

利用 CRISPR/Cas9 技术敲除 斑马鱼核受体 PXR 基因初探*

成凯¹, 冯永永², 周莉², 李凯彬², 聂湘平¹

(1. 暨南大学生命科学技术学院生态系//水生生物研究所, 广东 广州 510632;
2. 中国水产科学研究院珠江水产研究所, 广东 广州 510380)

摘要: 孕烷 X 受体 (Pregnane X receptor, PXR) 是核受体超家族 (NRs) 中 NR11 的重要成员之一, 在保护机体免于内源性和外源性物质损伤方面具有重要作用。利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术建立 PXR 基因敲除的斑马鱼模型, 为研究环境污染物的毒性机理及代谢过程提供基础模型。根据 PXR 基因序列, 设计 gRNA 靶位点, 体外转录合成 gRNA。同时, 将设计合成的 gRNA 与 Cas9 mRNA 通过显微注射转入斑马鱼受精卵, 经孵化、筛选出有效的突变体, 并逐代培养杂交筛选出 PXR 基因敲除突变体。结果表明利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术成功敲除 PXR 基因, 经测序分析获得稳定的 PXR^(+4/+4) 基因纯合体。

关键词: PXR; CRISPR/Cas9; 斑马鱼

中图分类号: S917.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2018) 05-0115-08

Knocking out nuclear transcriptional factor PXR gene in zebrafish via CRISPR/Cas9 technology

CHENG Kai¹, FENG Yongyong², ZHOU Li², LI Kaibin², NIE Xiangping¹

(1. Department of Ecology//Hydrobiology Research Institute, Jinan University, Guangzhou 510632, China;
2. Pearl River Fisheries Research Institute CAFS, Guangzhou 510380, China)

Abstract: Pregnane X receptor (PXR) transcriptional factor is one of the nuclear receptors family members, which plays a crucial role in the process of the transformation and metabolism of exogenous and endogenous substances. The present study focus on the establishment of zebrafish model with PXR gene null by use of CRISPR/Cas9 gene editing technology to provide a fundamental model for the studying of environmental toxicological analysis. Target sites of gRNA are designed and synthesized based on the sequence of PXR gene. The mixtures of gRNA and Cas9 mRNA were injected into zebrafish fertilized eggs during single cell phase via microinjection technical approach. Mutant with PXR gene null species were selected out through generational hybridization. Result showed that PXR gene in zebrafish was successfully knocked out by CRISPR/Cas9 technological approach, and sequence analysis exhibited 4 bp insert in the encoding PXR gene region.

Key words: pregnane X receptor (PXR); CRISPR/Cas9; zebrafish

* 收稿日期: 2018-03-30

基金项目: 国家科技支撑计划 (2015BAI09B05); 国家自然科学基金 (41576110)

作者简介: 成凯 (1992 年生), 男; 研究方向: 环境科学; E-mail: 296243760@qq.com

通信作者: 聂湘平 (1966 年生), 男; 研究方向: 生态毒理学; E-mail: txpnie@jnu.edu.cn

李凯彬 (1973 年生), 男; 研究方向: 水生生物学; E-mail: likuibins@126.com

孕烷 X 受体 (Pregnane X receptor, PXR) 是核受体超家族 (NRs) 中 NR1I 的重要成员之一, 在保护生物机体免于内源性和外源性物质损伤方面有重要作用^[1]。PXR 转录因子参与调控众多与解毒代谢相关的基因, 例如人体内药物代谢的主要酶系之一细胞色素 P450 (CYP) 就是 PXR 转录因子调控的下游重要靶基因之一, 该酶也是包括鱼类在内许多动物代谢外源污染物的主要代谢酶系。因此 PXR 核转录因子诱导激活或抑制阻遏^[2], 可调节外源污染物的代谢和转运^[3], 对外源污染物在体内的转化、代谢有着重要的作用^[4]。目前研究鱼类生物 PXR 转录因子在环境污染物暴露下的调控响应变化已有报道^[5-6]。但对 PXR 转录因子在污染物解毒代谢中的具体作用机制还缺少深入研究。如果能利用新一代 CRISPR/Cas9 基因编辑技术^[7]对该目标基因进行编辑, 获得 PXR 纯缺陷型 PXR^(-/-), 对比较研究 PXR 转录因子在污染物代谢过程中作用将会有重要帮助。

CRISPR/Cas9 系统是第三代“基因组定点编辑技术”^[8], 该系统中 crRNA (CRISPR-derived RNA) 与 tracrRNA (trans-activating RNA) 结合形成一个单链向导 RNA (guide RNA, gRNA), 能特异性识别目标基因序列, 并引导 Cas9 核酸内切酶准确识别特定靶位点进行 DNA 双链剪切^[9], 利用细胞的非同源末端自我连接修复机制, 断裂处的基因片段在自我修复过程中可能会出现插入或缺失突变现象^[10], 从而改变基因组原始结构, 达成基因

编辑目的。

本研究利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术, 以模式生物斑马鱼为研究对象, 建立鱼类体内和污染物代谢密切相关的核转录因子 PXR 基因靶向敲除系统, 获得完全缺失 PXR 基因的斑马鱼, 为 PXR 基因的相关研究提供基础研究材料。

1 材料与方法

野生型斑马鱼品系 Tuebingen (Tu) 由中国水产科学研究院珠江水产研究所提供, Cas9 mRNA 表达质粒采用 pXI7-Cas9^[11], YFP-nanos3 质粒由南京大学动物模式研究所提供^[11-12]。

1.1 gRNA 靶位点的设计

在 NCBI 上查询斑马鱼 PXR 基因的核酸序列 Sequence ID: XM_005167420.4, 查询 PXR 基因内含子、外显子结构及其转录本信息。设计原则: 根据 PXR 基因组外显子结构 (图 1), 靶位点选取其第 2 个外显子, 靶位点的设计应在起始密码子 ATG 之后, 为了保证基因剪切被破坏, 原则上不可选取 5-UTR 和 3-UTR。以 PXR 基因的第 2 个外显子的序列为模板, 通过网站 <http://crispr.mit.edu/> 设计 gRNA 靶位点, 从在线设计结果中挑选符合要求的靶位点序列, 并比对高评分且特异性强的靶位点作为候选位点 (图 2)。再根据各组 gRNA 靶位点序列 (表 1) 分别设计其对应的特异性正向引物 (表 2)。



图 1 PXR 基因组外显子结构示意图

Fig. 1 PXR genome exon structure diagram

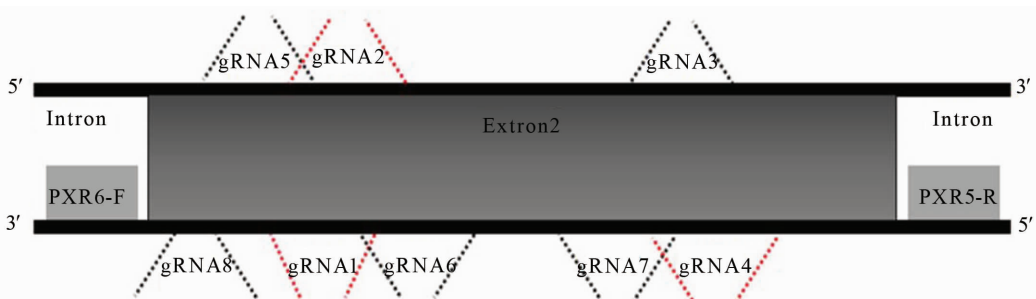


图 2 gRNA 靶位点示意图

Fig. 2 gRNA target map

gRNA 具体序列见表 1

The gRNA specific sequence is shown in Table 1

表 1 gRNA 靶位点¹⁾
Table 1 gRNAtarget site

gRNA	Target sequence
gRNA1	5'-CCCCTGGACGATTCCGGACACGG-3'
gRNA2	5'-ACCGTGTCCCGAATCGTCCAAGG-3'
gRNA3	5'-TAGATTTGTCGCCGCATACTTGG-3'
gRNA4	5'-GTATGCGGCGACAAATCTACTGG-3'
gRNA5	5'-AATGGAGGAGCTTTCTCCCTGG-3'
gRNA6	5'-GGGACACGGTGATGGGTCTGAGG-3'
gRNA7	5'-CCGCATACTTGGCAAATTTTAGG-3'
gRNA8	5'-CAGGATGAGTAAAGAAATGGAGG-3'

1): Cas9 mRNA 只能切割 PAM (protospacer adjacent motif) 上游的序列, 红色字体标记为 PAM 区
Cas9 mRNA can only shear the sequence of PAM upstream, the red font marks are the PAM area

表 2 gRNA 特异性正向引物
Table 2 gRNA specific forward primer

gRNA	Primer sequence
gRNA-1	5'-TAATACGACTCACTATAACCCCTGGACGATTCCGGACACGGGTTTGTAGAGCTAGAAATAGC-3'
gRNA-2	5'-TAATACGACTCACTATAACCGTGTCCCGAATCGTCCAGGG GTTTTGTAGAGCTAGAAATAGC-3'
gRNA-3	5'-TAATACGACTCACTATATAGATTTGTCGCCGCATACTTGG GTTTTGTAGAGCTAGAAATAGC-3'
gRNA-4	5'-TAATACGACTCACTATAGTATGCGGCGACAAATCTACTGG GTTTTGTAGAGCTAGAAATAGC-3'
gRNA-5	5'-TAATACGACTCACTATAAATGGAGGAGCTTTCTCCCTGG GTTTTGTAGAGCTAGAAATAGC-3'
gRNA-6	5'-TAATACGACTCACTATAGGGACACGGTGATGGGTCTGAGG GTTTTGTAGAGCTAGAAATAGC-3'
gRNA-7	5'-TAATACGACTCACTATAACCGCATACTTGGCAAATTTTAGG GTTTTGTAGAGCTAGAAATAGC-3'
gRNA-8	5'-TAATACGACTCACTATACAGGATGAGTAAAGAAATGGAGG GTTTTGTAGAGCTAGAAATAGC-3'

1.2 体外转录合成 gRNA

1.2.1 gRNA 模板构建

gRNA 特异性的正向引物根据各组 gRNA 靶位点设计, 包括 T7 启动子序列, 靶点序列及部分 scaffold 序列, 通过此引物将 T7 启动子序列和靶点序列带入。通用反向引物为部分 scaffold 序列及终止信号: 5'-AAAAAAGCACCGACTCGGT-3'。通过 PCR 方法扩增出目的片段, PCR 反应体系构成: PrimeSTAR Max Premix 25 μ L, gRNA 特异性的正向引物和通用反向引物各 2 μ L, gRNA 模板 (即设计的靶位点) 1 μ L, ddH₂O 补足至 50 μ L。

PCR 反应条件: 98 $^{\circ}$ C 下变性 10 s, 55 $^{\circ}$ C 下退火 5 s, 72 $^{\circ}$ C 下延伸 5 s, 共进行 35 个循环; 将 PCR 产物用 $w = 2\%$ 琼脂糖凝胶进行电泳, 目标大小为 120 bp 左右。

用 RNase free 的 PCR 产物回收试剂盒 (Axgen) 对上述 PCR 产物进行回收, 回收完毕用 DEPC-H₂O 溶解回收到的 PCR 产物。

1.2.2 gRNA 体外转录

使用试剂盒 MAXIscript[®] T7 Kit (Ambion) 进行 gRNA 体外转录, 转录完成后, 取 1 μ L 产物用 $w = 2\%$ 琼脂糖凝胶进行电泳, 可检测转录出的 gRNA 条带的完整性, 并用紫外分光光度计测量转录出 gRNA 浓度, 存于 -70 $^{\circ}$ C。

1.3 Cas9 和 YFP-nanos3mRNA 合成

以 pXT7-Cas9 质粒为模板制备 Cas9 mRNA, 用 *EcoR* I、*Hind* III 双酶切将质粒线性化 (*EcoR* I 和 *Hind* III 是 pXT7-Cas9 质粒 T7 转录下游的 2 个酶切位点, 双酶切是为防止酶切后自连); 然后用 m MessagemMachine SP6 Kit (Ambion, 美国) 按说明书的指示进行体外转录, 完成转录后取 1 μ L 产物用 $w = 2\%$ 琼脂糖凝胶进行电泳以检测转录的目的条带完整性。转录产物用试剂盒 RNease Mini kit (Qiagen) 纯化。最后用紫外分光光度计测量转录出 Cas9 mRNA 浓度, 存于 -70 $^{\circ}$ C。在注射 gRNA 与 Cas9 mRNA 时不能确保会在每一颗鱼卵中得到表达, 后续需要展开大量的测序工作, 为提高筛选

效率在显微注射中引入 YFP-nanos3 mRNA, 此 mRNA 会在斑马鱼胚胎中翻译表达出黄色荧光蛋白, 相关文献证明, YFP 基因以球虫基因为载体搭建后在真核细胞中黄色荧光蛋白能够得以表达^[13], 故利用其蛋白的荧光表达性状进行初步筛选可提高后续实验筛选效率。YFP-nanos3mRNA 的制备方法与 Cas9 相同。

1.4 显微注射

选取若干条野生型斑马鱼进行雌雄配对, 待其交配产卵后, 收集挑选一细胞期的受精卵进行注射, 依照 gRNA 识别位点, 将 8 个 gRNA 分为 3 组, 第 1 组为 gRNA1、gRNA4、gRNA6; 第 2 组为 gRNA3、gRNA5、gRNA7; 第 3 组为 gRNA2、gRNA8; 使同一组内 gRNA 识别位点无重复片段。将 Cas9 mRNA 调整到 300 ng/ μ L, gRNA 300 ng/ μ L, YFP-nanos3 mRNA 300 ng/ μ L 按 1:1:1 混匀注射, 注射量为 1~2 nL。

1.5 gRNA 活性验证

1.5.1 提取斑马鱼基因组 DNA 显微注射 24 h 后, 挑选有荧光表达的受精卵分别从注射组和对照组挑选活卵, 用基因组 DNA 提取试剂盒 (尧舜禹生物科技有限公司, 南京) 提取 DNA, 存于 -20°C 。

1.5.2 PXR 基因的扩增 以提取到的基因组 DNA 为模板, 进行 PCR 反应。

上游引物 PXR6-F: 5'-ACAGATTTTGGTAT-CACTG-3'

下游引物 PXR5-R: 5'-TTATTAGTACGGGCTT-GGA-3'

PCR 反应条件: 95°C 下预变性 5 min; 95°C 下变性 30 s, 54°C 下退火 30 s, 72°C 下延伸 45 s, 共进行 35 个循环; 再在 72°C 下延伸 5 min。PCR 产物用 $w=2\%$ 琼脂糖凝胶进行电泳, 根据条带可进行初步分析。PCR 的引物是根据 NCBI 上斑马鱼 PXR 的基因序列 (Gene ID: 565875) 进行设计。

1.5.3 DNA 序列分析 以上 PCR 产物用 Gel Extraction Kit (OMEGA) 试剂盒胶回收, 用 pMD18-T Vector Cloning Kit (TaKaRa) 连接, 转入 DH5 α 感受态 (TaKaRa) 中, 挑取单克隆, 经由广州艾基生物技术有限公司测序验证, 测序结果用 Chromas 和 SnapGene 软件进行分析比对, 通过靶位点附近位置是否出现 Indel 突变以确定有活性的 gRNA。

1.6 可遗传突变个体的筛选与培育

检测到突变的同批显微注射受精卵孵化并饲养

至性成熟, 再与野生型杂交繁殖获取 F1 代, 对 F1 代剪尾鳍以提取 DNA 进行测序鉴定, 筛选出缺失 PXR 基因的杂合突变体, 标准化饲养至成鱼, 杂合突变体之间进行杂交繁殖, 得到 F2 代, 仍然以剪尾鳍的方式提取 DNA 进行基因鉴定, 根据理论分析, 在 F2 代便可以得到完全缺失 PXR 基因型的纯合子斑马鱼, 在后续实验结果中 PXR^(+/+) 型斑马鱼在 F2 代中获取, 得以印证理论分析。

2 结果与分析

2.1 gRNA 活性测试

合成 gRNA 与 Cas9mRNA 后, 用 $w=2\%$ 琼脂糖凝胶进行电泳, 凝胶成像结果显示 gRNA 和 Cas9 mRNA 均为单一条带 (图 3)。

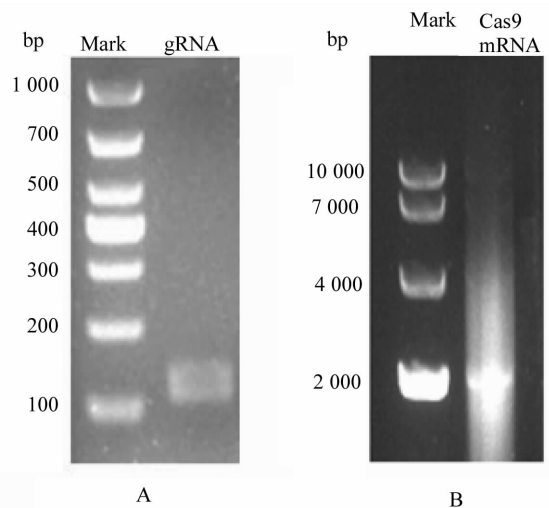


图 3 gRNA 和 Cas9 mRNA 凝胶电泳检测

Fig. 3 gRNA and Cas9 mRNA gel electrophoresis detection A: gRNA 凝胶电泳, 其 Marker 是 DL1000; B: Cas9mRNA 凝胶电泳, 其 Marker 是 DL10000

A: mRNA gel electrophoresis and its marker DL1000; B: Cas9 mRNA gel electrophoresis and its marker DL 10000

将合成后的 gRNA、Cas9 mRNA 和 YFP-nanos3 mRNA 通过显微注射斑马鱼一细胞期受精卵的方式验证 gRNA 活性, 选取有荧光的斑马鱼鱼卵, 提取基因组 DNA, PCR 扩增目的序列, 再进行胶回收, 与 PMD18-T 载体连接转化后, 挑取单克隆, 通过菌液 PCR 获得阳性菌株, 送广州艾基生物技术有限公司测序, 序列比对结果显示, gRNA1、gRNA6、gRNA7 具有活性 (表 3, 表 4), gRNA2、gRNA3、gRNA4、gRNA5 和 gRNA8 均无活性, 在此不再表述。

表 3 预测区序列的敲除鉴定 1

Table 3 Deletion identification of the prediction area sequence 1

gRNA	Mutation type / bp	Sequence	Mutation rate /%
	WT	TCAGGATGAGTAAAGAAATGGAGGAGCTTTCTCCCCTGGACGATTCTGGGACACGGTGAT	
gRNA1	-7	TCAGGATGAGTAAAGAAATGGAGGAGCTTTCTCCCCTGGACGATTCTGG-----TGAT	9.09
gRNA6	-5	TCAGGATGAGTAAAGAA-----GGAGCTTTCTCCCCTGGACGATTCTGGGACACGGTGAT	9.09

表 4 预测区序列的敲除鉴定 2¹⁾

Table 4 Deletion identification of the prediction area sequence 2

gRNA	Mutation type / bp	Sequence	Mutation rate /%
	WT	GATTCTGGGACACGGTGATGGGTCTGAGGAGGAAACAGAGGAGGATGACGAACCT	
gRNA7	-9	GATTCTGGGACACGGTGA-----GGAGGAAACAGAGGAGGATGACGAACCT	29.17
gRNA7	-6	GATTCTGGGACACGGTGATGGG-----GAGGAAACAGAGGAGGATGACGAACCT	29.17
gRNA7	-10	GATTCTGGGACACGGTGATGG-----AAACAGAGGAGGATGACGAACCT	29.17
gRNA7	-5	GATTCTGGGACACGGTGATGG-----AGGAGGAAACAGAGGAGGATGACGAACCT	29.17
gRNA7	+1/-4	GATTCTGGGACACGGTGATGGCTA--GGAGGAAACAGAGGAGGATGACGAACCT	29.17
gRNA7	-9	GATTCTGGGACACGGTGA-----GGAGGAAACAGAGGAGGATGACGAACCT	29.17
gRNA7	+2/-7	GATTCTGGGACACGGTGATGGGAT-----GAGGAAACAGAGGAGGATGACGAACCT	29.17

1) 红色字体标注为插入基因片段，红色标注连字符为缺失基因片段

Red font is labeled as inserted gene fragment and red labeling hyphen is missing gene fragment

2.2 筛选稳定敲除 PXR 基因的斑马鱼

将筛选到具有活性的 gRNA1、gRNA6 和 gRNA7 混匀后与 Cas9 mRNA 和 YFP-nanos3 mRNA 按照 1:1:1 的剂量显微注射受精卵得到 F0 代，与野生型斑马鱼杂交繁殖获取 F1 代，对 F1 代剪尾鳍以提取 DNA 进行测序鉴定，筛选出缺失 PXR 基因的杂合突变体有 4 种突变型（图 4），挑选 indel 4 bp A 型为 F1 代。标准化饲养至成鱼，F1 代之间进行杂交繁殖，得到 F2 代，在 F2 代中通过 DNA 测序验证挑选，indel 4 bp A 峰图（图 5）单一整齐，没有杂峰套峰出现，表示两条等位基因均在同一点插入相同的 4 个碱基导致该段基因移码突变，从而达到基因敲除的目的，得到纯合突变体。

3 讨论

CRISPR 是细菌和古细菌为应对病毒和质粒不断攻击而进化而来的获得性免疫防御机制^[14]。在此基础上发展建立起来的 CRISPR/Cas9 基因编辑技术是近代分子生物学研究中一项重要革新技术，该技术可以直接对基因组进行编辑，使目标基因出现不可逆的改变^[15]。CRISPR/Cas9 基因编辑技术与较早的锌指核酸酶（Zinc-finger nucleases, ZFNs）

以及转录激活因子效应物核酸酶（Transcription activator-like effector nucleases, TALENs）系统相比，在设计上更为简便快捷，成本低廉且敲除高效^[16]。

本实验依据 CRISPR/Cas9 基因编辑技术，以模式生物斑马鱼为研究对象，在 PXR 基因上选取其第二个外显子，设计 gRNA 靶位点，体外转录合成 gRNA 和 Cas9 mRNA，对野生型斑马鱼鱼卵进行显微注射，进行基因敲除。CRISPR/Cas9 技术通过破坏 DNA 双链引起细胞非同源末端自我修复，在自我修复过程中所发生的情况有缺失、插入和缺失插入同时存在，非同源末端自我修复导致的基因片段移码突变类型是不可控因素，本实验在验证 gRNA1、gRNA6、gRNA7 具有活性后将三组混匀通过显微注射进入野生型斑马鱼鱼卵，出现缺失和插入基因突变类型。其中缺失 6 bp 对 PXR 基因编码的蛋白序列影响较小，插入 4 bp B 型包含插入 3 bp 和缺失 1 bp，这种情况较为复杂，插入 4 bp A 型为完整插入 4 bp，可以破坏原始基因序列并确保影响 PXR 基因编码的蛋白序列，故而选取插入 4 bp A 型的斑马鱼通过逐代杂交筛选，最终获得完全缺失 PXR 基因的斑马鱼，并能稳定繁殖后代。

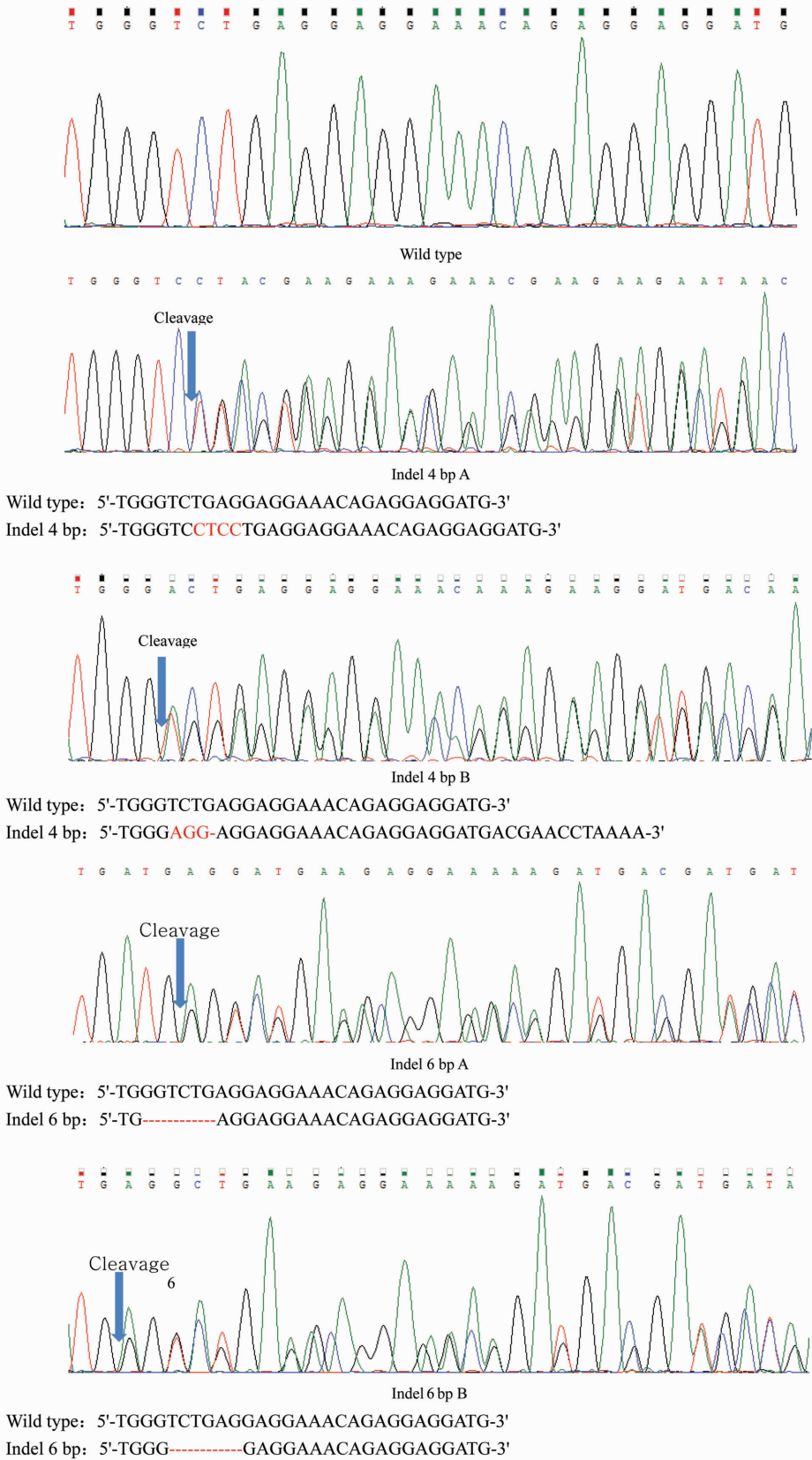


图 4 DNA 序列测序图

Fig. 4 Sequence map of DNA sequence

红色字体标注为插入基因片段, 红色标注连字符为缺失基因片段

Red font is labeled as inserted gene fragment and red labeling hyphen is missing gene fragment

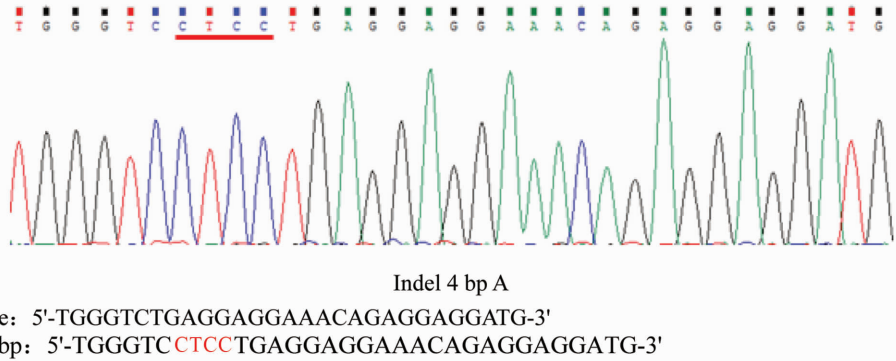


图 5 F2 代 DNA 测序验证

Fig. 5 F2 generation DNA sequencing validation

红色下划线与红色字体标注为插入的基因片段

The red underline is marked with the red font as the inserted 4 bp

YFP-nanos3 mRNA 表达的黄色荧光蛋白可发出稳定荧光且不需要依赖其他辅助因子, 转入目的细胞后的荧光蛋白基因稳定且对多数宿主的生理无影响作用, 是理想的报告基因, 简化了显微注射的检测工作, 通过直观观察筛选出研究对象^[17], 提高实验效率。相关研究表明 CRISPR/Cas9 技术可

成功建立在非模式生物当中如罗非鱼^[18], 说明 CRISPR/Cas9 技术具有普适性。本研究在斑马鱼体内成功建立 PXR 基因的 CRISPR/Cas9 敲除系统, 为后续 PXR 基因对药物代谢的研究以及理解鱼类 PXR 基因的功能提供实验依据。

参考文献:

- [1] 葛乐乐, 范辉, 马珂. 孕烷 X 受体(PXR)对药物代谢途径的调控[J]. 中国现代应用药学, 2013, 30(12): 1357 - 1359.
GE L L, FAN H, MA K. Role of pregnane X receptor (PXR) in drug metabolism modulation[J]. China Modern Applied Pharmacy, 2013, 30(12): 1357 - 1359.
- [2] 王宇光, 刘浩生, 张娴懿, 等. 人参中皂苷成分的孕烷 X 受体激动特性筛选[J]. 药学学报, 2013, 48(1): 144 - 148.
WANG Y G, LIU H S, ZHANG X X, et al. Screening of pregnane X receptor activation from ginsenosides[J]. Acta Pharmaceutica Sinica 2013, 48(1): 144 - 148.
- [3] TIMSIT Y E, NEGISHI M. CAR and PXR: The xenobiotic-sensing receptors[J]. Steroids, 2007, 72(3): 231 - 246.
- [4] 赵其锦, 查伟斌, 周芳, 等. 孕烷 X 受体介导的代谢酶和转运体转录调控及其在化疗药物耐药中的作用[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2012, 17(8): 931 - 940.
ZHAO Q J, CHA W B, ZHOU F, et al. The transcriptional regulation of drug enzymes and transporters mediated by pregnane X receptor and its significant role in multidrug resistance [J]. Chinese Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics, 2012, 17(8): 931 - 940.
- [5] GRÄNS J, WASSMUR B, FERNÁNDEZ-SANTOSCOY M, et al. Regulation of pregnane-X-receptor, CYP3A and P-glycoprotein genes in the PCB-resistant killifish (Fundulus heteroclitus) population from New Bedford Harbor [J]. Aquatic Toxicology, 2015, 159(6): 198 - 207.
- [6] WASSMUR B, GRÄNS J, KLING P, et al. Interactions of pharmaceuticals and other xenobiotics on hepatic pregnane X receptor and cytochrome P450 3A signaling pathway in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. Aquatic Toxicology, 2010, 100(1): 91 - 100.
- [7] 郑武, 谷峰. CRISPR/Cas9 的应用及脱靶效应研究进展[J]. 遗传, 2015(10): 1003 - 1010.
ZHENG W, GU F. Progress of application and off-target effects of CRISPR/Cas9 [J]. Hereditas (Beijing), 2015, 37(10): 1003 - 1010.
- [8] 方锐, 畅飞, 孙照霖, 等. CRISPR/Cas9 介导的基因组定点编辑技术[J]. 生物化学与生物物理进展, 2013, 40(8): 691 - 702.
FANG R, CHANG F, SUN Z L, et al. New method of genome editing derived from CRISPR/Cas9 [J]. Progress in Biochemistry and Biophysics, 2013, 40(8): 691 - 702.
- [9] JINEK M, CHYLINSKI K, FONFARA I, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity [J]. Science, 2012: 1225829.
- [10] 贾颀航, 邱毅, 孙慧清, 等. 基因修复与转座子介导

- 的基因治疗[J]. 国际遗传学杂志, 2003, 26(5):253-257.
- JIA Y F, QIU Y, SUN H Q, et al. Gene repair and transposon mediated gene therapy[J]. Foreign Medical Sciences, 2003, 26(5):253-257.
- [11] DONG Z, DONG X, JIA W, et al. Improving the efficiency for generation of genome-edited zebrafish by labeling primordial germ cells[J]. International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2014, 55:329.
- [12] 杨杰,张智红,骆清铭. 荧光蛋白研究进展[J]. 生物物理学报,2010,26(11):1025-1035.
- YANG J, ZHANG Z H, LUO Q M. Recent progress in fluorescent proteins research[J]. Acta Biophysica Sinica, 2010,26(11):1025-1035.
- [13] 李继东,何生虎. 串联型黄色荧光蛋白在 Vero 细胞中的表达[J]. 江西农业大学学报, 2009, 31(5):962-966.
- LI J D, HE S H. Expression of tandem yellow fluorescent protein in Vero cells[J]. Journal of Jiangxi Agricultural University, 2009, 31(5):962-966.
- [14] MUSSOLINO C, CATHOMEN T. RNA guides genome engineering[J]. Nature Biotechnology, 2013, 31(3):208-209.
- [15] 常振仪,严维,刘东风,等. CRISPR/Cas9 技术研究进展[J]. 农业生物技术学报, 2015, 23(9):1196-1206.
- CHANG Z Y, YAN W, LIU D F, et al. Research progress on CRISPR/Cas[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2015, 23(9):1196-1206.
- [16] 刘志国. CRISPR/Cas9 系统介导基因组编辑的研究进展[J]. 畜牧兽医学报, 2014, 45(10):1567-1583.
- LIU Z G. Research progress on CRISPR/Cas9 mediated genome editing[J]. Acta Veterinariae Zootechnica Sinica, 2014, 45(10):1567-1583.
- [17] 钱玲玲,秦玉梅,邓少平. 稳定表达甜味受体蛋白 T1R2/T1R3 的 HEK293 细胞系的建立[J]. 食品与生物技术学报, 2013, 32(2):142-147.
- QIAN L L, QIN Y M, DENG S P. Establishment of HEK293 cell line stably expressing sweet preceptor protein T1R2/T1R3[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2013, 32(2):142-147.
- [18] 李明辉. 罗非鱼基因敲除技术的建立及其在性别决定与分化研究中的应用[D]. 重庆:西南大学, 2014.
- LI M H. Establishment of tilapia gene knockout technique and its application in the study of sex determination and differentiation[D]. Chongqing: Southwest University, 2014.