广州生物院利用单碱基编辑器在猪上实现多位点单碱基编辑

作者：writer 来源：中国科学院

本文原地址：https://www.iikx.com/news/progress/5837.html

本文仅供学习交流之用，版权归原作者所有，请勿用于商业用途！

广州生物院利用单碱基编辑器在猪上实现多位点单碱基编辑。6月28日，中国科学院广州生物医药与健康研究院赖良学课题组在国际学术期刊Nature Communications(《自然-通讯》)发表了题为Efficient base editing for multiple genes and loci in pigs using base editors 的研究论文。首次从细胞、胚胎及动物三个层面探讨了单碱基编辑器对猪多基因进行同时点突变的可行性，并且通过体细胞核移植和胚胎注射两种途径获得两种单位点单碱基突变猪模型(杜氏肌营养不良症和早衰症猪模型)和一种三位点单碱基突变猪模型(重症免疫缺陷猪模型)。该成果的应用将加速生物医药相关的大动物猪模型培育和农业精准育种。

单碱基编辑器是近年才出现的新基因编辑系统，被认为是基因编辑技术3.0版本。该系统的基本原理是基于脱氨酶的作用，将胞嘧啶(C)转变为胸腺嘧啶(T)(Cytidine base editors, CBEs)，或将腺嘌呤(A)转变成鸟嘌呤(G)(adenine base editors，ABEs)，这种碱基间的相互转换，不会引起双链 DNA 的断裂，利用其进行基因编辑，更加有效而又安全。而较早期的Cas9等基因编辑工具均会伴随DNA断裂，后者会造成基因组的不稳定性，对被编辑的生物机体带来安全隐患。

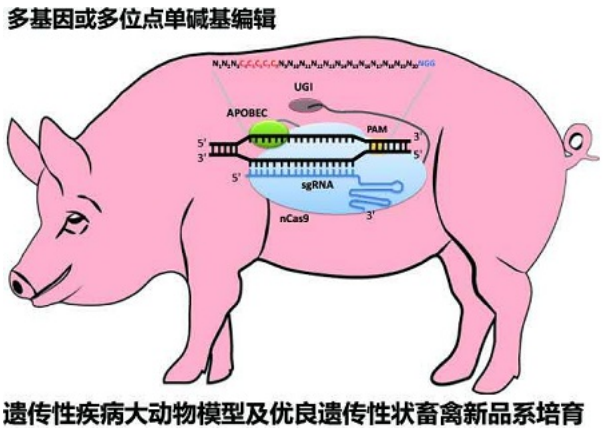
单碱基编辑器出现以后，很快被广泛地运用于动物、植物和人细胞的基因编辑。但是，以往的研究主要集中在单位点的碱基突变。而人类遗传性疾病以及动物遗传性状改变往往涉及多个位点的单碱基突变，因此，对基因组的多个位点进行单碱基编辑才更有可能培育出能够模拟人遗传性疾病的大动物模型和拥有优良遗传性状的畜禽新品系。

该研究利用BE3和A3A-BE3两种单碱基编辑工具，在细胞和胚胎层面，对基因组进行三基因单碱基编辑，每个基因设计一条gRNA，突变成终止密码子或者突变诱导新的mRNA剪切位点。在胎胚上，三基因同时被编辑效率最高可达50%。而细胞层面，三基因同时编辑最高可达25%。在很多动物体内存在有内源性逆转录病毒，这种基因系列相同的内源性病毒往往以多拷贝的形式分布于染色体的不同位点。而猪内源性病毒的存在，给猪作为异种移植器官供体带来安全隐患。该研究还对与猪内源性病毒复制有关的pol基因进行了单碱基突变，制造提前的终止密码子，从而实现单基因的多位点失活。通过二代测序分析，可以看到在体细胞内，多拷贝的敲除率达到80%以上，而在胚胎层面，71%病毒拷贝得到敲除。因此，该研究证明，单碱基编辑系统在细胞和胚胎层面均可实现多基因或单基因多位点的高效碱基突变。

该研究进一步通过胚胎注射以及体细胞核克隆的途径分别培育出了单基因突变猪和多基因突变猪。所获得含有单基因突变的杜氏肌肉营养不良症(Duchenne muscular

dystrophy，DMD)猪模型以及早衰症(Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome，HGPS)猪模型，均极好地模拟了病人的表型。所获得的与免疫细胞发育相关的三基因(RAG1、RAG2、IL2RG)纯合突变猪的胸腺和脾脏发育有明显缺陷，T细胞、B细胞及NK细胞缺失，免疫细胞不能进行V(D)J基因组重排，具有典型的重症免疫缺陷表型。由于猪的免疫系统与人非常相似，这种重症免疫缺陷猪模型将成为生物医药研究领域的重要基因修饰工具猪。

该论文的共同通讯作者为研究员赖良学以及副研究员王可品。广州生物院博士研究生谢精科、葛维凯、栗楠、刘琪帅为共同第一作者。研究工作得到中科院战略先导专项、国家重点研发计划、国家自然科学基金、广东省实验室、广东省及广州市科技计划、中科院青年创新促进会等的支持。



本研究选择的基因位点

Target gene	Phenotype	Target sequence
DMD	WT	GCTTCAGGAAGACCTAGAGCAGG
	DMD (Q493STOP)	GCTTTAGGAAGACCTAGAGCAGG
TYR	WT	GTGGCCAGCTCTCAGGCAGGGG
	Albinsim (Q28STOP)	GTGGCTAGCTCTCAGGCAGGGG
LMNA	WT	GTGGGCGGATCCATCTCCTCTGG
	HGPS (G608G)	GTGGGTGGATCCATCTCCTCTGG
RAG1	WT	GGAGCAATCTCCAGCAGTCCTGG
	Immunodeficiency (Q61STOP)	GGAGTAATCTCCAGCAGTCCTGG
RAG2	WT	GTCACTACAGATGATAACAGTTGG
	Immunodeficiency (Q4STOP)	GTCACTATAGATGATAACAGTTGG
IL2RG	WT	GTCCAGCTCCAGGACCCACGGG
	Immunodeficiency (Q155STOP)	GTCTAGCTCCAGGACCCACGGG
POL	WT	GTTCAAAGATTAATCCAACAGGG
	PERV-inactivated (Q148STOP)	GTTTAAAGATTAATCCAACAGGG

广州生物院利用单碱基编辑器在猪上实现多位点单碱基编辑

更多 科学进展 请访问 https://www.iikx.com/news/progress/

本文版权归原作者所有，请勿用于商业用途，爱科学iikx.com转发