

霍梦飞, 孟繁明, 王塑天, 等. 靶向切割猪 Y 染色体的 CRISPR/Cas9 载体构建及功能验证 [J]. 华南农业大学学报, 2023, 44(2): 187-196.
HUO Mengfei, MENG Fanming, WANG Sutan, et al. Construction and functional validation of CRISPR/Cas9 vector targeting pig Y chromosome cutting[J].
Journal of South China Agricultural University, 2023, 44(2): 187-196.

靶向切割猪 Y 染色体的 CRISPR/Cas9 载体构建及功能验证

霍梦飞^{1,2†}, 孟繁明^{2†}, 王塑天², 李 颖^{1,2}, 杨化强¹

(1 国家生猪种业工程技术研究中心/华南农业大学 动物科学学院, 广东 广州 510642; 2 广东省农业科学院
动物科学研究所/畜禽育种国家重点实验室/广东省畜禽育种与营养研究重点实验室, 广东 广州 510640)

摘要:【目的】通过 CRISPR/Cas9 系统对 Y 染色体多位点切割, 实现目标染色体的敲除, 为畜禽性别控制提供新的手段。【方法】以 CRISPR/Cas9 技术为基础, 寻找 Y 染色体上能被 sgRNA 特异性识别的多拷贝重复序列, 并通过体外切割、定量分析、核型鉴定验证其对靶点的有效性。【结果】所设计的 sgRNA 能够在体外实现对靶片段的明显切割, 且切割效率均达到了 50% 以上。基因的定量分析结果证明了其在细胞水平切割的有效性, 且簇状重复序列切割效果明显优于散在重复序列; 核型鉴定结果证实了细胞水平猪 Y 染色体的丢失。【结论】研究结果为后续构建染色体敲除猪, 实现猪的性别控制奠定了基础。

关键词: 猪; CRISPR/Cas9; Y 染色体; 性别控制; 基因编辑

中图分类号: S813.3

文献标志码: A

文章编号: 1001-411X(2023)02-0187-10

Construction and functional validation of CRISPR/Cas9 vector targeting pig Y chromosome cutting

HUO Mengfei^{1,2†}, MENG Fanming^{2†}, WANG Sutan², LI Hao^{1,2}, YANG Huaqiang¹

(1 National Engineering Research Center for Breeding Swine Industry/College of Animal Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China; 2 Institute of Animal Sciences, Guangdong Academy of Agricultural Sciences/
State Key Laboratory of Livestock and Poultry Breeding/Guangdong Key Laboratory of Livestock
and Poultry Breeding and Nutrition, Guangzhou 510640, China)

Abstract: 【Objective】To knock out the target chromosome by CRISPR/Cas9 system to cut multiple sites of Y chromosome, and provide a new method for sex control of livestock and poultry. 【Method】Based on CRISPR/Cas9 technology, we searched for multiple copies of repeat sequences on Y chromosome that can be specifically recognized by sgRNA, and verified their effectiveness on target by in vitro cleavage, quantitative analysis and karyotype identification. 【Result】The designed sgRNA could cut the target fragment obviously in vitro, and the cutting efficiency was more than 50%. The results of quantitative analysis of genes further proved the effectiveness of gene cutting at the cell level, and the cutting effect of clustered repeats was significantly better than that of scattered repeats. Karyotype identification also confirmed the loss of pig Y

收稿日期: 2022-01-15 网络首发时间: 2023-01-02 16:52:14

首发网址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/44.1110.S.20221230.1115.002.html>

作者简介: 霍梦飞, 硕士研究生, 主要从事动物遗传育种与繁殖研究, E-mail: 1249492666@qq.com; 孟繁明, 博士, 主要从事猪育种研究, E-mail: 130288199@qq.com; †表示同等贡献; 通信作者: 杨化强, 副研究员, 博士, 主要从事动物遗传育种与繁殖研究, E-mail: yangh@scau.edu.cn

基金项目: 广东省基础与应用基础研究基金 (2019B1515210030); 广东省科技计划重点领域研发计划 (2018B020203002)

chromosome at the cellular level. 【Conclusion】 The research results lay a foundation for the subsequent construction of chromosome knockout pigs and the realization of sex control in pigs.

Key words: Pig; CRISPR/Cas9; Y chromosome; Sex control; Gene editing

染色体作为生物遗传物质的载体,对当前生命遗传研究开展尤为重要。染色体消除技术 (Chromosome elimination technology) 近年来随着基因编辑技术的发展不断进步,在动物模型构建、家畜育种改良中的性别控制、特定染色体的功能研究以及人类非整倍体疾病治疗等领域具有重要的应用价值。目前通过该技术已成功在人、小鼠、斑马鱼等物种上实现了特定染色体的消除^[1-3],然而打靶效率低、非靶点的额外失活及操作过程的繁琐性大大制约了该技术的发展^[3-5]。但随着新一代 CRISPR/Cas9 技术的出现,灵活的靶点选择、较高的编辑效率以及对于靶点多重切割的可能性使该技术的有效运用成为可能。

目前,研究者们已通过锌指核酸酶 (Zinc finger nuclease, ZFN) 技术、Cre/loxP 系统、TKNEO 基因敲入等多种方法实现了目标染色体的敲除^[5-7]。ZFN 技术通过人工改造的核酸内切酶 (锌指蛋白单元) 与特定的 DNA 序列结合赋予其精确的打靶功能^[8],但其脱靶效应、毒性及锌指结构的低适用性造成其基因操作效率低下^[9]; Cre/loxP 系统主要由 Cre 重组酶与 2 个 loxP 位点组成,由于 loxP 的位点不同会产生 DNA 链的插入、删除、易位等不同重组方式^[10],但该系统的使用需要引入特定表达元件且本身会对细胞产生毒性^[4, 11]; TKNEO 是胸苷激酶 (Thymidine kinase, TK) 和新霉素抗性 (Neomycin resistance, NEO) 的融合编码基因,利用传统基因打靶技术敲入目标染色体进行药筛可产生自发性染色体缺失^[3],但其操作的繁琐性和不确定性使其并不具有广泛的适用性。

CRISPR/Cas9 技术近年来已经成为了基因编辑的主要手段,其由大肠埃希菌 II 型 CRISPR/Cas 系统改造而来,由于其引导 RNA (Small guide RNA, sgRNA) 序列的灵活性而能对多个位点进行灵活编辑,从而实现基因的定点敲入、敲除或其他多种修饰^[12-16]。该系统主要由 2 个部分组成, Cas9 蛋白和 sgRNA, 其中后者负责识别目标靶序列,前者依靠其自身含有的 2 个切割域完成对目标序列的切割,之后依靠细胞本身的 2 种修复机制 (同源重组修复和非同源末端连接) 实现目标序列的精确编辑^[17-21]。最新研究表明, CRISPR/Cas9 系统可通过产生多重 DNA 双链断裂 (Double-strand breakage,

DSB) 引起 Y 染色体降解^[22-23],对这种方法,虽然部分细胞会因自身修复机制保持基因组的稳定性,但是仍有相当的几率可产生特定染色体消除的细胞,通过筛选出此种染色体消除的细胞系作为供体应用于动物克隆,可制备出特定染色体消除的动物,因此达到控制动物本身及其后代的性别进行偏移的目的。

本研究拟通过 CRISPR/Cas9 技术,在猪 Y 染色体内寻找能够被特异 sgRNA 识别的重复序列,进行多位点切割以实现目标染色体的降解。本研究旨在为特定染色体及其携带基因功能的研究提供一种新的工具,同时也为实现大型家畜性别控制提供一种新的技术方案。

1 材料与方法

1.1 材料

本试验所用的 CRISPR/Cas9 载体 HP180_px330_GFP 及猪胎儿成纤维细胞 (Porcine embryonic fibroblast, PEF) 由国家生猪种业工程技术研究中心保存。设计的 sgRNA 及相关引物由华大基因合成。质粒与基因组 DNA 抽提试剂盒、限制性内切酶 BpiI、gRNA 体外转录试剂盒 GeneArt™ Precision gRNA Synthesis Kit、荧光定量试剂盒 PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix 购自赛默飞公司; T4 DNA 连接酶购自 TaKaRa 公司; Cas9 内切酶购自 NEB 公司; 感受态细胞 Trans5α、6×DNA Loading buffer、RNA loading buffer 购自全式金生物。高糖 DMEM 培养液、胰酶、胎牛血清均购自 Gibco 公司。

1.2 方法

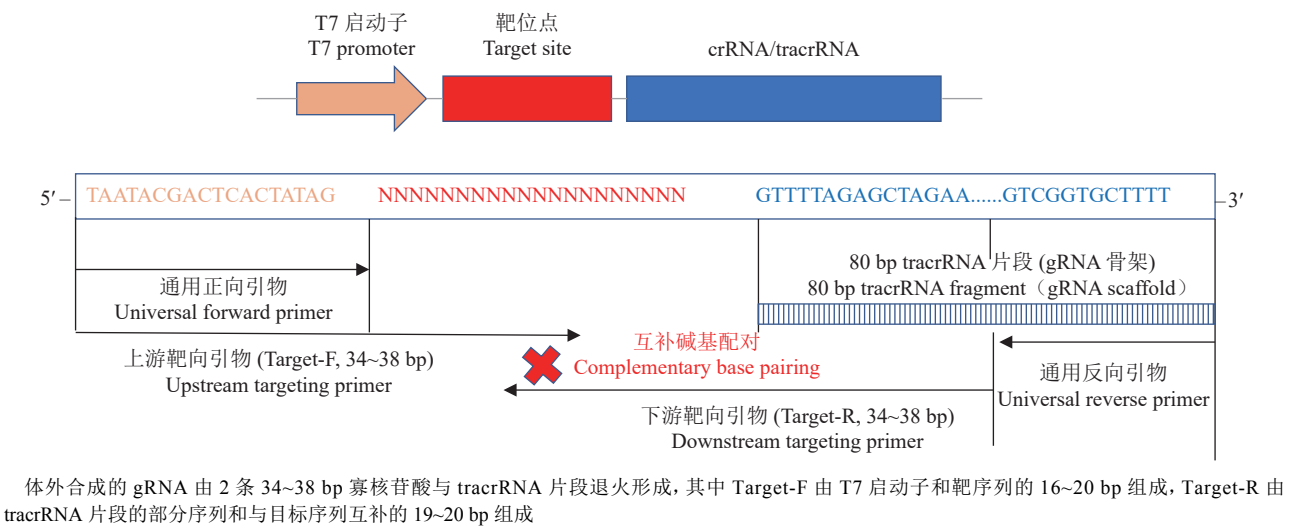
1.2.1 寻找 Y 染色体特异靶向重复序列及 sgRNA 设计 在 Ensembl 获取整个 Y 染色体注释文件,在 Linux 下用 awk 命令提取注释文件中的所有基因,并在 Ensembl 上将每个基因与全基因组序列进行逐一比对,最终筛选出符合条件的多拷贝基因。

利用在线网站 CCTop - CRISPR/Cas9 target online predictor(<https://cctop.cos.uni-heidelberg.de/>)对所选择靶基因进行 sgRNA 设计,确定最终序列与位点,并送至华大基因合成。

1.2.2 sgRNA 体外切割验证 对设计好的

sgRNA 体外转录进行切割, 初步筛选出效率较高的进行载体构建。首先进行靶片段的 PCR 扩增。根据本试验靶基因的选择, 使用 Primer Premier 6 进行相应靶点引物设计, 合成目标靶片段。然后根据赛默飞公司的 GeneArt™ Precision gRNA Synthesis

Kit 说明书设计 sgRNA 体外转录模板引物, 并最终进行 Gene_ID 为 ENSSSCG00000043058、ENSSSCG00000046447 的转录模板合成 (以下简称为 43058、46447)。其合成原理 (图 1) 及相关引物 (表 1、表 2) 如下所示。



Two 34~38 bp oligonucleotides are needed to assemble the synthetic gRNA with tracrRNA fragment, among them the Target-F is composed of the T7 promoter and 16~20 bp sequence of the target sequence, and the Target-R is composed of partial sequence of tracrRNA fragment and 19~20 bp sequence complementary to the target sequence

图 1 sgRNA 合成原理图

Fig. 1 Schematic diagram of sgRNA synthesis

表 1 靶片段扩增引物		
Table 1 Primers of target fragment amplification		
引物名称	引物序列(5'→3')	产物长度/bp
Primer name	Primer sequence	Product length
43058target_F	GTCCCATTTTCCAGGCCTTA	616
43058target_R	G TTCAGAGGCACACAATGTG	
46447target_F	AGTTGAAGGCCACTTGGTCA	657
46447target_R	ATGACAATTTGTCCTGGTGGCC	

体外 Cas9 切割验证主要包含 3 个过程: Cas9-sgRNA 的自发组装、Cas9-sgRNA 复合体与靶片段的特异结合、Cas9-sgRNA 对靶点进行特异切割。采用 20 μL 反应体系: 体外转录 sgRNA 模板 100 ng, 靶片段 250 ng, Cas9 蛋白 1 μL, 10×Cas9 Reaction buffer 2 μL, 最后加 Nuclease-free water 补足至 20 μL。

在进行 Cas9 体外切割时, 反应体系首先加入除靶片段外其他成分进行 Cas9 与 sgRNA 组装 (组装时间 30 min), 再加入相应靶片段孵育 1 h, 切割完毕后在反应体系中加入 2 μL 的蛋白酶 K 再次孵育 20 min。最终切割产物加入 6×DNA Loading Buffer 进行 20 g/L 的凝胶电泳, 分析电泳条带灰度计算切割效率。

表 2 sgRNA 体外转录模板合成引物		
Table 2 Primers for synthesis of sgRNA in vitro transcription template		
引物名称	引物序列(5'→3')	
Primer name	Primer sequence	
T43058-F1	TAATACGACTCACTATAGTCACTGGGGACTTGGA	
T43058-R1	TTCTAGCTCTAAAACCAAGTCCAAGTCCCAGTG	
T43058-F2	TAATACGACTCACTATAGGTGCATCTTTAGGAGACAC	
T43058-R2	TTCTAGCTCTAAAACGTGTCTCTCTAAAGATGCACC	
T46447-F1	TAATACGACTCACTATAGATGTGGCTGCAGAACTCG	
T46447-R1	TTCTAGCTCTAAAACCGAGTTTCTGCAGCCACAT	
T46447-F2	TAATACGACTCACTATAGAAGAAGCGCTCTAGAACAGG	
T46447-R2	TTCTAGCTCTAAAACCTGTCTCTAGAGCGCTTCT	

1.2.3 CRISPR/Cas9 载体构建 确定有效的 sgRNA 后进行真核细胞表达载体构建。首先使用限制性内切酶 BpiI 对载体 HP180_px330_GFP (图 2) 双酶切使其线性化, 合成的 sgRNA 经退火形

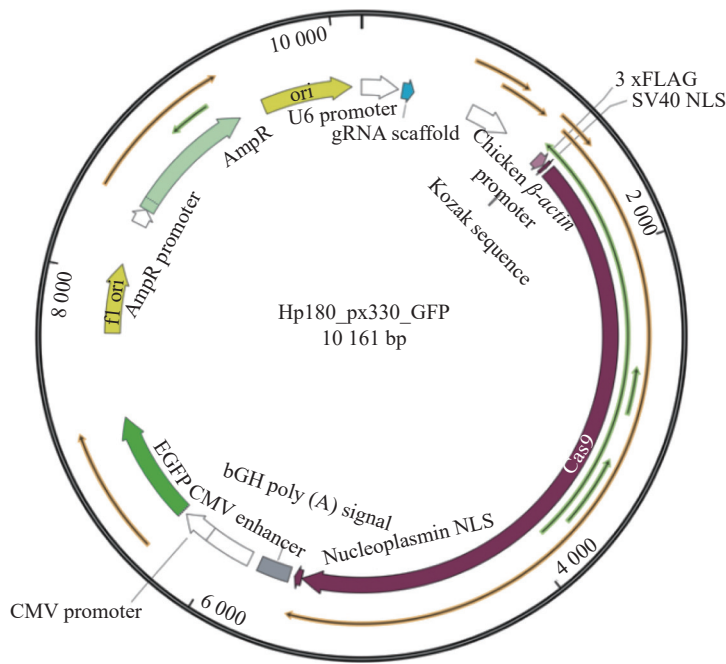


图 2 HP180_px330_GFP 载体结构图
Fig. 2 HP180_px330_GFP structure diagram

成双链由 T4 连接酶在 16 ℃ 条件下连接 1 h, 然后热应激转入 Trans5 α 感受态细胞, 于 220 r/min、37 ℃ 培养 1 h 后涂布含氨苄青霉素的 LB 平板, 隔夜培养后挑取单克隆, 进行菌液 PCR 并送测序, 测序正确菌液进行质粒抽提, 用于 PEF 电转。

1.2.4 PEF 培养与转染 试验所用细胞经鉴定为公猪细胞 (使用引物 F: TCATAGCTCAAACGATGGACGTG, R: ACACAATGAAAGCGTTCATGGGTC, 扩增片段大小为 92 bp)。PEF 复苏后加入含体积分数为 12% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养液, 置于 38 ℃、CO₂ 体积分数为 5% 的培养箱中培养。当复苏后的细胞融合度达到 80%~90% 时, 用质量分数为 0.05% 的胰酶消化后进行细胞计数。取 1 $\times$ 10⁶ mL⁻¹ 细胞悬液加入 1.5 mL 离心管, 加入 100 μ L 电转液及目的质粒以 Lonza 核转仪进行电转, 电转程序 A003。转染 24 h 后, 荧光显微镜下拍照并观察转染细胞荧光信号强弱, 判断转染效果。

1.2.5 流式分选及单细胞克隆团鉴定 细胞转染 2~3 d 后进行流式分选 (Fluorescence activating cell sorter, FACS)。细胞分选前经质量分数为 0.05% 的胰酶消化, 加入含体积分数为 2% 胎牛血清的 DPBS 重悬, 并在上机前经 40 μ m 细胞筛过滤防止细胞团块的干扰。根据 GFP 标记激发波长 488 nm 分选出阳性细胞 (5 $\times$ 10⁴~10 $\times$ 10⁴ 个) 并进行极限稀释 (梯度稀释降低细胞密度) 培养, 细胞培养形成单个细胞团后取部分细胞抽提 DNA 进行 Y 染色体性

别决定区 (Sex determination region of Y chromosome, SRY) 基因鉴定。引物信息如表 3 所示。

表 3 靶基因及 SRY 基因 PCR 引物		
Table 3 PCR primers of target gene and SRY gene		
引物名称 Primer name	引物序列(5'→3') Primer sequence	产物长度/bp Product length
43058_F	CATTGTGATGCATGGGCGATT	238
43058_R	GAGACCTCAAGTCCAAGTCCC	
46447_F	ATGTGGCTGCAGAACTCGT	169
46447_R	ATTTGTCCTGGTGGCCTGAC	
SRY_F	GTGGCTGGGATGCAAGTGGA	228
SRY_R	GCCTTGGCGACTGTGTATGTGA	

1.2.6 实时定量荧光 PCR 检测 Y 染色体敲除效率 分选后待细胞融合度达到 80%~90% 提取基因组 DNA, 并设计相应靶基因及 SRY 定量引物 (表 3) 观察其 DNA 含量是否显著降低。以基因组为模板检测目的基因在 DNA 水平的含量是否变化, 并以基因组水平的 β -actin 为内参。反应体系与反应产物均按照相应试剂盒 (PrimeScriptTM RT reagent Kit with gDNA Eraser 与 PowerUpTM SYBRTM Green Master Mix) 说明进行。

1.2.7 核型鉴定 对 SRY 鉴定为阴性细胞继续扩繁培养, 并传代至 T25 培养瓶, 待细胞生长至融合度为 70%~80% 时进行核型分析, 判断染色体核型是否缺失。核型分析由杭州卡优太谱生物科技公司进行。

2 结果与分析

2.1 多拷贝基因查询及 sgRNA 设计结果

2.1.1 多拷贝基因查询结果 通过 Ensembl 的 blast 筛选出了 35 个位于 Y 染色体上的多拷贝基

因, 统计结果如表 4 所示。

通过再次与 NCBI 数据库进行比对, 以及基于靶点基因组测序的真实结果与 sgRNA 设计的情况, 我们最终选择了网站预测评分较高、符合测序结果且在 Y 染色体上重复拷贝数靠前 (多位点

表 4 猪 Y 染色体多拷贝基因信息¹⁾
Table 4 Muti-copy genes in Y chromosome of pig

基因编号 Gene_ID	起始位置 Begin position	结束位置 End position	长度/bp Length	拷贝数 Copy number
ENSSSCG00000041799	20 570 323	20 570 724	402	90
ENSSSCG00000045041	23 748 599	23 749 006	408	42
ENSSSCG00000043614	22 488 485	22 488 925	441	39
ENSSSCG00000043058	21 558 744	21 559 151	408	39
ENSSSCG00000050250	20 115 553	20 117 373	1 821	32
ENSSSCG00000049276	20 156 946	20 158 766	1 821	32
ENSSSCG00000041211	20 259 563	20 261 383	1 821	32
ENSSSCG00000041323	20 851 299	20 853 119	1 821	32
ENSSSCG00000051247	23 675 355	23 677 155	1 821	32
ENSSSCG00000044850	22 938 437	22 940 148	1 721	32
ENSSSCG00000035359	19 637 403	19 639 087	1 685	32
ENSSSCG00000038218	20 710 734	20 712 418	1 685	32
ENSSSCG00000031994	20 902 449	20 904 133	1 685	32
ENSSSCG00000032210	21 694 455	21 696 139	1 685	32
ENSSSCG00000033039	19 929 688	19 931 370	1 683	32
ENSSSCG00000044818	21 140 962	21 142 262	1 301	32
ENSSSCG00000039954	22 859 918	22 861 602	1 685	31
ENSSSCG00000049743	23 367 269	23 368 953	1 685	31
ENSSSCG00000042334	19 885 774	19 887 455	1 682	31
ENSSSCG00000042971	21 982 938	21 984 619	1 682	31
ENSSSCG00000045651	23 897 691	23 899 366	1 676	31
ENSSSCG00000051215	20 442 628	20 444 448	1 821	30
ENSSSCG00000041507	22 640 161	22 641 981	1 821	30
ENSSSCG00000045761	24 007 552	24 009 372	1 821	29
ENSSSCG00000041750	23 944 189	23 946 009	1 821	29
ENSSSCG00000050201	21 301 627	21 303 492	1 821	29
ENSSSCG00000048908	19 541 113	19 542 933	1 821	27
ENSSSCG00000045241	21 443 949	21 445 655	1 707	26
ENSSSCG00000046033	23 455 676	23 457 401	1 726	24
ENSSSCG00000036112	22 537 239	22 541 180	3 942	3
ENSSSCG00000043960	23 320 436	23 322 365	1 930	2
ENSSSCG00000031258	21 822 265	21 828 538	6 274	*
ENSSSCG00000051413	21 205 077	21 216 797	11 721	*
ENSSSCG00000046447	22 138 546	22 177 691	39 146	*
ENSSSCG00000042484	23 810 416	23 850 459	40 244	*

1) “*” 代表基因序列太长, 不存在完全拷贝片段, 拷贝数统计不完整, 但存在部分序列多拷贝, 因此也可作为多拷贝基因的一种; 加粗Gene_ID为靶基因

1) “*” represents that the gene sequence is too long, there is no complete copy fragment, and the copy number statistics are incomplete, but there are multiple copies of some sequences, so it can also be used as a kind of multi copy gene; Bold gene ID represents the target gene

DSB) 的 Gene_ID 为 ENSSSCG00000043058、ENSSCG00000046447 的基因进行了 sgRNA 设计。这 2 个基因在全基因组的比对结果如图 3 所示。

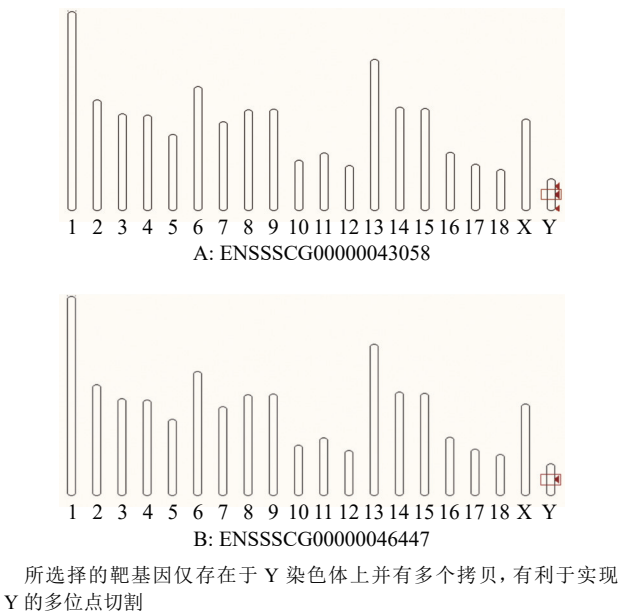
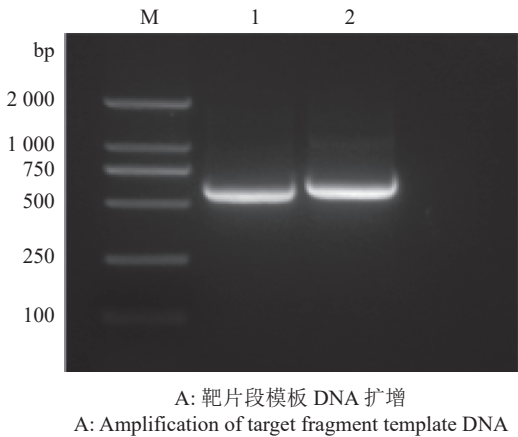


图 3 ENSSSCG00000043058 和 ENSSSCG00000046447 在猪染色体上的位置示意图

Fig. 3 Locations of ENSSSCG00000043058 and ENSSSCG00000046447 on pig chromosome



M: DL2000 DNA marker; 1 和 2 分别代表扩增靶片段 43058 和 46447, 长度分别为 616 和 657 bp; 3、4、5 和 6 代表转录产物 43058sg1、43058sg2、46447sg1 和 46447sg2, 长度均为 100 bp

M:DL2000 DNA marker; 1 and 2 represent the amplified target fragment 43058 and 46447 respectively, and the lengths are 616 and 657 bp respectively; 3, 4, 5 and 6 represent transcripts 43058sg1, 43058sg2, 46447sg1 and 46447sg2 respectively, and the lengths all are 100 bp

2.1.2 sgRNA 设计结果 对 ENSSSCG00000043058 和 ENSSSCG00000046447 位点进行 sgRNA 设计 (表 5)。在 sgRNA 及其互补序列末端分别加上与 *Bpi*I 酶切 HP180_px330_GFP 质粒互补的黏性末端, 由华大基因合成相应的 Oligo。

表 5 sgRNA 靶点位置和序列		
Table 5 Location and sequence of sgRNA target		
sgRNA	Y染色体位置	靶点序列
	Position on Y chromosome	Target sequence
43058sg1	21 558 841~21 558 860	TCACTGGGGACTTGGACTTG
43058sg2	21 558 795~21 558 814	ATGGAGGATTCTGAACCAGT
46447sg1	22 254 580~22 254 599	GATGTGGCTGCAGAACTCG
46447sg2	22 254 625~22 254 644	AAGAAGCGCTCTAGAACAGG

2.2 sgRNA 体外切割结果

以野生型 PEF DNA 为模板进行 PCR 扩增, 产物进行凝胶电泳分析后切胶回收得到 sgRNA 体外转录模板。根据 GeneArt™ Precision gRNA Synthesis Kit 试剂盒的体系与方法进行 sgRNA 的转录模板合成 (图 4A) 与体外 sgRNA 转录 (图 4B), 转录产物经纯化后电泳验证条带完整性 (长度 100 bp), 电泳结果与预期一致。

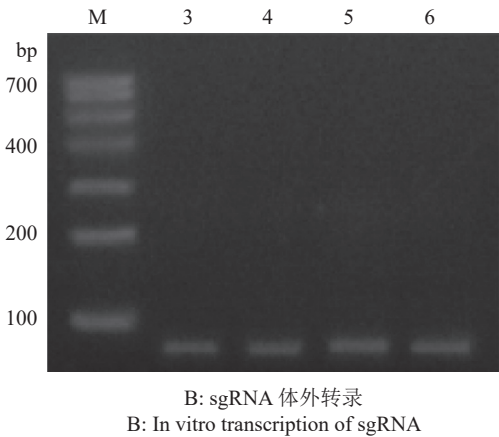


图 4 靶片段模板 DNA 扩增与 sgRNA 体外转录结果

Fig. 4 Amplification of target fragment template DNA and in vitro transcription of sgRNA

将扩增好的靶片段、sgRNA 按照一定比例与 Cas9 混合, 按照方法中的步骤进行反应得到切割产物, 43058sg1 的理论切割产物长度为 525 和 91 bp, 43058sg2 的理论切割产物长度为 444 和 172 bp, 46447sg1 的理论切割产物长度为 498 和 159 bp,

46447sg2 的理论切割产物长度为 453 和 204 bp。凝胶电泳分析表明 43058sg2 与 46447sg2 均达到了预期的切割效果, 并且 43058sg2 实现了接近完全的靶基因切割 (图 5)。灰度分析表明, 46447sg2 的体外切割效率也达到了 58%(图 6), 最终我们选择

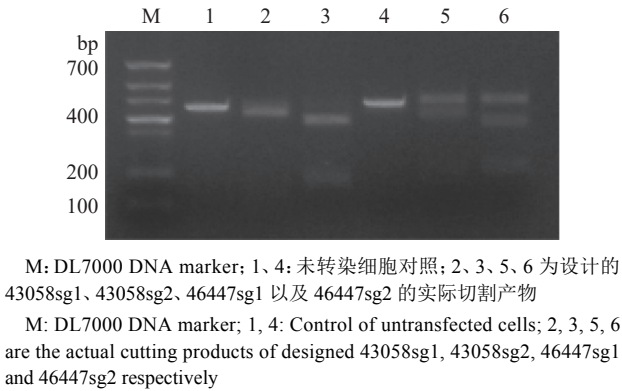


图 5 设计的 sgRNA 体外切割电泳图

Fig. 5 Electrophoregram of in vitro cleavage of designed sgRNA

43058sg2 和 46447sg2 进行载体构建。

2.3 HP180_px330_GFP 载体构建结果

HP180_px330_GFP 骨架上有预留的 *BpiI* 双酶

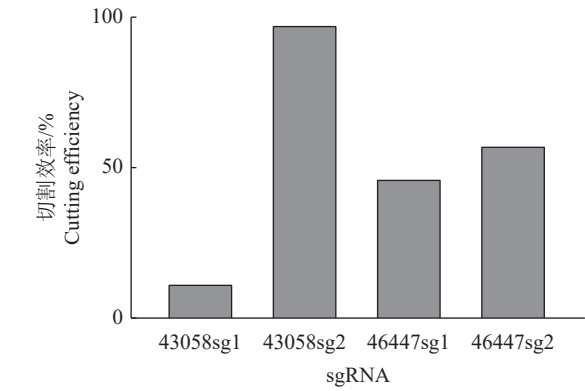


图 6 设计的 sgRNA 的体外切割效率

Fig. 6 In vitro cutting efficiency of designed sgRNA

切位点, 其线性化后与退火形成具有黏性末端的双链 sgRNA, 在连接酶作用下形成闭合环状结构。其测序结果如图 7 所示, 结果与设计的 sgRNA 结果一致, 表明载体构建成功。

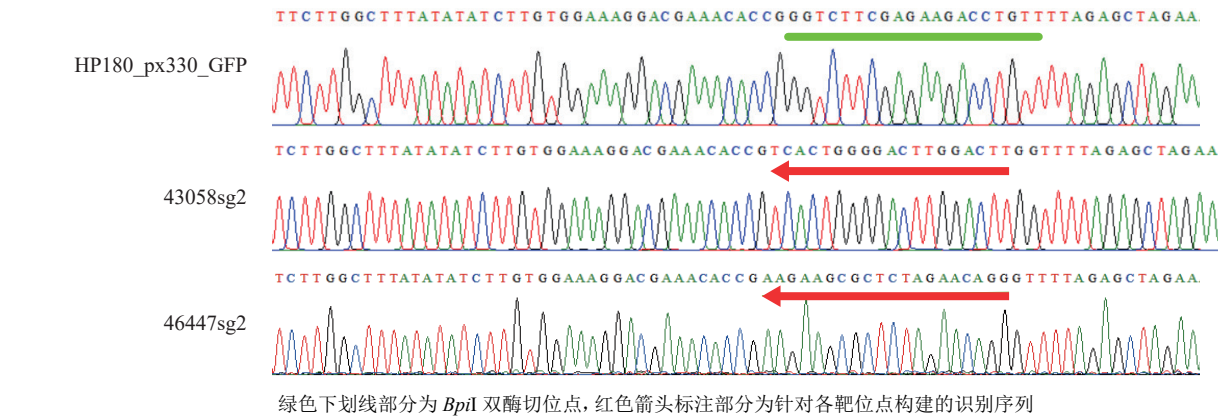


图 7 HP180_px330_GFP 质粒测序结果

Fig. 7 HP180_px330_GFP plasmid sequencing results

2.4 细胞性别鉴定及细胞转染检测

2.4.1 性别鉴定 对试验所用 PEF 进行 *SRY* 鉴定, 电泳结果显示目的细胞为雄性 (图 8)。

2.4.2 细胞转染 将构建的 CRISPR/Cas9 载体通过细胞核转染导入雄性 PEF 中。由于载体带有增强绿色荧光蛋白 (Enhanced green fluorescent protein, EGFP) 表达单元, 可通过观察 EGFP 的表达评估载体的转染效率。对已电转的细胞培养 24 h 后观察荧光信号, 确定已构建好的载体成功电转进入细胞。结果 (图 9) 表明质粒已成功表达。

2.5 FACS 分选阳性细胞及单克隆鉴定结果

通过 FACS 分选 EGFP 阳性细胞, 我们发现对照组与试验组 GFP 信号存在显著差异, 其中对照组未检测到 GFP 信号, 而阳性对照的细胞转染效率达到了 71%, 这与荧光观察结果类似。通过

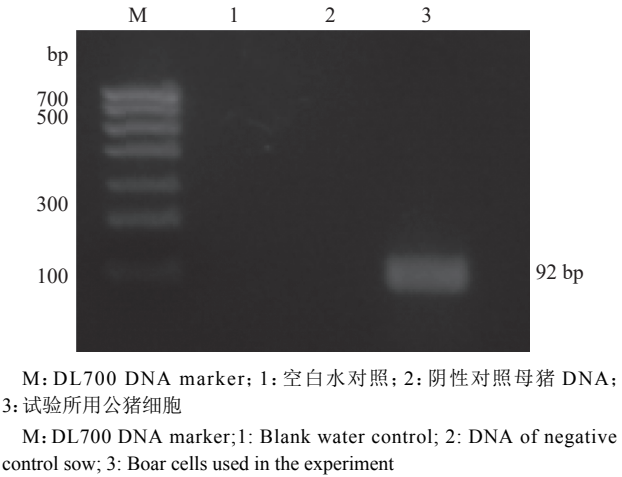
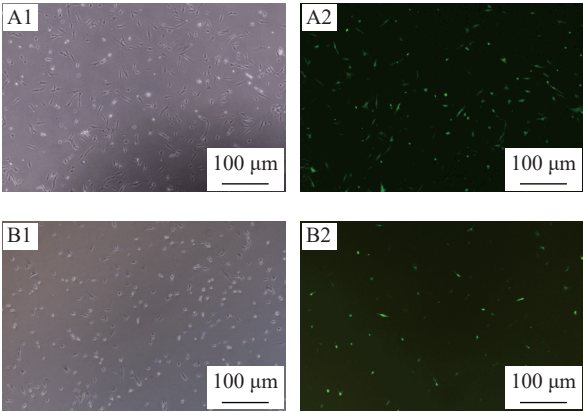


图 8 *SRY* 基因检测结果

Fig. 8 *SRY* gene assay result

培养 EGFP 阳性细胞, 获得单细胞克隆团。接着我们对单克隆细胞团提取微量 DNA, 进行相应的

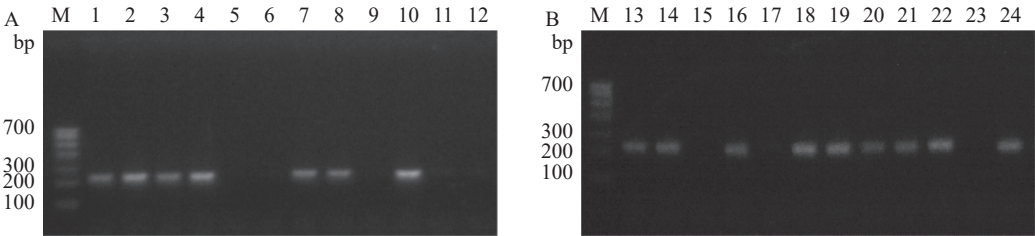


A、B 分别为 2 次重复试验的转染效果示意图; A1、B1 为细胞明场图片, A2、B2 分别为 A1、B1 同视野的 EGFP 表达图

A and B are cell transfection results of two repeated experiments; A1 and B1 are transfected cells imaged in bright field, and A2 and B2 are EGFP expression images of the same vision as A1 and B1, respectively

图 9 PEF 电转后荧光表达效果图

Fig. 9 EGFP expression after PEF electroporation



M: DL700 DNA marker; 1~24 代表单克隆细胞团编号

M: DL700 DNA marker; 1~24 represent the number of monoclonal cell clusters

图 10 单克隆细胞团 SRY 基因鉴定示意图

Fig. 10 SRY gene identification of monoclonal cell clusters

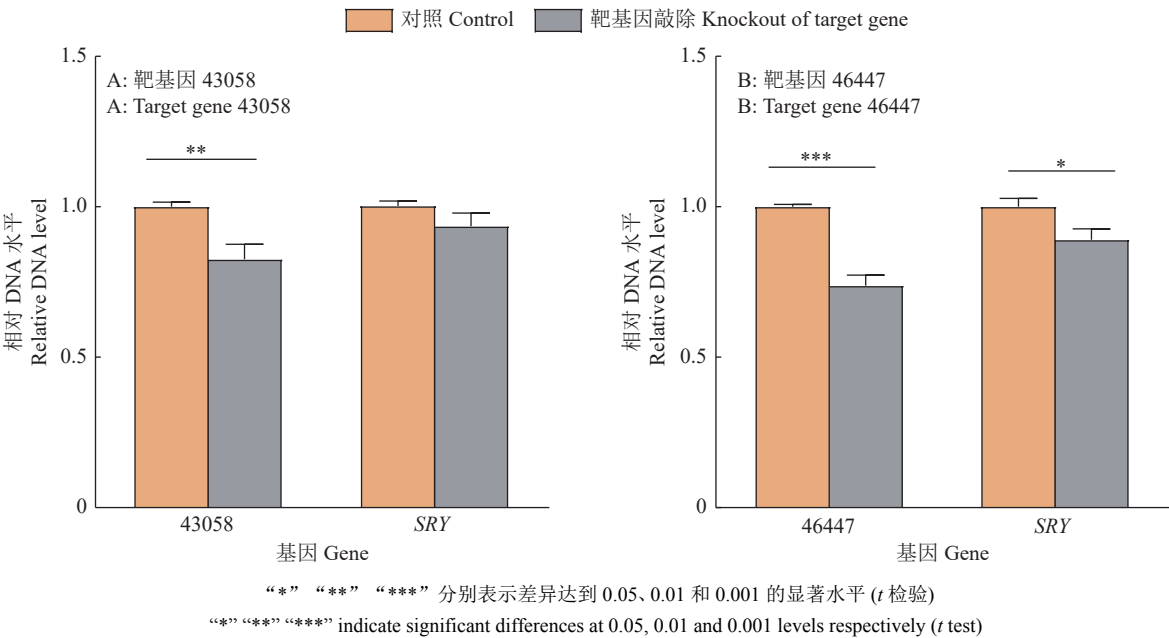


图 11 EGFP 阳性细胞中靶基因和 SRY 基因相较于正常雄性细胞的 DNA 水平检测

Fig. 11 Detection of DNA levels of target genes and SRY gene in EGFP-positive cells compared with normal male cells

2.7 核型分析结果

核型鉴定结果显示上述流式分选得到的 EGFP 阳性细胞存在染色体缺失现象, 表明设计的

SRY 检测, 发现 1/3 的细胞克隆未检测到 SRY 信号 (图 10), 显示这些细胞的 Y 染色体存在缺失的可能。

2.6 实时定量荧光 PCR 检测目的基因及 SRY 基因

由于选用的目的基因在 PEF 上并不表达 mRNA, 因此采用 qPCR 检测目的基因 (内参基因选择 β -actin) 和 SRY 基因的 DNA 含量。我们抽提 EGFP 阳性细胞的基因组 DNA, 进行 qPCR 分析目的基因 (43058 和 46477) 和 SRY 在 DNA 水平的含量。qPCR 结果显示在进行靶基因敲除后, 靶基因含量均显著降低。其中靶基因 43058 和 46447 分别下降了约 20% 和 30% ($P < 0.05$), 对应的 SRY 也下降了 7% 和 11%。46447 敲除效果相对于 43058 的基因敲除效果更为显著, 不仅靶基因敲除效率较高, SRY 基因 DNA 水平也下降较多 (图 11)。

sgRNA 在细胞水平上能够实现整个 Y 染色体的删除。在鉴定的 12 个单细胞核型中, 有 1 个完全缺失 Y 染色体 (图 12)。

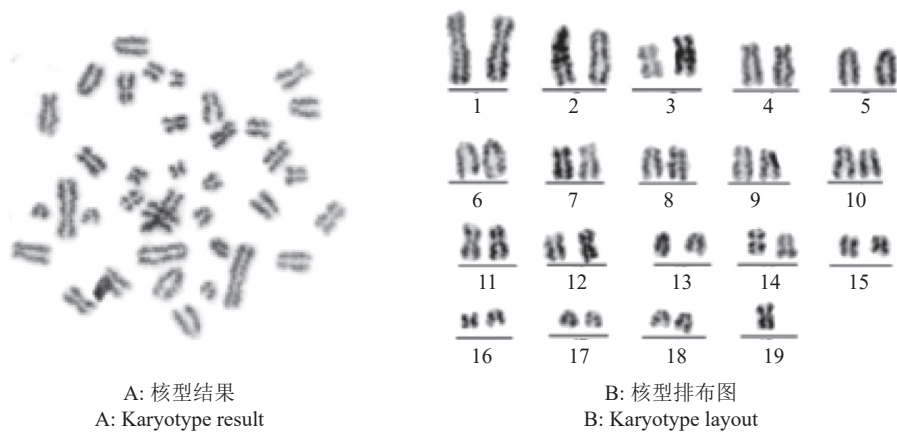


图 12 EGFP 阳性细胞核型分析结果示意图

Fig. 12 Diagram of karyotype assay result of EGFP-positive cells

3 讨论与结论

CRISPR/Cas9 近年来由于其基因编辑的灵活性和高效率而被广泛应用。其通过 DSB 导致的非保守非同源末端连接修复途径造成目的基因的敲除效果,但是该途径常常造成异常的插入缺失,甚至破坏染色体和基因组的完整性^[24-26]。而以天然的(或定向的)DNA 模板的同源重组修复 (Homologous recombination repair, HDR) 途径则可以对目的基因位点进行精确修饰而产生意向的目的基因型^[14, 27],本研究利用 CRISPR 系统的高效切割能力对 Y 染色体上多个重复基因位点进行切割,通过产生多重 DSB 损伤基因组和 DNA 修复的稳定性,引起 Y 染色体降解。实现整条染色体删除是建立在 CRISPR/Cas9 系统能对多个位点进行同时编辑的基础上的,虽然早期的研究已经证明能够产生大片段的缺失,但这对于整条染色体的消融还远远不够。2015 年, Yang 等^[28] 首先通过靶向内源性逆转率病毒 (PERVs) 的 62 个重复位点在猪上实现了 PERVs 的全基因组降解;随后,研究人员进一步利用 CRISPR/Cas9 对靶点切割的多重性,成功在 ES 细胞、体内细胞和受精卵中删除了 Y 染色体,并对其他常染色体 (7 号、14 号) 及 X 染色体进行了特异性消除^[22-23]。实现该技术的关键是在 Y 染色体上寻找能够被 sgRNA 特异识别的靶向序列,这些序列在其他常染色体或 X 染色体上不能被识别,通过对其进行多重切割从而实现整条染色体的消融。因此在选择靶点时,单一数据库的比对结果不能很好地反映个体染色体组的真实情况,最终选择靶基因是在 Ensembl 比对的基础上重新与 NCBI、Sanger 测序结果进行比对,选择多个数据库共有序列并与个体基因组序列结合,增加靶点的可靠性。

不同于一般的 sgRNA 效率检测采用 T7E1 酶切和测序验证,由于本试验靶点为 Y 上的多拷贝重

复序列,这些片段在 Y 上广泛分布且保守性不强,可能会存在一些 SNP 或者突变,导致扩增未编辑前的靶基因产物时出现套峰现象,和编辑后的测序结果无法区分。因此在这里只能通过体外切割进行 sgRNA 的效率检测。最终以 ID 为 ENSSSCG00000043058、ENSSSCG00000046447 的基因为靶点设计 sgRNA,通过对 Y 上不同靶点,即散在重复和簇状聚集的靶基因的打靶,探索了不同打靶位点对编辑效率的影响,结果表明簇状聚集的打靶效果要明显优于散在重复序列,这与 Zuo 等^[22] 和 Adikusuma 等^[23] 的研究结果一致,其原因可能是长臂偶然断裂造成的染色体截断或易位导致的。另外由于我们选择的基因为非蛋白编码基因,所以在定量分析时最终选择以 DNA 为模板。在检测靶点 DNA 含量变化的同时我们也对 SRY 含量进行了定量,结果均表明其表达量随靶基因降低而降低,虽然这种变化并不明显,但从侧面说明了整条 Y 染色体降解的可能性。核型分析的结果也表明部分单细胞克隆在染色体水平确实存在着 Y 染色体的丢失,表明通过多位点断裂造成整条染色体的缺失是可行的。

本研究通过寻找能够特异性识别 Y 染色体的多拷贝重复序列设计 sgRNA,并通过体外切割、qPCR、细胞转染、核型分析等手段证明了该系统在体外体内都有较高的切割效率,可成功实现整条染色体的消除,为未来染色体功能及动物性别控制研究提供了新的方向。

参考文献:

[1] O'DOHERTY A, RUF S, MULLIGAN C, et al. An aneuploid mouse strain carrying human chromosome 21 with Down syndrome phenotypes[J]. Science, 2005, 309(5743): 2033-2037.

[2] XIAO A, WANG Z, HU Y, et al. Chromosomal deletions and inversions mediated by TALENs and

CRISPR/Cas in zebrafish[J]. *Nucleic Acids Research*, 2013, 41(14): e141. doi: 10.1093/nar/gkt464.

[3] LI L B, CHANG K, WANG P, et al. Trisomy correction in Down syndrome induced pluripotent stem cells[J]. *Cell Stem Cell*, 2012, 11(5): 615-619.

[4] ABRAM C L, ROBERGE G L, HU Y, et al. Comparative analysis of the efficiency and specificity of myeloid-Cre deleting strains using ROSA-EYFP reporter mice[J]. *Journal of Immunological Methods*, 2014, 408: 89-100.

[5] TADA M, MATSUMURA H, KUROSE Y, et al. Target chromosomes of inducible deletion by a Cre/inverted loxP system in mouse embryonic stem cells[J]. *Chromosome Research*, 2009, 17(4): 443-450.

[6] CHIANG J C, JIANG J, NEWBURGER P E, et al. Trisomy silencing by XIST normalizes Down syndrome cell pathogenesis demonstrated for hematopoietic defects in vitro[J]. *Nature Communications*, 2018, 9: 5180.

[7] JIANG J, JING Y, COST G J, et al. Translating dosage compensation to trisomy 21[J]. *Nature*, 2013, 500(7462): 296-300.

[8] SANTIAGO Y, CHAN E, LIU P Q, et al. Targeted gene knockout in mammalian cells by using engineered zinc-finger nucleases[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, 105(15): 5809-5814.

[9] KIM H, KIM J. A guide to genome engineering with programmable nucleases[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2014, 15(5): 321-334.

[10] SPITZ F, HERKENNE C, MORRIS M A, et al. Inversion-induced disruption of the Hoxd cluster leads to the partition of regulatory landscapes[J]. *Nature Genetics*, 2005, 37(8): 889-893.

[11] LOONSTRA A, VOOIJIS M, BEVERLOO H B, et al. Growth inhibition and DNA damage induced by Cre recombinase in mammalian cells[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2001, 98(16): 9209-9214.

[12] GARNEAU J E, DUPUIS M, VILLION M, et al. The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA[J]. *Nature*, 2010, 468(7320): 67-71.

[13] DELTCHEVA E, CHYLINSKI K, SHARMA C M, et al. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III[J]. *Nature*, 2011, 471(7340): 602-607.

[14] YOSHIMI K, KUNIHITO Y, KANEKO T, et al. ssODN-mediated knock-in with CRISPR-Cas for large genomic regions in zygotes[J]. *Nature Communications*, 2016, 7: 10431.

[15] ZHENG Q, CAI X, TAN M H, et al. Precise gene deletion and replacement using the CRISPR/Cas9 system in human cells[J]. *BioTechniques*, 2014, 57(3): 115-124.

[16] GILBERT L A, HORLBECK M A, ADAMSON B, et al. Genome-scale CRISPR-mediated control of gene repression and activation[J]. *Cell*, 2014, 159(3): 647-661.

[17] 方锐, 畅飞, 孙照霖, 等. CRISPR/Cas9 介导的基因组定点编辑技术[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2013, 40(8): 691-702.

[18] BURMA S, CHEN B P C, CHEN D J. Role of non-homologous end joining (NHEJ) in maintaining genomic integrity[J]. *DNA Repair*, 2006, 5(9/10): 1042-1048.

[19] HARTLERODE A J, SCULLY R. Mechanisms of double-strand break repair in somatic mammalian cells[J]. *The Biochemical Journal*, 2009, 423(2): 157-168.

[20] GASIUNAS G, BARRANGOU R, HORVATH P, et al. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(39): E2579-E2586.

[21] JINEK M, CHYLINSKI K, FONFARA I, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity[J]. *Science*, 2012, 337(6096): 816-821.

[22] ZUO E, HUO X, YAO X, et al. CRISPR/Cas9-mediated targeted chromosome elimination[J]. *Genome Biology*, 2017, 18(1): 224. doi: 10.1186/s13059-017-1354-4.

[23] ADIKUSUMA F, WILLIAMS N, GRUTZNER F, et al. Targeted deletion of an entire chromosome using CRISPR/Cas9[J]. *Molecular Therapy*, 2017, 25(8): 1736-1738.

[24] FU Y, FODEN J A, KHAYTER C, et al. High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells[J]. *Nature Biotechnology*, 2013, 31(9): 822-826.

[25] ADIKUSUMA F, PILTZ S, CORBETT M A, et al. Large deletions induced by Cas9 cleavage[J]. *Nature*, 2018, 560(7717): E8-E9.

[26] CULLOT G, BOUTIN J, TOUTAIN J, et al. CRISPR-Cas9 genome editing induces megabase-scale chromosomal truncations[J]. *Nature Communications*, 2019, 10: 1136.

[27] LAPINAITE A, KNOTT G J, PALUMBO C M, et al. DNA capture by a CRISPR-Cas9-guided adenine base editor[J]. *Science*, 2020, 369(6503): 566-571.

[28] YANG L, GÜELL M, NIU D, et al. Genome-wide inactivation of porcine endogenous retroviruses (PERVs)[J]. *Science*, 2015, 350(6264): 1101-1104.

【责任编辑 庄 延】