

· 基础研究 ·

猪 SALL1 蛋白分子信息分析及基因敲除细胞系制备

李美双¹, 赵丽华², 李荣凤^{1,2*}

¹南京医科大学生殖医学国家重点实验室, ²江苏省异种移植重点实验室, 江苏 南京 211166

[摘要] **目的:**从巴马小型猪 SALL1 的蛋白结构出发,分析其与人 SALL1 蛋白的同源性,进一步制备 *Sall1* 基因敲除的巴马小型猪胎儿成纤维细胞系,为通过体细胞核移植技术获得猪肾脏发育缺陷模型提供实验材料。**方法:**利用生物信息学方法分析人、猪、鼠 SALL1 的蛋白结构。利用在线设计软件,在猪 *Sall1* 基因第 1 外显子区域设计单链引导 RNA (single guide RNA, sgRNA) 并将其连接至 PX330 质粒,构建猪 *Sall1* 基因敲除打靶载体。在初步转染细胞的基础上,通过 *Sall1* 基因测序分析验证 PX330-sgRNA 载体打靶效率,最后将打靶载体转染至原代猪胎儿成纤维细胞 (porcine fetal fibroblast, PFF) 中,通过药物筛选获得单克隆细胞并鉴定其基因型。**结果:**生物信息学分析表明,相比小鼠,猪的 SALL1 蛋白与人 SALL1 蛋白具有更高的同源性。成功构建猪 *Sall1* 基因敲除打靶载体,并获得 33 个单克隆细胞系,经基因测序鉴定得到 16 个 *Sall1* 双等位基因敲除的细胞系。**结论:**生物信息学方法验证了人和猪 SALL1 蛋白具有更高的同源性。利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术获得 *Sall1* 基因敲除细胞系,为研究 *Sall1* 基因在猪肾脏发育过程中的作用提供研究材料,并为下一步获得猪肾脏缺失模型奠定基础。

[关键词] 猪; *Sall1*; 蛋白结构; CRISPR/Cas9; 猪胎儿成纤维细胞

[中图分类号] Q319

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2022)07-941-07

doi: 10.7655/NYDXBNS20220705

Molecular information analysis of SALL1 protein in pig and establishment of gene-knockout pig cell lines

LI Meishuang¹, ZHAO Lihua², LI Rongfeng^{1,2*}

¹State Key Laboratory of Reproductive Medicine, Nanjing Medical University, ²Jiangsu Key Laboratory of Xenotransplantation, Nanjing 211166, China

[Abstract] **Objective:** Based on the protein structure of SALL1, the homology of SALL1 protein between pig and human was analyzed. Bama miniature pig fetal fibroblast cell lines with *Sall1* gene knocked-out were developed in order to providing experimental donor cells for obtaining a pig renal development deficiency model via somatic cell nuclear transfer. **Methods:** Firstly, bioinformatics methods were used to analyze the structural of SALL1 protein between human, pig and mouse. Secondly, sgRNA was designed on the first exon of pig *Sall1* gene and connected to PX330 plasmid to construct *Sall1* gene knockout target vector. Then, through the initial cells transfection, the targeting efficiency of PX330-sgRNA vector was verified by *Sall1* gene sequencing analysis. Finally, the vector was transfected into primary porcine fetal fibroblasts (PFFs). The monoclonal cells were obtained through drug screening and their genotypes were identified. **Results:** Bioinformatics analysis showed that pig SALL1 protein was more similar to human counterparts than mouse. CRISPR/Cas9 expression vector for *Sall1* gene targeting was constructed and 33 monoclonal cell lines were obtained, among them 16 *Sall1* biallelic mutant cell lines were identified by gene sequencing. **Conclusion:** Bioinformatics methods confirmed the higher homology of human and porcine SALL1 proteins. *Sall1*^{-/-} cell lines were obtained by CRISPR/Cas9 gene editing technology, which will provided research materials for studying the role of *Sall1* gene on the development of pig kidney, and lay a foundation for obtaining the porcine renal development deficiency model in the next step.

[Key words] pig; *Sall1*; protein structure; CRISPR/Cas9; porcine fetal fibroblast

[J Nanjing Med Univ, 2022, 42(07):941-947]

[基金项目] 国家自然科学基金(31971379)

*通信作者 (Corresponding author), E-mail: lirongfeng@njmu.edu.cn

肾脏疾病是最常见的疾病之一,全球约有8.5亿患者饱受急性或慢性肾衰竭的折磨^[1]。目前由于透析设备以及肾脏供体的短缺,每年约有5万人死于肾衰竭^[2]。肾脏透析疗法虽然可以代替肾脏完成排泄功能,但是并不能代替肾脏行使内分泌功能。肾脏移植虽然在一定程度上恢复肾脏功能,但也由于器官供应的短缺和免疫抑制药物的相关问题而受到阻碍,因此开发新的低免疫原性的器官具有较大的应用前景。利用患者来源的干细胞通过囊胚互补技术,有望在大动物体内再生人源化的肾脏器官。囊胚互补首先利用基因编辑技术在胚胎发育早期阶段敲除决定某个器官发育的关键基因,然后待胚胎发育到囊胚阶段后将多能干细胞注入到囊胚腔内,干细胞将参入胚胎形成嵌合体,并优先去形成由于关键基因敲除导致的缺失的器官。Chen等^[4]将正常小鼠胚胎干细胞注射到来自*rag-2*缺陷小鼠的囊胚中,获得了其成熟B细胞和T细胞均来源于供体干细胞的嵌合小鼠。此后,研究者们对囊胚互补的研究逐渐深入,胸腺^[5]、甲状腺^[6]、肺^[6-7]等脏器的种内囊胚互补均已出现。2010年Kobayashi等^[8]利用囊胚互补技术在小鼠体内生成大鼠胰腺,论证了利用囊胚互补进行异种器官生成的可行性。这提示研究者去探索在人类以外的物种中产生具有功能的人类器官。考虑到在解剖学、生理学等方面与人类的相似之处,猪被认为是再生人源性器官的合适载体^[9]。

CRISPR即规律间隔成簇短回文重复序列,最早于1987年由Ishino在大肠杆菌中发现。研究者们将CRISPR与II型CAS蛋白相结合,使其迅速成为应用最广泛的基因编辑工具^[10]。体细胞核移植与CRISPR/Cas9的联合应用已广泛用于大动物基因编辑模型的构建^[11]。例如,2017年Zhang等^[12]将*C3*基因敲除,产生了血浆中C3蛋白缺乏的猪模型;2020年Fischer等^[13]获得了*GGTA1/CMAH/B4GALNT2*三基因敲除的猪模型用于异种免疫排斥的研究。这说明结合体细胞核移植技术与CRISPR/Cas9技术获得肾脏发育缺陷猪模型的可能性。2013年Matsunari等^[14]首先获得了*Pdx1*^{-/-}胰腺发育缺陷的猪模型,随后他们将带有荧光标记的另一品系的猪胚胎卵裂球注入*Pdx1*^{-/-}囊胚中,获得了来源于荧光标记细胞的具有正常组织特征及功能的外源胰腺。2020年Matsunari等^[15]又在*HHEX*^{-/-}肝脏缺陷的猪模型中通过种内囊胚互补获得了肝脏发育正常的猪胎儿,这证明了猪进行种内囊胚互补的可能性。此外,

2017年Wu等^[16]提出人类干细胞经囊胚互补可移植并分化为猪胚胎中的多个谱系。2020年Das等^[17]将人诱导多能干细胞注入*ETV1*^{-/-}猪囊胚中,其后代的血管内皮细胞均来源于人类细胞。因此,本研究认为通过CRISPR/Cas9基因编辑技术获得肾脏器官发育缺陷的猪模型,并将其与囊胚互补技术结合,或许可以实现在猪体内再生人的肾脏器官。

Spalt样转录因子1(spalt like transcription factor1, SALL1)在肾脏发生过程中极为重要。*Sall1*基因主要表达于输尿管芽周围的生后肾原基内,参与诱导输尿管芽反复分支形成输尿管、肾盂、肾盏和集合小管的肾脏发育过程。2001年Nishinakamura等^[18]研究发现*Sall1*基因的纯合缺失小鼠在出生后24h内死亡,表现出肾发育不全或严重发育不良。2019年Goto等^[19]利用囊胚互补技术将大鼠胚胎干细胞注射到*Sall1*敲除小鼠囊胚内,嵌合体比例为69.1%,这提示通过敲除猪*Sall1*基因获得肾脏发育空位,从而进行人猪异种囊胚互补的可能性。

关于猪肾脏发育不良模型,虽然Watanabe等^[20]进行了研究,但其获得的动物模型依然存在一定的局限性,目前为止尚未见到肾脏完全缺失的猪模型报道。本研究通过对人、猪、鼠SALL1蛋白的同源性进行分析,进一步验证了猪与人SALL1蛋白的相似性,同时通过CRISPR/Cas9基因编辑技术对巴马小型猪胎儿成纤维细胞进行*Sall1*基因敲除,为获得肾缺失猪模型以及研究*Sall1*基因在猪肾脏发育过程中的作用提供研究材料,并为下一步获得肾缺失模型以及进行人源性干细胞囊胚互补奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

35 d猪胎儿成纤维细胞由本实验室制备并培养。DMEM培养液、DPBS、0.25% Trypsin-EDTA、G418和Penn/Strep solution(Gibco公司,美国),胎牛血清(Sigma公司,美国),PX330骨架质粒(Addgene公司,美国),*Bbs*I核酸内切酶、Quick Ligase连接酶(New England Biolabs公司,美国);FastPure Gel DNA Extraction mini Kit(南京Vazyme公司),无内毒素质粒大提试剂盒(北京TIANGEN公司),P3细胞核转染试剂盒(Lonza公司,德国),DH5 α 感受态、pMD 18T载体(TaKaRa公司,日本)。

1.2 方法

1.2.1 人、猪、鼠SALL1蛋白的生物信息学分析

下载NCBI(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/>)

中所提供的人、猪、鼠SALL1蛋白的氨基酸序列,使用DNAMAN软件比对分析人与猪SALL1氨基酸的相似度及人与鼠SALL1氨基酸的相似度;使用在线网站SOPMA (<https://npsa-prabi.ibcp.fr/>) 比对分析人、猪、鼠SALL1蛋白的二级结构,预测其 α 螺旋、 β 折叠、 β 转角和无规卷曲的比例;使用在线网站SWISS MODEL (<https://www.swissmodel.expasy.org/>) 预测人、猪、鼠SALL1蛋白的三级结构,再使用PyMOL软件比较人与猪及人与鼠SALL1蛋白三维结构的相似度;使用NCBI中CD-search工具比对人、猪、鼠SALL1蛋白的保守结构域。

1.2.2 sgRNA的设计与CRISPR/Cas9载体构建

根据NCBI中所提供的猪*Sall1*基因序列(Gene ID:100519899),在第1外显子两端设计可用于扩增*Sall1*基因的PCR引物并送至南京金斯瑞生物公司合成。以巴马小型猪胎儿成纤维细胞(porcine fetal fibroblast, PFF)基因组DNA为PCR模板,反应条件为:95℃ 5 min;95℃ 30 s,64℃ 30 s,72℃ 1 min,35个循环;72℃ 7 min。通过琼脂糖凝胶电泳获得单一条带后将产物送至生物公司测序,确定巴马小型猪中*Sall1*基因的具体序列。根据测序获得的*Sall1*基因序列,利用CRISPR在线设计网站(<http://crispor.tefor.net/>),遵循靶点设计原则(5'端为G,3'端为PAM序列,即NGG)选择合适的靶点位置,设计长度为20 bp的sgRNA序列并在5'端进行磷酸化修饰。

CRISPR/Cas9载体构建由PX330载体线性化、引物退火、PX330线性化载体与退火引物连接等步骤组成。首先使用*Bbs* I核酸内切酶酶切PX330质粒使其线性化,同时将合成的5'磷酸化的sgRNA序列于37℃孵育30 min,95℃孵育5 min,然后将其以5℃/min的速率将温度降至25℃。再使用Quick Ligase连接酶将已线性化的PX330质粒与退火引物连接,反应条件为25℃连接10 min。最后将连接产物转化至大肠杆菌感受态DH5 α 中,挑取单菌落保存并送测序公司检测sgRNA是否成功连入PX330质粒,测序引物为:5'-ACTATCATATGCTTACCGTA-AC-3'。经测序分析后选择连接成功的菌液使用大提质粒试剂盒提取质粒。

1.2.3 *Sall1*基因PX330-sgRNA载体打靶效率验证

使用DMEM培养基(含15%胎牛血清)于6 cm培养皿中培养原代PFF细胞,待细胞融合度达到90%左右时,0.05%胰蛋白酶消化并收集细胞。细胞计数后取 1×10^6 个细胞,按照P3细胞核转染试剂盒

说明书,利用程序EN150,将5 μ g *Sall1*-PX330-sgRNA质粒转入细胞中。培养48 h后提取细胞基因组。PCR扩增打靶区域后进行琼脂糖凝胶电泳,切胶回收纯化DNA,并用测序分析方法检测sgRNA的打靶效率。首先,PCR扩增打靶区域基因组后送至南京思普金生物科技有限公司测序,PCR引物和反应条件同1.2.2。然后,以野生型细胞的测序结果为对照,利用在线分析软件(<https://tider.deskgen.com/>)分析打靶载体的效率。

1.2.4 细胞转染和单克隆细胞的筛选鉴定

使用DMEM培养基(含15%胎牛血清)于6 cm培养皿中培养原代PFF细胞,待细胞融合度达到90%左右时,0.05%胰蛋白酶消化并收集细胞。将8 μ g的*Sall1*-PX330-sgRNA打靶载体与1 μ g的Td-tomato(G418抗性)质粒混匀后按照P3细胞核转染试剂盒,使用程序EN150进行核转染。转染完成后将细胞平均分至30个10 cm培养皿中培养。24 h后将培养液换为含有浓度为1 mg/mL的G418培养基进行药物筛选,每3 d更换1次液体。

药筛至未转染阴性对照组细胞全部死亡时,将G418浓度调整至500 μ g/mL,继续培养7~10 d至单克隆细胞形成。用克隆环挑取状态较好的单克隆细胞至24孔板中,待细胞长满后留取30%于原培养板提基因组,70%传代至6孔板中至细胞长满后冻存储用。

使用细胞裂解液NP40裂解细胞提取基因组DNA并进行PCR扩增,裂解反应条件为:55℃ 60 min,95℃ 10 min。PCR产物测序后比对序列,选择突变的细胞基因组经PCR扩增和琼脂糖凝胶纯化。将纯化的基因组DNA与pMD18-T载体连接后转化至大肠杆菌感受态中,每板挑选12个菌落进行测序。测序结果与野生型比对后确定*Sall1*基因敲除细胞系。

2 结果

2.1 人、猪、鼠SALL1氨基酸序列及蛋白结构比对结果

使用DNAMAN进行氨基酸比对发现:人与猪SALL1氨基酸的相似度为92.46%,人与鼠SALL1氨基酸的相似度为90.19%。使用SOPMA在线网站进行二级结构比对发现:人SALL1蛋白的 α 螺旋占比为23.79%, β 转角占比为4.53%,拓展链占比为13.44%,无规卷曲占比为58.23%;猪SALL1蛋白的 α 螺旋占比为23.23%, β 转角占比为4.30%,拓展链占

比为13.20%,无规卷曲占比为59.28%;鼠SALL1蛋白的 α 螺旋占比为22.98%, β 转角占比为3.85%,拓展链占比为11.87%,无规卷曲占比为61.30%(图1)。使用PyMOL软件进行SALL1蛋白三维结构分析发现:人与猪三级结构对比时均方根偏差(root mean square deviation, RMSD)为0.155,人与鼠三级结构对比时RMSD值为12.827(图2)。使用CD-search进行结构域对比发现:人、猪SALL1蛋白都具有SUF4-like、SUF4-like super family、zf-H2C2-2、zf-C2H2 4种结构域,而鼠SALL1蛋白具有SUF4-like、SUF4-like super family、zf-H2C2-2、zf-C2H2、

COG5048这5种结构域(图3)。

2.2 CRISPR/Cas9 敲除位点选择及打靶载体的构建

根据NCBI中所提供的猪Sall1基因序列,在其两端设计扩增Sall1基因的PCR引物(Sall1-F: 5'-AACCGCACCACTAAGAGCAAGGAT-3'; Sall1-R: 5'-AAGGGTTGGCAGATGTTTCGTAAAG-3'),以猪PFF基因组为模板,进行PCR扩增,将其产物经琼脂糖凝胶电泳后得到Sall1基因的单一直泳条带(图4),同时将其PCR扩增产物送至生物公司测序,比对测序结果证明其序列与NCBI中提供的序列一致。

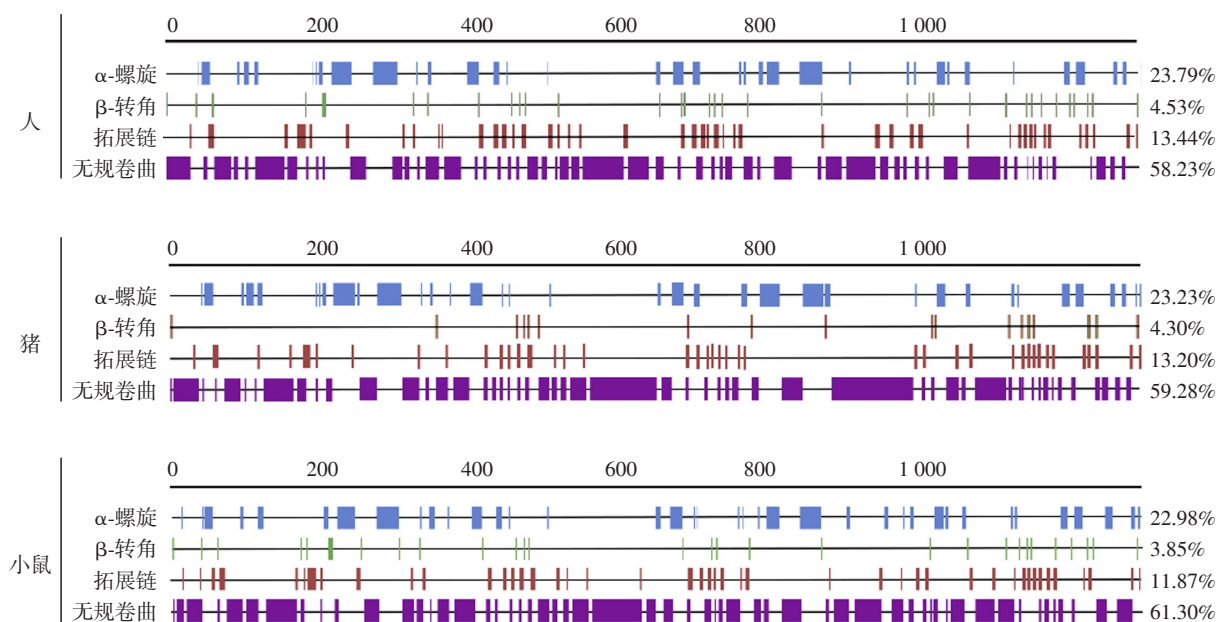


图1 人、猪、鼠SALL1蛋白的二级结构构成

Figure 1 Secondary structural composition of human, pig and mouse SALL1 protein

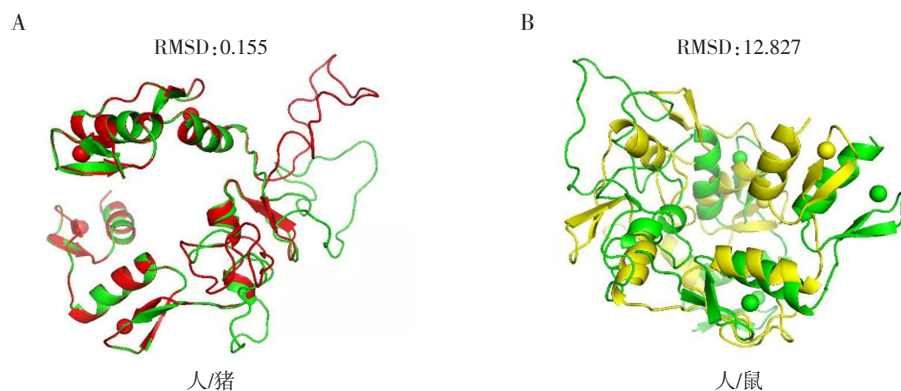


图2 人与猪、人与鼠SALL1蛋白三级结构比较(绿色为人SALL1蛋白三维建模图,红色为猪SALL1蛋白三维建模图,黄色为小鼠SALL1蛋白三维建模图)。

图2 人与猪、人与鼠SALL1蛋白三级结构比较

Figure 2 Tertiary structure prediction of human/pig and human/mouse SALL1 protein



图3 人、猪、鼠SALL1蛋白结构域对比

Figure 3 Comparison of human, pig and mouse SALL1 protein domains

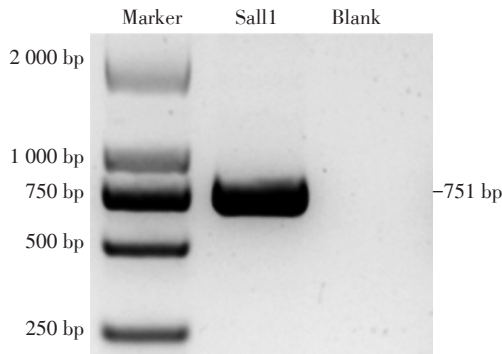


图4 Sall1 基因PCR 扩增产物凝胶电泳

Figure 4 The results of PCR amplification products of Sall1

选取 *Sall1* 基因第1外显子作为 CRISPR/Cas9 作用靶点设计 sgRNA(图5),并在其两端加上可与 *Bbs* I 酶切位点相连接的黏性末端合成相应的 Oligo (*Sall1* - sgRNA - F: 5' - CACCGAACCTCTCTACCTCAACTCG - 3'; *Sall1* - sgRNA - R: 5' - AAACCGAGTTGAGGTAGAGAGGTTG - 3'),将使用 *Bbs* I 酶切后的 PX330 质粒与退火后的 Oligo 连接,转化入大肠杆菌感受态后挑取单克隆菌落送至公司测序。测序结果证明 PX330 成功与 sgRNA 连接(图6)。

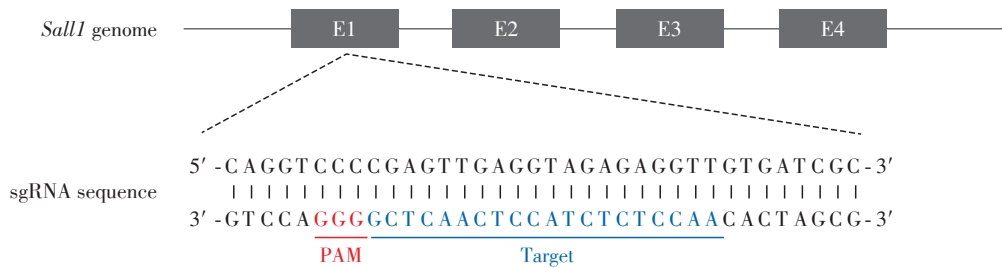


图5 Sall1 基因sgRNA 靶点设计模式图

Figure 5 The pattern diagram of Sall1 gene knockout

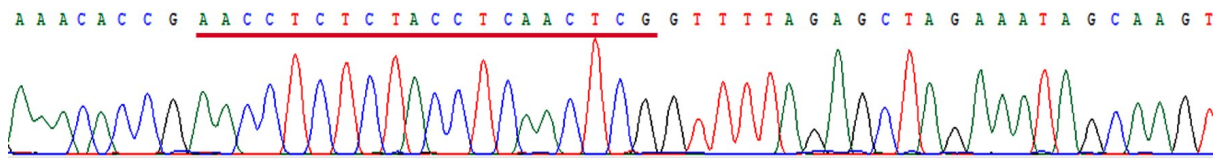


图6 重组载体测序验证

Figure 6 Verification of recombinant vector via sequencing

2.3 *Sall1* 基因 CRISPR/Cas9 打靶载体效率验证
将重组打靶载体 PX330-sgRNA 转染至 PFF 后,

提取细胞基因组。使用 PCR 扩增其基因组后送至生物公司测序,测序结果表明 PX330-sgRNA 的打靶

效率为51.6%。

2.4 Sall1 基因敲除细胞系的制备及鉴定

将PX330-sgRNA 打靶载体与Td-tomato(G418 抗性)质粒共同转染原代PFF后,经G418药筛获得

33个单克隆细胞系。TA克隆测定具体序列,共获得23个Sall1基因敲除的细胞系,敲除效率为69.7%。其中Sall1双等位基因敲除的细胞系16个(主要敲除形式见表1),敲除效率为48.5%。

表1 Sall1^{-/-}细胞系的主要敲除形式
Table 1 The knocking-out modalities of Sall1^{-/-} cell line

编号	序列	类型
WT	GGTCCCCGAGTTGAGGTAGAGAGGTTGTGATCGCTGA	WT
1	GGTCCCCGAG G TTGAGGTAGAGAGGTTGTGATCGCTGA	+1 bp
2	GGTCCCC-----GAGGTAGAGAGGTTGTGATCGCTGA	-5 bp
3	GGT-----AGAGAGGTTGTGATCGCTGA GGTCCCCGAG G TTGAGGTAGAGAGGTTGTGATCGCTGA	-14 bp/+1 bp
4	GGTCC----GTTGAGGTAGAGAGGTTGTGATCGCTGA	-4 bp
5	GGTCCCCGAG G GTTGAGGTAGAGAGGTTGTGATCGCTGA	+1 bp
6	GGTCCCC-----GAGAGGTTGTGATCGCTGA	-11 bp

WT:野生型;加框为增加的碱基;-为删除。

3 讨论

哺乳动物胚胎肾脏发生十分复杂,可分为前肾、中肾、后肾3个阶段。前肾和中肾在肾脏发生过程中逐渐退化,后肾最终发育为永久肾。胎儿发育晚期输尿管芽侵入后肾间质,随后这两种组织相互诱导共同分化促使后肾的发生。研究已发现许多对后肾发生至关重要的基因,主要包括Sall1、Six1、Gdnf、Six4、Eya1等。SALL1蛋白在S形体、逗号形小体、肾小管和足细胞等间充质衍生结构中大量表达。研究表明人类Sall1基因突变将会导致一种与多器官发育缺陷相关的常染色体显性遗传病,即Townes-Brocks综合征,其可表现为肾发育不全或肾缺陷^[21]。Sall1基因敲除的纯合子小鼠表现出输尿管芽生长及分支受损^[22],这说明Sall1基因对后肾发育中输尿管芽的侵袭作用至关重要。

与啮齿类动物相比,猪的组织形态与生理和人更为相似^[23]。同时,与非人灵长类动物相比,猪具有广泛的可用性、优良的育种潜力和较短的生殖成熟期^[23]。本研究利用生物信息技术分析人、猪、鼠SALL1蛋白的氨基酸序列、二级结构、三级结构和保守结构域,发现猪SALL1蛋白与人SALL1蛋白具有高度同源性。由此本文认为,制备Sall1基因敲除的猪PFF细胞系,以获得肾脏缺失的猪模型,使下一步通过猪Sall1基因敲除囊胚和人干细胞互补在猪体内再生人源化肾脏成为可能。

早期传统的基因敲除方法基于同源重组,其用

途也主要局限于小鼠模型的开发^[24]。2013年CRISPR/Cas9基因编辑系统的问世极大地促进了大动物基因编辑模型的发展。本课题组在前期研究中已成功构建多种基因敲除的猪模型,如C3^{-/-}、Six1^{-/-}和Six1^{-/-}/Six4^{-/-}等基因敲除克隆猪^[12,25],这验证了CRISPR/Cas9在大动物基因编辑模型构建中的可行性与便捷性。本研究首先通过测序检测用于基因编辑的Sall1-PX330-sgRNA打靶载体的敲除效率,随后将其与G418抗性的质粒共同转入猪PFF细胞系中。通过药物筛选共获得33个单克隆细胞系,经过多重鉴定后发现共有23个Sall1单等位基因和双等位基因敲除的细胞系,其敲除效率高达69.7%,而其中双等位基因敲除的细胞系有16个,其敲除效率为48.5%。本研究结果显示利用CRISPR/Cas9技术制备Sall1基因敲除的猪PFF细胞系具有高效性与可实施性。

综上所述,本研究利用生物信息学方法验证了人与猪SALL1蛋白较高的同源性。同时构建了可用于Sall1基因敲除的CRISPR/Cas9打靶载体,并成功获得了Sall1双等位基因敲除的细胞系,这些细胞系可为构建猪肾脏缺失模型提供供体细胞,为探究Sall1基因在猪肾脏发育过程中的作用提供前期基础,并为在异种动物体内再生人源化肾脏提供理论依据。

[参考文献]

[1] JAGER K J, KOVESDY C, LANGHAM R, et al. A single

- number for advocacy and communication-worldwide more than 850 million individuals have kidney diseases [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2019, 34(11):1803-1805
- [2] LUYCKX V A, AL-ALY Z, BELLO A K, et al. Sustainable development goals relevant to kidney health: an update on progress [J]. *Nat Rev Nephrol*, 2021, 17(1): 15-32
- [3] LI Y H, HUANG K. Human-animal inter species chimerism via blastocyst complementation: advances, challenges and perspectives: a narrative review [J]. *Stem Cell Investig*, 2021, 8:20
- [4] CHEN J, LANSFORD R, STEWART V, et al. RAG-2-deficient blastocyst complementation: an assay of gene function in lymphocyte development [J]. *PNAS*, 1993, 90(10):4528-4532
- [5] YAMAZAKI K, KUBARA K, ISHII S, et al. *In vitro* and *in vivo* functions of T cells produced in complemented thymi of chimeric mice generated by blastocyst complementation [J]. *Sci Rep*, 2022, 12(1):3242
- [6] WEN B Q, LI E H, USTIYAN V, et al. *In vivo* generation of lung and thyroid tissues from embryonic stem cells using blastocyst complementation [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2021, 203(4):471-483
- [7] MORI M, FURUHASHI K, DANIELSSON J A, et al. Generation of functional lungs via conditional blastocyst complementation using pluripotent stem cells [J]. *Nat Med*, 2019, 25(11):1691-1698
- [8] KOBAYASHI T, YAMAGUCHI T, HAMANAKA S, et al. Generation of rat pancreas in mouse by interspecific blastocyst injection of pluripotent stem cells [J]. *Cell*, 2010, 142(5):787-799
- [9] COOPER D K C, GASTON R, ECKHOFF D, et al. Xenotransplantation - the current status and prospects [J]. *Br Med Bull*, 2018, 125(1):5-14
- [10] ZHANG C, QUAN R F, WANG J F. Development and application of CRISPR/Cas9 technologies in genomic editing [J]. *Hum Mol Genet*, 2018, 27(R2):R79-R88
- [11] GAO M Y, ZHU X L, YANG G, et al. CRISPR/Cas9-mediated gene editing in porcine models for medical research [J]. *DNA Cell Biol*, 2021, 40(12):1462-1475
- [12] ZHANG W, WANG G, WANG Y, et al. Generation of complement protein C3 deficient pigs by CRISPR/Cas9-mediated gene targeting [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1):5009
- [13] FISCHER K, RIEBLINGER B, HEIN R, et al. Viable pigs after simultaneous inactivation of porcine MHC class I and three xenoreactive antigen genes GGTA1, CMAH and B4GALNT2 [J]. *Xenotransplantation*, 2020, 27(1): e12560
- [14] MATSUNARI H, NAGASHIMA H, WATANABE M, et al. Blastocyst complementation generates exogenic pancreas in vivo in apancreatic cloned pigs [J]. *PNAS*, 2013, 110(12):4557-4562
- [15] MATSUNARI H, WATANABE M, HASEGAWA K, et al. Compensation of disabled organogenesis in genetically modified pig fetuses by blastocyst complementation [J]. *Stem Cell Rep*, 2020, 14(1):21-33
- [16] WU J, PLATERO-LUENGO A, SAKURAI M, et al. Interspecies chimerism with mammalian pluripotent stem cells [J]. *Cell*, 2017, 168(3):473-486
- [17] DAS S, KOYANO - NAKAGAWA N, GAFNI O, et al. Generation of human endothelium in pig embryos deficient in ETV2 [J]. *Nat Biotechnol*, 2020, 38(3):297-302
- [18] NISHINAKAMURA R, OSAFUNE K. Essential roles of Sall family genes in kidney development [J]. *J Physiol Sci*, 2006, 56(2):131-136
- [19] GOTO T, HARA H, SANBO M, et al. Generation of pluripotent stem cell-derived mouse kidneys in Sall1-targeted anephric rats [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1):451
- [20] WATANABE M, NAKANO K, UCHIKURA A, et al. Anephrogenic phenotype induced by SALL1 gene knock-out in pigs [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1):8016
- [21] BEAUDOUX O, LEBRE A S, DOCO FENZY M, et al. Adult diagnosis of Townes-Brocks syndrome with renal failure: two related cases and review of literature [J]. *Am J Med Genet A*, 2021, 185(3):937-944
- [22] TAKASATO M, OSAFUNE K, MATSUMOTO Y, et al. Identification of kidney mesenchymal genes by a combination of microarray analysis and Sall1-GFP knockin mice [J]. *Mech Dev*, 2004, 121(6):547-557
- [23] LU T Y, YANG B C, WANG R L, et al. Xenotransplantation: current status in preclinical research [J]. *Front Immunol*, 2019, 10:3060
- [24] RATNER L D, LA MOTTA G E, BRISKI O, et al. Practical approaches for knock-out gene editing in pigs [J]. *Front Genet*, 2020, 11:617850
- [25] WANG J, LIU M, ZHAO L, et al. Disabling of nephrogenesis in porcine embryos via CRISPR/Cas9-mediated SIX1 and SIX4 gene targeting [J]. *Xenotransplantation*, 2019, 26(3): e12484

[收稿日期] 2002-04-15

(责任编辑:蒋莉)