

利用 CRISPR/Cas9 技术敲除 HeLa 细胞中 YAF2 基因

丛晓杰 马晓骊 陈 虹 黄秉仁 陈 等

摘 要 **目的** 利用 CRISPR/Cas9 技术建立 YAF2 (YY1 associated factor 2) 基因敲除的宫颈癌 HeLa 细胞株,用于 YAF2 基因在宫颈癌细胞中分子功能的研究。**方法** 首先利用 CRISPR/Cas9 序列设计网站,设计两对靶向 YAF2 基因第 2 外显子不同位点的向导 RNA (single - guide RNA, sgRNA)。化学合成 sgRNA 寡核苷酸序列,分别克隆至质粒 pX335 中,测序确认插入片段正确的克隆。先用一对重组载体转染 HeLa 细胞,7 天后,再用另一对转染 HeLa 细胞,第 2 对转染 3 天后,取培养细胞的 2/3 提取基因组 DNA,对敲除位点附近的片段进行 PCR 扩增后通过 DNA 测序对敲除效率进行分析,剩余细胞在 96 孔平板上通过有限稀释法筛选 YAF2 敲除的细胞株。用蛋白质免疫印迹实验初步鉴定 YAF2 蛋白质表达缺失的细胞克隆,提取其基因组 DNA,对敲除位点附近的序列进行 PCR 扩增,将扩增产物克隆至 pGEM - T easy 载体,通过 DNA 测序确认 YAF2 基因纯合敲除的细胞株。**结果** 成功构建两对针对人 YAF2 基因第二外显子的 pX335 - sgRNA 质粒;PCR 产物测序证明两对重组载体均有 YAF2 基因敲除活性;得到 2 株 YAF2 敲除的 HeLa 细胞株。**结论** 利用 CRISPR/Cas9 技术在 HeLa 细胞中成功敲除 YAF2 基因,为在 HeLa 细胞中研究 YAF2 的分子功能奠定基础。

关键词 CRISPR/Cas9 YAF2 HeLa

中图分类号 R34

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2016.11.007

Establishment of YAF2 Gene Knockout HeLa Cell Line by CRISPR/Cas9. Cong Xiaojie, Ma Xiaoli, Chen Hong, et al. State Key Laboratory of Medical Molecular Biology, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Institute of Basic Medical Sciences, CAMS and PUMC, Beijing 100005, China

Abstract **Objective** The aim of this study was to establish the HeLa cell line with YAF2 gene knockout by CRISPR/Cas9 technique. **Methods** Firstly, two pairs of short guide RNA were designed to target two different sites of exon 2 of YAF2, and the sequences were chemically synthesized, and inserted into plasmid pX335. Next, the correct clones were confirmed by DNA sequencing. The first pair of pX335 - sgRNA was transfected into HeLa cells, and seven days later, the second pair was transfected. Three days after the second transfection, genomic DNA from a total of 2/3 cultured cells were extracted and the DNA fragment encompassing knockout site was amplified by polymerase chain reaction (PCR) to detect the knockout efficiency. The remaining of the cells was cultured to isolate single cell clones by limited dilution method. The candidate clones were cultured and Western blot was carried out to initially screen YAF2 expression level. Genomic DNAs from YAF2 - null clones were extracted to serve as the template to amplify the target fragments by PCR. Then, the products were cloned into pGEM - T easy vectors and YAF2 knockout were confirmed through DNA sequencing. **Results** Two pairs of recombinant plasmids differentially targeting two sites of exon 2 of YAF2 gene were successfully constructed and the knockout efficiency estimated by PCR was high; two stable YAF2 knockout cell lines were obtained. **Conclusion** The YAF2 gene was successfully knocked out in HeLa cells by CRISPR/cas9 technique, which laid a foundation for the study of the molecular function of YAF2 in HeLa cells.

Key words CRISPR/Cas9; YAF2; HeLa

YAF2 (YY1 associated factor 2) 蛋白是 YAF2 基因编码的 YY1 相关因子,其 N 端含有一个锌指结构域。YAF2 在肌细胞生成的过程中显著上调,通过钙离子激活的蛋白酶促进转录抑制因子 YY1 蛋白水

解。多梳蛋白复合物 (polycomb group, PcG) 是一个重要的转录抑制复合物,在维持胚胎干细胞干性、特异性基因的表达、细胞分化和染色质表观修饰中都发挥着重要的作用,而 YAF2 能够介导 YY1 对多梳蛋白的募集,在转录和表观遗传中发挥作用^[1,2]。研究表明,在斑马鱼早期胚胎发育中,YAF2 抑制 caspase - 8 介导的细胞凋亡,保证胚胎细胞存活和胚胎发育,拮抗其家族成员 RYBP (RING1 and YY1 binding protein) 的功能。但在条件性敲除 RYBP 的果

基金项目:国家自然科学基金资助项目 (81272229)

作者单位:100005 中国医学科学院基础医学研究所、北京协和医学院基础学院生物化学与分子生物学系、医学分子生物学国家重点实验室

通讯作者:陈等,副研究员,电子信箱:chendeng2001@hotmail.com

蝇中,外源的 YAF2 能够回补由于 RYBP 缺失造成的 PcG 相关的 H3K27me3 的下调,互补 RYBP 的功能^[2]。在人非小细胞肺癌和结直肠癌细胞中,YAF2 通过稳定程序性死亡因子 5(programmed cell death 5, PDCD5)促进 p53 介导的细胞对遗传毒性的应激反应^[3]。在骨髓瘤细胞中,YAF2 能够促进 MYCN(v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene neuroblastoma derived homolog)依赖的转录激活作用,抑制 Myc 的反式激活和转化,在细胞周期调节、细胞分化和细胞凋亡中发挥作用。由于 YAF2 在细胞中的分子功能尚不十分明确,本研究利用 CRISPR(clustered regularly interspaced short palindromic repeats)/Cas9 技术敲除宫颈癌 HeLa 细胞中的 YAF2 基因,为研究 YAF2 在肿瘤细胞中的分子功能奠定基础。

材料与方法

1. 材料:人宫颈癌 HeLa 细胞株由中国医学科学院基础医学研究所宋伟副研究员馈赠。pX335 质粒由中国医学科学院基础医学研究所黄粤教授馈赠。DH5 α 感受态细胞购自北京全式金生物技术有限公司。限制性核酸内切酶 Bbs I 购自 New England BioLabs 公司。DNA Ligation Kit Ver. 2.0 购自(大连)宝生物工程股份有限公司。 β -actin 抗体(A5441)和 YAF2 抗体(HPA026867)购自美国西格玛-奥德里奇中国有限公司。高纯度质粒中提试剂盒购自北京康为世纪生物科技有限公司。T 载体连接试剂盒和胶回收试剂盒购自北京擎科新业生物技术有限公司。Lipo3000 转染试剂购自 Invitrogen 公司。基因组 DNA 快速抽提试剂盒购自生工生物工程(上海)股份有限公司。蛋白酶抑制剂 Cocktail 购自 Roche 生物公司。羊抗小鼠 IgG/HRP 和羊抗兔 IgG/HRP 购自北京中杉金桥生物技术有限公司。ECL 化学发光底物和 BCA 蛋白质定量试剂盒购自 Pierce 公司。寡核苷酸链的合成及 DNA 测序均由(上海)生工生物工程股份有限公司完成。

2. 方法:(1)sgRNA 靶位点的选择及寡核苷酸链的合成:在网站(<http://crispr.mit.edu/>)上提交包含 YAF2 第 2 外显子及上下游部分内含子在内的约 200nt 的序列,在网站给出的高分 nicked guide RNA 对中筛选至少有 1 条链的目的片段位于第 2 外显子的 guide RNA 对。按照上述条件,共挑选两对,分别命名为 sgRNA-A-F/R 和 sgRNA-B-F/R。设计寡核苷酸链时,正义链模板的 5' 末端添加 5'-CACC-3',反义链模板的 5' 末端添加 5'-AAAC-

3',以便与 Bbs I 酶切后形成的黏性末端互补配对(寡核苷酸单链序列见表 1)。使用 DNAMAN 软件设计扩增靶位点附近 DNA 片段的 PCR 引物:AT-F:5'-TGC CTC TTC CTG ACT CCC TT-3';AT-R:5'-TGT GAC CCA GTT CCT ATC GC-3',扩增产物长度为 448bp。(2) pX335-sgRNA 载体的构建:将 sgRNA 寡核苷酸两条互补单链退火形成双链:用退火缓冲液(10mmol/L Tris, 50mmol/L NaCl, 1mmol/L EDTA)稀释每条寡核苷酸单链至 100 μ mol/L,互补配对的两条 sgRNA 寡核苷酸单链各取 10 μ l,混合,100 $^{\circ}$ C 煮沸 3min,自然冷却至室温,4 $^{\circ}$ C 储存备用。寡核苷酸单链 Guide A-F-1 和 Guide A-F-2 退火后形成 sgRNA-A 的上游序列,命名为 sgRNA-A-F;寡核苷酸单链 Guide A-R-1 和 Guide A-R-2 退火后形成 sgRNA-A 的下游序列,命名为 sgRNA-A-R。用同样方法得到 sgRNA-B-F 和 sgRNA-B-R。用限制性核酸内切酶 Bbs I 线性化 pX335 质粒 1 μ g,胶回收后稀释线性化质粒浓度至 5ng/ μ l;将 sgRNA-A-F, sgRNA-A-R, sgRNA-B-F, sgRNA-B-R 分别稀释 400 倍,分别取上述稀释质粒和 sgRNAs,用 T4 DNA 连接酶进行连接,连接体系如下:1 μ l 线性化的 pX335 质粒,8 μ l 稀释的双链 sgRNA,10 μ l 连接酶 solution I,1 μ l ddH $_2$ O,共 20 μ l 体系,16 $^{\circ}$ C 连接过夜。连接产物转化 DH5 α 感受态细胞,挑取单克隆,提取质粒进行 DNA 测序。提取和纯化测序正确的重组质粒 pX335-sgRNA-A-F、pX335-sgRNA-A-R、pX335-sgRNA-B-F 和 pX335-sgRNA-B-R,全部稀释至 1 μ g/ μ l,-20 $^{\circ}$ C 储存备用。(3) 细胞的培养和转染:HeLa 细胞的培养:使用 DMEM 高糖培养基,含 10% 胎牛血清及双抗(100U/ml 青霉素和 0.1mg/ml 链霉素),置于 37 $^{\circ}$ C,5% CO $_2$ 的细胞培养箱内培养。HeLa 细胞的转染:将 HeLa 细胞种至 6 孔板中,转染前汇合度达 70%。转染前 1h 进行细胞换液,每孔更换 1ml 含 3% 胎牛血清不含抗生素的 DMEM 培养基。使用 Lipo3000 转染试剂进行转染,每孔转染 pX335-sgRNA-A-F 和 pX335-sgRNA-A-R 质粒各 3 μ g,pEGFP-C1 质粒 0.5 μ g,转染 6h 后更换为新的完全培养基。约 7 天后,将上述转染细胞传代,种于新的 6 孔板,转染 pX335-sgRNA-B-F 和 pX335-sgRNA-B-R 质粒各 3 μ g,方法同前。同时,分别单独转染两对 pX335-sgRNA 质粒,方法同前。(4) 细胞基因组 DNA 的提取:共同转染组的细胞第 2 次转染约 3 天

后消化细胞,收集约 2/3 的细胞;使用基因组 DNA 提取试剂盒提取其基因组 DNA。单独转染组的细胞也于转染 3 天后消化收集细胞,同样方法提取基因组 DNA。(5)PCR 及活性检测:在第 2 外显子前后的内含子区域设计合适的引物 AT - F/AT - R 用以检测敲除活性。PCR 体系如下:2 × PrimeSTAR GC buffer, 20 μl; dNTPs, 3.2 μl; 20 μmol/L primer AT - F 和 AT - R 各 0.4 μl; 100 ng/μl 基因组 DNA, 0.2 μl; ddH₂O, 15.4 μl; PrimeSTAR HS DNA 聚合酶, 0.4 μl。PCR 程序为:首先 95℃ 变性 10s,接着 95℃ 变性 10s, 52℃ 退火 5s, 72℃ 延伸 30s 作为 1 个循环,共 30 个循环;最后 72℃ 延伸 5min。将 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳,对 448bp 附近的片段进行胶回收和 DNA 测序。根据测序峰图估计两对 sgRNA 联合作用及分别单独作用的活性。(6)筛选 YAF2 稳定敲除的细胞株:第 2 次转染约 3 天后,取培养细胞的 2/3 用于提取基因组 DNA,余下细胞经细胞计数和梯度稀释,制成细胞密度为 10 个/毫升的细胞悬液,以每孔 0.1 ml 种于 96 孔板中。10 天后镜下观察,选出单细胞克隆转种至 24 孔板中,并逐渐扩大培养至 6 孔板。当 6 孔板中细胞汇合度达到 80% 左右时,消化收集 2/3 细胞,余下细胞种回原孔。将收集的不同克隆的细胞分别进行 Western blot 法检测 YAF2 蛋白表达情况。用 Western blot 法初步鉴定 YAF2 表达阴性的细胞克隆,提取基因组 DNA,通过 PCR 扩增和克隆测序,检测 YAF2 基因是否发生移码突变或无义突变。

结 果

1. pX335 质粒信息及寡核苷酸的设计:pX335 质粒以 U6 启动子转录 sgRNA,以 CBh 启动子启动含有核定位序列的人类密码子优化的化脓性链球菌 Cas9 切口酶(human codon - optimized of streptococcus pyogenes CRISPR associated protein 9 nickase, hSpCas9n)的表达。此切口酶相比正常的 Cas9 失活了一个活性结构域,仅能在双链 DNA 的一条链上形成切口,而不再直接形成 DNA 双链断裂(double - strand breaks, DSB)。寡核苷酸单链 Guide A - F - 1 和 Guide A - F - 2 退火后形成 sgRNA - A 的上游双链寡核苷酸序列,且包含特异性黏性末端,命名为 sgRNA - A - F;用同样方法得到 sgRNA - A 的下游双链寡核苷酸序列 sgRNA - A - R 及 sgRNA - B 的上下游序列(寡核苷酸序列列表见表 1)。每对 sgRNA 上下游序列引导 hSpCas9n 进行 DNA 剪切,得到的切口间隔约 50bp,两切口之间形成 DSB,再利用非同源

末端连接(non - homologous end joining, NHEJ)进行修复。

表 1 sgRNA 名称及寡核苷酸序列

sgRNA	寡核苷酸序列(5'→3')
Guide A - F - 1	CACCGGACACAACCCGGACACGACG
Guide A - F - 2	AAACCGTCGTGTCCGGGTGTGTCC
Guide A - R - 1	CACCGCCGAAGCCGCTCTCGGATGA
Guide A - R - 2	AAACTCATCCGAGGACGGCTTCGGC
Guide B - F - 1	CACCGGGCCTCGGCGCTGTTCGGGA
Guide B - F - 2	AAACTCCGAACAGCGCCGAGGCC
Guide B - R - 1	CACCGCATGATGTGCGATGTGCGGA
Guide B - R - 2	AAACTCCGCACATCGCATCATGCG

黏性末端序列用斜体碱基表示

2. 人类的 YAF2 基因(图 1)位于第 12 号染色体短臂 1 区 2 带,长度为 82403bp,存在 5 种编码不同蛋白质的剪接变异体。经鉴定,HeLa 细胞中的 YAF2 蛋白主要由第 2 剪接体编码(NM_005748.5),其 mRNA 含有 4 个外显子,编码区长度为 540bp,共编码 180 个氨基酸。由于第 1 外显子上编码区长度仅为 26bp,不适合设计 sgRNA,故选择长度为 126bp 的第 2 外显子作为设计 sgRNA 的区域。对于笔者设计的两对 sgRNAs,sgRNA - B 的上下游靶序列完全位于第 2 外显子内部,sgRNA - A 上游靶序列位于第 1 内含子中,下游靶序列位于第 2 外显子内部。两对 sgRNA 共同发挥作用,理论上可以提高对第 2 外显子的编辑效率。PCR 扩增引物 AT - F/AT - R 分别位于第 1 内含子和第 2 内含子中,扩增产物完全涵盖敲除靶位点(图 1)。经 DNA 测序验证,重组载体 pX335 - sgRNA - A - F、pX335 - sgRNA - A - R、pX335 - sgRNA - B - F 和 pX335 - sgRNA - B - R 的插入序列及位置与预期相符,重组载体构建成功。

3. 两对 pX335 - sgRNA 可提高对 YAF2 基因的敲除效率:两对 pX335 - sgRNA 先后转染 HeLa 细胞,挑选细胞单克隆之前,收集 2/3 的细胞,以其总基因组 DNA 为模板,扩增靶位点附近序列,将 PCR 产物回收后直接进行 DNA 测序。单独转染一对 pX335 - sgRNA 的 HeLa 细胞也用同样的方法处理后进行 DNA 测序。由于细胞池中野生型和不同突变类型的 HeLa 细胞共同存在,因此扩增产物由于对靶位点附近 DNA 的编辑而在测序峰图上形成套峰,且突变序列的平均峰高与野生型序列的平均峰高之比在一定程度上可以反映敲除效率。结果显示,与野生型序列相比,共同转染组细胞的 DNA 扩增序列出现明显的

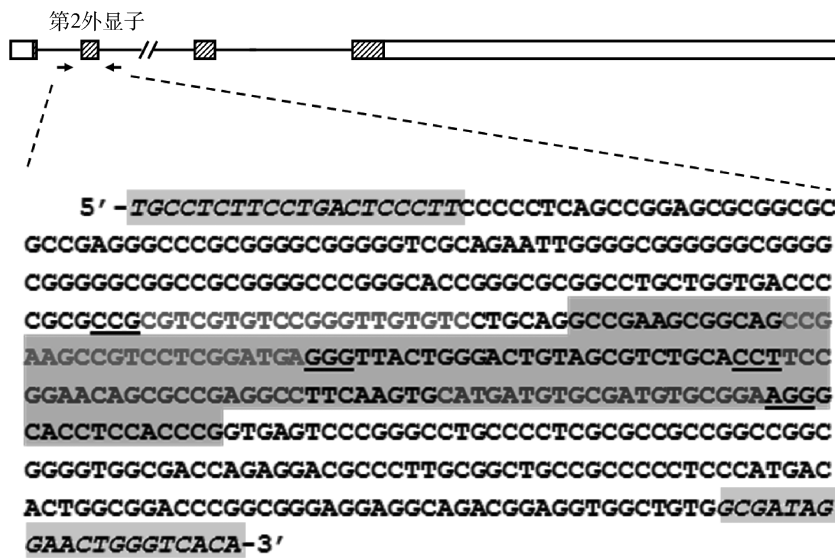
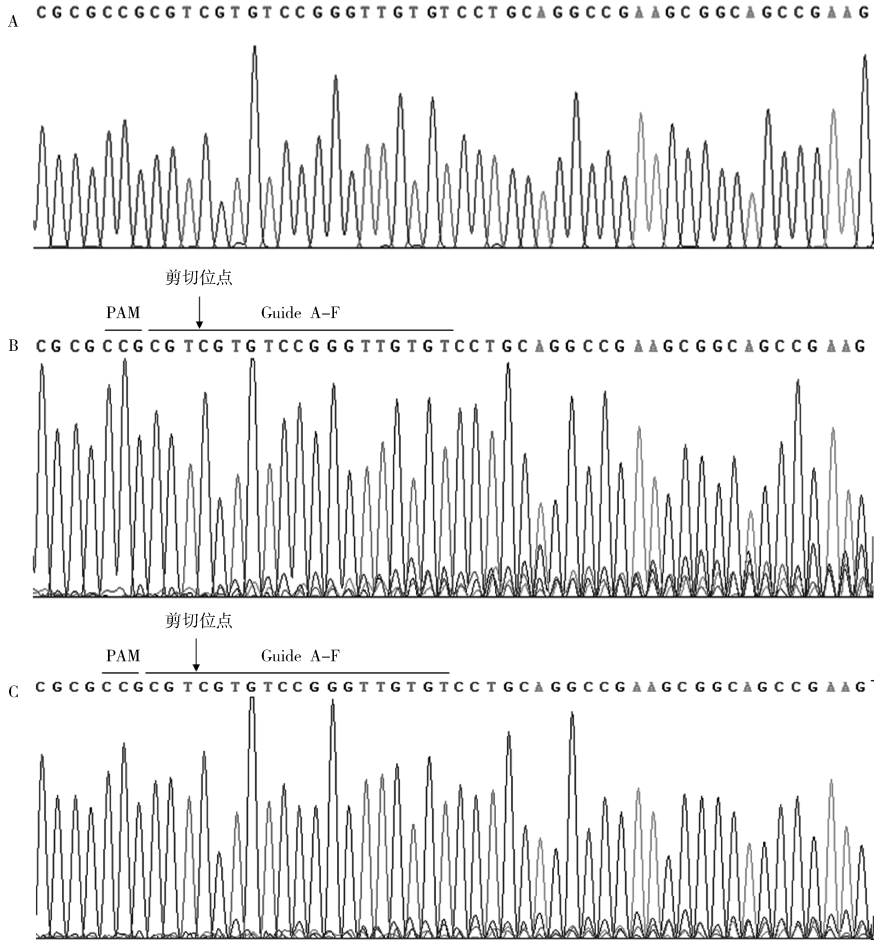


图 1 YAF2 基因模式图和 sgRNA 靶位点示意图

箭头为扩增引物的位置,蓝色背景斜体序列为 PCR 引物序列,灰色背景碱基序列代表第 2 外显子序列,红色字体序列为第 1 对 sgRNA,紫色字体序列为第 2 对 sgRNA,下划线标记 PAM (protospacer adjacent motif) 序列

套峰,表明 pX335 - sgRNA 对靶位点有编辑活性,且 均峰高更高,说明两对 sgRNA 共同作用的敲除效率 突变序列平均峰高比两个单独转染组的突变序列平 更高(图 2)。



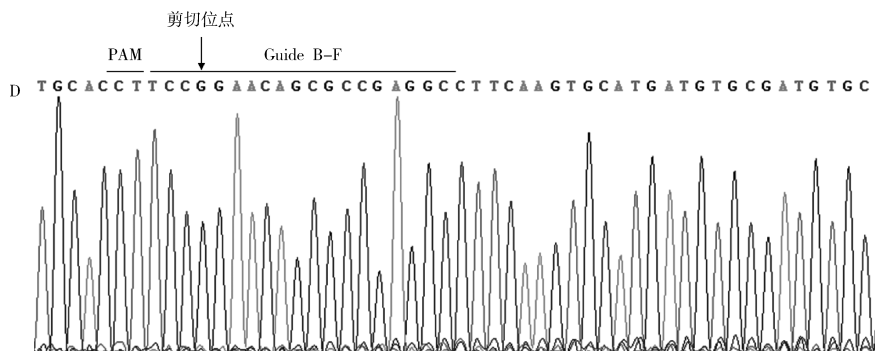


图2 DNA测序检测两对sgRNA共同作用的活性

A. 野生型 HeLa 细胞在靶位点附近的测序峰图; B. 两对 pX335 - sgRNA 共同转染细胞池在对应位置的测序峰图; C. pX335 - sgRNA - A - F/R 单独转染的细胞池在对应位置的测序峰图; D. pX335 - sgRNA - B - F/R 单独转染的细胞池在对应位置的测序峰图; sgRNA、PAM 序列及剪切位点均标注于相应位置

4. 获得稳定敲除 YAF2 基因的细胞株 2 株: 用

Western blot 法检测单克隆细胞中 YAF2 蛋白的表达水平, 结果显示, 野生型 HeLa 细胞中能检测到分子质量约为 25kDa 的 YAF2 蛋白条带, 但在 2 株筛选单克隆的 HeLa 细胞中 YAF2 蛋白条带消失 (图 3)。将这两株细胞靶位点序列的 PCR 产物与 pGEM - T easy 载体进行连接, 连接产物转化 *E. Coli* 细胞后各挑取 4 个菌落进行 PCR 鉴定 (图 4), 由于扩增条带大小相似, 因此全部进行 DNA 测序。测序结果显示, 每株细胞在敲除靶位点附近检测到两种类型的 3 的非整倍数的核苷酸的插入和 (或) 缺失, 或者内含子和外显子接头处核苷酸序列改变 (图 5)。至此在基因和蛋白质水平上都确认了 YAF2 敲除成功。

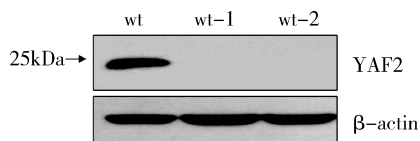


图3 Western blot 法鉴定 YAF2 基因敲除的 HeLa 细胞中 YAF2 蛋白质的表达水平

wt 为野生型对照, wt - 1、wt - 2 分别为基因敲除的 2 株单克隆细胞株, β - actin 作为上样量对照

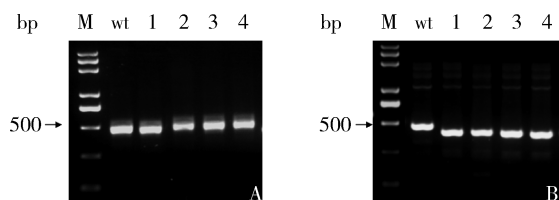


图4 wt - 1、wt - 2 在敲除靶位点附近的 PCR 扩增片段经连接 pGEM - T easy 载体后, 菌落 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳图

M. DL2000plus; 5000、3000、2000、1000、750、500、250、100bp

讨 论

相比于传统的同源重组介导的基因编辑方法, 新的基因编辑工具——锌指核酸酶 (zinc finger nucleases, ZFNs), 转录激活因子样效应因子核酸酶 (transcription activator - like effector nucleases, TALENs) 和规律成簇间隔短回文重复 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR) 使得对基因编辑的效率大大提高^[4-12]。这 3 种基因编辑方法本质上都是基因剪刀, 都导致 DSB 和基因敲除、基因替换、定点突变等^[13]。CRISPR 系统是细菌和古细菌在长期进化过程中形成的一种适应性免疫防御, 用来对抗入侵的病毒及外源 DNA。CRISPR 系统利用 crRNA (CRISPR - derived RNA) 和 tracrRNA (trans - activating crRNA), 结合相关内切酶 Cas (CRISPR - associated) 蛋白来指导对外源序列的降解, 从而为细菌提供免疫性^[14,15]。利用 CRISPR 系统的这一特性, CRISPR/Cas9 技术是利用人工合成的 sgRNA 来引导 Cas9 蛋白在靶位点实施剪切, 再利用细胞本身 DNA 修复过程的高错配率导致的核苷酸插入或缺失, 以实现基因编辑^[16]。相比第 1、2 代基因编辑工具 ZFN 和 TALENs, CRISPR/Cas9 系统有着载体构建简单快速, 构建成本低, 敲除效率高等优点。

CRISPR/Cas9 系统利用同源 sgRNA 与靶位点的互补识别引导核酸内切酶 Cas9 在靶点进行 DNA 双链切割, 细胞通过 NHEJ 对 DSB 进行修复的过程会在断裂位点产生随机的核苷酸的插入和 (或) 缺失, 可能形成移码突变或无义突变。pX335 质粒表达的 Cas9 切口酶仅在 DNA 双链的一条链上形成切口, 当两个切口间隔相近时, 两切口之间的 DNA 片段会被剪切形成 DSB, 再进行 NHEJ。因此, 使用间隔在

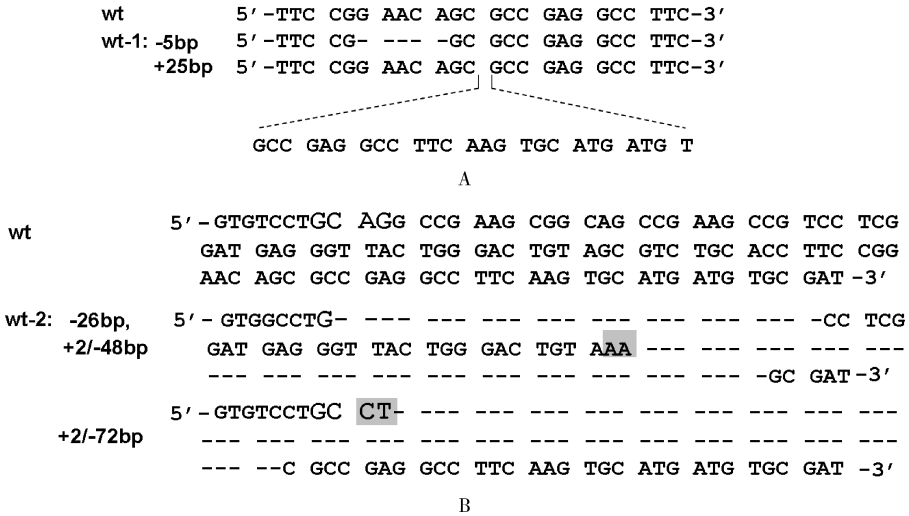


图5 两株单克隆细胞在靶位点附近的缺失和插入突变

A. wt-1 在第 2 外显子内缺失或插入 3 的非整数倍的核苷酸,造成移码突变;B. wt-2 第 1 内含子与第 2 外显子接头处碱基突变,导致 mRNA 的剪接异常(灰色背景碱基表示核苷酸的插入,-表示核苷酸的缺失)

50bp 以内的两条 sgRNA 引导两个 Cas9 切口酶实施剪切,可以有效降低脱靶率。考虑到转染及敲除效率,本实验采用了两对 sgRNA 间隔 7 天共同转染,共同作用相邻靶位点的方式对目的基因进行敲除,两对 pX335-sgRNA 重组载体转染细胞后分别在各自靶位点进行 DNA 剪切,从而提高对 YAF2 的敲除效率。通过对 YAF2 第 2 外显子附近片段的 DNA 测序发现,共同转染组从第 1 对 sgRNA 的靶位点处开始出现大量套峰,证实本实验使用的两对靶向 YAF2 第 2 外显子的 sgRNA 均有敲除活性,且二者共同作用的敲除效率优于单独敲除的效率。实验通过 Western blot 法和 DNA 测序,从蛋白质和基因水平确定了对 YAF2 的敲除,增加了结果的可靠性。由于基因外显子中 3 的整倍数的碱基改变有可能对其编码蛋白的影响较小,因此选择了外显子中核苷酸序列改变数为 3 的非整倍数或者内含子和外显子接头处核苷酸序列改变的细胞株进行扩大培养,筛选得到两株稳定敲除 YAF2 基因的 HeLa 细胞株。

由于 YAF2 通过与多梳蛋白的相互作用,在基因的转录和表观遗传中发挥重要作用,因此本研究在宫颈癌 HeLa 细胞中建立的 YAF2 敲除的细胞株对于研究肿瘤细胞中 YAF2 的分子功能具有重要意义。

参考文献

1 Wilkinson F, Pratt H, Atchison ML. PcG recruitment by the YY1 REPO domain can be mediated by Yaf2[J]. Cell Biochem, 2010,109 (3):478-486

2 Basu A, Wilkinson FH, Colavita K, et al. YY1 DNA binding and interaction with YAF2 is essential for polycomb recruitment[J]. Nucleic Acids Res,2014,42(4):2208-2223

3 Park SY, Choi HK, Jo SH, Seo J, et al. YAF2 promotes TP53-mediated genotoxic stress response via stabilization of PDCD5[J]. Biochim Biophys Acta, 2015,1853(5):1060-1072

4 Brown AJ, Fisher DA, Kouranova E, et al. Whole-rat conditional gene knockout via genome editing[J]. Nat Methods,2013,10(7):638-640

5 Tesson L,Usal C,Menoret S,et al. Knockout rats generated by embryo microinjection of TALENs[J]. Nat Biotechnol, 2011, 29(8): 695-696

6 Miller JC,Tan S,Qiao G,et al. A TALE nuclease architecture for efficient genome editing[J]. Nat Biotechnol,2011,29(2):143-148

7 Bedell VM,Wang Y,Campbell JM,et al. In vivo genome editing using a high-efficiency TALEN system[J]. Nature, 2012, 491 (7422): 114-118

8 Wiedenheft B,Sternberg SH, and Doudna JA. RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea[J]. Nature, 2012, 482 (7385): 331-338

9 Mojica FJ,Diez-Villasenor C, Soria E,et al. Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria[J]. Mol Microbiol,2000,36(1): 244-246

10 Terns MP,Terns RM. CRISPR-based adaptive immune systems[J]. Curr Opin Microbiol,2011,14(3): 321-327

11 Bhaya D,Davison M, Barrangou R. CRISPR-Cas systems in bacteria and archaea: versatile small RNAs for adaptive defense and regulation[J]. Annu Rev Genet,2011,45: 273-297

12 Papadaki M. CRISPR: taking the shortcut to a healthy genome editing enterprise[J]. Regen Med, 2016,11(3):229-234

13 Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity[J]. Science,2012, 337:816-821

14 Gasiunas G, Barrangou R, Horvath P, et al. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria[J]. Science,2012, 109:E2579-E2586

15 Zhang F, Wen Y, Guo X. CRISPR/Cas9 for genome editing: progress, implications and challenges[J]. Hum Mol Genet,2014, 23 (R1):R40-46

16 Fu Y, Foden JA, Khayter C, et al. High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells[J]. Nat Biotechnol, 2013,31:822-826

(收稿日期:2016-04-12)
(修回日期:2016-04-21)