

CRISPR/Cas9 基因编辑技术在畜禽育种中的研究进展

贾名扬¹, 王磊¹, 陈俊峰², 张家庆², 闫祥洲², 邢宝松^{2*}, 王璟^{2*}

1.河南科技学院动物科技学院, 河南 新乡 453003;

2.河南省农业科学院畜牧研究所, 河南省畜禽繁育与营养调控重点实验室, 河南省生猪种业工程研究中心, 郑州 450002

摘要: CRISPR/Cas9 是一种高效、精准的基因编辑技术, 在畜禽基因编辑领域已取得了广泛应用。简述了 CRISPR/Cas9 技术在猪、牛、羊及禽类遗传育种方面的研究进展和应用情况, 总结了该技术在育种应用方面所面临的问题, 并对其未来发展趋势进行了展望, 以期对未来该技术在畜禽育种领域的应用提供参考。

关键词: CRISPR/Cas9 系统; 基因编辑; 畜禽育种

DOI: 10.19586/j.2095-2341.2024.0021

中图分类号: Q75, S813

文献标志码: A

Research Progress of CRISPR/Cas9 Gene Editing Technology in Livestock and Poultry Breeding

JIA Mingyang¹, WANG Lei¹, CHEN Junfeng², ZHANG Jiaqing², YAN Xiangzhou², XING Baosong^{2*}, WANG Jing^{2*}

1. College of Animal Science and Veterinary Medicine, Henan Institute of Science and Technology, Henan Xinxiang 453003, China;

2. Henan Engineering Research Center for Breeding Swine Industry, Henan Key Laboratory of Farm Animal Breeding and Nutritional Regulation, Institute of Animal Husbandry, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, China

Abstract: CRISPR/Cas9 is an efficient and accurate gene editing technology, which is widely used in the field of livestock and poultry gene editing. This paper introduced the research progress and application of CRISPR/Cas9 technology in breeding of pig, cow, sheep and poultry, summarized the problems of its application in breeding, and prospected its future development trend, in order to provide reference for the future application of the technology in the field of livestock and poultry breeding.

Key words: CRISPR/Cas9 system; gene editing; livestock breeding

基因编辑是一种对基因组进行定点修饰的技术, 可在某一位点实现特定 DNA 片段的插入、缺失、修改和替换。成簇规律间隔短回文重复序列/Cas 关联蛋白 9 (clustered regularly interspersed short palindromic repeat/CRISPR associated protein 9, CRISPR/Cas9) 技术是继锌指核酸内切酶 (zinc finger nucleases, ZFN)、转录激活因子效应物核酸酶 (transcription activator-like effector nucleases, TALENs) 等基因编辑技术后推出的第三代基因编

辑技术^[1]。CRISPR/Cas9 系统靶向精准、脱靶率低, 已成为现有基因编辑和基因修饰中操作最简便、效率最高、成本最低的技术之一。

基因编辑技术已被广泛应用于畜牧生产的不同领域, 例如提高动物生产性能、开展抗病育种、生产无角动物等。本文主要阐述了 CRISPR/Cas9 在主要畜禽品种遗传改良方面的最新研究进展, 并简要总结了该技术在应用中所面临的问题和挑战, 以期为我国畜禽产业的可持续发展提供参考。

收稿日期: 2024-02-06; 接受日期: 2024-05-20

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2021YFD1301200); 河南省优秀青年科学基金项目 (222300420051); 河南省重点研发与推广专项 (212102110010; 242102110023); 河南省农业科学院科技创新团队项目 (2024TD22)。

联系方式: 贾名扬 E-mail: jia1my@163.com

*通信作者 王璟 E-mail: wangjing@hnagri.org.cn; 邢宝松 E-mail: xingbaosong@hnagri.org.cn

1 CRISPR/Cas9 基因编辑技术在猪基因组编辑中的应用

1.1 在肉质性状方面的应用

我国是生猪养殖与消费大国,利用 CRISPR/Cas9 技术快速改良猪经济性状,对养猪业发展有重要意义。肉质是影响猪肉的风味、嫩度、色泽、水分等特性的关键性状之一。早在 2006 年,密苏里大学团队利用基因编辑技术生产出表达人源化脂肪非典型钙黏蛋白 1 (fat atypical cadherin 1, Fat1) 基因的猪,与野生型对比,基因编辑猪 omega-3 多不饱和脂肪酸 (omega-3 polyunsaturated fatty acids, ω -3 PUFAs) 合成增加,亚油酸水平升高,肉质性状得到改善^[2]。

1.2 在产肉量方面的应用

产肉量是影响生猪养殖经济效益的关键因素,肌肉生长抑制素 (myostatin, MSTN) 在动物骨骼肌的增殖、分化、生长中起抑制作用,敲除后可促进肌肉生长,减少脂肪沉积^[3]。2015 年, Wang 等^[4]使用 CRISPR/Cas9 技术编辑 MSTN 双等位基因,将猪胎儿成纤维细胞 (porcine fetal fibroblasts, PFF) 的转染效率提高到约 90%。随后,在二花脸猪^[5]、巴马猪^[6]和两广小花猪^[7]等地方猪种中也成功实现了 MSTN 基因的敲除。胰岛素样生长因子 2 (insulin-like growth factor 2, IGF2) 能促进成肌细胞的增殖和肌纤维的分化。王煜等^[8]使用 hA3A-BE3、hA3A-BE3-Y130F 和 hA3A-eBE-Y130F 编辑巴马猪胎儿成纤维细胞 IGF2 基因,编辑效率分别可达 71.43%、56.86% 和 40.38%。Xiang 等^[9]利用 CRISPR/Cas9 技术对 IGF2 第 3 个内含子中一个保守的 SNP 位点 (IGF2-intron3-3072) 进行编辑,生产出的基因编辑猪平均体质量为 49.64±1.55 kg,比野生型重 34.58%,胴体质量提高 33.35%。

1.3 在抗病能力方面的应用

猪流行病严重影响着我国生猪产业的发展,CRISPR/Cas9 技术在提高猪抗病能力方面有着巨大的潜力。猪繁殖和呼吸障碍综合症 (porcine reproductive and respiratory syndrome, PRRS) 是一种严重影响经济效益的猪传染病。研究发现,利用 CRISPR/Cas9 技术敲除分化抗原 163 (cluster of differentiation 163, CD163) 基因第 7 外显子,攻毒实验表明,该基因编辑猪可有效抵抗猪繁殖与呼吸综

合征病毒 (porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV) 感染^[10]。随后有研究发现,敲除 CD163 SRCR5 区域^[11]或 CD163 类同源物^[12]均可达到抵抗 PRRSV 感染的作用。随着编辑器的发展,CD163 的编辑方式和效率也随之提高。2020 年,赵建国等^[13]利用改良的 hA3A-BE3-NG 成功制备了 CD163 蛋白缺失猪细胞,在 NGH (H=A、C 或 T) PAM 位点上改良后的编辑器效率 (平均为 21.27%) 远高于 hA3A-BE3 编辑器 (平均为 2.81%)。2022 年,赵为民等^[14]使用 YE1-BE3-FNLS 系统,通过单碱基编辑技术使 CD163 第 7 个外显子提早出现终止密码子,编辑效率高达 60%。

基因编辑技术日渐成熟,研究人员不再满足于单基因编辑。Song 等^[15]使用碱基编辑器 hA3A-BE3-Y130 生产了三基因编辑猪,实现了 CD163 和 MSTN 表达提前终止,IGF2 表达增加,显著提高了猪的生长性能和抗病能力。猪传染性胃肠炎是一种高度接触性肠道传染病,pAPN 是传染性胃肠炎病毒 (transmissible gastro enteritis virus, TGEV) 感染的关键受体。Xu 等^[16]利用 CRISPR/Cas9 技术同时编辑 CD163 和 pAPN,实现 CD163 和 pAPN 同时失活,使得双基因编辑猪同时具备猪繁殖与呼吸综合症和传染性胃肠炎抗性。2023 年, Ren 等^[17]使用 Cas12iMax 基因编辑新工具,同时编辑了巴马猪膜内氨酰氨基肽酶 [alanyl (membrane) aminopeptidase, NPEP]、CD163、MSTN 和 IGF2,四基因编辑猪的生长速率和肌肉产量得以提高,同时具有抵抗猪繁殖与呼吸综合症病毒和猪流行性肠胃炎病毒感染的能力。

除了 PRRS 和传染性胃肠炎,在猪其他传染性疾方面也开展了相关研究。猪是口蹄疫 (foot-and-mouth disease, FMD) 易感动物,敲除草莓缺口同源物 2 (strawberry notch homolog 2, SBNO2) 基因^[18]或敲除 RNA 结合蛋白 RALY (RBP associated with lethal yellow mutation) 基因^[19]均可抑制口蹄疫病毒 (foot-and-mouth disease virus, FMDV) 复制。Xie 等^[20]将包含游离 S-腺苷甲硫氨酸结构域蛋白 2 (radical S-adenosyl methionine domain-containing protein 2, RSAD2) 特异性插入猪 Rosa 26 基因座,生产了一只组成型过表达 pRSAD2 的基因编辑猪,从该基因编辑猪分离的成纤维细胞猪瘟疫病毒 (classical swine fever virus, CSFV) 感染率明显降低。同时,基因编辑猪的聚

(rC)结合蛋白1 [poly (rc)-binding protein 1, PCBP1]基因也可显著降低对CSFV的感染率^[21]。综上可知,基于CRISPR/Cas9基因编辑技术开展的抗病育种,主要原理是敲除或者改变病毒感染受体的关键位点,影响RNA病毒的结合和复制,从而达到抗病育种的效果。

1.4 在其他方面的应用

猪是恒温动物,对环境温度有一定的适应范围,其中冷应激对仔猪危害很大。解偶联蛋白1 (uncoupling protein 1,UCPI)是适应性产热的关键基因,猪缺失UCPI基因可导致仔猪体温调节能力弱,易产生冷应激死亡^[22]。Zheng等^[23]使用CRISPR/Cas9技术在猪内源性UCPI位点敲入小鼠UCPI,在急性寒冷暴露环境中,这些基因编辑猪在不改变体力活动或日常能量需求的同时,体温调节得到改善,脂肪沉积变少。毛色是猪重要品种特征之一,遗传调控机制较复杂。Liang等^[24]使用CRISPR/Cas9技术对大白猪体细胞原癌基因(proto-oncogene c-kit, KIT)重复拷贝进行精确删除,首次在大家畜中获得结构性变异修复的基因编辑猪,尽管毛色仍为白色,但红细胞数量显著提高,贫血症状得到改善,肉色也显著提高。

以上研究结果证实CRISPR/Cas9基因编辑技术在改良猪生长、肉质、毛色等多种经济性状方面的有效性,为提高生猪产业经济效益提供了新的方向。

2 CRISPR/Cas9基因编辑技术在牛、羊基因组编辑中的应用

2.1 在生长性状方面的应用

牛、羊均属于单胎动物,繁殖周期与生长周期均比猪长,试验成本高,基因编辑发展相对滞后,而随着CRISPR/Cas9技术的出现,该领域的研究进入快速发展期。生长性状是影响养殖经济效益的关键指标,牛羊方面最成功的基因编辑案例也是MSTN基因。通过CRISPR/Cas9基因编辑技术对牛的MSTN基因进行定点编辑,培育出的MSTN基因编辑牛的平均活体质量、胴体质量、屠宰率、净肉重与净肉率均显著高于对照牛,可显著提高生长性能和产肉率^[25]。已有研究证实,MSTN基因编辑牛成熟后没有健康问题,并可通过生殖细

胞将MSTN突变传给下一代,说明基因编辑所得性状能够稳定种系传递^[26]。使用CRISPR/Cas9系统编辑绵羊MSTN基因,比野生型绵羊体质量更重,肌肉质量更高^[27]。Wang等^[28]通过CRISPR/Cas9技术获得MSTN、刺鼠信号蛋白(agoutisignalingprotein, ASIP)和 β -胡萝卜素加氧酶2(beta-carotene oxygenase 2,BCO2)三基因编辑羊,平均日增重较野生型高1.31倍。姚旭东^[29]使用An-cBE4max系统对哈萨克羊MSTN基因进行编辑,让其提前终止翻译,sg1位点在孤雌胚和受精胚中编辑效率分别为70%和90%,获得的8只羔羊均发生碱基转换,编辑效率达100%。除MSTN外,细胞因子信号抑制蛋白2(suppressor of cytokine signaling 2,SOCS2)也是调控生长性状的关键基因,缺乏SOCS2可改变能量代谢、影响脂肪组织重塑^[30]。Zhou等^[31]利用CRISPR/Cas9技术在SOCS2基因抑制子引入突变,获得的突变羊的体质量、体长、身高明显高于野生型。

2.2 在奶制品品质改良方面的应用

牛羊是奶制品的重要来源,CRISPR/Cas9技术在奶制品品质改良及乳腺反应器方面也具有应用。 β -乳球蛋白(β -lactoglobulin, BLG)基因是奶中的过敏原,使用CRISPR/Cas9技术生产BLG基因缺失牛、羊,它们所产的奶不含BLG过敏原^[32-33]。硬脂酰CoA去饱和酶1(stearoyl-CoA desaturase1, SCD1)是脂肪酸代谢途径的关键调节因子,SCD1基因敲除的编辑羊可生产出低脂羊奶^[34],褪黑素可用于改善睡眠,研究表明N-乙酰血清素-O-甲基转移酶(N-acetylserotonin-O-methyltransferase, ASMT)和5-羟色胺-N-乙酰基转移酶(aaralkylamine N-acetyltransferase, AANAT)是褪黑素(melatonin, MT)合成过程中的限速酶^[35],Ma等^[36]利用CRISPR/Cas9技术生产的AANAT和ASMT编辑绵羊可生产出富含褪黑素的羊奶。这些研究为乳制品品质改良提供了参考,有利于促进功能性牛羊奶产品的开发和生产。

2.3 在抗病能力方面的应用

基因编辑技术也广泛应用于牛、羊的抗病育种,天然抗性相关巨噬细胞蛋白1(natural resistance associated macrophage protein 1, Nramp1)是结核病易感基因之一,提高其表达量可增强牛的抗结核能力。Gao等^[37]利用Cas9切口酶(Cas9n)技术将NRAMP1敲入到牛肌动蛋白结合蛋白1

(fascin actin-bundling protein 1, FSCN1)基因和肌动蛋白 β 基因(β -actin, ACTB)区域间,培育出的奶牛 *NRAMP1* 基因表达水平明显增强,提高了奶牛对结核分枝杆菌的抵抗力。牛病毒性腹泻病毒(bovine viral diarrhea virus, BVDV)会引起牛的胃肠道、呼吸道、繁殖疾病,补体调节蛋白46(complement regulator protein, CD46)对 BVDV 的附着起重要作用,Workman 等^[38]使用 CRISPR 工具定向编辑牛 *CD46*,发现第一头 *CD46* 基因编辑小牛“金格”对 BVDV 易感性大大降低^[48]。朊病毒蛋白(prion protein, PrP)是传染性海绵状脑病的病原体,通过 CRISPR/Cas9 技术敲除该基因,可生产出抗传染性海绵状脑病的山羊^[39]。透明质酸酶2(hyaluronidase 2, HYAL2)是绵羊肺腺瘤病毒(jaagsiekte sheep retrovirus, JSRV)受体,Menchaca 等^[40]通过 CRISPR/Cas9 技术生产了 *HYAL2* 基因缺失绵羊,有助于绵羊肺腺瘤病的防治。

2.4 在其他方面的应用

羊的产毛量也是重要经济性状之一,成纤维细胞生长因子5(fibroblast growth factor 5, FGF5)对哺乳动物毛发周期性生长具有重要调控作用, *FGF5* 表达量降低可使羊毛长度变长和数量显著增加。李冠纬^[41]使用 BE2 编辑器将陕北白绒山羊 *FGF5* 基因第一外显子引入终止密码子,与野生山羊相比,所获得的5只基因编辑羊毛纤维更长,毛囊更多。繁殖性状是绵羊的重要经济性状,其中多胎基因(fecundity booroola, *FecB*)是绵羊繁殖性状的主效基因之一,丁一格^[42]对滩羊 *FecB* 基因进行单碱基定点编辑,胚胎编辑效率为22.91%,所得的基因编辑羊产羔率提高了43.86%。

以上研究证实 CRISPR/Cas9 基因编辑技术可用于反刍动物经济性状改良和抗病育种,有利于提高牛、羊产业的经济效益。

3 CRISPR/Cas9 基因编辑技术在其他畜禽类基因组编辑中的应用

3.1 在产肉量方面的应用

禽类为人类的生活提供了大量的肉、蛋产品,但其与哺乳动物生理结构的差异,导致基因编辑技术在禽类育种中的应用受限。CRISPR/Cas9 技术解决了传统基因编辑技术在鸡上应用难的问

题。2019年, Bhattacharya^[43]使用 CRISPR/Cas9 技术敲低了 *MSTN* 基因的表达,抑制其抗肌源性功能,生成的 *MSTN* 敲除鸡的体质量比野生型高17.6%。2020年, Kim 等^[44]发现使用 D10A-Cas9 切口酶生产出的 *MSTN* 基因敲除鸡与野生型相比,腿质量高出55.3%,腹部脂肪沉积量平均降低77.9%。

3.2 在肉质性状方面的应用

鸡腹部脂肪过度沉积会降低饲料利用率,其中脂肪甘油三酯水解酶(adipose triglyceride lipase, ATGL)是调控甘油三酯水解的关键酶^[45],其活性受到 G0/G1 开关基因2(G0/G1 switch gene 2, *GOS2*)基因编码蛋白质的抑制^[46], Park 等^[47]发现 *GOS2* 基因敲除鸡腹部脂肪沉积与野生型相比平均减少49.2%,脂肪酸组成也得到了优化。

3.3 在性别决定方面的应用

早期性别鉴定可以降低孵化场的饲养成本,利用 CRISPR/Cas9 技术将绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)插入鸡的 Z 染色体中,使雄性鸡携带 ZZ 染色体,雌性鸡携带 ZW 染色体。结果发现,基因编辑的 ZW 雌性(表达 *GFP*)与野生型 ZZ 雄性交配所生的后代中,表达 *GFP* 的为 ZZ 雄性,而不表达 *GFP* 的为雌性,在实际生产中,使用荧光检测装置即可实现性别的早期、高效辨别^[48]。

3.4 在抗病能力方面的应用

禽白血病给养鸡产业带来了严重的经济损失。Lee 等^[49]通过 CRISPR/Cas9 技术对 I 型 Na^+/H^+ 交换蛋白(Na^+/H^+ exchange type 1, *NHE1*)进行精准编辑,致使鸡胚成纤维细胞(douglas foster-1, DF-1)对 B 亚群白血病病毒(avian leukosis virus sub-group B, ALV-B)感染产生抗性。随后, Lee 等^[50]又使用相同的方法对 A 亚群禽白血病病毒(ALV-A)受体基因外显子2进行敲除,得到了可增强 ALV-A 抗性的 DF-1 细胞。2020年, Koslová 等^[51]使用 CRISPR/Cas9 技术完成了 *NHE1* 基因精确敲除,制备出的基因编辑模型对 ALV-J 产生抗性。鸭坦布苏病毒(duck tembusu virus, DTMUV)造成5%~30%的病鸭死亡,战彦韬^[52]通过 CRISPR/Cas9 敲低了鸭胚成纤维细胞中的 *HMGB1* 基因,发现 DTMUV 复制能力显著提升,证实了 *duHMGB1* 具有抗 DTMUV 感染的作用,为研发针对该病的新型药物或疫苗佐剂提供了科学依据。

综上所述, CRISPR/Cas9 基因编辑技术在禽

类的生长、抗病育种、肉质等多种经济性状改良方面提供了一种有效的方法,有助于提高这些产业的经济效益。

4 问题与挑战

目前,尽管我国拥有丰富的畜禽遗传资源,但筛选的有重要育种价值的基因并不多,能用于基因编辑的基因更是有限,同时一些畜禽重大疫病致病基因尚未明确,满足不了基因编辑育种的需要,这极大地限制了畜禽基因编辑的发展,因此亟需挖掘、鉴定、验证重要性状关键基因。

自CRISPR技术诞生以来,始终面临各种难题。关于基因组不稳定性及染色体完整性的安全问题尚未得到深入研究,CRISPR/Cas9基因编辑导致的基因组不稳定性不容小觑。Adikusuma等^[53]研究显示CRISPR/Cas9切割后,小鼠受精卵中出现千碱基量级的缺失;法国波多尔大学研究团队发现CRISPR/Cas9基因组编辑会诱导出现百万碱基规模的染色体大片段缺失^[54]。这么大长度的片段缺失,比脱靶效应更为严重。2018年6月,两项研究表明,CRISPR/Cas9基因编辑后的细胞往往是p53基因发生突变的细胞,有变成癌细胞的可能性^[55-56]。Leibowitz等^[57]研究发现CRISPR/Cas9基因编辑技术会对细胞核结构造成损伤,出现微核及染色体桥等畸变,从而引起染色体断裂。由此可见,目前对CRISPR/Cas9基因编辑技术的相关机制及安全风险的认识尚且不足,在进行CRISPR/Cas9基因编辑时务必做好安全性评估。

此外,动物基因编辑的伦理问题很复杂,包括基因编辑脱靶效应导致的动物畸形、寿命缩短等损害动物福利的问题、基因编辑畜禽产品相关食品安全问题、环境安全问题以及消费者的知情权等。尽管CRISPR/Cas9技术面临很多挑战,但该技术已取得了很多突破性的进展,这将有助于畜禽类改良、疾病防控等。

5 展望

CRISPR/Cas9技术在易用性、效率、速度以及成本方面都具有优势,但目前该技术在畜禽方面的应用绝大多数都是以编码区为目标。近年来,

随着高通量测序技术的发展,筛选出大量调控畜禽经济性状的miRNA、lncRNA、circRNA等非编码RNA,以及启动子、增强子等调控元件,这些非编码区也可作为CRISPR/Cas9技术的编辑对象。此外,CRISPR/Cas9技术还可与全基因组关联分析联合使用,对畜禽重要经济性状的标记进行功能表征。

基因编辑技术发展迅速,基因编辑工具箱也在不断扩展。新发现了Cas9的多种替代物,例如saCas9具有更广泛的PAM序列和更高的DNA敏感性^[58],Cas12a不需要tracrRNA,可靶向富含T的基序^[59],Cas13提供了改变转录组的可能性,还可用于成像、碱基编辑和检测转录变异等^[60],Cas14蛋白可靶向ssDNA,具有先进的基因编辑效率^[61]。此外,胞嘧啶碱基编辑器(cytosine base editor, CBEs)和腺嘌呤碱基编辑器(adenine base editor, ABEs)也先后被开发出来,可有效进行单碱基编辑^[62]。中国科学院遗传与发育生物学研究所高彩霞研究组创新运用AI辅助的大规模蛋白结构预测,开发了一系列新型碱基编辑系统,其中Sdd6-CBE碱基编辑器,在小鼠细胞系的编辑效率高达43.1%^[63]。张锋团队开发了新的搜索算法识别出188种新型CRISPR系统,脱靶效应比目前的CRISPR-Cas9系统要少^[64]。

虽然基因编辑技术发展速度很快,但基因编辑畜禽进入消费市场还受到政府法规和公众接受度的限制。2023年10月,哥伦比亚成为全球首个批准抗蓝耳病基因编辑猪上市的国家。美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)已批准4种基因编辑动物产品,包括生长速度更快的三文鱼、可减少过敏反应和免疫排斥反应的Galsafe猪、耐热短毛牛等。目前,只有美国允许转基因牲畜进入消费市场,澳大利亚和新西兰允许销售不包含外源基因的转基因产品,中国和欧盟国家禁止转基因畜禽进入消费市场。2023年6月,我国农业农村部组织制定了《农业用基因编辑动物安全评价指南》并广泛征求社会意见。可以预见,随着基因编辑技术的逐渐完善,基因编辑畜禽产品进入消费市场大有前景。

CRISPR/Cas9基因编辑技术的发展,极大地提高了动物遗传育种的效率,推动了畜禽遗传改良事业的发展。同时,我们也应该清醒地认识到CRISPR/Cas9技术在畜禽育种中的应用仍然存在

一些问题,例如编辑诱导的染色体大片段缺失、双链断裂、染色体碎裂等风险,这些也将是未来研究的重点。随着基因编辑技术的进一步成熟和发展,其将对畜禽育种的发展起到积极推动作用。

参 考 文 献

- [1] 赵美威,段承俐,刘江. 基于类转录激活因子效应物(TALEs)的基因组定点操控技术[J]. 动物学研究,2013,34(5):509-518. ZHAO M W, DUAN C L, LIU J. Transcription activator-like effectors(TALEs)based genome engineering[J]. Zool. Res., 2013, 34(5): 509-518.
- [2] LAI L, KANG J X, LI R, *et al.*. Generation of cloned transgenic pigs rich in omega-3 fatty acids[J]. Nat. Biotechnol., 2006, 24(4): 435-436.
- [3] 朱秋宇,胡兰. 动物机体中肌肉生长抑制素基因的研究进展[J]. 现代畜牧兽医,2014(9):51-55. ZHU Q Y, HU L. Research progress of *Myostatin* gene in animal[J]. Mod. J. Anim. Husb. Vet. Med., 2014(9): 51-55.
- [4] WANG K, OUYANG H, XIE Z, *et al.*. Efficient generation of myostatin mutations in pigs using the CRISPR/Cas9 system[J/OL]. Sci. Rep., 2015, 5: 16623[2024-05-31]. <https://doi.org/10.1038/srep16623>.
- [5] WANG K, TANG X, XIE Z, *et al.*. CRISPR/Cas9-mediated knockout of myostatin in Chinese indigenous Erhualian pigs[J]. Transgenic Res., 2017, 26(6): 799-805.
- [6] ZHU X X, ZHAN Q M, WEI Y Y, *et al.*. CRISPR/Cas9-mediated MSTN disruption accelerates the growth of Chinese *Bama* pigs[J]. Zuchthygiene, 2020, 55(10): 1314-1327.
- [7] 彭定威,李瑞强,曾武,等. 编辑MSTN半胱氨酸节基元促进两广小花猪肌肉生长[J]. 遗传,2021,43(3):261-270. PENG D W, LI R Q, ZENG W, *et al.*. Editing the cystine knot motif of MSTN enhances muscle development of Liang Guang Small Spotted pigs[J]. Hereditas, 2021, 43(3): 261-270.
- [8] 王煜,宋瑞高,赵建国,等. 碱基编辑器介导的猪IGF2基因高效定点突变[J]. 中国畜牧兽医,2020,47(11):3427-3435. WANG Y, SONG R G, ZHAO J G, *et al.*. Efficient site-directed mutation of porcine *IGF2* gene via base editors[J]. China Anim. Husb. Vet. Med., 2020, 47(11): 3427-3435.
- [9] XIANG G, REN J, 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.
- [10] WANG H, SHEN L, CHEN J, *et al.*. Deletion of *CDI63* exon 7 confers resistance to highly pathogenic porcine reproductive and respiratory viruses on pigs[J]. Int. J. Biol. Sci., 2019, 15(9): 1993-2005.
- [11] BURKARD C, OPRIESSNIG T, MILEHAM A J, *et al.*. Pigs lacking the scavenger receptor cysteine-rich domain 5 of *CDI63* are resistant to porcine reproductive and respiratory syndrome virus 1 infection[J]. J. Virol., 2018, 92(16): 415-418.
- [12] CHEN J, WANG H, BAI J, *et al.*. Generation of pigs resistant to highly pathogenic-porcine reproductive and respiratory syndrome virus through gene editing of *CDI63*[J]. Int. J. Biol. Sci., 2019, 15(2): 481-492.
- [13] WANG Y, BI D, QIN G, *et al.*. Cytosine base editor (hA3A-BE3-NG)-mediated multiple gene editing for pyramid breeding in pigs[J/OL]. Front. Genet., 2020, 11: 592623[2024-05-31]. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.592623>.
- [14] 赵为民,王慧利,曹少先,等. 猪*CDI63*基因的单碱基编辑研究[J]. 畜牧兽医学报,2022,53(4):1041-1050. ZHAO W M, WANG H L, CAO S X, *et al.*. The study of base editing of porcine *CDI63* gene[J]. Acta Vet. Zootechnica Sin., 2022, 53(4): 1041-1050.
- [15] SONG R, WANG Y, ZHENG Q, *et al.*. One-step base editing in multiple genes by direct embryo injection for pig trait improvement[J]. Sci. China Life Sci., 2022, 65(4): 739-752.
- [16] XU K, ZHOU Y, MU Y, *et al.*. *CDI63* and *pAPN* double-knockout pigs are resistant to PRRSV and TGEV and exhibit decreased susceptibility to PDCoV while maintaining normal production performance[J/OL]. eLife, 2020, 9: e57132[2024-05-31]. <https://doi.org/10.7554/eLife.57132>.
- [17] REN J, HAI T, CHEN Y, *et al.*. Improve meat production and virus resistance by simultaneously editing multiple genes in livestock using Cas12i^{Max}[J]. Sci. China Life Sci., 2024, 67(3): 555-564.
- [18] 王妍鳕,任亭亭,孙跃峰,等. 利用CRISPR/Cas9系统构建*SB-NO2*基因敲除细胞系及其功能研究[J]. 甘肃农业大学学报, 2021,56(1):22-28. WANG Y X, REN T T, SUN Y F, *et al.*. Construction of *SB-NO2* knockout cell lines using CRISPR/Cas9 system and its function evaluation[J]. J. Gansu Agric. Univ., 2021, 56(1): 22-28.
- [19] 张林,吴金恩,任玫,等. *RALY*基因敲除PK-15细胞系的构建及对口蹄疫病毒复制的影响[J]. 中国兽医科学,2023,53(9): 1115-1121. ZHANG L, WU J N, REN M, *et al.*. Construction of *RALY* gene knockout PK-15 cell line and its effect on replication of foot-and-mouth disease virus[J]. Chin. Vet. Sci., 2023, 53(9): 1115-1121.
- [20] XIE Z, JIAO H, XIAO H, *et al.*. Generation of *pRSAD2* gene knock-in pig via CRISPR/Cas9 technology[J/OL]. Antivir. Res., 2020, 174: 104696[2024-05-31]. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2019.104696>.
- [21] QI C, PANG D, YANG K, *et al.*. Generation of PCBP1-deficient pigs using CRISPR/Cas9-mediated gene editing[J/OL]. iScience, 2022, 25(10): 105268[2024-05-31]. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.105268>.
- [22] BERG F, GUSTAFSON U, ANDERSSON L. The uncoupling protein 1 gene (*UCP1*) is disrupted in the pig lineage: a genetic explanation for poor thermoregulation in piglets[J/OL]. PLoS Genet., 2006, 2(8): e129[2024-05-31]. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0020129>.
- [23] 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]. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2017, 114(45): 9474-9482.
- [24] LIANG X, LAN J, XU M, *et al.*. Impact of *KIT* editing on coat pigmentation and fresh meat color in Yorkshire pigs[J]. CRISPR J., 2022, 5(6): 825-842.

- [25] 吴珊珊,王学侨,王鑫,等. *MSTN*基因编辑鲁西牛屠宰性状与肉用品质分析[J]. 农业生物技术学报,2023,31(1):87-97.
WU S S, WANG X Q, WANG X, *et al.*. Analysis of slaughter traits and meat quality of *MSTN* gene-edited Luxi cattle(*Bos taurus*)[J]. J. Agric. Biotechnol., 2023, 31(1): 87-97.
- [26] GIM G M, KWON D H, EOM K H, *et al.*. Production of *MSTN*-mutated cattle without exogenous gene integration using CRISPR-Cas9[J/OL]. Biotechnol. J., 2022, 17(7): e2100198[2024-05-31]. <https://doi.org/10.1002/biot.202100198>.
- [27] CRISPO M, MULET A P, TESSON L, *et al.*. Efficient generation of myostatin knock-out sheep using CRISPR/Cas9 technology and microinjection into zygotes[J/OL]. PLoS ONE, 2015, 10(8): e0136690[2024-05-31]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136690>.
- [28] WANG X, NIU Y, ZHOU J, *et al.*. Multiplex gene editing via CRISPR/Cas9 exhibits desirable muscle hypertrophy without detectable off-target effects in sheep[J/OL]. Sci. Rep., 2016, 6: 32271[2024-05-31]. <https://doi.org/10.1038/srep32271>.
- [29] 姚旭东. 单碱基编辑哈萨克羊 *MSTN* 基因的研究[D]. 石河子:石河子大学,2021.
- [30] VAL C H, DE OLIVEIRA M C, LACERDA D R, *et al.*. SOCS2 modulates adipose tissue inflammation and expansion in mice[J/OL]. J. Nutr. Biochem., 2020, 76: 108304[2024-05-31]. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2019.108304>.
- [31] ZHOU S, CAI B, HE C, *et al.*. Programmable base editing of the sheep genome revealed No genome-wide off-target mutations[J/OL]. Front. Genet., 2019, 10: 215[2024-05-31]. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00215>.
- [32] SILAEVA Y Y, KUBEKINA M V, BRUTER A V, *et al.*. Gene editing CRISPR/Cas9 system for producing cows with hypoallergenic milk on the background of a beta-lactoglobulin gene knockout[J/OL]. E3S Web Conf., 2020, 176: 1006[2024-05-31]. <https://doi.org/10.1051/e3sconf/202017601006>.
- [33] ZHOU W, WAN Y, GUO R, *et al.*. Generation of beta-lactoglobulin knock-out goats using CRISPR/Cas9[J/OL]. PLoS ONE, 2017, 12(10): e0186056[2024-05-31]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186056>.
- [34] TIAN H, LUO J, ZHANG Z, *et al.*. CRISPR/Cas9-mediated stearyl-CoA desaturase 1 (SCD1) deficiency affects fatty acid metabolism in goat mammary epithelial cells[J]. J. Agric. Food Chem., 2018, 66(38): 10041-10052.
- [35] TAN D X, MANCHESTER L C, ESTEBAN-ZUBERO E, *et al.*. Melatonin as a potent and inducible endogenous antioxidant: synthesis and metabolism[J]. Molecules, 2015, 20(10): 18886-18906.
- [36] MA T, TAO J, YANG M, *et al.*. An AANAT/ASMT transgenic animal model constructed with CRISPR/Cas9 system serving as the mammary gland bioreactor to produce melatonin-enriched milk in sheep[J/OL]. J. Pineal Res., 2017, 63(1): 12406 [2024-05-31]. <https://doi.org/10.1111/jpi.12406>.
- [37] GAO Y, WU H, WANG Y, *et al.*. Single Cas9 nickase induced generation of NRAMP1 knockin cattle with reduced off-target effects[J/OL]. Genome Biol., 2017, 18(1): 13[2024-05-31]. <https://doi.org/10.1186/s13059-016-1144-4>.
- [38] WORKMAN A M, HEATON M P, VANDER LEY B L, *et al.*. First gene-edited calf with reduced susceptibility to a major viral pathogen[J/OL]. PNAS Nexus, 2023, 2(5): pgad125[2024-05-31]. <https://doi.org/10.1093/pnasnexus/pgad125>.
- [39] HU S, YANG M, POLEJAEVA I. 360 double knockout of goat myostatin and prion protein gene using clustered regularly interspaced short palindromic repeat CRISPR/Cas9 systems[J/OL]. Reprod. Fertil. Dev., 2015, 27(1): 268[2024-05-31]. <https://doi.org/10.1071/rdv27n1ab360>.
- [40] MENCHACA A, MULET A P, DOS SANTOS NETO P C, *et al.*. CRISPR in sheep: a southern perspective[J]. Transgenic Res., 2018, 27(5): 469-470.
- [41] 李冠纬. 单碱基基因编辑系统介导的 *FGF5* 基因敲除绒山羊的创制与评价[D]. 杨凌:西北农林科技大学,2020.
- [42] 丁一格. ABEs介导的 *FecB* 基因突变滩羊的制备[D]. 杨凌:西北农林科技大学,2020.
- [43] BHATTACHARYA T K, SHUKLA R, CHATTERJEE R N, *et al.*. Comparative analysis of silencing expression of myostatin (*MSTN*) and its two receptors (ACVR2A and ACVR2B) genes affecting growth traits in knock down chicken[J/OL]. Sci. Rep., 2019, 9(1): 7789[2024-05-31]. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-44217-z>.
- [44] KIM G D, LEE J H, SONG S, *et al.*. Generation of myostatin-knockout chickens mediated by D10A-Cas9 nickase[J]. FASEB J., 2020, 34(4): 5688-5696.
- [45] ZIMMERMANN R, STRAUSS J G, HAEMMERLE G, *et al.*. Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase[J]. Science, 2004, 306(5700): 1383-1386.
- [46] YANG X, LU X, LOMBÈS M, *et al.*. The G(0)/G(1) switch gene 2 regulates adipose lipolysis through association with adipose triglyceride lipase[J]. Cell Metab., 2010, 11(3): 194-205.
- [47] PARK T S, PARK J, LEE J H, *et al.*. Disruption of G(0)/G(1) switch gene 2 (G0S2) reduced abdominal fat deposition and altered fatty acid composition in chicken[J]. FASEB J., 2019, 33(1): 1188-1198.
- [48] LEE H J, YOON J W, JUNG K M, *et al.*. Targeted gene insertion into Z chromosome of chicken primordial germ cells for avian sexing model development[J]. FASEB J., 2019, 33(7): 8519-8529.
- [49] LEE H J, LEE K Y, PARK Y H, *et al.*. Acquisition of resistance to avian leukosis virus subgroup B through mutations on tvb cysteine-rich domains in DF-1 chicken fibroblasts[J/OL]. Vet. Res., 2017, 48(1): 48[2024-05-31]. <https://doi.org/10.1186/s13567-017-0454-1>.
- [50] LEE H J, PARK K J, LEE K Y, *et al.*. Sequential disruption of ALV host receptor genes reveals no sharing of receptors between ALV subgroups A, B, and J[J/OL]. J. Anim. Sci. Biotechnol., 2019, 10: 23[2024-05-31]. <https://doi.org/10.1186/s40104-019-0333-x>.
- [51] KOSLOVÁ A, TREFIL P, MUCKSOVÁ J, *et al.*. Precise CRISPR/Cas9 editing of the *NHE1* gene renders chickens resistant to the J subgroup of avian leukosis virus[J]. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2020, 117(4): 2108-2112.
- [52] 战彦韬. 应用CRISPR/Cas9敲低DEF细胞 *HMGBl* 基因对鸭坦布苏病毒复制的影响[D]. 泰安:山东农业大学,2020.

- [53] ADIKUSUMA F, PILTZ S, CORBETT M A, *et al.* Large deletions induced by Cas9 cleavage[J]. *Nature*, 2018, 560(7717): 8-9.
- [54] CULLOT G, BOUTIN J, TOUTAIN J, *et al.* CRISPR-Cas9 genome editing induces megabase-scale chromosomal truncations[J/OL]. *Nat. Commun.*, 2019, 10(1): 1136[2024-05-31]. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09006-2>.
- [55] HAAPANIEMI E, BOTLA S, PERSSON J, *et al.* CRISPR-Cas9 genome editing induces a p53-mediated DNA damage response[J]. *Nat. Med.*, 2018, 24(7): 927-930.
- [56] IHRY R J, WORRINGER K A, SALICK M R, *et al.* p53 inhibits CRISPR-Cas9 engineering in human pluripotent stem cells[J]. *Nat. Med.*, 2018, 24(7): 939-946.
- [57] LEIBOWITZ M L, PAPATHANASIOU S, DOERFLER P A, *et al.* Chromothripsis as an on-target consequence of CRISPR-Cas9 genome editing[J]. *Nat. Genet.*, 2021, 53(6): 895-905.
- [58] HU J H, MILLER S M, GEURTS M H, *et al.* Evolved Cas9 variants with broad PAM compatibility and high DNA specificity[J]. *Nature*, 2018, 556(7699): 57-63.
- [59] ZETSCHKE B, GOOTENBERG J S, ABUDAYYEH O O, *et al.* Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system[J]. *Cell*, 2015, 163(3): 759-771.
- [60] XU C, ZHOU Y, XIAO Q, *et al.* Programmable RNA editing with compact CRISPR-Cas13 systems from uncultivated microbes[J]. *Nat. Meth.*, 2021, 18(5): 499-506.
- [61] HILLARY V E, CEASAR S A. A review on the mechanism and applications of CRISPR/Cas9/Cas12/Cas13/Cas14 proteins utilized for genome engineering[J]. *Mol. Biotechnol.*, 2023, 65(3): 311-325.
- [62] PORTO E M, KOMOR A C. In the business of base editors: evolution from bench to bedside[J/OL]. *PLoS Biol.*, 2023, 21(4): e3002071[2024-05-31]. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3002071>.
- [63] HUANG J, LIN Q, FEI H, *et al.* Discovery of deaminase functions by structure-based protein clustering[J]. *Cell*, 2023, 186(15): 3182-3195.
- [64] ALTAE-TRAN H, KANNAN S, SUBERSKI A J, *et al.* Uncovering the functional diversity of rare CRISPR-Cas systems with deep terascale clustering[J/OL]. *Science*, 2023, 382(6673): eadi1910[2024-05-31]. <https://doi.org/10.1126/science.adi1910>.