

# 体外定点突变体或 CRISPR/Cas9 介导的敲入突变体快速筛选方法的建立

宋春林<sup>1</sup> 张雨晴<sup>1</sup> 翟玉静<sup>2</sup> 张刚<sup>1</sup> 王颖<sup>2</sup>

(青岛大学, 山东 青岛 266071 1 肿瘤精准医学研究院; 2 公共卫生学院)

**[摘要]** 目的 探讨建立一种体外定点突变体或 CRISPR/cas9 介导的敲入突变体的快速筛选方法,以提高突变体筛选效率,降低实验成本。方法 针对构建的体外定点突变体或 CRISPR/Cas9 介导的敲入突变体,采用 3' 端第 1、2 和 3 个核苷酸分别与突变序列相匹配的筛选引物进行聚合酶链式反应(PCR),通过琼脂糖凝胶电泳检测是否有特异性扩增条带。结果 利用特异性突变筛选引物进行 PCR 在正确的突变体中有效地扩增出了 DNA 条带,而在未成功突变的样本中则无法扩增,琼脂糖凝胶电泳显示有 DNA 扩增条带,证明正确突变体筛选成功。结论 本研究建立的突变体快速筛选方法能够简便快速地筛选出正确突变体,明显简化了突变体的鉴定过程,可有效降低实验成本,提高工作效率。

**[关键词]** 聚合酶链反应; 诱变, 定点; 突变; CRISPR/Cas9; 基因敲入技术; 诱变力试验

**[中图分类号]** R394 **[文献标志码]** A

**ESTABLISHMENT OF A RAPID SCREENING METHOD FOR *IN VITRO* SITE-DIRECTED MUTANTS OR CRISPR/Cas9-MEDIATED KNOCK-IN MUTANTS** SONG Chunlin, ZHANG Yuqing, ZHAI Yujing, ZHANG Gang, WANG Ying (Institute of Tumor Precision Medicine, Qingdao University, Qingdao 266071, China)

**[ABSTRACT]** **Objective** To establish a rapid screening method for *in vitro* site-directed mutants or CRISPR/Cas9-mediated knock-in mutants, and to improve mutant screening efficiency and reduce experimental costs. **Methods** Polymerase chain reactions (PCRs) were carried out with primers designed with the last one, two, and three nucleotides in the 3' end matching the mutated DNA sequences for the constructed *in vitro* site-directed mutants or CRISPR/Cas9-mediated knock-in mutants, and agarose gel electrophoresis was used to detect specific amplification bands. **Results** PCR using specific mutation screening primers effectively amplified DNA bands in correct mutants but failed in unsuccessfully mutated samples. The presence of DNA amplification bands revealed by agarose gel electrophoresis confirmed the successful screening for desired mutants. **Conclusion** The rapid screening method for mutants introduced in this study can easily and quickly identify correct mutants, which significantly simplifies the identification process of mutations, and thereby reduces experimental costs and improves work efficiency.

**[KEY WORDS]** Polymerase chain reaction; Mutagenesis, site-directed; Mutation; CRISPR/Cas9; Gene knock-in techniques; Mutagenicity tests

通过引入突变进行基因功能的研究是常用的实验方法,基因突变可以发生在细胞内或细胞外。目前,鉴定突变体的通用方法是通过聚合酶链式反应(PCR)扩增含有突变位点的基因组 DNA 片段,然后进行 DNA 测序以确定突变是否成功,实际操作成本高且耗时长<sup>[1]</sup>。使用传统方法在基因组上实现基因突变的难度很高,近年来 CRISPR/Cas9 系统在基因编辑中的成功应用为实现基因突变提供了更快捷精准的手段<sup>[2-5]</sup>。然而,CRISPR/Cas9 系统介导的基因组定点突变的效率受到多种因素影响,包括细胞类型、基因拷贝数、突变类型以及基因组位点等<sup>[6-8]</sup>,科研成本相对较高。

为了解决基因定点突变的鉴定问题,本研究旨

在构建一种使用突变引物进行 PCR 扩增的突变体筛选方法,即在引物 3' 端的 1~3 个碱基处引入与突变序列相匹配的核苷酸,分别检验它们对细胞外和细胞内突变的检测效率。相较于传统的测序方法,该方法可快速高效地检测正确的体外定点突变体或 CRISPR/Cas9 介导的敲入突变体,可简化实验步骤,达到有效提高筛选效率和节省实验成本的目的。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料及试剂

HCT116 和 LN299 细胞购自中国科学院苏州生物研究创新中心;DH5 $\alpha$  大肠杆菌细胞购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司;胎牛血清购自美国 BI 公司;胰蛋白酶、DMEM 培养基、青链霉素混合液和转染试剂 Lipofectamine 2000 购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司;单链寡核苷酸(ssODN)

购自美国 IDT 公司。

### 1.2 细胞培养

DH5 $\alpha$  大肠杆菌细胞培养于含 50 mg/L 氨苄青霉素的 LB 培养基中,置于 37  $^{\circ}$ C 恒温培养箱中培养。HCT116 和 LN299 细胞培养于含体积分数 0.1 的胎牛血清和含有抗生素(青霉素 10 kU/L,链霉素 0.01 g/L)的 DMEM 培养基中,置于 37  $^{\circ}$ C、含体积分数 0.05 CO $_2$  的恒温培养箱中常规培养,以备后续实验使用。

### 1.3 体外定点突变体的构建

使用含有突变位点的引物对于包含有目标基因的质粒进行定点突变 PCR。PCR 反应的总体积为 25  $\mu$ L:0.5  $\mu$ L 模板(质量浓度  $5 \times 10^{-5}$  g/L),1  $\mu$ L 引物(每条,摩尔浓度为 10  $\mu$ mol/L),2  $\mu$ L dNTPs,1.5  $\mu$ L MgSO $_4$ ,2.5  $\mu$ L 10  $\times$  PCR Buffer,0.5  $\mu$ L KOD-Plus-Neo(TOYOB0,日本)和 16  $\mu$ L ddH $_2$ O。反应条件为:94  $^{\circ}$ C 预变性 3 min;然后 98  $^{\circ}$ C 变性

15 s,51  $^{\circ}$ C 退火 30 s,68  $^{\circ}$ C 延伸 4 min,共进行 34 个循环;最后 68  $^{\circ}$ C 延伸 5 min。PCR 反应结束后加入 1  $\mu$ L DpnI,37  $^{\circ}$ C 孵育 1 h 以消化 PCR 反应体系中的质粒模板,后将 PCR 产物转化大肠杆菌感受态细胞 DH5 $\alpha$  涂平板后,于 37  $^{\circ}$ C 恒温培养箱过夜培养至形成单菌落,次日挑选单菌落进行菌落 PCR,鉴定正确突变体。本研究所用引物均由上海生工生物工程股份有限公司合成,引物序列见表 1。

### 1.4 体外定点突变体的筛选

菌落 PCR 反应的总体积为 7  $\mu$ L:1  $\mu$ L 引物(每条,浓度为 10  $\mu$ mol/L),3.5  $\mu$ L 的 2  $\times$  Taq Plus Master Mix II(Vazyme,中国)和 1.5  $\mu$ L 的 ddH $_2$ O。反应条件为:94  $^{\circ}$ C 预变性 3 min;然后 94  $^{\circ}$ C 变性 30 s,62  $^{\circ}$ C 退火 30 s,72  $^{\circ}$ C 延伸 2 min,共进行 34 个循环;最后 72  $^{\circ}$ C 延伸 5 min。PCR 反应产物进行琼脂糖凝胶电泳观察是否有 DNA 扩增条带。引物序列见表 1。

表 1 引物序列和 ssODN 序列

引物或 ssODN	正向序列(5'→3')	反向序列(5'→3')
VRK1 RNAi resistant	CTGACATGGCAAAAAAGGAGTGGAAGGTGG-GCTTGCCCATGGCCAAGGAG	CTCCTTGGCCAATGGGCAAGCCACCTTCCAC-TCCTTTTTTGGCATGTGACG
BubR1 L669A/I672A	CTCTCAGCATCAAGAAGGCGAGCCAGCTAT-TGAAGACAGTCGTGAAGC	GCTTCACGACTGTCTTCAATAGCTGGGCTCGC-CTTCTTGATGCTGAGAG
Cdc20 C165E	CCAGCCGCAAAAACGGAACGATATATTCCTTC	GAAGGAATATATCGTTCCGTTTTGCGGCTGG
VRK1 RNAi resistant screening	CATGGCAAAAAAGGAG	CATAGGATCCTTACTTCTGGACTCTCTTTCTGG
BubR1 L669A/I672A screening	TCAGCATCAAGAAGGC	GATCGCGCCGCTCACTGAAAGAGCAAAGC
Cdc20 C165E screening	CAGCCGCAAAAACGGAA	GCTAGCGCCGCTCAGCGGATGCCTTG
HDAC1-1	CATCCGTCCAGATAACATGA	TGTGGTCAGCAGCAACAAAAC
HDAC1-2	CATCCGTCCAGATAACATGAG	TGTGGTCAGCAGCAACAAAAC
HDAC1-3	CATCCGTCCAGATAACATGAGT	TGTGGTCAGCAGCAACAAAAC
HDAC1-1-2	CATCCGTCCAGATAACATCA	TGTGGTCAGCAGCAACAAAAC
HDAC1-1-3	CATCCGTCCAGATAACAAGA	TGTGGTCAGCAGCAACAAAAC
HDAC1-1-4	CATCCGTCCAGATAACGTGA	TGTGGTCAGCAGCAACAAAAC
HDAC1-1-5	CATCCGTCCAGATAATATGA	TGTGGTCAGCAGCAACAAAAC
c-Jun	CTTTCCCTGTCAAAGGCTCC	GACTCCATGTGCATAGCGCT
HDAC1 ssODN	ATGACTACATTAATTTCTTGGCTCCATCCGTCCAGATAACATGAGTGAGTTCAGCAAGCAGA-TGCAGAGATGTAAGTCCATTCTGTTCCCTCACACTTGAA	
c-Jun ssODN	TTCTCTCCGCTTGATCCGCTCCTGGGACTCCATGTGATAGCGCTCAGGGGCGGTGTCTCGCC-GGGCATCTCGGGCACTGTCTGA	
HDAC1 gRNA	CCATCCGTCCAGATAACATGT	
c-Jun gRNA	ATGTGATGGGGACAGGGG	

### 1.5 CRISPR/Cas9 介导的敲入突变体的构建

以 PX459 为载体构建靶向 *c-Jun* 外显子 1 的质粒。以单链寡核苷酸为模板 DNA,在基因组中引入 P244A 突变。首先将饱和度 40% 的 HCT116 细胞接种于 6 孔板上;次日将 PX459 和模板 DNA 各 2  $\mu$ g 加入到 Lipofectamine 2000 中进行细胞转染;24 h 后加入 1 mg/L 嘌呤霉素进行筛选,筛选 48 h 后用普通 DMEM 培养基继续培养细胞至形成单克

隆,以备用于后续基因组 DNA 提取。同样的方法也应用于 LN299 细胞 HDAC1 的 Y87F 突变。

### 1.6 基因组 DNA 的提取

收集约 100 000 个 LN299 或者 HCT116 细胞,PBS 缓冲液洗涤以后重悬于 150  $\mu$ L 的 5 mmol/L Tris-HCl (pH 8.8)中,95  $^{\circ}$ C 孵育 10 min。细胞裂解液冷却至室温后,加入 30  $\mu$ g 蛋白酶 K,56  $^{\circ}$ C 孵育 30 min 以后,95  $^{\circ}$ C 孵育 10 min。以 13 000 r/min 离

心 2 min, 将含有基因组 DNA 的上清液转移到新的离心管中, 于  $-20^{\circ}\text{C}$  保存, 以备用于后续的基因组 PCR 鉴定。

### 1.7 CRISPR/Cas9 介导的敲入突变体的筛选

以 200 ng HCT116 或 LN299 基因组 DNA 为模板, 使用 3' 端最后 1、2 或 3 个核苷酸与突变序列相匹配的筛选引物 (HDAC1-1、HDAC1-2、HDAC1-3) 进行基因组 PCR。反应体系为 12  $\mu\text{L}$ : 2  $\mu\text{L}$  模板, 1  $\mu\text{L}$  引物 (每条, 浓度为 10  $\mu\text{mol/L}$ ), 6  $\mu\text{L}$  的 2 $\times$ Taq Plus Master Mix II 和 2  $\mu\text{L}$  的 ddH<sub>2</sub>O。反应条件为: 94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 3 min; 然后 94  $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s, 64  $^{\circ}\text{C}$  退火 30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 1 min, 共进行 34 个循环; 最后 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 5 min。基因组 PCR 反应产物进行琼脂糖凝胶电泳观察是否有扩增条带。其后通过提高退火温度和引物的 3' 端引入新突变的方法进一步优化 HDAC1-1 引物的检测特异性。引物序列见表 1。

### 1.8 DNA 测序

按照 1.6 中的方法提取 HCT116 或 LN299 细胞基因组 DNA, 使用位于预期敲入位点的上游和下游约 200 bp 处的引物进行 PCR 扩增, 对扩增产物进行测序。引物序列见表 1。

### 1.9 不同 DNA 聚合酶扩增效率的检验

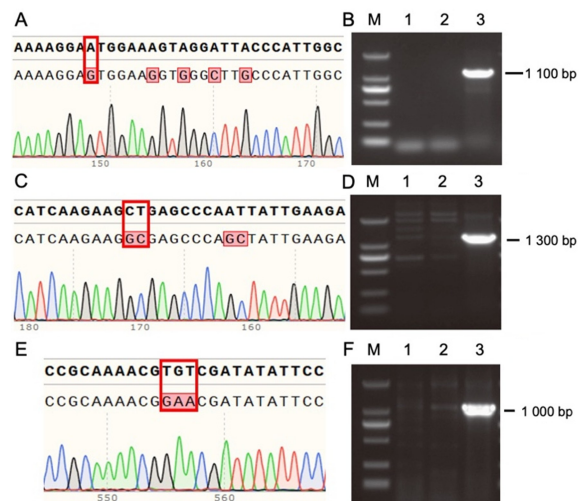
分别使用普通 Taq 酶 2 $\times$ Hieff<sup>®</sup> PCR Master Mix with dye (YEASEN 公司, 中国)、2 $\times$ Taq Plus Master Mix II dye plus (Vazyme 公司, 中国)、高保真 DNA 聚合酶 2 $\times$ Hieff Canace<sup>®</sup> Plus PCR Master Mix with dye (YEASEN 公司, 中国)、2 $\times$ Phanta Flash Master Mix dye plus (Vazyme 公司, 中国)、KOD One<sup>™</sup> PCR Master Mix (TOYOBO 公司, 日本) 对突变体进行 PCR 检测, 通过比较扩增条带的强度确定不同 DNA 聚合酶的扩增效率。

## 2 结 果

### 2.1 细胞外突变的检测结果

使用 3' 端包含突变基因序列的正向引物和下游 DNA 序列的反向引物, 分别检测了构建在 pcDNA5/FRT/To 载体上 3 个基因的定点突变。第一个是 VRK1 基因发生了抗 RNA 干扰突变: 分别以正确突变基因和未成功突变基因的菌落为模板, 使用 3' 端与第 1 个突变位点 (A $\rightarrow$ G) 匹配的正向引物 (5'-CATGGCAAAAAGGAG-3') 和下游 DNA 序列的反向引物进行菌落 PCR 反应, 正确突变基因的 PCR 反应产物进行琼脂糖凝胶电泳显示有大小约

为 1 100 bp 的强 DNA 扩增条带, 未成功突变基因则没有扩增条带 (图 1A、B); 第 2 个是 *BubR1* 基因发生 L669A/I672A 突变: 分别以正确突变基因以及未成功突变基因的菌落为模板, 使用 3' 端与突变位点 (CT $\rightarrow$ GC) 匹配的正向引物 (5'-TCAGCAT-CAAGAAGGC-3') 和下游 DNA 序列的反向引物进行菌落 PCR 反应, 正确突变基因的 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳, 显示有大小约 1 300 bp 的强信号条带, 未成功突变基因则没有扩增条带 (图 1C、D); 第 3 个是 *Cdc20* 基因发生 C165E 突变: 分别以正确突变基因和未成功突变基因的菌落为模板, 使用 3' 端与突变位点 (TGT $\rightarrow$ GAA) 匹配的正向引物 (5'-CAGCCGCAAAAACGGAA-3') 和下游 DNA 序列的反向引物进行菌落 PCR 反应, 正确突变基因的 PCR 反应产物进行琼脂糖凝胶电泳, 显示有大小约 1 000 bp 的强信号条带, 未成功突变基因则没有扩增条带 (图 1E、F)。



A: 野生型 VRK1 (顶部序列) 和抗 RNA 干扰的 VRK1 突变序列 (底部序列) 对比, 红色框内表示正向引物 3' 端与突变序列匹配的位置 (C、E 中同); B: 携带野生型 VRK1 质粒的菌落 (第 1、2 泳道) 和突变型 VRK1 质粒的菌落 (第 3 泳道) 的 PCR 扩增结果; C、E: 野生型 *BubR1* 或 *Cdc20* (顶部序列) 和其对应突变型 (底部序列) 的 DNA 序列对比; D、F: 野生型质粒的菌落 (第 1、2 泳道) 和突变型质粒的菌落 (第 3 泳道) 的 PCR 扩增结果

图 1 使用菌落 PCR 进行细胞外突变的检测

### 2.2 细胞内突变的检测结果

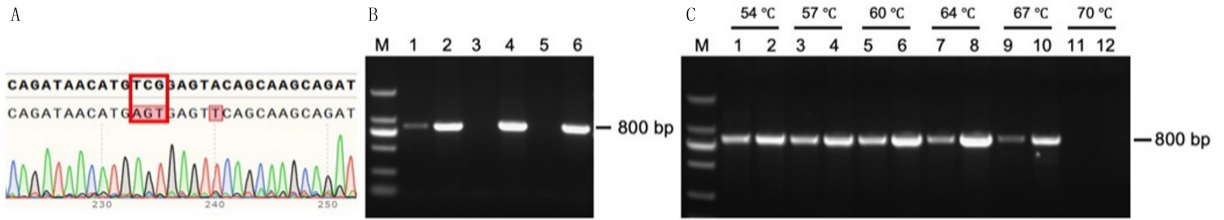
当使用只有一个核苷酸匹配突变序列的引物 HDAC1-1 时, 亲本基因组扩增得到弱信号条带, 同时敲入基因组扩增出强信号条带; 使用 HDAC1-2、HDAC1-3 时, 只有敲入突变基因组产生强信号的条带, 亲本基因组无扩增 (图 2A、B)。进一步优化 HDAC1-1 引物的检测特异性发现, 升高退火温度, 敲入突变基因组与亲本基因组条带的强度比不断增

加,当退火温度设置为 70 °C 时,两者的扩增均告失败(图 2C)。

进一步优化实验显示,在只有 1 个核苷酸与突变序列匹配的引物的 3' 端倒数第 2、3 和 4 位分别引

入新的突变,也能够提高反应的特异性(图 3)。

最后,采用该方法成功地筛选出在 HCT116 细胞的 *c-Jun* 基因上发生 P244A(CCC→GCT) 敲入突变成功的克隆(图 4A、B)。



A: *HDAC1* 野生型(顶部)与突变型(底部)的序列比对; B: 野生型 *HDAC1* 的亲本细胞基因组(第 1、3、5 泳道)和 *HDAC1* Y87F 敲入突变细胞基因组(第 2、4、6 泳道)PCR 结果, 1 与 2、3 与 4、5 与 6 泳道的反应分别使用 *HDAC1*-1、*HDAC1*-2、*HDAC1*-3 引物; C: 优化 *HDAC1*-1 引物的退火温度的结果, 第 1、3、5、7、9 和 11 泳道为野生型 *HDAC1*, 第 2、4、6、8、10 和 12 泳道为突变型 *HDAC1*

图 2 以亲本 LN299 和 *HDAC1* Y87F 敲入突变的细胞基因组细胞内突变的检测结果

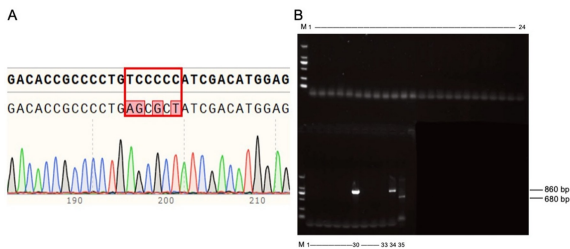


野生型 *HDAC1* 的亲本细胞基因组(第 1、3、5、7、9 泳道)和 *HDAC1* Y87F 敲入突变基因组(第 2、4、6、8、10 泳道)的 PCR 扩增结果; 1 与 2、3 与 4、5 与 6、7 与 8、9 与 10 泳道分别使用 *HDAC1*-1、*HDAC1*-1-2、*HDAC1*-1-3、*HDAC1*-1-4 和 *HDAC1*-1-5(倒数第 5 位引入新突变)引物

泳道 1、3、5、7、9 使用 HCT116 *c-Jun* 野生型细胞基因组 DNA 为模板, 泳道 2、4、6、8、10 为 HCT116 *c-Jun* P244A 敲入突变细胞基因组 DNA 为模板; 第 1、2 和 9、10 泳道使用 YEASEN 和 Vazyme 的普通 Taq 酶, 第 3~8 泳道分别使用 YEASEN、Vazyme 和 TOYOBO 的高保真 DNA 聚合酶

图 3 引物倒数第 1~5 位分别引入突变对于 PCR 特异性影响

图 5 不同 DNA 聚合酶的扩增效率对比



A: 野生型(顶部)与突变型 *c-Jun*(底部)的 DNA 序列比对; B: 使用 3' 端含有 4 个突变核苷酸的反向引物, 对 32 个细胞株(1~32 泳道)进行基因组 PCR, 33~35 泳道分别为亲本细胞、敲入后的混合细胞和 *c-Jun* 阳性对照的 PCR 扩增结果

图 4 携带敲入突变细胞株的筛选

### 2.3 不同 DNA 聚合酶检测效率的比较

为提高该方法的扩增效率, 本研究比较了 5 种不同 DNA 聚合酶对于突变体检测的效率, 结果表明普通的 Taq 酶较高保真 DNA 聚合酶, 更适用于突变克隆的筛选(图 5)。

地应用, 这个问题变得越来越突出。因此, 设计新的方法以提高突变克隆鉴定效率具有极高的应用价值。例如, 可以在引入目的突变的同时引入限制性内切酶识别位点, 从而间接识别阳性克隆。然而, 大多数基因无法在引入限制性内切酶识别位点的同时保持所编码的氨基酸不变, 从而极大地限制了该方法的应用。

本研究借鉴了疾病诊断中常用的基于 PCR 反应的突变检测方法, 并进行了针对性的优化, 来快速筛选带有目的突变的阳性克隆。本研究中首先使用克隆在质粒上的含有定点突变的 *VRK1*、*BubR1* 和 *Cdc20* 基因来检测该方法能否有效鉴定细胞外突变。 *VRK1* 参与包括细胞周期的起始、 $G_2/M$  期的染色质浓缩、高尔基体断裂和有丝分裂中的核膜组装等多个过程, 多种肿瘤中均能够检测到其过度表达<sup>[9-11]</sup>。 *BubR1* 和 *Cdc20* 是介导纺锤体组装检查点激活的关键成分, 在哺乳动物中高度保守, 其表达水平与纺锤体组装检查点功能之间存在剂量依赖性效应<sup>[12-15]</sup>。本研究在引物的 3' 端分别设计了与突变序列相匹配的第 1、2、3 个碱基, 菌落 PCR 结果显示该方法可有效扩增携带有突变型的质粒, 而野生型

## 3 讨 论

DNA 突变是研究基因功能的常用方法, 但通过 DNA 测序找到正确的突变体往往需要耗费大量时间和金钱, 尤其是在突变成功率偏低的情况下。随着 CRISPR/Cas9 介导的敲入突变方法越来越广泛

无 PCR 产物。

本研究进一步使用了 HDAC1 Y87F 和 *c-Jun* P244A 敲入突变细胞系以验证该方法检测基因组 DNA 敲入突变的效率。HDAC1 基因编码的蛋白质属于组蛋白脱乙酰酶家族,在真核基因表达的调控中起着关键作用<sup>[16-17]</sup>。*c-Jun* 参与包括细胞增殖、凋亡、存活、肿瘤发生和组织形态发生等多种细胞活动。有研究表明细胞外信号可以诱导 *c-Jun* 的翻译后修饰,从而导致转录活性和靶基因表达的改变<sup>[18-20]</sup>。为了保护供体 DNA 不会被 Cas9 内切酶重复切割,在不改变编码氨基酸的情况下,分别对模板 DNA 上的 PAM 序列进行了同义突变(TCG→AGT,TC→AG)。结果显示,在引物的 3'端引入与突变序列相匹配碱基可有效区分亲本和敲入突变基因组。

以上结果证实无论是细胞内还是细胞外突变,该方法只需要增加一步菌落 PCR 或者基因组 PCR 即可成功筛选阳性克隆,对一个或几个阳性克隆进行测序即可获得所需的突变体,显著地提高了突变体筛选的效率。本研究还进一步优化了 PCR 的退火温度,引入额外的突变位点增加该方法的特异性,并考察了不同 DNA 聚合酶的应用效果。

基于本研究的结果,为提高该方法的扩增效率和特异性,我们提出以下建议:①使用普通的 Taq 酶。②尽量使用 3'端含有 2 或 3 个甚至更多的与突变序列匹配的引物进行克隆的快速筛选。如果只能使用含有 1 个突变核苷酸的引物,则可通过提高退火温度或在引物 3'端的倒数第 2 至第 4 个核苷酸中的任意一个位点引入单个突变碱基,以减少假阳性的产生。③在使用 CRISPR/Cas9 进行敲入突变时,需要将 DNA 模板的 PAM 位点进行突变来避免模板被 Cas9 识别切割。我们建议在设计引物时将突变后的 PAM 位点的 DNA 序列也引入引物中,从而提高筛选的特异性。④需要注意的是,该方法仅适合于敲入细胞系的筛选。对于 CRISPR/Cas9 介导的基因敲除,由于基因敲除结果不可预测,无法使用该方法来筛选基因敲除细胞。

综上所述,本研究建立并且优化了一种通过一步 PCR 就能够快速地筛选出体外定点突变体或者 CRISPR/cas9 介导的敲入突变体的方法,简化了突变体的鉴定过程,有效降低了实验成本,提高了工作效率。

静完成了实验操作和数据整理;宋春林、张刚、王颖完成了数据分析和论文的写作;宋春林、张雨晴、翟玉静完成了论文的校对。所有作者均阅读并同意发表该论文。所有作者均声明不存在利益冲突。

## [参考文献]

- [1] JIA H Y, COUTO-RODRIGUEZ R, JOHNSON S, et al. Highly efficient and simple SSPER and rrPCR approaches for the accurate site-directed mutagenesis of large and small plasmids[J]. N Biotechnol, 2022,72:22-28.
- [2] SHARMA G, SHARMA A R, BHATTACHARYA M, et al. CRISPR-Cas9: A preclinical and clinical perspective for the treatment of human diseases[J]. Mol Ther, 2021,29(2):571-586.
- [3] GHAEMI A, BAGHERI E, ABNOUS K, et al. CRISPR-cas9 genome editing delivery systems for targeted cancer therapy [J]. Life Sci, 2021,267:118969.
- [4] PETAZZI P, MENÉNDEZ P, SEVILLA A. CRISPR/Cas9-mediated gene knockout and knockin human iPSCs [M]// Methods in Molecular Biology. New York, NY: Springer US, 2020:559-574.
- [5] ZHANG B H. CRISPR/Cas gene therapy[J]. J Cell Physiol, 2021,236(4):2459-2481.
- [6] ZARATE O A, YANG Y B, WANG X Z, et al. BoostMEC: Predicting CRISPR-Cas9 cleavage efficiency through boosting models[J]. BMC Bioinformatics, 2022,23(1):446.
- [7] ANZALONE A V, RANDOLPH P B, DAVIS J R, et al. Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA[J]. Nature, 2019,576(7785):149-157.
- [8] KATTI A, DIAZ B J, CARAGINE C M, et al. CRISPR in cancer biology and therapy[J]. Nat Rev Cancer, 2022,22(5):259-279.
- [9] SHIELDS J A, MEIER S R, BANDI M, et al. VRK1 is a synthetic-lethal target in VRK2-deficient glioblastoma[J]. Cancer Res, 2022,82(21):4044-4057.
- [10] BUDZISZEWSKI G R, ZHAO Y N, SPANGLER C J, et al. Multivalent DNA and nucleosome acidic patch interactions specify VRK1 mitotic localization and activity[J]. Nucleic Acids Res, 2022,50(8):4355-4371.
- [11] PARK S, ARTAN M, HAN S H, et al. VRK-1 extends life span by activation of AMPK via phosphorylation[J]. Sci Adv, 2020,6(27):eaaw7824.
- [12] ELOWE S, BOLANOS-GARCIA V M. The spindle checkpoint proteins BUB1 and BUBR1: (SLiM) ming down to the basics[J]. Trends Biochem Sci, 2022,47(4):352-366.
- [13] WANG L, KRUSE T, LÓPEZ-MÉNDEZ B, et al. Spatial separation of phosphatase and kinase activity within the Bub complex is required for proper mitosis[J]. J Mol Cell Biol, 2023,4(11):mjac062.
- [14] BLOOM C R, NORTH B J. Physiological relevance of post-translational regulation of the spindle assembly checkpoint protein BubR1[J]. Cell Biosci, 2021,11(1):1-19.

- [7] MARTIN-GALLAUSIAUX C, MARINELLI L, BLOT-TIÈRE H M, et al. SCFA: Mechanisms and functional importance in the gut[J]. Proc Nutr Soc, 2021,80(1):37-49.
- [8] LIU H, WANG J, HE T, et al. Butyrate: A double-edged sword for health? [J]. Adv Nutr, 2018,9(1):21-29.
- [9] ZHOU D, PAN Q, XIN F Z, et al. Sodium butyrate attenuates high-fat diet-induced steatohepatitis in mice by improving gut microbiota and gastrointestinal barrier[J]. World J Gastroenterol, 2017,23(1):60-75.
- [10] 曾金祥,魏娟,毕莹,等. 车前子醇提取物降低急性高尿酸血症小鼠血尿酸水平及机制研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013,19(9):173-177.
- [11] JOHNSON R J, BAKRIS G L, BORGHI C, et al. Hyperuricemia, acute and chronic kidney disease, hypertension, and cardiovascular disease: Report of a scientific workshop organized by the national kidney foundation[J]. Am J Kidney Dis, 2018,71(6):851-865.
- [12] KUMAR A U A, BROWNE L D, LI X, et al. Temporal trends in hyperuricaemia in the Irish health system from 2006-2014: A cohort study[J]. PLoS One, 2018,13(5):e0198197.
- [13] LIU R, HAN C, WU D, et al. Prevalence of hyperuricemia and gout in mainland China from 2000 to 2014: A systematic review and meta-analysis[J]. Biomed Res Int, 2015, 2015:762820.
- [14] TRIFIRÒ G, MORABITO P, CAVAGNA L, et al. Epidemiology of gout and hyperuricaemia in Italy during the years 2005-2009: A nationwide population-based study [J]. Ann Rheum Dis, 2013,72(5):694-700.
- [15] ZHAO H Y, LU Z X, LU Y J. The potential of probiotics in the amelioration of hyperuricemia[J]. Food Funct, 2022,13(5):2394-2414.
- [16] CHELAKKOT C, GHIM J, RYU S H. Mechanisms regulating intestinal barrier integrity and its pathological implications [J]. Exp Mol Med, 2018,50(8):1-9.
- [17] RUAN Z, LIU S Q, ZHOU Y, et al. Chlorogenic acid decreases intestinal permeability and increases expression of intestinal tight junction proteins in weaned rats challenged with LPS [J]. PLoS One, 2014,9(6):e97815.
- [18] XU R, LEI Y H, SHI J, et al. Effects of lactadherin on plasma D-lactic acid and small intestinal MUC2 and claudin-1 expression levels in rats with rotavirus-induced diarrhea[J]. Exp Ther Med, 2016,11(3):943-950.
- [19] KUO W T, ODENWALD M A, TURNER J R, et al. Tight junction proteins occludin and ZO-1 as regulators of epithelial proliferation and survival[J]. Ann N Y Acad Sci, 2022,1514(1):21-33.
- [20] PARADA VENEGAS D, DE LA FUENTE M K, LANDSKRON G, et al. Short chain fatty acids (SCFAs)-mediated gut epithelial and immune regulation and its relevance for inflammatory bowel diseases[J]. Front Immunol, 2019,10:277.
- [21] MICHIELAN A, DINCÀ R. Intestinal permeability in inflammatory bowel disease: Pathogenesis, clinical evaluation, and therapy of leaky gut [J]. Mediators Inflamm, 2015, 2015:628157.
- [22] BALTAZAR-DÍAZ T A, GONZÁLEZ-HERNÁNDEZ L A, ALDANA-LEDESMA J M, et al. Escherichia/Shigella, SCFAs, and metabolic pathways-the triad that orchestrates intestinal dysbiosis in patients with decompensated alcoholic cirrhosis from western Mexico[J]. Microorganisms, 2022,10(6):1231.
- [23] ALLAM-NDOUL B, CASTONGUAY-PARADIS S, VEILLEUX A. Gut microbiota and intestinal trans-epithelial permeability[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(17):6402.
- [24] SALVO ROMERO E, ALONSO COTONER C, PARDO CAMACHO C, et al. The intestinal barrier function and its involvement in digestive disease[J]. Rev Esp Enferm Dig, 2015, 108:686-696.
- [25] SHEN L. Tight junctions on the move: Molecular mechanisms for epithelial barrier regulation[J]. Ann N Y Acad Sci, 2012, 1258:9-18.
- [26] SHI N, LI N, DUAN X W, et al. Interaction between the gut microbiome and mucosal immune system [J]. Military Med Res, 2017,4(1):14.
- [27] ZHOU Y, ZHAO M C, PU Z Y, et al. Relationship between oxidative stress and inflammation in hyperuricemia: Analysis based on asymptomatic young patients with primary hyperuricemia[J]. Medicine, 2018,97(49):e13108.

(本文编辑 耿波 厉建强)

(上接第 258 页)

- [15] PIANO V, ALEX A, STEGE P, et al. CDC20 assists its catalytic incorporation in the mitotic checkpoint complex [J]. Science, 2021,371(6524):67-71.
- [16] PAO P C, PATNAIK D, WATSON L A, et al. HDAC1 modulates OGG1-initiated oxidative DNA damage repair in the aging brain and Alzheimer's disease[J]. Nat Commun, 2020, 11(1):2484.
- [17] GRABOWSKA A, SAS-NOWOSIELSKA H, WOJTAS B, et al. Activation-induced chromatin reorganization in neurons depends on HDAC1 activity[J]. Cell Rep, 2022,38(7):110352.
- [18] MORGAN E L, SCARTH J A, PATTERSON M R, et al. E6-mediated activation of JNK drives EGFR signalling to promote proliferation and viral oncoprotein expression in cervical cancer[J]. Cell Death Differ, 2021,28(5):1669-1687.
- [19] WAUDBY C A, ALVAREZ-TEIJEIRO S, JOSUE RUIZ E, et al. An intrinsic temporal order of c-JUN N-terminal phosphorylation regulates its activity by orchestrating co-factor recruitment[J]. Nat Commun, 2022,13(1):6133.
- [20] VELASCO-AVILES S, PATEL N, CASILLAS-BAJO A, et al. A genetic compensatory mechanism regulated by *Jun* and *Mef2d* modulates the expression of distinct class II *Hdacs* to ensure peripheral nerve myelination and repair [J]. Elife, 2022,11:e72917.

(本文编辑 耿波 厉建强)