

利用 CRISPR/Cas9 技术对人多能干细胞进行高效基因组编辑

刘改改, 李爽, 韦余达, 张永贤, 丁秋蓉

中国科学院上海生命科学研究院营养科学研究所, 上海 200031

摘要: CRISPR/Cas9 技术提供了一个全新的基因组编辑体系。本文利用 CRISPR/Cas9 平台, 在人胚胎干细胞株中对选取的一段特定基因组区域进行了多种基因组编辑: 通过在基因编码框中引入移码突变进行基因敲除; 通过单链 DNA 提供外源模板经由同源重组定点敲入 FLAG 序列; 通过同时靶向多个位点诱导基因组大片段删除。研究结果表明 CRISPR/Cas9 可以对人多能干细胞进行高效基因编辑, 获得的突变干细胞株有助于对基因和基因组区域的功能进行分析和干细胞疾病模型的建立。

关键词: CRISPR/Cas9 基因编辑; 人多能干细胞; 基因敲除; DNA 序列定点插入; 基因组大片段删除

Efficient genome editing in human pluripotent stem cells through CRISPR/Cas9

Gaigai Liu, Shuang Li, Yuda Wei, Yongxian Zhang, Qiurong Ding

Institute for Nutritional Sciences, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Shanghai 200031, China

Abstract: The RNA-guided CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeat)-associated Cas9 nuclease has offered a new platform for genome editing with high efficiency. Here, we report the use of CRISPR/Cas9 technology to target a specific genomic region in human pluripotent stem cells. We show that CRISPR/Cas9 can be used to disrupt a gene by introducing frameshift mutations to gene coding region; to knock in specific sequences (e.g. FLAG tag DNA sequence) to targeted genomic locus *via* homology directed repair; to induce large genomic deletion through dual-guide multiplex. Our results demonstrate the versatile application of CRISPR/Cas9 in stem cell genome editing, which can be widely utilized for functional studies of genes or genome loci in human pluripotent stem cells.

Keywords: CRISPR/Cas9 genome editing; human pluripotent stem cells; gene disruption; targeted DNA insertion; large-genomic deletion

基因组测序技术的发展极大推动了人类对各类疾病遗传致病因素的认识。针对多种疾病进行的外

显子测序(Exome sequencing)和全基因组关联研究(Genome-wide association study, GWAS)提示很多新

收稿日期: 2015-05-29; 修回日期: 2015-06-24

基金项目: 上海市浦江人才计划(编号:15PJ1409200)资助

作者简介: 刘改改, 硕士, 助理研究员, 研究方向: 干细胞治疗。E-mail: liugaigai@sibs.ac.cn

通讯作者: 丁秋蓉, 博士, 研究员, 研究方向: 干细胞与转化医学。E-mail: qrding@sibs.ac.cn

DOI: 10.16288/j.ycz.15-240

网络出版时间: 2015-9-16 11:06:06

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20150916.1106.004.html>

的基因突变和疾病发生具有强烈相关性^[1]。深入解析这些遗传突变,并建立携带特定遗传突变的疾病模型用于针对性的药物筛选,将极大提高对疾病致病机理的认识和加速疾病防治方案的开发。

人类多能干细胞(Human pluripotent stem cells, hPSCs)和基因组编辑技术结合所建立的细胞模型,为疾病研究提供了一个独特的实验平台。利用这个平台体系,研究人员可以研究特定基因突变甚至染色体结构变异对人类多种细胞类型和组织器官功能的影响及其详细的分子机制,并可建立携带不同遗传突变的“个性化”疾病模型用于大规模药物筛选。该模型体系的建立得益于基因组编辑技术,尤其是 CRISPR/Cas9(Clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated proteins9, CRISPR/Cas9)技术的飞速发展。目前常用的 CRISPR/Cas9 平台是从化脓链球菌(*Streptococcus pyogenes*)的型 CRISPR 系统优化而来,由 SpCas9 核酸酶和 gRNA 构成^[2-5]。其中 SpCas9 核酸酶识别基因组中的 PAM (Protospacer adjacent motif)序列, gRNA 中长约 20 bp 的引导序列决定靶向特异性。当基因组上位于 PAM 5'端的前体间隔序列(Protospacer)与 gRNA 中的引导序列互补时,Cas9 核酸酶启动对 DNA 双链进行切割,形成 DNA 双链断裂缺口(Double-strand breaks, DSBs)。DSBs 能激活细胞内非同源末端连接(Non-homologous end joining, NHEJ)和同源重组(Homology directed repair, HDR)两种 DNA 修复机制。NHEJ 修复过程可以引入碱基的随机插入或者缺失(Insertion or deletion);而在外源模板存在的情况下,细胞也可以通过 HDR 的方式对基因组进行精确修复。利用 CRISPR/Cas9 技术,本实验室建立了在人多能干细胞中进行基因敲除或者敲入的基因组编辑体系^[6,7]。本研究以位于人 2 号染色体上的 *LINC00116* 基因组区域为例,利用 CRISPR/Cas9 技术对人多能干细胞中的该基因组区域进行了基因敲除、FLAG 短肽序列定点插入和基因组大片段删除,获得的多个突变干细胞株为下一步对该基因组区域进行功能分析提供了特有的细胞平台。

1 材料和方法

1.1 CRISPR/Cas9 载体构建

通过 Online 软件(<http://www.genome-engineer->

[ing.org](http://www.genome-engineer.org))针对特定基因组区域进行 CRISPR 靶向序列设计和脱靶位点预测,或者通过对靶向位点附近序列进行观察,寻找符合要求的序列,进一步通过序列比对确认特异性后获得靶向序列。将靶向序列(20 bp)克隆入 pgRNA_cloning vector (Addgene, <http://www.addgene.org/>)获得 gRNA 质粒。pCas9-GFP 质粒来自 Addgene。文中用到的靶向序列(下划线为 PAM)分别是:ORF 靶向:5'-GTGCTAGTAGCCTTC-GCTTCTGG-3';FLAG 定点敲入:5'-GGCGGAAGG-CGCAGAGTCTCAGG-3';大片段删除:5'-GTA-ACACATGCCCAGAGGCAGGG-3'和 5'-GCTAAGC-CTCCAGTACAATGTGG-3'。FLAG-ssODN(Single-stranded oligodeoxynucleotide)序列为(下划线为 FLAG 编码序列):5'-GCAAGGTGGCCATGAGG-GGGACAGAATGGGGCGGAAGGCGCAGAGTCTCACTTGTCATCGTCATCCTTGTAATCGGCCAGGTCCAGCTTCTTCTGCGTCGCCGCCAGCTTGTCCTGCAGCCTC-3',购自美国 IDT(Integrated DNA Technoliges)公司。

1.2 gRNA 靶向活性鉴定

为鉴定 gRNA 的靶向活性,Cas9 质粒分别和不同的 gRNA 质粒共转入 HEK293T 细胞。48 h 后对细胞进行基因组 DNA 抽提,并对靶向位点附近的基因组序列进行 PCR 扩增(产物长度为 300~500 bp)。PCR 产物经过纯化后利用 Surveyor Mutation Detection 试剂盒(Transgenomic, USA)进行活性分析。

1.3 hPSCs 培养和电穿孔

人胚胎干细胞株 HUES9^[8]在 mTeSR1 培养基(STEMCELL Technologies, Canada)中培养。培养皿预先用 Geltrex(Life Technologies, USA)处理,每 24 h 更换新鲜 mTeSR1 培养基,细胞密度达 80%时用 Accutase(STEMCELL Technologies, Canada)消化传代。

细胞在电穿孔前用 10 $\mu\text{mol/L}$ ROCK 抑制剂(Santa Cruz Biotechnologies, USA)预处理 3~4 h,随后用 Accutase 消化为单细胞悬液。对细胞计数后将 1×10^7 个细胞重悬至 800 μL 预冷的 PBS 中,加入 25 μg pCas9-GFP 质粒和 25 μg gRNA 表达质粒或者 15 μg pCas9-GFP 质粒、15 μg gRNA 表达质粒和 30 μg FLAG-ssODN 后混合。将约 800 μL 细胞与 DNA 混合液转移至 0.4 cm 电穿孔杯(Bio-Rad, USA)中,冰

上孵育 5 min, 在电穿孔仪(Bio-Rad, USA)中用 250 V 和 500 μ F 的条件进行电穿孔。电穿孔后加入适量培养液进行细胞重悬, 再度离心去除死细胞后种下。

1.4 细胞分选和单克隆分离

电穿孔 48 h 后, 荧光显微镜下观察绿色荧光蛋白(GFP)以确定 CRISPR/Cas9 质粒成功表达。细胞用 Accutase 消化为单细胞悬液后离心重悬于 PBS 中, 通过流式分选出绿色荧光表达细胞, 以每块 10 cm 培养皿 15~30 K 个细胞的密度种下。细胞恢复生长 3~4 d 后镜下可见单克隆, 10 d 左右单克隆被挑选分离至 96 孔板中。当 96 孔板中细胞密度达到 80% 左右时, 进行细胞消化传代, 获得两块同样的 96 孔板细胞, 一块用于继续培养, 另一块贴壁恢复生长一段时间后用于基因组 DNA 抽提和基因型鉴定。

1.5 基因型鉴定

用于基因型鉴定的 96 孔板在细胞密度长至 80%~90% 时, PBS 洗去培养基后每孔加入 50 μ L 细胞裂解液(10 mmol/L Tris pH 7.5, 10 mmol/L EDTA, 10 mmol/L NaCl, 0.5% Sarcosyl, 40 μ g/mL 蛋白酶 K)在 56~60°C 孵育过夜裂解细胞。随后每孔加入 100 μ L 预冷的 95% 乙醇和 75 mmol/L NaCl 在室温或 -20°C 孵育 1 h 进行离心沉淀 DNA。75% 乙醇漂洗 2 遍后室温晾干, 每孔用 30 μ L 的 ddH₂O 或者 TE 缓冲液加 0.1 mg/mL RNase A 进行 DNA 溶解。

溶解获得的基因组 DNA 用于下一步 PCR 鉴定基因型。设计 PCR 引物对靶向位点附近的基因组 DNA 进行扩增, 扩增片段长度为 150~200 bp。PCR 产物首先通过 2.5% 的琼脂糖胶电泳鉴定, 携带 NHEJ 引入的碱基插入或缺失或者通过 HDR 定点插入 FLAG 序列的 PCR 产物在胶上会表现出位移。潜在阳性单克隆的 PCR 产物通过 Sanger 测序进一步确认序列或者克隆到 T 载体中测序确认序列。

2 结果与分析

2.1 干细胞基因编辑体系建立

本课题组前期利用 CRISPR/Cas9 技术构建了一个对人多能干细胞株进行基因组编辑的平台体系(图 1)^[6,7,9]。该体系包含两个质粒, 一个是由 CAG(CMV early enhancer/chicken beta actin promoter)启动的 SpCas9

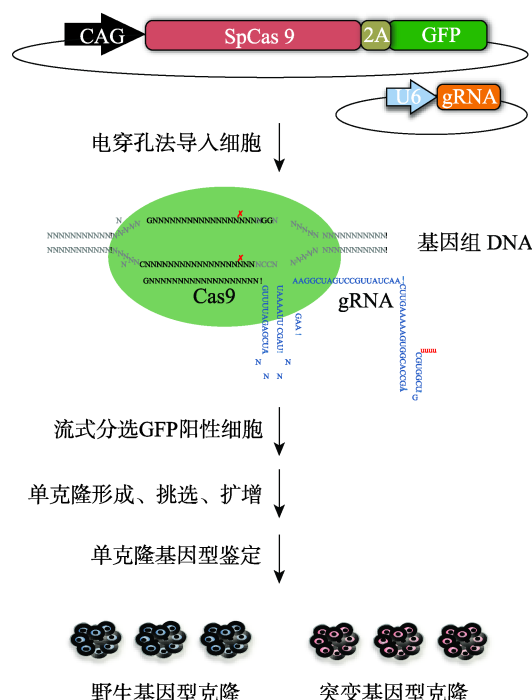


图 1 利用 CRISPR/Cas9 靶向人多能干细胞流程示意图
CAG: 巨细胞病毒早期增强子/鸡 β -肌动蛋白启动子; GFP: 绿色荧光蛋白。

表达质粒, 并以 2A 肽段连接的方式同时表达 GFP 荧光蛋白, 作为下游筛选标记; 另一个质粒包含 U6 启动的 gRNA 元件, 可以通过简单的酶切连接方式获得具有特定靶向序列的 gRNA 质粒。实验流程主要包括电穿孔、流式分选、单克隆形成、单克隆基因型鉴定和扩增等步骤。同批实验的多个突变克隆和野生型克隆可用于后期研究。

2.2 基因敲除

近期一项针对小鼠中长链非编码 RNA(Long intergenic noncoding RNA, lincRNA)的大规模筛选表明, 若干非编码 RNA 和脂肪分化紧密相关, 其中一条名称为 *lnc-RAP-5*^[10]。LINC00116 为 *lnc-RAP-5* 人种属中相应的同源基因, 它位于人 2 号染色体上, 总长约 15 kb。通过对这段基因组区域的基因编码框和物种保守性分析, 发现在 LINC00116 基因第 7 个外显子中存在一个物种保守性很高的基因编码框(Open reading frame, ORF), 提示在前期研究中被预测为非编码的 LINC00116 基因组区域有可能编码蛋白。为探究这种可能性, 确认该 ORF 是否编码蛋白, 以及其在脂肪分化中可能的作用, 本文首先利用 CRISPR/Cas9 靶向该编码区, 通过引入移码突变获

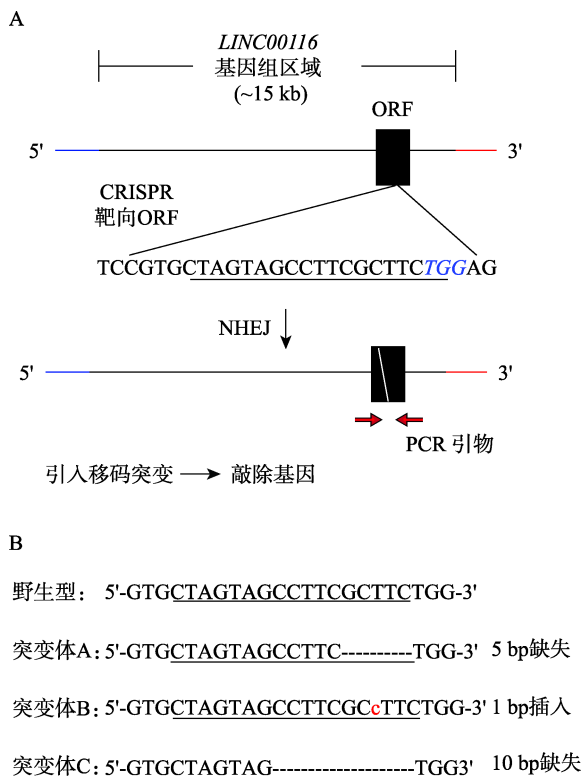


图 2 利用 CRISPR/Cas9 敲除基因

A: 靶向基因组区域、靶向位点和 PCR 鉴定引物位置示意图。*LINC00116* 基因组区域长约 15 kb。蓝色斜体为 PAM 序列, 下划线为靶向序列。B: 代表性突变克隆序列。图中突变体 A、B、C 均为两条等位基因突变序列相同的纯合子突变克隆。

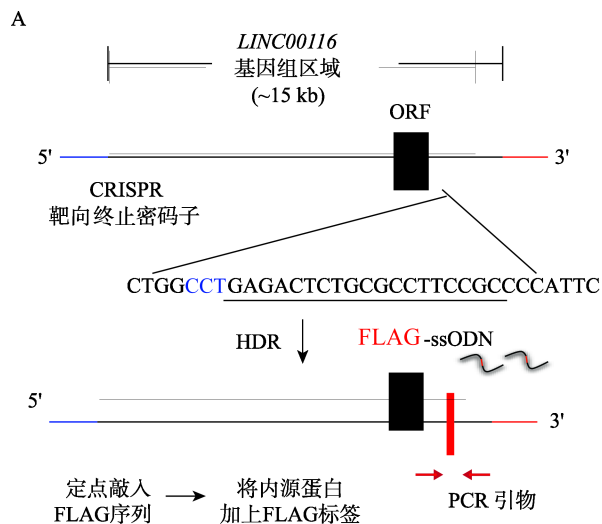


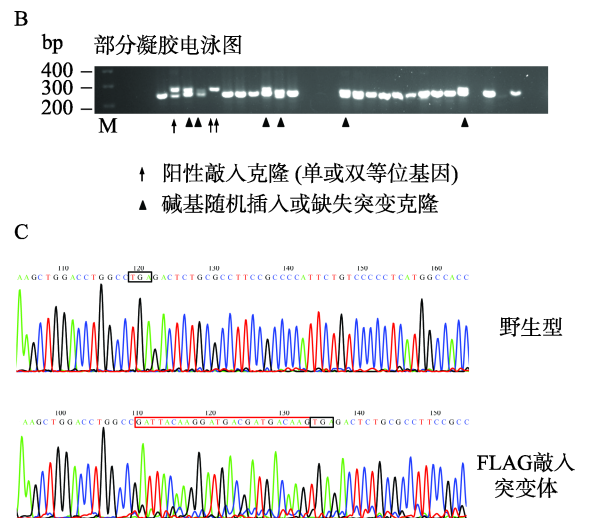
图 3 利用 CRISPR/Cas9 定点敲入 FLAG 序列

A: 靶向基因组区域、靶向位点和 PCR 鉴定引物位置示意图。FLAG-ssODN 为外源单链模板, 其中红色部分为 FLAG 编码序列, 两边黑色部分为同源臂。蓝色斜体为 PAM 序列, 下划线为靶向序列。B: 部分 DNA 凝胶电泳鉴定图。M 为 1 kb plus DNA marker。单箭头标记 1 个等位基因中插入 FLAG 序列的阳性克隆, 双箭头标记两个等位基因中均插入 FLAG 序列的阳性克隆, 黑三角标记发生随机碱基插入或缺失的突变克隆, 未标记克隆为野生基因型。野生基因型条带大小为 240 bp, FLAG 敲入基因型条带大小为 264 bp。C: 代表性单克隆测序结果, 包括野生型克隆(上)和正确敲入 FLAG 编码序列的阳性克隆(下)。红色方框中为 FLAG 编码序列, 黑色方框中为终止密码子。

得基因敲除干细胞株(图 2A)。靶向后共获得 162 个单克隆。进一步对获得的单克隆进行靶向基因组区域的 PCR 扩增和测序, 成功鉴定出 93 个突变克隆(突变率约 57%), 其中双等位基因具有相同序列突变的纯合子克隆有 14 个(纯合率约 8.6%), 双等位基因带有不同突变的复合型杂合子克隆有 9 个(复合杂合子率约 5.6%), 剩余单等位基因突变杂合子克隆有 70 个(单突变杂合子率约 43%)。对突变克隆的序列分析显示突变一般发生在位于 PAM 5'端的 3 个碱基附近, 碱基插入或缺失的数目均小于 20 bp, 绝大部分在 10 bp 以内, 最常见的为 1 bp 碱基插入和 5 bp 碱基缺失(图 2B)。

2.3 FLAG 短肽序列的定点敲入

由于缺乏合适的内源蛋白抗体, 为确定该基因编码框是否编码蛋白, 本文在终止密码子前定点敲入编码 FLAG 小肽的 DNA 序列, 用 FLAG 小肽标记内源蛋白, 因而后期可以通过 FLAG 抗体对内源蛋白的表达和功能进行检测。gRNA 序列靶向终止密码子, 在 HEK293T 细胞中的活性检测中显示较高的靶向活性(附图1)。单链核苷酸 FLAG-ssODN 携带 FLAG 编码序列以及靶向序列两边长为 50 bp 的同源臂序列作为外源模板。Cas9-GFP、gRNA 和 FLAG-ssODN



同时导入多能干细胞进行基因编辑(图 3A)。靶向后共获得 450 个单克隆。通过 PCR 对靶向位点附近的基因组序列进行扩增后发现成功插入 FLAG 序列(24 bp)的克隆在琼脂糖电泳中相比野生型克隆显示明显的位移(图 3B), 也同时存在若干经由 NHEJ 修复过程引入碱基插入或缺失突变而产生的突变克隆(图 3B)。随后通过对潜在阳性克隆进行测序进一步确认 FLAG 序列的正确插入(图 3C)。最终鉴定结果显示 1 共获得 5 个阳性克隆, 其中一个克隆的两条等位基因中均有正确 FLAG 序列插入, 定点插入效率约 1.1%。

2.4 基因组大片段删除

为同时研究 *LINC00116* 的生物学功能, 以及 *LINC00116* 和 ORF 编码蛋白之间的生物学联系, 本文将全部 *LINC00116* 基因组区域(约 15 kb)进行大片段删除后观察对细胞功能的影响。两条 gRNAs 序列分别靶向 *LINC00116* 基因组区域两边, 在 HEK293T 细胞的活性检测中均显示出较高的靶向活性(附图 1)。将两条 gRNA 同时导入细胞后, 基因组区域两边产生 DSBs, 有部分细胞因而发生大片段缺失(图 4A), 靶向后一共获得 190 个克隆。通过 PCR 进行阳性克隆筛选, 首先在靶向位点的两边设计 PCR 引

物(第 1 对引物), 发生大片段缺失的阳性克隆能扩增出 PCR 产物, 野生型克隆由于中间序列很长而不会有 PCR 产物生成(图 4B, 上方电泳图); 随后通过针对大片段中间序列设计引物(第 2 对引物)对获得的阳性克隆中大片段缺失是发生在 1 条等位基因还是同时发生在两条等位基因中进行分析(图 4B, 下方电泳图)。结果显示在 11 个单克隆中发生了大片段缺失(阳性率约 5.6%), 其中一个单克隆的两条等位基因中均发生了片段缺失(图 4B)。PCR 产物的测序结果进一步确认了大片段缺失(图 4C)。

3 讨论

本研究以位于人 2 号染色体上的 *LINC00116* 基因组区域为例, 通过 CRISPR/Cas9 基因组编辑技术成功在人胚胎干细胞株 HUES9 中进行了多种基因编辑: 通过在基因编码框中引入移码突变敲除基因; 通过单链核苷酸提供外源同源模板经由同源重组定点敲入 FLAG 序列; 通过同时导入两条 gRNAs 诱导基因组大片段缺失。各种突变效率比较显示通过 NHEJ 过程引入碱基插入或缺失产生移码突变的效率最高, 在本研究中效率为 57%, 其中在两个等位基因中同时发生碱基插入或缺失的突变效率为 14%。

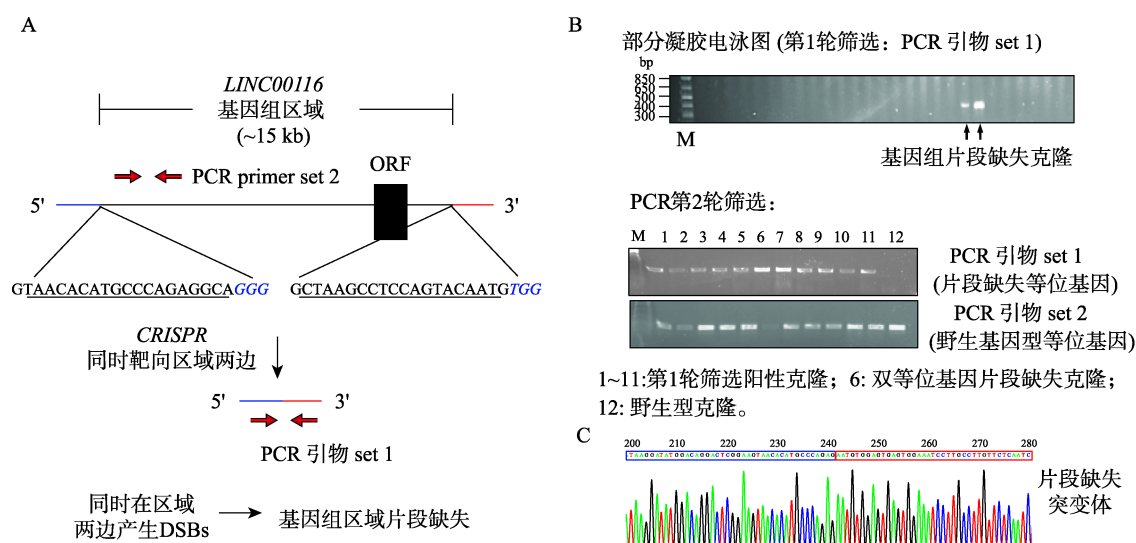


图 4 利用 CRISPR/Cas9 进行基因组大片段删除。

A: 靶向基因组区域、靶向位点和 PCR 鉴定引物位置示意图。靶向删除序列两边的基因组序列分别用蓝色和红色线条标记。B: 部分 DNA 凝胶电泳鉴定图。M 为 1 kb plus DNA marker。箭头所指为潜在的阳性克隆。第 1 对引物(针对片段删除等位基因)产物大小为 416 bp, 第 2 对引物(针对野生型等位基因)产物大小为 346 bp。C: 代表性单克隆测序结果。蓝色方框中为靶向删除序列 5'端序列, 红色方框中为靶向删除序列 3'端序列。

利用 CRISPR 对多能干细胞中多个基因组区域进行靶向的研究结果显示, 经由 NHEJ 引入碱基插入或缺失突变的效率均大于 50%^[6], 提示利用 CRISPR 技术可以进行高效的基因敲除, 甚至多个基因的同时敲除。

在由同源重组敲入特定点突变或者外源序列方面, 本研究通过单链核苷酸模板定点敲入 FLAG 小肽序列的效率偏低, 仅为 1.1%。后期可尝试从以下几个方面提高重组效率: (1) 增加单链核苷酸模板中同源臂的长度。本文中单链核苷酸模板两边同源臂长度为 50 bp, 但受单链核苷酸体外合成长度的限制(目前 200 bp), 同源臂长度一般小于 100 bp; (2) 构建质粒载体作为外源模板。利用质粒载体可以大幅度增加同源臂长度, 并且可以引入抗性基因表达框经由药物筛选富集成功重组的细胞。本实验室前期通过两边携带 500 bp 长度同源臂和嘌呤霉素(Puromycin)筛选基因的质粒载体成功在多个基因组位点定点插入 GFP 报告基因, 阳性克隆效率>60%(未发表数据); (3) 提高 gRNA 的靶点活性。筛选更高活性的 gRNA 靶向序列可能有助于提高重组效率; (4) 抑制 NHEJ 过程。由于细胞在 DNA 修复过程中 NHEJ 和 HDR 是两个相互拮抗的过程, 抑制 NHEJ 过程可以相应提高 HDR 效率。多个研究组已经成功通过体外筛选找到抑制 NHEJ 修复过程的小分子化合物^[11~13]。在基因靶向同时通过此类小分子化合物处理细胞, 可以达到增强 HDR 过程而提高 DNA 序列敲入效率的目的。

本文利用同时导入两条 gRNA 对基因组区域进行了大片段靶向删除, 效率约为 5%。靶向删除基因组大片段的效率不仅和每条 gRNA 的基因编辑活性相关, 同时也和片段长度相关。靶向删除片段长度的增加可能带来效率的降低^[14]。此外, 导入两条或者多条 gRNAs, 不仅可以引入基因组区域缺失, 同时还可以引发其他多种染色体结构变异^[15,16], 包括染色体区域插入(Insertion)、重复(Duplication)、易位(Translocation)和倒位(Inversion)等, 为模拟染色体结构变异导致的人类疾病提供了一个合适的平台。

基因靶向潜在的问题是脱靶效应。本研究组和其他研究组前期通过对靶向得到的干细胞单克隆株进行全基因组测序分析脱靶情况^[17~19]。结果显示 TALEN 和 CRISPR 靶向后得到的干细胞克隆中脱靶率均很低, 提示在保证靶向序列的高度特异性、控

制基因编辑蛋白表达强度和时间的情况下, 脱靶现象是可以避免的。值得注意的是, 在全基因组测序中, 研究人员发现很多单克隆(包括突变株和同批的野生型细胞株), 相比编辑前的干细胞母株, 产生若干新的点突变^[9,17~19]。由于这些点突变附近基因组序列和靶向序列没有任何相似性, 因此推测是在细胞培养和传代中随机发生, 其中少数位于基因编码区而造成氨基酸突变。这种随机突变的获得提示基因靶向后获得的每个单克隆都可能存在靶向引入突变外的基因组序列上的差别。因而, 在建立干细胞疾病模型对特定基因突变进行功能分析时, 为避免这种随机突变对细胞表型的影响, 实验设计需要对多个野生型和突变型克隆同时进行表型比对, 在多个干细胞母株中进行疾病模型建立, 并利用多种对照组设计(如在基因敲除克隆中通过引入外源质粒恢复基因表达)等进行综合分析。

CRISPR 基因组编辑技术平台由于载体构建简单、靶向位点选择灵活、靶向效率稳定, 目前已经被广泛用于各类细胞和模式动物的基因组编辑^[20], 它在干细胞平台中的应用潜力也远远超出了本文涉及的这几个方面。可以预见, 基因组编辑技术和干细胞平台的结合将极大提高人们对生命科学的认识, 推动精准医疗发展, 加速细胞治疗和基因治疗等新一代医药方案的开发。

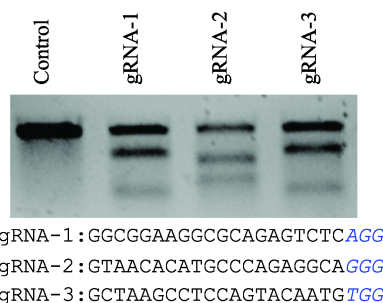
附录: 附图 1 见电子版 www.chinagene.cn。

参考文献

- [1] The NHGRI GWAS Catalog. <http://www.genome.gov/gwastudies/>. [DOI]
- [2] Cong L, Ran FA, Cox D, Lin SL, Barretto R, Habib N, Hsu PD, Wu XB, Jiang WY, Marraffini LA, Zhang F. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 2013, 339(6121): 819–823. [DOI]
- [3] Mali P, Yang LH, Esvelt KM, Aach J, Guell M, DiCarlo JE, Norville JE, Church GM. RNA-Guided Human Genome Engineering via Cas9. *Science*, 2013, 339(6121): 823–826. [DOI]
- [4] Jinek M, East A, Cheng A, Lin S, Ma E, Doudna J. RNA-programmed genome editing in human cells. *Elife*, 2013, 2: e00471. [DOI]
- [5] Cho SW, Kim S, Kim JM, Kim JS. Targeted genome engineering in human cells with the Cas9 RNA-guided en-

- donuclease. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(3): 230–232. [DOI]
- [6] Ding QR, Regan SN, Xia YL, Oostrom LA, Cowan CA, Musunuru K. Enhanced efficiency of human pluripotent stem cell genome editing through replacing TALENs with CRISPRs. *Cell Stem Cell*, 2013, 12(4): 393–394. [DOI]
- [7] Peters DT, Cowan CA, Musunuru K. Genome editing in human pluripotent stem cells. *StemBook* [Internet], 2013, Apr 29. [DOI]
- [8] Cowan CA, Klimanskaya I, McMahon J, Atienza J, Witmyer J, Zucker JP, Wang SP, Morton CC, McMahon AP, Powers D, Melton DA. Derivation of embryonic stem-cell lines from human blastocysts. *N Engl J Med*, 2004, 350(13): 1353–1356. [DOI]
- [9] Ding QR, Lee YK, Schaefer EAK, Peters DT, Veres A, Kim K, Kuperwasser N, Motola DL, Meissner TB, Hendriks WT, Trevisan M, Gupta RM, Moisan A, Banks E, Friesen M, Schinzel RT, Xia F, Tang A, Xia YL, Figueroa E, Wann A, Ahfeldt T, Daheron L, Zhang F, Rubin LL, Peng LF, Chung RT, Musunuru K, Cowan CA. A TALEN genome-editing system for generating human stem cell-based disease models. *Cell Stem Cell*, 2013, 12(2): 238–251. [DOI]
- [10] Sun L, Goff LA, Trapnell C, Alexander R, Lo KA, Hacısuleyman E, Sauvageau M, Tazon-Vega B, Kelley DR, Hendrickson DG, Yuan BB, Kellis M, Lodish HF, Rinn JL. Long noncoding RNAs regulate adipogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(9): 3387–3392. [DOI]
- [11] Yu C, Liu YX, Ma TH, Liu K, Xu SH, Zhang Y, Liu HL, La Russa M, Xie M, Ding S, Qi LS. Small molecules enhance CRISPR genome editing in pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*, 2015, 16(2): 142–147. [DOI]
- [12] Chu VT, Weber T, Wefers B, Wurst W, Sander S, Rajewsky K, Kühn R. Increasing the efficiency of homology-directed repair for CRISPR-Cas9-induced precise gene editing in mammalian cells. *Nat Biotechnol*, 2015, 33(5): 543–548. [DOI]
- [13] Maruyama T, Dougan SK, Truttmann MC, Bilate AM, Ingram JR, Ploegh HL. Increasing the efficiency of precise genome editing with CRISPR-Cas9 by inhibition of nonhomologous end joining. *Nat Biotechnol*, 2015, 33(5): 538–542. [DOI]
- [14] Canver MC, Bauer DE, Dass A, Yien YY, Chung J, Masuda T, Maeda T, Paw BH, Orkin SH. Characterization of genomic deletion efficiency mediated by CRISPR/Cas9 in mammalian cells. *J Biol Chem*, 2014, 289(31): 21312–21324. [DOI]
- [15] Lee HJ, Kim E, Kim JS. Targeted chromosomal deletions in human cells using zinc finger nucleases. *Genome Res*, 2010, 20(1): 81–89. [DOI]
- [16] Lee HJ, Kweon J, Kim E, Kim S, Kim JS. Targeted chromosomal duplications and inversions in the human genome using zinc finger nucleases. *Genome Res*, 2012, 22(3): 539–548. [DOI]
- [17] Veres A, Gosis BS, Ding QR, Collins R, Ragavendran A, Brand H, Erdin S, Cowan CA, Talkowski ME, Musunuru K. Low incidence of off-target mutations in individual CRISPR-Cas9 and TALEN targeted human stem cell clones detected by whole-genome sequencing. *Cell Stem Cell*, 2014, 15(1): 27–30. [DOI]
- [18] Smith C, Gore A, Yan W, Abalde-Atristain L, Li Z, He CX, Wang Y, Brodsky RA, Zhang K, Cheng LZ, Ye ZH. Whole-genome sequencing analysis reveals high specificity of CRISPR/Cas9 and TALEN-based genome editing in human iPSCs. *Cell Stem Cell*, 2014, 15(1): 12–13. [DOI]
- [19] Suzuki K, Yu C, Qu J, Li M, Yao XT, Yuan TT, Goebel A, Tang SW, Ren RT, Aizawa E, Zhang F, Xu XL, Soligalla RD, Chen F, Kim J, Kim NY, Liao HK, Benner C, Esteban CR, Jin YB, Liu GH, Li YR, Izpisua Belmonte JC. Targeted gene correction minimally impacts whole-genome mutational load in human-disease-specific induced pluripotent stem cell clones. *Cell Stem Cell*, 2014, 15(1): 31–36. [DOI]
- [20] Hsu PD, Lander ES, Zhang F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell*, 2014, 157(6): 1262–1278. [DOI]

(责任编辑: 张博)



附图 1 gRNA 靶向活性鉴定。

Cel-I 核酸突变检测显示各条 gRNA 靶点活性在 20%~50%之间。剪切后的小分子量条带强度显示相对的突变活性。gRNA-1 为 FLAG 序列定点敲入所用靶向 gRNA, gRNA-2 和 gRNA-3 分别为基因组片段删除所用 5'和 3'靶向 gRNA。蓝色斜体为 PAM 序列。