

一种快速获得 *Vav1* 基因敲除稳定细胞系的方法

郭 果^{1,3#}, 李赛超^{1,3#}, 王 丽¹, 刘 璐¹, 卢燎勋^{1,2*}, 黄 蓉^{1,2*}

(1. 新乡医学院医学检验学院, 河南 新乡 453000; 2. 河南省免疫与靶向药物重点实验室 河南省分子诊断与医学检验技术协同创新中心, 河南 新乡 453000; 3. 临床检验诊断学河南省研究生创新实践基地, 河南 新乡 453000)

【摘要】 目的 建立一种快速获得 *Vav1* 基因敲除稳定细胞系的方法。**方法** 构建针对小鼠 *Vav1* 基因的特异性打靶载体, 利用脂质体转染法转染 B16 小鼠黑色素瘤细胞, 使用流式细胞仪对 GFP 阳性单细胞进行分选, 对得到的 GFP 阳性单克隆细胞使用直接裂解法获取基因组 DNA, 将其用于荧光 PCR, 产物通过毛细管电泳和分析后即可快速获知其基因型。**结果** 使用以上方法在短时间内得到了大量 GFP 阳性单克隆细胞, 从中随机挑选 16 个, 通过荧光 PCR 检测其基因型, 结果表明敲除效率为 87.5%; 通过测序对部分荧光 PCR 结果进行验证, 发现其基因型结果完全正确。**结论** 将 CRISPR/Cas9 基因编辑系统、流式细胞仪单克隆分选、荧光 PCR 和大批量 DNA 样本处理技术结合, 可以短时间内在 B16 小鼠黑色素瘤细胞中获得大量 *Vav1* 基因敲除稳定单克隆细胞。

【关键词】 CRISPR/Cas9; 基因敲除; *Vav1* 基因; 流式细胞仪分选; 荧光 PCR

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2018) 08-0101-07

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2018.08.018

A rapid method for obtaining *Vav1* gene knockout stable cell lines

GUO Guo^{1,3#}, LI Saichao^{1,3#}, WANG Li¹, LIU Lu¹, LU LiaoXun^{1,2*}, HUANG Rong^{1,2*}

(1. School of Laboratory Medicine, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453000, China; 2. Henan Key Laboratory of immunology and targeted therapy, Henan Collaborative Innovation Center of Molecular Diagnosis and Laboratory Medicine, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453000; 3. Henan Graduate Innovative Practice Base of Clinical Laboratory Diagnostics, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453000)

【Abstract】 Objective To establish a rapid method for obtaining *Vav1* gene knockout stable cell lines. **Methods** Specific targeting vectors for the mouse *Vav1* gene were constructed and transfected into the mouse melanoma cell line B16 using liposomes. GFP-positive single cells were sorted by flow cytometry. Genomic DNA was collected by directly lysing GFP-positive single cells and used for fluorescent PCR. The PCR product was loaded for capillary electrophoresis and the result were analyzed for rapid determination of the genotype. **Results** By using this method, a large number of GFP-positive single cells were obtained in a short time. Sixteen GFP-positive single cells were randomly selected and their genotypes were detected by fluorescence PCR; the result showed that the knockout efficiency was 87.5%. Some of the single-cell genotypes were confirmed by Sanger sequencing and the result showed that the genotype result obtained by

【基金项目】 国家自然科学基金(81501342); 新乡医学院博士科研启动费(505129)。

【作者简介】 郭果(1990—), 女, 硕士研究生, 专业: 临床检验诊断学。E-mail: 1796095762@qq.com。

李赛超(1991—), 男, 硕士研究生, 专业: 临床检验诊断学。E-mail: 1240441028@qq.com。 #共同第一作者

【通信作者】 卢燎勋(1984—), 男, 讲师, 研究方向: 免疫调控相关基因的功能研究。E-mail: luliiaoxun@qq.com。

黄蓉(1987—), 女, 讲师, 研究方向: 免疫调控相关基因的功能研究。E-mail: huangrongonly@163.com。 * 共同通信作者

fluorescence PCR were completely correct. **Conclusions** The combination of the CRISPR/Cas9 gene editing system, flow cytometry monoclonal sorting, fluorescence PCR, and high-throughput DNA sample processing technology enables a large number of *Vav1* gene knockout stable monoclonal cells to be obtained in a short time in the mouse melanoma cell line B16.

【**Keywords**】 CRISPR/Cas9; gene knockout; *Vav1* gene; flow cytometry sorting; fluorescence PCR

随着基因敲除技术的发展,特别是对 ZFN、TALEN 和 CRISPR/Cas9 技术的深入研究,其在植物、动物和微生物等领域的应用也愈发成熟^[1, 5, 7, 8, 10, 12, 16-19]。其中 CRISPR/Cas9 系统由于载体构建简单,敲除效率高,所以也被广范应用于各种细胞系的基因敲除^[6, 11, 14, 20]。传统的利用 CRISPR/Cas9 系统进行细胞系基因敲除需要借助于抗生素筛选得到单克隆细胞,其耗时久,效率低,不能在短时间内获得足够多的单克隆细胞。而在得到单细胞克隆以后,由于 CRISPR/Cas9 系统的固有特性,其对基因组 DNA 进行剪切常在切割位点形成少数几个碱基的缺失或是插入,不能通过普通的凝胶电泳直接检测出这种变化所造成的差异。而常规的检测方法如直接测序法可以获得关于突变体非常详细的信息,但是其周期长,操作繁琐,不能大规模应用;PCR 酶切检测法极度依赖切割位点附近是否有可用的酶切位点,适用范围非常狭窄;T7E1 酶切检测法灵敏度不够高,需要多个步骤进行操作,而且 T7E1 酶价格昂贵,不适合进行大规模筛选;PAGE 电泳检测法步骤繁琐,试剂昂贵,费时费力;高分辨率溶解曲线检测法 (high-resolution melting (HRM) analysis) 仅仅只能检测是否有突变,不能得到碱基插入或是缺失的具体数目^[9, 13, 21]。综上所述,这些传统方法都不能同时快速获得大量单细胞克隆和准确的对突变体进行检测。流式细胞仪的分选功能可以将目标细胞进行单克隆分选,保证每一个培养孔中只含有一个细胞,能在短时间内获得大量单克隆细胞;由于荧光 PCR 具有分辨率高、操作简便和成本低廉等特点,其已经被广泛应用于 SNP 检测、基因型检测等领域^[3-4],尽管已经有研究报道将其应用于单克隆细胞基因型检测^[2, 15],但是在实际应用中,如何在短时间内高效地对单克隆细胞样本进行批量处理,以获得基因组 DNA 进行后续分析,还有待解决。

本研究中将 CRISPR/Cas9 基因编辑系统、流式细胞仪单克隆分选技术、荧光 PCR 技术和大批量 DNA 样本处理技术结合起来,在 B16 小鼠黑色素瘤细胞中获得大量 *Vav1* 基因敲除的单克隆细胞。

1 材料和方法

1.1 细胞

B16 小鼠黑色素瘤细胞购于中国科学院细胞库。

1.2 主要试剂及仪器

BbsI 限制性内切酶 (NEB); T4 DNA 连接酶 (NEB); pX458 (Addgene); 脂质体 Lipofectamine 3000 (Life); 减血清培养基 Opti-MEM (Hyclone); Hi-Di™ Formamide (Applied Biosystems); Taq 酶 (Vazyme)。

PCR 仪 (Eppendorf); NanoDrop2000 超微量分光光度计 (Thermo); ABI 测序仪 3730 (Applied Biosystems); 流式细胞仪分选仪 (BD fusion)。

1.3 实验方法

1.3.1 打靶位点选择和引物合成

针对小鼠 *Vav1* 基因,在小鼠基因组数据库 Ensembl (<http://asia.ensembl.org>) 中找到小鼠 *Vav1* 基因 DNA 序列,然后使用在线设计软件 <http://crispr.mit.edu/>,在小鼠 *Vav1* 基因的靶位点 exon5 内挑选 2 个特异性位点作为 sgRNA 的靶序列,这两个靶序列分别为: *Vav1*-sgRNA1: CTAC-GAGGACCTAATGCGCTTGG, *Vav1*-sgRNA2: CGAG-GACCTT TATGACTGCG TGG。根据选定的 sgRNA 靶序列,设计 2 对共 4 条引物序列,并在引物序列的 5' 端添加 BbsI 酶切位点 (下划线代表酶切位点): M-*Vav1*-IVT-1: CACCGCTACGAGGACCTAATGCGCT; M-*Vav1*-IVT-2: AAACAGCGCATTAGGTCCTCGTAGC; M-*Vav1*-IVT-3: CACCGCGAGGACCTTATGACTGCG 和 M-*Vav1*-IVT-4: AAACCGCAGTCATAAAGGTCC TCGC (上海百力格生物技术有限公司合成)。

1.3.2 载体构建

首先将 4 条引物以 M-*Vav1*-IVT-1 + M-*Vav1*-IVT-2 和 M-*Vav1*-IVT-3 + M-*Vav1*-IVT-4 的组合方式通过退火配对获得带有粘性末端的双链 DNA 片段,具体程序如下:首先将合成的两对引物分别磷酸化,磷酸化反应体系为,引物 M-*Vav1*-IVT-1 + M-*Vav1*-IVT-2 和 M-*Vav1*-IVT-3 + M-*Vav1*-IVT-4 各加入 1 μ L (100 μ mol/L),再加入 1 μ L 10 $\times$ T4 Ligation

Buffer (NEB), 然后加入 0.5 μL T4 Polynucleotide Kinase (NEB M0201S), 最后加入 6.5 μL ddH₂O 至总体积 10 μL 。配制好反应体系以后, 充分混匀, 置于 37℃ 孵育 30 min; 取出以上反应产物, 转移至 PCR 仪中进行变性和退火, 反应程序如下: 95℃ 5 min; 95℃~25℃ at -5℃/min。利用 BbsI 限制性内切酶将载体(PX458) DNA 线性化, 纯化回收 PX458 载体 DNA; 3 μL 10 × NEB Buffer 2.1; 1 μL BbsI (NEB) 最后补水至总体积 30 μL , 置于 37℃ 孵育 2 h。酶切完成以后纯化酶切产物并回收至 30 μL ddH₂O 中。最后通过连接反应、转化、重组子筛选获得完整的 sgRNA 和 Cas9 表达载体; 加入 0.5 μL 带有粘性末端的双链 DNA 片段和 2 μL 具有相同粘性末端的载体 DNA, 再加入 0.5 μL T4 DNA 连接酶 (NEB M0202S) 和 1 μL 10 × T4 ligation Buffer (NEB), 反应 1 h 后转化大肠杆菌 DH5 α 并涂布氨苄青霉素抗性平板, 置于 37℃ 培养箱进行过夜培养, 第 2 天下午挑选单菌落进行测序验证, 即可得到 sgRNA 和 Cas9 表达载体 PX458-Vav1-1 和 PX458-Vav1-2。

1.3.3 质粒 DNA 转染 B16 细胞系

将构建好的表达载体 PX458-Vav1-1 和 PX458-Vav1-2 质粒 DNA 等质量混合, 通过脂质体介导的转染方式转染 B16 小鼠黑色素瘤细胞。B16 细胞接种到 24 孔板上培养 24 h 用于转染实验。将 PX458-Vav1-1 和 PX458-Vav1-2 载体质粒 DNA 各取 1.5 μg , 两种质粒共计 3 μg 加入到 150 μL 减血清培养基 (Opti-MEM) 中进行稀释; 取 0.75 μL 脂质体 Lipofectamine 3000 稀释于 150 μL 减血清培养基 (Opti-MEM) 中, 然后将脂质体稀释液加入至 DNA 稀释液中, 充分混匀, 置于室温条件下孵育 20 min。将上述步骤中已接种培养细胞的 24 孔板中的培养基弃去, 然后将复合物按顺序分别加入相应的细胞中, 每孔加入 300 μL 。所有细胞在 37℃ 5% 浓度 CO₂ 培养箱中孵育 1.5 h 后, 弃去培养基, 更换新鲜的培养基继续培养。

1.3.4 流式细胞仪分选获得单细胞克隆

转染 40~80 h 后, 弃去培养基, 采用胰酶消化法将细胞重悬于含有 500 μL 新鲜培养基的离心管中, 1350 r/min 离心 5 min, 丢弃大部分培养基上清, 留约 200 μL 培养基于管底, 用移液器轻轻吹打混匀, 再加 400 μL 新鲜培养基混匀后转移至流式管中。为了获得稳定的突变单克隆细胞, 通过流式细

胞仪将 GFP 阳性单细胞分选至已经加有 150 μL 新鲜培养基的 96 孔细胞培养板中。培养 14 d 后, 将单克隆转移至 48 孔细胞培养板中继续扩大培养并做后续分析。

1.3.5 裂解细胞获取 DNA 溶液 PCR 扩增包含有打靶位点的 DNA 序列

取少量细胞, 离心力 1500 r/min, 离心时间 5 min, 弃去上清液, 保留底部细胞, 加入 20 μL 细胞裂解液, (细胞裂解液配方为: 100 mmol/L KCl, 20 mmol/L Tris-HCl pH 9.0, 0.3% Triton X-100, 1.0 mg/mL proteinase K), 使用移液器将细胞吹打混匀, 加入矿物油覆盖细胞裂解液, 55℃ 孵育 15 min, 使细胞充分裂解, 再转移至 95℃, 孵育 10 min, 使蛋白酶 K 变性, 处理完以后的裂解液即可作为 PCR 模板使用, 置于 -20℃ 保存备用。

1.3.6 利用 PCR 扩增包含有打靶位点的 DNA 序列

首先使用在线引物设计软件 primer3 (<http://primer3.ut.ee/>), 针对打靶位点基因组序列设计特异性引物, Vav1-f PCR-F: TGGCCTGAATC TGTC-CCCTA(上游引物 5' 端进行 FAM 荧光标记) 和 Vav1-f PCR-R: GCAGCCATCTCTACCCTTCC, (上海百力格生物科技有限公司合成); 通过 PCR 扩增包含打靶位点目的片段, 体系为: (Vazyme, P111) 2 × Taq Master PCR MIX: 10 μL , Vav1-F PCR-F (5 $\mu\text{mol/L}$) 和 Vav1-F PCR-R (5 $\mu\text{mol/L}$) 各 0.5 μL ; 细胞裂解液 DNA: 2 μL ; 补充 ddH₂O 至总体积 20 μL ; 程序为: 95℃ 5 min; 95℃ 30 s, 60℃ 30 s, 72℃ 40 s; 72℃ 10 min; 35 个循环。电泳检测 PCR 产物, 如果有清晰 DNA 条带, 则取 2 μL PCR 产物, 稀释 200 倍, 用于后续分析。

1.3.7 利用荧光 PCR 技术检测单细胞克隆基因型

按照: Hi-DiTM Formamide: 9 μL ; PCR 产物(步骤 1.3.6 中获得): 0.5 μL ; 标准分子量内参 DNA: 0.5 μL 比例进行混合。将混合物置于 PCR 仪上, 按照: 95℃ 10 min; 4℃ 10 min 进行变性反应。完成后, 置于 ABI 测序仪 3730 (Applied Biosystems) 上进行毛细管电泳。最后采用 Genemapper © ID software v3.2 软件分析数据, 根据标准分子量内参 DNA 的片段大小直接确定检测样本 PCR 产物的碱基数, 通过与野生型对照样本的 PCR 产物碱基数进行比较, 可以准确反映每个单克隆细胞插入或缺失的碱基数目。



图 1 *Vav1* 基因 sgRNA 设计与载体构建

Figure. 1 Design and construction of *Vav1* gene sgRNA

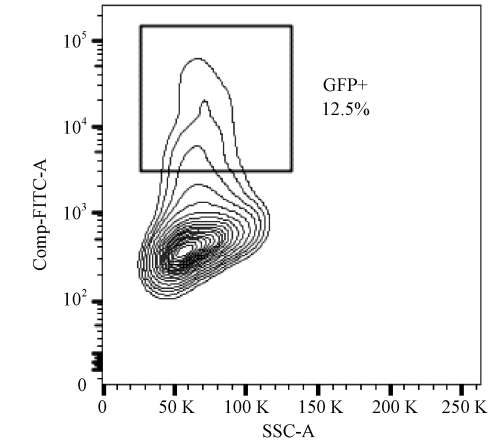


图 2 流式检测 GFP 在 B16 细胞的表达

Figure. 2 Flow cytometry of GFP expression in B16 cells after transfection

1. 3. 8 测序验证单细胞克隆基因型

选取部分确定已经敲除了 *Vav1* 基因的样本,利用和 1. 3. 6 中相同的引物序列(其中上游引物去掉 5' 端 FAM 荧光标记,命名为 *Vav1*-f PCR-F-1)进行 PCR 扩增,将 PCR 产物进行 TA 克隆,挑取单克隆进行培养,然后送测序,验证其碱基缺失或插入等信息。

2 结果

2. 1 打靶位点设计和载体构建

根据软件设计结果,最终在小鼠 *Vav1* 基因的靶位点 exon5 内挑选 2 个特异性位点作为 sgRNA 的靶

序列,其位置分布和序列见图 1a。经过连接反应,将两条 sgRNA 分别连接进入 PX458 载体中,通过进一步的测序验证,发现两条 sgRNA 已经连接进入载体中,而且序列和插入方向完全正确(图 1b 和图 1c)。

2. 2 流式细胞仪进行单细胞分选

选择流式细胞仪分选仪(BD fusion)的 FITC 通道,用同一细胞系转染了无 GFP 质粒的细胞做阴性对照,设置阈值,即可准确将 GFP 阳性细胞群分离出来。如图 2 所示,脂质体转染 3 d 后 GFP 阳性率为 12. 5%。

2. 3 通过荧光 PCR 检测 GFP 阳性单细胞基因型

经过扩大培养以后,从分选得到的 GFP 阳性单细胞中,随机挑选 16 个,通过荧光 PCR 对其基因型进行检测。如图 3 所示,共检测了 16 个 GFP 阳性单细胞,其中 14 个基因敲除,2 个野生型,敲除效率为 87. 5% (14/16);在发生了基因敲除的 14 个单细胞克隆中,有 2 个有单峰,12 个有双峰,而且 14 个单细胞克隆缺失的碱基数目均不同,表明其基因型具有多样性;在具有双峰的 12 个单细胞克隆中,13 号单细胞克隆有一个峰与野生型相比,缺失了 1 个碱基,7 号和 9 号单细胞克隆的 2 个峰之间均只有 1 个碱基的差异。以上结果表明:(1)通过对 GFP 阳性单细胞进行分选,是一种有效地对发生了基因敲除的阳性细胞群进行富集的手段;(2)CRISPR/Cas9 系统对打靶位点的切割具有随机性;(3)利用荧光 PCR 检测单细胞基因型具有很高的灵敏度和准确

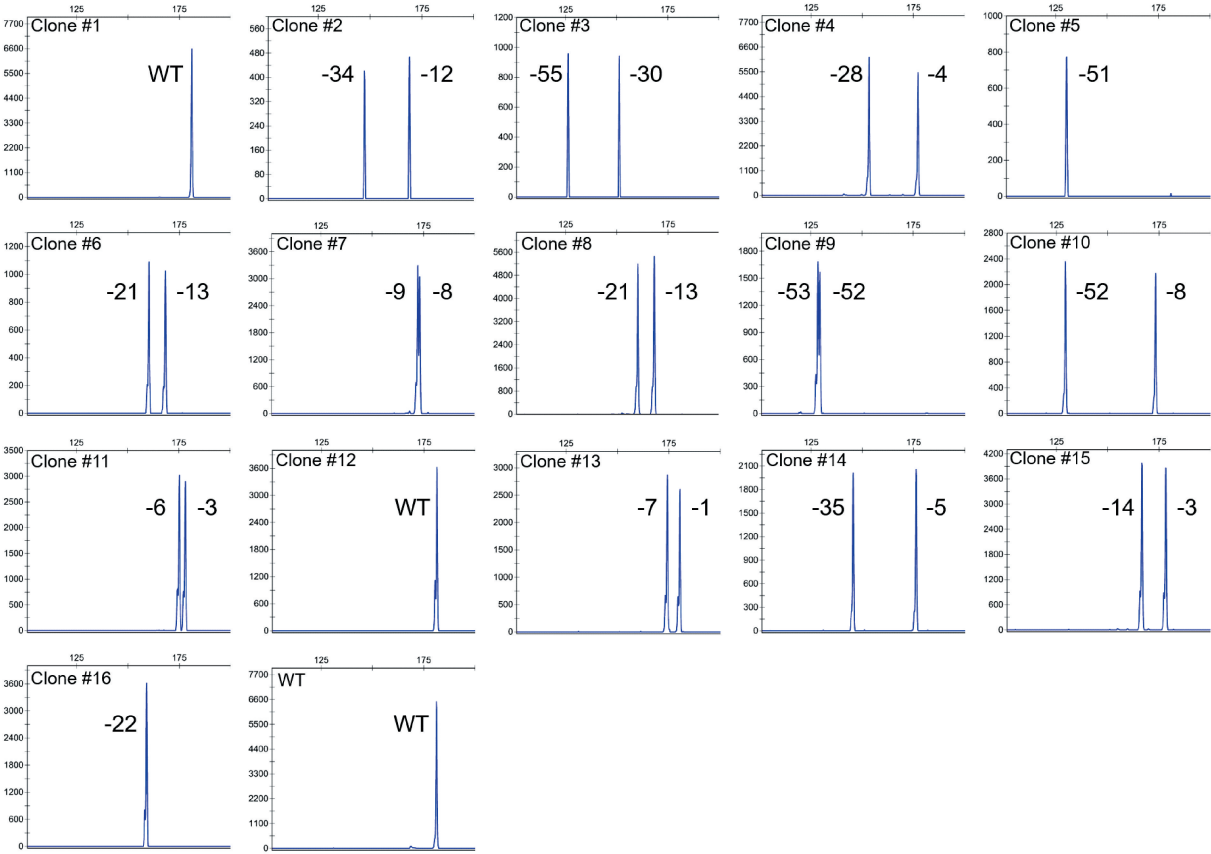


图 3 荧光 PCR 检测 GFP 阳性单细胞基因型

Figure. 3 Genotyping a GFP-positive single cell by fluorescence PCR

性,即使 1 个碱基的差异变化都可以精确的检测出来。

2.4 测序验证单细胞克隆基因型

为了验证通过荧光 PCR 进行基因型检测的准确性和可靠性,本研究选取了 3 个经过荧光 PCR 验证过的阳性克隆进行测序检测,如图 4b 所示,2 号单细胞克隆的 4 个打靶位点均发生了基因组编辑,其中一条染色体上的 2 个打靶位点分别缺失 27 和 7 个碱基,另一条染色体上的 2 个打靶位点分别缺失 9 和 3 个碱基,这一结果与荧光 PCR 的检测结果显示出现的两个分别缺失 12 和缺失 32 个碱基的峰一致;3 号单细胞克隆荧光 PCR 检测结果表明其两条染色体分别缺失了 30 和 55 个碱基,通过测序结果分析可以看出,其 4 个打靶位点均发生了基因组编辑,其中一条染色体上的 2 个打靶位点分别缺失 3 和 27 个碱基,另一条染色体上的 2 个打靶位点同时进行了切割,导致发生了 55 个碱基丢失的大片段删除,两种方法得到的结果也是相同的(图 4c);5 号单细胞克隆经荧光 PCR 检测的结果显示其具有单一峰,即两条染色体均发生了 51 个碱基的剪切,分

析测序结果发现其两条染色体的 4 个打靶位点均同时发生了切割,这就造成此单克隆只有一种基因型,即在 2 个打靶位点之间缺失 55 个碱基。以上结果表明,经过测序得到的基因型结果和通过荧光 PCR 检测得到的基因型结果完全吻合,显示了利用荧光 PCR 检测单细胞基因型具有良好的准确性和可靠性。

3 讨论

CRISPR/Cas9 系统由于具有简单易用、剪切效率高等特点,在短短几年时间内已经得到了广泛推广和应用^[22],但是在利用其对细胞系进行基因敲除的过程中,有一些问题亟待解决:(1)传统的细胞系转染以后,需要借助抗性进行筛选来获取单克隆,费时费力;(2)获得单细胞克隆以后,需要使用试剂盒进行 DNA 抽提,工作量大,成本昂贵;(3)对单细胞克隆进行基因型鉴定时,由于 CRISPR Cas9 系统的固有特性,其对基因组 DNA 进行剪切以后,常在切割位点形成少数几个碱基的缺失或是插入,而常规的检测方法如直接测序法、PCR 酶切检测法、

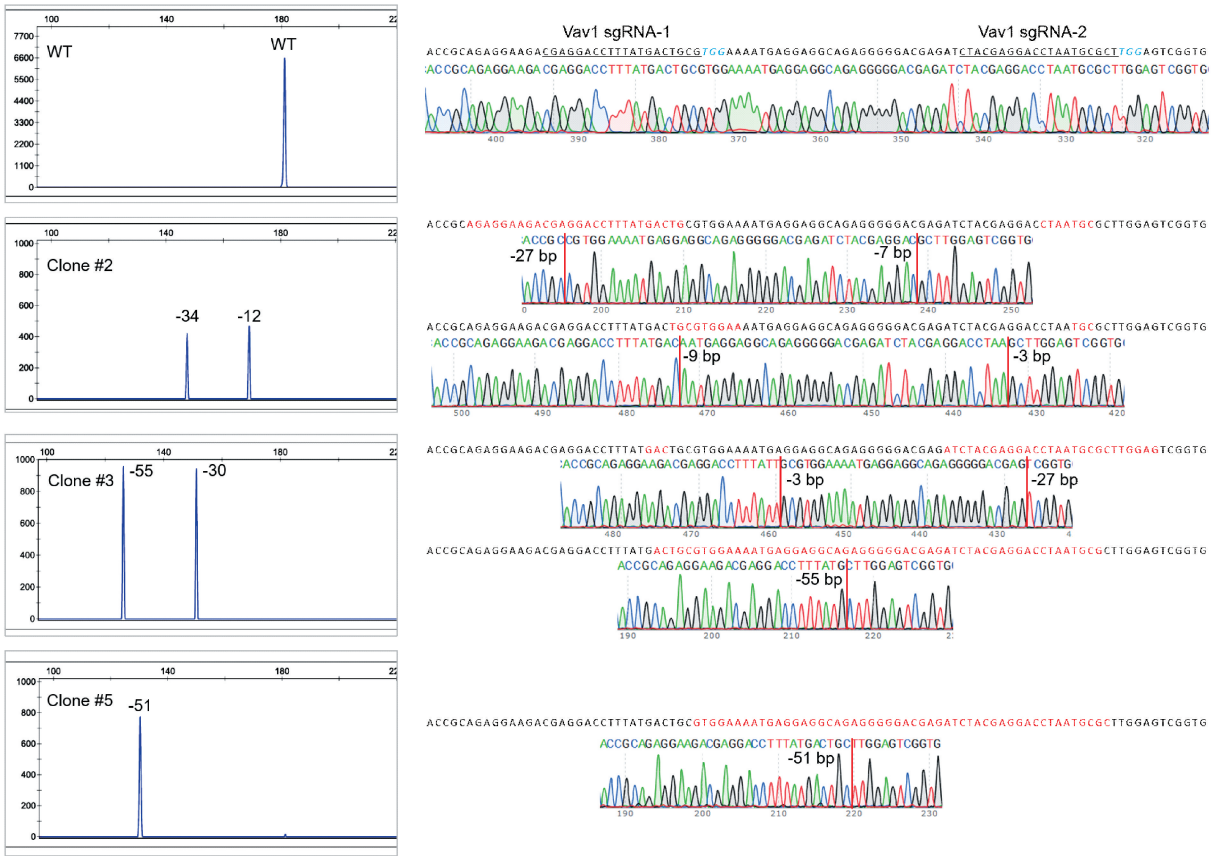


图 4 阳性克隆测序结果与荧光 PCR 比对

Figure. 4 Comparative fluorescence PCR and Sanger sequencing of representative *Vav1* knockout clones

T7E1 酶切检测法、PAGE 电泳检测法、高分辨率溶解曲线检测法等,由于检测精度不够或是操作难度大等原因,都不能同时快速和准确的对突变体进行检测。以上这些原因导致利用 CRISPR/Cas9 系统对细胞系进行基因敲除经常需要耗费很长时间,而且难以获得足够多不同基因型的单细胞克隆用于后续研究。

本研究中将 CRISPR/Cas9 基因编辑系统、流式细胞仪单克隆分选技术、荧光 PCR 技术和大批量 DNA 样本处理技术结合,可以在短时间内获得大量阳性单克隆细胞,这种对阳性单克隆细胞的富集可以有效解决传统方法中筛选难的问题。在获得阳性单克隆细胞以后,本研究采用直接裂解法可快速获得基因组 DNA,结合荧光 PCR 技术,在短时间内对多个基因敲除单克隆细胞进行基因型鉴定。

相比于传统的细胞系基因敲除方法,本研究首次将流式细胞仪分选功能、荧光报告蛋白、DNA 直接裂解法和荧光 PCR 技术高效结合,开创性地解决了传统细胞系敲除中的一系列问题,其具有以下优点:(1)此方法不需要借助抗性筛选,而是直接利用

流式细胞仪分选功能对荧光蛋白阳性细胞群进行筛选,可以在最短时间内获得大量的阳性单克隆细胞,这也为后续从中挑选不同基因型的单细胞打下了良好基础;(2)此方法不需要使用试剂盒抽提基因组 DNA,对细胞的处理时间只需要 25 min,可以在短时间内对大批量样本进行集中处理,极大地节省了经济和时间成本;(3)此方法灵敏度和精确度极高,只需要极少量 DNA 即可,而且可准确检测 1 个碱基的差异;(4)此方法无应用范围限制,检测目标区域不需要有特定酶切位点的存在;(5)此方法因为不涉及 DNA 抽提,对样本进行 PCR 以后经过简单的稀释、变性和毛细管电泳即可以检测分析,步骤简便,所以适合大规模批量化操作;(6)此方法具有通用性,没有细胞系或是特定基因的应用限制。

基于以上优点,本研究所提出的快速获得 *Vav1* 基因敲除稳定细胞系的方法可以进行推广,可在 B16 小鼠黑色素瘤细胞中快速获得大量 *Vav1* 基因敲除稳定单克隆细胞,为细胞系基因敲除提供了一种简单、高效、可行的方法,也为细胞系基因敲除提供了新的思路。

参考文献:

- [1] Cermak T, Doyle EL, Christian M, et al. Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting[J]. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39(12): e82.
- [2] Chenouard V, Brusselle L, Heslan JM, et al. A Rapid and Cost-Effective Method for Genotyping Genome-Edited Animals: A Heteroduplex Mobility Assay Using Microfluidic Capillary Electrophoresis [J]. *J Genet Genomics*, 2016, 43(5): 341–348.
- [3] Chiang PW, Song WJ, Wu KY, et al. Use of a fluorescent-PCR reaction to detect genomic sequence copy number and transcriptional abundance [J]. *Genome Res*, 1996, 6(10): 1013–1026.
- [4] DeWoody JA, Schupp J, Kenefic L, et al. Universal method for producing ROX-labeled size standards suitable for automated genotyping [J]. *Biotechniques*, 2004, 37(3): 348, 350, 352.
- [5] Foley JE, Yeh JR, Maeder ML, et al. Rapid mutation of endogenous zebrafish genes using zinc finger nucleases made by Oligomerized Pool ENgineering (OPEN) [J]. *PLoS One*, 2009, 4(2): e4348.
- [6] 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(9): 822–826.
- [7] Gaj T, Gersbach CA, Barbas CF. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering [J]. *Trends Biotechnol*, 2013, 31(7): 397–405.
- [8] Hsu PD, Lander ES, Zhang F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering [J]. *Cell*, 2014, 157(6): 1262–1278.
- [9] Huang MC, Cheong WC, Lim LS, et al. A simple, high sensitivity mutation screening using Ampligase mediated T7 endonuclease I and Surveyor nuclease with microfluidic capillary electrophoresis [J]. *Electrophoresis*, 2012, 33(5): 788–796.
- [10] Maeder ML, Thibodeau-Beganny S, Sander JD, et al. Oligomerized pool engineering (OPEN): an 'open-source' protocol for making customized zinc-finger arrays [J]. *Nat Protoc*, 2009, 4(10): 1471–1501.
- [11] Mandal PK, Ferreira LM, Collins R, et al. Efficient ablation of genes in human hematopoietic stem and effector cells using CRISPR/Cas9 [J]. *Cell Stem Cell*, 2014, 15(5): 643–652.
- [12] Miller JC, Tan S, Qiao G, et al. A TALE nuclease architecture for efficient genome editing [J]. *Nat Biotechnol*, 2011, 29(2): 143–148.
- [13] Montgomery J, Wittwer CT, Palais R, et al. Simultaneous mutation scanning and genotyping by high-resolution DNA melting analysis [J]. *Nat Protoc*, 2007, 2(1): 59–66.
- [14] Niu J, Zhang B, Chen H. Applications of TALENs and CRISPR/Cas9 in human cells and their potentials for gene therapy [J]. *Mol Biotechnol*, 2014, 56(8): 681–688.
- [15] Ramlee MK, Yan T, Cheung AM, et al. High-throughput genotyping of CRISPR/Cas9-mediated mutants using fluorescent PCR-capillary gel electrophoresis [J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 15587.
- [16] Sander JD, Reyon D, Maeder ML, et al. Predicting success of oligomerized pool engineering (OPEN) for zinc finger target site sequences [J]. *BMC Bioinformatics*, 2010, 11: 543.
- [17] Sovová T, Kerins G, Demnerová K, et al. Genome Editing with Engineered Nucleases in Economically Important Animals and Plants: State of the Art in the Research Pipeline [J]. *Curr Issues Mol Biol*, 2017, 21: 41–62.
- [18] Straimer J, Lee MC, Lee AH, et al. Site-specific genome editing in *Plasmodium falciparum* using engineered zinc-finger nucleases [J]. *Nat Methods*, 2012, 9(10): 993–998.
- [19] Urnov FD, Rebar EJ, Holmes MC, et al. Genome editing with engineered zinc finger nucleases [J]. *Nat Rev Genet*, 2010, 11(9): 636–646.
- [20] Zhai S, Liu C, Zhang L, et al. PLCE1 Promotes Esophageal Cancer Cell Progression by Maintaining the Transcriptional Activity of Snail [J]. *Neoplasia*, 2017, 19(3): 154–164.
- [21] Zhu X, Xu Y, Yu S, et al. An efficient genotyping method for genome-modified animals and human cells generated with CRISPR/Cas9 system [J]. *Sci Rep*, 2014, 4: 6420.
- [22] 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.

〔收稿日期〕2017–11–15