

# 利用人工锌指蛋白核酸酶进行植物基因定点突变和置换<sup>\*</sup>

张余洋<sup>\*\*</sup> 张晓辉<sup>\*\*\*</sup> 张婵娟

(华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室 武汉 430070)

**摘要** 基因定点突变技术在基因组原位改变基因特定序列,避免常规转基因过程中位置效应和插入失活。定点突变生物体不含转基因或标记基因,降低风险性。高等植物基因定点突变研究初见端倪,将可能为基因原位功能研究、作物遗传改良和分子设计提供有效策略。利用锌指蛋白核酸酶(zinc finger nucleases, ZFN)引入DNA定点断裂(double-strand breaks, DSBs)可以高效介导基因定点突变,使得ZFN在基因定点突变中倍受关注。综述了植物基因定点突变的一般策略,重点介绍了锌指蛋白的结构、原理、应用,特别是ZFN介导的植物基因定点突变与置换研究进展,并对ZFN介导的植物基因定点突变与置换应用前景进行了讨论。

**关键词** 基因定点突变 基因定点置换 锌指蛋白核酸酶 植物

**中图分类号** Q819

常规转基因过程中,目标基因随机整合进染色体,这种整合随机性引发整合位点和表达效应的不确定,从而制约了转基因技术在农业及基础科学上的应用。利用基因定点突变和置换技术可以实现基因组原位引入基因序列的改变,既可避免位置效应导致的表达不确定性(如基因沉默),又可避免插入导致插入位点基因的失活<sup>[1]</sup>。随着重要作物如水稻、玉米、小麦、大豆和番茄等基因组序列逐步阐明([www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/PLANTS/PlantList.html](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/PLANTS/PlantList.html)),需要一种方法来利用大量序列信息获得定点突变进行重要基因功能的鉴定。另一方面,定点突变和修复生物体不含有转基因DNA片段或标记基因,降低应用风险。基因定点突变和置换技术将可能为植物基因组原位功能研究、作物遗传改良和作物分子设计提供更为有效的策略。

在一些模式生物(如酵母)中,利用染色体与外源DNA片段的同源重组(homologous recombination, HR)

可以实现基因的定点突变与定点置换<sup>[2]</sup>。但是,在高等生物尤其是植物中,这种同源重组效率非常低,限制了其使用。由于基因定点突变和置换技术具有巨大的应用潜力,各国科学家投入大量研究,其中不乏成功的尝试。如:(1)利用寡核苷酸介导单碱基置换(插入或缺失)<sup>[3]</sup>;(2)利用高效正、负向筛选标记筛选同源重组子<sup>[4]</sup>;(3)异位表达重组酶提高重组频率<sup>[7]</sup>;(4)利用锌指蛋白核酸酶(zinc finger nucleases, ZFN)在染色体DNA上引入定点断裂,促进基因定点突变和置换<sup>[8~10]</sup>。基因定点突变与置换技术将在植物遗传改良方面发挥极其重要的作用,其中,ZFN是目前最具潜力的基因定点突变和置换工具。在此,本文重点介绍了锌指核酸酶的结构、作用原理、研究现状及应用方面的最新进展,并对应用ZFN进行植物基因定点突变和置换的技术路线作了细致的介绍。

## 1 ZFN的结构及作用原理

虽然在酵母以及原核生物中具有较高的同源重组频率,但在植物中的同源重组频率相对较低。研究发现基因组定点双链断裂(double-strand breaks, DSBs)可

收稿日期:2008-07-08 修回日期:2008-08-13

<sup>\*</sup> 国家自然科学基金(30800756)、新疆生产建设兵团博士资金(2008JC04)、华中农业大学博士科研资金(52204-07037)资助项目

<sup>\*\*</sup> 电子信箱:yyzhang@mail.hzau.edu.cn

<sup>\*\*\*</sup> 并列第一作者

以提高植物的同源重组效率。将限制性内切酶 I-SceI 酶切位点导入烟草基因组中,在 I-SceI 酶作用下产生定点的 DSB,可使该位点的同源重组效率提高 100 倍<sup>[11]</sup>。这表明基因组中部分位点断裂可以提高同源重组频率。因此有效的在植物基因组中引入一个切割位点是关键。I-SceI 酶切位点虽然提高了该位点的重组频率,但进行植物基因组内源位点重组操作就受到限制。研究者开发出 ZFN 为植物同源重组介导的基因定点整合和置换提供了有效的基因组 DNA 定点切割工具<sup>[8]</sup>。

ZFN 是一种人工改造的核酸内切酶,由两部分组成,包括一个 DNA 结合域和一个非特异性核酸内切酶。其工作原理是 DNA 结合域与特定 DNA 结构结合,与之相连的非特异性核酸内切酶随之发挥剪切作用,在结合位点产生断裂,促进同源重组,提高定点突变和置换频率(图 1)。当 ZFN 进行 DNA 定点切割时,如果存在一个具有一定同源性 DNA 为模板,则可以根据模板复制实现 DNA 定点置换(图 2:A,C),当不存在模板时,ZFN 进行基因组 DNA 定点剪切则产生非同源末端连接(Non-homologous end joining, NHEJ),引发基因定点突变(图 2,B)。

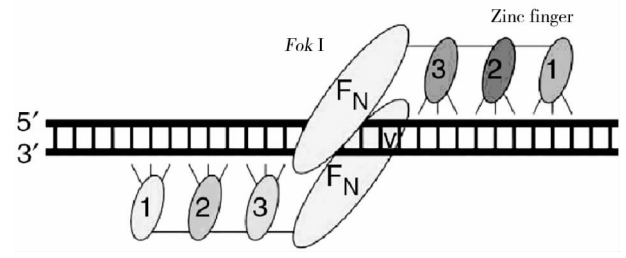


图 1 锌指蛋白核酸酶定点切割 DNA

Fig.1 DNA double strand break by zinc-finger nucleases

Numbers 1 ~3 represent three tandem zinc proteins, F<sub>N</sub> denotes nucleases FokI

ZFN 结构中的 DNA 结合域是由 3 ~4 个甚至更多的 Cys2-His2 锌指蛋白(zinc-fingers)串联组成,每个锌指蛋白识别并结合一个特异的三联体碱基。多个锌指蛋白串联起来形成一个锌指蛋白组可以识别一段特异的碱基序列,具有很强的特异性<sup>[12~15]</sup>。锌指蛋白广泛存在于真核生物转录因子家族(transcription factor family),具有一个  $\alpha$ - $\beta$ - $\beta$  二级结构,骨架结构保守,其中  $\alpha$  螺旋的 1~6 氨基酸残基决定锌指的 DNA 结合特异性。适当改变决定 DNA 结合特异性的氨基酸的可以获得新的 DNA 结合特异性<sup>[16]</sup>。因此 ZFN 在具有良

好的 DNA 识别特异性同时,又具有较好的可塑性,成为最具潜力的 DNA 定点剪切工具<sup>[17]</sup>。目前自然筛选以及人工突变获得的具有高特异性的锌指蛋白至少有 141 个,其中识别 GNN 三联体碱基的锌指蛋白最为有效<sup>[18,19]</sup>。

ZFN 中与 DNA 结合域相连的非特异性核酸内切酶一般采用 FokI 端 96 个氨基酸残基组成的 DNA 剪切域<sup>[20,21]</sup>。来源于海床黄杆菌(*Flavobacterium okeanokoites*)的 FokI 具有一种特性,即只在二聚体状态时才有酶切活性。两个 ZFN 中的 FokI 单体分别相互靠近在 6~8 bp 时,FokI 发挥酶切活性,对 DNA 进行定点切割。最近,Cathomen 等<sup>[10]</sup>将 FokI 结构进行了改造,使之只有在异型 ZFN 作用时才产生酶切活性,降低了错切率。锌指蛋白还可与不同效应因子结合,如激活域(结合形成 zinc-finger activator, ZFA)、阻遏域(结合形成 zinc-finger repressor, ZFR)、甲基化酶(结合形成 zinc-finger methylase, ZFM)、重组酶(结合形成 zinc-finger recombinase)和整合酶(结合形成 zinc-finger integrase)等,使得锌指蛋白具有独特的应用价值<sup>[19,22,23]</sup>。

## 2 ZFN 进行基因定点突变和置换的研究现状

实验证明 ZFNs 可以在不同细胞类型包括拟南芥<sup>[8]</sup>、烟草<sup>[9]</sup>、线虫<sup>[24]</sup>、果蝇<sup>[25,26]</sup>、非洲爪蟾<sup>[27]</sup>、人类<sup>[28,29]</sup>中发挥作用。在果蝇中,ZFNs 介导了高效的基因定点突变,有实验显示超过 1% 的子代可以产生同源重组介导的基因定点突变<sup>[26]</sup>。Urnov 等<sup>[28]</sup>设计了四指的 ZFN,识别人导致 X 连锁重症联合免疫缺陷(X-linked severe combined immunodeficiency disease, SCID)的突变基因 *IL2RG* 位点,利用该系统介导了人类细胞 *IL2RG* 缺陷基因的高效修复,在无选择压力下修复效率达 18%,而对照只有 0.001%。

在植物上,Lloyd 等<sup>[8]</sup>在拟南芥中用 ZFN 诱导了染色体基因的定点突变。将 QQR-LO ZFN 编码序列连接在热诱导型启动子下游。ZFN 的两个作用位点之间为 *EcoRI* 位点。通过对转基因植物热激处理后,该区段 DNA 序列分析和 RFLP 分析确认其是否发生序列改变。农杆菌转化获得转基因拟南芥,经过热激处理后,转化当代植株和后代突变率达到 20%<sup>[8]</sup>,表明 ZFNs 可以在植物细胞核中有效工作,通过非同源末端连接途径(non-homologous end joining, NHEJ)引发基因定点突变。在 106 个 ZFN 诱导突变中,83 个(78%)是简单的序列缺失,14 个(13%)是简单的序列插入,9 个(8%)

是插入和缺失同时发生。在 10% 的植株中,缺失会得到遗传给后代,证明的 ZFN 介导的基因突变是可以遗传的。

Wright 等<sup>[9]</sup>也证明 ZFNs 可以提高植物基因定点突变和置换频率。Wright 等设计了一个缺失了 600 bp 的靶基因 *gus:nptII*, 缺失区段内部含有 ZFN 特异识别位点 Zif268, 将该不完整基因片段通过农杆菌导入烟草基因组。以含有 600 bp 的完整基因片段 *GUS:NPTII* 为供体 DNA (Donor DNA), 同时构建特异识别 Zif268 的 ZFNs 表达载体, 共同转化烟草原生质体。通过 GUS 染色和抗性筛选确定基因置换频率。转化细胞的 10% 获得基因定点整合, 比不用 ZFNs 时效率提高了  $10^4 \sim 10^5$  倍。即每 10 个转化子中有 1 个实现了同源重组介导的基因定点整合。遗传分析表明 20% 为精确重组, 没有伴随碱基的缺失或插入。这一结果表明利用 ZFNs 定点切割染色体 DNA, 可以显著提高同源重组介导的基因定点整合效率, 这为基因定点突变和置换提供了一个非常有潜力的工具。

这两个研究都是在植物中利用 ZFN 开展的基因定点突变和置换。前者是利用 ZFN 通过 NHEJ 高效介导基因定点突变 (图 2, B), 而后者是利用 ZFN 通过 HR 高效介导基因定点置换, 达到基因置换的效果 (图 2, A)。还可以利用 ZFN 特异识别、切割靶位点, 以突变型 DNA 为供体模板, 通过 HR 高效介导基因定点突变 (图 2, C)。

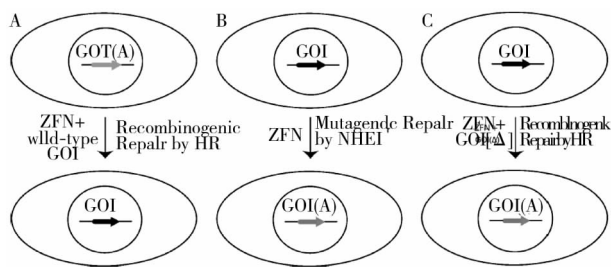


图 2 植物细胞中 ZFN 介导基因定点突变和置换

Fig. 2 ZFN-mediated gene targeted mutagenesis and replacement in plants

A: ZFN - mediated gene target repair (recombinogenic repair) through homologous recombination (HR); B: ZFN-mediated target gene mutagenesis (mutagenic repair) through non-homologous end joining (NHEJ); C: ZFN - mediated target gene mutagenesis (recombinogenic repair) through HR. GOI(Δ) denotes gene of interest with mutation

### 3 ZFN 介导基因定点突变与置换的技术方案

目前对通过 ZFN 进行植物基因定点突变和置换研究最为广泛, 技术也日趋成熟。利用 ZFN 进行植物基因定点突变和置换最关键的一步是设计和构建高特异性的 ZFN。各个独立的研究机构和实验室各自使用不同的方案, 而且其设计和筛选设计非常专业的知识和技能, 不是一般植物科学研究者所习知。为了使各研究机构的 ZFN 研究成果得以共享, 并使 ZFN 介导的基因定点突变和置换技术得到推广, J Keith Joung 和 Daniel Voytas 等人发起成立了锌指协会 (zinc finger consortium) ([www.zincfingers.org](http://www.zincfingers.org)) 致力于开发易于操作的, 标准化的 ZFN 构建平台。该组织开发的 ZFN 表达载体和 141 个锌指蛋白模块 (zinc finger consortium vector kits) 可用于开展定点突变和定点置换研究。进行基因定点突变时, 直接构建识别靶位点的植物 ZFN 表达载体, 通过常规遗传转化, 获得转化再生苗, 再进行突变效率分析 (图 2, A)。进行基因定点置换时, 需要将 DNA 供体和 ZFN 表达载体同时引入 (图 2, B)。该实施方案概述如下:

#### 3.1 ZFP 设计

利用 ZFN 设计软件分析目标基因的 ZFN 靶位点 (免费的在线 ZFN 设计软件: ZiFiT: <http://bindr.gdcb.iastate.edu/ZiFiT/>; Zinc Finger Tools: <http://www.zincfingertools.org>)。软件分析获得靶位点及相应的 ZF 蛋白编码序列。将靶位点自身的识别有效性和基因突变的有效性结合起来确定靶位点的最佳位置, 从而筛选出符合条件的 ZF 蛋白。

#### 3.2 ZFP 多联体拼接

根据模块拼接法 (modular assembly) 将符合条件的 ZF 表达载体通过酶切连接的方法将 ZF 编码序列依次构建融合基因表达载体, 从而完成三联体的 ZF 表达载体 pc3XB-F1/F2/F3<sup>[30]</sup>。

#### 3.3 ZFP 结合活性检测

利用细菌双杂交 (B2H) 报告系统 (图 3) 检测三联体锌指结构域的 DNA 结合活性。将三联体锌指编码区通过酶切连接构建至细菌双杂交表达载体 pGP-FB 中, 形成锌指蛋白细菌表达载体 pGP-FB-F1/F2/F3。设计并合成一对含有锌指蛋白结合目标 DNA 靶位点的寡核苷酸, 退火后形成靶位点构建于 pBAC-lacZ 载体, 形成报告载体 pBAC-ZFBS-lacZ。先将报告载体 pBAC-ZFBS-lacZ 转化细菌细胞, 然后同时将锌指表达

载体 pGP-FB-F1/F2/F3 和 Gal4 融合表达载体 pAC-KAN- $\alpha$ Gal4 转化细胞。共转化 pGB-FB-origBA 和 pAC-KAN- $\alpha$ Gal4 作为阳性对照;共转化 pGB-FB 和 pAC-KAN- $\alpha$ Gal4 作为阴性对照。通过对转化细胞的  $\beta$ -半乳糖苷酶报告基因检测筛选出超出对照 3 倍表达量的 ZF 表达载体。

尽管有研究者采用不同方法如凝胶阻滞实验 (Gel shift assay) 或者检测 ZFN 对目标 DNA 消化活性<sup>[30]</sup>, 但皆没有考虑基因组水平对 ZFN 活性的影响。而 B2H 系统在基因组水平上筛选出高活性的 ZF 锌指, 具有更强的可行性。

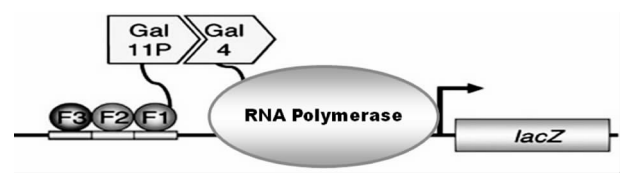


图3 细菌双杂交报告系统

Fig.3 Bacterial two-hybrid reporter system

Coexpression of the zinc finger-Gal11P and  $\alpha$ -Gal4 hybrid proteins in a B2H reporter strain leads to activated expression of a *lacZ* reporter gene. F1 ~ F3 denote a three-finger array, Gal11P represents a fragment of the yeast Gal11P protein. The  $\alpha$ -Gal4 hybrid protein consists of a portion of the *E. coli* RNA polymerase  $\alpha$ -subunit and a fragment of yeast Gal4

### 3.4 构建 ZFN 植物表达载体

以植物 ZFN 表达载体 pDW1775 为基本载体, 通过酶切连接的方法将检测筛选出的高效锌指表达载体中 pGP-FB-F1/F2/F3 编码区域构建至植物表达载体中。在该载体中锌指三联体蛋白编码基因下游有 *FokI* 编码区域, 并且有 SV40 作核定位信号, 从而表达为 ZFN。

### 3.5 供体 DNA 制备

在进行基因置换的研究, 需要制备供体 DNA。而这种供体 DNA 是否为突变型或者是野生型都可以。如果是突变型供体, 则基因定点置换的结果是基因定点突变, 如果是野生型供体 DNA, 而靶位点是突变区域, 则定点置换的结果是 DNA 定点修复。供体 DNA 两端有靶位点同源区域, 便于实现同源重组依赖性的定点置换。

### 3.6 基因定点突变和置换植株获得

通常采用农杆菌介导的方法将植物 ZFN 转化载体导入植物基因组, 获得转化再生植株, 用于基因定点突变研究 (图 2, B)。通过原生质体电激转化和愈伤的基

因枪转化, 将植物 ZFN 表达载体和供体 DNA 共转化植株, 获得转化再生植株, 用于基因定点置换研究 (图 2, A, C)。值得指出的是目前对于供体 DNA 的引入途径有多种, 因不同的受体植物而异。对于那些难以进行原生质操作或遗传转化物种来说, 笔者认为通过病毒诱导的基因沉默 (virus induced gene silencing, VIGS) 可以将供体引入。另外, 笔者还认为, 可以通过花粉管导入供体 DNA。

### 3.7 定点突变与置换效果分析

对基因定点突变或置换的植株利用 PCR、Southern blot、基因测序等手段分析基因定点整合或置换的效率和精确性等。为了证实 ZFN 介导的定点突变是否引起附近 DNA 重排, 采用附近区域存在的限制性酶切位点, 与对照相比进行多态性杂交分析。通过序列分析检测基因突变情况以及 ZFN 是否导致供体 DNA 错误整合。

## 4 ZFN 介导基因定点突变与置换优势和应用前景

### 4.1 ZFN 具有较高的特异性和灵活性

一般地, 每对 ZFN 需要 18 bp 识别序列, 既每  $6.9 \times 10^{10}$  bp ( $4^{18}$  bp) 出现一个识别位点, 因此, ZFN 对于基因组小于  $10^{10}$  的植物物种 (如番茄、水稻、玉米等) 来说已经具有很强的特异性。在适当的时候利用识别 24 bp 的 4 个锌指 ZFN 可以进一步提高识别特异性。利用 ZFN 定点突变应当可以在所有植物物种实施。目前已经合成的大量锌指转录因子在植物细胞中发挥功能, 为 ZFN 研究提供了技术资源。另一方面, 调整锌指蛋白  $\alpha$  螺旋识别区域个别残基就可以改变锌指的识别特性, 从而为锌指设计带来方便。

### 4.2 特别适合于基因定点突变以后性状得到改良的基因

植物定点突变或置换后可能带来优良的性状。例如植物真核翻译起始因子 (eukaryotic initiation factor, eIF) 参与病毒的复制与侵染, 而 *eIF* 基因突变会赋予寄主植物的病毒抗性<sup>[31, 32]</sup>, 利用 ZFN 对这种基因进行定点突变具有较好的研究前景。植物体中由于个别碱基突变改变植物性状的基因还有很多, 如品质相关腊质基因 (*Waxy*), 抗除草剂基因 (*als*) 等。ZFN 不仅产生定点突变, 还可以利用其定向突变, 提高特定等位基因频率达到性状改良目的, 这为充分利用关联分析获得研究结果进行“品种分子设计”奠定了技术基础。

### 4.3 定点突变与置换两种途径互为补充

利用 ZFN 介导的 NHEJ 途径(图 2,B)和 ZFN 介导的 HR 途径(图 2,A,C)分别实现基因定点突变和置换。定点置换过程中,如果供体 DNA 为突变型,那么和定点突变有异曲同工的效果。而如果供体 DNA 为野生型,则置换结果为定点修复。

### 4.4 前景

ZFN 的 DNA 结合特异性是其介导基因定点突变和置换功能决定因素<sup>[33]</sup>。虽然本文所介绍的模块组合法构建 ZFN 有一定的失败率<sup>[34]</sup>,但是当前国际上很多研究机构在 ZFN 介导的基因定点突变和置换方面通力合作,建立资源共享平台。锌指协会 ZF 和 ZFN 应用技术不断完善,ZF 结合域应用研究延伸到不同领域,ZFN 研究尤为重要。ZFN 介导的基因的定点突变和置换技术无论在基础研究还是在植物应用研究方面都具有重要意义。相信随着研究的不断深入,这一技术必将在基础遗传学研究及植物遗传改良等方面发挥越来越重要的作用。

### 参考文献

- [1] Tzfira T, White C. Towards targeted mutagenesis and gene replacement in plants. *Trends Biotechnol*, 2005, 23(12):567 ~ 569
- [2] Lettier G, Feng Q, Mayolo A A, et al. The role of DNA double-strand breaks in spontaneous homologous recombination in *S cerevisiae*. *PLoS Genet*, 2006, 2(11):e194
- [3] Okuzaki A, Toriyama K. Chimeric RNA/DNA oligonucleotide-directed gene targeting in rice. *Plant Cell Rep*, 2004, 22(7):509 ~ 512
- [4] Terada R, Urawa H, Inagaki Y, et al. Efficient gene targeting by homologous recombination in rice. *Nat Biotechnol*, 2002, 20(10):1030 ~ 1034
- [5] Iida S, Terada R. Modification of endogenous natural genes by gene targeting in rice and other higher plants. *Plant Mol Biol*, 2005, 59(1):205 ~ 219
- [6] Terada R, Johzuka - Hisatomi Y, Saitoh M, et al. Gene targeting by homologous recombination as a biotechnological tool for rice functional genomics. *Plant Physiol*, 2007, 144(2):846 ~ 856
- [7] Shaked H, Melamed - Bessudo C, Levy A A. High-frequency gene targeting in *Arabidopsis* plants expressing the yeast RAD54 gene. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(34):12265 ~ 12269
- [8] Lloyd A, Plaisier C L, Carroll D, et al. Targeted mutagenesis

using zinc - finger nucleases in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(6):2232 ~ 2237

- [9] Wright D A, Townsend J A, Winfrey R J J, et al. High-frequency homologous recombination in plants mediated by zinc - finger nucleases. *Plant J*, 2005, 44(4):693 ~ 705
- [10] Szczeppek M, Brondani V, Büchel J, et al. Structure - based redesign of the dimerization interface reduces the toxicity of zinc - finger nucleases. *Nat Biotechnol*, 2007, 25, 786 ~ 793
- [11] Puchta H, Dujon B, Hohn B. Homologous recombination in plant cells is enhanced by *in vivo* induction of double strand breaks into DNA by a site - specific endonuclease. *Nucleic Acids Res*, 1993, 21(22):5034 ~ 5040
- [12] Kumar S, Allen G C, Thompson W F. Gene targeting in plants: fingers on the move. *Trends Plant Sci*, 2006, 11(4):159 ~ 161
- [13] Hurt J A, Thibodeau S A, Hirsh A S, et al. Highly specific zinc finger proteins obtained by directed domain shuffling and cell - based selection. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(21):12271 ~ 12276
- [14] Pabo C O, Peisach E, Grant R A. Design and selection of novel Cys2His2 zinc finger proteins. *Annu Rev Biochem*, 2001, 70:313 ~ 340
- [15] Segal D J, Beerli R R, Blancafort P, et al. Evaluation of a modular strategy for the construction of novel polydactyl zinc finger DNA - binding proteins. *Biochemistry*, 2003, 42(7):2137 ~ 2148
- [16] Dreier B, Beerli R R, Segal D J, et al. Development of zinc finger domains for recognition of the 5' - ANN - 3' family of DNA sequences and their use in the construction of artificial transcription factors. *J Biol Chem*, 2001, 276(31):29466 ~ 29478
- [17] Dreier B, Fuller R P, Segal D J, et al. Development of zinc finger domains for recognition of the 5' - CNN - 3' family DNA sequences and their use in the construction of artificial transcription factors. *J Biol Chem*, 2005, 280(42):35588 ~ 35597
- [18] Carroll D, Morton J J, Beumer K J, et al. Design, construction and *in vitro* testing of zinc finger nucleases. *Nat Protoc*, 2006, 1(3):1329 ~ 1341
- [19] Nomura W, Sugiura Y. Design and synthesis of artificial zinc finger proteins. *Methods Mol Biol*, 2007, 352:83 ~ 93
- [20] Kim Y G, Cha J, Chandrasegaran S. Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(3):1156 ~ 1160
- [21] Miller J C, Holmes M C, Wang J, et al. An improved zinc - finger nuclease architecture for highly specific genome editing. *Nat Biotechnol*, 2007, 25(7):778 ~ 785

- [22] Mandell J G, Barbas C F. Zinc Finger Tools: custom DNA – binding domains for transcription factors and nucleases. *Nucleic Acids Res*, 2006, 34( Web Server issue ): W516 ~ 523
- [23] Papworth M, Kolasinska P, Minczuk M. Designer zinc – finger proteins and their applications. *Gene*, 2006, 366(1): 27 ~ 38
- [24] Morton J, Davis M W, Jorgensen E M, et al. Induction and repair of zinc – finger nuclease – targeted double – strand breaks in *Caenorhabditis elegans* somatic cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(44): 16370 ~ 16375
- [25] Bibikova M, Golik M, Golik K G, et al. Targeted chromosomal cleavage and mutagenesis in *Drosophila* using zinc – finger nucleases. *Genetics*, 2002, 161(3): 1169 ~ 1175
- [26] Beumer K, Bhattacharyya G, Bibikova M, et al. Efficient gene targeting in *Drosophila* with zinc – finger nucleases. *Genetics*, 2006, 172(4): 2391 ~ 2403
- [27] Bibikova M, Carroll D, Segal D J, et al. Stimulation of homologous recombination through targeted cleavage by chimeric nucleases. *Mol Cell Biol*, 2001, 21(1): 289 ~ 297
- [28] Urnov F D, Miller J C, Lee Y L, et al. Highly efficient endogenous human gene correction using designed zinc – finger nucleases. *Nature*, 2005; 435(7042): 646 ~ 651
- [29] Moehle E A, Rock J M, Lee Y L, et al. Targeted gene addition into a specified location in the human genome using designed zinc finger nucleases. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(9): 3055 ~ 3060
- [30] Wright D A, Thibodeau – Beganny S, Sander J D, et al. Standardized reagents and protocols for engineering zinc finger nucleases by modular assembly. *Nat Protoc*, 2006, 1(3): 1637 ~ 1652
- [31] Yeam I, Cavatorta J R, Ripoll D R, et al. Functional dissection of naturally occurring amino acid substitutions in eIF4E that confers recessive potyvirus resistance in plants. *Plant Cell*, 2007, 19(9): 2913 ~ 2928
- [32] Zhang Y Y, Li H X, Ouyang B, et al. Regulation of eukaryotic initiation factor 4E and its isoform: Implications for antiviral strategy in plants. *J Integr Plant Biol*, 2006, 48(10): 1129 ~ 1139
- [33] Cornu T I, Thibodeau – Beganny S, Guhl E, et al. DNA – binding specificity is a major determinant of the activity and toxicity of zinc – finger nucleases. *Mol Ther*, 2008, 16: 352 ~ 358
- [34] Ramirez C L, Foley J E, Wright D A, et al. Unexpected failure rates for modular assembly of engineered zinc fingers. *Nat Methods*, 2008, 5: 374 ~ 375

## Targeted Gene Mutagenesis and Replacement Mediated by Zinc Finger Nucleases

ZHANG Yu-yang ZHANG Xiao-hui ZHANG Chan-juan

(National Key Laboratory of Crop Genetic Improvement, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

**Abstract** Gene targeted mutagenesis and replacement can be used to modify gene sequence in genomic background without position effect or insertion inactivation in transgenic plants. Targeted mutagenesis organism has little biosafety concerns free of transgenes or marker genes. Gene targeted mutagenesis and replacement in high plants now appears to be a potential tool for gene functional analysis in situ, crops genetic improvement and molecular design. Zinc finger nuclease (ZFN) is most important and would be widely used in gene targeted mutagenesis and replacement through introducing double-strand breaks in genome. Strategies for gene targeted mutagenesis and replacement in plants is discussed. ZFN is described in detail from its structure, operation model and application in plants. Developmental prospect of ZFN in plant gene targeted mutagenesis and replacement is also discussed.

**Key words** Targeted mutagenesis Gene replacement Zinc finger nucleases Plant