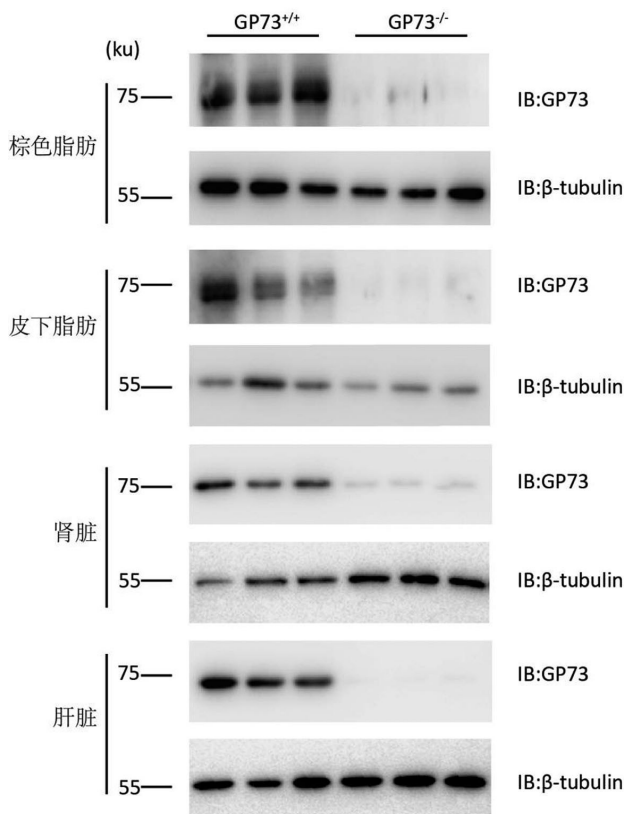


图4 基因敲除小鼠相关组织内 GP73 蛋白表达情况

2.4 基因敲除小鼠血清 GP73 水平验证 $GP73^{-/-}$ 小鼠血清 GP73 蛋白水平低于 WT 小鼠 ($P < 0.0001$), 见图5。

3 讨论

GP73 作为一种被熟知的 II 型跨膜蛋白,具有单个 N 端跨膜结构域和一个广泛的 C 端卷曲螺旋结构域^[7],近年来的研究发现,除了全长的 GP73 分子以外 GP73 还能被 Furin 蛋白酶识别并切割,作为一种可溶形式的 GP73 从细胞中释放出来^[8]。而可溶形式的 GP73 除了目前公认的可作为 HCC 血清标志物以外,还被发现与调控免疫、糖脂代谢、以及肿瘤转移等领域密切相关:随着细胞外可溶性 GP73 的升高,会诱发内质网应激现象,在肝细胞与免疫细胞之间相互传递,引起肿瘤巨噬细胞的募集,影响了肿瘤微环境,导致机体的免疫耐受^[9]。另一方面,GP73 能选择性与表皮生长因子受体(EGFR)作用,从而帮助 EGFR 和 RTK 锚定在跨高尔基体网络(TGN)上,并朝着迁移方向极化循环回到质膜,通过调控 EGFR/RTK 复合物循环的信号动力学,从而长时间激活 AKT/S6K 信号,促进肿瘤的发展和转移^[10]。此外,GP73 还能通过盘绕结构域与具有抑制细胞凋亡作用的蛋白质 sCLU 相互作用,促进 sCLU 的转运和分泌,进而增强癌细胞的侵袭行为^[11]。研究发现,GP73 高表达可以选择性激活非经典的转化生长因子 β (TGF- β) 信号通路,通过脂筏选择性地调节其通路,从而促进肿瘤的生长和转移^[12]。以上研究结果提示,GP73 不仅在肝病的病理进程中起着重要的作用,且在机体免疫调控与新陈代谢中有着重要地位。

CRISPR/Cas9 作为目前最普遍的对哺乳动物基因组功能进行系统研究的基因工程技术,在 II 型原核生物簇状规则间隔短回文重复序列(CRISPR)适应性免疫系统环境下,由 RNA 引导的 DNA 内切酶

Cas9,对内源性基因组位点进行精确裂解(DNA双链断裂)^[13],在通过易出错的非同源末端连接(NHEJ)过程中,导致移码突变和基因敲除,从而完成指定的基因编辑,具有易编程性和广泛适用性^[14]。本研究通过CRISPR/Cas9技术构建了GP73敲除小鼠模型,该模型具有敲除效率高、实验重复性好的优点。本研究为未来研究可溶性GP73在机体内的生理作用和代谢机制提供了模型参考。

参考文献:

- [1] KLADNEY R D, BULLA G A, GUO L, et al. GP73, a novel Golgi-localized protein upregulated by viral infection[J]. *Gene*, 2000,249(1): 53-65.
- [2] KLADNEY R D, CUI X, BULLA G A, et al. Expression of GP73, a resident Golgi membrane protein, in viral and nonviral liver disease[J]. *Hepatology*, 2002,35(6): 1431-1440.
- [3] MAO Y, YANG H, XU H, et al. Golgi protein 73 (GOLPH2) is a valuable serum marker for hepatocellular carcinoma [J]. *Gut*, 2010,59(12): 1687-1693.
- [4] WAN L, GAO Q, DENG Y, et al. GP73 is a glucogenic hormone contributing to SARS-CoV-2-induced hyperglycemia[J]. *Nature Metabolism*, 2022,4(1): 29-43.
- [5] YANG X, WU F, CHEN J, et al. GP73 regulates Hepatic Steatosis by enhancing SCAP-SREBPs interaction[J]. *Scientific Reports*, 2017,7(1):14932.
- [6] PENG Y, ZENG Q, WAN L, et al. GP73 is a TBC-domain Rab GTPase-activating protein contributing to the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease without obesity [J]. *Nature Communications*, 2021,12(1):7004.
- [7] NORTON P A, COMUNALE M A, KRAKOVER J, et al. N-linked glycosylation of the liver cancer biomarker GP73 [J]. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2008,104(1): 136-149.
- [8] BACHERT C, FIMMEL C, LINSTEDT A D. Endosomal trafficking and proprotein convertase cleavage of cis Golgi Protein GP73 produces marker for hepatocellular carcinoma[J]. *Traffic*, 2007, 8(10): 1415-1423.
- [9] WEI C, YANG X, LIU N, et al. Tumor microenvironment regulation by the endoplasmic reticulum stress transmission mediator Golgi Protein 73 in mice[J]. *Hepatology*, 2019,70(3): 851-870.
- [10] YE Q H, ZHU W W, ZHANG J B et al. GOLM1 modulates EGFR/RTK cell-surface recycling to drive hepatocellular carcinoma metastasis[J]. *Cancer Cell*, 2016,30(3): 444-458.
- [11] ZHOU Y, LI L K, HU L B, et al. Golgi phosphoprotein 2 (GOLPH2/GP73/GOLM1) interacts with secretory clusterin[J]. *Molecular Biology Reports*, 2011,38(3): 1457-1462.
- [12] YANG X L, WEI C W, LIU N, et al. GP73, a novel TGF- β target gene, provides selective regulation on Smad and non-Smad signaling pathways[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 2019,1866(4): 588-597.
- [13] CONG L, RAN F A, COX D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas Systems[J]. *Science (American Association for the Advancement of Science)*, 2013, 339(6121): 819-823.
- [14] HSU P D, LANDER E S, ZHANG F, et al. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering [J]. *Cell*, 2014,157(6): 1262-1278.

本文引用格式:

徐艺心,甄兰,黄庆,等. 基于CRISPR/Cas9技术构建GP73基因敲除小鼠模型及表型验证[J]. *广西医科大学学报*, 2023, 40(1): 107-111. DOI: 10.16190/j.cnki.45-1211/r.2023.01.017

XU Y X, ZHEN L, HUANG Q, et al. Construction of GP73 knockout mouse model based on CRISPR/Cas9 technology and phenotype validation [J]. *Journal of Guangxi Medical University*, 2023, 40(1): 107-111. DOI: 10.16190/j.cnki.45-1211/r.2023.01.017