

利用CRISPR/Cas9技术构建敲除MEIS2基因的HEK293T人胚肾细胞系

卢利莎¹ 白杨² 刘鑫² 王洪涛² 高洁² 杨亦青^{2,3} 苏培² 刘翠翠²
王钰² 张磊升² 熊涛^{1*} 周家喜^{2*}

(¹长江大学生命科学学院, 荆州 434025; ²中国医学科学院, 北京协和医学院血液病医院(血液学研究所), 实验血液学国家重点实验室, 天津 300020; ³河北北方学院医学检验学院, 张家口 075000)

摘要 CRISPR/Cas9系统作为一种新型的基因组编辑技术, 利用人工设计的向导RNA(single-guide RNA, sgRNA)介导外源表达的Cas9蛋白与基因组靶点特异性结合以实现基因组DNA的特异性切割, 切割后的基因组DNA通过非同源末端连接或同源重组的方式进行修复, 从而实现基因的敲除、敲入等。MEIS2属于一类高度保守的同源盒转录因子MEIS家族, 研究发现, MEIS2广泛参与胚胎的早期发育及肿瘤的发生发展, 但其发挥作用的机制目前还不是很清楚。该研究针对MEIS2基因作用的功能域, 设计两个靶向MEIS2基因Exon3和Exon8的sgRNA, 通过SURVEYOR分析及Western blot检测, 确认了所设计sgRNA的有效性。进一步通过细胞分选及Western blot检测筛选出稳定敲除MEIS2基因的HEK293T细胞株。最后, 通过序列测定确认MEIS2发生了移码突变。综上所述, 该研究利用CRISPR/Cas9技术成功建立了完全敲除MEIS2的HEK293T细胞株, 为研究MEIS2的功能和作用机制提供了有效工具。

关键词 MEIS2; CRISPR/Cas9系统; 基因敲除

Construction of MEIS2 Knockout HEK293T Cell Line by CRISPR/Cas9 Technology

Lu Lisha¹, Bai Yang², Liu Xin², Wang Hongtao², Gao Jie², Yang Yiqing^{2,3}, Su Pei², Liu Cuicui², Wang Yu²,
Zhang Leisheng², Xiong Tao^{1*}, Zhou Jiayi^{2*}

(¹College of Life Sciences, Yangtze University, Jingzhou 434025, China; ²State Key Laboratory of Experimental Hematology, Institute of Hematology & Blood Diseases Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Tianjin 300020, China; ³Hebei North University, Faculty of Medical Laboratory Sciences, Zhangjiakou 075000, China)

Abstract CRISPR/Cas9 system is the newest gene-editing technology through constitutive expression of nucleases Cas9, which binds to specific site in the genome mediated by single-guide RNA and induces double-strand breaks (DSBs) at desired genomic loci. DSBs induced by these site-specific nucleases can be repaired by error-prone nonhomologous end joining (NHEJ) or homology directed repair (HDR), to generate gene-specific knockout or knockin cells. MEIS2 belongs to MEIS transcription factor family with conservative homeodomains. Studies have suggested that MEIS2 is a potent regulator of development and tumorigenesis, but the mechanisms are still unclear. In this study, we designed two single-guide RNAs targeting the Exon3 and Exon8 of MEIS2 gene,

收稿日期: 2015-01-13 接收日期: 2015-02-04

国家自然科学基金(批准号: 31171431、31301206)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0716-8083077, E-mail: xiongtao@hotmail.com; Tel: 022-23909412, E-mail: zhoujx@ihcams.ac.cn

Received: January 13, 2015 Accepted: February 4, 2015

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31171431, 31301206)

*Corresponding authors. Tel: +86-716-8083077, E-mail: xiongtao@hotmail.com; Tel: +86-22-23909412, E-mail: zhoujx@ihcams.ac.cn

网络出版时间: 2015-03-30 15:34

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20150330.1534.006.html>

which encode its two homeodomains. We measured their gene-targeting efficiency by SURVEYOR assay and Western blot analysis. Through dilution plating, we isolated a monoclonal *MEIS2* knockout cell line. Sequence analysis indicated that it contained frameshift mutations in both *MEIS2* alleles. In summary, we have successfully employed CRISPR/Cas9 system to construct a *MEIS2* knockout cell line, and it will be a powerful tool for studying the functions and related mechanisms of *MEIS2*.

Keywords *MEIS2*; CRISPR/Cas9; gene knockout

CRISPR(clustered regularly interspaced short palindromic repeat)是最早发现于原核生物大肠杆菌基因组中的串联重复序列。随后的研究发现,这种串联重复序列广泛存在于细菌和古细菌中,且证实其参与细菌和古细菌抵御外来噬菌体的入侵^[1-2]。CRISPR中的重复序列长度范围为21~48 bp,间隔可变序列长度范围为21~72 bp,其位于重复序列之间,CRISPR基因座在转录后进行加工生成成熟的crRNA。*CAS*基因位于临近CRISPR基因座的区域,编码的蛋白具有核酸酶和解旋酶的活性,在crRNA的介导下识别靶向的DNA序列,对DNA双链进行特异性切割,发挥免疫防御的功能^[3-4]。CRISPR/CAS系统对DNA序列的特异性切割依赖于CAS和crRNA形成的蛋白核酸复合物对DNA序列上PAM(protospacer adjacent motif)区域的识别,利用这一特性可以将其作为人工核酸内切酶(engineered endonuclease, EEN),用以对基因组特定位点进行遗传修饰,从而实现精确的基因组编辑^[5]。CRISPR/Cas9系统是基于CRISPR/CAS系统切割靶向DNA的原理人为优化的基因组编辑系统。利用人工设计的向导RNA(single-guide RNA, sgRNA)介导外源表达的Cas9蛋白与基因组的靶点特异性地结合,从而实现对基因组DNA特异性地切割^[6]。切割后的DNA有两种修复方式:非同源末端连接(non-homologous end joining, NHEJ)和同源重组(homologous recombination)。在没有外源的同源DNA存在时,切割的DNA可以通过非同源末端连接结合,从而在切割位点引入插入或缺失序列(Indel),引发目的基因编码的蛋白发生移码突变以实现目的基因的敲除。在有同源片段存在的条件下,切割的DNA发生同源重组,将外源片段整合到基因组中,以实现基因的敲除、敲入及突变等。

*MEIS2*属于一类高度保守的同源盒转录因子*MEIS*家族,此家族共有*MEIS1*、*MEIS2*和*MEIS3*三个成员。*MEIS2*通常与PBX(Pre-B-cell leukemia ho-

meobox)形成蛋白复合物,进而与HOX(Homeobox)相互作用促进下游基因的转录并参与个体发育以及分化过程^[7]。*MEIS2*在个体发育中发挥着重要的作用,缺失后可导致个体发育异常。在斑马鱼中抑制*MEIS2*的表达,其心脏发育严重受损^[8];*MEIS2*通过与PAX3、PAX7和OTX2相互作用调控顶盖发育,在早期脑的发育中发挥着重要作用^[9-10];*MEIS2*通过促进PAX6及cyclin D1来促进眼的发育以及视网膜的发生^[11-12]。同时,*MEIS2*的异常表达与肿瘤的发生发展密切相关,其通过抑制TGF- β II型受体的表达促进肺癌的恶性进展^[13];通过促进髓系细胞的增殖同时抑制其分化参与白血病的发生发展^[14]。虽然*MEIS2*的功能逐步被发现,但目前对*MEIS2*的作用机制还知之甚少,对其功能的研究手段主要是RNA干扰技术,而RNA干扰的瞬时性以及不彻底性会影响对基因功能的正确判断。本研究利用CRISPR/Cas9系统构建了稳定敲除*MEIS2*的HEK293T细胞株,为研究*MEIS2*的作用机制提供了有效工具。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株和质粒 HEK293T细胞由本实验室保存,PX458质粒购自Addgene公司,Trans 5 α 感受态细胞购自北京全式金生物技术公司,pGEM-T Easy Vector System购自Promega公司。

1.1.2 实验试剂 质粒小提试剂盒Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System及转染试剂FuGENE HD Transfection Reagent购自Promega公司,限制性内切酶*Bbs* I购自New England Biolabs公司,琼脂糖购自Invitrogen公司,胶回收试剂盒Zymoclean Gel DNA Recovery Kit购自ZYMO RESERACH公司,DMEM高糖培养基购自Thermo公司,胎牛血清购自Corning公司,SURVEYOR分析试剂盒购自Transgenomic公司,胶纯化试剂盒QIAquick PCR purification Kit及提基因组试剂盒DNeasy Blood & Tissue Kit购

自QIAGEN公司。

1.1.3 引物合成 所有引物和寡核苷酸链均由Invitrogen公司合成。

1.2 实验方法

1.2.1 sgRNA的设计和寡核苷酸链合成 利用哈佛大学张峰实验室提供的网络工具(<http://crispr.mit.edu>)设计MEIS2的向导RNA, 在正义链模板的5'端添加CACC, 可与Bbs I酶切后形成的黏性末端互补; 反义链模板的5'端添加AAAC, 与Bbs I酶切后形成的黏性末端互补。表1为设计的寡核苷酸序列。针对MEIS2基因作用的功能域, 分别设计了两个靶向MEIS2基因的Exon3和Exon8的sgRNA, 并根据靶点位置设计CRISPR鉴定引物, 分别为MEIS2-Exon3-F: 5'-TAT TTG TCG GGC TGC AGT G G-3', MEIS2-Exon3-R: 5'-TGT TCA AGT AGC TGG AGG CG-3', 产物大小为695 bp, 切割后产物大小为303 bp和392 bp; MEIS2-Exon8-F: 5'-AGA GCT ACT GCA CTG TGT CAA-3', MEIS2-Exon8-R: 5'-TGC AGT ATC CGA AGT TGC TCT-3', 产物大小722 bp, 切割后产物大小为320 bp和402 bp。

1.2.2 载体构建 用Bbs I内切酶切割线性化质粒PX458(1~2 µg), 按照Zymoclean Gel DNA Recovery Kit说明书进行切胶回收。sgRNA寡核苷酸单链退火形成双链: 取等量的上游链和下游链混合(终浓度为10 µmol/L)。程序如下: 37 °C 30 min, 95 °C 5 min, -1 °C/s降温至25 °C(连接时将产物1:200稀释后使用)。连接体系: 线性化PX458质粒(100~200 ng), 稀释后的sgRNA寡核苷酸双链1 µL, 10×T4 DNA连接酶缓冲液1 µL, T4连接酶1 µL, 补水至10 µL, 4 °C连接过夜。连接产物转化Trans 5α感受态细胞, 氨苄抗性平板筛选, 挑取单克隆, 按照质粒小提试剂盒说明书提取质粒并测序验证。

1.2.3 细胞培养和细胞转染 HEK293T细胞培养条件: DMEM高糖培养基(含10%胎牛血清)、L-glutamine、丙酮酸钠。37 °C、5% CO₂恒温培养。

转染前将1.3×10⁵ HEK293T细胞接种至24孔板中培养, 当细胞密度达到60%~70%时, 使用FuGENE HD转染试剂进行细胞转染(质粒终浓度为0.5 µg/L), 以等量空白载体PX458为阴性对照。

1.2.4 提取细胞基因组DNA 细胞转染后48 h, 将各组细胞进行消化, 取一部分进行传代以及保种。一部分消化完成后用PBS洗两次, 按照DNeasy Blood &

Tissue Kit试剂盒说明书操作步骤提取基因组DNA。

1.2.5 聚合酶链式反应以及SURVEYOR分析检测 PCR条件如下: Supermix 45 µL, Enhancer 3 µL, 基因组DNA 1 µL, Primers(F+R) 1 µL, 补水至50 µL。程序如下: 94 °C预变性5 min; 94 °C变性30 s, 60 °C退火30 s, 72 °C延伸60 s, 共32个循环; 最后72 °C延伸10 min, 4 °C保存。取反应后产物5 µL进行琼脂糖凝胶电泳检测其特异性。

SURVEYOR分析步骤如下: 用QIAquick PCR purification Kit试剂盒进行PCR产物纯化, 将回收产物稀释至20 mg/L, 按照SURVEYOR分析试剂盒说明书步骤进行检测, 用2%琼脂糖凝胶进行分析。随后用凝胶定量软件计算切割效率, 公式为: $\text{Indel}(\%) = 100 \times [1 - \sqrt[2]{(1 - f_{\text{cut}})}]$, $f_{\text{cut}} = (b+c)/(a+b+c)$, 其中Indel为插入缺失比率, f_{cut} 为切割比率, a为未被切割条带的灰度值, b和c表示切割产生的新条带的灰度值^[15]。

1.2.6 筛选稳定敲除MEIS2的HEK293T细胞株 为了进一步获得稳定敲除MEIS2的HEK293T细胞株, 我们将PX458-sgRNA质粒转染HEK293T细胞48 h后, 采用流式分选的方法接种至96孔板中, 保证单细胞接种, 等细胞扩增至12孔板时, 部分提取蛋白并保种, 检测MEIS2蛋白水平的表达; 部分提取基因组DNA, 经PCR扩增后测序, 测序结果与原基因组进行比对, 检测靶向敲除MEIS2基因是否成功。

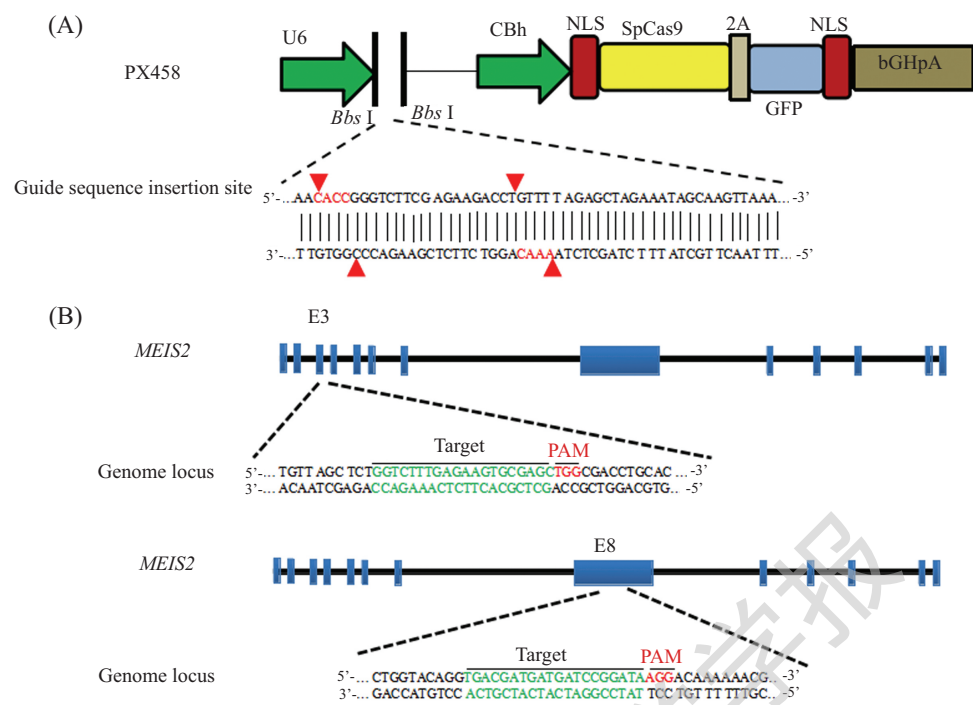
2 结果

2.1 合成sgRNA寡核苷酸序列并构建载体

MEIS2基因具有两个相对保守的功能域, 一个是与DNA结合的功能域, 另一个是与PBX蛋白结合的功能域, 分别位于Exon3和Exon8。我们针对Exon3和Exon8分别设计sgRNA, 并命名为MEIS2-Exon3-sgRNA和MEIS2-Exon8-sgRNA, 根据网站中的评分选择得分较高、特异性较好的sgRNA序列, 送Invitrogen公司进行寡核苷酸链的合成。合成后的寡核苷酸单链先通过退火形成双链, 然后通过Bbs I酶切位点将其构建插入PX458质粒载体中, 并将构建完成的质粒送Invitrogen公司测序, 根据测序结果选择正确序列的质粒进行扩增, 用于下一步实验(图1和表1)。

2.2 PX458-MEIS2-sgRNA质粒转染HEK293T细胞

正常培养HEK293T细胞至密度为60%~70%, 使

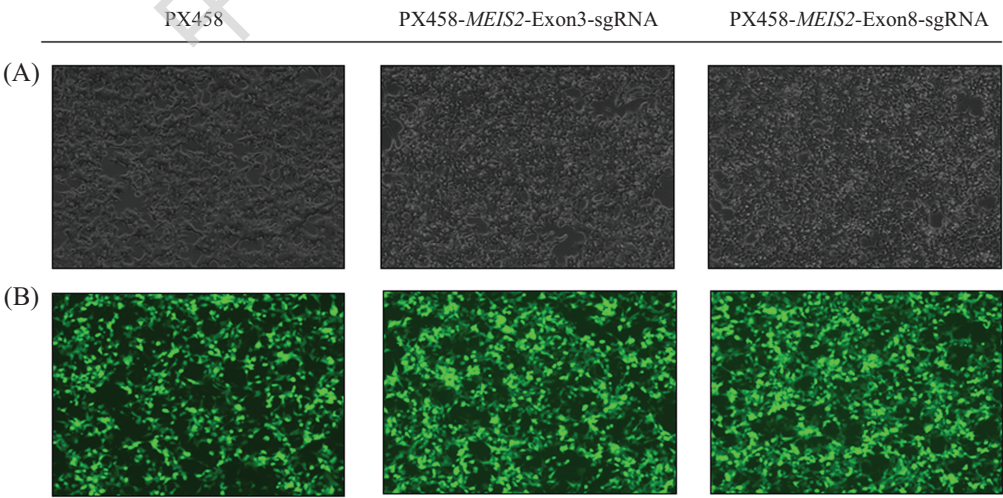


A: PX458质粒结构, 有2个Bbs I酶切位点; B: Exon3/8-sgRNA的靶向识别位置及其周围的DNA序列。
A: structure of plasmid PX458, which contains two Bbs I sites for the insertion of sgRNA-targeting oligos; B: the genomic sequences around the Exon3/8-sgRNA-targeting sites.

图1 构建靶向MEIS2的PX458质粒
Fig.1 Construction of MEIS2-targeting PX458 plasmids

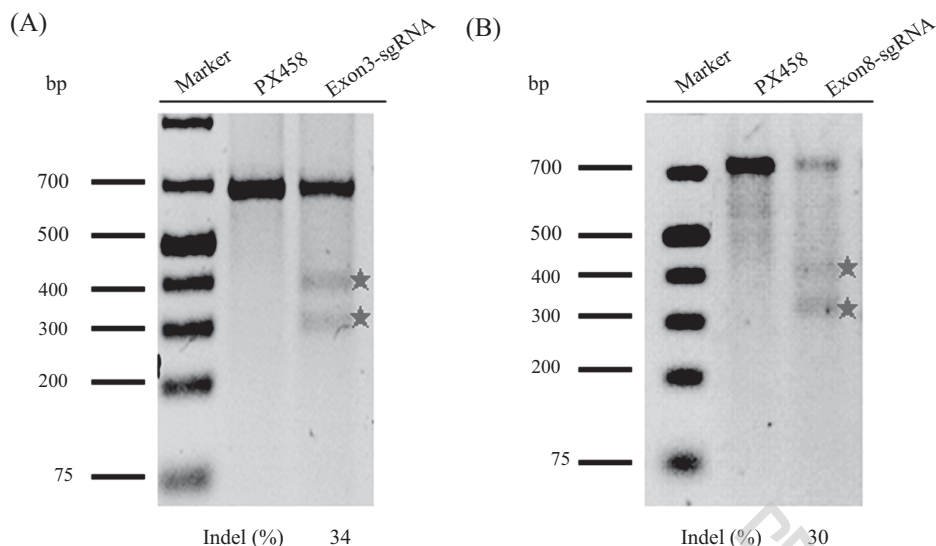
表1 MEIS2-Exon3/8-sgRNA寡核苷酸序列
Table 1 The oligo sequences of MEIS2-Exon3/8-sgRNA

向导RNA sgRNA	寡核苷酸序列 Oligonucleotide sequence
MEIS2-Exon3-sgRNA	F: 5'-CAC CGG TCT TTG AGA AGT GCG AGC-3' R: 5'-AAA CGC TCG CAC TTC TCA AAG ACC-3'
MEIS2-Exon8-sgRNA	F: 5'-CAC CTG ACG ATG ATG ATC CGG ATA-3' R: 5'-AAA CTA TCC GGA TCA TCA TCG TCAC-3'



A: 明场下视野(10×); B: 荧光下视野(10×)。
A: microscopy under bright field (10×); B: microscopy under fluorescent field (10×).

图2 质粒转染HEK293T细胞
Fig.2 Plasmid transfected HEK293T cells



A: SURVEYOR分析Exon3-sgRNA的有效性, PX458为阴性对照; B: SURVEYOR分析Exon8-sgRNA的有效性, PX458为阴性对照。五角星标记为MEIS2基因特异性片段, 用来量化切割效率。

A: SURVEYOR assay of Exon3-sgRNA targeted effect, and the PX458 was used as negative control; B: SURVEYOR assay of Exon8-sgRNA targeted effect, and the PX458 was used as negative control. The asterisks indicated the expected MEIS2-specific fragments used to quantify indel frequency.

图3 SURVEYOR分析Exon3/8-sgRNA的切割效率

Fig.3 Exon3/8-sgRNA induced indels measured by SURVEYOR assay

用FuGENE HD作为转染试剂, 将质粒PX458-MEIS2-Exon3-sgRNA和PX458-MEIS2-Exon8-sgRNA转染HEK293T细胞, 以空白载体PX458作为阴性对照。在荧光显微镜下观察发现, 与对照组相比, 转染了PX458-MEIS2-sgRNA的HEK293T细胞多数表达绿色荧光, 表明质粒转染HEK293T细胞成功。

2.3 利用CRISPR/Cas9系统能高效切割HEK293T基因组DNA

HEK293T细胞转染PX458/PX458-MEIS2-sgRNA质粒后, 正常培养48 h。用DNeasy Blood & Tissue Kit试剂盒提取基因组DNA, 以其作为模板进行PCR扩增, 分别扩增基因组中Exon3/8区域。按照SURVEYOR试剂盒操作步骤进行操作, 用2%琼脂糖凝胶进行分析。随后用凝胶定量软件计算切割效率, 发现Exon3-sgRNA和Exon8-sgRNA均靶向敲除成功, 其切割效率分别为34%和30%(图3)。

2.4 利用CRISPR/Cas9系统高效敲除HEK293T细胞内源MEIS2的表达

为检测CRISPR/Cas9系统对内源基因表达水平的影响, 将转染PX458/PX458-MEIS2-sgRNA质粒的HEK293T细胞培养48 h后, 收取蛋白样品进行Western blot检测。转染空白载体PX458质粒的HEK293T细胞本底具有较高水平的MEIS2蛋白表达, 而转染PX458-sgRNA质粒的HEK293T细胞的MEIS2蛋白

表达水平明显下调, 与SURVEYOR分析切割效率一致, Exon3-sgRNA较Exon8-sgRNA下调MEIS2蛋白的表达水平更明显(图4)。

2.5 构建稳定敲除MEIS2的HEK293T细胞株

为了进一步构建稳定敲除MEIS2的HEK293T细胞, 我们通过流式分选的方法将单个转染PX458/PX458-MEIS2-sgRNA质粒的HEK293T细胞接种至96孔板培养。挑选单克隆细胞株进行Western blot检测, 选择能显著敲除MEIS2蛋白表达的细胞株。如图5所示, Exon3-sgRNA 4#为MEIS2半量敲除的细胞株, Exon8-sgRNA 3#为MEIS2完全敲除的细胞株, 因此我们选择Exon8-sgRNA 3#和Exon3-sgRNA 4#细胞株进行下一步鉴定。

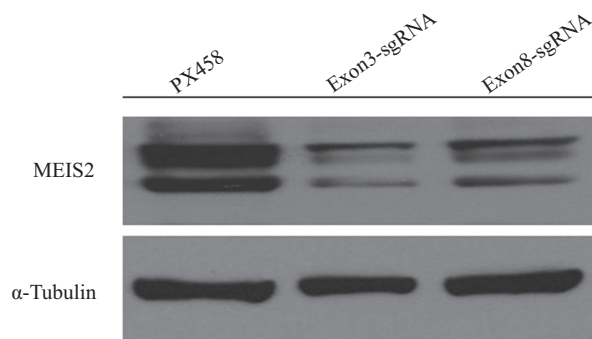


图4 Western blot检测Exon3/8-sgRNA的靶向敲除效果
Fig.4 The targeted knockout effect of Exon3/8-sgRNA measured by Western blot

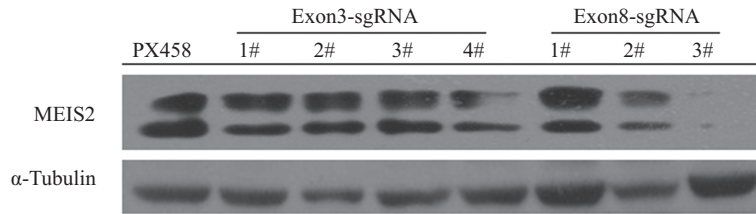
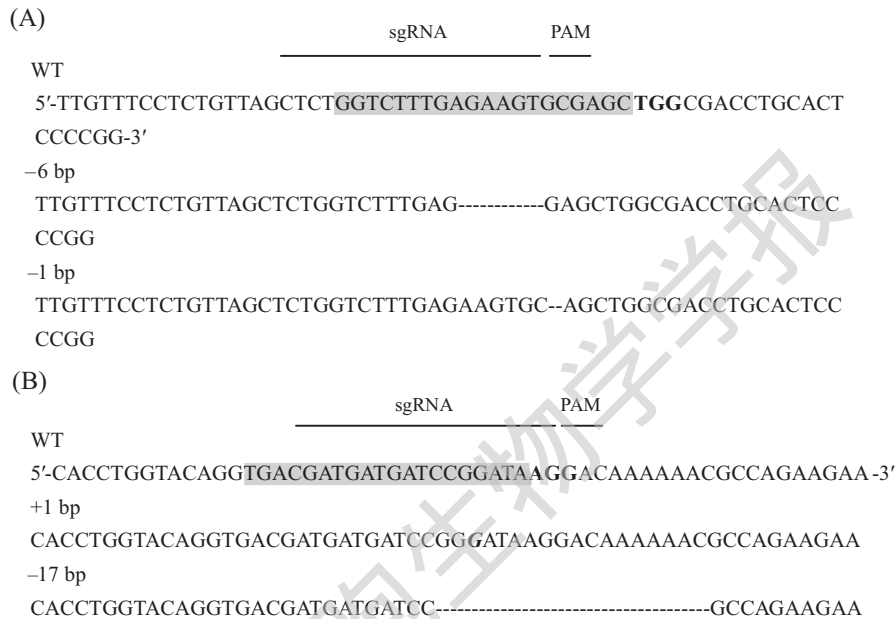


图5 CRISPR介导诱变后利用Western blot检测单克隆细胞的MEIS2蛋白表达量

Fig.5 Western blot analysis of MEIS2 expression in the monoclonal cell lines isolated after CRISPR-mediated mutagenesis



A: *MEIS2*-Exon3-sgRNA 4#测序结果。灰色阴影标记为所设计sgRNA序列, 加粗字体为PAM序列; B: *MEIS2*-Exon8-sgRNA 3#测序结果。灰色阴影标记为所设计sgRNA序列, 加粗字体为PAM序列。斜体加粗为突变后插入的碱基。

A: the sequences of *MEIS2*-Exon3-sgRNA 4#. The sgRNA target site was shaded in gray and the PAM was labeled in overstriking; B: the sequences of *MEIS2*-Exon8-sgRNA 3#. The sgRNA target site was shaded in gray, the PAM was labeled in overstriking and the inserted mutation was marked in overstriking and italic.

图6 2个单克隆细胞在目的sgRNA位点的插入/缺失突变

Fig.6 The inserted and deleted mutation of the two monoclonal cells at the sgRNA sites

提取*MEIS2*-EXON3 sgRNA 4#和*MEIS2*-Exon8-sgRNA 3#基因组DNA, 经PCR扩增后连接T载体, 并送Invitrogen公司测序。分析测序结果发现, Exon3-sgRNA介导Cas9核酸酶在靶点位置造成了6 bp和1 bp两种缺失突变。由于6 bp缺失突变不能改变MEIS2蛋白的开放阅读框, 仅使翻译产生的MEIS2蛋白缺失两个氨基酸, 不能达到完全敲除*MEIS2*基因的目的, 此株细胞为一个*MEIS2*缺失杂合子(图6A)。Exon8-sgRNA产生了1 bp插入突变以及17 bp缺失两种突变, 两种突变均能改变MEIS2编码蛋白的开放阅读框, 提前终止MEIS2蛋白翻译(图6B), 说明我们通过CRISPR/Cas9体系获得了一个稳定敲除MEIS2的HEK293T细胞株。

3 讨论

基因组编辑技术是研究基因功能的重要工具, 早期的同源重组技术虽然能对目的基因进行有效编辑, 但效率极低, 人工核酸酶技术的出现极大地提高了基因组编辑的效率。除了文中使用的CRISPR/Cas9系统, 人工核酸酶系统还包括锌指核酸内切酶(zinc finger endonuclease, ZFN)和类转录激活因子效应物核酸酶(transcription activator-like effector nuclease, TALEN)^[16]。ZFN和TALEN通过DNA蛋白对靶点进行特异性的识别: ZFN中的一个锌指结构单元能够识别三个碱基序列; 而TALEN通过RVD(repeat variable di-residue)介导其对特异碱基的识别, 根据锌指结构单元或RVD组合, 可以设计结合任意基因组中DNA序

列的模块化蛋白, 从而对特定的DNA序列进行识别和切割^[17-18]。CRISPR/Cas9系统是一个由蛋白和核酸组成的蛋白核酸复合物, 利用sgRNA对特定的DNA序列进行识别, 进而介导Cas9蛋白对靶点序列进行切割^[19-20]。基因组的大小决定了靶点DNA序列通常在10 bp以上, 因此, ZFN或TALEN系统需要根据靶点序列将锌指蛋白单元或是RVD排列组合, 使得质粒的构建费时费力。而CRISPR/Cas9系统对靶点的识别依赖于sgRNA与靶标DNA之间的碱基互补配对, 因此, 针对不同的靶点只需替换23 bp大小的sgRNA, 使得质粒的构建更为简单、快捷, 易于掌握。

在CRISPR/Cas9技术出现之前, 在细胞水平研究基因的功能主要利用RNA干扰技术。RNA干扰技术为解析基因的功能和机制作出了重要贡献, 但RNA干扰的瞬时性以及不彻底性会影响对基因功能的正确判断。CRISPR/Cas9技术能够在基因组水平造成移码突变, 从而敲除目的基因, 是较RNA干扰技术更适于研究基因功能的有效工具。近期一项研究中, 利用CRISPR/Cas9全基因组文库技术筛选黑色素瘤耐药基因, 成功筛选到了未被RNA干扰文库发现的耐药相关基因^[21]。

MEIS2作为转录因子广泛参与胚胎的早期发育及肿瘤的发生、发展, 但其作用机制目前仍不清楚。本研究利用CRISPR/Cas9技术成功构建了MEIS2完全敲除的HEK293T细胞株, 为研究MEIS2的作用机制提供了有效工具。同时, 我们也建立了MEIS2半量敲除的细胞株, 该细胞株与MEIS2完全敲除的HEK293T细胞株为研究MEIS2剂量依赖型的功能研究提供了最佳工具。

致谢——

感谢中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所李劲松研究员在实验设计方面提供的建议和帮助。

参考文献 (References)

- 1 Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, Amemura M, Nakata A. 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): 5429-33.
- 2 Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, Boyaval P, Moineau S, *et al*. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science* 2007; 315(5819): 1709-12.
- 3 Deveau H, Garneau JE, Moineau S. CRISPR/Cas system and its role in phage-bacteria interactions. *Annu Rev Microbiol* 2010; 64: 475-93.
- 4 Kunin V, Sorek R, Hugenoltz P. Evolutionary conservation of sequence and secondary structures in CRISPR repeats. *Genome Biol* 2007; 8(4): R61.
- 5 Hwang WY, Fu Y, Reyon D, Maeder ML, Tsai SQ, Sander JD, *et al*. Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. *Nat Biotechnol* 2013; 31(3): 227-9.
- 6 Mali P, Esvelt KM, Church GM. Cas9 as a versatile tool for engineering biology. *Nat Methods* 2013; 10(10): 957-63.
- 7 Seong KC, Nikolaos V, Charles GS. Meis family proteins are required for hindbrain development in the zebrafish. *Development* 2002; 129(3): 585-95.
- 8 Paige SL, Thomas S, Stoick-Cooper CL, Wang H, Maves L, Sandstrom R, *et al*. A temporal chromatin signature in human embryonic stem cells identifies regulators of cardiac development. *Cell* 2012; 151(1): 221-32.
- 9 Agoston Z, Li N, Haslinger A, Wizenmann A, Schulte D. Genetic and physical interaction of Meis2, Pax3 and Pax7 during dorsal midbrain development. *BMC Dev Biol* 2012; 12: 10.
- 10 Agoston Z, Schulte D. Meis2 competes with the Groucho co-repressor Tle4 for binding to Otx2 and specifies tectal fate without induction of a secondary midbrain-hindbrain boundary organizer. *Development* 2009; 136(19): 3311-22.
- 11 Bessa J, Tavares MJ, Santos J, Kikuta H, Laplante M, Becker TS, *et al*. Meis1 regulates cyclin D1 and c-myc expression, and controls the proliferation of the multipotent cells in the early developing zebrafish eye. *Development* 2008; 135(5): 799-803.
- 12 Xin Zhang, Friedman A, Heaney S, Purcell P, Richard LM. Meis homeoproteins directly regulate Pax6 during vertebrate lens morphogenesis. *Genes Dev* 2002; 16(16): 2097-107.
- 13 Halder SK, Cho YJ, Datta A, Anumanthan G, Ham AJ, Carbone DP, *et al*. Elucidating the mechanism of regulation of transforming growth factor beta Type II receptor expression in human lung cancer cell lines. *Neoplasia* 2011; 13(10): 912-22.
- 14 Fujino T, Yamazaki Y, Largaespada DA, Jenkins NA, Copeland NG, Hirokawa K, *et al*. Inhibition of myeloid differentiation by Hoxa9, Hoxb8, and Meis homeobox genes. *Exp Hematol* 2001; 29(7): 856-63.
- 15 Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc* 2013; 8(11): 2281-308.
- 16 Mussolino C, Cathomen T. RNA guides genome engineering. *Nat Biotechnol* 2013; 31(3): 208-9.
- 17 Geurts AM, Cost GJ, Freyvert Y, Zeitler B, Miller JC, Choi VM, *et al*. Knockout rats via embryo microinjection of zinc-finger nuclease. *Science* 2009; 325(5939): 433.
- 18 Cermak T, Doyle EL, Christian M, Wang L, Zhang L, Schmidt C, *et al*. Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting. *Nucleic Acids Res* 2011; 39(12): e82.
- 19 Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, *et al*. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* 2013; 339(6121): 819-23.
- 20 Mali P, Yang L, Esvelt KM, Aach J, Guell M, DiCarlo JE, *et al*. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science* 2013; 339(6121): 823-6.
- 21 Shalem O, Sanjana NE, Hartenian E, Shi X, Scott DA, Mikkelsen TS, *et al*. Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells. *Science* 2014; 343(6166): 84-7.