

MEK 抑制剂 PD0325901 显著提高猪胎儿成纤维细胞 ssODN 介导的 HDR 效率

欧浩¹, 李国玲¹, 王豪强¹, 黄广燕¹, 蔡更元^{1,2}, 李紫聪¹,
吴珍芳^{1,2}, 张献伟^{1,2}

1. 华南农业大学动物科学学院, 国家生猪种业工程技术研究中心, 广州 510642

2. 温氏食品集团股份有限公司, 新兴 527400

摘要: 基因组 DNA 发生双链断裂(double strand break, DSB)后主要通过同源定向修复(homologous-directed repair, HDR)和非同源末端连接(nonhomologous end joining, NHEJ)两种途径进行修复, 其中单链寡聚核苷酸(single-stranded oligodeoxynucleotide, ssODN)介导的同源定向修复是动物基因组常用的基因组定点修饰技术, 具有较大的科研和应用价值。为提高猪基因组 ssODN 介导 HDR 效率, 本研究以猪胎儿成纤维细胞(porcine fetal fibroblasts, PFFs)为研究对象, 利用丝裂原活化的细胞外信号调节激酶(mitogen-activated extracellular signal-regulated kinase, MEK)抑制剂 PD0325901 培养细胞, 研究其对 HDR 效率的影响及作用分子机理。结果显示, PD0325901 能显著提高 PFFs 的 G₂ 期和 S 期细胞群百分比, 减少 G₁ 期细胞群比率, 促进 HDR 修复因子的表达。在最适浓度 250 nmol/L 时, PD0325901 使 ssODN 介导的 GFP 报告载体的修复效率提高了 58.8%; 同时使 PFFs 基因组位点 *DMD* 和 *ROSA26* 定点修饰效率分别提高了 48.16% 和 17.64%。本研究表明, MEK 抑制剂 PD0325901 能显著提高猪基因组 ssODN 介导的同源定向修复效率, 为高效制备定点基因修饰动物模型提供了新思路。

关键词: MEK 抑制剂; 同源定向修复(HDR); PD0325901; 基因编辑

收稿日期: 2018-10-29; 修回日期: 2019-03-02

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 31772555)和国家转基因重大专项(编号: 2016ZX08006002)资助[Supported by the National Natural Science Foundation of China (No.31772555) and the National Transgenic Major Projects (No.2016ZX08006002)]

作者简介: 欧浩, 硕士, 专业方向: 动物遗传育种。E-mail: 719367112@qq.com

李国玲, 博士, 研究方向: 基因编辑与遗传育种。E-mail: 792268184@qq.com

欧浩和李国玲并列第一作者。

通讯作者: 张献伟, 博士, 硕士生导师, 研究方向: 动物遗传育种。E-mail: zxianw@163.com

DOI: 10.16288/j.ycz.18-294

网络出版时间: 2019/3/26 9:24:44

URI: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20190326.0924.003.html>

MEK inhibitor PD0325901 significantly boosts ssODN-mediated HDR efficiency in porcine fetal fibroblasts

Hao Ou¹, Guoling Li¹, Haoqiang Wang¹, Guangyan Huang¹, Gengyuan Cai^{1,2},
Zicong Li¹, Zhenfang Wu^{1,2}, Xianwei Zhang^{1,2}

1. National Engineering Research Center for Breeding Swine Industry, College of Animal Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China

2. Wens Foodstuff Group Co., Ltd, Xinxing 527400, China

Abstract: There are two major pathways, homology-directed repair (HDR) and nonhomologous end joining (NHEJ), involved in double-strand break (DSB) repair. Single-stranded oligodeoxyribonucleotide (ssODN)-mediated homologous recombination repair is commonly used for animal site-directed genome editing, with great scientific and practical value. To improve ssODN-mediated HDR efficiency in the pig genome, we investigated the effect and molecular mechanism of mitogen-activated extracellular signal-regulated kinase (MEK) inhibitor PD0325901 on the HDR efficiency in porcine fetal fibroblasts (PFFs). The results showed that PD0325901 obviously increased the percentage of G₂ and S phase cell populations and reduced the cell population ratio in the G₁ phase of PFFs, and promoted the expression of HDR repair factor. At the optimal concentration of 250 nmol/L, PD0325901 increased the repair efficiency of ssODN-mediated GFP reporter vector by 58.8% and the directed editing efficiency of PFF *DMD* and *ROSA26* locus by 48.16% and 17.64%, respectively. The results show that MEK inhibitor PD0325901 significantly promotes the efficiency of ssODN-mediated homologous-directed repair in the porcine genome, thus offering a new idea to generate genetically modified pigs more effectively.

Keywords: MEK inhibitor; homologous-directed repair (HDR); PD0325901; gene editing

传统转基因技术是将目的基因随机整合到基因组中并使之表达,无法控制转基因的整合位点,且伴随着效率低、表达稳定性差等问题,为转基因动物品系和育种品系的建立带来诸多不便。随着锌指核酸内切酶(zinc-finger endonuclease, ZFN)^[1]、类转录激活因子效应物核酸酶(transcription activator-like effector nuclease, TALEN)^[2]、规律成簇的间隔短回文重复(clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR)^[3],以及结构引导的核酸酶(structure-guided nuclease, SGN)^[4]等新型基因编辑技术的出现,使动物基因组 DNA 突变的效率和准确性大大提高,推动了基因定向修饰动物的研究^[5]。新型基因编辑技术可在基因组内高效产生双链断裂(double strand break, DSB),激活细胞中两种 DNA 修复路径——同源重组定向修复(homologous-directed repair, HDR)和非同源末端连接(nonhomologous end joining, NHEJ)。

NHEJ 无需同源修复模板,由 NHEJ 修复因子将 DNA 双链断裂的两端强行拼接起来,容易造成基因片段的缺失、突变或外源基因的插入等,是基因敲除的有效途径;HDR 路径需要同源 DNA 模板,修复过程产生错误的概率较低,是定向突变和定点敲入(knock-in, KI)最为依赖的修复路径^[6]。尽管运用新型基因编辑工具能够使细胞 DNA 发生 DSB 的效率和准确性极大的提高,但双链 DNA 模板修复效率相对较低,只有 0.5%~20%左右,利用 HDR 进行高效的定点敲入具有较大的难度^[3,7]。相比双链 DNA 模板,单链寡聚核苷酸(single-stranded oligodeoxyribonucleotide, ssODN)作为同源修复模板具有更高的定向修复效率^[8~10]。目前,ssODN 介导的 DNA 修复的具体通路仍然不是很清楚,但该途径也需要在 DSB 的断裂末端进行 DNA 末端剪切(DNA resection),因此与其他 HDR 通路具有相同的起始途径^[11]。一般认为 ssODN

介导的同源定向修复途径也属于 HDR 的一种,有研究表明通过小分子化合物调控 HDR 通路,可以促进 ssODN 介导的定向修复效率。Maruyama 等^[12]使用小分子化合物 Scr7(DNA 连接酶 IV 抑制剂)将 ssODN 介导的定点整合效率提高了 19 倍;将 Scr7 直接注射至小鼠受精卵,使定点整合效率提高 2 倍。Ma 等^[13]使用 VE-822 (Rad3 相关激酶抑制剂)和 AZD-7762 (检查点激酶 CHEK1 的特异性抑制剂)将 ssODN 介导的定点整合效率提高 3 倍。虽然这些小分子化合物可显著提高 HDR 效率^[14],但都主要集中在对人和小鼠的研究,对猪的研究鲜有报道^[15,16]。由于大部分小分子化合物对细胞和胚胎存在一定的毒害作用,剂量过大会损伤细胞或基因编辑胚^[17],因此小分子化合物的使用剂量和新化合物的开发还需要继续优化。

RAS-RAF-MEK-ERK 信号通路是调节细胞增殖、分化、代谢、凋亡和细胞周期等众多细胞生理过程的主干信号通路,丝裂原活化的细胞外信号调节激酶 (mitogen-activated extracellular signal-regulated kinase, MEK) 是该信号通路的重要组成部分^[18]。PD0325901 是一种选择性的非 ATP 竞争性 MEK 抑制剂,其与 MEK 结合会使 MEK 与 ATP 结合位点的构象发生变化,从而抑制 MEK 的激活^[19,20]。Lin 等^[21]研究显示,使用 PD0325901 和 CHIR99021 (GSK3 β 抑制剂)能消除 ESC (embryonic stem cell) 细胞系之间同源重组效率的差异,表明 MEK 信号通路可能参与细胞 DNA 的同源重组修复,但该信号通路是否参与体细胞同源重组目前还没有研究报道。

猪的生理学、解剖学和遗传学特征与人类非常相似,是研究人类疾病的重要动物模型。杜氏肌营养不良症 (Duchenne muscular dystrophy, DMD) 是一种 X 连锁隐性遗传病,由 *DMD* 基因突变导致的人类肌肉萎缩无力,丧失独立行走能力为特点的疾病,提高猪该位点的定点编辑效率对制备人类 DMD 疾病猪模型具有重要意义^[22]。此外,*ROSA26* 基因位点是猪基因组上最常用的安全港位点,外源性的基因定点插入该位点能高效稳定表达,同时不会影响其他内源基因的表达,因此常用该位点来构建基因编辑猪模型^[23]。本研究以猪胎儿成纤维细胞 (porcine fetal fibroblasts, PFFs) 为研究对象,以 *DMD* 和 *ROSA26* 位点为靶点,利用 MEK 抑制剂 PD0325901

提高 PFFs 细胞中 ssODN 介导定向修复效率,为高效制备基因定向编辑猪模型提供重要参考信息。

1 材料与方法

1.1 材料

报告载体 ssODN-mediated HDR reporter 由本实验室前期构建^[24]。该报告载体中 *EGFP* (enhanced green fluorescent protein) 序列中间插入一个终止密码子和一个 *BamH* 限制性内切酶位点,*BamH* 用于线性化报告载体;该报告载体能与 *EGFP* 基因相应的同源模板重组,使 *EGFP* 表达绿色荧光信号,而没有发生同源定向修复的则被提前终止翻译。Cas9/sgRNA 共表达质粒 pX330 (Plasmid #42230) 购自美国 Addgene 公司;PFFs 细胞由温氏食品集团股份有限公司提供;MEK 抑制剂 PD0325901 购自美国 Selleck 公司;引物和 ssODN 由深圳华大基因科技有限公司合成。

1.2 Cas9/sgRNA 共表达质粒的构建

在 CCTop CRISPR/Cas9 网站 (<https://crispr.cos.uni-heidelberg.de/index.html>) 设计 *DMD* 和 *ROSA26* 基因的 sgRNA^[25,26],序列见表 1。sgRNA 引物混匀后置于 95 °C 水中自然冷却至室温,使其形成双链 DNA,克隆到 pX330-U6-hSpCas9 质粒的 *BpiI* 位点上。

1.3 PD0325901 配制及细胞培养

取适量 PD0325901 溶解于 DMSO 溶剂,添加至完全培养基 (DMEM 细胞培养基+10% 胎牛血清) 分别配置成 25 nmol/L、50 nmol/L、100 nmol/L 和 250 nmol/L 的溶液备用,复苏后的 PFF 细胞培养至汇合度 90% (10 cm 板),进行后续实验。

表 1 sgRNA 序列信息

Table 1 sgRNA sequences used in this study

基因	sgRNA 序列 (5'→3')
<i>DMD</i>	F : GTTGGAGACTGAAGTAAACC
	R : GGTTTACTTTCAGTCTCCAAC
<i>ROSA26</i>	F : GTGAGAGTTATCTGACCGTA
	R : TACGGTCAGATAACTCTCAC

1.4 MTT 法检测细胞活性

复苏后的 PFF 细胞培养至汇合度 90% (10 cm 板), 用 0.25% 胰酶消化, 调整细胞密度为 $10^3 \sim 10^5$ 个/孔至 96 孔板, 加入 100 μ L/孔不同浓度梯度的培养基溶液, 每个梯度设置 8 个重复, 培养 48 h。加 20 μ L/孔 MTT 溶液 (5 mg/mL, 即 0.5% MTT), 培养 4 h 后去掉孔内培养液, 加 150 μ L/孔二甲基亚砷, 置摇床上低速振荡 10 min, 使结晶物充分溶解。在酶联免疫检测仪 $OD_{490 \text{ nm}}$ 处测量各孔的吸光值, 对结果进行统计分析。

1.5 流式细胞术检测细胞周期

复苏后的 PFF 细胞培养至汇合度 90% (10 cm 板), 用 0.25% 胰酶消化, 铺至 6 孔板, 加入 2 mL/孔不同浓度梯度的培养基溶液, 每个梯度设置 3 个重复, 继续培养 48 h。消化细胞至 1.5 mL 离心管并去掉培养基, 每管加 500 μ L 预冷的 70% 乙醇 (-20 $^{\circ}$ C), 重悬, 置于 4 $^{\circ}$ C 固定过夜。隔天每管加 500 μ L 碘化丙啶 (propidium iodide, PI) 染色液, 充分振荡, 4 $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min, 使用流式细胞仪进行检测, 利用软件 Modifit 5.0 进行统计分析。

1.6 HDR 和 NHEJ 相关基因表达水平的检测

复苏后的 PFF 细胞培养至汇合度 90% (10 cm 板), 用 0.25% 胰酶消化, 铺至 6 孔板, 加入 2 mL/孔不同浓度梯度的培养基溶液, 每个梯度设置 3 个重复, 继续培养 48 h。使用 RNA 抽提试剂盒抽提总 RNA, 反转录后对 cDNA 进行实时荧光定量 PCR 检测, 分析 NHEJ 相关基因 *XRCC5*、*XRCC6*、*LIG4*、*PNKP* 和 HDR 相关基因 *Rad50*、*Rad51*、*Rad52*、*BRCA1* 的表达水平。qRT-PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 15 s, 60 $^{\circ}$ C 复性 15 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 15 s, 40 个循环; 溶解曲线 95 $^{\circ}$ C 30 s; 60 $^{\circ}$ C 30 s; 95 $^{\circ}$ C 30 s。qRT-PCR 引物见表 2。

1.7 ssODN 介导的 HDR 效率检测

复苏后的 PFF 细胞培养至汇合度 90% (10 cm 板), 用 0.25% 胰酶消化。参考美国 Thermo fisher 公司的 Lipofectamine® LTX & Plus Reagent protocol 说明书, 共转染 8 μ g/孔线性化的 ssODN-mediate HDR

表 2 qRT-PCR 引物序列信息

Table 2 The sequences of quantitative real-time PCR primers used in this study

基因	序列 (5'→3')	产物大小 (bp)
<i>LIG4</i>	F : GCCGCTATCGCAGACATTG	251
	R : GCCATCATCTCACCATCAAGG	
<i>PNKP</i>	F : GGACCGTGGCAGTGAAACAG	221
	R : CTCTTCCTCCTCCTCGTGTGG	
<i>XRCC5</i>	F : GAGGAAGGCACCGTTGAAG	188
	R : GAGAGAGGAATCTGACACTTAGC	
<i>XRCC6</i>	F : GCGATGAAGAAGAAGAAGAGGAG	225
	R : CATAGAACACCACTGCCAAGAG	
<i>BRCA1</i>	F : ACGCCACTCTCAACTTCTG	195
	R : CAAGCCTGATGCCACAATAG	
<i>Rad52</i>	F : CTACTGGTGGCAACTCTGTATTATG	163
	R : ACCCTGTGACCCTCAATGTAAC	
<i>Rad50</i>	F : GTGGTGATGCTAAAGGGAGAC	232
	R : GGAAGTTACGCTGCTGTGAG	
<i>Rad51</i>	F : CGTTCAACACAGACCACCAG	187
	R : GCAAGTCGCAGAAGCATCC	

reporter (*Bam*H 酶切) 和 1 μ g/孔 ssODN (序列见表 3), 每个处理设置 3 个重复。铺至 6 孔板培养 24 h, 加入 2 mL/孔不同浓度梯度的培养基溶液, 继续培养 48 h, 使用流式细胞术检测细胞荧光数的百分比。

复苏后的 PFF 细胞培养至汇合度 90% (10 cm 板), 用 0.25% 胰酶消化, 分别共转染 8 μ g/孔 pX330-DMD-Cas9 质粒和 1 μ g/孔 ssODN、8 μ g/孔 pX330-ROSA26-Cas9 质粒和 1 μ g/孔 ssODN (序列见表 3), 每个处理设置 3 个重复。铺至 6 孔板培养 24 h, 加入 2 mL/孔不同浓度梯度的培养基溶液, 继续培养 48 h。抽提细胞总 DNA, PCR 扩增目的基因序列 (引物序列见表 4)。回收纯化后分别使用 T7 End δ 和 Hind 酶切, 进行琼脂糖凝胶电泳分离, 灰度扫描电泳条带, 根据公式: 同源定向修复效率 = Hind 条带灰度值 / T7 End δ 条带灰度值, 计算同源定向修复效率。同时按照中美泰和生物技术有限公司 clone smarter TA 克隆试剂盒 (产品编号 C5853) 说明书, 对纯化的 DNA 进行 TA 克隆测序, 计算同源定向修复效率。

表 3 ssODN 序列信息

Table 3 The sequences of ssODN used in this study

基因	序列(5'→3')	长度(nt)
EGFP	CTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCCAAGGCTACGTCC AGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCG	140
DMD	TTTATTGTTTCAGCGTTTGGGAATCTCCTGAAGACAAGTCATTGGCAGTTTCATTGTTGGAGACTGAAGTAAA AGCTTACCTGGACAGTTACCAAACAGCTTTAGAAGAAGTACTCTCATGGCTTCTTTCAGCTGAGGACACAC TGCA	146
ROSA26	ATGTCTGGGACTGGATGAGCAAGTACAACAAACAAAATGGGCTTAAAGTATGAGTGAGAGTTATCTGACC AAGCTTGTAAGGATGCAAGTGAGGGGGCCTAAGGTTTGGAGATTAATATTTAATCTCAGATGCTATACTTTG GTGG	146

表 4 PCR 引物序列

Table 4 PCR primer sequences used in this study

基因	序列(5'→3')	产物大小(bp)
DMD	F : CTACTGTTTCATGTCTCTGATAATGCAAGTGG	554
	R : CACATTCCTGTATGAACCACTGGC	
ROSA26	F : AGATCTTTGTGTCGCAATTTCC	633
	R : CCAGCAACACCTAAGATTTCAGA	

1.8 数据分析

采用 SPSS21 软件进行独立样品 *T*-test 分析, 分析每个处理组与对照组的差异, 数据以 Mean ± SEM 表示。**P*<0.05 表示差异显著, ***P*<0.01 表示差异极显著。

2 结果与分析

2.1 PD0325901 对 PFFs 细胞活性和细胞周期分布的影响

PFF 细胞经 25 nmol/L、50 nmol/L、100 nmol/L 和 250 nmol/L 浓度的 PD0325901 处理, 使用 MTT 方法检测细胞增殖活性。结果显示, 25 nmol/L、50 nmol/L、100 nmol/L 浓度下细胞活性比对照组分别提高了 17.2%、5%、10.12% 经 250 nmol/L PD0325901 处理后, 细胞活性比对照组下降了 6.35%。低浓度 (25 nmol/L) 对细胞活性有促进作用, 而高浓度 (250 nmol/L) 对细胞活性具有一定的抑制作用, 但差异不显著(*P*>0.05) 表明这 4 个浓度梯度的 PD0325901 对细胞活性没有影响(图 1A)。流式细胞术检测细胞结果显示, 随着 PD0325901 浓度增加, 处于 *G*₂ 期和 *S* 期的 PFFs 细胞群显著增加(*P*<0.05), 处于 *G*₁ 期细胞群显著减少(*P*<0.05) (图 1B), 细胞表现一定程度

的同步化。

2.2 PD0325901 对 DNA 修复因子表达水平的影响

PFFs 细胞经不同浓度的 PD0325901 处理后, 进行 qRT-PCR 检测。结果显示, NHEJ 相关修复基因 (*XRCC5*、*XRCC6*、*LIG4* 和 *PNKP*) 和 HDR 相关修复基因 (*Rad50*、*Rad51*、*Rad52* 和 *BRCA1*) 表达量随 PD0325901 添加剂量的升高呈现不规律变化(图 2)。在 NHEJ 通路中 25 nmol/L 和 250 nmol/L PD0325901 对 *XRCC5*、*XRCC6* 和 *PNKP* 表达具有上调作用; 但对于 *LIG4* 基因表达, 仅 250 nmol/L 剂量对其具有上调作用。在 HDR 通路中, 不同浓度 PD0325901 对 *Rad50* 和 *Rad52* 表达都有上调作用, 在 250 nmol/L 剂量下, *Rad50* 和 *Rad52* 基因表达量提高近 3 倍 (*P*<0.05), 但二者表达量与 PD0325901 添加量不存在剂量依赖效应; 然而对于 *BRCA1* 和 *Rad51* 基因, 100 nmol/L PD0325901 对二者的表达呈现下调作用 (*P*<0.05), 而经其他剂量处理后, *BRCA1* 和 *Rad51* 基因的表达量均表现不同程度的上调作用。

2.3 PD0325901 对 ssODN 介导的 HDR 效率的影响

ssODN 介导的 HDR 报告载体和相应 ssODN 共

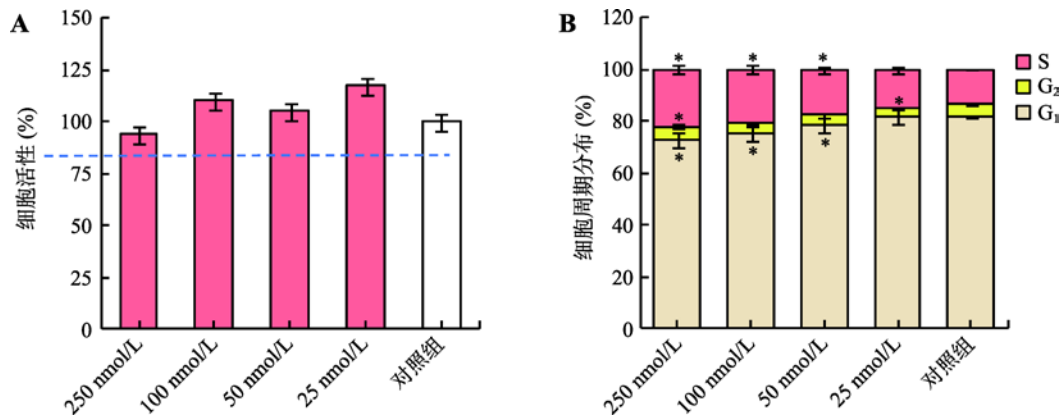


图 1 PD0325901 对细胞活性和细胞周期的影响

Fig. 1 The cell activity and cell cycle distribution after treatment with PD0325901

A: 不同浓度的 PD0325901 对细胞活性的影响; B: 不同浓度的 PD0325901 对细胞周期的影响。* $P < 0.05$, 表示差异显著。

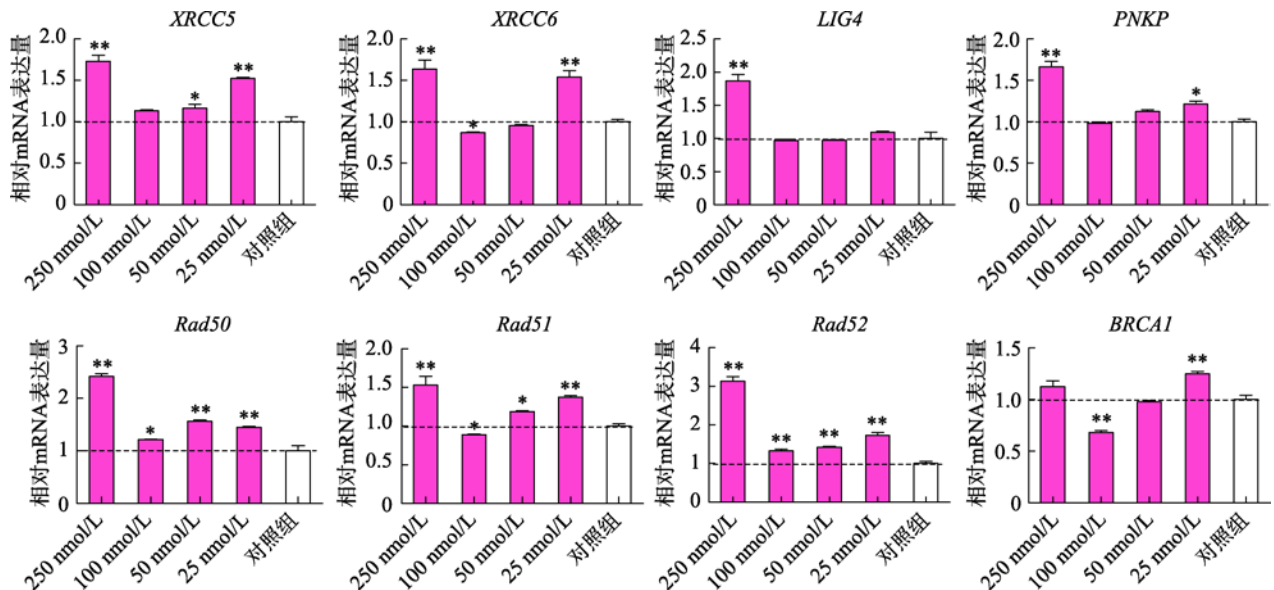


图 2 PD0325901 对 DNA 修复因子表达水平的影响

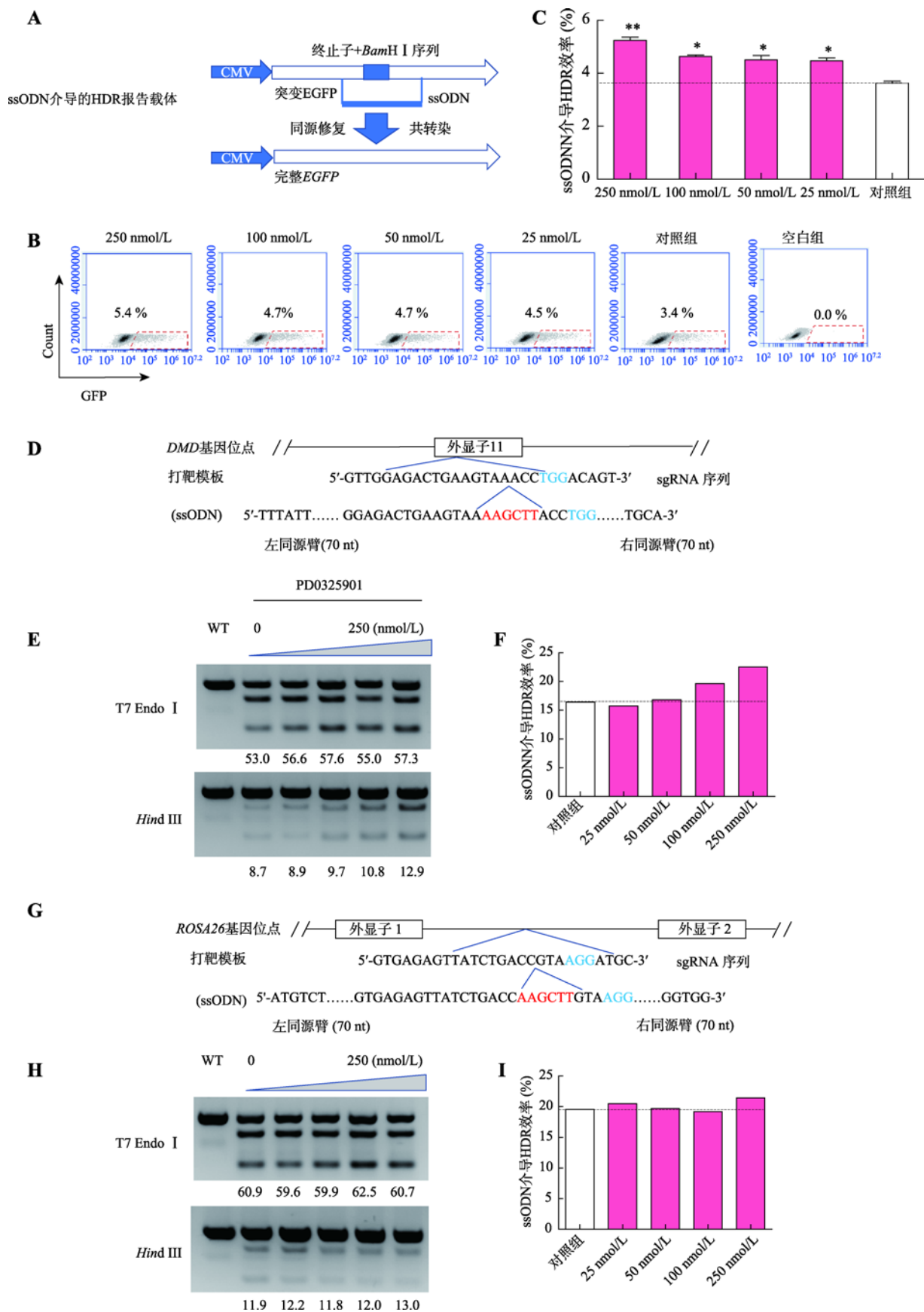
Fig. 2 The mRNA expression levels of DNA repair factors after treatment with PD0325901

XRCC5、*XRCC6*、*LIG4* 和 *PNKP* 为 NHEJ 相关修复基因; *Rad50*、*Rad51*、*Rad52* 和 *BRCA1* 为 HDR 相关修复基因。

* $P < 0.05$, 表示差异显著, ** $P < 0.01$ 表示差异极显著。

转染至 PFF 细胞, 流式细胞术结果显示, 25 nmol/L、50 nmol/L、100 nmol/L 和 250 nmol/L 浓度 PD0325901 均能提高 HDR 效率, 提高了 32.3%~58.8% ($P < 0.05$) (图 3, A~C)。X330-DMD-Cas9 质粒和相应的 ssODN 共转染至 PFF 细胞后, 用 *Hind* 酶切方法评估 DMD 基因位点编辑效率。结果显示, 25 nmol/L、50 nmol/L、100 nmol/L 和 250 nmol/L 浓度 PD0325901 均能提高 HDR 效率, 达 2.6%~37.1% (图 3, E 和 F), 并表现明显的剂量依赖效应。共转染 pX330-ROSA26-Cas9 质

粒和相应的 ssODN, 用 *Hind* 酶切方法评估 ROSA26 基因编辑效率。结果显示, 25 nmol/L、50 nmol/L 和 250 nmol/L PD0325901 促进 ROSA26 位点 HDR 效率, 分别提高了 4.8%、0.8% 和 9.6% (图 3, H 和 I), 但 100 nmol/L 剂量时, ROSA26 位点 HDR 效率略微下降。进一步利用 TA 克隆和测序验证, 结果显示, 在 250 nmol/L PD0325901 剂量下 DMD 和 ROSA26 基因位点的 HDR 效率分别提高了 48.16% 和 17.64% (表 5; 图 3, J 和 K), 与 *Hind* 酶切结果基本一致。



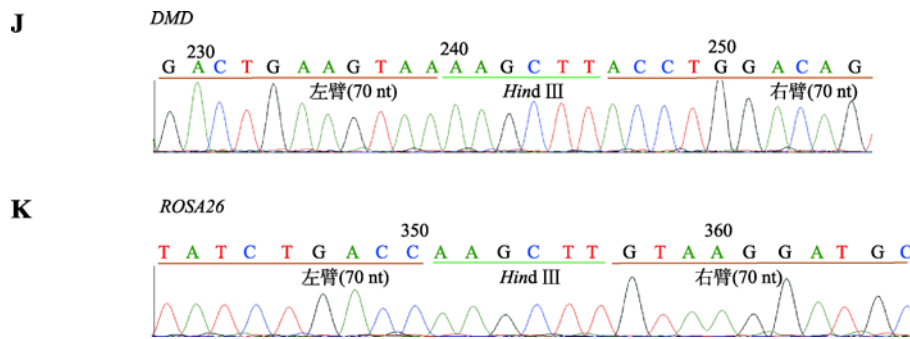


图 3 PD0325901 对 ssODN 介导的 HDR 效率的影响

Fig.3 The ssODN-mediated gene editing efficiency after treatment with PD0325901

A :ssODN 介导的 HDR 报告载体修复模式图 ;B :报告载体 HDR 修复效率的流式细胞术检测结果(用 EGFP 荧光细胞百分比表示 HDR 效率) ;C :PD032590 处理组间 ssODN 介导报告载体 HDR 修复的效率比较($n=3$)。* $P<0.05$, 表示差异显著, ** $P<0.01$ 表示差异极显著 ;D 和 G :ssODN 介导 *Hind* 识别序列定点整合至猪基因组模式图。D 图为 *DMD* 基因位点, G 图为 *ROSA26* 基因位点 ;E 和 H :核酸内切酶酶切法检测 *DMD* 位点(图 E)和 *ROSA26* 位点(图 H)编辑效率电泳结果。T7 *Endo*I 为 T7 核酸内切酶 I 酶切电泳图, 图上的数字表示灰度扫描数值, 代表目标位点发生 DSB 的效率 ;*Hind* 为 *Hind* 限制性核酸内切酶酶切电泳图, 图上数字表示灰度扫描数值, 代表目标位点 *Hind* 定点整合效率 ;F 和 I :分别为图 E 和图 H 灰度扫描值的柱状图展示结果(HDR 效率= *Hind* 灰度扫描值/T7 *Endo*I 灰度扫描值, $n=3$) ;J 和 K :分别为定点整合 *Hind* 识别序列至 *DMD*(图 J)和 *ROSA26*(图 K)基因位点的测序峰图。

表 5 TA 克隆数据统计

Table 5 The statistics of TA cloning

基因	浓度	KI 效率(阳性/总数)
<i>DMD</i>	对照组	18.75% (3/16)
	250 nmol/L	27.78% (5/18)
<i>ROSA26</i>	对照组	25.00% (4/16)
	250 nmol/L	29.41% (5/17)

3 讨论

细胞所在的分裂期会显著影响 DNA 修复双链断裂途径的选择, 在修复过程中, NHEJ 可以发生在细胞分裂的任一时期, 而 HDR 主要发生在 S 和 G₂ 期, 李国玲等^[17]通过同步化细胞周期至 S 和 G₂ 期, 成功提高了基因组定点修饰的效率。Yang 等^[27]在人多能干细胞中添加 ABT-751 化合物, 使细胞停滞在 G₂ 期, 将 2~5 kb 片段整合至人基因组 5 个不同区域的效率提高了 3~6 倍 ; Lin 等^[28]添加 aphidicolin 和 nocodazole, 使人胚胎干细胞、成纤维细胞和 293T 细胞停滞在 G₂ 期, 显著提高 ssODN 介导的定向修复效率。本研究结果显示, 随着 PD0325901 浓度增加, 处于 G₂ 期和 S 期的 PFFs 细胞群显著增加, 处于 G₁ 期细胞群显著减少, 细胞表现一定程度的同步化, 与前人的报道结果不一致^[29~31]。Wang 等^[30]研

究表明, RAS-RAF-MEK-ERK 信号转导通路通过激活 MEK-ERK, 促进细胞周期素 D1 (cyclin D1) 的表达及其与细胞周期依赖性激酶 4 (cyclin-dependent kinase 4, Cdk4) 的结合来调控细胞周期, 促进细胞进入 S 期。Ayunadirah 等^[31]研究发现添加 PD0325901 显著降低了 MDA-MB-231 乳腺癌细胞的增殖, 同时发现细胞周期停滞在 G₁ 期。本研究用 MEK 抑制剂 PD0325901 处理 PFFs 后, 检测到 S 期细胞数量反而显著增加, 推测可能是由于 MEK 通路受到抑制后影响其他平行信号通路调控细胞周期, 或细胞种类差异导致结果不一致, 但具体机理尚不明确。已有的研究表明, 添加小分子化合物 PD0325901 使细胞同步至 S 期和 G₂ 期, 其可能有利于提高定点整合效率^[17,32~34]。本研究结果也显示, 250 nmol/L 浓度 PD0325901 能显著提高报告载体、*DMD* 和 *ROSA26* 位点上 ssODN 介导的同源修复效率, 表明将细胞周期同步化在 S 和 G₂ 期可以提高细胞定向修复效率。

NHEJ 和 HDR 通路的激活需要许多关键因子的参与, 它们能调节修复途径的选择, 并在修复过程中发挥不可替代的重要作用^[17,35,36]。本研究结果显示, 不同浓度的 PD0325901 抑制剂均能提高报告载体、*DMD* 和 *ROSA26* 位点上 ssODN 介导的同源修复效率, 并表现明显剂量依赖性。本研究结果推测, PD0325901 上调 *Rad50*、*Rad51* 和 *Rad52* 的表达可能

是提高同源重组效率的关键,但 PD0325901 添加剂量与上述因子表达并没有剂量依赖性关系,因而,二者间的相关性但仍需进一步研究。另外,PD0325901 对 NHEJ 关键因子的表达也有不同程度的上调作用,尤其是 25 nmol/L 和 250 nmol/L 浓度影响较大,呈“U 型效应”。在前人研究中也发现类似的现象,如 Li 等^[17]在猪胎儿成纤维细胞中分别添加 L755507、Resveratrol 和 Scr7 3 种小分子抑制剂,NHEJ 和 HDR 关键因子的表达水平出现了类似的“U 型效应”。Kachhap 等^[37]在 DU-145 和 LNCaP 细胞中添加不同浓度梯度的丙戊酸(valproic acid, VPA),*BRCA1* 基因的表达水平也同样出现类似的“U 型效应”。产生“U 型效应”的原因可能是小分子浓度过高时,出现负反馈调节,其具体调控机理还有待进一步研究。同时,本研究利用 PD0325901 提高 ssODN 介导的同源修复效率,证实了 MEK 抑制剂 PD0325901 对猪体细胞 HDR 效率具有促进作用,与前人报道 PD0325901 可提高 ESC 定点整合效率结果一致^[15]。本研究通过向猪成纤维细胞培养基中添加 MEK 抑制剂使 EGFP 报告载体的同源修复效率显著提高了 58.8%,使 *DMD* 和 *ROSA26* 位点的同源重组效率分别提高了 48.16% 和 17.64%,并表现较低的细胞毒性,这对提高 PFFs 细胞定向编辑效率及基因定向编辑猪的研究具有重要价值和意义。

参考文献(References):

- [1] Kim YG, Cha J, Chandrasegaran S. Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to *Fok* I cleavage domain. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(3): 1156–1160. [DOI]
- [2] Boch J, Scholze H, Schornack S, Landgraf A, Hahn S, Kay S, Lahaye T, Nickstadt A, Bonas U. Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type effectors. *Science*, 2009, 326(5959): 1509–1512. [DOI]
- [3] Hsu PD, Lander ES, Zhang F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell*, 2014, 157(6): 1262–1278. [DOI]
- [4] Xu S, Cao S, Zou B, Yue Y, Gu C, Chen X, Wang P, Dong X, Xiang Z, Li K, Zhu M, Zhao Q, Zhou G. An alternative novel tool for DNA editing without target sequence limitation: the structure-guided nuclease. *Genome Biol*, 2016, 17(1): 186. [DOI]
- [5] Huang YQ, Li GL, Yang HQ, Wu ZF. Progress and application of genome-edited pigs in biomedical research. *Hereditas(Beijing)*, 2018, 40(8): 632–646.
- [6] 黄耀强, 李国玲, 杨化强, 吴珍芳. 基因编辑猪在生物医学研究中的应用. *遗传*, 2018, 40(8): 632–646. [DOI]
- [6] Difilippantonio MJ, Zhu J, Chen HT, Meffre E, Nussenzweig MC, Max EE, Ried T, Nussenzweig A. DNA repair protein Ku80 suppresses chromosomal aberrations and malignant transformation. *Nature*, 2000, 404(6777): 510–514. [DOI]
- [7] Capecchi MR. Altering the genome by homologous recombination. *Science*, 1989, 244(4910): 1288–1292. [DOI]
- [8] Chen F, Pruett-Miller SM, Huang Y, Gjoka M, Duda K, Taunton J, Collingwood TN, Frodin M, Davis G. High-frequency genome editing using ssDNA oligonucleotides with zinc-finger nucleases. *Nat Methods*, 2011, 8(9): 753–755. [DOI]
- [9] Shen B, Zhang X, Du Y, Wang J, Gong J, Zhang X, Tate PH, Li H, Huang X, Zhang W. Efficient knockin mouse generation by ssDNA oligonucleotides and zinc-finger nuclease assisted homologous recombination in zygotes. *PLoS One*, 2013, 8(10): e77696. [DOI]
- [10] Hu Z, Shi Z, Guo X, Jiang B, Wang G, Luo D, Chen Y, Zhu YS. Ligase IV inhibitor SCR7 enhances gene editing directed by CRISPR-Cas9 and ssODN in human cancer cells. *Cell Biosci*, 2018, 8(1): 12. [DOI]
- [11] Richardson CD, Kazane KR, Feng SJ, Zelin E, Bray NL, Schäfer AJ, Floor SN, Corn JE. CRISPR-Cas9 genome editing in human cells occurs via the Fanconi anemia pathway. *Nat Genet*, 2018, 50(8): 1132–1139. [DOI]
- [12] Maruyama T, Dougan SK, Truttmann MC, Bilate AM, Ingram JR, Ploegh HL. Increasing the efficiency of precise genome editing with CRISPR-Cas9 by inhibition of nonhomologous end joining. *Nat Biotechnol*, 2015, 33(5): 538–542. [DOI]
- [13] Ma X, Chen X, Jin Y, Ge W, Wang W, Kong L, Ji J, Guo X, Huang J, Feng XH, Fu J, Zhu S. Small molecules promote CRISPR-Cpf1-mediated genome editing in human pluripotent stem cells. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 1303. [DOI]
- [14] Chu VT, Weber T, Wefers B, Wurst W, Sander S, Rajewsky K, Kühn R. Increasing the efficiency of homology-directed repair for CRISPR-Cas9-induced precise gene editing in mammalian cells. *Nat Biotechnol*, 2015, 33(5): 543–548. [DOI]
- [15] Li G, Zhang X, Zhong C, Mo J, Quan R, Yang J, Liu D, Li Z, Yang H, Wu Z. Small molecules enhance CRISPR/Cas9-mediated homology-directed genome editing in primary cells. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 8943. [DOI]
- [16] Gerlach M, Kraft T, Brenner B, Petersen B, Niemann H, Montag J. Efficient Knock-in of a point mutation in

- porcine fibroblasts using the CRISPR/Cas9-GMNN fusion gene. *Genes*, 2018, 9(6): 296. [DOI]
- [17] Li GL, Zhong CL, Mo JX, Quan R, Wu ZF, Li ZC, Yang HQ, Zhang XW. Advances in site-specific integration of transgene in animal genome. *Hereditas(Beijing)*, 2017, 39(2): 98–109.
李国玲, 钟翠丽, 莫健新, 全绒, 吴珍芳, 李紫聪, 杨化强, 张献伟. 动物基因组定点整合转基因技术研究进展. *遗传*, 2017, 39(2): 98–109. [DOI]
- [18] Hao P Q, An S, Yang Y, Liu Y, Guo XX, Xu TR. The progress on MEK kinases and their inhibitors. *Chin J Cell Biol*, 2015, 37(10): 1425–1431.
郝佩琪, 安输, 杨洋, 刘莹, 郭晓汐, 徐天瑞. MEK 激酶及其抑制剂的研究进展. *中国细胞生物学学报*, 2015, 37(10): 1425–1431. [DOI]
- [19] Neuzillet C, Tijeras-Raballand A, de Mestier L, Cros J, Faivre S, Raymond E. MEK in cancer and cancer therapy. *Pharmacol Therapeut*, 2014, 141(2): 160–171. [DOI]
- [20] Zhao Y, Adjei AA. The clinical development of MEK inhibitors. *Nat Rev Clin Oncol*, 2014, 11(7): 385–400. [DOI]
- [21] Lin Z, Zhang Y, Gao T, Wang L, Zhang Q, Zhou J, Zhao J. Homologous recombination efficiency enhanced by inhibition of MEK and GSK3 β . *Genesis*, 2014, 52(11): 889–896. [DOI]
- [22] Roberts RG. Dystrophin, its gene, and the dystrophinopathies. *Adv Genet*, 1995, 33: 177–231. [DOI]
- [23] Li X, Yang Y, Bu L, Guo X, Tang C, Song J, Fan N, Zhao B, Ouyang Z, Liu Z, Zhao Y, Yi X, Quan L, Liu S, Yang Z, Ouyang H, Chen YE, Wang Z, Lai L. Rosa26-targeted swine models for stable gene over-expression and Cre-mediated lineage tracing. *Cell Res*, 2014, 24(4): 501–504. [DOI]
- [24] Li G, Liu D, Zhang X, Quan R, Zhong C, Mo J, Huang Y, Wang H, Ruan X, Xu Z, Zheng E, Gu T, Hong L, Li Z, Wu Z, Yang H. Suppressing Ku70/Ku80 expression elevates homology-directed repair efficiency in primary fibroblasts. *Int J Biochem Cell Bi*, 2018, 99: 154–160. [DOI]
- [25] Stemmer M, Thumberger T, Del Sol Keyer M, Wittbrodt J, Mateo JL. CCTop: an intuitive, flexible and reliable CRISPR/Cas9 target prediction tool. *PLoS One*, 2015, 10(4): e0124633. [DOI]
- [26] Labuhn M, Adams FF, Ng M, Knoess S, Schambach A, Charpentier EM, Schwarzer A, Mateo JL, Klusmann JH, Heckl D. Refined sgRNA efficacy prediction improves large- and small-scale CRISPR–Cas9 applications. *Nucleic Acids Res*, 2018, 46(3): 1375–1385. [DOI]
- [27] Yang D, Scavuzzo MA, Chmielowiec J, Sharp R, Bajic A, Borowiak M. Enrichment of G2/M cell cycle phase in human pluripotent stem cells enhances HDR-mediated gene repair with customizable endonucleases. *Sci Rep*, 2016, 6: 21264. [DOI]
- [28] Lin S, Staahl BT, Alla RK, Doudna JA. Enhanced homology-directed human genome engineering by controlled timing of CRISPR/Cas9 delivery. *eLife*, 2014, 3: e04766. [DOI]
- [29] Weber JD, Raben DM, Phillips PJ, Baldassare JJ. Sustained activation of extracellular-signal-regulated kinase 1 (ERK1) is required for the continued expression of cyclin D1 in G1 phase. *Biochem J*, 1997, 326(Pt 1): 61–68. [DOI]
- [30] Wang S, Wang S, Zhu XG, Zhang JQ, Qiao XM, Ye YJ, Liang B, Ma XT, Cui ZR. Significance of MEK-ERK cascade in the development of human breast carcinoma. *Chin J Surg*, 2002, 40(3): 171–174.
王殊, 王杉, 祝学光, 张嘉庆, 乔新民, 叶颖江, 梁斌, 马向涛, 崔志荣. 细胞外信号调节激酶及其上游激酶在人乳腺癌发生发展中的意义. *中华外科杂志*, 2002, 40(3): 171–174. [DOI]
- [31] Ayub A, Yip WK, Seow HF. Dual treatments targeting IGF-1R, PI3K, mTORC or MEK synergize to inhibit cell growth, induce apoptosis, and arrest cell cycle at G1 phase in MDA-MB-231 cell line. *Biomed Pharmacother*, 2015, 75: 40–50. [DOI]
- [32] Chiruvella KK, Liang Z, Wilson TE. Repair of double-strand breaks by end joining. *CSH Perspect Biol*, 2013, 5(5): a012757. [DOI]
- [33] Karanam K, Kafri R, Loewer A, Lahav G. Quantitative live cell imaging reveals a gradual shift between DNA repair mechanisms and a maximal use of HR in mid S phase. *Mol Cell*, 2012, 47(2): 320–329. [DOI]
- [34] Branzei D, Foiani M. Regulation of DNA repair throughout the cell cycle. *Nat Rev Mol Cell Bio*, 2008, 9(4): 297–308. [DOI]
- [35] Ceccaldi R, Rondinelli B, D'Andrea AD. Repair pathway choices and consequences at the Double-Strand break. *Trends Cell Biol*, 2015, 26(1): 52–64. [DOI]
- [36] Li X, Heyer WD. Homologous recombination in DNA repair and DNA damage tolerance. *Cell Res*, 2008, 18(1): 99–113. [DOI]
- [37] Kachhap SK, Rosmus N, Collis SJ, Kortenhorst MS, Wissing MD, Hedayati M, Shabbeer S, Mendonca J, Deangelis J, Marchionni L, Lin J, Höti N, Nortier JW, DeWeese TL, Hammers H, Carducci MA. Downregulation of homologous recombination DNA repair genes by HDAC inhibition in prostate cancer is mediated through the E2F1 transcription factor. *PLoS One*, 2010, 5(6): e11208. [DOI]