



CRISPR/Cas9 基因编辑技术在家畜育种 新材料创制中的研究进展

王欢, 邹惠影, 朱化彬, 赵善江*

(中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 农业农村部动物遗传育种与繁殖(家禽)重点实验室, 北京 100193)

摘要: 规律性成簇间隔的短回文重复序列/CRISPR 相关蛋白 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated, CRISPR/Cas) 系统是最新一代能对细胞或生物体基因组进行精准编辑的基因工程技术, 与前两代基因编辑技术 ZFN 和 TALEN 相比, CRISPR/Cas 具有应用成本低、适用编辑范围广、打靶效率高、操作简单、可支持多位点操作等诸多优点。近年来, CRISPR/Cas 系统尤其是 Type II 类、A 型的 CRISPR/Cas9 系统已经作为最新一代基因编辑技术被广泛应用于提高家畜繁殖效率、生产性能、抗病性以及动物模型构建等研究中, 并创制了一批基因编辑牛羊育种新材料。本文就其发展历程、技术改造和优化最新进展以及在家畜繁殖性状、生产性状和抗病性状等方面的研究应用进行综述, 重点介绍了该系统在家畜育种学研究中已取得的最新进展, 并就 CRISPR/Cas9 基因编辑技术在家畜育种应用中现存的问题及其应用前景进行简要论述。

关键词: 基因编辑; CRISPR/Cas9; 家畜育种新材料

中图分类号: S813.1

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2021)04-0851-11

Advances in Evaluation of Livestock Breeding New Materials by Using the CRISPR/Cas9 Gene Editing Technology

WANG Huan, ZOU Huiying, ZHU Huabin, ZHAO Shanjiang*

(Key Laboratory of Animal (Poultry) Genetics, Breeding and Reproduction of Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

Abstract: The clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated (CRISPR/Cas) system is a genetic engineering technology that can precisely edit the genome of cells and organisms. Compared with the traditional ZFN and TALEN gene editing technologies, CRISPR/Cas has the advantages of slow cost, wide editing range, high target efficiency, simple operation and simultaneous support for multi-site operation. In recent years, the CRISPR/Cas system, especially the Type II and Type A CRISPR/Cas9 system, has been widely used as the latest generation of gene editing technology to improve the breeding efficiency, production performance, disease resistance and animal model construction of livestock, and created a batch of new genetically edited materials for cattle and sheep breeding. In this paper, we provide an overview of the development process, technological transformation, the latest progress in optimization

收稿日期: 2020-07-30

基金项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务费(2019-YWF-YB-03); 中国农业科学院科技创新工程(ASTIP-IAS06); 国家奶牛产业技术体系项目(CARS-36)

作者简介: 王欢(1995-), 女, 河北廊坊人, 硕士, 主要从事动物繁殖生物技术研究, E-mail: 17710734315@163.com

* 通信作者: 赵善江, 主要从事动物繁殖生物技术研究, E-mail: zhaoshanjiang@caas.cn

of CRISPR/Cas, as well as research applications in livestock breeding traits, production traits and disease resistance traits, basic principles and applications of CRISPR/Cas9 system, and its latest applications and achievements in livestock breeding. The problems and application prospects of the CRISPR/Cas9-based gene-editing system in livestock breeding are also discussed briefly.

Key words: gene editing; CRISPR/Cas9; livestock breeding new materials

* **Corresponding author:** ZHAO Shanjiang, E-mail: zhaoshanjiang@caas.cn

基因编辑技术(gene editing technology)是指可以对基因组进行定点编辑的技术^[1],该技术始于基因打靶技术,随后经历了锌指核酸内切酶技术(zinc-finger nuclease, ZFN)、类转录激活因子效应物核酸酶技术(transcription activator-like effector nuclease, TALEN)和规律性成簇间隔的短回文重复序列/CRISPR 相关蛋白技术(clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR associated, CRISPR/Cas)三次革命性的突破,基因定点修饰的效率不断提高,给基因编辑技术的应用带来了全新的发展方向。第三代基因编辑技术 CRISPR/Cas 系统是一种适应性免疫系统,科研人员研究发现,根据不同 Cas 蛋白的序列和结构之间的差异,可以将 CRISPR/Cas 系统分为 3 种类型,每种类型的 CRISPR/Cas 系统又可细分为 A、B、C 3 种亚型^[2],目前应用最为广泛的 CRISPR/Cas9 系统属于 Type II 类、A 型,其余类型的 CRISPR/Cas 系统由于免疫机制非常复杂,并未应用于基因组工程中。

CRISPR/Cas9 系统来自于酿脓链球菌(streptococcus pyogenes),即 A 群链球菌(group A streptococcus, GAS)和嗜热链球菌(streptococcus thermophilus),是现今应用最为广泛的可以靶向基因组 DNA 特定位点并进行修饰的工具^[3]。利用 CRISPR/Cas9 系统可以在不同物种以及多种细胞类型中进行定点、精确的基因编辑。该系统具有应用成本低、适用编辑范围广、打靶效率高、操作简单、可支持多位点操作等优点,已成功应用于多种家畜高繁殖性状、生产性能以及强抗病性状的培育和改良、试验动物疾病模型的构建和病毒学等诸多领域^[4],并取得了许多重要成果。对于家畜育种而言,遗传进展慢和育种成本高是限制我国自主化良种家畜培育的“卡脖子”问题。而新的基因精准编辑技术的产生与应用对家畜育种和疾病防控等产生了巨大和深远的影响。目前,家畜基因编辑育种已成为世界

各国进行技术和种质资源创新的研究制高点,我国也先后在猪、牛等家畜品种中创建了基因编辑育种技术体系,创制了一批基因编辑牛羊育种新材料。本文就最新一代 CRISPR/Cas9 基因编辑技术在提高家畜繁殖性能、生产性能、抗病性能等方面的研究应用进行综述,重点介绍该系统在家畜育种学研究中已取得的最新进展,并就 CRISPR/Cas9 基因编辑技术在家畜育种应用中现存的问题及其应用前景进行简要论述。

1 CRISPR/Cas9 基因编辑技术的发展历程与研究现状

CRISPR/Cas9 基因编辑技术的研究始于 20 世纪 80 年代,随着研究的一步步深入,CRISPR/Cas9 基因编辑技术不断被人们所熟知并广泛应用(图 1),在应用的过程中为强化系统优势,消除自身存在的一些弊端,CRISPR/Cas9 基因编辑系统仍处于不断被优化的过程中,不断的创新性研究推动其发展成为一个高度动态的微生物学技术,在此过程中该技术的效率也在不断提升。

1.1 CRISPR/Cas9 技术的发展历程

1987 年, Ishino 等^[5]在研究 K12 型大肠杆菌中的碱性磷酸酶同工酶(alkaline phosphatase isozyme, IAP)时,首次发现了一种不知其功能的特殊的 DNA 回文序列。但直到 2000 年, Mojica 等^[6]才发现这些重复序列在细菌中发挥着重要的调控作用,并将其命名为规律性成簇间隔的短回文重复序列,简称:CRISPR。并且在这一过程中还发现了一些与 CRISPR 位于同一基因簇的核酸酶,统称为 CRISPR-associated 蛋白,即 Cas 蛋白。此后随着科研人员研究的不断深入,CRISPR/Cas9 系统在细菌内的作用机制被揭示,并于 2012 年成功在体外构建了 CRISPR/Cas9 系统,实现了对 DNA 的精准编辑^[7-8]。2015 年, Ran 等^[1]将 CRISPR/Cas9 系统成功应用于小鼠体内。此后 CRISPR/Cas9 系统迈入迅猛发展的时代,短短几年时间便成功应用于不同

物种的多种领域。CRISPR/Cas9 系统还被构建成 CRISPR/Cas9 文库,在体内和体外实现功能性基因的筛选^[9]。2017 年,Xu 等^[10]将 CRISPR 文库构建在 piggyBac 载体上,在小鼠肝内成功筛选到与肝癌相关的基因。

1.2 CRISPR/Cas9 基因编辑技术的改造和优化进展

人类对 CRISPR/Cas9 系统不断的研究推动其发展成为一个高度动态的微生物学技术,为强化系统优势和消除其自身存在的弊端,科研人员对其组成部分 Cas9 蛋白^[11-12]和 sgRNA^[13]进行了一系列的创新性改造(图 1),以期达到提高 Cas9 保真性、效率、使用范围以及降低脱靶效率等目的,多种多样的变体正在不断涌现。此外,为提高 Cas9 蛋白的效率,人们尝试将 Cas9 蛋白的分子量缩小,先后发现的 SpCas9、SaCas9、NmCas9 等不同种属的分子量更小的 Cas9 变体蛋白均已成功得到应用^[14-15]。但研究发现,它们依然存在一定的问题,如 CRISPR/SaCas9 系统的活性不高,且需要复杂的启动相关的基因序列,因此,限制了该系统的使用范围^[16]。随后,人们通过在 Cas9 核酸酶结构域(RuvC)引入单碱基突变(D10A 或 H840A)使该结构域发生失活进而制备出仅能切割一条 DNA 链的 Cas9 切口酶(Cas9 nickase,Cas9n)。研究发现,将 Cas9n 与两条不同的 sgRNA 结合使用,可以增加 CRISPR/Cas9n 系统的特异性,还可以增加基因编辑的使用范围,实现较大基因片段的编辑^[17]。当 Cas9 两个结构域(RuvC 和 HNH)都发生突变时,可以得到没有切割活性只有结合活性的 dCas9 蛋白(nickase-dead Cas9,dCas9),而 CRISPR/dCas9 系统可以在不损伤基因组 DNA 的情况下,在转录、表达水平对基因组的特定位点进行调控^[18]。此外,科研人员还发现,通过调控 Cas9 蛋白的活性也可有效提高 CRISPR/Cas9 系统的编辑效率,目前已经发现多种办法可以成功调控 Cas9 的活性,包括改变运输方式和引入适体核酸(aptazyme)组件等,均可在一定程度上提高 CRISPR/Cas9 系统的效率^[19-20]。

传统的 CRISPR/Cas9 系统都是通过引入 DNA 双链断裂(DNA double-strand break,DSBs)从而进行基因编辑的,这种方式容易导致过度的 DNA 损伤或细胞死亡^[21]。随着人们探索的不断深入,2016 年,Komor 等^[22]首次将胞嘧啶脱氨酶 APOBEC1 与 CRISPR/Cas9 系统融合,获得可高效诱导 DNA 由胞嘧啶(cytosine, C)向胸腺嘧啶(thymine, T)单碱

基转换的系统,并将其命名为胞嘧啶单碱基编辑器(cytosine base editor, CBE),该技术可在不发生双链断裂和没有供体模板的情况下实现对目标基因的编辑。2017 年,Gaudelli 等^[23]又成功研发出可实现 DNA 由腺嘌呤(adenine, A)向鸟嘌呤(guanine, G)精确转换的腺嘌呤单碱基编辑器(adenine base editor, ABE)。单碱基编辑器技术的问世,实现了在不发生 DNA 双链断裂也不引入重组修复模板的情况下,对基因组的单个碱基进行编辑的可能,使 CRISPR/Cas9 技术更加安全、高效和精准。然而,Zuo 等^[24]和 Jin 等^[25]分别在小鼠胚胎基因组和水稻基因组编辑中发现,CBE 存在严重脱靶效应。而这可能是因为普遍存在的五碱基对编辑窗口中存在不止一个 C 时,现有的碱基编辑器会产生不必要的 C→T 转换的可能,进而导致单碱基编辑有可能产生大量无法预测的脱靶突变,为此,科学家开始尝试提高单碱基编辑器的精度,从而降低脱靶效率,2018 年,Gehrke 等^[26]设计了一种根据 TCR>TCY>VCN 层次结构优先对特定基序中胞嘧啶去氨基化的 APOBEC3A-Cas9 单碱基突变(APOBEC3A-Cas9 base editor)技术,通过密码子优化和加入额外的核定位序列,极大地降低了单碱基突变脱靶率和错误率。2020 年,Wang 等^[27]研发并验证了利用腺嘌呤碱基编辑介导的起始密码子突变实现高效基因沉默(i-Silence)的新方法,该方法通过单碱基编辑器介导起始密码子从 ATG 突变到 GTG 或 ACG,进而实现基因沉默。研究表明,该方法可以在不产生不必要编辑的情况下精确地诱导目标基因沉默,是更安全、高效的基因敲除方法,具有广阔的应用前景。

在降低脱靶效率方面,2019 年,Zuo 等^[24]首先建立了新型脱靶检测技术 GOT1(genome-wide off-target analysis by two-cell embryo injection),以此来提升基因编辑技术脱靶检测的敏感性,尤其是在发现基因编辑完全随机的脱靶位点上具有更高的准确性。2019 年,Anzalone 等^[28]成功研发了一种超精确的新型基因编辑工具并将其命名为 Prime Editor,该工具可将 Cas9 切口酶和反转录酶融合在一起,反转录酶可以依据提供的模板序列将突变精确写入到靶位点。Prime Editor 技术在不需要依赖供体模板和 DNA 双链断裂的情况下,实现了所有 4 种单碱基的自由转换,在该研究中实现了 44 个碱基的插入和 80 个碱基的删除。Prime Editor 技术的问

世有效解决了单碱基编辑器存在的不能随意编辑所有碱基以及较为严重的脱靶效应的问题,同时,极大

地提高了 CRISPR/Cas9 系统的使用范围、编辑准确度和效率。

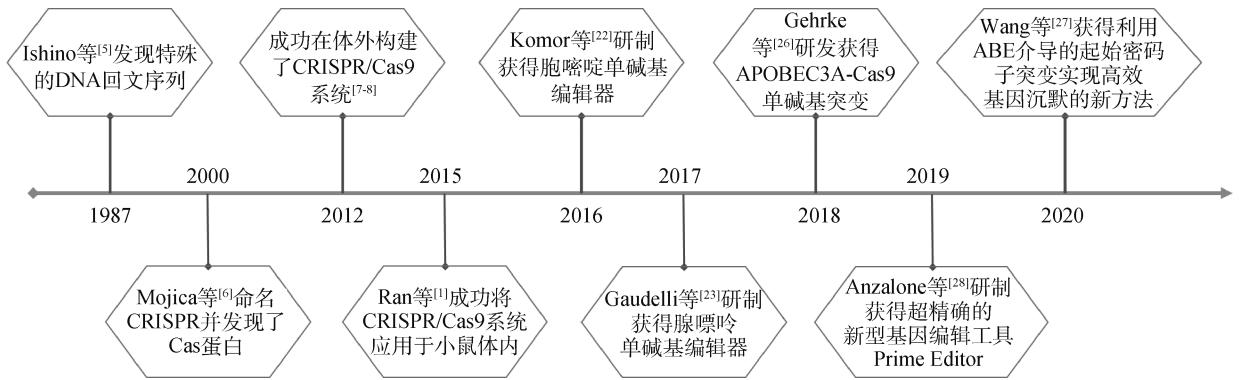


图1 CRISPR/Cas技术的发展历程和优化改造

Fig. 1 The development process and optimization of CRISPR/Cas technology

2 CRISPR/Cas9 基因编辑技术的作用机理

2.1 CRISPR/Cas9 系统的组成

CRISPR/Cas9 系统的基因座主要包括以下几

部分: CRISPR 相关蛋白基因座 (CRISPR Cas genes)、前导序列 (leader) 以及由不连续的重复序列 (repeat) 和间隔序列 (spacers) 间隔排列组合而成的 CRISPR 簇 (CRISPR array)^[1], 见图 2。

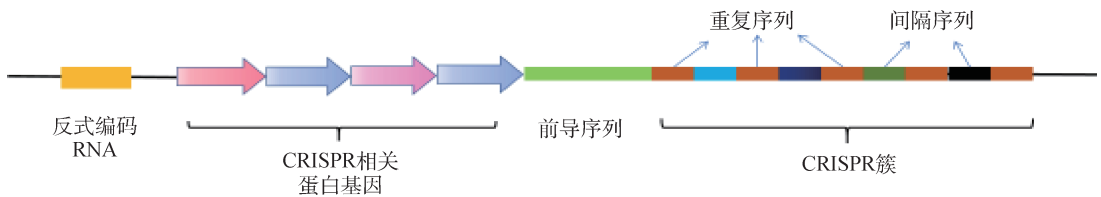


图2 CRISPR/Cas 的基因座

Fig. 2 Locus of CRISPR/Cas

2.2 CRISPR/Cas9 系统的作用机理

当病毒侵染细菌时, CRISPR/Cas 系统主要通过以下几个步骤发挥作用(图 3)。适应阶段: 宿主捕获、识别到病毒的外源 DNA 中由 NGG(N 为任意碱基)3~7 个碱基组成的, 主要参与 Cas 蛋白识别外源基因工作的原间隔序列 (protospacer adjacent motif, PAM), 并将病毒 DNA 整合到 CRISPR 簇中, 形成重复序列。转录阶段: 当宿主再次检测到入侵者时, 首先, CRISPR 簇转录生成前体 RNA 转录物 (pre-CRISPR RNA, pre-crRNA), 与此同时获得反式激活的 CRISPR 重复区互补的反式编码 RNA (trans-activating crRNA, tracrRNA), 随后, pre-crRNA 与 tracrRNA 结合进一步加工为成熟的、较小的、能够发挥功能的 crRNA。干扰阶段: crRNA 和 tracrRNA 通过碱基互补形成双链 RNA 结构, Cas 蛋白在双链 RNA 的介导下识别再次入侵的病毒 DNA 靶序列, 并对靶序列进行切割和降解。

研究发现, 尽管不同种 CRISPR/Cas 系统的 Cas 蛋白不尽相同, 但是当病毒入侵细菌时所有的 CRISPR/Cas 系统大多通过以上 3 个步骤来抵御入侵。

研究发现, 只有成熟的 crRNA 和 tracrRNA 通过碱基互补配对形成双链 RNA 结构后, 才能引导 Cas9 蛋白靶向到基因的特定位置, 发挥内切酶活性进行切割^[8]。为操作方便, 科学家将 crRNA 和 tracrRNA 进行适当的改造, 整合成一条单链 RNA, 即单链引导 RNA (single guide RNA, sgRNA), 从而将 CRISPR/Cas9 系统简化为两部分: sgRNA 和 Cas9 蛋白, 其中, 作为应用最为广泛的 CRISPR/Cas9 系统, 它的工作原理(图 4): 1) 具有核酸酶活性的 Cas9 蛋白在 sgRNA 的引导下, 特异性识别原间隔序列相邻基序。2) 当 Cas9 蛋白靶向到靶 DNA 指定位置后, 发挥核酸酶作用, 完成对 DNA 双链的切割, 造成双链断裂 (double-strand break, DSB)。

3)当靶 DNA 双链断裂后,细胞启动自我修复机制,利用非同源末端连接修复(non-homology end joining,NHEJ)和同源重组修复(homology dependent repair,HDR)两种方式对基因进行修复。在此环

节,科研人员引入外源基因,通过同源重组的方式将目的基因整合到靶基因中,随后,外源基因便可在受体细胞中进行表达,从而实现基因编辑的效果^[21]。

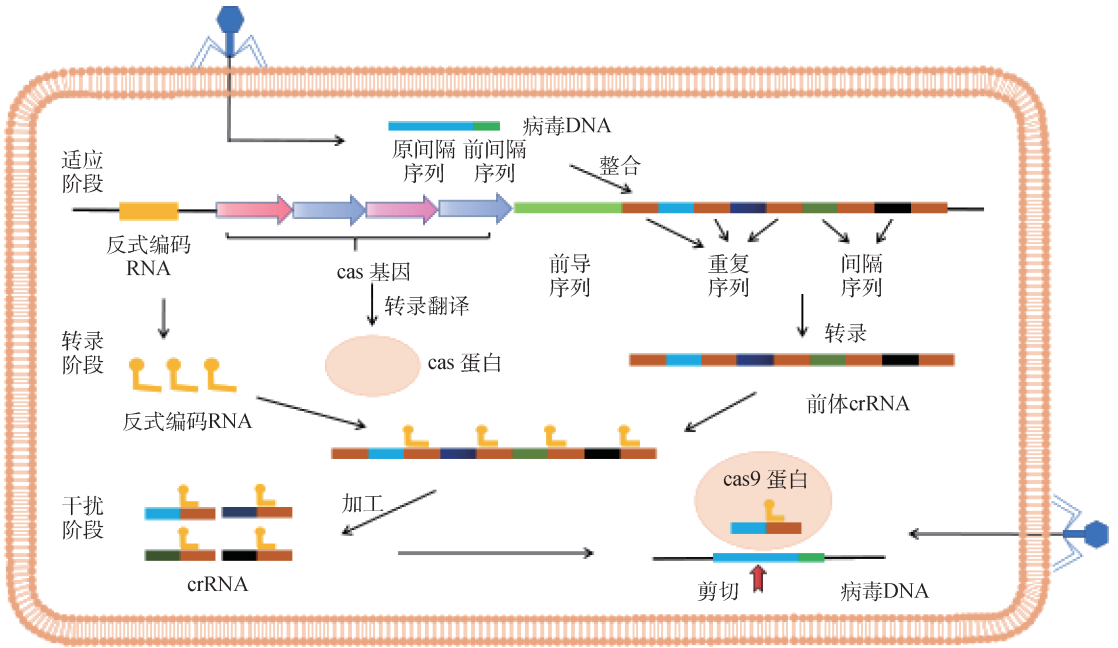


图 3 病毒入侵时 CRISPR/Cas 系统的工作原理
Fig. 3 The working principle of CRISPR/Cas system when virus invades

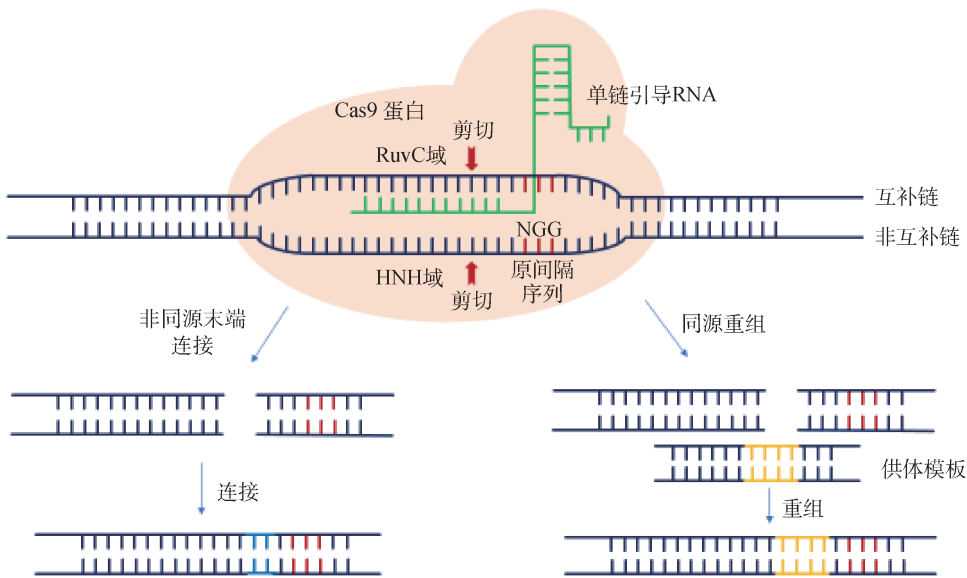


图 4 CRISPR/Cas9 系统的工作原理
Fig. 4 The working principle of CRISPR/Cas9 system

3 CRISPR/Cas9 基因编辑技术在家畜育种新材料创制中的研究进展

CRISPR/Cas9 系统自问世以来,广泛应用于微生物、动植物等诸多物种,展现出极大的应用前景。家畜基因编辑育种已成为世界各国进行技术和种质资源创新的研究制高点,我国也先后在猪、牛等家畜品种中创建了基因编辑育种技术体系,创制了一批基因编辑牛、羊、猪等育种新材料(表 1),在培育具有世界竞争力的家畜品种,提高我国畜牧产业的国际竞争力等方面具有重大的应用前景。

3.1 在高繁殖力育种新材料创制中的应用

转基因技术的问世,为解决家畜诸多方面尤其是繁殖方面的问题提供了全新的思路和方法,但是对于猪、牛、羊等大型家畜来说,转基因技术在育种、繁殖方面的应用进展缓慢,而 CRISPR/Cas9 系统的问世,极大程度地改变了这一局面,科研人员利用 CRISPR/Cas9 系统在不同家畜的繁殖育种方面均取得了突破性进展^[29-31]。CRISPR/Cas9 系统可以高效地操纵特定基因,根据需求实现物种内品种间的一个或多个主效应基因的转移,从而达到高效育种、繁殖的目的,有效提高牧场的经济效益。

研究发现,在雌性动物卵泡发育过程中 BMP15 和 GDF9 基因均扮演重要角色,冯万有^[29]利用 CRISPR/Cas9 靶向基因编辑技术突变 BMP15 和 GDF9 基因,进而提高水牛繁殖性能。Xist 是一种非编码 RNA,可以使雌性小鼠的两条 X 染色体中的一条失活,它在克隆小鼠胚胎中 X(Xa)染色体上的异位表达严重影响了克隆效率。2010 年,Inoue 等^[30]通过敲除雄性体细胞 Xist 成功将克隆效率提高了 8~9 倍。Matoba 等^[31]通过 RNAi 降低了克隆胚胎中 Xist 的表达水平,将克隆效率提高了 10 倍以上。相信将来 CRISPR/Cas9 系统对 Xist 的精确编辑将有效提高家畜 Xist 的敲除效率,进一步提高家畜克隆效率。

3.2 在高生产性能育种新材料创制中的应用

利用 CRISPR/Cas9 系统进行基因敲除或敲入可极大改良家畜的生产性能,在改善肉质、提高产肉量和提升被毛质量等方面都具有显著成效。

IGF2 是重要的胰岛素样生长因子,对家畜胚胎和出生后的生长及肌肉细胞增殖均有重要调控作用。研究发现,IGF2 经由肝产生后作用于靶细胞可促进细胞迁移、增殖和分化^[32]。2018 年, Xiang

等^[33]使用 CRISPR-Cas9 技术编辑 IGF2 内含子 3 的 3 072 位点,获得了在该调控元件周围 12 个不同等位基因发生突变的猪,该猪及子代猪在不影响肉质的情况下生长速度显著提高,通过该试验可提高巴马猪的产肉量,且首次证明编辑非编码区域可以改善家畜的经济性状。2019 年, Liu 等^[34]利用 CRISPR/Cas9 系统在中国本土猪品种梁光小斑点猪的猪胚胎成纤维细胞(PEFs)中,对 IGF2 内含子 3 中 ZBED6 结合位点基序有效破坏,从而有效提高了该品系的瘦肉率,具有重要的商业价值。肌肉生长抑制素(myostatin, MSTN)广泛存在于猪、牛、羊等动物体内,起到抑制骨骼肌发育和生长的作用,可以显著增加肌纤维的直径、提高肌纤维数量^[35],属于转化生长因子- β (transforming growth factor- β superfamily, TGF- β)超家族。研究表明, MSTN 的基因功能异常是导致动物具有双肌性状的遗传基础^[36]。2014 年, Ni 等^[37]利用 CRISPR/Cas9 系统在山羊原代成纤维细胞中进行基因编辑,获得了同时敲除肌肉生长抑制素、核孔蛋白 155(NUP)、朊蛋白(PrP)和 β -乳球蛋白(BLG)4 个基因的单克隆细胞系,成功获得了 MSTN 敲除羊,为改良羊肉品质奠定了基础。2015 年, Wang 等^[38]成功敲除山羊 MSTN 使之呈现双肌表型,从而加速了优质山羊的培育进程。随后,张驹^[39]利用 CRISPR/Cas9 技术对山羊的 MSTN 基因进行敲除,同时,在一特定位点中插入了 Fat-1 基因以替代 MSTN 基因,从而得到了既可以在体内高表达 Fat-1 基因,又有效提升羊肉中 ω -3 含量,还能增加羊肉产量的绒山羊。此后,诸多科学家利用 CRISPR/Cas9 系统敲除 MSTN,成功培育出高产肉量的猪、牛、羊^[40-41]。

毛皮一直是牧场经济收入来源的一个重要方面,如何有效提高家畜毛皮质量一直是牧场及科研工作者探索的方向。随着控制家畜毛皮基因的不断发现,使利用 CRISPR/Cas9 系统快速提升家畜毛皮质量成为可能。2015 年, Wang 等^[40]利用 CRISPR/Cas9 技术敲除了山羊的 FGF5 和 MSTN 基因,获得了被毛长度显著增加、且呈现双肌表型特点的山羊个体,该试验实现了在山羊体内同时敲除多个基因,为获得优质绒山羊提供了新的思路和理论依据。Zhang 等^[42]利用 CRISPR/Cas9 技术编辑毛色基因 ASIP,首次获得不同毛色的遗传修饰绵羊。在规模养殖中,牛角的存在极易造成牛只的意外伤害甚至流产,而传统的去角方法不仅给牛只带

来巨大痛苦还会造成牛只出现严重的应激反应,不仅不符合动物福利还会给牧场带来较大的经济损失^[43]。因此,科研人员致力于通过现代基因编辑技术进行无角牛的培育。研究发现,控制无角性状的基因位于 1 号染色体,为 202 bp 的重复,被称为 *Pc* (polledness of celtic origin) 位点。该位点与牛的生产性能等均不相关,具有较为简单的遗传性,比较适合进行基因编辑。2020 年,谷明娟等^[44] 利用 CRISPR/Cas9 技术,将 *Pc* 位点 P202ID 基因型定点整合到有角蒙古牛 (*bos taurus*) 胎儿成纤维细胞基因组中,得到 4 株定点整合入细胞基因组的阳性单克隆细胞。该试验为培育无角体细胞克隆牛提供了试验材料和技术支撑,为研究牛角的发生发育机制提供了基础材料。

3.3 在抗病育种新材料创制中的应用

家畜疾病如疯牛病、猪繁殖与呼吸综合征、猪瘟等一直给养殖人员造成巨大的困扰,给养殖业带来了严重的经济损失,疾病已然成为制约畜牧业发展的重要因素之一。不仅如此,某些家畜疾病及其不当治疗在一定程度上还会对人类的生命安全造成影响,如人畜共患病的暴发、食品质量安全、药物残留等问题。研究发现,很多家畜疾病依靠防疫和药物治疗等传统方法无法得到解决。随着基因编辑技术的不断发展和应用,科研人员发现,将 CRISPR/Cas9 系统应用于抗病家畜的制备具备良好的应用前景。

2016 年,Bevacqua 等^[45] 利用 CRISPR/Cas9 系统在牛胎儿成纤维细胞和 IVF 胚胎中诱导引起疯牛病的 *PRNP* 基因的敲除和等位基因的敲入,为治愈疯牛病奠定了基础。2017 年,Gao 等^[46] 利用 CRISPR/Cas9 系统介导的同源重组技术证明了单个 Cas9n 诱导的单链断裂可以刺激自然抗性相关巨噬细胞蛋白-1 (*NRAMP1*) 基因的插入,显著降低了脱靶效应发生的机率,同时通过体细胞核移植,获得了增加抵抗结核病能力的转基因牛。猪繁殖与呼吸综合征 (porcine reproductive and respiratory syndrome, PRRS) 是由猪繁殖与呼吸综合征病毒 (PRRSV) 引起的接触性传染病,严重制约了养猪业的发展^[47]。研究发现,CD163 是 PRRSV 侵染的主要受体,它很大程度上决定了病毒对细胞的敏感性^[48]。随后,人们对其进行研究,以期获得抗 PRRSV 的猪。2019 年,Chen 等^[49] 利用 CRISPR/Cas9 系统结合供体载体,将猪 CD163 的第 7 外显

子替换为人 CD163-like 1 (hCD163L1) 的相应外显子,显著抑制了 PRRSV 病毒的复制,保护猪免受 HP-PRRSV 感染,该研究为利用基因编辑技术培育抗 PRRSV 猪提供了新的方向。猪瘟 (classical swine fever, CSF) 是由猪瘟病毒 (classical swine fever virus, CSFV) 引起的严重危害养猪行业发展的疾病之一,具有极大的危害性和普遍性。2018 年,Xie 等^[50] 通过 CRISPR/Cas9 介导的敲入策略将筛选出的能有效抑制猪瘟病毒复制的 *shRNA* 基因精确地整合到了猪内源 Rosa26 位点,从而获得了抗 CSFV 猪,试验证明,利用该方法可有效限制 CSFV 在猪体内的复制表达,同时还减轻了 CSF 的临床症状,降低了死亡率,并且发现,抗 CSFV 猪还可以将抗病性稳定地传给 F1 代,该试验为防治猪瘟提供了新的思路。

3.4 在基因修饰疾病模型制备中的应用

利用 CRISPR/Cas9 系统介导的基因编辑技术可快速建立和模拟基因突变的动物或细胞模型,从而揭示基因突变与生物功能发生变化的关系,同时通过构建动物模型也可揭示与疾病相关基因的具体功能,为治疗家畜乃至人类疾病提供理论基础^[51]。2014 年,Hai 等^[52] 利用 CRISPR/Cas9 系统对 *vWF* 进行编辑,成功构建出血管性血友病动物模型,为该病的发病机制、遗传基础以及治疗方法的研究提供了很好的试验动物模型。2017 年,Huang 等^[53] 将 CRISPR/Cas9 系统应用于美国巴马小型猪,同时靶向敲除载脂蛋白 E (apo lipoprotein E, *ApoE*) 和低密度脂蛋白受体 (low-density lipoprotein receptor, *LDLR*) 基因,成功获得双等位基因敲除猪,所构建的动物模型对治疗人类心血管疾病和相关转化研究具有重要参考意义。2018 年,Yan 等^[54] 利用 CRISPR/Cas9 基因编辑和体细胞核移植技术,成功培育出世界首例人突变亨廷顿基因 (*HTT*) 敲入猪,精准地模拟出人类神经退行性疾病,成功建立了神经退行性疾病亨廷顿病猪疾病模型。同年,Zhu 等^[55] 结合 CRISPR/Cas9 和体细胞核移植技术,成功培育出世界首例亨廷顿舞蹈病基因敲入迷你猪,为研发治疗亨廷顿舞蹈症新药提供了稳定可靠的动物模型。

此外,基因修饰猪是解决移植器官短缺的重要途径,猪的异种器官移植一直是科学家探索的方向,但是猪内源性逆转录病毒 (PERVs) 跨物种传播对人体来说存在患新型疾病的潜在风险。2017 年,

Niu 等^[56]利用 CRISPR/Cas9 系统在猪原代细胞系中灭活了所有的 PERV,并通过体细胞核移植成功

获得了 PERV 灭活猪,一举解决临床异种移植的安全性问题。

表 1 CRISPR/Cas9 基因编辑家畜育种新材料

Table 1 The livestock breeding new materials using the CRISPR/Cas9 gene editing technology

物种 Species	基因 Gene	目的 Purpose	方法 Method
猪 Pig	<i>IGF2</i>	提高产肉量	利用 CRISPR/Cas9 对 <i>IGF2</i> 内含子 3-3072 位点进行编辑 ^[33]
	<i>IGF2</i>	提高瘦肉率	利用 CRISPR/Cas9 对 <i>IGF2</i> 内含子 3 中 ZBED6 结合位点基序进行破坏 ^[34]
	<i>CD163</i>	使猪免受 HP-PRRSV 感染	利用 CRISPR/Cas9 将猪 <i>CD163</i> 的第 7 外显子替换为人 <i>CD163-like 1</i> (hCD163L1) 的相应外显子 ^[49]
	<i>shRNA</i>	培育抗 PRRSV 猪	利用 CRISPR/ cas9 介导的敲入策略将筛选出的能有效抑制猪瘟病毒复制的 <i>shRNA</i> 基因整合到猪内源 <i>Rosa26</i> 位点 ^[50]
	<i>ApoE\LDLR</i>	构建治疗人类心血管疾病和相关转化研究方面的动物模型	利用 CRISPR/Cas9 同时靶向敲除 <i>ApoE</i> 、 <i>LDLR</i> 基因 ^[53]
	<i>HTT</i>	建立神经退行性疾病亨廷顿病猪疾病模型	利用 CRISPR/Cas9 将 <i>HTT</i> 基因敲入 ^[54]
	<i>PERV</i>	解决临床异种移植的安全性问题	利用 CRISPR/Cas9 系统在猪原代细胞系中灭活了所有的 <i>PERV</i> ^[56]
牛 Cattle	<i>BMP15\GDF9</i>	提高繁殖性能	利用 CRISPR/Cas9 靶向 <i>BMP15</i> 、 <i>GDF9</i> 突变 ^[29]
	<i>Pc</i>	制备无角牛	利用 CRISPR/Cas9 将 <i>Pc</i> 位点 P202ID 基因型定点整合到有角蒙古牛基因组中 ^[44]
	<i>PRNP</i>	治愈疯牛病	利用 CRISPR/Cas9 在牛胎儿成纤维细胞和 IVF 胚胎中诱导引起疯牛病的牛 <i>PRNP</i> 基因的敲除和等位基因的敲入 ^[45]
	<i>NRAMP1</i>	增加牛抵抗结核病的能力	利用 CRISPR/Cas9n 诱导单链断裂可以刺激自然抗性相关巨噬细胞蛋白-1 (<i>NRAMP1</i>) 基因的插入 ^[46]
羊 Ovine	<i>MSTN</i>	改良羊肉品质	利用 CRISPR/Cas9 敲除 <i>MSTN</i> 、
	<i>NUP\PrP</i>		<i>NUP</i> 、 <i>PrP</i> 和 <i>BLG</i> 4 个基因 ^[37]
	<i>BLG</i>		
	<i>FGF5</i>	增加被毛长度、且呈现双肌表型	利用 CRISPR/Cas9
	<i>MSTN</i>		技术敲除山羊的 <i>FGF5</i> 和 <i>MSTN</i> 基因 ^[40]
	<i>MSTN</i>	获得在体内高表达 <i>Fat-1</i> 基因、且提升羊肉中 ω -3 含量、增加羊肉产量的绒山羊	利用 CRISPR/Cas9 对其 <i>MSTN</i> 基因进行敲除,同时在一特定位置中插入 <i>Fat-1</i> 基因用以替代 <i>MSTN</i> 基因 ^[39]
<i>Fat-1</i>			
<i>ASIP</i>	获得不同毛色的绵羊	利用 CRISPR/Cas9 技术编辑毛色基因 <i>ASIP</i> ^[42]	

4 CRISPR/Cas9 系统存在的问题

随着基因编辑技术的日趋成熟,畜牧行业的发

展将会更多地应用到基因编辑技术尤其是最新一代的 CRISPR/Cas9 系统^[57-61]。但同时,CRISPR/Cas9 系统还存在一些问题正制约着其发展和应用,

如 CRISPR/Cas9 系统对 PAM 序列有较高的依赖性、存在较为严重的脱靶效应、还容易导致过度的 DNA 损伤等一系列的技术安全性问题,这就给基因编辑技术在家畜应用上带来了一系列的争议。如何规范基因编辑动物的制备和生产,如何使大众对基因编辑动物放心、安心,已逐渐成为人们关注的重点。笔者认为若想有效解决这一问题则需要政府有关部门建立一套更加适合基因编辑动物的健全的安全监管体系,在保障基因编辑动物安全生产应用的同时也要确保基因编辑动物的安全审批效率,这不仅有利于规范市场还可以为基因编辑技术在我国的发展提供良好的环境,进而更加高效、便捷、安全地应用于家畜生产,促进我国畜牧行业更好更快的发展。

5 前景展望

目前,我国已经先后启动了多项种质自主培育联合攻关重大专项,力求突破一批关键技术,培育出具有世界竞争力的家畜品种,降低我国对家畜核心种质的对外依存度,提高我国种业的国际竞争力。CRISPR/Cas9 基因编辑技术的产生与应用是生命科学的又一次技术革命,对育种和疾病防控等研究产生了巨大和深远的影响。相信随着基因编辑技术效率的不断提高,CRISPR/Cas9 技术将会在家畜育种新材料创制等方面发挥更重要的作用。

参考文献 (References):

- [1] RAN F A, CONG L, YAN W X, et al. *In vivo* genome editing using *Staphylococcus aureus* Cas9[J]. *Nature*, 2015, 520(7546):186-191.
- [2] CHYLINSKI K, MAKAROVA K S, CHARPENTIER E, et al. Classification and evolution of type II CRISPR-Cas systems[J]. *Nucleic Acids Res*, 2014, 42(10):6091-6105.
- [3] ISHINO Y, KRUPOVIC M, FORTERRE P. History of CRISPR-Cas from encounter with a mysterious repeated sequence to genome editing technology[J]. *J Bacteriol*, 2018, 200(7):e00580-17.
- [4] HRYHOROWICZ M, LIPINSKI D, ZEYLAND J, et al. CRISPR/Cas9 immune system as a tool for genome engineering[J]. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 2017, 65(3):233-240.
- [5] 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]. *J Bacteriol*, 1987, 169(12):5429-5433.
- [6] 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]. *Mol Microbiol*, 2000, 36(1):244-246.
- [7] MAKAROVA K S, ARAVIND L, WOLF Y I, et al. Unification of Cas protein families and a simple scenario for the origin and evolution of CRISPR-Cas systems[J]. *Biol Direct*, 2011, 6:38.
- [8] GASUNAS G, BARRANGOU R, HORVATH P, et al. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012, 109(39):E2579-E2586.
- [9] ZHOU Y X, ZHU S Y, CAI C Z, et al. High-throughput screening of a CRISPR/Cas9 library for functional genomics in human cells [J]. *Nature*, 2014, 509(7501):487-491.
- [10] XU C L, QI X L, DU X G, et al. *piggyBac* mediates efficient *in vivo* CRISPR library screening for tumorigenesis in mice[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2017, 114(4):722-727.
- [11] KLEINSTIVER B P, PATTANAYAK V, PREW M S, et al. High-fidelity CRISPR-Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects[J]. *Nature*, 2016, 529(7587):490-495.
- [12] SLAYMAKER I M, GAO L Y, ZETSCHE B, et al. Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity[J]. *Science*, 2016, 351(6268):84-88.
- [13] FU Y F, SANDER J D, REYON D, et al. Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs [J]. *Nat Biotechnol*, 2014, 32(3):279-284.
- [14] HSU P D, SCOTT D A, WEINSTEIN J A, et al. DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases[J]. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(9):827-832.
- [15] HOU Z G, ZHANG Y, PROPSON N E, et al. Efficient genome engineering in human pluripotent stem cells using Cas9 from *Neisseria meningitidis*[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110(39):15644-15649.
- [16] AMRANI N, GAO X D, LIU P P, et al. NmeCas9 is an intrinsically high-fidelity genome-editing platform [J]. *Genome Biol*, 2018, 19(1):214.
- [17] TREVINO A E, ZHANG F. Genome editing using Cas9 nickases [J]. *Methods Enzymol*, 2014, 546:

- 161-174.
- [18] BROCKEN D J W, TARK-DAME M, DAME R T. dCas9: A versatile tool for epigenome editing[J]. *Curr Issues Mol Biol*, 2018, 26:15-32.
- [19] NIHONGAKI Y, YAMAMOTO S, KAWANO F, et al. CRISPR-Cas9-based photoactivatable transcription system[J]. *Chem Biol*, 2015, 22(2):169-174.
- [20] HEMPHILL J, BORCHARDT E K, BROWN K, et al. Optical control of CRISPR/Cas9 gene editing[J]. *J Am Chem Soc*, 2015, 137(17):5642-5645.
- [21] BARMAN A, DEB B, CHAKRABORTY S. A glance at genome editing with CRISPR-Cas9 technology[J]. *Curr Genet*, 2020, 66(3):447-462.
- [22] KOMOR A C, KIM Y B, PACKER M S, et al. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage[J]. *Nature*, 2016, 533(7603):420-424.
- [23] GAUDELLI N M, KOMOR A C, REES H A, et al. Programmable base editing of A • T to G • C in genomic DNA without DNA cleavage[J]. *Nature*, 2017, 551(7681):464-471.
- [24] ZUO E W, SUN Y D, WEI W, et al. Cytosine base editor generates substantial off-target single-nucleotide variants in mouse embryos[J]. *Science*, 2019, 364(6437):289-292.
- [25] JIN S, ZONG Y, GAO Q, et al. Cytosine, but not adenine, base editors induce genome-wide off-target mutations in rice[J]. *Science*, 2019, 364(6437):292-295.
- [26] GEHRKE J M, CERVANTES O, CLEMENT M K, et al. An APOBEC3A-Cas9 base editor with minimized bystander and off-target activities[J]. *Nat Biotechnol*, 2018, 36(10):977-982.
- [27] WANG X J, LIU Z W, LI G L, et al. Efficient gene silencing by adenine base editor-mediated start codon mutation[J]. *Mol Ther*, 2020, 28(2):431-440.
- [28] ANZALONE A V, RANDOLPH P B, DAVIS J R, et al. Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA[J]. *Nature*, 2019, 576(7785):149-157.
- [29] 冯万有. 基于 CRISPR/Cas9 系统靶向敲除水牛 *BMP15* 和 *GDF9* 基因的研究[D]. 南宁: 广西大学, 2015.
- FENG W Y. Targeted editing buffalo *BMP15* and *GDF9* via CRISPR/Cas9 system[D]. Nanning: Guangxi University, 2015. (in Chinese)
- [30] INOUE K, KOHDA T, SUGIMOTO M, et al. Impeding *Xist* expression from the active X chromosome improves mouse somatic cell nuclear transfer[J]. *Science*, 2010, 330(6003):496-499.
- [31] MATOBA S, INOUE K, KOHDA T, et al. RNAi-mediated knockdown of *Xist* can rescue the impaired postimplantation development of cloned mouse embryos[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108(51):20621-20626.
- [32] YOUNIS S, SCHÖNKE M, MASSART J, et al. The ZBED6-IGF2 axis has a major effect on growth of skeletal muscle and internal organs in placental mammals[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2018, 115(9):E2048-E2057.
- [33] XIANG G H, REN J L, HAI T, et al. Editing porcine *IGF2* regulatory element improved meat production in Chinese Bama pigs[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2018, 75(24):4619-4628.
- [34] LIU X F, LIU H B, 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 Res*, 2019, 28(1):141-150.
- [35] MCPHERRON A C, LEE S J. Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997, 94(23):12457-12461.
- [36] HE Z Y, ZHANG T, JIANG L, et al. Use of CRISPR/Cas9 technology efficiently targeted goat myostatin through zygotes microinjection resulting in double-muscling phenotype in goats[J]. *Biosci Rep*, 2018, 38(6):BSR20180742.
- [37] NI W, QIAO J, HU S W, et al. Efficient gene knock-out in goats using CRISPR/Cas9 system[J]. *PLoS One*, 2014, 9(9):e106718.
- [38] WANG X L, YU H H, LEI A M, et al. Generation of gene-modified goats targeting *MSTN* and *FGF5* via zygote injection of CRISPR/Cas9 system[J]. *Sci Rep*, 2015, 5:13878.
- [39] 张 驹. CRISPR/Cas9 系统介导羊 *MSTN* 基因敲除和定点整合 *fat-1* 基因的研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古大学, 2016.
- ZHANG J. Generation of *MSTN* gene knock-out and *fat-1* gene knock-in goat via CRISPR/Cas9[D]. Huhhot: Inner Mongolia University, 2016. (in Chinese)
- [40] WANG X, NIU Y, ZHOU J, et al. CRISPR/Cas9-mediated *MSTN* disruption and heritable mutagenesis in goats causes increased body mass[J]. *Anim Genet*, 2018, 49(1):43-51.
- [41] 尉翔栋, 吕晨晨, 朱肖亭, 等. 利用 CRISPR-Cas9 基因编辑技术制备牛 *MSTN* 基因编辑胚胎[J]. 河南农业

- 科学,2019,48(2):131-136.
- WEI X D, LÜ C C, ZHU X T, et al. Preparation of bovine *MSTN* gene edited embryos using CRISPR/Cas9 gene editing technology[J]. *Journal of Henan Agricultural Sciences*, 2019, 48(2):131-136. (in Chinese)
- [42] ZHANG X M, LI W R, LIU C X, et al. Alteration of sheep coat color pattern by disruption of *ASIP* gene via CRISPR Cas9[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1):8149.
- [43] CARLSON D F, LANCTO C A, ZANG B, et al. Production of hornless dairy cattle from genome-edited cell lines[J]. *Nat Biotechnol*, 2016, 34(5):479-481.
- [44] 谷明娟,高 丽,周新宇,等. 蒙古牛无角 POLLED 位点的定点编辑[J]. 农业生物技术学报, 2020, 28(2):242-250.
- GU M J, GAO L, ZHOU X Y, et al. Targeted editing of hornless POLLED locus in Mongolia cattle (*Bos taurus*)[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2020, 28(2):242-250. (in Chinese)
- [45] BEVACQUA R J, FERNANDEZ-MARTÍN R, SAVY V, et al. Efficient edition of the bovine *PRNP* prion gene in somatic cells and IVF embryos using the CRISPR/Cas9 system[J]. *Theriogenology*, 2016, 86(8):1886-1896. e1.
- [46] GAO Y P, WU H B, WANG Y S, et al. Single Cas9 nickase induced generation of *NRAMP1* knockin cattle with reduced off-target effects[J]. *Genome Biol*, 2017, 18(1):13.
- [47] LUNNEY J K, FANG Y, LADINIG A, et al. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV): Pathogenesis and interaction with the immune system[J]. *Annu Rev Anim Biosci*, 2016, 4:129-154.
- [48] ZHANG Q Z, YOO D. PRRS virus receptors and their role for pathogenesis[J]. *Vet Microbiol*, 2015, 177(3-4):229-241.
- [49] CHEN J Y, WANG H T, BAI J H, et al. Generation of pigs resistant to highly pathogenic-porcine reproductive and respiratory syndrome virus through gene editing of *CD163*[J]. *Int J Biol Sci*, 2019, 15(2):481-492.
- [50] XIE Z C, PANG D X, YUAN H M, et al. Genetically modified pigs are protected from classical swine fever virus[J]. *PLoS Pathog*, 2018, 14(12):e1007193.
- [51] 冷 焯. CRISPR/Cas9 基因编辑技术在动物疾病模型构建的应用[J]. 中国畜禽种业, 2020, 16(1):44-45.
- LENG Y. Application of CRISPR/Cas9 gene editing technology in animal disease model construction[J]. *The Chinese Livestock and Poultry Breeding*, 2020, 16(1):44-45. (in Chinese)
- [52] HAI T, TENG F, GUO R F, et al. One-step generation of knockout pigs by zygote injection of CRISPR/Cas system[J]. *Cell Res*, 2014, 24(3):372-375.
- [53] HUANG L, HUA Z D, XIAO H W, et al. CRISPR/Cas9-mediated *ApoE*^{-/-} and *LDLR*^{-/-} double gene knockout in pigs elevates serum LDL-C and TC levels[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(23):37751-37760.
- [54] YAN S, TU Z C, LIU Z M, et al. A Huntingtin Knockin pig model recapitulates features of selective neurodegeneration in Huntington's disease[J]. *Cell*, 2018, 173(4):989-1002. e13.
- [55] ZHU X X, ZHONG Y Z, GE Y W, et al. CRISPR/Cas9-mediated generation of Guangxi Bama Minipigs harboring three mutations in α -Synuclein causing Parkinson's disease[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1):12420.
- [56] NIU D, WEI H J, LIN L, et al. Inactivation of porcine endogenous retrovirus in pigs using CRISPR-Cas9[J]. *Science*, 2017, 357(6357):1303-1307.
- [57] 戴学宇,张乾义,徐 璐,等. CRISPR/Cas9 基因编辑技术在重要猪病毒病防控中的研究与应用[J]. 畜牧兽医学报, 2020, 51(5):943-951.
- DAI X Y, ZHANG Q Y, XU L, et al. Research progress and application of CRISPR/Cas9 gene editing technology in prevention and control of important swine virus diseases[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2020, 51(5):943-951. (in Chinese)
- [58] 刘思远,卢 丹,唐中林. CRISPR/Cas9 技术及其在猪基因编辑中的应用[J]. 畜牧兽医学报, 2020, 51(3):409-416.
- LIU S Y, LU D, TANG Z L. Research progress on CRISPR/Cas9 and its application in pigs genome editing[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2020, 51(3):409-416. (in Chinese)
- [59] PENG Q, FANG L R, DING Z, et al. Rapid manipulation of the porcine epidemic diarrhea virus genome by CRISPR/Cas9 technology[J]. *J Virol Methods*, 2020, 276:113772.
- [60] WHITWORTH K M, LEE K, BENNE J A, et al. Use of the CRISPR/Cas9 system to produce genetically engineered pigs from *in vitro*-derived oocytes and embryos[J]. *Biol Reprod*, 2014, 91(3):78.
- [61] YANG H Q, WU Z F. Genome editing of pigs for agriculture and biomedicine[J]. *Front Genet*, 2018, 9:360.