

· 基础研究 ·

GPRASP2 基因编辑猪胎儿成纤维细胞系的建立

张敏¹, 姚俊¹, 鲁雅洁¹, 王红顺¹, 王盈², 杨海元², 魏钦俊¹, 曹新^{1*}, 戴一凡²¹南京医科大学医学遗传学系, 江苏 南京 211166; ²南京医科大学江苏省异种移植重点实验室, 江苏 南京 211166

[摘要] 目的: 采用CRISPR/Cas9基因编辑技术构建G蛋白偶联受体相关分选蛋白2(G protein-coupled receptor associated sorting protein 2, GPRASP2)基因敲除的猪胎儿成纤维细胞(porcine fetal fibroblast, PFF), 为构建GPRASP2基因敲除巴马小型猪模型提供相应的供体细胞。方法: 采用生物信息学方法对人与猪GPRASP2基因进行亲缘性和同源性分析, 预测人与猪GPRASP2基因编码的氨基酸序列和蛋白二级结构; 设计合成靶向巴马猪GPRASP2基因编码区上游和下游的单导向RNA(single guide RNA, sgRNA), 以pX330质粒为载体, 构建含有Cas9骨架的重组打靶质粒, 并将此重组质粒转染至PFF中, G418药物筛选阳性单克隆细胞, 测序分析其基因型。结果: 生物信息学分析提示人/猪GPRASP2亲缘关系相近, 同源性较高, 且主要功能结构域Arm2的二维和三维结构相似。构建了靶向猪GPRASP2基因的重组打靶质粒并转染PFF, 通过药物筛选、基因型分析和Western blot验证, 成功获得GPRASP2基因敲除单克隆PFF。结论: 人/猪GPRASP2基因亲缘关系相近且高度同源; 采用CRISPR/Cas9介导的基因编辑技术成功构建GPRASP2基因敲除的单克隆PFF, 为建立GPRASP2基因敲除巴马小型猪模型奠定了前期基础。

[关键词] GPRASP2; CRISPR/Cas9; 猪胎儿成纤维细胞; GPRASP2基因敲除细胞系

[中图分类号] R784

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2021)01-004-07

doi: 10.7655/NYDXBNS20210102

Construction of GPRASP2-modified porcine fetal fibroblasts

ZHANG Min¹, YAO Jun¹, LU Yajie¹, WANG Hongshun¹, WANG Ying², YANG Haiyuan², WEI Qinjun¹, CAO Xin^{1*}, DAI Yifan²¹Department of Medical Genetics, Nanjing Medical University, Nanjing 211166; ²Jiangsu Key Laboratory of Xenotransplantation, Nanjing Medical University, Nanjing 211166, China

[Abstract] **Objective:** To construct G protein-coupled receptor associated sorting protein 2 (GPRASP2)-modified porcine fetal fibroblasts (PFFs) as donor cells for the generation of GPRASP2-disrupted Bama miniature (BM) pigs. **Methods:** Bioinformatics methods were applied to phylogenetic and homologue analysis of human/porcine GPRASP2, and the secondary structures of human/porcine GPRASP2 proteins were predicted. Two single-guide RNAs (sgRNAs), targeting the upstream/downstream of coding sequence of the porcine GPRASP2, were designed, synthesized and ligated to pX330 plasmid. The recombinant plasmids containing Cas9 backbone were transfected into PFFs. Viable cell colonies were obtained using G418 screening and subjected to genotyping via direct PCR-based sequencing. **Results:** The human and porcine GPRASP2 proteins are evolutionarily closer, highly homologous, and predicted to have the similar functional Arm2 domains via 2D and 3D structure modeling. CRISPR/Cas9-sgRNA expression vectors targeting porcine GPRASP2 were constructed and transfected into PFFs. GPRASP2-deficient monoclonal PFFs were obtained by drug screening, genotypic analysis and Western blot assay. **Conclusion:** The human/porcine GPRASP2 proteins are evolutionarily closer and highly homologous. The GPRASP2-deficient cells were successfully constructed via CRISPR/Cas9 mediated gene editing, which provided a substantial foundation for the generation of GPRASP2-disrupted BM pigs.

[Key words] GPRASP2; CRISPR/Cas9; porcine fetal fibroblast; GPRASP2-deficient cell line

[J Nanjing Med Univ, 2021, 41(01):004-010]

[基金项目] 国家自然科学基金项目(32070587); 江苏省财政厅转化医学实验室平台建设项目; 南京医科大学科研创新基金重大项目(2017NUMCX001)

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

G 蛋白偶联受体(G protein-coupled receptor, GPCR)是人类基因组中最庞大的膜蛋白家族,它们是一类具有7次跨膜螺旋结构的超家族^[1],主要通过配体结合并发生内吞后发挥作用,可调控生物体内许多重要的生理过程。G 蛋白偶联受体相关分选蛋白(GPCR associated sorting protein, GASP)主要在GPCR内吞后的分选过程发挥重要作用,通过与受体的羧基端相互结合,从而介导GPCR进入降解或再循环途径,从而调控相关信号转导^[2]。GPRASP2为GASP家族成员(即GASP2),参与GPCR活性调节,并与肿瘤发生、细胞生长及衰老、生理调节和溶酶体降解等生理过程相关^[2]。本课题组在1个X连锁隐性遗传耳聋家系中首次定位和发现GPRASP2基因突变(c.1717_1718GC>AA, p.A573N)与综合征性耳聋(syndromic hearing loss, SHL)的发生相关^[3]。为进一步推进对GPRASP2基因突变/功能缺陷致聋的分子病因学的理解,还需要在模型动物水平进行耳聋基因型/表型相关性的研究和GPRASP2功能的探讨。

随着基因编辑技术的发展,构建基因缺陷的动物模型为从病理与病因学上研究遗传性耳聋提供了有效途径。小鼠等啮齿类模型动物的内耳发育、遗传和解剖结构与人类差别较大^[4],无法精确模拟人内耳的生理功能和病理过程。猪在分子进化上与人亲缘关系相近,在遗传、生理生化、器官发育和病程发展等方面,特别在内耳发育、听器结构和功能上与人相似^[5-6]:猪出生时耳蜗形态已基本发育成熟并已具备正常听力,这与人胚胎时期的内耳发育过程一致^[7-8];猪的内耳耳蜗形态以及螺旋器结构和功能与人相似;猪的听阈和敏感听力范围与人接近^[9],具有相似的听性脑干反应(auditory brainstem response, ABR)^[10];巴马小型猪体型大小合适,遗传背景明晰,应用于遗传性耳聋的研究更具优势^[10]。本研究采用CRISPR/Cas9介导的基因编辑技术成功获得猪GPRASP2基因敲除的猪胎儿成纤维细胞(porcine fetal fibroblasts, PFF),为构建GPRASP2基因缺陷的巴马小型猪模型和在体水平探索GPRASP2的致聋机制奠定了实验基础。

1 材料和方法

1.1 材料

PFF由南京医科大学江苏省异种移植重点实验室提供;pX330质粒(Addgene 423230)、带G418抗性标记的pCMV td-tomato质粒(Clontech公司,日本);Bbs I限制性内切酶和T7EN1酶(New England

Biolabs公司,美国);琼脂糖凝胶回收试剂盒(Qiagen公司,德国);质粒小提中量试剂盒和DH5 α 感受态细胞(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、青/链霉素双抗和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南京金斯瑞公司合成。

1.2 方法

1.2.1 人/猪GPRASP2的生物信息学分析

采用MEGA7.0软件,选取包括猪和人等20物种进行GPRASP2基因亲缘性分析,并绘制GPRASP2的系统进化树。采用GeneDoc软件,比对人/猪GPRASP2氨基酸序列,并进行同源性和保守性分析。

采用DNASTAR软件中Protean模块对人/猪GPRASP2蛋白进行二级结构分析,以Chou-Fasman算法预测蛋白 α 螺旋、 β 折叠、 β 转角的比例。采用Swiss-Model在线工具对人/猪GPRASP2蛋白的三维结构进行模拟(<https://www.swissmodel.expasy.org/>),因Protein Data Bank(PDB)数据库中未检索到GPRASP2同源蛋白的结构,故采用从头计算法对人/猪GPRASP2蛋白主要功能结构域Arm2(含250个氨基酸残基)进行三维结构模拟。

1.2.2 CRISPR/Cas9的靶点设计和打靶载体构建

利用CRISPR靶点在线设计工具(<http://crispr.mit.edu/>),分别在猪GPRASP2基因编码区(coding sequence, CDS)的上游和下游各设计1对20 bp左右的sgRNA寡核苷酸序列(sgRNA oligo,表1),由南京金斯瑞合成5'端磷酸化修饰的sgRNA oligo。

表1 GPRASP2靶点位置及sgRNA寡核苷酸序列

Table 1 GPRASP2 targeting loci and sgRNA oligonucleotide sequence

Oligo名称	序列(5'→3')
GPRASP2-CDS-UP-F	caccGCCCAATGGTGGTCCGGCCTA
GPRASP2-CDS-UP-R	aaacTAGGCCGGACCACCATTTGGGC
GPRASP2-CDS-DOWN-F	caccGGAACCCCTTGCTCATAGCG
GPRASP2-CDS-DOWN-R	aaacCGTATGAGCAAGGGTTTCC

载体构建步骤主要包括oligo退火、载体酶切和连接^[11-13]。将合成的sgRNA oligo以去离子水稀释至100 μ mol/L,反应体系(10 μ L):正链oligo 1 μ L,反链oligo 1 μ L,去离子水 8 μ L;PCR仪设置退火程序:37 $^{\circ}$ C孵育30 min,95 $^{\circ}$ C孵育5 min,再以5 $^{\circ}$ C/min速度逐渐降温至25 $^{\circ}$ C;退火后将oligo稀释250倍。

用 *Bbs* I 限制性内切酶对 pX330 质粒进行线性化,并连接退火产物,再转化感受态 DH5 α ,挑单克隆菌落至摇管,37 °C 培养 12~16 h,分装 1 mL 的菌液送测序。测序验证后冻存菌液,并小提质粒。

1.2.3 细胞转染和单克隆细胞的筛选

PFF 培养于含 16% 胎牛血清的 DMEM 培养基中,待细胞汇合度达到 90% 后,以 0.05% 胰蛋白酶消化并离心收集细胞;取 1 μ g pCMV td-tomato 分别与空载 pX330 质粒、靶向猪 GPRASP2 基因 CDS 上游和下游的重组 pX330-CDS-UP/pX330-CDS-DOWN 质粒各 5 μ g 共转染 PFF;参照 Lonza 核转试剂盒说明书配制核转液,使用程序 U-023 进行核转,转染后 24 h 加 1 mg/mL 的 G418 进行药筛培养,隔天换液,并根据细胞生长状态调整 G418 用药浓度。9~10 d 后,显微镜观察单克隆位置,并在皿底标记;弃皿中培养液,PBS 清洗 2 遍,将克隆环放置于皿底单克隆位置,加 0.05% 胰蛋白酶消化细胞,转接于 24 孔板中,待细胞长满后再转接至 12 孔板中培养,孔板盖上标记克隆编号和日期;12 孔板中细胞长满后,取部分细胞用 NP40 裂解液裂解,提取基因组 DNA,PCR 扩增靶点区域,CDS1 上游引物 5'-TTCTGCACTCTGTTG-GCTGAG-3',下游引物 5'-AGCAGCAGAAC-CAGACTCATT-3',扩增产物长度 722 bp。反应条件:95 °C 预变性 3 min;95 °C 15 s,60 °C 15 s,72 °C 1 min,35 个循环;PCR 产物经切胶回收,连接 pMD18-T 载体,连接产物转化感受态 DH5 α 中,每板挑取 12 个菌落送公司测序;测序结果与猪 GPRASP2 基因序列(XM-003135261.4)进行比对,鉴定得每个克隆细胞的基因型。

1.2.4 重组载体打靶效率验证

提取转染细胞的基因组 DNA,同前 PCR 扩增;切胶回收 PCR 产物(5 μ L),加入 2 μ L 10 \times NEBuffer 2.0,用 Nuclease-free 水补足至 19 μ L,在 PCR 仪中进行退火反应:95 °C 10 min,再逐渐冷却至室温;退火结束后,取 9.5 μ L 退火产物加入 0.5 μ L T7EN1 酶,剩余 9.5 μ L 退火产物加 0.5 μ L 去离子水(即不加酶的对照组),混匀后 37 °C 下反应 15 min;加入 0.5 μ L 蛋白酶 K 使 T7EN1 酶失活,采用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分析和检测打靶效率。根据条带灰度值,计算细胞转染敲除效率,敲除效率=100 \times [1-(1-裂解产物占比)¹²]。

1.2.5 Western blot 验证

分别取野生型和 GPRASP2 基因敲除的 PFF,加入含有蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液后超声破碎和

低温离心,提取总蛋白,经 SDS-PAGE 胶分离,转膜至 PVDF 膜上,用 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h,加 GPRASP2 抗体(1:1 000,Abcam 公司,英国)和 β -tubulin 抗体(1:1 000,北京翼飞雪),4 °C 孵育过夜,TBST 洗膜后室温孵育二抗(羊抗兔或羊抗鼠)2 h,TBST 洗膜后,化学发光仪(Bio-Rad 公司,美国)检测蛋白表达情况。

2 结果

2.1 人/猪 GPRASP2 基因的分子进化关系与同源性分析

包含猪和人在内 20 个物种的 GPRASP2 系统进化树如图 1A 所示,分值越高的节点其置信度也越高。进化树显示人/猪 GPRASP2 在分子进化上亲缘关系更近,且人/猪 GPRASP2 蛋白同源性较高,氨基酸序列一致性达 86%(图 1B),且主要功能结构域 Arm2 的氨基酸序列一致性高达 94%。

2.2 人/猪 GPRASP2 蛋白结构分析

采用 DNASTar 软件中 Protean 模块的 Chou-Fasman 算法对人/猪 GPRASP2 蛋白进行二级结构分析。人/猪 GPRASP2 蛋白及其主要功能结构域 Arm2 的二级结构具有相近的 α 螺旋、 β 折叠、 β 转角的数量(表 2),提示人/猪 GPRASP2 蛋白的二级结构相似。蛋白三维结构模拟显示人/猪 GPRASP2 的主要功能结构域 Arm2 的三维结构相似。考虑到人/猪 GPRASP2 在分子进化上亲缘关系相近且高度同源,推测人/猪 GPRASP2 蛋白具有相似的生物学功能,这还需从在体水平进一步验证。

2.3 重组打靶质粒和 GPRASP2 基因敲除 PFF 的基因型鉴定

测序结果如图 2 所示,pX330 中分别插入了 GPRASP2 基因 CDS 上游和下游靶点的 sgRNA 序列。

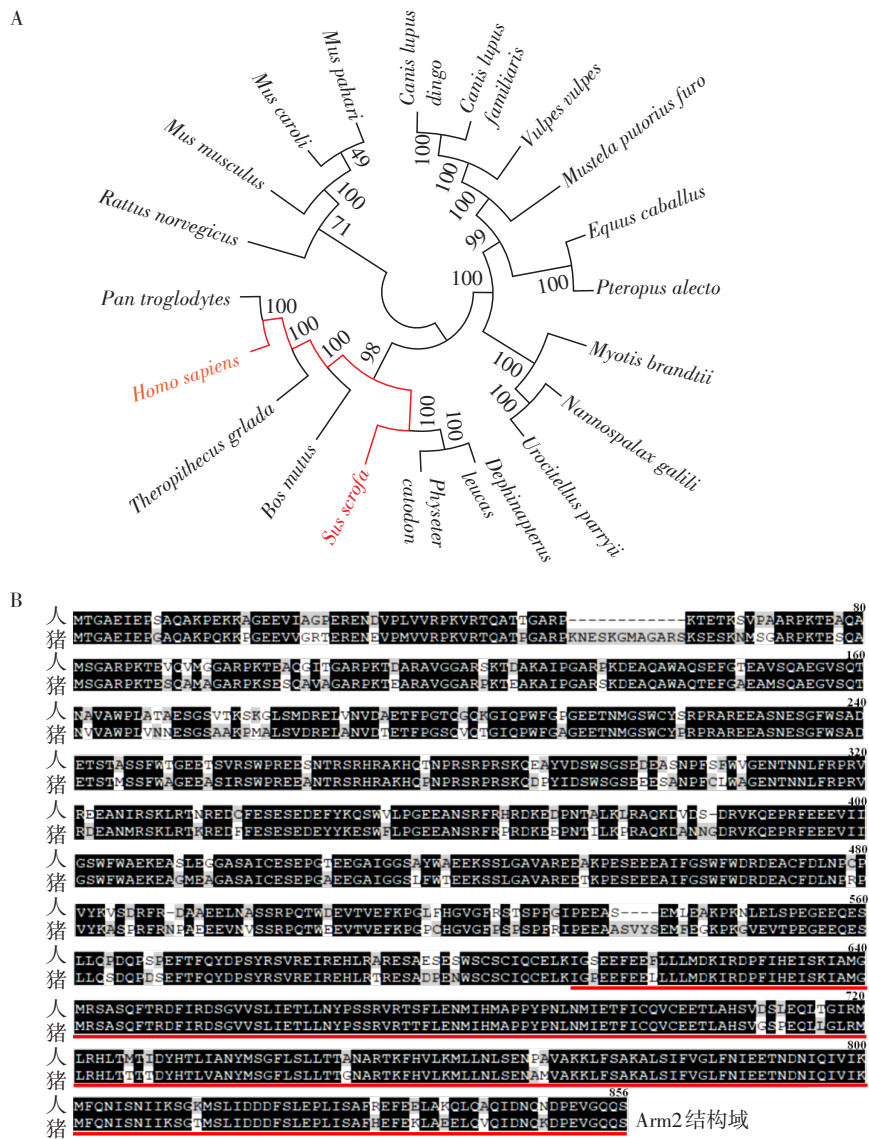
经测序鉴定,共获得 42 个阳性单克隆,其中 5 个为双等位突变的阳性单克隆(表 3),包含 5 种等位基因突变型(图 3),4 种导致 GPRASP2 编码氨基酸的移码和蛋白截短。

2.4 GPRASP2 基因敲除效率的验证

如图 4 所示,转染 pX330-CDS-UP 和 pX330-CDS-DOWN 重组打靶质粒的 PFF 对应的 PCR 产物均可观察到明显剪切条带,敲除效率分别为 20% 和 15%,选取敲除效率较高的 pX330-CDS-UP 重组质粒用于后续转染和单克隆 PFF 筛选。

2.5 GPRASP2 基因敲除 PFF 的 Western blot 验证

采用 Western blot 随机验证其中 1 株 GPRASP2



A: GPRASP2系统进化树。根代表所有分类的共同祖先, 结点代表分类单元, 分支数据代表自展值, 表示可信度; B: 人/猪GPRASP2氨基酸同源性比较。红线为Arm2结构域。

图1 GPRASP2系统进化树和人/猪GPRASP2蛋白氨基酸同源性分析

Figure 1 GPRASP2 phylogenetic tree and homology analysis of human and porcine GPRASP2

表2 GPRASP2蛋白及其Arm2结构域的二级结构分析

Table 2 Analysis of the secondary structures of GPRASP2 protein and Arm2 domain (%)

比例	GPRASP2蛋白		Arm2结构域	
	人	猪	人	猪
α螺旋	43.9	41.1	47.8	42.2
β折叠	19.0	17.4	36.1	35.2
β转角	31.5	34.1	20.9	24.3

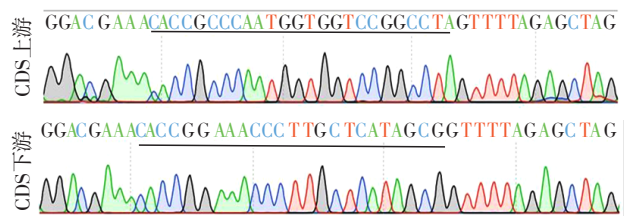


图2 重组打靶质粒测序验证图
Figure 2 Sequencing of recombinant vectors

基因敲除PFF细胞系(GPRASP2^{c.113_114delCT/c.113_114delCT})中GPRASP2蛋白的表达情况。如图5所示, 在GPRASP2基因敲除PFF细胞中未检测到GPRASP2蛋白表达, 表明GPRASP2基因敲除PFF构建成功,

可用于后续的体细胞核移植。

3 讨论

本课题组在中国1个X-连锁遗传性SHL大家系

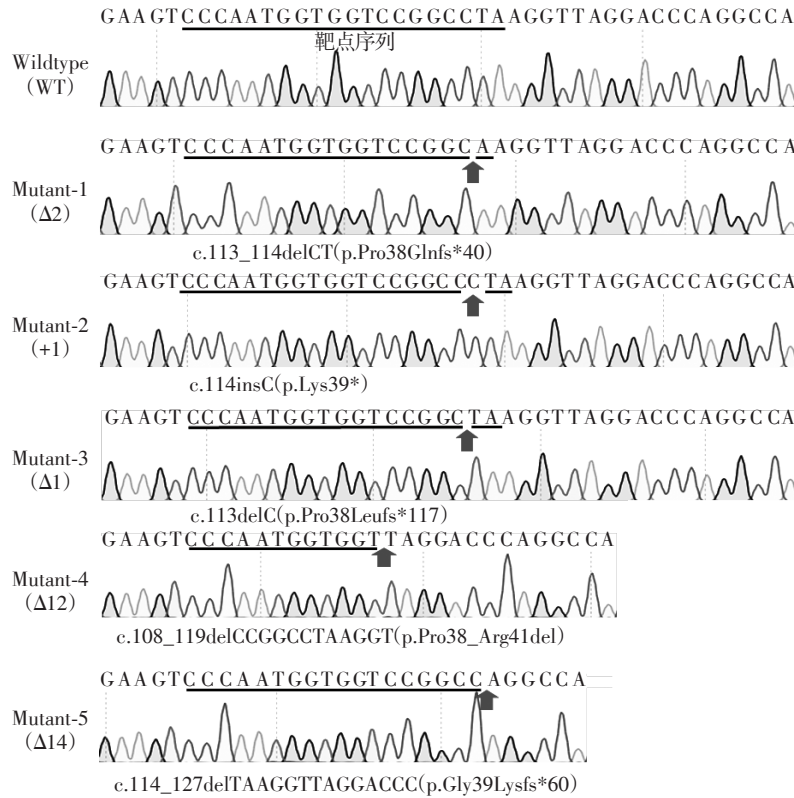


图3 GPRASP2基因敲除PFF的等位基因型分析

Figure 3 The allelic genotypes of GPRASP2-knockout PFF

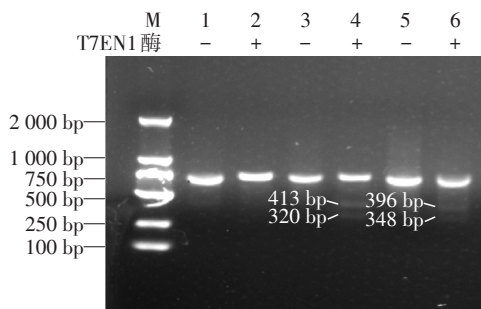
表3 GPRASP2基因敲除PFF单克隆细胞基因型

Table 3 Genotypes of GPRASP2-knockout monoclonal PFF

细胞名称	靶点	基因型
WT	GAAGTCCCAATGGTGGTCCGGCCTAAGGTTAGGACCCAGG GAAGTCCCAATGGTGGTCCGGCCTAAGGTTAGGACCCAGG	WT/WT
MT1	GAAGTCCCAATGGTGGTCCGGC--AAGGTTAGGACCCAGG GAAGTCCCAATGGTGGTCCGGC--AAGGTTAGGACCCAGG	Δ2/Δ2
MT2	GAAGTCCCAATGGTGGTCCGGCCCTAAGGTTAGGACCCAGG GAAGTCCCAATGGTGGTCCGGCCCTAAGGTTAGGACCCAGG	+1/+1
MT3	GAAGTCCCAATGGTGGTCCGGC-TAAGGTTAGGACCCAGG GAAGTCCCAATGGTGGTCCGGC-TAAGGTTAGGACCCAGG	Δ1/Δ1
MT4	GAAGTCCCAATGGTGGT-----TAGGACCCAGG GAAGTCCCAATGGTGGTCCGGC-----AGG	Δ12/Δ14
MT5	GAAGTCCCAATGGTGGTCCGGC--AAGGTTAGGACCCAGG GAAGTCCCAATGGTGGTCCGGC-----AGG	Δ2/Δ14

中成功定位和克隆了1个新的致聋基因GPRASP2, 该家系患者均为男性且携带GPRASP2突变, 表现为重度以上听力损失伴外耳廓畸形、内耳道狭窄/闭锁以及眼睑下垂等表型, 并在家系成员中呈现典型的遗传共分离^[3]。GPRASP2基因定位于人染色体Xq22.1, 编码区位于第5外显子, 共编码838个氨基酸, 其羧基端含有高度保守的Arm2功能结构域, 该

结构域主要通过多个GPCR的羧基末端结构域相互作用, 从而特异性靶向GPCR进入溶酶体降解或再循环途径^[14]。本研究提示人/猪GPRASP2在分子进化上亲缘关系相近并高度同源, 且人/猪GPRASP2蛋白及其主要功能结构域Arm2在二级结构和三级结构上高度相似, 推测GPRASP2基因在人/猪相应组织器官(包括内耳)中可能具有相似的



M: DL2000 marker; 1, 2: 未转染组 PCR 产物; 3, 4: Cas9-sgRNA-CDS-UP 转染组 PCR 产物; 5, 6: Cas9-sgRNA-CDS-Down 转染组 PCR 产物; -/+ : 无或加 T7EN1 酶。

图4 猪 GPRASP2 基因敲除靶点的 T7EN1 酶切验证

Figure 4 T7EN1 cleavage assay of target sites in porcine GPRASP2



WT: 野生型 PFF; KO: GPRASP2 基因敲除 PFF。

图5 GPRASP2 基因敲除 PFF 的 Western blot 验证

Figure 5 Western blot assay of GPRASP2-deficient PFF

生物学功能。

GPRASP2 作为 GASP 家族成员 (GASP2) 在 GPCR 内吞后的分选过程中发挥着重要作用。GPCR 经配体刺激后,质膜表面的蛋白受体经 G 蛋白偶联受体激酶磷酸化以及 β -arrestins 作用下与 G 蛋白解偶联,通过网格蛋白有被小泡的协助完成内吞,内吞后的分选途径一般包括再循环和降解^[15]。目前已经鉴定出多个受体再循环途径以及 GPCR 内吞后进入溶酶体降解途径的 GASP^[15-16],涉及多方面的生理功能。有研究表明 GASP 家族蛋白可作为肿瘤的分子标志物指示肿瘤的发生发展,GASP1 在多种类型的肿瘤患者血清中都具有较高的表达量,包括乳腺癌、脑瘤、肝癌以及肺癌等^[17];GASP2 和 GASP3 在术前和术后头颈鳞状细胞癌患者中的表达具有显著差异^[18];Horn 等^[19]研究发现 GPRASP2 羧基端部分与亨廷顿蛋白(htt)的氨基端(polyQ)相互作用,形成 htt-GPRASP2 复合物,参与受体胞吞作用和突触后信号转导,影响受体的转运,而这一过程与亨廷顿舞蹈症发生有较大相关性;Edfawy 等^[20]研究发现 GPRASP2 能够通过代谢型谷氨酸受体(mGluR)信号通路调控神经系统发育,且敲除 GPRASP2 基因导致小鼠出现自闭症谱系障碍样行为^[20]。现有研究提示 GPRASP2 与神经系统疾病相关;本课题组则

在人类家系中首次关联了 GPRASP2 基因突变/功能缺陷与 SHL 的发生相关^[3]。

为精确模拟 GPRASP2 突变导致的 SHL 表型,从在体水平研究 GPRASP2 的功能及其突变致聋的机制,本研究拟选择巴马小型猪构建耳聋动物模型。猪是除了灵长类动物以外在进化关系上与人最接近的实验动物,并在诸多器官(包括听觉器官)的解剖结构和发育遗传方面高度相似^[13]。采用基因编辑技术构建基因缺陷的耳聋模型猪可精确模拟人遗传性耳聋的疾病表型和病理过程,如杨仕明课题组利用乙基亚硝基脲(ENU)诱变构建了 MITF 基因敲除小型猪模型,成功复制了人 Mondini 畸形病伴听力损失的临床表型^[21];本课题组基于 CRISPR/Cas9 介导的基因编辑技术成功构建了 OSBPL2 基因敲除的巴马小型猪模型,首次精确模拟了人 OSBPL2 基因突变导致的渐进性听力损失的临床表型(DENA67)和内耳听毛细胞的病理过程^[13]。

本研究利用 CRISPR/Cas9 技术成功构建了 GPRASP2 基因敲除的 PFF 细胞系,为后续体细胞核移植和重组胚胎构建提供合适的供体细胞,为构建 GPRASP2 基因敲除的巴马小型猪模型奠定了前期基础,以期为进一步探索 GPRASP2 基因突变致聋机制与基因治疗提供合适的大动物模型。

[参考文献]

- [1] MYKYTYN K, ASKWITH C. G-protein-coupled receptor signaling in cilia [J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2017,9(9):a028183
- [2] ABU-HELO A, SIMONIN F. Identification and biological significance of G protein-coupled receptor associated sorting proteins (GASPs) [J]. Pharmacol Ther, 2010, 126 (3):244-250
- [3] XING G, YAO J, LIU C, et al. GPRASP2, a novel causative gene mutated in an X-linked recessive syndromic hearing loss [J]. J Med Genet, 2017, 54:426-430
- [4] STEPHANIE E, DIETMAR H, KATHARINA S, et al. Cochlea-specific deletion of Cav1.3 calcium channels arrests inner hair cell differentiation and unravels pitfalls of conditional mouse models [J]. Front Cell Neurosci, 2019, 13:225
- [5] GUO W, YI H, REN L, et al. The morphology and electrophysiology of the cochlea of the miniature pig [J]. Anat Rec (Hoboken), 2015, 298:494-500
- [6] 陈伟,陈磊,杨仕明,等. 荣昌猪遗传性听力缺陷家系的发掘与应用 [J]. 中华耳科学杂志, 2016, 14(1): 10-14

[7] 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

[8] CHEN W, HAO Q Q, REN L L, et al. Cochlear morphology in the developing inner ear of the porcine model of spontaneous deafness [J]. *BMC Neurosci*, 2018, 19(1): 28

[9] HEFFNER R S, HEFFNER H E. Hearing in domestic pigs (*Sus scrofa*) and goats (*Capra hircus*) [J]. *Hear Res*, 1990, 48(3): 231-240

[10] YI H J, GUO W, WU N, et al. The temporal bone microdissection of miniature pigs as a useful large animal model for otologic research [J]. *Acta Otolaryngol*, 2014, 134: 26-33

[11] SHAKWEER W M E, HAFEZ Y M, El-Sayed A A, et al. Construction of ovine GH - pmKate2N expression vector and its uptake by ovine spermatozoa using different methods [J]. *J Genet Eng Biotechnol*, 2017, 15(1): 13-21

[12] 曾华沙, 姚俊, 王红顺, 等. 人/猪 OSBPL2 同源性比较及猪 PFFs 靶基因敲除细胞系的建立 [J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2018, 38(2): 149-154

[13] YAO J, ZENG H, ZHANG M, et al. OSBPL2-disrupted pigs recapitulate dual features of human hearing loss and hypercholesterolaemia [J]. *J Genet Genom*, 2019, 46(8): 379-387

[14] BORNERT O, MØLLER T C, BOEUF J, et al. Identification of a novel protein-protein interaction motif mediating interaction of GPCR-associated sorting proteins with G protein-coupled receptors [J]. *PLoS One*, 2013, 8(2): e56336

[15] ABDULLAH N, BEG M, SOARES D, et al. Downregulation of a GPCR by β -arrestin2-mediated switch from an endosomal to a TGN recycling pathway [J]. *Cell Rep*, 2016, 17(11): 2966-2978

[16] 季丙元, 陈京, 白波. G 蛋白偶联受体相关分选蛋白研究进展 [J]. *济宁医学院学报*, 2013, 36(4): 287-291

[17] TUSZYNSKI G P, ROTHMAN V L, ZHENG X, et al. G-protein coupled receptor-associated sorting protein 1 (GASP-1), a potential biomarker in breast cancer [J]. *Exp Mol Pathol*, 2011, 91(2): 608-613

[18] RICKMAN D S, MILLON R, DE REYNIES A, et al. Prediction of future metastasis and molecular characterization of head and neck squamous-cell carcinoma based on transcriptome and genome analysis by microarrays [J]. *Oncogene*, 2008, 27(51): 6607-6622

[19] HORN S C, LALOWSKI M, GOEHLER H, et al. Huntingtin interacts with the receptor sorting family protein GASP2 [J]. *J Neural Transm (Vienna)*, 2006, 113(8): 1081-1090

[20] EDFAWY M, GUEDES J R, PEREIRA M I, et al. Abnormal mGluR-mediated synaptic plasticity and autism-like behaviours in Gprasp2 mutant mice [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 1431

[21] HAI T, GUO W, YAO J, et al. Creation of miniature pig model of human Waardenburg syndrome type 2A by ENU mutagenesis [J]. *Hum Genet*, 2017, 136(11-12): 1463-1475

[收稿日期] 2019-09-18

