

α -半乳糖基抗原缺失模型兔的研制与评价

<https://doi.org/10.3969/j.issn.2095-4344.2958>

穆钰峰^{1,2}, 魏利娜¹, 吴勇¹, 邵安良¹, 陈亮¹, 屈树新², 徐丽明^{1,2}

2095-4344.2958

投稿日期: 2020-01-14

送审日期: 2020-01-19

采用日期: 2020-03-09

在线日期: 2020-07-31

中图分类号:

R446; R496; R318

文章编号:

2095-4344(2021)02-00281-05

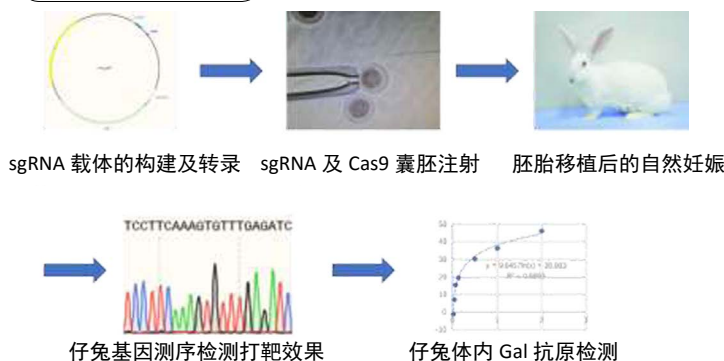
文献标识码: B

文章快速阅读:

文章特色—

- (1) 使用 CRISPR/Cas9 技术成功敲除兔体内 GGTA1 部分基因;
- (2) 制备 Gal 抗原缺失兔模型, 以期用于动物源生物材料的免疫原性风险评价及原位植入实验等相关研究。

技术路线 (主要思路)



文题释义:

Gal抗原: 中文全称为 α -半乳糖基抗原($\alpha 1$, 3galactosyle, Alpha1, 3Gal, 或 α -Gal), 是半乳糖基与细胞膜上的蛋白或脂结合构成的一组完全性抗原, 研究表明Gal抗原是异种移植中引起超急性免疫排斥反应的主要靶抗原。

CRISPR/Cas9基因编辑技术: 是指在sgRNA引导下, 利用Cas9核酸酶靶向特定DNA序列并产生双链断裂(DSB), 通过同源重组修复(HDR)或非同源末端连接(NHEJ)的方式, 从而实现基因敲除、敲入和染色体转位等。目前, CRISPR/Cas9系统以其快速、简便、高效的特点已经广泛应用于生命科学领域。

摘要

背景: 有研究表明一种称为 α -Gal的糖抗原是动物源性生物材料或异种器官移植引起超急性免疫排斥反应的主要靶抗原。

目的: 研制Gal抗原缺失兔模型, 预期用于评价植入性医疗器械, 其局部植入后对宿主的局部免疫反应及非特异性炎症反应风险。

方法: 选用SPF级6-8月龄新西兰大白兔作为模式动物蓝本, 制备Gal抗原缺失兔模型。采用CRISPR/Cas9介导的基因编辑技术, 针对调控兔子Gal抗原表达的GGTA1基因第8外显子设计构建2条相辅的sgRNA。经转录后将GGTA1 sgRNA mRNAs与Cas9 mRNA共显微注射到体外培养的兔子受精卵中, 继续短暂体外培养后植入代孕母兔体内, 经自然妊娠获得仔兔。基因编辑成功与否通过凝胶电泳和基因测序进行验证。Gal抗原的表达参照行业标准给出的方法(Y/T 1561-2017)进行检测。研究经中国食品药品检定研究院实验动物资源研究所动物伦理委员会批准[批准号: 中检动(福)第2017(B)007号]。

结果与结论: ①基因编辑后的胚胎被转移至4只代孕兔体内, 自然妊娠后获得15只基因编辑仔兔, 仔兔的外观发育及进食行为等未见异常; ②凝胶电泳及基因测序结果显示15只仔兔中有14只的靶向基因被成功编辑, 但编辑的碱基并不相同; 随机检测其主要脏器Gal抗原, 表达均降低了99.96%以上; ③结果表明, Gal抗原缺失兔子有望用于动物源性医疗器械的免疫原性风险评价和异种骨、角膜等原位植入实验, 以便能够更客观科学地评价动物源性医疗器械的安全性和有效性。

关键词: Gal抗原; GGTA1基因; CRISPR/Cas9; 基因编辑; 免疫原性; 模式动物; 原位植入; Gal抗原缺失兔子

缩略语: α -半乳糖基抗原: $\alpha 1$, 3galactosyle, Alpha1, 3Gal或 α -Gal

Development and evaluation of alpha-galactosyl antigen-deficient rabbit model

Mu Yufeng^{1,2}, Wei Lina¹, Wu Yong¹, Shao Anliang¹, Chen Liang¹, Qu Shuxin², Xu Liming^{1,2}

¹National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 102629, China; ²School of Materials Science and Engineering, Southwest Jiaotong University, Chengdu 611756, Sichuan Province, China

Mu Yufeng, Master candidate, National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 102629, China; School of Materials Science and Engineering, Southwest Jiaotong University, Chengdu 611756, Sichuan Province, China

¹中国食品药品检定研究院, 北京市 102629; ²西南交通大学材料科学与工程学院, 四川省成都市 611756

第一作者: 穆钰峰, 男, 1995年生, 江苏省连云港市人, 汉族, 西南交通大学、中国食品药品检定研究院联合培养在读硕士, 主要从事生物医学工程、医疗器械生物学评价研究。

并列第一作者: 魏利娜, 1987年生, 河南省内黄县人, 汉族, 2014年北京大学毕业, 博士, 助理研究员, 主要从事医疗器械生物学评价研究。

通讯作者: 徐丽明, 博士, 研究员, 中国食品药品检定研究院, 北京市 102629; 西南交通大学材料科学与工程学院, 四川省成都市 611756

并列通讯作者: 屈树新, 博士, 教授, 西南交通大学材料科学与工程学院, 四川省成都市 611756

<https://orcid.org/0000-0001-6059-5681>(穆钰峰); <https://orcid.org/0000-0003-2510-3818>(魏利娜)

基金资助: 国家重点研发计划(2016YFC1103203), 项目负责人: 徐丽明

引用本文: 穆钰峰, 魏利娜, 吴勇, 邵安良, 陈亮, 屈树新, 徐丽明. α -半乳糖基抗原缺失模型兔的研制与评价[J]. 中国组织工程研究, 2021, 25(2):281-285.



Wei Lina, MD, Assistant research, National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 102629, China

Mu Yufeng and Wei Lina contributed equally to this work.

Corresponding author: Xu Liming, MD, Researcher, National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 102629, China; School of Materials Science and Engineering, Southwest Jiaotong University, Chengdu 611756, Sichuan Province, China

Co-corresponding author: Qu Shuxin, PhD, Professor, School of Materials Science and Engineering, Southwest Jiaotong University, Chengdu 611756, Sichuan Province, China

Abstract

BACKGROUND: α -Galactosyl (α -Gal) is the main target antigen in hyperacute rejection resulting from animal tissues or xenotransplantation.

OBJECTIVE: To develop a Gal antigen-deficient rabbit model in order to objectively evaluate the immunogenicity risk of animal-derived biomaterials and the local response to implantation in the host.

METHODS: New Zealand white rabbits, SPF grade, 6–8 months old, were selected as model animals to prepare Gal antigen-deficient rabbits. Using CRISPR/Cas9-mediated gene editing technology, two complementary sgRNAs were designed and constructed for the 8th exon of GGTA1 gene to regulate Gal antigen expression in rabbits. After transcription, GGTA1 sgRNA mRNAs and Cas9 mRNA were co-microinjected into *in vitro* cultured rabbit fertilized eggs, which were then implanted into surrogate mother rabbits after a brief *in vitro* culture, and the neonatal rabbits were obtained by natural pregnancy. The success of gene editing was verified by gel electrophoresis and gene sequencing. The expression of Gal antigen was detected with reference to the method given by the industry standard (YY/T 1561-2017). The study protocol was approved by the Animal Ethics Committee of the Laboratory Animal Resources Laboratory of the National Institutes for Food and Drug Control (approval No. 2017(B)007).

RESULTS AND CONCLUSION: The embryos were transferred to four surrogate rabbits after gene editing. Fifteen gene-edited pups were obtained after natural pregnancy. The appearance and feeding behavior of the pups were not abnormal. Gel electrophoresis and gene sequencing results showed that 14 out of 15 rabbits were successfully edited, but the edited bases were not the same. The Gal antigen of the main organs was detected randomly, and its expression was reduced by more than 99.96%. Therefore, Gal-antigen-deficient rabbits are expected to be used for immunogenic risk assessment of animal-derived medical devices and *in situ* implantation experiments of heterogeneous bone and cornea, in order to be able to more objectively and scientifically evaluate the safety and effectiveness of animal-derived medical devices.

Key words: Gal antigen; GGTA1 gene; CRISPR/Cas9; gene editing; immune rejection; model animals; orthotopic implantation; Gal antigen-deficient rabbit

Funding: the National Key Research and Development Project of China, No. 2016YFC1103203 (to XLM)

How to cite this article: MU YF, WEI LN, WU Y, SHAO AL, CHEN L, QU SX, XU LM. Development and evaluation of alpha-galactosyl antigen-deficient rabbit model. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2021;25(2):281-285.

0 引言 Introduction

因动物源性生物材料具有良好的生物相容性和组织诱导活性，且材料来源充足，动物源性医疗器械产品的研发已成为热点，并被广泛用于创伤修复等再生医疗领域。然而，由于动物源性生物材料的特殊来源，导致其应用于人体面临着由异种免疫原性引起的免疫排斥反应潜在风险，直接影响着材料的安全性和有效性^[1-2]，所以这类医疗器械产品需进行更全面的生物学评价以评估其潜在安全风险。常规的医疗器械生物学评价中关于安全性风险评价实验多采用野生型实验动物进行评价，但野生型实验动物对来自其他动物的异种免疫原敏感性与人体不同，无法客观地评价动物源性医疗器械的安全性。所以，用野生型实验动物不能客观地评价动物源性医疗器械的异种免疫原性及对宿主的植入反应，亟需开发一种合适的动物模型用于动物源性医疗器械免疫原性及宿主植入反应等安全风险评价。

已有研究表明 α -半乳糖基抗原 ($\alpha 1$, 3galactosyle, Alpha1, 3Gal 或 α -Gal, 以下简称为 Gal 抗原) 是异种移植排斥的主要靶抗原。Gal 抗原是一种受半乳糖基转移酶 ($\alpha 1$, 3galactosyltransferase, GGTA 1) 调控的半乳糖基与细胞膜上的蛋白或脂结合构成的一组完全性抗原^[3]，这种抗原表达在除了人、类人猿、旧世纪猴之外的所有低等哺乳动物体内。人体由于受肠道菌群 (含有 Gal 抗原) 的刺激，体内含有高水平的抗 Gal 抗体，因此人体内植入未去除 Gal 抗原的动物组织器官会产生超急性免疫排斥反应^[3-5]。动物源性医疗器械的原材料多来源于猪、牛、马，甚至鼠等，安全风险评价实验动物多用大鼠、小鼠、兔子等，这些动物体内都表达 Gal 抗原而无 Gal 抗体，因此对动物源性材料中的残留 Gal 抗原不会产生免疫排斥反应，进而不能客观地评价动物源性医

疗器械对人体的免疫原性及宿主植入反应等安全风险。

为此，很多研究利用基因编辑制备 Gal 抗原缺失动物模型，用于研究动物组织器官及动物源生物材料的异种免疫原性^[6-7]。实验课题组通过基因编辑技术研制了 Gal 抗原缺失小鼠，并广泛用于动物源性医疗器械的免疫原性剩余风险评价^[8-12]。然而，伴随着动物源生物材料的广泛应用，生物角膜^[13]、异种骨植入物^[14]、生物硬脑膜补片等越来越多的动物源生物材料被用于植入类医疗器械^[15]，由于这类医疗器械的特殊用途，其宿主植入反应试验要求尽可能采用原位植入等模拟临床使用环境的方式进行，以全面评价引起宿主局部植入反应的免疫原性、局部非特异性炎症、异物刺激反应等风险因素。然而，小鼠、大鼠等小型实验动物因体型过小而不适用于原位植入试验，猪、羊等大型实验动物体型过大，养殖成本高。与之相比，兔子的体型适中、繁殖周期短、易饲养，且有着与人类更相似的解剖结构，被广泛应用于疾病动物模型的建立^[16-18]。为能客观评价动物源性医疗器械的宿主植入反应风险，课题组通过 CRISPR-Cas 9 技术制备了 Gal 抗原缺失兔子，并进行纯化和繁育，建系保种。预期用于动物源性医疗器械的免疫原性风险评价和原位植入实验等，以期能够客观地评价动物源性医疗器械的安全性和有效性研究。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 Gal 抗原缺失兔子模型的制备。

1.2 时间及地点 实验于 2017 年 9 月至 2019 年 2 月在北京中国食品药品检定研究院完成。

1.3 材料

1.3.1 实验动物 选用 SPF 级 6–8 月龄、体质量 3–5 kg 的新

新西兰大白兔作为模式动物蓝本, 制备 Gal 抗原缺失兔子。实验动物由中国食品药品检定研究院实验动物资源研究所提供, 许可证号: SCXK(京)2014-0013, 全程在中检院动物所 SPF 级环境下饲养。研究经中国食品药品检定研究院实验动物资源研究所动物伦理委员会批准 [批准号: 中检动(福)第 2017(B)007 号]。

1.3.2 实验用主要试剂、仪器及设备 TIAMamp Genomic DNA 试剂盒(天根, 中国), NEBuffer 2(NEB, USA), T7 内源性核苷酸酶(NEB, USA), DNA Marker 2000(天根, 中国), 琼脂凝胶(索莱宝, 中国), TIAN gel midi 纯化试剂盒(天根, 中国), QuantiTect Reverse Transcription(Qiagen, Germany), TB Green™ Premix Ex Taq™ II(TAKARA, Japan), α-Gal 抗原检测试剂盒(三药, 中国); CR 基因扩增仪(Veriti, 日本), 电泳仪(Bio-Rad, 美国), 实时荧光定量 PCR 仪(LC480 II, 瑞士), 凝胶成像分析系统(UVI, 英国)等。

1.4 实验方法

1.4.1 GGTA1 基因敲除兔子的制备

(1)sgRNA 序列设计: 根据已有的 GGTA1 基因敲除小鼠、猪的研究及 NCBI 检索结果 (Gene ID: 14594)^[6-7], 对比兔子基因序列分析, 确定兔子 Gal 抗原的调控基因 GGTA1 基因功能区。并选定基因功能区 CDS(编码区)序列的第 8 外显子作为基因靶点, 使用 Feng Zhang 等提供的 CRISPR/Cas9-sgRNA 设计在线网站 (<http://crispr.mit.edu/>), 在第 8 外显子上设计了 2 个 sgRNA(见图 1)。

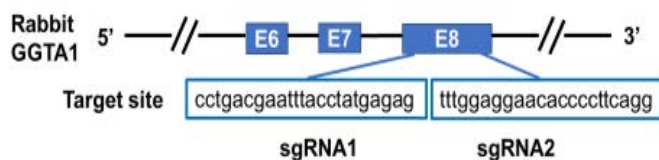


图 1 | 基因打靶示意图

Figure 1 | Schematic diagram of gene targeting

(2)sgRNA 载体构建与转录: 合成上述设计的 2 个相辅的打靶序列 DNA 寡核苷酸后, 95 °C 退火 5 min 合成双链 DNA, 再将双链 DNA 克隆到 Bbs I 酶切回收的 pUC57-T7 表达载体 (基因 ID 51306); 随后用 T₇ 引物扩增重组的载体 (pUC57-T7-GGTA1/sGNA)。扩增完成后, 用 MAXIscript™ T7 试剂盒进行转录, miRNeasy Mini 试剂盒纯化, 得到合成的 GGTA/sGNA1 和 GGTA/sGNA2 备用。

将 3×FLAG-NLS-SpCas9-NLS 载体 (Addgene ID:48137) 线性化处理后体外转录并纯化备用。

(3) 受精卵注射与胚胎移植: 首先, 将 6-8 月龄的雌性新西兰大白兔注射促滤泡激素 (FSH, 50 IU) 进行促进超速排卵, 每 12 h 注射 1 次, 连续注射 3 d。在最后一次注射后将其与雄性兔子合笼, 并注射 100 IU 人源绒毛膜促性腺激素 (hCG), 18 h 后将雌性受孕兔子实施安乐死, 用 DPBS-BAS 冲洗输卵管收集受精卵。将原核阶段的胚胎培养在卵母细胞培养液中。

将 200 mg/L 的 Cas9 mRNA 及 40 mg/L 的 GGTA1/sGNA

实验动物造模过程的相关问题

造模目的:	研制 Gal 抗原缺失兔模型
研究动物模型的方法及意义:	通过 CRISPR-Cas 9 介导的基因编辑技术制备 Gal 抗原缺失兔子, 并进行纯化和繁育, 建系保种。预期用于评价植入性医疗器械局部植入后对宿主的局部免疫反应及非特异性炎症反应风险
动物来源及品系:	SPF 级新西兰大白兔由中国食品药品检定研究院实验动物资源研究所提供
模型与所研究疾病的关系:	兔子的体型适中、繁殖周期短、易饲养, 且有着与人类更相似的解剖结构, 更适用于原位植入实验等医疗器械安全风险评价项目
造模技术描述:	① sgRNA 序列设计; ② sgRNA 载体构建与转录; ③ 受精卵注射与胚胎移植
造模主要诱导用药:	受精卵注射: 促滤泡激素; 人源绒毛膜促性腺激素 胚胎注射: Cas9 mRNA; GGTA1/sGNA mRNAs
动物数量:	基因编辑后的胚胎被转移至 4 只代孕兔体内, 其中有 3 只兔子成功着床怀孕, 常规饲养后共获得 15 只仔兔
造模成功评价指标:	通过凝胶电泳和基因测序进行验证
造模后实验观察指标:	① GGTA 1 基因编辑兔胚胎移植结果; ② 基因型鉴定结果; ③ 基因编辑兔体内 Gal 抗原检测结果
伦理委员会批准:	研究经中国食品药品检定研究院实验动物资源研究所动物伦理委员会批准 [批准号: 中检动(福)第 2017(B)007 号]

mRNAs, 按照常规的细胞质注射方式进行胚胎注射。注射完毕后, 将胚胎转移至 EBSS 培养液, 在 38.5 °C, 体积分数 5%CO₂, 100% 湿度条件下进行短期培养。

将 224 个注射了 Cas9-GGTA1/sGNA mRNA 的胚胎移入 4 只受体兔输卵管内, 并进行常规饲养。经检查有 3 只兔子注射的基因处理胚胎成功着床怀孕, 常规饲养后共获得 15 只仔兔。

1.4.2 新生小兔基因型鉴定 根据兔子 GGTA1 基因功能区 CDS 序列, 设计如下扩增引物对新生小兔基因型进行鉴定: F: TGG AGG AGT TCA TAA CAT CTG C; R: TGC TGG GAT TAT CAT ATA GGC CT, 扩增碱基片段长度 (602 bp)。

从新生小兔耳缘组织提取 DNA, PCR 扩增后纯化, NEBuffer 2 热变性、退火, 杂交 PCR 产物经 T7 内源性核苷酸酶在 37 °C 消化 30 min; 经 2% 琼脂凝胶电泳后进行纯化, 分析琼脂糖凝胶电泳结果。同时将 PCR 产物连接 pGM-T 载体后送测序, 确定新生小兔基因型。

1.4.3 基因编辑兔体内 Gal 抗原的测定 检测基因编辑兔心、肝、脾、肺、肾 5 个重要脏器组织的 Gal 抗原表达情况, 评价 GGTA 1 基因编辑后的效果。此次研究 Gal 抗原的表达水平采用特异性抗 Gal 抗体的 ELISA 抑制法进行检测^[19-23]。实验原理是: 采用 Gal 抗原的特异性抗体 (鼠源, M86), 先用 M86 与组织中的 Gal 抗原进行反应, 再进行离心分离未反应的剩余抗体; 将剩余抗体通过人工合成的 Gal/BSA 固相抗原包被 96 孔板进行测定, 以此计算与组织反应的抗原表达量。

具体操作参照医疗器械行业标准 YY/T1561-2017(组织工程医

研究原著

疗器械产品 动物源性支架材料残留 α -Gal 抗原检测), 使用 α -Gal 抗原检测试剂盒进行检测。

1.5 主要观察指标 ① GGTA 1 基因编辑兔胚胎移植结果; ② 基因型鉴定结果; ③ 基因编辑兔体内 Gal 抗原检测结果。

1.6 统计学分析 统计数据采用 Excel 及 Graphpad Prism7 软件进行差异显著性分析 (t 检验), $P < 0.05$ 认为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 GGTA1 基因编辑兔胚胎移植结果 将 224 个注射了打靶载体 (Cas9-GGTA1/sgRNA mRNA) 的胚胎移植入 4 只受体兔输卵管内, 并进行常规饲养检查, 确认有 3 只注射了基因编辑胚胎的兔子成功受孕, 常规饲养后共获得 15 只 F0 代仔兔, 具体胚胎移植情况见表 1。F0 代仔兔发育正常, 未见出生缺陷 (见图 2), 未见哺乳进食及行为异常。部分 F0 代仔兔与野生型兔质量对比见表 2, 仔兔的体质量与同期出生的野生型兔子的体质量对比结果显示两者之间的体质量增长趋势基本相同, 差异无显著性意义 ($P > 0.05$)。

表 1 | GGTA 1 敲除兔胚胎移植情况

Table 1 | GGTA 1 knockout rabbit embryo transfer

受体序号	胚胎移植数 (n)	怀孕 (是/否)	仔代小兔数 (n)	GGTA 突变数目 (n)(%仔兔)	GGTA 双敲 (n)(%仔兔)
1	60	是	6	5(83.3%)	5(100%)
2	54	是	5	5(100%)	5(100%)
3	52	否	0	-	-
4	58	是	4	4(100%)	4(100%)

表 2 | 部分 F0 代仔兔与野生型 (WT) 体质量对比 (kg)

Table 2 | Comparison of body mass of partial F0 generation rabbits and wild-type rabbits

周龄 (周)	兔子编号					
	F0-2	F0-4	F0-5	F0-6	F0-8	F0-10
1	0.06	0.05	0.04	0.07	0.06	0.05
2	0.19	0.09	0.10	0.12	0.13	0.10
3	0.24	0.19	0.15	0.21	0.19	0.26
4	0.34	0.29	0.18	0.30	0.29	0.32
5	0.56	0.53	0.50	0.59	0.43	0.49
6	0.80	0.80	0.80	0.84	0.67	0.78
7	1.21	0.83	1.01	1.11	1.13	0.98
8	1.41	0.98	1.23	1.10	1.54	1.23
9	1.58	1.23	1.33	1.23	1.78	1.45
10	1.89	1.33	1.56	1.41	1.92	1.63

周龄 (周) 兔子编号

周龄 (周)	兔子编号					
	F0-13	F0-14	F0-15	WT-1	WT-2	WT-3
1	0.06	0.06	0.05	0.06	0.06	0.05
2	0.14	0.19	0.15	0.14	0.13	0.16
3	0.26	0.27	0.23	0.21	0.23	0.25
4	0.35	0.38	0.35	0.34	0.35	0.38
5	0.56	0.58	0.60	0.61	0.60	0.59
6	0.80	0.82	0.81	0.91	0.81	0.87
7	1.01	1.00	1.31	1.28	1.05	1.25
8	1.32	1.13	1.69	1.51	1.27	1.50
9	1.58	1.29	1.87	1.81	1.57	1.81
10	1.83	1.43	2.01	1.99	1.75	1.98

表注: 仔兔的体质量与同期出生的野生型兔子的体质量对比, 差异无显著性意义 ($P > 0.05$)

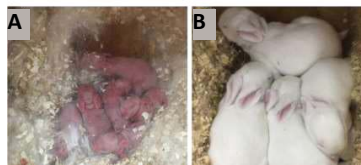
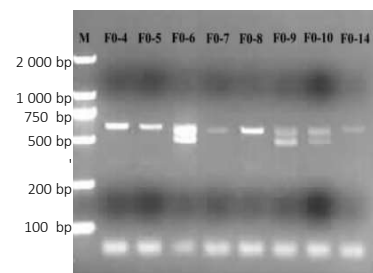


图 2 | F0 代基因编辑兔第 0 周 (A) 及第 2 周 (B) 图片
Figure 2 | F0 generation gene-edited rabbits at week 0 (A) and week 2 (B)



图注: DNAMarker: DL2000; F0-4, F0-5, F0-6, F0-7, F0-8, F0-9, F0-10, F0-14: F0 代仔兔
Figure 3 | Nucleic acid gel electrophoresis of partial F0 generation rabbits

2.2 基因型鉴定结果

2.2.1 凝胶电泳结果 取仔兔耳边缘组织提取 DNA, PCR 扩增后进行凝胶电泳, 设计前后引物计划扩增基因序列 602 bp。由凝胶电泳图 (见图 3) 可以看出第 6, 9, 10 号基因编辑兔呈现明显双条带, 这是因为基因编辑兔的 2 条 DNA 单链在被基因编辑时, 双链均断裂, 在机体自行修复双链时具有剪切碱基数不确定性的特点, 进而出现两条单链扩增碱基数差异较大, 经凝胶电泳后出现双条带的现象。其余基因编辑兔由于 2 条单链差异不大或剪切碱基数目过少, 无法凝胶电泳分离并确认其是否被成功编辑, 需进一步进行基因测序来确认其基因片段是否被成功编辑。

2.2.2 基因测序结果 基因编辑兔的基因测序结果显示 1 只仔兔为野生型 (F0-14), 其余仔兔的 GGTA 1 第 8 外显子基因片段均被成功编辑, 但被编辑的部位不尽相同, 被剪切的碱基数也不相同 (详细数据未给出, 详见该研究的发明专利公示内容, sgRNA 及其制备的 Gal 抗原缺失兔子模型和应用, 专利公布号: CN 108330130 A)。

2.3 基因编辑兔体内 Gal 抗原检测结果 为了确认 GGTA1 基因编辑兔体内 Gal 抗原的表达情况, 随机选择 4 只 F0 代兔子, 并对基因敲除型与野生型兔子的心、肝、脾、肺、肾共 5 个主要脏器的 Gal 抗原表达量进行了检测和对比, 检测结果见表 3。Gal 抗原的 ELISA 检测结果证实, 4 只 F0 代基因编辑兔的各主要脏器 Gal 抗原表达相较于野生型均下降了 99.96% 及以上。

表 3 | Gal 抗原表达的检测结果

Table 3 | Gal antigen expression

兔 (动物编号)	心	肝	脾	肺	肾
野生型 (mg/g)	8.37	19.54	78.32	84.05	27.46
1 (%*)	99.99	99.99	未检测到	99.97	99.96
2 (%*)	99.99	99.99	未检测到	100	100
3 (%*)	99.99	100	99.99	100	100
4 (%*)	100	100	未检测到	未检测到	100

表注: “*” 与野生型相比 Gal 抗原表达量减低的百分数

3 讨论 Discussion

目前, 文献报道的建立敲除异种移植主要靶抗原 “Gal 抗原” 的动物模型多见于 GGTA 1 敲除鼠和猪的研究^[24-26],

尚无 Gal 抗原缺失兔子模型的研究报道。此次研究采用 CRISPR/Cas9 系统介导的基因编辑技术,通过兔子受精卵注射 Cas9 mRNA 和 sgRNA,破坏 GGTA 1 的第 8 外显子,植入代孕兔子体内后,成功获得 15 只 F0 代仔兔。

F0 代仔兔均未见发育异常,进食、活动等行为也未见异常。基因编辑兔与同期出生的野生型兔子的体质量增长趋势基本相同,不具有显著性差异。核酸凝胶电泳及基因测序结果显示除 14 号仔兔靶向基因未被成功编辑外,其余 14 只仔兔 GGTA 1 基因功能的 CDS 区第 8 外显子靶向片段均被成功编辑,但是由于 CRISPR/Cas 9 技术的本身限制^[27-29],在对靶向基因进行编辑时会导致 DNA 双链同时断裂, DNA 双链自身修复并重新连接时存在随机插入或删除的现象,进而出现了 14 只仔兔的靶向碱基编辑结果并不完全一致的结果。

随后的 ELISA 结果显示与野生型相比,随机挑选的 GGTA 1 基因编辑兔主要脏器(心、肝、脾、肺、肾)的 Gal 抗原表达减少了约 99.96% 及以上,这一结果验证了兔子种群中 Gal 抗原受 GGTA 1 基因调控,也进一步表明虽然仔兔的靶向碱基编辑并不一致,但均破坏了其基因阅读框架,导致 GGTA 1 基因出现移码突变而破坏了兔子体内 Gal 抗原相关蛋白的表达。值得注意的是,此次研究中野生型兔子的主要脏器 Gal 抗原表达检测显示脾脏和肺脏的 Gal 抗原表达显著高于其他脏器,这一结果和研究报道的小鼠主要脏器的 Gal 抗原表达趋势一致^[30-31],初步证实了 Gal 抗原在不同脏器的表达量存在种属间一致性。

结论:如前所述,此次研究采用 CRISPR/Cas 9 系统介导的基因编辑技术制备了 Gal 抗原缺失兔子模型,其 GGTA1 第 8 外显子部分碱基被成功编辑,破坏了基因阅读框架,其体内 Gal 抗原含量显著降低或消失(主要脏器降低 99.96% 及以上)。

由于技术所限导致的 2 条基因单链间的差异,这些 F0 代基因编辑兔子是否能够稳定地遗传尚需进一步通过优化繁育,并进行后续的基因型与 Gal 抗原表达的检测来加以验证。

作者贡献:徐丽明负责实验设计,穆钰峰、魏利娜、吴勇、邵安良、陈亮负责实验实施,徐丽明、屈树新负责实验评估,穆钰峰、魏丽娜负责资料收集,实验评估为盲法评估。

经费支持:该文章接受了“国家重点研发计划(2016YFC1103203)”的资助。所有作者声明,经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

利益冲突:文章的全部作者声明,在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

机构伦理问题:研究经中国食品药品检定研究院实验动物资源研究所动物伦理委员会批准[批准号:中检动(福)第 2017(B)007 号]。实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。实验动物在麻醉下进行所有的手术,并尽一切努力最大限度地减少其疼痛、痛苦和死亡。

文章查重:文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

文章外审:文章经小同行外审专家双盲外审,同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

文章版权:文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

开放获取声明:这是一篇开放获取文章,根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享 4.0”条款,在合理引用的情况下,允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展,同时允许任

何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献,并为之建立索引,用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

4 参考文献 References

- [1] 全国医疗器械生物学评价标准化技术委员会.《动物源医疗器械第 1 部分:风险管理应用》[S].YY/T 0771.1.北京,中国标准出版社,2009.
- [2] BADYLAK SF, GILBERT TW. Immune Response to Biologic Scaffold Materials. *Semin Immunol.* 2008;20(2):109-116.
- [3] SANDRIN MS, MCKENZIE IF. Gal alpha (1,3)Gal, the major xenoantigen(s) recognised in pigs by human natural antibodies. *Immunol Rev.* 1994; 141:169-190.
- [4] GALILI U, SHOHEB SB, KOBRIN E, et al. Man, apes, and Old World monkeys differ from other mammals in the expression of α -galactosyl epitopes on nucleated cells. *J Biol Chem.* 1988; 263:17755-17762.
- [5] ORIOL R, YE Y, KOREN E, et al. Carbohydrate antigens of pig tissues reacting with human natural antibodies as potential targets for hyperacute vascular rejection in pig-to-man organ xenotransplantation. *Transplantation.* 1993; 56:1433-1442.
- [6] CHOI HJ, KIM MK, LEE HJ, et al. Effect of α Gal on corneal xenotransplantation in a mouse model. *Xenotransplantation.* 2011; 18(3):176-182.
- [7] KIM MS, JEONG S, LIM HG, et al. Differences in xenoreactive immune response and patterns of calcification of porcine and bovine tissues in α -Gal knock-out and wild-type mouse. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2015;48(3):392-399.
- [8] 邵安良,魏利娜,范昌发,等.2 种 Gal 抗原缺失小鼠的免疫学特性比较研究[J]. *药物分析杂志*, 2018, 38(8):1288-1295.
- [9] SHAO A, LING Y, XU L, et al. Xenogeneic bone matrix immune risk assessment using GGTA1 knockout mice. *Artif Cells Nanomed Biotechnol.* 2018;46(sup3):S359-S369.
- [10] 邵安良,魏利娜,范昌发,等. Gal 抗原缺失小鼠的应用示范:动物源性硬脑膜补片的免疫原性反应评价[J]. *药物分析杂志*, 2018, 38(8):1296-1303.
- [11] 魏利娜,邵安良,黄立静,等.去细胞异种角膜基质与去细胞异种结膜基质的免疫原性研究[J]. *药物分析杂志*, 2019, 39(8):1362-1369.
- [12] 陈亮,邵安良,魏利娜,等.应用 Gal 抗原缺失小鼠评价可降解异种脱细胞真皮基质的免疫原性[J]. *药物分析杂志*, 2019, 39(8):1370-1378.
- [13] WANG X, HUANG Y, JASTANEIAH S, et al. Protective Effects of Soluble Collagen during Ultraviolet-A Crosslinking on Enzyme-Mediated Corneal Ectatic Models. *Plos One.* PLoS One. 2015;10(9):e0136999.
- [14] BRACEY DN, SEYLER TM, JINNAH AH, et al. A porcine xenograft-derived bone scaffold is a biocompatible bone graft substitute: An assessment of cytocompatibility and the alpha gal epitope. *Xenotransplantation.* 2019;26(5):e12534.
- [15] 王亚东,陈谦学.生物型人工硬脑膜补片在颅脑损伤大骨瓣减压术中的应用[J]. *中国临床神经外科杂志*, 2015, 20(3):151-152.
- [16] YUAN L, SUI T, CHEN M, et al. CRISPR/Cas9-mediated GJA8 knockout in rabbits recapitulates human congenital cataracts. *Sci Rep.* 2016;6:22024.
- [17] ZHANG J, XIE C, LU Y, et al. Potential Antigens Involved in Delayed Xenograft Rejection in a Ggta1/Cmah Dko Pig-to-Monkey Model. *Sci Rep.* 2017;7(1):10024.
- [18] MILLAND J, CHRISTIANSEN D, LAZARUS BD, et al. The Molecular Basis for Gal (1,3) Gal Expression in Animals with a Deletion of the 1,3Galactosyltransferase Gene. *J Immunol.* 2006;176(4):2448-2454.
- [19] 陆艳,单永强,邵安良,等. ELISA 抑制法检测动物组织中 α 1,3-Gal 抗原[J]. *药物分析杂志*, 2015, 35(10):40-46.
- [20] 单永强,徐丽明,柯林楠,等.动物源性生物材料中残留 α -Gal 抗原检测方法[J]. *生物医学工程学杂志*, 2015, 32(3):680-687.
- [21] LU Y, SHAO A, XU L, et al. A standardized quantitative method for detecting remnant alpha-Gal antigen in animal tissues or animal tissue-derived biomaterials and its application. *Sci Rep.* 2018;8(1):15424.
- [22] 徐丽明,邵安良,柯林楠,等.一种检测 α -1,3Gal 抗原的试剂盒及其应用[P]. CN103983767A, 2014-08-13.
- [23] 全国外科植入物和矫形器械标准化技术委员会组织工程医疗器械产品分技术委员会.《组织工程医疗器械产品动物源性支架材料的残留 α -Gal 抗原检测》[S]. YY/T 1561.北京,中国标准出版社,2017.
- [24] CHIANG TR, FANG ET AL, GREGORY R, et al. Anti-GAL antibodies in humans and 1,3 alpha-galactosyltransferase knock-out mice. *Transplantation.* 2000; 69(12):2593-2600.
- [25] PUGA YUNG GL, LI Y, BORSIG L, et al. Complete absence of the α -Gal xenoantigen and isoglobotrihexosyl ceramide in α 1,3galactosyltransferase knock-out pigs. *Xenotransplantation.* 2012;19(3):196-206.
- [26] HAN CHAO G, CHENGJIANG Z, XI X, et al. Production of α 1,3-galactosyltransferase and cytidine monophosphate-N-acetylneuraminic acid hydroxylase gene double-deficient pigs by CRISPR/Cas9 and handmade cloning. *J Reprod Dev.* 2017; 63(1):17-26.
- [27] RAN FA, HSU P, LIN CY, et al. Double Nicking by RNA-Guided CRISPR Cas9 for Enhanced Genome Editing Specificity. *Cell.* 2013;154(6):1380-1389.
- [28] ZUO E, SUN Y, WEI W, et al. Cytosine base editor generates substantial off-target single-nucleotide variants in mouse embryonic. *Science.* 2019;364(6437):289-292.
- [29] ZHANG XH, TEE LY, WANG XG, et al. Off-target Effects in CRISPR/Cas9-mediated Genome Engineering. *Mol Ther Nucleic Acids.* 2015;4:e264.
- [30] SHAO A, XU L, WU X, et al. Gal epitope expression and immunological properties in iGb3S deficient mice. *Sci Rep.* 2018;8(1):15433.
- [31] 徐丽明,邵安良,范昌发.一种制备 GGTA1 和 iGb3S 双基因敲除的非人哺乳动物的方法及应用[P]. CN104894163A, 2015-09-09.