

· 新技术 ·

RS-1 提高 CRISPR-Cas9 系统介导的人乳铁蛋白基因敲入效率

周文君, 郭日红, 邓明田, 王锋, 张艳丽

南京农业大学 江苏省家畜胚胎工程实验室, 江苏 南京 210095

周文君, 郭日红, 邓明田, 等. RS-1 提高 CRISPR-Cas9 系统介导的人乳铁蛋白基因敲入效率. 生物工程学报, 2017, 33(8): 1224-1234.

Zhou WJ, Guo RH, Deng MT, et al. RS-1 enhanced the efficiency of CRISPR-Cas9 mediated knock-in of human lactoferrin. Chin J Biotech, 2017, 33(8): 1224-1234.

摘要: 尝试利用 CRISPR-Cas9 系统敲除山羊基因组中 β -乳球蛋白 (*BLG*) 基因, 以实现在 *BLG* 基因座敲入人乳铁蛋白 (*hLF*) 基因, 并进一步探讨了不同浓度 RAD51 蛋白激活剂 (RS-1) 对同源重组效率的影响。首先针对山羊 *BLG* 的第一外显子设计并构建了 sgRNA 和 Cas9 共表达载体 pCas9-sgBLG, 将该载体转染至山羊耳成纤维细胞, 利用 PCR 和 T7EN1 法验证了其基因组编辑活性; 然后进一步构建了 *BLG* 基因打靶载体 pBHA-hLF-NIE (包含 *NEO/EGFP*); 将该打靶载体与 pCas9-sgBLG 载体共转染至山羊耳成纤维细胞, 分别用 0、5、10 和 20 $\mu\text{mol/L}$ RS-1 处理细胞, 分析了绿色荧光蛋白的表达效率; 同时用 800 $\mu\text{g/mL}$ G418 对不同浓度 RS-1 处理后的细胞进行筛选, 挑取 EGFP 阳性细胞克隆, 进一步通过 PCR 和测序鉴定 *hLF* 定点敲入的阳性细胞克隆。结果显示: 设计的 sgRNA 编辑山羊 *BLG* 位点的效率为 25%–31%; 报告基因的表达效率提示 RS-1 可以促进基因敲入效率的提高, 其效率与 RS-1 浓度呈正相关, 20 $\mu\text{mol/L}$ RS-1 处理组的效率是对照组的 3.5 倍; 利用 G418 筛选 *hLF* 敲入阳性细胞克隆后, 当 RS-1 浓度为 0–10 $\mu\text{mol/L}$ 时, *hLF* 敲入效率随着 RS-1 浓度增加而升高, 在 10 $\mu\text{mol/L}$ 时阳性克隆率最高为 32.61%, 然而在 20 $\mu\text{mol/L}$ 时敲入阳性克隆率下降至 22.22%, 且衰老细胞克隆增多。以上结果表明, 利用 CRISPR-Cas9 系统可以实现在山羊耳成纤维细胞中敲除 *BLG* 基因和敲入 *hLF* 基因, 且适宜浓度的 RS-1 可以显著提升基因敲入效率, 本试验为高效利用 CRISPR-Cas9 系统获得基因敲入的细胞提供了参考依据。

关键词: CRISPR-Cas9, RS-1, β -乳球蛋白, 同源重组, 人乳铁蛋白, 山羊耳成纤维细胞

Received: March 16, 2017; **Accepted:** June 5, 2017

Supported by: National Major Special Program of Breeding of Transgenic Organisms New Variety (No. 2014ZX08008-004).

Corresponding author: Yanli Zhang. Tel: +86-25-84395381; E-mail: zhangyanli@njau.edu.cn

国家转基因新品种培育重大专项 (No. 2014ZX08008-004) 资助。

RS-1 enhanced the efficiency of CRISPR-Cas9 mediated knock-in of human lactoferrin

Wenjun Zhou, Rihong Guo, Mingtian Deng, Feng Wang, and Yanli Zhang

Jiangsu Livestock Embryo Engineering Laboratory, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, Jiangsu, China

Abstract: This study aims to knock out the goat β -lactoglobulin (*BLG*) gene using CRISPR-Cas9 system and knock in human lactoferrin (*hLF*) at the *BLG* locus, and further study the effect of RAD51 stimulatory compound (RS-1) on homologous recombination efficiency. First, we designed an sgRNA targeting the first exon of goat *BLG* gene and constructed a co-expression vector pCas9-sgBLG. This sgRNA vector was then transfected into goat ear fibroblasts (GEFs), and the target region was examined by T7EN1 assay and sequencing. Second, we constructed a targeting vector pBHA-hLF-NIE including *NEO* and *EGFP* genes based on *BLG* gene locus. This targeting vector together with pCas9-sgBLG expression vector was co-transfected into GEFs. Transfected cells were then treated with 0, 5, 10 and 20 $\mu\text{mol/L}$ RS-1 for 72 h to analyse the EGFP expression efficiency. Next, we used 800 $\mu\text{g/mL}$ G418 to screen G418-resistant cell clones, and studied *hLF* site-specific knock-in cell clones by PCR and sequencing. The editing efficiency of sgBLG was between 25% and 31%. The *EGFP* expression efficiency indicated that the gene knock-in efficiency was improved by RS-1 in a dose-dependent manner, which could reach 3.5-fold compared to the control group. The percentage of positive cells with *hLF* knock-in was increased to 32.61% when 10 $\mu\text{mol/L}$ RS-1 was used. However, when the concentration of RS-1 increased to 20 $\mu\text{mol/L}$, the percentage of positive cells decreased to 22.22% and resulted in an increase of senescent cell clone number. These results suggested that *hLF* knock-in and *BLG* knock-out in GEFs were achieved by using CRISPR/Cas9 system, and optimum concentration of RS-1 could improve knock-in efficiency, which provides a reference for efficiently obtaining gene knock-in cells using CRISPR/Cas9 in the future.

Keywords: CRISPR-Cas9, RS-1, β -lactoglobulin, homologous recombination, *hLF*, goat ear fibroblasts

基因编辑技术现已成为生物学和医学研究领域中最热门的技术之一，其中的串联间隔重复序列 (Clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR)/相关蛋白 9 (Cas9) 系统^[1]被众多研究者用于基因组定点编辑等多种用途，被 Science 杂志评为 2015 年十大科学突破之首。其中，CRISPR-Cas9 系统首先被发现于细菌和古细菌的 II 型 CRISPR/Cas 系统中，其作为“获得性免疫系统”可以抵御外来病毒入侵^[2]，现被应用于真核生物细胞和个体的基因编辑^[3-5]。由 sgRNA 引导的 Cas9 核酸内切酶可以在基因组

中引入双链断裂 (Double-stranded break, DSB)，其可以通过非同源末端连接 (Nonhomologous end joining, NHEJ) 和同源修复 (Homology-directed repair, HDR) 两种途径修复^[6-7]。利用 CRISPR-Cas9 系统和同源重组模板可以高效敲入外源基因，因此该系统被广泛应用在转基因动物细胞和个体的研究与生产中^[8-10]。

羊乳，作为牛乳的一种替代品，有着较之前者更高的乳脂和蛋白含量。 β -乳球蛋白 (β -lactoglobulin, BLG) 是羊乳中主要的乳清蛋白，也是羊乳中引起人体过敏反应的主要过敏

原之一^[11]。酶水解、加热并不能减少 BLG 蛋白过敏性，反而会增加人体的过敏反应，发酵工艺由于会产生新的副产物，也无法有效减少其过敏性^[12-13]。人乳铁蛋白 (Human lactoferrin, hLF) 是一种多功能糖蛋白，具有促进铁吸收、抗菌、抗病毒、抗癌和抗氧化等多种生物学功能，是一种十分理想的食物添加剂和药物^[14-16]。在山羊 *BLG* 基因座中敲入 *hLF* 基因既可以去除山羊乳中的过敏原，又能增加羊乳中的营养成分，使其更加“人源化”。然而目前利用 CRISPR-Cas9 技术敲除山羊 *BLG* 基因、同时定点整合 *hLF* 基因的相关研究鲜见报道。

研究表明，RAD51 是有丝分裂细胞中催化 DNA 同源重组修复过程中同源配对的唯一蛋白因子，其通过介导 DNA 链配对和链交换而参与了 DNA 同源重组修复^[17]。RAD51 蛋白激活剂 (RAD51 stimulatory compound, RS-1) 可激活 RAD51 蛋白活性且使得 RAD51 蛋白与 DNA 的结合更加稳定^[18]，可让同源重组的效率提升至 3 倍，然而过高浓度的 RS-1 具有较强的细胞毒性^[19]。目前关于 RS-1 在山羊体细胞中提高基

因编辑效率的研究未见报道。

因此，本试验尝试利用 CRISPR-Cas9 技术在山羊 *BLG* 位点精确敲入 *hLF*，同时还探讨了不同浓度 RS-1 对 CRISPR-Cas9 介导山羊基因组敲入效率的影响，为今后高效利用 CRISPR-Cas9 技术获得基因编辑动物提供了参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒、菌种和细胞

pX330 质粒 (Addgene, #42230) 由本实验室留存；pMD-19T 克隆载体购自 TaKaRa 公司；pHA-hLF 包括 *hLF* cDNA 序列；pBC-hLF 包含 *NEO* 基因和 *EGFP* 基因，宿主菌为埃希氏大肠杆菌 DH5 α ，60 日龄雌性羔羊耳成纤维细胞，均由本实验室保存。

1.1.2 引物

本试验中所使用到的引物通过 NCBI 的 Primer Blast 在线设计，引物由南京金斯瑞生物技术有限公司和南京擎科生物技术有限公司合成，引物序列见表 1。

表 1 质粒构建与鉴定用引物

Table 1 Primers for plasmid construction and detection

| Primer name | Primer sequence (5'-3') | Size (bp) | Purpose |
|-----------------|------------------------------|-----------|--|
| BLG-5' HA-F | TCTTGTAGACGCCTCAGT | 1 564 | Amplification of the 5' homology arm |
| BLG-5' HA-R | GCTAGCCGGAATCCTACTTGGCTCATCC | | |
| BLG-3' HA-F | CTCGAGGCCTGGACATCCAGAAGGTT | 1 699 | Amplification of the 3' homology arm |
| BLG-3' HA-R | TCTAGAGCCGTTTCCCTGAAAGACA | | |
| NEO-IRES-EGFP-F | CTCGAGTAGTTATTAATAGTAATCAA | 3 064 | Amplification of CMV-NEO-IRES2-EGFP |
| NEO-IRES-EGFP-R | CTCGAGTTGGACAAACCACAACACTAGA | | |
| T7-BLG-F | ACCTGCCCTTGCTAAGA | 622 | Identification of sgRNA editing efficiency |
| T7-BLG-R | CTCCAGCCTCCAGAATG | | |
| 5KI-F | TCTGGATGGTATTCTCTG | 2 409 | Identification of the 5' junction |
| 5KI-R | CGGCATAATAGTGAGTTC | | |
| 3KI-F | GAAGAACGGCATCAAGGT | 2 371 | Identification of the 3' junction |
| 3KI-R | CAAGTGAAGCAGGTGTCA | | |

1.1.3 主要试剂

FBS (Gibco, 26140079)、DMEM (Gibco, 11965092)、Trypsin (Gibco, 25200056)、G418 (Gibco, 11811023) 和 Neon™ 100 μ L 转染试剂盒购自 Life Technology 公司; 各种限制性内切酶、各种分子量 marker、高保真 PrimerStar DNA 聚合酶、LA *Taq* DNA 聚合酶和 pMD-19T 载体购自宝生物工程(大连)有限公司; T4 DNA 连接酶、热敏碱性磷酸酶, *Bbs* I 限制性内切酶购自 NEB 公司; 纯化试剂盒购自 Qiagen 公司; 质粒提取试剂盒购自 Omega 公司; 其他未说明试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 sgRNA 设计与 pCas9-sgBLG 表达载体构建

针对山羊 *BLG* 基因 (NCBI, Z33881.1, 8 088 bp) 的第一外显子区域设计 sgRNA, 根据张锋实验室在线软件 (<http://crispr.mit.edu/>) 设计了引导序列长度为 20 nt 的 sgRNA 引导序列, 靶标位点序列为 GGCCCTCGCCTGTGGCATC CAGG。然后通过酶切连接将引导序列连接至 pX330 构建成 pCas9-sgBLG 表达载体。

1.2.2 pBHA-hLF-NIE 打靶载体的构建

1 558 bp 的 5'同源臂和 1 687 bp 的 3'同源臂分别扩增自野生型山羊基因组 *BLG* 基因 (GenBank 登录号 Z33881.1) 505–2 062 bp 和 2 268–3 954 bp 区域。在 5'同源臂添加 *Nhe* I 酶切位点, 3'同源臂添加 *Xho* I 和 *Kpn* I 酶切位点, 分别将其连接至 pMD-19T 载体, 得到 pBHA-5' 和 pBHA-3'。然后使用 *Kpn* I 酶切 pBHA-5' 和 pBHA-3' 载体, 回收线性化的 pBHA-5' 载体和 3' 同源臂, 通过 T4 DNA 连接酶将 3'同源臂连接至线性化的 pBHA-5' 载体中, 构建成 pBHA-5'-3'

载体。CMV-NEO-IRES2-EGFP 片段从 pBC-hLF 质粒上扩增后回收, 两端添加 *Xho* I 酶切位点。*hLF* cDNA 片段从 pHA-hLF 质粒通过 *Nhe* I 和 *Xho* I 双酶切后回收得到。将 3'*BLG* 同源臂、*hLF* cDNA 片段和 NEO-IRES2-EGFP 片段通过酶切连接依次连接至 pBHA-5'-3' 载体, 最终构建成 *BLG* 基因的打靶载体 pBHA-hLF-NIE。

1.2.3 CRISPR-Cas9 编辑山羊 *BLG* 位点活性检测

解冻第 3 代山羊耳成纤维细胞, 培养液为 DMEM+10% FBS+1% 谷氨酰胺, 待汇合度达到 80%–90% 的时候, 进行转染。将 pCas9-sgBLG 表达载体与电转溶液和细胞混合至终浓度为 $1 \mu\text{g}/10^5$ 细胞, 然后在 1.6 kV、10 ms、3 pulses 的参数下进行电转染, 将 5×10^5 细胞接种于 6 孔板中继续培养。转染 72 h 后, 收集细胞, 提取 DNA, 通过 PCR 扩增 sgBLG 靶标区域, 产物回收后进行 T7E1 检测和连接 T 载体测序。T7E1 检测采用 400 ng PCR 回收产物, 退火后使用 T7 核酸内切酶 I 处理 0.5 h, 产物通过 2.5% 的琼脂糖凝胶电泳和凝胶成像系统进行分析。引物分别为 T7-BLG-F 和 T7-BLG-R。

1.2.4 RS-1 对 CRISPR-Cas9 引导的基因敲入效率的影响

为进一步检测 RS-1 对基因敲入效率的影响, 将酶消化后悬浮的山羊耳成纤维细胞 (1×10^5) 与 pCas9-sgBLG 表达载体 (0.5 μg) 和 pBHA-hLF-NIE 打靶载体 (0.5 μg) 混合进行电转染, 电转染方法参照 1.2.3 中的转染方法进行。转染后将细胞继续培养在分别含有 0、5、10 和 20 $\mu\text{mol/L}$ RS-1 的培养液中 72 h, 一方面将利用 R&D 流式细胞仪对进行绿色荧光细胞计数, 统计绿色荧光细胞比例; 另一方面在 RS-1

处理后添加 G418 (800 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 进行筛选, 每 3 天更换 1 次培养液, 筛选培养至 16–20 d 后, 挑取 EGFP 阳性克隆, 然后继续用含 G418 (400 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的完全培养基进行扩大培养。收集细胞, 其中 1/5 继续培养后冻存, 剩余的 4/5 提取 DNA 并用于 PCR 扩增打靶区域, 所有 PCR 鉴定后的阳性产物回收后进行 TA 克隆并测序。PCR 中所使用引物为 5KI-F/R 和 3KI-F/R, 5KI-F 和 3KI-R 分别位于山羊 *BLG* 基因 42–59 bp 和 4 140–4 157 bp

区域, 5KI-R 和 3KI-F 分别包括部分 *hLF* 基因和 *EGFP* 基因 (图 1)。

2 结果与分析

2.1 pBHA-hLF-NIE 打靶载体的构建

将 *hLF* cDNA 片段和 NEO-IRES₂-EGFP 片段连接至含有 5' 和 3' 同源臂的载体构建成 pBHA-hLF-NIE 打靶载体, 其结构与打靶位置示意图见图 1。

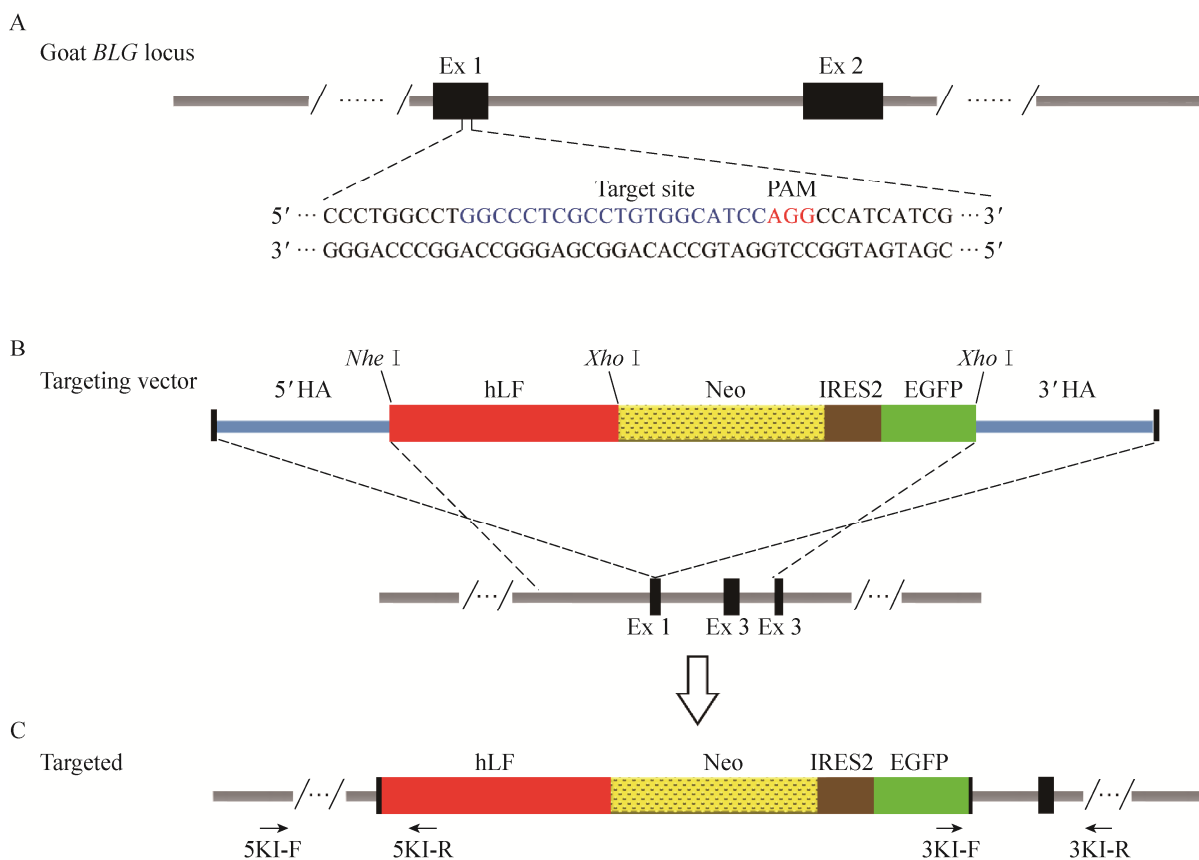


图 1 sgBLG 靶标位点和打靶载体示意图

Fig. 1 Scheme of sgRNA targeting *BLG* locus and targeting strategy. *BLG*: β -lactoglobulin; Ex 1: exon 1 of *BLG*; Ex 2: exon 2 of *BLG*; Ex 3: exon 3 of *BLG*; hLF: human lactoferrin cDNA; *NEO*: neomycin resistance gene; IRES: internal ribosome entry site; EGFP: enhanced green fluorescent protein; HA: homologous arm; PAM: protospacer adjacent motif. 5KI-F/R: primers used for 5' junction PCR. 3KI-F/R: primers used for 3' junction PCR.

2.2 Cas9 在羊耳成纤维细胞中活性检验

将构建成功的 pCas9-BLG 电转染至羊耳成纤维细胞, 转染后 72 h 后收集细胞提取基因组 DNA, 然后使用引物 T7-BLG-F/R 扩增得到 622 bp 的 sgBLG 基因组靶标区域。PCR 产物回收后分别进行 T7E1 检测和连接 T 载体测序。T7E1 检测结果表明, sgBLG 靶标区域存在插入和缺失等突变情况, 测序结果显示, sgBLG 靶位点存在 1-59 bp 的缺失, 提示 sgBLG 可以有效引导 Cas9 蛋白编辑羊耳成纤维细胞 BLG 位点 (图 2)。进一步对 T7E1 的酶切结果进行灰度分析发现 sgBLG 引导的 Cas9 编辑活性为 25%~31%。

2.3 不同浓度 RS-1 对基因敲入效率的影响

将 pCas9-sgBLG 表达载体和 pBHA-hLF-NIE 打靶载体共转染至羊耳成纤维细胞, 然后分别在细胞培养液中添加 0、5、10 和 20 $\mu\text{mol/L}$ 的 RS-1 进行继续培养。为了减少非整合打靶载体表达的 EGFP 干扰, 本研究将 RS-1 处理后的细胞传 4 代后利用流式细胞计数统计绿色荧光细胞比例。结果表明, 绿色荧光细胞的比例随着 RS-1 浓度升高而增加, 10 $\mu\text{mol/L}$ 和 20 $\mu\text{mol/L}$ RS-1 处理组的绿色荧光阳性细胞比例显著高于对照组 ($P < 0.05$, 图 3C)。该结果表明, RS-1 可以显著提高羊耳成纤维细胞中的外源基因敲入效率, 且与浓度呈正相关。

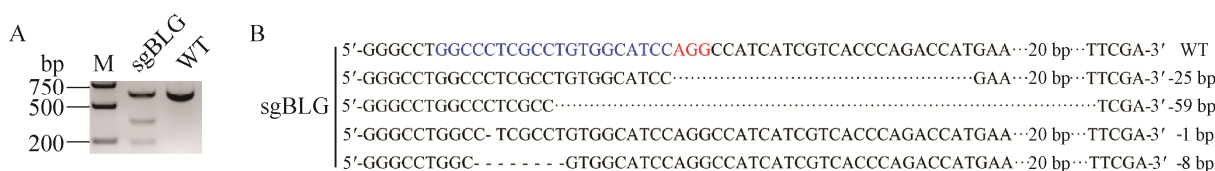


图 2 在 GEFs 中检测 sgBLG 编辑活性

Fig. 2 Testing of sgBLG targeting activity by transfection of pCas9-sgBLG into GEFs. (A) T7E1 assay of sgBLG targeting activity. M: DNA marker. WT: wild-type. (B) Sequencing result of sgBLG target region. The sequence in blue indicates the guide sequence of sgBLG, and the sequence in red indicates the PAM.

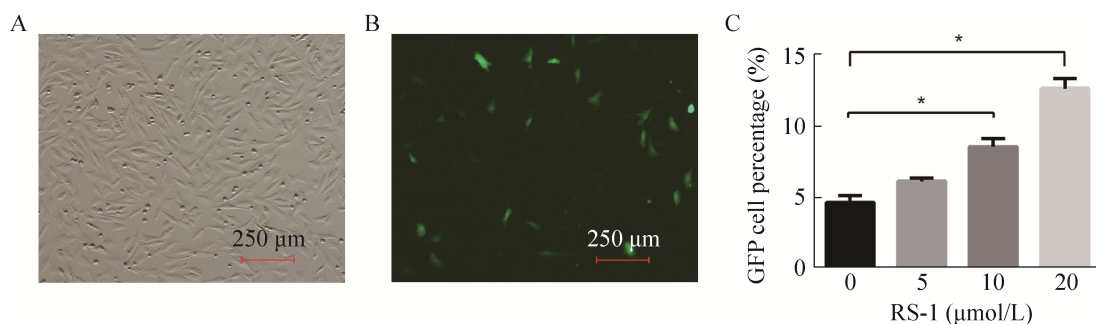


图 3 RS-1 对基因敲入效率的影响

Fig. 3 Effect of RS-1 on knock-in efficiency. The goat ear fibroblasts were transfected with pCas9-sgBLG plasmid and pBHA-hLF-NIE and observed under microscopy in white field (A) and with FITC filter (B). (C) Analysis of effect of RS-1 on knock-in efficiency by flow cytometry. GFP-positive rates indicated the knock-in efficiency. The asterisk means a significant difference ($P < 0.05$) between two groups.

2.4 不同浓度 RS-1 对 *hLF* 敲入阳性细胞克隆率的影响

对共转染后的山羊成纤维细胞分别进行 0、5、10 和 20 $\mu\text{mol/L}$ RS-1 处理后,进一步添加 G418 筛选阳性细胞克隆,分别获得 EGFP 阳性克隆 42、43、46 和 27 个。对获得的阳性细胞进行基因敲入效率检测(图 4 和表 2),结果显示,添加 RS-1 的处理组 5'和 3'端敲入阳性率均高于未添加的对照组,其中 10 $\mu\text{mol/L}$ 浓度 RS-1 处理组的敲入效率最高,5'端连接阳性率从 16.67%提升至 36.69% ($P<0.05$),3'端连接阳

性率从 11.90%提升至 32.61% ($P<0.05$)。然而当 RS-1 浓度达到 20 $\mu\text{mol/L}$ 时,5'和 3'端连接阳性率均出现下降,分别为 25.93% ($P>0.05$) 和 22.22% ($P>0.05$)。另外,如表 2 所示,本试验中 3'端连接 PCR 阳性克隆的 5'端检测结果均为阳性,因此以 3'端连接 PCR 阳性克隆率来表示 *hLF* 定点敲入效率。测序结果进一步表明,*hLF* 基因已经精确整合至山羊 *BLG* 基因座(图 5)。此外,本研究中细胞经过 20 $\mu\text{mol/L}$ RS-1 处理后,死亡细胞数目明显增加,衰老细胞克隆数目显著增多 ($P<0.05$)。

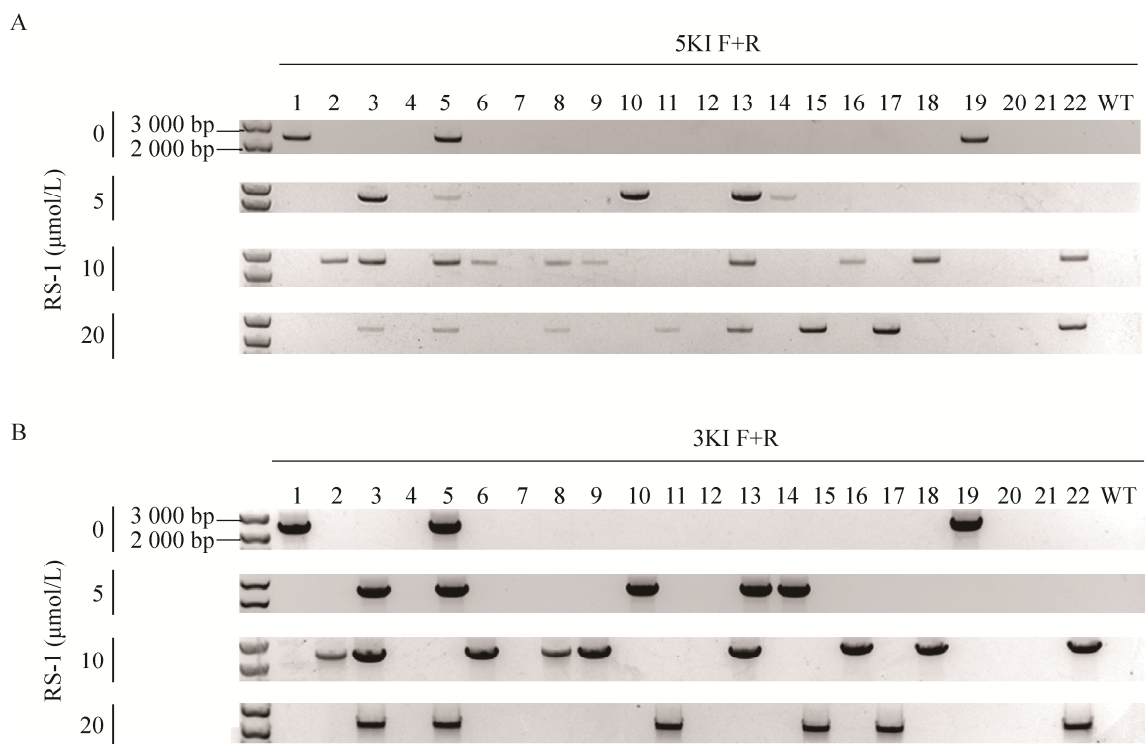


图 4 部分 PCR 筛选 *hLF* 敲入阳性细胞克隆结果

Fig. 4 Partial results of PCR screening for *hLF* knock-in clones. (A) Partial PCR amplification results of *hLF* knock-in clones using primer 5KI-F/R. KI: knock-in. (B) Partial PCR amplification results of *hLF* knock-in clones using primers 3KI-F/R. KI: knock-in.

表 2 *hLF* 敲入阳性细胞克隆 PCR 筛选结果Table 2 The result of screening *hLF* knock-in positive cell clones by PCR

| Groups | Drug resistant clones | 5' junction PCR ⁺ (%) | 3' junction PCR ⁺ (%) | Senescent |
|-----------|-----------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------|
| 0 μmol/L | 42 | 7 (16.67%) ^a | 5 (11.90%) ^a | 1 ^a |
| 5 μmol/L | 43 | 6 (14.29%) ^a | 6 (14.29%) ^a | 2 ^a |
| 10 μmol/L | 46 | 17 (36.96%) ^b | 15 (32.61%) ^b | 1 ^a |
| 20 μmol/L | 27 | 8 (29.63%) ^a | 6 (22.22%) ^a | 7 ^b |

Senescent: cells in the clone did not proliferate after 7 days. Data with different characters indicate a significant difference ($P < 0.05$) and with the same characters indicate no significant difference ($P > 0.05$).

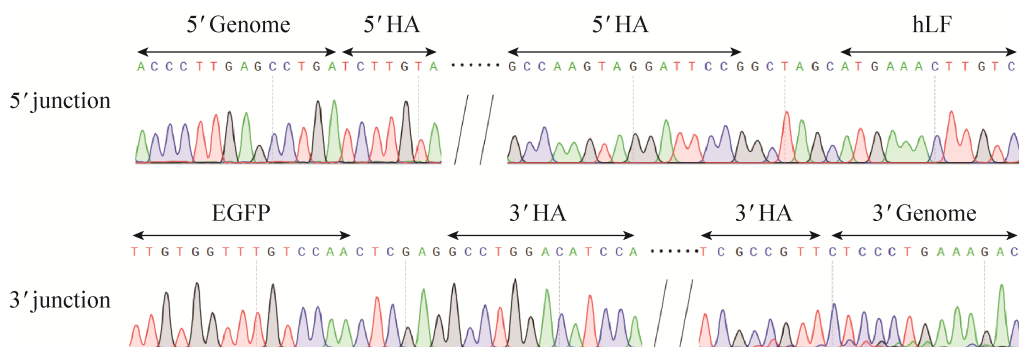


图 5 部分 5'与 3'连接 PCR 阳性细胞克隆测序峰图

Fig. 5 Partial sequencing peak diagrams of 5' and 3' junction PCR positive clones.

3 讨论

本试验首次使用 CRISPR-Cas9 系统在山羊基因组 *BLG* 基因位点定点敲入 *hLF* cDNA 序列。同时本试验还研究了不同浓度 RS-1 对 Cas9 引导的敲入效率的影响。目前利用靶向性的核酸酶基因编辑技术可以快速、高效地获得基因编辑家畜。使用 CRISPR-Cas9 技术敲除 *BLG* 和同时插入 *hLF*，既可以减少山羊乳的过敏原性，又保障了其营养价值，从而使其更加“人源化”^[20]。在早期的研究中，通过显微注射和随机插入等方法获得转基因家畜的效率相对较低，存在敲入位点不够精确和拷贝数不确定等问题^[21]。随后，研究者尝试使用长同源臂构建打靶载体，可以通过同源重组获得精确基因打靶细胞系或个体。2004 年，孙丽新^[22]在山羊乳腺 β -酪蛋

白基因座定点插入 *hLF* cDNA；Shen 等^[23]将人组织型纤溶酶原激活剂突变体 (ht-PAm) 基因插入至山羊胎儿成纤维细胞 β -酪蛋白基因座；张学明^[24]将胶质细胞源性神经营养因子 (GDNF) 基因插入至山羊胎儿成纤维细胞 β -酪蛋白基因座；孟立^[25]在山羊乳腺上皮细胞的 β -酪蛋白基因座定点插入 *hLF* cDNA，并且体外激素诱导获得了 hLF 蛋白。胡林勇^[26]在山羊耳成纤维细胞 *BLG* 基因位点插入 α -乳白蛋白 (ALA)，并结合体细胞核移植技术获得了转基因后代。然而，以上方法依然存在着试验周期长和整合效率低等问题。

近几年，随着基因编辑技术的飞速进步，ZFN、TALENs 和 CRISPR-Cas9 已被广泛应用于转基因研究和转基因动物的生产。由于 CRISPR-Cas9 技术较之 ZFN 和 TALENs 的便捷

性和高效性^[27], 现已经成为最热门的基因编辑技术之一, 而且已经被应用于反刍动物的基因打靶研究中。Jeong 等^[28]使用 CRISPR-Cas9 技术在牛 β -酪蛋白基因位点插入人胰岛素 (hINS) 基因。同时文献表明, Cas9 较之 TALENs 有更高的编辑效率^[29], 而且张锋实验室改良后的 Cas9 蛋白具有更高的特异性^[30]。本试验的阳性细胞克隆鉴定结果表明, 未经 RS-1 处理的对照组, 阳性率达到 16.67%, 显著高于传统的打靶方法^[31]。Cui 等^[32]使用 TALENs 编辑山羊 *BLG* 位点, 效率为 5%–13%; 宋绍征等使用 TALENs 和 3 种药物连续筛选的方法提升编辑效率至 17%, 与本研究结果相近^[33]。本试验在体细胞中的实验结果表明, 非筛选条件下基因敲入效率最高可达 14%, 药物筛选后基因敲入效率可进一步提升至 32.61%, 提示 CRISPR-Cas9 系统可能是一种优于传统同源重组的打靶方法, 适用于家畜体细胞的基因打靶。

目前关于提高同源重组效率的研究表明, 通过同步细胞周期, 基因沉默和添加不同的化学物质可以提升同源重组效率^[34-37]。添加化学物质法作为一种简单便捷的方法被众多研究者所采用, 常见的化合物分为两类: 一类为 NHEJ 途径中关键酶抑制剂, 如 SCR7^[19,34-35]; 另一种为 HDR 途径中关键酶的激活剂, 如 RS-1^[19,36]。研究报道, 在转染后的细胞培养基中添加 SCR7 可以提升 CRISPR-Cas9 引导的敲入效率, 在人和小鼠细胞系上可以提升 4–5 倍^[34], 在小鼠胚胎上可以提高 17%–30%^[35]。但同时也有文献表明, SCR7 并不能显著提高胚胎中 CRISPR-Cas9 引导的同源重组效率^[36]。本试验尝试在转染后的细胞培养基中添加不同浓度的 RS-1, 以探究其对同源重组效率的影响。流式

细胞术分析结果表明, 同源重组效率随着 RS-1 浓度的升高而增加, 在 20 $\mu\text{mol/L}$ 时效率最高, 约 14%。Pinder 等^[19]在不同细胞系中使用 RS-1 来提升 CRISPR-Cas9 引导的敲入效率, 其结果表明, RS-1 浓度在 0–20 $\mu\text{mol/L}$ 时, 同源重组效率与浓度正相关, 与本结果一致。

在阳性细胞克隆鉴定结果中, RS-1 浓度在 0–10 $\mu\text{mol/L}$ 时, *hLF* 敲入阳性克隆率与 RS-1 浓度呈正相关。然而, 当 RS-1 浓度升高至 20 $\mu\text{mol/L}$ 时, *hLF* 敲入阳性克隆率下降至 22.22%, 与流式检测结果相反。这可能是由于 20 $\mu\text{mol/L}$ RS-1 对于山羊耳成纤维细胞有着较强的细胞毒性, 导致处理后的细胞在 G418 筛选时的存活率下降。同时本试验还观察到, 20 $\mu\text{mol/L}$ RS-1 处理组的细胞在 RS-1 处理 72 h 后贴壁数明显少于对照组; 此外 20 $\mu\text{mol/L}$ 处理组获得的细胞克隆数最少, 这一现象与 Pinder 等^[19]发现的 RS-1 的浓度 $\geq 10 \mu\text{mol/L}$ 时会出现较强的细胞毒性的现象一致。因此, 适宜浓度的 RS-1 可以显著提升 CRISPR-Cas9 介导的山羊基因组打靶效率, 但 RS-1 浓度过高时会降低打靶效率。

总之, 本试验采用 CRISPR-Cas9 系统实现了在山羊 *BLG* 位点定点敲入 *hLF* 基因。同时, 本试验还首次使用 RS-1 来促进山羊耳成纤维细胞的同源重组效率, 发现其在 10 $\mu\text{mol/L}$ 时获得的 *hLF* 敲入效率最高, 但在 20 $\mu\text{mol/L}$ 时具有较强细胞毒性, 反而会降低 *hLF* 敲入效率。该研究为今后高效利用 CRISPR-Cas9 系统获得基因敲入的家畜提供了参考依据。

REFERENCES

- [1] Brouns SJJ, Jore MM, Lundgren M, et al. Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in

- prokaryotes. *Science*, 2008, 321(5891): 960–964.
- [2] Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 2012, 337(6096): 816–821.
- [3] Cong L, Ran FA, Cox D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 2013, 339(6121): 819–823.
- [4] Wang HY, Yang H, Shivalila CS, et al. One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell*, 2013, 153(4): 910–918.
- [5] Guo RH, Wan YJ, Xu D, et al. Generation and evaluation of *Myostatin* knock-out rabbits and goats using CRISPR/Cas9 system. *Sci Rep*, 2016, 6: 29855.
- [6] Urnov FD, Rebar EJ, Holmes MC, et al. Genome editing with engineered zinc finger nucleases. *Nat Rev Genet*, 2010, 11(9): 636–646.
- [7] Hsu PD, Scott DA, Weinstein JA, et al. DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(9): 827–832.
- [8] Wang XL, Yu HH, Lei AM, et al. Generation of gene-modified goats targeting *MSTN* and *FGF5* via zygote injection of CRISPR/Cas9 system. *Sci Rep*, 2015, 5: 13878.
- [9] Lv QY, Yuan L, Deng JC, et al. Efficient generation of myostatin gene mutated rabbit by CRISPR/Cas9. *Sci Rep*, 2016, 6: 25029.
- [10] Platt RJ, Chen SD, Zhou Y, et al. CRISPR-Cas9 knockin mice for genome editing and cancer modeling. *Cell*, 2014, 159(2): 440–455.
- [11] Sharma S, Kumar P, Betzel C, et al. Structure and function of proteins involved in milk allergies. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 2001, 756(1/2): 183–187.
- [12] Ehn BM, Allmere T, Telemo E, et al. Modification of IgE binding to β -lactoglobulin by fermentation and proteolysis of cow's milk. *J Agr Food Chem*, 2005, 53(9): 3743–3748.
- [13] Ehn BM, Ekstrand B, Bengtsson U, et al. Modification of IgE binding during heat processing of the cow's milk allergen β -lactoglobulin. *J Agr Food Chem*, 2004, 52(5): 1398–1403.
- [14] Lönnnerdal B, Iyer S. Lactoferrin: molecular structure and biological function. *Annu Rev Nutr*, 1995, 15: 93–110.
- [15] González-Chávez SA, Arévalo-Gallegos S, Rascón-Cruz Q. Lactoferrin: structure, function and applications. *Int J Antimicrob Ag*, 2009, 33(4): 301.e1–301.e8.
- [16] van der Strate BWA, Beljaars L, Molema G, et al. Antiviral activities of lactoferrin. *Antivir Res*, 2001, 52(3): 225–239.
- [17] Baumann P, West SC. Role of the human RAD51 protein in homologous recombination and double-stranded-break repair. *Trends Biochem Sci*, 1998, 23(7): 247–251.
- [18] Jayathilaka K, Sheridan SD, Bold TD, et al. A Chemical compound that stimulates the human homologous recombination protein RAD51. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(41): 15848–15853.
- [19] Pinder J, Salsman J, Dellaire G. Nuclear domain 'knock-in' screen for the evaluation and identification of small molecule enhancers of CRISPR-based genome editing. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43(19): 9379–9392.
- [20] Sun BX, Hou WW, Ouyang HS. Transgenic animal bioreactor. *Animal Sci Vet Med*, 2000, 17(3): 18–20 (in Chinese).
孙博兴, 侯万文, 欧阳红生. 转基因动物生物反应器. *动物科学与动物医学*, 2000, 17(3): 18–20.
- [21] Tan WF, Proudfoot C, Lillico SG, et al. Gene targeting, genome editing: from Dolly to editors. *Transgenic Res*, 2016, 25(3): 273–287.
- [22] Sun LX. The production of gene-targeting at GEF β -casein gene locus with human lactoferrin gene and analysis of gene integrate site[D]. Shanghai: East China Normal University, 2004 (in Chinese).
孙丽新. *hLF* 基因打靶山羊胎儿成纤维细胞株的建立及其整合位点的分析[D]. 上海: 华东师范大学, 2004.
- [23] Shen W, Lan GC, Yang XY, et al. Targeting the

- exogenous *htPAm* gene on goat somatic cell *beta-casein* locus for transgenic goat production. *Mol Reprod Dev*, 2007, 74(4): 428–434.
- [24] Zhang XM. Human *gdnf* gene knock-in at *beta-casein* locus in bovine fetal fibroblast cells and production of gene-targeted blastocysts by SCNT[D]. Hohhot: Inner Mongolia University, 2009 (in Chinese).
张学明. 人 *gdnf* 在牛胎儿成纤维细胞 *beta-casein* 基因座的定位整合及基因打靶克隆囊胚的制备[D]. 呼和浩特: 内蒙古大学, 2009.
- [25] Meng L. Studies on construction of specific gland expressional vector of hLF and modified fibroblast cell line[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2010 (in Chinese).
孟立. 人乳铁蛋白表达载体的构建及转基因阳性细胞株的建立[D]. 南京: 南京农业大学, 2010.
- [26] Hu LY. Gene targeting toward β -lactoglobulin gene in goat[D]. Yangling: Northwest A&F University, 2012 (in Chinese).
胡林勇. 靶向山羊 β -乳球蛋白基因的基因打靶研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2012.
- [27] Hsu PD, Lander ES, Zhang F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell*, 2014, 157(6): 1262–1278.
- [28] Jeong YH, Kim YJ, Kim EY, et al. Knock-in fibroblasts and transgenic blastocysts for expression of human FGF2 in the bovine β -casein gene locus using CRISPR/Cas9 nuclease-mediated homologous recombination. *Zygote*, 2015, 24(3): 442–456.
- [29] Liu C. The study on efficiency of CRISPR/Cas9 and TALENs mediated gene targeting at dairy goat β -casein locus[D]. Hohhot: Inner Mongolia University, 2016 (in Chinese).
刘畅. CRISPR/Cas9 与 TALENs 介导奶山羊 β -酪蛋白位点基因打靶效率的比较研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古大学, 2016.
- [30] Slaymaker IM, Gao LY, Zetsche B, et al. Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity. *Science*, 2016, 351(6268): 84–88.
- [31] Shen W, Yang ZT, Deng JX. Production of mammary gland bioreactor by gene targeting of somatic cells. *Chin J Biotech*, 2003, 19(6): 767–770 (in Chinese).
沈伟, 杨正田, 邓继先. 体细胞基因打靶制备动物乳腺生物反应器的策略与应用. *生物工程学报*, 2003, 19(6): 767–770.
- [32] Cui CC, Song YJ, Liu J, et al. Gene targeting by TALEN-induced homologous recombination in goats directs production of β -lactoglobulin-free, high-human lactoferrin milk. *Sci Rep*, 2015, 5: 10482.
- [33] Song SZ, Zhu MM, Yuan YG, et al. *BLG* gene knockout and *hLF* gene knock-in at *BLG* locus in goat by TALENs. *Chin J Biotech*, 2016, 32(3): 329–338 (in Chinese).
宋绍征, 朱孟敏, 袁玉国, 等. 转录激活因子样效应物核酸酶介导的山羊 β -乳球蛋白基因敲除和人乳铁蛋白基因定点整合. *生物工程学报*, 2016, 32(3): 329–338.
- [34] Chu VT, Weber T, Wefers B, et al. Increasing the efficiency of homology-directed repair for CRISPR-Cas9-induced precise gene editing in mammalian cells. *Nat Biotechnol*, 2015, 33(5): 543–548.
- [35] Maruyama T, Dougan SK, Truttmann MC, et al. Increasing the efficiency of precise genome editing with CRISPR-Cas9 by inhibition of nonhomologous end joining. *Nat Biotechnol*, 2015, 33(5): 538–542.
- [36] Song J, Yang DS, Xu J, et al. RS-1 enhances CRISPR/Cas9- and TALEN-mediated knock-in efficiency. *Nat Commun*, 2016, 7: 10548.

(本文责编 陈宏宇)