

DOI: 10.14188/j.ajsh.2019.03.003

富含 ω -3型多不饱和脂肪酸基因工程猪研究进展

魏妍妍, 詹群美, 朱向星, 唐冬生*

(佛山科学技术学院 广东省基因编辑工程技术研究中心, 广东 佛山 528000)

摘要: 我国是世界第一大生猪养殖国, 猪肉在我国肉类食品组成中占有重要地位, 是国人获取动物蛋白的重要来源。猪肉中 ω -6多不饱和脂肪酸(polyunsaturated fatty acids, PUFAs)含量高, 而 ω -3 PUFAs含量少, 不利于人类健康。基因工程技术可以对特定DNA片段敲除、插入和替换, 在改良猪生产性状方面具有巨大潜力, 采用基因工程培育富含 ω -3 PUFAs猪具有巨大的市场价值。本文阐述了猪肉 ω -3 PUFAs含量少的原因, 并就利用基因工程技术培育富含 ω -3 PUFAs猪的研究进展进行了分析, 以期提升猪肉 ω -3 PUFAs含量的相关研究与实践奠定基础。

关键词: 猪; 猪肉; 多不饱和脂肪酸; 脂肪酸脱氢酶; 基因工程

中图分类号: S814.8

文献标识码: A

文章编号: 2096-3491(2019)03-0204-06

Research progress on genetic engineered pigs rich in ω -3 PUFAs

WEI Yanyan, ZHAN Qunmei, ZHU Xiangxing, TANG Dongsheng*

(Guangdong Gene Editing Engineering Technology Research Center, Foshan University, Foshan 528000, Guangdong, China)

Abstract: China is the largest pig farming country in the world. Pork plays an important role in the composition of meat products in China and is an important source of animal protein for Chinese people. The content of ω -6 polyunsaturated fatty acids (PUFA) in pork is high, while the content of ω -3 PUFAs is low, which is not conducive to human health. Genetic engineering technology can knock out, insert and replace specific DNA fragments, and has great potential in improving pig production traits. It is of great market value to breed pigs rich in ω -3 PUFAs by genetic engineering technique. In this paper, the reasons for the low content of ω -3 PUFAs in pork are described, and the research progress of using genetic engineering technique to create pigs rich in ω -3 PUFAs is reviewed. This paper lays a foundation for the research and practice of improving the content of pork rich in ω -3 PUFAs.

Key words: pig; pork; polyunsaturated fatty acid; Fat-1; genetic engineering

0 引言

我国是猪肉消费大国, 生猪存栏和猪肉产量稳居世界第一。猪肉是人体维生素、矿物质以及蛋白质等营养物质的重要来源之一, 而猪肉又是我国动物性食品的第一大来源, 与国人的生活息息相关。随着经济水平的日益提升, 国人对猪肉品质的要求

也越来越高, “不仅要吃好, 还要吃得健康”是当今猪肉消费的主旋律。随着技术的革新, 猪新品种培育已经从传统的遗传改良进入到组学时代, 特别是近几年突飞猛进的基因工程技术为培育更高品质猪肉提供了技术基础。本文就富含 ω -3型多不饱和脂肪酸基因工程猪的研究进展进行综述, 以期开展基因工程提升猪肉品质奠定基础。

收稿日期: 2019-03-16 修回日期: 2019-04-22 接受日期: 2019-05-19

作者简介: 魏妍妍(1994-), 女, 硕士生, 研究方向为动物基因编辑与分子设计育种。E-mail: wei_yanyan@126.com

* 通讯联系人: 唐冬生(1962-), 男, 教授, 博士, 研究方向为分子遗传育种。E-mail: tangdsh@163.com

基金项目: 国家科技重大专项(2009ZX08010-023B, 2018ZX08010-08B)、广东省重点领域研发计划(2018B020203003)和佛山市科技创新项目计划(2017AG100111)

引用格式: Wei Y Y, Zhan Q M, Zhu X X, *et al.* Research progress on genetic engineered pigs rich in ω -3 PUFAs [J]. Biotic Resources, 2019, 41(3): 204-209.

魏妍妍, 詹群美, 朱向星, 等. 富含 ω -3型多不饱和脂肪酸基因工程猪研究进展[J]. 生物资源, 2019, 41(3): 204-209.

1 猪肉中 ω -3型多不饱和脂肪酸

1.1 多不饱和脂肪酸分类

不饱和脂肪酸是脂肪酸中的主要成分之一,可分为单不饱和脂肪酸(monounsaturated fatty acids, MUFAs)和多不饱和脂肪酸(polyunsaturated fatty acids, PUFAs)。由于人体不能自主合成PUFAs,只能从食物中摄取后利用,而PUFAs与人体健康密切相关,因此PUFAs也被称为必需脂肪酸。国际上按照首个双键距离甲基末端碳原子的数目,以 ω 编号系统,将PUFAs分为 ω -3 PUFAs, ω -6 PUFAs, 分别表示首个双键距离甲基末端碳原子编号为3和6。 ω -3 PUFAs主要包括 α -亚麻酸(α -linolenic acid, ALA)、二十五碳烯酸(eicosapentaenoic acid, EPA)、二十二碳五烯酸(docosapentaenoic acid, DPA)和二十二碳六烯酸(docosahexaenoic acid, DHA),主要来自海洋鱼类、蔬菜和坚果等^[1]。 ω -6 PUFAs则富含于玉米、谷物和大豆等饲料中。

1.2 ω -3 PUFAs、 ω -6 PUFAs与人体健康的关系

人体不能自主合成PUFAs,需要从食物中摄取。人类日常饮食中 ω -6 PUFAs丰富而 ω -3 PUFAs极少,人体中 ω -6 PUFAs与 ω -3 PUFAs的比例严重失调。例如在西方的饮食中, ω -6 PUFAs和 ω -3 PUFAs的比例可达15:1~16.7:1甚至更高。降低 ω -6 PUFAs与 ω -3 PUFAs的比例会抑制很多的发病机制,包括心血管疾病^[2,3],癌症^[4,5]和炎症^[6]等。例如当 ω -6 PUFAs与 ω -3 PUFAs的比例降低至4:1时,二级心血管疾病死亡率会降低70%。当 ω -6 PUFAs与 ω -3 PUFAs的比例降低至2.5:1时,可使结肠癌患者减少直肠细胞增生。类风湿性关节炎患者的 ω -6 PUFAs与 ω -3 PUFAs的比例为2:1~3:1时可抑制炎症,当 ω -6 PUFAs与 ω -3 PUFAs的比例为5:1时对哮喘患者有益,而当 ω -6 PUFAs与 ω -3 PUFAs的比例为10:1时则不利于哮喘患者的健康^[7]。联合国粮农组织(food and agriculture organization of the United Nations, FAO)建议人类膳食中 ω -6 PUFAs/ ω -3 PUFAs应在5:1~10:1之间。

1.3 猪肉缺乏 ω -3 PUFAs的原因与解决方案

猪肉能够为人体提供所需的蛋白质、矿物质和维生素等营养物质,同时也是国人摄入必需脂肪酸的主要食品来源之一。但猪肉也存在 ω -6 PUFAs多而 ω -3 PUFAs少的情况。王凯强等^[8]研究表明有机猪肉和普通猪肉的 ω -6 PUFAs与 ω -3 PUFAs的比值分别高达13.2和27.9,已经显著高于FAO提

出的健康食品标准。因此,降低猪肉中 ω -6 PUFAs与 ω -3 PUFAs的比值将对人类的健康有益,而开拓富含高 ω -3 PUFAs的猪肉将有很大的市场前景。

猪与人一样不能自主合成PUFAs,只能通过食物摄取。饲料中 ω -3 PUFAs含量低是导致猪肉中 ω -3 PUFAs含量偏低的主要原因。猪饲料原料主要包含玉米、麦麸、鱼粉和豆粕等。富含 ω -6 PUFAs丰富的玉米和豆粕占比大,而富含 ω -3 PUFAs的鱼粉由于价格较高而占比小,导致猪饲料中 ω -3 PUFAs含量低,最终导致猪肉中 ω -3 PUFAs含量偏低。通过调整饲料配比来提高 ω -3 PUFAs含量,能够降低 ω -6 PUFAs与 ω -3 PUFAs的比值,从而改善猪肉品质,但由于涉及饲养成本和科学配方等问题,难以进行大规模推广应用。

反刍动物,如牛和羊,瘤胃中有些微生物由于存在脂肪酸脱氢酶(fatty acid dehydrogenase),能够将 ω -6 PUFAs转化为 ω -3 PUFAs并为动物体吸收,使得牛肉和羊肉含有更为丰富的 ω -3 PUFAs。但猪体内缺乏多不饱和脂肪酸脱氢酶基因,不能编码脂肪酸脱氢酶,无法实现 ω -6 PUFAs向 ω -3 PUFAs的转化。但借助基因工程向猪体内导入具有转化 ω -6 PUFAs为 ω -3 PUFAs活性的脂肪酸脱氢酶基因,将有望获得富含 ω -3 PUFAs的猪肉。

2 *Fat-1* 基因的来源和功能

Fat-1 (fatty acid desaturase-1)基因是一种具有合成 ω -3 PUFAs功能的脂肪酸脱氢酶基因,位于秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*)四号染色上,编码脂肪酸脱氢酶,脂肪酸脱氢酶可将碳链上特定位置的碳碳单键氧化成碳碳双键,形成不饱和脂肪酸或者更高级的多不饱和脂肪酸。此外,*Fat-1*基因还可识别16~20碳的 ω -6 PUFAs,使 ω -6 PUFA碳链甲基端的第三个碳位置的单键催化生成双键合成相应的 ω -3 PUFAs^[9]。自Spychalla等^[10]首次验证*Fat-1*基因可以将 ω -6 PUFAs转化为 ω -3 PUFAs后,引起了科学界的广泛关注。早在2001年,Kang等^[11]利用腺病毒载体介导的转染方法将*Fat-1*基因转染到鼠的心肌细胞中,发现 ω -3 PUFAs含量显著增加, ω -6 PUFAs与 ω -3 PUFAs的比值由15:1下降到为1:1。Ge等^[12]将*Fat-1*基因转到人乳腺细胞系之中,同样发现 ω -6 PUFAs与 ω -3 PUFAs的比值明显下降。这为进一步制备富含 ω -3 PUFAs的基因工程动物奠定了基础,现阶段已经在鼠、牛^[13]、羊和猪等动物中成功表达*Fat-1*基因。

3 基因工程猪应用的基因工程技术

基因工程目前包括转基因技术和基因编辑技术等方法,基因工程已经应用于医药、农业等领域。例如利用基因工程培育新品种改良畜禽生产性状,提高动物抗病性,制作人类疾病模型或进行器官移植等。利用基因工程的方法向猪基因组中导入 *Fat-1* 基因,能提高猪肉中 $\omega-3$ PUFAs,与传统的育种方法相比,基因工程的方法目的性强,大大缩短育种年限。

3.1 转基因技术及应用

转基因技术是将提取的特定生物基因组所需的目的基因或人工合成的指定序列DNA片段转入特定生物中,与其本身的基因组进行重组,再从重组体中进行数代的人工选育,从而获得具有稳定表现特定的遗传性状的个体。美国科学家Jaenisch等^[14]通过病毒SV40制备出世界上首例转基因动物。构建转基因猪的常用方法有:原核注射法(pronuclear microinjection)、体细胞核移植(somatic cell nuclear transfer)^[15]、精子介导法转基因(sperm-mediated gene transfer)^[16]和病毒介导法转基因(virus-mediated gene transfer)等。

原核注射法主要将线性化的DNA经显微操作技术注射到受精卵雄原核中,再进行胚胎移植。Gordon等^[17]用原核注射法制备了转基因小鼠。随后,通过原核注射法制备了转基因牛^[18]。1985年,科学家通过原核注射法将人的生长激素(growth hormone)基因导入猪的受精卵并成功获得世界首例转基因猪^[19]。这种方法可以导入较长的基因组片段,产生的转基因动物可稳定遗传,但也存在产生阳性转基因的几率较低,并且外源基因插入位点及拷贝数不可控等一些不足。精子介导法是根据精子俘获外源DNA的能力,作为载体将外源DNA导入卵中。Lavitrano等^[20]通过精子介导法,将*hDAF*基因与猪的精液共孵育,获得了用于异种移植研究的转基因猪。但是,目前精子介导法对精子质量和操作环境比较高,基因定点插入比较困难。病毒转染是通过病毒载体,将基因有效整合到宿主染色体基因组上。主要包括慢病毒转染和腺病毒转染等方法。其转染效率较高但是操作复杂成本较大^[21]。

体细胞核移植是指将一个物种的体细胞移植到去核卵母细胞中,移入的供体细胞核在受体卵胞质中完成重编程,产生与供体细胞核动物的遗传成份一样动物的技术。1997年,通过细胞核移植技术克隆羊“多莉”诞生,大大推动了转基因猪的研究进

展^[22]。Lai等^[23]将绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)转染至猪胎儿成纤维细胞中,通过细胞核移植的方法获得了转GFP克隆猪。至今,基于体细胞核移植的转基因猪技术已被广泛使用,特别是与基因编辑技术相结合,极大地提高了基因定点修饰的效率,在遗传改良猪肉品质方面取得了重要进展。

3.2 基因编辑技术及应用

基因编辑是近年兴起的精准基因组修饰技术,能够实现对特定DNA片段敲除、插入、替换和改写,高效地实现可遗传的改变。基因编辑技术通过核酸酶的作用,在靶位点切断DNA,使DNA产生双链断裂(double-strand break, DSB),通过同源重组(homologous recombination, HR)和非同源末端链接(nonhomologous end joining, NHEJ)的方式对DNA进行修饰。当产生DSB时,若细胞内存在与裂口两端同源序列,则可通过HR进行敲除或插入;若无同源序列,双链DNA序列则通过NHEJ引起突变。目前基因编辑技术包括锌指核酸酶(zinc-finger nuclease, ZFN)技术^[24]、转录激活因子样效应物核酸酶(transcription activator-like effector nuclease, TAL-EN)^[25]技术和CRISPR/Cas9等^[26]。

ZFN由能够识别并结合特定DNA序列的DNA结合域锌指蛋白和DNA剪切域Fok I核酸内切酶两部分构成^[27]。锌指蛋白可以特异性的结合DNA从而准确确定靶位点。Fok I核酸内切酶是Sugisaki在细菌中发现的一种限制性内切酶^[28],2个Fok I形成二聚体,Fok I在二聚体的条件下有酶切活性,介导DNA定点剪切形成DSB,实现基因编辑^[29]。TALEN是第二代人工核酸酶基因编辑技术,TAL-EN的构造和作用原理与ZFN相似,TALEN技术中,TALE蛋白特异性识别并且结合DNA,具有非特异性切割的仍是Fok I核酸酶。与ZFN技术相比,TALEN能够识别的靶序列的范围更广,基因编辑效率更高^[30]。

第三代基因编辑技术即CRISPR/Cas9系统,由于CRISPR/Cas9比ZFN/TALEN剪切更高效和特异性更好,使其在基因编辑领域掀起了热潮。CRISPR属于细菌的免疫系统,由32~33 bp的非重复间隔序列和一组高度保守的同向重复序列串联而成。CRISPR/Cas有I、II、III三种类型,II型系统是最常用于基因编辑的一种类型。即CRISPR/Cas9基因编辑技术。CRISPR/Cas9系统由具有核酸内切酶性质的Cas9蛋白和特异靶向性的RNA(crRNA)以及反式激活RNA(transactivating

crRNA, tracrRNA)组成^[31]。crRNA和tracrRNA可以通过碱基互补配对原则形成一种新型向导RNA(guide RNA, gRNA)。gRNA长度一般为20 nt。gRNA对靶向目标位于5'-NGG序列进行识别,引导Cas9蛋白对靶序列双向剪切^[32,33]。

利用CRISPR/Cas9已经实现了对于多个物种和细胞系的基因编辑,如通过CRISPR/Cas9对肺炎链球菌和大肠杆菌的基因组引起精确突变^[34]。利用CRISPR/Cas9对小鼠肺癌、结肠癌疾病模型的构建^[35,36]、对牛*IARS*基因突变的正确修复^[37]等多个物种进行基因编辑。也有很多利用该技术来对猪基因编辑进行敲除和敲入。Hai等^[38]通过受精卵显微注射CRISPR/Cas9 mRNA的方法,将猪*VWF*基因敲除,单等位基因的敲除效率高达68%,双等位基因敲除效率达到了37%。通过CRISPR-Cas9敲除猪*MSTN*基因,提高猪肉瘦肉率,产生8个双等位基因突变猪,并且基因敲除率高达21.79%^[39]。Bi等^[40]敲除*MSTN*, Western印迹显示*MSTN*减少约50%。Zheng等^[41]用CRISPR/Cas9基因编辑技术在猪白色脂肪组织重构早在2000万年前丢失的*UCP1*基因,目标基因敲入率为11.5%,使猪脂肪沉积降低,并且提高猪的产热能力。总之,基因编辑技术为遗传改良猪经济性性状提供了强有力的工具。

4 利用基因工程技术培育富含 ω -3 PUFAs猪肉

通过基因工程提高 ω -3 PUFAs含量已经在牛、羊和猪等动物中实现。Wu等^[42]克隆出转*Fat-1*基因奶牛,肌肉组织中 ω -6 PUFAs与 ω -3 PUFAs比值显著降低,并且牛奶中 ω -6 PUFAs与 ω -3 PUFAs的比值也显著降低。Zhang等^[43]手工克隆出转*Fat-1*基因的绵羊,并测定 ω -6 PUFAs与 ω -3 PUFAs在各器官组织中的比值相对于对照组均显著降低。

相比牛和羊,通过基因工程提升猪肉 ω -3 PUFAs含量更为重要。Lai等^[44]克隆出6头转*Fat-1*基因的猪,其 ω -3 PUFAs含量显著提高, ω -6 PUFAs与 ω -3 PUFAs的比值从8.52下降到1.69,而十二碳五烯酸(EPA)和二十二碳五烯酸(DPA)分别增加15倍和4倍。Zhang等^[45]手工克隆出14头*Fat-1*基因猪, ω -6 PUFAs/ ω -3 PUFAs从11.48:1下降到1.16:1。Zhou等^[46]生产出转*Fat-1*基因克隆猪,其F1代比非转基因猪的 ω -6 PUFAs/ ω -3 PUFAs值降低了6.0倍。2018年,通过CRISPR/Cas9基因编辑技术在杜洛克猪基因组上敲入*Fat-1*基因,F1代*Fat-1*基因的表达更为稳定,体内 ω -3 PUFAs水平显著增加, ω -6 PUFAs与 ω -3 PUFAs比例明显下降,从

9.36降至2.12^[47]。这些研究表明转*Fat-1*基因克隆猪不仅富含 ω -3 PUFAs,还能将该表型稳定遗传给后代,从而为大规模推广可提高 ω -3 PUFAs的猪群奠定基础。

5 结 语

生猪养殖和猪肉生产在我国国民经济和人民健康生活中占有重要地位。采用基因工程改良猪肉品质,生产富含 ω -3 PUFAs猪肉具有重要意义。本文阐述了 ω -3 PUFAs对健康的益处和猪肉 ω -3 PUFAs含量少的原因,并就利用基因工程技术培育富含 ω -3 PUFAs猪进行了分析,为提升猪肉 ω -3 PUFAs含量的相关研究与实践奠定基础。

参考文献

- [1] Kaur N, Chugh V, Gupta A K. Essential fatty acids as functional components of foods-a review [J]. J Food Sci Technol, 2014, 51(10): 2289-2303.
 - [2] O'Connell T D, Block R C, Huang S P, et al. ω -3-Polyunsaturated fatty acids for heart failure: effects of dose on efficacy and novel signaling through free fatty acid receptor 4 [J]. Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 2017, (103): 74-92.
 - [3] Yu Z, Huang T, Zheng Y, et al. *PCSK9* variant, long-chain n-3 PUFAs, and risk of nonfatal myocardial infarction in Costa Rican Hispanics [J]. Am J Clin Nutr, 2017, 105(5): 1198-1203.
 - [4] Gu Z N, Wu J S, Wang S H, et al. Polyunsaturated fatty acids affect the localization and signaling of *PIP₃/AKT* in prostate cancer cells [J]. Carcinogenesis, 2013, 34(9): 1968-1975.
 - [5] Lee S, Lee J, Choi I J, et al. Dietary n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids, the *FADS* gene, and the risk of gastric cancer in a Korean population [J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 3823.
 - [6] Schwager J, Richard N, Riegger C, et al. ω -3 PUFAs and resveratrol differently modulate acute and chronic inflammatory processes [J]. BioMed Research International, 2015, (2015): 1-11.
 - [7] Simopoulos A P, Cleland L G, Christiansen E N. Omega-6/omega-3 essential fatty acid ratio: the scientific evidence [J]. Scandinavian Journal of Nutrition, 2004, 48(1): 49-50.
 - [8] Wang K Q, Zhu D, Pang X M, et al. Research on traceability identification for organic pork based on fatty acid differences [J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2014, 41(21): 106-110.
- 王凯强, 朱丹, 逢秀梅, 等. 基于脂肪酸差异的有机猪

- 肉溯源识别研究[J]. 广东农业科学, 2014, 41(21): 106-110.
- [9] Watts J L. Using *Caenorhabditis elegans* to uncover conserved functions of omega-3 and omega-6 fatty acids [J]. J Clin Med, 2016, 5(2): E19.
- [10] Spychalla J P, Kinney A J, Browse J. Identification of an animal -3 fatty acid desaturase by heterologous expression in *Arabidopsis* [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1997, 94(4): 1142-1147.
- [11] Kang Z B, Ge Y, Chen Z, *et al.* Adenoviral gene transfer of *Caenorhabditis elegans* n-3 fatty acid desaturase optimizes fatty acid composition in mammalian cells [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98(7): 4050-4054.
- [12] Ge Y L, Chen Z H, Kang Z B, *et al.* Effects of adenoviral gene transfer of *C. elegans* n-3 fatty acid desaturase on the lipid profile and growth of human breast cancer cells [J]. Anticancer Res, 2002, 22(2A): 537-543.
- [13] Liu X F, Wei Z Y, Bai C L, *et al.* Insights into the function of n-3 PUFAs in *fat-1* transgenic cattle [J]. J Lipid Res, 2017, 58(8): 1524-1535.
- [14] Jaenisch R, Mintz B. Simian virus 40 DNA sequences in DNA of healthy adult mice derived from preimplantation blastocysts injected with viral DNA [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1974, 71(4): 1250-1254.
- [15] Zhu X X, Quan S N, Huang Y, *et al.* The application of somatic cell nuclear transfer technology on porcine genetic modification [J]. Genomics and Applied Biology, 2013, 32(6): 692-699.
- 朱向星, 全守能, 黄勇, 等. 体细胞核移植技术在猪基因修饰中的应用[J]. 基因组学与应用生物学, 2013, 32(6): 692-699.
- [16] Hao S L, Yan A F, Jiang H, *et al.* Sperm-mediated anti-freeze protein gene transfer in tiapia [J]. Transgenic Res, 2014, 23(5): 857.
- [17] Gordon K, Ruddle F H. Gene transfer into mouse embryos [M]. Manipulation of Mammalian Development. Springer US, 1986, 4: 1-36.
- [18] Meevoy T G, Sreenan J M. The efficiency of production, centrifugation, microinjection and transfer of one- and two-cell bovine ova in a gene transfer program [J]. Theriogenology, 1990, 33(4): 819-828.
- [19] Hammer R E, Pursel V G, Rexroad C E, *et al.* Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection [J]. Nature, 1985, 315(6021): 680-683.
- [20] Lavitrano M, Bacci M L, Forni M, *et al.* Efficient production by sperm-mediated gene transfer of human decay accelerating factor (*hDAF*) transgenic pigs for xenotransplantation [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99(22): 14230-14235.
- [21] Jakobsen J E, Li J, Kragh P M, *et al.* Pig transgenesis by sleeping beauty DNA transposition [J]. Transgenic Res, 2011, 20(3): 533-545.
- [22] Schnieke A E, Kind A J, Ritchie W A, *et al.* Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts [J]. Science, 1997, 278(5346): 2130-2133.
- [23] Lai L X, Park K W, Cheong H T, *et al.* Transgenic pig expressing the enhanced green fluorescent protein produced by nuclear transfer using colchicine-treated fibroblasts as donor cells [J]. Mol Reprod Dev, 2002, 62(3): 300-306.
- [24] Tang D S, Jiang H, Liu F, *et al.* Multi-locus, high efficiency gene targeting mediated by zinc finger nucleases [J]. Chinese Science Bulletin, 2012, 57(9): 711-719.
- 唐冬生, 蒋泓, 刘芳, 等. 锌指核酸酶介导的高效多位点基因打靶[J]. 科学通报, 2012, 57(9): 711-719.
- [25] Luo T T, Yan A F, Liu L, *et al.* *In vitro* study of joint intervention of E-cad and Bmi- I mediated by transcription activator-like effector nuclease in nasopharyngeal carcinoma [J]. Journal of Central South University(Medical Science), 2018, 43(3): 229-239.
- 罗婷婷, 严爱芬, 刘连, 等. 类转录激活因子效应物核酸酶介导的E-cad和Bmi- I 基因联合干预鼻咽癌的体外研究[J]. 中南大学学报(医学版), 2018, 43(3): 229-239.
- [26] 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.
- [27] Maeder M L, Thibodeau-Beganny S, Osiaik A, *et al.* Rapid "open-source" engineering of customized zinc-finger nucleases for highly efficient gene modification [J]. Mol Cell, 2008, 31(2): 294-301.
- [28] Sugisaki H, Kanazawa S. New restriction endonucleases from *Flavobacterium okeanoikoites* (*FokI*) and *Micrococcus luteus* (*MluI*) [J]. Gene, 1981, 16(1/2/3): 73-78.
- [29] Zhang Y, Jiang H, Liu F, *et al.* Electronic design and simulation of specific zinc finger protein [C]. IEEE Press, 2011, 216-220.
- [30] Liu W X, Yan A F, Liu F, *et al.* Artificial construction and identification of transcription activator-like effector nucleases and multi-loci gene targeting vector [J]. Chinese Journal of Biomedical Engineering, 2015, 21(5): 400-406.
- 刘婉霞, 严爱芬, 刘芳, 等. 人工转录激活子样效应因子核酸酶与多位点基因打靶载体的构建与鉴定[J]. 中华生物医学工程杂志, 2015, 21(5): 400-406.
- [31] Hsu P D, Lander E S, Zhang F. Development and ap-

- plications of CRISPR-Cas9 for genome engineering [J]. Cell, 2014, 157(6): 1262-1278.
- [32] Horvath P, Barrangou R. CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea [J]. Science, 2010, 327(5962): 167-170.
- [33] Wang H Y, Yang H, Shivalila C S, *et al.* One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas - mediated genome engineering [J]. Cell, 2013, 153(4): 910-918.
- [34] Jiang W Y, Bikard D, Cox D, *et al.* RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems [J]. Nat Biotechnol, 2013, 31(3): 233-239.
- [35] Platt R J, Chen S D, Zhou Y, *et al.* CRISPR-Cas9 knockin mice for genome editing and cancer modeling [J]. Cell, 2014, 159(2): 440-455.
- [36] Roper J, Tammela T, Akkad A, *et al.* Colonoscopy-based colorectal cancer modeling in mice with CRISPR-Cas9 genome editing and organoid transplantation [J]. Nat Protoc, 2018, 13(2): 217-234.
- [37] Ikeda M, Matsuyama S, Akagi S, *et al.* Publisher correction: correction of a disease mutation using CRISPR/Cas9-assisted genome editing in Japanese black cattle [J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 1470.
- [38] 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.
- [39] Wang K K, Ouyang H S, Xie Z C, *et al.* Efficient generation of myostatin mutations in pigs using the CRISPR/Cas9 system [J]. Sci Rep, 2015, (5): 16623.
- [40] Bi Y Z, Hua Z D, Liu X M, *et al.* Isozygous and selectable marker-free *MSTN* knockout cloned pigs generated by the combined use of CRISPR/Cas9 and Cre/LoxP [J]. Sci Rep, 2016, (6): 31729.
- [41] Zheng Q T, Lin J, Huang J 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): E9474-E9482.
- [42] Wu X, Ouyang H S, Duan B, *et al.* Production of cloned transgenic cow expressing omega-3 fatty acids [J]. Transgenic Res, 2012, 21(3): 537-543.
- [43] Zhang P, Liu P, Dou H W, *et al.* Handmade cloned transgenic sheep rich in omega-3 fatty acids [J]. PLoS One, 2013, 8(2): e55941.
- [44] Lai L X, Kang J X, Li R F, *et al.* Generation of cloned transgenic pigs rich in omega-3 fatty acids [J]. Nat Biotechnol, 2006, 24(4): 435-436.
- [45] Zhang P, Zhang Y D, Dou H W, *et al.* Handmade cloned transgenic piglets expressing the nematode *fat-1* gene [J]. Cell Reprogram, 2012, 14(3): 258-266.
- [46] Zhou Y R, Lin Y L, Wu X J, *et al.* The high-level accumulation of n-3 polyunsaturated fatty acids in transgenic pigs harboring the n-3 fatty acid desaturase gene from *Caenorhabditis briggsae* [J]. Transgenic Res, 2014, 23(1): 89-97.
- [47] Li M J, Ouyang H S, Yuan H M, *et al.* Site-specific *fat-1* knock-in enables significant decrease of n-6PUFAs/n-3PUFAs ratio in pigs [J]. G3 (Bethesda), 2018, 8(5): 1747-1754.

□