

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.10.002

应用 CRISPR/Cas9 系统构建 MTHFD1 基因敲除的 HEK-293 细胞系*

解晓露^{1,2} 王芳¹ 裴培¹ 成翕悦^{1,2} 包怡华¹ 王珊^{1Δ} 张霆^{1Δ}

(1 首都儿科研究所儿童发育与营养重点实验室 北京 100020; 2 北京协和医学院研究生院 北京 100730)

摘要 目的:利用成簇的、规律间隔的短回文重复序列 /Cas9 核酸酶(CRISPR/Cas9)基因编辑技术构建亚甲基四氢叶酸脱氢酶 1 (methylenetetrahydrofolate dehydrogenase 1, MTHFD1) 基因敲除人胚肾(HEK-293)稳定细胞系。**方法:**利用在线软件筛选出评分最高的 3 条针对 MTHFD1 基因的单向导 RNA (sgRNA), 然后合成 sgRNA 序列并将其插入到含有 GFP 标签的质粒中; 重组质粒转染 HEK-293 细胞后通过流式细胞仪分选出已被转入 sgRNA 的单细胞, 通过测序确认单克隆细胞系中 MTHFD1 的 DNA 序列突变状态; 最后应用实时荧光定量多聚核苷酸链式反应 (real-time quantitative Polymerase Chain Reaction, RT-qPCR) 和蛋白质印迹 (Western blot) 方法检测单克隆细胞中 MTHFD1 的 mRNA 和蛋白表达水平。**结果:**重组载体中含有正确的 sgRNA 序列; 测序结果显示该细胞系中 MTHFD1 基因发生了单个碱基插入突变和 6 个碱基的缺失突变; RT-qPCR 结果显示单克隆细胞系中 MTHFD1 在 mRNA 水平显著降低; Western blot 检测成功构建 MTHFD1 蛋白缺失的 HEK-293 细胞。**结论:**本研究利用 CRISPR/Cas9 技术成功构建的 MTHFD1 敲除 HEK-293 细胞系。

关键词:亚甲基四氢叶酸脱氢酶 1; 基因编辑技术; 人胚肾细胞; 基因敲除

中图分类号:R-33; Q789 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2019)10-1807-05

Construction of MTHFD1 Gene Knockout HEK-293 Cell Line by CRISPR/Cas9 Technology*

XIE Xiao-lu^{1,2}, WANG Fang¹, PEI Pei¹, CHENG Xi-yue^{1,2}, BAO Yi-hua¹, WANG Shan^{1Δ}, ZHANG Ting^{1Δ}

(1 Beijing Municipal Key Laboratory of Child Development and Nutriomics, Capital Institute of Pediatrics, Beijing, 100020, China;

2 Graduate Schools of Peking Union Medical College, Beijing, 100730, China)

ABSTRACT Objective: To construct a stable methylenetetrahydrofolate dehydrogenase 1 (MTHFD1) gene knockout HEK-293 cell line by clustered regularly interspersed short palindromic repeats (CRISPR)/CRISPR associated protein 9 (Cas9) technique. **Methods:** Three high grade single-guided RNAs (sgRNAs) targeting MTHFD1 gene were screened by online software, then synthesized and inserted into plasmids containing GFP tags. After transfection of recombinant plasmids into HEK-293 cells, monoclonal cells were obtained by flow cytometry. The mutation status of MTHFD1 DNA sequence in monoclonal cell lines was confirmed by sequence analysis. The mRNA and protein expressing levels of MTHFD1 in monoclonal cells were conducted by real-time quantitative Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR) and Western blot, respectively. **Results:** The expected sgRNA sequence of the recombinant vector was obtained in the HEK-293 cell. Sequencing results showed that MTHFD1 gene had a single base insertion and six base deletion mutations in the cell line. RT-qPCR and Western blot results showed that the MTHFD1 mRNA expression level was significantly reduced and its protein expression level wasn't detected in the cell line, respectively. **Conclusion:** The MTHFD1 gene knockout HEK-293 cell line was successfully constructed by CRISPR/Cas9.

Key words: Methylenetetrahydrofolate dehydrogenase 1; CRISPR/Cas9; HEK-293 cell; Knockout

Chinese Library Classification(CLC): R-33; Q789 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2019)10-1807-05

前言

叶酸代谢又被称为一碳代谢,是体内激活和转移一碳单位用于嘌呤和胸苷生物合成的重要代谢过程^[1]。大多数的细菌、酵母和植物可以自身合成叶酸,但是动物只能从外界摄取叶酸。在发育中的胎儿中,叶酸的缺乏会引发一种被称为神经管缺陷的严重出生缺陷,每年全球约有 300,000 个活产婴儿,不同地

区的发病率从 0.03 到 20/1000 婴儿不等^[2]。这种缺陷是由于在孕早期神经管闭合失败而导致的无脑、脊柱裂、脑膨出及脑积水等畸形,是一类非常严重的出生缺陷,给社会及家庭造成了极大的社会负担^[3-6]。在成年人中,叶酸摄入量不足是导致孕期贫血的重要原因^[7]。另外,由于叶酸在核酸合成中的重要作用,抑制叶酸代谢可以阻滞细胞增殖。基于这一原理研发了大量目前广泛使用的抗生素和化疗药物,包括抑制细菌叶酸合成

* 基金项目:国家自然科学基金项目(31571324)

作者简介:解晓露(1989-),博士研究生,主要研究方向:出生缺陷的机制研究, E-mail: xiaoluxie126@126.com

Δ 通讯作者:张霆, E-mail: zhangtingcv@163.com; 王珊, E-mail: wsaquarius@163.com

(收稿日期:2019-02-02 接受日期:2019-02-28)

和转换的磺胺甲恶唑、甲氨蝶呤和培美曲塞等^[8]。同时,因叶酸代谢也有助于同型半胱氨酸的重甲基化,从而影响表观遗传学,其与心血管疾病和癌症也密切相关^[9-11]。由亚甲基四氢叶酸脱氢酶 1(methylenetetrahydrofolate dehydrogenase 1,MTHFD1)编码的 C1 四氢叶酸(Tetrahydrofolic Acid, THF)合成酶,通过其甲酰-THF 合成酶 (FTHFS) 活性催化甲酸和 THF 向 10- 甲酰-THF 的转化,是一碳单位进入叶酸代谢的切入点^[12]。研究发现 MTHFD1 的基因多态性不仅是神经管畸形和先天性心脏病等出生缺陷的高风险因素^[13-15],也与结直肠癌的发生密切相关^[16,17]。然而,MTHFD1 在疾病中的具体机制尚不清楚。同时,目前还未见到 MTHFD1 缺失细胞模型的相关研究报道。本研究拟通过 CRISPR (clustered regularly interspersed short palindromic repeats) / Cas9 (CRISPR-associated 9) 基因编辑技术构建敲除载体,转染人胚肾 (HEK-293) 细胞,构建 MTHFD1 敲除 HEK-293 单克隆细胞系,为下一步研究 MTHFD1 在疾病发生中的机制研究奠定研究基础。

1 材料和方法

1.1 材料

HEK-293 细胞购自中国医学科学院基础医学研究所国家实验细胞资源共享平台;0.05% EDTA-Trypsin、DMEM 培养基、磷酸盐缓冲液及胎牛血清购自 Gibco;脂质体转染试剂

Lipofectamine 2000 购自 Life Invitrogen 公司;细胞培养瓶、培养板及移液管等细胞培养耗材购自 Corning 公司;细胞裂解液购自 Merck Millipore 公司;蛋白酶抑制剂 (Protease Inhibitor Cocktail,PIC)购自 Roche 公司;SDS-PAGE 凝胶试剂盒及 2× Loading Buffer 购自索莱宝公司;BCA 蛋白浓度定量试剂盒及蛋白质 Marker 购自 Thermo Scientific 公司;细胞组织 RNA 提取试剂盒购自 Qiagen 公司;DNA 提取试剂盒购自 TaKaRa 公司;BsmB I 限制性内切酶和 T4 DNA 连接酶购自纽英伦生物技术(北京)公司;一步法反转录试剂盒和 2× qPCR MIX 购自 Abm 公司;用于检测 CRISPR/Cas9 基因敲除效率的 q-PCR 引物合成于上海生工生物工程有限公司。

1.2 材料与方法

1.2.1 引物设计与质粒构建 在 NCBI 数据库中,人的 MTHFD1 基因的 Gene ID 为 4522,对蛋白质序列进行分析后选择第 1 个外显子中保守序列区域进行靶点筛选,并在张峰课题组开发的 CRISPR 在线靶点设计网站上 (<http://crispr.mit.edu/>),根据 Cas9 靶点设计原则选择得分较高的作为 sgRNA 备选序列,后在其两端加入 BsmB I 位点切割后产生的互补黏端,设计获得上下游 sgRNA 序列,见表 1。将退火形成双链的 sgRNA 与酶切后的 pU6-GFP-backbone 载体混合,在 T4 DNA 连接酶的作用下进行连接。载体构建完成后送至上海生工生物有限公司进行测序鉴定。

表 1 人 MTHFD1-sgRNA 核酸片段
Table 1 Human MTHFD1-sgRNA Oligo

Name	Target site
H-MTHFD1-sgRNA-1	Forward 5'-ATCCGCGGAGATCTCCTTCCCGTTC-3' Reverse 5'-AAACGAACGGGAAGGAGATCTCCGC-3'
H-MTHFD1-sgRNA-2	Forward 5'-ATCCGCAGTTGAAGGAGCAAGTACC-3' Reverse 5'-AAACGGTACTTGCTCCTTCAACTGC-3'
H-MTHFD1-sgRNA-3	Forward 5'-ATCCGCAATGCTATTGCACCCGAGA-3' Reverse 5'-AAACTCTCGGGTGCAATAGCATTGC-3'

1.2.2 细胞转染 HEK293 细胞培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中,自复苏后传代 2-3 代,待细胞状态稳定后,在 6 孔板每个孔中传 1×10^5 个细胞,24 h 后,将三种质粒进行混合后,取 2 μ g 质粒混合物与 5 μ L Lipofectamine 2000 混合后转染细胞,继续培养 48 h。

1.2.3 流式分选及单克隆细胞的培养 用磷酸盐缓冲液洗涤细胞 2 次后,加入 0.05% EDTA-Trypsin,37℃ 消化 2 min,800 rpm,5 min,加入 1 mL DMEM 培养基制成单细胞悬液。利用贝克曼库尔特 MoFlo XDP 超速流式细胞分选系统进行单细胞分选,分选的单克隆细胞接种至 96 孔板中,每隔 2-3 天进行换液,待 96 孔板长满后传代至 24 孔板,依次扩大培养传至 6 孔板和 T25 培养瓶中。

1.2.4 测序鉴定单克隆克隆 选取单克隆细胞按 1×10^5 个传至 6 孔板中,培养至细胞密度约 90%收获细胞,磷酸盐缓冲液洗涤两遍后,按照细胞基因组抽提试剂盒说明书提取细胞 DNA,后设计上下游引物扩增特定片段,见表 2。PCR 产物送至

上海生工生物科技有限责任公司测序鉴定外显子 1 的碱基插入或者缺失情况。

1.2.5 RT-qPCR 鉴定 扩大培养细胞后收取细胞,按照细胞组织 RNA 提取试剂盒的说明书,提取 RNA 并按照反转录试剂盒的说明书进行反转录后获得 cDNA。按照试剂盒说明书进行 qPCR 验证,qPCR 引物见表 3,qPCR 体系:SYBRGreen Mix 10 μ L,上下游引物各 0.6 μ L,cDNA 2 μ L,ddH₂O 6.8 μ L。qPCR 实验至少重复 3 次,将 Ct 值换算成 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 作为相对表达量。

1.2.6 Western blot 鉴定 收集单克隆细胞和 Wild Type(WT) HEK-293 细胞,磷酸盐缓冲液洗涤后加入含 PIC 的蛋白裂解液,室温裂解 5 min,然后 14000 rpm 离心 5 min,取上清,测蛋白浓度后加入等量 2× Loading Buffer,开水煮沸 5 min。然后取配制好的 10% SDS-PAGE gel 进行蛋白质电泳,使用天能全自动化学发光成像分析系统对电泳结果进行拍照及分析。

1.3 统计学分析

计量资料数据应用 SPSS 24.0 软件进行两独立样本 t 检

验,以 $p < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

表 2 含人 MTHFD1-sgRNA 质粒的测序引物
Table 2 Suggested Sequencing Primers of H-MTHFD1-sgRNA-Plasmid

Primer	Sequence
H-MTHFD1-sgRNA-1	Forward 5'-TTCTTGGGTAGTTTGCAG-3'
H-MTHFD1-sgRNA-1	Reverse 5'-GCGTACTTGGCATATGAT-3'
H-MTHFD1-sgRNA-2	Forward 5'-TTCTTGGGTAGTTTGCAG-3'
H-MTHFD1-sgRNA-2	Reverse 5'-GCGTACTTGGCATATGAT-3'
H-MTHFD1-sgRNA-3	Forward 5'-TTCTTGGGTAGTTTGCAG-3'
H-MTHFD1-sgRNA-3	Reverse 5'-GCGTACTTGGCATATGAT-3'

表 3 人 MTHFD1 基因的 qPCR 引物
Table 3 The qPCR primers for human MTHFD1

qPCR Primer	Sequence
MTHFD1	Forward TTGTTGGCCCAGAAGGGTTT
Reverse	CTGACAGTGGCAACAAGCAC
GAPDH	Forward GTGTTTCCTCGTCCCGTAGA
Reverse	AATCTCCACTTTGCCACTGC

2 结果

2.1 人 MTHFD1- CRISPR/Cas9 表达载体的鉴定

重组载体构建完成后,对 sgRNA 序列进行测序,测序结果如图 1 所示,本研究所构建 3 个重组质粒正确插入 3 条 Human-MTHFD1-sgRNA Oligo,载体构建成功。

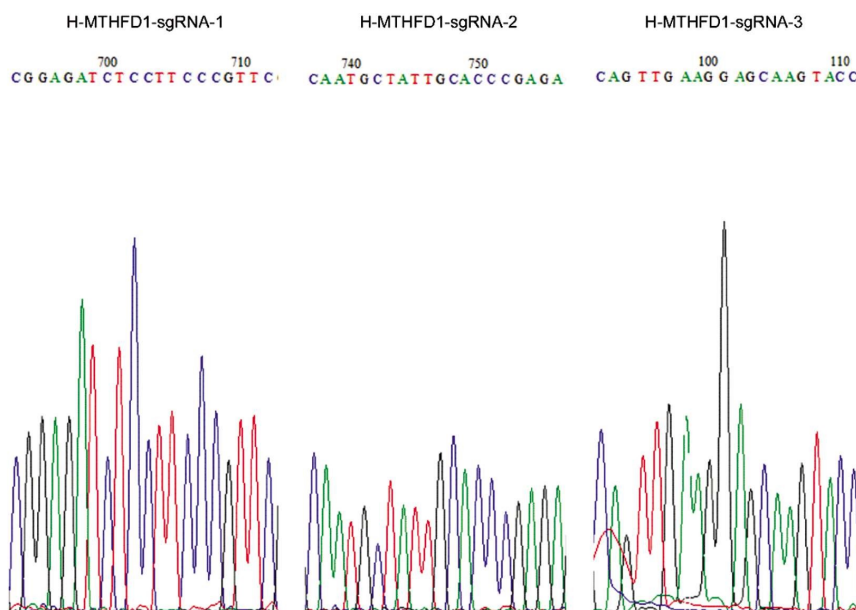


图 1 人 sgRNA-MTHFD1- CRISPR/Cas9 载体靶位点的鉴定

Fig. 1 Identification of the target sites of Human-sgRNA-MTHFD1-CRISPR/Cas9 vectors

2.2 sgRNA 活性的鉴定显示在细胞 MTHFD1 基因位点的定向插入或缺失

提取单克隆细胞系的 DNA 进行 PCR 扩增,对 PCR 产物测序后与野生型细胞株中 MTHFD1 序列进行序列比对分析,以检查插入或缺失突变。结果发现,在挑选的三株单克隆细胞株中,敲除 MTHFD1 的细胞株 1 插入了单碱基 C;敲除 MTHFD1 的细胞株 2 缺失了 7 个 bp 碱基;而敲除 MTHFD1 的

细胞株 3 并未出现碱基的插入和缺失,推测该细胞株可能对该位点进行了错配修复,见图 2。结果说明我们所构建的 sgRNA 可以引导 Cas9 对 MTHFD1 基因进行定向切割。

2.3 单克隆细胞系中 MTHFD1 的 mRNA 水平明显降低

根据结果 2.2,我们扩大培养细胞株 1 和 2 并提取总 RNA 进行反转录,RT-qPCR 结果显示敲除 MTHFD1 的细胞株 1 和细胞株 2 中 MTHFD1 的转录水平降低了 94%和 96%,结果说

明我们构建的 MTHFD1 敲除细胞株在转录水平上几乎检测不到 MTHFD1, 见图 3。

2.4 单克隆细胞株中未检测到 MTHFD1 的蛋白质表达

Western blot 方法检测转染 H-MTHFD1-sgRNA 质粒后的单克隆细胞株 1 和 2, 结果显示野生型 HEK293 细胞中 MTHFD1 表达正常, 而 MTHFD1 敲除的单克隆细胞株 1 和 2 中并未检测到 MTHFD1 的表达, 内参 GAPDH 表达量正常且基本一致, 见图 4, 说明本研究成功建立 MTHFD1 敲除细胞株。

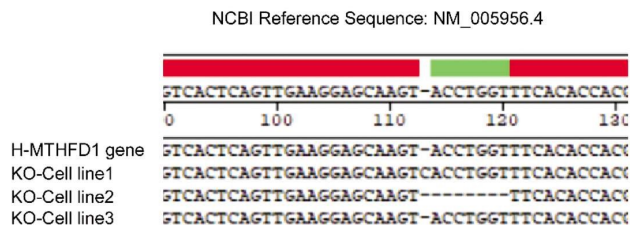


图 2 sgRNA 活性的鉴定

Fig. 2 Identification of sgRNA activity

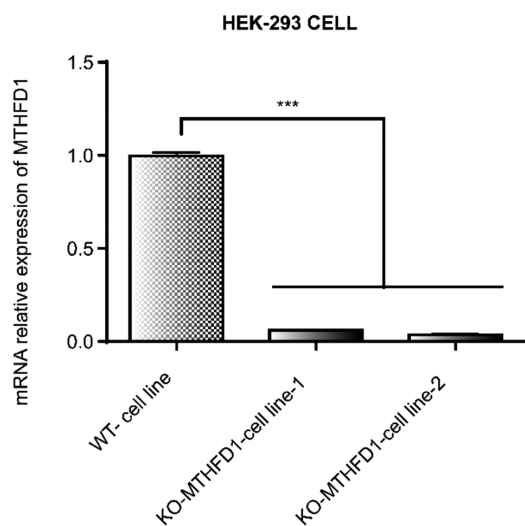


图 3 在 MTHFD1 敲除的 HEK-293 细胞中 MTHFD1 的转录水平

Fig. 3 The mRNA levels of MTHFD1 in MTHFD1 knock out HEK-293 cells

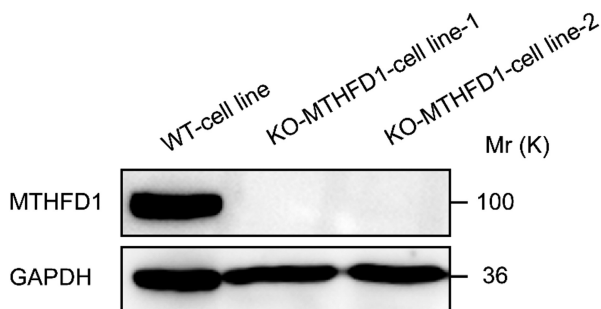


图 4 在 MTHFD1 敲除的 HEK-293 细胞中 MTHFD1 的蛋白水平

Fig. 4 The protein levels of MTHFD1 in MTHFD1 knock out HEK-293 cells

3 讨论

自细菌限制性内切酶首次应用于 DNA 重组以来, 基因编辑技术已有近 40 年历史^[18,19]。然而, 直到开发出具有高性价比、操作方便、基因编辑功能精确的工程核酸酶, 该领域才取得重大进展^[20]。这些已经应用于临床的基因编辑核酸内切酶包括巨

核酸酶(Meganuclease, MNs)、锌指核酸酶(Zincfinger nucleases, ZNFs)、转录激活物样效应核酸酶 (Transcription activator-like effector nuclease, TALENs) 和 CRISPR/Cas9。其中, CRISPR/Cas9 系统以其高效、快速、多功能、易用、低成本等优点, 在生物医药领域得到了越来越广泛的应用, 是目前在该领域应用最广泛的基因编辑技术, 成为“本世纪最重要的生物技术发现”^[21]。

MTHFD1 具有包括亚甲基四氢叶酸脱氢酶、甲基四氢叶酸环水解酶和甲酰四氢叶酸合成酶在内的三种酶功能, 是亚甲基四氢叶酸生成的主要来源, 直接参与调控胸苷的生物合成并影响基因组的稳定性^[22]。在叶酸缺乏时, MTHFD1 入核以牺牲细胞质中半胱氨酸的重甲基化为代价来保证胸苷的合成^[23]。研究表明在 MTHFD1 基因上插入基因捕获载体破坏其活性将导致小鼠致死, 可见该基因在发育中的重要性^[24]。大量研究证实该基因的多态性(G1958A)是神经管畸形的高危险因素^[25-27]。研究发现在中国汉族神经管畸形人类标本中, MTHFD1 基因的多态性(包括 SNP 位点 rs1956545 和 rs56811449)可以作为中国人群神经管畸形发生的潜在指标, 该位点的某些特定基因型可能具有较低的发生神经管畸形的风险^[27]。但是, 该基因在神经管畸形中的作用机制尚不清楚。因此, 本研究采用 CRISPR/Cas9 技术构建了 MTHFD1 敲除细胞株, 将有助于该发现的进一步研究, 对神经管畸形的诊断及预防具有重要意义。

HEK-293 细胞是一种人胚肾细胞, 上皮样, 贴壁生长, 因其具有永生性、增殖周期短、转染效率高、培养条件简单方便等特点, 是目前应用最为广泛的基因编辑工具细胞^[28,29]。文献报道 HEK-293 细胞被一种抗 NF-M 的单克隆抗体强烈而特异地染色, NF-M 是一种主要的神经丝亚单位, 同时在基因芯片分析中发现许多在神经干细胞和造血干细胞中大量表达的基因也在 HEK-293 细胞中大量表达, 说明 HEK-293 细胞具有神经元谱系细胞的特性, 有助于我们进行神经管畸形的机制研究^[30]。另外, 在人胚胎发育过程中 MTHFD1 蛋白在该细胞中表达量较高(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4522#gene-expression>), 敲除后可以产生明显的生物学效应, 是值得进一步进行机制研究的细胞模型。

目前发现的 CRISPR/Cas 系统根据组成成分和作用机制的不同分三种类型: I 型、II 型和 III 型, 它们主要存在于约 90% 已测序的古细菌和 40% 已测序的真细菌中。其中 II 型的组成最为简单, 以 Cas9 蛋白和向导 RNA (sgRNA) 为核心组成, 是目前研究最深入的类型^[31]。本研究利用 II 型系统首先针对 MTHFD1 外显子 1 设计了 3 条 sgRNA, 并同时转染 HEK-293 细胞, 不仅提高了 Cas9 与 sgRNA 系统的特异性, 也减少了脱靶效应, 再利用流式单细胞分选技术根据 GFP 标签筛选出特异性被基因编辑的单细胞, 避免了应用病毒载体, 降低生物危害性, 操作简单方便, 可以作为一种高效的构建敲除细胞系的方法。

4 结论

本研究利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术首次成功构建了 MTHFD1 敲除的 HEK-293 细胞系, 为进一步研究 MTHFD1 在出生缺陷、肿瘤、心血管疾病中的作用及机制奠定了基础。

参考文献(References)

- [1] Ebara S. Nutritional role of folate[J]. Congenit Anom (Kyoto), 2017,

- 57(5): 138-141
- [2] Ami N, Bernstein M, Boucher F, et al. Folate and neural tube defects: The role of supplements and food fortification[J]. *Paediatr Child Health*, 2016, 21(3): 145-154
- [3] Copp A J, Adzick N S, Chitty L S, et al. Spina bifida [J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2015, 1: 15007
- [4] Radcliff E, Cassell C H, Tanner J P, et al. Hospital use, associated costs, and payer status for infants born with spina bifida [J]. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*, 2012, 94(12): 1044-1053
- [5] Botto L D, Moore C A, Khoury M J, et al. Neural-tube defects[J]. *N Engl J Med*, 1999, 341(20): 1509-1519
- [6] Melvin E C, George T M, Worley G, et al. Genetic studies in neural tube defects. NTD Collaborative Group [J]. *Pediatr Neurosurg*, 2000, 32(1): 1-9
- [7] Sifakis S, Pharmakides G. Anemia in pregnancy[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2000, 900: 125-136
- [8] Chattopadhyay S, Moran R G, Goldman I D. Pemetrexed: biochemical and cellular pharmacology, mechanisms, and clinical applications[J]. *Mol Cancer Ther*, 2007, 6(2): 404-417
- [9] Ducker G S, Rabinowitz J D. One-Carbon Metabolism in Health and Disease[J]. *Cell Metab*, 2017, 25(1): 27-42
- [10] Rosenzweig A, Blenis J, Gomes A P. Beyond the Warburg Effect: How Do Cancer Cells Regulate One-Carbon Metabolism? [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2018, 6: 90
- [11] Rizzo A, Napoli A, Roggiani F, et al. One-Carbon Metabolism: Biological Players in Epithelial Ovarian Cancer[J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(7)
- [12] MacFarlane A J, Perry C A, Girmay H H, et al. Mthfd1 is an essential gene in mice and alters biomarkers of impaired one-carbon metabolism[J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(3): 1533-1539
- [13] Christensen K E, Deng L, Bahous R H, et al. MTHFD1 formyltetrahydrofolate synthetase deficiency, a model for the MTHFD1 R653Q variant, leads to congenital heart defects in mice[J]. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*, 2015, 103(12): 1031-1038
- [14] Christensen K E, Rohlicek C V, Andelfinger G U, et al. The MTHFD1 p.Arg653Gln variant alters enzyme function and increases risk for congenital heart defects[J]. *Hum Mutat*, 2009, 30(2): 212-220
- [15] Jiang J, Zhang Y, Wei L, et al. Association between MTHFD1 G1958A polymorphism and neural tube defects susceptibility: a meta-analysis[J]. *PLoS One*, 2014, 9(6): e101169
- [16] Levesque N, Christensen K E, Van Der Kraak L, et al. Murine MTHFD1-synthetase deficiency, a model for the human MTHFD1 R653Q polymorphism, decreases growth of colorectal tumors[J]. *Mol Carcinog*, 2017, 56(3): 1030-1040
- [17] MacFarlane A J, Perry C A, McEntee M F, et al. Mthfd1 is a modifier of chemically induced intestinal carcinogenesis [J]. *Carcinogenesis*, 2011, 32(3): 427-433
- [18] Smithies O, Gregg R G, Boggs S S, et al. Insertion of DNA sequences into the human chromosomal beta-globin locus by homologous recombination[J]. *Nature*, 1985, 317(6034): 230-234
- [19] Thomas K R, Folger K R, Capecchi M R. High frequency targeting of genes to specific sites in the mammalian genome [J]. *Cell*, 1986, 44(3): 419-428
- [20] Gaj T, Sirk S J, Shui S L, et al. Genome-Editing Technologies: Principles and Applications[J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2016, 8(12)
- [21] Memi F, Ntokou A, Papangeli I. CRISPR/Cas9 gene-editing: Research technologies, clinical applications and ethical considerations [J]. *Semin Perinatol*, 2018, 42(8): 487-500
- [22] Field M S, Kamynina E, Stover P J. MTHFD1 regulates nuclear de novo thymidylate biosynthesis and genome stability[J]. *Biochimie*, 2016, 126: 27-30
- [23] Field M S, Kamynina E, Agunloye O C, et al. Nuclear enrichment of folate cofactors and methylenetetrahydrofolate dehydrogenase 1 (MTHFD1) protect de novo thymidylate biosynthesis during folate deficiency[J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(43): 29642-29650
- [24] MacFarlane A J, Perry C A, Girmay H H, et al. Mthfd1 is an essential gene in mice and alters biomarkers of impaired one-carbon metabolism[J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(3): 1533-1539
- [25] Brody L C, Conley M, Cox C, et al. A Polymorphism, R653Q, in the Trifunctional Enzyme Methylenetetrahydrofolate Dehydrogenase/ Methenyltetrahydrofolate Cyclohydrolase/ Formyltetrahydrofolate Synthetase Is a Maternal Genetic Risk Factor for Neural Tube Defects: Report of the Birth Defects Research Group [J]. *Am J Hum Genet*, 2002, 71(5): 1207-1215
- [26] Meng J, Han L, Zhuang B. Association between MTHFD1 polymorphisms and neural tube defect susceptibility [J]. *J Neurol Sci*, 2015, 348(1-2): 188-194
- [27] Wu J, Bao Y, Lu X, et al. Polymorphisms in MTHFD1 Gene and Susceptibility to Neural Tube Defects: A Case-Control Study in a Chinese Han Population with Relatively Low Folate Levels [J]. *Med Sci Monit*, 2015, 21: 2630-2637
- [28] Nettleship J E, Watson P J, Rahman-Huq N, et al. Transient expression in HEK 293 cells: an alternative to E. coli for the production of secreted and intracellular mammalian proteins [J]. *Methods Mol Biol*, 2015, 1258: 209-222
- [29] Lin Y C, Boone M, Meuris L, et al. Genome dynamics of the human embryonic kidney 293 lineage in response to cell biology manipulations[J]. *Nat Commun*, 2014, 5: 4767
- [30] Shaw G, Morse S, Ararat M, et al. Preferential transformation of human neuronal cells by human adenoviruses and the origin of HEK 293 cells[J]. *FASEB J*, 2002, 16(8): 869-871
- [31] Mali P, Yang L, Esvelt K M, et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9[J]. *Science*, 2013, 339(6121): 823-826