

利用 CRISPR/Cas9 敲除大鼠胰岛素受体底物 1 (*Irs1*) 基因

马元武, 马 婧, 路迎冬, 陈 炜, 张 旭, 于 磊, 张连峰

(中国医学科学院, 北京协和医学院, 医学实验动物研究所, 卫生部人类疾病比较医学重点实验室, 北京 100021)

【摘要】 目的 为研究胰岛素受体底物 1 (*Irs1*) 基因与代谢病之间的关系, 我们利用 CRISPR/Cas9 系统敲除大鼠 *Irs1* 基因, 为研究代谢病提供基因敲除大鼠。**方法** 针对 *Irs1* 第一外显子, 设计 CRISPR/Cas9 作用靶点, 构建 sgRNA 表达质粒。利用 T7 RNA 聚合酶体外转录 sgRNA 和 Cas9。将 Cas9 mRNA 和 sgRNA 混合物注射入 SD 大鼠的受精卵中, 实现靶基因敲除。用 T7EN1 实验初步检测靶基因的修饰情况, 再经过测序分析确定突变。**结果** 获得了 5 个在 *Irs1* 基因突变的首建鼠, 突变效率为 83%。**结论** 得到了稳定遗传的 *Irs1* 基因敲除大鼠。

【关键词】 *Irs1*; 基因敲除; 大鼠; CRISPR/Cas9

【中图分类号】 R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2014) 03-0055-06

doi: 10. 3969. j. issn. 1671. 7856. 2014. 003. 012

Generating insulin receptor substrate 1 (*Irs1*) knockout rat using CRISPR/Cas9

MA Yuan-wu, MA Jing, LU Ying-dong, CHEN Wei, ZHANG Xu, YU Lei, ZHANG Lian-feng

(Key Laboratory of Human Disease Comparative Medicine, Ministry of Health, Institute of Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Sciences (CAMS) & Peking Union Medical College (PUMC), Beijing 100021, China,)

【Abstract】 Objective To study the relationship of insulin receptor substrate-1 (*Irs1*) and metabolic disease, we generated *Irs1* gene knockout rat by CRISPR/Cas9 system. **Methods** Two sgRNA targeting sites were designed for *Irs1* targeting. The Cas9 and sgRNAs were transcribed by T7 RNA polymerase *in vitro*. Cas9 mRNA and sgRNA mixtures were pooled and microinjected into one-cell fertilized eggs of SD rats to generate rats with targeted mutation. **Results** Five rats with the mutations were detected with the efficiency of 83%. **Conclusion** The *Irs1* gene knockout rats generated in this study can be transmitted by germline.

【Key words】 *Irs1*; Gene knockout; Rat; CRISPR/Cas9

大鼠在生理、行为、代谢方面比小鼠更有优势, 在研究人类正常和疾病状态下的生理生化过程以及药物临床前的毒理学研究中发挥重要作用^[1-3]。胰岛素受体底物 1 (*Irs1*) 是胰岛素受体酪氨酸激酶底物, 是介导胰岛素信号传导途径的关键蛋白, 与

代谢病关系密切^[4-5]。*Irs1* 作为一个重要的候选基因在 2 型糖尿病发病机制研究方面较为深入^[6]。*Irs1* 敲除小鼠出生时体重为正常小鼠的一半, 4 月龄时表现出糖耐受损伤, 并伴随有温和的胰岛素抵抗和高胰岛素血症, 是一种较好研究代谢疾病的动物

【基金项目】 国家科技支撑计划课题(2012BA139B02)。

【作者简介】 马元武(1983 年 -), 男, 博士, 研究方向: 分子遗传学。E-mail: mayuanwu@ gmail. com。

【通讯作者】 张连峰。E-mail: zhanglf@ cnilas. org。

模型^[5,7-9]。但小鼠生理、行为、代谢方面与人类存在较大差异,大鼠在这些方面要优于小鼠,因此建立 *Irs1* 基因敲除大鼠,用于研究胰岛素信号传递,胰岛素抵抗以及与 2 型糖尿病之间的关系等,具有重要的意义。近几年的研究表明,一种细菌来源的成簇规律间隔回文短重复序列以及临近相关基因(CRISPR/Cas9),在从细菌、斑马鱼、到哺乳动物细胞以及小鼠、大鼠等都表现出较强的基因组编辑活性^[10-19]。本研究将利用 CRISPR/Cas9 系统,通过原核注射的方式用于产生 *Irs1* 基因敲除大鼠。

1 材料和方法

1.1 质粒构建

针对 *Irs1* 基因我们设计了两个靶点,合成两对寡聚核苷酸链(Rat-IRS1-E1(1)-gRNA: TAGGGCA AAGGCCACCATGAC 和 AAACGTCATGGTGGGCCT TTGC; Rat-IRS1-E1(2)-gRNA: TAGGCTGCGGT GGTAGCTGCAG 和 AAACCTGCAGCTACCACCGCA G)用于制备 sgRNA。合成的寡聚核苷酸经退火(95℃ 5 min 后自然降至室温),连入经 *Bsa* I 酶切经回收的 pUC57-sgRNA 表达载体(南京大学黄兴许老师惠赠),构建 sgRNA 表达载体。通过测序验证连入片段是否正确,选择正确的克隆,扩大培养后提取质粒用于准备体外转录模板。

1.2 体外转录

Cas9 表达质粒(Addgene No. 44758,南京大学黄兴许老师惠赠),经 *Age* I 酶切线性化,经酚氯仿抽提纯化后,溶于无核酸酶的水中作为模板,用于体外转录。Cas9 mRNA 的合成由试剂盒 T7 Ultra Kit(Ambion, AM1345)在体外利用 T7 RNA 聚合酶完成。sgRNA 的表达载体经 *Dra* I 酶切线性化后,经酚氯仿抽提纯化,溶于无核酸酶的水中作为模板,用于体外转录。sgRNA 的体外合成由试剂盒 MEGAscript Kit(Ambion, AM1354)在体外利用 T7 RNA 聚合酶完成。

1.3 Cas9/sgRNA 的原核注射

转录好的 Cas9 mRNA 和 sgRNA 混合并调整浓度至 20 ng/μL 和 10 ng/μL/每种 sgRNA,显微注射法将 RNA 混合物注射到 SD 大鼠的受精卵的雄性核和细胞质中(大鼠购自北京维通利华实验动物有限公司【SCXK(京)2012-0001】),用 SD 大鼠作为假孕受体大鼠(购自北京维通利华实验动物有限公司【SCXK(京)2012-0001】),制备转基因大鼠

(TE2000U 纤维注射仪)。实验相关动物在本所卫生部人类疾病比较医学重点实验室繁育(【SCXK(京)2013-002】),实验中涉及动物操作程序已经得到中国医学科学院医学实验动物研究所动物使用与管理委员会批准,批准号为 ILAS-GC-2012-001。

1.4 T7EN1 酶切实验

大鼠在出生 7~14 d 时,用剪脚趾标记法标记,收集剪下的组织,选用经典的酚氯仿方法提取基因组 DNA,溶于 0.1 × TE 中。设计一对引物包含 sgRNA 作用靶点,上游引物为 R-IRS1-S1: 5'-CTCACCCAGTTTTTCGACACC-3',下游引物为 R-IRS1-AS1: 5'-AGAAGTTCTCTGAGTGGCCACA-3'(上海英俊生物技术有限公司合成,中国)。PCR 反应体系 50 μL (PCR 反应相关试剂购自宝生物工程(中国)有限公司,中国)。反应条件:95℃ 5 min; (95℃ 30 s, 60℃ 30 s, 72℃ 30 s) × 30; 72℃ 10 min; 保存 4℃。扩增片段大小为 687 bp。用 PCR 纯化试剂盒(Takara 公司)纯化 PCR 产物。取 100 ng 纯化后的 PCR 产物在 NEB Buffer 2 中变性、复性后,用 T7 核酸内切酶(NEB, M0302L) 37℃ 孵育 40 min,然后用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳分离。T7 核酸内切酶能够识别不完全配对的双链 DNA,并进行切割,如果 CRISPR/Cas9 对靶点造成了突变,将能够被该酶识别,并造成双链 DNA 断裂。因此,在琼脂糖凝胶电泳中存在除 PCR 产物带之外的条带,说明退火产物能够被 T7 核酸内切酶识别并切割,表明靶点 DNA 序列可能存在突变。为进一步验证突变存在,以及突变情况,我们将通过 TA 克隆、测序进一步检测确定突变。

1.5 RT-PCR 检测 *Irs1* 的表达情况

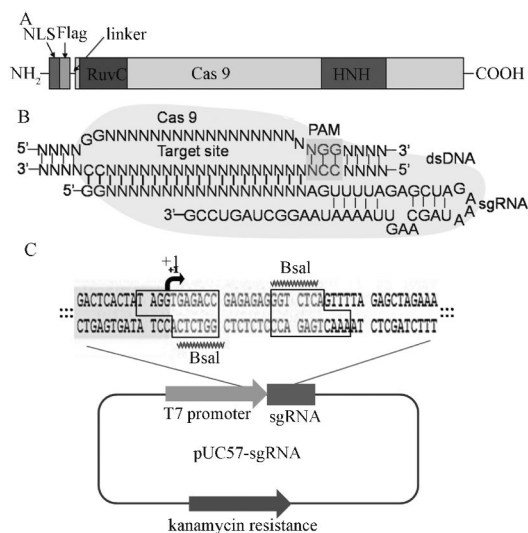
颈椎脱臼法牺牲大鼠,提取 F₁ 代杂合大鼠和野生(WT)对照大鼠的肝脏、骨骼肌、脂肪、肾脏和脊髓总 RNA,利用逆转录试剂盒(Life Technologies)逆转录成 cDNA,利用引物 RT-IRS1-F: 5'-GGAGGACTTGAGCTATGACACG-3' 和 RT-IRS1-F: 5'-GAGGATTGTTGAGATGCTGCCT-3' 扩增目的基因,大小为 437 bp 扩增目的基因。GAPDH 作为内参,确定 *Irs1* 在两种组织中的表达情况,比较杂合子和野生对照大鼠的 *Irs1* 表达差异。

2 结果

2.1 sgRNA 的设计和打靶载体的构建

CRISPR/Cas9 系统作为一种相对于 ZFNs 和

TALENs 更为简单的基因组编辑技术,近几年来引起了广泛的兴趣。Cas9 包含有一个 HNH 基序和三个 RuvC 基序,分别同源于 HNH 和 RuvC 内切核酸酶^[20-22](图 1A)。研究表明 Cas9 能够在单一的导向性 RNA (sgRNA) 的作用下,识别含有 PAM (Pro-space adjacent motif, NGG 基序) 靶序列,并实现把 DNA 序列的双链断裂(图 1B)。依据文献报道的 sgRNA 的作用靶点设计方法^[10, 21, 23],设计作用靶点。本文中,我们针对 *Irs1* 基因设计了两个 sgRNA 作用靶点。依据 sgRNA 载体经 *Bsa* I 形成的粘性末端,合成寡聚核苷酸链,经退火后连入 pUC57-sgRNA 载体中(图 1C),完成 sgRNA 载体构建,经测序验证正确。



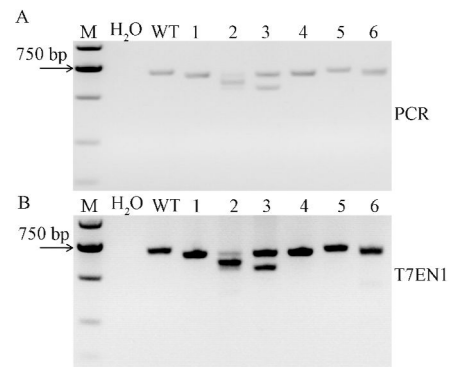
注:A. Cas9 结构示意图。Cas9 包含一个核定位信号(NLS),一个 flag 标记和一段连接区。B. Cas9/sgRNA 介导的基因打靶。靶序列(蓝色)含有~20 bp 并且临近 3' 端含有 PAM(红色),并且 NGG 是位点识别和 DNA 裂解所必须的。C. pUC57-sgRNA 表达载体。该载体含有一个卡那霉素抗性基因,退火后的双链寡核苷酸可以插入两个 *Bsa* I 位点中。

图 1 CRISPR/Cas9 介导的基因打靶示意图

Note: A. Schematic diagram of Cas9. Cas9 containing a nuclear localization signal (NLS) region, flag and a linker region. B. Cas9/sgRNA-mediated gene targeting. The target sequence (blue) is ~20 bp and closed to PAM, whereas PAM (red), and the NGG motif are essential for site recognition and cleavage. C. pUC57-sgRNA expression vector. This sgRNA expression vector containing a kanamycin resistance gene. The annealed oligos were inserted between the two *Bsa* I restriction sites.

Fig. 1 Schematic diagram of CRISPR/Cas9-mediated gene targeting

2.2 产生 CRISPR/Cas9 介导的 *Irs1* 基因突变大鼠



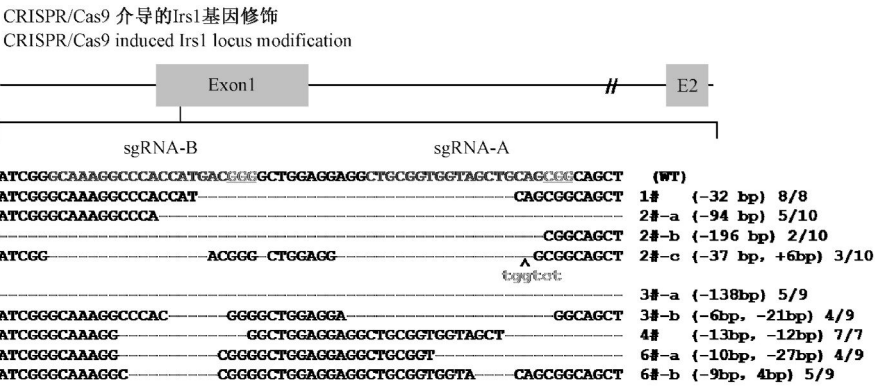
注:M: Marker DL2000 (Takara); H₂O: DNA 模板为水; WT: DNA 模板为野生对照基因组 DNA; 1-6 为通过显微注射 F₀ 代大鼠编号。A. 利用引物 R-IRS1-S1 和 R-IRS1-AS1 扩增包含 sgRNA 作用靶点的一段 DNA 序列。B. PCR 产物利用 T7EN1 实验分析靶点基因修饰情况。

图 2 CRISPR/Cas9 系统介导 *Irs1* 的基因修饰情况
Note: M: DNA molecular weight marker DL2000 (Takara); H₂O: Template DNA was replaced with water; WT: Template DNA was replaced with wild type rat genomic DNA; 1-6: Rats generated by microinjection. A. Target loci of *Irs1* were amplified using genomic DNA templates from founders using primers R-IRS1-S1 and R-IRS1-AS1. B. PCR products were subjected to the T7EN1 cleavage assay to detect the modification in the target loci.

Fig. 2 CRISPR/Cas9 system mediated genetic modifications in *Irs1*

Cas9 表达质粒和 sgRNA 表达载体,分别经 *Age* I 和 *Dra* I 线性化后,经酚氯仿抽提后,作为模板利用 T7 RNA 聚合酶体外转录合成 Cas9 mRNA 和 sgRNA。随后按 Cas9 mRNA (20 ng/μL) 和 sgRNA (10 ng/μL) 混合后,通过原核注射法显微注射 SD 大鼠的受精卵。我们通过显微注射并移植了 65 个受精卵到 2 个假孕大鼠中,后来一只孕鼠意外死亡,最后共产生 6 只大鼠。我们对靶点 DNA 的 PCR 扩增,从图 2A 中明显看出这六只大鼠中有 5 只与野生型条带相比存在明显差异。随后我们靶点扩增的 PCR 产物经 T7EN1 实验进一步靶点基因突变情况(图 2B),结合 PCR 扩增结果,只有#5 鼠未有明显变化,说明 CRISPR/Cas9 在#5 鼠中未发挥作用或发挥作用后经过了正确的修复,为便于统计,我们认为其未发生任何基因修饰改变。随后我们对其余 5 只可能存在基因修饰的大鼠靶点扩增产物,通过 TA 克隆、测序最终确定了 CRISPR/Cas9 对 *Irs1* 造成的基因修饰情况(图 3),结果显示效率可达 83%。

前面的结果可以看出#2 大鼠含有 94 bp 的缺失

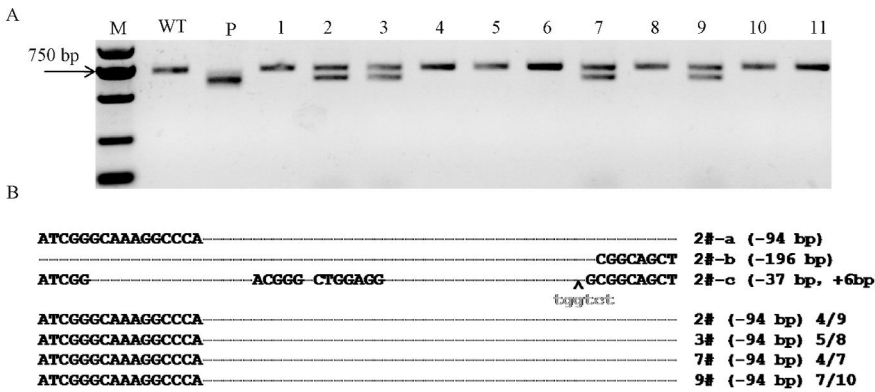


注:可能含有基因修饰的 PCR 产物全部进行测序。PAM 基序表示为绿色加下划线;靶点红色表示;突变蓝色小写表示;插入(+),缺失(-)情况在每一行的右端显示。N/N 表示检测的克隆数和阳性数。

图 3 sgRNA 和靶点处 DNA 序列的结构示意图

Note: PCR amplicon of the targeted fragment in the *Irs1* in rats were sequenced. The PAM sequence is underlined and highlighted in green; the targeting site are red; the mutations are blue, lower case; insertions (+), deletions (-) are shown to the right of each allele. N/N indicates positive colonies out of total sequenced.

Fig. 3 Schematic diagrams of sgRNAs and DNA sequences of targeting genomic loci



注: A. F_0 代大鼠#2 与野生型大鼠交配产生的 11 个子代大鼠,突变传代情况分析。2、3、7 和 9 号能够明显看到缺失条带。B. F_1 代的 2、3、7 和 9 号通过 TA 克隆进一步确定#2 founder 的 94 bp 与 F_0 代缺失一致,表明 Cas9/sgrRNA 介导的基因突变可以传代。

图 4 基因突变的传代情况分析

Note: A. Detection of CRISPR/Cas9-mediated target cleavage of *Irs1* in 11 F_1 pups derived from founder #2 by PCR amplification. Mutations were detected in 4 F_1 pups (2, 3, 7 and 9). B. PCR amplicon of the targeted fragment at the *Irs1* in potential founder #2-derived F_1 pups 2, 3, 7 and 9 were cloned and sequenced. Sequencing result showed 94 bp deletions same as the founder #2 was detected in the offspring, indicating that a mutation induced by Cas9/sgrRNA was transmittable.

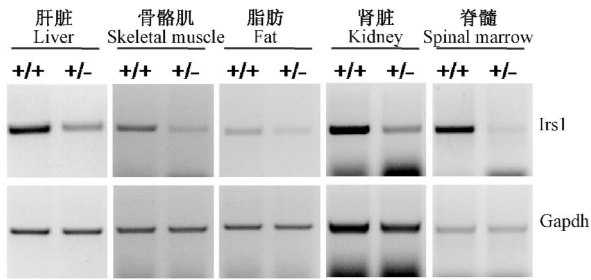
Fig. 4 Analysis of the transmission of the target mutation

基因型,该缺失造成了 *Irs1* 基因的移码突变,并提前产生了终止密码子,为进一步验证该技术造成的缺失是否可以稳定传代。我们将#2 大鼠与野生型的 SD 大鼠进行交配,产生了 11 只子代大鼠。我们对 F_1 代产生的大鼠,进行了 PCR 扩增和基因型鉴定,结果表明该缺失能够稳定遗传(图 4)。通过本项目

的研究,我们利用 CRISPR/Cas9 系统成功实现了对大鼠 *Irs1* 基因进行了敲除。

在建立了 *Irs1* 基因敲除大鼠后,我们对产生的 F_1 代杂合子取了肾脏,骨骼肌,脂肪和脊髓总 RNA,利用引物 RT-IRS1-F 和 RT-IRS1-R 对 *Irs1* 的表达情况进行了分析(图 5),结果表明 *Irs1* 杂合子大鼠在

所取组织中表达有明显的降低。



注: +/+ : 为野生型 SD 大鼠; +/- : 为 *Irs1* 杂合子大鼠。利用引物 RT-IRS1-F 和 RT-IRS1-R 用来检测 *Irs1* 基因表达情况。*Irs1* 基因表达在 F_1 代杂合子大鼠中明显降低。

图 5 RT-PCR 分析 *Irs1* 在 F_1 代

杂合子大鼠中的基因表达情况

Note: +/- : wild type SD rat; +/- : *Irs1* heterozygous rat. Primer RT-IRS1-F and RT-IRS1-R were used for gene expression analysis. Gene expression decreased in F_1 generation heterozygous rat.

Fig. 5 RT-PCR analysis of *Irs1* gene expression in F_1 heterozygous rat

3 讨论

基因敲除技术作为一种重要基因工程手段在研究基因功能方面发挥着重要作用。基于胚胎干 (ES) 细胞基因打靶技术为精确的遗传学修饰提供了一种强有力的手段。在过去的 20 多年里,该技术在建立基因敲除、基因敲入和条件性基因敲除小鼠模型发挥了极为重要的作用^[24]。但由于大鼠 ES 细胞培养条件的限制,直到 2010 年才建立了第一种基于 ES 细胞的基因敲除大鼠模型 (p53 基因敲除大鼠模型)^[25]。但目前,基于大鼠 ES 细胞上水平的遗传学修饰不仅时间周期非常长,要经历 ES 细胞水平打靶、克隆筛选、囊胚注射形成嵌合体,到产生杂合的遗传修饰大鼠模型需要一年半到两年的时间,而且 ES 细胞的培养条件并不非常成熟,对环境人员要求都非常苛刻。这些因素严重限制了基因工程大鼠模型的制备。大鼠比小鼠在研究生理、代谢和药物筛选方面具有更多的优势,近几年来随着技术的发展,使得大鼠作为一种重要的动物模型开始回归实验室。

Irs1 是胰岛素受体酪氨酸激酶底物,在胰岛素刺激引起信号转到中起重要作用,与代谢病关系密切。本研究利用近年发展起来的基因组编辑技术 CRISPR/Cas9 系统对大鼠的 *Irs1* 基因进行敲除,建立 *Irs1* 基因敲除大鼠,效率达 83%。本研究为研究

胰岛素信号传递,胰岛素抵抗以及与 2 型糖尿病之间的关系提供 *Irs1* 基因敲除大鼠。

近十几年的研究,表明基因组编辑技术如基因组编辑技术如锌指核酶 (ZFNs) 技术^[26-27]、转录激活样效应因子 (TALENs) 技术^[28-30] 和 CRISPR/Cas 系统^[31-34],在从细菌到高等哺乳动物都表现出较高的基因组编辑活性。在应用于建立基因敲除小鼠和大鼠模型方面发挥着极为重要的作用。ZFNs 和 TALENs 需要针对每个设计的作用靶点,设计构建两个特异性的质粒表达特异性蛋白来实现目的基因的靶向性敲除,设计和操作相对比较繁琐,不适用于大部分实验室。CRISPR/Cas 系统是细菌一套免疫系统,依据主要的核心组成元件和序列 CRISPR/Cas 系统组要分为 I, II, III 型^[34],其中 II 型来源的 Cas9 蛋白,表现出非常强的 DNA 裂解活性。这种核酸酶活性仅仅需要一种非编码 RNA-小导向性 RNA (sgRNA) 介导下即可实现定向基因打靶^[10],因此 CRISPR/Cas9 系统应用较为广泛。CRISPR/Cas9 系统作为一种相对于 ZFNs 和 TALENs 更为简便、快速的基因组编辑技术,在应用于基因敲除动物模型的建立方面前景非常广阔。本研究利用该系统建立 *Irs1* 基因敲除大鼠,不仅为代谢病的研究提供了 *Irs1* 敲除大鼠,更使得 CRISPR/Cas9 作为一种常规技术在大鼠敲除模型建立方面也具有非常重要的实际价值。

参考文献:

- [1] Abbott A. Laboratory animals: the Renaissance rat[J]. Nature, 2004, 428(6982): 464-466.
- [2] Aitman TJ, Critser JK, Cuppen E, et al. Progress and prospects in rat genetics: a community view[J]. Nat Genet, 2008, 40(5): 516-522.
- [3] Jacob HJKwite AE. Rat genetics: attaching physiology and pharmacology to the genome[J]. Nat Rev Genet, 2002, 3(1): 33-42.
- [4] Thirone AC, Huang C, and Klip A. Tissue-specific roles of IRS proteins in insulin signaling and glucose transport[J]. Trends Endocrinol Metab, 2006, 17(2): 72-78.
- [5] Araki E, Lipes MA, Patti ME, et al. Alternative pathway of insulin signalling in mice with targeted disruption of the IRS-1 gene[J]. Nature, 1994, 372(6502): 186-190.
- [6] Kovacs P, Hanson RL, Lee YH, et al. The role of insulin receptor substrate-1 gene (IRS1) in type 2 diabetes in Pima Indians[J]. Diabetes, 2003, 52(12): 3005-3009.
- [7] Nakamura A, Tajima K, Zolaya K, et al. Protection from non-alcoholic steatohepatitis and liver tumorigenesis in high fat-fed insulin receptor substrate-1-knockout mice despite insulin

- resistance[J]. *Diabetologia*, 2012, 55(12): 3382–3391.
- [8] Long YC, Cheng Z, Copps KD, et al. Insulin receptor substrates Irs1 and Irs2 coordinate skeletal muscle growth and metabolism via the Akt and AMPK pathways[J]. *Mol Cell Biol*, 2011, 31(3): 430–441.
- [9] Selman C, Partridge L, and Withers DJ. Replication of extended lifespan phenotype in mice with deletion of insulin receptor substrate 1[J]. *PLoS One*, 2011, 6(1): e16144.
- [10] 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.
- [11] Auer TO, Duroure K, De Cian A, et al. Highly efficient CRISPR/Cas9-mediated knock-in in zebrafish by homology-independent DNA repair[J]. *Genome Res*, 2013, 24(1): 142–153.
- [12] Burgess DJ. Technology: a CRISPR genome-editing tool[J]. *Nat Rev Genet*, 2013, 14(2): 80.
- [13] Cong L, Ran FA, Cox D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems[J]. *Science*, 2013, 339(6121): 819–823.
- [14] Hou Z, Zhang Y, Propson NE, et al. Efficient genome engineering in human pluripotent stem cells using Cas9 from *Neisseria meningitidis*[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110(39): 15644–15649.
- [15] Li W, Teng F, Li T, et al. Simultaneous generation and germline transmission of multiple gene mutations in rat using CRISPR-Cas systems[J]. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(8): 684–686.
- [16] Mali P, Yang L, Esvelt KM, et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9[J]. *Science*, 2013, 339(6121): 823–826.
- [17] Wang H, Yang H, Shivalila CS, et al. One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering[J]. *Cell*, 2013, 153(4): 910–918.
- [18] Ma Y, Zhang X, Shen B, et al. Generating rats with conditional alleles using CRISPR/Cas9[J]. *Cell Res*, 2014, 24(1): 122–125.
- [19] 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.
- [20] Taylor GK, Heiter DF, Pietrovski S, et al. Activity, specificity and structure of I-Bth03051: a representative of a new homing endonuclease family[J]. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39(22): 9705–9719.
- [21] Sapranaukas 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.
- [22] Makarova KS, Aravind L, Wolf YI, et al. Unification of Cas protein families and a simple scenario for the origin and evolution of CRISPR-Cas systems[J]. *Biol Direct*, 2011, 6: 38.
- [23] Gasiunas G, Barrangou R, Horvath P, et al. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012, 109(39): E2579–E2586.
- [24] Capecchi MR. Gene targeting in mice: functional analysis of the mammalian genome for the twenty-first century[J]. *Nat Rev Genet*, 2005, 6(6): 507–512.
- [25] Tong C, Li P, Wu NL, et al. Production of p53 gene knockout rats by homologous recombination in embryonic stem cells[J]. *Nature*, 2010, 467(7312): 211–213.
- [26] Geurts AM, Cost GJ, Freyvert Y, et al. Knockout rats via embryo microinjection of zinc-finger nucleases[J]. *Science*, 2009, 325(5939): 433.
- [27] Brown AJ, Fisher DA, Kouranova E, et al. Whole-rat conditional gene knockout via genome editing[J]. *Nat Methods*, 2013, 10(7): 638–640.
- [28] Tesson L, Usal C, Menoret S, et al. Knockout rats generated by embryo microinjection of TALENs[J]. *Nat Biotechnol*, 2011, 29(8): 695–696.
- [29] Miller JC, Tan S, Qiao G, et al. A TALE nuclease architecture for efficient genome editing[J]. *Nat Biotechnol*, 2011, 29(2): 143–148.
- [30] 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.
- [31] Wiedenheft B, Sternberg SH, and Doudna JA. RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea[J]. *Nature*, 2012, 482(7385): 331–338.
- [32] 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.
- [33] Terns MPTerns RM. CRISPR-based adaptive immune systems[J]. *Curr Opin Microbiol*, 2011, 14(3): 321–327.
- [34] Bhaya D, Davison M, and 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.

[修回日期]2014-02-24