应用昆虫学报 *Chinese Journal of Applied Entomology* 2018, 55(2): 208–216. DOI: 10.7679/j.issn.2095–1353.2018.029

家蚕 β-呋喃果糖苷酶基因 *BmSuc1* 的 CRISPR 敲除载体的构建与导入*

朱文恺[1**] 甘 泉[1,2**] 贺 伟[1] 张新伟[1,2] 周 跃[1] 吴梦雪[1]
孙同同[1] 江 松[1] 孟 艳[1,2***]

(1. 安徽农业大学生命科学学院，合肥 230036；2.安徽省蚕桑资源利用国际联合研发中心，合肥 230036)

摘 要 **【目的】** CRISPR/Cas9 是近些年报道较多的基因编辑新工具，具有简便高效、特异性强等优势。*BmSuc1* 是从鳞翅目经济昆虫家蚕 *Bombyx mori* 体内发现的编码 β-呋喃果糖苷酶（β-fructofuranosidase，β-FFase）的基因，也是首个被克隆和鉴定的动物型 β-FFase 编码基因。β-FFase 是作用于果糖基的蔗糖水解酶，BmSUC1 可能与家蚕防御桑叶生物碱的生理过程有关，但目前其发挥作用的分子机制尚不清晰。为了解析 *BmSuc1* 在蚕体的作用途径及其生理功能，本研究基于 CRISPR/Cas9 基因编辑系统构建表达双元 sgRNA 的 CRISPR 载体，用于敲除家蚕基因组中的 *BmSuc1* 基因。**【方法】** 根据目的基因 *BmSuc1* 的 ORF 序列设计 2 条 sgRNA，通过同源重组的方法分别插入 CRISPR 载体的 *Sal* I 和 *Nhe* I 酶切位点。进而利用转基因显微注射技术将该编辑载体注入 G_0 代蚕卵，经催青孵化饲养家蚕并自交制备 G_1 代蚕种。**【结果】** PCR 验证及测序结果均表明 CRISPR 编辑载体构建成功。根据 DsRed2 红色蛋白的荧光标记，从 G_1 代家蚕幼虫中成功筛选出阳性转基因个体。**【结论】** 本文详细介绍了表达双元 sgRNA 的 CRISPR 载体的构建方法，所获得的阳性转基因家蚕对于下一步探讨 *BmSuc1* 在家蚕糖类营养的吸收与利用途径中的作用奠定了重要的实验基础，有助于阐明蚕-桑相互选择和适应的分子机制。

关键词 CRISPR/Cas9，基因编辑，sgRNA，家蚕，β-呋喃果糖苷酶

Construction of a CRISPR vector to edit the β-fructofuranosidase gene *BmSuc1* and its incorporation in the silkworm *Bombyx mori*

ZHU Wen-Kai[1**] GAN Quan[1,2**] HE Wei[1] ZHANG Xin-Wei[1,2] ZHOU Yue[1]
WU Meng-Xue[1] SUN Tong-Tong[1] JIANG Song[1] MENG Yan[1,2***]

(1.School of Life Sciences, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China; 2.Anhui International Joint Research and Development Center of Sericulture Resources Utilization, Hefei 230036, China)

Abstract **[Objectives]** CRISPR/Cas9 is a novel genome-editing tool that has recently had broad application in many fields of research. CRISPR/Cas9 has the advantages of simplicity, efficiency and high specificity. *BmSuc1* encodes β-fructofuranosidase (β-FFase, a fructosyl-hydrolytic sucrase) in the silkworm *Bombyx mori* (Lepidoptera). *BmSuc1* is also the first β-FFase gene to have been cloned and identified in an animal. The physiological function of BmSUC1 in the silkworm is probably related to defense against mulberry alkaloids. However, further research is needed to confirm this. In order to clarify the role of BmSUC1 we used the CRISPR/Cas9 genome-editing system to construct a dual-sgRNA expressing vector. **[Methods]** We first designed two sgRNAs against *BmSuc1* ORF and inserted these into the *Sal* I and *Nhe* I restriction enzyme sites of a CRISPER edition vector using the homologous recombination method. We then microinjected the

*资助项目 Supported projects：国家自然科学基金项目（31172270）；国家级大学生创新训练项目（201610364026）；安徽省国际科技合作项目（1503062033）

**共同第一作者 Co-first authors，E-mail：kevincapricious@icloud.com；gq517988@163.com

***通讯作者 Corresponding author，E-mail：mengyan@ahau.edu.cn

收稿日期 Received：2017-12-25，接受日期 Accepted：2018-01-26

recombinant CRISPR plasmid into G_0 silkworm eggs and created a G_1 generation by G_0 sib-crossing. **[Results]** Both sgRNA insertions were verified by polymerase chain reaction and sequencing. DsRed2 fluorescence confirmed that we successfully obtained positive transgenic G_1 individuals. **[Conclusion]** This study provides a detailed description of the construction of a CRISPR edition vector to express dual sgRNAs. The resultant positive transgenic silkworms will help clarify the biological role of *BmSuc1*-coding β-FFase in the silkworm.

Key words CRISPR/Cas9, genome edition, sgRNA, *Bombyx mori*, β-fructofuranosidase

鳞翅目模式生物家蚕 *Bombyx mori* 是一种重要的产丝经济昆虫，对桑叶具有寡食性。除野桑蚕以外，很多家蚕的近缘种，却不能以桑叶为食。桑叶乳汁中含有高浓度的 DNJ、D-AB1 等糖类似生物碱（Asano *et al.*，2001），它们对于 α-葡萄糖苷酶有强烈的抑制作用，但不能抑制 β-呋喃果糖苷酶（β-fructofuranosidase，β-FFase，E.C.3.2.1.26）的活性（Daimon *et al.*，2008）。β-FFase 是一种蔗糖水解酶，广泛分布于动物以外的物种。2008 年，研究人员在家蚕体内首次发现了动物型 β-FFase 编码基因 *BmSuc1* 和 *BmSuc2*（Daimon *et al.*，2008）。该研究表明，*BmSuc1* 在家蚕幼虫的中肠、前部及中部丝腺高量表达，而 *BmSuc2* 未检测到其表达；*BmSuc1* 能够编码产生有活性的 β-FFase，且其活性不受 DNJ、D-AB1 等生物碱的抑制（Daimon *et al.*，2008）。由此推测，*BmSuc1* 编码的 β-FFase 可能在家蚕抵御桑叶生物碱的毒害作用中起着重要的生理作用（杨伟克等，2016）。

CRISPR/Cas9 系统是近年来广泛运用于生物学研究的基因编辑工具（Xing *et al.*，2016）。Cas9 是从微生物适应性免疫系统中发现的由 RNA 引导的核酸酶，能够对基因组进行精确、高效的编辑（Hwang *et al.*，2013）。Cas9 核酸酶中含有 RuvC 和 NHN 两个结构域，可造成 DNA 的双链断裂（Barrangou，2012）。Cas9 核酸酶依赖于单链引导 RNA（single guiding RNA，sgRNA）识别基因组中的 5′-NGG 基序（Protospacer adjacent motif，PAM），从而精确靶向到目的基因组进行编辑（Jiang *et al.*，2013）。sgRNA 由一条约 20 nt 的 CRISPR RNA (crRNA)和一段固定序列的 transRNA 构成（Hwang *et al.*，2013），CRISPR/Cas9 的靶向特异性由这条根据目标序列设计的 20 nt 左右的 crRNA 提供（Ran *et al.*，2013）。有研究表明，尽管 sgRNA 决定了大部分的编辑特异性，但由于其与互补 DNA 序列之间也会因位点及个别碱基的错配，而导致脱靶（Veres *et al.*，2014）。构建双元 sgRNA 的编辑载体，并在 sgRNA 设计时尽可能避免易造成脱靶的位点，可有效减少可能存在的脱靶效应（Ran *et al.*，2013）。

为了进一步弄清 β-FFase 在家蚕幼虫发育中的生理功能，以及了解 β-FFase 在家蚕避开桑叶生物碱毒害的防御系统中的作用机制，我们试图利用 CRISPR/Cas9 基因编辑系统对家蚕 *BmSuc1* 基因进行基因组敲除。本实验构建了用于 *BmSuc1* 基因敲除的携有双元 sgRNA 的 CRISPR 载体，并导入多化性家蚕转基因基础品系 Nistari，成功获得了该阳性转基因品系。

1　材料与方法

1.1　实验材料与主要试剂

用于家蚕转基因的基础品系 Nistari 及双元 sgRNA 原始表达载体 PXL-IE1DsRed2-U6-sgRNA (以 2 个 U6 启动子分别驱动表达，图 1：A)，由中国科学院上海植物生理生态研究所谭安江研究员实验室惠赠。同源重组试剂盒购自苏州神洲基因公司，DNA 凝胶回收试剂盒为 Promega 公司产品。大肠杆菌感受态细胞 DH5a 为全式金公司产品。pMD-19T 载体、连接转化试剂、质粒抽提试剂盒、质粒 DNA 纯化回收试剂盒及 DNA marker 等常规分子生物学试剂购自上海生工生物有限公司。蚕卵显微注射用重组质粒 DNA 抽提试剂盒 EndoFree Plasmid Maxi Kit 为 Qiagen 公司产品。

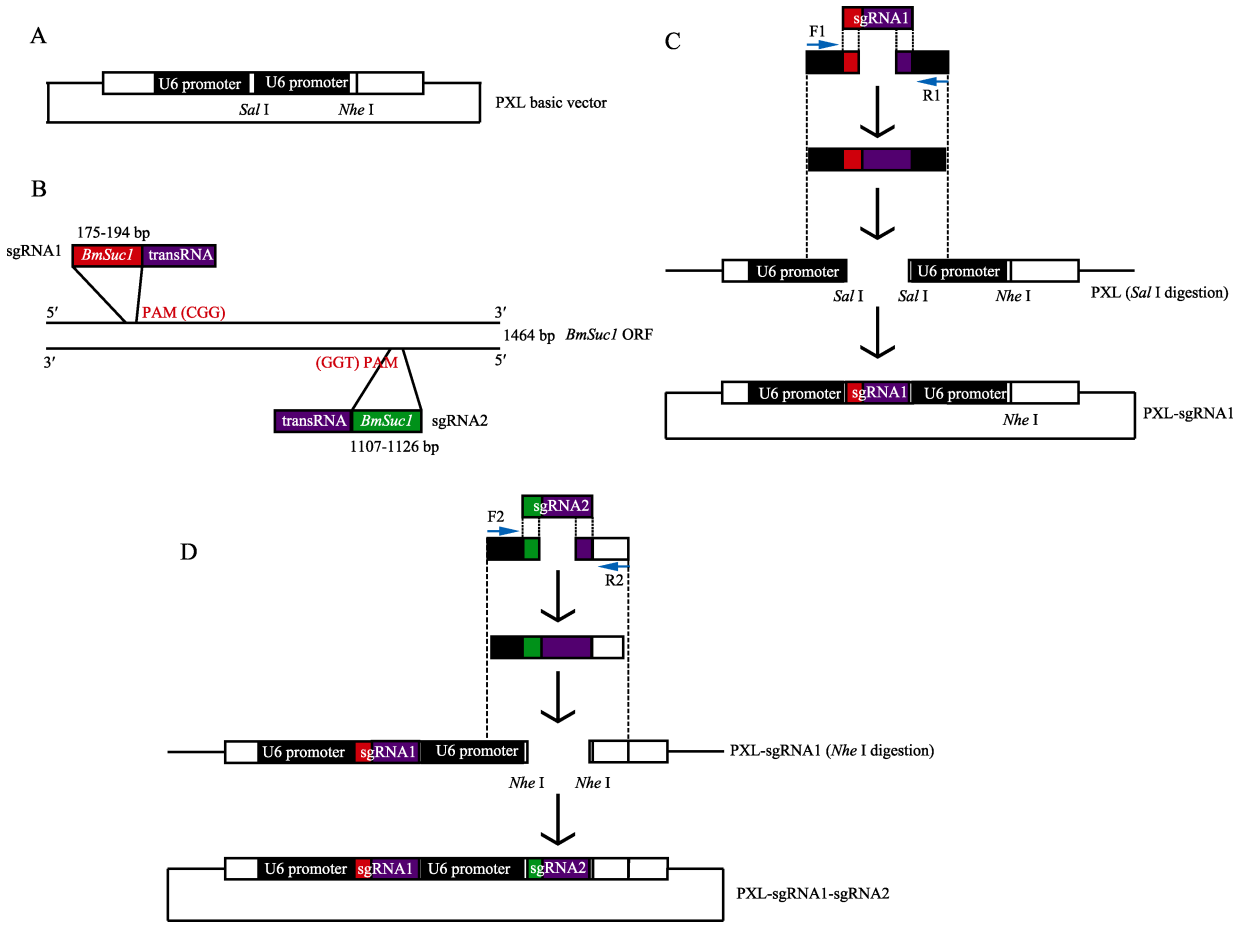

图 1　表达双元 sgRNA 的 CRISPR 载体的构建示意图

Fig. 1　The sketch map for construction of dual-sgRNA expressing CRISPR vector

A. PXL 基础载体；B. sgRNA 在 *BmSuc1* ORF 中的位置与构成；C. sgRNA1 同源片段的 PCR 扩增与重组构建；D. sgRNA2 同源片段的 PCR 扩增与双元重组构建。

A. PXL basic vector; B. Constitution of sgRNA and their positions in *BmSuc1* ORF; C. PCR amplification and homologous recombination of sgRNA1 and construction into PXL vector; D. PCR amplification and homologous recombination of sgRNA2 and dual construction.

1.2　实验方法

1.2.1　双元 sgRNA 的设计与合成　基于家蚕 *BmSuc1* 基因的开放阅读框（Open reading frame, ORF）序列，依据 sgRNA 的基本结构及设计原则，我们利用在线网站（www.crispr.dbcls.jp）进行 sgRNA 的靶标序列设计。sgRNA 的基本结构由 target sequence 和 transRNA 两部分组成。其中 target sequence 与 *BmSuc1* 序列同源，由 GGN（共 20 bp）+ NGG（PAM 识别位点，不参与 sgRNA 的构成）组成，transRNA 由一段 84 bp 的固定序列（GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTTTTT）组成。将设计的两条 sgRNA 交由上海生工生物有限公司合成（sgRNA1 和 sgRNA2，图 1：B）。

1.2.2　引物设计及 sgRNA 同源片段的制备　引物设计要保证目的片段两端至少有 15-25 bp 与载体酶切位点两端的序列一致，便于重组反应的进行。因此，PCR 所用引物中除了酶切位点和保护碱基外，还有至少 40-45 bp，包括 5′端与 PXL 载体同源的 20 bp 以及来自 sgRNA 特异性序列 20-25 bp（表 1）。

如图 1（C，D）所示，分别以合成的 sgRNA1 或 sgRNA2 为模板进行 PCR 扩增。50 μL PCR

表 1　PCR 引物序列
Table 1　Primer sequences used in PCR amplification

名称 Name	序列 Sequence（5′-3′）
sgRNA1-F	*GCGTCGAC*AATATCGTGCTCTACAAGTG**GGCTGGATGAATGACCCTAAGTTTT**
sgRNA1-R	*GCGTCGAC*ACATAACCTTATCGATACCG**AAAAAAAAGCACCGACTCGGTGCCA**
sgRNA2-F	*CGGCTAGC*AATATCGTGCTCTACAAGTG**GGCCGAATTCTATCGCTTGCGTTTT**
sgRNA2-R	*CGGCTAGC*TTGTTATAGATATCAAGCTG**AAAAAAAAGCACCGACTCGGTGCCA**

加粗部分为 sgRNA 同源序列，下划线部分为与 PXL 载体限制性酶切位点外侧同源的序列，斜体为酶切位点和保护碱基（sgRNA1，*Sal* I；sgRNA2，*Nhe* I）。

Bolded letters are homologous sequences to sgRNA. Underlined letters are homologous sequences to outside of restriction sites in PXL vector. Italic letters show restriction site and protective nucleotides (*Sal* I for sgRNA1, *Nhe* I for sgRNA2).

反应体系中包括 5×primeSTAR buffer 10 μL, 2.5 mmol·L^{-1} 的 dNTP 4 μL，100 μmol·L^{-1} 的上、下游引物各 2 μL，模板 DNA2 μL，高保真 DNA 聚合酶 0.5 μL 及 ddH$_2$O。PCR 反应程序：94 ℃预变性 10 min，后接 35 个循环，每个循环包括 98 ℃变性 30 s，65 ℃ (sgRNA1) 或 56 ℃（sgRNA2）退火 30 s，72℃延伸 30 s。循环结束后 72 ℃反应 10 min。

1.2.3　TA 克隆与测序验证　将 PCR 产物经 1.0%的琼脂糖凝胶电泳检测，并用 DNA 纯化回收试剂盒回收目的片段。按 TA 克隆载体试剂盒说明书将纯化得到的 PCR 产物连接到 pMD-19T 载体。然后按常规方法将连接产物转化进 DH5a 感受态细胞，用含 0.1%氨苄抗性的 LB 平板培养，筛选阳性克隆，挑取单菌落送公司进行测序，验证 sgRNA 同源片段的序列正确性，获得重组质粒 pMD-19T-sgRNA1 和 pMD-19T-sgRNA2。

1.2.4　同源重组及双元 sgRNA 表达载体的构建　如图 1（C）所示，用 *Sal* Ⅰ对原始载体 PXL-IE1DsRed2-U6-sgRNA 和测序正确的 pMD-19T-sgRNA1 重组质粒 DNA 进行单酶切，经琼脂糖凝胶电泳，用 DNA 纯化回收试剂盒回收酶切后的线性化 PXL 载体和 sgRNA1 同源片段。按照同源重组试剂盒的说明书要求，将 sgRNA1 同源片段和线性化载体以 3∶1 摩尔比加到 0.5 mL 试管中进行重组反应。20 μL 反应体系中包含反应液 10 μL，线性化载体 2 μL，sgRNA1 同源片段 6 μL 和 ddH$_2$O 2 μL。混匀，45 ℃放置 30 min 后，如上所述进行转化。挑取单克隆进行培养，经菌液 PCR 验证后，提取重组质粒 DNA，再行测序验证。如图 1（D）所示，用 *Nhe* Ⅰ酶切线性化处理测序正确的 PXL-IE1DsRed2-U6-sgRNA1 和 pMD-19T-sgRNA2 重组质粒 DNA，纯化回收后，将 sgRNA2 同源片段和包含 sgRNA1 的线性化 PXL 载体进行重组反应。同样，经转化、单菌落培养、PCR 验证及测序验证双元 sgRNA 表达载体 (PXL-IE1DsRed2-U6-sgRNA1-U6-sgRNA2)的成功构建。

1.2.5　显微注射与荧光筛选　蚕卵的转基因显微注射委托中国科学院上海生命科学研究院植物生理生态研究所谭安江小组操作。双元 sgRNA 表达载体的重组质粒构建成功后，导入大肠杆菌感受态细胞 DH5a 进行扩大培养，参照试剂盒操作手册提取重组质粒。质粒 DNA 再经酚-氯仿法纯化后，按 300 ng/ μL 的浓度注射入产卵 6 h 以内的 Nistari 蚕卵中，每粒蚕卵显微注射一次，总共注射 480 粒蚕卵。注射后正常催青，待蚕卵孵化后用新鲜的桑叶饲养（G_0）（Zhang *et al.*, 2015）。按常规方法进行 G_0 代母蛾自交，利用 Olympus BX53 荧光显微镜，从自交产生的 G_1 代转青卵或刚孵化的蚁蚕中筛选带有 DsRed 红色荧光标记的转基因阳性家蚕个体。

2　结果与分析

2.1　双元 sgRNA 的设计与合成

根据 *BmSuc1* 的 ORF 序列，我们利用在线网站（www.crispr.dbcls.jp）预测出了约 80 条 sgRNA 候选位点（图 2）。我们选用其中 2 个靶向位点，即 175-197 bp 和 1 104-1 126 bp 两处，

position start - end	+ −	target sequence 20mer+PAM (total 23mer)
3 - 25	+	GTTCGCCTGGAGCACACCGGTGG [gRNA]
8 - 30	-	CCTGGAGCACACCGGTGGCGCTG [gRNA]
19 - 41	-	CCGGTGGCGCTGGCCGCCGTGCT [gRNA]
33 - 55	+	CGCCGTGCTCGCCGTGACGCTGG [gRNA]
35 - 57	-	CCGTGCTCGCCGTGACGCTGGGA [gRNA]
44 - 66	-	CCGTGACGCTGGGACAAGCTCTC [gRNA]
102 - 124	+	AGAATACATCGCGGATAAAAAGG [gRNA]
144 - 166	-	CCGCCCGCACTATCACATCTCTC [gRNA]
147 - 169	-	CCCGCACTATCACATCTCTCCGC [gRNA]
154 - 176	+	TATCACATCTCTCCGCCCGTCGG [gRNA]
169 - 191	-	CCCGTCGGCTGGATGAATGACCC [gRNA]
175 - 197	+	GGCTGGATGAATGACCCTAACGG [gRNA]
239 - 261	+	TTTACCCTTACGACAGCGTTTGG [gRNA]
240 - 262	+	TTACCCTTACGACAGCGTTTGGG [gRNA]
241 - 263	+	TACCCTTACGACAGCGTTTGGGG [gRNA]
243 - 265	-	CCCTTACGACAGCGTTTGGGGTC [gRNA]
244 - 266	-	CCTTACGACAGCGTTTGGGGTCC [gRNA]
255 - 277	+	CGTTTGGGGTCCGATGCACTGGG [gRNA]
265 - 287	-	CCGATGCACTGGGGTCACGTTTC [gRNA]
287 - 309	+	CCAGTAGCAACCTGATCGACTGG [gRNA]
287 - 309	-	CCAGTAGCAACCTGATCGACTGG [gRNA]
303 - 325	+	CGACTGGGAACACCTCCCTACGG [gRNA]
318 - 340	-	CCCTACGGCTCTCATCCCTGAAA [gRNA]
337 - 359	+	GAAACCGAAATGTGCTTCTCGGG [gRNA]
340 - 362	+	ACCGAAATGTGCTTCTCGGGCGG [gRNA]
372 - 394	-	CCACGGAGATGACCTGGTACTGT [gRNA]
402 - 424	+	GGGCCGCGTCACTACTGACACGG [gRNA]
472 - 494	+	GTTAACTTCCGCAAGTATGAAGG [gRNA]
504 - 526	-	CCTCTCCTACGTGCCCGACAATT [gRNA]
517 - 539	-	CCCGACAATTCAGCTGATTTCAG [gRNA]
533 - 555	+	ATTTCAGAGACCCCAAGATTTGG [gRNA]
610 - 632	+	AGAGTGCTCCTTTACAGATCAGG [gRNA]
612 - 634	+	AGTGCTCCTTTACAGATCAGGGG [gRNA]
618 - 640	-	CCTTTACAGATCAGGGGATCTGT [gRNA]
658 - 680	+	TCGGTCTTGGGAGAATCAGACGG [gRNA]
667 - 689	+	GGAGAATCAGACGGCGACATGGG [gRNA]
677 - 699	+	ACGGCGACATGGGCTACATGTGG [gRNA]
678 - 700	+	CGGCGACATGGGCTACATGTGGG [gRNA]
706 - 728	+	CCCGATCTGTTTGAACTCGGCGG [gRNA]
734 - 756	-	CCATTTTCCTCTGGTCCCCTCAA [gRNA]
741 - 763	+	CCTCTGGTCCCCTCAAGGATTGG [gRNA]
741 - 763	-	CCTCTGGTCCCCTCAAGGATTGG [gRNA]
749 - 771	-	CCCCTCAAGGATTGGAACCGAAA [gRNA]
766 - 788	-	CCGAAAGGCGACAGATACAAGAA [gRNA]
781 - 803	+	TACAAGAACACGTATCAGACCGG [gRNA]
888 - 910	+	TTATGCGACTCAAACCATACAGG [gRNA]
889 - 911	+	TATGCGACTCAAACCATACAGGG [gRNA]
895 - 917	+	ACTCAAACCATACAGGGCGACGG [gRNA]
902 - 924	-	CCATACAGGGCGACGGCAAGACT [gRNA]
917 - 939	+	GCAAGACTTACTTGATTGGCTGG [gRNA]
962 - 984	+	ACCTTGAGAAAGAGGACGGCTGG [gRNA]
963 - 985	+	CCTTGAGAAAGAGGACGGCTGGG [gRNA]
963 - 985	-	CCTTGAGAAAGAGGACGGCTGGG [gRNA]
966 - 988	+	TGAGAAAGAGGACGGCTGGGCGG [gRNA]
967 - 989	+	GAGAAAGAGGACGGCTGGGCGGG [gRNA]
1003 - 1025	+	GTTAGAGAGCTGCAGCTGATCGG [gRNA]
1033 - 1055	+	ATCACCATGAACCCACTAGAAGG [gRNA]
1069 - 1091	+	AGAACCGATAGCGTCCATAACGG [gRNA]
1073 - 1095	-	CCGATAGCGTCCATAACGGAGAT [gRNA]
1083 - 1105	-	CCATAACGGAGATCTAGAGCCCC [gRNA]
1103 - 1125	-	CCCAGCAAGCGATAGAATTCGGCC [gRNA]
1104 - 1126	-	CCAGCAAGCGATAGAATTCGGCC [gRNA]
1199 - 1221	+	GTCTTGTCACAACAGTGACGTGG [gRNA]
1213 - 1235	+	GTGACGTGGGATCCTGAAGTCGG [gRNA]
1237 - 1259	+	AAAGTGATTGTTAACAGGAGCGG [gRNA]
1254 - 1276	+	GAGCGGAGAAGTAAGGCAAGTGG [gRNA]
1259 - 1281	+	GAGAAGTAAGGCAAGTGGAATGG [gRNA]
1260 - 1282	+	AGAAGTAAGGCAAGTGGAATGGG [gRNA]
1296 - 1318	+	GACCTCATGGAGACTATTCTTGG [gRNA]
1298 - 1320	-	CCTCATGGAGACTATTCTTGGAT [gRNA]
1311 - 1333	+	ATTCTTGGATGCAAGTTCTTTGG [gRNA]
1374 - 1396	+	GATCTTCTCTGATGGAGATTGGG [gRNA]
1413 - 1435	-	CCGGCAAACCTTGTCCGTAGAAG [gRNA]
1414 - 1436	-	CCGCAAACCTTGTCCGTAGAAGC [gRNA]
1421 - 1443	-	CCTTGTCCGTAGAAGCGTATCGA [gRNA]
1459 - 1481	-	CCCGCTTAAGCGTGTGATTTCTC [gRNA]
1460 - 1482	-	CCGCTTAAGCGTGTGATTTCTCA [gRNA]

图 2　在线网站设计的 **sgRNA** 靶向序列及其位置

Fig. 2　Online design for sgRNA target sequences

PAM 位点（5′-NGG）被短框标出，长框标出的区域为本研究所用的两个 sgRNA 靶标序列。

Short boxes represent PAM motif (5′-NGG). Target sequences for sgRNA1 and sgRNA2 used in this study are shown in two long boxes.

其 PAM 序列分别为 CGG 和 TGG（图 1：B，图 2）。因此，根据 sgRNA 的结构组成，我们设计合成的双元 sgRNA 的序列分别为：sgRNA1，**GGCTGGATGAATGACCCTAA**GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTTTTT（104 bp，下划线加粗为 20 bp 的 *BmSuc1* 靶标序列，其余为 transRNA 序列）和 sgRNA2，**GGCCGAATTCTATCGCTTGC-**GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTTTTT（104 bp，结构同 sgRNA1）。

2.2　sgRNA 同源片段的制备

为了 PCR 扩增包含目的 sgRNA 的同源片段，我们设计的 PCR 引物对如表 1 所示。分别以合成好的 sgRNA1、sgRNA2 为模板，进行 PCR 反应扩增。PCR 产物经过 1%琼脂糖凝胶电泳分析，所得 sgRNA 同源片段的长度（约 130 bp）与预期相符（图 3）。分别对所得的 sgRNA 同源片段 1（图 3：A）和片段 2（图 3：B）进行切胶回收，并与 pMD-19T 载体连接。经转化大肠杆菌和阳性克隆测序，结果如图 4（A，B）所示，两条 sgRNA 同源片段的碱基序列和设计的完全相符。

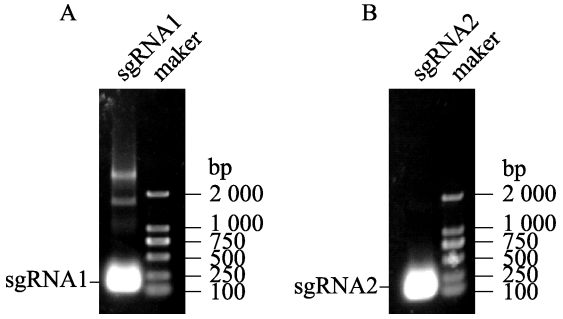

图 3　sgRNA1（**A**）和 **sgRNA2**（**B**）同源片段的 **PCR** 扩增

Fig. 3　PCR amplification for sgRNA1 (A) and sgRNA2 (B) homologous fragments

Maker：DNA 标准分子量。

Maker: DNA molecular standard.

2.3　同源重组及双元 CRISPR 载体的构建

原理如图 1（C）所示，将 PXL 原始载体经 *Sal* Ⅰ单酶切后，用相同的限制性内切酶把 sgRNA1 同源片断从 pMD-19T-sgRNA1 重组载体上酶切下来，进而同源重组到 PXL 原始载体上。以提取的重组质粒 DNA 为模板，PCR 验证结果表明同源重组成功（图 5：A），测序结果再次确认了 PXL-IE1DsRed2-U6-sgRNA1 重组载体的获得。同理，将 PXL-IE1DsRed2-U6-sgRNA1 载体用 *Nhe* Ⅰ单酶切后，用相同的限制性内切酶把

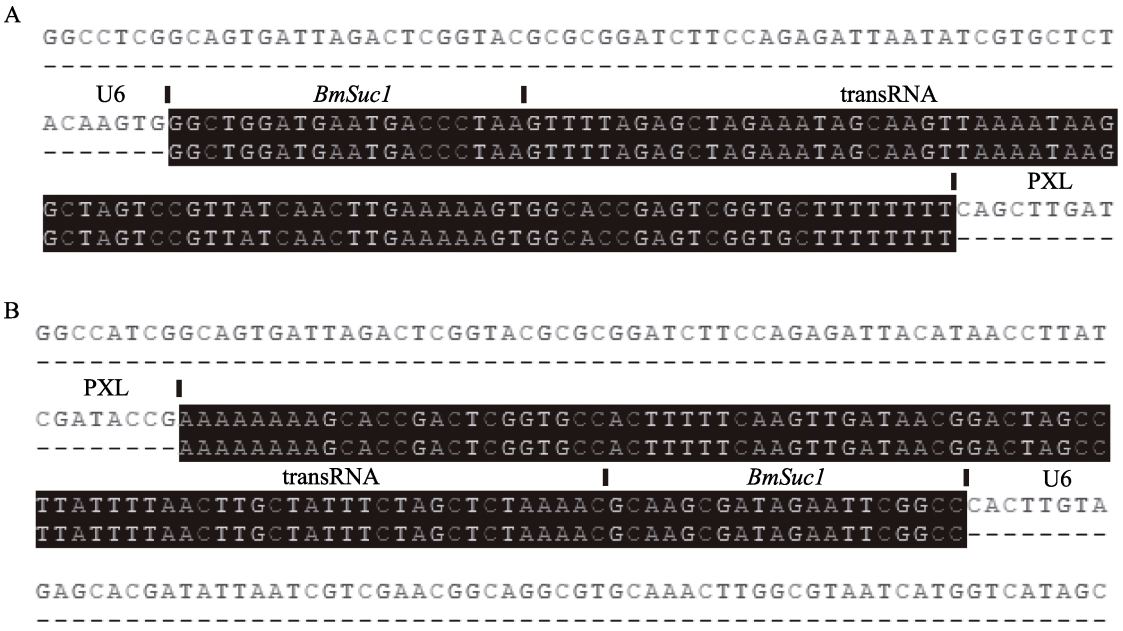

图 4　TA 克隆测序验证 sgRNA 同源片段的序列

Fig. 4　Confirmation of sgRNA homologous fragments by TA cloning and sequencing

A. sgRNA1；B. sgRNA2；上行，重组 pMD-19T 序列；下行，104 bp 的 sgRNA 序列。

A. sgRNA1; B. sgRNA2. Up, recombinant pMD-19T sequences, down, 104 bp sgRNA.

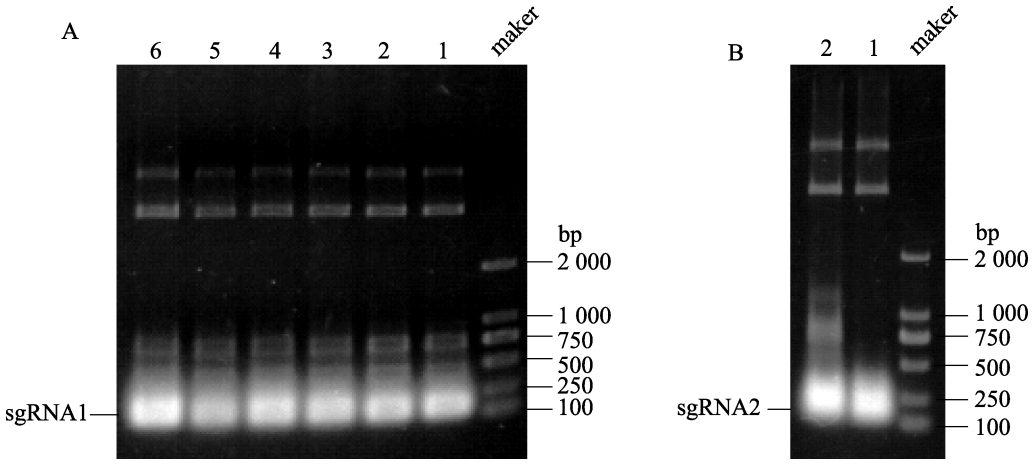

图 5　PCR 扩增验证 sgRNA 表达载体的构建

Fig. 5　Confirmation of the construction of sgRNA expressing vector by PCR amplification

A. PXL-IE1DsRed2-U6-sgRNA1 载体的 PCR 验证，泳道 1-6 为平行样；

B. PXL-IE1DsRed2-U6-sgRNA1-U6-sgRNA2 载体的 PCR 验证，泳道 1-2 为两个平行样；marker：DNA 分子量标准。

A. PXL-IE1DsRed2-U6-sgRNA1vector, lanes 1-6, duplicate samples;

B. PXL-IE1DsRed2-U6-sgRNA1-U6-sgRNA2 vector, lanes 1-2, two duplicate samples. marker: DNA molecular standard.

sgRNA2 同源片断从 pMD-19T-sgRNA2 重组载体上酶切下来，再同源重组到 PXL-IE1DsRed2-U6-sgRNA1 载体上（图 1：D）。提取重组质粒 DNA，经 PCR 和测序验证，我们成功获得了 PXL-IE1DsRed2-U6-sgRNA1-U6-sgRNA2 双元表达载体（图 5：B）。

2.4　转基因阳性个体的荧光筛选

显微注射后的 G_0 代 Nistari 蚕卵的孵化率约为 52%，共收集幼虫 249 头，用新鲜的桑叶饲养。

自交 80 个蛾区以制备 G_1 代，每个蛾区平均有 120 粒蚕卵孵化，在产生的 G_1 代中筛选转基因阳性个体。由于所用载体携带 DsRed2 红色荧光蛋白的表达序列，所以利用荧光显微镜筛选得到的红色荧光个体即为阳性转基因家蚕。结果如图 6 所示，我们从刚孵化的 G_1 代蚁蚕中成功筛选获得了 1 头表达双元 sgRNA 的 CRISPR 转基因品系，阳性率约为 0.01%。

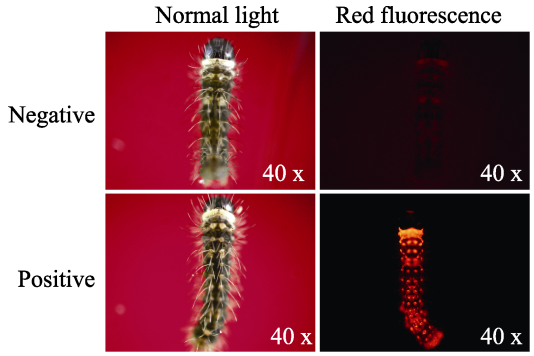

图 6　**CRISPR 转基因家蚕阳性个体的荧光筛选（40×）**
Fig. 6　The screening of positive CRISPR transgenic silkworms through red fluorescence (40×)

3　讨论

家蚕作为吐丝结茧的经济昆虫，为我国及世界上很多国家的经济社会发展作出了巨大贡献。然而，与同为模式生物的果蝇相比，家蚕的遗传操作研究相对缓慢。家蚕转基因技术自建立后（Tamura *et al.*，2015），近些年才逐步有所发展。基因重组、基因敲除等基因编辑技术在家蚕研究中严重滞后（马三垣和夏庆友，2015）。自 2004 年家蚕基因组草图（Xia *et al.*，2004）发表以来，其精细图谱（Consortium，2008）、遗传变异图谱（Xia *et al.*，2009）、表观遗传图谱（Xiang *et al.*，2010）等里程碑式的成果陆续发表，引起了国内外昆虫研究者的广泛关注。在此背景下，同时顺应近年来基因编辑技术的革命性进展，该类技术开始运用于家蚕功能基因组的研究（Daimon *et al.*，2014；Xia *et al.*，2014）。CRISPR/Cas9 基因编辑系统是近几年出现的新的基因敲除技术。相比于较早的 ZFN、TALEN 技术，CRISPR/Cas9 系统具有载体构建简单，靶向更精确，效率更高，可同时进行多位点编辑并且可遗传等多个优点（Cong *et al.*，2013；Wang *et al.*，2013）。

虽然相较于其他技术，CRISPR/Cas9 系统的靶向性有明显优势，但脱靶效应依然存在（Veres *et al.*，2014）。采用双元 sgRNA 系统的构建方式可进一步提高其靶向精确性（Ran *et al.*，2013）。单元 sgRNA 体系只在靶标位点形成局部的片段插入或缺失，很容易造成脱靶效应；而双元 sgRNA 体系可以在靶标区域的 2 个位点形成片段的插入或缺失，很可能造成两个 sgRNA 之间长区域的缺失，大大的降低了脱靶效应，相应的提升了基因组敲除效率。2013 年，谭安江课题组成功利用双元 sgRNA 系统敲除了家蚕基因组 *BmBLOS2* 基因，获得了 3 482 bp 缺失型转基因家蚕，验证了 *BmBLOS2* 与油蚕形成的重要关联（Wang *et al.*，2013）。2015 年，他们同样利用双元 sgRNA 系统，成功敲除了 *BmWnt1* 基因，获得了 18 081 bp 大片段缺失型转基因家蚕，证明了 *BmWnt1* 基因在家蚕胚胎发育时期的重要作用（Zhang *et al.*，2015）。这些应用实例说明双元 sgRNA 相对于单元 sgRNA 来说，有着更佳的基因组 DNA 编辑效应。因此，为了使得 CRISPR/Cas9 基因敲除系统能够特异性地敲除 *BmSuc1* 基因，尽可能降低脱靶问题，我们基于 *BmSuc1* 的开放阅读框序列，遵从 sgRNA 的基本结构及筛选原则，在 www.crispr.dbcls.jp 网站分别设计出 sgRNA1 及 sgRNA2 两条序列（图 2）。按图 1 所示原理进行设计和操作，经 PCR 和测序验证，结果表明我们成功构建了带有双元 sgRNA 的 CRISPR 表达载体 PXL-IE1DsRed2-U6-sgRNA1-U6-sgRNA2（图 5）。进而利用蚕卵显微注射技术，把该质粒载体导入家蚕基因组，经荧光筛选确认，我们获得的了阳性 CRISPR 转基因品系（图 6）。

sgRNA 由 target sequence 和 transRNA 两部分构成，其中 transRNA 由固定的长为 84 bp 的碱基组成。值得注意的是，target sequence 与目的敲除基因的序列同源（20 bp + PAM），PAM 的基序特征为 5′-NGG，是 sgRNA 引导 Cas9 核酸

酶进行基因组编辑的识别位点，因此 PAM 位点不参与 sgRNA 的序列设计。本研究选用以 GG（或 CC）碱基为头或尾的 20 bp *BmSuc1* 靶向序列（图 2），可增强 sgRNA 引导 Cas9 核酸酶进行基因组切割的特异性，从而提高对 *BmSuc1* 的编辑效率。另外，本文详细介绍了 sgRNA 的设计合成、同源重组和 CRISPR 表达载体的构建过程（图 1），为 CRISPR/Cas9 基因编辑系统在家蚕及其他物种中的运用提供了理论参考。

BmSuc1 是在家蚕体内发现的第一种动物型 β-呋喃果糖苷酶基因。虽然研究者推测该基因与家蚕抵抗桑叶生物碱相关，但具体分子机制尚不明确（Daimon *et al.*，2008）。本研究基于 CRISPR/Cas9 基因编辑系统，成功构建了针对 *BmSuc1* 基因编辑的 CRISPR 载体，并获得了阳性转基因品系（图 6）。为后续利用该 CRISPR 转基因品系和携带 Cas9 的转基因品系进行杂交，从其后代中筛选 CRISPR/Cas9-*BmSuc1* 的基因编辑体系，进一步解析 BmSUC1 在蚕体内的生理功能奠定了必要的实验基础。

致谢：感谢中国科学院上海植物生理生态研究所谭安江研究员对本研究提供的技术帮助。

参考文献 (References)

Asano N, Yamashita T, Yasuda K, Ikeda K, Kizu H, Kameda Y, Kato A, Nash RJ, Lee HS, Ryu KS, 2001. Polyhydroxylated alkaloids isolated from mulberry trees (*Morus alba* L.) and silkworms (*Bombyx mori* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(9): 4208–4213.

Barrangou R, 2012. RNA-mediated programmable DNA cleavage. *Nature Biotechnology* 30(9): 836–838.

Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, Hsu PD, Wu X, Jiang W, Marraffini LA, Zhang F, 2013. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 339(6121): 819–823.

Daimon T, Kiuchi T, Takasu Y, 2014. Recent progress in genome engineering techniques in the silkworm, *Bombyx mori*. *Dev. Growth Differ*, 56(1): 14–25.

Daimon T, Taguchi T, Meng Y, Katsuma S, Mita K, Shimada T, 2008. Beta-fructofuranosidase genes of the silkworm, *Bombyx mori*: insights into enzymatic adaptation of *B. mori* to toxic alkaloids in mulberry latex. *J. Biol. Chem.*, 283(22): 15271–15279.

Jiang W, Bikard D, Cox D, Zhang F, Marraffini LA, 2013. RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems. *Nature Biotechnology*, 31(3): 233–239.

Ma SY, Xia QY, 2015. Genome editing brings a new era of silkworm research. *Science of Sericulture*, 2: 195–203. [马三垣,夏庆友, 2015. 基因组编辑开启家蚕研究新纪元. 蚕业科学, 2: 195–203.]

Ran FA, Hsu PD, Lin CY, Gootenberg JS, Konermann S, Trevino AE, Scott DA, Inoue A, Matoba S, Zhang Y, Zhang F, 2013. Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell*, 154(6): 1380–1389.

Tamura T, Thibert C, Royer C, Kanda T, Abraham E, Kamba M, Komoto N, Thomas JL, Mauchamp B, Chavancy G, Shirk P, Fraser M, Prudhomme JC, Couble P, 2000. Germline transformation of the silkworm *Bombyx mori* L. using a piggyBac transposon-derived vector. *Nature Biotechnology*, 18(1): 81–84.

Veres A, Gosis BS, Ding Q, Collins R, Ragavendran A, Brand H, Erdin S, Cowan CA, Talkowski ME, Musunuru K, 2014. Low incidence of off-target mutations in individual CRISPR-Cas9 and TALEN targeted human stem cell clones detected by whole-genome sequencing. *Cell Stem Cell*, 15(1): 27–30.

Wang H, Yang H, Shivalila CS, Dawlaty MM, Cheng AW, Zhang F, Jaenisch R, 2013. One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell*, 153(4): 910–918.

Wang WY, Fu Y, Reyon D, Maeder ML, Tsai SQ, Sander JD, Peterson RT, Yeh JR, Joung JK, 2013. Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. *Nature Biotechnology*, 31(3): 227–229.

Xia Q, Guo Y, Zhang Z, Li D, Xuan Z, Li Z, Dai F, Li Y, Cheng D, Li R, Cheng T, Jiang T, Becquet C, Xu X, Liu C, Zha X, Fan W, Lin Y, Shen Y, Jiang L, Jensen J, Hellmann I, Tang S, Zhao P, Xu H, Yu C, Zhang G, Li J, Cao J, Liu S, He N, Zhou Y, Liu H, Zhao J, Ye C, Du Z, Pan G, Zhao A, Shao H, Zeng W, Wu P, Li C, Pan M, Li J, Yin X, Li D, Wang J, Zheng H, Wang W, Zhang X, Li S, Yang H, Lu C, Nielsen R, Zhou Z, Wang J, Xiang Z, Wang J, 2009. Complete resequencing of 40 genomes reveals domestication events and genes in silkworm (*Bombyx*). *Science*, 326(5951): 433–436.

Xia Q, Li S, Feng Q, 2014. Advances in silkworm studies accelerated by the genome sequencing of *Bombyx mori*. *Annual Review of Entomology*, 59: 513–536.

Xia Q, Wang J, Zhou Z, Li R, Fan W, Cheng D, Cheng T, Qin J, Duana J, Xu H, Li Q, Li N, Wang M, Dai F, Liu C, Lin Y, Zhao P, Zhang H, Liu S, Zha X, Li C, Zhao A, Pan M, Pan G, Shen Y, Gao Z, Wang Z, Wang G, Wu Z, Hou Y, Chai C, Yu Q, He N,

Zhang Z, Li S, Yang H, Lu C, Wang J, Xiang Z, Mita K, Kasahara M, Nakatani Y, Yamamoto K, Abe H, Ahsan B, Daimoni T, Doi K, Fujii T, Fujiwara H, Fujiyama A, Futahashi R, Hashimotol S, Ishibashi J, Iwami M, Kadono-Okuda K, Kanamori H, Kataoka H, Katsuma S, Kawaoka S, Kawasaki H, Kohara Y, Kozaki T, Kuroshu RM, Kuwazaki S, Matsushima K, Minami H, Nagayasu Y, Nakagawa T, Narukawa J, Nohata J, Ohishi K, Ono Y, Osanai-Futahashi M, Ozaki K, Qu W, Roller L, Sasaki S, Sasaki T, Seino A, Shimomura M, Shimomura M, Shin-I T, Shinoda T, Shiotsuki T, Suetsugu Y, Sugano S, Suwa M, Suzuki Y, Takiya S, Tamura T, Tanaka H, Tanaka Y, Touhara K, Yamada T, Yamakawa M, Yamanaka N, Yoshikawa H, Zhong YS, Shimada T, Morishita S, 2008. The genome of a lepidopteran model insect, the silkworm *Bombyx mori*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 38(12): 1036–1045.

Xia Q, Zhou Z, Lu C, Cheng D, Dai F, Li B, Zhao P, Zha X, Cheng T, Chai C, Pan G, Xu J, Liu C, Lin Y, Qian J, Hou Y, Wu Z, Li G, Pan M, Li C, Shen Y, Lan X, Yuan L, Li T, Xu H, Yang G, Wan Y, Zhu Y, Yu M, Shen W, Wu D, Xiang Z, Yu J, Wang J, Li R, Shi J, Li H, Li G, Su J, Wang X, Li G, Zhang Z, Wu Q, Li J, Zhang Q, Wei N, Xu J, Sun H, Dong L, Liu D, Zhao S, Zhao X, Meng Q, Lan F, Huang X, Li Y, Fang L, Li C, Li D, Sun Y, Zhang Z, Yang Z, Huang Y, Xi Y, Qi Q, He D, Huang H, Zhang X, Wang Z, Li W, Cao Y, Yu Y, Yu H, Li J, Ye J, Chen H, Zhou Y, Liu B, Wang J, Ye J, Ji H, Li S, Ni P, Zhang J, Zhang Y, Zheng H, Mao B, Wang W, Ye C, Li S, Wang J, Wong GK, Yang H, 2004, Biology Analysis Group, 2004. A draft sequence for the genome of the domesticated silkworm (*Bombyx mori*). *Science*, 306(5703): 1937–1940.

Xiang H, Zhu J, Chen Q, Dai F, Li X, Li M, Zhang H, Zhang G, Li D, Dong Y, Zhao L, Lin Y, Cheng D, Yu J, Sun J, Zhou X, Ma K, He Y, Zhao Y, Guo S, Ye M, Guo G, Li Y, Li R, Zhang X, Ma L, Kristiansen K, Guo Q, Jiang J, Beck S, Xia Q, Wang W, Wang J, 2010. Single base-resolution methylome of the silkworm reveals a sparse epigenomic map. *Nat. Biotechnol.*, 28(5): 516–520.

Xing Y, Yang Q, Ren J, 2016. Application of CRISPR/Cas9 mediated genome editing in farm animals. *Hereditas*，38(3): 217–226. [幸宇云, 杨强, 任军, 2016. CRISPR/Cas9 基因组编辑技术在农业动物中的应用. 遗传, 38(3): 217–226.]

Yang K, Tang F, Liu Z, Zhong J, Dong Z, 2016. Transcriptional expression of β-fructofuranosidase gene in midgut of the 5th instar *Bombyx mori* larvae. *Journal of Southern Agriculture*, 47(5): 721–725. [杨伟克, 唐芬芬, 刘增虎, 钟健, 董占鹏, 2016. 5 龄家蚕中肠 β-呋喃果糖苷酶基因转录表达分析. 南方农业学报, 47(5): 721–725.]

Zhang Z, Aslam AF, Liu X, Li M, Huang Y, Tan A, 2015. Functional analysis of *Bombyx* Wnt1 during embryogenesis using' the CRISPR/Cas9 system. *J. Insect Physiol.*, 79: 73–79.