

王煜,吴勇,梁春南,等. 利用 CRISPR/Cas9 技术构建基因修饰小鼠模型的技术优化进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(5): 152-158.

Wang Y, Wu Y, Liang CN, et al. Progress in the optimization of CRISPR/Cas9 technology for the establishment of genetically modified mouse models [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(5): 152-158.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.05.017

# 利用 CRISPR/Cas9 技术构建基因修饰小鼠模型的技术优化进展

王煜, 吴勇, 梁春南, 范昌发\*

(中国食品药品检定研究院实验动物资源研究所, 北京 102629)

**【摘要】** CRISPR/Cas9 技术的兴起,推动了生命科学各个领域的发展。随着对其认识的不断加深,人们进行了多重改进和优化,以适应不同的应用场景。在基因修饰小鼠模型制作中,CRISPR/Cas9 技术的优化也带来了众多突破性进展。本文简要回顾了 CRISPR/Cas9 技术的发展历程,并从 CRISPR/Cas9 元件优化、条件敲除/敲入基因修饰小鼠模型的构建以及 CRISPR/Cas9 元件和 HDR 模板的递送系统层面总结了优化策略,展望该技术未来的发展。

**【关键词】** CRISPR/Cas9; 小鼠模型; 条件敲除/敲入; 递送

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 05-0152-07

## Progress in the optimization of CRISPR/Cas9 technology for the establishment of genetically modified mouse models

WANG Yu, WU Yong, LIANG Chunnan, FAN Changfa\*

(Institute for Laboratory Animal Resources, National Institutes for Food and Drug Control (NIFDC), Beijing 102629, China)

**【Abstract】** CRISPR/Cas9 technology has driven the development of various fields in life science. With continuous deepening of its understanding, researchers have made multiple improvements and optimizations to adapt to various application scenarios. The optimization of CRISPR/Cas9 technology has also provided breakthroughs in the establishment of genetically modified mouse models. This article briefly reviews the development process of CRISPR/Cas9 technology and summarizes optimization strategies of CRISPR/Cas9, establishment of conditional knockout/knockin gene-modified mouse models, and delivery systems for CRISPR/Cas9 elements and HDR templates.

**【Keywords】** CRISPR/Cas9; mouse model; conditional knockout/knockin; delivery

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

小鼠和人类有着非常相似的遗传背景,二者约 90%的基因组为保守共线性 (conserved synteny) 区域<sup>[1]</sup>。与人类其他同源关系较近的猴、大猩猩等动物相比,小鼠的体型小,繁殖能力强,饲养成本较

[基金项目] 国家重点研发计划(2021YFC2301700)。

[作者简介] 王煜 (2000—),女,硕士研究生,研究方向:传染病动物模型构建与疫苗评价研究。E-mail:wangyu09075@163.com

[通信作者] 范昌发 (1970—),男,博士,研究员,博士生导师,研究方向:疾病动物模型研究。E-mail:fanf@nifdc.org.cn

低,更加符合实验动物伦理要求。因此,小鼠成为实验室人类疾病相关研究使用最广泛的模式动物。尽管其基因组与人类基因组有着较高的同源性,但二者之间的差异也不可小觑<sup>[2]</sup>。例如,小鼠和人类在免疫系统发育、激活和对外来抗原的应答方面存在显著差异,导致无法用小鼠很好地模拟病原体感染人体的过程<sup>[3]</sup>。正常小鼠与人类细胞固有的分子过程决定了组织特异性癌症发病率的显著差异,导致了与年龄相关的癌症类型在小鼠和人类中易发性不同<sup>[4-5]</sup>。研究人类的疾病发生过程、评价新药的体内疗效以及研发应对流行病的疫苗,都需要合适的动物模型,以重现人类疾病临床症状。因此,研究人员尝试通过敲除某些基因或将人源基因插入到小鼠基因组的方法构建疾病动物模型,模拟人类疾病的发生<sup>[6-8]</sup>。近年建立的 CRISPR/Cas 技术为构建基因修饰小鼠模型提供了有力的工具<sup>[9-12]</sup>。随着科学技术的不断进步,科学家也在不断尝试新的技术手段,采取不同策略优化该基因编辑技术体系,以期更好地、更有效地利用 CRISPR/Cas 系统构建基因修饰动物模型,满足基础研究和临床试验的需要。本文就利用 CRISPR/Cas9 技术构建基因修饰动物模型的技术优化进展做简要回顾。

## 1 CRISPR/Cas 系统的发展历程

2007 年,法国科学家发现了一种细菌的获得性免疫系统—CRISPR/Cas 系统,细菌可以特异识别入侵的外源 DNA,利用 Cas 蛋白对其进行剪切破坏<sup>[13]</sup>,以消除外源 DNA 的影响。2011~2012 年,美国科学家和法国科学家等开展了大量的研究,并于 2012 年揭示了细菌和古细菌通过 CRISPR/Cas 系统进行免疫防御的分子机制<sup>[14-18]</sup>。之后,两人合作成功构建了 CRISPR/Cas9 系统<sup>[19]</sup>。2013 年,CRISPR/Cas9 技术开始用于小鼠内源基因的高效编辑<sup>[20]</sup>。在 CRISPR/Cas9 系统建立之前,基因编辑技术已经历了锌指蛋白(zinc finger protein, ZFP)技术和转录激活因子样效应物核酸酶(transcription activator-like effector nucleases, TALEN)等技术<sup>[21-22]</sup>。与这两种基因编辑技术相比,CRISPR/Cas9 技术更加精准、便捷和高效<sup>[23]</sup>。

## 2 CRISPR/Cas9 技术优化及其在基因编辑小鼠中的应用

CRISPR/Cas9 系统由两部分构成,即 sgRNA

(small guide RNA)和 Cas9(Cas9 nuclease)蛋白。sgRNA 能够通过碱基互补配对对靶序列的进行识别,在 sgRNA 的引导下,Cas9 核酸酶能够识别靶序列前的 PAM(proto-spacer adjacent motif)序列,并在 PAM 序列上游 3~8 bp 处对靶位点精确剪切<sup>[24]</sup>。经 Cas9 剪切的靶序列形成 DSB(double strand breaks)缺口,在基因组本身存在的差错倾向修复机制的作用下,靶序列产生了错配,即发生了基因突变,导致该基因被敲除。如果此时存在外源 DNA 同源重组模板 HDR(Homology directed repair),就会发生同源重组修复,新的 DNA 序列就会在某一位点发生整合<sup>[25]</sup>。基于 CRISPR/Cas9 技术原理,科学家尝试对 sgRNA 和 Cas9 两个元件进行改良,以期降低脱靶效率,提高外源基因敲入的精准度与效率,从而在基因编辑小鼠模型的构建方面获得更多突破。

### 2.1 Cas9 蛋白的加工修饰及其在构建小鼠模型中的应用

Cas9 核酸酶是 CRISPR/Cas9 基因编辑技术中常用的酶,它可以在靶基因的特定位置引起 DNA 双链断裂。其缺点是可能引起不必要的 DNA 双链断裂,导致非特异性编辑,即脱靶效应(off-target effect)。因此,科学家尝试对 Cas9 核酸酶进行改造或者替换,以实现更加精准的基因编辑,降低脱靶效应。

#### 2.1.1 Cas9n 蛋白

Cas9n(Cas9 nickase)是在 Cas9 蛋白的基础上,通过丙氨酸取代 Cas9 两个结构域 RuvC 和 HNH 中的一个关键残基,从而形成一种只能引起 DNA 单链断裂的酶。目前,常用的 Cas9n 蛋白有两种,一种是通过用丙氨酸替代第 10 位的天冬氨酸使 RuvC 结构域失活形成的 D10A 突变内切酶(D10A mutant nickase),另一种是通过用丙氨酸替代第 840 位的组氨酸使 HNH 结构域失活形成 H840A 突变内切酶(H840A mutant nickase)。DNA 单链断裂主要通过高保真的碱基切除修复(base-excision repair, BER)途径修复<sup>[26]</sup>,因此,Cas9n 很难引起非特异性编辑。基于 Cas9n 的特性,科学家尝试采用对应两条互补 DNA 链的两个 sgRNA 介导,两个 Cas9n 蛋白在相近位置切割的策略,将脱靶效应最小化。在一项实验中,作者成功使用 D10A 突变体对小鼠的受精卵进行了基因修饰,最终在胚胎水平上检测基因编辑效率,大致与 Cas9 组相同<sup>[27]</sup>。脱靶效应不仅导致目

标基因没有得到修饰,而且还会导致非靶基因被破坏,产生不符合预期的表型。经 Cas9n 处理的受精卵发育而成的小鼠,虽然也存在目标基因没有被修饰的情况,但其靶基因之外的基因组区域被破坏的概率较低。因此,这些未被基因编辑的小鼠大部分还是野生型,可以再次回收利用,减少了实验动物的数量,更加符合实验动物伦理。

### 2.1.2 fCas9 蛋白

fCas9(FokI-dCas9)是另一种改进的核酸酶,它是由 FokI 双链切割酶和双突变 Cas9 蛋白(dCas9)构成。其中 dCas9(dead Cas9)蛋白是由 Cas9 的 RuvC 和 HNH 两个核酸酶活性区域同时发生突变产生,只能在 sgRNA 的引导下进行定位结合,不能发挥剪切功能<sup>[28]</sup>。而 FokI 双链切割酶只有在形成二聚体时才能发挥作用<sup>[29]</sup>。因此,CRISPR/fCas9 系统的特异性不仅由双 sgRNA 决定,而且 FokI 的共定位也在发挥作用,所以特异性大大提高。一项研究表明,以将 Cas9 mRNA 和 sgRNA 注射到受精卵的方式构建基因修饰小鼠,使用 fCas9 与使用 Cas9n 相比,效率相近或更高<sup>[30]</sup>。而另一项研究表明,通过将 CRISPR/Cas9 DNA 载体显微注射进入受精卵的方式构建基因修饰小鼠,fCas9 的基因修饰效率明显高于 Cas9 和 Cas9n<sup>[31]</sup>。

### 2.1.3 Cas9 蛋白与碱基编辑器的融合

近年来,人们通过对 Cas9 蛋白的加工与修饰,使其功能进一步提升,有效地提高了基因编辑效率和精准度,甚至实现针对某几个特定碱基进行编辑。例如,在一项关于乳腺癌的研究中,建成了一个在乳腺中条件表达碱基编辑器 BE3 的小鼠模型。BE3 碱基编辑器(cytosine base editor,CBE)是一种杂合蛋白,包含化脓性链球菌 Cas9n(SpCas9<sup>D10A</sup>)与大鼠 APOBEC1 胞苷脱氨酶和尿嘧啶糖基化酶抑制剂(UGI)结构域。在递送 sgRNA 后,BE3 的 Cas9 部分与基因组靶位点结合,并将脱氨酶定位在其 5' 端,在 4~5 个核苷酸的小窗口内产生 C-T 转换<sup>[32]</sup>。在另一项关于镰状贫血症的研究中,作者构建了一种 Cas9n 和反转录酶的融合蛋白,称为 PE(Prime editor)。他能够将 sgRNA 上的序列信息复制到目标 DNA 位点。在镰状红细胞小鼠模型中,PE 能够完成 T 到 A 的碱基替换,从而达到基因纠正的目的<sup>[33]</sup>。既然 PE 能够纠正造成镰状红细胞的基因突变,那么也可以在小鼠体内构建这种基因突变。因此,无论是 BE3 CBE 还是 PE,都为构建基因突变

疾病的小鼠模型提供了契机。

## 2.2 Cas9 的补充——Cas12a 在小鼠模型构建中的应用

Cas12a 是一种 Cas9 蛋白的替代和补充工具,与 Cas9 蛋白相比,他有以下几个优点:首先,Cas12a 蛋白只有单个核酸位点,在切割 DNA 双链时形成 1 个交错互补的 DSB 缺口<sup>[34]</sup>,因此,他能更好地支持 HDR 模板修复,更有利于敲入工作的进行;其次,在进行基因编辑时 Cas12a 蛋白只需要 1 个 crRNA,不需要 trancerRNA,因此他比 Cas9 的结构更加简化<sup>[35]</sup>;最后,他能够与靶区域不可逆结合并且对脱靶序列进行严格区分,与 SpCas9 相比,Cas12a 脱靶效应较少<sup>[36]</sup>。随着人们对 Cas12a 蛋白认识的不断加深,CRISPR/Cas12a 正在逐渐应用到哺乳动物细胞以及模型制作方面。在一项研究中,研究者使用博沃克利莫拉菌来源的 Cas12a(Mb3Cas12a),得到较高编辑效率的基因敲除小鼠,同时还发现使用标记有单体链霉亲和素(mSA)的 Mb3Cas12a 能够提高基因敲入的效率<sup>[37]</sup>。在另一项研究中,作者使用直肠真杆菌来源的 Cas12a 蛋白(MAD7)在小鼠基因组 Rosa26 位点实现了大小片段的敲入<sup>[38]</sup>。CRISPR/Cas12a 基因编辑策略在动物模型制作方面仍然存在有待人们发掘的巨大潜力。

### 2.3 sgRNA 的优化

有研究发现,在 sgRNA 的 5' 端和 3' 端进行化学修饰,即 5' & 3' -sgRNA,能够提高 CRISPR/Cas9 在细胞中的基因编辑效率<sup>[39]</sup>。在另一项研究中,发现将 sgRNA 的不变区(Cas9 结合区和尾区)用 2' 羟基和硫代磷酸酯键修饰,能够增强细胞中某靶基因的敲除效率,作者将该种修饰的 sgRNA 称为 e-sgRNA。用靶向肝细胞的脂质纳米粒包埋 sgRNA,以静脉注射的方式输送到组成型表达 Cas9 和绿色荧光蛋白 GFP 的小鼠体内,对比未修饰的 sgRNA、5' & 3' -sgRNA 以及 e-sgRNA 三组实验,结果显示,e-sgRNA 介导的基因编辑效率明显高于未修饰的 sgRNA 和 5' & 3' -sgRNA<sup>[40]</sup>。但也有实验表明,e-sgRNA 增强基因编辑效率并不是一成不变的,某些情况下未修饰的 sgRNA 和 5' & 3' -sgRNA 介导的基因编辑效率比 e-sgRNA 高<sup>[40]</sup>。

## 3 利用 CRISPR/Cas9 技术构建条件敲除/敲入小鼠

Cre-LoxP 重组酶系统是目前最常用的构建条件敲除/敲入小鼠的系统。利用 Cre-LoxP 重组酶系

统构建条件性敲入敲除小鼠的原理是:将两个 LoxP 基因座插入靶序列的两侧,以产生 flox 小鼠。flox 小鼠与 Cre 小鼠杂交后,LoxP 标记的 DNA 序列将被删除,而不同的启动子驱动 Cre 在不同的组织和细胞中表达<sup>[41]</sup>。Cre 重组酶发挥作用的最适温度为 37 °C,因此最适宜在哺乳动物中使用。在基因修饰小鼠模型的构建中,由于敲除某一基因或者敲入某一基因会导致小鼠胚胎发育不正常,从而导致较高的致死率。构建条件性敲除/敲入小鼠,能够起到很好的种系传递、特定时间敲除/敲入以及组织特异性表达的作用。

### 3.1 构建稳定遗传的敲除/敲入小鼠模型

能够稳定遗传的基因编辑小鼠需要在受精卵水平上对基因组进行遗传修饰。其优点是在后期实验中仅需将条件敲除/敲入小鼠与 Cre 工具鼠交配即可获得数量可观的目标鼠,大大节省了构建模型的成本。

#### 3.1.1 构建稳定遗传的条件敲除小鼠

利用 Cre-LoxP 系统构建稳定遗传的条件敲除小鼠最传统的方式是直接对靶基因的一个或多个外显子两侧插入 LoxP 基因座。在一些研究中,作者设计了针对靶序列两侧位点的两种 sgRNA,在靶基因的两侧分别形成 DSB 缺口;同时设计了一个带有两个 LoxP 基因座和敲除基因序列的 DNA 供体,这个 DNA 供体会通过同源重组的方式使两个 LoxP 基因座插入到靶序列的两侧<sup>[42]</sup>。该方法中 HDR 模板较长,因此 HDR 供体与 CRISPR/Cas9 系统的递送需要使用显微注射的方法,操作复杂,对操作人员技术要求高。而 Nishizono 等<sup>[43]</sup>和 Horii 等<sup>[44]</sup>科学家结合电穿孔技术,利用 CRISPR/Cas9 技术将单个 LoxP 基因座的 HDR 插入到靶序列的两侧,能够大大降低实验操作的难度。

#### 3.1.2 构建稳定遗传的条件敲入小鼠

LSL(LoxP-stop-LoxP)是由两个 LoxP 基因座中间夹一个终止蛋白构成的元件。当不存在 Cre 重组酶时,终止蛋白正常表达,被 LSL 标记的基因不能表达;当存在 Cre 重组酶时,被 LoxP 标记的终止蛋白基因被删除,从而使得被 LSL 标记的基因能够正常表达。构建稳定遗传的条件敲入小鼠需要将 LSL 元件与目的基因连接在同一个 HDR 模板上,然后插入基因组上的安全港位点。而如何将 HDR 模板导入受精卵是基因敲入成功的关键。通常使用双链 DNA 作为供体建立条件敲入小鼠的效率通常只有

1%~10%。而近年来发展起来的 Easi-CRISPR 技术使用 DNA 单链供体,敲入效率可以达到 30%~60%<sup>[45-46]</sup>。虽然 Easi-CRISPR 技术大大提高了基因敲入的效率,但是仍然要依靠显微注射的方式递送。美国加州大学研究人员开发了一种叫做 CRISPR-READI 的技术,将腺相关病毒(AAV)介导的 HDR 供体递送与 Cas9/sgRNA RNP 电穿孔相结合,以高效率和高通量在小鼠基因组中工程化大的位点特异性修饰,并成功地将 1 个 774 bp 的荧光报告基因、1 个 2.1 kb 的 CreERT2 驱动基因和 1 个 3.3 kb 的表达盒插入到胚胎和活体鼠的内源基因座上<sup>[47]</sup>。腺相关病毒的容纳量为 4.9 kb,因此,不仅可以容纳靶基因和 LoxP 基因座,还能将 Cre 基因直接插入到小鼠的基因组中,大大缩短了条件敲入小鼠的繁育时间。

### 3.2 构建临时性条件敲除/敲入小鼠

在构建条件性敲除/敲入小鼠时,都需要构建 LSL-Cas9 小鼠,即将 LSL 序列、Cas9 基因序列插入到 Rosa26 安全港位点。当给予 sgRNA 与 Cre 时,Cas9 蛋白能够正常表达,被 sgRNA 引导至靶序列,进行基因敲除。如果进行基因敲入,在基因敲除的基础上再递送一个 HDR 模板。在利用该种小鼠模型模拟疾病发生过程时,sgRNA 和 Cre 重组酶以及 HDR 模板的递送通常使用慢病毒或腺相关病毒载体。例如,在一项研究中,作者使用一种能够特异性感染神经元的 AAV,构建了 1 个 AAV-U6-sgRNA-Cre 载体,其中 sgRNA 能够靶向高表达神经元特异性 RNA 剪接因子 NeuN(RbFox3),然后将包装好的病毒通过立体定向注射进入 Cre 依赖型 Cas9 小鼠的前额叶皮层,后续实验发现 Cas9 蛋白成功在靶序列附近形成基因突变,并且与对照组相比,在注射 AAV-U6-sgRNA-Cre 载体的区域 NeuN 蛋白表达减少了 80%<sup>[48]</sup>。在另一项研究中,作者应用一种能够特异性感染神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞的 AAV9 变体递送 Cre 重组酶和 sgRNA,产生了星形胶质细胞特异性 Act1 敲除小鼠<sup>[49]</sup>。也有研究人员成功使用某种 AAV9 变体装载 sgRNA、Cre 以及突变基因的 HDR 模板进行基因敲入,成功构建肺癌小鼠模型<sup>[50]</sup>。

## 4 CRISPR/Cas9 系统的递送技术优化

### 4.1 受精卵水平的递送技术优化

如果要得到基因修饰小鼠的稳定遗传品系,就

要从受精卵或者胚胎干细胞的水平进行基因编辑。常用的将 CRISPR/Cas9 元件导入受精卵或胚胎干细胞的办法是显微注射。在进行基因敲除操作时,通过胞质注射方式递送 Cas9 mRNA 和 sgRNA 更容易成功<sup>[51]</sup>。但在另一项研究中,作者成功通过原核注射的方式将含有 Cas9 和 sgRNA 的质粒递送到受精卵中并产生基因修饰小鼠<sup>[31]</sup>。这种方式虽然免除了由 Cas9 和 sgRNA 的 DNA 转录到 mRNA 这一步,但其安全性和成功率是否优于前一种方式,有待进一步探索。在进行基因敲入操作时,需要将目的基因 HDR 模板递送至受精卵中,使目的基因整合到敲入位点。因此,使用原核注射成功率更高。有研究显示,在 S 期进行原核注射能够提高基因敲入的效率<sup>[52]</sup>。另外,注射前受精卵的培养时间和温度对敲入效率也有影响<sup>[53]</sup>。

显微注射法递送 CRISPR/Cas9 系统以及 HDR 模板的方法,操作复杂,对操作人员技术要求高。近年来新开发的电穿孔技术有望替代显微注射的方法<sup>[54]</sup>。但是,目前电穿孔技术只能递送小片段,无法将大片段递送进入受精卵。因此,电穿孔技术有待进一步发展和优化。

#### 4.2 个体水平的递送技术优化

当不需要建立稳定繁殖体系,并且需要构建条件敲入/敲除小鼠时,研究人员通常会以腺相关病毒载体(AAV)包裹 Cre、sgRNA 以及启动子载体感染小鼠<sup>[48]</sup>。近年来,科学家也在尝试以各种方式优化这种递送方式。例如,在一项研究中报道了一种能够特异性靶向感染神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞的 AAV9 变体<sup>[49]</sup>。在另一项研究中,作者发现短期给予核糖核苷酸还原酶(RNR)抑制剂氟达拉滨可将小鼠肝中 CRISPR/Cas9 和 AAV-HR 介导的同源重组效率提高 2~7 倍,而不会引起明显的毒性<sup>[55]</sup>。

#### 5 总结与展望

随着科学技术的不断进步,科学家从不同角度进行完善和优化,以期用 CRISPR/Cas9 技术构建更加符合基础研究和临床需求的基因修饰小鼠模型,以解决人类疾病研究和药物研发过程中的模型缺乏瓶颈问题。尽管 CRISPR/Cas 基因编辑系统在小鼠中的基因编辑日趋完善,但是在未来,仍然有两大方向需要人们的持续努力:一是结合分子生物学、结构化学、蛋白质工程等学科,对 CRISPR/

Cas9 系统的元件进行改造和修饰甚至替换,进一步提高基因编辑效率,降低脱靶效应,通过对 Cas9 蛋白的加工改造衍生出更多修饰方法。二是解决长片段插入效率和递送问题,寻找一种便捷简单的递送方式,并且提高长片段的插入效率,是构建基因敲入小鼠亟待解决的问题之一。

#### 参考文献:

- [1] WATERSTON R, LINDBLAD-TOH K, BIRNEY E, et al. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome [J]. *Nature*, 2002, 420: 520-562.
- [2] BRESCHI A, GINGERAS T R, GUIGÓ R. Comparative transcriptomics in human and mouse [J]. *Nat Rev Genet*, 2017, 18(7): 425-440.
- [3] MESTAS J, HUGHES C C W. Of mice and not men; differences between mouse and human immunology [J]. *J Immunol*, 2004, 172(5): 2731-2738.
- [4] RANGARAJAN A, WEINBERG R A. Opinion: comparative biology of mouse versus human cells: modelling human cancer in mice [J]. *Nat Rev Cancer*, 2003, 3(12): 952-959.
- [5] DEPINHO R A. The age of cancer [J]. *Nature*, 2000, 408(6809): 248-254.
- [6] SUN S H, CHEN Q, GU H J, et al. A mouse model of SARS-CoV-2 infection and pathogenesis [J]. *Cell Host Microbe*, 2020, 28(1): 124-133, e4.
- [7] JIANG Y, LI J, TENG Y, et al. Complement receptor C5aR1 inhibition reduces pyroptosis in hDPP4-transgenic mice infected with MERS-CoV [J]. *Viruses*, 2019, 11(1): 39.
- [8] XIAO C, OGLE S A, SCHUMACHER M A, et al. Loss of parietal cell expression of Sonic hedgehog induces hypergastrinemia and hyperproliferation of surface mucous cells [J]. *Gastroenterology*, 2010, 138(2): 550-561, e1-e8.
- [9] 赵勇, 师长宏, 赵亚, 等. 利用 CRISPR/Cas9 技术构建 miRNA-29b1 基因敲除小鼠 [J]. *中国比较医学杂志*, 2016, 2(12): 1-4.  
ZHAO Y, SHI C H, ZHAO Y, et al. Construction of miRNA-29b1 knockout mice based on CRISPR/Cas9 technology [J]. *Chin J Comp Med*, 2016, 2(12): 1-4.
- [10] 张雨, 郭中坤, 付彬, 等. 利用 CRISPR/Cas9 技术构建 Bpi 基因敲除小鼠 [J]. *中国比较医学杂志*, 2020, 30(6): 39-46.  
ZHANG Y, GUO Z K, FU B, et al. Construction of Bpi gene-knockout mice using CRISPR/Cas9 [J]. *Chin J Comp Med*, 2020, 30(6): 39-46.
- [11] 吴曦, 霍桂桃, 刘甦苏, 等. 利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术建立 FcγR 基因大片段敲除小鼠模型 [J]. *中国实验动物学报*, 2019, 27(5): 583-591.  
WU X, HUO G T, LIU S S, et al. Establishment of a large fragment FcγR gene knockout mouse model using CRISPR/Cas9 genome editing technique [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2019,

- 27(5): 583–591.
- [12] 陈丽香, 彭秀华, 谭丹, 等. 基于 CRISPR/Cas9 系统定点编辑小鼠 *MAD2L1* 基因及其脱靶效应分析 [J]. 中国实验动物学报, 2017, 25(6): 587–593.  
CHEN L X, PENG X H, TAN D, et al. Mouse *MAD2L1* gene editing by CRISPR/Cas9 and analysis of its off-target effect [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2017, 25(6): 587–593.
- [13] BARRANGOU R, FREMAUX C, DEVEAU H, et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes [J]. Science, 2007, 315(5819): 1709–1712.
- [14] WIEDENHEFT B, VAN DUJIN E, BULTEMA J B, et al. RNA-guided complex from a bacterial immune system enhances target recognition through seed sequence interactions [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011, 108(25): 10092–10097.
- [15] SAPRANAUSKAS R, GASIUNAS G, FREMAUX C, et al. The *Streptococcus thermophilus* CRISPR/Cas system provides immunity in *Escherichia coli* [J]. Nucleic Acids Res, 2011, 39(21): 9275–9282.
- [16] WIEDENHEFT B, LANDER GC, ZHOU K, et al. Structures of the RNA-guided surveillance complex from a bacterial immune system [J]. Nature, 2011, 477(7365): 486–489.
- [17] DELTCHEVA E, CHYLINSKI K, SHARMA C M, et al. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III [J]. Nature, 2011, 471(7340): 602–607.
- [18] SASHITAL D G, WIEDENHEFT B, DOUDNA J A. Mechanism of foreign DNA selection in a bacterial adaptive immune system [J]. Mol Cell, 2012, 46(5): 606–615.
- [19] JINEK M, CHYLINSKI K, FONFARA I, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity [J]. Science, 2012, 337(6096): 816–821.
- [20] SHEN B, ZHANG J, WU H, et al. Generation of gene-modified mice via Cas9/RNA-mediated gene targeting [J]. Cell Res, 2013, 23(5): 720–723.
- [21] CARROLL D. Genome engineering with zinc-finger nucleases [J]. Genetics, 2011, 188(4): 773–782.
- [22] JOUNG J K, SANDER J D. TALENs: a widely applicable technology for targeted genome editing [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2013, 14(1): 49–55.
- [23] HUANG S, YAN Y, SU F, et al. Research progress in gene editing technology [J]. Front Biosci (Landmark Ed), 2021, 26(10): 916–927.
- [24] NISHIMASU H, RAN F A, HSU P D, et al. Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA [J]. Cell, 2014, 156(5): 935–949.
- [25] MA Y, ZHANG L, HUANG X. Genome modification by CRISPR/Cas9 [J]. FEBS J, 2014, 281(23): 5186–5193.
- [26] CONG L, RAN F A, COX D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems [J]. Science, 2013, 339(6121): 819–823.
- [27] RAN F A, HSU P D, LIN C Y, et al. Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity [J]. Cell, 2013, 154(6): 1380–1389.
- [28] TSAI S Q, WYVEKENS N, KHAYTER C, et al. Dimeric CRISPR RNA-guided FokI nucleases for highly specific genome editing [J]. Nat Biotechnol, 2014, 32(6): 569–576.
- [29] BITINAITE J, WAH D A, AGGARWAL A K, et al. FokI dimerization is required for DNA cleavage [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998, 95(18): 10570–10575.
- [30] HARA S, TAMANO M, YAMASHITA S, et al. Generation of mutant mice via the CRISPR/Cas9 system using FokI-dCas9 [J]. Sci Rep, 2015, 5: 11221.
- [31] NAKAGAWA Y, SAKUMA T, SAKAMOTO T, et al. Production of knockout mice by DNA microinjection of various CRISPR/Cas9 vectors into freeze-thawed fertilized oocytes [J]. BMC Biotechnol, 2015, 15: 33.
- [32] ANNUNZIATO S, LUTZ C, HENNEMAN L, et al. *In situ* CRISPR-Cas9 base editing for the development of genetically engineered mouse models of breast cancer [J]. EMBO J, 2020, 39(5): e102169.
- [33] LI C, GEORGAKOPOULOU A, NEWBY G A, et al. *In vivo* HSC prime editing rescues sickle cell disease in a mouse model [J]. Blood, 2023, 141(17): 2085–2099.
- [34] ZETSCHE B, GOOTENBERG J S, ABUDAYYEH O O, et al. Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system [J]. Cell, 2015, 163(3): 759–771.
- [35] PAUL B, MONTOYA G. CRISPR-Cas12a: functional overview and applications [J]. Biomed J, 2020, 43(1): 8–17.
- [36] STROHKENDL I, SAIFUDDIN F A, RYBARSKI J R, et al. Kinetic basis for DNA target specificity of CRISPR-Cas12a [J]. Mol Cell, 2018, 71(5): 816–824.
- [37] WANG Z, WANG Y, WANG S, et al. Efficient genome editing by CRISPR-Mb3Cas12a in mice [J]. J Cell Sci, 2020, 133(9): jcs240705.
- [38] LIU Z, SCHIEL JA, MAKSIMOVA E, et al. ErCas12a CRISPR-MAD7 for model generation in human cells, mice, and rats [J]. CRISPR J, 2020, 3(2): 97–108.
- [39] HENDEL A, BAK R O, CLARK J T, et al. Chemically modified guide RNAs enhance CRISPR-Cas genome editing in human primary cells [J]. Nat Biotechnol, 2015, 33(9): 985–989.
- [40] YIN H, SONG C Q, SURESH S, et al. Structure-guided chemical modification of guide RNA enables potent non-viral *in vivo* genome editing [J]. Nat Biotechnol, 2017, 35(12): 1179–1187.
- [41] KOS C H. Cre/loxP system for generating tissue-specific knockout mouse models [J]. Nutr Rev, 2004, 62(6 Pt 1): 243–246.
- [42] XU M, XU H, CHEN J, et al. Generation of conditional *Acrv11* knockout mice by CRISPR/Cas9-mediated gene targeting [J]. Mol Cell Probes, 2018, 37: 32–38.
- [43] NISHIZONO H, HAYANO Y, NAKAHATA Y, et al. Rapid generation of conditional knockout mice using the CRISPR-Cas9 system and electroporation for neuroscience research [J]. Mol Brain, 2021, 14(1): 148.
- [44] HORII T, MORITA S, KIMURA M, et al. Efficient generation

- of conditional knockout mice via sequential introduction of lox sites [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 7891.
- [45] MIURA H, QUADROS R M, GURUMURTHY C B, et al. Easi-CRISPR for creating knock-in and conditional knockout mouse models using long ssDNA donors [J]. *Nat Protoc*, 2018, 13(1): 195–215.
- [46] QUADROS R M, MIURA H, HARMS D W, et al. Easi-CRISPR: a robust method for one-step generation of mice carrying conditional and insertion alleles using long ssDNA donors and CRISPR ribonucleoproteins [J]. *Genome Biol*, 2017, 18(1): 92.
- [47] CHEN S, SUN S, MOONEN D, et al. CRISPR-READI: efficient generation of knockin mice by CRISPR RNP electroporation and AAV donor infection [J]. *Cell Rep*, 2019, 27(13): 3780–3789.
- [48] KONERMANN S, BRIGHAM M D, TREVINO A, et al. Optical control of mammalian endogenous transcription and epigenetic states [J]. *Nature*, 2013, 500(7463): 472–476.
- [49] XIAO D, ZHANG W, WANG Q, et al. CRISPR-mediated rapid generation of neural cell-specific knockout mice facilitates research in neurophysiology and pathology [J]. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 2021, 20: 755–764.
- [50] PLATT R J, CHEN S, ZHOU Y, et al. CRISPR-Cas9 knockin mice for genome editing and cancer modeling [J]. *Cell*, 2014, 159(2): 440–455.
- [51] HAN Y, SLIVANO O J, CHRISTIE C K, et al. CRISPR-Cas9 genome editing of a single regulatory element nearly abolishes target gene expression in mice—brief report [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2015, 35(2): 312–315.
- [52] ABE T, INOUE K I, FURUTA Y, et al. Pronuclear microinjection during S-phase increases the efficiency of CRISPR-Cas9-assisted knockin of large DNA donors in mouse zygotes [J]. *Cell Rep*, 2020, 31(7): 107653.
- [53] NAKAGAWA Y, SAKUMA T, NISHIMICHI N, et al. Culture time of vitrified/warmed zygotes before microinjection affects the production efficiency of CRISPR-Cas9-mediated knock-in mice [J]. *Biol Open*, 2017, 6(5): 706–713.
- [54] TAKEMOTO T. Zygote electroporation for CRISPR/Cas9 delivery to generate genetically modified mice [J]. *Methods Mol Biol*, 2020, 2050: 121–126.
- [55] TSUJI S, STEPHENS C J, BORTOLUSSI G, et al. Fludarabine increases nuclease-free AAV- and CRISPR/Cas9-mediated homologous recombination in mice [J]. *Nat Biotechnol*, 2022, 40(8): 1285–1294.

[收稿日期]2023-07-10