

郑虎, 高美娟, 杨化强. 基因编辑技术在猪遗传育种中的研究进展 [J]. 畜牧与兽医, 2024, 56 (1): 129-139.

ZHENG H, GAO M J, YANG H Q. Progress in research on gene editing in pig breeding [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2024, 56 (1): 129-139.

基因编辑技术在猪遗传育种中的研究进展

郑虎, 高美娟, 杨化强*

(华南农业大学动物科学学院, 国家生猪种业工程技术研究中心, 广东 广州 510642)

摘要: 基因编辑是针对基因组特定的靶点序列, 利用人工特异性核酸酶对靶点序列进行编辑 (基因敲除、插入、替换等修饰) 的技术。基因编辑技术广泛应用于生物医学研究以及农业遗传育种改良。猪作为重要的农业经济动物, 是养殖最为广泛的肉用型家畜, 随着人类物质需求的提高, 现代养殖业需要培育更多具有优良经济性状、适应人们多样化需求的新品种。利用基因编辑技术提高猪的生产性能、抗逆性能和抗病性能是未来生猪种业发展的重要方向。本文综述了基因编辑猪在畜牧业遗传育种领域的研究进展, 并展望了该领域当前面临的挑战和未来发展方向。

关键词: 基因编辑; 猪; 遗传育种

中图分类号: S813 **文献标志码:** A **文章编号:** 0529-5130(2024)01-0129-11

Progress in research on gene editing in pig breeding

ZHENG Hu, GAO Meijuan, YANG Huaqiang*

(National Engineering Research Center for Breeding Swine Industry, College of Animal Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: Gene editing refers to the use of the specific artificial nucleases to cleave the target genome sequence to achieve precise genetic modifications including gene knockout, knockin, or replacement. Gene editing technology has been widely used in basic and translational study in biomedicine as well as for genetic breeding in the agricultural field. Pigs are the most popularly farmed livestock for meat. With the development of human society and increasing demand for food, modern farming industry requires cultivating novel pig breeds with excellent economic traits so as to meet people's diversified needs. The use of gene editing to improve pig production performance, stress tolerance and disease resistance is an important direction for future development of the pig breeding industry. This review summarizes the progress in research on gene editing pigs, gives an overview of the current development of gene editing technology and its application in the field of modern pig breeding, and discusses the current challenges and future directions of the field.

Keywords: gene editing; pig; genetic breeding

基因编辑技术利用人工核酸酶系统靶向切割生物体基因组特定位点, 诱导细胞 DNA 损伤修复, 产生定点突变, 从而实现定向改变生物遗传信息的目的。基因编辑技术与传统的转基因技术不同, 转基因技术是将目的基因随机整合到基因组位点上使其表达, 但是这种随机插入造成了转基因表达在不同转基因个体之间的不一致性, 影响了转基因生物表型的稳定性; 而基因编辑可以对目的基因位点进行定点突变, 实现目的基因型和表型的预期改造。随着基因编辑技术的进展, 先后出现锌指核酸酶系统 (zinc finger nucleases,

ZFN), 类转录激活样受体因子核酸内切酶系统 (transcription activator-like effector nucleases, TALEN) 和规律性短回文重复序列簇系统 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats/Cas endonucleases, CRISPR/Cas)^[1-4]等多种基因编辑工具。当前基因编辑已广泛应用于生命科学、农业和医学等领域, 为生物医学基础和转化研究、农业作物和动物遗传改良带来突破性进展。

在畜牧业领域, 降低养殖成本、提高养殖生产效率是畜牧业发展的核心。畜禽遗传资源是畜牧养殖可持续发展的源头, 动物遗传育种繁殖新技术的变革和创新是促进优质种业发展的加速剂。随着现代化生物育种技术 (如动物转基因技术、基因编辑、胚胎工程等遗传育种和繁殖相关技术) 的发展, 家畜育种已经从传统育种发展到以调整基因为主的现代分子育

收稿日期: 2023-03-23; 修回日期: 2023-10-31

基金项目: 广东省基础与应用基础研究基金项目(2019B151210030)

第一作者: 郑虎, 男, 硕士研究生

*通信作者: 杨化强, 博士, 副研究员, 研究方向: 动物生物技术
与动物生物育种, E-mail: yangh@scau.edu.cn。

种技术。基因编辑技术在改良动物表型、加快遗传进程上具有传统育种技术无法比拟的优势。在猪的遗传育种上,基因编辑技术已成功应用于改善猪的生长性状和生产性能、提升抗病性,促进了现代生猪种业的创新发展。同时,猪在生理学和遗传学与人类具有较高的相似性,利用基因编辑猪作为模型动物已广泛应用于生物医学领域的基础和转化研究^[5-6]。本文聚焦于近年来基因编辑技术在猪育种领域的研究成果,综述了基因编辑技术在猪遗传育种改良中的研究和应用进展。

1 基因编辑技术及基因编辑工具

基因编辑通过使用特异性核酸酶识别特定基因序列,诱导基因组断裂,利用基因组修复机制对断裂基因组进行修复,实现目的基因位点的定向突变,从而改变生物体的特定性状和功能。其本质是利用人工核酸酶靶向切割 DNA 双链,使 DNA 靶位点发生双链断裂(double-strand-breaks, DSBs),激活基因组非同源末端连接(nonhomologous end joining, NHEJ)或同源定向修复(homologous-directed repair, HDR)机制,实现对目的基因的敲除或敲入^[7]。其中 NHEJ 是真核生物 DNA 修复的主要方式^[8],其不需要相应的同源序列就能将 DNA 断裂后的 2 个末端重新连接起来,这种修复一般是易错的,导致 DSB 区域碱基缺失或额外碱基插入,引起目的基因发生移码突变而达到基因敲除的目的^[9]。HDR 的修复方式以同源 DNA 作为修复模板,在 DSB 两端的同源区域之间添加所需的修饰序列,实现基因敲入的效果。只有细胞内存在与损伤 DNA 同源序列时,才能激活 HDR 修复途径。无论 NHEJ 还是 HDR 都依赖于 DSB 的产生,基因编辑工具通过诱导高效的定点 DSB 生成,从而实现高效的定点基因敲除或敲入。NHEJ 修复的效率远高于 HDR,因此基因编辑介导的基因敲除效率远高于基因敲入的效率。通过基因编辑工具产生 DSB 可引入一系列基因组编辑效果,从点突变到大片段定点插入,实现对目的基因的精确改造。

1.1 ZFNs

第一代基因编辑工具是利用限制性核酸内切酶在某些特定位置识别和切割 DNA 序列,随着技术的不断革新,ZFNs 作为基因组定点编辑技术诞生。1996 年, Kim 等^[10]将锌指蛋白(zinc finger protein, ZFP, 其中 1 个锌指单元识别 3 个碱基)与 *Fok I* (非特异性限制性核酸内切酶)融合,首次构建出具有靶向切割 DNA 功能的 ZFN,其中 DNA 识别域由 3~4 个 Cys₂His₂锌指蛋白(Cys₂His₂ZFP)连接而成,用于特异性识别碱基三联体^[11];DNA 结构域 C 端为

Fok I 切割结构域,该结构域二聚形成非特异性核酸酶才具有切割基因组活性^[12],同时有利于减少对 DNA 的非特异性剪切。当 2 个 ZFN 分别与靶位点结合时,*Fok I* 亚基单体结合发生二聚形成功能性核酸酶作用产生靶向 DSB,并诱导 DSB 修复通路^[10]。ZFN 的特异性取决于 ZFP,单个 ZFP 的特异性取决于周围锌指所在的环境和目标 DNA,并不是所有的 DNA 三联都有相应的锌指结构域可用;ZFP 与 *Fok I* 在靶序列上的连接方式和位置同样会影响 ZFN 的结构活性和功能特异性^[13]。ZFN 靶向技术的最新进展可以改进锌指单元之间跳过核苷酸的能力, Paschon 等^[14]对 ZFN 结构蛋白进行改造,通过改变 DNA 结合域和 ZFN 结构域的顺序,利用新的接头跳过锌指单元之间的核苷酸序列,即如果相邻的 3 bp 并没有合适的一个单元,则可以跳过 1 bp,大大增加了 ZFP 与目标序列匹配的机率,提高 ZFN 的靶向精确度。

然而,ZFP 载体构建较为复杂,与配体结合力较弱,ZFN 剪切的过程容易形成异源二聚体,诱导脱靶效应;同时引起碱基错配和 DNA 序列改变,产生一定的细胞毒性,导致细胞发生死亡、额外突变^[15]。此外,ZFN 在识别 DNA 位点时,存在着上下文依赖效应,即识别 DNA 的重复氨基酸时会产生相互作用,改变特异性识别,影响基因编辑的效果。

1.2 TALENs

TALENs 是利用变形菌属植物病原菌黄单胞菌(*Xanthomonas*)分泌的天然蛋白——激活因子样效应物(TAL effectors, TALEs),通过人工添加一个在特定位点切断 DNA 双链的核酸酶,形成的具有 DNA 特异性识别和切割功能的蛋白质工具。该技术最初由 Christian 等^[16]建立。TALENs 由一个 N 端结构域——核定位信号(nuclear localization signal, NLS),一个 DNA 识别域——特异性识别基因组靶序列,以及一个 *Fok I* 内切酶的 C 端结构域组成。其中 DNA 识别域由保守的氨基酸重复序列单元组成,每个单元又由 14~18 个识别 DNA 特异序列的 TALE 单元连接而成^[17-18],每个 TALE 蛋白通过 DNA 识别域识别一个对应的碱基从而结合到靶位点上;*Fok I* DNA 切割结构域与 TALE 融合形成二聚体 TALENs,特异性切割靶序列,其切割 DNA 的原理与 ZFN 相似。TALENs 的序列单元通过组装成模块化蛋白质,用于特异性结合与靶向内源性目的基因,解决 ZFNs 不能任意识别目的基因序列和识别序列存在着上下文依赖效应等问题。

与 ZFNs 技术相比,TALENs 与 DNA 靶位点结合具有高度特异性,识别 DNA 序列较长,同源序列较少,极大地降低了脱靶率;而且 TALENs 相较于

ZFNs, 其识别性更为广泛、灵活性更强、切割效率和成功率高, 细胞毒性小。但是, TALENs 构建比较困难, 需要大量的试验步骤和技术, 技术门槛较高。此外, 虽然相对于 ZFNs 已经有了显著的改进, TALENs 仍然存在着一定的脱靶和细胞毒性问题, 还需要进一步提高精确性和安全性。

1.3 CRISPR/Cas9

CRISPR/Cas9 普遍存在于古细菌和细菌体内, 是一种菌体特异性免疫系统, 该系统首次由 Ishino 等^[19]在大肠杆菌碱性磷酸酶基因中发现, 之后通过对其他细菌的基因结构进行研究, Mojica 等^[20]和 Jasen 等^[21]也发现该系统的存在, 并提出用 CRISPR 来命名该结构。在大多数细菌及古细菌中, 该结构是由一段保守的重复序列区 (repeat) 和一段间隔序列区 (spacer) 组成的重复性 DNA 序列, 其中 spacer 区用于细菌捕获的外源基因片段。2005 年, Pourcel 等^[22]揭示了 CRISPR 的内部结构, 指出 CRISPR 系统中的 spacer 区具有与宿主菌胞质同源的遗传物质, 由此认为细菌可利用 CRISPR 进行体内干扰从而抵抗外源基因的入侵。2007 年, Barrango 等^[23]研究表明宿主菌可以进一步运用 CRISPR 系统干扰噬菌体入侵菌体。研究发现, Cas 基因可以编码多种功能的 Cas 蛋白, 与 CRISPR 序列区域共同组成 CRISPR/Cas 系统发生作用, 进而特异性识别外源性遗传物质的靶序列, Cas 蛋白可以与 CRISPR 启动子前导区 (leader) 转录生成的 CRISPR-RNAs (crRNA) 相结合, 靶向切割外源性 DNA 序列, 对抗病毒对细菌体的入侵^[24]。随后, 反式激活 crRNA (transactivating crRNA, tracrRNA) 与 crRNA 前体相结合形成向导 RNA (single-strand RNA, sgRNA), 并与 Cas 核酸酶作用形成复合体, 特异性识别并剪断特定核苷酸序列^[25]。2008 年, Marraffini 等^[26]研究表明 CRISPR/Cas 系统能有效阻止外源基因在体内的合成和表达, 随后研究者揭示 CRISPR/Cas 系统是微生物体内一种可稳定遗传的适应性免疫系统, 能将病毒的遗传序列转化为自身序列, 保护自身进行二次免疫。

由于不同的 CRISPR/Cas 系统在适应阶段具有高度保守性, 且其在表达、干扰阶段有所差异, 故将其

分为 I 型、II 型和 III 型, 适用于基因编辑最常用和最具特征的 CRISPR/Cas 系统是基于化脓链球菌发展而来的 II 型基因编辑工具——CRISPR/Cas9 系统。2012 年, Jinek 等^[27]首次发现 CRISPR/Cas9 可以通过 sgRNA 作为单一转录本进行编程用于体外靶向 DNA 切割。根据 CRISPR/Cas9 系统基因编辑的原理, Cas9 系统主要包括 Cas9 蛋白——核酸内切酶活性、crRNA——靶向特异性和 tracrRNA, 其中 crRNA 和 tracrRNA 结合形成一条 sgRNA, sgRNA 与原间隔区相邻基序 (protospacer adjacent motif, PAM) 序列 (NGG) 毗邻的靶 DNA 互补, 由一段识别序列 (20 bp) 和一段重复序列组成, 其中识别序列利用碱基互补原则靶向结合到基因位点上, Cas 蛋白与重复序列形成复合体结构用以发挥核酸酶内切功能, 靶向切断双链核苷酸目的序列^[11], 形成 DSB, 双链 DNA 断裂后利用 NHEJ 和 HDR 两种方式进行细胞自我修复, 从而对靶点碱基进行随机插入或删除, 使基因产生移码突变或破坏基因组结构, 导致基因组功能失效或基因敲除^[9]。2013 年, Cong 等^[28]首次利用 CRISPR/Cas9 在人 293T 细胞与小鼠 Nero2A 细胞进行靶向基因定点突变, CRISPR/Cas9 系统作为基因编辑新技术的应用, 推动了基因编辑的不断更新。随着 CRISPR/Cas9 系统研究不断深入, 科学家将多个 sgRNA 表达框构建到相应靶点序列, 然后将其整合在同一个载体中, 从而实现 sgRNA 表达框的共同表达, 其高切割活性允许在单个反应中同时靶向单个细胞中的多个 DNA 序列位点, 从而敲除多个基因或染色体长片段, 实现更灵活和多样化的基因修饰效果。

CRISPR/Cas9 系统相较于 ZFN 和 TALEN, 具有打靶特异性、高精度性和操作简单等优点, 仅需 sgRNA 引导即可对基因组任意位点进行打靶, 切割能力不受基因组甲基化影响^[29], 编辑效率高、成本低, 在动植物基因编辑中得到了广泛的利用, 大大降低了基因编辑的门槛。但是, CRISPR/Cas9 在应用上依赖 PAM 序列, 依然存在脱靶效应和大片段插入效率低等问题。表 1 对目前基因编辑系统的特点进行了相关比较 (表 1)。

表 1 ZFN、TALEN、CRISPR/Cas9 系统的比较

项目	ZFN	TALEN	CRISPR/Cas9
靶点 DNA 序列的识别区域	锌指蛋白结构域	TALE 蛋白可变残基 (RVD)	单链向导 RNA (gRNA)
识别模式	蛋白质—DNA	蛋白质—DNA	RNA—DNA
剪切结构	Fok I 核酸酶结构域	Fok I 核酸酶结构域	Cas9 蛋白

续表1

项目	ZFN	TALEN	CRISPR/Cas9
靶向序列大小	通常每个 ZFN 单体靶向 9~18 bp, 每对 ZFN 靶向 18~36 bp	通常每个 TALEN 单体靶向 14~20 bp, 每对 TALEN 靶向 28~40 bp	通常为 20 bp 的引导序列+PAM 序列
靶向限制	难以靶向非富含 G 的位点	每个 TALEN 单体的 5' 靶向碱基必须为 T	靶向位点必须位于 PAM 序列之前
构建难易	需要复杂的分子克隆方法	需要复杂的分子克隆方法	简易的克隆程序和寡聚物合成
导入方法	相对容易, 因为 ZFN 的尺寸较小, 表达元件适用于多种病毒载体	相对困难, 因为 TALEN 功能性元件尺寸较大	难度大, 因为 SpCas9 很大, 导致 AAV 等病毒载体的包装问题
优点	蛋白结构小	特异性高, 切割效率较好	高的靶向效率和低细胞毒性
缺点	结构复杂, 靶向效率低, 细胞毒性高	细胞毒性高和靶向效率低	受限于 PAM 序列, 存在脱靶效应

2 基因编辑在猪育种中的应用

基因编辑通过引入新的遗传变异（如遗传缺陷的修复、无关基因的灭活、有用的等位基因和单倍型在品种间的表达等）来加速畜禽遗传改良，利用基因编辑技术对经济性状相关基因进行编辑（敲除、插入或修饰），增加群体中有利等位基因的频率来提高群体遗传效益，促进畜禽生产。在猪的育种工作中，种系传播是最终目标，编辑后的目标基因必须稳定传递给下一代，以进行群体或种系遗传改良。常用的基因编辑育种策略主要利用体细胞核移植技术（somatic cell nuclear transfer technique, SCNT）将编辑好的细胞系进行克隆，在一代内即可产生基因纯合修饰的基因编辑猪，但是该方案也存在核移植效率低以及基因编辑克隆后代出生率低的缺陷；另一种制备基因编辑猪的策略是直接对猪单细胞胚胎进行 CRISPR 注射，该方案操作较为简便，同时也可避免基因编辑克隆猪制备效率低的问题，但是该种方案出生的后代一般都为嵌合体动物，需要继续杂交 1~2 代以获得纯合基因编辑动物。基因编辑现阶段已应用于下述多个性状的种猪遗传育种改良。

2.1 提高生产性能

猪肉是最主要的肉类食物来源，改良猪肉相关经济性状是猪育种工作的重点之一。肌肉的发育和体重的增长通过垂体和肝脏系统进行调节，主要由生长激素（growth hormone, GH）-胰岛素样生长因子（insulin-like growth factor, IGF）轴通过 IGF-1R/Akt/mTOR 信号通路进行调控^[30]。1985 年，Hammer 等^[31]将人源性 GH 通过胞质注射导入母猪受精卵内获得转基因猪，与野生型猪相比，GH 转基因显著提高了猪的生长速度。另有研究将猪源性的 GH 转入湖北白猪体内获得的转基因猪，与野生型猪相比，其生物转化率提高 10% 左右。GH 由脑垂体释放，刺激肌

肉、肝脏等组织中的 IGF-1 表达，研究表明来自肌肉和肝脏中 IGF-1 均能刺激肌肉发育。Pursel 等^[32]通过向受精卵中注射 DNA，成功地将编码 GH 和 IGF-1 的基因引入猪体内，其中表达 GH 转基因的 2 个家系比野生型猪的体重增加了 11.1% 和 13.7%，饲料转化效率均提高了 18% 左右，皮下脂肪水平降低，肌肉、皮肤和骨骼发育速度增加。表达 IGF-1 的转基因猪其生长速度虽与野生型猪类似，但脂肪含量显著减少，瘦肉组织显著增加。虽然在生长性能上有了明显改善，但也发现 GH 转基因猪存在跛行、嗜睡和胃溃疡增加等生理缺陷，对压力的有效反应能力降低等问题。IGF-2 是 IGF-1 的姐妹分子，也在肌肉发育和脂肪沉积中起关键作用，IGF-2 基因调节区的突变调控猪肌肉生长水平。1999 年，Jeon 等^[33]发现猪 IGF-2 第 3 个内含子处的核苷酸突变使得 IGF-2 在骨骼肌发育过程中的表达显著增加，有效提高瘦肉率。2018 年，Xiang 等^[34]运用 CRISPR/Cas9 系统对 IGF-2 基因第 3 个内含子上的单核苷酸位点（第 3 072 位核苷酸）进行突变，培育出 IGF-2 基因修饰巴马猪，与野生型猪相比，其产肉量和瘦肉率都显著增加。2019 年，Liu 等^[35]运用 CRISPR/Cas9 系统对猪胎儿成纤维细胞（porcine fetal fibroblasts, PFFs）进行编辑，破坏与 ZBED6 结合的 IGF-2 第 3 个内含子序列位点，从而消除了 ZBED6 阻遏物的结合，使其调节功能丧失，培育出具有较高瘦肉率的 IGF2 基因编辑猪。

肌肉生长抑制素（myostatin, MSTN）是个体生长、肌肉发育和脂肪沉积研究的常见靶点，对肌肉生长起负调控作用，其突变会诱导肌肉发育或产生“双肌”性状。MSTN 基因由 3 个外显子和 2 个内含子组成，其中第 3 个外显子决定了 MSTN 成熟肽的作用，可以通过破坏第 3 个外显子的结构使 MSTN 生物活性丧失。2015 年，Qian 等^[36]利用 ZFN 技术培育出

MSTN 基因突变的梅山猪, 与野生型猪相比, MSTN 突变体生长发育正常, 肌肉质量增加, 脂肪沉积减少, 纯合 MSTN 突变体 (MSTN -/-) 具有明显的“双肌”表型。吴添文等^[37] 使用 TALEN 技术对 MSTN 基因进行编辑并培育出 MSTN 基因突变大白猪、梅山猪。华文君等^[38] 利用 CRISPR/Cas9 编辑 MSTN 位点, 并结合 SCNT 技术获得高产瘦肉基因编辑猪新种质——中超 916。2016 年 Bi 等^[39] 利用 CRISPR/Cas9 系统和 *Cre/LoxP* 重组酶系统产生无选择性标记基因的 MSTN 基因单敲除克隆猪, 其中 MSTN 表达量下降 50%, 肌源性基因表达显著上升, 提高了肌纤维数量, 增加了猪体瘦肉率。2017 年, Wang 等^[40] 运用 CRISPR/Cas9 系统编辑 PFF 细胞中 MSTN 基因, 并运用 SCNT 技术成功培育出 MSTN 双等位基因突变克隆猪, 与野生型猪相比, 基因编辑猪肌纤维数目增加, 出现明显的肌间沟, 猪体瘦肉率得到显著提高。2020 年, Li 等^[41] 使用 CRISPR/Cas9 将 PVD20H 和 GP19del 突变基因导入中国本土猪种的 MSTN 信号肽区, 发现信号肽中的 2 个突变都增加了肌肉质量, 这种策略可以上调肌源性调节因子 (MyoD、Myogenin 和 Myf-5) 的表达, 且不影响细胞中 MSTN 成熟肽的产生。该研究表明通过对 MSTN 信号肽进行精确编辑也可以提升猪肌肉的发育。然而, 有报道指出, MSTN 敲除猪虽然有效改善了产肉量和瘦肉率, 但同时出现一系列动物健康问题, 如 MSTN 纯合基因敲除猪存在腿部发育异常、无法站立和行走以及高死亡率的问题。Kang 等^[42] 报道了 MSTN 基因敲除猪具有肌肉发达、瘦肉增加和背膘减少的优点,

但在长白品种的 MSTN 纯合敲除仔猪中存在前腿或后腿异常、无法站立和行走的问题, 受影响的小猪无法竞争哺乳, 并在出生后 3 d 内死亡。

SCF E3 泛素连接酶在许多细胞基础活动过程中发挥重要作用, 其由 SKP1、Cullin-1/Cdc53 和一种 Fbox 蛋白组成, Fbox 蛋白赋予复合物底物特异性, 其中 Fbxo40 诱导胰岛素受体底物-1 (IRS1) 泛素化, 从而使 IGF-1/Akt 通路失活^[43]。Fbxo40 表现出肌肉特异性表达模式^[44], 在 Fbxo40 基因敲除小鼠中, IGF-1/Akt 途径激活, 体重和肌肉质量显著增加。2018 年, Zou 等^[45] 利用 CRISPR/Cas9 技术和 SCNT 制备了 Fbxo40 基因敲除猪。在 Fbxo40 基因敲除猪的肌肉中, IRS1 水平提高, IGF-1/Akt 通路激活。与野生型对照相比, Fbxo40 敲除猪的肌肉质量增加了约 4%, 瘦肉率也得到提升, 且 Fbxo40 基因敲除猪没有任何异常表型。因此, Fbxo40 可作为未来规避 MSTN 突变副作用的可能替代基因操作位点, 然而这一观点尚未被充分证实, 需要进一步的研究来验证其可行性和安全性。Fbxo40 和 MSTN 基因敲除动物之间的差异可能是由于基因时空表达或调节的差异所致, Fbxo40 主要在出生后的动物骨骼肌中表达^[44], 而 MSTN 在胚胎发育到成年期都有表达, 其通过自分泌或旁分泌系统调节肌肉细胞原始细胞^[46]。因此, MSTN 可能更广泛地影响包括肌肉在内的多种器官发育, 而 Fbxo40 的功能仅限于骨骼肌。表 2 汇总了目前已报道的采用基因编辑策略提升猪生产性能的研究 (表 2)。

表 2 基因编辑技术在提高猪生产性能上的应用

基因功能	制备方法	突变方式	编辑工具	参考文献
IGF-2: 促生长	胞质注射	内含子序列突变干扰阻遏物 ZBED6 结合	CRISPR/Cas9	[34]
	克隆 SCNT	内含子序列突变干扰阻遏物 ZBED6 结合	CRISPR/Cas9	[35]
	克隆 SCNT	基因敲除	ZFN	[36]
	克隆 SCNT	基因敲除	TALEN	[37]
	克隆 SCNT	基因敲除	CRISPR/Cas9	[38]
MSTN: 肌肉生长负调节因子	克隆 SCNT	基因敲除 通过 <i>Cre</i> 重组酶切除选择性标志物	CRISPR/Cas9	[39]
	克隆 SCNT	基因敲除	CRISPR/Cas9	[40]
	克隆 SCNT	基因敲除	CRISPR/Cas9	[41]
Fbxo40: 促进骨骼肌生长	克隆 SCNT	基因敲除	CRISPR/Cas9	[45]

2.2 改善猪肉品质

当前养猪业除了提高猪肉的产量, 对猪肉品质的要求也不断提高。不饱和脂肪酸 (unsaturated fatty

acids, UFAs) 具有调节血脂、预防血栓、调节免疫等生物学效用, 有较高的营养价值。哺乳动物自身不能合成或合成的量不能满足机体生长发育所需, 需通

过采食来摄取体内所需的 UFAs。2004 年, Saeki 等^[47]在猪的基因组中导入菠菜根部脂肪酸去饱和酶 (fatty acid desaturase-2, FAD-2) 基因, 获得了高不饱和脂肪酸 (highly unsaturated fatty acid, HUFA) 转基因猪, 其不饱和脂肪酸的含量比野生型猪高 20%。多不饱和脂肪酸 (poly unsaturated fatty acids, PUFAs) 分为 ω -3 脂肪酸和 ω -6 脂肪酸两大类, ω -6 脂肪酸促进炎症的发生, 而 ω -3 脂肪酸却能延缓身体自我防卫机制中那些不利方面的过度反应, 抑制炎症的发生, 可有效改善心脑血管疾病。由于猪的体内缺乏相应脂肪酸转化酶, ω -6 脂肪酸不能自主转化为 ω -3 脂肪酸^[48]。秀丽隐杆线虫体内含有一种编码脂肪酸去饱和酶的基因 (Fat-1), 可以将 ω -6 多不饱和脂肪酸 (ω -6 PUFAs) 转化为 ω -3 多不饱和脂肪酸 (ω -3 PUFAs)。2006 年, Lai 等^[49]将 Fat-1 基因引入猪的基因组中, 生产出富含 ω -3 PUFAs 的转基因猪, 猪肉的营养价值得到显著提高。2012 年, Zhang 等^[50]将编码子优化的 mFat-1 基因插入真核表达载体中, 生产表达 mFat-1 基因的转基因猪。2018 年, Li 等^[51]通过 CRISPR/Cas9 技术将 Fat-1 基因成功插入猪 Rosa26 (pRosa26) 基因座上, 培育出定点修饰的 Fat-1 转基因猪。然而, 由于这些转基因猪缺乏 Δ -12 去饱和酶 (Fat-2) 基因, 只将外源性而非内源性产生的 ω -6 PUFAs 转化为 ω -3 PUFAs。2019 年, Tang 等^[52]利用 SCNT 技术成功培育出脂肪酸去饱和酶 Fat1-Fat2 共表达的转基因猪, 使肌间脂肪组织中 ω -3 和 ω -6 的含量得到显著提高。2021 年, You 等^[53]通过使用 CRISPR/Cas9 系统和 SCNT 技术, 将 Fat-1 和 IGF-1 基因精确插入 pRosa26 基因座上, 获得定点修饰的双基因转基因猪, 其中 ω -3 PUFAs 水平显著增加, 并降低 ω -6/ ω -3 PUFAs 比率, 提供了富含 ω -3 PUFAs 的肉类。生产中在提高猪肉 ω -3 PUFAs 含量的同时, 人体也应该合理控制对 ω -3 PUFAs 的摄入量, 不宜过量, 因为 ω -3 PUFAs 摄入过量会延长人体凝血时间, 增加出血风险, 同时引起

机体氧化应激, 导致细胞损伤和炎症反应, 抑制免疫系统, 增加疾病感染风险等不良影响。

猪牛羊等肌肉细胞表面存在 α -半乳糖苷抗原 (galactose- α -1, 3-galactose, α -gal), 食用红肉 (猪肉、牛肉和羊肉) 可能会在部分人群诱发过敏^[54]。同时红肉细胞表面存在大量的 N-甘氨酸神经氨酸 (Neu5Gc)^[55], 一旦被机体吸收, 就会结合在人类细胞表面, 引发慢性炎症, 从而导致结、直肠癌和动脉粥样硬化。这些罕见的综合征可以通过基因编辑培育基因敲除动物去除肌肉表面的过敏原原来避免。CMPN-甘氨酸神经氨酸羟化酶 (CMAH) 基因敲除可以将猪中的 Neu5Gc 转化为人源性 Neu5Ac, 消除 Neu5Gc 的副作用。Yen 等^[56]通过将 CRISPR/Cas9 制备的 α -Gal 敲除和 Neu5Gc 敲除猪进行杂交获得双基因敲除后代, 发现双基因敲除型猪比野生型猪诱发的炎症更少, 减少红肉过敏现象, 将其作为健康的红肉来源。过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 辅激活因子 α (peroxisome proliferator-activated receptor gamma-activator 1 alpha, PGC1 α) 是一种调控肌纤维类型转化和线粒体生物合成的转录共激活因子。2017 年, Zhang 等^[57]和 Ying 等^[58]通过过表达猪肌肉中 PGC1 α 基因, 显著增加了肌肉线粒体的生物发生, 通过增强线粒体呼吸和脂肪酸氧化, 将快速糖酵解纤维转化为缓慢和氧化纤维, 改善肉色, 降低滴水损失, 有效提高猪肉品质。过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (peroxisome proliferator-activated receptor gamma, PPAR γ) 是脂肪形成的主要调节因子, 在骨骼肌纤维形成和脂肪沉积中起重要作用, 2021 年, Gu 等^[59]制备了肌肉特异性过表达 PPAR γ 的转基因猪, PPAR γ 可通过激活脂肪细胞分化调节因子的增强表达来促进脂肪细胞分化, 从而进行脂肪沉积, 显著增加 PPAR γ 转基因猪肌肉内脂肪含量。特异性 PPAR γ 的过表达也可以促进氧化纤维的形成, 同时保持了胴体瘦肉率。表 3 对目前已报道的基因编辑改善猪肉品质的研究做出相关汇总 (表 3)。

表 3 基因编辑技术在改善猪肉品质上的应用

基因功能	制备方法	突变方式	编辑工具	参考文献
FAD-2: 产生 UFAs	胞质注射	转基因	-	[47]
Fat-1: 将 ω -6 PUFA 转换为 ω -3 PUFA	克隆 SCNT	转基因	-	[49-50, 52]
	克隆 SCNT	基因敲入	CRISPR/Cas9	[51, 53]
α -Gal: 诱发过敏	克隆 SCNT	基因敲除	CRISPR/Cas9	[56]
Neu5Gc: 导致慢性炎症				
PGC1 α : 调节肌纤维类型	胞质注射	转基因	-	[57]
	克隆 SCNT	转基因		[58]
PPAR γ : 肌纤维形成和脂肪沉积	克隆 SCNT	基因敲入	CRISPR/Cas9	[59]

注: -表示没有利用基因编辑工具。

2.3 改善仔猪抗寒性

解偶连蛋白1 (uncoupling protein 1, UCP1) 位于线粒体内膜, 通过解偶联 ATP 合成和质子穿过内膜产生热量。UCP1 是非寒颤产热的关键因子, 负责棕色脂肪组织 (BAT) 介导的产热, 在提高仔猪有效抗寒和调节体温平衡方面起关键作用, UCP1 还参与动物脂肪沉积, 调节身体肥胖方面发挥重要作用。猪线粒体中的 UCP1 表达非常低甚至不存在, 引起 BAT 功能表达较弱, 机体产热性能下降, 加速脂肪沉积, 尽管 Lin 等^[60]证明了猪的冷适应依赖于 BAT 细胞中的 UCP3, 但由于仔猪出生后体温调节系统发育不良, 机体缺乏非寒颤产热, 仔猪表现出较差的热调节。2017年, Zheng 等^[61]通过外源性小鼠 UCP1 的 cDNA 构建了猪脂联素启动子, 并使用 CRISPR/Cas9 技术将其定点插入到猪内源性 UCP1 基因外显子的第2位点位上, 成功制备出能够抗寒的转 UCP1 基因猪。试验发现, 在 4℃ 寒冷条件下, 野生型仔猪体内直肠温度在急性冷暴露环境下的前 2 h 表现出体温持续下降, 在第 3 和第 4 小时略有恢复, 但仍显著低于 UCP1 转基因仔猪的直肠温度, 而 UCP1 转基因仔猪体内直肠温度可以保持 38℃ 的正常体温 4 h, 且比野生型仔猪体温高 2℃。由于脂联素启动子驱动脂肪细胞 UCP1 的表达, 与野生型仔猪相比, 转 UCP1 基因猪生长正常, 背膘厚度、脂肪细胞大小和体脂沉积均显著减少, 胴体瘦肉率得到显著提高。

2.4 提高抗病性

当今养猪业高密度的饲养模式加速了猪传染性疾病的发生和传播, 这些传染性疾病造成生猪养殖死亡率上升、生产效率下降, 极大地降低了养猪业经济效益。基因编辑技术的新突破从遗传本质上赋予动物对病原感染的抗性, 为预防和控制养殖业传染性疫病提供了新的思路。近年来, 基因编辑技术在猪抗病育种研究中取得诸多进展, 如利用全基因组学鉴别致病力基因、诱导基因靶向缺失或突变制备弱毒或减毒疫苗、进行动物抗病育种改良等。

2.4.1 猪繁殖与呼吸综合征

猪繁殖与呼吸综合征 (porcine reproductive and respiratory syndrome, PRRS), 即猪蓝耳病, 可引起妊娠后期母猪流产, 感染仔猪呼吸系统, 引起呼吸系统传染病甚至死亡。PRRS 的病原是猪繁殖和呼吸综合征病毒 (porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV), 具有高度传染性, 同时由于 PRRSV 的高进化率, PRRSV 分离株显示出高度的遗传和抗原变异性, 阻碍了疫苗免疫的有效性。PRRSV 感染宿主细胞主要通过受体介导的途径, PRRSV 在宿主体内表现出精准的细胞嗜性, 靶向猪单核细胞或巨噬

细胞的特定亚群, 并通过硫酸乙酰肝素 (heparan sulphate, HS), 唾液黏附素 (sialoadhesin, Sn) 和清道夫受体 CD163 (cluster of differentiation 163) 等多个受体感染宿主细胞^[62]。

2016年, Whitworth 等^[63]敲除猪受体基因 CD163 后对其进行攻毒, 发现 CD163 基因敲除猪对 PRRSV 感染具有完全抗性, 证实 CD163 是 PRRSV 入侵宿主时的关键受体。CD163 第 7 个外显子上富含与病毒互作位点——半胱氨酸结构域 5 (scavenger receptor cysteine-rich domain 5, SRCR5)。目前, 通过基因编辑技术对 CD163 的敲除、CD163 基因第 7 个外显子 SRCR5 的缺失和病毒感染袋中第 7 个外显子的部分缺失已经实现了对 PRRSV 感染的抗性提升。2017年, Burkard 等^[64]通过胚胎注射 CRISPR/Cas9 消除 CD163 的第 7 外显子, 成功制备了 CD163 基因外显子 7 缺失的基因编辑猪, 攻毒试验显示基因编辑猪对 PRRSV-1 和 PRRSV-2 感染具有抵抗力。2019年, Guo 等^[65]利用 CRISPR/Cas9 技术精确地敲除了两广小花猪和大白猪品种中 CD163 SRCR5 结构域中一段长度为 41 个氨基酸片段, 通过病毒感染试验发现这些基因编辑猪对 PRRSV-2 具有抗性。2020年, Xu 等^[66]使用 CRISPR/Cas9 和 SCNT 成功地产生了 CD163 和 pAPN (猪氨肽酶 N, 一种导致传染性胃肠炎病毒 TGEV 感染的因子) 双基因敲除 (double knock-out, DKO) 的基因编辑大白猪, 通过攻毒试验发现这些 DKO 猪对 PRRSV-2 和猪传染性胃肠炎病毒 (TGEV) 表现出完全抗性, 且与野生型猪相比, 其生产性能和繁殖性能没有显著差异。2021年, Tanihara 等^[67]通过电穿孔将靶向 CD163 基因第 7 外显子的 CRISPR/Cas9 系统引入猪体外受精的受精卵中, 也制备了对 PRRSV 具有抗性的基因编辑猪。

2.4.2 非洲猪瘟

非洲猪瘟 (African swine fever, ASF) 是一种传播速度快、致病性和死亡率高的传染病, 其发病过程短, 可引起猪发生急性出血热, 给全球养猪业带来巨大损失。ASF 是由非洲猪瘟病毒 (African swine fever virus, ASFV) 引起, ASFV 的基因组庞大且复杂, DNA 大小在 170 kb 至 190 kb, 可编码 150 多个开放阅读框 (open reading frame, ORF), 其中包含 50 种结构蛋白和 100 种宿主诱导的免疫调节蛋白^[68]。猪巨噬细胞是 ASFV 攻击的天然靶细胞, 抗 CD163 基因的抗体能够抑制 ASFV 对宿主细胞的攻击, 减弱 ASFV 与巨噬细胞的结合, 推测其可以作为 ASFV 感染宿主的潜在受体, 然而, Popescu 等^[69]用 ASFV 攻击 CD163 KO 猪, 发现 CD163 基因编辑猪不能抵抗 ASFV 的感染, 在 CD163 KO 和野生型猪之间观察到

临床症状和毒理学几乎没有差异。由于疣猪和家猪感染 ASFV 后症状有显著差异, Palgrave 等^[70]对二者进行比较分析发现疣猪和家猪之间 RELA (NF- κ B 转录因子 P65 亚基) 基因存在序列差异, 推测 RELA 基因的多态性可能赋予猪对 ASFV 感染的不同敏感性, 并有后者通过 TALEN 和 ZFN 制备了 RELA 点突变的基因编辑猪^[71]。然而, 通过替换 3 个氨基酸引起的 RELA 突变并没有使家猪对 ASFV 产生明显抗性, 它只是延迟了临床症状的发作, 并导致一些动物鼻分泌物和血液中的病毒减少^[72]。Hübner 等^[73]用编码 Cas9 的质粒和靶向 ASFV CP204L 的 sgRNA 转染猪细胞, 证明该 CRISPR 系统能在细胞水平抑制 ASFV 的感染, Cas9 切割病毒基因组使病毒产量降低了 4 个数量级。

2.4.3 伪狂犬病

伪狂犬病 (pseudorabies, PR) 是一种强急性自然疫源传染病, 病原是伪狂犬病毒 (pseudorabies virus, PRV), 也称 (suid herpesvirus-1, SuHV-1)。猪是 PRV 的天然宿主和传染源, 在病猪中表现为消化道、呼吸道和神经性疾病, 其中仔猪极易患病, 表现为高热、腹泻呕吐和神经系统症状, 具有较高死亡率, 妊娠母猪感染后出现流产、死胎等繁殖性障碍, 严重危害全球养猪业发展。

目前已有多项利用基因编辑技术修饰宿主基因进行 PRV 抗病育种的研究。PRV 对宿主细胞的感染可以由细胞膜蛋白 Nectin1 和 Nectin2 (PRV 病毒糖蛋白 gD 候选受体) 介导, 2020 年, Huang 等^[74]利用 CRISPR/Cas9 靶向 PK15 细胞中敲除 Nectin1 和 Nectin2 基因, 与野生型 (WT) 细胞相比, Nectin1 或 Nectin2 基因敲除细胞中的 PRV 载量显著减少。通过同时敲除 PK15 细胞中的 Nectin1 和 Nectin2, 发现

与单基因敲除细胞相比, 双基因敲除细胞对 PRV 的抵抗力没有进一步增加, 进一步研究发现, Nectin1 或 Nectin2 KO 不会显著影响病毒对细胞的吸附和内化, 但会阻断 PRV 在细胞间传播。因此 Nectin1 和 Nectin2 可能是有效的 PRV 抗病育种候选基因位点。先前的研究报道, Nectin1 的胞外 N-末端可变区样 (V) 结构域对 α 疱疹病毒感染很重要, 某些残基中的氨基酸取代会严重降低 PRV gD/Nectin1 结合和 PRV 感染能力^[75]。2022 年, Yang 等^[76]将 Nectin1 的 129 位处的苯丙氨酸突变为丙氨酸产生 Nectin1 (F129A) 点突变小鼠, 用 PRV 感染突变小鼠发现, 纯合突变小鼠显著减轻了疾病表型, 降低了血清与脑组织中的病毒载量和小鼠死亡率。Nectin1 基因修饰是赋予动物 PRV 抗性的有效途径, 为培育 PRV 抗病猪提供方法参考。CRISPR/Cas9 可直接剪切 PRV 基因组来清除胞内病毒, 从而有效防治 PRV 感染。2017 年, Tang 等^[77]利用 CRISPR/Cas9 系统靶向 PRV 基因组中的多个基因位点 (多为病毒基因组 UL 和 Us 区), 设计了 75 组 sgRNA, 通过荧光素酶 (Luciferase) 标记 PRV 进行 sgRNA 高通量筛选, 发现大多数 sgRNA 显著抑制 PRV 复制, 使用多个 sgRNA 同时靶向 PRV 可完全抑制细胞中 PRV 的复制。2018 年, Ren 等^[78]构建了靶向 PRV UL30 的 CRISPR 系统, 发现其可以在细胞水平显著抑制 PRV 的感染。Hölper 等^[79]建立了猪 sgRNA 文库, 靶向猪基因组中所有注释基因, 并使用该文库筛选 PRV 感染猪细胞的关键宿主基因。该研究鉴定出鞘磷脂合酶 1 (sphingomyelin synthase 1, SMS1) 在 PRV 感染中发挥重要作用。表 4 对当前基因编辑在提高猪只抗病性方面的应用进行了相关概括 (表 4)。

表 4 基因编辑在提高猪只抗病性上的应用

病毒	目的基因	编辑工具/突变方式	参考文献
猪繁殖和呼吸综合征病毒	CD163	CRISPR/Cas9, 基因敲除	[63, 67]
	CD163-SRCR5	CRISPR/Cas9, 基因缺失	[64-65]
	CD163, pAPN	CRISPR/Cas9, 基因敲除	[66]
非洲猪瘟病毒	RELA	TALEN, ZFN, 位点突变	[70]
	ASFV CP204L	CRISPR/Cas9, 基因敲除	[73]
伪狂犬病毒	Nectin1, Nectin2	CRISPR/Cas9, 基因敲除	[74]
	Nectin1 (F129A)	CRISPR/Cas9, 位点突变	[76]
	PRVUL 和 Us 区	CRISPR/Cas9	[77]
	PRV UL30	CRISPR/Cas9	[78]
	SMS1	CRISPR/Cas9, 基因敲除	[79]

3 小结和展望

基因编辑技术可快速实现猪的生产性能、抗逆性和抗病性等方面的改良,对养猪业的创新发展具有重要意义。虽然当前基因编辑在技术操作上并无显著瓶颈,但该技术的应用中仍存在一定的脱靶效应、额外DNA插入等问题,基因编辑猪的生物安全具有一定风险性。农业农村部对农业用基因编辑产品其脱靶性、载体片段随机的整合和载体序列残留等具有一定要求,且要求编辑后的基因在个体间无基因漂移的发生,这就需提高基因编辑对目的基因定点修饰的效率、降低脱靶效应,建立更加优良的基因编辑系统,培育符合生物安全规范的基因编辑猪。

尽管基因编辑猪在实验室中显示出潜在优势,但其能否用于商业化生产还存在一定的生物安全性和产业转化应用问题,亟待我们进一步研究和解决。农业部要求农业用基因编辑产品的生物安全需满足食用安全和环境安全,即不会对人类健康或环境造成危害,因此,基因编辑猪的食品安全需要经过严格的实验室试验验证,对基因编辑猪自身健康状况、行为表现、生长和繁殖能力以及猪肉的营养价值、毒性和过敏原性等方面进行安全性评估,使优良经济性状的基因编辑猪肉满足人体食用标准,同时对基因编辑猪进行严格的环境风险评估,以确保不会对环境造成负面影响。此外,基因编辑猪能否用于商业化生产,除了基于基因编辑猪对人类、自身和环境是否有益外,还取决于社会公众的可接受性,当前人们对基因编辑的伦理问题还具有争议,在基因编辑全面到来以前,人们仍需保持警惕、审慎、包容和创新的态度接受该技术的应用。因此,建立合理的基因编辑产品管理体系、强化监管和审批流程,进行公众教育,以提高公众对基因编辑技术的认识和理解,推进基因编辑动物从实验室走向市场。

参考文献:

- [1] RAN F A, HSU P D, LIN C Y, et al. Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity [J]. *Cell*, 2013, 154 (6): 1380-1389.
- [2] HSU P D, LANDER E S, ZHANG F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering [J]. *Cell*, 2014, 157 (6): 1262-1278.
- [3] DOUDNA J A, CHARPENTIER E. The new frontier of genome engineering with CRISPR - Cas9 [J]. *Science*, 2014, 346 (6213): 1258096.
- [4] NISHIMASU H, RAN F A, HSU P D, et al. Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA [J]. *Cell*, 2014, 156 (5): 935-949.
- [5] WANG J, LIU M, ZHAO L, et al. Disabling of nephrogenesis in porcine embryos via CRISPR/Cas9-mediated SIX1 and SIX4 gene targeting [J]. *Xenotransplantation*, 2019, 26 (3): e12484.
- [6] YAN S, TU Z, LIU Z, et al. A huntingtin knockin pig model recapitulates features of selective neurodegeneration in Huntington's disease [J]. *Cell*, 2018, 173 (4): 989-1002. e13.
- [7] HEYER W D, EHMSSEN K T, LIU J. Regulation of homologous recombination in eukaryotes [J]. *Annual Review of Genetics*, 2010, 44: 113-139.
- [8] VERGUNST A C, HOOYKAAS P J J. Recombination in the plant genome and its application in biotechnology [J]. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 1999, 18 (1): 1-31.
- [9] LIEBER M R. The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway [J]. *Annual Review of Biochemistry*, 2010, 79: 181-211.
- [10] 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*, 1996, 93 (3): 1156-1160.
- [11] BIBIKOVA M, BEUMER K, TRAUTMAN J K, et al. Enhancing gene targeting with designed zinc finger nucleases [J]. *Science*, 2003, 300 (5620): 764.
- [12] 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 Research*, 2005, 33 (18): 5978-5990.
- [13] HÄNDEL E M, ALWIN S, CATHOMEN T. Expanding or restricting the target site repertoire of zinc-finger nucleases: the inter-domain linker as a major determinant of target site selectivity [J]. *Molecular Therapy*, 2009, 17 (1): 104-111.
- [14] PASCHON D E, LUSSIER S, WANGZOR T, et al. Diversifying the structure of zinc finger nucleases for high-precision genome editing [J]. *Nature Communications*, 2019, 10 (1): 1133.
- [15] CARLSON D F, TAN W, LILLICO S G, et al. Efficient TALEN-mediated gene knockout in livestock [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2012, 109 (43): 17382-17387.
- [16] CHRISTIAN M, CERMAK T, DOYLE E L, et al. Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases [J]. *Genetics*, 2010, 186 (2): 757-761.
- [17] CHU C, YANG Z, YANG J, et al. Homologous recombination-mediated targeted integration in monkey embryos using TALE nucleases [J]. *BMC Biotechnology*, 2019, 19 (1): 1-10.
- [18] CERMAK T, DOYLE E L, CHRISTIAN M, et al. Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting [J]. *Nucleic Acids Research*, 2011, 39 (12): e82.
- [19] ISHINO Y, SHINAGAWA H, MAKINO K, et al. Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product [J]. *Journal of Bacteriology*, 1987, 169 (12): 5429-5433.
- [20] MOJICA F J M, DÍEZ-VILLASEÑOR C, SORIA E, et al. Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria [J]. *Molecular Microbiology*, 2000, 36 (1): 244-246.
- [21] JANSEN R, EMBDEN J D A, GAASTRA W, et al. Identification of

- genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes [J]. *Molecular Microbiology*, 2002, 43 (6): 1565–1575.
- [22] POURCEL C, SALVIGNOL G, VERGNAUD G. CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies [J]. *Microbiology*, 2005, 151 (3): 653–663.
- [23] BARRANGO U R, FREMAUX C, DEVEAU H, et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes [J]. *Science*, 2007, 315 (5819): 1709–1712.
- [24] BROUNS S J J, JORE M M, LUNDGREN M, et al. Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes [J]. *Science*, 2008, 321 (5891): 960–964.
- [25] JIANG W, BIKARD D, COX D, et al. RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems [J]. *Nature Biotechnology*, 2013, 31 (3): 233–239.
- [26] MARRAFFINI L A, SONTHEIMER E J. CRISPR interference limits horizontal gene transfer in staphylococci by targeting DNA [J]. *Science*, 2008, 322 (5909): 1843–1845.
- [27] JINEK M, CHYLINSKI K, FONFARA I, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity [J]. *Science*, 2012, 337 (6096): 816–821.
- [28] CONG L, RAN F A, COX D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems [J]. *Science*, 2013, 339 (6121): 819–823.
- [29] HSU P D, SCOTT D A, WEINSTEIN J A, et al. DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases [J]. *Nature Biotechnology*, 2013, 31 (9): 827–832.
- [30] FLORINI J R, EWTON D Z, COOLICAN S A. Growth hormone and the insulin-like growth factor system in myogenesis [J]. *Endocrine Reviews*, 1996, 17 (5): 481–517.
- [31] HAMMER R E, PURSEL V G, REXROAD JR C E, et al. Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection [J]. *Nature*, 1985, 315 (6021): 680–683.
- [32] PURSEL V G, HAMMER R E, BOLT D J, et al. Expression of growth hormone transgenes in swine [J]. *J Reprod Fertil Suppl*, 2018, 10: 235–245.
- [33] JEON J T, CARLBORG Ö, TÖRNSTEN A, et al. A paternally expressed QTL affecting skeletal and cardiac muscle mass in pigs maps to the IGF2 locus [J]. *Nature Genetics*, 1999, 21 (2): 157–158.
- [34] XIANG G, REN J, HAI T, et al. Editing porcine IGF2 regulatory element improved meat production in Chinese Bama pigs [J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2018, 75: 4619–4628.
- [35] LIU X, LIU H, WANG M, et al. Disruption of the ZBED6 binding site in intron 3 of IGF2 by CRISPR/Cas9 leads to enhanced muscle development in Liang Guang Small Spotted pigs [J]. *Transgenic Research*, 2019, 28: 141–150.
- [36] QIAN L, TANG M, YANG J, et al. Targeted mutations in myostatin by zinc-finger nucleases result in double-muscling phenotype in Meishan pigs [J]. *Scientific Reports*, 2015, 5 (1): 14435.
- [37] 吴添文, 齐传翔, 李训碧等. 基因组编辑猪的研究现状及展望 [J]. *农业生物技术学报*, 2017, 25 (5): 781–787.
- [38] 华文君, 毕延震, 刘西梅, 等. CRISPR/Cas9 技术制备猪肌肉生长抑制素基因敲除细胞 [J]. *基因组学与应用生物学*, 2015, 34 (5): 945–949.
- [39] BI Y, HUA Z, LIU X, et al. Isozygous and selectable marker-free MSTN knockout cloned pigs generated by the combined use of CRISPR/Cas9 and Cre/LoxP [J]. *Scientific Reports*, 2016, 6 (1): 31729.
- [40] WANG K, OUYANG H, XIE Z, et al. Efficient generation of myostatin mutations in pigs using the CRISPR/Cas9 system [J]. *Scientific Reports*, 2015, 5 (1): 16623.
- [41] LI R, ZENG W, MA M, et al. Precise editing of myostatin signal peptide by CRISPR/Cas9 increases the muscle mass of Liang Guang Small Spotted pigs [J]. *Transgenic Research*, 2020, 29: 149–163.
- [42] KANG J D, KIM S, ZHU H Y, et al. Generation of cloned adult muscular pigs with myostatin gene mutation by genetic engineering [J]. *RSC Advances*, 2017, 7 (21): 12541–12549.
- [43] RAYMOND J. DESHAIES, CLAUDIO A. P. Joazeiro. RING Domain E3 Ubiquitin Ligases [J]. *Annual Review of Biochemistry*, 2009, 78 (1).
- [44] SHI J, LUO L, EASH J, et al. The SCF-Fbxo40 complex induces IRS1 ubiquitination in skeletal muscle, limiting IGF1 signaling [J]. *Developmental Cell*, 2011, 21 (5): 835–847.
- [45] ZOU Y, LI Z, ZOU Y, et al. An FBXO40 knockout generated by CRISPR/Cas9 causes muscle hypertrophy in pigs without detectable pathological effects [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2018, 498 (4): 940–945.
- [46] LEE Y S, HUYNH T V, LEE S J. Paracrine and endocrine modes of myostatin action [J]. *Journal of Applied Physiology*, 2016, 120 (6): 592–598.
- [47] SAEKI K, MATSUMOTO K, KINOSHITA M, et al. Functional expression of a $\Delta 12$ fatty acid desaturase gene from spinach in transgenic pigs [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2004, 101 (17): 6361–6366.
- [48] KANG J X. The omega-6/omega-3 fatty acid ratio in chronic diseases: animal models and molecular aspects [J]. *World Rev Nutr Diet*, 2011, 102: 22–29.
- [49] LAI L, KANG J X, LI R, et al. Generation of cloned transgenic pigs rich in omega-3 fatty acids [J]. *Nature Biotechnology*, 2006, 24 (4): 435–436.
- [50] ZHANG P, ZHANG Y, DOU H, et al. Handmade cloned transgenic piglets expressing the nematode fat-1 gene [J]. *Cellular Reprogramming*, 2012, 14 (3): 258–266.
- [51] LI M, OUYANG H, YUAN H, et al. Site-specific Fat-1 knock-in enables significant decrease of n-6PUFAs/n-3PUFAs ratio in pigs [J]. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 2018, 8 (5): 1747–1754.
- [52] TANG F, YANG X, LIU D, et al. Co-expression of fat1 and fat2 in transgenic pigs promotes synthesis of polyunsaturated fatty acids [J]. *Transgenic Research*, 2019, 28: 369–379.
- [53] YOU W, LI M, QI Y, et al. CRISPR/Cas9-mediated specific integration of Fat-1 and IGF-1 at the p Rosa26 locus [J]. *Genes*, 2021, 12 (7): 1027.
- [54] COMMINS S P, JERATH M R, COX K, et al. Delayed anaphylaxis to α -gal, an oligosaccharide in mammalian meat [J]. *Allergy International*, 2016, 65 (1): 16–20.
- [55] JAHAN M, THOMSON P C, WYNN P C, et al. The non-human glycan, N-glycolylneuraminic acid (Neu5Gc), is not expressed in all organs and skeletal muscles of nine animal species [J]. *Food Chemistry*, 2021, 343: 128439.

- [56] YEN C H, TAI H C, PENG S H, et al. Scaffold derived from GGTA1 and CMAH double knockout pigs elicits only slight inflammation in a gene - edited pig model [J]. *Materialia*, 2020, 14: 100836.
- [57] ZHANG L, ZHOU Y, WU W, et al. Skeletal muscle-specific overexpression of PGC-1 α induces fiber-type conversion through enhanced mitochondrial respiration and fatty acid oxidation in mice and pigs [J]. *International Journal of Biological Sciences*, 2017, 13 (9): 1152.
- [58] YING F, ZHANG L, BU G, et al. Muscle fiber-type conversion in the transgenic pigs with overexpression of PGC1 α gene in muscle [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2016, 480 (4): 669-674.
- [59] GU H, ZHOU Y, YANG J, et al. Targeted overexpression of PPAR γ in skeletal muscle by random insertion and CRISPR/Cas9 transgenic pig cloning enhances oxidative fiber formation and intramuscular fat deposition [J]. *The FASEB Journal*, 2021, 35 (2): e21308.
- [60] LIN J, CAO C, TAO C, et al. Cold adaptation in pigs depends on UCP3 in beige adipocytes [J]. *Journal of Molecular Cell Biology*, 2017, 9 (5): 364-375.
- [61] ZHENG Q, LIN J, HUANG J, et al. Reconstitution of UCP1 using CRISPR/Cas9 in the white adipose tissue of pigs decreases fat deposition and improves thermogenic capacity [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2017, 114 (45): E9474-E9482.
- [62] VAN BREEDAM W, DELPUTTE P L, VAN GORP H, et al. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus entry into the porcine macrophage [J]. *Journal of General Virology*, 2010, 91 (7): 1659-1667.
- [63] WHITWORTH K M, ROWLAND R R R, EWEN C L, et al. Gene-edited pigs are protected from porcine reproductive and respiratory syndrome virus [J]. *Nature Biotechnology*, 2016, 34 (1): 20-22.
- [64] BURKARD C, LILLICO S G, REID E, et al. Precision engineering for PRRSV resistance in pigs: macrophages from genome edited pigs lacking CD163 SRCR5 domain are fully resistant to both PRRSV genotypes while maintaining biological function [J]. *PLoS Pathogens*, 2017, 13 (2): e1006206.
- [65] GUO C, WANG M, ZHU Z, et al. Highly efficient generation of pigs harboring a partial deletion of the CD163 SRCR5 domain, which are fully resistant to porcine reproductive and respiratory syndrome virus 2 infection [J]. *Frontiers in Immunology*, 2019, 10: 1846.
- [66] XU K, ZHOU Y, MU Y, et al. CD163 and pAPN double-knockout pigs are resistant to PRRSV and TGEV and exhibit decreased susceptibility to PDCoV while maintaining normal production performance [J]. *eLife*, 2020, 9: e57132.
- [67] TANIHARA F, HIRATA M, NGUYEN N T, et al. Generation of CD163-edited pig via electroporation of the CRISPR/Cas9 system into porcine *in vitro*-fertilized zygotes [J]. *Animal Biotechnology*, 2021, 32 (2): 147-154.
- [68] BAO J, WANG Q, LIN P, et al. Genome comparison of African swine fever virus China/2018/Anhui XCGQ strain and related European p72 Genotype II strains [J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2019, 66 (3): 1167-1176.
- [69] POPESCU L, GAUDREAUULT N N, WHITWORTH K M, et al. Genetically edited pigs lacking CD163 show no resistance following infection with the African swine fever virus isolate, Georgia 2007/1 [J]. *Virology*, 2017, 501: 102-106.
- [70] PALGRAVE C J, GILMOUR L, LOWDEN C S, et al. Species-specific variation in RELA underlies differences in NF- κ B activity: a potential role in African swine fever pathogenesis [J]. *Journal of Virology*, 2011, 85 (12): 6008-6014.
- [71] LILLICO S G, PROUDFOOT C, CARLSON D F, et al. Live pigs produced from genome edited zygotes [J]. *Scientific Reports*, 2013, 3 (1): 2847.
- [72] MCCLEARY S, STRONG R, MCCARTHY R R, et al. Substitution of warthog NF- κ B motifs into RELA of domestic pigs is not sufficient to confer resilience to African swine fever virus [J]. *Scientific Reports*, 2020, 10 (1): 1-11.
- [73] HÜBNER A, PETERSEN B, KEIL G M, et al. Efficient inhibition of African swine fever virus replication by CRISPR/Cas9 targeting of the viral p30 gene (CP204L) [J]. *Scientific Reports*, 2018, 8 (1): 1-7.
- [74] HUANG Y, LI Z, SONG C, et al. Resistance to pseudorabies virus by knockout of nectin1/2 in pig cells [J]. *Archives of Virology*, 2020, 165: 2837-2846.
- [75] STRUYF F, MARTINEZ W M, SPEAR P G. Mutations in the N-terminal domains of nectin-1 and nectin-2 reveal differences in requirements for entry of various alphaherpesviruses and for nectin-nectin interactions [J]. *Journal of Virology*, 2002, 76 (24): 12940-12950.
- [76] YANG X, YU C, ZHANG Q, et al. A nectin1 mutant mouse model is resistant to pseudorabies virus infection [J]. *Viruses*, 2022, 14 (5): 874.
- [77] TANG Y D, LIU J T, WANG T Y, et al. CRISPR/Cas9-mediated multiple single guide RNAs potently abrogate pseudorabies virus replication [J]. *Archives of Virology*, 2017, 162: 3881-3886.
- [78] REN L, PENG Z, OUYANG T, et al. Subculturing cells have no effect on CRISPR/Cas9-mediated cleavage of UL30 gene in pseudorabies virus [J]. *Animal Models and Experimental Medicine*, 2018, 1 (1): 74-77.
- [79] HÖLPER J E, GREY F, BAILLIE J K, et al. A genome-wide CRISPR/Cas9 screen reveals the requirement of host sphingomyelin synthase 1 for infection with pseudorabies virus mutant gD⁻ Pass [J]. *Viruses*, 2021, 13 (8): 1574.