

赵为民,戴超辉,陈哲,等. CRISPR/dCas9-KRAB 系统沉默猪 *LncRNA-NEAT1* 基因[J].江苏农业学报,2023,39(4):1036-1042.
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2023.04.013

CRISPR/dCas9-KRAB 系统沉默猪 *LncRNA-NEAT1* 基因

赵为民^{1,2,3}, 戴超辉^{1,2,3}, 陈哲^{1,2,3}, 涂枫^{1,2,3}, 李辉^{1,2,3}, 付言峰^{1,2,3},
李碧侠^{1,2,3}, 任守文^{1,2,3}, 程金花^{1,2,3}

(1.江苏省农业科学院畜牧研究所,江苏 南京 210014; 2.江苏省农业种质资源保护与利用平台,江苏 南京 210014; 3.农业农村部种养殖结合重点实验室,江苏 南京 210014)

摘要: 本研究利用 RT-PCR 检测 *LncRNA-NEAT1* 基因表达在细胞中的亚定位,采用 5'RACE 获得 *LncRNA-NEAT1* 基因的转录起始位点;利用 CRISPOR 软件对-300~0 bp 区域的 *LncRNA-NEAT1* 启动子序列设计 sgRNA 并构建到 px330 载体,通过转染细胞与 *T7E1* 酶切验证 sgRNA 效率;利用酶切和亚克隆方法将 dCas9-KRAB-BSD 片段替换 px330 载体的 Cas9 序列,形成重组 px330-dCas9-KRAB 载体;将验证有效的 sgRNA 构建到 px330-dCas9-KRAB 载体,形成 px330-sgRNA-dCas9-KRAB 载体。添加不同质量浓度的 Blasticidin S 处理细胞,以最小致死质量浓度来确定筛选质量浓度。转染 px330-sgRNA-dCas9-KRAB 载体并用 Blasticidin S 筛选细胞 7 d 后进行 *LncRNA-NEAT1* 基因的表达检测,同时对 sgRNA 在 *LncRNA-NEAT1* 基因启动子上的结合位点进行 Sanger 测序,以进一步验证上述结合位点是否发生切割。结果显示 *LncRNA-NEAT1* 主要表达于细胞核,而在细胞质中几乎不表达。5'RACE 获得了 *LncRNA-NEAT1* 5'端大约 270 bp 的序列。qPCR 检测结果显示,与对照组相比,sgRNA1 和 sgRNA2 能够显著抑制 *LncRNA-NEAT1* 的表达($P<0.05$)。Sanger 测序结果表明 sgRNA1 和 sgRNA2 所在的位点并没有发生碱基缺失和插入。研究结果为后续进一步研究 *LncRNA-NEAT1* 在先天性免疫反应中的功能奠定了基础。

关键词: CRISPR; dCas9-KRAB; *LncRNA-NEAT1* 基因; 猪; 基因沉默

中图分类号: S852.28 文献标识码: A 文章编号: 1000-4440(2023)04-1036-07

Silencing of pig *LncRNA-NEAT1* gene by CRISPR/dCas9-KRAB system

ZHAO Wei-min^{1,2,3}, DAI Chao-hui^{1,2,3}, CHEN Zhe^{1,2,3}, TU Feng^{1,2,3}, LI Hui^{1,2,3}, FU Yan-feng^{1,2,3},
LI Bi-xia^{1,2,3}, REN Shou-wen^{1,2,3}, CHENG Jin-hua^{1,2,3}

(1. Institute of Animal Science, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China; 2. Jiangsu Germplasm Resources Protection and Utilization Platform, Nanjing 210014, China; 3. Jiangsu Key Laboratory of Crop and Livestock Integration, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Nanjing 210014, China)

收稿日期:2022-08-19

基金项目:江苏省种业振兴揭榜挂帅项目[JBGS(2021)099];扬州市重点研发项目(现代农业)(YZ2021037);国家生猪产业技术体系项目(CARS-PIG-35);江苏省农业重大新品种创制项目(PZCZ201733)

作者简介:赵为民(1983-),男,湖北钟祥人,博士,副研究员,主要从事猪抗病育种研究。(E-mail) zhao_weimin1983@aliyun.com

通讯作者:程金花,(E-mail) jhcheng@jaas.ac.cn

Abstract: In this study, the sub-localization of *LncRNA-NEAT1* in cells was detected by RT-PCR. And the transcription initiation site of *LncRNA-NEAT1* gene was obtained by 5'RACE. The CRISPOR software was used to design the sgRNA in the promoter sequence of *LncRNA-NEAT1* within -300~0 bp region. The selected sgRNA was constructed into px330, and the efficiency of sgRNA was verified by transfected cells and *T7E1* digestion. Cas9 fragment in the px330 vector was replaced by the dCas9-KRAB-

BSD fragment using enzyme digestion and subcloning to form a recombinant px330-dCas9-KRAB vector. It was verified that the effective sgRNA was constructed into the px330-dCas9-KRAB vector to form the px330-sgRNA-dCas9-KRAB vector. Cells were treated by adding different concentrations of Blasticidin S. And the screening concentration was determined by the minimum lethal concentration. The px330-sgRNA-dCas9-KRAB vector was transfected into the cells. After seven days of screening cells with Blasticidin S, the expression of *LncRNA-NEAT1* gene was detected. Meanwhile, the binding site of sgRNA on the *LncRNA-NEAT1* gene promoter was subjected to Sanger sequencing to further verify whether the above binding site was cleaved. The results showed that *LncRNA-NEAT1* was mainly expressed in the nucleus, but hardly in the cytoplasm. The 5' RACE obtained a sequence of approximately 270 bp at the 5' end of *LncRNA-NEAT1*. The qPCR results showed that compared with the control group, sgRNA1 and sgRNA2 could significantly inhibit the expression of *LncRNA-NEAT1* ($P < 0.05$). Sanger sequencing results showed that there were no deletions and insertions at the sites where sgRNA1 and sgRNA2 were located. The results laid the foundation for further research on the function of *LncRNA-NEAT1* in the innate immune response.

Key words: CRISPR; dCas9-KRAB; *LncRNA-NEAT1* gene; pig; gene silencing

长链非编码 RNA (Long non-coding RNA, LncRNA) 是一类本身不编码蛋白、转录本长度超过 200 bp 的 RNA。研究结果表明 LncRNA 参与了 X 染色体失活、胚胎发育、基因印记、癌症、免疫等各种细胞生命活动^[1-5]。

近年来大量畜禽相关的 LncRNA 被鉴定出来, 这些 LncRNA 紧密参与了畜禽肌肉发育、免疫调控、繁殖等重要性状^[6-9], 注释和解析这些 LncRNA 的功能对进一步挖掘调控畜禽重要经济性状的功能元件具有深远意义。然而大多数 LncRNA 定位于细胞核, 而 RNAi 的工作系统主要在细胞质中发挥作用, 对定位于细胞核的 LncRNA 作用非常有限^[10-12], 这限制了 LncRNA 的功能解析。

CRISPRi 系统通过核酸酶活性失活的 Cas9 (dCas9) 和 sgRNA 的复合物结合到某个基因的转录起始位点 (Transcription start site, TSS) 附近, 物理性阻碍 RNA 聚合酶的通过, 从而导致基因沉默^[13]。通过 dCas9 融合基因抑制结构域如 KRAB (Krüppel-associated box), 形成 dCas9-KRAB 复合结构, 可进一步提高转录抑制的效率^[14-16]。Liu 等^[17] 利用 CRISPRi 系统鉴定了数百个与细胞生长相关的 LncRNA, Klann 等^[18] 利用 CRISPRi 系统鉴定了大量与基因表达调控相关的功能元件。CRISPRi 系统在抑制基因表达上也呈现出较强的特异性^[19-20], 是研究 LncRNA 功能的新一代工具。

LncRNA-NEAT1 是在研究肌细胞分化时发现的一个长链非编码 RNA^[21], 其作为核心组分主要参与细胞亚结构旁斑 (Paraspeckle) 的形成, 在细胞分化、癌症发生和病毒感染等生物学过程中发挥着重要作用^[21-23]。本课题组前期研究结果表明猪 *LncRNA-NEAT1* 基因在脂蛋白刺激下表达显著上调,

表明其在 Toll 样受体 2 (Toll Like Receptor 2, TLR2) 介导的先天性免疫反应中可能起到调控作用^[24]。本研究利用 CRISPR/dCas9-KRAB 系统来抑制 *LncRNA-NEAT1* 基因的表达, 为后续进一步研究其在先天性免疫反应中的功能奠定基础。

1 材料和方法

1.1 细胞、菌株与质粒

Trans5a 感受态菌株购于北京擎科生物科技有限公司, Lenti-dCas9-KRAB-blast 载体由华中农业大学赵长志惠赠, 猪 PK15 细胞、px330 载体由本实验室保存。

1.2 试剂

RNA 提取试剂盒购于南京诺唯赞医疗科技有限公司; DNA 提取试剂盒、DNA marker 购于北京擎科生物科技有限公司; 内切酶 *Bbs* I、*T7E1* 酶购于 NEB 公司; PCR 酶、T 载体、末端转移酶 *TdT*、T4 连接酶、qPCR 试剂、反转录试剂盒购于宝生物工程 (大连) 有限公司; 无内毒素质粒试剂盒购于天根生化科技 (北京) 有限公司; Blasticidin S HCl (灭瘟素 S) 购于南京碧云天生物技术有限公司; DNA 纯化回收试剂盒购于 Zymo Research Zymo research_安诺伦 (北京) 生物科技有限公司; DMEM 培养基、青链霉素购于武汉博士德生物工程有限公司; 胎牛血清购于 Biological Industries (BI) 公司; opti-MEM 和 Lipofectamine™ 3000 Transfection Reagent 购于赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司。

1.3 猪 *LncRNA-NEAT1* 基因的亚细胞表达分布

待细胞密度长至 80% 左右, 胰酶消化细胞, 用预冷

PBS 清洗两遍后加入 Buffer A (10 mmol/L tris-cl, 10 mmol/L NaCl, 0.5% IGEPAL[®] CA-630), 冰上放置 5 min, 离心后上清液用于细胞质 RNA 的提取。用 Buffer A 洗涤沉淀 2 次, 沉淀用于细胞核 RNA 的提取。

1.4 猪 *LncRNA-NEAT1* 基因的 5' 末端快速扩增 (5'RACE)

基于前期测序获得部分序列结果^[24], *LncRNA-NEAT1* 基因的 5' 末端快速扩增过程如下: 利用 oligodT 反转录 cDNA 第一链, 然后再利用 *TdT* 酶进行 5' 末端 dC-tailing, 回收纯化后, 用引物 5P (5'-AAG-CAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGGGGGGGG-3') 和 5' 末端的特异性引物 5' GSP (5'-CTGCCTCCTCCTTCAGACAAAG-3') 扩增其 5' 末端。PCR 扩增条件: 95 °C 5 min, 95 °C 30 s, 65 °C (-0.5 °C) 45 s, 72 °C 1 min, 15 个循环; 95 °C 1 min, 60 °C 45 s, 72 °C 1 min, 20 个循环; 72 °C 3 min。扩增的 PCR 产物经过 DNA 纯化回收后与 T 载体连接, 然后转化 Trans5a 感受态细胞, 后续进行测序验证。

1.5 *LncRNA-NEAT1* 基因启动子区域的 sgRNA 设计

针对 *LncRNA-NEAT1* 基因启动子区 (-300~0 bp) 利用 CRISPOR (<http://crispor.tefor.net/>) 在线设计 2 对 sgRNA。设计原则为选取 cfdSpecScore>80, Doench'16-Score>50 的 sgRNA。

1.6 px330-sgRNA 质粒构建

依据 sgRNA 的序列合成反向互补的单链寡核苷酸 sgF 和 sgR, 并在 sgF 的 5' 端添加 CACCG, 在 sgR 的 5' 端添加 AAAC。95 °C 变性 5 min, 室温冷却, 使 sgF 和 sgR 退火互补。Bbs I 酶切 px330 载体, 回收纯化后与退火的寡核苷酸连接, 转化 Trans5a 感受态细胞, 后续进行测序验证与无内毒素质粒提取。

1.7 px330-sgRNA-dCas9-KRAB 载体构建

通过酶切 px330 载体, 将 Cas9 序列替换为多克隆位点, 然后再将 dCas9-KRAB-BSD 插入到该多克隆位点。具体方法如下: 首先以 px330 载体为模板, 通过引物 F: 5'-TTGTACCGGTCGTACGGCTAGC-CTCGAGAAGCTTGAATTCCTAGAGCTCGCTGA-3' 和 R: 5'-GATCGCGCCGCTCCCCAGCAT-3' 进行 PCR 扩增。PCR 产物包含引入了多个酶切位点 (引物 F 下划线部分) 的 bGH poly(A) 片段。然后对 PCR 产物和 px330 载体分别进行 Age I 和 Not I 双酶切并进行连接, 转化 Trans5a 感受态细胞, 后续进行测序验证

与质粒提取。此重组后的载体为 px330-MCS。将筛选好的 sgRNA 先构建到 px330-MCS, 为 px330-sgRNA-MCS。然后对 px330-sgRNA-MCS 和 Lenti-dCas9-KRAB-blast 进行 BsiW I 和 Eco R I 双酶切, 将 Lenti-dCas9-KRAB-blast 载体中的 dCas9-KRAB-BSD 连接到 px330-sgRNA-MCS 中, 形成重组载体 px330-sgRNA-dCas9-KRAB。

1.8 Blasticidin S 筛选质量浓度摸索

猪 PK15 细胞铺板 12 孔板, 24 h 后待细胞密度达到 80% 左右, 分别添加 0 μg/ml、1 μg/ml、3 μg/ml、4 μg/ml 的 Blasticidin S, 每个质量浓度处理 3 次重复, 每 2 d 换 1 次, 在第 7 d 时观察细胞的死亡情况, 使细胞致死的最小剂量为后续的药筛质量浓度。

1.9 *LncRNA-NEAT1* 基因的沉默

猪 PK15 细胞在转染前 1 d 铺 12 孔板, 转染时密度大约 70%。对照组转染 px330-dCas9-KRAB, 实验组分别转染 px330-sgRNA1-dCas9-KRAB 和 px330-sgRNA2-dCas9-KRAB 质粒, 48 h 后, 利用 Blasticidin S 筛选细胞 7 d 后进行 *LncRNA-NEAT1* 基因的表达检测。

1.10 定量 PCR

1 μg RNA 反转录成 cDNA, 使用 QuantStudio 5 进行 qPCR 扩增。对照组与试验组各 3 个生物学重复, 每个样品重复 3 次。采用三步法扩增, 程序简要如下: 预变性 95 °C 2 min, 95 °C 15 s, 60 °C 30 s, 72 °C 30 s, 40 个循环。数据均以平均值±标准差表示。使用单因素方差分析各组之间的差异显著性。引物序列见表 1。

表 1 引物序列信息

Table 1 Primer sequence information

基因	引物序列(5'→3')	退火温度 (°C)	扩增长度 (bp)
<i>LncRNA-NEAT1</i>	F: TCCAACCTTGACGGACACTG	60	165
	R: TGCAGCTCTCAACTACCTGC		
<i>HPRT</i>	F: CCCAGCGTCGTGATTAGTGA	60	191
	R: TTGAGCACACAGAGGGCTAC		

2 结果与分析

2.1 猪 *LncRNA-NEAT1* 表达的亚细胞定位

利用低渗溶液将细胞总 RNA 分为细胞质和细

胞核 RNA, RT-PCR 结果显示 *LncRNA-NEAT1* 表达于细胞核, 在细胞质中几乎不表达(图 1)。*HPRT* 作为细胞内参基因, 其在细胞核内转录后会向细胞质中运输, 其 mRNA 在细胞质中的表达量多于细胞核。图 1 结果显示 *HPRT* 在细胞质的表达量高于细胞核, 符合其表达定位。

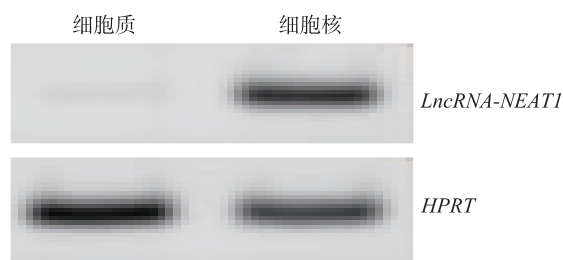


图 1 *LncRNA-NEAT1* 在细胞质与细胞核中的表达

Fig.1 Expression of *LncRNA-NEAT1* in cytoplasm and nucleus

2.2 猪 *LncRNA-NEAT1* 转录起始位点

为了确定 *LncRNA-NEAT1* 的转录起始位点, 通过 5'RACE 对其 5'端序列进行了克隆, 图 2 结果显示得到大约 270 bp 的条带, 与预期相符。

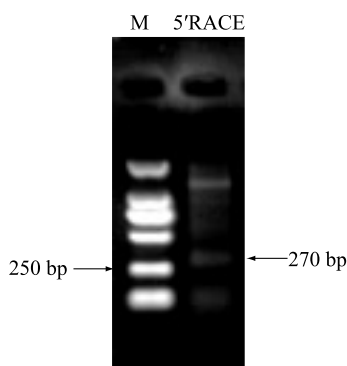


图 2 *LncRNA-NEAT1* 的 5'RACE 扩增结果

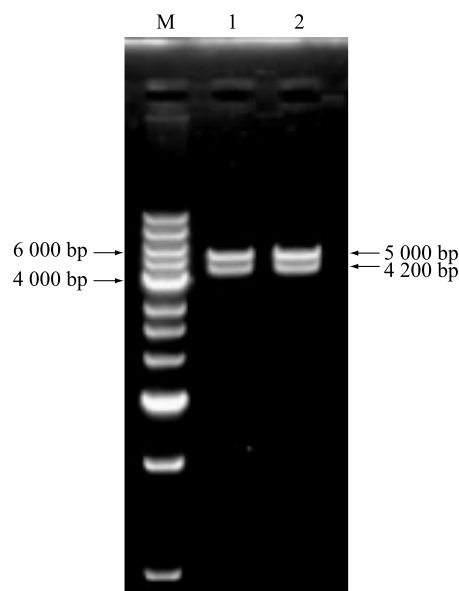
Fig.2 5'RACE amplification of *LncRNA-NEAT1*

2.3 猪 *LncRNA-NEAT1* 启动子区的 sgRNA 设计与效率验证

通过 CRISPOR 在线设计程序, 对 *LncRNA-NEAT1* 启动子区 (-300~0 bp) 设计了 2 对 sgRNA, 分别为 sgRNA1: 5'-CCGAGGCGTCTCCTCAGACA-3', PAM 为 GGG, 位置约 -200 bp, Doench 16-Score 参数为 63; sgRNA2: 5'-GAGCAATGCCCCGGT-GACG-3', PAM 为 CGG, 位置约 -150 bp, Doench 16-Score 参数为 63。

2.4 px330-sgRNA-dCas9-KRAB 载体的酶切验证

图 3 显示构建的 px330-sgRNA-dCas9-KRAB 经过 *BsiW* I 和 *Eco* R I 双酶切后, 得到约 4 200 bp 的 px330 骨架和 5 000 bp 的 dCas9-KRAB-BSD 片段, 与预期相符。



M: DNA 相对分子质量标准样品; 1: px330-sgRNA1-dCas9-KRAB 载体 *BsiW* I 和 *Eco* R I 双酶切; 2: px330-sgRNA2-dCas9-KRAB 载体 *BsiW* I 和 *Eco* R I 双酶切。

图 3 px330-sgRNA-dCas9-KRAB 质粒的酶切鉴定

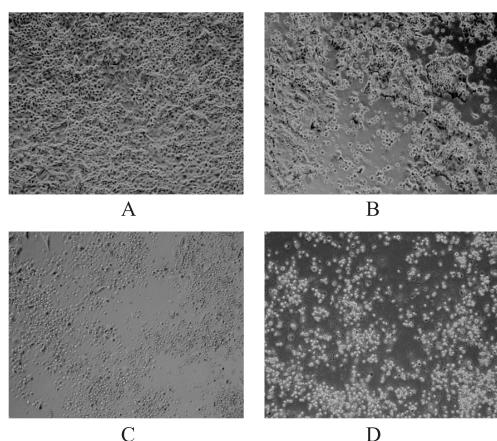
Fig.3 Identification of px330-sgRNA-dCas9-KRAB plasmid by enzyme digestion

2.5 Blasticidin S 筛选质量浓度的确定

图 4 结果显示, 在加 Blasticidin S 培养 7 d 后, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 质量浓度 Blasticidin S 处理的细胞只有部分细胞死亡(图 4B), 而 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 与 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 质量浓度 Blasticidin S 处理的细胞几乎全部死亡(图 4C、图 4D), 因此在后续的筛选中, Blasticidin S 筛选质量浓度为 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。图 4A 为阴性对照组, 细胞生长正常。

2.6 CRISPR/ dCas9-KRAB 系统沉默猪 *LncRNA-NEAT1* 的表达

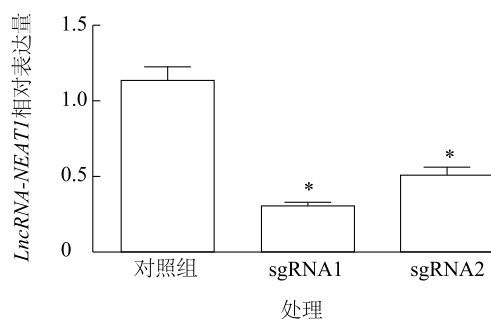
细胞转染 px330-sgRNA-dCas9-KRAB (试验组) 与 px330-dCas9-KRAB (对照组) 36 h 后, 添加 Blasticidin S 筛选细胞 7 d, 对 *LncRNA-NEAT1* 基因的表达进行 qPCR 检测。结果(图 5)显示, 与对照组相比, sgRNA1 和 sgRNA2 分别使 *LncRNA-NEAT1* 表达下降了 73% 和 55%, 达到显著水平 ($P < 0.05$)。



A: 阴性对照组; B: 1 µg/ml 的 Blasticidin S; C: 3 µg/ml 的 Blasticidin S; D: 4 µg/ml 的 Blasticidin S。

图 4 不同质量浓度 Blasticidin S 对细胞的致死效果

Fig.4 The killing effect of different concentrations of Blasticidin S on cells



* 表示与对照组相比差异显著 ($P < 0.05$)。

图 5 sgRNA1 和 sgRNA2 对 *LncRNA-NEAT1* 基因的沉默效果

Fig.5 Silencing effect of sgRNA1 and sgRNA2 on *LncRNA-NEAT1* gene

2.7 猪 *LncRNA-NEAT1* 启动子区的切割验证

为了进一步验证 CRISPR/ dCas9-KRAB 系统中的 sgRNA 是否会切割其结合位点,利用 Sanger 测序对 sgRNA1 和 sgRNA2 的结合位点进行分析。结果(图 6)显示试验组中 sgRNA1 和 sgRNA2 的结合位点和对照组一致,其序列没有发生碱基缺失或者插入。

3 讨论

近年来随着重测序以及功能基因组学的发展,猪相关的 LncRNA 与增强子等被大量鉴定出来^[6,25]。CRISPRi 与 RNAi 和 CRISPR/dCas9 敲除相比,在研究细胞核内相关的 LncRNA 或表达增强子(Enhancer-derived RNAs, eRNAs)上有着较大优势^[12,15],并且也可以进行高通量的筛选研究,为解析猪功能基因组以

及挖掘重要调控元件奠定基础。

LncRNA-NEAT1 在最初发现时定位于小鼠肌细胞核内,作为核心组分主要参与细胞亚结构旁斑(Paraspeckle)的形成^[21]。本试验发现猪 *LncRNA-NEAT1* 几乎只表达于细胞核,表明 *LncRNA-NEAT1* 的表达定位在物种间相对保守。由于 Lenti-dCas9-KRAB-blast 载体较大(约 14 kb),如果再联合转染 sgRNA 表达载体,会导致转染效率低,从而会影响基因沉默效果。本研究通过酶切与亚克隆构建了 px330-sgRNA-dCas9-KRAB 这种“All-in-one”载体,将 sgRNA 和 dCas9-KRAB 表达元件都整合到一个载体,大幅度缩减了载体,提高了表达效率^[26-27],从而进一步提升沉默效果。

位于 TSS 不同位置的 sgRNA 对 CRISPR/ dCas9-KRAB 的沉默效果具有决定性作用^[15,28]。因此本研究首先利用 5'RACE 确定了 *LncRNA-NEAT1* 的 TSS。由于大多数编码 LncRNA 基因,其表达水平相对于编码蛋白基因较低^[29-31],确定这些重要而表达水平较低的 LncRNA 的 TSS 并不容易,这也是利用 CRISPR/dCas9-KRAB 系统沉默 LncRNA 一个限制因素。

TSS 附近启动子区对基因表达水平有重要影响,其区域内碱基的删除或插入会影响其基因的表达^[32-34]。尽管 dCas9 呈现失活的状态,并不会切割 sgRNA 的结合位点^[13],为了进一步验证 *LncRNA-NEAT1* 的表达下调不是由于 sgRNA 切割 TSS 附近启动子区造成的,本研究利用 Sanger 测序对试验组 sgRNA 的结合位点进行序列分析,结果显示其结合位点并没有发生删除或者插入,表明 *LncRNA-NEAT1* 的表达下调是通过 CRISPR/dCas9-KRAB 系统来实现。

本研究获得了 *LncRNA-NEAT1* 基因的 TSS 位点,在其附近启动子区设计并验证了 2 对有效 sgRNA,通过构建“All-in-one”载体,利用 CRISPR/dCas9-KRAB 系统有效沉默了猪 *LncRNA-NEAT1* 基因的表达。

参考文献:

- [1] LODA A, HEARD E. *Xist* RNA in action: past, present, and future[J]. PLoS Genet, 2019, 15(9): e1008333.
- [2] KUANG L D, LEI M, LI C Y, et al. Whole transcriptome sequencing reveals that non-coding RNAs are related to embryo morphogenesis and development in rabbits[J]. Genomics, 2020, 112(3): 2203-2212.

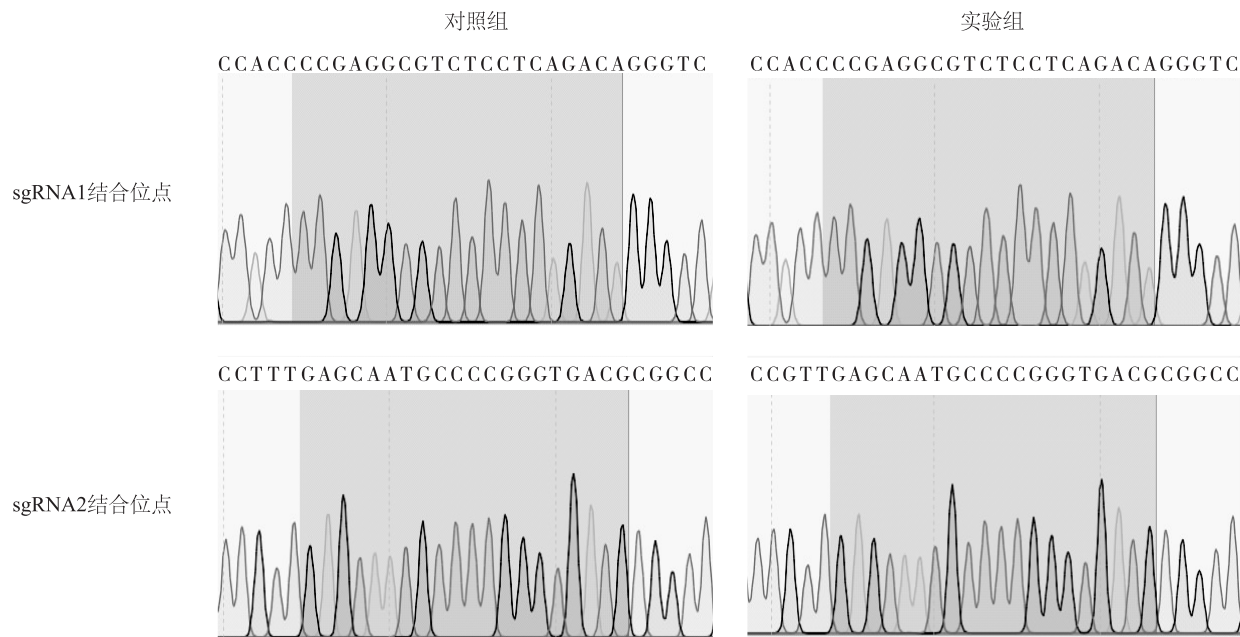


图6 猪 *LncRNA-NEAT1* 启动子区 sgRNA 结合位点的 Sanger 测序峰图

Fig.6 Sanger sequencing peak map of sgRNA binding sites in the promoter region of pig *LncRNA-NEAT1*

- [3] MACDONALD W A, MANN M R W. Long noncoding RNA functionality in imprinted domain regulation[J]. PLoS Genet, 2020, 16(8):e1008930.
- [4] LIU B, SUN L, LIU Q, et al. A cytoplasmic NF- κ B interacting long noncoding RNA blocks I κ B phosphorylation and suppresses breast cancer metastasis[J]. Cancer Cell, 2015, 27(3):370-381.
- [5] XU H, JIANG Y, XU X, et al. Inducible degradation of *LncRNA sros1* promotes IFN- γ -mediated activation of innate immune responses by stabilizing *stat1* mRNA[J]. Nat Immunol, 2019, 20(12):1621-1630.
- [6] JIN L, TANG Q, HU S, et al. A pig BodyMap transcriptome reveals diverse tissue physiologies and evolutionary dynamics of transcription[J]. Nat Commun, 2021, 12(1):3715.
- [7] GAO J, PAN Y, XU Y, et al. Unveiling the long non-coding RNA profile of porcine reproductive and respiratory syndrome virus-infected porcine alveolar macrophages[J]. BMC Genomics, 2021, 22(1):177.
- [8] LIU J, ZHOU Y, HU X, et al. Transcriptome analysis reveals the profile of Long non-coding RNAs during chicken muscle development[J]. Front Physiol, 2021, 12:660370.
- [9] DU Z Q, EISLEY C J, ONTERU S K, et al. Identification of species-specific novel transcripts in pig reproductive tissues using RNA-seq[J]. Anim Genet, 2014, 45(2):198-204.
- [10] DERRIEN T, JOHNSON R, BUSSOTTI G, et al. The GENCODE v7 catalog of human long noncoding RNAs: analysis of their gene structure, evolution, and expression[J]. Genome Res, 2012, 22(9):1775-1789.
- [11] FATICA A, BOZZONI I. Long non-coding RNAs: new players in cell differentiation and development[J]. Nat Rev Genet, 2014, 15(1):7-21.
- [12] BOETTCHER M, MCMANUS M T. Choosing the right tool for the job: RNAi, TALEN, or CRISPR[J]. Mol Cell, 2015, 58(4):575-585.
- [13] QI L S, LARSON M H, GILBERT L A, et al. Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression[J]. Cell, 2013, 152(5):1173-1183.
- [14] GILBERT L A, LARSON M H, MORSUT L, et al. CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes[J]. Cell, 2013, 154(2):442-451.
- [15] GILBERT L A, HORLBECK M A, ADAMSON B, et al. Genome-scale CRISPR-mediated control of gene repression and activation[J]. Cell, 2014, 159(3):647-661.
- [16] ALERASOOL N, SEGAL D, LEE H, et al. An efficient KRAB domain for CRISPRi applications in human cells[J]. Nat Methods, 2020, 17(11):1093-1096.
- [17] LIU S J, HORLBECK M A, CHO S W, et al. CRISPRi-based genome-scale identification of functional long noncoding RNA loci in human cells[J]. Science, 2017, 355(6320):7111.
- [18] KLANN T S, BLACK J B, CHELLAPPAN M, et al. CRISPR-Cas9 epigenome editing enables high-throughput screening for functional regulatory elements in the human genome[J]. Nat Biotechnol, 2017, 35(6):561-568.
- [19] THAKORE P I, DIPPOLITO A M, SONG L, et al. Highly specific epigenome editing by CRISPR/Cas9 repressors for silencing of distal regulatory elements[J]. Nat Methods, 2015, 12(12):1143-1149.
- [20] MANDEGAR M A, HUEBSCH N, FROLOV E B, et al. CRISPR

- Interference efficiently induces specific and reversible gene silencing in human iPSCs[J]. *Cell Stem Cell*, 2016, 18(4):541-553.
- [21] SUNWOO H, DINGER M E, WILUSZ J E, et al. Men epsilon/beta nuclear-retained non-coding RNAs are up-regulated upon muscle differentiation and are essential components of paraspeckles[J]. *Genome Res*, 2009, 19(3):347-359.
- [22] IMAMURA K, IMAMACHI N, AKIZUKI G, et al. Long noncoding RNA NEAT1-dependent SFPQ relocation from promoter region to paraspeckle mediates IL8 expression upon immune stimuli[J]. *Mol Cell*, 2014, 53(3):393-406.
- [23] LI K, YAO T, ZHANG Y, et al. NEAT1 as a competing endogenous RNA in tumorigenesis of various cancers: role, mechanism and therapeutic potential[J]. *Int J Biol Sci*, 2021, 17(13):3428-3440.
- [24] 赵为民, 方晓敏, 涂 枫, 等. 猪单核源性巨噬细胞受 FSL-1 刺激后 lncRNAs 的鉴定与特征分析[J]. *江苏农业学报*, 2019, 35(2):346-356.
- [25] ZHAO Y, HOU Y, XU Y, et al. A compendium and comparative epigenomics analysis of cis-regulatory elements in the pig genome[J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1):2217.
- [26] SAKUMA T, NISHIKAWA A, KUME S, et al. Multiplex genome engineering in human cells using all-in-one CRISPR/Cas9 vector system[J]. *Sci Rep*, 2014, 4:5400.
- [27] CEBOLA I. Deletion of regulatory elements with all-in-one CRISPR-Cas9 Vectors[J]. *Methods Mol Biol*, 2021, 2351:321-334.
- [28] RADZISHEUSKAYA A, SHLYUEVA D, MULLER I, et al. Optimizing sgRNA position markedly improves the efficiency of CRISPR/dCas9-mediated transcriptional repression[J]. *Nucleic Acids Res*, 2016, 44(18):e141.
- [29] LAM M T, LI W, ROSENFELD M G, et al. Enhancer RNAs and regulated transcriptional programs[J]. *Trends Biochem Sci*, 2014, 39(4):170-182.
- [30] CHEN H, DU G, SONG X, et al. Non-coding transcripts from enhancers: new insights into enhancer activity and gene expression regulation[J]. *Genomics Proteomics Bioinformatics*, 2017, 15(3):201-207.
- [31] NOJIMA T, PROUDFOOT N J. Mechanisms of lncRNA biogenesis as revealed by nascent transcriptomics[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2022, 23(6):389-406.
- [32] AOYAGI N, WASSARMAN D A. Developmental and transcriptional consequences of mutations in drosophila TAF (II) 60[J]. *Mol Cell Biol*, 2001, 21(20):6808-6819.
- [33] DANINO Y M, EVEN D, IDESES D, et al. The core promoter: at the heart of gene expression[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1849(8):1116-1131.
- [34] BUTLER J E, KADONAGA J T. The RNA polymerase II core promoter: a key component in the regulation of gene expression[J]. *Genes Dev*, 2002, 16(20):2583-2592.

(责任编辑:成纾寒)