

乔延召, 刘凯, 李清华, 等. 利用 CRISPR/Cas9 系统构建可诱导型猪 *Sohlh1* 基因敲除细胞系 [J]. 华南农业大学学报, 2021, 42(2): 1-8.
QIAO Yanzhao, LIU Kai, LI Qinghua, et al. Construction of pig cell line with inducible *Sohlh1* gene knockout using CRISPR/Cas9 system [J]. Journal of South China Agricultural University, 2021, 42(2): 1-8.

利用 CRISPR/Cas9 系统构建可诱导型猪 *Sohlh1* 基因敲除细胞系

乔延召¹, 刘 凯², 李清华¹, 黄建豪¹, 卫恒习¹, 张守全¹

(1 华南农业大学 动物科学学院/国家生猪种业工程技术研究中心, 广东 广州 510642;

2 汕尾宝山猪场有限公司, 广东 汕尾 516600)

摘要:【目的】将 Tet-on 系统与 CRISPR/Cas9 系统相结合建立诱导敲除猪 *Sohlh1* 基因的细胞系。【方法】分离培养猪胎儿成纤维细胞 (PFF), 进行慢病毒载体 PCW-eSpCas9(1.1) 侵染并通过 1 μg/mL 嘌呤霉素筛选及强力霉素 (Dox) 诱导; 改造 pLV-sgRNA 载体, 进行 293FT 细胞转染验证; 构建含 *Sohlh1* 基因目标靶点的 pLV-sgRNA-2A-GFP 特异性载体, 进行慢病毒包装检测; 利用包装病毒侵染稳转 PCW-eSpCas9(1.1) 的 PFF 细胞, 3 μg/mL 灭活菌素进行筛选, 随后添加 Dox 诱导进行表达分析和敲除效率检测。【结果】建立了受 Dox 调控可诱导 eSpCas9(1.1) 蛋白表达的 PFF 细胞系, 不添加 Dox, eSpCas9(1.1) 蛋白不表达; 293FT 细胞表达绿色荧光, 表明 pLV-sgRNA-2A-GFP 载体改造成功。3、4、6 号 *Sohlh1* 基因靶点具有敲除活性, 利用最优的 2 个靶点构建了 pLV-sgRNA-2A-GFP 特异性载体, 荧光表达显示载体慢病毒包装成功。构建稳转 PCW-eSpCas9(1.1) 和 pLV-sgRNA-2A-GFP 的 PFF, 经 Dox 诱导 72 h 后, *Sohlh1* 基因的敲除效率为 85%。【结论】利用 Tet-on 系统和 CRISPR/Cas9 系统成功构建了可诱导型猪 *Sohlh1* 基因敲除细胞系, 为研究 *Sohlh1* 基因的功能以及制备条件性敲除 *Sohlh1* 基因去除生殖细胞的模型猪奠定了基础。

关键词: 猪; Tet-on 系统; CRISPR/Cas9 系统; *Sohlh1*; 基因敲除

中图分类号: S828

文献标志码: A

文章编号: 1001-411X(2021)02-0001-08

Construction of pig cell line with inducible *Sohlh1* gene knockout using CRISPR/Cas9 system

QIAO Yanzhao¹, LIU Kai², LI Qinghua¹, HUANG Jianhao¹, WEI Hengxi¹, ZHANG Shouquan¹

(1 College of Animal Science, South China Agricultural University/National Engineering Research Center for Breeding Swine Industry, Guangzhou 510642, China; 2 Shanwei Baoshan Pig Farm Co., Ltd., Shanwei 516600, China)

Abstract: 【Objective】The Tet-on system was combined with the CRISPR/Cas9 system to establish a pig cell line with inducible *Sohlh1* gene knockout. 【Method】Porcine fetal fibroblast (PFF) was isolated and cultured for infection with lentiviral vector PCW-eSpCas9(1.1), screened by 1 μg/mL purinomycin and induced by doxycycline (Dox). The pLV-sgRNA vector was modified and transfected with 293FT cells for validation. The pLV-sgRNA-2A-GFP specific vector containing *Sohlh1* gene target was constructed for lentivirus packaging

收稿日期: 2020-03-16 网络首发时间: 2021-01-18 18:00:27

网络首发地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/44.1110.S.20210118.1328.002.html>

作者简介: 乔延召 (1992—), 男, 硕士, E-mail: 2440154044@qq.com; 通信作者: 张守全 (1964—), 男, 教授, 博士, E-mail: sqzhang@scau.edu.cn

基金项目: 国家重点研发计划 (2017YFD0501902, 2018YFD0501001); 广东省现代农业产业技术体系 (2016LM1102)

detection. PCW-eSpCas9(1.1) PFF cell was transfected by package virus infection and screened by 3 $\mu\text{g/mL}$ blasticidin, followed by Dox induction for expression analysis and knockout efficiency detection. 【Result】 PFF cell line, which was regulated by Dox to induce eSpCas9 (1.1) protein expression, was established. Without Dox addition, eSpCas9 (1.1) protein expression was not observed. Green fluorescence was expressed in 293FT cells, indicating the successful transformation of pLV-sgRNA-2A-GFP vector. The No. 3, 4 and 6 *Sohlh1* gene targets had knockout activities. The pLV-sgRNA-2A-GFP specific vector was constructed with the two optimal targets, and the fluorescence expression showed that the vector lentivirus was successfully packaged. The PFF cell of stable PCW-eSpCas9(1.1) and pLV-sgRNA-2A-GFP transformation was constructed. After 72 hours of Dox induction, the knockout efficiency of *Sohlh1* gene was 85%. 【Conclusion】 The pig cell line with inducible *Sohlh1* gene knockout is successfully constructed using the Tet-on system and CRISPR/Cas9 system, which lays a foundation for studying the function of *Sohlh1* gene and preparing the model pig with conditional *Sohlh1* gene knockout to remove germ cells.

Key words: pig; Tet-on system; CRISPR/Cas9 system; *Sohlh1*; gene knockout

精卵发生特异碱性螺旋环螺旋转录因子 (Spermatogenesis and oogenesis specific basic helix-loop-helix transcription factor, *Sohlh1*) 是一种主要在睾丸和卵巢中表达的组织特异性基因,能够调控精子和卵子的发生^[1]。小鼠睾丸中 *Sohlh1* 的 mRNA 最早可在胚胎发育 12.5 d 时检测到,在胚胎发育 15.5 d 时通过免疫组化检测到了 SOHLH1 蛋白,免疫荧光试验进一步证实 SOHLH1 蛋白在精原细胞中的特异性表达^[1]。母鼠卵巢中 *Sohlh1* 的 mRNA 最早可在胚胎发育 13.5 d 时卵细胞进入减数分裂 I 期检测到,蛋白则在胚胎发育 15.5 d 时检测到,在卵母细胞中 SOHLH1 蛋白同时存在于细胞核和细胞质中^[2]。研究表明, *Sohlh1* 可能被视为原发性卵巢功能不全的调控基因^[3],非梗阻性无精子症也与 *Sohlh1* 基因的突变有关^[4]。 *Sohlh1* 在生殖发育中更多的调控机制有待于进一步研究,以往的研究显示 *Sohoh1* 作为生殖细胞特异表达基因,其启动子被广泛应用于生殖细胞特异表达启动子,敲除此基因则被广泛应用到生殖发育障碍动物模型中。

作为一种理想的基因编辑技术,CRISPR/Cas9 技术在模式动物制备^[5-6]、遗传疾病治疗^[7-9]、癌症研究^[10-11] 等多个领域得到了广泛的应用。但 CRISPR/Cas9 系统存在脱靶问题^[12],效率受影响,Slaymaker 等^[13] 把 3 个带正电荷的氨基酸突变为非极性的氨基酸,大大降低了 CRISPR/Cas9 系统的“脱靶”切割,使其效率显著提高。除基因编辑技术外,慢病毒转基因法以其稳定、高效整合的优势,也常常被应用在转基因细胞和动物生产中。

四环素诱导表达系统因高效、可控和低渗漏等优点深受研究者喜爱。四环素调控系统中的 Tet-on 系统又称四环素开启系统,指只有在诱导剂四环素

或其衍生物强力霉素存在的条件下,rtTA 蛋白才能结合到 Tet 应答元件 (Tet-responsive element, TRE) 序列上产生激活作用,使插入的目的基因进行表达^[14-18]。这种安全可调控的特点极大地方便了目的基因多方面的研究^[19]。利用 Tet-on 系统能够对目的基因时空表达进行调控的特点,本研究将 CRISPR/Cas9 系统与 Tet-on 系统相结合,通过条件性地对 *Sohlh1* 基因进行敲除,达到构建可诱导型 *Sohlh1* 基因敲除细胞系的目的,以此细胞系建立的克隆猪生殖模型,将有助于 *Sohlh1* 基因功能、生殖细胞发育以及人类生殖障碍等问题的研究。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 试验动物组织 仔猪睾丸组织和 30 d 胎龄猪胎儿采自广东温氏集团水台原种猪场。

1.1.2 质粒和细胞株 pLV-sgRNA(#50662)质粒、pGL3-GFP 质粒购于 Addgene 公司;低脱靶优化慢病毒载体 PCW-eSpCas9(1.1)(含 Tet-on 系统)、稳转 Cas9 蛋白猪胎儿成纤维细胞 (Porcine fetal fibroblast, PFF) 系、慢病毒包装质粒 psPAX2、pMD2.G 由国家生猪种业工程技术研究中心保存;293FT 细胞株购于 ATCC 公司。

1.1.3 主要试剂 pMD™18-T Vector Cloning Kit 购自 TaKaRa 公司;感受态细胞 *Escherichia coli* Stb13 和 DH5 α 、TransScript II One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix(AT311)、质粒提取试剂盒购自全式金生物公司; *Spe* I、*Eco*R I、*Xho* I、*Nhe* I 等限制性内切酶购于 Thermo 公司; ClonExpress® MultiS One Step Cloning Kit 购自南京诺唯赞公司;GML-PC 慢病毒浓缩试剂盒、HG-

Trans293™transfection reagent、Lipofectamine™ 2000、Attractene Transfection Reagent 购自上海吉满生物公司;灭稻瘟菌素、嘌呤霉素购自 Sigma 公司;动物组织总 RNA 提取试剂盒、细胞基因组提取试剂盒购自天根生化公司;凝胶回收试剂盒购自 Magen 公司;全蛋白提取试剂盒购自凯基公司。

1.2 方法

1.2.1 PFF 细胞的获取 取纯种杜洛克公猪 30 d 胎龄的胎儿,用含有双抗的 PBS 缓冲液清洗,75%(φ)乙醇溶液消毒全身,在超净台内去除头、尾、四肢、心脏及其他脏器,双抗液再次清洗后,于培养皿中用眼科剪将胚胎充分剪碎,使组织块直径小于 1 mm;随后加入 37 °C 预热的 DMEM/F12 培养液,转移混合液至卡式瓶,混合均匀并放入培养箱中培养,5 h 后再加入适量含 20%(φ)FBS 的 DMEM/F12 培养液,24~48 h 后观察组织块旁细胞生长状况。待长出的 PFF 细胞达到足够密度时,进行细胞冻存。

1.2.2 PCW-eSpCas9(1.1)慢病毒载体侵染 PFF 细胞及检测 复苏保存的 PFF 细胞并进行培养,待细胞汇合度(细胞生长面积/孔板面积)达约 80% 时,用 PCW-eSpCas9(1.1)慢病毒载体浓缩液侵染并放回培养箱中培养,12 h 后换液为新鲜培养基继续培养。病毒侵染 2 d 后换用含有 1 μ g/mL 嘌呤霉素的完全培养基继续培养,每天换液,筛选大约 2 周,待细胞稳定生长,一部分进行冻存;另外一部分加入强力霉素(Dox)进行诱导,最后收集诱导组、未诱导组细胞进行 RT-PCR 和 Western-blot 检测。

1.2.3 pLV-sgRNA 载体的改造及验证 以 pLV-sgRNA(#50662)质粒和 pGL3-GFP 质粒为模板,融合 PCR 得到 2A-GFP 片段。再用 *Spe* I 和 *Eco* R I 双酶切 pLV-sgRNA 质粒,得其线性化片段。随后将 2A-GFP 片段与 pLV-sgRNA 线性化片段进行连接(步骤见 One Step Cloning Kit 连接试剂盒说明书),产物转化感受态细胞 Stbl3,挑取单菌落至含有氨苄青霉素的 LB 培养液中培养 12 h,菌液 PCR 鉴定,反应程序为:94 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 30 s、60 °C 退火 30 s、72 °C 延伸 1 min,32 个循环;72 °C 延伸 10 min。将阳性质粒送生工测序。最后根据 Lipofectamine™ 2000 转染手册将测序正确的改造载体转入 293FT 细胞进行荧光检测。

1.2.4 猪 *Sohlh1* 基因的扩增及靶位点预测 依据动物组织总 RNA 提取试剂盒说明书抽提仔猪睾丸组织 RNA,按反转录试剂盒要求进行反转录;根据 NCBI 数据库记录的猪 *Sohlh1* 基因序列,使用 Primer Premier 5.0 软件设计 *Sohlh1* 扩增引物(*Sohlh1*-F: ATGGCGTCCGGGGCTCCGAG;

Sohlh1-R: TCAGTAGGCAAAGAAGTCAG),以 cDNA 为模板,进行 *Sohlh1* 基因的 PCR 扩增,胶回收 DNA 片段进行 T-A 克隆、连接 pMD™18-T 载体、转化 DH5 α 感受态细胞、菌液 PCR 鉴定,选取阳性菌测序,将结果在 NCBI 数据库中进行比对。最后把测序所得猪 *Sohlh1* 基因 CDs 区输入 sgRNA Designer 软件(<http://www.broadinstitute.org/rnai/public/analysis-tools/sgrna-design>),根据评分和所在外显子区域选出合适的靶基因位点。

1.2.5 pLV-sgRNA-2A-GFP 特异性载体的构建及慢病毒包装 以 PCR 扩增的人 U6 启动子片段和含有靶位点的 sgRNA 片段为模板,融合 PCR 得到 U6-sgRNA 瞬时表达载体,用无血清培养基稀释后,加入转染试剂 Attractene Transfection Reagent,形成核酸-转染试剂复合物。将复合物转染已筛选并验证表达 Cas9 蛋白的 PFF 细胞,于 48~72 h 收集细胞进行基因组提取及 PCR 扩增,引物为 F-S3gS4g、R-S5gS6g(表 1),随后对敲除基因片段进行分子克隆操作(同“1.2.4”),测序鉴定,进行敲除活性分析。根据 *Sohlh1* 基因靶位点敲除分析结果,选取目标靶点构建 pLV-sgRNA-2A-GFP 特异性载体:用 *Xho* I 和 *Nhe* I 酶切已构建好的 pLV-sgRNA-2A-GFP 质粒,得其线性化载体并与 U6-sgRNA 瞬时表达载体进行连接,产物转化 Stbl3 感受态细胞,分子克隆步骤同“1.2.4”,阳性质粒送生工测序比对。

表 1 *Sohlh1* 基因敲除鉴定引物

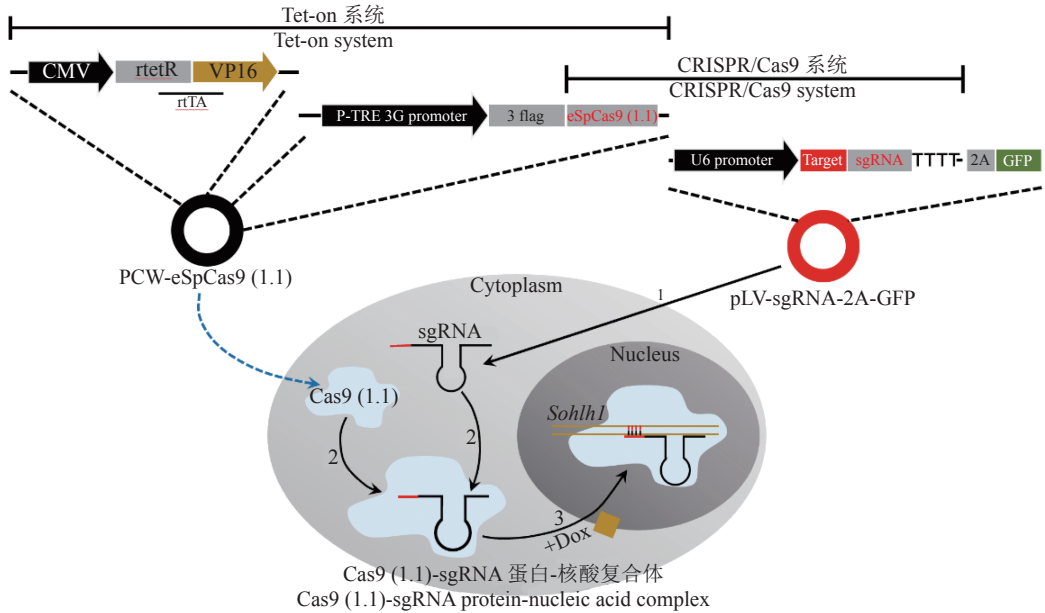
引物名称	引物序列(5'→3')	产物长度/bp
Primer name	Primer sequence	Product length
F-S3gS4g	AGAGGGATGAGGTAGGGC	404
R-S3gS4g	TGCCCGACAGACACCACA	
F-S5gS6g	CTTGGGGTCTTCCGCCTG AGA	922
R-S5gS6g	TGAAGACGGGAGGGCTGA	

特异性载体的慢病毒包装检测:用 Opti-DMEM 稀释混合好的 DNA(穿梭质粒、psPAX2 和 pMD2.G 质量比为 2:2:1),加入转染试剂 HG-Trans293™transfection reagent,然后转入 293FT 细胞中,于 37 °C、CO₂ 体积分数为 5% 的培养箱内培养,分别在 48 和 72 h 后收集病毒上清液,用 GML-PC 慢病毒浓缩试剂盒进行浓缩。用 1 mL 浓缩液和 1 μ L 终浓度为 10 μ g/mL 的 Polybrene 共同侵染 293FT 细胞,48 h 后显微镜观察荧光表达情况。

1.2.6 筛选细胞系阳性比例鉴定 用上述 pLV-sgRNA-2A-GFP 特异性慢病毒载体侵染稳转 *PCW-*

eSpCas9(1.1) 基因 PFF 细胞 (图 1), 3~4 d 后换用含 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的灭稻瘟菌素、15%(ϕ) 血清的新鲜培养基培养。每 2~3 d 用含有抗生素的新鲜培养基换液并随时观察细胞荧光表达情况, 一段时间以后待大部分细胞都有荧光表达时, 停止药物筛选。培养药物筛

选的 PFF 阳性细胞至 80% 的细胞汇合度, 更换含有 Dox 的完全培养液继续培养, 3 d 后收集细胞, 抽提基因组, 进行 PCR 扩增, 引物为 F-S3gS4g、R-S3gS4g (表 1), 分子克隆步骤同“1.2.4”, 最后将阳性菌送生工测序并统计样品敲除效率。



图中黑色虚线段表示 PCW-eSpCas9(1.1) 载体、pLV-sgRNA-2A-GFP 载体各自包含的基因片段; 蓝色虚线箭头表示 PCW-eSpCas9(1.1) 基因稳转 PFF 细胞, 黑色实线箭头 1、2、3 分别表示 pLV-sgRNA-2A-GFP 特异性慢病毒载体感染 PFF 细胞、Cas9(1.1)-sgRNA 蛋白-核酸复合物的形成以及 Dox 诱导后 *Sohlh1* 基因的切割

The black dotted line in the figure shows the gene fragments contained in PCW-eSpCas9(1.1) vector and pLV-sgRNA-2A-GFP vector respectively; The blue dotted arrow indicates the stable PFF cell transformation of PCW-eSpCas9(1.1) gene, while the black solid arrow 1, 2 and 3 indicate the infection of bpLV-sgRNA-2A-GFP-specific lentivirus vector on PFF cells, the formation of Cas9(1.1)-sgRNA protein-nucleic acid complex and the cleavage of *Sohlh1* gene after Dox induction respectively

图 1 sgRNA 与 *Sohlh1* 基因靶向结合示意图

Fig. 1 Schematic diagram of targeted binding of sgRNA and *Sohlh1* gene

2 结果与分析

2.1 转 PCW-eSpCas9(1.1) 基因细胞系的检测

慢病毒包装质粒 PCW-eSpCas9(1.1)(图 2) 感染 PFF 细胞, 嘌呤霉素筛选得到细胞克隆团 (图 3)。Dox 诱导转 PCW-eSpCas9(1.1) 基因 PFF 细胞系后进行 RT-PCR 检测, 结果显示 *eSpCas9*(1.1) 基因只在诱导后的细胞中转录 (图 4)。Western-blot 检测结果显示 Dox 诱导组细胞能够表达 *eSpCas9*(1.1) 蛋白, 未诱导组细胞不表达该蛋白 (图 5)。综合以上结果, 可以得出 *eSpCas9*(1.1) 基因已整合到 PFF 细胞基因组上并稳定表达。

2.2 pLV-sgRNA 载体的改造结果

融合 PCR 得到的 2A-GFP 片段与酶切 pLV-sgRNA 质粒后得到的片段 (图 6) 进行连接、转化, 阳性菌测序正确。重组质粒转染 293FT 细胞, 转染后 48 h 荧光显微镜观察到带绿色荧光的细胞 (图 7), 表明 pLV-sgRNA 载体成功地改造为 pLV-sgRNA-2A-GFP 载体。

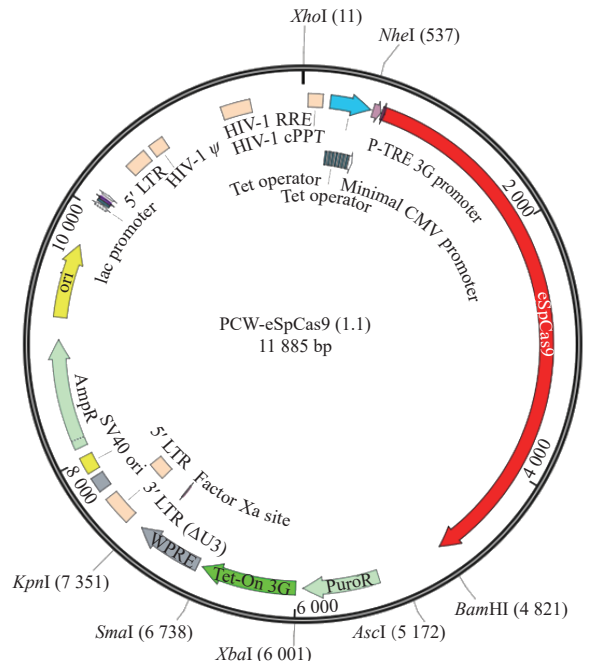


图 2 优化后的低脱靶慢病毒载体 PCW-eSpCas9(1.1) 结构
Fig. 2 Structure of optimized low miss lentivirus vector PCW-eSpCas9(1.1)

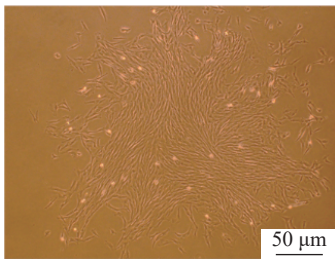
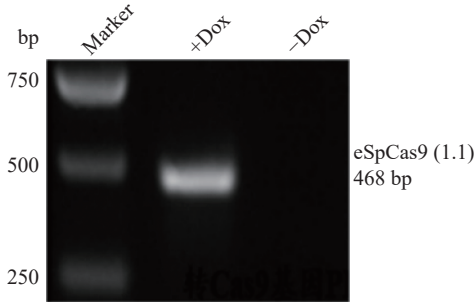


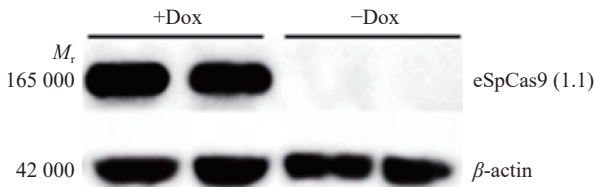
图 3 嘌呤霉素筛选的 *PCW-eSpCas9(1.1)* 基因阳性 PFF 细胞克隆
Fig. 3 *PCW-eSpCas9(1.1)* gene positive PFF cell clones screened by purinomycin



+Dox 表示经 Dox 诱导组, -Dox 表示未经 Dox 诱导组
 +Dox means Dox-induced group, and -Dox means non-Dox-induced group

图 4 RT-PCR 检测表达 *eSpCas9(1.1)* 基因细胞系

Fig. 4 Detection of cell line expressing *eSpCas9(1.1)* gene by RT-PCR



+Dox 表示经 Dox 诱导组, -Dox 表示未经 Dox 诱导组
 +Dox means Dox-induced group, and -Dox means non-Dox-induced group

图 5 Western-blot 检测表达 *eSpCas9(1.1)* 蛋白细胞系

Fig. 5 Detection of cell line expressing *eSpCas9(1.1)* protein by Western-blot

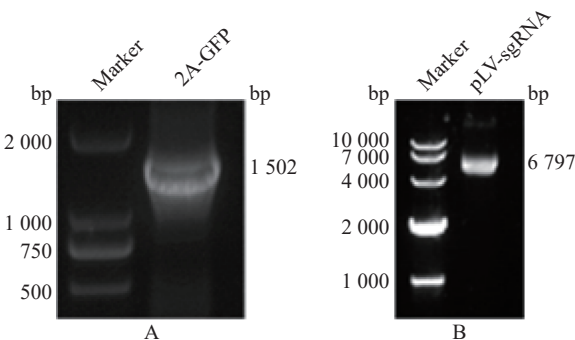
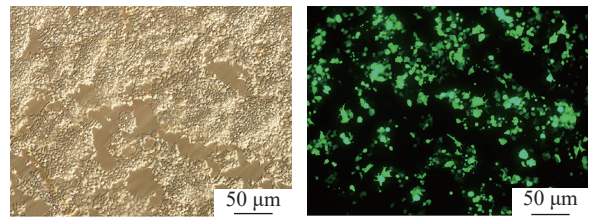


图 6 融合 PCR 扩增得到 2A-GFP 片段 (A) 和双酶切 pLV-sgRNA 载体得到的线性化片段 (B)
Fig. 6 2A-GFP fragment obtained by fusion PCR (A) and the linearized fragment obtained by double enzyme digestion of pLV-sgRNA vector (B)



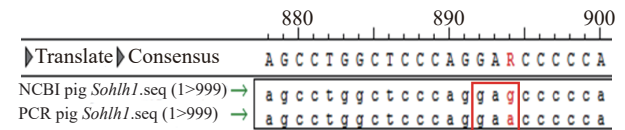
A: 白光 White light B: 荧光 Fluorescence

图 7 荧光显微镜检测 pLV-sgRNA-2A-GFP 质粒转染后的 293FT 细胞

Fig. 7 Detection of 293FT cells transfected with the pLV-sgRNA-2A-GFP plasmid by fluorescence microscopy

2.3 猪 *Sohlh1* 基因测序及靶位点的选择

Lasergene 软件比对 PCR 扩增后测序所得猪 *Sohlh1* 基因与 NCBI 数据库所报道的猪 *Sohlh1* 基因, 结果表明两者序列基本一致, 仅在起始密码子下游 894 bp 处有 1 个碱基不同 (图 8), 但是所编码的均为谷氨酸, 对 *Sohlh1* 功能无影响。再通过软件预测 *Sohlh1* 基因 CDs 区全部的 sgRNA 位点, 分析各位点的评分及所在的外显子区域, 从中选择符合条件的 4 个靶位点 (表 2)。



图中红色方框内所示密码子 gag 或 gaa 编码的均为谷氨酸
 The glutamic acid encoded by codon gag or gaa is shown in the red box

图 8 PCR 扩增猪 *Sohlh1* 基因与 NCBI 数据库对比

Fig. 8 Comparison of pig *Sohlh1* gene amplified by PCR with NCBI database

2.4 pLV-sgRNA-2A-GFP 特异性载体的构建及慢病毒包装检测

PCR 扩增出 U6 启动子与含有靶位点的 sgRNA 片段 (图 9A), 融合 PCR 得到 U6-sgRNA 瞬时表达载体 (图 9B)。为验证敲除效果, 使用 U6-sgRNA 转染转 *Cas9* 基因 PFF 细胞, 转染后 48~72 h 抽提基因组进行 PCR 扩增, 得到 1593 bp 的敲除基因片段, 经克隆、测序得到各靶位点的敲除情况 (图 10)。试验送样 72 个, 有效结果中 3、4、6 号位点突变的样品数分别为 17、16 及 14 个, 3、4 号位点同时突变的为 8 个, 5 号位点均无突变, 分析测序结果知 3、4、6 号靶位点有敲除活性, 同时 3、4 号位点可形成同时断裂的切割, 利于提高突变几率 (图 10)。XhoI 与 NheI 双酶切 pLV-sgRNA-2A-GFP 质粒, 产物大小为 7807 bp (图 9C), 与带有 3、4 号靶位点的 U6-sgRNA 载体连接, 阳性菌测序正确。将 pLV-sgRNA-2A-GFP 特异性载体进行慢病毒包装, 其浓缩液感染 293FT 细胞, 48 h 后观察到 293FT 细胞的荧光表达, 表明 pLV-sgRNA-2A-GFP 特异性载体慢病毒包装成功 (图 11)。

表 2 *Sohlh1* 基因靶点的预测与评分

Table 2 Prediction and scoring of *Sohlh1* gene targets

靶点编号 Target site number	靶位点序列 Target sequence	线性 Linear	sgRNA评分 sgRNA score
3	TGGCGCCCAGTTCTGCTGCGAGG	正义 Sense	0.470226526704
4	CTCTCGCTGAGCACGTTCCGCGG	反义 Antisense	0.544904374542
5	GCCCTGCTCCCCAGTTTCGACGG	正义 Sense	0.713514505108
6	AGGTGCAGCAGACCTCGACGTGG	正义 Sense	0.529772952150

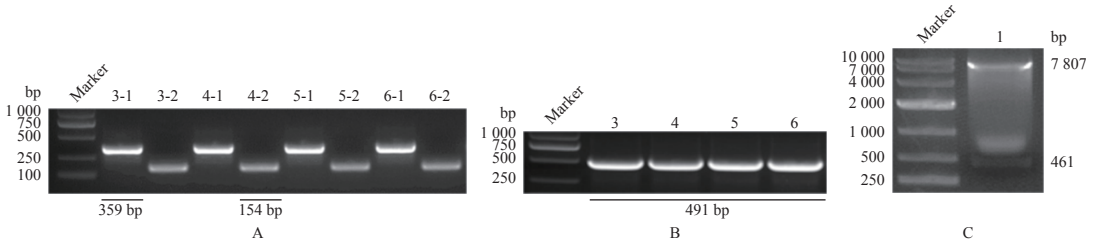
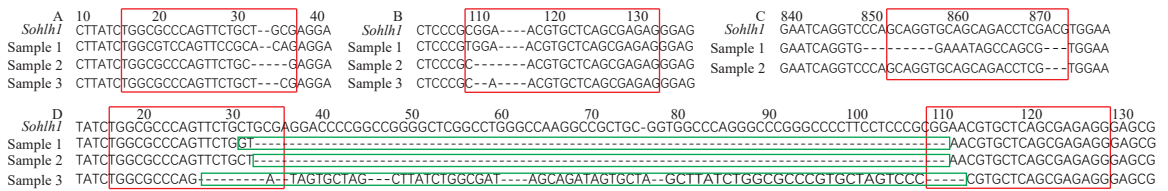


图 A 中, 3-1、4-1、5-1、6-1 表示 PCR 分别扩增 3、4、5、6 号靶点得到的 U6 启动子单个片段, 3-2、4-2、5-2、6-2 表示 PCR 扩增得到的含有 3、4、5、6 号靶点的 sgRNA 片段; 图 B 中, 3、4、5、6 表示融合 PCR 构建的包含 3、4、5、6 号靶点的 U6-sgRNA 瞬时表达载体片段; 图 C 中, 1 为质粒双酶切后的片段 pLV-sgRNA-2A-GFP

In figure A, 3-1, 4-1, 5-1 and 6-1 represent the single fragment of U6 promoter obtained by PCR amplification, 3-2, 4-2, 5-2 and 6-2 represent sgRNA fragments containing target sites obtained by PCR amplification; In figure B, 3, 4, 5 and 6 represent the transient expression vector fragment of U6-sgRNA constructed by fusion PCR; In figure C, 1 refers to the pLV-sgRNA-2A-GFP fragment of plasmid after double enzyme digestion

图 9 PCR 检测 pLV-sgRNA-2A-GFP 特异性载体的构建

Fig. 9 Construction of pLV-sgRNA-2A-GFP specific vector and PCR examination



A: 3 号靶位点敲除; B: 4 号靶位点敲除; C: 6 号靶位点敲除; D: 3、4 号靶位点同时敲除; 红色方框内的是各靶位点序列对应位置, 绿色方框内的是 3、4 号靶位点同时敲除断裂后形成的序列

A: Knockout of target 3; B: Knockout of target 4; C: Knockout of target 6; D: Simultaneous knockout of targets 3 and 4; In the red box are the corresponding positions of each target sequence, and in the green box are the sequences formed after the simultaneous knockout and fracture of target 3 and 4

图 10 不同靶位点敲除的序列分析

Fig. 10 Sequence analysis of different target knockout

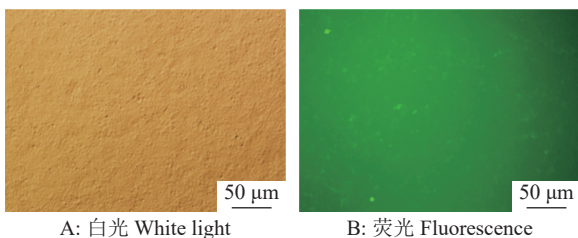


图 11 特异性载体慢病毒浓缩液感染 293FT 细胞荧光显微镜观察

Fig. 11 Fluorescence microscopy observation of 293FT cells infected by specific vector lentivirus concentrate

2.5 慢病毒感染 PFF 细胞及阳性细胞筛选结果

稳转 PCW-eSpCas9(1.1) 基因 PFF 细胞进行 pLV-sgRNA-2A-GFP 特异性慢病毒载体感染, 灭稻

瘟菌素筛选 3 d 左右细胞大量死亡。图 12 为药物筛选 7、14、28 d 荧光显微镜观察结果, 可以看到 28 d 所筛选的细胞系有约 90% 以上的细胞表达了绿色荧光蛋白, 表明此时 pLV-sgRNA-2A-GFP 特异性慢病毒载体感染 PFF 细胞系筛选成功。在筛选成功的 PFF 细胞系中加入 Dox 诱导培养 72 h, PCR 扩增 *Sohlh1* 基因含有 3、4 号靶位点的片段, 经分子克隆与测序, 结果显示测序的 20 个菌液中, 3 号位点有突变的样品数为 14 个, 突变率为 70%, 4 号位点有突变的样品数为 7 个, 突变率为 35%, 而 3、4 号位点同时发生移码突变的样品数为 4 个, 突变率为 20%, 最终测得样品突变总数为 17 个, 有敲除的样品比例达到 85%。

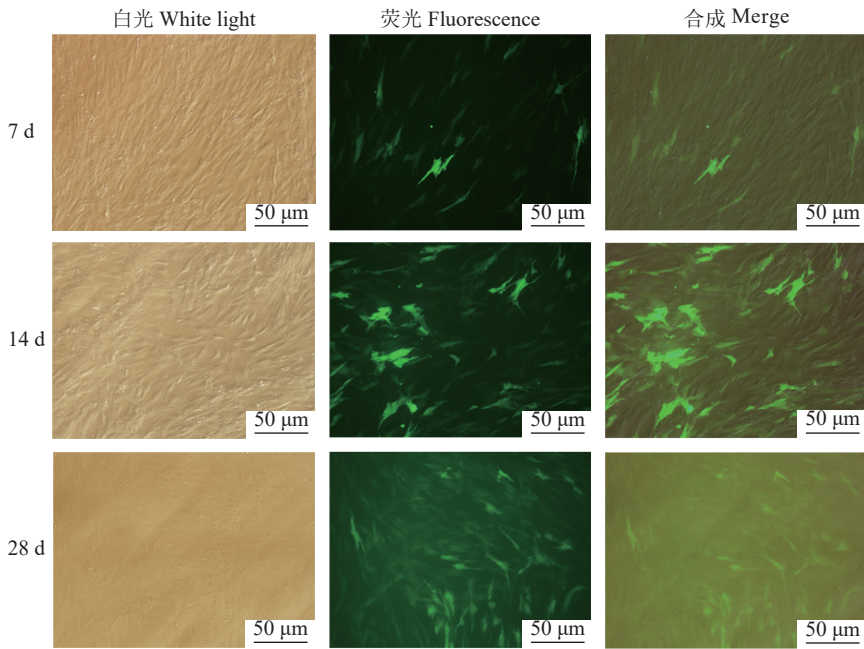


图 12 药物筛选不同天数荧光显微镜观察

Fig. 12 Fluorescence microscopy observation on different days of drug screening

3 讨论与结论

生殖细胞特异性基因由于只在生殖细胞中表达, 对于发育生物学研究显得十分重要。基因敲除试验证明 *Sohlh1* 基因在生殖细胞成熟过程中起着重要的作用^[1-2], 成年 *Sohlh1*(-/-) 雌鼠卵巢的临床表型与人类卵巢早衰 (Premature ovarian failure, POF) 患者相似, 而且雄性性腺机能衰退^[20] 等也与 *Sohlh1* 基因的突变有关。本研究选择 *Sohlh1* 为靶基因, 通过软件预测 *Sohlh1* 基因 CDs 区全部的 sgRNA 位点, 构建 U6-sgRNA 瞬时表达元件进行敲除效果的验证, 测序得到各靶位点的敲除情况, 成功地筛选到有敲除活性的靶位点, 为研究敲除后 *Sohlh1* 基因的功能打下了基础。

本研究使用的 Tet-on 系统, 它的调控元件为反式应答转录激活因子 (Reverse tTA, rtTA), 在不加入诱导剂 Dox 时, rtTA 不与表达目的基因的 Tet 应答元件 (TRE) 结合, 无法启动目的基因表达, 当加入 Dox 诱导后, rtTA 结构改变, 能够结合到 TRE 上, 激活插入的目的基因表达。本研究利用已经优化好的低脱靶率慢病毒载体 PCW-eSpCas9(1.1)(含 Tet-on 系统), 通过 Tet-on 系统与 CRISPR/Cas9 系统的紧密结合, 使用构建好的 pLV-sgRNA-2A-GFP 特异性慢病毒载体侵染含有上述系统的 PFF 细胞, 由 Tet-on 系统调控 *Cas9* 基因的表达, 在试验中加入 Dox 诱导表达 *Cas9* 蛋白对 *Sohlh1* 基因进行切割, 造成 *Sohlh1* 基因突变, 测序结果显示有敲

除样品的比例高达 85%, 成功地构建了可诱导型猪 *Sohlh1* 基因敲除细胞系。

猪在生理结构上与人类极为相似, 包括胃肠道、肾脏、外神经、皮肤、内分泌系统、生殖系统等^[21], 因此, 猪可作为一种重要的大动物模型应用于预防和治疗药物的临床前试验^[22]、人类疾病发病机制及功能基因组学研究^[23-24]。但猪制备生殖疾病模型鲜有报道。本研究构建的敲除 *Sohlh1* 基因细胞系可用于后期条件性生殖细胞敲除猪模型的制备, 为后期研究 *Sohlh1* 基因的功能和解决人类生殖疾病相关问题创造条件。

本研究通过改造和优化的慢病毒载体介导, 利用 Tet-on 系统和 CRISPR/Cas9 系统成功制备了可诱导型 *Sohlh1* 基因敲除 PFF 细胞系, 为研究 *Sohlh1* 基因的功能以及制备条件性敲除 *Sohlh1* 基因生殖模型猪储备了试验材料。

参考文献:

- [1] BALLOW D, MEISTRICH M L, MATZUK M, et al. *Sohlh1* is essential for spermatogonial differentiation[J]. *Developmental Biology*, 2006, 294(1): 161-167.
- [2] PANGASS A, CHOI Y, BALLOWD J, et al. Oogenesis requires germ cell-specific transcriptional regulators *Sohlh1* and *Lhx8*[J]. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103(21): 8090-8095.
- [3] ZHAO S, LI G, DALGLEISH R, et al. Transcription factor SOHLH1 potentially associated with primary ovarian insufficiency[J]. *Fertility and Sterility*, 2015, 103(2): 548-553.

- [4] CHOI Y, JEON S, CHOI M, et al. Mutations in *Sohlh1* gene associate with nonobstructive azoospermia[J]. *Human Mutation*, 2010, 31(7): 788-793.
- [5] NIU Y, SHEN B, CUI Y, et al. Generation of gene-modified cynomolgus monkey via Cas9/RNA-mediated gene targeting in one-cell embryos[J]. *Cell*, 2014, 156(4): 836-843.
- [6] 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[J]. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2014, 46: 49-55.
- [7] WU Y, LIANG D, WANG Y, et al. Correction of a genetic disease in mouse via use of CRISPR-Cas9[J]. *Cell Stem Cell*, 2013, 13(6): 659-662.
- [8] XIE F, YE L, CHANG J C, et al. Seamless gene correction of beta-thalassemia mutations in patient-specific iPSCs using CRISPR/Cas9 and piggyBac[J]. *Genome Research*, 2014, 24(9): 1526-1533.
- [9] WU Y, ZHOU H, FAN X, et al. Correction of a genetic disease by CRISPR-Cas9-mediated gene editing in mouse spermatogonial stem cells[J]. *Cell Research*, 2015, 25(1): 67-79.
- [10] TORRES R, MARTIN M C, GARCIA A, et al. Engineering human tumour-associated chromosomal translocations with the RNA-guided CRISPR-Cas9 system[J]. *Nature Communications*, 2014, 5: 3964.
- [11] XUE W, CHEN S, YIN H, et al. CRISPR-mediated direct mutation of cancer genes in the mouse liver[J]. *Nature*, 2014, 514(7522): 380-384.
- [12] 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.
- [13] SLAYMAKER I M, GAO L, ZETSCHE B, et al. Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity[J]. *Science*, 2016, 351(6268): 84-88.
- [14] GOSSEN M, FREUNDLIEB S, BENDER G, et al. Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian Cells[J]. *Science*, 1995, 268(5218): 1766-1769.
- [15] GOSSEN M, BUJARD H. Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters[J]. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1992, 89: 5547-5551.
- [16] FURTH P A, ST ONGE L, BOGER H, et al. Temporal control of gene expression in transgenic mice by a tetracycline-responsive promoter[J]. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1994, 91: 9302-9306.
- [17] BICHARA M, WAGNER J, LAMBERT I B. Mechanisms of tandem repeat instability in bacteria[J]. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 2006, 598(1/2): 144-163.
- [18] YU J, MULLER H, HEHN S, et al. Construction and application of an inducible system for homogenous expression levels in bulk cell lines[J]. *PLoS One*, 2009, 4(7): e6445.
- [19] GAJBHIYE V, ESCALANTE L, CHEN G, et al. Drug-loaded nanoparticles induce gene expression in human pluripotent stem cell derivatives[J]. *Nanoscale*, 2014, 6(1): 521-531.
- [20] BAYRAM Y, GULSUNER S, GURAN T, et al. Homozygous loss-of-function mutations in SOHLH1 in patients with nonsyndromic hypergonadotropic hypogonadism[J]. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2015, 100(5): E808-E814.
- [21] BODE G, CLAUSING P, GERVAIS F, et al. The utility of the minipig as an animal model in regulatory toxicology[J]. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 2010, 62(3): 196-220.
- [22] LIU Y, ZENG B H, SHANG H T, et al. Bama miniature pigs (*sus scrofa domestica*) as a model for drug evaluation for humans: Comparison of in vitro metabolism and in vivo pharmacokinetics of lovastatin[J]. *Comparative Medicine*, 2008, 58(6): 580-587.
- [23] ROGERS C S, STOLTZ D A, MEYERHOLZ D K, et al. Disruption of the CFTR gene produces a model of cystic fibrosis in newborn pigs[J]. *Science*, 2008, 321(5897): 1837-1841.
- [24] WIMMERS K, MURANI E, PONSUKSILI S. Functional genomics and genetical genomics approaches towards elucidating networks of genes affecting meat performance in pigs[J]. *Briefings in Functional Genomics*, 2010, 9(3): 251-258.

【责任编辑 庄 延】