

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2013.00778

锌指核酸酶技术制备肌肉生长抑制素基因敲除的五指山小型猪成纤维细胞

曹随忠¹, 岳成鹤^{1,2}, 李西睿², 冯冲², 龙川², 潘登科²

1. 四川农业大学动物医学院, 雅安 625014;
2. 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 北京 100193

摘要: 敲除猪肌肉生长抑制素(Myostatin, *MSTN*)基因可能提高猪瘦肉率, *MSTN*基因敲除猪也可作为相关疾病的动物模型。文章利用锌指核酸酶(Zinc-finger nucleases, ZFNs)技术敲除五指山小型猪胎儿成纤维细胞 *MSTN*基因, 为制备 *MSTN*基因敲除猪奠定基础。ZFNs质粒或编码 ZFNs的 mRNA 均能高效敲除 *MSTN*基因, 使用 ZFNs mRNA 能直接得到 *MSTN*^{+/-}和 *MSTN*^{-/-}两种基因型的细胞克隆。DNA 序列测定与分析发现, 细胞克隆的突变类型多为 ZFNs作用靶位点处不大于 10 bp 的碱基插入或缺失(92.18%); 氨基酸预测发现, 突变型 *MSTN*基因的终止密码子常常提前出现。将 *MSTN*基因敲除的细胞进行体细胞核移植(Somatic cell nuclear transfer, SCNT)发现, 胚胎体外早期发育潜力与野生型无显著差异, 表明这些细胞可用于后续 *MSTN*基因敲除猪的制备。

关键词: 肌肉生长抑制素; 基因敲除; 五指山小型猪; 锌指核酸酶; *MSTN*^{-/-}成纤维细胞

Production of myostatin gene knockout Wuzhishan miniature pig fibroblasts with zinc-finger nucleases

CAO Sui-Zhong¹, YUE Cheng-He^{1,2}, LI Xi-Rui², FENG Chong², LONG Chuan², PAN Deng-Ke²

1. College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China;
2. Institute of Animal Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China

Abstract: Disruption of myostatin (*MSTN*) gene in pigs may improve porcine lean meat percentage (LMP), and create an animal model for certain human diseases. Using zinc-finger nucleases (ZFNs) technology, *MSTN* gene was deleted in Wuzhishan miniature pig fibroblasts by transfection of either ZFNs plasmids or ZFNs mRNA in high efficiency. Strikingly, ZFNs encoding mRNA could produce *MSTN*^{+/-} and *MSTN*^{-/-} cell colonies with single or double allele deletion by single

收稿日期: 2012-11-01; 修回日期: 2012-12-07

基金项目: 转基因动物新材料的育种价值评估项目(编号: 2011ZX08010-006)和中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(编号: 2012yq-2)资助

作者简介: 曹随忠, 副教授, 博士, 研究方向: 兽医产科学。E-mail: caosuizhong@yahoo.com.cn;

岳成鹤, 硕士, 研究方向: 兽医产科学。E-mail: yuechenghe@126.com

曹随忠和岳成鹤同为第一作者。

通讯作者: 潘登科, 博士, 副研究员, 研究方向: 转基因(基因敲除)猪。E-mail: pandengke2002@163.com

网络出版时间: 2013-5-21 14:19:18

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20130521.1419.001.html>

transfection. Sequencing results demonstrated that 92.18% of the mutations were short fragment deletions or insertions (≤ 10 bp). Prediction of amino acids sequences indicated that more than half of the mutations cause premature translational-termination codon. $MSTN^{+/+}$, $MSTN^{+/-}$, and $MSTN^{-/-}$ cell colonies were used as nuclear donor for somatic cell nuclear transfer (SCNT), and developmental potential of SCNT embryos were measured by the blastocyst rate. The results revealed no significant difference in development competence among the three kinds of reconstructed embryos (14.29% vs. 19.64% vs. 16.13%), which provides the possibility of making myostatin knock out pigs in the future.

Keywords: myostatin; gene knockout; Wuzhishan miniature pigs (WZSP); zinc-finger nucleases (ZFNs); $MSTN^{-/-}$ fibroblasts

我国的地方猪种瘦肉率偏低, 但普遍具有繁殖性能好、肉质优良、抗逆性强等特质^[1], 提高地方猪种的瘦肉率将是改良和保护地方猪品种的有益尝试。敲除五指山小型猪(Wuzhishan miniature pig, WZSP)肌肉生长抑制素(Myostatin, $MSTN$)基因将为这一设想提供理想的实验平台。 $MSTN$ 又称生长分化因子-8(Growth differentiation factor-8, GDF-8), 属于转化生长因子- β (Transforming growth factor- β , TGF- β) 超家族, 是骨骼肌发育的主要负调控因子。 $MSTN$ 通过抑制主要的肌源性调控因子如 MyoD 从而降低成肌细胞的增殖率, 通过影响 Notch 通路抑制成肌细胞分化^[2-5]。 $MSTN$ 的缺失使其对成肌细胞增殖和分化的抑制作用消失, $MSTN$ 基因缺失动物表现明显的“双肌”表型, 皮特兰猪的高瘦肉率也与 $MSTN$ 基因的表达下调有关^[6]。

最近研究发现, $MSTN^{-/-}$ 小鼠的肌腱小而脆弱, 表明 $MSTN$ 还调控肌腱的结构和功能^[7]。另外, $MSTN$ 的缺失能显著增强小鼠肌肉和肝脏的胰岛素敏感性, 减轻胰岛素抵抗相关的症状^[8]。因此, $MSTN$ 基因敲除猪也是研究与治疗肌腱发育相关疾病和 II 型糖尿病的良好动物模型。

基于同源重组(Homologous recombination, HR)的传统基因打靶方法敲除猪 $MSTN$ 基因效率低, 且一次只能敲除一个拷贝的 $MSTN$ 基因。锌指核酸酶(Zinc-finger nucleases, ZFNs)具有高效产生 DNA 双

链切口(Double-strand breaks, DSBs)的能力, 已成功应用于多种动物的基因修饰^[9-11]。本研究应用 ZFNs 技术制备 $MSTN^{+/-}$ 和 $MSTN^{-/-}$ WZSP 细胞, 并以体细胞核移植(Somatic cell nuclear transfer, SCNT)检验基因敲除细胞重构胚胎的早期体外发育潜力。

1 材料和方法

1.1 定制 ZFNs 质粒和编码 ZFNs 的信使核糖核酸(mRNA)

ZFNs 的定制: 针对 $MSTN$ 基因特异位点的 ZFNs 设计和生产由美国 Sigma 公司完成。经生物信息学方法分析和在酵母中的 DNA 切割能力比较, 最终确定了 2 对 ZFNs(表 1), 作用靶位点分别位于 $MSTN$ 基因第一外显子和第二外显子特定序列(表 2)。

1.2 锌指核酸酶对的有效性检测和 $MSTN$ 基因敲除细胞的制备

1.2.1 WZSP 原代胎儿成纤维细胞系的建立

妊娠 35 d 的 WZSP 母猪由中国农业科学院北京畜牧兽医研究所提供。以无菌手术取得 35 d 胎龄胎

表 1 ZFNs- $MSTN$ 在酵母中的功能验证

ZFNs 对	Mel-1 相对活性(% CCR5) >50%
PZFN1/PZFN2-set 1	65%
PZFN1/PZFN2-set 2	74%

表 2 两对 ZFNs- $MSTN$ 对应的 DNA 结合位点

ZFNs	DNA 结合位点	$MSTN$ 基因座
SET 1	TACCTGTTTTATGCTGAttgtGCTGGTCCCGTGGAT	Exon 1
SET 2	CCTTCCCAGGACcaggaGAAGATGGGCTGGTA	Exon 2

注: 大写字母表示为 ZFNs 结合位点碱基, 小写字母表示 ZFNs 剪切位点碱基。

儿, 去除头部、四肢、内脏等后, 以组织块法和含 20%(v/v)胎牛血清(Fetal Bovine Serum, Gibco)的 DMEM 培养液(Gibco)分离培养和建立原代胎儿成纤维细胞系, 细胞冻存于液氮中。

1.2.2 细胞电转染 ZFNs

原代胎儿成纤维细胞解冻后, 用含 20% FBS 的 DMEM 培养液复苏培养至第 3 d, 消化、收集细胞, 用含一定量 ZFNs 的电转染液重悬细胞(100 万个细胞/次)后按 T-16 程序进行电转染(Amaxa Nucleofector® 核转仪及其配套的原代成纤维细胞电转染试剂盒, Lonza)。将电转染后的细胞培养于含 20% FBS 的 DMEM 培养液中, 72 h 后消化、收集细胞, 检测 ZFNs 的有效性及其制备单细胞克隆。

1.2.3 ZFNs 对切割靶 DNA 序列工作效率检测

ZFNs 中的核酸内切酶 *FokI* 酶在靶序列位点产生 DSBs, 断裂的 DNA 常常以非同源末端接合(Non-homologous end joining, NHEJ)的方式被重新连接起来, 此时往往有小片段的缺失、插入等, 而导致基因功能受到影响。通过比较 PCR 产物大小往往不能判断靶基因是否发生了突变, 而利用对靶位点 PCR 产物的 T-A 克隆及 DNA 序列测定的方式可以统计 PCR 产物片段中的突变比例和突变类型, 并以此作为 ZFNs 突变效率的判断标准。

提取电转后 72 h 细胞的基因组 DNA, 通过 PCR 扩增 ZFNs 作用靶位点上下游共计约 755 bp DNA 片段, 经琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒(Zymoclean Gel DNA Recovery Kit, Alkali Scientific)回收目的片段后连接 T 载体, 转化感受态细胞 *E. coli* DH5 α 12 h 后测定靶 DNA 序列。将获得的序列信息与野生型序列(即表 2 所示 DNA 结合位点及 ZFNs 剪切位点, 下同)比对, 以获知 ZFNs 作用靶位点突变信息。

1.2.4 有限稀释法制备单细胞克隆

将电转染后的细胞 500~700 个稀释至 100 mL 含 20% FBS 的 DMEM 培养液中, 分别加入 10 个 100 mm 细胞培养皿中, 在 38 $^{\circ}$ C、5% CO $_2$ 、饱和湿度条件下培养, 直至细胞克隆直径生长至 2 mm 以上, 用牛津杯和 38 $^{\circ}$ C 预热的胰蛋白酶消化液将其挑出, 在 48 孔细胞培养板中扩大培养。

1.3 *MSTN* 基因敲除类型的分析

培养于 48 孔细胞培养板中的细胞克隆长至 80%~90%汇合时, 消化、收集细胞后一部分冻存, 提取其余细胞的基因组 DNA, 通过 PCR 扩增 ZFNs 作用靶位点上下游共计约 755 bp 片段, 经 DNA 序列测定有突变者, 按 1.2.3 所述工作效率检测法探明 ZFNs 作用靶位点突变类型, 并用 DNAMAN 软件将 DNA 序列信息翻译成氨基酸序列, 以预测基因活性。

1.4 脱靶效应(Off-targeting)分析

Sigma 公司提供了猪的基因组范围内搜索到的与 ZFNs 靶位点相似的序列信息。分别设计引物, 对与 Set 1 靶序列相似程度最高(不匹配碱基数 6 bp)的序列进行 PCR 扩增后测序, 与野生型序列比对以分析其有无突变, 突变者视为 ZFNs 的脱靶作用。

1.5 体细胞核移植及重构胚胎早期体外发育能力的观察

将有限稀释法培养获得的基因型为 *MSTN*^{+/+}、*MSTN*^{+/-}和 *MSTN*^{-/-} 的 WZSP 细胞用于 SCNT 实验^[12], 重构胚胎体外的早期发育能力以体细胞核移植后第 6 d 囊胚率衡量[囊胚率=(囊胚数/融合重构胚数) \times 100%]。

2 结果与分析

2.1 ZFNs 对在猪成纤维细胞中的功能验证

如表 3 所示, 在已进行的 ZFNs 功能验证中, SET 1 组 ZFNs mRNA 介导细胞发生突变的效率最高, 可达 25%(13/52)。其余的质粒(SET 1 组和 SET 2 组)介导的突变效率为 2%~22%不等。

表 3 ZFNs-*MSTN* 在 WZSP 胎儿成纤维细胞中介导 *MSTN* 基因突变的效率比较

组别	ZFNs	基因量/细胞数 (μ g/ 10^6)	突变率(%)
SET 1	质粒	2	10(5/50)
	质粒	4	10(5/50)
	质粒	6	4(2/50)
	mRNA	6	25(13 / 52)
SET 2	质粒	2	2(1/50)
	质粒	4	12(6/50)
	质粒	6	22(11/50)

2.2 ZFNs 在 WZSP 胎儿成纤维细胞中介导 *MSTN* 基因突变

2.2.1 细胞克隆的制备

为制备不含外源基因的 *MSTN* 基因敲除细胞, SET 1 mRNA 被用于电转染猪胎儿成纤维细胞, 并通过有限稀释法获得细胞克隆 66 个(表 4)。

表 4 ZFNs-*MSTN*-SET 1-mRNA 在细胞克隆中介导 *MSTN* 基因突变的效率

ZFNs	基因量/ 细胞数	细胞系	突变率	
			杂合	纯合
mRNA	6 $\mu\text{g}/10^6$	11WP1FF0	36.4%(24/66)	7.58%(5/66)

2.2.2 细胞克隆敲除类型的分析

细胞克隆靶片段的 PCR 产物通过 DNA 序列测定以确定有无突变, 突变者再通过 T-A 克隆和 DNA 序列测定与比对确定其突变类型。

依据 PCR 产物测序峰图初步判断单细胞克隆 *MSTN* 基因突变情况。测序峰图中的套峰表明了细胞 *MSTN* 基因突变的发生, 而单峰可能是野生型, 也可能是纯合突变。图 1 为 Z1mY75 号细胞克隆的靶序列 PCR 产物测序峰图, *FokI* 酶切割位点 ttgtt 的 -5 bp 的 G 开始出现套峰, 说明细胞克隆中含有靶位点突变的细胞; 图 2 展示了该细胞克隆 *MSTN* 基因从靶位点 ttgtt 的 -1 bp 开始直到 +4 bp 出现 10 bp 的碱基缺失(AttgttGCTG), 图中没有出现套峰, 说明 Z1mY100 号细胞克隆的靶位点发生了纯合突变。

SET 1-mRNA 在 WZSP 胎儿成纤维细胞中介导产生的突变类型均为小片段缺失/插入突变(表 5)。对位点的突变类型作一简单汇总发现, 碱基突变范围为(-25 bp, +4 bp)的小片段缺失/插入, 且 10 bp 以内的碱基缺失/插入占总突变类型的 92.17%, 其中又以缺失 10 bp 的最多(图 3)。就细胞克隆的碱基突变类型而言, 某些细胞克隆可能含有两种以上的 *MSTN* 基因型, 说明这种细胞克隆可能不是由单一细胞生长而来, 判定细胞克隆基因型的标准: T-A 克隆中突变型菌落大于菌落总数的 50% 时判定为含有 *MSTN*^{-/-} 细胞。

为了更准确地统计 ZFNs 在本研究中的突变效率, 将突变型 T-A 克隆数相加, 除以细胞克隆总数, 得到 ZFNs 在细胞克隆中的加权突变率为 19.88%

(13.12/66); ZFNs 在细胞克隆中的纯合突变效率为 7.16%(4.73/66)。

氨基酸预测分析表明(图 4), Z1mY100 号细胞克隆的 *MSTN* 基因第 1 外显子第 20 位提前出现终止密码子(UGA)。类似的预测分析表明, Z1mY75 号细胞克隆分别在 15 位、20 位等位点出现终止密码子(UGA)。MSTN 共有 376 个氨基酸残基, 在羧基端经二硫键形成二聚体后才能发挥功能^[13], 所以预测这两个细胞克隆的 *MSTN* 基因已经被敲除(*MSTN*^{-/-})。本研究获得细胞克隆的其他突变类型均含移码突变或终止密码子提前, 预计这些突变的存在将使得其所在的 *MSTN* 基因失去活性。

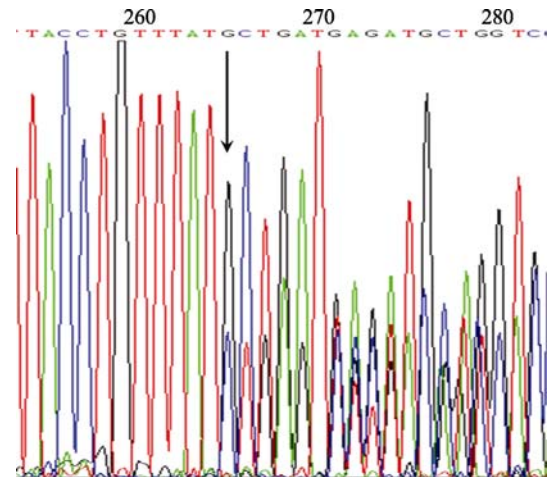


图 1 PCR 产物直接测序法判断 *MSTN* 基因型

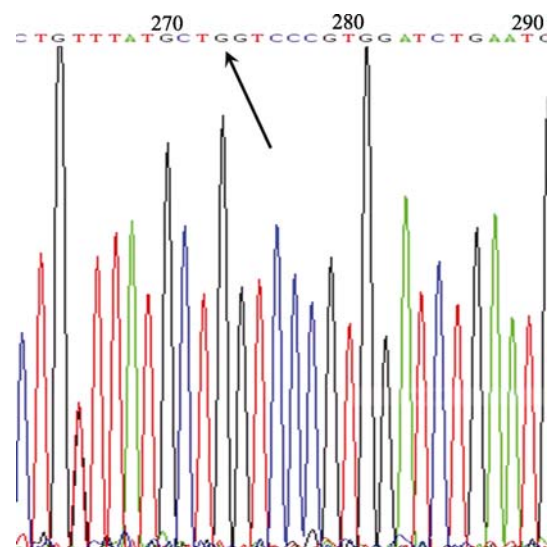


图 2 *MSTN*^{-/-} 细胞克隆 Z1mY100 的测序峰图

表 5 *MSTN* 基因突变细胞克隆的靶序列信息(部分)

ZFNs 作用靶位点 DNA 序列信息*	序列性质
TACCTGTTTATGCTGAttgtGCTGGTCCCGTGGATCTGAAT	(WT)
TACCTGTTTAT-----CTGAAT	(-25 bp)
TACCTGTTTATGCTG-----GGTCCCGTGGATCTGAAT	(-10 bp)
TACCTGTTTATGCTGAttgt-----GGTCCCGTGGATCTGAAT	-4 bp
TACCTGTTTATGCTGAttgtTGCTGGTCCCGTGGATCTGAAT	+1 bp
TACCTGTTTATGCTGAttgtTGTGCTGGTCCCGTGGATCTGAAT	+4 bp
TACCTGTTTATGCTG-----CTGGTCCCGTGGATCTGAAT	-7 bp

注: *红色部分为碱基插入, “---”为碱基缺失。

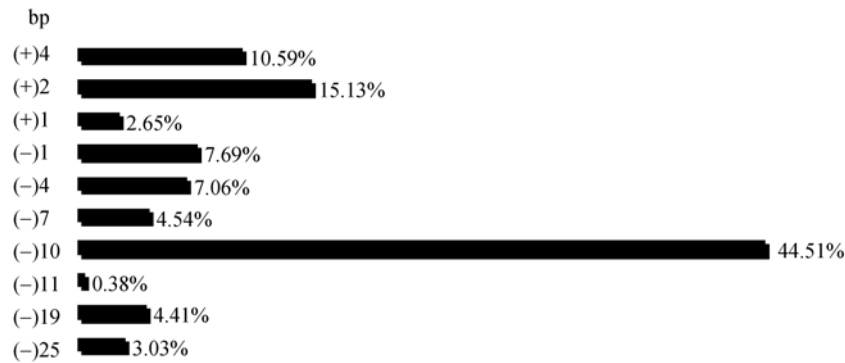
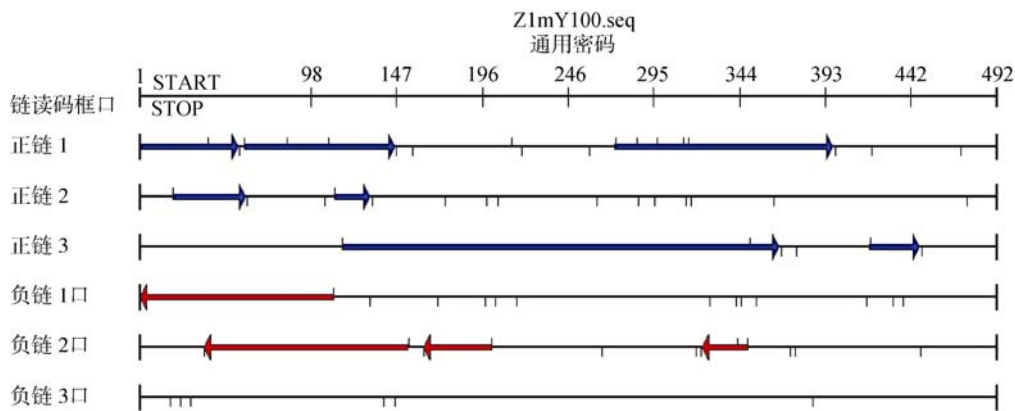


图 3 细胞克隆中的突变类型比例统计

图 4 Z1mY100 号细胞克隆的 *MSTN* 氨基酸序列预测

2.3 脱靶分析

经过与 Set 1 组 ZFNs 作用靶序列相似程度最高 (不匹配碱基数 6 bp) 的 9 段序列(表 6)分别进行 PCR 扩增后测序, 以及与野生型序列的比对分析, 没有发现脱靶现象(表 7)。

2.4 重构胚胎早期体外发育能力的观察

将基因型为 *MSTN*^{+/+}、*MSTN*^{+/-} 和 *MSTN*^{-/-} WZSP 细胞用于体细胞核移植实验, 观察胚胎发育情况(表

8)。实验数据表明, 核供体为野生型、杂合子及纯合突变 WZSP 细胞的重构胚融合率与囊胚率均无显著差异, 初步说明 ZFNs 介导的 *MSTN* 基因突变对相应细胞参与重构胚胎早期体外发育的能力未产生显著影响, 即这些细胞可以用于后续的 *MSTN* 基因突变猪的生产。

3 讨论

ZFNs 技术是一种新兴的基因靶向修饰技术, 以

表 6 猪基因组内 ZFNs 靶序列的相似序列统计

ZFNs 结合位点	猪基因组内与靶位点相似的序列数 (0-7: 含有不匹配碱基的序列位点数)							
	0	1	2	3	4	5	6	7
	Set1 ACCTGTTTATGCTGAttgtt GCTGGTCCCGTGGAT	1	0	0	0	0	1	8
Set2 CCTTCCCAGGACcagga GAAGATGGGCTGGTA	1	0	0	0	3	9	158	—

注: 大写字母表示 ZFNs 结合位点碱基, 小写字母表示 ZFNs 剪切位点碱基。

表 7 潜在脱靶位点 PCR 扩增产物测序分析结果统计

细胞 编号	不匹配碱基数								
	5 bp			6 bp					
	Chr.10	Chr.X	Chr.15 ^①	Chr.15 ^②	Chr.16	Chr.9	Chr.13	Chr.2 ^①	Chr.2 ^②
ZmY75	WT*	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
ZmY 100	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT

注: *WT 为野生型(Wild type, WT), 表示该位点没有检测到突变/脱靶; ①/②: 在同一染色体上的不同潜在脱靶位点。

表 8 重构胚胎早期体外发育能力

细胞编号	基因型	SCNT 胚胎总数(枚)	融合率(%)	第 6 d 囊胚数(枚)	囊胚率(%)
Z1mY91	<i>MSTN</i> ^{+/+}	106	85.85	13	14.29
Z1mY97	<i>MSTN</i> ^{+/-}	135	82.96	22	19.64
Z1mY100	<i>MSTN</i> ^{-/-}	106	87.74	15	16.13

其高效、无筛选标记等优势迅速崛起。ZFNs 的基因敲除效率是基于同源重组的传统基因打靶的 $10^3 \sim 10^5$ 倍, 足以在野生型二倍体动物细胞基础上一次性获得基因缺失细胞, 节约大量的时间和精力。例如在 *GGTA1* 基因缺失猪的制备中, 传统基因打靶路线需要两次转染-筛选和至少 3 次体细胞核移植^[14-17], 而 Hauschild 等^[11]应用 ZFNs 技术制备 *GGTA1* 基因缺失猪只需一次转染-筛选和一次 SCNT 即可, 其中 *GGTA1*^{-/-} 细胞约占细胞总数的 1% 左右。本研究应用编码 ZFNs 的 mRNA 在细胞中产生纯合突变效率为 7.16%, 高于前述 Hauschild 等的报道, 与 Santiago 等^[18]应用编码 ZFNs 的 mRNA 突变 CHO 细胞 DHFR(二氢叶酸还原酶)基因的纯合突变效率(7%) 相当。本研究中, ZFNs 产生的突变类型多为小片段的碱基缺失或插入(10 bp 的占 92.7%), 与 Yu 等^[19]的结果一致(<20 bp 的占 80%), 但最长删除片段(25 bp)小于 Yu 等(110 bp)和 Hauschild 等(96 bp)的报道。

转基因动物育种常利用抗性标记基因和药物筛选制备基因修饰细胞, 但含抗性基因的转基因动物作为食品具有潜在的风险; 利用 LoxP 系统虽可以去

除抗性标记基因, 这却使得实验步骤更加繁琐。ZFNs 技术的应用可能使这一矛盾得以解决^[10,19], 如本研究应用 ZFNs 技术, 通过一次转染-筛选制备出不含抗性标记的 *MSTN*^{+/+} 和 *MSTN*^{-/-} 细胞, 若再结合 SCNT 技术即可制备不含抗性标记基因的 *MSTN*^{+/+} 和 *MSTN*^{-/-} 五指山小型猪。

在 ZFNs 技术应用中, 使用编码 ZFNs 的 mRNA 优势还在于没有质粒整合的可能。质粒在导入细胞后可能发生断裂, 并随机插入基因组中, 这不但可能干扰和破坏正常基因的表达与调控, 还可能持续地表达 *Fok* 酶, 增加脱靶的可能, 这也是在应用 ZFNs 技术时需要重视的问题^[20,21]。另外 mRNA 具有相对较短的半衰期, 从而限制了 ZFNs 的作用时间, 进一步降低了脱靶的可能性。

MSTN 基因表达下调或功能缺失在多种动物中表现出明显的骨骼肌纤维增生与肌肉肥大^[2,4-6], 将敲除 *MSTN* 基因作为提高瘦肉率途径具有潜在的应用价值。然而, *MSTN* 的功能并不局限于调控骨骼肌的生长发育, Mendias 等^[7]研究发现, *MSTN* 缺失小鼠的肌腱成纤维细胞数量减少, 使肌腱相对较小而更加脆弱, 提示 *MSTN* 的缺失是否适合用于猪的育

种还需要进一步研究; 另有研究发现, MSTN 在降低脂肪重建等方面可能具有一定的作用^[22], *MSTN*^{+/-}和 *MSTN*^{-/-}五指山小型猪可以作为厘清这些问题的良好动物模型, 本研究制备的 *MSTN*^{+/-}和 *MSTN*^{-/-}细胞能够为探索上述问题提供良好的研究材料。

参考文献(References):

- [1] 许振英. 中国地方猪种种质特性. 杭州: 浙江科学技术出版社, 1989. [DOI](#)
- [2] Grobet L, Martin LJ, Poncelet D, Pirottin D, Brouwers B, Riquet J, Schoeberlein A, Dunner S, Ménéssier F, Massabanda J, Fries R, Hanset R, Georges M. A deletion in the bovine myostatin gene causes the double-muscling phenotype in cattle. *Nat Genet*, 1997, 17(1): 71–74. [DOI](#)
- [3] McFarlane C, Hui GZ, Amanda WZW, Lau HY, Lokireddy S, Ge XJ, Mouly V, Butler-Browne G, Gluckman PD, Sharma M, Kambadur R. Human myostatin negatively regulates human myoblast growth and differentiation. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2011, 301(1): C195–C203. [DOI](#)
- [4] McPherron AC, Lawler AM, Lee SJ. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF- β superfamily member. *Nature*, 1997, 387(6628): 83–90. [DOI](#)
- [5] McPherron AC, Lee SJ. Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(23): 12457–12461. [DOI](#)
- [6] Stinckens A, Luyten T, Bijttebier J, Van den Maagdenberg K, Dieltiens D, Janssens S, De Smet S, Georges M, Buys N. Characterization of the complete porcine *MSTN* gene and expression levels in pig breeds differing in muscularity. *Anim Genet*, 2008, 39(6): 586–596. [DOI](#)
- [7] Mendias CL, Bakhurin KI, Faulkner JA. Tendons of myostatin-deficient mice are small, brittle, and hypocellular. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(1): 388–393. [DOI](#)
- [8] Wilkes JJ, Lloyd DJ, Gekakis N. Loss-of-function mutation in myostatin reduces tumor necrosis factor α production and protects liver against obesity-induced insulin resistance. *Diabetes*, 2009, 58(5): 1133–1143. [DOI](#)
- [9] Bibikova M, Beumer K, Trautman JK, Carroll D. Enhancing gene targeting with designed zinc finger nucleases. *Science*, 2003, 300(5620): 764. [DOI](#)
- [10] Geurts AM, Cost GJ, Freyvert Y, Zeitler B, Miller JC, Choi VM, Jenkins SS, Wood A, Cui XX, Meng XD, Vincent A, Lam S, Michalkiewicz M, Schilling R, Foeckler J, Kalloway S, Weiler H, Ménoret S, Anegón I, Davis GD, Zhang L, Rebar EJ, Gregory PD, Urnov FD, Jacob HJ, Buelow R. Knockout rats via embryo microinjection of zinc-finger nucleases. *Science*, 2009, 325(5939): 433. [DOI](#)
- [11] Hauschild J, Petersen B, Santiago Y, Queisser AL, Carnwath JW, Lucas-Hahn A, Zhang L, Meng XD, Gregory PD, Schwitzer R, Cost GJ, Niemann H. Efficient generation of a biallelic knockout in pigs using zinc-finger nucleases. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(29): 12013–12017. [DOI](#)
- [12] 罗学明, 肖炜, 冯冲, 龙川, 闫军, 薛振华, 云鹏, 潘登科. 初次卵裂时间是猪克隆胚胎发育潜能的重要标识. *生物化学与生物物理进展*, 2010, 37(12): 1339–1345. [DOI](#)
- [13] Thomas M, Langley B, Berry C, Sharma M, Kirk S, Bass J, Kambadur R. Myostatin, a negative regulator of muscle growth, functions by inhibiting myoblast proliferation. *J Biol Chem*, 2000, 275(51): 40235–40243. [DOI](#)
- [14] Dai YF, Vaught TD, Boone J, Chen SH, Phelps CJ, Ball S, Monahan JA, Jobst PM, McCreath KJ, Lamborn AE, Cowell-Lucero JL, Wells KD, Colman A, Polejaeva IA, Ayares DL. Targeted disruption of the $\alpha 1$, 3-galactosyltransferase gene in cloned pigs. *Nat Biotechnol*, 2002, 20(3): 251–255. [DOI](#)
- [15] Kolber-Simonds D, Lai LX, Watt SR, Denaro M, Arn S, Augenstein ML, Betthausen J, Carter DB, Greenstein JL, Hao YH, Im GS, Liu ZH, Mell GD, Murphy CN, Park KW, Rieke A, Ryan DJ, Sachs DH, Forsberg EJ, Prather RS, Hawley RJ. Production of α -1, 3-galactosyltransferase null pigs by means of nuclear transfer with fibroblasts bearing loss of heterozygosity mutations. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(19): 7335–7340. [DOI](#)
- [16] Lai LX, Kolber-Simonds D, Park KW, Cheong HT, Greenstein JL, Im GS, Samuel M, Bonk A, Rieke A, Day BN, Murphy CN, Carter DB, Hawley RJ, Prather RS. Production of α -1, 3-galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning. *Science*, 2002, 295(5557): 1089–1092. [DOI](#)
- [17] Phelps CJ, Koike C, Vaught TD, Boone J, Wells KD, Chen SH, Ball S, Specht SM, Polejaeva IA, Monahan JA, Jobst PM, Sharma SB, Lamborn AE, Garst AS, Moore M, Demetris AJ, Rudert WA, Bottino R, Bertera S, Trucco M, Starzl TE, Dai YF, Ayares DL. Production of $\alpha 1$, 3-galactosyltransferase-deficient pigs. *Science*, 2003, 299(5605): 411–414. [DOI](#)
- [18] Santiago Y, Chan E, Liu PQ, Orlando S, Zhang L, Urnov FD, Holmes MC, Guschin D, Waite A, Miller JC, Rebar EJ, Gregory PD, Klug A, Collingwood TN. Targeted gene knockout in mammalian cells by using engineered zinc-finger nucleases. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(15): 5809–5814. [DOI](#)
- [19] Yu SL, Luo JJ, Song ZY, Ding FR, Dai YR, Li NP. Highly

efficient modification of beta-lactoglobulin (BLG) gene via zinc-finger nucleases in cattle. *Cell Res*, 2011, 21(11): 1638–1640. [DOI](#)

- [20] Gabriel R, Lombardo A, Arens A, Miller JC, Genovese P, Kaepfel C, Nowrouzi A, Bartholomae CC, Wang JB, Friedman G, Holmes MC, Gregory PD, Glimm H, Schmidt M, Naldini L, von Kalle C. An unbiased genome-wide analysis of zinc-finger nuclease specificity. *Nat Biotechnol*,

2011, 29(9): 816–823. [DOI](#)

- [21] Pattanayak V, Ramirez CL, Joung JK, Liu DR. Revealing off-target cleavage specificities of zinc-finger nucleases by in vitro selection. *Nat Methods*, 2011, 8(9): 765–770. [DOI](#)
- [22] Schuelke M, Wagner KR, Stolz LE, Hübner C, Riebel T, Kömen W, Braun T, Tobin JF, Lee SJ. Myostatin mutation associated with gross muscle hypertrophy in a child. *N Engl J Med*, 2004, 350(26): 2682–2688. [DOI](#)

•科学新闻•

企鹅为什么不会飞

John Speakman 研究员最近参与了一项国际合作课题的研究, 解决了长久以来困扰科学界的一个谜团——企鹅为什么不会飞? 该工作发表在最近的《美国国家科学院院刊》上。

企鹅科是一类广泛分布的海鸟, 其共同特点是不能飞行。企鹅为什么在进化过程中丧失了飞行能力? 原因一直都是个谜, 因为丧失飞行能力使企鹅的一些行为看起来与环境不相适应。例如, 为了从栖息地走到海边, 帝企鹅通常会花上几天时间步行 60 公里, 如果它们能飞的话, 则只需要几个小时的时间。此外, 许多企鹅都是海豹的猎物, 如果企鹅能飞行的话, 即使只能掠过捕食者, 都不会遭到捕食。那么, 企鹅为什么不会飞?

有一种观点认为, 企鹅可能无法设计出既能飞行又能游泳和潜水的双翼, 这种观点我们称之为生物力学理论。根据这种理论, 企鹅在进化过程中, 双翼越来越来适应游泳和潜水, 使得游泳和潜水行为变得非常高效, 但也使得飞行成本越来越高, 在某些时候, 企鹅甚至无法维持飞行的成本, 因此就变得不再会飞。

一个由来自加拿大、美国、英国和中国的科学家组成的联合小组, 在对海雀科的一种鸟类——海鸬进行了观察之后发现, 用生物力学理论来解释企鹅为什么不会飞这一问题极有可能是正确的。海鸬是一种潜水和游泳行为与企鹅非常类似的海鸟, 不同的是, 海鸬仍然保留了飞行能力。从各种方面来看, 海鸬就像是依然保留了飞行能力的企鹅祖先。该团队借助了一种叫做双标水的同位素技术, 在用记录仪监控海鸬行为数据的同时检测了海鸬的能量消耗, 这样就有可能同时检测其飞行行为和潜水行为的能量需求。

这篇文章发表在 PNAS 杂志上, 文章证实了海鸬的潜水行为所需的能量远高于其他鸟类, 仅次于企鹅潜水行为的效率。但是, 海鸬飞行行为所需的能量, 是其基础代谢率的 31 倍, 在所有有报道的飞行鸟类中是最高的。这种高效潜水和高效飞行行为的结合很好的印证了生物力学模型的预测。

该课题的研究目的是要确定驱动北极海鸟能量需求的因素, 本意是为了预测捕鱼业、航海和气候变化等人类行为在现在和将来对鸟类的影响, 这篇文章是该课题的一项意外发现。

该文章的第一作者, 来自加拿大马尼托巴大学的研究生 Kyle Elliott 表示, 很显然, 野生动物的结构限制了其功能, 动物会在两种不同生境中的行为中取折衷。当然前提是鳍状肢不能飞行。

该文章的通讯作者, 来自密苏里大学圣路易斯分校的 Bob Ricklefs 教授表示, 海鸟从能飞到不能飞的转变, 是研究动物跨越适应谷的经典案例, 在该案例中, 在特殊的环境条件下即使是适应性差的结构改变也能使动物跨越适应谷。这将成为很好的教材, 因为它再次证明了能量学和生理学研究的价值。

John Speakman 研究员在本课题中主要负责同位素分析, 他表示, “和许多人一样, 我被电影中企鹅横渡南极冰盖的镜头深深吸引, 我总是在想, 它们究竟为什么失去了飞行的能力? 现在这一问题终于解决了, 很高兴能作为团队的一员在本课题中参与了数据的收集 and 问题的解决。”

(摘自 http://www.genetics.ac.cn/xwzx/kyjz/201305/t20130522_3844801.html)