

引用格式:

韩佃刚, 胡娟, 董俊, 周思佳, 陈朝林, 张家翔, 信吉阁. 利用 CRISPR/Cas9 技术构建猪 *LDLR* 基因敲除细胞[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2023, 49(4): 468–471.

HAN D G, HU J, DONG J, ZHOU S J, CHEN C L, ZHANG J X, XIN J G. Generation of *LDLR*-knockout pig cells using by CRISPR/Cas9 technology[J]. Journal of Hunan Agricultural University(Natural Sciences), 2023, 49(4): 468–471.

投稿网址: <http://xb.hunau.edu.cn>



利用 CRISPR/Cas9 技术构建猪的 *LDLR* 基因敲除细胞

韩佃刚^{1,2}, 胡娟³, 董俊², 周思佳³, 陈朝林³, 张家翔³, 信吉阁^{3*}

(1.云南农业大学动物科学技术学院, 云南 昆明 650201; 2.昆明海关技术中心, 云南 昆明 650200; 3.云南农业大学动物医学院, 云南 昆明 650201)

摘 要: 利用 CRISPR/Cas9 系统构建猪的低密度脂蛋白受体基因 *LDLR* 敲除细胞: 根据 NCBI 数据库猪 *LDLR* 基因(Gene ID 为 396801)序列设计 sgRNA 靶位点, 构建敲除打靶载体, 通过电转染猪胎儿成纤维细胞, 经 G418 筛选获得细胞克隆, 进行 PCR 扩增和 T 载体克隆测序, 经序列比对计算基因敲除效率。结果表明, 依照 CRISPR/Cas9 系统 GN20GG 法则, 在 *LDLR* 基因第一外显子上设计 1 条 sgRNA, 测序结果显示靶序列已正确连接, 转染、筛选后共获得 30 个单细胞克隆, 23 个测序成功, 其中有 7 个细胞克隆为 *LDLR* 基因敲除细胞克隆, 敲除效率为 30.4%。

关 键 词: 猪; 低密度脂蛋白受体基因; 基因敲除; CRISPR/Cas9 系统

中图分类号: S828.9; Q78

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2023)04-0468-04

Generation of *LDLR*-knockout pig cells using by CRISPR/Cas9 technology

HAN Diangang^{1,2}, HU Juan³, DONG Jun², ZHOU Sijia³, CHEN Chaolin³, ZHANG Jiaxiang³, XIN Jige^{3*}

(1.College of Animal Science and Technology, Yunnan Agricultural University, Kunming, Yunnan 650201, China; 2.Technology Center of Kunming Customs, Kunming, Yunnan 650200, China; 3.College of Veterinary Medicine, Yunnan Agricultural University, Kunming, Yunnan 650201, China)

Abstract: The objective of this study was to disrupt the low density lipoprotein receptor gene(*LDLR*) of pig cells using the CRISPR/Cas9 system. Specific guide RNA(sgRNA) sequences were designed based on the *LDLR* sequence from the NCBI database(Gene ID 396801). A CRISPR/Cas9 target vector was constructed and porcine embryonic fibroblasts colonies were generated through electrotransfection and G418 screening. Genotype identification was performed on the cell colonies. PCR products were cloned into a T vector and subjected to sequence alignment. The efficiency of gene knockout was analyzed statistically. The sgRNA was designed to target the first exon of the *LDLR* following the GN20GG rule. DNA sequence assays confirmed the correct construction of the target vector, which was subsequently introduced into porcine fetal fibroblasts using electroporation. In total, 30 monoclonal cells were isolated, with successful sequencing of 23 colonies. Among these, seven cell colonies exhibited gene modifications, resulting in a fragment knockout efficiency of 30.4%.

Keywords: pig; *LDLR* gene; gene knockout; CRISPR/Cas9 system

动脉粥样硬化是引起急性心肌梗死、卒中等重大疾病的首要病因^[1]。这些疾病的发病过程中,

低密度脂蛋白受体(LDLR)和载脂蛋白 E(ApoE)起着关键性的作用。LDLR 是一种细胞表面糖蛋白,

收稿日期: 2022-06-07

修回日期: 2023-08-11

基金项目: 国家自然科学基金项目(31960658、31360532); 云南省科技计划项目(2013FB041)

作者简介: 韩佃刚(1980—), 男, 山东潍坊人, 博士, 高级兽医师, 主要从事检验检疫研究, 1227394912@qq.com; *通信作者, 信吉阁, 博士, 教授, 主要从事兽医公共卫生学研究, 1104263681@qq.com

广泛存在于体内组织或细胞中,如肝脏、肾上腺、成纤维细胞、平滑肌细胞和血管内皮细胞等^[2]。*LDLR* 可以与 ApoE 结合,进而清除血中的脂蛋白颗粒;另外, *LDLR* 可通过与低密度脂蛋白(LDL)颗粒上的脂蛋白 B(ApoB)相互作用,清除血中的 LDL^[3]。由此可见, *LDLR* 在清除血液中的胆固醇和甘油三酯富集的脂蛋白颗粒中扮演着非常重要的角色。啮齿类动物是目前应用最广泛的动物模型, *LDLR*^{-/-}基因敲除的小鼠、大鼠被广泛作为动脉粥样硬化的模型动物,而其与人亲缘关系较远,遗传背景、体型以及寿命等方面与人类有较大差异,转化医学和临床前研究需要非啮齿类动物模型。猪在解剖结构、生理代谢及疾病发生机理等方面与人有很多相似之处,被认为是理想的动物模型^[4]。构建猪动物模型在心血管相关研究及转化医学领域优势明显。CRISPR/Cas9 基因编辑系统作为基因编辑系统的第 3 代工具,具有操作简单、敲除效率高、实验成本低等优势,为大动物基因编辑提供了一个有效的技术支持^[4-7]。本研究中,利用 CRISPR/Cas9 系统构建猪 *LDLR* 基因打靶载体,通过转染、筛选等多个技术环节构建猪 *LDLR* 基因敲除细胞模型,以期在细胞水平研究基因功能和构建基因敲除动物提供依据。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

Cas9 质粒(41815)、sgRNA 质粒(41819)购自 Addgene;引物购自昆明硕擎生物科技有限公司;限制性内切酶、连接酶等购自 Fermentas;猪胎儿成纤维细胞由云南农业大学动物医学院实验室冻存;DMEM/F12、PBS、胎牛血清均购自 Thermo;PCR 仪购自 ABI;双稳定电泳仪购自北京六一仪器厂;细胞电转仪购自 Bio-Rad;凝胶成像系统购自 Genentech;培养箱购自 Thermo;超净工作台购自广州瑞智净化设备有限公司。

1.2 方法

1.2.1 *LDLR* 基因序列设计

根据 CRISPR/Cas9 系统 GN20GG 设计法则,依照 GenBank 中 *LDLR* 序列信息(Gene ID 为 396801),在靠近起始密码子 ATG 位置选择打靶序列,设计一条 sgRNA 序列。合成靶序列,在正义

链 5'端添加 CACC 接头(Oligo1),在反义链的 5'端添加 AAAC 接头(Oligo2),便于酶切载体连接。

1.2.2 sgRNA 载体构建

2 条 sgRNA 进行退火反应。反应体系包括 Oligo1 10 μ L、Oligo2 10 μ L、NEB Buffer3 5 μ L、ddH₂O 25 μ L。将配制好的体系混匀、瞬离,置于沸水中加热 5 min,自然冷却至室温(3~4 h)。用 Solution I 将退火产物与经 *Bbs*I 酶切 sgRNA 质粒连接,反应体系为线性化 sgRNA 质粒 0.5 μ L、Solution I 5.0 μ L、退火产物 4.5 μ L;16 $^{\circ}$ C 连接 30 min,并将连接产物转化入大肠杆菌 Top10 中,涂布于含卡那霉素的 LB 固体平板上,37 $^{\circ}$ C 过夜培养,挑取单克隆、摇菌,并送昆明硕擎生物科技有限公司测序,鉴定靶序列正确插入。

1.2.3 细胞转染与单克隆筛选

参照文献[8]的方法,先进行猪胎儿成纤维细胞复苏培养,汇合度达 80% 时进行细胞转染。取生长状态良好的细胞 1×10^7 个,用 PBS 清洗 2 次,重悬在 600 μ L PBS 中,将其转入电转杯中,加入质粒 Cas9、sgRNA 各 50 μ g 并吹打混匀,将电转杯放入电转仪中进行转染,转染参数为 230 V、500 μ F。电转后将细胞分到 15 个直径为 10 cm 的培养皿中培养;隔天换液,换成含 G418(质量浓度为 800 μ g/mL)的培养基培养;隔 2 d 换液,筛选 8~10 d 后用细胞克隆环挑取单克隆细胞,转移到 48 孔板培养,待 48 孔板中细胞长满传代到 24 孔板。

1.2.4 基因敲除细胞克隆鉴定

NP40 裂解细胞先 56 $^{\circ}$ C 裂解 1.5 h,再 95 $^{\circ}$ C 裂解 10 min。扩增 *LDLR* 靶序列片段,引物为 *LDLR*-F (5'-ATGAAGTCCACGGGCTGGGT-3')和 *LDLR*-R (5'-GTCCTGGCAGCGGAAGTCA-3')。PCR 条件为:95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,60 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s,35 个循环。取 3 μ L PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测分析,PCR 产物以正向引物送昆明硕擎生物科技有限公司测序。测序结果运用 Vector NTI 11.5 与原序列比对,采用 pMD19-T Vector Cloning Kit 经 TA 克隆、连接、转化、提质粒后用通用引物 M13 测序。测序结果与原序列比对,鉴定基因敲除情况。

2 结果与分析

2.1 LDLR 基因序列设计结果

设计的 sgRNA 序列为 GCTGCAGTGAAG AGAAATG, PAM 为 TGG, 并合成靶序列 Oligo1 (5'-CACCgctgcagtgaagagaaatg-3')和 Oligo2(5'-AA ACcatttctctccactgcagc-3')。

2.2 sgRNA 载体构建结果

将 2 条 sgRNA Oligo 退火, 形成双链后连接到 *Bbs* I 酶切的 sgRNA 质粒上, 转化入大肠埃希菌, 并挑取单克隆菌落测序, 结果如图 1 所示, 显示序列连接正确。

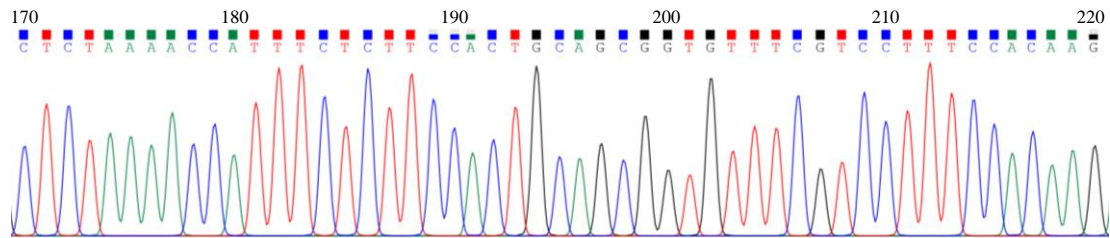


图 1 sgRNA 载体测序结果
Fig.1 Sequencing results of sgRNA vector

2.3 细胞转染与单克隆筛选结果

把 Cas9 质粒、sgRNA 质粒转染到猪胎儿成纤维细胞, 观察到细胞长势良好, 呈典型的成纤维细胞形态, 培养 8~10 d, 形成单克隆细胞(图 2)。

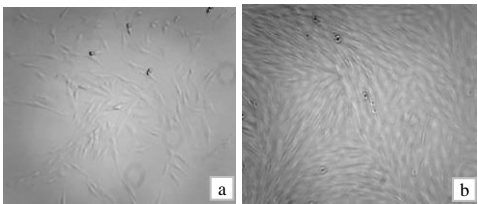


图 2 培养 3 d(a)和 8 d(b)的猪胎儿成纤维细胞克隆
Fig.2 Porcine embryonic fibroblasts colonies cultured for 3 d(a) and 8 d(b)

2.4 基因敲除细胞克隆鉴定结果

经筛选、培养后共获得 30 个单细胞克隆, 琼脂糖凝胶电泳检测部分结果如图 3 所示, 在预期片段大小处有单一明亮条带。测序结果显示, 23 个细胞测序成功, 序列比对结果显示为 7 个细胞克隆在靶位点发生了突变, 敲除效率为 30.4%。确定的靶位点序列变化列于表 1。序列变化有碱基缺失、插入。

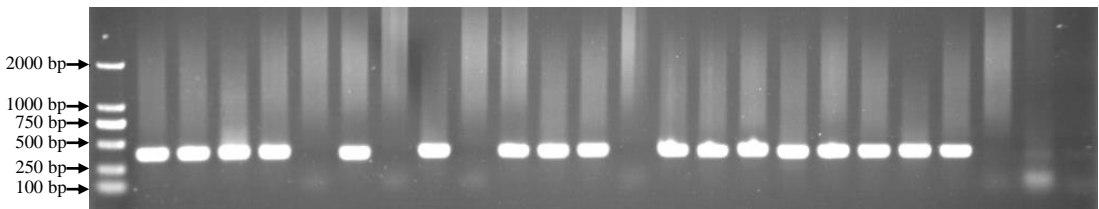


图 3 基因敲除猪胎儿成纤维细胞克隆的 PCR 鉴定电泳结果
Fig.3 The PCR electrophoretogram results of *LDLR*-knockout porcine embryonic fibroblasts colonies

表 1 基因敲除猪胎儿成纤维细胞克隆基因测序结果

Table 1 The result of gene sequencing for <i>LDLR</i> -knockout porcine embryonic fibroblasts colonies		
克隆编号	基因序列	插入/缺失
WT	CGGTGGCAGCTGCAGTGAAGAGAAATGTGGAGAAACG	
#T2	CGGTGGCAGCTGCAGTGGAA----AATGTGGAGAAACG	△4/△4
#T5	CGGTGGCAGCTGCAGTGAAGAGAAATGTGGAGAAACG CGGTGGCAGCTGCAGTGGAA----AATGTGGAGAAACG	WT/△4
#T6	CGGTGGCAGCTGCA-----AATGTGGAGAAACG	△10/△10
#T8	CGGTGGCAGCTGCAGTGAAGAG--AATGTGGAGAAACG CGGTGGCAGCTGCAGTGG-----AATGTGGAGAAACG	△1/△5
#T15	CGGTGGCAGCTGCAGTGAAGAG--AATGTGGAGAAACG	△1/+1
#T20	CGGTGGC-----GTGGAGAAACG CGGTGGCAGCTGCAGTGG-----AATGTGGAGAAACG	△20/△5
#T23	CGGTGGCAGCTGCAGTGAAGAGAAATGTGGAGAAACG CGGTGGCAGCTGCAGTGG-----AATGTGGAGAAACG	WT/△6

WT 示野生型的靶位点序列。红色碱基为 sgRNA 靶位点序列; 蓝色碱基为 PAM 结合位点序列。“△”示碱基缺失; “+”示碱基插入。

3 结论与讨论

在 CRISPR/Cas9 系统中, sgRNA 引导 Cas9 核酸酶在基因的靶位点形成双链或是单链的切口, 从而激活细胞的 DNA 修复机制, 包括非同源重组的末端链接修复和精确的同源重组机制, 而非同源重组的末端链接修复中会发生随机的碱基插入或缺失^[9-10]。本研究中, 在 *LDLR* 基因第一外显子上设计 1 条 sgRNA, 构建敲除打靶载体, 细胞转染、筛选获得细胞克隆, 鉴定了 7 个细胞克隆在基因靶位点发生碱基插入或缺失, 表明 sgRNA 编辑了 *LDLR* 基因。利用 CRISPR/Cas9 系统在多个物种上进行基因敲除研究多有报道, 如绵羊肌肉卫星细胞 *MSTN* 基因的靶向敲除^[11], 构建 *Mindin* 基因敲除的小鼠^[12], 敲除 HEK293FT 细胞系的 *CYP2E1* 基因^[13], 敲除猪胎儿成纤维细胞系的 *APN* 基因^[14]等, 本研究结果与这些研究的类似。

本研究中, 敲除效率为 30.4%, 这与赵为民等^[15]的 CRISPR/Cas9 系统介导大鼠 *L6* 细胞 *Inhba* 基因编辑研究中的敲除效率类似。朱晓晗等^[16]的 CRISPR/Cas9 技术构建巴马小型猪 *F9* 基因敲除细胞系的效率是 45.5%; 徐长江等^[17]的利用 CRISPR/Cas9 系统构建 *pAPN* 基因敲除的猪回肠上皮细胞系的效率为 15.5%; 赵丽华等^[18]基于 CRISPR/Cas9 系统制备猪 *Pax2* 基因敲除细胞系效率为 45.21%。可见, 敲除效率有待进一步提高。

参考文献:

- [1] XU H L, JIANG J X, CHEN W Z, et al. Vascular macrophages in atherosclerosis[J]. Journal of Immunology Research, 2019: 4354786.
- [2] RUDENKO G, HENRY L, HENDERSON K, et al. Structure of the LDL receptor extracellular domain at endosomal pH[J]. Science, 2002, 298: 2353–2358.
- [3] ALABI A, XIA X D, GU H M, et al. Membrane type 1 matrix metalloproteinase promotes LDL receptor shedding and accelerates the development of atherosclerosis[J]. Nature Communications, 2021, 12(1): 1889.
- [4] TANIHARA F, HIRATA M, OTOI T. Current status of the application of gene editing in pigs[J]. The Journal of Reproduction and Development, 2021, 67(3): 177–187.
- [5] 胡小丹, 游敏, 罗文新. 基因编辑技术[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2018, 34(3): 267–277.
- [6] HSU P D, LANDER E S, ZHANG F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering[J]. Cell, 2014, 157(6): 1262–1278.
- [7] 庄重, 赵龙, 白皓, 等. CRISPR/Cas9 技术在家禽育种方面的应用[J]. 中国农业科技导报, 2022, 24(1): 14–23.
- [8] 信吉阁, 成文敏, 潘伟荣, 等. 猪胎儿成纤维细胞和耳皮肤成纤维细胞培养方法的研究[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2013(9): 1–4.
- [9] CONG L, RAN F A, COX D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems[J]. Science, 2013, 339: 819–823.
- [10] MALI P, YANG L H, ESVELT K M, et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9[J]. Science, 2013, 339: 823–826.
- [11] 李聪. CRISPR/Cas9 技术对绵羊肌肉卫星细胞 *MSTN* 基因的靶向敲除研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2015.
- [12] 纪慈数, 赵志刚, 贺颖. 利用 CRISPR/Cas9 技术制备 *Mindin* 基因敲除小鼠[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2016, 55(6): 922–926.
- [13] 范启明, 李若碧, 王飞, 等. 利用 CRISPR/Cas9 技术构建 *CYP2E1* 基因敲除的 HEK293FT 细胞系[J]. 癌变 畸变 突变, 2017, 29(5): 352–357.
- [14] LUO L, WANG S, ZHU L, et al. Aminopeptidase N-null neonatal piglets are protected from transmissible gastroenteritis virus but not porcine epidemic diarrhea virus[J]. Scientific Reports, 2019, 9(1): 13186.
- [15] 赵为民, 涂枫, 王泽平, 等. CRISPR/Cas9 系统介导大鼠 *Inhba* 基因的编辑[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2021, 47(6): 700–704.
- [16] 朱晓晗, 刘晓蕊, 李琳, 等. 利用 CRISPR/Cas9 技术高效构建巴马小型猪 *F9* 基因敲除细胞系[J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2022, 42(1): 1–7.
- [17] 徐长江, 王晓朋, 徐奎, 等. 利用 CRISPR/Cas9 编辑系统构建 *pAPN* 基因敲除的 IPI-2I 细胞系[J]. 中国畜牧兽医, 2021, 48(7): 2282–2290.
- [18] 赵丽华, 刘曼菱, 李美双, 等. 基于 CRISPR/Cas9 系统制备猪 *Pax2* 基因敲除细胞系[J]. 内蒙古大学学报(自然科学版), 2023, 54(2): 169–178.

责任编辑: 邹慧玲
英文编辑: 柳 正