

锌指核酸酶技术在基因治疗中的应用研究进展

李战伟,王 令,任 刚,王 昕,张智英

(西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西 杨凌 712100)

[摘 要] 锌指核酸酶技术是一种新兴的基因高效靶向修饰和调控技术,目前该技术已在人类疾病的基因治疗中得到应用,通过敲除致病基因使其丧失致病性或者通过修复突变基因使基因表达正常,实现了对多种人类疾病的基因治疗。基于提高锌指核酸酶效率、特异性和降低细胞毒性等方面的研究较少的现状,特就人工锌指核酸酶介导的基因敲除和基因同源重组修复等在人类疾病基因治疗方面的应用及存在问题进行了综述,并对相关研究的开展进行了展望。

[关键词] 基因治疗;锌指核酸酶;同源重组;靶向修饰

[中图分类号] Q78

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2011)06-0055-06

Progress on applications of zinc finger nuclease technology in gene therapy

LI Zhan-wei, WANG Ling, REN Gang, WANG Xin, ZHANG Zhi-ying

(College of Animal Science and Technology, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: Zinc finger nuclease technology can be used effectively in gene regulation and modification. A number of recent papers have shown how this technology can be applied effectively to models of human gene therapy. A variety of human diseases have been treated by gene inactivation or gene correction. However, few papers focus on how to improve the efficiency of zinc finger nucleases and specificity, minimize cytotoxicity. The applications of this technology to human gene therapy and problems were summarized in this review to provide a basis for related researches.

Key words: gene therapy; zinc finger nucleases; homologous recombination; targeting modification

基因治疗是将人的正常基因或有治疗作用的基因,通过一定方式导入人体靶细胞,以纠正基因缺陷或发挥治疗作用,从而达到疾病治疗目的的生物医学技术,通常包括基因置换、基因修正、基因修饰、基因失活等。经过 20 多年的发展,基因治疗技术现已取得了明显的成效,2003 年,陈立等^[1]成功研制了“重组 AAV-2 人凝血因子Ⅸ注射液”。2004 年,基因治疗产品重组人 p53 抗癌注射液研制成功^[2]。Masahiko 等^[3]通过基因治疗成功培育出了新的听觉毛细胞,并且恢复了成年聋天竺鼠的听力。Wang 等^[4]采用阻断生物钟基因表达的基因疗法,对小鼠进行戒毒试验,发现该方法可以阻断生物钟基因参

与调控的药物成瘾途径,使药物的心理成瘾被克服。

作为一种新的治疗手段,基因治疗目前还存在着很多悬疑^[5],如基因效应时间较短;基因导入系统缺乏靶向性,效率也较低;导入的基因不能根据病变的性质和严重程度,在适当的组织器官内以适当的水平或方式表达以及基因治疗的安全性问题等。所以,在未完全解释人类基因组的运转机制和充分了解基因调控机制及疾病的分子机理之前,通过增加正常基因拷贝等来补充缺陷基因功能,从而进行基因治疗是相当危险的。事实证明,基于同源重组和基因定点纠错原理,在 DNA 水平的原位修复是基因治疗的理想措施。

* [收稿日期] 2010-11-12

[基金项目] 西北农林科技大学引进人才启动基金项目(2111020821)

[作者简介] 李战伟(1986—),男,河南周口人,在读硕士,主要从事锌指核酸酶技术研究。E-mail: lizhanwei06@nwsuaf.edu.cn

[通信作者] 张智英(1958—),男,陕西兴平人,教授,博士,博士生导师,主要从事动物基因组学、动物病毒学及其在癌症治疗中的应用研究。E-mail: zhangzhy@nwsuaf.edu.cn

传统的基因靶向修饰技术依赖于细胞内自然发生的同源染色体的随机交换,但其效率非常低,通常为 10^{-6} 级,增加了实际操作的工作量,限制了该项技术的应用。由于在人体细胞内,基因同源重组的效率特别低,所以用单纯的同源重组实现人类基因组的永久修复是不切实际的,这也严重阻碍了生物医学的研究和安全有效的基因治疗的发展^[6]。

锌指核酸酶技术的核心设计思想是将 2 个有特定功能的结构域——特异性识别模块(能够识别并结合特异 DNA 序列的锌指蛋白)和功能模块(功能调节域或非特异性核酸内切酶 *Fok I*)进行巧妙的融合,形成具有特定功能的蛋白^[7]。人工锌指蛋白转录因子(Zinc finger DNA-binding protein transcription factors, ZFP TF)由特定序列的结合域(Binding domain, BD)和效应结构域(Effector domain, ED) 2 部分组成,调控目标基因表达,进而治疗相关疾病;人工锌指核酸酶(Zinc finger nuclease, ZFN)是由能够识别并结合特定 DNA 序列的锌指蛋白和一个非特异性核酸内切酶 *Fok I* 融合而成的一种人工合成酶。ZFN 能识别一段特异的 DNA 序列,并在此特异位点产生 1 个 DNA 双链切口(Double strand break, DSB),然后利用细胞固有的同源重组或非同源末端连接修复机制进行切口修复,从而达到精确定点修饰和改造致病基因的目的^[8-9]。锌指核酸酶技术不仅将基因组靶向修饰的效率提高了 3~5 个数量级,而且具有极高的特异性^[10]。从原理上说,通过对识别 DNA 序列的锌指蛋白的筛选和组装,人工 ZFN 能够在动物染色体的任何位点上工作。锌指核酸酶技术将使基因治疗更安全、有效、简便、实用,在基因治疗人类疾病方面有巨大的发展潜力和广阔的应用前景。目前,国内外相继报道了此技术在人类疾病基因治疗方面的应用研究成果,但对如何提高锌指核酸酶的效率 and 特异性,及降低细胞毒性等的研究尚比较少。基于以上原因,现对锌指核酸酶技术在基因治疗中的应用研究进行了综述,分析了目前研究的现状及存在的问题,以期对锌指核酸酶技术的深入研究与应用提供参考。

1 锌指核酸酶

1.1 锌指蛋白

锌指(Zinc finger)是存在于很多 DNA 结合蛋白中的具有指状结构的一类模体。每个锌指单位约含 30 个氨基酸残基, Zn^{2+} 存在时折叠形成紧密的

$\alpha\beta 2$ 结构,其中 Zn^{2+} 夹叠在 α 螺旋和两股反向平行的 β 链中,与 β 链末端的 2 个半胱氨酸和 α 螺旋 C 末端的 2 个组氨酸形成四面体结构。单个锌指的 α 螺旋插入 DNA 双螺旋的大沟,其 -1、3、6 相应位置的氨基酸残基与 DNA 相互作用,特异性识别 DNA 序列上 3 个连续碱基,并与之结合,而且其骨架结构比较保守^[11-12]。目前从自然界筛选的和人工突变的具有高特异性的锌指,可以识别所有的 GNN 和 ANN 以及部分 CNN 和 TNN 三联体。识别不同三联碱基的多个锌指可以串联起来形成一个锌指蛋白(Zinc finger protein, ZFP),该蛋白可识别并结合一段特异的 DNA 序列。因此,ZFP 与 DNA 的结合具有高度特异性和可塑性。

ZFP 源自转录调控因子家族(Transcription factor family),最早是由诺贝尔奖获得者 Miller 等^[13]在爪蟾卵母细胞的转录因子 III A (TF III A)中首先发现的,是由一系列锌指结构组成的蛋白,广泛存在于从酵母到人类的真核生物中,据统计大约有 2% 的人类基因(700~900 个)编码锌指蛋白,其通常与真核基因的表达调控密切相关。KLF5 (Krüppel-like factor 5) 为一种锌指蛋白转录因子,是心血管疾病的关键调节因子^[14],Krox20 是一种促进脂肪细胞分化的锌指蛋白转录因子^[15],而 GATA2 则是抑制脂肪细胞分化的锌指蛋白转录因子^[16]。

1.2 人工锌指核酸酶

单个人工 ZFN 是由具有特定碱基序列识别功能的锌指蛋白和一个非特异性核酸内切酶 *Fok I* 融合而成的一种人工合成酶^[17]。人工 ZFN 中的锌指蛋白通常由 3~4 个锌指单元串联起来,可特异识别并结合 DNA 链上的 9~12 个连续碱基。与锌指蛋白相连的非特异性核酸内切酶来自 *Fok I* C 端的由 96 个氨基酸残基组成的 DNA 剪切域。当 2 个 ZFN 单体的识别位点相距 5~7 bp 时,ZFN 中的 *Fok I* 形成二聚体并产生酶切功能,从而达到 DNA 定点剪切的目的^[18-20]。

理论上讲,可以通过选择结合特定三联碱基的锌指单元,并将其按一定的顺序串联起来与 *Fok I* 融合形成 ZFN,进而对染色体上的特定片段进行切割,产生 1 个 DNA 双链切口,然后由细胞固有的 DNA 修复机制,通过非同源末端连接或同源重组或切口修复,构造突变体或完成基因修复工作。

2 锌指核酸酶技术在基因治疗中的应用

2.1 人工锌指蛋白转录因子

人工锌指蛋白转录因子由特定序列的结合域和功能调节域 2 部分组成,可激活、沉默或调控目标基因的表达^[21-23],用于基因功能、发病机理研究或者治疗某种疾病。糖尿病神经病变(Diabetic neuropathy, DN)是糖尿病最常见的并发症之一,临床上除了严格控制血糖外,国家食品与药品管理局(Food and drug administration, FDA)批准的治疗糖尿病神经病变的惟一方法,就是使用止痛药或抗抑郁症药,而这些药物治标不治本。Pricel 等^[24]设计的人工锌指蛋白转录因子可调节内源性血管内皮生长因子(VEGF)的表达,防止糖尿病神经病变。Liu 等^[25]研究发现,锌指蛋白和 VP16 或 p65 转录激活域的融合表达蛋白也可激活 VEGF-A 的表达。Bartsevich 等^[26]从酵母表达的组多肽文库中筛选得到了一种新的锌指蛋白转录因子,该转录因子可以调节 K562 细胞染色体中多药耐药基因(Multi-Drug Resistance gene, MDR gene)的表达。魏勇^[27]设计了一种人工锌指蛋白转录因子,该转录因子可启动 ECV304 细胞中内源性 A20 基因的表达,对内毒素诱导的细胞凋亡具有明显的抑制作用。Sangamo 公司的新药 Diabetic Neuropathy (DN) SB-509 是一种人工锌指蛋白,该蛋白结合在具有神经系统保护功能的 VEGF-A 基因上,可激活 VEGF-A 基因,从而达到保护神经系统的目的,目前该药物正在进行 2 期临床试验。研究人员还用 SB-509 来尝试治疗肌萎缩性侧索硬化症(Amyotrophic lateral sclerosis, ALS),前期试验表明,SB-509 可以明显改善患者的肌肉功能。同时,SB-509 用于 ALS 的治疗也已进入了 2 期临床试验。

2.2 锌指核酸酶

ZFN 在基因治疗中的应用主要包括 2 个方面:第一,ZFN 介导的基因中断(基因沉默),即利用 ZFN 切断某些与疾病相关的基因(如艾滋病毒);第二,ZFN 介导的基因更正,即用“正常”或更正的“DNA 序列”替换致病基因,如 X-相关免疫缺陷、镰状细胞性贫血、 β -地中海贫血突变等单基因导致的疾病。

2.2.1 ZFN 介导的基因敲除在基因治疗基础研究中的作用 ZFN 介导的基因敲除可以精确地敲除靶基因,这使 ZFN 在研究特定基因的功能、发现人

类疾病的相关基因及其调控机制,或者建立人类疾病模型进行相关研究等方面有广泛的应用前景。锌指核酸酶技术曾用于敲除果蝇、斑马鱼胚胎中的特定基因^[28-30]。ZFN 对人类干细胞基因组的靶向敲除,有助于研究干细胞分化过程中的关键调控基因^[31]。

大鼠在许多生理特性上要较小鼠更接近人类,是建立人类疾病模型的理想对象。2009 年,Geurts 等^[32]针对绿色荧光蛋白基因和 2 种内源性大鼠基因(IgM 基因和 Rab38 基因)设计并验证了 3 种 ZFN,通过原核注射或胞浆内注射将 ZFN 转移到转基因动物体内的单个胚胎细胞中,结果显示转基因动物中绿色荧光蛋白基因被完全敲除;32 种 IgM 基因和单一 Rab38 基因的敲除率高达 25%~100%。使用锌指核酸酶技术突变的大鼠后代同样带有突变基因,这证明该修饰是可永久遗传的。

ZFN 介导的基因敲除技术,可以精确地修饰基因或其周围的调控元件,从而可为研究人类疾病构建良好的动物模型,有助于使大鼠在生理学、免疫学、人类遗传病等的研究中发挥更大的作用。ZFN 技术将帮助发现更多的新的人类疾病相关基因,推动基因治疗研究和应用不断取得突破性进展。

2.2.2 ZFN 介导的基因沉默在基因治疗中的应用 利用 ZFN 介导的基因敲除能够容易、准确地沉默基因,进而达到治疗疾病的目的。

HIV 病毒通常是附着在 T 细胞表面的 CCR5 蛋白受体上而潜入人体细胞的。Samson 等^[33]研究表明,CCR5 基因第 32 位碱基的缺失将赋予 T 细胞对 HIV 的抗性。Kandavelou 等^[34]利用人工 ZFN 进行了 CCR5 基因的定点敲除。在小鼠试验中,处理后的细胞对艾滋病毒的持续攻击表现出很强的抗性。Perez 等^[35]使用人工 ZFN 破坏内源 CCR5 基因,获得了 HIV 抗性基因型。Holt 等^[36]利用 ZFN 打靶修饰获得了具有 HIV 抗性的人体干细胞。现 Sangamo 公司正申请在 HIV 病人身上测试该种 ZFN 药物的临床试验许可。

目前,全世界乙型肝炎病毒(HBV)的慢性感染者多达 3.5 亿~4.0 亿人,每年因其造成上百万人死亡。现在常用的乙型肝炎疗法主要是阻止新病毒的形成,但对已经存在的病毒无杀伤作用。Cradick 等^[37]以乙肝病毒 DNA 为靶向基因,使用 ZFN 在特定位点进行切割,结果表明,26%的靶序列仍是线性的,10%发生了剪切和错配,乙型肝炎 RNA 表达水平降低 29%。这些结果第一次证明了利用 ZFN 靶

向敲除病毒 DNA 及其用于治疗乙型肝炎等类似疾病的可能性。

2.2.3 ZFN 介导的基因同源重组修复在基因治疗中的作用 ZFN 曾用于介导非洲爪蟾卵细胞、线虫、果蝇、斑马鱼细胞、人类细胞以及其他动植物细胞中的同源重组^[38-45],重组效率高达 15%。

Urnov 等^[46]利用 ZFN 介导的同源重组修复技术实现了人类细胞 *IL2R γ* 基因的高效修复,其针对因 1 个 *IL2R γ* 基因突变引起的 X-性联严重联合免疫缺陷病(X-linked severe combined immune deficiency, X-SCID),设计了 4 锌指的 ZFN 用于 *IL2R γ* 基因的修复,结果表明,在无选择压力下,该基因的正确修复效率达 18%,其中 7%的细胞中的 2 条 X 染色体均发生了正确的基因修复。在人类细胞中如此高的同源重组率充分说明,将 ZFN 用于疾病基因治疗是可行的。

Sangamo 公司已申请了镰状细胞贫血等单基因疾病药物的管制许可,拟在原地细胞中进行 ZFN 介导的基因纠正,用于治疗因编码血红蛋白基因突变引起的镰刀形贫血病、地中海贫血病等多种血红蛋白病。

3 存在问题

3.1 有治疗价值的基因少

ZFN 介导的基因重组修复,需要将靶基因的正确克隆作为供体注入到靶细胞当中,因此锌指核酸酶技术在基因治疗中的实施,是以疾病相关基因的发现和克隆为前提的。但目前锌指核酸酶技术在基因治疗上面临着有治疗价值的基因太少的难题,对于多基因导致的疾病,往往纠正 1 个基因并不能解决问题。锌指核酸酶技术和生物学的发展是相辅相成的,应进一步发挥 ZFN 在靶向基因敲除及基因功能研究方面的作用,发现和克隆更多有临床应用价值的疾病相关基因;利用 ZFN 对人类疾病相关基因的靶向敲除和修饰,建立各种人类疾病动物模型,更深入地揭示人类疾病的发病机理,更好地为人类疾病的基因治疗服务。

3.2 脱靶与安全问题

锌指核酸酶技术是基因治疗领域的新兴技术,其在基因治疗方面的应用仍然处于起步阶段,尽管其特异性和安全性较其他的基因治疗方式有了明显的提高,但 DNA 剪切的准确性并不像人们预期的那样高,而且由于锌指蛋白对特异序列识别的特异性和亲和性还不够高,从而不可避免地会发生错误

酶切,即脱靶(off-target)问题,这些非特异性行为均可能带来不同程度的细胞毒性。

Doyon 等^[28]和 Meng 等^[29]分别将编码特异性 ZFN 的 mRNA 注入到斑马鱼单细胞期胚胎中,对靶基因进行了高效定点敲除,但通过 SOLEXA 测序发现,在形态正常的胚胎中,约有 1%的脱靶现象出现。Porteus 等^[47]利用 ZFN 技术高效率地修复了体细胞中突变的绿色荧光蛋白(Green fluorescence protein, GFP)基因,但 75%的靶细胞由于 ZFN 的过量表达而死亡。Doyon 等^[28]、Meng 等^[29]和 Perez 等^[35]通过序列搜索和体外结合的方式,检测 ZFN 潜在的结合位点,并分别发现了 ZFN 可以诱导低水平非靶基因的突变。Urnov 等^[46]在设计 ZFN 时,通过增加锌指单元的办法提高 ZFN 对识别序列的专一性和亲和性,进而降低其细胞毒性。

设计出高特异性的锌指组合是锌指核酸酶技术的瓶颈,但该技术一直为 Sangamo 生物公司所垄断。2008 年 7 月,美国麻省总医院 Maeder 等^[48]采用开源方式(Oligomerized pool engineering, OPEN),选择性地针对不同 DNA 序列,建立了 66 个锌指库,从库中筛选了 37 对 ZFN,将其分别作用于 1 个植物基因和 3 个人类基因,基因敲除率可达 1%~50%。因此,新的开源方式筛选方法对促进 ZFN 的研究具有重要意义。

综上所述,仍需要改进和完善锌指蛋白的组装或筛选方法,加大对 ZFN 与 DNA 作用机理的研究,提高 ZFN 对靶位点的亲和性和识别特异性,从而提高 ZFN 的靶向效率,降低 ZFN 的细胞毒性。

4 研究展望

为了筛选得到高亲和性的锌指蛋白,获得高效率的 ZFN,本实验室建立了人工 ZFN 筛选和活性验证的技术体系。利用细菌双杂交技术,采用 OPEN 方法建立了锌指文库,并筛选出了靶向结合人类 *DYRK1A* 和 *CFTR* 基因的 35 对和 24 对锌指蛋白,然后组装成 ZFN,目前正在哺乳细胞水平验证其靶向切割 DNA 的活性。为了提高 ZFN 的靶向效率和特异性,降低 ZFN 的细胞毒性,该实验室也在研究不同来源锌指框架、锌指个数、锌指间连接多肽对 ZFN 介导基因靶向修饰效率的影响。通过对上述因素的系统研究,旨在提高 ZFN 靶向修饰人类疾病相关基因的特异性和降低细胞毒性。

目前,锌指核酸酶技术还处在进一步完善阶段,更多的实验室会对 ZFN 的基本理论和实际应用进

行更深入系统的研究。随着锌指核酸酶技术的不断完善和发展,将会有少数临床试验方案取得明显疗效,第一批锌指核酸酶技术相关药物可能上市。ZFN 在构建各种人类疾病动物模型、研究人类疾病发病机理和治疗人类遗传疾病方面将体现出极大的应用价值。利用 ZFN 对人体细胞进行靶向修饰,可纠正某些遗传缺陷,为克服许多现阶段无法治愈的疾病提供一个强大的治疗工具。此外,ZFN 技术还可能用于改善动物体质和预防各种疾病等。

【参考文献】

- [1] 陈立,陈浩明,陆华中,等.腺相关病毒介导的小鼠Ⅸ因子在血友病 B 小鼠体内的表达研究[J].中国科学: C 辑,2003,33(2):175-181.
Chen L,Chen H M,Lu H Z,et al. The study of expression of factor Ⅸ in Hemophilia B mice mediated by AAV[J]. Science in China: Ser C,2003,33(2):175-181. (in Chinese)
- [2] Pearson S,Jia H,Kandachi K. China approves first gene therapy[J]. Nat Biotechnol,2004,22(1):3-4.
- [3] Masahiko I,Ryosei M,Kohei K,et al. Auditory hair cell replacement and hearing improvement by *Atoh1* gene therapy in deaf mammals[J]. Nat Medicine,2005,11(3):271-276.
- [4] Wang X J,Wang Y Q,Xin H Y,et al. Altered expression of circadian clock gene, *mPer1*, in mouse brain and kidney under morphine dependence and withdrawal[J]. J Circadian Rhythms,2006,22(4):9-13.
- [5] 邓洪新,田聆,魏于全. 基因治疗的发展现状、问题和展望[J]. 生命科学,2005,17(3):196-199.
Deng H X,Tian L,Wei Y Q. Current status, problems and prospects in gene therapy[J]. Chinese Bulletin of Life Sci,2005,17(3):196-199. (in Chinese)
- [6] 王令,张存芳,张智英. 锌指核酸酶在基因组靶向修饰中的应用[J]. 中国生物化学与分子生物学报,2009,25(7):585-589.
Wang L,Zhang C F,Zhang Z Y. Application of zinc finger nucleases in genome targeting modification[J]. Chinese J of Biochem and Mol Biol,2009,25(7):585-589. (in Chinese)
- [7] Jason M,Wayne D M,Erik M J,et al. Induction and repair of zinc-finger nuclease-targeted double-strand breaks in *Caenorhabditis elegans* somatic cells[J]. Proc Natl Acad Sci USA,2006,103(44):16370-16375.
- [8] Porteus M H,Carroll D. Gene targeting using zinc finger nucleases[J]. Nat Biotechnol,2005,23(8):967-973.
- [9] Wu J,Kandavelou K,Chandrasegaran S. Custom designed zinc finger nucleases: What is next? [J]. Cell Mol Life Sci,2007,64(22):2933-2944.
- [10] Cathomen T,Joung J K. Zinc finger nucleases: The next generation emerges[J]. Mol Ther,2008,16(7):1200-1207.
- [11] Pavletich N P,Pabo C O. Zinc finger DNA recognition crystal structure of a Zif 268-DNA complex at 2.1 Å [J]. Science,1991,252(5007):809-817.
- [12] Wilson J H. Pointing fingers at the limiting step in gene targeting [J]. Nat Biotechnol,2003,21(7):759-760.
- [13] Miller J,McLachlan A D,Klug A. Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor III A from *Xenopus oocytes* [J]. EMBO Journal,1985,4(6):1609-1614.
- [14] Oishi Y,Manabe I,Tobe K,et al. Krüppel-like transcription factor KLF5 is a key regulator of adipocyte differentiation [J]. Cell Metab,2005,1(1):27-39.
- [15] Chen Z,Torrens J I,Anand A,et al. Krox20 stimulates adipogenesis via C/EBP[β]-dependent and-independent mechanisms [J]. Cell Metab,2005,1(2):93-106.
- [16] Tong Q,Tsai J,Tan G,et al. Interaction between GATA and the C/EBP family of transcription factors is critical in GATA-mediated suppression of adipocyte differentiation [J]. Mol Cell Biol,2005,25(2):706-715.
- [17] Kim Y G,Cha J,Chandrasegaran S. Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to *FokI* cleavage domain [J]. Proc Natl Acad Sci USA,1996,93(3):1156-1160.
- [18] Wah D A,Bitinaite J,Schildkraut I,et al. Structure of *FokI* has implications for DNA cleavage [J]. Proc Natl Acad Sci USA,1998,95(18):10564-10569.
- [19] Mani M,Smith J,Kandavelou K,et al. Binding of two zinc finger nuclease monomers to two specific sites is required for effective double-strand DNA cleavage [J]. Biochem Biophys Res Commun,2005,334(4):1191-1197.
- [20] Smith J,Bibikova M,Whitby F G,et al. Requirements for double strand cleavage by chimeric restriction enzymes with zinc finger DNA-recognition domains [J]. Nucleic Acids Res,2000,28(17):3361-3369.
- [21] Beerli R R,Dreier B,Barbas III C F. Positive and negative regulation of endogenous genes by designed transcription factors [J]. Proc Natl Acad Sci USA,2000,97(4):1495-1500.
- [22] Klug A,Rhodes D. Zinc fingers: A novel protein fold for nucleic acid recognition [J]. Cold Spring Harb Symp Quant Biol,1987,52:473-482.
- [23] Reik A,Gregory D,Urnov F D. Biotechnol and therapeu: Chromatin as a target [J]. Curr Opin Genet Dev,2002,12:233-242.
- [24] Pricel S A,Dent C,Jimenez B D,et al. Gene transfer of an engineered transcription factor promoting expression of VEGF-A protects against experimental diabetic neuropathy [J]. Diabetes,2006,55(6):1847-1854.
- [25] Liu P Q,Rebar E J,Zhang L,et al. Regulation of an endogenous locus using a panel of designed zinc finger proteins targeted to accessible chromatin regions [J]. The Journal of Biological Chemistry,2001,276(13):11323-11334.
- [26] Bartsevich V V,Juliano R L. Regulation of the *MDR1* gene by transcriptional repressors selected using peptide combinatorial libraries [J]. Mol Pharm,2000,58(1):1-10.
- [27] 魏勇. 基于 A20 基因为药物靶的人工锌指蛋白转录因子的设计[D]. 重庆:第三军医大学,2009.
Wei Y. Design of an artificial zinc finger protein transcription

- factors acting on the A20 gene [D]. Chongqing: Third Military Medical University, 2009. (in Chinese)
- [28] Doyon Y, McCammon J M, Miller J C, et al. Heritable targeted gene disruption in zebrafish using designed zinc-finger nucleases [J]. Nat Biotechnol, 2008, 26(6): 702-708.
- [29] Meng X, Noyes M B, Zhu L J, et al. Targeted gene inactivation in zebrafish using engineered zinc-finger nucleases [J]. Nat Biotechnol, 2008, 26(6): 695-701.
- [30] Ramirez C L, Foley J E, Wright D A, et al. Unexpected failure rates for modular assembly of engineered zinc fingers [J]. Nat Methods, 2008, 5(5): 374-375.
- [31] Bartsevich V V, Miller J C, Case C C, et al. Engineered zinc finger proteins for controlling stem cell fate [J]. Stem Cells, 2003, 21(6): 632-637.
- [32] Geurts A M, Cost G J, Freyvert Y, et al. Knockout rats via embryo microinjection of zinc-finger nucleases [J]. Science, 2009, 325(5939): 433.
- [33] Samson M, Libert F, Doranz B J. Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene [J]. Nature, 1996, 382(6593): 722-725.
- [34] Kandavelou K, Ramalingam S, London V, et al. Targeted manipulation of mammalian genomes using designed zinc finger nucleases [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2009, 388(1): 56-61.
- [35] Perez E E, Wang J B, Miller J C, et al. Establishment of HIV-1 resistance in CD4⁺ T cells by genome editing using zinc-finger nucleases [J]. Nat Biotechnol, 2010, 26(7): 808-816.
- [36] Holt N, Wang J B, Kim K, et al. Human hematopoietic stem/progenitor cells modified by zinc-finger nucleases targeted to CCR5 control HIV-1 *in vivo* [J]. Nat Biotechnol, 2010, 28(8): 839-847.
- [37] Cradick T J, Keck K, Bradshaw S, et al. Zinc-finger nucleases as a novel therapeutic strategy for targeting hepatitis B virus DNAs [J]. Mol Ther, 2010, 18(5): 947-954.
- [38] 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 [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2006, 103(44): 16370-16375.
- [39] Carroll D, Beumer K J, Morton J J, et al. Gene targeting in drosophila and *caenorhabditis elegans* with zinc-finger nucleases [J]. Methods in Mol Biol, 2008, 435: 63-77.
- [40] Bibikova M, Carroll D, Segal D J, et al. Stimulation of homologous recombination through targeted cleavage by chimeric nucleases [J]. Mol Cell Biol, 2001, 21(1): 289-297.
- [41] Bibikova M, Golic M, Golic K G, et al. Targeted chromosomal cleavage and mutagenesis in *Drosophila* using zinc-finger nucleases [J]. Genetics, 2002, 161(3): 1169-1175.
- [42] Beumer K, Bhattacharyya G, Bibikova M, et al. Efficient gene targeting in *Drosophila* with zinc finger nucleases [J]. Genetics, 2006, 172(4): 2391-2403.
- [43] 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 [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 104(9): 3055-3060.
- [44] Lee H J, Kim E, Kim J S. Targeted chromosomal deletions in human cells using zinc finger nucleases [J]. Genome Res, 2010, 20(1): 81-89.
- [45] Durai S, Mani M, Kandavelou K, et al. Zinc finger nucleases: Custom-designed molecular scissors for genome engineering of plant and mammalian cells [J]. Nucleic Acids Res, 2005, 33(18): 5978-5990.
- [46] Urnov F D, Miller J C, Lee Y L, et al. Highly efficient endogenous human gene correction using designed zinc-finger nucleases [J]. Nature, 2005, 435(7042): 646-651.
- [47] Porteus M H, Baltimore D. Chimeric nucleases stimulate gene targeting in human cells [J]. Science, 2003, 300(5620): 763-768.
- [48] Maeder M L, Thibodeau-Beganny S, Osiak A, et al. Rapid open source engineering of customized zinc-finger nucleases for highly efficient gene modification [J]. Mol Cell, 2008, 31(2): 294-301.