

金冰艳, 刘晓艺, 李浩然, 等. 微量电穿孔联合 CRISPR/Cas9 系统制备基因编辑猪胚胎 [J]. 畜牧与兽医, 2025, 57 (10): 1-9.

JIN B Y, LIU X Y, LI H R, et al. Preparation of gene-edited porcine embryos by micro electroporation combined with the CRISPR/Cas9 system [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2025, 57 (10): 1-9.

微量电穿孔联合 CRISPR/Cas9 系统制备基因编辑猪胚胎

金冰艳, 刘晓艺, 李浩然, 王雁, 程盼盼, 王若茜, 张运海, 李运生*

(安徽农业大学动物科技学院, 安徽 合肥 230031)

摘要: 电穿孔是一种高通量制备基因编辑胚胎的方法, 其操作简单但胚胎基因编辑效率较低。本研究通过改造制作了一个微量电穿孔槽用于胚胎电穿孔, 联合 CRISPR/Cas9 系统, 选取肌肉生长抑制素 (MSTN) 基因作为靶基因, 旨在探讨不同电穿孔参数下猪胚胎发育能力和基因编辑效率。结果: 改制后的微量电穿孔槽对胚胎发育无显著性影响, 但明显降低了电转的液体使用量; 比较不同电穿孔参数下的胚胎发育效率发现, 30 V-1 ms-4 次脉冲、25 V-2 ms-4 次脉冲和 25 V-3 ms-3 次脉冲对胚胎发育影响较低, 作为后续试验参数; 比较不同参数下电穿孔的编辑效率发现, 添加 Cas9 mRNA 不能获得基因编辑胚胎, 25 V-2 ms-4 次脉冲时添加 100 ng/ μ L Cas9 蛋白其基因编辑效率是 (59.29 \pm 7.67)%, 是获得基因编辑猪胚胎的最佳方案。本研究为电穿孔法制备基因编辑猪奠定了基础。

关键词: CRISPR/Cas9 系统; 电穿孔; 猪胚胎; MSTN 基因

中图分类号: S813.3 文献标志码: A 文章编号: 0529-5130(2025)10-0001-09

Preparation of gene-edited porcine embryos by micro electroporation combined with the CRISPR/Cas9 system

JIN Bingyan, LIU Xiaoyi, LI Haoran, WANG Yan, CHENG Panpan,

WANG Ruoqian, ZHANG Yunhai, LI Yunsheng*

(College of Animal Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei 230031, China)

Abstract: Electroporation is a high-throughput method to prepare gene-edited embryos, which is simple to operate but the efficiency of embryonic gene editing is still low. In this study, a micro electroporation tank was modified and fabricated for embryo electroporation, and the MSTN gene was selected as the target gene to explore the porcine embryo developmental ability and gene editing efficiency under different electroporation parameters. It was found that the modified micro electroporation tank did not obviously affect embryo development, but significantly reduced the amount of liquid used for electroporation. The results of comparing the efficiency of embryo development under different electroporation parameters showed that the three groups of 30 V-1 ms-4 pulses, 25 V-2 ms-4 pulses and 25 V-3 ms-3 pulses had a lower effect on embryo development, which were used for subsequent experimental parameters. The comparison of the editing efficiency of electroporation under different parameters revealed that gene-edited embryos could not be obtained with the addition of Cas9 mRNA under different parameters. The gene editing efficiency of 100 ng/ μ L Cas9 protein added at 25 V-2 ms-4 pulses was (59.29 \pm 7.67)%, which was the best protocol for obtaining gene-edited porcine embryos. This study laid a foundation for preparation of gene-edited pig embryos by electroporation.

Keywords: CRISPR/Cas9 system; electroporation; porcine embryo; MSTN gene

CRISPR/Cas9 技术属于第三代基因编辑技术, 作为目前研究最深入、应用最广泛的基因编辑系统, 已广泛应用于构建人类疾病模型、治疗基因疾病和农作物、畜禽改良等方面^[1-3]。基因编辑动物的产生主要依赖于体细胞核移植和显微注射技术, 这 2 种方法

对试验设备和研究人员的技术水平要求较高, 且通量较小。电穿孔法是利用电场作用, 瞬时提高胞膜的通透性, 使基因编辑试剂进入细胞或胚胎内^[4-6], 完成细胞或胚胎的基因编辑, 可以一次操作数十枚胚胎^[4], 大大提升工作效率, 为今后基因编辑规模化生产提供新的路径。但电穿孔法生产胚胎的发育效率严重依赖电穿孔参数, 而电穿孔参数是由电压强度、脉冲持续时间、脉冲数和脉冲间隔时间等因素决定的^[7-8]。胚胎基因编辑效率也受到基因编辑试剂浓度、受精卵大小和基因组激活时间等因素影响^[4]。

收稿日期: 2024-09-24; 修回日期: 2025-07-30

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (32272881)

第一作者: 金冰艳, 女, 硕士研究生

* 通信作者: 李运生, 博士, 教授, 主要从事动物胚胎工程方面的研究, E-mail: lys@ahau.edu.cn.

肌肉生长抑制素 (myostatin, MSTN) 又称为生长分化因子-8 (growth differentiation factor 8, GDF-8), 是一种由肌细胞产生和释放的蛋白质, 是肌肉生长发育及分化的负向调控因子; MSTN 基因失活或表达降低可以促进肌肉生长, 增加骨骼肌质量^[9]。MSTN 基因编辑猪已经广泛生产^[10], 在猪的育种中表现出较大的潜力。

本研究采用改制的微量电穿孔槽, 筛选适宜的电穿孔参数, 并比较不同电穿孔参数下添加 Cas9 mRNA 或 Cas9 蛋白对猪胚胎发育和编辑效率的影响, 以期建立一种简单高效获得基因编辑胚胎的方案, 为后续研究快速获得 MSTN 敲除猪奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

新鲜猪卵巢取自安徽省临泉县拾分味道食品有限公司屠宰场, 猪精液采自颍上县科繁畜禽改良服务站的成年杜洛克种公猪。

1.2 主要试剂

Opti-MEM I 减血清培养基、胎牛血清 (FBS) 和双抗 (penicillin streptomycin) 购自 Thermo Fisher 公司; 2×Rapid Taq Master Mix 和 MSTN 引物购自南京擎科生物科技有限公司; Guide-it sgRNA In Vitro Transcription Kit 试剂盒 (Code No. 632635) 体外转录试剂盒购自 TaKaRa 公司; Triton X-100、Percoll 细胞分离液和 10×PBS 购自北京索莱宝科技有限公司; Cas9 蛋白 (CP01-200) 购自 PAN Bio 公司; 其余试剂均购自 Sigma 公司。

1.3 自制电穿孔槽及其对猪体外受精胚胎发育的影响

目前可购得的融合槽容积约 70 μL (70 mm \times 1 mm), 可容纳约 100 枚细胞。电穿孔过程中, 铺满融合槽需要大量电穿孔液导致成本过高, 且微量融合槽在国内难以购得。因此, 本研究根据试验室内现有融合槽 (BTX, BTX 450-1), 将其改制为微量融合槽。将长度 70 mm 的融合槽使用树脂熔胶进行隔断, 隔成 5 个长约 10 mm \times 1 mm 的微量融合槽, 如图 1 所示。隔断融合槽时使用的树脂熔胶属于低生物接触毒性树脂, 对胚胎毒害作用较小。改制后的微量电穿孔槽每段可盛放约 10 μL 的电穿孔液, 最多可放置 30 枚猪受精卵。

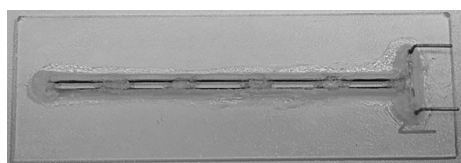


图 1 自制电穿孔槽结构

将对对照组的猪体外受精胚胎直接放入培养液中培养, 而处理组是将猪体外受精胚胎与体外培养液一同放入自制的电穿孔槽中 2 min 后再进行培养, 分析自制电穿孔槽对猪体外受精胚胎发育的影响。

1.4 sgRNA 设计及验证

使用 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 网站查询 MSTN 基因序列, 通过在线预测网站 CRISPOR^[11] (<http://crispor.tefor.net/>) 设计 sgRNA 序列并预测编辑效率及脱靶率等, 挑选出 3 条最合适的 sgRNA 序列。使用 Guide-it sgRNA In Vitro Transcription Kit 试剂盒 (Code No. 632635) 体外转录, 纯化后的 sgRNA 置于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冻存待后续使用。

将 sgRNA 和购买的 Cas9 mRNA 用 RNase-free Water 稀释并混合, 使其最终浓度为 sgRNA 25 ng/ μL , Cas9 mRNA 50 ng/ μL 。根据显微注射针直径计算液体积量, 吸取 5 μL 左右注射液, 用固定针固定胚胎, 将 Cas9 mRNA 和 sgRNA 注射到胚胎胞质内。培养至囊胚阶段后收样测序, 统计 3 种 sgRNA 的编辑效率。

1.5 卵母细胞体外成熟及体外受精

参照许腾腾^[12]的方法进行卵母细胞体外成熟培养和体外受精。将收集的卵丘-卵母细胞复合体 (COCs) 置于成熟培养基中, 每孔含有 400 μL 成熟培养液并在其中放入 100 个 COCs 后覆盖石蜡油, 在 38.5 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 、饱和湿度培养箱中体外成熟培养 (42 \pm 2) h。将成熟后 COCs 周围的卵丘细胞去除, 对 M II 期卵母细胞进行体外受精, 受精完成后对猪体外受精胚胎进行电穿孔。

1.6 猪体外受精胚胎电穿孔

将 Opti-MEM I、sgRNA 和 Cas9 mRNA 或 Cas9 蛋白按体积 1 : 1 : 1 进行混合, 使 sgRNA 和 Cas9 mRNA 或 Cas9 蛋白最终浓度为 100 ng/ μL 。将体外受精后的胚胎在 PZM-3 液滴内恢复 1 h 后, 用预热好的 Opti-MEM I 减血清培养基洗涤 3 次, 然后将胚胎排列在含有 10 μL 电穿孔液的电穿孔槽内, 施加不同电穿孔参数对胚胎进行电穿孔。将电穿孔后的胚胎快速用 PZM-3 液滴洗涤 3 次, 移到覆盖石蜡油的 PZM-3 液滴中, 置于 38.5 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 、饱和湿度培养箱中培养。

1.7 基因编辑效率的检测

在 NCBI 网站上面查询猪 MSTN 基因序列 (NCBI Gene ID: 399534) 并根据其序列对 MSTN 基因第二外显子靶向片段设计扩增引物。试验中设计的上游引物为 MSTN-EXON2-F (5'-GCAAGTGAAGGAAA-ACCCAA-3'), 下游引物为 MSTN-EXON2-R (5'-CTGGTCCTGGAAGGTTACAG-3')。设计完成后送至

南京擎科生物科技有限公司进行引物合成,用于后续扩增囊胚中MSTN基因。

将添加Cas9 mRNA或Cas9蛋白后电穿孔的胚胎培养至囊胚阶段,提取囊胚基因组为模板,使用上述设计的引物对靶向片段进行扩增。PCR体系为:2×Rapid Taq Master Mix 酶 25.0 μL,上下游引物各1.0 μL,囊胚基因组DNA 3.0 μL, ddH₂O 20.0 μL。扩增程序:98℃预变性2 min;98℃变性10 s,55℃退火10 s,72℃延伸1 min,共45个循环;72℃延伸10 s。将PCR扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳鉴定,确定目的片段大小无误,随后将PCR原液送至测序公司进行Sanger测序。TIDE测序按照已公布的方法进行^[13],并根据网站提示建议进行操作。

1.8 DAPI染色计数

胚胎固定:待体外受精后的胚胎发育至第7天,挑选出囊胚,置于DPBS/PVP溶液中快速洗涤3遍,再置于4%PFA中固定15 min,用DPBS/PVP溶液再洗涤3次,每次5 min。

DNA染色:将固定后囊胚置于DAPI溶液中,避光孵育10 min后取出,用DPBS/PVP溶液洗涤3次,每次5 min。

封片:根据盖玻片的尺寸,在载玻片上点涂凡士林对应盖玻片的四角,在正方形中心加入5 μL抗淬

灭剂,将染色后的胚胎移入抗淬灭剂中;缓慢倾斜盖上盖玻片,从一侧轻压,并轻压盖玻片四边,使胚胎展开,并在盖玻片四周涂上指甲油进行固定封片。用记号笔在载玻片背面划出囊胚所在范围以便快速找到胚胎,在载玻片上标记好信息,避光保存。

1.9 数据分析

所有试验均重复3次以上,计算胚胎卵裂率、囊胚率、死亡率、编辑效率(突变样本数/总样本数×100%)、嵌合率(嵌合样本数/突变样本数×100%)。数据用“平均值±标准误”表示,使用Graphpad Prism 8、SPSS 26.0等软件对数据进行单因素方差分析和独立样本t检验, $P<0.05$ 表示差异显著。

2 结果与分析

2.1 自制电穿孔槽对猪体外受精胚胎发育的影响

将猪体外受精胚胎与体外培养液一同放入自制的电穿孔槽中2 min,统计胚胎发育能力。在自制电穿孔槽内放置2 min的处理组与对照组间的卵裂率、囊胚率和死亡率均无显著性差异。如图2所示,处理后胚胎的卵裂和囊胚的形态及大小与对照组无明显差异,且2组间胚胎的卵裂率、囊胚率和死亡率均无显著性差异。可初步说明自制的电穿孔槽对猪胚胎发育影响不大,可用于后续试验。

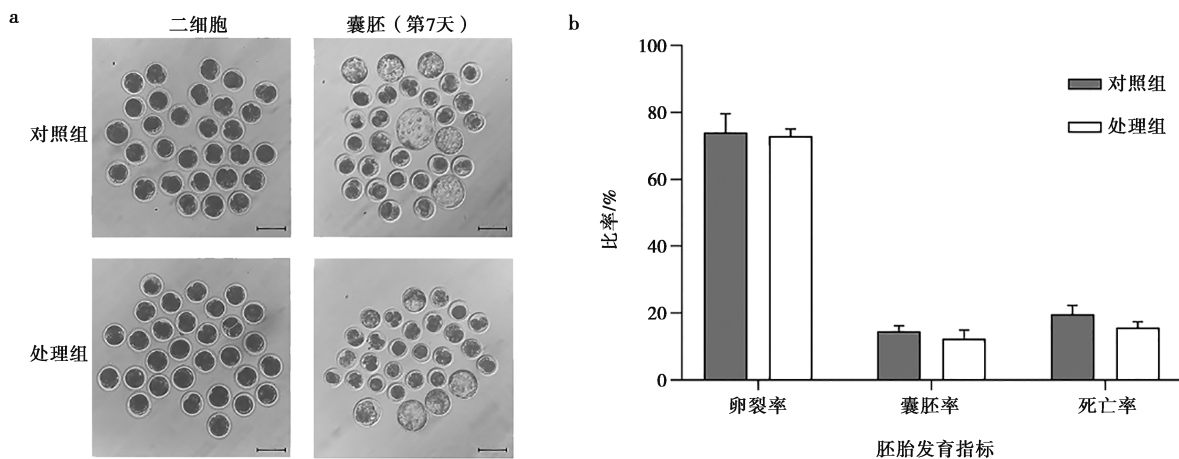


图2 自制电穿孔槽对猪体外受精胚胎发育的影响(标尺=100 μm)

2.2 sgRNA编辑效果验证

如表1所示,使用网站设计出靶向猪MSTN基因二号外显子的3条sgRNA序列,使用试剂盒对sgRNA进行体外转录及纯化。纯化后的sgRNA与试剂盒自带的Cas9蛋白对目的片段进行体外切割验证,确认3条sgRNA均能切开目的片段后,再通过显微

注射的方式在胚胎层面验证sgRNA的有效性。收集显微注射后的囊胚样本并进行Sanger测序,统计编辑效率,结果如表2所示。3种sgRNA对猪体外受精胚胎的基因编辑效率无显著性差异,后续试验中选取sgRNA 1与Cas9组分一起对猪体外受精胚胎进行基因编辑。

表 1 靶向猪 MSTN 基因第二外显子的 sgRNA 序列

sgRNA	序列 (5'→3')	位置/bp
sgRNA 1	AACCCATGAAAGACGGTACAAGG	159~183
sgRNA 2	AAAGACGGTACAAGGTATACTGG	168~190
sgRNA 3	TACCTGTACCGTCTTTCATGGG	162~184

表 2 不同 sgRNA 显微注射猪胚胎的编辑效率

sgRNA	重复数	样本数	编辑胚胎数	编辑效率/%
sgRNA 1	3	33	28	87.54±6.28
sgRNA 2	3	29	25	86.41±1.28
sgRNA 3	3	33	29	89.20±2.84

2.3 电穿孔基因编辑胚胎

2.3.1 电穿孔参数的获得

根据文献 [4], 选择脉冲电压为 25 或 30 V, 脉

冲持续时间为 1、2 或 3 ms, 脉冲次数为 3 或 4 次作为试验影响参数, 由这 3 组相关参数共同组合出 12 个电穿孔方案。以脉冲持续时间为主优化脉冲电压和脉冲次数, 将猪胚胎分别在这 12 组参数下进行电穿孔。不同电穿孔参数对胚胎发育情况的影响结果见表 3。脉冲持续时间为 1 ms 时, 各参数下胚胎的卵裂率、囊胚率和死亡率均无显著差异; 脉冲持续时间为 2 ms 和 3 ms 时, 电压和脉冲次数的增加导致胚胎的卵裂率和囊胚率下降, 死亡率升高并出现显著性差异。根据胚胎的发育情况及电穿孔基因编辑的原理, 选择 30 V-1 ms-4 次脉冲, 25 V-2 ms-4 次脉冲和 25 V-3 ms-3 次脉冲共 3 组电穿孔参数作为后续添加试验参数。

表 3 不同电穿孔参数下猪胚胎的发育情况

组别	重复数	培养数	卵裂率/%	囊胚率/%	死亡率/%	
对照	5	165	68.67±3.27	15.78±2.29	20.67±2.87	
25 V-3 次脉冲	5	158	69.64±5.15	18.41±3.16	17.25±4.82	
1 ms	30 V-3 次脉冲	5	157	75.07±3.66	16.56±3.11	16.02±3.01
25 V-4 次脉冲	6	191	74.08±5.16	15.89±3.39	16.95±4.59	
30 V-4 次脉冲	6	194	67.38±6.63	18.90±4.40	18.58±3.85	
对照	5	167	71.89±3.68 ^a	21.25±6.70 ^a	20.06±3.26	
25 V-3 次脉冲	3	105	53.50±5.62 ^{ab}	12.28±3.27 ^{ab}	40.73±8.68	
2 ms	30 V-3 次脉冲	3	103	45.28±12.92 ^b	3.90±0.99 ^b	45.83±17.95
25 V-4 次脉冲	6	208	60.15±7.24 ^{ab}	14.35±2.89 ^{ab}	32.62±6.19	
30 V-4 次脉冲	6	208	50.51±10.14 ^{ab}	9.27±3.20 ^{ab}	41.61±10.86	
对照	5	224	62.76±6.50 ^a	13.59±3.87 ^a	28.57±3.54 ^b	
25 V-3 次脉冲	8	263	77.31±3.71 ^a	14.31±2.69 ^a	13.97±2.39 ^b	
3 ms	30 V-3 次脉冲	6	201	62.41±5.46 ^a	9.12±1.26 ^{ab}	27.29±4.44 ^b
25 V-4 次脉冲	4	128	63.12±9.80 ^a	11.69±1.41 ^a	25.99±8.29 ^b	
30 V-4 次脉冲	4	128	33.87±5.33 ^b	3.19±1.36 ^b	50.69±7.15 ^a	

注: 相同脉冲时间下比较, 无字母或小写字母相同表示差异不显著 ($P>0.05$), 不同表示差异显著 ($P<0.05$)。

2.3.2 Cas9 mRNA 联合电穿孔生产基因编辑胚胎

为确定添加 Cas9 mRNA 和 sgRNA 对胚胎发育是否有影响, 比较 Cas9 mRNA 添加浓度分别为 0 和 100 ng/ μ L 时胚胎发育质量, 结果如表 4 所示。电穿孔参数为 25 V-3 ms-3 次脉冲时, 添加 100 ng/ μ L Cas9 mRNA 后胚胎的卵裂率、囊胚率和死亡率均极显著低于 0 ng/ μ L ($P<0.05$); 其余相同电穿孔参数下添加浓度为 100 或 0 ng/ μ L 的 Cas9 mRNA 时, 胚胎的卵裂率、囊胚率和死亡率均无显著性差异。初步证明, 除 25 V-3 ms-3 次脉冲试验组添加 Cas9 mRNA 会影

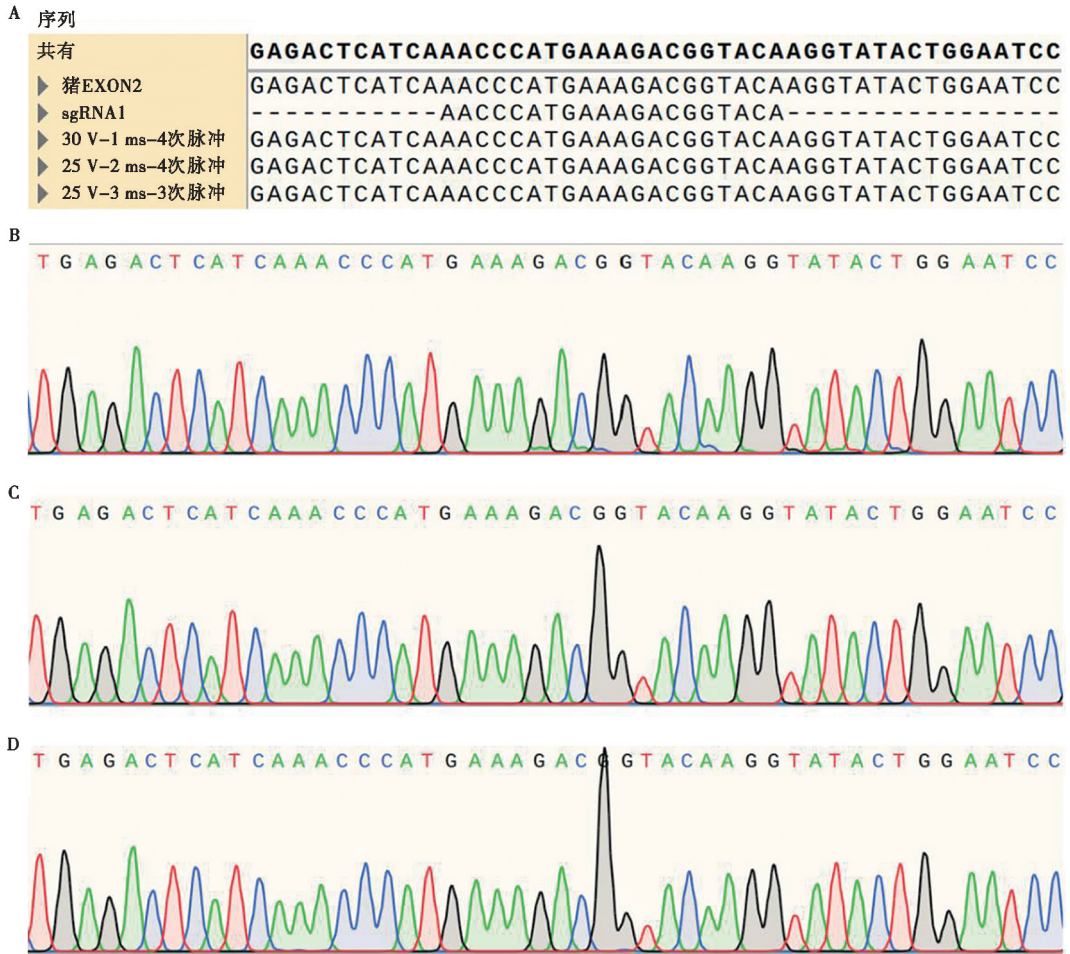
响胚胎发育外, 添加 Cas9 mRNA 和 sgRNA 对其余电穿孔组胚胎的发育能力无显著影响。

如图 3 所示, 收集囊胚样本进行 Sanger 测序后发现, 3 组电穿孔参数的编辑效率均为 0, 3 组添加浓度为 100 ng/ μ L Cas9 mRNA 后电穿孔得到的囊胚测序结果均未发现碱基插入、缺失或替换。初步证明在本试验电穿孔参数下, 添加 100 ng/ μ L 的 Cas9 mRNA 进行猪体外受精胚胎电穿孔基因编辑的效果不佳。

表 4 添加 Cas9 mRNA 电穿孔猪胚胎的发育效率

组别	Cas9 mRNA 浓度/ (ng · μL ⁻¹)	卵裂率/%	囊胚率/%	死亡率/%
30 V-1 ms-4 次脉冲	0	72.93±2.62	25.30±4.08	13.94±4.88
	100	64.44±6.76	22.22±2.94	23.33±1.93
25 V-2 ms-4 次脉冲	0	80.42±7.09	15.80±6.42	11.81±0.70
	100	73.22±8.72	21.92±8.13	11.12±5.72
25 V-3 ms-3 次脉冲	0	77.03±6.09 ^a	16.90±3.84 ^a	12.35±3.30 ^b
	100	16.49±4.36 ^b	3.16±1.35 ^b	71.06±0.93 ^a

注：同组不同 Cas9 mRNA 浓度间比较，小写字母不同表示差异显著 ($P < 0.05$)。



A. 添加 Cas9 mRNA 电穿孔后胚胎序列对比；B. 30 V-1 ms-4 次脉冲组 MSTN-KO 胚胎峰图；C. 25 V-2 ms-4 次脉冲组 MSTN-KO 胚胎峰图；D. 25 V-3 ms-3 次脉冲组 MSTN-KO 峰图。

图 3 添加 Cas9 mRNA 电穿孔后猪胚胎的序列对比

2.3.3 Cas9 蛋白联合电穿孔生产基因编辑胚胎

同理，先确定添加 Cas9 蛋白和 sgRNA 对胚胎发育是否有影响，试验结果如表 5 所示。电穿孔参数为 30 V-1 ms-4 次脉冲、25 V-2 ms-4 次脉冲或 25 V-3 ms-3 次脉冲时，不同 Cas9 蛋白浓度试验组的卵裂率、囊胚率和死亡率均无显著性差异。初步说明，添加 Cas9 蛋白和 sgRNA 对电穿孔组胚胎发育能力无显著影响。

由表 6 可知，30 V-1 ms-4 次脉冲组编辑效率最低，25 V-2 ms-4 次脉冲组的编辑效率最高。30 V-1 ms-4 次脉冲组的编辑效率显著低于 25 V-2 ms-4 次脉冲组 ($P < 0.05$)，而与 25 V-3 ms-3 次脉冲组的编辑效率无显著性差异，且 25 V-2 ms-4 次脉冲组与 25 V-3 ms-3 次脉冲组的编辑效率间也没有显著性差异。囊胚样本 Sanger 测序表明 (图 4)，3 组电穿孔参数下添加 Cas9 蛋白的囊胚测序峰图杂峰明显；

对比碱基序列发现，编辑胚胎的碱基序列出现了不同程度的插入、缺失或替换。使用在线网站 TIDE (<http://shinyapps.datacurators.nl/tide-batch/>) 对样本测序结果进行质量检测 and 拆峰，获得每个样本突变频

谱图后，统计出现 3 个及以上显著突变基因型，判定为嵌合样本。分析 MSTN-KO 胚胎样本的基因型后统计嵌合率发现，各组间嵌合率无显著性差异 (表 6)。

表 5 添加 Cas9 蛋白电穿孔猪胚胎的发育效率

组别	Cas9 蛋白浓度/ (ng · μL ⁻¹)	卵裂率/%	囊胚率/%	死亡率/%
30 V-1 ms-4 次脉冲	0	71.82±6.03	22.68±2.75	16.49±3.96
	100	63.33±1.93	20.00±1.92	22.22±2.94
25 V-2 ms-4 次脉冲	0	69.20±7.42	14.70±2.97	21.43±7.16
	100	73.24±8.00	17.44±0.68	22.45±7.95
25 V-3 ms-3 次脉冲	0	77.31±3.71	14.31±2.69	13.97±2.39
	100	70.66±4.56	17.36±1.83	19.65±3.05

表 6 添加 Cas9 蛋白电穿孔猪胚胎的编辑效率

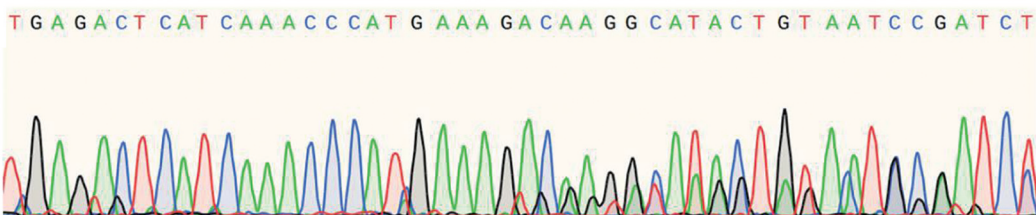
组别	重复数	样本数	编辑效率/%	嵌合率/%
30 V-1 ms-4 次脉冲	10	47	26.10±9.12 ^b	47.00±19.28
25 V-2 ms-4 次脉冲	10	49	59.29±7.67 ^a	37.14±13.69
25 V-3 ms-3 次脉冲	10	72	41.72±5.84 ^{ab}	43.81±10.29

注：同列比较，不同字母表示差异显著 (P<0.05)。

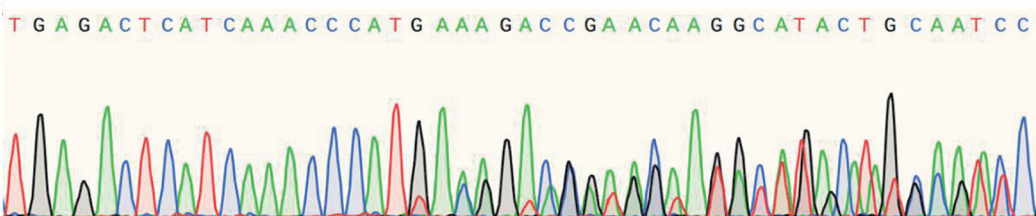
A 序列

共有	TGAGACTCATCAAACCCATGAAAGACGGTACAAGGNATACTGNAATCCGATC
猪EXON2	TGAGACTCATCAAACCCATGAAAGACGGTACAAGGTATACTGGAATCCGATC
sgRNA1	-----AACCATGAAAGACGGTACA-----
30 V-1 ms-4次脉冲	TGAGACTCATCAAACCCATGAAAGA-----CAAGGCATACTGTAATCCGATC
25 V-2 ms-4次脉冲	TGAGACTCATCAAACCCATGAAAGACCGAACAAGGCATACTGCAATCCGATC
25 V-3 ms-3次脉冲	TGAGACTCATCAAACCCATGAAAGACGGTGCAAGGTGTACTGCAATCCCAGC

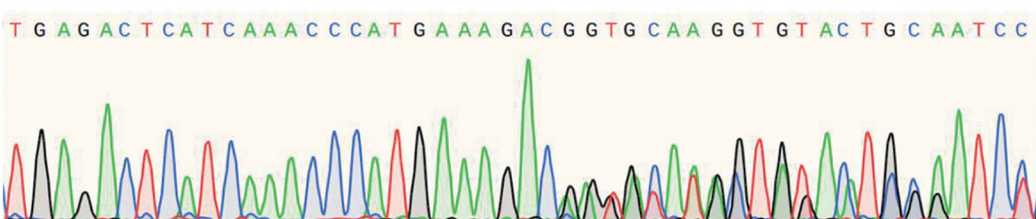
B



C



D



A. 添加 Cas9 蛋白电穿孔后胚胎序列对比; B. 30 V-1 ms-4 次脉冲组 MSTN-KO 胚胎峰图; C. 25 V-2 ms-4 次脉冲组 MSTN-KO 胚胎峰图; D. 25 V-3 ms-3 次脉冲组 MSTN-KO 胚胎峰图。

图 4 添加 Cas9 蛋白电穿孔后猪胚胎的测序结果

如图 5 和表 7 所示, 收集在不同参数下添加 Cas9 蛋白后电穿孔的囊胚进行染色, 统计囊胚细胞数。结

果显示不同电穿孔参数下囊胚的细胞数与对照组无显著性差异, 但均低于对照组。

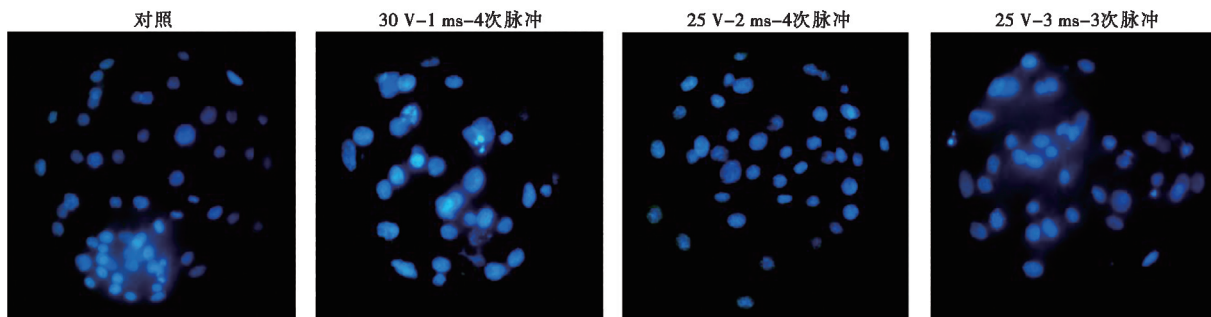


图 5 添加 Cas9 蛋白电穿孔猪囊胚的 DAPI 染色

表 7 添加 Cas9 蛋白电穿孔猪囊胚的细胞数

组别	囊胚细胞数/个
对照	47.00±3.21
30 V-1 ms-4 次脉冲	39.80±1.66
25 V-2 ms-4 次脉冲	42.60±4.12
25 V-3 ms-3 次脉冲	39.80±4.58

3 讨论

为检测自制的电穿孔槽对胚胎发育是否有不利的影响, 进行接触毒性试验。结果表明, 对照组和处理组胚胎的卵裂率、囊胚率和死亡率均无显著性差异, 试验组胚胎的卵裂率和囊胚率略低于对照组, 可能是由于试验组胚胎在进行体外操作时间大于对照组所致。初步说明自制电穿孔槽对猪胚胎发育影响不大, 可用于后续试验。

电穿孔法是通过高强度电场作用瞬时提高细胞膜的通透性。电穿孔的有效参数高度依赖于受精卵的种类, 因此需要优化每一个变量参数。在优化电穿孔条件时, 需要考虑电压、施加电压次数 (即脉冲数) 以及脉冲宽度 (脉冲持续时间)。有研究人员证明, 增加穿孔电压和脉冲次数可以增大膜孔密度, 增加脉冲持续时间可以增加膜孔形成的大小^[14-16]。Lin 等^[4]指出, 增加脉冲电压可以实现较高的突变率, 但胚胎发育能力也会随之下降; Nishio 等^[17]在相同脉冲次数和脉冲宽度条件下, 施加不同脉冲电压发现, 穿孔电压为 40 V 时的卵裂率和囊胚率显著低于脉冲电压为 30 V 时的电穿孔胚胎; 本研究结果与 Nishio 等^[17]研究结果相近, 穿孔电压为 30 V 的试验组胚胎存活率低于穿孔电压为 25 V 的试验组。Hirata 等^[18-19]通过研究发现, 增加脉冲次数会影响猪胚胎的囊胚率; 脉冲次数增加到 7 时, 囊胚率接近 0, 脉冲电压 30 V

脉冲数为 5 时, 囊胚率就出现了显著性下降。本研究结果表明, 脉冲持续时间为 3 ms 时, 4 次脉冲的存活率低于 3 次脉冲, 与上述试验结果相近。

Lin 等^[4]指出, Cas9 组分类别 (Cas9 蛋白或 Cas9 mRNA) 和浓度等均会影响基因编辑效率, 且由于递送方式不同, 获得相同基因编辑效率时所需的 Cas9 组分浓度不同。电穿孔基因编辑试剂通过临时微孔进入胚胎内发挥编辑作用, 这种递送方式导致进入胚胎中的基因编辑试剂量不确定。基因编辑效率在一定浓度内随着基因编辑组分浓度的上升而增加, 但是达到一个峰值后反而逐渐下降。大量研究表明^[20-24], 电穿孔基因编辑时, Cas9 mRNA 浓度约 100~400 ng/μL, Cas9 蛋白浓度约 50~200 ng/μL 可以获得基因编辑猪胚胎。综合考虑电穿孔基因编辑的原理和已报道的研究结果来看, 本研究最后选取添加 100 ng/μL 的 Cas9 mRNA 或 Cas9 蛋白进行基因编辑试验。

有研究表明, 在一定剂量和条件下, Cas9 mRNA 可以在胚胎中引起细胞毒性或胚胎发育异常; 这与 Cas9 mRNA 的浓度、编辑目标基因的选择、编辑时机等因素有关^[25-27]。本研究发现, 电穿孔参数为 25 V-3 ms-3 次脉冲时添加 100 ng/μL Cas9 mRNA 对胚胎发育出现负面影响。有研究指出, 添加 Cas9 mRNA 使用电穿孔法可获得约 70% 的编辑小鼠胚胎^[28]; Tanihara 等^[20]用该报道的参数添加 Cas9 mRNA 后对猪胚胎进行电穿孔, 只能获得 25% 的编辑猪胚胎。本研究在电穿孔液中添加 Cas9 mRNA 后施加筛选出的电穿孔参数对猪胚胎进行基因编辑, 均未出现基因编辑胚胎, 与 Tanihara 等^[20]研究结果相近, 说明 Cas9 mRNA 不适用于电穿孔基因编辑猪胚胎的制备。这与 Cas9 mRNA 自身性质有关: 首先, Cas9 mRNA 的内在稳定性相对较差; 其次, Cas9 mRNA 进入胚胎内需要进行翻译才能发挥功能, 过程中需要

启动子及密码子的优化等步骤；第三，Cas9 mRNA（约 1 500 kDa）远大于 Cas9 蛋白（160 kDa）^[20]，通过临时微孔进入胚胎内的含量也相对较少。Wang 等^[27]研究指出，直接递送 Cas9 蛋白可以减少与 Cas9 mRNA 递送相关的细胞毒性和不良影响，同时提高基因编辑效率。Liang 等^[26]通过研究人类三原核受精卵的基因编辑，暗示了直接递送 Cas9 蛋白可能在某些情况下降低细胞毒性和不良影响的反应。本研究发现，在 3 组电穿孔参数下添加 100 ng/ μ L Cas9 蛋白对胚胎发育无影响，与前人研究结果相同。Yamano 等^[29]发现，Cas9 蛋白分子量约为 160 kDa，远大于 Cas9 mRNA（约 1 500 kDa）的分子量^[30]，更易通过电场形成的膜孔进入受精卵中进行基因编辑。测序结果显示，添加 Cas9 蛋白后在 3 组电穿孔参数下均获得基因编辑胚胎，可能与 Cas9 蛋白分子量小有关。25 V-2 ms-4 次脉冲试验组的编辑效率显著高于 30 V-1 ms-4 次脉冲试验组，其余试验组间均无显著性差异。嵌合率分析表明，3 组间嵌合率无显著性差异，需要进一步试验挑选合适的电穿孔时间，以降低胚胎的嵌合率。

4 结论

本研究利用电穿孔技术与 CRISPR/Cas9 技术相结合，通过改制的微量电穿孔槽成功获得 MSTN 基因敲除猪胚胎。筛选出适宜的电穿孔参数 25 V-2 ms-4 次脉冲，并发现添加 100 ng/ μ L Cas9 蛋白更适合电穿孔胚胎编辑基因，是电穿孔基因编辑猪胚胎的最佳方案，为后续快速获得基因编辑猪奠定了研究基础。

参考文献：

- 曹慧, 韩博, 孙东晓. 基因编辑技术及其在畜禽遗传育种中的应用研究进展 [J]. 中国畜牧杂志, 2024, 60 (7): 6-12.
- 冯留锁, 任帅, 朱旭玲, 等. CRISPR/Cas9 基因编辑体系及其在作物育种中的应用 [J]. 河南科技学院学报 (自然科学版), 2022, 50 (4): 1-9.
- 张庆颜, 董小玉, 臧乃亮, 等. CRISPR/Cas9 系统在人类疾病中的研究应用进展 [J]. 分子诊断与治疗杂志, 2018, 10 (3): 206-211.
- LIN J C, VAN EENENNAAM A L. Electroporation - mediated genome editing of livestock zygotes [J]. Front Genet, 2021, 12: 648482.
- GEBOERS B, SCHEFFER H J, GRAYBILL P M, et al. High-voltage electrical pulses in oncology: irreversible electroporation, electrochemotherapy, gene electrotransfer, electrofusion, and electroimmunotherapy [J]. Radiology, 2020, 295 (2): 254-272.
- 姜爱文, 郭鸿运, 吴望军, 等. 利用 Cas9/sgRNA 体系提高猪胎儿成纤维细胞基因组编辑效率 [J]. 南京农业大学学报, 2023, 46 (3): 545-554.
- VERMA A, ASIVATHAM S J, DENEKE T, et al. Primer on pulsed electrical field ablation: understanding the benefits and limitations [J]. Circ Arrhythm Electrophysiol, 2021, 14 (9): e010086.
- 曾智杰. MSTN 基因编辑猪产肉性状和骨骼肌纤维类型研究 [D]. 合肥: 安徽农业大学, 2020.
- 杨鹏, 黄涛, 徐梦思. 肌肉生长抑制素基因在重要经济动物育种中的研究进展 [J]. 新疆农垦科技, 2023, 46 (5): 61-64.
- 金晨, 王若茜, 刘通, 等. Myostatin 基因编辑家畜研究进展 [J]. 黑龙江动物繁殖, 2022, 30 (5): 23-30.
- CONCORDET J P, HAEUSSLER M. CRISPOR: intuitive guide selection for CRISPR/Cas9 genome editing experiments and screens [J]. Nucleic Acids Res, 2018, 46 (W1): W242-W245.
- 许腾腾. HIPPO 信号效应蛋白 YAP 在猪早期胚胎发育中的作用 [D]. 合肥: 安徽农业大学, 2019.
- BRINKMAN E K, VAN STEENSEL B. Rapid quantitative evaluation of CRISPR genome editing by TIDE and TIDER [J]. Methods Mol Biol, 2019, 1961: 29-44.
- GOWRISHANKAR T R, ESSER A T, VASILKOSKI Z, et al. Microdosimetry for conventional and supra-electroporation in cells with organelles [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 341 (4): 1266-1276.
- KRASSOWSKA W, FILEV P D. Modeling electroporation in a single cell [J]. Biophys J, 2007, 92 (2): 404-417.
- SAULIS G, SAULÈ R. Size of the pores created by an electric pulse: microsecond vs millisecond pulses [J]. Biochim Biophys Acta BBA Biomembr, 2012, 1818 (12): 3032-3039.
- NISHIO K, TANIHARA F, NGUYEN T V, et al. Effects of voltage strength during electroporation on the development and quality of in vitro-produced porcine embryos [J]. Reprod Domest Anim, 2018, 53 (2): 313-318.
- HIRATA M, WITTAYARAT M, HIRANO T, et al. The relationship between embryonic development and the efficiency of target mutations in porcine endogenous retroviruses (PERVs) *Pol* genes in porcine embryos [J]. Animals (Basel), 2019, 9 (9): 593.
- HIRATA M, TANIHARA F, WITTAYARAT M, et al. Genome mutation after introduction of the gene editing by electroporation of Cas9 protein (GEEP) system in matured oocytes and putative zygotes [J]. In Vitro Cell Dev Biol Anim, 2019, 55 (4): 237-242.
- TANIHARA F, TAKEMOTO T, KITAGAWA E, et al. Somatic cell reprogramming-free generation of genetically modified pigs [J]. Sci Adv, 2016, 2 (9): e1600803.
- MIAO D, GIASSETTI M I, CICCARELLI M, et al. Simplified pipelines for genetic engineering of mammalian embryos by CRISPR-Cas9 electroporation [J]. Biol Reprod, 2019, 101 (1): 177-187.
- 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]. Anim Sci J, 2020, 91 (1): e13386.
- TANIHARA F, HIRATA M, NGUYEN N T, et al. Generation of PDX-1 mutant porcine blastocysts by introducing CRISPR/Cas9-

- system into porcine zygotes via electroporation [J]. Anim Sci J, 2019, 90 (1): 55-61.
- [24] TANIHARA F, HIRATA M, NGUYEN N T, et al. Efficient generation of GGTA1-deficient pigs by electroporation of the CRISPR/Cas9 system into *in vitro*-fertilized zygotes [J]. BMC Biotechnol, 2020, 20 (1): 40.
- [25] KIM K, RYU S M, KIM S T, et al. Highly efficient RNA-guided base editing in mouse embryos [J]. Nat Biotechnol, 2017, 35 (5): 435-437.
- [26] LIANG P, XU Y, ZHANG X, et al. CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human tripronuclear zygotes [J]. Protein Cell, 2015, 6 (5): 363-372.
- [27] WANG W, KUTNY P M, BYERS S L, et al. Delivery of Cas9 protein into mouse zygotes through a series of electroporation dramatically increases the efficiency of model creation [J]. J Genet Genom, 2016, 43 (5): 319-327.
- [29] YAMANO T, NISHIMASU H, ZETSCHKE B, et al. Crystal structure of Cpf1 in complex with guide RNA and target DNA [J]. Cell, 2016, 165 (4): 949-962.
- [30] LE Q A, TANIHARA F, WITTAYARAT M, et al. Comparison of the effects of introducing the CRISPR/Cas9 system by microinjection and electroporation into porcine embryos at different stages [J]. BMC Res Notes, 2021, 14 (1): 7.

· 信息 ·

《畜牧与兽医》入选《2024 中国农林核心期刊目录》A 类期刊

2024 年，“中国农林核心期刊”评价遴选持续以期刊发展核心指标的定量评价与学科专家定性评价为综合评价依据。在此基础上对我国 853 种中、英文农林领域期刊进行了全面梳理和科学分类评价，共遴选出中文期刊 280 种、英文期刊 34 种，共计 13 类 314 种，其中 A 类 247 种，B 类 67 种。《畜牧与兽医》入选《2024 中国农林核心期刊目录》A 类期刊。

