

# 序列特异性核酸酶及其在植物基因组定向修饰中的应用

韦 韬<sup>1</sup> 张 勇<sup>2\*</sup> 刘 玉<sup>2</sup> 郑雪莲<sup>2</sup> 邓科君<sup>2</sup> 陈成彬<sup>1</sup> 宋文芹<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>南开大学生命科学学院, 天津 300071; <sup>2</sup>电子科技大学生命科学与技术学院, 成都 610054)

**摘要** 通过对基因组特定区域进行精确定向遗传修饰, 一方面可以针对目标序列进行精确突变, 获得突变材料, 对目标基因功能进行明确鉴定; 另一方面可以进行目标序列的精确置换或插入, 将外源基因随机导入造成的表达及遗传的不确定性降至最低。传统的基因定向修饰技术仅依赖于细胞自身的同源重组, 修饰效率低下, 而且还存在位置效应和遗传不稳定等诸多问题。通过引入序列特异性核酸酶(sequence-specific nucleases, SSN), 可以在基因组特定位点造成DNA双链断裂(double strand break, DSB), 促进依赖于细胞内源“同源重组”及“非同源末端连接”的DNA修复事件的定向发生, 实现基因组定向遗传修饰效率的大幅提升。迄今为止, 在基因组定向遗传修饰研究及应用领域, 已经有多种不同类型的序列特异性核酸酶被有效使用, 在多种生物中实现了不同类型的基因组定向遗传修饰。该文首先综述了SSN的结构特征及技术原理, 然后对SSN技术在植物基因组定向遗传修饰中的研究进展和应用前景进行了重点介绍。

**关键词** 序列特异性核酸酶; DNA修复; 基因组定向修饰

## Sequence-specific Nucleases and Its Application on Genome Targeting in Plants

Wei Tao<sup>1</sup>, Zhang Yong<sup>2\*</sup>, Liu Yu<sup>2</sup>, Zheng Xuelian<sup>2</sup>, Deng Kejun<sup>2</sup>, Chen Chengbin<sup>1</sup>, Song Wenqin<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin 300071, China; <sup>2</sup>College of Life Sciences and Technology, University of Electronic Science and Technology of China, Chengdu 610054, China)

**Abstract** Through gene targeting at specific loci of the genome, we can obtain mutant which have precise mutation at target sequence and clearly identify the gene function. On the other hand, genome targeting by directly substitution or insertion, can minimize the uncertainty caused by the expression of foreign gene which inserted randomly. The traditional gene targeting technique, which rely solely on the cell's own homologous recombination, is inefficient. And there also are many other issues, like position effects and genetic instability, and so on. By introducing the sequence-specific nucleases (SSN), we can introduce DNA double strand break at specific genomic loci, stimulate the occurrence of the direct DNA repair events which depend on intracellular “homologous recombination” and “non-homologous end joining”, and dramatically improve the efficiency of gene targeting

收稿日期: 2013-07-30 接受日期: 2013-09-02

国家自然科学基金(批准号: 30900779、31271420)、国家重点基础研究发展计划(973)项目(批准号: 2009CB119105)和天津市自然科学基金(批准号: 13JCZDJC29000)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 028-83206556, E-mail: zhangyong916@uestc.edu.cn; Tel: 022-23508241, E-mail: songwq@nankai.edu.cn

Received: July 30, 2013 Accepted: September 2, 2013

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.30900779, 31271420), the State Key Development Program for Basic Research of China (Grant No.2009CB119105) and the Natural Science Foundation of Tianjin (Grant No.13JCZDJC29000)

\*Corresponding authors. Tel: +86-28-83206556, E-mail: zhangyong916@uestc.edu.cn; Tel: +86-22-23508241, E-mail: songwq@nankai.edu.cn

网络出版时间: 2013-10-25 12:12 URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20131025.1212.003.html>

finally. To date, at the area of genome targeting research, there are different types of sequence-specific nucleases that have been effectively used. And in multiple species different types of target genetic modifications have been achieved. In this review, the principles and structural characteristics of SSN were introduced firstly, and then we discussed the advances and prospects of genome targeting in plants.

**Key words** sequence-specific nucleases; DNA repair; targeted genome modification

## 1 引言

随着现代生物技术的发展, 越来越多不同物种的基因组已经完成测序<sup>[1-2]</sup>。面对大量的基因组序列信息, 解读各类基因的功能以及按照人们的意愿对基因组进行定向修饰便成为了生物学的当务之急。为此, 基因的定向修饰技术应运而生, 并得到了各国科学家的青睐。基因组的定向修饰包括对基因组内源序列的改造或通过同源重组途径将外源基因片段插入基因组的特定位置。这项技术为研究特定基因的功能提供了有力工具, 此外人们可以利用该技术对基因组进行改造以获得所需的生物性状, 具有广泛的应用价值和发展前景。近年来, 一些研究者应用传统的技术手段已经对不同生物材料进行了基因组的靶向修饰<sup>[3-5]</sup>。这些传统的方法主要分为两类: 随机插入突变和同源重组<sup>[6-7]</sup>。利用随机插入突变进行基因定向修饰时, 常利用一些能随机插入基因序列的病毒、细菌或其他载体在宿主细胞基因组中进行随机突变, 建立一个随机插入序列的突变体库, 然后通过相应的方法筛选目标突变体; 同源重组法包括自然条件下的同源重组和由重组酶介导的位点特异性重组。尽管取得了一定的成效, 但传统的基因定向修饰技术效率低, 并且特异性不高。例如, 逆转录病毒法有较高的不确定性以及对非目标基因的损伤而产生的细胞毒性; 自然条件下细胞内的同源重组概率很低, 大约为 $10^{-6}$ , 从而造成极低的基因修饰效率。因此, 寻求一种高效、精确的基因定向修饰技术对基因组研究和生物学的发展具有重要的意义。

在植物领域, 利用基因定点突变与定点置换技术可以在基因组原位改变基因序列, 为基因功能的研究提供了方便。此外, 通过基因操作手段改良和培育植物新品种一直都是生物技术研究的核心问题。随着植物遗传转化技术特别是农杆菌介导转化方法的发展与成熟, 基因的定向修饰技术已经在植物研究中得到了广泛的应用。然而植物细胞主要通过NHEJ途径进行DNA损伤修复, 通过HR进行

定点修复的概率很低<sup>[7]</sup>, 因此在植物细胞中定向整合外源基因的难度较大。近年来, 随着拟南芥、水稻、玉米等植物基因组测序计划的推进及相关基因操纵技术的完善, 针对植物基因组特定基因(或区域)进行“基因定向修饰(gene targeting, GT)”<sup>[8-18]</sup>, 逐渐成为可能。通过对基因组特定区域进行精确定位修饰: 一方面, 可以针对目标序列进行精确突变, 获得突变材料, 对目标基因功能进行明确鉴定; 另一方面, 可以进行目标序列的精确置换或插入, 将外源基因随机导入造成的表达及遗传的不确定性降至最低<sup>[11-12, 14-15, 19-27]</sup>。基因组定向修饰的实现, 需要在目标序列区域定向诱导DNA“双链断裂(double-strand break, DSB)”的产生, 随后依靠细胞内源DNA修复机制, 完成DSB区域的定向修饰<sup>[28]</sup>。包括高频射线、化学诱变剂、核酸酶、转座元件等多种因素都可以引发细胞内DNA双链产生断裂<sup>[14, 21, 28-30]</sup>, 然而精确定向DSB的诱导一直是实现“基因组定向修饰”的技术瓶颈, 限制了该技术在基础及应用研究中的应用及推广。

基因组定向遗传修饰一直是生物学研究的前沿与热点领域, 近年以ZFN(zinc finger nuclease)、TALEN(transcription activator-like effectors nuclease)、Meganucleases和CRISPR(clustered regularly interspaced short palindromic repeats)/Cas(CRISPR-associated)系统等技术为代表的定向遗传修饰技术成为该领域最有应用潜力的新工具。鉴于基因组定向遗传修饰技术在生物科学中的巨大影响力, *Nature Method*多次将其列为“年度技术”<sup>[25]</sup>, 最近的*Science*文章也将TALEN为代表的基因组定向修饰技术评为“2012年十大科学突破之一”<sup>[31]</sup>。本文将首先从研发背景、结构特征和作用原理等方面综述不同的序列特异性核酸酶(sequence-specific nucleases, SSN)技术体系; 然后重点介绍SSN技术定点改造植物基因组的一般策略和技术方案, 并对它们在植物研究中的进展进行详述; 最后对SSN技术在植物基因组定向修饰方面的应用前景展开讨论。

## 2 SSN的结构特征及技术原理

1996年, Kim等<sup>[32]</sup>通过将“C2H2锌指(zinc finger)”结构域与*Fok I*限制酶的核酸酶结构域进行融合, 人工合成了可以识别特定位点的“锌指核酸酶(zinc finger nuclease, ZFN)”。ZFN实际上是由识别特定核酸序列的“C2H2锌指”DNA结合结构域和*Fok I*的非特异性DNA切割结构域构成的“杂合限制酶(hybrid restriction enzymes)”, 其中DNA结合结构域由3-6个甚至更多的“C2H2锌指”串联组成, 每个锌指结构域特异识别并结合一个三联体碱基单位(triplet), 多个锌指结构域串联后实现了ZFN对切割位点的特异性识别<sup>[13-15,33-35]</sup>。通过改变锌指蛋白中“识别螺旋(recognition helix, RH)”的氨基酸构成<sup>[36]</sup>, 可以针对性地获得目标序列的DNA结合特异性<sup>[8,10-13,22-23,34,37]</sup>。ZFN中的*Fok I*核酸酶结构域对切割位点不具识别特异性, 并且仅在二聚体状态下才具备核酸酶活性<sup>[14,21,32,34,38-39]</sup>。因此, 在实际应用中, 通常需要针对靶序列设计一对ZFN, 并且在靶序列之间留有5~7 bp的间隔区域(spacer)(确保一对ZFN中*Fok I*二聚体的形成)。根据两侧的靶序列, 一般可以设计含有识别3-4个三联体碱基单位的锌指结构域的ZFN, 这样就可以实现23~31 bp的DNA序列特异识别, 并通过两侧*Fok I*结构域的二聚体对间隔区域进行特异切割, 从而诱导精确定位DSB的实现(图1)<sup>[12-13,16-17,22-23,35,37,39-42]</sup>。

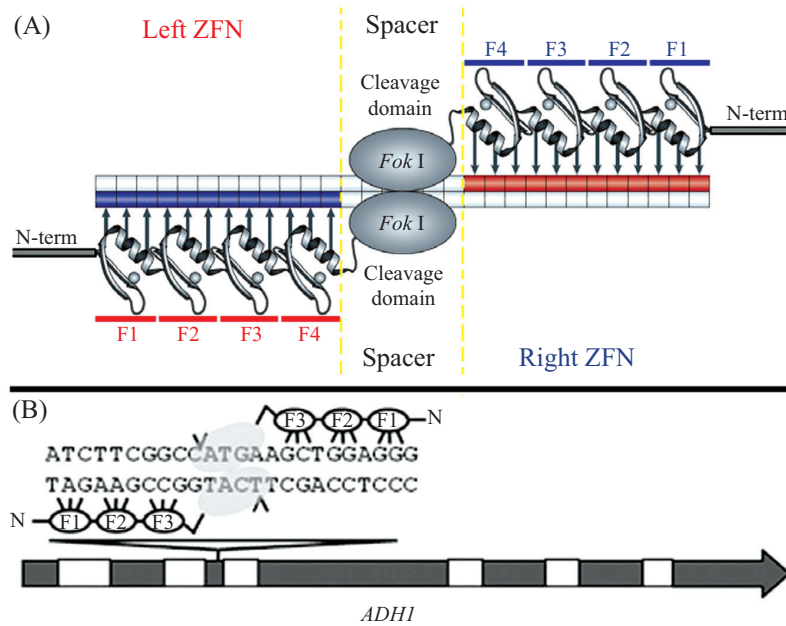
2009年, 由Bogdanove及Boch领导的研究小组同时揭示了一种源自植物病原菌的“类转录激活因子(transcription activator-like effectors, TALE)”蛋白与DNA分子结合的识别规律<sup>[43-44]</sup>。研究发现, TALE蛋白中部的一段串联重复序列提供了与目标DNA序列特异识别及结合的能力, 不同TALE蛋白的串联重复基本单元由34个氨基酸残基构成(也包括33或35个氨基酸残基构成的重复单元, TALE中最后1个重复单元由20个氨基酸残基构成), 其中第12、13位的氨基酸残基在不同重复单元中为可变氨基酸残基, 被称为RVD(repeat-variable di-residue)。通过对比分析不同TALE的RVD氨基酸残基排列及其对应识别的DNA碱基序列, 研究者发现, 不同RVD组合特异性地对应一个核苷酸(最为常见的编码方式为: HD→C、NG→T、NI→A、NN→G)<sup>[43-44]</sup>。这种氨基酸与核苷酸的一一对应关系, 提供了一种简单且直接的针对特定DNA序列构建结合蛋白的设

计思路。Daniel Voytas领导的实验室首先将其应用于靶向核酸酶构建中, 参考ZFN的构建策略, 将TALE的DNA结合相关结构域与*Fok I*的核酸酶结构域融合, 进而优化二者间的连接序列(linker), 获得了针对特定DNA序列具有特异切割活性的核酸酶-TALEN(transcription activator-like effectors nuclease)<sup>[45]</sup>。与ZFN相比, TALEN可以识别更长的DNA靶序列(通常在13~30个核苷酸之间都可以设计具有识别活性的单个TALEN)、更为灵活的选择靶向作用位点(因为RVD针对单一核苷酸进行识别)、跨度更大的间隔区域(15~30个核苷酸, (ZFN一般为5~7个核苷酸)。总体而言, TALEN可以实现从45~90 bp的DNA序列特异识别, 并在间隔区域进行切割, 同样可以诱导精确定位DSB的实现(图2)<sup>[45-49]</sup>。

第三种用于产生定点DSB的蛋白是归巢核酸内切酶(meganucleases/LAGLIDADG homing endonucleases, LHE)(图3), LHE与ZFN和TALEN的不同之处在于它是自然发生的由可移动内含子编码的基因定向修饰蛋白<sup>[50-51]</sup>。LHE是由两个相同的亚基形成的同源二聚体结构, 每个亚基为160到200个氨基酸残基大小。它可以通过接头序列连接两个串联重复单体形成一个简单的肽而起作用<sup>[52]</sup>。LHE作用的DNA靶位点通常是20~30 bp, 具有很强的特异性, LHE也因此被应用于基因组的定点修饰。相比较于ZFN和TALEN, LHE的切割域和DNA结合域划分并不明确。因此, 重新设计归巢核酸内切酶的DNA连接位点具有一定的挑战性, DNA结合结构域的任何改变都有可能破坏核酸酶的切割活力<sup>[50]</sup>。目前, 已经开发了许多方法来评估突变的LHE活力及其改变的靶向特异性。例如, 高通量分析已经在细菌和酵母中被开发用来检测由LHE诱导的切口及随后发生重组的报告基因。此外, 利用不同算法的计算程序也已被用于评估修饰酶的DNA结合亲和力。由于这些技术上的挑战, 普通实验室很难对LHE的结合特异性进行改造, 通常只有极少数的学术团体和公司构建的LHE能高效地结合到新的DNA位点。相对而言, ZFN和TALEN则是大部分科研应用中更加实际的选择<sup>[53]</sup>。

最近, 研究者依据(古)细菌的CRISPR/Cas9免疫系统工作原理, 为基因组工程研究领域引入了一个新的核酸酶成员, 即RNA导向的可编程CRISPR/Cas9核酸酶定点剪切系统<sup>[55]</sup>。细菌和古细菌随时面临



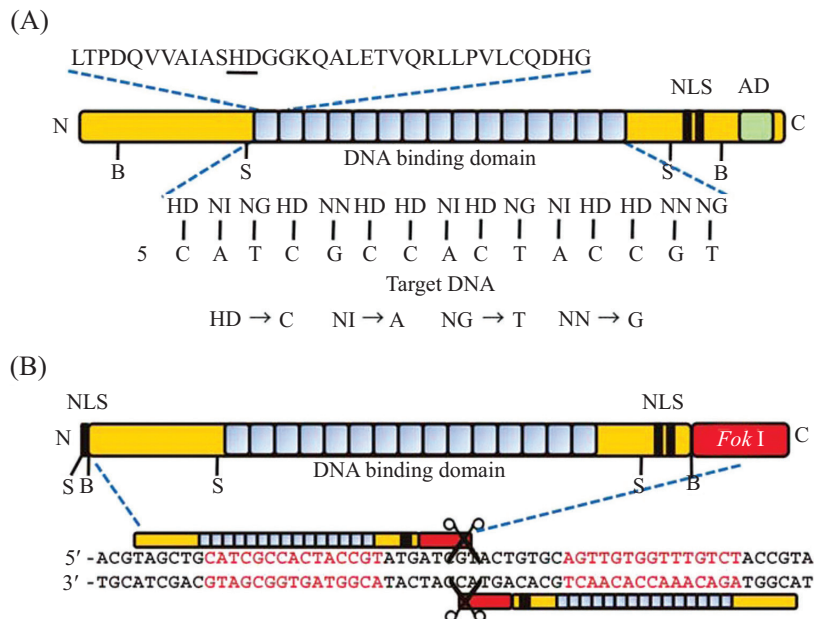


A: ZFN中的锌指结构域及Fok I结构域示意图(根据参考文献[14]修改); B: 拟南芥内源ADHI基因ZFN识别位点及切割区域示意图(根据参考文献[13]修改)。

A: schematic composition of zinc finger domain and Fok I domain in ZFN (modified from reference [14]); B: schematic of ZFN target sites and cutting domain in the gene *ADHI* coding sequences (modified from reference [13]).

图1 ZFN组成结构示意图

Fig.1 Schematic composition of ZFN



A: TALE结构域示意图; B: TALEN蛋白结构、识别位点及切割区域示意图(参考文献[47])。

A: schematic composition of TAL effector; B: structure of a TALEN, target sites and cutting domain (reference [47]).

图2 TALEN组成结构示意图

Fig.2 Schematic composition of TALEN

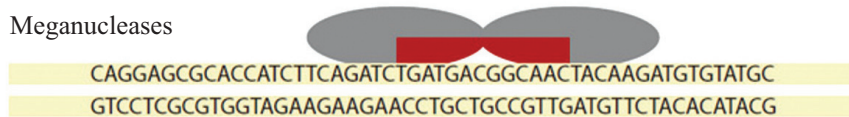


图3 Meganucleases组成结构示意图(红色区域代表催化结构域, 参考文献[54])

Fig.3 Schematic composition of Meganucleases (the catalytic domain is shown in red, reference [54])

病毒及质粒的侵入威胁, 宿主细胞在进化中形成了CRISPR(clustered regularly interspaced short palindromic repeats)/Cas(CRISPR-associated)为核心的免疫系统: CRISPR区间序列(CRISPR spacers)按照一定顺序转录并加工成小分子干扰crRNA(CRISPR-derived RNA), 引导Cas核酸酶定点剪切目标DNA双链并降解入侵的病毒及质粒DNA<sup>[56]</sup>。Jinek等<sup>[55]</sup>研究表明, 在细菌中一个tracrRNA分子(trans-activating crRNA)与另一序列特异性crRNA的同源区域配对, 之后可识别DNA双链中的同源序列, 进而引导Cas9识别并切割目标DNA双链, 形成定向DSB(图4)。进一步的研究证明, Cas9的核酸内切酶HNH和RuvC区域分别剪切互补和非互补的DNA链, 可以产生平滑剪切的双链DNA末端。这种在DNA序列的确定和不连续的位置上定点剪切目标DNA双链的能力为基因组定向编辑技术开辟了新途径。随后研究者采用不同的crRNA: tracrRNA二元复合体构建策略分别在人源细胞系及小鼠中实现了基于RNA导向的CRISPR/Cas9系统的目标基因组定向修饰工作<sup>[57-58]</sup>。对比其他序列特异性核酸酶技术体系, CRISPR/Cas9系统拥有几个显著特点: 依赖于RNA导向的基因组目标序列识别特异性、较为灵活的目标位点设计、更为快捷高效的载体构建系统, 为高效的基因组定向编辑的实现拓展了技术空间<sup>[55-58]</sup>。

### 3 SSN在植物基因组定向遗传修饰中的应用

传统的基因修饰技术依赖于细胞自身的同源重组修复机制, 效率十分低下, 同时植物细胞DNA损伤的主要修复途径为NHEJ, 这大大限制了该技术在植物研究中的应用。序列特异性核酸酶可以在基因组特定位置产生DSB, 为植物基因组的定向修饰带来了新的希望。到目前为止, 基因工程中基于SSN技术进行基因组修饰的方法主要包括定点诱变、基因置换、基因插入和基因结构的定向改变。国内外研究者已经在一些模式植物和重要作物中利用SSN技术进行了目标基因(或目标区域)的精确定向修饰, 为该技术在农作物基因工程育种中的应用奠定了研究基础。

#### 3.1 目标基因定向突变

针对目标基因特定位点, 设计、构建并有效表达SSN, 可以在目标位点定向引入DNA双链断裂

(double strands break, DSB)。由核酸酶切割产生的DNA双链切口通过细胞内的非同源末端连接途径修复(non-homologous end joining, NHEJ), 这个过程经常会在切口处引起DNA短链的插入或缺失。在基因开放阅读框内碱基的缺失和插入会导致蛋白质翻译的提前终止及移码突变, 进而实现目标基因的定向敲除, 随后针对转化株系进行基因分型可以确定定向突变材料<sup>[53]</sup>。

第一个由ZFN介导的植物基因组定点修饰的报道是在拟南芥中进行的。2005年, Lloyd等<sup>[59]</sup>将一个具有QQR锌指结构域的ZFN编码序列连接在热激诱导型启动子下游(图5), 同时将携带有QQR ZFN靶位点的目标序列通过根癌农杆菌转染的方法导入到拟南芥细胞中。ZFN被热激诱导表达后, 对转基因拟南芥植株QQR-ZFN靶序列的完整性分析表明: 1.7%~19.6%的靶位点带有ZFN诱导的突变。其中, 单纯的碱基插入和缺失的比例分别为78%和13%, 其他位点表现为缺失和插入并存的复杂重组, 并且可以看出这些突变主要是由NHEJ途径介导的。

Cermak等<sup>[47]</sup>利用Golden gate组装法针对拟南芥*ADHI*基因构建了一对TALEN(图2), 并将其编码序列连接在CaMV 35S启动子下游, 随后通过农杆菌转染将重组质粒导入拟南芥原生质体内表达, 最后通过PCR扩增检测到了发生在TALEN靶位点的6个独立突变事件, 分析发现这些突变均是在目标位点发生了4~15 bp碱基的缺失, 达到了基因敲除的效果。同时, Mahfouz等<sup>[17]</sup>报道基于Hax3设计的TALEN可以与目标序列进行特异性结合, 将重组质粒导入烟草叶片进行瞬时表达后, TALEN切割靶位点产生的DSB可通过NHEJ途径得到修复, 从而证明了TALEN可以对植物基因组进行定点修饰。最近, 国内外研究者已经在相关模式植物及重要作物中, 开始应用TALEN技术进行目标基因(或区域)的定向修饰, 分别在水稻、烟草、二穗短柄草中实现了内源基因的定向遗传修饰<sup>[60-62]</sup>。

虽然基因工程的大部分工作都集中在模式生物, 但在包括玉米、大豆和碧冬茄在内的少数作物品种中亦有利用SSN进行定点诱变的报道。Gao等<sup>[63]</sup>针对玉米*liguleless*位点侧翼的序列重新设计了I-CreL LHE, 最后在目标位点产生了可遗传的等位基因突变, 这也是第一个利用重新设计的LHE定向修饰作物基因组的报道。大豆是多倍体生物, 其染色体中

有大约75%的基因是重复的。在整株植物转化之前, Curtin等<sup>[16]</sup>通过根毛诱导的方法鉴定可以利用特异的ZFN对7个大豆基因进行定点突变。其中, 研究人员针对*DCL4*基因的两个重复设计了一对ZFN, 并利用根毛诱导法转化获得了一个可遗传的*DCL4b*突变体。

### 3.2 目标基因定向插入及置换

虽然目标基因的敲除在基础和应用植物研究中具有很重要的作用, 但是基因工程中的另一个强有力的手段是修饰基因, 而不是消除它的功能。作为一种非随机性方式, DNA损伤的同源重组修复途径(homologous recombination, HR)需要一个包含有与切口两侧序列同源的DNA分子作为模板, 在对DSB进行修饰后可以特异的改变一个基因的序列或在染色体的特定位置引入外源基因。此外, 在染色体的同一位点插入多个外源基因有利于通过杂交的方法将转基因引入到其它种质资源<sup>[53]</sup>。

基于HR途径, Wright等<sup>[40]</sup>在烟草中利用ZFN实现了GUS报告基因的同源重组修复。为了测试ZFN可以提高植物中HR事件发生的概率, 研究者首先将缺失了600 bp的*GUS:NPTII*报告基因整合到烟草基因组中, 并在报告基因中插入了一个Zif268 ZFN结合位点。然后以含有600 bp的完整基因片段*GUS:NPTII*为供体DNA, 同时构建特异识别的Zif268 ZFN表达载体, 共转化烟草原生质体。通过对*GUS*报告基因检测和抗性筛选确定基因置换频率得出转化细胞的10%获得了基因定点整合, 比不用ZFN时效率提高了104~106倍。进一步的分析表明, 大约20%的阳性抗性细胞发生了精确的同源重组, 而其它细胞则包含了额外的DNA重排。Townsend等<sup>[12]</sup>以烟草*Sur A*和*SuR B*基因为靶向基因, 设计、组装特异ZFN, 将ZFN质粒和经修饰后获得除草剂抗性基因的*Sur B*供体模板通过电穿孔法同时导入烟草原生质体中, 最终检测到0.2%~4.0%的基于HR的基因置换事件发生, 同时获得了抗除草剂特性的突变植株<sup>[12]</sup>。

利用ZFN进行基因编辑的另外一个例子是由Skukla完成的。作者设计的ZFNs可以特异地结合到玉米的*IPK1*基因, 该基因编码肌醇-1,3,4,5,6-五磷酸酶。这个酶是植酸生物合成途径中的一个重要的酶, 有助于增加玉米种子中的总磷含量。然而植酸在食料中的营养价值有限, 并且与动物废料中的污染物相牵连, 因此通过打断*IPK1*基因来减少植酸含量对于农业生产具有重要意义。研究者针对*IPK1*基因的

5个位点设计了66对ZFN, 基于可以在培养细胞的基因中产生DSB以及提高NHEJ修复的能力, 他们最终筛选4对ZFN对*IPK1*基因的第二个外显子进行修饰。*IPK1*基因被ZFN诱导形成的DSB打断, 在拥有供体模板的情况下进行HR修复, 其中供体模板中含有一个除草剂抗性基因和与目标基因位点两侧同源的短臂。通过对大约600个转化的具有除草剂抗性的愈伤组织进行筛选以检测基因修饰结果, 最终观察到几个等位基因在*IPK1*位点有除草剂基因编码框插入。所有的子代表现出应有的分离比率, 从而表明这种插入可以有效的传递给后代<sup>[11]</sup>。

近来, Zhang等<sup>[61]</sup>利用TALEN技术对烟草*ALS*基因进行了定向修饰。研究者通过基于原生质体的SSA分析得到了最优的TALEN结构(图6), 并利用流式细胞术检测了不同TALEN的活性。在成功转化的细胞中, TALEN造成*ALS*基因定点突变和插入的概率分别为30%和14%。对带有*ALS*基因突变的16个愈伤组织进一步分析发现, 它们均是在同一位点发生了变化。当将一个与*ALS*基因同源的供体分子和TALEN的编码结构同时导入愈伤组织细胞后, 4%的基因发生了同源置换。这一结果进一步证实了利用TALEN进行植物基因组定向修饰的可行性。

## 4 展望

基因组的定点修饰技术作为基因工程研究中的核心, 一直以来都存在着基因定向修饰效率低下、靶位点不确定、遗传稳定性以及由于脱靶效应带来的安全性等问题。近年来, 基于SSN的基因组定向遗传修饰技术的快速发展为这些问题的解决带来了新的希望<sup>[54]</sup>。目前, SSN技术已经在动物和人类细胞基因组研究中得到了快速的发展, 由于被证实可以用于植物基因组的修饰, 这项先进的技术也得到了植物学家的肯定, 并已在一些模式植物和经济植物中得到了应用。显然, 设计和生产特异性的核酸酶是将这项技术成功应用到植物基因组靶向修饰的关键步骤<sup>[53-54]</sup>。目前, 研究人员可以通过许多公开的平台和方案来构建新的ZFN和TALEN, 此外还可以从特定的科研单位购买所需的核酸酶。例如, 研究者可以从Sigma-Aldrich公司购买ZFN。但是需要指出的是, 现有的一些用于设计和装配不同SSN的方案在技术上仍存在着诸多困难, 并且有的方法十分耗时。因此, 需要寻找新的方法或改进现有的设



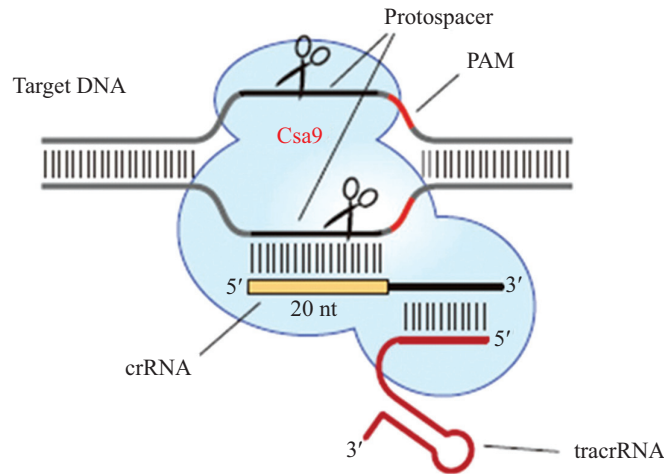
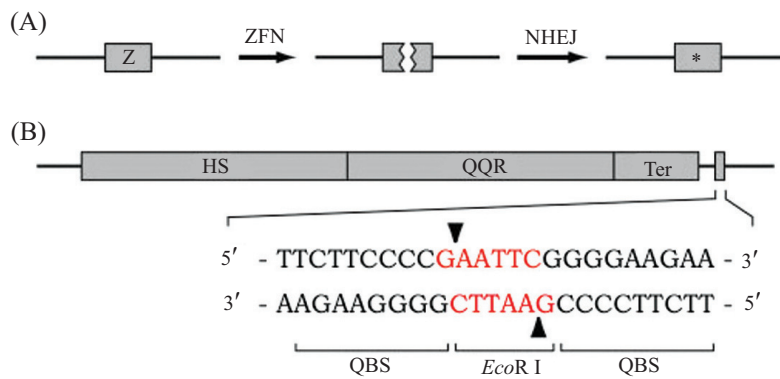


图4 RNA导向的CRISPR/Cas9系统简要工作原理示意图(根据参考文献[55]修改)

Fig.4 Schematic composition of RNA-guided CRISPR/Cas9 system (modified from reference [55])

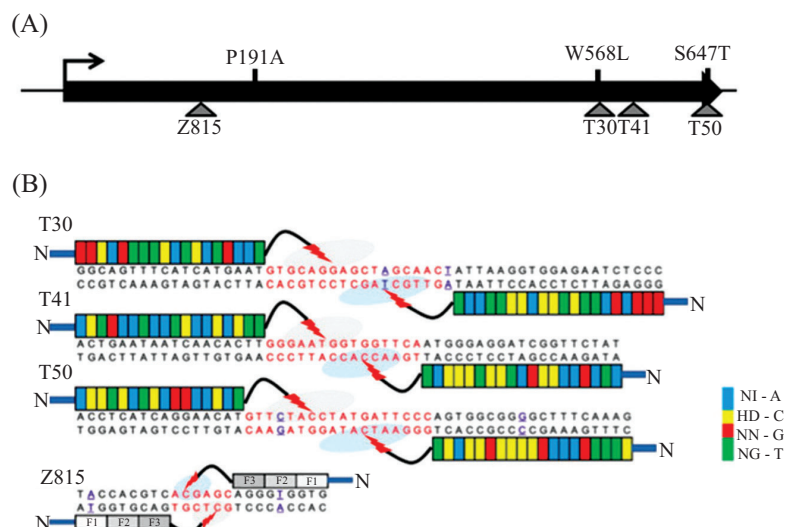


A: 利用ZFN诱导突变的策略; B: HS::QQR-QEQ的结构示意图(根据参考文献[59]修改)。

A: strategy for induction of mutations using ZFN; B: schematic of HS::QQR-QEQ construct (modified from reference [59]).

图5 ZFN介导的定点诱变

Fig.5 Targeted mutagenesis using ZFN



A: 烟草ALS基因TALENs和ZFN结合位点示意图; B: 烟草ALS基因TALEN和ZFN结合位点的DNA序列(参考文献[61])。

A: schematic of the target sites for the TALENs and the ZFN in tobacco *ALS*; B: DNA sequences of the TALEN and ZFN recognition sites in *ALS* (reference [61]).

图6 TALENs定点修饰烟草ALS基因

Fig.6 Targeting the tobacco *ALS* genes with TALENs

计和装配方案以提高实验效率。

虽然SSN的设计和组装是使用这项技术进行基因编辑的核心,但是SSN的活力验证以及传递工具的选择对于能否成功的进行基因组定向修饰也是十分重要的。在这里,研究者同样可以根据不同的要求找到最适合于目标植物定向修饰的表达系统<sup>[53]</sup>。例如,SSN转基因的过表达对于拟南芥或其他模式植物是有用的,但对于经济作物可能就不合适。还有,在一些植物中可以将两个核酸酶单体和供体DNA分子通过两个质粒或T-DNA共转化后瞬时表达进行基因定点修饰。然而,对于一些具有重要经济价值的物种来说共转化是一个相对低效的过程。此外,这个过程可能会导致无意分子整合到植物基因组中,致使产生转基因。除了SSN的活性外,SSN在细胞中的表达水平,以及目标序列在基因组中的位置和细胞生长的生理阶段都对基因定点修饰效率有很重要的影响。表达技术的改进和新筛选方法的使用将会更有利于对植物细胞中基因定点修饰事件的检测和打靶效率的提高<sup>[64]</sup>。同时,对DNA分子整合到植物细胞基因组的过程和核酸酶作用于靶位点的潜在影响因素更好的了解,都有助于植物基因组定向修饰效率的提高。

SSN介导的基因定向修饰技术的进一步进展很可能是通过设计新的核酸酶或找到新的表达、选择工具来实现,以及利用它们对更多植物品种的内源基因和转基因进行定点修饰<sup>[53]</sup>。然而,需要重点指出的是这项技术的成功运用同样依靠于对植物遗传转化过程和DNA修复机制的了解。同时,揭示载体分子导入基因组DSB的机制、DNA结构对SSN目标序列可能的影响、DSB修复动力学过程和特异植物蛋白在HR和NHEJ途径中的作用对于进行有效的植物基因编辑都是必要的<sup>[64]</sup>。

近来,研究人员发现了一类广泛分布于细菌和古生菌基因组中由二元RNA介导的CRISPR/Cas系统可以为原核生物提供对抗噬菌体等外源基因的获得性免疫能力<sup>[65]</sup>。CRISPR间区序列(CRISPR spacers)按照一定顺序转录并加工成小分子干扰CRISPR RNA(crRNA)后与一个反式激活的tracrRNA配对可形成向导RNA(guide RNA, gRNA),引导Cas蛋白切割同源DNA序列<sup>[55]</sup>。到目前为止,这个新工具已经在酵母<sup>[66]</sup>和一些动物基因组中实现了个性化定制的DNA剪切<sup>[58,67]</sup>。然而其在植物研究中的应用价值

以及这种新的剪切工具是否能超越现有的ZFN和TALEN方法,还需要时间和实践来验证。

总之,尽管目前SSN技术在植物中进行广泛的应用仍然面临着诸多难题,但是其在植物基因功能鉴定以及基因改良育种等研究领域的优势是无可比拟的。相信随着科学水平的不断发展,SSN技术将会成为植物基因工程研究领域的强有力手段。

### 参考文献 (References)

- Goff SA, Ricke D, Lan TH, Presting G, Wang R, Dunn M, *et al.* A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*). *Science* 2002; 296(5565): 92-100.
- Pavliček A, Pačes J, Clay O, Bernardi G. A compact view of isochores in the draft human genome sequence. *FEBS Lett* 2002; 511(1): 165-9.
- Risseuw E, Dijk ME, Hooykaas PJ. Gene targeting and instability of *Agrobacterium* T-DNA loci in the plant genome. *Plant J* 2002; 11(4): 717-28.
- Miao ZH, Lam E. Targeted disruption of the TGA3 locus in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 2003; 7(2): 359-65.
- Ruf S, Kössel H, Bock R. Targeted inactivation of a tobacco intron-containing open reading frame reveals a novel chloroplast-encoded photosystem I-related gene. *J Cell Biol* 1997; 139(1): 95-102.
- Britt AB, May GD. Re-engineering plant gene targeting. *Trends Plant Sci* 2003; 8(2): 90-5.
- Ray A, Langer M. Homologous recombination: Ends as the means. *Trends Plant Sci* 2002; 7(10): 435-40.
- Porteus MH, Carroll D. Gene targeting using zinc finger nucleases. *Nat Biotechnol* 2005; 23(8): 967-73.
- Kumar S, Allen GC, Thompson WF. Gene targeting in plants: Fingers on the move. *Trends Plant Sci* 2006; 11(4): 159-61.
- Terada R, Johzuka-Hisatomi Y, Saitoh M, Asao H, Iida S. Gene targeting by homologous recombination as a biotechnological tool for rice functional genomics. *Plant Physiol* 2007; 144(2): 846-56.
- Shukla VK, Doyon Y, Miller JC, DeKolver RC, Moehle EA, Worden SE, *et al.* Precise genome modification in the crop species *Zea mays* using zinc-finger nucleases. *Nature* 2009; 459(7245): 437-41.
- Townsend JA, Wright DA, Winfrey RJ, Fu F, Maeder ML, Joung JK, *et al.* High-frequency modification of plant genes using engineered zinc-finger nucleases. *Nature* 2009; 459(7245): 442-5.
- Zhang F, Maeder ML, Unger-Wallace E, Hoshaw JP, Reyon D, Christian M, *et al.* High frequency targeted mutagenesis in *Arabidopsis thaliana* using zinc finger nucleases. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107(26): 12028.
- Urnov FD, Rebar EJ, Holmes MC, Zhang HS, Gregory PD. Genome editing with engineered zinc finger nucleases. *Nat Rev Genet* 2010; 11(9): 636-46.
- Carroll D. Genome engineering with zinc-finger nucleases. *Genetics* 2011; 188(4): 773-82.



- 16 Curtin SJ, Zhang F, Sander JD, Haun WJ, Starker C, Baltes NJ, *et al.* Targeted mutagenesis of duplicated genes in soybean with zinc-finger nucleases. *Plant Physiol* 2011; 156(2): 466-73.
- 17 Mahfouz MM, Li L. TALE nucleases and next generation GM crops. *GM crops* 2011; 2(2): 99-103.
- 18 Lusser M, Parisi C, Plan D, Rodríguez-Cerezo E. Deployment of new biotechnologies in plant breeding. *Nat Biotechnol* 2012; 30(3): 231-9.
- 19 DeKelver RC, Choi VM, Moehle EA, Paschon DE, Hockemeyer D, Meijising SH, *et al.* Functional genomics, proteomics, and regulatory DNA analysis in isogenic settings using zinc finger nuclease-driven transgenesis into a safe harbor locus in the human genome. *Genome Res* 2010; 20(8): 1133-42.
- 20 Jacob HJ, Lazar J, Dwinell MR, Moreno C, Geurts AM. Gene targeting in the rat: Advances and opportunities. *Trends Genet* 2010; 26(12): 510-8.
- 21 Weinthal D, Tovkach A, Zeevi V, Tzfira T. Genome editing in plant cells by zinc finger nucleases. *Trends Plant Sci* 2010; 15(6): 308-21.
- 22 Cui X, Ji D, Fisher DA, Wu Y, Briner DM, Weinstein EJ. Targeted integration in rat and mouse embryos with zinc-finger nucleases. *Nat Biotechnol* 2011; 29(1): 64-7.
- 23 Li T, Huang S, Jiang WZ, Wright D, Spalding MH, Weeks DP, *et al.* TAL nucleases (TALNs): Hybrid proteins composed of TAL effectors and FokI DNA-cleavage domain. *Nucleic Acids Res* 2011; 39(1): 359-72.
- 24 Wood AJ, Lo TW, Zeitler B, Pickle CS, Ralston EJ, Lee AH, *et al.* Targeted genome editing across species using ZFNs and TALENs. *Science* 2011; 333(6040): 307.
- 25 Baker M. Gene-editing nucleases. *Nat Methods* 2011; 9(1): 23-6.
- 26 Mussolino C, Cathomen T. TALE nucleases: Tailored genome engineering made easy. *Curr Opin Biotech* 2012; 23: 1-7.
- 27 Waltz E. Tiptoeing around transgenics. *Nat Biotechnol* 2012; 30(3): 215-7.
- 28 Puchta H, Dujon B, Hohn B. Two different but related mechanisms are used in plants for the repair of genomic double-strand breaks by homologous recombination. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93(10): 5055-60.
- 29 Tovar J, Lichtenstein C. Somatic and meiotic chromosomal recombination between inverted duplications in transgenic tobacco plants. *Plant Cell* 1992; 4(3): 319-32.
- 30 Xiao YL, Li X, Peterson T. Ac insertion site affects the frequency of transposon-induced homologous recombination at the maize pI locus. *Genetics* 2000; 156(4): 2007-17.
- 31 Bryn B. Breakthrough of the Year. *Science* 2012; 338(6114): 1526.
- 32 Kim YG, Cha J, Chandrasegaran S. Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93(3): 1156-60.
- 33 Bibikova M, Beumer K, Trautman JK, Carroll D. Enhancing gene targeting with designed zinc finger nucleases. *Science* 2003; 300(5620): 764.
- 34 Durai S, Mani M, Kandavelou K, Wu J, Porteus MH, Chandrasegaran S. Zinc finger nucleases: Custom-designed molecular scissors for genome engineering of plant and mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 2005; 33(18): 5978-90.
- 35 Sander JD, Dahlborg EJ, Goodwin MJ, Cade L, Zhang F, Cifuentes D, *et al.* Selection-free zinc-finger-nuclease engineering by context-dependent assembly (CoDA). *Nat Methods* 2010; 8(1): 67-9.
- 36 Pavletich NP, Pabo CO. Zinc finger-DNA recognition: Crystal structure of a Zif268-DNA complex at 2.1 Å. *Science* 1991; 252(5007): 809-17.
- 37 Carroll D, Morton JJ, Beumer KJ, Segal DJ. Design, construction and *in vitro* testing of zinc finger nucleases. *Nat Protoc* 2006; 1(3): 1329-41.
- 38 Miller JC, Holmes MC, Wang J, Guschin DY, Lee YL, Rupniewski I, *et al.* An improved zinc-finger nuclease architecture for highly specific genome editing. *Nat Biotechnol* 2007; 25(7): 778-85.
- 39 Doyon Y, Vo TD, Mendel MC, Greenberg SG, Wang J, Xia DF, *et al.* Enhancing zinc-finger-nuclease activity with improved obligate heterodimeric architectures. *Nat Methods* 2010; 8(1): 74-9.
- 40 Wright DA, Townsend JA, Winfrey Jr RJ, Irwin PA, Rajagopal J, Lonosky PM, *et al.* High-frequency homologous recombination in plants mediated by zinc-finger nucleases. *Plant J* 2005; 44(4): 693-705.
- 41 Osakabe K, Osakabe Y, Toki S. Site-directed mutagenesis in Arabidopsis using custom-designed zinc finger nucleases. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107(26): 12034.
- 42 Gupta A, Meng X, Zhu LJ, Lawson ND, Wolfe SA. Zinc finger protein-dependent and-independent contributions to the *in vivo* off-target activity of zinc finger nucleases. *Nucleic Acids Res* 2011; 39(1): 381-92.
- 43 Boch J, Scholze H, Schornack S, Landgraf A, Hahn S, Kay S, *et al.* Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science* 2009; 326(5959): 1509-12.
- 44 Moscou MJ, Bogdanove AJ. A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors. *Science* 2009; 326(5959): 1501.
- 45 Christian M, Cermak T, Doyle EL, Schmidt C, Zhang F, Hummel A, *et al.* Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. *Genetics* 2010; 186(2): 757-61.
- 46 Bogdanove AJ, Voytas DF. TAL effectors: Customizable proteins for DNA targeting. *Science* 2011; 333(6051): 1843-6.
- 47 Cermak T, Doyle EL, Christian M, Wang L, Zhang Y, 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.
- 48 Hockemeyer D, Wang H, Kiani S, Lai CS, Gao Q, Cassady JP, *et al.* Genetic engineering of human pluripotent cells using TALE nucleases. *Nat biotechnol* 2011; 29(8): 731-4.
- 49 Miller JC, Tan S, Qiao G, Barlow KA, Wang J, Xia DF, *et al.* A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. *Nat Biotechnol* 2010; 29(2): 143-8.
- 50 Taylor GK, Petrucci LH, Lambert AR, Baxter SK, Jarjour J, Stoddard BL. LAHEDES: the LAGLIDADG homing endonuclease database and engineering server. *Nucleic Acids Res* 2012; 40(W1): W110-W116.
- 51 Arnould S, Delenda C, Grizot S, Desseaux C, Paques F, Silva G, *et al.* The I-CreI meganuclease and its engineered derivatives: applications from cell modification to gene therapy. *Protein Eng Des Sel* 2011; 24(1/2): 27-31.
- 52 Stoddard BL. Homing endonucleases: From microbial genetic invaders to reagents for targeted DNA modification. *Structure*

- 2011; 19(1): 7-15.
- 53 Curtin SJ, Voytas DF, Stupar RM. Genome Engineering of Crops with Designer Nucleases. *Plant Genome* 2012; 5(2): 42-50.
- 54 Voytas DF. Plant genome engineering with sequence-specific nucleases. *Annu Rev Plant Biol* 2013; 64: 327-50.
- 55 Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 2012; 337(6096): 816-21.
- 56 Barrangou R. RNA-mediated programmable DNA cleavage. *Nat biotechnol* 2012; 30(9): 836-8.
- 57 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.
- 58 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.
- 59 Lloyd A, Plaisier CL, Carroll D, Drews GN. Targeted mutagenesis using zinc-finger nucleases in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102(6): 2232-7.
- 60 Li T, Liu B, Spalding MH, Weeks DP, Yang B. High-efficiency TALEN-based gene editing produces disease-resistant rice. *Nat Biotechnol* 2012; 30(5): 390-2.
- 61 Zhang Y, Zhang F, Li X, Baller JA, Qi Y, Starker CG, *et al.* Transcription activator-like effector nucleases enable efficient plant genome engineering. *Plant Physiol* 2013; 161(1): 20-7.
- 62 Shan Q, Wang Y, Chen K, Liang Z, Li J, Zhang Y, *et al.* Rapid and efficient gene modification in rice and Brachypodium using TALENs. *Mol Plant* 2013; 6(4):1365-8.
- 63 Gao H, Smith J, Yang M, Jones S, Djukanovic V, Nicholson MG, *et al.* Heritable targeted mutagenesis in maize using a designed endonuclease. *Plant J* 2009; 61(1): 176-87.
- 64 Tzfira T, Weinthal D, Marton I, Zeevi V, Zuker A, Vainstein A. Genome modifications in plant cells by custom-made restriction enzymes. *Plant Biotechnol J* 2012; 10: 373-89.
- 65 Jiang W, Bikard D, Cox D, Zhang F, Marraffini LA. RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems. *Nat biotechnol* 2013; 31(3): 233-9.
- 66 DiCarlo JE, Norville JE, Mali P, Rios X, Aach J, Church GM. Genome engineering in *Saccharomyces cerevisiae* using CRISPR-Cas systems. *Nucleic Acids Res* 2013; 41: 4336-43.
- 67 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.