

• 动物及兽医生物技术 •

单碱基编辑系统介导欧拉藏绵羊 *GDF9*、*FecB* 多胎基因的定点突变

赵逸凡¹, 张迎冰¹, 于芮峦¹, 吴英², 陈永忠², 赵若琳¹, 张成图^{2*}, 苏建民^{1*}

1 西北农林科技大学动物医学院 农业农村部动物生物技术重点实验室, 陕西 杨凌 712100

2 西宁市动物疫病预防控制中心, 青海 西宁 810016

赵逸凡, 张迎冰, 于芮峦, 吴英, 陈永忠, 赵若琳, 张成图, 苏建民. 单碱基编辑系统介导欧拉藏绵羊 *GDF9*、*FecB* 多胎基因的定点突变[J]. 生物工程学报, 2023, 39(1): 204-216.

ZHAO Yifan, ZHANG Yingbing, YU Ruiluan, WU Ying, CHEN Yongzhong, ZHAO Ruolin, ZHANG Chengtu, SU Jianmin. Single base editing system mediates site-directed mutagenesis of genes *GDF9* and *FecB* in Ouler Tibetan sheep[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(1): 204-216.

摘要: 本研究旨在利用单碱基编辑系统(single base editing system)实现欧拉藏绵羊成纤维细胞 *FecB* 和 *GDF9* 基因靶位点 A 到 G 和 C 到 T 的碱基替换并检测其编辑效率。首先设计合成靶向欧拉藏绵羊 *FecB* 和 *GDF9* 基因的 sgRNA 序列, 再分别连接至 epi-ABEmax、epi-BE4max 质粒, 构建载体并电转至欧拉藏绵羊成纤维细胞, 最后对阳性细胞 *FecB* 和 *GDF9* 基因进行 Sanger 测序鉴定靶位点突变结果, 并通过 T-A 克隆估算单碱基编辑系统的编辑效率。结果显示获得了靶向欧拉藏绵羊 *FecB* 和 *GDF9* 基因的 sgRNA, 并构建使欧拉藏绵羊 *FecB* 和 *GDF9* 基因单碱基突变的载体, *FecB* 基因靶位点编辑效率为 39.13%, *GDF9* 基因靶位点(G260、G721、G1184)编辑效率分别为 10.52%、26.67%和 8.00%。本研究运用单碱基编辑系统在欧拉藏绵羊成纤维细胞上实现了 *FecB* 和 *GDF9* 基因靶位点突变, 为改良欧拉藏绵羊一胎多羔的繁殖性状奠定理论基础。

关键词: 欧拉藏绵羊; 单碱基编辑系统; *FecB* 基因; *GDF9* 基因

资助项目: 青海省“昆仑英才·高端创新创业人才”计划; 青海省重点研发与转化计划(2022-QY-209)

This work was supported by the Qinghai Province “Kunlun Talents” and the Key Research and Development Transformation Program of Qinghai Province (2022-QY-209).

*Corresponding authors. ZHANG Chengtu. E-mail: zhangchengt@126.com;

SU Jianmin. Tel: +86-29-87082336, E-mail: sujm@nwafu.edu.cn

Received: 2022-05-30; Accepted: 2022-09-05

Single base editing system mediates site-directed mutagenesis of genes *GDF9* and *FecB* in Ouler Tibetan sheep

ZHAO Yifan¹, ZHANG Yingbing¹, YU Ruiluan¹, WU Ying², CHEN Yongzhong², ZHAO Ruolin¹, ZHANG Chengtu^{2*}, SU Jianmin^{1*}

1 Key Laboratory of Animal Biotechnology of the Ministry of Agriculture, College of Veterinary Medicine, Northwest A&F University, Yangling 712100, Shaanxi, China

2 Xining Center for Animal Disease Prevention and Control, Xining 810016, Qinghai, China

Abstract: In this study, a single base editing system was used to edit the *FecB* and *GDF9* gene to achieve a targeted site mutation from A to G and from C to T in Ouler Tibetan sheep fibroblasts, and to test its editing efficiency. Firstly, we designed and synthesized sgRNA sequences targeting *FecB* and *GDF9* genes of Ouler Tibetan sheep, followed by connection to epi-ABEmax and epi-BE4max plasmids to construct vectors and electrotransfer into Ouler Tibetan sheep fibroblasts. Finally, Sanger sequencing was performed to identify the target point mutation of *FecB* and *GDF9* genes positive cells. T-A cloning was used to estimate the editing efficiency of the single base editing system. We obtained gRNA targeting *FecB* and *GDF9* genes and constructed the vector aiming at mutating single base of *FecB* and *GDF9* genes in Ouler Tibetan sheep. The editing efficiency for the target site of *FecB* gene was 39.13%, whereas the editing efficiency for the target sites (G260, G721 and G1184) of *GDF9* gene were 10.52%, 26.67% and 8.00%, respectively. Achieving single base mutation in *FecB* and *GDF9* genes may facilitate improving the reproduction traits of Ouler Tibetan sheep with multifetal lambs.

Keywords: Ouler Tibetan sheep; single base editing system; *FecB* gene; *GDF9* gene

欧拉藏绵羊的生长繁殖及种群活动主要分布在我国青海、西藏的部分地区,其具有四肢修长、背部宽阔、肌肉硕大等体型特征。欧拉藏绵羊繁殖性状由于生长环境的限制与本身基因性状的控制,多数母羊为一胎一羔,极少数为双羔。欧拉藏绵羊具有壮硕的肉羊体型,同时具备耐粗饲、抗寒、抗病力强、生长发育快与育肥性能好的优点,改善其繁殖性状具有重大意义^[1-2]。*FecB* 基因与生长分化因子 9 (growth differentiation factor 9, *GDF9*)已被证实为调控绵羊繁殖性状的主效基因。骨形态发生蛋白受体 1B 基因(*BMPRI1B*) 746 bp 碱基位置发

生 A 到 G 的突变后称为 *FecB* 基因,突变导致第 249 位氨基酸由谷氨酰胺(Q)转变为精氨酸(R),进而使得绵羊排卵数和产羔数显著增加,2001 年 Montgomery 等首次发现基因 *FecB* 可以调控绵羊排卵率,其主要影响卵泡颗粒细胞分化和卵泡发育,从而促进排卵^[3-4]。研究表明基因 *FecB* 突变可能是调节绵羊的繁殖性能的主要原因,它影响卵母细胞的早期发育、卵泡成熟以及卵丘颗粒细胞的增殖水平^[5-6]。欧拉藏绵羊群体中存在 *FecB* 多胎基因的自然突变,但只检测到 B+型杂合子而且基因型频率只有 0.026,比例较低^[7]。喇永富等^[8]利用 PCR-RFLP

技术检测欧拉藏绵羊群体中 *FecB* 基因的多态性,发现基因 *FecB* 可能是影响欧拉藏绵羊排卵及产羔率的主效基因。2021年吴艳芳^[9]将52只 *FecB* 基因突变滩羊母羊与5只 *FecB* 基因突变滩羊公羊发情配种进行扩繁实验,结果母羊妊娠率为70.59%,产羔率为150.00%,为 *FecB* 基因影响藏羊多胎性状提供现实依据。敲降 *GDF9* 基因使雌性小鼠卵泡发育停滞在初级单层卵泡阶段,证明 *GDF9* 基因对卵泡的正常发育至关重要^[10]。已有研究发现绵羊繁殖性能的高低与 *GDF9* 基因的表达水平及多态性呈密切相关。McNatty 等发现基因 *GDF9* 和 *BMP15* 表达水平的高低影响着绵羊排卵率^[11]。*GDF9* 基因促进卵巢各阶段的生长发育、促进颗粒细胞增殖但抑制其分化、调节卵丘细胞代谢并诱导其扩张、调节卵泡膜细胞发育以及影响相关生殖激素、酶和细胞因子的合成^[12-16]。

通过编辑 *FecB* 基因与 *GDF9* 基因改良欧拉藏绵羊繁殖性状的相关技术未见报道,因此,运用单碱基编辑使欧拉藏绵羊 *FecB* 基因与 *GDF9* 基因定点发生突变,进而培育一胎双羔的高产母羊可视为畜牧业育种的一种新型技术手段。

如今三代基因编辑技术 CRISPR/Cas9 在生物领域广泛应用。在该系统中 crRNA 可识别外源 DNA 中的互补核苷酸片段(原间隔区),从而赋予识别特异性序列的能力^[17]。此外,一种被称为 tracrRNA 的反式激活 CRISPR RNA 需要与 Cas9 核酸酶形成核糖核蛋白复合物,造成特异性双链 DNA 断裂(double strand break, DSB) DSB,这2个 RNA 组分结合到一个称为“引导 RNA”(sgRNA)的嵌合分子中,Cas9 蛋白被其牵引进而实现基因的定点编辑^[18]。单碱基编辑是由 CRISPR/Cas 系统演化而来,胞嘧啶碱基编辑器(cytosine base editors, CBE)由 nCas9 或 dCas9 与胞嘧啶脱氨酶组成^[19-20],在 sgRNA 引

导下,基因组 DNA 与 CBE 系统中的 Cas9 蛋白形成 R-loop 复合体,Cas9 蛋白使 DNA 局部解链,使得胞嘧啶脱氨酶可以与 R-loop 复合体中未与 sgRNA 配对的 ssDNA 结合,将其一定区域上的胞嘧啶(C)脱氨基变成尿嘧啶(U),继而在 DNA 修复或者复制后使尿嘧啶(U)被胸腺嘧啶(T)替换,最终完成 C 到 T 或 G 到 A 的替换^[19]。2017年 David Liu 团队成功构建了腺嘌呤碱基编辑器(adenine base editors, ABE),该系统利用腺嘌呤脱氨酶催化腺嘌呤(A)脱氨后转化为肌苷(I)。肌苷(I)本身的化学结构与鸟嘌呤(G)十分相似,细胞修复机制识别肌苷(I),将它替换为鸟嘌呤(G),从而高效地将靶目标 A-T 替换为 G-C^[21]。之后 David Liu 团队改良了 ABE 系统的核定位信号与脱氨酶密码子,重建并优化了腺嘌呤(ABE7.10)碱基编辑器,由此产生了具有高效率的定点 ABEmax 编辑器^[22]。Episomal 载体可以表达 Cas9 与 sgRNA,并通过 NHEJ/MMEJ 通路实现高效的基因编辑^[23-24],并且该载体可以在真核生物的细胞分裂过程中跟随复制^[25],在细胞中持续表达 Cas9 与 sgRNAs。Episomal 载体还包含 blasticidin 耐药基因组分,后续实验可通过该药物筛选阳性细胞。单碱基编辑系统以 episomal 载体为骨架,同时携带 sgRNA 序列、ABE 或 CBE 组分,在实验设计与操作中显得更为简单便捷^[26]。

随着 CRISPR 系统的广泛应用,单碱基编辑系统针对绵羊基因编辑的研究将不断增加。已有研究发现,当 *FecB* 基因 746 bp 核苷酸位置发生 A 到 G 的单碱基替换,会导致骨形态发生蛋白受体高度保守区域中的谷氨酰胺突变为精氨酸^[27]。*GDF9* 基因 G1、G4 及 G8 突变能引起氨基酸的变化再结合相应受体,进而影响绵羊的高繁殖性状^[28]。本研究旨在使用单碱基编辑系统对欧拉藏绵羊 *FecB*、*GDF9* 多胎基因进

行定点突变修饰, 在欧拉藏绵羊细胞水平上实现基因单碱基替换。研究结果可为使用单碱基编辑技术培育基因编辑多胎欧拉藏绵羊, 改良欧拉藏绵羊一胎多羔的繁殖性状奠定理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料和试剂

欧拉藏绵羊耳缘组织采自青海省某欧拉藏绵羊羊场刚出生一周龄的羊羔, 成纤维细胞由本实验室分离、培养, 并冻存于实验室液氮罐中。复苏后于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养, 培养基成分为 90% DMEM 与 10% 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS)。

文中所用的实验试剂和耗材见表 1。

1.2 实验方法

1.2.1 欧拉藏绵羊原代成纤维细胞的培养

在青海省某欧拉藏绵羊羊场挑选刚出生一周的羊羔, 将欧拉藏绵羊耳朵表皮上的羊毛彻底刮干净, 碘伏擦拭 3 次, 再用酒精擦拭 3 次, 剪下耳缘组织, 放置于碘伏中浸泡 30 s, 再放置于 75% 乙醇中浸泡 30 s, 最后置于含有

200 IU/mL 青霉素与链霉素的生理盐水中带回实验室。用生理盐水将耳缘组织清洗 3 次, 然后浸泡在 75% 乙醇中消毒 1 min, 再用生理盐水清洗 3 次, 清洗结束后放入培养皿中, 并将组织剪碎, 均匀平铺在 60 mm 培养皿中, 每个碎片滴加 1 滴培养液 (DMEM+10% FBS+1% 双抗) 浸润组织, 为原代细胞生长提供营养。将培养皿放置于 5% CO₂、38 °C 培养箱, 12 h 后观察组织中原代细胞的生长状态并更换培养液, 每隔 24 h 观察细胞生长状态, 弃掉漂浮的组织块并更换培养液, 直至细胞晕形成后丢弃组织块 (记为 F1 代)。本研究欧拉藏绵羊原代细胞的采集严格遵守动物实验福利规范, 采集一周龄羊羔耳缘细胞后立即放归羊场。

1.2.2 sgRNA 及检测引物设计

根据 NCBI 数据库上公布的绵羊 *FecB* 和 *GDF9* 基因序列在靶点筛选网站 [Guide design resources—Zhang Lab (zlab.bio)] 上设计靶位点序列, 选取突变位点 (g.A746G, p.Q249R) 3' 端附近-NGG 作为 sgRNA 的前间隔序列邻近基序 (protospacer adjacent motif, PAM) 位点, 必须

表 1 文中所用实验试剂和耗材

Table 1 List of test reagents and consumables used in this study

Reagent	Sourcing company
epi-ABEmax vector	Purchase by Addgenen website
epi-BE4max vector	Purchase by Addgenen website
Enzyme BspQI	New England Biolabs
T4 DNA ligase	TransGen Biotech
GenlociCruiser Enzyme	Genloci Biotechnologies Inc
Whole Genome Extraction Kit	TIANGEN
PCR product Purification and Recovery Kit	TaKaRa
Endotoxin-free Plasmid Extraction Kit	Omega
DL2000 DNA Marker	TransGen Biotech
ApexHFHSDNAPolymeraseCL	Accurate Biology
2×EasyTaq [®] PCR Super Mix (+dye)	TransGen Biotech
DMEM	Gibco
Fetal bovine serum (FBS)	Gibco
Competent cell (<i>E. coli</i> DH5α)	TransGen Biotech

将突变位点控制于编辑窗口(PAM 远端 4–8 nt)内(图 1)。在 sgRNA 上游退火引物 5'插入酶切位点 TTT, 下游退火引物 5'插入酶切位点 AAC, 将设计好的 sgRNA 引物交由北京擎科生物科技有限公司合成。实验共设计 2 条长度为 23 bp sgRNA 的单链, 上下游引物各 10 μ L, 98 $^{\circ}$ C 5 min 后自然冷却, 合成 sgRNA 双链。

1.2.3 sgRNA 表达载体的构建

分别以 epi-ABE_{max} 和 epi-BE4_{max} 载体为基本骨架, 混合 1 μ L 内切酶 BspQI 与 1 000 ng 上述载体, 反应条件: 50 $^{\circ}$ C 15 min, 80 $^{\circ}$ C

20 min, 4 $^{\circ}$ C 保存, 载体酶切线性化后, 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 产物, 胶回收纯化, 置于-20 $^{\circ}$ C 长期保存。然后将退火后已合成的 GDF9-sgRNA 与 FecB-sgRNA 双链分别连接至 epi-ABE_{max}、epi-BE4_{max} 载体, 反应体系: 5 μ L 溶液 I +4 μ L sgRNA+1 μ L 线性化载体, 16 $^{\circ}$ C 30 min。将连接产物转化 50 μ L 感受态细胞大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α , 置入 1.5 mL 离心管后加入 700 mL LB, 37 $^{\circ}$ C 摇菌 50 min, 3 000 \times g 离心 5 min, 将感受态细胞沉淀吹打后, 均匀涂布于含有氨苄青霉素的平板上, 菌落

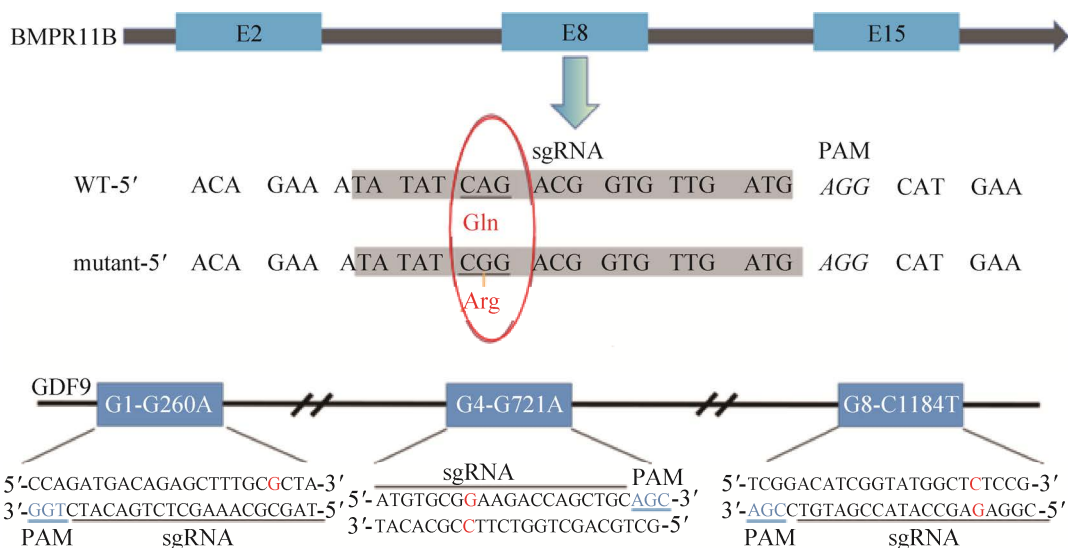


图 1 基因 *FecB* sgRNA、基因 *GDF9* sgRNA 位置示意图

Figure 1 Location of gene *FecB* sgRNA and gene *GDF9* sgRNA.

表 2 sgRNA 退火引物序列

Table 2 Oligonucleotides for generating transcription of sgRNA expression vectors

Primer	Sequence (5'→3')
U6- <i>FecB</i> -sgRNA-F	tTtTATATCAGACGGTGTGATG
U6- <i>FecB</i> -sgRNA-R	aacCATCAACACCGTCTGATATA
<i>GDF9</i> -G1-sgRNA-F	tTtTAGCGCAAAGCTCTGTCATC
<i>GDF9</i> -G1-sgRNA-R	aacGATGACAGAGCTTTGCGCTA
<i>GDF9</i> -G4-sgRNA-F	tTtATGTGCGGAAGACCAGCTGC
<i>GDF9</i> -G4-sgRNA-R	aacGCAGCTGGTCTTCCGCACAT
<i>GDF9</i> -G8-sgRNA-F	tTtCGGAGAGCCATACCGATGTC
<i>GDF9</i> -G8-sgRNA-R	aacGACATCGGTATGGCTCTCCG

Lowercase stands for sticky end.

37 °C 生长 14 h 后, 随机挑取若干菌落进行常规 Sanger 测序鉴定, 将鉴定结果为阳性的单克隆菌落扩大培养, 使用无内毒素质粒提取试剂盒大量提取符合实验要求的质粒, 储存备用。

1.2.4 电转欧拉藏绵羊成纤维细胞

欧拉藏绵羊原代成纤维细胞传代后在 60 mm 细胞皿中生长, 当细胞生长密度为 90% 并且形态良好时, 使用已提取的质粒转染成纤维细胞。具体步骤如下: 吸弃培养液、用 PBS 清洗 2 遍细胞表面、加入 1 mL 胰酶消化细胞、吹打细胞并置入离心管离心(1 350×g、5 min)、弃上清, 再向离心管里加入 800 μL Opti-MEM 吹打细胞后离心, 重复上述操作、加入 600 μL 电转液混匀 10 μg 质粒, 室温静置 10 min、将细胞与电转液置于电转杯, 使用 BTX ECM2001 细胞电融仪电击(510 V、2 ms 1 次)、细胞在 4 °C 静置 10 min、将电转后的细胞置于 60 mm 培养皿, 加入 3 mL 培养液。每个细胞培养皿做好标记, 细胞放置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱生长 24 h 后观察细胞状态并更换新鲜培养液。新鲜培养液培养 48 h 后再添加 25 ng/mL blasticidin 筛选 48 h 后获得阳性细胞。

1.2.5 编辑位点 PCR 产物 Sanger 测序

筛选获得细胞用 1 mL 胰酶消化 4 min, 吹打细胞后离心(2 000×g、10 min), 再使用全基因组提取试剂盒提取细胞基因组 DNA。使用表 3 中的引物与高保真酶扩增目标 DNA 序列, 将 PCR 产物送北京擎科生物科技有限公司进行 Sanger 测序。

1.2.6 T-A 克隆检测

Sanger 测序只能鉴定靶位点的编辑情况, 进行 T-A 克隆将更为准确地估算出靶位点的编辑效率。裂解剩余细胞获取基因组 DNA 并进行目的片段 PCR 扩增, 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳后胶回收纯化, 在目的片段平末端加 A 试剂形成

黏性末端, 连接 T 载体, 将连接产物转化入大肠杆菌感受态细胞(*E. coli* DH5α), 37 °C 培养过夜, 挑取单克隆菌落置入 2 mL LB 中培养 6 h 送至北京擎科生物科技有限公司进行 Sanger 测序。测序结果经比对后计算基因突变效率。

2 结果与分析

2.1 欧拉藏绵羊成纤维细胞的培养

采用组织贴壁法分离原代成纤维细胞, 组织在培养皿里培养 2 d 后, 显微镜下明显观察到组织边缘细胞逐渐分离生长, 形成细胞晕。培养 4 d 后(图 2A), 细胞密度达到 60%, 细胞形态清晰透明, 呈梭形, 此时弃去组织块, 待细胞密度长满后进行传代。传代 2 d 后(图 2B) 欧拉藏绵羊成纤维细胞形态稳定、边缘清晰、生长力良好, 此时表明成功获得欧拉藏绵羊成纤维细胞。

2.2 sgRNA 表达载体的构建与鉴定

线性载体 PCR 结果表明(图 3), 获得 14 900 bp 的目的条带, 完成初步鉴定。然后将阳性单克隆菌落进行常规 Sanger 测序, 连接 sgRNA 片段的序列、位置与方位均与实验预期相符(图 4), 这表明欧拉藏绵羊 *FecB* 基因 sgRNA 细胞载体构建成功。

表 3 *FecB* 和 *GDF9* 基因目标位点扩增引物

Table 3 Primers for genotyping and amplifying Cas9/sgRNA targeted *FecB* and *GDF9* gene fragments

Primer	Sequence (5'→3')
<i>FecB</i> -F	AGGTCCAGAGGACGATAGCA
<i>FecB</i> -R	AGGAAACCCTGAACATCGCTAA
<i>GDF9</i> -G1-F	CAGTGTGTAGAGGTGGCGT
<i>GDF9</i> -G1-R	TGGTTTTGCTGCTTTGCCTG
<i>GDF9</i> -G4-F	GGAATATTCACATGTCTGTAAATTTTACATGTTCC
<i>GDF9</i> -G4-R	GAGGGAATGCCACCTGTGAAAAGCC
<i>GDF9</i> -G8-F	GGTCTTGGCACTGAGGAGTC
<i>GDF9</i> -G8-R	ACACCCTCAGCAGCTTCTTC

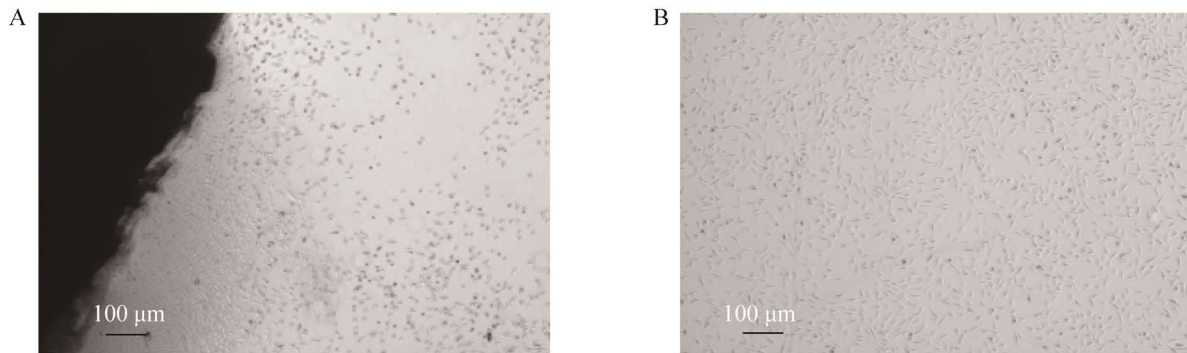


图2 欧拉藏绵羊成纤维细胞系(40×) A: 原代培养. B: 传代培养

Figure 2 Euler Tibetan sheep fibroblast cell line (40×). A: Primary culture. B: Subculture.

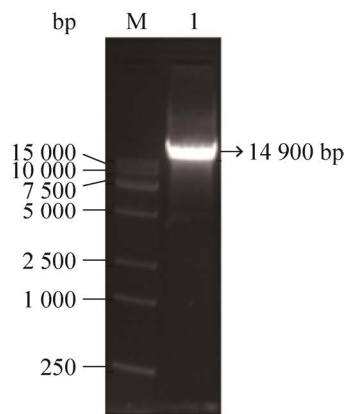


图3 质粒酶切电泳检测 M: DNA 相对分子质量标准. 1: BspQI 酶切线性化载体

Figure 3 Plasmid digestion electrophoresis. M: Trans8K[®] Plus DNA marker. 1: BspQI digestion of linearized vectors.

2.3 sgRNA 表达载体转染细胞后 *FecB*、*GDF9* 基因靶位点突变检测

Blasticidin 药物筛选细胞 48 h 后, 大量细胞死亡, 裂解剩余细胞提取基因组 DNA, 使用高保真酶扩增基因组目的片段。用表 2 的 *FecB* 基因、*GDF9* 基因目标位点扩增引物退火形成 PCR 产物, 并鉴定 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳后 PCR 产物的条带大小(图 5), 与实验预期结果比对, 将正确的 PCR 产物进行 Sanger 测序, 用 DNAMAN 软件将样品 PCR 的测序结果与

NCBI 数据库绵羊 *FecB* 野生型基因进行比对, 测序结果显示(图 6), epi-ABEmax 编辑窗口的 +7 碱基 A 与 G 位置出现了明显的双峰, 对照物 WT 未出现叠峰, 此结果表示目标位点的腺

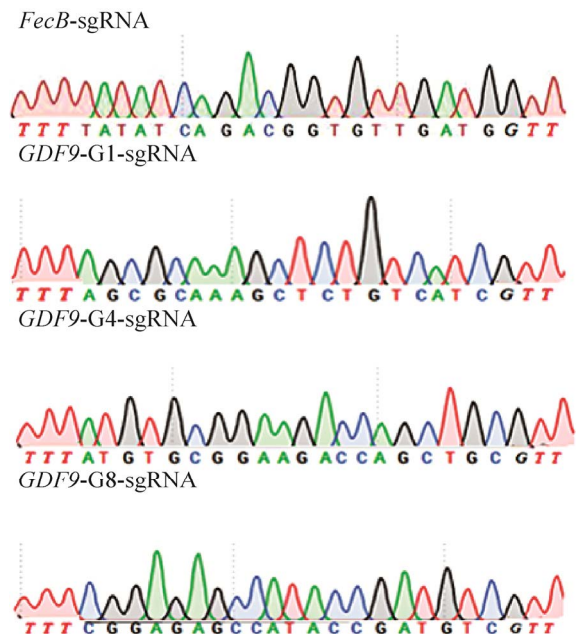


图4 *FecB*-sgRNA-epi-ABEmax 和 *GDF9*-sgRNA-epi-BE4max 载体 Sanger 测序结果 斜体标记酶切位点

Figure 4 Sanger sequencing results of *FecB*-sgRNA-epi-ABEmax and *GDF9*-sgRNA-epi-BE4max vectors. The restriction sites are marked in italics.

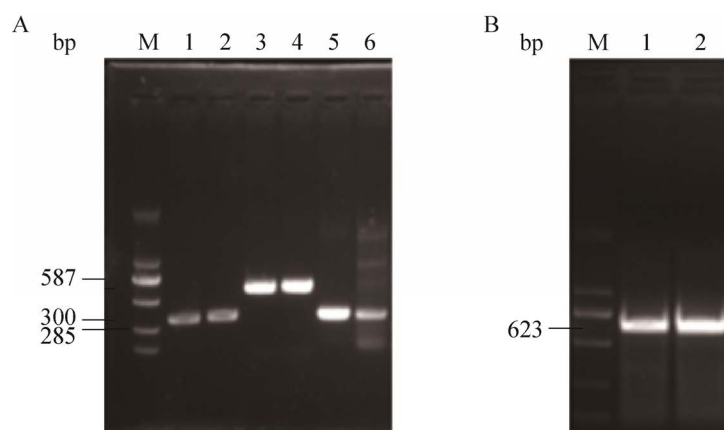


图 5 基因 *GDF9* 与 *FecB* 各靶位点 PCR 鉴定结果 A: *GDF9* 各靶位点 PCR 鉴定结果. M: Trans2K[®] Plus DNA marker; 1: *GDF9*-G1-sgRNA 阴性对照; 2: *GDF9*-G1-epi-BE4max; 3: *GDF9*-G4-sgRNA 阴性对照; 4: *GDF9*-G4-epi-BE4max; 5: *GDF9*-G8-sgRNA 阴性对照; 6: *GDF9*-G8-epi-BE4max. B: *FecB* 靶位点 PCR 鉴定结果. M: Trans2K[®] Plus DNA marker; 1: *FecB* 阴性对照; 2: *FecB*-epi-ABEmax

Figure 5 PCR identification results of *GDF9* and *FecB* target sites. A: PCR identification results of *GDF9* target sites. M: Trans2K[®] Plus DNA marker; 1: *GDF9*-G1-sgRNA negative control; 2: *GDF9*-G1-epi-BE4max; 3: *GDF9*-G4-sgRNA negative control; 4: *GDF9*-G4-epi-BE4max; 5: *GDF9*-G8-sgRNA negative control; 6: *GDF9*-G8-epi-BE4max. B: PCR identification results of *FecB* target sites. M: Trans2K[®] Plus DNA marker; 1: *FecB* negative control; 2: *FecB*-epi-ABEmax.

嘌呤(A)已成功实现定点突变, 该位点被编辑为鸟嘌呤(G)。测序结果还显示, 在 BE4max 编辑窗口的 G1、G4 和 G8 在相应靶位点均出现重叠峰, 其中 G4 靶点处重叠峰明显。此结果表明目标位点的胞嘧啶(C)和鸟嘌呤(G)均已成功实现定点突变, 依次被编辑为胸腺嘧啶(T)和腺嘌呤(A)。以上结果证实了 ABEmax 与 BE4max 系统对绵羊 *FecB*、*GDF9* 基因有一定的编辑效果。

2.4 *FecB*、*GDF9* 基因靶位点 T-A 克隆测序结果分析

FecB 基因 T-A 克隆测序结果显示(图 7), 9 个样品为有效结果发生正确突变, 14 个样品为无效结果未发生突变, epi-ABEmax 系统的编辑窗口为+4 或+7 位, 目标位点的编辑效率达到 39.13% (9/23)。*GDF9* 基因 T-A 克隆测序结果表明, G1 位点 38 个有效结果中出现 4 个正确

突变, 1 个非目标突变, 有效编辑率为 10.52%; G4 位点 15 个有效结果中出现 4 个正确突变, 1 个非目标突变, 有效编辑率为 26.67%; G8 位点 25 个有效结果中出现 2 个发生正确突变, 1 个非目标突变, 有效编辑率为 8.00%。

3 讨论

基因编辑技术已广泛应用于家畜抗病、高产的新品种培育研究中, 本团队已经创建了抗病基因组编辑牛培育技术体系, 先后通过 ZFN (锌指核糖核酸酶)、TALENs (转录激活因子样效应物核酸酶)和 CRISPR/Cas9 三代基因编辑技术联合体细胞克隆技术培育出人溶菌酶基因编辑抗乳腺炎高产奶牛、*SPI10* 基因编辑抗结核奶牛和 *NRAMP1* 基因编辑抗结核奶牛^[29-31], 其中前 2 类产品现已完成环境释放, 2020 年获批了中华人民共和国农业农村部安全

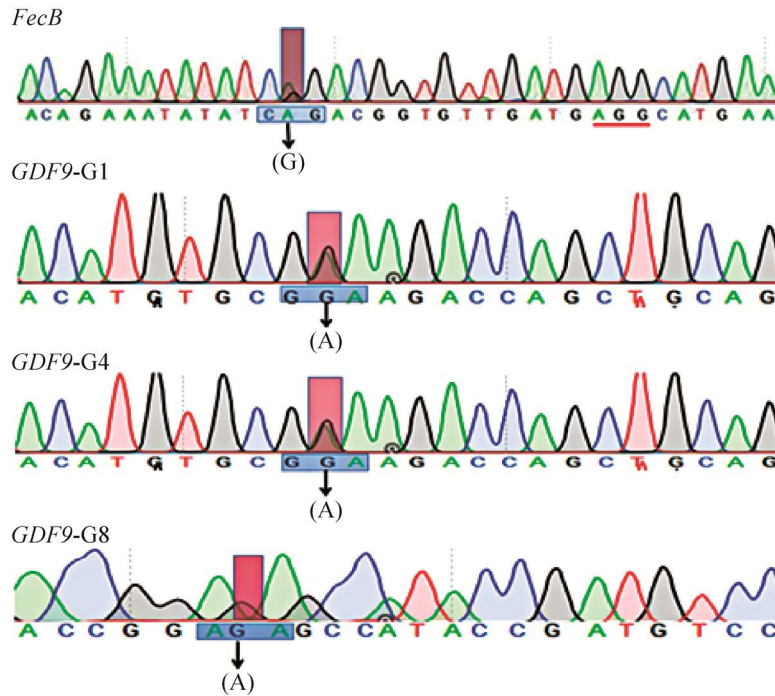


图 6 靶位点测序峰图 箭头指向为突变靶位点；PAM 区域标记下划线

Figure 6 Sequencing peak diagram of target sites. The arrow points to the target mutation; the PAM area is marked with an underscore.

	<i>FecB</i>	Frequency
WT	TATATC <u>AG</u> ACGGTGTGGATG	
ABEmax	TATATC <u>CG</u> ACGGTGTGGATG	9/23
WT	TAG <u>CG</u> CAAAGCTCTGACATCTGG	
BE4max	TAG <u>TG</u> CAAAGCTCTGACATCTGG	4/38
	TAGCG <u>TAA</u> AGCTCTGACATCTGG	1/38
WT	ATGTGCG <u>GA</u> AAGACCAGCTGCAGC	
BE4max	ATGTGCG <u>AA</u> AAGACCAGCTGCAGC	4/15
	ATGTGC <u>AGA</u> AAGACCAGCTGCAGC	1/15
	ATGT <u>ACG</u> GAAGACCAGCTGCAGC	0/15
WT	CGGAG <u>AG</u> CCATACCGATGTCCGA	
BE4max	CGGAA <u>AG</u> CCATACCGATGTCCGA	2/25
	CGGAGAA <u>CC</u> ATACCGATGTCCGA	1/25

图 7 基因 *FecB* 和 *GDF9* 各位点编辑效率

Figure 7 The editing efficiency of *FecB* and *GDF9* genes at each point.

证书,达到农业转基因牛新品系认定标准。但单碱基基因编辑技术在家畜育种上的应用尚需深入研究。

目前已报道 2 类 DNA 碱基编辑器,将 C-G 碱基对转换为 T-A 碱基对的胞嘧啶碱基编辑器(cytosine base editors, CBE)和将 A-T 碱基对转换为 G-C 碱基对的腺嘌呤碱基编辑器(adenine base editors, ABE)。CBE 和 ABE 系统可以介导所有 4 种可能的过渡突变(C 到 T、A 到 G、T 到 C 和 G 到 A)。单碱基编辑系统已成功应用于人类细胞、斑马鱼、小鼠、兔、大豆、猪及植物等各种实验材料^[32-34]。Liu 等运用 NG-ABEmax 系统在兔胚胎中实现 75%–100% 和 80%–100% 的靶向突变效率,创建了具有精确定点突变的新兔子模型,证明了单碱基编辑系统的高效性并扩大了兔子的基因组靶向范围^[35]。单碱基编辑系统在大动物的应用中已有先例,袁泓明^[36]使用 BE4-Gam 与 AncBE4max 系统对猪胚胎进行单碱基编辑,获得 *GGTA1* 与 *B4galNT2* 基因单位点突变的大白猪,并通过体细胞核移植技术获得基因突变的香猪。张坤团队在牛胚胎中显微注射 BE3 与 ABE7.10 对 *SMAD4* 基因进行编辑,发现 BE3 对基因靶位点 6 与 7 位的编辑效率分别为 86.3%和 85.4%, ABE7.10 对靶位点编辑效率为 79.4%。同时利用 BE3 在牛胚胎中提前引入 *CDX2* 基因终止密码子,发现 BE3 能够在牛胚胎中进行高效率的基因敲除^[37]。Zhou 等使用 ABEmax 系统,成功地生产下 8 只滩羊,其中有 6 只滩羊发生 *FecB* 基因定点突变,2 只未发生突变,在新生羔羊中, *FecB* 基因定点突变效率为 75%^[38]。

欧拉藏绵羊成纤维细胞 *GDF9* 基因靶位点(G260、G721、G1184)成功实现了从 A 到 G 和从 C 到 T 的碱基突变,这与预期突变位点相符,经 T-A 克隆检测测序结果分析,编辑效

率分别为 10.52%、26.67%和 8.00%。相较于陈玉林团队使用 CRISPR-Cas9 系统定点突变绒山羊 *GDF9* 基因的 G231 位点获得 24%的编辑效率^[39],本研究使用的 BE4max 系统在该基因 G4 位点上的表现更佳,但在 G1 和 G8 位点上则较差。这可能由于突变位点的上下游序列未完全符合 APOBEC1 脱氨酶的特异性(为 TC 或 CC 序列)^[19]以及载体体积过大导致细胞转染效率降低相关。此外,本研究在 G1、G4 及 G8 位点附近均发现了非目标 C 至 T 的转换,但未发现有 indels 或其他非预期突变(如 C 到 G 或 A)。非目标位点突变的产生与 APOBEC1 脱氨酶的高活性相关^[40],对于靶点 C 上游为 T 的序列(即 T-C 序列),如 G8 位点,可使用 APOBEC3A 结构域来降低非目标 C 的编辑^[41]。而对于 G1 位点(G-C 序列),可通过 BE-PACE 技术改进后的脱氨酶提高其在 GC 序列中的编辑效率^[42]。

孙嘉媛等^[43]利用 xCas9-ABE、ABEmax4、xCas9-BE4 和 BE4max 四种新型单碱基编辑器靶向绵羊 *FecB* 多胎基因实现定点突变,结果显示在绵羊细胞中,ABEmax 编辑效率为 46.15%,xCas9-ABE 的编辑效率为 38.46%,对比得知 ABEmax 系统更适合绵羊单碱基编辑的应用。Fu 等^[44]筛选出 NG-ABEmax 变体,该变体有着更优越的编辑效率与更宽阔的编辑窗口,能在 ABEmax 系统无法访问的位置进行有效编辑。epi-ABEmax 系统是 NG-ABEmax 系统的变体,能将 sgRNA 序列与 ABEmax 系统整合到一个载体上,该载体便于操作且具有更好的可控性和更少的副产物。本研究则利用 epi-ABEmax 系统与电击转染技术编辑欧拉藏绵羊成纤维细胞 *FecB* 多胎基因,经 Sanger 测序可知,欧拉藏绵羊成纤维细胞 *FecB* 基因靶位点(p.Q249R)成功实现了 A 到 G 的碱基突变,这与预期突变位点

相符, T-A 克隆检测测序统计结果高达 9/23 (39.13%)。丁一格^[45]曾发现 ABE7.10、ABEmax、xCas9-ABE 三种碱基编辑器在滩羊细胞上均具有较好的基因编辑效果, 其中 ABEmax 编辑效率最高, 可达 7/13 (53.85%), 并引入了预期点突变。本研究细胞层面上的编辑结果略低于 53.85%, 这可能是由于 epi-ABEmax 同时连接 sgRNA 序列、ABE 编辑系统与 blasticidin 抗性序列等组分, 导致载体体积过大降低了细胞转染效率。

在单碱基编辑的研究中, 也许会出现质粒随机整合的问题, 即质粒整合至细胞基因组从而导致药物无法筛除, 这种细胞的基因组完整性受到了破坏, 不能用于后续的核移植实验, 细胞安全性可在实验后期进行全基因组测序检验。Bystander 突变也是碱基编辑的常见问题, 即目标碱基外发生突变。结果显示 *FecB* 基因在 A7 编辑了, A4 没有编辑, 而 *GDF9-G1* 位点在 C6 发生了 Bystander 突变, *GDF9-G4* 位点在 G5、G7 发生了 Bystander 突变, *GDF9-G8* 位点的 G7 也发生了 Bystander 突变, 或许是因为 BE4max 编辑系统的精确性较低, 藏绵羊原代细胞电转效率较低等原因。后期筛选 *FecB* 基因突变与 *GDF9* 基因突变的单克隆细胞时, 都可以利用 Sanger 测序的方法检测阳性细胞单位点突变结果, 获得正确多位点突变的细胞可用于后续的细胞核移植实验。

综上所述, 本研究利用单碱基编辑系统实现了欧拉藏绵羊成纤维细胞 *FecB* 基因与 *GDF9* 基因单碱基突变, 为后期欧拉藏绵羊成纤维细胞定点编辑 *FecB*、*GDF9* 基因以及后期单克隆细胞的筛选, 克隆胚胎的构建与克隆胚胎移植等动物生物技术的应用奠定了理论基础, 为改良欧拉藏绵羊的繁殖性状, 进而提高其育种生产能力提供了技术依据。

4 结论

本研究使用单碱基编辑系统构建欧拉藏绵羊 *FecB*、*GDF9* 基因 sgRNA 表达载体, 并实现了欧拉藏绵羊 *FecB* 与 *GDF9* 基因共 4 个靶位点 A 到 G 与 C 到 T 的碱基突变, 编辑效率分别为 39.13%、10.52%、26.67% 与 8.00%。研究结果可为改良欧拉藏绵羊繁殖性状及绵羊的繁殖生产提供一定参考。

REFERENCES

- [1] 后永贵. 欧拉型藏羊母羊繁殖性能分析[J]. 中国畜禽种业, 2019, 15(12): 73.
HOU YG. Analysis of reproductive performance of female Tibetan sheep of Euler type[J]. The Chinese Livestock and Poultry Breeding, 2019, 15(12): 73 (in Chinese).
- [2] 祁玉香, 余忠祥. 欧拉型藏羊[J]. 中国草食动物, 2006, 26(4): 62-65.
Qi YX, YU ZX. Ouler Tibetan sheep[J]. China Herbivores, 2006, 26(4): 62-65 (in Chinese).
- [3] MONTGOMERY GW, GALLOWAY SM, DAVIS GH, MCNATTY KP. Genes controlling ovulation rate in sheep[J]. Reproduction: Cambridge, England, 2001, 121(6): 843-852.
- [4] KUMAR S, PUNETHA M, JOSE B, BHARATI J, KHANNA S, SONWANE A, GREEN JA, WHITWORTH K, SARKAR M. Modulation of granulosa cell function via CRISPR-Cas fuelled editing of *BMPR-1B* gene in goats (*Capra hircus*)[J]. Scientific Reports, 2020, 10: 20446.
- [5] 郭晓飞. *FecB* 基因影响小尾寒羊繁殖力的分子机制研究[D]. 北京: 中国农业大学博士学位论文, 2018.
GUO XF. Study on molecular mechanism of *FecB* gene for fecundity in small tail Han sheep[D]. Beijing: Doctoral Dissertation of China Agricultural University, 2018 (in Chinese).
- [6] MCNATTY KP, GALLOWAY SM, WILSON T, SMITH P, HUDSON NL, O'CONNELL A, BIBBY AH, HEATH DA, DAVIS GH, HANRAHAN JP, JUENGL JL. Physiological effects of major genes affecting ovulation rate in sheep[J]. Genetics, Selection, Evolution: GSE, 2005, 37(Suppl 1): S25-S38.
- [7] 乔海生, 杨博辉, 岳耀敬, 马世科, 乔国艳, 扎西塔. 高原型藏羊种公羊群体 *BMPR-1B* 基因多态性检测分析[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2018(16): 56-58.
QIAO HS, YANG BH, YUE YJ, MA SK, QIAO GY,

- ZHA XT. Detection and analysis of *BMPR-IB* gene polymorphism in plateau type Tibetan breeding rams[J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, 2018(16): 56-58 (in Chinese).
- [8] 喇永富, 李发弟, 杨勤, 石红梅, 李俊龙, 王钢, 张小雪, 王维民. *FecB* 基因在 5 个中国地方绵羊品种中的多态性及其与产羔数的关联分析[J]. 中国草食动物科学, 2020, 40(2): 12-17.
LA YF, LI FD, YANG Q, SHI HM, LI JL, WANG G, ZHANG XX, WANG WM. Genetic polymorphism of *FecB* gene and effect in five Chinese local sheep breeds[J]. China Herbivore Science, 2020, 40(2): 12-17 (in Chinese).
- [9] 吴艳芳. *MSTN* 基因敲除和 *FecB* 基因突变滩羊扩繁试验[D]. 杨凌: 西北农林科技大学硕士学位论文, 2021.
WU YF. Breeding experiment of *MSTN* gene knockout tan sheep and *FecB* gene mutation tan sheep[D]. Yangling: Master's Thesis of Northwest A&F University, 2021 (in Chinese).
- [10] DONG JW, ALBERTINI DF, NISHIMORI K, KUMAR TR, LU NF, MATZUK MM. Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis[J]. Nature, 1996, 383(6600): 531-535.
- [11] MCNATTY KP, JUENGEL JL, WILSON T, GALLOWAY SM, DAVIS GH, HUDSON NL, MOELLER CL, CRANFIELD M, READER KL, LAITINEN MPEGROOME NP, SAWYER HR, RITVOS O. Oocyte-derived growth factors and ovulation rate in sheep[J]. Reproduction: Cambridge, England Supplement, 2003, 61: 339-351.
- [12] OTSUKA F, MCTAVISH KJ, SHIMASAKI S. Integral role of *GDF-9* and *BMP-15* in ovarian function[J]. Molecular Reproduction and Development, 2011, 78(1): 9-21.
- [13] VITT UA, HAYASHI M, KLEIN C, HSUEH AJW. Growth differentiation factor-9 stimulates proliferation but suppresses the follicle-stimulating hormone-induced differentiation of cultured granulosa cells from small antral and preovulatory rat Follicles1[J]. Biology of Reproduction, 2000, 62(2): 370-377.
- [14] SUGIURA K, PENDOLA FL, EPPIG JJ. Oocyte control of metabolic cooperativity between oocytes and companion granulosa cells: energy metabolism[J]. Developmental Biology, 2005, 279(1): 20-30.
- [15] ELVIN JA, YAN CN, WANG P, NISHIMORI K, MATZUK MM. Molecular characterization of the follicle defects in the growth differentiation factor 9-deficient ovary[J]. Molecular Endocrinology, 1999, 13(6): 1018-1034.
- [16] 徐敏丽, 白莉雅, 王建英, 崔绪奎, 张果平. 绵羊 *GDF9* 基因研究进展[J]. 山东农业科学, 2016, 48(5): 148-152, 158.
- XU ML, BAI LY, WANG JY, CUI XK, ZHANG GP. Research advances of sheep *GDF9* gene[J]. Shandong Agricultural Sciences, 2016, 48(5): 148-152, 158 (in Chinese).
- [17] HORVATH P, BARRANGOU R. CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea[J]. Science, 2010, 327(5962): 167-170.
- [18] JINEK M, CHYLINSKI K, FONFARA I, HAUER M, DOUDNA JA, CHARPENTIER E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity[J]. Science, 2012, 337(6096): 816-821.
- [19] KOMOR AC, KIM YB, PACKER MS, ZURIS JA, LIU DR. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage[J]. Nature, 2016, 533(7603): 420-424.
- [20] REES HA, LIU DR. Base editing: precision chemistry on the genome and transcriptome of living cells[J]. Nature Reviews Genetics, 2018, 19(12): 770-788.
- [21] GAUDELLI NM, KOMOR AC, REES HA, PACKER MS, BADRAN AH, BRYSON DI, LIU DR. Programmable base editing of A•T to G•C in genomic DNA without DNA cleavage[J]. Nature, 2017, 551(7681): 464-471.
- [22] KOBLAN LW, DOMAN JL, WILSON C, LEVY JM, TAY T, NEWBY GA, MAIANTI JP, RAGURAM A, LIU DR. Improving cytidine and adenine base editors by expression optimization and ancestral reconstruction[J]. Nature Biotechnology, 2018, 36(9): 843-846.
- [23] XIE YF, WANG DQ, LAN F, WEI G, NI T, CHAI RJ, LIU D, HU SJ, LI MQ, LI DJ, WANG HY, WANG YM. An episomal vector-based CRISPR/Cas9 system for highly efficient gene knockout in human pluripotent stem cells[J]. Scientific Reports, 2017, 7(1): 2320.
- [24] WANG B, WANG ZS, WANG DQ, ZHANG BL, ONG SG, LI MQ, YU WQ, WANG YM. *krCRISPR*: an easy and efficient strategy for generating conditional knockout of essential genes in cells[J]. Journal of Biological Engineering, 2019, 13: 35.
- [25] Van CRAENENBROECK K, Van HOENACKER P, HAEGEMAN G. Episomal vectors for gene expression in mammalian cells[J]. European Journal of Biochemistry, 2000, 267(18): 5665-5678.
- [26] QI T, WU FJ, XIE YQ, GAO SQ, LI MM, PU J, LI DL, LAN F, WANG YM. Base editing mediated generation of point mutations into human pluripotent stem cells for modeling disease[J]. Frontiers in Cell and Developmental Biology, 2020, 8: 590581.
- [27] ROY J, POLLEY S, DE S, MUKHERJEE A, BATASYAL S, PAN S, BRAHMA B, DATTA TK, GOSWAMI SL. Polymorphism of fecundity genes (*FecB*, *FecX*, and *FecG*) in the Indian Bonpala sheep[J]. Animal Biotechnology, 2011, 22(3): 151-162.

- [28] HANRAHAN JP, GREGAN SM, MULSANT P, MULLEN M, DAVIS GH, POWELL R, GALLOWAY SM. Mutations in the genes for oocyte-derived growth factors GDF9 and BMP15 are associated with both increased ovulation rate and sterility in Cambridge and belclare sheep (*Ovis aries*)[J]. *Biology of Reproduction*, 2004, 70(4): 900-909.
- [29] LIU X, WANG YS, TIAN YC, YU Y, GAO MQ, HU GD, SU F, PAN SH, LUO Y, GUO ZK, QUAN FS, ZHANG Y. Generation of mastitis resistance in cows by targeting human lysozyme gene to β -casein locus using zinc-finger nucleases[J]. *Proceedings Biological Sciences*, 2014, 281(1780): 20133368.
- [30] GAO YP, WU HB, WANG YS, LIU X, CHEN LL, LI Q, CUI CC, LIU X, ZHANG JC, ZHANG Y. Single Cas9 nickase induced generation of NRAMP1 knockin cattle with reduced off-target effects[J]. *Genome Biology*, 2017, 18(1): 13.
- [31] WU HB, WANG YS, ZHANG Y, YANG MQ, LV JX, LIU J, ZHANG Y. TALE nickase-mediated SP110 knockin endows cattle with increased resistance to tuberculosis[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2015, 112(13): E1530-E1539.
- [32] KANG BC, YUN JY, KIM ST, SHIN Y, RYU J, CHOI M, WOO JW, KIM JS. Precision genome engineering through adenine base editing in plants[J]. *Nature Plants*, 2018, 4(7): 427-431.
- [33] MALI P, YANG LH, ESVELT KM, AACH J, GUELL M, DICARLO JE, NORVILLE JE, CHURCH GM. RNA-guided human genome engineering via Cas9[J]. *Science*, 2013, 339(6121): 823-826.
- [34] WANG HY, YANG H, SHIVALILA CS, DAWLATY MM, CHENG AW, ZHANG F, JAENISCH R. One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering[J]. *Cell*, 2013, 153(4): 910-918.
- [35] LIU Z, SHAN H, CHEN S, CHEN M, SONG Y, LAI L, LI Z. Highly efficient base editing with expanded targeting scope using SpCas9-NG in rabbits[J]. *FASEB Journal*, 2020, 34(1): 588-596.
- [36] 袁泓明. 基于基因编辑技术制备 CD163 基因修饰猪及 α -Gal/Neu5Gc/Sd^a 缺失猪[D]. 长春: 吉林大学博士学位论文, 2020.
YUAN HM. Generation of CD163 modified pigs and α -gal/Neu5Gc/sd^a delete pigs with gene-editing technique[D]. Changchun: Doctoral Dissertation of Jilin University, 2020 (in Chinese).
- [37] 王紫曾晨. 碱基编辑器在牛胚胎中的应用效果研究[D]. 杭州: 浙江大学硕士学位论文, 2021.
WANG ZCC Research on the effectiveness of base editors in cattle embryos[D]. Hangzhou: Master's Thesis of Zhejiang University, 2021 (in Chinese).
- [38] ZHOU SW, DING YG, LIU J, LIU Y, ZHAO XE, LI GW, ZHANG CG, LI C, WANG Y, KALDS P, GAO YW, ZONG B, HUANG XY, HUANG SH, YU HH, KOU QF, PETERSEN B, HUANG XX, WANG XL, MA BH, et al. Highly efficient generation of sheep with a defined *FecB* B mutation via adenine base editing[J]. *Genetics, Selection, Evolution: GSE*, 2020, 52(1): 35.
- [39] NIU YY, ZHAO XE, ZHOU JK, LI Y, HUANG Y, CAI B, LIU YT, DING Q, ZHOU SW, ZHAO J, ZHOU GX, MA BH, HUANG XX, WANG XL, CHEN YL. Efficient generation of goats with defined point mutation (I397V) in *GDF9* through CRISPR/Cas9[J]. *Reproduction, Fertility, and Development*, 2018, 30(2): 307-312.
- [40] KIM YB, KOMOR AC, LEVY JM, PACKER MS, ZHAO KT, LIU DR. Increasing the genome-targeting scope and precision of base editing with engineered Cas9-cytidine deaminase fusions[J]. *Nature Biotechnology*, 2017, 35(4): 371-376.
- [41] GEHRKE JM, CERVANTES O, CLEMENT MK, WU YX, ZENG J, BAUER DE, PINELLO L, JOUNG JK. An APOBEC3A-Cas9 base editor with minimized bystander and off-target activities[J]. *Nature Biotechnology*, 2018, 36(10): 977-982.
- [42] THURONYI BW, KOBLAN LW, LEVY JM, YEH WH, ZHENG C, NEWBY GA, WILSON C, BHAUMIK M, SHUBINA-OLEINIK O, HOLT JR, LIU DR. Continuous evolution of base editors with expanded target compatibility and improved activity[J]. *Nature Biotechnology*, 2019, 37(9): 1070-1079.
- [43] 孙嘉媛, 孙珂欣, 丁一格, 周世卫, 高亚伟, 陈玉林, 王小龙. 四种单碱基编辑器在羊成纤维细胞上的编辑效率[J]. *农业生物技术学报*, 2021, 29(1): 169-177.
SUN JY, SUN KX, DING YG, ZHOU SW, GAO YW, CHEN YL, WANG XL. Editing efficiency of four single base editors in sheep (*Ovis aries*) and goat (*Capra hircus*) fibroblasts[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2021, 29(1): 169-177 (in Chinese).
- [44] FU JH, LI Q, LIU XY, TU TX, LV XJ, YIN XD, LV JN, SONG ZM, QU J, ZHANG JW, LI JS, GU F. Human cell based directed evolution of adenine base editors with improved efficiency[J]. *Nature Communications*, 2021, 12: 5897.
- [45] 丁一格. ABEs 介导的 *FecB* 基因突变滩羊的制备[D]. 杨凌: 西北农林科技大学硕士学位论文, 2020.
DING YG. Highly efficient generation of sheep with a defined *FecB* mutation via adenine base editing[D]. Yangling: Master's Thesis of Northwest A&F University, 2020 (in Chinese).

(本文责编 陈宏宇)