

基因编辑猪在生物医学研究中的应用

黄耀强, 李国玲, 杨化强, 吴珍芳

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

摘要: 基因组编辑技术能够精确靶向修饰生物体基因组特定位点、人为改造生物遗传信息。自 21 世纪初, 基因组编辑技术得到迅猛发展, 锌指核酸酶(zinc finger nucleases, ZFN)、转录激活样受体因子(transcription-activating-like receptor factor, TALEN)和成簇的规律间隔短回文重复序列及其相关系统(clustered regularly interspaced short palindromic repeats/Cas endonucleases, CRISPR/Cas) 3 种新型基因组编辑系统先后诞生。基因组编辑技术能对生物体内源基因进行精确靶向修饰, 被广泛应用于生物医学研究领域。猪与人类亲缘关系接近, 在生理特征与病理病程等诸多方面与人类具有相似性, 是人类疾病动物模型与异种器官移植研究的重要对象。本文主要介绍了 ZFN、TALEN 和 CRISPR/Cas9 3 种基因组编辑技术的发展概况与作用机理, 综述了基因编辑猪在人类疾病模型、器官移植与人源化器官培育等生物医学领域里的最新研究进展, 并对基因编辑猪的应用前景进行了展望。

关键词: 基因编辑技术; 基因编辑猪; 人类疾病模型; 异种器官移植

Progress and application of genome-edited pigs in biomedical research

Yaoqiang Huang, Guoling Li, Huaqiang Yang, Zhenfang Wu

National Engineering Research Center for Breeding Swine Industry, College of Animal Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China

Abstract: Genome editing technologies (GETs) can precisely alter the genomic sequences and modify the genetic information at the target site of an organism. Since the beginning of the 21st century, the GETs, including zinc finger nucleases (ZFN), transcription-activating-like receptor factor (TALEN), and clustered regularly interspaced short palindromic repeats/Cas endonucleases (CRISPR/Cas), have been successively developed. The GETs can easily engineer the targeted genomic site of animals to exhibit a desired phenotype(s), thereby providing valuable tools in biomedical research. The pigs are closely related to human, in terms of similarities in physiological properties and pathogenic characters. Thus, pigs have been used as important animal models in studies of human disease, xenotransplantation, and humanized organs regeneration. In this review, we summarize the development of the three GETs, research progress of

收稿日期: 2018-01-06; 修回日期: 2018-05-18

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 31772555)资助[Supported by the National Natural Science Foundation of China (No.31772555)]

作者简介: 黄耀强, 硕士研究生, 专业方向: 分子遗传与动物育种。E-mail: 1720297202@qq.com

通讯作者: 吴珍芳, 博士, 教授, 研究方向: 遗传育种。E-mail: wzfemail@163.com

DOI: 10.16288/j.ycz.18-026

网络出版时间: 2018/7/6 9:02:50

URI: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20180706.0845.002.html>

genome-edited pigs as disease models and organ donors for xenotransplantation, and the prospects of their applications in future biomedical research.

Keywords: genome editing technology; gene-editing pig; disease model; xenotransplantation

基因组编辑技术(genome editing technologies, GETs)能够精确靶向修饰生物体基因组特定位点、人为改造生物体遗传信息。以锌指核酸酶(zinc finger nucleases, ZFN)、类转录激活因子效应物核酸酶(transcription activator-like effector nucleases, TALEN)和成簇的规律间隔短回文重复序列及其相关系统(clustered regularly interspaced short palindromic repeats/Cas endonucleases, CRISPR/Cas)为代表的新型基因组编辑技术已经掀起了生命科学研究的热潮,在生物学、医学和农业等各领域被广泛应用。与产生基因随机位点整合的传统转基因修饰技术不同,人工构建的基因组编辑系统可以实现基因组靶序列的精确切割,激发细胞内源性 DNA 损伤修复继而实现基因组定点修饰,成为研究基因功能、修改遗传信息的重要手段,在动物模型建立、异种器官移植等生物医学领域具有重要作用。尽管啮齿类动物的生物学基础研究价值无法替代,但由于其与人类的生理特征相距较远等因素,在模拟人类疾病病程与器官移植等方面的实际应用受到限制。猪的心血管系统和脏器尺寸等生理解剖特征与人体高度相似,免疫特征与免疫反应也与人体比较接近,这就决定了其可作为人类疾病动物模型和异种器官移植研究的理想对象。然而在相当长的一段时间里,猪的定点基因修饰操作是非常困难的。由于研究人员至今尚未建立猪的胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESC)或诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSC)等具有生殖系嵌合能力的细胞系,基因修饰猪只能通过体细胞核移植技术(somatic cell nuclear transfer, SCNT)进行克隆制备。而传统的同源重组技术对体细胞进行基因修饰的能力极低,极大地限制了基因修饰猪的制作和研究。具有较高打靶效率的基因组编辑技术的出现,大大提升了基因修饰动物的制备效率。SCNT 结合基因组编辑技术,推动了猪在生物医学领域的应用。本文结合 ZFN、TALEN 和 CRISPR/Cas9 等新型基因组编辑技术的发展概况和作用机理,对基因编辑猪在模拟人类疾病、异种

器官移植等生物医学方面具有重要意义的最新研究进展进行了综述。

1 基因组编辑技术的发展

传统的转基因技术是指将已知外源基因整合进细胞基因组并使之表达的技术,如原核显微注射法、慢病毒介导法等。传统转基因技术产生的基因整合是随机的,其诱导效率与适用性低,同时转基因动物受内源、外源基因的双重影响而表现出遗传性状的不确定性。自 20 世纪 70 年代报道了基于酵母细胞进行外源基因的同源重组(homologous recombination)和内源基因敲除(knock-out)后,基因打靶技术迅猛发展^[1-3]。1986 年,Thomas 等^[4]利用同源重组恢复了抗新霉素基因缺陷细胞的抗药性,这是首次基于哺乳动物细胞开展的基因编辑。由于猪的 ES 细胞系尚未稳定建立,因此基因编辑猪的制备主要依靠体细胞同源重组结合 SCNT 技术。然而体细胞体外增殖能力有限,同源重组效率极其低下,因此利用传统基因工程技术制备转基因猪的效率极低。随着多种生物的基因组测序相继完成,生物遗传信息与生命体间的遗传差异成为重要研究资源,加上对细胞基因组同源重组机制的认识不断加深^[5,6],以 ZFN、TALEN 和 CRISPR/Cas9 系统为主的新型基因组编辑技术应运而生,为解析基因功能及其调控、精确改造生物遗传信息的研究带来了突破性进展。1996 年, Kim 等^[7]将锌指蛋白(zinc finger protein, ZFP)与 *Fok I* 融合,首次构建出具有靶向切割 DNA 功能的 ZFN。在 ZFN 诞生 15 年后,第二代基因组编辑技术 TALEN 开始发展。TALEN 技术最初由 Christian 等^[8]建立,此后经历了逐步完善的技术改进过程。ZFN 与 TALEN 技术的发展成熟,重新定义了遗传学研究的界限和范畴。1987 年, Ishino 等^[9]在大肠杆菌的碱性磷酸酶基因中首次发现规律间隔性成簇短回文重复序列的特殊结构,此后 Mojica

等^[10]和 Jasen 等^[11]在其他细菌和古菌基因组也发现此类结构,并将其命名为 CRISPR,这一结构与病毒等外源遗传物质之间存在的同源性以及二者间的免疫调控关系也逐渐明确。CRISPR/Cas9 技术作为第三代基因组编辑系统,正是基于细菌等微生物抵御外界 DNA 的获得性免疫系统发展起来的,2012 年被报道后,便迅速突破了以往的基因组编辑技术在实际应用上所面临的多种限制,成为基因组定点编辑的主要工具。

2 ZFN、TALEN 与 CRISPR/Cas9 基因组编辑技术的作用机制

基因组编辑技术通过限制性核酸酶对基因组特定位点进行切割,产生 DNA 双链断裂(double strand breaks, DSB)。DSB 经细胞内 DNA 的主要修复机制非同源末端连接(non-homologous end joining, NHEJ)或同源重组(homologous directed recombination, HDR)后实现靶基因的遗传学修饰。NHEJ 是真核生物基因组的主要修复机制^[12],不需要或仅需有限的同源序列即可将断开的 DNA 游离末端重新缝合,常伴随着核苷酸的插入或缺失(insertions and deletions, indels)并形成编码区移码突变,继而敲除内源基因^[13,14]。在同源片段存在的情况下,DSB 处发生 HDR 的概率大幅提高,通过将同源 DNA 置换或重组至 DSB 以恢复或修改遗传信息,实现基因定点编辑或敲入(knock-in)^[15,16](图 1)。无论 NHEJ 还是 HDR 都依赖于 DSB 的产生,然而基因组中自然发生 DSB 的频率极低,因此如何诱导特定基因位点产生 DSB 成为对动物进行基因编辑所面临的主要问题。ZFN、TALEN 和 CRISPR/Cas9 系统等新型基因组编辑技术可以靶向切割基因组,产生 DSB,继而激发细胞的 NHEJ 或 HDR 修复,实现多种生物基因组的高效而精确的编辑。

ZFN 由负责特异性识别 DNA 序列的 Cys₂ His₂ 锌指蛋白(Cys₂ His₂ ZFP)与非特异性的 II S 型限制性核酸内切酶 *Fok I* 经连接区(linker)融合而成^[7,17]。Cys₂ His₂ 锌指最初在非洲爪蟾(*Xenopus laevis*)的转录因子 TFIIIA 中被发现^[18],是由约 30 个氨基酸组成的肽链。锌指的 Cys、His 氨基酸残基与 Zn²⁺螯合,

使得肽链折叠成 β - β - α 的结构。 α -螺旋的-1、+3、+6 位氨基酸直接同靶序列的三联碱基相互作用,介导 Cys₂ His₂ ZF 基序嵌合至 DNA 链,因此若干与密码子对应的 ZF 模块微组(modular assembly)后可特异性结合相应 DNA 片段^[19~21],使用者只需根据靶基因设计 8~10 个锌指结构域,并与核酸内切酶的催化域结合,可制备出靶向特异性的 ZFN。*Fok I* 属 II 型限制性内切酶,通过识别非回文序列 5'-GGATG-3',在此序列的下游处切割 DNA^[22,23]。ZFNs 对 DNA 的切割需要两个 ZFN 单体以精确的方向分别结合至靶序列两侧,一个 *Fok I* 先与 DNA 反应,激活切割域,再与另一个 *Fok I* 反应形成二聚物并切割 DNA (图 1A)。*Fok I* 酶切结构域二聚化是 ZFN 切割 DNA 所需的条件,也利于减少对 DNA 的非特异剪切,因为激活 *Fok I* 催化域并切割 DNA 磷酸键需要二者形成二聚体^[7,21,23,24]。此外,ZFP 与 *Fok I* 之间的连接序列及其长度同样会影响 ZFN 的活性及靶向特异性^[25]。2001 年,Bikikova 等^[26]将特制的 ZFN 注射于非洲爪蟾卵母细胞核后,发现 ZFN 可靶向切割 DNA 的特定序列并激发同源重组。随后,该技术在黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*)基因研究上得到应用^[17,27]。基于模块微组装策略构建的 ZFN 在斑马鱼(*Danio rerio*)、兔(*Oryctolagus cuniculus*)、小鼠(*Mus musculus*)和猪(*Sus scrofa*)等物种中也均实现了基因敲除或敲入^[28~32]。在 TALEN 基因打靶技术出现之前,ZFN 为实现诸多物种的靶向基因修饰提供了可能^[33,34],然而由于 ZFN 存在作用靶点受限、打靶效率不稳定、载体构建困难等弊端,限制了 ZFN 系统的实际应用。

TALEN 由特异性识别蛋白与 *Fok I* 内切酶结合而成的嵌合体,其 DNA 识别结构域由自然界的效应蛋白—TALEs (transcription activator like effectors)衍生构建所得。TAL 效应蛋白模块串联后识别 DNA 的特定碱基序列^[35~37],直到 2009 年两个研究团队分别报道了植物病原菌黄单胞杆菌(*Xanthomonas*)的 TALE 可结合 DNA 特定序列^[38,39],这种特性才开始被用于基因打靶载体的构建。TALE 整体结构包括由约 33~35 个氨基酸残基(典型长度为 34 个氨基酸)的模块串联成的中间重复结构域、N 端分泌转运信号结构域以及 C 端核定位信号与转录激活结构域。中

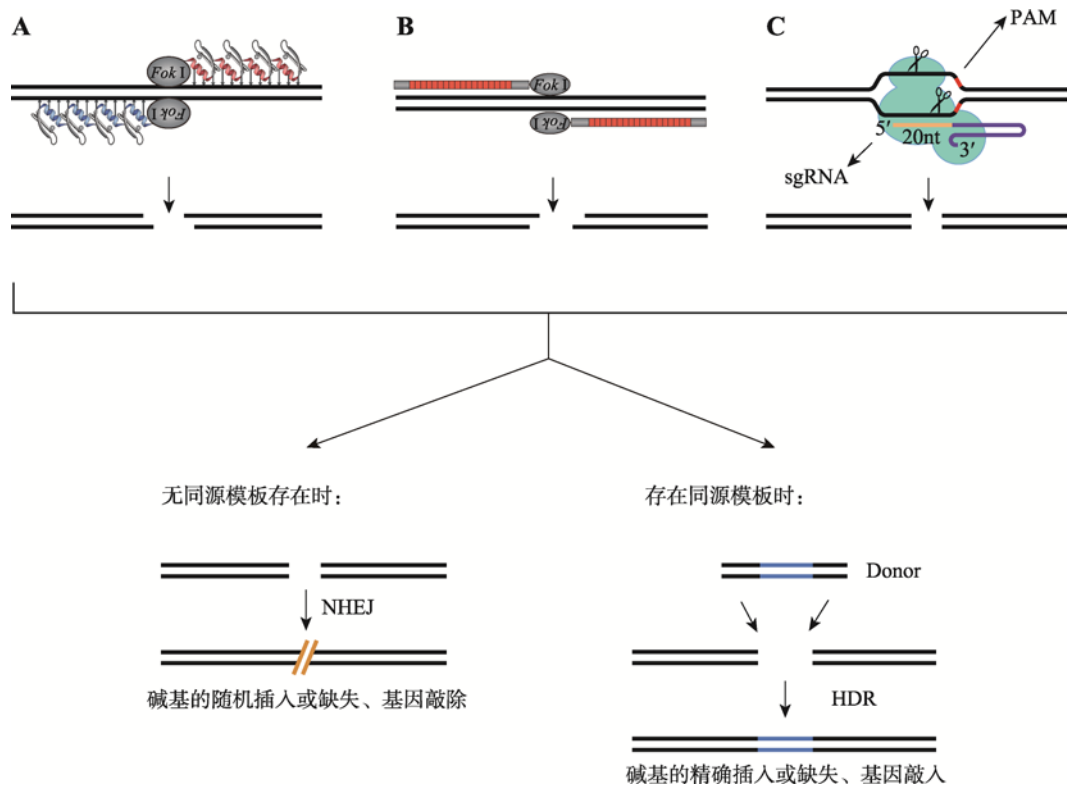


图 1 ZFN、TALEN 和 CRISPR/Cas9 系统介导的基因组编辑原理

Fig. 1 Schematic illustration of the principles of ZFN-, TALEN- and CRISPR/Cas9-mediated genome-editing technologies

A: ZFN 介导的基因组编辑原理; B: TALEN 介导的基因组编辑原理; C: CRISPR/Cas9 介导的基因组编辑原理。ZFN、TALEN 和 CRISPR/Cas9 诱导基因组靶位点形成 DSB, DSB 被细胞内源性修复机制 NHEJ 和 HDR 等修复, 实现靶基因的敲除或精确编辑。根据文献[21,37,53]等修改绘制。

间串联重复序列是 TALE 对 DNA 的识别模块及结合域, 重复片段间的氨基酸序列高度保守, 彼此间差异在于第 12、13 位的重复可变残基(repeat variable di-residues, RVDs)。RVDs 与 DNA 碱基之间的识别密码为: 组氨酸-天冬氨酸(HD)识别 C, 天冬氨酸-异亮氨酸(NI)识别 A, 天冬氨酸-甘氨酸(NG)识别 T, 天冬氨酸-天冬氨酸(NN)或天冬氨酸-赖氨酸(NK)识别 G, 同时 DNA 甲基化也会影响 RVD 与碱基对结合的特异性^[38-40]。成对的 TALEN 分子结合到 DNA 靶序列之后, 其碳末端的 Fok I 酶切结构域会发生二聚化, 并切割 DNA 双链(图 1B)。另有研究表明, 直接与碱基结合的是 RVD 的第二个氨基酸残基, 第一个氨基酸残基主要稳定 RVD 环状构型^[41]。自 2010 年 TALEN 技术建立后, 陆续有实验室尝试改进相关的合成技术, 包括 Zhang 等^[42]基于分层连接(hierarchical ligation)策略构建出 TALE 工具箱,

有效解决了 TALE 串联重复片段的构建难题。Miller 等^[37]利用 TALE 特定截断变异型, 将 TALEN 系统改造为更适合哺乳动物细胞的基因组编辑系统。随着对 TALEN 靶向机制的了解以及产物合成技术的改善^[42-44], TALEN 技术的应用范围迅速扩展, 相继被应用于人类细胞和斑马鱼、小鼠、猴(*Macaca fascicularis*)、猪等动物的基因组编辑^[45]。与 ZFN 比较, TALEN 对细胞的毒性较小, 基因靶向特异性更强, 且 TALEN 的构建也较为方便, 因此得到了广泛应用。

CRISPR/Cas 系统是迄今为止最新的 RNA 导向式基因组编辑系统, 来源于细菌和古菌等原核生物识别和摧毁外源入侵的病毒或质粒等遗传物质时获得的免疫防御系统^[46, 47]。化脓链球菌(*Streptococcus pyogenes* SF370)获得性免疫系统的 DNA 序列主要包括以下部分: CRISPR 序列, 分别编码 CRISPR 序

列相关核酸内切酶 Cas9、Cas1、Cas2 和 Cns2 的基因片段, 以及反式激活 RNA (trans-activating RNA, tracrRNA) 的编码序列等, 其中, CRISPR 序列的高度重复片段之间存在非重复的间隔序列。当细菌首次遭到某种病毒或外源质粒入侵时, 可将病毒基因的特定序列整合到自身基因组的 CRISPR 区; 当相应病毒再次入侵时, CRISPR 区的特定序列可转录生成 crRNA 前体 (pre-crRNA), pre-crRNA 经内源 RNase III 和 Cas9 等蛋白的催化剪接后, 形成 crRNA^[48~52], 引导 CRISPR/Cas9 复合物寻找病毒同源序列, 由 Cas9 的 HNH 与 RuvC 两个酶切域分别切割 DNA 双链^[53~55]。基于 II 型 CRISPR/Cas 构建的基因打靶系统已经被广泛应用, 其系统包括具有核酸内切酶活性的 Cas9、靶向特异性的 crRNA 以及 tracrRNA。将 crRNA 和 tracrRNA 组合为一条单链的向导 RNA (single-strand RNA, sgRNA), 极大推动了 CRISPR/Cas9 系统的应用^[53] (图 1C)。2013 年, Hwang 等^[56]率先应用 CRISPR/Cas9 系统在斑马鱼胚胎内进行高效的基因打靶。此后, CRISPR/Cas9 技术被广泛应用在对多种动物基因组靶向修饰的研究。与此同时, 研究者利用晶体学等多种技术手段, 深入解析了 CRISPR/Cas9 对 DNA 靶序列的识别与切割等机理。Jinek 等^[57]率先解析了 Cas9 的二叶状晶体结构, 电镜显示 Cas9 分子内沟槽在 gRNA 诱导下可发生结构重取向反应并形成容纳 RNA/DNA 的中心通道 (central channel), 表明 RNA 的载入可激发 Cas9 对 DNA 的捕获并激活 CRISPR/Cas9。Sternberg 等^[58]借助晶体分析与分子内荧光共振能量转移 (intramolecular Förster resonance energy transfer) 等方法对 Cas9 的催化域进行相对定位, 认为 Cas9 切割 DNA 靶位点的效率与 HNH 活性构象的状态有关, 并揭示了一种确保 HNH 与 RuvC 切割 DNA 的变构通讯模式, 即 HNH 通过动态变构对 RuvC 的别构调控施加影响, 活性状态的 HNH 可通过二者之间的信号传感器激活 RuvC 的酶切功能。这些结果支持了 Cas9 精确切割 DNA 的多重调控模式, 如 gRNA 载入与 DNA 定向解螺旋之后, 对靶向 DNA 的正确识别促使 HNH 变构并触发 RuvC 催化活性等“校勘”机制。这些分子机制的解析有助于科研人员对 Cas9 进行遗传改造以适应不同需求的应用。2016 年, Komor 等^[59]

基于 CRISPR/Cas9 与胞嘧啶脱氨酶的融合, 构建出可将胞嘧啶转换为胸腺嘧啶的单碱基编辑系统 (base editor, BE)。2017 年, Gaudelli 等^[60]将 RNA 腺苷酸脱氨酶与 Cas9 突变体融合, 经多轮选择与蛋白修饰后, 建立了腺嘌呤单碱基转换系统 (adenine base editor, ABE), 在基因组上成功实现了腺嘌呤到鸟嘌呤的精确转换, 再次显示了 CRISPR/Cas9 系统的基因编辑能力^[61]。基于噬菌体辅助持续演化系统 (Phage assistant continuous evolution, PACE) 得到的 xCas9 可识别 NG 等更多类型的 PAM 序列, 在更精确的基因组操作方面具有优势。同时, xCas9 靶向基因组特定序列的特异性有所改善, 表明 CRISPR/Cas9 技术可能会在基因组编辑效率、特异性与 PAM 可容性等方面实现兼容^[62]。CRISPR/Cas9 具备了 ZFN 和 TALEN 等基因打靶技术未能达到的特异性和精确性, 摆脱了合成 DNA 特异识别模块的繁琐操作, 仅需 sgRNA 引导即可对基因组任意位点进行打靶, 切割能力不受基因组甲基化影响^[63]。但是, 在应用上也面临着脱靶效应^[64,65]等困扰。

基因组编辑技术导致的脱靶效应是指由其导致的基因组非预期、不可控的意外断裂。由于基因组中同源序列及高度相似序列的存在, 因此 ZFN、TALEN 与 CRISPR 3 种基因组编辑技术均存在着潜在脱靶效应, 这是基因组编辑技术应用于生物医学研究与临床治疗时所面临的主要瓶颈。如何降低脱靶效应是该领域研究的焦点之一。DNA 结合域靶向 DNA 的特异性不足与酶切域发生非特异性切割, 是导致脱靶效应的两大因素。目前, 科研人员已找到了针对性的方法来降低脱靶效应, 如优化 DNA 结合域长度, 对其进行改善以量化评估并增强 DNA 结合特异性, 对 Fok I 酶改造以及通过选择进化以筛选更具靶向特异性的 ZFN/TALEN 二聚体等手段, 均可弱化由于对基因组特定位点识别能力有限而导致的脱靶。Pattanayak 等^[66]依据能量补偿模式, 解释了 ZFN 结合能 (binding energy) 过剩对其靶位点识别影响, 认为避免使用 DNA 结合能过剩的 ZFN 可减少脱靶。也有研究表明, 当构建的 ZF 数量为 4~6 时, ZFN 对 DNA 的靶向特异性更强^[67]。对核酸内切酶结构域进行改造是增强基因组编辑技术打靶特异性的另一策略。Fok I 具有随机同源二聚化的性

质, 因此通过对 *Fok I* 进行异质化改造, 使其转变为必须依赖 ZF 或 TALE 等靶向定位结构才能形成稳态二聚化的性质, 能在一定程度上避免非特异性酶切的发生^[68]。单切口(single-strand break, SSB)趋向于高保真修复且不能诱导 NHEJ, 因此构建切口酶(nickase)也可降低非特异性酶切的几率, 如通过 ZFNickase 定点诱导 DNA 形成单链断裂, 能有效改进基因组编辑的靶向性^[69]。Cas9 的 D10A 突变型 Cas9-nickase (Cas9n) 具有切口酶性质, 结合 1 对 sgRNAs 以诱导 DNA 相应范围内的单链断裂后即可形成 DNA 双切口, 能明显降低 CRISPR 技术导致的脱靶效应^[70,71]。Slaymaker 等^[72]筛选出具备更强打靶特异性的 eSpCas9, 并验证了 Cas9 结合 DNA 以及 DNA 重杂化等反应过程对脱靶效应的影响。由于 CRISPR/Cas9 系统的特异性主要取决于 sgRNA 的定点靶向能力, 考虑到基因组潜在脱靶位点的复杂性, 以及 gRNA 与 DNA 靶序列之间错配碱基的具体数量与定位对 CRISPR/Cas9 打靶特异性的影响, 因此设计 sgRNA 时应保证其足够的特异性^[73], 通过对基因组潜在脱靶位点进行高通量分析并量化评估 Cas9 对特定定位点的潜在脱靶效应, 可为 sgRNA 的选择与相关的脱靶检测提供依据^[74]。

3 基因编辑猪在医学领域中的应用

基于 ES 和同源重组的传统基因打靶技术在猪等缺乏体外稳定培养的 ES 细胞系的大动物上的应用效率极低, 大大限制了基因打靶大动物的制备。ZFN、TALEN 和 CRISPR/Cas9 等基因组编辑技术可定点切割基因组并激发细胞 DNA 损伤修复, 高效介导基因定点修饰, 提高基因编辑大动物的制备效率。猪具有与人类相似的解剖学、生理学等特征, 遗传亲缘关系和营养代谢生理与人类接近, 寿命较长且具有繁殖周期短、产仔量高等特征, 允许研究者对疾病模型猪的病程发展进行长期研究, 并可通过遗传改造获得移植器官, 可用于人类疾病动物模型和器官移植等生物医学领域的研究。基因组编辑技术结合 SCNT 制备基因编辑猪, 可为生物医学研究提供遗传稳定的材料。

3.1 利用基因组编辑技术建立人类疾病模型猪

基于基因操作手段获得的人类疾病动物模型对于研究疾病的发病机理、开发医疗诊断新技术具有重要意义。长期以来, 人类疾病动物模型以基因修饰小鼠为主, 然而小鼠体型较小、寿命较短, 生理功能等各方面与人类存在较大差异, 与人类具有同样遗传缺陷的小鼠可能无法完全模拟人类疾病特征, 同时小鼠模型无法对疾病进程和药物疗效进行长期跟踪, 因此限制了其在人类医学上的转化应用, 如小鼠模型获得的抗肿瘤药物临床前研究成果仅有约 5% 可在临床 III 期试验中表现出期望的药效^[75]。非人灵长类动物与人类遗传亲缘最为接近, 其生理解剖特征与代谢反应等特征与人类相似度最高, 基于灵长类动物取得的实验结果能客观地反映人体内的各种相应机制。然而, 非人灵长类动物不仅资源匮乏, 对其进行基因修饰与胚胎操作也较难实施, 而且对非人灵长类动物开展实验也受到伦理限制。以资源丰富的猪作为实验动物, 既弥补了非人灵长类动物所面临的资源匮乏, 也克服了小鼠寿命短、亲缘关系远等方面的不足, 且猪实验成本较低、遗传修饰与胚胎操作技术成熟, 作为实验模型受到的伦理争议较小, 是理想的大动物模型。具有特定遗传缺陷基因编辑猪可模拟多种人类疾病, 以此为平台进行肿瘤、心血管系统疾病、代谢性疾病和神经退行性疾病等的发病机理研究、药物评估等临床前试验, 有利于加速推动实验动物研究成果的临床转化。

3.1.1 心血管系统疾病模型

建立心血管疾病动物模型对于研究心血管疾病机理与药物研发具有重要意义。小型啮齿类动物与人类的心血管系统差异明显, 如小鼠心跳频率每分钟可达 500 次以上, 与人类有较大差距。猪的心血管系统, 特别在解剖结构、运动机能等方面, 与人类相似度高, 是人类血管疾病模型制备的理想对象。胰岛素增敏剂噻唑烷二酮类药物(troglitazone, TZD) 是 2 型糖尿病的治疗药物, 可作为配体激活过氧化物酶体增殖物激活受体- γ (peroxisome proliferators-activated receptors- γ , Ppar- γ), 对小鼠心血管疾病模型表现出一定的疗效, 但在病患的临床使用上却面

面临着不良心血管事件的限制^[76]。PPAR- γ 与人类心血管疾病、机体免疫及胰岛素敏感的关系密切。为探究其在人类心血管疾病中的作用,2011 年 Yang 等^[77]应用 ZFN 技术,靶向敲除了猪成纤维细胞中的 *Ppar- γ* 基因,对获得单碱基突变细胞系进行 SCNT,成功制备出单等位 *Ppar- γ* 基因敲除猪。这是首次将锌指核酸酶基因打靶技术应用于猪的内源基因敲除,并结合 SCNT 技术获得基因敲除猪,该模型可作为心血管疾病发病机理、*Ppar- γ* 的体内精确调控机制以及 *Ppar- γ* 靶标药物与治疗新方法开发等研究的对象,在基因治疗和转化医学研究上具有重要意义。家族性肥厚型心脏病(familial hypertrophic cardiomyopathy, HCM) 是主要的遗传性心脏病, HCM 的病理机制尚未明确,病因包括编码 β -心肌球蛋白重链(β -myosin heavy chain, MyHC)的 *MYH7* 基因发生突变。啮齿类等动物的心肌球蛋白亚型异于人类,因此 *MYH7* 突变的小鼠模型并不能有效模拟人类的 HCM。猪的电生理学等与人类类似,具备作为 HCM 模型动物的可能。2017 年, Montag 等^[78]利用 TALEN 技术对猪 *MYH7* 位点进行 R723G 碱基突变并获得单碱基突变的克隆猪,该模型表现出明显的由 R723G 型 *MYH7* 突变导致的 HCM 早期症状,如心肌排列紊乱、核畸形以及 *MYH7* 过表达导致引起的 α/β -MyHC 失调,但是该克隆猪存活时间极短(产前死亡、产后 24 h 内死亡),这可能与 *MYH* 表达紊乱有关。该研究是首次基于 Selection-free SCNT 通过诱导点突变构建出的心血管疾病模型猪。由于在医学研究上,病变心脏组织较难获得,因此对 HCM 的长期研究需要动物模型加以辅助。以猪为代表的大动物模型实验成果有利于研究 HCM 病人早期心脏衰竭等的遗传机制。

3.1.2 免疫缺陷模型

X 染色体上的白细胞介素-2 受体共同 γ 链基因(*IL-2RG*)编码的受体蛋白对动物体自然杀伤细胞(natural killer cell, NK cell)的发育起着重要作用。*IL-2RG* 缺陷会导致 NK 细胞活性丧失,机体免疫功能严重受损。2013 年, Watanabe 等^[79]向猪胎儿成纤维细胞转入 ZFN 表达载体后,靶向敲除了细胞的 *IL2RG* 基因,经 SCNT 得到的 *IL2RG*-KO 猪表现出

与人类 X 染色体连锁重症联合免疫缺陷(X-severe combined immunodeficiency disease, X-SCID)相似的症状,包括一个胸腺完全缺失、T 与 NT 细胞量不足等。在成熟前 T 细胞发育为成熟 T 细胞以及成熟前 B 细胞发育为成熟 B 细胞的免疫组库分化过程中,发生 V(D)J 基因片段的重排,形成淋巴细胞表面的高度多样性抗体可变区的编码基因。V(D)J 重排的一个早期步骤是 B、T 细胞内 *IG* 或 *TCR* 基因 SRR 双链断裂,该过程由重组激活基因(Recombination Activating gene 1/2, *RAG1/2*)的蛋白产物催化,*RAG1/2* 中任意一者缺失都会导致 T、B 淋巴细胞分化阻滞、外周血不具成熟淋巴细胞而引发 SCID^[80,81]。猪与人类免疫系统具有相似性,*RAG* 突变猪可模拟人类 SCID,为进一步解析 SCID 机制和探究治疗方法提供帮助。2014 年, Lee 等^[82]利用 TALEN 系统对猪体细胞的 *RAG2* 进行靶向修饰,经 SCNT 后获得的 *RAG2* 突变纯合子胸腺异常,并有脾脏内炎症与细胞凋亡等发育停滞现象。在接受人类诱导多能干细胞移植后,*RAG2* 基因修饰猪发育为成熟的三层畸胎瘤,说明该 *RAG2*-KO 猪具有免疫缺陷的表型,是成功的 SCID 大动物模型。同年, Huang 等^[83]根据巴马猪的 *RAG1*、*RAG2* 基因,分别设计了 TALEN 表达载体,对成纤维细胞打靶后建立 *RAG1*、*RAG2* 基因双敲除的细胞系,并克隆出 *RAG1/2* 双敲猪,*RAG1/2* 功能障碍导致胸腺腺发育出现缺陷,免疫器官内成熟 T、B 淋巴细胞大幅减少且淋巴细胞 V(D)J 基因片段重排消失,表现出典型的 SCID 特征。由于小鼠的生理指标以及炎症免疫反应等机制与人类差距较大,因此基于 SCID 小鼠模型进行的药物筛选与临床评价、干细胞治疗长期跟踪等方面的研究,获得的成果难以有效地转化为临床应用,而 SCID 模型猪的应用有望填补这方面的空白。同时,免疫缺陷疾病的致病因素复杂,制备免疫缺陷模型猪有利于研究者对相关功能障碍基因与环境因素进行筛查,推动人体免疫细胞的分化以及机体免疫系统的建立或损伤等研究。

3.1.3 脂代谢异常疾病模型

家族性高胆固醇血症(familial hypercholesterolemia, FH)作为一种导致人体脂代谢紊乱的常染色

体单基因显性遗传病,其发病源于低密度脂蛋白受体(low density lipoprotein receptor, *LDLR*)基因缺陷,致使细胞表面 *LDLR* 蛋白功能障碍,*LDLR* 无法介导血液中携带胆固醇的 LDL、 β -VLDL 进入细胞进行清除代谢,导致二者血浆浓度增高继而引发动脉粥样硬化(atherosclerosis)等临床症状。2012 年,Carlson 等^[84]利用 TALEN 打靶技术敲除猪成纤维细胞基因组的 *LDLR* 经 SCNT 后获得 *LDLR*^{-/-} 克隆猪,对模拟人类 FH 等脂代谢综合征具有重要生物医学价值。2017 年,Huang 等^[85]将靶向 *ApoE* (apolipoprotein E)及 *LDLR* 基因的 sgRNA 与 Cas9 载体同时转入巴马小型猪的胚胎成纤维细胞后,获得 11 个 *ApoE* 与 *LDLR* 基因双敲的细胞克隆;经 SCNT 后获得 6 头 *ApoE*^{-/-}/*LDLR*^{-/-} 后代,其血清低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、总胆固醇(TC)和 LDL 的主要载脂蛋白 APOB 浓度较阴性猪显著增高,表现出动脉粥样硬化相关的脂代谢异常。该研究首次获得脂代谢紊乱及血管粥样硬化的基因修饰猪。猪的消化系统和新陈代谢接近人类,*ApoE*/*LDLR* 双基因修饰猪等代谢性疾病猪模型为研究人类代谢性疾病分子机理、开发相关药物和治疗手段提供重要动物平台。

3.1.4 癌症模型

世界首例癌症相关基因打靶猪——重组腺相关病毒介导的乳腺癌相关基因 1 (breast cancer associated gene 1, *BRCA1*)敲除猪于 2010 年被报道^[86]。随着 CRISPR/Cas9 等新型基因组编辑技术的出现,构建可模拟人类癌症的克隆猪发展也逐步加快。2017 年,Wang 等^[87]利用 TALEN 技术,在猪基因组上插入 *Cas9* 基因,获得可在 Cre 酶诱导下表达 *Cas9* 核酸酶分子的基因编辑猪。研究人员利用包含重组酶与靶向肿瘤相关基因的 gRNAs 慢病毒感染猪的肺脏后,成功诱导了猪肺癌相关抑癌基因以及原癌基因的突变,率先在体内利用基因组编辑技术建立原发性肺癌大动物模型。该研究成果的技术突破之一在于 *Cas9* 条件性表达体系的建立,达到了跳过胚胎注射和 SCNT 等阶段,仅需使用重组酶即可启动 sgRNA 引导的体内基因组编辑的目的。该基因编辑猪的建立,将推动猪基因功能研究,加快生物医药研究与重要基因修饰模型的制备,人类癌症模型猪

将在癌症治疗策略与诊断技术研发、药物评估中具有重要作用。

3.1.5 神经退行性疾病模型

亨廷顿舞蹈症(Huntington disease, HTT)、脊髓侧缩硬化症(Amyotrophic Lateral Sclerosis, ALS)和帕金森病(Parkinson's disease, PD)等神经退行性疾病的特征之一是伴随年龄增长逐渐加重的神经病理学症状与选择性神经元退化。神经退行性疾病模型猪可模拟病患脑组织致病蛋白沉淀聚集、神经元死亡等特征病变,显示出比转基因小鼠模型更为优越的临床前应用前景。2015 年,Zhou 等^[88]应用 CRISPR/Cas9 技术获得了 *PARK2* 与 *PINK1* 基因突变的猪细胞系,进行核移植克隆后得到基因编辑猪,经检测,克隆猪的神经元无法表达 PINK 1 与 Parkin 蛋白,而且 7 月龄猪未表现出明显的帕金森综合征,与人类神经退行性疾病随着年龄增长愈渐明显的病程相符。该研究首次实现了一个世代内大动物双基因的等位敲除,加速了大动物疾病模型的建立和异种器官移植研究进展。亨廷顿舞蹈症是常染色体显性遗传病,以特定神经元退化为特征,由亨廷顿基因上 CAG 密码子重复突变所致。CAG 三碱基重复过多会导致毒性蛋白产生,聚集于神经元并引起神经元死亡,最终出现亨廷顿舞蹈症。2018 年,Yan 等^[89]应用 CRISPR/Cas9 技术精准地将包含 150CAG 重复的人源亨廷顿突变基因插入猪 *HTT* 内源基因位点,经 SCNT 建立了表达人源突变型 HTT 的基因编辑猪,这是国际上首次建立的模拟神经退行病人基因突变的大动物模型。克隆猪表现出 HTT 患者神经元选择性退行病变的典型病理特征以及亨廷顿舞蹈样、呼吸衰竭等疾病表型,且这些疾病特征均可遗传至克隆动物后代。作为神经退行性疾病研究领域的重大突破,亨廷顿基因敲入猪的建立既可促进神经退行性疾病的新药研发筛选、干细胞治疗手段的临床前评价,也为更深入了解神经细胞死亡的机制及寻找有效的治疗方法提供支持。

3.1.6 其他疾病模型

血管性血友病因子(von Willebrand factor, vWF)作为重要的血浆成分,在血凝过程中具有重要作用。

vWF 基因突变可导致遗传性血管性血友病(von Willebrand disease, *vWD*)的发生,病人表现为出血时间延长等凝血障碍。Hai 等^[90]通过将靶向切割 *vWF* 的 Cas9 与 sgRNA 注射受精卵胞浆后,利用胚胎移植技术高效获得存活的 *vWF* 双等位基因敲除猪。猪的心血管与循环系统与人体具有可比性,*vWD*-KO 猪的肺部 *vWF* 表达基本被阻断,凝血因子 FVIII 降解失活且机体出血时间延长,与 *vWD* 患者的凝血功能障碍等临床表型相似。这是首次利用 CRISPR/Cas9 技术构建的具有特定疾病表型的哺乳动物疾病模型,胚胎注射结合胚胎移植的发育方式,为基因修饰大动物模型的快速建立提供了一种可行方法,对人类 *vWF* 等遗传性疾病的发病机理与治疗方法的研究起到推动作用。2015 年,Zhou 等^[88]利用 Cas9-nickase 载体对猪胎儿成纤维细胞进行转染,获得纯合的酪氨酸酶基因(*Tyrosinase*, *TYR*)敲除细胞系,经体细胞克隆后建立 *TYR* 基因敲除的克隆猪。由于酪氨酸酶的失活,克隆猪体内黑色素等酪氨酸酶反应产物缺失,其皮肤、虹膜异常白化,表现为典型的白化病特征。该研究应用 Cas9-nickase,避免了因脱靶效应而对克隆胚胎的发育过程造成过大影响。猪皮肤的结构、厚度、色素沉着及血液供应方面都与人类更为相似,因此该克隆猪可在白化病发病机制方面的研究上发挥作用。纯发-甲型外胚叶发育不良症(ectodermal dysplasia-9, ED-9)患者毛发稀少且甲营养不良。Han 等^[91]通过单链寡核苷酸结合 CRISPR/Cas9 和 SCNT 的技术路线,成功在猪体内引入导致 ED-9 的 *Hoxc13* 基因无义突变,制备出毛发缺失、毛囊与蹄发育异常的 ED-9 克隆猪,可应用于 ED-9 与皮肤癌等疾病的发病机制、动物体毛发再生以及伤口愈合等需要无毛动物模型的研究。

3.2 新型基因组编辑技术在异种器官移植和人源化器官研究上的应用

临床器官移植是治疗终末期器官衰竭的重要方法,器官移植医学领域所面临的一大困境就是器官资源匮乏。异种器官移植和人源化器官培育等方法有望解决这个难题,而猪器官被视为合适的器官移植供体。虽然猪的心脏、肾脏等器官在规模尺寸、生理机能上与特定病理反应上跟人类器官接近,但

种属间器官不相容性和猪内源逆转录病毒(porcine endogenous retrovirus, PERV)跨物种感染的隐患仍然限制异种器官移植的临床应用^[92, 93]。通过基因编辑技术对器官移植过程中与免疫排斥反应相关的基因加以修饰,有望使猪源器官更加接近人类免疫系统可接受的范围;嵌合体大动物体内培育人源化器官同样是解决移植器官供源匮乏的可能途径。基因编辑猪的制备,有望加速猪-人种间器官移植的研究,推动人源化器官的培育,缓解移植器官供源不足的紧张局面。

3.2.1 猪-灵长类器官移植过程的免疫不相容

外源器官植入后与人类免疫系统的不相容阻碍了异种器官移植的临床应用进展。特异性敲除猪体内抗原分子或其合成酶基因可缓解异种器官移植出现的免疫排斥反应。导致宿主对猪器官发生超急性排斥反应(hyperacute rejection)的表面抗原主要包括由 *GGTA1* (α -1,3-galactosyltransferase)基因编码的 α -1,3-galactosyltransferase、*CMAH* (cytidine monophosphate-N-acetylneuraminic acid hydroxylase)基因编码的 Meu5Gc,以及 *B4GALNT2* (beta-1,4-N-acetyl-galactosa-aminyl transferase 2)基因编码的 Sda blood group 等。 α -1,3-galactose (α -gal)表面抗原作为在猪细胞表面广泛表达的多聚糖分子,是猪-灵长类动物器官移植进程中导致超急性排斥反应的最主要抗原分子,因此敲除 α -gal 的合成酶基因 *GGTA1*,对于解决免疫排斥反应、延长移植器官存活具有重要意义。2002 年,Lai 等^[94]基于传统基因打靶载体介导的同源重组和 SCNT 技术对猪细胞 *GGA1* 基因进行同源置换后,制备出首例敲除半乳糖苷转移酶的克隆猪,对异种器官移植研究的具有重大意义。2011 年,Hauschild 等^[95]应用 ZFN 技术对 *GGTA1* 基因进行高效双敲除,获得细胞表面完全无 Gal 表达的转基因猪,其抗补体介导溶解(complement-mediated lysis)能力与利用传统同源重组技术获得的转基因猪相似,很大程度上抑制了猪源器官移植人体后超急性排斥反应的发生。*CMAH* 编码的 N-羟乙酰神经氨酸(N-glycolylneuraminic acid, Neu5Gc)是除 Gal 之外的主要免疫抗原,Neu5Gc 可在 *GGTA1*-KO 猪上皮细胞广泛表达^[96]。Lutz 等^[97]结合 ZFN 技术和 SCNT

构建出 *GGTA1/CMAH* 双基因敲除猪, 并证明人体血清对 *GGTA1/CMAH*-KO 猪细胞的免疫排斥性较 *GGTA1*-KO 猪更小。2017 年, Martens 等^[98]利用 CRISPR/Cas9 敲除猪胚胎内上述 3 种糖类抗原的编码基因 *GGTA1*、*CMAH* 和 *B4GALNT2* 后克隆出三基因敲除猪, 检测发现人类血清对三基因敲除细胞的异种免疫抗性结合显著减少。这些特异性抗原敲除猪将在抗免疫排斥药物的筛选、建立更安全器官供体、临床转化等研究上发挥重要作用, 一系列技术路线的建立也为最终培育出适用于临床应用的猪器官奠定基础。尽管目前应用基因修饰技术降低猪异种器官移植中的免疫排斥反应已取得了显著进展, 然而在应用中仍有诸多问题需要解决, 猪器官的异种移植仍然任重道远。

3.2.2 PERV 的跨物种感染

PERV 属 γ -逆转录病毒(γ -retroviruses)。目前尽管尚未有 PERV 感染人体的报道, 但 PERV 感染体外培养条件下的人类细胞并整合入细胞基因组仍然是猪器官移植必须解决的隐患。为克服猪-人器官移植过程中 PERV 传播至宿主这一隐患, 在实现了对 PK15 细胞内 62 拷贝的 *PERV pol* 序列的靶向敲除后^[99], 2017 年, Niu 等^[100]基于 CRISPR/Cas9 系统联合细胞凋亡抑制因子等策略, 培育出全部 *PERV pol* 拷贝突变、PERV 失活的克隆猪。检测发现, 克隆猪不仅生理表现正常, 而且其 PERV 对人类细胞的感染率大幅降低, 从而消除了器官移植中 PERV 感染的潜在隐患。这一研究成果通过基因组修饰解决了异种器官移植中潜在的内源病毒感染问题, 为移植医学研究提供相对稳定安全的研究材料, 再次展示了基因组编辑技术对推动解决供体器官紧缺局面的意义, “定制”异种器官的医学应用前景光明。

3.2.3 培育人源化器官

人类多能干细胞(human pluripotent stem cells, hPSCs)具备多潜能分化能力, 可在动物胚胎内整合发育, 通过囊胚间的互补, 可形成异种嵌合体并获得再生器官。以小鼠为宿主培育 hPSC 衍生的人-小鼠异种嵌合体的效率低, 以猪为活体系统培育人-猪嵌合体则有望培育出正常的人源器官。2013 年,

Matsunaria 等^[101]利用异体猪的卵裂球胚胎对因 *Hes1* 基因表达异常而导致胰腺发育缺陷的克隆猪胚进行补偿, 成功制备出健康可育的嵌合体猪, 胰腺器官由异体胚胎发育而来, 证实了同种异源间囊胚互补与再生器官的可行性。2017 年, Wu 等^[102]应用 CRISPR/Cas9 系统对猪胚胎中胰腺发育相关基因 *PDX1* 进行敲除, 为结合 hPSC 移植建立大动物体内再生人类胰腺的平台奠定基础。随后, Wu 等^[103]利用 Cas9/gRNA 获得小鼠基因修饰胚, 建立了多能囊胚补偿平台, 研究人员通过将大鼠 PSC 注射进器官发育缺陷小鼠的胚胎内, 验证了大鼠 PSC 对嵌合体的生成以及再生器官发育的贡献作用。该研究还首次评估了基于 naive、intermediated 以及 primed 等不同分化状态的 hiPSCs (human induced pluripotent stem cells) 对人-猪嵌合胚胎发育的作用, 不同状态的 hiPSCs 在猪胚胎中形成不等程度的嵌合, 为在动物体内再生人类器官打下了理论基础。这项研究有力地推动基于基因组编辑技术制备人-猪嵌合胚胎以及人类器官再生的研究进程, 同时也必须认识到, 以基因编辑猪为载体再生人体器官的科学进程仍受多方面条件的制约, 既包括对胚胎微环境调控尚缺精确认识等技术短板, 也包括研究过程中必须面临道德与监管等问题。

4 结语与展望

基因组编辑技术已经成为生命科学发展进程的里程碑式的突破, 是生命科学研究方法的革新。多种生物基因组测序的相继完成, 为解析具体基因功能、创造符合研究目的遗传变异提供了资源。CRISPR/Cas9 等基因组编辑技术可对动物体基因进行高效精确的修饰, 同时可以避免外源遗传物质整合入宿主基因组, 体现出传统转基因技术无可比拟的优势。基于基因组编辑技术与体细胞克隆技术的策略制备基因编辑猪, 在遗传病理研究、医疗技术开发等医学研究的应用上具有独特优势, 并已在模拟人类疾病和异种器官移植研究上获得突破。此外, 基因组编辑技术还可以应用于基因治疗, 为遗传性的机体代谢障碍、器官衰竭病变的医治提供有别于药物治疗的新思路。利用基因组编辑操作对疾

病模型动物开展疾病相关突变基因位点的碱基编辑、基因替换或敲除等基因修复治疗,可为多种遗传病开发有效的治疗手段,并提供重要的临床前安全与策略指导,其医学应用前景巨大。然而,基因组编辑技术的应用也面临着体内导入效率不高、潜在脱靶效应和基因编辑效率不足等缺点,且目前制备的疾病模型猪种类偏少,仍然需要大量工作以建立更多能精确模拟人类疾病表型的疾病模型猪。此外,如何最大限度地解决异种器官移植过程中宿主对外源器官的免疫排斥、彻底清除外源器官携带的内源性病毒仍需继续研究;动物体内培育人源器官的研究应用更是处于初级阶段,相关法律条例的评估与颁布也迫在眉睫。尽管如此,基因编辑大动物的研究无疑将为生物医学的发展注入更大的动力。随着人们对生物遗传机制认识的深入,对猪等大动物进行精确的基因编辑操作将会更为简易和高效,基因编辑猪也会在生物医学研究中得到更为广泛的应用并使得相关领域受益。

参考文献(References):

- [1] Hinnen A, Hicks JB, Fink GR. Transformation of yeast. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1978, 75(4): 1929–1933. [DOI]
- [2] Orr-Weaver TL, Szostak JW, Rothstein RJ. Yeast transformation: a model system for the study of recombination. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1981, 78(10): 6354–6358. [DOI]
- [3] Rothstein RJ. One step gene disruption in yeast. *Methods Enzymol*, 1983, 101: 202–211. [DOI]
- [4] Thomas KR, Folger KR, Capecchi MR. High frequency targeting of genes to specific sites in the mammalian genome. *Cell*, 1986, 44(3): 419–428. [DOI]
- [5] Rouet P, Smih F, Jasin ME. Expression of a site-specific endonuclease stimulates homologous recombination in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91(13): 6064–6068. [DOI]
- [6] Smih F, Rouet P, Romanienko PJ, Jasin M. Double-strand breaks at the target locus stimulate gene targeting in embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res*, 1995, 23(24): 5012–5019. [DOI]
- [7] Kim YG, Cha J, Chandrasegaran S. Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to *Fok* I cleavage domain. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(3): 1156–1160. [DOI]
- [8] Christian M, Cermak T, Doyle EL, Schmidt C, Zhang F, Hummel A, Bogdanove AJ, Voytas DF. Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. *Genetics*, 2010, 186(2): 757–761. [DOI]
- [9] Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, Amemura M, Nakata A. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J Bacteriol*, 1987, 169(12): 5429–5433. [DOI]
- [10] Mojica FJ, Díez-Villaseñor C, Soria E, Juez G. Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of *Archaea*, *Bacteria* and mitochondria. *Mol Microbiol*, 2000, 36(1): 244–246. [DOI]
- [11] Jansen R, Embden JD, Gaastra W, Schouls LM. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Mol Microbiol*, 2002, 43(6): 1565–1575. [DOI]
- [12] Vergunst AC, Hooykaas PJJ. Recombination in the plant genome and its application in biotechnology. *Crit Rev Plant Sci*, 1999, 18 (1): 1–31. [DOI]
- [13] Mengiste T, Paszkowski J. Prospects for the precise engineering of plant genomes by homologous recombination. *Biol Chem*, 1999, 380(7–8): 749–758. [DOI]
- [14] Lieber MR. The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway. *Annu Rev Biochem*, 2010, 79: 181–211. [DOI]
- [15] Krejci L, Altmannova V, Spirek M, Zhao X. Homologous recombination and its regulation. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40(13): 5795–5818. [DOI]
- [16] Heyer WD, Ehmsen KT, Liu J. Regulation of homologous recombination in eukaryotes. *Annu Rev Genet*, 2010, 44: 113–139. [DOI]
- [17] Bibikova M, Beumer K, Trautman JK, Carroll D. Enhancing gene targeting with designed zinc finger nucleases. *Science*, 2003, 300(5620): 764. [DOI]
- [18] Miller J, McLachlan AD, Klug A. Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor TFIIIA from *Xenopus oocytes*. *EMBO J*, 1985, 4(6): 1609–1614. [DOI]
- [19] Wolfe SA, Nekludova L, Pabo CO. DNA recognition by Cys2His2 zinc finger proteins. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 2000, 29: 183–212. [DOI]
- [20] Klug A. The discovery of zinc fingers and their applications in gene regulation and genome manipulation. *Q Rev Biophys*, 2010, 43(1): 1–21. [DOI]
- [21] Urnov FD, Rebar EJ, Holmes MC, Zhang HS, Gregory PD. Genome editing with engineered zinc finger nucleases. *Nat Rev Genet*, 2010, 11(9): 636–646. [DOI]
- [22] Sugisaki H, Kanazawa S. New restriction endonucleases

- from *Flavobacterium okeanokoites* (*Fok*) and *Micrococcus luteus* (*Mlu*). *Gene*, 1981, 16(1–3): 73–78. [DOI]
- [23] Vanamee ES, Santagata S, Aggarwal AK. *Fok* requires two specific DNA sites for cleavage. *J Mol Biol*, 2001, 309(1): 69–78. [DOI]
- [24] Bitinaite J, Wah DA, Aggarwal AK, Schildkraut I. *Fok* dimerization is required for DNA cleavage. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(18): 10570–10575. [DOI]
- [25] Händel EM, Alwin S, Cathomen T. Expanding or restricting the target site repertoire of zinc-finger nucleases: The inter-domain linker as a major determinant of target site selectivity. *Mol Ther*, 2009, 17(1): 104–111. [DOI]
- [26] Bibikova M, Carroll D, Segal DJ, Trautman JK, Smith J, Kim YG, Chandrasegaran S. Stimulation of homologous recombination through targeted cleavage by chimeric nucleases. *Mol Cell Biol*, 2001, 21(1): 289–297. [DOI]
- [27] Bibikova M, Golic M, Golic KG, Carroll D. Targeted chromosomal cleavage and mutagenesis in *Drosophila* using zinc-finger nucleases. *Genetics*, 2002, 161(3): 1169–1175. [DOI]
- [28] Santiago Y, Chan E, Liu PQ, Orlando S, Zhang L, Urnov FD, Holmes MC, Guschin D, Waite A, Miller JC, Rebar EJ, Gregory PD, Klug A, Collingwood TN. Targeted gene knockout in mammalian cells by using engineered zinc-finger nucleases. *Proc Natl Acad Sci USA*, 105(15): 5809–5814. [DOI]
- [29] Geurts AM, Cost GJ, Freyvert Y, Zeitler B, Miller JC, Choi VM, Jenkins SS, Wood A, Cui X, Meng X, Vincent A, Lam S, Michalkiewicz M, Schilling R, Foeckler J, Kalloway S, Weiler H, Ménoret S, Anegón I, Davis GD, Zhang L, Rebar EJ, Gregory PD, Urnov FD, Jacob HJ, Buelow R. Knockout rats via embryo microinjection of zinc-finger nucleases. *Science*, 2009, 325(5939): 433. [DOI]
- [30] Doyon Y, McCammon JM, Miller JC, Faraji F, Ngo C, Katibah GE, Amora R, Hocking TD, Zhang L, Rebar EJ, Gregory PD, Urnov FD, Amacher SL. Heritable targeted gene disruption in zebrafish using designed zinc-finger nucleases. *Nat Biotechnol*, 2008, 26(6): 702–708. [DOI]
- [31] Yang D, Yang H, Li W, Zhao B, Ouyang Z, Liu Z, Zhao Y, Fan N, Song J, Tian J, Li F, Zhang J, Chang L, Pei D, Chen YE, Lai L. Generation of PPAR γ mono-allelic knockout pigs via zinc-finger nucleases and nuclear transfer cloning. *Cell Res*, 2011, 21(6): 979–982. [DOI]
- [32] Cui X, Ji D, Fisher DA, Wu Y, Briner DM, Weinstein EJ. Targeted integration in rat and mouse embryos with zinc-finger nucleases. *Nat Biotechnol*, 2010, 29(1): 64–67. [DOI]
- [33] Durai S, Mani M, Kandavelou K, Wu J, Porteus MH, Chandrasegaran S. Zinc finger nucleases: Custom-designed molecular scissors for genome engineering of plant and mammalian cells. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33(18): 5978–5990. [DOI]
- [34] Rahman SH, Maeder ML, Joung JK, Cathomen T. Zinc-finger nucleases for somatic gene therapy: the next frontier. *Hum Gene Ther*, 2011, 22(8): 925–933. [DOI]
- [35] Bogdanove AJ, Voytas DF. TAL effectors: customizable proteins for DNA targeting. *Science*, 2011, 333(6051): 1843–1846. [DOI]
- [36] Carlson DF, Fahrenkrug SC, Hackett PB. Targeting DNA with fingers and TALENs. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2012, 1: e3. [DOI]
- [37] Miller JC, Tan S, Qiao G, Barlow KA, Wang J, Xia DF, Meng X, Paschon DE, Leung E, Hinkley SJ, Dulay GP, Hua KL, Ankoudinova I, Cost GJ, Urnov FD, Zhang HS, Holmes MC, Zhang L, Gregory PD, Rebar EJ. A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. *Nat Biotechnol*, 2011, 29(2): 143–148. [DOI]
- [38] Moscou MJ, Bogdanove AJ. A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors. *Science*, 2009, 326(5959): 1501. [DOI]
- [39] Boch J, Scholze H, Schornack S, Landgraf A, Hahn S, Kay S, Lahaye T, Nickstadt A, Bonas U. Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type effectors. *Science*, 2009, 326(5959): 1509–1512. [DOI]
- [40] Deng D, Yin P, Yan C, Pan X, Gong X, Qi S, Xie T, Mahfouz M, Zhu JK, Yan N, Shi Y. Recognition of methylated DNA by TAL effectors. *Cell Res*, 2012, 22(10): 1502–1504. [DOI]
- [41] Deng D, Yan C, Pan X, Mahfouz M, Wang J, Zhu JK, Shi Y, Yan N. Structural basis for sequence-specific recognition of DNA by TAL effectors. *Science*, 2012, 335(6069): 720–723. [DOI]
- [42] Zhang F, Cong L, Lodato S, Kosuri S, Church GM, Arlotta P. Efficient construction of sequence-specific TAL effectors for modulating mammalian transcription. *Nat Biotechnol*, 2011, 29(2): 149–153. [DOI]
- [43] Cermak T, Doyle EL, Christian M, Wang L, Zhang Y, Schmidt C, Baller JA, Somia NV, Bogdanove AJ, Voytas DF. Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39(12): e82. [DOI]
- [44] Morbitzer R, Elsaesser J, Hausner J, Lahaye T. Assembly of custom TALE-type DNA binding domains by modular cloning. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39(13): 5790–5799. [DOI]

- [45] Mussolino C, Morbitzer R, Lütge F, Dannemann N, Lahaye T, Cathomen T. A novel TALE nuclease scaffold enables high genome editing activity in combination with low toxicity. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39(21): 9283–9293. [DOI]
- [46] Deveau H, Garneau JE, Moineau S. CRISPR/Cas system and its role in phage-bacteria interactions. *Annu Rev Microbiol*, 2010, 64: 475–493. [DOI]
- [47] Horvath P, Barrangou R. CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. *Science*, 2010, 327(5962): 167–170. [DOI]
- [48] Deltcheva E, Chylinski K, Sharma CM, Gonzales K, Chao Y, Pirzada ZA, Eckert MR, Vogel J, Charpentier E. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase . *Nature*, 2011, 471(7340): 602–607. [DOI]
- [49] Carte J, Wang R, Li H, Terns RM, Terns MP. Cas6 is an endoribonuclease that generates guide RNAs for invader defense in prokaryotes. *Genes Dev*, 2008, 22(24): 3489–3496. [DOI]
- [50] Haurwitz RE, Jinek M, Wiedenheft B, Zhou K, Doudna JA. Sequence- and structure-specific RNA processing by a CRISPR endonuclease. *Science*, 2010, 329(5997): 1355–1358. [DOI]
- [51] Carte J, Pfister NT, Compton MM, Terns RM, Terns MP. Binding and cleavage of CRISPR RNA by Cas6. *RNA*, 2010, 16(11): 2181–2188. [DOI]
- [52] Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, Hsu PD, Wu X, Jiang W, Marraffini LA, Zhang F. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 2013, 339(6121): 819–823. [DOI]
- [53] Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 2012, 337(6096): 816–821. [DOI]
- [54] Makarova KS, Haft DH, Barrangou R, Brouns SJ, Charpentier E, Horvath P, Moineau S, Mojica FJ, Wolf YI, Yakunin AF, van der Oost J, Koonin EV. Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol*, 2011, 9(6): 467–477. [DOI]
- [55] Garneau JE, Dupuis MÈ, Villion M, Romero DA, Barrangou R, Boyaval P, Fremaux C, Horvath P, Magadán AH, Moineau S. The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature*, 2010, 468(7320): 67–71. [DOI]
- [56] Hwang WY, Fu Y, Reyon D, Maeder ML, Tsai SQ, Sander JD, Peterson RT, Yeh JR, Joung JK. Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(3): 227–229. [DOI]
- [57] Jinek M, Jiang F, Taylor DW, Sternberg SH, Kaya E, Ma E, Anders C, Hauer M, Zhou K, Lin S, Kaplan M, Iavarone AT, Charpentier E, Nogales E, Doudna JA. Structures of Cas9 endonucleases reveal RNA-mediated conformational activation. *Science*, 2014, 343(6176): 1247997–1247997. [DOI]
- [58] Sternberg SH, LaFrance B, Kaplan M, Doudna JA. Conformational control of DNA target cleavage by CRISPR–Cas9. *Nature*, 2015, 527(7576): 110–113. [DOI]
- [59] Komor AC, Kim YB, Packer MS, Zuris JA, Liu DR. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature*, 2016, 533(7603): 420–424. [DOI]
- [60] Gaudelli NM, Komor AC, Rees HA, Packer MS, Badran AH, Bryson DI, Liu DR. Programmable base editing of A•T to G•C in genomic DNA without DNA cleavage. *Nature*, 2017, 551(7681): 464–471. [DOI]
- [61] The “new favorite” of gene editing technology—single base editors. *Hereditas (Beijing)*, 2017, 39(12): 1115–1121.
魏瑜, 张晓辉, 李大力. 基因编辑之“新宠”——单碱基基因组编辑系统. *遗传*, 2017, 39(12): 1115–1121. [DOI]
- [62] Hu JH, Miller SM, Geurts MH, Tang W, Chen L, Sun N, Zeina CM, Gao X, Rees HA, Lin Z, Liu DR. Evolved Cas9 variants with broad PAM compatibility and high DNA specificity. *Nature*, 2018, 556(7699): 57–63. [DOI]
- [63] Hsu PD, Scott DA, Weinstein JA, Ran FA, Konermann S, Agarwala V, Li Y, Fine EJ, Wu X, Shalem O, Cradick TJ, Marraffini LA, Bao G, Zhang F. DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nature Biotechnol*, 2013, 31(9): 827–832. [DOI]
- [64] Fu Y, Foden JA, Khayter C, Maeder ML, Reyon D, Joung JK, Sander JD. High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. *Nature Biotechnol*, 2013, 31(9): 822–826. [DOI]
- [65] Zheng W, Gu F. Progress of application and off-target effects of CRISPR/Cas9. *Hereditas (Beijing)*, 2015(10): 1003–1010.
郑武, 谷峰. CRISPR/Cas9 的应用及脱靶效应研究进展. *遗传*, 2015(10): 1003–1010. [DOI]
- [66] Pattanayak V, Ramirez CL, Joung JK, Liu DR. Revealing off-target cleavage specificities of zinc-finger nucleases by *in vitro* selection. *Nat Methods*, 2011, 8(9): 765–770. [DOI]
- [67] Bhakta MS, Henry IM, Ousterout DG, Das KT, Lockwood SH, Meckler JF, Wallen MC, Zykovich A, Yu

- Y, Leo H, Xu L, Gersbach CA, Segal DJ. Highly active zinc-finger nucleases by extended modular assembly. *Genome Res*, 2013, 23(3): 530–538. [DOI]
- [68] Miller JC, Holmes MC, Wang J, Guschin DY, Lee YL, Rupniewski I, Beausejour CM, Waite AJ, Wang NS, Kim KA, Gregory PD, Pabo CO, Rebar EJ. An improved zinc-finger nuclease architecture for highly specific genome editing. *Nat Biotechnol*, 2007, 25(7): 778–785. [DOI]
- [69] Wang J, Friedman G, Doyon Y, Wang NS, Li CJ, Miller JC, Hua KL, Yan JJ, Babiarz JE, Gregory PD, Holmes MC. Targeted gene addition to a predetermined site in the human genome using a ZFN-based nicking enzyme. *Genome Res*, 2012, 22(7): 1316–1326. [DOI]
- [70] Ran FA, Hsu PD, Lin CY, Gootenberg JS, Konermann S, Trevino AE, Scott DA, Inoue A, Matoba S, Zhang Y, Zhang F. Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell*, 2013, 154(6): 1380–1389. [DOI]
- [71] Cho SW, Kim S, Kim Y, Kweon J, Kim HS, Bae S, Kim JS. Analysis of off-target effects of CRISPR/Cas-derived RNA-guided endonucleases and nickases. *Genome Res*, 2014, 24(1): 132–141. [DOI]
- [72] Slaymaker IM, Gao L, Zetsche B, Scott DA, Yan WX, Zhang F. Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity. *Science*, 2016, 351(6268): 84–88. [DOI]
- [73] Pattanayak V, Lin S, Guilinger JP, Ma E, Doudna JA, Liu DR. High-throughput profiling of off-target DNA cleavage reveals RNA-programmed Cas9 nuclease specificity. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(9): 839–843. [DOI]
- [74] Tsai SQ, Zheng Z, Nguyen NT, Liebers M, Topkar VV, Thapar V, Wyvekens N, Khayter C, Iafrate AJ, Le LP, Aryee MJ, Joung JK. GUIDE-seq enables genome-wide profiling of off-target cleavage by CRISPR-Cas nucleases. *Nat Biotechnol*, 2015, 33(2): 187–197. [DOI]
- [75] Hutchinson L, Kirk R. High drug attrition rates—where are we going wrong? *Nat Rev Clin Oncol*, 2011, 8(4): 189–190. [DOI]
- [76] Nissen SE, Wolski K. Effect of rosiglitazone on the risk of myocardial infarction and death from cardiovascular causes. *N Engl J Med*, 2007, 356(24): 2457–2471. [DOI]
- [77] Yang D, Yang H, Li W, Zhao B, Ouyang Z, Liu Z, Zhao Y, Fan N, Song J, Tian J, Li F, Zhang J, Chang L, Pei D, Chen YE, Lai L. Generation of PPAR- γ mono-allelic knockout pigs via zinc-finger nucleases and nuclear transfer cloning. *Cell Res*, 2011, 21(6): 979–982. [DOI]
- [78] Montag J, Petersen B, Flögel AK, Becker E, Lucas-Hahn A, Cost GJ, Mühlfeld C, Kraft T, Niemann H, Brenner B. Successful knock-in of Hypertrophic Cardiomyopathy-mutation R723G into the *MYH7* gene mimics HCM pathology in pigs. *Sci Rep*, 8(1): 4786. [DOI]
- [79] Watanabe M, Nakano K, Matsunari H, Matsuda T, Maehara M, Kanai T, Kobayashi M, Matsumura Y, Sakai R, Kuramoto M, Hayashida G, Asano Y, Takayanagi S, Arai Y, Umeyama K, Nagaya M, Hanazono Y, Nagashima H. Generation of interleukin-2 receptor gamma gene knockout pigs from somatic cells genetically modified by zinc finger nuclease-encoding mRNA. *PLoS One*, 2013, 8(10): e76478. [DOI]
- [80] McBlane JF, van Gent DC, Ramsden DA, Romeo C, Cuomo CA, Gellert M, Oettinger MA. Cleavage at a V(D)J recombination signal requires only RAG1 and RAG2 proteins and occurs in two steps. *Cell*, 1995, 83(3): 387–395. [DOI]
- [81] Ru H, Chambers MG, Fu TM, Tong AB, Liao M, Wu H. Molecular mechanism of V(D)J recombination from synaptic RAG1-RAG2 complex structures. *Cell*, 2015, 163(5): 1138–1152. [DOI]
- [82] Lee K, Kwon DN, Ezashi T, Choi YJ, Park C, Ericsson AC, Brown AN, Samuel MS, Park KW, Walters EM, Kim DY, Kim JH, Franklin CL, Murphy CN, Roberts RM, Prather RS, Kim JH. Engraftment of human iPS cells and allogeneic porcine cells into pigs with inactivated RAG2 and accompanying severe combined immunodeficiency. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111(20): 7260–7265. [DOI]
- [83] Huang J, Guo X, Fan N, Song J, Zhao B, Ouyang Z, Liu Z, Zhao Y, Yan Q, Yi X, Schambach A, Frampton J, Esteban MA, Yang D, Yang H, Lai L. RAG1/2 knockout pigs with severe combined immunodeficiency. *J Immunol*, 2014, 193(3): 1496–1503. [DOI]
- [84] Carlson DF, Tan W, Lillico SG, Stverakova D, Proudfoot C, Christian M, Voytas DF, Long CR, Whitelaw CB, Fahrenkrug SC. Efficient TALEN-mediated gene knockout in livestock. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(43): 17382–17387. [DOI]
- [85] Huang L, Hua Z, Xiao H, Cheng Y, Xu K, Gao Q, Xia Y, Liu Y, Zhang X, Zheng X, Mu Y, Li K. CRISPR/Cas9-mediated ApoE $^{-/-}$ and LDLR $^{-/-}$ double gene knockout in pigs elevates serum LDL-C and TC levels. *Oncotarget*, 2017, 8(23): 37751–37760. [DOI]
- [86] Luo Y, Li J, Liu Y, Lin L, Du Y, Li S, Yang H, Vajta G, Callesen H, Bolund L, Sørensen CB. High efficiency of BRCA1 knockout using rAAV-mediated gene targeting: developing a pig model for breast cancer. *Transgenic Res*, 2011, 20(5): 975–988. [DOI]

- [87] Wang K, Jin Q, Ruan D, Yang Y, Liu Q, Wu H, Zhou Z, Ouyang Z, Liu Z, Zhao Y, Zhao B, Zhang Q, Peng J, Lai C, Fan N, Liang Y, Lan T, Li N, Wang X, Wang X, Fan Y, Doevedans PA, Sluijter JPG, Liu P, Li X, Lai L. Cre-dependent Cas9-expressing pigs enable efficient *in vivo* genome editing. *Genome Res*, 2017, 27(12): 2061–2071. [DOI]
- [88] Zhou X, Xin J, Fan N, Zou Q, Huang J, Ouyang Z, Zhao Y, Zhao B, Liu Z, Lai S, Yi X, Guo L, Esteban MA, Zeng Y, Yang H, Lai L. Generation of CRISPR/Cas9-mediated gene-targeted pigs via somatic cell nuclear transfer. *Cell Mol Life Sci*, 2015, 72(6): 1175–1184. [DOI]
- [89] Yan S, Tu Z, Liu Z, Fan N, Yang H, Yang S, Yang W, Zhao Y, Ouyang Z, Lai C, Yang H, Li L, Liu Q, Shi H, Xu G, Zhao H, Wei H, Pei Z, Li S, Lai L, Li XJ. A huntingtin knockin pig model recapitulates features of selective neurodegeneration in Huntington's disease. *Cell*, 2018, 173(4): 989–1002.e13. [DOI]
- [90] Hai T, Teng F, Guo R, Li W, Zhou Q. One-step generation of knockout pigs by zygote injection of CRISPR/Cas system. *Cell Res*, 2014, 24(3): 372–375. [DOI]
- [91] Han K, Liang L, Li L, Ouyang Z, Zhao B, Wang Q, Liu Z, Zhao Y, Ren X, Jiang F, Lai C, Wang K, Yan S, Huang L, Guo L, Zeng K, Lai L, Fan N. Generation of Hoxc13 knockout pigs recapitulates human ectodermal dysplasia-9. *Hum Mol Genet*, 2017, 26(1): 184–191. [DOI]
- [92] Ibrahim Z, Busch J, Awwad M, Wagner R, Wells K, Cooper DK. Selected physiologic compatibilities and incompatibilities between human and porcine organ systems. *Xenotransplantation*, 2006, 13(6): 488–499. [DOI]
- [93] Le Tissier P, Stoye JP, Takeuchi Y, Patience C, Weiss RA. Two sets of human-tropic pig retrovirus. *Nature*, 1997, 389(6652): 681–682. [DOI]
- [94] Lai L, Kolber-Simonds D, Park KW, Cheong HT, Greenstein JL, Im GS, Samuel M, Bonk A, Rieke A, Day BN, Murphy CN, Carter DB, Hawley RJ, Prather RS. Production of alpha-1,3-galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning. *Science*, 2002, 295(5557): 1089–1092. [DOI]
- [95] Hauschild J, Petersen B, Santiago Y, Queisser AL, Carnwath JW, Lucas-Hahn A, Zhang L, Meng X, Gregory PD, Schwinzer R, Cost GJ, Niemann H. Efficient generation of a biallelic knockout in pigs using zinc-finger nucleases. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(29): 12013–12017. [DOI]
- [96] Song KH, Kang YJ, Jin UH, Park YI, Kim SM, Seong HH, Hwang S, Yang BS, Im GS, Min KS, Kim JH, Chang YC, Kim NH, Lee YC, Kim CH. Cloning and functional characterization of pig CMP-N-acetylneuraminic acid hydroxylase for the synthesis of N-glycolylneuraminic acid as the xenoantigenic determinant in pig-human xenotransplantation. *Biochem J*, 2010, 427(1): 179–188. [DOI]
- [97] Lutz AJ, Li P, Estrada JL, Sidner RA, Chihara RK, Downey SM, Burlak C, Wang ZY, Reyes LM, Ivary B, Yin F, Blankenship RL, Paris LL, Tector AJ. Double knockout pigs deficient in N-glycolylneuraminic acid and G alactose α -1, 3- Galactose reduce the humoral barrier to xenotransplantation. *Xenotransplantation*, 2013, 20(1): 27–35. [DOI]
- [98] Martens GR, Reyes LM, Butler JR, Ladowski JM, Estrada JL, Sidner RA, Eckhoff DE, Tector M, Tector AJ. Humoral reactivity of renal transplant-waitlisted patients to cells from GGTA1 /CMH/B4GalNT2, and SLA Class I knockout pigs. *Transplantation*, 2017, 101(4): e86–e92. [DOI]
- [99] Yang L, Güell M, Niu D, George H, Lesha E, Grishin D, Aach J, Shrock E, Xu W, Poci J, Cortazio R, Wilkinson RA, Fishman JA, Church G. Genome-wide inactivation of porcine endogenous retroviruses (PERVs). *Science*, 2015, 350(6264): 1101–1104. [DOI]
- [100] Niu D, Wei HJ, Lin L, George H, Wang T, Lee IH, Zhao HY, Wang Y, Kan Y, Shrock E, Lesha E, Wang G, Luo Y, Qing Y, Jiao D, Zhao H, Zhou X, Wang S, Wei H, Güell M, Church GM, Yang L. Inactivation of porcine endogenous retrovirus in pigs using CRISPR-Cas9. *Science*, 2017, 357(6357): 1303–1307. [DOI]
- [101] Matsunari H, Nagashima H, Watanabe M, Umeyama K, Nakano K, Nagaya M, Kobayashi T, Yamaguchi T, Sumazaki R, Herzenberg LA, Nakauchi H. Blastocyst complementation generates exogenic pancreas *in vivo* in apancreatic cloned pigs. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(12): 4557–4562. [DOI]
- [102] Wu J, Vilarino M, Suzuki K, Okamura D, Bogliotti YS, Park I, Rowe J, McNabb B, Ross PJ, Belmonte JCI. CRISPR-Cas9 mediated one-step disabling of pancreas-togenesis in pigs. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 10487–10487. [DOI]
- [103] Wu J, Platero-Luengo A, Sakurai M, Sugawara A, Gil MA, Yamauchi T, Suzuki K, Bogliotti YS, Cuello C, Morales Valencia M, Okumura D, Luo J, Vilariño M, Parrilla I, Soto DA, Martinez CA, Hishida T, Sánchez-Bautista S, Martinez-Martinez ML, Wang H, Nohalez A, Aizawa E, Martinez-Redondo P, Ocampo A, Reddy P, Roca J, Maga EA, Esteban CR, Berggren WT, Nuñez Delicado E, Lajara J, Guillen I, Guillen P, Campistol JM, Martinez EA, Ross PJ, Izpisua Belmonte JC. Interspecies chimerism with mammalian pluripotent stem cell. *Cell*, 2017, 168(3): 473–486. [DOI]