



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111150854 A

(43)申请公布日 2020.05.15

(21)申请号 202010068656.2

(22)申请日 2020.01.21

(71)申请人 中国科学院生物物理研究所  
地址 100101 北京市朝阳区大屯路15号

(72)发明人 王晓群 仇子龙 吴倩 孙乐

(74)专利代理机构 中科专利商标代理有限责任  
公司 11021

代理人 张莹 崔亚松

(51)Int.Cl.

A61K 48/00(2006.01)

A61P 25/00(2006.01)

A61K 49/00(2006.01)

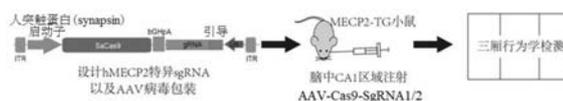
权利要求书1页 说明书8页  
序列表2页 附图6页

(54)发明名称

一种改善自闭症社交障碍的方法

(57)摘要

本发明涉及生物技术领域,具体涉及一种改善自闭症社交障碍的方法。本发明提供了一种可以改善自闭症小鼠模型社交障碍的方法,该方法构建针对人源hMECP2特异的敲减载体,通过立体定位注射的方法注射到MECP2-TG自闭症小鼠模型的海马CA1区,从而改善其社交障碍。



1.降低自闭症患者海马CA1区MeCP2基因的表达或MeCP2蛋白的水平的试剂在制备用于改善自闭症患者社交障碍的药物中的应用。

2.权利要求1所述的应用,其中所述试剂是利用基因编辑技术或RNA干扰技术构建靶向自闭症患者MeCP2基因的片段和/或包含该片段的载体。

3.权利要求1所述的应用,其中所述试剂包括靶向MeCP2基因的RNAi片段和/或siRNA片段和/或用于CRISPR/Cas9基因敲除技术的sgRNA片段,和/或,包括含有所述片段的载体。

## 一种改善自闭症社交障碍的方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,具体涉及一种改善自闭症患者社交障碍的方法。

### 背景技术

[0002] 自闭症,又称孤独症,是广泛性发育障碍的一种亚型,以男性多见,起病于婴幼儿期,主要表现为不同程度的语言发育障碍、社会交际行为障碍和重复刻板行为。自闭症发病机制复杂,主要因素有遗传、围产期因素、免疫系统异常和神经内分泌异常等等。据美国国立卫生研究院精神健康研究所(NIMH)的数据,美国孤独症患病率在1‰-2‰。2010年国内部分地区相关报道,广东孤独症患病率为0.67%,深圳地区高达1.32%。自闭症患者的社交障碍与患者的MeCP2蛋白水平的异常息息相关。MeCP2基因的突变或缺失,或MeCP2基因的拷贝数增多,均会引起自闭症。已知一部分自闭症患者致病机制为MeCP2(methyl CpG binding protein 2,甲基化CpG岛结合蛋白2)基因拷贝数加倍,与之对应的MeCP2-TG的小鼠是高表达MeCP2基因的自闭症动物模型,该模型小鼠具有与人类自闭症相似的表型,表现为超声波交流障碍、社交行为障碍和重复刻板行为。因此针对该小鼠模型自闭症发病机制及其治疗进行研究能够帮助我们更好地了解和治疗人类自闭症。

[0003] CRISPR(Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)/Cas9(CRISPR associated protein 9)基因敲除技术是继锌指核酸酶、同源重组和TALEN(transcription activator-like(TAL)effector nucleases)之后定点敲除基因的又一种方法。CRISPR/Cas系统是细菌和古细菌在长期演化过程中形成的一种适应性免疫防御,可用于对抗入侵的病毒及外源DNA。CRISPR/Cas系统通过将入侵噬菌体和质粒DNA的片段整合到CRISPR中,并利用相应的CRISPR RNAs(crRNAs)来指导同源序列的降解,从而提供免疫性。此系统的工作原理是crRNA(CRISPR-derived RNA)通过碱基配对与tracrRNA(trans-activating RNA)结合形成tracrRNA/crRNA复合物,此复合物引导核酸酶Cas9蛋白在与crRNA配对的序列靶位点剪切双链DNA。而通过人工设计这两种RNA,可以改造形成具有引导作用的sgRNA(short guide RNA,短引导RNA),足以引导Cas9对DNA的定点切割。Cas9作为一种灵活的工具,可应用在多个方面,包括转录激活、转录抑制、表观遗传标记的调节、基因组结构的调节、sgRNA表达和定位的控制、基因组编辑等。

[0004] 对于自闭症小鼠模型的治疗,目前仍然处于突变体野生型杂交或者整脑MeCP2基因水平改变的阶段,并未找出与自闭症病症相关的特异脑区,也没有在该脑区特定敲减MeCP2基因去观察其变化,而且这些手段并不能提供给病人使用。

### 发明内容

[0005] 本发明为解决现有技术中的技术问题,提供了一种可以改善自闭症患者社交障碍的方法。该方法构建针对人源hMECP2特异的敲除载体,通过立体定位注射的方法注射到MECP2-TG自闭症小鼠模型的海马CA1区,从而改善其社交障碍。人类有些自闭症患者也是hMECP2基因拷贝数增加导致,MeCP2-TG自闭症小鼠模型患病机理与人类自闭症疾病相似,

因此该模型可以为人类自闭症治疗提供一种新的思路和方法。

[0006] 然而,本发明中方法并不限于仅在MECP2-TG自闭症小鼠模型中起作用,研究发现,一部分自闭症患者致病机制为MeCP2基因拷贝数加倍,导致MeCP2蛋白过量表达,因此在由于MeCP2基因拷贝数加倍引起的自闭症的小鼠中,通过分子生物学技术降低患病小鼠海马CA1区MeCP2基因的表达水平,同样能够改善其社交障碍。这也为改善人类自闭症患者社交障碍提供一定的参考。

[0007] 为此,本发明第一方面提供降低自闭症患者海马CA1区MeCP2基因的表达或MeCP2蛋白的水平试剂在制备用于改善自闭症患者社交障碍的药物中的应用。

[0008] 在本发明的一些实施方案中,所述试剂是利用基因编辑技术或RNA干扰技术构建靶向自闭症患者MeCP2基因的片段。

[0009] 在本发明的另一些实施方案中,所述试剂是包含利用基因编辑技术或RNA干扰技术构建靶向自闭症患者MeCP2基因的片段的载体。

[0010] 在本发明的一些实施方案中,所述降低自闭症患者海马CA1区MeCP2基因的表达或MeCP2蛋白的水平试剂包括靶向MeCP2基因的RNAi片段和/或siRNA片段和/或用于CRISPR/Cas9基因敲除技术的sgRNA片段。

[0011] 在本发明的另一些实施方案中,所述降低自闭症患者海马CA1区MeCP2基因的表达或MeCP2蛋白的水平试剂包括含有靶向MeCP2基因的RNAi片段和/或siRNA片段和/或用于CRISPR/Cas9基因敲除技术的sgRNA片段的载体。

[0012] 在缺失MECP2蛋白的转基因小鼠中表达人源hMECP2蛋白,可以挽救小鼠的自闭症表现,提示了人源hMECP2蛋白在小鼠中也可以正常发挥生理作用(Collins et al.,2004)。由于鼠源Mecp2基因与人源hMECP2基因的编码DNA序列不同,在小鼠内导入人源hMECP2基因便形成了一种类似过表达MECP2蛋白的效果,从而建立MeCP2-TG自闭症小鼠模型(Collins et al.,2004)。在这个动物模型中,可以依照其来源不同选择性敲减部分MECP2蛋白。这对于人类中因为遗传问题过表达MECP2而患有自闭症的病人提供了研究与治疗途径。MeCP2-TG自闭症小鼠模型是一种由于MECP2基因过表达而具有自闭症(Autism)表型的小鼠,且该小鼠中MECP2基因表达量是正常情况的2倍。关于MeCP2-TG自闭症小鼠模型更详细的介绍参见Collins AL,Levenson JM,Vilaythong AP,Richman R,Armstrong DL,Noebels JL,et al.Mild overexpression of MeCP2 causes a progressive neurological disorder in mice.Hum Mol Genet.2004;13(21):2679-89.

[0013] 由于小鼠中的MECP2基因与人源hMeCP2基因编码DNA序列不同,可利用基因编辑技术或RNA干扰技术靶向敲除或敲低人源hMeCP2基因而不影响小鼠本身MECP2基因的表达,从而缓解或改善因过量表达MECP2蛋白引起的小鼠自闭症。

[0014] MECP2-TG小鼠中MECP2基因是泛表达的。发明人经过不懈的努力,通过实验证实了对于MECP2-TG小鼠,仅敲减海马CA1区域中的人源hMECP2基因就可以改善患病小鼠的社交能力。

[0015] 本发明使用三厢范式研究野生型(WT)、MECP2-TG小鼠及治疗后的小鼠的社交行为。通过三厢实验来评定小鼠的社交能力。关于三厢范式的具体报道参见Takumi T,Tamada K,Hatanaka F,Nakai N,Bolton PF.Behavioral neuroscience of autism.Neurosci Biobehav Rev.2019.

[0016] 在本发明的一些实施方案中,改善MeCP2-TG自闭症小鼠社交障碍的方法包括步骤:

[0017] 1) 利用基因编辑技术或RNA干扰技术构建特异性靶向人源hMeCP2基因的片段和/或包含该片段的载体;

[0018] 2) 将所述片段和/或载体施用于MeCP2-TG自闭症小鼠的海马CA1区,以降低人源hMeCP2基因的表达或hMeCP2蛋白的水平,MeCP2-TG自闭症小鼠社交障碍获得改善。

[0019] 本发明中野生型(WT)小鼠(FVB品系)购自北京维通利华公司,MECP2-TG自闭症小鼠模型购自JAX(Jackson lab),保种编号:Jax stock No.008679,转基因鼠全称为FVB-Tg(MECP2)1Hzo/J。

[0020] CRISPR/Cas9基因敲除技术是继锌指核酸酶、同源重组和TALEN之后定点敲除基因的又一种方法。Cas9作为一种灵活的工具,可应用在多个方面,包括转录激活、转录抑制、表观遗传标记的调节、基因组结构的调节、sgRNA表达和定位的控制、基因组编辑等。世界各地的研究团队已报到了多种体内Cas9治疗的方法。本发明就是利用CRISPR/Cas9系统对基因组进行编辑从而达到治疗的目的。当然,也可以通过其他分子生物学方法降低MECP2基因的表达,以改善社交障碍。

[0021] 本发明通过将由腺相关病毒(AAV)包装的人源hMECP2特异sgRNA注射入小鼠海马CA1区域,敲低或敲除MECP2-TG小鼠中表达的人源hMECP2基因,利用CRISPR/Cas9系统使得该脑区总MECP2表达降低,进而缓解自闭症小鼠的社交障碍。

[0022] 自闭症可能与多个脑区相关,本发明数据显示,海马体CA1区是自闭症相关的重要脑区,改善CA1神经元内的MECP2表达情况(降低CA1区中过量表达的MECP2水平),可以有效缓解小鼠的自闭症症状(增加其与陌生小鼠的交流时间)。

[0023] 本发明的有益效果在于通过CA1区域降低hMECP2基因的表达可以改善该自闭症小鼠的社交行为障碍,人类有些自闭症患者也是hMECP2基因拷贝数增加导致,MeCP2-TG自闭症小鼠模型患病机理与人类自闭症疾病相似,因此该模型可以为人类自闭症治疗提供一种新的思路和方法。

## 附图说明

[0024] 下面将结合附图来说明本发明。

[0025] 图1:本发明中构建载体、向小鼠注射包含载体的AAV以及进行三厢行为学检测的实验流程图;

[0026] 图2:本发明中构建的pX601-AAV-hMECP2::NLS-SaCas9-NLS-3xflag-bGHpA;U6::BsaI-sgRNA载体图谱;

[0027] 图3:本发明中构建的载体的部分骨架示意图;

[0028] 图4:检测小鼠在进行三厢行为学实验过程中,海马体CA1区域的细胞活动的具体实验流程;

[0029] 图5a:本发明中野生型(WT)及MECP2-TG小鼠的三厢实验轨迹记录样例,左侧图中黑线为小鼠运动轨迹,右侧为时间分布热图,灰色方框与其内的白色虚线方框(笼具区域)之间为接触区域;

[0030] 图5b:本发明中WT及MECP2-TG小鼠海马CA1区中SZ细胞与OZ细胞的分布及活动样

例,其中,左图中灰色的细胞为SZ细胞,灰色外侧有白色的轮廓线的细胞(白色箭头所指)为OZ细胞,白色的细胞为其他的未强烈活动的细胞;

[0031] 图5c:野生型WT及MECP2-TG小鼠海马CA1中SZ细胞与OZ细胞的比例统计结果;

[0032] 图6a:WT、MECP2-TG以及治疗组小鼠处于SZ及OZ区域的时间分布热图;

[0033] 图6b:WT、MECP2-TG以及治疗组小鼠处在SZ及OZ区域的停留时间统计结果;

[0034] 图6c:WT、MECP2-TG以及治疗组小鼠的社交时间统计结果;

[0035] 图7a:本发明中治疗组小鼠的三厢实验轨迹记录样例,白色曲线为小鼠运动轨迹,灰色方框与其内的白色虚线方框(笼具区域)之间为接触区域,外侧白色虚线框指三厢实验装置底面;

[0036] 图7b:本发明中治疗组小鼠海马CA1区中SZ细胞与OZ细胞的分布及活动样例,其中,左图中灰色的细胞为SZ细胞,灰色外侧有白色的轮廓线的细胞(白色箭头所指)为OZ细胞,白色的细胞为其他的未强烈活动的细胞;

[0037] 图7c:本发明中治疗组小鼠海马CA1区中SZ细胞与OZ细胞的比例统计结果;

[0038] 图7d:WT、MECP2-TG以及治疗组小鼠处于SZ及OZ区域的时间比统计结果;

[0039] 图8:AAV病毒在治疗组小鼠中表达4周后,治疗组小鼠海马体的脑切片免疫荧光图像,右侧图片为左侧大图中虚线区域的放大,右侧图片自上至下分别展示发出绿色荧光、红色荧光、蓝色荧光、荧光叠加的细胞;

[0040] 图9a:治疗组小鼠个体中的基因编辑现象,方框内核苷酸序列是sgRNA的靶向序列,灰色核苷酸序列为PAM(Protospacer-adjacent motif),小写字母位置为发生了点突变的位点;

[0041] 图9b:人源和鼠源的MECP2基因的其中一段片段的对比,黑色方框内序列是sgRNA的靶向序列,灰色核苷酸序列为PAM,灰色小方框中为小鼠中MECP2基因与人源hMECP2基因的差异位点。

## 具体实施方式

[0042] 下面参照具体的实施例进一步描述本发明,但是本领域技术人员应该理解,本发明并不限于这些具体的实施例。

[0043] 下述实施例中的实验方法,如果没有特殊说明,均为常规实验方法。实验所用到的试剂,如无特殊说明,均可通过市售渠道获得。

[0044] 实施例1:WT与MECP2-TG自闭症小鼠的三厢行为学比较

[0045] 1) 分别对WT小鼠和MECP2-TG自闭症小鼠(15周)进行三厢实验。参见附图5a,在最左侧箱体的笼子中关闭一只陌生小鼠,分别记录WT小鼠和MECP2-TG自闭症小鼠与陌生小鼠的交流情况,并分别记录其在10分钟的运动轨迹。同时,利用记录数据在matlab中做出时间分布热图。

[0046] 附图5a中,灰色方框与其内的白色虚线方框(笼具区域)之间为接触区域,二者距离4.5厘米。若区域内笼具置有幼年小鼠(陌生小鼠),则该区域称为社交区域(Social Zone,简写为SZ,在SZ区域内进行相关且强烈活动的细胞称之为SZ细胞),该箱体为SZ箱体。若区域内笼具未置幼年小鼠,则该区域称为物品区域(Object Zone,简写为OZ,在OZ区域内进行相关且强烈活动的细胞称之为OZ细胞),该箱体为OZ箱体。

[0047] 实验过程中SZ依据幼年小鼠的置放位置随机出现在三厢的左侧或右侧,同时OZ区域在三厢的另一侧;白色虚线方框为笼具区域(区域大小为笼具底面,长10厘米,宽6厘米,四壁为间距1厘米的栅栏),实验时随机将一只4-5周大的幼年小鼠放置于左侧或右侧的笼具区域,图5a中样例均为幼年小鼠置于左侧的情况。

[0048] 结果表明,在三厢实验中野生型(WT)小鼠更偏向待在陌生小鼠所在的箱体附近;而MECP2-TG小鼠更偏向待在无小鼠的箱体附近。这也与MECP2-TG小鼠患有自闭症,具有社交障碍相一致。

[0049] 2) 由于动物的行为活动都必然有相关的神经环路机制,这一机制在细胞层面上的具体表现通常是某一类或几类细胞的活动、数量与特定动物行为具有相关性。因此,本发明中小鼠的不同行为活动,即经常与陌生小鼠交流的行为和社交障碍行为(避免与陌生小鼠交往的行为),与不同的细胞活动有联系,通过分析相关细胞的活动及数目,可以提示小鼠的社交障碍是否得到了缓解。

[0050] 在WT与MECP2-TG自闭症小鼠在进行三厢实验的同时,分别观测了其海马CA1区域的细胞活动。

[0051] 小鼠海马体CA1区域中的GCaMP6s蛋白与细胞内的钙离子结合可发出绿色荧光,当钙离子浓度降低,蛋白不再与钙离子结合时绿色荧光消失,从而达到动态检测细胞内钙离子浓度的目的,由于神经元内钙离子浓度与神经元的电活动密切相关,所以对钙离子浓度的检测即可反应神经元的活动性。

[0052] 使用植入式荧光显微镜技术检测小鼠(15周)在进行三厢行为学检测过程中,海马体CA1区域的细胞活动,具体实验流程如图4(实验流程具体参考Ziv Y,Burns LD,Cocker ED,Hamel EO,Ghosh KK,Kitch LJ,et al.Long-term dynamics of CA1 hippocampal place codes.Nat Neurosci.2013;16(3):264-6.),操作步骤如下:

[0053] a.在小鼠海马体CA1区域注射AAV5-Cre(50nl,Vector biolabs)和AAV2/5-DIO-GCaMP6s(450nl,Vector biolabs)的混合病毒。

[0054] b.小鼠海马体切片显示,注射完成3周后,GCaMP6可以良好的表达在CA1神经元中。

[0055] c.通过手术,在小鼠CA1上方植入一枚grin lens(Inscopix,GLP-1042),通过404胶水固定grin lens,并在颅骨上铺设牙科水泥以保护grin lens不因小鼠运动而移动。进行行为实验时在grin lens后端接入微型荧光显微镜镜体。

[0056] d.调节焦距,使荧光显微镜下可清晰观察到表达GCaMP6的细胞的荧光信号,并进行细胞成像,记录动物在进行3厢行为测试时的细胞活动。

[0057] e,f.使用CNMF算法(具体参考Pnevmatikakis EA,Soudry D,Gao Y,Machado TA,Merel J,Pfau D,et al.Simultaneous Denoising,Deconvolution,and Demixing of Calcium Imaging Data.Neuron.2016;89(2):285-99.)对成像数据进行处理,识别细胞(e),并对细胞活动进行提取(f)。

[0058] 植入式荧光显微镜观测到的WT小鼠和MECP2-TG自闭症小鼠的CA1区细胞的活动情况如图5b所示。同时统计了WT小鼠和MECP2-TG自闭症小鼠中SZ细胞和OZ细胞的比例,参见附图5c。

[0059] 图5b,5c中实验结果表明:WT小鼠中SZ细胞比例显著高于OZ细胞;而在MECP2-TG小鼠中,SZ细胞比例降低,OZ细胞比例升高,但两者不存在细胞比例的显著差异。

[0060] 实施例2:用于特异敲减hMECP2基因的AAV-Cas9-sgRNA1/2的构建过程

[0061] 1) 将人源hMeCP2基因全长导入<http://www.e-crisp.org/E-CRISP/>网站,查找合适的PAM位点及合适的sgRNA,得到两条以上的sgRNA,本发明的实验使用了5'-CCTGGGGCTCAGGGGGCTGGTGGGGT-3'(sgRNA1,如SEQ ID NO:1所示)和5'-ACTCTGAGTGGTGGTGGTGGTGG-3'(如SEQ ID NO:2所示)两条sgRNA,如附图3。

[0062] 2) 按照引物设计原则合成两条sgRNA,退火后分别构建至质粒pX601-AAV-CMV::NLS-SaCas9-NLS-3xHA-bGHPA;U6::BsaI-sgRNA(购自addgene公司)中,同时对该载体骨架进行改造,将CMV片段切除并插入突触蛋白synapsin启动子,将HA标签切除并插入Flag标签。改造形成pX601-AAV-hMECP2::NLS-SaCas9-NLS-3xflag-bGHPA;U6::BsaI-sgRNA1/2质粒,质粒图谱如附图2所示。连接有sgRNA1的载体简称为Cas9-sgRNA1,连接有sgRNA2的载体简称为Cas9-sgRNA2,并将二者质粒浓度调节相等,然后分别包装进AAV病毒(订购自BrainVTA)中。为了提高基因敲减效率,分别获得了AAV-Cas9-sgRNA1和AAV-Cas9-sgRNA2病毒,将其等体积混合获得AAV-flag-SaCas9-SghMECP1/2。

[0063] 实施例3:MECP2-TG小鼠的海马CA1区域特异敲减人源hMeCP2基因的过程

[0064] 在实验过程中,一方面需要通过MECP2-TG小鼠进行Cas9介导的基因敲减(施用AAV-flag-SaCas9-SghMECP1/2,即含有质粒pX601-AAV-hMECP2::NLS-SaCas9-NLS-3xflag-bGHPA;U6::BsaI-sgRNA1/2的AAV病毒)制备治疗组小鼠(Rescue);另一方面需要对治疗组小鼠的海马体CA1区神经元进行功能荧光检测,此时需要用另一种AAV病毒(AAV2/5-DIO-GCaMP6s,购买自Vector biolabs)感染CA1区神经元。

[0065] 1) 将AAV-flag-SaCas9-SghMECP2与AAV2/5-DIO-GCaMP6s进行1:1体积混合后(总体积1 $\mu$ l)载入到立体定位仪上的玻璃电极内。

[0066] 2) 使用立体定位仪找到小鼠CA1区域(前囟向后1.9mm,中央向两侧1.4mm),使用颅钻将头骨钻开,钻孔后将玻璃电极下降到硬脑膜以下1.4mm,将病毒缓缓注射入CA1区域。使用电动注射泵将1 $\mu$ l混合好的病毒通过玻璃电极缓慢注射(注射速度0.05 $\mu$ l/min)入CA1区。

[0067] 3) 注射完成后使玻璃电极在组织内停留7min。取出玻璃电极,在颅骨均匀涂抹红霉素眼膏以防止小鼠头皮伤口产生炎症,将小鼠皮肤缝合好。将小鼠放在温箱里待其苏醒,苏醒后放入饲养笼。病毒表达至高峰期需要两到三周。

[0068] 本发明中构建载体、向小鼠注射包含载体的AAV以及进行后续三厢行为学检测的实验流程如附图1所示。

[0069] 实施例4:治疗组小鼠三厢行为分析

[0070] 在获得实施例3的治疗组小鼠(或称为Rescue小鼠,即特异敲减CA1区域人源hMeCP2基因的MECP2-TG小鼠,简称为MECP2-TG-sgRNA)的同时,向MECP2-TG小鼠的CA1区域注射含对照空载体(未插入目的片段)的AAV病毒,其他实验步骤同实施例3,获得对照小鼠(MECP2-TG-LacZ小鼠)。将WT、对照小鼠和治疗组小鼠,在三厢中的探索时间与陌生小鼠的交流时间进行统计对比,结果如附图6所示。

[0071] 将三厢中包含陌生小鼠的箱体称为SZ箱体,无小鼠的箱体称为OZ箱体,统计WT、MECP2-TG-LacZ小鼠以及治疗组小鼠在不同箱体内的时间,同时统计了WT、MECP2-TG-LacZ小鼠以及治疗组小鼠与陌生小鼠的交流时间。

[0072] 可以看出野生型小鼠、治疗组小鼠与陌生小鼠的交流时间相近;而作为对照的

MECP2-TG-LacZ小鼠与陌生小鼠的交流时间显著低于野生型小鼠和治疗组小鼠。治疗组小鼠明显喜欢在具有陌生鼠笼的箱体中活动,并与陌生鼠有更多交流。说明利用CRISPR/Cas9技术将人源hMECP2基因在MECP2-TG小鼠的CA1区中敲除之后,MECP2-TG小鼠的社交表型得到了一定的恢复。

[0073] 实施例5:WT、MECP2-TG小鼠及治疗组小鼠三厢行为对比

[0074] 采用如实施例1的三厢实验,观察治疗组小鼠(病毒注射6周后,透镜植入3周后的15周龄的治疗组小鼠)的表现。

[0075] 如图7a所示,治疗组小鼠处于SZ区的时间显著长于处于OZ区的时间,这与野生型的表现是一致的,说明MECP2-TG小鼠的社交障碍获得了改善。并且,根据图7b、7c结果,治疗组小鼠CA1区域的SZ细胞比例也显著高于OZ细胞比例,这也与野生型小鼠中的SZ细胞比例显著高于OZ细胞比例的表现一致。

[0076] 图7d中统计了15周的WT、MECP2-TG小鼠及治疗组小鼠在三厢行为实验时,其分别处于SZ区和OZ区的时间比,进一步说明了治疗组小鼠处于SZ区的时间显著长于处于OZ区的时间,这与野生型的表现一致,与患有自闭症的MECP2-TG小鼠的表现相反,治疗组小鼠的社交能力得到改善。

[0077] 综上所述,在CA1区检测到了与小鼠社交区域相关的细胞,通过降低MECP2-TG小鼠中人源hMECP2基因的表达,治疗组小鼠的社交能力得到改善,并且SZ细胞比例显著高于OZ细胞比例。

[0078] 实施例6:治疗组小鼠海马CA1区免疫荧光检测

[0079] 待病毒在实施例3中的治疗组小鼠中表达了4周后,进行以下操作:

[0080] 1) 将小鼠进行麻醉,使用4%PFA进行心脏灌注,脑取出后置于4%PFA中4度过夜;

[0081] 2) 对小鼠的脑进行振荡切片,120-150um厚;

[0082] 3) 将脑片进行0.1%PBST(1mL Triton-100(购买自Amresco)与999mL 1×PBS混匀)打孔(对细胞内部的蛋白进行染色,需要在孵育液中加入Triton-100,在细胞膜上造成孔洞,方便一抗或二抗进入细胞膜)30分钟,10%驴血清室温封闭2小时,一抗anti-Flag(1:300,购买自Sigma)4度过夜。二抗Alexa Fluoro594 IgG(购买自Invitrogen)室温孵育2小时,DAPI(1:1000)染色30分钟。激光共聚焦显微镜下观察其表达情况,如图8所示,红色为Cas9-Flag表达,主要在CA1区域,蓝色为细胞核,绿色为GCaMP6s的表达。

[0083] 通过细胞计数实验,发现有63.4%的CA1区细胞同时被AAV-flag-SaCas9-SghMECP2与AAV2/5-DIO-GCaMP6s所感染,表现为红色与绿色的共染,说明在治疗组小鼠中,使用功能荧光成像检测到的海马体CA1区的活动神经元中包含人源MECP2蛋白被敲减的细胞,即治疗组小鼠行为过程中的细胞功能检测可以检测到经AAV病毒(AAV-flag-SaCas9-SghMECP2)感染得到治疗的细胞。

[0084] 实施例7:MECP2-TG-sgRNA小鼠基因敲除效率检测

[0085] 1) 使用尖头镊将海马CA1区域中表达Flag的区域轻轻切下。放进一个盛有少量磷酸缓冲液(PBS)的EP管里,短暂离心使其沉至管底;

[0086] 2) 吸掉EP管中的磷酸缓冲液,加入500μL组织裂解液(SNET)和5μL蛋白酶K(上海翊胜生物科技有限公司),颠倒混匀,于55℃恒温摇床上放置30min;

[0087] 3) 观察EP管中的脑组织直至无明显组织块,变澄清状后,分别加入饱和NaCl溶液

300 $\mu$ L, 颠倒混匀, 12000rpm 4 $^{\circ}$ C 离心15min。取上清液吸入新的灭菌的1.5mL EP管中, 分别加入700 $\mu$ L异丙醇, 上下颠倒数次, 此时可以看到絮状物出现。12000rpm 4 $^{\circ}$ C 离心15min;

[0088] 4) 离心完成后小心取出EP管, 可以看到管底有少量白色沉淀, 说明有DNA沉淀下来, 小心吸去上清, 加入700 $\mu$ L 70%乙醇漂洗沉淀, 12000rpm 4 $^{\circ}$ C 离心10min。小心吸去上清, 置于室温下干燥2-5min, 直至产物成透明状后加入100 $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O溶解, 置于4 $^{\circ}$ C存放过夜使基因组DNA充分溶解。

[0089] 5) 基因组PCR鉴定检测引物: 上游引物: 5' -GCCGAGGCCAAAAAGAAAGCCG-3', 如SEQ ID NO:3所示; 下游引物: 5' -GCCTTGGCATGGAGGATGAAAC-3', 如SEQ ID NO:4所示, PCR程序设定: 98 $^{\circ}$ C, 2min; 35个循环, 98 $^{\circ}$ C10s, 58 $^{\circ}$ C10s, 72 $^{\circ}$ C15s; 72 $^{\circ}$ C3min; 12 $^{\circ}$ C保温。

[0090] 6) 将目的条带连接到克隆载体 (pEASY-Blunt, 购自北京全式金生物技术有限公司) 上进行测序。

[0091] 参见图9a, 结果可以看到感染了携带有Cas9-sgRNA载体的病毒的治疗组小鼠 (#248, #245, #237) CA1区域的人源hMeCP2基因中有一些点突变和片段缺失等基因编辑现象。具体的, #248小鼠的hMeCP2基因中发生片段缺失, #245和#237发生了点突变(小写字母为突变位点), 而WT和对照病毒感染的小鼠 (#137, 由病毒AAV-SaCas9-Sg LacZ感染, 即上述MECP2-TG-LacZ小鼠) 中则没有基因编辑现象。方框内核苷酸序列是sgRNA的识别区域。

[0092] 图9b中展示了人源hMECP2基因和鼠源MECP2基因的片段对比, 方框内核苷酸序列是sgRNA的识别区域, 在sgRNA的识别区域内, 鼠源MECP2基因存在4个不同的碱基, 故此鼠源MECP2基因难以被识别剪切。在构建靶向人源hMECP2基因而不敲除鼠源MECP2基因的CRISPR/Cas9基因编辑载体时, 还可以选择其他的sgRNA的识别区域, 只要满足在识别区域内, 人源与鼠源MECP2基因的核苷酸序列至少有四个不同即可。

[0093] 应当注意的是, 以上所述的实施例仅用于解释本发明, 并不构成对本发明的任何限制。通过参照典型实施例对本发明进行了描述, 但应当理解为其中所用的词语为描述性和解释性词汇, 而不是限定性词汇。可以按规定在本发明权利要求的范围内对本发明作出修改, 以及在不背离本发明的范围和精神内对本发明进行修订。尽管其中描述的本发明涉及特定的方法、材料和实施例, 但是并不意味着本发明限于其中公开的特定例, 相反, 本发明可扩展至其他所有具有相同功能的方法和应用。

## 序列表

	<110> 中国科学院生物物理研究所	
	<120> 一种改善自闭症社交障碍的方法	
	<130> IB179493	
	<160> 4	
	<170> PatentIn version 3.3	
	<210> 1	
	<211> 27	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<400> 1	
	cctggggctc aggggggctg gtgggt	27
[0001]	<210> 2	
	<211> 26	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<400> 2	
	actctgagtg gtggtgatgg tgggtg	26
	<210> 3	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<400> 3	
	gccgaggcca aaaagaaagc cg	22
	<210> 4	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	

---

[0002]	<400> 4 gccttggcat ggaggatgaa ac	22
--------	-------------------------------------	----

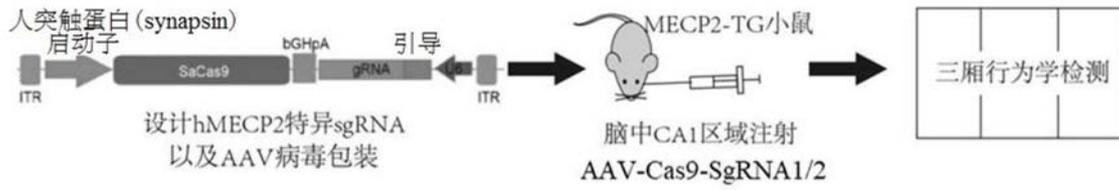


图1

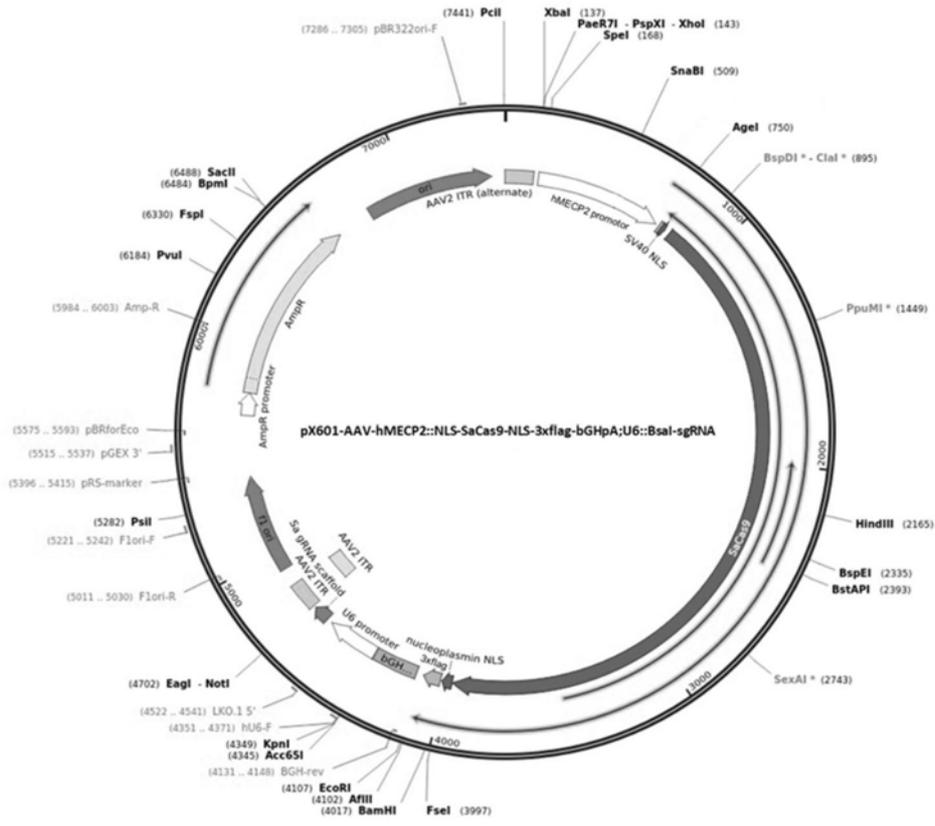


图2



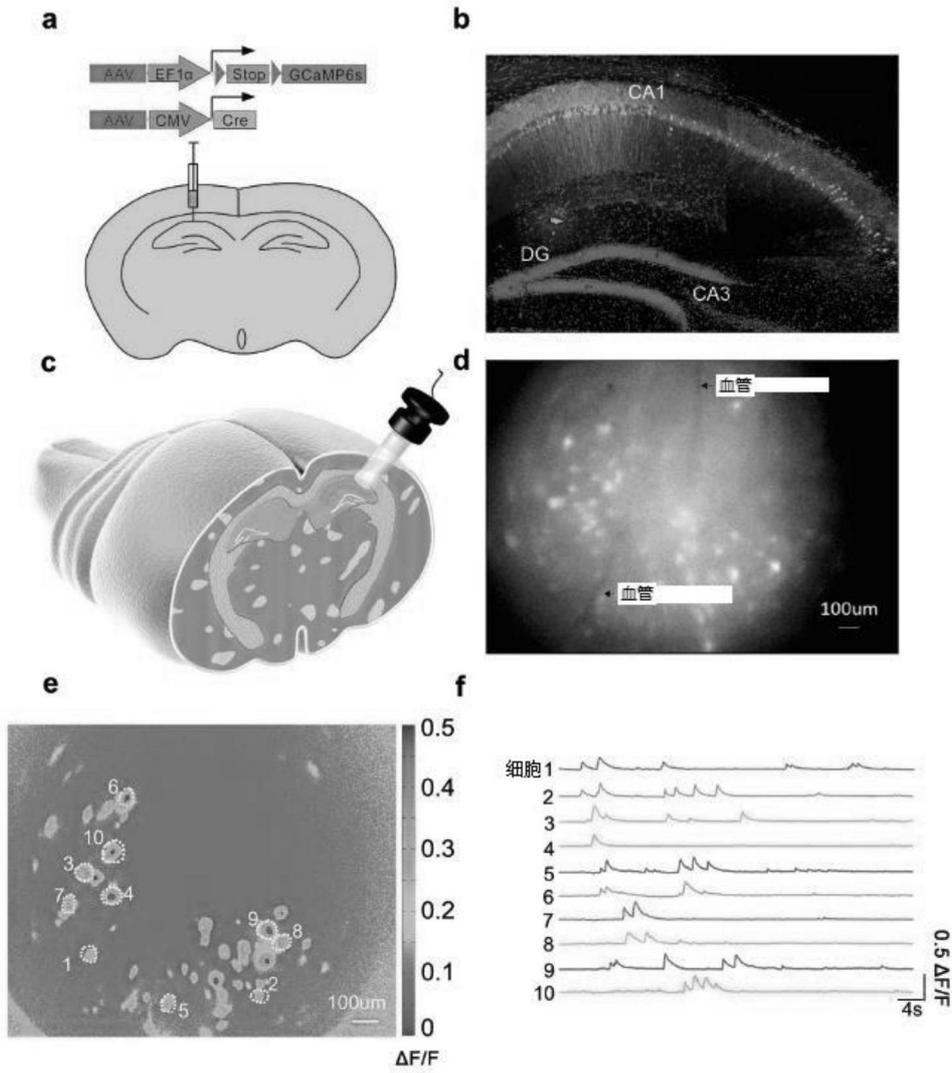


图4

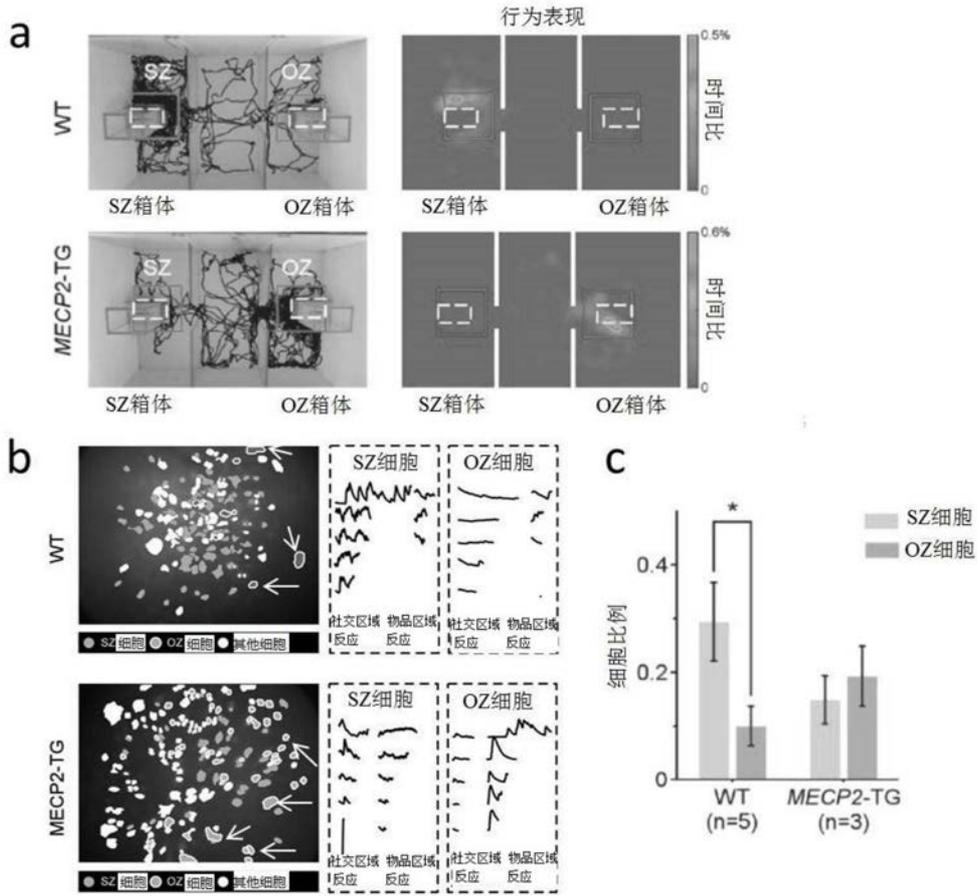


图5

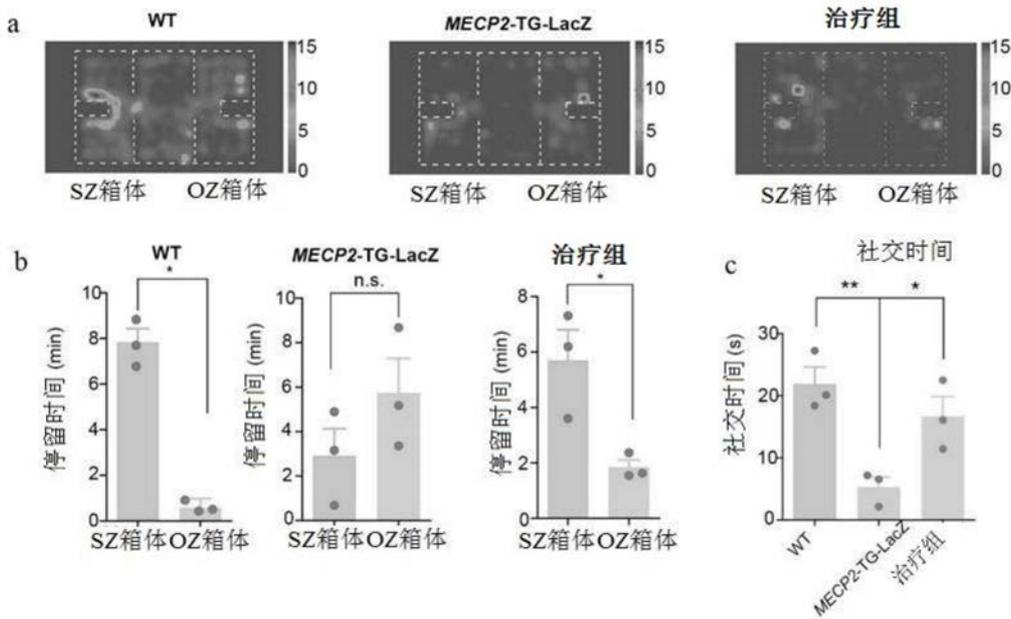


图6

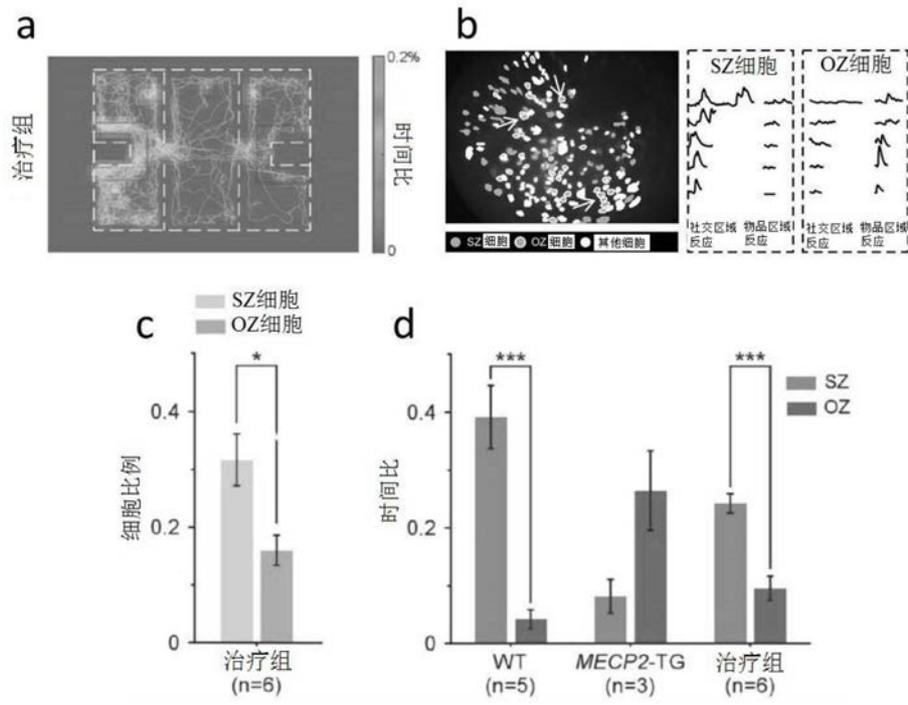


图7

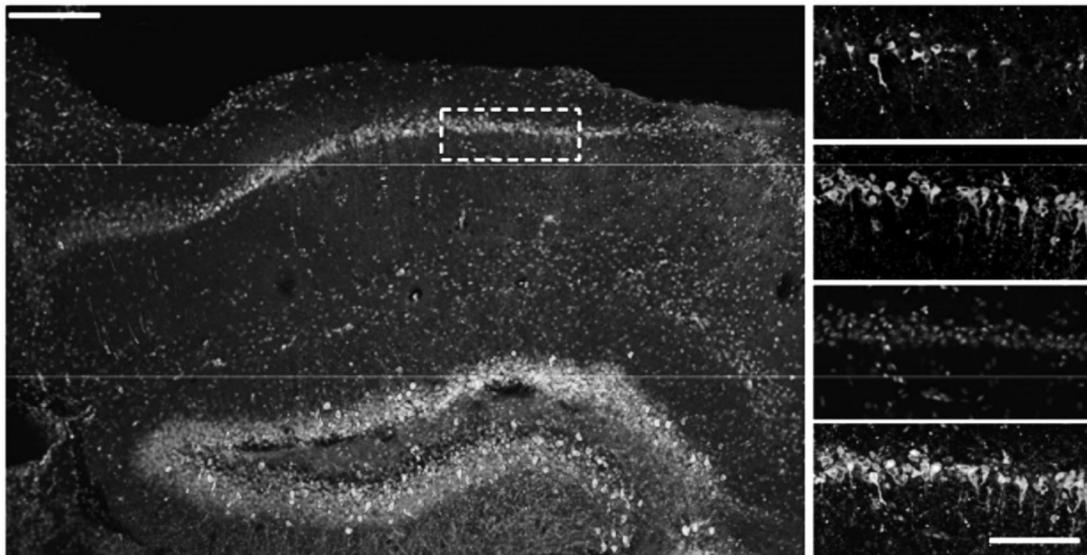


图8

