

靶向小鼠 KRT5 基因的 CRISPR/Cas9 系统设计与打靶效力分析^①

王 蓉^{lab②}, 陈圆圆^{lab}, 潘向和^{lab}, 李 鑫², 于鸿浩^{lab}, 岳鹏鹏^{lab③}

(1. 桂林医学院 a. 智能医学与生物技术学院; b. 广西高校生物化学与分子生物学重点实验室, 广西 桂林 541199; 2. 桂林医学院第二附属医院放射科, 广西 桂林 541199)

摘要 目的: 单纯型大疱性表皮松解症(EBS)是一种单基因遗传性皮肤病, KRT5 基因突变是其主要的遗传学病因。本研究在综合分析人 KRT5 基因的致病突变位点后, 在其附近设计、合成 3 条 sgRNA 序列, 并构建靶向小鼠 KRT5 基因的 CRISPR/Cas9 系统, 以模拟人 KRT5 基因的致病突变。方法: 分析数据库中人 KRT5 基因的致病突变位点, 设计 3 条小鼠拟突变位点 sgRNA 序列; 构建 pGL3-U6-KRT5-sgRNA 表达质粒, 然后采用 Lipofectamine™ 3000 转染试剂将 pGL3-U6-KRT5-sgRNA 表达质粒与 pST1374-NLS-flag-linker-Cas9 表达质粒共同转染入小鼠 N2a 细胞, 再以嘌呤霉素和杀稻瘟菌素进行筛选; 采用 PCR 产物测序和 TA 克隆测序鉴定突变序列, 分析打靶效力。结果: 成功构建了 3 个 pGL3-U6-KRT5-sgRNA 表达质粒, 将其转入小鼠 N2a 细胞后, 打靶 KRT5 基因的效力最高为 64.29%, 最低为 16.67%。结论: 设计的 CRISPR/Cas9 系统可以有效打靶小鼠 KRT5 基因, 为后续建立 KRT5 基因编辑的小鼠模型, 探讨 KRT5 基因在 EBS 发生、发展中的作用和机制奠定基础。

关键词: CRISPR/Cas9; 基因编辑; 单纯型大疱性表皮松解症; KRT5

中图分类号: R393

文献标志码: A

文章编号: 1008-2409(2022)05-0001-07

CRISPR/Cas9 system design and target effectiveness verification targeting KRT5 gene of mice^①

WANG Rong^{lab②}, CHEN Yuanyuan^{lab}, PAN Xianghe^{lab}, LI Xin², YU Honghao^{lab}, YUE Pengpeng^{lab③}.

(1. a. School of Intelligent Medicine & Biotechnology; b. Key Laboratory of Biochemistry & Molecular Biology of Guangxi Institutions of Higher Learning, Guilin Medical University, Guilin 541199; 2. Dept. of Radiology, the 2nd Affiliated Hospital of Guilin Medical University, Guilin 541199, China)

Abstract Objective: Epidermolysis bullosa simplex (EBS) is a monogenic hereditary skin disease, and KRT5 gene mutation is the main genetic cause. After a comprehensive analysis of the pathogenic mutation sites of the human KRT5 gene in this study, three sgRNA sequences targeting the mouse KRT5 gene were designed and synthesized nearby to mimic the pathogenic mutations of the human KRT5 gene, and the corresponding CRISPR/Cas9 system was constructed so as to validate mimic disease-causing mutations in

① 基金项目: 国家自然科学基金项目(31860302); 广西科技基地和人才专项(2019AC20329)。

② 作者简介: 王蓉(1999—), 女, 甘肃定西人, 2022年桂林医学院生物技术本科毕业, 现就读于兰州大学生命科学学院, 生物化学与分子生物学专业硕士。

③ 通信作者: 岳鹏鹏, E-mail: yue_pengpeng@163.com。

the human KRT5 gene. Methods: The pathogenic mutation site of human KRT5 was analyzed through the database, three sgRNA sequences near the mutagenic site of mice was designed, and pGL3-U6-KRT5-sgRNA expression plasmid was constructed. Next, the pGL3-U6-KRT5-sgRNA expression plasmid and the pST1374-NLS-flag-linker-Cas9 expression plasmid were co-transfected into mouse N2a cells through the Lipofectamine™ 3000 transfection reagent kit, and then puromycin and blasticidal were used for screening. Finally, PCR product sequencing and TA cloning sequencing methods were used to analyze the targeting efficiency. Results: The pGL3-U6-KRT5-sgRNA expression plasmid was successfully constructed and co-transfected into mouse N2a cells, with the highest and lowest efficacy of targeting KRT5 gene were 64.29% and 16.67% respectively. Conclusion: The designed CRISPR/Cas9 system can effectively target the mouse KRT5 gene, which lays a foundation for the subsequent establishment of a KRT5 gene-edited mouse model and for exploring the role and mechanism of KRT5 gene in the occurrence and development of EBS.

Keywords: CRISPR/Cas9; gene editing; epidermolysis bullosa simplex (EBS); KRT5

2020 年诺贝尔化学奖授予两位在基因编辑领域做出巨大贡献的科学家,这也是对 CRISPR/Cas9 的认可。CRISPR/Cas9 作为一种超选择性和精确的基因编辑工具在编辑同一细胞中的多个基因方面具有明显优势,以及在动物模型构建和疾病治疗方面具有巨大潜力。CRISPR/Cas9 系统是在微生物中发现的重复间隔序列^[1],经基因工程改造后作为基因编辑工具被广泛应用。相比于锌指蛋白核酸酶(zinc-finger nucleases, ZFNs)和转录激活因子样效应物核酸酶(transcription activator-like effector nucleases, TALENs)这两种基因编辑技术^[2],CRISPR/Cas9 系统具有简单、方便、高效和低成本等优点^[3-4]。CRISPR/Cas9 系统主要由 Cas9 蛋白(CRISPR-associated protein 9)和单链向导 RNA(single guide RNA, sgRNA)两部分组成。Cas9 蛋白是一种 RNA 依赖的 DNA 内切酶,与 sgRNA 形成复合物。sgRNA 通常是一种包含 20 个 nt 核苷酸的小 RNA,与靶序列互补,将 Cas9 蛋白招募到靶点,发挥 DNA 切割功能^[5]。通过改变 sgRNA 的靶向序列,Cas9 几乎可以与基因组任何位置的 DNA 结合并切割。真核细胞将通过同源重组(homologous recombination, HR)或非同源末端连接(non-homologous end joining, NHEJ)的方式来修复断裂后的 DNA 双链,从而达到对目标 DNA 进行编辑的目的^[6-7]。

遗传性大疱性表皮松解症(epidermolysis bullosa,

EB)主要是因皮肤中结构蛋白的遗传基因突变导致的单基因遗传性皮肤病。临床主要表现为皮肤及黏膜松解,轻微摩擦即可致真皮与表皮分离而反复出现水疱^[8]。根据 2008 年最新的 EB 分类,主要分为单纯型大疱性表皮松解(epidermolysis bullosa simplex, EBS),交界型大疱性表皮松解症(junctional epidermolysis bullosa, JEB),营养不良型大疱性表皮松解症(dystrophic epidermolysis bullosa, DEB)和 Kindler 综合征(kindler syndrome, KS),其中 EBS 是最常见的一类,发生率为 1:50 000^[9]。患者一般为常染色体显性(AD)或隐性(AR)遗传,其中 75% 的患者是由于编码角蛋白 5 的 KRT5 基因突变所致^[10]。近年来,我国关于 EBS 病例的报道越来越多,但是报道中只是对临床病例进行基因检测,停留在临床特征与基因分析层面,后续并没有进行深入研究^[11-13]。因此,有必要通过 CRISPR/Cas9 系统对该基因进行打靶,以便深入了解 KRT5 基因的致病机制,探究可行的医疗策略。

1 材料与方法

1.1 实验材料与仪器

主要实验材料:小鼠来源神经瘤母细胞 N2a, pGL3-U6-sgRNA 质粒, pST1374-NLS-flag-linker-Cas9 表达质粒均为上海科技大学黄行许教授惠赠; Solution I/Ex, Taq/Premix, Taq/10×Ex, Taq Buffer 和

感受态菌株 DH5 α 购于宝日医生物技术(北京)有限公司;DNA 纯化和质粒小提试剂盒购于天根生化科技有限公司;TransDirect[®] Mouse Genotyping 试剂盒购于北京全式金生物技术有限公司;嘌呤霉素,杀稻瘟菌素,Opti-MEM 1 培养基,DMEM(高糖)培养基,胎牛血清和 Lipofectamine[™] 3000 转染试剂盒等购于赛默飞世尔公司;仪器主要包括 CO₂ 恒温细胞培养箱,恒温摇床,冷冻离心机以及 PCR 仪等^[14-15]。

1.2 实验方法

本研究主要包括 sgRNA 的设计、表达载体的构建、细胞转染及筛选、打靶位点 DNA 的 PCR 扩增以及 TA 克隆测序等^[14-15],具体步骤如下。

1.2.1 sgRNA 序列的设计与表达质粒构建

检索数据库 OMIM 和 ClinVar 中 KRT5 致病突变位点,综合分析后,选择两个突变位点作为靶标。使用 Clustal Omega 软件比对人和小鼠 KRT5 蛋白序列,找到靶标对应的小鼠 KRT5 氨基酸残基,即为拟突变位点;最后根据氨基酸残基的编码序列设计 3 条 sgRNA。化学合成时,分别在 3 条特异靶向小鼠 KRT5 基因的 sgRNA 序列的 5' 端和 3' 端加上黏性末端,经退火、连接、转化、质粒提取、Sanger 测序等实验得到 pGL3-U6-KRT5-sgRNA1、pGL3-U6-KRT5-sgRNA2 和 pGL3-U6-KRT5-sgRNA3 质粒。

1.2.2 细胞培养和转染

小鼠 N2a 细胞接种于 6 孔板中,将构建好的 sgRNA1、sgRNA2 和 sgRNA3 质粒分别与 Cas9 质粒通过 Lipofectamine[™] 3000 转染试剂(Invitrogen[™])共转染至 N2a 细胞中,实验组每孔分别转染 sgRNA 质粒和 Cas9 质粒各 2 500 ng。转染后将合适浓度的嘌呤霉素和杀稻瘟菌素 S 同时加入培养基,通过药物筛选将得到的阳性共转染细胞用于后续实验。

1.2.3 基因组 DNA 扩增及测序

将收集到的阳性细胞按 TransDirect Animal Tissue PCR Kit 说明书操作进行裂解,并以其作为模板扩增打靶位点。PCR 扩增上游引物序列为 5'-GGTCAGTTCAGCTACCCACG-3',下游引物序列为 5'-AGTAAGCCAAAGACGCCAGT-3'。用 Sanger 测序法对 PCR 产物进行测序,若打靶位点

出现套峰,则能够初步证明发生基因编辑。

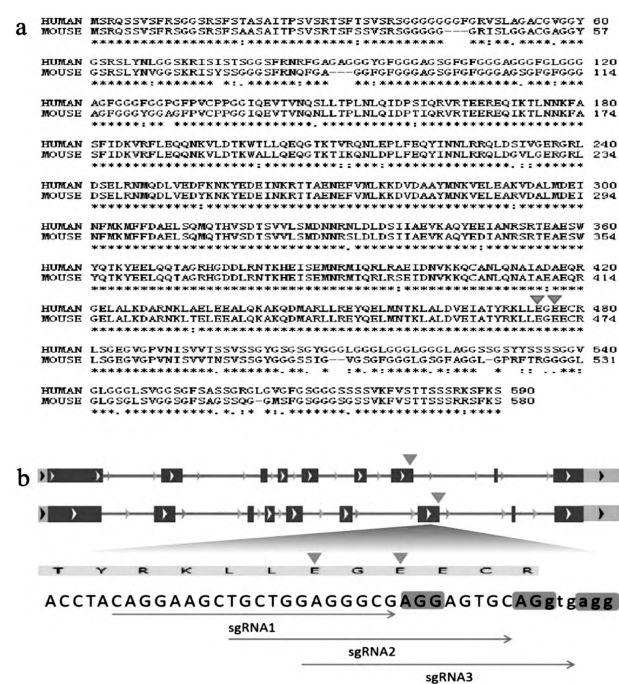
1.2.4 打靶效力分析

对测序后初步判定发生了基因编辑的 PCR 产物进行胶回收,得到的胶回收产物与 pMD[™] 19-T 载体进行连接、转化以及菌液 PCR 筛选阳性克隆后,将阳性克隆再次进行测序,以分析靶点基因型和打靶效力。

2 结果

2.1 sgRNA 的设计与载体构建

OMIM 中收录 21 个 KRT5 基因致病性突变, ClinVar 中收录了 53 个 KRT5 基因致病性突变,综合分析不同变异位点导致的疾病表型、突变频率等因素,选择人 Dowling-Meara 型 EBS 中的两个突变位点 GLU475 和 GLU477 作为参考位点。Clustal Omega 软件蛋白序列比对结果发现人 KRT5 蛋白 GLU475 和 GLU477 位点分别与小鼠 KRT5 蛋白 GLU469 和 GLUG471 相对应,因此,在小鼠 KRT5 和 GLUG471 位点附近设计 3 条 sgRNA,见图 1。

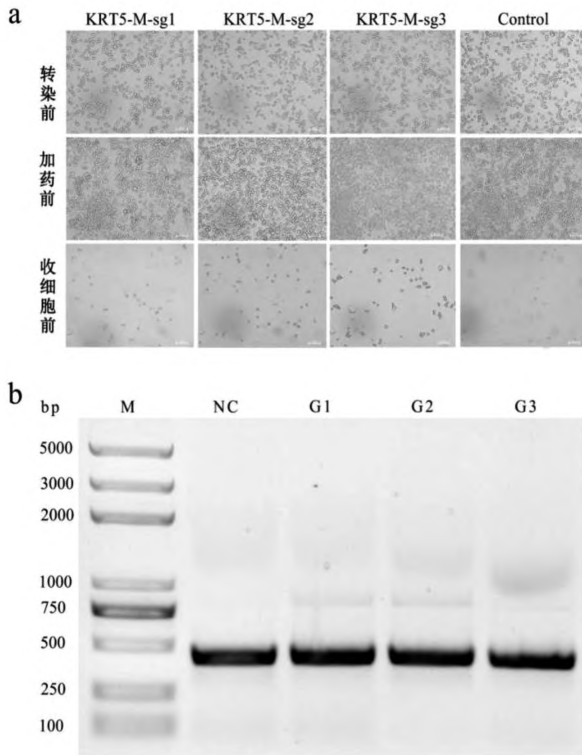


a:人和小鼠 KRT5 蛋白序列对比图,三角号代表人参考位点和小鼠拟突变位点;b:sgRNA 打靶示意图,三角号代表拟突变位点,蓝色箭头线条标示 sgRNA 序列,灰色背景序列为 PAM 结构,小写字母为内含子序列

图 1 sgRNA 设计示意图

2.2 细胞转染、筛选及阳性鉴定

分别将 sgRNA 质粒与 Cas9 质粒共转染 N2a 细胞,利用药物成功筛选出阳性共转染细胞,经裂解后 PCR 扩增,得到打靶区域目标 DNA 片段,见图 2。

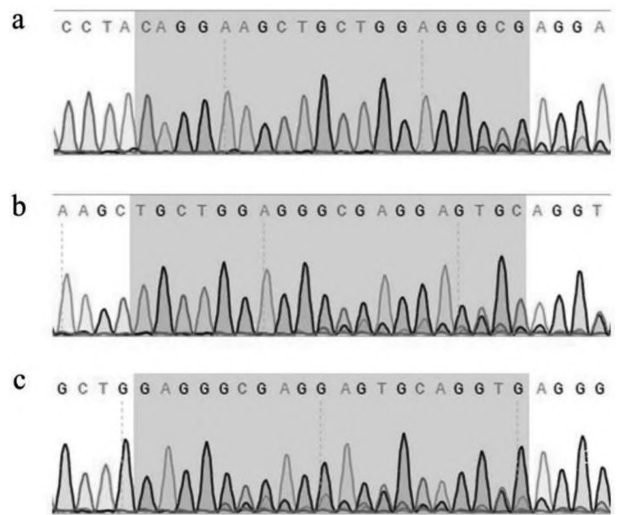


a: 细胞转染图; b: 打靶位点 DNA 的 PCR 扩增结果, M 代表 Marker, NC 表示野生型, G1、G2 和 G3 分别为 sgRNA1-Cas9、sgRNA2-Cas9 和 sgRNA3-Cas9 转染型

图 2 细胞转染和打靶位点的 PCR 产物电泳图

2.3 打靶效力

PCR 产物测序发现 3 个打靶位点均存在套峰,初步证明发生了基因编辑,见图 3。通过 TA 克隆测序结果表明 sgRNA1 靶点成功测序 14 个样品,其中有 9 个分别发生碱基的缺失、替换和插入,编辑效率达 64.29%;sgRNA2 靶点成功测序 18 个样品,其中有 3 个发生碱基的缺失,编辑效率达 16.67%;sgRNA3 靶点成功测序 19 个样品,其中有 6 个分别发生碱基的缺失和替换,编辑效率达 31.58%,见图 4。



a、b、c 灰色阴影部分分别为 sgRNA1、sgRNA2 和 sgRNA3 靶点基因编码序列

图 3 打靶位点 PCR 产物测序图

sgRNA1	
ATCGCCACCTACAGGAAGCTGCTGGAGGGCGAGGAGTGC	野生型
ATCGCCACCTACAGGAAGCTGCTaGAGGGcCGAGGAGTGC	(+1,+1,1/14)
ATCGCCACCTACAGGAAGCTGCTGGAGG -CGAGGAGTGC	(-1,1/14)
ATCGCCACCTACAGGAAGCTGCTGGAGGGcCGAGGAGTGC	(+1,1/14)
ATCGCCACCTACAGGAAGCTGCTGGAGG -CGAGGAGTGC	(-1,1/14)
ATCGCCACCTACAGGAAGCTGCTG -----AGGAGTAc	(-7,+1,1/14)
ATCGCCACCTACAGGAAGT-----TGC	(-18,4/14)
sgRNA2	
CTACAGGAAGCTGCTGGAGGGCGAGGAGTGCAGGTGAGG	野生型
CTACAGGAAGCTGCTGGAGG -CGAGGAGTGCAGGTGAGG	(-1,2/18)
CTACAGGAAGCTGCTGGAGGG----GAGTGCAGGTGAGG	(-4,1/18)
sgRNA3	
GGAAGCTGCTGGAGGGCGAGGAGTGCAGGTGAGGGCCGT	野生型
GGAAGCTGCTGGAGG -CGAGGAGTGCAGGTGAGGGCCGT	(-1,3/19)
GAAGCTGCTGGcG--CGAGGAGTGCAGGTGAGGGCCGT	(-2,+1,1/19)
GGAAGCAtgTGGAGGGCGAGGAGTGCAGGTGAGGcCCGT	(+3,1/19)
GGAAGCTGCTGGAGGGcCGAGGAGTGCAGGTGAGGGCCGT	(+1,1/19)

加粗字体代表靶点序列;“-”代表缺失;“+”代表插入;小写字母代表插入序列或替换序列

图 4 打靶位点突变基因型序列

3 讨论

传统的基因敲除技术主要是应用同源重组原理,通过基因靶向技术使突变基因的功能丧失或插入目的基因^[16]。而 CRISPR/Cas9 系统,利用与目的基因具有同源性的 sgRNA 能够特异性结合基因组 DNA 形成杂合双链,且特定的核酸内切酶 Cas9 能够

对感兴趣的几乎任意 DNA 序列进行切割并造成 DNA 的双链断裂(double-strand break, DSB), 然后通过非同源末端连接(non-homologous end joining, NHEJ)对切断的双链进行修复, 从而在切割位点产生随机插入、缺失或者替换^[17]。因此, 高效靶向目标基因的 sgRNA 以及 Cas9 是 CRISPR/Cas9 系统进行基因敲除不可缺少的两个重要元件。其中, sgRNA 是 CRISPR/Cas9 系统能否特异性编辑目标基因的关键^[18], 这也是本研究中首先进行检索和筛查确定拟突变位点的原因所在。分别通过检索 OMIM 和 ClinVar 数据库中 KRT5 基因致病性突变位点, 以及比对人和小鼠 KRT5 蛋白序列, 最后确定与人 KRT5 突变对应的小鼠基因组拟突变位点, 并根据氨基酸残基的编码序列设计 3 条 sgRNA。

目前, 所发现的有关 KRT5 基因突变的种类有碱基的缺失或插入、基因杂合点突变等多种突变^[19], 此外, 即使是一个基因发生的突变可能会导致不同的 EBS 表型, 不同基因发生的突变也可能导致同一个 EBS 表型^[20], 所以 EBS 的临床表型类型依然是不确定的。目前认为最有效的方法是咨询和预防, 尽管遗传学基础已被阐明, 但仍无有效的治疗方案, 主要是对症治疗, 例如手术矫正畸形、药物治疗和饮食疗法等^[21], 因此, 利用 KRT5 基因编辑小鼠作为 EBS 的模型和治疗方法的工具, 仍然是目前 EBS 研究的主要方向。但早期关于 KRT5 基因编辑的小鼠模型是在随机位点进行的, 因而与人类疾病不完全相同, 并没有达到模拟人类致病突变研究的目的; 还有像 Peters 等^[22]通过删除启动子和 KRT5 基因的前两个外显子的方法, 不但需要胚胎干细胞、载体构建复杂、耗时且花费大, 且该突变虽然能造成这种疾病, 但有关 KRT5 基因突变的类型并不只有 1 种。因此, 该突变所引起的疾病可能并不适合存在的多种临床表型。而本实验中利用 CRISPR/Cas9 系统, 设计的 3 条 sgRNA 导向序列是根据人的致病突变位点所设计的, 可以介导 Cas9 蛋白高效地切割靶点 DNA, 进而用于编辑小鼠 KRT5 基因, 影响小鼠

KRT5 基因编码蛋白的功能, 从而简便、高效模拟人 EBS 的突变类型。

此外, CRISPR/Cas9 系统高效、特异性编辑目标基因与实验过程中质粒、细胞状态、转染及后续实验过程中的处理细节也有关, 例如, 本实验中所选择的质粒提取试剂盒能够极大限度去除内毒素、RNA 及蛋白等污染, 且该试剂盒提出的质粒纯度高、质量稳定, 不但提高了真核细胞的转染效率, 在一定程度上也提高了 Cas9 的活性, 对后续转染过程中 Cas9 蛋白的切割也很有利。转染时除提高质粒的质量和活性外, 笔者选择 Lipo 3000 转染试剂替代 Lipo 2000 以提高转染效率, 它对细胞作用温和, 毒性低, 可提高转染过程中细胞的活性, 从而提高细胞转染效率。此外, 转染前的细胞状态、细胞密度, 转染过程中药物筛选的浓度、筛选时间, 后期阳性细胞及其 DNA 的获取方法等细节的优化都是影响实验结果的重要因素。

最后 3 个位点的打靶效力分别为 64.29%、16.67% 和 31.58%, 其中 sgRNA1 的打靶效力超过了 50%。而 sgRNA2 和 sgRNA3 的打靶效力较低, 一方面可能与序列本身的特异性有关, 因为 sgRNA 与靶序列的互补配对是保证 Cas9 特异性切割的重要因素, 一般设计的 sgRNA 是一段 20 bp 左右的序列。本次实验中所设计的 sgRNA 均为 20 bp, 查阅近年关于 CRISPR/Cas9 系统进行基因编辑的文章不难发现其设计的 sgRNA 长度大多也在 20 bp 左右, 但其编辑效率却从 11%~100% 不等^[23-26](均为 TA 克隆测序结果所得), 可能与靶序列本身的空间结构有关。此外, 要考虑 sgRNA 的容错性, 在与靶序列存在 1~5 个碱基错配的情况下仍然可以切割与靶序列类似的 DNA 序列^[27]。对此, Fu 等^[28]认为, 可将 sgRNA 的长度适当缩短至 17~18 bp, 这样就可以在保证与靶序列结合的前提下将脱靶效应降低 5 000 倍。PAM 序列下游(+4)到(+7)位置的区域内可能出现的错配, 也会使得基因编辑的效率降低^[27]。另一方面, 采用 TA 克隆测序进行基因型和敲除效率分析存在

局限性,由于TA克隆测序的样本数量有限,突变基因型分析和打靶效率仅仅是在所送测样本范围内进行分析和计算。因此,要想获得更为准确的打靶效率应采用高通量测序方法。

综上所述,本研究设计的sgRNA导向序列能够介导Cas9蛋白特异性切割靶点DNA来编辑小鼠KRT5基因,为后续建立KRT5基因编辑小鼠模型提供了技术条件,并为探讨EBS的发病原理、病发过程及其治疗方法奠定基础。

参考文献:

- [1] JANSEN R, EMBDEN J D, GAASTRA W, et al. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes[J]. *Mol Microbiol*, 2002, 43(6): 1565-1575.
- [2] LIU H, LIU C, ZHAO Y H, et al. Comparing successful gene knock-in efficiencies of CRISPR/Cas9 with ZFNs and TALENs gene editing systems in bovine and dairy goat fetal fibroblasts[J]. *J INTEGR AGR*, 2018, 17(2): 406-414.
- [3] JINEK M, CHYLINSKI K, FONFARA I, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity[J]. *Science*, 2012, 337(6096): 816-821.
- [4] MALI P, YANG L, ESVELT K M, et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9[J]. *Science*, 2013, 339(6121): 823-826.
- [5] WADA N, UETA R, OSAKABE Y, et al. Precision genome editing in plants: state-of-the-art in CRISPR/Cas9-based genome engineering[J]. *BMC Plant Biol*, 2020, 20(1): 234.
- [6] THURTTLE-SCHMIDT D M, LO T W. Molecular biology at the cutting edge: a review on CRISPR/CAS9 gene editing for undergraduates[J]. *Biochem Mol Biol Educ*, 2018, 46(2): 195-205.
- [7] CONG L, RAN F A, COX D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems[J]. *Science*, 2013, 339(6121): 819-823.
- [8] 黄桃源, 文玮, 陈文静, 等. 遗传性大疱性表皮松解症1例报告[J]. *中国烧伤创疡杂志*, 2019, 31(2): 146-148.
- [9] FINE J D, EADY R A, BAUER E A, et al. The classification of inherited epidermolysis bullosa (EB): report of the third international consensus meeting on diagnosis and classification of EB[J]. *J Am Acad Dermatol*, 2008, 58(6): 931-950.
- [10] BOLLING M C, LEMMINK H H, JANSEN G H, et al. Mutations in KRT5 and KRT14 cause epidermolysis bullosa simplex in 75% of the patients[J]. *Br J Dermatol*, 2011, 164(3): 637-644.
- [11] 赵丽, 简玉洛, 张媛, 等. 大疱性表皮松解症手部畸形的外科治疗[J]. *中华整形外科杂志*, 2013, 29(6): 463-464.
- [12] 高丽, 杨桂兰. 阿维A胶囊联合窄谱中波紫外线治疗遗传性大疱性表皮松解症1例[J]. *皮肤病与性病*, 2013, 35(2): 123-124.
- [13] 于灵, 冯素英. 先天性大疱性表皮松解症诊断及治疗进展[J]. *中华皮肤科杂志*, 2016, 49(7): 516-519.
- [14] 岳鹏鹏, 郭俊璠, 于鸿浩, 等. 基于CRISPR/cas9系统高效编辑小鼠Galt基因[J]. *生物技术通报*, 2020, 36(8): 235-242.
- [15] 岳鹏鹏, 唐琴艳, 李欣怡, 等. 靶向小鼠Gaa基因的CRISPR/Cas9系统设计及打靶效力分析[J]. *医学研究生学报*, 2020, 33(10): 1021-1027.
- [16] LAMOTTE L, JACKEROTT M, BUCCHINI D, et al. Knock-in of diphtheria toxin a chain gene at Ins2 locus: effects on islet development and localization of Ins2 expression in the brain[J]. *Transgenic Res*, 2004, 13(5): 463-473.
- [17] 梁振伟, 饶书权, 沈岩, 等. 通过CRISPR/Cas9系统敲除人源PDE10A基因[J]. *基础医学与临床*, 2014, 34(4): 439-443.
- [18] 岳鹏鹏, 杨光宇, 王添贤, 等. 靶向小鼠Tyr基因的CRISPR/Cas9系统构建及打靶效力分析[J]. *生物学杂志*, 2021, 38(5): 34-38, 65.
- [19] ARIN M J, GRIMBERG G, SCHUMANN H, et al. Identification of novel and known KRT5 and KRT14 mutations in 53 patients with epidermolysis bullosa simplex: correlation between genotype and phenotype[J]. *Br J Dermatol*, 2010, 162(6): 1365-1369.

- [20] 王红燕, 刘娜, 肖洁平, 等. KRT5 基因新突变 (p. Gly207Asp) 导致一家系伴斑状色素沉着的单纯性大疱性表皮松解症[J]. 临床皮肤科杂志, 2022, 51(2): 70-73.
- [21] 段妍. 单纯型和显性营养不良型大疱性表皮松解症基因突变研究[D]. 广州: 南方医科大学, 2014.
- [22] PETERS B, KIRFEL J, BÜSSOW H, et al. Complete cytolysis and neonatal lethality in keratin 5 knockout mice reveal its fundamental role in skin integrity and in epidermolysis bullosa simplex[J]. Mol Biol Cell, 2001, 12(6): 1775-1789.
- [23] 杨佳璇, 李明浩, 李艾静, 等. 利用 CRISPR/Cas9 技术敲除 K562 细胞中的 SMIM1 基因[J]. 临床输血与检验, 2022, 24(1): 22-28.
- [24] 高淑慧, 瞿创, 吴凤麟, 等. 基于 CRISPR-Cas9 定向编辑 CCL17 和 CCL22 基因的研究[J]. 中国当代医药, 2018, 25(12): 4-8.
- [25] 赵为民, 涂枫, 王泽平, 等. CRISPR/Cas9 系统介导大鼠 Inhba 基因的编辑[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2021, 47(6): 700-704.
- [26] 郭俊璠, 于鸿浩, 付灿, 等. 靶向小鼠 Idua 基因的 CRISPR/Cas9 系统构建及打靶效率分析[J]. 基因组学与应用生物学, 2021, 40(3): 1400-1409.
- [27] 史梦然, 沈宗毅, 张楠, 等. CRISPR/Cas9 系统在疾病研究和治疗中的应用[J]. 生物工程学报, 2021, 37(4): 1205-1228.
- [28] FU Y, SANDER J D, REYON D, et al. Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs[J]. Nat Biotechnol, 2014, 32(3): 279-284.

[收稿日期: 2022-07-12]

[责任编辑: 向 秋 英文编辑: 阳雨君]