论文

利用猪单个胚胎建立高效快速的 CRISPR/Cas9 打靶位点检测方法

康难难, 陈红全, 高基民*

温州医科大学检验医学院, 生命科学学院, 温州 325035

* 联系人, E-mail: jimingao64@163.com

收稿日期: 2016-02-01; 接受日期: 2016-02-26

国家自然科学基金(批准号: 81573110)资助

摘要 基因工程猪可作为动物模型研究人类疾病, 也是异种器官移植最合适的供体. CRISPR/Cas9 系统是高效特异的基因编辑工具. 因此本文通过显微注射的方式将 sgRNA 和 Cas9 mRNA 注射入单细胞期的孤雌胚胎中, 待其发育为囊胚后检测打靶效率. T7EN1 酶切和 TA 克隆测序结果表明, 本研究可以在猪的孤雌胚胎中同时实现 3 个基因 (*B2M*, *CIITA*, *GGTA1* 或者 *LDLR*, *LEP*, *LEPR*) 的高效敲除(敲除率分别为 62.5% 和 50%), 为使用 CRISPR/Cas9 系统高效、快速和经济地建立多基因修饰的猪模型提供了基础.

关键词 CRISPR/Cas9, 猪孤雌胚胎, 多基因敲除, 基因修饰, 猪模型

猪(*Sus scrofa domestica*)作为常见的家畜动物不仅具有较高的经济价值, 还因与人类有着类似的生理和解剖学特征, 而被作为多种人类疾病的理想模型, 同时也是潜在的异种器官移植的供体. 基因修饰猪在生物医药方面也具有广泛的应用前景^[1,2]. 目前已经有很多技术手段可以制备基因修饰猪, 如体细胞核移植(somatic cell nuclear transfer, SCNT)、锌指蛋白核酸酶(zinc-finger nucleases, ZFN)和转录激活因子样效应因子核酸酶(transcription activator-like effector nucleases, TALEN), 但是这些技术的局限性在于比较耗时、花费高和效率低等^[3~7].

CRISPR/Cas9(clustered regularly interspaced

short palindromic repeats/CRISPR-associated proteins 9)系统是近年基因编辑的研究热点, 具有省时、花费低廉和编辑效率高等特点. 自 2010 年 Jinek 课题组^[8~11]在 Science 上发表了利用化脓链球菌中的 Type II CRISPR/Cas9 系统可以切割质粒 DNA 的论文之后, CRISPR/Cas9 系统作为一种新型的基因编辑工具迅速风靡全球. 与 ZFN 和 TALEN 需要构建高特异性的 DNA 结合蛋白来精确靶向基因位点不同, Cas9 核酸内切酶只需要提供一个包含特异的 20 nt 的小片段 sgRNA(single guide RNA)来决定靶向特异性. sgRNA 是由 crRNA(CRISPR RNA)与 tracrRNA(trans-activating CRISPR RNA)嵌合构成的一个约 100 个核苷酸

引用格式: 康难难, 陈红全, 高基民. 利用猪单个胚胎建立高效快速的 CRISPR/Cas9 打靶位点检测方法. 中国科学: 生命科学, 2016, 46: 304–313
Kang N N, Chen H Q, Gao J M. Efficient generation of multiple-gene knockout pig parthenogenetic embryos by using CRISPR/Cas9 system and rapid estimation of knockout efficiency by single blastocyst genotyping. Sci Sin Vitae, 2016, 46: 304–313, doi: 10.1360/N052016-00034

大小的 RNA. crRNA 能够与靶向的 DNA 形成 RNA-DNA 复合物, 这段靶向 DNA 序列叫做前间隔序列 (protospacer). crRNA 与 tracrRNA 一起构成的 sgRNA 与 Cas9 相互作用形成核糖核蛋白. sgRNA 的 5'端的约 20 nt(对应的是 crRNA)通过 RNA-DNA 互补配对指引 Cas9 与靶序列结合进而对靶位点进行切割, 造成 DNA 双链断裂(double strand break, DSB). 在细胞中, 核酸酶造成的 DSB 在没有修复模板的情况下, 以非同源末端连接(nonhomologous end-joining, NHEJ)的方式进行修复. NHEJ 能够引起随机长度的碱基插入或缺失(insertion/deletion mutations, indels), 可以破坏编码基因的翻译阅读框架. CRISPR/Cas9 系统已经成功构建了基因修饰动物模型, 包括小鼠 (*Mus musculus*)^[10]、大鼠(*Rattus norvegicus*)^[12]、斑马鱼(*Danio rerio*)^[13]、果蝇(*Drosophila melanogaster*)^[14]、食蟹猴(*Macaca fascicularis*)^[15]以及家畜^[16-18].

一些研究表明, 通过猪受精卵胞质注射 Cas9 mRNA 和 sgRNA 能够有效地构建双等位基因敲除的猪模型^[19-21], 证实了这种方法的可行性. 此前, Zhou 等人^[22]将 Cas9 mRNA 与多个 sgRNA 混合注入小鼠受精卵胞质中, 实现了小鼠进行多基因修饰, 成功构建免疫缺陷小鼠模型. Yang 等人^[23]利用 CRISPR/Cas9 系统实现了猪肾脏上皮细胞基因组中内源性逆转录病毒 62 个位点的同时修饰, 大大降低了异种器官移植的风险, 同时也证明了 CRISPR/Cas9 对于更加复杂的基因编辑具有很大的潜力. 猪妊娠期长、受精卵采集比较困难、花费高等制约了基因工程猪的构建, 贸然注射不经过验证效率的 sgRNA 风险较大, 虽然可以在猪成纤维细胞中检测 sgRNA 的效率, 但是不能反应在体的实际情况. 本研究拟在猪孤雌胚胎中验证应用 CRISPR/Cas9 构建多基因修饰猪模型的可行性. 因此本研究选择了与免疫排斥相关基因 *B2M*($\beta 2$ microglobulin), *CIITA*(class II transactivator), *GGTA1*(α -1,3-galactosyltransferase)(第一组)以及脂代谢相关基因 *LDLR*(low-density lipoprotein receptor), *LEP*(leptin), *LEPR*(Leptin receptor)(第二组), 每个基因分别设计两个 sgRNA, 将每组的 sgRNAs+Cas9 mRNA 通过原核注射的方式分别注入猪孤雌胚胎中, 以实现三基因同时敲除. 待其发育至囊胚后检测打靶效率, 以建立高效快速的 CRISPR/Cas9 打靶位点检测方法, 为构建多基因修饰基因工程猪奠定技术基础.

1 材料与方法

1.1 sgRNA 载体的构建与引物设计

CRISPR/Cas9 针对打靶位点设计 sgRNA 的要求如下: (i) 对于 sgRNA 的长度, 一般应为 20 nt 左右; (ii) 对于 sgRNA 序列的碱基组成, 可选 3'末端含 GG 的 sgRNA, 同时 sgRNA 序列尽量避免以 4 个以上的 T 结尾, GC%含量最佳 40%~60%; (iii) 如果构建 U6 或 T7 启动子驱动 sgRNA 的表达载体, 需考虑 sgRNA 的 5'碱基为 G 或 GG, 以提高其转录效率(所用 sgRNA 表达载体的 T7 启动子后已经含有 GG 序列); (iv) 对于 sgRNA 靶向基因的结合位置, 如果该蛋白具重要结构功能域, 可考虑将基因敲除位点设计在编码该结构域的外显子; 如果不能确定基因产物性质, 可选择将待敲除位点放在靠近基因编码区的 ATG 下游, 最好位于第一或第二外显子; (v) 检查 sgRNA 靶向结合位点基因组序列是否存在 SNPs(single nucleotide polymorphisms). 结合 NCBI (National Center for Biotechnology Information)上猪 *B2M*, *CIITA*, *GGTA1*, *LDLR*, *LEP* 和 *LEPR* 基因组 DNA 序列, 设计了 sgRNA 结合靶点, 并合成两条互补的寡核苷酸链(表 1). 经退火(95°C 5 min; 95°C~85°C, 每秒降低 2°C; 85°C~25°C, 每秒降 0.1°C; 4°C 保持)形成双链后, 与经 *Bsa* I (NEB, R0535, 英国)线性化后的 pUC57-T7-sgRNA(Addgene plasmid, 511329, 美国)载体用 *T4* DNA Ligase(NEB, M0202S)连接. 连接产物转化至大肠杆菌感受态细胞(TransGen, CD201-02, 北京)后挑取单克隆, 经测序后扩大培养提取质粒用于体外转录.

为检测 Cas9-sgRNA 的切割效果, 在 sgRNA 作用位点上下游设计 PCR(polymerase chain reaction)引物. 由于 *B2M*, *CIITA*, *GGTA1* 的两条 sgRNA 间隔 138~225 bp, 所以对每个基因的两个 sgRNAs 靶位点设计一对引物进行 PCR 扩增; 而 *LDLR*, *LEP*, *LEPR* 的两条 sgRNA 至少间隔 2.4 Kbp, 针对每个 sgRNA 靶位点各设计一对引物进行 PCR 扩增, 引物序列见表 3.

1.2 体外转录

体外转录参考 Zhou 等人^[22]的方法, 简述如下: sgRNA 的体外转录: (i) 用 *Dra* I (NEB, R0129S) 线性化构建好的 sgRNA 载体后, 用 PCR 的方式将

表 1 构建 sgRNA 表达载体的寡核苷酸序列

名称	正义链	反义链
B2M-sgRNA1	5'-TAGGTGAGTAAACCTGAACCTTC-3'	5'-AAACGAAGGTTTCAGGTTTACTCA-3'
B2M-sgRNA2	5'-TAGGGACTGGTCTTTCTACCTTC-3'	5'-AAACGAAGGTAGAAAGACCAGTC-3'
CIITA-sgRNA1	5'-TAGGACTGAAAATGTCTTTGCCC-3'	5'-AAACGGGCAAAGACATTTTCAGT-3'
CIITA-sgRNA2	5'-TAGGTGGAGGTGCTGGAGGACTC-3'	5'-AAACGAGTCCTCCAGCACCTCCA-3'
GGTA1-sgRNA1	5'-TAGGATGTCTTGCCACCTCTTCT-3'	5'-AAACAGAAGAGGTGGCAAGACAT-3'
GGTA1-sgRNA2	5'-TAGGCTACAGGCCTGGTGGTACA-3'	5'-AAACTGTACCACCAGGCCTGTAG-3'
LDLR-sgRNA1	5'-TAGGGTTCACGCAGATCTGGCTGC-3'	5'-AAACGCAGCCAGATCTGCGTGAAC-3'
LDLR-sgRNA2	5'-TAGGGGTGTACTCACTACGGTCCA-3'	5'-AAACTGGACCGTAGTGAGTACACC-3'
LEP-sgRNA1	5'-TAGGGGTGACAATCGTCTTGATGA-3'	5'-AAACTCATCAAGACGATTGTCACC-3'
LEP-sgRNA2	5'-TAGGGGATCTGTTGGTAGATCGCC-3'	5'-AAACGGCGATCTACCAACAGATCC-3'
LEPR-sgRNA1	5'-TAGGTGCAAACCTAATGGTGGATC-3'	5'-AAACGATCCACCATTAGGTTTGCA-3'
LEPR-sgRNA12	5'-TAGGGCTTCCCGGTCTTCATATG-3'	5'-AAACCATATGAAGACCCGGGAAGC-3'

表 2 Cas9 mRNA/sgRNAs 显微注射猪孤雌胚胎情况

打靶基因	收集卵巢数量	收集 COCs 数量	成熟卵母细胞数量	应用 Cas9-sgRNA 注射的卵母细胞数		激活 144 h 囊胚发育率	
				注射组	对照组	注射组	对照组
B2M, CIITA, GGTAI	400	850	630	209	250	11% (23/209)	13.6% (34/250)
LDLR, LEP, LEPR	400	968	740	335	250	11.34% (38/335)	13.6% (34/250)

表 3 针对 sgRNA 打靶位点设计的 PCR 引物序列

名称	上游引物	下游引物
B2M sg1+2	5'-ATGGAAGCTCATTTGGCCTGAAG-3'	5'-TGATAATCCCAGGATGCAGATGC-3'
CIITA sg1+2	5'-CCAGGTCTGGACAGTCATGACTG-3'	5'-AAAGCCAGGTCAGAGCAGGCAAG-3'
GGTA1 sg1+2	5'-CCAGAGGTTACATTTACCCCATTC-3'	5'-CATCATGCCACTCGGCTTCTATG-3'
LDLR sg1	5'-CTGAACCCAATGGTCACCGTGTC-3'	5'-AGTCCTTTTCGCTGAAGTGGGTGC-3'
LDLR sg2	5'-GCCTCCTCTGATTCATCCAGACC-3'	5'-TGTTGCTGTGGATCCAGTCCACC-3'
LEP sg1	5'-ACGCCATGTGTGGTTCCCTCTGT-3'	5'-CTGGGCATCAGGATTCCAGTCTG-3'
LEP sg2	5'-GTTCTGGGCCTAGATAGGATGGTG-3'	5'-ACCACCTCCGTGGAGTAGAGGGA-3'
LEPR sg1	5'-GGGAGGCTTCAGATAAGTTTGGG-3'	5'-CTATGAGACTTGGAGGAGGTCTC-3'
LEPR sg2	5'-GAATTCCACTGTGGCCAGCTCAC-3'	5'-AGTCTCTGAGAACAGACTTGCGG-3'

pUC57-sgRNA 表达载体上的 T7 启动子与 sgRNA 序列进行扩增, 将扩增产物作为转录模板. PCR 引物序列为: sgRNA-For: 5'-TCTCGCGCGTTTCGGTGATGACGG-3', sgRNA-Rev: 5'-AAAAAAAGCACCGACTCGGTGCCACTTTTTTC-3'; PCR 反应程序如下: 94℃, 5 min; ((98℃, 10 s; 72~62℃, -1℃/cycle, 15 s; 72℃, 30 s) 10 cycles, (98℃, 10 s; 62℃, 15 s; 72℃, 30 s) 25 cycles); 72℃, 5 min; 4℃保持. 加入 2 μL RNasecure 使 RNases 失活; 用 MinElute PCR 纯化试剂盒回收 PCR 产物; (ii) 应用 MEGAscript™ Kit(Ambion, AM1354, 美国)体外转录 sgRNAs, 之后加入 1 μL TURBO™ Dnase 以消化 DNA 模板, 反应条件: 37℃, 15 min; (iii) 应用 MEGAclear™ Kit

(Ambion, AM1908)纯化 sgRNAs; (iv) 取 200 ng sgRNAs 加入 1%的琼脂糖凝胶进行电泳(180 V, 10 min); (v) 分装 sgRNAs 冻存于-80℃.

Cas9 的体外转录: (i) 用 Age I (NEB, R0552S) 将 Cas9 线性化: Cas9 10 μg+10 μL NEB buffer 1+4 μL Age I, 用水补齐至 100 μL, 37℃孵育 3 h; 加 4 μL RNasecure 60℃孵育 10 min; 1%的琼脂糖凝胶进行电泳检查质粒是否完全消化; 用 MinElute PCR 纯化试剂盒(QIAGEN, 28004, 美国)回收线性化的 Cas9; (ii) 应用 mMESSAGE mMACHINE® T7 Ultra Kit(Ambion, AM1345)体外转录 Cas9; (iii) 应用 RNeasy Mini Kit(QIAGEN, 74104)纯化转录后的 Cas9 mRNA; (iv) 取 200 ng 转录后的 mRNA 加入 1%的琼

脂糖凝胶进行电泳(180 V, 10 min); (v) 分装转录产物并于-80℃保存。

1.3 猪卵母细胞培养与 Cas9/sgRNA 卵母细胞注射

从收集的猪卵巢中获取猪卵丘-卵母细胞复合体(cumulus oocyte complexes, COCs), 显微镜下挑取 A, B 级的 COCs 放入 TCM-199(tissue culture medium-199, 组织培养液)成熟培养基中, 于 5% CO₂, 38.5℃ 的培养箱中培养 38~42 h. 经体外成熟培养后, 将卵母细胞用 0.1 mg/mL 透明质酸酶(hyaluronidase)消化掉包裹在卵母细胞外围的卵丘细胞, 挑取卵周隙明显、卵细胞膜完整、胞质均匀且排出第一极体的成熟卵母细胞^[3,24,25]。

注射前将 20 ng/μL 的 Cas9 mRNA 分别与总量为 30 ng/μL 的 *B2M*, *CHITA*, *GGTA1* sgRNAs 和 30 ng/μL 的 *LDLR*, *LEP*, *LEPR* sgRNAs 混合, 然后利用显微操作系统和微量注射泵(Eppendorf, TransferMan NK 2, 德国)将 RNA 混合物注射到 MII 期卵母细胞胞质中。然后将胚胎于 PZM-3(porcine zygote medium-3, 猪胚胎培养液)培养基中 2 h 后移入激活介质(0.25 mol/L D-山梨醇, 0.05 mmol/L Mg(C₂H₃O₂)₂, 0.1 mg/mL BSA)中以 150 V/mm 脉冲电压, 100 μs/次, 进行电激活^[24]。激活后的胚胎与 COCs 的培养条件相同。注射列表见表 2。

1.4 T7EN1 酶切效应检测和测序

CRISPR/Cas9 在 sgRNA 打靶位点处产生 DSB, 细胞通过 NHEJ 的方式进行修复, 产生随机的碱基插入或缺失。Cas9/sgRNA 在猪孤雌胚胎中发挥切割不一定在单细胞时期, 在单细胞中, 等位基因(allele)的突变形式不可能达到 100%相同, 可能会单个 allele 发生突变而另一个 allele 未受影响。采用 PCR 方法将打靶位点上下游基因扩增出来, 产生基因各种不同突变的 PCR 片段, 经过退火后, 各种不完美互补配对的单链产物随机组合到一起, 形成发夹样或泡状结构。T7 Endonuclease I (NEB, M0302L)能够识别这种结构并将该处双链 DNA 切断, 通过凝胶电泳可检测 Cas9/sgRNA 作用效率。

在显微镜下将单个成熟囊胚连同 0.5 μL 磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline, PBS)转移到 0.2 mL 的 PCR 管底部然后加入 25 μL 的裂解液(100 mmol/L Tris-HCl, 5 mmol/L EDTA, 200 mmol/L NaCl, 0.2%十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS)pH 8.0)与

1 μL 的蛋白酶 K(Sigma, P6556, 美国), 56℃ 孵育 10 min, 95℃ 孵育 5 min 以终止反应, -20℃ 保存。应用 PCR 来扩增目的片段, 以 1 μL 的裂解反应液作为模版, 采用 Prime STAR[®] HS DNA Polymerase (TaKaRa, R010A, 日本)50 μL 体系, 反应条件为: 94℃, 5 min; ((98℃, 10 s; 72~62℃, -1℃/cycle, 15 s; 72℃, 50 s) 10 cycles, (98℃, 10 s; 62℃, 15 s; 72℃, 50 s) 25 cycles); 72℃, 5 min; 4℃ 保持。PCR 引物序列见表 3。琼脂糖凝胶电泳确认扩增产物的特异性后用 PCR 产物纯化试剂盒(AXYGENKIT, AP-PCR-50G, 美国)回收扩增产物。取 400 ng 纯化后的 PCR 产物与 4 μL 的 NEB buffer 2, 用水补齐至 40 μL 后进行退火反应, 反应条件为: 95℃, 5 min, 95℃~85℃, -1℃/cycles, 1 s; 85℃~25℃, -0.1℃/cycles, 1 s; 4℃ 保持。取 20 μL 退火产物, 每个体系加入 0.3 μL 的 T7 Endonuclease I, 37℃ 孵育 15~20 min, 之后 2.5% 琼脂糖凝胶电泳(100 V, 25 min)。

1.5 脱靶效应检测

由于样品限制, 对单个囊胚 3 个 sgRNAs 潜在的脱靶位点(off target site)进行分析。结合对猪全基因组序列进行分析, 潜在的脱靶位点通过公开的网站工具——OFFinder^[27]筛选出来。这些潜在脱靶位点与靶位点有 2~4 个碱基的错配。将脱靶位点上下游序列通过 PCR 进行扩增, 产物经退火后进行 T7EN1 酶切实验。潜在脱靶位点、序列信息及 PCR 引物见表 4。

2 结果

2.1 sgRNA 设计选择与打靶载体的构建

根据之前文献报道的 sgRNA 设计方法^[8,28-30], 针对每个基因各设计两条 sgRNA, 其中参与组成 MHC-I 类分子(major histocompatibility complex class I molecule, MHC-I 类分子)的 *B2M* 的两条 sgRNA 间隔 138 个碱基, 参与组成 MHC-II 类分子的 *CHITA* 的两条 sgRNA 被 225 个碱基相隔, *GGTA1* 的两条 sgRNA 被 142 个碱基相隔; 而针对参与脂代谢的基因 *LDLR*, *LEP*, *LEPR* 设计的 sgRNA 中间各相隔约 2.6, 2.4 和 2.7 Kbp(图 1A)。根据 pUC57-sgRNA 表达载体经 *Bsa*I 线性化后形成黏性末端, 合成与其互补的寡核苷酸链(表 2), 经退火后连入 sgRNA 表达载体(图 1B), 经测序后检验正确。

表 4 靶位点相应脱靶位点及脱靶位点扩增引物^{a)}

名称	打靶位点	脱靶位点	脱靶位点处 PCR 引物	
			上游	下游
<i>B2M</i> sgRNA2	GACTGGTCTTTCTACC TTCTGG	cAgTGGTCTTTCTA CTTCAGG	CATGGTTCCTAGTCGGATT CGCTAA	CGCTGTGGCTCAGTGGGTTAAG
		GACTGGTCTTTCT TgCcTCGGG	AAGGCAAGATGGACAGCAGAGTG	AGGAGGCATGAGTGC GGAGAA
		GACTGGTCTTT CatCCTTAAGG	ACCATGTGTGGGAGTTCTCTACGA	ATCCGAGCCGAGTCTGTAACCTAC
		GAgTtGTCTTTCTA ACTTCTGG	TTGTTTGTCTTGA TGTACACCTCA	CACATACTTGCCATAGCTTCTCAG
		cAgTGGTCTTTCTA CtTCTGG	GCAGGAACCAGACTTGAGCCATT	CTACTCTATGCCAAGTGCCATGTGT
<i>CIITA</i> sgRNA1	TGAGTAAACCTGAAC TTCAGG	ACTGAAATGTtTTTa CCtTGG	GAAGTGGTGGTCTGCTCTGATC	AGCGAAGAGATTAGCCTTGTGTGT
		gCTGAAAaGTCTTTGCC CCCGG	ACCCATCTTTGCTGGAGGAATACC	CTAAATTGCCTTTGGTCAGGTTGGT
		ACTGA cAATGTtTTtCCCAAGG	CGCCAATTTACATTTCCCAACAG	GGAGCCGAGAATACACTGGAGA
		gCTGAAAcTg cCTTTGCCAAGG	CCCAATCCTTTAGCCAATTTATCC	GCACACATGGAGATGATAAGTAAGC
		ACTGAAAgTCTTTG CtTGG	GTGTCCGATCCAGTGTGGAGTTG	CGGGTGAGTTGTGAATGTGAGTCT
<i>GGTA1</i> sgRNA2	CTACAGGCCTGGTGGT ACAAGG	agACAGGCCaGGTGGTACA AAGG	CATCTGGTCATCAGGCTCTGTTGG	AGGTGTCTTCCATGTCTTGGCTATT
		CcACAGGCCTGGaGGT gCAGGG	CTCCTTGACCTCTCTCCAACCA	GCAGGCAGACAGGACACTCAGA
		CtTCAaGCCaGGTGGTAC ACGG	AGTCAAGGAAAGGAAAGCCAGGG	CAGCGAGTTAGGAGTCCAGCATAG
		CTACtGGCCTGGTGGT tAAGG	AGGAGTTGCGATACAGAGCGAAT	TTTATTGGCTCCCACTCAACCCCTAT
		CcAaAGGCCTGGaGGTACA AAGG	AGGTTCTGGCGGAACA ACTGATG	AGCGTGGGAGAGGACAAGGAA
<i>LEP</i> sgRNA2	GGATCTGTGGTAGAT CGCC	GcgTCTGTGTgTAGAT CcCGGG	TGAGGCTCTCGGAACACTGCTT	CCCTTGTGGCTCTGTGGTAATGC
		GaATCTGTgGGTgGATgGCC GGG	CCGCCTGGACCGTTCTTCTTATG	CAGCCTCTGCTCATAGTTCTCTCAG
		GGATCgGTaGGTAGATga CCAGG	AACAGAGCCCGAGCCTGGAAA	GGAAGCAAGGACACCGCATTAGAA
		GGATCTGTgGGgAGAgAGC CTGG	TGTTGCTCAGTCAGGTCAAGTTCAT	AGGAGTTGGGAATGTTGGAGGAATG
		GtCTCTGTGGTAGt TCcCAGG	AACTCTAGGACCTTGGCTGAAGACA	TGCTTTATGTTGACCCACGAGTAGG
<i>LDLR</i> sgRNA1	GTTACGCGAGATCTGG CTGCAGG	GTTCAgGCAGgT CTGTGCAGG	CCTCTTGTGGGCTTGGACTTCTT	CCGACCTGGTGAACGAGATTGAG
		cTtAgGCAGATCTGGCT GTGG	GATACAAGAAAGGACCCACCCAAG	GCAATCTCAAGTCTGGCTGGAAGTA
		GTTCAg cgAGATCTGGCTGCAGG	TGCTTTGTCACTGCGAAGTCTCC	GGAATGCCTCATCCACTCACTTGTT
		GTTCAg cgAGATCTGGCTGCAGG	TGCTTTGTCACTGCGAAGTCTCC	GGAATGCCTCATCCACTCACTTGTT
		GgTCA CGCAGATgTGGtGTCTGG	ACACCACAGCTCATGGCAACAC	GGCAAAGCACATTCAGAAACGAAG
<i>LEPR</i> sgRNA2	GCTTCCCGGGTCTTCA TATGAGG	GCTgCCC GGTCTTgCtTtTGAAGG	GAGACTGTGGGTTACTGCTGAGG	TCTCTGTGGCTGGCTGGTCA
		GCcTCCCGGGTCT tATATaAGG	ACTTGCTTTATTGTGGTGGTCTGGA	GATGTACCTCTGGTCCCAATGTCTG
		aCTTtCaGGGTCTT CAtTGAGG	CCTACAGCACAGCGACAGCAAT	AGAGGATGGCGAGTGGAAAGACA
		GCTcCCaGGGcCTT CAtTGAGG	TCAGTTGTCCAAACCTAAACCCCTT	GTCCAGTCTATGCTCTTTCTCTCT
		GCTcCCC GGTgTTCATgTGGG	CTGCCGTCTTCATGTGTCTTCTCAA	CACAACATCTGTAGTCTGGTAA

a) PAM(protospacer adjacent motif)序列用粗体表示, 错配碱基用小写字母表示

2.2 通过单个囊胚基因型鉴定快速获得多基因敲除猪囊胚

Cas9/sgRNA 已成功对多个物种进行基因编辑^[18,31,32], 但是还没有在猪中同时敲除多个基因. 为了验证其可行性, 按之前文献报道的方式^[33]将外转录生成 Cas9 mRNA 和 sgRNA. 混合后注射到猪 MII 期卵母细胞中. 在卵母细胞孤雌激活, 待卵母细胞发育到囊胚阶段后, 收集胚胎进行检测. 注射 Cas9 mRNA+sgRNA 后卵母细胞发育成囊胚的比率(Cas9 mRNA+B2M, *CIITA*, *GGTA1* sgRNAs, 11.00%; Cas9 mRNA+*LDLR*, *LEP*, *LEPR* sgRNAs, 11.34%)同未注射 Cas9 mRNA+sgRNA 的卵母细胞发育成囊胚的比率(13.6%)相比基本一致(表 4), 表明 Cas9 mRNA+sgRNAs 对猪胚胎没有毒性^[15,18]. 随后任意各选取 8

枚胚胎进行基因型鉴定与分析.

通过 PCR 扩增出包含打靶位点的基因组片段, 回收纯化的 PCR 产物经退火, 再进行 T7EN1 酶切检测, 结果如图 2A. 值得注意的是, 胚胎 I 12, 15, 17 的 PCR 条带能够明显地看到 3~4 个条带存在, 可能是因为在发育到囊胚的过程中, CRISPR/Cas9 在胚胎多个细胞的基因组中产生 DSB, 在 NHEJ 修复过程中随机插入或缺失较大 DNA 片段, 在凝胶电泳中即显现出差异, 随后的 T7EN1 及测序证实了这一点. 从图中可以看到 I 11, 12, 13, 14, 15, 17; II 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8 号胚胎经 T7EN1 酶切检测到突变的发生, 同时敲除 *B2M*, *CIITA*, *GGTA1* 样品为 I 12, 13, 14, 15, 17, 比例为 62.5%; 而同时敲除 *LDLR*, *LEP*, *LEPR* 样品为 II 1, 3, 4, 5, 比例为 50%(表 5). 选取 3 个基因同

图1 靶位点分布以及 pUC57-sgRNA 表达载体示意图

A: *B2M*, *CIITA*, *GGTA1* 和 *LDLR*, *LEP*, *LEPR* 的部分蛋白编码区与 Cas9/sgRNAs 的靶位点区域示意图。灰色框表示外显子, 黑色粗线表示内含子; PAM(protospacer adjacent motif)序列用下划线强调显示; sgRNA 靶位点序列用黑色粗斜体显示; 扩增引物的位置用箭头表示; B: pUC57-sgRNA 表达载体示意图, 其是通过合成 sgRNA 骨架序列, 插入 pUC57 载体得到; 载体含有 T7 启动子, 用于体外转录 sgRNA; T7 启动子后预留两个 *Bsa* I 酶切位点用于克隆; *Bsa* I 识别序列用黑色粗体显示, 箭头为 *Bsa* I 酶切的具体位置; 退火后的双链寡核苷酸可以插入 *Bsa* I 位点中

时发生突变的样品 I 12, 15 与 II 3, 4 进行 T-A 克隆测序, 结果如图 2B, 测序结果显示突变片段大小从 -181 bp~+211 bp 不等, 和 T7EN1 酶切检测结果的一致。

2.3 脱靶效应分析

选取 I -12(*B2M*-sgRNA2, *CIITA*-sgRNA1, *GGTA1*-sgRNA2)和 II -3(*LEP*-sgRNA2, *LDLR*-sgRNA1, *LEPR*-sgRNA2)号囊胚, 利用 Cas-OFFinder^[27]对每个 sgRNA

筛选出 5 个潜在的脱靶位点进行检测(表 3)。针对脱靶位点设计引物扩增目的片段后将目的片段进行 T7EN1 酶切检测, 结果如图 3。与对照相比, 潜在的脱靶位点并没有明显的切割条带(*B2M* sg2 OT1, 5, *CIITA* sg1 OT5, *GGTA1* sg2 OT1, *LEP* sg2 OT 1, 2, 3 以及 *LEPR* sg2 OT 3 跟各自的对照有明显完全相同的切割条带是因为这些位点附近存在单核苷酸多态性或是在 DNA 聚合酶扩增 DNA 片段时, 遇到重复序列将突变引入到 PCR 片段)。

图2 CRISPR/Cas9 介导的单个囊胚多基因修饰情况

A: 验证 sgRNA-Cas9 介导的多基因修饰的效率。左图为 PCR 扩增免疫排斥相关基因(*B2M*, *CIITA* 和 *GGTA1*)与脂代谢相关基因(*LDLR*, *LEP* 和 *LEPR*)的靶位点片段。I 12 号囊胚的 *B2M*, *CIITA* 和 *GGTA1* 靶位点出现大片段的插入和缺失; I 13, 14, 15 号囊胚的 *GGTA1* 靶位点出现大片段的缺失; I 17 号囊胚的 *B2M* 和 *GGTA1* 靶位点出现较大片段的插入与缺失。右图为通过 T7EN1 酶切实验检测 sgRNA-Cas9 介导的免疫相关基因(*B2M*, *CIITA* 和 *GGTA1*)与脂代谢相关基因(*LDLR*, *LEP* 和 *LEPR*)靶位点切割情况。左图的 PCR 产物进行 T7EN1 酶切实验的详细过程详见材料与方法。M: Marker DL2000 (TaKaRa); I 11~18, II 1~8 为显微注射的囊胚编号; con: 对照; B: I 12, 15 号囊胚 *B2M*, *CIITA* 和 *GGTA1* 基因靶位点修饰后的 TA 克隆序列情况; II 3, 4 号囊胚 *LDLR*, *LEP* 和 *LEPR* 基因靶位点修饰后的 TA 克隆序列情况。I 12 号囊胚的 *B2M*, *CIITA* 测序结果未见大片段插入, 与测序样品较少有关。PAM 序列用下划线强调显示; sgRNA 靶位点序列用黑色粗斜体显示; 突变区域用“+”和小写字母表示; 插入突变用(+)表示, 缺失突变用(-)表示

图3 多基因修饰单囊胚脱靶效应分析

利用 T7EN1 酶切实验检测潜在脱靶位点是否发生突变. 共选 5 个靶位点, 每个靶位点 5 个脱靶位点共 30 个脱靶位点, PCR 扩增后进行 T7EN1 酶切实验. OT: 脱靶位点(off-target)

3 讨论

$\beta 2$ 微球蛋白($\beta 2$ microglobulin, B2M)是由淋巴细胞、血小板、多形核白细胞产生的一种小分子球蛋白, 并且是 MHC- I 类分子的 β 链(轻链)部分(为一条单链多肽)^[34]. MHC- II 基因反式作用因子(class II transactivator, CIITA)在研究裸淋巴细胞综合征时被分离, 发现其通过影响 MHC- II 的转录水平, 进而控制 T 细胞在免疫应答中的强度, 被认为是 MHC- II 基因表达最关键的调控分子^[35]. α -1,3-半乳糖基转移酶(α -1,3-galactosyltransferase, GGTA1)形成的半乳糖- α 1,3-半乳糖(α 乳糖-半)表位能与相应的抗体结合, 引发抗原抗体反应. 由于人的 *GGTA1* 碱基突变而失活, 变为假基因, 并且人体内存在 α -Gal 抗体, 所以在猪到人异种移植中会引起超急性移植排斥反应^[36,37]. 敲除猪的 *B2M*, *CIITA* 基因能够使 MHC- I 类与 II 类分子活性消失, 从而消除 T 细胞在免疫应答中的作用; 敲除猪的 *GGTA1* 基因能够避免异种移植引起的超急性排斥反应.

低密度脂蛋白受体(low-density lipoprotein receptor, LDLR)是一种多功能细胞表面蛋白, 作为一

种内吞性受体, 能够与多种配体相互作用, 可以对血脂的动态平衡及纤溶功能的稳定进行调节其与动脉粥样硬化发生发展的多个环节密切相关^[38,39]. 瘦素(leptin, LEP)是由肥胖基因编码的蛋白质, 主要由白色脂肪组织合成和分泌, 具有调节体内脂肪储存量和维持能量平衡的作用, 可直接作用于脂肪细胞抑制脂肪的合成, 促进分解, 避免肥胖发生. 瘦素受体(leptin receptor, LEPR)是 leptin 的主要受体, 在下丘脑的核团上高度表达, 而这些核团具有调节摄食与体重的功能. 敲除 *LDLR*, *LRP*, *LEPR* 基因可以得到脂代谢紊乱的猪疾病模型.

本研究利用 CRISPR/Cas9 在猪孤雌胚胎中实现 3 个基因(*B2M*, *CIITA*, *GGTA1* 或者 *LDLR*, *LEP*, *LEPR*)同时高效敲除, 对以后得到异种器官移植供体猪或者构建代谢障碍猪疾病动物模型提供了一定的基础, 同时整个流程需要大概 4~6 周的时间, 相比传统基因修饰方法节省更多的时间与精力. 本研究方法成功利用猪单个胚胎建立了高效快速的 CRISPR/Cas9 打靶位点检测方法, 为系统、高效地改造猪基因组提供了新的思路 and 方向.

致谢

第三军医大学魏泓实验室给予了显微注射支持; 南京大学模式动物研究所的杜忆南博士对本课题提供了宝贵意见; 南京医科大学张军教授、榆林学院于鸿皓对本文的编辑、讨论及建议提供了帮助, 在此一并致谢.

参考文献

- 1 Fahrenkrug S C, Blake A, Carlson D F, et al. Precision genetics for complex objectives in animal agriculture. *J Anim Sci*, 2010, 88: 2530–2539
- 2 Tan W S, Carlson D F, Walton M W, et al. Precision editing of large animal genomes. *Adv Genet*, 2012, 80: 37–97
- 3 Lai L, Kolber-Simonds D, Park K W, et al. Production of alpha-1,3-galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning. *Science*, 2002, 295: 1089–1092
- 4 Carter D B, Lai L, Park K W, et al. Phenotyping of transgenic cloned piglets. *Cloning Stem Cells*, 2002, 4: 131–145
- 5 Bogdanove A J, Voytas D F. TAL effectors: customizable proteins for DNA targeting. *Science*, 2011, 333: 1843–1846
- 6 Carroll D, Beumer K J, Morton J J, et al. Gene targeting in *Drosophila* and *Caenorhabditis elegans* with zinc-finger nucleases. *Methods Mol Biol*, 2008, 435: 63–77
- 7 Urnov F D, Rebar E J, Holmes M C, et al. Genome editing with engineered zinc finger nucleases. *Nat Rev Genet*, 2010, 11: 636–646
- 8 Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 2012, 337: 816–821
- 9 Jinek M, East A, Cheng A, et al. RNA-programmed genome editing in human cells. *Elife*, 2013, 2: e00471
- 10 Haurwitz R E, Jinek M, Wiedenheft B, et al. Sequence- and structure-specific RNA processing by a CRISPR endonuclease. *Science*, 2010, 329: 1355–1358
- 11 Sashital D G, Jinek M, Doudna J A. An RNA-induced conformational change required for CRISPR RNA cleavage by the endoribonuclease Cse3. *Nat Struct Mol Biol*, 2011, 18: 680–687
- 12 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: 684–686
- 13 Jao L E, Wente S R, Chen W. Efficient multiplex biallelic zebrafish genome editing using a CRISPR nuclease system. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110: 13904–13909
- 14 Yu Z, Ren M, Wang Z, et al. Highly efficient genome modifications mediated by CRISPR/Cas9 in *Drosophila*. *Genetics*, 2013, 195: 289–291
- 15 Niu Y, Shen B, Cui Y, et al. Generation of gene-modified cynomolgus monkey via Cas9/RNA-mediated gene targeting in one-cell embryos. *Cell*, 2014, 156: 836–843
- 16 Hai T, Teng F, Guo R, et al. One-step generation of knockout pigs by zygote injection of CRISPR/Cas system. *Cell Res*, 2014, 24: 372–375
- 17 Ni W, Qiao J, Hu S, et al. Efficient gene knockout in goats using CRISPR/Cas9 system. *PLoS One*, 2014, 9: e106718
- 18 Wang Y, Du Y, Shen B, et al. Efficient generation of gene-modified pigs via injection of zygote with Cas9/sgRNA. *Sci Rep*, 2015, 5: 8256
- 19 Corat M A F, Metais J Y, Dunbar C E. Progress towards creation of a rhesus macaque animal model for PNH disease via CRISPR/Cas9 technology to knock out the PIG-a gene. *Blood*, 2014, 124: 4389
- 20 Su Y H, Lin T Y, Huang C L, et al. Construction of a CRISPR-Cas9 system for pig genome targeting. *Anim Biotechnol*, 2015, 26: 279–288
- 21 Wu J Q, Mei G, Liu Z G, et al. Improving gene targeting efficiency on pig IGF2 mediated by ZFNs and CRISPR/Cas9 by using SSA reporter system. *Yi Chuan*, 2015, 37: 55–62
- 22 Zhou J, Shen B, Zhang W, et al. One-step generation of different immunodeficient mice with multiple gene modifications by CRISPR/Cas9 mediated genome engineering. *Int J Biochem Cell Biol*, 2014, 46: 49–55
- 23 Yang L, Guell M, Niu D, et al. Genome-wide inactivation of porcine endogenous retroviruses (PERVs). *Science*, 2015, 350: 1101–1104
- 24 Bethhauser J, Forsberg E, Augenstein M, et al. Production of cloned pigs from *in vitro* systems. *Nat Biotechnol*, 2000, 18: 1055–1059
- 25 Wang Y, Zhou X Y, Xiang P Y, et al. The meganuclease I-SceI containing nuclear localization signal (NLS-I-SceI) efficiently mediated mammalian germline transgenesis via embryo cytoplasmic microinjection. *PLoS One*, 2014, 9: e108347
- 26 Bae S, Park J, Kim J S. Cas-OFFinder: a fast and versatile algorithm that searches for potential off-target sites of Cas9 RNA-guided endonucleases. *Bioinformatics*, 2014, 30: 1473–1475
- 27 Sapranas R, Gasiunas G, Fremaux C, et al. The *Streptococcus thermophilus* CRISPR/Cas system provides immunity in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39: 9275–9282
- 28 Gasiunas G, Barrangou R, Horvath P, et al. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109: E2579–E2586

- 29 Shen B, Zhang W, Zhang J, et al. Efficient genome modification by CRISPR-Cas9 nickase with minimal off-target effects. *Nat Methods*, 2014, 11: 399–402
- 30 Reyes L M, Estrada J L, Wang Z Y, et al. Creating class I MHC-null pigs using guide RNA and the Cas9 endonuclease. *J Immunol*, 2014, 193: 5751–5757
- 31 Sander J D, Joung J K. CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. *Nat Biotechnol*, 2014, 32: 347–355
- 32 Shen B, Zhang J, Wu H, et al. Generation of gene-modified mice via Cas9/RNA-mediated gene targeting. *Cell Res*, 2013, 23: 720–723
- 33 Gussow D, Rein R, Ginjaar I, et al. The human beta 2-microglobulin gene. Primary structure and definition of the transcriptional unit. *J Immunol*, 1987, 139: 3132–3138
- 34 Devaiah B N, Singer D S. CIITA and its dual roles in MHC gene transcription. *Front Immunol*, 2013, 4: 476
- 35 Estrada J L, Martens G, Li P, et al. Evaluation of human and non-human primate antibody binding to pig cells lacking GGTA1/CMAH/beta4GalNT2 genes. *Xenotransplantation*, 2015, 22: 194–202
- 36 Wang Z Y, Burlak C, Estrada J L, et al. Erythrocytes from GGTA1/CMAH knockout pigs: implications for xenotransfusion and testing in non-human primates. *Xenotransplantation*, 2014, 21: 376–384
- 37 Ding R, He Z Q, Zhu L, et al. Oxidized high-density lipoprotein accelerates atherosclerosis progression by inducing the imbalance between treg and teff in LDLR knockout mice. *APMIS*, 2015, 123: 410–421
- 38 Minicocci I, Prisco C, Montali A, et al. Contribution of mutations in low density lipoprotein receptor (LDLR) and lipoprotein lipase (LPL) genes to familial combined hyperlipidemia (FCHL): a reappraisal by using a resequencing approach. *Atherosclerosis*, 2015, 242: 618–624

Efficient generation of multiple-gene knockout pig parthenogenetic embryos by using CRISPR/Cas9 system and rapid estimation of knockout efficiency by single blastocyst genotyping

KANG NanNan, CHEN HongQuan & GAO JiMin

School of Laboratory Medicine and Life Science, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325035, China

Genetically engineered pigs can be used as human disease models and organ donors for xenotransplantation. The CRISPR-Cas9 system, with customizable specificities, has been developed as a highly efficient genome editing tool. In this study, we took advantage of the microinjection system and injected Cas9 mRNA and sgRNAs into parthenogenetic embryos cytoplasmically, collected each individual embryo, and evaluated the cutting efficiency of CRISPR/Cas9 when the embryo developed to blastocyst. The results of the T7EN1 assay and TA clone sequencing demonstrated that CRISPR/Cas9-mediated gene editing achieved simultaneous disruption of three genes (*B2M*, *CIITA* and *GGTA1*; *LDLR*, *LEP* and *LEPR*) in a single pig parthenogenetic embryo by micro-injection with high efficiency (62.5%; 50% each). These results suggest that the CRISPR/Cas9 system can generate pig models with multiple gene modifications in an efficient, rapid, and low-cost manner.

CRISPR/Cas9, pig parthenogenetic embryos, multiple genes knockout, gene modification, porcine model

doi: 10.1360/N052016-00034