

• 农业生物技术 •

采用 *CEL I* 酶粗提物高效鉴定 CRISPR/Cas9 介导的基因突变

罗婉冰, 林秋鹏, 李晓霞, 周泽娇, 阳辉勇, 杜荣裕, 李洪清

华南师范大学 生命科学学院 广东省植物发育与生物工程重点实验室, 广东 广州 510631

罗婉冰, 林秋鹏, 李晓霞, 等. 采用 *CEL I* 酶粗提物高效鉴定 CRISPR/Cas9 介导的基因突变. 生物工程学报, 2017, 33(5): 775–784.

Luo WB, Lin QP, Li XX, et al. Efficient identification of gene knockout mutant mediated by CRISPR/Cas9 by *CEL I* crude extracts. Chin J Biotech, 2017, 33(5): 775–784.

摘要: CRISPR/Cas9 是新兴的基因组编辑技术, 该技术操作简单、效率高, 已成为目前最主流的基因组编辑技术。利用该技术进行突变体创制, 对基因功能研究和育种应用具有重要的意义, 而快速、高效、低成本的基因编辑个体鉴定是其中的重要环节。本研究对影响 *CEL I* 粗提物鉴定 CRISPR/Cas9 介导的水稻基因编辑个体的条件, 包括蛋白用量及作用时间、PCR 反应缓冲液等条件进行了探索, 并将整个检测体系集成于一管操作。同时, 采用 *CEL I* 粗提物检测了 CRISPR/Cas9 介导水稻 *stn1* 突变的 T₀ 代植株及后代, 对杂合突变、纯合突变及双等位突变的鉴定策略进行了探讨; 该方法检测正确率经测序验证达 100%。上述结果表明, 采用 *CEL I* 粗提物检测突变体与已有方法比较具有廉价、快速和高效的特点。

关键词: *CEL I* 粗提物, CRISPR/Cas9, 突变体, 鉴定, *stn1*

Received: October 18, 2016; **Accepted:** January 3, 2017

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 31571759).

Corresponding author: Hongqing Li. Tel/Fax: +86-20-85211375; E-mail: hqli@scnu.edu.cn

国家自然科学基金 (No. 31571759) 资助。

Efficient identification of gene knockout mutant mediated by CRISPR/Cas9 by *CEL I* crude extracts

Wanbing Luo, Qiupeng Lin, Xiaoxia Li, Zejiao Zhou, Huiyong Yang, Rongyu Du, and Hongqing Li

Guangdong Key Laboratory of Biotechnology for Plant Development, School of Life Sciences, South China Normal University, Guangzhou 510631, Guangdong, China

Abstract: CRISPR/Cas9, emerged as an efficient and powerful gene editing technology, has become the mainstream genome editing technology. Constructing mutants using CRISPR/Cas9 system is of great significance to the functional study and breeding application of useful genes. As the basis of the technology, a method for identification of mutation with efficiency and lower cost is needed. In this report, we studied the factors influencing mutation detected by *CEL I* crude extracts, such as the amount of protein, enzyme incubation time, PCR buffers. Under the optimized conditions, we can integrate the mutation detection steps into one-tube reaction. We used this system to examine the mutation types and frequency of rice *stm1* mediated by CRISPR/Cas9. We also used this method to identify different mutation types including homozygous, heterozygous and bi-allelic mutations. The accuracy of this method reached 100% verified by sequencing. Altogether, our results showed that using *CEL I* crude extracts was an efficient and low cost method for identification of CRISPR/Cas9 mediated mutation.

Keywords: *CEL I* crude extracts, CRISPR/Cas9, mutant, identification, *stm1*

随着测序技术的发展,许多物种的全基因组测序工作已经完成。阐明基因的功能及构建基因调控和互作网络成为现阶段的主要任务。构建基因突变个体是十分有效的基因功能研究手段。基因组编辑技术的出现,使得快速、高效地定点突变目的基因成为可能。

CRISPR/Cas9 系统是细菌的免疫系统,其主要作用是防御外来质粒或噬菌体 DNA 的入侵。科学家在大肠杆菌发现了特殊的成簇的规律间隔的短回文重复序列^[1],并于 2002 年正式将其命名为 CRISPR (Clustered regularly interspaced short palindromic repeats)^[2]。2013 年, *Science* 杂志同期刊登了两篇关于 CRISPR/Cas9 介导的基因敲除的文献,首次报道了 CRISPR/Cas9 系统可用于人类和小鼠细胞的基因组编辑,证明了 CRISPR 技术可用于编辑高等真核基因组^[3-4]。此

后,CRISPR 技术也被应用到植物基因组编辑中,并在模式植物拟南芥、烟草以及小麦、水稻、高粱、玉米等重要农作物中获得成功^[5-10],并且证明了产生的编辑可以在植物中稳定遗传^[11]。此外,基因编辑过的植物可以通过自交、回交等手段,获得不带 CRISPR 元件的基因编辑株^[12]。CRISPR/Cas9 引入突变的方式是通过 sgRNA 识别靶位点,利用 Cas9 的核酸内切酶活性使靶位点 DNA 的双链发生断裂 (Double-strand breaks, DSBs),从而激活个体自身修复机制。编辑个体可以通过非同源末端连接介导的修复方式 (Non-homologous end joining, NHEJ) 和同源重组介导的修复方式 (Homology-directed repair, HDR) 对双链断裂处进行修复^[13]。通过 NHEJ 介导的修复方式进行修复时,断裂的 DNA 末端重新连接,这种非精确的修复会导致在断裂位

置上产生少量核苷酸的插入或删除,进而产生突变^[14]。CRISPR 技术与传统基因打靶技术相比突变效率更高,与 ZFN、TALEN 等基因组编辑技术相比具有耗时更短、操作简单等特点,因此已被广泛用于突变体的构建。由于编辑效率的限制,通过 CRISPR 技术产生的大量编辑个体仍需通过进一步的筛选鉴定,因此建立快速、高效和低成本鉴定体系尤为重要。

CEL I 酶是芹菜中发现的可以特异识别 DNA 双链中的错配位点并切割双链的核酸内切酶^[15]。研究表明,芹菜 *CEL I* 酶粗提物可以用于点突变的检测^[16-17]。利用该酶的特点,可以有效鉴定 CRISPR 突变体。本文以水稻为材料构建了 *dep1* 基因和 *stn1* 基因的突变体,利用 *CEL I* 酶粗提物进行鉴定,并对鉴定条件进行了优化,将 PCR 反应、产物变性、复性处理和 *CEL I* 酶切整合在一管中进行,结合琼脂糖凝胶电泳,建立了一种快速、高效和廉价的突变体检测系统。

1 材料与方 法

1.1 材料

水稻“中花 11” (*Oryza sativa* L.) 由本实验室保存。水稻 *dep1* 突变株由本实验室创制^[18]。*rTaq* 聚合酶、LA *Taq* 聚合酶缓冲液购自大连 TaKaRa 生物有限公司。B *Taq* 聚合酶、KOD 聚合酶均购自东洋纺(上海)生物科技有限公司。大肠杆菌感受态菌株 JM109、根癌农杆菌感受态菌株 EHA105 为本实验室保存。CRISPR 载体由华南农业大学刘耀光教授提供^[19]。限制性内切酶和 T4 DNA 连接酶购自大连 TaKaRa 生物有限公司。质粒抽提试剂盒为 Axygen 公司产品。引物合成由上海生工生物技术有限公司完成。

测序由北京睿博兴科生物技术有限公司完成。蛋白浓度测定 BCA 试剂盒由碧云天生物技术公司提供。

1.2 方法

1.2.1 *CEL I* 酶粗提及蛋白质浓度测定

蒸馏水冲洗芹菜后,用无菌吸水纸擦干,去掉根部,用榨汁机榨取并收集汁液,在 4 °C 的条件下用 Bradley 等的方法^[20]进行 *CEL I* 酶的粗提取,提取物保存于-20 °C 备用。蛋白测定的方法采用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒进行测定,调整蛋白浓度至 1 μg/μL。

1.2.2 构建水稻 *stn1* 突变用的 CRISPR/Cas9 载体

stn1 为端粒结合蛋白 CST 复合体中的组分,是染色体末端的保护蛋白^[21-22]。为了突变水稻中 *stn1* 基因,首先设计用于构建 CRISPR 载体的 spacer 序列,其 gRNA 靶位点位于 *stn1* 基因 CDS 序列的第 100 bp (图 1),两条接头互补序列见表 1。

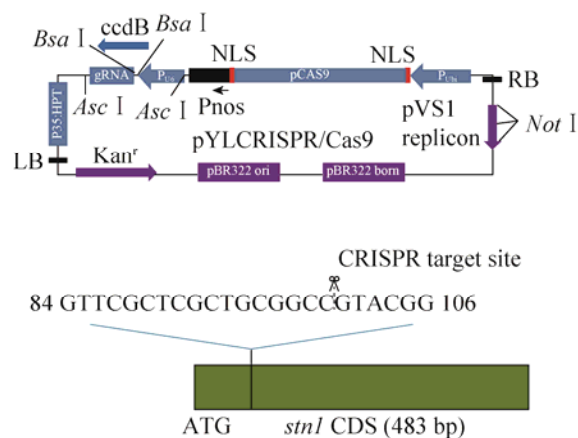


图 1 CRISPR 载体图谱和 *stn1* 的 CRISPR 靶位点设计

Fig. 1 Physical map of CRISPR vector and CRISPR target site of *stn1*.

表 1 本研究所用的引物

Table 1 Primers used in this research

Primer name	Primer sequence (5'-3')
<i>stn1</i> CR-Fw	GCCGTTTCGCTCGCTGCGGCCGTA
<i>stn1</i> CR-Re	CCCATACGGCCGAGCGAGCGAA
<i>dep1</i> CR-Fw	GCCGATCTTGAAGCAGCTGTACA
<i>dep1</i> CR-Re	AAACTGTACAGCTGCTTCAAGAT
<i>stn1</i> -Fw	AGAGGGAGACCTGCAGGAGCGAA
<i>stn1</i> -Re	CGTTGAGGATGTCAGAGGTGGTGAG
<i>dep1</i> -Fw	GCCTCTAGTCCCTTTGTATG
<i>dep1</i> -Re	GAGCAGGAGAAGCAGTCC
U6-Fw	GAGCTTGGAGTGGATGGAAT
U6-Re	AGCACCGACTCGGTGCCACT

将所需接头引物等量混合,经变、复性处理,与 *Bsa* I 酶切的载体相连接,转化大肠杆菌,提取阳性菌株的质粒,测序。将确认无误的质粒转入农杆菌 EHA105,获得含有用于水稻 *stn1* 突变的农杆菌菌株 EHA105/CRISPR*stn1*。

1.2.3 农杆菌介导转化水稻

参照 Li 等^[18]的方法,利用农杆菌 EHA105/CRISPR*stn1* 转化水稻品种中花 11 的愈伤组织,用潮霉素筛选获得再生组培苗。组培苗经炼苗后,移栽钵钵,即为 T₀ 代植株。按转基因水稻种植要求严格管理。

1.2.4 扩增 *dep1* 及 *stn1* 突变位点所在片段

提取水稻叶片的基因组 DNA,以引物组合 *dep1*-Fw/*dep1*-Re 和 *stn1*-Fw/*stn1*-Re 进行 PCR 扩增,理论产物长度约为 948 bp 和 491 bp。反应体系包括基因组 DNA 1 μL,10×PCR 缓冲液 2.5 μL,dNTPs (2 mmol/L) 2.5 μL,上游引物 (10 μmol/L) 1 μL,下游引物 (10 μmol/L) 1 μL,DNA polymerase 1 U,补去离子水到 25 μL。PCR 反应的参数设置如下:94 °C 预变性 5 min,然后进行 35 个循环的 PCR 扩增 (94 °C,30 s;退火温度,30 s;72 °C,1 min),最后 72 °C 延伸 10 min。其中 *stn1* 退火温度为 65 °C,*dep1* 的退火温度为 55 °C。

1.2.5 *CEL* I 酶粗提物切割 PCR 产物

转化株 DNA 经 PCR 扩增后,将产物(或加入等量的野生型 DNA 扩增产物)进行变、复性处理,再向其中加入 *CEL* I 酶,42 °C 温育,用 EDTA 终止反应。取 10 μL 样品进行电泳检测。

2 结果与讨论

2.1 *CEL* I 酶粗提物用于突变体的检测

dep1 是水稻直立密穗控制基因^[23],本论文 *dep1-29* 突变株由本实验室创制,测序结果表明,该植株为双位点突变 (-2/-5) (图 2)。为检测 *CEL* I 酶粗提物是否能切割异源双链 DNA,取 1 μL *CEL* I 酶粗提物直接加入到经变性、复性处理的 PCR 样品中,与不加 *CEL* I 酶的样品进行对比。电泳结果显示 *CEL* I 酶可以切割异源双链 DNA,切出条带符合预期大小,证明 *CEL* I 酶粗提物适用于点突变的检测。

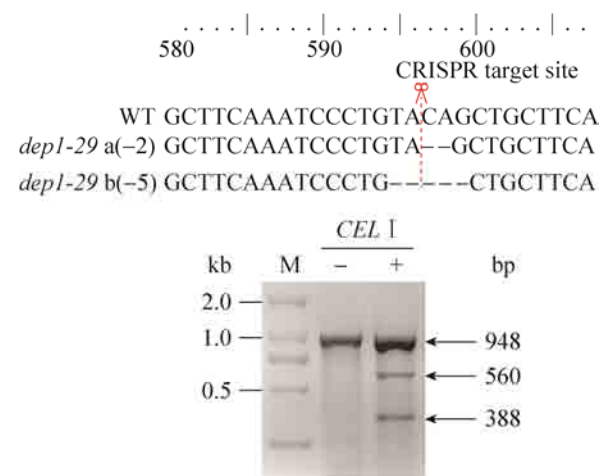


图 2 *dep1-29* 突变株突变位点的测序结果和 *CEL* I 酶切检测结果 (*dep1-29 a* 和 *dep1-29 b* 表示 *dep1-29* 突变株包含双等位突变的两种突变类型)

Fig. 2 Sequence of *dep1-29* mutant and *CEL* I analysis. *dep1-29 a* and *dep1-29 b* showed the target sequences of bi-alleles mutation of *dep1-29*.

2.2 *CEL I* 酶用量及作用时间的优化

酶的用量是影响酶切效果的重要因素。因此,采用不同 *CEL I* 酶粗提物的量对来源于 *dep1-29* 的 PCR 产物进行酶切 (图 3), 结果表明, 粗提物总蛋白用量在 0.1 μg 时, 酶切效果达到最佳。增加粗提物的用量, 酶切效果不会有显著提升。

酶切时间是影响酶切效果的另一重要因素。采用 0.1 μg *CEL I* 酶对 *dep1-29* 突变体材料的 PCR 产物进行酶切 (图 3)。结果表明, *CEL I* 酶作用 10 min 时可以见到酶切的条带, 随着时间增加, *CEL I* 酶的切割效率逐渐提升, 在 40 min 时达到最佳。继续增加时间并不能提升 *CEL I* 酶的切割效率。

2.3 PCR 体系对 *CEL I* 切割效率的影响

简便、快捷的突变体鉴定方法要求采用 *CEL I* 粗提物在合适的 PCR 缓冲体系中进行酶切。因此, 首先选择目前普遍使用的聚合酶和缓冲系统 (*r Taq* 聚合酶、*LA Taq* 聚合酶、Blend *Taq* 聚合酶、*KOD* 聚合酶) 进行实验 (图 4)。结

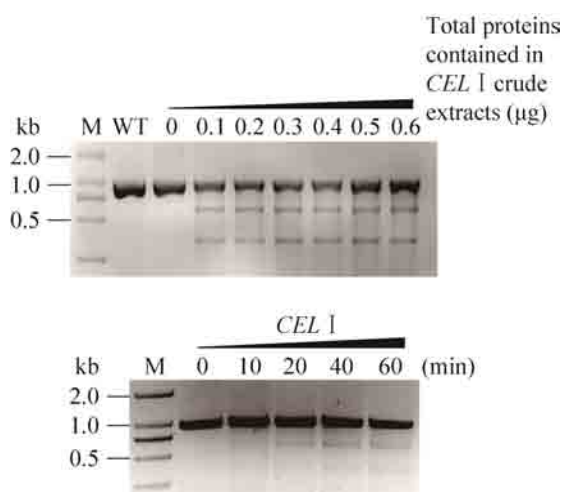


图 3 *CEL I* 酶粗提物用量及酶切时间对突变鉴定的影响

Fig. 3 Effects of the amount of *CEL I* crude extracts and digestion time on mutation identification.

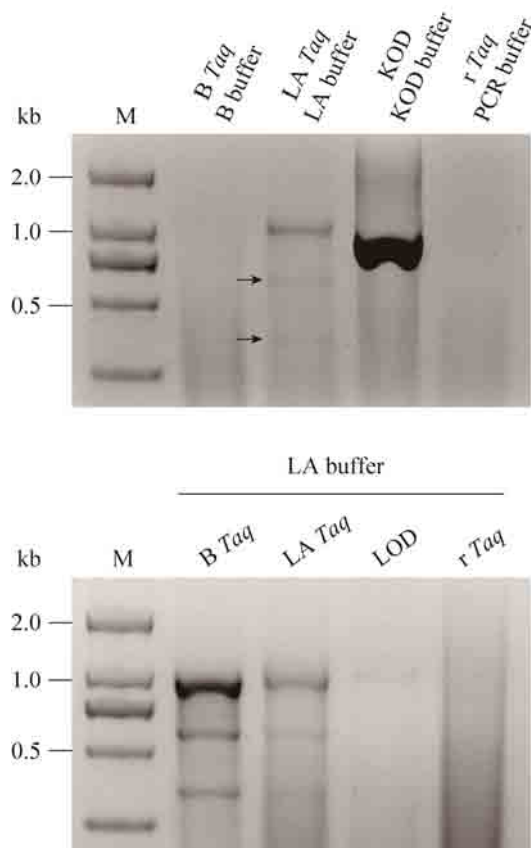


图 4 不同 PCR 体系对 *CEL I* 粗提物酶切效率的影响
Fig. 4 Effect of digestion using *CEL I* crude extracts in different PCR systems.

果表明, *KOD* 酶的扩增效果最佳, 但 *CEL I* 酶在该体系中的切割效果不理想。B *Taq* 酶体系和 *r Taq* 酶体系中 PCR 扩增效果差, 电泳检测时不能看见 1 000 bp 处的条带。LA *Taq* 酶体系能够扩增到 *dep1* 片段, 且 *CEL I* 酶在该体系中表现出了切割活性。进一步通过采用 LA buffer 与不同的 *Taq* 酶组合, 发现 B *Taq* 与 LA buffer 组合可以提高 PCR 的效率和保证 *CEL I* 的酶切活性。

2.4 *CEL I* 酶对 CRISPR 介导的 *stn1* 基因敲除株突变进行分型

采用农杆菌介导的方法, 我们将 *stn1*-CRISPR 转化水稻, 获得 35 个独立的转基因株系。由于转

基因株中可能含有无突变、杂合突变、纯合突变及双位点突变等多种类型,我们根据 *CEL I* 酶能切割异源 DNA 双链的特点,设计了两种方法对上述类型进行区分:1) 将 PCR 产物直接变性、复性、酶切;2) 将 PCR 产物与野生型植株的 PCR 产物等量混合,变性、复性,再用 *CEL I* 酶切。*stn1-1* 和 *stn1-4* 是通过的 *stn1*-CRISPR 转化获得的两个突变株系。其中 *stn1-1* 的 PCR 产物变、复性后可以被 *CEL I* 酶切割,其 PCR 产物与野生型植株 PCR 产物混合变、复性后也可以被 *CEL I* 酶切割,说明突变株为杂合突变或双位点突变。*stn1-4* 的 PCR 产物变、复性后不能被 *CEL I* 酶切割,其 PCR 产物与野生型植株 PCR 产物混合变、复性后可以被 *CEL I* 酶切割,说明该突变株为纯合突变。对上述两个突变株 PCR 产物进行克隆,转化大肠杆菌并挑单克隆

进行测序,结果表明 *stn1-1* 突变株存在两种突变类型 (-3 bp/-1 bp),而 *stn1-4* 为单碱基缺失的纯合突变 (-1 bp/-1 bp)。以上结果表明,*CEL I* 酶不仅可以快速鉴定突变体,而且可以对不同的类型进行有效区分(图 5)。

2.5 *CEL I* 酶策略检测 CRISPR 介导的 *stn1* 基因突变株及验证

为验证 *CEL I* 酶策略检测的正确率,利用该策略对 CRISPR 介导的 *stn1* 突变的 T₀ 代植株(已测序)进行酶切检测。结果表明,其中#4、#9、#17 为纯合突变植株,#8 为野生型植株,其余植株为杂合体或双等位突变体或嵌合体(图 6)。*CEL I* 酶检测结果与测序结果对比完全一致。以上结果表明利用 *CEL I* 酶策略在本次实验中的正确率达 100%,表明该方法是一种非常理想的检测 CRISPR 突变株的方法。

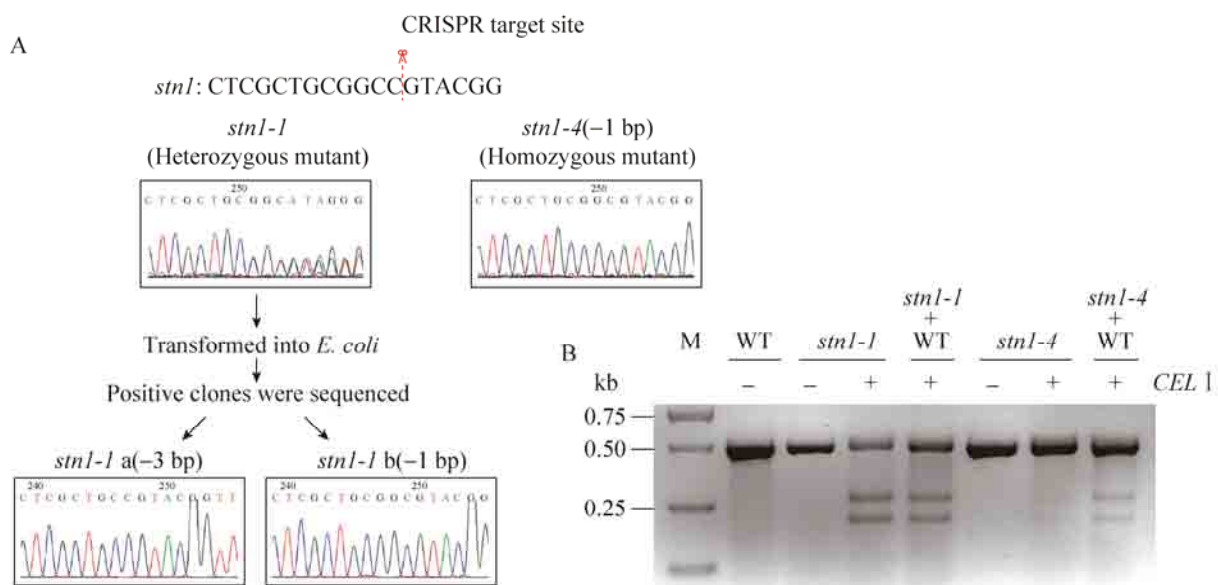


图 5 *CEL I* 酶检测两种不同突变类型的突变株 (A: *stn1-1* 和 *stn1-4* 两种突变株的测序结果; B: 利用 *CEL I* 酶策略检测杂合和纯合突变株)

Fig. 5 Identification of two types of mutations using *CEL I* enzyme. (A) Sequences of *stn1-1* and *stn1-4*. (B) Identification of heterozygous and homozygous mutants using *CEL I* strategy.

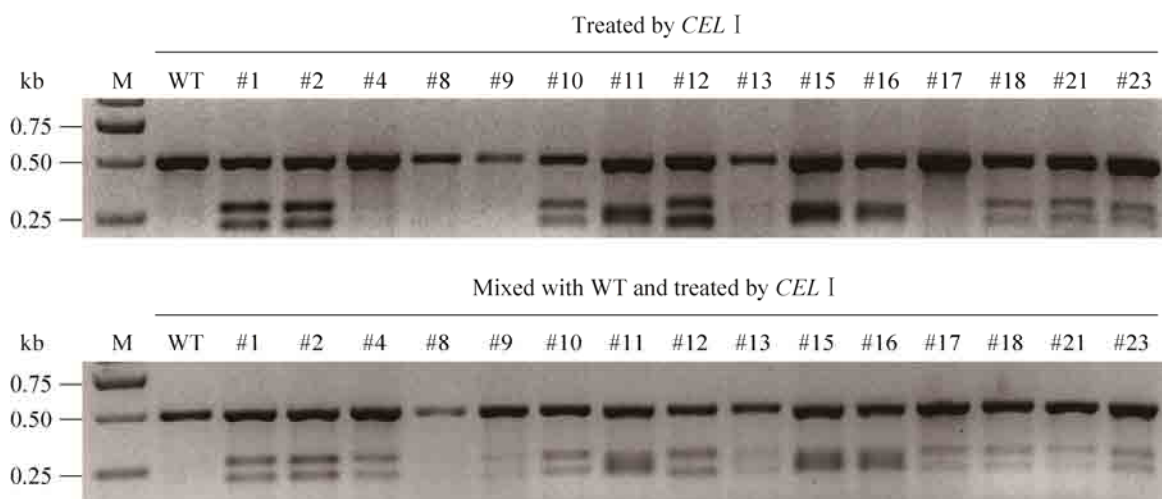


图 6 *CEL I* 酶策略检测 CRISPR 介导的 *stn1* 基因突变株

Fig. 6 Identification of *stn1* knockout mutant mediated by CRISPR/Cas9 using *CEL I* strategy.

3 讨论

3.1 *CEL I* 酶策略与其他方法用于鉴定 CRISPR 基因敲除株的比较

CEL I 酶具有切割异源双链中非配对碱基位点的特性, 该特性已被广泛用于突变体的鉴定, 本研究采用 *CEL I* 的粗提物, 通过优化酶的用量、作用时间、PCR 反应系统及采用检测方法, 建立了一个廉价、高效的检测 CRISPR 方法创制的突变体, 并且所有集成于一管的检测方法, 其正确率达 100%。该方法可以广泛用于 CRISPR 基因敲除个体初筛及后代鉴定。

商品化的产品 *CEL I* 价格较高, 单个样品检测成本大于 3 元人民币, 而 *CEL I* 粗提物来源于廉价的芹菜, 从 600 g 材料就能得到 15–20 mL 的蛋白粗提物, 每次用量也只需 0.5 μ L, 一次提取的量至少可用于 30 000 个样品的鉴定。与采用聚丙烯酰胺凝胶电泳的方法相比^[24], 采用 *CEL I* 酶的方法, 只需要使用常规的琼脂糖凝胶

电泳, 操作更加方便、省时。而且, 采用 *CEL I* 酶粗提物时, 我们扩增 PCR 产物一般为 1 kb 左右, 有利于检测大片段的缺失。

T7E1 法^[25]与 *CEL I* 策略法非常相似, 其工作原理与 *CEL I* 法相同, 都是通过错配酶识别并切割异源双链 DNA, 从而达到基因型分型的目的。该方法也是目前广泛应用的 CRISPR 突变个体检测方法。相比于 *CEL I* 而言, 该方法商品化程度更高, 应用面更广。然而在大量样品的检测筛选方面, *CEL I* 酶策略只需要获得芹菜粗提物, 大大降低了成本, 更能适应大量样品的筛选, 表现出比 T7E1 更高的性价比。

PCR-SSCP 是一种简单、快速的点突变筛查手段^[26], 其技术原理是 PCR 扩增后的 DNA 片段经变性成单链 DNA, 单链 DNA 在中性聚丙烯酰胺凝胶中电泳时形成不同的立体构象, 其构象直接影响泳动速率, 相同长度的 DNA 单链其核苷酸序列仅有单个碱基的差别, 就可以产生立体构象的不同, 产生不同的泳动带。PCR-SSCP

的缺点是存在假阴性和假阳性,对长度不超过 300 bp 的待测片段的检出率为 70%–80%。与 PCR-SSCP 相比,CEL I 粗提物检测法只需要简单的琼脂糖凝胶电泳,而且可检测片段不受长度限制,检出突变的效率高。

PCR/RE (PCR/restriction enzyme) 检测法是将靶点切割位点设计在限制性内切酶识别位点上,CRISPR/Cas9 诱导的突变会改变该酶切位点,被突变的靶序列不能被限制性内切酶切断,从而可以通过对酶切基因组 DNA 进行 PCR 扩增来鉴定突变。其检测特定是:操作简单,突变检出效率高。缺点是 CRISPR 系统作用的靶点选择受到限制,尤其是需要对特定碱基进行突变时。各种酶的使用也需要一定的费用。与采用 PCR/RE (PCR/restriction enzyme) 检测法鉴定 CRISPR 突变个体相比^[27],使用 CEL I 酶鉴定的方法可以灵活选择靶位点,使用的是能针对所有位点的廉价的酶。

DNA 序列测定法 (Direct sequencing, DS) 是 PCR 产物经克隆后测序或直接用 PCR 产物进行测序,可以直接提供突变的位点和序列。在采用 CRISPR 系统获得高效率突变的情况下,可以采用 PCR 产物直接测序的方法进行鉴定。但在突变效率不高或进行子代突变体遗传规律分析时,与 DNA 序列测定法相比,CEL I 酶策略具有廉价的特点。

3.2 不同 PCR 体系对 CEL I 酶策略效果有影响

采用 CEL I 酶粗提物进行突变体的鉴定,除廉价外,还需要做到快速和高效。为此,通过整合检测过程的各个环节包括 PCR、产物变复性和酶切,达到在同一管中操作。我们发现,

不同的 PCR 体系对基因的扩增效果有影响,且不同的缓冲液对 CEL I 酶的粗提物的切割效率也有影响。其中 Blend Taq 聚合酶在 LA Taq 聚合酶所配套的 LA buffer 中能表现出更加优越的 PCR 效率以及切割效率。由于不同缓冲液的组成成分不同,对聚合酶和 CEL I 酶切的作用效率存在差异。因此在进行 CEL I 酶策略鉴定的时候应重视 PCR 体系的选择,建议先通过预实验挑选最适合的 PCR 体系。

3.3 CEL I 酶策略对 CRISPR 突变材料进行鉴定和分型

采用 CRISPR 创制的突变个体多数表现为少量的碱基缺失或增加,且创制的个体在 T₀ 代可能为野生型、杂合突变、纯合突变或双位点突变。CEL I 具有可以切割异质双链 DNA 的特点,可以对 DNA 双链中不配对的核苷酸所在的位置进行切割。利用 CEL I 酶的这一特点,可以对 CRISPR 突变动植物材料进行鉴定。采用该方法还可以对突变类型进行区分。其原理是:杂合突变和双位点突变个体的 PCR 产物变性、复性后能被 CEL I 酶识别。纯合突变个体 PCR 产物与野生型个体 PCR 产物混合后经变、复性处理后可以被 CEL I 酶识别。

REFERENCES

- [1] 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): 5429–5433.
- [2] Zhang BX, Sun QX, Li HF. Advances in genetic modification technologies. *Chin J Biotech*, 2015, 31(8): 1162–1174 (in Chinese).

- 张白雪, 孙其信, 李海峰. 基因修饰技术研究进展. 生物工程学报, 2015, 31(8): 1162–1174.
- [3] Mali P, Yang LH, Esvelt KM, et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*, 2013, 339(6121): 823–826.
- [4] Cong L, Ran FA, Cox D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 2013, 339(6121): 819–823.
- [5] Shan QW, Wang YP, Li J, et al. Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(8): 686–688.
- [6] Miao J, Guo DS, Zhang JZ, et al. Targeted mutagenesis in rice using CRISPR-Cas system. *Cell Res*, 2013, 23(10): 1233–1236.
- [7] Feng ZY, Zhang BT, Ding WN, et al. Efficient genome editing in plants using a CRISPR/Cas system. *Cell Res*, 2013, 23(10): 1229–1232.
- [8] Nekrasov V, Staskawicz B, Weigel D, et al. Targeted mutagenesis in the model plant *Nicotiana benthamiana* using Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(8): 691–693.
- [9] Jiang WZ, Zhou HB, Bi HH, et al. Demonstration of CRISPR/Cas9/sgRNA-mediated targeted gene modification in Arabidopsis, tobacco, sorghum and rice. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41(20): e188.
- [10] Liang Z, Zhang K, Chen KL, et al. Targeted mutagenesis in *Zea mays* using TALENs and the CRISPR/Cas system. *J Genet Genomics*, 2014, 41(2): 63–68.
- [11] Feng ZY, Mao YF, Xu NF, et al. Multigeneration analysis reveals the inheritance, specificity, and patterns of CRISPR/Cas-induced gene modifications in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2014, 111(12): 4632–4637.
- [12] Qu LJ, Guo DS, Zhang JZ, et al. The application of CRISPR/Cas system in plant genome editing. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 2015, 27(1): 64–70(in Chinese).
- 瞿礼嘉, 郭冬姝, 张金喆, 等. CRISPR/Cas 系统在植物基因组编辑中的应用. *生命科学*, 2015, 27(1): 64–70.
- [13] Symington LS, Gautier J. Double-strand break end resection and repair pathway choice. *Annu Rev Genet*, 2011, 45(1): 247–271.
- [14] Shan QW, Gao CX. Research progress of genome editing and derivative technologies in plants. *Hereditas (Beijing)*, 2015, 37(10): 953–973 (in Chinese).
- 单奇伟, 高彩霞. 植物基因组编辑及衍生技术最新研究进展. *遗传*, 2015, 37(10): 953–973.
- [15] Till BJ, Burtner C, Comai L, et al. Mismatch cleavage by single-strand specific nucleases. *Nucleic Acids Res*, 2004, 32(8): 2632–2641.
- [16] Han SY, Yang ML, Gai JY, et al. Crude extraction and activity assay of *CEL I*. *Hereditas (Beijing)*, 2006, 28(9): 1112–1116 (in Chinese).
- 韩锁义, 杨玛丽, 盖钧镒, 等. *CEL I* 酶的粗提取及其活性检测. *遗传*, 2006, 28(9): 1112–1116.
- [17] Cui HR, Li CN, Wu DX, et al. A detection method for point mutations based on *CEL I* crude extract. *J Nucl Agric Sci*, 2011, 25(1): 37–42 (in Chinese).
- 崔海瑞, 李春楠, 吴殿星, 等. *CEL I* 粗提物用于点突变检测的技术. *核农学报*, 2011, 25(1): 37–42.
- [18] Li MR, Li XX, Zhou ZJ, et al. Reassessment of the four yield-related genes *Gn1a*, *DEP1*, *GS3*, and *IPA1* in rice using a CRISPR/Cas9 system. *Front Plant Sci*, 2016, 7: 377.
- [19] Ma XL, Zhang QY, Zhu QL, et al. A robust CRISPR/Cas9 system for convenient, high-efficiency multiplex genome editing in monocot and dicot

- plants. *Mol Plant*, 2015, 8(8): 1274–1284.
- [20] Till BJ, Zerr T, Comai L, et al. A protocol for TILLING and ecotilling in plants and animals. *Nat Protoc*, 2006, 1(5): 2465–2477.
- [21] Martín V, Du LL, Rozenzhak S, et al. Protection of telomeres by a conserved Stn1-Ten1 complex. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(35): 14038–14043.
- [22] Song XY, Leehy K, Warrington RT, et al. STN1 protects chromosome ends in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(50): 19815–19820.
- [23] Huang XZ, Qian Q, Liu ZB, et al. Natural variation at the DEP1 locus enhances grain yield in rice. *Nat Genet*, 2009, 41(4): 494–497.
- [24] Zhu XX, Xu YJ, Yu SS, et al. An efficient genotyping method for genome-modified animals and human cells generated with CRISPR/Cas9 system. *Sci Rep*, 2014, 4: 6420.
- [25] Mashal RD, Koontz J, Sklar J. Detection of mutations by cleavage of DNA heteroduplexes with bacteriophage resolvases. *Nat Genet*, 1995, 9(2):177–183.
- [26] Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, et al. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, 86(8): 2766–2670.
- [27] Gao X, Ma N, Wang DY, et al. Characterize CRISPR/Cas9 established *Chrm3* gene knockout mice by enzyme restriction. *Chin J Biochem Mol Biol*, 2016, 32(4): 404–409 (in Chinese).
高旭, 马宁, 王大勇, 等. 限制性内切酶策略鉴定 CRISPR/Cas9 介导的 *Chrm3* 基因敲除小鼠. *中国生物化学与分子生物学报*, 2016, 32(4): 404–409.

(本文责编 郝丽芳)