

# 应用 SSA 报告载体提高 ZFN 和 CRISPR/Cas9 对猪 *IGF2* 基因的打靶效率

吴金青<sup>1</sup>, 梅瑰<sup>2</sup>, 刘志国<sup>1</sup>, 陈瑶生<sup>1</sup>, 丛佩清<sup>1</sup>, 何祖勇<sup>1</sup>

1. 中山大学生命科学学院, 有害生物控制与资源利用国家重点实验室, 广州 510006;

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, 广州 510640

**摘要:** *IGF2*(Insulin-like growth factor 2)基因作为最复杂多样的生长因子之一, 对猪胎儿发育以及出生后生长发育和肌肉生成起着非常重要的作用。通过基因组编辑技术对我国本地猪种的 *IGF2* 基因作精确的遗传修饰, 对于提高本地猪种的瘦肉率具有重要的育种意义。文章在蓝塘猪胎儿成纤维细胞(Porcine fetal fibroblasts, PEF)中检测了锌指核酸酶(Zinc finger nucleases, ZFN)和 CRISPR/Cas9 对 *IGF2* 基因的打靶效率, 结果表明 CRISPR/Cas9 对 *IGF2* 基因的切割效率最高可达 9.2%, 显著高于 ZFN 的切割效率(<1%), 但两者均未达到作为体细胞核移植(Somatic nuclear transfer, SCNT)供体细胞所需的打靶效率。应用 SSA (Single-strand annealing)报告载体筛选技术来富集 *IGF2* 基因被 ZFN 和 CRISPR/Cas9 修饰过的 PEF 细胞, 结果表明, 该技术可使 CRISPR/Cas9 的打靶效率提高 5 倍左右, 对 ZFN 的打靶效率具有更大的增强作用。

**关键词:** *IGF2* 基因; ZFN; CRISPR/Cas9; SSA 报告系统

## Improving gene targeting efficiency on pig *IGF2* mediated by ZFNs and CRISPR/Cas9 by using SSA reporter system

Jinqing Wu<sup>1</sup>, Gui Mei<sup>2</sup>, Zhiguo Liu<sup>1</sup>, Yaosheng Chen<sup>1</sup>, Peiqing Cong<sup>1</sup>, Zuyong He<sup>1</sup>

1. State Key Laboratory of Biocontrol, School of Life Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510006, China;

2. Institute of Animal Science, Guangdong Academy of Agricultural Sciences; State Key Laboratory of Livestock and Poultry Breeding, Guangzhou 510640, China

**Abstract:** *IGF2* (Insulin-like growth factor 2) is a major growth factor affecting porcine fetal and postnatal development. We propose that the precise modification of *IGF2* gene of Chinese indigenous pig breed—Lantang pig by genome editing technology could reduce its backfat thickness, and increase its lean meat content. Here, we tested the genome editing activities of zinc finger nucleases (ZFNs) and CRISPR/Cas9 system on *IGF2* gene in the Lantang porcine fetal fibroblasts (PEF). The results indicated that CRISPR/Cas9 presented cutting efficiency up to 9.2%, which was significantly higher than that generated by ZFNs with DNA cutting efficiency lower than 1%. However, even by using CRISPR/Cas9, the relatively lower percentage of genetically modified cells in the transfected popula-

收稿日期: 2014-06-19; 修回日期: 2014-08-29

基金项目: 国家转基因重大专项(编号: 2013ZX08006005-005)和国家重点基础研究发展计划(973 计划)项目(编号: 2010CB945404)资助

作者简介: 吴金青, 硕士研究生, 专业方向: 生物工程。E-mail: jinqingw@163.com

通讯作者: 何祖勇, 博士, 讲师, 研究方向: 动物遗传与育种。E-mail: zuyonghe@gmail.com

DOI: 10.16288/j.ycz.2015.01.008

网络出版时间: 2014-10-15 8:07:28

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20141015.0807.003.html>

tion was not satisfied for somatic nuclear transfer (SCNT). Therefore, we used a SSA (Single-strand annealing) reporter system to enrich genetically modified cells induced by ZFN or CRISPR/Cas9. T7 endonuclease I assay revealed that this strategy improved genome editing activity of CRISPR/Cas9 by 5 folds, and was even more effective for improving genome editing efficiency of ZFN.

**Keywords:** *IGF2* gene; ZFN; CRISPR/Cas9; SSA reporter system

胰岛素样生长因子 2(或者类胰岛素生长因子 2) (Insulin-like growth factor 2, *IGF2*)<sup>[1]</sup>, 又称为生长调节素(Somatomedin A), 是目前所知功能最复杂多样的生长因子之一。作为一种胚胎生长因子, *IGF2* 不仅在胎儿的生长发育中发挥重要作用, 同时也是一种促有丝分裂肽, 对机体的正常生长发育有重要作用, 并能刺激肿瘤细胞的增殖。研究表明, 猪 *IGF2* 基因内含子 3 的 3072<sup>[2]</sup>位点发生单碱基突变(G→A)会引起 *IGF2* 基因的抑制因子 ZBED6<sup>[3]</sup>的蛋白表达量下调, 进而提高 *IGF2* 基因的表达水平, 对促进猪肌肉形成具有重要调控作用。该位点的突变与瘦肉率存在相关性, 可增加 3%~4%的瘦肉量。通过近年来迅速发展的基因组编辑技术对本地猪种的 *IGF2* 基因内含子 3 的 3072 位点进行精确的 G→A 点突变操作, 在基因组中不引入任何其他的外源 DNA 序列, 这样可以使本地猪种保持基因组的“纯度”, 最大限度地保留了其肉质优良、口感好等优良性状, 又能特异地提高其瘦肉率, 对于改良和利用本地猪种资源具有重要的育种意义。

通过传统的同源重组方法获取基因打靶猪不仅工作量大而且效率低下。基因组编辑技术包括锌指核酸酶技术<sup>[4]</sup>(Zinc finger nucleases, ZFN)、TALEN (Transcription activator-like effector nucleases)技术<sup>[5]</sup>以及 CRISPR (Clustered regularly interspaced short palindromic repeats)/Cas9<sup>[6, 7]</sup>技术的出现, 极大地提高了基因定点修饰的效率和精确性。其中 ZFN 和 TALEN 都是蛋白导向型的基因组编辑技术, 前者通过一种锌指蛋白结构识别基因组序列, 后者通过转录因子类似物蛋白识别基因组序列, 两者都是借助 *Fok* 核酸内切酶对靶基因进行非特异性切割的基因组编辑技术。与 ZFN 和 TALEN 不同, CRISPR/Cas9 技术是一种 RNA 导向型的基因组编辑技术<sup>[8]</sup>, 是由细菌和古生菌中一种被称为 CRISPR/Cas 的获得性免疫系统改造而来。CRISPR 位点由一系列保守的重复序列组成, 重复序列之间被短的间隔序列(Spacer)

隔开。依靠该免疫系统, 细菌或古细菌中 Cas 核酸酶将入侵的外源 DNA 切割成小片段, 作为间隔序列整合到自身基因组中的 CRISPR 位点上, 随后以间隔序列作为模板转录出相应的 CRISPR RNA (crRNA), crRNA 进一步与 trans-activating crRNA (tracrRNA)结合形成 tracrRNA:crRNA 复合体, 用来引导 Cas 核酸内切酶降解入侵的噬菌体或质粒<sup>[9]</sup>。通过人工设计, 可以将 tracrRNA 和 crRNA 这两种 RNA 改造形成具有引导作用的 sgRNA (short guide RNA), 足以引导 Cas9 对 DNA 的定点切割。sgRNA 可以构建到带有 U6 启动子的载体上, 可在哺乳动物细胞中获得表达。构建不同的 sgRNA 表达载体时, 只需要替换其中 20 bp 的 gRNA 序列即可, 而不像 ZFN 和 TALEN, 需要重新设计和组装与 DNA 结合的蛋白序列, 使 CRISPR/Cas9 技术具有操作更加简便和成本更低的优势。上述 3 种基因组编辑技术使基因定点遗传修饰变得相对简单高效, 不仅被应用于制备小鼠和斑马鱼等模式动物基因敲除模型<sup>[8]</sup>, 而且已经成功地用于制备基因敲除猪<sup>[10]</sup>。

目前应用基因组编辑技术制备基因敲除猪主要有两种途径。第一种方法是将表达 ZFN、TALEN 或 CRISPR/Cas9 的 mRNA 通过显微注射的方法<sup>[10]</sup>注入猪原核期受精卵当中, 再通过胚胎移植的方法获得基因敲除猪; 第二种方法是先制备基因敲除猪胎儿成纤维细胞系(Porcine fetal fibroblasts, PEF), 然后通过体细胞核移植的方法获得基因敲除猪。第一种方法可以较为快速地获得基因敲除猪, 但是基因敲除猪的遗传修饰类型、性别和遗传背景难以控制; 而采用第二种方法, 不仅可以预先确定遗传修饰类型和性别, 而且可以获得遗传背景完全一样的基因敲除猪。虽然 ZFN 和 CRISPR/Cas9 具有较强的基因组编辑能力, 但是多数情况下, 它们的活性往往不够高, 影响获取基因敲除的 PEF 细胞系。因此, 需要一种方法可以有效筛选基因组已被修饰过的细胞。在 HEK293 等永生细胞系中, 通过应用 SSA(Single-strand

annealing)报告载体<sup>[11]</sup>以及 Surrogate 报告载体<sup>[12]</sup>可以有效富集基因组被 ZFN 和 TALEN 修饰的细胞。但是目前还未见关于在 PEF 等原代细胞中应用该技术的报道。

本研究在 PEF 细胞中比较了 ZFN 和 CRISPR/Cas9 对猪 *IGF2* 基因打靶效率,并分析了这两种基因组编辑技术介导的基因修饰类型的差异性。通过构建 SSA 报告系统,利用 T7E I 实验和 TA 克隆测序分析方法证明该报告系统可以显著提高 ZFN 和 CRISPR/Cas9 对猪 *IGF2* 基因的打靶效率,为今后获取 *IGF2* 定点修饰猪进行了有益探索。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

蓝塘猪胎儿成纤维细胞由实验室分离建立。PX330 (sgRNA/Cas9 表达质粒) 购自 Addgene (北京中原公司代理, 货号: #42230)。pEGFP-SSA 载体由实验室构建保存。

## 1.2 方法

### 1.2.1 IGF2 基因靶位点选择

根据 *IGF2* 基因序列从 Sigma 公司定制 3 对靶向 *IGF2* 的 ZFN。在 3 对 ZFN 识别序列范围内, 根据 sgRNA 基本设计原则(序列符合 5'-GN<sub>19</sub>NGG-3'), 并借助软件分析(<http://crispr.mit.edu/>); 设计 5 条靶向猪 *IGF2* 基因的 sgRNA, 具体序列见表 1。

表 1 靶向 *IGF2* 基因 gRNA 序列信息

名称	序列	PAM	AT(%)
<i>IGF2</i> -sgRNA-1	CTTCGCCTAGGCTCGCAGCG	CGG	30
<i>IGF2</i> -sgRNA-2	TTCGCCTAGGCTCGCAGCGC	GGG	30
<i>IGF2</i> -sgRNA-3	GCTCGCAGCGCGGGAGCGCG	TGG	15
<i>IGF2</i> -sgRNA-4	CTCGCAGCGCGGGAGCGCGT	GGG	20
<i>IGF2</i> -sgRNA-5	TCGCAGCGCGGGAGCGCGTG	GGG	20

注：PAM (Protospacer-adjacent motif)指 sgRNA 结合基序。

### 1.2.2 猪 *IGF2* 基因 sgRNA/Cas9 打靶载体的构建

PX330 载体可同时表达 sg RNA 和密码子经人源性优化的 Cas9 蛋白(图 1)。根据表格 1 中所设计的 5 条 sgRNA, 合成相应的寡核苷酸正负单链, 每条单链上添加有相应的黏性末端。用 *Bbs* (NEB 公司)酶切 1  $\mu$ g PX330 载体, 线性化的质粒经电泳后, 通过胶回收试剂盒(OMEGA 公司)回收酶切载体。同时, 对正负两条寡核苷酸链进行复性和磷酸化处理, 使之形成具有黏性末端的双链 DNA 短片段。将上述短片段和线性化的 PX330 载体通过 T4 连接酶进行连接反应, 接着转化至 DH5 $\alpha$  感受态细胞中。最后挑选细菌单克隆, 通过测序鉴定 sgRNA 表达载体是否构建成功。

### 1.2.3 PEF 细胞培养与转染

PEF 细胞从蓝塘猪胎儿中分离建立。PEF 细胞在含有 20%胎牛血清和双抗(100 U/mL 青霉素和 100 mg/mL 链霉素)的 DMEM 培养基中生长。细胞培养 1~2 d

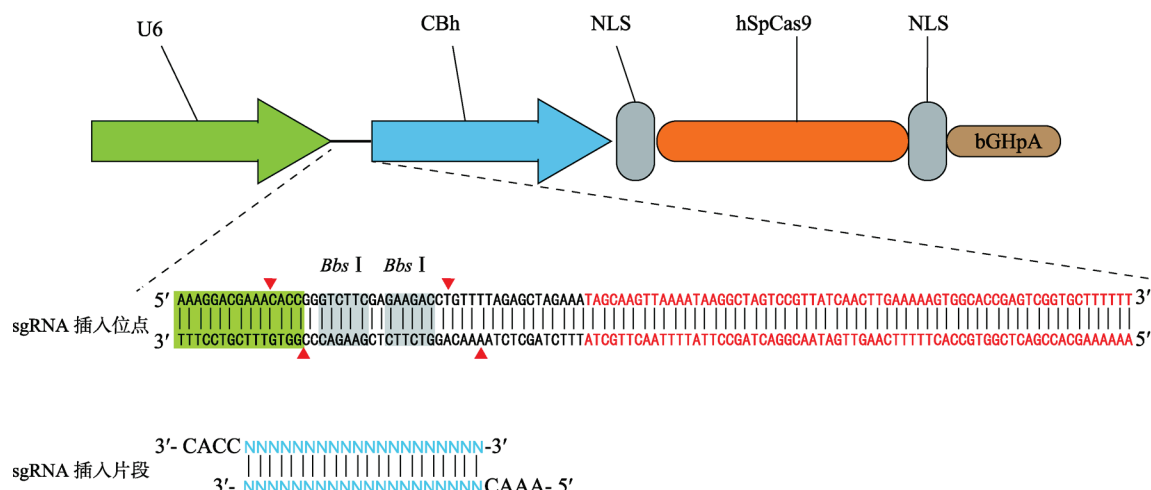


图 1 Cas9 与 sgRNA 共表达载体图谱(PX330 载体)

后更换一次培养基。PEF 细胞生长至 80%左右的汇合度时,先用 PBS 洗涤两遍,然后用胰酶消化 2 min,随后加入血清终止消化,将消化后的细胞收集至 15 mL 的离心管进行离心,弃上清后再用 PBS 洗涤一遍进行第二次离心。离心后弃上清,然后用适量 Buffer R (Life Technology)溶液重悬细胞,使细胞密度达到  $1.0 \times 10^7$  个细胞/mL,使用 Neon™ 转染系统(Life Technology)对 PEF 细胞进行电击转染。转染条件为:1700 V 电压,脉冲 20 s,脉冲次数为 1 次。细胞转染后 24 h 更换培养基,添加双抗,在 5%的  $\text{CO}_2$ 、37 条件下进行培养。3 d 后进行流式分析、分选或者收取细胞提取 DNA 进行后续实验。

#### 1.2.4 T7E I 实验

T7 核酸内切酶 (T7E 酶)可以用来检测由 ZFN 或者 CRISPR/Cas9 介导的基因突变,实验方法参照文献[12]。PEF 细胞在转染后 3 d,或者是经分选后再培养一周,使用组织/细胞提取试剂盒(OMEGA 公司)提取细胞基因组,通过 PCR 扩增出包含 ZFN 和 CRISPR/Cas9 识别位点的长度为 663 bp 的 *IGF2* 基因片段,采用 Axgen PCR 清洁试剂盒(Axgene 公司)纯化 PCR 产物。纯化后的 PCR 产物先在高温下

变性,然后经逐步降温退火形成异源双链 DNA,使用 T7E 对上述产物进行酶切,如果 ZFN 或 CRISPR/Cas9 有活性,会产生 460 bp 和 203 bp 的两个片段,可以在聚丙烯酰胺胶中分辨出来。最后通过 Image J 软件计算 ZFN 和 CRISPR/Cas9 的切割效率,估算其活性。PCR 扩增 *IGF2* 基因的引物如下:

*IGF2*-F: 5'-CCTCTCCTTTCCCAGTC\_CTTC-3';

*IGF2*-R12: 5'-GGAGGTCCCAGAAAAAGTCGT-3'。

#### 1.2.5 测序分析

利用 LA *Taq* 酶(TaKaRa 公司)扩增出包含 ZFN 和 sgRNA 所识别位点的 *IGF2* 基因片段,利用琼脂糖凝胶电泳分离该片段,然后用胶回收试剂盒(OMEGA 公司)回收,将回收的片段克隆到 pMD18-T 载体(TaKaRa 公司)中,转化后挑选若干个单菌落,由上海英骏公司进行测序分析。

#### 1.2.5 *IGF2*-SSA 报告载体构建及 SSA 实验原理

pEGFP-SSA 骨架载体上两段 F 重复片段的中间存在 *Xho* 和 *Bam*H 两个酶切位点(图 2A),先用这两种内切酶对骨架载体进行双酶切,并回收载体骨架片段。合成含有 ZFN 和 sgRNA 识别位点的两条

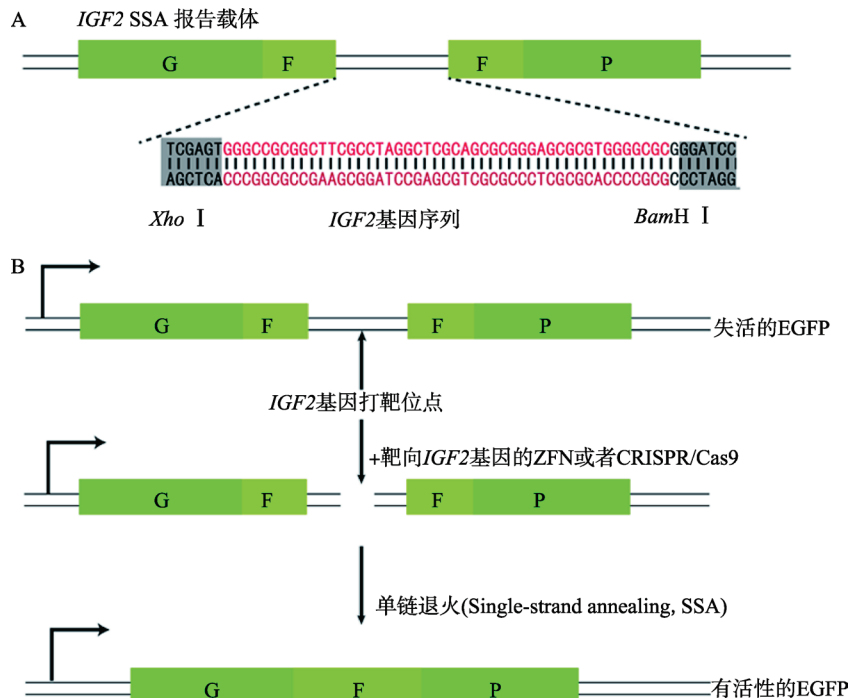


图 2 *IGF2* SSA 实验原理

A: *IGF2* SSA 报告载体,其中插入的 *IGF2* 基因序列为 ZFN 和 sgRNA 的靶位点; B: SSA 实验原理图。



互补的寡核苷酸单链, 经高温变性和复性后形成两端分别带有 *Xho* 和 *Bam*H 两个酶切位点粘性末端的短片段, 克隆到 pEGFP-SSA 骨架载体, 构建 *IGF2*-SSA 报告载体。SSA 报告系统的检测原理如下: 当报告载体上的 *EGFP* 基因的中间片段(F 片段)发生重复时, 报告载体无法表达出正常的 *EGFP* 蛋白。此时在两个 F 片段中间插入 *IGF2* 基因的 sgRNA 或 ZFN 的识别位点后, 在 Cas9 或 ZFN 对报告载体进行切割产生双链断裂后, 细胞会通过单链退火(Single-strand annealing, SSA)的修复机制, 利用同源序列互补重构出完整的 *EGFP* 基因(图 2B), 恢复荧光表达。此时, 通过检测细胞的绿色荧光水平可以对 sgRNA/Cas9 或 ZFN 的活性进行评估。

### 1.2.6 流式细胞分析与分选

先用 2%的胰蛋白酶消化贴壁的 PEF 细胞, 然后用 PBS 重悬成单个细胞, 经 50  $\mu$ m 尼龙膜过滤到流式管中, 在 FACSclibur 流式细胞分析仪上分析细胞的荧光比例与强度。应用 FACSaria II 流式细胞分选仪器分选出 EGFP 阳性细胞, 接种至 12 孔板中继续培养。

## 2 结果与分析

### 2.1 靶向猪 *IGF2* 的 CRISPR/Cas9 在 PEF 细胞中的活性验证

将构建好的 5 条 *IGF2*-sgRNA 分别与 *IGF2*-SSA 共转染至 PEF 细胞中, 48 h 后检测细胞内的 EGFP 荧光表达情况, 并通过流式细胞分析术对表达 EGFP 的细胞比例进行定量, 初步评估 5 条 sgRNA 的活性。结果表明, 5 条 sgRNA 均有活性, 其中 *IGF2*-sgRNA-2 和 *IGF2*-sgRNA-4 的活性最高(图 3), EGFP 荧光比例与只转染 SSA 报告载体的对照相比, 都提高了 6.5 倍。

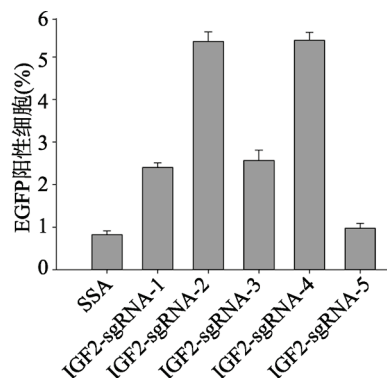


图 3 利用 SSA 方法对 *IGF2*-sgRNA 活性评估

### 2.2 T7E 酶切检测靶向 *IGF2* 基因 sgRNA/Cas9 的活性

分别将 5 条靶向 *IGF2* 基因的 sgRNA 质粒通过电转染方法转染 PEF 细胞中, 48 h 后收集细胞, 提取基因组 DNA, 通过 PCR 扩增 *IGF2* 基因片段, 通过 T7E 突变检测方法, 进一步验证 *IGF2*-sgRNA 的活性。从图 4 中可以看出, 除了 *IGF2*-sgRNA-5 未能检测到 460 bp 和 203 bp 酶切条带, 其余 4 条 sgRNA 均可见相应的酶切条带, 它们的活性分别估算为 5.1%、2.7%、7.8%和 9.2%。其中 *IGF2*-sgRNA-4 的估算活性最高, 与 SSA 检测的结果相符。

### 2.3 SSA 报告载体法富集被 ZFN 与 sgRNA/Cas9 修饰过的细胞

为了更好地比较 SSA 方法对提高 ZFN 和 CRISPR/Cas9 的打靶效率是否存在差异, 本研究选择 *IGF2*-sgRNA-1 与 *IGF2*-ZFN-set3 作为比较对象, 因为两者的靶位点基本重合(图 5A)。流式分析结果显示, *IGF2*-sgRNA-1 可以使 5.2%的细胞中的 *IGF2*-SSA 报告载体恢复 EGFP 荧光表达, 明显高于 *IGF2*-ZFN-set3 介导 1.5%的细胞表达 EGFP(图 5B), 这表明在该位点上, CRISPR/Cas9 的打靶效率明显高于 ZFN。同时, 通过 T7E 突变检测方法分别在分选前和分选后的细胞中检测 CRISPR/Cas9 和 ZFN 的切割效率, 结果发现在分选前的细胞中, *IGF2*-sgRNA-1 切割的效率为 1.6%, 而在分选后的细胞中, 其切割效率提高至 9.3%, 这表明 SSA 报告载体方法可以使 CRISPR/Cas9 的打靶效率提高 5 倍左右(图 5C)。

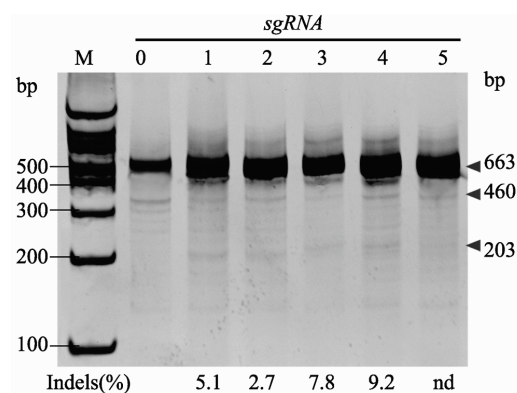


图 4 T7E1 酶切法检测靶向猪 *IGF2* 基因的 CRISPR/Cas9 活性

M: Marker; 0: 阴性对照; 1~5: *IGF2*-sgRNA-1~*IGF2*-sgRNA-5。

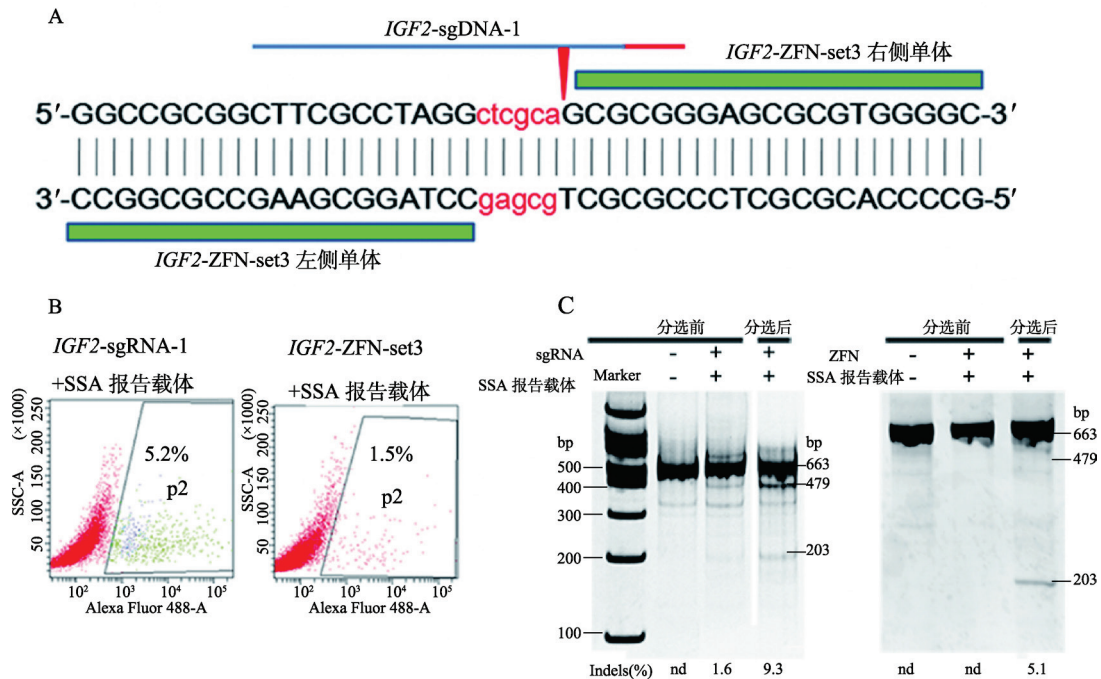


图 5 SSA 富集 ZFN 与 CRISPR/Cas9 基因修饰细胞实验

A: IGF2-sgRNA-1 和 IGF2-ZFN-set3 识别靶位点; B: 流式分选 IGF2-sgRNA-1 和 IGF2-ZFN-set3 与 SSA 共转染 EGFP 阳性细胞; C: T7E 实验验证 SSA 富集效率。

而 IGF2-ZFN-set3 分选前的细胞中切割效率低于检测下限( $<1\%$ ),而在分选后的细胞中提高至 5.1%,这提示 SSA 报告载体方法对低活性的 ZFN 具有更明显的提高打靶效率的作用。

#### 2.4 TA 克隆测序分析富集效率和突变类型

TA 克隆结果如表 2 所示。在转染 IGF2-sgRNA-1+SSA 后,以分选前的细胞基因组为模板扩增获得的 50 个 PCR 克隆中,发生突变的有 6 个,打靶效率为 12%;从分选后细胞基因组为模板扩增获得的 48 个 PCR 克隆中,发生突变的有 7 个,打靶效率为 16.7%。这表明 SSA 报告载体方法可使 CRISPR/Cas9 的打靶效率提高至 1.4 倍。对于 IGF2-ZFN-set3+SSA,从分选前的细胞基因组为模板扩增获得的 60 个 PCR 克隆中未检测到发生突变的克隆,而从分选后的细胞基因组为模板扩增获得的 30 个 PCR 克隆中,检测到发生突变的克隆为 5 个,打靶效率为 16.7%。与通过 T7E 突变检测的结果相一致,SSA 报告载体方法对低活性的 ZFN 具有更明显的提高打靶效率的作用。

此外,对测序结果进行统计分析,本研究发现 CRISPR/Cas9 和 ZFN 在猪 IGF2 基因引起的敲除片

段大小和突变类型存在差异。从图 6 的测序结果可以看出,CRISPR/Cas9 对猪 IGF2 基因可以引起达 123 bp 的缺失,而 ZFN 对该基因引起的敲除片段都小于 50 bp,说明 CRISPR/Cas9 可能更容易引起较大片段缺失。另外,ZFN 在 IGF2 基因引起 80% 的缺失突变,其余 20% 的突变为既有缺失又有插入的复合突变;而 CRISPR/Cas9 对 IGF2 基因的同个位点造成的突变类型中,插入突变高达 50%,而缺失突变仅占 30%,复合突变占 20%(与 ZFN 相似)(图 7)。这两种基因组编辑工具引起基因突变类型存在差异可能与两者所使用的非特异性内切酶引起双链 DNA 断裂末端不同相关,其中 ZFN 的 Fok 内切酶在切割 DNA 后会产生粘性末端,而 Cas9 切割 DNA 后会留下平末端。

表 2 T7E 实验和 TA 克隆实验对靶向猪 IGF2 基因 sgRNA 和 ZFN 的效率统计

打靶载体	分选前		分选后	
	T7E	TA 克隆	T7E	TA 克隆
IGF2-ZFN-set3	nd	nd	5.1%	16.7%
IGF2-sgRNA-1	1.6%	12%	9.3%	16.7%

**A** *IGF2* sgRNA-1

```
CGGCGGCAGCCGGGCGCGCGCTTCGCCTAGGCTCGCAGCGCGGAGCGCGTGGGGCGCGG (WT)
CGGCGGCAGCCGGGCGCGCGCTTCGCCTAGG --- AGCGCGGGAGCGCGTGGGGCGCGG (-5,1/50)
CGGCGGCAGCCGGGCGCGCGCTTCGCCTAGGCTCGCGG --- GAGCGCGTGGGGCGCGG (-5,1/50)
CGGCGGCAGCCGGGCGCGCGCTTCGCCTAGG --- CCGC (-123+2,1/50)
CGGCGGCAGCCGGGCGCGCGCTTCGCCTAGGCTCGCAAGCGCGGGAGCGCGTGGGGCGCGG (+1,3/50)
```

**B** *IGF2* sgRNA-1+SSA

```
CGGCGGCAGCCGGGCGCGCGCTTCGCCTAGGCTCGCAGCGCGGAGCGCGTGGGGCGCGG (WT)
CGGCGGCAGCCGGGCGCGCGCTTCGCCTAGG --- AGCGCGGGAGCGCGTGGGGCGCGG (-10,1/48)
CGGCGGCAGCCGGGCGCGCGCTTCGCCTAGG --- CGTGGGGCGCGG (-11,1/48)
--- GCCT --- GACACGCGGCG --- G (-57,2/48)
CGGCGGCAGCCGGGCGCGCGCTTCGCCTAGGCTCGCAAGCGCGGGAGCGCGTGGGGCGCGG (+1,3/48)
CGGCGGCAGCCGGGCGCGCGCTTCGCCTAGGCTCACAAAGCGCGGGAGCGCGTGGGGCGCGG (+1,1/48)
```

**C** *IGF2* -ZF1-set3+SSA

```
CGGCGGCAGCCGGGCGCGCGCTTCGCCTAGGCTCGCAGCGCGGGAGCGCGTGGGGCGCGG (WT)
CGGCGGCAGCCGGGCGCGCGCTTCGCCTAG --- TCACAGCGCGGGAGCGCGTGGGGCGCGG (-2,3/30)
CGGCGGC --- CC --- G --- GGGCGCGG (-42,1/30)
CGGCGCA --- CGCGTGGGGCGCGG (-35+1,1/30)
```

图 6 TA 克隆测序分析

A: *IGF2* sgRNA-1 测序比对结果; B: *IGF2* sgRNA-1+SSA EGFP 阳性细胞分选后测序比对结果; C: *IGF2*-ZFN-set3+SSA EGFP 阳性细胞分选后测序结果。

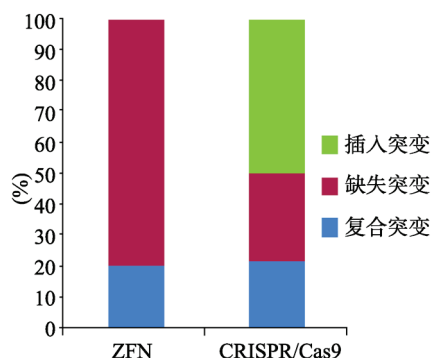


图7 ZFN与CRISPR/Cas9介导IGF2基因突变类型的比较

复合突变：既有插入突变又有缺失突变。

### 3 讨 论

ZFN 是最早出现的基因组编辑工具，在家畜基因敲除研究中已经得到了较多的应用。Yang 等<sup>[13]</sup>研究发现，采用新霉素(G418)筛选之后 ZFN 在 PEF 细胞中对猪 *Ppar-γ* 基因的打靶活性仅有 4%，而 Watanabe 等<sup>[14]</sup>利用 ZFN 对猪 *IL2RG* 进行基因敲除研究中，ZFN 在 PEF 细胞中的打靶效率更低仅为 0.5%。上述两个研究中基因敲除猪的获得都是通过挑选单细胞克隆方法筛选出基因敲除的细胞系用于体细胞克隆。Hauschild 等<sup>[15]</sup>利用 ZFN 对猪 *GGT1* 基因敲除研究中，在 PEF 细胞中活性也较低，仅有 1%，由于该基因表达与膜蛋白有关，该课题组通过借助相应的抗体采用磁珠分选的方法获取了基因敲除细胞。从上述相关研究中可以看出 ZFN 在猪 PEF

细胞中的打靶效率相对比较低，获取敲除细胞系的难度较大。CRISPR/Cas9 作为最新的基因编辑工具，具有更加高效简便的特点。2014 年，周琪课题组通过受精卵显微注射 CRISPR/Cas9 mRNA 的方法，获得了 *vWF* 基因敲除猪，单等位基因的敲除效率高达 68%，双等位基因敲除效率也达到了 37%<sup>[10]</sup>。尽管采用受精卵显微注射 CRISPR/Cas9 mRNA 的方法获取基因敲除猪具有较高的效率，然而也存在一定的缺陷，比如利用该方法无法在基因敲除猪出生前确定其性别及基因修饰的情况。目前尚未见关于 CRISPR/Cas9 技术在 PEF 细胞中进行基因打靶，进而用于体细胞克隆的研究报告。

本研究利用 ZFN 和 CRISPR/Cas9 对猪 *IGF2* 基因进行了定点敲除相关研究,并通过 SSA 方法提高了 ZFN 和 CRISPR/Cas9 对猪 *IGF2* 基因的打靶效率。研究表明,从 Sigma 公司购买的 3 对 ZFN 在 PEF 细胞中的活性均偏低,都无法通过 T7E I 检测出来,这与靶向猪 *IL2RG* 基因<sup>[14]</sup>和 *GGTA1* 基因<sup>[15]</sup>分别只有 0.5%效率和 1%的效率相一致。因而,本文构建了靶向该基因的 5 条 sgRNA,分别通过 SSA 方法和 T7E I 评估了它们的活性,其中活性最高的 *IGF2*-sgRNA-4 切割效率接近 10%。本研究结果表明,CRISPR/Cas9 对猪 *IGF2* 基因的敲除效率要高于 ZFN。然而 CRISPR/Cas9 在其他物种中的打靶效率可以达到 80%以上<sup>[8]</sup>,在显微注射过的猪受精卵中的打靶效率也达到 68%,此外本实验室发现 CRISPR/Cas9 对猪其他基因,如 *BMP15* 基因敲除效率也可以达 20%以上(未发表)。



本文认为在 PEF 细胞中, CRISPR/Cas9 对 *IGF2* 基因的打靶效率不够高的原因可能有两个方面: (1) PEF 细胞转染效率相比于其他细胞系如 HEK293FT 细胞较低; (2) *IGF2* 基因结构较为复杂, GC 含量很高, 甲基化程度高, 所设计的每条 sgRNA 的 GC 含量都在 70% 以上, 可能会影响其与靶位点的结合。因为 ZFN 和 CRISPR/Cas9 对猪 *IGF2* 基因的打靶效率都偏低, 所以需要有效的方法提高它们的打靶效率。韩国科学家利用 Surrogate 报告载体筛选方法在 HEK293FT 细胞中可以将 ZFN 对 *TP53* 基因的打靶效率提高 13 倍<sup>[12]</sup>, 其他相关研究通过 SSA 报告载体筛选<sup>[11]</sup>的方法也可以在 HEK293FT 和 HeLa 等细胞系中将 ZFN 介导的基因修饰效率提高至不同的程度, 但目前尚未见关于在 PEF 细胞等原代细胞中应用这些筛选方法来提高基因打靶效率的报道。

本研究应用 SSA 报告系统, 在 PEF 细胞中检测了其靶向猪 *IGF2* 基因的 ZFN 和 sgRNA 是否具有提高打靶效率的作用, 结果表明 SSA 报告系统均可显著提高两种基因组编辑工具的打靶效率, 而且对低活性的 ZFN 的提高效果更为明显(表 2)。本研究应用 SSA 报告系统, 在 PEF 细胞中只经过一轮细胞筛选, 在 Surrogate 报告载体方法中提到采用两轮细胞筛选的方法可以进一步提高 ZFN 的打靶效率<sup>[12]</sup>, 因此, 今后可通过两轮细胞筛选方法进一步提高 ZFN 或 CRISPR/Cas9 对猪 *IGF2* 基因的打靶效率, 为获取 *IGF2* 基因定点修饰的蓝塘猪提供研究基础。

## 参考文献

- [1] Van Laere AS, Nguyen M, Braunschweig M, Nezer C, Collette C, Moreau L, Archibald AL, Haley CS, Buys N, Tally M, Andersson G, Georges M, Andersson L. A regulatory mutation in *IGF2* causes a major QTL effect on muscle growth in the pig. *Nature*, 2003, 425(6960): 832–836. [\[DOI\]](#)
- [2] Oczkowicz M, Tyra M, Walinowicz K, Różycki M, Rejdach B. Known mutation (A3072G) in intron 3 of the *IGF2* gene is associated with growth and carcass composition in Polish pig breeds. *J Appl Genet*, 2009, 50(3): 257–259. [\[DOI\]](#)
- [3] Markljung E, Jiang L, Jaffe JD, Mikkelsen TS, Wallerman O, Larhammar M, Zhang XL, Wang L, Saenz-Vash V, Gnirke A, Lindroth AM, Barrés R, Yan J, Strömberg S, De S, Pontén F, Lander ES, Carr SA, Zierath JR, Kullander K, Wadelius C, Lindblad-Toh K, Andersson G, Hjälms G, Andersson L. ZBED6, a novel transcription factor derived from a domesticated DNA transposon regulates *IGF2* expression and muscle growth. *PLoS Biol*, 2009, 7(12): e1000256. [\[DOI\]](#)
- [4] Bibikova M, Golic M, Golic KG, Carroll D. Targeted chromosomal cleavage and mutagenesis in *Drosophila* using zinc-finger nucleases. *Genetics*, 2002, 161(3): 1169–1175. [\[DOI\]](#)
- [5] Joung JK, Sander JD. TALENs: a widely applicable technology for targeted genome editing. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2013, 14(1): 49–55. [\[DOI\]](#)
- [6] Cong L, Ran FA, Cox D, Lin SL, Barretto R, Habib N, Hsu PD, Wu XB, Jiang WY, Marraffini LA, Zhang F. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 2013, 339(6121): 819–823. [\[DOI\]](#)
- [7] Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 2012, 337(6096): 816–821. [\[DOI\]](#)
- [8] Gaj T, Gersbach CA, Barbas CF. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends Biotechnol*, 2013, 31(7): 397–405. [\[DOI\]](#)
- [9] Garneau JE, Dupuis ME, Villion M, Romero DA, Barrangou R, Boyaval P, Fremaux C, Horvath P, Magadán AH, Moineau S. The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature*, 2010, 468(7320): 67–71. [\[DOI\]](#)
- [10] Hai T, Teng F, Guo RF, Li W, Zhou Q. One-step generation of knockout pigs by zygote injection of CRISPR/Cas system. *Cell Res*, 2014, 24(3): 372–375. [\[DOI\]](#)
- [11] Doyon Y, Holmes MC, Li TJ. Rapid screening of biologically active nucleases and isolation of nuclease-modified cells. Google Patents US2012037926 A1. 2011. [\[DOI\]](#)
- [12] Kim H, Um E, Cho SR, Jung CR, Kim H, Kim JS. Surrogate reporters for enrichment of cells with nuclease-induced mutations. *Nat Methods*, 2011, 8(11): 941–943. [\[DOI\]](#)
- [13] Yang DS, Yang HQ, Li W, Zhao BT, Ouyang Z, Liu ZM, Zhao Y, Fan NN, Song J, Tian JT, Li F, Zhang JF, Chang L, Pei DQ, Chen YE, Lai LX. Generation of PPAR $\alpha$  mono-allelic knockout pigs via zinc-finger nucleases and nuclear transfer cloning. *Cell Res*, 2011, 21(6): 979–982. [\[DOI\]](#)
- [14] Watanabe M, Nakano K, Matsunari H, Matsuda T, Maehara M, Kanai T, Kobayashi M, Matsumura Y, Sakai R, Kuramoto M, Hayashida G, Asano Y, Takayanagi S, Arai Y, Umeyama K, Nagaya M, Hanazono Y, Nagashima H. Generation of interleukin-2 receptor gamma gene knockout pigs from somatic cells genetically modified by zinc finger nuclease-encoding mRNA. *PLoS One*, 2013, 8(10): e76478. [\[DOI\]](#)
- [15] Hauschild J, Petersen B, Santiago Y, Queisser AL, Carnwath JW, Lucas-Hahn A, Zhang L, Meng XD, Gregory PD, Schwinzer R, Cost GJ, Niemann H. Efficient generation of a biallelic knockout in pigs using zinc-finger nucleases. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(29): 12013–12017. [\[DOI\]](#)

(责任编辑: 张 博)