



魏红江，二级教授，博士生导师，云南农业大学副校长，同时是国家重点研发计划首席科学家，全国兽医专业学位研究生教育指导委员会委员，云南省科技领军人才，云南省小型猪基因编辑与异种器官移植重点实验室主任，云南省异种器官移植工程研究中心主任，昆明市异种器官移植医学转化中心主任，云南省“兴滇英才支持计划”顶尖团队-云南农业大学异种器官移植供体及小型猪人类疾病模型研发团队带头人。长期从事小型猪新品种培育及实验动物化、利用动物基因编辑和体细胞克隆技术开展异种器官移植、小型猪疾病模型构建、孤雌生殖以及地方畜禽遗传资源保护等方面的研究。2017年合作获得世界首批内源性逆转录病毒失活克隆猪，2020年合作获得内源性逆转录病毒失活且12个基因编辑的异种移植供体猪，独立构建了单个基因到12个基因编辑的人源化异种器官移植克隆猪，并与国内多家医院合作开展基因编辑供体猪肝脏和肾脏的异种移植人体临床试验。主持国家级和省部级科研项目40余项，以第一作者或通信作者身份在*Science*、*Nature Biomedical Engineering*等学术刊物发表论文80余篇，授权发明专利（排名第一）11项，制定云南省地方标准2项，获省部级技术发明一等奖（排名第一）1项，其他省部级科技奖3项。

GTKO/hCD55 基因编辑异种器官移植供体猪的构建及功能验证

王娇祥^{1,2,3}，张璐^{1,2,4}，陈姝含^{1,2,4}，角德灵^{1,2,4}，赵恒^{1,2,4}，魏太云^{1,2,4}，郭建雄^{1,2,4}，徐凯祥^{1,2,4}，魏红江^{1,2,3,4}

(1. 云南省小型猪基因编辑与异种器官移植重点实验室，昆明 650201; 2. 云南省异种器官移植工程研究中心，昆明 650201; 3. 云南农业大学动物科学技术学院，昆明 650201; 4. 云南农业大学动物医学院，昆明 650201)

【摘要】 目的 开发 α -1,3-半乳糖苷转移酶基因敲除(α -1,3-galactosyltransferase gene-knockout, GTKO)/人CD55(human CD55, hCD55)转基因的基因编辑异种器官移植供体猪并进行功能验证。**方法** 利用成簇的规律间隔的短回文重复序列(clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR)/CRISPR相关蛋白核酸酶9(CRISPR-associated nuclease 9, Cas9)、PiggyBac转座子技术和体细胞克隆技术，构建GTKO/hCD55基因编辑的滇南小耳猪，通过Sanger测序、实时荧光定量PCR、流式细胞术、免疫荧光实验、重亚硫酸盐测序、抗原抗体结合实验和补体依赖的细胞毒性实验分析其表型及功能。**结果** 将基因编辑载体PX458和PiggyBac转染至野生型胎猪成纤维细胞后，经嘌呤霉素药物筛选获得48个单细胞克隆，挑选2个单细胞克隆进行体细胞克隆，获得2个妊娠33 d的胎猪。F01胎猪的 α -1,3-半乳糖基转移酶(α -1,3-galactosyltransferase, GGTA1)基因型为-17 bp和野生型(wild type, WT)，F02胎猪的GGTA1基因型为-26 bp/+2 bp和-3 bp。两个胎猪的hCD55 mRNA表达量均显著高于WT猪($P < 0.01$)，以F02胎猪作为供体细胞来源进行连续克隆后获得11头存活仔猪，鉴定均为GTKO/hCD55基因编辑猪。这些猪的 α -Gal抗原表达缺失，但hCD55出现弱表达或不表达的情况。因此，对hCD55基因的CpG岛进行甲基化分析，结果表明在不表达hCD55的肾脏组织中hCD55基因的CpG岛被高甲基化，而表达hCD55的肾脏组织中hCD55基因的CpG岛未被甲基化或部分被甲基化。对hCD55基因的CpG岛进行密码子优化降低CG含量后，可实现hCD55基因的稳定表达。此外，抗原抗体结合实验表明人IgM结合到GTKO/hCD55基因编辑猪成纤维细胞的数量显著小于WT猪($P < 0.01$)；补体依赖的细胞毒性实验表明GTKO/hCD55猪的成纤维细胞成活率明显高于WT猪($P < 0.01$)。**结论** 成功获得了GTKO/hCD55基因编辑异种器官移植供体猪，并通过密码子优化降低了hCD55基因CpG岛的CG含量，从而有效避免甲基化导致的基因表达沉默。本研究可为供体猪的开发提供借鉴，将指导后续异种器官移植研究。

【关键词】 异种器官移植；滇南小耳猪； α -1,3-半乳糖基转移酶；人CD55

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1674-5817(2025)04-0379-14



【基金项目】 国家重点研发计划-干细胞及转化研究重点专项“异种移植用人源化基因编辑供体猪的构建及临床前研究”(2019YFA0110700)

【第一作者】 王娇祥(1996—)，女，博士研究生，主要从事基因编辑研究。E-mail: jiaoxiangwang2021@126.com；

张璐(2000—)，女，硕士研究生，主要从事基础兽医学研究。E-mail: 3077289149@qq.com；

陈姝含(1996—)，女，硕士研究生，主要从事基础兽医学研究。E-mail: chenshuhuan090203@163.com

【通信作者】 魏红江(1971—)，男，博士，教授，主要从事动物基因编辑与体细胞克隆技术研究。E-mail: hongjiangwei@126.com。ORCID: 0000-0002-5663-1093

Construction and Functional Validation of GTKO/hCD55 Gene-Edited Xenotransplant Donor Pigs

WANG Jiaoxiang^{1,2,3}, ZHANG Lu^{1,2,4}, CHEN Shuhan^{1,2,4}, JIAO Deling^{1,2,4}, ZHAO Heng^{1,2,4}, WEI Taiyun^{1,2,4}, GUO Jianxiong^{1,2,4}, XU Kaixiang^{1,2,4}, WEI Hongjiang^{1,2,3,4}

(1. Yunnan Province Key Laboratory for Porcine Gene Editing and Xenotransplantation, Kunming 650201, China; 2. Yunnan Province Xenotransplantation Research Engineering Center, Kunming 650201, China; 3. Faculty of Animal Science and Technology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China; 4. College of Veterinary Medicine, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China)

Correspondence to: WEI Hongjiang (ORCID: 0000-0002-5663-1093), E-mail: hongjiangwei@126.com

[ABSTRACT] Objective To develop GTKO (α -1, 3-galactosyltransferase gene-knockout, GTKO)/hCD55 (human CD55) gene-edited xenotransplant donor pigs and verify their function. **Methods** In this study, CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats)/Cas9 (CRISPR-associated nuclease 9), PiggyBac transposon technology and somatic cell nuclear transfer technology were used to construct GTKO/hCD55 gene-edited Diannan miniature pigs. The phenotype and function of GTKO/hCD55 pigs were analyzed by Sanger sequencing, real-time fluorescence quantitative PCR, flow cytometry, immunofluorescence, bisulfite sequencing, antigen-antibody binding assays, and complement-dependent cytotoxicity assays. **Results** After transfection of PX458 and PiggyBac gene editing vectors into wild-type fetal pig fibroblasts, 48 single-cell colonies were obtained through puromycin drug screening. Two single-cell colonies were selected for somatic cell nuclear transfer, resulting in two fetal pigs at 33 days of gestation. The *GGTA1* (α -1,3-galactosyltransferase) genotypes of fetal pig F01 were -17 bp and wild type (WT), while the *GGTA1* genotypes of fetal pig F02 were -26 bp/+2 bp and -3 bp. The hCD55 mRNA expression levels of both fetal pigs were significantly higher than those of WT pigs ($P < 0.01$). The fetal pig F02 was selected as the donor cell source for recloning, 11 surviving piglets were obtained, all identified as GTKO/hCD55 gene-edited pigs. These pigs showed absence of α -Gal antigen expression, but weak or no expression of hCD55 was observed. Methylation analysis of the hCD55 gene's CpG island showed hypermethylation in kidney tissue lacking hCD55 expression, whereas it was not methylated or partially methylated in kidney tissue expressing hCD55. Moreover, codon optimization of the CpG island of the hCD55 gene to reduce CG content could achieve stable expression of the hCD55 gene. In addition, antigen-antibody binding experiment showed that the amount of human IgM binding to GTKO/hCD55 gene-edited pig fibroblasts was significantly lower than that of WT pigs ($P < 0.01$). Complement-dependent cytotoxicity experiment showed that the survival rate of fibroblasts in GTKO/hCD55 pigs was significantly higher than that in WT pigs ($P < 0.01$). **Conclusion** This study demonstrates the successful generation of GTKO/hCD55 gene-edited xenotransplant donor pigs. Methylation-induced gene silencing of the hCD55 gene can be effectively avoided by reducing the CG content of the CpG island through codon optimization. This study provides a reference for the development of xenotransplant donor pigs and guides subsequent research on xenotransplantation.

[Key words] Xenotransplantation; Diannan miniature pigs; α -1,3-galactosyltransferase; Human CD55

近年来, 异种器官移植领域不断取得新突破^[1], 猪到非人灵长类的心脏和肾脏异种移植均已实现多例长期存活^[2-4]。而且, 基因编辑供体猪的心脏^[5-6]、肾脏^[7-8]和肝脏^[9]先后移植给了终末期器官衰竭患者, 并能在人体内正常发挥功能。因此, 开发和优化基因编辑供体猪是推进异种器官移植研究的关键。

α -1,3-半乳糖基转移酶(α -1,3-galactosyltransferase,

GGTA1) 催化合成的 α -半乳糖基抗原(α -Gal)表位会造成超急性排斥反应, 来自GGTA1基因敲除(α -1, 3-galactosyltransferase gene-knockout, GTKO)猪的器官移植能提高非人灵长类动物的长期存活率^[10], 然而GTKO猪器官在异种移植后期仍出现抗体介导的排斥反应, 导致移植功能丢失^[11]。为了解决这一问题, 通常在猪体内过表达一个或多个补体调节蛋白, 可

抑制抗原抗体复合物激活补体系统导致的移植物功能丢失^[12-13]。由 *CD55* 基因编码的人类衰变加速因子 (decay-accelerating factor, DAF) 可加速 C3 转化酶衰减, 进而抑制补体级联反应^[14-15], 保护异种移植组织免受补体介导的损伤^[16]。非人灵长类动物接受 GTKO/*hCD55* 基因编辑猪的肾脏移植后最长存活了 499 d^[17], 是目前基因编辑数量最少, 存活时间最长的供体猪类型。目前, 成都中科奥格生物科技有限公司已开发出 GTKO/*hCD55* 基因编辑的异种器官移植供体猪^[18], 但存在 *hCD55* 低表达的情况, 而低表达 *hCD55* 的猪细胞对人源补体依赖细胞毒性的抵抗能力不如高表达 *hCD55* 的猪细胞^[19]。此外有研究表明, 与 *hCD46* 相比, *hCD55* 的抗补体依赖的细胞毒性效果更佳^[4]。因此, 开发能稳定高表达 *hCD55* 的 GTKO/*hCD55* 基因编辑猪, 作为异种器官移植供体猪的基础版本, 对筛选出更合适的多基因编辑异种器官移植供体猪具有重要意义。

本研究利用成簇的规律间隔的短回文重复序列 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR) /CRISPR 相关蛋白核酸酶 9 (CRISPR-associated nuclease 9, Cas9) 系统、PiggyBac 转座子系统结合体细胞克隆技术, 构建 GTKO/*hCD55* 基因编辑的滇南小耳猪, 并进行基因序列优化、表型分析和功能验证, 筛选出可稳定高表达 *hCD55* 的基因编辑供体猪, 以期对异种器官移植供体猪的开发提供借鉴。

1 材料与方法

1.1 实验材料及仪器

本研究所用雄性 O 型血野生型 (wild type, WT) 滇南小耳猪胎猪成纤维细胞和代孕母猪 (160~210 日龄的三元猪) 均由云南省小型猪基因编辑与异种器官移植重点实验室自行培育 [SCXK (滇) K2020-0003], 实验用小型猪质量合格证号为 2023SC010000311。动物实验获云南农业大学生命科学伦理委员会批准 (伦理批件号 202204020)。所有实验均在云南农业大学云南省动物基因编辑与体细胞克隆技术重点实验室 [SYXK (滇) K2020-0005] 完成。

PX458 质粒 (货号 112220) 购自美国 Addgene 公司; Super PiggyBac 质粒由中国科学院上海生命科学研究院神经科学研究所杨辉老师赠送; 所有核酸订购和测序均在擎科生物科技有限公司完成; 兔补体 (货号 S7764-5ML) 购自美国 Sigma-Aldrich 公司; 细胞裂解

液 (货号 PD101-01)、一步法克隆试剂盒 (货号 C115-01) 购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司; PCR 纯化试剂盒 (货号 AP-PCR-50) 购自美国 Axygen 公司; pMD-19T (货号 6013)、PrimeScript RT 试剂盒 (货号 RR047B)、TB Green (货号 RR820B) 和 LA Taq DNA 聚合酶 (货号 RR002A) 购自日本 TaKaRa 公司; TransZol UP (货号 ET111-01) 购自北京全式金生物技术股份有限公司; 抗人 *CD55* 细胞流式抗体 (货号 555694) 购自美国 BD 公司; FITC 偶联的 α -Gal 细胞流式抗体 (货号 ALX-650-001F-MC05) 购自美国 Enzo Life Science 公司; 组织自发荧光淬灭剂 A 液和 B 液 (货号 G1221-5ML)、偶联 CY3 标记的羊抗兔二抗 (货号 GB21303)、抗荧光淬灭封片剂 (货号 G1401-5ML) 购自武汉赛维尔生物科技股份有限公司; *CD55* 兔一抗 (货号 ab230638) 购自英国 Abcam 公司; DAPI (货号 62248) 购自美国 Thermo 公司; FITC 偶联的抗人 IgG 抗体 (货号 62-8411)、FITC 偶联的抗人 IgM 抗体 (货号 18842) 购自美国 Invitrogen 公司; 钙黄绿素 AM (货号 C2012-0.1mL)、碘化丙啶 (货号 ST511) 购自上海碧云天生物技术股份有限公司; 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) (货号 WS500T) 购自澳大利亚 Ausbian 公司; DMEM 培养基 (货号 C11995500BT) 购自美国 Gibco 公司; 血液/细胞/组织基因组 DNA 提取试剂盒 (货号 DP304)、无内毒素质粒小提中量试剂盒 (货号 DP118) 购自天根生化科技 (北京) 有限公司; EZ DNA Methylation™ 试剂盒 (货号 D5001) 购自美国 Zymo Research 公司; 琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒 (货号 CW2302M) 购自江苏康为世纪生物科技股份有限公司。

流式细胞仪 (CytoFLEX) 购自美国 Beckman Coulter 公司; Lonza-4D 核转染仪 X 模块 (AAF-1003X) 购自德国 Lonza 公司; 低速离心机 (centrifuge 5702) 购自德国 Eppendorf 公司; 显微操作仪 (HMS-320D)、细胞融合仪 (HCF-230)、四仓培养箱 (HincubatorDI-4R) 购自广州市华粤行仪器科技有限公司; 测序仪 (3730) 购自美国 Applied Biosystems 公司; 通用型动物麻醉机 (R620-S1-IEC) 购自深圳市瑞沃德生命科技有限公司。

1.2 *GGTA1* 基因敲除和 *hCD55* 基因过表达载体的构建

针对猪 *GGTA1* 基因 (Gene ID: 396733) 的第 8 外显子区域进行 Sanger 测序以对单核苷酸多态性 (single

nucleotide polymorphism, SNP) 进行分析。通过在线网站 (<https://zlab.squarespace.com/guide-design-resources>) 设计单链向导 RNA (single guide RNA, sgRNA), sgRNA1 序列为 5'-GATGCGCATGAAGACCATCG-3'; sgRNA2 序列为 5'-GCTACAGGCCTGGTGGTACA-3', 将两个 sgRNA 克隆到 PX458 载体上, 构建 *GGTA1* 基因敲除载体。将 1 179 bp 的人延伸因子 1 α (elongation factor 1 alpha, EF-1 α) 启动子和 1 143 bp 的 hCD55 基因以及嘌呤霉素 (puromycin, Puro) 抗性基因克隆到 PiggyBac 转座子载体上, 构建 hCD55 过表达载体 (LD78-EF1 α -hCD55-P2A-Puro)。

1.3 GTKO/hCD55 基因编辑单细胞克隆的制备与鉴定

转染前 2 d 复苏 O 型血 WT 滇南小耳猪胎猪成纤维细胞并传代培养。待细胞生长融合度为 40%~60% 时, 用 0.25% 胰蛋白酶溶液消化后, 加入含 2% FBS 的细胞培养基终止消化, 通过低速离心机 1 200 r/min, 室温离心 3 min, 收集细胞沉淀并准确计数。取约 3×10^5 个细胞再次离心, 充分去除上清液。将 sgRNA1、sgRNA2、LD78-EF1 α -hCD55-P2A-Puro 和 Super PiggyBac 质粒按 1:1:2:1 的比例与电穿孔缓冲液充分混合, 静置 5 min, 再与细胞充分混匀后, 转移至电击杯中, 在设定的 Lonza-4D 核转染仪 X 模块 EH100 程序下进行转染。电穿孔后, 加入约 80 μ L 完全细胞培养基, 并将电穿孔比色杯置于 5% CO₂ 培养箱中, 温度为 38 $^{\circ}$ C, 持续 15 min。将细胞轻轻转移至 6 cm 细胞培养皿中。48 h 后, 添加 2.0 μ g/mL 的嘌呤霉素筛选 2 d。将筛选后的细胞极度稀释至 10 cm 培养皿进行单克隆培养, 每 3 d 换液 1 次, 约 9 d 形成单细胞克隆。在显微镜下用记号笔圈出单克隆, 弃除上清液, PBS 清洗 2 遍, 将单细胞克隆用 0.25% 胰蛋白酶溶液消化后, 吸取单细胞于 96 孔板继续扩大培养, 选取扩大培养后生长融合度为 70%~80% 的细胞进行消化, 取 500 μ L 细胞悬液至 PCR 管中, 用于后续 GTKO 和 hCD55 基因型鉴定。

用细胞裂解液将单细胞克隆裂解后, 以其 DNA 作为模板进行 PCR, PCR 引物序列: GTKO-F 为 5'-ACAGCAACAGACGTCTCTCATC-3'; GTKO-R 为 5'-CTTGAAGCACTCCTGAGTGATG-3'; PB-hCD55-F 为 5'-TGCCTGAGCGGAAAGATG-3'; PB-hCD55-R 为 5'-GCCACCTGGTACATCAATCTG-3'。*GGTA1* 靶区域的 PCR 扩增片段长度理论值为 627 bp, hCD55 的 PCR 扩增片段长度理论值为 940 bp。扩增体系为 50 μ L, 扩

增程序为 95 $^{\circ}$ C 5 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 68 $^{\circ}$ C~58 $^{\circ}$ C (每个循环退火温度降低 1 $^{\circ}$ C) 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 10 个循环; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 58 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 25 个循环; 72 $^{\circ}$ C 7 min。扩增产物用 PCR 纯化试剂盒纯化后进行 Sanger 测序, 通过 SnapGene 软件 (GSL Biotech, 版本号: v3.2.1.0) 进行序列比对, 选取在靶区域测序结果有套峰或有片段缺失的 PCR 纯化产物, TA 克隆至 pMD-19T 载体上, 再进行转化、涂板并于 37 $^{\circ}$ C 培养箱中培养 12 h, 选择至少 8 个菌落进行 PCR 测序, 从而筛选出基因编辑正确的阳性单细胞克隆。

1.4 GTKO/hCD55 基因编辑猪的制备及其基因型鉴定

按先前文献^[20]报道的方法进行体细胞核移植和胚胎移植, 制备 GTKO/hCD55 基因编辑猪。简要说, 用质量分数为 0.1% 的透明质酸酶处理从三元猪卵巢 (来源于云南神农肉业食品有限公司) 中分离培养的卵丘-卵母细胞复合体, 获得处于减数分裂 II 期的卵母细胞。利用显微操作仪将置于 TLH-PVA 操作液中的卵母细胞用斜口吸管轻轻吸出第一极体, 完成去核操作, 再将 GTKO/hCD55 基因编辑的供体细胞注入去核卵母细胞的卵周隙中。然后, 使用细胞融合仪在融合培养基中以 200 V/mm 的单一直流脉冲处理 20 μ s, 使重构胚胎发生融合。再将重构胚胎在 PZM-3 培养基中培养 0.5~1 h, 并在激活培养基中以 150 V/mm 的单脉冲刺激 100 ms 进行激活。之后转移到添加 5 μ g/mL 细胞松弛素 B 的 PZM-3 培养基中, 置于四仓培养箱中平衡 2 h。在上述相同培养条件下于 PZM-3 培养基中继续培养, 直至进行胚胎移植。通过手术将重构胚胎移植到代孕受体三元猪的输卵管中, 妊娠 33 d 后通过剖宫产获得活的胎猪。获取胎猪后立即将其浸入含 5% 青霉素-链霉素溶液 (penicillin-streptomycin, PS) 和 10% FBS 的 DMEM 溶液中, 并运送到实验室。在层流罩下去除胎猪的头、尾、四肢和内脏, 用无菌 PBS (含 5% PS) 将剩余的胎猪组织清洗 3 次, 并用不含 PS 的 PBS 溶液清洗 5 次。用眼科剪刀将组织剪成碎片, 转移至 T25 培养瓶中, 加入 3 mL 胶原酶 IV, 并将组织在 37 $^{\circ}$ C 恒温箱的水平摇床上消化 1 h。通过离心除去胶原酶后, 将收集的细胞在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 的培养箱中用含有 2% FBS 和 1% PS 的 DMEM 培养基培养。每 3 d 更换 1 次培养基。传代并获取细胞, 将细胞密度调至 5×10^4 个细胞/mL, 冷冻保存备用。获取的细胞通过普通 PCR、T7EI 酶切实验、Sanger 测序、流式细胞术和

蛋白质印迹法进行鉴定。以基因编辑成功的胎猪作为供体细胞来源,进行第二轮体细胞核移植和胚胎移植以获得GTKO/hCD55基因编辑仔猪。手术时,先通过耳缘静脉注射丙泊酚(2 mg/kg)诱导麻醉,然后通过通用型动物麻醉机进行异氟烷(1.5%~2%)维持麻醉。

收集胎猪的心脏组织、仔猪耳组织和意外死亡仔猪的肾脏组织样品于-80℃保存,利用血液/细胞/组织基因组DNA提取试剂盒提取胎猪和仔猪的DNA作为模板,通过普通PCR进行胎猪血型(*EAA*基因)^[21]和性别(*ZFX*基因和*SRY*基因)鉴定,所用引物序列: Intron7-F为5'-GCTTCTTGATGGATTGACAC-3', Intron7-R为5'-GATCCAGAAGTTCCTTCAGC-3'; Z-F/M-F为5'-ATAATCACATGGAGAGCCACAAGCT-3', Z-F/M-R为5'-GCACTTCTTTGGTATCTGAGAAAGT-3'; *SRY*-F为5'-TAGACGCTTTCATTGTGTGGTC-3', *SRY*-R为5'-GCCAGTAGTCTCTGTGCCTCCT-3'。参照1.3节中的方法对克隆胎猪和仔猪进行基因型鉴定,通过引物GTKO-F1(5'-GCCTGGTTGGCTTCCAAGAGT-3')和GTKO-R1(5'-TTCATCATGCCACTCGGCTT-3')进行*GGTA1*靶区域的PCR扩增,片段长度理论值为818 bp。所有PCR扩增体系、扩增程序和其他鉴定方法均参考1.3节的方法。

1.5 实时荧光定量PCR检测hCD55表达

收集GTKO/hCD55基因编辑和野生型胎猪心脏组织。用TransZol UP提取总RNA。使用PrimeScript RT试剂盒将RNA反转录成cDNA,以cDNA为模板,通过引物hCD55qPCR-F(5'-TCCAGCACCACCACAAATTGAC-3')、hCD55qPCR-R(5'-GGTGGGACCTTGAAGTTAGAG-3')、pGAPDH-F(5'-AGGGCATCCTGGGCTACACT-3')和pGAPDH-R(5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTAG-3')进行实时荧光定量PCR扩增。反应体系为20 μL,包含10 μL 2×TB Green、1 μL cDNA、各1 μL上下游引物和7 μL ddH₂O。反应程序:95℃ 30 s; 95℃ 10 s, 60℃ 45 s, 40个循环。以*GAPDH*为内参, hCD55基因的相对表达水平由2^{-ΔΔC_t}法计算得到。

1.6 流式细胞术鉴定hCD55和α-Gal抗原

参照1.4节成纤维细胞的建立方法收集GTKO/hCD55基因编辑猪耳组织和野生型猪耳组织成纤维细胞,悬浮于100 μL 1×PBS中,并用2 μL PE偶联的抗人CD55抗体(稀释比1:100) 37℃孵育15 min,再加入

100 μL 1×PBS。用2 μL α-Gal抗体(稀释比为1:100) 37℃孵育15 min,再加入100 μL 1×PBS,通过细胞流式仪分析hCD55和α-Gal抗原的表达情况。

1.7 免疫荧光实验检测hCD55表达

将GTKO/hCD55基因编辑猪和WT猪肾组织通过石蜡包埋后切片(厚度为5 μm),用二甲苯脱蜡,梯度(95%、85%、70%)乙醇中水化,微波法进行抗原修复。PBS清洗3次,每次3 min,滴加50 μL组织自发荧光淬灭剂A液,室温避光孵育10 min,用PBS清洗3次,每次3 min,用1% FBS封闭30 min。然后滴加兔抗人CD55一抗(稀释比1:200)和α-Gal细胞流式抗体(稀释比1:200) 37℃避光孵育1 h,用PBS清洗3次,每次3 min,滴加偶联CY3标记羊抗兔二抗(稀释比1:200) 37℃避光孵育30 min。用DAPI进行细胞核染色,用PBS清洗3 min,滴加50 μL组织自发荧光淬灭剂B液,用纯水冲洗后用抗荧光淬灭封片剂封片,显微镜下观察组织中hCD55的表达情况。

1.8 重亚硫酸盐测序检测hCD55的甲基化

参照1.4节的方法分别提取单细胞克隆混合体(C35&C45)、胎猪成纤维细胞(GTKO/hCD55F02)和5头仔猪肾脏组织(GTKO/hCD55F02P01、GTKO/hCD55F02P12、GTKO/hCD55F02P13、GTKO/hCD55F02P14和GTKO/hCD55F02P17) DNA(400 ng/μL)。按照EZ DNA MethylationTM试剂盒说明书推荐程序进行胞嘧啶-胸腺嘧啶(CT)转化^[22]。将转化好的DNA样品放在-20℃保存备用。利用引物CPGhCD55-F1(5'-TTTATATTGAGTGGGTGGAG-3')、CPGhCD55-R1(5'-CACTAAATCCTTCTCRCCAA-3')、CPGhCD55-F2(5'-GTGGAGATTGAAGTTAGGTT-3')和CPGhCD55-R2(5'-CCTTATTAACACCTCRCAAC-3')进行PCR扩增。PCR反应体系总体积为25 μL,包括12.5 μL GC Buffer II、2.0 μL dNTP、6.25 μL ddH₂O、0.625 μL上游引物、0.625 μL下游引物、0.5 μL TaKaRa LA Taq DNA聚合酶、2.5 μL DNA模板。PCR反应程序:94℃预变性10 min; 95℃变性45 s, 50℃退火30 s, 72℃延伸30 s,共35个循环; 72℃终延伸7 min。先用外引物CPGhCD55-F1和CPGhCD55-R1进行PCR扩增,将其产物参照1.3节方法进行纯化后作为第2次PCR的模板,再用CPGhCD55-F2和CPGhCD55-R2进行PCR扩增,最后参照1.3节的方法进行纯化、TA克隆、菌液PCR和测序。通过BiQ Analyzer软件进行序列比对分析。

1.9 hCD55 基因 CpG 岛的密码子优化

为了得到一个高效稳定表达的 hCD55 基因序列, 将替换前 (LD78-EF1 α -hCD55-P2A-Puro) 中 hCD55 基因序列以 ATG 开始的 64 bp 序列的高 CG 含量部分密码子进行替换, 以减少 hCD55 基因的 CG 含量。通过 *Bgl* II 和 *Hind* III 于 37 °C 酶切替换前载体 (LD78-EF1 α -hCD55-P2A-Puro) 2 h, 通过以下两对引物并以替换前载体作为模版进行 PCR 扩增, PCR 扩增体系和扩增程序参考 1.3 节。然后通过琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒将酶切和 PCR 产物胶回收后, 将两个产物通过一步法克隆试剂盒进行 50 °C 同源重组 30 min, 再进行 *DH5 α* 感受态细胞的转化、涂氨苄抗性平板并于 37 °C 培养箱中培养 12 h, 选择至少 8 个菌落进行 PCR 测序, 从而筛选出基因编辑正确的阳性单菌落克隆。最后通过无内毒素质粒小提中量试剂盒提取质粒 (即 LD78-EF1 α -hCD55-P2A-PuroCPGxiugai) 备用。引物序列: CPGxiugaihCD55-F1 为 5'-GTAAATGCGGGCCAAGATCTGCACACTGGTATTTTCGGTTT-3'; CPGxiugaihCD55-R1 为 5'-CGCCGCGGGCACGCTCGGCCGCGGACGGTCATGGTGGCTCACGACACCTGAAATGGAA-3'; CPGxiugaihCD55-F2 为 5'-AGTGGCTCGGCCTAGTGTGCCAGCTGCACTGCCCCTCTAGGGGAGCTGCCCCGGCTGC-3'; CPGxiugaihCD55-R2 为 5'-TCTCTCCAGGAATTTTCACAAAGCTTTCTTCACATTTGTAAGTTATTACAGTATCCTCT-3'。参考 1.3 节将替换前 (LD78-EF1 α -hCD55-P2A-Puro) 与替换后 (LD78-EF1 α -hCD55-P2A-PuroCPGxiugai) 的质粒载体分别转染到野生型胎猪成纤维细胞, 每个载体转染进行 3 次重复, 转染 48 h 后, 添加 2.0 μ g/mL 的嘌呤霉素 2 d 以筛选细胞。参考 1.6 节中流式细胞术方法对转染细胞的 hCD55 基因表达进行鉴定。

1.10 抗原抗体结合实验

取 6 名健康志愿者血清 (全部志愿者均已知情同意), 每人 500 μ L, 混合成 3 mL 后于 56 °C 灭活 10 min; 用 PBS 代替人血清做阴性对照。同时, 收集 1.6 节中的 GTKO/hCD55 猪和 WT 猪耳组织成纤维细胞, 并用流式细胞仪进行细胞计数。

用 50 μ L 灭活混合人血清分别与 50 μ L 1×10^5 个野生型猪和基因编辑猪的成纤维细胞混匀, 血清终浓度为 50%, 室温避光孵育 2 h, 加入 0.5 mL 预冷 PBS 终止反应, 200 $\times g$ 离心 3 min 弃上清, 分别用 50 μ L FITC 偶联的抗人 IgG 抗体 (稀释比 1:100) 和 50 μ L FITC 偶联的抗人 IgM 抗体 (稀释比 1:200) 室温避光孵育

30 min。再次加入 0.5 mL 预冷 PBS 终止反应, 200 $\times g$ 离心 3 min 弃上清, 50 μ L PBS 重悬细胞, 通过流式细胞仪检测人 IgG 和 IgM 阳性的猪成纤维细胞含量。

1.11 补体依赖的细胞毒性实验

用 50 μ L 同一批次的人混合血清与 1×10^5 个 GTKO/hCD55 基因编辑猪和 WT 猪成纤维细胞混匀, 血清终浓度为 50%, 室温避光孵育 2 h, 加入 0.5 mL 预冷 PBS 终止反应, 200 $\times g$ 离心 3 min 弃上清, 加入 1:6 稀释的兔补体室温孵育 1 h, 200 $\times g$ 离心 3 min 弃上清, 然后加入 1:2 000 稀释的钙黄绿素 AM (calcein AM) 和碘化丙啶 (propidium iodide, PI) 室温避光孵育 15 min, 用流式细胞仪检测细胞存活率。

1.12 统计学分析

应用 SPSS 17.0 软件进行统计分析, 并使用 GraphPad Prism 8.0.2 软件绘制统计图。各实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 *t* 检验分析两组数据之间的差异显著性。以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 GTKO/hCD55 成纤维细胞系制备成功

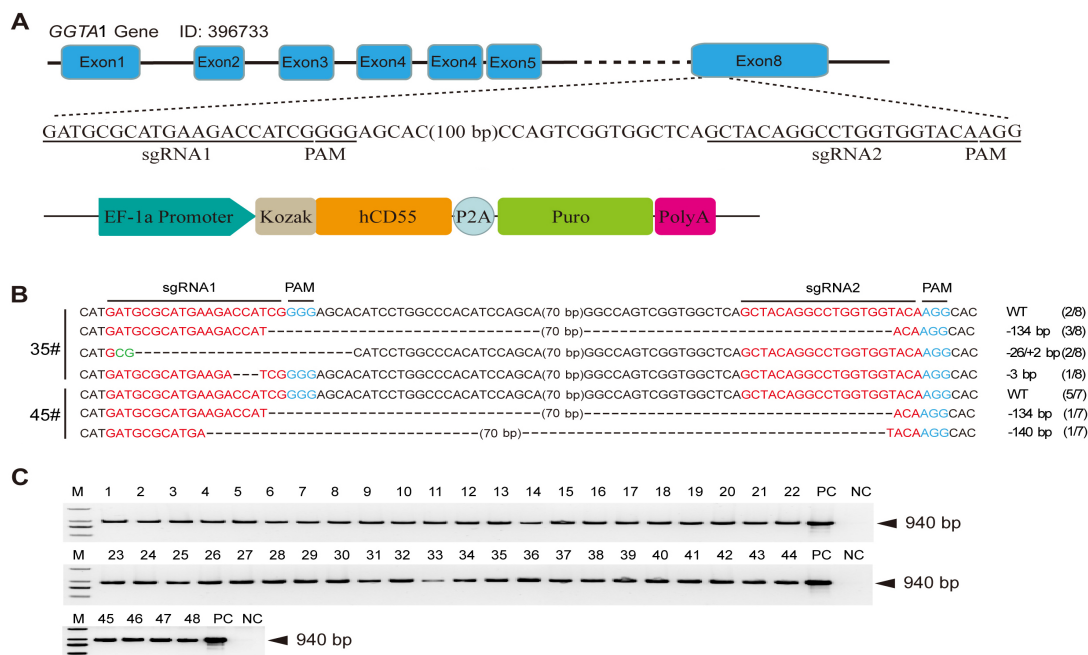
设计 2 条 sgRNA, 靶向猪 *GGTA1* 基因的第 8 号外显子, 并构建过表达 hCD55 的 PiggyBac 转座子载体 (图 1A)。将载体共转染至猪成纤维细胞中, 经极度稀释进行单细胞克隆培养后, 转移至 96 孔板中扩增培养, 共获得 48 个单细胞克隆, 经 PCR、TA 克隆及 Sanger 测序分析 *GGTA1* 基因突变情况和 hCD55 整合情况。结果表明, 35# 单细胞克隆的 *GGTA1* 基因型为 -134 bp、-26 bp/+2 bp、-3 bp 和 WT, 45# 单细胞克隆的 *GGTA1* 基因型为 -140 bp、-134 bp 和 WT (图 1B), 而且 48 个单细胞克隆均有 hCD55 基因转入 (图 1C)。最后选择单细胞克隆 35# 和 45# 的混合体进行体细胞核移植和胚胎移植。

2.2 体细胞核移植及胚胎移植成功获得克隆猪

以单细胞克隆 35# 和 45# 混合体作为供体细胞, 进行体细胞核移植。在妊娠 33 d 时, 通过剖宫产共获得 2 个成活胎猪, 建立胎猪成纤维细胞作为供体细胞, 进行第二轮体细胞核移植和胚胎移植。5 头代孕母猪共分娩 20 头克隆仔猪, 11 头成活, 其中 1 头脐裂, 出生时体重范围为 400~740 g, 存活天数为 1~206 d; 另外有 6 头死胎, 3 头木乃伊胎 (表 1)。

2.3 GTKO/hCD55 克隆胎猪的基因型鉴定结果

以胎猪基因组 DNA 为模板, 进行 PCR 扩增验证胎猪的血型和性别。通过 PCR、Sanger 测序、实时荧光



注: A, *GGTA1* 基因敲除 sgRNA 设计和 hCD55 基因过表达载体的构建示意图; B, 阳性单细胞 35# 和 45# 的 *GGTA1* 基因 sgRNA 靶区域的基因型; C, 48 个细胞单克隆 hCD55 基因的 PCR 鉴定电泳图; PC, 阳性对照; NC, 阴性对照; -, 敲除碱基; +, 插入碱基; M, DNA 分子量标准; WT, 野生型; WT (2/8) 表示 TA 克隆后 8 个单菌落测序中有 4 种基因型包括 2 个 WT、3 个 -134 bp、2 个 -26/+2 bp 和 1 个 -3 bp。

Note: A, Design of sgRNA for *GGTA1* gene knockout and schematic diagram of the vector for hCD55 gene overexpression; B, Genotype of the sgRNA targeted region of *GGTA1* in positive single-cell clones 35# and 45#; C, PCR identification of the hCD55 gene from 48 single-cell clones; PC, Positive controls; NC, Negative controls; -, Indicates the knockout bases; +, Indicates the bases insertion; M, DNA ladder; WT, Wild type; WT (2/8) indicates among 8 single colonies sequencing after TA cloning, four genotypes were identified: two WT, three -134 bp, two -26/+2 bp and one -3 bp.

图1 GTKO/hCD55 基因编辑阳性单细胞克隆的筛选

Figure 1 Screening of single-cell clones positive for GTKO/hCD55 gene editing

定量PCR和流式细胞术分析胎猪的基因型和基因表达情况。结果显示, 2个胎猪(F01和F02)均为O型血雄性(图2A~C)。两个胎猪均有hCD55的基因插入, 目的条带大小与阳性一致为940 bp(图2D)。F01的GGTA1基因型为敲除17 bp和WT为单等位基因缺失, F02的GGTA1基因型为敲除26 bp/插入2 bp和敲除3 bp为双等位基因缺失(图2E~F)。两个胎猪组织中hCD55 mRNA表达水平均极显著高于WT($P < 0.01$, 图2G)。流式结果显示F02胎猪GGTA1催化合成的抗原表位 α -Gal表达缺失, 但未检测到hCD55基因的表达(图2H)。

2.4 GTKO/hCD55 基因编辑克隆仔猪的基因型鉴定结果

对出生成活的 11 头仔猪进行基因型鉴定, PCR 及测序结果显示, 11 头仔猪均成功整合 hCD55 基因, 且 *GGTA1* 基因型均为 -26 bp/+2 bp 和 -3 bp (图 3A~D)。流式细胞术结果显示, GTKO/hCD55 基因编辑猪的 *GGTA1* 表达缺失, hCD55 弱表达 (图 3E)。免疫荧光

检测结果显示,所有猪肾组织中 α -Gal表达缺失,P01和P13猪肾组织高表达hCD55,P12、P14和P17猪肾组织低表达hCD55(图3F)。

2.5 甲基化水平对hCD55 基因表达的影响

对hCD55基因进行序列分析,发现hCD55基因的起始密码子下游存在CpG岛(图4A)。用重亚硫酸盐测序法检测C35&C45单细胞克隆混合体、GTKO/hCD55 F02胎猪的成纤维细胞和5头克隆仔猪(hCD55基因高表达组P01、P13;hCD55基因低表达组P12、P14、P17)肾脏组织中hCD55的甲基化状态。结果表明,C35&C45单细胞克隆混合体的甲基化水平为13.9%;F02胎猪成纤维细胞的甲基化水平为87.5%;P01和P13克隆仔猪的甲基化水平分别为20.8%和13.9%,而P12、P14和P17克隆仔猪的甲基化水平分别为99.3%、91.7%和94.4%(图4B)。

这些结果提示, hCD55 基因的高甲基化状态可能是导致 hCD55 在胎猪和仔猪中表达水平降低的一个原因。

表1 胚胎移植和克隆仔猪的产生

Table 1 Embryo transfer and production of cloned piglets

序号 No.	仔猪编号 Piglet ID	仔猪出生体重/g Body weight/g	仔猪出生时状态 Status at birth	存活时间/d Survival time/d	代孕母猪编号 Recipients sow ID
1	DN-GTKO-hCD55F02P01	500	健康	3	P516
2	DN-GTKO-hCD55F02P02	400	健康	1	
3	DN-GTKO-hCD55F02P03	720	死胎	/	P452
4	DN-GTKO-hCD55F02P04	380	死胎	/	
5	DN-GTKO-hCD55F02P05	620	脐裂	4	P511
6	DN-GTKO-hCD55F02P06	200	木乃伊胎	/	
7	DN-GTKO-hCD55F02P07	560	死胎	/	
8	DN-GTKO-hCD55F02P08	300	木乃伊胎	/	
9	DN-GTKO-hCD55F02P09	400	木乃伊胎	/	P443
10	DN-GTKO-hCD55F02P10	480	死胎	/	
11	DN-GTKO-hCD55F02P11	560	健康	2	
12	DN-GTKO-hCD55F02P12	580	健康	3	
13	DN-GTKO-hCD55F02P13	520	健康	1	P525
14	DN-GTKO-hCD55F02P14	260	虚弱	2	
15	DN-GTKO-hCD55F02P15	320	死胎	/	
16	DN-GTKO-hCD55F02P16	620	健康	2	
17	DN-GTKO-hCD55F02P17	740	健康	1	P525
18	DN-GTKO-hCD55F02P18	560	死胎	/	
19	DN-GTKO-hCD55F02P19	540	健康	21	
20	DN-GTKO-hCD55F02P20	660	健康	206	

2.6 hCD55 密码子优化及表达水平验证结果

为了进一步验证hCD55基因甲基化影响蛋白表达水平，将hCD55基因高CG区域进行密码子的同义替换（图5A中标红碱基表示同义替换后的碱基），CG含量从81%减少到69%（图5A）。将密码子替换前（图5B中用hCD55CG 81%表示）和替换后（图5B中用hCD55CG 69%表示）载体分别转染胎猪成纤维细胞，加药筛选后通过流式细胞术进行hCD55蛋白表达检测。结果显示，在3次重复实验中，密码子同义替换载体转染的细胞hCD55均稳定高表达，而且在hCD55（1）实验中替换后载体比替换前载体转染的细胞hCD55表达更强（图5B）。这些结果表明，通过密码子优化降低hCD55基因的CG含量，有助于基因的稳定高表达。

2.7 GTKO/hCD55 基因编辑猪成纤维细胞抗免疫排斥的功能评价

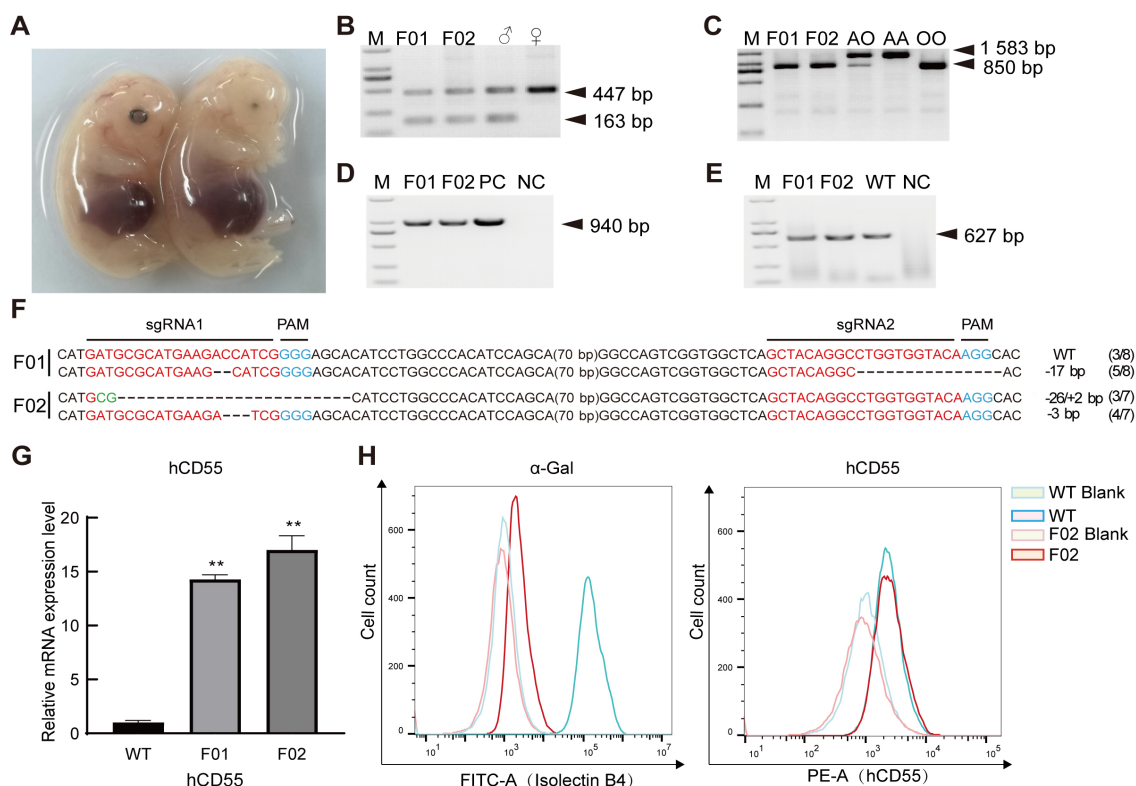
WT和GTKO/hCD55基因编辑猪的成纤维细胞与混合人血清孵育后，进行IgG和IgM抗体结合水平分析以及补体依赖的细胞毒性分析。结果显示，两组IgG的结合程度无明显差异（图6A、C），但GTKO/hCD55基因编辑猪成纤维细胞与IgM的结合程度低于WT（图6A、C， $P < 0.01$ ）。在补体依赖的细胞毒性

实验中，GTKO/hCD55基因编辑猪成纤维细胞的成活率（68.7%）高于WT猪的成活率（29.8%）（图6B， $P < 0.01$ ）。以上结果提示，GTKO/hCD55基因编辑猪在作为异种器官移植供体时，可能会有效缓解抗原抗体结合以及补体系统激活导致的免疫排斥反应。

3 讨论

异种器官移植供体猪的开发是进行异种器官移植研究的必要条件，而开发能稳定表达人源基因的供体猪对异种移植物的长期存活至关重要。本研究通过CRISPR/Cas9系统、PiggyBac转座子系统结合体细胞克隆技术，成功获得GTKO/hCD55基因编辑的滇南小耳猪，有效降低了异种移植中人天然抗体和补体系统激活对猪移植物的损伤，为我国异种器官移植研究提供了一种可用的供体猪模型。

当前已经开发了单个基因（如GTKO）到多个基因的基因编辑供体猪，其中有报道13基因编辑供体猪能表现出正常的生理机能、生育能力和遗传稳定性。这些供体猪已经开展了大量猪到非人灵长类，甚至猪到人的异种器官移植研究，源自3KO/7TG基因编辑猪供体的肾脏移植可在食蟹猴体内长期存活（758 d），另将10基因编辑猪心脏移植到两个脑死亡人类受体体



注：A，2个胎龄33 d的克隆胎猪；B，胎猪心脏组织的性别鉴定PCR结果；C，胎猪心脏组织的血型基因PCR鉴定结果；D，胎猪心脏组织的hCD55基因的PCR鉴定；E，胎猪心脏组织的GGTA1基因sgRNA靶区域的PCR结果；F，胎猪心脏组织的GGTA1基因sgRNA靶区域的基因型；G，F01和F02胎猪心脏组织hCD55的mRNA表达水平；H，F02胎猪成纤维细胞中α-Gal和hCD55表达的流式细胞术分析结果。M，DNA分子量标准；WT，野生型；PC，阳性对照；NC，阴性对照；♂，雄性；♀，雌性；AO，AO型血；AA，AA型血；OO，OO型血；Blank，未加抗体的对照；F02，胎儿编号；** $P < 0.01$ 。

Note: A, Two cloned fetal pigs at 33 days of gestation; B, PCR results of sex identification of fetal pig heart tissue; C, PCR results of blood group gene identification of fetal pig heart tissue; D, PCR identification of hCD55 gene in fetal pig heart tissue; E, PCR results of the target region of GGT1 gene sgRNA in fetal pig heart tissue; F, Genotype results of the target region of GGT1 gene sgRNA in fetal pig heart tissue; G, hCD55 mRNA expression levels in fetal pig F01 and F02 heart tissues; H, Flow cytometric analysis results of α-Gal and hCD55 expression in fetal porcine F02 fibroblasts. M, DNA ladder; WT, Wild type; PC, Positive controls; NC, Negative controls; ♂, Male; ♀, Female; AO, AO blood type; AA, AA blood type; OO, OO blood type; Blank, Control without antibody; F02, Fetal number; ** $P < 0.01$.

图2 GTKO/hCD55基因编辑克隆胎猪的鉴定

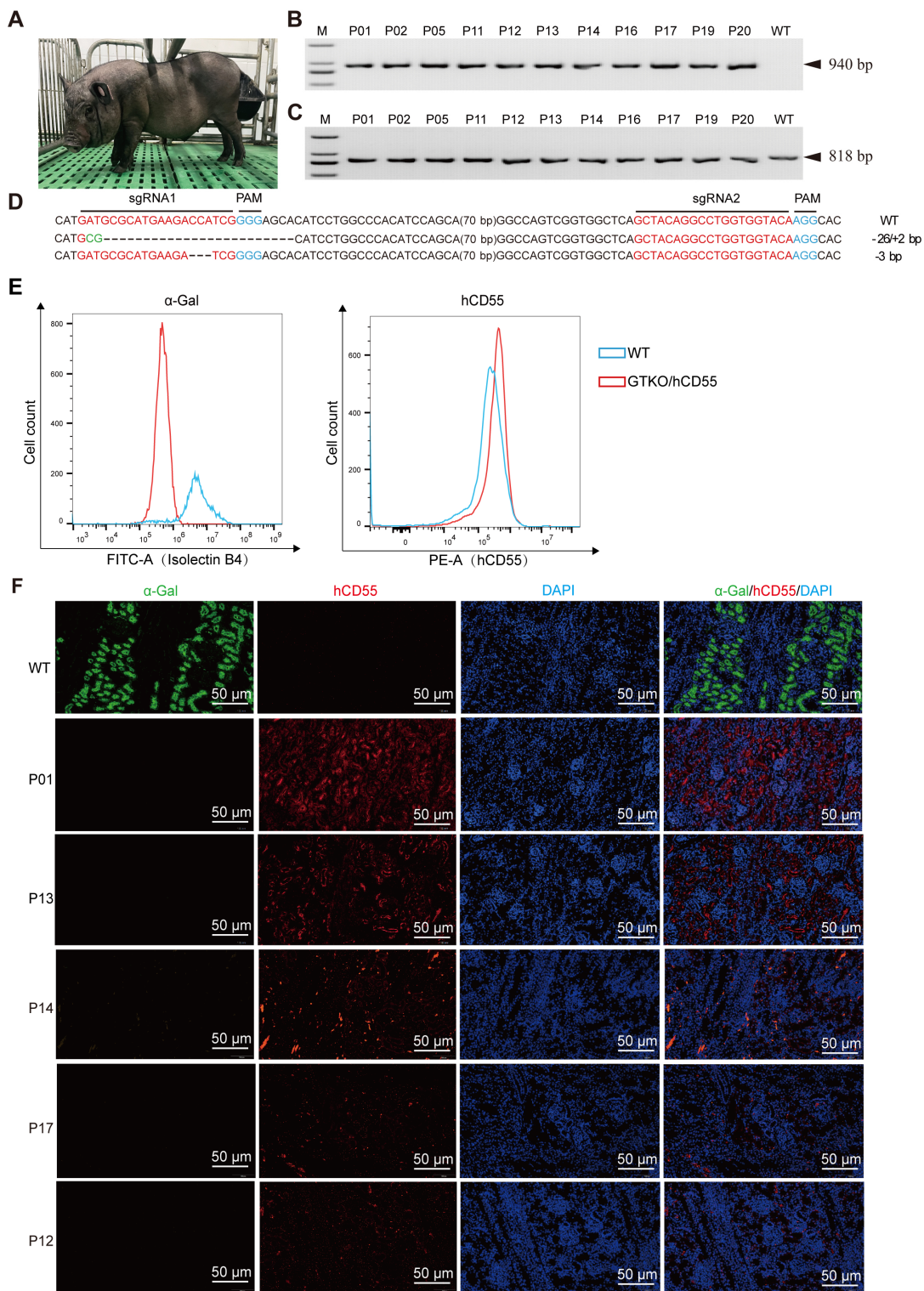
Figure 2 Identification of GTKO/hCD55 gene-edited cloned fetal pigs

内，心脏移植后的66 h功能监测中展现出完备的心功能。这些研究均证实基因编辑供体猪的临床有效性^[4,20,23-25]。未来还需通过筛选编辑的目的基因与优化多基因的编辑组合，削弱异种移植后的免疫排斥反应，这对移植供体猪的开发研究具有重要意义。本课题组除了本文开发的GTKO/hCD55基因编辑供体猪，还开发了其他12种多基因编辑的供体猪，包括已应用于猪到人辅助性肝移植临床试验的10基因编辑供体猪^[9]。目前，我们正在对这些基因编辑供体猪进行系统比较研究^[26]，旨在筛选出分别适合肾脏、心脏或肝脏异种器官移植的基因编辑组合，为后续临床应用铺垫基础。

在本研究GTKO/hCD55供体猪开发过程中，挑选

的两个单细胞克隆中GGTA1 sgRNA靶区域出现了3~4种基因型，这与理论上单克隆细胞应仅存在2种基因型的预期不符，推测这一现象是由于极度稀释法未能获得纯净的单细胞克隆，这与我们之前的研究结果一致^[27-28]。为解决此问题，可如本文一样通过连续两次体细胞克隆，筛选出双等位基因敲除且人源基因稳定表达仔猪。

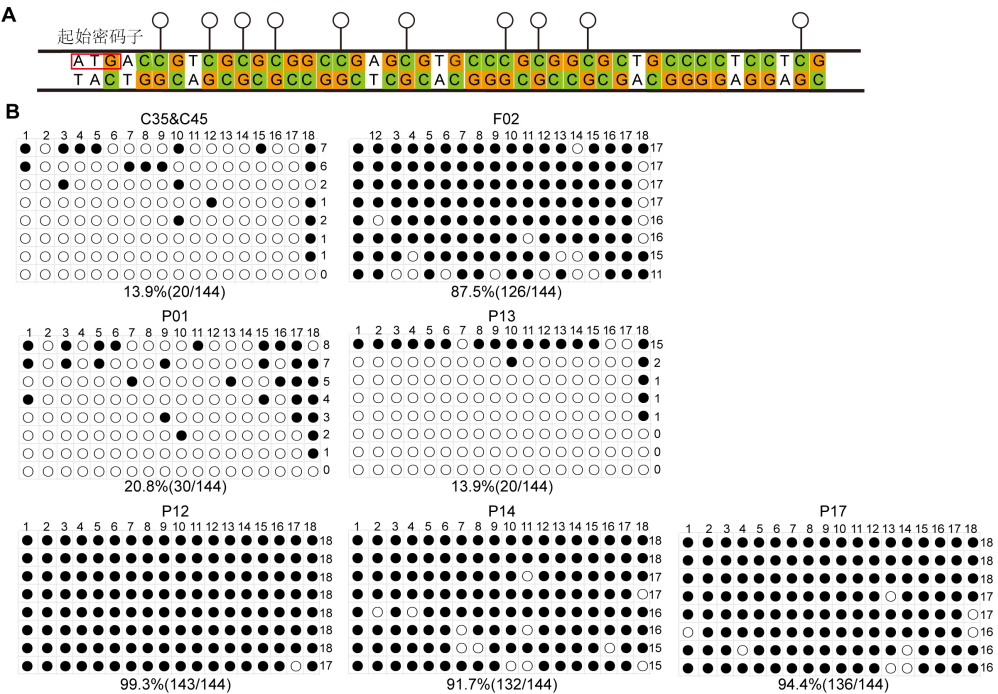
尽管GTKO/hCD55基因编辑胎猪组织中hCD55基因的mRNA表达水平显著高于WT，然而，流式细胞术分析显示，胎猪成纤维细胞中未检测到hCD55蛋白的表达。此外，对多个GTKO/hCD55基因编辑猪个体肾脏进行免疫荧光染色，结果发现部分个体也出现hCD55弱表达的情况。为了解释这一现象，我们对供



注：A，GTKO/hCD55 基因编辑克隆仔猪的照片；B，11 头克隆仔猪 hCD55 基因的 PCR 鉴定结果；C，仔猪 *GGTA1* 基因 sgRNA 靶区域的 PCR 结果；D，仔猪 P20 *GGTA1* 基因 sgRNA 靶区域的基因型；E，仔猪 P20 成纤维细胞中 α -Gal 和 hCD55 表达的流式细胞分析结果；F，仔猪肾脏组织的免疫荧光染色结果，标尺为 50 μ m。M，DNA 分子量标准；WT，野生型。

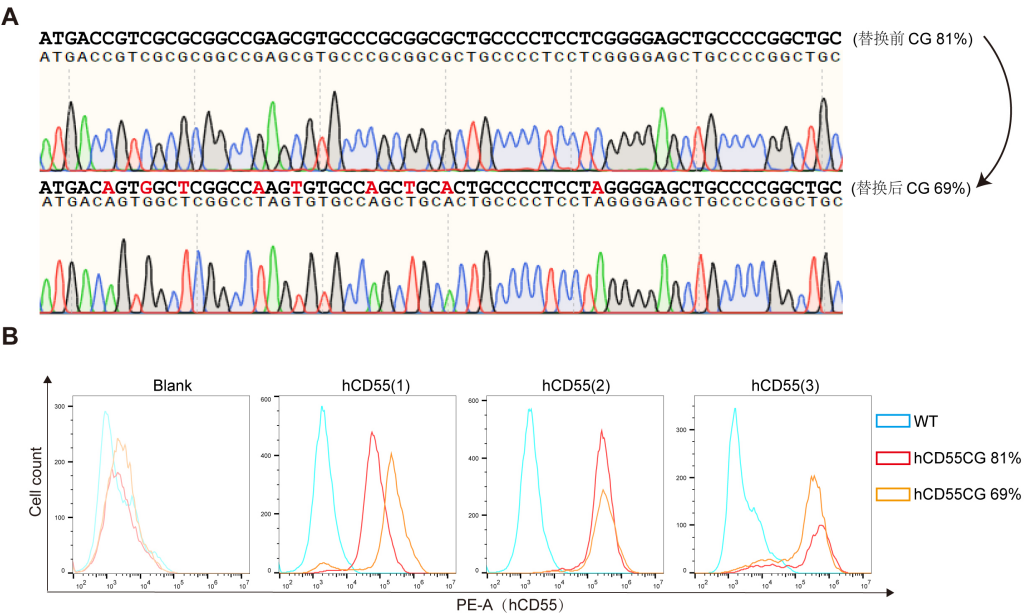
Note: A, Photo of cloned piglets with GTKO/hCD55 gene editing; B, PCR identification results of hCD55 gene in 11 piglets; C, PCR results of the sgRNA target region of the piglet *GGTA1* gene; D, *GGTA1* genotype of the sgRNA target region in piglet P20; E, Flow cytometry analysis results of α -Gal and hCD55 expression in P20 piglet-derived fibroblasts; F, Immunofluorescence results of piglet kidney tissues, the scale bar indicates 50 μ m. M, DNA ladder; WT, wild type.

图3 GTKO/hCD55 基因编辑仔猪的鉴定
Figure 3 Identification of GTKO/hCD55 gene-edited cloned piglets



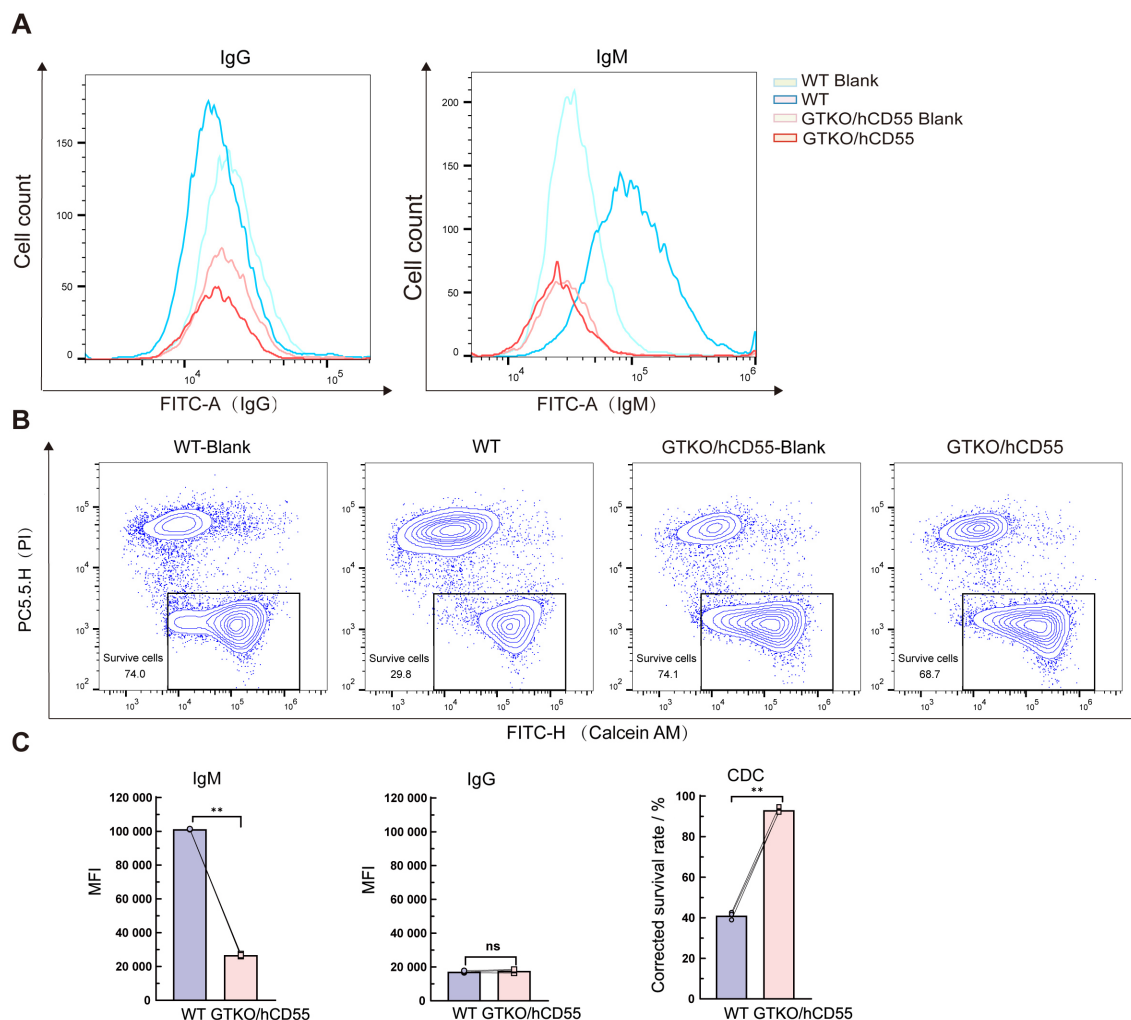
注：A，hCD55 基因上的 CpG 岛示意图；B，C35&C45 单细胞克隆混合体、克隆胎猪 F02 成纤维细胞、克隆仔猪（P01、P13、P12、P14、P17）肾脏组织中的 hCD55 基因甲基化水平。实心黑圆表示甲基化位点，空心圆表示无甲基化位点。
Note: A, Schematic representation of CpG island in the hCD55 gene; B, Methylation levels of hCD55 gene in mixed single-cell clones of C35&C45, cloned fetal pig F02 fibroblasts and cloned piglets (P01, P13, P12, P14, P17) kidney tissues. Solid black circles indicate methylation sites, and hollow circles indicate unmethylated sites.

图4 单细胞克隆混合体、胎猪、克隆仔猪中 hCD55 基因甲基化水平
Figure 4 Methylation levels of hCD55 gene in mixed single-cell clones, fetal pigs, and cloned piglets



注：A，密码子优化前后 hCD55 基因 CpG 岛区域的 Sanger 测序结果；B，优化前后（分别用 hCD55CG 81% 和 hCD55CG 69% 表示）载体分别转染猪成纤维细胞，流式细胞术检测 hCD55 在细胞中的表达水平（3 次重复实验结果）。Blank，未加抗体的对照；WT，野生型。
Note: A, Sanger sequencing results of CpG island region in hCD55 gene before and after codon optimization; B, Porcine fibroblasts were transfected with the codon unoptimized and codon optimized vectors (represents by hCD55CG 81% and hCD55CG 69% respectively), and the expression level of hCD55 in the cells was detected by flow cytometry (triplicate experimental results). Blank, control without antibody; WT, wild type.

图5 CpG 岛区域密码子优化前后成纤维细胞中的 hCD55 表达水平
Figure 5 Expression levels of hCD55 in fibroblasts before and after optimization of CpG island region codon



注：A，混合人血清孵育猪成纤维细胞后，人IgG和IgM抗体与猪成纤维细胞的结合程度分析；B，混合人血清孵育猪成纤维细胞后，补体对猪细胞的杀伤分析；C，图A与图B的统计分析结果。WT，野生型；GTKO/hCD55，实验组；Blank，未加抗体的对照；MFI，通过流式细胞仪检测到的荧光信号强度的平均值；CDC，补体依赖的细胞毒性实验；** $P < 0.01$ ； $^{ns}P > 0.05$ 。

Note: A, Binding extent analysis of human IgG and IgM antibodies to porcine fibroblasts after incubation with mixed human serum; B, Porcine cell death analysis induced by complement after incubation of porcine fibroblasts with mixed human serum; C, The statistical analysis results of figures A and B. WT, wild-type; GTKO/hCD55, experimental group; Blank, control without antibody; MFI, mean fluorescence intensity; CDC, complement-dependent cytotoxicity; ** $P < 0.01$; $^{ns}P > 0.05$.

图6 GTKO/hCD55基因编辑猪的抗免疫排斥效果评价

Figure 6 Evaluation of anti-immune rejection efficacy of GTKO/hCD55 gene-edited pigs

体细胞、胎猪成纤维细胞、克隆仔猪组织进行了hCD55基因CpG岛的甲基化分析。结果发现，低甲基化猪个体中hCD55的表达水平较高，而高甲基化的胎猪成纤维细胞和仔猪组织中hCD55的表达水平低。当采用CpG岛密码子同义替换法降低hCD55基因甲基化水平后，在3次重复实验中，hCD55基因都实现了稳定高表达。由此，我们推测在克隆或细胞传代过程中会导致转入的外源基因发生甲基化，最终引发基因表达沉默。因此，在转入外源基因时，有必要对外源基因进行适当的密码子优化，从而降低因甲基化导致的基因表达沉默风险。

综上，本研究成功获得了GTKO/hCD55基因编辑异种器官移植用供体猪，并探讨了密码子优化技术对模型构建的优化效应，为未来基因编辑供体猪的开发和后续异种器官移植研究提供参考。

[医学伦理声明 Medical Ethics Statement]

本研究涉及的动物实验均已通过云南农业大学生命科学伦理委员会审批（审批号：202204020），各实验过程均遵照中国实验动物相关法律法规条例要求进行。人体血清样本采集及使用均已获得提供者知情同意，符合《赫尔辛基宣言》及中国相关法律法规。

All experimental animal protocols in this study were

reviewed and approved by Life Science Ethics Committee of Yunnan Agricultural University (Approval Number: 202204020), all experimental procedures were performed in accordance with the requirements of laws and regulations in China related to experimental animals. The collection and use of human serum samples have obtained the informed consent of all donors and comply with the Declaration of Helsinki and relevant laws and regulations in China.

[作者贡献 Author Contribution]

王娇祥负责实验设计、数据收集整理、初稿撰写和修改；
张璐负责部分实验操作和实验重复性验证；
陈姝含负责开展文献调研和参与部分实验操作；
角德灵参与数据核实、统计、分析，以及文稿中英文部分的翻译；
赵恒指导实验操作；
魏太云负责实验动物的饲养与管理、提供实验样品；
郭建雄负责体细胞克隆和胚胎移植实验；
徐凯祥负责监督和领导实验研究的执行、给予实验指导、对文稿进行审核和修订；
魏红江负责策划总体研究目标、获取基金项目资助、研究策划和管理、对文稿进行审核和修订。

[利益声明 Declaration of Interest]

所有作者均声明本文不存在利益冲突。

[参考文献 References]

- [1] ALI A, KEMTER E, WOLF E. Advances in organ and tissue xenotransplantation[J]. *Annu Rev Anim Biosci*, 2024, 12: 369-390. DOI:10.1146/annurev-animal-021122-102606.
- [2] SINGH A K, GOERLICH C E, ZHANG T S, et al. Genetically engineered pig heart transplantation in non-human primates [J]. *Commun Med*, 2025, 5(1): 6. DOI: 10.1038/s43856-025-00731-y.
- [3] EISENSON D, HISADOME Y, SANTILLAN M, et al. Consistent survival in consecutive cases of life-supporting porcine kidney xenotransplantation using 10GE source pigs[J]. *Nat Commun*, 2024, 15(1):3361. DOI:10.1038/s41467-024-47679-6.
- [4] ANAND R P, LAYER J V, HEJA D, et al. Design and testing of a humanized porcine donor for xenotransplantation[J]. *Nature*, 2023, 622(7982):393-401. DOI:10.1038/s41586-023-06594-4.
- [5] MOHIUDDIN M M, SINGH A K, SCOBIE L, et al. Graft dysfunction in compassionate use of genetically engineered pig-to-human cardiac xenotransplantation: a case report[J]. *Lancet*, 2023, 402(10399):397-410. DOI:10.1016/S0140-6736(23) 00775-4.
- [6] GRIFFITH B P, GOERLICH C E, SINGH A K, et al. Genetically modified porcine-to-human cardiac xenotransplantation[J]. *N Engl J Med*, 2022, 387(1):35-44. DOI:10.1056/NEJMoa2201422.
- [7] PAN W Q, ZHANG W M, ZHENG B H, et al. Cellular dynamics in pig-to-human kidney xenotransplantation[J]. *Med*, 2024, 5 (8):1016-1029.e4. DOI:10.1016/j.medj.2024.05.003.
- [8] KAWAI T, WILLIAMS W W, ELIAS N, et al. Xenotransplantation of a porcine kidney for end-stage kidney disease[J]. *N Engl J Med*, 2025, 392(19):1933-1940. DOI:10.1056/NEJMoa2412747.
- [9] MALLAPATY S. First pig-to-human liver transplant recipient 'doing very well'[J]. *Nature*, 2024, 630(8015): 18. DOI:10.1038/d41586-024-01613-4.
- [10] KUWAKI K, TSENG Y L, DOR F J M F, et al. Heart transplantation in baboons using alpha1, 3-galactosyl-transferase gene-knockout pigs as donors: initial experience [J]. *Nat Med*, 2005, 11(1):29-31. DOI:10.1038/nm1171.
- [11] AZIMZADEH A M, KELISHADI S S, EZZELARAB M B, et al. Early graft failure of GalTKO pig organs in baboons is reduced by expression of a human complement pathway-regulatory protein[J]. *Xenotransplantation*, 2015, 22(4): 310-316. DOI: 10.1111/xen.12176.
- [12] MOHIUDDIN M M, GOERLICH C E, SINGH A K, et al. Progressive genetic modifications of porcine cardiac xenografts extend survival to 9 months[J]. *Xenotransplantation*, 2022, 29(3): e12744. DOI:10.1111/xen.12744.
- [13] CHABAN R, MCGRATH G, HABIBABADY Z, et al. Increased human complement pathway regulatory protein gene dose is associated with increased endothelial expression and prolonged survival during *ex-vivo* perfusion of GTKO pig lungs with human blood[J]. *Xenotransplantation*, 2023, 30(4): e12812. DOI:10.1111/xen.12812.
- [14] WARD T, PIPKIN P A, CLARKSON N A, et al. Decay-accelerating factor CD55 is identified as the receptor for echovirus 7 using CELICS, a rapid immuno-focal cloning method[J]. *EMBO J*, 1994, 13(21):5070-5074. DOI:10.1002/j.1460-2075.1994.tb06836.x.
- [15] LUKACIK P, ROVERSI P, WHITE J, et al. Complement regulation at the molecular level: the structure of decay-accelerating factor[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(5): 1279-1284. DOI:10.1073/pnas.0307200101.
- [16] MURAKAMI H, NAGASHIMA H, TAKAHAGI Y, et al. Transgenic pigs expressing human decay-accelerating factor regulated by porcine *MCP* gene promoter[J]. *Mol Reprod Dev*, 2002, 61(3):302-311. DOI:10.1002/mrd.10043.
- [17] KIM S C, MATHEWS D V, BREEDEN C P, et al. Long-term survival of pig-to-rhesus macaque renal xenografts is dependent on CD4 T cell depletion[J]. *Am J Transplant*, 2019, 19(8):2174-2185. DOI:10.1111/ajt.15329.
- [18] 李欣, 潘登科, 周佳, 等. 表达人源补体调节蛋白hCD55对异种胰岛移植的保护作用[J]. *器官移植*, 2022, 13(4):475-482. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7445.2022.04.010.
- [19] 夏强兵, 冯豪, 王璐, 等. GTKO/hCD55 基因工程猪到人异种移植 CDC 技术的探讨[J]. *中华器官移植杂志*, 2022, 43(6): 364-369. DOI:10.3760/cma.j.cn421203-20220505-00096.
- [20] XIA Q B, FENG H, WANG L, et al. Exploration of complement-dependent cytotoxicity technology for GTKO/hCD55 genetically engineered pig-to-human xenotransplantation[J]. *Chin J Organ Transplant*, 2022, 43(6): 364-369. DOI: 10.3760/cma.j.cn421203-20220505-00096.
- [20] YUE Y N, XU W H, KAN Y N, et al. Extensive germline genome

- engineering in pigs[J]. Nat Biomed Eng, 2021, 5(2): 134-143. DOI:10.1038/s41551-020-00613-9.
- [21] 王娇祥, 王艳, 胡珂, 等. 猪血型PCR鉴定方法的建立[J]. 实验动物与比较医学, 2023, 43(6):585-594. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2023.065.
- WANG J X, WANG Y, HU K, et al. Establishment of PCR identification method for pig blood type[J]. Lab Anim Comp Med, 2023, 43(6): 585-594. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2023.065.
- [22] LETI F, LLACI L, MALENICA I, et al. Methods for CpG methylation array profiling via bisulfite conversion[J]. Methods Mol Biol, 2018, 1706: 233-254. DOI: 10.1007/978-1-4939-7471-9_13.
- [23] MOAZAMI N, STERN J M, KHALIL K, et al. Pig-to-human heart xenotransplantation in two recently deceased human recipients[J]. Nat Med, 2023, 29(8): 1989-1997. DOI: 10.1038/s41591-023-02471-9.
- [24] LOCKE J E, KUMAR V, ANDERSON D, et al. Normal graft function after pig-to-human kidney xenotransplant[J]. JAMA Surg, 2023, 158(10): 1106-1108. DOI:10.1001/jamasurg.2023.2774.
- [25] WANG J X, XU K X, LIU T, et al. Production and functional verification of 8-gene (*GGTA1*, *CMAH*, *β 4GalNT2*, hCD46, hCD55, hCD59, hTBM, hCD39) -edited donor pigs for xenotransplantation[J]. Cell Prolif, 2025: e70028. DOI:10.1111/cpr.70028.
- [26] MANOOK M, OLASO D, ANWAR I, et al. Prolonged xenokidney graft survival in sensitized NHP recipients by expression of multiple human transgenes in a triple knockout pig[J]. Sci Transl Med, 2024, 16(751): eadk6152. DOI: 10.1126/scitranslmed.adk6152.
- [27] YANG C, WEI Y F, LI X L, et al. Production of four-gene (GTKO/hCD55/hTBM/hCD39) -edited donor pigs and kidney xenotransplantation[J]. Xenotransplantation, 2024, 31(4): e12881. DOI:10.1111/xen.12881.
- [28] ZHAO H, LI Y Y, WIRIYAH DAMRONG T, et al. Improved production of GTKO/hCD55/hCD59 triple-gene-modified Diannan miniature pigs for xenotransplantation by recloning[J]. Transgenic Res, 2020, 29(3): 369-379. DOI:10.1007/s11248-020-00201-2.
- (收稿日期: 2025-02-20 修回日期: 2025-04-27)
(本文编辑: 陈毅)
- [引用本文]**
王娇祥, 张璐, 陈姝含, 等. GTKO/hCD55 基因编辑异种器官移植供体猪的构建及功能验证[J]. 实验动物与比较医学, 2025, 45(4): 379-392. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2025.024.
- WANG J X, ZHANG L, CHEN S H, et al. Construction and functional validation of GTKO/hCD55 gene-edited xenotransplant donor pigs[J]. Lab Anim Comp Med, 2025, 45(4): 379-392. DOI: 10.12300/j.issn. 1674-5817.2025.024.

《实验动物与比较医学》2026 年征订启事

《实验动物与比较医学》(CN 31-1954/Q, ISSN 1674-5817) 由上海科学院主管, 上海市实验动物学会和上海实验动物研究中心联合主办, 是我国实验动物科学及比较医学领域创刊最早的一本专业学术期刊。本刊目前是中国科技论文统计源期刊(即中国科技核心期刊), 并被荷兰 Scopus、瑞典 DOAJ、美国 Chemical Abstracts 和 Ulrichsweb、英国 CAB Abstracts 和 Global Health、波兰 ICI World of Journals 和 ICI Master List、WHO 西太平洋地区医学索引(WPRIM) 和美国 EBSCO 数据库, 以及中国开放获取期刊数据库、中国核心期刊数据库、中国科技期刊数据库、中国生物医学文献数据库、中国期刊全文数据库、中国学术期刊综合评价数据库、中国期刊网和万方医学网等收录, 并入选中国医师协会发布的中国医药卫生“核心期刊”目录和中国科协组织的 2022—2025 年度“科技期刊双语传播工程”, 参与中国科技期刊卓越行动计划二期集群化试点项目(B5)。

本刊兼顾理论与实践、普及与提高, 刊登实验动物科学和比较医学领域的研究及应用新成果、新进展、新信息。期刊内容主要涉及人类疾病动物模型(荣获 2024 年华东地区期刊优秀栏目)、实验动物资源开发与利用、实验动物管理、实验动物福利与伦理、动物实验技术与方法、实验动物医学、比较医学方法研究, 以及以实验动物为基础的生物医药各领域基础与应用研究。读者对象为生物学、医学、药学、动物学和农学等各领域从事实验动物生产、繁育、检测和管理, 以及应用实验动物进行比较医学研究的广大科技工作者、教育工作者和医学工作者。欢迎订阅!

本刊为中文双月刊, 大 16 开, 彩色印刷; 全年出版 6 期, 每期定价 30 元/本, 全年定价 180 元/套。读者可在各地邮局订阅, 邮发代号为 4-789; 也可以联系本刊编辑部购买, 联系电话: 021-50793657。E-mail: bjb50793657@163.com。编辑部地址: 上海市浦东新区金科路 3577 号(邮编 201203)。期刊官网地址: <http://www.slarc.org.cn/dwyx>。

《实验动物与比较医学》编辑部