

CRISPR/Cas9 介导 *RB1* 基因敲除及其在鸡前脂肪细胞分化、增殖中的功能研究

张琦^{1,2}, 黄娇娇³, 杨彩侠¹, 王宇祥^{1,2}, 张慧^{1,2}, 赵建国³, 李辉^{1,2*}

(1. 东北农业大学动物科学技术学院, 哈尔滨 150030; 2. 农业部鸡遗传育种重点实验室, 哈尔滨 150030;
3. 中国科学院动物研究所 干细胞与生殖生物学国家重点实验室, 北京 100101)

摘要: 旨在研究 *RB1* 基因在鸡前脂肪细胞分化和增殖过程中的功能, 本研究利用 CRISPR/Cas9 系统在鸡前脂肪细胞中敲除 *RB1* 基因, 检测鸡前脂肪细胞的分化和增殖能力及相关标志基因的表达水平。结果表明, CRISPR/Cas9 系统能够有效介导 *RB1* 基因的敲除并引起 *RB1* 基因翻译的提前终止, 敲除效率可以达到 10%。油红 O 提取比色和 CCK-8 的结果显示, 敲除 *RB1* 基因后, 鸡前脂肪细胞的分化能力减弱、增殖能力增强; qRT-PCR 结果显示, *RB1* 基因敲除之后脂肪细胞分化标志基因 *G0S2*、*FAS*、*A-FABP* 的 mRNA 表达水平下降, 尤其是 *G0S2* 基因的表达水平在前脂肪细胞分化的各个阶段都表现为显著的下降。同时 *RB1* 基因敲除还引起细胞周期相关基因 *CyclinD1*、*E2F1*、*Ki67*、*PCNA* 的 mRNA 表达水平升高。初步推断, *RB1* 基因可能是调控鸡前脂肪细胞分化和增殖的关键调节因子。

关键词: CRISPR/Cas9; *RB1*; 鸡; 脂肪沉积; 分化; 增殖

中图分类号: S831.2

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2016)09-1775-10

CRISPR/Cas9 Mediated *RB1* Knockout and Its Impact on Chicken Preadipocytes Differentiation and Proliferation

ZHANG Qi^{1,2}, HUANG Jiao-jiao³, YANG Cai-xia¹, WANG Yu-xiang^{1,2},
ZHANG Hui^{1,2}, ZHAO Jian-guo³, LI Hui^{1,2*}

(1. College of Animal Science and Technology, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China;
2. Key Laboratory of Chicken Genetics and Breeding, Ministry of Agriculture, Harbin 150030, China;
3. State Key Laboratory of Stem Cell and Reproductive Biology, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract: In order to study the role of *RB1* gene on chicken preadipocyte differentiation and proliferation. CRISPR/Cas9 system was established and conducted to knockout the *RB1* gene in the chicken preadipocyte. The proliferation and differentiation of chicken preadipocytes and the expression of related marker genes were detected. Results showed that the CRISPR/Cas9 system could effectively mediate *RB1* knockout and cause truncated translation in chicken at the rate of 10%. Oil Red O and CCK-8 were used to evaluate the ability of differentiation and proliferation in chicken preadipocyte respectively. Knockout of *RB1* in chicken preadipocyte resulted in enhanced proliferation capability and decreased differentiation capability in chicken preadipocyte. *RB1* knockout decreased the transcriptional expression of adipocyte differentiation associated genes such as *G0S2*, *FAS* and *A-FABP*. Especially, the expression of *G0S2* was significantly decreased

收稿日期: 2016-03-22

基金项目: 国家自然科学基金(青年科学基金)(31301960); 国家 863 项目(2013AA102501); 现代农业产业技术体系建设专项(CARS-42)

作者简介: 张琦(1990-), 女, 黑龙江齐齐哈尔人, 硕士生, 主要从事家禽遗传育种研究, E-mail: zhangxiaqi0405@163.com

* 通信作者: 李辉, 教授, E-mail: lihui@neau.edu.cn

at all stages of preadipocyte differentiation. Further, *RB1* knockout increased the expression of cell proliferation associated genes such as *CyclinD1*, *E2F1*, *Ki67* and *PCNA*, which was corresponded to the enhanced proliferation capability in the *RB1* knockout cells. In summary, *RB1* may be a key regulator on differentiation and proliferation of chicken preadipocyte.

Key words: CRISPR/Cas9; *RB1*; chicken; fat deposition; differentiation; proliferation

肉鸡是全世界广泛饲养并具有重要经济价值的禽类。由于高强度选择,肉鸡的生长速度和肉产量得以明显提高。然而肉鸡体内脂肪(尤其是腹脂)蓄积过多一直是困扰世界范围内肉鸡育种工作者的重大问题。脂肪组织中脂肪细胞的过度增殖和分化会造成脂肪形成加剧从而引发机体脂肪的过度蓄积。因此,研究脂肪沉积的分子遗传机制对防止动物体内脂肪过度沉积,提高肉鸡的饲料转化效率具有重要的意义。脂肪细胞的分化和增殖是一个由众多因子共同调控的复杂过程,本课题组前期对鸡 1 号染色体上影响腹脂性状的 QTL(数量性状基因座)进行了初步定位,在鸡 1 号染色体上发现了多个影响鸡腹脂重和腹脂率的 QTL;进一步通过加大标记密度和扩大群体规模的方法将影响鸡腹脂率的 QTL 精细定位在鸡 1 号染色体上 3.7 Mb 的区域内;对该区域内的基因进行分析,结果鉴定出了 *RB1*(视网膜母细胞瘤基因)等与鸡体脂性状相关的重要基因^[1-3]。因此,本课题组选择 *RB1* 基因作为影响鸡腹脂沉积的重要基因进行后续研究。在哺乳动物上针对 *RB1* 基因的研究较多,它参与机体内许多生长发育调节过程比如细胞周期调控、细胞凋亡和细胞衰老^[3],但在家禽上尤其是对鸡脂肪细胞分化和增殖的影响的研究比较少。

自 2013 年 CRISPR/Cas9 系统的出现为基因组编辑提供了很好的解决方案。CRISPR 系统是由许多细菌的一种免疫防御机制,可用来抵抗外源核酸(如病毒或质粒)的入侵^[4]。CRISPR/Cas9 系统利用人工设计的向导 RNA(Single-guide RNA, sgRNA)介导外源表达的 Cas9 蛋白与基因组的靶点特异性地结合,从而实现基因组 DNA 特异性地切割。该系统已经在多种模式生物、细胞以及家畜中得到大量研究与应用,具有非常广阔的应用前景^[5-7]。但是迄今为止, Cas9 介导的基因组编辑在家禽上尚未见报道。

本研究的主要目的有两个:一是探讨 CRISPR/Cas9 技术对鸡细胞基因组编辑的可行性;二是以鸡前脂肪细胞为模型,利用 CRISPR/Cas9 系统构建

RB1 基因敲除的鸡前脂肪细胞,检测敲除 *RB1* 基因后细胞的分化和增殖能力,研究 *RB1* 对鸡脂肪细胞分化和增殖的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

试验所用的细胞为实验室前期构建的鸡前脂肪细胞系(命名为 ICPA-II), Cas9 载体为 pX330-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9 载体。

1.2 方法

1.2.1 gRNA 的设计和载体构建 利用 MIT 张峰实验室提供的在线工具(<http://crispr.mit.edu/>)进行 gRNA 的设计。根据鸡 *RB1* 基因的序列(GenBank 登录号:NM_204419),针对 *RB1* 基因的第 5 外显子和第 6 外显子共设计了 3 个 gRNAs, 构建 gRNA 的寡核苷酸序列分别为(下划线标记的碱基为构建 gRNA 的寡核苷酸上引入的 *Bbs* I 酶切位点): *RB1*-5E-gRNA1-F: 5'-CACCGCAAAGAG-GTGGATGTTAACA-3', *RB1*-5E-gRNA1-R: 5'-A-AACTGTTAACATCCACCTCTTTGC-3'; *RB1*-6E-gRNA1-F: 5'-CACCGGACTTGTGGCCTTATTT-ATC-3', *RB1*-6E-gRNA1-R: 5'-AAACGATAAAT-AAGGCCACAAGTCC-3'; *RB1*-6E-gRNA2-F: 5'-CACCGTATTTATCTGGAGCAACCCA-3', *RB1*-6E-gRNA2-R: 5'-AAACTGGGTTGCTCCAGAT-AAATAC-3'。

利用限制性内切酶片段长度多态性(RFLP)技术对上述 3 条 gRNAs 打靶后细胞的基因型进行鉴定。*RB1*-5E-gRNA1 目标打靶区域存在 *Hpa* I 酶切位点, *RB1*-6E-gRNA1 和 *RB1*-6E-gRNA2 目标打靶区域存在 *Hae* III 酶切位点。打靶成功可能造成潜在打靶位置附近基因组碱基的突变、缺失或者插入,从而使扩增的包含打靶片段的 PCR 产物不能被 *Hpa* I 或 *Hae* III 内切酶切割。根据限制性内切酶的切割与否可以初步断定 *RB1* 是否发生了基因打靶并分析打靶效率。筛选为阳性的细胞克隆再通过测序确定 *RB1* 基因的突变类型。

针对 RB1 基因的 gRNA-CRISPR/Cas9 打靶载体的构建:1) pX330 空载体的酶切:用 *Bbs* I 酶 (NEB, R0539) 线性化 pX330 质粒, 并进行切胶回收。2) gRNA 寡核苷酸双链的合成:将合成的两条寡核苷酸以 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的形式稀释, 取等量的上游链和下游链混合。反应程序: 95°C 210 s, 降温至室温。3) gRNA 寡核苷酸双链与线性化的 pX330 载体连接:连接体系:线性化的 pX330 载体 35 ng、退火形成的 gRNA 寡核苷酸双链 $2 \mu\text{L}$ 、T4 buffer $1 \mu\text{L}$ 、T4 连接酶 $1 \mu\text{L}$ 、补水至 $10 \mu\text{L}$ 。连接条件:室温 5 min。随后将连接产物进行转化, 并挑取单克隆菌落进行测序, 将测序结果正确的菌液进行质粒大提。构建的 3 个载体的名称分别为 RB1-g4、RB1-g5、RB1-g6。

1.2.2 gRNA 的体外转录及体外切割活性检测

根据 *In vitro* Transcription T7 Kit (TaKaRa, 6140) 试剂盒的说明书进行 gRNA 的体外转录。将体外转录获得的 gRNA 与包含潜在打靶区域的 DNA 片段按照 Cas9 酶 (NEB, M0386) 的说明书进行酶切。酶切体系:包含潜在打靶区域的 DNA 片段 150 ng、gRNA 100 ng、Cas9 酶 $1 \mu\text{L}$ 、 $10\times$ buffer $2 \mu\text{L}$ 、补水至 $20 \mu\text{L}$ 。反应条件: 37°C 酶切 1 h。酶切后的产物利用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳进行检测, 根据电泳结果分析 3 个 gRNAs 的体外切割活性。

1.2.3 细胞转染 细胞培养条件:10% 血清的 DMEM (Gibco, 12800017) 无抗生素培养基, 37°C 5% CO_2 中培养。野生型的鸡前脂肪细胞按照 6×10^4 个 \cdot 孔⁻¹ 的浓度传到 6 孔板中, 然后按照 Lipofectamine™ 2000 Transfection Reagent (Invitrogen, 11668019) 操作说明书进行转染。将前期构建的 RB1-g4、RB1-g5、RB1-g6 质粒和 GFP 质粒共转。转染后 24 h 利用流式细胞仪进行分选, 将带有绿色荧光的细胞分选到 96 孔板中, 每孔 1 个细胞。

1.2.4 CRISPR/Cas9 介导的细胞打靶效率和突变模式检测

将分选好的细胞进行培养, 适时传代。当细胞传到 24 孔板时, 每个孔取一半细胞继续培养, 剩下的一半细胞提取基因组进行打靶效率鉴定和突变模式检测。对提取的细胞基因组的打靶区域进行 PCR 扩增, PCR 扩增引物: RB1-5e-F: $5'$ -AGC-CAAGGTATCAGTGTGGG- $3'$, RB1-5e-R: $5'$ -AAACGGGCACTTCTCAGACA- $3'$ 。

对扩增的 PCR 产物进行酶切鉴定, 不能被 *Hpa* I 酶切开的产物连接到 pMD18-T 载体上进

行测序, 进一步分析鸡 RB1 基因的突变模式。

1.2.5 前脂肪细胞诱导分化和油红 O 染色及提取比色 利用油酸诱导前脂肪细胞分化, 然后利用油红 O 染色和提取比色的方法检测细胞的脂滴沉积情况, 从表观上观察细胞的分化情况。具体步骤:向贴壁细胞中加入油酸 (终浓度 $320 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 诱导细胞分化, 持续诱导 24、48、72 和 96 h 后, 弃去培养基, 用 PBS 洗 3 遍, 10% 甲醛固定 30 min, PBS 洗 2 遍。油红 O 工作液染 10 min, 弃去多余的染色液, 60% 异丙醇分色 10~20 s, 蒸馏水冲洗 3 次, 室温干燥, 100% 异丙醇溶解被染细胞中的油红 O 15 min。用 100% 异丙醇作为空白对照, 用酶标仪测定 510 nm 波长的吸光度值, 每组内设置 3 个重复。

1.2.6 CCK-8 法检测细胞增殖 将敲除组和野生型组的细胞分别计数。然后将细胞传入 96 孔板中, 每个孔放入 4 800 个细胞。分别在细胞增殖 0、24、48、72 和 96 h 时向细胞培养基中加入培养基体积 10% 的 CCK-8 溶液, 将细胞放入培养箱中培养 1 h, 然后用酶标仪测定 450 nm 波长的吸光度值。每组内设置 3 个重复。

1.2.7 基因表达检测 用 qRT-PCR 方法进行相关基因表达水平的定量分析。qRT-PCR 反应按 FastStart Universal SYBR Green Master (ROX) (Roche) 说明书操作。反应体系:FastStart Universal SYBR Green Master (ROX) ($2\times$) $5 \mu\text{L}$, 上游引物 ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) $0.2 \mu\text{L}$, 下游引物 ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) $0.2 \mu\text{L}$, cDNA 模板 $1 \mu\text{L}$, ddH₂O $3.6 \mu\text{L}$ 。反应条件: 95°C 预变性 10 min, 95°C 变性 15 s, 60°C 复性延伸 60 s, 共 40 个循环。熔解曲线: 95°C 15 s, 60°C 10 min, 95°C 15 s, 每个样品设 3 孔重复。以 β -actin 基因为内参, 利用 $2^{-\Delta\text{Ct}}$ 方法将原始 Ct 值转换为相对的基因表达量。所用引物序列见表 1。

2 结果

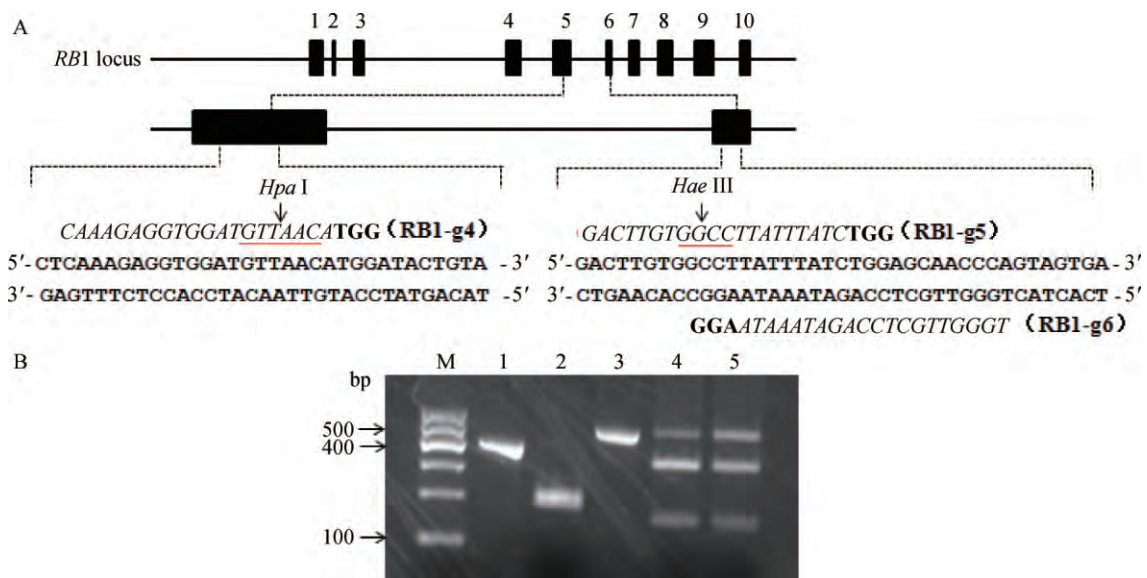
2.1 鸡 RB1 基因打靶载体的构建以及 gRNA 打靶效率的体外酶切检测

将设计好的 3 个 gRNA 载体 RB1-g4、RB1-g5、RB1-g6 进行体外转录, 获得 mRNA (图 1A), 将上述得到的 mRNA、包含潜在打靶区域的 DNA 片段和 Cas9 蛋白共孵育, 通过比较 DNA 片段被酶切的比来估计相应 gRNA 的打靶效率 (酶切率 = 切开条带 / 检测条带的吸光度值)。结果显示, RB1-g4

表 1 qRT-PCR 的引物

Table 1 Primers used for qRT-PCR

基因名称 Name	GenBank 登录号 GenBank accession No.	引物序列 (5'-3') Primer sequence	产物长度/bp Size	退火温度/°C Annealing temperature
RB1	NM_204419	GCCTTATTTATCTGGAGCAAC AAGACGCACAGCAACAAC	160	60
Cyclin D1	NM_205381	AGAAGTGCGAAGAGGAAGT TGATGGAGTTGTCGGTGTA	186	60
PCNA	NM_204170	GTGCTGGGACCTGGGTT CGTATCCGCATTGTCTTCT	159	60
Ki67	NM_205505	AGGTCCGTTCCCTCGTT CATTGTCGTCTGGGTCATC	270	60
G0S2	NM_001190924	CGGGGCGAAAGAGCTGAG AGCACGTACAGCTTCACCAT	171	60
A-FABP	AY675941	ATGTGCGACCAGTTTGT TCACCATTGATGCTGATAG	143	60
E2F1	NM_205219	GGAATGGGTGCTGTGGGAGAT AGCCAGGGAGGAGGAAACAAAC	253	60
FAS	NM_205155	AAGGAGGAAGTCAACGG TTGATGGTGAGGAGTCG	196	60
β -actin	NM_205518	TCTTGGGTATGGAGTCCTG TAGAAGCATTTCGGGTGG	331	60



A. RB1 基因上 gRNA 的靶位点示意图:黑色方框为外显子,斜体字母是 gRNA 的打靶序列,加粗字母是 PAM 序列,带有下划线的部分是打靶区域的酶切位点。B. 各个 gRNA 打靶效率的体外酶切检测结果:1. 包含 RB1-g4 潜在打靶区域的 DNA 片段,长度为 403 bp;2. RB1-g4 打靶效率的体外酶切检测结果,将 DNA 片段切成 213 和 190 bp;3. 包含 RB1-g5 和 RB1-g6 潜在打靶区域的 DNA 片段,长度为 499 bp;4.5. 分别是 RB1-g5 和 RB1-g6 打靶效率的体外酶切检测结果,将 DNA 片段切割成了 346 和 153 bp

A. gRNA target sites in RB1; Exons are shown as black boxes, the gRNA-targeting sequences are the labeled in italic letters, and the protospacer-adjacent motif (PAM) sequences are the labeled in bold letters, the restriction sites at the target regions are underlined. B. *In vitro* cleavage activity assay of gRNA; The 1st (403 bp) and 3rd lanes (499 bp) are positive control; The 2nd lane is the RFLP result of RB1-g4 targeting activity *in vitro* detection, which separates the amplification fragment into 213 and 190 bp; The 4th and 5th lanes indicate the results of RB1-g5 and RB1-g6 targeting activity *in vitro* detection, which separate the amplification fragment into 346 and 153 bp

图 1 gRNA 的设计和打靶效率检测

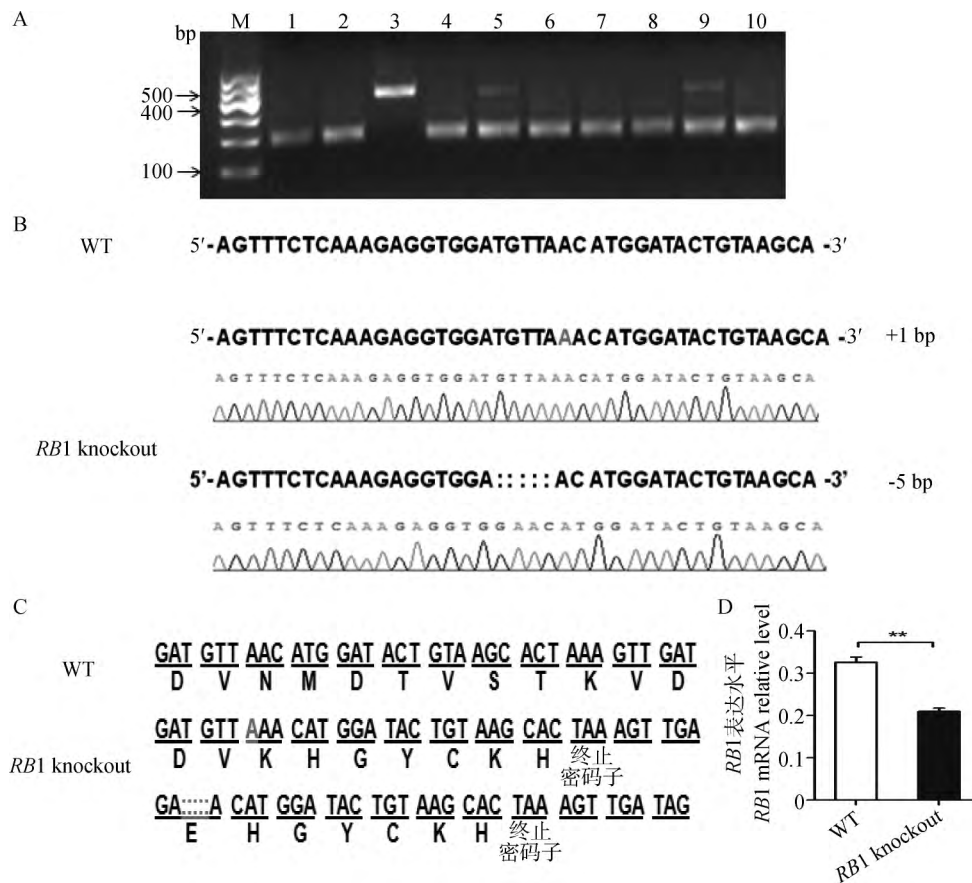
Fig 1 Design and *in vitro* cleavage activity assay of gRNA

组的 DNA 片段全部被酶切,体外切割效率为 100%,而 *RB1-g5* 和 *RB1-g6* 的体外切割效率分别为 70%和 60%(图 1B)。所以后续选取 *RB1-g4* 进行细胞转染等试验。

2.2 CRISPR/Cas9 介导的鸡前脂肪细胞中 *RB1* 基因的敲除

将 *RB1-g4* 质粒和 GFP 质粒共转染 ICPA- II 细胞。对筛选到的细胞提取 DNA 进行 PCR 扩增,然后用 *Hpa* I 内切酶对 PCR 产物进行切割。共鉴定了 10 个细胞克隆,其中有 1 个克隆(命名为 *RB1-KO-1-4*)即第 3 泳道的 PCR 产物不能被 *Hpa* I 酶切开(图 2A),初步推算 CRISPR/Cas9 系统在鸡前脂肪细胞系中 *RB1* 基因的敲除效率为 10%

(1/10)。*RB1-KO-1-4* 细胞克隆的 PCR 产物测序结果显示,这个细胞克隆的两条同源染色体的打靶类型分别为插入 1 个碱基和缺失 5 个碱基,造成了氨基酸的移码突变(图 2B),使氨基酸翻译提前终止(图 2C)。对敲除 *RB1* 基因的鸡前脂肪细胞和野生型的鸡前脂肪细胞进行了 qRT-PCR 分析,结果发现敲除 *RB1* 基因的鸡前脂肪细胞的 *RB1* 基因表达量极显著($P < 0.01$)的低于野生型鸡前脂肪细胞的 *RB1* 基因表达量(图 2D)。由于目前针对鸡这个物种的 Western blot 的抗体较少,之前的试验中也尝试了一些商业化的针对哺乳动物 *RB1* 基因的抗体,但是都没有特异性反应。所以本试验没有利用 Western blot 的方法验证 *RB1* 基因的敲除。



A. *Hpa* I 酶切鉴定;B. *RB1* 敲除细胞的基因组类型;C. 基因突变和氨基酸突变结果,1 个碱基的插入和 5 个碱基的缺失导致了氨基酸翻译提前终止;D. 鸡 *RB1* 基因在野生型的鸡前脂肪细胞和敲除 *RB1* 基因的鸡前脂肪细胞中的表达情况。*, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$,下同

A. gRNA mutagenesis efficiencies were assessed by *Hpa* I ;B Sequence results confirmed *RB1* deletion;C. 1 bp insertion and 5 bp deletion in *RB1* gene results in premature translation termination condon;D. *RB1* transcriptional expression was significantly reduced in *RB1* knockout chicken preadipocyte when compared with wild-type cells. *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$, the same as below

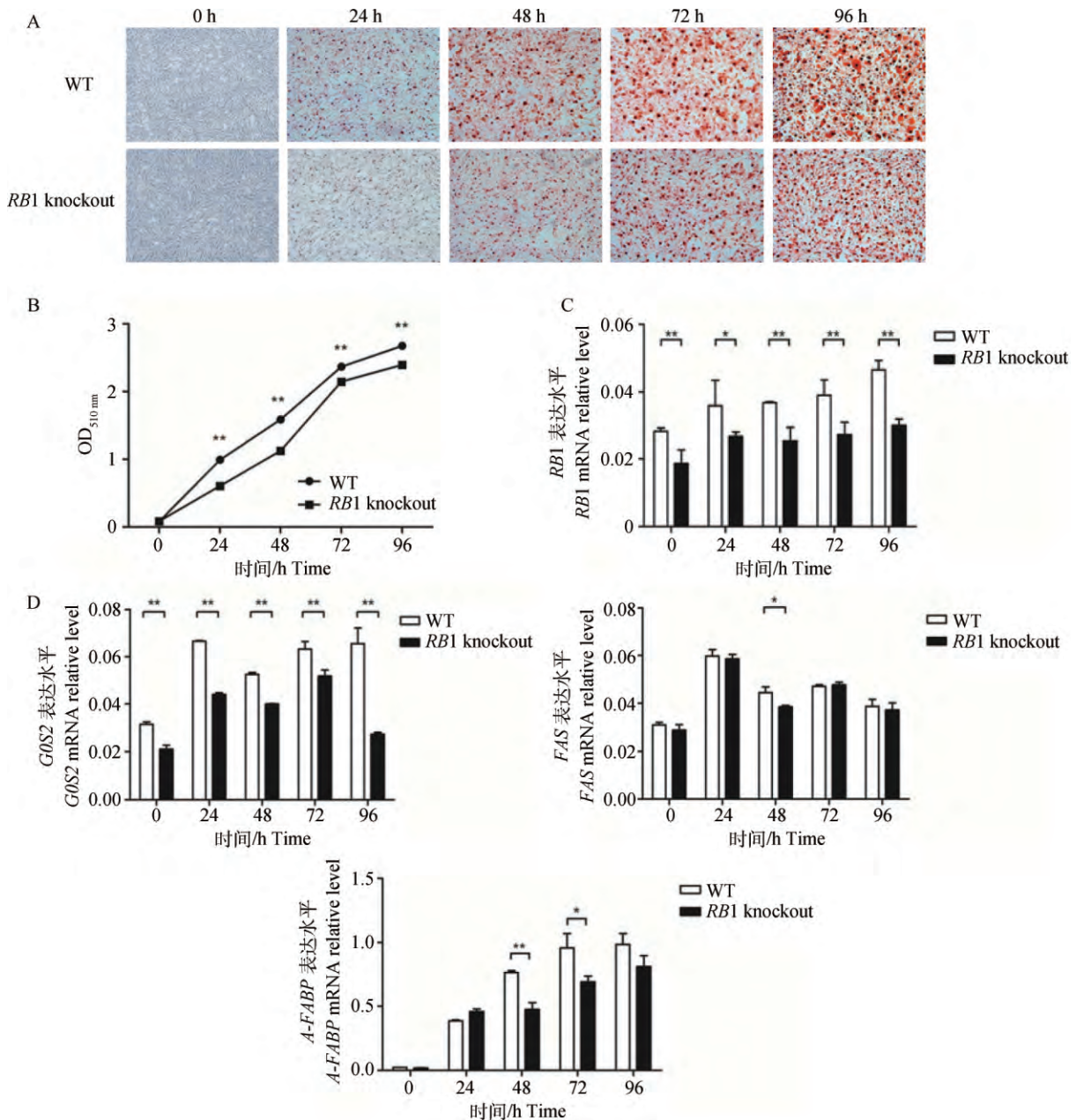
图 2 CRISPR/Cas9 介导 *RB1* 基因在鸡脂肪前体细胞中的敲除

Fig 2 Identification of *RB1* gene knockout mediated by CRISPR/Cas9 in chicken preadipocyte

2.3 RB1 基因促进鸡前脂肪细胞的分化

为了检测 RB1 基因对鸡前脂肪细胞分化的影响,分别将敲除 RB1 基因的鸡前脂肪细胞和野生型的鸡前脂肪细胞以 6×10^4 个·孔⁻¹ 的密度传到 6 孔板中,待细胞稳定贴壁后,加入油酸(终浓度为 $320 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 诱导细胞分化,此时记为试验 0 h。持续诱导 24、48、72 和 96 h 后进行油红 O 染色(图

3A) 并进行提取比色和细胞数目的校正。结果如图 3B 所示,在诱导分化 24、48、72 和 96 h 时,敲除组的油红 O 提取比色的 OD 值均极显著低于野生型组($P < 0.01$)。敲除组 RB1 基因的表达量极显著或显著($P < 0.01, P < 0.05$) 低于野生型组 RB1 的表达量(图 3C)。



A. 油红 O 染色(100×); B. 油红 O 提取比色表明 RB1 基因敲除阻碍鸡前脂肪细胞分化过程中的脂滴形成; C. RB1 基因在鸡脂肪前体细胞分化过程中表达呈上升趋势,同时 RB1 基因在敲除组细胞中显著低于在野生型鸡前脂肪细胞的表达; D. 敲除 RB1 基因影响了脂肪细胞分化标志基因(G0S2, FAS, A-FABP)的表达

图 3 敲除 RB1 基因对鸡前脂肪细胞分化的影响
Fig. 3 Effects of RB1 knockout on chicken preadipocyte differentiation

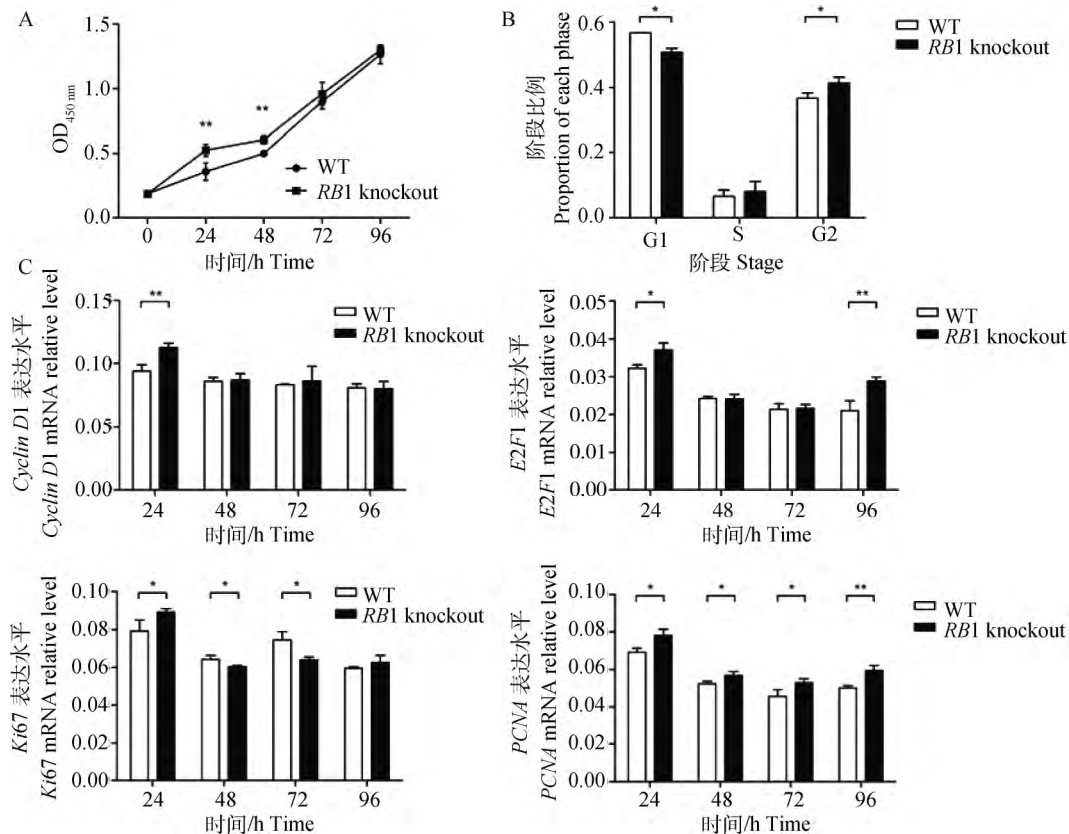
为了研究 *RB1* 基因对鸡前脂肪细胞分化过程中成熟脂肪细胞标志基因表达的影响,在进行油红 O 染色的同时收集了 5 个时间点的细胞,利用 qRT-PCR 的方法检测鸡前脂肪细胞分化过程中成熟脂肪细胞标志基因(*G0S2*、*FAS*、*A-FABP* 基因)的表达水平。结果显示,诱导分化 0、24、48、72 和 96 h 时,敲除组 *G0S2* 的表达量极显著低于野生型组 ($P < 0.01$);诱导分化 48 h 时,敲除组 *FAS* 的表达量显著低于野生型组 ($P < 0.05$);诱导分化 48 h 时,敲除组 *A-FABP* 的表达量极显著低于野生型组 ($P < 0.01$),诱导分化 72 h 时,敲除组 *A-FABP* 的表达量显著低于野生型组 ($P < 0.05$)(图 3D)。

2.4 *RB1* 基因抑制鸡前脂肪细胞的增殖

为了检测 *RB1* 基因对鸡前脂肪细胞增殖的影响,对敲除 *RB1* 基因的鸡前脂肪细胞和野生型的细胞进行了 CCK-8 检测,结果显示在细胞增殖 24 和 48 h 时,敲除 *RB1* 基因的鸡前脂肪细胞的增殖速度要极显著高于野生型的鸡前脂肪细胞的增殖速度

($P < 0.01$)(图 4A)。CCK-8 试验证明 *RB1* 基因抑制细胞增殖,为了探究此抑制作用是否是由细胞周期变化引起的,随后利用流式细胞仪进行了细胞周期检测,结果如图 4B 所示。敲除 *RB1* 基因引起鸡前脂肪细胞中 G1 期细胞比例显著降低 ($P < 0.05$),G2 期细胞比例显著升高 ($P < 0.05$)。由此结果可以推测,鸡 *RB1* 基因对鸡前脂肪细胞的细胞周期进程具有一定的抑制作用。

为了在 mRNA 水平上研究 *RB1* 基因对鸡前脂肪细胞增殖相关基因的影响,分别将敲除 *RB1* 基因的鸡前脂肪细胞和野生型的鸡前脂肪细胞以每孔 3×10^4 个 \cdot 孔⁻¹ 的密度传到 6 孔板中,待细胞稳定贴壁后记为 0 h,然后分别在细胞增殖 24、48、72 和 96 h 收集细胞,以 β actin 为内参,利用 qRT-PCR 的方法分析 *RB1* 基因敲除对鸡前脂肪细胞增殖过程中重要基因(*Cyclin D1*、*E2F1*、*Ki67*、*PCNA*)表达情况的影响。



A. 敲除 *RB1* 基因促进鸡前脂肪细胞数量的增加;B. 敲除 *RB1* 基因降低鸡前脂肪细胞细胞 G1 期细胞的比例,增加了 G2 期细胞的比例;C. 敲除 *RB1* 基因影响了鸡前脂肪细胞增殖过程中重要基因(*Cyclin D1*、*E2F1*、*Ki67* and *PCNA*)的表达

A. *RB1* knockout increased chicken preadipocyte proliferation; B. *RB1* knockout decreased the ratio of cells at G1 stage but increased the ratio of cells at G2 stage; C. *RB1* knockout increased expression of cell proliferation associated genes such as *Cyclin D1*, *E2F1*, *Ki67* and *PCNA*

图 4 敲除 *RB1* 基因对鸡前脂肪细胞增殖的影响

Fig. 4 Effects of *RB1* knockout on chicken preadipocyte proliferation

如图 4C 所示,增殖 24 h 时,敲除组 *Cyclin D1* 的表达量极显著高于野生型组 ($P < 0.01$);增殖 24 h 时,敲除组 *E2F1* 的表达量显著高于野生型组 ($P < 0.05$),在 96 h 时达到极显著水平 ($P < 0.01$);增殖 24 h 时,敲除组 *Ki67* 的表达量显著高于野生型组 ($P < 0.05$);增殖 24、48 和 72 h 时,敲除组 *PCNA* 的表达量显著高于野生型组 ($P < 0.05$),在 96 h 时达到极显著水平 ($P < 0.01$)。

3 讨论

基因编辑技术是研究基因功能的重要工具,早期的同源重组技术虽然能对目的基因进行有效编辑,但效率极低。人工核酸酶技术的出现极大地提高了基因组编辑的效率。目前比较常见的人工核酸酶系统主要有 ZFNs、TALENs 和 CRISPR/Cas9 3 种。但 ZFNs 和 TALENs 系统在质粒构建时费时费力^[8-9],而 CRISPR/Cas9 系统对靶点的识别依赖于 gRNA 与靶标 DNA 之间的碱基互补配对,使得质粒的构建更为简单、高效^[10]。因此,本研究选用 CRISPR/Cas9 系统对鸡前脂肪细胞进行基因打靶。结果显示,CRISPR/Cas9 系统对鸡前脂肪细胞的敲除效率为 10%。这与 CRISPR/Cas9 系统在其他物种细胞上的敲除效率相比要低一些^[11],造成打靶效率低的原因可能是由于这个系统在鸡上的应用还不够完善,还需要进一步优化。

RB1 基因已经被证明参与了许多生长发育调节过程。对人和小鼠的研究表明,*RB1* 促进肌细胞^[12]、成骨细胞分化^[13] 以及红细胞生成^[14]。但是 *RB1* 基因对鸡前脂肪细胞分化和增殖的调控机理仍不明确。本研究利用 CRISPR/Cas9 系统成功构建了敲除 *RB1* 基因的鸡前脂肪细胞,为研究 *RB1* 基因的作用机制提供了有效的模型。为了确定鸡 *RB1* 基因对鸡前脂肪细胞分化的作用,本研究将 *RB1* 基因在鸡前脂肪细胞中进行了敲除,并结合油红 O 染色和提取比色的方法比较了敲除组和野生型组细胞的分化能力。结果显示,敲除 *RB1* 基因之后,鸡前脂肪细胞脂滴沉积能力减弱。先前有研究显示,在体外培养条件下,*RB1* 基因所编码的蛋白 pRb 可促进小鼠胚胎成纤维细胞转分化成脂肪细胞^[15],造成上述结果是因为在小鼠胚胎成纤维细胞中 pRb 能激活 *C/EBPs* 家族介导的转录途径,进而诱发脂肪细胞分化。M. Classon 等^[16] 也发现,在 3T3 成纤维细胞中加入 pRb,随着 pRb 浓度的增

加,*C/EBP α* 介导的转录被激活,使细胞进行分化,反之缺失 pRb 时 3T3 成纤维细胞表现为分化受阻。这与本试验的研究结果是一致的。本研究利用 qRT-PCR 的方法检测了在诱导分化的过程中脂肪细胞分化标志基因的表达情况。结果显示,诱导分化 24、48、72 和 96 h 时,敲除组 *G0S2* 基因的表达量极显著低于野生型组 ($P < 0.01$);诱导分化 48 h 时,敲除组的 *FAS* 基因的表达量显著低于野生型组 ($P < 0.05$);诱导分化 48 和 72 h 敲除组的 *A-FABP* 基因的表达量显著低于野生型组 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。T. Ma 等^[17] 研究表明,在小鼠上敲除 *G0S2* 基因,小鼠的脂肪沉积能力要显著的低于野生型的小鼠。H. X. Cui 等^[18] 研究表明,*FAS* 基因的表达决定着脂肪酸的合成能力,而脂肪酸又是脂肪的主要储存形式甘油三酯合成所必须的原料。K. Motojima^[19] 研究表明,*A-FABP* 基因在哺乳动物的脂肪酸运输和脂肪细胞分化过程中发挥着重要的作用。因此 *A-FABP*、*G0S2*、*FAS* 对于脂肪的合成以及脂肪的沉积起着重要的作用,并且这 3 个基因也是前脂肪细胞分化成成熟脂肪细胞的重要标志基因。本研究结果显示,在鸡前脂肪细胞上敲除 *RB1* 基因之后,*G0S2*、*FAS*、*A-FABP* 基因的表达量都呈现下降的趋势。由此可以得出结论,在鸡前脂肪细胞敲除 *RB1* 基因减弱了前脂肪细胞分化成脂肪细胞的能力,即 *RB1* 基因促进鸡前脂肪细胞的分化。

为了检测 *RB1* 基因对鸡前脂肪细胞增殖的影响,通过 CCK-8 的方法发现敲除 *RB1* 基因促进鸡前脂肪细胞增殖,这与对鼠坐骨神经膜细胞的研究中发现干扰 *RB* 促进细胞增长的结果^[20] 是一致的。在哺乳动物中,*RB1* 主要通过 *E2F* 作用,调控细胞周期进程,从而调节细胞的增殖^[21]。由此猜测 *RB1* 基因对鸡前脂肪细胞增殖的抑制作用可能与其调节细胞周期的进程有关。本研究对细胞周期的检测结果表明,敲除 *RB1* 基因引起鸡前脂肪细胞中 G1 期细胞比例显著降低 ($P < 0.05$),G2 期细胞比例显著升高 ($P < 0.05$)。由此可以推测,鸡 *RB1* 基因对鸡前脂肪细胞的细胞周期进程具有一定的抑制作用。利用 qRT-PCR 的方法检测了细胞周期相关基因的表达情况。结果显示,增殖 24 h 时,敲除组的 *Cyclin D1* 的表达量极显著高于野生型组 ($P < 0.01$);增殖 24 h 时,敲除组的 *E2F1* 的表达量显著高于野生型组 ($P < 0.05$),在 96 h 时达到极显著水

平($P < 0.01$);增殖 24、48 和 72 h 时,敲除组的 *Ki67* 的表达量显著高于野生型组($P < 0.05$);增殖 24、48 和 72 h 时,敲除组的 *PCNA* 的表达量显著高于野生型组($P < 0.05$),在 96 h 时达到极显著水平($P < 0.01$)。 *Cyclin D1* 为细胞周期蛋白,是细胞 G1 期到 S 期的重要调控因子^[22], *E2F* 转录因子在调控细胞周期中也具有重要角色^[23-24], *Cyclin D1* 与 *E2F* 共同参与以 pRb 为主的细胞周期调控网络^[25]。 *Ki67* 和 *PCNA* 都是反映细胞增殖状态的良好指标^[26-27]。在鸡前脂肪细胞上敲除 *RB1* 基因之后, *CyclinD1*、*E2F1*、*Ki67*、*PCNA* 基因的表达量都呈现上升的趋势。由此可以得出结论,鸡 *RB1* 基因主要是通过抑制鸡前脂肪细胞的细胞周期进程,进而抑制鸡前脂肪细胞的增殖。

综上所述,本研究首次验证了 CRISPR/Cas9 系统在鸡这一物种上应用的可行性,即 CRISPR/Cas9 系统能够有效介导鸡细胞的基因敲除。另外,本研究发现 *RB1* 基因对鸡前脂肪细胞的分化具有促进作用,而对鸡前脂肪细胞的增殖具有抑制作用。本研究结果验证了笔者之前的 QTL 定位分析结果,同时为更加深入的研究 *RB1* 基因在鸡前脂肪细胞分化、增殖过程中所发挥的作用奠定了基础。

参考文献 (References):

- [1] LIU X, LI H, WANG S, et al. Mapping quantitative trait loci affecting body weight and abdominal fat weight on chicken chromosome one[J]. *Poult Sci*, 2007, 86(6):1084-1089.
- [2] LIU X, ZHANG H, LI H, et al. Fine-mapping quantitative trait loci for body weight and abdominal fat traits: effects of marker density and sample size[J]. *Poult Sci*, 2008, 87(7):1314-1319.
- [3] ZHANG H, ZHANG Y D, WANG S Z, et al. Detection and fine mapping of quantitative trait loci for bone traits on chicken chromosome one[J]. *J Anim Breed Genet*, 2010, 127(6):462-468.
- [4] HWANG W Y, FU Y, REYON D, et al. Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system [J]. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(3):227-229.
- [5] JINEK M, EAST A, CHENG A, et al. RNA-programmed genome editing in human cells[J]. *Elife*, 2013, 2:e471.
- [6] BARRANGOU R, FREMAUX C, DEVEAU H, et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes[J]. *Science*, 2007, 315(5819):1709-1712.
- [7] RAN F A, HSU P D, LIN C Y, et al. Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity[J]. *Cell*, 2013, 154(6):1380-1389.
- [8] GEURTS A M, COST G J, FREYVERT Y, et al. Knockout rats via embryo microinjection of zinc-finger nucleases[J]. *Science*, 2009, 325(5939):433.
- [9] CERMAK T, DOYLE E L, CHRISTIAN M, et al. Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting[J]. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39(12):e82.
- [10] CONG L, RAN F A, COX D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems[J]. *Science*, 2013, 339(6121):819-823.
- [11] WANG X, ZHOU J, CAO C, et al. Efficient CRISPR/Cas9-mediated biallelic gene disruption and site-specific knockin after rapid selection of highly active sgRNAs in pigs[J]. *Sci Rep*, 2015, 5:13348.
- [12] GU W, SCHNEIDER J W, CONDORELLI G, et al. Interaction of myogenic factors and the retinoblastoma protein mediates muscle cell commitment and differentiation[J]. *Cell*, 1993, 72(3):309-324.
- [13] BERMAN S D, YUAN T L, MILLER E S, et al. The retinoblastoma protein tumor suppressor is important for appropriate osteoblast differentiation and bone development[J]. *Mol Cancer Res*, 2008, 6(9):1440-1451.
- [14] SANKARAN V G, ORKIN S H, WALKLEY C R. Rb intrinsically promotes erythropoiesis by coupling cell cycle exit with mitochondrial biogenesis[J]. *Genes Dev*, 2008, 22(4):463-475.
- [15] CHEN P L, RILEY D J, CHEN Y, et al. Retinoblastoma protein positively regulates terminal adipocyte differentiation through direct interaction with C/EBPs[J]. *Genes Dev*, 1996, 10(21):2794-2804.
- [16] CLASSON M, KENNEDY B K, MULLOY R, et al. Opposing roles of pRB and p107 in adipocyte differentiation[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000, 97(20):10826-10831.
- [17] MA T, LOPEZ-AGUIAR A G, LI A, et al. Mice lacking G0S2 are lean and cold-tolerant[J]. *Cancer Biol Ther*, 2014, 15(5):643-650.
- [18] CUI H X, ZHENG M Q, LIU R R, et al. Liver dominant expression of fatty acid synthase (FAS) gene in two chicken breeds during intramuscular-fat development[J]. *Mol Biol Rep*, 2012, 39(4):3479-3484.
- [19] MOTOJIMA K. Differential effects of PPAR alpha

- activators on induction of ectopic expression of tissue-specific fatty acid binding protein genes in the mouse liver[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2000, 32(10): 1085-1092.
- [20] COLLINS M J, NAPOLI I, RIBEIRO S, et al. Loss of Rb cooperates with Ras to drive oncogenic growth in mammalian cells[J]. *Curr Biol*, 2012, 22(19): 1765-1773.
- [21] KREK W, EWEN M E, SHIRODKAR S, et al. Negative regulation of the growth-promoting transcription factor E2F-1 by a stably bound cyclin A-dependent protein kinase[J]. *Cell*, 1994, 78(1): 161-172.
- [22] COATS S, FLANAGAN W M, Nourse J, et al. Requirement of p27Kip1 for restriction point control of the fibroblast cell cycle [J]. *Science*, 1996, 272(5263): 877-880.
- [23] DU W, POGORILER J. Retinoblastoma family genes [J]. *Oncogene*, 2006, 25(38): 5190-5200.
- [24] SHERR C J. Cancer cell cycles[J]. *Science*, 1996, 274(5293): 1672-1677.
- [25] LI M, LOCKWOOD W, ZIELENSKA M, et al. Multiple CDK/CYCLIND genes are amplified in medulloblastoma and supratentorial primitive neuroectodermal brain tumor [J]. *Cancer Genet*, 2012, 205(5): 220-231.
- [26] SANCHEZ-MUNOZ A, PLATA-FERNANDEZ Y, JAEN A, et al. Proliferation determined by ki67 marker and pCR in locally advanced breast cancer patients treated with neo-adjuvant chemotherapy [J]. *Breast J*, 2013, 19(6): 685-686.
- [27] BROICH G, LAVEZZI A M, BIONDO B, et al. PCNA—a cell proliferation marker in vocal cord cancer. Part II: Recurrence in malignant laryngeal lesions [J]. *In vivo*, 1996, 10(2): 175-178.

(编辑 郭云雁)