

# CRISPR/Cas13d 介导猪胎儿成纤维细胞 *SUV39H1/SUV39H2* 基因敲降

毕登峰<sup>1,2</sup>, 王煜<sup>2</sup>, 姚婧<sup>2</sup>, 赵建国<sup>1,2\*</sup>

(1. 中国科学技术大学, 合肥 230026; 2. 中国科学院动物研究所, 北京 100101)

**摘要:** 研究旨在利用 CRISPR/Cas13d 系统对猪胎儿成纤维细胞(PEF)中的胚胎发育相关基因 *SUV39H1/SUV39H2* 进行 RNA 水平的敲降, 从而在猪上建立 CRISPR/Cas13d 介导的基因敲降系统。根据 *SUV39H1/SUV39H2* 基因的编码序列各设计 3 个靶向编码链的 sgRNAs, 并以单链寡核苷酸的形式合成, 退火后与 *BspQI* 线性化的 sgRNA 表达载体进行连接, 构建 *SUV39H1*-sgRNA 和 *SUV39H2*-sgRNA 表达载体, 用 Sanger 软件进行测序; 将 Cas13d 表达载体和靶向 *SUV39H1/SUV39H2* 基因的 sgRNA 载体按照 1:1、1:2、1:4、2:1 和 4:1 比例转染猪胎儿成纤维细胞, 48 h 后收集细胞, 用流式细胞术分选检测细胞转染效率, 用半定量 PCR 和实时荧光定量 PCR 检测敲降效率; 用半定量 PCR 和免疫荧光检测敲降 *SUV39H1/SUV39H2* 基因后, 靶基因转录水平及组蛋白 H3K9me3 水平的变化。测序结果表明, 针对 2 个基因设计的各 3 条 sgRNAs 均成功连入载体中; 流式细胞术分选结果显示, 转染效率约 70%; 半定量 PCR 结果表明, 与对照组相比, 3 个 sgRNAs 均极显著降低了 *SUV39H1* 和 *SUV39H2* 基因的表达 ( $P < 0.01$ ), 其中 *SUV39H1*-sgRNA-2 和 *SUV39H2*-sgRNA-1 均可使 *SUV39H1* 和 *SUV39H2* 的表达降低 50%; Cas13d:sgRNA 为 1:1、1:2 和 1:4 组细胞的存活率高于 2:1 和 4:1 组; 实时荧光定量 PCR 结果表明, Cas13d:sgRNA 为 1:2、1:4、2:1 和 4:1 组敲降效率均显著高于 1:1 组 ( $P < 0.05$ ), 且 Cas13d:sgRNA 为 1:2 组敲降效率最高(70%)。半定量 PCR 结果显示, 转染 *SUV39H1*-sgRNA-2 和 *SUV39H2*-sgRNA-1 极显著降低 *SUV39H1* 和 *SUV39H2* 的表达, 表达量为对照组的 25%~30% ( $P < 0.01$ )。免疫荧光检测结果表明, 敲降 *SUV39H1* 和 *SUV39H2* 基因后, 组蛋白 H3K9me3 水平显著降低 ( $P < 0.05$ )。因此, 本研究利用 CRISPR/Cas13d 系统在猪胎儿成纤维细胞中成功敲降 *SUV39H1* 和 *SUV39H2*, 并下调其催化的 H3K9me3 水平。

**关键词:** CRISPR/Cas13d; *SUV39H1/SUV39H2* 基因; 敲降; 猪胎儿成纤维细胞

中图分类号: Q786

文献标识码: A

Doi: 10.16431/j.cnki.1671-7236.2021.06.008

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



## CRISPR/Cas13d-mediated *SUV39H1/SUV39H2* Gene Knockdown in Porcine Embryonic Fibroblasts

BI Dengfeng<sup>1,2</sup>, WANG Yu<sup>2</sup>, YAO Jing<sup>2</sup>, ZHAO Jianguo<sup>1,2\*</sup>

(1. University of Science and Technology of China, Hefei 230026, China;

2. Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

**Abstract:** This study was aimed to knockdown the embryonic development related genes *SUV39H1/SUV39H2* in porcine embryonic fibroblasts (PEFs) by CRISPR/Cas13d system, so as to establish a CRISPR/Cas13d mediated gene knockdown system in pigs. According to the coding sequences of *SUV39H1/SUV39H2* genes, 3 sgRNAs were designed and synthesized in the form of single stranded oligonucleotides. After annealing, they were connected with the sgRNA expression

收稿日期: 2020-09-14

基金项目: 国家自然科学基金(81671274, 31601008)

作者简介: 毕登峰(1994-), 女, 内蒙古乌兰察布人, 硕士生, 研究方向: 细胞生物学, E-mail: bdf@mail.ustc.edu.cn

\*通信作者: 赵建国, 男, 山东日照人, 博士, 研究方向: 大动物遗传修饰, E-mail: zhaojg@ioz.ac.cn

vector linearized by *BSPQ* I. The sgRNA-expressing vectors of *SUV39H1* and *SUV39H2* genes sgRNA were constructed and sequenced by Sanger software. The expression vector of Cas13d and sgRNA vector targeting *SUV39H1/SUV39H2* genes were transfected into PEFs at the ratio of 1 : 1, 1 : 2, 1 : 4, 2 : 1 and 4 : 1. After 48 h, the cells were collected, and the transfection efficiency was detected by flow cytometry. The knockdown efficiency was detected by semi-quantitative PCR and Real-time quantitative PCR. Semi-quantitative PCR and immunofluorescence were used to detect the level of target gene transcripts and histone H3K9me3 after *SUV39H1/SUV39H2* genes knockdown. Sequencing results showed that 3 sgRNAs for each of two genes were successfully inserted into the vector. Flow cytometry results showed that the transfection efficiency was about 70%. Semi-quantitative PCR results showed that 3 sgRNAs extremely significantly reduced the expression of *SUV39H1/SUV39H2* genes compared with control group ( $P < 0.01$ ). *SUV39H1*-sgRNA-2 and *SUV39H2*-sgRNA-1 could reduce the expression of *SUV39H1* and *SUV39H2* by 50%. The survival rate of Cas13d : sgRNA in 1 : 1, 1 : 2 and 1 : 4 groups were higher than that of 2 : 1 and 4 : 1 groups. The knockdown efficiency of Cas13d : sgRNA in 1 : 2, 1 : 4, 2 : 1 and 4 : 1 groups were significantly higher than that of 1 : 1 group ( $P < 0.05$ ), and the knockdown efficiency of Cas13d : sgRNA in 1 : 2 group was the highest (70%). Semi-quantitative PCR results showed that transfection of *SUV39H1*-sgRNA-2 and *SUV39H2*-sgRNA-1 extremely significantly reduced the expression of *SUV39H1* and *SUV39H2*, and the expression level was 25%-30% of control group ( $P < 0.01$ ). The results of immunofluorescence showed that the level of histone H3K9me3 decreased significantly after *SUV39H1* and *SUV39H2* genes knockdown ( $P < 0.05$ ). Therefore, in this study, CRISPR/Cas13d system was used to knockdown *SUV39H1* and *SUV39H2* successfully, and downregulate H3K9me3 level catalyzed by them.

**Key words:** CRISPR/Cas13d; *SUV39H1/SUV39H2* genes; knockdown; porcine embryonic fibroblasts

CRISPR/Cas 系统已被广泛应用于高等生物的基因编辑,该系统包括多种类型<sup>[1]</sup>,其中,CRISPR/Cas13 是 CRISPR 系统的 2 类 IV 型,可以靶向并切割 RNA,进而在转录水平上干扰基因的表达<sup>[2]</sup>。Cas13 家族都包括单个 Cas13 酶和 64~66 nt 的 pre-crRNA, Cas13 蛋白有 2 个核酸结合结构域(higher eukaryotes and prokaryotes nucleotide-binding, HPEN),构成了核酸酶活性位点, Cas13 核酸酶在识别单链 RNA(ssRNA)时被激活,激活的 Cas13 蛋白可以将 64~66 nt 的 pre-crRNA 切割加工为成熟的 crRNA, crRNA 结合靶 RNA 可以激活 RNase 活性,进而依赖于前间隔序列临近位点(proto-spacer-flanking site, PFS)去识别 24~30 nt 的靶 RNA, sgRNA 与靶 RNA 碱基互补配对,引导 Cas13 核酸酶剪切靶 RNA,使其断裂并降解,从而在转录水平上抑制靶基因的表达<sup>[2-3]</sup>。在 Cas13 家族的 Cas13a<sup>[2]</sup>、Cas13b<sup>[4]</sup>、Cas13c、Cas13d<sup>[5]</sup> 这 4 种类型中, Cas13d 蛋白的平均长度为 930 个氨基酸,比其他 Cas13 酶小 20%,同时具有靶向范围广和效率高

等优点<sup>[6]</sup>。Zhou 等<sup>[7]</sup>利用 Cas13d 在视网膜穆勒胶质细胞中敲降 *PTBP1* 基因,实现了在小鼠中将神经胶质细胞转变为视神经元细胞,改善了永久性视力损伤小鼠的视力,而且通过敲降纹状体中的多聚嘧啶区结合蛋白 1(PTBP1)基因,将星形胶质细胞转分化为多巴胺神经元,缓解了帕金森氏病,揭示了 Cas13d 在疾病治疗中的巨大潜力。Mahas 等<sup>[8]</sup>利用 Cas13a、Cas13b 和 Cas13d 靶向本氏烟(*Nicotiana benthamiana*)易感的烟草花叶病毒发现, Cas13d 对靶病毒具有最强特异性及干扰性,并且可以同时干扰 2 种 RNA 病毒(如烟草花叶病毒和马铃薯病毒)进行干扰,从而在植物中实现抵抗病毒的侵染。

近年来,通过体细胞核移植(somatic cell nuclear transfer, SCNT)构建重构胚胎已经在多种动物中成功实现克隆,但是克隆效率仍然不高,其中不完全的表观重编程被认为是影响克隆重构胚胎(SCNT 胚胎)发育的关键因素之一<sup>[9]</sup>。通过调控表观遗传修饰可以促进表观重编程,这有利于 SCNT 胚胎的发育。DNA 甲基转移酶抑制剂(如 5-脱氧

胞苷)通过改变供体基因组的甲基化来提高 SCNT 胚胎的发育能力<sup>[10]</sup>;部分组蛋白去乙酰化酶抑制剂(如曲古抑菌素(TSA)、丙戊酸钠(VPA)、Scriptaid)通过提高组蛋白乙酰化促进 SCNT 胚胎的体外发育<sup>[11-14]</sup>。因此,调节表观修饰对于提高 SCNT 胚胎的发育效率是一种可行且有效的方式。除了 DNA 甲基化和组蛋白乙酰化,组蛋白甲基化也是一种重要的表观修饰。组蛋白 H3K9 甲基化与哺乳动物的异染色质和基因组稳定紧密相关。有报道已发现,组蛋白 H3K9 在克隆牛、羊、猪的胚胎中异常高甲基化,甲基转移酶抑制剂 BIX-01294 和 UNC0638 可以特异性抑制 H3K9 甲基转移酶 G9A 的活性,从而降低 SCNT 胚胎 H3K9me2 水平,提高 SCNT 胚胎发育率<sup>[13,15-16]</sup>。

SUV39H1 和 SUV39H2 是赖氨酸甲基转移酶 SUV39 亚家族中的 2 个成员,富集在组蛋白异染色质区,负责这些区域 H3K9 的甲基化。在早期胚胎发育过程中,SUV39H1 和 SUV39H2 表达是不一致的,受精后 SUV39H1 持续保持低水平表达,且直到 8-细胞期才可检测到 SUV39H1 蛋白,而 SUV39H2 则在卵母细胞和早期胚胎中都较为丰富,说明这 2 个基因在早期胚胎发育中可能发挥不同的功能<sup>[17]</sup>。受精后 SUV39H1 的过早表达提高了 H3K9me3 水平,使组成型异染色质和染色体中心提前成熟,而且 SUV39H1 驱动形成的 H3K9me3 会抑制表观重编程,极大地阻碍了植入前胚胎的发育;SUV39H2 负责受精后父原核中 H3K9 从头甲基化,其建立的 H3K9me3 会抑制早期胚胎发育后期的基因表达<sup>[17]</sup>。毛壳素可以特异性抑制组蛋白甲基转移酶 SUV39 家族的活性,降低 SCNT 胚胎中 H3K9me2、H3K9me3 水平,进而提高 SCNT 胚胎的发育能力<sup>[18]</sup>。因此,通过抑制 SUV39H1 和 SUV39H2 的表达来降低 H3K9me3 的水平能够促进 SCNT 胚胎的早期胚胎发育。

Cas13d 作为高效 RNA 编辑工具,可应用于基因功能研究、RNA 病毒抵抗、基因治疗等方面。因此,本研究针对 SUV39H1 和 SUV39H2 设计 sgRNA,进而在巴马猪胎儿成纤维细胞中评估 CRISPR/Cas13d 对靶基因敲降的作用,并进一步评估不同转染比例的 Cas13d 和 sgRNA 对靶基因敲降效率的影响,以期建立 CRISPR/Cas13d 在猪上的 RNA 敲降系统。最后,通过检测 *SUV39H1*、*SUV39H2* 基因敲降后细胞中 H3K9me3 的水平,为

后续利用 Cas13d 直接敲降 *SUV39H1*、*SUV39H2* 基因表达来提高猪 SCNT 胚胎发育奠定理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 质粒与菌种 Cas13d 和 sgRNA 表达载体均由上海科技大学配子发生与表观重编程研究组馈赠;大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞购自 TaKaRa 公司。试验所用巴马猪胎儿成纤维细胞来自于中国科学院动物研究所北方大动物研究基地。

1.1.2 主要试剂 氨苄青霉素(Amp)、无内毒素质粒大提试剂盒、DNA Marker 均购自天根生化科技(北京)有限公司;核酸内切酶 *BspQ I* 和 T4 连接酶均购自 NEB 公司;反转录(Primescript RT Reagent Kit)、实时荧光定量(TB Green Premix Ex Taq)及胶回收试剂盒均购自 TaKaRa 公司;MEM- $\alpha$  基础培养基、0.25% 胰酶、PBS 缓冲液、MEM NEAA、GlutaMAX、青-链霉素(Pen-strep)等均购自 Gibco 公司;胎牛血清(FBS)购自 HyClone 公司;Trizol、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)均购自 Life 公司;细胞转染试剂盒购自 Lonza 公司;三氯甲烷、异丙醇、乙醇均购自西陇科学股份有限公司;H3K9me3 抗体购自 Abcam 公司;羊抗兔 TRITC 购自中山金桥公司。

1.1.3 试剂配制 间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)完全培养基;MEM- $\alpha$  基础培养基中加入 15% FBS、1% GlutaMAX、1% MEM NEAA、1% Pen-strep 和 0.01% bFGF。

### 1.2 方法

1.2.1 sgRNA 的设计与合成 根据 *SUV39H1*、*SUV39H2* 基因的编码序列各设计 3 个靶向编码链的 sgRNAs(表 1),每个 sgRNA 长度为 30 nt,以单链寡核苷酸的形式在生工生物工程(上海)股份有限公司合成。100  $\mu\text{mol/L}$  sgRNA-F/R 单链寡核苷酸各 1  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 补至 10  $\mu\text{L}$ ,混合后于 95  $^{\circ}\text{C}$  孵育 5 min,室温放置 30 min,退火产物稀释 250 倍。

1.2.2 sgRNA 载体的线性化 利用限制性内切酶 *BspQ I* 对 sgRNA 表达载体进行酶切,酶切体系 50  $\mu\text{L}$ : sgRNA 质粒 5  $\mu\text{g}$ , *BspQ I* 2  $\mu\text{L}$ , 10  $\times$  Cutsmart Buffer 5  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 补至 50  $\mu\text{L}$ 。将酶切体系在 56  $^{\circ}\text{C}$  孵育 2 h 后,1.0% 琼脂糖凝胶电泳分离 4 875 bp 大小的 sgRNA 线性化载体,通过胶回收试剂盒进行纯化回收,回收后进行浓度测定。

表 1 sgRNA 序列

Table 1 sgRNA sequences

基因 Genes	sgRNA 名称 sgRNA names	sgRNA 序列 sgRNA sequences (5'→3')
SUV39H1	SUV39H1-sgRNA-1	ACGCCATTTCCACCAGGTAATACTCCTGTTC
	SUV39H1-sgRNA-2	TCTGCTTGGCCTTCTGCACCAGGTAGTTGG
	SUV39H1-sgRNA-3	AGTTGCACTCGTAGATGGGCAGCCCGGCTC
SUV39H2	SUV39H2-sgRNA-1	CTCATTAATGTAGTAGAAGTCTGAAGGTGG
	SUV39H2-sgRNA-2	TCATTACAGAATTGTTGAAGTAGTAATGGG
	SUV39H2-sgRNA-3	AGCTCTGTGATTTTCCTTTAGAGTTATTGC

1.2.3 质粒重组 连接体系 20  $\mu\text{L}$ ; 稀释后的退火产物 8  $\mu\text{L}$ , 线性化 sgRNA 质粒 50 ng, 10 $\times$  T4 DNA Ligase Buffer 2  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 补至 20  $\mu\text{L}$ 。将连接体系置 16  $^{\circ}\text{C}$  孵育 30 min。将 5  $\mu\text{L}$  连接产物转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞, 取 100  $\mu\text{L}$  菌液涂布在含 Amp 的固体培养基板上, 37  $^{\circ}\text{C}$  培养 16 h 后, 挑取 3 个单克隆菌落在 1 mL 含 Amp 的液体 LB 培养基中, 37  $^{\circ}\text{C}$  振荡培养 6 h, 送生工生物工程(上海)股份有限公司进行 Sanger 测序。使用 SnapGene 软件进行多重序列比对, 分析 Sanger 测序结果。选择测序结果比对连接正确的 sgRNA 质粒, 将菌液加入 200 mL 含 Amp 的液体培养基中, 37  $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 振荡培养 16 h, 用无内毒素质粒大提试剂盒提取质粒。

1.2.4 细胞转染 提前 2 d 将猪胎儿成纤维细胞解冻复苏, 传代后待细胞 70%~80% 汇合时进行细胞转染。首先, 提前配制质粒混合液, 即将 SUV39H1-sgRNA-1、SUV39H1-sgRNA-2、SUV39H1-sgRNA-3、SUV39H2-sgRNA-1、SUV39H2-sgRNA-2 和 SUV39H2-sgRNA-3 分别与 Cas13d 表达质粒(融合表达 GFP)按照 2  $\mu\text{g}$ : 4  $\mu\text{g}$ (分子摩尔比为 1:1)混合, 以 4  $\mu\text{g}$  Cas13d 作为对照组。然后, 用 0.05% 胰

蛋白酶消化细胞, 转移到 15 mL 离心管 1 200 r/min 离心 3 min, 弃上清, 用 37  $^{\circ}\text{C}$  预热的 PBS 洗 3 次, 用适量电转液重悬细胞, 计数后通过补加电转液使细胞密度为 5 $\times$ 10<sup>3</sup> 个/ $\mu\text{L}$ ; 取 100  $\mu\text{L}$  加入提前配好的质粒中, 混匀后转移至 Lonza 2b 电转杯中, 置于 Lonza 2b 电转仪中, 用 U-023 程序进行转染。转染后, 将细胞转移至加有 2 mL 培养基的 6 孔板中, 在 38.5  $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO<sub>2</sub> 条件下进行培养。转染 24 h 后, 更换细胞培养液以去除死细胞, 之后继续培养。

为了进一步提高 Cas13d/sgRNA 介导的基因干扰效率, 对 Cas13d 和 sgRNA 的转染比例进行调整, 针对 SUV39H1 基因的 sgRNA-2, 转染不同比例的 Cas13d 和 sgRNA, 分别按照 1:1、1:2、1:4、2:1 和 4:1 的比例转染, (在筛选 sgRNA 时, 转染 Cas13d:sgRNA 分子摩尔比为 1:1, 其中 Cas13d 质粒 8 830 bp, sgRNA 质粒 4 410 bp, 即包括 4  $\mu\text{g}$  Cas13d 质粒和 2  $\mu\text{g}$  sgRNA 质粒); 转染不同比例的 Cas13d:sgRNA 时, Cas13d 或 sgRNA 按照比例增加(表 2), 其中 Cas13d 和 sgRNA 质粒经稀释后均为 2 000 ng/ $\mu\text{L}$ , 转染 48 h 后, 在荧光显微镜下观察并拍照。

表 2 不同 Cas13d:sgRNA 转染体积

Table 2 Different transfection volume of Cas13d:sgRNA

Cas13d:sgRNA	Cas13d 体积 Cas13d volume/ $\mu\text{L}$	sgRNA 体积 sgRNA volume/ $\mu\text{L}$	H <sub>2</sub> O 体积 Volume of H <sub>2</sub> O/ $\mu\text{L}$	总体积 Total volume/ $\mu\text{L}$
1:1	2	1	6	109
1:2	2	2	5	109
1:4	2	4	3	109
2:1	4	1	4	109
4:1	8	1	0	109

1.2.5 流式细胞术分选检测细胞转染效率 细胞转染 48 h 后,使用 0.05%胰蛋白酶消化细胞,待细胞悬浮后,用含血清的培养基终止消化后将细胞以 1 200 r/min 离心 3 min,离心后用无血清培养基重悬,用 40  $\mu$ m 的细胞筛过滤,之后在流式细胞仪上设定合适的参数,富集 GFP 阳性细胞并检测转染效率。

1.2.6 敲降效率检测 细胞转染 48 h 后,使用 0.05%胰蛋白酶消化细胞,待细胞悬浮后,用含血清的培养基终止消化,将细胞收集到 1.5 mL EP 管中,5 000 r/min 离心 5 min,弃上清,获得细胞沉淀。利用 TRIzol 法提取 RNA,按照反转录试剂盒说明将 500 ng RNA 反转录得到 cDNA,以 cDNA 为模板,利用半定量 PCR 及实时荧光定量 PCR 鉴定不同 sgRNA 对靶标基因的敲降效率,实时荧光定量 PCR 及半定量 PCR 引物见表 3。

为了进一步检测敲降 *SUV39H1* 和 *SUV39H2*

基因后是否会影响 H3K9me3 的水平,在猪胎儿成纤维细胞中同时转染 *SUV39H1*-sgRNA-2 和 *SUV39H2*-sgRNA-1,48 h 后利用半定量 PCR 检测细胞中 *SUV39H1* 和 *SUV39H2* 的表达。半定量 PCR 体系 20  $\mu$ L:2 $\times$ SYBR Premix Ex Taq 10  $\mu$ L,上、下游引物各 0.8  $\mu$ L,cDNA 1  $\mu$ L, DNase/RNase-free ddH<sub>2</sub>O 补至 20  $\mu$ L。半定量 PCR 程序:95  $^{\circ}$ C 3 min;95  $^{\circ}$ C 10 s,60  $^{\circ}$ C 40 s,共 28 个循环。实时荧光定量 PCR 体系 20  $\mu$ L:2 $\times$ SYBR Premix Ex Taq 10  $\mu$ L,上、下游引物各 0.8  $\mu$ L,cDNA 1  $\mu$ L, DNase/RNase-free ddH<sub>2</sub>O 补至 20  $\mu$ L;实时荧光定量 PCR 程序:95  $^{\circ}$ C 3 min;95  $^{\circ}$ C 10 s,60  $^{\circ}$ C 40 s,共 40 个循环;95  $^{\circ}$ C 1 min,60  $^{\circ}$ C 30 s,95  $^{\circ}$ C 30 s。取 5  $\mu$ L PCR 产物用 2.0%琼脂糖凝胶电泳检测目的基因与内参基因 *GAPDH* 的表达,并对电泳结果进行灰度值分析,计算目的基因相对于内参基因的表达量,进一步计算处理组相对于对照组的表达。

表 3 引物序列

Table 3 Primer sequences

基因 Genes	引物序列 Primer sequences (5'→3')	片段大小 Product length/bp	退火温度 Annealing temperature/ $^{\circ}$ C	GenBank 登录号 GenBank accession No.
<i>SUV39H1</i>	F:CTTTGCCACAAGAACCATCCG R:TTCAGTCCCACACTTGCCT	146	60	NC_010461.5
<i>SUV39H2</i>	F:TGGAAAGGATGGCCAGATTCTAC R:CAATGTACTCAGCAATGGCAGG	160	60	NC_010452.4
<i>GAPDH</i>	F:CCTTCATTGACCTCCACTACATGGT R:CCACAACATACGTAGCACCAGCATC	183	60	NC_010447.5

### 1.2.7 免疫荧光法检测 H3K9me3 水平的变化

将转染后的细胞铺入已放有爬片的 48 孔板中,培养 48 h 后,用 37  $^{\circ}$ C 预热的 PBS 洗 3 次,然后用 4%多聚甲醛室温固定 30 min,用 PBS 洗 3 次,0.05% Triton-X 100 渗透 20 min,1% BSA 封闭 1 h,封闭结束后将 H3K9me3 一抗用 PBS 按照 1:500 稀释,加入到细胞中 4  $^{\circ}$ C 过夜孵育,次日,用洗脱液洗涤细胞 3 次,每次 10 min;然后与二抗按照 1:200 室温避光孵育 1 h,用 PBS 避光洗 3 次,每次 10 min,之后用 Hoechst 染核 15 min,在载玻片上加适量抗荧光淬灭剂,将有细胞面盖在抗淬灭剂上,指甲油封片保存,在激光共聚焦显微镜下观察并拍照。每个样品随机选择 5 个视野,重复 3 次。

### 1.3 数据统计与分析

以 *GAPDH* 为内参,利用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  方法计算靶基

因的相对表达量,用 GraphPad Prism 7 进行单因素方差分析,两组数据间的差异用 *t* 检验分析。免疫荧光图用 Image Pro Plus 6.0 统计平均荧光强度,用 GraphPad Prism 7 分析统计结果,统计结果用 *t* 检验分析。结果均以平均值 $\pm$ 标准误表示。 $P < 0.05$  表示差异显著, $P < 0.01$  表示差异极显著。

## 2 结果

### 2.1 靶向猪 *SUV39H1* 和 *SUV39H2* 基因的 sgRNA 载体的构建

sgRNA 载体包含 U6 启动子转录表达的 sgRNA 骨架,通过 *BspQI* 线性化 sgRNA 载体与靶向 *SUV39H1* 和 *SUV39H2* 基因的 sgRNA Oligo 进行重组,对构建的 *SUV39H1*-sgRNA 和 *SUV39H2*-sgRNA 质粒 Sanger 测序结果表明,

SUV39H1 和 SUV39H2 基因各 3 个 sgRNAs 序列均精确连入 U6 启动子和 sgRNA 骨架之间。SUV39H1-sgRNA-1 和 SUV39H2-sgRNA-1 见图 1。

2.2 猪胎儿成纤维细胞中 SUV39H1 和 SUV39H2 不同 sgRNAs 转染效率比较

sgRNA 分别与 Cas13d 表达质粒共转染猪胎儿成纤维细胞 48 h 后,流式细胞术分选结果显示,转

染效率约 70%,说明转染率较高且很稳定。因此,在后续试验中直接收取转染细胞检测。半定量 PCR 结果表明,与对照组相比,3 个 sgRNAs 均极显著降低 SUV39H1 和 SUV39H2 基因的表达 ( $P < 0.01$ ),其中 SUV39H1-sgRNA-2 和 SUV39H2-sgRNA-1 均可使 SUV39H1 和 SUV39H2 的表达降低 50%(图 2)。

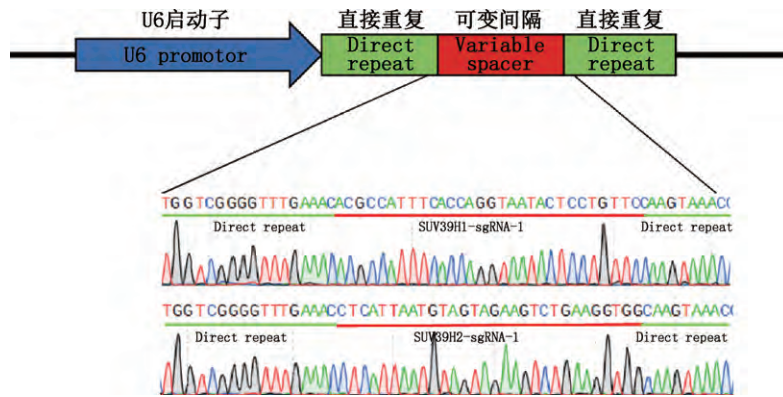
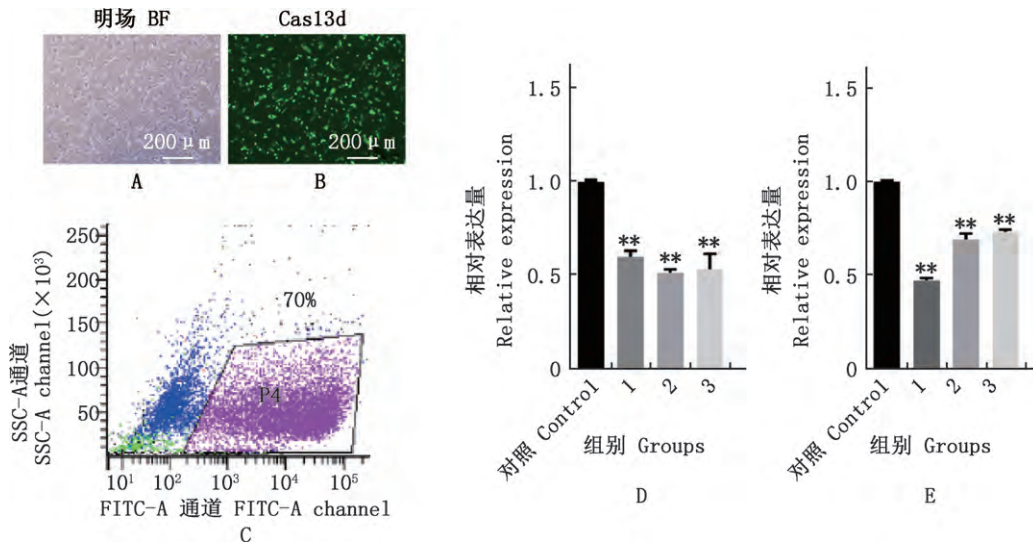


图 1 SUV39H1-sgRNA-1 和 SUV39H2-sgRNA-1 表达载体测序结果

Fig. 1 Sequencing results of SUV39H1-sgRNA-1 and SUV39H2-sgRNA-1 expressing vectors



①A,转染细胞明场照片(100×);B,转染细胞绿色荧光照片(100×);C,流式细胞术法检测转染效率;D,E,不同 sgRNAs 介导的 SUV39H1、SUV39H2 基因表达量变化。②对照表示仅转染 Cas13d,1~3,分别表示转染 Cas13d 和靶向 SUV39H1 和 SUV39H2 基因的 sgRNA 1-3。③与对照组相比,\* ,差异显著( $P < 0.05$ );\*\* ,差异极显著( $P < 0.01$ )。图 4 同

①A,Bright field photograph of transfected cells (100×);B,Green fluoescent photograph of transfected cells (100×);C,The transfected efficiency analysis via flow cytometry; D and E, The knockdown efficiency analysis via different sgRNA of SUV39H1 and SUV39H2 genes. ②Control,Cas13d transfected only;1-3,Con-transfection with Cas13d and sgRNA 1-3 targeted SUV39H1 and SUV39H1 genes, respectively. ③ Compared with control group,\* ,Significant difference ( $P < 0.05$ );\*\* ,Extremly significant difference ( $P < 0.01$ ). The same as fig. 4

图 2 猪胎儿成纤维细胞中 Cas13d 和不同 sgRNAs 对 SUV39H1 和 SUV39H2 基因表达的影响

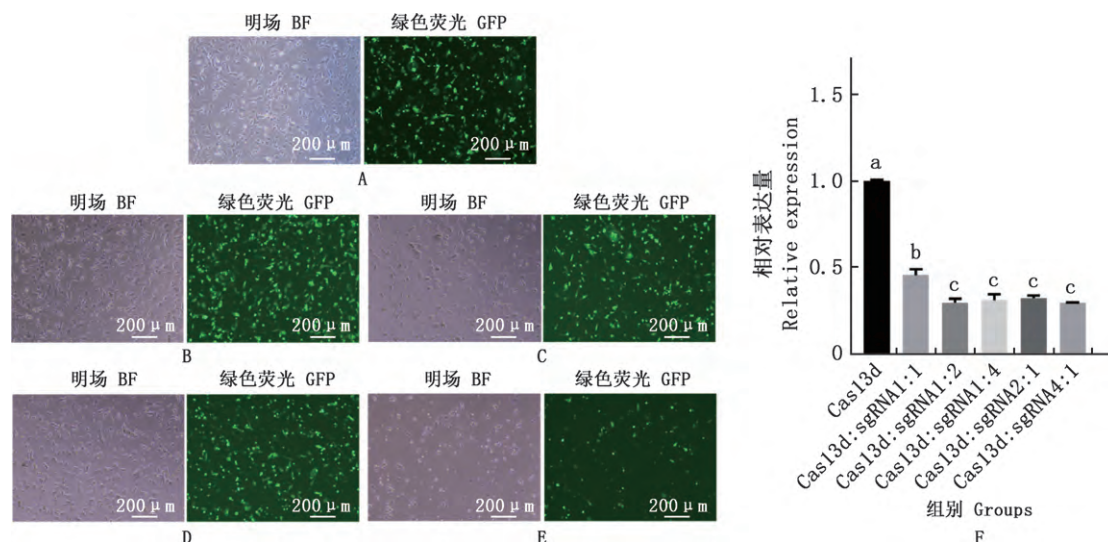
Fig. 2 Effects of Cas13d and different sgRNAs on SUV39H1 and SUV39H2 genes expression in porcine embryonic fibroblasts



### 2.3 猪胎儿成纤维细胞中转染不同比例的 Cas13d 和 sgRNA 对基因敲降效率的影响

由图 3 可知,Cas13d 与 sgRNA 的转染比例为 1:1、1:2 和 1:4 时,细胞存活率没有明显差别(图 3A、3B、3D),转染比例为 2:1 和 4:1 时,细胞

死亡较多(图 3C、3E)。实时荧光定量 PCR 结果表明,Cas13d 和 sgRNA 的转染比例为 1:2、1:4、2:1 和 4:1 时,敲降效率差异不显著( $P>0.05$ ),且与转染比例 1:1 差异显著( $P<0.05$ ),转染比例为 1:2 时敲降效率最高(70%)(图 3F)。



①A~E,分别表示 Cas13d 与 sgRNA 转染比例为 1:1、1:2、2:1、1:4 和 4:1 时细胞的明场及绿色荧光照片(100 $\times$ );F,Cas13d 与 sgRNA 转染比例为 1:1、1:2、2:1、1:4 和 4:1 时对 *SUV39H1* 基因敲降效率的影响。

②与 Cas13d 相比,肩标不同字母表示差异显著( $P<0.05$ );肩标相同字母表示差异不显著( $P>0.05$ )

①A-E, Bright field and GFP expression of cells when the transfection ratio of Cas13d:sgRNA are 1:1, 1:2, 2:1, 1:4 and 4:1, respectively (100 $\times$ ); F, Effects of Cas13d:sgRNA transfection ratio of 1:1, 1:2, 2:1, 1:4 and 4:1 on *SUV39H1* gene expression. ② Compared with Cas13d, values with different superscript letters represent significant difference ( $P<0.05$ ); While with the same superscript letters represent no significant difference ( $P>0.05$ )

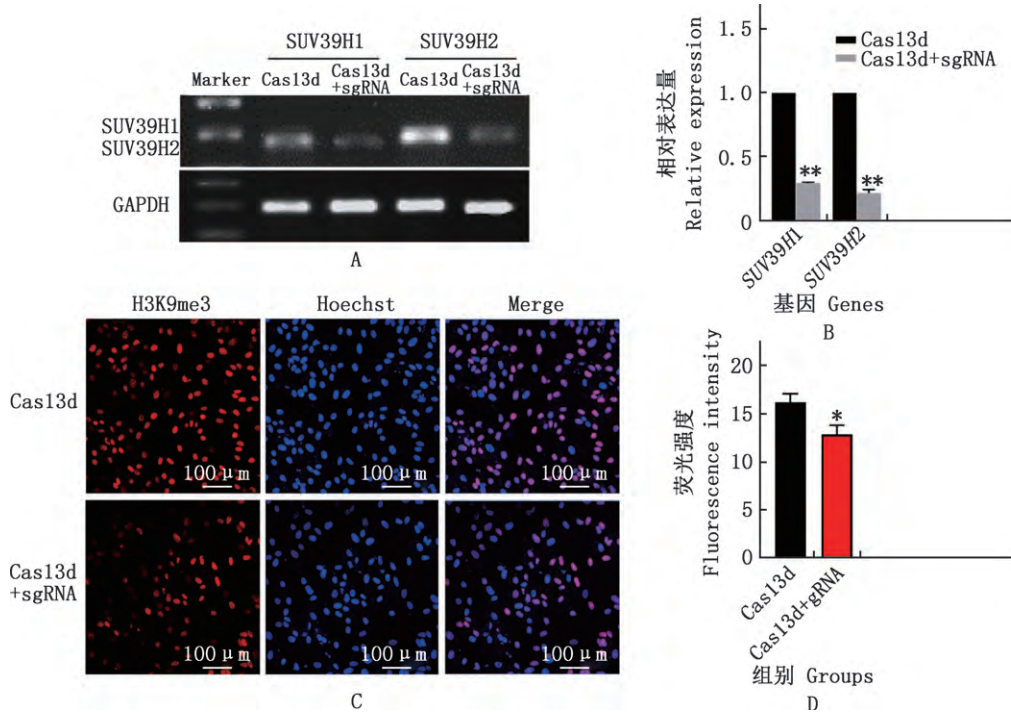
图 3 不同比例 Cas13d 和 sgRNA 转染对细胞状态及 *SUV39H1* 基因敲降效率的影响

Fig. 3 The effects of different ratios of Cas13d and sgRNA transfection on cell state and *SUV39H1* gene knockdown rate

### 2.4 敲降 *SUV39H1* 和 *SUV39H2* 对 *H3K9me3* 表达水平的影响

半定量 PCR 结果显示,转染针对靶基因敲降效率最高的 *SUV39H1*-sgRNA-2 和 *SUV39H2*-sgRNA-1 后,*SUV39H1* 和 *SUV39H2* 的表达极显著降低,表达量为对照组的 25%~30% ( $P<0.01$ ) (图 4A、

4B)。免疫荧光检测结果表明,*H3K9me3* 的荧光强度明显低于对照组(图 4C);对荧光强度进行量化,发现 *SUV39H1* 和 *SUV39H2* 敲降后猪成纤维细胞中 *H3K9me3* 的水平显著低于对照组猪胎儿成纤维细胞( $P<0.05$ ,图 4D)。



A, 半定量分析转染 Cas13d-SUV39H1-sgRNA 2+SUV39H2-sgRNA 1 后 SUV39H1 和 SUV39H2 的表达;B, 量化分析 SUV39H1 和 SUV39H2 的表达;C, SUV39H1 和 SUV39H2 对照组和敲降组细胞中组蛋白 H3K9me3 的荧光强度比较(200 $\times$ );D, H3K9me3 在猪胎儿成纤维细胞中荧光强度统计

A, Semi-quantitative analysis of expression level of SUV39H1 and SUV39H2 after transfection with Cas13d-SUV39H1-sgRNA2 + SUV39H2-sgRNA1; B, Analysis of grayscale value of SUV39H1 and SUV39H2; C, Immunofluorescence staining of H3K9me3 protein in PEFs with SUV39H1 and SUV39H2 knockdown and control groups (200 $\times$ ); D, Fluorescence intensity of H3K9me3 in PEFs

图 4 CRISPR/Cas13d 介导 SUV39H1/SUV39H2 敲降对 H3K9me3 水平的影响

Fig. 4 The effects of CRISPR/Cas13d-mediated SUV39H1/SUV39H2 knockdown on H3K9me3 levels

### 3 讨论

自 CRISPR/Cas 系统发现以来,在此基础上发展起来的基因编辑技术得到了迅速发展,能够在生物基因组水平特定位置的编辑,包括 DNA 插入、缺失、修饰及替换,极大地促进了基因组改造方面的研究,使目标表型更加容易得到。但是,目前的基因编辑技术大多是在基因组水平进行修饰的,而在转录组水平进行编辑则相对落后,但是在基因组水平上的修饰是稳定且不可逆转的,很可能会损害或影响其他基因的正常功能,在转录组水平的修饰就可以极大地减少这种负面效应<sup>[6]</sup>。尽管已经有 RNAi、反义寡核苷酸、CRISPRa/i 可以抑制或促进基因表达,但效率低、脱靶严重等问题促进了新 RNA 靶向工具的开发<sup>[20]</sup>。2016—2018 年,包括 Cas13a、Cas13b、Cas13c 和 Cas13d 的 Cas13 家族被相继发现,在 sgRNA 引导下靶向并切割目标 RNA,使靶 RNA 降解,从而在转录组水平实现干扰

基因表达。CRISPR/Cas13d 的高效和安全使之迅速成为干扰 RNA 表达的一个重要工具。He 等<sup>[21]</sup>在小鼠肝脏中实现了磷酸酶和张力蛋白同源物 (PTEN) 基因的敲降,影响了糖脂代谢相关基因的表达,从而可以应用于模拟体内代谢信号的调控<sup>[21]</sup>。另外,Abbott 等<sup>[22]</sup>针对 SARS-CoV-2 病毒的保守区域设计 crRNA 可以有效抑制人肺泡上皮细胞中 SARS-CoV-2 病毒和活甲型流感病毒 (IAV)。这些研究显示,Cas13d 作为一种 RNA 编辑手段,在基因治疗、抗病毒等方面具有广泛的应用前景。但是,到目前为止,尚未有研究表明 Cas13d 可以在猪细胞中干扰内源基因的表达。

在 SCNT 胚胎中存在多个组蛋白异常甲基化位点修饰,而 H3K9me3 被认为是高效重编程的关键障碍。H3K9 甲基转移酶 SUV39H1 和 SUV39H2 富集在异染色质区,负责异染色质上 H3K9 的甲基化,组蛋白 H3K9 的甲基化和转录抑制有关<sup>[23]</sup>,在



胚胎发育过程中,若同时敲除这 2 个基因,会导致小鼠 H3K9me3 在全基因组水平上的降低,表现为胚胎在 E12.5 天前可正常发育,之后会发育迟缓,并在出生前死亡<sup>[19]</sup>。因此,直接将 *SUV39H* 基因进行敲除,将严重影响胚胎发育,甚至致死。为了防止这种情况的发生,通过 siRNA 干扰 *SUV39H1/SUV39H2* 基因表达,降低 H3K9me3 的水平,可以促进小鼠克隆胚胎发育<sup>[9]</sup>;除此之外,在小鼠 SCNT 的原核期胚胎中注射去甲基化酶 KDM4B 或 KDM4D 的 mRNA,明显降低 H3K9me3 的水平,从而提高 SCNT 的胚胎发育率<sup>[24]</sup>。这 2 种方法均表明,通过抑制 H3K9 甲基转移酶 SUV39H 家族或过表达 H3K9 去甲基化酶 KDM4 家族,下调 H3K9me3 的表观修饰水平来促进 SCNT 胚胎的发育是一种行之有效的方式。而相较于 RNAi,Cas13d 具有效率高、脱靶低的优势,是对基因表达调控和功能研究的有力工具。因此,本研究针对 *SUV39H1* 和 *SUV39H2* 基因设计 sgRNA,利用 Cas13d 在猪胎儿成纤维细胞中敲降 *SUV39H1* 和 *SUV39H2* 的表达,从而下调 H3K9me3 水平,为提高猪 SCNT 胚胎发育奠定基础。

试验在成功构建 *SUV39H1*-sgRNA 和 *SUV39H2*-sgRNA 表达载体后,将不同的 sgRNA 与 Cas13d 共同转染到猪胎儿成纤维细胞中,比较不同 sgRNA 对靶基因的敲降效果发现,针对 *SUV39H1* 和 *SUV39H2* 这 2 个基因,均筛选到了较为高效的 sgRNA,*SUV39H1* 和 *SUV39H2* 的表达明显降低,敲降效率可达 50%。Le 等<sup>[25]</sup> 研究发现,通过提高 Cas9 蛋白的浓度能提高猪合子的基因编辑效率,还有研究表明,在一定范围内提高 Cas9 的 sgRNA 浓度可以提高敲除效率<sup>[26]</sup>。本试验将 Cas13d 和靶基因 sgRNA 以不同的比例转染猪胎儿成纤维细胞发现,在 Cas13d : sgRNA 为 1 : 2 时,细胞存活率不受影响,敲降效率最高,可达 70%,大大提高了 Cas13d 的基因干扰效率。采取 Cas13d : sgRNA 为 1 : 2 进行细胞转染同时敲降 *SUV39H1* 和 *SUV39H2* 后,免疫荧光染色检测发现,H3K9me3 水平明显降低,表明 CRISPR/Cas13d 可以敲降 H3K9 甲基转移酶 *SUV39H1* 和 *SUV39H2* 表达,进而降低 H3K9me3 的水平。

因此,CRISPR/Cas13d 作为新型的 RNA 干扰技术,可以在 RNA 水平有效地敲降猪成纤维细胞 *SUV39H1* 和 *SUV39H2* 基因的表达,使 H3K9me3 水平明显下降,后期可以在 SCNT 胚胎中利用 Cas13d 敲降 *SUV39H1* 和 *SUV39H2* 的表达,下调

H3K9me3 水平,提高猪 SCNT 胚胎的发育率,从而提高克隆成功率。同时,可以对多个阻滞 SCNT 胚胎发育的基因进行干扰,提高 SCNT 胚胎的发育效率。

#### 4 结 论

本研究成功构建了靶向猪 *SUV39H1* 和 *SUV39H2* 基因的 sgRNA 表达质粒,并将不同的 sgRNA 与 Cas13d 共同转染至猪胎儿成纤维细胞中,比较并筛选出了高效的 sgRNA。通过调整 Cas13d 与 sgRNA 转染细胞的比例,提高了敲降效率,并且在干扰组蛋白 H3K9 甲基转移酶 *SUV39H1* 和 *SUV39H2* 表达后,H3K9me3 水平明显下调。本研究在猪上建立了 CRISPR/Cas13d 介导的 RNA 敲降系统,证明 CRISPR/Cas13d 可以在猪胎儿成纤维细胞中实现对目标基因在转录水平的敲降,在猪胚胎中敲降 *SUV39H1* 和 *SUV39H2* 进而下调 H3K9me3 的水平,从而为提高猪克隆胚胎发育潜能奠定基础。

#### 参考文献 (References):

- [1] WRIGHT A V, NUNEZ J K, DOUDNA J A. Biology and applications of CRISPR systems: Harnessing nature's toolbox for genome engineering[J]. *Cell*, 2016, 164(1-2): 29-44.
- [2] ABUDAYYEH O O, GOOTENBERG J S, KONERMANN S, et al. C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector[J]. *Science*, 2016, 353(6299): aaf5573.
- [3] KONERMANN S, LOTFY P, BRIDEAU N J, et al. Transcriptome engineering with RNA-targeting type VI-D CRISPR effectors[J]. *Cell*, 2018, 173(3): 665-676.
- [4] SMARGON A A, COX D B T, PYZOSKA N K, et al. Cas13b is a type VI-B CRISPR-associated RNA-guided RNase differentially regulated by accessory proteins Csx27 and Csx28[J]. *Molecular Cell*, 2017, 65(4): 618-630.
- [5] YAN W X, CHONG S, ZHANG H, et al. Cas13d is a compact RNA-targeting type VI CRISPR effector positively modulated by a WYL-domain-containing accessory protein[J]. *Molecular Cell*, 2018, 70(2): 327-339.
- [6] GRANADOS-RIVERON J T, AQUINO-JARQUIN G. CRISPR-Cas13 precision transcriptome engineering in cancer[J]. *Cancer Research*, 2018, 78(15): 4107-4113.
- [7] ZHOU H, SU J, HU X, et al. Glia-to-neuron

- conversion by CRISPR-CasRx alleviates symptoms of neurological disease in mice[J]. *Cell*, 2020, 181(3): 590-603. e16.
- [8] MAHAS A, AMAN R, MAHFOUZ M. CRISPR-Cas13d mediates robust RNA virus interference in plants[J]. *Genome Biology*, 2019, 20(1):263.
- [9] MATOBA S, LIU Y, LU F, et al. Embryonic development following somatic cell nuclear transfer impeded by persisting histone methylation[J]. *Cell*, 2014, 159(4):884-895.
- [10] DING X, WANG Y, ZHANG D, et al. Increased pre-implantation development of cloned bovine embryos treated with 5-aza-2'-deoxycytidine and trichostatin A[J]. *Theriogenology*, 2008, 70(4):622-630.
- [11] FUJIMOTO K, SHINOJIMA N, HAYASHI M, et al. Histone deacetylase inhibition enhances the therapeutic effects of methotrexate on primary central nervous system lymphoma[J]. *Neuro-oncology Advances*, 2020, 2(1):vdaa084.
- [12] COSTA-BORGES N, SANTALO J, IBANEZ E. Comparison between the effects of valproic acid and trichostatin A on the *in vitro* development, blastocyst quality, and full-term development of mouse somatic cell nuclear transfer embryos[J]. *Cell Reprogramming*, 2010, 12(4):437-446.
- [13] CAO Z B, HONG R Y, DING B, et al. TSA and BIX-01294 induced normal DNA and histone methylation and increased protein expression in porcine somatic cell nuclear transfer embryos[J]. *PLoS One*, 2017, 12(1):e0169092.
- [14] ZHAO J, ROSS J W, HAO Y, et al. Significant improvement in cloning efficiency of an inbred miniature pig by histone deacetylase inhibitor treatment after somatic cell nuclear transfer[J]. *Biology of Reproduction*, 2009, 81(3):525-530.
- [15] HUANG J, ZHANG H, YAO J, et al. BIX-01294 increases pig cloning efficiency by improving epigenetic reprogramming of somatic cell nuclei[J]. *Reproduction*, 2016, 151(1):39-49.
- [16] FU L, YAN F X, AN X R, et al. Effects of the histone methyltransferase inhibitor UNC0638 on histone H3K9 dimethylation of cultured ovine somatic cells and development of resulting early cloned embryos[J]. *Reproduction in Domestic Animals*, 2014, 49(2): e21-5.
- [17] BURTON A, BROCHARD V, GALAN C, et al. Heterochromatin establishment during early mammalian development is regulated by pericentromeric RNA and characterized by non-repressive H3K9me3[J]. *Nature Cell Biology*, 2020, 22(7):767-778.
- [18] ZHANG Y M, GAO E E, WANG Q Q, et al. Effects of histone methyltransferase inhibitor chaetocin on histone H3K9 methylation of cultured ovine somatic cells and development of preimplantation cloned embryos[J]. *Reproductive Toxicology*, 2018, 79: 124-131.
- [19] PETERS A, O' CARROLL D, SCHERTHAN H, et al. Loss of the Suv39h histone methyltransferases impairs mammalian heterochromatin and genome stability[J]. *Cell*, 2001, 107(3):323-337.
- [20] JACKSON A L, BARTZ S R, SCHELTER J, et al. Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi[J]. *Nature Biotechnology*, 2003, 21(6): 635-637.
- [21] HE B, PENG W, HUANG J, et al. Modulation of metabolic functions through Cas13d-mediated gene knockdown in liver[J]. *Protein & Cell*, 2020, 11(7): 518-524.
- [22] ABBOTT T R, DHAMDHERE G, LIU Y, et al. Development of CRISPR as an antiviral strategy to combat SARS-CoV-2 and influenza[J]. *Cell*, 2020, 181(4):865-876.
- [23] LACHNER M, O' CARROLL N, REA S, et al. Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins[J]. *Nature*, 2001, 410(6824): 116-120.
- [24] LIU W, LIU X, WANG C, et al. Identification of key factors conquering developmental arrest of somatic cell cloned embryos by combining embryo biopsy and single-cell sequencing[J]. *Cell Discovery*, 2016, 2: 16010.
- [25] LE Q A, HIRATA M, NGUYEN N T, et al. Effects of electroporation treatment using different concentrations of Cas9 protein with gRNA targeting myostatin (MSTN) genes on the development and gene editing of porcine zygotes[J]. *Animal Science Journal*, 2020, 91(1):e13386.
- [26] SU K C, TSANG M J, EMANS N, et al. CRISPR/Cas9-based gene targeting using synthetic guide RNAs enables robust cell biological analyses[J]. *Molecular Biology of the Cell*, 2018, 29(20):2370-2377.

(责任编辑 田秀芝)