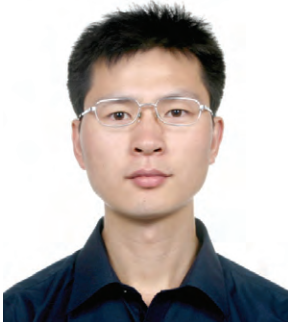


DOI: 10.13376/j.cbls/2015008

文章编号: 1004-0374(2015)01-0045-05



李伟, 博士, 中国科学院动物研究所研究员, 干细胞与细胞周期调控研究组 PI。主要从事干细胞和转基因动物模型方面的研究工作, 在多能性干细胞的建立、鉴定和应用, 以及基因修饰动物模型构建方面取得多项进展, 在 *Nature*、*Nature Biotechnology*、*Cell*、*Cell Stem Cell* 等刊物发表多篇文章。任中国生殖生物学会理事、中国遗传学会青年委员会委员、中国科学院青年创新促进会会员等。目前课题组主要针对多能性干细胞独特的细胞周期和基因组稳定性调控机制开展研究, 深入揭示其调控机制及其在细胞命运决定和疾病发生中的作用, 并依托这些机制进一步开发基因组编辑的新工具。

基因修饰大鼠模型的研究进展

许凯^{1,2}, 李伟^{1*}, 周琪^{1*}

(1 中国科学院动物研究所, 北京 100101; 2 安徽大学生命科学学院, 合肥 230601)

摘要: 相比小鼠, 大鼠在生理水平和认知能力等方面与人类更加接近, 而且体型更大更容易操作, 因而是研究人类疾病的良好模型。然而, 由于遗传修饰技术发展的滞后, 基因修饰大鼠模型的应用远远落后于小鼠。近年来, 随着大鼠胚胎干细胞和位点特异性核酸酶等技术的发展, 大鼠的遗传修饰得了一系列重要的进展。对各种遗传修饰技术在大鼠中的应用进行综述, 为制备基因修饰大鼠模型提供参考。

关键词: 大鼠; 遗传修饰; 胚胎干细胞; 单倍体; 位点特异性核酸酶

中图分类号: Q789; Q819 **文献标志码:** A

Advances in the development of genome-modified rat models

XU Kai^{1,2}, LI Wei^{1*}, ZHOU Qi^{1*}

(1 Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China;

2 School of Life Sciences, Anhui University, Hefei 230601, China)

Abstract: Rats are more similar to humans than mice in many aspects such as physiology and cognition, and also have larger body sizes that are convenient for manipulation, providing an important model for researching human diseases. However, due to the lack of effective genome-editing tools, the application of genome-modified rat models lags far behind that of mice. Recently, technologies on rat embryonic stem cells and site-specific nucleases have been developed, which bring many important advancements to genome modifications in rats. Here we review the application of various kinds of technologies for rat genome medication, which may help for the generation of genome-modified rat models for disease studies.

Key words: rat; genetic modification; embryonic stem cells; haploid; site-specific nuclease

与小鼠相比, 大鼠在生理水平和解剖结构上与人类更加接近, 在认知和行为分析方面大鼠也要优于小鼠。同时, 由于大鼠体型较大, 在采样和一些实验检测上, 如血液采集等, 更加便于操作和研究。

收稿日期: 2014-10-10

*通信作者: E-mail: qzhou@ioz.ac.cn (周琪); liwei@ioz.ac.cn (李伟)

这些因素使得大鼠成为小鼠之外另一种获得广泛应用的哺乳动物疾病模型。Abbott^[1]认为,针对一些复杂的疾病,在同样的诱导条件下,大鼠能够呈现疾病症状而小鼠不会呈现,提示在一些复杂疾病的模拟方面大鼠相比小鼠更具有优越性。遗传学修饰技术通过改变基因组的序列,包括基因插入、删除、突变、倒位和易位等形式控制基因的功能或表达调控模式,从而改变或建立相应的生物学表型,是研究基因功能和制备疾病动物模型的一种重要手段。通过基因修饰可以将基因型和表型直接关联,便于发病机制研究,也使得动物模型可以通过繁殖大量扩群,因而在疾病动物模型的制备中使用越来越广泛。由于基因修饰技术在大鼠中发展滞后,严重阻碍了大鼠基因修饰模型的广泛应用。近年来,随着大鼠干细胞技术和位点特异性核酸酶(site-specific nuclease)技术的突破,大鼠基因修饰模型的制备取得了一系列重要突破。本文主要综述遗传修饰技术在大鼠上的应用。

要实现哺乳动物个体的基因修饰,需要两个方面的结合:一是对遗传物质基因组DNA的修饰,常见技术包括质粒和病毒载体介导的随机整合、转座子系统介导的基因捕获、同源重组和位点特异核酸酶介导的精确基因突变等;二是将遗传修饰拓展到个体水平上并能够通过生殖系有效传递到下一代,常见技术包括胚胎原核注射、体细胞核移植、胚胎干细胞介导的生殖系嵌合以及单倍体胚胎干细胞替代精子与卵母细胞融合产生个体等。

1 利用转基因和随机突变技术制备基因修饰大鼠模型

1982年和1983年,Gordon和Ruddle^[2-3]首次采用在小鼠受精卵中原核内注射DNA片段的转基因方法,制备了转基因小鼠,随后证实原核注射的外源基因可以稳定整合进生殖系并随小鼠繁殖稳定地传递到下一代。这一技术迅速被不同的实验室所证实和采用,并一直沿用到今天,成为制备转基因动物系最常用的手段。Brinster等^[4]将这一技术用于特定功能基因的导入,制备了一系列转基因动物模型,包括第一只小鼠脑瘤模型。利用这一方法,Hammer等^[5]克隆了脊椎炎患者的HLA-B27基因并导入到大鼠中,制备了第一只转基因大鼠,并具有自体免疫类疾病的多种疾病表型,直到今天仍然是重要的疾病研究模型。在大鼠干细胞技术和位点

特异性核酸酶技术建立之前,获得基因突变大鼠非常困难。制备基因突变大鼠需要通过高通量突变和遗传筛选相结合,筛选出携带特定基因突变的大鼠系。2003年,Zan等^[6]利用N-ethyl-N-nitrosourea(ENU)高通量突变和遗传筛选获得了可遗传的基因突变大鼠。2007年,Kitada等^[7]利用Sleeping Beauty(SB)转座系统进行大规模基因捕获,成功地获得了具有插入突变的大鼠。

然而,利用基因随机整合制备的转基因大鼠,存在外源基因表达不稳定和非特异插入突变等问题,而且利用高通量的遗传突变和筛选制备基因突变大鼠还存在成本过高、流程复杂等问题,这些都给基因突变大鼠的广泛应用带来很多挑战。

2 大鼠胚胎干细胞介导的精确基因修饰

胚胎干细胞具有分化形成包括配子细胞在内的机体各种细胞的能力,可以通过早期胚胎嵌合形成嵌合动物的生殖细胞,因而可以作为基因修饰的载体,将携带的基因修饰通过生殖系嵌合传递到下一代。同时,由于胚胎干细胞可以在体外大量扩增传代,因而易于进行遗传修饰和筛选,可以在胚胎干细胞上进行精确的基因修饰。早在20世纪80年代,通过同源重组技术在胚胎干细胞中破坏掉原有的正常的基因实现基因敲除,并通过其生殖系嵌合能力获得了基因敲除小鼠^[8-12]。

然而,由于大鼠胚胎干细胞系难于建立,基因敲除技术一直未能在大鼠上获得成功。直到2008年,Buehr等^[13]和Li等^[14]才首次报道建立具有种系嵌合能力的大鼠胚胎干细胞系。随后,Tong等^[15]在大鼠胚胎干细胞系中通过同源重组敲除p53基因并进而利用胚胎嵌合获得基因敲除大鼠。

2011年,Elling等^[16]和Lee与Wutz^[17]建立了小鼠孤雌胚胎来源的单倍体胚胎干细胞,证实其在大规模遗传筛选中的应用。2012年,Yang等^[18]和Li等^[19]建立了小鼠孤雄来源的单倍体胚胎干细胞,证实其既具有种系嵌合能力,又可以替代配子与卵母细胞融合后获得到期发育(full-term development)小鼠,并通过这种方式获得转基因小鼠,证实这种方法可以作为一种新的转基因动物制备方法。Li等^[20]随后建立了大鼠的孤雄单倍体胚胎干细胞,并通过种系嵌合和替代配子两种途径,均获得了转基因大鼠,从而为转基因大鼠模型的制备提供了一种新的途径。

3 利用位点特异性核酸切割酶制备基因敲除大鼠

虽然大鼠胚胎干细胞和单倍体胚胎干细胞可以完成大鼠的精确基因修饰, 但是这种方法需要近2年时间才能获得基因敲除大鼠, 而且操作流程十分复杂。最近, 位点特异性核酸切割酶技术获得飞速发展, 为基因组精确编辑带来了革命性的变化。位点特异性核酸切割酶包括锌指核酸酶(zinc finger nuclease, ZFN)、转录激活子样效应因子核酸酶(transcription activator-like effector nuclease, TALEN)和成簇规律间隔短回文重复序列系统(clustered regulatory interspaced short palindromic repeats, CRISPR/Cas system), 通过识别特定的DNA序列进行切割进而引发突变, 实现对基因组的精确修饰。

3.1 ZFN技术在大鼠遗传修饰中的应用

锌指核酸酶是一种人工构建的核酸内切酶, 它由能够特异识别DNA序列的结合结构域和不具有序列特异性的核酸酶结构域组成。锌指核酸酶的DNA结合结构域是由锌指蛋白组成, 一个锌指是由大约30氨基酸组成, 每一个锌指能够识别3个特定的脱氧核糖核苷酸。通过多个锌指蛋白的串联形成的锌指蛋白结构域就能够特异地识别基因组中的一段核苷酸序列^[21]。与锌指蛋白结构域相连的核酸酶结构域是来自Fok I的C端的96个氨基酸残基^[22]。Fok I只有在二聚化状态下才具有酶切活性, 每一个Fok I单体与一个锌指蛋白结构域相连构成一个锌指蛋白酶, 识别一个特异性的位点。当两个识别位点相距适当的距离时, 两个单体ZFN相互作用产生酶切功能, 将DNA切断产生双链断裂(double-strand break, DSB), 通过然后同源定向修复(homology directed repair, HDR)机制定向插入删除或非同源末端连接(non-homologous end joining NHEJ)修复机制来产生随机插入缺失, 从而进行基因敲除或敲入^[21-24]。

2009年, Geurts等^[25]通过大鼠受精卵原核注射ZFN获得了基因敲除的大鼠。2010年, Mashimo等^[26]利用ZFN获得了X染色体连锁的严重免疫缺陷的基因敲除大鼠。2011年, Cui等^[27]利用ZFN技术结合同源重组技术在大鼠胚胎中直接引入了位点特异性修饰, 从而实现了更精确的基因组编辑, 包括点突变、精确的插入删除和条件性的敲除敲入等。2013年, Brown等^[28]利用ZFN基因组编辑技术和Cre-loxp系统快速有效地实现了大鼠的条件性

基因敲除, 为大鼠基因敲除的时空控制提供了新的方法。

然而, 利用ZFN进行基因敲除需要构建大量不同的模块进行组装, 这需要耗费大量的人力物力, 成本高昂, 使ZFN在大鼠基因修饰中的广泛应用具有一定的局限性。

3.2 TALEN技术在大鼠遗传修饰中的应用

TALEN技术主要是应用转录激活样效应子结构域来实现与DNA的特异性结合^[29]。转录激活样效应子是黄单胞菌进入植物细胞分泌的一种蛋白质, 由多个能够特异性识别DNA的串联“蛋白质模块”和两侧的N端及C端序列组成。每一个蛋白质模块包括34个氨基酸, 第12和13位氨基酸残基负责识别单个的脱氧核糖核苷酸。因此, 当足够多的蛋白质模块串联在一起时, 就能够特异地识别一段DNA序列^[30-31]。TALEN的核酸酶结构域然仍是Fok I, 需要二聚化状态下才能够进行切割, 两个识别位点间的适当间距为14~20个bp。TALEN也可以在基因组的特定位点酶切产生DNA双链断裂, 然后通过HDR或NHEJ产生插入缺失, 进行基因敲除敲入。

2011年, Tesson等^[32]通过TALEN的胚胎显微注射成功获得了基因敲除的大鼠。2012年, Tong等^[33]利用TALEN在大鼠的胚胎干细胞中进行快速有效的基因打靶。2014年, Remy等^[34]将TALEN和供体DNA片段显微注射到大鼠受精卵中, 在3个不同的基因组位点Rosa26、Hprt1和Ighm高效引入新的序列, 获得了同源定向修复修饰的大鼠。这些研究成果都证实了利用TALEN技术能够在大鼠中实现精确有效的基因敲除。

虽然, 理论上TALEN能够打靶大鼠的任何DNA序列, 但是与ZFN一样, TALEN模块的构建和组装非常复杂, 需要耗费大量的时间和成本, 这在一定程度上限制了TALEN技术在大鼠基因修饰中的应用。

3.3 CRISPR/Cas系统在大鼠遗传修饰中的应用

CRISPR/Cas系统是一种RNA指导的核酸内切酶系统, 主要包括CRISPR相关的RNA指导的DNA内切酶Cas9、CRISPR RNAs(crRNA)和transactivating crRNA(tracrRNA)等。crRNA能够与PAM(proto-spacer adjacent motifs)上游20个核苷酸(proto-spacer)序列互补配对, 和tracrRNA一起形成复合RNA共同指导Cas9蛋白在基因组这段特异的序列上进行切割, 从而产生DNA双链断裂, 然后, 通过同源

定向修复插入供体 DNA 或者通过非同源末端连接修复产生插入缺失。

1987 年, Ishino 等^[35]首先报道了 *E. coli* 碱性磷酸酶的同工酶序列中存在 CRISPR 成簇的重复序列。后来随着测序技术的发展, 很多微生物基因组测序完成, 在不同的细菌和古菌的基因组中其他的重复元件被报道。2000 年, Mojica 等^[36]将超过 40% 的细菌和 90% 的古菌中间隔的重复元件分类为一个特殊的成簇的重复元件家族。2002 年, Jansen 等^[37]和 2005 年, Mojica 等^[38]定义了 CRISPR, 确定了 Cas 基因。2005 年, 确定了 spacers 的来源, 提出了适应性免疫系统^[38-39]; Bolotin 等^[40]确定了 PAM。2007 年, Barrangou 等^[41]首次用实验证实了 CRISPR 的适应性免疫。2008 年, Brouns 等^[42]提出 spacers 转变成了 crRNA。2010 年, Garneau 等^[43]证实 Cas9 是由 spacers 指导并切割 DNA 靶。2011 年, Deltcheva 等^[44]认为 tracrRNA 和 crRNA 形成复合结构与 Cas9 相互作用。Sapranauskas 等^[45]提出 type II CRISPR 能够在其他的生物中进行异源表达。2013 年, 首先证实了在真核细胞中利用 CRISPR-Cas9 系统能够进行基因组的构建^[46-47]。

相对于 ZFN 和 TALEN 技术, CRISPR/Cas 系统更容易构建, 而且容易进行多靶向突变。2013 年, Li 等^[48]利用 CRISPR/Cas 系统在大鼠同时实现了 3 个基因的突变, 并且证实这些突变能够通过生殖系传递到下一代, 从而为快速获得多基因同步突变大鼠提供了一种新的途径。2014 年, Ma 等^[49]利用 CRISPR/Cas 系统实现了大鼠的条件性敲除。这些都证实了利用 CRISPR/Cas 系统能够在大鼠中实现快速精确高效的遗传修饰, 这为大鼠基因功能的研究和人类疾病模型的建立提供了良好的方法和途径。

4 展望

大鼠干细胞技术和位点特异性重组酶技术的飞速发展, 极大地推动了大鼠基因修饰的发展。利用这些新技术我们已经可以像制备基因修饰小鼠一样, 稳定快速地制备基因突变大鼠、多基因同步突变大鼠、条件性敲除大鼠等, 从而可以更好更快地开展大鼠基因功能研究和建立大鼠疾病模型。鉴于大鼠模型的优势, 未来大鼠基因修饰技术将进一步发展, 在遗传修饰的效率、精确性和速度上继续提高, 最终使基因修饰大鼠成为人类疾病和生物学研究的常用模型。

[参 考 文 献]

- [1] Abbott A. Laboratory animals: the Renaissance rat. *Nature*, 2004, 428(6982): 464-6
- [2] Gordon JW, Ruddle FH. Germ line transmission in transgenic mice. *Prog Clin Biol Res*, 1982, 85(Pt B): 111-24
- [3] Gordon JW, Ruddle FH. Gene transfer into mouse embryos: production of transgenic mice by pronuclear injection. *Methods Enzymol*, 1983, 101: 411-33
- [4] Brinster RL, Chen HY, Messing A, et al. Transgenic mice harboring SV40 T-antigen genes develop characteristic brain tumors. *Cell*, 1984, 37(2): 367-79
- [5] Hammer RE, Maika SD, Richardson JA, et al. Spontaneous inflammatory disease in transgenic rats expressing HLA-B27 and human β 2m: an animal model of HLA-B27-associated human disorders. *Cell*, 1990, 63(5): 1099-112
- [6] Zan Y, Haag JD, Chen KS, et al. Production of knockout rats using ENU mutagenesis and a yeast-based screening assay. *Nat Biotechnol*, 2003, 21(6): 645-51
- [7] Kitada K, Ishishita S, Tosaka K, et al. Transposon-tagged mutagenesis in the rat. *Nat Methods*, 2007, 4(2): 131-3
- [8] Folger KR, Wong EA, Wahl G, et al. Patterns of integration of DNA microinjected into cultured mammalian cells: evidence for homologous recombination between injected plasmid DNA molecules. *Mol Cell Biol*, 1982, 2(11): 1372-87
- [9] Wong EA, Capecchi MR. Homologous recombination between coinjected DNA sequences peaks in early to mid-S phase. *Mol Cell Biol*, 1987, 7(6): 2294-5
- [10] Smithies O, Gregg RG, Boggs SS, et al. Insertion of DNA sequences into the human chromosomal β -globin locus by homologous recombination. *Nature*, 1985, 317(6034): 230-4
- [11] Koller BH, Smithies O. Inactivating the β 2-microglobulin locus in mouse embryonic stem cells by homologous recombination. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, 86(22): 8932-5
- [12] Koller BH, Hagemann LJ, Doetschman T, et al. Germ-line transmission of a planned alteration made in a hypoxanthine phosphoribosyltransferase gene by homologous recombination in embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, 86(22): 8927-31
- [13] Buehr M, Meek S, Blair K, et al. Capture of authentic embryonic stem cells from rat blastocysts. *Cell*, 2008, 135(7): 1287-98
- [14] Li P, Tong C, Mehrian-Shai R, et al. Germline competent embryonic stem cells derived from rat blastocysts. *Cell*, 2008, 135(7): 1299-310
- [15] Tong C, Li P, Wu NL, et al. Production of p53 gene knockout rats by homologous recombination in embryonic stem cells. *Nature*, 2010, 467(7312): 211-3
- [16] Elling U, Taubenschmid J, Wirnsberger G, et al. Forward and reverse genetics through derivation of haploid mouse embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*, 2011, 9(6): 563-74
- [17] Leeb M, Wutz A. Derivation of haploid embryonic stem cells from mouse embryos. *Nature*, 2011, 479(7371):

- 131-4
- [18] Yang H, Shi L, Wang BA, et al. Generation of genetically modified mice by oocyte injection of androgenetic haploid embryonic stem cells. *Cell*, 2012, 149(3): 605-17
- [19] Li W, Shuai L, Wan H, et al. Androgenetic haploid embryonic stem cells produce live transgenic mice. *Nature*, 2012, 490(7420): 407-11
- [20] Li W, Li X, Li T, et al. Genetic modification and screening in rat using haploid embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*, 2014, 14(3): 404-14
- [21] Bibikova M, Beumer K, Trautman JK, et al. Enhancing gene targeting with designed zinc finger nucleases. *Science*, 2003, 300(5620): 764
- [22] Kim MK, Lee JS, Chung JH. *In vivo* transcription factor recruitment during thyroid hormone receptor-mediated activation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(18): 10092-7
- [23] Bibikova M, Golic M, Golic KG, et al. Targeted chromosomal cleavage and mutagenesis in *Drosophila* using zinc-finger nucleases. *Genetics*, 2002, 161(3): 1169-75
- [24] Carroll D. Genome engineering with zinc-finger nucleases. *Genetics*, 2011, 188(4): 773-82
- [25] Geurts AM, Cost GJ, Freyvert Y, et al. Knockout rats via embryo microinjection of zinc-finger nucleases. *Science*, 2009, 325(5939): 433
- [26] Mashimo T, Takizawa A, Voigt B, et al. Generation of knockout rats with X-linked severe combined immunodeficiency (X-SCID) using zinc-finger nucleases. *PLoS One*, 2010, 5(1): e8870
- [27] Cui X, Ji D, Fisher DA, et al. Targeted integration in rat and mouse embryos with zinc-finger nucleases. *Nat Biotechnol*, 2011, 29(1): 64-7
- [28] Brown AJ, Fisher DA, Kouranova E, et al. Whole-rat conditional gene knockout via genome editing. *Nat Methods*, 2013, 10(7): 638-40
- [29] Mahfouz MM, Li L, Shamimuzzaman M, et al. *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): 2623-8
- [30] Boch J, Scholze H, Schornack S, et al. Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science*, 2009, 326(5959): 1509-12
- [31] Moscou MJ, Bogdanove AJ. A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors. *Science*, 2009, 326(5959): 1501
- [32] Tesson L, Usal C, Menoret S, et al. Knockout rats generated by embryo microinjection of TALENs. *Nat Biotechnol*, 2011, 29(8): 695-6
- [33] Tong C, Huang G, Ashton C, et al. Rapid and cost-effective gene targeting in rat embryonic stem cells by TALENs. *J Genet Genomics*, 2012, 39(6): 275-80
- [34] Remy S, Tesson L, Menoret S, et al. Efficient gene targeting by homology-directed repair in rat zygotes using TALE nucleases. *Genome Res*, 2014, 24(8): 1371-83
- [35] Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, et al. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J Bacteriol*, 1987, 169(12): 5429-33
- [36] Mojica FJ, Diez-Villasenor C, Soria E, et al. Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of *Archaea*, Bacteria and mitochondria. *Mol Microbiol*, 2000, 36(1): 244-6
- [37] Jansen R, Embden JD, Gastra W, et al. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Mol Microbiol*, 2002, 43(6): 1565-75
- [38] Mojica FJ, Diez-Villasenor C, Garcia-Martinez J, et al. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *J Mol Evol*, 2005, 60(2): 174-82
- [39] Pourcel C, Salvignol G, Vergnaud G. CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies. *Microbiology*, 2005, 151(Pt 3): 653-63
- [40] Bolotin A, Quinquis B, Sorokin A, et al. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology*, 2005, 151(Pt 8): 2551-61
- [41] Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*, 2007, 315(5819): 1709-12
- [42] Brouns SJ, Jore MM, Lundgren M, et al. Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes. *Science*, 2008, 321(5891): 960-4
- [43] Garneau JE, Dupuis ME, Villion M, et al. The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature*, 2010, 468(7320): 67-71
- [44] Deltcheva E, Chylinski K, Sharma CM, et al. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature*, 2011, 471(7340): 602-7
- [45] Sapranaukas R, Gasiunas G, Fremaux C, et al. The *Streptococcus thermophilus* CRISPR/Cas system provides immunity in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39(21): 9275-82
- [46] Cong L, Ran FA, Cox D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 2013, 339(6121): 819-23
- [47] Mali P, Yang L, Esvelt KM, et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*, 2013, 339(6121): 823-6
- [48] Li W, Teng F, Li T, et al. Simultaneous generation and germline transmission of multiple gene mutations in rat using CRISPR-Cas systems. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(8): 684-6
- [49] Ma Y, Zhang X, Shen B, et al. Generating rats with conditional alleles using CRISPR/Cas9. *Cell Res*, 2014, 24(1): 122-5