

利用 CRISPR/Cas9 技术构建 CTCF 蛋白降解细胞系

谢德健, 师明磊, 张彦, 王天艺, 沈文龙, 叶丙雨, 李平, 何超, 张香媛, 赵志虎

军事医学科学院生物工程研究所, 北京 100071

摘要: CTCF 是脊椎动物关键的绝缘子蛋白, 在细胞生命过程中发挥重要作用, 敲除 *CTCF* 基因会导致小鼠胚胎死亡。为进一步探讨 CTCF 的功能, 本文利用 CRISPR/Cas9 介导的同源重组, 在内源性 *CTCF* 表达框上游敲入一个有丝分裂期降解结构域(Mitosis-special degradation domain, MD), 该结构域可以带动 CTCF 融合蛋白在 M 期降解。作为对照, 将 MD 结构域的第 42 位的精氨酸突变为丙氨酸, 形成无降解活性的 MD*, 可使 MD*-CTCF 融合蛋白始终稳定存在。将嘌呤霉素与融合蛋白同时表达, 即可利用抗生素筛选, 高效地筛选到纯合克隆。利用蛋白印迹技术和免疫荧光检测 3 种细胞在不同细胞周期的 CTCF 蛋白变化情况, 发现 MD-CTCF 细胞系 CTCF 蛋白含量约为野生型细胞的 10%, MD*-CTCF 细胞系的 CTCF 含量与野生型没有显著差别; 通过流式细胞术观测降解 CTCF 对细胞的影响, 发现 MD-CTCF 细胞系 G1 期明显延长。总之, 利用 CRISPR/Cas9 技术在 *CTCF* 表达框上游高效地插入 MD, 首个 CTCF 特异性降解的人类细胞系获得成功构建。

关键词: CRISPR/Cas9; 基因组编辑; CTCF; 蛋白质稳定性; 蛋白降解

Construction of CTCF degradation cell line by CRISPR/Cas9 mediated genome editing

Dejian Xie, Minglei Shi, Yan Zhang, Tianyi Wang, Wenlong Shen, Bingyu Ye, Ping Li, Chao He, Xiangyuan Zhang, Zhihu Zhao

Beijing Institute of Biotechnology, Beijing 100071, China

Abstract: The CCCTC-binding factor (CTCF) is the main insulator protein described in vertebrates. It plays fundamental roles during diverse cellular processes. *CTCF* gene knockout mice led to death during embryonic development. To further explore the functions of CTCF, we employed a CRISPR/Cas9-based genome engineering strategy to in-frame insert the mitosis-special degradation domain (MD) of cyclin B into the upstream open reading frame of *CTCF* gene. Fusion protein is designed to degrade during mitosis led by MD. As a control group, mutation of a single arginine (R42A) within the destruction box inactivates the MD leading to constitutive expression of MD*-CTCF. The homozygous clones were obtained via the screening by puromycin when coexpressed with puromycin resistance gene. The protein level of CTCF in

收稿日期: 2016-02-18; 修回日期: 2016-03-01

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 31370762)和国家重点基础研究发展规划项目(编号: 2013CB966802)资助[Supported by the National Natural Foundation of China (No.31370762) and the Major State Basic Research Development Program of China (No.2013CB966802)]

作者简介: 谢德健, 硕士研究生, 专业方向: 遗传学。E-mail: ncuskxiedejian@163.com

通讯作者: 赵志虎, 研究员, 博士, 研究方向: 表观遗传学。E-mail: zhaozh@nic.bmi.ac.cn

师明磊, 助理研究员, 博士, 研究方向: 表观遗传学。E-mail: shiml79@126.com

DOI: 10.16288/j.ycz.16-058

网络出版时间: 2016/5/23 11:09:16

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20160523.1109.004.html>

MD-CTCF cell line was about 10% of wild-type cells throughout cell cycles by the analyses of Western blotting and immunofluorescence. There was no significant difference between MD^{*}-CTCF cell line and wild type. Flow cytometry results showed prolonged G₁ phase in MD-CTCF cell line. Taken together, we demonstrated the feasibility of efficiently inserting MD domain into genome with the CRISPR/Cas9 technology and reported the first CTCF-specific degradation human cell line.

Keywords: CRISPR/Cas9; genome editing; CTCF; protein stability; protein degradation

CCCTC 结合因子(CCCTC binding factor, CTCF)是一种在进化上高度保守的锌指蛋白,其功能广泛,可以在转录激活、转录抑制,绝缘子、基因印迹和 X 染色体失活等过程中发挥功能^[1]。CTCF 蛋白在脊椎动物基因组有上万个结合位点,这些结合位点既有组成型的,也有组织类型特异性的。高通量测序结果证实,CTCF 在基因组关键调控区域如染色质结构域边界、增强子和启动子等位置富集^[2]。作为基因组高级结构的关键组织者,CTCF 调控细胞核内全局的染色质高级构象,在 DNA 甲基化、染色质高级结构和种系特异的基因表达调控等诸多方面发挥着重要的表观遗传调控作用^[3]。

为了深入研究基因功能,研究人员利用 RNA 干扰(RNA interference, RNAi)、锁核苷酸(Locked nucleic acid, LNA)封闭等方法在转录、翻译等不同层次调节其蛋白表达水平并取得一定进展^[4,5]。然而,与转录、翻译层次的调控相比,翻译后蛋白水平的直接调控具有更加直接、高效、可逆等特点^[6]。细胞周期蛋白 B 含有有丝分裂期特异性降解结构域(Mitosis-specific degradation motif, MD),当细胞进入有丝分裂中期后,MD 激活泛素介导的蛋白降解途径,迅速降解周期蛋白 B。将 MD 与特定目的蛋白融合,即可实现特定蛋白的高效降解^[7]。早期由于进行基因组编辑比较困难,人们通常将 MD 与目的基因克隆至表达载体,再将该载体转染相应细胞进行外源表达,而这种方式无法影响内源蛋白表达水平,对目的蛋白总体表达水平的影响也有限。CRISPR/Cas9 技术的出现使得在基因组上进行直接改造变得简便易行。因此,本文利用 CRISPR/Cas9 技术,将 MD 插入到基因组 CTCF 表达框上游,以期周期性持续降解细胞内 CTCF 蛋白,从而获得 CTCF 蛋白特异性降解细胞系,为后续研究 CTCF 功能奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

人肺癌细胞系 A549 购自美国 ATCC 细胞库;DH5 α 感受态细胞、限制性内切酶购自宝生物工程(大连)有限公司;KAPA HiFi DNA 聚合酶购自美国 KAPA Biosystems 公司;嘌呤霉素购自美国 Amersco 公司;Nocodazole 购自美国 SIGMA 公司;Gibson Assembly kit、T4 DNA 连接酶购自美国 NEB 公司;Lip3000 购自美国 Invitrogen 公司;小牛血清购自美国 Hyclone 公司;DMEM/F12 培养基购自美国 GIBCO 公司;CTCF 一抗购自美国 CST 公司(#2899); β -actin 抗体购自北京中杉金桥生物技术有限公司;DNA marker、核酸酶 A(RNaseA)、pEASY-Blunt3 载体购自北京全式金生物技术有限公司;质粒提取、胶回收、PCR 纯化试剂盒、BCA 蛋白定量试剂盒购自北京天根生化科技有限公司;引物及测序由上海生工生物工程技术有限公司完成。

1.2 方法

1.2.1 质粒构建及测序

CRISPR/Cas9 质粒 hCas9(Plasmid #41815, Addgene)以及 gRNA 装载质粒 gRNA-Cloning Vector(Plasmid #41824, Addgene)由 George Church 实验室提供;特异性 gRNA 与基因组配对的序列为 gtgttctcccttaataa(位于 CTCF 第一个外显子中的起始密码子 11 个碱基上游);供体(Donor)质粒 CTCF 同源臂序列由 HEK 293 基因组扩增得到,上下游同源臂序列长约为 800 bp;MD 以及 MD^{*}序列(将 MD 第 42 位氨基酸由 R 突变为 A,从而导致其失去降解能力)由人工合成获得,抗性基因 *puro*(R)从 pGK2.1 扩增获得。为了使 Puro 蛋白与 MD-CTCF 蛋白以非融合的形式表达,在 *puro* 和 MD 序列中间连接了一段

P2A 核糖体跳跃序列(P2A ribosomal skipping sequence)^[8]; 用 Gibson Assembly kit 将上述片段整合在一起构建到 pEASY-Blunt3 质粒中^[9]。PCR 扩增相关片段, 并用 Sanger 测序验证是否存在突变。

1.2.2 细胞系及培养条件

A549 细胞培养条件为 DMEM/F12 培养基, 含 10% 加强型小牛血清, 培养于 5% CO₂、37℃ 温箱。

1.2.3 转染细胞及筛选阳性克隆

采用 Lipofectamine™3000 阳离子脂质体转染试剂盒, 按照试剂盒说明书进行转染。转染 4 d 后, 采用嘌呤霉素 4 μg/mL 加压筛选; 加压约 10 d 后, 用克隆环挑出单克隆孔。将单克隆培养到 24 孔板, 7 d 后筛选阳性克隆。

利用 Oligo6 软件在 CTCF 上游设计一对引物, 引物序列为:

上游引物 CTCF-CNF: 5'-CTTTCACCCACGA-GATAAC-3';

下游引物 CTCF-CNR: 5'-CCCACATAACGAC-CTTT-3'。

分别提取 A549、MD、MD* 细胞的基因组 DNA, PCR 扩增目的片段。扩增程序: 95℃ 预变性 5 min; 95℃ 变性 30 s, 62℃ 复性 30 s, 72℃ 延伸 2 min, 30 个循环; 最后再 72℃ 延长 7 min。利用 1% 琼脂糖凝胶电泳回收目的产物并纯化。

1.2.4 Western blotting

用细胞刮刀收集培养皿中培养的细胞, 加入 RIPA 裂解液进行细胞裂解, 冰水浴超声破碎细胞核。在 4℃ 低温条件下 12 000×g 离心 8 min; 弃细胞碎片, 取上清用 BCA 法进行定量; 配制 12% SDS-PAGE 分离胶进行电泳, 恒流 10mA 将 PAGE 胶中蛋白转移到硝酸纤维素膜中, 用 5% 脱脂奶粉封闭 1 h, 然后用 5% 脱脂奶粉加入 1:1000 羊抗兔的 CTCF 单抗, 4℃ 过夜杂交; 随后用 TBST 漂洗 4 次, 用兔二抗进行常温杂交 1 h, 用 TBST 漂洗去除非特异性杂交背景, 用化学发光法显色、显影。

1.2.5 细胞同步化

传代培养至细胞密度为 60%~80%, 更换新鲜培养基, 加入 100 ng/mL Nocodazole 培养 12 h, 小心

收集悬浮细胞, 用于蛋白印迹或免疫荧光实验。

1.2.6 免疫荧光实验

用多聚赖氨酸处理圆形盖玻片, 小心镊至 24 孔板中, 将细胞铺到上层; 培养 24 h 后用 4%PFA(多聚甲醛)进行固定 10 min; 后用 PBS 清洗 3 遍, 用 0.5% TritonX-100 处理 10 min, 后用 PBS 清洗 3 遍; 每孔加入 500 μL 5% BSA, 37℃ 封闭 30 min, 用 PBS 缓冲液清洗 3 遍, 加入 CTCF 抗体 1:200 稀释(1% BSA), 室温孵育 45 min, 弃上清, 并用 PBS 洗 3 遍, 加入二抗 1:200 稀释, 避光室温孵育 30 min, PBS 清洗盖玻片 3 遍, 用 DAPI 染色封片。

1.2.7 细胞周期样品制备及检测

收集六孔板中原有的培养基到离心管, 用 PBS 洗 1 遍, 用 0.2 mL 0.25% 胰酶消化细胞, 再加入 1 mL 新鲜的培养基中和胰酶, 吹打混匀后将细胞悬液转移至离心管, 1000 r/min 离心 2 min, 细胞用 1 mL、70% 酒精固定 5 min, PBS 洗 3 遍, 用 RNaseA (1 mg/mL) 在 37℃ 处理 30 min, 加 PI(Propidium iodide, 溴化丙啉)染色, 用流式细胞仪(ACEA NovoCyte)进行检测。

2 结果与分析

2.1 gRNA 与 MD/MD*-CTCF 供体质粒的构建与鉴定

将从基因组 DNA 扩增获得的同源臂序列与 MD/MD*、Puro 序列用 Gibson Assembly Kit 整合到 pEASY-Blunt3 质粒中, 形成 Puro-2A-MD/MD*-CTCF 的供体序列(图 1 A)。对供体质粒进行酶切验证, 获得 2372 bp 供体全长片段, 以及 3040 bp 载体片段(图 1B)。供体序列经测序鉴定未产生突变。hCas9 质粒与 gRNA-Cloning vector 质粒经电泳鉴定, 大小与预期相符。

2.2 嘌呤霉素筛选获得阳性纯合克隆

转染供体质粒和 hCas9 质粒后约有 30% 细胞死亡。预实验表明, 野生型 A549 细胞在 1 μg/mL 嘌呤霉素处理 4 d 后, 绝大多数细胞死亡; 杂合克隆(只有一条染色体插入了靶向序列的杂合子细胞)则在 3 μg/mL 嘌呤霉素处理条件下有 60% 细胞存活, 而当浓度提高到 4 μg/mL 时只有 10% 细胞存活; 纯合克隆(同源染色体均插入了靶向序列的纯合子细胞)在 5 μg/mL

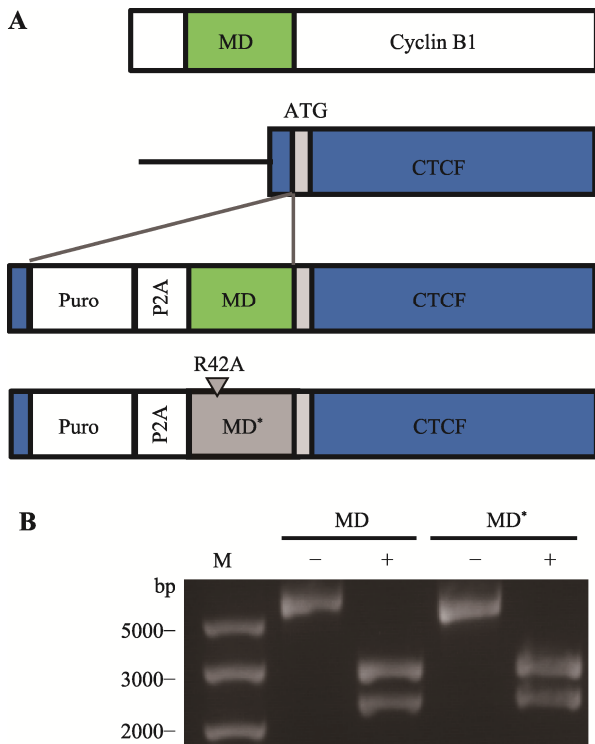


图 1 MD/MD*供体质粒的构建及鉴定

Fig. 1 Construction and verification of MD and MD* donor vectors

A: 在 CTCF ATG 上游插入 Puro 及 MD/MD*序列。R42A 是指将 MD 第 42 位精氨酸(R)突变为丙氨酸(A)。B: 酶切验证完整的 pEASY-Blunt3 供体质粒。M 为 DNA marker, MD 代表 MD-CTCF 的供体质粒, MD*代表 MD 突变型的供体质粒, “-”表示为未加 *EcoR* 酶进行酶切, “+”表示用 *EcoR* 进行酶切供体质粒, 其中酶切产生的较大片段为 pEASY-Blunt3 空载体片段, 较小的片段为插入片段。

嘌呤霉素处理后仍 100%存活(图 2)。因此, 提高嘌呤霉素浓度至 4 $\mu\text{g/mL}$, 可导致绝大多数杂合克隆死亡, 提高获得纯合克隆的效率。在实际操作中, 我们在正式转染 4 d 后, 加入 1 $\mu\text{g/mL}$ 的嘌呤霉素, 4 d 后可见大部分细胞死亡; 更换新鲜培养基继续培养 3 d 后, 增加嘌呤霉素浓度至 4 $\mu\text{g/mL}$, 持续培养直至形成克隆。转染 1 个六孔板(约 5×10^5 细胞)最终可获得 50~200 个克隆。用克隆环套取较大克隆, 将其转移至 24 孔板继续培养, 待长满后提取单克隆的基因组 DNA, 进行 PCR 扩增检测。野生型克隆扩增的片段大小为 1736 bp, 成功插入 MD/MD*片段的克隆 DNA 扩增片段则为 2684 bp。

PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳表明, 在 8 个单克隆样品中, 6 个为纯合克隆(只扩增获得 2684 bp 片段),

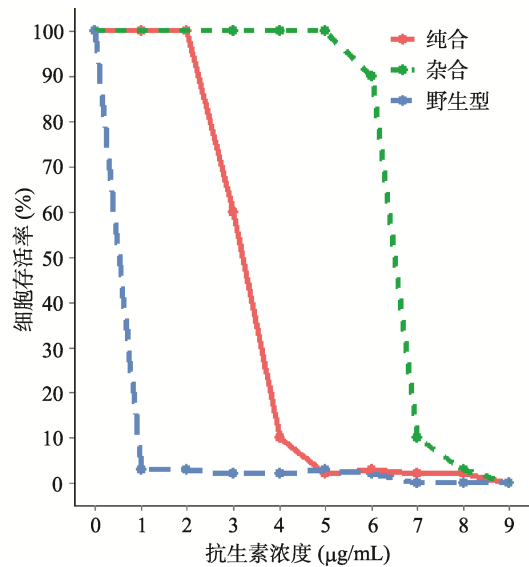


图 2 不同浓度抗生素条件下纯合克隆和杂合克隆及野生型细胞的存活率

Fig. 2 The survival rates of homozygote or heterozygote and wild type cells in different concentrations of antibiotic

占总克隆数 75%, 2 个为杂合克隆(同时扩增获得 2684 bp 片段与 1736 bp 片段), 占总克隆数 25%(图 3A)。将 PCR 产物克隆至 T 载体, 转化到大肠杆菌感受态细胞 DH5 α , Sanger 测序结果表明, 插入片段及整合位点与预期一致(图 3B)。以上结果证明, 成功获得了 MD 纯合克隆的 MD-CTCF 细胞系。

2.3 MD-CTCF 细胞系中 CTCF 含量在 M 期及 G₁ 期均显著下降

通过 PCR 鉴定获得阳性克隆后, 本研究运用 Western blotting 技术定量分析了 MD/MD*细胞系及野生型 A549 细胞 CTCF 蛋白的表达情况。结果表明 MD 细胞内的 CTCF 含量减少到野生型的 10%, 而 MD*细胞 CTCF 蛋白含量与野生型 A549 细胞相当, 仍然维持较高的表达水平(图 4A)。这证实了构建的 MD-CTCF 细胞系可以特定地降解 CTCF 蛋白。

随后, 本研究运用免疫荧光技术对 3 种细胞系的 CTCF 蛋白在不同细胞周期的表达进行了比较。正常培养条件下免疫荧光结果显示, MD-CTCF 细胞 CTCF 荧光信号较弱, MD*-CTCF 细胞和野生型 A549 细胞 CTCF 荧光信号维持在较强水平(图 4B)。该结果与 Western blotting 检测结果一致。与此同时, 通过比较细胞阻滞到 M 期以及释放以后 CTCF 含

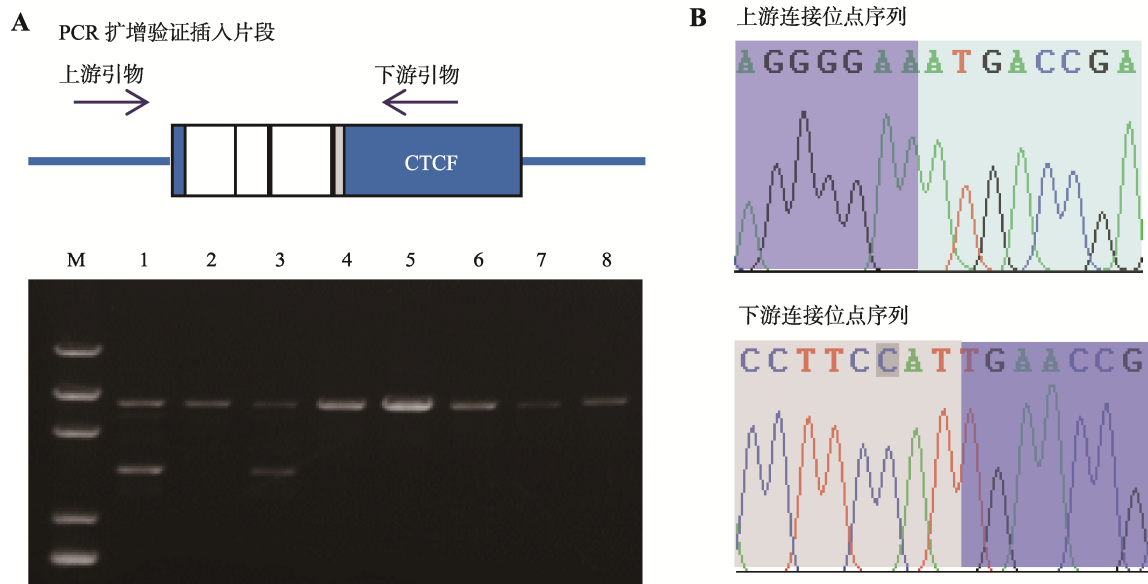


图 3 MD 阳性纯合克隆的检测

Fig. 3 Verification of MD homozygote

A: PCR 扩增检测。M: DNA Marker; 泳道 1 和 3 为杂合克隆, 泳道 2、4、5、6、7 和 8 为阳性纯合克隆; B: Sanger 测序证实 Puro 及 MD 精确插入到 *CTCF* 开放阅读框, 上游连接位点序列中紫色区域代表 *CTCF* 上游启动子部位序列, 淡绿色区域代表 *Puro* 基因序列, 下游连接位点序列中淡黄色区域代表 MD 序列, 紫色区域代表 *CTCF* 阅读框序列。

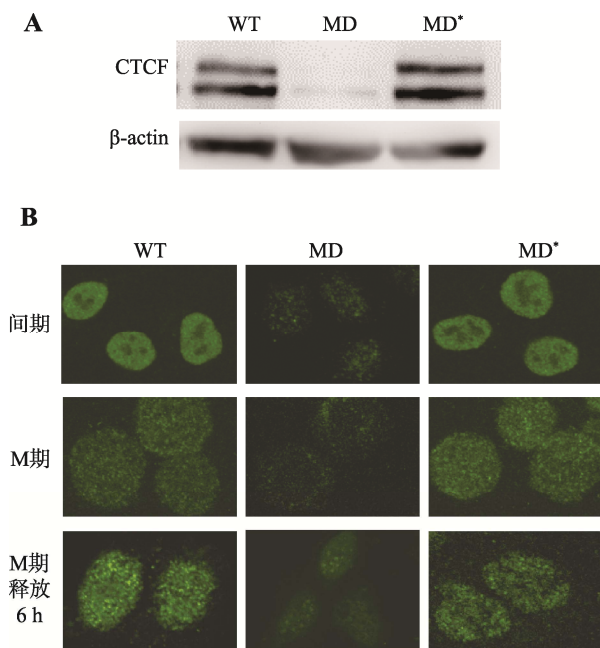


图 4 蛋白印迹和免疫荧光检测 CTCF 在不同细胞周期及处理方式下的蛋白丰度

Fig. 4 The CTCF protein level in different cell cycles and treatments detected by Western blotting and immunofluorescence assay

A: 利用蛋白印迹技术检测 3 种细胞系 CTCF 蛋白含量。B: 利用免疫荧光检测 3 种细胞系的 CTCF 蛋白在不同细胞周期的表达。WT 为野生型 A549 阳性对照组, MD 为实验组, MD* 为突变对照组。

量变化的情况, 结果发现在有丝分裂期, MD-CTCF 细胞 CTCF 荧光信号仍较弱, 而 MD*-CTCF 细胞和野生型 A549 细胞 CTCF 荧光信号仍维持在较强水平。将细胞同步化到 M 期进行释放, 分别取 0 h、6 h 细胞进行免疫荧光检测, 在进入 G₁ 期以后, CTCF 蛋白含量有一定程度的恢复。A549 及 MD* 细胞的 CTCF 荧光强度并未发生明显变化(图 4B)。

2.4 MD-CTCF 细胞 G₁ 期显著延长

流式细胞实验结果表明 MD-CTCF 细胞在 G₁ 期的细胞数显著增多, 约占 77.34%, 可能是因为 CTCF 的降解导致了细胞在 G₁ 期相关基因表达受到影响, 因此细胞需要更长的时间进行基因表达与蛋白合成, 才能够满足 G₁ 期检查点的需求, 进入下一个细胞周期(图 5)。

3 讨论

为研究 CTCF 含量高低对肿瘤细胞染色质构象的影响及机制, 本研究成功构建了 CTCF 特异性降解的细胞系(MD-CTCF)。结果发现与野生型 A549 细胞相比, CTCF 在 MD-CTCF 细胞系的整个细胞周期都显著降低但细胞仍能存活, 这可能是由于 A549

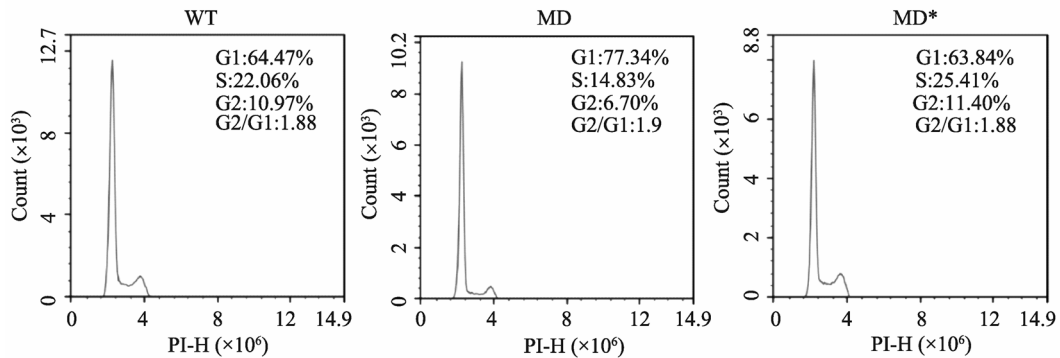


图 5 流式细胞术检测野生型、MD-CTCF 及 MD*-CTCF 细胞系的细胞周期

Fig. 5 Cell cycle analysis of wild type and MD/MD mutant cell lines by flow cytometry

MD-CTCF 细胞系的 G_1 期显著延长, 同时导致 S 期和 G_2 期所占比例显著降低。

细胞基因组高度紊乱, 对 CTCF 依赖程度降低所致。因此, 当细胞从 M 期进入 G_1 期后, 虽然 CTCF 含量极低, 但细胞也能勉强生长。

长期以来, 在高等生物基因组中进行外源基因敲入效率低。CRISPR 技术借助 gRNA 精确引导和 Cas9 高效切割, 精确地在基因组上产生切口, 从而极大增加了基因组切割的效率。但由于同源重组本身效率不高, 因此获得基因敲入阳性克隆的概率仍在 0.01% 以下^[10]。在相应供体片段中加入抗性标记, 通过抗生素筛选, 则可有效富集阳性克隆, 提高筛选效率。但是, 利用单一抗生素筛选可能获得大量杂合克隆。有报道指出在供体片段中加入不同抗性基因, 如杀稻瘟素与嘌呤霉素联用可以提高获得纯合克隆的效率^[11]。然而这种设计需要采用多个供体质粒, 且最后只能筛选获得在等位基因座位上恰好是不同抗性的供体的克隆, 增加了操作难度, 且进一步降低了克隆得率。有研究表明在带有抗药基因的双顺反子报告系统中, 增加抗生素使用浓度可以杀死抗性基因表达水平较低的克隆^[12]。本研究发现, 纯合克隆对嘌呤霉素的耐受性 (6 $\mu\text{g/mL}$) 显著高于杂合克隆 (2 $\mu\text{g/mL}$)。嘌呤霉素浓度达到 4 $\mu\text{g/mL}$ 即可有效杀死大部分杂合克隆, 显著提高了获得纯合阳性克隆的概率, 为 CRISPR/Cas9 介导的原位框内融合的纯合克隆筛选提供了一种有效途径。

CRISPR/Cas9 系统存在一定的脱靶风险。一般认为前间区序列邻近基序 (Protospacer adjacent motif, PAM) 的类型, sgRNA 与靶序列结合的特异性以及不同的细胞类型都有可能影响到 CRISPR/Cas9 系统的

脱靶效率^[13]。为降低脱靶的风险, 除提高 sgRNA 的特异性外, 还可对 Cas9 蛋白进行改造。主要策略有突变 Cas9 的一个具有酶切活性的结构域, 只保留一个有活性的结构域, 利用两个配对的 Cas9 蛋白进行酶切的双切口酶策略以及融合一个 Fok 核酸酶形成的 fCas9 策略, 这两种策略因均要识别两个 DNA 位点, 所以可以有效地降低脱靶的风险^[14,15]。本研究采用抗生素筛选的策略, 当供体片段正确插入到启动子下游时才会启动基因的转录和翻译。而一旦存在脱靶, 插入片段插入到其他的基因座位, *puro* 抗性基因无法表达, 克隆因此无法在含有嘌呤霉素的培养基中存活, 从而在一定程度上降低了获得脱靶克隆的风险。

CTCF 在维持和重建细胞染色体构象及调控基因表达中发挥重要作用。在拓扑学相关结构域的边界具有众多的 CTCF 结合位点, CTCF 结合在这些位点介导远距离染色质互作。Mundlos 等^[16]利用 CRISPR/Cas9 系统敲除 WNT6/IHH/EPHA4/PAX3 的基因座位的边界, 导致了拓扑学相关结构域的改变, 并最终证实短指 (Brachydactyly)、并指 (F-syndrome) 和多指 (Polydactyly) 是由于基因座位的改变导致染色质构象崩解最终影响到基因的表达而引起的; 上海交通大学吴强课题组通过 CRISPR 技术改变 CTCF 的结合位点的方向, 发现相关位点染色质构象发生改变, 并进而影响到启动子和增强子的功能, 直接证实了 CTCF 的结合位点的定位对染色体互作的影响^[17,18]。

对于 CTCF 降解会如何影响染色质构象人们还知之甚少。MD-CTCF 细胞系的建立为研究 CTCF 蛋

白在降解条件下染色质三维构象的变化, 阐明染色质构象形成的机制奠定了基础。

参考文献(References):

- [1] Phillips JE, Corces VG. CTCF: master weaver of the genome. *Cell*, 2009, 137(7): 1194–1211.
- [2] Ong CT, Corces VG. CTCF: an architectural protein bridging genome topology and function. *Nat Rev Genet*, 2014, 15(4): 234–246.
- [3] Cuddapah S, Jothi R, Schones DE, Roh TY, Cui KR, Zhao KJ. Global analysis of the insulator binding protein CTCF in chromatin barrier regions reveals demarcation of active and repressive domains. *Genome Res*, 2009, 19(1): 24–32.
- [4] Fire A, Xu SQ, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 1998, 391(6669): 806–811.
- [5] Braasch DA, Corey DR. Novel antisense and peptide nucleic acid strategies for controlling gene expression. *Biochemistry*, 2002, 41(14): 4503–4510.
- [6] Rakhit R, Navarro R, Wandless TJ. Chemical biology strategies for posttranslational control of protein function. *Chem Biol*, 2014, 21(9): 1238–1252.
- [7] Kadauke S, Udugama MI, Pawlicki JM, Achtman JC, Jain DP, Cheng Y, Hardison RC, Blobel GA. Tissue-specific mitotic bookmarking by hematopoietic transcription factor GATA1. *Cell*, 2012, 150(4): 725–737.
- [8] Kim JH, Lee SR, Li LH, Park HJ, Park JH, Lee KY, Kim MK, Shin BA, Choi SY. High cleavage efficiency of a 2A peptide derived from porcine teschovirus-1 in human cell lines, zebrafish and mice. *PLoS One*, 2011, 6(4): e18556.
- [9] Gibson DG, Benders GA, Axelrod KC, Zaveri J, Algire MA, Moodie M, Montague MG, Venter JC, Smith HO, Hutchison CA. One-step assembly in yeast of 25 overlapping DNA fragments to form a complete synthetic *Mycoplasma genitalium* genome. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(51): 20404–20409.
- [10] Krentz NAJ, Nian CL, Lynn FC. TALEN/CRISPR-mediated eGFP knock-in add-on at the OCT4 locus does not impact differentiation of human embryonic stem cells towards endoderm. *PLoS One*, 2014, 9(12): e114275.
- [11] Park A, Won ST, Pentecost M, Bartkowski W, Lee B. CRISPR/Cas9 allows efficient and complete knock-in of a destabilization domain-tagged essential protein in a human cell line, allowing rapid knockdown of protein function. *PLoS One*, 2014, 9(4): e95101.
- [12] Nakatake Y, Fujii S, Masui S, Sugimoto T, Torikai-Nishikawa S, Adachi K, Niwa H. Kinetics of drug selection systems in mouse embryonic stem cells. *BMC Biotech*, 2013, 13(1): 64.
- [13] Zheng W, Gu F. Progress of application and off-target effects of CRISPR/Cas9. *Hereditas(Beijing)*, 2015, 37(10): 1003–1010.
郑武, 谷峰. CRISPR/Cas9 的应用及脱靶效应研究进展. *遗传*, 2015, 37(10): 1003–1010.
- [14] Trevino AE, Zhang F. Chapter eight—Genome editing using Cas9 nickases. *Methods Enzymol*, 2014, 546: 161–174.
- [15] Tsai SQ, Wyvekens N, Khayter C, Foden JA, Thapar V, Reyon D, Goodwin MJ, Aryee MJ, Joung JK. Dimeric CRISPR RNA-guided Fok I nucleases for highly specific genome editing. *Nat Biotechnol*, 2014, 32(6): 569–576.
- [16] Lupiáñez DG, Kraft K, Heinrich V, Krawitz P, Brancati F, Klopocki E, Horn D, Kayserili H, Opitz JM, Laxova R, Santos-Simarro F, Gilbert-Dussardier B, Wittler L, Borschiwer M, Haas SA, Osterwalder M, Franke M, Timmermann B, Hecht J, Spielmann M, Visel A, Mundlos S. Disruptions of topological chromatin domains cause pathogenic rewiring of gene-enhancer interactions. *Cell*, 2015, 161(5): 1012–1025.
- [17] Guo Y, Xu Q, Canzio D, Shou J, Li JH, Gorkin DU, Jung I, Wu HY, Zhai Y, Tang YX, Lu YC, Wu YH, Jia ZL, Li W, Zhang MQ, Ren B, Krainer AR, Maniatis T, Wu Q. CRISPR inversion of CTCF sites alters genome topology and enhancer/promoter function. *Cell*, 2015, 162(4): 900–910.
- [18] Guo Y, Wu Q. Gene editing system inversion of CTCF binding sites alters chromatin topological architecture and enhancer/promoter function. *Hereditas(Beijing)*, 2015, 37(10): 1073–1074.
郭亚, 吴强. 采用 DNA 片段编辑技术反转 CTCF 结合位点改变基因组拓扑结构和增强子与启动子功能. *遗传*, 2015, 37(10): 1073–1074.

(责任编辑: 张博)