

## CRISPR/Cas9 结合 Cre-loxP 技术制备溴结构域蛋白 4 基因敲除小鼠

<https://doi.org/10.12307/2022.892>王向宇<sup>1</sup>, 朱睿智<sup>1</sup>, 赵志平<sup>1, 2</sup>, 张聿达<sup>1</sup>, 张永涛<sup>3</sup>, 王昌耀<sup>3</sup>

投稿日期: 2021-12-05

采用日期: 2022-01-05

修回日期: 2022-02-22

在线日期: 2022-03-11

中图分类号:

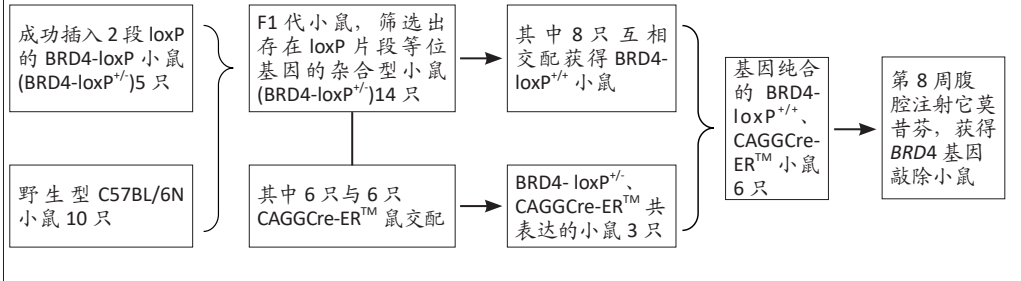
R459.9; R318; R394

文章编号:

2095-4344(2022)32-05179-06

文献标识码: B

## 文章快速阅读:



## 文题释义:

CRISPR/Cas9: 是一种由小导向RNA介导的对靶基因定向编辑技术, 可以快速、有效地修饰各种物种和细胞类型的内源基因。

Cre-loxP: Cre-loxP系统具有很高的组织特异性或空间特异性, 在该系统的衍生系统中, Cre ERT-它莫昔芬系统在翻译后水平对Cre入核时间进行调控, 具备优良的时间特异性, 可以做到控制目的基因在何时、何处精确表达。

## 摘要

背景: 目前CRISPR/Cas9结合Cre-loxP技术制备溴结构域蛋白4(bromodomain-containing protein 4, BRD4)基因敲除小鼠的实验方法非常少见。

目的: 运用CRISPR/Cas9技术敲除小鼠基因组中BRD4基因片段, 构建BRD4基因敲除小鼠。

方法: 根据BRD4基因的外显子序列, 设计一段gRNA并合成。gRNA体外转录后和Cas9 mRNA以及含loxP位点的质粒共同注射入受精卵细胞中, Cas9通过识别gRNA先导链切割目的片段, 然后loxP插入到切割位点, 在与Cre配种后, Cre酶会切割loxP位点实现最终的特异性删除效果。注射后的受精卵细胞移植至C57BL/6N雌性小鼠获得子代小鼠, 对子代小鼠进行测序鉴定其基因型。将成功导入loxP位点的小鼠BRD4-loxP<sup>+/+</sup>(F0代)与野生型C57BL/6N小鼠配交后筛选可稳定遗传的小鼠BRD4-loxP<sup>+/+</sup>(F1代), BRD4-loxP<sup>+/+</sup>小鼠一部分互相交配, 一部分与CAGGCre-ER<sup>TM</sup>鼠交配, 获得BRD4-loxP<sup>+/+</sup>小鼠和BRD4-loxP<sup>+/+</sup>、CAGGCre-ER<sup>TM</sup>共表达的小鼠(F2代); F2代小鼠互相交配可以获得纯合子BRD4-loxP<sup>+/+</sup>、CAGGCre-ER<sup>TM</sup>小鼠。将6-8周纯合子小鼠腹腔注射它莫昔芬75 mg/kg(溶于玉米油中), 连续7 d即可完成BRD4基因的诱导敲除。取基因敲除后的小鼠尾部片段, 吸附柱法提取DNA, 通过琼脂糖凝胶电泳检测BRD4基因片段在小鼠尾部组织中的表达。

结果与结论: ①通过PCR筛选鉴定出F1代小鼠7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 19, 20, 21, 25, 42, 43和47号小鼠为成功插入2条loxP片段等位基因的杂合型小鼠; ②F2代交互繁育出的F3代纯合子用它莫昔芬诱导后, 经PCR凝胶电泳验证表明纯合子小鼠中BRD4基因片段被成功敲除; ③提示利用CRISPR/Cas9技术结合Cre-loxP技术成功构建出了BRD4基因敲除小鼠。

关键词: CRISPR/Cas9; Cre-loxP; BRD4; 基因敲除; 小鼠; 它莫昔芬

缩略语: 溴结构域蛋白4: bromodomain-containing protein 4, BRD4

## Construction of bromodomain-containing protein 4 gene knockout mice by CRISPR/Cas9 combined with Cre-loxP technology

Wang Xiangyu<sup>1</sup>, Zhu Ruizhi<sup>1</sup>, Zhao Zhiping<sup>1, 2</sup>, Zhang Yuda<sup>1</sup>, Zhang Yongtao<sup>3</sup>, Wang Changyao<sup>3</sup><sup>1</sup>Medical Department of Qingdao University, Qingdao 266071, Shandong Province, China; <sup>2</sup>Huanggang Central Hospital, Huanggang 438000, Hubei Province, China; <sup>3</sup>Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao 266071, Shandong Province, China

Wang Xiangyu, Master candidate, Medical Department of Qingdao University, Qingdao 266071, Shandong Province, China

Corresponding author: Wang Changyao, MD, Associate chief physician, Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao 266071, Shandong Province, China

## Abstract

**BACKGROUND:** Currently, the combined use of CRISPR/Cas9 and CRE-LOXP to prepare bromodomain-containing protein 4 (BRD4) gene knockout mice is very rare.**OBJECTIVE:** To construct a BRD4 gene knockout mouse model by using CRISPR/Cas9 technology combined with Cre-loxP technology that can be used to knock out the BRD4 gene fragment in the mouse genome.**METHODS:** According to the exon sequence of BRD4 gene, a gRNA was designed and synthesized. After gRNA was transcribed *in vitro*, Cas9 mRNA and plasmid containing loxP site were injected into fertilized oocytes. Cas9 cut the target fragment by recognizing the leading strand of the gRNA, and then loxP was inserted into the cleavage site. After breeding with Cre, the Cre enzyme cut the loxP site to achieve the final specific deletion effect. The fertilized oocytes<sup>1</sup>青岛大学医学部, 山东省青岛市 266071; <sup>2</sup>黄冈市中心医院, 湖北省黄冈市 438000; <sup>3</sup>青岛大学附属医院, 山东省青岛市 266071

第一作者: 王向宇, 男, 1995年生, 山东省龙口市人, 汉族, 青岛大学在读硕士, 主要从事骨科方面的研究。

通讯作者: 王昌耀, 博士, 副主任医师, 青岛大学附属医院, 山东省青岛市 266071

<https://orcid.org/0000-0002-0792-4025> (王向宇)

基金资助: 国家自然科学基金项目(81772329), 负责人: 王昌耀

引用本文: 王向宇, 朱睿智, 赵志平, 张聿达, 张永涛, 王昌耀. CRISPR/Cas9结合Cre-loxP技术制备溴结构域蛋白4基因敲除小鼠[J].

中国组织工程研究, 2022, 26(32):5179-5184.



were transplanted into C57BL/6N recipient female mice to obtain progeny mice. The offspring mice were sequenced to identify their genotypes. The BRD4-loxP<sup>+/+</sup> (F0 generation) mice with loxP loci being successfully introduced was bred with wild-type C57BL/6N mice, and the stably inherited mice BRD4-loxP<sup>+/+</sup> (F1 generation) were selected. Some of the BRD4-loxP<sup>+/+</sup> mice interbred with each other and some interbred with CAGGcre-ER<sup>TM</sup> mice. BRD4-loxP<sup>+/+</sup> mice were co-expressed with BRD4-loxP<sup>+/+</sup> and CAGGcre-ER<sup>TM</sup> mice (F2 generation). The F2 generation mice were bred to obtain homozygous BRD4-loxP<sup>+/+</sup> and CAGGcre-ER<sup>TM</sup> mice. BRD4 gene knockout was induced by intraperitoneal injection of tamoxifen (75 mg/kg, dissolved in corn oil) in 6–8 weeks homozygous mice for 7 consecutive days. DNA was extracted from the tail fragment of the knockout mice using adsorption column method. The expression of BRD4 gene fragment in mouse tail tissue was detected by agarose gel electrophoresis.

**RESULTS AND CONCLUSION:** Screening using PCR revealed that mice 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 19, 20, 21, 25, 42, 43, and 47 of F1 generation were identified as heterozygous mice that were successfully inserted with two alleles of loxP fragment. The F3 homozygotes bred from F2 generation were induced with tamoxifen, and PCR gel electrophoresis verified that the BRD4 gene fragment was successfully knocked out in the homozygous mice. We therefore successfully constructed BRD4 gene knockout mice using CRISPR/Cas9 technology combined with Cre-LoxP technology in this study.

**Key words:** CRISPR/Cas9; Cre-loxP; BRD4; gene knockout; mouse; tamoxifen

**Funding:** the National Natural Science Foundation of China, No. 81772329 (to WCY)

**How to cite this article:** WANG XY, ZHU RZ, ZHAO ZP, ZHANG YD, ZHANG YT, WANG CY. Construction of bromodomain-containing protein 4 gene knockout mice by CRISPR/Cas9 combined with Cre-loxP technology. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2022;26(32):5179-5184.

## 0 引言 Introduction

溴结构域蛋白 4 (bromodomain-containing protein 4, BRD4) 是溴区结构域额外末端蛋白家族中的重要一员, 主要与染色质上乙酰化的组蛋白区域相互结合, 在基因转录的起始和延伸阶段发挥促进作用<sup>[1]</sup>。哺乳动物溴区结构域额外末端蛋白家族包含 BRD2、BRD3、BRD4 和 BRDT, 这些蛋白不仅能够结合乙酰化赖氨酸残基, 还可以通过额外末端结构域与额外的转录因子和表观遗传调节因子相互作用<sup>[2]</sup>。BRD4 是其中最主要的功能蛋白, 因为它与转录起始和超增强子形成有关<sup>[3]</sup>。BRD4 的研究主要集中在癌症和炎症疾病方面, 最近, BRD4 已被确定为急性髓系白血病的有治疗靶点<sup>[4-5]</sup>。还有研究表明, 在原发性骨癌中 BRD4 抑制剂 JQ1 可以通过抑制骨肉瘤中的致癌驱动因子以及抑制成骨细胞和破骨细胞的分化来有效地破坏恶性循环, 为骨肉瘤的治疗提供了强有力的临床依据。BAUD'HUIN 等<sup>[6]</sup>发现 BRD4 抑制剂 JQ1 可以通过干扰成骨细胞和破骨细胞的分化来恢复卵巢切除诱导的骨质疏松小鼠的骨量和骨强度。由此可以推断, BRD4 可能在骨破坏的过程中也发挥重要作用<sup>[7-9]</sup>。并且, 抑制 BRD4 可改善线粒体功能, 修复糖尿病心脏的结构和功能<sup>[10]</sup>。BRD4 与人体其他疾病的联系还有待研究, 所以构建一种 BRD4 基因敲除小鼠模型可以对有关研究产生巨大帮助。

CRISPR/Cas9 技术是一种由小导向 RNA 介导的对靶基因定向编辑技术, 可以快速、有效地修饰各种物种和细胞类型的内源基因, 对于转基因动物模型的生成, 可以将 Cas9 蛋白和转录的 sgRNA 直接注射到受精卵中, 在啮齿动物等模型中实现一个或多个等位基因的可遗传基因修饰<sup>[11-13]</sup>。目前, CRISPR/Cas9 技术在基础研究、生物技术和生物医学等许多领域得到广泛应用<sup>[14]</sup>。Cre-loxP 系统是一种流行且广泛应用的位点特异性基因操纵工具, 可以在细胞系和动物模型中有条件地敲除特定基因, 调节特定发育阶段或特定组织中选定基因的表达, 极大地促进了对基因功能和发育机制的理解<sup>[15-17]</sup>。Cre 是一种 38 kD 的位点特异性 DNA 重组酶, 可以识别 34 bp 的 loxP 序列, 根据其定位, 导致 2 个 loxP 位点之间的分子内和分子间重组<sup>[18]</sup>。loxP 位点由 1 个 8 bp 的非回文核和 2 个 13 bp 的反向重复序列组成, 通常通过使用包含可选择标记的结构体进行同源重组, 将其置于所

需 DNA 序列的所需位置和方向, 当 2 个 loxP 位点位于一个序列旁边并直接重复时, Cre 切除位于它们之间的整个 DNA 片段<sup>[19]</sup>。Cre-loxP 系统具有很高的组织特异性或空间特异性, 在该系统的衍生系统中, Cre ERT- 它莫昔芬系统在翻译后水平对 Cre 入核时间进行调控, 具备优良的时间特异性, 可以做到控制目的基因在何时、何处精确表达<sup>[20]</sup>。它莫昔芬是一种雌激素受体调节剂, 是一种被用在条件突变小鼠的 Cre/loxP 位点特异性重组系统背景下控制基因表达的强大研究工具。使 Cre 突变的雌激素受体 (Cre-ER<sup>TM</sup>) 融合蛋白对它莫昔芬敏感但对雌激素不敏感, 并保留了在没有配体的情况下被热休克蛋白以非活性构象隔离在细胞质中的特性, 添加它莫昔芬会诱导 Cre-ER<sup>TM</sup> 融合蛋白的构象变化, 从而诱导核易位和 Cre 重组酶激活, 从而切除 2 个 loxP 位点之间的 DNA 序列<sup>[21]</sup>。

此次研究以 CRISPR/Cas9 技术及 Cre-LoxP 系统为基础, 构建 BRD4 基因敲除小鼠, 希望帮助研究人员更直观地了解 BRD4 在各种相关疾病进程中的作用。

## 1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 分子生物学、基因水平的动物实验, 所有计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示。

1.2 时间及地点 实验于 2019–2021 年在青岛大学附属医院动物实验中心完成。

1.3 材料

1.3.1 实验动物 6 周龄 SPF 级 C57BL/6N 小鼠雌雄各 10 只及 CAGGCre-ER<sup>TM</sup> 鼠雌雄各 3 只, 体质量 20–22 g, 由赛业生物科技有限公司提供, 许可证号: SCXK(苏)2018-0003。

将小鼠置于 SPF 动物房内, 清洁级鼠粮喂养, 饲养条件符合相关《实验动物管理条件》。实验方案经青岛大学附属医院动物实验伦理委员会批准, 批准编号: AHQU-MAL20210428。实验过程符合实验动物福利伦理原则和本地及国家法规。

1.3.2 试剂与仪器 gRNA 体外转录试剂盒及纯化试剂盒购自美国 Ambion 公司; Cas9 mRNA 购自赛业生物科技有限公司; DNTPs 和 Taq 酶购自 Takara 公司; PCR 引物及质粒均由赛业生物科技有限公司提供; 小鼠基因组 DNA 提取试剂盒

由 Takara 公司提供；全波长酶标仪购自芬兰 Thermo 公司；RIPA 裂解液、磷酸酶抑制剂、蛋白酶抑制剂、BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自北京索莱宝公司；SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液 (5X)、异丙醇、SDS-PAGE 凝胶制剂盒购自上海雅酶生物科技有限公司；Anti-BRD4 抗体、Anti-GAPDH 抗体、HRP 标记通用型二抗购自美国 Abcam 公司；ECL 显色液购自德国 Millipore 公司；它莫昔芬和玉米油购自默克公司。

## 1.4 方法

**1.4.1 gRNA 重组质粒的构建** 根据 Genbank(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) 报道的 *BRD4* 基因序列 (基因 ID: 57261), 选择合适的敲除区域。应用 <http://crispor.tefor.net/crispor.py> 和 <https://cctop.cos.uni-heidelberg.de:8043/> 网站分析并设计 gRNA 序列, 并根据序列将其进行体外转录获得针对该基因的 gRNA, 构建携带靶位点同源臂及 loxP 位点的重组质粒。

**1.4.2 显微注射及胚胎移植**<sup>[22]</sup> 6-8 周龄 C57BL/6N 雌性小鼠皮下或腹腔注射孕马血清 10 IU, 48 h 后腹腔注射相同剂量的人血绒毛膜促性腺素, 超数排卵后的母鼠即与公鼠合笼, 于第 2 天早上挑选见栓雌鼠, 剖开腹腔, 在输卵管壶腹部收集受精卵细胞, 将转录好的 *BRD4* gRNA 和 Cas9 mRNA 以及含 loxP 位点的质粒共同注射入受精卵细胞中, 于体积分数 5%CO<sub>2</sub>、37 °C 培养箱中培养 24 h, 挑选成活受精卵细胞移植入假孕母鼠输卵管中, 获得 F0 代小鼠。

**1.4.3 基因型鉴定及可遗传检测** 根据目标供体载体序列设计相应引物, 用于鉴定 F0 代及其后代小鼠是否基因重组成功。引物序列见表 1, 2。在 F0 代小鼠发育至 1 周时, 剪取鼠尾组织经酚氯仿法提取 DNA, 依据表 1 的引物进行 PCR 扩增, 经凝胶电泳鉴定, 选取 PCR 阳性的样品进行测序。

**F0 代小鼠的可遗传性检测:** 将 PCR 以及测序正确的 F0 代小鼠与野生型 C57BL/6N 小鼠交配, 得 F1 代杂合子, 对 F1 代小鼠进行鉴定, 获得的阳性 F1 代杂合子小鼠即可稳定遗传, F1 代互交即可筛选出纯合子。

### 1.4.4 交配繁殖获得 BRD4 纯合敲除小鼠

(1) 经鉴定导入 loxP 序列成功的 *BRD4-loxP<sup>+/+</sup>* 杂合 F0 代小鼠通过与野生型 C57BL/6N 交配繁殖, 获得更多 *BRD4-loxP<sup>+/+</sup>* 小鼠。

(2) CAGGCre-ER<sup>TM</sup> 鼠与一部分 *BRD4-loxP<sup>+/+</sup>* 小鼠交配, 生仔后剪尾检测其基因型, 获得 *BRD4-loxP<sup>+/+</sup>*、CAGGCre-ER<sup>TM</sup> 小鼠。

(3) 一部分 *BRD4-loxP<sup>+/+</sup>* 小鼠互相交配, 获得 *BRD4-loxP<sup>+/+</sup>* 小鼠。

(4) *BRD4-loxP<sup>+/+</sup>*、CAGGCre-ER<sup>TM</sup> 共表达的小鼠与 *BRD4-loxP<sup>+/+</sup>* 小鼠互相交配, 生仔后剪尾检测其基因型, 获得 *BRD4-loxP<sup>+/+</sup>*、CAGGCre-ER<sup>TM</sup> 小鼠。

(5) 对 6-8 周龄小鼠每 24 h 腹腔注射 1 次它莫昔芬 (75 mg/kg, 溶于玉米油中), 连续 7 d 即可完成 *BRD4* 基因的诱导敲除<sup>[23]</sup>。

## 实验动物造模过程中的相关问题

造模目的	CRISPR/Cas9 结合 Cre-loxP 技术制备 <i>BRD4</i> 基因敲除小鼠
动物来源及品系	6 周龄 SPF 级 C57BL/6N 小鼠雌雄各 10 只及 CAGGCre-ER <sup>TM</sup> 鼠雌雄各 3 只, 体质量 20-22 g, 由赛业生物科技有限公司提供, 许可证号: SCXK(苏)2018-0003
模型与所研究疾病的关系	通过 CRISPR/Cas9 结合 Cre-loxP 技术对小鼠体内 <i>BRD4</i> 基因进行敲除
造模技术描述	参考文献 [22] 的方法建立转基因小鼠模型, 6-8 周龄 C57BL/6N 雌性小鼠皮下或腹腔注射孕马血清 10 IU, 48 h 后腹腔注射相同剂量的人血绒毛膜促性腺素, 超数排卵后的母鼠即与公鼠合笼, 于第 2 天早上挑选见栓雌鼠, 剖开腹腔, 在输卵管壶腹部收集受精卵细胞。将转录好的 <i>BRD4</i> gRNA 和 Cas9 mRNA 以及含 loxP 位点的质粒共同注射入受精卵细胞中, 于体积分数 5%CO <sub>2</sub> 、37 °C 培养箱中培养 24 h, 挑选成活受精卵细胞移植入假孕母鼠输卵管中, 获得 F0 代小鼠。经鉴定导入 loxP 序列成功的 <i>BRD4-loxP<sup>+/+</sup></i> 杂合 F0 代小鼠与野生型 C57BL/6N 交配繁殖, 获得更多 <i>BRD4-loxP<sup>+/+</sup></i> 小鼠 (F1 代), F1 代小鼠一部分互相交配, 一部分与 CAGGCre-ER <sup>TM</sup> 鼠交配, 获得 <i>BRD4-loxP<sup>+/+</sup></i> 小鼠和 <i>BRD4-loxP<sup>+/+</sup></i> 、CAGGCre-ER <sup>TM</sup> 共表达的小鼠 (F2 代), 互相交配后进行基因型鉴定筛选基因纯合的 <i>BRD4-loxP<sup>+/+</sup></i> 、CAGGCre-ER <sup>TM</sup> 小鼠 (F3 代), 第 8 周腹腔注射它莫昔芬, 获得 <i>BRD4</i> 基因敲除的小鼠
动物数量及分组方法	F0 代小鼠 ( <i>BRD4-loxP<sup>+/+</sup></i> 及其他基因型) 10 只, C57BL/6N 野生型小鼠 20 只, F1 代小鼠 ( <i>BRD4-loxP<sup>+/+</sup></i> 及其他基因型) 41 只, F2 代小鼠 ( <i>BRD4-loxP<sup>+/+</sup></i> 、CAGGCre-ER <sup>TM</sup> 及其他基因型) 37 只, F3 代小鼠 ( <i>BRD4-loxP<sup>+/+</sup></i> 、CAGGCre-ER <sup>TM</sup> 及其他基因型) 35 只。分组方法: 基因筛选理想的基因型小鼠为一组, 继续配繁; 基因型不满足要求的其他基因型小鼠分为一组
造模成功评价指标	取小鼠尾部组织进行 PCR 基因检测
造模后实验观察指标	PCR 基因检测目的基因表达情况
造模后动物处理	成功敲除 <i>BRD4</i> 基因的小鼠用来进行其他实验
伦理委员会批准	实验方案经青岛大学附属医院动物实验伦理委员会批准, 批准编号: AHQU-MAL20210428

表 1 | 基因重组小鼠鉴定引物对序列

Table 1 | Primer pair sequences for recombinant mouse gene identification

引物对	引物名称	引物序列 5'-3'
1	5' 臂的正向引物 (F1)	TGG GAG GCC TGC TTG AGA TTA
	3' 端 loxP 序列的反向引物 (R1)	GTG GAT TCG GAC CAG TCT GA
2	5' 端 loxP 序列的正向引物 (F2)	ACG TAA ACG GCC ACA AGT TC
	3' 臂的反向引物 (R2)	TTT CTT GGC AAA CAT CTC CTT GAG

表 2 | 基因敲除小鼠及野生型小鼠鉴定引物对序列

Table 2 | Primer pairs identified in knockout and wild-type mice

引物对	引物序列 (5'-3')	电泳图片解读
F1	5'-CTC CTC ACT TTC TGG GAC TAA CA-3'	纯合子: 1 条 220 bp 的条带
R1	5'-GCA TTA TCT ATC TGT AGG CTG TCC T-3'	野生型: 1 条 158 bp 的条带
Cag-M-F	5'-GCT AAC CAT GTT CAT GCC TTC-3'	存在 Cre 基因片段:
Cag-M-R	5'-AGG CAA ATT TTG GTG TAC GG-3'	1 条 180 bp 的条带
F2	5'-CTG TGT GCC TTC CCT GAT ACT TAC-3'	<i>BRD4</i> 基因片段敲除:
R1	5'-GCA TTA TCT ATC TGT AGG CTG TCC T-3'	1 条 319 bp 的条带

**1.4.5 普通 PCR 凝胶电泳检测 BRD4 在小鼠尾部组织中的表达** 离心吸附柱法提取小鼠尾基因组 DNA, 测纯度后以 50 μL 体系进行 PCR 扩增, 预变性 98 °C, 5 min, 变性 98 °C, 15 s, 退火 55 °C, 15 s, 延伸 72 °C, 20 s, 循环 35 次。末段延伸

72 °C, 5 min, 降温 16 °C, 2 min。然后制备 1.5% 琼脂糖凝胶, 加样、电泳, 电压 190–220 V, 电泳完毕后, 取出凝胶在紫外灯下观察, DNA 存在则显示出红色荧光条带, 采用凝胶成像系统拍照保存。

1.5 主要观察指标 基因敲除小鼠 BRD4-loxP<sup>+/+</sup>、CAGGCre-ER<sup>TM</sup> 和野生型小鼠 C57BL/6N 的基因型鉴定。

1.6 统计学分析 文章统计学方法已经青岛大学生物统计学专家审核。采用 SPSS 24.0 软件包进行数据统计与分析, 所有计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,  $P < 0.05$  为差异有显著性意义。

## 2 结果 Results

2.1 实验动物数量分析 采用 10 只 F0 代小鼠 (BRD4-loxP<sup>+/+</sup> 及其他基因型) 行基因型鉴定, 14 只 F1 代小鼠 (BRD4-loxP<sup>+/+</sup>) 行基因型鉴定, 9 只 F2 代小鼠 (BRD4-loxP<sup>+/+</sup>、CAGGCre-ER<sup>TM</sup> 及其他基因型) 行基因型鉴定, 6 只 F3 代小鼠 (BRD4-loxP<sup>+/+</sup>、CAGGCre-ER<sup>TM</sup>) 行基因型鉴定。PCR 电泳实验中未分组, 实验过程无脱失, 全部进入结果分析。

2.2 构建质粒及体外转录 根据 Genbank 报道的 BRD4 基因序列, 应用 <http://crispor.tefor.net/crispor.py> 和 <https://cctop.cos.uni-heidelberg.de:8043/> 网站分析并设计 gRNA 序列, 正向链: 5'-AGT CTC ACC CAT GCG CGT ACA GG-3'; 反向链: 5'-GCT GTC CTA GAG CGC TTT CCA GG-3', 经 gRNA 引导, 并以供体载体为模板, 于 BRD4 外显子 4、5 上下游插入一段含有 loxP 位点的序列, 见图 1。

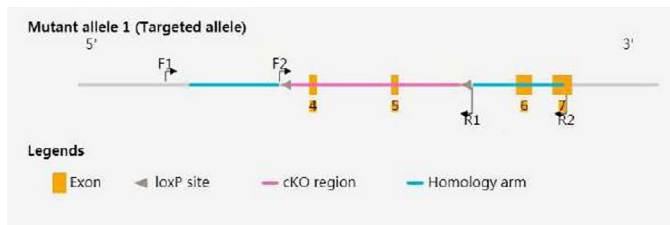
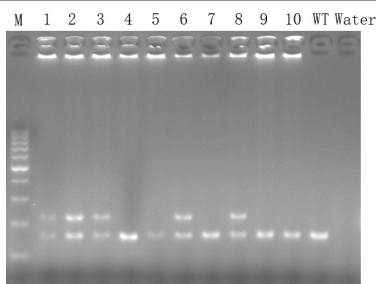


图 1 | 中靶载体示意图

Figure 1 | Schematic diagram of target carriers

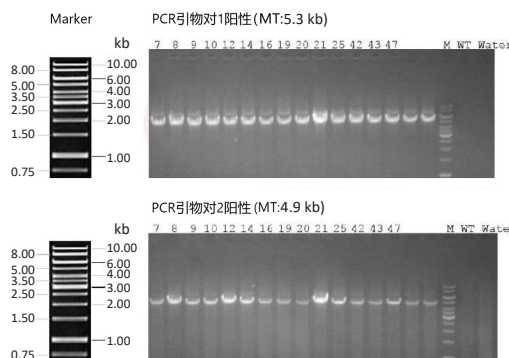
2.3 F0 代、F1 代、F2 代小鼠凝胶电泳鉴定结果 F0 代小鼠产仔后经基因鉴定 (表 2 中 F1、R1 引物序列) 成功插入两段 loxP 的 BRD4-loxP 小鼠为 1, 2, 3, 6, 8 号小鼠 (BRD4-loxP<sup>+/+</sup>), 与野生型 C57BL/6N 小鼠进行交配, 产生的 F1 代小鼠经鉴定可稳定遗传。通过 PCR 筛选鉴定出 F1 代小鼠 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 19, 20, 21, 25, 42, 43 和 47 号小鼠 (BRD4-loxP<sup>+/+</sup>) 经表 1 的引物对 1 进行 PCR 扩增后呈现 5.3 kb 条带, 说明该小鼠为 3' 侧成功插入 loxP 片段等位基因的杂合型小鼠; 经引物对 2 进行 PCR 扩增后呈现 4.9 kb 条带, 说明 5' 侧成功插入 loxP 片段; BRD4-loxP<sup>+/+</sup> 小鼠互相交配及与 CAGGCre-ER<sup>TM</sup> 小鼠配繁获得 BRD4-loxP<sup>+/+</sup> 和 BRD4-loxP<sup>+/+</sup>、CAGGCre-ER<sup>TM</sup> 共表达的小鼠, 经基因鉴定 (表 2 中 F1、R1、Cag-M-F、Cag-M-R 引物序列) 59, 61, 66 号小鼠基因型为 BRD4-loxP<sup>+/+</sup>、CAGGCre-ER<sup>TM</sup>; 58、60、64 号小鼠基因型为 BRD4-loxP<sup>+/+</sup>, 见图 2–4。



图注: 1, 2, 3, 6, 8 号小鼠基因型为 BRD4-loxP<sup>+/+</sup>。M 为 Marker

图 2 | F0 代小鼠基因鉴定电泳图

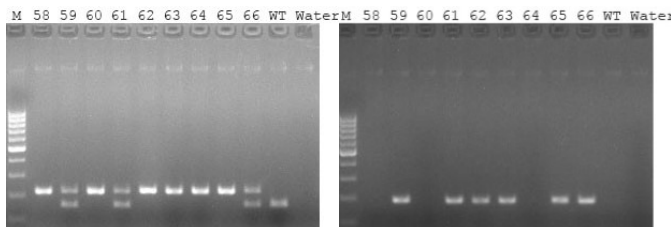
Figure 2 | Electrophoresis diagram of gene identification of F0 generation mice



图注: 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 19, 20, 21, 25, 42, 43 和 47 号小鼠基因型为 BRD4-loxP<sup>+/+</sup>。M 为 Marker, MT 为野生型

图 3 | F1 代小鼠基因鉴定电泳图

Figure 3 | Electrophoresis diagram of gene identification of F1 generation mice

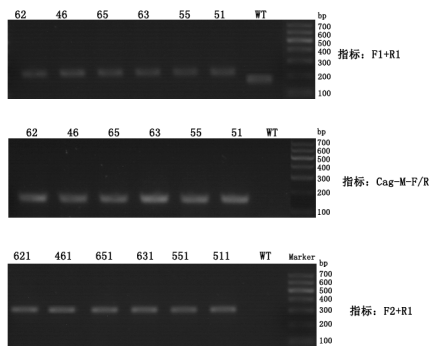


图注: 58, 60, 64 号小鼠基因型为 BRD4-loxP<sup>+/+</sup>; 59, 61, 66 号小鼠基因型为 BRD4-loxP<sup>+/+</sup>、CAGGCre-ER<sup>TM</sup>。M 为 Marker, MT 为野生型

图 4 | F2 代小鼠基因鉴定电泳图

Figure 4 | Electrophoresis diagram of gene identification of F2 generation mice

2.4 BRD4 在小鼠尾部组织中的表达 在敲除小鼠表型鉴定中, 提取敲除小鼠和野生型小鼠尾部组织的 DNA, 以特异性引物 (表 2) 通过 PCR 凝胶电泳检测后, 发现小鼠踝关节尾部组织中不存在 BRD4 的 DNA 片段, 见图 5, 表明 BRD4 已成功敲除。



图注: 46, 51, 55, 62, 63, 65 号小鼠 Cre 基因片段表达阳性, 且 BRD4 基因片段已敲除。MT 为野生型

图 5 | 基因敲除小鼠基因鉴定电泳图

Figure 5 | Electrophoretic map of gene identification in knockout mice

### 3 讨论 Discussion

此次研究首先通过 CRISPR/Cas9 技术将 C57BL/6N 小鼠受精卵中的 *BRD4* 基因 4、5 号外显子两侧的内含子中分别插入 2 个同向的 loxP 元件, 通过 PCR 鉴定 F0 和 F1 代小鼠然后进行序列分析, 产生有条件的基因敲除后代, 即 *BRD4-loxP<sup>+/+</sup>* 小鼠, 将其育种到野生型小鼠中以测试种系传递。CAGGCre-ER<sup>TM</sup> 鼠为全身表达 Cre 酶的小鼠, 在与 *BRD4-loxP<sup>+/+</sup>* 鼠杂交后即可产生 *BRD4-loxP<sup>+/+</sup>*、CAGGCre-ER<sup>TM</sup> 共表达小鼠, Cre 酶定位于胞浆中, 该酶不进入细胞核, 也无重组功能。6-8 周时用雌激素类似物它莫昔芬 (tamoxifen) 诱导, Cre 酶在自身核定位信号肽的作用下进入细胞核, 识别宿主 DNA 上的 loxP 位点并发生重组<sup>[24]</sup>, 从而将 2 个 loxP 位点之间的 *BRD4* 基因 4、5 号外显子切除。经基因鉴定, 46, 51, 55, 62, 63, 65 号小鼠 Cre 基因片段表达阳性, 且 *BRD4* 基因片段已敲除, 初步观察发现, 无论从皮毛外观还是雌雄比例均与野生型 C57BL/6N 小鼠无明显差别。此后的研究会展开进一步对比。

许多基因对发育至关重要, 它们的突变会导致成年前致死, 从而阻止对其在成年期功能的进一步研究<sup>[25-26]</sup>。在过去的几十年中, Cre-loxP 技术与它莫昔芬诱导系统相结合, 已被用于克服这种成年前致死率<sup>[27]</sup>, 此外, 该技术能够在任何特定时间点对不同细胞亚群进行精确的基因操作, 这被称为时间和空间可控的基因表达。这些基因修饰的主要诱导剂是它莫昔芬, 它使 Cre 突变的雌激素受体 (Cre-ER<sup>TM</sup>) 融合蛋白发生构象改变, 使 Cre 酶由细胞质进入细胞核, 识别宿主 DNA 上的 loxP 位点并切除目的基因<sup>[28]</sup>。结合近几年发展的 CRISPR/Cas9 技术, 可以敲除特定基因位点, 有靶向精确度高、实验周期短、无物种限制、易操纵等优势<sup>[29]</sup>。这两项技术的强大功能和多功能性已成为几乎所有医学研究领域基因打靶实验的重要工具。

基于 Cre-loxP 系统建立的基因敲除小鼠模型弥补了重要基因完全敲除后胚胎致死或过早死亡的缺陷。此次研究所产生的小鼠模型仅在它莫昔芬诱导后表现为 *BRD4* 的缺陷, 一般在成年以后诱导, 因此小鼠存活率得以保障。对基因敲除鼠及背景鼠进行 *BRD4* 的表达检测, 发现基因敲除鼠的 *BRD4* 表达显著低于背景鼠, 因此证实此次研究 *BRD4* 缺陷的小鼠造模成功, 可进一步应用于相关的疾病机制及药物研究。

*BRD4* 是溴区结构域额外末端蛋白家族的成员, 在超增强子组织和癌基因表达调控中发挥重要作用, 因此在癌症领域研究广泛<sup>[30-31]</sup>。此外, 在心血管领域, *BRD4* 蛋白在动脉粥样硬化及心力衰竭的发病过程中发挥重要作用<sup>[32-33]</sup>。并且 *BRD4* 蛋白的缺失可引发心肌功能的进行性下降, 最终导致扩张型心肌病<sup>[34]</sup>。*BRD4* 还是造血干细胞扩增和祖细胞发育所必需的<sup>[35]</sup>。随着对 *BRD4* 了解的深入, 研究者发现其在牙根尖及骨骼的相关炎症中也发挥重要作用<sup>[36-38]</sup>。REN 等<sup>[39]</sup>学者发现 *BRD4* 通过促进核因子  $\kappa$ B 信号的激活和与乙酰化的核因子  $\kappa$ B p65(赖氨酸 310) 结合, 参与促炎细胞因子的产生,

如肿瘤坏死因子  $\alpha$ 、白细胞介素 6 和白细胞介素 1, 促进破骨细胞的形成和活化。GUO 等<sup>[40]</sup>学者发现 I-BET151 可通过靶向 *BRD4* 介导的 RANKL 信号通路抑制破骨细胞形成和炎性细胞因子的分泌。

总之, *BRD4* 与人体各种疾病的关系还有很大的研究空间, 构建一种稳定的 *BRD4* 基因敲除小鼠模型是非常有意义的。此次研究利用 CRISPR/Cas9 技术稳定的优势来切断 DNA 序列并插入 loxP 位点, 利用 Cre-loxP 系统条件性切除的优点保证小鼠模型的成活率。所产生的 *BRD4* 基因敲除小鼠模型能帮助研究者更加直观了解 *BRD4* 在各种相关疾病中的作用, 明显增强了人们对 *BRD4* 基因功能进行精确研究的能力, 有利于进一步完善相关疾病的发病机制。

**作者贡献:** 研究为第一作者和通讯作者共同设计, 全体作者参与实验, 第一作者对结果数据进行分析、成文及修改, 通讯作者审核。

**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。

**版权转让:** 文章出版前全体作者与编辑部签署了文章版权转让协议。

**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。

**出版规范:** 该文章撰写遵守了国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。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。

### 4 参考文献 References

- DEY A, NISHIYAMA A, KARPOVA T, et al. Brd4 marks select genes on mitotic chromatin and directs postmitotic transcription. *Mol Biol Cell*. 2009;20(23):4899-4909.
- TANIGUCHI Y. The Bromodomain and Extra-Terminal Domain (BET) Family: Functional Anatomy of BET Paralogous Proteins. *Int J Mol Sci*. 2016;17(11):1849.
- LOVÉN J, HOKE HA, LIN CY, et al. Selective inhibition of tumor oncogenes by disruption of super-enhancers. *Cell*. 2013;153(2):320-334.
- ZUBER J, SHI J, WANG E, et al. RNAi screen identifies Brd4 as a therapeutic target in acute myeloid leukaemia. *Nature*. 2011;478(7370):524-528.
- DELMORE JE, ISSA GC, LEMIEUX ME, et al. BET bromodomain inhibition as a therapeutic strategy to target c-Myc. *Cell*. 2011;146(6):904-917.
- BAUD'HUIN M, LAMOUREUX F, JACQUES C, et al. Inhibition of BET proteins and epigenetic signaling as a potential treatment for osteoporosis. *Bone*. 2017;94:10-21.
- 任远中. *BRD4* 在类风湿性关节炎破坏中的作用机制研究 [D]. 青岛: 青岛大学, 2020.
- NAJAFOVA Z, TIRADO-MAGALLANES R, SUBRAMANIAM M, et al. *BRD4* localization to lineage-specific enhancers is associated with a distinct transcription factor repertoire. *Nucleic Acids Res*. 2017;45(1):127-141.
- MENG S, ZHANG L, TANG Y, et al. BET Inhibitor JQ1 Blocks Inflammation and Bone Destruction. *J Dent Res*. 2014;93(7):657-662.
- MU J, ZHANG D, TIAN Y, et al. *BRD4* inhibition by JQ1 prevents high-fat diet-induced diabetic cardiomyopathy by activating PINK1/Parkin-mediated mitophagy in vivo. *J Mol Cell Cardiol*. 2020;149:1-14.

- [11] LI W, TENG F, LI T, et al. Simultaneous generation and germline transmission of multiple gene mutations in rat using CRISPR-Cas systems. *Nat Biotechnol.* 2013;31(8):684-686.
- [12] YANG H, ANG H, SHIVALILA CS, et al. One-step generation of mice carrying reporter and conditional alleles by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell.* 2013;154(6):1370-1379.
- [13] DOUDNA JA, CHARPENTIER E. Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science (New York, N.Y.).* 2014; 346(6213):1258096.
- [14] 何晓东, 李江超, 兰天, 等. 乳腺上皮细胞特异性敲除 Scrib 基因杂合子小鼠的制作与鉴定 [J]. *中国比较医学杂志*, 2013,23(6):28-32.
- [15] AUBREY BJ, KELLY GL, KUEH AJ, et al. An inducible lentiviral guide RNA platform enables the identification of tumor-essential genes and tumor-promoting mutations in vivo. *Cell Rep.* 2015;10(8):1422-1432.
- [16] FLEMR M, BÜHLER M. Single-Step Generation of Conditional Knockout Mouse Embryonic Stem Cells. *Cell Rep.* 2015;12(4):709-716.
- [17] NOIMAN T, KAHANA C. A Simple Combined Use of CRISPR-Cas9 and Cre-LoxP Technologies for Generating Conditional Gene Knockouts in Mammalian Cells. *CRISPR J.* 2018;1:278-285.
- [18] GHOSH K, VAN DUYNE GD. Cre-loxP biochemistry. *Methods (San Diego, Calif.).* 2002;28(3):374-383.
- [19] BOUABE H, OKKENHAUG K. Gene targeting in mice: a review. *Methods Mol Biol (Clifton, N.J.).* 2013;1064:315-336.
- [20] 张杨, 贾林涛, 闫雨冬, 等. Cre-loxP 系统及其衍生系统方法学的研究和在神经科学中的应用 [J]. *药学报*, 2020,55(9):2035-2042.
- [21] FEIL R, WAGNER J, METZGER D, et al. Regulation of Cre recombinase activity by mutated estrogen receptor ligand-binding domains. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997;237(3):752-757.
- [22] MA Y, YU L, PAN S, et al. CRISPR/Cas9-mediated targeting of the Rosa26 locus produces Cre reporter rat strains for monitoring Cre-loxP-mediated lineage tracing. *FEBS J.* 2017;284(19):3262-3277.
- [23] HUANG, FL, LI F ZHANG WJ, et al. Brd4 participates in epigenetic regulation of the extinction of remote auditory fear memory. *Neurobiol Learn Mem.* 2021;179:107383.
- [24] HENRY SP, JANG CW, DENG JM, et al. Generation of aggrecan-CreERT2 knockin mice for inducible Cre activity in adult cartilage. *Genesis (New York, N.Y. : 2000).* 2009;47(12):805-814.
- [25] COUMOUL X, DENG CX. Roles of FGF receptors in mammalian development and congenital diseases. *Birth Defects Res C Embryo Today.* 2003;69(4):286-304.
- [26] FRIEDBERG EC, MEIRA LB. Database of mouse strains carrying targeted mutations in genes affecting biological responses to DNA damage Version 7. *DNA Repair (Amst).* 2006;5(2):189-209.
- [27] LE Y, SAUER B. Conditional gene knockout using cre recombinase. *Methods Mol Biol (Clifton, N.J.).* 2000;136:477-485.
- [28] WEINSTOCK A, GALLEG0-DELGADO J, GOMES C, et al. Tamoxifen activity against Plasmodium in vitro and in mice. *Malar J.* 2019;18(1): 378-378.
- [29] 仝慧慧, 齐浩铭, 王辰, 等. CRISPR/Cas9 系统介导 Slc6a6 基因敲除大鼠的繁殖与鉴定 [J]. *中国比较医学杂志*, 2019,29(5):44-50.
- [30] DONATI B, LORENZINI E, CIARROCCHI A. BRD4 and Cancer: going beyond transcriptional regulation. *Mol Cancer.* 2018;17(1):164.
- [31] WU SY, LEE CF, LAI HT, et al. Opposing Functions of BRD4 Isoforms in Breast Cancer. *Mol Cell.* 2020;78(6):1114-1132.e10.
- [32] LIN S, DU L. The therapeutic potential of BRD4 in cardiovascular disease. *Hypert Res.* 2020;43(10):1006-1014.
- [33] WANG H, FU H, ZHU R, et al. BRD4 contributes to LPS-induced macrophage senescence and promotes progression of atherosclerosis-associated lipid uptake. *Aging.* 2020;12(10):9240-9259.
- [34] KIM SY, ZHANG X, SCHIATTARELLA GG, et al. Epigenetic Reader BRD4 (Bromodomain-Containing Protein 4) Governs Nucleus-Encoded Mitochondrial Transcriptome to Regulate Cardiac Function. *Circulation.* 2020;142(24):2356-2370.
- [35] DEY A, YANG W, GEGONNE A, et al. BRD4 directs hematopoietic stem cell development and modulates macrophage inflammatory responses. *EMBO J.* 2019;38(7):e100293.
- [36] XIAO Y, LIANG L, HUANG M, et al. Bromodomain and extra-terminal domain bromodomain inhibition prevents synovial inflammation via blocking I kappaB kinase-dependent NF-kappaB activation in rheumatoid fibroblast-like synoviocytes. *Rheumatology (Oxford).* 2016; 55(1):173-184.
- [37] ZHANG QG, QIAN J, ZHU YC. Targeting bromodomain-containing protein 4 (BRD4) benefits rheumatoid arthritis. *Immunol Lett.* 2015;166(2): 103-108.
- [38] 许颖华, 姜龙, 史春. 慢性根尖周炎模型大鼠表观遗传分子: 溴结构域蛋白 4 的表达变化 [J]. *中国组织工程研究*, 2022,26(14): 2167-2171.
- [39] REN Y, ZHANG Y, WANG Z, et al. Role of Brd4 in the production of inflammatory cytokines in mouse macrophages treated with titanium particles. *Can J Physiol Pharmacol.* 2019;97(11):1028-1034.
- [40] GUO NH, ZHENG JF, ZI FM, et al. I-BET151 suppresses osteoclast formation and inflammatory cytokines secretion by targeting BRD4 in multiple myeloma. *Biosci Rep.* 2019;39(5):BSR20181245.

(责任编辑: GD, ZN, ZJP)