

· 基础研究 ·

## 应用 CRISPR/Cas9 和 Cas9-D10A 建立 Nsun5 基因敲除小鼠模型并分析脱靶效应

王仿竹<sup>1</sup>, 陈红全<sup>2</sup>, 王建瑛<sup>1</sup>, 沈彬<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>南京医科大学生殖医学国家重点实验室, 江苏 南京 211166; <sup>2</sup>浙江大学医学院附属邵逸夫医院检验科, 浙江 杭州 310016

**[摘要]** 目的: 为了检测 CRISPR/Cas9 系统的潜在脱靶效应, 分别利用野生型 Cas9 和切口酶 Cas9-D10A 构建了 RNA 甲基转移酶 Nsun5 基因敲除小鼠模型, 并对两种策略得到的 F0 小鼠进行脱靶分析, 以比较两种敲除策略的特异性。方法: 针对 Nsun5 基因第3外显子, 设计1对 sgRNA, 将野生型 Cas9 mRNA 和切口酶 Cas9-D10A mRNA 分别同这对 sgRNA 混合后注入小鼠一细胞期受精卵中, 实现靶基因敲除, 比较两种 Cas9 得到的 F0 代敲除小鼠的脱靶效应。结果: 利用 CRISPR/Cas9 和 Cas9-D10A 成功建立 Nsun5 基因敲除小鼠模型, 对两种 Cas9 得到的 F0 代突变小鼠进行潜在脱靶位点分析, 均未检测到脱靶位点的存在。结论: 两种策略都成功构建了不含脱靶位点的 Nsun5 基因敲除小鼠模型, 为进一步研究 Nsun5 的生物学功能打下基础。

**[关键词]** Nsun5; CRISPR/Cas9; 基因敲除; 脱靶效应

**[中图分类号]** Q784

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2020)09-1275-06

**doi:** 10.7655/NYDXBNS20200906

## Generating Nsun5 knockout mice using CRISPR/Cas9 and Cas9 - D10A system and analyzing the off-target effects

WANG Fangzhu<sup>1</sup>, CHEN Hongquan<sup>2</sup>, WANG Jianying<sup>1</sup>, SHEN Bin<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>State Key Laboratory of Reproductive Medicine, Nanjing Medical University, Nanjing 211166; <sup>2</sup>Department of Laboratory Medicine, Sir Runrun Shaw Hospital Affiliated to School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310016, China

**[Abstract]** **Objective:** In order to detect the putative off-target effects of CRISPR/Cas9 system, the knockout mouse model of RNA methyltransferase Nsun5 gene were constructed using wild-type Cas9 and nickase Cas9-D10A, respectively, and performed off-target analysis of F0 mice to compare the specificity of the two strategies. **Methods:** Paired sgRNAs targeting the third exon of Nsun5 were designed and co-injected with Cas9 mRNA and Cas9-D10A mRNA respectively into mouse one-cell fertilized eggs to generate Nsun5 knockout founders. Off-target effects were analyzed in founder mice injected with CRISPR/Cas9 and Cas9-D10A, respectively. **Results:** CRISPR/Cas9 and Cas9-D10A were used to establish the Nsun5 gene knockout mouse model successfully. The founder mice obtained from the two variants were subject to off-target analyzation, and no off-target sites were detected. **Conclusion:** Nsun5 gene knockout models were successfully generated by the both strategies without off-target sites, paving the way for further studying the biological functions of Nsun5.

**[Key words]** Nsun5; CRISPR/Cas9; gene knockout; off-target

[J Nanjing Med Univ, 2020, 40(09): 1275-1280]

CRISPR/Cas9 系统作为第3代基因编辑工具, 近几年得到广泛发展和应用<sup>[1-4]</sup>。CRISPR/Cas9 系统

**[基金项目]** 国家自然科学基金(31970796); 江苏省自然科学基金(BK20160045)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: binshen@njmu.edu.cn

中的 Cas9 蛋白具有两个内切酶活性中心(HNH 活性中心和 RuvC 活性中心), 在单导 RNA (single guide RNA, sgRNA) 的指导下, HNH 活性中心切断与 sgRNA 互补的 DNA 链, RuvC 活性中心切断非互补链, 造成的基因组 DNA 双链断裂会诱导细胞内的

DNA修复机制,在绝大多数情况下,细胞会通过非同源末端连接(non-homologous end joining, NHEJ)机制进行DNA修复,但该修复机制并不精确,容易发生错误(插入或缺失),从而造成移码突变,达到基因敲除的目的<sup>[5-9]</sup>。随着研究的深入,很多文献报道CRISPR/Cas9系统存在较严重的脱靶效应,并且由脱靶效应产生的突变可稳定遗传给后代<sup>[10-12]</sup>。将Cas9蛋白的RuvC活性中心(第10位天冬氨酸)突变,得到具有单链切割活性的Cas9切口酶(Cas9-D10A),在两条相邻sgRNA引导下,可以在不降低靶向切割效率的同时,显著降低脱靶效应<sup>[13]</sup>,但这仍然不能完全消除脱靶效应。因此应用CRISPR/Cas9系统建立基因敲除动物模型时必须对潜在的脱靶位点进行检测。

本研究分别利用CRISPR/Cas9和Cas9-D10A系统,采用原核注射的方式,成功敲除了RNA甲基化转移酶基因Nsun5,分别得到发生移码突变的基因敲除小鼠。为比较两种Cas9作用后得到基因敲除小鼠的脱靶效应,各选取3只发生移码突变的小鼠对潜在的脱靶位点进行检测,结果均未检测到脱靶现象,证明两种策略都成功构建了不含脱靶位点的Nsun5基因敲除小鼠模型,为进一步研究Nsun5的生物学功能奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

实验小鼠为C56BL/6J,饲养于南京医科大学动物中心(SPF级),每隔12h光暗循环,每日小鼠自由进食标准鼠粮及饮水。所有小鼠操作均严格按照标准操作指南进行,所有动物实验经南京医科大学实验动物福利伦理委员会批准。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 质粒构建与引物设计

根据文献报道的Paired sgRNA/Cas9-D10A设计原则<sup>[13]</sup>,在小鼠Nsun5基因第3外显子上设计了1对sgRNA(sgRNA1和sgRNA2),合成的寡核苷酸链序列用于构建pUC57-sgRNA表达载体。msNsun5-E3-1 T7 gRNA up: 5'-TAGGCCCAGCAGAGCCTTCCAT-3'和msNsun5-E3-1 T7 gRNA down: 5'-AAACATGGAAGGCTCTGCTGGG-3';msNsun5-E3-2 T7 gRNA up: 5'-TAGGCTGAGCTGGCCCCGACTCA-3'和msNsun5-E3-2 T7 gRNA down: 5'-AAACTGAGTCGGCC-CAGC-TCAG-3'。

构建步骤如下:将合成的寡核苷酸链退火

(95℃ 5 min;95℃~85℃每秒降低1℃;85℃~25℃每秒降0.1℃;4℃保持),用T4 DNA连接酶(TaKaRa公司,日本)连接退火产物和经Bsa I酶(NEB公司,美国)线性化的pUC57-sgRNA表达载体,转化后挑取克隆送测序,选取测序正确的克隆,扩大培养后提取质粒用于体外转录实验。

为检测切割效果,在sgRNA作用靶点上下游设计PCR引物。msNsun5-E3 For: 5'-GCTTGTCTCTGCCTCTTG-3'和msNsun5-E3 Rev: 5'-CTAGAAGT-CACAGTGGTCAA-3'。为检测脱靶效应,根据文献报道的sgRNA可以忍受1~3个碱基的不完美互补配对从而对基因组进行切割<sup>[12]</sup>,分别选取了sgRNA1和sgRNA2 10个最容易发生脱靶效应的位点进行检测,脱靶位点鉴定引物见表1。

#### 1.2.2 体外转录

体外转录Cas9和Cas9-D10A:①用Age I(NEB公司,美国)线性化Cas9和Cas9-D10A质粒。Cas9和Cas9-D10A各10 μg+10 μL NEB buffer 1+4 μL Age I,补水至100 μL,37℃孵育3h;加4 μL RNasecure(Ambion公司,美国)于60℃孵育10min;用MinElute PCR纯化试剂盒(Qiagen公司,美国)回收线性化的Cas9和Cas9-D10A;②利用mMESSAGE mMACHINE® T7 Ultra Kit(Ambion公司,美国)体外转录Cas9和Cas9-D10A;③利用RNeasy Mini Kit(Qiagen公司,美国)纯化转录后的Cas9 mRNA和Cas9-D10A mRNA;④取1 000 ng转录后的mRNA加入1%的琼脂糖凝胶进行电泳(180 V,10 min),用来检测mRNA的质量;⑤分装转录产物冻存于-80℃。

体外转录sgRNA:①采用PCR的方法将pUC57-sgRNA表达载体上的T7启动子+sgRNA序列扩增作为体外转录模板,PCR引物序列为sgRNA-For 5'-TCTCGCGCGTTTCGGTGATGACGG-3',sgRNA-Rev 5'-AAAAAAGCACCCGACTCGGTGCCACTTTTTTC-3'。PCR反应程序如下:94℃ 5 min;98℃ 10 s,72~62℃(每循环降低1℃)15 s,72℃ 30 s,10个循环;98℃ 10 s,62℃ 15 s,72℃ 30 s,25个循环;72℃ 5 min;4℃保持。加入2 μL RNasecure于60℃孵育10min;用MinElute PCR纯化试剂盒(Qiagen公司,美国)回收PCR产物。②利用MEGAscript™ Kit(Ambion公司,美国)体外转录sgRNA,之后加入1 μL DNA酶以消化DNA模板。③利用MEGAclean™ Kit(Ambion公司,美国)纯化sgRNA。④取200 ng sgRNA加入1%的琼脂糖凝胶进行电泳(180 V,10 min),以检测sgRNA质量。⑤分装sgRNA冻存

表1 针对sgRNA1和sgRNA2脱靶位点设计的PCR引物序列

Table 1 Oligonucleotide sequences of PCR primers for sgRNA1 and sgRNA2 off-target sites

引物名	上游(5'→3')	下游(5'→3')
N5-OT-sg1-1	ACCCGCTAAGTGTGTAGAACTTG	TCGAGTGCAGGCTTGTAGATGT
N5-OT-sg1-2	TTCGTCTTGCCAAGCCATGAATT	GCTGCTCTATGACAAGCGATCAA
N5-OT-sg1-3	TCCTAAGCCAGCCTTGAACCTTGC	GCTCCATCCATCAACGGCAGAC
N5-OT-sg1-4	GGTGAAGTACACTGTGCCTAG	ACGTGCCTGAATGTGAGAACCA
N5-OT-sg1-5	CAGCATCCAGTCCACCAACCTAG	GTTCACTACCAGGAGAGCCAGTG
N5-OT-sg1-6	AGCAAGTTCTGGGTTCTGTGTGA	AAGTCAGCGATGTCTTTGTGAGA
N5-OT-sg1-7	ATGAGTGTGTGGTGGCAGGTGGA	TTGTTCCCTGGCAGCTTGTCTG
N5-OT-sg1-8	GGTTAGGTAAATCCGTGTGCTTCA	CTCCTCAGATAGGCTTGGACTCA
N5-OT-sg1-9	GAGTGAGCACCCACAGTACCTACC	CGGCAACCCCTTCTCCTAACAGTT
N5-OT-sg1-10	AAGCACCAGCGTAGTCAGTCAG	AGGCAGAATTGTAGCCAGAAGGT
N5-OT-sg2-1	TGAGCCATCGGGTGAGACTAAGA	ACACAGCACAGCATTGCCTCT
N5-OT-sg2-2	CCAGTTAGACCGTTAGACCGAGA	CCAGGCATCACCTAGAACCAGAG
N5-OT-sg2-3	GCAACAGGAATGGAGGAGGAGGAA	GCAGGCACATTGTGAGGCAGAG
N5-OT-sg2-4	TCCTTGCCCTGACCAAATACC	TCCAACCTCTCACCTAAGAACTCAA
N5-OT-sg2-5	CGGTGGAGGTATGTGTTGAGAGG	GGCTGGAAGTGGCAGGATAAGG
N5-OT-sg2-6	TGTTCTGTCCACTGTCTTCATGTT	CCTCAGCCTCCTCAGCAATTC
N5-OT-sg2-7	GGCAGGAAGTGAGAAATGAGGAAGT	CACCTGGCTGTGGAGTGTAGAC
N5-OT-sg2-8	CTACCTCCTTCCCTCCAACCACACT	GCCAGTTGTCTTGGCCACAGAGAT
N5-OT-sg2-9	CCGTGAAGTTAAGACTGTCTTATG	GCTGTAGTTACAAGTGGCTGAG
N5-OT-sg2-10	GTCCATCCAGCACATGAGCACTAT	GCCCATTGCCCTCCTTCTCTTTC

N5:Nsun5;OT:off-target;sg1:sgRNA1;sg2:sgRNA2。

于-80℃。

### 1.2.3 Cas9/sgRNA的原核注射

解冻Cas9 mRNA和Cas9-D10A mRNA,并将其分别与转录好的sgRNA混合,将Cas9 mRNA和Cas9-D10A mRNA的终浓度调节至20 ng/μL,sgRNA1和sgRNA2的终浓度都为5 ng/μL。将混合物进行小鼠受精卵的显微注射。

### 1.2.4 脱靶效应检测和测序

剪出生后7 d的小鼠脚趾并编号,用酚氯仿法抽提小鼠基因组DNA,溶于水中。用设计好的引物msNsun5-E3 For和msNsun5-E3 Rev对小鼠基因组进行PCR扩增,50 μL反应体系。反应条件:95℃ 5 min;95℃ 30 s,58℃ 30 s,72℃ 30 s,32个循环;72℃ 5 min;4℃保持。PCR产物用1.5%琼脂糖凝胶电泳(150 V,20 min),将与对照组存在明显差异的PCR产物克隆连接T载体(TaKaRa公司,日本),随机挑取12个阳性克隆用M13-47通用引物测序(南京金斯瑞生物科技有限公司)。

脱靶效应检测:选取F0代小鼠基因组为模板,用rTaq酶(TaKaRa公司,日本)对sgRNA1和sgRNA2各10个脱靶位点进行PCR扩增。反应条件为:95℃ 5 min;95℃ 30 s,62℃(每循环降低0.2℃)

30 s,72℃ 30 s,35个循环;72℃ 5 min;4℃保持。

1.5%琼脂糖凝胶电泳(150 V,20 min)。用PCR产物纯化试剂盒(Axgen公司,美国)回收PCR产物,之后将纯化后的PCR产物退火。退火体系为:NEB Buffer 22 μL,PCR产物200 ng,水补齐至20 μL。退火程序:95℃ 5 min;95~85℃,每秒降低1℃;85~25℃,每秒降0.1℃;4℃保持。退火产物放于冰上,每个体系加入0.3 μL T7核酸内切酶I(NEB公司,美国),37℃孵育25 min之后用2.5%琼脂糖凝胶电泳(100 V,25 min)。

## 2 结果

### 2.1 针对小鼠Nsun5基因设计靶向sgRNA位点并进行原核注射

应用CRISPR/Cas9做基因敲除时,只有合理设计sgRNA,才能将靶基因彻底敲除。根据经验,将sgRNA设计在目标基因编码序列(coding sequence, CDS)的前1/3处时,在该处切割,发生DNA双链断裂,通过机体NHEJ修复,产生移码突变,能够导致基因彻底敲除;如果sgRNA距起始密码子ATG太近,机体会在起始密码子下游找到另一ATG充当起始密码子,仍会合成有功能的蛋白;而如果sgRNA

距起始密码子 ATG 位置太远,会导致该基因前面的功能域保留,致使敲除不彻底。根据以上原则,结合报道的 Paired sgRNA/Cas9-D10A 设计策略<sup>[11]</sup>,本研究将 1 对 sgRNA 设计在 Nsun5 基因 3 号外显子上(图 1A),通过体外转录得到 Cas9 mRNA、Cas9-D10A mRNA 和 sgRNA,利用原核注射技术体外将转录的 RNA 注射到小鼠一细胞期受精卵中,移植后,Cas9/sgRNA 组出生 17 只首建鼠;Cas9-D10A/sgRNA 组出生 7 只首建鼠(表 2)。

### 2.2 Nsun5 基因敲除首建鼠基因型鉴定

以 F0 代小鼠基因组为模板,利用引物 msNsun5-E3 For 和 msNsun5-E3 Rev 进行 PCR 扩增(野生型片

段大小为 487 bp,涵盖 sgRNA 作用靶点),然后进行凝胶电泳(图 1B)。Cas9 组中,首建鼠 1、3~5、7~13、15~17 号小鼠 PCR 条带与野生型对照相比存在明显差异,选取 3、4、7、9、11、12 号小鼠的 PCR 产物进行 T-A 克隆,并通过测序来鉴定其发生的具体突变(图 1C)。在 Cas9-D10A 组中,首建鼠 1、2、5~7 号小鼠 PCR 条带与野生型对照相比存在明显差异,选取 1、2、5、6 号小鼠 PCR 产物进行 T-A 克隆并测序(图 1C)。以上结果说明成功构建了 Nsun5 基因敲除首建鼠。

### 2.3 Nsun5 基因敲除首建鼠脱靶效应分析

为了检测这两种策略得到的基因敲除首建鼠是否存在脱靶效应,选取由 Cas9/sgRNA 和 Cas9-

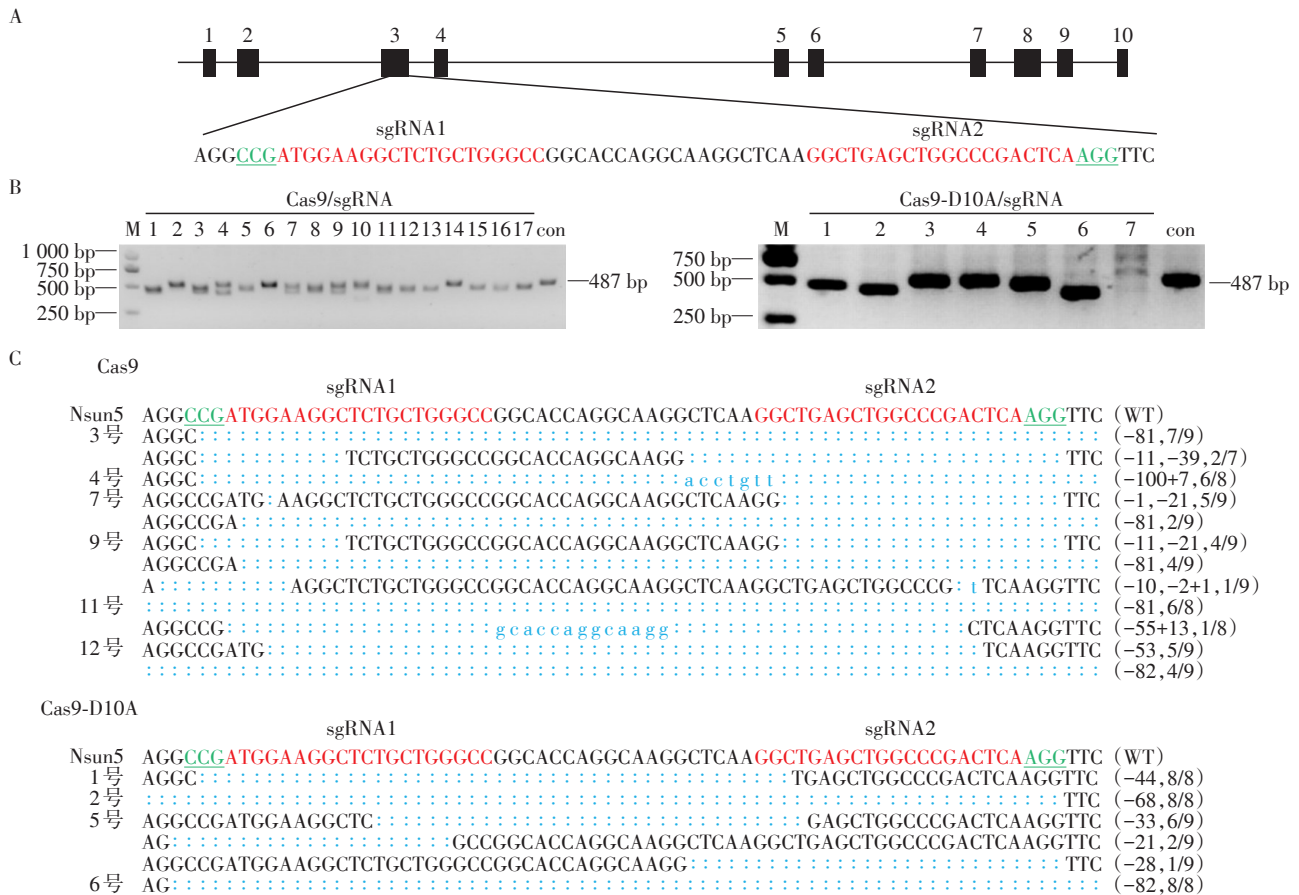


图 1 CRISPR/Cas9 介导小鼠 Nsun5 基因敲除鉴定  
Figure 1 Identification of CRISPR/Cas9-mediated knockout of mouse Nsun5 gene

表 2 小鼠胚胎显微注射 Cas9 mRNA 和 sgRNA 统计

Table 2 Summary of mouse embryo microinjection of Cas9 mRNA and sgRNAs

注射混合物	注射胚胎数	移植胚胎数	出生小鼠数	小鼠编号
20 ng/μL Cas9 mRNA+5 ng/μL sgRNA	120	63	17	C9-(1-17)
20 ng/μL Cas9-D10A mRNA+5 ng/μL sgRNA	120	65	7	D10A-(1-7)

D10A/sgRNA 构建的 Nsun5 基因敲除首建鼠各 3 只 (Cas9:5 号、7 号、12 号;Cas9-D10A:1 号、2 号、6 号), 分析并对比 Cas9 和 Cas9-D10A 得到首建鼠的脱靶效应。首先针对两个 sgRNA 各预测了 10 个最容易发生脱靶效应的位点(表 3), 然后设计引物进行 PCR 扩增, 之后进行 T7EN1 酶切检测脱靶效应(图 2)。从图中可以看出, 和对照相比, 选取的 6 只小鼠针对 sgRNA1 和 sgRNA2 潜在的 20 个脱靶位点均无突变, 对 T7EN1 酶切有切割条带的 PCR 产物, 进行了 T-A 克隆测序验证, 发现对应的 PCR 产物存在单核苷酸多态性或由重复序列导致的 Taq 酶扩增错误。

### 3 讨论

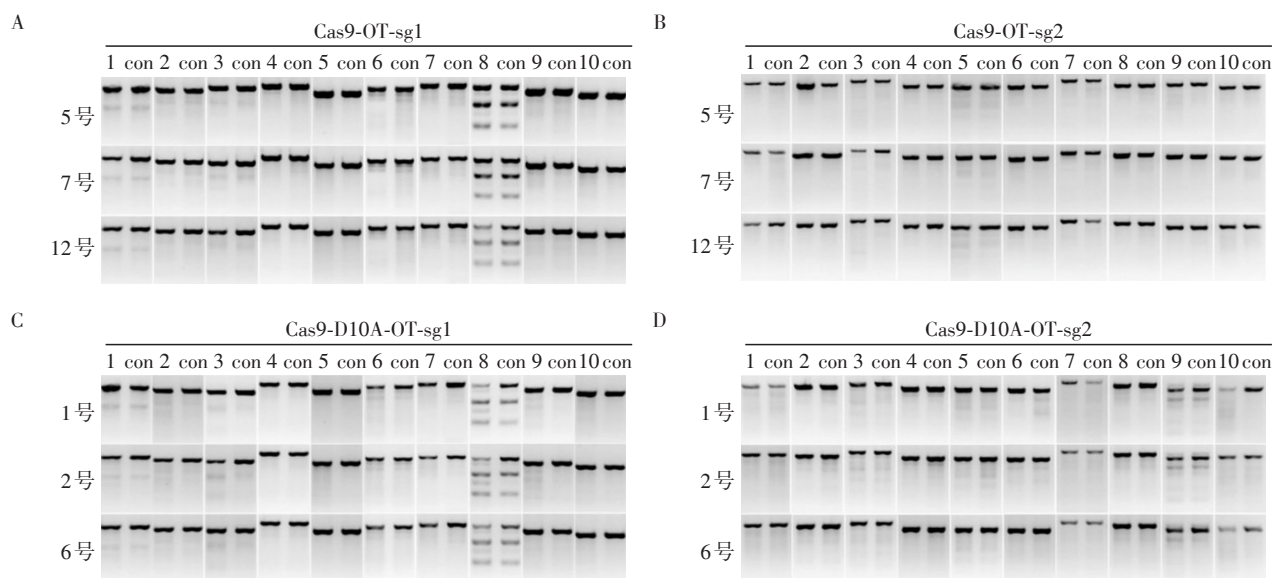
本研究利用 Cas9/sgRNA 和 Cas9-D10A/sgRNA 对小鼠 RNA 甲基化相关基因 Nsun5 进行了敲除, 检测了每个 sgRNA 潜在的脱靶位点, 但并没有发现脱靶效应, 为研究 Nsun5 的生物学功能提供了可靠的敲除小鼠模型。本研究挑选了 10 个最容易发生脱靶效应的位点进行检测, 在其他未检测的位点, 可能会存在脱靶效应; 由于 T7EN1 酶切检测方法存在检测极限(小于 1% 的突变检测不到), 低突变的脱靶位点可能会被遗漏; 另外, 首建小鼠易存在嵌合

表 3 sgRNA1 和 sgRNA2 脱靶位点的核苷酸序列

Table 3 Nucleotide sequences of off-target sites of sgRNA1 and sgRNA2

位点	序列名	寡核苷酸序列(5'→3')	位点	序列名	寡核苷酸序列(5'→3')
靶向位点	sg1	GGCCCAGCAGAGCCTTCCATCGG	靶向位点	sg2	GGCTGAGCTGGCCCGACTCAAGG
脱靶位点	sg1-1	AGACAGCAGAGCCTTCCATAGG	脱靶位点	sg2-1	GGCAGAGCTGGCCCGACTCACGG
	sg1-2	GTCCCTGCATAGCCTTCCATGAG		sg2-2	GGCTCAGCTGGGCGACTCAAGG
	sg1-3	GTGCCAGCAGAGCCTTCCAATAG		sg2-3	GGCGCAACTGGTCCGACTCAGGG
	sg1-4	GGCTGGGCAGAGCCTTCCATGAG		sg2-4	GCTTGAGCTGGCCCGACTCACAG
	sg1-5	TCCCAAGCACAGCCTTCCATGAG		sg2-5	GGGTGAGCTGTCCCAACTCAAAG
	sg1-6	GGAACAGAAAAGCCTTCCATCAG		sg2-6	GGCCATGCTGGGCGACTCACAG
	sg1-7	GACCCAACAGAGCCTTCCAGAGG		sg2-7	TGCTGGGCTGGCCCTACTCAGGG
	sg1-8	GGGCTATCAAAGCCTTCCATCAG		sg2-8	GGATCAGCAGGCCCTACTCAGAG
	sg1-9	GTCCGAGTGAGCCTTCCATTAG		sg2-9	TGCAGAGGTGGCCTGACTCATGG
	sg1-10	TGCCCAGAGTAGCCTTCCATGAG		sg2-10	GTGTGAGATGGCCTGACTCACAG

PAM 序列显示为绿色。碱基错配显示为红色。



A、B: Cas9 组首建鼠 5 号、7 号、12 号的脱靶位点检测; C、D: Cas9-D10A 组首建鼠 1 号、2 号、6 号的脱靶位点检测。OT: 脱靶效应; con: 野生型基因组对照。

图 2 F0 代 Nsun5 敲除小鼠脱靶效应分析

Figure 2 Analysis of the off-target in Nsun5 knockout mice of F0 generation

效应(DNA双链断裂发生在一细胞期之后),本研究只检测了脚趾基因组DNA的脱靶效应,不能代表其他器官,特别是生殖细胞中的脱靶情况。如利用全基因组测序和靶向深度测序对首建鼠的后代进行测序,能更精确地检测这两种策略的脱靶效应。本课题组的前期研究显示,利用Cas9和双sgRNA敲除小鼠Ar基因时,在突变小鼠尾巴基因组中可以检测到1个脱靶位点<sup>[13]</sup>,但在Cas9-D10A和双sgRNA策略构建的小鼠中检测不到这个脱靶位点,说明脱靶的发生和序列特异性以及目标序列上下游的环境有一定关系。

随着CRISPR/Cas9技术的不断完善,在科学研究和临床应用中发挥了举足轻重的作用。CRISPR/Cas9系统不仅可以对不同物种进行基因敲除<sup>[14-15]</sup>,还可以利用其造成的DNA双链断裂,同时提供供体DNA,在基因组中实现定点插入突变<sup>[16]</sup>。在基因调控上,利用催化区域失活的Cas9蛋白(dCas9,两个内切酶活性中心都被突变,失去切割活性,但是其在sgRNA的指导下仍能够和靶序列结合),成功对基因表达进行调控<sup>[17-18]</sup>。CRISPR/Cas9系统还可对染色体组蛋白进行修饰<sup>[19-20]</sup>,用于文库筛选<sup>[21-22]</sup>等。CRISPR-Cas工具极大地加快了研究进程,也为疾病诊断和治疗带来了新方法,值得进一步探索。

#### [参考文献]

- [1] GARNEAU J, DUPUIS M, VILLION M, et al. The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA[J]. *Nature*, 2010, 468(7320): 67-71
- [2] ANZALONE A V, KOBLAN L W, LIU D R. Genome editing with CRISPR - Cas nucleases, base editors, transposases and prime editors [J]. *Nat Biotechnol*, 2020, 38(7): 824-844
- [3] ADLI M. The CRISPR tool kit for genome editing and beyond[J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 1911
- [4] PICKAR-OLIVER, A, GERSBACH C A. The next generation of CRISPR - Cas technologies and applications [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2019, 20(8): 490-507
- [5] ANDERS C, NIEWOEHNER O, DUERST A, et al. Structural basis of PAM-dependent target DNA recognition by the Cas9 endonuclease [J]. *Nature*, 2014, 513(7519): 569-573
- [6] CHEN J, DAGDAS Y, KLEINSTIVER B, et al. Enhanced proofreading governs CRISPR - Cas9 targeting accuracy [J]. *Nature*, 2017, 550(7676): 407-410
- [7] JINEK M, JIANG F G, TAYLOR D W, et al. Structures of Cas9 endonucleases reveal RNA-mediated conformational activation [J]. *Science*, 2014, 343(6176): 1247997
- [8] 刘媛媛, 宋小玲, 王仿竹, 等. m6A识别蛋白Ythdf1在精子发生中的作用研究[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2019, 39(2): 171-175
- [9] 宋小玲, 刘媛媛, 王仿竹, 等. m6A识别蛋白Ythdf3在精子发生中的作用研究[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2019, 39(6): 846-750
- [10] HSU P, SCOTT D, WEINSTEIN J, et al. DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases [J]. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(9): 827-832
- [11] FU Y, FODEN J, 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
- [12] MALI P, AACH J, STRANGES P B, et al. CAS9 transcriptional activators for target specificity screening and paired nickases for cooperative genome engineering [J]. *Nat. Biotechnol*, 2013, 31(9): 833-838
- [13] SHEN B, ZHANG W, ZHANG J, et al. Efficient genome modification by CRISPR-Cas9 nickase with minimal off-target effects [J]. *Nat Methods*, 2014, 11(4): 399-402
- [14] HAI T, TENG F, GUO R, et al. One-step generation of knockout pigs by zygote injection of CRISPR/Cas system [J]. *Cell Res*, 2014, 24(3): 372-375
- [15] YANG D, XU J, ZHU T, et al. Effective gene targeting in rabbits using RNA-guided Cas9 nucleases [J]. *J Molecul Cell Biol*, 2014, 6(1): 97-99
- [16] RICHARDSON C D, RAY G J, DEWITT M A, et al. Enhancing homology-directed genome editing by catalytically active and inactive CRISPR-Cas9 using asymmetric donor DNA [J]. *Nat Biotechnol*, 2016, 34(3): 339-344
- [17] CHAVEZ A, SCHEIMAN J, VORA S, et al. Highly efficient Cas9-mediated transcriptional programming [J]. *Nat Methods*, 2015, 12(4): 326-328
- [18] LIAO H K, HATANAKA F, ARAOKA T, et al. *In vivo* target gene activation via CRISPR/Cas9-mediated trans-epigenetic modulation [J]. *Cell*, 2017, 171(7): 1495-1507
- [19] MCDONALD J I, CELIK H, ROIS L E, et al. Reprogrammable CRISPR/Cas9-based system for inducing site-specific DNA methylation [J]. *Biol Open*, 2016, 5(6): 866-874
- [20] MORITA S, NOGUCHI H, HORII T, et al. Targeted DNA demethylation *in vivo* using dCas9-peptide repeat and scFv-TET1 catalytic domain fusions [J]. *Nat Biotechnol*, 2016, 34(10): 1060-1065
- [21] SANJANA NE. Genome-scale CRISPR pooled screens [J]. *Anal Biochem*, 2016, 532: 95-99
- [22] SHI J, WANG E, MILAZZO J P, et al. Discovery of cancer drug targets by CRISPR-Cas9 screening of protein domains [J]. *Nat Biotechnol*, 2015, 33(6): 661-667