

# 编辑 MSTN 半胱氨酸节基元促进两广小花猪肌肉生长

彭定威<sup>1</sup>, 李瑞强<sup>1</sup>, 曾武<sup>1</sup>, 王敏<sup>1</sup>, 石翯<sup>1</sup>, 曾检华<sup>2</sup>, 刘小红<sup>1</sup>, 陈瑶生<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. 广东壹号食品股份有限公司, 广州 510620

**摘要:** 肌生长抑制素(myostatin, MSTN)是转化生长因子 $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ )家族成员之一, 是一种肌肉生长抑制因子。解除 MSTN 的生长抑制功能是提高畜禽肌肉产量的一种有效途径。TGF- $\beta$  的半胱氨酸节结构基元(cystine knot motif) 能够稳定 MSTN 蛋白结构, 对 MSTN 生物学功能的发挥具有重要调控作用。本研究应用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术在两广小花猪肾细胞(Liang Guang small spotted pig kidney cells, LPKCs) 中对 MSTN 基因外显子 3 进行编辑, 破坏了其半胱氨酸节基元, 以解除 MSTN 对靶基因的抑制功能。将流式分选获得的混合阳性 MSTN 编辑 LPKCs 作为供体细胞进行核移植和胚胎移植, 获得 8 头 MSTN 基因编辑两广小花猪仔猪, 其中 2 头存活至 10 日龄, 经鉴定这 2 头均为基因编辑杂合子, 它们在构成 MSTN 蛋白半胱氨酸节基元的两个半胱氨酸残基 C106 和 C108 编码序列附近分别发生碱基的缺失与替换, 导致移码突变, 使 C106 和 C108 突变为其他氨基酸。MSTN 基因编辑两广小花猪杂合子肩部和臀部肌肉较为发达。H&E 切片分析显示, MSTN 基因编辑猪肌纤维横截面积显著减少, 肌纤维数量显著增多。Western Blot 分析结果显示, C106 和 C108 缺失对 MSTN 蛋白表达无显著性影响, 但显著促进其靶基因 *Myf5*, *MyoD* 和 *Myogenin* 等成肌相关因子的表达。本研究获得的基因编辑猪模型没有造成 MSTN 表达完全缺失, 可保留 MSTN 其他生物学功能, 在促进两广小花猪肌肉生长的同时还消除了 MSTN 完全缺失可能对小花猪造成的潜在影响。

**关键词:** MSTN; CRISPR/Cas9; 两广小花猪; 基因编辑

收稿日期: 2020-07-15; 修回日期: 2020-12-24

**基金项目:** 国家转基因生物新品种培育重大专项(编号: 2016ZX08006003-006)和广东省重点领域研发计划项目(编号: 2018B020203003)资助  
[Supported by the National Transgenic Major Program (No. 2016ZX08006003-006) and the Key R&D Program of Guangdong Province (No. 2018B020203003)]

**作者简介:** 彭定威, 在读硕士研究生, 专业方向: 生物化学与分子生物学。E-mail: 840450611@qq.com

李瑞强, 在读硕士研究生, 专业方向: 生物化学与分子生物学。E-mail: 1584896796@qq.com

曾武, 在读硕士研究生, 专业方向: 生物化学与分子生物学。E-mail: 1045044813@qq.com

彭定威、李瑞强和曾武为并列第一作者。

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

DOI: 10.16288/j.ycz.20-222

网络出版时间: 2021/2/5 14:47:17

URI: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1913.r.20210203.1205.002.html>

## Editing the cystine knot motif of MSTN enhances muscle development of Liang Guang Small Spotted pigs

Dingwei Peng<sup>1</sup>, Ruiqiang Li<sup>1</sup>, Wu Zeng<sup>1</sup>, Min Wang<sup>1</sup>, Xuan Shi<sup>1</sup>, Jianhua Zeng<sup>2</sup>, Xiaohong Liu<sup>1</sup>, Yaoshen Chen<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. Guangdong YIHAO Food Co., Ltd., Guangzhou 510620, China

**Abstract:** Myostatin (MSTN) is a member of the transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) family, and functions as an inhibitor of muscle growth. Disrupting the inhibitory effect of MSTN on growth can provide an effective way to increase the muscle yield of livestock and poultry. The cystine knot motif of TGF- $\beta$  can stabilize the structure of MSTN protein and plays an important regulatory role in the biological function of MSTN. Accordingly, in this study, we used the CRISPR/Cas9 to edit the exon 3 of MSTN in the kidney cells of Liang Guang Small Spotted pig (LPKCs), in order to disrupt the cystine knot motif of MSTN and remove the inhibitory effect of MSTN on its target genes. *MSTN*-edited LPKCs were obtained through fluorescence-activated cell sorting (FACS) and used as donor cells for somatic cell nuclear transfer (SCNT) to generate cloned embryos, which were then transferred to surrogate sows to finally obtain eight *MSTN*-edited Liang Guang Small Spotted piglets. Among them, two survived to 10 days old. Genotyping revealed that these two piglets were gene edited heterozygotes with base deletion and substitution occurred within the coding sequence of C106 and C108 at the cystine knot motif of MSTN. These changes resulted in frameshift mutations, and conversion of C106 and C108 to other amino acids. More developments of muscles were observed at the shoulders and hips of the heterozygotes of *MSTN*-edited Liang Guang Small Spotted pigs. H&E analysis showed that the cross-sectional area (CSA) of myofiber in *MSTN*-edited pigs was significantly decreased, and the number of myofiber were significantly increased. Western blot analysis showed that the disruption of C106 and C108 did not affect the expression of MSTN protein, but significantly up-regulated the expression of its target genes such as *Myf5*, *MyoD*, *Myogenin* and other myogenic regulatory factors. In summary, the gene-edited pig model obtained in this study did not cause complete loss of MSTN expression, and could retain other biological functions of MSTN, thereby promoting muscle growth while minimizing the potential adverse effects on complete loss of MSTN in the Liang Guang Small Spotted pigs.

**Keywords:** *MSTN*; CRISPR/Cas9; Liang Guang Small Spotted pig; gene editing

肌肉生长抑制素(myostatin, MSTN), 又称生长与分化因子 8 (growth and differentiation factors 8, GDF8), 属于转化生长因子  $\beta$  超家族(transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ )成员, 是肌肉生长发育的负调控因子<sup>[1]</sup>。敲除 *MSTN* 基因的小鼠(*Mus musculus*)体重显著增加, 肌肉肥大, 肌纤维数量显著增多<sup>[2]</sup>。研究表明, 在人(*Homo sapiens*)、绵羊(*Ovis aries*)、牛(*Bovine*)和狗(*Canis lupus familiaris*)等多个物种中 *MSTN* 发生删除或点突变, 均可表现出骨骼肌显著增加的表型<sup>[3-6]</sup>。*MSTN* 基因由 3 个外显子和 2 个内含子组成<sup>[7]</sup>。猪(*Sus scrofa domestica*)*MSTN* 基因定位

于 15 号染色体上, 全长 6.7 kb, cDNA 序列长度为 1756 bp, 表达的 *MSTN* 蛋白前体由 375 个氨基酸组成<sup>[8]</sup>。与转化生长因子 TGF- $\beta$  超家族其他成员相似, *MSTN* 首先由内质网核糖体合成出一条 52 kDa 的无活性前体肽, 含有起分泌作用的信号肽、N 端前导肽(26 kDa)和 C 端成熟肽(12.5 kDa)<sup>[9]</sup>。*MSTN* 前体肽需经过一系列水解加工后才能形成具有生物学活性的成熟蛋白: 首先由信号肽酶切除由 24 个氨基酸组成的信号肽; 然后由弗林转化酶在 N 端前导肽和 C 端成熟肽之间的精氨酸-丝氨酸-精氨酸-精氨酸位点切割, 产生 N 端前导肽和 C 端成熟肽, 但两者

仍然以非共价键结合,形成无活性的潜伏型蛋白<sup>[10]</sup>;最后,无活性的潜伏型蛋白的N端前导肽在胞外经金属蛋白酶 BMP1/Tolloid 的剪切激活,释放出有活性的C端成熟肽<sup>[11]</sup>。C端成熟肽通过二硫键形成二聚体,成熟肽中的9个半胱氨酸残基形成 TGFβ 超家族特有的半胱氨酸节基元(cystine knot motif),是 MSTN 与受体结合所必需的一种结构,它能够通过影响 MSTN 的稳定性和共价二聚性来抑制其作为肌肉生长分化负调控因子的作用<sup>[12]</sup>。皮埃蒙特牛(Piedmontese cattle)MSTN 蛋白 313 位的半胱氨酸突变会产生双肌表型,与野生型 MSTN 蛋白相比,C313Y 突变的 MSTN 蛋白的共价二聚化显著降低,同时结构稳定性下降,对其他半胱氨酸突变体 C313A 和 C374A 的生化分析表明,完整的半胱氨酸结基序是 MSTN 稳定性和共价二聚的主要决定因素<sup>[13]</sup>。

利用 CRISPR/Cas9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR associated proteins 9)敲除 MSTN 可显著提高中国地方猪种的产肉量<sup>[14]</sup>,但 MSTN 表达缺失使其丧失其他重要的生物学功能,可能会对基因敲除猪健康造成潜在的不利影响。因此,利用 CRISPR/Cas9 对中国地方猪种 MSTN 的半胱氨酸节基元进行修饰是否能够获得类似皮埃蒙特牛 MSTN 基因 C313Y 突变所产生的促进肌肉生长的效果,值得进行研究。两广小花猪属于我国华南型地方猪种,具有肉质鲜美、肉色鲜红、肌肉脂肪含量高、系水力强和肌纤维直径小等优点,但也存在生长速度缓慢和产肉量偏低的缺点<sup>[15]</sup>。因此,本研究利用 CRISPR/Cas9 对 MSTN 的半胱氨酸节基元进行编辑,分析其对两广小花猪肌肉生长的影响,以期今后培育高产肉量的两广小花猪新品种提供研究基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

两广小花猪肾细胞系(Liang Guang Small Spotted pig kidney cells, LPKCs)由本实验室建立保存,CRISPR/Cas9 表达质粒 pSpCas9(BB)-2A-GFP (pX458) (Plasmid #48138)购自美国 Addgene 组织。

### 1.2 靶向 MSTN 基因外显子 3 的 CRISPR/Cas9 表达载体构建与活性验证

靶向 MSTN 基因外显子 3 的 sgRNA3-3 设计及其在两广小花猪胎儿成纤维细胞(porcine embryonic fibroblast, PEF)中的活性验证参考本团队前期的报道<sup>[14]</sup>。sgRNA3-3 的靶位点具体序列见图 1。

### 1.3 两广小花猪肾细胞(LPKCs)培养

从液氮罐中取出需要复苏的 LPKCs,根据“缓冻速融”原则,将取出的细胞迅速置于预热好的 37℃ 水浴锅,2~3 min 后待冻存液完全融化,将冻存管内的细胞转移至 1.5 mL 离心管内,并加入 1 mL 的 DMEM 稀释冻存液中的 DMSO 浓度,降低对复苏后细胞的伤害。1000×g 离心去除上清液后加入含有 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液,混匀后接种到培养瓶中进行培养,复苏约 24 h 后更换新鲜培养液。待细胞密度为 80%~90%左右进行传代培养。

### 1.4 质粒载体转染

准备好待转染质粒 pX458-gRNA3-3 后,选取生长状态良好的 10 代以内的 LPKCs,确定细胞数量(每 100 μL 体系需要细胞数目为 100 万个左右)。电转染

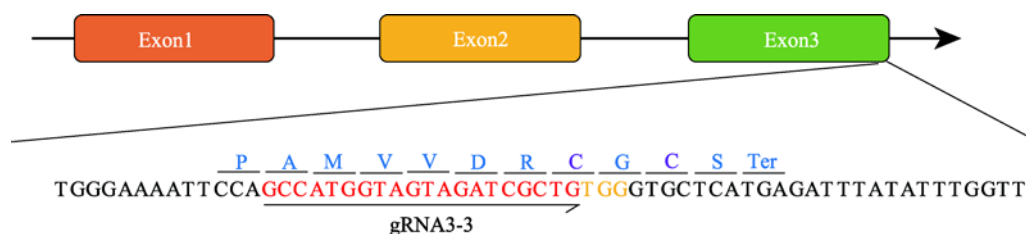


图1 MSTN 基因结构和 gRNA 序列

Fig. 1 MSTN gene structure and gRNA sequence

红色 DNA 序列为设计的 gRNA 序列,黄色字体表示 PAM 位点;紫色氨基酸为参与形成半胱氨酸结结构基元的半胱氨酸残基。

参数设置为 1400 V、10 ms、3 次脉冲进行电转染。将电转后的 LPKCS 接种至 6 孔板中, 轻轻混匀, 放入 37℃ 细胞培养箱中培养, 24 h 后荧光显微镜下观察拍照, 48 h 后待状态良好时进行流式分选。

### 1.5 流式分选获得增强型绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein, EGFP)阳性细胞

准备好待分选的转染后的 LPKCs 和未转染的阴性对照 LPKCs。用阴性对照 LPKCs 对流式细胞仪进行校准, 设置分选参数, 将转染后的细胞中 EGFP 阳性细胞分选出来, 收集到预先加入培养基的 6 孔板中, 放入 37℃ 细胞培养箱中培养; 24 h 后换液, 此后按细胞培养的方法进行培养传代。流式分选后, 扩大培养分选出的细胞, 待细胞长至足够量时, 分离一部分提取基因组, 进行 T7E1 实验和 TA 克隆实验。

### 1.6 T7E1 实验验证打靶效率

设计引物 *MSTN*-E3 (F: 5'-AGGGTAGGAAAG-TGATTCAGGATC-3'; R: 5'-GTAGCATACTCCAG-GCATGTAGC-3') 扩增打靶位点, 经过琼脂糖凝胶电泳鉴定扩增片段大小, 通过胶回收得到纯化的 PCR 产物, 将其置于 95℃ 变性 10 min, 然后按 -5℃/1 min 的降温速度下降至 25℃, 完成程序性退火, 接着在反应体系中加入 0.5 μL T7E1 酶, 置于 37℃ 水浴 30 min。酶切产物在 10% PAGE 胶中经 120 V 恒压电泳 90 min。电泳结束后小心取出 PAGE 胶, 经 EB 溶液染色 15 min 后, 使用蒸馏水漂洗 3 次, 置于凝胶成像仪中拍照; Image J 软件扫描电泳条带灰度值, 根据公式

$$\text{Indel (\%)} = 100 \times \{1 - \sqrt{[1 - (b+c)/(a+b+c)]}\}$$

计算打靶效率, 其中  $b$ 、 $c$  为切割峰面积,  $a$  为主峰面积<sup>[16]</sup>。

### 1.7 TA 克隆验证编辑效率

将得到的纯化 PCR 产物经 TA 克隆连接到 pMD-18T 载体上。将连接产物转化进大肠杆菌 DH5α 中, LB 摇菌 1 h, 涂板 37℃ 培养过夜, 挑取单克隆摇菌送测, 测定 20 个单克隆。将测序结果与野生型猪 *MSTN* 基因组进行比对, 确定 CRISPR/Cas9 在

*MSTN* 基因中诱导产生的突变位置和突变类型。计算发生编辑的克隆占总测序克隆数的百分比, 得出基因编辑效率。

### 1.8 *MSTN* 基因编辑克隆猪的生产

从屠宰场采集母猪卵巢, 用 37℃ 的生理盐水清洗, 从卵巢中分离出卵母细胞进行体外成熟培养, 然后选择成熟的卵母细胞进行体细胞核移植。将编辑型的 LPKCs 放入含有透明质酸酶和细胞松弛素的核移植操作液内, 卵母细胞则放入另一邻近的含 7.5 μmol/mL 细胞松弛素 B (cytochalasin B, CCB) 的操作液滴内, 并用矿物油覆盖操作液滴, 以防止水分蒸发。在显微注射仪下, 吸除卵母细胞的细胞核及第一极体, 并用注射针在去核的位置向卵母细胞的卵周隙注入状态良好的单个 LPKCs。然后用融合仪以 1.2 kV/cm 的单个直流电脉冲电击 30 ms, 使卵质与供体细胞融合并激活胚胎发育。融合后, 转移到 PZM-5 培养液中继续培养。待发育到 2-细胞期后, 挑选发育状态较好的胚胎, 进行胚胎移植。选取经产的待孕大白母猪, 通过手术法将 2-细胞期克隆胚胎植入输卵管中, 30 d 后经 B 超检查胚胎发育情况, 怀孕约 114 d 后接产。

### 1.9 新生仔猪基因型鉴定

剪取刚出生的基因编辑克隆猪耳样组织并进行标记编号如 3-1 等。取 5 mg 耳样组织按 Omega 组织 DNA 提取试剂盒(美国 Omega Bio-tek 公司)说明书操作步骤提取组织 DNA。利用 *MSTN*-E3 引物对扩增打靶位点序列, 通过琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物, 并通过 TA 克隆测序鉴定 *MSTN* 基因编辑克隆猪基因型。

### 1.10 基因编辑克隆猪背最长肌 H&E 染色

选取 10 日龄 *MSTN* 基因编辑猪和野生型猪各一头, 屠宰后取背最长肌组织, 在 4% 多聚甲醛中 4℃ 固定 24 h, 然后转移至 70% 的酒精中, 并放入 4℃ 冰箱进行长期保存。利用自动脱水机对固定的肌肉组织进行脱水, 并使用石蜡包埋机进行包埋, 包埋好的石蜡块用切片机进行切片。在进行 H&E 染色前需进行脱蜡复水处理, 即先将切片置于烘箱中 65℃



烘烤 30 min, 随后将切片分两次浸泡于两缸二甲苯中脱蜡, 每次 10 min。脱蜡完成后进行梯度浓度乙醇复水, 复水完成后进行 H&E 染色。染色结束后进行脱水处理并晾干, 最后采用中性树胶进行封片, 置于显微镜下观察拍照。

### 1.11 Western Blot

选取 10 日龄 *MSTN* 基因编辑猪和野生型猪各一头, 取背最长肌组织样品提取总蛋白, 使用 12% 的 PAGE 胶进行电泳分离蛋白, 按照 80 V×30 min 和 120 V×60 min 的程序进行电泳。电泳结束后转膜, 按 25 V 恒压条件转膜 35 min。转膜完成后, 迅速将 PVDF 膜取出浸入 3% BSA 溶液中, 放在摇床上室温封闭 1 h, 后将膜放入含有一抗的溶液中, 置于摇床上, 以 60 r/min, 4℃ 孵育过夜; 次日将膜取出放入 TBST 中, 置于摇床上, 室温下, 以 120 转/min 漂洗 4 次, 每次 5 min; 然后将膜放入含有二抗的溶液中, 置于摇床上, 室温下, 以 60 r/min 孵育 1 h; 孵育完成后, 将膜放入 TBST 中, 置于摇床上, 室温下, 以 120 r/min 漂洗 4 次, 每次 5 min。按照 1:1 的比例配制 ECL 曝光液, 将膜平铺在曝光板上, 加上曝光液曝光, 于 BLT GelView 6000 Pro 曝光成像仪中进行曝光拍照。本研究中使用的一抗包括 anti-MSTN (abcam)、anti-Myf5 (abcam)、anti-MyoD (abcam)、anti-Myogenin (abcam) 和 anti-GAPDH (abcam), 稀释比皆为 1:500; 二抗包括 anti-Mouse (abcam) 和 anti-Rabbit (abcam), 稀释比皆为 1:5000。

### 1.12 统计分析

定量实验包括至少 3 个独立重复。数据以均数±标准差(SD)表示。数据分析采用 *t* 检验或单因素方差分析, 再进行邓肯检验。

MSTN gRNA3-3 induced Indels 33.3 % (6/20)

```

CAAATAATATATGGGAAAATTCCAGCCATGGTAGTAGATCG--CTGTGGGTGCTCATGAGATTATATTGGTTCATTACT (WT)
CAAATAATATATGGGAAAATTCCAGCCATGGTAGTAGATC---CTGTGGGTGCTCATGAGATTATATTGGTTCATTACT (-1,2/20)
CAAATAATATATGGGAAAATTCCAGCCATGGTAGTAGATCGGCTGTGGGTGCTCATGAGATTATATTGGTTCATTACT (+1,1/20)
CAAATAATATATGGGAAAATTCCAGCCATGGTAGTAGAT-----GAGATTATATTGGTTCATTACT (-16,1/20)
CAAATAATATATGGGAAAATTCCAGCCATGGTAGTAGATC---TGTGGGTGCTCATGAGATTATATTGGTTCATTACT (-2,1/20)
CAAATAATATATGGGAAAATTCCAGCCATGGTAGTAGATCG---GTGGGTGCTC AATTATATTGGTTCATTACT (-2,1/20)
  
```

图3 sgRNA 打靶效率测序结果

Fig. 3 Evaluation of the targeting efficiency of sgRNA by sequence analysis

MSTN gRNA3-3 诱导产生的随机插入与缺失的效率达 33.3%(6/20)。红色字母表示 sgRNA 序列; 黄色字母表示 PAM 序列; 虚线代表缺失碱基; WT: 野生型序列; +: 碱基插入, -: 碱基缺失。

## 2 结果与分析

### 2.1 LPKCs 中高效编辑 *MSTN* 基因

分选得到的 EGFP 阳性 LPKCs 继续培养至 48 h, 取一部分细胞提取基因组 DNA, 利用引物对 *MSTN*-E3 进行 PCR 扩增靶位点序列, 然后通过 T7E1 酶切实验检测 pX458-sgRNA3-3 的打靶效率。结果显示, sgRNA3-3 打靶效率为 17.2% (图 2)。TA 克隆测序结果显示, sgRNA3-3 的打靶效率为 33.3% (图 3)。

### 2.2 高效获得 *MSTN* 基因编辑两广小花猪

将 981 枚克隆胚胎移植到 5 头代孕母猪体内, 最终有 4 头母猪怀孕到终期, 分娩出 13 头克隆猪,

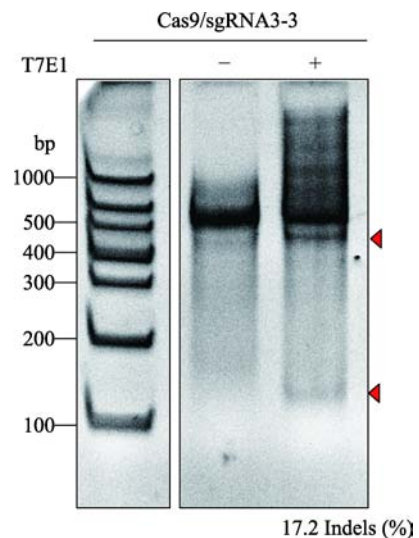


图2 T7E1 酶切鉴定结果

Fig. 2 The results of T7E1 assay

M: DNA Marker; 箭头代表 T7E1 酶切后预期产物所在位置; Indel(%)表示随机插入或缺失的比例。

其中 12 头活仔, 编辑型两广小花猪的初生重为  $0.885 \pm 0.3$  kg, 野生型两广小花猪初生重为  $0.725 \pm 0.2$  kg, 两者体重无差异显著性 ( $P = 0.3303$ ), 24 h 后剩余 10 头健仔(表 3)。出生的 12 头活仔, 经基因型鉴定, 有 8 头是 *MSTN* 编辑个体, 编辑效率达 66.7% (图 4)。

出生后第 10 d, 只剩下 3 头存活仔猪, 处死两头偏弱的个体进行采样。最后一头编辑猪 3 周后死

亡。与野生型相比, 编辑猪的肩部和臀部、背部肌肉较为发达(图 5)。基因型鉴定结果显示, 3-1 为野生型; 3-2 的一个等位基因发生 2 bp 缺失(c.1113\_1114del), 导致翻译产物中含有半胱结基序的 C-G-C-S-Ter 突变为 W-V-L-M, 并产生一段含有 45 个氨基酸的延长序列; 3-3 则为一个等位基因发生 1 bp 插入以及一个 G 碱基替换为 A 碱基, 结果导致翻译产物中含有半胱结基序的 C-G-C-S-Ter 突变为

表 3 SCNT 产生的 *MSTN* 编辑猪

Table 3 Summary of generation of *MSTN* edited pigs through SCNT

移植胚胎 (个)	受体 (头)	怀孕数 (%)	窝产仔数 (头)	活仔数(头)	健仔数 (头)*	编辑型 个体(头)	编辑型个体 出生重(kg)	野生型个体 出生重(kg)
981	5	4(80%)	13	12	10	8	$0.885 \pm 0.3$	$0.725 \pm 0.2$

\*仅展示出生第 1 d 健康猪的数据。

3-1	WT TGGGAAAATTCACGCCATGGTAGTAGATCGCTGGGTGCTCATGAGATTATATTGGTT 1 TGGGAAAATTCACGCCATGGTAGTAGATCGCTGGGTGCTCATGAGATTATATTGGTT 2 TGGGAAAATTCACGCCATGGTAGTAGATCGCTGGGTGCTCATGAGATTATATTGGTT 3 TGGGAAAATTCACGCCATGGTAGTAGATCGCTGGGTGCTCATGAGATTATATTGGTT 4 TGGGAAAATTCACGCCATGGTAGTAGATCGCTGGGTGCTCATGAGATTATATTGGTT 5 TGGGAAAATTCACGCCATGGTAGTAGATCGCTGGGTGCTCATGAGATTATATTGGTT	3-4	WT TGGGAAAATTCACGCCATGGTAGTAGATCGCTGGGTGCTCATGAGATTATATTGGTT 1 TGGGAAAATTCACGCCATGGTAGTAGATCGCTGGGTGCTCATGAGATTATATTGGTT 2 TGGGAAAATTCACGCCATGGTAGTAGATCGCTGGGTGCTCATGAGATTATATTGGTT 3 TGGGAAAATTCACGCCATGGTAGTAGATCGCTGGGTGCTCATGAGATTATATTGGTT 4 TGGGAAAATTCACGCCATGGTAGTAGATCGCTGGGTGCTCATGAGATTATATTGGTT 5 TGGGAAAATTCACGCCATGGTAGTAGATCGCTGGGTGCTCATGAGATTATATTGGTT
3-2	WT TGGGAAAATTCACGCCATGGTAGTAGATCGCTGGGTGCTCATGAGATTATATTGGTT 1 TGGGAAAATTCACGCCATGGTAGTAGATCGCTGGGTGCTCATGAGATTATATTGGTT 2 TGGGAAAATTCACGCCATGGTAGTAGATCGCTGGGTGCTCATGAGATTATATTGGTT 3 TGGGAAAATTCACGCCATGGTAGTAGATCGCTGGGTGCTCATGAGATTATATTGGTT 4 TGGGAAAATTCACGCCATGGTAGTAGATCGCTGGGTGCTCATGAGATTATATTGGTT 5 TGGGAAAATTCACGCCATGGTAGTAGATCGCTGGGTGCTCATGAGATTATATTGGTT	3-5	WT TGGGAAAATTCACGCCATGGTAGTAGATCGCTGGGTGCTCATGAGATTATATTGGTT 1 TGGGAAAATTCACGCCATGGTAGTAGATCGCTGGGTGCTCATGAGATTATATTGGTT 2 TGGGAAAATTCACGCCATGGTAGTAGATCGCTGGGTGCTCATGAGATTATATTGGTT 3 TGGGAAAATTCACGCCATGGTAGTAGATCGCTGGGTGCTCATGAGATTATATTGGTT 4 TGGGAAAATTCACGCCATGGTAGTAGATCGCTGGGTGCTCATGAGATTATATTGGTT 5 TGGGAAAATTCACGCCATGGTAGTAGATCGCTGGGTGCTCATGAGATTATATTGGTT
3-3	WT TGGGAAAATTCACGCCATGGTAGTAGATCGCTGGGTGCTCATGAGATTATATTGGTT 1 TGGGAAAATTCACGCCATGGTAGTAGATCGCTGGGTGCTCATGAGATTATATTGGTT 2 TGGGAAAATTCACGCCATGGTAGTAGATCGCTGGGTGCTCATGAGATTATATTGGTT 3 TGGGAAAATTCACGCCATGGTAGTAGATCGCTGGGTGCTCATGAGATTATATTGGTT 4 TGGGAAAATTCACGCCATGGTAGTAGATCGCTGGGTGCTCATGAGATTATATTGGTT 5 TGGGAAAATTCACGCCATGGTAGTAGATCGCTGGGTGCTCATGAGATTATATTGGTT	3-6	WT TGGGAAAATTCACGCCATGGTAGTAGATCGCTGGGTGCTCATGAGATTATATTGGTT 1 TGGGAAAATTCACGCCATGGTAGTAGATCGCTGGGTGCTCATGAGATTATATTGGTT 2 TGGGAAAATTCACGCCATGGTAGTAGATCGCTGGGTGCTCATGAGATTATATTGGTT 3 TGGGAAAATTCACGCCATGGTAGTAGATCGCTGGGTGCTCATGAGATTATATTGGTT 4 TGGGAAAATTCACGCCATGGTAGTAGATCGCTGGGTGCTCATGAGATTATATTGGTT 5 TGGGAAAATTCACGCCATGGTAGTAGATCGCTGGGTGCTCATGAGATTATATTGGTT
3-7	WT TGGGAAAATTCACGCCATGGTAGTAGATCGCTGGGTGCTCATGAGATTATATTGGTT 1 TGGGAAAATTCACGCCATGGTAGTAGATCGCTGGGTGCTCATGAGATTATATTGGTT 2 TGGGAAAATTCACGCCATGGTAGTAGATCGCTGGGTGCTCATGAGATTATATTGGTT 3 TGGGAAAATTCACGCCATGGTAGTAGATCGCTGGGTGCTCATGAGATTATATTGGTT 4 TGGGAAAATTCACGCCATGGTAGTAGATCGCTGGGTGCTCATGAGATTATATTGGTT 5 TGGGAAAATTCACGCCATGGTAGTAGATCGCTGGGTGCTCATGAGATTATATTGGTT	3-10	WT TGGGAAAATTCACGCCATGGTAGTAGATCGCTGGGTGCTCATGAGATTATATTGGTT 1 TGGGAAAATTCACGCCATGGTAGTAGATCGCTGGGTGCTCATGAGATTATATTGGTT 2 TGGGAAAATTCACGCCATGGTAGTAGATCGCTGGGTGCTCATGAGATTATATTGGTT 3 TGGGAAAATTCACGCCATGGTAGTAGATCGCTGGGTGCTCATGAGATTATATTGGTT 4 TGGGAAAATTCACGCCATGGTAGTAGATCGCTGGGTGCTCATGAGATTATATTGGTT 5 TGGGAAAATTCACGCCATGGTAGTAGATCGCTGGGTGCTCATGAGATTATATTGGTT
3-8	WT TGGGAAAATTCACGCCATGGTAGTAGATCGCTGGGTGCTCATGAGATTATATTGGTT 1 TGGGAAAATTCACGCCATGGTAGTAGATCGCTGGGTGCTCATGAGATTATATTGGTT 2 TGGGAAAATTCACGCCATGGTAGTAGATCGCTGGGTGCTCATGAGATTATATTGGTT 3 TGGGAAAATTCACGCCATGGTAGTAGATCGCTGGGTGCTCATGAGATTATATTGGTT 4 TGGGAAAATTCACGCCATGGTAGTAGATCGCTGGGTGCTCATGAGATTATATTGGTT 5 TGGGAAAATTCACGCCATGGTAGTAGATCGCTGGGTGCTCATGAGATTATATTGGTT	3-11	WT TGGGAAAATTCACGCCATGGTAGTAGATCGCTGGGTGCTCATGAGATTATATTGGTT 1 TGGGAAAATTCACGCCATGGTAGTAGATCGCTGGGTGCTCATGAGATTATATTGGTT 2 TGGGAAAATTCACGCCATGGTAGTAGATCGCTGGGTGCTCATGAGATTATATTGGTT 3 TGGGAAAATTCACGCCATGGTAGTAGATCGCTGGGTGCTCATGAGATTATATTGGTT 4 TGGGAAAATTCACGCCATGGTAGTAGATCGCTGGGTGCTCATGAGATTATATTGGTT 5 TGGGAAAATTCACGCCATGGTAGTAGATCGCTGGGTGCTCATGAGATTATATTGGTT
3-9	WT TGGGAAAATTCACGCCATGGTAGTAGATCGCTGGGTGCTCATGAGATTATATTGGTT 1 TGGGAAAATTCACGCCATGGTAGTAGATCGCTGGGTGCTCATGAGATTATATTGGTT 2 TGGGAAAATTCACGCCATGGTAGTAGATCGCTGGGTGCTCATGAGATTATATTGGTT 3 TGGGAAAATTCACGCCATGGTAGTAGATCGCTGGGTGCTCATGAGATTATATTGGTT 4 TGGGAAAATTCACGCCATGGTAGTAGATCGCTGGGTGCTCATGAGATTATATTGGTT 5 TGGGAAAATTCACGCCATGGTAGTAGATCGCTGGGTGCTCATGAGATTATATTGGTT	3-12	WT TGGGAAAATTCACGCCATGGTAGTAGATCGCTGGGTGCTCATGAGATTATATTGGTT 1 TGGGAAAATTCACGCCATGGTAGTAGATCGCTGGGTGCTCATGAGATTATATTGGTT 2 TGGGAAAATTCACGCCATGGTAGTAGATCGCTGGGTGCTCATGAGATTATATTGGTT 3 TGGGAAAATTCACGCCATGGTAGTAGATCGCTGGGTGCTCATGAGATTATATTGGTT 4 TGGGAAAATTCACGCCATGGTAGTAGATCGCTGGGTGCTCATGAGATTATATTGGTT 5 TGGGAAAATTCACGCCATGGTAGTAGATCGCTGGGTGCTCATGAGATTATATTGGTT

图 4 *MSTN* 基因编辑两广小花猪基因型鉴定

Fig. 4 Genotypes of *MSTN*-edited Liang Guang Small Spotted pig

红色字母表示 sgRNA 序列; 黄色字母表示 PAM 序列; 虚线代表缺失的碱基; WT: 野生型序列; 3-1 至 3-12 代表同一窝的 12 个不同的个体, WT 序列下方的数字表示每一个体所测的 TA 克隆数。



图 5 *MSTN* 基因编辑两广小花猪表型  
Fig. 5 Phenotype of *MSTN*-edited Liang Guang Small Spotted pig  
黄色箭头表示基因编辑型猪比野生型猪肌肉发达的部位; WT: 野生型; 3-3 为基因编辑猪; 10 day 表示日龄。

L-L-W-V-L, 并产生一段含有 46 个氨基酸的延长序列, 两者皆导致 *MSTN* 成熟肽 C 端的半胱氨酸结基序的破坏(图 6)。

## 2.2 *MSTN* 基因编辑猪杂合子的肌纤维数量显著增多

对 10 日龄 *MSTN* 基因外显子 3 编辑型两广小花猪杂合子 3-3 及其野生型小花猪 3-1 的肩胛部位的三角肌进行 H&E 切片染色, 肌纤维数量通过随机选取 3 个单位面积( $\text{mm}^2$ )的横截面切片视角, 采用软件 Photoshop 进行肌纤维计数, 并使用显微镜相机自带软件进行肌纤维面积统计。结果显示, *MSTN* 基因编辑两广小花猪杂合子肌纤维数量显著大于野生型猪, 而肌纤维面积显著小于野生型猪 (图 7), 表明破坏 *MSTN* 蛋白 C 端的半胱氨酸结基序可显著促进肌纤维增生。

## 2.3 *MSTN* 基因编辑猪杂合子的成肌调控因子表达显著上调

取 10 日龄野生型(3-1)和 *MSTN* 编辑杂合子(3-2)的背最长肌肉组织, 通过 Western Blot 检测 *MSTN* 及关键成肌调控因子的表达水平。Western Blot 结果则采用软件 Image J 扫描 3 次重复实验结果中条带的

3-1 (WT/WT)

```
WT  TGGGAAAATTCCAGCCATGGTAGTAGATCGCTGTGGGTGCTCATGAGATTATATTGGTT
1   TGGGAAAATTCCAGCCATGGTAGTAGATCGCTGTGGGTGCTCATGAGATTATATTGGTT
2   TGGGAAAATTCCAGCCATGGTAGTAGATCGCTGTGGGTGCTCATGAGATTATATTGGTT
3   TGGGAAAATTCCAGCCATGGTAGTAGATCGCTGTGGGTGCTCATGAGATTATATTGGTT
4   TGGGAAAATTCCAGCCATGGTAGTAGATCGCTGTGGGTGCTCATGAGATTATATTGGTT
5   TGGGAAAATTCCAGCCATGGTAGTAGATCGCTGTGGGTGCTCATGAGATTATATTGGTT
```

3-2 (WT/c.1113\_1114del CT)  
(C-G-C-S-Ter > W-V-L-M-45aa extension)

```
WT  TGGGAAAATTCCAGCCATGGTAGTAGATCGCTGTGGGTGCTCATGAGATTATATTGGTT
1   TGGGAAAATTCCAGCCATGGTAGTAGATCG--GTGGGTGCTCATGAGATTATATTGGTT
2   TGGGAAAATTCCAGCCATGGTAGTAGATCG--GTGGGTGCTCATGAGATTATATTGGTT
3   TGGGAAAATTCCAGCCATGGTAGTAGATCGCTGTGGGTGCTCATGAGATTATATTGGTT
4   TGGGAAAATTCCAGCCATGGTAGTAGATCGCTGTGGGTGCTCATGAGATTATATTGGTT
5   TGGGAAAATTCCAGCCATGGTAGTAGATCGCTGTGGGTGCTCATGAGATTATATTGGTT
```

3-3 (WT/c.1111\_1112insT & c.1112G>A)  
(R-C-G-C-S-Ter > L-L-W-V-L-46aa extension)

```
WT  TGGGAAAATTCCAGCCATGGTAGTAGATC-GCTGTGGGTGCTCATGAGATTATATTGGTT
1   TGGGAAAATTCCAGCCATGGTAGTAGATCTACTGTGGGTGCTCATGAGATTATATTGGTT
2   TGGGAAAATTCCAGCCATGGTAGTAGATC-GCTGTGGGTGCTCATGAGATTATATTGGTT
3   TGGGAAAATTCCAGCCATGGTAGTAGATC-GCTGTGGGTGCTCATGAGATTATATTGGTT
4   TGGGAAAATTCCAGCCATGGTAGTAGATC-GCTGTGGGTGCTCATGAGATTATATTGGTT
5   TGGGAAAATTCCAGCCATGGTAGTAGATC-GCTGTGGGTGCTCATGAGATTATATTGGTT
```

图 6 *MSTN* 基因编辑猪基因型鉴定结果

Fig. 6 Genotyping of *MSTN*-edited pigs

红色字母表示 sgRNA 序列; 黄色字母表示 PAM 序列; 虚线代表缺失的碱基; 个体编号后的括号内显示的是基因型, 个体编号下方括号内显示推测的翻译后蛋白序列型; WT: 野生型序列, WT 序列下方的数字表示每一个体所测的 TA 克隆数。



灰度值, 进行统计分析。结果显示, 与对照相比, 编辑猪的 *MSNT* 表达无显著性变化, 但是其关键成肌调控因子 *Myf5*、*MyoD* 和 *Myogenin* 的表达水平

均显著上调(图 8), 表明破坏 *MSTN* 蛋白 C 端的半胱氨酸结基不影响 *MSTN* 蛋白表达, 但可显著提高成肌分化潜能。

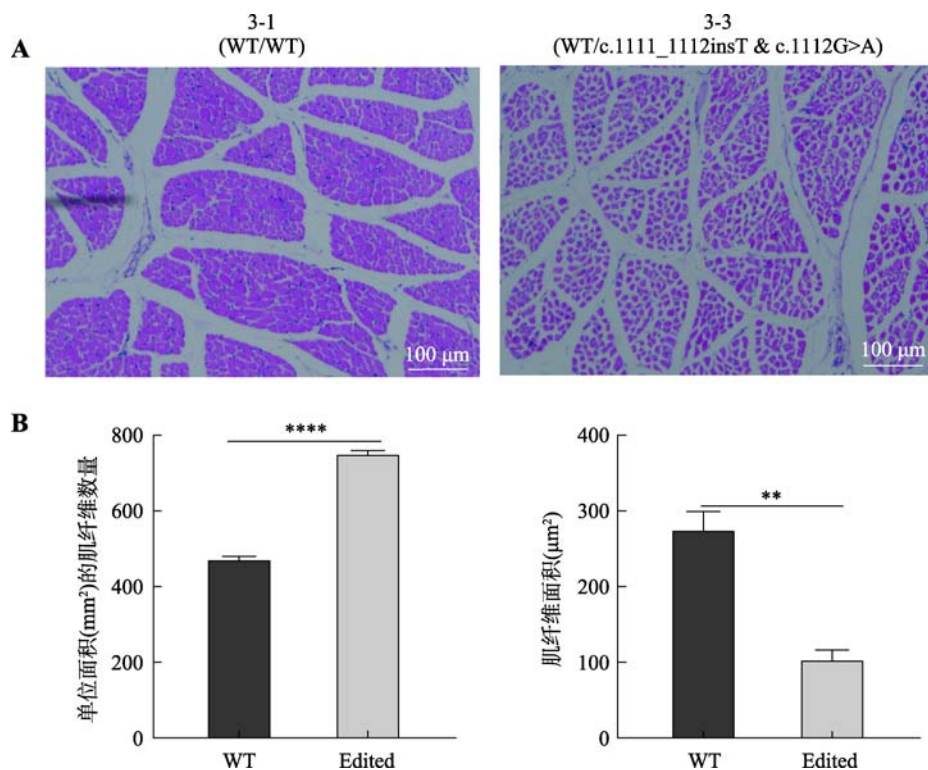


图 7 10 日龄外显子 3 编辑猪肌纤维 H&E 染色结果

Fig. 7 H&E staining results of 10 days old exon 3 edited pig muscle fiber

A: 肌肉横截面切片 HE 染色图。3-1、3-2 表示野生型及克隆猪的编号; 标尺=100  $\mu\text{m}$ 。B: 肌纤维数量和肌纤维面积统计柱状图; \*\*,  $P < 0.01$ , \*\*\*\*:  $P < 0.0001$ ; WT: 野生型两广小花猪(3-1); Edited: 编辑型两广小花猪(3-3)。

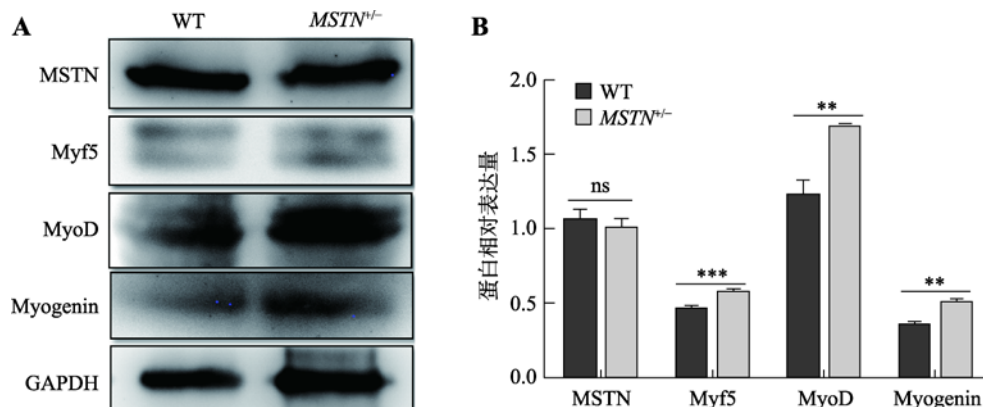


图 8 Western Blot 检测 *MSTN* 及关键成肌调控因子的蛋白表达量

Fig. 8 Analyses on the expressions of *MSTN* and the key myogenic regulatory factors (MRFs) by Western Blot

A: Western Blot 检测结果。WT 为野生型, *MSTN*<sup>+/−</sup> 为杂合子基因编辑猪, 左侧为条带对应的蛋白名称。B: 蛋白条带灰度扫描统计结果; ns:  $P > 0.05$ , \*\*:  $P < 0.01$ , \*\*\*:  $P < 0.001$ 。



### 3 讨论

本研究利用 CRISPR/Cas9 对两广小花猪 MSTN 蛋白 C 端的半胱氨酸节基元进行编辑, 以 EGFP 阳性的混合细胞群作供体进行核移植, 获得的 12 头活仔中有 8 头是基因编辑个体, 编辑效率达 66.7%, 与本团队前期利用类似方法获得基因编辑猪效率相当<sup>[17]</sup>。本研究中 MSTN 基因编辑两广小花猪在出生后存活率较低, 仅有 3 头存活到 10 日龄以上, 这可能跟代孕猪场是专业饲养瘦肉型商品猪, 饲养员对两广小花猪新生仔猪的护理缺乏经验, 以及该品种易患喘气综合征等因素相关, 这与本团队前期构建的 IGF2 基因编辑两广小花猪模型出现的高死亡率情况类似<sup>[17]</sup>。但是 MSTN 蛋白 C 端的半胱氨酸节基元的编辑是否也对两广小花猪的死亡造成影响, 有待后续深入研究。

对一头存活到 10 日龄的 MSTN 基因外显子 3 编辑杂合子的肌肉组织进行切片, 分析结果表明破坏 MSTN 蛋白 C 端的半胱氨酸节基元可显著促进肌纤维增生, 达到与 MSTN 基因双敲除类似的效果<sup>[18]</sup>。通过 Western Blot 对 MSTN 及成肌调节因子的分子表达水平进行分析, 结果表明破坏 MSTN 蛋白 C 端的半胱氨酸节基元不影响 MSTN 蛋白的表达, 但可显著促进关键成肌调节因子的蛋白表达, 这与皮埃蒙特牛中 MSTN 基因半胱氨酸节基元中发生的 C313Y 突变不影响 MSTN 蛋白表达, 但却能显著增强其肌肉发育相似<sup>[19]</sup>, 表明改变 MSTN 半胱氨酸节基元可显著促进动物肌肉生长发育。本研究的基因编辑并没有完全敲除 MSTN, 而只改变了 MSTN 的半胱氨酸节基元, 显著促进了肌纤维增生, 同时有可能保留了 MSTN 的其他重要生物学功能, 有利于维持家猪的生理健康, 为培育高产肉量的两广小花猪提供研究基础。

### 参考文献(References):

[1] Walker RG, Poggioli T, Katsimpardi L, Buchanan SM, Oh J, Wattus S, Heidecker B, Fong YW, Rubin LL, Ganz P, Thompson TB, Wagers AJ, Lee RT. Biochemistry and biology of GDF11 and myostatin: similarities, differences, and questions for future investigation. *Circ Res*, 2016,

118(7): 1125–1142. [DOI]  
[2] McPherron AC, Lawler AM, Lee SJ. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. *Nature*, 1997, 387(6628): 83–90. [DOI]  
[3] Grobet L, Martin LJ, Poncelet D, Pirottin D, Brouwers B, Riquet J, Schoeberlein A, Dunner S, Ménéssier F, Massabanda J, Fries R, Hanset R, Georges M. A deletion in the bovine myostatin gene causes the double-muscling phenotype in cattle. *Nat Genet*, 1997, 17(1): 71–74. [DOI]  
[4] Clop A, Marcq F, Takeda H, Pirottin D, Tordoir X, Bibé B, Bouix J, Caiment F, Elsen JM, Eychenne F, Larzul C, Laville E, Meish F, Milenkovic D, Tobin J, Charlier C, Georges M. A mutation creating a potential illegitimate microRNA target site in the myostatin gene affects muscularity in sheep. *Nat Genet*, 2006, 38(7): 813–818. [DOI]  
[5] Mosher DS, Quignon P, Bustamante CD, Sutter NB, Mellersh CS, Parker HG, Ostrander EA. A mutation in the myostatin gene increases muscle mass and enhances racing performance in heterozygote dogs. *PLoS Genet*, 2007, 3(5): e79. [DOI]  
[6] Catipović B. Myostatin mutation associated with gross muscle hypertrophy in a child. *N Engl J Med*, 2004, 351(10): 1030–1031. [DOI]  
[7] Lee SJ, McPherron AC. Regulation of myostatin activity and muscle growth. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(16): 9306–9311. [DOI]  
[8] Sonstegard TS, Rohrer GA, Smith TP. Myostatin maps to porcine chromosome 15 by linkage and physical analyses. *Anim Genet*, 1998, 29(1): 19–22. [DOI]  
[9] Thies RS, Chen T, Davies MV, Tomkinson KN, Pearson AA, Shakey QA, Wolfman NM. GDF-8 propeptide binds to GDF-8 and antagonizes biological activity by inhibiting GDF-8 receptor binding. *Growth Factors*, 2001, 18(4): 251–259. [DOI]  
[10] Wolfman MW, McPherron AC, Pappano WN, Davies MV, Song K, Tomkinson KN, Wright JF, Zhao L, Sebald SM, Greenspan DS, Lee SJ. Activation of latent myostatin by the BMP-1/tolloid family of metalloproteinases. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(26): 15842–15846. [DOI]  
[11] Lee SJ. Regulation of muscle mass by myostatin. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2004, 20(1): 61–86. [DOI]  
[12] Kambadur R, Sharma M, Smith TP, Bass JJ. Mutations in myostatin (GDF8) in double-muscling Belgian Blue and Piedmontese cattle. *Genome Res*, 1997, 7(9): 910–916. [DOI]  
[13] Starck CS, Sutherland-Smith AJ. The C313Y Piedmontese mutation decreases myostatin covalent dimerisation and stability. *BMC Res Notes*. 2011, 4: 442. [DOI]

- [14] Wang M, Huang X, Shi X, Liu XF, Zeng JH, Liu XH, Chen YS, He ZY. Editing the MSTN gene of Guangdong Small Spotted pigs by using CRISPR-Cas9 system. *Guangdong Agric Sci*, 2017, 44(02): 141–148.  
王敏, 黄翔, 石翮, 刘小凤, 曾检华, 刘小红, 陈瑶生, 何祖勇. 应用 CRISPR/Cas9 编辑广东小耳花猪 MSTN 基因. *广东农业科学*, 2017, 44(2): 141–148. [DOI]
- [15] Zhang ZG, Zhang XL, Li JY. The excellent breeding of Chinese pigs and its contribution to the world pig industry. *J Nat Resour*, 1994, 9(1): 1–8.  
张仲葛, 张晓岚, 李锦钰. 中国猪的优良种性及其对世界养猪业的贡献. *自然资源学报*, 1994, 9(1): 1–8. [DOI]
- [16] Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc*, 2013, 8(11): 2281–2308. [DOI]
- [17] Liu XF, Liu HB, Wang M, Li RQ, Zeng JH, Mo DL, Cong PQ, Liu XH, Chen YS, He ZY. Disruption of the ZBED6 binding site in intron 3 of IGF2 by CRISPR/Cas9 leads to enhanced muscle development in Liang Guang Small Spotted pigs. *Transgenic Res*, 2019, 28(1): 141–150. [DOI]
- [18] Qian LL, Tang MX, Yang JZ, Wang QQ, Cai CB, Jiang SW, Li HG, Jiang K, Gao PF, Ma DZ, Chen YX, An XR, Li K, Cui WT. Targeted mutations in myostatin by zinc-finger nucleases result in double-muscled phenotype in Meishan pigs. *Sci Rep*, 2015, 5: 14435. [DOI]
- [19] Berry C, Thomas M, Langley B, Sharma M, Kambadur R. Single cysteine to tyrosine transition inactivates the growth inhibitory function of Piedmontese myostatin. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2002, 283(1): C135–141. [DOI]

(责任编辑: 赵要风)