

• 农业生物技术 •

家蚕 CRISPR/Cpf1 基因编辑系统建立

董战旗^{1,2}, 秦琪¹, 张新铃¹, 李柯洁¹, 陈鹏¹, 潘敏慧^{1,2}

1 西南大学 家蚕基因组生物学国家重点实验室, 重庆 400716

2 西南大学 农业农村部蚕桑生物学与遗传育种重点实验室, 重庆 400716

董战旗, 秦琪, 张新铃, 等. 家蚕 CRISPR/Cpf1 基因编辑系统建立. 生物工程学报, 2021, 37(12): 4342-4350.

Dong ZQ, Qin Q, Zhang XL, et al. Development of a CRISPR/Cpf1 gene editing system in silkworm *Bombyx mori*. Chin J Biotech, 2021, 37(12): 4342-4350.

摘要: 自 CRISPR/Cas9 基因编辑系统成功应用于模式生物以来, 因其快速、高效、便捷等特点, 广泛应用于基因功能研究、基因治疗和基因工程等研究领域。与此同时, CRISPR/Cas 系统不断在微生物界的发现也加速了新的基因编辑工具的不断涌现。CRISPR/Cpf1 是第二类 (V 型) 能够编辑哺乳动物基因组的 CRISPR 系统, 相比于 CRISPR/Cas9 基因编辑系统, 能够利用 5'T-PAM 富集区增加基因组覆盖率, 具有其切割位点为粘性末端和更不易同源重组修复等诸多优势。基于此, 本研究构建了能够在家蚕细胞表达的 3 个不同来源的 CRISPR/Cpf1 (AsCpf1、FnCpf1 和 LbCpf1) 表达载体, 选择高度保守的家蚕热休克蛋白基因 *BmHSP60* 和家蚕 ATP 酶家族 *BmATAD3A* 基因分别设计靶标 gRNA, 构建 gHSP60-266R 和 gATAD3A-346R 基因编辑载体。通过 T7E1 酶切分析和 T 克隆测序, 鉴定 3 个 Cpf1 基因编辑系统 AsCpf1、FnCpf1 和 LbCpf1 对靶标基因 *BmHSP60* 和 *BmATAD3A* 的编辑效率。同时, 利用 Western blotting 分析不同基因编辑系统敲除靶基因后对其 BmATAD3A 和 BmHSP60 蛋白翻译的影响。本研究成功构建了家蚕 CRISPR/Cpf1 基因编辑系统, 能够在家蚕细胞中有效编辑家蚕基因组, 为家蚕基因功能研究、基因工程和遗传育种开发了新技术与新方法。

关键词: 家蚕, 基因编辑, CRISPR/Cpf1

Received: February 5, 2021; **Accepted:** April 27, 2021

Supported by: National Natural Science Foundation of China (Nos. 31902214, 31872427), Fundamental Research Funds for the Central Universities, China (Nos. SWU120008, XDJK2020C010), China Agriculture Research System of MOF and MARA, Natural Science Foundation of Chongqing, China (Nos. cstc2019jcyjmsxmX0096, cstc2020jcsxmsxmX0045).

Corresponding author: Minhui Pan. Tel/Fax: +86-23-68250716; E-mail: pmh047@126.com

国家自然科学基金 (Nos. 31902214, 31872427), 中央高校基本科研业务费 (Nos. SWU120008, XDJK2020C010), 财政部和农业农村部: 国家现代农业产业技术体系资助, 重庆市自然科学基金项目 (Nos. cstc2019jcyjmsxmX0096, cstc2020jcsxmsxmX0045) 资助。

Development of a CRISPR/Cpf1 gene editing system in silkworm *Bombyx mori*

Zhanqi Dong^{1,2}, Qi Qin¹, Xinling Zhang¹, Kejie Li¹, Peng Chen¹, and Minhui Pan^{1,2}

¹ State Key Laboratory of Silkworm Genome Biology, Southwest University, Chongqing 400716, China

² Key Laboratory for Sericulture Functional Genomics and Biotechnology of Agricultural and Rural Affairs Ministry, Southwest University, Chongqing 400716, China

Abstract: The CRISPR/Cas9 gene editing system has been widely used in basic research, gene therapy and genetic engineering due to its high efficiency, fast speed and convenience. Meanwhile, the discovery of novel CRISPR/Cas systems in the microbial community also accelerated the emergence of novel gene editing tools. CRISPR/Cpf1 is the second type (V type) CRISPR system that can edit mammalian genome. Compared with the CRISPR/Cas9, CRISPR/Cpf1 can use 5'T-PAM rich region to increase the genome coverage, and has many advantages, such as sticky end of cleavage site and less homologous recombination repair. Here we constructed three CRISPR/Cpf1 (AsCpf1, FnCpf1 and LbCpf1) expression vectors in silkworm cells. We selected a highly conserved *BmHSP60* gene and an ATPase family *BmATAD3A* gene to design the target gRNA, and constructed gHSP60-266 and gATAD3A-346 knockout vectors. The efficiency for editing the target genes *BmATAD3A* and *BmHSP60* by AsCpf1, FnCpf1 and LbCpf1 were analyzed by T7E1 analysis and T-clone sequencing. Moreover, the effects of target gene knockout by different gene editing systems on the protein translation of *BmHSP60* and *BmATAD3A* were analyzed by Western blotting. We demonstrate the CRISPR/Cpf1 gene editing system developed in this study could effectively edit the silkworm genome, thus providing a novel method for silkworm gene function research, genetic engineering and genetic breeding.

Keywords: *Bombyx mori*, gene editing, CRISPR/Cpf1

规律间隔成簇短回文重复序列(Clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR) 是原核生物基因组内的一段重复序列, CRISPR 及其相关的核酸酶 (CRISPR associated, Cas) 是在生命进化历史中, 细菌为了将病毒等外来入侵的基因清除掉而进化出来的自身免疫系统。通过该系统, 细菌可以在外源的基因组中插入间隔序列, 当相同的外源基因再次感染该系统, 可以定向切割外源基因组, 这是细菌特有的抵抗外界遗传物质入侵的自身免疫系统^[1-3]。目前自然界中, 把已发现的 CRISPR/Cas 系统分为 3 类: 第 I、II 和 III 类, 第 I 类 CRISPR 系统标志性蛋白为 Cas3, 属于解旋酶家族成员; 第 II 类 CRISPR 系统标志性蛋白为 Cas9, 含有核酸酶的 2 个结构域; 第 III 类 CRISPR 系统标志性蛋白为 Cas10, 具有核酸聚合酶以及核酸环化酶同源的结构域, 在古细菌中 75% 的类型、细菌中 40% 的类型都是第 III 类 CRISPR/Cas 系统^[4]。基于不同的效应蛋白家族, 第 II 类 CRISPR 系统分为 3 个类

型, 其中 II 型的标志性蛋白是 Cas9; V 型的标志性蛋白是 Cas12a; VI 型的标志性蛋白是 Cas13a (又称为 C2c2)、Cas13b 和 Cas13c^[4-8]。

CRISPR/Cas9 基因编辑技术成功应用于哺乳动物基因组编辑以来, 在家蚕中也快速建立了其基因编辑系统, 广泛地应用于基因功能验证、丝腺生物反应器和家蚕的遗传改良研究^[9-12]。由于 CRISPR/Cas9 的 PAM 序列为 NGG, 基因组覆盖率受限, 蛋白分子量相对较大 (在 150 kDa 以上), 切割位点为平末端切割, 更容易破坏靶标位点等一系列问题, 迫切需要开发新型的家蚕基因编辑技术。随着 CRISPR 基因组编辑的大规模应用和技术的快速发展, 基于基因组编辑、基因组调控和检测等功能的基因编辑系统不断涌现, 如 V-A 型系统不需要反式作用 RNA (trans-activating RNA, tracrRNA), 可单独使用单一一种类的间隔序列和部分重复序列 RNA (CRISPR RNA, crRNA) 作为向导交错切割 DNA 的 Cpf1 系统、负责前 crRNA 加工和靶向切割 RNA 的类型 VI-A 效应器 Cas13a 系

统等。Cpf1 是一个比 Cas9 系统蛋白更小、编辑系统更简单的核酸内切酶,能更容易进入细胞中修改靶标基因,相比于 CRISPR/Cas9 基因编辑系统,CRISPR/Cpf1 只需要 crRNA 识别目的 DNA 底物,而 CRISPR/Cas9 需要在 crRNA 和 tracrRNA 共同作用下才能结合靶标;CRISPR/Cpf1 识别的 PAM 序列和 CRISPR/Cas9 不同,CRISPR/Cpf1 富含 PAM 5'T 序列在基因组中覆盖率更广;CRISPR/Cas9 是平末端剪切,而 CRISPR/Cpf1 剪切目的 DNA 是粘性末端剪切,更不容易发生同源重组修复和改变靶标序列;CRISPR/Cpf1 本身还是一个核糖核酸酶 (Ribonuclease, RNase),是具有序列特异性的集脱氧核糖核酸酶 (Deoxyribonuclease, DNase) 和 RNase 于一身的核酸酶,能够同时靶向前体 RNA 和 DNA^[5,7,13-14]。基于 Cpf1 基因编辑系统的诸多优点,本研究在家蚕中构建了 3 个不同来源的 Cpf1 (AsCpf1、FnCpf1 和 LbCpf1) 基因编辑载体,以家蚕 *BmATAD3A* 和 *BmHSP60* 基因为靶标基因设计 gRNA 序列,分析不同来源的家蚕 Cpf1 基因编辑系统的效率和对靶蛋白的抑制效果,评估其在家蚕中的应用价值,为家蚕基因功能研究和家蚕遗传改良研究提供新型的基因编辑技术。

1 材料与方法

1.1 家蚕细胞系

家蚕卵巢细胞系 (BmN-SWU1) 为西南大学家蚕基因组生物学国家重点实验室构建并保存。

表 1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in this study

Primer names	Primer sequences (5'-3')
U6 F- <i>Bgl</i> II	GAAGATCTAGGTTATGTAGTACACATT
gHSP60-266R (<i>Bgl</i> II)	GAAGATCTAAAAAAGAACATCGGTGCTAAGTTAGTACATCTACAAGAGTAGAAATTA CACTTGTAGAGCACGATATTTTGT
gATAD3A-346R (<i>Bgl</i> II)	GAAGATCTAAAAAATACAGGAAGAAACAAAACAGCACATCTACAAGAGTAGAAATT ACACTTGTAGAGCACGATATTTTGT
HSP60-1F	GTTAGCAGATATGGTAGCTACTTGTGCG
HSP60-483R	TACATCAGCGCCAAACCTCACATC
ATAD3A-197F	TTTATACTTTCTAGAATAGTAACTC
ATAD3A-1499R	TCAGATGCTGGTTGCAGAAC

1.2 载体构建

通过 CRISPR 在线设计网站: <https://crispr.cos.uni-heidelberg.de/index.html>, 设计 CRISPR/Cpf1 基因编辑系统靶标 gRNA, 同时遵循 AsCpf1、FnCpf1 和 LbCpf1 系统的 PAM 序列为 TTTN 进行选择。以 U6-sgRNA 载体为模板, 上游引物: U6F (*Bgl* II), 下游引物: gHSP60-266R (*Bgl* II) 和 gATAD3A-346R (*Bgl* II) 进行扩增, PCR 产物连接到 pSL1180 载体上, 构建 pSL1180-U6-gHSP60-266 和 pSL1180-U6-gATAD3A-346。在 Addgene 公司购买 pcDNA3.1-AsCpf1、pcDNA3.1-FnCpf1 和 pcDNA3.1-LbCpf1 基因编辑载体, 然后分别用 *Bam*H I 和 *Kpn* I 双酶切连接到 pSL1180-OpIE2-OpIE2-PA 载体上, 获得 pSL1180-OpIE2^{prim}-AsCpf1-OpIE2-PA、pSL1180-OpIE2^{prim}-FnCpf1-OpIE2-PA 和 pSL1180-OpIE2^{prim}-LbCpf1-OpIE2-PA 基因编辑载体, 测序验证后使用。本研究所用引物见表 1。

1.3 免疫荧光

正常培养细胞, 提前在 24 孔板中铺上爬片, 加入适量的细胞, 转染基因编辑载体; 48 h 后去除培养基, 加入 200 μ L 4% 的多聚甲醛, 静置固定 15 min, 加入 1 mL 的 1 \times 磷酸缓冲盐溶液 (Phosphate buffer saline, PBS) 在摇床上清洗 3 次, 每次 5 min; 再加入 200 μ L 的 1% Triton X-100, 在室温通透 10 min; 用 PBS 缓慢清洗 3 次, 每次 5 min; 加入 200 μ L 封闭液 (含 10% 羊血清和 3%

BSA), 在 37 °C 封闭 1 h 后; 加入 200 μ L 人流感病毒血凝素 (Human influenza virus hemagglutinin, HA) 抗体 (1 : 200), 在 37 °C 孵育 1 h, 在摇床上用 PBS 缓慢清洗 6 次, 每次 5 min; 避光加入 200 μ L Alexa Fluor 488 标记的山羊抗小鼠 (1 : 1 000), 37 °C 恒温 1 h, 用 PBS 在摇床上缓慢清洗 6 次, 每次 5 min; 用甘油封片, 在荧光显微镜下观察载体表达情况。

1.4 T7E1 酶切分析

提取转染 48 h 后的基因组, 根据不同的靶点位置, 分别在其两端设计引物, 以提取的基因组 DNA 为模板进行 PCR, 分别回收 PCR 产物后, 按 2 倍体系添加 T7E1 缓冲液混匀后, 放入煮沸的水中慢慢降温至室温; 将产物加入 0.5 μ L T7E1; 在 37 °C 培养箱培养 30 min, 加入 1 \times 上样缓冲液 (Loading buffer) 在金属浴中 65 °C 孵育 10 min; 用 2% 核酸胶检测。

1.5 Western blotting 分析

收集转染基因编辑载体的蛋白样品, 13 000 \times g 离心 10 min, 然后去掉上清液, 在细胞沉淀中加入适量的裂解液 (苯甲基磺酰氟 (Phenylmethylsulfonyl fluoride, PMSF)/免疫沉淀 (Immunoprecipitation, IP) 裂解液=1/100), 在冰上裂解 30 min, 再加入 5 \times 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 上样缓冲液, 煮沸 10 min, 13 000 \times g 离心 10 min; 制备蛋白胶, 然后依序上样; 进行电泳, 根据蛋白标记 (Marker) 指示完成蛋白分离; 将聚偏二氟乙烯膜 (Polyvinylidene fluoride, PVDF) 膜, 在甲醇中浸泡 30 s 后, 放于适量体积的超纯水中静置 2–3 min, 取下分离胶盖于 PVDF 膜上, 在转移槽中转膜, 在摇床上用封闭液慢速轻摇 1 h; 加入一抗混合液 HA 和增殖细胞核抗原 (Proliferating cell nuclear antigen, PCNA) 为山羊抗小鼠单克隆抗体, 微管蛋白 (Tubulin) 为山羊抗兔单克隆抗体, 均购自碧云

天生物技术有限公司, 1 : 2 000), 慢速轻摇 1 h; 用三羟甲基氨基甲烷缓冲溶液和吐温 (Tris Buffer Solution Tween, TBST) 清洗 6 次, 每次 5 min; 然后加入二抗混合液 (比例为 1 : 5 000), 再慢速轻摇 1 h; 用 TBST 清洗 6 次, 每次 5 min; 在曝光仪成像。

2 结果与分析

2.1 家蚕 AsCpf1、FnCpf1 和 LbCpf1 表达载体构建和鉴定

为了在家蚕细胞中建立 Cpf1 基因编辑系统, 本研究在 Addgene 上获得来源于氨基酸球菌属的 Cpf1 (*Acidaminococcus* Cpf1, AsCpf1)、弗兰西斯菌的 Cpf1 (*Francisella novicida* Cpf1, FnCpf1) 和毛螺菌科的 Cpf1 (*Lachnospiraceae* Cpf1, LbCpf1) 的 Cpf1 表达框载体。根据 3 个 Cpf1 基因序列, 分别构建由一个 OpIE2 启动子启动和 OpIE2-polyA 终止的表达框表达 Cpf1 基因 (图 1A)。我们同时构建了一个 U6 启动子启动的 gRNA 序列, 由 TTTTTT 终止信号终止 (图 1A)。为了确保构建的载体能够在家蚕细胞中编辑家蚕基因组, 本研究首先分析 Cpf1 基因编辑载体在 BmN-SWU1 内的表达情况, 将 AsCpf1、FnCpf1 和 LbCpf1 载体, 转染到 BmN-SWU1 细胞中培养 48 h 后, 用免疫荧光技术分析其基因编辑载体 pSL1180-OpIE2^{P^{rim}}-AsCpf1-OpIE2-PA、pSL1180-OpIE2^{P^{rim}}-FnCpf1-OpIE2-PA 和 pSL1180-OpIE2^{P^{rim}}-LbCpf1-OpIE2-PA 可以在 BmN-SWU1 细胞内表达 (图 1B)。转染 48 h 后收集细胞总蛋白, 通过细胞核和细胞质分离试剂盒分离细胞核蛋白质, 增殖细胞核抗原蛋白 PCNA 在细胞核内合成, 并只在细胞核内表达, PCNA 蛋白可作为核内参蛋白, 微管蛋白 Tubulin 在细胞质中表达, 不在细胞核表达, 可作为细胞质内参蛋白。利用 Western blotting 分析 AsCpf1、FnCpf1 和 LbCpf1 蛋白表达情况,

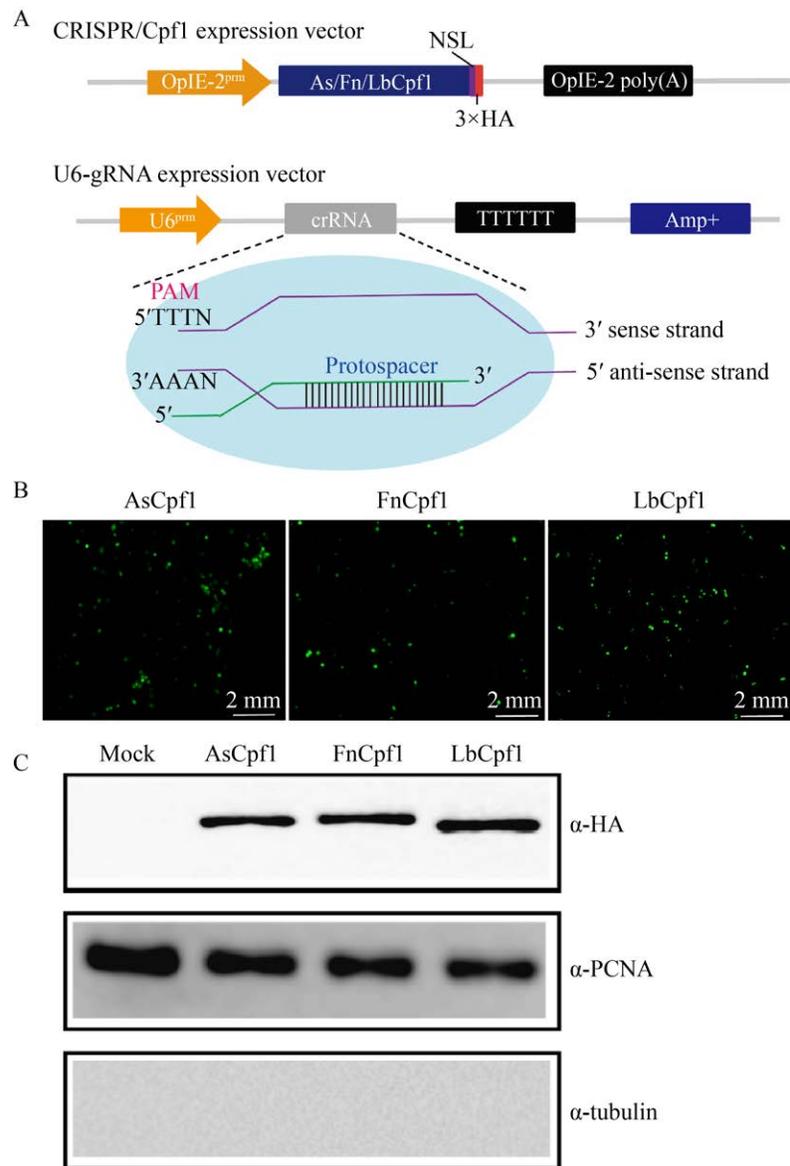


图1 家蚕 AsCpf1、FnCpf1 和 LbCpf1 表达载体构建和鉴定

Fig. 1 Construction of the AsCpf1, FnCpf1 and LbCpf1 expression vector (A) and identification of AsCpf1, FnCpf1 and LbCpf1 protein expression by immunofluorescence (B). Green represents the expression level of Cpf1 (Ruler: 2 mm). (C) Western blotting analysis of AsCpf1, FnCpf1 and LbCpf1 protein expression in the nucleus. HA tag represents the expression level of Cpf1, PCNA represents the expression level of nuclear reference protein, tubulin represents the expression level of reference protein in cytoplasm.

结果显示, AsCpf1、FnCpf1 和 LbCpf1 均可以通过 HA 标签检测到, 细胞核内参蛋白 PCNA 可以表达, 细胞质内参蛋白 Tubulin 检测不到表达。并且 3 个 Cpf1 蛋白在细胞核内表达大小和预测一致, 可用于后续基因编辑研究 (图 1C)。

2.2 T7E1 酶切鉴定 CRISPR/Cpf1 系统基因编辑效率

为了分析基因编辑载体的编辑效率, 以候选家蚕 *BmATAD3A* 和 *BmHSP60* 为候选靶标基因, 设计靶位点。将构建好的表达载体 AsCpf1、FnCpf1 和

LbCpf1, 分别和靶标 gHSP60 和 gATAD3A 共同转染细胞, 48 h 后收集转染的细胞提取家蚕基因组, 利用靶标位点两端的引物扩增靶位点附近序列。使用 T7E1 核酸内切酶检测突变、异源和错配的 DNA。核酸电泳结果显示: 靶序列为 *BmATAD3A* 和 *BmHSP60* 时, 可以明显检测到 AsCpf1、FnCpf1 和 LbCpf1 出现多条片段长度不同的剪切序列 (图 2A 和 2B), 而对照组 WT 中只检测到单一条带。以上结果表明, AsCpf1、FnCpf1 和 LbCpf1 基因编辑载体能够编辑靶标基因 *BmATAD3A* 和 *BmHSP60*。

2.3 T 克隆测序分析 CRISPR/Cpf1 基因编辑系统效率

为了进一步分析 AsCpf1、FnCpf1 和 LbCpf1 基因编辑载体对靶标基因的影响, 本研究提取转染后的家蚕基因组, PCR 扩增靶标序列, T 克隆后, 进行测序分析。比对测序结果发现, *BmATAD3A* 和 *BmHSP60* 靶基因附近的序列都检测到对 *BmATAD3A* 和 *BmHSP60* 基因进行基因编辑的现象。其中在 *BmATAD3A* 基因随机送样的 10 个测序结果中, 发现有 2 个序列发生碱基缺失和突变的现象, 2 个序列出现大片段插入的现象 (图 3A)。同样地, 在

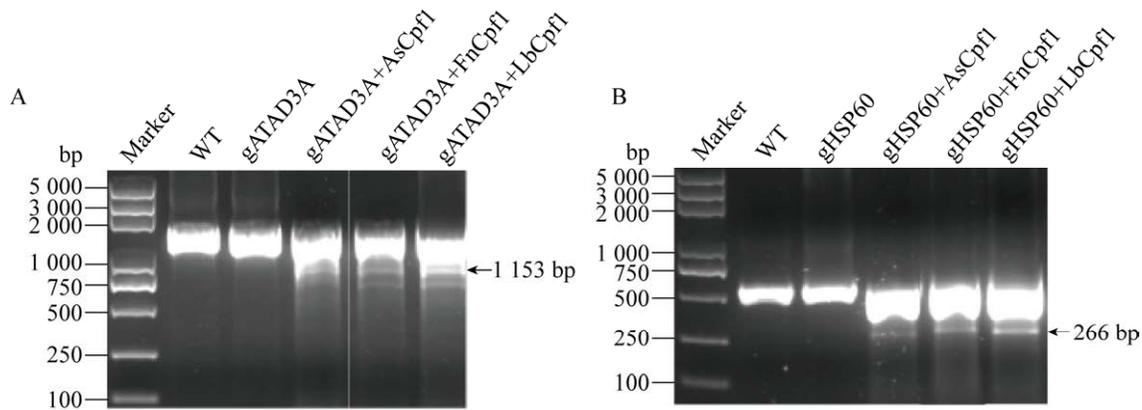


图 2 T7E1 酶切鉴定 CRISPR/Cpf1 系统基因编辑效率

Fig. 2 Identification of gene editing efficiency of CRISPR/Cpf1 system by T7E1 digestion. Gene editing efficiency of *BmATAD3A* (A) and *BmHSP60* (B).



图 3 测序分析 CRISPR/Cpf1 基因编辑系统基因敲除效率

Fig. 3 Analysis of gene knockout efficiency of CRISPR/Cpf1 gene editing system by sequencing. Gene knockout efficiency of *BmATAD3A* (A) and *BmHSP60* (B).

BmHSP60 基因测序的 10 个结果中, 也发现 4 个序列发生碱基突变、缺失和大片段插入的现象 (图 3B)。

2.4 Western blotting 分析 AsCpf1、FnCpf1 和 LbCpf1 系统对靶基因蛋白表达影响

为了确定 AsCpf1、FnCpf1 和 LbCpf1 基因编辑系统对靶蛋白的抑制效果, 将 AsCpf1、FnCpf1 和 LbCpf1 与 gHSP60 和 gATAD3A 表达载体共同转染 BmN-SWU1 中, 48 h 后收集转染后的总蛋白, 利用 Western blotting 检测相应蛋白的表达量水平变化, 以 Tubulin 蛋白为内参蛋白。利用 imageJ 软件计算蛋白灰度值, 将对照组 Mock 的蛋白表达灰度值设为 1。其中实验组 ATAD3A 敲除中 AsCpf1、FnCpf1 和 LbCpf1 系统蛋白灰度值分别为 0.58、0.51 和 0.62, 3 个 Cpf1 系统的 ATAD3A 蛋白翻译水平均发生下调表达; 3 个系统中 HSP60 蛋白灰度值分别减少为 0.63、0.62 和 0.72, 3 个 Cpf1 系统的 HSP60 蛋白表达量也相应减少 (图 4)。以上结果说明, AsCpf1、FnCpf1 和 LbCpf1 基因编辑系统对靶基因 *BmATAD3A* 和 *BmHSP60* 具有不同程度的敲除和敲低现象, 导致 ATAD3A 和 HSP60 蛋白表达量的减少。

3 讨论

自 CRISPR/Cas9 基因编辑系统快速应用于哺乳动物基因组编辑以来, CRISPR/Cas9 广泛应用于模式生物的动物模型构建、人类遗传性疾病治疗、动植物的遗传改良、化石燃料的开发和微生物

的资源利用等。国内外研究学者在家蚕中也进行了 CRISPR/Cas9 基因编辑技术相关研究, 2013 年 Wang 等首次报道了利用 CRISPR/Cas9 系统成功地敲除家蚕油蚕基因 *BmBLOS2*, 并且获得大片段缺失^[9]。2014 年 Ma 等通过同源重组介导的 CRISPR/Cas9 系统将靶基因敲入了家蚕 *Bmku70* 基因中^[10]。同时, 国内研究学者也进一步改进了该技术, Zeng 等通过改变 U6 启动子特性有效地提高了 sgRNA 候选靶位点的数量, 使 sgRNA 靶序列的选择从 GN19NGG 变为 N20NGG, 并能够有效地在体内和体外编辑外源基因^[15]。2016 年, 笔者也在家蚕中建立了病原诱导型 CRISPR/Cas9 基因编辑系统, 能够有效地抑制病毒增殖, 降低脱靶效率^[16-17]。CRISPR/Cas9 基因编辑技术相比于第一代锌指核酸酶技术和第二代 TALE 核酸酶技术具有操作简单、价格便宜和使用方便等优点, 但 Cas9 系统也存在靶位点有限、脱靶效应和一定的细胞毒性等一些亟须解决的问题, 限制了 CRISPR/Cas9 的广泛应用。

2015 年, Zetsche 等发现 CRISPR/Cpf1 基因编辑系统能够更简单、更快速和更精确地编辑人类的基因组, 同时可能避免 CRISPR/Cas9 系统的一些应用限制^[5]。而后评估了 16 种不同细菌来源的 Cpf1 酶, 其中有 3 种具有较高的切割活性, 分别是来源于氨基酸球菌属的 AsCpf1、弗兰西斯菌的 FnCpf1 和毛螺菌科的 LbCpf1^[6,18]。并且发现 CRISPR/Cpf1 基因编辑系统对基因组敲除的方法更省时省力, 可以快速实现基因组的无痕敲除,

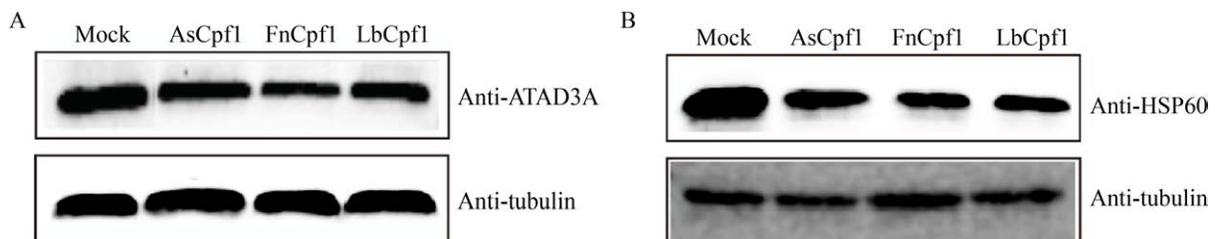


图 4 Western blotting 分析 AsCpf1、FnCpf1 和 LbCpf1 系统对靶蛋白表达的影响

Fig. 4 Western blotting analysis of the AsCpf1, FnCpf1, LbCpf1 system on protein expression levels of *BmATAD3A* (A) and *BmHSP60* (B).

并且总体敲除效率更高,同时,可实现多个基因的同时编辑^[19]。本研究利用 CRISPR/Cpf1 更精确的靶标能力以及更广泛的靶位点选择范围,构建了 AsCpf1、FnCpf1 和 LbCpf1 表达载体,证明了该系统能够有效地编辑靶标基因,但是由于在家蚕细胞中转染效率较低,并没有让靶标蛋白完全敲除,只是降低了靶标蛋白的表达(图 4),在未来的研究中可以通过构建表达细胞系或者转基因品系进一步提高其敲除效果,使该系统能够完全抑制靶标蛋白的表达,进而更广泛地应用于家蚕基因的功能研究。家蚕 CRISPR/Cpf1 基因编辑技术的成功构建,让家蚕基因功能研究有了更多的选择,根据其 PAM 序列特征在 5'T 富含区域可以有效地编辑,扩展了家蚕基因组编辑的范围^[4,7,18]。Cpf1 基因编辑系统剪切外源基因是在靶标 DNA 互补链的第 23 位和非互补链的 14 位到 18 位,可以产生多个剪切位点,细胞发生 NHEJ 修复后并不会改变 PAM 临近的序列,这样编辑系统就不会影响 Cpf1 蛋白的二次识别和编辑靶标序列,间接地提高了该基因编辑系统的编辑效率^[4,20]。Cpf1 切割后产生黏性末端,黏性末端更便于控制新 DNA 的插入,可以更广泛地应用于基因插入的研究,而 Cas9 编辑 DNA 时在同一位置切割,会产生平末端,不利于外源基因插入^[13]。同时,Cpf1 的 gRNA 长度为 42–44 nt,不需要 tracr-RNA 分子的帮助结合到靶序列上,更进一步简化了基因编辑流程,方便了遗传改良的应用^[4,20–21]。

4 结论

成功构建了 3 个不同来源的 CRISPR/Cpf1 基因编辑系统,通过 T7E1 酶切分析和 T 克隆测序分析显示该基因编辑系统能够有效编辑家蚕 BmATAD3A 和 BmHSP60 基因,Western blotting 分析显示基因编辑后能够显著抑制该蛋白表达。CRISPR/Cpf1 为家蚕基因编辑、基因调控研究和遗传改良研究提供了新型工具。

REFERENCES

- [1] Bondy-Denomy J, Pawluk A, Maxwell KL, et al. Bacteriophage genes that inactivate the CRISPR/Cas bacterial immune system. *Nature*, 2013, 493(7432): 429-432.
- [2] Chen BH, Gilbert LA, Cimini BA, et al. Dynamic imaging of genomic loci in living human cells by an optimized CRISPR/Cas system. *Cell*, 2013, 155(7): 1479-1491.
- [3] Shalem O, Sanjana NE, Hartenian E, et al. Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells. *Science*, 2014, 343(6166): 84-87.
- [4] Fonfara I, Richter H, Bratovič M, et al. The CRISPR-associated DNA-cleaving enzyme Cpf1 also processes precursor CRISPR RNA. *Nature*, 2016, 532(7600): 517-521.
- [5] Zetsche B, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, et al. Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system. *Cell*, 2015, 163(3): 759-771.
- [6] Fagerlund RD, Staals RHJ, Fineran PC. The Cpf1 CRISPR-Cas protein expands genome-editing tools. *Genome Biol*, 2015, 16: 251.
- [7] Gao L, Cox DBT, Yan WX, et al. Engineered Cpf1 variants with altered PAM specificities. *Nat Biotechnol*, 2017, 35(8): 789-792.
- [8] Nakade S, Yamamoto T, Sakuma T. Cas9, Cpf1 and C2c1/2/3—What's next? *Bioengineered*, 2017, 8(3): 265-273.
- [9] Wang YQ, Li ZQ, Xu J, et al. The CRISPR/Cas system mediates efficient genome engineering in *Bombyx mori*. *Cell Res*, 2013, 23(12): 1414-1416.
- [10] Ma SY, Chang JS, Wang XG, et al. CRISPR/Cas9 mediated multiplex genome editing and heritable mutagenesis of *BmKu70* in *Bombyx mori*. *Sci Rep*, 2014, 4: 4489.
- [11] Dong Z, Hu Z, Qin Q, et al. CRISPR/Cas9-mediated disruption of the *immediate early-0* and *2* as a therapeutic approach to *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus in transgenic silkworm. *Insect Mol Biol*, 2019, 28(1): 112-122.
- [12] Dong ZQ, Long JQ, Huang L, et al. Construction and application of an *HSP70* promoter-inducible genome editing system in transgenic silkworm to

- induce resistance to *Nosema bombycis*. Appl Microbiol Biotechnol, 2019, 103(23/24): 9583-9592.
- [13] Zetsche B, Heidenreich M, Mohanraju P, et al. Multiplex gene editing by CRISPR-Cpf1 using a single crRNA array. Nat Biotechnol, 2017, 35(1): 31-34.
- [14] Stella S, Alcón P, Montoya G. Structure of the Cpf1 endonuclease R-loop complex after target DNA cleavage. Nature, 2017, 546(7659): 559-563.
- [15] Zeng BS, Zhan S, Wang YQ, et al. Expansion of CRISPR targeting sites in *Bombyx mori*. Insect Biochem Mol Biol, 2016, 72: 31-40.
- [16] Dong ZQ, Chen TT, Zhang J, et al. Establishment of a highly efficient virus-inducible CRISPR/Cas9 system in insect cells. Antiviral Res, 2016, 130: 50-57.
- [17] Dong ZQ, Huang L, Dong FF, et al. Establishment of a baculovirus-inducible CRISPR/Cas9 system for antiviral research in transgenic silkworms. Appl Microbiol Biotechnol, 2018, 102(21): 9255-9265.
- [18] 杨帆, 李寅. 新一代基因编辑系统. 生物工程学报, 2017, 33(3): 361-371.
Yang F, Li Y. The new generation tool for CRISPR genome editing: CRISPR/Cpf1. Chin J Biotech, 2017, 33(3): 361-371 (in Chinese).
- [19] Zhang JF, Chen L, Zhang J, et al. Drug inducible CRISPR/cas systems. Comput Struct Biotechnol J, 2019, 17: 1171-1177.
- [20] Dong D, Ren K, Qiu XL, et al. The crystal structure of Cpf1 in complex with CRISPR RNA. Nature, 2016, 532(7600): 522-526.
- [21] Zhao NN, Li L, Luo GJ, et al. Multiplex gene editing and large DNA fragment deletion by the CRISPR/Cpf1-RecE/T system in *Corynebacterium glutamicum*. J Ind Microbiol Biotechnol, 2020, 47(8): 599-608.

(本文责编 郝丽芳)