

# 锌指核酸酶及其应用研究进展

李万利<sup>1,2</sup>, 李文清<sup>1,3</sup>, 王明发<sup>2</sup>, 王二耀<sup>2\*</sup>, 曹文广<sup>1\*</sup>

(1. 中国农业科学院 北京畜牧兽医研究所, 北京 100193; 2. 河南省农业科学院 畜牧兽医研究所, 河南 郑州 450002; 3. 河南农业大学 生命科学院, 河南 郑州 450002)

**摘要:** 锌指核酸酶由锌指和非限制性切割酶两部分组成, 锌指能特异性结合基因组双链 DNA, 非限制性切割酶能造成染色体上双链 DNA 的断裂, 通过机体的修复机制可以使目的基因突变或外源基因插入, 进而应用于转基因动物的制备。综述了锌指、切割酶及采用锌指核酸酶制备转基因动物的研究进展, 主要包括锌指的发现、结构及与 DNA 结合时的碱基分布和结合方式, 锌指的筛选和 design 方法; 切割酶的研究进展包括 *Fok I* 的发现及切割特点, 基因修饰后的异源二聚体切割特异性等。

**关键词:** 锌指; 切割酶; 锌指核酸酶; 显微注射; 转基因动物

中图分类号: S814 文献标志码: A 文章编号: 1004-3268(2014)08-0001-09

## Research Development on Zinc Finger Nucleases and Its Application

LI Wan-li<sup>1,2</sup>, LI Wen-qing<sup>1,3</sup>, WANG Ming-fa<sup>2</sup>, WANG Er-yao<sup>2\*</sup>, CAO Wen-guang<sup>1\*</sup>

(1. Beijing Institute of Animal Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China;  
2. Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, China; 3. College of Life Science, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

**Abstract:** Zinc finger nuclease was made of zinc finger and nonspecific cleavage nuclease. Zinc fingers could bind the double-stranded DNA specially. Non-specific cleavage nucleases could make double-stranded DNA break in chromosomal. The target gene mutation such as gene mutation or exogenous gene insertion happened by repairing mechanism *in vivo*. It could be used in transgenic animal production normally. The development of the research on zinc finger, cleavage enzyme and production of transgenic animal using zinc finger nucleases was summarized in this review. The discovery and the structure of zinc finger, its binding manners with DNA, selecting and designing methods were first discussed. Then the discovery of cleavage enzyme, characteristics of *Fok I* on cutting the DNA double strands, and specialities of engineered cleavage enzyme for cutting DNA double strands after heterodimer forming were analysed.

**Key words:** zinc finger; cleavage enzyme; zinc finger nuclease; microinjection; transgenic animal

收稿日期: 2014-02-06

基金项目: 国家博士后科学基金项目(2011M500461); 河南省财政预算项目(20137918)

作者简介: 李万利(1979-), 男, 河南上蔡人, 助理研究员, 博士, 主要从事动物遗传育种、家兔生产研究。

E-mail: liwanli605@163.com

\* 通讯作者: 王二耀(1971-), 男, 内蒙古呼和浩特人, 副研究员, 博士, 主要从事家畜胚胎工程研究。

E-mail: erylao@163.com

曹文广(1956-), 男, 陕西渭南人, 研究员, 博士, 主要从事转基因动物和雄性生殖细胞研究。

E-mail: ggwc@163.com

锌指核酸酶(zinc finger nucleases, ZFNs)由锌指(zinc finger, ZF)和切割酶(*Fok I*)两部分组成。经过近 30 a 的发展,人们对 ZFNs 的认识在分子水平、蛋白水平、晶体结构上都有了较大突破。目前,研究人员成功设计了针对不同物种和不同基因的锌指核酸酶,且已经应用于动物细胞或胚胎研究,并获得了一些转基因动物个体。

## 1 锌指的研究进展

1985 年, Brown 等<sup>[1]</sup>和 Miller 等<sup>[2]</sup>同时发现转录因子 III A(transcription factor III A, TF III A)具有锌指结合域,且在锌离子的作用下才具有活性,能特异性识别 DNA 序列。随后的研究<sup>[3-6]</sup>表明,在真核生物的蛋白质中广泛存在锌指,其参与蛋白质与蛋白质的相互作用及同 DNA 的相互作用。一些锌指除了能特异性结合 DNA 序列外,还可以特异性结合 RNA 序列,进而作用于 DNA 或 RNA,实现转录前或转录水平的基因调控<sup>[7]</sup>。

### 1.1 锌指的结构研究

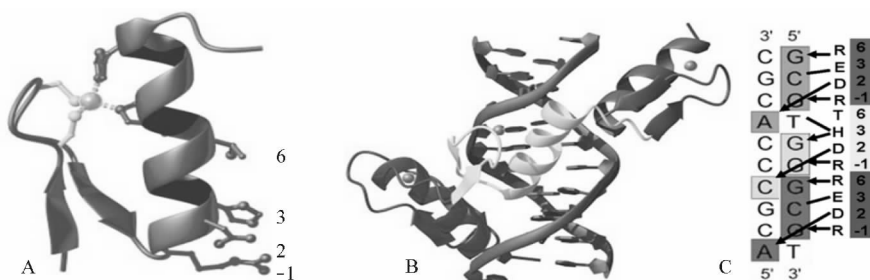
早期通过 PCR 测序获得了锌指的核苷酸序列,对其初级结构有了一定的了解,但受当时科研条件的限制,对其高级结构仍不清楚。Miller 等<sup>[2]</sup>对爪蛙卵内 TF III A 进行基因克隆和测序后发现,其蛋白的初级结构包含 9 个串联的近 30 个氨基酸的重复模块,且 Cys...Cys 和 His...His 形成环,锌离子位于环中心。随后 Wolfe 等<sup>[3]</sup>发现,锌指具有相同的序列(F/Y)-X-C-X<sub>2</sub>-5-C-X<sub>3</sub>-(F/Y)-X<sub>5</sub>-ψ-X<sub>2</sub>-H-X<sub>3</sub>-5-H,其中 X 表示任意的氨基酸, C 表示半胱氨酸(Cys), H 表示组氨酸(His), ψ 表示疏水残基。Nardelli 等<sup>[8]</sup>通过胶阻滞对具有锌指结构的 Krox-20(Krüppel box-20)和 Sp1(specificity protein 1)进行研究发现, Krox-20 和 Sp1 分别具有 3 个锌指,其对应的识别和结合序列分别为 GCGGGGGCG 和 GGGGCGGGG, 且每个指跨越 3 个碱基。进一步对锌指的蛋白质序列分析发现,识别基因组的 GCG 位点存在保守氨基酸,分别是位于第 18 位的谷氨酸和 21 位的精氨酸,而识别 GGG 位点的氨基酸序列中仅存在 1 个保守氨基酸,为第 18 位的组氨酸。通过甲基化干扰试验表明,7 个 G 中的任一个甲基化造成结合序列的突变都会干扰 Krox-20 复合物的形成,然而位于这一序列外的 A 或 G 的甲基化则对复合物的形成无影响。在结合位点 G 转换为 C 时,直接导致 Krox-20 丧失对该位点的识别。由于 Krox-20 锌指上的第 18 位和 21 位氨基酸直接接触并结合特定的

单个碱基形成氢键,因而 Krox-20 锌指上的第 18 位或 21 位氨基酸的改变将导致对原识别结合序列的亲力和选择性降低或丧失,同时可识别新的特异性 DNA 序列。而对于 Sp1 锌指,当第 18 位氨基酸由谷氨酸变为谷氨酰胺时,则导致锌指对基因组 DNA 选择性的丧失。这说明锌指对基因组 DNA 的识别和结合具有特异性。

随着生物技术的发展,可以对纯度较高的锌指蛋白(ZFPs)进行核磁共振以揭示锌指蛋白的高级结构。Pavletich 等<sup>[9]</sup>用核磁共振扫描 Cys<sub>2</sub>His<sub>2</sub> 锌指蛋白的晶体结构后发现,每个指包含 2 个反向平行的 β 片(β-sheet)和 1 个 α 螺旋(α-helix)串联形成的紧凑 ββα 结构域,且 2 个串联的反向平行的 β 片和 α 螺旋中间结合 1 个锌离子,每个 β 片一端有 1 个半胱氨酸和 α 螺旋上的 2 个组氨酸与锌离子共价结合(图 1A)。每个 α 螺旋紧紧嵌入 DNA 的大沟内,最终三指蛋白紧紧将 DNA 包裹起来(图 1B)。每个指具有相似的 DNA 结合排列,接触并覆盖 DNA 上的 4 个碱基,包括正义链上 3 个碱基、反义链上 1 个碱基(图 1C)。在每个指上位于 α 螺旋上的第 1、2、3、6 位的氨基酸残基与 DNA 双链上的碱基对形成 3 个以上氢键和/或范德华力,且 α 螺旋轴同其他 α 螺旋轴的接头成 45°角,使指紧紧固定于 DNA 双螺旋大沟内。典型的锌指与 DNA 碱基结合模式是 α 螺旋上位于-1、3、6 位的氨基酸同正义 DNA 链上的碱基能形成氢键和/或范德华力,而位于第 2 位的氨基酸能与 DNA 双链上的碱基形成氢键。而非典型锌指与 DNA 的结合模式是 α 螺旋上的第 3、6 位的残基识别正义 DNA 链上的碱基,第 1、2 位的氨基酸残基使指与 DNA 碱基接触。非典型的指具有不同的识别结合序列,表现出更多的侧链与碱基相互作用模式,且有时可以结合复杂的亚单位。大多数锌指具有的共同特点是仅有少量的完全保守残基,且保守的疏水核占据锌结合位点<sup>[10-11]</sup>。疏水残基具有保守性,但一些间隔域的长度存在差异<sup>[2,12]</sup>。如人的 Y 染色体上 6 指的锌指序列结构是 Y-X-C-X<sub>2</sub>-C-X-F-X<sub>7</sub>-L-X<sub>2</sub>-H-X<sub>4</sub>-H,其第 2 个芳香族残基到半胱氨酸的距离比典型的序列近 2 个残基。Wolfe 等<sup>[13]</sup>以急性早期蛋白 Zif268 为参照,采取两两结合的方式形成复合物来匹配它们的 DNA 结合位点并进行效果比较,进而计算这些两指识别结合序列的区别,最终获取了不同指结构的 α 螺旋在 DNA 大沟内的位置和方向。锌指蛋白除能与基因组 DNA 结合外,还能与 RNA 及蛋白质相互作用<sup>[14-17]</sup>。

单个锌指的氨基酸组成决定了该锌指的高级结构,然而多个锌指串联到一起时,其与 DNA 结合还受锌离子浓度和锌指串联接头的影响。Gregory 等<sup>[18]</sup>发现  $\beta$  片上的芳香化残基能塞进  $\beta\beta\alpha$  模体的核内并形成稳定折叠。一旦连接位点的残基换成半胱氨酸或组氨酸外的残基,锌指与 DNA 的结合能力则丧失<sup>[19-20]</sup>。此外,在缺乏锌离子时,指结构不能正确折叠,改变锌离子生理浓度对指结合 DNA 的亲合力有明显的影响。典型锌离子结合的电解常数介于  $10^{-8} \sim 10^{-11}$ ,因缓冲液的条件和分析方法的不同而存在一定的差异<sup>[21]</sup>。因此,锌离子偶联对 Cys<sub>2</sub>His<sub>2</sub> 蛋白的折叠和活性相当重要。此外,当多个锌指串联到一起时,其接头的长度会对多指的功能产生影响。尽管单个指蛋白能特异性和高亲和力地与 3 bp 的 DNA 结合,然而当多个

指串联在一起时,会彼此影响,甚至降低锌指蛋白与 DNA 的亲合力。目前,相邻二指连接最常见的接头是 TGEKP<sup>[22]</sup> 或一些极其接近的变体<sup>[23]</sup>。在已知的锌指-DNA 复合物中,这些区域的氨基酸排列非常有序<sup>[3,24-26]</sup>。Wolfe 等<sup>[3]</sup>发现,这一区域氨基酸由随机排列变成有序排列后,改变了锌指蛋白与 DNA 形成复合物的形式。同已知的接头结构相比,接头区覆盖 C 末端的  $\alpha$  螺旋,使之稳定并有助于蛋白质紧紧嵌入 DNA 大沟内。因接头的序列或长度不同可形成不同的结合模型<sup>[27]</sup>。目前,锌指接头的生理学功能尚未得到鉴定,突变分析显示,接头并非仅仅是连接相邻指的消极原件<sup>[28-29]</sup>。此外,不同接头的剪接变体可能在 RNA 识别中扮演角色<sup>[27]</sup>。TF III A 的晶体结构显示接头主要为间隔区穿过小沟<sup>[30]</sup>。



A 为单个锌指的结构示意图(2 个  $\beta$  片和 1 个  $\alpha$  螺旋),中间圆球为锌原子,-1、2、3、6 为螺旋上侧链氨基酸的位置;B 为锌指结合 DNA 示意图,双螺旋结构为 DNA,锌指的  $\alpha$  螺旋位于 DNA 的大沟内;C 为锌指结合基因碱基的示意图,箭头表示锌指蛋白氨基酸残基与 DNA 碱基靠氢键结合,短线表示锌指蛋白氨基酸残基与 DNA 碱基靠范德华力结合

图 1 锌指结构及其结合 DNA 的示意图

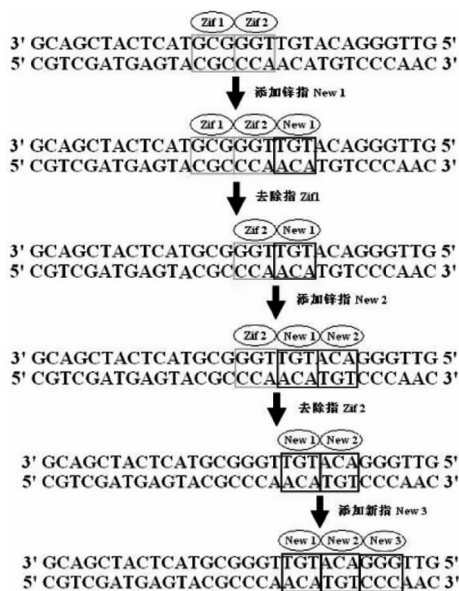
## 1.2 人工锌指的筛选

目前,人们可以通过选择适宜的核苷酸序列经一定的转录系统实现人工锌指的体内转录和表达,进而根据需要来设计特异性结合目的基因组 DNA 的人工锌指。在人工锌指的设计过程中,需要考虑其与 DNA 靶位点结合的亲和力和特异性。影响因素包括靶位点 DNA 的序列、锌指结构中关键位点的氨基酸残基、相邻指间接头的长短、锌指的数量等,这些因素中任何一个改变均会对设计锌指的生理功能产生影响。目前,多位研究人员建立了锌指设计和筛选方法,主要通过噬菌体展示、建立锌指库、酵母单杂交系统 3 种方法来获取人工锌指。

**1.2.1 噬菌体展示筛选锌指蛋白** 利用噬菌体展示筛选锌指蛋白的方法,由 Greisman 等<sup>[31]</sup>开发并得到广泛使用。具体步骤如下:先选择 2 个已知的 Zif268 的锌指覆盖结合位点 3' 位点作为锚定指固定在 DNA 上,利用噬菌体展示技术从锌指库中筛选能识别紧邻 DNA 上的碱基序列的锌指,并将其融

合到锚定指上,同时去除 3' 端位点的第 1 个指(Zif268 靠近 3' 端的指),留下 Zif268 的第 2 个指和新筛选的指。然后以第 2 个指和新筛选的指作为锚定指,再经噬菌体展示从库中筛选出能识别接下来的 DNA 上碱基的指,并将其融合到锚定指上,去除 Zif268 的第 2 个指,余下的 2 个指皆为能识别新的 DNA 位点的新指。再以此二指作为锚定蛋白质,经噬菌体展示从库中筛选出能识别接下来的 DNA 碱基的指,并将其融合到锚定指上,最终获得识别新的碱基位点的三指锌指(图 2)。采取该方法可以进行更多指的筛选。此外,Segal 等<sup>[32]</sup>首先集中构建识别每个潜在的 5'-GNNG-3' 序列的锌指,经噬菌体展示筛选、点突变提纯,这些锌指能识别 16 个呈现出严格的 5'-GNN-3' 特征的序列,可结合到假定的一些以 GNNGNNGNN 形式存在的潜在位点,但重叠相邻亚单位通常是 GC 碱基,且位于第 2 位的残基可与相邻亚单位侧翼 GC 碱基形成 1 个预期的接触位点。Beerli 等<sup>[33]</sup>证实,库中的锌指经装配后能

识别并结合许多富含 GC 的位点。Isalan 等<sup>[34]</sup>报道了针对既定序列特异性 DNA 结合域,利用噬菌体展示技术筛选锌指模块,再将典型的转录因子连接到筛选后的锌指模块上验证锌指功能。同时,他们还建立了设计和筛选针对存在多态性结合位点的锌指蛋白的技术,其检测方法快速、方便。应用该技术,成功筛选出 7 个不同的 ZFPs,这些 ZFPs 能结合人免疫缺陷型病毒(HIV-1)启动子上多变的 DNA 结合位点。Lee 等<sup>[35]</sup>报道了将 ZFNs 同人工的转录因子相结合来筛选 ZFNs 的方法,通过将 ZFNs 同转录因子相结合再转染细胞,观察细胞形态的改变来筛选高效的 ZFNs。首先设计构建连接到锌指上的人工转录因子,通过将随机化的多指 ZFPs 与组织器官特异性转录激活剂或抑制剂的结构域相结合来实现人工转录因子的功能。单独的多指 ZFPs 没有功能,但结合 DNA 后具有抑制剂的功能。将带有转录因子的 ZFPs 转染细胞并在细胞内表达后,经与不同的 DNA 位点结合,可改变细胞的形态,进而可以通过细胞的外形直接进行 ZFNs 的筛选。



椭圆内为锌指 Zif1、Zif2、New1、New2、New3,其中 New1、New2、New3 为筛选获得的新锌指;方块框内碱基为新锌指结合的 DNA 位点碱基

图 2 新的锌指筛选示意图

1.2.2 通过建立锌指库制备锌指 Choo 等<sup>[36]</sup>建立了含有 256 条锌指序列的锌指库。原则上,该库包含的指适合 DNA 上任意 4 个密码子碱基组合,且能根据需要的 9~10 个碱基位点找到与其对应的 3 条锌指,将其串联到一起形成新的三指来识别这些碱基。由于库中锌指特异性的筛选环境和条件同

自然状态下相对一致,因此,该库能更直接地说明在自然状态下的锌指如何识别碱基密码子,从而避免了多个锌指串联到一起后,侧链与侧链存在相互作用或环境中的水介导的锌指与锌指的接触以及识别结合位置上存在微小改变造成的不利影响。库中的指序列为通过选择与自然存在指序列相似的指序列,来识别非常相似或已经鉴定的 4 个碱基亚单位<sup>[17,31]</sup>。如 ZFPs 核受体元件(nuclear receptor element, NRE)的第 3 指,其识别结合的 DNA 序列是 5'-AAGG-3',与噬菌体展示获得序列的锌指一致,同 Tramtrack 的第 2 指在碱基识别位置上完全相同,均识别同一 DNA 序列。

1.2.3 通过酵母单杂交系统筛选锌指 通过酵母单杂交系统筛选锌指的方法由 Herrmann 等<sup>[37]</sup>建立,通过修改商品化酵母单杂交盒来优化四指库,突破了经典的噬菌体展示仅能筛选三指以下库的限制。其主要优点是直接利用 PCR 库制备锌指,且使用真核系统酵母的筛选比噬菌体展示或原核表达系统更具有优势,能直接选择肽类来识别基因组 DNA,而不用破坏真核细胞。将酵母基因组 DNA 装配到染色质中,ZFNs 直接作用于染色质存在的最终环境。起初选择的 ZFNs 仅具有识别结合 DNA 的功能,但不能切割基因组 DNA,进一步的策略是直接筛选有切割活性的、特异性的指。ZFNs 能切割目标 DNA,而在酵母基因组中目标 DNA 连接有致病基因,如单纯性疱疹病毒胸苷激酶(herpes simplex virus type 1 thymidine kinase, HSV-1 TK)基因<sup>[38]</sup>,HSV-1 TK 能抑制细胞生长,一旦 ZFNs 切割酵母基因组目标 DNA,由于同源重组或末端连接造成基因突变,最终造成 HSV-1 TK 基因的功能丧失,细胞能够存活和生长,从而筛选出高效的锌指结合域。

除了以上 3 种获取锌指的方法外,还有一些网站,可以协助进行锌指的设计。如美国斯克里普斯研究所科研人员开发了筛选锌指的网站,锌指联合会也创办了锌指筛选的网站。研究者只需要将感兴趣的基因输入网站的对话框内,便能进行锌指的筛选。锌指靶标(zinc finger targeter, ZiFiT)是一个简单且直观的网页工具,可设计结合特异 DNA 序列的锌指。目前的 ZiFiT 版本是基于广泛应用的 ZFP 设计方法——模块分析,即把已经存在的单个锌指连接到一起以识别预想的靶 DNA 序列。一些研究小组发现,锌指模块的试验特征是能结合大多数 DNA 三连体 64 个密码子。ZiFiT 基于 ZFP 数据库内的 1 个或更多模块来设计寻找可能的 DNA



位点突变率最高达 78%。Beumer 等<sup>[66]</sup>随后通过显微注射的方法进行了 *coilin* 基因和 PAS 激酶基因的突变,结果长度为 4.16 kb 的 Donor 获得的后代中 6.8% 的后代发生了 *coilin* 和 PAS 激酶基因的敲除,而 0.5 kb 的 Donor 未获得上述基因敲除的个体;随后将 ZFNs 的 mRNA 同 4.16 kb 或 7.46 kb 的 Donor 载体共作用后,在没有连接酶存在的情况下,后代中发生同源重组率高达 99%。Doyon 等<sup>[67]</sup>针对斑马鱼的金黄色、无尾或短尾基因设计了特异性 ZFNs,将不同 ZFNs 的 mRNA 注入到 1 细胞期的斑马鱼的卵内,获得了具有较高基因型突变比例的个体。其中,后代中敲除黄色基因的个体比率达 32%,而无尾或短尾个体的比率达到 20% 左右。Meng 等<sup>[68]</sup>采用显微注射的方法,将 ZFNs 的 mRNA 注入 1 细胞期的斑马鱼胚胎内,该 ZFNs 能识别和切割斑马鱼血管内皮生长因子 2 的受体(*kdra*)基因,成功获得 *kdra* 基因被破坏的转基因斑马鱼,且将转基因斑马鱼进行常规交配能产生敲除 *kdra* 基因的斑马鱼。Geurts 等<sup>[69]</sup>设计了针对大鼠内源性基因免疫球蛋白 M 和 *Rab38* 基因的 ZFNs,通过将 ZFNs 的质粒 DNA 或 mRNA 注入到大鼠的原核细胞内,经胚胎移植后,均可获得相应基因被破坏的大鼠。Mashimo 等<sup>[70]</sup>针对 X 连锁的重症综合性免疫缺陷基因设计了 ZFNs,将其 mRNA 注射到大鼠胚胎的原核细胞后,获得了高达 20% 重症综合性免疫缺陷基因敲除的大鼠。Carbery 等<sup>[71]</sup>将 ZFNs 的 mRNA 以 2 ng/ $\mu$ L 的剂量注射到小鼠的合子内,经过胚胎移植后,成功获得了 *Mdrla*、*Jag1*、*Notch3* 基因敲除的小鼠。Meyer 等<sup>[72]</sup>将 ZFNs 的 mRNA 和带有  $\beta$ -牛乳糖报告基因的载体一起注射到小鼠的原核细胞内,ZFNs 能结合和切割小鼠 *Rosa26* 基因,最终成功将  $\beta$ -牛乳糖报告基因插入到小鼠的基因组中。Flisikowska 等<sup>[73]</sup>设计了针对免疫球蛋白 M 的第 1 外显子和第 2 外显子的 ZFNs,将其 mRNA 注入兔原核细胞后,成功获得了免疫球蛋白 M 敲除的兔,该兔表现出 IgM 和 IgG 不足的症状。Hauschild 等<sup>[74]</sup>发现,在 37 °C 培养条件下利用 ZFNs 进行基因切割的效率是 8%;但在 30 °C 条件下,其切割效率高达 34%;经过转染成纤维细胞获得基因突变的细胞系,其效率约 1%,以此细胞作为供体核进行克隆后,重构胚可以继续发育,经胚胎移植后获得 GGTA1( $\alpha$ 1,3 位半乳糖基转移酶)双等位基因敲除的猪。Yang 等<sup>[75]</sup>设计了多对针对过氧化物酶增殖物激活性  $\gamma$  受体(peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$ , *PPAR $\gamma$* )基因的 ZFNs,将活性较

高的 ZFNs 的质粒与含新霉素抗性基因的质粒共转染胎儿成纤维细胞,并用 G418 筛选阳性细胞,经过克隆获得了 *PPAR $\gamma$*  基因单等位基因敲除的猪,效率达 20%。Yu 等<sup>[76]</sup>构建了针对奶牛牛奶中  $\beta$ -乳球蛋白基因(致敏原)的 ZFNs,将 ZFNs 的 mRNA 电转染至奶牛胎儿成纤维细胞中,经极限稀释法获得了  $\beta$ -乳球蛋白基因突变的细胞,再经克隆和胚胎移植获得了敲除  $\beta$ -乳球蛋白基因的奶牛。Cui 等<sup>[77]</sup>将 ZFNs 的 mRNA 和不同的 Donor 载体注入到大鼠或小鼠的胚胎内,再将注射后的胚胎移植到代孕母鼠体内,检测后代发现,2% 的大鼠后代带 *Not I* 位点载体插入到 *Mdrla* 位点,25.3% 的后代带 GFP 载体插入到 *Mdrla* 位点,37.5% 的后代带 *Not I* 位点载体插入到 *PXR* 位点,11.1% 的后代带 GFP 载体插入到 *PXR* 位点;在小鼠的后代中有 28.6% 带 MCS 位点载体插入到 *Mdrla* 位点,75% 的后代带 *Not I* 位点载体插入到 *Mdrla* 位点,7.5% 的后代带 GFP 载体插入到 *Mdrla* 位点。这表明对于不同的基因、连接不同的载体及不同的物种,获得转基因动物后代的效率差别较大。Meyer 等<sup>[78]</sup>将 ZFN<sup>*Rab38*</sup> 的 mRNA 和打靶载体一起注入到(C57BL/6N $\times$ FVB) *F<sub>1</sub>* 代小鼠的 1 细胞期胚胎内,将注射后的胚胎移植到代孕母鼠体内后,对获得后代进行分析显示,3.5% 的后代出现打靶载体整合到小鼠的基因组上。此后,研究人员又将寡核苷酸 Donor 代替双链的打靶载体同 ZFN<sup>*Rab38*</sup> 共同导入 1 细胞期胚胎内,获得阳性个体比率为 1.7%。

因此,采用 ZFNs 的 mRNA 和 Donor 载体以原核注射的方法可以获得预期的动物。此外,先转染胎儿成纤维细胞或胚胎干细胞后,结合克隆的方法获取重构胚,再经胚胎移植后也可获取转基因动物。由于 mRNA 不会整合到宿主的基因组中,相对较为安全。然而,mRNA 相对于质粒 DNA 不稳定,容易降解,需要严格防控 RNA 酶的污染。

## 4 小结

随着对锌指和 *Fok I* 结构的深入研究,研究人员已经开发出了相应的锌指筛选软件,并利用锌指核酸酶在多个物种上获得了基因敲除或外源基因插入的动物个体,获得转基因动物的效率为 1%~30%。尽管研究结果显示不同物种基因敲除或外源基因插入的效率存在一定的差异,但其作为新的转基因技术已经实现了转基因动物的高效生产。因此,在转基因动物的生产中,伴随着锌指核酸酶进一步优化,其应用将会越来越广泛。

## 参考文献:

- [1] Brown R S, Sander C, Argos P. The primary structure of transcription factor TF III A has 12 consecutive repeats[J]. Federation of European Biochemical Societies, 1985, 186(2): 271-274.
- [2] Miller J, McLachlan A D, Klug A. Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor III A from *Xenopus oocytes* [J]. The EMBO Journal, 1985, 4(6): 1609-1614.
- [3] Wolfe S A, Neklodova L, Pabo C O. DNA recognition by Cys<sub>2</sub>His<sub>2</sub> zinc finger proteins[J]. Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure, 2000, 29: 183-212.
- [4] Pabo C O, Peisach E, Grant R A. Design and selection of novel Cys<sub>2</sub>His<sub>2</sub> zinc finger proteins[J]. Annual Review of Biochemistry, 2001, 70: 313-340.
- [5] Moore M, Ullman C. Recent developments in the engineering of zinc finger proteins[J]. Briefings in Functional Genomics and Proteomics, 2003, 1: 342-355.
- [6] Klug A. Towards therapeutic applications of engineered zinc finger proteins[J]. FEBS Letters, 2005, 579: 892-894.
- [7] Searles M A, Lu D, Klug A. The role of the central zinc fingers of transcription factor III A in binding to 5S RNA[J]. Journal of Molecular Biology, 2000, 301(1): 47-60.
- [8] Nardelli J, Gibson T J, Vesque C, et al. Base sequence discrimination by zinc-finger DNA-binding domains [J]. Nature, 1991, 349: 175-178.
- [9] Pavletich N P, Pabo C O. Zinc finger-DNA recognition: Crystal structure of a Zif268-DNA complex at 2.1 Å [J]. Science, 1991, 252: 809-817.
- [10] Michael S F, Kilfoil V J, Schmidt M H, et al. Binding and folding properties of a minimalist Cys<sub>2</sub>His<sub>2</sub> zinc finger peptide[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1992, 89: 4796-4800.
- [11] Shi Y, Berg J M. A direct comparison of the properties of natural and designed zinc-finger proteins[J]. Chemistry & Biology, 1995, 2: 83-89.
- [12] Page D C, Mosher R, Simpson E M, et al. The sex-determining region of the human Y chromosome encodes a finger protein[J]. Cell, 1987, 51: 1091-1104.
- [13] Wolfe S A, Greisman H A, Ramm E I, et al. Analysis of zinc fingers optimized via phage display: Evaluating the utility of a recognition code[J]. Journal of Molecular Biology, 1999, 285: 1917-1934.
- [14] Weiss M A, Keutmann H T. Alternating zinc finger motifs in the male-associated protein ZFY: Defining architectural rules by mutagenesis and design of an "aromatic swap" second-site revertant[J]. Biochemistry, 1990, 29: 9808-9813.
- [15] Thukral S K, Morrison M L, Young E T. Alanine scanning site-directed mutagenesis of the zinc fingers of transcription factor ADR1: Residues that contact DNA and that transactivate [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1991, 88: 9188-9192.
- [16] Cook W J, Mosley S P, Audino D C, et al. Mutations in the zinc-finger region of the yeast regulatory protein ADR1 affect both DNA binding and transcriptional activation [J]. The Journal of Biological Chemistry, 1994, 269: 9374-9379.
- [17] Frankel A D, Berg J M, Pabo C O. Metal-dependent folding of a single zinc finger from transcription factor III A [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1987, 84: 4841-4845.
- [18] Gregory R C, Taxman D J, Seshasayee D, et al. Functional interaction of GATA1 with erythroid Kruppel-like factor and Sp1 at defined erythroid promoters [J]. Blood, 1996, 87: 1793-1801.
- [19] Lee J S, Galvin K M, Shi Y. Evidence for physical interaction between the zinc-finger transcription factors YY1 and Sp1 [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1993, 90: 6145-6149.
- [20] Merika M, Orkin S H. Functional synergy and physical interactions of the erythroid transcription factor GATA-1 with the Kruppel family proteins Sp1 and EKLF [J]. Molecular Cell Biology, 1995, 15: 2437-2447.
- [21] Perkins N D, Agranoff A B, Pascal E, et al. An interaction between the DNA-binding domains of RelA (p65) and Sp1 mediates human immunodeficiency virus gene activation [J]. Molecular and Cellular Biology, 1994, 14: 6570-6583.
- [22] Pellegrino G R, Berg J M. Identification and characterization of "zinc-finger" domains by the polymerase chain reaction [J]. Proceeding of National Academy of Science, 1991, 88(2): 671-675.
- [23] Schaub M, Krol A, Carbon P. Flexible zinc finger requirement for binding of the transcriptional activator staf to U6 small nuclear RNA and tRNA<sup>Sec</sup> promoters [J]. The Journal of Biological Chemistry, 1999, 274(34): 24241-24249.
- [24] Foster M P, Wuttke D S, Radhakrishnan I, et al. Domain packing and dynamics in the DNA complex of the N-terminal zinc fingers of TF III A [J]. Nature Structural & Biology, 1997, 4(8): 605-608.
- [25] Bowers P M, Schaufler L E, Klevit R E. A folding transition and novel zinc finger accessory domain in the transcription factor ADR1 [J]. Nature Structural & Biology, 1999, 6(5): 478-485.
- [26] Wuttke D S, Foster M P, Case D A, et al. Solution structure of the first three zinc fingers of TF III A bound to the cognate DNA sequence: Determinants of

- affinity and sequence specificity[J]. *Journal of Molecular Biology*, 1997, 273(1): 183-206.
- [27] Laity J H, Chung J, Dyson H J, *et al.* Alternative splicing of Wilms' tumor suppressor protein modulates DNA binding activity through isoform-specific DNA-induced conformational changes [J]. *Biochemistry*, 2000, 39(18): 5341-5348.
- [28] Choo Y, Klug A. A role in DNA binding for the linker sequences of the first three zinc fingers of TFⅢA[J]. *Nucleic Acids Research*, 1993, 21(15): 3341-3346.
- [29] Clemens K R, Zhang P, Liao X, *et al.* Relative contributions of the zinc fingers of transcription factor ⅢA to the energetics of DNA binding[J]. *Journal Molecular Biology*, 1994, 244(1): 23-35.
- [30] Nolte R T, Conlin R M, Harrison S C, *et al.* Differing roles for zinc fingers in DNA recognition; Structure of a six-finger transcription factor ⅢA complex[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1998, 95(6): 2938-2943.
- [31] Greisman H A, Pabo C O. A general strategy for selecting high-affinity zinc finger proteins for diverse DNA target sites[J]. *Science*, 1997, 275: 657-661.
- [32] Segal D J, Dreier B, Beerli R R, *et al.* Toward controlling gene expression at will; Selection and design of zinc finger domains recognizing each of the 5'-GNN-3' DNA target sequences[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1999, 96: 2758-2763.
- [33] Beerli R R, Segal D J, Dreier B, *et al.* Toward controlling gene expression at will; Specific regulation of the erbB2/HER-2 promoter by using polydactyl zinc finger proteins constructed from nodular building blocks [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1998, 95: 14628-14633.
- [34] Isalan M, Klug A, Choo Y. A rapid, generally applicable method to engineer zinc finger illustrated by targeting the HIV-1 promoter[J]. *Nature Biotechnology*, 2001, 19: 656-660.
- [35] Lee D, Seol W, Kim J S. Custom DNA-binding protein and artificial transcription factors[J]. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2003, 3: 339-353.
- [36] Choo Y, Klug A. Physical basis of a protein-DNA recognition code[J]. *Current Opinion in Structural Biology*, 1997, 7: 117-125.
- [37] Herrmann F, Garriga-Canut M, Baumstark R, *et al.* p53 gene repair with zinc finger nucleases optimised by yeast 1-hybrid and validated by Solexa sequencing [J]. *PLoS ONE*, 2011, 6(6): e20913.
- [38] Wera S, Degrève B, Balzarini J, *et al.* Budding yeast as a screening tool for discovery of nucleoside analogs for use in HSV-1 TK suicide-gene therapy[J]. *Biotechniques*, 1999, 27(4): 772-774, 776-777.
- [39] Sander J D, Zaback P, Joung J K, *et al.* Zinc finger targeter (ZiFiT): An engineered zinc finger/target site design tool [J]. *Nucleic Acids Research*, 2007, 35: W599-W605.
- [40] Suqisaki H, Kanazawa S. New restriction endonucleases from *Flavobacterium okeanoikoites* (Fok I) and *Micrococcus luteus* (Mlu I) [J]. *Gene*, 1981, 16(1/3): 73-78.
- [41] Roberts R J, Vincze T, Posfai J, *et al.* REBASE-restriction enzymes and DNA methyltransferases [J]. *Nucleic Acids Research*, 2005, 33: D230-232.
- [42] Lagunavicius A, Sasnauskas G, Halford S E, *et al.* The metal-independent type Ⅱ S restriction enzyme *Bfi* I is a dimer that binds two DNA sites but has only one catalytic centre[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2003, 326: 1051-1064.
- [43] Halford S E. Hopping, jumping and looping by restriction enzymes [J]. *Biochemical Society Transactions*, 2001, 29: 363-373.
- [44] Pingoud A, Fuxreiter M, Pingoud V, *et al.* Type Ⅱ restriction endonucleases; Structure and mechanism [J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2005, 62: 685-707.
- [45] Aggarwal A K. Structure and function of restriction endonucleases[J]. *Current Opinion in Structural Biology*, 1995, 5: 11-19.
- [46] Erskine S G, Baldwin G S, Halford S E. Rapid-reaction analysis of plasmid DNA cleavage by *EcoRV* restriction endonuclease [J]. *Biochemistry*, 1997, 36: 7567-7576.
- [47] Sasnauskas G, Jeltsch A, Pingoud A, *et al.* Plasmid DNA cleavage by *Mun* I restriction enzyme: Single-turnover and steady-state kinetic analysis [J]. *Biochemistry*, 1999, 38: 4028-4036.
- [48] Wright D J, Jack W E, Modrich P. The kinetic mechanism of *EcoR* I endonuclease[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1999, 274: 31896-31902.
- [49] Engler L E, Sapienza P, Domer L F, *et al.* The energetics of the interaction of *Bam*H I endonuclease with its recognition site GGATCC[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2001, 307: 619-636.
- [50] Heiter D F, Lunnem K D, Wilson G G. Site-specific DNA-nicking mutants of the heterodimeric restriction endonuclease R. *BbvCI* [J]. *Journal of Molecular Biology*, 2005, 348: 631-640.
- [51] Bellamy S R, Milsom S E, Scott D J, *et al.* Cleavage of individual DNA strands by the different subunits of the heterodimeric restriction endonuclease *BbvC* I [J]. *Journal of Molecular Biology*, 2005, 348: 641-653.
- [52] Gowers D M, Wilson G G, Halford S E. Measurement of the contributions of 1D and 3D pathways to the translocation of a protein along DNA[J]. *Proceedings*



- of the National Academy of Sciences, 2005, 102: 15883-15888.
- [53] Li L, Wu L P, Chandrasegaran S. Functional domains in *Fok I* restriction endonuclease[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1992, 89: 4275-4279.
- [54] Wah D A, Hirsch J A, Domer L F, *et al.* Structure of the multimodular endonuclease *Fok I* bound to DNA [J]. Nature, 1997, 388: 97-100.
- [55] Kim Y G, Chandrasegaran S. Chimeric restriction endonuclease[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1994, 91: 883-887.
- [56] Wah D A, Bitinaite J, Schildkraut I, *et al.* Structure of *Fok I* has implications for DNA cleavage[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1998, 95: 10564-10569.
- [57] Bitinaite J, Wah D A, Aggarwal A K, *et al.* *Fok I* dimerization required for DNA cleavage[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1998, 95: 10570-10575.
- [58] Bath A J, Milsom S E, Gormley N A, *et al.* Many type II S restriction endonucleases interact with two recognition sites before cleaving DNA[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2002, 277: 4024-4033.
- [59] Vanamee E S, Santagata S, Aggarwal A K. *Fok I* requires two specific DNA sites for cleavage[J]. Journal of Molecular Biology, 2001, 309: 69-78.
- [60] Catto L E, Ganguly S, Milsom S E, *et al.* Protein assembly and DNA looping by the *Fok I* restriction endonuclease[J]. Nucleic Acids Research, 2006, 34 (6): 1711-1720.
- [61] Li L, Chandrasegaran S. Alteration of the cleavage distance of *Fok I* restriction endonuclease by insertion mutagenesis[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1993, 90: 2764-2768.
- [62] Mani M, Smith J, Kandavelou K, *et al.* Binding of two zinc finger nuclease monomers to two specific sites is required for effective double-strand DNA cleavage [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2005, 334: 1191-1197.
- [63] Miller J C, Holmes M C, Wang J, *et al.* An improved zinc-finger nuclease architecture for highly specific genomic editing [J]. Nature Biotechnology, 2007, 25 (7): 778-785.
- [64] Ramalingam S, Kandavelou K, Rajenderan R, *et al.* Creating designed zinc-finger nuclease with minimal cytotoxicity[J]. Journal of Molecular Biology, 2011, 405(3): 630-641.
- [65] Beumer K, Bhattacharyya G, Bibikova M, *et al.* Efficient gene targeting in *Drosophila* with zinc-finger nucleases[J]. Genetics, 2006, 172: 2391-2403.
- [66] Beumer K J, Trautman J K, Liu J L, *et al.* Efficient gene targeting in *Drosophila* by direct embryo injection with zinc-finger nucleases[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2008, 105(50): 19821-19826.
- [67] Doyon Y, McCammon J M, Miller J C, *et al.* Heritable targeted gene disruption in zebrafish using designed zinc finger nucleases[J]. Nature Biotechnology, 2008, 26(6): 702-708.
- [68] Meng X, Noyes M B, Zhu L J, *et al.* Targeted gene inactivation in zebrafish using engineered zinc-finger nucleases[J]. Nature Biotechnology, 2008, 26(6): 695-701.
- [69] Geurts A M, Cost G J, Freyvert Y, *et al.* Knockout rats produced using designed zinc finger nucleases [J]. Science, 2009, 325: 433.
- [70] Mashimo T, Takizawa A, Volgt B, *et al.* Generation of knockout rats with X-linked severe combined immunodeficiency(X-SCID) using zinc-finger nucleases[J]. PLoS ONE, 2010, 5(1): e8870.
- [71] Carbery I D, Ji D, Harrington A, *et al.* Targeted genome modification in mice using zinc-finger nucleases [J]. Genetics, 2010, 186: 451-459.
- [72] Meyer M, de Angelis M H, Wurst W, *et al.* Gene targeting by homologous recombination in mouse zygotes mediated by zinc-finger nucleases[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2010, 107(34): 15022-15026.
- [73] Flisikowska T, Thorey I S, Offner S, *et al.* Efficient immunoglobulin gene disruption and targeted replacement in rabbit using zinc finger nucleases[J]. PLoS ONE, 2011, 6(6): e21045.
- [74] Hauschild J, Petersen B, Santiago Y, *et al.* Efficient generation of a biallelic knockout in pigs using zinc-finger nucleases[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2011, 108(29): 12013-12017.
- [75] Yang D, Yang H, Li W, *et al.* Generation of PPAR $\gamma$  mono-allelic knockout pigs via zinc-finger nucleases and nuclear transfer cloning[J]. Cell Research, 2011, 21: 979-982.
- [76] Yu S, Luo J, Song Z, *et al.* Highly efficient modification of beta-lactoglobulin (*BLG*) gene via zinc-finger nucleases in cattle[J]. Cell Research, 2011, 21: 1638-1640.
- [77] Cui X, Ji D, Fisher D A, *et al.* Targeted integration in rat and mouse embryos with zinc-finger nucleases[J]. Nature Biotechnology, 2011, 29(1): 64-67.
- [78] Meyer M, Ortiz O, Hrabé de Angelis M, *et al.* Modeling disease mutation by gene targeting in one-cell mouse embryos[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2012, 109(24): 9354-9359.