

基因编辑技术在猪现代育种和动物模型构建中应用的研究进展

张霞^{1,3} 刘晓研^{2,4} 苗义良^{1,2,3*}

(¹华中农业大学动物动医学院, 干细胞与再生生物学研究所, 武汉 430070; ²华中农业大学农业动物遗传育种与繁殖教育部重点实验室, 武汉 430070; ³湖北省生猪健康养殖协同创新中心, 武汉 430070; ⁴山东省青岛大学附属医院烟台毓璜顶医院生殖医学中心, 烟台 264000)

摘要 基因编辑技术是近几年兴起的一项能够对目标基因序列进行编辑的技术, 该技术主要利用人工核酸酶实现对基因组上特定DNA片段的删除、插入或修饰。猪是我国优质的肉用型家畜, 但随着人民生活水平的提高, 对猪的需求也由过去的膘肥体重转变为能提供更优质的肉品, 这就要求对猪的瘦肉率、肉质等主要经济性状方面进行育种改良, 从而优化猪肉的蛋白质和脂肪含量。此外, 由于猪在解剖学和生理学等方面与人类高度相似, 可以用于疾病模型、药物筛选及致病机理的研究, 基因编辑将在以上方面发挥显著的作用。利用基因编辑技术可以大大缩短猪在现代育种和疾病动物模型构建的时间, 使猪在农业发展和生物医学研究中拥有更大的潜力。该文主要综述传统转基因技术和基因编辑技术在猪育种和动物模型构建中所采用的方法, 并对比各种方法的优缺点, 旨在为猪的育种和动物模型的构建提供理论依据。

关键词 猪; 基因编辑; 育种; 动物模型

Current Progress of Gene Editing Technique in Modern Porcine Breeding and Animal Model Establishment

Zhang Xia^{1,3}, Liu Xiaoyan^{2,4}, Miao Yiliang^{1,2,3*}

(¹Institute of Stem Cell and Regenerative Biology, College of Animal Science and Veterinary Medicine, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China; ²Key Lab of Agricultural Animal Genetics, Breeding and Reproduction of Ministry of Education, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China; ³The Cooperative Innovation Center for Sustainable Pig Production, Wuhan 430070, China; ⁴Reproductive Medicine Centre, Affiliated Hospital of Qingdao University, Yuhuangding Hospital of Yantai, Yantai 264000, China)

Abstract Gene editing technology is a technology that can edit the target gene sequence and delete, insert and modify genome specific DNA fragment by artificial nucleic acid enzymes. Porcines are high quality livestock for meat production, however, people's demand for fat and weight is changed to obtain a better quality of meat with the improvement of people's living standards, which requires breeding and improving the main economic traits of porcines in lean meat percentage and meat quality to optimize the protein and fat content of pork. Besides, porcines are similar as to human in anatomy and physiology and they can be used in human disease models establishment, drug screening and the study of pathogenic mechanism. Gene editing technology can greatly reduce the time in

收稿日期: 2016-12-13 接受日期: 2017-02-07

国家科技支撑计划资助(批准号: 2015BAD03B01)资助的课题

*通讯作者。Tel: 027-87282091, E-mail: miaoyl@mail.hzau.edu.cn

Received: December 13, 2016 Accepted: February 7, 2017

This work was supported by the National Science and Technology Support Program (Grant No.2015BAD03B01)

*Corresponding author. Tel: +86-27-87282091, E-mail: miaoyl@mail.hzau.edu.cn

网络出版时间: 2017-03-20 16:53:49 URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20170320.1653.012.html>

modern porcine breeding and animal models of disease establishment, which makes porcines have greater potential in agricultural development and bio-medical research. This paper reviews traditional trans-genetic engineering and gene editing technologies in porcine breeding and animal models establishment and compares the advantages and disadvantages of each method. It provides a theoretical basis for porcine breeding and animal model establishment.

Keywords porcine; gene editing; breeding; animal model

传统育种技术, 主要通过杂交或其他诱变手段使群体中出现新的变异, 再通过选育获得新品种。该技术在过去的品种选育中做出巨大贡献, 但是遗传诱变会引起所有性状随机的和不可预测的遗传变异, 从而导致选育的不精确性和不可预见性, 并且该方法所需的周期较长, 通常一个新品种的培育至少需要十年以上。随着猪全基因组测序工作的完成, 解析基因的功能以及实现对重要功能基因的应用越来越重要, 基因编辑技术可以直接在分子水平对目的基因进行编辑, 不但可突破动物、植物和微生物之间的界限进行基因的转移, 拓宽种质资源的利用, 又能避开物种间杂交不育的生殖隔离, 在较短时期内培育出常规方法不能育成或难以育成的动物品种, 从而加快动物育种的改良进程。猪是我国优质的肉用型家畜, 但随着人民生活水平的提高, 对猪的需求也由过去的膘肥体重转变为提供更优质的肉品, 这就要求对猪的瘦肉率、肉质等主要经济性状方面进行育种改良, 从而优化猪肉的蛋白质和脂肪含量, 而基因编辑将在以上方面发挥显著的作用。由于猪在解剖学、生理学等方面与人类高度相似, 可用于疾病模型、药物筛选及致病机理的研究。利用基因编辑技术建立的人类疾病模型, 可以为解析人类重大疾病的发生、发展以及致病机理的研究提供良好的动物模型。

1 传统转基因技术在猪育种和动物模型构建中的应用

20世纪80年代以来, 转基因动物技术一直是动物遗传育种领域的研究热点。它在改良动物生产性状、提高畜禽抗病力以及生产人药用蛋白等非常规畜牧产品方面均有着广阔的应用前景。传统的转基因技术是指将已知的外源基因移入动物细胞并随机整合到基因组中, 从而使其得以表达的技术, 主要包括原核显微注射法、病毒载体法等。

1.1 原核注射

原核注射是指利用显微注射技术将外源DNA

导入受精卵的雄原核中, 随着受精卵的发育, 外源基因随机整合到受精卵的基因组中, 将受精卵移植入受体输卵管或子宫中获得转基因动物的方法。与其他转基因方法相比, 原核注射简单易行, 导入的基因片段大, 长度可达100 Kb。缺点是该方法不能用于晚期胚胎。外源DNA随机整合入宿主染色体中, 筛选插入位点非常困难, 在家畜中整合效率较低^[1]。1985年, Hammer等^[2]用显微注射技术把人生长激素融合基因(metallothionein-I/human growth hormone, *MT/hGH*)注射入猪受精卵中, 然后将受精卵移植入发情母猪, 获得了世界上第一头转基因猪。

1.2 体细胞电转

电穿孔技术是利用脉冲电场临时改变细胞膜的状态和通透性, 将外源基因导入细胞内的一种技术。这是最简单高效的一种将外源基因导入细胞内的方法。因此, 很多实验室利用这种方式获得转基因供体细胞以用于体细胞核移植(somatic cell nuclear transfer, SCNT)^[3], 最终获得转基因动物。通过该方法生产的转基因动物其优点在于出生的动物必然是阳性的转基因动物, 但该方法需要在体细胞上进行长期的筛选, 导致体细胞的状态不佳, 会影响克隆动物的出生率。

电穿孔之后, 外源性DNA进入细胞, 与基因组随机整合。由于随机的整合特性, 有些外源性基因会结合到松散的、有转录活性的染色质区, 有些外源性基因会结合到紧实的无转录活性的区域, 这就会影响到转基因的效果, 导致产生不同的表达水平, 该作用被称为位置效应^[4]。有报道证明, 使用绝缘元件可以保护相邻元件避免受到外源基因表达的影响, 这种方法能有效的克服“位置效应”^[5]。核基质附着区(matrix attachment regions, MARs)是与核基质(或核骨架)特异结合的DNA序列, 属于非编码序列, 富含AT, 通常长度为300~2 000 bp。通过与核基质的结合, 它能使染色质形成独立的环状结构, 调控基因的转录和表达, 减少由于位置效应引起的转基因沉默。MARs在提高转基因表达水平、消除转基因

个体间表达水平的差异、抑制转基因沉默等方面起着重要的作用。

随着电转技术的发展, 德国Amaxa公司研发的一种新型的转染技术被称为核转技术(nucleofection technology), 极大地提高了转染效率。核转染的原理是利用细胞特异性的多脉冲技术, 辅以专利的细胞特异性的核转试剂, 将DNA质粒直接导入细胞核内, 从而提高基因表达的效率。由于这种方法不依赖于细胞分裂就能达到细胞转染的目的, 所以对于那些分裂较慢的细胞比如原代细胞来说, 能够大大提高转染效率。一些很难转染的细胞利用这种方法可以被成功转染, 如淋巴细胞、原代的神经细胞以及树状突细胞等^[6]。与普通电转相比, 核转技术为猪的胎儿成纤维细胞的转染提供更加有效和快速的方法。这对通过核移植技术来制作基因编辑猪来讲是一个非常有效的改变。2007年, Nakayama等^[7]报道一组高效转染猪胎儿成纤维细胞的核转参数, 转染后进行体细胞核移植, 有30%~50%的胚胎表达绿色荧光, 并且有5%~6%的胚胎能发育到囊胚阶段。

1.3 病毒载体

1.3.1 慢病毒(lentiviruses) 慢病毒属于逆转录病毒的大家族, 能够转导非分裂细胞并且主动运输慢病毒基因组到细胞核。慢病毒载体可以通过与去透明带的合子共培养直接进入胚胎, 或通过直接注射进入合子或卵母细胞的卵周隙中。慢病毒进入宿主细胞后, 病毒RNA基因组反转录成DNA, 然后整合到宿主基因组(病毒)为子代病毒生产模板^[8]。

与原核注射相比, 慢病毒法转基因更加高效。出生的转基因猪可达到80%~100%^[9]。例如将携带绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)基因的慢病毒感染猪的合子, 共出生46头仔猪, 32头(70%)携带GFP, 其中30头(65%)表达GFP。与原核注射DNA相比, 慢病毒在制作转基因动物方面的效率要高出27倍。同一个研究组在牛上也获得成功, 他们用慢病毒感染牛的卵母细胞得到的后代都是转基因的并且所有的后代均表达GFP。然而, 用注射法把病毒颗粒注射到牛合子的卵周隙中没有获得转基因动物, 说明这项技术获得成功的关键在于注射的时间。慢病毒载体也可以用于核移植中体细胞的转染, 2004年, Hofmann等^[10]获得高效转染的牛胎儿成纤维细胞, 并可以作为核移植的核供体。Ritchie等^[8]把pgk-GFP慢病毒载体导入绵羊受精前的卵母细胞或体外

受精后6 h的受精卵的卵周隙中, 结果显示, 导入卵母细胞的获得20%的转基因羊, 导入受精卵的可获得30%的转基因羊。这些结果与牛的结果不同^[10]。

慢病毒转基因技术还存在一些缺陷。使用慢病毒载体制作转基因动物, 由于在胚胎的第一次卵裂中存在多点整合, 会导致出生的转基因动物有显著程度的嵌合, 同时由于癌基因的激活或基因沉默会导致一些不必要的副作用。此外, 还有一些残余载体的序列会具有增强子活性的可能^[11]。多点插入和嵌合就需要通过育种来分离不同的插入, 这需要耗费大量的时间和昂贵的饲养费用。慢病毒载体的另一个缺点是容量较小。一种HIV-1载体颗粒的最大包装能力为10 Kb。由于慢病毒载体中的顺式活性病毒元件有1.5 Kb, 所以要求包括内源启动子在内的转基因要小于8.5 Kb^[12], 然而DNA直接注射和电转/核转能够传递大于100 Kb的DNA片段, 如以细菌人工染色体为代表的DNA片段。

1.3.2 腺相关病毒载体(adeno-associated virus vectors)

腺相关病毒(adeno-associated virus, AAV)属于微小病毒科。最初, 在腺病毒制品中发现而得名。rAAVs具有高效感染哺乳类细胞的能力(基本上达到100%), 并且能将两侧为反向重复序列的单链DNA转入细胞中。病毒DNA可以通过随机整合和同源重组的方式整合入细胞的基因组。Russell等^[13]证明, rAAVs(recombinant adeno-associated virus)能通过同源重组来修饰细胞, 效率为0.1%~0.3%。基于之前的观察, 科学家开始对这个系统进行修改以期提高同源重组的效率并且降低随机插入率。在家畜中最明显的例子是, 通过rAAVs对CFTR基因的失活或修饰获得囊性纤维化猪的模型。Rogers等^[14]报道, 使用rAAVs能够使G418抗性细胞的CFTR位点的同源重组效率高达10%, 然而, 如果使用靶载体的电转法就不能获得同源重组。rAAVs的缺点是不易制作并且花费较为昂贵, 其容量较小, 只能携带小于4.5 Kb的片段, 这就限制了rAAVs在转基因领域的广泛应用。

1.4 反转录转座子(retrotransposons)

反转录转座子是指通过RNA为中介反转录成DNA后进行转座的可动元件。与慢病毒相比, 转座子能更高效地将DNA整合进基因组。这种转座系统基于一种转座酶的能力, 来催化两侧是末端反向重复序列(inverted terminal repeat sequence, ITRS)的插入DNA。反转录转座子在植物中被发现, 现在

被广泛应用于动物和植物上。其中, 有两种最常用的方法分别是PB(piggyBac)和SB(sleeping beauty)系统^[15-16]。这两种系统在哺乳动物细胞中都具有高效的插入和切除作用。在携带容量方面, 转座子比慢病毒要好一些, 能携带14~18 Kb的插入片段^[17]。此外, 由于这种方法不需要筛选标记, 所以可以用于生产无标记的转基因动物。

转座子生产转基因动物的缺点是它能在动物基因组中催化产生多个插入位点, 从而导致得到的每个转基因动物都是独特的, 并且由于转基因的随机分离得到的后代也是独特的。虽然这些多个位点的分离对于短的世代间隔的物种可能是实用的, 如小鼠, 但不适用于猪和牛, 除非这种方法能够在核移植之前识别出供体细胞的单个整合。尽管有这些缺点, 还是有一些研究组报道使用转座子系统来生成转基因动物, 包括小鼠、猪和牛, 并且表明转座子酶在生产转基因动物中的高效率以及多个插入位点的问题。据报道, 使用SB系统生产的三个转基因猪的品系携带不同的转基因。总的转基因动物的出生率为71%(27/38), 但是很大比例的后代含有多位点插入, 甚至有8个不同位点的插入。如果单个插入能够被控制和重复的话, 那么转座子酶法会成为一种更能为大家接受的转基因的方法。

综上所述, 在过去的几十年中, 传统的转基因技术发挥了重要的作用, 也获得了多种转基因动物, 但是由于其效率较低、随机整合等缺点, 限制了它们的广泛应用, 人们对基因组进行精细编辑的迫切需求促进新型基因编辑技术的出现。

2 基因编辑技术概述

基因组编辑技术是对目标基因组进行“编辑”, 实现针对基因组特定DNA片段的删除、插入或修饰的技术。近年来, 人们开发三大人工核酸酶技术, 即锌指核酸酶(zinc finger nucleases, ZFNs)、类转录激活因子效应物核酸酶(transcription activator-like effector nuclease, TALEN)和CRISPR/Cas9[clustered regulatory interspaced short palindromic repeats/Cas(CRISPR-associated 9)]技术。高效精准的基因编辑技术使猪在农业发展和生物医学研究中拥有更大的潜力。

2.1 锌指核酸酶

基因失活是分析基因功能和生产再现遗传性疾病的模型动物的一种有效工具。与费时、费力以及

低效的同源重组技术相比, ZFNs是一种更加有效的方法。ZFNs作为第一代人工核酸内切酶, 是由锌指结构的DNA识别结构域和DNA切割结构域Fok I融合而成^[18], DNA识别域包括三个或更多的Cys2His2锌指蛋白, 并且每个锌指与三个连续的DNA碱基对相互作用。Fok I内切酶只有当形成二聚体的时候才有活性^[19]。因此, 在基因组的特定位点上具有适当距离相反方向上的两个单独的ZFNs二聚体能够在靶DNA上产生双链断裂, 并诱导DBS修复通路, 包括直接连接两个DNA的双链DNA断裂(double-Strand DNA breaks, DSB)末端的非同源重组末端连接(nonhomologous end joining, NHEJ)以及有外源DNA片段存在的同源性修复(homology directed repair, HDR)。

Bibikova等^[20]报道, 在活体细胞中实现了ZFN介导的基因打靶, 他们是通过向非洲爪蟾卵母细胞的核中注射ZFNs质粒和外源DNA片段而实现的。随后, ZFNs被用于果蝇的基因打靶。在没有同源供体DNA的情况下发生NHEJ介导的基因打靶, 会产生小的缺失或小的插入^[20]。相反, 在有同源供体DNA存在的情况下能发生同源重组, 这促进精确基因打靶的应用。从此, ZFNs技术被广泛应用于在很多种类哺乳动物的基因缺失, 如大鼠^[21]、牛^[22]、人类细胞的基因定点插入^[23]以及生产条件化的敲除大鼠^[24]。2011年, 有研究报道了ZFNs介导的基因打靶应用于猪, Whyte等^[25]用ZFNs技术和体细胞核移植技术结合生产出eGFP转基因猪, 在猪上开启高效基因编辑的大门。随后, Hauschild等^[26]和Yang等^[27]用相同的技术分别得到敲除GGTAI(α 1,3-galactosyltransferase)基因和PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor gamma)基因的克隆猪, 并且在原代细胞中观察到双等位基因失活的比率达到1%, 这比之前同源重组的打靶效率高10 000倍。虽然ZFNs的出现大大促进基因组靶向修饰技术, 但是由于锌指基序与其靶序列间并不具有特异性, 对于每一个特定的靶点, 往往需要构建庞大的锌指表达文库, 并通过实验筛选出高效且特异结合靶序列的锌指蛋白, 因此在基因组上找到合适的ZFNs靶点比较困难。此外, ZFNs技术还存在其他缺点, 如脱靶现象、细胞毒性等, 限制该技术的广泛应用^[28]。

2.2 类转录激活因子效应物核酸酶(transcription activator-like effector nuclease, TALEN)

TALENs技术是一种崭新的分子生物学工具,

是基于对DNA识别域(TALEN结合臂)和人工改造的核酸内切酶的切割域(*Fok I*)的结合对细胞基因组进行修饰而实现的。TALENs的DNA识别域是由一些非常保守的重复氨基酸序列模块(module)组成, 每个模块由34个氨基酸组成, 其中, 第12和13位的氨基酸种类为可变的, 且决定该模块识别靶向位点的特异性。通过DNA识别域结合到靶位点上以及*Fok I*的切割域形成二聚体后, 可特异性对目标基因DNA实现切断, 在非同源末端连接修复过程中, DNA双链断开后会由于碱基的随机增减造成目标基因功能缺失。利用TALENs的序列模块, 可组装成特异结合任意DNA序列的模块化蛋白质, 从而达到靶向操作内源性基因的目的, 它克服了ZFNs方法不能识别任意目标基因序列以及识别序列经常受上下游序列影响等问题, 而且具有比ZFNs更好的灵活性, 使基因操作变得更加简单方便, 并且其脱靶效应和细胞毒性非常低。但是, 由于TALENs模块的组装比较费时费力, 这会影响该技术的大范围推广。

TALENs介导的基因编辑已经成功地应用于多个物种, 如大鼠^[29]、人类细胞^[30]、小鼠^[31]、兔子^[32]和猴^[33]。2012年, Carlson等^[34]发现, 通过向家畜的合子中直接注射TALEN(transcription activator-like effector nuclease)mRNA能够诱导75%的胚胎发生基因失活, 其中包括双等位基因修饰。他们还发明了一种用于原代成纤维细胞中TALENs介导的基因修饰的转座子共选策略。含有筛选标记的转座子与TALEN-编码的质粒同时转入细胞中, 并且瞬时的TALEN表达和转座子整合只能发生在成功转染的细胞中。转染一个TALEN-pair后共筛选能够分别得到54%的单个修饰和17%的双等位基因修饰。转染两个TALEN-pair后共筛选能够获得大片的染色体缺失或倒置(分别有10%和4%的克隆)。此外, 使用mono和biallelic修饰的ossabaw成纤维细胞做SCNT(somatic cell nuclear transfer), 获得75%的妊娠率, 并且6头妊娠的母猪产下18头仔猪。事实证明, TALENs比ZFNs更容易获得双等位基因的突变, 这大大缩短在大动物中获得纯合子的时间。之后, 大量的TALENs介导的基因修饰猪在短时间内出现。如2013年, Xin等^[35]利用TALENs技术成功实现猪GGT1(α -1,3-galactosyltransferase)基因的定点敲除。2014年, Li等^[36]运用TALENs技术成功将猪Rosa26基因位点进行定

点敲入。

2.3 CRISPR/Cas9

2013年, 一种由RNA介导的DNA剪切技术CRISPR/Cas9系统被引入基因工程和生物医学的研究, 引发一场新的革命。1987年, Ishino等^[37]在大肠杆菌中发现有串联间隔重复序列, 之后的研究发现这种重复序列存在于大多数古细菌和细菌中。2002年, 这种重复序列被正式命名为CRISPR。CRISPR的间隔序列和侵染细菌的病毒或噬菌体高度同源, 这可以保护细胞防止噬菌体的感染。2007年, Barrangou等^[38]发现, CRISPR以及CRISPR相关(Cas)的基因能提供对抗噬菌体的特异抵抗力。随后, crRNA(CRISPR RNA)、tracrRNA(transactivating crRNA)、PAM(proto-spacer adjacent motif)以及CRISPR系统中其他的一些细节被报道^[38]。根据适应阶段的高度保守性及表达和干扰阶段的差异性, 将CRISPR系统分为三大类型: I型、II型和III型。其中, II型系统结构较简单, 只需要一个Cas蛋白质来识别和切割目标DNA序列。2012年, Jinek等^[39]报道crRNA-tracrRNA形成一个双链RNA结构能够指导Cas9切割双链DNA。将crRNA-tracrRNA双链RNA结构改造成单链导向RNA(single-guide RNA, sgRNA)同样能够指导Cas9特异切割双链DNA。这表明, Cas9-crRNA-tracrRNA复合体是一个通过诱导目标DNA双链断裂的强大的基因编辑工具。从此, CRISPR/Cas9系统成为一种可以在多个物种基因中敲除(knock out, KO)或定点敲入的新型工具, 例如人和小鼠细胞^[40]、小鼠^[41]、食蟹猴^[42]和恒河猴^[43]等。2014年, Hai等^[44]首次通过向胚胎中注射CRISPR/Cas9方法获得vWF的KO猪, 并且打靶效率高达68.8%(11/16)。CRISPR/Cas9在猪基因编辑上的高效率 and 成功应用促进了对TALENs和ZFNs的广泛替代, 并且多个基因敲除、定点敲入和单核苷酸校正都在猪上取得成功。除了它对基因组的高效编辑, 脱靶切割可能是CRISPR/Cas9介导的精确基因编辑的最主要的挑战。研究表明, 尽管在胞质中注射大量的sgRNA, 但是CRISPR/Cas9系统并没有在猪的基因组中诱导显著的脱靶切割。此外, 已报道几种策略能提高Cas9的特异性以满足某些需要高水平特异性的基因组编辑的应用。

与传统的转基因方法相比, 核酸酶介导的基因编辑技术具有效率高、适用性广的优势, 并且能够

更为精确地对目标基因进行定点编辑,并且同时进行多位点的编辑。此外,核酸酶介导的基因编辑在大动物上应用的另一个优点是可以直接通过受精卵的直接注射来完成^[44-45]。在这种方案下,对于基因打靶或更加精细的基因编辑来说,体细胞核移植不再是必需的,也使得对大动物胚胎干细胞的需求不再那么迫切。基因组编辑技术中最重要的一个特性就是打靶的特异性。最优的打靶工具是只在打靶位点上产生修饰,而在基因组的其他位点不产生修饰。TALENs和CRISPR/Cas9在基因编辑上广泛应用,然而它们都没有完美的DNA识别特异性,所以在基因组的其他DNA位点也可能发生断裂。这种脱靶效应会在基因组序列上引入不被预期的改变,从而导致细胞、器官、组织甚至环境发生无法预计的后果。总之,由于基因编辑技术还存在打靶特异性低、大片段插入效率低等问题还不能完全取代传统的转基因技术,尤其在大片段的插入上,传统的转基因技术还存在优势。但传统的转基因技术在定点插入和无筛选标记方面仍存在缺陷,相信随着科学发展和研究需要,基因编辑技术将会不断地被完善和发展,最终形成一套完善的基因编辑技术体系。

3 基因编辑在猪育种和动物模型构建中的应用

3.1 猪的育种

肌抑素(myostatin, MSTN)对肌肉生长具有负调控作用,其功能缺失会导致动物肌肉肥大,表现出“双肌”性状。2015年, Qian等^[46]和Wang等^[47]分别利用ZFNs技术和CRISPR/Cas9技术对猪胎儿成纤维细胞自身肌抑素基因进行定点编辑,然后通过核移植技术获得MSTN基因纯合子敲除猪,显著降低MSTN的表达并提高瘦肉率。

猪繁殖与呼吸综合征(porcine reproductive and respiratory syndrome, PRRS), 又称蓝耳病, 是20世纪80年代首先在美国出现的一种灾难性疾病, 其临床表现为严重的繁殖障碍, 断奶猪普遍发生肺炎、生长延缓以及死亡率增加的症状。该病曾在上世纪迅速传遍世界各个养猪国家, 常造成严重的经济损失。近几年, 该病在国内呈现明显的高发趋势, 对养猪业造成重大损失, 已成为严重威胁我国养猪业发展的重要传染病之一。Whitworth等^[48-49]利用CRISPR/Cas9技术成功获得CD163(C cluster of D differentiation

163)敲除猪, 该猪对猪繁殖与呼吸综合征病毒耐受, PRRSv抗病猪的产生是人类在对抗此种致命性猪病上的重大突破。

3.2 疾病模型构建

心血管疾病是当代社会引起死亡的重要原因之一。动物模型的建立会帮助我们理解疾病的发病机理以及治疗方案的探索。尽管已经建立一些研究心血管疾病的啮齿类动物模型, 但是由于啮齿类体型较小, 与人类生理差别较大, 阻碍从基础研究向临床的转化。而猪的心脏解剖、血管和供血、冠状动脉系统解剖和功能以及胆固醇和脂蛋白代谢都与人类相似, 这使得猪成为研究人类心血管疾病的理想模型。随着核酸酶介导的基因编辑技术的快速发展加速基因编辑猪作为人类心血管疾病模型的建立。2011年, Yang等^[27]结合ZFNs和核移植技术获得过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPAR γ)敲除猪, 用于研究PPAR γ 在人类心血管疾病中的作用。低密度脂蛋白受体(low-density lipoprotein receptor, LDLR)是家族性高胆固醇血症的主要致病基因, 其特点是血清低密度脂蛋白升高导致胆固醇水平升高, 会加速动脉粥样硬化与早发冠心病的高风险。Carlson等^[34]通过TALENs和核移植制作LDLR敲除的ossabaw小型猪, 为研究家族性高胆固醇血症提供动物模型。NPC1L1(niemann-pick c1-like 1)对膳食胆固醇的吸收和胆汁中胆固醇的吸收至关重要, 通过直接向一细胞胚胎中注射CRIPR/Cas9获得Npc1l1敲除猪, 这个猪模型将为Npc1l1是如何影响人类的心血管和代谢疾病提供新的信息^[28,50]。

猪作为研究人类疾病的理想模型, 不仅在研究心血管疾病方面作出巨大贡献, 在其他疾病方面的作用也是其他动物不可比拟的。2015年, Cui等^[51]利用ZFNs技术获得生长激素受体(growth hormone receptor, GHR)的敲除猪, 对研究人类Laron综合征提供了理想的动物模型。同年, Zhou等^[52-53]和Wang等^[45]利用CRISPR/Cas9技术成功获得酪氨酸酶基因敲除猪、PARK2/PINK1(parkinson disease 2/PTEN induced putative kinase 1)双基因和PARKIN/DJ-1/PINK1三基因敲除猪, 为人们研究人类白化病和帕金森病提供了良好的动物模型。2016年, Kang等^[54-55]利用CRISPR/Cas9技术获得了RUNX3(runt-related transcription factor 3)和IL2RG(interleukin 2 receptor subunit gamma)敲除猪。利用RUNX3敲除猪

建立人类的胃癌模型, 为人类胃癌的治疗提供有效的模型, 而*IL2RG*敲除猪为免疫缺陷猪, 该敲除猪为再生医学异种移植等提供了良好的医学动物模型。同年, Han等^[56]利用CRISPR/Cas9技术在猪上敲除*Hoxc13*(homeobox C13)基因, 获得无毛猪, 为治疗人类外胚层发育不良-9(ectodermal dysplasia-9, ED-9)疾病提供了模型。Yu等^[57]利用CRISPR/Cas9技术敲除编码肌萎缩蛋白的*DMD*基因获得肌营养不良症疾病模型。

3.3 异种器官移植模型

由于猪的器官在体积和组织结构上都和人的器官比较接近, 人们一直期望能够用猪的器官代替人的器官开展异种器官移植。 α -1,3-半乳糖基转移酶在猪细胞表面合成半乳糖抗原表位, 而半乳糖抗原表位是猪-人移植的主要抗原, 能引起急性排异反应。为抑制这种急性排异反应, Phelps等^[58]利用转基因克隆技术获得世界上第一头*GGTA1*基因敲除的克隆猪, 从而开启利用转基因克隆技术进行基因打靶获得异种器官移植供体的先例。近年来, 随着核酸酶介导的基因打靶技术的发展, 使用ZFNs、TALENs和CRISPR/Cas9等技术都分别获得*GGTA1*敲除猪。将敲除*GGTA1*基因猪的心脏移植到狒狒体内, 结果证实, 移植后的心脏可在狒狒体内正常存活2~6个月, 最长的个体生存期可长179 d^[59]。

3.4 建立猪干细胞的报告筛选系统

转录因子*Oct4*可以维持胚胎干细胞的多能性, 它的表达能够反映胚胎干细胞的多能性。2016年, Lai等^[60]利用CRISPR/Cas9技术将*2A-tdTomato*基因片段敲入到*Oct4*基因的序列中, 并精确替代*Oct4*的终止序列, 从而获得能够荧光指示内源性*Oct4*激活表达的猪。该荧光报告基因由内源性*Oct4*启动子驱动, 使得荧光能够精确地指示内源性*Oct4*的激活。这种内源性*Oct4*启动子基础的报告系统不仅能够提高猪细胞在胚胎发育和细胞重编程过程中多能性的精确监控, 而且优化克隆猪和建立猪胚胎干细胞系的方案。

4 结语与展望

基因编辑技术效率高, 适用性广, 对基因的修饰精确度高, 被认为是理想的基因操作工具。基因编辑技术对应的友好位点的选择、多基因连接策略、表达调控策略等配套的技术体系的形成, 为今后大

规模、多基因的动物改良奠定了基础。猪基因组的测序完成以及基因修饰与新兴技术的结合将带来现实中可用的模型猪, 可为人类器官和治疗性蛋白质的迫切需求提供一种安全、可靠的来源, 并且为人类疾病提供的载体。将基因编辑技术与诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cell, iPSC)等干细胞技术相结合, 其应用前景更不可估量。另外, 生产能适应各种环境条件同时不容易受到和/或传播疾病的猪, 将有助于满足不断扩大的世界人口的营养需求。

参考文献 (References)

- 1 Wheeler MB, Walters EM. Transgenic technology and applications in swine. *Theriogenology* 2001; 56(8): 1345-69.
- 2 Hammer RE, Pursel VG, Rexroad CE Jr, Wall RJ, Bolt DJ, Ebert KM, *et al.* Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection. *Nature* 1985; 315(6021): 680-3.
- 3 Piedrahita JA, Olby N. Perspectives on transgenic livestock in agriculture and biomedicine: An update. *Reprod Fertil Dev* 2011; 23(1): 56-63.
- 4 Peach C, Velten J. Transgene expression variability (position effect) of CAT and GUS reporter genes driven by linked divergent T-DNA promoters. *Plant Mol Biol* 1991; 17(1): 49-60.
- 5 Kim JM, Kim JS, Park DH, Kang HS, Yoon J, Baek K, *et al.* Improved recombinant gene expression in CHO cells using matrix attachment regions. *J Biotechnol* 2004; 107(2): 95-105.
- 6 Leclere PG, Panjwani A, Docherty R, Berry M, Pizzey J, Tonge DA. Effective gene delivery to adult neurons by a modified form of electroporation. *J Neurosci Methods* 2005; 142(1): 137-43.
- 7 Nakayama A, Sato M, Shinohara M, Matsubara S, Yokomine T, Akasaka E, *et al.* Efficient transfection of primarily cultured porcine embryonic fibroblasts using the Amaxa Nucleofection system. *Cloning Stem Cells* 2007; 9(4): 523-34.
- 8 Ritchie WA, King T, Neil C, Carlisle AJ, Lillo S, McLachlan G, *et al.* Transgenic sheep designed for transplantation studies. *Mol Reprod Dev* 2009; 76(1): 61-4.
- 9 Whitelaw CB, Radcliffe PA, Ritchie WA, Carlisle A, Ellard FM, Pena RN, *et al.* Efficient generation of transgenic pigs using equine infectious anaemia virus (EIAV) derived vector. *FEBS Lett* 2004; 571(1/2/3): 233-6.
- 10 Hofmann A, Zakhartchenko V, Weppert M, Sebald H, Wenigerkind H, Brem G, *et al.* Generation of transgenic cattle by lentiviral gene transfer into oocytes. *Biol Reprod* 2004; 71(2): 405-9.
- 11 Galli C, Lagutina I, Perota A, Colleoni S, Duchì R, Lucchini F, *et al.* Somatic cell nuclear transfer and transgenesis in large animals: Current and future insights. *Reprod Domestic Anim* 2012; 47 Suppl 3: 2-11.
- 12 Pfeifer A. Lentiviral transgenesis. *Transgenic Res* 2004; 13(6): 513-22.
- 13 Russell DW, Hirata RK. Human gene targeting by viral vectors. *Nat Genet* 1998; 18(4): 325-30.
- 14 Rogers CS, Hao Y, Rokhlina T, Samuel M, Stoltz DA, Li Y, *et al.* Production of CFTR-null and CFTR-DeltaF508 heterozygous

- pigs by adeno-associated virus-mediated gene targeting and somatic cell nuclear transfer. *J Clin Invest* 2008; 118(4): 1571-7.
- 15 Ding S, Wu X, Li G, Han M, Zhuang Y, Xu T. Efficient transposition of the piggyBac (PB) transposon in mammalian cells and mice. *Cell* 2005; 122(3): 473-83.
 - 16 Izsvak Z, Ivics Z, Plasterk RH. Sleeping Beauty, a wide host-range transposon vector for genetic transformation in vertebrates. *J Mol Biol* 2000; 302(1): 93-102.
 - 17 Ivics Z, Izsvak Z. The expanding universe of transposon technologies for gene and cell engineering. *Mobile DNA* 2010; 1(1): 25.
 - 18 Kim YG, Cha J, Chandrasegaran S. Hybrid restriction enzymes: Zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93(3): 1156-60.
 - 19 Smith J, Bibikova M, Whitby FG, Reddy AR, Chandrasegaran S, Carroll D. Requirements for double-strand cleavage by chimeric restriction enzymes with zinc finger DNA-recognition domains. *Nucleic Acids Res* 2000; 28(17): 3361-9.
 - 20 Bibikova M, Golic M, Golic KG, Carroll D. Targeted chromosomal cleavage and mutagenesis in *Drosophila* using zinc-finger nucleases. *Genetics* 2002; 161(3): 1169-75.
 - 21 Geurts AM, Cost GJ, Freyvert Y, Zeitler B, Miller JC, Choi VM, et al. Knockout rats via embryo microinjection of zinc-finger nucleases. *Science* 2009; 325(5939): 433.
 - 22 Yu S, Luo J, Song Z, Ding F, Dai Y, Li N. Highly efficient modification of beta-lactoglobulin (BLG) gene via zinc-finger nucleases in cattle. *Cell Res* 2011; 21(11): 1638-40.
 - 23 Uddin B, Chen NP, Panic M, Schiebel E. Genome editing through large insertion leads to the skipping of targeted exon. *BMC Genomics* 2015; 16: 1082.
 - 24 Brown AJ, Fisher DA, Kouranova E, McCoy A, Forbes K, Wu Y, et al. Whole-rat conditional gene knockout via genome editing. *Nat Methods* 2013; 10(7): 638-40.
 - 25 Whyte JJ, Zhao J, Wells KD, Samuel MS, Whitworth KM, Walters EM, et al. Gene targeting with zinc finger nucleases to produce cloned eGFP knockout pigs. *Mol Reprod Dev* 2011; 78(1): 2.
 - 26 Hauschild J, Petersen B, Santiago Y, Queisser AL, Carnwath JW, Lucas-Hahn A, et al. Efficient generation of a biallelic knockout in pigs using zinc-finger nucleases. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108(29): 12013-7.
 - 27 Yang D, Yang H, Li W, Zhao B, Ouyang Z, Liu Z, et al. Generation of PPARgamma mono-allelic knockout pigs via zinc-finger nucleases and nuclear transfer cloning. *Cell Res* 2011; 21(6): 979-82.
 - 28 Carlson DF, Tan W, Lillico SG, Stverakova D, Proudfoot C, Christian M, et al. Efficient TALEN-mediated gene knockout in livestock. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; 109(43): 17382-7.
 - 29 Tesson L, Usal C, Menoret S, Leung E, Niles BJ, Remy S, et al. Knockout rats generated by embryo microinjection of TALENs. *Nat Biotechnol* 2011; 29(8): 695-6.
 - 30 Sun N, Liang J, Abil Z, Zhao H. Optimized TAL effector nucleases (TALENs) for use in treatment of sickle cell disease. *Mol Biosyst* 2012; 8(4): 1255-63.
 - 31 Sung YH, Baek IJ, Kim DH, Jeon J, Lee J, Lee K, et al. Knockout mice created by TALEN-mediated gene targeting. *Nat Biotechnol* 2013; 31(1): 23-4.
 - 32 Song J, Zhong J, Guo X, Chen Y, Zou Q, Huang J, et al. Generation of RAG 1- and 2-deficient rabbits by embryo microinjection of TALENs. *Cell Res* 2013; 23(8): 1059-62.
 - 33 Liu H, Chen Y, Niu Y, Zhang K, Kang Y, Ge W, et al. TALEN-mediated gene mutagenesis in rhesus and cynomolgus monkeys. *Cell Stem Cell* 2014; 14(3): 323-8.
 - 34 Carlson DF, Fahrenkrug SC, Hackett PB. Targeting DNA With Fingers and TALENs. *Mol Ther Nucleic Acids* 2012; 1: e3.
 - 35 Xin J, Yang H, Fan N, Zhao B, Ouyang Z, Liu Z, et al. Highly efficient generation of GGTA1 biallelic knockout inbred minipigs with TALENs. *PLoS One* 2013; 8(12): e84250.
 - 36 Li X, Yang Y, Bu L, Guo X, Tang C, Song J, et al. Rosa26-targeted swine models for stable gene over-expression and Cre-mediated lineage tracing. *Cell Res* 2014; 24(4): 501-4.
 - 37 Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, Amemura M, Nakata A. Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J Bacteriol* 1987; 169(12): 5429-33.
 - 38 Barrangou R, Marraffini LA. CRISPR-Cas systems: Prokaryotes upgrade to adaptive immunity. *Mol Cell* 2014; 54(2): 234-44.
 - 39 Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 2012; 337(6096): 816-21.
 - 40 Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* 2013; 339(6121): 819-23.
 - 41 Zhang L, Jia R, Palange NJ, Satheka AC, Togo J, An Y, et al. Large genomic fragment deletions and insertions in mouse using CRISPR/Cas9. *PLoS One* 2015; 10(3): e0120396.
 - 42 Niu Y, Shen B, Cui Y, Chen Y, Wang J, Wang L, et al. Generation of gene-modified cynomolgus monkey via Cas9/RNA-mediated gene targeting in one-cell embryos. *Cell* 2014; 156(4): 836-43.
 - 43 Chen Y, Zheng Y, Kang Y, Yang W, Niu Y, Guo X, et al. Functional disruption of the dystrophin gene in rhesus monkey using CRISPR/Cas9. *Hum Mol Genetics* 2015; 24(13): 3764-74.
 - 44 Hai T, Teng F, Guo R, Li W, Zhou Q. One-step generation of knockout pigs by zygote injection of CRISPR/Cas system. *Cell Res* 2014; 24(3): 372-5.
 - 45 Wang X, Cao C, Huang J, Yao J, Hai T, Zheng Q, et al. One-step generation of triple gene-targeted pigs using CRISPR/Cas9 system. *Sci Rep* 2016; 6: 20620.
 - 46 Qian L, Tang M, Yang J, Wang Q, Cai C, Jiang S, et al. Targeted mutations in myostatin by zinc-finger nucleases result in double-muscler phenotype in Meishan pigs. *Sci Rep* 2015; 5: 14435.
 - 47 Wang K, Ouyang H, Xie Z, Yao C, Guo N, Li M, et al. Efficient generation of myostatin mutations in pigs using the CRISPR/Cas9 system. *Sci Rep* 2015; 5: 16623.
 - 48 Whitworth KM, Rowland RR, Ewen CL, Tribble BR, Kerrigan MA, Cino-Ozuna AG, et al. Gene-edited pigs are protected from porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Nat Biotechnol* 2016; 34(1): 20-2.
 - 49 Whitworth KM, Lee K, Benne JA, Beaton BP, Spate LD, Murphy SL, et al. Use of the CRISPR/Cas9 system to produce genetically engineered pigs from *in vitro*-derived oocytes and embryos. *Biol Reprod* 2014; 91(3): 78.

- 50 Wang Y, Du Y, Shen B, Zhou X, Li J, Liu Y, *et al.* Efficient generation of gene-modified pigs via injection of zygote with Cas9/sgRNA. *Sci Rep* 2015; 5: 8256.
- 51 Cui D, Li F, Li Q, Li J, Zhao Y, Hu X, *et al.* Generation of a miniature pig disease model for human Laron syndrome. *Sci Rep* 2015; 5: 15603.
- 52 Zhou X, Wang L, Du Y, Xie F, Li L, Liu Y, *et al.* Efficient generation of gene-modified pigs harboring precise orthologous human mutation via CRISPR/Cas9-induced homology-directed repair in zygotes. *Hum Mut* 2016; 37(1): 110-8.
- 53 Zhou X, Xin J, Fan N, Zou Q, Huang J, Ouyang Z, *et al.* Generation of CRISPR/Cas9-mediated gene-targeted pigs via somatic cell nuclear transfer. *Cell Mol Life Sci* 2015; 72(6): 1175-84.
- 54 Kang JT, Ryu J, Cho B, Lee EJ, Yun YJ, Ahn S, *et al.* Generation of RUNX3 knockout pigs using CRISPR/Cas9-mediated gene targeting. *Rep Domest Anim* 2016; 51(6): 970-8.
- 55 Kang JT, Cho B, Ryu J, Ray C, Lee EJ, Yun YJ, *et al.* Biallelic modification of IL2RG leads to severe combined immunodeficiency in pigs. *Rep Biol Endocrinol* 2016; 14(1): 74.
- 56 Han K, Liang L, Li L, Ouyang Z, Zhao B, Wang Q, *et al.* Generation of Hoxc13 knockout pigs recapitulates human ectodermal dysplasia-9. *Hum Mol Genetics* 2016; doi: 10.1093/hmg/ddw378.
- 57 Yu HH, Zhao H, Qing YB, Pan WR, Jia BY, Zhao HY, *et al.* Porcine zygote injection with Cas9/sgRNA results in DMD-modified pig with muscle dystrophy. *Int J Mol Sci* 2016; 17(10): e1668.
- 58 Phelps CJ, Koike C, Vaught TD, Boone J, Wells KD, Chen SH, *et al.* Production of alpha 1,3-galactosyltransferase-deficient pigs. *Science* 2003; 299(5605): 411-4.
- 59 Kuwaki K, Tseng YL, Dor FJ, Shimizu A, Houser SL, Sanderson TM, *et al.* Heart transplantation in baboons using alpha1,3-galactosyltransferase gene-knockout pigs as donors: Initial experience. *Nat Med* 2005; 11(1): 29-31.
- 60 Lai S, Wei S, Zhao B, Ouyang Z, Zhang Q, Fan N, *et al.* Generation of knock-in pigs carrying Oct4-td tomato reporter through CRISPR/Cas9-mediated genome engineering. *PLoS One* 2016; 11(1): e0146562.