

## ZFN, TALEN 和 CRISPR/Cas9

# 在小鼠 *Rosa26* 基因定点整合外源基因的效率比较\*

刘小凤, 刘蔚, 聂宇, 丛佩清, 刘小红, 陈瑶生, 何祖勇

(中山大学生命科学学院/有害生物控制与资源利用国家重点实验室, 广东 广州 510006)

**摘要:** 哺乳动物黑色素的合成依赖于酪氨酸的氧化作用, 而酪氨酸酶 (Tyr) 是催化酪氨酸氧化反应的关键酶, 当外源 *Tyr* 基因整合进白毛小鼠基因组中, 会使它获得黑色素合成的能力, 表现出与原来不同的毛色表型。为方便、快捷地获得 *Tyr* 基因整合的小鼠, 构建了一个无启动子的 pTyr-2A-DsRed 同源重组质粒供体, 选择 *Rosa26* 的第一个内含子作为外源基因整合的靶位点, 设计了切割位点几乎一致的 ZFN、TALEN 和 CRISPR/Cas9 系统。通过流式对比分析 C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> 细胞中红色荧光蛋白 DsRed 的表达水平, 比较了 3 种基因组编辑工具介导的外源基因定点整合效率, 结果发现 CRISPR/Cas9 的效率最高, 在此基础上, 利用 CRISPR/Cas9 将供体整合到小鼠胚胎干细胞中, 筛选单细胞克隆进行囊胚腔注射和胚胎移植, 获得一只存活的嵌合体小鼠, 表现出白毛中夹杂黑毛的表型, 表明整合到小鼠 *Rosa26* 的 *Tyr* 基因可以正常表达。

**关键词:** CRISPR/Cas9; TALEN; ZFN; *Rosa26*; 定点整合

中图分类号: Q78 文献标志码: A 文章编号: 0529-6579 (2020) 02-0137-08

## Efficiency comparison of *Rosa26*-targeted integration of exogenous gene via ZFN, TALEN or CRISPR/Cas9

LIU Xiaofeng, LIU Wei, NIE Yu, CONG Peiqing, LIU Xiaohong, CHEN Yaosheng, HE Zuyong

(School of Life Sciences / State Key Laboratory of Biocontrol, Sun Yat-sen University,

Guangzhou 510006, China)

**Abstract:** Mammalian melanin synthesis is dependent on the oxidation of tyrosine. Tyrosinase (Tyr) is a key enzyme that catalyzes the oxidation of tyrosine. When exogenous *Tyr* is integrated into the genome of white coat color mouse, it can render the mouse to obtain the function of melanin synthesis, presenting a different coat color. To rapidly generate the mouse model with *Tyr* gene integrated, in this study, we constructed a promoterless plasmid donor pTyr-2A-DsRed, which contains the coding sequences of *Tyr* gene and the red fluorescent reporter (*DsRed*), and the two flanking homologous arms. We selected the first intron of *Rosa26* for targeting integration, and designed ZFN pair, TALEN pairs and CRISPR/Cas9 cutting at almost the same site. Through measuring the intensity of DsRed fluorescence in C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> cells by flow cytometry, we compared the efficiency of the targeted integration of exogenous DNA mediated by the three different genome editing tools, and found that CRISPR/Cas9 was the most efficient. Therefore, we

\* 收稿日期: 2019-04-30

基金项目: 国家转基因生物新品种培育重大专项项目 (2016ZX08006003-006); 广东省自然科学基金 (2016A030313310)

作者简介: 刘小凤 (1992 年生), 女; 研究方向: 动物遗传与育种; E-mail: 1107016164@qq.com

刘蔚 (1991 年生), 女; 研究方向: 动物遗传与育种; E-mail: 1119035661@qq.com

(以上两位作者并列第一作者)

通信作者: 何祖勇 (1981 年生), 男; 研究方向: 动物遗传与育种; E-mail: zuyonghe@foxmail.com

further integrated the plasmid donor into the genome of mouse embryonic stem (ES) cells, and screening the targeted single cell clones for blastocyst injection and subsequent embryo transfer. Ultimately, a single survived chimeric mouse with plasmid donor integrated was obtained. This mouse presented a white color hair mixed with black color hair phenotype, indicating that the targeted integration of *Tyr* gene in *Rosa26* locus was correctly expressed.

**Key words:** CRISPR/Cas9; TALEN; ZFN; *Rosa26*; targeted integration

锌指核酸酶 (zinc-finger nuclease, ZFN) 技术、类转录激活效应因子核酸酶 (transcription activator-like effector nuclease, TALEN) 技术和成簇规律间隔短回文重复 (clustered regulatory interspaced short palindromic repeat, CRISPR) /Cas9 技术是近年来新发展的三种基因组编辑技术, 它们均是通过引导核酸内切酶切割 DNA 靶位点序列, 形成 DNA 双链断裂 (DNA double-strand break, DSB), 从而诱导细胞进行 DNA 损伤修复。细胞一般通过非同源末端连接 (non-homologous end joining, NHEJ) 或同源重组 (homology-directed repair, HDR) 两种不同的 DNA 修复途径来实现基因组编辑, 包括基因敲除 (knockout)、基因定点突变及外源基因的定点整合 (knockin) 等。

ZFN 由锌指蛋白 (ZFP) 和 IIS 型限制性内切酶 *Fok I* 融合构成。3 ~ 5 个串联的 ZFP 构成 ZFN 的 DNA 结合结构域, 可与 DNA 靶位点特异性结合, 然后引导 *Fok I* 蛋白二聚体发挥 DNA 切割功能<sup>[1-2]</sup>。TALEN 技术与 ZFN 技术类似, 是通过类转录激活效应因子 (TALE) 与 DNA 靶位点特异结合, 诱导 *Fok I* 蛋白二聚体在靶位点进行切割<sup>[3]</sup>。而 CRISPR/Cas9 技术则是通过人工合成的单链引导 RNA (single strand guide RNA, sgRNA) 序列与靶位点特异性结合, 引导 Cas9 蛋白进行 DNA 双链切割<sup>[4]</sup>。近年来, 这三种基因组编辑技术以高效、精准的特点在基因敲除方面得到了广泛应用, 但是对于定点整合外源基因, 三者达到的效率参差不齐, 且目前尚未见在同一位点上对这三种基因组编辑技术介导的外源 DNA 片段整合效率进行系统比较的研究报道。因此本研究设计了靶向小鼠 *Rosa26* 基因同一个位点的 ZFN、TALEN 和 CRISPR/Cas9, 首先在 C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> 细胞中比较了三者的靶向切割效率, 然后构建了一个含有黑色素生成相关的酪氨酸酶基因 *Tyr* 和红色荧光蛋白报告基因 *DsRed* 的无启动子同源重组质粒供体 pTyr-2A-DsRed, 在基因组编辑工具的介导下, 只有正确整合到小鼠 *Rosa26* 基因的供体载体才能启动 *Tyr* 及 *DsRed* 基因的表达, 通过对比转染后的细胞红色荧光强度, 本研究

系统比较了三种基因组编辑工具介导外源 DNA 定点整合的效率, 结果发现 CRISPR/Cas9 的效率最高, 在此基础上, 利用 CRISPR/Cas9 将供体整合到小鼠胚胎干细胞中, 筛选单细胞克隆进行囊胚腔注射和胚胎移植, 获得一只存活的嵌合体小鼠, 表现出白毛中夹杂黑毛的表型, 这表明整合到小鼠 *Rosa26* 的 *Tyr* 基因可以正常表达。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> 细胞由本实验室保存, 小鼠胚胎干细胞由中山大学实验动物中心提供, 昆明小鼠 (Kunming mice, KM) 来自中山大学实验动物中心, pX458 质粒 (Cas9/sgRNA 共表达质粒) 购自 Addgene 公司。PCR 引物及载体构建相关的 oligo 序列由上海生工生物技术公司合成。

### 1.2 方法

**1.2.1 *Rosa26* 基因靶位点选择** 应用 ZiFiT 在线分析软件 (<http://zifit.partners.org/ZiFiT/>) 对小鼠 *Rosa26* 基因内含子 1 的序列进行分析, 设计 1 对 ZFN 和 2 对 TALEN; 应用 CRISPR DESIGN (<http://crispr.mit.edu/>) 设计一条 gRNA, 使三者的切割位点几乎重叠 (图 1: A)。

### 1.2.2 ZFN、TALEN 与 CRISPR/Cas9 表达载体构建

#### 1) ZFN 表达质粒构建

ZFN 与 *Rosa26* 内含子的结合区域如图 1: A 所示, 两段 ZFN 结合序列中间的序列为切割位点。ZFN 质粒由 SIGMA 公司合成。

#### 2) TALEN 表达质粒构建

TALEN 与 *Rosa26* 内含子的结合区域如图 1: A 所示, TALEN 质粒采用本实验室前期使用的“Golden Gate”方法构建<sup>[5]</sup>。

#### 3) CRISPR/Cas9 表达质粒构建

pX458 载体可同时表达 sgRNA、Cas9 蛋白以及 EGFP 荧光蛋白, 通过 *Bbs I* 酶切可将 gRNA 序列连进载体。合成 gRNA 正负单链时, 在 5' 端加上与 *Bbs I* 内切酶开 pX458 载体后的粘性末端互补的序列 (表 1), 将合成好的 gRNA 正负单链粉末稀

释至 100 μmol/L, 进行 gRNA 的磷酸化和退火, 使之形成具有粘性末端的双链 DNA 短片段。将退火并磷酸化的 gRNA 双链短片段和 pX458 载体通过

*Bbs* I 内切酶和 *T<sub>4</sub>* 连接酶进行酶切和连接反应, 接着进行转化, 挑取单克隆, 测序验证 CRISPR/Cas9 表达质粒是否构建成功。

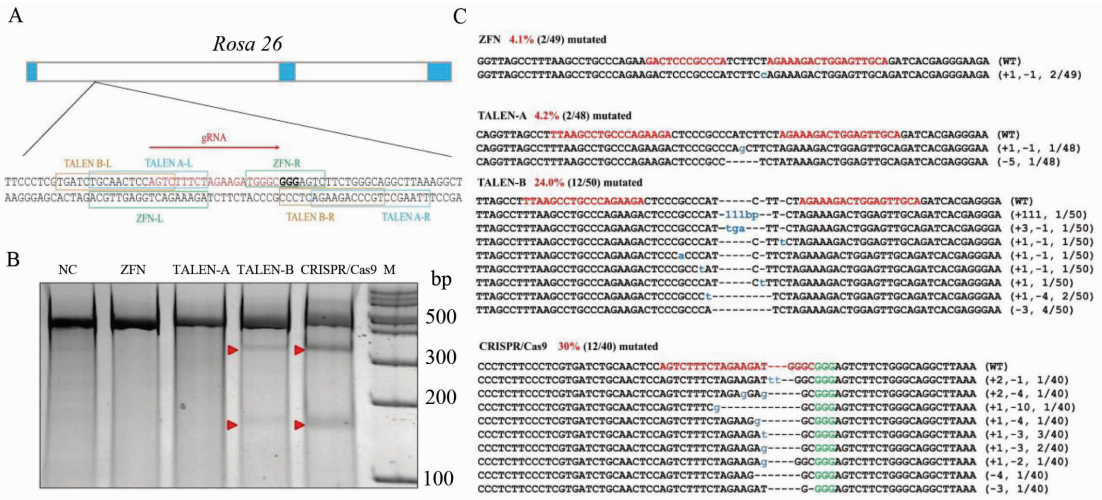


图 1 ZFN、TALEN、CRISPR/Cas9 靶向切割效率鉴定

Fig. 1 Analysis the targeted cutting efficiency of ZFN, TALEN and CRISPR/Cas9

A: *Rosa26* 基因编辑靶点示意图; B: T7E I 酶切法分析靶向切割结果; C: TA 克隆测序分析结果

表 1 靶向小鼠 *Rosa26* 基因的 gRNA oligo 序列

Table 1 Oligos of gRNA targeting mouse *Rosa26* gene

名称	序列 (5' - 3')
gRNA Top	caccgAGTCTTTCTAGAAGATGGGC
gRNA Bottom	aaacGCCCATCTTCTAGAAAGACTc

**1.2.3 同源重组质粒供体构建** 在小鼠中, 黑色素沉积的类型与数量差异造成了不同的毛色表型。动物的黑色素分为两类: 真黑色素 (eumelanin) 与褐黑色素 (pheomelanin), 这两种黑色素的合成均依赖于酪氨酸的氧化, 而酪氨酸酶 (Tyr) 是催化酪氨酸氧化的关键酶<sup>[6]</sup>。当外源 *Tyr* 基因整合进白毛色小鼠中, 成功整合外源 *Tyr* 基因的白色小鼠会产生黑色素沉积, 产生不同于对照组的毛色表型<sup>[7]</sup>。因此当构建基因敲入小鼠时, Tyr 可以作为一个遗传筛选标记, 使我们可以通过毛色来快速、高效地鉴别 Knockin 小鼠。Parikh 团队在 2015 年用 CRISPR/Cas9 技术插入了 *Tyr* 基因, 并成功得到了毛色改变的嵌合体小鼠<sup>[8]</sup>。

为方便、快捷地获得 *Tyr* 基因整合的小鼠, 我们构建了 pTyr-2A-DsRed 同源重组质粒供体 (图 2: A), 供体包含位于两侧的同源臂和位于中间的外源插入序列。研究表明, 同源臂长度为 1 kb 左右时具有最优的同源重组效率<sup>[9]</sup>。我们所设计的 5'

同源臂序列长度为 921 bp, 3'同源臂序列长度 873 bp。插入序列包括了需整合的 *Tyr* 基因序列与红色荧光报告基因 (*DsRed*) 序列, 此外, 还有一个剪接受体位点 (splicing acceptor, SA), 该受体位点的存在使插入序列被整合到基因组后, 在转录后剪接时可与 5' 端外显子连接, 保证插入序列可以正常翻译<sup>[10-11]</sup>。

**1.2.4 细胞转染** 选用 15 代以内的细胞, 胰酶消化后, 1 600 r/min 离心 4 min, 吸掉上清, 加入 1 mL PBS 洗涤并用细胞计数仪计算细胞数量。计数后, 将 PBS 细胞悬液 1 600 r/min 离心 4 min, 吸掉上清, 按每 1 × 10<sup>6</sup> 细胞加入 100 μL 细胞悬浮液 R, 吹打均匀。同时按照每 100 μL 细胞悬浮液加入 5 μg 质粒, 轻轻吹打均匀备用, 电转染参数设置为 1 400 V, 20 ms, 2 pulse。将电转后的细胞接种至预热好的培养皿内, 48 h 后可在显微镜下观察细胞荧光, 分析转染效率。

**1.2.5 T7E I 实验** T7E I 酶 (T7 核酸内切酶 I) 可以用来检测基因编辑工具介导的基因突变效率。其检测原理为: 先扩增出包含打靶位点的基因序列, T7E I 酶可以识别扩增产物中包含的杂交异源双链 DNA, 并在识别位点进行切割, 使酶切产物中包含扩增主带以及酶切后断裂而成的两条较小的 DNA 条带, 通过聚丙烯酰胺凝胶电泳分离出 3 条

大小不一的条带, 从而估算出 CRISPR/Cas9 的打靶效率。

首先设计 T7E I 引物, 使 PCR 扩增打靶位点共约 500 bp 的序列长度, 使位点位于序列约 100 ~ 200 bp 的位置 (表 2)。收集细胞并提取基因组, PCR 扩增出包含 3 种基因工具识别位点的 *Rosa26* 基因片段, 后用胶回收试剂盒纯化 PCR 产物。纯化后的 PCR 产物高温变性后, 经逐步降温退火形成异源双链 DNA, 在变性退火产物中加入 0.5  $\mu$ L T7E I 酶, 置于 37  $^{\circ}$ C 水浴锅内, 反应 30 min。配制  $w = 10\%$  的 PAGE 胶用于酶切电泳, 电泳参数设置为电压 120 V, 时间 90 min。电泳结束后, 小心取出 PAGE 胶, 于配制好的核酸染料中染色 15 min 左右。染色后用清水清洗 3 次去除残余的核酸染料, 置于凝胶成像系统观察并拍照。通过 Image J 软件估算 3 种基因编辑工具的切割效率。

表 2 *Rosa26* 编辑位点 PCR 扩增引物

Table 2 The primers used for PCR amplification of editing site of *Rosa26* gene

名称	序列 (5' - 3')
<i>Rosa26</i> - F	GCACGTTTCGACTTGACTT
<i>Rosa26</i> - R	CCTCCCATTTTCCTTATTTGC

**1.2.6 流式分选** 电转后 48 h 细胞荧光强度较强, 可进行流式分选。用胰酶消化贴壁细胞, 1 600 r/min 离心 4 min, 吸掉上清, 用 PBS 重悬。将细胞悬液经 50  $\mu$ m 尼龙膜过滤到流式管中, 以防堵塞流式分选仪, 同时准备接收阳性细胞的培养皿, 在 FACScalibur 流式细胞分析仪上可分析细胞的荧光比例与强度。对于要分选培养单克隆的细胞, 流式细胞仪设置为 96 孔板, 每孔 1 个细胞, 用添加了含有  $w = 20\%$  胎牛血清的完全培养基的 96 孔板收集, 培养 7 d 后换液并进一步扩大培养。

**1.2.7 嵌合体小鼠制备** 促排四周龄母小鼠, 并与公鼠合笼, 检查交配栓。3.5 d 后用引颈法处死母鼠, 并收集输卵管和子宫中的胚胎, 转移到覆有石蜡油的 M16 培养基内, 37  $^{\circ}$ C 培养基内培养。

将分选并扩增后的 ES 单克隆细胞用胰酶消化成单细胞悬液, 并转移到 M2 培养基液滴内, 同时将培养好的囊胚转移到液滴内。用显微注射系统将 ES 细胞注射到囊胚腔内, 每个囊胚注射 10 ~ 12 个 ES 细胞。37  $^{\circ}$ C 培养 1 ~ 3 h, 待囊胚腔恢复后, 移入代孕母鼠子宫中。

## 2 结果与分析

### 2.1 ZFN、TALEN、CRISPR/Cas9 靶向切割效率鉴定

将构建好的 ZFN、TALEN 和 CRISPR/Cas9 表达质粒分别电转染至  $C_2C_{12}$  细胞中, 48 h 后收集细胞, 提取细胞基因组, 通过 PCR 扩增 *Rosa26* 靶位点序列, 通过 T7E I 酶切法分析 3 种基因编辑工具的靶向切割活性, 酶切结果显示 ZFN 和 TALEN-A 无明显的靶向切割活性, TALEN-B 和 CRISPR/Cas9 有明显的切割活性, 其中 CRISPR/Cas9 的切割活性略强 (图 1: B)。进一步的 TA 克隆测序分析结果验证了 T7E I 酶切结果, 其中 ZFN 在靶位点引起 Indel 的效率为 4.1% (2/49), TALEN-A 为 4.2% (2/48), TALEN-B 为 24% (12/50), 而 CRISPR/Cas9 为 30% (12/40) (图 1: C)。因此, CRISPR/Cas9 在该位点具有相对较高的靶向切割活性。

### 2.2 ZFN、TALEN、CRISPR/Cas9 定点整合外源基因的效率比较

将 ZFN、TALEN 和 CRISPR/Cas9 表达质粒分别与同源重组质粒供体共转染至  $C_2C_{12}$  细胞中, 24 h 后通过荧光显微镜可观察到少数表达红色荧光蛋白 DsRed 的细胞 (图 2: B), 表明部分供体质粒在基因编辑工具的介导下通过同源重组正确整合到 *Rosa26* 位点。进一步应用流式细胞仪对 DsRed 阳性细胞的比例进行定量分析, 结果显示在  $C_2C_{12}$  细胞中, ZFN 的 Knockin 效率为  $(0.11 \pm 0.05)\%$ , TALEN-A 和 TALEN-B 的效率分别为  $(0.13 \pm 0.06)\%$  和  $(0.08 \pm 0.02)\%$ , CRISPR/Cas9 的效率为  $(1.36 \pm 0.40)\%$  (图 2: C), 表明 CRISPR/Cas9 介导的定点整合效率明显高于 ZFN 和 TALEN。

### 2.3 利用 CRISPR/Cas9 构建定点整合外源基因的 ES 细胞株

由于 CRISPR/Cas9 具有较强的基因定点整合效率, 因此本研究选用 CRISPR/Cas9 作为基因编辑工具来构建 *Tyr* 定点整合的 ES 细胞。将构建好的 pX458-*Rosa26* 质粒与质粒供体共转染至 ES 细胞中, 流式分选出表达有 GFP 的细胞, 继续培养一周后, 荧光显微镜下可见在饲养层细胞上, ES 细胞开始形成岛状的细胞克隆, 部分 ES 细胞克隆同时表达 EGFP 绿色荧光蛋白和 DsRed 红色荧光蛋白 (图 3: A)。应用克隆环消化带有荧光标记的 ES 细胞克隆, 转移到新的培养皿中, 继续培养扩增细胞

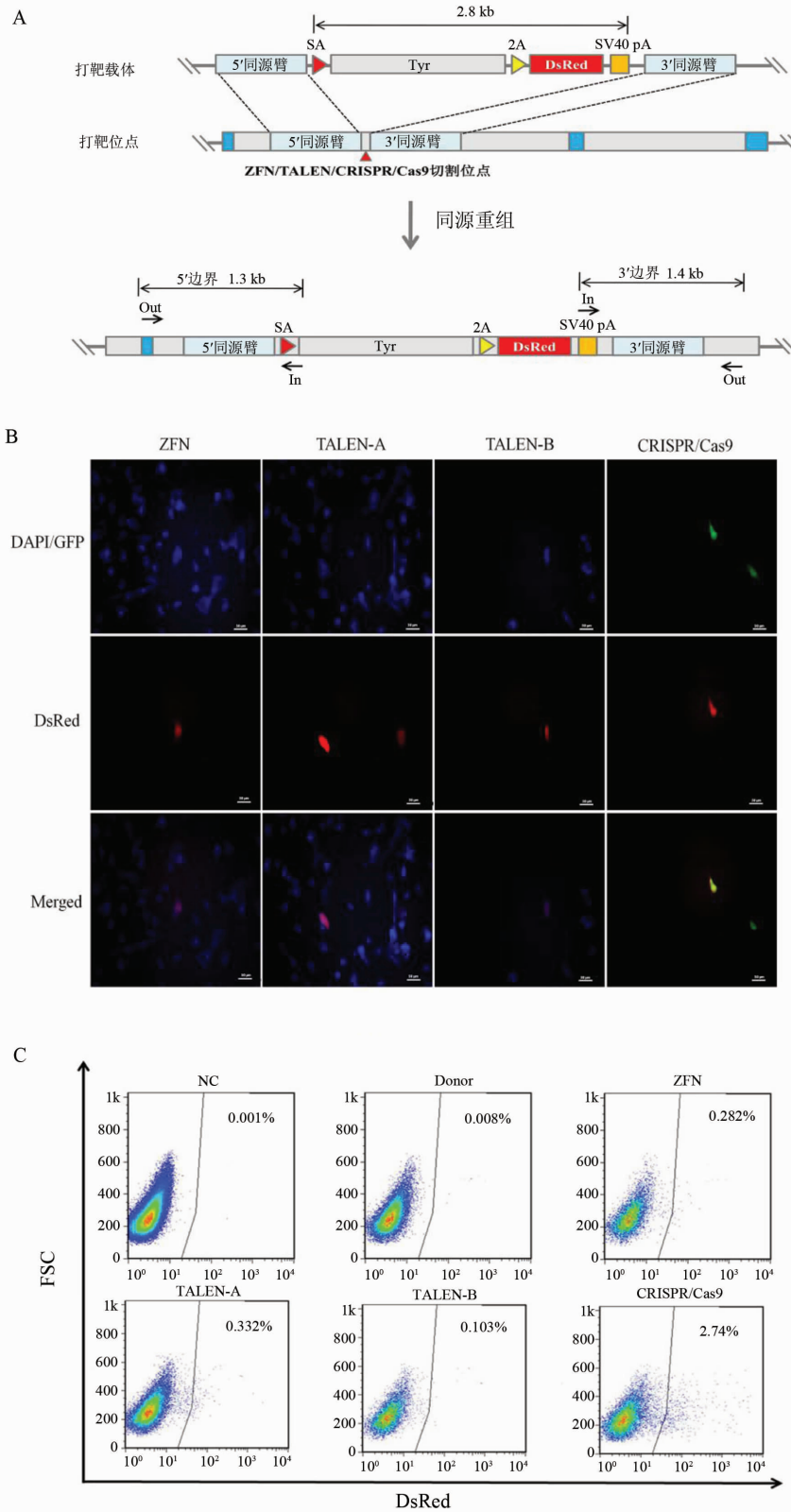


图 2 ZFN、TALEN、CRISPR/Cas9 定点整合外源基因的效率鉴定

Fig. 2 Efficiencies of targeted integration of exogenous genes mediated by ZFN, TALEN or CRISPR/cas9

A: 在 *Rosa26* 位点整合外源基因的示意图; B: 转染 24 h 后的荧光图;

C: 流式分析表达 DsRed 的细胞比率 (代表性结果)

数量,待其数量足够时,取一部分细胞提取基因组并进行 PCR 扩增分析。在得到的 5 个单细胞克隆中,有 3 个克隆成功扩增出了中间的 *Tyr* 基因插入序列,其中#3、#4 克隆同时成功扩增出了右侧边界片段(图 2: A,图 3: B 和图 3: C)。其中#3 ES 克隆右侧边界片段序列图谱表明外源供体质粒 3' 端完整地整合到了打靶位点,质粒与打靶位点交界处没有发生碱基的缺失或插入等(图 3: D)。

#### 2.4 构建外源基因整合的嵌合体小鼠

挑选正确整合了 *Tyr-2A-DsRed* 基因的 3# ES 单克隆细胞注射入昆明白小鼠的囊胚腔中,并将囊胚移植到代孕昆明白母鼠输卵管内,最终母鼠成功诞下一只健康存活的嵌合体小鼠,毛色与普通昆明白小鼠明显不同:白毛夹杂着黑毛(图 4: A)。近距离观察眼球,其虹膜颜色比对照小鼠明显偏暗(图 4: B),表明整合进 *Rosa26* 基因的 *Tyr* 基因可以正确表达,促进黑色素合成,使嵌合体小鼠表现出不同的毛色表型和虹膜颜色。

### 3 讨论

本研究设计了靶向小鼠在 *Rosa26* 内含子的 ZFN、TALEN、CRISPR/Cas9 基因编辑工具,使三者在同一打靶位点对外源 *Tyr* 基因进行定点整合。在验证三种基因编辑工具的靶向切割活性时发现设计的 ZFN 切割活性最低,仅为 4.1%;两对 TALEN 中有一对的切割活性可达到 24%;而 CRISPR/Cas9 的切割活性最强,可达到 30%。因此,针对本研究中既定打靶位点设计基因编辑工具,要获得高活性的 ZFN 难度较大,TALEN 居中,CRISPR/Cas9 较小。

研究表明,由 ZFN 或 CRISPR/Cas9 通过 HDR 介导的 DNA 片段的定点整合通常效率较低,尤其在哺乳动物细胞中,通过同源重组实现 DNA 片段定点整合效率约为  $10^{-6} \sim 10^{-5}$ [12-13]。基因编辑工具的选择在一定程度上可以影响定点整合的效率,在同源序列存在的情况下,由基因编辑工具所

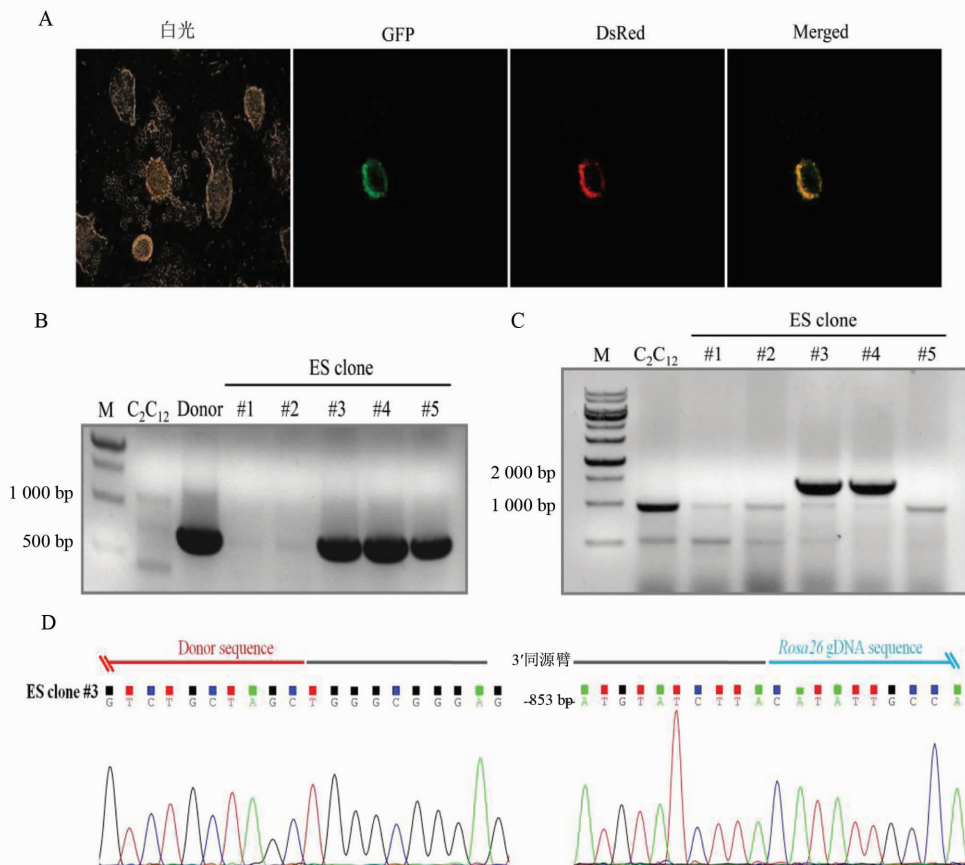


图 3 利用 CRISPR/ Cas9 构建外源基因定点整合 ES 细胞克隆

Fig. 3 Generation of targeted integrated ES single clones by CRISPR/ Cas9

A: ES 克隆荧光图; B: PCR 扩增中间插入片段; C: PCR 扩增右侧边界片段; D: #3 ES 克隆右侧边界片段序列图谱

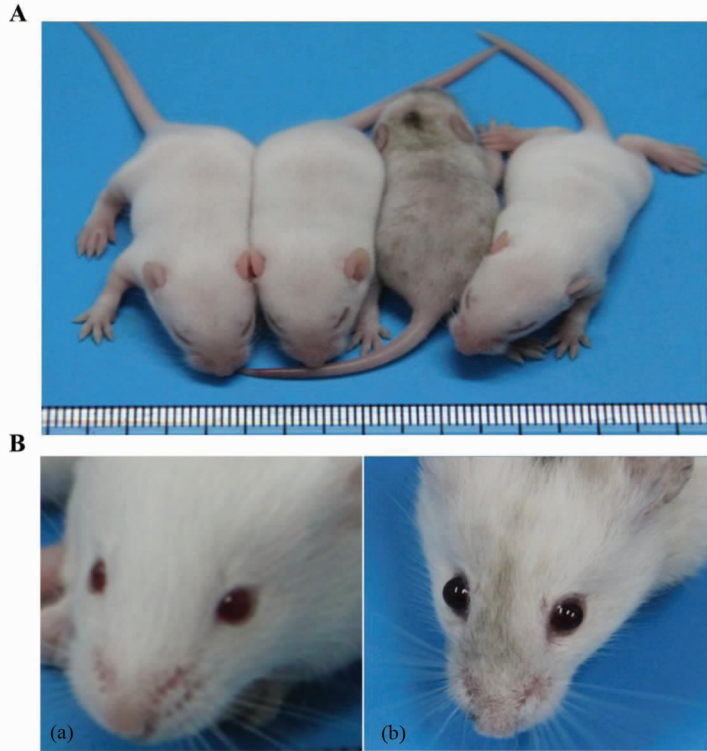


图 4 构建 *Tyr* 基因定点整合的嵌合体小鼠

Fig. 4 Generation chimeric mouse with targeted integration of *Tyr* gene

A: *Tyr* 嵌合体小鼠与普通昆明白小鼠合影; B: 眼部虹膜特写。对照小鼠 (a), *Tyr* 嵌合体小鼠 (b)

造成的 DNA 发生双链断裂能促进同源重组修复, 从而提高定点整合外源基因的效率<sup>[14]</sup>。本研究对红色荧光的分析结果显示, 在  $C_2C_{12}$  细胞中, ZFN 和 TALEN 的介导的定点整合效率约为 0.1% ~ 0.3%, CRISPR/Cas9 的效率达到 2.74%, 具有明显的优势, 这与前期 CRISPR/Cas9 具有最佳的切割效率的结果是一致的。

使用 CRISPR/Cas9 对无启动子的质粒供体 pTyr-2A-DsRed 进行定点整合时, 本研究利用 pX458 载体上携带的 EGFP 报告基因, 通过流式分选可快速富集转染阳性细胞用于后续实验, 进一步通过流式分析定点整合到基因组上的供体上的红色荧光蛋白 DsRed, 即可快速鉴定定点整合的效率。相对于传统的正负药物筛选定点整合的细胞单克隆, 此方法省去繁琐的筛选过程, 更加省时高效。

对于定点整合的细胞基因组的巢式 PCR 扩增

得到了 3' 端边界序列和中间插入序列的条带, 证明了外源基因的成功整合。而针对 5' 端边界序列的扩增无明显目的条带, 我们推测可能是由非常规重组 (illegitimate recombination) 引起的。非常规重组与同源重组在哺乳动物细胞 DSB 修复过程中互为竞争关系, 研究表明, 非常规重组可能导致在基因组与 donor 连接位置处发生复杂的 DNA 重组, 包括 DNA 缺失, 重复, 插入和倒位等<sup>[15-16]</sup>。当然左侧同源臂的大量 GC 重复序列也在一定程度上增加了扩增的难度。

最后, 我们成功得到了一只整合了 *Tyr* 基因的嵌合体小鼠, 该小鼠相对于非嵌合体小鼠具有明显的毛色区别。通过观察毛色变化可以更加直观、快速地鉴别目标外源基因整合小鼠, 这为今后制作 *Rosa26* 定点整合小鼠提供了一种简便高效的方法。

#### 参考文献:

[1] KIM Y G, CHA J, CHANDRASEGARAN S. Hybrid restriction enzymes: Zinc finger fusions to Fok I cleavage

domain[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1996, 93 (3):

- 1156 – 1160.
- [2] BITINAITE J, WAH D A, AGGARWAL A K, et al. Fok I dimerization is required for DNA cleavage [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1998, 95(18): 10570 – 10575.
- [3] LI T, HUANG S, ZHAO X, et al. Modularly assembled designer TAL effector nucleases for targeted gene knockout and gene replacement in eukaryotes [J]. *Nucleic Acids Research*, 2011, 39(14): 6315 – 6325.
- [4] CONG L, RAN F A, COX D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems [J]. *Science*, 2013, 339(6121): 819 – 823.
- [5] HE Z, PROUDFOOT C, WHITELAW C B A, et al. Comparison of CRISPR/Cas9 and TALENs on editing an integrated EGFP gene in the genome of HEK293FT cells [J]. *Springerplus*, 2016, 5(1): 814.
- [6] OZEKI H, ITO S, WAKAMATSU K, et al. Chemical characterization of hair melanins in various coat-color mutants of mice [J]. *Journal of Investigative Dermatology*, 1995, 105(3): 361 – 366.
- [7] FURLAN-MAGARIL M, REBOLLAR E, GUERRERO G, et al. An insulator embedded in the chicken alpha-globin locus regulates chromatin domain configuration and differential gene expression [J]. *Nucleic Acids Research*, 2011, 39(1): 89 – 103.
- [8] PARIKH B A, BECKMAN D L, PATEL S J, et al. Detailed phenotypic and molecular analyses of genetically modified mice generated by CRISPR-Cas9-Mediated editing [J]. *PLoS One*, 2015, 10(1): e0116484.
- [9] BASSETT A R, TIBBIT C, PONTING C P, et al. Mutagenesis and homologous recombination in *Drosophila* cell lines using CRISPR/Cas9 [J]. *Biology Open*, 2013, 3(1): 42 – 49.
- [10] SRINIVAS S, WATANABE T, LIN C S, et al. Cre reporter strains produced by targeted insertion of EYFP and ECFP into the ROSA26 locus [J]. *BMC Developmental Biology*, 2001, 1: 1 – 8.
- [11] CHEN C M, KROHN J, BHATTACHARYA S, et al. A comparison of exogenous promoter activity at the ROSA26 locus using a PhiC31 integrase mediated cassette exchange approach in mouse ES cells [J]. *PLoS One*, 2011, 6(8): e23376.
- [12] ORLANDO S J, SANTIAGO Y, DEKELVER R C, et al. Zinc-finger nuclease-driven targeted integration into mammalian genomes using donors with limited chromosomal homology [J]. *Nucleic Acids Research*, 2010, 38(15).
- [13] MERKLE F T, NEUHAUSSER W M, SANTOS D, et al. Efficient CRISPR-Cas9-Mediated generation of knockin human pluripotent stem cells lacking undesired mutations at the targeted locus [J]. *Cell Reports*, 2015, 11(6): 875 – 883.
- [14] LI G, ZHONGL C, MO J, et al. Advances in site-specific integration of transgene in animal genome [J]. *Yichuan*, 2017, 39(2): 98 – 109.
- [15] SARGENT R G, BRENNEMAN M A, WILSON J H. Repair of site-specific double-strand breaks in a mammalian chromosome by homologous and illegitimate recombination [J]. *Molecular and Cellular Biology*, 1997, 17(1): 267 – 277.
- [16] LIU X, WANG M, QIN Y, et al. Targeted integration in human cells through single crossover mediated by ZFN or CRISPR/Cas9 [J]. *BMC Biotechnol*, 2018, 18(1): 66.

(责任编辑 张冰)