

# 基因编辑技术及其在畜禽遗传育种中的应用研究进展

□曹慧 韩博 孙东晓



■本报记者 杨丽霞 摄

## 基因编辑技术

### 1、ZFNs 基因编辑技术

最早利用核酸酶实现在预定位置附近进行基因编辑的技术是 ZFNs 技术。1985 年在转录因子 III 中发现锌指结构。1996 年首次将锌指蛋白与核酸内切酶连接形成 ZFNs。

ZFN 由两部分融合而成,一是 DNA 结合结构域,二是 FokI 核酸内切酶切割结构域。锌指结构能够识别并结合特定的 3 个连续的核苷酸,人为地将多个锌指蛋白连接在一起可识别并结合具有特定序列 DNA 片段。单个 FokI 核酸酶不能发挥切割作用,只有当其形成二聚体时才具有酶切活性。单个的 ZFN 无活性,只有当两个 ZFN 结合到正确的 DNA 序列上,FokI 形成二聚体才具有切割活性。

ZFNs 是第一代人为利用核酸酶进行基因编辑的工具,实现在特定位点附近断裂 DNA 双链,使在特定位点进行基因编辑成为可能,但该技术存在着一些问题,如脱靶效应,导致错误的切割位置;由于锌指结构识别的特殊性,目前无法设计出识别任意一段 DNA 序列的 ZFNs,选择编辑的基因位点会受到限制;ZFN 设计复杂成本较高

不适合推广使用。

### 2、TALENs 基因编辑技术

转录激活因子效应物(Transcription Activator-like Effector, TALE)是从植物的黄单胞菌中提取出来的蛋白,具有识别特定 DNA 序列的功能。2010 年,Christian 等将 TALEs 的酸性转录激活结构域替换成 FokI 核酸内切酶构成 TALEN,并证明其可用性。

TALENs 由 DNA 识别 TALE 结构域和切割 FokI 结构域构成。TALE 由恒定位信号序列(Nuclear Localization Sequence, NLS)、介导 DNA 识别的重复区域、酸性转录激活结构域 3 个部分组成。介导 DNA 识别的每个重复序列由 33—35 个氨基酸组成。每个重复序列第 12、13 位氨基酸残基不同,称之为重复可变双残基(Repeat Variant Di-Residues, RVDs),1 个 RVD 可识别 1 个特定的核苷酸。根据所要识别的 DNA 片段,将相应的 RVD 串联起来,即可结合到特定的 DNA 片段。由于 TALEN 的切割结构域使用的是核酸酶 FokI,因此,只有成对的 TALEN 才具有切割活性。

相较于 ZFNs,TALENs 凭借识别位点的选择更加灵活、特异性强、操作简便的特点,成为第二代基因编辑工具。但 TALENs 技术也存在一些问题,如体积较为庞大,构建过程繁琐,1 对 TALEN 无法编辑多个基因,目前多用

于单基因敲除,存在些许的脱靶效应。

### 3、基于 CRISPR 的基因编辑技术

Jansen 等在各种细菌和古细菌中发现碱性磷酸酶附近存在串联间隔重复序列,并将其命名为 CRISPR。Horvath 等证实嗜热链球菌的噬菌体抗性与 CRISPR 和 Cas 蛋白有关。Makarova 等揭露 CRISPR/Cas 系统的分子机制。Jinek 等将 tracrRNA、crRNA 融合形成 sgRNA,同时将 Cas9 蛋白进行优化,实现在特定位点使 DNA 双链断裂,开启了使用 CRISPR/Cas9 技术进行基因编辑的大门。科学家在对 CRIPSR/Cas9 技术的深入研究的同时,开发出了精确的碱基编辑新技术:碱基编辑器(Base Editor, BE)和先导编辑系统(Prime Editor, PE)。

CRISPR/Cas9: CRISPR/Cas9 是细菌和古细菌的一种不断进化的适应性免疫防御机制,该机制能够抵抗病毒与噬菌体的入侵,该系统主要由 5'端 tracrRNA (Trans- activating crRNA, tracrRNA)、一系列 Cas 蛋白编码基因、3'端 CRISPR 基因 3 部分构成。3'端的 CRISPR 基因序列由 3 部分构成,为前导区(Leader)、多个不连续的重复序列区(Repeat)、多个间隔区(Spacer)。CRISPR/Cas9 的工作过程可以概括为 3 个阶段,第 1 阶段为间隔序列的获取:当外源 DNA 入侵细菌时,Cas 蛋白会将外源基因切割并整合到 CRISPR 序列

中,形成新的重复间隔序列(Protospacer);第 2 阶段为基因座的表达:当同类 DNA 再次入侵时,前导区发挥启动子的作用启动 CRISPR 转录,形成 pre-RNA,随后加工形成 crRNA,crRNA 与 tracrRNA 具有互补序列,2 者结合形成双链二级结构,与 Cas9 蛋白结合形成复合体;第 3 阶段为外源 DNA 的切割:形成的三聚复合体具有特异性识别 PAM (Protospacer Adjacent Motif, PAM)序列的作用,Cas9 蛋白的 2 个核酸切割区域能够切断 DNA 双链引发细胞内基因修复机制(HNH 结构域切割与间隔序列互补的外源 DNA 链,RuvC 结构域切割含有 PAM 序列的外源 DNA 链)。

Base Editor: 使用 CRISPR/Cas9 技术会导致 DNA 双链断裂,用该技术对基因进行编辑会导致不同的 indels (Insertion/Deletion, Indel),形成多基因型嵌合突变体。为解决上述问题,2016 年刘如谦团队开发出基于 CRISPR 系统的单碱基编辑器,这种基因编辑的特点是无需 DNA 双链的断裂即可进行单碱基替换,并且不需要提供 DNA 重组修复的模板。碱基编辑器有胞嘧啶碱基编辑器(Cytosine Base Editor, CBE)和腺嘌呤碱基编辑器(Adenine Base Editor, ABE)两种。

CBE 可以在基因组靶位点上实现 C>T 碱基的替换,由 4 部分组成:将 C 碱基转化成 U 碱基的胞嘧啶脱氨酶、结合到目标 DNA 上的经过修饰的 Cas9 蛋白

(dCas9)、引导 Cas9-胞嘧啶脱氨酶到目标基因座的 sgRNA、抑制 U 碱基转换成 C 碱基的 UGI (Uracil Glycosylase Inhibitor, UGI)。CBE 系统通过 sgRNA 引导 dCas9-胞嘧啶脱氨酶结合到靶 DNA 上,dCas9 不具有切割活性,胞嘧啶脱氨酶使靶位点上的 C 碱基脱氨形成 U 碱基,DNA 复制时,U 碱基被替换成 T 碱基,从而实现 CG>TA 碱基对的替换。

尿嘧啶和胸腺嘧啶分别由胞嘧啶和 5-甲基胞嘧啶的自发水解脱氨形成,可导致 CG>TA 突变,该类型的突变占所有已知致病性单核苷酸多态性(SNP)的大约一半,因此将目标位点的 AT 碱基替换成 CG 碱基可以纠正一部分人类疾病相关的 SNP。已有的腺嘌呤脱氨酶不能对 DNA 上的腺嘌呤脱氨,Gaudelli 等通过定向进化筛选的方法获得一种转移性 RNA 腺苷脱氨酶(TadA),TadA 与 CRISPR-Cas9 突变体融合时,可以使 DNA 上的腺嘌呤脱氨。ABE 催化腺嘌呤脱氨形成肌苷,肌苷被聚合酶处理为鸟苷,在 DNA 复制之后可将 AT 碱基对转化为 GC 碱基对。

Prime Editor: 碱基编辑器只能实现 C>T、A>G、G>A、T>C 碱基的替换,无法进行其他碱基的替换,具有局限性。2019 年,刘如谦团队利用先导编辑向导 RNA (Prime Editing Guide RNA, pegRNA)将 nCas9 (Cas9 nickase)和逆转录酶的融合蛋白引导至目标基因位点

进行基因编辑。pegRNA 由 3 部分组成,第 1 部分为单链导向 RNA (Single-guide RNA, sgRNA);第 2 部分为引物结合位点(Prime Binding Site, PBS);第 3 部分为携带有目标基因位点编辑信息的逆转录模板。先导系统的工作原理为:首先 nCas9 蛋白和逆转录酶融合蛋白在 pegRNA 中的 sgRNA 序列的引导下与目标基因位点结合,其次含有 PAM 序列的 DNA 单链被 nCas9 蛋白切断,接着断裂的 DNA 单链充当引物与 pegRNA 上的 PBS 序列结合,逆转录酶以 RT (Reverse Transcription, RT)序列作为模板开始逆转录,反应完成后,DNA 切口处出现 3'flap 结构和 5'flap 结构,不含目标突变的 5'flap 更容易被结构特异性内切酶 Flap endonuclease1 切除,且 Exonuclease 1 具有核酸外切酶的活性,可以将残余的 5'flap 碱基进一步切除,最后经过 DNA 链的连接和修复实现目标序列的编辑。

相较于 ZFNs,TALENs,CRISPR/Cas9 以及由其衍生来的基因编辑工具具有编辑效率高、构建简单、精准性高、序列要求低、能同时编辑多个基因等独特的优势,因此被称为第三代基因编辑工具。但 CRISPR/Cas9 基因编辑技术也存在许多的问题,其脱靶效应比 ZFNs,TALENs 高;会有嵌合体突变动物的产生;编辑效率高与靶点的选择有关;转基因动物个体的存活率低、不健康。

## 基因编辑技术在畜禽遗传育种中的应用

### 1、猪

中国是世界上最大的猪肉生产国和出口国,提高养猪业的生产效率和猪肉品质有利于我国养猪业的发展。已有研究表明肌生成抑制蛋白(Myostatin, MSTN)能够抑制成肌细胞的增殖,从而对肌肉的生长产生负调控作用,MSTN 基因突变使动物的成肌细胞数量增加,引起家畜的臀、肩、大腿等部位肌肉群发达从而呈现“双肌”性状,因此使用基因编辑技术破坏家畜的 MSTN 基因有望提高生产性能。Wang 等使用 CRISPR/Cas9 系统获得猪胎儿 MSTN 基因突变的成纤维细胞,再结合体细胞核移植(Somatic Cell Nuclear Transfer, SCNT)技术获得 MSTN 双等位基因敲除猪,发现 MSTN 突变仔猪的出生体重比同窝野生型仔猪增加 15%,并且背最长肌有更多的肌纤维。2016 年,Bi 等使用 CRISPR/Cas9 结合 Cre/LoxP 重组系统获得 MSTN 基因突变的猪,被编辑的猪骨骼肌发育增强,同时背部脂肪厚度减小。n-3 不饱和脂肪酸脱氢酶由脂肪酸脱氢酶 1 (Fat1) 基因编码,可将多不饱和脂肪酸从 n-6 转化成 n-3。n-3 多不饱和脂肪酸只能从食物中获取,2016 年,Tao 等使用 ZFN 技术在猪的基因组中插入外源 Fat1 基因,使 n-3 多不饱和脂肪酸含量更高。胰岛样生长因子 2 (Insulin-like Growth Factor-2, IGF2) 是一种重要的生长因子,可以促进哺乳动物胎儿期和出生后的生长发育。Song 等使用 CBE 破坏猪的 MSNT 和 CD163 基因,并引入有益的 IGF2 双等位基因,显著提高了猪的生产性能和抗病性。

NANOS2 基因是雄性生殖特异性基因,公猪缺少 NANOS2 基因可以正常生长但不育。2017 年,Park 等使用 CRISPR/Cas9 技术敲除普通公猪的 NANOS2 基因,并将优良公猪的精原细胞移入 NANOS2 基因敲除的公猪中,发现基因敲除公猪开始产生优良公猪的精

子。BMP15 基因是调控单胎动物排卵率和产仔数的关键基因。2020 年,Shi 等使用 CRISPR/Cas9 系统获得 BMP15 单或双等位基因敲除猪,发现双等位基因敲除的猪不育,不育的原因包括卵泡发育停滞、颗粒细胞丢失以及卵母细胞异常,并且无明显的情期周期。

猪传染性疾病给世界养猪业带来巨大的经济损失,利用基因编辑技术提高猪对传染性疾病的抗性有助于养猪业的发展和经济的稳定。猪繁殖与呼吸综合征(Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome, PRRS)是感染猪繁殖与呼吸综合征病毒(Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus, PRRSV)引起的疾病,该病对母猪及仔猪健康有很大影响。研究发现 CD163 基因表达的受体是 PRRSV 进入宿主细胞的关键受体。2018 年,Wu 等使用 CRISPR/Cas9 系统结合 SCNT 技术获得 CD163 基因敲除的杜洛克猪,CD163 双等位基因敲除猪对 PRRSV 有完全抵抗力。非洲猪瘟(Africans Wine Fever, ASF)对野猪和家猪的致死率高达 100%。目前没有疫苗或其他治疗方法来抑制非洲猪瘟病毒(Africans Wine Fever Virus, ASFV)的感染。2018 年,Hübner 等使用靶向 ASFV-p30 基因的 CRISPR/Cas9 系统对野猪肺细胞系(Wild Boar Lung Cell Line, WSL)进行编辑,发现 ASFV 产量降低了 4 个数量级,为治疗 ASF 提供有效的措施。

### 2、牛

牛作为大型单胎哺乳动物,具有繁殖周期长、试验成本高等特点。在牛上使用基因编辑技术具有缩短育种周期、减少成本等作用。Luo 等通过 ZFNs 技术破坏牛的 MSTN 基因,这些牛肌肉生长迅速,在 1 个月大时股四头肌肥大,并且出现“双肌”表型。B-乳球蛋白(Beta-lactoglobulin, BLG)是牛乳和

山羊乳中人类主要的过敏原,敲除山羊或奶牛基因组中的 BLG 基因有望让过敏者饮用牛奶和山羊奶。Yu 等使用 ZFNs 技术成功使牛的 BLG 基因突变,开启了基因编辑技术在大型动物上的应用。Sun 等通过 ZFNs 技术获得 BLG 双等位基因突变奶牛,并获得无 BLG 基因的牛奶,使牛乳过敏患者食用牛奶成为可能。牛场通常会对犊牛进行去角处理以便管理,Carlson 等使用 TALEN 技术将荷斯坦牛基因组中引入无角基因,获得 5 头基因编辑牛,其中两头纯合牛牛生长到 10 月龄仍未长角。2020 年,Ortega 等利用 CRISPR/Cas9 技术敲除牛的 NONAG 基因,以探究该基因缺失对滋养层和多层内细胞团的影响,发现 NONAG 基因对滋养层没有明显作用,主要影响多层内细胞团的分化与增殖。

金黄色葡萄球菌感染的奶牛会患乳腺炎,该病给奶牛业带来巨大的经济损失。Liu 等使用 ZFNickases 成功将溶葡萄球菌素基因插入到 β-酪蛋白基因座中,通过 SCNT 技术获得的克隆牛产出的牛奶中含有溶葡萄球菌素能够杀死金黄色葡萄球菌,为奶牛乳腺炎治疗提供新的方法。牛的结核病是由于感染牛分枝杆菌(Mycobacterium Bovis, M.bovis)造成的一种人畜共患病。Gao 等使用 Cas9n (Cas9 nickase)和 SCNT 技术获得天然抗性相关巨噬细胞蛋白 1 (Natural Resistance[1] associated Macrophage Protein- 1, NRAMP1)基因敲入的杂合体小牛,小牛表现出较强的结核病抗性。才冬杰利用 CRISPR/Cas9 技术将牛肾上皮(MDBK)细胞中的低密度脂蛋白受体(Low Density Lipoprotein Receptor, LDLR)基因敲除,并用牛病毒性腹泻病毒(Bovine Viral Diarrhea Virus, BVDV)侵袭 MDBK 细胞,发现敲除了 LDLR 基因的细胞只表达了少量的 BVDV 病毒

蛋白,为防治牛感染 BVDV 提供思路。

### 3、羊

Crispo 等通过显微注射技术在绵羊受精卵中注入针对绵羊 MSTN 基因的 CRISPR/Cas9 表达载体,获得 MSTN 基因突变绵羊,表现出“双肌”表型。Zhou 等在绵羊上使用 CBE3 系统模拟了细胞因子信号转导抑制因子(Suppressor of Cytokine Signaling 2, SOCS2)基因的自然突变(R96C),发现该基因突变的个体体重增加或体型增大。有研究表明在山羊 BLG 基因座敲入人乳铁蛋白基因(Human Lactoferrin, hLF),不仅能够去除过敏原,而且能够促进羊乳的人源化改造。Cui 等使用 TALEN 技术敲除山羊的 BLG 基因,同时通过同源重组引入 hLF 基因,使该山羊作为乳腺生物反应器,用于大规模生产 hLF。2017 年,Zhou 等使用 CRISPR/Cas9 系统获得 BLG 双等位基因敲除山羊,该山羊所产的奶中无 BLG 蛋白。

羊绒纺织品轻薄柔软而且保温性能良好,因此羊毛是绵羊和绒山羊的重要经济性状。已有研究表明成纤维生长因子(Fibroblast Growth Factor 5, FGF5)是调控毛发生长功能的重要基因,是毛发生长的负调控因子。王小龙等使用 CRISPR/Cas9 系统破坏 FGF5 基因,发现 FGF5 基因敲除的绒山羊次级毛囊更多、被毛更长。因此破坏绒山羊的 FGF5 基因可以有效地提高羊绒产量。2018 年,Li 等使用 CBE 对山羊 FGF5 基因的外显子 1 进行无义突变,获得 FGF5 基因敲除山羊,这些山羊表现出多毛性状。2020 年,Zhang 等使用 CRISPR/Cas9 系统和 SCNT 技术获得 5 只 FGF5 基因敲除的杜泊羊,这些羊的 FBG5 蛋白功能紊乱,表现为细毛产量高和活性毛囊密度大。

性别鉴定和增加产仔数也是生产中的重要一步。Boulanger 等使用 ZFNs

技术证实 FOXL2 基因是山羊的雌性性别决定基因。BMP1B 基因通过影响卵泡颗粒细胞的分化和卵泡的发育促进排卵,该基因的 FecBB 突变,是由于第 764 位发生了 A>G 突变,导致谷氨酰胺变成了精氨酸,该突变与家养绵羊的排卵率和产仔数的增加高度相关。Zhou 等在绵羊上使用 CBE3 成纤维细胞的 BMP1B 基因上引入 FecBB 突变,遗憾的是由于具有旁编辑效应,因此无法阐明该突变对表型的影响。

### 4、家禽

家禽能够快速生产优质蛋白,并且饲料转化率高,是重要的动物性蛋白来源。使用基因编辑技术可以对家禽进行性别控制、提高家禽肉品质以及剔除家禽产品中的过敏原,从而提高产品质量和生产效率。Park 等使用 TALEN 技术将鸡原始生殖细胞中的卵清蛋白(Ovalbumin, OVA)基因成功敲除,并获得 OVA 单等位基因敲除鸡。Oishi 等使用 CRISPR/Cas9 技术将产生卵清蛋白和卵黏蛋白的基因敲除,将蛋清中的这两种致敏成分剔除,使鸡蛋过敏的人有望食用鸡蛋。Oishi 等使用 CRISPR/Cas9 技术将干扰素-β 基因整合到鸡原始生殖细胞(Primordial Germ Cells, PGCs)OVA 基因的翻译起始位点,基因编辑成功的原始生殖细胞产生配子,并产生具有 OVA 基因打靶的后代,并发现该后代生产的鸡蛋蛋清中人干扰素-β 高度表达。Lee 等使用 CRISPR/Cas9 技术敲除鹌鹑的 MSTN 基因,基因编辑的纯合子鹌鹑具有胸肌和腿肌的重量增加、脂肪沉积少、饲料转化率高等特点,满足了生产者和消费者的需求。DMRT1 是 Z 染色体连锁基因,也是睾丸决定因子。Lee 等使用 CRISPR/Cas9 技术敲除鸡的 DMRT1 基因,发现早期胚胎性腺朝雌性方向分化,但未实现功能性性反转。

### 小结与展望

传统的育种方式具有周期长、资源少、成本高、遗传不稳定等缺点,使用基因编辑技术能够有效解决上述问题,有利于开发具有有益性状的畜禽种质资源,同时基因编辑技术也是研究基因功能、构建动物模型的重要技术。从 ZFNs 到 TALEN 再到 CRISPR/Cas9,基因编辑技术不断迭新,编辑效率得到了很大的提升,脱靶效率有所降低。此外由于人们对基因功能的认识有限,基因编辑的动物可能出现新的疾病,严重的会导致死亡。例如突变猪的 MSTN 基因可以提高猪的瘦肉率,有时也会导致猪的畸形,这可能是因为该基因还参与维持猪的其他功能。目前基因编辑技术仍在不断地发展,人们对于基因组学的研究也在不断地深入,相信在未来能够推动畜牧业朝着有益的方向发展。

(作者单位:中国农业大学动物科学技术学院)