

## 人工锌指核酸酶突变 EGFP 基因的功能分析

袁玉国, 于宝利, 宋绍征, 周峰, 张利清, 顾迎迎, 禹明慧, 成勇

扬州大学兽医学院 江苏省动物重要疫病与人兽共患病防控协同创新中心, 江苏 扬州 225009

袁玉国, 于宝利, 宋绍征, 等. 人工锌指核酸酶突变 EGFP 基因的功能分析. 生物工程学报, 2013, 29(11): 1573-1580.  
Yuan YG, Yu BL, Song SZ, et al. Targeted exogenous EGFP gene editing in caprine fetus fibroblasts using zinc-finger nucleases. Chin J Biotech, 2013, 29(11): 1573-1580.

**摘要:** 锌指核酸酶技术在基因定点修饰中具有效率高和特异性好等特点, 并成功应用于数十种生物。目前, 该技术是否能应用羊上尚未报道。为了敲除转基因山羊标记基因 (EGFP), 构建了一对针对 EGFP 外显子上的锌指核酸酶表达载体, 将其电转染至转 EGFP 基因胎儿成纤维细胞中, 研究了锌指核酸酶突变 EGFP 基因的效率 and 方式, 利用基因显微注射单细胞获得的转基因 (EGFP) 细胞系作为锌指核酸酶的靶细胞。结果显示, 通过锌指核酸酶的突变作用, 转染后的细胞发绿色荧光比例下降, 测序结果显示在 EGFP 外显子中插入 1 个碱基 G, 导致编码 EGFP 基因的阅读框改变, 从而起到基因突变的作用。结果表明, 文中构建的锌指核酸酶对 EGFP 基因有突变作用, 可以为以后获得无标记基因供核细胞进行体细胞核移植生产克隆羊奠定基础。

**关键词:** 人工锌指核酸酶, 核移植, EGFP, 基因打靶, 细胞显微注射, 山羊体细胞

## Targeted exogenous EGFP gene editing in caprine fetus fibroblasts by zinc-finger nucleases

Yuguo Yuan, Baoli Yu, Shaozheng Song, Feng Zhou, Liqing Zhang, Yingying Gu, Minghui Yu, and Yong Cheng

*Jiangsu Co-innovation Center for Prevention and Control of Important Animal Infectious Diseases and Zoonoses, College of Veterinary Medicine, Yangzhou University, Yangzhou 225009, Jiangsu, China*

**Abstract:** Gene knockout by ZFNs (zinc-finger nucleases) is efficient and specific, and successfully applied in more than

**Received:** January 17, 2013; **Accepted:** April 8, 2013

**Supported by:** National Natural Science Foundation of China (No. 31101871), National Major Special Projects on New Cultivation for Transgenic Organisms (Nos. 2011ZX08008-004, 2009ZX08008-009B), Priority Academic Program Development of Jiangsu Higher Education Institutions.

**Corresponding author:** Yong Cheng. Tel: +86-514-87979348; E-mail: cheng1391@hotmail.com

国家自然科学基金 (No. 31101871), 国家转基因生物新品种培育重大专项 (Nos. 2011ZX08008-004, 2009ZX08008-009B), 江苏高校优势学科建设工程资助。

网络出版时间: 2013-07-22

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20130722.1556.004.html>

10 organisms. Currently, it is unclear whether this technology can be used for knocking-out enhanced green fluorescent protein (EGFP) gene in transgenic goats. Here we constructed and used ZFN-coding plasmids to produce genetic knockouts in the cells of cloned fetus produced from donor cells by microinjection of EGFP gene. Following introduced plasmids into caprine primary cultured fetus fibroblasts by electroporation, targeting of a transgene resulted in sequence mutation. Using the flow cytometric analysis, we confirmed the disappearance of EGFP expression in treated cells. Sequence from PCR products corresponding to targeted site showed that insertion of a G into the exon of EGFP resulted in frame shift mutation. These results suggest that ZFN-mediated gene targeting can apply to caprine fetus fibroblasts, which may open a unique avenue toward the creation of gene knockout goats combining with somatic cell nuclear transfer.

**Keywords:** zinc-finger nucleases, nuclear transfer, EGFP, gene targeting, microinjection of cell, caprine somatic cell

基因组靶向修饰是近年来生命科学研究的热点之一,特别是在基因功能分析、生产模式动物、治疗人类疾病和优良家畜育种等方面,基因组靶向修饰具有广阔的应用前景<sup>[1]</sup>。应用同源重组可实现对目的基因靶向修饰,但由于其费时、效率低 ( $10^{-5}\sim 10^{-7}$ ) 等缺点,成为限制该项技术广泛应用的瓶颈之一<sup>[1-2]</sup>。利用人工锌指核酸酶 (Zinc-finger nucleases, ZFNs) 可引入 DNA 定点 DSBs (Double-strand breaks, DSBs) 以高效介导基因定点突变,极大提高基因打靶效率 (甚至可达到 10% 以上效率),从而给基因组靶向修饰带来了新的希望<sup>[2-4]</sup>。ZFNs 由一个识别特定 DNA 序列的锌指蛋白域和非特异性核酸内切酶 (*Fok I*) 组成,其作用机理是 DNA 结合域与特定 DNA 序列结合,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<sup>[5]</sup>。每个锌指蛋白可特异性识别并结合 DNA 链上的 3 个连续碱基,一个由 3 个及以上的锌指蛋白组成的锌指蛋白域可结合 9 个及以上碱基长度的靶位点,并且改变锌指蛋白中的几个残基可产生新的具有不同 DNA 结合特异性的 ZFNs<sup>[6]</sup>。因此,可通过基因工程改造锌指结构域使锌指核酸酶针对复杂

基因组里的特定 DNA 序列,借助内源 DNA 的修复机制可精确修饰高等生物的基因组,不仅可以提高基因组靶向修饰的效率几个数量级,而且具有极高的特异性<sup>[7-8]</sup>。随着 ZFNs 介导基因打靶技术的发展和成熟,农业育种和包括为人类疾病和器官移植的大动物模型在内的医学研究等将毫无疑问受益于此项新技术<sup>[1,4]</sup>。在基因和细胞治疗方面,利用 ZFNs 对人体细胞、胚胎干细胞和诱导的多能干细胞的靶基因座进行靶向修饰,均获得了较好的效率<sup>[9-10]</sup>。

目前,哺乳动物转基因大多采用体细胞克隆的方法,在此过程中,筛选转基因细胞必须应用抗性或标记基因,这就使得获得的转基因动物携带抗性或标记基因,但转基因动物抗性或标记基因的生物安全性是一个必须解决的问题,而探索应用 ZFNs 进行标记基因删除的研究是一项极有意义的工作。目前,ZFNs 是否能介导山羊体细胞基因组靶向修饰以及修饰方式未见报道,本实验构建并表达针对 EGFP 基因的 ZFNs 进行转基因山羊胎儿成纤维细胞打靶的研究,以揭示 ZFNs 靶向修饰 EGFP 基因的方式和效率,为 ZFNs 结合体细胞核移植技术进行转基因动物标记基因敲除、提高生物安全性提供新思路。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料

质粒 pMLM290 (Addgene plasmid 21872) 和 pMLM292 (Addgene plasmid 21873) 购自 addgene 公司; 质粒 pAPLM 由本实验室保存; 实验羊购自高邮市菱唐乡; 各种限制性内切酶、DNA 连接试剂盒购自大连宝生物工程有限公司; DNA 纯化试剂盒购自 QIAGEN 公司; 转染液购自 Eppendorf 公司; 细胞培养相关试剂购自 HyClone 公司; 核移植相关试剂购自 Sigma 公司。

### 1.2 人工锌指核酸酶真核表达载体的构建

将 pMONO-neo-GFP 基因序列 (www.invivogen.com) 输入到 CoDA 软件 (www.zifit.partners.org) 中进行分析, 选取 EGFP 编码序列上的一个靶位点 (ACAATCTTCttaaGATGATGGA) 进行锌指蛋白表达载体的构建 (表 1)。人工合成表达识别靶序列左右侧 3 个三联体氨基酸序列的 DNA (EGFP-L ZFNs sequence, EGFP-R ZFNs sequence, 见图 1), 用 *Xba* I 和 *Bam*H I 双酶切后, 凝胶回收 276 bp 片段。同时用 *Xba* I 和 *Bam*H I 分别双酶切 pMLM290 和 pMLM292 质粒, 线性化长片段再用连接酶与上述的 276 bp 片段分别连接构建左右侧载体。构建正确的载体用 *Apa*L I 和 *Nru* I 双酶切, 胶回收 3 313 bp 片段用于细胞打靶的研究。

### 1.3 转基因克隆胎儿成纤维细胞系的建立

用 *Sal* I 和 *Not* I 酶切、胶回收含 EGFP 表达框的质粒 pAPLM 片段<sup>[11]</sup>, 稀释成 2~3 ng/ $\mu$ L 用于单细胞基因注射。在 Eppendorf 显微操作系统

中进行胎儿成纤维细胞基因注射, 具体方法见文献[12]。G418 筛选后获得的转基因细胞作供核细胞。山羊超数排卵、手术取卵、卵母细胞去核、移核及胚胎移植操作方法同文献[13]。移植受体 35 d B 超妊娠检查, 怀孕受体手术取胎儿建立转基因克隆胎儿成纤维细胞系 (2#), 方法同前。细胞冻存于液氮中备用。

### 1.4 ZFNs 电转染转基因胎儿成纤维细胞及 FACS 分析

复苏 2#细胞, 培养至 70%~80% 汇合时进行电转染含左右侧 3 313 bp 的 ZFNs, 条件同上。同时共转染用 *Apa*L I 和 *Nru* I 双酶切 pMLM290 和 pMLM292 片段作对照。转染细胞电转染后分 2 份, 一份稀释成单细胞培养在 96 孔板中, 另一部分培养在六孔板中, 在第 6 天时, 0.25% 胰酶消化细胞, 加 D-hank's 吹打分散、离心, 重复 3 次, 用含 1% FCS 的 D-hank's 吹打细胞, 然后细胞悬浮于 D-hank's 中, 以  $1\times 10^6$  的细胞数进行 FACS 荧光分析, 实验重复 3 次。

### 1.5 细胞 EGFP 基因序列突变分析

96 孔板中细胞长满后, GFP 观察呈阴性的细胞传至 48 孔板, 生长至 90% 汇合时, 收集细胞, 用天根细胞基因组 DNA 提取试剂盒提取 DNA。以 DNA 为模板, 用跨突变区的特异性引物 (Forward: 5'-GCTGGATGGTGATGTGAATGG-3'; Reverse: 5'-GTGTTCTGCTGGTAATGGTCTGC-3') PCR 扩增 484 bp 产物, 扩增条件为: 94  $^{\circ}$ C 5 min; 94  $^{\circ}$ C 30 s, 62  $^{\circ}$ C 40 s, 72  $^{\circ}$ C 40 s; 72  $^{\circ}$ C 延伸 5 min。然后将 PCR 产物克隆至 T 载体上, 挑取 10 个克隆送上海生工生物公司测序。

表 1 EGFP 上 ZFNs 靶位点及其锌指氨基酸序列

Table 1 EGFP ZFNs target sites and amino-acid sequences of designed ZF recognition helices

ZFNs	ZFN binding sequence	Finger 1	Finger 2	Finger 3
EGFP-L	<u>TGTTAGAA</u> GaaattcCTACTACCT	KRQHLEY	VRHNLTR	QRNNLGR
EGFP-R	ACAATCTTC <u>ttaagGATGATGGA</u>	DKTKLRV	VRHNLTR	ISHNLAR

Each ZFNs target sites are indicated by the underlines. Fingers 1-3 show the amino acids of zinc-finger recognition helices of each ZFNs.

#### EGFP-L ZFNs sequence

GAAAAAAATCTAGACCCGGGGAGCGCCCTTCCAGTGTGCAATTTGCATGCGGAACTTTTCGAAACGTCAGCATTGGGA  
ATATCATACCCGTACTCATACCCGGTGAAAAACCGTTTCAGTGTGCGATCTGTATGCGAAATTTCTCCGTTTCGTCATAACT  
TGACCCGTCATCTACGTACGCACACCCGGCGAGAAGCCATTCCAATGCCGAATATGCATGCGCAACTTCAGTCAGCGTAA  
CAACTTGGGTCGTCACCTAAAAACCCACCTGAGGGGATCCAAGAAGGA

#### EGFP-R ZFNs sequence

GAAAAAAATCTAGACCCGGGGAGCGCCCTTCCAGTGTGCAATTTGCATGCGGAACTTTTCGGACAAAACCAAATTGCG  
TGTTATACCCGTACTCATACCCGGTGAAAAACCGTTTCAGTGTGCGATCTGTATGCGAAATTTCTCCGTTTCGTCATAACT  
TGACCCGTCATCTACGTACGCACACCCGGCGAGAAGCCATTCCAATGCCGAATATGCATGCGCAACTTCAGTATTTCTCA  
TAACTTGGCAGTCACCTAAAAACCCACCTGAGGGGATCCAAGAAGGA

图 1 ZFNs 识别区左右侧编码序列

Fig. 1 Left and right coding sequence of ZFNs.

## 2 结果

### 2.1 人工锌指核酸酶真核表达载体的构建

将 EGFP 基因序列输入 CoDA 软件中, 将条件设置 5~6 个, 进行分析, 找到一个锌指蛋白识别编码绿色荧光蛋白基因的靶位点, 如表 2 所示左侧 3 个三联体 DNA 是 TGTGATGAA, 右侧 3 个三联体 DNA 是 GGAGATGAT, 左右侧 3 个锌指蛋白所对应的氨基酸序列和编码氨基酸对应的 DNA 序列见 EGFP-R ZFNs 和 EGFP-L ZFNs sequence, 斜体序列为酶切位点。人工合成这两段 DNA 序列, 用 Xba I 和 BamH I 双酶回收后分别插入到 pMLM290 和 pMLM292 载体中, 构建成一对锌指核酸酶表达载体 pLZFE1729 和 pRZFE1729 (图 2), 用 BamH I 酶切均可有 5 973 bp

条带 (图 3), 与预期结果相符。

### 2.2 转基因克隆胎儿成纤维细胞系的建立

运用单细胞基因显微注射的方法对培养的贴壁细胞进行注射, 细胞经 G418 筛选后获得了两个单克隆细胞株, 且在荧光显微镜下均可观察到绿色荧光。用这两株细胞进行了 2 次核移植实验, 共超排了 8 只供体山羊, 获得了 57 枚 MII 期卵母细胞, 将 29 枚激活胚移植到 4 只受体中, 其中 3 只 35 dB 超检查呈阳性, 取 2#受体羊胎儿, 建立了 2#-1 和 2#-2 两个胎儿细胞系。

### 2.3 打靶细胞 FACS 分析

pLZFE1729 和 pRZFE1729 载体酶切回收后共电转染 2#-1 细胞, 在第 6 天收集细胞进行 FACS 分析, 转染锌指核酸酶的细胞仅有 0.2% 细胞有

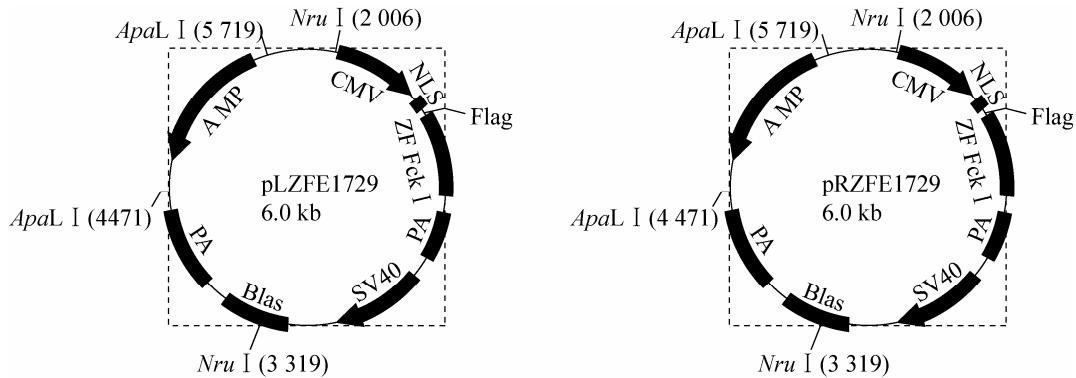


图 2 pLZFE1729 和 pRZFE1729 质粒图

Fig. 2 Plasmids of pLZFE1729 and pRZFE1729. CMV: CMV promoter; NLS: SV40 nuclease localization signal; ZF: sequence of EGFP-L ZFNs sequence and EGFP-R ZFNs; *Fok* I: *Fok* I nuclease; PA: BGH polyadenylation sequence; SV40: SV40 early promoter and origin; Blas: blasticidin resistance gene.

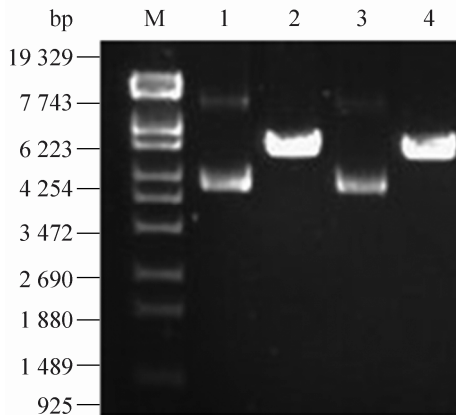


图 3 质粒 pLZFE1729 和 pRZFE1729 的酶切鉴定

Fig. 3 Identification of pLZFE1729 and pRZFE1729 by enzyme digestion. M: marker T14; 1, 3: plasmid of pLZFE1729 and pRZFE1729; 2, 4: pLZFE1729 and pRZFE1729 digested with *Bam*H I.

绿色荧光, 而对照组细胞中有 5% 的细胞有可见绿色荧光 (图 4), 两者存在差异, 表明构建的锌指核酸酶转染后对细胞 EGFP 基因有切割左右或突变作用, 导致细胞发绿色荧光的比例减少。

## 2.4 突变靶序列测序分析

PCR 扩增细胞转染后的靶序列区域, 产物测

序结果与正常序列经 Blast 软件比对结果显示, 在外显子 GTTAC (1 894 bp 位置) 后增加一个碱基 G (图 5), 将突变后的 EGFP 编码序列输入蛋白翻译软件进行分析, 编码框发生改变, 其相应的氨基酸由原先的 239 个变成 156 个。

## 3 讨论

目前构建人工锌指核酸酶的方法有模块组装 (Modular assembly, MA)、寡聚文库构建 (Oligomerized pool engineering, OPEN)、上下文依赖组装 (Context-dependent assembly, CoDA) 等方案<sup>[14]</sup>, 为方便广大研究人员, 锌指协会开发了一个锌指靶序列搜索工具 (Zinc finger targeter, ZiFiT, <http://zifit.partners.org/ZiFiT/>), 输入特定序列并设置一定参数, 可用于寻找到适宜于这 3 种方案的的 3-三联子目标序列, 并对所得靶位点构建 ZFN 成功可能性进行评估。本实验运用 CoDA 方法将 EGFP 编码序列输入到该网站上进行分析, 在编码序列上找到一个靶位点, 并将获得的三联子对应 DNA 序列连接到含有

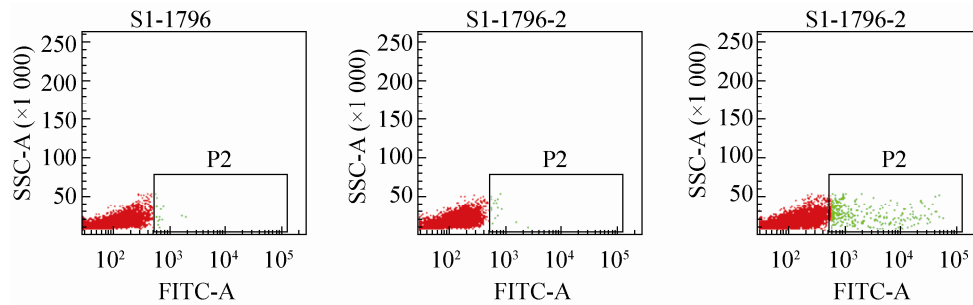


图4 FACS 分析绿色荧光强度

Fig. 4 Analysis for EGFP fluorescence intensity by FACS. In the ZFNs-treated cells (S1-1796, S1-1796-2), the number of cells expressing of EGFP was 0.2%. In the control (S1-1796-3), the number of cells expressing of EGFP was 5%.

```

EGFP1870 CAACTATAATTCTCACAATGTTTAC ATTATGGCAGATAAGCAGAAGAATG 1919
          |||
Mutant sequence CAACTATAATTCTCACAATGTTTACGATTATGGCAGATAAGCAGAAGAATG
  
```

图5 突变细胞 PCR 产物序列 Blast 比对结果

Fig. 5 Blast result of PCR product of mutant cells.

*Fok I* 核酸内切酶的通用质粒 (pMLM290 和 pMLM292) 中, 即构建一对人工锌指核酸酶表达质粒 (pLZFE1729 和 pRZFE1729)。

基因敲除或突变以研究基因功能和获得动物模型是一项非常有用的方法。传统的基因敲除技术如同源重组效率低且需要长期的药物筛选, 目前仅在小鼠和人上获得胚胎干细胞, 因而限制了该技术在家畜上的应用。培养体细胞打靶效率低也是体细胞核移植技术较难应用于大型家畜上的主要原因。随着 ZFNs 技术的发展和逐渐成熟, 其在哺乳动物基因打靶上的优势已逐渐显现。通过显微注射的方法将 ZFNs 质粒或 mRNA 注射到胚胎原核, 出生大鼠基因敲除效率最高可达 40%, 并且可通过生殖系遗传给后代<sup>[15]</sup>。由于用显微注射方法产生的动物存在嵌合体等缺点, 且需要大量的受体、繁殖周期长, 并需要大量的饲养成本, 对于大型哺乳类动物而言, 该方

法存在很大的风险<sup>[16]</sup>。针对细胞中特定基因设计特异性 ZFNs, 通过对细胞进行电转染 ZFNs 质粒或 mRNA 可提高打靶效率, 同时结合体细胞核移植技术获得基因敲除动物<sup>[16-19]</sup>, 可解决传统的同源重组技术由于长期药物筛选导致细胞活力差和获得更多的单克隆打靶细胞系等问题。为了验证所构建的 ZFNs 有效性, 同时为以后获得不含荧光蛋白山羊奠定基础, 本实验将 ZFNs 片段转染含 EGFP 基因的原代克隆山羊胎儿成纤维细胞, 与未转染组相比, 细胞发绿色荧光的比例降低了 4.8%, 初步证明了构建的 ZFNs 有效性。Watanable 等<sup>[20]</sup>用转基因猪原代胎儿成纤维细胞的 EGFP 基因进行 ZFNs 打靶, 其细胞发绿色荧光的比例降低了 15%, 与本实验获得的结果基本相似, 应用 ZFNs 消除或降低荧光蛋白的模式不仅在猪上有效, 而且在山羊上也可得到类似的结果。作者推测获得的转基因克隆胎儿成纤维细胞

发荧光的比例较低,可能与基因的甲基化或乙酰化而降低了对照细胞的荧光数目所导致,与我们前期的报道类似<sup>[13]</sup>。

ZFNs 技术是近几年发展起来的转基因技术,其对基因靶向敲除的效率和特异性有待进一步提高,尤其对靶位点的突变存在如碱基缺失、插入等多种方式,甚至存在脱靶现象也时常发生。本实验对打靶细胞 PCR 产物测序结果表明,靶序列及附近上下游序列无突变,仅在距靶序列下游 180 bp 左右位置插入 1 个碱基 G,这种突变方式可能由于构建的 ZFNs 特异性较差而存在脱靶现象。Watanabe 等报道其 EGFP 序列突变方式有碱基插入、缺失和替换,并且突变发生在靶序列位置或其上、下游附近位置,其中插入的碱基为 4 bp,缺失的碱基为 1~15 bp,替换的碱基为 1 bp。同样在猪、牛等哺乳动物细胞内源基因上也同样存在类似的结果<sup>[16-19]</sup>。在本实验中,构建的 ZFNs 产生的突变方式虽然在距靶序列较远位置插入 1 个碱基 G,但其突变仍发生在编码绿色荧光蛋白的外显子位置上,不仅造成 83 个氨基酸缺失,而且从 152~156 的 5 个氨基酸发生突变,其表达的蛋白分子量大小由正常的 26.9 kDa 变成 17.6 kDa,这可能是导致有荧光细胞减少的分子生物学原因。从实验结果来看,ZFNs 转染细胞靶位点虽然出现异位现象,但在特异性位点附近还是发生了突变,并使绿色荧光细胞比例下降,什么原因导致脱靶需要进一步研究。

## REFERENCES

- [1] Provost FL, Lillico S, Passet B, et al. Zinc finger nuclease technology heralds a new era in mammalian transgenesis. *Trends Biotechnol*, 2009, 28(3): 134-140.
- [2] Meyer M, de Angelis MH, Wurst W, et al. Gene targeting by homologous recombination in mouse zygotes mediated by zinc-finger nucleases. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(34): 15022-15026.
- [3] Urnov FD, Rebar EJ, Holmes MC, et al. Genome editing with engineered zinc finger nucleases. *Nat Rev Genet*, 2010, 11(9): 636-646.
- [4] Rémy S, Tesson L, Ménoret S. Zinc-finger nucleases: a powerful tool for genetic engineering of animals. *Transgenic Res*, 2010, 19(4): 363-371.
- [5] Liu PQ, Chan EM, Cost GJ, et al. Generation of a triple-gene knockout mammalian cell line using engineered zinc-finger nucleases. *Biotechnol Bioeng*, 2010, 106(6): 97-105.
- [6] Beumer KJ, Trautman JK, Bozas A, et al. Efficient gene targeting in *Drosophila* by direct embryo injection with zinc-finger nucleases. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(12): 19821-19826.
- [7] Miller JC, Holmes MC, Wang J, et al. An improved zinc-finger nuclease architecture for highly specific genome editing. *Nat Biotechnol*, 2007, 25(4): 778-785.
- [8] Doyon Y, McCammon JM, Miller JC, et al. Heritable targeted gene disruption in zebrafish using designed zinc-finger nucleases. *Nat Biotechnol*, 2008, 26(6): 702-708.
- [9] Hockemeyer D, Soldner F, Beard C, et al. Efficient targeting of expressed and silent genes in human ESCs and iPSCs using zinc-finger nucleases. *Nat Biotechnol*, 2009, 27(5): 851-857.
- [10] Zou J, Maeder ML, Mali P, et al. Gene targeting of a disease-related gene in human induced pluripotent stem and embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*, 2009, 5: 97-110.
- [11] Yuan YG, An LY, Yu BL, et al. Construction of mammary gland specific vector for expression of human lactoferrin. *J Yangzhou Univ: Agri Life Sci Ed*, 2011, 32(3): 6-10 (in Chinese).  
袁玉国, 安礼友, 于宝利, 等. 人乳铁蛋白乳腺特异性表达载体的构建及其功能的验证. *扬州大学学报: 农业与生命科学版*, 2011, 32(3): 6-10.
- [12] Gueroussov S, Tarnawsky SP, Cui XA, et al. Analysis of mRNA nuclear export kinetics in mammalian cells by microinjection. *J Vis Exp*, 2010, 1(46): 2387-2395.
- [13] An LY, Yuan YG, Yu BL, et al. Generation of human lactoferrin transgenic cloned goats using donor cells with dual markers and a modified selection procedure. *Theriogenology*, 2012, 78(6):

- 1303-1311.
- [14] Xiao A, Hu YY, Wang WY, et al. Progress in zinc finger nuclease engineering for targeted genome modification. *Hereditas*, 2011, 33(7): 665-683 (in Chinese).  
肖安, 胡莹莹, 王唯晔, 等. 人工锌指核酸酶介导的基因组定点修饰技术. *遗传*, 2011, 33(7): 665-683.
- [15] Geurts AM, Cost GJ, Freyvert Y, et al. Knockout rats via embryo microinjection of zinc-finger nucleases. *Science*, 2009, 325(5939): 433.
- [16] Yang D, Yang H, Li W, et al. Generation of PPAR $\gamma$  mono-allelic knockout pigs via zinc-finger nucleases and nuclear transfer cloning. *Cell Res*, 2011, 21(6): 979-982.
- [17] Hauschild J, Petersen B, Santiago Y, et al. Efficient generation of a biallelic knockout in pigs using zinc-finger nucleases. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(29): 12013-12017.
- [18] Whyte JJ, Zhao J, Wells KD, et al. Gene targeting with zinc finger nucleases to produce cloned eGFP knockout pigs. *Mol Reprod Dev*, 2011, 78(1): 2.
- [19] Yu S, Luo J, Song Z, et al. Highly efficient modification of beta-lactoglobulin (BLG) gene via zinc-finger nucleases in cattle. *Cell Res*, 2011, 21(11): 1638-1640.
- [20] Watanabe M, Umeyama K, Matsunari H, et al. Knockout of exogenous EGFP gene in porcine somatic cells using zinc-finger nucleases. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 402(1): 14-18.

(本文责编 郝丽芳)



## 《生物工程学报》对摘要的写作要求

1. 研究报告摘要: 基本要素包括研究目的、方法、结果和结论 (不用单列标题书写)。目的 (Purpose): 主要说明作者写此文章的目的, 或说明本文主要要解决的问题; 方法 (Methods): 重点说明作者的主要工作过程及使用的方法。应用性文章如需要, 可注明条件、使用的主要设备和仪器。结果 (Results): 本文最后得出的结果 (实验数据部分)。结论 (Conclusions): 如系基础研究, 应写明本文的创新之处, 及文章在讨论部分表述的观点; 如系应用性研究, 应尽可能提及本文结果和结论的应用范围和应用情况或应用前景。

2. 综述摘要: 包括论述内容的发展水平、自己的评论及展望, 尤其要注意结合自己的研究工作。

3. 英文摘要的撰写要点: 英文摘要的内容应与中文摘要一致, 但比中文摘要更详尽。英文摘要完成后, 务必请英文较好、且专业知识强的专家审阅定稿后再返回编辑部。凡不符合要求的, 即使学术上可以达到刊出的水平, 本刊也将推迟发表。

(1) 建议使用第一人称, 尽量不使用第三人称和被动语态。

(2) 建议用主动语态, 被动语态表达拖拉模糊尽量不用, 这样可以免好多长句, 以求简单清晰。

(3) 尽量使用清晰简练的短句, 避免很长的句子。注意正确使用英文写作习惯和语法。

(4) 摘要应当使用过去时态, 语法正确, 句子通顺。

(5) 摘要中避免使用缩写语, 除非是那些人人皆知的 (如DNA、ATP等), 或者确实是非常长, 而且出现多次的短语才允许用缩写语, 并且在第一次出现时要写出全称。

(6) 在英文摘要中, 不要使用任何汉字字符, 包括标点、括号、温度、希腊字母等。

(7) 句子的开头处最好不要使用数字。