

# Ash2l-1/Ash2l-2 在小鼠胚胎干细胞中的表达特异性及互补效应

谢晶, 范辰, 张景龙, 张仕强

西北农林科技大学动物医学院, 杨凌 712100

**摘要:** H3K4me3 是一种重要的表观遗传修饰, 主要由 MLL(mixed lineage leukemia)甲基转移酶复合体催化, 对小鼠胚胎干细胞(mouse embryonic stem cells, mESCs)自我更新能力的维持具有重要作用。ASH2L 是 MLL 复合体中一个重要的核心亚单位, 参与调控 mESCs 中染色质的开放状态。ASH2L 在 mESCs 中有 2 个异构体: ASH2L-1(80 kDa)和 ASH2L-2(65 kDa), 且以 ASH2L-2 的表达为主; 而在小鼠胚胎成纤维细胞(mouse embryonic fibroblast, MEF)中, 只有 ASH2L-1 表达。目前, *Ash2l-1* 和 *Ash2l-2* 在 mESCs 中的作用尚不清楚。本文利用 CRISPR/Cas9 基因组编辑技术, 建立了 *Ash2l-1*<sup>-/-</sup>和 *Ash2l-2*<sup>-/-</sup> mESCs。通过碱性磷酸酶染色、免疫荧光染色和 qRT-PCR 发现, *Ash2l-1*<sup>-/-</sup>和 *Ash2l-2*<sup>-/-</sup> mESCs 在碱性磷酸酶、多能性调控转录因子(*Oct4*、*Nanog*、*Sox2* 和 *Klf4*)的表达与野生型对照无显著差异。通过拟胚体分化实验, 发现 *Ash2l-1*<sup>-/-</sup> mESCs 诱导的拟胚体在 *Snai2*(外胚层标记基因)和 *Gata4*(内胚层标记基因)的表达上显著低于野生型 mESCs 诱导的拟胚体( $P<0.01$ )。通过 Western blotting, 发现 *Ash2l-1*<sup>-/-</sup> mESCs 中 ASH2L-2 的表达显著上调( $P<0.01$ ), *Ash2l-2*<sup>-/-</sup> mESCs 中 ASH2L-1 的表达显著上调( $P<0.01$ ), 而 *Ash2l-1*<sup>-/-</sup>和 *Ash2l-2*<sup>-/-</sup> mESCs 中, 基因组 H3K4me3 的表达与野生型对照并无显著差异。这表明 *Ash2l-1* 和 *Ash2l-2* 之间存在补偿效应。利用 JASPAR 和 KEGG 预测分析发现, *Ash2l-1* 和 *Ash2l-2* 启动子区分别具有 3 个和 16 个潜在的多能性转录因子结合位点, 这些转录因子可能介导实现 *Ash2l-1* 和 *Ash2l-2* 之间的补偿效应。以上结果表明, *Ash2l-1* 和 *Ash2l-2* 之间的补偿效应可能参与 mESCs 多能性的维持和基因组 H3K4me3 的调控。

**关键词:** H3K4me3; ASH2L 异构体; CRISPR/Cas9; 小鼠胚胎干细胞; 补偿效应

## Expression specificity and compensation effect of *Ash2l-1/Ash2l-2* in mouse embryonic stem cells

Jing Xie, Chen Fan, Jinglong Zhang, Shiqiang Zhang

College of Veterinary Medicine, Northwest A&F University, Yangling 712100, China

**Abstract:** H3K4me3 is an important epigenetic modification that plays a critical role in maintaining self-renewal of

收稿日期: 2017-08-28; 修回日期: 2017-12-21

基金项目: 国家自然科学基金青年项目(编号: 31301218)资助[Supported by the National Natural Science Foundation of China (No.31301218)]

作者简介: 谢晶, 硕士研究生, 专业方向: 动物生物技术。E-mail: 2606283391@qq.com

通讯作者: 张仕强, 副教授, 硕士生导师, 研究方向: 干细胞生物学与体细胞重编程。E-mail: shiqiangzhang@nwsuaf.edu.cn

DOI: 10.16288/j.ycz.17-284

网络出版时间: 2018/2/26 10:54:00

URI: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20180226.1053.004.html>

mouse embryonic stem cells (mESCs). H3K4me3 is catalyzed mainly by the mixed lineage leukemia (MLL) methyl-transferase complex. ASH2L, a core subunit of the MLL complex, participates in regulating the open state of chromatin in mESCs. There are two isoforms of the ASH2L protein: ASH2L-1 (80 kDa), which only exists in mouse embryonic fibroblasts and ASH2L-2 (65 kDa), which is the predominant isoform in mESCs. The roles of *Ash2l-1* and *Ash2l-2* in mESCs have not yet been elucidated. In this study, we established *Ash2l-1*<sup>-/-</sup> and *Ash2l-2*<sup>-/-</sup> knockout mESCs using CRISPR/Cas9. Alkaline phosphatase (AP) staining, immunofluorescence staining, and qRT-PCR showed that there were no obvious differences on the expression level of AP and pluripotent transcription factors (*Nanog*, *Oct4*, *sox2* and *Klf4*) among *Ash2l-1*<sup>-/-</sup> mESCs, *Ash2l-2*<sup>-/-</sup> mESCs and wild type (WT) mESCs. However, analysis of embryoid body (EB) differentiation showed that the expression level of *Snai2* (ectoderm gene) and *Gata4* (endoderm gene) in *Ash2l-1*<sup>-/-</sup> EBs was significantly lower than that in WT EBs ( $P < 0.01$ ). Western blotting assay revealed that the expression of ASH2L-2 was significantly increased ( $P < 0.01$ ) in *Ash2l-1*<sup>-/-</sup> mESCs and vice versa. However, there were no obvious differences on the genomic H3K4me3 level among *Ash2l-1*<sup>-/-</sup> mESCs, *Ash2l-2*<sup>-/-</sup> mESCs and WT mESCs. These results indicate that there exist compensation effects between *Ash2l-1* and *Ash2l-2*. Bioinformatic analysis predicted that there were three and 16 potential binding sites for pluripotency transcription factors located in the promoter of *Ash2l-1* and *Ash2l-2*, respectively. These transcription factors may mediate the compensation effect between *Ash2l-1* and *Ash2l-2*. Collectively, these results indicate that the compensation effects between *Ash2l-1* and *Ash2l-2* may be involved in the maintenance of mESCs pluripotency and the regulation of genomic H3K4me3.

**Keywords:** H3K4me3; ASH2L isoforms; CRISPR/Cas9; mouse embryonic stem cells; compensation effect

胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)是一类具有自我更新能力的细胞,具有无限增殖和多向分化潜能。由于这种特性,ESCs已成为再生医学和细胞治疗的重要种子细胞<sup>[1,2]</sup>。表观遗传修饰可以在不改变碱基序列的情况下,通过改变染色质的结构调节基因的表达,调控 ESCs 的自我更新<sup>[3]</sup>。组蛋白氨基末端残基的翻译后修饰对于调节基因的表达具有重要作用,如甲基化、乙酰化、磷酸化、泛素化及 ADP 核糖基化等。组蛋白赖氨酸甲基化主要由组蛋白赖氨酸甲基转移酶完成,在组蛋白赖氨酸残基上主要发生单甲基化、双甲基化和三甲基化修饰。通常 H3K4、H3K36 及 H3K79 甲基化与基因激活相关,而 H3K9、H3K27 及 H4K20 甲基化与基因沉默有关。在小鼠胚胎干细胞(mouse embryonic stem cells, mESCs)中,染色质存在高水平的 H3K4 三甲基化(H3K4 trimethylation, H3K4me3)和 H3K4 乙酰化修饰,同时存在低水平的 H3K9me3 修饰<sup>[4-6]</sup>。

H3K4me3 主要分布在常染色质区转录活化基因的启动子区,可与组蛋白乙酰化酶、去乙酰化酶等相互作用改变邻近组蛋白甲基化修饰状态,调控

基因转录<sup>[4-6]</sup>。在酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)中, H3K4me3 由 Set1 调节;在哺乳动物中,主要由 MLL (mixed lineage leukemia)家族蛋白(包括 MLL1、MLL2、MLL3、MLL4、SET1A 和 SET1B)调节<sup>[7]</sup>。ASH2L(absent, small, homeotic-2-like)是果蝇 ASH2 (absent, small, homeotic discs)的同源物<sup>[8]</sup>,其与 RBBP5(retinoblastoma binding protein 5)、DPY30 (dumpy 30 protein)及 WDR5(WD repeat containing protein 5)共同组成了 MLL 甲基化转移酶复合体的核心亚单位<sup>[9-11]</sup>。有研究表明,一旦 ASH2L 缺失,MLL 复合体不能进行 H3K4me3 修饰<sup>[12]</sup>。*Ash2l* 缺失的小鼠会在妊娠期死亡,揭示 *Ash2l* 在小鼠胚胎发展过程中具有重要作用<sup>[13]</sup>。Wan 等<sup>[14]</sup>发现 *Ash2l* 可通过调节 H3K4me3 修饰影响染色质的结构,调控 mESCs 自我更新能力。

CRISPR/Cas9(clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated 9)是一种新型的基因组定点编辑技术,常用的 II 型 CRISPR 系统由负责靶向的导向 RNA(guide RNA, gRNA)与负责切割的 Cas9 核酸酶组成。当基因组上 PAM(proto-

spacer adjacent motif)区 5'端的前体间隔序列与 gRNA 中的引导序列互补时, Cas9 核酸酶可以对 DNA 双链进行切割, 引发 DNA 双链断裂, 激活细胞内非同源末端连接和同源重组两种 DNA 修复机制<sup>[15]</sup>。目前, CRISPR/Cas9 基因组编辑技术已被应用于制备多种动物以及细胞的基因敲除<sup>[16-18]</sup>。

本文研究发现, ASH2L 在 mESCs 中存在 2 个异构体: ASH2L-1 和 ASH2L-2, 且 ASH2L-2 具有多能干细胞表达特异性。目前, *Ash2l-1* 和 *Ash2l-2* 在 mESCs 中的作用尚不清楚。本文进一步利用 CRISPR/Cas9 基因组编辑技术建立了 *Ash2l-1*<sup>-/-</sup>和 *Ash2l-2*<sup>-/-</sup> mESCs, 并分析了分别缺失 *Ash2l* 两个变异体对 mESCs 的影响, 为进一步研究 *Ash2l-1* 和 *Ash2l-2* 对 mESCs 的作用机制奠定了基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 mESCs 培养

本文使用 3 株 mESCs, 分别是 TT2(加拿大 Matthew Lorincz 实验室馈赠, 品系为 C57BL/6 X CBA)、J1(购自美国模式培养集存库 ATCC, 品系为 129S4/SvJae)及 E14TG2a(购自中国科学院干细胞库, 品系为 129/Ola)。mESCs 培养基成分为 DMEM (HyClone, 美国)、15%胎牛血清(Gibco, 美国)、100× GlutaMAX(Gibco, 美国)、100×NEAA(Gibco, 美国)、100×青霉素/链霉素(Hyclone, 美国)、1000 U/mL LIF(Millipore, 美国)、1000×β-Mercaptoethanol(Gibco, 美国)。在 37℃、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养。培养皿预先用 0.1%明胶于 37℃培养箱中包被 2 h。每 24 h 更换新鲜培养基, 当细胞密度达 80%时, 用 0.25% (W/V)胰蛋白酶消化传代。

### 1.2 Western blotting 检测 ASH2L 和 H3K4me3 的表达

Western blotting 检测 ASH2L 表达时, 按照以下方法提取蛋白: 取 5~10×10<sup>6</sup> 个细胞, 用预冷的 PBS 漂洗 2 遍。每 10<sup>6</sup> 个细胞加入 100 μL 的 RIPA 裂解液, 冰上放置 20 min。于 4℃、1400 g 离心 15 min; 收集上清, 用 BCA 试剂盒(晶彩生物, 西安)测定蛋

白质浓度。Western blotting 检测 H3K4me3 表达时, 按照以下方法提取组蛋白: 每 10<sup>6</sup> 个细胞加入 500 μL 的 0.5% NP-40, 冰上放置 10 min。于 4℃、5000 g 离心 5 min。加入 0.2 mol/L 盐酸重悬细胞, 4℃过夜。于 4℃、20 000 g 离心 5 min; 收集上清, 加入 1.5 mol/L Tris(pH 8.8)中和。

每孔蛋白上样 20~35 μg, 进行 SDS-PAGE 凝胶 (5%浓缩胶; ASH2L 为 10%分离胶; H3K4me3 为 15%分离胶)电泳。电泳条件分别为: 80 V, 30 min; 120 V, 1 h 30 min。电泳结束后采用 PVDF 膜进行转膜 (15 V, 45 min)。然后加入一抗于 4℃过夜孵育。ASH2L 抗体(Cell Signaling, 美国)的稀释比例为 1:2000; GAPDH 抗体(三箭生物, 天津)的稀释比例为 1:5000。H3K4me3 抗体(Active Motif, 美国)的稀释比例为 1:1000; 组蛋白 H3(Sino biological, 北京)的稀释比例为 1:1000。一抗孵育后使用 TBST 漂洗 3 遍, 每次 10 min; 再加入羊抗兔二抗(三箭生物, 天津, 稀释比例为 1:5000)和羊抗鼠二抗(三箭生物, 天津, 稀释比例为 1:5000), 室温孵育 1 h。TBST 漂洗 3 遍, 每次 10 min; 最后用 ECL 试剂盒曝光检测。采用 Image J 软件对 3 次蛋白结果进行分析, 以 GAPDH 和组蛋白 H3 为内参, 计算目的蛋白的相对表达量。

### 1.3 gRNA/Cas9 打靶载体的构建

在 UCSC 网站(<http://genome.ucsc.edu/>)查询 *Ash2l-1* 和 *Ash2l-2* 的启动子元件, 在 Optimized CRISPR Design 网站(<http://crispr.mit.edu/>)分别设计靶向 *Ash2l-1*-CpG 岛和 *Ash2l-2*-RLTR12B 的 gRNA, 序列见表 1。hPuro2-hU6-gRNA-CBh-hCas9 载体(Matthew Lorincz 实验室馈赠)可以同时表达 gRNA 和 Cas9 蛋白。用高保真 DNA 聚合酶复性合成 gRNA, PCR 扩增条件为: 96℃ 3 min, 96℃ 30 s, 50℃ 30 s, 72℃ 3 min, 3 个循环; 72℃ 5 min, 10℃保温。用 DNA 纯化回收试剂盒(TIANGEN, 北京)进行胶回收。用 *Sap* I (NEB, 美国)和 *Xba* I (NEB, 美国)限制性内切酶酶切 gRNA 和骨架载体, 经连接、转化感受态细胞、挑取细菌单克隆、摇菌, 用质粒提取试剂盒(TIANGEN, 北京)抽提质粒。用 *Nde* I (NEB, 美国)和 *Sap* I 限制性内切酶对质粒进行酶切, 最后测序鉴定。

表 1 靶向 *Ash2l-1*-CpG 岛和 *Ash2l-2*-RLTR12B 的 gRNAs 序列信息Table 1 Sequences of gRNAs targeting *Ash2l-1*-CpG islands and *Ash2l-2*-RLTR12B

名称	序列(5'→3')	PAM	Tm( )	GC(%)
<i>Ash2l-1</i> -CpG 岛-5'-gRNA-1	ACTTTGAGTCCGCCGCTTTA	AGG	58	50
<i>Ash2l-1</i> -CpG 岛-5'-gRNA-2	AAAACGCCTGCTCATAGTCG	TGG	57	50
<i>Ash2l-1</i> -CpG 岛-3'-gRNA-1	TGCACTGGGCTAACGACGGG	AGG	63	65
<i>Ash2l-1</i> -CpG 岛-3'-gRNA-2	GACAAATGTGTTCGCGGCCC	AGG	61	60
<i>Ash2l-2</i> -RLTR12B-5'-gRNA-1	CTAATTACTGCGACAGTTGC	AGG	53	45
<i>Ash2l-2</i> -RLTR12B-5'-gRNA-2	GAGAACCGCGATAGCAGTCC	AGG	59	60
<i>Ash2l-2</i> -RLTR12B-3'-gRNA-1	AAATGCGTGTGCGCGCGCTG	GGG	67	65
<i>Ash2l-2</i> -RLTR12B-3'-gRNA-2	TGCCAGCAAACCCGAGGATC	TGG	61	60

#### 1.4 有效转染组合的筛选

当 TT2 细胞密度达到 50% 时, 将 gRNA/Cas9 打靶载体组成 4 种组合(表 2), 分别使用 Lipofectamine 3000(Invitrogen, 美国)转染 TT2。24 h 后, 换成含嘌呤霉素(2 μg/mL)的 mESCs 培养基进行筛选。用嘌呤霉素处理 48 h 后, 更换为正常的 mESCs 培养基继续培养。当细胞密度达到 80% 时, 提取细胞基因组 DNA, 进行 PCR 鉴定。针对 DNA 切割靶位点的上下游设计 PCR 扩增引物(引物序列见表 3), 根据 PCR 产物大小确定有效的转染组合。

在鉴定 *Ash2l-2*-RLTR12B 敲除实验中, PCR 引物位置示意图见结果 2.2 部分 C 图。第 1、2、3 对引物组合分别为 1F+1R、2F+2R 和 1F+2R。当无敲除发生时, 第 1、2、3 对引物分别扩增出大小为 500 bp、509 bp 和 2120 bp 的条带。当双等位基

因敲除发生时, 第 1、2 对引物扩增不出条带, 第 3 对引物扩增出大小为 809 bp 的条带。当单等位基因敲除发生时, 第 1、2 对引物扩增出大小为 500 bp 和 509 bp 的条带, 第 3 对引物扩增出大小分别为

表 2 gRNA/Cas9 载体的转染组合

Table 2 Transfection combinations of gRNA/Cas9 vectors

靶点	gRNA/Cas9 载体的转染组合
<i>Ash2l-1</i> -CpG 岛	组合 1: 5'-gRNA-1/Cas9 与 3'-gRNA-1/Cas9
	组合 2: 5'-gRNA-1/Cas9 与 3'-gRNA-2/Cas9
	组合 3: 5'-gRNA-2/Cas9 与 3'-gRNA-1/Cas9
	组合 4: 5'-gRNA-2/Cas9 与 3'-gRNA-2/Cas9
<i>Ash2l-2</i> -RLTR12B	组合 1: 5'-gRNA-1/Cas9 与 3'-gRNA-1/Cas9
	组合 2: 5'-gRNA-1/Cas9 与 3'-gRNA-2/Cas9
	组合 3: 5'-gRNA-2/Cas9 与 3'-gRNA-1/Cas9
	组合 4: 5'-gRNA-2/Cas9 与 3'-gRNA-2/Cas9

表 3 PCR 鉴定引物序列信息

Table 3 Primer sequences for PCR validation

引物名称	引物序列(5'→3')	Tm( )	GC(%)
<i>Ash2l-1</i> -CpG 岛-1	F: AGTGTCTCCGGTACCTTCCT	58	55
	R: GTGTGAGCCAAGAGCGTTTC	58	55
<i>Ash2l-1</i> -CpG 岛-2	F: CCTTACCCACTTTCGGCCTC	59	60
	R: TGCTCCGCACAGTGTAAGG	59	55
<i>Ash2l-1</i> -CpG 岛-3	F: CCCCACTGCAACTCCACTTCTCCCAACTGCCGCCAT	75	61
	R: CCACCCACAACCTACCTCGGGCTCTCTGGAATCAGACCT	72	58
<i>Ash2l-2</i> -RLTR12B-1	F: GTCCCCCACTGACATGGTTT	58	55
	R: TCAAGGGCTGCGAATTGTCT	58	50
<i>Ash2l-2</i> -RLTR12B-2	F: CCTTAGACCTTGCTTGGTGACA	58	50
	R: AGCAAGAATGGCTCATGGTAGA	57	45

2120 bp 和 809 bp 的条带。

在鉴定 *Ash2l-1*-CpG 岛敲除实验中, PCR 引物位置示意图见结果 2.2 部分 E 图。第 1、2 对引物组合分别为 1F+1R 和 2F+2R。由于 CpG 岛中的 GC 含量高, 第 3 对引物组合 1F+2R 无法扩增出对应的长片段。针对此问题, 在 1F 和 2R 的位置附近设计引物 3F 和 3R 作为最后选用的第 3 对引物组合见结果 2.2 部分 E 图。当无敲除发生时, 第 1、2、3 对引物分别扩增出大小为 500 bp、538 bp 和 1505 bp 的条带。当双等位基因敲除发生时, 第 1、2 对引物扩不出条带, 第 3 对引物扩增出大小为 701 bp 的条带。当单等位基因敲除发生时, 第 1、2 对引物分别扩增出大小为 500 bp 和 538 bp 的条带, 第 3 对引物扩增出大小分别为 1505 bp 和 701 bp 的条带。

### 1.5 单克隆获取与基因型鉴定

当确定有效的 gRNA/Cas9 打靶载体组合后, 采用上述转染和筛选方法, 挑取单克隆至 96 孔板中。当细胞密度达 80% 时, 取一半细胞接种于 24 孔板, 继续培养, 冻存; 取一半细胞接种于 96 孔板, 提取基因组 DNA。以基因组 DNA 为模板, 采用上述 PCR 鉴定方法, 初步鉴定发生双等位基因敲除的单克隆。然后将 PCR 产物连接到 pGEM-T Easy 载体(Promega, 美国)进行测序验证。

### 1.6 碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, AP)染色

野生型 mESCs、*Ash2l-1*<sup>-/-</sup>和 *Ash2l-2*<sup>-/-</sup> mESCs 分别用 PBS 漂洗 2 次, 加入 4% 多聚甲醛, 室温固定 20 min。PBS 漂洗 3 次, 加入 AP 染色液进行染色。AP 染色液配制方法: 称取 5 mg 的 Fast Red TR(Sigma, 美国)和 2 mg 的  $\alpha$ -磷酸萘酚钠盐(Sigma, 美国), 溶解于 5 mL 的 0.1 mol/L Tris-HCl(pH9.0)中。10~20 min 后阳性细胞呈现红色, PBS 漂洗以终止反应, 在显微镜下观察照相。

### 1.7 免疫荧光染色检测多能性调控转录因子的表达

野生型 mESCs、*Ash2l-1*<sup>-/-</sup>和 *Ash2l-2*<sup>-/-</sup> mESCs 分别用 PBS 漂洗 2 次, 加入 4% 多聚甲醛, 室温固定 20 min。PBS 漂洗 3 次, 加入 0.25% Triton-X, 室温处理 30 min。PBS 漂洗 3 次, 加入 1% BSA 室温

封闭 1 h; 4 过夜孵育一抗(*Oct4*, 1:200, Santa Cruz, 美国; *Sox2*, 1:200, Santa Cruz, 美国; *Nanog*, 1:200, Abcam, 英国)。PBS 漂洗 3 次, 加入二抗(Alexa Fluor 488 donkey anti-mouse IgG(H+L), 1:500, Life Technologies, 美国; Alexa Fluor 596 donkey anti-rabbit IgG(H+L), 1:500, Life Technologies, 美国), 室温孵育 1 h。PBS 漂洗 2 次后, DAPI(1:1000, Roche, 瑞士)染色 2 min, PBS 漂洗 2 次, 在荧光显微镜下观察照相。

### 1.8 拟胚体(embryoid body, EB)的培养和 qRT-PCR

当野生型 mESCs、*Ash2l-1*<sup>-/-</sup>和 *Ash2l-2*<sup>-/-</sup> mESCs 的细胞密度达 80% 时, 用 0.25% (W/V) 胰蛋白酶消化, 吹打为单细胞。140 g 离心 5 min, 去除上清, 用撤去 LIF 的 mESCs 分化培养基重悬细胞。收集细胞 ( $2 \times 10^5$  细胞/mL) 到细菌培养皿中培养。悬浮培养 8 d 后, 将 EB 转移至铺有 0.1% 明胶的培养皿中进行贴壁培养。贴壁培养 8 d 后, PBS 漂洗 1 次, 加入 RZ 裂解液, 提取总 RNA (TIANGEN, 北京)。使用反转录试剂盒(TransGen, 北京)将 RNA 反转录为 cDNA, 进行 qRT-PCR, 检测三胚层标志基因的表达。实时定量 PCR 扩增体系 2  $\mu$ L 的 cDNA, 12.5  $\mu$ L 的 TransStart Tip Green qPCR SuperMix(TransGen, 北京), 各 0.3  $\mu$ mol/L 的上下游引物, 加水补充到 25  $\mu$ L。以 *Gapdh* 为内参, 以  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  相对定量进行分析。所有数据均用 3 次独立实验的平均值  $\pm$  标准偏差表示, 并经 One-Way ANOVA 检验差异是否具有统计学意义。

### 1.9 启动子区转录因子结合位点的预测

利用 JASPAR 数据库(<http://jaspar.genereg.net/>)分别预测 *Ash2l-1*-CpG 岛和 *Ash2l-2*-RLTR12B 启动子区转录因子的结合位点。在 DAVID 数据库(<https://david.ncifcrf.gov/>)中进行 KEGG(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 mESCs 中 ASH2L-1 和 ASH2L-2 的表达

通过 Western blotting 检测 3 株 mESCs (TT2、J1、

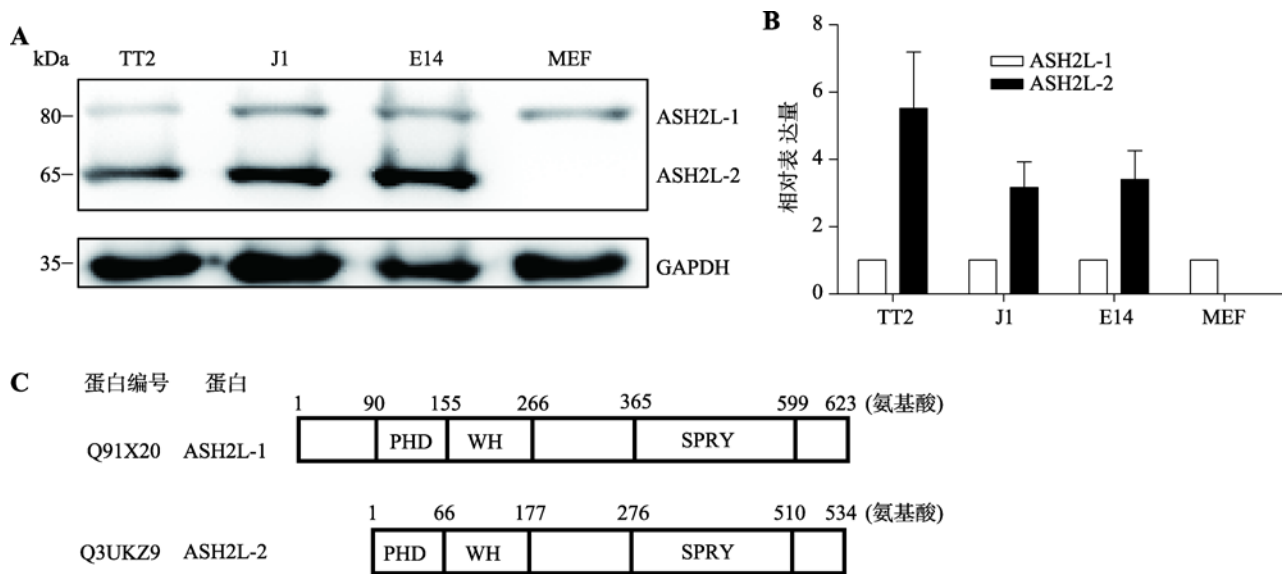


图 1 ASH2L-1 和 ASH2L-2 的表达

Fig. 1 Expression of ASH2L-1 and ASH2L-2

A, B: Western blotting 检测 ASH2L-1 和 ASH2L-2 的表达及定量分析; C: ASH2L-1 和 ASH2L-2 氨基酸序列结构示意图。

E14)和小鼠胚胎成纤维细胞(mouse embryonic fibroblast, MEF)中 ASH2L 的表达。Western blotting 和定量分析结果显示, ASH2L 在 mESCs 中有 2 个异构体: ASH2L-1(80 kDa)和 ASH2L-2(65 kDa), 且以 ASH2L-2 的表达为主。而在 MEF 中, 只有 ASH2L-1 表达(图 1: A, B)。这表明 ASH2L 蛋白在 mESCs 中存在 ASH2L-1 和 ASH2L-2 两个异构体, 且 ASH2L-2 具有干细胞表达特异性。经 NCBI 网站查询可知, ASH2L-1 由 623 个氨基酸组成, ASH2L-2 由 534 个氨基酸组成。ASH2L-1 除了在 N 端比 ASH2L-2 多 89 个氨基酸外, 其他序列与 ASH2L-2 一样, 二者都包含 PHD、WH 和 SPRY 结构域(图 1C)。

## 2.2 gRNA/Cas9 打靶载体的构建和有效转染组合的筛选

在 UCSC 网站查询发现, ASH2L-1 由 CpG 岛启动元件驱动表达, 而 ASH2L-2 由长末端重复序列 RLTR12B 启动元件驱动表达。由此, 分别在二者的启动元件两边设计 gRNA, 其测序结果与设计的序列一致(图 2: A, B), 表明 hPuro2-hU6-gRNA-CBh-hCas9 载体构建成功。

在鉴定 *Ash2l-2*-RLTR12B 敲除实验中, 转染组合 3 可以有效引导 gRNA/Cas9 打靶载体敲除 *Ash2l-*

*2*-RLTR12B。PCR 引物位置示意图见图 2C, 凝胶电泳结果见图 2D。对照组为野生型 mESCs, 第 1、2、3 对引物分别扩增出大小为 500 bp、509 bp 和 2120 bp 的条带。实验组分别为发生双等位和单等位基因敲除的单克隆 A 和 B。对于单克隆 A, 第 1、2 对引物扩增不出条带, 第 3 对引物扩增出大小为 809 bp 的条带。对于单克隆 B, 第 1、2 对引物分别扩增出大小为 500 bp 和 509 bp 的条带, 第 3 对引物扩增出大小分别为 2120 bp 和 809 bp 的条带。

在鉴定 *Ash2l-1*-CpG 岛敲除实验中, 转染组合 4 可以有效引导 gRNA/Cas9 打靶载体敲除 *Ash2l-1*-CpG 岛。PCR 引物位置示意图见图 2E, 凝胶电泳结果见图 2F。对照组为野生型 mESCs, 第 1、2、3 对引物分别扩增出大小为 500 bp、538 bp 和 1505 bp 的条带。实验组为分别发生双等位和单等位基因敲除的单克隆 C 和 D。对于单克隆 C, 第 1、2 对引物扩增不出条带, 第 3 对引物扩增出大小为 701 bp 的条带。对于单克隆 D, 第 1、2 对引物分别扩增出大小为 500 bp 和 538 bp 的条带, 第 3 对引物扩增出大小分别为 1505 bp 和 701 bp 的条带。

本文统计分析了 gRNA/Cas9 打靶载体的敲除效率。在挑取的靶向敲除 *Ash2l-1*-CpG 岛的 48 个单克隆中, 野生型单克隆有 26 个; 发生单等位基因敲除



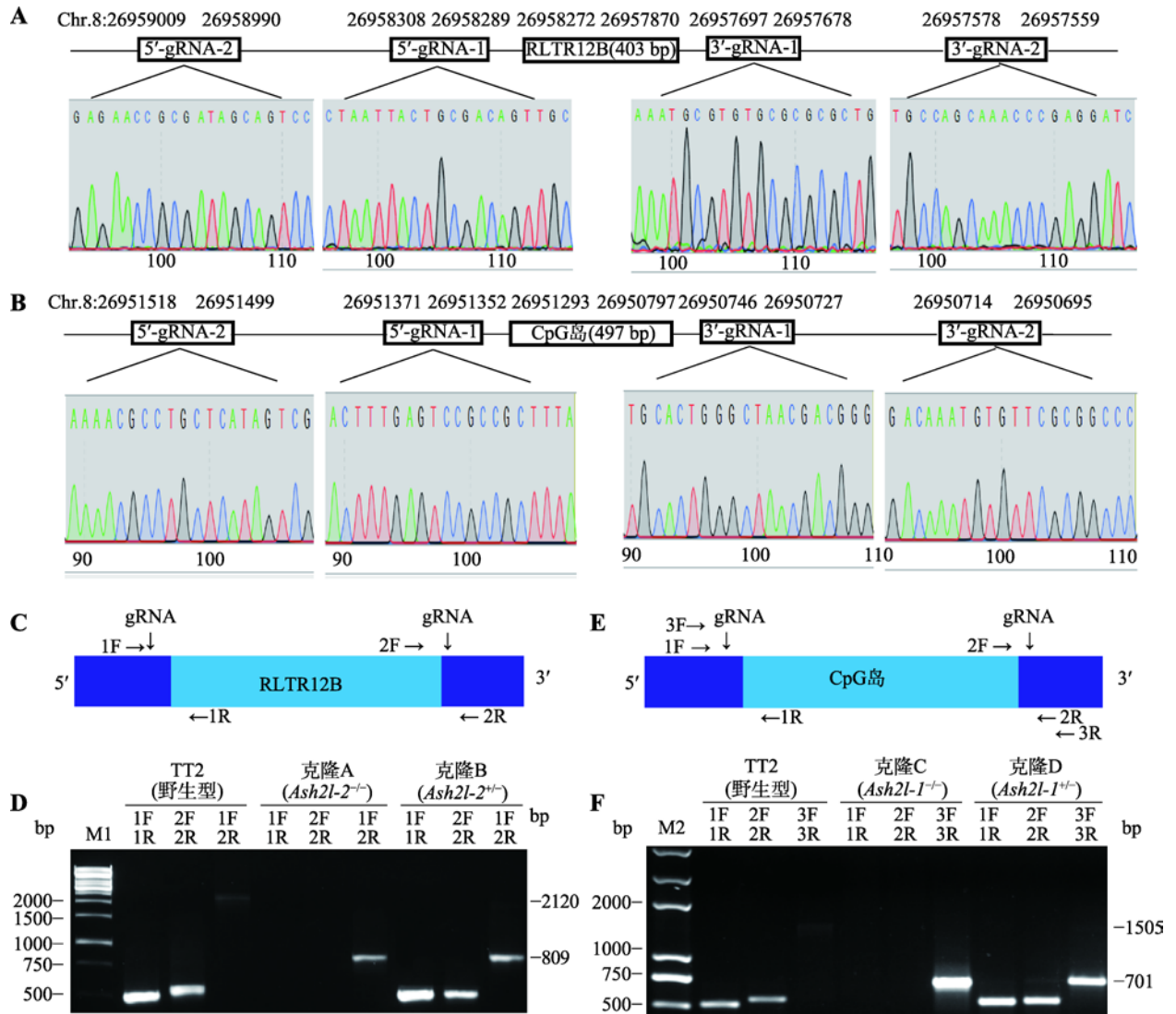


图 2 gRNA 测序和单克隆鉴定

**Fig. 2 Sanger sequencing of gRNAs and colonies identification**

A, B: 靶向 *Ash2l-1*-CpG 岛和 *Ash2l-2*-RLTR12B 启动子的 gRNA 位置示意图及测序结果。C: *Ash2l-2* 敲除鉴定中 PCR 引物位置示意图。D: *Ash2l-2* 敲除鉴定。M1 为 AL10000 Plus DNA Marker。第 1 对引物(1F+1R)(针对野生型等位基因)产物为 500 bp, 第 2 对引物(2F+2R)(针对野生型等位基因)产物为 509 bp, 第 3 对引物(1F+2R)(针对野生型等位基因)产物为 2120 bp, 第 3 对引物(1F+2R)(针对双等位基因敲除)产物为 809 bp。E: *Ash2l-1* 敲除鉴定中 PCR 引物位置示意图。F: *Ash2l-1* 敲除鉴定。M2 为 Trans2K plus2 DNA marker。第 1 对引物(1F+1R)(针对野生型等位基因)产物为 500 bp, 第 2 对引物(2F+2R)(针对野生型等位基因)产物为 538 bp, 第 3 对引物(3F+3R)(针对野生型等位基因)产物为 1505 bp, 第 3 对引物(3F+3R)(针对双等位基因敲除)产物为 701 bp。

的单克隆有 14 个, 敲除效率为 29.2%; 发生双等位基因敲除的单克隆有 8 个, 敲除效率为 16.7%。在挑取的靶向敲除 *Ash2l-2*-RLTR12B 的 32 个单克隆中, 野生型单克隆有 22 个; 发生单等位基因敲除的单克隆有 7 个, 敲除效率为 21.9%; 发生双等位基因敲除的单克隆有 3 个, 敲除效率为 9.4%。统计结果见表 4。

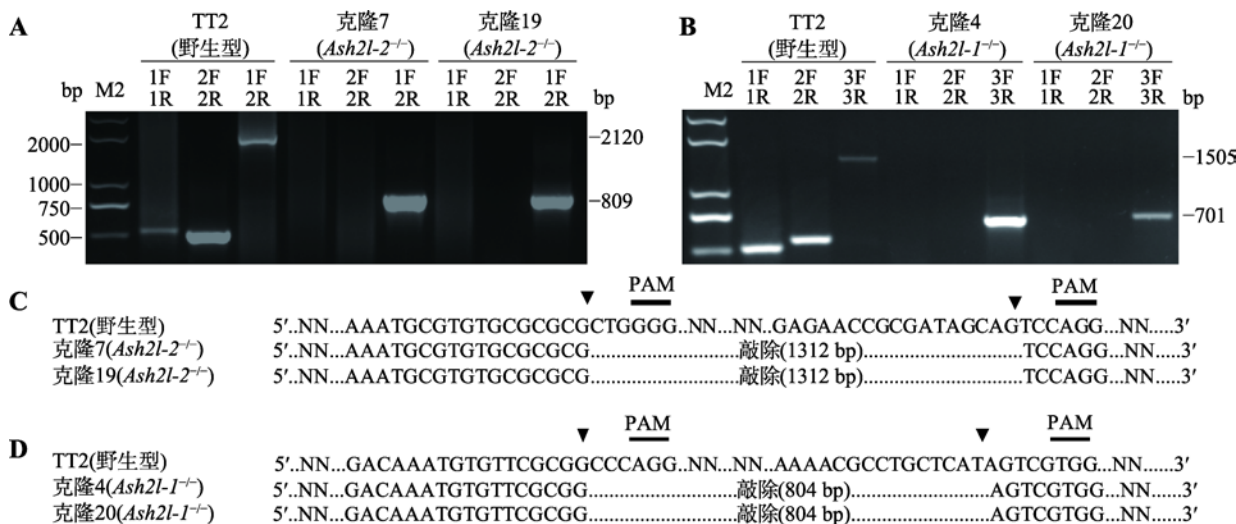
### 2.3 *Ash2l-1<sup>-/-</sup>*和 *Ash2l-2<sup>-/-</sup>* mESCs 的鉴定

为了建立 *Ash2l-1<sup>-/-</sup>*和 *Ash2l-2<sup>-/-</sup>* mESCs, 经 PCR 鉴定, 初步分析单克隆中的基因编辑情况。在鉴定 *Ash2l-2*-RLTR12B 敲除实验中, PCR 引物位置示意图见图 2C, 凝胶电泳结果见图 3A。对照组为野生型 mESCs, 第 1、2、3 对引物分别扩增出大小

表 4 CRISPR/Cas9 组合 3 和组合 4 的敲除效率

**Table 4 Knockout efficiency of CRISPR/Cas9 combination 3 and 4**

敲除靶点	克隆总数	野生型(+/+)	单等位基因敲除(+/-)	双等位基因敲除(-/-)
<i>Ash2l-1</i> -CpG 岛	48	26(54.1%)	14(29.2%)	8(16.7%)
<i>Ash2l-2</i> -RLTR12B	32	22(68.7%)	7(21.9%)	3 (9.4%)



**图 3** *Ash2l-1<sup>-/-</sup>*和 *Ash2l-2<sup>-/-</sup>* mESCs 的鉴定

**Fig. 3** Identification of *Ash2l-1*<sup>-/-</sup> and *Ash2l-2*<sup>-/-</sup> mESCs

A: 单克隆 7 和 19 中 *Ash2l-2* 敲除鉴定。第 1 对引物(1F+1R)(针对野生型等位基因)产物为 500 bp, 第 2 对引物(2F+2R)(针对野生型等位基因)产物为 509 bp, 第 3 对引物(1F+2R)(针对野生型等位基因)产物为 2120 bp, 第 3 对引物(1F+2R)(针对双等位基因敲除)产物为 809 bp。B: 单克隆 4 和 20 中 *Ash2l-1* 敲除鉴定。第 1 对引物(1F+1R)(针对野生型等位基因)产物为 500 bp, 第 2 对引物(2F+2R)(针对野生型等位基因)产物为 538 bp, 第 3 对引物(3F+3R)(针对野生型等位基因)产物为 1505 bp, 第 3 对引物(3F+3R)(针对双等位基因敲除)产物为 701 bp。C、D: 单克隆 7 和 19、单克隆 4 和 20 的测序结果。

为 500 bp、509 bp 和 2120 bp 的条带。实验组为挑取的单克隆 7 和 19, 第 1、2 对引物扩增不出条带, 第 3 对引物扩增出大小为 809 bp 的条带, 由此初步判断这两株克隆发生了双等位基因敲除。在鉴定 *Ash2l-1*-CpG 岛敲除实验中, PCR 引物位置示意图见图 2E, 凝胶电泳结果见图 3B。对照组为野生型 mESCs, 第 1、2、3 对引物分别扩增出大小为 500 bp、538 bp 和 1505 bp 的条带。实验组为挑取的单克隆 4 和 20, 第 1、2 对引物扩增不出条带, 第 3 对引物扩增出大小为 701 bp 的条带, 由此初步判断这两株克隆发生了双等位基因敲除。

通过以上结果初步判定单克隆 7 和 19、单克隆 4 和 20 分别发生了 *Ash2l*-2-RLTR12B 和 *Ash2l*-1-CpG 岛双等位基因敲除。测序分析表明, 切割位点发生在基因组 PAM 序列上游 3~5 个碱基处。单克隆 7 和 19 敲除了长度为 1312 bp 的 *Ash2l*-2-RLTR12B(图 3C), 单克隆 4 和 20 敲除了长度为 804 bp 的 *Ash2l*-1-

CpG 岛(图 3D)。以上结果表明, 本文通过 CRISPR/Cas9 技术成功获得 *Ash2l-1*<sup>-/-</sup>和 *Ash2l-2*<sup>-/-</sup> mESCs。

#### 2.4 *Ash2l-1*<sup>-/-</sup>和 *Ash2l-2*<sup>-/-</sup> mESCs 多能性鉴定

野生型 mESCs、*Ash2l-1*<sup>-/-</sup> mESCs(单克隆 4 和 20)和 *Ash2l-2*<sup>-/-</sup> mESCs(单克隆 7 和 19)多数呈边缘紧凑的岛状或巢状, 在克隆形态和碱性磷酸酶的表达上未有明显差异(图 4A)。免疫荧光染色和 qRT-PCR 结果显示, 上述 5 株细胞中 *Oct4*、*Sox2* 和 *Nanog* 的表达没有显著差异(图 4 :B ,C)。EB 分化实验表明, 相比于野生型 EB, *Ash2l-1*<sup>-/-</sup> EB 中的 *Snai2*(外胚层标志基因)和 *Gata4*(内胚层标志基因)的表达显著降低( $P<0.01$ ), *Mixl1*(中胚层标志基因)的表达没有显著差异。而 *Ash2l-2*<sup>-/-</sup> EB 中, *Snai2*、*Mixl1* 和 *Gata4* 的表达均无显著差异(图 4D)。以上结果提示, *Ash2l-1*<sup>-/-</sup> mESCs 可能在外胚层和内胚层起源的器官形成方面具有发育缺陷。



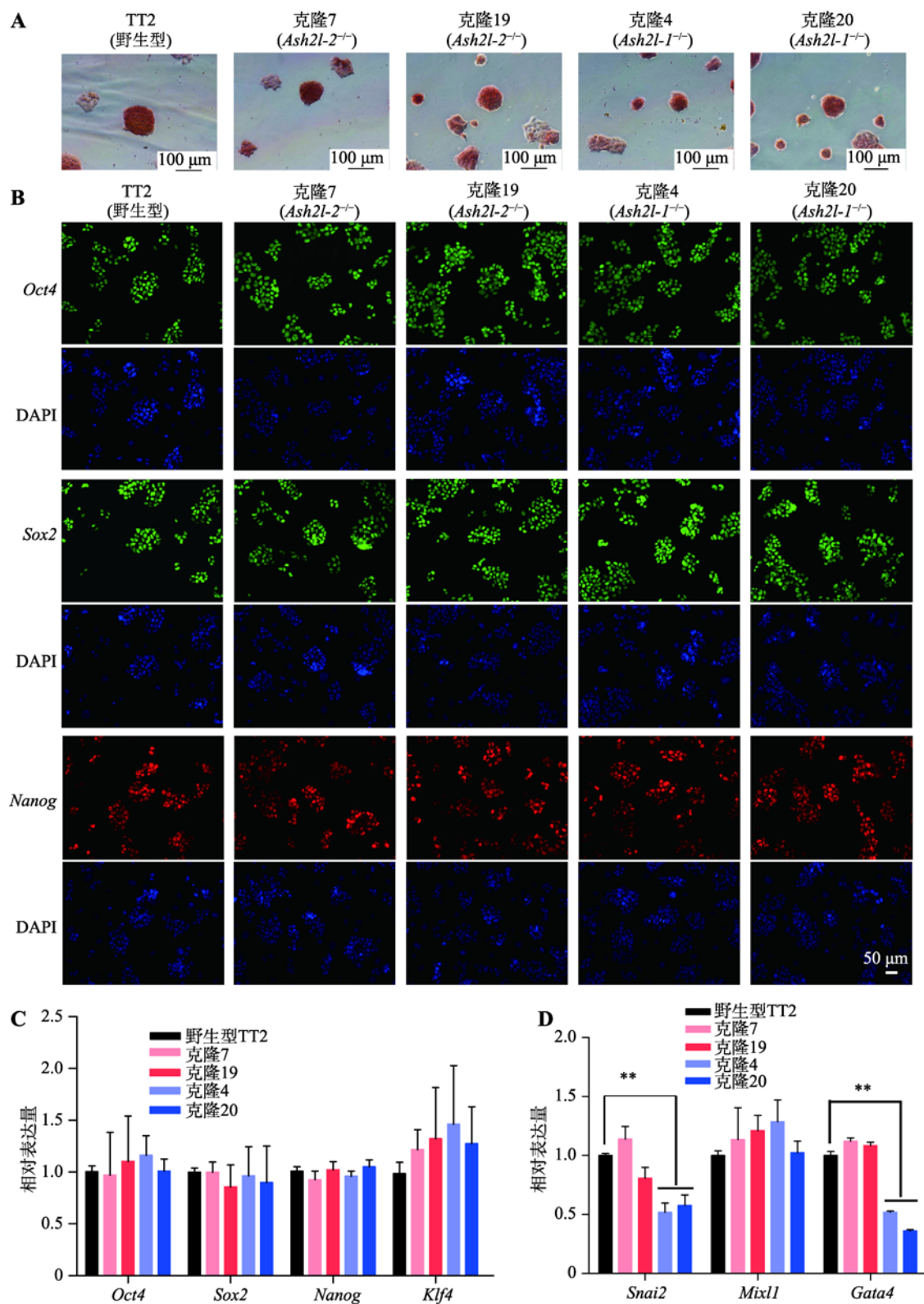


图4 *Ash2l-1<sup>-/-</sup>*和*Ash2l-2<sup>-/-</sup>* mESCs 多能性鉴定结果

Fig. 4 Pluripotency characterization of *Ash2l-1<sup>-/-</sup>* and *Ash2l-2<sup>-/-</sup>* mESCs

A: TT2、单克隆7和19、单克隆4和20的AP染色结果(比例尺: 100 μm); B: *Oct4*、*Sox2*、*Nanog* 的免疫荧光染色(比例尺: 50 μm, DAPI为细胞核染色); C: qRT-PCR 检测 *Oct4*、*Sox2*、*Nanog* 和 *Klf4* 的表达; D: qRT-PCR 检测 *Snai2*、*Mixl1* 和 *Gata4* 的表达。\*\*表示  $P < 0.01$ 。

## 2.5 *Ash2l-1* 和 *Ash2l-2* 之间的补偿效应

qRT-PCR 结果表明：与野生型 mESCs 相比，*Ash2l-2*<sup>-/-</sup> mESCs 中 *Ash2l-2* 的 mRNA 表达量下降，*Ash2l-1* 的表达极显著上调( $P<0.01$ )。*Ash2l-1*<sup>-/-</sup> mESCs 中，*Ash2l-1* 的 mRNA 表达量下降，*Ash2l-2* 的表达显著上调( $P<0.05$ ) (图 5A)。Western blotting 结果表明：与野生型 mESCs 相比，*Ash2l-2*<sup>-/-</sup> mESCs 中 ASH2L-2 的表达下降，ASH2L-1 的表达极显著上调( $P<0.01$ )。

*Ash2l-1*<sup>-/-</sup> mESCs 中 ASH2L-1 表达下降，ASH2L-2 的表达极显著上调( $P<0.01$ ) (图 5：B，C)。 *Ash2l-1*<sup>-/-</sup> 和 *Ash2l-2*<sup>-/-</sup> mESCs 中 H3K4me3 的表达没有显著变化 (图 5：D，E)。由此推测，*Ash2l-1* 和 *Ash2l-2* 之间存在补偿效应。

JASPAR 数据库预测结果显示，分别有 826 和 1008 个转录因子结合在 *Ash2l-1*-CpG 岛和 *Ash2l-2*-RLTR12B 启动子区。KEGG 分析表明，在 *Ash2l-1*-CpG 岛启动子区，有 3 个转录因子 (HAND1、SMAD2

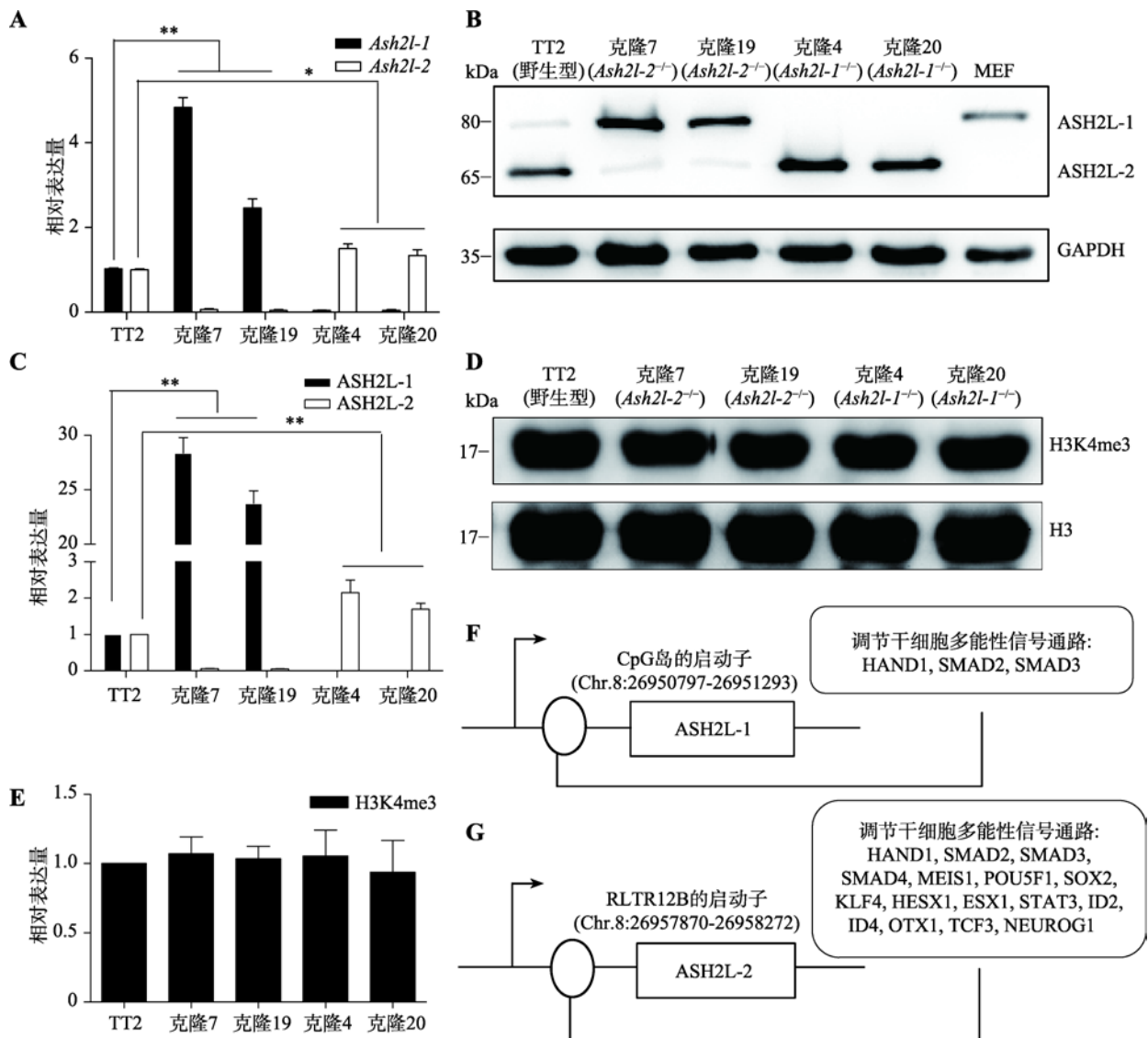


图 5 *Ash2l-1* 和 *Ash2l-2* 之间的补偿效应

Fig. 5 The compensation effect between *Ash2l-1* and *Ash2l-2*

A: qRT-PCR 检测 *Ash2l-1* 和 *Ash2l-2* 的 mRNA 表达。\*表示  $P<0.05$ ，\*\*表示  $P<0.01$ ；B，C：Western blotting 检测 ASH2L-1 和 ASH2L-2 的蛋白表达量和蛋白结果的定量分析；D，E：Western blotting 检测 H3K4me3 的蛋白表达量和蛋白结果的定量分析；F，G：参与调节干细胞多能性的转录因子在 *Ash2l-1*-CpG 岛和 *Ash2l-2*-RLTR12B 上的结合位点。

和 SMAD3) 参与调节干细胞多能性(图 5F)。在 *Ash2l-2*-RLTR12B 启动子区, 有 16 个转录因子(HAND1、SMAD2、SMAD3、SMAD4、MEIS1、POU5F1、SOX2、KLF4、HESX1、ESX1、STAT3、ID2、ID4、OTX1、TCF3 和 NEUROG1)参与调节干细胞多能性(图 5G)。以上结果提示, *Ash2l-1* 和 *Ash2l-2* 之间的补偿效应可能是通过若干多能性转录因子介导实现的。

### 3 讨论

组蛋白甲基化修饰是表观遗传的重要内容, 参与染色质形成、基因印记、基因转录调控等多种重要生命活动, 对 mESCs 自我更新具有重要影响。ASH2L 是 MLL 复合体的核心成分, 影响 H3K4 甲基转移酶活性, 对 mESCs 多能性的维持十分重要<sup>[3,12~14]</sup>。一旦 *Ash2l* 的表达降低, mESCs 分化, 与 mESCs 自我更新和多能性相关的转录因子, 如 *Nanog*、*Oct4*、*Esrrb* 及 *Rex1* 的表达下降。*Ash2l* 可通过作用于 *Cdh7*、*c-Myc* 和 *Kdm4c*, 影响染色质重构、转录调控和 H3K9me3 去甲基化过程, 进而调节染色质开放状态 维持 mESCs 自我更新能力<sup>[14,19~21]</sup>。

本研究发现 在 mESCs 中 ASH2L 存在 ASH2L-1 和 ASH2L-2 两个异构体, 且以 ASH2L-2 的表达为主。而在 MEF 中, 只表达 ASH2L-1。ASH2L-1 由 CpG 岛驱动表达, 而 ASH2L-2 由长末端重复序列 RLTR12B 驱动表达。RLTR12B 属于内源性逆转录病毒(endogenous retroviruses, ERVs), ERVs 可参与 ESC 多能性的维持<sup>[22]</sup>。MuERV-L 在 mESCs 中受 REX1 调控表达, 与 mESCs 多能性有关<sup>[23]</sup>。而 HERV-H 和 HERV-K 的表达受 NANOG、OCT4 调节, 与人类早期胚胎的发育密切联系<sup>[24]</sup>。ASH2L-2 在 mESCs 中特异表达 是 ERVs 参与 mESCs 多能性调控的表现。

在体外分化过程中, *Ash2l-1*<sup>-/-</sup> mESCs 诱导产生的 EB 在外胚层标记基因 *Snai2* 和内胚层标记基因 *Gata4* 的表达上显著低于野生型 mESCs 产生的 EB。由此推断, *Ash2l-1*<sup>-/-</sup> mESCs 可能会在神经系统、皮肤上皮组织<sup>[25~27]</sup>及内胚层起源的器官(如肝脏、胰腺、肺等)形成方面具有发育缺陷<sup>[28~30]</sup>。*Ash2l-1*<sup>-/-</sup> 和 *Ash2l-2*<sup>-/-</sup> mESCs 具有多能性, 在碱性磷酸酶、多能

性调控转录因子(*Oct4*、*Nanog*、*Sox2* 和 *Klf4*)的表达上与野生型对照并无显著差异。*Ash2l-1* 和 *Ash2l-2* 对基因组 H3K4me3 没有影响。Wan 等<sup>[14]</sup>用 RNAi 干扰 *Ash2l* 表达 发现 mESCs 的克隆形态无法维持, 多能性丧失, 整体 H3K4me3 水平降低。MLL 复合体中其他核心亚单位(RBBP5、DPY30 或 WDR5)的单独敲除, 也会导致整体 H3K4me3 水平下调<sup>[9~11]</sup>。由此推测, *Ash2l-1* 和 *Ash2l-2* 在功能上存在互补效应 这与 qRT-PCR 和 Western blotting 检测的结果相吻合(图 5: A~C)。有研究表明, *Tet* 家族中的 *Tet1* 和 *Tet2* 在 mESCs 中均有表达, 具有将 DNA 甲基化催化为羟甲基化的能力, 二者在功能上可以互补。单独敲低 *Tet1* 或者 *Tet2* 的 mESCs 仍具有多能性, *Nanog* 和 *Oct4* 的表达水平几乎没有变化, 但当这两个基因同时被敲低时, *Nanog* 和 *Oct4* 表达下降, 中胚层分化受阻。这些结果表明补偿效应是细胞内部的一种保守机制<sup>[31,32]</sup>。

生物信息学预测表明, 在 *Ash2l-1*-CpG 岛启动子区 有 3 个转录因子参与调节干细胞多能性(图 5F)。其中, HAND1 对心血管的正常发育具有关键作用, 敲除 HAND1 可导致小鼠胚胎早期死亡<sup>[33,34]</sup>。由此推测 *Ash2l-2* 的敲除可能会影响 HAND1 在 *Ash2l-1*-CpG 岛启动子区的结合, 影响小鼠胚胎早期的发育。在 *Ash2l-2*-RLTR12B 启动子区 有 16 个转录因子参与调节干细胞多能性(图 5G)。其中, MEIS1 在胚胎造血系统发育、白血病发生发展及神经系统发育中发挥重要作用<sup>[35,36]</sup>。经 STRING(<https://string-db.org/>)数据库预测, MEIS1 可能与 ASH2L 相互作用(结果未列出)。由此推测, *Ash2l-1* 敲除可能会影响 MEIS1 在 *Ash2l-2*-RLTR12B 启动子区的结合, 影响 MEIS1 的功能。所以, *Ash2l-1* 和 *Ash2l-2* 之间的补偿效应可能是通过这些多能性调控转录因子实现的。这种补偿效应参与 mESCs 的自我更新能力的维持和基因组 H3K4me3 的调控, 但 *Ash2l-1*<sup>-/-</sup> 和 *Ash2l-2*<sup>-/-</sup> mESCs 的发育缺陷可能在细胞分化过程中才能体现出来。本文为进一步深入研究 *Ash2l-1* 和 *Ash2l-2* 对 mESCs 的影响奠定了基础。

### 参考文献(References):

- [1] Murry CE, Keller G. Differentiation of embryonic stem cells

- to clinically relevant populations: lessons from embryonic development. *Cell*, 2008, 132(4): 661–680. [DOI]
- [2] Evans M. Discovering pluripotency: 30 years of mouse embryonic stem cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2011, 12(10): 680–686. [DOI]
- [3] Wu H, Sun YE. Epigenetic regulation of stem cell differentiation. *Pediatr Res*, 2006, 59(4 Pt 2): 21R–25R. [DOI]
- [4] Zhang TY, Cooper S, Brockdorff N. The interplay of histone modifications – writers that read. *EMBO Rep*, 2015, 16(11): 1467–1481. [DOI]
- [5] Kouzarides T. Chromatin modifications and their function. *Cell*, 2007, 128(4): 693–705. [DOI]
- [6] Mattout A, Meshorer E. Chromatin plasticity and genome organization in pluripotent embryonic stem cells. *Curr Opin Cell Biol*, 2010, 22(3): 334–341. [DOI]
- [7] Malik S, Bhaumik SR. Mixed lineage leukemia: histone H3 lysine 4 methyltransferases from yeast to human. *FEBS J*, 2010, 277(8): 1805–1821. [DOI]
- [8] Ikegawa S, Isomura M, Koshizuka Y, Nakamura Y. Cloning and characterization of *ASH2L* and *Ash2l*, human and mouse homologs of the *Drosophila ash2* gene. *Cytogenet Cell Genet*, 1999, 84(3–4): 167–172. [DOI]
- [9] Dou YL, Milne TA, Ruthenburg AJ, Lee S, Lee JW, Verdine GL, Allis CD, Roeder RG. Regulation of MLL1 H3K4 methyltransferase activity by its core components. *Nat Struct Mol Biol*, 2006, 13(8): 713–719. [DOI]
- [10] Jiang H, Shukla A, Wang XL, Chen WY, Bernstein BE, Roeder RG. Role for Dpy-30 in ES cell-fate specification by regulation of H3K4 methylation within bivalent domains. *Cell*, 2011, 144(4): 513–525. [DOI]
- [11] Ang YS, Tsai SY, Lee DF, Monk J, Su J, Ratnakumar K, Ding JJ, Ge YC, Darr H, Chang B, Wang JL, Rendl M, Bernstein E, Schaniel C, Lemischka IR. Wdr5 mediates self-renewal and reprogramming via the embryonic stem cell core transcriptional network. *Cell*, 2011, 145(2): 183–197. [DOI]
- [12] Steward MM, Lee JS, O'Donovan A, Wyatt M, Bernstein BE, Shilatifard A. Molecular regulation of H3K4 trimethylation by ASH2L, a shared subunit of MLL complexes. *Nat Struct Mol Biol*, 2006, 13(9): 852–854. [DOI]
- [13] Stoller JZ, Huang L, Tan CC, Huang FC, Zhou DD, Yang JF, Gelb BD, Epstein JA. Ash2l interacts with Tbx1 and is required during early embryogenesis. *Exp Biol Med*, 2010, 235(5): 569–576. [DOI]
- [14] Wan M, Liang JC, Xiong YY, Shi FT, Zhang Y, Lu WS, He QY, Yang D, Chen R, Liu D, Barton M, Zhou SY. The trithorax group protein Ash2l is essential for pluripotency and maintaining open chromatin in embryonic stem cells. *J Biol Chem*, 2013, 288(7): 5039–5048. [DOI]
- [15] Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F. Genome engineering using the crispr-cas9 system. *Nat Protoc*, 2013, 8(11): 2281–2308. [DOI]
- [16] Wu YX, Liang D, Wang YH, Bai MZ, Tang W, Bao SM, Yan ZQ, Li DS, Li JS. Correction of a genetic disease in mouse via use of CRISPR-Cas9. *Cell Stem Cell*, 2013, 13(6): 659–662. [DOI]
- [17] Hwang WY, Fu YF, Reyon D, Maeder ML, Tsai SQ, Sander JD, Peterson RT, Yeh JRJ, Joung JK. Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(3): 227–229. [DOI]
- [18] Mali P, Yang LH, Esvelt KM, Aach J, Guell M, DiCarlo JE, Norville JE, Church GM. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*, 2013, 339(6121): 823–826. [DOI]
- [19] Schnetz MP, Bartels CF, Shastri K, Balasubramanian D, Zentner GE, Balaji R, Zhang XD, Song LY, Wang ZH, LaFramboise T, Crawford GE, Scacheri PC. Genomic distribution of CHD7 on chromatin tracks H3K4 methylation patterns. *Genome Res*, 2009, 19(4): 590–601. [DOI]
- [20] Kim J, Woo AJ, Chu JL, Snow JW, Fujiwara Y, Kim CG, Cantor AB, Orkin SH. A Myc network accounts for similarities between embryonic stem and cancer cell transcription programs. *Cell*, 2010, 143(2): 313–324. [DOI]
- [21] Loh YH, Zhang WW, Chen X, George J, Ng HH. Jmjd1a and Jmjd2c histone H3 Lys 9 demethylases regulate self-renewal in embryonic stem cells. *Genes Dev*, 2007, 21(20): 2545–2557. [DOI]
- [22] Sharif J, Endo TA, Nakayama M, Karimi MM, Shimada M, Katsuyama K, Goyal P, Brind'Amour J, Sun MA, Sun ZX, Ishikura T, Mizutani-Koseki Y, Ohara O, Shinkai Y, Nakanishi M, Xie HH, Lorincz MC, Koseki H. Activation of endogenous retroviruses in *Dnmt1*<sup>-/-</sup> ESCs involves disruption of SETDB1-mediated repression by NP95 binding to hemimethylated DNA. *Cell Stem Cell*, 2016, 19(1): 81–94. [DOI]
- [23] Schoorlemmer J, Pérez-Palacios R, Climent M, Gullar D, Muniesa P. Regulation of mouse retroelement MuERV-L/MERV expression by REX1 and epigenetic control of stem cell potency. *Front Oncol*, 2014, 4: 14. [DOI]
- [24] Gerdes P, Richardson SR, Mager DL, Faulkner GJ. Transposable elements in the mammalian embryo: pioneers surviving through stealth and service. *Genome Biol*, 2016, 17: 100. [DOI]
- [25] Mayor R, Morgan R, Sargent MG. Induction of the pro-



- spective neural crest of *Xenopus*. *Development*, 1995, 121(3): 767–777. [DOI]
- [26] Shi JL, Severson C, Yang JX, Wedlich D, Klymkowsky MW. Snail2 controls mesodermal BMP/Wnt induction of neural crest. *Development*, 2011, 138(15): 3135–3145. [DOI]
- [27] Romano LA, Runyan RB. Slug is a mediator of epithelial-mesenchymal cell transformation in the developing chicken heart. *Dev Biol*, 1999, 212(1): 243–254. [DOI]
- [28] Narita N, Bielinska M, Wilson DB. Wild-type endoderm abrogates the ventral developmental defects associated with GATA-4 deficiency in the mouse. *Dev Biol*, 1997, 189(2): 270–274. [DOI]
- [29] Molkentin JD, Lin Q, Duncan SA, Olson EN. Requirement of the transcription factor GATA4 for heart tube formation and ventral morphogenesis. *Genes Dev*, 1997, 11(8): 1061–1072. [DOI]
- [30] Fujikura J, Yamato E, Yonemura S, Hosoda K, Masui S, Nakao K, Miyazaki JI, Niwa H. Differentiation of embryonic stem cells is induced by GATA factors. *Genes Dev*, 2002, 16(7): 784–789. [DOI]
- [31] Dawlaty MM, Ganz K, Powell BE, Hu YC, Markoulaki S, Cheng AW, Gao Q, Kim J, Choi SW, Page DC, Jaenisch R. Tet1 is dispensable for maintaining pluripotency and its loss is compatible with embryonic and postnatal development. *Cell Stem Cell*, 2011, 9(2): 166–175. [DOI]
- [32] Yang J, Guo RP, Wang H, Ye XY, Zhou ZC, Dan JM, Wang HY, Gong P, Deng W, Yin Y, Mao SQ, Wang LB, Ding JJ, Li JS, Keefe DL, Dawlaty MM, Wang JL, Xu GL, Liu L. Tet enzymes regulate telomere maintenance and chromosomal stability of mouse ESCs. *Cell Rep*, 2016, 15(8): 1809–1821. [DOI]
- [33] Thattaliyath BD, Livi CB, Steinhilber ME, Toney GM, Firulli AB. *HAND1* and *HAND2* are expressed in the adult-rodent heart and are modulated during cardiac hypertrophy. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 297(4): 870–875. [DOI]
- [34] Firulli AB, McFadden DG, Lin Q, Srivastava D, Olson EN. Heart and extra-embryonic mesodermal defects in mouse embryos lacking the bHLH transcription factor Hand1. *Nat Genet*, 1998, 18(3): 266–270. [DOI]
- [35] Garcia-Cuellar MP, Steger J, Füller E, Hetzner K, Slany RK. Pbx3 and Meis1 cooperate through multiple mechanisms to support Hox-induced murine leukemia. *Haematologica*, 2015, 100(7): 905–913. [DOI]
- [36] Ariki R, Morikawa S, Mabuchi Y, Suzuki S, Nakatake M, Yoshioka K, Hidano S, Nakauchi H, Matsuzaki Y, Nakamura T, Goitsuka R. Homeodomain transcription factor Meis1 is a critical regulator of adult bone marrow hematopoiesis. *PLoS One*, 2014, 9(2): e87646. [DOI]

(责任编辑: 谷峰)

## 声 明

《遗传》杂志 2018 年第 40 卷第 1 期稿件《TBC 蛋白家族成员在人类疾病发生发展中的作用》中, 通讯作者周钢桥所属单位更正为:

1. 广西医科大学研究生院, 南宁 530021

2. 军事科学院军事医学研究院辐射医学研究所, 蛋白质组国家重点实验室, 国家蛋白质科学中心(北京), 北京 100850

周钢桥