



利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术敲除团头鲂 *socs1* 重复基因

赵心愉, 刘娟, 邹曙明*

(上海海洋大学, 农业农村部团头鲂遗传育种中心, 农业农村部淡水水产种质资源重点实验室
水产科学国家级实验教学示范中心, 上海 201306)

摘要: 以团头鲂细胞因子信号传导抑制蛋白 1 (SOCS1) 基因 *socs1a* 和 *socs1b* 为编辑对象, 在线分析并筛选出合适的靶点合成向导 RNA (guide RNA, gRNA), 然后对 1~2 细胞期的团头鲂胚胎进行 gRNA 和 Cas9 蛋白的混合注射。通过荧光定量 PCR 技术在转录水平检测 *socs1a* 和 *socs1b* 的表达, 并通过测序平台在 DNA 水平鉴定基因序列的突变, 成功建立了多种 *socs1* 的突变品系。与同期野生型 (WT) 相比, *socs1a* 突变杂合体 (SOCS1a^{+/-}) 和 *socs1b* 突变杂合体 (SOCS1b^{+/-}) 团头鲂生长性能增强、体质量显著增加, 同时炎症因子基因中肿瘤坏死因子 α 基因 (*TNF- α*) 和白细胞介素 6 基因 (*IL-6*) 表达量显著增加, 而白细胞介素 1 β 基因 (*IL-1 β*) 表达无明显变化。注射嗜水气单胞菌后, 与野生型不同的是, *IL-6* 和 *TNF- α* 在 SOCS1a^{+/-} 和 SOCS1b^{+/-} 团头鲂肝脏中的表达均有持续显著上升。本实验通过 CRISPR/Cas9 系统成功敲除了团头鲂 *socs1a* 和 *socs1b*, 为进一步探讨 *socs1* 的作用提供了一定的研究基础, 同时为 CRISPR/Cas9 基因编辑技术在养殖鱼类中的合理应用提供了依据和借鉴。

关键词: 团头鲂; CRISPR/Cas9; SOCS1; 基因编辑

中图分类号: Q 789; S 965.1

文献标志码: A

基因编辑技术是一项对基因组进行精确定点修饰的技术, 通过对特定的 DNA 片段进行敲除、加入和替换等, 实现基因组水平精准的基因编辑^[1]。不同于先前的转录激活样效应因子核酸酶 (transcription activator-like effector nuclease, TALEN) 技术^[2] 与锌指核酸酶 (zinc-finger nuclease, ZFN) 技术^[3], CRISPR/Cas9 系统仅需借助 Cas9 核酸酶和一个向导 gRNA (guide RNA), 由于其高效率、低成本和易于操作^[4] 而被广泛应用。细胞因子信号传导抑制因子 (suppressors of cytokine signaling, SOCS) 是由细胞产生并反馈性阻断细胞因子信号转导过程的负性调节因子。SOCS1 作为 SOCS 家族中的一员, 具有其家族相似的结构特征, 包

括位于中央的 SH2 结构域、位于 C 端的 SOCS 盒和一个可变的 N 端扩展的 SH2 子结构域, 这对于 SH2 结构域对目标磷酸肽的高亲和力受体有至关重要的作用^[5]。另外, SOCS1 中 SH2 结构域和激酶抑制区 (kinase inhibitory region, KIR) 结构作为假底物跟 JAK 激酶 (JAKs) 的催化位点结合, 是 SOCS 抑制 JAKs 活性的关键区域^[6]。SOCS1 蛋白广泛表达于各个组织中, 但表达量极低, 可以通过细菌或病毒感染或细胞因子治疗诱导而产生^[7]。

SOCS1 是 JAK/STAT 通路的一个重要负反馈调控蛋白, 可通过其 SH2 结构域结合到 JAK 催化结构域的 JH1 区的酪氨酸 (Tyr) 残基来抑制 JAKs

收稿日期: 2019-03-11 修回日期: 2019-05-17

资助项目: 国家自然科学基金 (31572220, 2012BAD26B00); 上海高校知识服务平台 (ZF1206)

通信作者: 邹曙明, E-mail: smzou@shou.edu.cn

活性,在细胞的生长、分化和免疫调节等方面发挥重要作用。SOCS1还通过其SH2结构域结合JAK2活化环,并通过特有结构KIR与JAKs发生竞争作用^[8-9]减少JAK2和STAT5磷酸化,从而对生长激素(growth hormone, GH)通路信号产生抑制作用,更有研究表明,SOCS1在小鼠(*Mus musculus*)中过量表达也许会造成GH信号通路活性彻底丧失^[10]。另外,延伸蛋白BC复合物和E3泛素连接酶可与SOCS1蛋白C端的SOCS盒相互作用,使JAK和STAT等通路蛋白通过泛素蛋白酶降解,从而调控机体的免疫反应^[11]。

SOCS1并不局限作用于经典的JAK/STAT信号通路,也同样对不会激活JAK/STAT通路的胰岛素和toll样受体信号转导细胞因子产生抑制作用^[12]。SOCS1在T细胞活化过程中强烈地调控白细胞介素(IL-2、IL-4、IL-12和IL-15)的产生^[13]。SOCS1能够损害抗病毒能力信号通路,在此过程中病毒使用SOCS1蛋白逃避机体免疫系统^[14]。目前虽已对几个硬骨鱼类的SOCS1进行了研究,但相较于哺乳动物,对非哺乳类脊椎动物SOCS1的结构、表达和生理功能却知之甚少。

团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)由于食性广、养殖成本低和成活率高等特点,已成为我国重要的草食性经济鱼类。本实验将高效基因编辑系统CRISPR/Cas9用于编辑*socs1a*和*socs1b*基因,对团头鲂阳性突变体筛选后,建立*socs1a*和*socs1b*基因敲除团头鲂模型,发现其对团头鲂的生长发育和炎症反应发挥重要作用,突变体的建立为进一步探索*socs1*基因的功能机制以及对团头鲂新品系的选育提供了基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物与材料

实验用团头鲂(团头鲂胚胎和3龄团头鲂),均取自上海滨海鱼类育种实验站。显微注射所用胚胎为人工受精所得,胚胎在室温(25±3)℃下孵化,为了防止缺氧死亡,每隔2~3h换水1次。取鲜活团头鲂剖杀后迅速将所取组织放置于含RNA store保存液的RNA free离心管中,以备后续提取总RNA。

总RNA提取试剂Trizol Reagent购自Life(美国)公司;反转试剂盒TaKaRa RNA PCR Kit (AMV) Ver.3.0、反转录酶Reverse Transcriptase M-MLV (RNase H-)、DNA Ladder Marker和pMD 19T克隆

载体购自宝生物工程(大连)有限公司;HIFenzyme Mix购于Thermo公司,18S rRNA通用引物购于生工生物工程(上海)股份有限公司;T4 DNA连接酶购于深圳中晶生物技术有限公司;BamH I和Xho I限制性内切酶购自New England Biolabs (NEB)公司。

1.2 *socs1a*和*socs1b*的序列保守性及功能位点分析

对获得的团头鲂*socs1a*和*socs1b*基因进行生物信息学分析,采用BLAST在线程序进行碱基序列的比对分析、运用Clustal W软件比对分析SOCS1a和SOCS1b氨基酸序列。

1.3 *socs1a*和*socs1b*靶位点检测及引物设计

用Ensembl genome browser在线工具查询内含子、外显子、5'/3'-非翻译区(untranslated region, UTR)以及起始密码子的位置。通过在线程序<https://crispr.mit.edu>设计待敲除基因的靶位点,将靶位点序列在NCBI数据库进行BLAST,确认是团头鲂基因组中的单一一位点,分别选取合适的靶点进行敲除。靶点的类型可分为两大类,即T7或SP6类型。T7启动子要求转录起始位点为GG,并且第3个碱基最好为G或A;SP6启动子则要求转录起始位点的前3位为GAA。为了扩大靶位点设计的范围,本实验选用T7类型的启动子。靶位点包含20个碱基,其中5'端为GG,有利于提高T7启动子的合成效率;紧邻靶点3'端的3个碱基构成PAM (protospacer adjacent motif)区,序列为NGG,其中N为任意碱基。

根据靶点位置设计目的基因敲除的PCR检测引物,与普通PCR引物相比还应满足的条件:在靶点附近设计引物,使其距离靶点两侧均大于100 bp,且PCR扩增产物不要超过500 bp,同时琼脂糖凝胶电泳为单一条带^[15]。

1.4 gRNA的制备和Cas9 mRNA的合成

以实验室保存的pMD19-gRNA scaffold质粒为模板,上游引物为含有T7启动子、gRNA靶点和scaffold的特异性引物,下游引物为通用引物transverse(表1),PCR扩增反应体系:HIF enzyme Mix 25 μL,上下游引物各1 μL(100 μmol/L),pMD19-gRNA scaffold质粒100 ng,补水至50 μL。反应条件:98℃预变性5 min;98℃变性10 s,66.4℃退火15 s,72℃延伸22 s,34个循环;

最后 72 °C 延伸 10 min。用 DNA-clean up kit 回收 PCR 产物后, 利用 T7 *In Vitro* Transcription Kit 体外转录 gRNA, 再用 Post-reaction clean up kit 纯化回收 gRNA, 琼脂糖凝胶电泳检测 gRNA 质量并测定浓度。Cas9 mRNA 通过 pT3TS-nCas9 质粒合成, 使用 mMES-SAGE mMACHINE T3 Transcription kit 转录体外转录 mRNA。Cas9 mRNA 原液冻存于 -80 °C 用于后续的显微注射。

1.5 团头鲂受精卵显微注射制备 F₀ 实验鱼

使团头鲂受精卵均匀黏附在塑料培养皿中, 将 Cas9 mRNA 和 gRNA 的混合溶液添加到显微注射针中, 并在团头鲂胚胎 1~2 细胞期进行注射。每个受精卵注射 1 nL 混合物 (Cas9 mRNA : gRNA = 9 : 1, V : V), 每个靶基因注射 200 枚受精卵, 同期未注射的 200 枚受精卵作为对照组。

1.6 靶点突变效率的检测

随机选取受精后发育到 48 h (48hpf) 的已注射的胚胎 (15 枚, 3 枚/管), 用碱裂解法提取团头鲂胚胎基因组: 将胚胎 (剥除细胞膜) 置于已预先加入 50 μL 50 mmol/L NaOH 的 EP 管中, 振荡离心, 95 °C 变性 10 min, 加入 5 μL 1 mol/L Tris-HCl, 离心 1 000 r/min 6 min, 使未溶解的胚胎位于底部。取上清液 DNA 1 μL 作为模板, 然后根据靶点设计的检测引物进行 PCR 后, 纯化 PCR 产物, 用 T7E1 核酸内切酶检测突变的靶点, 反应体系: PCR 产物 6 μL、Buffer 1.1 μL、DEPC 水 8.5 μL, 短暂振荡离心后 95 °C 加热 5 min; 等阶降温 (95~85 °C, 3 s/°C; 85~25 °C, 5 s/°C), 直至 4 °C, 全程总用时不超过 16 min, 然后加入 0.5 μL T7E1 酶于 37 °C 反应 40 min, 2% 琼脂糖凝胶电泳检测。选择敲除效率高靶点的进行后续更多的敲除, 以保证胚胎个体存活的数量以及提高基因编辑的效率。

1.7 *socs1a* 和 *socs1b* 打靶 F₀ 突变体的筛选

突变体与野生型的 F₀ 代幼鱼团头鲂 (未验证是否成功敲除的幼鱼) 利用同样大小的网箱进行同池饲养, 并待其成长至 3 月龄剪取尾鳍, 利用碱裂法提取基因组 DNA, 根据靶点设计的检测引物进行 PCR 后, 通过 T7E1 酶切法进行基因型检测, 发现潜在条带送至生工生物工程 (上海) 股份有限公司技术部进行测序, 同时与同池

饲养的野生型幼鱼进行序列比对, 利用 chromas 软件观察其峰值图确定突变类型, 筛选出 F₀ 杂合子。

1.8 攻毒实验

挑选出体质量为 30~50 g 野生型、*socs1a* 突变型和 *socs1b* 突变型团头鲂各 9 尾, 分别放置在 50 L 的水循环槽中, 腹腔注射 0.2 μL 感染浓度为 9×10^7 CFU/g 的嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*), 每组注射 9 尾团头鲂, 实验水温为 28 °C。分别在注射 0、6、12 h 时采集感染组团头鲂肝脏组织 (每组取 3 尾) 放于液氮中快速冻存, 分装后 -80 °C 冻存。

1.9 qRT-PCR 分析

用 TRIzol 裂解法提取野生型和突变体团头鲂肝脏组织的总 RNA, DNase 处理后, 用 Prime Script RT 试剂盒反转录出 cDNA 单链。内参基因采用的是 18S *rRNA* (表 1)。利用 SYBR Green Premix Ex Taq 在 CFX96 Touch real-time PCR 荧光定量仪进行 qRT-PCR 扩增。引物分别为 IL-1β-qRT-F/R, TNF-α-qRT-F/R^[16] 和 IL-6-qRT-F/R^[17] (表 1)。采用 ΔC_T 法进行相对定量分析, 攻毒之后的肝脏中白细胞介素-1β 基因 (*IL-1β*)、肿瘤坏死因子-α 基因 (*TNF-α*) 和白细胞介素-6 基因 (*IL-6*) 表达差异采用 *t* 检验的方法进行分析。qRT-PCR 所得数据用平均值 ± 标准差 (mean ± SD) 表示。

2 结果

2.1 *socs1a* 和 *socs1b* 的序列保守性及功能位点分析

对已获得的团头鲂 *socs1a* 和 *socs1b* 进行序列比对, 结果显示二者碱基序列相似度只有 45%, 但多肽比对结果相似度上升为 56%。运用 ClustalW 软件比对分析 SOCS1a 和 SOCS1b 氨基酸序列, 发现都拥有 SOCS 家族结构的 SH2 域和 SOCS 盒, 并且 SOCS1a 的 SH2 结构域与 SOCS1b 氨基酸相似度为 60%。除此之外, SOCS1s 成熟肽还含有特殊结构 KIR, 其氨基酸相似度极高 (图 1)。

2.2 gRNA 靶位点的选择以及检测引物设计

在 <https://crispr.mit.edu> 网页中可找到符合序列要求的若干靶点, 后在 NCBI 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 进行 BLAST 比对, 确认是团头

表 1 实验所用引物及其序列

Tab. 1 Primers used in this study

引物 primers	序列 (5'-3') sequences	用途 usage
SOCS1a-靶1-F	TAATACGACTCACTATAGGGAGGGTTCTGTGCTCACTGTTTTAGAGCTAGAAATAGC	gRNA模板扩增
SOCS1a-靶2-F	TAATACGACTCACTATAGGGTCCCATGACTGTAGAGGGTTTTAGAGCTAGAAATAGC	gRNA模板扩增
SOCS1b-靶1-F	TAATACGACTCACTATAGGCCCTGTGGCGCAACTGTAGTTTTAGAGCTAGAAATAGC	gRNA模板扩增
SOCS1b-靶2-F	TAATACGACTCACTATAGGAATGTGACCTCATCACCCGTTTTAGAGCTAGAAATAGC	gRNA模板扩增
transreverse	AAAAAAGCACCGACTCGGTGCCAC	gRNA模板扩增
SOCS1a-mu1F	TCGCTAAAACGACAGATGAACC	鉴定引物
SOCS1a-mu1R	TGTTGTCCTTTGTAACCTCAGCG	鉴定引物
SOCS1a-mu2F	GTTTCGATAATCCGTCTGCG	鉴定引物
SOCS1a-mu2R	ACAGAACCCTCCCCAGCG	鉴定引物
SOCS1b-mu1F	CAGAACCATTATCTATGCTTT	鉴定引物
SOCS1b-mu1R	CAGGAACGTCCCAAGAGG	鉴定引物
SOCS 1a-qRT-F	GGGTCCCATGACTGTAGAGG	qRT-PCR
SOCS 1a-qRT-R	GGGTCTGTGCTCACTTGGG	qRT-PCR
SOCS 1b-qRT-F	GGAATGTGACCTCATCACCC	qRT-PCR
SOCS 1b-qRT-R	TCAAGTAATTCACAGCCTGGGT	qRT-PCR
IL-1 β -qRT-F	TACGATAAGACCAGCACGAC	qRT-PCR
IL-1 β -qRT-R	TCGGTGATACATACGTGGAC	qRT-PCR
TNF- α -qRT-F	AAGAAAGTACAACCTGGGCTC	qRT-PCR
TNF- α -qRT-R	TTTTCTAATTTCAAGCCGCC	qRT-PCR
IL-6-qRT-F	ACAGCAGTATGGGGGAGTTAT	qRT-PCR
IL-6-qRT-R	TTCATCACGCAGAGTTTTAC	qRT-PCR
18S-qRT-F	ACCGCAGCTAGGAATAATGG	qRT-PCR
18S-qRT-R	GGTCGGAACCTACGACGGTAT	qRT-PCR

鲂基因组中的唯一位点，以防敲除其他基因。为使其基因功能基本丧失，尽可能选择编码区域的前端(图2)。检测引物根据引物要求设计(表1)，进行普通PCR后需得到单一条带，防止检测时假阳性的出现，筛选出PCR鉴定突变型的引物对为SOCS1a-mu1F/R，SOCS1a-mu2F/R，SOCS1b-mu1F/R，其中敲除*socs1b*的2个靶点共用1对检测引物。

2.3 48 hpf 靶点有效性的检测分析及突变率的检测

对提取的48 hpf胚胎基因组DNA进行PCR，扩增产物经纯化后进行T7E1酶切检测，使用BIO-RAD Image Lab软件分析，依据条带的灰度

计算突变率，计算公式：突变率(%)=突变型带/(野生型带+突变型带)。以此对*socs1a*和*socs1b*靶点进行筛选，最终得到效率较高的靶点。检验敲除效率样品中T7E1酶切效率较高的靶点是SOCS1a-靶2(酶切效率为35%)及SOCS1a-靶1(酶切效率为20%)，而SOCS1b效率较高的靶点是SOCS1b-靶2，酶切效率约为25%，SOCS1b-靶1的酶切效率为20%(图3)。因此后续选用敲除靶点是SOCS1a-靶2和SOCS1b-靶2。

2.4 *socs1a* 和 *socs1b* 打靶 F₀ 突变体的筛选

将3月龄已进行显微注射的团头鲂幼鱼进行检测，同时对所剪取尾鳍提取基因组DNA，经过PCR扩增后的产物后用T7E1酶进行酶切，

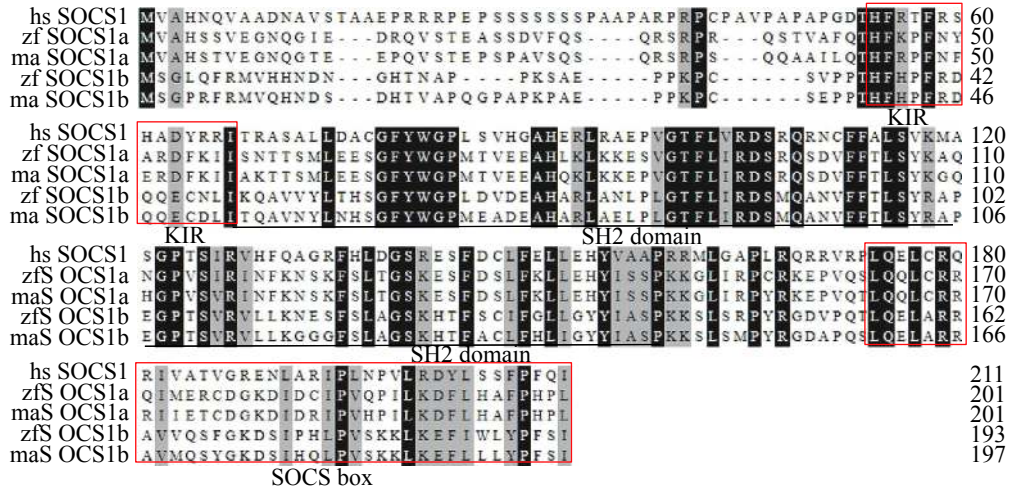


图 1 团头鲂 (ma) SOCS1a 和 SOCS1b 与人类 (hs) 和斑马鱼 (zf) 所对应氨基酸多序列的比对

Fig. 1 Alignment of (*M. amblycephala*) (ma) SOCS1a and SOCS1b amino acid sequences with *Homo sapiens* (hs) and *Danio rerio* (zf)

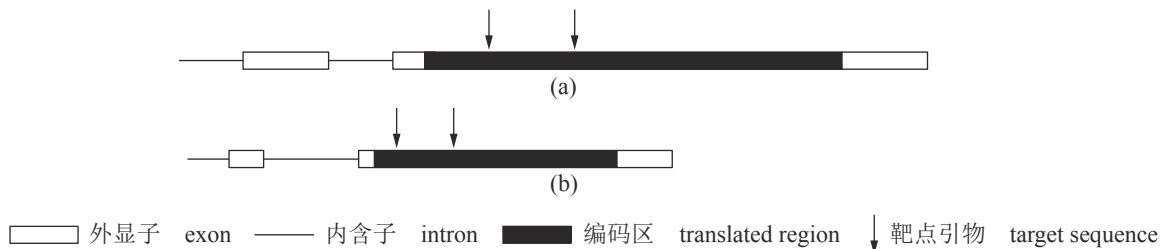


图 2 靶位点选择

Fig. 2 Schematic representation of *socs1* with target site

(a) *socs1a*, (b) *socs1b*

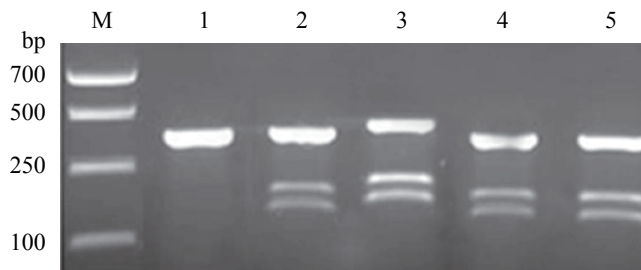


图 3 T7E1 酶切分析 sgRNA 基因编辑效率

M. DL 2000 marker, 1. 野生型, 2. SOCS1a-靶 1, 3. SOCS1a-靶 2, 4. SOCS1b-靶 1, 5. SOCS1b-靶 2

Fig. 3 T7E1 digestion analysis of indel efficiency

M. DL 2000 marker, 1. wild type, 2. SOCS1a-target1, 3. SOCS1a-target2, 4. SOCS1b-target1, 5. SOCS1b-target2

对潜在突变所对应的 PCR 产物进行测序。在注射 SOCS1a-靶 2 的 137 尾幼鱼中, 共有 42 尾在靶位点发生的不同类型的突变, 编辑效率为 30.65%; 在注射 SOCS1b-靶 2 的 143 尾幼鱼中, 发现 35 尾在靶位点出现不同类型的突变, 突变率为

24.48%, 突变类型 (表 2), 分析 *socs1a* 突变体的基因型, 其中发生缺失的共有 28 尾, 插入为 9 尾, 5 尾发生替换; 对 *socs1b* 突变体的基因型进行检测后, 发现其中发生缺失的有 24 尾, 插入为 5 尾, 6 尾发生替换。

表 2 *socs1a* 和 *socs1b* 敲除后 F₀ 代测序比对结果Tab. 2 The BLAST of sequence results of *socs1a* and *socs1b* mutants

名称 name	序列 sequences	数量/尾 number
SOCS1aWT	TATTGGGGTCCCATGACTGTAGAGGAGGCACATCA	95
a#1	TATTGGGGTCCCATGACTGTA -- GGAGGCACATCA	2
a#2	TATTGGGGTCCCATGACTGTAG -GGAGGCACATCA	3
a#3	TATTGGGGTCCCATG --- TAGAGGAGGCACATCA	15
a#4	TATTGGGGTCCCATGACTGT- -AGGAGGCACATCA	3
a#5	TATTGGGGTCCCATGAC-- -AGAGGAGGCACATCA	3
a#6	TATTGGGGTCCCATG----- -AGGAGGCACATCA	2
a#7	TATTGGGGTCCCATGACTG C TAGAGGAGGCACATCA	3
a#8	TATTGGGGTCCCATGACTGTA AT GAGGAGGCACATCA	2
a#9	TATTGGGGTCCCATGACTGTAGA ACTG AGGAGGCACATCA	4
a#10	TATTGGGGTCCCATGACTGTAG CGG AGGCACATCA	1
a#11	TATTGGGGTCCCATGACT GG AGGAGGCACATCA	4
SOCS1bWT	CCAGCAGGAATGTGACCTCATCACCCAGGCTG	108
b#1	CCAGCAGGAATGTGACCTCATC- - -CAGGCTG	3
b#2	CCAGCAGGAATGTGACCTCATC- -CCAGGCTG	1
b#3	CCAGCAGGAATGTGACCTCAT- - - -CAGGCTG	4
b#4	CCAGCAGGAATGTGACCTCATC- CCCAGGCTG	2
b#5	CCAGCAGGAATGTGA- CTCATCACCCAGGCTG	14
b#6	CCAGCAGGAATGTGACCTCATGCCACCCAGGCTG	3
b#7	CCAGCAGGAATGTGACCTCATCAAACCCAGGCTG	2
b#8	CCAGCAGGAATGTGACCTCATCA GCC AGGCTG	2
b#9	CCAGCAGGAATGTGACCTCA AT ACCCAGGCTG	4

注: SOCS1aWT为*socs1a*的野生型, a#1~ a#11为*socs1a*突变型; SOCS1bWT为*socs1b*的野生型, b#1~ b#9为*socs1b*突变型; - 表示碱基的缺失, 红色表示插入的碱基序列

Notes: SOCS1aWT is the wild type of *socs1a*, and a#1- a#11 is the mutation type of *socs1a*; SOCS1bWT is the wild type of *socs1b*, and b#1-b#9 is the mutant of *socs1b*; - represents base deletion, and red represents the inserted sequence of bases

在 *socs1a* 发生的突变类型中, a#3 突变类型的数量最多, 测序结果中, *socs1a* 在 G 和 T 之间 ACTG 被敲除 (图 4-a), a#3 突变类型数量最多; 在 *socs1b* 突变体中, b#5 突变类型数量最多, *socs1b* 中碱基 C 被删除 (图 4-b), 突变均引起编码的氨基酸发生改变, 且翻译提前终止, 影响 SOCS1 的结构, 破坏了 *socs1a* 和 *socs1b* 在机体内的功能。为了证实突变体 *socs1a* 和 *socs1b* 在团头鲂中被有效地敲除, 通过 qRT-PCR 检测目的基因的表达, 与野生型 (WT) 相比, *socs1a* 和 *socs1b* 的表达量明显减少, *socs1a* 的表达量降低 50%,

socs1b 的表达量降低 40% ($P < 0.05$), 表明敲除导致 *socs1a* 和 *socs1b* mRNA 的表达降低 (图 4-c, d)。

2.5 *socs1a* 和 *socs1b* 的敲除使团头鲂生长加快和炎症反应异常

对已经敲除成功的 42 尾 3 月龄 *socs1a* 突变杂合体 (SOCS1a^{+/-}) 和 35 尾 *socs1b* 突变杂合体 (SOCS1b^{+/-}) 团头鲂进行称量体质量, 同时以同池饲养的野生型团头鲂为对照, 结果发现, 突变体个体明显大于野生型 (图 5-a), 且型体质量和体长明显高于野生型 ($P < 0.05$) (图 5-b, c), 并且 SOCS1b^{+/-} 突变型体质量和体长高于 SOCS1a^{+/-} 突

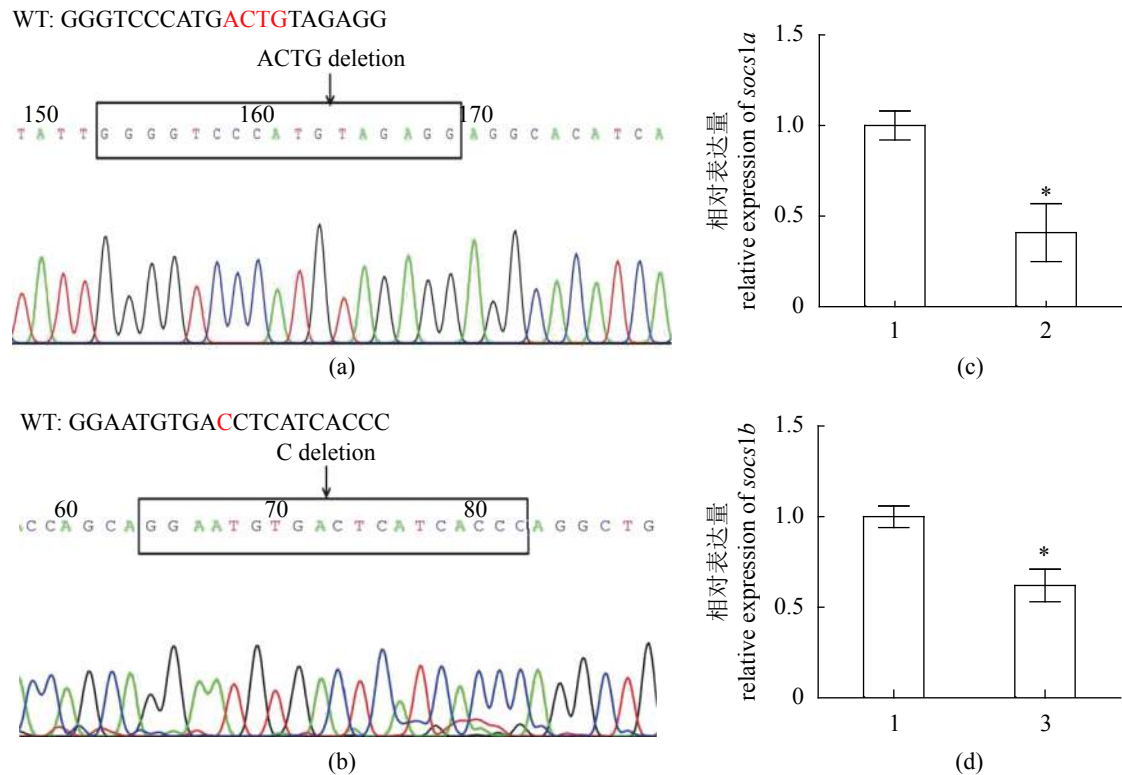


图 4 3 月龄基因编辑结果

(a) 敲除 *socs1a* 后 (a#3) PCR 产物测序峰图; (b) 敲除 *socs1b* 后 (b#5) PCR 产物测序峰图 (黑线标出靶点位置, 箭头表示突变位点); (c) *socs1a* 的 mRNA 水平; (d) *socs1b* 的 mRNA 水平, “*”表示差异显著 ($P<0.05$); 1. 野生型, 2. $SOCS1a^{-/-}$, 3. $SOCS1b^{-/-}$

Fig. 4 Results of gene-edited alleles

(a) sequencing peaks of PCR products after *socs1a* knock-out (a#3); (b) sequencing peaks of PCR products after *socs1b* knock-out (b#5) (black lines indicate position of target, arrows represent the mutation site); (c) expression level of *socs1a* mRNA in $SOCS1a^{-/-}$ and WT by qRT-PCR; (d) expression level of *socs1b* mRNA in $SOCS1b^{-/-}$ and WT by qRT-PCR “*” represents significant difference ($P<0.05$); WT. wild type, 1. WT, 2. $SOCS1a^{-/-}$, 3. $SOCS1b^{-/-}$

变型, 但并不显著 ($P>0.05$)。

为了检测团头鲂 *socs1a* 和 *socs1b* 的敲除对炎症反应的影响, 挑选同期健康的野生型和突变品系 a#3 和 b#5 (表 2), 利用 qRT-PCR 对典型炎症因子肿瘤坏死因子- α (TNF- α), 白细胞介素-1 β (IL-1 β) 和白细胞介素-6 (IL-6) 的基因表达进行分析, 虽然 IL-1 β mRNA 表达水平较野生型稍有变化, 但并不存在显著差异。但是, TNF- α 和 IL-6 mRNA 表达水平则有显著性升高 ($P<0.05$) (图 6-a)。对团头鲂个体用嗜水气单胞菌进行攻毒实验, 发现在使用浓度为 9×10^7 CFU/g 嗜水气单胞菌注射到团头鲂腹腔后, 肝脏中 IL-6 和 TNF- α 在此过程中转录水平较野生型发生变化: 在野生型团头鲂肝脏中 IL-1 β 表达量出现瞬时的增长后回落到最初值。与野生型不同, 2 个突变型中 IL-6 在 6 和 12 h 表达量显著增加出现逐步累加状态 ($P<0.05$), TNF- α 的表达与 IL-6 也呈现相似的趋势。

3 讨论

本实验利用 CRISPR/Cas9 技术, 构建团头鲂 *socs1a* 和 *socs1b* 基因的敲除品系, 得到有效敲除的团头鲂突变体。结果发现, 与野生型相比, 团头鲂 *socs1a* 基因杂合突变体和 *socs1b* 基因杂合突变体的生长性能都显著提高, 体质量显著增加。这种现象的产生可能与团头鲂 *socs1a* 和 *socs1b* 对生长有一定的抑制作用有关。在利用 TALEN 技术对斑马鱼 *socs1a* 基因敲除杂合子的研究中也得到了相似的结果, 表现为 *socs1a* 突变杂合体的体质量显著增加^[18]。已有研究证明, GH 作为调节机体生长、发育、增殖和分化的重要因子, 能够与靶细胞表面受体 GHR 结合, 使 JAK 磷酸化进而激活 STAT, 从而调控下游基因的转录表达, 以调节机体生长代谢^[19]。一项关于体外超表达的研究表明, SOCS1 通过对 STAT5 和 JAK2 的去磷酸化作用, 降低 STAT5 的 DNA

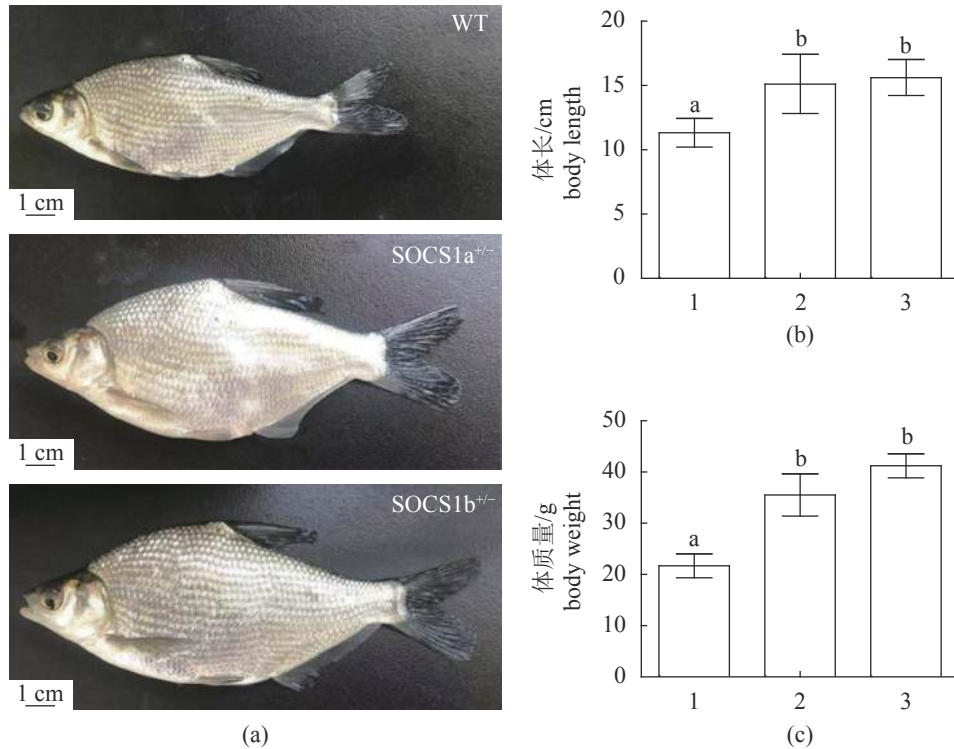


图 5 敲除个体生长异常

(a) 三月龄 SOCS1^{+/-}与 WT 典型个体的照片；(b) 三月龄 SOCS1^{+/-}与 WT 体长统计比较；(c) 三月龄 SOCS1^{+/-}与 WT 体质量统计比较；1. 野生型，2. SOCS1a^{+/-}，3. SOCS1b^{+/-}；不同字母标记的列数有极显著性差异 ($P < 0.01$)

Fig. 5 General phenotypic abnormality observed in mutations

(a) growth of SOCS1^{+/-} and WT at 3 month of age; (b) the body length of SOCS1^{+/-} and wild type at 3 months postfertilization; (c) the body weight of SOCS1^{+/-} and wildtype at 3 months postfertilization; 1. WT. 2. SOCS1a^{+/-}, 3. SOCS1b^{+/-}; columns marked with different letters are extremely significantly different $P < 0.01$

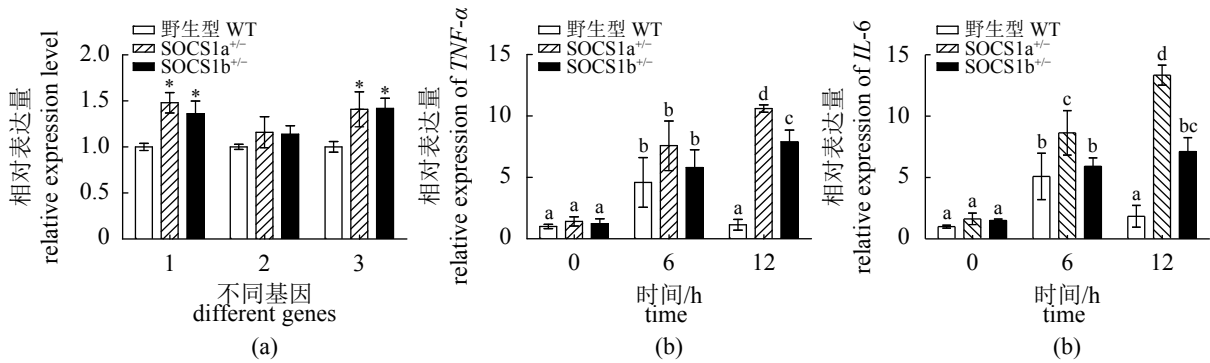


图 6 敲除重复基因 *socs1* 后团头鲂肝脏中 *TNF-α*、*IL-1β* 和 *IL-6* 表达的变化

(a) 健康状态下敲除 *socs1* 团头鲂后对肝脏中 *TNF-α*、*IL-1β* 和 *IL-6* 表达的影响；(b) 嗜水气单胞菌感染敲除 *socs1* 团头鲂后对肝脏中 *TNF-α* 表达的影响；(c) 嗜水气单胞菌感染敲除 *socs1* 团头鲂后对肝脏中 *IL-6* 表达的影响；1. *TNF-α*，2. *IL-1β*，3. *IL-6*；* 表示差异显著 ($P < 0.05$)，不同字母表示有极显著性差异 ($P < 0.01$)

Fig. 6 Changes of *TNF-α*, *IL-1β* and *IL-6* gene expression in the liver of blunt snout bream after knocking out the repetitive gene *socs1*

(a) effect of *TNF-α*, *IL-1β* and *IL-6* expression in liver of knock-out *socs1a* and *socs1b* *M. amblycephala* under good condition; (b) effect of *TNF-α* expression in liver of knock-out *socs1a* and *socs1b* *M. amblycephala* infected with *A. hydrophila*; (c) effect of *IL-6* expression in liver of knock-out *socs1a* and *socs1b* *M. amblycephala* infected with *A. hydrophila*; 1. *TNF-α*, 2. *IL-1β*, 3. *IL-6*; * represents significant difference ($P < 0.05$), columns marked with different letters are extremely significantly different ($P < 0.01$)

结合能力和 GH 依赖的受体活性, 表现出对 GH 信号的抑制作用^[20]。所以, SOCS1 作为 JAK/STAT 信号通路的重要负调控细胞因子, 敲除 SOCS1 可能会过度激活 JAK/STAT 通路以及减弱 GH 信号抑制, 导致团头鲂突变品系出现生长异常(加快)的现象。

在炎症反应过程中, 活化的单核巨噬细胞生成炎症因子, 它在炎症因子产生及代谢过程中处于中心地位, 而炎症因子的分泌也成为早期炎症反应的主要标志之一^[21]。为了探讨敲除 *socs1* 对团头鲂炎症因子的影响, 观察 3 个典型的炎症因子的表达。通过 qRT-PCR 发现, 在敲除 *socs1a* 和 *socs1b* 团头鲂中 *IL-6* 和 *TNF- α* 表达量都显著增加, 而 *IL-1 β* 无显著变化。SOCS1^{-/-} 小鼠在出生后 3 周内出现致死性新生综合征, T 淋巴细胞数量明显减少, 并因严重的炎症病变致死^[22]。证明了同哺乳动物一样, *socs1a* 和 *socs1b* 的敲除对团头鲂的炎症反应产生重要影响。

随后, 用嗜水气单胞菌对有效敲除 *socs1* 后的团头鲂个体进行攻毒实验, 发现 *socs1a* 和 *socs1b* 杂合突变体均显示 *IL-6* 和 *TNF- α* mRNA 水平持续增加, 表明 *socs1a* 和 *socs1b* 强烈抑制 *IL-6* 和 *TNF- α* 的表达。*TNF- α* 激活中性粒细胞和淋巴细胞, 增强吞噬细胞的吞噬作用和杀伤能力。*IL-6* 促进 B 细胞分化并产生抗体和 T 细胞增殖^[23]。*IL-1 β* 可以激活 T 细胞并促进 B 细胞的生长和分化^[24], 这对体内消除侵入的微生物感染和维持微生物环境的平衡很重要^[25]。促炎细胞因子 *IL-6*、*TNF- α* 和 *IL-1 β* 等在细胞损伤和炎症发生的过程中起重要作用^[26]。已有研究证明, 过量 SOCS1 会降低调节性 T 细胞中 *IL-12* 的表达, 巨噬细胞经脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 刺激后, SOCS1 的抑制蛋白 DNMT1 会激活 JAK2/STAT3 信号通路而受到明显影响, 并且抑制促炎因子 *IL-6* 和 *IFN- α* 的生成^[27]。促炎因子可以促进炎症反应, 但当其表达量过多会引起过度炎症反应, 导致机体内环境稳态破坏。SOCS1 作为 JAK/STAT 通路上的一个关键性负调控因素蛋白, 能抑制促炎性因子如肿瘤坏死因子 *TNF- α* 、白细胞介素 *IL-6* 和干扰素 *IFN- γ* ^[28]。本实验中, 通过使用嗜水气单胞菌对 *socs1a* 和 *socs1b* 敲除杂合系进行攻毒实验后, 导致其 JAK-STAT 通路被激活, 炎症因子 *IL-6* 和 *TNF- α* 增多, SOCS1 蛋白在感染过程中的任务是调节炎症反应, 同时维持炎症

反应的保护性反应。SOCS1 的缺少使其不能够被抑制, 而使炎症因子被过度升高, 造成炎症反应异常, 导致其机体的损伤。

本实验通过将特异性的 gRNA 和 Cas9 蛋白注射到已受精的单细胞期的团头鲂胚胎中, 成功编辑团头鲂 *socs1a* 和 *socs1b*, 并进行不同靶点的突变率的检测, 筛选出已经敲除成功的 *socs1a* 突变杂合体和 *socs1b* 突变杂合体, 此后将对敲除 *socs1* 团头鲂的杂合子 F₀ 进行雌核发育技术和自交, 筛选出纯合子后代, 进一步深入研究 *socs1* 的功能。

参考文献 (References):

- [1] 马琰岩, 李晶哲, 高尔宁, 等. 基因编辑技术的发展及其在中药研究中的前景展望[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(1): 34-40.
Ma Y Y, Li J Z, Gao E N, et al. Progress of gene editing technologies and prospect in traditional Chinese medicine[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2017, 42(1): 34-40(in Chinese).
- [2] Sun N, Zhao H M. Seamless correction of the sickle cell disease mutation of the *HBB* gene in human induced pluripotent stem cells using TALENs[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2014, 111(5): 1048-1053.
- [3] Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity[J]. *Science*, 2012, 337(6096): 816-821.
- [4] Bibikova, M, Beumer K, Trautman J K, et al. Enhancing gene targeting with designed zinc finger nucleases[J]. *Science*, 2003, 300(5620): 764.
- [5] 孙玉鸣, 徐春雷, 黄勇, 等. SOCS1 对炎症和辅助性 T 细胞作用的研究进展[J]. *医学研究与教育*, 2017, 34(3): 68-72.
Sun Y M, Xu C L, Huang Y, et al. Advances on SOCS1 on inflammation and T helper cells[J]. *Medical Research and Education*, 2017, 34(3): 68-72(in Chinese).
- [6] Krebs D L, Hilton D J. SOCS proteins: negative regulators of cytokine signaling[J]. *Stem Cells*, 2001, 19(5): 378-387.
- [7] Hebenstreit D, Luft P, Schmedlechner A, et al. IL-4 and IL-13 induce SOCS-1 gene expression in A549 cells by three functional STAT6-binding motifs located upstream of the transcription initiation site[J]. *The Journal of Immunology*, 2003, 171(11): 5901-5907.

- [8] Wakil S J, Abu-Elheiga L A. Fatty acid metabolism: target for metabolic syndrome[J]. *The Journal of Lipid Research*, 2008, 50(S1): S138-S143.
- [9] Jump D B, Clarke S D. Regulation of gene expression by dietary fat[J]. *Annual Review of Nutrition*, 1999, 19: 63-90.
- [10] Ram P A, Waxman D J. SOCS/CIS protein inhibition of growth hormone-stimulated STAT5 signaling by multiple mechanisms[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1999, 274(50): 35553-35561.
- [11] Alexander W S. Suppressors of cytokine signalling (SOCS) in the immune system[J]. *Nature Reviews Immunology*, 2002, 2(6): 410-416.
- [12] Kinjyo I, Hanada T, Inagaki-Ohara K, *et al.* SOCS1/JAB is a negative regulator of LPS-induced macrophage activation[J]. *Immunity*, 2002, 17(5): 583-591.
- [13] Davey G M, Heath W R, Starr R. SOCS1: a potent and multifaceted regulator of cytokines and cell-mediated inflammation[J]. *Tissue Antigens*, 2006, 67(1): 1-9.
- [14] Dimitriou I D, Clemenza L, Scotter A J, *et al.* Putting out the fire: coordinated suppression of the innate and adaptive immune systems by SOCS1 and SOCS3 proteins[J]. *Immunological Reviews*, 2008, 224(1): 265-283.
- [15] Ran F A, Hsu P D, Wright J, *et al.* Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system[J]. *Nature Protocols*, 2013, 8(11): 2281-2308.
- [16] Jiang H, Hu Y Z, Wei X L, *et al.* Chemotactic effect of β -defensin 1 on macrophages in *Megalobrama amblycephala*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2018, 74: 35-42.
- [17] Fu X Q, Ding Z J, Fan J, *et al.* Characterization, promoter analysis and expression of the interleukin-6 gene in blunt snout bream, *Megalobrama amblycephala*[J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2016, 42(6): 1527-1540.
- [18] Dai Z R, Wang H L, Jin X, *et al.* Depletion of suppressor of cytokine signaling-1a causes hepatic steatosis and insulin resistance in zebrafish[J]. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 2015, 308(10): E849-E859.
- [19] Figueiredo M A, Mareco E A, Silva M D P, *et al.* Muscle-specific growth hormone receptor (GHR) over-expression induces hyperplasia but not hypertrophy in transgenic zebrafish[J]. *Transgenic Research*, 2012, 21(3): 457-469.
- [20] Torisu T, Nakaya M, Watanabe S, *et al.* Suppressor of cytokine signaling 1 protects mice against concanavalin a-induced hepatitis by inhibiting apoptosis[J]. *Hepatology*, 2008, 47(5): 1644-1654.
- [21] Grayfer L, Hodgkinson J W, Belosevic M. Antimicrobial responses of teleost phagocytes and innate immune evasion strategies of intracellular bacteria[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2014, 43(2): 223-242.
- [22] Starr R, Metcalf D, Elefanty A G, *et al.* Liver Degeneration and lymphoid deficiencies in mice lacking suppressor of cytokine signaling-1[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1998, 95(24): 14395-14399.
- [23] Sawada S, Chosa N, Ishisaki A, *et al.* Enhancement of gingival inflammation induced by synergism of IL-1 β and IL-6[J]. *Biomedical Research*, 2013, 34(1): 31-40.
- [24] 乐海浪, 罗国强. 创伤后早期炎症因子TNF- α 、IL-1、IL-6的研究进展[J]. *现代诊断与治疗*, 2014, 25(4): 763-765.
- Le H L, Luo G Q. Research progress of early posttraumatic inflammatory cytokines TNF- α 、IL-1、IL-6[J]. *Modern Diagnosis & Treatment*, 2014, 25(4): 763-765(in Chinese).
- [25] 李学钊. 山羊白细胞介素-1 β 与白细胞介素-6的克隆表达及生物学活性研究 [D]. 南京: 南京农业大学, 2010.
- Li X Z. Cloning, expression and bioactivity analysis of goat interleukin-1 β and interleukin-6[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2010 (in Chinese).
- [26] Wilson M R, Choudhury S, Takata M. Pulmonary inflammation induced by high-stretch ventilation is mediated by tumor necrosis factor signaling in mice[J]. *American Journal of Physiology Lung Cellular and Molecular Physiology*, 2005, 288(4): L599-L607.
- [27] Lu L F, Boldin M P, Chaudhry A, *et al.* Function of miR-146a in controlling Treg cell-mediated regulation of Th1 responses[J]. *Cell*, 2010, 142(6): 914-929.
- [28] Fujimoto M, Naka T. Regulation of cytokine signaling by SOCS family molecules[J]. *Trends in Immunology*, 2003, 24(12): 659-666.

Knock-out analysis of duplicated *socs1* using CRISPR/Cas9 in *Megalobrama amblycephala*

ZHAO Xinyu, LIU Juan, ZOU Shuming*

(Genetics and Breeding Center for Blunt Snout Bream, Key Laboratory of Freshwater Aquatic Genetic Resources, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: In this study, the suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS1) genes *socs1a* and *socs1b* of *Megalobrama amblycephala* were used as genetic editing objects, and we screened out appropriate target synthetic guide RNA (gRNA) by online analysis. According to the mixture injection (gRNA and Cas9 protein) in the 1-2 cell stage embryos, the results of identifications of *socs1* expression level by qRT-PCR and gene mutants by sequencing showed that we successfully established *socs1* knock-out mutant. Compared with wild type, the growth performance and body mass of SOCS1a^{+/-} and SOCS1b^{+/-} were significantly increased, Meanwhile, the expression levels of inflammatory cytokines *TNF-α* and *IL-6* were significantly increased, while the expression levels of *IL-1β* were not changed. After *Aeromonas hydrophila* injection, in contrast to the wild type, significant increases in levels of *IL-6* and *TNF-α* mRNA were observed in both *socs1a* and *socs1b* heterozygous mutants. The duplicated *socs1* knock-out blunt snout bream has been successfully obtained by the CRISPR/Cas9 gene editing system, which provides a basis for further study of the *socs1* gene. Meanwhile, our experimental results will provide a basis and reference for the CRISPR/Cas9 gene editing techniques in other aquaculture species.

Key words: *Megalobrama amblycephala*; CRISPR/Cas9; SOCS1; gene editing

Corresponding author: ZOU Shuming. E-mail: smzou@shou.edu.cn

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (31572220, 2012BAD26B00); Shanghai University Knowledge Service Platform (ZF1206)