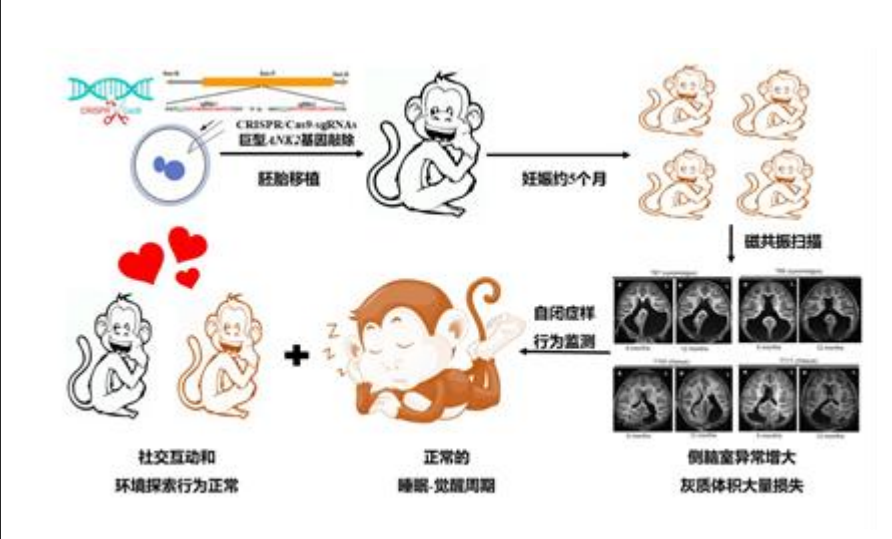


基于 CRISPR/Cas9 基因编辑技术构建 ANK2 敲除猴模型

(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， 2023-03-24)

名称	中文	基于 CRISPR/Cas9 基因编辑技术构建 ANK2 敲除猴模型
	英文	Construction of ANK2 knockout monkey model based on CRISPR/Cas9 gene editing technology
缩略图		
资源源描述	本项目以食蟹猴和猕猴为动物模型，利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术，构建了巨型 ANK2 基因特异性敲除的猴模型。	
动物模型制作方法	1 CRISPR/Cas9 编辑猴胚胎 健康雌性食蟹猴，年龄从 5 到 8 岁，月经规律周期，被选为超数排卵的卵母细胞供体。在来月经后，选定的雌猴每天在同一时间肌肉注射 rhFSH（重组人 FSH，Gonal F，Laboratories Serono），持续 8 天，并在第 9 天注射 rhCG（Recombinant Human Chorionic Gonadotropin alpha for Injection，Merck Serono）。注射 rhCG 后 32~35 小时，使用腹腔镜收集卵母细胞。收集的卵母细胞转移至预平衡的成熟培养基中培养，中期 II 停滞的卵母细胞用于进行 ICSI。以雌雄原核的出现为受精成功的标志。向受精卵母细胞注射 Cas9 mRNA (20 ng/μL) 和 sgRNA（每个 sgRNA 10 ng/μL 或 20 ng/μL）。注射的胚胎在化学成分明确的 H9 培养液中培养，使胚胎卵裂发育。将 2 细胞至囊胚期的高质量卵裂胚胎转移至匹配的代孕猴输卵管中。通常，将三个胚胎移植到每个代孕猴体内，并在移植后 20~30 天首先通过超声检查进行妊娠诊断。 2 对编辑猴进行基因型鉴定 收集流产胎儿的组织，包括胎盘、脐带、脑、心脏、肾脏、肝脏、肺、肌肉、皮肤和/或卵巢，在液氮中快速冷冻保存用于基因型鉴定。对于成功分娩猴，采集胎盘、脐带、耳部皮肤成纤维细胞和/或外周血用于基因型鉴定。收集的组织在裂解缓冲液（10 mM Tris-HCl、0.4 M NaCl、2 mM EDTA、1% SDS 和 100 mg/ml 蛋白酶 K）中消化。通过苯酚-氯仿从裂解物中提取基因组 DNA，并通过使用 T7 核酸内切酶 (NEB) 的 T7E1 切割测定和 Sanger 测序鉴定 ANK2 突变。我们的检测结果显示在猕猴和食蟹猴中，巨型 ANK2 基因被特异性敲除。检测结果如下：	

	a Cynomolgus monkey WT agRNA.1 agRNA.2 T87 GCCTCTCCGAGTACGAGTGCAGCTCTCAGT...GT bp...GAGCCCTGAGTCTCTGAGGACAGCTCTCTGA GCCTCTCC...GAGTACGAGTGCAGCTCTCAGT...GT bp...GAGCCCTGAGTCTCTGAGGACAGCTCTCTGA GCCTCTCC...GAGTACGAGTGCAGCTCTCAGT...GT bp...GAGCCCTGAGTCTCTGAGGACAGCTCTCTGA GCCTCTCC...GAGTACGAGTGCAGCTCTCAGT...GT bp...GAGCCCTGAGTCTCTGAGGACAGCTCTCTGA T88 GCCTCTCCGAGTACGAGTGCAGCTCTCAGT...GT bp...GAGCCCTGAGTCTCTGAGGACAGCTCTCTGA GCCTCTCC...GAGTACGAGTGCAGCTCTCAGT...GT bp...GAGCCCTGAGTCTCTGAGGACAGCTCTCTGA GCCTCTCC...GAGTACGAGTGCAGCTCTCAGT...GT bp...GAGCCCTGAGTCTCTGAGGACAGCTCTCTGA GCCTCTCC...GAGTACGAGTGCAGCTCTCAGT...GT bp...GAGCCCTGAGTCTCTGAGGACAGCTCTCTGA Rhesus monkey WT agRNA.1 agRNA.2 T185 GCCTCTCCGAGTACGAGTGCAGCTCTCAGT...GT bp...GAGCCCTGAGTCTCTGAGGACAGCTCTCTGA GCCTCTCC...GAGTACGAGTGCAGCTCTCAGT...GT bp...GAGCCCTGAGTCTCTGAGGACAGCTCTCTGA GCCTCTCC...GAGTACGAGTGCAGCTCTCAGT...GT bp...GAGCCCTGAGTCTCTGAGGACAGCTCTCTGA GCCTCTCC...GAGTACGAGTGCAGCTCTCAGT...GT bp...GAGCCCTGAGTCTCTGAGGACAGCTCTCTGA T113 GCCTCTCCGAGTACGAGTGCAGCTCTCAGT...GT bp...GAGCCCTGAGTCTCTGAGGACAGCTCTCTGA GCCTCTCC...GAGTACGAGTGCAGCTCTCAGT...GT bp...GAGCCCTGAGTCTCTGAGGACAGCTCTCTGA GCCTCTCC...GAGTACGAGTGCAGCTCTCAGT...GT bp...GAGCCCTGAGTCTCTGAGGACAGCTCTCTGA GCCTCTCC...GAGTACGAGTGCAGCTCTCAGT...GT bp...GAGCCCTGAGTCTCTGAGGACAGCTCTCTGA T113 GCCTCTCCGAGTACGAGTGCAGCTCTCAGT...GT bp...GAGCCCTGAGTCTCTGAGGACAGCTCTCTGA GCCTCTCC...GAGTACGAGTGCAGCTCTCAGT...GT bp...GAGCCCTGAGTCTCTGAGGACAGCTCTCTGA GCCTCTCC...GAGTACGAGTGCAGCTCTCAGT...GT bp...GAGCCCTGAGTCTCTGAGGACAGCTCTCTGA GCCTCTCC...GAGTACGAGTGCAGCTCTCAGT...GT bp...GAGCCCTGAGTCTCTGAGGACAGCTCTCTGA b Cynomolgus monkey WT agRNA.1 agRNA.2 T87 GCCTCTCCGAGTACGAGTGCAGCTCTCAGT...GT bp...GAGCCCTGAGTCTCTGAGGACAGCTCTCTGA GCCTCTCC...GAGTACGAGTGCAGCTCTCAGT...GT bp...GAGCCCTGAGTCTCTGAGGACAGCTCTCTGA GCCTCTCC...GAGTACGAGTGCAGCTCTCAGT...GT bp...GAGCCCTGAGTCTCTGAGGACAGCTCTCTGA GCCTCTCC...GAGTACGAGTGCAGCTCTCAGT...GT bp...GAGCCCTGAGTCTCTGAGGACAGCTCTCTGA GCCTCTCC...GAGTACGAGTGCAGCTCTCAGT...GT bp...GAGCCCTGAGTCTCTGAGGACAGCTCTCTGA T88 GCCTCTCCGAGTACGAGTGCAGCTCTCAGT...GT bp...GAGCCCTGAGTCTCTGAGGACAGCTCTCTGA GCCTCTCC...GAGTACGAGTGCAGCTCTCAGT...GT bp...GAGCCCTGAGTCTCTGAGGACAGCTCTCTGA GCCTCTCC...GAGTACGAGTGCAGCTCTCAGT...GT bp...GAGCCCTGAGTCTCTGAGGACAGCTCTCTGA GCCTCTCC...GAGTACGAGTGCAGCTCTCAGT...GT bp...GAGCCCTGAGTCTCTGAGGACAGCTCTCTGA Rhesus monkey WT agRNA.1 agRNA.2 T185 GCCTCTCCGAGTACGAGTGCAGCTCTCAGT...GT bp...GAGCCCTGAGTCTCTGAGGACAGCTCTCTGA GCCTCTCC...GAGTACGAGTGCAGCTCTCAGT...GT bp...GAGCCCTGAGTCTCTGAGGACAGCTCTCTGA GCCTCTCC...GAGTACGAGTGCAGCTCTCAGT...GT bp...GAGCCCTGAGTCTCTGAGGACAGCTCTCTGA GCCTCTCC...GAGTACGAGTGCAGCTCTCAGT...GT bp...GAGCCCTGAGTCTCTGAGGACAGCTCTCTGA T113 GCCTCTCCGAGTACGAGTGCAGCTCTCAGT...GT bp...GAGCCCTGAGTCTCTGAGGACAGCTCTCTGA GCCTCTCC...GAGTACGAGTGCAGCTCTCAGT...GT bp...GAGCCCTGAGTCTCTGAGGACAGCTCTCTGA GCCTCTCC...GAGTACGAGTGCAGCTCTCAGT...GT bp...GAGCCCTGAGTCTCTGAGGACAGCTCTCTGA GCCTCTCC...GAGTACGAGTGCAGCTCTCAGT...GT bp...GAGCCCTGAGTCTCTGAGGACAGCTCTCTGA
动物模型表型数据	图 1. (a-b) 转基因猴中巨型 ANK2 等位基因的 Sanger 测序结果 (a) 和深度测序结果 (b)。 从外周血样本中分离的基因组 DNA 用于测序。 Protospacers 为红色文本，PAM 为绿色并带有下划线。突变为蓝色，插入 (+)、缺失 (-) 和点突变 (m) 显示在每个等位基因的右侧。 (a) 中 TA 测序的克隆率和 (b) 中高通量测序读数的百分比显示在相应图部分最右侧的列中。 我们对成功敲除巨型 ANK2 的猴模型进行了表型的细致探索。首先我们对在 24 个月时收集的核磁共振 (MRI) 数据进行了定量分析，以评估大脑体积变化。 根据恒河猴 (F99) 和食蟹猴 (Cyno162) 的大脑图谱，对每只猴子的大脑进行登记并分割成 94 个子区域。 在本研究中，将每只突变猴的 MRI 数据与物种特异性标准脑图谱而不是物种匹配的野生型 (WT) 对照进行比较，因为这些标准脑图谱是通过使用更多 野生型个体构建的。每个大脑区域的灰质体积 (GMV) 损失被定义为缺失 GMV 与特定物种标准脑图谱相比的百分比(将缺失的 GMV 体积除以脑图谱的标准化区域 GMV)。分析结果显示在巨型 ANK2 敲除猴中表现出一致且显著的体积改变的区域主要位于左视区 1、左视区 2、左前视区、左腹侧颞叶皮层和右内侧额叶皮层。 为了检测大量 ANK2 耗竭是否会导致 ASD 的核心症状，我们进行了一系列行为测试，包括社交互动、环境探索、刻板行为、独处和自我打扮。与年龄和性别匹配的野生型对照猴相比，突变猴没有表现出典型的 ASD 样行为。 同样，主动和被动社交互动的频率和持续时间在 WT 和突变猴之间也没有太显著的差异。探索兴趣和刻板印象方面的检测在巨型 ANK2 敲除猴和野生型对照组之间也未有显著差异。以上数据表明，非人类灵长类动物中巨型 ANK2 敲除不会导致类似 ASD 的行为。 这与突变小鼠的观察结果形成鲜明对比。 睡眠与神经可塑性、大脑发育和健康密切相关。 我们想知道突变猴子的大脑缺陷是否会导致催眠状态。 对 9 个月、15 个月和 24 个月时通过活动记录仪监测睡眠-觉醒周期数据细致分析发现,上述年龄段的巨型 ANK2 敲除猴都有正常的总睡眠和放松睡眠，且与 WT 猴之间没有差异。我们还评估了白天活动、夜间活动以及白天/夜间活动的比率。

巨型 ANK2 敲除猴在这些方面也没有显示出与野生型猴子的任何差异。为了探讨年龄是否影响两组之间的睡眠-觉醒周期,数据在单独的 2(组: KO 与 WT)×3(年龄: 9 个月、15 个月和 24 个月)中进一步分析,发现两组之间的睡眠和活动模式均未观察到显著差异(所有 P 值 > 0.05)

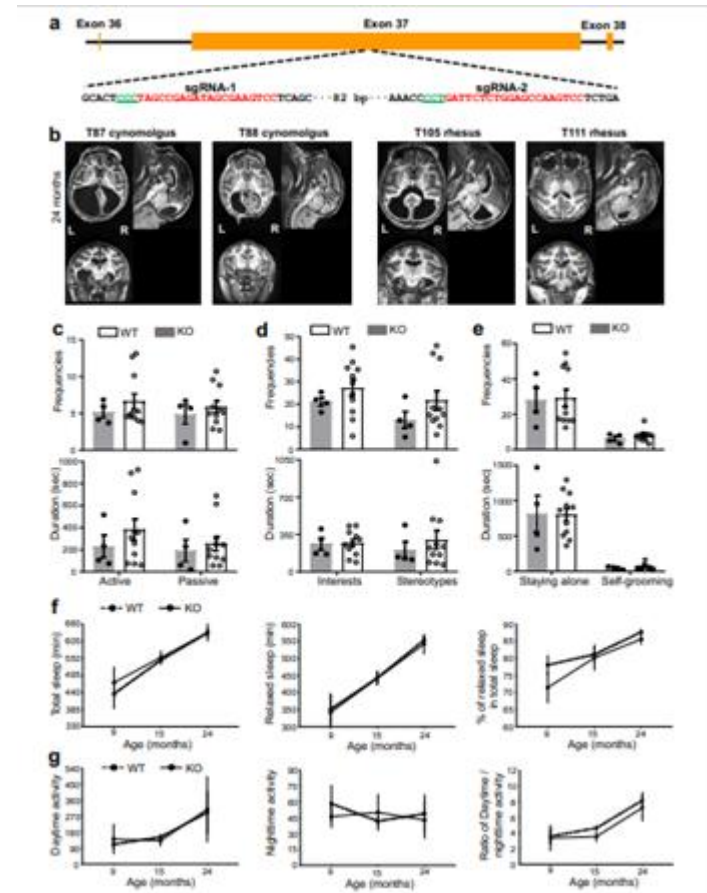


图 2. 巨型 ANK2 敲除猴子表现出脑容量损失,但没有表现出 ASD 症状并且具有正常的睡眠-觉醒周期。a 示意图显示了两个靶向巨型 ANK2 特定外显子的 sgRNA。b 每只基因敲除 (KO) 猴子 24 个月时结构图像的轴向、矢状和冠状切片示例。L-左; R-对。c-e 主动和被动社交活动的频率和持续时间 KO 和 WT 猴子之间的互动 (c)、探索性和刻板印象行为 (d)、独处和自我梳理 (e)。(g)白天活动、夜间活动和白天/夜间活动的比率。所有数据在表示为平均值±SEM。

动物模型的评价

对外周血、皮肤组织等材料提取基因组,用 Sanger 测序结果证实转基因猴中巨型 ANK2 等位基因的被成功敲除。全基因组测序结果验证 sgRNA 打靶未发生脱靶效应。

动物模型应用案例

本项目对脑容量损失的病因、发病机制以及诊断标志物发掘具有重要的参考价值。

动物模型的安全性评价

动物模型制备过程中的监督管理、处置措施、微生物菌株检测、对环境和生态影响的评估等由中国科学院昆明动物研究所实验动物中心统一管理。建模过程中未见动物出现感染与毒性反应等。

动物模型的保存类型

☒建模方法 ☐活体 ☐生物样本

资源地点	中国科学院昆明动物研究所	
资源生成时间	2021 年 6 月 1 日至 2022 年 6 月 24 日	
最新修订时间	2022 年 6 月 30 日	
合作及共享方式	合作方式	科研合作
	共享方式	☐ 完全开放共享 ☒ 协议共享 ☐ 暂不共享
知识产权	a. 标注知识产权说明 使用本动物模型时，请在文章中引用以下文献： 1. Qin DD[#], Zhou JK[#], He XC[#], Shen XY[#], Li C, Chen HZ, Yan LZ, Hu ZF, Li X, Lv LB, Yao YG[*], Wang Z[*], Huang XX[*], Hu XT[*], Zheng P[*]. Depletion of giant ANK2 in monkeys causes drastic brain volume loss. Cell Discovery, 2021, 7(1):113. b. 动物模型标注参考以下规范： 动物模型来源引用参考以下规范： 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(http://nhp.kiz.ac.cn)； 英文表达方式：National Resource Center for Non-Human Primates, National Science & Technology Infrastructure of China (http://nhp.kiz.ac.cn)。 致谢方式参考以下规范： 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(http://nhp.kiz.ac.cn)提供动物模型支撑。” 英文致谢方式：Acknowledgement for the animal model support from "National Resource Center for Non-Human Primates, National Science & Technology Infrastructure of China. (http://nhp.kiz.ac.cn)". c. 动物模型贡献者信息 姓名：郑萍 单位：中国科学院昆明动物研究所 电话：0871-68125423 邮箱：zhengp@mail.kiz.ac.cn	
其它说明内容	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。	