

基因修饰技术及其在动物育种和生物医药领域的应用

闫艳霞^{1,2}, 李紫聪^{1,2}, 董亚铮^{1,2}, 李政^{1,2}, 黄思秀^{1,2}✉

(1. 华南农业大学动物科学学院, 广州 510642; 2. 国家生猪种业工程技术研究中心, 广州 510642)

摘要: 基因修饰技术是一种能精确改造生物基因组, 实现外源基因定点整合和基因定点敲除的技术。早期的基因修饰形式主要是转基因, 随着科学研究的不断深入, 新型基因修饰方法也逐渐研发出来, 包括敲除、敲入、定点突变等。根据研究或应用的目的, 可以将基因修饰技术分为转基因和基因敲除两方面内容。近年来, 随着现代分子技术的高速发展, 基因修饰技术不断改进创新, 其相关方法和技术已逐步应用于改良家畜性状、研究基因功能、制作动物生物反应器以及构建人类疾病动物模型等领域中, 使得畜禽基因功能的研究和转基因育种更加高效, 在动物遗传育种以及生物医药等领域取得了显著成就, 弥补了传统转基因技术的随机整合、遗传不稳定等缺陷, 具有广阔的发展前景。作者从动物转基因和基因敲除技术两方面阐述了基因修饰技术的发展现状及发展趋势, 并简要概括了基因修饰技术在动物育种和生物医药领域的应用现状。

关键词: 基因修饰; 转基因技术; 基因敲除技术

中图分类号: S813.3

文献标识码: A

Doi: 10.16431/j.cnki.1671-7236.2024.02.022

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Gene Modification Technology and Its Application in Animal Breeding and Biomedicine

YAN Yanxia^{1,2}, LI Zicong^{1,2}, DONG Yazheng^{1,2}, LI Zheng^{1,2}, HUANG Sixiu^{1,2}✉

(1. College of Animal Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;

2. National Engineering Research Center for Breeding Swine Industry, Guangzhou 510642, China)

Abstract: Gene modification is a technology that can be used to achieve site-specific integration of exogenous and knockout of endogenous genes. The early form of gene modification was mainly transgene. With the deepening of scientific research, new gene modification methods were gradually developed, such as knockout, knock in, site-specific mutation, etc. According to the purpose of research or application, gene modification technology can be divided into transgenic and gene knockout. In recent years, with the rapid development of modern molecular technology, gene modification technology has been continuously improved and innovated, and its related methods and technologies have been gradually applied in the fields of improving livestock traits, studying gene function, making animal bioreactors and constructing animal models of human diseases, making the research of gene function and transgenic breeding of livestock and poultry more efficient. Remarkable achievements have been made in the fields of animal genetic breeding and biomedicine, which have made up for the defects of random integration and genetic instability of traditional transgenic technology, and have broad prospects for development. In this paper, the development status and trend of gene modification technology were described from the aspects of animal transgenic and gene knockout technologies, and the application status of gene modification

收稿日期: 2023-09-25

基金项目: 广东省乡村振兴战略专项“广东省畜禽地方品种保护与开发利用提升工程”

联系方式: 闫艳霞, E-mail: 2393662931@qq.com. 通信作者黄思秀, E-mail: sxhuang815@scau.edu.cn

technology in the field of animal breeding and biomedicine was briefly summarized.

Key words: gene modification; transgenic technology; gene knockout technology

基因修饰是指在宿主细胞内插入一段目的基因或者从其基因组中删除某段特定基因,使得原有基因型得到加强或改变,主要包括转基因和基因敲除两大方面内容。与传统的育种技术相比,转基因技术能突破物种界限、打破生殖隔离、定向选育高产高效的动物新品种,在品种改良、构建动物模型以及生产药物蛋白等方面凸显了广阔的应用前景。随后发展起来的基因敲除技术进一步完善了基因修饰技术,尤其是近年新兴的锌指核酸酶(zinc finger nucleases, ZFNs)、转录激活子样效应因子核酸酶(transcription activator-like effector nucleases, TALENs)以及规律成簇的间隔短回文重复序列及相关蛋白 9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated protein 9, CRISPR/Cas9)成为家畜改良的有力工具。已有研究报道通过转基因和基因敲除等技术对基因组进行修饰能够改变动物的生产性能,在猪、牛和羊等家畜育种中的应用较为广泛,尤其是在改良农畜性状、提高畜禽抗病能力以及改善畜产品品质等方面获得了突破性进展。作者从转基因和基因敲除技术的发展入手,对近年来基因修饰在动物育种以及生物医药领域的应用现状进行综述。

1 转基因技术

转基因属于早期的动物基因修饰,其是把一个外源基因导入到宿主动物细胞中,使染色体基因组整合外源基因,让其表达并改变宿主动物的性状。1974年,Jaenisch等^[1]通过显微操作技术将猿病毒40(Simian virus 40, SV40)注射到小鼠囊胚胚胎腔中,将其移植到假孕代孕母体子宫内,世界上首例转基因小鼠由此诞生。1982年,Palmiter等^[2]向小鼠受精卵原核中显微注射含有小鼠金属硫蛋白-I基因启动子的DNA片段,将重组胚移植到受孕母鼠内,获得了生长迅速的转基因“超级鼠”。此后转基因技术不断发展,尤其是从外源基因的随机整合发展到定位整合,取得了突飞猛进的成就。

1.1 基因的随机整合技术

1.1.1 原核期胚胎显微注射法 原核显微注射技术是利用显微操作仪把DNA载体注射到受精卵的细胞核中,使DNA载体随机地整合至染色体中,再将其移植到代孕雌性动物生殖道内,其分娩后对新生动物基因筛选鉴定后即获得基因修饰动物。

1980年,Gordon等^[3]将由单纯疱疹病毒和SV40病毒DNA片段组成的重组质粒显微注射到受精小鼠卵母细胞原核中,再将胚胎植入假孕母体的输卵管中发育至足月,最终获得转基因小鼠,首次建立了显微注射法。显微注射法是由显微注射和胚胎移植技术相结合来制备基因修饰动物,最常用于制作转基因小鼠。猪受精卵含有大量的脂肪颗粒导致很难找到其雄原核,通常需要对其进行离心后才能看到原核,在技术上有一定的局限性。但胞浆的空间比原核空间大很多,在操作上与原核显微注射相比,胞浆注射较简单。这种方法的优点是试验周期短、外源基因的转移率较高、转入的DNA片段大小不受限制。不足之处是操作技术复杂、成本高、不能定点整合,且插入拷贝数随机、整合效率低,通常只有1%。

1.1.2 胞浆单精子注射法 胞浆单精子注射法(intra cytoplasmic sperm injection, ICSI)是向处于成熟分裂II期的卵母细胞的胞浆内显微注射单个精子使其受精,再将体外培养获得的早期胚胎移植到母体子宫使其发育为动物个体,即获得转基因动物。1999年,Perry等^[4]将破膜处理后的精子与外源基因共同孵育1min后将其显微注射到小鼠卵母细胞质中,结果显示后代有20%为阳性小鼠,此研究证实胞浆单精子注射法是一种有效的转基因手段。相比于原核显微注射法,胞浆单精子注射法不会造成卵子阻滞,精子与卵细胞的自然融合可避免人为机械操作造成的原核损伤,另外体外胚胎发育的状况良好,转基因效率更高。缺点是整合不稳定,方法体系不完善,但仍具有广泛的发展前景。

1.1.3 慢病毒载体法 近40年来,原核显微注射一直是生产转基因小鼠的首选方法,但哺乳动物通过这种方法获得转基因动物的成功率极低,而利用慢病毒载体能够将外源基因高效整合到基因组DNA中,故慢病毒感染成为生产转基因动物的一种重要工具。Lois等^[5]用重组慢病毒载体体外感染小鼠胚胎,获得了普遍表达启动子驱动的绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)基因的转基因小鼠和高水平表达GFP的转基因大鼠。Hofmann等^[6]通过携带活性启动子的慢病毒载体将基因转移到猪胚胎,首次利用慢病毒载体法在哺乳动物上取得成功,获得了GFP转基因猪。Sasaki等^[7]将含有增强型GFP转基因的慢病毒载体注射

到囊胚的胚泡中,成功获得了带有增强型 GFP 转基因猕猴,在国际上引起了巨大轰动。2019 年,靳泽华等^[8]利用表达鸡 *navs* 基因 sgRNA 的慢病毒介导的 CRISPR/Cas9 技术进行编辑鸡 DF1 细胞系基因组,结果表明基于慢病毒系统的 CRISPR/Cas9 技术可用于鸡基因组的编辑。此方法的优点是操作简单、整合率高、单拷贝定点整合、宿主范围广,缺点是携带的外源基因长度有限制、外源基因的表达可能会受到干扰导致低表达,同时可能会激活原癌基因或有害基因,存在安全隐患。

1.2 基因的定位整合技术

1.2.1 基因打靶技术 基因打靶是指通过目的基因定点进行同源重组,使基因组中的某一特定基因发生改变,进而通过生物活体来研究此基因的功能。2007 年,研究人员通过基因打靶胚胎干细胞培育了基因打靶小鼠,为基因打靶技术奠定了基础^[9]。基因打靶技术的优点是能够较精确地整合位点并且具有较高的表达水平,但该技术的基因打靶效率太低、容易发生二次同源重组、敲除某些基因,从而对动物造成不良影响,甚至死亡等。

1.2.2 胚胎干细胞途径的定位整合技术 胚胎干细胞途径的定位整合技术是从处于胚泡期的胚胎细胞群中分离胚胎干细胞,把 DNA 载体转染到胚胎干细胞中,筛选实现基因修饰的胚胎干细胞并将其注入囊胚腔中,将注射后的囊胚移植到代孕雌性动物生殖道,将得到部分组织发生基因修饰的嵌合体动物,需要再繁殖一代才能筛选到全身组织发生基因修饰的动物。Thomas 等^[10]首先对小鼠胚胎干细胞进行定点诱变,然后将该打靶 ES 细胞导入小鼠的囊胚中并移植到代孕母鼠子宫内,获得嵌合体仔鼠,再相互交配得到纯合小鼠。此方式需要建立胚胎干细胞系,并掌握囊胚注射和胚胎移植技术。该方法最大的特点就是能够实现定向变异与育种,但胚胎干细胞系的构建和培养技术还不够成熟,而且试验周期较长。

1.2.3 体细胞核移植途径的定位整合技术 体细胞核移植技术也称为动物克隆技术,其过程是把 DNA 载体转染到培养好的体细胞中,通过一定方法将实现基因修饰的体细胞筛选出来,再通过体细胞核移植结合胚胎移植获得全身组织发生基因修饰的动物。1997 年,第一个体细胞克隆动物—绵羊多莉(Dolly)诞生,它是通过向去核的卵母细胞中显微注射绵羊的乳腺上皮细胞,再将重组胚胎移植到代孕动物体内,成功获得了克隆羊^[11]。此技术需要掌握体细胞核移植与胚胎移植技术。体细胞核移植技术

具有高效性、不需选配、能够实现大片段基因的转移等优势。但体细胞转染外源基因的效率较低,细胞筛选具有一定的难度,移植后代的存活率低、恢复全能性困难、细胞培养的代数有限等。

1.2.4 转座子介导的基因定位整合技术 转座子技术通常用于低等生物的遗传操作,是转基因动物功能研究的一种重要手段。相比之下,由于缺乏有效的转座子系统,转座子在小鼠和其他脊椎动物中的使用仍然有限。Ding 等^[12]通过研究卷心菜环蛾中携带多个基因的 PiggyBac 转座子在哺乳动物小鼠转座子系统转座能力,结果发现其能够进行高效转座,并获得了带有荧光的转基因小鼠。转座子介导的基因定位整合技术具有整合效率高、承载容量大、整合位点易确定等特点,但其会诱导剪切和插入的位点发生突变,结果存在不稳定性,另外还存在与内源跳跃基因相互作用的可能性^[13]。

2 基因敲除技术

基因敲除主要用于研究基因功能和实现基因精确缺失^[14],其是通过基因同源重组原理定点修饰改造基因组,并使修饰和改造后的遗传信息经生殖系遗传,改变宿主性状^[15]。通过同源重组载体介导实现内源靶基因敲除一般效率很低,随着基因修饰技术的发展,除了同源重组外,新的原理和技术也逐渐被应用,目前一般利用同源重组载体结合 ZFNs、TALENs 或 CRISPR/Cas9 表达载体在内源靶基因中高效定点插入筛选标记基因,实现高效的基因敲除。如果目的只是敲除(灭活)靶基因,而不需要在靶基因中定点插入筛选标记基因,单纯用 ZFNs、TALENs 或 CRISPR/Cas9 表达载体介导也能够实现高效的基因敲除,其过程是切割靶基因,让其进行非同源末端连接修复,修复后将会在靶基因的切割位置产生约几个碱基的突变,从而让靶基因的氨基酸序列改变,达到敲除或灭活靶基因的目的^[16-18]。

2.1 人工核酸内切酶载体介导整合

2.1.1 ZFNs 介导的基因敲除 ZFNs 技术是近年来发展起来的新型基因编辑技术之一,ZFNs 是由锌指蛋白和 *Fok I* 内切酶两部分组成。在存在适当设计的供体 DNA 的情况下,ZFNs 诱导靶位点和供体 DNA 之间的同源重组。在没有供体 DNA 的情况下,ZFNs 介导的切割使非同源末端连接进而破坏基因位点。由 ZFNs 介导的动物靶向遗传修饰最早是在果蝇^[19]和斑马鱼^[20]中得到证实。2009 年,Geurts^[21]等利用 ZFNs 敲除了 1 个外源基因绿色荧

光蛋白和 2 个内源性基因免疫球蛋白 M 和 Ras 相关的 GTP 结合蛋白(Rab38),首次成功构建了基因打靶大鼠并证实了 ZFNs 的高效性。2015 年,梁浩^[22]利用构建的一对识别位点和切割位点位于小鼠 *MSTN* 基因第 1 外显子区域的 ZFNs 定点敲除小鼠 *MSTN* 基因,成功获得了基因纯合突变的小鼠。ZFNs 方法很难找到完全匹配的三连子锌指,并且其脱靶效率极高,故没有被广泛应用。

2.1.2 TALENs 介导的基因敲除 TALENs 靶向基因敲除技术为分子生物学研究提供了一种全新的手段,实现了基因组的定点突变。其在 2012 年被《Science》评选为年度十大科学突破的新技术之一,已被广泛运用于各种生物的基因组编辑。TALENs 介导的基因敲除首先利用其特异性较强的 TALE 结构识别并定位至靶位点,再通过发挥内切酶活性在左、右靶位点的中间区域切断 DNA 双链,从而诱发 DNA 损伤修复机制,成功敲除或敲入靶基因^[23]。2011 年,Miller 等^[24]利用 TALENs 特异性敲除了人内源性 *NTF3* 和 *CCR5* 基因,表明其可以有效地应用于内源基因的调控和修饰。2017 年,Chen 等^[25]利用定点突变将一对编码 TALEN 的 mRNA 注入 SD 大鼠的受精卵,获得了瘦素受体敲除的肥胖 SD 大鼠。TALENs 实现了对任意基因序列的修饰,与 ZFNs 技术相比,TALENs 技术成功率高、适用范围广、效率也更高,但其不足是 TALENs 分子比 ZFNs 大很多,制备 1 个蛋白质分子比较麻烦,不能有效导入细胞,易引起机体免疫反应等。

2.1.3 CRISPR/Cas9 介导的基因敲除 CRISPR/Cas9 系统是通过 II 型 CRISPR/Cas 免疫系统依赖 Cas9 DNA 切割酶和目标序列互补的向导

RNA 定点切割外源 DNA,进而识别和降解外源 DNA。CRISPR/Cas9 系统是一种新型的基因修饰技术,可用于治疗人类免疫缺陷病毒(Human immunodeficiency virus, HIV)等免疫疾病。2013 年,Cong 等^[26]设计了 2 种不同的 II 型 CRISPR/Cas 系统,并指出 Cas9 核酸酶能够由短 RNA 指导来精确切割小鼠和人类细胞中的内源性基因组位点。CRISPR/Cas9 系统能够精确修饰多个基因组,而且近年来得到了飞速发展并逐渐偏向于实践应用,如 Khalili 等^[27]利用 CRISPR/Cas9 系统清除人 T 细胞基因组中的 I 型 HIV(HIV-1)。2017 年,呼锐^[28]利用 CRISPR/Cas9 基因修饰工具将 Cas9 mRNA 和 sgRNA 注入原核,成功获得了具有长毛性状的 *FGF5* 基因敲除羊。2018 年,研究人员利用体细胞核移植结合 CRISPR/Cas9 系统成功生产出 1 头 *CD163* 基因敲除猪^[29]。2022 年,Widjaya 等^[30]提出通过双敲除和敲除-敲入对应靶基因来提高干细胞移植中用于 HIV 治疗的 CRISPR 编辑效率,促进了 CRISPR 编辑的干细胞移植对 HIV 相关基因修饰的未来发展。CRISPR/Cas9 系统操作简便,适用于多种生物体,并能够同时对多个靶基因序列或单碱基进行定点编辑。

近年来发展起来的 ZFNs、TALENs 及 CRISPR/Cas9 基因组编辑三大工具,能够实现基因组的精确修饰,为高效率基因打靶开辟了一条崭新的道路。ZFNs、TALENs 及 CRISPR/Cas9 介导的基因敲除技术被广泛应用,其优缺点也逐渐凸显(表 1)。此外,还有一种特殊的基因修饰技术——条件性敲除或组织特异性敲除,这种技术目前应用也较多,该技术一般利用 Cre-loxP 系统介导实现^[17,31]。

表 1 ZFNs、TALENs 及 CRISPR/Cas9 优缺点

Table 1 Advantages and disadvantages of ZFNs, TALENs and CRISPR/Cas9

基因修饰技术 Gene modification technology	优点 Advantages	缺点 Disadvantages
ZFNs	靶向传递基因的效率 高; 靶向结合效率高	组装困难、耗时耗力; 核酸酶设计成功率低; 可能有较高的脱靶率; 不适合高通量靶向目的基因
TALENs	成本低、细胞毒性较小; 特异性高,容易设计; 靶向结合效率高; 核酸酶设计成功率较高	靶向传递效率低; 重复序列可能造成非特异性剪切; 通量低
CRISPR/Cas9	编辑效率更高; 操作简单,成本低; 通量上无限制	脱靶效率较高; 同源重组效率低

2.2 同源重组结合人工核酸内切酶载体介导整合

通过同源重组使靶向基因失活能够为研究基因功能提供理论信息,但自然状态下细胞染色体与供体 DNA 发生同源重组效率非常低(约为 1×10^{-6}),费时费力,以及潜在不良的诱变效应,限制了该技术的使用。人工核酸内切酶是定向修饰基因组的重要工具,其通过诱导靶向 DNA 双链断裂诱发细胞 DNA 修复机制,从而实现精确高效的遗传修饰^[32]。1986 年,Thomas 等^[33]通过同源重组结合基因打靶技术,成功向缺失新霉素抗药基因的细胞中导入抗药基因。2008 年,Doyon 等^[34]设计了针对斑马鱼金色和无尾/短尾基因的 ZFNs,将编码 ZFNs 的 mRNA 注射到单细胞胚胎中,在斑马鱼中成功实现了基因的定点突变。同源重组结合人工核酸内切酶载体介导整合大大提高了基因定点整合的效率,为动物模型的建立与基因组功能的研究提供了强大动力。

3 基因修饰技术的应用

3.1 动物遗传育种领域

3.1.1 改良畜禽性状 提高畜禽生长性状和产品品质是畜牧学研究的重大课题,研究者们长期致力于研发具有优良性状的新品种。传统品种改良主要是利用杂交育种筛选优良性状,需要消耗大量的人力物力和时间,而利用基因修饰技术大大提高了改良效率。Golovan 等^[35]利用基因修饰技术构建了唾液腺表达大肠杆菌源植酸酶的基因修饰猪模型,此成果大大降低了猪饲料中无机磷和植酸酶的添加量,降低了成本,同时降低了猪排泄物中的磷含量,猪肉生产更环保。Crispo 等^[36]利用 CRISPR/Cas9 系统将绵羊基因组中的肌肉生长抑制素 *Myostatin* 基因敲除,通过显微注射获得了肌肉生长抑制素敲除羊,结果表明缺失 *Myostatin* 基因的绵羊体重比野生型绵羊更高。

3.1.2 提高畜禽抗病能力 传染病的暴发对养鸡业影响巨大,而通过转基因技术在鸡基因组中转入对这类疾病具有抵抗力的基因,使这些基因不能侵染鸡,从而培育出抗病鸡,能够一定程度上减少经济损失。2023 年,“多莉”实验室利用基因编辑技术修改了鸡生殖细胞中产生蛋白质的基因,培育出了能够抵抗禽流感的鸡^[37]。利用 CRISPR/Cas9 基因修饰工具可以精准地编辑猪基因组中的抗病基因,增强猪对某些病原微生物的抵抗能力,Whitworth 等^[38]利用 CRISPR/Cas9 基因修工具敲除猪基因组

中的 *CD163* 基因,使其不受猪繁殖和呼吸综合征病毒的感染,从而增强了猪抗病能力。Gao 等^[39]利用 CRISPR/Cas9 基因修饰系统在牛基因组中插入 *NRAMP1* 基因,证明其可以提高牛对结核病的抵抗力。

3.1.3 改善畜产品品质 通过转基因技术能够使奶牛分泌具有不同特性的牛奶,从而满足大众对不同奶质的需求。2002 年,Ravensbergen 等^[40]将牛的 α_{s1} 酪蛋白启动子与 6.2 kb 的人乳铁蛋白基因组片段结合作为转基因载体,经显微注射获得了人乳铁蛋白含量较高的转基因牛,实现了“人源化牛奶”的规模化生产,广泛应用在开发新型婴幼儿配方奶粉、功能食品和药物等领域,并且此种奶牛还具有抗乳房炎等特性,为奶牛培育新品种提供了良好材料。基因修饰技术也广泛应用于其他肉类动物的生产中,Zheng 等^[41]应用 CRISPR/Cas9 系统在猪内源性 *UCP1* 基因位点定点插入外源小鼠 *UCP1* 基因,成功获得了转基因编辑猪,其瘦肉率得到显著提高;Park 等^[42]通过 CRISPR/Cas9 基因修饰工具定向编辑鸡基因组从而生产脂肪含量低的基因修饰鸡。

3.1.4 研究基因功能 随着 DNA 测序技术的不断发展,已经有许多物种完成了全基因组测序。目前生物学研究的一个重要课题就是探究基因的功能,而基因修饰技术可以特异性识别靶向序列,定点修饰靶向基因,所以通过其来鉴定重要基因的功能越来越重要。2015 年,Hu 等^[43]通过 TALENs 技术敲除人乳头瘤病毒(Human papilloma virus, HPV)阳性细胞系中的 *E6* 和 *E7* 原癌基因,能够抑制 HPV 阳性细胞增长并降低其致癌作用。作为一种高通量遗传筛选工具,CRISPR/Cas9 已被用于分析癌症相关基因功能以及生物学途径^[44]。2023 年,Santinha 等^[45]建立了一种腺相关病毒介导体内单细胞 CRISPR 筛选的转录连锁分析方法(AAV-Perturb-Seq),以高通量方式研究复杂组织中基因型和表型的关系,有助于更好地理解生物学和疾病机制的因果关系,以确定干预和治疗疾病的治疗靶点。此方法被广泛应用于体内基因组学研究,如最新研究表明使用 CRISPR 研究基因功能有助于理解 22q11.2 缺失综合征^[46]。

3.2 生物医药领域

3.2.1 基因治疗 随着基因组学的飞速发展,具有靶向特异性、高精确性等优势的新型基因修饰成为了基因治疗领域的强大工具,并广泛应用于遗传

性疾病治疗、传染性疾病治疗和癌症治疗等领域。Perez 等^[47]通过定点敲除 CD4⁺ T 细胞 CCR5 基因获得了 HIV 抗性基因型细胞,抑制了 HIV 的繁殖与传播,达到了基因治疗的目的。Mussolino 等^[48]利用 TALENs 和 ZFNs 技术成功定点敲除了 HEK293 细胞的 CCR5 及 CCR2 基因位点中 19 bp 的靶序列,结果显示 45% 转染细胞均实现了基因编辑。Niu 等^[49]将 Cas9 的 mRNA 和 sgRNA 共同注射到单细胞阶段胚胎中,成功在食蟹猴中实现了精确的基因靶向,这对人类遗传性疾病的基因治疗具有里程碑式的意义。利用 CRISPR/Cas9 基因修饰系统能够编辑干细胞和免疫应答细胞中的基因。如在癌症免疫治疗中,通过 CRISPR/Cas9 系统靶向敲除程序性死亡受体-1,然后将工程细胞移植回体内,能够显著提高其对癌细胞的细胞毒性^[50],该技术对肝癌、肺癌和前列腺癌的临床试验正在进行中,有望取得更大突破。Koo 等^[51]通过腺病毒共同递送编码 Cas9 蛋白和表皮生长因子受体(EGFR)突变特异性 sgRNA 的质粒,结果抑制了异种移植小鼠肿瘤的生长。除了目前研究较多的抗癌领域,CRISPR/Cas9 系统在与遗传性疾病相关的各种疾病(如 β 地中海贫血、酪氨酸血症)的治疗发展中也显示出巨大的潜力^[52-53]。基因组定点修饰技术在治疗遗传性疾病方面有很大的应用价值,如果能够针对人工核酸内切酶所引起的不良反应设定安全的检测方法、使细胞毒性降低,则将会不断扩大基因治疗的应用范围。

3.2.2 生产动物生物反应器 动物生物反应器的研制为生产药物蛋白开拓了新局面,并且目前已有从动物生物反应器中成功表达外源活性蛋白的报道。2015 年,曾有学者利用 CRISPR/Cas9 基因修饰工具对猪受精卵的基因组(产生猪白蛋白的基因区域)进行了基因编辑,敲入人类生产白蛋白的等位基因,所产仔猪均带有预期敲入的基因,并且能在其血液中检测到人白蛋白^[54]。利用唾液腺生物反应器而获得表达人基因治疗蛋白方面的研究也取得了很大进展。2017 年,Zeng 等^[55]构建出了唾液腺特异表达人神经生长因子(hNGF)的转基因小鼠,从而能够利用该转基因小鼠的唾液腺作为生物反应器从转基因小鼠的唾液中制备出 hNGF 蛋白。2022 年,Zeng 等^[56]成功制备了转人神经生长因子基因猪,首次利用转基因猪的唾液腺作为生物反应器,高效合成人神经生长因子。与小鼠等生物反应器相比,近年开发和应用的猪唾液腺生物反应器中存在

的蛋白表达总量较多、活性较高,为推动重组药物蛋白的生产和应用作出了重要贡献。

3.2.3 建立人类疾病的动物模型 动物疾病模型的构建对于疾病发生机制的研究以及疾病的防治等具有极其重要的意义,另外,在药物开发、器官移植等方面也发挥着重要作用。由于临床上对动物模型的需求日益增加,因此,利用基因修饰技术构建动物模型已成为研究热点。Song 等^[57]首次利用 TALENs 技术获得了世界首例免疫缺陷家兔疾病模型,并建立了兔基因打靶的高效技术平台。2001 年,Uchida 等^[58]通过显微注射技术成功获得了亨廷顿蛋白(Huntingtin, HTT)基因突变的基因编辑猪。随后,Yang 等^[59]利用体细胞克隆技术构建了亨廷顿舞蹈症(huntington disease, HD)猪模型。2018 年,Yan 等^[60]将人源突变 HTT 基因定点插入到猪 HTT 基因座内,成功制备出表达人源性全长突变型 HTT 的基因编辑猪,此模型可以模拟人类神经退行性疾病的特征,为进一步研究大型哺乳动物神经性疾病的发病机制和治疗策略提供依据。

4 小结与展望

基因修饰技术在给人类健康、生活带来诸多益处的同时,也面临着由此引发的法律问题和伦理挑战。2018 年的“基因编辑婴儿”事件引发争议,国家明令禁止以生殖为目的的人类胚胎基因编辑活动,基因编辑双胞胎婴儿的诞生严重违背了伦理道德和基因发展规律,极易引发道德问题与社会风险,因此应不断完善有关人类基因编辑的法律制度。在动物福利方面,基因修饰技术是一把双刃剑。一方面,使用更精确的基因修饰技术,如 CRISPR/Cas9 技术可以提高畜禽的抗病性,还可用于缓解动物生产中的福利问题,例如在孵化场大量扑杀不需要的雄性雏鸡和反刍动物去角。另一方面,在基因修饰过程中存在脱靶效应会致使动物畸形。近年来,国家高度重视科研伦理的治理工作,法律制度的不断完善为基因修饰技术的发展提供了有利保障,另外应使公众积极参与到伦理监管中,还应当加强科研人员的道德培育,提高科研人员的社会责任感。

基因修饰技术随着现代生物学分子技术的发展而不断完善,使得畜禽基因功能的研究和转基因育种更加高效,在动物遗传育种以及生物医药等领域取得了显著成就,其在畜牧业的应用前景不可估量。基因修饰技术弥补了传统转基因技术的随机整合、遗传不稳定等缺陷,具有广阔的发展前景。尤其是

CRISPR/Cas9 技术因其具有简单、高效、成本低等特点,逐渐被研究人员认可并使用。基因修饰技术对于研究基因遗传功能和控制至关重要,极大推动了有关疾病治疗领域的发展。但此技术的组织靶向递送困难和脱靶效应仍在一定程度上限制了其临床应用,因此提高药物传递效率和特异性是未来主要的研究方向。虽然目前仍有许多问题亟待解决,但随着研究的不断深入以及科研人员的不断努力,相信在不久的将来会研发出更加安全、高效的基因编辑工具,为人类生活和畜牧生产造就福音。

参考文献 (References):

- [1] JAENISCH R, MINTZ B. Simian virus 40 DNA sequences in DNA of healthy adult mice derived from preimplantation blastocysts injected with viral DNA[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1974, 71(4):1250-1254.
- [2] PALMITER R D, BRINSTER R L, HAMMER R E, et al. Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes[J]. *Nature*, 1982, 300(5893):611-615.
- [3] GORDON J W, SCANGOS G A, PLOTKIN D J, et al. Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1980, 77(12):7380-7384.
- [4] PERRY A C, WAKAYAMA T, KISHIKAWA H, et al. Mammalian transgenesis by intracytoplasmic sperm injection[J]. *Science*, 1999, 284(5417):1180-1183.
- [5] LOIS C, HONG E J, PEASE S, et al. Germline transmission and tissue-specific expression of transgenes delivered by lentiviral vectors[J]. *Science*, 2002, 295(5556):868-872.
- [6] HOFMANN A, KESSLER B, EWERLING S, et al. Efficient transgenesis in farm animals by lentiviral vectors[J]. *EMBO Reports*, 2003, 4(11):1054-1058.
- [7] SASAKI E, SUEMIZU H, SHIMADA A, et al. Generation of transgenic non-human primates with germline transmission[J]. *Nature*, 2009, 459(7246):523-527.
- [8] 靳泽华, 谢梦利, 易辰阳, 等. 应用基于重组慢病毒的 CRISPR/Cas9 技术构建基因突变的鸡 DF1 细胞[J]. *华中农业大学学报*, 2019, 38(3):83-88.
JIN Z H, XIE M L, YI C Y, et al. Using CRISPR/Cas9 technology to construct chicken DF1 cells with gene mutations[J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2019, 38(3):83-88. (in Chinese)
- [9] 秦川. 揭示基因组功能的强大工具: 基因打靶技术——2007 年度诺贝尔生理学或医学奖成果简介[J]. *科技导报*, 2007, 24:30-35.
QIN C. Powerful tools to reveal the function of the genome: Gene targeting technology — 2007 Nobel prize in physiology or medicine introduction[J]. *Science and Technology Herald*, 2007, 24:30-35. (in Chinese)
- [10] THOMAS K R, CAPECCHI M R. Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells[J]. *Cell*, 1987, 51(3):503-512.
- [11] SCHNIEKE A E, MCSHIR J, KIND A J, et al. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells[J]. *American Journal of Ophthalmology*, 1997, 124(2):276.
- [12] DING S, WU X, LI G, et al. Efficient transposition of the PiggyBac (PB) transposon in mammalian cells and mice[J]. *Cell*, 2005, 122(3):473-483.
- [13] 谢维欣, 武建明, 王洪梅, 等. 转座子在动物转基因研究中的应用[J]. *家畜生态学报*, 2011, 32(5):87-90.
XIE W X, WU J M, WANG H M, et al. Application of transposons in transgenic studies in animals[J]. *Journal of Domestic Animal Ecology*, 2011, 32(5):87-90. (in Chinese)
- [14] 高宇, 程潜, 张梦君, 等. 基因敲除技术研究进展[J]. *农业技术与装备*, 2017, 8:19-22.
GAO Y, CHENG Q, ZHANG M J, et al. Progress in gene knockout technology[J]. *Agricultural Technology and Equipment*, 2017, 8:19-22. (in Chinese)
- [15] 滕艳, 杨晓. 基因打靶技术: 开启遗传学新纪元[J]. *遗传*, 2007, 11:1291-1298.
TENG Y, YANG X. Gene-targeting technology: The opening of a new era in genetics[J]. *Genetic*, 2007, 11:1291-1298. (in Chinese)
- [16] 肖安, 张博. 人工核酸内切酶介导的新一代基因组编辑技术进展[J]. *生物工程学报*, 2015, 31(6):917-928.
XIAO A, ZHANG B. Progress in next-generation genome editing technology mediated by artificial endonucleases[J]. *Journal of Bioengineering*, 2015, 31(6):917-928. (in Chinese)
- [17] 陶果, 信吉阁, 肖晶, 等. 基因敲除技术最新研究进展及其应用[J]. *安徽农业科学*, 2013, 41(29):11605-11608.
TAO G, XIN J G, XIAO J, et al. Recent research

- progress and application of gene knockout technology[J]. *Anhui Agricultural Science*, 2013, 41(29):11605-11608. (in Chinese)
- [18] 张白雪,孙其信,李海峰.基因修饰技术研究进展[J]. *生物工程学报*,2015,31(8):1162-1174.
ZHANG B X, SUN Q X, LI H F. Progress in gene modification technology[J]. *Journal of Bioengineering*, 2015,31(8):1162-1174. (in Chinese)
- [19] BIFFI A. Clinical translation of TALENs: Treating SCID-X1 by gene editing in iPSCs[J]. *Cell Stem Cell*, 2015,16(4):348-349.
- [20] SHIAU C E, KAUFMAN Z, MEIRELES A M, et al. Differential requirement for IRF8 in formation of embryonic and adult macrophages in zebrafish[J]. *Public Library of Science*, 2015,10(1):e0117513.
- [21] GEURTS A M, COST G J, FREYVERT Y, et al. Knockout rats *via* embryo microinjection of zinc-finger nucleases[J]. *Science*, 2009,325(5939):433.
- [22] 梁 浩. 锌指核酸酶介导的小鼠 *MSTN* 基因敲除的研究[D]. 呼和浩特:内蒙古大学, 2015.
LIANG H. Study of zinc-finger nuclease-mediated gene knockout of *MSTN* in mice[D]. Hohhot: Inner Mongolia University, 2015. (in Chinese)
- [23] CHRISTIAN M, CERMAK T, DOYLE E L, et al. Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases[J]. *Genetics (Austin)*, 2010, 186(2):757-761.
- [24] MILLER J C, TAN S, QIAO G, et al. A TALE nuclease architecture for efficient genome editing[J]. *Nature Biotechnology*, 2011,29(2):143-148.
- [25] CHEN Y, LU W, GAO N, et al. Generation of obese rat model by transcription activator-like effector nucleases targeting the leptin receptor gene[J]. *Science China. Life Sciences*, 2017,60(2):152-157.
- [26] CONG L, RAN F A, COX D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems[J]. *Science*, 2013,339(6121):819-823.
- [27] KHALILI K, KAMINSKI R, CHEN Y, et al. Elimination of HIV-1 genomes from human T-lymphoid cells by CRISPR/Cas9 gene editing[J]. *Scientific Reports*, 2016,4:6:22555.
- [28] 呼 锐. 利用 CRISPR/Cas9 技术一步生产 *FGF5* 基因敲除绵羊的研究[D]. 北京:中国农业大学, 2017.
HU R. One-step production of *FGF5* gene knockout sheep using CRISPR/Cas9 technology[D]. Beijing: China Agricultural University, 2017. (in Chinese)
- [29] YANG H, ZHANG J, ZHANG X, et al. CD163 knockout pigs are fully resistant to highly pathogenic Porcine reproductive and respiratory syndrome virus[J]. *Antiviral Research*, 2018,151:63-70.
- [30] WIDJAYA M A, JU J C, LEE S D. CRISPR-edited stem cell transplantation for HIV-related gene modification *in vivo*: A systematic review[J]. *Stem Cell Reviews Reports*, 2022,18(5):1743-1755.
- [31] 周 维,付喜爱,张德显,等.基因敲除技术的研究进展[J]. *中国兽医杂志*, 2015,51(3):67-69.
ZHOU W, FU X A, ZHANG D X, et al. Progress in gene knockout technology[J]. *Chinese Veterinary Journal*, 2015,51(3):67-69. (in Chinese)
- [32] XIAO A, WU Y, YANG Z, et al. EENdb: A database and knowledge base of ZFNs and TALENs for endonuclease engineering[J]. *Nucleic Acids Research*, 2013,41(Database issue):D415-22.
- [33] THOMAS K R, FOLGER K R, CAPECCHI M R. High frequency targeting of genes to specific sites in the mammalian genome[J]. *Cell*, 1986,44(3):419-428.
- [34] DOYON Y, MCCAMMON J M, MILLER J C, et al. Heritable targeted gene disruption in zebrafish using designed zinc-finger nucleases[J]. *Nature Biotechnology*, 2008,26(6):702-708.
- [35] GOLOVAN S P, MEIDINGER R G, AJAKAIYE A, et al. Pigs expressing salivary phytase produce low-phosphorus manure[J]. *Nature Biotechnology*, 2001, 19(8):741-745.
- [36] 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]. *Public Library of Science*, 2015, 10(8): e0136690.
- [37] 艾立纷. “多莉”实验室育出能抗禽流感的鸡[N]. *环球时报*, 2023-10-12(5).
AI L F. The “Dolly” laboratory has produced chickens that can fight avian influenza[N]. *Global Times*, 2023-10-12 (5). (in Chinese)
- [38] WHITWORTH K M, ROWLAND R R, EWEN C L, et al. Gene-edited pigs are protected from Porcine reproductive and respiratory syndrome virus[J]. *Nature Biotechnology*, 2016,34(1):20-22.
- [39] GAO Y, WU H, WANG Y, et al. Single Cas9 nickase induced generation of NRAMP1 knock in cattle with reduced off-target effects[J]. *Genome Biology*, 2017, 18(1):13.
- [40] RAVENSBERGEN B, PAUWELS E K J, SALAHEDDINE M, et al. Large scale production of recombinant human lactoferrin in the milk of transgenic cows[J]. *Nature Biotechnology*, 2002,

- 20(5):484-487.
- [41] 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]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2017, 114(45):E9474-E9482.
- [42] 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 Journal*, 2019, 33(1): 1188-1198.
- [43] HU Z, DING W, ZHU D, et al. TALEN-mediated targeting of HPV oncogenes ameliorates HPV-related cervical malignancy[J]. *Journal of Clinical Investigation*, 2015, 125(1):425-436.
- [44] YIN H, XUE W, ANDERSON D G. CRISPR-Cas9: A tool for cancer research and therapeutics[J]. *Nature Reviews, Clinical Oncology*, 2019, 16(5): 281-295.
- [45] SANTINHA A J, KLINGLER E, KUHN M, et al. Transcriptional linkage analysis with *in vivo* AAV-Perturb-Seq[J]. *Nature*, 2023, 622(7982):367-375.
- [46] NO AUTHORS LISTED. Using CRISPR to study gene function aids understanding of 22q11. 2 deletion syndrome[J]. *Nature*, 2023. Doi: 10. 1038/d41586-023-02779-z. Online ahead of print.
- [47] PEREZ E E, WANG J, MILLER J C, et al. Establishment of HIV-1 resistance in $CD4^+$ T cells by genome editing using zinc-finger nucleases[J]. *Nature Biotechnology*, 2008, 26(7):808-816.
- [48] MUSSOLINO C, MORBITZER R, LUTGE F, et al. A novel TALE nuclease scaffold enables high genome editing activity in combination with low toxicity[J]. *Nucleic Acids Research*, 2011, 39(21):9283-9293.
- [49] NIU Y, SHEN B, CUI Y, et al. Generation of gene-modified cynomolgus monkey *via* Cas9/RNA-mediated gene targeting in one-cell embryos[J]. *Cell*, 2014, 156(4):836-843.
- [50] CHENG H, ZHANG F, DING Y. CRISPR/Cas9 delivery system engineering for genome editing in therapeutic applications[J]. *Pharmaceutics*, 2021, 13(10):1649.
- [51] KOO T, YOON A R, CHO H Y, et al. Selective disruption of an oncogenic mutant allele by CRISPR/Cas9 induces efficient tumor regression[J]. *Nucleic Acids Research*, 2017, 45(13):7897-7908.
- [52] 胡思慧, 刘倩宜, 谢冬纯, 等. CRISPR/Cas 基因编辑技术治疗人类遗传性疾病的临床研究进展[J]. *生命科学*, 2022, 34(10):1250-1263.
- HU S H, LIU Q Y, XIE D C, et al. Progress in clinical studies of CRISPR/Cas gene editing technology for the treatment of human genetic diseases[J]. *Life Sciences*, 2022, 34(10):1250-1263. (in Chinese)
- [53] 朱佩琪, 蒋伟东, 周 诺. CRISPR/Cas9 基因编辑系统的发展及其在医学研究领域的应用[J]. *中国比较医学杂志*, 2019, 29(2):116-123.
- ZHU P Q, JIANG W D, ZHOU N. Development of the CRISPR/Cas9 gene editing system and its application in the field of medical research[J]. *Chinese Journal of Comparative Medicine*, 2019, 29(2):116-123. (in Chinese)
- [54] PENG J, WANG Y, JIANG J Y, et al. Production of human albumin in pigs through CRISPR/Cas9-mediated knockin of human cDNA into swine albumin locus in the zygotes[J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: 16705.
- [55] ZENG F, LI Z, ZHU Q, et al. Production of functional human nerve growth factor from the saliva of transgenic mice by using salivary glands as bioreactors[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7:41270.
- [56] ZENG F, LIAO S, KUANG Z, et al. Genetically engineered pigs as efficient salivary gland bioreactors for production of therapeutically valuable human nerve growth factor[J]. *Cells*, 2022, 11(15):2378.
- [57] SONG J, ZHONG J, GUO X, et al. Generation of RAG1- and 2-deficient rabbits by embryo microinjection of TALENs[J]. *Cell Research*, 2013, 23(8):1059-1062.
- [58] UCHIDA M, SHIMATSU Y, ONOE K, et al. Production of transgenic miniature pigs by pronuclear microinjection[J]. *Transgenic Research*, 2001, 10(6): 577-582.
- [59] YANG D, WANG C E, ZHAO B, et al. Expression of huntington's disease protein results in apoptotic neurons in the brains of cloned transgenic pigs[J]. *Human Molecular Genetics*, 2010, 19(20): 3983-3994.
- [60] YAN S, TU Z, LIU Z, et al. A huntingtin knock in pig model recapitulates features of selective neurodegeneration in huntington's disease[J]. *Cell*, 2018, 173(4):989-1002.