

技术与方法

利用CRISPRi干扰研究*MyoG*和*Myf6*基因对牛骨骼肌卫星细胞分化的影响

李冬晓 李树峰* 佟慧丽 张伟伟 刘丹 严云勤

(东北农业大学生命科学学院, 细胞生物学实验室, 哈尔滨 150030)

摘要 CRISPR干扰(clustered regularly interspaced short palindromic repeat interference, CRISPRi)技术因高效的基因干扰效率而成为基因功能研究的重要工具。*MyoG*、*Myf6*基因是生肌调节因子家族(myogenic regulatory factors, MRFs)的重要成员,是骨骼肌分化所必需的调控因子。该研究以牛骨骼肌卫星细胞为实验材料,探讨*MyoG*和*Myf6*基因在骨骼肌卫星细胞分化过程中的相互关系。构建*MyoG*、*Myf6*基因CRISPRi载体,分别转染牛骨骼肌卫星细胞,诱导其分化,Real-time PCR检测肌肉分化重要功能基因*MyoG*、*Myf6*、*MYH2*、*MyoD*的表达情况。结果表明,在牛骨骼肌卫星细胞分化期间,抑制*MyoG*基因表达将诱导*Myf6*基因的代偿性升高,但并不能完全弥补*MyoG*基因的缺少对肌肉分化产生的影响,而抑制*Myf6*基因表达则不会引起*MyoG*基因表达升高,这为肌肉分化机制的阐明提供了理论依据。

关键词 *MyoG*; *Myf6*; CRISPRi; 牛; 骨骼肌卫星细胞; 分化

Influence of *MyoG* and *Myf6* Genes on the Differentiation of Bovine Skeletal Muscle Satellite Cell Using CRISPRi

Li Dongxiao, Li Shufeng*, Tong Huili, Zhang Weiwei, Liu Dan, Yan Yunqin

(Northeast Agricultural University College of Life Science, the Laboratory of Cell and Developmental Biology, Harbin 150030, China)

Abstract CRISPRi (clustered regularly interspaced short palindromic repeat interference), has become an important tool for the study of gene functions due to its efficiency. *MyoG* and *Myf6* are important members of the myogenic regulatory factors family, which are necessary regulating factors for skeletal muscle differentiation. In this study, we set primary bovine skeletal muscle satellite cells as the experimental material to fully investigate the interrelation between *MyoG* and *Myf6*. The CRISPRi vector of *MyoG* and *Myf6* are constructed and transfected into bovine skeletal muscle satellite cells respectively, and induce differentiation, then detect the expression of *MyoG*, *Myf6*, *MYH2*, *MyoD* via Real-time PCR. The result shows that during differentiation of bovine skeletal muscle satellite cells, the inhibition of *MyoG* induces the compensatory increase of *Myf6*, though this can not offset the influence of *MyoG* on muscle differentiation. In contrast, the inhibition of *Myf6* can not increase the expression of

收稿日期: 2015-11-02 接受日期: 2016-01-20

国家转基因专项“高产优质转基因肉牛新品种培育”(批准号: 2014ZX08007-002)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0451-55190846, E-mail: lishufeng11@sina.com

Received: November 2, 2015 Accepted: January 20, 2016

This work was supported by the Breeding Program for High-quality New Varieties of Genetically Modified Bovine from the National Major Transgenic Project (Grant No.2011ZX08007-002)

*Corresponding author. Tel: +86-451-55190846, E-mail: lishufeng11@sina.com

网络出版时间: 2016-03-17 10:45:04

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20160317.1045.002.html>

MyoG. These results provide theoretical basis for the mechanism study of muscle differentiation.

Keywords *MyoG*; *Myf6*; CRISPRi; bovine; skeletal muscle satellite cell; differentiation

CRISPR(clustered regularly interspaced short palindromic repeat)技术作为继ZFN(zinc fingernucleases)和TALEN(transcription activator-like effector nucleases)后的又一新的基因编辑手段,引起了越来越多研究者的重视。该技术的原理是核酸酶Cas9蛋白受到向导RNA(single guide RNA, sgRNA)的引导,对特定基因片段进行精确地剪切,通过基因修复途径实现基因编辑^[1]。较ZFN和TALEN而言,CRISPR技术具有成本低、制作简单、操作周期短、作用高效等优点^[2]。目前,该技术已经在多个物种中得到应用,包括酿酒酵母^[3]、线虫^[4]、小鼠^[5]、果蝇^[6]、斑马鱼^[7]、人细胞^[8-9]、拟南芥^[10]等。而基于CRISPR系统开发而来的CRISPR干扰(clustered regularly interspaced short palindromic repeat interference, CRISPRi)技术因其干扰的高效性也被广泛关注。CRISPRi是通过突变获得无内切酶活性的dCas9(dead Cas9)^[11],dCas9与sgRNA形成复合物,该复合物与靶位点结合形成空间位阻,抑制转录延伸或抑制RNA聚合酶及转录调控因子与靶序列结合^[12],这一机制与RNAi有本质区别, RNAi主要通过降解mRNA使基因沉默。

*MyoG*和*Myf6*基因是生肌调节因子家族(myogenic regulatory factors, MRFs)的重要成员,是一类具有碱性螺旋-环-螺旋(base helix-loop-helix, bHLH)核蛋白的骨骼肌特异性转录调节因子^[13-15]。动物胚胎形成后,肌纤维的初级结构已基本形成,是次级结构形成的主要时期,涉及到了肌纤维数量的固定、肌纤维类型的分化等,*MyoG*和*Myf6*基因在此过程中起到了重要作用^[16]。*MyoG*基因调控着中胚层细胞分化为成肌细胞,再由成肌细胞融合为肌纤维这一过程,是骨骼肌分化所必需的正调控因子。通过胚胎干细胞基因打靶使小鼠*MyoG*基因失活,产生突变纯合小鼠,*MyoG*基因缺失的小鼠虽有成肌细胞正常存在,但绝大部分细胞不分化形成肌纤维,本应发育成骨骼肌的部位仅有正常数量的单个核细胞和少量肌纤维,由于骨骼肌的巨大缺损,这些纯合突变小鼠在出生前后致死^[17]。通过Cre-LoxP条件性基因打靶技术在小鼠胚胎肌肉形成之后敲除*MyoG*基因发现,小鼠骨骼肌能够正常形成,且小鼠也能出生并存活,但是出生后的体重比野生型小30%,相同位置的骨

骼肌的尺寸与重量均小于野生型^[18]。*Myf6*基因是脊椎动物胚胎发育过程中骨骼肌发生的主导调节基因之一,在骨骼肌的分化后期,其编码产物可诱导成肌细胞分化融合成肌管、促进肌纤维的形成并且维持肌肉的表型^[19]。*Myf6*基因编码产物减少的小鼠虽有骨骼肌形成,但会导致肋骨生长缺陷^[20]。

目前,通过CRISPRi在牛骨骼肌卫星细胞中实现高效的基因干扰方面的报道不多,而且干扰*MyoG*、*Myf6*基因后,在肌肉分化过程中其分化相关基因的表达变化,尤其是*MyoG*与*Myf6*的相互关系方面的报道更少。本研究利用CRISPRi技术干扰*MyoG*、*Myf6*基因,探究在*MyoG*、*Myf6*基因低表达的情况下,肌肉分化相关基因在分化过程中的表达变化,分析总结*MyoG*、*Myf6*基因在肌肉分化过程中的相互关系,从而更好地为肌肉发育方面的机制研究提供理论依据,为畜禽肉用性状的基因改造及家畜的瘦肉率的提高等生产实践提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒、菌种和细胞株 pSPgRNA(*Streptococcus pyogenes* guide RNA)质粒、dCas9质粒购于Addgene公司(北京中原公司代理购买);菌株DH5 α 购于北京全式金生物技术有限公司;牛骨骼肌卫星细胞由本实验室分离纯化及保存,且为第三代细胞。

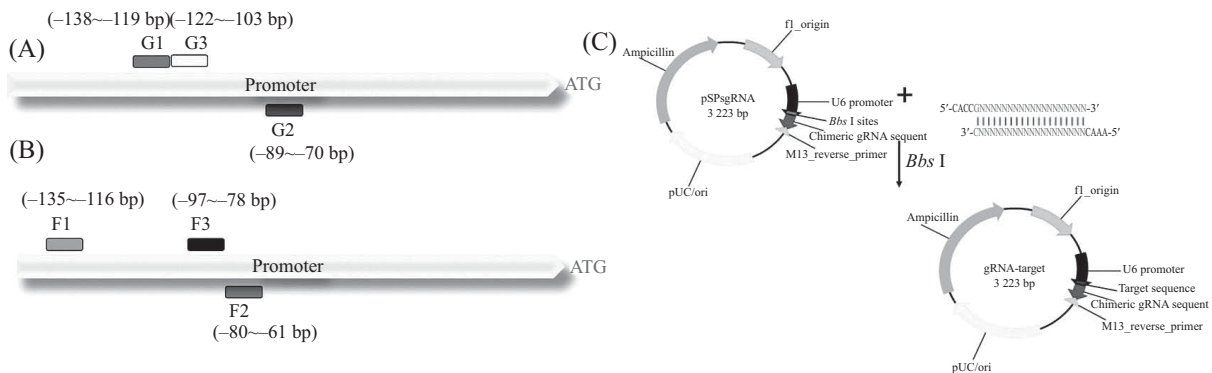
1.1.2 工具酶、试剂盒和其他试剂 限制性内切酶(*Bbs* I)购于北京NEB公司;BioTeke Super RT Kit购于北京百泰克生物技术有限公司;SYBR[®] Prime-Script[™] RT-PCR Kit II购于大连TaKaRa生物技术有限公司;MyoG、Myf6、GAPDH抗体购自Santa Cruz公司(一抗)和北京Biosynthesis公司(二抗);PEI购于Sigma公司。

1.2 方法

1.2.1 CRISPRi干扰载体的构建 根据靶位点预测网站(<http://zifit.partners.org/ZiFiT/CSquare9Nuclease.aspx>)对*MyoG*、*Myf6*基因启动子区进行靶位点预测,选取*MyoG*基因的3个靶位点G1、G2、G3;选取*Myf6*基因的3个靶位点F1、F2、F3(表1、图1A和图1B)设计相应的寡核苷酸单链,退火后分别与*Bbs* I酶

表1 牛*MyoG*、*Myf6*基因靶位点信息

靶位点名称 Target site name	靶位点(5'→3') Target site (5'→3')	上游引物(5'→3') Sense primer (5'→3')	下游引物(5'→3') Antisense primer (5'→3')
G1	GGC TCA GGT TTC TGT GGC GT	CAC CGG CTC AGG TTT CTG TGG CGT	AAA CAC GCC ACA GAA ACC TGA GCC
G2	GCC ATT TAA ACC CTC CCC GC	CAC CGC CAT TTA AAC CCT CCC CGC	AAA CGC GGG GAG GGT TTA AAT GGC
G3	GCG TTG GCT ATA TTT ATC TC	CAC CGC GTT GGC TAT ATT TAT CTC	AAA CGA GAT AAA TAT AGC CAA CGC
F1	GAG CTA CTA TAT ATA AAG CT	CAC CGA GCT ACT ATA TAT AAA GCT	AAA CAG CTT TAT ATA TAG TAG CTC
F2	GTT CTG GGT GGT TAC CCA GA	CAC CGT TCT GGG TGG TTA CCC AGA	AAA CTC TGG GTA ACC ACC CAG AAC
F3	GCA CTA ATT AAA TGC CAT CT	CAC CGC ACT AAT TAA ATG CCA TCT	AAA CAG ATG GCA TTT AAT TAG TGC



A: 靶位点在*MyoG*基因启动子上的分布; B: 靶位点在*Myf6*基因启动子上的分布; C: CRISPRi干扰载体构建图谱。

A: the distribution of *MyoG* target on the *MyoG* promoter; B: the distribution of *Myf6* target on the *Myf6* promoter; C: interference vector construction map of CRISPRi.

图1 靶位点分布及干扰载体构建图

Fig.1 The distribution of target and interference vector map of CRISPRi

切的pSPgRNA质粒进行连接反应(*Bbs* I酶切产生非互补黏性末端, 因此并不需要对连接方向进行鉴定), 之后用Trans DH5 α 感受态细胞进行转化, 挑取细菌单菌落, 进行测序鉴定(图1C)。

1.2.2 牛骨骼肌卫星细胞的培养、转染及分化 用含20%胎牛血清和10%马血清的DMEM培养液培养牛骨骼肌卫星细胞。采用PEI转染方式, 按照转染试剂(μ L)/DNA(μ g)比例为2/1对细胞进行转染, 将不含筛选标记基因的CRISPRi载体转染至汇合度为70%~80%的牛骨骼肌卫星细胞中, 其中PEI加入8 μ L, pSPgRNA与dCas9按照1:1比例, 分别加入2 μ g CRISPRi载体和2 μ g dCas9于6孔板中, 24 h后用含2%马血清的DMEM分化培养基诱导其分化。

1.2.3 Real-time PCR检测mRNA水平 通过PEI瞬时转染的方法, 分别将构建的CRISPRi载体及dCas9载体共转染牛骨骼肌卫星细胞, 同时设置阴性对照

和空白对照, 并诱导其分化, 分别于24 h、48 h和72 h后用Trizol法提取各组细胞总RNA, 反转录获得cDNA, 利用Premier 5跨基因内含子设计Real-time PCR扩增引物(表2), 以牛肌动蛋白 β -actin基因为内参基因, 按照SYBR[®] Premix Ex Taq[™](TaKaRa公司)试剂盒说明书操作配制反应体系, 利用ABI7500荧光定量PCR仪(Applied Biosystems, US)分析PCR过程中的荧光信号值, 并获得各样品和基因的Ct值, 以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算基因表达的差异倍数。之后统计其干扰效率, 筛选出干扰效率最佳的2个CRISPRi载体用于后续实验。

1.2.4 Western blot检测蛋白质水平 分别将CRISPRi载体及dCas9载体共转染牛骨骼肌卫星细胞, 并诱导其分化, 分别于分化24 h、48 h和72 h后将细胞用蛋白裂解液裂解获得蛋白质, SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白质, 然后将目的条带转到PVDF膜

表2 Real-time PCR的引物序列
Table 2 Primer sequences for Real-time PCR

基因 Gene	引物序列(5'→3') Primer sequence (5'→3')	扩增长度(bp) Product length (bp)
<i>MyoG</i>	Sense: TGG GCG TGT AAG GTG TGT AA Antisense: TGC AGG CGC TCT ATG TAC TG	197
<i>Myf6</i>	Sense: TGG ACC CCT TCA GCT ACA G Antisense: CTT CCT TGG CAG TTA TCA CGA G	126
<i>MYH2</i>	Sense: GGC TGC GTC TTC TCA CTT GG Antisense: GAC TTT CGG AGG TAA GGA GCA	106
<i>MyoD</i>	Sense: AAC TGT TCC GAC GGC ATG AT Antisense: GCA GTC GAG GCT CGA CAC C	141
<i>β-actin</i>	Sense: GAC CTC TAC GCC AAC ACG Antisense: GCA GCT AAC AGT CCG CCT A	271

上, 5%脱脂奶粉封闭, 分别用MyoG、Myf6特异性一抗于37 °C孵育1 h, 二抗于37 °C孵育1 h, 然后利用显影技术获得免疫染色条带, 从而分析目的基因表达的蛋白质水平。

1.2.5 免疫荧光染色 分别将干扰载体及dCas9载体共转染牛骨骼肌卫星细胞, 并诱导其分化, 于分化72 h后将细胞用PBS清洗2次, 冷甲醇固定10 min, 然后用含0.1% Triton X-100的PBST透膜30 min, PBST清洗3次, 再用含5%牛血清白蛋白(BSA)的PBST于37 °C孵育60 min; 然后用结蛋白一抗(Desmin:5% BSA的PBST=1:100)孵育60 min, PBST清洗3次, 二抗避光孵育60 min, 然后PBST清洗3次, DAPI染4 min, PBST清洗3次, 加抗荧光淬灭剂封片。荧光倒置显微镜下观察细胞分化形成的肌管形态, 随机选取5个视野, 对分化形成的肌管进行计数并统计分析。

1.2.6 统计分析 应用SPSS 17.0软件包计算各组试验数据平均值、标准差及标准误差, 并对各组试验数据之间的差异显著性进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 牛MyoG、Myf6基因CRISPRi干扰载体的构建及筛选

将pSPgRNA质粒用*Bbs* I进行单酶切, 回收片段与退火后的寡聚核苷酸双链连接、转化, 挑取单菌落送生工生物工程(上海)股份有限公司测序, 测序结果100%正确。CRISPRi载体分别命名为CRISPRi-G1、CRISPRi-G2、CRISPRi-G3; CRISPRi-F1、CRISPRi-F2、CRISPRi-F3。

分别将构建的CRISPRi载体及dCas9载体共转染牛骨骼肌卫星细胞, Real-time PCR检测24 h、

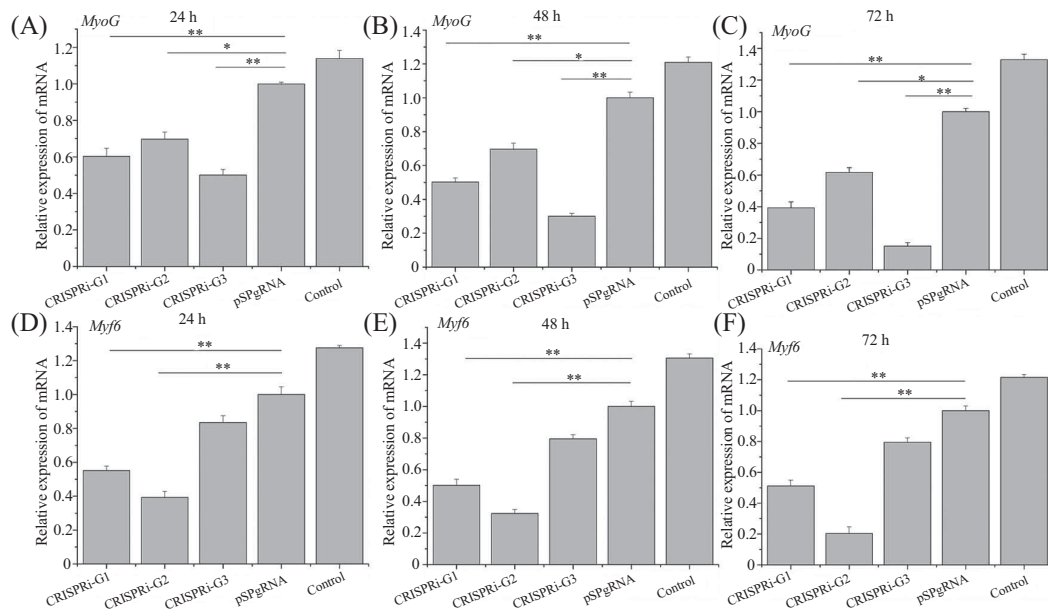
48 h、72 h后其对靶基因的干扰效率。如图2所示, 在转染了3个CRISPRi载体后, 靶基因*MyoG*的相对表达量与对照组相比, 均有不同程度的下降且CRISPRi-G1、CRISPRi-G3差异极显著($P < 0.01$); 其中, CRISPRi-G3载体的干扰效率最高, 且24 h、48 h、72 h其干扰效率分别为49.95%、69.83%、84.71%, CRISPRi-G1载体的24 h、48 h、72 h对应的干扰效率分别为39.63%、49.55%、60.74%, 为了研究不同程度干扰*MyoG*基因对分化的影响, 选择CRISPRi-G1、CRISPRi-G3用于后续试验。用同样方法筛选*Myf6*基因, 其中, CRISPRi-F2载体的干扰效率最高, 且24 h、48 h、72 h其干扰效率分别为60.67%、67.73%、79.51%, 选择CRISPRi-F2用于后续试验。而且通过24 h、48 h、72 h这三个时间段的结果比较可以看出, 在诱导分化72 h后的干扰效果最佳。因此, 后续的Real-time PCR检测分化相关基因的表达变化实验均选取诱导分化后72 h这一时间点。

2.2 牛MyoG、Myf6基因CRISPRi干扰载体的Western blot验证

转染CRISPRi载体并诱导其分化后, 于24 h、48 h、72 h采用Western blot检测靶基因表达的蛋白质水平变化。如图3所示, 实验组的蛋白质水平低于对照组, 且CRISPRi-G1、CRISPRi-G3差异极显著($P < 0.01$)。结果表明, 在干扰*MyoG*基因后, 靶基因的表达得到了抑制。同样, 如图4所示, *Myf6*基因的实验组的蛋白质水平低于对照组, 且CRISPRi-F2差异极显著($P < 0.01$), 在干扰*Myf6*基因后, 靶基因的表达也得到了抑制。

2.3 干扰MyoG基因对牛骨骼肌卫星细胞分化的影响

2.3.1 干扰MyoG基因后, 细胞分化形成的肌管形态

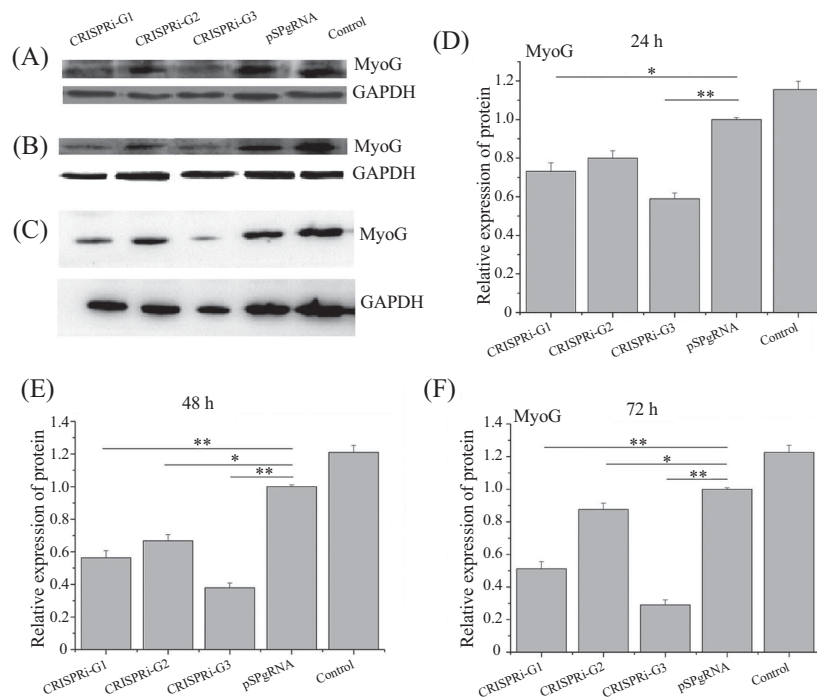


A~C: 分别为诱导分化24 h、48 h、72 h后,不同干扰载体的*MyoG*的mRNA相对表达量; D~F: 分别为诱导分化24 h、48 h、72 h后,不同干扰载体的*Myf6*的mRNA相对表达量。实验重复3次,结果用平均值 \pm 标准误差表示。* $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

A~C: mRNA relative expression of different *MyoG* interference vector after inducing differentiation 24, 48, 72 h. D~F: mRNA relative expression of different *Myf6* interference vector after inducing differentiation 24, 48, 72 h. Each value represents an average of three independent transfection experiments. Each error bar represents the standard deviation of the triplicate experiments. * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

图2 实时定量PCR检测靶基因的表达量变化

Fig.2 The expression of target gene detected by Real-time PCR

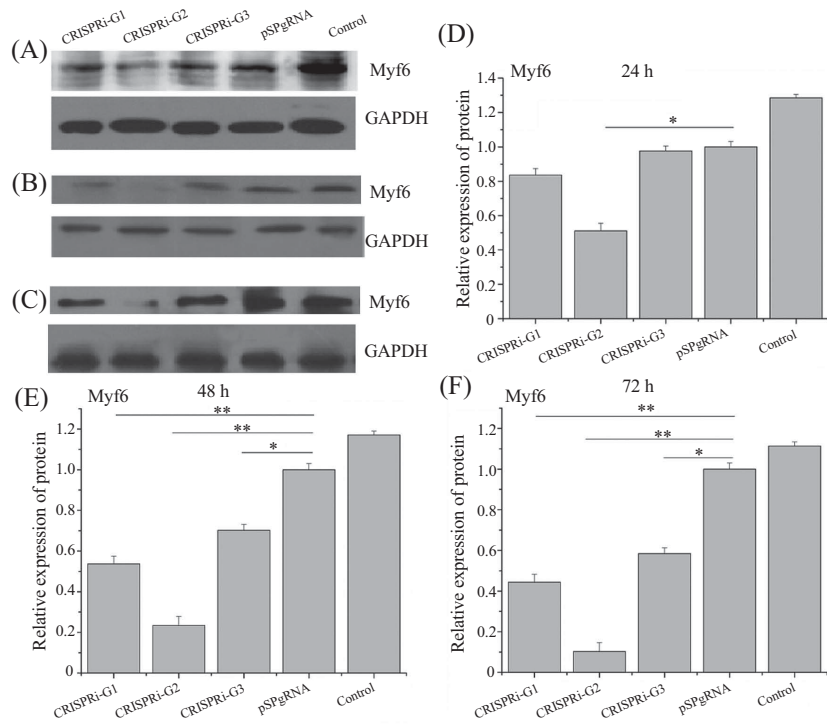


A~C: 分别为诱导分化24 h、48 h、72 h后,不同CRISPRi载体的*MyoG*的蛋白质水平; D~F: 为其对应的灰度扫描结果。图中每一个数值代表3个独立转染实验的平均值; 每一个柱子上的标准误差为3个实验的标准误差。* $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

A~C: protein levels of different *MyoG* CRISPRi vector after inducing differentiation 24, 48, 72 h; D~F: grayscale scan results correspondingly. Each value represents an average of three independent transfection experiments. Each error bar represents the standard deviation of the triplicate experiments. * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

图3 Western blot检测*MyoG*蛋白质水平

Fig.3 *MyoG* protein levels detected by Western blot

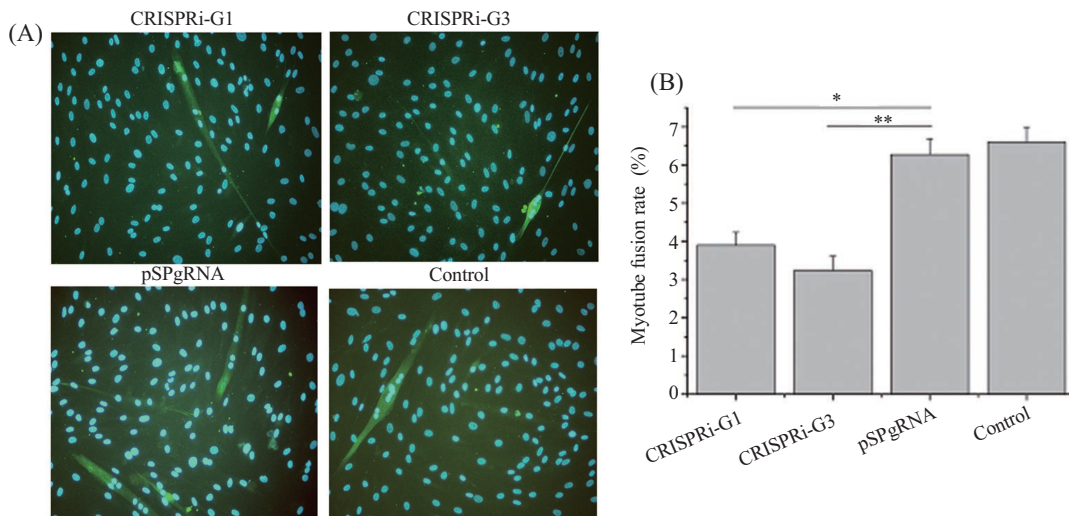


A~C: 分别为诱导分化24 h、48 h、72 h后, 不同CRISPRi载体的Myf6蛋白质水平; D~F: 为其对应的灰度扫描结果。图中每一个数值代表3个独立转染实验的平均值; 每一个柱子上的标准误为3个实验的标准误。* $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

A~C: protein levels of different Myf6 CRISPRi vector after inducing differentiation 24, 48, 72 h; D~F: grayscale scan results correspondingly. Each value represents an average of three independent transfection experiments. Each error bar represents the standard deviation of the triplicate experiments. * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

图4 Western blot检测Myf6蛋白质水平

Fig.4 Myf6 protein levels detected by Western blot

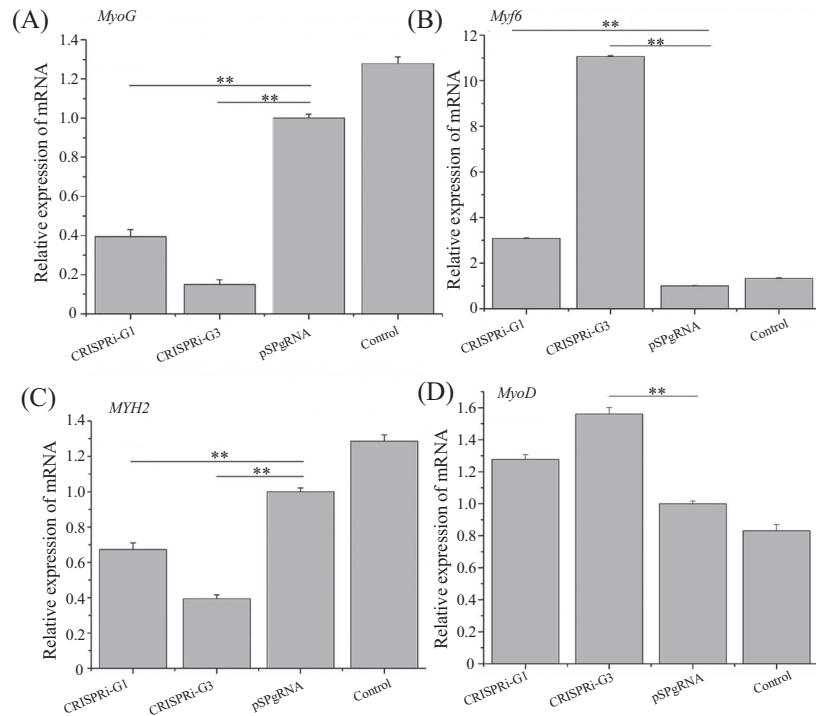


A: 干扰MyoG基因后细胞形态; 绿色荧光代表分化细胞中的Desmin, 蓝色为DAPI染色的细胞核。B: 干扰MyoG基因后肌管融合率统计。实验重复3次, 结果用平均值 \pm 标准误表示。* $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

A: detection of differentiated cells after interference of MyoG; Green represents Desmin in differentiated cells, blue is nuclei stained by DAPI. B: statistical analysis of myotube fusion rate after interference of MyoG. Each value represents an average of three independent transfection experiments. Each error bar represents the standard deviation of the triplicate experiments. * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

图5 倒置荧光显微镜观察干扰MyoG基因后细胞形态(200 \times)及肌管融合率统计

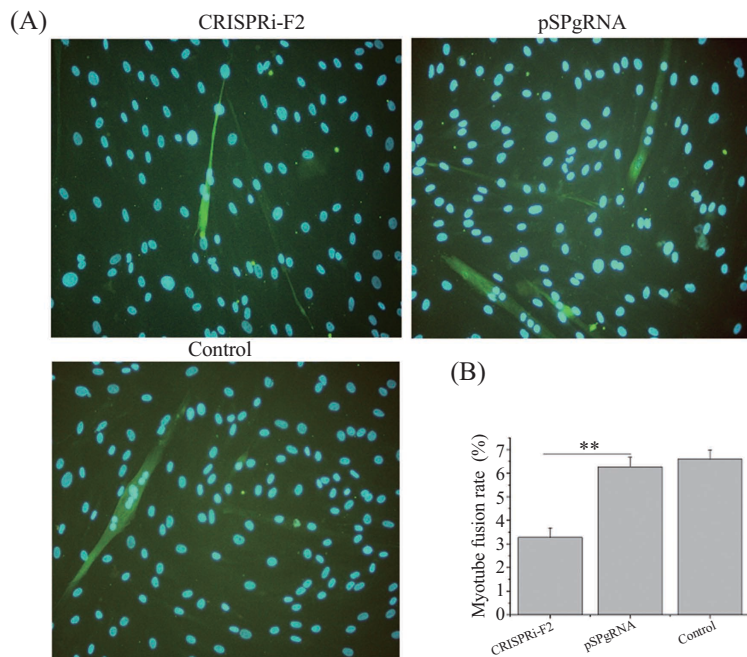
Fig.5 Detection of differentiated cells by inverted fluorescence microscope (200 \times) and statistical analysis of myotube fusion rate after interference of MyoG



A~D: 干扰*MyoG*后实时定量PCR分别检测*MyoG*、*Myf6*、*MYH2*、*MyoD*的表达。实验重复3次,结果用平均值±标准误表示。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。
A~D: the expression of *MyoG*, *Myf6*, *MYH2* and *MyoD* detected by Real-time PCR after interference of *MyoG*. Each value represents an average of three independent transfection experiments. Each error bar represents the standard deviation of the triplicate experiments. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

图6 实时定量PCR检测干扰*MyoG*基因后分化相关基因表达量变化

Fig.6 The expression of differentiation-related genes detected by Real-time PCR after interference of *MyoG*

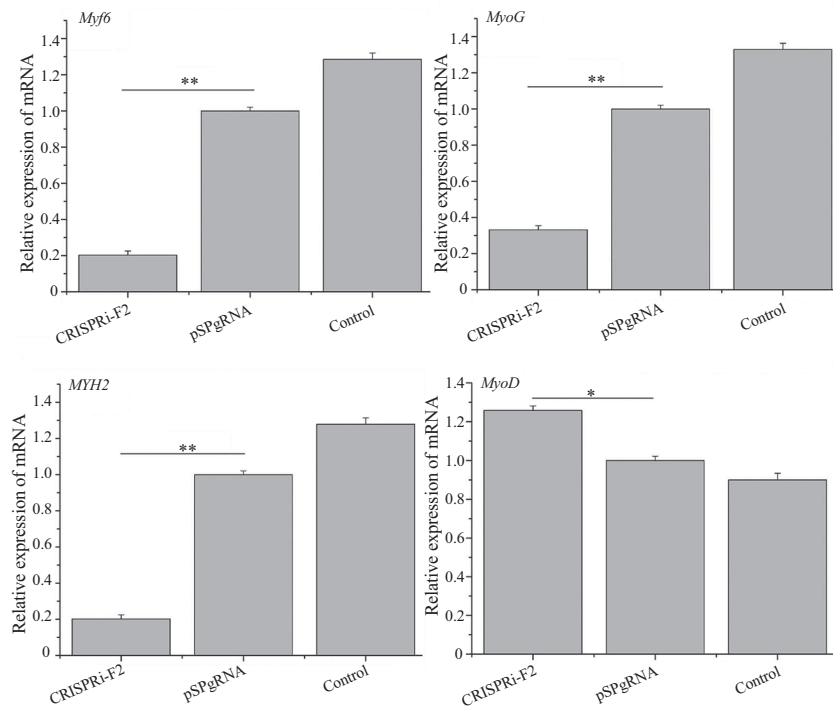


A: 干扰*Myf6*基因后细胞形态;绿色荧光代表分化细胞中的Desmin,蓝色为DAPI染色的细胞核。B: 干扰*Myf6*基因后肌管融合率统计;实验重复3次,结果用平均值±标准误表示。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

A: detection of differentiated cells after interference of *Myf6*; Green represents Desmin in differentiated cells, blue is nuclei stained by DAPI. B: statistical analysis of myotube fusion rate after interference of *Myf6*. Each value represents an average of three independent transfection experiments. Each error bar represents the standard deviation of the triplicate experiments. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

图7 倒置荧光显微镜观察干扰*Myf6*基因后细胞形态(200×)及肌管融合率统计

Fig.7 Detection of differentiated cells by inverted fluorescence microscope (200×) and statistical analysis of myotube fusion rate after interference of *Myf6*



实验重复3次, 结果用平均值±标准误表示。* $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

Each value represents an average of three independent transfection experiments. Each error bar represents the standard deviation of the triplicate experiments. * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

图8 实时定量PCR检测干扰Myf6基因后分化相关基因表达量变化

Fig.8 The expression of differentiation-related genes detected by Real-time PCR after interference of Myf6

的观察 转染MyoG基因干扰载体并诱导其分化后72 h, 于荧光倒置显微镜下观察肌管形态(图5A), 并对细胞分化72 h后肌管融合率(图5B)进行统计分析。结果表明, 干扰MyoG基因后, 肌管融合率降低了37.76%~48.36%, 形态和数目较对照组有极显著差异($P<0.01$)。

2.3.2 干扰MyoG基因后, Real-time PCR检测分化相关基因表达量的变化 转染MyoG基因干扰载体并诱导其分化后72 h, 用Real-time PCR检测肌肉分化相关基因MyoG、Myf6、MYH2及MyoD的表达量变化。结果显示, 在细胞分化期间, 干扰MyoG后, Myf6上调, 且MyoG干扰效率越高, Myf6被上调得越多, MYH2表达下调, MyoD表达上调(图6)。

2.4 干扰Myf6基因对牛骨骼肌卫星细胞分化的影响

2.4.1 干扰Myf6基因后, 细胞分化形成的肌管形态的观察 转染Myf6基因干扰载体并诱导其分化后72 h, 于荧光倒置显微镜下观察肌管形态(图7A), 并对细胞分化72 h后肌管融合率进行了统计分析(图7B)。结果表明, 干扰Myf6基因后, 肌管融合率降低了47.74%, 形态和数目较对照组有极显著差异

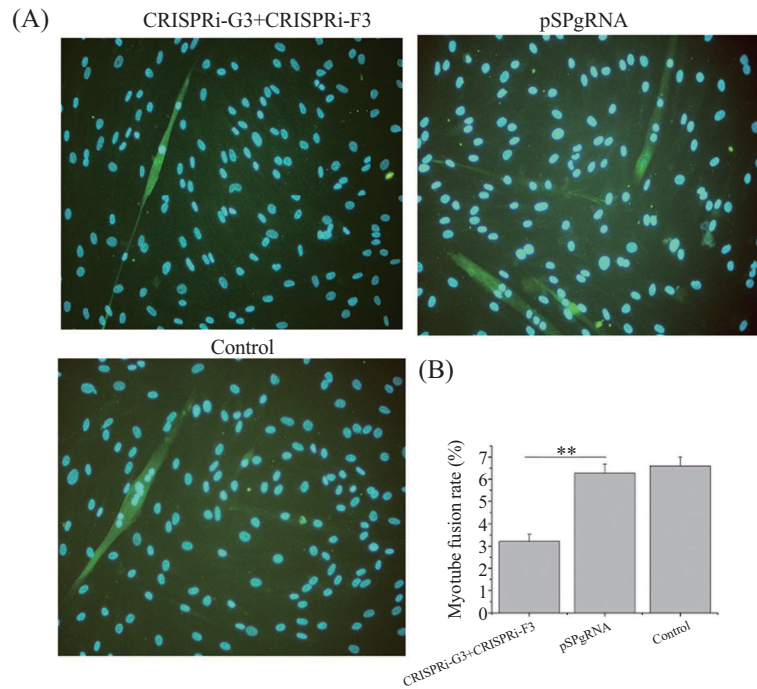
($P<0.01$)。

2.4.2 干扰Myf6基因后, 分化相关基因表达量的变化 转染Myf6基因干扰载体并诱导其分化后72 h, 用Real-time PCR检测肌肉分化相关基因MyoG、Myf6、MYH2及MyoD的表达量变化。结果显示, 在细胞分化期间, 干扰Myf6后, MyoG和MYH2表达下调, MyoD表达上调(图8)。

2.5 同时干扰MyoG和Myf6基因对牛骨骼肌卫星细胞分化的影响

2.5.1 同时干扰MyoG和Myf6基因后, 细胞分化形成的肌管形态的观察 同时共转染MyoG和Myf6基因干扰载体并诱导其分化后72 h, 于荧光倒置显微镜下观察肌管形态(图9A), 并对细胞分化72 h后肌管融合率进行了统计分析(图9B)。结果表明, 同时干扰MyoG和Myf6基因后, 肌管融合率降低了48.84%, 形态和数目较对照组有极显著差异($P<0.01$)。

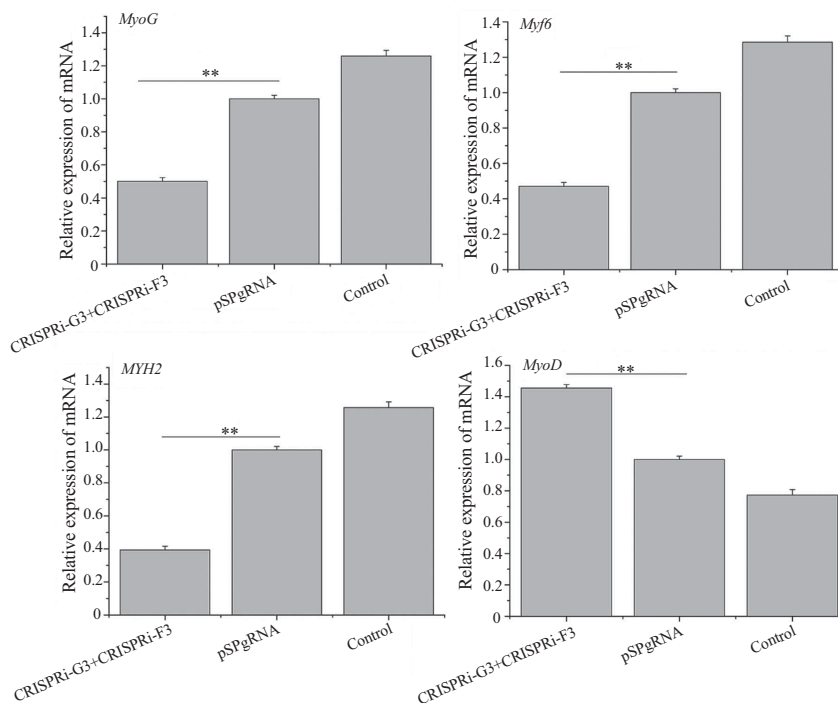
2.5.2 同时干扰MyoG和Myf6基因后, 分化相关基因表达量的变化 同时共转染MyoG和Myf6基因干扰载体并诱导其分化后72 h, 用Real-time PCR检测肌肉分化相关基因MyoG、Myf6、MYH2及MyoD的表达量变化。结果显示, 在细胞分化期间, 同时干扰



A: 干扰*MyoG*和*Myf6*基因后细胞形态; 绿色荧光代表分化细胞中的Desmin, 蓝色为DAPI染色的细胞核。B: 干扰*MyoG*和*Myf6*基因后肌管融合率统计。实验重复3次, 结果用平均值±标准误表示。* $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

A: detection of differentiated cells after interference of *MyoG* and *Myf6*; Green represents Desmin in differentiated cells, blue is nuclei stained by DAPI. B: statistical analysis of myotube fusion rate after interference of *MyoG* and *Myf6*. Each value represents an average of three independent transfection experiments. Each error bar represents the standard deviation of the triplicate experiments. * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

图9 倒置荧光显微镜观察干扰*MyoG*和*Myf6*基因后细胞形态(200×)及肌管融合率统计
Fig.9 Detection of differentiated cells by inverted fluorescence microscope (200×) and statistical analysis of myotube fusion rate after interference of *MyoG* and *Myf6*



实验重复3次, 结果用平均值±标准误表示。* $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

Each value represents an average of three independent transfection experiments. Each error bar represents the standard deviation of the triplicate experiments. * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

图10 实时定量PCR检测干扰*MyoG*和*Myf6*基因后分化相关基因表达量变化
Fig.10 The expression of differentiation-related genes detected by Real-time PCR after interference of *MyoG* and *Myf6*

MyoG和Myf6基因后, MYH2表达下调, MyoD表达上调(图10)。

3 讨论

由sgRNA引导的CRISPRi基因沉默是高效的。2013年, 研究人员在Cell杂志上报道, 在Hela细胞中, 靶向干扰人内源基因转铁蛋白CD71和趋化因子CXCR4的效率可达80%^[12]。本研究将这一技术用于牛骨骼肌卫星细胞中, 对MyoG基因的干扰效率可达84.71%, 对于Myf6基因的干扰效率为79.51%, 且对其进行免疫荧光染色也可直观地看出, 干扰两个基因后形成的肌管小且少, 肌管融合率较对照组也显著较低。

相较于ZFNs和TALEN, CRISPR技术的优点之一在于, 在一个CRISPR系统中可构建多个sgRNA, 通过将其共转染从而实现哺乳动物基因组中的多个基因进行同时编辑^[21], 基于CRISPR系统的CRISPRi技术也可以实现多基因的同时干扰^[11], 本实验中的MyoG与Myf6基因的同时干扰就是通过同时共转染多个sgRNA来实现CRISPRi技术在牛骨骼肌卫星细胞中的多基因同时干扰。本实验的结果可见, MyoG的干扰效率达50%, Myf6的干扰效率达53%, 虽然其干扰效率不如单独干扰组, 这是由转染的干扰质粒减半所致, 但总的来说, 其干扰效率是高效的, 可以满足研究的需要。

有研究表明, 生肌调节因子家族(MRFs)成员在结构上的高度同源性决定了其功能的相似性, 而其中Myf6与MyoG的同源性最高, MyoG表达时伴随有Myf6表达, 二者在功能上存在一定程度的重叠, 能够互相促进并共同控制肌肉分化。在生肌节早期阶段, Myf6的表达与MyoG有所重叠, Myf6的表达可以瞬时替代MyoG的缺乏^[22]。而且, Myf6促进肌肉分化的能力与MyoG相似^[23], 但它可在成年哺乳动物肌肉中持续表达, 与肌肉持续分化状态有关^[24]。本实验在对牛骨骼肌卫星细胞研究时发现, 敲低MyoG后, Myf6表达增加, 且MyoG干扰效率越高, Myf6被上调的越多, 表现出明显的代偿效应; 但敲低Myf6后, MyoG未表现出对Myf6的代偿效应, MyoG表达量反而下降, 说明Myf6与MyoG的代偿作用是单向的而非相互的。此外, 在本研究中发现, 在敲低MyoG后, 尽管Myf6表现出代偿性的上调, 但肌肉分化的标志基因MYH2的表达量降低, 说明Myf6的代偿效应还不足以完全

弥补MyoG对细胞分化所造成的影响。当把MyoG和Myf6基因同时敲低后就严重的阻碍了细胞的分化, MYH2的表达显著下降, 但与单独干扰相比, 未表现出叠加效应。

MyoD可促使成肌细胞分化为肌管, 在肌肉特异性基因转录调控中起着总开关的作用^[25], 其与MyoG及Myf6的表达密切相关。Lee等^[26]的结果表明, 敲低MyoG后, MyoD上调1.32倍。在本研究中也发现, 无论敲低MyoG或Myf6, MyoD的表达量均有所增加, 这一趋势与文献一致。总之, 有关于MyoG及Myf6表达关系及其对肌肉分化的影响值得深入探讨。

参考文献 (References)

- 1 Sapranauskas R, Gasiunas G, Fremaux C, Barrangou R, Horvath P, Siksnys V. The *Streptococcus thermophilus* CRISPR/Cas system provides immunity in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res* 2011; 39(21): 9275-82.
- 2 Gaj T, Gersbach CA, Barbas CF 3rd. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends Biotechnol* 2013; 31(7): 397-405.
- 3 DiCarlo JE, Norville JE, Mali P, Rios X, Aach J, Church GM. Genome engineering in *Saccharomyces cerevisiae* using CRISPR-Cas systems. *Nucleic Acids Res* 2013; 41(7): 4336-43.
- 4 Friedland AE, Tzur YB, Esvelt KM, Colaiácovo MP, Church GM, Calarco JA. Heritable genome editing in *C. elegans* via a CRISPR-Cas9 system. *Nat Methods* 2013; 10(8): 741-3.
- 5 Shen B, Zhang J, Wu H, Wang J, Ma K, Li Z, et al. Generation of gene-modified mice via Cas9/RNA-mediated gene targeting. *Cell Res* 2013; 23(5): 720-3.
- 6 Gratz SJ, Cummings AM, Nguyen JN, Hamm DC, Donohue LK, Harrison MM, et al. Genome engineering of *Drosophila* with the CRISPR RNA-guided Cas9 nuclease. *Genetics* 2013; 194(4): 1029-35.
- 7 Hwang WY, Fu Y, Reyon D, Maeder ML, Tsai SQ, Sander JD, et al. Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. *Nat Biotechnol* 2013; 31(3): 227-9.
- 8 Jinek M, East A, Cheng A, Lin S, Ma E, Doudna J. RNA-programmed genome editing in human cells. *Elife* 2013; 2(2): e00471-e71.
- 9 Mali P, Yang L, Esvelt KM, Aach J, Guell M, DiCarlo JE, et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science* 2013; 339(6121): 823-6.
- 10 Li JF, Norville JE, Aach J, McCormack M. Multiplex and homologous recombination-mediated genome editing in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana* using guide RNA and Cas9. *Nat Biotechnol* 2013; 31(8): 688-91.
- 11 Gilbert LA, Larson MH, Leonardo M, Zairan L, Brar GA, Torres SE, et al. XCRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes. *Cell* 2013; 154(2): 442-51.
- 12 Lei S, Qi, Larson MH, Gilbert LA, Doudna JA, Weissman JS, Arkin AP, et al. Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. *Cell* 2013; 152(5): 1173-83.

- 13 Bergstrom DA, Tapscott SJ. Molecular distinction between specification and differentiation in the myogenic basic helix-loop-helix transcription factor family. *Mol Cell Biol* 2001; 21(7): 2404-12.
- 14 Marotta M, Sarria Y, Ruiz-Roig C, Munell F, Roig-Quilis M. Laser microdissection-based expression analysis of key genes involved in muscle regeneration in mdx mice. *Neuromuscul Disord* 2007; 17(9/10): 707-18.
- 15 Yosuke N, Partridge TA, Ryoichi M, Zammit PS. Entry of muscle satellite cells into the cell cycle requires sphingolipid signaling. *J Cell Biol* 2006; 174(2): 245-53.
- 16 Shibata M, Matsumoto K, Aikawa K, Muramoto T, Fujimura S, Kadowaki M. Gene expression of myostatin during development and regeneration of skeletal muscle in Japanese black cattle. *J Anim Sci* 2006; 84(11): 2983-9.
- 17 Buckingham M, Bajard L, Chang T, Daubas P, Hadchouel J, Meilhac S, *et al.* The formation of skeletal muscle: From somite to limb. *J Anat* 2003; 202(1): 59-68.
- 18 Gros J, Manceau M, Thomé V, Marcelle C. A common somitic origin for embryonic muscle progenitors and satellite cells. *Nature* 2005; 435(7044): 954-8.
- 19 Yun K, Wold B. Skeletal muscle determination and differentiation: Story of a core regulatory network and its context. *Curr Opin Cell Biol* 1996; 8(6): 877-89.
- 20 McKay BR, O'Reilly CE, Phillips SM, Tarnopolsky MA, Gianni P. Co-expression of IGF-1 family members with myogenic regulatory factors following acute damaging muscle-lengthening contractions in humans. *J Physiol* 2008; 586(Pt 22): 5549-60.
- 21 Le C, F Ann R, David C, Shuailiang L, Robert B, Naomi H, *et al.* Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* 2013; 339(6121): 819-23.
- 22 Sumariwalla VM, Klein WH. Similar myogenic functions for myogenin and MRF4 but not *MyoD* in differentiated murine embryonic stem cells. *Genesis* 2001; 30(4): 239-49.
- 23 Kassari-Duchossoy L, Gayraud-Morel B, Gomès D, Rocancourt D, Buckingham M, Shinin V, *et al.* Mrf4 determines skeletal muscle identity in *Myf5: MyoD* double-mutant mice. *Nature* 2004; 431(7007): 466-71.
- 24 Hinterberger TJ, Sassoon DA, Rhodes SJ, Konieczny SF. Expression of the muscle regulatory MRF4 during somite and skeletal myofiber development. *Dev Biol* 1991; 147(1): 144-56.
- 25 Pisconti A, Brunelli S, Padova MD, Palma CD, Deponti D, Baes S. Follistatin induction by nitric oxide through cyclic GMP: A tightly regulated signaling pathway that controls myoblast fusion. *J Cell Biol* 2013; 172(2): 233-44.
- 26 Lee EJ, Malik A, Pokharel S, Ahmad S, Mir BA, Cho KH, *et al.* Identification of genes differentially expressed in myogenin knock-down bovine muscle satellite cells during differentiation through RNA sequencing analysis. *PLoS One* 2014; 9(3): e92447.