

# CRISPR/Cas9 基因组编辑技术在农业动物中的应用

幸宇云, 杨强, 任军

江西农业大学, 省部共建猪遗传改良与养殖技术国家重点实验室, 南昌 330045

**摘要:** CRISPR(Clustered regularly interspaced short palindromic repeats)/Cas(CRISPR associated proteins)是在细菌和古细菌中发现的一种用来抵御病毒或质粒入侵的获得性免疫系统。目前已发现的 CRISPR/Cas 系统包括 I、II 和 III 型, 其中 II 型系统的组成较简单, 由其改造成的 CRISPR/Cas9 技术已成为一种高效的基因组编辑工具。自 2013 年 CRISPR/Cas9 技术成功用于哺乳动物基因组定点编辑以来, 应用该技术进行基因组编辑的报道呈现出爆发式的增长。农业动物不仅是重要的经济动物, 也是人类疾病和生物医药研究的重要模式动物。本文综述了 CRISPR/Cas9 技术在农业动物中的研究和应用进展, 简述了该技术的脱靶效应及减少脱靶的主要方法, 并展望了该技术的应用前景。

**关键词:** CRISPR/Cas9; 基因组编辑; 农业动物; 脱靶

## Application of CRISPR/Cas9 mediated genome editing in farm animals

Yuyun Xing, Qiang Yang, Jun Ren

State Key Laboratory for Pig Genetic Improvement and Production Technology, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China

**Abstract:** CRISPR (Clustered regularly interspaced short palindromic repeats)/Cas (CRISPR associated proteins) is an acquired immune system found in bacteria and archaea that fight against invasion of viruses or plasmids. CRISPR/Cas systems are currently classified into three main types: I, II and III, of which type II has relatively simple components. The CRISPR/Cas9 technology modified from type II CRISPR/Cas system has been developed as an efficient genome editing tool. Since the initial application of the CRISPR/Cas9 technology in mammals in 2013, the reports of this system for genomic editing has skyrocketed. Farm animals are not only economically important animals, but also ideal animal models for human diseases and biomedical studies. In this review, we summarize the applications of CRISPR/Cas9 in farm animals, briefly describe the off-target effects and the main solutions, and finally highlight the future perspectives of this technology.

**Keywords:** CRISPR/Cas9; genome editing; farm animals; off-target

收稿日期: 2015-09-21; 修回日期: 2016-01-03

基金项目: 国家科技重大专项(编号: 2014ZX08006-005)和国家自然科学基金项目(编号: 31560304)资助[Supported by the National Science and Technology Major Project of China (No.2014ZX08006-005) and the National Natural Science Foundation of China (No.31560304)]

通讯作者: 幸宇云, 副研究员, 研究方向: 动物遗传育种与繁殖、动物转基因技术。E-mail: xingyuyun9@hotmail.com

DOI: 10.16288/j.ycz.15-398

网络出版时间: 2016-1-14 16:51:54

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20160114.1651.003.html>

基因组编辑(Genome editing)是指利用特异性的核酸酶,通过同源介导修复(Homology-directed repair, HDR)和非同源末端连接(Non-homologous end-joining, NHEJ)修复机制<sup>[1]</sup>以实现外源 DNA 的插入、删除或替换,从而在基因组水平对基因及其调控元件进行定向修饰的一种基因工程手段。精准的基因组编辑技术对基因功能的研究、经济物种的遗传改良、人类疾病模型的构建、基因治疗等领域有重要的推动作用,目前已成为现代生命科学研究的热点之一。

迄今为止,成功应用于基因组编辑的特异性核酸酶包括锌指核酸酶(Zinc-finger nuclease, ZFN)、转录激活子样效应因子核酸酶(Transcription activator-like effector, TALEN)和成簇规律间隔短回文重复序列(Clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR)/Cas(CRISPR associated proteins)。2002 年, ZFN 技术首次应用于敲除目的基因<sup>[2]</sup>,之后在基因组编辑的研究与应用中取得了一系列进展<sup>[3]</sup>。然而,由于存在制备复杂、成本较高和效率较低的不足, ZFN 并未成为广泛使用的基因组编辑技术。2011 年,TALEN 技术成功应用于目标基因的编辑<sup>[4-6]</sup>。与 ZFN 技术相比,TALEN 技术更简单和高效,但该技术靶点模块的构建仍较复杂。2012 年,美国 Doudna 教授和德国 Charpentier 教授共同在 *Science* 上发表文章,阐述了在体外建立的 CRISPR/Cas9 基因组编辑技术<sup>[7]</sup>。相比 ZFN 和 TALEN, CRISPR/Cas9 技术更简单、高效和低成本,该技术 2013 年被 *Science* 杂志评为年度十大科学进展之一<sup>[8]</sup>。

CRISPR/Cas 是一种后天性免疫系统,在约 40% 细菌、几乎所有的古细菌<sup>[9]</sup>和少量噬菌体<sup>[10]</sup>中均存在。根据 CRISPR 基因座和 Cas 基因的不同,CRISPR/Cas 体系目前被分成 I 型、II 型和 III 型,作为 I 型的 CRISPR/Cas9 是三类体系中结构较简单的一种<sup>[11]</sup>。CRISPR/Cas9 基因组编辑基本原理是:靶位点特异性 crRNA(CRISPR-derived RNA)和辅助的 tracrRNA (Trans-activating CRISPR RNA)形成嵌合向导 RNA (Guide RNA, gRNA)后,指引 Cas9 蛋白切割目标区域的 DNA 序列,目标区域为原型间隔序列毗邻基序 (Protospacer adjacent motif, PAM)前的 gRNA 识别序列,其中 Cas9 的 HNH 结构域切割与 crRNA 互补配

对的模板链,Cas9 的 RuvC 结构域切割含有 PAM 的链<sup>[12]</sup>。

自 2013 年 CRISPR/Cas9 技术在人(*Homo sapiens*)和小鼠(*Mus musculus*)细胞上成功应用以来<sup>[13-15]</sup>,该技术已经广泛用于小鼠、大鼠、斑马鱼、果蝇等多种模式动物的研究,包括基因功能研究、基因治疗、疾病模型研制等<sup>[16-18]</sup>。农业动物既是重要的经济动物,也是理想的生物医学研究模式动物,本文综述了 CRISPR/Cas9 技术在农业动物中的应用进展情况、目前存在的主要问题、解决对策及其发展前景。

## 1 CRISPR/Cas9 技术在农业动物中的应用

农业动物包括猪(*Sus scrofa*)、牛(*Bos taurus*)、羊(*Ovis aries*)、马(*Equus caballus*)、鸡(*Gallus gallus*)、鸭(*Anas platyrhynchos*)、犬(*Canis lupus familiaris*)、兔(*Oryctolagus cuniculus*)、家蚕(*Bombyx mori*)等,为人类提供肉、奶、蛋等食物和皮毛等副产品。此外,农业动物也是人类生物医学研究的理想动物模型,可在人为设计的条件下反复观察生理和病理变化,且相比于大鼠(*Rattus norvegicus*)和小鼠,农业动物、特别是猪在解剖、生理代谢和疾病特征上与人更为相似。

### 1.1 研制农业动物疾病模型和生物医学模型

血管性血友病(Von Willebrand disease, vWD)是仅次于血友病的常见遗传性出血性疾病,由 vWF (von Willebrand factor,血管性血友病因子)基因缺陷所造成。周琪课题组利用 CRISPR/Cas9 技术,获得了猪 vWD 模型<sup>[19]</sup>。该研究将体外转录获得的 Cas9 mRNA 和靶向猪 vWF 基因外显子的单导向 RNA (Single guide RNA, sgRNA)注射入猪原核期胚胎的胞质中。76 枚胚胎移植到 5 头受体猪,最终获得了 16 头后代,目的基因插入/缺失突变效率达到 68.8% (11/16);单等位基因突变和双等位基因突变的 vWF 抗原水平均极显著低于野生型个体( $P<0.01$ ),双等位基因突变个体的凝血时间极显著高于野生型个体( $P<0.01$ )。赖良学课题组运用 CRISPR/Cas9 技术,针对皮肤白化病相关的酪氨酸酶(Tyrosinase, *TYR*)基因、帕金森疾病相关的帕金森疾病 2 型(Parkinson disease 2, *PARK2*)和 PTEN 诱导激酶 1(PTEN-induced

putative kinase 1, *PINK1*)基因, 获得了分别敲除这3个基因的体细胞克隆猪<sup>[20]</sup>。*TYR* 双等位基因敲除猪表现出白化病; *PARK2* 及 *PINK1* 双等位基因敲除猪的2个靶基因均不表达, 但由于猪年龄尚小, 暂未观察到帕金森疾病的表型。Honda 等<sup>[21]</sup>采用 CRISPR/Cas9 技术, 在兔原核期胚胎中直接显微注射携带 *TYR*-sgRNA 序列的 CRISPR/Cas9 质粒 DNA, 获得了敲除该基因的兔子, 使其表现出白化病症状。

开展异种器官移植是解决人供体器官短缺的重要途径, 猪被认为是人体异种器官来源的首选动物。目前猪器官用于人类的主要障碍为免疫排斥反应和猪内源性逆转录病毒(Porcine endogenous retroviruses, PERVs)造成的重大医疗风险问题。 $\alpha$ -1,3-半乳糖基转移酶( $\alpha$ -1, 3-Galactosyltransferase, *GGTA1*)基因与异种器官移植后的超急性免疫排斥反应显著相关, Sato 等<sup>[22]</sup>通过 CRISPR/Cas9 技术敲除猪胎儿成纤维细胞中的 *GGTA1* 基因, 并利用皂素物质 IB4SAP 能灭活表达该基因的细胞的特点, 在两周的时间内即获得了 *GGTA1* 双等位基因敲除的细胞系。Tector 课题组<sup>[23]</sup>针对3个与免疫排斥相关的 *GGTA1*、胞苷单磷酸 N-乙酰神经氨酸羟化酶(Cytidine monophosphate-N-acetylneuraminic acid hydroxylase, *CMAH*)和异红细胞糖苷合成酶(Isogloboside 3 synthase, *iGb3S*)基因, 共转染靶向上述2个或3个基因的 CRISPR/Cas9-PX330 重构质粒于肝脏细胞中, 筛选阳性细胞用于体细胞核移植, 最终获得了敲除单个基因及同时敲除2个或3个基因的胎儿或仔猪。利用类似的方法, 该课题组的另一项研究<sup>[24]</sup>针对猪肝细胞分别敲除 *GGTA1*、*GGTA1/CMAH* 和 *GGTA1/CMAH*/ $\beta$ -1,4-N-乙酰半乳糖胺基转移酶 2( $\beta$ -1,4-N-Acetylgalactosaminyl transferase 2,  *$\beta$ 4GalNT2*)基因, 以3种细胞系为供体获得克隆猪, 然后分析3种基因敲除猪的细胞与人 IgM 和 IgG 抗体的结合能力, 发现 *GGTA1/CMAH*/ *$\beta$ 4GalNT2* 基因敲除猪的抗体结合能力最弱。这两项研究与 Sato 等<sup>[22]</sup>的报道一样, 最终目的均是为了研发出免疫排斥反应较低的器官供体猪。最近, 哈佛大学的 Church 课题组利用 CRISPR/Cas9 技术, 将猪肾细胞系 PK15 中所有62个拷贝的 *PERV pol*(多聚酶)基因敲除, 使内源性病毒传递给人的风险降低了1000倍以上<sup>[25]</sup>。

值得一提的是, 农业动物特别是大家畜作为人类健康研究重要模式生物的作用凸显出来。例如, 在本文综述的 CRISPR/Cas9 基因组编辑猪的报道中, 一半为探索性地研制用于器官移植和其他疾病研究的家猪模型。可以预见, 随着 CRISPR/Cas9 技术的逐步完善和成熟, 研究人员利用该工具将研制出越来越多服务于人类健康研究需要的基因组编辑农业动物。

## 1.2 提高农业动物生产性能

分化簇163(Cluster of differentiation 163, *CD163*)被认为是猪蓝耳病病毒的受体基因, 分化簇1D(Cluster of differentiation 1D, *CD1D*)是一类抗原递呈因子。Whitworth 等<sup>[26]</sup>利用 CRISPR/Cas9 技术, 通过体细胞核移植和原核期胚胎显微注射的方式获得了分别敲除 *CD163* 和 *CD1D* 的基因编辑猪; 针对 *CD163* 双等位基因敲除猪的后续研究表明, 该基因编辑猪经过蓝耳病毒株攻毒后未表现出临床症状, 具有良好的抗蓝耳病能力, 而7头对照猪全部表现出典型的蓝耳病症状<sup>[27]</sup>。蓝耳病是对全世界养猪业危害最大的传染病之一, 每年给养猪业造成巨大的经济损失, 该报道在养猪业引起了高度关注; 值得一提的是, 通过显微注射 Cas9 mRNA 和 sgRNA 所获得的基因编辑猪中仅仅是敲除了 *CD163* 基因, 并未导入任何外源基因序列, 不存在转基因生物安全性风险。

肌肉生长抑制素(Myostatin, *MSTN*)基因对肌肉生长发育具有重要调控作用。Menchaca 课题组<sup>[28]</sup>利用 CRISPR/Cas9 技术, 获得了敲除 *MSTN* 基因的绵羊, 基因编辑绵羊表现出更好的产肉性能。Ni 等<sup>[29]</sup>选择 *MSTN*、核孔蛋白155(Nucleoporin 155, *NUP*)、 $\beta$ -乳球蛋白(Beta-lactoglobulin, *BLG*)和朊蛋白(Prion protein, *PrP*)基因为靶向基因, 利用 CRISPR/Cas9 技术, 针对山羊原代成纤维细胞实现了单个基因的单/双等位基因敲除以及4个基因的同步敲除; 通过体细胞克隆, 获得了 *MSTN* 双等位基因敲除的山羊, 但并未分析其胴体性状。Wang 等<sup>[30]</sup>利用 CRISPR/Cas9 技术, 获得了 *MSTN* 双等位基因敲除猪, 基因编辑猪表现出“双肌”表型。

牛泌乳量大、乳汁活性蛋白的产量高, 因此其乳腺是理想的生物反应器。人成纤维细胞生长因子

2(Human fibroblast growth factor 2, hFGF2)是一种多功能生长因子,在促进组织生长发育、新血管形成和参与组织修复过程中起着重要的作用,但其在人体内的表达量较低。Jeong 等<sup>[31]</sup>借助 CRISPR/Cas9 技术将该基因导入到牛成纤维细胞的  $\beta$ -casein 基因内含子中,通过体细胞核移植获得了导入 hFGF2 基因的牛囊胚,在细胞和胚胎水平均检测到 hFGF2 基因的表达,为最终获得表达 hFGF2 蛋白的基因编辑牛奠定了基础。

### 1.3 开展功能基因组学研究

随着猪、牛、羊、鸡、鸭等动物基因组测序工作的完成,农业动物的功能基因组学研究时代已经到来。面对农业动物海量的基因组序列,科研人员力图更深入、全面地挖掘和认识基因功能,并将新的研究成果更好地服务于农业生产及人类生物医学研究。CRISPR/Cas9 技术可对基因组序列进行精确的切割和修饰,是开展基因功能研究的有力武器。

Brooks 等<sup>[32]</sup>通过原核期胚胎注射 Cas9 mRNA 和靶向糖皮质激素受体(Glucocorticoid receptor, *GR*)基因的 sgRNA,对照组只注射 Cas9 mRNA,比较敲除和未敲除 *GR* 基因的羊早期胎儿,发现实验组和对对照组的胎儿在发育、形态和生化指标上均无差异,证明该基因在早期胎儿的滋养外胚层并未参与调节皮质醇的功能。

*KU70* 是参与真核生物 DNA 双链断裂修复的重要基因,该基因功能的缺失能提高同源重组(Homologous recombination, HR)效率。夏庆友课题组<sup>[33]</sup>利用 CRISPR/Cas9 技术敲除了家蚕胚胎的 *KU70* 基因,使家蚕胚胎水平 HR 的效率得到提高,证实在家蚕中破坏该基因可提高 HR 的效率。Wei 等<sup>[34]</sup>针对家蚕的 *OK*、犬尿氨酸-3-单加氧酶(Kynurenine 3-monooxygenase, *KMO*)、酪氨酸羟化酶(Tyrosine hydroxylase, *TH*)和 *TAN* 基因,通过显微注射将 Cas9 mRNA 和 sgRNA 导入家蚕原核期胚胎,使靶基因的突变率达到 16.7%~35.0%;敲除 *OK* 基因的家蚕表现出应有的透亮表皮,且突变位点可遗传给后代。无翅型 MMTV 整合位点家族成员 1(Wingless-type MMTV integration site family member 1, *WNT1*)是影响昆虫胚胎发育的重要基因,研究人员利用 CRISPR/Cas9 技术敲除家蚕该基因,使家

蚕胚胎孵化率显著下降,且孵化幼虫表现出体节发育和着色异常<sup>[35]</sup>。Li 等<sup>[36]</sup>利用 CRISPR/Cas9 技术敲除家蚕蜕皮激素氧化酶(Ecdysome oxidase, *EO*)基因,发现其终龄幼虫阶段被延长。

突变型的 Cas9(dCas9)会失去对 DNA 的切割活性,但其与 DNA 的结合能力不受影响,将 gRNA 引导下的 dCas9 结合到启动子区或转录因子结合区,可抑制基因表达。这种具有转录抑制活性的 CRISPR-dCas9 系统简称为 CRISPRi 系统。Zhao 等<sup>[37]</sup>利用 CRISPRi 系统在猪的细胞水平抑制了导入的 *eGFP* 基因的表达,为在农业动物中开展基因表达调控研究提供了良好的借鉴。

### 1.4 优化 CRISPR/Cas9 技术体系

为了使 CRISPR/Cas9 技术更好地应用于农业动物领域,科研人员针对不同种类动物的受精卵、卵母细胞、胎儿成纤维细胞、诱导性多功能干细胞(Induced pluripotent stem cells, iPSCs)等开展多样化的基因组编辑,并有针对性优化其技术体系,取得了良好的成效。如可实现外源基因的定点敲入<sup>[38,39]</sup>、多个基因的同时敲除<sup>[41,42]</sup>、染色体大片段的缺失和倒置<sup>[42]</sup>、针对胚胎的打靶成功率达到了 100%<sup>[41]</sup>等。

八聚体结合转录因子 4(Octamer-binding transcription factor 4, OCT4)是参与调控胚胎干细胞自我更新和维持其全能性的重要转录因子之一。Kwon 等<sup>[38]</sup>将 Cas9 mRNA 和 *OCT4*-sgRNA 注射入体外培养的猪孤雌胚胎中,不同实验组中 37%~50%的胚胎的 *OCT4* 基因被敲除;另外,在显微注射时加入增强绿色荧光蛋白(Enhanced green fluorescent protein, *eGFP*)供体 DNA,获得了敲入荧光蛋白的胚胎。该研究表明,CRISPR/Cas9 技术可针对孤雌胚胎实现基因的敲除和敲入。Heo 等<sup>[39]</sup>运用 CRISPR/Cas9 技术在牛 iPSCs 上实现了 *NANOG* 基因的敲除及 *GFP* 的定点敲入;此外,针对牛卵母细胞注射 Cas9 mRNA、*NANOG*-sgRNA 及供体 DNA(*GFP*),卵母细胞经体外成熟培养和体外受精后,在胚胎水平实现了基因的敲入。Véron 等<sup>[40]</sup>通过鸡孵化期胚胎神经管和体节电转的方法,导入靶向配对盒 7(Paired box 7, *PAX7*)基因的 CRISPR-sgRNA/Cas9 质粒,实现了该基因的敲除。

研究人员在农业动物中开展了 3 个以上基因的同时编辑并取得了良好的效果。如赖良学课题组<sup>[41]</sup>



选择与免疫机能相关的白介素 2 受体链(Interleukin 2 receptor gamma chain, *IL2rg*)、重组激活基因(Recombination activating gene, *RAG*)1、*RAG*2、*TIK1*和血清白蛋白(Albumin, *ALB*)基因为目标,通过原核期胚胎注射 Cas9 mRNA 和靶基因 sgRNA,获得了 *IL2rg* 和 *IL2rg/RAG1* 双等位基因敲除兔,打靶成功率为 100%;同时对 3 个和 5 个基因的编辑分别获得了 100%和 33.3%的突变率。夏庆友课题组<sup>[42]</sup>通过 CRISPR/Cas9 技术,针对家蚕卵巢细胞系 BmN-SWU1 实现了 6 个基因的同时敲除,此外还实现了染色体大片的缺失和倒置。

为了提高 CRISPR/Cas9 技术在农业动物中的基因组编辑效率,研究人员合成 sgRNA 时用猪 U6 启动子代替人 U6 启动子,以期获得更佳的打靶效率<sup>[43]</sup>;显微注射 Cas9 mRNA 和 sgRNA 至猪原核期胚胎,待发育至囊胚后,通过 PCR 及测序检测单个胚胎以筛选出打靶效率最高的 sgRNA<sup>[44]</sup>;将携带 *GFP* 和红色荧光蛋白(Red fluorescent protein, *RFP*)的 CRISPR/Cas9 质粒先后转染猪胎儿成纤维细胞,通过双重荧光筛选提高打靶成功率<sup>[45]</sup>;应用 SSA(Single-strand annealing)报告载体,使 CRISPR/Cas9 对猪胎儿成纤维细胞的打靶效率提高 5 倍左右<sup>[46]</sup>。

## 2 CRISPR/Cas9 技术目前存在的主要问题及可能的解决对策

CRISPR/Cas9 技术因其高效、低价、简单实用而备受研究人员的青睐。研究人员既可以自己组装用于不同物种的 CRISPR/Cas9 载体,也可以便捷地从美国 Addgene 质粒库(<http://www.addgene.org/CRISPR/>)订购获得种类丰富的质粒(表 1),每个质粒的成本约为 65 美金。不过,由于 PAM 之前的识别序列只有 20 个碱基、存在少量错配序列时也能靶向结合<sup>[47]</sup>;且 PAM 序列具有多样性,以来自酿脓链球菌(*Streptococcus pyogenes*)的 Cas9 为例,除了识别 5'-NGG 的 PAM 外,5'-NAG 之前的 sgRNA 序列也可能特异性地靶向结合,虽然其结合效率较低<sup>[48]</sup>。因此,该技术存在一个明显的不足是容易脱靶<sup>[16]</sup>。目前对于脱靶位点的预测主要是依据序列的比对,例如麻省理工学院张锋实验室所开发的 sgRNA 序列在线设计软件 <http://crispr.mit.edu>,可根据每一条 sgRNA 序列推

测出可能的脱靶位点,并按发生概率的高低排序。在本文所引用的文章中,部分检测了脱靶位点(表 1);这些研究对脱靶位点的预测均是根据 sgRNA 识别序列在整个基因组中的同源性(如 3'端多于 12 或 14 个碱基相同),只有 3 篇文章报道了极少量的脱靶现象<sup>[28,30,41]</sup>。

CRISPR/Cas9 技术的脱靶效应无特定规律,难于预测<sup>[48]</sup>。为降低脱靶效应,研究人员提出了以下几点对策:(1)选择特异性尽可能高的 sgRNA 序列。将 sgRNA 特异性序列在 NCBI(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)、ENSEMBL(<http://asia.ensembl.org/Multi/Tools/Blast?db=core>)等生物信息网站比对,从中选择特异性最高的序列;(2)结合突变型的 nickase-Cas9 蛋白和一对 sgRNA 识别序列,利用每条序列识别双链中的一条,使 CRISPR 的靶向特异性提高 150~1500 倍<sup>[49]</sup>;(3)采用缩短 2~3 个碱基的 sgRNA 识别序列,因为稍短的 sgRNA 序列被认为会降低 CRISPR/Cas9 对错配的容忍度<sup>[50]</sup>;(4) *FokI*-dCas9 融合策略:dCas9 与 *FokI* 核酸酶融合后,双链断裂(Double-strand break, DSB)的形成依赖于 *FokI* 的二聚化,二聚化酶对序列错配的容忍度大大降低,可显著减少脱靶事件的发生<sup>[51,52]</sup>;(5)实验体系的优化。例如降低 gRNA 的浓度和(或)Cas9 mRNA (蛋白)在细胞水平的表达量可减少脱靶的发生<sup>[53,54]</sup>;采用细胞穿透肽(Cell penetrating peptides, CPPs)作为介导将 Cas9 蛋白和 gRNA 导入宿主细胞中,脱靶效应显著下降<sup>[55]</sup>等。

由于难于彻底消除脱靶效应,研究人员力图准确地捕捉脱靶位点。有些课题组针对单克隆细胞系开展全基因组测序<sup>[56,57]</sup>;虽然目前全基因组重测序的费用相比以前大幅下降,但若要对众多单克隆细胞系开展重测序,其费用依然昂贵。另一种分析脱靶位点的方法是染色质免疫沉淀-测序(Chromatin immunoprecipitation followed by sequencing, ChIP-seq),但该方法是将 dCas9 与基因组结合,结合位点并不代表是真实的脱靶位点,因为 dCas9 只结合、但不切割目标序列<sup>[47,58,59]</sup>。此外,还有 GUIDE-seq(Genome-wide, unbiased identification of DSBs enabled by sequencing)、IDLV(Integrase-defective lentiviral vector)和 digenome-seq 等检测脱靶位点的方法<sup>[60]</sup>。可以预见,随着 CRISPR/Cas9 技术的发展,更多或更好的检测脱靶位点的方法将会面世。

表 1 农业动物基因组编辑报道中所使用的 CRISPR/Cas9 质粒

Table 1 CRISPR/Cas9 vectors used in reported genome editing in farm animals

物种	目的基因	CRISPR/Cas9 质粒(Addgene 编号*)	来源	Cas9/gRNA 导入方法	脱靶情况	文献
猪	<i>vWF</i>	pEASY-T1-cas9 (无)	周琪, 中国	受精卵细胞质显微注射	未检测到	[19]
	<i>TYR</i> 、 <i>PARP2</i> 、 <i>PINK1</i>	hCas9 (41815), hCas9-D10A (41816) gRNA-GFP-T1 (41819)	George Church, 美国	细胞转染	未检测到	[20]
	<i>GGTA1</i>	hCas9 (41815)	Church George, 美国	细胞转染	未检测	[22]
	<i>GGTA1</i> 、 <i>CMAH</i> 、 <i>iGb3S</i>	PX330 (42230)	Feng Zhang, 美国	细胞转染	未检测	[23]
	<i>GGTA1</i> 、 <i>CMAH</i> 、 <i><math>\beta</math>4GalNT2</i>	PX330 (42230)	Feng Zhang, 美国	细胞转染	未检测	[24]
	<i>PERV pol</i>	PiggyBac-Cas9 (无) lentiCRISPR v2 (52961)	William T. Pu, 美国 Feng Zhang, 美国	细胞转染	未检测到	[25]
	<i>CD163</i> 、 <i>CD1D</i>	PX330 (42230) Mmessage Mmachine Ultra Kit (无)	Feng Zhang, 美国 Ambion 公司, 美国	细胞转染 受精卵细胞质显微注射	未检测	[26]
	<i>MSTN</i>	PX330 (42230)	Feng Zhang, 美国	细胞转染	检测到 1 个 脱靶位点	[30]
	<i>eGFP</i>	PX260 (42229) pdCas9-humanized (44246)	Feng Zhang, 美国 Stanley Qi, 美国	细胞转染	未检测到	[37]
	<i>OCT4</i> 、 <i>eGFP</i>	hCas9 (41815)	Church George, 美国	孤雌激活胚胎显微注射	未检测	[38]
	<i>GGTA1</i>	pCX-Flag2-NLS1-Cas9-NLS2(无), ppU6-BSaI <sub>2</sub> -gRNA(无)	Chin-Kai Chuang, 中国台湾	细胞转染	未检测	[43]
	<i>MITF</i>	PX330 (42230) PXT7-hCas9(无)	Feng Zhang, 美国 中国斑马鱼资源中心	细胞转染 受精卵细胞质显微注射	未检测到	[44]
	<i>BMP15</i>	PX458 (48138)	Feng Zhang, 美国	细胞转染	未检测到	[45]
	<i>IGF2</i>	PX330 (42230)	Feng Zhang, 美国	细胞转染	未检测	[46]
牛	<i><math>\beta</math>-casein</i> 、 <i>hFGF2</i>	pR-GEN-BovineCSN2_U6-SG(无), CMV-Cas9(无)	ToolGen Inc, 韩国	细胞转染	未检测	[31]
	<i>NANOG</i> 、 <i>GFP</i>	PX330 (42230)	Feng Zhang, 美国	细胞转染/成熟卵母细胞的细胞质显微注射	未检测到	[39]
羊	<i>MSTN</i>	PX330 (42230) JDS246 (43861)	Feng Zhang, 美国 Keith Joung, 美国	细胞转染 受精卵细胞质显微注射	检测到 1 个 脱靶位点	[28]
	<i>MSTN</i> 、 <i>NUP</i> 、 <i>BLG</i> 、 <i>PrP</i>	PX330 (42230)	Feng Zhang, 美国	细胞转染	未检测到	[29]
	<i>GR</i>	PX330 (42230) pT7-gRNA (46759)	Feng Zhang, 美国 Wenbiao Chen, 美国	受精卵细胞质显微注射	未检测到	[32]
兔	<i>TYR</i>	PX330 (42230)	Feng Zhang, 美国	细胞转染/原核显微注射	未检测到	[21]
	<i>IL2rg</i> 、 <i>RAG1</i> 、 <i>RAG2</i> 、 <i>TIK1I</i> 、 <i>ALB</i>	T7-Cas9-NLS-BGH (无)	赖良学, 中国	原核期胚胎细胞质显微注射	检测到 1 个 脱靶位点	[41]
蚕	<i>KU70</i>	pUC57-hA4-Cas9 (无) pUC57-gRNA(无)	夏庆友, 中国	细胞转染/胚胎显微注射	未检测	[33]
	<i>OK</i> 、 <i>KMO</i> 、 <i>TH</i> 、 <i>TAN</i>	pSP6-2sNLS-SpCas9(无)	高冠军, 中国	胚胎显微注射	未检测到	[34]
	<i>WNT1</i>	pTD1-T7-Cas9(无)	谭安江, 中国	胚胎显微注射	未检测	[35]
	<i>EO</i>	IE1-Cas9(无) U6-BmEOsgRNA(无)	谭安江, 中国	胚胎显微注射	未检测	[36]
	<i>KYNU2</i> 、 <i>BMBLOS2</i> 、 <i>TH</i> 、 <i>RE</i> 、 <i>FL</i> 、 <i>YELLOW-E</i>	pUC57-hA4-Cas9 (无) T-U6-gRNA(无)	夏庆友, 中国	细胞转染	未检测到	[42]
	<i>PAX7</i>	hCas9 (41815) gRNA_Cloning Vector (41824)	Church George, 美国	胚胎电转	未检测	[40]

注: \* “无”表示该质粒未储入 Addgene 质粒库。

### 3 展 望

农业动物是人类健康研究的重要模式动物,应用精准的 CRISPR/Cas9 技术研制重要的疾病模型将有广阔而光明的前景。如果利用该工具将猪体内引起免疫排斥的基因和 PERVs 基因全部敲除,将向猪的器官成功移植于人这一目标迈出关键的步伐。在小鼠中,研究人员利用该技术已成功研制出了肺脏和肝脏肿瘤模型<sup>[61,62]</sup>。相比小鼠,猪无论从器官大小、生理结构和基因组都更接近于人,如果利用该编辑技术,针对中国小型猪研制出人类重要疾患(如癌症)的小型家猪模型,将会为靶向药物的开发提供重要帮助。在牛、羊中利用 CRISPR/Cas9 技术将目的基因精确导入 ROSA26 “安全港位点(Safe harbor locus)”,将可通过乳腺生物反应器获得重要活性功能蛋白。此外,CRISPR/Cas9 技术为农业动物的分子育种提供了有力的技术手段。例如,研究表明携带 *RELA* (V-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A) 基因 *S531P* 突变的非洲野猪具有天然抵抗非洲猪瘟的能力<sup>[63]</sup>,若利用精准的 CRISPR/Cas9 基因组编辑技术将该突变位点导入商业猪种中,将使商业猪获得非洲猪瘟的天然免疫力。可以预见,CRISPR/Cas9 技术在农业动物领域将会有广阔的应用前景,并将对农业动物生产产生深远的影响。

#### 参考文献(References):

- [1] Bibikova M, Carroll D, Segal DJ, Trautman JK, Smith J, Kim YG, Chandrasegaran S. Stimulation of homologous recombination through targeted cleavage by chimeric nucleases. *Mol Cell Biol*, 2001, 21(1): 289–297. [DOI]
- [2] Bibikova M, Golik M, Golik KG, Carroll D. Targeted -chromosomal cleavage and mutagenesis in *Drosophila* using zinc-finger nucleases. *Genetics*, 2002, 161(3): 1169–1175. [DOI]
- [3] Urnov FD, Rebar EJ, Holmes MC, Zhang HS, Gregory PD. Genome editing with engineered zinc finger nucleases. *Nat Rev Genet*, 2010, 11(9): 636–646. [DOI]
- [4] Li T, Huang S, Jiang WZ, Wright D, Spalding MH, Weeks DP, Yang B. TAL nucleases (TALNs): hybrid proteins composed of TAL effectors and FokI DNA-cleavage domain. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39(1): 359–372. [DOI]
- [5] Miller JC, Tan S, Qiao GJ, Barlow KA, Wang JB, Xia DF, Meng XD, Paschon DE, Leung E, Hinkley SJ, Dulay GP, Hua KL, Ankoudinova I, Cost GJ, Urnov FD, Zhang HS, Holmes MC, Zhang L, Gregory PD, Rebar EJ. A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. *Nat Biotechnol*, 2011, 29(2): 143–148. [DOI]
- [6] Mahfouz MM, Li LX, Shamimuzzaman M, Wibowo A, Fang XY, Zhu JK. De novo-engineered transcription activator-like effector (TALE) hybrid nuclease with novel DNA binding specificity creates double-strand breaks. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(6): 2623–2628. [DOI]
- [7] Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 2013, 337(6096): 816–821. [DOI]
- [8] 2013 Runners-Up. Genetic microsurgery for the masses. *Science*, 2013, 342(6165): 1434–1435. [DOI]
- [9] Horvath P, Barrangou R. CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. *Science*, 2010, 327(5962): 167–170. [DOI]
- [10] Seed KD, Lazinski DW, Calderwood SB, Camilli A. A bacteriophage encodes its own CRISPR/Cas adaptive response to evade host innate immunity. *Nature*, 2013, 494(7438): 489–491. [DOI]
- [11] Makarova KS, Haft DH, Barrangou R, Brouns SJ, Charpentier E, Horvath P, Moineau S, Mojica FJM, Wolf YI, Yakunin AF, van der Oost J, Koonin EV. Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol*, 2011, 9(6): 467–477. [DOI]
- [12] Zhou JW, Xu QP, Yao J, Yu SM, Cao SZ. CRISPR/Cas9 genome editing technique and its application in site-directed genome modification of animals. *Hereditas (Beijing)*, 2015, 37(10): 1011–1020.  
周金伟, 徐绮斌, 姚婧, 余树民, 曹随忠. CRISPR/Cas9 基因组编辑技术及其在动物基因组定点修饰中的应用. *遗传*, 2015, 37(10): 1011–1020. [DOI]
- [13] Jinek M, East A, Cheng A, Lin S, Ma E, Doudna J. RNA-programmed genome editing in human cells. *Elife*, 2013, 2: e00471. [DOI]
- [14] Cong L, Ann Ran F, 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]
- [15] 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]

- [16] Lu XJ, Xue HY, Ke ZP, Chen JL, Ji LJ. CRISPR-Cas9: a new and promising player in gene therapy. *J Med Genet*, 2015, 52(5): 289–296. [DOI]
- [17] Shalem O, Sanjana NE, Zhang F. High-throughput functional genomics using CRISPR–Cas9. *Nat Rev Genet*, 2015, 16(5): 299–311. [DOI]
- [18] Feng WY, Dai YF, Mou LS, Cooper DKC, Shi DS, Cai ZM. The potential of the combination of CRISPR/Cas9 and pluripotent stem cells to provide human organs from chimeric pigs. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(3): 6545–6556. [DOI]
- [19] Hai T, Teng F, Guo RF, Li W, Zhou Q. One-step generation of knockout pigs by zygote injection of CRISPR/Cas system. *Cell Res*, 2014, 24(3): 372–375. [DOI]
- [20] Zhou XQ, Xin JG, Fan NN, Zou QJ, Huang J, Ouyang Z, Zhao Y, Zhao BT, Liu ZM, Lai SS, Yi XL, Guo L, Esteban MA, Zeng YZ, Yang HQ, Lai LX. Generation of CRISPR/Cas9-mediated gene-targeted pigs via somatic cell nuclear transfer. *Cell Mol Life Sci*, 2015, 72(6): 1175–1184. [DOI]
- [21] Honda A, Hirose A, Sankai T, Yasmin L, Yuzawa K, Honsho K, Izu H, Iguchi A, Ikawa M, Ogura A. Single-step generation of rabbits carrying a targeted allele of the tyrosinase gene using CRISPR/Cas9. *Exp Anim*, 2015, 64(1): 31–37. [DOI]
- [22] Sato M, Miyoshi K, Nagao Y, Nishi Y, Ohtsuka M, Nakamura S, Sakurai T, Watanabe S. The combinational use of CRISPR/Cas9-based gene editing and targeted toxin technology enables efficient biallelic knockout of the  $\alpha$ -1,3-galactosyltransferase gene in porcine embryonic fibroblasts. *Xenotransplantation*, 2014, 21(3): 291–300. [DOI]
- [23] Li P, Estrada JL, Burlak C, Montgomery J, Butler JR, Santos RM, Wang ZY, Paris LL, Blankenship RL, Downey SM, Tector M, Tector AJ. Efficient generation of genetically distinct pigs in a single pregnancy using multiplexed single-guide RNA and carbohydrate selection. *Xenotransplantation*, 2015, 22(1): 20–31. [DOI]
- [24] Estrada JL, Martens G, Li P, Adams A, Newell KA, Ford ML, Butler JR, Sidner R, Tector M, Tector J. Evaluation of human and non-human primate antibody binding to pig cells lacking *GGTA1/CMAH/β4GalNT2* genes. *Xenotransplantation*, 2015, 22(3): 194–202. [DOI]
- [25] Yang LH, Güell M, Niu D, George H, Lesha E, Grishin D, Aach J, Shrock E, Xu WH, Poci J, Cortazio R, Wilkinson RA, Fishman JA, Church G. Genome-wide inactivation of porcine endogenous retroviruses (PERVs). *Science*, 2015, 350(6264): 1101–1104. [DOI]
- [26] Whitworth KM, Lee K, Benne JA, Beaton BP, Spate LD, Murphy SL, Samuel MS, Mao JD, O’Gorman C, Walters EM, Murphy CN, Driver J, Mileham A, McLaren D, Wells KD, Prather RS. Use of the CRISPR/Cas9 system to produce genetically engineered pigs from *in vitro*-derived oocytes and embryos. *Biol Reprod*, 2014, 91(3): 78. [DOI]
- [27] Whitworth KM, Rowland RRR, Ewen CL, Tribble BR, Kerrigan MA, Cino-Ozuna AG, Samuel MS, Lightner JE, McLaren DG, Mileham AJ, Wells KD, Prather RS. Gene-edited pigs are protected from porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Nat Biotechnol*, 2016, 34(1): 20–22. [DOI]
- [28] Crispo M, Mulet AP, Tesson L, Barrera N, Cuadro F, Dos Santos-Neto PC, Nguyen TH, Crénéguy A, Brusselle L, Anegón I, Menchaca A. Efficient generation of Myostatin knock-out Sheep using CRISPR/Cas9 technology and microinjection into zygotes. *PLoS One*, 2015, 10(8): e0136690. [DOI]
- [29] Ni W, Qiao J, Hu SW, Zhao XX, Regouski M, Yang M, Polejaeva IA, Chen CF. Efficient gene knockout in goats using CRISPR/Cas9 system. *PLoS One*, 2014, 9(9): e106718. [DOI]
- [30] Wang KK, Ouyang HS, Xie ZC, Yao CG, Guo NN, Li MJ, Jiao HP, Pang DX. Efficient generation of myostatin mutations in pigs using the CRISPR/Cas9 system. *Sci Rep*, 2015, 5: 16623. [DOI]
- [31] Jeong YH, Kim YJ, Kim EY, Kim SE, Kim J, Park MJ, Lee HG, Park SP, Kang MJ. Knock-in fibroblasts and transgenic blastocysts for expression of human *FGF2* in the bovine  $\beta$ -casein gene locus using CRISPR/Cas9 nuclease-mediated homologous recombination. *Zygote*, 2015, 22: 1–15. [DOI]
- [32] Brooks K, Burns G, Spencer TE. Biological roles of Hydroxysteroid (11-Beta) Dehydrogenase 1 (*HSD11B1*), *HSD11B2*, and Glucocorticoid Receptor (*NR3C1*) in Sheep conceptus elongation. *Biol Reprod*, 2015, 93(2): 38. [DOI]
- [33] Ma SY, Chang JS, Wang XG, Liu YY, Zhang JD, Lu W, Gao J, Shi R, Zhao P, Xia QY. CRISPR/Cas9 mediated multiplex genome editing and heritable mutagenesis of *BmKu70* in *Bombyx mori*. *Sci Rep*, 2014, 4: 4489. [DOI]
- [34] Wei W, Xin HH, Roy B, Dai JB, Miao YG, Gao GJ. Heritable genome editing with CRISPR/Cas9 in the silkworm, *Bombyx mori*. *PLoS One*, 2014, 9(7): e101210. [DOI]
- [35] Zhang ZJ, Aslam AFM, Liu XJ, Li MW, Huang YP, Tan AJ. Functional analysis of *Bombyx Wnt1* during embryogenesis using the CRISPR/Cas9 system. *J Insect Physiol*, 2015, 79:



- 73–79. [DOI]
- [36] Li ZQ, You L, Zeng BS, Ling L, Xu J, Chen X, Zhang ZJ, Palli SR, Huang YP, Tan AJ. Ectopic expression of ecdysone oxidase impairs tissue degeneration in *Bombyx mori*. *Proc Biol Sci*, 2015, 282(1809): 20150513. [DOI]
- [37] Zhao YC, Dai Z, Liang Y, Yin M, Ma KY, He M, Ouyang HS, Teng CB. Sequence-specific inhibition of microRNA via CRISPR/CRISPRi system. *Sci Rep*, 2014, 4: 3943. [DOI]
- [38] Kwon J, Namgoong S, Kim NH. CRISPR/Cas9 as tool for functional study of genes involved in preimplantation embryo development. *PLoS One*, 2015, 10(3): e0120501. [DOI]
- [39] Heo YT, Quan XY, Xu YN, Baek S, Choi H, Kim NH, Kim J. CRISPR/Cas9 nuclease-mediated gene knock-in in bovine-induced pluripotent cells. *Stem Cells Dev*, 2015, 24(3): 393–402. [DOI]
- [40] Véron N, Qu ZD, Kipen PAS, Hirst CE, Marcelle C. CRISPR mediated somatic cell genome engineering in the chicken. *Dev Biol*, 2015, 407(1): 68–74. [DOI]
- [41] Yan QM, Zhang QJ, Yang HQ, Zou QJ, Tang CC, Fan NN, Lai LX. Generation of multi-gene knockout rabbits using the Cas9/gRNA system. *Cell Regen (Lond)*, 2014, 3(1): 12. [DOI]
- [42] Liu YY, Ma SY, Wang XG, Chang JS, Gao J, Shi R, Zhang JD, Lu W, Liu Y, Zhao P, Xia QY. Highly efficient multiplex targeted mutagenesis and genomic structure variation in *Bombyx mori* cells using CRISPR/Cas9. *Insect Biochem Mol Biol*, 2014, 49: 35–42. [DOI]
- [43] Su YH, Lin TY, Huang CL, Tu CF, Chuang CK. Construction of a CRISPR-Cas9 system for pig genome targeting. *Anim Biotechnol*, 2015, 26(4): 279–288. [DOI]
- [44] Wang XL, Zhou JW, Cao CW, Huang JJ, Hai T, Wang YF, Zheng QT, Zhang HY, Qin GS, Miao XN, Wang HM, Cao SH, Zhou Q, Zhao JG. Efficient CRISPR/Cas9-mediated biallelic gene disruption and site-specific knockin after rapid selection of highly active sgRNAs in pigs. *Sci Rep*, 2015, 5: 13348. [DOI]
- [45] He ZY, Shi X, Du BZ, Qin YF, Cong PQ, Chen YS. Highly efficient enrichment of porcine cells with deletions induced by CRISPR/Cas9 using dual fluorescence selection. *J Biotechnol*, 2015, 214: 69–74. [DOI]
- [46] Wu JQ, Mei G, Liu ZG, Chen YS, Cong PQ, He ZY. Improving gene targeting efficiency on pig *IGF2* mediated by ZFNs and CRISPR/Cas9 by using SSA reporter system. *Hereditas (Beijing)*, 2015, 37(1): 55–62.
- 吴金青, 梅瑰, 刘志国, 陈瑶生, 丛佩清, 何祖勇. 应用 SSA 报告载体提高 ZFN 和 CRISPR/Cas9 对猪 *IGF2* 基因的打靶效率. *遗传*, 2015, 37(1): 55–62. [DOI]
- [47] Wu XB, Scott DA, Kriz AJ, Chiu AC, Hsu PD, Dadon DB, Cheng AW, Trevino AE, Konermann S, Chen SD, Jaenisch R, Zhang F, Sharp PA. Genome-wide binding of the CRISPR endonuclease Cas9 in mammalian cells. *Nat Biotechnol*, 2014, 32(7): 670–676. [DOI]
- [48] Sander JD, Joung JK. CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. *Nat Biotechnol*, 2014, 32(4): 347–355. [DOI]
- [49] Ann Ran F, Hsu PD, Lin CY, Gootenberg JS, Konermann S, Trevino AE, Scott DA, Inoue A, Matoba S, Zhang Y, Zhang F. Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell*, 2013, 154(6): 1380–1389. [DOI]
- [50] Fu YF, Sander JD, Reyon D, Cascio VM, Joung JK. Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs. *Nat Biotechnol*, 2014, 32(3): 279–284. [DOI]
- [51] Tsai SQ, Wyvekens N, Khayter C, Foden JA, Thapar V, Reyon D, Goodwin MJ, Aryee MJ, Joung JK. Dimeric CRISPR RNA-guided FokI nucleases for highly specific genome editing. *Nat Biotechnol*, 2014, 32(6): 569–576. [DOI]
- [52] Guilinger JP, Thompson DB, Liu DR. Fusion of catalytically inactive Cas9 to FokI nuclease improves the specificity of genome modification. *Nat Biotechnol*, 2014, 32(6): 577–582. [DOI]
- [53] Hsu PD, Scott DA, Weinstein JA, Ran FA, Konermann S, Agarwala V, Li YQ, Fine EJ, Wu XB, Shalem O, Cradick TJ, Marraffini LA, Bao G, Zhang F. DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(9): 827–832. [DOI]
- [54] Fu YF, Foden JA, Khayter C, Maeder ML, Reyon D, Joung JK, Sander JD. High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(9): 822–826. [DOI]
- [55] Ramakrishna S, Kwaku Dad AB, Beloor J, Gopalappa R, Lee SK, Kim H. Gene disruption by cell-penetrating peptide-mediated delivery of Cas9 protein and guide RNA. *Genome Res*, 2014, 24(6): 1020–1027. [DOI]
- [56] 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]

- [57] 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]
- [58] Duan JZ, Lu GQ, Xie Z, Lou ML, Luo J, Guo L, Zhang Y. Genome-wide identification of CRISPR/Cas9 off-targets in human genome. *Cell Res*, 2014, 24(8): 1009–1012. [DOI]
- [59] Kuscu C, Arslan S, Singh R, Thorpe J, Adli M. Genome-wide analysis reveals characteristics of off-target sites bound by the Cas9 endonuclease. *Nat Biotechnol*, 2014, 32(7): 677–683. [DOI]
- [60] Zheng W, Gu F. Progress of application and off-target effects of CRISPR/Cas9. *Hereditas (Beijing)*, 2015, 37(10): 1003–1010.  
郑武, 谷峰. CRISPR/Cas9 的应用及脱靶效应研究进展. *遗传*, 2015, 37 (10): 1003–1010. [DOI]
- [61] Platt RJ, Chen SD, Zhou Y, Yim MJ, Swiech L, Kempton HR, Dahlman JE, Parnas O, Eisenhaure TM, Jovanovic M, Graham DB, Jhunjhunwala S, Heidenreich M, Xavier RJ, Langer R, Anderson DG, Hacohen N, Regev A, Feng GP, Sharp PA, Zhang F. CRISPR-Cas9 knockin mice for genome editing and cancer modeling. *Cell*, 2014, 159(2): 440–455. [DOI]
- [62] Xue W, Chen SD, Yin H, Tammela T, Papagiannakopoulos T, Joshi NS, Cai WX, Yang G, Bronson R, Crowley DG, Zhang F, Anderson DG, Sharp PA, Jacks T. CRISPR-mediated direct mutation of cancer genes in the mouse liver. *Nature*, 2014, 514(7522): 380–384. [DOI]
- [63] Palgrave CJ, Gilmour L, Stewart Lowden C, Lillico SG, Mellencamp MA, Whitelaw CBA. Species-specific variation in RELA underlies differences in NF- $\kappa$ B activity: a potential role in African swine fever pathogenesis. *J Virol*, 2011, 85(12): 6008–6014. [DOI]

(责任编辑: 李明洲)