

· 基础研究 ·

利用 CRISPR/Cas9 技术高效构建巴马小型猪 F9 基因敲除细胞系

朱晓晗, 刘晓蕊, 李琳, 王盈, 杨海元*, 戴一凡*

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: 利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术建立巴马小型猪 F9 基因敲除的胚胎成纤维(porcine fetal fibroblast, PFF) 细胞系, 为后续构建血友病乙巴马小型猪模型提供原材料。方法: 首先通过生物信息学方法对人和猪 F9 基因同源性进行分析, 模拟并分析人和猪 FIX 二级、三级结构的相似性; 其次选取猪 F9 基因的第 2 外显子为敲除靶点, 利用 CRISPR 在线靶点设计工具 (<http://www.e-crisp.org/E-CRISP/designcrispr.html>) 设计并合成单链向导 RNA (single guide RNA, sgRNA), 以 pX330 质粒为骨架构建打靶载体, 同 G418 抗性质粒一同转染至野生巴马小型猪的 PFF 中, 经药物 G418 筛选获得抗性单细胞克隆, 测序并鉴定其基因型。结果: 生物信息学分析表明人和猪的 F9 基因具有较近的遗传距离, FIX 的氨基酸序列相似值为 83.33%, 三维结构的均方根偏差 (root mean square deviation, RMSD) 值为 0.149。成功构建打靶载体并转染 PFF 细胞, 药筛后共获得 55 个单细胞克隆, 经过测序显示有 25 个单细胞克隆的 F9 基因发生突变, 计算敲除率为 45.5%。结论: 人和猪 F9 基因具有高度同源性; 构建的 Cas9/sgRNA 表达载体可以高效编辑 PFF 中的 F9 基因。最终获取 F9 基因敲除的单细胞克隆, 为构建乙型血友病巴马小型猪模型奠定了重要的前期工作基础。

[关键词] 血友病乙; F9; CRISPR/Cas9; FIX

[中图分类号] Q785

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2022)01-001-07

doi: 10.7655/NYDXBNS20220101

Efficient construction of Bama minipig F9 gene knockout cell line using CRISPR/Cas9 technology

ZHU Xiaohan, LIU Xiaorui, LI Lin, WANG Ying, YANG Haiyuan*, DAI Yifan*

Jiangsu Key Laboratory of Xenotransplantation, Nanjing Medical University, Nanjing 211166, China

[Abstract] **Objective:** Establishing the F9 gene knockout cell lines of porcine fetal fibroblasts (PFFs) of Bama minipig by CRISPR/Cas9 gene editing technology provides raw materials for the subsequent construction of Bama minipig models of hemophilia B. **Methods:** Firstly, we analyzed the homology of human and pig F9 gene and the similarity of the secondary and tertiary structure of human and pig FIX by bioinformatics method. Secondly, we selected the second exon of pig F9 gene as the targeting region and used online tools (<http://www.e-crisp.org/E-CRISP/designcrispr.html>) to design sgRNA. The pX330 plasmid is used as the backbone to construct targeting vectors, which were then co-transfected with a G418 resistant plasmid into the PFFs of wild Bama miniature pigs. The G418 resistant single-cell colonies were obtained and sequenced. **Results:** Bioinformatics analysis showed that the F9 gene of human and pig had a close phylogenetic distance. The similarity value of the amino acid sequence of FIX and the root mean square deviation (RMSD) value of the three-dimensional structure was 83.33% and 0.149, respectively. A total of 55 resistant single-cell colonies were obtained by G418 screening. Twenty-five single-cell colonies bearing mutations in the F9 gene targeting region have been identified by sanger sequencing, indicating the knockout efficiency was 45.5%. **Conclusion:** The human and pig F9 genes have a high degree of homology. The constructed Cas9/sgRNA expression vectors can efficiently induce mutagenesis in the pig F9 gene. The F9 gene knockout PFF lays an essential foundation for the construction of Bama minipig model of hemophilia B.

[Key words] hemophilia B; F9; CRISPR/Cas9; FIX

[J Nanjing Med Univ, 2022, 42(01):001-007]

[基金项目] 国家自然科学基金(81970164, 81874144)

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

血友病乙(hemophilia B)是一种由缺乏凝血因子IX(factor IX, FIX)而引起的X染色体隐性遗传性出血性疾病,是最常见的先天性出血性疾病之一^[1]。血友病乙在男性中的发病率较高,每10万名男性中约有2.8例发生,无种族或地域差异性^[2]。根据FIX在患者体内的含量,血友病乙被分类为轻度(> 0.05~0.40 U/mL)、中度(0.01~0.05 U/mL)、重度(< 0.01 U/mL)3个等级^[1,3]。FIX又称血浆凝血活酶,是一种维生素K依赖性血浆蛋白酶,由肝脏合成,正常情况下在血浆中以无活性的酶原形式存在。人体内FXIa(activated factor XI, FXIa)及FVIIa(activated factor VII, FVIIa)通过连续切割FIX的p.Arg191-Ala192和p.Arg226-Val227位点,从而使FIX活化。随后,FIXa(activated factor IX, FIXa)与FVIIIa(activated factor VIII, FVIIIa)形成FX(factor X, FX)酶复合物,切割FX的p.Arg182-Ser183和p.Arg234-Ile235位点,使FX活化,参与体内凝血级联反应^[4]。编码FIX的基因F9位于Xq27.1,全长约34 kb,由8个外显子和7个内含子构成,该基因的突变或缺失是血友病乙发病的根本原因^[5]。截至2020年2月,FIX变异体数据库(<http://www.factorix.org/>)已统计血友病乙患者F9基因突变形式有1 244种,包括点突变、插入、缺失等,分布于内含子、外显子和非编码区域,但最常见的突变发生在蛋白编码区,且以点突变为^[5-7]。

血友病乙作为一种基因病,针对其遗传发病机制、基因诊断、基因治疗的研究是当前血友病乙研究的重点,但是这些研究需要有良好的动物模型。目前经典的血友病动物模型有狗和小鼠,但两者与人类亲缘关系远、生理特性不同,不能精准地模拟人类血友病的生理特性和临床表征^[8-9]。猪是除灵长动物以外与人类在进化上亲缘关系最近的物种之一,在遗传、生理生化和疾病发展等方面与人类具有极高的相似性,尤其是凝血系统与人类十分相似,因此是本次血友病乙动物模型构建的良好选择^[10]。

本研究首先通过分析人和猪F9基因的同源性,以及对人和猪FIX二级结构及三级结构的模拟和分析,验证了人和猪FIX的高度同源性。其次以巴马小型猪胎儿原代成纤维细胞(porcine fetal fibroblast, PFF)为原材料,结合CRISPR/Cas9技术,构建F9基因第2外显子突变的单克隆细胞系,为进一步利用体细胞核移植(somatic cell nuclear transfer, SCNT)技术构建血友病乙猪模型提供了原材料。

1 材料和方法

1.1 材料

35 d原代巴马猪胎儿成纤维细胞(PFF)由本组实验室培养。DH5 α 感受态细胞、质粒小提试剂盒、质粒中提试剂盒(北京天根生化科技公司);pX330质粒(Addgene 423230)、Bbs I限制性内切酶、T4 Ligase连接酶(New England Biolabs公司,美国);Basic Nucleofector™ Kits和细胞电转仪(Lonza公司,德国);DMEM培养液,胎牛血清、胰酶、青链霉素双抗和PBS缓冲液(Gibco公司,美国);引物序列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F9基因同源性分析

在NCBI数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)中检索包括人和猪在内的多个物种的F9基因序列,利用MEGA X软件和在线工具iTOL(<https://itol.embl.de/>)绘制系统进化树。此外,搜索FIX的氨基酸序列,利用ClustalX2软件进行人和猪FIX氨基酸序列的比对,再用DNAMAN软件计算两者氨基酸序列的相似值。

1.2.2 人/猪FIX蛋白的结构比较

利用DNASTAR软件中的protein模块分析人和猪FIX蛋白的二级结构,使用Chou-Fasman算法预测人和猪FIX蛋白 α 螺旋、 β 折叠、 β 转角的比例。使用Swiss Model在线工具(<https://www.swissmodel.expasy.org/>)对人和猪FIX蛋白进行三维建模,然后利用pymol软件比较两者三维结构的相似度,得出均方根偏差(root mean square deviation, RMSD)值。

1.2.3 sgRNA的设计

依据NCBI数据库中猪的F9基因序列,利用在线工具Primer3 web(<http://primer3.ut.ee/>)设计包含第2外显子在内的1 kb左右基因序列的PCR引物 exon-2,上游:5'-ACCAAAGCTGCTCTCCTGACTCA-3',下游:5'-TGCTGGCGTAAACCTAGAGT-3',使用巴马猪PFF的基因组DNA作为模板进行扩增,反应体系:50 μ L,反应条件:95 $^{\circ}$ C 5 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 56 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 35个循环; 72 $^{\circ}$ C 7 min; 保存于4 $^{\circ}$ C。通过琼脂糖凝胶电泳观察PCR产物长度,并送南京擎科公司进行测序,以确认巴马猪F9基因第2外显子序列与数据库记载的符合程度。将测序获得的巴马猪F9基因第2外显子序列作为模板,利用CRISPR在线靶点设计工具(<http://www.e-crisp.org/E-CRISP/designcrispr.html>)设计2对25 bp左右

的 sgRNA 寡核苷酸序列,分别命名为 2-sgRNA1、2-sgRNA2,5'末端磷酸化修饰,交由南京金斯瑞公司合成(表1)。

表1 F9基因靶向位点及sgRNA寡核苷酸序列

Table 1 F9 gene targeting loci and sgRNA oligonucleotide sequence

名称	序列(5'→3')
2-sgRNA1 F	CACCGAGGTATAATTCAGGCAAAC
2-sgRNA1 R	AAACGTTTGCCTGAATTATACCTC
2-sgRNA2 F	CACCGCTCCGCATGTGAAGGATGTT
2-sgRNA2 R	AAACAACATCCTTCACATGCGGAGC

1.2.4 CRISPR/Cas9打靶载体的构建

CRISPR/Cas9打靶载体构建主要包括:引物退火、pX330载体酶切、线性化pX330载体与sgRNA连接等步骤。首先,用高压灭菌的去离子水分别将2对寡核苷酸单链稀释成100 μmol/L浓度,然后从正链引物与负链引物中各吸取1 μL,加入8 μL去离子水中。将混合好的10 μL体系,在PCR仪中进行退火操作:37℃ 30 min,95℃ 5 min;结束后以每分钟降5℃的速度降至25℃保持。同时,按照说明书步骤,将pX330载体用*Bbs*I酶进行酶切使其线性化,再分别将线性化的pX330载体与退火的双链sgRNA用T4 Ligase连接酶进行连接。将连接产物转化至大肠杆菌DH5α中,涂板后挑取单菌落进行菌株保存和测序,根据返回的测序结果筛选包含正确打靶载体的菌株,将对应菌株扩大培养后利用无内毒素质粒中提试剂盒进行质粒提取。

1.2.5 细胞培养

原代巴马猪PFF用16% FBS培养约24 h,条件为37℃,5% CO₂。接着用DPBS清洗贴壁细胞,然后使用0.05%胰酶消化约2 min,终止消化后将细胞悬液收集到15 mL离心管,1 200 r/min离心5 min得到细胞沉淀。按照Lonza成纤维细胞转染试剂盒的说明书配制核转液,在核转液中加入适量打靶载体及抗性质粒(pHY54 SV40-neo),用核转染程序U 023转染。转染结束后用2~3 mL 16% FBS培养液重悬细胞并分盘至20个10 cm培养皿中,使每个视野下的细胞数在50个左右。细胞培养皿在恒温培养箱中培养,条件为37℃,5% CO₂^[11]。

1.2.6 单细胞克隆的筛选与鉴定

细胞筛选:细胞培养24 h后,用含有G418药物的培养液进行换液。药物筛选第9天左右,在4倍镜下观察到单细胞克隆,挑选状态佳的单细胞克隆,显微镜下观察其位置,并于培养皿的血底做标

记。去除皿中培养液,DPBS清洗,在标记处放置合适大小的克隆环,用0.25%的胰酶消化约2 min,加入无药培养液中中止消化,转移细胞悬液至24孔板,孔板盖上标记克隆编号和日期。24孔板中的细胞隔日用含G418的培养液进行换液,直至细胞长满皿底,胰酶消化并传代至12孔板(遗留部分细胞在原皿),待12孔板中的细胞长满后,即可冻存备用;遗留在24孔板中的细胞,加入培养液继续培养,长满皿底后提取基因组DNA,用于鉴定单细胞克隆基因型^[12]。

单细胞克隆基因型的鉴定:用0.25%的胰蛋白酶消化24孔板里的细胞,用NP40裂解液裂解细胞,提取基因组DNA,用引物exon-2进行PCR,反应体系50 μL,反应条件:95℃ 5 min;95℃ 30 s,56℃ 30 s,72℃ 30 s,35个循环;72℃ 7 min;保存于4℃。通过琼脂糖凝胶电泳观察PCR产物长度,并将PCR产物送南京擎科公司进行测序。测序结果返回后与野生型序列进行对比,得出每个单细胞克隆的基因型;根据结果去除12孔板中的阴性号,保留阳性号,并进行冻存。

2 结果

2.1 人/猪F9基因同源性分析

利用MEGA X软件和在线工具iTOL绘制系统发育树,结果表明人和猪F9基因遗传距离较近(图1);利用ClustalX2软件对人与猪FIX的氨基酸序列进行比对,结果显示两者FIX氨基酸序列高度一致(图2);接着用DNAMAN软件计算人与猪FIX氨基酸序列的相似值,结果为83.33%。以上结果表明人和猪FIX氨基酸序列具有很高的同源性。

2.2 人/猪FIX结构的比较

利用DNASTAR软件中的protein模块分析人和猪FIX的二级结构,并使用Chou-Fasman算法预测人和猪FIX的α螺旋、β折叠、β转角比例,结果显示,人的FIXα螺旋占26.9%,β折叠占35.8%,β转角占33.8%(图3A);猪的FIXα螺旋占21.2%,β折叠占32.9%,β转角占35.5%(图3B)。由此可见,人和猪FIX具有相似的二级结构。使用Swiss Model在线工具对人和猪FIX进行三维建模,接着利用pymol软件比较两者三维结构的相似度,得出RMSD值为0.149,表明两者在三维结构上亦具有极高的相似性(图3C)。以上结果表明,人/猪FIX具有高度一致的同源性,因此可以推测人/猪FIX在对应的组织内具有相似的生理功能。

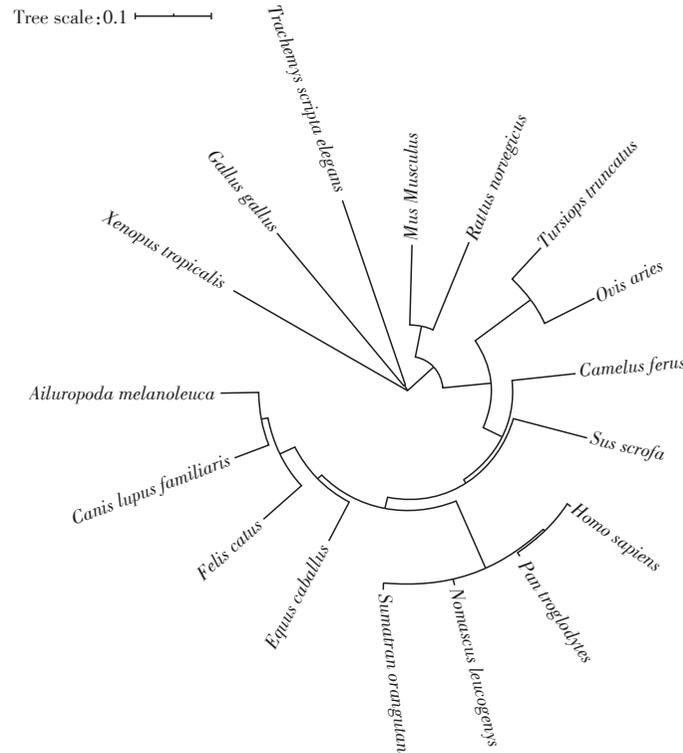
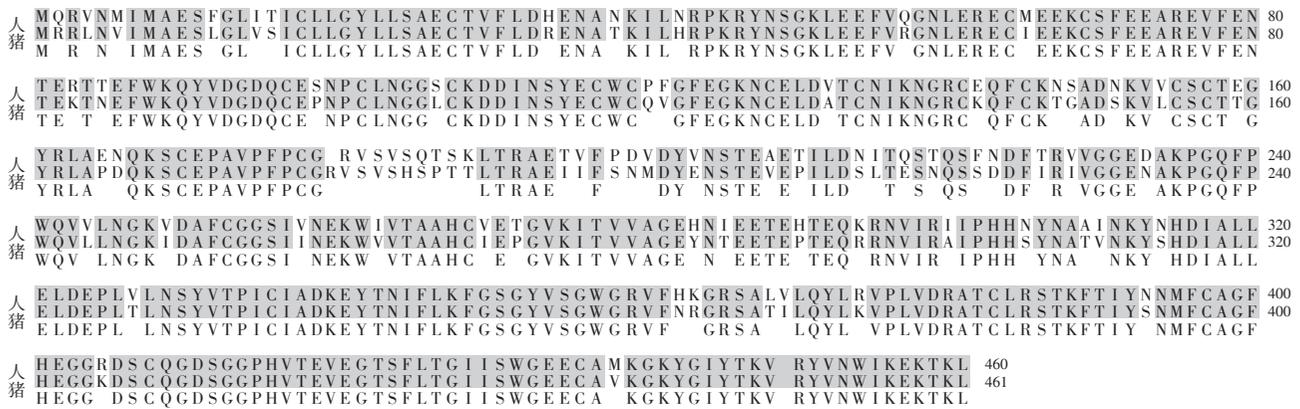


图1 不同物种F9基因系统进化树

Figure 1 Phylogenetic tree of F9 genes in different species



人/猪FIX氨基酸序列的同源性分析。相同氨基酸用灰色阴影表示。

图2 人/猪FIX蛋白氨基酸序列的同源性分析

Figure 2 Homology analysis of amino acid sequence between human/pig FIX protein

2.3 F9基因CRISPR/Cas9靶向载体的构建

依据巴马猪F9基因第2外显子序列,利用在线工具设计2对sgRNA寡核苷酸序列(图4A),退火形成双链后分别与线性化pX330载体连接(图4B)。将连接产物转化至大肠杆菌DH5α中,涂板后挑取单菌落进行摇菌,抽提质粒并送测序,测序结果(图4C、D)表明sgRNA均已成功连接至pX330上。

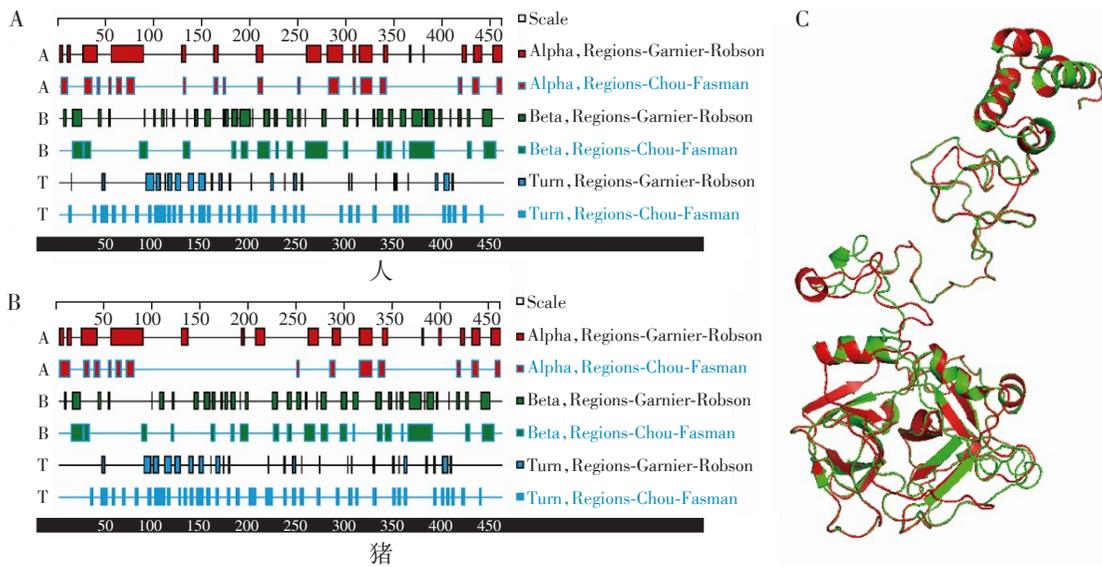
2.4 单细胞克隆的获得和鉴定

野生巴马猪胚胎成纤维细胞转染 pX330-

sgRNA和抗性质粒pHY54 SV40-neo后,经过G418筛选,最终得到单细胞克隆共55个(表2),其中有25个单细胞克隆发生基因突变,敲除率为45.5%;选用敲除号中状态较好的单细胞克隆进行冻存。

3 讨论

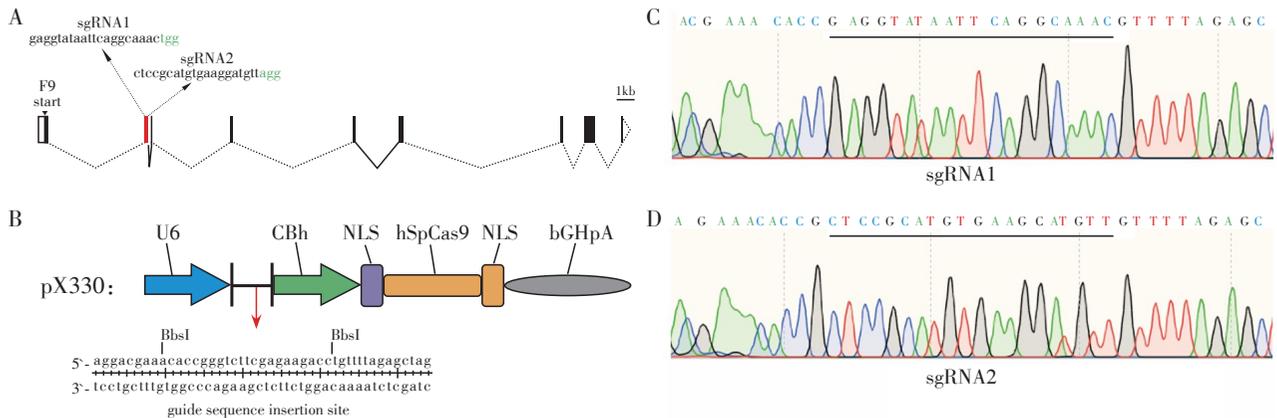
血友病乙是一种与X染色体连锁有关的隐性遗传性凝血功能障碍,主要因F9基因改变致血浆FIX活性缺乏^[7]。大多数患者表现为自发性或轻微



A、B:人/猪FIX二级结构分析,红色表示 α 螺旋,绿色表示 β 折叠,蓝色表示 β 转角;C:人/猪FIX三级结构比较,红色为人FIX三维建模图,绿色为猪FIX三维建模图;RMSD=0.149。

图3 人/猪FIX蛋白质二级结构和三级结构分析

Figure 3 Analysis of FIX protein secondary and three-dimensional structures between human and pig



A:巴马猪F9基因靶点示意图,红色区域为2号外显子;箭头所指的灰色序列为靶序列,绿色序列为Cas9识别的PAM序列;B:pX330载体示意;C、D:重组载体示意图,黑色划线处为插入序列。

图4 F9基因靶点和重组载体测序

Figure 4 Targets of F9 gene and sequencing of recombinant vectors

创伤后出血不止,以及长期反复出血导致的关节畸形和躯体残疾等。中国血友病患者率为3.6/10万,其中,血友病乙所占比例为16.13%^[13]。由于中国人口基数大,新增人口多,血友病乙仍是影响众多家庭的遗传疾病之一。目前血友病的治疗方式包括输注凝血因子制品、药物辅助治疗及正处于探索阶段的基因治疗术。疾病动物模型是研究血友病致病机制和治疗策略的重要工具。因此,建立一个与人类血友病乙生物特性和临床表征相近的动物模型显得尤为重要^[14-15]。

第1例血友病乙动物模型形成于二十世纪八十

年代,美国Chapel Hill鉴定出患有血友病乙的狗,其发病机制及临床病理表现与人类血友病乙极为相似。二十世纪末,Monahan等^[16]提出将其用于血友病治疗的临床前动物试验。基因工程技术推动了血友病乙动物模型的研究和应用。1997年,Lin等^[17]利用胚胎干细胞基因打靶的方式获得第一例血友病乙小鼠模型。二十一世纪以来,基因编辑技术飞速发展,基于DNA双链断裂(double-strand break, DSB)激活细胞内部修复机制的工程化核酸酶基因编辑技术逐渐成为基因编辑技术的主流。2013年,Cong等^[18]利用规律成簇的间隔短回文重复

表2 F9敲除单细胞克隆基因型
Table 2 Genotypes of F9 knockout single cell clones

序号	目的片段	类型
WT	...CAAAGAGGTATAATTCAGGCAAACCTGGA//ACCTAACATCCTTCACATGCGGAGCAAA...	WT
1	...CAAT C AGGCATAATTCA A GCA-----//ACCTAACATCCTTCACATGCGGAGCAAA...	-11 bp
2	...CAAAGAGGTATAATTCAGGCAAA A CTGT G GGA//ACCTAACATCCTTCACATGCGGAGCAAA...	+2 bp
3	...CAAAGAGGTATAATTCAGGCA-----//.....TCCTTCACATGCGGAGCAAA...	-121 bp
4	...CAAAGAGGTATAATTCAGGCA-----//.....TCCTTCACATGCGGAGCAAA...	-121 bp
5	...CAAAGAGGTATAATTCAGGCA-----//.....TCCTTCACATGCGGAGCAAA...	-121 bp
6	...CAAAGAGGTATAATTCAGGCA//..... AAGAA ...	-117 bp
7	...CAAAGAGGTATAATTCAGGCAA-----//.....TCCTTCACATGCGGAGCAAA...	-120 bp
8	...CAAAGAGGTATAATTCAGGCAA-----//.....TCCTTCACATGCGGAGCAAA...	-120 bp
9	...CAAAGAGGTATAATTCAGGCAAACCTGGA//-----TTCACATGCGGAGCAAA...	-11 bp
10	...CAAAGAGGTATAATTCAGGCAA-----//.....TCCTTCACATGCGGAGCAAA...	-120 bp
11	...CAAAGAGGTATAATTCAGGCAA-----//.....TCCTTCACATGCGGAGCAAA...	-120 bp
12	...CAAAGAGGTATAATTCAGGCA-----//.....TCCTTCACATGCGGAGCAAA...	-121 bp
13	...CAAAGAGGTATAATTCAGGCAA-CTGGA// ACCTAACATCCTTCACATGCGGAGCAAA...	-1 bp
14	...CAAAGAGGT AACGCCGGAT -----//ATGCGGAGCAAA...	+9 bp, -140 bp
15	...CAAAGAGGTATAATTCAGGCAAA A CTGGA// ACCTAACATC-TTCACATGCGGAGCAAA...	+1 bp, -1 bp
16	...CAAAGAGGTATAATTCAGGCA-----//.....TCCTTCACATGCGGAGCAAA...	-121 bp
17	...CAAAGAGGTATAATTCAGGCAA-----//.....TCCTTCACATGCGGAGCAAA...	-120 bp
18	...CAAAGAGGTAT-----//.....TCCTTCAC G TGG C TGCAAA...	-132 bp
19	...CAAAGAGGTATAATTCA----AACTGGA// ACCTAAC---CTTCACATGCGGAGCAAA...	-7 bp
20	...CAAAGAGGTATAAT-----//.....ATCCTTCACATGCGGAGCAAA...	-127 bp
21	...CAAAGAGGTATAATTCAGGCAA-----//.....TCCTTCACATGCGGAGCAAA...	-120 bp
22	...CAAAGAGGTATAATTCAGGC---CTGGA// ACCTAACATCCTTCACATGCGGAGCAAA...	-3 bp
23	...CAAAGAGGTATAATTC-----TGGA// ACCTAACATCCTTCACATGCGGAGCAAA...	-8 bp
24	...CAAAGAGGTATAATTCAGGCAAA A CTGGA// ACCTAAC A TCCTTCACATGCGGAGCAAA...	+2 bp
25	...CAAAGAGGTATAATTCAGGCAA-CTGGA// ACCTAAC A ACCTTCACATGCGGAGCAAA...	-1 bp, +1 bp

首行加黑加粗处为靶序列;WT为野生型;+为增加;-为删除;红色字母为突变的碱基;蓝色字母为增加的碱基。

序列相关核酸酶(CRISPR/Cas9)技术在鼠和人类细胞中实现了基因编辑,开启了基因编辑技术新篇章。此后,利用CRISPR/Cas9技术构建的血友病动物模型,尤其是多种小鼠血友病模型得到了极大的发展,为研究血友病提供了便利。

然而,小鼠与人类之间存在明显的物种差异,并非构建血友病动物模型的最佳选择,深入研究血友病亟需一个与人类生理、病理情况更为相似的动物模型。猪在遗传背景、生理特点及疾病发生发展等方面具有小鼠无法比拟的优势,且猪的凝血系统与人类极为相似,更符合血液病动物模型的需求。本研究通过分析人和猪F9的遗传距离,以及对人和猪FIX氨基酸序列、蛋白质二级结构及三级结构的模拟与分析,揭示了人与猪FIX的高度同源性。因此,猪是构建血友病乙动物模型的良好选择。此外,本课题组利用CRISPR/Cas9技术结合体细胞核移植

技术成功构建了多个猪模型。2015年Chen等^[19]构建的3只B细胞缺陷仔猪;2018年Zhang等^[12]构建的GGTA1、CMAH和β4GalNT2三基因敲除猪;2019年Yao等^[20]构建的听力缺陷猪。以上成果表明了CRISPR/Cas9技术在构建基因修饰猪方面的可行性和便捷性。本研究利用2个sgRNA对巴马小型猪的胎儿成纤维细胞的F9基因进行打靶。CRISPR/Cas9表达质粒转染细胞后经过药物筛选,获得55个单细胞克隆。基因型分析显示其中有25个单细胞克隆在靶点处发生了基因突变[(包含15个大片段缺失(>100 bp),8个小片段缺失(<100 bp),5个碱基的插入,4个碱基的突变)],敲除效率高达45.5%。本研究结果显示在进行基因敲除时,在靶点处使用2个sgRNA是较为理想的选择。

综上,本研究通过高效的CRISPR/Cas9打靶载体成功获得了巴马小型猪F9基因敲除细胞系,为接

下来构建血友病乙巴马小型猪模型提供了重要的原材料。

[参考文献]

- [1] LJUNG R. How I manage patients with inherited haemophilia A and B and factor inhibitors [J]. *Br J Haematol*, 2018, 180(4):501-510
- [2] STOOFF S, KERSSEBOOM R, DE VRIES F, et al. Hemophilia B in a female with intellectual disability caused by a deletion of Xq26.3q28 encompassing the F9 [J]. *Mol Genet Genomic Med*, 2018, 6(6): 1220-1224
- [3] DOLAN G, BENSON G, DUFFY A, et al. Haemophilia B: where are we now and what does the future hold? [J]. *Blood Rev*, 2018, 32(1):52-60
- [4] GOODEVE A C. Hemophilia B: molecular pathogenesis and mutation analysis [J]. *J Thromb Haemost*, 2015, 13(7):1184-1195
- [5] 王朝荣,余自强,孙玲,等. 40例血友病乙患者的基因分析及发病机制研究[J]. *中国实验血液学杂志*, 2013, 21(4):963-968
- [6] GAO W, XU Y, LIU H, et al. Characterization of missense mutations in the signal peptide and propeptide of FIX in hemophilia B by a cell-based assay [J]. *Blood Adv*, 2020, 4(15):3659-3667
- [7] HUANG L, LI L, LIN S, et al. Molecular analysis of 76 Chinese hemophilia B pedigrees and the identification of 10 novel mutations [J]. *Mol Genet Genomic Med*, 2020, 8(11):e1482
- [8] 李杰,闫振宇.血友病鼠模型的构建及研究进展[J]. *中国比较医学杂志*, 2019, 29(6):141-146
- [9] NICHOLS T C, HOUGH C, AGERSØ H, et al. Canine models of inherited bleeding disorders in the development of coagulation assays, novel protein replacement and gene therapies [J]. *J Thromb Haemost*, 2016, 14(5): 894-905
- [10] WATSON A L, CARLSON D F, LARGAESPADA D, et al. Engineered swine models of cancer [J]. *Front Genet*, 2016, 7:78
- [11] 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
- [12] ZHANG R, WANG Y, CHEN L, et al. Reducing immunoreactivity of porcine bioprosthetic heart valves by genetically - deleting three major glycan antigens, GGTA1/ β 4GalNT2/CMAH [J]. *Acta Biomater*, 2018, 72:196-205
- [13] QU Y, NIE X, YANG Z, et al. The prevalence of hemophilia in mainland China: a systematic review and meta-analysis [J]. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 2014, 45(2):455-466
- [14] SHARMA A, EASOW M M, SRIGANESH V, et al. Gene therapy for haemophilia [J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2016, 12(12):CD010822
- [15] WANG D, WANG K, CAI Y. An overview of development in gene therapeutics in China [J]. *Gene Ther*, 2020, 27(7/8):338-348
- [16] MONAHAN P E, SAMULSKI R J, TAZELAAR J, et al. Direct intramuscular injection with recombinant AAV vectors results in sustained expression in a dog model of hemophilia [J]. *Gene Ther*, 1998, 5(1):40-49
- [17] LIN H F, MAEDA N, SMITHIES O, et al. A coagulation factor IX-deficient mouse model for human hemophilia B [J]. *Blood*, 1997, 90(10):3962-3966
- [18] CONG L, RAN F A, COX D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems [J]. *Science*, 2013, 339(6121):819-823
- [19] 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
- [20] YAO J, ZENG H, ZHANG M, et al. OSBPL2-disrupted pigs recapitulate dual features of human hearing loss and hypercholesterolaemia [J]. *J Genet Genomics*, 2019, 46(8):379-387

[收稿日期] 2020-10-26

(本文编辑:蒋莉)