

人/猪 OSBPL2 同源性比较及猪 PFFs 靶基因敲除细胞系的建立

曾华沙¹, 姚俊¹, 王红顺¹, 王盈², 杨海元², 曹新^{1*}, 戴一凡²

¹南京医科大学生物技术系, ²江苏省异种移植重点实验室, 江苏 南京 211166

[摘要] 目的: 基于 CRISPR/Cas9 技术构建猪胎儿成纤维细胞 (porcine fetal fibroblasts, PFFs) OSBPL2 敲除细胞系, 为构建小型猪致聋基因缺陷动物模型奠定重要的前期工作基础。方法: 首先通过生物信息学方法对人与猪 OSBPL2 基因共线性和同源性进行分析, 预测并模拟人与猪 OSBPL2 蛋白质二级、三级结构。其次, 设计合成靶向猪 OSBPL2 第 5、6 外显子设计单导向 RNA (single guide RNA, sgRNA), 以 pX330 质粒为载体, 构建含有 Cas9 骨架的重组载体, 转染至猪 PFFs 中, G418 药物筛选阳性单克隆细胞。最后, T7EN1 酶切实验检测靶向效率, 序列分析检测单克隆细胞基因型。结果: 生物信息学分析结果表明人与猪的 OSBPL2 在染色体上具有较好的共线性关系, 蛋白质氨基酸同源性高达 88%, 且具有相似的功能结构域。成功构建打靶 OSBPL2 基因的 Cas9/sgRNA 表达载体, 转染 PFFs 细胞, 药物筛选获得 OSBPL2 基因双敲的单细胞克隆并测序证实了基因突变型。结论: 人和猪 OSBPL2 基因具有高度的同源性。构建成功的 Cas9/sgRNA 表达载体在 PFFs 中预期实现了 OSBPL2 基因编辑并获得基因双敲的单细胞克隆, 为后续 OSBPL2 基因敲除猪模型构建提供了必需的实验材料。

[关键词] OSBPL2; 共线性分析; CRISPR/Cas9; PFFs

[中图分类号] Q26

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2018)02-149-06

doi: 10.7655/NYDXBNS20180202

Homology comparison between human and pig OSBPL2 and establishment of pig PFFs with target gene knockout

Zeng Huasha¹, Yao Jun¹, Wang Hongshun¹, Wang Ying², Yang Haiyuan², Cao Xin^{1*}, Dai Yifan²

¹Department of Biotechnology, ²Jiangsu Key Laboratory of Xenotransplantation, NMU, Nanjing 211166, China

[Abstract] **Objective:** To build OSBPL2-knockout porcine fetal fibroblasts (PFFs) based on CRISPR/Cas9 technology and lay the important preparative foundation for establishing an experimental animal model of deafness in miniature pigs with OSBPL2 defects. **Methods:** Bioinformatics methods were applied to analyze the collinearity and homology of OSBPL2 between human and pig. The secondary and tertiary structures of OSBPL2 protein of human and pig were predicted and simulated. Two single-guide RNAs (sgRNAs) respectively targeting the fifth and the sixth exon of pig OSBPL2 were designed, synthesized and cloned into pX330 plasmid. G418 was used to obtain the positive monoclonal cells after transfection into PFFs. Finally, the efficiency of CRISPR/Cas9 mediated knockout was assessed by the T7EN1 enzyme digestion assay and the genotypes of monoclonal cells were identified by sequencing analysis. **Results:** Bioinformatic analysis revealed that the OSBPL2 of human and pig had a good collinearity on chromosome, highly homologous amino acid sequence (88%) and similar functional domain characteristics. CRISPR/Cas9 expression vectors targeting OSBPL2 were constructed and transfected into PFFs. OSBPL2-knockout monoclonal cells with mutant genotypes were obtained by drug screening and confirmed by DNA sequencing. **Conclusion:** The human and pig OSBPL2 sequences and their protein structures are highly homologous. CRISPR/Cas9 expression vectors were constructed to achieve OSBPL2 gene targeting in PFFs. OSBPL2-knockout monoclonal cells were obtained, which could contribute to the construction of OSBPL2-knockout miniature pig model.

[Key words] OSBPL2; collinearity analysis; CRISPR/Cas9; porcine fetal fibroblasts

[Acta Univ Med Nanjing, 2018, 38(02): 149-154]

[基金项目] 国家自然科学基金 (81771000, 31571302); 江苏省重点研发计划 (社会发展) 项目 (BE2016762)

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

氧化固醇结合蛋白 (oxysterol binding protein, OSBP) 是一类氧化固醇的受体蛋白, 参与细胞内胆固醇的转运和代谢, 与 OSBP 结构具有较高同源性

的蛋白被称为 OSBP 相关蛋白 (OSBP-related proteins, ORPs)。人类 ORPs 家族有 12 个成员。氧化固醇结合蛋白样蛋白 2 (oxysterol binding protein-like 2, OSBPL2) 是 ORPs 蛋白家族的一员 (ORP2), 编码该蛋白的基因定位在人染色体 20 q 13.33 上, cDNA 全长 4 027 bp, 编码 480 个氨基酸。OSBPL2 蛋白分子量为 55 kDa, C 端含有该家族成员共有的结合氧化固醇蛋白结构域 (OSBP-related ligand-binding domain, ORD)^[1-2]。在中国仓鼠卵巢细胞研究中发现, OSBPL2 的膜结合部分定位于高尔基体, 参与脂质分子的代谢^[3]。本课题组前期研究中基于一个中国常染色体显性遗传耳聋家系的遗传学分析首次发现 *OSBPL2* 基因突变 (c.153_154delCT) 与非综合征性耳聋 (non-syndromic hearing loss, NSHL) 的发生相关^[4]。随后, 在一德国 NSHL 家系中也发现了 *OSBPL2* 基因的另一突变 (c.141_142delTG)^[5], 确证了 *OSBPL2* 是一新的致聋基因。为进一步推进 *OSBPL2* 基因突变/功能缺陷致聋的分子病因学的理解, 还需在模型动物水平进行耳聋基因型/表型相关性研究和 *OSBPL2* 功能的探讨。

猪是除灵长类动物以外与人进化关系最近的物种之一, 且猪的内耳解剖结构和功能与人更为接近; 此外, 不同于啮齿类动物而与人相似的是, 猪的内耳柯蒂氏器发育和听力均是在胚胎后期形成并成熟^[6-8]。因此, 猪是更为理想的研究 *OSBPL2* 病理突变与耳聋基因型/表型的动物模型。本研究通过对人和猪等物种的 *OSBPL2* 基因的同源共线性分析, 进一步验证了猪与人的 *OSBPL2* 具有高度同源性, 并模拟了人与猪 *OSBPL2* 的蛋白结构。本课题组前期已利用 CRISPR/Cas9 (Clustered regularly interspaced short palindromic repeats/Cas9) 技术成功构建了 *OSBPL2* 基因敲除的 HeLa 细胞系^[9], 在此基础上, 本研究将进一步对巴马小型猪胎儿原代成纤维细胞 (Porcine fetal fibroblasts, PFFs) 进行 *OSBPL2* 基因敲除, 获得猪 *OSBPL2* 基因敲除单克隆细胞系, 为 *OSBPL2* 基因缺陷型耳聋猪模型的构建以及进一步在动物水平研究 *OSBPL2* 的功能及其突变致聋的分子机制奠定实验基础。

1 材料和方法

1.1 材料

巴马猪胎儿由南京医科大学江苏省异种移植重点实验室猪场提供; pX330 质粒 (Addgene 423230)、*Bbs* I 限制性内切酶、Quick Ligase 连接酶

和 T7EN1 酶 (New England Biolabs 公司, 美国); Plasmid Safe ATP-Dependent DNase (Epicentre 公司, 美国); 琼脂糖凝胶回收试剂盒 (Qiagen 公司, 德国); 质粒小提试剂盒、质粒中提试剂盒和 DH5 α 感受态 (北京天根生化科技公司); Basic Nucleofector™ Kits 和细胞转染仪 (Lonza 公司, 德国); DMEM 培养基、胎牛血清、胰酶、Penn/Strep 双抗和 PBS 缓冲液 (Gibco 公司, 美国); PMD18-T 载体 (TaKaRa 公司, 日本); 引物和磷酸化的寡核苷酸序列由北京华大基因合成。

1.2 方法

1.2.1 人/猪 *OSBPL2* 基因同线性分析

由于在现有的猪参考基因组数据库 (SGSC Sscrofa10.2/susScr3, SGSC Sscrofa9.2/susScr2) 中未能检索到完整的 *OSBPL2* 基因组序列, 推测猪 *OSBPL2* 基因在猪参考基因组数据库中未能完全进行测通注释。参考人类 20 号染色体 *OSBPL2* 基因及其侧翼序列寻找猪基因组中对应的同源区域。使用 Ensembl 数据库 (<http://www.ensembl.org>) 在线绘制, 预测猪 *OSBPL2* 基因在猪的染色体位置, 以及与人 *OSBPL2* 基因的共线性。

1.2.2 人/猪 *OSBPL2* 基因同源性分析

采用 Clustal2.1 软件, 选取包括人和猪 2 个物种进行 *OSBPL2* 氨基酸序列比对, 对 *OSBPL2* 在人和猪上的同源保守性进行比较分析。

1.2.3 人/猪 *OSBPL2* 蛋白的结构比较

利用 DNASTAR 软件中的 Protean 模块的 2 种算法对人 *OSBPL2* 蛋白和猪 *OSBPL2* 蛋白进行二级结构分析, 其中, 使用 Chou-Fasman 算法预测人 *OSBPL2* 蛋白, 猪 *OSBPL2* 蛋白 α 螺旋, β 折叠, β 转角的比例。人 *OSBPL2* 蛋白和猪 *OSBPL2* 蛋白具有近似相等数量的 α 螺旋、 β 折叠和 β 转角。使用 Swiss Model 在线工具 (<https://www.swissmodel.expasy.org/>) 对人 *OSBPL2* 蛋白和猪 *OSBPL2* 蛋白进行三维建模, 比较两者的二级和三维结构的相似度。

1.2.4 CRISPR/Cas9 sgRNA 表达载体的靶点设计和载体的构建

根据猪 *OSBPL2* mRNA 序列 (TSA: Sus scrofa HD368 mRNA sequence), 设计引物, 用猪的基因组 DNA 作为模板, 确定一段猪 *OSBPL2* 基因组序列, 在 CRISPR 在线靶点设计工具上 (<http://crispr.mit.edu/>) 分别在第 5 和第 6 外显子上设计一个 20 bp 的 sgRNA 寡核苷酸序列, 5' 末端磷酸化修饰, 交北京华大基因合成。

载体构建包括退火、酶切、连接等步骤 (参照

<http://www.genome-engineering.org/crispr/>)。首先将2对寡核苷酸单链分别退火形成双链。用高压灭菌的去离子水将每条寡核苷酸稀释成100 μmol/L浓度,按如下退火体系加入到0.5 mL PCR管中:正链Oligo 1 μL,负链Oligo 1 μL,8 μL去离子水,每管10 μL体系,在PCR仪中按37℃孵育30 min,95℃孵育5 min,1 min降5℃,降温至25℃,4℃保持。再将Bbs I酶切线性化的pX330载体与稀释后的退火双链Oligo进行连接,室温5 min放置连接,然后转化到DH5α中,挑取单克隆菌落,小提质粒用Bbs I酶切鉴定,并送铂尚测序公司测序验证。验证成功后保存菌种,提取质粒。

1.2.5 细胞转染和阳性克隆细胞的筛选和鉴定

细胞培养与细胞转染^[10]:原代PFFs用16%胎牛血清培养。取3管 1×10^6 个细胞,分别与新霉素表达质粒(pCMV td-tomato)1 μg共转染5 μg空载pX330,重组载体pX330-Exon 5,pX330-Exon 6,按Lonza基本成纤维细胞转染试剂盒说明书配转染试剂,用核转染程序U-023转染,转染后分盘至10 cm细胞培养皿中,每个细胞培养皿中细胞在1个4倍镜视野下观察有30~60个细胞。分盘剩下的细胞分别放至6孔板中,置于5% CO₂,38.5℃恒温培养箱中,转染24 h用含1 mg/mL浓度G418的培养基培养,每隔1 d进行换液,根据细胞生长状态确定是否降低药物浓度。待6孔板中细胞长满,用胰蛋白酶消化收集细胞,提取基因组DNA。

挑取单克隆细胞:转染分盘至10 cm培养皿的细胞药筛后第9天左右,在4倍镜下观察到单克隆细胞长出。显微镜下观察克隆位置,在细胞培养皿皿底做标记(4倍镜下)。PBS洗2遍,挑选合适大小的克隆环放在克隆上,加0.05%的胰酶(胰酶铺满克隆环底)消化3 min,加无药培养基中止消化,用移液枪移入24孔板中,孔板上标记克隆编号和日期。

单克隆细胞传代、冻存:挑取的单克隆细胞24 h后用加药培养基换液,待24孔板细胞长满消化传代至6孔板中,待6孔板中细胞长满冻存,备用。

提取基因组DNA:24孔板中留下部分细胞,长满后消化下来用NP40裂解细胞,提取基因组DNA用于TA克隆鉴定敲除细胞基因型。

TA克隆鉴定细胞基因型:用24孔板中裂解的细胞做PCR,预变性95℃5 min;变性95℃,30 s,退火61℃,30 s,延伸72℃,1 min,共35个循环;总延伸72℃,7 min;琼脂糖核酸电泳后切胶回收,进行TA克隆,与pMD18-T载体连接,连接产物转化到

DH5α感受态中,涂菌,每板挑取12管单克隆菌落,送公司测序。将测序结果与野生型序列比对得出每个克隆敲除基因型。

1.2.6 T7EN1酶切检测突变效率

用转染后的细胞提取的基因组扩增目的片段,反应条件为:预变性98℃,30 s;变性98℃,10 s,退火60℃,15 s,延伸72℃,30 s,共35个循环;总延伸72℃,2 min。阳性对照组反应条件为:预变性98℃,30 s;变性98℃,5 s,退火60℃,10 s,延伸72℃,20 s,共35个循环;总延伸72℃,2 min。对上述PCR产物进行琼脂糖凝胶电泳后切胶回收,20 μL去离子水洗脱。

T7EN1酶切电泳体系^[11]:取5 μL纯化产物分别加2 μL 10×NEBuffer2,12 μL去离子水,每个PCR管中共19 μL体系在PCR仪中进行退火反应,退火结束后取9.5 μL退火产物,各加0.5 μL T7EN1酶,剩下的9.5 μL退火产物加0.5 μL去离子水,作为不加酶的对照组,37℃孵育15 min,每管加入0.5 μL Proteinase K失活T7EN1酶,加loading buffer,1%琼脂糖凝胶,100 V,50 min后分析电泳结果。

2 结果

2.1 人/猪OSBPL2基因同线性及氨基酸序列同源性分析结果

参考人类20号染色体OSBPL2基因及其侧翼序列寻找猪基因组中对应的同源区域,预测猪OSBPL2基因及其侧翼区域位于17号染色体长臂上,与人OSBPL2基因及其侧翼序列存在高度共线性(图1A),且人和猪OSBPL2蛋白的氨基酸序列比对显示,二者OSBPL2蛋白的同源性很高,氨基酸序列一致性达到88%(图1B)。

2.2 人/猪OSBPL2蛋白结构对比结果

利用DNASTar软件中Protean模块的2种算法对人和猪OSBPL2蛋白进行二级结构分析。其中,Chou-Fasman算法预测人OSBPL2蛋白α螺旋占40.6%,β折叠占25.8%,β转角占30.8%;猪OSBPL2蛋白α螺旋占33.1%,β折叠占25.2%,β转角占29.1%。人和猪OSBPL2蛋白具有近似相等数量的α螺旋、β折叠和β转角。由此推测,人和猪OSBPL2蛋白在二级结构上具有很高的-致性(图2A)。而人和猪OSBPL2蛋白结构模拟也显示两者三维结构相似度很高,都含有一个严格保守的OSBP指纹特征基序“EQVSHHPP”(图2B)。生物信息学分析结果表明,人和猪OSBPL2分子进化具有较近的亲缘关

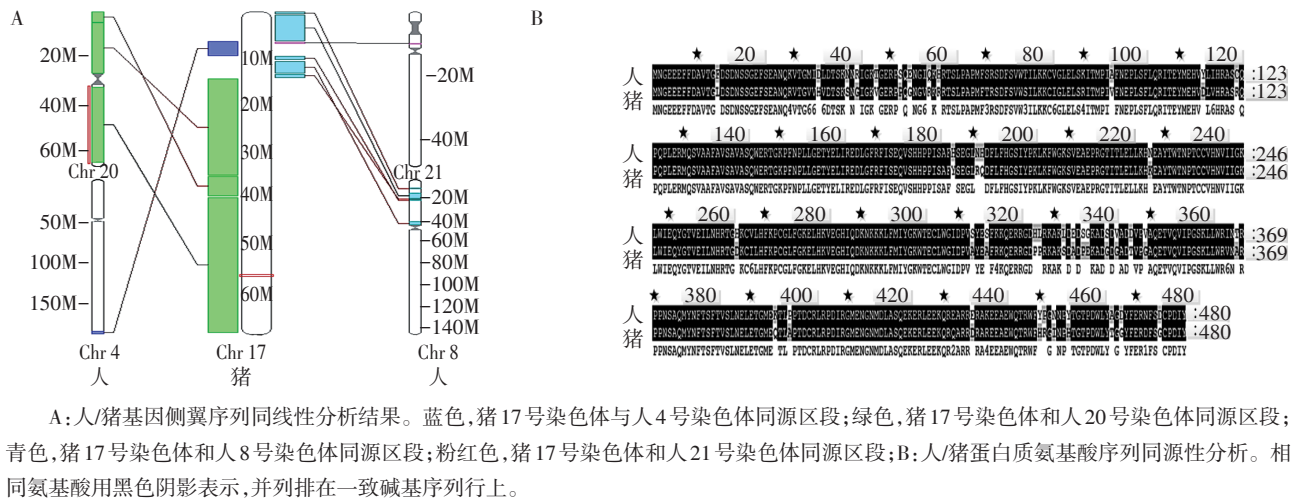


图1 人与猪 *OSBPL2* 基因同线性和蛋白氨基酸同源性分析

Figure 1 Synteny analysis of gene sequences and comparison of *OSBPL2* amino acid sequences homology between human and pig

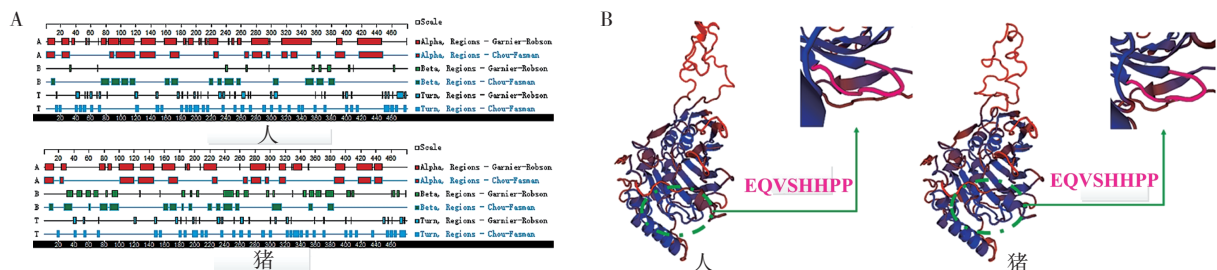


图2 人与猪 *OSBPL2* 蛋白质二级、三维结构分析

Figure 2 Analysis of *OSBPL2* protein secondary and three-dimensional structures between human and pig

系,序列比对和结构分析具有高度的同源一致性,推测 *OSBPL2* 在人/猪相应的组织细胞中具有相似的生物学功能。

2.3 CRISPR/Cas9 靶点确定和重组载体测序

表1是设计的2对sgRNA寡核苷酸序列,将添加接头的sgRNA合成,退火后分别与线性化的pX330载体连接,转化到DH5 α 感受态细胞中,挑取阳性单克隆菌落。摇菌后,抽提质粒,用pX330质粒U6启动子的一段引物:5'-ACTATCATATGCTTACGTAAC-3'进行测序,如图3B所示,重组载体pX330上分别成功插入了*OSBPL2* Exon 5和Exon 6的靶点sgRNA序列。

2.4 *OSBPL2* 敲除细胞系的筛选与鉴定结果

通过G418筛选后得到的细胞克隆,TA克隆测序后与野生型序列对比。扩增靶序列的PCR引物正义为5'-GAACTGTCCAGAATCACCATGCC-3',反义为5'-CCCAAGACGGGTTGAACGG-3',退火温度

表1 *OSBPL2* 靶向位点及sgRNA寡核苷酸序列

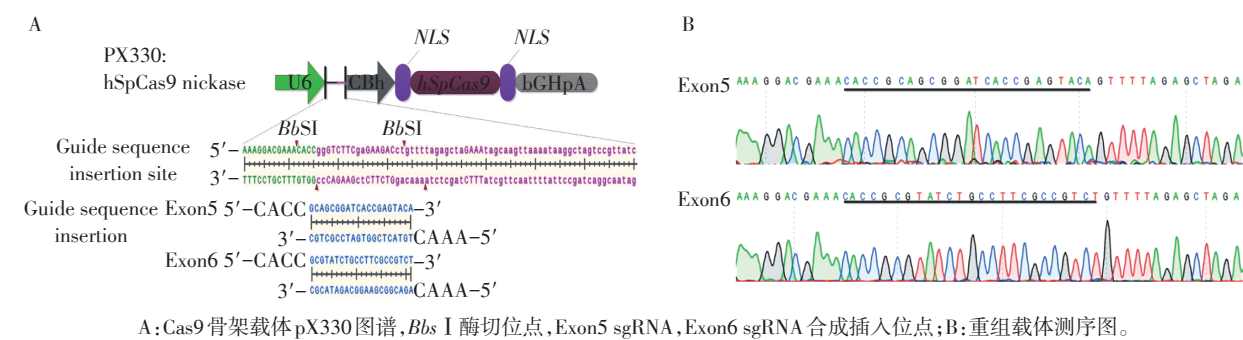
Table 1 *OSBPL2* targeting loci and sgRNA oligonucleotide sequence

名称	序列(5'→3')
Exon5-oligo-F	CACCGCAGCGGATCACCGAGTACA
Exon5-oligo-R	AAACTGTACTCGGTGATCCGCTGC
Exon6-oligo-F	CACCGCGTATCTGCCCTTCGCCGTCT
Exon6-oligo-R	AAACAGACGGCGAAGGCAGATACGC

60℃,长度870 bp。测序结果显示 *OSBPL2* 基因的第5外显子靶点区域有不同碱基数的缺失或插入突变类型(图4),第6外显子靶点区域没有观察到碱基改变或插入或缺失现象,与T7EN1酶的鉴定电泳结果一致。

2.5 T7EN1 敲除效率的验证

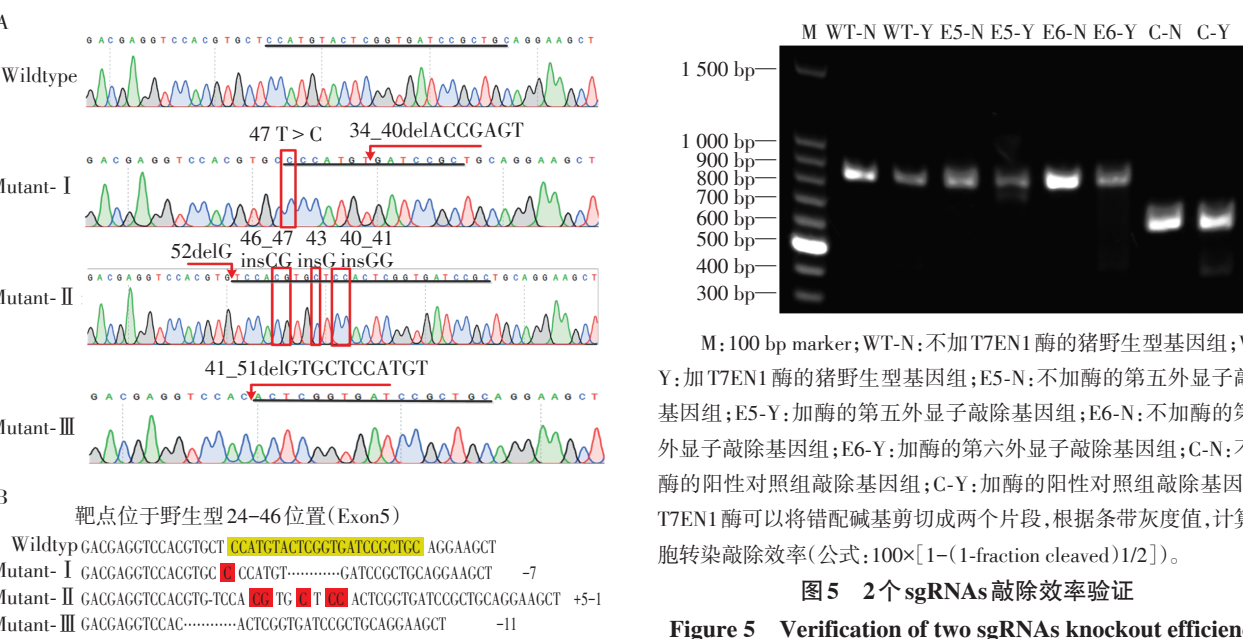
PCR产物退火处理后,T7EN1酶在敲除靶点位置剪切,通过电泳结果可以看到目的片段被剪切成2段。因为本实验设计的2个外显子处的敲除靶点



A: Cas9 骨架载体 pX330 图谱, *BbsI* 酶切位点, Exon5 sgRNA, Exon6 sgRNA 合成插入位点; B: 重组载体测序图。

图3 重组载体的构建与测序

Figure 3 Construction and sequencing of recombinant vectors



A: 部分单克隆细胞靶位点(反向测序结果); B: 突变型与野生型序列(GACC01000357.1)比对结果。

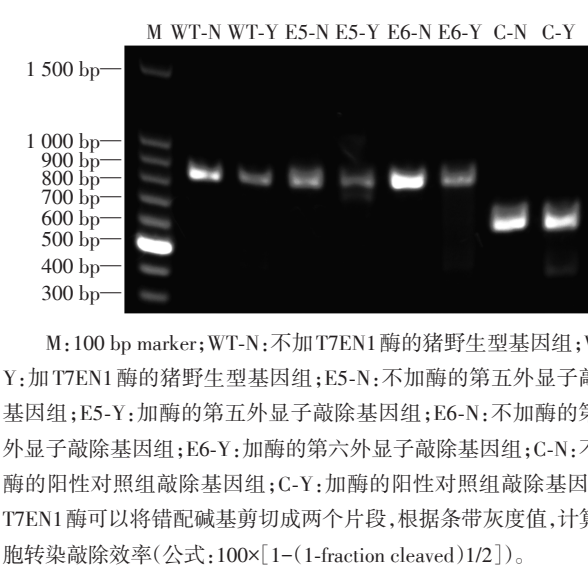
图4 单克隆细胞在目的sgRNA位点的部分缺失突变图谱(Exon 5)

Figure 4 Mutation mapping in purpose sgRNA locus of part monoclonal cells (Exon 5)

分别靠近目的片段的两端,电泳分析在靠近目的片段条带的下面有被剪切过的片段条带。在阳性对照组和转染了第5外显子的细胞基因组都可以观察到PCR片段被剪切的条带(图5)。验证了第5外显子靶点发生了碱基的缺失或插入,灰度扫描用公式计算转染敲除效率11.4%。

3 讨论

听觉器官中,除了外耳、中耳腔与人高度一致外,猪耳蜗的大小、鼓室内结构,甚至耳蜗骨壁的厚度、强度均与人极为相近,也同人一样,猪在出生前耳蜗已发育成熟并具有听力功能^[12]。猪的听觉动



M: 100 bp marker; WT-N: 不加T7EN1酶的猪野生型基因组; WT-Y: 加T7EN1酶的猪野生型基因组; E5-N: 不加酶的第5外显子敲除基因组; E5-Y: 加酶的第5外显子敲除基因组; E6-N: 不加酶的第6外显子敲除基因组; E6-Y: 加酶的第6外显子敲除基因组; C-N: 不加酶的阳性对照组敲除基因组; C-Y: 加酶的阳性对照组敲除基因组。T7EN1酶可以将错配碱基剪切成两个片段,根据条带灰度值,计算细胞转染敲除效率(公式: $100 \times [1 - (1 - \text{fraction cleaved})^{1/2}]$)。

图5 2个sgRNAs敲除效率验证

Figure 5 Verification of two sgRNAs knockout efficiency

态范围也和人的类似^[13],野猪的行为听力范围是42~40 500 Hz,敏感听力范围为250~16 000 Hz,类似于人类。猪的听性脑干反应(auditory brainstem responses, ABRs)几乎与人类一致^[8]。反映在基因组方面,猪与人具有很近的进化亲缘关系,因此两者基因组大小相近、基因数量和结构类似(参见SGSC Sscrofa10.2/susScr3, SGSC Sscrofa9.2/susScr2)。众多的人类致病基因也能够猪基因组中找到同源基因^[14],突变后能够产生类似的遗传效应和病理表型。因此,现有的研究提示猪和人在耳特别是内耳解剖、结构、遗传和功能上具有高度的相似性和一致性。

本研究靶向人新的耳聋致病基因OSBPL2,已查询到猪的同源基因,并通过包括猪和人在内的多物种OSBPL2序列构建系统分子进化树分析(结果未纳入)、猪与人OSBPL2基因同线性预测、mRNA和蛋白序列同源一致性比较以及蛋白结构的三维

结构建模,均显示猪与人 *OSBPL2* 基因在分子进化上具有较近的亲缘关系,序列和结构上均具有高度的同源性,有理由认为 *OSBPL2* 基因在猪和人相应组织细胞(包括内耳听觉细胞)中具有相似的生物学功能。

以 CRISPR/Cas9 为代表的基因组编辑技术结合体细胞克隆为构建遗传修饰动物模型创造了前所未有的发展机遇。在创建动物模型研究领域,CRISPR/Cas9 技术的应用突破了一些制约体细胞克隆发展的关键技术瓶颈,如某些动物 ES 细胞限制、传统基因打靶技术和体外基因定点整合效率低等问题。而今,CRISPR/Cas9 系统结合业已成熟的体细胞核移植技术极大地推动了遗传修饰模型的创建和该产业的发展。如, Park 等^[15]利用 CRISPR/Cas9 系统在猪的胚胎细胞上编辑 *NANOS2* 基因,建立基因单敲、双敲突变的小猪,获得与敲除小鼠同样的拟表型。Kang 等^[16]利用 CRISPR/Cas9 系统获得靶向 *RUNX3* 基因敲除的原代猪成纤维细胞系,并以此为核供体进行体细胞核移植,胚胎移植后成功从 2 只代孕母猪生出 4 只活的 *RUNX3* 敲除小猪,在其内部器官系统无 *RUNX3* 蛋白的表达。Chen 等^[10]利用高效 CRISPR/Cas9 基因打靶获得 B 细胞缺陷猪,靶向小型巴马猪的 IgM 重链基因的 JH 区域,以此来影响 B 细胞的发育和分化,体细胞核移植得到的小猪 B 细胞未产生抗体,IgM 轻链蛋白表达水平大幅降低,几乎检测不到重链基因编码蛋白的表达,表现出 B 细胞缺乏的表型。

本研究 CRISPR/Cas9 技术成功制备了 *OSBPL2* 基因敲除猪 PFFs 细胞系,为后续通过体细胞核移植和胚胎移植,创建 *OSBPL2* 基因敲除小型猪奠定了重要的前期工作基础。

[参考文献]

- [1] Laitinen S, Lehto M, Lehtonen S, et al. ORP2, a homolog of oxysterol binding protein, regulates cellular cholesterol metabolism[J]. J Lipid Res, 2002, 43(2): 245-255
- [2] Jaworski C J, Moreira E, Li A, et al. A family of 12 human genes containing oxysterol-binding domains [J]. Genomics, 2001, 78(3): 185-196
- [3] Hynynen R, Laitinen S, Kakela R, et al. Overexpression of OSBP-related protein 2 (ORP2) induces changes in cellular cholesterol metabolism and enhances endocytosis [J]. Biochem J, 2005, 390(Pt 1): 273-283
- [4] Xing G, Yao J, Wu B, et al. Identification of *OSBPL2* as a novel candidate gene for progressive nonsyndromic hearing loss by whole - exome sequencing [J]. Genet Med, 2015, 17(3): 210-218
- [5] Thoenes M, Zimmermann U, Ebermann I, et al. *OSBPL2* encodes a protein of inner and outer hair cell stereocilia and is mutated in autosomal dominant hearing loss (DF-NA67)[J]. Orphanet J Rare Dis, 2015, 10: 15
- [6] Lee J H, Chang S Y, Moy W J, et al. Simultaneous bilateral laser therapy accelerates recovery after noise-induced hearing loss in a rat model [J]. PeerJ, 2016, 4: e2252
- [7] Brett P, Du X, Zoka-Assadi M, et al. Feasibility study of a hand guided robotic drill for cochleostomy [J]. Biomed Res Int, 2014, 2014: 656325
- [8] Guo W, Yi H, Ren L, et al. The morphology and electrophysiology of the cochlea of the miniature pig [J]. Anat Rec (Hoboken), 2015, 298(3): 494-500
- [9] 陈庆, 鲁雅洁, 姚俊, 等. 基于 CRISPR/Cas9 技术建立敲除 *OSBPL2* 基因的 HeLa 细胞株 [J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2016, 36(9): 1072-1078
- [10] Chen F, Wang Y, Yuan Y, et al. Generation of B cell-deficient pigs by highly efficient CRISPR/Cas9 - mediated gene targeting [J]. J Genet Genomics, 2015, 42(8): 437-444
- [11] Yu HH, Zhao H, Qing YB, et al. Porcine Zygote Injection with Cas9/sgRNA Results in DMD-Modified Pig with Muscle Dystrophy [J]. Int J Mol Sci, 2016, 17(10): E1668
- [12] Hoffstetter M, Lugauer F, Kundu S, et al. Middle ear of human and pig: a comparison of structures and mechanics [J]. Biomed Tech (Berl), 2011, 56(3): 159-165
- [13] Heffner R S, Heffner H E. Hearing in domestic pigs (*Sus scrofa*) and goats (*Capra hircus*) [J]. Hear Res, 1990, 48(3): 231-240
- [14] Li M, Chen L, Tian S, et al. Comprehensive variation discovery and recovery of missing sequence in the pig genome using multiple de novo assemblies [J]. Genome Res, 2017, 27(5): 865-874
- [15] Park KE, Kaucher AV, Powell A, et al. Generation of germline ablated male pigs by CRISPR/Cas9 editing of the *NANOS2* gene [J]. Sci Rep, 2017, 7: 40176
- [16] Kang JT, Ryu J, Cho B, et al. Generation of *RUNX3* knockout pigs using CRISPR/Cas9-mediated gene targeting [J]. Reprod Domest Anim, 2016, 51(6): 970-978

[收稿日期] 2017-04-16