



农业重大科学研究成果专著

GENOME EDITING OF ANIMALS

李奎等编著

动物基因组编辑



科学出版社

国家科学技术学术著作出版基金资助出版

农业重大科学研究成果专著

动物基因组编辑

李奎等编著



科学出版社

北京

内 容 简 介

动物基因组编辑技术是当前国际研发热点。本书详细介绍了动物基因组编辑技术的衍生和发展历程,包括基因组编辑新技术及其原理、动物基因组编辑相关技术及其原理、基因组编辑动物安全评价原则及应用前景等内容。本书主要由工作在基因组编辑动物制备和培育一线的青年科技工作者编写,他们结合国内外最新研究报道及切身的经验和体会,结合基因组编辑动物制备和培育的实际案例,详细介绍了猪等大家畜中基因组编辑技术应用的现状、技术细节、成功经验及发展趋势。

本书可供从事动物基因组编辑、动物基因组、动物育种等方面专家、研究生和大学生阅读参考。

图书在版编目(CIP)数据

动物基因组编辑/李奎等编著. —北京: 科学出版社, 2017.3

(农业重大科学研究成果专著)

ISBN 978-7-03-051243-7

I. ①动… II. ①李… III. ①动物-基因组-研究 IV. ①Q953

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2016)第 321298 号

责任编辑: 李秀伟 白雪/责任校对: 李 影

责任印制: 肖 兴/封面设计: 刘 新

科学出版社出版

北京东黄城根北街16号

邮政编码: 100717

<http://www.sciencep.com>

北京通州皇家印刷厂印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2017年3月第一版 开本: 720×1000 1/16

2017年3月第一次印刷 印张: 13 3/4

字数: 270 000

定价: 108.00 元

(如有印装质量问题, 我社负责调换)

编委会名单

主 编 李 奎 (中国农业科学院北京畜牧兽医研究所)

副主编 周 荣 (中国农业科学院北京畜牧兽医研究所)

编 委

刘志国 (中国农业科学院北京畜牧兽医研究所)

吴添文 (中国农业科学院北京畜牧兽医研究所)

阮进学 (中国农业科学院北京畜牧兽医研究所)

宋春雷 (中国农业科学院北京畜牧兽医研究所)

陶晨雨 (中国农业科学院北京畜牧兽医研究所)

樊俊华 (中国农业科学院北京畜牧兽医研究所)

牟玉莲 (中国农业科学院北京畜牧兽医研究所)

杨述林 (中国农业科学院北京畜牧兽医研究所)

崔文涛 (中国农业科学院北京畜牧兽医研究所)

白立景 (中国农业科学院北京畜牧兽医研究所)

李训碧 (中国农业科学院北京畜牧兽医研究所)

鞠辉明 (扬州大学)

宋成义 (扬州大学)

李秋艳 (中国农业大学)

连正兴 (中国农业大学)

戴蕴平 (中国农业大学)

张 涌 (西北农林科技大学)

赖良学 (中国科学院广州生物医药与健康研究院)

李小平 (中国科学院广州生物医药与健康研究院)

郑新民 (湖北省农业科学院畜牧兽医研究所)

毕延震 (湖北省农业科学院畜牧兽医研究所)

任红艳 (湖北省农业科学院畜牧兽医研究所)

序

基因工程技术日趋成熟，受到世界各国高度重视并已取得迅猛发展。随着国家科技重大专项“转基因生物新品种培育”的启动，我国基因组编辑技术取得了长足的进步。基因组编辑技术可以仿照自然突变，实现对基因组的精确修饰，也可完成对基因组的定点突变、敲除和插入等。

基因组编辑技术在农业和医学等方面均具有广阔的应用前景和实用价值。在农业领域，该技术可以修改基因序列使之符合人类的需要，如生产人源化牛奶、培育节粮高产的畜禽新品种等。在医学领域，将基因组编辑动物运用于比较医学，快速构建动物模型，可以深入地了解人类重大疾病的发病机理及探究致病主效基因的功能和机制，为基因治疗提供前期研究基础和理论依据。

由“转基因生物新品种培育”重大专项重大课题主持人李奎教授等编著的《动物基因组编辑》一书较为全面地介绍了动物基因组编辑技术，主要涵盖了基因打靶技术，以锌指核酸酶（ZFN）、转录激活因子样效应物核酸酶（TALEN）及规律成簇间隔短回文重复序列/规律成簇间隔短回文重复序列关联蛋白（CRISPR/Cas）系统等基因组编辑新技术，显微注射、体细胞核移植等基因组编辑相关技术，基因工程动物生物安全评价和检测技术，详细描述了现代基因工程技术在猪等家畜上的实践经验。该书主要由年轻的一线科研工作者参与编写，针对基因工程动物制备成本高、效率低等问题，详细地介绍了该团队在基因组编辑猪等家畜制备方面的操作实例和经验。

该书所归纳总结的技术内容前沿、先进、实用，对我国动物基因组编辑技术的研究发展具有良好的推动作用，适宜从事基因工程研究的科研人员和相关专业研究生学习和参考。

李奎

2016年9月

前 言

工欲善其事，必先利其器。方法技术从来都是科学进步的推动力，在生命科学领域更是如此。基因组编辑技术是通过人工核酸酶介导的基因组定点修饰技术。这种技术原则上能在任何物种基因组的任何位置上进行设计切除，从而能在内源性序列上引入特异性修改。人工核酸酶介导的基因组编辑（genome editing with engineered nucleases）技术入选 2011 年的 *Nature Methods* 最受关注的技术成果。2013 年的 *Science*、*Nature Biotechnology* 等杂志上，接连报道规律成簇间隔短回文重复序列/规律成簇间隔短回文重复序列关联蛋白（clustered regularly interspaced palindromic repeat/CRISPR-associated protein, CRISPR/Cas）系统成为基因组编辑的一个简单通用工具。这一系列基因组编辑新技术的研究和利用，进一步将靶向基因操纵推向高潮，使得多个基因敲除、敲入变得更为简单、高效，将令动物育种、干细胞定向分化、遗传疾病定点修复等在未来数年内得到迅猛发展。

畜牧业是国家农业生产的支柱，畜牧业的发展状况是反映一个国家和地区农业生产水平高低的重要指标。随着社会进步和人民生活水平的提高，畜牧生产得到了高速发展。畜禽品种作为影响畜牧业生产效率的重要因素，受到了政府、社会和广大畜牧工作者的高度重视。纵观古今，从依靠环境影响、自然突变来选择和利用优良基因，人工杂交对优选基因进行重组和积累，到分子标记辅助选育，人类从未停止对家畜的遗传改良。动物基因组编辑技术已经成为在动物体内进行高效、位点特异性基因修饰的一个常用技术，通过对动物基因组进行靶向特异性的突变，从而解答并提出更多精确的畜牧生产中的问题，是改良畜禽品种的有效手段，具有重要的科学研究价值和应用前景。

本书既介绍了传统的基因打靶技术，还囊括了锌指核酸酶（zinc-finger nuclease, ZFN）、转录激活因子样效应物核酸酶（transcription activator-like effector nuclease, TALEN）及 CRISPR/Cas 系统等基因组编辑新技术。同时，还汇总整理了显微注射、体细胞核移植等一系列基因组编辑相关技术，涵盖了数十项基因组编辑技术方法，对于从事和即将从事相关研究的科研人员是一本实用参考书。

本书编写者主要为工作在科研一线的青年教师、博士后和博士研究生，他们

在动物基因组编辑研究工作中具有丰富的实践经验。本书的编著过程还得到了国内同行专家关心，特别是上海交通大学杨立桃副教授等，在此感谢他们悉心的指导和无私的帮助。受编者能力所限，管窥蠡测在所难免。企盼起到抛砖引玉的作用，恳请读者批评指正。

作者

2016年8月

目 录

序	
前言	
第一章 动物基因组编辑技术的衍生和发展	1
第一节 利用基因打靶技术制备转基因动物的基本流程	2
一、插入型载体 (O 型载体)	2
二、置换型载体 (Ω 型载体)	2
第二节 影响中靶效率的因素	3
一、同源臂的同源性及其长度	3
二、载体导入的方法	4
三、靶基因位点	4
四、转染时细胞和细胞周期的选择	4
第三节 传统基因打靶技术	4
一、Cre/loxP 重组酶打靶系统	5
二、FLP/FRT 重组酶系统	6
三、 Φ C31 重组酶系统	8
第四节 基因打靶的应用	10
一、基因功能研究	10
二、动物疾病模型与基因治疗	10
三、家畜育种	11
参考文献	12
第二章 基因组编辑新技术	16
引言	16
第一节 锌指核酸酶 (ZFN) 技术	16
一、ZFN 技术原理及制备方法	18
二、ZFN 研究进展	23
三、技术前景	24
参考文献	34
第二节 TALEN 技术	35
一、TALEN 技术原理及制备方法	36
二、TALEN 应用进展	40

三、TALEN 技术前景	42
参考文献	52
第三节 CRISPR/Cas9 基因组编辑技术	54
一、CRISPR/Cas 系统简介	54
二、CRISPR/Cas9 基因组编辑技术的原理、功能及特点	60
三、CRISPR/Cas9 基因组编辑系统的构建方法	63
四、CRISPR/Cas9 基因组编辑技术的应用	65
五、前景展望	70
参考文献	72
第三章 基因组编辑相关技术	76
第一节 显微注射技术	76
一、原核显微注射技术制作转基因猪	77
二、原核显微注射法培育基因工程动物的研究现状	83
参考文献	86
第二节 体细胞核移植技术	87
一、体细胞核移植技术简介	88
二、体细胞克隆的主要方法及流程	89
三、猪的胚胎移植手术操作	95
四、体细胞克隆技术目前存在的问题	100
五、体细胞克隆技术的前景展望	101
参考文献	102
第三节 RNA 干扰技术	105
一、RNAi 的发现	105
二、RNAi 的作用机制	105
三、RNAi 的生物学特点	107
四、影响 RNAi 效率的因素	107
五、RNAi 技术应用中存在的问题	108
六、RNAi 的应用	108
参考文献	110
第四节 病毒载体转基因技术	111
一、慢病毒载体	111
二、腺病毒载体	113
三、腺相关病毒载体	115
四、单纯疱疹病毒载体	116
参考文献	117

第五节 人工染色体技术	118
一、酵母人工染色体	118
二、细菌人工染色体	119
三、人类人工染色体	119
四、人工染色体的应用	120
参考文献	121
第六节 转座子	122
一、转座子的定义	122
二、转座子类型	123
三、DNA 转座子家族	123
四、PB 转座子结构及转座机制	124
五、SB 转座子研究进展	125
六、Tol2 转座子结构及转座机制	128
七、转座子的应用	129
参考文献	132
第七节 精子介导的基因转移技术	134
一、精子载体法的发现	135
二、精子载体法的机制	135
三、精子载体法的应用	136
四、精子载体法应用中存在的问题	136
参考文献	137
第八节 复合性状转基因动物制备技术	138
一、复合性状基因组编辑技术的发现	138
二、复合性状基因组编辑技术的机制及特点	139
三、复合性状基因组编辑技术的应用	140
参考文献	140
案例一：基于 <i>MSTN</i> 基因座的转 <i>IGF-1</i> 基因猪	141
案例二：可控表达 <i>GH</i> 转基因猪	144
第四章 基因组编辑动物的评价与检测	153
第一节 基因工程动物的生物安全评价	153
一、基因组编辑动物的生物安全评价原则	154
二、基因组编辑动物的生物安全风险分析	155
三、基因组编辑动物的生物安全管理办法	160
参考文献	163
第二节 基因工程动物的分子特征识别技术	164

一、核酸水平的检测	164
二、蛋白质水平的检测	167
三、分子特征检测新方法	173
参考文献	175
第五章 基因组编辑动物的应用	178
第一节 研究基因功能，建立不同动物模型	178
第二节 建立人类疾病的动物模型	180
第三节 在疾病治疗中的应用	181
一、杜氏肌营养不良	182
二、帕金森病	182
三、血友病	183
四、 β -地中海贫血症	184
五、遗传性酪氨酸血症	184
六、镰状细胞贫血	184
七、X连锁的严重联合免疫缺陷病	185
八、X连锁的慢性肉芽肿病	186
九、大疱性表皮松懈症	186
十、 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶缺陷症	186
十一、遗传性白内障	187
十二、囊性纤维化	187
十三、传染性疾病	187
十四、癌症	190
第四节 基因组编辑技术在生物制药中的应用	192
第五节 基因组编辑技术在畜牧生产中的应用	192
第六节 基因组编辑技术存在的潜在问题	196
一、技术问题	196
二、生态和生物安全问题	197
三、伦理问题	197
第七节 展望	198
参考文献	198
索引	205

第一章 动物基因组编辑技术的衍生和发展

基因组编辑是近年基因工程技术的新发展,可通过对目的基因进行“编辑”,包括特定 DNA 片段敲除、特异突变引入和定点 DNA 片段转入等,从而实现对基因组的精确修饰,是在外源基因导入、基因打靶及 RNA 干扰等技术之上发展起来的一项新技术。过去几十年中,外源基因导入、基因打靶及 RNA 干扰等技术是“反向遗传学”中研究基因功能的一系列主要方法,被广泛应用于生命科学研究的各个领域。但外源基因的导入通常是随机的,其导入基因组的位置往往不可预期;传统基因打靶虽可在动物基因组中实现精确修饰,但其打靶效率非常低,通常需要添加筛选标记基因对阳性细胞进行富集;而 RNA 干扰则是降低基因的表达,对基因表达的调控不可稳定遗传,且效果也较为短暂。近些年,基于序列特异性核酸酶的基因组编辑技术的出现,如锌指核酸酶(zinc-finger nuclease, ZFN)、转录激活因子样效应物核酸酶(transcription activator-like effector nuclease, TALEN)、规律成簇间隔短回文重复序列/Cas9(clustered regularly interspaced short palindromic repeat/Cas9, CRISPR/Cas9)系统等,为动物基因组定点修饰提供了行之有效的新方法。当核酸酶锚定到基因组上的特异性序列时,可对目的基因组序列进行切割,从而产生双链断裂(double strand break, DSB);基因组可通过非同源末端连接(non-homologous ending joining, NHEJ)或同源重组(homologous recombination, HR)的方式,对 DNA 双链断裂进行修复,在基因组特定位点实现 DNA 的插入、替换或删除,从而实现精确修饰。

基因打靶(gene targeting)技术,是基于基因的同源重组发展起来的一种基因修饰技术,指外源性 DNA 片段与受体细胞基因组中的同源序列发生重组,并整合于特定的位点上,从而改变受体细胞遗传特性的一种方法。20 世纪初,美国生物学家 Morgan 等通过对果蝇眼色遗传的研究,揭示基因组产生交换的基础是同源染色体之间的 DNA 重组;70 年代,同源重组技术开始在酵母细胞中发展起来(Hinnen et al., 1978);直到 1985 年,Smithies 等才在哺乳动物细胞中实现了同源重组(Smithies et al., 1985)。1989 年,真正通过同源重组获得的基因敲除小鼠诞生(Capecci, 1989)。这项技术能精确地修饰基因组,从而定向地改变细胞或整体本身的遗传结构和特征,因而被广泛地应用于生物学的各个领域。

第一节 利用基因打靶技术制备转基因动物的基本流程

通过基因打靶技术制备转基因动物，需要经过以下的基本流程：①**打靶载体的构建**：即将同源序列、目的基因及其调控元件、筛选标记基因等，构建到打靶载体中。②**受体细胞的选择**：基因打靶技术在小鼠基因工程研究中的应用最为广泛，其主要原因在于小鼠具有完善的胚胎干细胞系统和胚胎重建技术，而其他绝大多数动物尚未建立胚胎干细胞系统或者胚胎重建技术发展缓慢，因而其基因敲除动物的制备受到了很大限制。大型动物中应用较多的主要为胎儿成纤维细胞。③**打靶载体的导入**：利用显微注射和电穿孔等一系列方法将载体导入细胞。④**阳性细胞的筛选**：由于同源重组的效率较低，一般会采用标记基因进行阳性细胞的富集。目前在动物细胞中常用的筛选标记基因主要有新霉素基因(*neomycin, Neo*)、单纯疱疹病毒-胸苷激酶基因(*herpes simplex virus thymidine kinase gene, HSV-tk*)及次黄鸟嘌呤磷酸核糖转移酶基因(*hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase, HPRT*)等。⑤**阳性细胞的鉴定**：一般是先采用PCR法，其中一条引物位于打靶载体上的外源序列区，另一条引物位于基因组上同源序列的外侧，然后再通过Southern blot方法进一步确定是否发生了同源重组。⑥**转基因动物的制备**：将重组阳性细胞培养成动物胚胎，大型动物一般采取体细胞核移植的方法制备转基因动物。

打靶载体的构建是基因打靶过程中最为重要的一环。同源重组载体主要包括5'和3'侧的同源臂、两者间的外源序列及一些辅助细胞筛选的标记基因。该载体可以通过同源臂锚定其靶基因组上插入的位置，从而达到基因敲除（破坏内源基因的表达）、基因敲入（外源基因在宿主细胞特定位置表达功能蛋白）和基因定点突变（纠正宿主突变的致病基因）等目的。根据研究目的和要求的不同，目前基因打靶的策略主要有以下几种。

一、插入型载体（O型载体）

插入型载体一般包含靶基因的同源臂及选择标记基因，且在同源臂内含有特异性的酶切位点。同源重组时可在载体同源臂内形成缺口，将载体插入染色体相应区域，达到基因敲除的目的。该方法较为简单，但其缺点是不能直接区别和筛选出随机整合和定点整合的细胞克隆。

二、置换型载体（Ω型载体）

为了解决鉴别随机整合和定点整合的问题，学者们研制出了正负双向选择(positive negative-selection, PNS)载体系统，即载体中具有正负筛选标记基因。

正筛选标记基因位于同源区内，多为 *Neo* 基因，在同源重组或随机整合中均可正常表达，在细胞筛选过程中，不整合外源性片段的细胞将被 G418 杀死。而负筛选标记基因位于目标序列的同源区之外，多位于载体的 3' 端，且多为 *HSV-tk* 基因。在同源重组过程中，*HSV-tk* 基因将被切除而丢失。如果发生随机整合，*HSV-tk* 基因则被保留下来。*HSV-tk* 可将无毒的丙氧鸟苷 (ganciclovir, Ganc) 转变为具有毒性的核苷酸，并杀死细胞，从而排除随机整合的现象。因此，最终获得的是不含 *HSV-tk* 基因的同源重组细胞株。目前该方法的应用最广泛。

除了上述两种载体构建策略以外，还有一些其他策略，如“打了就走” (hit and run) 策略 (Lakhlani et al., 1997)、标记与交换法 (tag and exchange) (Askew et al., 1993)、双置换法 (double replacement) (Wu et al., 1994) 等。但如果我们需要模拟某些基因的表达模式，即在特定的组织、细胞中或者特定的发育阶段中失活等，上述的打靶载体就无法满足严苛的试验需求。而条件性基因打靶 (conditional gene targeting) 系统的发现使这种希望变成现实。目前应用最多的是重组酶 Cre/loxP 系统。在接下来的章节中会详细叙述该系统。

此外，将传统的基因打靶技术与新型的基因组编辑技术如 ZFN、TALEN 及 CRISPR/Cas9 等技术相结合，在实现精确突变的同时，既可大大提高生物基因组编辑的效率，又无需筛选标记，使得基因组编辑生物更加安全。

第二节 影响中靶效率的因素

受体细胞中靶效率指发生同源重组的细胞数占转染的细胞总数的百分比，也称同源重组效率，其影响因素主要有以下几个方面。

一、同源臂的同源性及长度

影响中靶效率的众多因素中，最主要是同源臂的同源性。同源性越高则打靶效率越高。因此，在构建打靶载体时，一般都采用高保真的 DNA 聚合酶来扩增同源序列以保证其同源性。此外，同源臂的长度也影响着打靶效率。总体上讲，较长的同源臂有利于基因组分子间的同源识别和杂合 DNA 链的形成。有研究表明，当载体同源臂的长度由 4kb 延长到 9kb 时，基因打靶效率可提高 10 倍，同时，非同源重组效率也提高了 40 倍 (Thomas and Capecchi, 1987)。也有研究表明，同源臂达一定长度后，继续延长并不会明显提高同源重组效率 (Hasty et al., 1991)。同时，同源臂太长会导致打靶载体过大，从而影响其构建和转染。目前打靶载体的同源臂一般在 4~8kb。

二、载体导入的方法

目前,载体导入受体细胞的方法主要有脂质体、显微注射、电穿孔、精子载体及病毒载体介导等方法。不同的转染方法对同源重组效率有明显影响。其中,显微注射法的同源重组绝对效率最高,但其成本较高;电穿孔方法的效率高,但对细胞损伤也较大。每种载体导入方法各有优缺点,针对不同细胞、载体和实验条件等,可以选择不同的载体导入方法。

三、靶基因位点

受体细胞中染色体结构或一些特异性的基因组序列会影响其与外源序列同源重组的概率,从而导致同源重组率不同。一般来说,转录活性高的基因有利于基因同源重组的发生(Frohman and Martin, 1989),DNA超螺旋容易打开的部位容易被特异重组酶和同源序列识别,有利于产生同源重组。

四、转染时细胞和细胞周期的选择

哺乳动物细胞尤其是体细胞的同源重组概率非常低,比胚胎干细胞(embryonic stem cell, ESC)要低得多,且非同源重组的概率较高。此外,相同的打靶载体在不同体细胞中的转染效率及基因同源重组效率也不尽相同。在有丝分裂细胞中,外源基因片段的同源重组具有一定的细胞周期依赖性,有学者认为其在S期更容易发生。因此,如果将体细胞同化到一个适当的时期,可能会提高打靶载体的同源重组效率。

第三节 传统基因打靶技术

20世纪80年代发展起来的基于位点特异性重组(site-specific recombination, SSR)系统的基因打靶技术,可实现基因定点敲除、敲入、置换、倒置和组织特异性表达等遗传操作。该技术由于克服了随机整合和重组效率低等缺点,逐渐在功能基因研究领域占据了优势地位。位点特异性重组是由位点特异性重组酶介导,识别特异性重组位点,可以对基因功能进行精细的分析研究,给基因工程领域带来了历史性的革命。传统打靶技术已经在多个物种实现了基因的定点修饰。根据重组酶识别特异性位点时与靶序列形成共价连接的氨基酸的不同,重组系统分为酪氨酸家族(如Cre重组酶、FLP重组酶等)和丝氨酸家族(如 Φ C31重组酶等)。本书就传统基因打靶技术中研究和运用最多的Cre/loxP、FLP/FRT和 Φ C31等3个位点特异性重组系统做简要介绍。

一、Cre/loxP 重组酶打靶系统

1981年, Cre重组酶最早由Sternberg等学者于P1噬菌体中发现(Sternberg, 1981; Sternberg and Hamilton, 1981; Sternberg et al., 1981)。Cre重组酶基因编码区序列全长1029bp, 编码343个氨基酸组成的38kDa的蛋白质。Arg259位点在与loxP位点作用中发挥最重要的作用, 该位点突变影响Cre酶对loxP位点识别的特异性。

野生型(WT)loxP位点来源于P1噬菌体, 长34bp, 含有两个13bp的反向重复序列和一个8bp的非对称间隔区序列。Cre重组酶特异性识别和结合13bp的反向重复序列区域, 间隔区是DNA链断裂和重组交换发生的区域。不对称的间隔区序列指示loxP位点的方向性(图1-1A)。

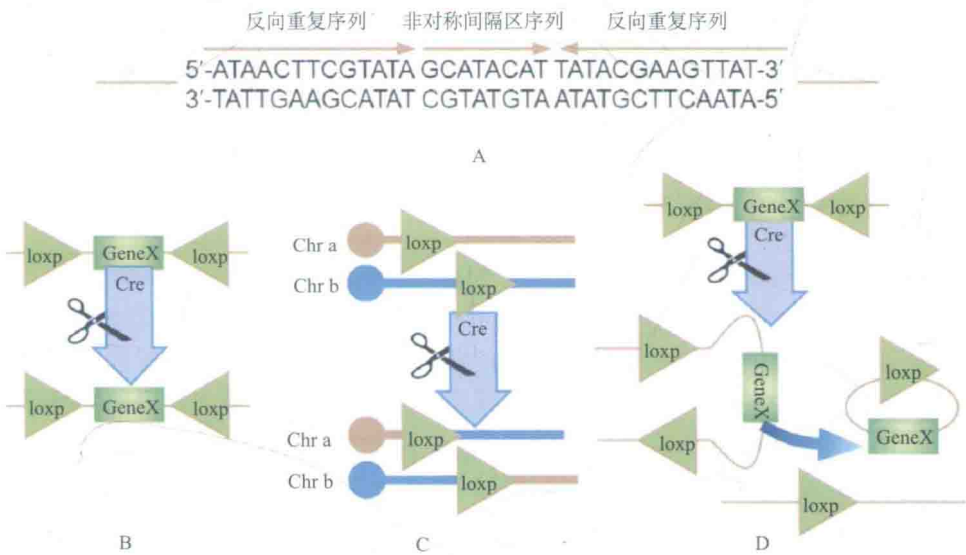


图 1-1 loxP 位点的结构及 Cre/loxP 的重组结果

A. loxP 位点的序列结构图。间隔区决定 loxP 位点的方向。B. 两个 loxP 位点方向相反, 并且位于同一条 DNA 链上, 则 Cre 酶能使两个 loxP 位点之间的序列倒位。C. 两个 loxP 位点位于不同的 DNA 链上, 或者不同的染色体上, 则 Cre 酶能使两条 DNA 链发生交换或使两条染色体易位。D. 两个 loxP 位点方向相同, 并且位于同一条 DNA 链上, 则 Cre 酶能够将两个 loxP 位点之间的序列切除, 留下一个 loxP 位点

Cre 酶介导的两个 loxP 位点间的重组是一个动态、可逆的过程, 可以分成三种情况: 如果两个 loxP 位点位于同一条 DNA 链上, 并且方向相同, Cre 酶能有效切除两个 loxP 位点间的序列(图 1-1B); 如果两个 loxP 位点分别位于两条不同的 DNA 链或不同的染色体上, Cre 酶能介导两条 DNA 链的交换或染色体易位

(图 1-1C)；如果两个 loxP 位点位于同一条 DNA 链上，但是方向相反，Cre 酶则导致两个 loxP 间序列的倒置(图 1-1D)。

Cre 重组酶介导 loxP 位点间的重组机制的模型为 Holliday 模型(Guo et al., 1997)。由于每个反向重复序列只能结合一个 Cre 酶分子，所以每次重组需要 4 个 Cre 酶分子，说明重组的效率在很大程度上与重组酶的表达水平有关(Hoess and Abremski, 1985)。Cre 重组酶的底物既可为超螺旋 DNA，也可是线性 DNA。

Cre/loxP 系统的基因打靶首先需要靶基因或重要功能域片段被两个 loxP 序列锚定(称为“floxed”)，建立转基因系。由于该转基因系细胞中不表达 Cre 酶，被锚定的靶基因不会被改变(Rajewsky et al., 1996; Lakso et al., 1992)。在需要的时候引入 Cre 酶即可完成特定的遗传操作。由于普通细胞的重组效率极低，Cre/loxP 系统与胚胎干细胞的结合大大拓展了这一系统的应用。如果 Cre 酶的表达由可调控的启动子引导，则可完成条件性敲除、敲入、置换和倒置。小鼠胚胎干细胞体系的较早建立使基于 Cre/loxP 重组酶系统的组织特异性敲除在小鼠中得以广泛应用。组织特异性敲除首先要获得组织特异性启动子调控 Cre 蛋白表达的 Cre 小鼠及携带特定 loxP 位点的目的基因小鼠。目前 Cre 基因小鼠大多是通过常规的显微注射获得的，可以通过 Western 杂交或抗体进行检测。

二、FLP/FRT 重组酶系统

FLP/FRT 位点特异性重组系统(flippase recombination enzyme and FLP recombination target)具有非常高的重组效率和靶向性，广泛应用于多种微生物，拟南芥、水稻等植物，以及小鼠、大鼠、果蝇、线虫等模式动物的研究中，实现了基因敲除、基因敲入、单碱基突变、碱基缺失突变、染色体大片删除等基因工程操作。

FLP 重组酶是 1980 年 Hartley 等对酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)的 2 μ m 双链环状质粒进行测序时发现的。该质粒的特点是存在 2 个 599bp 的反向重复序列(Sternberg and Hamilton, 1981)，并且 2 个反向重复序列之间能够发生重组。进一步研究发现，2 μ m 环状质粒内发生的 DNA 重组属于位点特异性重组，Broach 和 Hicks(1980)将这一重组酶命名为翻转酶复合酶(flippase recombination enzyme, FLP)。

FLP/FRT 系统与 Cre/loxP 系统类似，也包含 2 个组分，即 FLP 重组酶及其重组位点(FLP recombination target, FRT)。FLP 重组酶基因全长共 1272bp，编码长度为 423 个氨基酸残基。FRT 重组位点即 FLP 重组酶作用的靶序列，是 2 个 48bp 长的序列。包含 3 个 13bp 的重组酶结合区和 1 个非对称间隔区。8bp 间隔区紧邻的 2 个 13bp 的反向重复序列是重组酶识别和结合的位点，8bp 间隔区序列是 DNA 链断裂和重组的发生区域。间隔区序列的不对称性指示重组位点的方向性，