

利用 CRISPR/Cas9 系统建立 *Xist* 基因敲除猪模型

李国玲, 钟翠丽, 倪生, 刘德武, 蔡更元, 李紫聪, 杨化强, 吴珍芳

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, 广州 510642

摘要: 体细胞核移植技术在家畜良种繁育、基因修饰动物生产、濒危动物的拯救和人类疾病的治疗等领域具有重要的应用价值, 但目前克隆动物生产效率较低, 平均不超过 5%。低下的克隆效率极大地限制了该技术的快速发展。在影响克隆猪生产效率的诸多因素中, X 染色体的异常失活是导致克隆效率低下的重要原因, 而与 X 染色体失活密切相关的一个重要基因是 *Xist* 基因, 这表明 *Xist* 基因可能直接或间接地影响猪的克隆效率。本文以 CRISPR/Cas 系统为基础, 在 *Xist* 基因上设计 5 个 CRISPR/Cas 系统靶位点, 并筛选出有效的 Target 3、Target 4 sgRNA, 在细胞水平切割效率为 1% 和 3%, 在胚胎水平为 75% 和 85.7%。同时将有效的 sgRNA 体外转录并显微注射至胚胎体内, 发现 Target 3 和 Target 4 组合效果最好, 敲除效率为 100%。通过胞浆注射和胚胎移植方法生产出 6 头克隆猪, 有 2 头活仔实现完全敲除。本文成功建立 *Xist* 基因敲除猪模型, 为后续通过敲除猪 *Xist* 基因提高克隆效率的研究奠定了基础。

关键词: *Xist*; CRISPR/Cas; 克隆效率; 猪

Establishment of porcine *Xist* knockout model using CRISPR/Cas9 system

Guoling Li, Cuili Zhong, Sheng Ni, Dewu Liu, Gengyuan Cai, Zicong Li, Huaqiang Yang, Zhenfang Wu

National Engineering Research Center for Swine Breeding Industry, College of Animal Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China

Abstract: Somatic cell nuclear transfer technique has great applications in livestock breeding, production of genetically modified animals, rescue of endangered species and treatment of human diseases. However, the currently low efficiency in animals cloning, an average of less than 5%, greatly hindered the rapid development of this technique. Among many factors which affect the efficiency of cloning pigs, X chromosome inactivation is an important one. Moreover, *Xist* gene is closely related to X chromosome inactivation, suggesting that it may directly or indirectly affects cloning efficiency. In this study, multiple sgRNAs were designed based on the CRISPR/Cas system, and two

收稿日期: 2016-04-19; 修回日期: 2016-06-18

基金项目: 国家转基因重大专项(编号: 2016ZX08006002)和广东省科学技术部(编号: 2016B0202330064, 2015TX01N081)资助[Supported by the National Transgenic Major Projects (No. 2016ZX08006002) and Department of Science and Technology of Guangdong Province of China (Nos. 2016B0202330064, 2015TX01N081)]

作者简介: 李国玲, 硕士研究生, 专业方向: 基因编辑。E-mail: 792268184@qq.com

通讯作者: 杨化强, 博士, 副研究员, 研究方向: 遗传育种。E-mail: Yangh@scau.edu.cn

吴珍芳, 博士, 教授, 研究方向: 遗传育种。E-mail: wzfemail@163.com

DOI: 10.16288/j.ycz.16-137

网络出版时间: 2016/12/1 17:11:19

URI: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20161201.1711.002.html>

sites (Target 3 and Target 4) whose mutation efficiency were 1% and 3% at the cellular level were selected. We successfully knocked out *Xist* with 100% efficiency by microinjecting sgRNAs for Target 3 and Target 4 in embryo. Finally, 6 cloning piglets were born including two *Xist*-fully-knockout piglets. The follow-up studies on increasing cloning efficiency can be carried out based on the *Xist*-knockout model.

Keywords: *Xist*; CRISPR/Cas; cloning efficiency; porcine

体细胞核移植技术(Somatic cell nuclear transfer, SCNT)在家畜良种繁育、基因修饰动物生产、濒危动物的拯救和人类疾病的治疗等领域具有重要的应用价值。在多莉羊^[1]出生后,哺乳动物克隆技术有了很大突破,并相继诞生了小鼠(*Mus musculus*)^[2]、山羊(*Capra aegagrus hircus*)^[3]、水牛(*Bubalus*)^[4]、兔子(*Leporidae*)^[5]、大鼠(*Rattus norvegicus*)^[6]、狗(*Canis lupus familiaris*)^[7]、雪貂(*Mustela putorius furo*)^[8]和猪(*Sus scrofa domestica*)^[9]等多种克隆动物。随着研究的不断深入,更多的研究者开始探索影响克隆动物生产效率低下的因素,如细胞培养液成分、供体细胞类型、操作手段以及表观遗传方式等^[10]。但目前克隆动物的出生效率依然很低,后代出生率平均不超过 5%^[11,12],尤其是猪的克隆效率基本维持在 1%~2%^[13]。

在影响克隆猪生产效率的诸多因素中,X染色体的异常失活是导致克隆效率低下的重要原因^[14,15],而与X染色体失活密切相关的是*Xist*基因^[16],其在XIC(X-inactivation center)中心开始转录,转录产物通过包围一条X染色体导致X染色体的失活,这表明*Xist*基因可能直接或间接地影响猪的克隆效率。Wutz等^[17]通过大量实验证明了*Xist*基因的第一外显子突变体对小鼠细胞存活的必要性,随后Inoue等^[18]通过敲除供体细胞*Xist*基因使小鼠的克隆效率提高近10倍;Matoba等^[19]和Oikawa等^[20]通过RNA干扰处理供体细胞*Xist*基因也有相似的发现。Mao等^[21]研究发现,通过添加组蛋白抑制剂Oxamflatin促进*Xist*基因甲基化也可以提高小鼠的克隆效率。以上研究均表明,抑制或破坏*Xist*基因表达均能有效地提高克隆小鼠的出生率,而此类研究在猪上尚未见报道。

CRISPR/Cas是细菌和古生菌抵抗外源病毒或质粒入侵的获得性免疫系统,主要有3种类型(I型、II型和III型)^[22],目前应用最广泛的是产脓链球菌中的II型CRISPR/Cas系统。CRISPR/Cas系统通过tracrRNA与crRNA复合物引导单个Cas9核酸酶实现对目的基因的定点切割^[23]。在实际应用中,

CRISPR/Cas系统通常会把两个编码tracrRNA与crRNA的基因结合成一个单链向导RNA(sgRNA),即现在运用的CRISPR/Cas系统主要是由Cas9蛋白和sgRNA组成。本研究以CRISPR/Cas系统为基础,在*Xist*基因上设计多个CRISPR/Cas系统打靶位点,并筛选出有效的sgRNA。同时将有效的sgRNA体外转录并显微注射至胚胎体内,验证其对*Xist*基因的敲除效果;最后通过筛选有效sgRNA组合,建立*Xist*基因敲除猪模型。通过生产*Xist*基因敲除猪模型,获得*Xist*基因敲除的细胞系,为后续通过敲除猪*Xist*基因提高克隆效率的研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

gRNA cloning vector和pcDNA3.3-hCas9(add-gene: 41815)质粒由中国科学院广州医药与健康中心研究员赖良学教授赠送;猪成体成纤维细胞(444)由广东温氏食品集团华农温氏股份有限公司水台原种猪场提供5日龄杜洛克公猪。

1.2 方法

1.2.1 sgRNA的设计和CRISPR/Cas系统载体制备

利用在线网站CRISPR Genome Engineering Resources(<http://crispr.genome-engineering.org/>)对*Xist*基因第一外显子筛选5个sgRNA,序列与位点为:

Target 1 (4976-4993): 5'-GGATCCCATCCCTC-CTAC-3';

Target 2(253-275): 5'-GGAATGTTTTTGGTT-GACTCTT-3';

Target 3 (16949-16968): 5'-GGCTATTATTCAT-CTTAACC-3';

Target 4 (16598-16616): 5'-TTCCTGTTTTGGC-TATAC-3';

Target 5 (740-758): 5'-GGAAAAGTGTGGGT-TTTG-3'。

对筛选出的sgRNA和对应的互补序列分别加

上与 *Bbs* 酶切 CRISPR/Cas 骨架质粒互补的粘性末端, 合成对应的 Oligo。合成的 sgRNA 单链复性形成的双链与线性化的 CRISPR/Cas 骨架进行连接、转化、挑单克隆测序; 测序正确的菌液抽提质粒, 一类为抽提后直接用于细胞转染的质粒组(U6-gRNA-N、U6-Cas9, N 为对应的靶位点编号), 另一类为抽提后用于体外转录的质粒组(T7-gRNA-N、T7-Cas9, N 为对应的靶位点编号)。

1.2.2 T7E1 酶切检测突变效率

当复苏后的细胞汇合度达到 50%~80%(8×10^6)时, 将 U6-gRNA-N 质粒转染成体成纤维细胞。转染 24 h 后, 提取基因组 DNA, 使用 PrimeSTAR HS DNA Polymerase PCR 扩增 *Xist* 基因第一外显子, 引物信息见表 1。

PCR 产物进行纯化后, 产物按 NEB 提供的说明书进行 T7 endonuclease (T7E1)酶切, 酶切产物进行电泳分析。

1.2.3 测序检测突变效率

通过单克隆测序验证各靶位点的切割效率, 对共转染组靶位点的检测采用两个靶位点检测引物组合的方式进行扩增。扩增片段纯化后通过平末端连接到克隆载体, 转化后挑取单克隆测序。

1.2.4 体外转录

通过 T7-s F/Tracr-rev R 引物(T7-s F: 5'-GAAA-TTAATACGACTCACTATA-3'; Tracr-rev R: 5'-AAAAAGCACCAGCTCGGTGCCAC-3')从 T7-gRNA-N 质粒上扩增得到 T7-gRNA-N 体外转录模板。采

用 T7 Quick High Yield RNA Synthesis Kit (NEB)体外转录 T7-gRNA-N, 通过 *Mss* 内切酶线性化获得 T7-Cas9 体外转录模板, 采用 mMESSAGE mMACHINE® T7 Kit 进行体外转录和加帽反应, 然后用 *E.coli* poly(A) polymerase (NEB)对产物进行加 poly(A)反应, 并进行电泳检测。

1.2.5 体细胞核移植

从屠宰场收集猪卵巢, 用生理盐水(37℃)清洗干净, 使用注射器抽取直径为 6 mm 卵泡中的卵母细胞。D 体视显微镜下挑选出细胞质均匀、卵丘致密且包裹 2 层以上的卵丘细胞-卵母细胞复合体(Cumulus oocyte complexes, COCs)。在 39℃、5% CO₂、饱和湿度的培养箱中培养 42~44 h 后转移到含透明质酸酶的离心管中, 用吸管将脱去卵丘的卵母细胞拣出。洗涤后于体视镜下将带有第一极体的成熟卵母细胞挑出。将挑选已排出第一极体且形态良好的卵母细胞用去核针采用盲吸法去核, 随后注入适合的体细胞, 完成胚胎重构过程。

1.2.6 胞浆显微注射

为进一步验证在细胞水平具有活性的靶位点在克隆胚胎水平的敲除效果, 将 T7-gRNA-3 或 T7-gRNA-4 和 T7-Cas9 的 mRNA 混合后(T7-Cas9 的 mRNA 终浓度为 200 ng/μL, T7-gRNA 的 RNA 终浓度为 20 ng/μL)注射克隆胚胎, 每组注射 80 枚胚胎, 每枚胚胎注射 10 pL 预混液。

1.2.7 胚胎移植

根据 CRISPR/Cas 系统在克隆胚胎水平得到的结果选择出能有效敲除 *Xist* 基因的质粒组合进一步生产 *Xist* 基因敲除猪。将注射完的胚胎用胚胎培养液洗涤 5 遍后, 转入预平衡好的胚胎培养液, 置于 39℃、饱和湿度、低氧(5% O₂+5% CO₂+90% N₂)的条件下培养过夜。第 2 d 早上采用输卵管移植法将发育到 2 细胞的胚胎移植入到发情受体母猪子宫。常规手术缝合, 术后连续 4 h 注射抗生素消炎, 每天记录受体母猪的生理情况。此外, 胚胎移植后的第 10 h 注射 1000 IU 的 PMSG, 第 13 d 注射 800 IU 的 HCG 来维持妊娠。

表 1 引物信息

Table 1 The information of primers

引物名称	引物序列(5' 3')
Target 1	F: TTTTGGTTGACTCTTCTGGTTTT R: TTAGCATAACAAGTAGCCCTCA
Target 2	F: TTTTCCCGGTGGAAGCTTGCTGGT R: CCAAGGGGTTGGAGAAAGAG
Target 3	F: TCATCTGGAG CATCAACC R: AAGGAGCTAGTAGTCAAAC
Target 4	F: CTCATTACTAAGGGTGGTGGGT R: GTCCCATCATTCTAAGCCCTCA
Target 5	F: CCTCTTTCTCCAACCCCTTG R: GCATAACAAGTAGCCCTCA

2 结果与分析

2.1 U6-gRNA-N 载体构建

U6-gRNA 质粒骨架上有预留的 *Bbs* 双酶切位点, 其线性化后与各靶位点对应的 Oligo 经过复性后形成带两个粘性末端的双链 DNA, 在连接酶的作用下构成完整 U6-gRNA-N 载体, 其测序结果如图 1 所示, 结果与设计的 sgRNA 一致, 表明载体构建成功。

2.2 T7E1 酶切检测突变效率

Target 1、Target 2、Target 3、Target 4 和 Target 5 靶位点经 T7E1 酶切, 结果发现除 Target 1 靶位点未检测到突变外, Target 2、Target 3、Target 4 和 Target 5 靶位点均检测到突变(图 2), 经灰度扫描得到的突变率分别为 11%、18%、20%和 14%, 表明 U6-gRNA-2、U6-gRNA-3、U6-gRNA-4 和 U6-gRNA-5 在转染细胞时均有活性。

2.3 测序检测突变效率

通过单克隆测序的方法对各转染组均检测了 96 个单克隆, 发现仅 U6-gRNA-3 和 U6-gRNA-4 有切

割效果, 分别为 1%和 3%(图 3A), 而 U6-gRNA-1、U6-gRNA-2 和 U6-gRNA-5 对应的靶位点均未检测到突变, 表明 U6-gRNA-1、U6-gRNA-2 和 U6-gRNA-5 均无活性。同时对 U6-gRNA-3 和 U6-gRNA-4 共转染组测序后发现, 13 个单克隆中有 2 个发生敲除突变, 在发生敲除突变的 8 号和 11 号单克隆中均敲除了 Target 3 靶位点和 Target 4 靶位点之间的片段(图 3B), 敲除效率为 18.2%。

2.4 T7-gRNA-N 载体构建

根据 T7E1 酶切和测序分析, 构建体外转录载体 T7-gRNA-3 和 T7-gRNA-4。载体测序结果见图 4。

2.5 T7-gRNA-N 和 T7-Cas9 体外转录

利用构建好的 T7-gRNA-3、T7-gRNA-4 质粒制备相应的体外转录产物(图 5)。经体外转录后得到的 gRNA 浓度均在 5000 ng/ μ L(20 μ L)以上, 电泳结果发现其条带完整(图 5A), 说明 gRNA 较好的体外转录效果除了与其片段小有利体外转录外, 可能还与大幅增加反应时间(过夜反应)有关。得到的 Cas9-mRNA 的浓度为 1.360 μ g/ μ L(50 μ L), 电泳条带存在

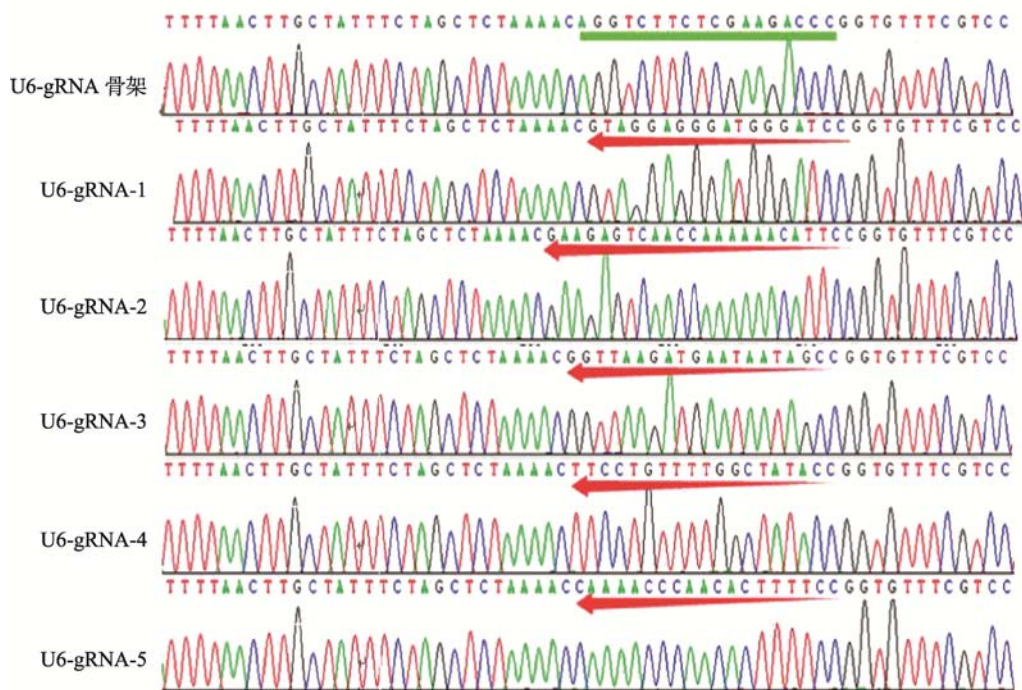


图 1 U6-gRNA-N 质粒测序结果

Fig. 1 The sequences of U6-gRNA-N plasmids

绿色下划线部分为 *Bbs* 酶切位点, 红色箭头标注部分为针对各靶位点构建的识别序列。

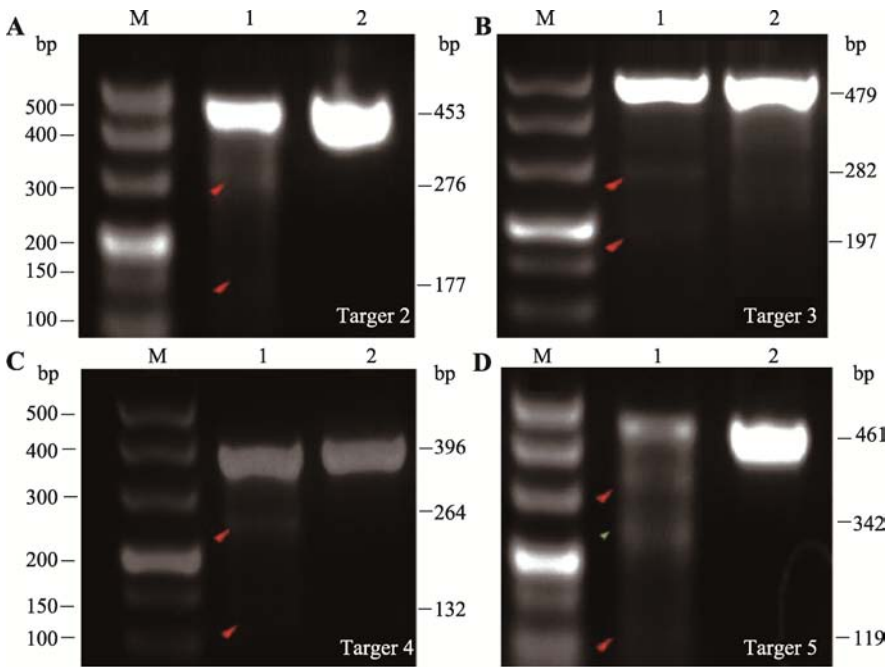


图 2 T7E1 内切酶检测各靶位点对应 gRNA 切割活性
Fig. 2 The indel (insert and deletion) of different sgRNAs after treated by T7E1 enzyme
A ~ D 分别为 Target 2、Target 3、Target 4 和 Target 5 经 T7E1 内切酶酶切后的电泳结果。1：突变体 DNA PCR 产物；2：野生型 DNA PCR 产物。M：500 bp DNA Marker。

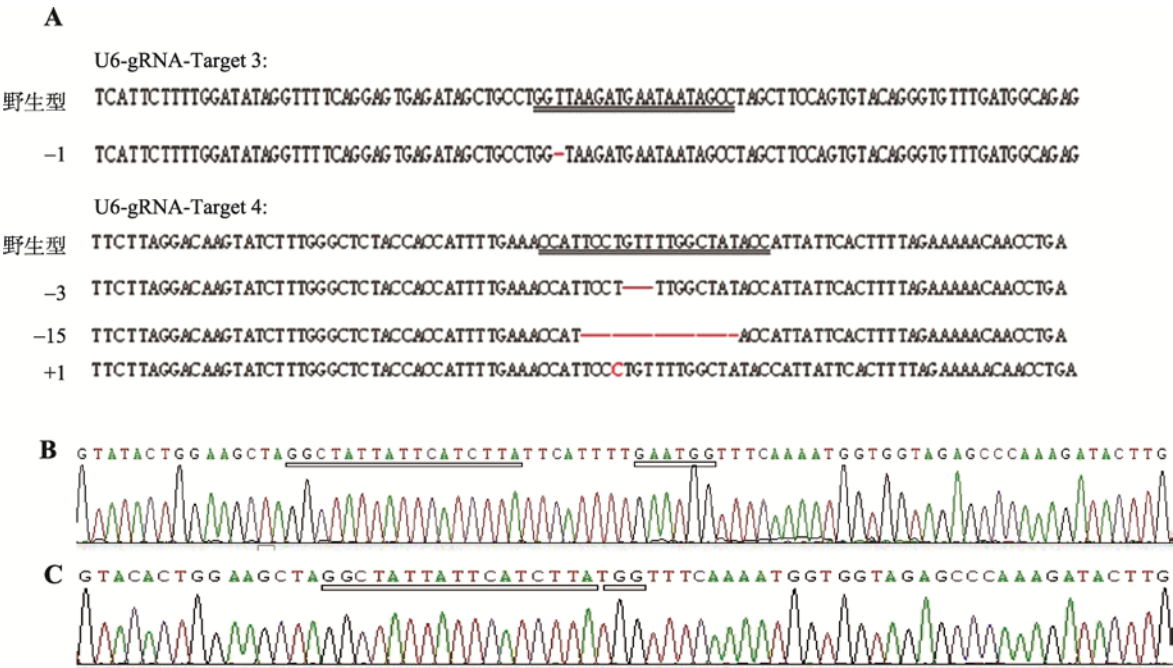


图 3 Target 3、Target 4 靶位点测序结果
Fig. 3 Target 3, Target 4 target site sequencing results
A：靶位点突变种类。图中双下划线分别为在 *Xist* 基因上设计的 Target 3、Target 4 靶位点对应的序列；红色横线表示碱基缺失；红色字母表示碱基插入。B：U6-gRNA-3 和 U6-gRNA-4 共转染 8 号单克隆测序结果；C：U6-gRNA-3 和 U6-gRNA-4 共转染 11 号单克隆测序结果。双下划线表示在 *Xist* 基因上设计的 Target 3、Target 4 靶位点对应 sgRNA 序列。

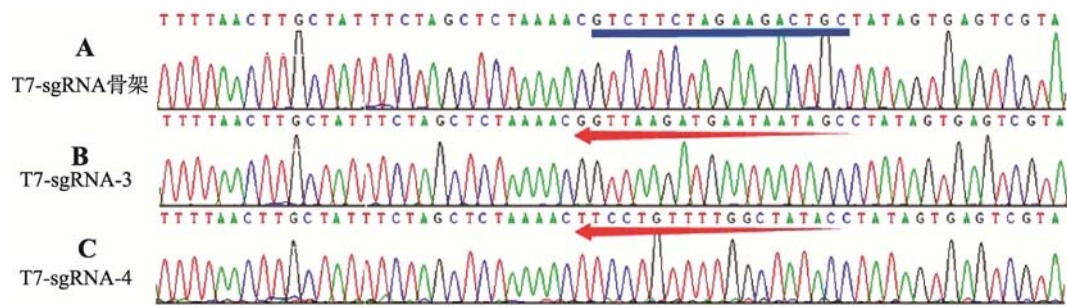


图 4 T7-gRNA-3、T7-gRNA-4 质粒测序结果

Fig. 4 The sequences of T7-gRNA-3 plasmid and T7-gRNA-4 plasmid

A : T7-gRNA 质粒骨架序列 ; B、C : 分别为 T7-gRNA-3、T7-gRNA-4 质粒序列。蓝色下划线部分为 *Bbs* 酶切位点 , 红色箭头标记部分为针对 Tatget 3、Tatget 4 构建的识别序列。

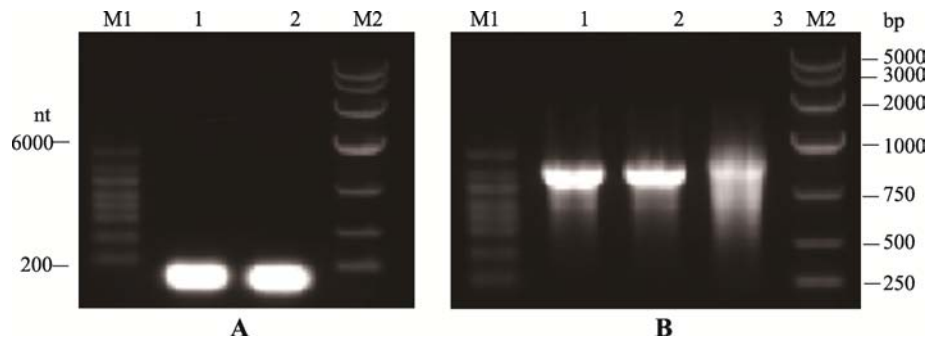


图 5 T7-gRNA-N 和 T7-Cas9 体外转录产物

Fig. 5 The products of T7-sgRNA-N and T7-Cas9 *in vitro* transcription

A : T7-gRNA 体外转录产物。1、2 分别为 T7-gRNA-3、T7-gRNA-4 体外转录产物 ; B : T7-Cas9 体外转录产物。1、2 代表 T7-Cas9 体外转录产物 , 3 代表 7-Cas9 体外转录产物加尾。M1 : 6000nt RNA Marker ; M2 : 5000 bp DNA Marker。

拖带(图 5B), 这是因为体外转录时 T7-Cas9 存在部分序列转录不完全的现象, 这可能与 T7-Cas9 基因序列长度超出试剂盒最佳转录范围有关。但从图 5 中可以发现 T7-Cas9 主带清晰, 说明转录产物是完整的, 加尾后主条带位置有所上移说明加尾成功。

2.6 克隆胚 CRISRP/Cas9 切割活性

将 T7-gRNA-3、T7-gRNA-4 与 T7-Cas9 体外转录产物混合后注射入克隆胚。对发育到囊胚水平的胚胎数进行统计并对相应 sgRNA 靶位点进行测序(表 2)。测序结果显示各组囊胚均发生突变, 其中第 1 组和第 2 组均发生在靶位点上, 第 3 组突变均发生在 Target 3 和 Target 4 靶位点之间, 并导致了其间约 350 bp 片段的敲除。同时, 对同一囊胚的多次测序发现, 单个囊胚会出现嵌合体的现象, 其中第 1 组、第 2 组和第 3 组出现嵌合体概率(囊胚嵌合体数/囊胚总数)分别为 100%、83.3%和 57.1%。

表 2 克隆胚体外验证 CRISRP/Cas9 切割效果

Table 2 The activity of CRISRP/Cas9 was verified *in vitro* by cloned embryos

组别	收集囊胚数/ 注射克隆胚数	囊胚突变数 (枚)	突变率 (%)
第 1 组(Target 3)	4/80	3	75
第 2 组(Target 4)	7/80	6	85.7
第 3 组(Target 3+Target 4)	14/80	14	100

2.7 Xist 基因敲除猪生产

将 T7-gRNA-3 和 T7-gRNA-4 体外转录产物共注射 1200 枚克隆胚胎, 然后移植 3 头受体母猪, 最终有一头母猪成功分娩共产下 6 头克隆猪(图 6), 其中 3 头为死胎, 1 头弱仔 2 d 后死亡, 另外 2 头克隆猪有大舌头的症状分别于第 4 d 和第 6 d 死亡。对 6 头克隆猪分别采集肝脏、心脏、耳皮组织样, 抽取各组织 DNA 后经 PCR 分析, 初步检测结果如图 7



图 6 显微注射得到的 *Xist* 基因敲除猪

Fig. 6 *Xist* gene knockout pigs obtained by microsurgical injection

1~6 分别为出生克隆猪编号, 其中 1 号为弱仔, 2~3 号为大舌头的症状, 4~6 号为死胎。

所示。PCR 产物链入克隆载体后测序, 发现 1、2、4 号克隆猪 3 个胚层的 *Xist* 基因均被成功敲除, 3 号克隆猪仅有肝脏组织的 *Xist* 基因被敲除, 5 号克隆猪未检测到 *Xist* 基因敲除, 6 号克隆猪的肝脏组织和耳皮组织的 *Xist* 基因被敲除, 出现嵌合体频率(嵌合体数/总个体数)为 40%。

3 讨论

3.1 CRISPR/Cas 系统的脱靶现象

继锌指核酸酶和 TALEN 技术之后, CRISPR/Cas 技术使得基因组修饰技术的效率大大提高, 但随着研究的深入, 人们发现该技术的主要缺点是脱靶^[24], 其主要原因是 sgRNA 错配^[25]、Cas9 蛋白突变或与非既定 PAM 序列识别^[26]和作用细胞类型差异^[27]等。本研究中 CRISPR/Cas 系统对 *Xist* 基因打靶时未对潜在脱靶位点进行检测, 潜在的脱靶可能导致一些

重要基因的突变, 最终导致生产的克隆猪死亡, 因此脱靶现象的解决显得尤为重要。最早人们解决脱靶现象的方法主要是提高 CRISPR/Cas 系统引导序列的特异性。Cong 等^[28]研究表明, 融合的 sgRNA 序列引导效率低于 crRNA 和 tracrRNA 分开表达的模式, 而 Mali 等^[29]通过融合的 sgRNA 序列 3'端保留更完整的 tracrRNA 序列可提高 sgRNA 的引导效率。同时, Cho 等^[30]发现 17nt sgRNA 脱靶现象明显高于 20nt sgRNA, 而 Dang 等^[31]将 sgRNA 延长大约 5 个碱基对(bp), 同时 sgRNA 中的一串胸腺嘧啶(T)的第 4 个碱基 T 突变为胞嘧啶(C)或鸟嘌呤(G)时显著降低了脱靶效应。另外, 也有研究人员通过修饰或替代 Cas9 蛋白的结构取得了一定的进展。2016 年, Lee 等^[32]将 *Sth* Cas9 替换成 *Spy* Cas9 蛋白, 而 *Sth* Cas9 可识别更长的 PAM 序列, 从而提高其打靶效率。同年, 张锋等^[33]通过改变化脓性链球菌 Cas9 蛋白(*Streptococcus pyogenes* Cas9 (SpCas9))氨基酸序列的其中 3 个氨基酸, 显著降低了脱靶效应, 而 Kleinstiver 等^[34]对酶类 Cas9 的不同区域进行了处理, 通过改变其同 DNA 靶点接触的蛋白部分, 得到了相似的结果。因此, 随着对 CRISPR/Cas 结构和功能研究的不断深入, 其脱靶效应有望得到解决。

3.2 CRISPR/Cas9 系统对 *Xist* 基因上不同靶位点的切割效率

本研究主要采用 T7E1 内切酶酶切和测序对 *Xist* 基因上的 5 个靶位点对应的 sgRNA 活性进行检测, 发现 5 个靶位点对应 sgRNA 的打靶效率存在明显的差异。对于同一靶位点通过不同检测方法检测出的切割效率的差异可能是由于 CRISPR/Cas 系统脱靶或方法本身的精确性造成的, 其中通过测序得到的突变效率更为真实可靠, 而 T7E1 内切酶酶切结果存

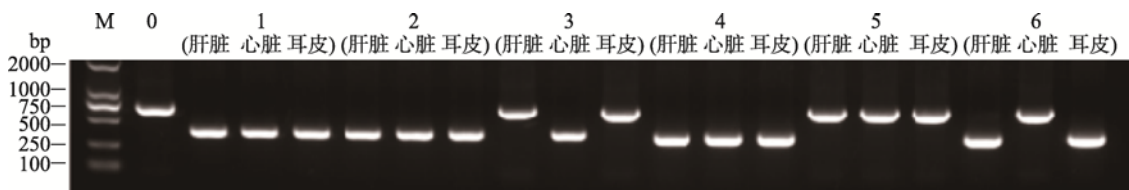


图 7 克隆猪不同组织 *Xist* 基因敲除情况检测

Fig. 7 *Xist* gene knockout detection in different tissues

0: 阴性对照; 1~6 分别为出生克隆猪编号, 其中 1 号为弱仔, 2~3 号为大舌头的症状, 4~6 号为死胎。

在一定程度的假阳性。另外, 5 个靶位点切割效率间存在很大的差异, 这可能是由靶位点基因序列的修饰引起的, 如通过 ZFN 和 TALEN 系统打靶时, 甲基化程度会明显影响其打靶效率^[35,36], 由于 CRISPR/Cas 系统对靶位点的识别是通过碱基互补配对实现的, 所以这种修饰对 CRISPR/Cas 系统效率的影响究竟有多大仍不清楚。与些同时, 相对于单位点切割突变效率, 在细胞水平通过 U6-gRNA-3 和 U6-gRNA-4 的组合发现对 *Xist* 基因的敲除效率可以提高到 18.2%, 囊胚水平上的敲除效率则达到 100%, 提示单靶位点的切割很容易在细胞自身修复机制下得到恢复, 而双靶位点的同时切割可以让两靶位点间的片段游离出基因组, 再通过细胞自身修复而产生缺失。

3.3 *Xist* 基因敲除猪存活率低的现象

一直以来, 克隆猪的出生效率都只维持在 1%~2%^[11]。大多数克隆猪在孕期流产, 只有少数能发育到妊娠末期或成年, 即使存活下来的克隆猪也多伴有器官的发育异常。在本研究中最终未能获得成活的 *Xist* 基因敲除猪。造成这种结果的原因有很多, 例如克隆胚胎甲基化异常导致胚胎的死亡, 由于体细胞和生殖细胞之间的表观遗传差异, 体细胞核对抗卵细胞质的反应不同, 从而影响重组胚的后续发育; 此外, 潜在的脱靶可能导致一些重要基因的突变, 最终造成胚胎的死亡。最后, 移植母猪数过少是未能获得成活的 *Xist* 基因敲除猪的主要原因。

3.4 *Xist* 基因敲除猪的嵌合体现象

本研究在囊胚水平的检测结果及对 *Xist* 基因敲除猪的检测结果都发现存在嵌合体现象。而 Horii 等^[37]通过比较直接注射 CRISPR/Cas 系统 DNA、注射 CRISPR/Cas 系统 RNA 进入原核、注射 CRISPR/Cas 系统 RNA 进入胞质这 3 种不同使用方法的效率时均未发现小鼠存在嵌合体现象。分析其原因可能是小鼠受精胚的第一次卵裂在受精后 24 h 开始, 分裂时间需要 15 min^[38]; 而猪克隆胚胎的初次卵裂时间是不一致的, 在激活后的 20 h 左右, 部分胚胎开始分裂成 2 细胞, 直到 48 h 前后完成首次卵裂^[39], 这也就是在检测囊胚和 *Xist* 基因敲除猪时总会发现有个别嵌合体现象的原因。

参考文献(References):

- [1] Wise J. Dolly the sheep was a clone, Edinburgh scientist maintains. *BMJ*, 1998, 316(7131): 573. [DOI]
- [2] Wakayama T, Perry ACF, Zuccotti M, Johnson KR, Yanagimachi R. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature*, 1998, 394(6691): 369–374. [DOI]
- [3] Baguisi A, Behboodi E, Melican DT, Pollock JS, Destrempes MM, Cammuso C, Williams JL, Nims SD, Porter CA, Midura P, Palacios MJ, Ayres SL, Denniston RS, Hayes ML, Ziomek CA, Meade HM, Godke RA, Gavin WG, Overström EW, Echelard Y. Production of goats by somatic cell nuclear transfer. *Nat Biotechnol*, 1999, 17(5): 456–461. [DOI]
- [4] Kitiyanant Y, Saikhun J, Chaisalee B, White KL, Pavasuthipaisit K. Somatic cell cloning in Buffalo (*Bubalus bubalis*): effects of interspecies cytoplasmic recipients and activation procedures. *Cloning Stem Cells*, 2001, 3(3): 97–104. [DOI]
- [5] Chesné P, Adenot PG, Viglietta C, Baratte M, Boulanger L, Renard JP. Cloned rabbits produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nat Biotechnol*, 2002, 20(4): 366–369. [DOI]
- [6] Zhou Q, Renard JP, Le Friec G, Brochard V, Beaujean N, Cherifi Y, Fraichard A, Cozzi J. Generation of tile cloned rats by regulating oocyte activation. *Science*, 2003, 302(5648): 1179. [DOI]
- [7] Lee BC, Kim MK, Jang G, Oh HJ, Yuda F, Kim HJ, Shammim M, Kim JJ, Kang SK, Schatten G, Hwang WS. Dogs cloned from adult somatic cells. *Nature*, 2005, 436(7051): 641. [DOI]
- [8] Li ZY, Sun XS, Chen J, Liu XM, Wisely SM, Zhou Q, Renard JP, Leno GH, Engelhardt JF. Cloned ferrets produced by somatic cell nuclear transfer. *Dev Biol*, 2006, 293(2): 439–448. [DOI]
- [9] Polejaeva IA, Chen SH, Vaught TD, Page RL, Mullins J, Ball S, Dai YF, Boone J, Walker S, Ayares DL, Colman A, Campbell KHS. Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature*, 2000, 407(6800): 86–90. [DOI]
- [10] Lagutina I, Fulka H, Lazzari G, Galli C. Interspecies somatic cell nuclear transfer: advancements and problems. *Cell Reprogram*, 2013, 15(5): 374–384. [DOI]
- [11] Zhao JG, Whyte J, Prather RS. Effect of epigenetic regulation during swine embryogenesis and on cloning by nuclear transfer. *Cell Tissue Res*, 2010, 341(1): 13–21. [DOI]
- [12] Whitworth KM, Li RF, Spate LD, Wax DM, Rieke A, Whyte JJ, Manandhar G, Sutovsky M, Green JA, Sutovsky P, Prather RS. Method of oocyte activation affects cloning efficiency in pigs. *Mol Reprod Dev*, 2009, 76(5): 490–500. [DOI]
- [13] Nánássy L, Lee K, Jávora A, Macháty Z. Effects of activation methods and culture conditions on development of parthenogenetic porcine embryos. *Anim Reprod Sci*, 2008, 104(2–4): 264–274. [DOI]
- [14] McGraw S, Oakes CC, Martel J, Cirio MC, De Zeeuw P, Mak W, Plass C, Bartolomei MS, Chaillet JR, Trasler JM. Loss of DNMT1o disrupts imprinted X chromosome inac-

- tivation and accentuates placental defects in females. *PLoS Genet*, 2013, 9(11): e1003873. [DOI]
- [15] Park SJ, Park HJ, Koo OJ, Choi WJ, Moon JH, Kwon DK, Kang JT, Kim S, Choi JY, Jang G, Lee BC. Oxamflatin improves developmental competence of porcine cell nuclear transfer embryos. *Cell Reprogram*, 2012, 14(5): 398–406. [DOI]
- [16] Wutz A. Gene silencing in X-chromosome inactivation: advances in understanding facultative heterochromatin formation. *Nat Rev Genet*, 2011, 12(8): 542–553. [DOI]
- [17] Wutz A, Rasmussen TP, Jaenisch R. Chromosomal silencing and localization are mediated by different domains of *Xist* RNA. *Nat Genet*, 2002, 30(2): 167–174. [DOI]
- [18] Inoue K, Kohda T, Sugimoto M, Sado T, Ogonuki N, Matoba S, Shiura H, Ikeda R, Mochida K, Fujii T, Sawai K, Otte AP, Tian XC, Yang XZ, Ishino F, Abe K, Ogura A. Impeding *Xist* expression from the active X chromosome improves mouse somatic cell nuclear transfer. *Science*, 2010, 330(6003): 496–499. [DOI]
- [19] Matoba S, Inoue K, Kohda T, Sugimoto M, Mizutani E, Ogonuki N, Nakamura T, Abe K, Nakano T, Ishino F, Ogura A. RNAi-mediated knockdown of *Xist* can rescue the impaired postimplantation development of cloned mouse embryos. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(51): 20621–20626. [DOI]
- [20] Oikawa M, Inoue K, Shiura H, Matoba S, Kamimura S, Hirose M, Mekada K, Yoshiki A, Tanaka S, Abe K, Ishino F, Ogura A. Understanding the X chromosome inactivation cycle in mice: A comprehensive view provided by nuclear transfer. *Epigenetics*, 2014, 9(2): 204–211. [DOI]
- [21] Mao JJ, Xie SX, Zee J, Soeller I, Li QS, Rockwell K, Amsterdam JD. Rhodiola rosea versus sertraline for major depressive disorder: A randomized placebo-controlled trial. *Phytomedicine*, 2015, 22(3): 394–399. [DOI]
- [22] Li J, Zhang Y, Chen KL, Shan QW, Wang YP, Liang Z, Gao CX. CRISPR/Cas: a novel way of RNA-guided genome editing. *Hereditas (Beijing)*, 2013, 35(11): 1265–1273. 李君, 张毅, 陈坤玲, 单奇伟, 王延鹏, 梁振, 高彩霞. CRISPR/Cas 系统: RNA 靶向的基因组定向编辑新技术. 遗传, 2013, 35(11): 1265–1273. [DOI]
- [23] Garneau JE, Dupuis MÈ, 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]
- [24] Zheng W, Gu F. Progress of application and off-target effects of CRISPR/Cas9. *Hereditas (Beijing)*, 2015, 37(10): 1003–1010. 郑武, 谷峰. CRISPR/Cas9 的应用及脱靶效应研究进展. 遗传, 2015, 37(10): 1003–1010. [DOI]
- [25] Lin YN, Cradick TJ, Brown MT, Deshmukh H, Ranjan P, Sarode N, Wile BM, Vertino PM, Stewart FJ, Bao G. CRISPR/Cas9 systems have off-target activity with insertions or deletions between target DNA and guide RNA sequences. *Nucleic Acids Res*, 2014, 42(11): 7473–7485. [DOI]
- [26] Zhang YL, Ge XL, Yang FY, Zhang LP, Zheng JY, Tan XF, Jin ZB, Qu J, Gu F. Comparison of non-canonical PAMs for CRISPR/Cas9-mediated DNA cleavage in human cells. *Sci Rep*, 2014, 4: 5405. [DOI]
- [27] Duan JZ, Lu GQ, Xie Z, Lou ML, Luo J, Guo L, Zhang Y. Genome-wide identification of CRISPR/Cas9 off-targets in human genome. *Cell Res*, 2014, 24(8): 1009–1012. [DOI]
- [28] 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]
- [29] Mali P, Yang LH, Esvelt KM, Aach J, Guell M, DiCarlo JE, Norville JE, Church GM. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*, 2013, 339(6121): 823–826. [DOI]
- [30] Cho SW, Kim S, Kim Y, Kweon J, Kim HS, Bae S, Kim JS. Analysis of off-target effects of CRISPR/Cas-derived RNA-guided endonucleases and nickases. *Genome Res*, 2014, 24(1): 132–141. [DOI]
- [31] Dang Y, Jia GX, Choi J, Ma HM, Anaya E, Ye CT, Shankar P, Wu HQ. Optimizing sgRNA structure to improve CRISPR-Cas9 knockout efficiency. *Genome Biol*, 2015, 16: 280. [DOI]
- [32] Lee CM, Cradick TJ, Bao G. The *Neisseria meningitidis* CRISPR-Cas9 system enables specific genome editing in mammalian cells. *Mol Ther*, 2016, 24(3): 645–654. [DOI]
- [33] Slaymaker IM, Gao LY, Zetsche B, Scott DA, Yan WX, Zhang F. Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity. *Science*, 2016, 351(6268): 84–88. [DOI]
- [34] Kleinstiver BP, Pattanayak V, Prew MS, Tsai SQ, Nguyen NT, Zheng ZL, Joung JK. High-fidelity CRISPR–Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects. *Nature*, 2016, 529(7587): 490–495. [DOI]
- [35] Bultmann S, Morbitzer R, Schmidt CS, Thanisch K, Spada F, Elsaesser J, Lahaye T, Leonhardt H. Targeted transcriptional activation of silent oct4 pluripotency gene by combining designer TALEs and inhibition of epigenetic modifiers. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40(12): 5368–5377. [DOI]
- [36] Kim Y, Kweon J, Kim A, Chon JK, Yoo JY, Kim HJ, Kim S, Lee C, Jeong E, Chung E, Kim D, Lee MS, Go EM, Song HJ, Kim H, Cho N, Bang D, Kim S, Kim JS. A library of TAL effector nucleases spanning the human genome. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(3): 251–258. [DOI]
- [37] Horii T, Arai Y, Yamazaki M, Morita S, Kimura M, Itoh M, Abe Y, Hatada I. Validation of microinjection methods for generating knockout mice by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Sci Rep*, 2014, 4: 4513. [DOI]
- [38] Sun JH. Research on gene differential expression in sister blastomeres in 2-cell mouse embryo[D]. Yangling: Northwest A&F University, 2012. 孙健红. 小鼠 2-细胞胚胎姐妹卵裂球基因差异表达研究[学位论文]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2012. [DOI]
- [39] Luo XM, Xiao W, Feng C, Long C, Yan J, Xue ZH, Yun P, Pan DK. Timing of the first zygotic cleavage as a developmental potential marker for porcine cloned embryos. *Prog Biochem Biophys*, 2010, 37(12): 1339–1345. 罗学明, 肖伟, 冯冲, 龙川, 闫军, 薛振华, 云鹏, 潘登科. 初次卵裂时间是猪克隆胚胎发育潜能的重要标识. 生物化学与生物物理进展, 2010, 37(12): 1339–1345. [DOI]