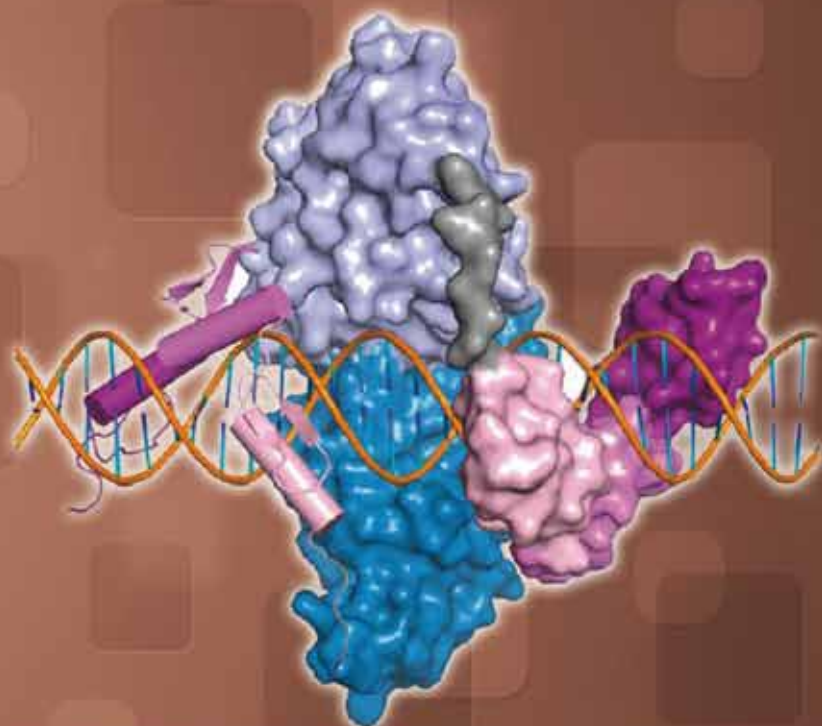


# 生命奥秘

LifeOmics

2014年 5月刊 总第65期



新一代位点特异性基因组工程学利器  
——TALEN、ZFN以及CRISPR/Cas

父辈的印记

豆娘幼虫的“丢卒保车”逃生法

无奇不有

生命世界

解读生命

走进科学

# 目录 | CONTENTS

## 专题

### 新一代位点特异性基因组工程学利器 ——TALEN、ZFN以及CRISPR/Cas

前言 .....	01
一、TALEN技术 .....	02
1. TALEN结构及技术原理 .....	02
2. TALEN技术的应用及近期发展 .....	06
二、ZFN技术 .....	08
1. ZFN结构及基本技术原理 .....	08
2. ZFN技术的进展与应用 .....	11
3. ZFN技术的缺陷 .....	13
三、CRISPR/Cas系统 .....	14
1. CRISPR/Cas系统元件与特征 .....	14
2. CRISPR/Cas系统工作原理 .....	15
3. 不同类型的CRISPR/Cas系统 .....	16
4. CRISPR技术的应用 .....	17
四、三种基因定点修饰技术的总结与比较 .....	21
1. TALEN、ZFN和CRISPR/Cas的共同点 .....	21
2. TALEN、ZFN和CRISPR/Cas的技术特点 .....	22

下一期（2014年06月刊）预告：营养基因组学——我们可以吃得更健康

营养基因组学（nutritional genomics或nutrigenomics）是一门研究食物是如何影响个体遗传信息表达，以及个体基因如何进行营养物质、生物活性物质代谢，并对这一代谢过程做出何种反应的学问。下一期《生命奥秘》将介绍营养基因组学的相关内容，并探讨营养素是如何影响基因组以及基因组又是如何影响人体代谢的。

## 热点

父辈的印记 .....	29
-------------	----

## 百态

豆娘幼虫的“丢卒保车”逃生法 .....	38
海豚听力与反应时间的记录资料 .....	40
果蝇繁殖过快导致后代的适合度降低 .....	41

本刊文章主要由国外网站文章编译而成，如有版权问题，请版权所有人与本刊联系。  
凡本刊所载文章，版权归作者本人和本刊所有，如需转载，请注明作者及出处“生命奥秘”。  
本刊提供的任何信息都不能作为医疗凭证和依据，仅供科研参考。

# 专题

*Worthy Issues*

## 新一代位点特异性基因组工程学利器 ——TALEN、ZFN以及CRISPR/Cas

特约编辑：闵力，男，在读博士，研究方向：分子生物学与肿瘤学  
章程，男，在读博士，研究方向：分子生物学与肿瘤学

### 前言

转录激活样效应因子核酸酶（transcription activator-like effector nuclease, TALEN）技术与锌指核酸酶（Zinc-finger nuclease, ZFN）技术组成了一大类强有力的基因组编辑工具，这一大类技术的发展重新划定了生物学研究的边界。这些嵌合核酸酶由两部分组成——一个可编码的序列特异性DNA结合模块与一个非特异性的DNA切割结构域。通过诱导DNA双链断裂（DNA double-strand break）来刺激容易出错的非同源末端连接或在特定基因所在的位置进行的同源定向修复，TALEN和ZFN能够完成一系列遗传学编辑修饰操作。

成簇规律间隔短回文重复（clustered regulatory interspaced short palindromic repeat, CRISPR）技术是最新出现的一种基因组编辑工具，它能够完成RNA导向的DNA识别及编辑。与其它基因组编辑工具相比，CRISPR技术更易于操作，具有更强的可扩展性。

本文将以上述三种技术为例，介绍并探讨新一代位点特异性基因组工程技术的生物学原理、未来发展趋势，及其在遗传学研究领域的作用和潜在的医学应用前景。

# 一、TALEN技术

TAL效应因子 (TAL effector, TALE) 最初是在一种名为黄单胞菌 (*Xanthomonas* sp.) 的植物病原体中作为一种细菌感染植物的侵袭策略而被发现的。这些TALE通过细菌III类分泌系统 (bacterial type III secretion system) 被注入植物细胞中, 通过靶定效应因子特异性的基因启动子来调节转录, 来促进细菌的集落形成。由于TALE具有序列特异性结合能力, 研究者通过将FokI核酸酶与一段人造TALE连接起来, 形成了一类具有特异性基

因组编辑功能的强大工具, 即TALEN。

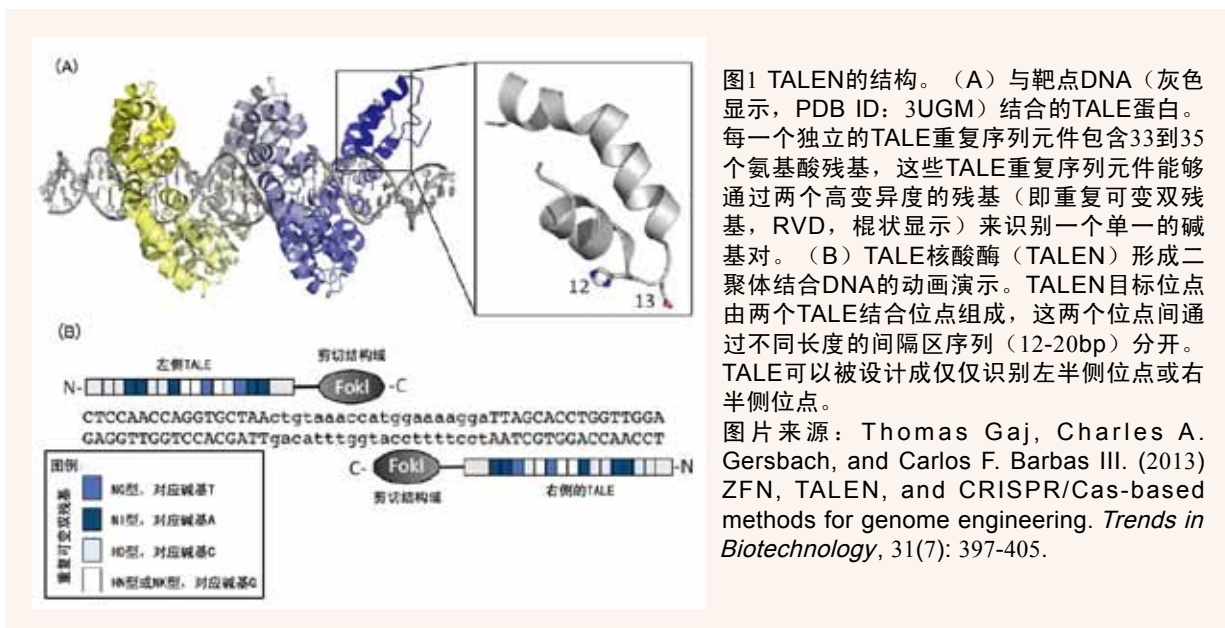
近年来, TALEN已广泛应用于酵母、动植物细胞等细胞水平基因组改造, 以及拟南芥、果蝇、斑马鱼及小鼠等各类模式研究系统。2011年《自然·方法》(*Nature Methods*) 将其列为年度技术, 而2012年的《科学》(*Science*) 则将TALEN技术列入了年度十大科技突破, 针对该文的评论更是给予它基因组的巡航导弹技术的美誉。

## 1. TALEN结构及技术原理

### 1.1 TALEN的典型结构

如前文所述, 典型的TALEN由一个包含核定位信号 (Nuclear localization signal, NLS) 的N端结构域、一个包含可识别特定DNA序列的典型串联TALE重复序列的中央结构域, 以及一个具有FokI核酸内切酶功能的C

端结构域组成。不同类型的TALEN元件识别的特异性DNA序列长度有很大区别。一般来说, 天然的TALEN元件识别的特异性DNA序列长度一般为17-18bp; 而人工TALEN元件识别的特异性DNA序列长度则一般为14-20bp。



## 1.2 TALEN技术的原理与步骤

TALEN技术的原理并不复杂，即通过DNA识别模块将TALEN元件靶向特异性的DNA位点并结合，然后在FokI核酸酶的作用

下完成特定位点的剪切，并借助于细胞内固有的同源定向修复（HDR）或非同源末端连接途径（NHEJ）修复过程完成特定序列的插入（或倒置）、删失及基因融合（图2）。

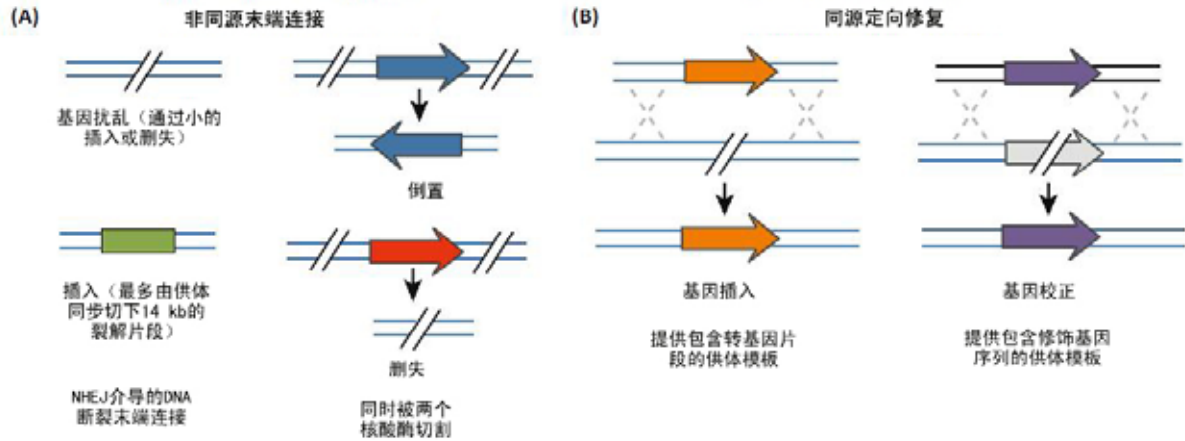


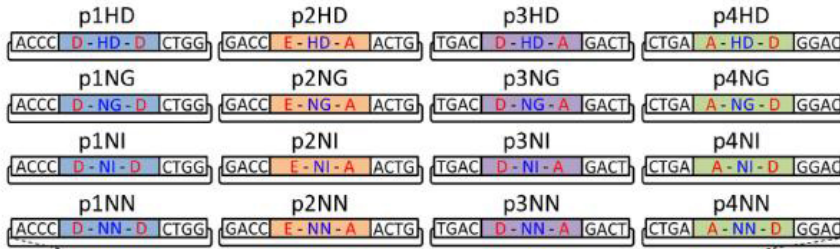
图2 TALEN进行基因组编辑的原理。利用位点特异性核酸酶可以进行基因组编辑，而核酸酶诱导的DNA双链断裂（DSB）可由同源定向修复（HDR）或非同源末端连接途径（NHEJ）来修复。（A）在供体质粒（donor plasmid）暴露出延长的同源臂（homology arm）的情况下，HDR可能导致插入的单个或多个转基因发生改变或取代原有的基因。（B）在缺失供体质粒的情况下，NHEJ介导的修复会产生小的插入或删除突变，并可能导致目标基因被破坏；在有双链寡核苷酸或线状供体质粒存在的情况下，这些DNA片段可能通过NHEJ介导的连接反应插入；同时诱导两个DSB的产生则会引起删失、插入和易位突变。

图片来源：Thomas Gaj, Charles A. Gersbach, and Carlos F. Barbas III. (2013) ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends in Biotechnology*, 31(7): 397-405.

TALEN技术的核心原理就是在同一个蛋白（TALEN）上有序地实现引导进入细胞核、靶位点DNA的特异性识别和靶位点DNA的切割这三个不同的功能，这一点在上述TALEN典型结构一节中已作了较为详细的描述。在具体操作中，例如在实验室条

件下，实现TALEN的关键就在于完成DNA的特异性识别功能，一般说来分为两个步骤。图3与图4分别以“铂金门”TALEN构建系统（Platinum Gate TALEN construction system）和商业化的easyT体系为例，展示了实验操作中TALEN元件的构建。

**步骤一**



**步骤二**

组件的数量

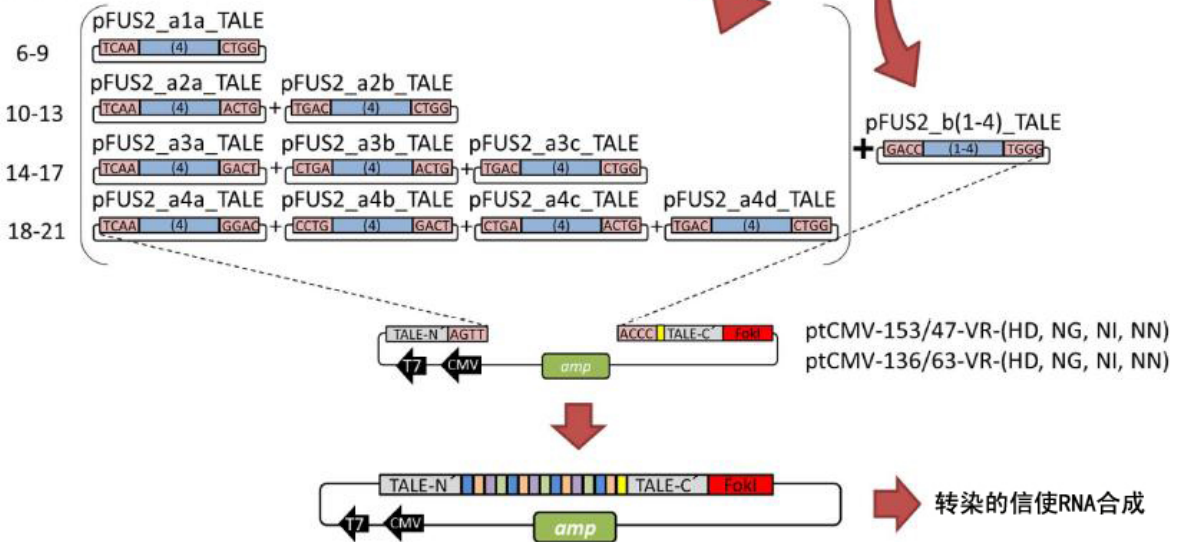


图 3 “铂金门” TALEN构建系统TALEN元件构建操作示意图。步骤一，四个或更少的组件被连接到阵列质粒（array plasmid）上；步骤二，构建好的阵列随后被连接到哺乳动物表达载体中；白色和粉色的长方形分别表示在BsaI和Esp3I限制性内切酶切割后留下的粘性末端；蓝色字母代表RVD，红色字母代表non-RVD变化，黄色长方形代表后半重复。

图片来源：Tetsushi Sakuma, Hiroshi Ochiai, Takehito Kaneko, Tomoji Mashimo, Daisuke Tokumasu, et al. (2014) Repeating pattern of non-RVD variations in DNA-binding modules enhances TALEN activity. *Science Report*, 3(3379): 1-8.

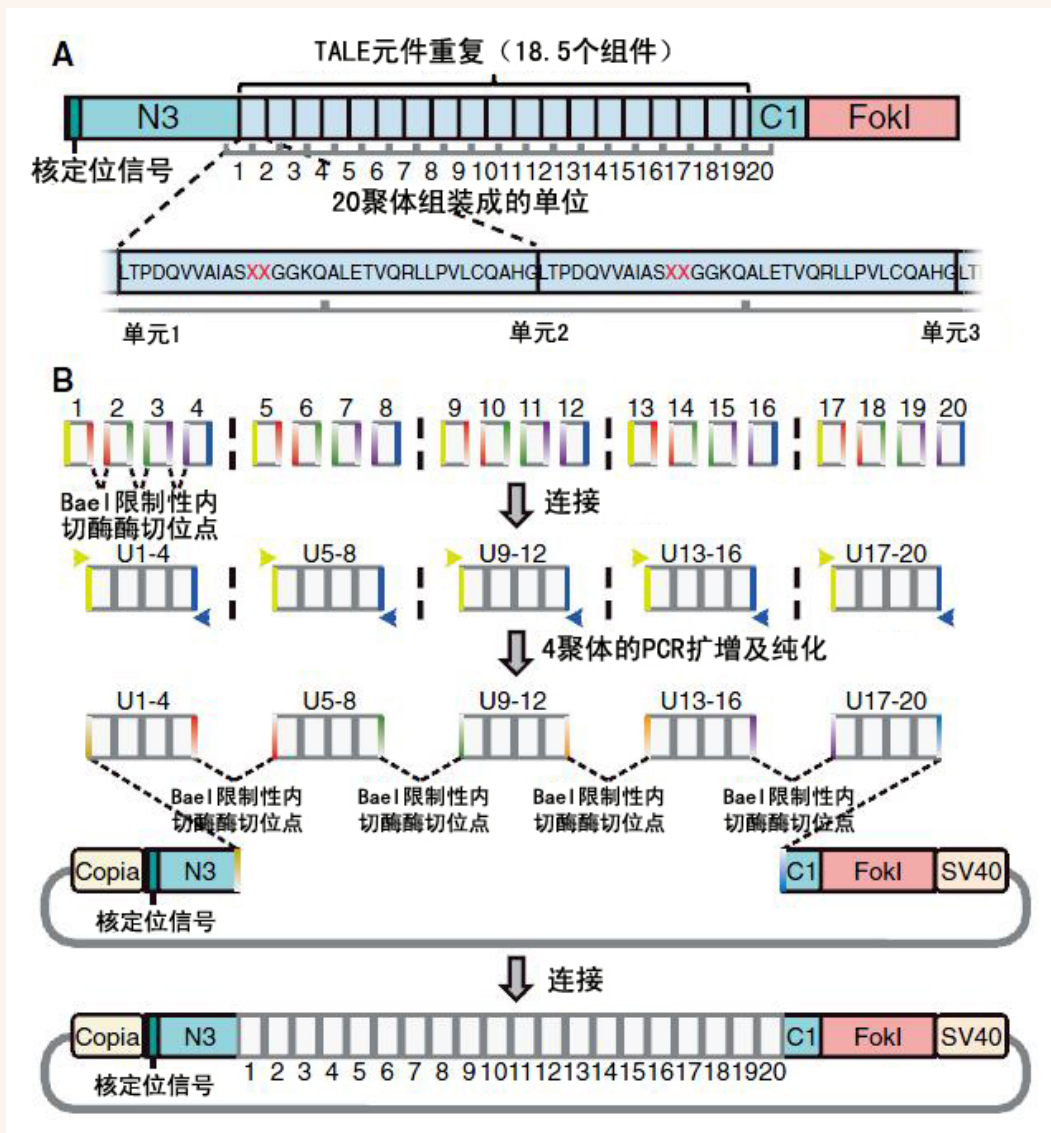


图 4 “easyT” TALEN构建系统TALEN元件构建操作示意图。(A) 包含一个长度为18.5个组件的TALE重复元件的TALEN体系示意图。该TALE重复元件由20个单体单位 (monomer unit) 组装而成。单体单位的边界在组装过程中发生了移位。(B) TALEN克隆示意图。第一步, 由四个单体通过连接反应组装成4聚体; 第二步, 4聚体 (4-mers) 进行PCR扩增, 琼脂糖凝胶电泳, 胶回收并浓缩; 最后, 在第二次连接反应中, 4聚体被组装到TALEN骨架质粒 (backbone plasmid) 上; 黄色和蓝色箭头分别表示4聚体扩增时的正向引物与反向引物。

图片来源: Tomonori Katsuyama, Arslan Akmammedov, Makiko Seimiya, Samuel C. Hess, Cem Sievers and Renato Par. (2013) An efficient strategy for TALEN-mediated genome engineering in *Drosophila*. *Nucleic Acids Research*, 41(17): e163-171.

### 1.2.1 构建TAL靶点识别模块

TAL的DNA特异性识别单位是间隔32个恒定氨基酸残基的二联氨基酸。二联氨基酸与AGCT这4个核苷酸碱基有一一对应的关系:

腺嘌呤 (A) 由NI识别、胸腺嘧啶 (T) 由NG识别、鸟嘌呤 (G) 由NN识别, 而胞嘧啶 (C) 则由HD识别。实验操作中, 我们通过靶位点的DNA序列可以反推能特异性识别这



一序列的二联氨基酸序列，从而构建TAL靶点识别模块。

### 1.2.2 TAL靶点识别模块的克隆与表达

根据之前对TALEN结构的介绍，我们需要将上一步骤中根据目标DNA序列构建好的一对TAL靶点识别模块与N端的核定位序列、C端的FokI酶连接起来，才能得到一个完整的TALEN元件。一般来说，我们可以采用专门用于构建TALEN的真核表达载体体系，将一

对特异性的TAL靶点识别模块克隆进该载体中，再通过转染等方式导入细胞内。这种体系一般由供体质粒（donor plasmid，提供单基、二联及三联等类型的TAL模块）和骨架质粒（backbone plasmid，用于构建TALEN并表达构建好的TALEN）两类质粒构成，常用的TALEN体系有RCIscript-GoldyTALEN和pC-GoldyTALEN、TAL5-BB和pTAL6-BB及pCS2TAL3-DD和pCS2TALE-RR等。

## 2. TALEN技术的应用及近期发展

虽然TALEN技术的基本原理并不难理解，但其发现过程却较为曲折。从1989年首次发现TAL起，研究者前后历时近21年才研究清楚TAL的工作原理。自2010年正式发明TALEN技术以来，全球范围内多个研究小组利用体外培养细胞、酵母、拟南芥、水稻、果蝇及斑马鱼等多个动植物体系验证了TALEN的特异性切割活性。

### 2.1 TALEN技术的应用

2011年北京大学（Peking University）的Zhang等人首次使用TALEN技术在斑马鱼中成功实现了定向突变和基因编辑；而爱荷华州立大学（Iowa State University）的Wang等人则在2012年，也以斑马鱼为模式动物，并首次使用TALEN技术在活体内完成了特定DNA的删除、人工DNA插入等较为复杂的操作。随后TALEN技术在植物、大小鼠的基因组改造等方面的应用也顺利完成。而2013年Zhang使用TALEN诱导了DNA双链断裂，提高同源定向修复效率，在斑马鱼中实现了同源重组基因打靶。

### 2.2 TALEN的近期发展

如前所述，经典的TALEN体系已经广

泛应用，越来越多的实验室以及实验外包公司均能很好地完成TALEN相关实验，但是基本限于单基因的插入或敲除操作，而且主要用于单个基因功能的研究。2013年，首尔国立大学化学系和国家基因工程创新举措研究中心的Kim课题组建立了一个全基因组规模（genome-scale collection）的TALEN体系，他们系统地选取了人类基因组中高度特异性的序列作为靶位点以避免脱靶（off-target）效应，通过一种高通量克隆体系，一次性构建了18,740个编码蛋白的基因的TALEN质粒。

在这项研究中，研究者以一种巧妙的方式优化了TALEN质粒的结构，以检测插入靶位点后质粒对应位置上EGFP的表达的方式检测了TALEN靶位点插入成功率（图5a）。通过这一方式，他们可以研究不同间隔序列下特定靶位点插入效率（图5b&c），从而针对每一个靶位点，都能选出最佳的TALEN体系结构。2014年2月，北京大学生命科学学院魏文胜课题组依托于一种自主研发的TALE蛋白组装技术（ULTIMATE system）完成了全部TALE元件的解码工作。

近年来，随着TALEN技术逐渐成熟，全球范围内各实验室已广泛使用TALEN技术来

完成基因打靶操作。TALEN通过与显微注射、慢病毒感染等技术手段相结合，其应用范围越来越广。相信在不远的将来，其应用必将

跨越干细胞研究、基因治疗、神经网络，以及动植物育种等多个领域，强力推动生命科学的进步。

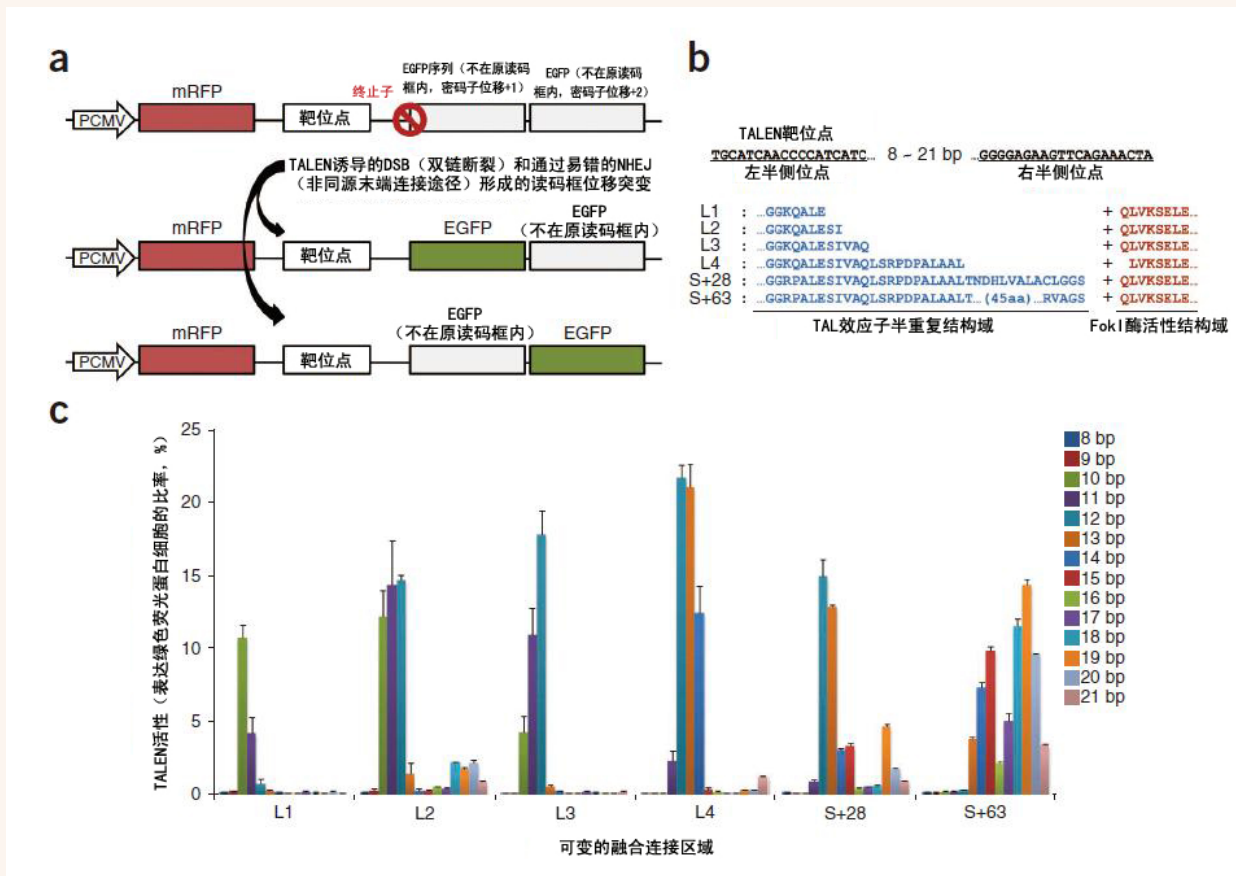


图 5 TALEN元件的优化。（a）基于RFP-GFP报告基因的各TALEN元件基因编辑活动的检测方法图示，只有插入靶位点后才能修正紧随其后EGFP的读码框以表达EGFP；（b）TALEN靶点和TAL效应子与FokI结构域融合连接区域的氨基酸序列；（c）TALEN基因编辑活力的比较。报告基因质粒包含靶位点，靶位点中有各类间隔序列（彩色标记），将报告基因质粒和TALEN质粒共转染到HEK293细胞中，然后使用流式细胞术分离GFP阳性的细胞。

图片来源：Yongsu Kim, Jiyeon Kweon, Annie Kim, Jae Kyung Chon, Ji Yeon Yoo, Hye Joo Kim1, Sojung Kim et al. (2013) A library of TAL effector nucleases spanning the human genome. *Nature Biotechnology*, 31(3): 251-260.

## 二、ZFN技术

锌指核酸酶（Zinc-finger nuclease, ZFN）又名锌指蛋白核酸酶（ZFPN），它是一类人工合成的限制性内切酶，由锌指DNA结合域（zinc finger DNA-binding domain）与限制性内切酶的DNA切割域（DNA-cleavage domain）融合而成。研究者可以通过加工改造ZFN的锌指DNA结合域，靶向定位于不同的DNA序列，从而使得ZFN可以结合复杂基因组中的目的序列，并由DNA切割域进行特异性切割。此外，通过将锌指核酸酶

技术和胞内DNA修复机制结合起来，研究者还可以自如地在生物体内对基因组进行编辑。目前，在大量植物、果蝇、斑马鱼、蛙、大/小鼠及牛等物种中，ZFN技术已被广泛应用于靶向基因的突变，通过人工修改基因组信息可以产生遗传背景被修改的新物种。该技术在医学领域也具有非常重大的价值，对于疾病的基因治疗有潜在意义，具有非常广泛的应用前景。

### 1. ZFN结构及基本技术原理

#### 1.1 ZFN的结构

顾名思义，ZFN由负责特异性识别序列的锌指DNA结合域和进行非特异性限制性内切酶切割的DNA切割域两部分组成（图6）。其中锌指DNA结合域部分一般包含3个独立的锌指（Zinc finger, ZF）重复结构，每个锌指结构能够识别3个碱基，因而一个锌指DNA结合域可以识别9bp长度的特异性序列（而ZFN二聚体，则包含6个锌指，可以识别18bp长

度的特异性序列）。目前最常用的ZF结构为Cys2His2锌指，其结构由大约30个氨基酸包裹一个锌原子构成。研究表明，增加锌指的数量可以扩大ZFN特异性识别DNA序列的长度，从而获得更强的序列特异性。具体操作中，则一般通过模块化组合单个ZF，来获得特异性识别足够长的DNA序列的锌指DNA结合域。ZFN的三维空间结构如图6所示。

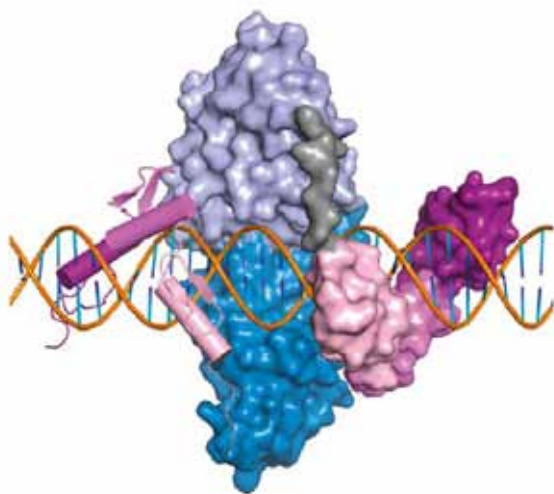


图6 ZFN的结构。该图为DNA双链与一对ZFN结合的示意图。每一对锌指用粉色标出，图像左侧的锌指用带状结构表示，右侧的锌指用填充空间结构表示；FokI的DNA切割域如蓝色区域所示；位于连接域与切割域之间的长度为四个氨基酸的“连接区”（linker）如灰色填充空间结构所示。DNA双链的糖-磷酸骨架为橙色，碱基显示为蓝色，在ZF结合位点两侧的DNA区域间距为6bp。该示意图由Smith等人在2000年根据锌指蛋白与DNA结合的晶体结构数据所编译而来。  
图片来源：Carroll D. (2011) Genome engineering with zinc-finger nucleases. *Genetics*. 188(4): 773-82.

此外，如果锌指DNA结合域与目的DNA序列能够完美配对，即便只含3个ZF结构的ZFN也能在基因组中特异性地结合18bp长度的序列。通过研究者长期的努力，识别每一种三联碱基的64种锌指组合中已有大部分被发现并编撰成目录，这些相关数据也都能够在公共的数据库或者文献中被检索到。针对每一条需要识别的目标序列，我们都可以使用与密码子对应的类似方式对锌指结构进行模块化组装（modular assembly），从而获得能够识别特定DNA序列的锌指蛋白结构。

ZFN的切割域与DNA结合域通过连接区

（linker）结合。在ZFN中应用最广泛的DNA切割域来自II S型限制性内切酶FokI。由于切割域与DNA链的结合能力较弱，因此DNA切割域必须以二聚体的形式发挥作用。构建锌指核酸酶时，应针对DNA各链上的邻近区域设计两条ZFN，使其DNA切割域能够位于双链的同一位置，以达到最佳的切割效果。两条ZFN之间具有被称为“间隔区”的spacer结构，该结构的长度以5~6bp为宜，7bp也能正常工作，合理的“间隔区”设计才能保证ZFN二聚体拥有最佳的工作空间（图7）。

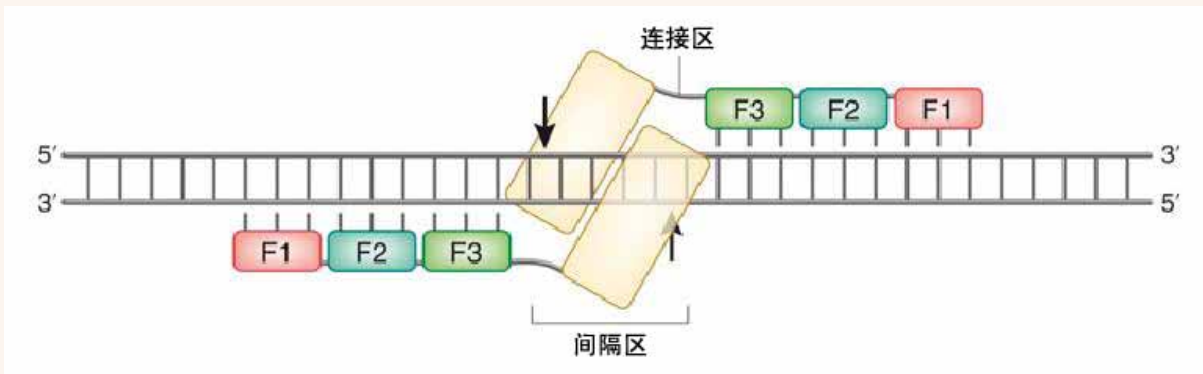


图7 ZFN特异性识别DNA并与DNA结合示意图。每个DNA识别域包含三个锌指，锌指从N端开始命名，在图中标示为F1、F2、F3。每个锌指结构分别与3个碱基发生直接接触，由此产生特异性。单独的FokI切割域不具有特异性识别能力，但当与锌指结构相连，并与另一个FokI切割域形成二聚体后，便能够对DNA双链进行切割。两个切割位点之间的距离约为4bp，如箭头所示。

图片来源：Carroll D. (2011) Genome engineering with zinc-finger nucleases. *Genetics*. 188(4): 773-82.

## 1.2 ZFN技术的初步应用及其机制

ZFN技术可用于基因组编辑。针对目的基因序列设计并合成ZFN后，使之对DNA进行特异性切割，从而形成DNA双链断裂区（Double-Stranded Breaks, DSB）；通过破坏非同源末端链接（non-homologous end

joining, NHEJ）使目的基因失活，或借助同源重组（homologous recombination, HR）等方式完成DNA的修复连接，可以使断裂的DNA双链重新黏合。将以上两步结合起来便可以完成一般的基因组编辑操作，具体机制如图8所示。

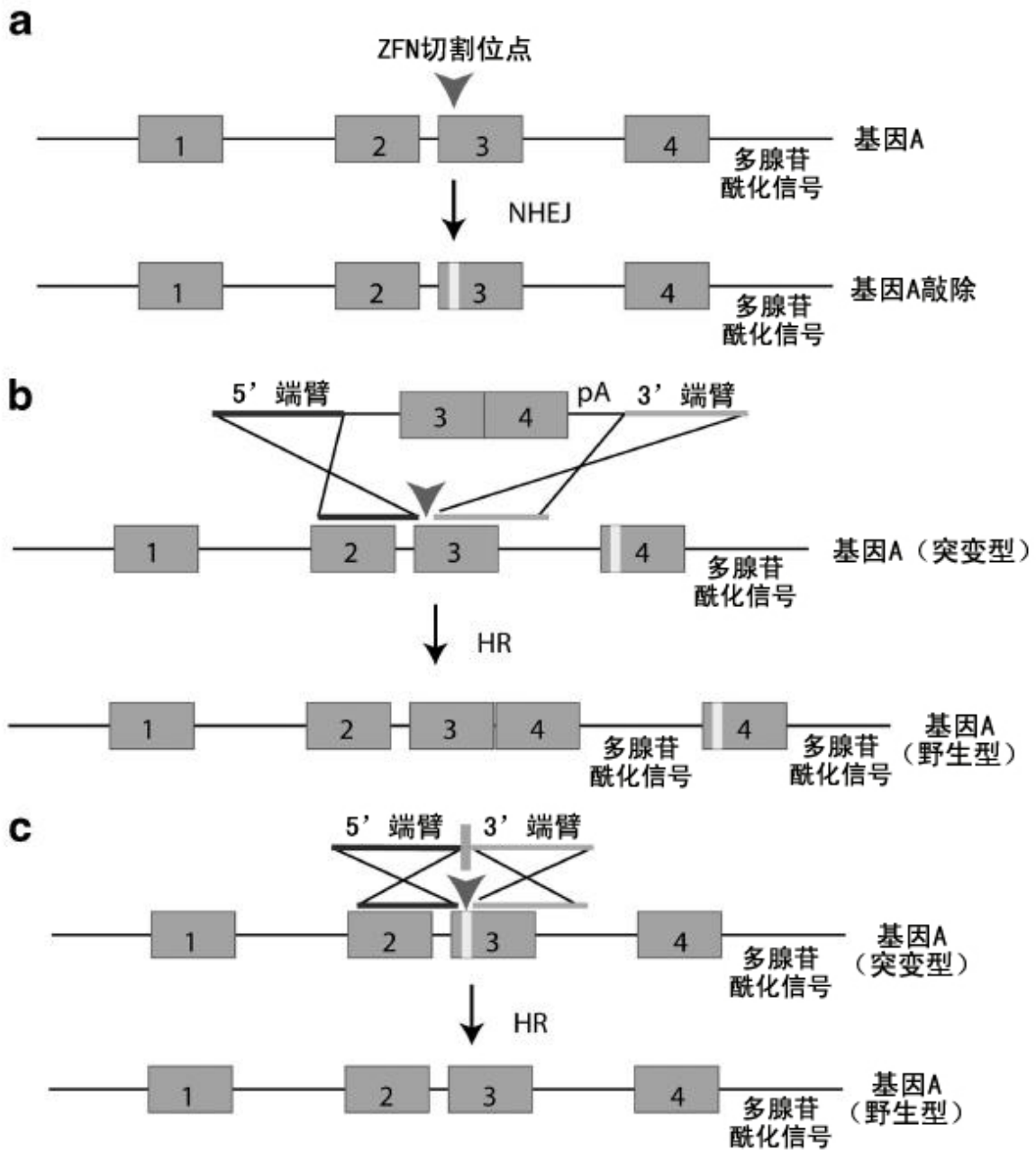


图8 通过ZFN技术对基因进行编辑操作的几种主要方式示意图。通过对靶基因编码区域的目标序列进行ZFN切割，可以产生DSB，导致基因无法通过NHEJ修复而失活，从而达到基因敲除的目的。通过在两端引入wild type（野生型，WT）DNA模板，并借助于同源重组（homologous recombination, HR）的修复，整个表达元件（expression cassette）可以替换发生DSB的区域，从而可以修复具有致病性的突变基因。通过提供能够覆盖ZFN切割位点附近整个核苷酸多态性区域的DNA序列，同样可以利用同源重组实现基因的修复，箭头显示的是ZFN切割位点。

图片来源： Palpant NJ, Dudzinski D. (2013) Zinc finger nucleases: looking toward translation. *Gene Ther*, 20(2):121-7.

ZFN技术具有重大的应用价值。在科研和农业领域，该技术既可用于基因的敲除失活，也可用于导入目标基因，使基因激活或阻断，或者人为改造基因序列，使之符合人们的要求。在医疗领域，经ZFN技术改造后导入治疗性基因的质粒或干细胞可被导入人体，实现基因治疗。此外，ZFN技术也可以直接用于有害

基因的修补替换或是直接删除，以达到相关治疗目的。ZFN技术具有极佳的特异性和效率，因此能将基因/基因组错误修改的风险降到最低。从理论上来说，研究人员甚至可以在任何物种中，对处于任意生长时期的细胞进行ZFN操作，可以自如地修改其基因，而还不破坏细胞状态。

## 2. ZFN技术的进展和应用

目前，除了传统的DNA重组技术外，合成具有可控特异性的锌指结构域的平台主要有两个：其一为Sangamo Bioscience公司所独有，在两个锌指的基础上生产更多ZF的锌指核酸酶，并与Sigma公司合作，通过Compozr项目销售预制的锌指；另一个是由锌指联盟（Zinc Finger Consortium）开发的Oligomerized PoolEngineering（OPEN）技术，该技术主要通过大肠杆菌双杂交系统（*E. coli* two-hybrid selection system）来对ZFN进行筛选，这是一个开放平台，其模块化的锌指库和试剂皆可免费获得。

早期的ZFN技术一般采用普通的FokI-ZFN二聚体形式来保证其切割效率，但使用过程中可能因同源二聚体效应（homodimerization）而导致脱靶，影响切割

特异性。Miller等人和Szczepek等人在2007年分别开发出FokI的变体，使得ZFN可以在异源二聚体（heterodimer）形式下使用，从而在保证切割效率的前提下大大提升了特异性，并减少了细胞毒性，具有更优良的科研和应用价值。

ZFN虽然是刚刚兴起的技术，但已被越来越广泛地应用到科研和医疗领域中。ZFN技术的先导之一，Sangamo Biosciences公司正在和宾夕法尼亚大学合作，研究ZFN技术通过介导核酸酶引起CCR5基因座的破坏。这一研究成果在治疗HIV中具有广阔的应用前景，而且ZFN技术也已尝试应用于杜氏肌营养不良症（Duchenne muscular dystrophy）、21三体综合征等遗传疾病的基因治疗（图9）。



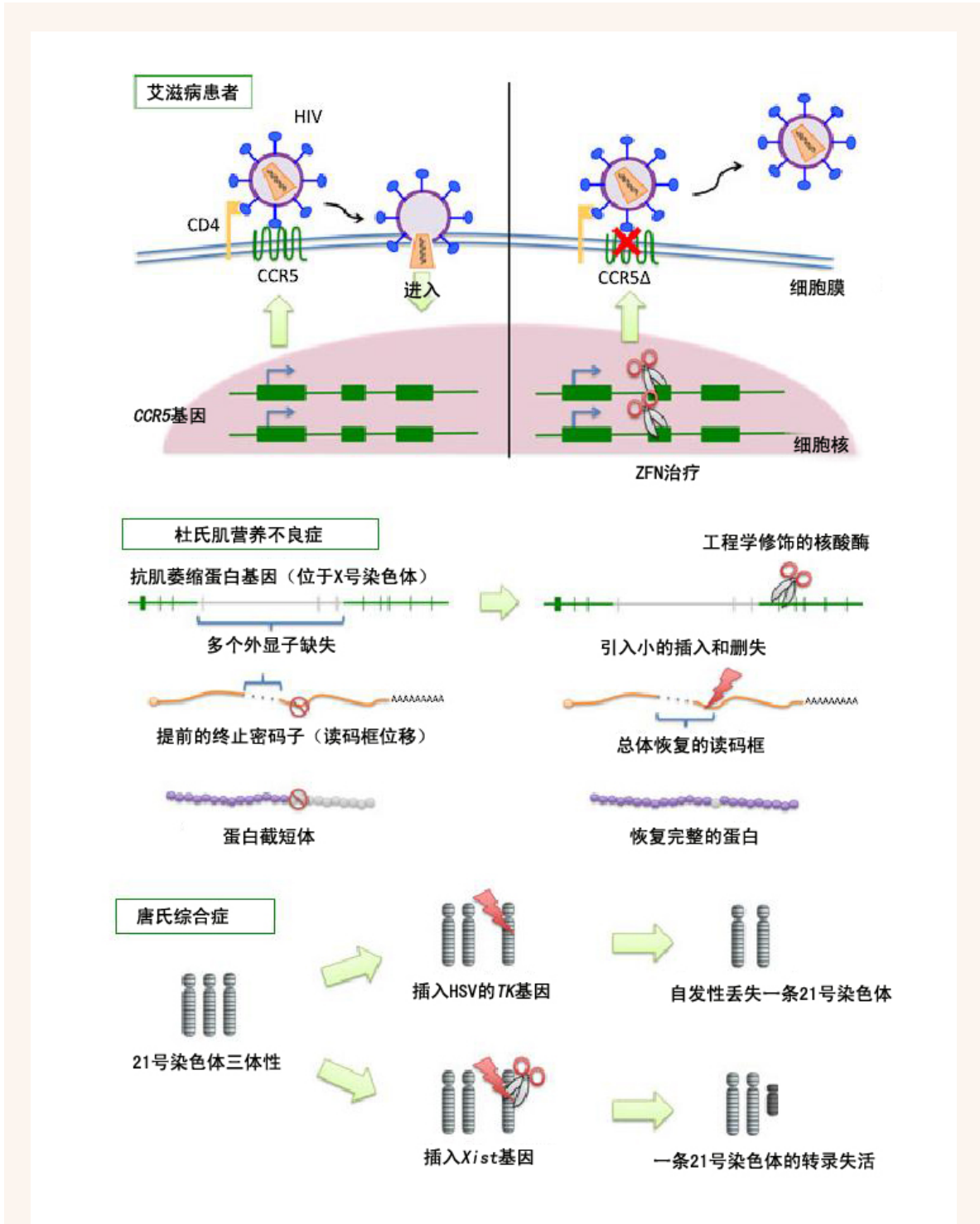


图9 使用ZFN技术治疗艾滋病和遗传疾病的示意图。（上）治疗艾滋病：使用ZFN技术切割CCR5受体的编码序列，以破坏CCR5膜受体的功能，使HIV失去细胞感染能力。（中）治疗杜氏肌营养不良症：使用ZFN技术进行基因组编辑，插入小段序列将Dystrophin基因的读码框恢复正常。（下）治疗21三体综合征（唐氏综合症）：使用ZFN插入HSV的TK基因，直接造成一条21号染色体自发丢失；使用ZFN在一条21号染色体上插入Xist基因，使这整个染色体失去功能。

图片来源：Hongmei Lisa Li, Takao Nakano, and Akitsu Hotta. (2014) Genetic correction using engineered nucleases for gene therapy applications. *Development Growth Differentiation*, 56(1): 63-77.

早期的ZFN技术需要借助病毒或质粒载体的方式进入细胞，之后再表达形成具有功能的蛋白。但Barbas等人发现ZFN可以依靠自身锌指部分跨过细胞膜进入细胞，并发挥作用，如此则可避免载体插入重要基因而引起突变等潜在风险。近年来，一系列应用ZFN所

取得的振奋人心的科研成果相继发表在高水平杂志上，如使患有人血液疾病乙型血友病（hemophilia B）的小鼠恢复血液凝结功能；在干细胞领域，研究者使用ZFN技术精确修正基因突变，从而使与人体疾病相关的缺陷蛋白失活等。

### 3. ZFN技术的缺陷

ZFN技术虽然简易实用，但也具有一定缺陷。ZFN对DNA的剪切需要两个FokI切割区域的二聚化，并且需要至少一个识别单元结合DNA。DNA识别域虽然具有较强的特异性识别能力，但由于ZFN剪切的过程并不完全依赖同源二聚体的形成，所以一旦形成异源二聚体，就很可能造成脱靶效应，并最终可能导致DNA的错配和序列改变，产生较强的细胞毒性。当这些不良影响积累过多，超过细胞修复机制承受的范围时，便会引起细胞的凋亡。另一方面，该手段仍然受到现有生物学领域研究手段的限制，因此在细胞内部操作的精确程度和后果都较难预料。如果ZFN引起相关基因突

变，则可能会导致一系列意想不到的后果，在与人体相关的应用领域，甚至可能引发癌症。

另外，ZFN作为基因治疗的手段之一，如果在生物体内使用，可能会引发免疫反应。现有的研究手段尚不能预测引入的ZNF蛋白是否会引起免疫系统的进攻。并且到目前为止，ZFN技术只能用于体外操作（*in vitro*），在对人体提取的细胞进行处理之后，再导入回输到病人体内。而直接向患者体内导入相关ZFN元件进行基因编辑处理则具有较大的潜在风险，且效率不高。以上诸多限制导致人体相关的ZFN操作较为繁琐，难以推广应用。





## 三、CRISPR/Cas系统

不论是TALEN技术还是ZFN技术，其定向打靶都依赖于DNA序列特异性结合蛋白模块的合成，这一步骤非常繁琐费时。而CRISPR/Cas技术作为一种最新涌现的基因组编辑工具，能够完成RNA导向的DNA识别及编辑。CRISPR/Cas技术使用一段序列特异

性向导RNA分子（sequence-specific guide RNA）引导核酸内切酶到靶点处，从而完成基因组的编辑。CRISPR/Cas系统的开发为构建更高效的基因定点修饰技术提供了全新的平台。

### 1. CRISPR/Cas系统元件与特征

CRISPR/Cas系统最早是在细菌的天然免疫系统内发现的，其主要功能是对抗入侵的病毒及外源DNA。1987年大阪大学（Osaka University）的研究人员在*E.coli* K12的碱性磷酸酶基因附近发现了成簇的规律间隔的短回

文重复序列（Clustered regularly interspaced short palindromic repeat, CRISPR），其结构如图10所示，目前普遍认为有40%的细菌基因组具有这样的结构。

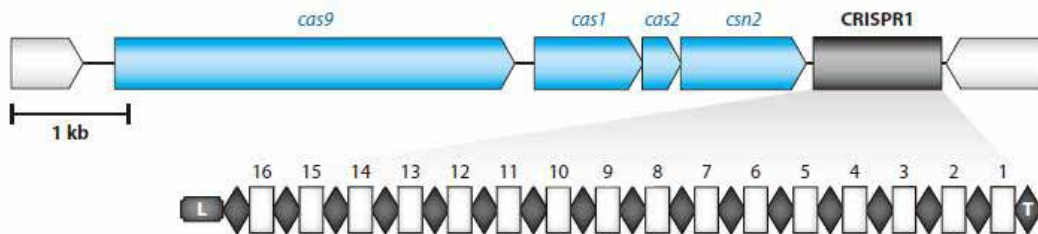


图10 CRISPR的结构（以嗜热链球菌LMD-9基因组CRISPR1/Cas系统的位点为例）。（上）Cas基因由蓝色表示，包括广泛存在的cas1和cas2，II类系统特征基因cas9和csn2。重复间隔物阵列（CRISPR）由黑色表示。（下）CRISPR的重复序列（repeat）和间隔物序列（spacer）分别用黑色菱形、灰色长方形表示。缩写：L，前端；T，末端重复；数字代表间隔物序列被获取的顺序。

图片来源：Rodolphe Barrangou1 and Philippe Horvath. (2012) CRISPR: New Horizons in Phage Resistance and Strain Identification. *Annual Review of Food Science*, 3: 143-162.

CRISPR/Cas系统由CRISPR序列元件与Cas基因家族组成。其中CRISPR由一系列高度保守的重复序列（repeat）与同样高度保守的间隔序列（spacer）相间排列组成。而在CRISPR附近区域还存在着一部分高度保守

的CRISPR相关基因（CRISPR-associated gene, Cas gene），这些基因编码的蛋白具有核酸酶活性的功能域，可以对DNA序列进行特异性的切割。

## 2. CRISPR/Cas系统工作原理

CRISPR/Cas作为原核生物中普遍存在的一种系统，最初的功能就是识别外源性入侵的核酸序列，并对其进行特异性降解，以达到抗病毒的作用。这一过程分两步进行——crRNA

的合成及在crRNA引导下的RNA结合与剪切，具体机制如图11所示，包含crRNA的生物学合成和RNA的结合与剪切两大步骤。

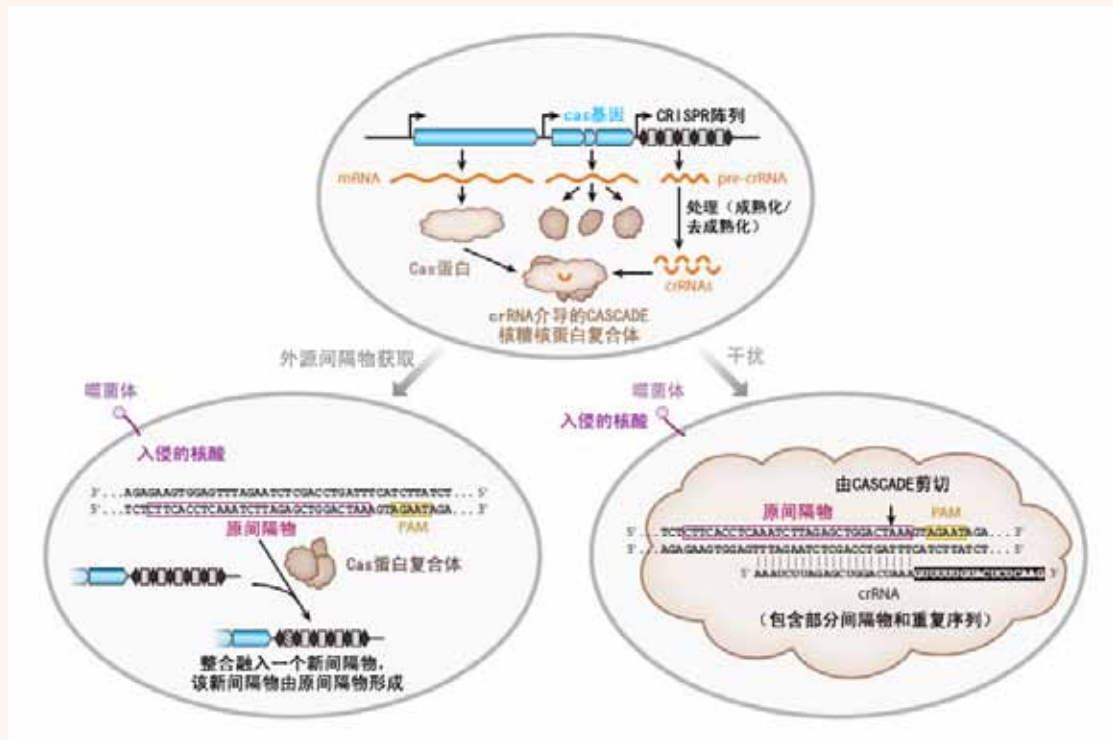


图11 CRISPR抗病毒运行机制。（上）crRNA和Cas蛋白的生物学合成：*Cas*基因转录为mRNA，随后翻译为Cas蛋白，Cas蛋白可以形成CASCADE复合体（抗病毒防御的CRISPR相关复合体）。CRISPR重复间隔物阵列转录为全长的前体crRNA（pre-crRNA），随后经过加工成为crRNA。这些crRNA包含部分的重复间隔物序列。（下左）间隔物（spacer）获取：噬菌体的原间隔物序列，一般在PAM（原间隔物模块）的旁边，可由Cas蛋白识别，并产生一个新的重复间隔物单元，插在原有的重复间隔物阵列前端。（下右）干扰：由crRNA介导的CASCADE核糖核蛋白复合体识别入侵的同源序列，在PAM附近的原间隔物序列处将这些双链DNA（dsDNA）截断。

图片来源：Rodolphe Barrangou1 and Philippe Horvath. (2012) CRISPR: New Horizons in Phage Resistance and Strain Identification. *Annual Review of Food Science*, 3: 143-162.

### 2.1 crRNA的生物学合成

CRISPR区域第一个重复序列上游有一段CRISPR的前导序列（Leader sequence），该序列作为启动子来启动后续CRISPR序列的转录，转录生成的RNA被命名为CRISPR RNA（简称crRNA）。

### 2.2 RNA的结合与剪切

CRISPR/Cas系统中crRNA与tracrRNA（反式激活的crRNA）形成嵌合RNA分子，即单向导RNA（Single guide RNA, sgRNA）。sgRNA可以介导Cas9蛋白在特定序列处进行切割，形成DNA双链断裂（Double-Stranded Break, DSB），完成基因定向编辑等的各类操作。

### 3. 不同类型的CRISPR/Cas系统

根据功能元件的不同，CRISPR/Cas系统可以分为I类系统、II类系统和III类系统。这三类系统又可以根据其编码Cas蛋白的基因不同

而分为更多的亚类。不同类型CRISPR/Cas系统完成干扰的步骤也有所不同（图12）。

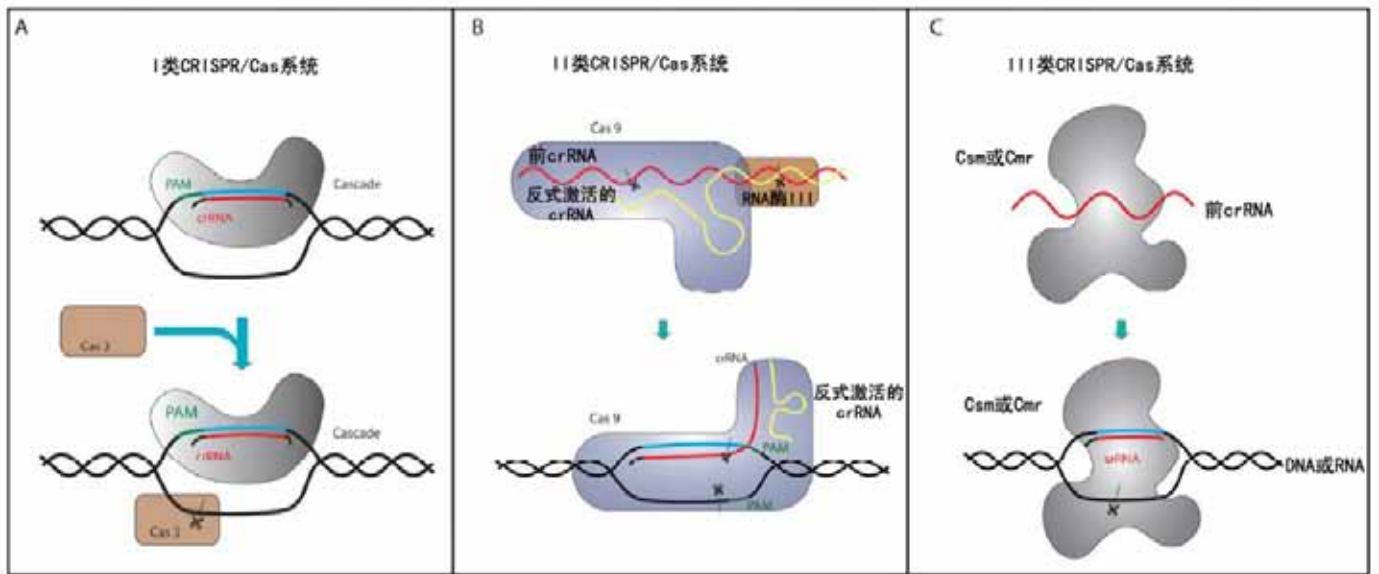


图12 三种不同的CRISPR/Cas干扰系统作用步骤。CRISPR/Cas系统根据分类有三种，其共同特点是都具有DNA区域（蓝色）、靶向crRNA（红色）和原间隔物模块（PAM，绿色）。在I类系统（A）中，入侵的DNA有Cascade:crRNA复合体识别，PAM模块则能促进外源性DNA的识别，随后核酸酶Cas3被募集并将目标DNA降解。在II类系统（B）中，只需要单独的Cas9蛋白即可完成干扰，并不依赖一个多蛋白复合体，Cas9和反式激活的crRNA（tracrRNA）、前crRNA（pre-crRNA）形成复合体，该复合体促使RNA酶III将前crRNA加工为成熟的crRNA。在III类系统（C）中，一个多蛋白复合体（Csm或Cmr）或Cas6促进前crRNA转化为成熟的crRNA，最终导致目标DNA的降解。

图片来源：Hagen Richter, Lennart Randau and André Plagens. (2013) Exploiting CRISPR/Cas: Interference Mechanisms and Applications. *International Journal of Molecular Science*, 2013, 14, 14518-14531.

I类和III类CRISPR/Cas系统进行干扰时只需要crRNA和Cas蛋白两种元件的参与，而II类CRISPR/Cas系统包括crRNA、tracrRNA和Cas蛋白三种元件。其中II类CRISPR/Cas系统最先在改造后用于小鼠和人类基因组编辑，同时也是目前研究最为充分的系统。根据Cas蛋白的类型不同分为三个亚类：II-A类含

有Cas1、Cas2、Cas9和Csn2样蛋白；II-B类含有Cas1、Cas2、Cas4和Csn12样Cas9四种蛋白；II-C类则有Cas1、Cas2及Cas9三种蛋白。此外，II类CRISPR/Cas系统也是目前最常用于人工基因组编辑的CRISPR/Cas系统，其靶向基因组编辑的步骤如图13所示。

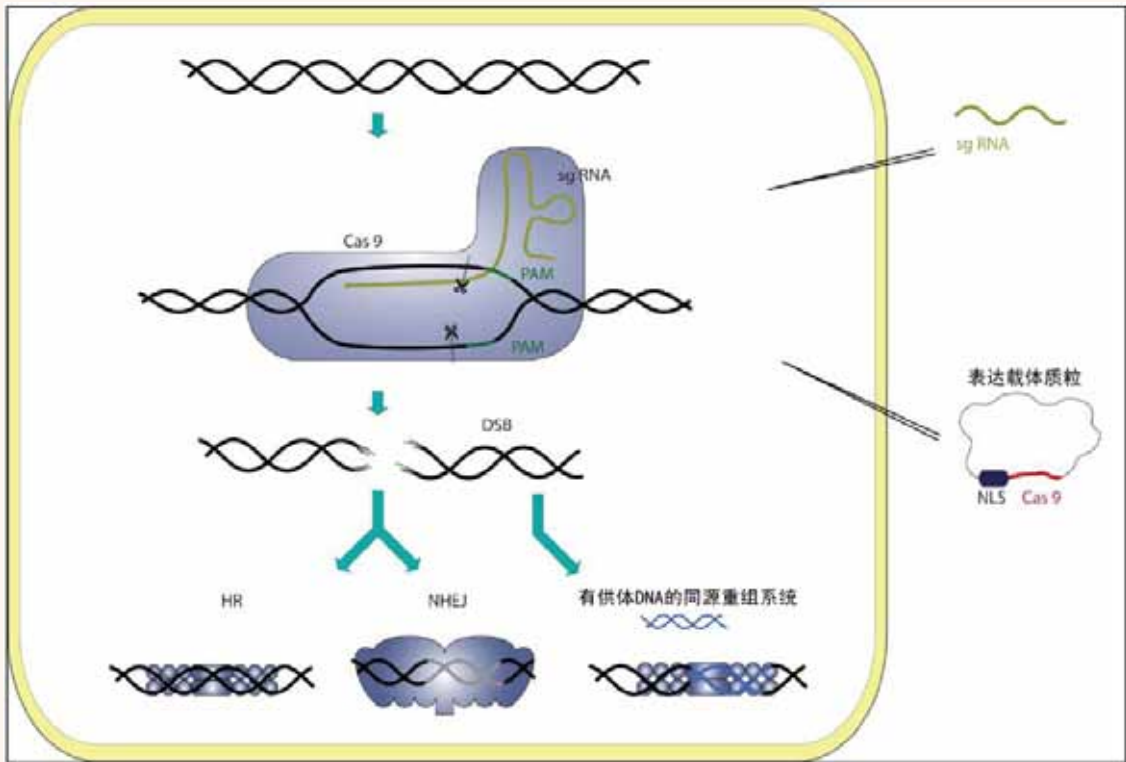


图13 利用一段小向导RNA (sgRNA):Cas复合体系统靶向基因组编辑的步骤。将编码密码子优化的Cas9 (红色) 序列、一段核定位序列 (NLS) 和一段包括目标靶序列的小向导RNA (sgRNA, 黄色) 序列同时构建在一个质粒中, 再将质粒转染进目标细胞。一个有功能的sgRNA:Cas9干扰复合体会在细胞内完成组装, 该复合体会在PAM结构的上游目标DNA序列上诱导产生一个双链断裂 (DSB), 而DSB则能被宿主细胞的DNA修复系统、同源重组系统 (HR) 和非同源末端连接途径 (NHEJ) 修复。HR系统以宿主的等位基因为模板复原野生型序列, 将序列恢复为断裂前的状态; 而容易出错的NHEJ系统则会在目标位点 (灰色) 引入插入和删失。使用一段合成的供体DNA模板与Cas系统质粒共转染, 可以诱导HR (蓝色), 提高编辑效率。

图片来源: Hagen Richter, Lennart Randau and André Plagens. (2013) Exploiting CRISPR/Cas: Interference Mechanisms and Applications. *International Journal of Molecular Science*, 2013, 14, 14518-14531.

## 4. CRISPR技术的应用

自1987年大阪大学 (Osaka University) 的研究人员在细菌的天然免疫系统中发现CRISPR/Cas系统以来, CRISPR作为一种潜在技术在很长时间内都没有得到重视与发展。近年来, 由于基因工程技术的突飞猛进, CRISPR/Cas俨然已经成为科学界最炙手可热的热点之一, 被广泛应用于各类体内和体外体系的遗传学改造、转基因模式动物的构建, 甚至基因治疗领域。

2013年初的《科学》第339卷第6121期连载了两篇具有重要意义的CRISPR技术论文, 其中一篇描述的是麻省理工学院 (Massachusetts Institute of Technology, MIT) Zhang的研究组使用CRISPR技术完成了多重基因组编辑, 另一篇描述了哈佛医学院 (Harvard Medical School) Church的研究组首次使用CRISPR技术完成了RNA介导的人类基因组编辑 (图14)。他们使用基因工程



同年，中国科学院动物研究所周琪研究员利用CRISPR-Cas技术在大鼠中实现了多基因同步敲除；而怀特海德研究所（Whitehead Institute）的 Jaenisch利用CRISPR-Cas技术构建了条件敲除的小鼠转基因模型；北京大学生命科学学院的瞿礼嘉教授课题组利用

CRISPR-Cas系统成功地实现了对水稻特定基因的定点突变；杜克大学Pratt工程学院基因组科学研究所的Gersbach研究组则已经开始尝试使用CRISPR技术进行基因治疗。仅这一年内，CRISPR/Cas领域就取得了如此多鼓舞人心的突破，简直可以用一日千里来形容了。



## 资讯 · 频道

[www.LifeOmics.com](http://www.LifeOmics.com)

## 特约编辑招聘启事

为了及时收集生命科学最新资讯、提高《生命奥秘》办刊质量，现面向从事生命科学或对这学科有浓厚兴趣的科研人员、学生诚聘特约编辑（兼职）。

### 岗位职责：

独立完成《生命奥秘》专题的策划：对基因组学、蛋白组学、生物信息学和细胞生物学等学科的发展以及生物医学领域相关技术（例如基因诊断技术、干细胞和克隆技术、生物芯片技术等）的应用进行翻译及深入评述。

选题要求内容新颖、评述精辟、注重时效和深入浅出。尤其欢迎以自身系统研究为基础的高水平译述与评论，结合所从事的科研工作提出自己的见解、今后设想或前瞻性展望。

### 要求：

- 1.具备基因组学、蛋白组学、生物信息学、细胞生物学等生命科学学科背景；
- 2.具备良好的生命科学前沿触觉；
- 3.具备较高的外文文献翻译、编译水平；
- 4.具备较强的选题策划、资料搜集、组织能力，以及专业稿件撰写能力；
- 5.具有高级职称；或者拥有（正在攻读）该领域的最高学位。

有意者请将个人简历发送至 [editor@lifeomics.com](mailto:editor@lifeomics.com)

## 四、三种基因定点修饰技术的总结与比较

### 1. TALEN、ZFN和CRISPR/Cas的共同点

从分子生物学角度来看，基因定点修饰操作可以分为敲入（knock in）、敲除（knock out）、删失（deletion）及基因融合（gene integration）这几种类型。而其中敲除又有

多重敲除（multiplex knockout）和条件敲除（conditional knockout）等特殊类型，本质上均是利用非同源末端连接途径（NHEJ）修复和同源重组（HR）修复，联合特异性DNA的靶向识别及核酸内切酶完成的DNA序列改变，其总体模式如图15所示。

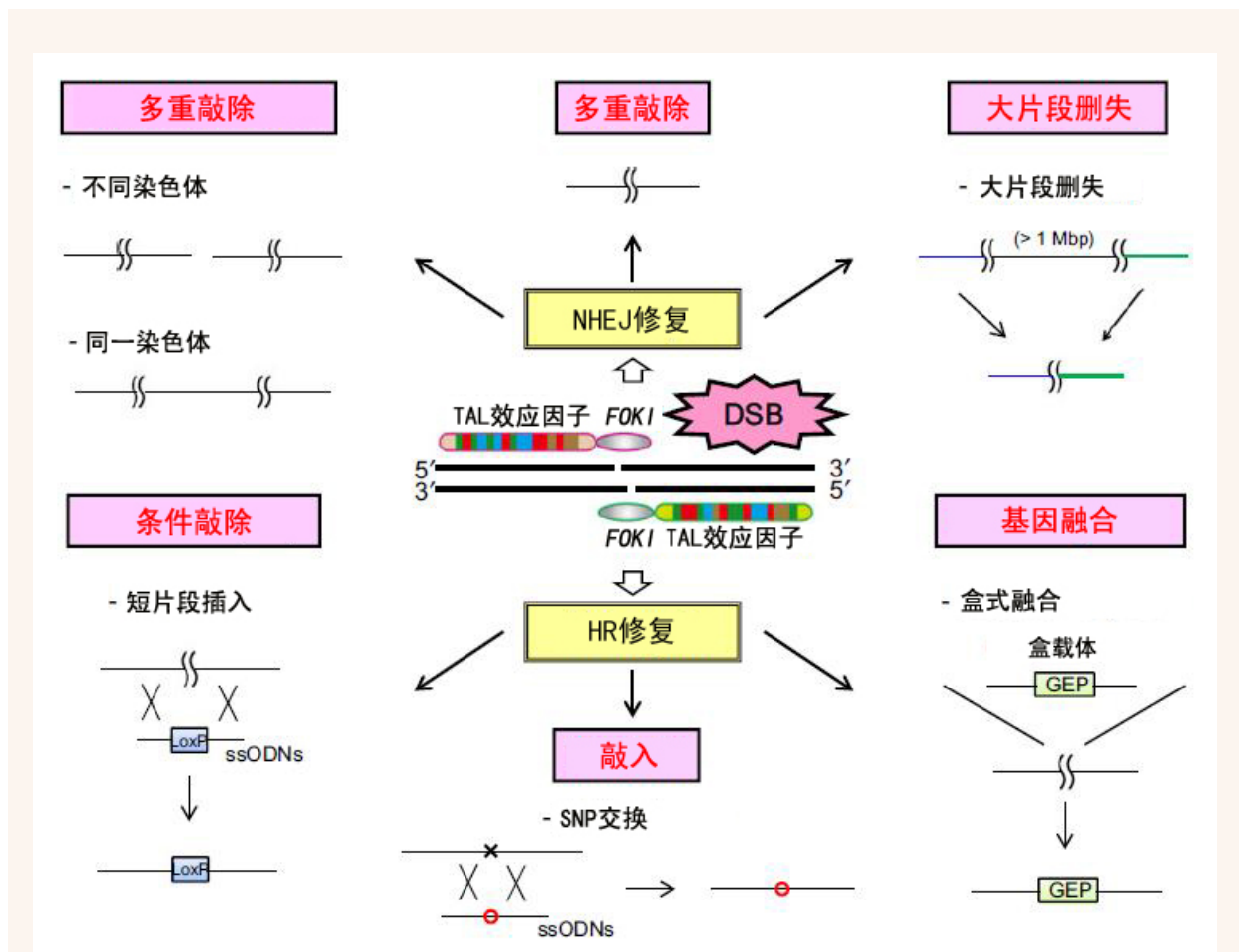


图15 使用 TALEN、ZFN和CRISPR等技术的分子生物学途径示意图。

图片来源: Tomoji Mashimo. (2014) Gene targeting technologies in rats: Zinc finger nucleases, transcription activator-like effector nucleases, and clustered regularly interspaced short palindromic repeats. *Development Growth Differentiation*, 56(1): 46–52.



近年来TALEN、ZFN和CRISPR/Cas三大基因定点修饰技术已经广泛应用于生命科学与医学的各个方面，包括但不局限于转基因动植物模型的构建、基因治疗及转基因育种等。虽然TALEN、ZFN和CRISPR/Cas三种技术在

技术细节上有着各自独一无二的特色，但它们在各类应用中的基本模式却是相似的，例如在转基因大鼠的构建上，三种技术均是以显微注射的方式进入大鼠胚胎的（图16）。

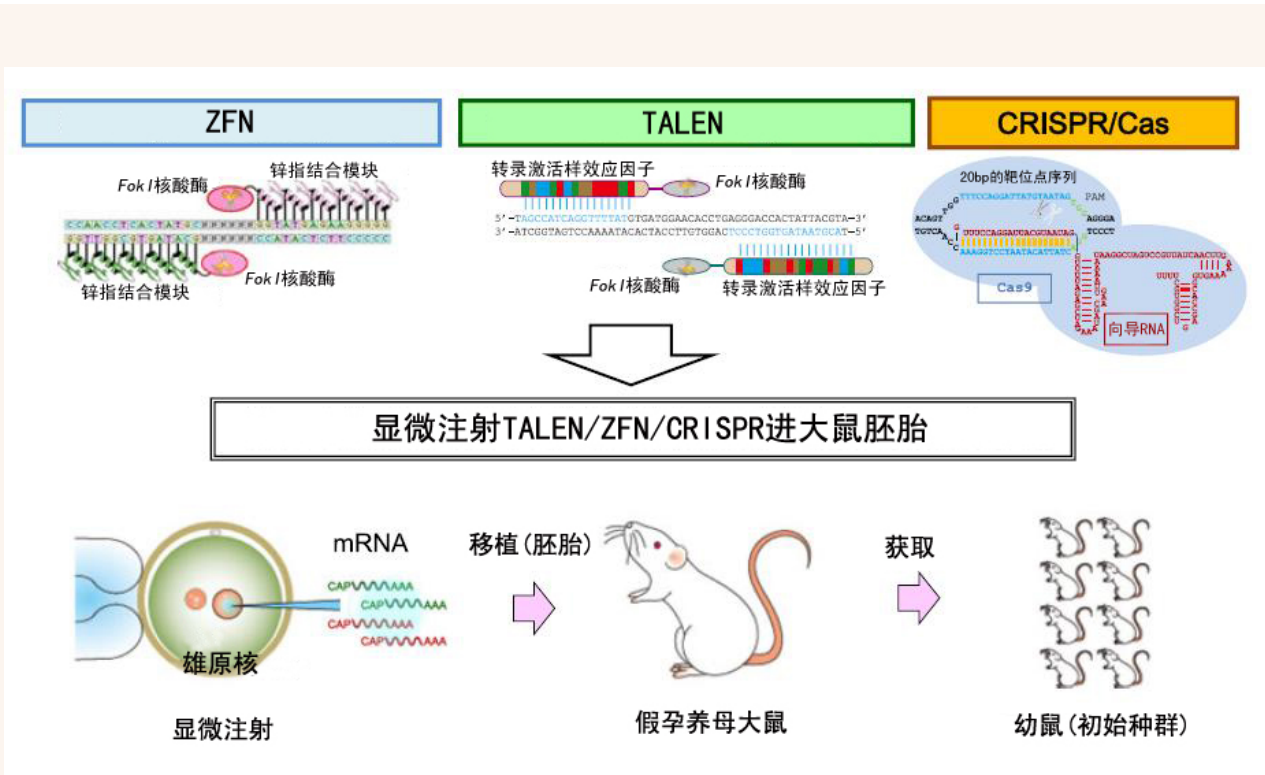


图16 使用基因工程学方式构建基因靶向敲除大鼠的示意图。在大鼠（rat）胚胎中以显微注射的方式使用TALEN、ZFN和CRISPR等技术进行基因打靶。

图片来源: Tomoji Mashimo. (2014) Gene targeting technologies in rats: Zinc finger nucleases, transcription activator-like effector nucleases, and clustered regularly interspaced short palindromic repeats. *Development Growth Differentiation*, 56(1): 46–52.

## 2. TALEN、ZFN和CRISPR/Cas的技术特点

虽然TALEN、ZFN和CRISPR/Cas均能用于与基因组定点修饰相关的各类操作，应用范围有很大程度的重合，但是这三种技术有各自

不同的技术特点和适用范围（表1），因此实际操作中，实验者都会根据实际需要选择合适的基因组定点修饰技术方案。

表1 TALEN、ZFN和CRISPR/Cas三种基因定点修饰技术特点的比较

	TALEN	ZFN	CRISPR/Cas9
靶点DNA序列的识别区域	重复可变双残基 (RVD) 的重复	锌指 (ZF) 结构域	CRISPR RNA (crRNA) 或向导RNA (gRNA)
DNA的剪切	FokI核酸酶结构域	FokI核酸酶结构域	Cas9蛋白
典型核酸酶的构建当时	8-31个重复可变双残基的拼接	通过搜索各类ZF组合数据库, 拼接3-4个ZF结构	gRNA的寡核苷酸合成和分子克隆 (或RNA合成)
所识别的靶位点大小	(8-31 bp) * 2	(9或12 bp) * 2	20bp + “NGG” * 1
最小模块识别碱基数	1	3	1
优点	设计较ZFN简单、特异性高	平台成熟、效率高于被动同源重组	靶向精确、脱靶率低、细胞毒性低、廉价简便
缺点	细胞毒性、模块组装过程繁琐、需要大量测序工作、一般大型公司才有能力开展、成本高	设计依赖上下游序列、脱靶率高、具有细胞毒性	靶区前无PAM则不能切割、特异性不高、NHEJ依然会产生随机毒性

表格来源: Hongmei Lisa Li, Takao Nakano, and Akitsu Hotta. (2014) Genetic correction using engineered nucleases for gene therapy applications. *Development Growth Differentiation*, 56(1): 63-77.

TALEN技术是目前商业化最成功的技术, 虽然将单个的TALEN模块进行组装需要大量的分子克隆和测序操作, 十分繁琐, 但是很多商业公司可以提供组装好的三联密码子TALEN模块, 甚至四联密码子TALEN模块, 这样就大大缩短了构建TALEN元件的实验周期。不过也正是因为如此, 绝大多数实验室都难以自行完成TALEN技术的完整操作, 对其推广造成了障碍。

ZFN技术则是最早被广泛使用的基因组定点修饰技术, 各大平台均比较完善, 有很多可以直接使用的资源, 然而由于其自身的三联属性, 其设计比TALEN更为繁琐, 而且高度依赖于目标序列及其上下游序列, 还具有脱靶率高及细胞毒性大等诸多限制性因素。

CRISPR/Cas技术摆脱了合成并组装具有特异性DNA识别能力蛋白模块的繁琐操作, 其gRNA的设计和合成工作量远远小于TALEN和ZFN技术的DNA识别模块的构建过程, 且毒性远远低于ZFN技术。然而CRISPR/Cas技术也有上下文依赖性, 目前只能应用于上游有PAM序列的靶位。

TALEN、ZFN和CRISPR/Cas三大基因组定点修饰技术应用于各个生物医学领域的历史都并不长, 但近年来发展无比迅速, 积累了大量的网络资源和平台资源。以模式动物果蝇 (*Drosophila melanogaster*) 的基因组定点修饰为例, 目前可查的基因组定点修饰相关数据库已经多达十七个 (表2)。

表2 现有的TALEN、ZFN及CRISPR相关设计数据库资源

	网址	基本功能
TAL effector	<a href="http://www.genome-engineering.org/taleffectors">http://www.genome-engineering.org/taleffectors</a>	TALEN 信息资源
CRISPR	<a href="http://www.genome-engineering.org/crispr">http://www.genome-engineering.org/crispr</a>	CRISPR 信息资源
TALEN targeter	<a href="https://tale-nt.cac.cornell.edu">https://tale-nt.cac.cornell.edu</a>	TALEN设计
TALengineering	<a href="http://www.talengineering.org">http://www.talengineering.org</a>	TALEN 信息资源
E-TALEN	<a href="http://www.e-talen.org/E-TALEN">http://www.e-talen.org/E-TALEN</a>	TALEN设计
E-CRISP	<a href="http://www.e-crisp.org/E-CRISP/">http://www.e-crisp.org/E-CRISP/</a>	CRISPR/gRNA设计
flyCRISPR	<a href="http://flycrispr.molbio.wisc.edu/">http://flycrispr.molbio.wisc.edu/</a>	果蝇特异性的CRISPR/gRNA设计
oxfCRISPR	<a href="http://groups.mrcfgu.ox.ac.uk/liu-group/useful-links/oxfcrispr/oxfcrispr">http://groups.mrcfgu.ox.ac.uk/liu-group/useful-links/oxfcrispr/oxfcrispr</a>	果蝇特异性的CRISPR/gRNA设计
CRISPR flydesign	<a href="http://www.crisprflydesign.org/">http://www.crisprflydesign.org/</a>	果蝇特异性的CRISPR/gRNA设计
DRSC	<a href="http://www.flyrnai.org/crispr/">http://www.flyrnai.org/crispr/</a>	可搜索到的所有果蝇gRNA靶点列表
Cas9 guide RNA design	<a href="http://cas9.cbi.pku.edu.cn">http://cas9.cbi.pku.edu.cn</a>	针对模式系统的gRNA设计
flyCas9	<a href="http://www.shigen.nig.ac.jp/fly/nigfly/cas9/index.jsp">http://www.shigen.nig.ac.jp/fly/nigfly/cas9/index.jsp</a>	果蝇特异性的CRISPR/gRNA设计
EENdb	<a href="http://eendb.zfgenetics.org/index.php">http://eendb.zfgenetics.org/index.php</a>	工程核酸酶数据库
Addgene	<a href="http://www.addgene.org/genome_engineering">http://www.addgene.org/genome_engineering</a>	质粒数据信息库
Mojo hand	<a href="http://www.talendesign.org">http://www.talendesign.org</a>	TALEN设计
ZiFiT targeter	<a href="http://zifit.partners.org/ZiFiT">http://zifit.partners.org/ZiFiT</a>	TALEN、ZFN及CRISPR设计

表格来源: Kelly J. Beumer, and Dana Carroll. (2014) Targeted genome engineering techniques in *Drosophila*. *Methods*, in press, DOI: 10.1016/j.ymeth.2013.12.002.

由于在技术特征方面存在区别, TALEN、ZFN和CRISPR/Cas作为不同的技术在研究领域上虽然有极高重复度, 但一些特殊的研究领域, 在这几种基因组修饰工具的选

择上, 依然具有较强的偏好性。例如在基因治疗领域, 不同技术在应用上也有不同的分工(表3)。

表3 工程修饰的核酸酶在人类遗传病治疗中的研究

	定向核酸酶	细胞类型	疾病	病因	矫正方式	作者及年份
破坏	ZFN	CD4+ T	艾滋病	HIV感染	破坏CCR5阴性细胞	Perez 2008
	ZFN	CD34+ HSCs	艾滋病	HIV感染	破坏CCR5阴性细胞	Holt 2010
	CRISPR	CD4+ T	艾滋病	HIV感染	破坏HIV的LTR区域	Ebina 2013
	TALEN	iPSC	丙型肝炎	HCV感染	破坏APOB阴性细胞	Ding 2013
	TALEN	融合的真皮成纤维细胞	卡恩斯-塞尔综合征	mtDNA中的5kb删失	破坏突变了mtDNA	Bacman 2013
移码	ZFN	成肌细胞	杜氏肌营养不良症	外显子51、51-53或51-60删失	外显子50处(1+3n)移码突变	Rousseau 2011
	TALEN	永生化的成肌细胞	杜氏肌营养不良症	外显子48-50删失	外显子50处(2+3n)移码突变	Ousterout 2013
	ZFN	CD4+ T	X连锁的SCID	IL2R $\gamma$ 的5号外显子移码突变	外显子5有1bp的移码突变	Umov 2005
敲入	ZFN	永生化的B淋巴细胞	X连锁的SCID	IL2R $\gamma$ 在5号外显子处或其后切断	IL2R $\gamma$ 的cDNA(外显子5-8)敲入	Lombardo 2007
	ZFN	小鼠肝脏	乙型肝炎	F9 Y155终止	hF9 cDNA(外显子2-8)敲入	Li 2011
	ZFN	iPSC	唐氏综合症	21三体	Xist敲入使多出的21号染色体失活	Jiang 2013
替换	ZFN	iPSC	帕金森症	a-synuclein	点突变 Thr53Ala	Soldner 2011
	ZFN	iPSC	镰刀形红细胞贫血病	b-globin	点突变 Val6Glu	Zou 2011
	ZFN	iPSC	镰刀形红细胞贫血病	b-globin	点突变 Val6Glu	Sebastiano 2011
	ZFN	iPSC	代谢性肝病	a1-antitrypsin	点突变 Lys342Glu	Yusa 2011
	TALEN	iPSC	代谢性肝病	a1-antitrypsin	点突变 Lys342Glu	Choi 2013
	TALEN	iPSC	大疱性表皮松解	COL7A1	点突变 Stop613Arg	Osborn 2013
	TALEN	融合的真皮成纤维细胞	遗传性视神经张力障碍	MT-ND6	点突变 Ala72Val	Bacman 2013



## 参考文献

1. Thomas Gaj, Charles A. Gersbach, and Carlos F. Barbas III. (2013) ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends in Biotechnology*, 31(7): 397-405.
2. Yongsub Kim, Jiyeon Kweon, Annie Kim, Jae Kyung Chon, Ji Yeon Yoo, Hye Joo Kim, Sojung Kim, Choongil Lee, et al. (2013). A library of TAL effector nucleases spanning the human genome. *Nature Biotechnology*, 31(3): 233-239.
3. Yongsub Kim, Jiyeon Kweon, Annie Kim, Jae Kyung Chon, Ji Yeon Yoo, Hye Joo Kim<sup>1</sup>, Sojung Kim, et al. (2013) A library of TAL effector nucleases spanning the human genome. *Nature Biotechnology*, 31(3): 251-260.
4. Chuanxian Wei, Jiyong Liu, Zhongsheng Yu, Bo Zhang, Guanjun Gao, Renjie Jiao. (2013) TALEN or Cas9 e Rapid, Efficient and Specific Choices for Genome Modifications. *Journal of Genetics and Genomics*, 40(1): 281-289.
5. Qiurong Ding, Youn-Kyoung Lee, Esperance A.K. Schaefer, Derek T. Peters<sup>1</sup>, Adrian Veres, Kevin Kim, Nicolas Kuperwasser, et al. (2012) A TALEN genome-editing system for generating human stem cell-based disease models. *Cell Stem Cell*, 12(2): 238–251.
6. Victoria M. Bedell, Ying Wang, Jarryd M. Campbell, Tanya L. Poshusta, Colby G. Starker, Randall G. Krug II, et al. (2012) In vivo genome editing using a high-efficiency TALEN system. *Nature*, 491(7422): 114-118.
7. Yang J, Zhang Y, Yuan P, et al. Complete decoding of TAL effectors for DNA recognition. *Cell research*, 2014, in press.
8. Dana Carroll. (2011) Genome engineering with zinc-finger nucleases. *Genetics*, 188(4): 773-82.
9. Dana Carroll. (2008) Zinc-finger Nucleases as Gene Therapy Agents. *Gene Therapy*, 15(22): 1463–1468.
10. Palpant NJ, Duzdzinski D. (2013) Zinc finger nucleases: looking toward translation. *Gene Therapy*, 20(2):121-7.
11. Severine Remy, Laurent Tesson, Severine Menoret, Claire Usal, Andrew M. Scharenberg, Ignacio Anegon. (2010) Zinc-finger nucleases: a powerful tool for genetic engineering of animals. *Transgenic Research*, 19(1): 363–371.
12. Eva-Maria Händel, and Toni Cathomen. (2011) Zinc-Finger Nuclease Based Genome Surgery: It' s All About Specificity. *Current Gene Therapy*, 11(1): 28-37.
13. NJ Palpant, and D Duzdzinski. (2013 ) Zinc finger nucleases: looking toward translation. *Gene Therapy*, 20: 121-127.
14. Seokjoong Kim, and Jin-Soo Kim. (2011) Targeted genome engineering via zinc finger nucleases. *Plant Biotechnology Reports*, 5(1): 9-17.
15. Wu J, Kandavelou K, and Chandrasegaran S. (2007) Custom-designed zinc finger nucleases: what is next? *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64(22): 2933-2944.
16. Rodolphe Barrangou<sup>1</sup>, and Philippe Horvath. (2012) CRISPR: New Horizons in Phage Resistance and Strain Identification. *Annual Review of Food Science*, 3(1): 143-162.
17. Hagen Richter, Lennart Randau, and André Plagens. (2013) Exploiting CRISPR/Cas: Interference Mechanisms and Applications. *International Journal of Molecular Science*, 14(1): 14518-14531.
18. Le Cong, Ann Ran, David Cox, Shuailiang Lin, Robert Barretto, Naomi Habib, et al. (2013) Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 339(6121): 819-823.
19. Prashant Mali<sup>1</sup>, Luhan Yang, Kevin M. Esvelt, John Aach, Marc Guell<sup>1</sup>, James E. DiCarlo, Julie E. Norville<sup>1</sup>, George M. Church. (2013) RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*, 339(6121): 823-826.
20. Wenyan Jiang, David Bikard, David Cox, Feng Zhang, and Luciano A Marraffini. (2013) RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems. *Nature Biotechnology*, 31(3): 233-239.
21. Woong Y Hwang, Yanfang Fu, Deepak Reyon, Morgan L Maeder, Shengdar Q Tsai, Jeffrey D Sander, Randall T Peterson, J-R Joanna Yeh, and J Keith Joung. (2013) Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. *Nature Biotechnology*, 31(3): 227-229.
22. Judith Reeks, James H. Naismith, and Malcolm F. White. (2013) CRISPR interference: a structural perspective. *Biochemistry Journal*, 453(1): 155–166.
23. Kelly J. Beumer, Jonathan K. Trautman, Michelle Christian, Timothy J. Dahlem, Cathleen M. Lake, R. Scott Hawley, David J. Grunwald, Daniel F. Voytas, and Fand Dana Carroll. (2013) Comparing zinc finger nucleases and transcription activator-like effector nucleases for gene targeting in *Drosophila*. *Genes Genomes Genetics*, 3(10): 1717-1725.
24. Hongmei Lisa Li, Takao Nakano, and Akitsu Hotta. (2014) Genetic correction using engineered nucleases for gene therapy applications. *Development Growth Differentiation*, 56(1): 63-77.
25. Tomoji Mashimo. (2014) Gene targeting technologies in rats: Zinc finger nucleases, transcription activator-like effector nucleases, and clustered regularly interspaced short palindromic repeats. *Development Growth Differentiation*, 56(1): 46–52.

26. Kelly J. Beumer, and Dana Carroll. (2014) Targeted genome engineering techniques in Drosophila. *Methods*, in press, DOI: 10.1016/j.ymeth.2013.12.002.
27. Tomonori Katsuyama, Arslan Akmammedov, Makiko Seimiya, Samuel C. Hess, Cem Sievers and Renato Par. (2013) An efficient strategy for TALEN-mediated genome engineering in Drosophila. *Nucleic Acids Research*, 41(17): e163-171.
28. Tetsushi Sakuma, Hiroshi Ochiai, Takehito Kaneko, Tomoji Mashimo, Daisuke Tokumasu, et al. (2014) Repeating pattern of non-RVD variations in DNA-binding modules enhances TALEN activity. *Science Report*, 3(3379): 1-8.



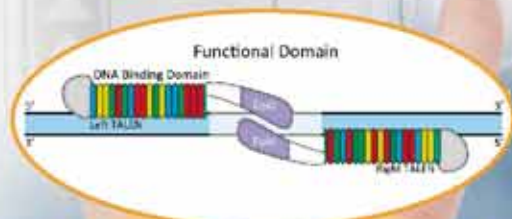
# 百态 · 频道

[www.LifeOmics.com](http://www.LifeOmics.com)

# 基因组编辑工具—CRISPR & TALEN

● 快速交货

● 保证序列

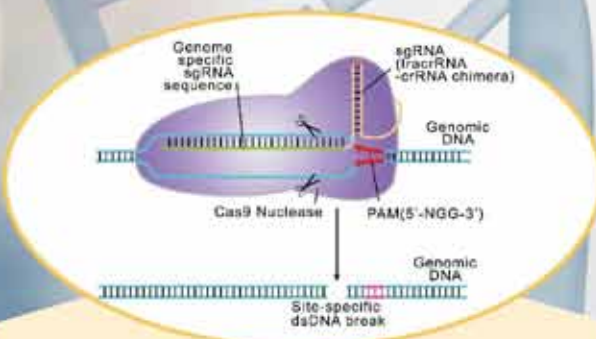


## Genome-TALER™ TALEN 和 TALE-TF 定制服务

— 应用于基因敲除或敲入、靶基因激活

专为精确、快速的基因组编辑实验而设计。提供多层次的TALENs, TALE-TFs和其他基于TALE的靶向基因组修饰工具的设计、构建和验证服务。

¥ 4800元起



## Genome-CRISP™ CRISPR-Cas9 产品与服务

— 应用于基因敲除或敲入

专为简单、快速的基因组编辑实验而设计。提供多层次的CRISPR-Cas9 sgRNA设计、克隆构建、功能验证及其他相关服务。

¥ 2800元起



## 人类 AAVS1 safe harbor 基因敲入试剂盒及敲入克隆

— 应用于基因敲入

通过TALEN或CRISPR-Cas9系统介导的同源重组，将您的目标基因、筛选标记或其他遗传因子靶向敲入人类第19号染色体上的(AAVS1 safe harbor)安全敲入位点。在AAVS1位点上插入外源基因片段能保证转入基因片段的功能，对细胞无已知的副作用。超过18,000个经过序列确证的ORF敲入克隆可供选择。

## 比较TALEN与CRISPR-Cas9系统的应用

特性	TALEN	CRISPR-Cas9
识别方式	蛋白质-DNA	RNA-DNA
甲基化敏感性	敏感	不敏感
染色质结构敏感性	敏感	敏感
多基因（位点）靶向编辑	较少使用	可使用
脱靶效应	极低	潜在脱靶效应较TALEN和ZFN高

## 相关服务

服务	TALEN	CRISPR-Cas9
细胞水平功能验证	代理报告基因检测	✓
染色体水平功能验证	T7核酸内切酶I酶切检测	✓
	qPCR检测	✓
供体克隆服务	设计与构建	✓
稳转细胞株服务	筛选单克隆细胞株	✓
	构建稳转细胞库	✓

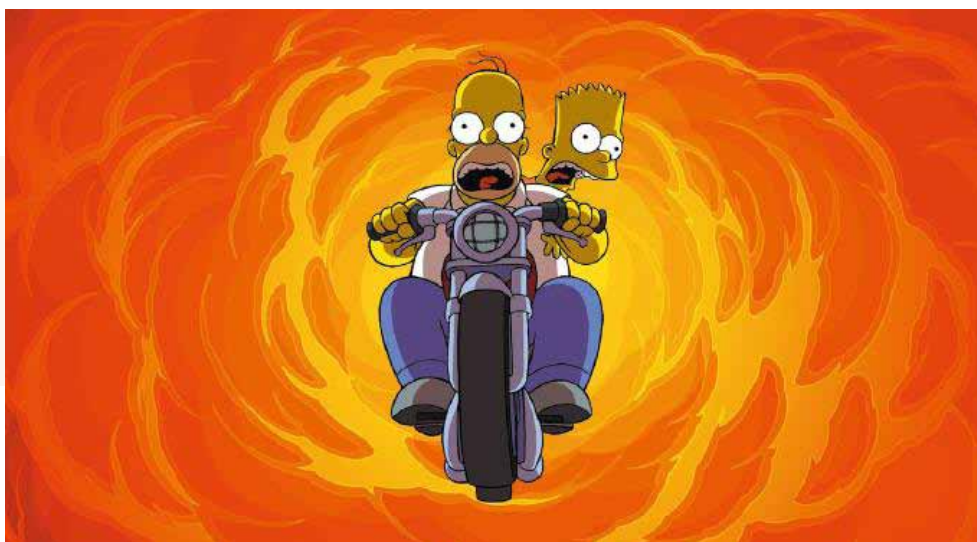


官方微信账号  
Mr.Gene

# 热点

*Hot Topics*

## 父辈的印记



遗传的作用可能会超过基因的作用，但是相关机制还是个未解之谜。

去年10月，Brian Dias当上了爸爸，他有了一个儿子。他和全天下所有父亲一样，对今后即将面对的责任感到了一股莫名的焦虑。因

为从那一刻起，他所做的每一个决定都将影响儿子未来的发育，包括身体上的和心理上的。但是和其他父母不同的是，Dias非常清楚自



己过去的经历可能会对孩子带来一些影响，如果算上他父母，他祖父母，他太祖父父母的经历，那就更多了。

一个人的祖先住在哪，或者他们对教育的重视程度如何，这些信息都能够一代代地遗传下去。可是祖先的健康情况、是否吸烟、耐饥饿程度如何，是否参加过战争，这些信息也会遗传下去吗？

作为美国埃莫里大学（Emory University in Atlanta, Georgia）Kerry Ressler实验室的博士后，Dias在他儿子出生之前，已经花了两年多的时间，想通过小鼠动物试验来回答上面那些问题。他尤其关注的一个问题是与恐惧相关的某种气味对小鼠会产生怎样的影响，这种影响又会给小鼠后代的大脑留下什么样的印记。

Dias首先让雄性小鼠接触苯乙酮（acetophenone），这是一种镇静催眠药，闻起来有一种甜甜的杏仁味，然后再对这些小鼠的足部给予一个较轻的电击刺激。这些小鼠每天都被这样“折腾”5次，连续3天之后，它们对杏仁味就非常害怕了，再闻到杏仁味时就会被吓得一动不动，哪怕没有被电击也是如此。

10天之后，Dias让这些雄性小鼠与正常的雌性小鼠进行交配。这些小鼠的后代成年之后，其中有很多都对杏仁味非常敏感，而且在它们闻到杏仁味时，如果突然出现一点噪声，这些小鼠也更容易被吓住。这些小鼠的后代，即第一代实验鼠的“孙辈”在有杏仁味的环境中也会显得更加的神经过敏。除了这些生理反应之外，这三代小鼠还有一个共同点，那就是它们鼻腔里的M71神经纤维球（M71 glomeruli）明显要比其它小鼠大一些，这些M71神经纤维球是鼻腔内专门感受杏仁味，并且将信号传递给大脑嗅球（olfactory bulb）神经元细胞的结构。Dias和Ressler在今年1月出版的《自然 神经科学》（*Nature Neuroscience*）杂志上发表文章称，这种环境因素的遗传现象应该也属于表观遗传学

（epigenetics）的范畴。所谓表观遗传学指的就是基因组上的一种化学修饰现象，这种作用可以在不改变基因序列的前提下影响DNA的包装和基因表达。

生物学家们是在植物中第一次观察到这种表观遗传现象的。比如西红柿就可以遗传一种非常重要的化学修饰模式，该修饰能够对一个与西红柿成熟相关的重要基因起到调控作用。但是近几年来科学家们也不断地发现，在啮齿类动物和我们人类自身中也能够观察到这种表观遗传现象。不过学界对这一观点还持有争议，其中有部分原因是因为这种观点很容易让大家联想到另外一个人，那就是19世纪的一位法国生物学家Jean-Baptiste Lamarck。Lamarck认为生物能够将获得性性状（acquired traits）遗传给下一代，不过很多人都不认可这种理论。美国马萨诸塞大学医学院（University of Massachusetts Medical School in Worcester）的分子生物学家Oliver Rando就指出，Lamarck的这种理论在我们现代生物学家看来实在是有点耸人听闻。不过Rando通过自己的研究也发现，在动物中的确存在这种遗传现象。他表示：“如果这是真的，为什么几百年来那么多优秀的科学家都没有发现呢？”

大家之所以对这种理论持怀疑态度，有一个很重要的原因就是没人知道这种遗传的具体机制是什么。要阐明这个问题，就得在生殖生物学（reproductive biology）方面下大工夫，才能搞清楚在生殖细胞（能够分化成为精子细胞和卵子细胞的细胞）中如何形成相关的信号，起码可以让我们一览人类遗传的神奇之处。

由于母亲在怀孕时就有可能将环境因素对母体造成的影响遗传给胎儿。因此，要清楚地研究这种表观遗传现象，生物学家们只能够将目标锁定在父亲身上，这些科学家们也一直在研究精子细胞是如何获得，或者失去这些表观遗传学修饰物的。据澳大利亚阿德莱德大学（University of Adelaide in Australia）的生

殖生物学家Michelle Lane介绍，在近两三年内，他们也取得了一些进展，掌握了一些新信

息。但是相关的机制研究也还处在“胚胎”水平，这对他们而言就是一个黑匣子。

## ► 植物怪兽和肥胖儿

表观遗传学革命开始于21世纪初期，当时科学家们开始不断地报告称，漫不经心的母亲、儿童时期遭受的虐待、高脂饮食、空气污染等各种环境因素都能够对DNA造成影响，在DNA上添加或者去除掉一些化学修饰物标签，起到控制基因表达，或者关闭基因表达的作用。不过十几年过去了，大家对这种观点还是存在争论（*Nature* 467,146–148; 2010）。而认为这种表观遗传学修饰物能够遗传给下一代的观点更是引发了巨大的争议。

瑞典植物学家Carl Linnaeus是第一个观察到这种遗传现象的人。Linnaeus在1740年获得了一份植物样本，这个植物看起来与普通的云兰（toadflax）属植物柳穿鱼（*Linaria vulgaris*）没什么区别，不过就是开出的花不一样。但是这在Linnaeus的眼里却非同寻常，因为按照当时的观念，植物是根据花的结构来进行分类的。于是他这样写到：“这件事就好像一头母牛生下了一个长着狼脑袋的小牛犊一样不可思议。”因此他将这株植物命名为Peloria，即希腊语“怪兽”的意思。

到了20世纪90年代，英国John Innes中心（John Innes Centre in Norwich, UK）的植物学家Enrico Coen发现，这种植物怪兽的

基因组中有甲基化基团（methyl groups）对Lcyc基因造成了影响，彻底抑制了该基因的表达（我们知道DNA甲基化修饰的常规作用就是关闭基因表达），而Lcyc基因就是与该植物花结构相关的重要基因。Coen的课题组还发现，这些甲基化修饰物能够遗传给下一代。

他们的科研成果发表之后一直到2000年代中期才第一次被人注意到。当时在欧洲开展了一个很大规模的表观遗传学研究工作，发现在人类中也存在这种表观修饰物遗传现象。还有一个对瑞典历史文献进行的回顾性研究发现，在青春期前经历过饥荒的男性的孙辈与普通人（不缺食物的人）相比，不太容易患上心脏病或者糖尿病。在英国也曾经对孩子们进行过类似的研究，该研究于2005年发表，他们发现在11岁之前就开始吸烟的男性，其后代超重的风险会大大升高。

不过很多科学家对此表示怀疑。因为表观遗传学研究往往都很散乱，很难排除一些混杂的变量。不过近几年来开展的几个啮齿类动物研究对上述结论提供了支持性的证据，而且也逐渐发现这些环境变量会对动物的精子细胞造成影响，将性状传递给精子细胞。

## ► 精子标记

比如用高脂食物喂养的雄性大鼠的雌性后代，胰腺中DNA甲基化的水平就会出现异常；用低蛋白食物喂养的雄性大鼠的后代，肝脏中胆固醇相关基因的表达水平也会发生改变。糖尿病前期（prediabetes）雄性大鼠的

精子细胞也会呈现出异常的甲基化修饰现象，它们的子辈和孙辈患上糖尿病的风险也要远远高过普通大鼠。

据负责低蛋白饮食试验的Rando介绍，他们很多人都已经观察到了这种来自父亲的影响

（遗传）作用，也花了很多时间研究这个问题，试图找出其中的作用机制。

动物研究引发了很大的争论。其中最具争议的一个试验结果就是美国华盛顿州立大学（Washington State University in Pullman）Michael Skinner实验室发表的结果。Skinner的课题组给怀孕的大鼠用了大剂量的杀虫剂（pesticides）和杀真菌剂（fungicides），这使得这些大鼠的子女在成年之后出现了器官损伤的现象。其中雄性后代的精子细胞出现了DNA甲基化修饰异常的现象，而且这种改变

至少被遗传了四代。

但是至少有两个实验室都没能重复出这个试验结果。2010年，美国联邦调查人员发现，Skinner实验室的1名博士后在另外一篇相关的文章中捏造了试验数据，该文章的作者在2009年时已经撤回了那篇文章。不过Skinner指出有一些实验室重复出了他们的试验结果，那些试验失败的人是因为试验方法有问题。去年，Skinner实验室又成功地重复出了当年那篇被撤回的文章所提出的试验结果。

## ► 甲基化作用机制

了解这种表观遗传机制非常困难，难点之一就在于在绝大部分相关的研究中所检测的指标，比如血糖、血脂、生育能力等方面的变化情况还会受到其它很多因素的影响，因此很难得出确定的因果关系结论。相比之下，Dias和Ressler的苯乙酮试验则充分利用了一条生物学规律和特性，即化学物质只能够与某个特定的受体结合，而该受体又只能由一个基因编码并表达，他们在这个实验中采用的就是苯乙酮和*Olf151*基因这一对组合，“这就是我们这个研究的最大特点。”Rando介绍说。

Dias和Ressler明确指出他们并没有发现具体的作用机制，但是他们拿出了一个说得通的理论假设。他们发现，不知道是什么原因，实验中屡次出现的恐惧气味信息让小鼠精子细胞中*Olf151*基因的甲基化修饰水平降低了。他们还进行了体外受精试验，排除了在交配过程中通过身体接触等其它渠道遗传这种恐惧因子的可能性。这种表观恐惧因子通过精子细胞遗传给了下一代，使子代小鼠鼻腔中*Olf151*受体的表达量升高，因此对苯乙酮的气味也更加敏感。

但是这条因果关系链还是不太牢靠。美国埃莫里大学的发育遗传学家William Kelly认

为，这条证据链中有很多断点，所以也只能算是一种可能而已，仅此而已。他们还是不知道环境因素信息在父辈和子代间是如何传递的。

第一个问题就是环境因素的作用是如何进入动物生殖细胞的？具体到Dias的试验就是苯乙酮味道这种恐惧因子是如何进入试验小鼠的精子细胞的？由于生殖细胞能够表达嗅觉受体，因此精子细胞中的*Olf151*受体有可能会感受到血液中的气味分子，从而使得精子细胞DNA的甲基化修饰状态发生了相应的改变。

另外一种可能就是，当试验小鼠经受了苯乙酮和电击刺激之后，它们可能会表达一些RNA分子（也许是在大脑中表达），然后这些RNA分子会进入血液循环系统，与精子细胞接触，特异性地对精子细胞的*Olf151*基因发挥作用。很多植物研究也都发现了这种全身性的RNA穿梭现象和机制。比如植物叶片中表达的RNA分子就可以经由植物的脉管系统到达其它位置，并且影响当地基因的表达水平。

但是给精子细胞加上一个表观遗传学标记这还只是第一步。这种表观遗传印记如果要遗传那么多代，那么信号就得先保证在经历了很多轮的表观遗传学重编程（epigenetic

reprogramming) 作用的“洗礼”之后还能够“历久弥新”。对于哺乳动物而言，这些表观遗传学重编程步骤在受孕之后的几个小时之内就已经启动了，还处于单细胞状态的胚胎此时就会“剥掉”源自精子细胞那一半DNA上的大部分甲基化修饰基因。随着胚胎的进一步发育和分裂，胚胎干细胞会逐步分化为各种组织细胞，在这个过程中会慢慢重建其甲基化修饰模式。即便源自父亲的某些表观遗传学修饰信号在这个过程中能够侥幸保存下来，但是胚胎自身的原生殖细胞 (primordial germ cell) 在将来动物成年之后会分化为精子细胞或卵子细胞之后，在繁衍过程中还是会再经受一次表观遗传学重编程过程，这种表观遗传学修饰信号怎么能够经受住这么多次的考验呢？

有一些基因会自己想办法躲过这个表观遗传学重编程过程。其中最著名的例子就是基因印记现象 (imprint)，即父方或母方的基因会持续保持甲基化修饰状态，基因表达被彻底关闭。精子或卵子细胞也会携带这种甲基化修饰物，而且一直将其携带到胚胎里。

目前已知具有基因印记效应的基因达到了100个左右，但还有很多非印记基因可能也

借助了同样的机制在逃避表观遗传学重编程作用的清洗。据加拿大麦基尔大学 (McGill University in Montreal, Canada) 的表观遗传学家 Sarah Kimmins 介绍，越来越多的人认为，在精子细胞中有更多的、超出了我们之前预计的DNA序列区域会逃避表观遗传学重编程作用的清洗。可是他们不知道为什么会这样，它们是怎么做到的。也许通过对印记基因的研究能够帮助他们发现一点线索。

让我们再回到 *Olf151* 基因上来，即便该基因也躲过了表观遗传学重编程作用的清洗，我们也很难解释它为什么会对后代的行为产生这么大的影响作用。据 Dias 和 Ressler 报道称，在他们从试验小鼠获得的精子样本中，每100个精子中大约有86个存在 *Olf151* 基因甲基化修饰的现象，在用另外一种气味进行试验的平行试验组中，每100个精子中大约有95个存在 *Olf151* 基因甲基化修饰的现象。这种差异是具有统计学意义的，但是差别并不大。而且实验鼠后代的行为也受到了明显的影响，在苯乙酮试验组中，有一半试验动物的后代对这种气味的敏感度都要高于普通小鼠。

## ▶ 另有其人

虽然有关这个遗传机制的问题让很多人挠头，也吸引了很多人来研究这个问题，但还是有一部分人不相信存在这种遗传，他们感觉这就好像是童话故事一般。Kelly 就引用 Rodgers 和 Hammerstein 版的音乐剧《灰姑娘》中的台词说道：“每天都在发生着不可能发生的事情。”

比如在 Dias 实验中观察到的DNA甲基化现象就有可能是另外一条作用机制完全不同的途径的“副产物”。

途径之一可能就是组蛋白 (组蛋白就是包裹着DNA的一种核蛋白) 修饰机制。乙酰基团 (Acetyl groups) 和甲基基团 (methyl

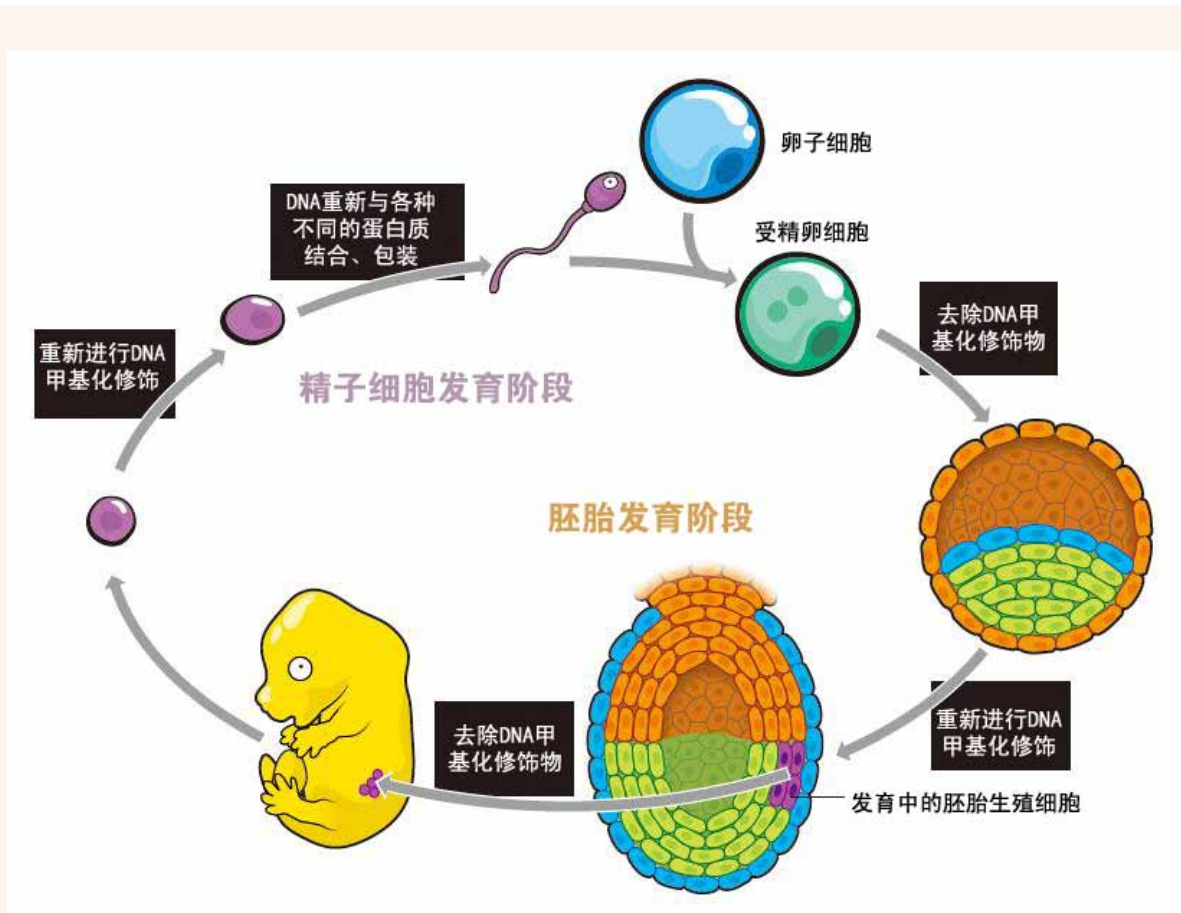
groups) 都能够连接到组蛋白上，影响相关DNA区域的表达。但是在精子细胞的形成过程中，DNA会与这些组蛋白脱离，转而与鱼精蛋白 (protamines) 结合，而且结合得更加紧密。

不过即便如此，还是有大约10%的组蛋白 (指的是我们人类，小鼠只有1%) 会被保留下来。这些位点就有可能起到传递表观遗传学修饰信息的作用。有科研人员在2011年发表文章称，线虫 (nematode worms) 体内的某些组蛋白修饰物可以伴随线虫终生，而且能够被遗传好几代。Kimmins 等人也在去年的12月称，她们发现用低叶酸 (这是构成甲基基团的

原材料) 饮食饲养的雄性小鼠, 其精子细胞中组蛋白的甲基化水平明显降低, 这些小鼠后代中发生出生缺陷的比例也明显增高。

其他一些研究也指出, 附着在DNA分子上, 对基因表达起调控作用的小RNA分子也可能与此遗传作用有关。2012年发表的一份调查报告显示, 在不吸烟的男性中, 他们的精子细胞内有28种microRNA的表达与

吸烟男子有差异。而且这些RNA分子的表达模式可以被遗传数代之久。去年, Lane的课题组发现, 肥胖雄性小鼠的精子细胞中也有11个microRNA的表达有异常情况, 这些microRNA分子能够将胰岛素抵抗 (insulin resistance) 的特性遗传给自己的子孙, 达两代之久。



彻底清洗一切痕迹。科研人员正在努力探究DNA甲基化修饰等表观遗传学标志物是如何在哺乳动物中一代代地遗传下去的。在胚胎发育过程中, 将来注定会发育成精子细胞的胚胎生殖细胞会经历一连串表观遗传学重编程作用, 即先去掉某些表观遗传学修饰物, 然后再添加一些表观遗传学修饰物, 来个彻底的改头换面。

因此Rando认为, 这种遗传机制也许还有另外一种可能, 也许是朊病毒 (prions)。朊病毒是一种折叠发生错误的蛋白质, 具有

传染性, 已经有研究发现, 朊病毒与出芽酵母 (budding yeast) 的某些可传递性状相关 (Nature 482,294–296; 2012)。当然也有

可能是精液里精子细胞之外的其它某些成分在起作用。有科研人员在今年1月报道称，精囊缺失的雄性小鼠的后代与对照组相比更肥胖，代谢问题也更严重，这说明精液中的某些成分也可能对精子细胞的基因表达，以及雌性动物的生殖道起到了一定的影响作用。

Rando估计，如果这种表观遗传机制与DNA甲基化、组蛋白，或者RNA分子有关，那么用不了几年我们就能够取得重大突破了，

不过他也同时说道：“但是如果与这些因素全都无关，我们也许又得在黑暗中再摸索几十年。”

Dias将于今年4月前往美国波士顿市，参加一个重要的表观遗传学学术会议，了解该领域最新的研究进展。他两手交叉在一起说道：“如果说科学教会了我什么，我认为那就是永远不要放弃继续追求科学的真相。”

原文检索：

Virginia Hughes. (2014) THE SINS OF THE FATHER. *Nature*, 507:22-24.



筱玥/编译

# qPCR试剂与验证引物

## —开学聚惠，好礼相送

针对基因和miRNA表达的定量检测，GeneCopoeia专业的研发团队研发并推出一整套基于SYBR Green I染料法的qPCR检测相关试剂。

活动期间，miRNA qPCR试剂**8折优惠!**

基因qPCR试剂**6折优惠!**

凡购买以下qPCR试剂，累积：

- ⊙ 满1980元，可获得**50元**京东购物卡
- ⊙ 满3880元，可获得**150元**京东购物卡
- ⊙ 满5000元，可获得**200元**京东购物卡
- ⊙ 满10000元，可获得价值**450元**全能九阳豆浆机一台
- ⊙ 满20000元，可获得**900元**京东购物卡



产品名称	货号	目录价	活动价格
miRNA 逆转录试剂盒	AMRT-0020	¥1380	¥1104
	AMRT-0050	¥3105	¥2484
miRNA qPCR Kit	AMPR-0200	¥1100	¥880
	AMPR-0600	¥3135	¥2508
	AMPR-1200	¥5940	¥4752
All-in-One™ miRNA qRT-PCR Detection Kit	AOMD-Q020	¥2380	¥1904
	AOMD-Q050	¥5680	¥4544
All-in-One™ qPCR Mix	AOPR-0200	¥555	¥333
	AOPR-0600	¥1580	¥948
	AOPR-1200	¥2997	¥1800
All-in-One™ First-Strand cDNA Synthesis Kit	AORT-020	¥360	¥216
	AORT-050	¥810	¥486

## 现货qPCR验证引物促销中

一次性购买基因qPCR验证引物10对以上，**6折优惠**

All-in-One™ qPCR引物	人、小鼠、大鼠基因上游和下游引物的混合液
All-in-One™ qPCR内参引物	人、小鼠、大鼠各3个持家基因的qPCR引物

同时购买同种miRNA的qPCR验证引物，第2、3、4...条**半价**

All-in-One™ miRNA qPCR引物	人、小鼠、大鼠特异的miRNA检测上游引物
All-in-One™ miRNA qPCR内参引物	人、小鼠、大鼠snRNA U6的特异检测上游引物

以上所有现货引物均经过qPCR实验验证，提供验证报告。**3**个工作日内即可送货

**活动时间：2014年3月15日—2014年6月15日**

## 基因与miRNA表达量检测芯片 (qPCR arrays)

基因表达量检测阵列	Exprofile™ Cancer Gene qPCR Arrays	癌症相关基因表达量检测
	Exprofile™ Pathway-Focused Gene qPCR Arrays	信号通路相关基因表达量检测
miRNA表达量检测阵列	miProfile™ miRNome qPCR Arrays	全基因组miRNA表达量检测
	miProfile™ Cancer miRNA qPCR Arrays	癌症相关miRNA表达量检测
	miProfile™ Disease and Focus-Group miRNA qPCR Arrays	疾病或特定群组相关表达量检测
表达量检测阵列的定制服务	Custom-made Gene or miRNA qPCR Arrays	表达量检测阵列定制与qPCR检测服务
数据分析工具	Online data analysis tool	在线分析，完全免费

## 已发表的文章

- ◎ DICER1 deficit induces Alu RNA toxicity in age-related macular degeneration, 2011, *Nature*, IF 36.101.
- ◎ miR-612 suppresses the invasive-metastatic cascade in hepatocellular carcinoma, 2013, *JEM*, IF 14.776.
- ◎ CUL4B promotes replication licensing by up-regulating the CDK2–CDC6 cascade, 2013, *JCB*, IF 9.921.

更多文章，请浏览公司网站 [www.fulengen.com/tech/publication/qPCR.php](http://www.fulengen.com/tech/publication/qPCR.php)

### GeneCopoeia (复能基因)

Tel: 4006-020-200 020-32068595  
Email: sales@fulengen.com  
Web: www.genecopoeia.com.cn

### 经销商:



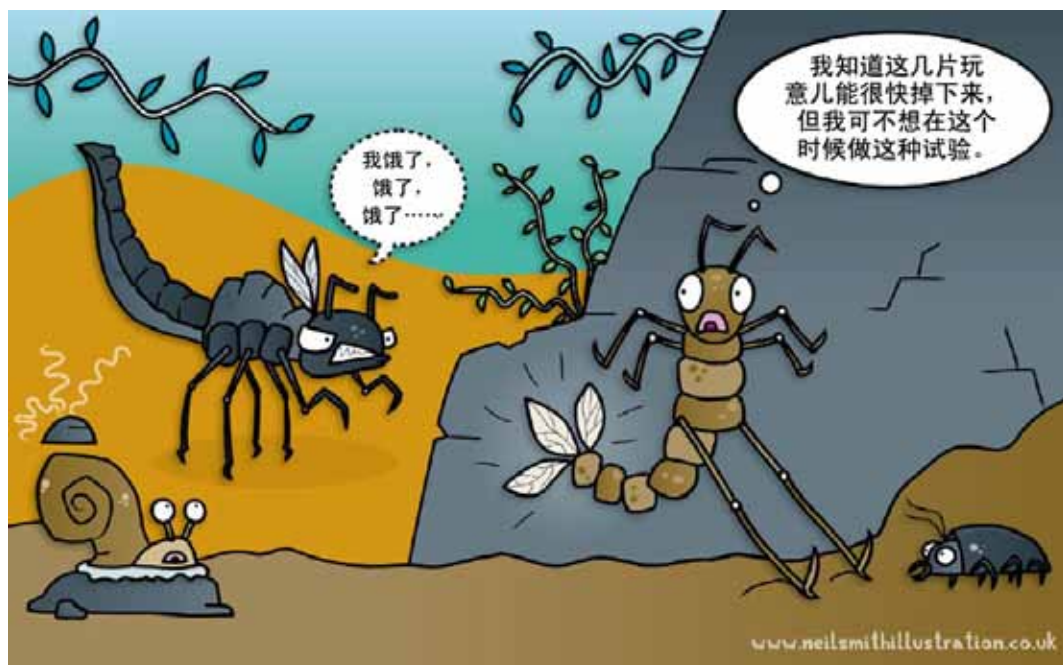
**GeneCopoeia™**  
Expressway to Discovery



# 百态

*Amazing Lives*

## 豆娘幼虫的“丢卒保车”逃生法



夏日里，豆娘（damselfly）成虫常常在池塘水面飞翔，形成了一道引人注目的风景线。然而，在它们早年的水生生活时期，生存环境是极其不安全的。不过，它们有自己的生存方法。在幼虫的腹部末端，附有类似叶片的薄片组织——尾腮，它起着推动器的作用。此结构能为豆娘幼虫提供完美的推动作用，使它们逃离天敌的追捕。不过，除此之外，豆娘幼虫还具有一种自我保护机制，能帮助它们从饥饿的肉食天敌手下逃脱，那就是自割行为，即尾腮脱落。来自加拿大圭尔夫大学（University of Guelph）的 Jennifer Gleason、Douglas Fudge 和 Beren Robinson 表示，由于幼虫脱落其尾腮的能力

可轻易提高它们的存活率，因此很可能导致在极早期水体栖居的幼虫进化出相对易脱落的尾腮连结组织，从而增加它们的生存几率。为了检验这个推理是否真实，这几名加拿大研究者测量了能够破坏豆娘幼虫尾腮连结组织的力度，以及连结组织的大小和薄膜厚度。结果，他们发现，与来自蜻蜓幼虫较少的池塘相比，来自鱼类稀少池塘（此处肉食性蜻蜓幼虫数目可观）的豆娘幼虫的连结组织要脆弱得多。研究小组表示，这表明豆娘幼虫的自割行为可能是在小型肉食性昆虫（如蜻蜓幼虫）的捕食自然选择作用下进化而成的，而且这种进化优先发生在连结组织较小的幼虫，或尾腮连结组织处薄膜面积较小的幼虫身上。

原文检索：

Gleason, J. E., Fudge, D. S. and Robinson, B. W. (2014). Eco-mechanics of lamellar autotomy in larval damselflies. *J. Exp. Biol.* 217, 185-191.



文佳/编译

## 海豚听力与反应时间的记录资料



鲸鱼和海豚都具有极其灵敏的听力，可用于导航、交流以及追捕猎物。然而，人类在海洋活动的不断增多给它们的生活拉响了警报：人为产生的噪声环境正对这些听力敏感的生物造成影响。英国圣安德鲁斯大学（University of St Andrews）的Paul Wensveen（他与荷兰海洋哺乳动物研究公司（Sea Mammal Research Company）的数名职员合作）表示，人们对此事的关注已经促使他们尝试建立水下噪音的声学安全标准。遗憾的是，测量动物的响度知觉很可能极具挑战性。所幸仍有前人的探索：2011年，James Finneran和Carolyn Schlundt曾在《美国声学学会杂志》（*Journal of the Acoustic Society of America*）上发表了有关论文，他们通过测量一只宽吻海豚（bottlenose dolphin）的听力，进行了数千次响度知觉（perceived loudness）试验。

不过，Wensveen等人提出，还有一种更简易的方法来测试动物的响度知觉，此法还可

用于人类婴儿的相关测试。具体方法是将一个孩子或一只动物对声音产生反应的时间作为声音响度的指标。理由很简单，不管人类还是动物，对响度高的声音产生的反应都会比响度低得要快。

于是，Wensveen与一只名为Jerry的青年雄性海湾鼠海豚（harbour porpoise）共同合作，进行试验。在此之前，Jerry已经受过训练，能够通过游离某个定点位置来“表明”它对极低的声音有反应。试验中，Wensveen等人耗费数月时间来测量Jerry对不同声音的反应时间，在声压级（音量）范围为59-168dB，水中声压参考值为 $1 \mu\text{Pa}$ （微帕斯卡）条件下，这些声音的音频范围处于0.5-125kHz区间。接着，研究小组计算了一系列听觉加权函数（auditory weighting functions），这种函数能够作为一种指标，说明Jerry及与其年龄相仿的海湾鼠海豚对声音响度的感知情况。研究小组表示，雄性哺乳动物对于噪音的行为和生理反应与其感知声音

响度的相关度较高，而前者与未经加强的声压级的相关度则相对较低。他们希望，Jerry的听觉函数还能起到另一个作用，即给人为产生

的水体噪音设置更安全的限度，以更好地保护鲸类动物的听力。

原文检索：

Wensveen, P. J., Huijser, L. A. E., Hoek, L. and Kastelein, R. A. (2014). Equal latency contours and auditory weighting functions for the harbour porpoise (*Phocoena phocoena*). *J. Exp. Biol.* 217, 359–369.



文佳/编译

## 果蝇繁殖过快导致后代的适合度降低



如果你选择在一片腐烂的水果上面安家养子，那么一定无法持久。这个道理对黑腹果蝇

(*Drosophila melanogaster*) 也一样——它们的母亲将产下的卵置于腐烂的水果上，她的

后代则以里面的微生物作为首要食物来源，结果它们的生命短暂得如同白驹过隙。这里面有何奥秘？来自印度贾瓦哈拉尔·尼赫鲁先进科学研究中心（the Jawaharlal Nehru Centre for Advanced Scientific Research）的Pankaj Yadav和Vijay Sharma就对这种发育迅速的果蝇产生了兴趣：它们的幼年期最多仅达216小时（比普通果蝇少了29小时），这种加速发育的行为会让它们付出何等代价呢？对此，他们研究了这种繁育情况特殊的果蝇群体，探究幼年发育期缩短对其适合度产生了何种影响，以揭示它们为此做出了何种妥协。

两名研究者测试了这种果蝇在幼虫发育期的生存能力、成虫的寿命、形成成虫的规模、生育能力、体型大小以及忍受饥渴的能力，结果发现果蝇为了缩短其完全发育为成虫的时间，付出了明显的代价。尽管这些迅速生长的

果蝇在发育成熟之后依然能像普通果蝇一样生存，但它们的适合度却出现了明显的减损：无论其体型大小还是重量都比普通果蝇低，且成虫寿命较短，忍受饥渴的耐力较低，雌性产的卵也较少。不过，当两名研究者进一步分析果蝇的生育能力与其体重的相关度时，发现若以体重作为相对标准进行比较，那么体型较小、发育迅速的果蝇反而比体型较大的普通果蝇产卵更多。

因此，发育迅速的果蝇通过牺牲自己的适合度来折衷加速的发育，这好比它们拥有比普通的亲朋好友更快的生物钟。Yadav和Sharma表示，他们的研究能证明一个结论：对于果蝇，其幼年期发育时间和生物钟周期与其成虫生命史的几种特征相关，这暗示生物钟可能具有适应性的意义。

原文检索：

Yadav, P. and Sharma, V. K. (2014). Correlated changes in life history traits in response to selection for faster pre-adult development in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *J. Exp. Biol.* 217, 580-589.



文佳/编译



## 慢病毒完整解决方案

-  **40,000**个现货克隆，即选即包，完全**免费**！
-  ORF表达克隆的病毒低至**8000**元；miRNA、shRNA克隆的病毒低至**3000**元！
-  滴度高达 **$10^{10}$** copies/mL！
-  最快**20**个工作日内送货！
-  已发表几十篇**高分文章**，详情见官网。

注：以上荧光图为真实实验结果图

A group of people are performing a human pyramid against a cloudy sky. The pyramid consists of four people standing on the ground, two people standing on their shoulders, and one person standing on the shoulders of the two people in the middle. The person at the top is wearing a dark jacket and white pants. The people at the base are wearing dark jackets. The sky is filled with soft, white clouds. The overall tone of the image is purple and blue.

**合办专题专刊**  
**网站广告合作**  
**邮件群发推广**

请致电 (020) 32051255

[www.LifeOmics.com](http://www.LifeOmics.com)  
[www.LifeOmics.com](http://www.LifeOmics.com)