

夏潇潇, 王佳琳, 李玲, 等. 海门山羊 MSTN 基因克隆、生物信息学分析及单碱基编辑的研究 [J]. 畜牧与兽医, 2025, 57 (5): 24-30.
XIA X X, WANG J L, LI L, et al. Cloning, bioinformatics analysis and single base editing of MSTN gene in Haimen goat [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2025, 57 (5): 24-30.

海门山羊 MSTN 基因克隆、生物信息学分析及单碱基编辑的研究

夏潇潇^{1,2#}, 王佳琳^{1,2#}, 李玲^{1,2}, 佰伍加^{1,2}, 宋志贤³, 岳恒¹, 曹少先⁴, 袁玉国^{1,2*}

(1. 扬州大学兽医学院/扬州大学动物基因工程重点实验室, 江苏 扬州 225009;

2. 江苏省动物重要疫病与人兽共患病防控协同创新中心, 江苏 扬州 225009;

3. 扬州大学医学院, 江苏 扬州 225009;

4. 江苏省农业科学院畜牧研究所/江苏省畜禽精准育种工程研究中心/农业农村部种养结合重点实验室, 江苏 南京 210014)

摘要: 为探明海门山羊不同组织中肌肉生长抑制素 (MSTN) 基因表达规律及其编码蛋白结构特点, 通过克隆海门山羊 MSTN 基因 CDS 序列并分析其生物特点, 运用实时荧光定量 PCR 技术分析 MSTN 基因在不同组织中的表达水平, 在 MSTN 基因第 2、3 外显子上设计 3 个单碱基编辑靶位点, 将构建的 sgRNA 质粒分别与胞嘧啶碱基编辑器 YE1-BE3-FNLS 电转入培养的海门山羊胎儿成纤维细胞中, 筛选 48 h 后提取细胞基因组 DNA, 对 PCR 扩增靶位点序列进行 Sanger 测序和 TA 克隆分析。结果: 海门山羊 MSTN 基因的 CDS 序列编码 375 个氨基酸, 具有高度保守性。海门山羊不同组织中 MSTN 基因表达水平存在差异, 其中骨骼肌的表达量最高; 3 条 sgRNA 均可在 MSTN 基因外显子上进行单碱基编辑, 编辑效率分别为 25%、37% 和 29%。结论: 研究结果为进一步利用单碱基基因编辑技术培育 MSTN 基因突变海门山羊新品系提供了新的依据。

关键词: 海门山羊; 肌肉生长抑制素; 单碱基编辑

中图分类号: S826 文献标志码: A 文章编号: 0529-5130(2025)05-0024-07

Cloning, bioinformatics analysis and single base editing of MSTN gene in Haimen goat

XIA Xiaoxiao^{1,2#}, WANG Jialin^{1,2#}, LI Ling^{1,2}, KYAW Paing Oo^{1,2}, SONG Zhixian³,

YUE Heng¹, CAO Shaoxian⁴, YUAN Yuguo^{1,2*}

(1. College of Veterinary Medicine/Key Laboratory of Animal Genetic Engineering, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China;

2. Jiangsu Co-innovation Center of Prevention and Control of Important Animal Infectious Diseases and Zoonoses, Yangzhou 225009, China;

3. College of Medicine, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China;

4. Institute of Animal Science, Jiangsu Academy of Agricultural Science/Jiangsu Province Engineering Research Center for Precision Animal Breeding/Key Laboratory of Crop and Animal Integrated Farming, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Nanjing 210014, China)

Abstract: In order to investigate the expression of the myostatin (MSTN) gene and the structural characteristics of its encoded protein in different tissues of Haimen goat, the CDS sequence of MSTN gene of Haimen goat was cloned and the biological characteristics were analyzed. The expression level of the MSTN gene in different organs and muscle tissues of Haimen goat was checked by RT-qPCR. Three sgRNA plasmids targeting the second and third exons of the MSTN gene were designed and constructed, respectively, and co-transfected with YE1-BE3-FNLS into the fetal fibroblasts cell in Haimen goat. After 48 h of screening, cell DNA was extracted, and target site sequences were

收稿日期: 2024-06-12; 修回日期: 2025-03-12

基金项目: 江苏省种业振兴“揭榜挂帅”项目 (JBGS [2021] 025); 江苏高校优势学科建设工程项目 (PAPD); 高等学校学科创新引智计划项目 (D18007); 扬州市市校合作专项 (YZ2023205)

第一作者: 夏潇潇, 女, 硕士研究生; 王佳琳, 女, 硕士研究生。*共同第一作者

*通信作者: 袁玉国, 博士, 副教授, 研究方向为动物基因编辑与生物育种, E-mail: yyg9776430@163.com。

amplified by PCR for Sanger sequencing and TA cloning analysis. The data indicated that the CDS sequence for the MSTN gene of Haimen goat encoding 375 amino acids, which was highly conserved. The MSTN gene was expressed in different tissues and organs of Haimen goats, and the expression level of MSTN was the highest in the triceps brachii. Three sgRNA successfully introduced stop codons with editing efficiencies of 25%, 37%, and 29%, respectively. These data laid a foundation for the use of single base gene editing technology to breed new strains of Haimen goats with MSTN gene mutation.

Keywords: Haimen goat; myostatin; single base editing

肌肉生长抑制素 (myostatin, MSTN) 是转化生长因子- β 超家族一员, 主要在骨骼肌中表达并抑制其分化与生长^[1]。在家畜和其他动物中发现 MSTN 基因自然突变可表现出典型的双肌性状^[2]。近年来, 基于 CRISPR/Cas9 以及发展出来的单碱基编辑器, 如胞嘧啶碱基编辑器 (CBE) 等基因编辑工具可以高效地在动物基因组上进行基因删除、插入和替换等精准遗传操作^[3]。目前, 利用这些基因编辑技术体系获得了 MSTN 基因突变的牛^[4]、羊^[5]、猪^[6]和兔^[7]等家畜, 并表现出双肌臀表型、生长速度快等特点。

海门山羊又称长江三角洲白山羊, 是皮肉毛兼优的优良地方山羊品种之一, 是世界上唯一的可产优质毛笔毛的品种, 主要分布在江苏海门地区, 具有性成熟早、产羔率高等特点^[8]。海门山羊体型相对偏小, 饲养周期较长, 育肥效果欠佳, 养殖效益低^[9]。目前, 海门山羊 MSTN 基因序列及表达特征尚不清楚。为探明海门山羊各组织中 MSTN 基因表达规律及其编码蛋白结构特点, 本试验通过克隆海门山羊 MSTN 基因 CDS 序列并分析其生物特点, 运用实时荧光定量 PCR (qPCR) 技术分析 MSTN 基因在不同组织中的表达水平。在 MSTN 基因外显子上设计特异 sgRNA, 在海门山羊胎儿成纤维细胞上进行单碱基编辑效率的验证, 为进一步利用单碱基编辑技术制备 MSTN 基因突变海门山羊育种材料提供新的依据。

1 材料与方法

1.1 样品采集

将 1 日龄海门山羊 (本实验室饲养母羊所生) 安乐死, 解剖取山羊心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏、瘤胃、十二指肠、臂三头肌、背最长肌、股四头肌, 剪切成小碎块, 用生理盐水、DEPC 水冲洗后放于 -80 °C 冰箱保存备用。

1.2 主要试剂与材料

ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix (Q711) DNA 产物纯化试剂盒、逆转录试剂盒均购自南京诺唯赞生物科技有限公司。YE1-BE3-FNLS 质粒由江苏农科院畜牧所曹少先课题组赠予。Guide-it™ sgRNA In Vitro Transcription sgRNA 体外转录试剂盒购

终校

自宝生物工程 (大连) 有限公司。

1.3 引物设计与合成

根据山羊 MSTN 基因序列 (登录号: NM_001285737.1) 设计 PCR 及 qPCR 引物, 引物序列见表 1。引物均由安徽通用生物有限公司合成。

1.4 海门山羊 MSTN 基因克隆与测序

将 50~100 mg 的肌肉组织研磨, 用 TRIzol 法提取总 RNA 并合成 cDNA。扩增 MSTN 基因 PCR 反应体系: 2×Mix 10 μ L, 上下游引物各 0.8 μ L, 模板 2 μ L, 补 ddH₂O 至 20 μ L。反应条件: 95 °C 5 min; 95 °C 30 s, 50 °C 15 s, 72 °C 72 s, 35 次循环; 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物与 pMD19-T 载体在 16 °C 连接后转化感受态细胞, 提取单克隆菌落质粒进行测序分析。

表 1 引物信息

基因	引物序列 (5'→3')	产物大小/bp	用途
MSTN	F: TTGGCTTGCGCTTACTCA	1 204	PCR
	R: CACCCACAGCGATCTACT		
	F: GATCTTGCTGTAACCTTCCCAGA	157	qPCR
	R: CAGTTAGAGGTAACGACAGCAT		
GAPDH	F: GGGCTGCTTTTAATACTGGCAAA	103	qPCR
	R: CCATGGGTGGAATCATACTGGAA		

1.5 生物信息学分析

利用 DNASTar 软件将海门山羊 MSTN 氨基酸序列与其他物种的序列进行比对, 分析海门山羊与其他物种的差异性, 并利用 Mega 6.0 软件构建系统进化树, 利用在线软件预测分析 MSTN 蛋白结构与功能。

1.6 qPCR 分析

以 4 只海门山羊各组织 cDNA 为模板, 以山羊 GAPDH 基因为内参, 检测各组织中 MSTN 基因相对表达量。反应体系: 2×Mix 10 μ L, 引物各 0.4 μ L, 模板 1 μ L, 补 ddH₂O 至 20 μ L。反应条件: 95 °C 30 s; 95 °C 10 s, 57 °C 30 s, 40 次循环。采用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 法分析各组织中 MSTN 基因相对表达量。

1.7 sgRNA 表达载体的构建

在山羊 MSTN 基因 (登录号: NM_001285737.1)

外显子 (Exon) 上设计 3 条 sgRNA, 靶位点及序列如图 1 所示。用同源重组的方法连接到 pGL3-U6-sgRNA-PGK-puromycin 载体中, 插入成功的质粒分别命名为 SG1、SG2 和 SG3。

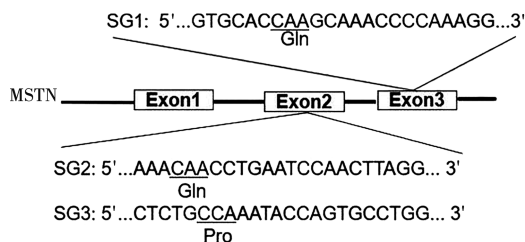


图 1 靶位点示意

应, 如图 2 所示可扩增出大小约 1 200 bp 条带。

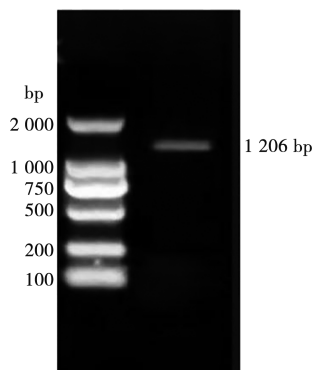


图 2 海门山羊 MSTN 基因 PCR 扩增结果

1.8 海门山羊胎儿成纤维细胞转染

消化收集 80%~90% 丰度的海门山羊胎儿成纤维细胞 (取自本实验室流产海门山羊胎儿), 用 PBS 和电转液吹打洗涤, 将 YE1-BE3-FNLS 分别与等浓度 sgRNA 载体 (SG1, SG2 和 SG3) (共 15 μg 质粒) 混合后在 2 mm 宽的电转杯中电转染 (330 V, 500 μs, 2 次)。细胞在 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h, 以 400 μg/mL 嘌呤霉素筛选 48 h, 显微镜下观察细胞红色荧光表达情况。

1.9 细胞基因编辑效率的检测

细胞筛选 48 h, 提取 DNA 进行 PCR 扩增。对测序有套峰的 PCR 产物进一步单克隆测序, 每个样本随机挑取 10~20 个菌落, 分析基因突变情况与效率。

1.10 数据统计与分析

数据采用统计分析软件 SPSS 22.0 进行单因素方差分析, 以“平均值±标准差”表示。 $P < 0.05$ 表示差异显著。

2 结果与分析

2.1 海门山羊 MSTN 基因克隆与鉴定

以海门山羊背最长肌 cDNA 为模板进行 PCR 反

2.2 海门山羊 MSTN 基因序列相似性比对

利用 DNASTar 软件对绵羊 (*Ovis aries*, NP_001009428.1, 375 aa), 牛 (*Bos taurus*, NP_001001525.1, 375 aa), 水牛 (*Bubalus bubalis*, NP_001277896.1, 375 aa), 猪 (*Sus scrofa*, NP_999600.2, 375 aa), 家犬 (*Canis lupus familiaris*, NP_001002959.1, 375 aa), 家兔 (*Oryctolagus cuniculus*, NP_001103291.1, 375 aa), 人 (*Homo sapiens*, NP_005250.1, 375 aa), 猕猴 (*Macaca fascicularis*, XP_045223337.1, 375 aa), 猩猩 (*Pongo pygmaeus*, XP_054332845.1, 375 aa), 鼠 (*Mus musculus*, NP_034964.1, 376 aa), 斑马鱼 (*Danio rerio*, NP_571094.2, 374 aa), 家鸡 (*Gallus gallus*, NP_001001461.1, 375 aa) 的 MSTN 氨基酸序列进行比对, 与海门山羊 (*Capra hicus*) 同源性依次为 100.0%、93.3%、92.0%、95.2%、93.1%、94.7%、94.1%、94.4%、94.4%、92.0%、65.6% 及 87.7%。物种间进化树结果显示海门山羊与绵羊同源性最高, 亲缘关系最近, 与鸡和斑马鱼同源性最低, 亲缘关系最远 (图 3)。

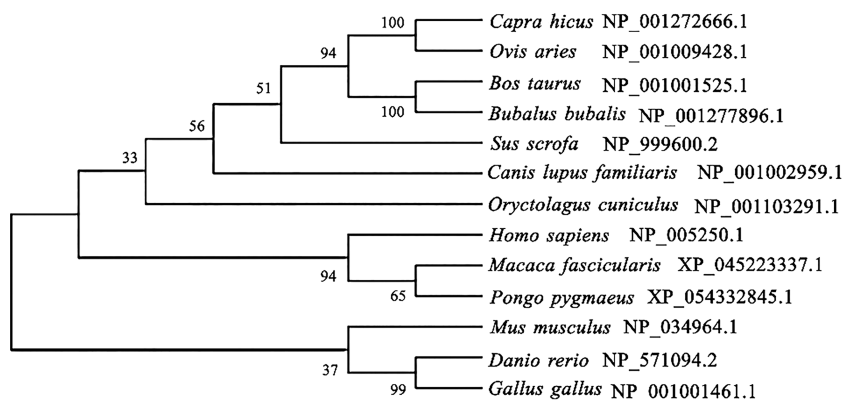


图 3 MSTN 核苷酸序列系统进化树

2.3 海门山羊 MSTN 蛋白理化性质分析

如表 2 所示, 利用 ProtParam 软件分析表明海门山羊 MSTN 基因共编码 375 个氨基酸, 且为亲水蛋

白, 其中频率表示单个氨基酸占氨基酸总数的百分比。

表 2 海门山羊 MSTN 蛋白氨基酸组成

氨基酸	数量	频率/%	氨基酸	数量	频率/%
天冬氨酸 (Asp, D)	23	6.1	甲硫氨酸 (Met, M)	14	2.1
谷氨酰胺 (Gln, Q)	18	4.8	苯丙氨酸 (Phe, F)	24	3.7
精氨酸 (Arg, R)	17	4.5	脯氨酸 (Pro, P)	21	6.4
赖氨酸 (Lys, K)	31	8.3	苏氨酸 (Thr, T)	21	5.6
丙氨酸 (Ala, A)	15	4.0	丝氨酸 (Ser, S)	6	5.6
天门冬酰胺 (Asn, N)	17	4.5	色氨酸 (Trp, W)	12	1.6
半胱氨酸 (Cys, C)	13	3.5	酪氨酸 (Tyr, Y)	22	3.2
谷氨酸 (Glu, E)	25	6.7	缬氨酸 (Val, V)	24	5.9
甘氨酸 (Gly, G)	20	5.3	异亮氨酸 (Ile, I)	3	6.4
组氨酸 (His, H)	7	1.9	亮氨酸 (Leu, L)	7	9.9

2.4 海门山羊 MSTN 蛋白结构预测

用 SOPMA 和 SWISS MODEL 软件预测表明海门山羊 MSTN 蛋白由 α -螺旋 (86 个氨基酸)、延伸链 (76 个氨基酸)、 β -转角 (11 个氨基酸) 和无规则卷

曲 (202 个氨基酸) 组成, 占比分别为 22.93%、20.27%、2.93% 和 53.87% (图 4)。MSTN 蛋白三级结构主要以无规则卷曲为主 (图 5)。



A. 密码子对应图; B. 二级结构预测图。

图 4 海门山羊 MSTN 蛋白二级结构预测

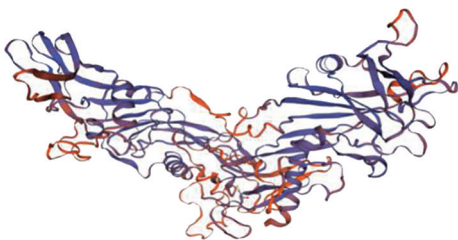


图 5 海门山羊 MSTN 蛋白三级结构预测

2.5 海门山羊 MSTN 蛋白互作分析

利用 STRING 软件分析蛋白互作关系, 表明 MSTN 蛋白与激活素 A 受体 2A 型 (ACVR2A)、转化生长因子 β 受体 1 (TGFB1)、SMAD 家族成员 2 (SMAD2)、肌源性分化因子 1 (MYOD1)、肌源性因子 5 (MYF5)、肌细胞生成素 (MYOG)、卵泡抑素 (FST)、激活素受体 1B 型 (ACVR1B)、卵泡抑素样

3 (FSTL3) 和激活素 A 受体 2B 型 (ACVR2B) 等蛋白具有互作关系 (图 6)。

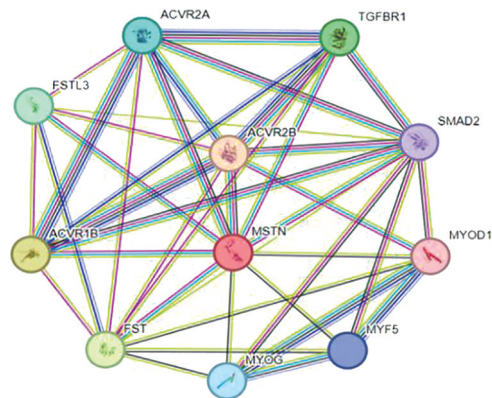
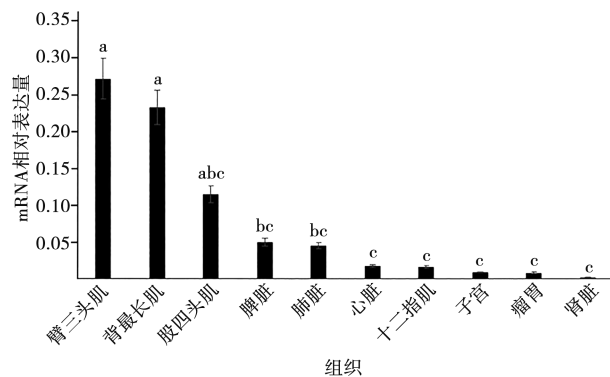


图 6 海门山羊 MSTN 蛋白互作结构



不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$), 相同字母表示差异不显著 ($P > 0.05$)。

2.6 MSTN 基因在海门山羊不同组织中的表达

如图 7 所示, qPCR 结果显示 MSTN 基因在海门山羊不同组织中的表达水平存在差异。骨骼肌中的表达量最高, 其中臂三头肌和背最长肌的表达量显著高于其他组织 ($P < 0.05$), 而股四头肌与其他各组差异不显著 ($P > 0.05$)。

图 7 MSTN 基因在海门山羊不同组织中的表达

2.7 质粒电转染效率

将构建好的 3 个 sgRNA 表达载体分别与 YE1-BE3-FNLS 共转染海门山羊胎儿成纤维细胞, 筛选 48 h 后观察细胞红色荧光表达 (图 8), 用 Image 软件分析基因转染效率为 55%。

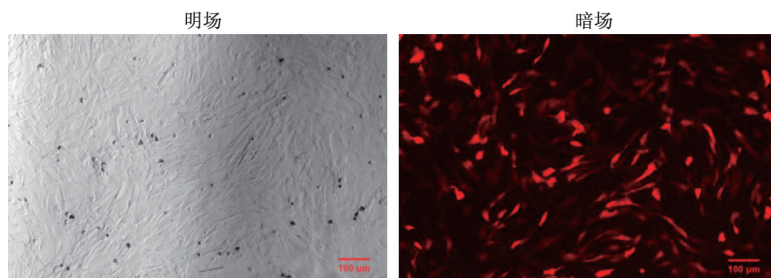
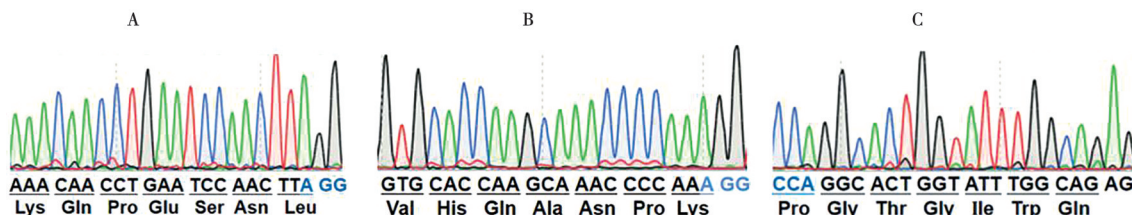


图 8 细胞电转荧光效果

2.8 细胞靶位点编辑效率分析

细胞转染、筛选后, 提取 DNA 进行 PCR 扩增, 产物经 Sanger 测序。结果如图 9A~C 所示, PCR 产物测序均有套峰, 说明转染的细胞中存在突变。为了进一步分析各组细胞中 MSTN 基因编辑形式, 将 PCR

产物进行单克隆测序, 结果如图 10~12 和表 3 所示, SG1 中 C>T 编辑效率为 25% (5/20), SG2 中 G>A 编辑效率为 37% (10/27), SG3 中 C>T 和 A>G 的编辑效率 29% (18/62)。



A. SG1 转染后测序结果; B. SG2 转染后测序结果; C. SG3 转染后测序结果。

图 9 细胞转染 sgRNA 质粒 DNA 测序结果

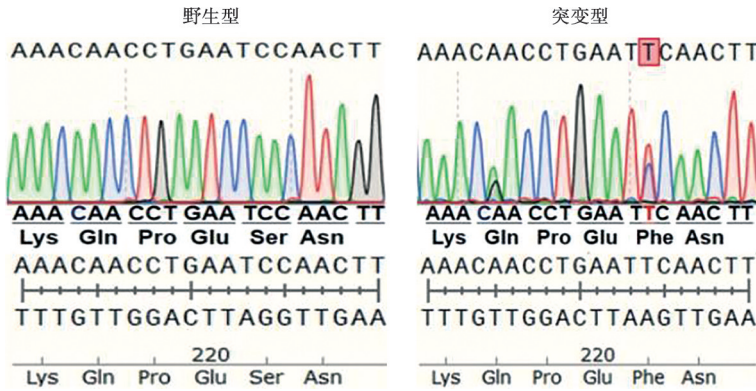


图 10 SG1 TA 克隆发生 C>T 突变测序结果

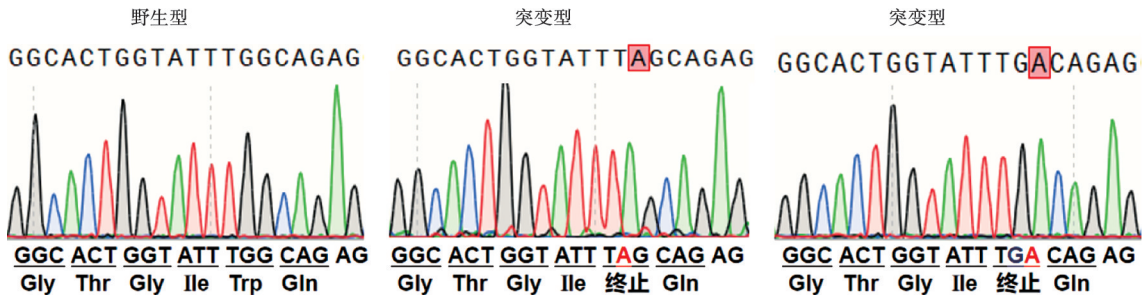


图 11 SG2 TA 克隆发生 G>A 突变测序结果

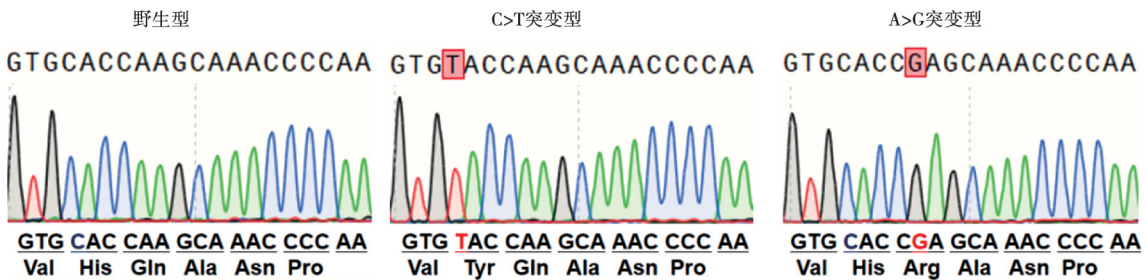


图 12 SG3 TA 克隆发生 C>T、A>G 突变测序结果

表 3 MSTN 基因靶位点编辑效率汇总

编号	n	外显子	突变类型	YE1-BE3-FNLS 编辑器突变率/%
SG1	20	2	C>T	25.0
SG2	37	2	G>A	37.0
SG3	62	3	C>T/A>G	29.0

3 讨论

目前，国内外有关畜禽及其他动物的 MSTN 基因结构及功能研究都有报道^[10-12]，而有关江苏地方优良品种海门山羊的 MSTN 研究尚未详细报道。本试验结果表明，海门山羊 MSTN 基因编码 375 个氨基酸，与报道的山羊、藏羊结果一致^[13-14]，表明 MSTN 基因具有高度的保守性。通过对 MSTN 蛋白进行蛋白互

作分析显示其与 FSTL3 和 ACVR2B 等蛋白均具有互作关系。

目前对海门山羊 MSTN 基因研究较少，目前尚不清楚其各组织的表达水平及差异。本研究检测了 MSTN 基因在海门山羊不同组织中的表达情况。MSTN 基因在海门山羊不同器官及不同部位肌肉中均有表达，在肌肉组织中表达最高。这与藏羊、新西兰白兔表达规律类似^[14-15]。

细胞电转染效率受多方面因素影响，包括细胞状态、细胞数量、电转液、质粒浓度等，此外，不同电压、电流也会对电转结果造成影响。本研究参考林洁等^[16]对于细胞电穿孔转染效率的优化方法，确定了一个较为合适的电转染条件，可将 sgRNA 质粒与单碱基编辑器质粒高效电转进海门山羊胎儿成纤维细胞。同时，在试验过程中还尝试过脂质体转染，但几

次尝试后均发现其效率远不如电穿孔转染的效率好,经脂质体转染的细胞死亡率虽然有所下降,但其细胞荧光效率及基因编辑效率显著降低,这与张禾璇等^[17]在 HepG2、ADM 细胞上研究结果一致。在海门山羊胎儿成纤维细胞上基因编辑结果显示,设计的 3 条 sgRNA 均实现了有效编辑,编辑效率高于绵羊 MSTN 基因编辑效率^[18-19],低于 Yuan 等^[20]在猪 MSTN 基因上的编辑效率,这可能与 sgRNA 本身的靶位点碱基序列有关。虽然姚旭东等^[18]的绵羊胎儿成纤维细胞 24 h 荧光效率高于本试验的结果,但其细胞基因编辑效率低,可能也与 sgRNA 质粒是否同时进入细胞有关。同时还发现在靶位点附近出现一些非目的突变,这可能是基因本身的高活性所引起的多个 C 脱氨基导致^[18-21]。

总之,本研究克隆并分析了海门山羊 MSTN 基因 CDS 序列, MSTN 基因在海门山羊骨骼肌中的表达水平最高。利用 CBE 单碱基编辑系统对海门山羊胎儿成纤维细胞外显子进行了基因编辑并成功引入终止子,基因编辑效率最高达到 37%。以上结果为后续利用原核胚胎显微注射的方法获得 MSTN 基因编辑海门山羊奠定了基础。

参考文献:

- [1] MCPHERRON A C, LAWLER A M, LEE S J. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-superfamily member [J]. *Nature*, 1997, 387 (6628): 83-90.
- [2] GROBET L, MARTIN L J, PONCELET D, et al. A deletion in the bovine myostatin gene causes the double-muscling phenotype in cattle [J]. *Nature*, 1997, 17 (1): 71-74.
- [3] VILLIGER L, JOUNG J, KOBLAN L, et al. CRISPR technologies for genome, epigenome and transcriptome editing [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2024, 25 (6): 464-487.
- [4] GU M, WANG S, DI A, et al. Combined transcriptome and metabolome analysis of smooth muscle of myostatin knockout cattle [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24 (9): 8120.
- [5] HE Z, ZHANG T, JIANG L, et al. Use of CRISPR/Cas9 technology efficiently targeted goat myostatin through zygotes microinjection resulting in double-muscling phenotype in goats [J]. *Biosci Rep*, 2018, 38: BSR20180742-BSR20180747.
- [6] REN J, HAI T, CHEN Y, et al. Improve meat production and virus resistance by simultaneously editing multiple genes in livestock using Cas12i^{Max} [J]. *Sci China Life Sci*, 2024, 67 (3): 555-564.
- [7] ZHANG T, LU Y, SONG S, et al. 'Double-muscling' and pelvic tilt phenomena in rabbits with the cystine-knot motif deficiency of myostatin on exon 3 [J]. *Biosci Rep*, 2019, 39 (5): BSR20190207.
- [8] 戴晖, 陈启康, 顾拥建, 等. 海门山羊品种资源与生产性能研究 [J]. *畜牧与兽医*, 2013, 45 (2): 45-47.
- [9] 黄玮, 王锋, 徐辉, 等. 加快发展海门山羊产业的思考 [J]. *畜牧与兽医*, 2011, 43 (10): 44-46.
- [10] KALDS P, ZHOU S, HUANG S, et al. When less is more: targeting the myostatin gene in livestock for augmenting meat production [J]. *J Agric Food Chem*, 2023, 71 (10): 4216-4227.
- [11] 周磊, 李东旭, 冒魏佳, 等. Cas9 和 PE 介导湖羊骨骼肌卫星细胞 MSTN 基因敲除的研究 [J]. *南京农业大学学报*, 2025, 48 (2): 419-426.
- [12] 李隐侠, 刘伟佳, 张晨俭, 等. MSTN 基因编辑湖羊胫腓肌的转录组分析 [J]. *南京农业大学学报*, 2024, 47 (2): 342-350.
- [13] 金鑫燕. 山羊肌生成抑制素 (MSTN) 基因的克隆及生物信息学分析 [J]. *中国畜牧兽医*, 2011, 38 (9): 111-114.
- [14] 张军霞, 贺娜, 李明明, 等. 藏羊 MSTN 基因克隆、生物信息学及组织表达分析 [J]. *中国畜牧兽医*, 2022, 49 (11): 4307-4317.
- [15] 姜懿轩, 王亚玲, 邢珊珊, 等. 新西兰白兔 MSTN 基因克隆、生物信息学分析及表达谱构建 [J]. *中国畜牧兽医*, 2021, 48 (10): 3501-3511.
- [16] 林洁, 高建, 段永恒, 等. 宫颈细胞系化学转染与电穿孔转染效率的比较与优化 [J]. *中国组织化学与细胞化学杂志*, 2019, 28 (5): 467-73.
- [17] 张禾璇, 单可人, 何燕, 等. 脂质体法与电穿孔法转染两种细胞效率的比较 [J]. *重庆医学*, 2014, 43 (33): 4432-4433.
- [18] 姚旭东, 蒙亚琦, 任秀美奥, 等. 利用单碱基编辑系统定点编辑哈萨克羊 MSTN 基因的研究 [J]. *畜牧兽医学报*, 2021, 52 (8): 2162-2170.
- [19] 赵若琳, 张成图, 张迎冰, 等. 欧拉藏绵羊 MSTN 基因单碱基编辑体系的建立 [J]. *中国畜牧杂志*, 2023, 59 (6): 274-277.
- [20] YUAN H, YU T, WANG L, et al. Efficient base editing by RNA-guided cytidine base editors (CBEs) in pigs [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2020, 77 (4): 719-733.
- [21] KIM Y B, KOMOR A C, LEVY J M, et al. Increasing the genome-targeting scope and precision of base editing with engineered Cas9-cytidine deaminase fusions [J]. *Nat Biotechnol*, 2017, 35 (4): 371-376.