

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2021.23.001

• 基础研究 •

一种 DHFR 介导的可调控的腺嘌呤碱基编辑器的构建*

刘舒 彭凤 段晓悦 万晓玲 罗学廷 李潇飒[△]

(上海交通大学附属第一人民医院眼科 上海 201620)

摘要 目的:单碱基编辑器作为一种高效、精确、低脱靶的编辑系统,目前被广泛应用于生物体中。然而,Cas 核酸酶本身的免疫原性具有引发机体免疫反应的潜在风险,可能阻碍其在基因治疗中的有效和安全使用。因而本研究旨在构建一种由 DHFR 介导的可调控腺嘌呤碱基编辑器(adenine base editor, ABE)。**方法:**将大肠杆菌来源的不稳定结构域-二氢叶酸还原酶(dihydrofolate reductase, DHFR)的一种突变形式,融合于 ABE 的不同相对位置,构建数种 DD-ABE 载体。从已发表的内源基因靶点中挑选三个高效位点检测 DD-ABE 编辑水平。转染四种 DD-ABE 表达载体,用不同浓度 TMP 处理,通过 Western Blot 检测 DD-ABE 融合蛋白的表达水平。共转染 DD-ABE 与 sgRNA 质粒,通过基因组 PCR 扩增以及 Sanger 测序检测基因的编辑水平。**结果:**在构建的四种 DD-ABE 编辑器中,缺乏 TMP 的诱导,各组仅有非常少量的 DD-ABE 融合蛋白表达。TMP 最佳工作浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 。DD-ABE 载体加药组的蛋白表达水平以及基因编辑水平均高于未加药组。ABECD 未加药组的碱基编辑效率最低,加药组的蛋白表达水平和编辑效率与 ABEmax 无明显差异。**结论:**本研究成功构建 ABECD 作为可调控的 ABE,为其体内应用提供了新的技术依据。

关键词: ABE; DHFR; 基因编辑

中图分类号: R-33; Q78; Q75 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2021)23-4401-06

A Tunable Adenine Base Editor Mediated by DHFR*

LIU Shu, PENG Feng, DUAN Xiao-yue, WAN Xiao-ling, LUO Xue-ting, LI Xiao-sa[△]

(Department of Ophthalmology, First People's Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University, Shanghai, 201620, China)

ABSTRACT Objective: The base editors have been widely used in many organisms, processing the advantages of accuracy, efficiency, and low off-target. However, when applying to gene therapy, the immunogenicity of Cas nuclease may trigger immune response that prevents its efficiency and safety. Therefore, the study aims to construct a tunable adenine base editor (ABE) mediated by DHFR. **Methods:** By fusing a destabilizing domain-a mutant form of *Escherichia coli* dihydrofolate reductase (DHFR) to different positions of adenine base editor (ABE), we constructed several DD-ABE vectors. Three of the published endogenous gene targets were selected to test the editing efficiency. We transfected HEK293T cells with the DD-ABE expression vectors in the presence of TMP at different concentrations, and detected the expression of fusing proteins utilizing Western Blot. Then we co-transfected DD-ABE vectors with sgRNAs, and detected the base editing efficiency by PCR amplification and Sanger sequencing. **Results:** In all the ABE-DD editing systems that we constructed, there were tiny amounts of stabilized DD-ABE protein in the absence of TMP. The optimal working concentration of TMP was 10 $\mu\text{mol/L}$. The protein expression and base editing efficiency of DD-ABE treated with TMP were higher than those of untreated group. ABECD possessed the lowest gene editing efficiency in the absence of TMP, and, the protein level of ABECD stabilized by 10 $\mu\text{mol/L}$ TMP could be equal to wild type ABE, leading to comparable genomic editing efficiency. **Conclusions:** The study constructed ABECD as an inducible ABE and provided new theoretical basis for its application in vivo.

Key words: ABE; DHFR; Gene editing

Chinese Library Classification(CLC): R-33; Q78; Q75 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2021)23-4401-06

前言

串联间隔重复序列 (Clustered regularly interspaced short-palindromic repeats, CRISPR)/ 相关蛋白(Cas)系统首先被发现于细菌和古细菌中^[1],经改造后被广泛应用于真核生物细胞和

个体的基因编辑^[2-4]。由 CRISPR/Cas9 介导的腺嘌呤碱基编辑器 (Adenine Base Editor, ABE), 在不产生 DNA 双链断裂的情况下,在哺乳动物内源基因组上实现了高效 A>G (互补链 T>C) 的碱基转换^[5]。至今,ABE 的版本已经经过数轮的改善和进化,新建立的 ABEmax^[6] 经证实进一步提高了靶位点处的编辑效

* 基金项目:国家自然科学基金项目(82000906)

作者简介:刘舒(1997-),女,硕士,研究方向:眼科遗传病,电话:18317010290, E-mail: liu970105@163.com

[△] 通讯作者:李潇飒,女,博士,副研究员,研究方向:基因编辑的应用, E-mail: lixs@shanghaitech.edu.cn

(收稿日期:2021-03-30 接受日期:2021-04-27)

率,并降低了全基因组范围内的脱靶效应。

ABE 需要借助腺相关病毒 (adeno-associated virus, AAV) 递送到体内,后者将介导 ABE 的持续表达^[7]。已有研究表明,相当比例的人体内存在 Cas 蛋白的抗体,预示着 CRISPR/Cas 系统的免疫原性可能阻碍其安全及有效性,甚至可能在治疗时造成明显的毒性,造成临床应用中的潜在风险^[8-10]。即使在免疫豁免的眼球中,Cas 核酸酶的持续表达也可能会引发免疫反应,导致被编辑细胞的移除和严重的组织损伤^[11]。因此理想的体内基因编辑系统应建立在可调控的基因编辑器基础上,在实现有效编辑的同时,调控编辑系统的短期、高效表达,减少临床应用潜在风险。

因此,建立可调控的 ABE 编辑器具有重要的临床意义。目前研究者们已经开发出了基于光遗传学^[12-14]、化学小分子^[15-17]等的可调控 CRISPR/Cas 系统。其中四环素 / 多环素(tet/dox)介导的条件基因治疗方法应用较为广泛,已被证实在小鼠眼中能够有效调节蛋白丰度^[18-20],但其应用仍存在诸多限制,包括表达时间长、需要长时间的诱导激活和清除^[21-24]、高水平四环素将破坏线粒体稳态^[25,26]、分子量过大等问题。因此,分子量较小且快速调控的不稳定结构域有更大的优势^[27,28]。它本质上是一种突变的、不稳定的蛋白,容易被泛素 - 蛋白酶体系统降解。

在本研究中,我们将 ABEmax 与一种大肠杆菌来源的不稳定结构域 - 二氢叶酸还原酶 (dihydrofolate reductase, DHFR/DD) 结合,构建了一个可由其小分子稳定剂甲氧苄啶 (TMP)调控的腺嘌呤编辑器,并证实其实可实现可控表达,且相比于原始 ABE,其编辑效率没有明显降低,为 ABE 的体内应用提供了一定的理论参考依据。

1 材料与方法

1.1 感受态、质粒和细胞

ABEmax 质粒与 pGL3-U6-sgRNA 为上海科技大学陈佳组所赠。DHFR 序列为金维智公司合成得到。大肠杆菌感受态细胞 Trans5α Chemically Competent Cell 购自北京全式金生物公司。人胚肾细胞(HEK293T cell)复苏后在含 5% CO₂ 的 37 °C 恒温培养箱中培养,完全培养基为添加 10% 牛血清 (赛默飞,美国)和 1% 青 - 链霉素 (赛默飞,美国)的杜氏培养基 DMEM (赛默飞,美国)。

1.2 主要试剂

细胞培养所用培养板、胰酶、1×PBS、转染试剂等购自赛默飞公司。DNA 提取试剂盒购自北京全式金生物公司。质粒提取试剂盒购自 Qiagen 公司。高保真 PrimeSTAR® HS DNA 聚合酶购自宝日医生物技术(北京)有限公司。T4 连接酶、限制性内切酶购自 NEB(北京)有限公司。两片段重组酶、多片段重组酶购自诺唯赞公司。DNA 片段纯化试剂盒、DNA 胶回收纯化试剂盒购自 Axygen 公司。本实验所购抗体均购自 abcam 公司。甲

醛、乙醇等常规化学有机试剂均来自国药集团(上海)有限公司。

1.3 sgRNA 表达载体构建

将引物用双蒸水稀释到 10 μmol/L,将两条 sgRNA 的引物通过退火形成二聚体,退火体系 10 μL:1 μL 10×NEB2 buffer、上下游引物各 4.5 μL,退火条件 95 °C 5 min,95 °C 30 s,85 °C 30 s (降 2 °C/s)、降温至 25 °C (降 0.1 °C/s)、4 °C。利用酶切将 pGL3-U6-sgRNA-PGK-puromycin 载体线性化,酶切体系 50 μL:3 μg pGL3-U6-sgRNA 载体、1 μL Bbs I -HF 酶、5 μL 10× Buffer、ddH₂O (双蒸水)补足,37 °C 酶切 3 h。酶切产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分离,回收 DNA 片段。取 2 μL 退火产物与 50 ng pGL3-U6-sgRNA 载体连接。

连接产物转化:加入 50 μL 大肠杆菌 DH5α 感受态细胞悬液,混匀后冰浴 25 min;42 °C 热激 60 s,迅速转移至冰上静置 2 min;加入 0.4 mL LB 液体培养基(不含抗生素),37 °C 振荡培养 40 min,使大肠杆菌恢复正常生理状态,将菌体沉淀涂布到含 50 μg/mL 氨苄霉素的 LB 平板上。次日挑取单克隆菌落进行菌液 PCR 鉴定,扩大培养后提取质粒 DNA,对得到的阳性克隆送测序以进一步鉴定。

1.4 DD-ABE 表达载体构建

构建 ABEmax-3× HA 载体:首先用引物扩增出 3 个拷贝的 HA 序列,纯化回收。ABEmax 质粒用 *Eco*R1 和 *Pme*1 双酶切,酶切产物经 1% 琼脂糖凝胶检测、回收。将 3 个拷贝的 HA 序列与 ABEmax 的 C 端融合,构建质粒 ABEmax-3×HA。

在 ABEmax-3×HA 的基础上构建 DD-ABE 载体:以合成的 DHFR 为模板进行扩增、纯化。对于 ABEmax-3× HA 质粒选择合适的酶切位点进行酶切,得到在不同相对位置线性化的载体,利用同源重组技术将其与纯化后的 DHFR 片段融合,构建 DD-ABE 表达载体。

1.5 细胞转染及基因组提取

提前一天将 HEK293T 细胞接种在多聚赖氨酸处理过的 24 孔板中。16-24 小时后,当细胞达到约 60% 汇合度时,使用 Lipofectamine LTX 进行 DNA 转染,质粒添加比例为 500 ng ABE:340 ng sgRNA,之后加入 0.84 μL Plus 和 1.68 μL Lipofectamine LTX。细胞培养 24 h 后加入 TMP 和嘌呤霉素 (2 μg/mL)连续培养 48 小时。弃去培养基,1×PBS 溶液清洗细胞,收集细胞后用 DNA 快速提取试剂盒提取基因组 DNA。

1.6 PCR 扩增及 Sanger 测序

基因组 DNA 经 PrimeSTAR® HS DNA 聚合酶 PCR 扩增,PCR 体系:100 ng 模板、上下游引物各 1 μL、4 μL dNTP、10 μL 5×PrimeSTAR buffer、0.5 μL PrimeSTAR® HS、加水补足至 50 μL。用于扩增的基因组上下游引物见表 1^[29]。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分离鉴定,并进行 Sanger 测序。测序得到的峰图文件用 EditR 软件(editr_V10)做进一步定量分析。

表 1 基因组 DNA 的扩增引物

Table1 Primers used for genomic DNA amplification in the study

Targeted gene	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
ABE site14	AGTGTGGGATTACAGCCTG	AACCTGAAGCCTTTCCCAA
ABE site16	TCTGTGCCAGTCCCCCAAAT	CAGCAATCCAGCAACACGCG
ABE site19	CTCATTCCCCACTCCCTCC	ATCTCAGCGCTTCGTCAC

1.7 Western Blot

将 HEK293T 细胞接种到 6 孔板中, 分别转染 2 μg ABE 载体, 细胞培养 48 h 后提取蛋白, 并用 Pierce bicinchoninic acid (BCA) 蛋白检测试剂盒测定蛋白浓度。将约 20 mg 蛋白裂解液高温 (99 $^{\circ}\text{C}$) 变性 5 min, 经 8% SDS-PAGE 凝胶电泳分离, 转膜条件 300 mA 150 min, 使用 5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h, 加入 1:1000 稀释的 β -actin 和 HA 标签一抗, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, 次日分别加入相应的二抗, 洗膜后加入化学发光试剂成像, 根据灰带深浅和条带粗细计算灰带灰度值, 得出蛋白相对表达量。

2 结果

2.1 DD-ABE 表达载体的构建

DHFR 作为一种不稳定结构域, 当它与目标蛋白融合时,

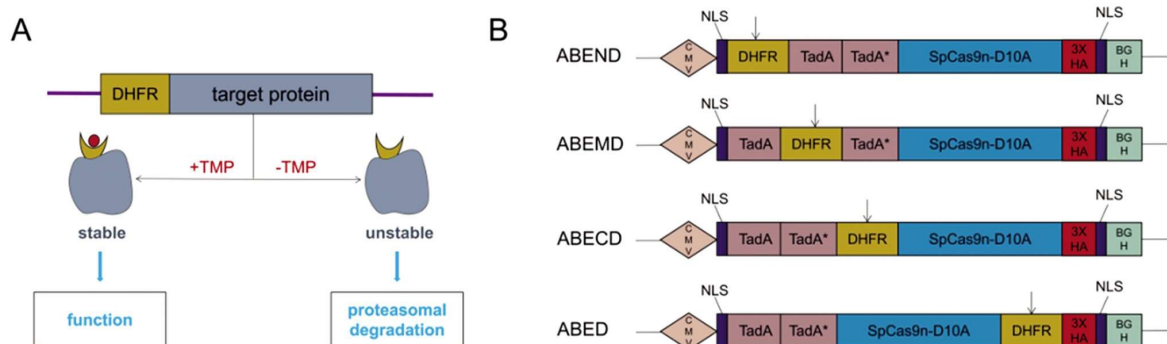


图 1 构建 DD-ABE 表达载体

Fig. 1 Construct DD-ABE vector

Note: NLS: nuclear localization signal, TadA: wild-type *Escherichia coli* adenosine deaminase.

TADA *: mutant *Escherichia coli* adenosine deaminase, SpCas9n-D10A: SpCas9 nuclease carrying D10A mutation, BGH: polyadenosine acid.

2.2 sgRNA 表达载体的构建

ABEmax 的编辑框与 ABE7.10 相同,腺嘌呤脱氨酶催化位于远离 PAM 端的第 4~8 位的腺嘌呤(A)脱氨转化为肌苷(I)。由于肌苷(I)的化学结构与鸟嘌呤(G)相似,被细胞修复机制识别后替换成鸟嘌呤(G),从而完成从腺嘌呤(A)到鸟嘌呤(G)的编辑^[6]。基于此编辑框,我们从已发表的位点中挑选三个高效内源基因靶点,包括 ABE site14、ABE site16、ABE site19^[29,32](图 2)。用于表达 sgRNA 的 pGL3-U6-sgRNA 载体包含一个由 PGK 启动子表达的嘌呤霉素(puromycin),作为细胞瞬时转染后的筛选。在 3 个位点中,ABE site14 被编辑的碱基为第 5、6、7 位的腺嘌呤;ABE site16 被编辑的碱基为第 4、5、7 位的腺嘌呤;ABE site19 位点被编辑的碱基为 4、6、8 位的腺嘌呤。

2.3 不同浓度 TMP 调控 DD-ABE 的蛋白表达

为了实现 ABE 的精确和有效调控,我们在 HEK293T 细胞中共转染 ABEmax-3×HA 与四种 DD-ABE 表达载体,将 TMP 设置为 0、0.01 μmol/L、0.1 μmol/L、1 μmol/L、10 μmol/L、50 μmol/L、100 μmol/L 共 7 个工作浓度梯度,处理 48 小时后收集蛋白,Western Blot 检测各组 ABE 蛋白的表达水平。如图 3 所示,当 TMP 浓度为 0 时,ABEND (图 3A)、ABEMD (图 3B)、ABECD(图 3C)、ABED(图 3D)蛋白表达水平极低,说明缺乏 TMP 的诱导,DD-ABE 不能稳定存在于细胞中。随着 TMP 浓度的升高,四种 DD-ABE 载体的蛋白表达量逐渐增加,并且同时在 10 μmol/L TMP 处理下检测出最高的蛋白表达量。

合成的融合蛋白倾向于被泛素-蛋白酶系统降解。只有在其小分子药物伴侣 TMP 存在时,DD 能够稳定存在,促使目标蛋白在细胞内维持较高的稳态水平并发挥功能^[90](图 1A)。然而,研究证明只有当 DD 耦合在目标蛋白的特定位置时,才能对蛋白起有效的调控作用^[91]。因此,为了获得高效且严格调控的 DD-ABE 编辑器,我们首先在 ABEmax 的 C 端添加 3 个拷贝的 HA 标签,以构建 ABEmax-3×HA 表达载体,通过与 HA 抗体杂交即可检测 ABE 蛋白的表达量。在 ABEmax-3×HA 的基础上,我们进一步设计并构建 DD 分别位于 TadA N 端,TadA 和 TadA* 之间,TadA* C 端以及 nCas9 C 端的表达载体,分别称作 ABEND、ABEMD、ABECD、ABED,他们的 C 端均包含 3 个拷贝的 HA 标签,如图 1B 所示。

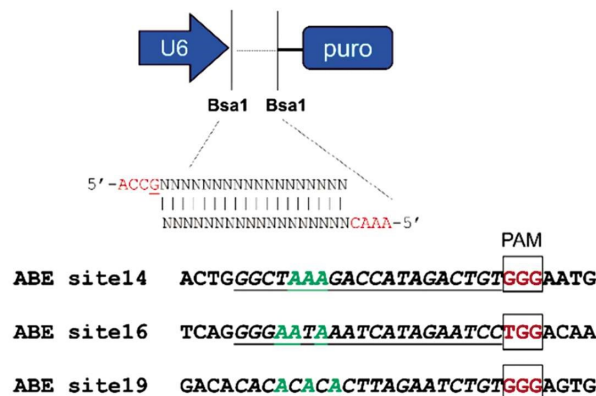


图 2 sgRNA 结构图

Fig. 2 Structure of sgRNA

Note: The edited adenine amino acid (A) is shown in green and NGG PAM is shown in red. U6: U6 promoter; puro: purinomycin.

因此后续实验我们将选择 10 $\mu\text{mol/L}$ TMP 作为工作浓度。

在 10 $\mu\text{mol/L}$ TMP 作用下, ABEND(图 3A)的蛋白表达水平相对于不加药时提高了 3.6 倍, 而 ABEMD(图 3B)、ABECD(图 3C)、ABED(图 3D)的蛋白水平分别提高了 1.7 倍、6 倍、9.4 倍。另外, 将野生型 ABEmax 的蛋白表达水平设为对照, 进一步分析 Western Blot 的结果发现, ABEND 蛋白最高表达水平约为野生型 ABEmax 的 50% ($P < 0.05$), ABEMD 和 ABED 的

蛋白最高表达量约为 ABEmax 的 80% ($P < 0.05$), 而 ABECD 的蛋白表达水平与野生 ABEmax 蛋白表达水平无显著性差异

($P > 0.05$)。由此, 我们推测 ABECD 可能是 ABE 调控表达载体的有效形式, 但仍需从基因编辑水平做进一步验证。

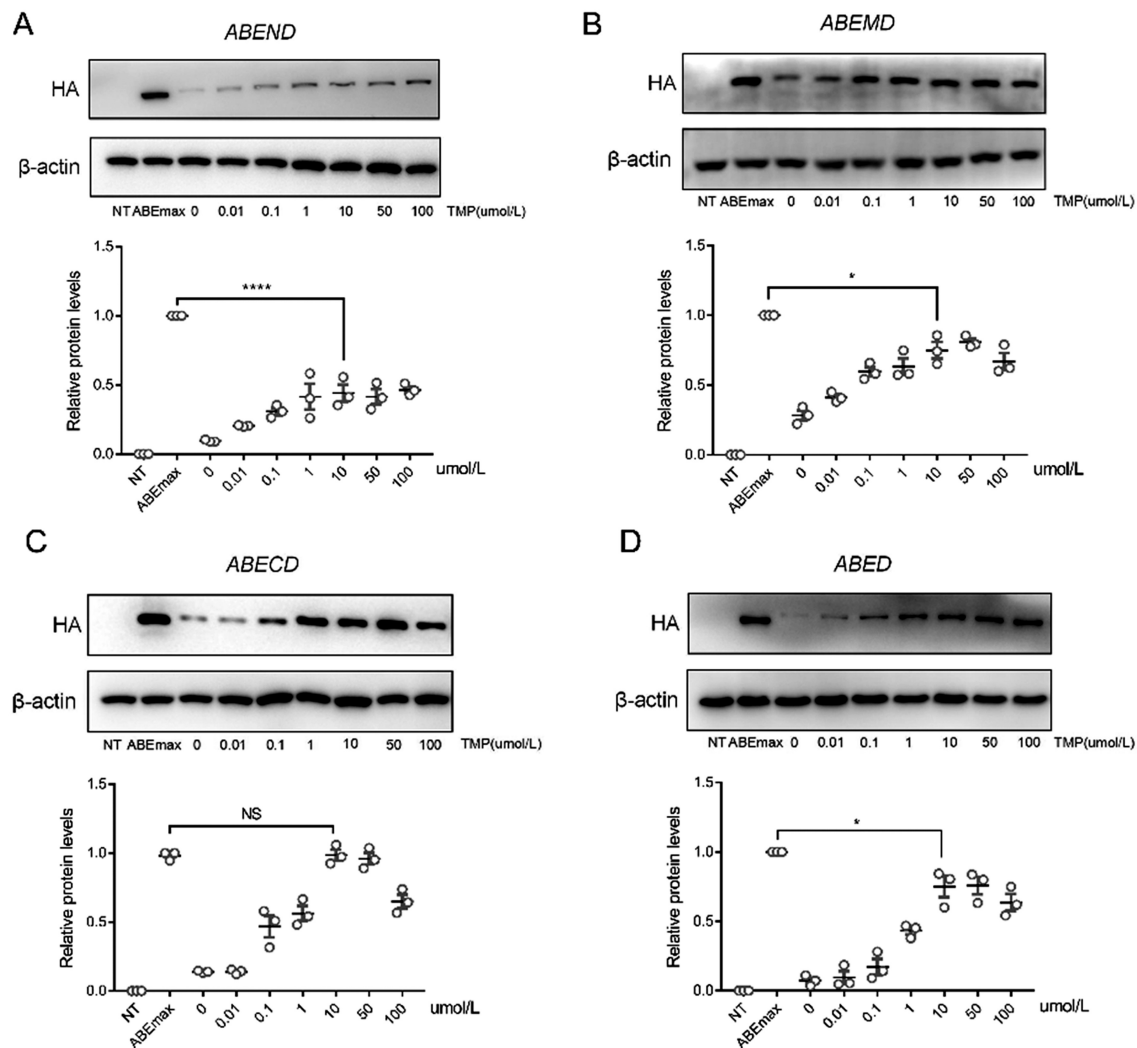


图 3 不同浓度的 TMP 时 ABE-DD 蛋白的表达水平

Fig. 3 Protein levels of ABE-DD stabilized by different concentrations of TMP. (A) ABEND; (B) ABEMD; (C) ABECD; (D) ABED.

Note: Data indicate the means $\pm$ s.d. of three independent experiments. NT, non-transfected group. Data indicated the mean $\pm$ S.E.M. (n=3).

NS: no significance($P > 0.05$), *: $P < 0.05$.

2.4 ABECD 能够精确调控 A>G 的编辑水平

为检测 DD 对编辑效率的影响, 我们分别共转 ABEmax、4 种 DD-ABE 表达载体与 3 种 sgRNA, 检测有无 TMP 存在时的 DD-ABE 的编辑效果, 并与野生型 ABEmax 的编辑水平进行比较。

首先, 在 ABEmax 组设置 10 μ mol/L TMP 的加药组和未加药组, 测序结果表明, 3 个位点中, 加药组 ABEmax 的编辑效率与未加药组相比无显著性差异 ($P > 0.05$), 说明 TMP 不会对 ABEmax 的功能造成影响 (图 4A, 4B, 4C)。之后, 分别比较 TMP 对各组 DD-ABE 编辑水平的调控, 测序结果显示在 ABEND、ABEMD、ABDCD 三组中, 加药组的碱基编辑效率比未加药组高 ($P < 0.05$), 而 ABED 组中, 加药组与未加药组的编辑效率无显著性差异 ($P > 0.05$), 说明 TMP 不能有效调控其对内源基因的编辑作用。同时, 测序结果显示, 在 ABE site14 (图 4A)、ABE site16 (图 4B)、ABE site19 (图 4C) 三个位点中,

ABECD 分别将平均编辑效率提高了 60.3%、42.3%、36.3%, 相对地, ABEND 仅提高了 24.7%、15.3%、15%, ABEMD 仅提高了 12%、15.3%、15.3%, ABED 仅提高了 11%、7.3%、9.7%, 因此 TMP 对 ABECD 的编辑效率有更强的调节作用。最后, 图 4 表明, 在各组 ABE-DD 的加药组中, ABECD 加药组可以达到或略低于 ABEmax 的编辑效率, 且在未加药组的编辑水平最低。综上, 在四种 DD-ABE 编辑器中, ABECD 是最为有效的可调控 ABE 融合形式, 可以在 TMP 的作用下实现高效和严格的调控。

3 讨论

自从 CRISPR/Cas 系统被改造成修饰靶向基因的工具以来, 基因编辑技术取得了快速的发展^[2], 现在已被应用于多种生物体的基因编辑研究, 为改良农业产品和遗传疾病的治疗等带来了巨大的希望。CRISPR/Cas 衍生系统之一, ABE, 可以在不引起双链断裂的情况下实现更加精准、高效的碱基编辑, 操作

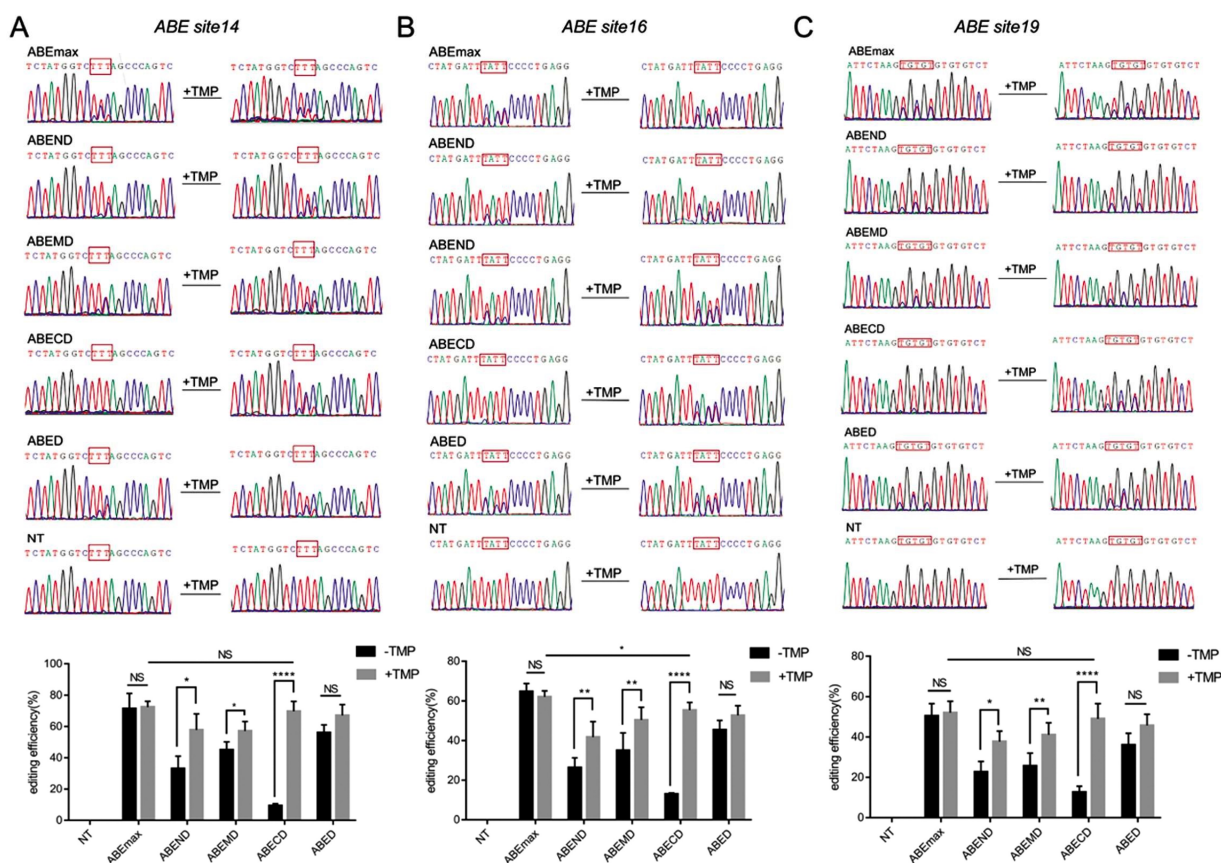


图4 ABE-DD 载体在三个内源基因 A>G 的编辑效率

Fig. 4 The editing efficiency of ABE-DD vector in three endogenous targeted sites. (A) ABE site14;(B) ABE site16;(C) ABE site19.

Note: NT, non-transfected group. Data indicated the mean±S.E.M. (n=3). NS: no significance($P>0.05$), *: $P<0.05$.

简便且安全性更高;然而其应用仍然存在诸多限制,包括潜在的脱靶风险、过宽的编辑窗口、Cas 蛋白的免疫原性等。

对于后者,本研究通过将 ABE 与一种不稳定结构域耦合,构建一种可调节的 ABE 编辑器,以达到精准调控蛋白表达及基因编辑效率的目的。我们选择了大肠杆菌来源的不稳定结构域-DHFR,主要原因是其小分子稳定剂 TMP 是一种抗生素,对于人体有很高的安全性^[29],并且具备穿越血-脑屏障的能力^[33]。此外, TMP 可经由腹腔注射、口服、眼药水等多种给药途径到达体内,实现快速、可逆的靶蛋白调控并维持较高的浓度^[34]。

在本研究中,我们首先建立了 DHFR 位于 ABEmax 不同相对位置的四种 DD-ABE 融合蛋白(图 1),并且在它们的 C 端融合了 3 个拷贝的 HA 标签用于研究其蛋白表达水平。我们挑选了 3 个已发表的具有较高 A>G 编辑效率的内源基因位点(图 2),用于编辑效率检测。我们发现,在未经 TMP 处理时,几乎所有的 DD-ABE 仅有非常少量的蛋白表达,证明 DHFR 表现出了强大的诱导融合蛋白降解的能力(图 3)。而在添加了 10 $\mu\text{mol/L}$ TMP 后, ABE 的蛋白表达水平平均提高了数倍,其中 DD 位于 TadA C 端的 ABECD 蛋白表达量与野生型 ABEmax 无显著性差异($P>0.05$)(图 3)。在内源基因编辑上, ABECD 同样表现出了精确且有效的编辑潜力,加入 TMP 后,三个位点中 A>G 的效率均得到了明显的提升,并且接近野生 ABEmax 的编辑效率($P=0.9980$)(图 4)。

我们的研究结果表明,与已开发的可调控 Cas9 编辑系统相比, DD-ABE 编辑系统不仅拥有精确、高效的可调控潜能,同

时 TMP 可以快速、可逆地稳定 DD-ABE,与 tet/dox 的长时间诱导^[21-24]相比,具有更大的优势。另一方面,光遗传学诱导的 Cas9 的调控^[12-14],往往需要依赖侵入性或可植入性装置,以达到足够的光强刺激基因表达;其他二聚体小分子的诱导剂^[15]则对机体具有潜在的毒性风险。TMP 作为抗生素具有较高的安全性^[29],因此 DD-ABE 在临床应用研究中可作为一种更加安全的 ABE 编辑器。

尽管我们的研究证实 ABECD 是 DHFR 介导的调节 ABE 的有效形式, ABE 本身存在的其他一些限制未能得到改善,例如潜在的基因组脱靶效应、较宽的编辑窗口,同时研究发现 ABE 编辑后的细胞系在全转录组水平存在大量的 RNA SNVs^[30,31,35]。目前已有研究分别开发出了具有更高保真性和更窄编辑窗口的 ABE^[30,36]。在未来的研究中,我们将联合本研究成果和以上的改进技术,建立保真性、精确性、安全性更高的可调控型 ABE 系统。

参考文献(References)

- [1] Martin Jinek, Krzysztof Chylinski, Ines Fonfara, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity[J]. Science, 2012, 337(6096): 816-821
- [2] Le Cong, F Ann Ran, David Cox, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems[J]. Science, 2013, 339(6121): 819-823
- [3] Rihong Guo, Yongjie Wan, Dan Xu, et al. Generation and evaluation of Myostatin knock-out rabbits and goats using CRISPR/Cas9 system [J]. Scientific reports, 2016, 6(1): 1-10
- [4] Haoyi Wang, Hui Yang, Chikdu S Shivalila, et al. One-step generation

- of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering[J]. *Cell*, 2013, 153(4): 910-918
- [5] Nicole M Gaudelli, Alexis C Komor, Holly A Rees, et al. Programmable base editing of A to T to G to C in genomic DNA without DNA cleavage[J]. *Nature*, 2017, 551(7681): 464-471
 - [6] LW Koblan, JL Doman, C Wilson, et al. Improving cytidine and adenine base editors by expression optimization and ancestral reconstruction[J]. *Nature biotechnology*, 2018, 36(9): 843-846
 - [7] Fathema Uddin, Charles M Rudin, Triparna Sen. CRISPR gene therapy: applications, limitations, and implications for the future[J]. *Frontiers in Oncology*, 2020, 10
 - [8] CT Charlesworth, PS Deshpande, DP Dever, et al. Identification of preexisting adaptive immunity to Cas9 proteins in humans[J]. *Nature medicine*, 2019, 25(2): 249-254
 - [9] VL Simhadri, J McGill, S McMahon, et al. Prevalence of Pre-existing Antibodies to CRISPR-Associated Nuclease Cas9 in the USA Population [J]. *Molecular therapy Methods & clinical development*, 2018, 10: 105-112
 - [10] DL Wagner, L Amini, DJ Wendering, et al. High prevalence of *Streptococcus pyogenes* Cas9-reactive T cells within the adult human population[J]. *Nature medicine*, 2019, 25(2): 242-248
 - [11] W Yu, Z Wu. Ocular delivery of CRISPR/Cas genome editing components for treatment of eye diseases[J]. *Advanced drug delivery reviews*, 2021, 168: 181-195
 - [12] J Hemphill, EK Borchardt, K Brown, et al. Optical Control of CRISPR/Cas9 Gene Editing [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2015, 137(17): 5642-5645
 - [13] Y Nihongaki, S Yamamoto, F Kawano, et al. CRISPR-Cas9-based photoactivatable transcription system[J]. *Chemistry & biology*, 2015, 22(2): 169-174
 - [14] LR Polstein, CA Gersbach. A light-inducible CRISPR-Cas9 system for control of endogenous gene activation [J]. *Nature chemical biology*, 2015, 11(3): 198-200
 - [15] LE Dow, J Fisher, KP O'Rourke, et al. Inducible in vivo genome editing with CRISPR-Cas9 [J]. *Nature biotechnology*, 2015, 33(4): 390-394
 - [16] F González, Z Zhu, ZD Shi, et al. An iCRISPR platform for rapid, multiplexable, and inducible genome editing in human pluripotent stem cells[J]. *Cell stem cell*, 2014, 15(2): 215-226
 - [17] S Lin, BT Staahl, RK Alla, et al. Enhanced homology-directed human genome engineering by controlled timing of CRISPR/Cas9 delivery[J]. *eLife*, 2014, 3: e04766
 - [18] Michelle A Chang, James W Horner, Bruce R Conklin, et al. Tetracycline-inducible system for photoreceptor-specific gene expression[J]. *Investigative ophthalmology & visual science*, 2000, 41(13): 4281-4287
 - [19] JB Kerrison, EJ Duh, Y Yu, et al. A system for inducible gene expression in retinal ganglion cells[J]. *Investigative ophthalmology & visual science*, 2005, 46(8): 2932-2939
 - [20] Yun-Zheng Le, Wei Zheng, Peng-Cheng Rao, et al. Inducible expression of cre recombinase in the retinal pigmented epithelium[J]. *Investigative ophthalmology & visual science*, 2008, 49(3): 1248-1253
 - [21] Julia Duerr, Maren Gruner, Susanne C Schubert, et al. Use of a new-generation reverse tetracycline transactivator system for quantitative control of conditional gene expression in the murine lung [J]. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 2011, 44(2): 244-254
 - [22] Marco J Herold, Jens van den Brandt, Jost Seibler, et al. Inducible and reversible gene silencing by stable integration of an shRNA-encoding lentivirus in transgenic rats [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2008, 105(47): 18507-18512
 - [23] Isabelle M Mansuy, Danny G Winder, Theodore M Moallem, et al. Inducible and reversible gene expression with the rtTA system for the study of memory[J]. *Neuron*, 1998, 21(2): 257-265
 - [24] Hongkui Zeng, Kyoji Horie, Linda Madisen, et al. An inducible and reversible mouse genetic rescue system [J]. *PLoS genet*, 2008, 4(5): e1000069
 - [25] Iliana A Chatzisprou, Ntsiki M Held, Laurent Mouchiroud, et al. Tetracycline antibiotics impair mitochondrial function and its experimental use confounds research [J]. *Cancer research*, 2015, 75(21): 4446-4449
 - [26] Norman Moullan, Laurent Mouchiroud, Xu Wang, et al. Tetracyclines disturb mitochondrial function across eukaryotic models: a call for caution in biomedical research [J]. *Cell reports*, 2015, 10(10): 1681-1691
 - [27] Mari Iwamoto, Tomas Björklund, Cecilia Lundberg, et al. A general chemical method to regulate protein stability in the mammalian central nervous system [J]. *Chemistry & biology*, 2010, 17(9): 981-988
 - [28] Laura A Banaszynski, Ling-chun Chen, Lystranne A Maynard-Smith, et al. A rapid, reversible, and tunable method to regulate protein function in living cells using synthetic small molecules[J]. *Cell*, 2006, 126(5): 995-1004
 - [29] J Grünewald, R Zhou, S Iyer, et al. CRISPR DNA base editors with reduced RNA off-target and self-editing activities [J]. *Nature biotechnology*, 2019, 37(9): 1041-1048
 - [30] Barry I Schweitzer, Adam P Dicker, Joseph R Bertino. Dihydrofolate reductase as a therapeutic target [J]. *The FASEB Journal*, 1990, 4(8): 2441-2452
 - [31] Xiaomeng An, Linlin Li, Sen Wu. In vivo tunable CRISPR mediates efficient somatic mutagenesis to generate tumor models[J]. *Protein & cell*, 2019, 10(6): 450-454
 - [32] C Zhou, Y Sun, R Yan, et al. Off-target RNA mutation induced by DNA base editing and its elimination by mutagenesis [J]. *Nature*, 2019, 571(7764): 275-278
 - [33] RWA Barling, JB Selkon. The penetration of antibiotics into cerebrospinal fluid and brain tissue [J]. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 1978, 4(3): 203-227
 - [34] Shyamtanu Datta, Marian Renwick, Viet Q Chau, et al. A destabilizing domain allows for fast, noninvasive, conditional control of protein abundance in the mouse eye-implications for ocular gene therapy [J]. *Investigative ophthalmology & visual science*, 2018, 59(12): 4909-4920
 - [35] Holly A Rees, Christopher Wilson, Jordan L Doman, et al. Analysis and minimization of cellular RNA editing by DNA adenine base editors[J]. *Science advances*, 2019, 5(5): eaax5717
 - [36] Seuk-Min Ryu, Taeyoung Koo, Kyoungmi Kim, et al. Adenine base editing in mouse embryos and an adult mouse model of Duchenne muscular dystrophy[J]. *Nature biotechnology*, 2018, 36(6): 536-539