

朱丽颖, 郑月萍, 徐雪珍, 等. 一种准确、简便测定 CRISPR/Cas9 基因编辑效率的方法[J]. 江苏农业学报, 2020, 36(2): 299-305.
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2020.02.007

一种准确、简便测定 CRISPR/Cas9 基因编辑效率的方法

朱丽颖¹, 郑月萍¹, 徐雪珍¹, 段芊芊¹, 韩妮莎²

(1. 浙江农林大学农业与食品科学学院, 浙江 杭州 311300; 2. 浙江农林大学林业与生物技术学院, 浙江 杭州 311300)

摘要: CRISPR/Cas9 基因编辑技术是近年来发展迅速的一项基因定点编辑技术, 但对特定 CRISPR/Cas9 基因编辑技术的编辑效率进行有效评估的方法仍十分匮乏, 本研究的目的是建立一种准确、简便测定 CRISPR/Cas9 基因编辑效率的方法。在我们的方法中, 将与种子专一表达启动子(2S3) 连接的 mCherry 荧光蛋白报告基因作为选择基因, 并以编码脂肪酸脱氢酶 *FAD2* 的基因为靶序列; 然后对经 CRISPR/Cas9 编辑的拟南芥种子进行脂肪酸组分分析, 根据其组分变化计算该方法的编辑效率。结果显示, 利用 mCherry 荧光蛋白报告基因的种子专一表达特性, 可简便快速地筛选阳性的初级转化子和后代的无转基因突变子; 而种子油脂分析法能快速、准确地鉴定 CRISPR/Cas9 编辑的突变体, 可以精确地检测出核酸长度小至单个碱基对的突变, 用该方法获得的 CRISPR/Cas9 基因编辑效率(54.5% ~ 74.1%) 远高于基于聚丙烯酰胺凝胶电泳法获得的编辑效率(3.7% ~ 15.4%)。说明, 该方法检测 CRISPR/Cas9 基因编辑效率的高效性与可行性。

关键词: CRISPR/Cas9; 基因编辑; 突变体筛选; 脂肪酸组分分析

中图分类号: Q784 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2020) 02-0299-07

A convenient and accurate method for determining the efficiency of CRISPR/Cas9-based gene editing

ZHU Li-ying¹, ZHENG Yue-ping¹, XU Xue-zhen¹, DUAN Qian-qian¹, HAN Ni-sha²

(1. School of Agricultural and Food Sciences, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, China; 2. School of Forestry and Biotechnology, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, China)

Abstract: In recent years, CRISPR/Cas9 gene editing technology is a fast-growing gene targeted editing technology, but there are few effective methods the evaluate its editing efficiency. The purpose of this study was to establish an accurate and convenient method for determining the gene editing efficiency. In our assay, the mCherry fluorescent protein reporter gene under the control of a seed-specific promoter (2S3) was employed as a selection gene, and a gene encoding the fatty acid desaturase *FAD2* was used as the target sequence for editing. The editing efficiency of the CRISPR/Cas9 method was subsequently determined through monitoring the alteration in the seed fatty acid composition of *Arabidopsis* plants subjected to the gene editing. The results showed that the seed-specific expression of the mCherry fluorescent protein reporter gene allowed us to quickly and easily screen for the positive primary transformants and the transgene-free progeny. Moreover, seed oil analysis enabled us to quickly and accurately identify the mutants edited by CRISPR/Cas9, including those

with a single-base insertion or deletion. The efficiency of CRISPR/Cas9 based gene editing measured based on seed oil analysis (54.5% ~ 74.1%) was much higher than that measured based on polyacrylamide gel electrophoresis analysis (3.7% ~ 15.4%). The above results demonstrate the effectiveness and feasibility of the present method for

收稿日期: 2019-12-25

基金项目: 科技部转基因重大专项(2016ZX08010003-003)

作者简介: 朱丽颖(1994-), 女, 河南郑州人, 硕士研究生, 主要从事植物生物技术研究。(E-mail) zhuly_6545@ 163.com

通讯作者: 郑月萍, (E-mail) zyp860819@ 126.com

determining the efficiency of CRISPR/Cas9 gene editing.

Key words: CRISPR/Cas9; gene editing; mutant screening; fatty acid composition analysis

CRISPR/Cas9 基因编辑技术在为基础研究和应用研究创建新材料方面是一个非常有价值的工具。CRISPR/Cas9 介导的基因组编辑技术需要 Cas9 蛋白,与目标 DNA 序列互补的导向 RNA (gRNA) 以及在目标序列中存在 NGG 原间隔子相邻基序 (PAM) 位点^[1-2]。简而言之,CRISPR/Cas9 介导的基因组编辑利用 20 bp gRNA,通过碱基配对将 Cas9 核酸酶导向靶位点,Cas9 切割目标位点以产生双链断裂 (DSB),然后在 DNA 修复过程中引入突变。CRISPR/Cas9 基因编辑技术首先应用在人类与动物细胞系中,随后被改造应用于植物(如拟南芥、烟草、高粱、水稻、小麦、玉米等)基因组的定向编辑研究中,已经开发了几种 CRISPR 载体用于植物基因组编辑^[2-9]。已有研究表明,CRISPR/Cas9 介导的基因组编辑技术可以成功地在植物物种中产生各种遗传突变并获得了较高的诱导率和可稳定遗传的基因编辑植株^[10-11]。

然而随着基因编辑模型数量的增加,如何快速、高效地获得大量具有预期突变的阳性植株并对基因突变进行检测,特别是进行高通量的筛选,制约了基因编辑技术的发展。同时,在商业化应用之前,对某一特定的编辑载体进行评估有利于该载体的广泛推广。此外,在发掘新的 Cas9 蛋白的过程中也急需一种评估其切割效率的方法。因此,开发一种快速、高

效且经济的检测方法显得尤为重要^[12]。

目前已经报道了许多用于鉴定 CRISPR/Cas9 基因编辑突变体的方法,如聚合酶链反应 (PCR)/限制酶 (RE) 检测法^[13],T7 核酸内切酶 I (T7E I) 检测法,Surveyor 核酸酶检测法^[14],基于高分辨率熔解 (HRM) 分析检测法^[15-17]。但这些方法在实践中往往存在耗时多、昂贵或误报率高的问题。目前,广泛采用的是基于聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 的基因分型检测法,该方法不依赖于异源双链体的形成,并且能可靠地检测靶位点处的突变^[18],既可用于鉴定新突变,还可用作常规基因分型。但是,该方法对于检测碱基替换或者单个碱基对突变的灵敏度有限。因此,本研究提出了一种高效评估 CRISPR/Cas9 编辑载体编辑效率的方法,该方法能在高效检测突变体的情况下,对碱基替换和单个碱基的突变有着更好的检测效果,并且在操作复杂度,准确度,性价比方面均较现有方法有所提升。

1 材料与方法

1.1 CRISPR/Cas9 载体的构建

在 Wang 等^[19]报道的新型的 CRISPR/Cas9 编辑载体的基础上,我们对其进行了改造,主要是靶基因的选择和克隆,以及荧光蛋白报告基因的插入。此过程中涉及的引物序列信息如表 1 所示。

表 1 引物序列表

Table 1 List of primer sequences

引物	序列 (5'→3')	酶切位点
ZYP7-FAD2 CRISPR Cas9-F0	TGTCGCACGGCACACGCTTTGGTTTTAGAGCTAGAAATAGC	-
ZYP7-FAD2 CRISPR Cas9-R0	AACGTTTGTCTCGGGTGGCCCCAATCTCTTAGTCGACTCTCTAC	-
ZYP7-FAD2 CRISPR Cas9-BsF	ATATATGGTCTCGATTGTCGCACGGCACACGCTTTGGTT	Bsa I
ZYP7-FAD2 CRISPR Cas9-BsR	ATTATTGGTCTCGAAACGTTTGTCTCGGGTGGCCCC	Bsa I
ZYP11-At2S3 promoter amplification-FP	TTTCAGATTAAGCTGGCACAAC	-
ZYP11-At2S3 promoter amplification-RP	AGACGAGGAAGAGCTTGTTAGC	-
ZYP12-BamH I-EcoR I-At2S3 promoter amplification-BamH I-FP	ATTCCGGGATCCGAATTC TTTCAGATTAAGCTGGC	BamH I, EcoR I
ZYP12-BamH I-EcoR I-At2S3 promoter amplification-BamH I-RP	GCACGCCGATCCGTTTGTCTATTTGTG	BamH I

斜体部分为保护碱基,下划线部分为酶切位点。

1.1.1 克隆报告基因至 CRISPR/Cas9 载体 以拟南芥基因组 DNA 为模板,以 ZYP11-FP 和 ZYP11-

RP 为引物扩增种子特异性表达的 At2S3 基因启动子,用来驱动 mCherry 荧光蛋白基因。利用引物

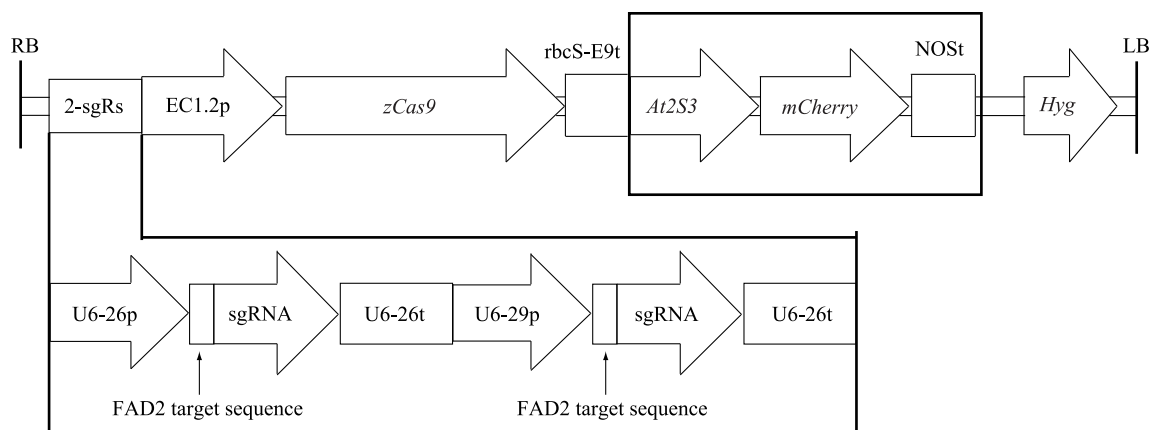
ZYP12-FP 和 ZYP12-RP 将酶切位点 *Bam*H I 和 *Eco*R I 克隆到 *At2S3* 片段两端,得到的 PCR 产物为 *Bam*H I-*Eco*R I-*At2S3*-*Bam*H I。用 *Bam*H I 分别酶切 pFGC-35S-*mCherry*-NOS 和 *Bam*H I-*Eco*R I-*At2S3*-*Bam*H I,连接 2 个酶切后片段获得表达载体 pFGC-*At2S3-mCherry*-NOS。再用 *Eco*R I 分别酶切 pHEE401 和 pFGC-*At2S3-mCherry*-NOS,连接酶切后得到的 pHEE401 和 *At2S3-mCherry*-NOS 片段,获得 pHEE401-*At2S3-mCherry*-NOS 质粒载体。

1.1.2 sgRNA 靶位点选择及引物设计 本研究以脂肪酸去饱和酶基因 *FAD2* 为基础设计靶序列,运用 CRISPR 在线设计工具 (<http://www.genome.arizona.edu/crispr/CRISPRsearch.html>) 筛选目标基因的靶序列。并对选择的靶序列作脱靶情况的分析 (<http://www.rgenome.net/cas-offinder/>),最终从拟

南芥 *FAD2* 基因中选取了 G+C 含量较高、基因特异性较强的 2 个关键片段 *FAD2*-1 (Target1: 5'-TCG-CACGGCACACGCTTTG -3')、*FAD2*-2 (Target2: 5'-GTTTGTCTCTCGGGTGGCCC -3')作为靶序列。

1.1.3 sgRNA 表达盒的获取 以 pCBC-DT1T2 载体为模板进行四引物扩增,ZYP7 用来克隆 *FAD2* 靶序列^[12],在 sgRNA 片段两端分别克隆一个靶序列和 *Bsa*I 酶切位点序列,从而得到具有 2 个 *FAD2* 靶序列的 sgRNA 表达盒,进行琼脂糖电泳检测并割胶回收目的片段。

1.1.4 重组载体的构建 将 sgRNA 的 PCR 产物和 pHEE401-*At2S3-mCherry*-NOS 载体分别用 *Bsa*I 酶切后进行连接,成功构建重组载体,构建好的载体具有 2 个 sgRNA 表达盒和 1 个 Cas9 蛋白基因,筛选标记为潮霉素抗性基因和荧光蛋白基因 *mCherry*(图 1)。



RB、LB:T-DNA 左右边界;EC1.2p:*EC1.2* 基因的启动子;*rbcS-E9t*:*rbcS E9* 基因的终止子;2-sgRs:2 个 sgRNA 组成的表达组件;*zCas9*:玉米密码子优化的 Cas9 蛋白基因;U6-26p 和 U6-29p:2 个拟南芥 *U6* 基因的启动子;U6-26t:*U6-26* 基因的终止子;*At2S3p*:拟南芥 2S3 基因的启动子;*mCherry*:*mCherry* 荧光蛋白基因;*NOS*:*NOS* 基因的终止子;*Hyg*:潮霉素抗性基因。

图 1 用于快速检测 CRISPR/Cas9 基因编辑系统编辑效率的双元载体质粒图谱

Fig.1 The binary vector plasmid map for rapid detection of editing efficiency of CRISPR/Cas9 gene editing system

1.2 农杆菌介导的浸花法转化拟南芥

以野生型拟南芥 WT(*Col-0*)为 T_0 代植株,使用农杆菌介导的浸花法将构建好的编辑基因载体转化至拟南芥^[20]。

1.3 突变体筛选

1.3.1 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳法 在靶序列两端设计引物,使 PCR 产物为包括靶序列在内约 200 bp 的片段,提取 T_1 代阳性转基因植株叶片的 DNA 为模板进行 PCR。PCR 反应条件为:94 °C 预

变性 5 min;94 °C 30 s,59 °C 30 s,72 °C 30 s,25 个循环;72 °C 延伸 10 min,最后 4 °C 保温 10 min。取 1.5 μ l PCR 产物用 8% 的非变性聚丙烯酰胺凝胶(丙烯酰胺:甲叉双丙烯酰胺=29:1,质量比)检测^[21],用 200 V 电压电泳 1.5 h,0.1% 硝酸银溶液染色,最后用扫描仪记录结果。

1.3.2 拟南芥种子油脂分析法 称取 5 mg 拟南芥种子放入 2 ml 离心管中用组织研磨仪进行 2 次破碎(60 Hz,60 s)。离心 10 s 后加入 400 μ l 1 mg/ml

的十七烷酸甘油三酯(正己烷做溶剂),上下摇匀后再进行破碎(60 Hz,60 s),室温静置1 h后12 000 *g* 离心10 min。吸取200 μ l 上清液转移到12 ml 玻璃管中,氮吹浓缩至50~100 μ l。加入2 ml 含有1%浓硫酸的甲醇溶液,于80 $^{\circ}$ C 恒温干式金属浴上反应2 h。反应结束后,立即将玻璃管置于冰中冷却,加入2 ml 0.9% NaCl(质量体积比)溶液和2 ml 正己烷,拧紧管盖后涡旋混匀,3 000 *g* 离心6~10 min。吸取上清液,转移到新的12 ml 玻璃管中。在原玻璃管中继续加入2 ml 正己烷再次萃取,合并2次获得的上清液。氮吹浓缩上清液体积至300 μ l 左右后,转移到安捷伦顶空进样瓶的内插管中,继续氮吹至50 μ l。然后用气相色谱仪进行检测^[22]。

2 结果与分析

2.1 拟南芥转基因阳性后代的筛选

将编辑基因载体转化到拟南芥获得 T_1 代种子后,使用体式荧光显微镜筛选转基因阳性种子,筛选结果如图2所示。在蓝色激发光下显示红色荧光的种子表示有 mCherry 荧光蛋白报告基因转入,即为阳性植株。

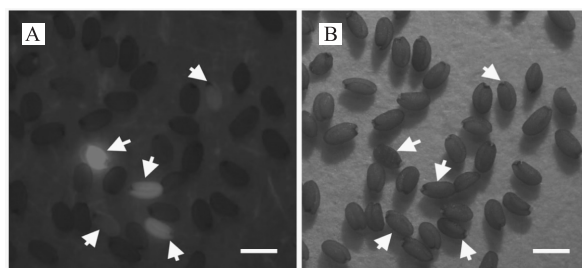


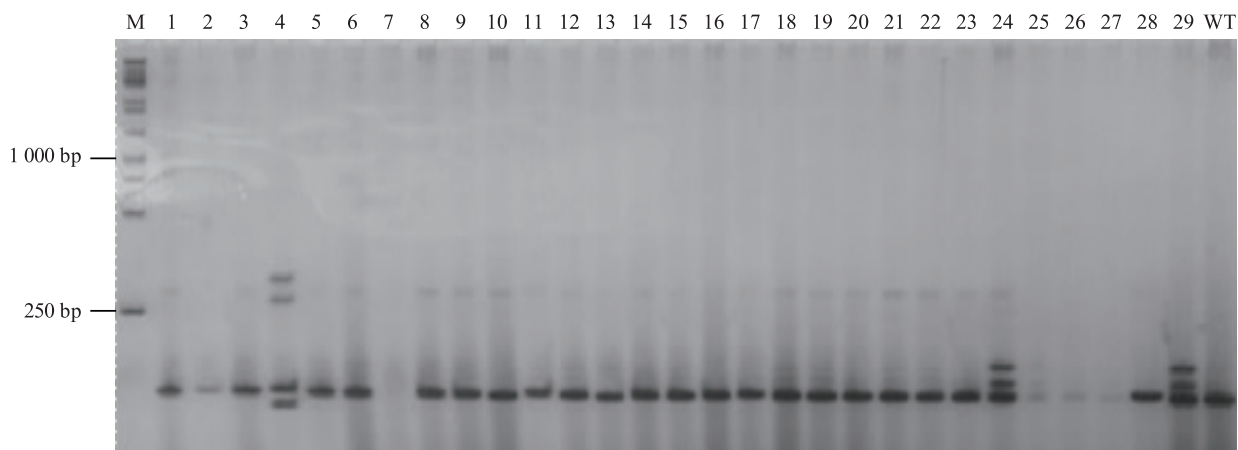
图 A: T_1 代转基因种子在蓝光激发下的照片;图 B: T_1 代转基因种子在明场中的照片。其中,箭头指示在蓝光激发下能够显示红色荧光的种子,即转基因阳性种子。

图2 借助 mCherry 荧光蛋白报告基因高效筛选拟南芥转基因后代

Fig.2 Efficient screening of *Arabidopsis* transgenic offspring with the mCherry fluorescent protein reporter gene

2.2 CRISPR/Cas9 基因编辑效率检测

2.2.1 聚丙烯酰胺凝胶电泳法 利用聚丙烯酰胺凝胶电泳法,对荧光筛选获得的转基因阳性植株进行突变与否的鉴定。聚丙烯酰胺凝胶电泳结果(图3)显示,不具有野生型对照条带的为纯合突变植株,既有突变条带又有野生型对照条带的为杂合突变植株,只有野生型对照条带的则为未突变植株。



泳道1、2、3、5、6、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、28为未突变株系;泳道4、24、29为检测到的基因组突变株系。M: DNA 分子标记;WT:野生型对照。

图3 聚丙烯酰胺凝胶电泳图

Fig.3 Polyacrylamide gel electrophoresis map

对鉴定结果进行统计从而确定 CRISPR/Cas9 系统的编辑效率。如表2所示,4次试验的编辑效率分别为15.4%、9.1%、3.7%、4.0%。

2.2.2 脂肪酸组分分析 将 T_1 代对应的 T_2 代种子

分别进行脂肪酸组分分析,结果发现 *FAD2* 被编辑后其中一个株系(图4B)与野生型(图4A)相比油酸(C18:1)的相对含量明显增加,亚油酸(C18:2)与亚麻酸(C18:3)的相对含量都明显减少,其中

C18 : 2 的相对含量降低了 26%。一般野生型拟南芥种子中 C18 : 1 含量大约 17%,当C18 : 1 含量≥ 30%时判定 *FDA2* 位点突变。我们对脂肪酸组分变化达到判定突变标准的株系提取 DNA 后进行了测序,测序结果表明这些株系确实存在突变。

表 2 通过聚丙烯酰胺凝胶电泳法检测获得的 CRISPR/Cas9 基因编辑效率

筛选试验	总植株数	突变体数	编辑效率(%)
1	26	4	15.4
2	22	2	9.1
3	27	1	3.7
4	25	1	4.0

统计分析得出 CRISPR/Cas9 基因编辑效率如表 3 所示,4 次试验的编辑效率分别为 57.7%、54.5%、74.1%、72.0%。

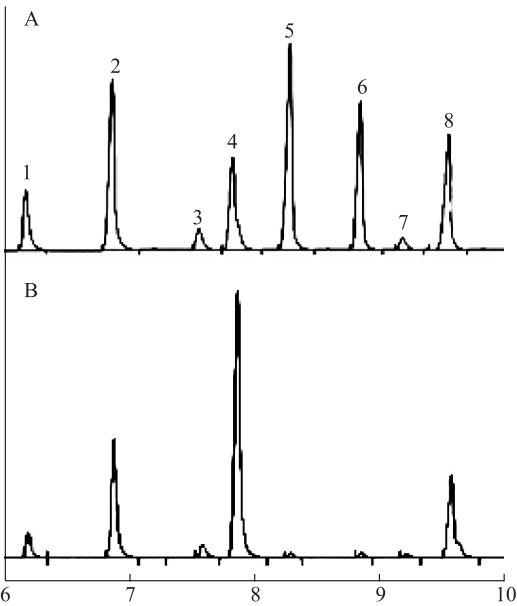


图 A:野生型 WT 背景下脂肪酸甲酯气相色谱图,图 B: *FAD2* 脂肪酸甲酯气相色谱图。脂肪酸甲酯(FAME)峰值 1:十六烷酸甲酯(C16 : 0);峰值 2:十七烷酸甲酯(C17 : 0);峰值 3:硬脂酸甲酯(C18 : 0);峰值 4:油酸甲酯(C18 : 1);峰值 5:亚油酸甲酯(C18 : 2);峰值 6:亚麻酸甲酯(C18 : 3);峰值 7:花生酸甲酯(C20 : 0);峰值 8:二十碳烯酸甲酯(C20 : 1)。

图 4 拟南芥脂肪酸甲酯的 GC 分析

Fig.4 GC analysis of *Arabidopsis* fatty acid methyl esters

表 3 通过脂肪酸组分分析获得的 CRISPR/Cas9 的编辑效率
Table 3 Editing efficiency of CRISPR/Cas9 obtained by fatty acid composition analysis

筛选试验	总植株数	突变体数	编辑效率(%)
1	26	15	57.7
2	22	12	54.5
3	27	20	74.1
4	25	18	72.0

2.2.3 聚丙烯酰胺凝胶电泳法与脂肪酸组分分析法统计结果比较 通过对 T₁代转基因阳性植株进行分子鉴定,统计分析后得到 CRISPR/Cas9 基因编辑效率为3.7%~15.4%,但对 T₂代种子的脂肪酸组分进行分析,通过脂肪酸组分的变化得到的 CRISPR/Cas9 编辑效率为54.5%~74.1%。并且,以其中一个株系为例,对其 T₁代植株进行聚丙烯酰胺凝胶电泳检测并未检测出突变(图 5A),通过对其 T₂代种子的脂肪酸组分进行测定后分析发现,C18 : 1 的含量由 16%上升为 40%,与野生型相比增加了 24 个百分点。对该株系的后代分离群体进行测序,测序结果也表明该株系的 *FAD2* 基因确实存在突变,且该突变为一个碱基的插入(图 5B)。比较 2 种检测方法所得的结果,我们可以得知通过分析脂肪酸组分变化来检测 CRISPR/Cas9 基因编辑突变体的方法漏检率更低,结果更准确,方法更具优越性。该方法有效地克服了分子鉴定存在的缺陷,从而能高效地检测 CRISPR/Cas9 基因编辑技术的编辑效率。

3 讨论

CRISPR/Cas9 基因编辑技术是一种高效的基因编辑技术,为基因功能研究和作物改良提供了突变体^[23-25]。本研究对 CRISPR/Cas9 基因编辑效率的检测方法进行了优化。将 *mCherry* 荧光蛋白报告基因作为选择基因。根据脂肪酸脱氢酶 *FAD2* 在拟南芥油脂合成中的作用,选择 *FAD2* 基因为靶序列。将构建的载体使用农杆菌转化拟南芥,用荧光筛选获得 T₁代转基因阳性植株,对阳性植株分别采用聚丙烯酰胺凝胶电泳法和 T₂代的脂肪酸组分分析法对编辑效率进行检测,结果表明通过脂肪酸组分分析的方法可以快速、高效地对基因突变进行检测,特别是高通量的筛选。同时该方法可以对编辑载体进

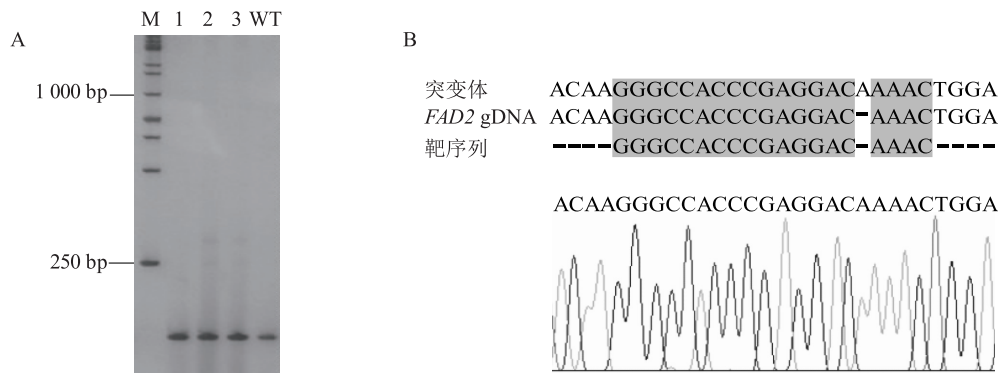


图 A: 聚丙烯酰胺凝胶电泳图, 泳道 1、2、3 为不同株系的 PCR 产物, M: DNA 分子标记, WT: 野生型对照。图 B: *FAD2* 突变体测序结果图。

图 5 突变体聚丙烯酰胺凝胶电泳检测结果与测序检测结果对比

Fig.5 Comparison of mutant detection results obtained by polyacrylamide gel electrophoresis and sequencing

行评估,为载体的商业化应用提供理论基础。此外,该方法也可以为评估新的 Cas9 蛋白提供一个有效的工具。

Wang 等^[19]报道了一种新型的 CRISPR/Cas9 编辑载体,该载体中的 Cas9 蛋白基因由卵细胞特异性表达的 *EC1.2* 基因的启动子驱动,以此可以有效地避免组成型过表达启动子常产生的嵌合型 T_1 代突变体^[26]。另外,该载体中 2 个串联的 sgRNA 取代了传统的单个 sgRNA,从而可以同时 2 个甚至多个基因进行编辑,避免了传统的杂交方法获得多突变体过程中的基因连锁和基因渗透现象。

本研究对该编辑载体进行了设计和改造,在标记基因的选择上,用报告基因替代了常用的选择基因,将种子特异性表达的 *At2S3* 基因启动子驱动的 *mCherry* 荧光蛋白基因插入在 *Cas9* 蛋白基因之后,可以高效筛选 T_1 代转基因阳性植株以及最终获得非转基因的突变后代。荧光蛋白报告基因的插入相比于传统的筛选方法如抗生素筛选具有更高的优越性,它可以克服抗生素筛选不足,比如基因编辑后造成的植株致死或由于抗性较差而不能筛选到阳性植株。而且基于荧光信号筛选,突变体可以从大群体中分离出来,这有助于节省时间和劳动力。最后,前人常使用组成型表达的 35 S 启动子来驱动荧光蛋白的表达,但是往往由此造成荧光蛋白在植物体内广泛表达而影响植物的生长发育,因此,我们在本研究中选用了在种子中专一性表达的 *At2S3* 基因启动子来驱动 *mCherry* 荧光基因。在靶序列的选择上,将以脂肪酸脱氢酶基因 *FAD2* 为基础设计的靶序列插入载体。在拟南芥,脂肪酸脱氢酶 *fad2* 是位于内

质网的油酸(C18:1)去饱和酶,负责在油酸中引入第二个双键形成亚油酸(C18:2)^[27]。因此,突变体 *fad2* 中 C18 不饱和脂肪酸的组成均较野生型有极大的区别^[28]。最后只要通过检测转基因阳性植株中 C18 不饱和脂肪酸的组成,快速简便地筛选出被编辑的植株,从而确定特定的 CRISPR/Cas9 基因编辑技术的编辑效率。

我们对 T_1 代转基因阳性植株进行分子鉴定,鉴定结果进行统计分析后得到的 CRISPR/Cas9 基因编辑效率为 3.7%~15.4%。但对 T_2 代种子的脂肪酸组分进行分析,通过脂肪酸组分的变化得到的 CRISPR/Cas9 基因编辑效率为 54.5%~74.1%。由此我们发现,通过分析脂肪酸组分变化来检测 CRISPR/Cas9 基因编辑突变体的方法漏检率更低,结果更准确,方法更具优越性。该方法有效地克服了分子鉴定存在的缺陷,从而能高效地检测 CRISPR/Cas9 基因编辑技术的编辑效率。

本研究对鉴定 CRISPR/Cas9 基因编辑突变体的方法进行了改进,与其他方法相比,该方法既不受可用的限制性内切酶酶切位点的限制,也不需要大量的人力物力就可以进行高通量的筛选;而且该方法有效地克服了分子鉴定存在的缺陷,能够有效地筛选出被 CRISPR/Cas9 基因编辑后 1 个或 2 个碱基的缺失、插入或者替换的突变体,从而快速、准确、高效地对 CRISPR/Cas9 基因编辑效率进行检测并快速筛选突变体。

参考文献:

- [1] MALI P, YANG L, ESVELT K M, et al. RNA-guided human ge-

- nome engineering via Cas9[J]. Science, 2013, 339: 823-826.
- [2] CONG L, RAN F A, COX D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems[J]. Science, 2013, 339: 819-823.
- [3] FENG Z, MAO Y, XU N, et al. Multigeneration analysis reveals the inheritance, specificity, and patterns of CRISPR/Cas-induced gene modifications in *Arabidopsis* [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2014, 111: 4632-4637.
- [4] LI J F, ZHANG D, SHEEN J. Cas9-based genome editing in *Arabidopsis* and *tobacco* [J]. Methods Enzymol, 2014, 546: 459-472.
- [5] MA X, ZHANG Q, ZHU Q, et al. A Robust CRISPR/Cas9 system for convenient, high-efficiency multiplex genome editing in monocot and dicot plants[J]. Mol. Plant, 2015, 8: 1274-1284.
- [6] XIE K, MINKENBERG B, YANG Y, et al. CRISPR/Cas9 multiplex editing capability with the endogenous tRNA-processing system[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2015, 112: 3570-3575.
- [7] GAO X, CHEN J, DAI X, et al. An effective strategy for reliably isolating heritable and Cas9-Free *Arabidopsis* mutants generated by crispr/cas9-mediated genome editing [J]. Plant Physiol, 2016, 171: 1794-1800.
- [8] PAN C, YE L, QIN L, et al. CRISPR/Cas9 mediated efficient and heritable targeted mutagenesis in tomato plants in the first and later generations[J]. Sci Rep, 2016, 6: 24765.
- [9] DING D, CHEN K, CHEN Y, et al. Engineering introns to express RNA guides for Cas9- and Cpf1-mediated multiplex genome editing[J]. Mol Plant, 2018, 11: 542-552.
- [10] VANLEUVEN A J, PARK S, MENKE D B, et al. A PAGE screening approach for identifying CRISPR-Cas9-induced mutations in zebrafish[J]. Biotechniques, 2018, 64(6): 275-278.
- [11] XING H L, DONG L, WANG Z P, et al. A CRISPR/Cas9 toolkit for multiplex genome editing in plants[J]. BMC Plant Biol, 2014, 14(1): 327.
- [12] ZHOU Y, ZHU S, CAI C, et al. High-throughput screening of a CRISPR/Cas9 library for functional genomics in human cells[J]. Nature, 2014, 509(7501): 487-491.
- [13] 唐 国,黄安群,孙志鹏,等. 三种 CRISPR/Cas9 基因敲除变异检测方法的比较分析[J]. 淡水渔业,2019,49(2):20-26.
- [14] SHAN Q, WANG Y, LI J, et al. Genome editing in rice and wheat using the CRISPR/Cas system[J]. Nat Protoc, 2014, 9(10): 2395-2410.
- [15] DAHLEM T J, HOSHIIJIMA K, JURYNEC M J, et al. 2012. Simple methods for generating and detecting locus-specific mutations induced with TALENs in the zebrafish genome[J]. PLoS genetics, 8(8): e1002861.
- [16] THOMAS H R, PERCIVAL S M, YODER B K, et al. High-throughput genome editing and phenotyping facilitated by high resolution melting curve analysis [J]. PLoS One, 2014, 9(12): e114632.
- [17] 兰 博,谢秋巧,明建军,等. 比较 T7E1 和 Surveyor 核酸内切酶对于点突变的检测效率[J]. 广西医科大学学报,2015,32(6):887-890.
- [18] 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.
- [19] WANG Z P, XING H L, DONG L, et al. Egg cell-specific promoter-controlled CRISPR/Cas9 efficiently generates homozygous mutants for multiple target genes in *Arabidopsis* in a single generation[J]. Genome Biol, 2015, 16: 144.
- [20] 郭 勇,王玉成,王智博. 一种基于农杆菌介导的拟南芥瞬时转化技术优化[J]. 东北林业大学学报,2016,44(6):41-44,83.
- [21] 王 芳,李晓静,周延清. 聚丙烯酰胺凝胶电泳检测大豆 SRAP 标记[J]. 中州大学学报,2014,31(6):125-128.
- [22] 徐明明,史卓维,郑璐侠,等. 蓖麻油、氢化蓖麻油及其聚氧乙烯衍生物中的主要脂肪酸的鉴别[J]. 药物分析杂志,2015,35(10):1862-1865.
- [23] 马斯霜,白海波,惠 建,等. CRISPR/Cas9 技术及其在水稻和小麦遗传改良中的应用综述[J]. 江苏农业科学,2019,47(20):29-33.
- [24] 黄 娟,邓国富,高利军,等. CRISPR/Cas9 系统及其在作物育种中的应用[J]. 南方农业学报,2018, 49(1): 14-21.
- [25] 沈明晨,薛 超,乔中英,等. CRISPR/Cas9 系统在水稻中的发展和利用[J]. 江苏农业科学,2019,47(10):5-10.
- [26] SPRUNCK S, RADEMACHER S, VOGLER F, et al. Egg cell-secreted EC1 triggers sperm cell activation during double fertilization [J]. Science, 2012, 338: 1093-1097.
- [27] AL AMIN N, AHMAD N, WU N, et al. CRISPR-Cas9 mediated targeted disruption of FAD2-2 microsomal omega-6 desaturase in soybean (*Glycine max.*L.) [J]. BMC Biotechnol, 2019, 19(1):9.
- [28] LOU Y, SCHWENDER J, SHANKLIN J. FAD2 and FAD3 desaturases form heterodimers that facilitate metabolic channeling *in vivo* [J]. J Biol Chem, 2014, 289(26): 17996-18007.

(责任编辑:陈海霞)