

## 偏侧黑质原位基因编辑建立成年猕猴帕金森病模型

(国家非人灵长类实验动物资源库编制, 云南省昆明市盘龙区茨坝街道龙欣路 17 号, 650201, 0871-68424851, nhp@mail.kiz.ac.cn, 2022-06-30)

资源名称	中文	偏侧黑质原位基因编辑建立成年猕猴帕金森病模型
	英文	Adult macaque model of Parkinson disease developed by <i>in situ</i> gene editing in unilateral substantia nigra
资源标识	CSTR:13153.11.20140601.AMD.PDPINK1DJ-1.01.KIZ	
数据集内容	<p>a. 描述摘要</p> <p>我们利用腺相关病毒血清型 9 (adeno-associated virus 9, AAV9) 介导的 CRISPR/Cas9 基因编辑系统, 直接在两组猕猴 (老年猕猴组和中年猕猴组) 的偏侧黑质进行 <i>PINK1</i> 和 <i>DJ-1</i> 基因共同编辑, 首次建成了具备 PD 核心表型的猕猴模型, 也证明了基因和年龄同样在猕猴 PD 发展中起重要作用。该建模策略可在短时间内 (6-10 个月) 构建大量基因编辑的 PD 猴, 为 PD 病因与诊治研究提供可靠的猕猴模型。</p> <p>b. 关键词</p> <p>帕金森病, 基因编辑, 猕猴模型, 运动症状, PINK1, DJ-1</p> <p>c. 数据的时间范围</p> <p>2014 年 6 月 1 日-2021 年 6 月 24 日</p> <p>d. 数据的空间范围</p> <p>中国科学院昆明动物研究所</p> <p>e. 学科范围</p> <p>神经生物学</p> <p>f. 行业范围</p> <p>自然科学研究和试验发展</p> <p>g. 数据格式</p> <p>.tiff, .mov</p> <p>h. 数据量</p> <p>88MB</p> <p>i. 名词解释与量纲</p> <p>j. 数据精度</p> <p>每段笼内行为录像采集数据时长 1 小时, 采样率 25 帧每秒, 分辨率为 2,000,000 像素; 常规病理染色照片为 JPEG 格式, 在 40 倍物镜下拍摄, 分辨率为 2560×1920。</p> <p>k. 数据更新频度</p> <p>无更新</p>	

<p>缩略图</p>	
<p>数据质量描述</p>	<p>a. 实验动物和伦理 实验方案和动物福利均获得中国科学院昆明动物研究所伦理委员会的批准 (IACUC No.15001)。猕猴单笼饲养, 标准的明/暗周期, 自由取食饮水, 由兽医照看。共 10 只雄性成年猕猴参与 PD 建模。其中, 4 只用于初步研究, 即尝试单独编辑 <i>PINK1</i> (n=2, 90067, 95301) 或 <i>DJ-1</i> 基因 (n=2, 95075, 97081); 另 4 只进行 <i>PINK1</i> 与 <i>DJ-1</i> 基因共同编辑 (n=4, 070229, 070209, 94089, 97093); 其余 2 只猕猴作为年龄匹配的正常对照 (n=2, 99357, 91097), 用于比较 TH 免疫组化染色结果。</p> <p>b. 行为数据采集要求 固定时间采样 (每个实验周的周三上午 10: 00), 固定时长 (猕猴单笼自由活动 1 小时), 固定距离 (录像机位于笼子前方 1 米处), 在没有外部干扰的情况下记录。</p> <p>c. 病理数据采集要求 黑质多巴胺能神经元主要位于黑质致密部, 我们在 4×物镜 (3.5 mm × 2.6 mm)、20×物镜 (690.8 μm × 518.1 μm) 和 40×物镜 (345.4 μm × 259 μm) 下鉴定具备典型多巴胺能神经元形态且呈现 TH 免疫组化阳性染色的细胞, 以第三对脑神经 3n 为参考, 选定黑质长轴近中心区域 40×物镜拍照用于细胞计数。</p> <p>d. 以科学规范为原则, 每条数据的采集、描述与数字化表达的每个环节均由专业人员操作, 保证信息准确信及科学性。实验数据源于仪器测量, 逐一录入。</p>
<p>数据产生方式</p>	<p>a. 行为学数据 为了评估猕猴 PD 症状, 我们从三方面收集行为数据: 1) 记录猕猴的日常行为量化 PD 症状, 使用改进版 <i>Kurlan</i> 量表 (旧大路猴帕金森病</p>

	<p>经典评定量表) 进行评分; 2) 通过阿扑吗啡 (Apo) 诱导的旋转反映黑质-纹状体多巴胺功能缺陷; 3) 通过食物抓取任务测量精细运动。我们利用数码相机 (Sony HDR-XR260, 日本) 收集每只猕猴的录像。实验期间, 共收集日常行为数据七次, 在第 0 周 (基线), 术后第 6、10、12、14、16 和 18 周的每周三上午进行。</p> <p>为了检测基因编辑对黑质-纹状体多巴胺功能的影响, 我们采用经典的药理学试验, 即 Apo 诱导的旋转进行评估。首先, 在 1 小时的视频中, 从第 15 分钟到第 45 分钟的 30 分钟内, 对每只猕猴自发旋转进行计数。其次, 猕猴肌注 Apo 10 分钟后, 再次拍摄 1 小时的视频。同样从第 15 分钟到第 45 分钟的 30 分钟内进行旋转计数。注射前 5 分钟, 将 2 mg 的 Apo 溶解于 2 mL (1 mg/mL) 的维生素 C 溶液 (0.5 mg/2 mL)。在第 0 周 (基线)、术后第 6 周、第 10 周、第 12 周、第 14 周的每周三, 行为录像后进行药理学测试。</p> <p>为了评价猕猴 PD 发展过程中精细运动障碍, 我们进行简易的食物抓取测试。猕猴从笼子前的食物盒内拿一块食物作为奖励。抓取行为稳定后, 收集基线数据。记录每只猕猴抓取食物的潜伏期、正确率和利手偏好。每只猕猴须在每个测试周的三天内完成 180 次测试 (每天 60 次)。猕猴在第 0 周 (基线)、术后第 6 周、第 10 周、第 12 周、第 14 周进行测试。</p> <p>b. PD 病理染色</p> <p>TH 染色: 猕猴双侧黑质的冠状切片用 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (5 min)、3% triton X-100 (4 min, 中国北京索莱宝) 和山羊血清 (15 min, 中国福州迈新) 处理, 然后兔抗 TH 抗体 (1:1000, AB152, Millipore) 4 °C 过夜。次日, 切片与二抗 (PV-9000, 30 min, 中国北京中杉金桥) 37 °C 孵育。之后 DAB 显色 2 min (DAB-1031 Kit, 20×, 中国福州迈新), 苏木精复染细胞核。</p> <p>PSer129αS 染色: 切片用 10 μM/ mL 蛋白酶 K (中国上海阿拉丁) 在 10 mM Tris-HCl, pH=7.8、100 mM NaCl, 0.1% Tween-20 (Bio-Rad, 美国) 中 37°C 处理 30 min。之后用 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (5 min, 中国福州迈新)、3% Triton X-100 (4 min, 中国北京索莱宝), 10% 山羊血清处理 (15 min, 中国福州迈新), 经典的兔抗 PSer129αS 多克隆抗体 (1: 100, ab59264, Abcam, 美国) 4°C 过夜。次日, 切片与抗兔/小鼠二抗试剂盒 (PV 9000, 中国北京中杉金桥) 37°C 孵育 30 min。之后 DAB 显色 2 min (DAB-1031Kit, 20×, 中国福州迈新), 苏木精复染细胞核。</p> <p>染色后, 所有切片乙醇梯度脱水并用二甲苯透明, 中性树脂封片, 光学显微镜 (奥林匹斯, CX41; 照相机: 奥林匹斯 DP25; 软件: cellSens Entry 1.4.1; 日本) 采集照片。每只猕猴选取 10 张黑质冠状切片的左右区域, 对 TH 阳性细胞和 PSer129αS 聚集进行计数。</p>
<p>数据采集、加工处理方法</p>	<p>a. 行为学数据</p> <p>两名有经验的视频分析员参与录像分析。评分者不知每只猕猴的实验操作, 他们使用改进版 <i>Kurlan</i> 量表 (Smith RD, Zhang Z, Kurlan R, McDermott M, Gash DM. Developing a stable bilateral model of parkinsonism in rhesus monkeys. <i>Neuroscience</i> 1993, 52: 7-16) 对视频片段打分。该量表包括 4 个部分: A 部分: 帕金森病特征; B 部分: 药物副作用; C 部分: 总体活动水平; D 部分: 临床分期。PD 评分依据 A 部分得出, 总分为 20, 包括震颤: 0-3; 姿势: 0-2; 步态: 0-4; 运动迟缓: 0-4; 平衡: 0-2; 总体运动技能: 0-3; 防御反应: 0-2。两位评分者的得分如果没有明显差异 (少于两分), 将数据汇总; 若评分出现较大差异, 则由实验者检查, 最终评分将通过一起观看视频确定。在旋转计数中, 两名视频分析员同样不知猕猴的实验操作, 统计视频中猕猴的旋转次数。</p>

	<p>b. PD 病理特征染色数据</p> <p>通过 ImageJ 软件 (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA) 在 40×物镜下对选定区域的黑质多巴胺能神经元 (TH 阳性染色细胞) 计数。分别算出猕猴对照侧和基因编辑侧的平均细胞密度 (个数/mm<sup>2</sup>)。为了验证计数方法的可靠性, 黑质多巴胺能神经元的总数通过与 Garcia 等 (Garcia-Dominguez I, Vesela K, Garcia-Revilla J, Carrillo-Jimenez A, Roca-Ceballos MA, Santiago M, et al. <i>Peripheral Inflammation Enhances Microglia Response and Nigral Dopaminergic Cell Death in an in vivo MPTP Model of Parkinson's Disease. Front Cell Neurosci</i> 2018, 12: 398) 和 Gundersen 等 (Gundersen HJ, Bagger P, Bendtsen TF, Evans SM, Korbo L, Marcussen N, et al. <i>The new stereological tools: disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis. APMIS</i> 1988, 96: 857-881) 使用的方法估算, 得出猕猴对照侧黑质多巴胺能神经元的平均总数约 14800, 与报道的结果一致 (约 14500)。黑质 P<sub>Ser129</sub>αS 聚集计数时, 发现阳性染色信号则进行统计。</p> <p>为了验证基因编辑效果, 通过 Nikon A1 共聚焦显微镜获取 z-stack 图像。分析 EGFP<sup>+</sup>NeuN<sup>+</sup>和 EGFP<sup>+</sup>NeuN<sup>+</sup>黑质细胞的 Paris 免疫染色的荧光强度用于定量 PINK1 的表达水平; 分析 EGFP<sup>+</sup>NeuN<sup>+</sup>和 EGFP<sup>+</sup>NeuN<sup>+</sup>黑质细胞的 DJ-1 免疫染色的荧光强度, 量化 DJ-1 的表达水平。</p>
<p>数据使用条件、方法</p>	<p>资源包含的文本、图片与视频等材料在 Windows 操作系统下, 采用 Microsoft office 等办公软件即可打开</p>
<p>知识产权</p>	<p>a. 标注知识产权说明</p> <p>使用本数据集时, 请在文章中引用以下文献:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Hao Li, Shihao Wu, Xia Ma, et al. Co-editing PINK1 and DJ-1 Genes Via Adeno-Associated Virus-Delivered CRISPR/Cas9 System in Adult Monkey Brain Elicits Classical Parkinsonian Phenotype. <i>Neurosci. Bull.</i> 37, 1271–1288 (2021). <a href="https://doi.org/10.1007/s12264-021-00732-6">https://doi.org/10.1007/s12264-021-00732-6</a></li> </ol> <p>b. 数据标注参考以下规范:</p> <p>数据来源引用参考以下规范:</p> <p>中文表达方式: 数据来源于国家科技基础条件平台—国家非人灵长类实验动物资源库(<a href="http://nhp.kiz.ac.cn">http://nhp.kiz.ac.cn</a>);</p> <p>英文表达方式: National Resource Center for Non-Human Primates, National Science &amp; Technology Infrastructure of China (<a href="http://nhp.kiz.ac.cn">http://nhp.kiz.ac.cn</a>)。</p> <p>致谢方式参考以下规范:</p> <p>中文致谢方式: “感谢国家科技基础条件平台-国家非人灵长类实验动物资源库(<a href="http://nhp.kiz.ac.cn">http://nhp.kiz.ac.cn</a>)提供数据支撑。”</p> <p>英文致谢方式: Acknowledgement for the data support from " National Resource Center for Non-Human Primates, National Science &amp; Technology Infrastructure of China. (<a href="http://nhp.kiz.ac.cn">http://nhp.kiz.ac.cn</a>)".</p> <p>c. 数据贡献者信息</p> <p>姓名: 李浩</p> <p>单位: 中国科学院昆明动物研究所</p> <p>电话: 15808890289</p> <p>邮箱: lihao@mail.kiz.ac.cn</p>
<p>其它说明内容</p>	<p>若使用方希望利用该资源的任何材料开展宣传等活动, 须事先得到资源管理方的书面授权。</p>