

文章编号 1006-8147(2022)04-0372-06

论著

幼年特发性关节炎 10p11.21 遗传位点敲除的单克隆细胞系的建立

张四鹏, 李津

(天津医科大学基础医学院细胞生物学系, 天津 300070)

摘要 目的: 建立幼年特发性关节炎 10p11.21 遗传位点敲除的单克隆细胞系。方法: 首先利用自身免疫病致病变异的遗传和表观遗传精细定位平台鉴定 10p11.21 遗传位点可能的因果变异; 通过全表型组关联研究(PheWAS)数据库确定这一位点的因果变异与其他疾病的相关性; 荧光素酶报告基因实验来验证候选因果变异是否具有转录调控功能; 利用 CRISPR/Cas9 技术将因果变异所在基因组区域进行敲除。结果: 生物信息学分析的结果显示 10p11.21 遗传位点的单核苷酸多态性(SNP)rs7100025 的 PICS 值为 0.705 7, 可能是这一位点的因果变异; PheWAS 数据库检索结果显示 rs7100025 与多种免疫疾病具有显著相关性; rs7100025 具有调控基因转录的功能, 正向插入包含 G 等位基因和 A 等位基因的 rs7100025 序列可以提高荧光素酶表达水平, 并且 G 等位基因相较于 A 等位基因效果更加明显; 成功设计构建了删除 rs7100025 所在基因组区域的 guide RNA 质粒, 并在 Jurkat 细胞系中将 rs7100025 位点进行敲除。筛选得到的单克隆细胞系的基因型在 Sanger 测序中得以验证。结论: 精细定位幼年特发性关节炎 10p11.21 遗传位点可能的因果变异 rs7100025(PICS 值为 0.705 7), 并成功建立这一变异敲除的单克隆 Jurkat 细胞系, 敲除的片段大小为 456 bp。

关键词 全基因组关联分析; 因果变异的精细定位; 荧光素酶报告基因; 基因编辑; 单克隆细胞系

中图分类号 R329.2+8

文献标志码 A

Establishment of a monoclonal cell line with deletion of juvenile idiopathic arthritis associated genetic locus at 10p11.21

ZHANG Si-peng, LI Jin

(Department of Cell Biology, School of Basic Medical Sciences, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

Abstract Objective: To establish a monoclonal cell line with deletion of juvenile idiopathic arthritis associated genetic locus at 10p11.21. **Methods:** Fine-mapping was performed on the platform which integrates genetic and epigenetic annotations of pathogenic variants in autoimmune diseases to determine the likely causal variants at the 10p11.21 locus. The PheWAS database was searched for the association between the candidate causal variant of this locus and other diseases. Luciferase reporter gene assay was conducted to examine whether the likely causal variant has transcription regulatory ability. The CRISPR/Cas9 genome editing technology was employed to knock out the genomic region where the causal variant is located from the CD4⁺T cells. **Results:** Fine-mapping result showed that the PICS value of the single nucleotide polymorphism (SNP)rs7100025 at the 10p11.21 locus was 0.705 7, which may be the causal variation of this locus. PheWAS-database searching results showed that rs7100025 is associated with a variety of immune diseases. rs7100025 has the function of regulating gene transcription. Forward insertion of rs7100025 sequence containing G allele and A allele was able to promote transcription in the luciferase reporter assay, and the G allele demonstrated a stronger transcription regulatory activity than the A allele. Guide-RNA construct was designed and constructed targeting the flanking genomic region of rs7100025. The genomic locus containing rs7100025 was deleted from the genomic DNA of Jurkat cells. The genotype of the selected monoclonal cell line was verified by Sanger sequencing. **Conclusion:** The likely causal variant rs7100025 at the 10p11.21 juvenile idiopathic arthritis associated genetic locus (PICS value was 0.705 7) are identified, and a monoclonal Jurkat cell line with this variant deleted and the knockout fragment size of 456 BP are successfully established.

Key words GWAS; fine mapping of causal variant; luciferase reporter assay; genome editing; monoclonal cell line

自身免疫性疾病是指人体的免疫系统错误地攻击自身的组织、器官, 造成自身损伤。目前已经发现了超过 80 种自身免疫疾病, 总发病率为 3%~5%^[1]。

其中儿童自身免疫疾病严重影响了儿童的身心健康, 对个人及家庭带来了重大的经济负担。儿童自身免疫疾病危险因素复杂多样, 多项研究显示遗传因素对疾病的发生发展有重要的影响^[2]。因此, 开展遗传学研究对于儿童自身免疫疾病的预防和精准治疗具有一定的指导作用。

基金项目 天津市自然科学基金(18JCYBJC42700)

作者简介 张四鹏(1998-), 男, 硕士在读, 研究方向: 自身免疫病和神经精神类疾病遗传学研究; 通信作者: 李津, E-mail: jli01@tmu.edu.cn。

近20年来,全基因组关联分析(genome-wide association study, GWAS)聚焦于基因组的单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP),无偏地系统性地研究了与复杂疾病和性状相关的遗传位点,取得了丰硕的成果,已有数千遗传位点在文献中报道^[3]。但是关于这些位点的作用机制的研究却很少^[4]。

一项关于10种儿童自身免疫疾病的研究报道了位于ANKRD30A的内含子区域的SNPrs7100025与幼年特发性关节炎(Juvenile idiopathic arthritis, JIA)显著相关^[5]。但是对于这一位点如何影响疾病的发生、发展缺少相应的实验研究。因此,本研究聚焦于对ANKRD30A的内含子位点的功能研究,通过生物信息学分析和实验方法精细定位这一位点的因果变异,利用CRISPR/Cas9技术构建删除因果变异所在基因组区域的单克隆细胞系,为后续机制研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料 实验所用细胞人HEK293T以及人Jurkat细胞均购自ATCC细胞库,DMEM培养基、1640培养基、胎牛血清、青霉素链霉素双抗、胰酶均购自美国Gibco公司,使用的BsmBI酶购自NEB公司,KpnI、HindIII酶和T4连接酶购自Thermo公司,Dual-Luciferase Reporter Assay System试剂盒购自promega公司,PCR酶和同源重组酶购自诺维赞公司。

1.2 方法

1.2.1 精细定位因果变异 PICS平台(<https://pubs.broadinstitute.org/pubs/finemapping/>)是一个对GWAS遗传位点进行因果变异精细定位的在线分析网站^[6]。该算法整合1 000 G基因组数据中SNP间的连锁不平衡信息和各种免疫细胞中转录和顺式调控元件,鉴定GWAS遗传位点最有可能导致疾病的因果变异,即PICS概率(PICS_Probability)最高的SNP。使用此分析工具,输入10p11.21位点最相关的SNP(称为index SNP)rs7100025和疾病关联强度P值的负对数值 $-\log_{10}(P \text{ 值})=10.075 \ 7$ 。rs7100025与JIA的关联分析P值=8.4E-11,所以其 $-\log_{10}(P \text{ 值})=10.075 \ 7$ 。Ancestry选择EUR,可以得到这个位点的SNPs的PICS排序以及这些SNPs与rs7100025之间的连锁不平衡关系r²。

1.2.2 PheWAS数据 PheWAS(Phenome-wide Association Studies,全表型关联研究)是对一个特定的SNP在全表型组中找到与它关联的表型的一种研究方法,与GWAS相反,被称为反向GWAS。在Open Targets Genetics数据库中^[7-8],输入rs7100025

位点,得到与该位点相关的疾病信息。

1.2.3 细胞培养 HEK293T细胞使用DMEM完全培养基培养。DMEM完全培养基由DMEM空培加10%胎牛血清以及1%青霉素链霉素双抗组成。Jurkat细胞使用1640完全培养基培养。1640完全培养基由1640空培加10%胎牛血清以及1%青霉素/链霉素双抗组成。两种细胞均在37℃,5%CO₂浓度的恒温细胞培养箱中培养。

1.2.4 荧光素酶报告基因质粒构建 在rs7100025位点上下游各250 bp设计引物。考虑到荧光素酶报告基因的方向效应,在其反方向上也同样设计引物。引物序列见表1。以HEK293T细胞的基因组DNA为模板,用PCR酶将其扩增。PCR程序为:95℃ 3 min,95℃ 15 s 58℃ 15 s 72℃ 1 min 35个循环,72℃ 5 min。使用的载体为PGL4.23,使用的酶切位点分别是HindIII和KpnI。将PCR产物和酶切产物同时跑胶纯化,然后用同源重组酶将两个产物进行无缝连接,用DH5α感受态细胞进行转化,铺板。最后挑取单克隆进行摇菌扩增,选择Sanger测序结果正确的质粒进行实验。

构建rs7100025次等位基因型(minor allele)即突变型的荧光素酶报告基因质粒,使用的引物序列见表1。以构建完成的野生型质粒为模板,PCR程序为:95℃ 3 min,95℃ 15 s 58℃ 15 s 72℃ 7 min 30个循环,72℃ 5 min,PCR产物用DpnI酶37℃消化2 h,然后用DH5α进行转化、铺板,挑取单克隆测序,选取测序结果正确的质粒进行实验。构建的突变型质粒同样经过Sanger测序验证。

1.2.5 荧光素酶报告基因实验 将得到的rs7100025位点的4个质粒(野生型正向、野生型反向、突变型正向、突变型反向),各取500 ng分别和50 ng PGL4.74转染6孔板中生长的HEK293T细胞,同时使用500 ng空载的PGL4.23与50 ng PGL4.74作为对照组。转染试剂使用的是PEI。转染的时候使用无血清培养基,6 h后更换为完全培养基,48 h后收细胞,并使用promega公司的Dual-Luciferase Reporter Assay System试剂盒以及GloMax 20/20仪器检测荧光强度。

1.2.6 rs7100025位点gRNA质粒构建 在rs7100025位点上下游区域分别构建sgRNA,sgRNA1序列:5'-GCTTCTACAAGTCTTTTTCG-3',sgRNA2序列:5'-AGTGGGATTGCCATGTTATT-3',sgRNA3序列:5'-CAGTAATTATCTATCGAGTG-3',sgRNA4序列:5'-GTTTTGCATCGTAGTTACAC-3'。将这些sgRNA oligo退火形成双链,退火的条件为

95℃ 10 min,缓慢降温至室温 2 h,同时以 lenti-cas9-V2 质粒为载体,用 BsmI 55℃酶切 2 h 回收。用 T4 连接酶将退火形成的 sgRNA 双链和回收后的载体片段连接,构建质粒,质粒均经 Sanger 测序正确后使用。

1.2.7 rs7100025 位点敲除细胞系构建 将 4 个构建好的 rs7100025 位点 sgRNA 质粒各 2.5 μg,与 PAX2 质粒 6.5 μg,VSVG 质粒 3.5 μg,在空培中混匀,并缓慢加入等体积的混有 80 μg PEI 的空培,轻轻混匀后静置 20 min,加入到空培培养的 10 cm 培养皿的 HEK293T 细胞中,6 h 后将空培换成完全培养基。收取其培养 48 h 后产生的病毒液,感染 Jurkat 细胞 24 h,然后换取新鲜的完全培养基,加入终浓度 2 μg/mL 的嘌呤霉素培养 3 d,然后更换为新鲜的完全培养基。培养 2 d 后,收集部分细胞,提取基因组

DNA,PCR 进行基因型鉴定。PCR 条件:95℃3 min,95℃ 15 s 58℃ 15 s 72℃ 1 min 35 个循环,72℃ 5 min。

1.2.8 rs7100025 位点敲除细胞系的单克隆的筛选 对经鉴定产生 rs7100025 位点敲除的细胞进行单克隆筛选。将细胞稀释到 100 个/mL 的浓度后,在显微镜下将单个细胞挑取到 96 孔板中,每天观察细胞的生长状况,待细胞长满 96 孔板后将其传至 24 孔板内,待细胞量足够后,收取部分细胞提取基因组 DNA,然后做基因型鉴定。将 PCR 产物进行琼脂糖电泳实验,选取有敲除的条带进行 Sanger 测序。将测序结果显示 rs7100025 位点有敲除的单克隆细胞进行传代培养。

1.3 统计学处理 数据分析和作图采用 GraphPad Prism 7.0 软件。两组间比较采用 *t* 检验, $P<0.05$ 差异具有统计学意义。

表 1 质粒构建引物序列

Tab 1 Primer sequences for plasmid construction

引物名称	引物序列
PGL4.23-正向 rs7100025 Forward	5'-TTTCTCTGGCCTAACTGGCC GGTACCCCCAAATAACATGGCAATCC-3'
PGL4.23-正向 rs7100025 Reverse	5'-TTATATACCCTCTAGTGTCTAAGCTT CACCTGTGTAACATACGATGCAAA-3'
PGL4.23-反向 rs7100025 Forward	5'-TTTCTCTGGCCTAACTGGCCGGTACCCACCTGTGTAACATACGATGCAAA-3'
PGL4.23-反向 rs7100025 Reverse	5'-TTATATACCCTCTAGTGTCTAAGCTT CCCAAATAACATGGCAATCC-3'
PGL4.23-正向 rs7100025Mut Forward	5'-CAGGTACGTaTAACAACATGAATTCATCTCAAAGACA-3'
PGL4.23-正向 rs7100025Mut Reverse	5'-GTTGTTAaACGTACCTGTAAACACATTCATTTTATTTT-3'
PGL4.23-反向 rs7100025Mut Forward	5'-GTTGTTAaACGTACCTGTAAACACATTCATTTTATTTT-3'
PGL4.23-反向 rs7100025Mut Reverse	5'-CAGGTACGTaTAACAACATGAATTCATCTCAAAGACA-3'
rs7100025-KO genotyping Forward	5'-TCCACATAACCTTGGGCTGT-3'
rs7100025-KO genotyping Reverse	5'-CTGGAACACATGCACAAAGG-3'

2 结果

2.1 生物信息学发现 10p11.21 位点因果变异 表 2 为 PICS 值前 5 的 SNPs。rs7100025 的 PICS 值为 0.705 7,远远大于同一连锁不平衡区域(Linkage disequilibrium,LD)的其他 SNPs。

表 2 10p11.21 位点的 SNPs 为幼年特发性关节炎因果变异的 PICS 后验概率

Tab 2 PICS posterior probability of being causal variants in juvenile idiopathic arthritis for SNPs at 10p11.21 locus

Index_SNP	Linked_SNP	Dprime	Rsquare	Phase	PICS_probability
rs7100025	rs7100025	1.000 0	1.000 0	N,N	0.705 7
rs7100025	rs11011088	0.964 7	0.888 9	A,A	0.084 9
rs7100025	rs1926131	0.958 9	0.878 1	A,A	0.074 5
rs7100025	rs7905906	0.953 0	0.867 4	A,T	0.065 6
rs7100025	rs35506010	0.946 7	0.836 7	A,D	0.045 5

注:Dprime, Rsquare 均为衡量该 SNP 与 index SNP 之间连锁不平衡关系的指数;PICS:Probabilistic Identification of Causal SNPs

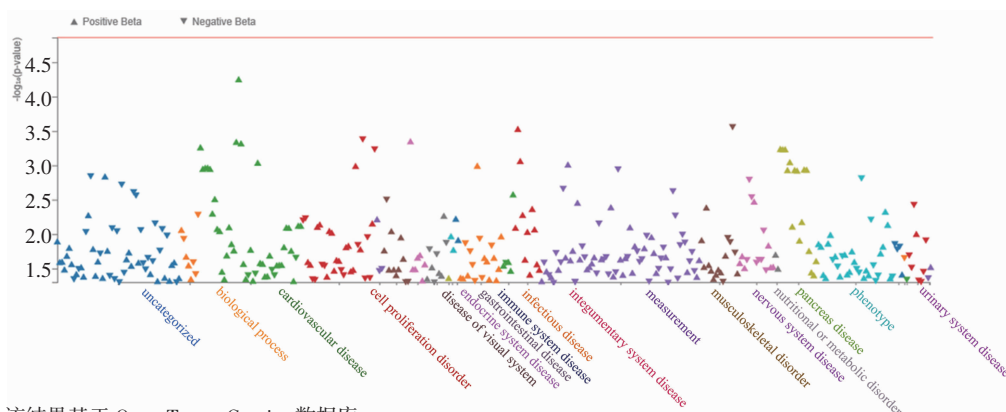
2.2 SNPrs7100025 是一个多效性变异 针对 rs7100025 位点的 PheWAS 研究显示,rs7100025 与众多疾病有着密切的关系,例如典型的心脏病、免

疫系统疾病,rs7100025 是一个多效性变异(pleiotropic variant),对许多疾病有着重要影响,见图 1。

2.3 PGL4.23-rs7100025 质粒构建 将 rs7100025 位点附近一段 500 bp 的序列克隆到 PGL4.23 载体上,如图 2 所示,rs7100025 位点正向和反向序列的 PCR 产物为 545 bp,载体用 Hind III 和 Kpn I 双酶切之后的长度为 4 236 bp,通过同源重组技术将 PCR 纯化产物和载体纯化产物连接。质粒构建成功后 Sanger 测序无误。

2.4 荧光素酶报告基因实验检测 rs7100025 位点的功能 双荧光素酶报告基因实验显示,正向插入包含 G 等位基因和 A 等位基因的 rs7100025 序列可以提高荧光素酶报告质粒转录活性,并且 G 等位基因效果更加明显;反向插入包含 C 等位基因和 T 等位基因的 rs7100025 序列对基因的调控与空载对照相比无明显差异,见图 3。

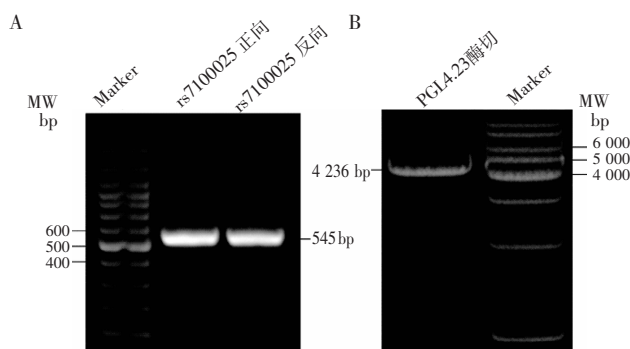
2.5 rs7100025 位点 gRNA 质粒构建 Lenti-Cas9-V2 质粒经 BsmI 酶切之后的产物,琼脂糖凝胶电



注:该结果基于 Open Target Genetics 数据库

图1 rs7100025 位点 PheWAS 结果图

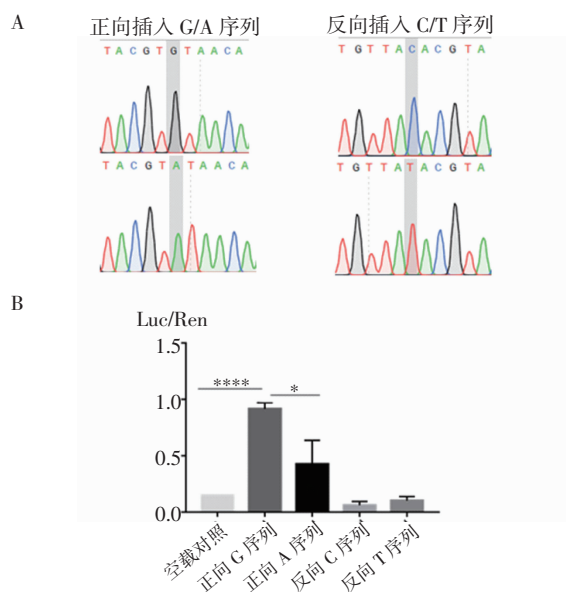
Fig 1 The results of PheWAS at rs7100025



注:A:rs7100025 正向和反向 PCR 产物的获取;B:PGL4.23 经 Kpn I 和 Hind III 双酶切产物的获取

图2 重组质粒 PGL4.23-rs7100025 的构建

Fig 2 Construction of recombinant plasmid PGL4.23-rs7100025

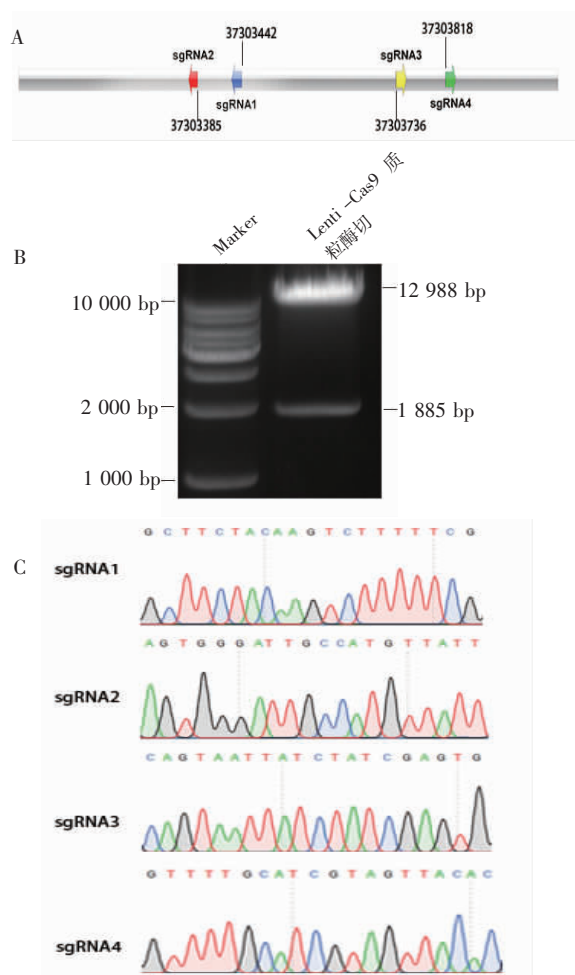


注:A:PGL4.23-rs7100025 质粒测序结果,其中突变质粒正向 A>G,反向 T>C;B:rs7100025 位点荧光素酶报告基因结果;**** $P < 0.0001$; * $P < 0.05$

图3 荧光素酶报告基因实验检测 rs7100025 的转录调控功能

Fig 3 Luciferase reporter gene assay detects the transcription regulatory activity of rs7100025

泳回收 12 988 bp 大小的条带(图 4B),与退火形成的 sgRNA 双链用 T4 连接酶连接,其中 sgRNA 在基因组上的位置如图 4A 所示,构建好的质粒均经过 Sanger 测序验证正确。



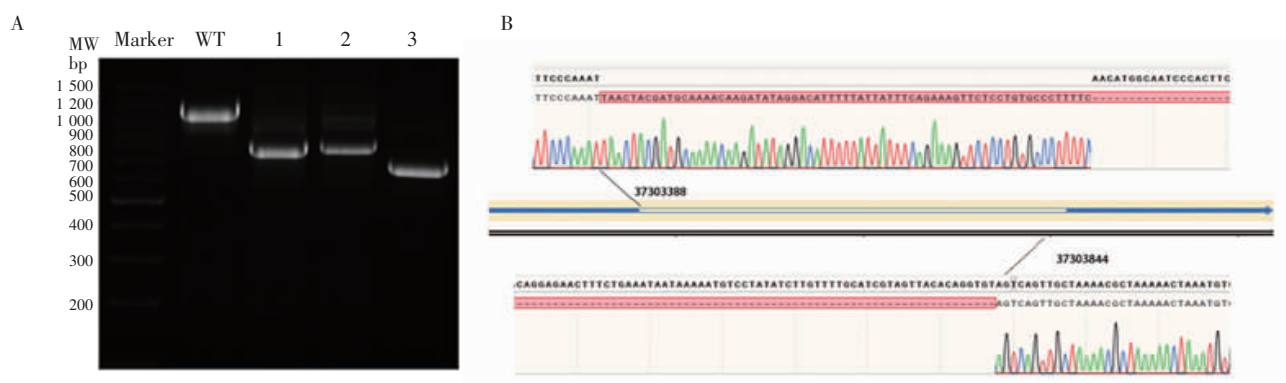
注:A:4 个 sgRNA 在基因组上的位置,其中数字代表 10 号染色体的碱基序号;B:Lenti-Cas9-V2 质粒用 BsmB I 酶切之后的产物获取;C:4 个 gRNA Sanger 测序结果图

图4 rs7100025 位点敲除质粒的构建

Fig 4 Construction of plasmids with rs7100025 genomic region being deleted

2.6 rs7100025 位点敲除的 Jurkat 细胞系构建 利用构建的 sgRNA 质粒以及慢病毒介导的感染技术,将 rs7100025 位点在 Jurkat 细胞系中进行敲除,并经过嘌呤霉素筛选,筛选出单克隆。单克隆细胞基因型鉴定的结果如图所示(图 5A)。选取 3 号单克隆做 Sanger

测序,测序结果如图所示(图 5B)。Jurkat 细胞 chr10:37303388 至 chr10:37303844 的基因组 DNA 序列(456 bp)被敲除。SNPrs7100025(chr10:37303610)就位于这段序列之中。因此,成功建立了幼年特发性关节炎 10 号染色体上遗传位点因果变异删除的单克隆细胞。



注:A:rs7100025 位点敲除细胞单克隆基因型鉴定结果图;B:rs7100025 位点敲除细胞 3 号单克隆 Sanger 测序结果,其中 37303388 和 37303844 为 10 号染色体上的位置,这个片段被成功敲除

图 5 rs7100025 位点敲除的 Jurkat 细胞系构建

Fig 5 Construction of Jurkat cell line with rs7100025 region being deleted

3 讨论

在过去十多年中,GWAS 已经对人类基因组中数百万个遗传变异进行了基因型-表型关联测试,研究 SNP 与疾病的相关性,报道了众多复杂疾病的遗传位点^[4,9]。GWAS 中所发现的遗传位点具有以下 3 个特点。

(1)GWAS 研究发现的 indexSNP 不一定是因果变异。由于 LD 的存在,遗传变异通常会与染色体上的一些临近变异高度连锁。因此,当一个区域中的一个或多个变异,对人类复杂特征或疾病产生因果效应时,该区域中的许多非因果变异也与疾病等表型呈现显著相关性。目前已经有许多统计方法和基因组功能注释被广泛应用于确定因果变异^[10-12],例如贝叶斯分析、ANNOVAR 注释软件、VEP 注释软件等等。本研究使用了自身免疫病致病变异的遗传和表观遗传精细定位平台进行生物信息学分析确定了 rs7100025 为 10p11.21 位点最为可能的因果变异。

(2)无论是 GWAS 的 indexSNP 还是因果变异,大约 93% 的 SNP 都位于基因组的非编码区,例如基因的内含子和基因间的区域^[13]。因此,GWAS SNPs 对疾病发生、发展的影响是通过其对靶基因的转录调控实现的。通过荧光酶素实验证明了 rs7100025 具有调控转录的能力。

(3)GWAS 位点所调控的靶基因不一定是距离其

最近的基因。有可能是 eQTL 基因或者 Hi-C 基因^[14],与 GWAS 因果变异在基因组分布上有一定的距离。由于染色质的高度折叠,GWAS 因果变异与靶基因的启动子区相反应,实现其对靶基因的远端调控作用。

由于基因组编辑的困难,GWAS 位点的功能研究远远落后于 GWAS 的遗传学发现。CRISPR/Cas9 技术的发明和应用为进行 GWAS SNPs 的功能研究提供了新的方向。在肾癌易感性遗传位点的功能研究中,研究者在人肾细胞癌细胞中敲除因果变异 rs35252396,获得了单克隆细胞。进一步与野生型细胞相比,发现其所调控的靶基因及所影响的信号通路^[15]。在另一项对多种自身免疫病的遗传学研究中,作者利用 CRISPR/Cas9 技术将 rs558245864 位点敲除获得了两个杂合细胞系,并与野生型细胞系相比,发现这一位点对染色质可及性及基因转录的影响^[16]。因此,建立因果变异删除的单克隆细胞系是对 GWAS 位点进行功能研究的重要环节。

GWAS 单一 SNP 对疾病的作用力相对较小,体现为其 OR 一般仅为 1.1~1.2。此外,GWAS 位点的作用往往由多个变异共同驱动,对单个变异进行编辑可能无法表现出足够的作用力以产生相应的细胞或生化水平的变化,因此对整个疾病遗传位点的删除可能是一种更为有效的研究策略^[17-19]。同样在技术上,对单一 SNP 的编辑目前相对较难。因此在 GWAS 位点的功能学研究中,往往对 GWAS 位点进行敲除。敲除的片段大小从几十个碱基到几百个碱基

不等。当然对单一 SNP 编辑,更能精准地研究这一 SNP 的功能和作用。在一项关于 5 种血管系统疾病 (vascular diseases) 的研究中,研究者在内皮细胞和血管平滑肌细胞中特异性敲除了 rs9349379 位点附近的 88bp 区域,通过 RNA-seq 实验发现这一缺失导致内皮素-1(EDN1)基因的表达水平升高。然后再对 rs9349379 位点进行单碱基的编辑,得到 rs9349379 的次等位基因型(G/G)的细胞系,验证了 EDN1 为 rs9349379 位点的靶基因^[20]。

利用 CRSPR/Cas9 技术对免疫细胞进行基因组编辑的实验存在着许多技术难点。与肿瘤细胞系的贴壁生长不同,作为自身免疫疾病的研究模型 Jurkat 细胞是悬浮细胞。对其进行转染效率低,因此采用了慢病毒感染的方法。通过获得高滴度的病毒液来感染悬浮细胞,从而使悬浮细胞的基因组编辑成功进行。应用该技术成功敲除了 Jurkat 细胞中 rs7100025 所在的基因组区域,为寻找这一位点的靶基因以及后续的相关功能研究奠定了基础。

参考文献:

- [1] WANG L F, WANG F S, GERSHWIN M E. Human autoimmune diseases: a comprehensive update[J]. *J Intern Med*, 2015, 278(4): 369–395.
- [2] SELDIN M F. The genetics of human autoimmune disease: a perspective on progress in the field and future directions[J]. *J Autoimmun*, 2015, 64: 1–12.
- [3] ISHIGAKI K. Beyond GWAS: from simple associations to functional insights[J]. *Semin Immunopathol*, 2022, 44(1): 3–14.
- [4] VISSCHER P M, WRAY N R, ZHANG Q, et al. 10 years of GWAS discovery: biology, function, and translation[J]. *Am J Hum Genet*, 2017, 101(1): 5–22.
- [5] LI Y R, LI J, ZHAO S D, et al. Meta-analysis of shared genetic architecture across ten pediatric autoimmune diseases[J]. *Nat Med*, 2015, 21(9): 1018–1027.
- [6] FARH K K, MARSON A, ZHU J, et al. Genetic and epigenetic fine mapping of causal autoimmune disease variants[J]. *Nature*, 2015, 518(7539): 337–343.
- [7] GHOUSAINI M, MOUNTJOY E, CARMONA M, et al. Open targets genetics: systematic identification of trait-associated genes using large-scale genetics and functional genomics[J]. *Nucleic Acids Res*, 2021, 49(D1): D1311–D1320.
- [8] MOUNTJOY E, SCHMIDT E M, CARMONA M, et al. An open approach to systematically prioritize causal variants and genes at all published human GWAS trait-associated loci[J]. *Nat Genet*, 2021, 53(11): 1527–1533.
- [9] TAM V, PATEL N, TURCOTTE M, et al. Benefits and limitations of genome-wide association studies[J]. *Nat Rev Genet*, 2019, 20(8): 467–484.
- [10] SCHAID D J, CHEN W, LARSON N B. From genome-wide associations to candidate causal variants by statistical fine-mapping[J]. *Nat Rev Genet*, 2018, 19(8): 491–504.
- [11] CANNON M E, MOHLKE K L. Deciphering the emerging complexities of molecular mechanisms at GWAS loci [J]. *Am J Hum Genet*, 2018, 103(5): 637–653.
- [12] BROEKEMA R V, BAKKER O B, JONKERS I H. A practical view of fine-mapping and gene prioritization in the post-genome-wide association era[J]. *Open Biol*, 2020, 10(1): 190221.
- [13] MAURANO M T, HUMBERT R, RYNES E, et al. Systematic localization of common disease-associated variation in regulatory DNA[J]. *Science*, 2012, 337(6099): 1190–1195.
- [14] CROSS-DISORDER GROUP OF THE PSYCHIATRIC GENOMICS CONSORTIUM. Genomic relationships, novel loci, and pleiotropic mechanisms across eight psychiatric disorders[J]. *Cell*, 2019, 179(7): 1469–1482.e11.
- [15] GRAMPP S, PLATT J L, LAUER V, et al. Genetic variation at the 8q24.21 renal cancer susceptibility locus affects HIF binding to a MYC enhancer[J]. *Nat Commun*, 2016, 7: 13183.
- [16] KUMASAKA N, KNIGHTS A J, GAFFNEY D J. High-resolution genetic mapping of putative causal interactions between regions of open chromatin[J]. *Nat Genet*, 2019, 51(1): 128–137.
- [17] CORRADIN O, SAIKHOVA A, AKHTAR-ZAIDI B, et al. Combinatorial effects of multiple enhancer variants in linkage disequilibrium dictate levels of gene expression to confer susceptibility to common traits[J]. *Genome Res*, 2014, 24(1): 1–13.
- [18] GUO C, LUDVIK A E, ARLOTTO M E, et al. Coordinated regulatory variation associated with gestational hyperglycaemia regulates expression of the novel hexokinase HKDC1[J]. *Nat Commun*, 2015, 6: 6069.
- [19] RAOS, YAO Y, BAUER D E. Editing GWAS: experimental approaches to dissect and exploit disease-associated genetic variation[J]. *Genome Med*, 2021, 13(1): 41.
- [20] GUPTA R M, HADAYA J, TREHAN A, et al. A genetic variant associated with five vascular diseases is a distal regulator of endothelin-1 gene expression[J]. *Cell*, 2017, 170(3): 522–533.

(2021-12-24 收稿)