

• 生物技术与方法 •

CRISPR/Cas13 系统敲减 HEK293T 细胞 *ku70* 和 *lig4* 基因表达

王豪强¹, 李国玲¹, 黄广燕¹, 李紫聪¹, 郑恩琴¹, 徐铮¹, 杨化强^{1,2}, 吴珍芳^{1,2},
张献伟^{1,2}, 刘德武¹

1 华南农业大学 动物科学学院 国家生猪种业工程技术研究中心, 广东 广州 510642

2 温氏食品集团股份有限公司, 广东 云浮 527400

王豪强, 李国玲, 黄广燕, 等. CRISPR/Cas13 系统敲减 HEK293T 细胞 *ku70* 和 *lig4* 基因表达. 生物工程学报, 2020, 36(7): 1414–1421.

Wang HQ, Li GL, Huang GY, et al. Knockdown the expression of *ku70* and *lig4* in HEK293T cells by CRISPR/Cas13 system. Chin J Biotech, 2020, 36(7): 1414–1421.

摘要: 成簇的规律间隔的短回文重复序列 (Clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR)/CRISPR 相关蛋白 (CRISPR-associated proteins, Cas) 系统是目前基因编辑、基因表达研究的热点, 其中靶向 RNA 的 CRISPR/Cas13 系统的开发为 RNA 的干扰和编辑提供了新的方向。文中针对 HEK293T 细胞非同源末端连接 (Nonhomologous end joining, NHEJ) 通路修复关键因子 *Ku70* 和 *Lig4* 的编码序列, 设计并合成 CRISPR/Cas13a、b 系统相应的 gRNA, 检测其对 *ku70* 和 *lig4* 基因表达的影响。结果显示, Cas13a 对 *ku70* 和 *lig4* 的 RNA 敲减效果可以达到 50% 以上, Cas13b 对 *ku70* 和 *lig4* 的 RNA 敲减效果分别达到 92% 和 76%; 同时 Cas13a、b 系统能将 *Ku70* 和 *Lig4* 蛋白水平分别下调至 68% 和 53%。CRISPR/Cas13 系统可有效敲减 HEK293T 细胞 RNA 和蛋白质表达, 为基因功能和调控研究提供一种新的策略。

关键词: CRISPR/Cas13, *ku70*, *lig4*, 基因敲减

Received: November 1, 2019; **Accepted:** February 19, 2020

Supported by: National Transgenic Major Projects (No. 2016ZX08006002), Project of R & D Plan in Key Areas of Guangdong, China (No. 2018B020203002).

Corresponding authors: Dewu Liu. Tel: +86-20-85284816; E-mail: dwliu@scau.edu.cn

Xianwei Zhang. Tel: +86-766-2986345; E-mail: zxianw@163.com

国家转基因重大专项 (No. 2016ZX08006002), 广东省科技创新战略专项 (No. 2018B020203002) 资助。

Knockdown the expression of *ku70* and *lig4* in HEK293T cells by CRISPR/Cas13 system

Haoqiang Wang¹, Guoling Li¹, Guangyan Huang¹, Zicong Li¹, Enqin Zheng¹, Zheng Xu¹, Huaqiang Yang^{1,2}, Zhenfang Wu^{1,2}, Xianwei Zhang^{1,2}, and Dewu Liu¹

¹ National Engineering Research Center for Breeding Swine Industry, College of Animal Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, Guangdong, China

² Wens Foodstuff Group Co., Ltd, Yunfu 527400, Guangdong, China

Abstract: Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/CRISPR-associated proteins (Cas) system is a hotspot of gene editing and gene expression research, in which CRISPR/Cas13 system provides a new direction for RNA interference and editing. In this study, we designed and synthesized the corresponding gRNAs of CRISPR/Cas13a and CRISPR/Cas13b systems in non-homologous end joining (NHEJ) pathway, such as Ku70 and Lig4, and then detected the expression of *ku70* and *lig4* in HEK293T cells. The CRISPR/Cas13a system could efficiently knockdown the mRNA expression of *ku70* and *lig4* more than 50%, and CRISPR/Cas13b system also suppressed *ku70* and *lig4* about 92% and 76%, respectively. Also, CRISPR/Cas13a, b systems could down-regulate Ku70 and Lig4 proteins level to 68% and 53%, respectively. The study demonstrates that the CRISPR/Cas13 system could effectively knockdown the expression of RNA and protein in HEK293T cells, providing a new strategy for gene function and regulation research.

Keywords: CRISPR/Cas13, *ku70*, *lig4*, gene knockdown

CRISPR/Cas 系统是来源于细菌与古菌的一种后天免疫防御系统, 主要用于防止外来质粒或噬菌体的侵入^[1], 其中 II CRISPR/Cas9 系统能对基因组 DNA 实现精确编辑, 目前已被广泛应用于农业生产及医学领域^[2]。最近研究发现一种新型的靶向 RNA 的 CRISPR 蛋白 Cas13, 它的发现及开发为人类干扰和编辑 RNA 提供更便捷的方法。Cas13 属于 2 类 VI 型 CRISPR 关联蛋白家族, 该蛋白目前共发现 4 种亚型, 分别是 Cas13a (也称作 C2c2)、Cas13b、Cas13c 和 Cas13d^[3]。与 CRISPR/Cas9 类似, VI 型 CRISPR 系统含有一个效应蛋白即 Cas13 蛋白, 它与 CRISPR RNA (crRNA) 结合后形成一个 crRNA 引导的 RNA 靶向复合物^[4-7]。截至目前, 所发现的 Cas13 蛋白均有两个截然不同的核糖核酸酶活性。其一, 主要用于 pre-crRNA 的加工, 有利于 VI 型干扰复合物的形成; 其二, 由两个高等真核和原核核酸结合结构域 (Higher eukaryotes and prokaryotes nucleotide-binding domain, HEPN) 提供, 是病毒干扰过程中降解外来 RNA 的关键。另外, 除了

Cas13 蛋白外, 部分 VI 型系统拥有额外的附属蛋白, 这些蛋白是非必需的, 但具有调节干扰效果的活性^[5-6]。IV-B 和 VI-C 系统缺乏适应性基因 *cas1* 和 *cas2*, 说明它们可能利用同一基因组内的其他 Cas 位点获取适应模块, 或者丢失适应模块, 不再需要获取新的原始间隔序列。特别地, Cas13b 存在两种亚型 VI-B1 和 VI-B2, 其中 VI-B1 系统拥有一个额外的开放阅读框 Csx28, 它编码一种小蛋白, 该小蛋白带着一个假定的跨膜结构域(或信号肽) 和一个发散的 HEPN 结构域; VI-B2 系统拥有一个不同的开放阅读框 Csx27, 它编码一种包含 3-4 个可预测的跨膜结构域。VI-D 系统具有更小的 Cas13 蛋白, 并且携带一个与原核防御系统有关的 WYL 结构域附属蛋白。张锋实验室根据 Cas13 蛋白靶向 RNA 的性质, 设计并开发了靶向 RNA 的 CRISPR/Cas13a、b 系统^[8], 通过设计 28/30 nt 的 RNA 互补序列, 可以实现特异性切割靶 RNA 和非特异性切割周围环境的 RNA。研究表明, 来源于纤毛菌属 *Leptotrichia wadeii* 的 LwaCas13a 具有 50% 左右的 RNA 敲减水平^[8], 来

源于普氏菌属 (*Prevotella* sp. P5-125) 的 PspCas13b 在萤火虫素酶报告载体上具有 90%–95% 的 RNA 敲减水平^[9]。相对传统的 RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 技术, CRISPR/Cas13 系统具有更好的专一性和更低的脱靶效应^[8-11]; 相对于 CRISPR/Cas9 等 DNA 编辑工具, RNA 水平的编辑避免了任何由于对遗传基因组 DNA 操作所引发的脱靶效应的担忧, 为基因编辑器的改造和疾病的治疗提供了多种可选择的高效手段。

本课题组前期研究发现 RNA 干扰 NHEJ 关键因子 Ku70、Ku80、PNKP、Lig4 等可显著提高猪原代成纤维细胞的同源定向修复 (Homology-directed repair, HDR) 效率^[12-13], 同时 CRISPR 干扰 Ku70 和 Ku80 同样能够显著提高 HDR 编辑效率^[14-15]。因此, 本研究尝试利用 CRISPR/Cas13a、b 系统特异性敲减 HEK293T 细胞 *ku70* 和 *lig4* 基因表达, 为提高 HDR 效率提供一种新的策略, 为 CRISPR/Cas13 蛋白的研究提供经验。

1 材料与方法

1.1 材料

Cas13a 系统 (#91906 和 #91924)、Cas13b 系统 (#103854 和 #103862) 和 mCherry2-C1 质粒 (#54563) 均来源于美国 Addgene。HEK293T 购自美国标准生物制品收藏中心 (#ATCC ACS-4500)。

1.2 Cas13a、b 系统构建

针对人 *ku70* (GeneID: 2547) 和 *lig4* (GeneID: 3981) 2 个基因的 CDS 序列分别设计对应的 gRNA (表 1 和表 2), 并由北京六合华大基因科技有限公司合成 gRNA oligo 引物。参考 Thermo Fisher Scientific 的 Fast Digest *Bpi* I 说明书线性化 Cas13a、b 的 U6 质粒。将上述合成的引物退火后与线性化的 U6 质粒 16 °C 过夜连接, 详细体系见 TaKaRa T4 DNA Ligase (#2011A) 说明书。将连接好的环状 DNA 转化到大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5 α 感受态细胞中, 并划线涂板。第 2 天将扩大培养的单克隆菌落 (Amp^R) 进行 Sanger 测序,

测序引物为 U6 (human): CCGTAACTTGAAAGT ATTTTCG, 将测序正确的菌液在氨苄青霉素终浓度为 100 μ g/mL 的 LA 培养基中扩大培养, 并用 Omega bio-tek 公司的 Endo-Free Plasmid Mini Kit II (#D6950) 进行质粒抽提备用, 为后续 HEK293T 细胞转染做准备。

表 1 Cas13a 和 Cas13b 靶向 *ku70* 的 gRNA 序列
Table 1 Cas13a and Cas13b target gRNA sequence of *ku70*

| System | Items | Sequence (5'–3') |
|--------|-------|------------------------------------|
| Cas13a | g1 | GCCTCCAAGGCTATGTTTGAATCTC AGA |
| | g2 | GAGCATCCAGTGTATCCAAAGTGTG TAC |
| | g3 | GATCTCTGGCTGTGGTGTCTATG GTA |
| Cas13b | g1 | GAATATTTATAGTCTCCACTTGCTTC AAGG |
| | g2 | ATCAAATCTCTTCTCCTGAATATTT ATAG |
| | g3 | GAGATTCAAACATAGCCTTGGAGG CATCAA |
| | g4 | GTCAAAGGTGTCAACTCATCTTC ACTCTG |
| | g5 | GTACACACTTTGGATACACTGGATG CTCAT |
| | g6 | GAGATCTCGATCACTGCTTATGATC TTACT |

表 2 Cas13a 和 Cas13b 靶向 *lig4* 的 gRNA 序列
Table 2 Cas13a and Cas13b target gRNA sequence of *lig4*

| System | Items | Sequence (5'–3') |
|--------|-------|------------------------------------|
| Cas13a | g1 | GATCTGGAAAAAGTCTGTAGGCAA CTGC |
| | g2 | GATCCTTCTGTAGGACTCAGTGATA TTT |
| | g3 | GCAACTGCATGATCCTTCTGTAGG ACTC |
| Cas13b | g1 | GATCTGTAGTGACATTATGCAACTC AGCAG |
| | g2 | GTCCTACAGAAGGATCATGCAGTT GCCTAC |
| | g3 | GATAGAAATATCACTGAGTCCTAC AGAAGG |
| | g4 | GCAGCTAGCATTGGTTTAAATGCA GAAAAT |
| | g5 | GAGTCCTACAGAAGGATCATGCAG TTGCCT |
| | g6 | GCAATAGCAGCTAGCATTGGTTTA AATGCA |

1.3 细胞培养与传代

将液氮保存的 HEK293T 在 37 °C 水浴锅中快速解冻, 解冻的细胞经 600×g、5 min 离心后, 使用含 10% FBS (Gibco) 和 1% Anti-Anti (Invitrogen) 的 DMEM (Invitrogen) 生长培养基重悬细胞并进行培养, 培养条件为 37 °C、5% CO₂。细胞生长至 90% 时, 用 PBS 清洗 2 遍, 随后加入适量的 Trypsin/EDTA (0.05%, Gibco) 消化 1–2 min, 待细胞完全脱落后用生长培养基终止反应, 600×g 离心 5 min 后, 使用生长培养基重悬细胞并接种至新的细胞培养皿中继续培养。

1.4 实时荧光定量 PCR 检测 Cas13a、b 系统对 mRNA 的干扰效果

当 HEK293T 细胞汇合度达到 70%–90% 时, 参考 Thermo Fisher Scientific 公司的 Lipofectamine 3000 Reagent 说明书转染细胞。以 24 孔板为例, 每孔将 500 ng Cas13a、b 质粒分别和 500 ng 相应的 U6-gRNA 共转染至细胞中。转染 48 h 后, 抽提细胞 RNA, 经反转录后对细胞 cDNA 进行实时荧光定量 PCR, 检测 *ku70* 和 *lig4* 的 RNA 表达水平, 荧光定量 PCR 引物见表 3。

1.5 Cas13a、b 系统的转染效率

为了鉴定 Cas13a、b 系统的转染效率, 将不同的 Cas13a、b 系统 (包括 Cas13 质粒和 U6-gRNA 质粒) 分别同 mCherry2-C1 质粒共转 HEK293T 细胞, 质粒用量均为 500 ng/孔, 步骤与上述保持一致。待细胞转染 48 h 后, 使用流式细胞术 (BD accuri C6 plus) 检测红光细胞比例, 通道为 FL3。

红光细胞比例间接反映 Cas13 系统的转染效率。

1.6 Western blotting 检测目的基因的蛋白水平

将上述转染 48 h 的细胞用 PBS 清洗 2 遍后, 使用碧云天的 Western 及 IP 细胞裂解液 (#P0013) 裂解细胞。将 5×蛋白缓冲液加入裂解后的样品中并在 100 °C 水中煮沸 5–10 min。使用 BCA 法测定蛋白浓度便于 SDS-PAGE 上样。将蛋白总量为 20 μg 的蛋白样品上样至 12% 的 SDS-PAGE 凝胶孔中, 70 V 电泳 30 min, 90 V 电泳 1–2 h。使用 iBlot 2 Gel Transfer Device 系统 (Invitrogen) 将蛋白条带转移至 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶粉封闭 2 h 后, 4 °C 过夜孵育 1 : 2 000 KU70 (Proteintech, #10723-1-AP) 兔多克隆抗体或 1 : 2 000 LIG4 (Abcam, #ab193353) 兔单克隆抗体和 1 : 2 000 β-Actin (Cell signaling, #4970S) 兔单克隆抗体, TBST 洗膜 3 次, TBS 洗膜 1 次后, 室温孵育山羊抗兔 IgG 1–2 h, 并按上述方法洗膜。将清洗好的膜浸湿并显色后置于 UVP 显色装置曝光拍照, 随后用 ImageJ 1.52a (National Institutes of Health, USA) 软件进行灰度扫描分析^[16–17], 将目的蛋白灰度值参照内参灰度值进行归一化处理 3 次。使用 GraphPad Prism 8.0 软件将归一化处理的数据作图。

1.7 统计分析

基因 mRNA 表达、转染效率及蛋白扫描结果使用 IBM SPSS Statistics 20 进行单因素邓肯方差分析。结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示。* 和 ** 分别表示 $P < 0.05$ 和 $P < 0.01$ 的显著性水平。

表 3 实时荧光定量 PCR 引物信息

Table 3 The primer sequences for qPCR

| Primer name | CCDS IDs | Primer sequence (5'–3') | Size (bp) |
|-------------|----------|---------------------------|-----------|
| RTQ-hKu70-F | 14 021 | GAAGAAGCAGAGGAAGAACAAGAAG | 116 |
| RTQ-hKu70-R | | TACCATAGAACACCACAGCCAAG | |
| RTQ-hLig4-F | 9 508 | TTCATAATGATGCTGCTGAGTTGC | 165 |
| RTQ-hLig4-R | | CCTTCTCAATGTGCTCAATATCTGC | |
| RTQ-hActb-F | 5 341 | TCGTGCGTGACATTAAGGAGAAG | 176 |
| RTQ-hActb-R | | GAAGGAAGGCTGGAAGAGTGC | |

2 结果与分析

2.1 Cas13a、b 系统构建

将合成的 gRNA 退火后与 *Bpi* I 酶切的线性化 U6 质粒进行连接。单克隆菌扩大培养后进行 Sanger 测序，测序结果 (图 1) 符合预期。

2.2 Cas13a、b 系统对 *ku70* 和 *lig4* 基因 mRNA 水平的影响

针对 *ku70* 和 *lig4* 基因，我们分别为 Cas13a 系统设计 3 对 gRNA, Cas13b 系统设计 6 对 gRNA。将 Cas13a、b 系统共转染 HEK293T 细胞，48 h 后荧光定量 PCR 显示，所有 Cas13a、b 系统的不同 gRNA 对 *ku70* mRNA 的表达水平均呈现出显著下调的现象 ($P < 0.01$)，其中 Cas13a-g2 对 *ku70* 的敲减效果可以达到 56%，Cas13b-g5 对 *ku70* 的敲减效果高达 92% (图 2A)。另外，在对 *lig4* 基因的干扰上，仅有 Cas13b-g2 和 g5 展现出显著的敲减效果，分别达到 70% 和 76% 的敲减水平 (图 2B)，其余如 Cas13a-g3 和 Cas13b-g4 则具有较大的 RNA 敲减趋势 ($P < 0.1$)。

2.3 Cas13a、b 系统转染效率评估

将共转 Cas13 系统和红光质粒 mCherry2-C1 的 HEK293T 细胞用 PBS 清洗 2 次，经胰酶消化

并离心，PBS 重悬后，使用流式细胞术检测红光细胞比例。如图 3 所示，红色荧光细胞数约占总细胞数的 65.7%–71.0%，即 3 对 Cas13a 的 gRNA 和 6 对 Cas13b 的 gRNA 转染效率无明显差异。

2.4 Cas13a、b 系统对 *Ku70* 和 *Lig4* 蛋白水平的影响

将 Cas13a、b 系统转染 HEK293T 细胞，48 h 后裂解并变性，用于 Western blotting 实验。使用 ImageJ 软件分析，结果显示，Cas13a-g2、g3 和

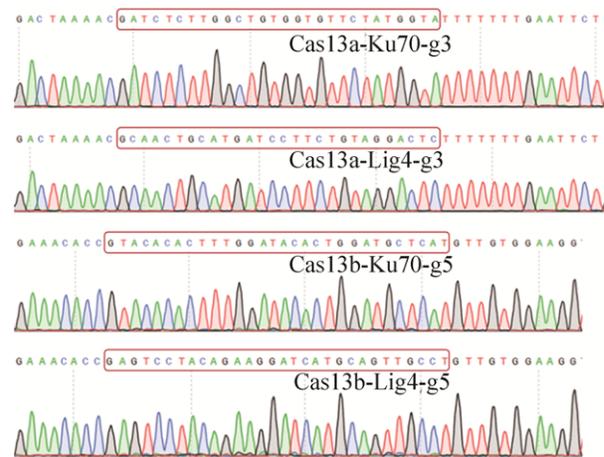


图 1 Cas13a、b 系统重构质粒测序

Fig. 1 Reconstituted plasmid sequencing of the Cas13 system using U6 primer. We only listed representative sequencing results.

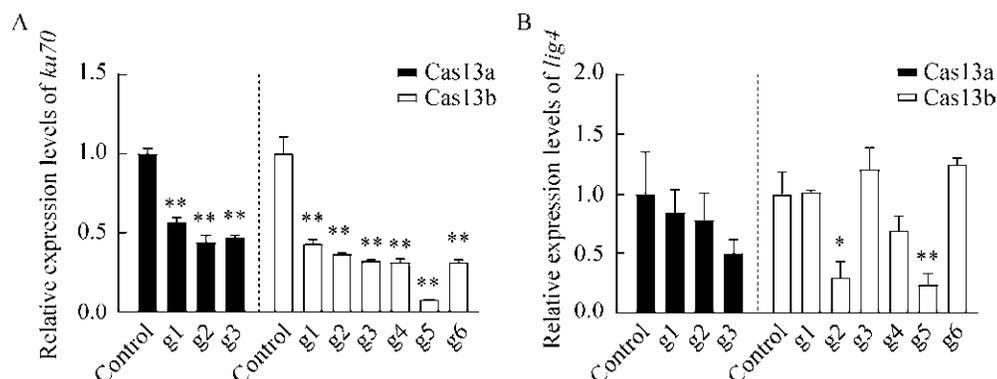


图 2 Cas13a、b 对 *ku70* 和 *lig4* 基因 mRNA 水平的影响 (A: Cas13a、b 系统对 *ku70* 基因 mRNA 水平的影响; B: Cas13a、b 系统对 *lig4* 基因 mRNA 水平的影响)

Fig. 2 Effect of Cas13a, b on mRNA levels of NHEJ repair factors. (A) Effect of Cas13a, b on mRNA levels of *ku70*. (B) Effect of Cas13a, b on mRNA levels of *lig4*. Control indicates no transfection of gRNA group. Data is shown as $\bar{x} \pm s$, $n=3$ (one-way ANOVA). * and ** represent $P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively.

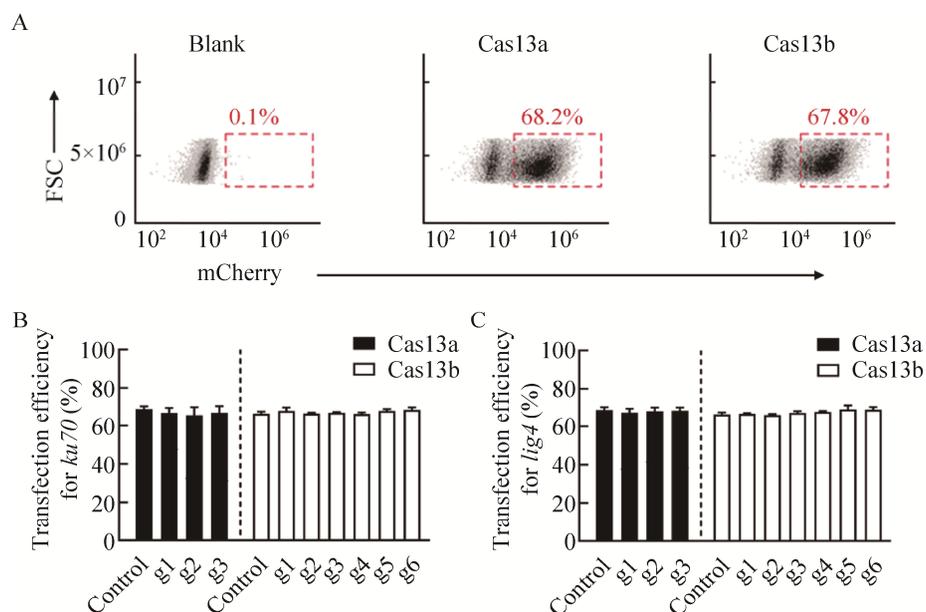


图3 Cas13a、b 系统转染效率评估 (A: mCherry 红光校正 Cas13a、b 系统的流式细胞图; B: Cas13a、b 系统干扰 *ku70* 的转染效率; C: Cas13a、b 系统干扰 *lig4* 的转染效率)

Fig. 3 Evaluation of transfection efficiency for Cas13a, b system. (A) Corrected flow cytometry with mCherry. (B) Transfection efficiency that Cas13a, b systems interfere *ku70*. (C) Transfection efficiency that Cas13a, b systems interfere *lig4*. Blank represents no transfection group. Control indicates no transfection of gRNA group. Data is shown as $\bar{x} \pm s$, $n=3$ (one-way ANOVA).

Cas13b-g2、g4-g6 均能将 Ku70 蛋白表达水平下调 20% 以上, 其中 Cas13a-g3 和 Cas13b-g2 在各自系统中具有最大的下调能力, 分别能够将 Ku70 蛋白表达下调至 74% 和 68% (图 4A)。此外, 除

Cas13a-g2 外其余 gRNA 均能使 Lig4 蛋白水平下调 20% 以上, 其中 Cas13a-g3 和 Cas13b-g4 在各自系统中具有最大的下调能力, 分别能够将 Lig4 蛋白水平下调至 73% 和 53% (图 4B)。

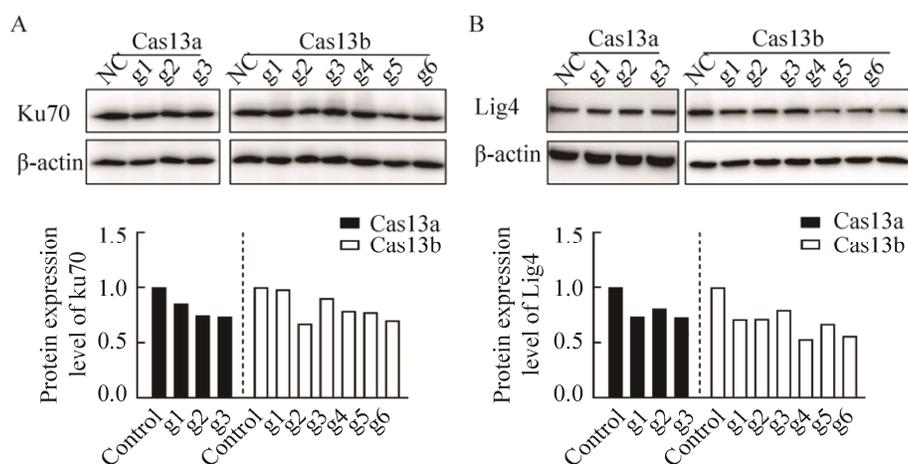


图4 Cas13a、b 对 Ku70 和 Lig4 蛋白水平的影响 (A: Cas13a、b 对 Ku70 蛋白水平的影响; B: Cas13a、b 对 Lig4 蛋白水平的影响)

Fig. 4 Effect of Cas13a, b on protein level of Ku70 and Lig 4. (A) Effect of Cas13a, b on protein level of Ku70. (B) Effect of Cas13a, b on protein level of Lig4. The histogram was expressed as the relative expression of the target protein/ β -actin. Data was obtained by ImageJ software. NC and control indicate no transfection of gRNA group.

3 讨论

CRISPR/Cas13 系统是一种新兴的有望替代 RNA 干扰的 RNA 编辑技术^[8-9]。本研究使用 CRISPR/Cas13a、b 系统能够有效降低 *ku70* 和 *lig4* 的转录和蛋白表达水平,但不同的 gRNA 拥有不同的敲减效果。最近研究表明,哺乳动物细胞中,靶向 RNA 的低二级结构能够大大提高转录本的敲减效果^[8]。由于 Cas13 系统不具备解旋酶活性, RNA 的高级结构影响 gRNA 靶向能力,故而在 gRNA 设计时需要考虑 RNA 的可靶向性以及周围二级结构对 RNA 切割能力的影响^[18]。人的 Ku70 和 Lig4 蛋白分别由 *xrcc6* 和 *lig4* 基因编码,根据 Ensembl 数据库显示,*xrcc6* 基因存在 8 个转录本,其中 6 个能够翻译形成蛋白,*lig4* 基因具有 5 个能够翻译成蛋白的转录本,这些差异的转录本主要是 mRNA 的前体或由于可变剪切造成的。基于 Cas13 蛋白的切割原理,本研究将荧光定量 PCR 引物设计在靶位点两端,以便检测 RNA 水平的变化,初步了解敲减事件的发生。由于多转录本具有相同的靶位点,可能影响目的蛋白的下调水平,因此我们建议设计 gRNA 时尽可能避免可变剪切带来的影响。另外,部分 gRNA 使得目的基因的转录水平和蛋白水平表达不一致。原因可能如下: 1) 基因的表达一般分为转录和翻译两个层面,尤其是真核生物,基因表达存在时间和位置的时空间隔。蛋白表达存在一定的滞后性,48 h 可能不足以使得转录水平和翻译水平保持一致。而过久的转染时间会导致一定的细胞毒性问题。2) 受可变剪切的影响^[19],可靶向 RNA 的种类大于 1,使得靶向能力分散。另外,多转录本的存在影响基因表达调控,进而影响蛋白表达水平。3) 蛋白调控过程是复杂的,DNA 修复因子如 Ku70、Lig4 等存在交互网络,而这个调控网络尚未完全被人类了解。4) Cas13 质粒大小约 13 kb,基因的干扰表达受转染效率的影响较大。5) gRNA 靶向特异性影响 Cas13 系统对 mRNA 的调控效率,特异性

高、脱靶效率低的 gRNA 更容易富集在靶位点区域,具有更快、更强地干扰基因表达的能力。另外,*ku70* 和 *lig4* 敲减效果的不同除了 gRNA 的影响外,Cas13 系统不同亚型的切割活性也是影响敲减效果的因素之一。Konermann 等发现在哺乳动物细胞中 Cas13d 具有比 Cas13a、b 更强烈、更可观的敲减效果^[7],这个现象可能是由于 Cas13d 拥有更小的蛋白分子量,能够更容易地转染或包装到细胞内,并对细胞的转录和翻译有着较低的负担所造成的。

与 RNAi 相比,尽管 Cas13 系统未能将转录水平敲减至 1% 以下,但其对蛋白的敲减已达到 RNAi 的水平^[12]。另外,CRISPRi 和 NgAgoi 也仅能敲减 Ku70 和 Lig4 约 40%–60% 的蛋白表达量^[14-15]。这些结果证明 Cas13a、b 系统成功达到我们的预期,并具备巨大的潜在价值。目前,CRISPR/Cas13a、b 系统对蛋白敲减效果有限,主要在于 Cas 蛋白分子量巨大,转染或病毒包装以及细胞内蛋白运转困难。因此,Rauch 等基于人类蛋白特性设计并合成了 CIRTIS 系统 (CRISPR/Cas inspired RNA targeting system)^[20],整个系统仅有 2.7 kb,克服了 Cas13 系统分子量大和免疫原性的限制。此外,Cas13 系统除了靶向 RNA,敲减目的 RNA 的作用外,还可用于 RNA 编辑,纠正由于基因突变所导致的疾病^[9,21]。它不改变基因组序列的特性让其具有可逆性,似乎在基因治疗等方面比 CRISPR/Cas9 系统更为安全。本研究使用 CRISPR/Cas13a、b 系统主要针对 Ku70 和 Lig4 蛋白,筛选出了具有显著敲减效果的 gRNA。在不编辑基因组的条件下,为基因功能和调控研究提供一种可行方案。

REFERENCES

- [1] Deveau H, Garneau JE, Moineau S. CRISPR/Cas system and its role in phage-bacteria interactions. *Annu Rev Microbiol*, 2010, 64: 475–493.
- [2] Hsu PD, Lander ES, Zhang F. Development and

- applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell*, 2014, 157(6): 1262–1278.
- [3] O'Connell MR. Molecular mechanisms of RNA targeting by Cas13-containing type VI CRISPR-Cas systems. *J Mol Biol*, 2019, 431(1): 66–87.
- [4] East-Seletsky A, O'Connell MR, Knight SC, et al. Two distinct RNase activities of CRISPR-C2c2 enable guide-RNA processing and RNA detection. *Nature*, 2016, 538(7624): 270–273.
- [5] Smargon AA, Cox DBT, Pyzocha NK, et al. Cas13b is a type VI-B CRISPR-associated RNA-guided RNase differentially regulated by accessory proteins *Csx27* and *Csx28*. *Mol Cell*, 2017, 65(4): 618–630.e7.
- [6] Yan WX, Chong SR, Zhang HB, et al. Cas13d is a compact RNA-targeting type VI CRISPR effector positively modulated by a WYL-domain-containing accessory protein. *Mol Cell*, 2018, 70(2): 327–339.e5.
- [7] Konermann S, Lotfy P, Brideau NJ, et al. Transcriptome engineering with RNA-targeting type VI-D CRISPR effectors. *Cell*, 2018, 173(3): 665–676. e14.
- [8] Abudayyeh OO, Gootenberg JS, Essletzbichler P, et al. RNA targeting with CRISPR-Cas13. *Nature*, 2017, 550(7675): 280–284.
- [9] Cox DBT, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, et al. RNA editing with CRISPR-Cas13. *Science*, 2017, 358(6366): 1019–1027.
- [10] Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, et al. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*, 2001, 411(6836): 494–498.
- [11] Jackson AL, Bartz SR, Schelter J, et al. Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nat Biotechnol*, 2003, 21(6): 635–637.
- [12] Li GL, Liu DW, Zhang XW, et al. Suppressing *Ku70/Ku80* expression elevates homology-directed repair efficiency in primary fibroblasts. *Int J Biochem Cell Biol*, 2018, 99: 154–160.
- [13] Quan R, Li GL, Mo JX, et al. Effects of RNA interference on the porcine NHEJ pathway repair factors on HR efficiency. *Hereditas (Beijing)*, 2018, 40(9): 749–757 (in Chinese).
全绒, 李国玲, 莫健新, 等. RNA 干扰猪 NHEJ 通路修复因子对 HR 效率的影响. *遗传*, 2018, 40(9): 749–757.
- [14] Ye LP, Wang CK, Hong LJ, et al. Programmable DNA repair with CRISPRa/i enhanced homology-directed repair efficiency with a single Cas9. *Cell Discov*, 2018, 4: 46.
- [15] Li GL, Quan R, Wang HQ, et al. Inhibition of *Ku70* and *Ku80* by CRISPR interference, not *NgAgo* interference, increases the efficiency of homologous recombination in pig fetal fibroblasts. *J Integr Agric*, 2019, 18(2): 438–448.
- [16] Carvajal-Vergara X, Sevilla A, D'Souza SL, et al. Patient-specific induced pluripotent stem-cell-derived models of LEOPARD syndrome. *Nature*, 2010, 465(7299): 808–812.
- [17] 用 ImageJ 对条带进行定量分析[EB/OL]. [2020-01-05]. <https://www.plob.org/article/14865.html>.
- [18] Abudayyeh OO, Gootenberg JS, Konermann S, et al. C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector. *Science*, 2016, 353(6299): aaf5573.
- [19] Wang ET, Sandberg R, Luo SJ, et al. Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes. *Nature*, 2008, 456(7221): 470–476.
- [20] Rauch S, He E, Srien M, et al. Programmable RNA-guided RNA effector proteins built from human parts. *Cell*, 2019, 178(1): 122–134.e12.
- [21] Abudayyeh OO, Gootenberg JS, Franklin B, et al. A cytosine deaminase for programmable single-base RNA editing. *Science*, 2019, 365(6451): 382–386.

(本文责编 郝丽芳)