

遗传修饰技术在绵羊分子设计育种中的应用

王海涛^{1,2}, 李亭亭³, 黄勋^{1,2}, 马润林^{1,2,4}, 刘秋月¹

1. 中国科学院种子创新研究院, 北京 100101

2. 中国科学院遗传与发育生物学研究所, 分子发育生物学国家重点实验室, 北京 100101

3. 浙江农林大学, 杭州 311300

4. 中国科学院大学, 北京 100049

摘要: 利用遗传修饰技术可以使动物在遗传水平发生改变, 实现在个体内表达外源基因或对其内源基因的功能造成影响。在动物育种中, 可以利用遗传修饰技术在分子水平进行设计并实现品种的快速改良。从传统的遗传修饰技术、病毒载体、精子载体等介导的遗传修饰技术到新型人工核酸酶介导的基因编辑技术, 尤其是 CRISPR/Cas9 为代表的人工核酸酶的运用使得基因编辑动物的制备变得更加高效快捷, 并迅速在多个物种中得到应用。这些方法也已经拓展到了绵羊(*Ovis aries*)遗传育种领域。利用遗传修饰技术在绵羊中进行分子育种比传统的育种方式具有更大的优势, 可以使用多种策略直接对性状进行快速改良, 并且可以加快育种进程。本文详细介绍了遗传修饰技术在绵羊中的研究历程, 探讨了通过遗传修饰技术进行绵羊分子设计育种的可能性, 并提出以上技术和方法在绵羊育种中面临的问题和挑战。

关键词: 绵羊; 遗传修饰; 基因编辑; 动物育种

Application of genetic modification technologies in molecular design breeding of sheep

Haitao Wang^{1,2}, Tingting Li³, Xun Huang^{1,2}, Runlin Ma^{1,2,4}, Qiuyue Liu¹

1. Innovation Academy for Seed Design, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

2. State Key Laboratory of Molecular Developmental Biology, Institute of Genetics and Developmental Biology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

3. Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, China

4. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract: Genetic modification technologies can be used for modifying animal genome to express exogenous genes or affect the function of endogenous genes. In animal breeding, genetic modification technologies allow the rapid generation of germplasms with beneficial traits. It includes traditional genetic modification, virus or sperm

收稿日期: 2021-03-08; 修回日期: 2021-04-14

基金项目: 中国科学院战略性先导科技专项(A类)(编号: XDA24030205)资助[Supported by the Strategic Priority Research Program of Chinese Academy of Sciences (No. XDA24030205)]

作者简介: 王海涛, 博士, 博士后, 研究方向: 农业动物基因编辑。E-mail: wanght@genetics.ac.cn

通讯作者: 马润林, 博士, 研究员, 研究方向: 免疫功能基因组学与免疫遗传学。E-mail: rlma@ucas.ac.cn

刘秋月, 博士, 副研究员, 研究方向: 肉羊遗传育种。E-mail: qyliu@genetics.ac.cn

DOI: 10.16288/j.ycz.21-087

网络出版时间: 2021/5/6 10:33:00

URI: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20210430.1638.002.html>

carrier-mediated genetic modification and nuclease-mediated genome editing, especially the CRISPR/Cas9, one of the artificial nuclease genome editing technologies, have been applied in genome editing in many domestic animals including sheep (*Ovis aries*). Compared with conventional strategies used for animal breeding, there is great value for sheep breeding improvement by using genome editing technology, which is more effective and timesaving. In this review, we summarize the approaches of genetic modification in sheep and discuss the possibility of molecular design and breeding of sheep by genome editing technologies. We also identify the potential bottlenecks and challenges of these technologies in sheep breeding.

Keywords: sheep; genetic modification; genome editing; animal breeding

绵羊(*Ovis aries*)是畜牧业中重要的农业动物之一, 约在 1 万年前即被人类所驯化^[1], 主要为人类提供皮毛、肉类和奶制品等。为了获得具有优良性状的绵羊品种, 人们通过各种方式进行品种的选育, 期望获得具有较高肉奶产量、生产优质皮毛或具有较高抗病能力的绵羊品种。传统的育种方式是通过表型选择将优良性状个体进行保留。整个过程需要对其亲本进行选种, 包括选定亲本品系、确定杂交组合、杂交代数等。为了固定表型, 需要采用适当的近交, 但近交会引起动物的表型退化、品质衰退等。杂交产生的后代也会出现性状分离的现象, 育种过程非常缓慢且复杂。

自基因的概念提出以来, 分子生物学和基因工程理论和技术获得了较大的发展, 明确了遗传变异可以引起性状的变化。因此, 可以通过对基因进行修饰或编辑实现新品种培育。通过物理或化学诱变可以在动物中实现诱变育种^[2], 但诱变产生的基因突变往往是随机性的, 并且会产生无育种价值的性状或不利于育种的性状。遗传修饰育种直接针对调控性状的基因, 通过转基因或基因编辑等方式对基因进行分子设计, 在保留品种固有优良性状的基础上, 引入新性状, 改善劣势性状, 而且可以突破品种的局限, 将其他物种的性状引入, 从而克服物种间的生殖隔离, 把不同物种的优质性状集合和重组, 实现定向选择育种。分子设计育种相比传统育种在可预见性和选择上有了极大的提高。

通过遗传修饰在动物中进行分子设计育种, 理论上仅需要一个世代就能获得稳定遗传的品系, 可以大大缩短育种时间, 降低育种成本。通过直接对基因进行操作, 在获得的基因修饰个体中就能获得稳定的基因型。基因修饰操作的过程对个体的要求

较低, 需要品种内具有典型性状的个体提供体细胞、胚胎或卵细胞即可。基因修饰个体的制备需要代孕母畜, 但代孕受体的选择标准也较为宽松, 不需要本品种内的最优个体, 可以用物种内其他品种中具有优良繁殖能力的个体, 拓宽了选择范围, 同时保有一定数量的受体即可。通过规模化的基因修饰, 可以在短时间内获得一定数量的基因修饰动物群体。通过将获得的纯合子进行交配, 对群体进行扩繁, 可以在几代之内就建立相当规模的稳定遗传品系, 相较于杂交育种缩短了时间, 提高了效率。

1 遗传修饰技术在绵羊中的应用

在绵羊等大动物中, 遗传育种对性状的改良主要包括改善原有性状以及引入新性状。可以转入外源基因序列以获得原物种不具备的表型或功能。遗传修饰的方式最初为外源基因的随机插入或同源重组介导的插入或删除, 同时需要借助受精卵显微注射或体细胞核移植(somatic cell nuclear transfer, SCNT)的方式获得遗传修饰绵羊。在自然情况下同源重组发生的概率极低, 只有 10^{-6} ^[3], 遗传修饰细胞的筛选难度较大, 适合在干细胞中进行筛选, 而绵羊的干细胞体系目前并不成熟。因此, 提高同源重组效率成为分子设计育种中的关键。

在以人工核酸酶为代表的基因编辑技术出现后, 以 CRISPR/Cas(clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR associated 9)系统为代表的基因编辑逐渐成为遗传修饰的常用方法。人工核酸酶系统通过提高 DNA 双链断裂效率来提高同源重组的效率, 其原理为: 当基因组中出现双链缺口时, 启动基因组损伤修复机制, 包括非同源末端连

接(non-homologous end joining, NHEJ)修复, 或者存在同源供体的情况下, 启动同源重组修复(homology-directed repair, HDR), 将外源基因引入至重组区域^[4]。因此, 提高基因组中双链断裂的效率, 就能提高同源重组的能力, 从而提高基因打靶效率, 可以使随机的重组效率由原来的 $10^{-7} \sim 10^{-6}$ 提高至 $10^{-2} \sim 10^{-1}$ 。借助新型基因编辑工具, 不仅能实现外源基因在受体中稳定高效的表达, 还可以实现基因组中序列的缺失、碱基替换和插入等, 造成移码突变、氨基酸转换等。基因编辑工具的出现极大地丰富了遗传修饰的方法和策略。遗传修饰技术发展及在绵羊中的应用进程如图 1 所示。

制备遗传修饰大动物涉及多种原理和技术的应用以及繁杂的操作流程(图 2)。原理方面涉及随机插入、同源重组、DNA 碱基修复、转座子、RNAi 转录后调控等分子生物学基础概念。将这些概念转化为实际可操作的技术, 首先需要根据实验目的构建相应质粒载体, 其次要实现载体向细胞、胚胎甚至个体的转移。操作技术包括: 脂质体/病毒/精子等方法进行载体递送, mRNA 或蛋白质的直接显微注射, 体细胞核移植技术等获得基因被修饰的个体。总体可分为以下 3 部分: (1) 获得目的基因序列并通过限制性内切酶的酶切连接, 制备携带外源基因或具有敲除、点突变或干扰等功能的载体。例如具有同源

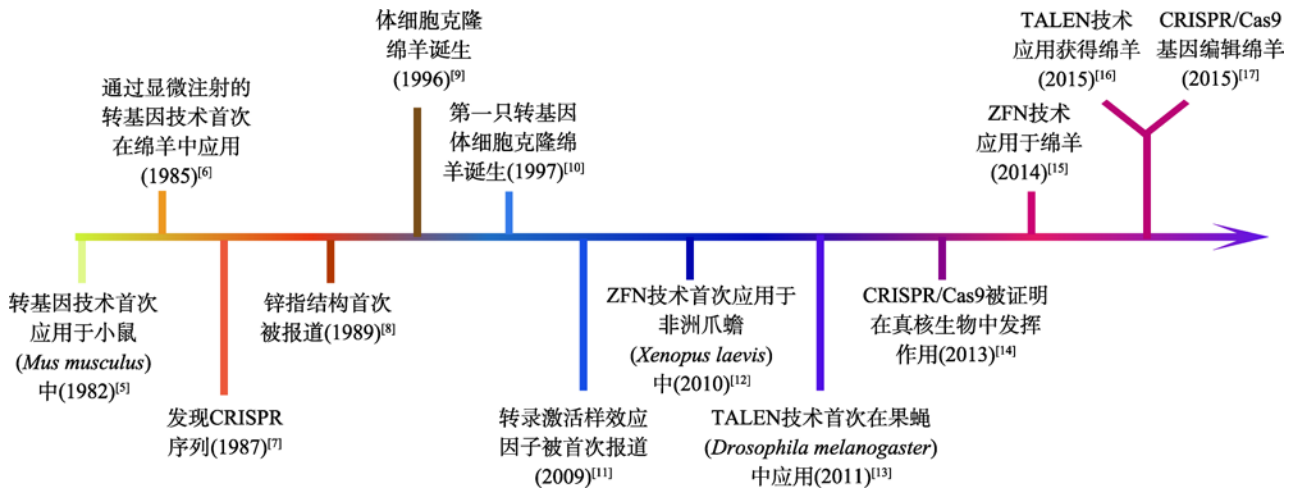


图 1 遗传修饰技术及其在绵羊中应用的里程碑事件

Fig. 1 Milestones in genetic modification and its application in sheep

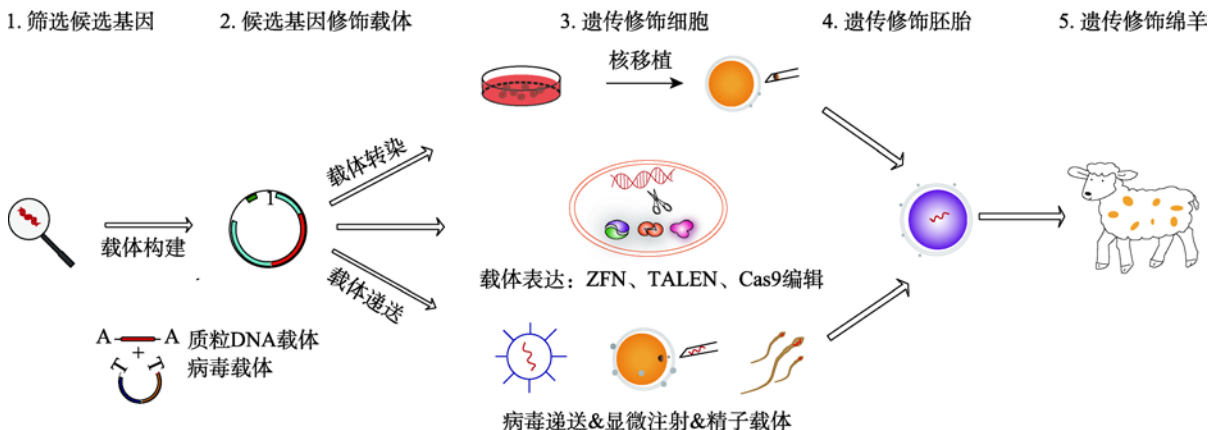


图 2 制备遗传修饰绵羊流程图

Fig. 2 Schematic of generating genetically modified sheep

制备遗传修饰绵羊之前, 需要确定候选基因, 通过载体构建获得具有各种候选基因修饰功能的载体。通过载体转染或各种递送方式, 在供体细胞或受精卵中载体表达并对基因组进行修饰或编辑。获得的遗传修饰胚胎移植入受体母羊中发育并获得遗传修饰绵羊。

重组功能的载体, 以及表达外源基因、转座子酶、siRNA、锌指核酸酶(zinc finger nucleases, ZFN)、转录激活因子样效应物核酸酶(transcription activator-like effector nucleases, TALEN)或 CRISPR/Cas9 等元件的载体, 或者体外获得具有基因修饰功能的 mRNA 或蛋白质。(2)通过细胞转染、病毒递送或显微注射等方式将载体、mRNA 或蛋白质转入体细胞或早期胚胎中, 对供体细胞或受精卵基因组进行遗传修饰。(3)发生基因修饰的供体细胞或受精卵再通过体细胞核移植技术或胚胎移植技术移入受体动物子宫内, 从而获得包括绵羊在内的多种遗传修饰动物。

1.1 传统的遗传修饰方法

在高效基因编辑技术建立以前, 在绵羊中主要通过基因组本身的同源重组或外源片段随机插入对基因进行修饰, 并结合显微注射或体细胞核移植技术获得遗传修饰个体。使用这种遗传修饰方式, 在基因组中发生基因编辑或重组的效率较低, 插入位点具有随机性, 并且容易产生嵌合体等特点。通过显微注射和体细胞核移植技术获得的转基因绵羊研

究结果见表 1。与最早获得的转基因小鼠(*Mus musculus*)类似, 第一只转基因绵羊也是通过显微注射获得。1985 年, 研究者将人生长激素基因(human growth hormone, *hGH*)通过显微注射注入绵羊胚胎, 通过胚胎移植入代孕受体中获得第一只转基因绵羊^[6]。在后续较长时间内, 人们通过显微注射制备了多种转基因绵羊, 如转羊生长激素基因的绵羊^[18,19]以及转 Visna 病毒糖蛋白绵羊等^[20]。

克隆羊多莉的诞生标志着哺乳动物体细胞克隆技术的建立^[9]。利用体细胞筛选获得稳定整合外源基因的单克隆细胞作为细胞核供体, 经过核移植和胚胎移植技术产下预期性状的克隆后代, 同时不存在显微注射产生嵌合的问题。研究人员最早通过此方法获得了能够在羊乳中表达人凝血因子的转基因绵羊^[10]。2001 年英国的罗斯林研究所通过同源重组结合体细胞克隆技术获得了 *oPRP* (ovine prion protein)和 *GGTA1* ($\alpha(1,3)$ galactosyl transferase)定点敲除的绵羊^[30]。该技术获得的细胞供体是通过同源重组获得的基因敲除单克隆细胞, 因此再通过体细胞核移植获得的克隆后代均为阳性个体。McCreath

表 1 通过显微注射和体细胞核移植技术获得的遗传修饰绵羊

Table 1 Genetic modified sheep generated by microinjection and somatic cell nuclear transfer

制备方法	基因名称	序列	编辑结果	表达情况	参考文献
显微注射	<i>hGH</i>	<i>GH</i> cDNA	随机整合	无	[6]
	<i>oGH</i> (ovine growth hormone)	<i>GH</i> cDNA	随机整合	表达	[18,19]
	<i>vLRT/vvENV</i> (virus long terminal repeat/visna virus envelope)	病毒 LTR 区	随机整合	表达	[20]
	<i>hGFR</i> (human growth hormone-releasing factor)/ <i>bGH</i> (bovine growth hormone)	<i>GH</i> cDNA	随机整合	无	[21]
	<i>hGFR/bGH</i>	minigene	随机整合	表达	[22]
	<i>haLAT</i> (human $\alpha 1$ -antitrypsin)	minigene	随机整合	表达	[23]
	<i>hAF IX</i> (human antihemophilic factor IX)	cDNA	随机整合	表达	[24]
	<i>hBCF VIII</i> (human blood clotting factor VIII)	cDNA	随机整合	表达	[25]
	<i>CAT</i> (chloramphenicol acetyl transferase)	编码序列	随机整合	表达	[26]
	<i>HTT</i> (Huntington)	人 <i>HD</i> cDNA	随机整合	表达	[27]
	<i>IGF1</i> (insulin-like growth factors)	cDNA	随机整合	表达	[28]
	<i>oTLR4</i> (ovine Toll-like receptor 4)	cDNA	随机整合	表达	[29]
体细胞核移植	<i>hF IX</i> (human factor IX)	完整编码区	随机整合	无	[10]
	<i>oPRP</i> 和 <i>GGTA1</i>	cDNA	定点敲除	<i>GGTA1</i> 和 <i>PRP</i> 敲除	[30]
	<i>COL1A1</i> 位点插入 AAT 基因	cDNA	定点插入	AAT 表达	[31]
	<i>oTLR4</i>	cDNA	随机整合	表达	[32]
	<i>Caenorhabditis elegans fat-1</i>	cDNA	随机整合	被沉默	[33]

等^[31]也通过同源重组及体细胞核移植技术获得了 *COL1A1* (ovine $\alpha 1(I)$ procollagen) 定点插入 *AAT* ($\alpha 1$ -antitrypsin) 的基因修饰绵羊。

显微操作技术理论上可以在任何能获得卵细胞的动物中进行操作, 甚至可以在胚盘下腔注射以获得遗传修饰禽类, 而体细胞核移植只能对两栖类、鱼类和哺乳类卵细胞进行操作。通过显微注射技术制备遗传修饰动物时, 在原核形成到第一次卵裂之间进行显微操作, 才能尽可能的避免产生嵌合体。早期获得遗传修饰动物的效率较低, 使得显微注射获得的个体大多数为野生型或嵌合体。而体细胞核移植技术可以将大量的筛选工作在细胞水平进行, 避免在出生的后代中产生大量阴性个体或嵌合体。

1.2 精子载体、慢病毒载体、转座子介导的遗传修饰

显微注射或体细胞核移植技术是将遗传修饰载体导入早期胚胎或细胞的传统方式, 此后又发展出利用精子或病毒等生物载体的导入方式。精子载体法的原理为, 通过将精子与 DNA 共孵育后, 将携带 DNA 的精子受精, 从而获得基因修饰的受精卵; 或者在绵羊睾丸中直接注射外源载体, 载体进入精子后再进行交配获得基因修饰后代。多个团队分别通过这种方法制备了 *SLC7A11* (solute carrier family 7 member 11)^[34]、*PPAR γ* (peroxisome proliferator-activated receptor gamma)^[35] 和 *LPL* (lipoprotein lipase)^[36] 的转基因绵羊, 并获得了具有表型的 F_1 后代。但这种方

法的重复性较差且效率较低。

慢病毒载体介导的基因修饰依赖于病毒感染细胞的能力, 通过将慢病毒注射到绵羊卵子或胚胎, 实现基因转移。通过慢病毒载体感染, 已获得了转 *GFP* (green fluorescent protein) 转基因羊^[37-39] 以及具有更高产毛性能的转 *FGF5* (fibroblast growth factor 5) 绵羊^[40]。结合显微注射和慢病毒载体的方法, 也获得了转入外源基因表达量较高的后代^[41,42]。病毒载体递送质粒相对于显微注射法和体细胞核移植方法相对简单, 甚至在小鼠中可以直接通过鼻腔或气管滴入的方法递送到肺部进行基因编辑^[43], 但这一方法在大动物中还未见报道。此外, 使用病毒载体法获得遗传修饰动物在安全性方面也会受到限制。

在基因组中存在具有特殊功能的序列, 也可被用于实现绵羊中基因遗传修饰。例如构建表达转座酶的质粒载体并结合其他递送方法, 即利用转座子的转座活性将序列插入基因组中特定区域, 在绵羊中已有报道(表 2)。Bevacqua 等^[44]通过 Tn5 或 SB (sleeping beauty) 转座子载体结合显微注射成功获得了遗传修饰绵羊个体; Hu 等^[45]则通过 SB 转座子介导的 RNAi 获得了 *MSTN* (myostatin) 敲低的绵羊个体。

一般情况下, 精子载体和慢病毒载体介导的遗传修饰技术不需要依赖精密的仪器设备和复杂的技术操作, 相比显微操作和体细胞和移植技术成本较低。利用转座子介导的遗传修饰, 是在高效精确的人工核酸酶技术规模运用之前的有效修饰方法。人工核酸酶技术出现后, 凭借在修饰效率上的巨大优

表 2 绵羊中使用病毒载体、精子载体或转座子介导的遗传修饰研究

Table 2 Studies on genetic modifications by using viral, sperm or transposon vectors in sheep

修饰方法	基因名称	辅助方法	编辑结果	参考文献
精子载体	<i>SLC7A11</i>	睾丸内注射	基因表达	[34]
	<i>PPARγ</i>	睾丸内注射	基因表达	[35]
	<i>LPL</i>	睾丸内注射	基因表达	[36]
	<i>eGFP</i>	慢病毒介导	基因表达	[46]
病毒载体	<i>eGFP</i>	显微注射	基因表达	[37-39]
	<i>FGF5</i>	显微注射	异位表达	[40]
	<i>GFP</i>	显微注射	基因表达	[41]
	<i>tdTomato</i> 、 <i>zYellow</i> 和 <i>acGFP</i>	显微注射	基因表达	[42]
转座子载体	Tn5 和 SB 转座子	显微注射	<i>GFP</i> 表达	[44]
	SB 转座子	RNAi	<i>MSTN</i> 敲低	[45]

势, 成为了在农业动物中的遗传修饰的主要方法。然而, 技术的创新无法突破动物生殖方式的局限, 畜禽动物本身的生殖方式决定了对其进行遗传修饰操作时, 可选择的载体递送方式以及修饰难度存在差异。例如, 哺乳动物可获得卵母细胞并在体外进行受精, 从而将受精卵与显微注射、转染等操作体系配合。而禽类的生殖方式决定了受精卵在离开母体之前, 已经经过卵裂等发育阶段成为多细胞的胚胎, 此外, 禽类的蛋壳也加大了对卵或胚胎进行遗传修饰操作的难度。

1.3 人工核酸酶介导的基因精准编辑

如前面所述, 通过显微注射和体细胞核移植技术, 可以实现外源基因的表达或内源基因的打靶, 但外源基因的插入是随机的, 打靶的效率也很低。随着人工核酸酶被证实可以运用于遗传修饰后, 动

物的基因修饰已经从最初单一的、随机性的转基因向基因组的精准敲入、敲除和点突变快速发展, 甚至可以实现时间和组织特异性的基因编辑。目前通过显微注射和 SCNT 结合常用的人工核酸酶技术获得基因编辑绵羊的方法如图 3 所示, 所报道获得的基因编辑绵羊如表 3 所示。

1.3.1 ZFN 介导的基因编辑

Lee 等^[8]于 1989 年首次报道了锌指结构, 后来逐渐发展为可用于基因编辑的锌指核酸酶技术。ZFN 系统通过序列识别结构域和切割结构域发挥作用。其中, 锌指蛋白由 Cys2-His2 蛋白单元组成, 可以与基因序列上的 3 个碱基识别^[65]。根据靶基因序列, 将多个蛋白单元串联组装而成的锌指蛋白即可对其识别, 串联结构越长, 就越有识别的特异性^[66]。起切割作用的为 *Fok I* 酶, 在锌指蛋白的引导下切割

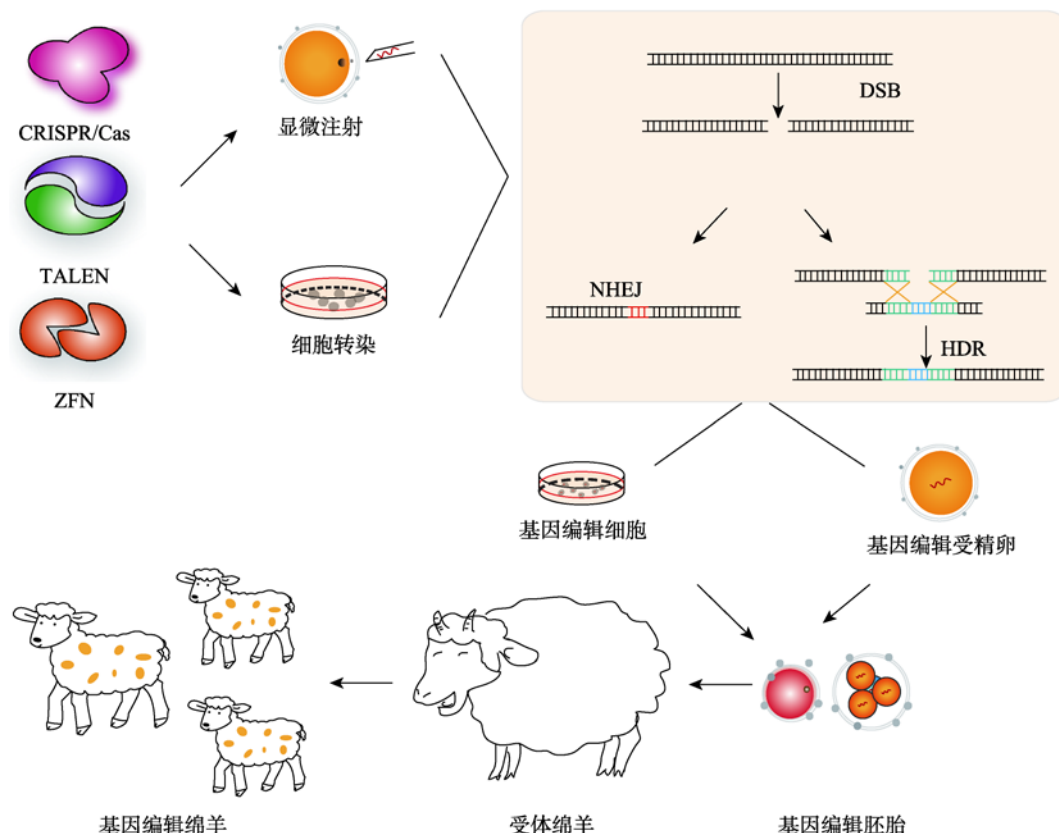


图 3 人工核酸酶技术制备基因编辑绵羊的方法示意图

Fig. 3 Schematic diagram for generating genome edited sheep using nuclease technique

ZFN、TALEN 或 Cas9 载体主要通过显微注射或体细胞核移植递送入体细胞或受精卵中, 在细胞中介导 DNA 双链断裂(DNA double strand break, DSB), 经过细胞内同源重组修复(HDR)或非同源末端连接(NHEJ)修复可以对内源基因进行编辑或引入外源基因, 获得的基因编辑细胞经过体细胞核移植(SCNT)获得后代, 基因编辑胚胎则通过胚胎移植入受体中获得后代。

表 3 人工核酸酶技术介导的基因编辑在绵羊遗传修饰中的应用

Table 3 Application of gene editing mediated by nuclease techniques in sheep genetic modification

人工核酸酶	基因名称	递送方法	编辑结果	参考文献
ZFN	<i>MSTN</i>	脂质体转染	基因敲除	[14, 47]
TALEN	<i>MSTN</i>	显微注射	基因敲除	[15]
	<i>MSTN</i>	核移植	基因敲除	[48, 49]
CRISPR/Cas9	<i>MSTN</i>	显微注射	基因敲除	[17, 50]
	<i>MSTN</i> 、 <i>ASIP</i> (agouti gene) 和 <i>BCO2</i> (beta-carotene oxygenase 2 β)	显微注射	基因敲除	[51]
	<i>TNSALP</i> (tissue-nonspecific alkaline phosphatase)	显微注射	基因敲除	[52]
	<i>PDX1</i> (pancreatic and duodenal homeobox protein 1)	显微注射	基因敲除	[53]
	<i>GFP</i>	显微注射	定点敲入	[54]
	<i>CFTR</i> (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator)	核移植	基因敲除	[55]
	<i>MSTN</i>	核移植	基因敲除	[56]
	<i>SOCS2</i> (suppressor of cytokine signaling 2)	显微注射	碱基突变	[57]
	<i>ASIP</i>	显微注射	基因敲除	[58]
	<i>BMPRII</i> (bone morphogenetic protein receptor type 1B)	显微注射	基因敲除	[59, 60]
	<i>otoferlin</i>	显微注射	重组敲入	[61]
	<i>FGF5</i>	显微注射	基因敲除	[62, 63]
	<i>ASMT</i> (acetylserotonin methyltransferase)	显微注射	随机整合	[64]

基因序列^[67]。而 *Fok I* 通常形成二聚体, 因此可以对序列造成双链断裂, 进而启动基因修复机制^[68]。带有 ZFN 表达元件的质粒载体正是通过这种机制对细胞基因组进行编辑。ZFN 首次在非洲爪蟾 (*Xenopus laevis*) 中被应用^[12], 此后在果蝇 (*Drosophila melanogaster*)^[69] 等动物中均被成功使用。

Salabi 等^[14]在绵羊肌肉卫星细胞中通过 ZFN 对 *MSTN* 进行了编辑并筛选获得了阳性克隆, 继而验证 *MSTN* 在卫星细胞中的功能。Zhang 等^[47]在绵羊成纤维细胞中成功敲除了 *MSTN* 基因, 并通过 ZFN mRNA 的显微注射获得了基因编辑胚胎。但目前未见有通过 ZFN 获得基因编辑绵羊的报道。ZFN 的使用比被动的同源重组在效率上有了较大的提高, 但由于其设计复杂、特异性较差、有细胞毒性以及容易脱靶等原因, 逐渐被后来的其他人工核酸酶所取代。

1.3.2 TALEN 介导的基因编辑

转录激活因子样效应物核酸酶是在植物病原体黄单胞菌 (*Xanthomonas*) 中发现的转录激活样效应物的基础上建立的^[11], 其结构和原理与 ZFN 相似, 包

括具有识别功能的 TALE 蛋白和切割功能的 *Fok I* 酶。TALE 具有结合 DNA 的功能, 其中含有的重复串联区域包含 34 个氨基酸, 第 12 和 13 位点的氨基酸对于识别特定的碱基起关键作用^[70]。在 TALE 导向下, *Fok I* 对基因组的特定区域进行切割。TALEN 以二聚体的形式发挥双链切割作用, 因此通常制作 1 对 TALEN 载体。自 TALEN 运用到果蝇中以来^[13], 在绵羊中的应用主要靶向绵羊 *MSTN* 基因。通过 TALEN mRNA 注射受精卵^[15], 或体细胞核移植均获得了 *MSTN* 编辑绵羊, 且在表型上与野生型呈现差异^[48, 49]。相比 ZFN, TALEN 在特异性方面有所提高, 但 TALE 分子较大、制备依然复杂, 需要的成本和时间过长。

1.3.3 CRISPR/Cas 介导的基因编辑

CRISPR/Cas 系统凭借其简单的设计、更高的效率, 为基因编辑带来了革命性的突破。CRISPR 全称为成簇的、规律间隔的短回文重复序列。Cas 为 CRISPR 相关基因编码的特异切割 DNA 分子的核酸酶, 于 1987 年在细菌和古细菌中被发现, 具有发挥细菌免疫功能的作用^[7]。CRISPR/Cas 系统分为 I、II

和 III, 其中 Cas9 属于 II 型系统, 仅需要一种蛋白参与即可完成序列切割^[71]。II 型系统包含 4 种分子, 其中 crRNA 和 tracrRNA 组成的双链复合体引导 Cas9 蛋白在序列上特定位置切割。在实际应用中, 通过 4 个碱基将 crRNA 和 tracrRNA 连接, 形成向导 RNA (single-guide RNA, sgRNA) 表达框。一个 Cas9 载体包含了 sgRNA 表达框和 Cas9 蛋白。由于生物体内含有 RNase, 只需要将 20 bp 的 sg 序列连入载体中, 就能获得可以在细胞内切割 DNA 序列的全部元件, sg 序列则为切割提供引导。sg 序列虽然依赖于相邻的 PAM 序列(5'-NGG-3'序列), 但在基因组中, NGG 序列普遍存在, 平均每 128 bp 序列中就可以找到一个位点^[71]。CRISPR/Cas 系统在 2013 年被证实可用于哺乳动物的基因编辑, 此后使用 CRISPR/Cas9 进行动物基因编辑的研究出现井喷式的成果。利用显微注射技术, 可以实现 Cas9 mRNA 及其 sgRNA 同时被注入受精卵中, 获得基因编辑的绵羊。Crispo 等^[17]和 Han 等^[50]利用该方法分别获得了 *MSTN* 编辑的绵羊, 其与野生型绵羊相比表现出明显的体重差异。Wang 等^[51]则获得了多个基因(*MSTN*、*ASIP* 和 *BCO2*)同时编辑的绵羊, 显示出 Cas9 系统的强大编辑能力。此外, 通过 Cas9 系统结合显微注射获得了 *TNSALP*^[52]及 *PDX1*^[53]基因编辑绵羊。另外, 还实现了绵羊 Rosa26 位点的外源基因定点插入^[54]。CRISPR 系统也可以与 SCNT 技术结合制备基因编辑绵羊, 如对 *CFTR* 基因编辑的绵羊^[55]以及 *MSTN* 编辑的绵羊^[56]。

1.3.4 单碱基编辑系统(base editing)

2016 年, Komor 等^[72]开发了基于 Cas9 系统的单碱基编辑系统, 该技术被评为 *Science* 杂志年度十大科学技术突破之一, 在基因治疗、遗传育种等领域具有应用的潜力。通过将失活或只有单链切割活性的 dCas9 (deactivated Cas, dCas) 及 nCas9 (nickase Cas, nCas) 与嘧啶或嘌呤脱氨酶结合, 单碱基编辑器可以精准的将胞嘧啶(C)转化为胸腺嘧啶(T), 或将腺嘌呤(A)转化为鸟嘌呤(G), 分别称之为胞嘧啶碱基编辑器(cytosine base editors, CBE)和腺嘌呤碱基编辑器(adenine base editors, ABE)^[73]。单碱基编辑器不需要依赖基因组双链断裂的产生, 也无需供体 DNA

参与编辑, 因此简化了基因编辑步骤。在绵羊中, Zhou 等^[57]通过 CBE 系统实现了 *SOCS2* 基因的 C>T 转换, 获得了具有更快生长速度的基因编辑滩羊, 为培育快长型绵羊品系奠定了基础。单碱基编辑系统将动物的遗传修饰从最初的整个基因的插入或大片段的敲除缩小到单个碱基的操作水平, 对动物中由单碱基突变导致性状变异的位点进行基因编辑。但单碱基编辑系统目前仅可以实现碱基的转换(transition)而无法实现碱基的颠换(transversion), 只能对符合碱基转换类型的特定突变进行编辑, 限制其对任意性状的操作。此外, Jin 等^[74]及 Zuo 等^[75]分别在不同物种中发现单碱基编辑系统存在严重的脱靶效应, 应用时可能存在较大风险。其中, Zuo 等^[75]还建立了名为 GOT1 (genome-wide off-target analysis by two-cell embryo injection)的脱靶检测技术, 能够显著提高单碱基编辑时脱靶检测的敏感性, 可以在全基因组范围内发现以往检测手段不易发现的脱靶位点。该方法为减少单碱基编辑技术应用的风险提供保障, 利于该技术的广泛应用。

目前, 除 Cas9 及单碱基编辑系统外, 还有多种 CRISPR 相关的基因编辑工具被开发出来。例如, 具有更高编辑效率的 Cas12 系统, 具有靶向 RNA 编辑功能的 Cas13 系统, 能够编辑单链 DNA 的 Cas14 系统^[76]以及更小分子量的 CasX^[77]等。除 Cas9 之外, 目前尚未见到其他 CRISPR/Cas 系统在绵羊中应用的报道, 但这些研究为绵羊的分子育种提供了较新的思路和方法。

2 利用遗传修饰在绵羊中进行分子设计育种的主要方向

在驯化初期, 人类饲养绵羊作为主要肉类来源, 因此驯化方向大多为肉用品种。此后, 为了获得羊毛等副产品, 人们又驯化出产毛量、毛色各异的地方绵羊品种。经过长期的人工驯化, 现在的绵羊品种与其祖先在体型外貌、行为、生殖能力等方面显示了巨大差异, 并在品种间出现显著变异。人工选择会在基因组上留下与动物性状相关的选择信号或分子标记。通过遗传修饰在绵羊中进行分子育种, 不仅使育种时间大为缩短, 也可以将多种优良性状

聚合,一次实现多个性状的改良。在绵羊中,通过遗传修饰进行分子设计育种主要体现在增强抗病抗逆能力,包括抗病毒、细菌及寄生虫能力和抗寒、抗高温高湿能力;改良生产性状,包括肉产量、肉品质、奶品质;改善羊毛产量和品质,包括毛长度、产量和强度;提高繁殖力,包括排卵数和产羔数等方面;制备动物模型,包括人类疾病模型或制备药品等。利用遗传修饰在绵羊中进行分子设计育种的应用方向如图 4 所示。

2.1 通过分子设计育种改善羊毛性状

从克隆羊多莉出生到现在的 20 多年间,国内外针对上述性状开展了多项遗传改良方面的研究。在提高羊毛性状方面,Damak 等^[26,78]获得的 *IGF1* 转基因绵羊 F₁ 代的羊毛产量提高了 6.2%,但 F₂ 代的羊毛产量提高效果却不显著。Bawden 等^[28]将毛角蛋白 II 基因在皮质中特异性表达,获得的转基因羊毛结构发生改变,外观富有光泽且卷曲度下降。多项获得 *FGF5* 基因编辑绵羊的研究都证实转基因个体羊

毛产量比野生型绵羊有显著提高^[38,45]。Zhang 等^[58]通过显微注射和 Cas9 技术敲除了 *ASIP* 基因获得毛色发生变化的基因编辑绵羊。He 等^[34]通过睾丸注射进行 *SLC7A11* 基因编辑也获得了毛色变化的绵羊。

2.2 通过分子设计育种改变肉产量及品质

在改善绵羊产肉量及肉品质方面是研究者投入精力最多的领域。Amdas 等^[19]获得的转生长激素基因绵羊可过量表达生长激素,使生长速度增加同时减少脂肪含量。牛生长激素^[21]以及人生长激素^[6]都曾被转入绵羊中以提高绵羊生长速度。在提高产肉量方面,*MSTN* 基因是大部分研究者选择的靶基因。*MSTN* 敲除的绵羊大部分能获得生长速度较快、体重显著增加以及肌纤维增大的表型。Proudfoot 等^[16]、Crispo 等^[17]、Hu 等^[45]、Zhao 等^[48]、Li 等^[49]、Han 等^[50]以及 Zhang 等^[56]通过 TALEN 或 Cas9 等方法结合显微注射或体细胞核移植获得了 *MSTN* 敲除绵羊,且取得预期表型。通过 Cas9 介导的 *SOCS2* 基因单碱基编辑绵羊同样表现出显著提升的生长速度^[57]。

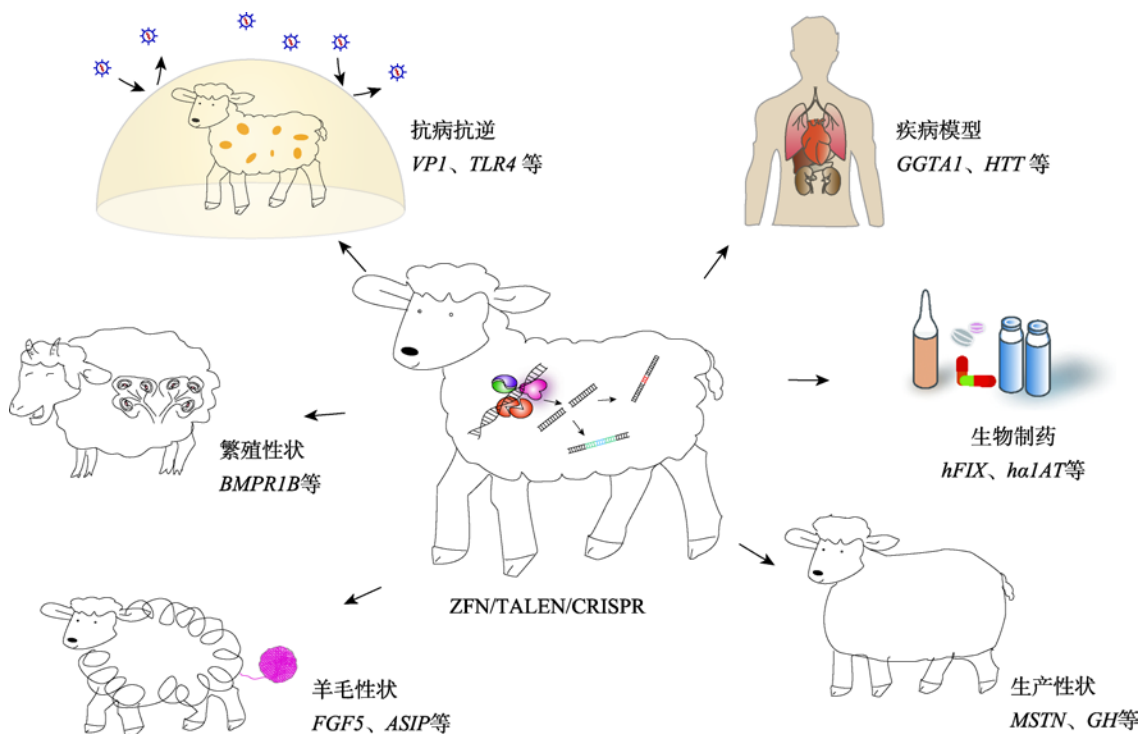


图 4 利用遗传修饰在绵羊中进行分子设计育种的应用方向

Fig. 4 Applications of molecular design breeding in sheep using genetic modification

通过对性状相关的基因进行修饰,在绵羊中可以实现多个方向的应用,例如生产性状,包括肉产量、肉质、生长速度等;毛纤维性状,包括羊毛产量、结构、毛色等;繁殖性状,包括产羔数等;高抗病能力;制备人类疾病模型;通过乳腺反应器生产药物等。

绵羊肉品质的改良主要集中在减少肌间脂肪含量和改善脂肪成分方向, 主要通过导入外源基因和对脂肪代谢相关通路中成员进行编辑来实现。目前, 已获得了 *PPAR γ* ^[35]、*LPL*^[36]和 *Fat1*^[33,79]的转基因绵羊。

2.3 通过分子设计育种进行绵羊抗病及疾病模型研究

抗病育种研究主要包括针对病原体进行干扰、针对内源病原体受体进行敲除、转入具有病毒抗原的基因以及诱导动物体内产生抗体 4 个方面。Denning 等^[30]通过基因敲除获得了 4 只 *PrP* 单等位基因敲除绵羊。Clements 等^[20]制备了转入羊髓鞘脱落病毒核衣壳蛋白基因的绵羊, 在该绵羊血液中检测到了 vvENV 糖蛋白的抗体。Deng 等^[80]通过睡美人转座子将口蹄疫病毒 VP1 蛋白转入绵羊中, 转基因绵羊在体外攻毒实验中表现出抗病能力。此外, *TLR4* 基因也被转入绵羊中获得具有抗病能力的转基因绵羊^[32]。

在生物医药或人类疾病模型制备方面, 主要包括绵羊乳腺生物反应器制备药物或建立人类疾病模型绵羊。从 20 世纪 90 年代起, 出现了多个转人凝血因子绵羊的报道, 并可以在绵羊乳腺中获得人凝血因子, 用于治疗血友病等血液疾病。2000 年, McCreath 等^[31]将人 α -1-抗胰蛋白基因定点整合在绵羊的 *COL1A1* 基因中, 获得了首例基因打靶绵羊。人 *HTT* 突变体转基因绵羊的建立为人亨廷顿舞蹈症的研究提供了疾病模型^[27,46]。在动物疾病模型领域, Denning 等^[30]获得的 *GGTA1* 敲除绵羊为异种器官移植的研究奠定了基础。Williams 等^[52]将 *TNSALP* 基因进行编辑, 获得了模拟人 HPP (Hypophosphatasia) 综合症的绵羊模型。Vilarino 等^[53]获得了 *PDX1* 基因敲除绵羊, 同样出现胰腺缺失的表型。Fan 等^[56]获得的 *CFTR* 基因编辑绵羊, 表现出与人囊性纤维化相似的表型。Menchaca 等^[61]将 *otoferlin* 突变型通过 Cas9 介导的单链同源重组转入绵羊中, 获得了耳聋模型的绵羊。Ma 等^[64]将褪黑激素(melatonin)基因转入绵羊中, 获得了在乳腺中表达褪黑激素的转基因绵羊。

2.4 通过分子设计育种改善绵羊繁殖性能

绵羊的繁殖性状是羊实际生产中最受关注的性

状。影响绵羊产羔的主效基因为 *FecB*, 即骨形态发生蛋白 *BMP1B* 在 A746G 位置发生了氨基酸突变, 该突变能显著提高绵羊的产羔能力^[59]。目前已有 Cas9 介导的 *BMP1B* 基因编辑绵羊^[59,60], 但其后代的产羔表型还未见报道。

除上述获得的已知功能的基因修饰绵羊, 还有部分绵羊中定位清晰但功能不完全明确的主效基因, 也可做为后续基因编辑的研究对象, 如与产羔数相关的 *BMP15* (bone morphogenetic protein 15)、*GDF9* (growth differentiation factor 9)等^[81]; 与绵羊椎骨数相关的 *VRTN* (vertebrae development homolog)基因^[82]; 与改善肉质相关的 *MC4R* (melanocortin-4 receptor) 基因^[83]和 *FABP4* (fatty acid-binding protein 4)^[84]等。目前已经在绵羊中开展遗传修饰研究的基因及其相关功能见表 4。这些研究为绵羊分子设计育种提供了可行的思路。

近年来, 我国肉羊规模化养殖比例一直在提升, 随着养殖方式的转变, 生长快、繁殖能力强且饲料转化率高的舍饲肉羊品种将会愈发受市场认可。但生长、繁殖以及代谢这些性状均为多基因控制复杂性状, 如何在传统育种理论上更好引入分子育种概念是需要探索的。一方面针对这些重要经济性性状的部分功能明确的主效基因, 可直接利用以上的遗传修饰方法快速获得性能突出的基因编辑动物做为育种新材料; 另一方面对于目前尚不确定的功能位点, 可以通过这些遗传修饰手段直接在目标动物中验证功能位点的有效性, 进一步促进育种过程中分子标记辅助选择的准确度。

与猪(*Sus scrofa*)相比, 绵羊中进行遗传修饰的研究无论在数量和质量上都比较低。其原因首先在于两个物种的养殖数量和研究重要性方面差距较大; 其次从技术层面, 猪为多胎动物且养殖规模较大, 卵母细胞相对容易获得, 体外培养体系更成熟, 且细胞对体外环境的耐受性更好; 另外猪的遗传修饰模型除了涉及畜牧业, 还常作为疾病模型或器官移植来源延伸到医学研究领域, 因此更多的团队以猪为研究对象。相比较而言, 绵羊繁殖能力低于猪, 较难获得大量的卵母细胞。目前在绵羊中进行遗传修饰操作的目的是主要为品种遗传改良, 在疾病模型等领域研究较少。但是, 绵羊也是医学中神经生物

表 4 重要性状基因在基因修饰绵羊中的研究

Table 4 Studies on crucial genes in genetically modified sheep

性状类型	基因名称	基因类型	基因功能	位点变化	基因修饰绵羊(预期)表型	参考文献
生长性状	<i>GH</i>	外源基因	促进生长	cDNA 随机整合	生长加快	[6,18,19,21,22]
	<i>MSTN</i>	内源基因	抑制肌肉生长	RNAi 敲低或敲除	敲除后肌肉量增加	[15,17,45,48-50,56]
	<i>SOCs2</i>	内源基因	促进骨发育	单碱基突变	点突变体型增大, 体重增加	[57]
羊毛纤维	<i>CAT</i>	外源基因	氯霉素抗性	cDNA 随机整合	羊毛产量	[26]
	<i>SLC7A11</i>	内源基因	谷氨酸转移	cDNA 随机整合	毛色变化	[34]
	<i>FGF5</i>	内源基因	调节毛发生长	定点敲除(移码突变)	敲除后毛产量增加	[38,45]
	<i>ASIP</i>	内源基因	黑皮质素拮抗剂	定点敲除(移码突变)	改变毛色	[58]
	<i>IGF1</i>	外源基因	生长调节	cDNA 随机整合	外源基因表达后毛产量增加	[78]
抗病抗逆	<i>vLRT/vvENV</i>	外源基因	ENV 蛋白	随机整合	产生抗体	[20]
	<i>TLR4</i>	外源基因	炎症反应	cDNA 随机整合	增强抗病能力	[31,32]
	<i>VPI shRNA</i>	外源基因	口蹄疫病毒蛋白	随机整合	干扰口蹄疫病毒基因组	[80]
繁殖性状	<i>ha1AT</i>	外源基因	蛋白酶抑制剂	Minigene 随机整合	外源基因表达	[23]
	<i>hFIX</i>	外源基因	凝血	cDNA 随机整合	外源基因表达	[24,25]
	<i>HTT</i>	外源基因	影响神经系统	cDNA 随机整合	亨廷顿舞蹈症	[27,69]
	<i>PPARγ</i>	内源基因	脂肪沉积	cDNA 随机整合	增加肌间脂肪	[35]
	<i>LPL</i>	内源基因	脂肪沉积	cDNA 随机整合	增加肌间脂肪	[36]
	<i>TNSALP</i>	内源基因	降低碱性磷酸酶活性	单碱基突变	人 HPP 综合征模型	[52]
	<i>PDX1</i>	内源基因	胰腺发育	定点敲除(移码突变)	敲除后胰腺缺失	[53]
	<i>CFTR</i>	外源基因	膜信号转导调节	定点敲除(移码突变)	囊性纤维化模型	[55]
	<i>BMPRII</i>	内源基因	卵泡发育	定点重组插入	增加产羔数	[59]
	<i>otoferlin</i>	外源基因	听力形成	定点重组插入	耳聋模型	[61]
	<i>ASMT</i>	外源基因	褪黑激素合成	cDNA 随机整合	过表达增加褪黑激素表达量	[64]
	<i>Rosa-26</i>	友好位点	无	定点插入	外源基因插入后稳定表达	[54]

学以及脊柱发育研究等方面的良好研究对象, 未来的绵羊分子设计育种研究也可以更多的应用于建立医用模型。

3 遗传修饰技术在绵羊中应用的问题及展望

分子设计育种代表着未来种业的发展方向, 近年来在遗传修饰技术方面发展迅速, 但总体看来家畜分子育种尤其是绵羊分子育种的研究还处于初级阶段, 距离商业化以及实际生产还有较长路要走。其中的问题主要包括功能基因研究不够明确, 生产效率低且成本高, 生产周期长以及较难通过生物安全评价等。

3.1 功能基因选择和表达调控研究不够明确

分子生物学和基因组学研究经过几十年的迅猛发展, 已经取得了瞩目的成就, 但是对于畜禽大动物尤其是绵羊而言, 由于基因组的解析、基因功能的挖掘以及基因表达调控模式探究等方面的研究远远落后于人类以及模式动物, 只有极少数性状被定位到了致因突变并阐明了遗传机理。而且绵羊和其他家畜的重要经济性状大多为数量性状, 这类性状存在多基因协同或拮抗表达或者存在印记效应等, 导致遗传操作的难度较大。传统的转基因方法的随机插入可能造成表达不稳定, 影响其他基因的表达; 生长相关基因敲除或突变, 会造成动物瘫痪或器官发育异常; 繁殖相关基因突变, 会造成母畜不育或

难产等。这些问题仅通过革新基因编辑技术并不能从根本上解决。在畜禽大动物上, 可以通过可靠的遗传资源群体、准确的表型数据测定并结合现有的大数据进行遗传定位分析, 同时利用分子生物学手段解析致病基因及突变的调控机理, 最终利用合理的基因编辑手段获得分子设计个体。但这个过程周期长且耗费大, 需要团队合作。目前, 已发现的可能影响绵羊表型的基因及其相应的功能突变见表5。

3.2 制备遗传修饰动物的生产效率低且成本较高

在绵羊、山羊(*Capra hircus*)和猪等大动物中, 无论是通过显微操作技术还是体细胞核移植技术制备遗传修饰动物, 都存在效率偏低的问题。通过显微注射方法获得基因编辑个体时, 会存在产生的基因编辑个体嵌合现象, 即产生的基因编辑后代个体中包含不同的基因型。其原因在于受精卵注射核酸后, 没有立即对胚胎进行编辑, 而在胚胎卵裂后才对不同细胞各自进行编辑而产生不同的基因型, 因此, 应尽快在受精后立即进行显微注射, 以提高胚胎发育早期发生基因编辑的概率, 从而降低产生嵌合后代的概率。此外, 对注射核酸的总量及浓度也需要优化调整。在绵羊、山羊和猪中通过显微注射获得遗传修饰动物的效率均可达到10%以上甚至更高, 而体细胞核移植技术克隆效率低, 且去核过程会对细胞质造成较大损伤。通过克隆胚胎获得基因编辑绵羊、山羊和猪的效率往往不超过5%, 实验获得绵羊、山羊和猪个体的效率统计见表6。

为了提高遗传修饰动物的效率, 找到引发效率低下的原因是关键。不同动物物种之间, 影响遗传修饰的因素以及阳性个体获得效率存在显著差异。研究显示, 体细胞核移植制备克隆动物的主要障碍包括移植后胚胎存活率低且容易流产, 其主要原因为体细胞重编程过程中的多种表观修饰障碍。在猪中, *RTL1* (retrotransposon-like-1)的甲基化异常是以猪诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPS)为供体时克隆成功与否的重要影响因素, *RTL1*的敲除和代偿实验证明克隆动物的关键因素在于*RTL1*的表达是否正常^[104]。制备克隆猴(*Macaca fascicularis*)的难点也在于胚胎发育过程中的甲基化修饰, 例如存在H3K9三甲基化, 当添加了H3K9me3

去甲基化酶KDM4D和组蛋白去乙酰化酶HDAC抑制剂TSA后, 获得了世界首例体细胞克隆猴^[105], 表明在克隆猴过程中在培养体系中添加表观遗传修饰的抑制剂可以提高克隆效率。在克隆猴制备过程中供体细胞的选择也比较关键, 使用卵丘细胞做供体的克隆猴出生后不久便死亡, 而使用胎儿成纤维细胞做供体时获得了存活的克隆猴。此外, 外源因子对重构胚的发育也有影响。褪黑激素是一种抗氧化剂, 具有清除活性氧的作用, 通过调节氧化应激, 可减少DNA损伤, 在体细胞核移植的胚胎发育液中添加褪黑激素等可以提高猪重构胚的发育潜能, 进而提高克隆效率^[106]。在绵羊中, 也有通过在供体细胞培养过程中添加表观修饰抑制剂KDM4D提高克隆胚胎体外发育能力的报道^[107], 表明表观修饰对动物克隆胚胎发育的影响存在普遍性, 通过改善这些影响, 可以提高获得克隆动物的效率。要根本解决克隆效率低的问题, 对大动物胚胎发育过程调控方式以及关键效应通路等的基础研究至关重要。

在实验操作方面, 现有的受精卵电转染系统可以将sgRNA及Cas9的mRNA共转入受精卵中, 并通过Cas9作用对受精卵进行编辑, 这是获得基因编辑动物的简化方法^[108]。显微操作和体细胞核移植过程需要的显微操作设备, 成本较高, 同时需要专门的技术人员操作, 增加了培训和时间成本。对于提供受体动物的实验场, 需要专门预留一定数量的优质后备母羊, 在饲养成本上有所增加。

3.3 基因编辑新品种的生物安全评价和应用

通过分子设计育种获得的畜禽要实现商业化所面临的最大问题为生物安全评价。以CRISPR/Cas系统代表的人工核酸酶介导的基因编辑技术已经成为遗传修饰的主流方法。我国对基因修饰动植物(包括转基因和基因编辑)的生物安全评价非常严格, 目前在我国批准上市的只有抗番木瓜环斑花叶病毒(papaya ringspot virus)的转基因木瓜(*Carica papaya*)和抗棉铃虫的转基因棉花(*Gossypium hirsutum*)。转基因生物安全主要针对遗传修饰动植物是否会破坏生态平衡, 是否会影响人们的健康等方面进行评价。目前还没有确切的证据证实基因修饰动植物在生物安全方面有安全隐患。例如转基因牛产生的重组乳铁蛋白饲喂小鼠实验中, 长期的饲喂未使小鼠出现

表 5 已发现的可能影响绵羊表型的基因及其功能性突变

Table 5 Identified genes and functional mutations that may affect phenotypes of sheep

性状	基因全称	发现来源	绵羊上突 变名称	位于绵羊 染色体	影响表型或功能	中国地方绵羊品种中分布情况
排卵数性状	<i>BMPRII</i>	绵羊	<i>FecB</i>	6	排卵数增加, 加性效应	自然突变在小尾寒羊和湖羊中频率较高
	<i>BMP15</i>	绵羊	<i>FecX^b</i>	X	杂合排卵数增加, 纯合不育	未发现
		绵羊	<i>FecX^o</i>	X	纯合突变个体排卵显著增加	未发现
		绵羊	<i>FecX^l</i>	X	杂合排卵数增加, 纯合不育	未发现
		绵羊	<i>FecX^{Gr}</i>	X	纯合突变个体排卵显著增加	未发现
		绵羊	<i>exon2 G>A</i>	X	突变杂合个体产羔数显著增加	未发现
	<i>GDF9</i>	绵羊	<i>FecX^l</i>	X	杂合排卵数增加, 纯合不育	未发现
		绵羊	<i>FecX^{tl}</i>	X	杂合排卵数增加, 纯合不育	未发现
		绵羊	<i>FecX^G</i>	X	杂合排卵数增加, 纯合不育	未发现
		绵羊	<i>FecX^{AR}</i>	X	杂合产羔数增加, 纯合不育	未发现
		绵羊	<i>FecTT</i>	5	杂合排卵数增加, 纯合不育	未发现
	<i>LHCGR</i> (luteinizing hormone/ choriogonadotropin receptor)	绵羊	<i>G8FecGH</i>	5	杂合排卵数增加, 纯合不育	未发现
		绵羊	<i>G7FecGF</i>	5	杂合排卵数增加, 纯合不育	未发现
		绵羊	<i>FecGE</i>	5	突变纯合子排卵显著增加	未发现
		绵羊	<i>G6</i>	5	杂合排卵数增加, 纯合不育	未发现
		绵羊	<i>G5</i>	5	杂合排卵数增加, 纯合不育	未发现
	<i>LEPR</i> (Leptin receptor)	绵羊	<i>G4</i>	5	杂合排卵数增加, 纯合不育	已报道
		绵羊	<i>G3</i>	5	杂合排卵数增加, 纯合不育	已报道
		绵羊	<i>G2</i>	5	杂合排卵数增加, 纯合不育	未发现
		绵羊	<i>G1</i>	5	杂合排卵数增加, 纯合不育	已报道
		绵羊		3	促黄体素受体参与参与繁殖活动	绵羊中突变, 非常显著, 降低产羔数
	estrogen receptor 2	猪、绵羊		1	在绵羊中, 该基因突变对新西兰罗姆尼羊的初情期和排卵数有影响	绵羊中突变, 缩短发情周期但降低排卵数
		绵羊		7		绵羊中突变显著增加产羔数
		绵羊		7		绵羊中该突变增加产羔数

续表 5

性状	基因全称	发现来源	绵羊上突 变名称	位于绵羊 染色体	影响表型或功能	中国地方绵羊品种中分布情况
季节性繁殖相关	thyroid stimulating hormone receptor	鸡、绵羊		7	参与光周期控制下的繁殖调控	大规模重测序在鸡和绵羊中均已被定位
产肉相关	CLGP(callipyge)	绵羊	callipyge	18	背部和后肢肌肉肥大	不遵循一般孟德尔遗传，继承父本突变杂合羔羊呈现 CLPG 性状
	MSTN	绵羊		8	肌肉发育负调控因子，突变或敲除出现肌肉发达；Texel 羊中具有天然双肌性状	哺乳动物中高度保守，绵羊、牛、人、狗、猪、兔中均有功能确定的突变
	VRTN	猪、绵羊		7	猪中突变导致胸椎数增加	
角形相关	RXFP2(relaxin/insulin-like family peptide receptor 2)	绵羊		10	群体遗传学鉴定发现对绵羊角的有无、大小、形状具有调控作用	绵羊中确定与角型相关
毛色相关	melanocyte inducing transcription factor	狗、鸭子、绵羊		20	毛色变化	绵羊中没有确定突变位点
	ASIP	绵羊				绵羊中有确定位点
脂肪相关	BCO2	绵羊			有义突变引起脂肪变成黄色	绵羊中有确定位点
尾型相关	BMP2	绵羊		13	尾巴脂肪大小	重测序遗传定位发现区间，无确切的位点
	PDGFD(platelet derived growth factor D)	绵羊		15	尾巴脂肪大小	重测序遗传定位发现区间，无确切的位点
	TBX7(T-box transcription factor T)	绵羊			尾巴长短，影响尾椎数	GWAS 定位发现
体型大小相关	PLAG1 zinc finger	猪				猪大规模重测序发现
	ligand dependent nuclear receptor corepressor like	猪				猪大规模重测序发现
	insulin like growth factor 1	狗				影响狗体型大小的位点
生长速度	insulin like growth factor 2	猪				在欧洲猪种中影响生长的 IGF2 突变位点
	Zinc finger BED-type containing 6	猪			抑制胰岛素样生长因子 IGF2 表达水平，影响肌原细胞的生长分化	
	SOC52	绵羊		3	与乳房炎有关，绵羊中突变后影响体重和大小	

表 6 在绵羊、山羊和猪中进行显微注射或体细胞核移植获得个体的比率统计

Table 6 Rates of offspring generated by microinjection or SCNT in sheep, goats and pigs

物种	方法	基因	遗传修饰类型	移植胚胎数/ 受体数/怀孕	基因编辑后代/ 所有后代	获得后代 比率(%)	参考 文献
绵羊	原核注射	<i>hGH</i>	随机整合	1032/192/—	1/73	7.1	[6]
		<i>hFIX</i>	随机整合	67/24/11	6/7	10.4	[10]
		<i>oGH</i>	随机整合	408/109/39	4/44	10.7	[18]
		<i>bGH; hGHRF</i>	随机整合	842/98/33; 435/120/51	2/47; 9/63	5.6; 14.5	[21]
		<i>bGH; hGRF</i>	随机整合	247/—/42	11/42	17.0; 9.4	[22]
		<i>ha1AT</i>	随机整合	549/152/73	5/113	20.6	[23]
		<i>hBCFVIII</i>	随机整合	1145/454/276	13/434	37.9	[25]
		<i>CAT</i>	随机整合	371/76/—	4/31	8.4	[26]
		<i>HTT</i>	随机整合	413/138/—	6/150	36.3	[27]
		<i>MSTN</i>	Cas9 敲除	213/55/31	2/35	16.4	[50]
		<i>MSTN</i> 、 <i>ASIP</i> 和 <i>BCO2</i>	Cas9 敲除	578/82/77	35/36	7.3	[51]
		<i>SOCS2</i>	BE3 点突变	53/8/3	3/4	7.5	[67]
		<i>ASIP</i>	Cas9 敲除	92/60/6	5/6	6.5	[58]
		<i>BMPRIIB</i>	Cas9 点突变	279/39/16	7/21	7.5	[59]
		<i>FGF5</i>	基因敲除	100/53/14	3/18	18	[62]
		<i>FGF5</i>	基因敲除	63/43/18	20/23	36.5	[63]
	徒手克隆	<i>fat-1</i>	随机整合	53/29/4	3/3	5.7	[80]
	体细胞 核移植	<i>AAT</i>	定点插入	80/42/20	13/14	17.5	[31]
		<i>oTLR4</i>	随机整合	859/113/12; 1009/108/7	9/9	0.7; 0.3	[32]
		<i>fat-1</i>	随机整合	128/16/3; 147/20/3	5/5	1.6; 2.0	[33]
		<i>MSTN</i>	TALEN 敲除	70/5/1	1/1	1.4	[48]
山羊	原核注射	<i>MSTN</i>	TALEN 敲除	282/37/28	13/23	1.4	[49]
		<i>MSTN</i>	Cas9 敲除	416/137/64	26/93	22.4	[85]
		<i>MSTN</i>	Cas9 敲除	18/5/3	1/4	22.2	[86]
		<i>FGF5</i>	BE3 点突变	22/7/3	5/5	22.7	[87]
		<i>BLG</i> (β -lactoglobulin)	Cas9 敲除	103/67/18	4	25.2	[88]
山羊	原核注射	<i>GDF9</i>	Cas9 敲除	56/17/13	6/8	32.1	[89]
		<i>MSTN</i>	TALEN 敲除	403/29/7	3/3	0.7	[90]
		<i>MSTN</i>	Cas9 敲除	269/21/7	3/3	2.2	[91]
		<i>EDAR</i> (ectodysplasin receptor)	Cas9 敲除	257/79/5	2/6	2.3	[92]
猪	体细胞 核移植	—	纯体细胞克隆	586/10/2	0/7	1.2	[93]
		<i>LDLR</i> (low-density lipoprotein receptor)	敲除	2276/18/9	57/57	2.5	[94]
		<i>PPARγ</i>	ZFN 敲除	1134/8/4	2/10	0.2	[95]
		<i>GGTA1</i>	TALEN 敲除	2411/12/9	30/30	1.2	[96]
		<i>FBXO40</i>	Cas9 敲除	5424/16/7	17/17	0.3	[97]
		<i>CD163</i>	Cas9 敲除	2192/6/4	26/26	1.2	[98]
		<i>DMD</i> (henne muscle dystrophy)	Cas9 敲除	98/8/1	1/2	2.0	[99]
	显微注射	<i>TMPS2</i> (ransmembrane protease, serine S1, member 2)	Cas9 敲除	135/2/2	12/12	8.8	[100]
		<i>SRY</i> (sex determining region Y)	Cas9 敲除	66/4/2	12/12	18.2	[101]
		<i>NANOS2</i>	Cas9 敲除	84/4/3	18/18	21.4	[102]
		<i>GGTA1</i>	Cas9 敲除	94/4/2	4/15	16.0	[103]

显著的临床症状和行为异常^[109]。遗传修饰生物的排泄物是否会对环境产生威胁也未有定论。即便如此, 仍然需要制定完善的评价体系, 针对食物毒性、过敏性、抗生素及营养成分代谢等方面进行安全评估。虽然基因编辑技术等遗传修饰方法在育种应用中受到了争议, 但不可忽视其巨大的应用前景。在有严格的生物安全评价为保障基础上, 分子设计育种代表着未来家畜育种的发展方向, 能够促进畜牧业发展。

目前, 由于生物安全评价的限制, 通过遗传修饰育种获得的动物品种目前很难开展大规模的育种研究, 更不可能实现商业化。美国食品药品监督管理局分别在2009年、2014年和2015年批准了基因修饰山羊、兔(*Oryctolagus cuniculus*)和鸡生产的药物上市, 而真正得以进入食品领域的遗传修饰动物仅为2015年批准的转生长激素三文鱼(*Oncorhynchus*)和2020年批准的 α -gal 敲除的基因编辑猪。目前批准上市的品种仅仅是众多研究成果的冰山一角, 期望未来有越来越多的分子育种动物产品走进人们的视野。

在绵羊和其他农业动物中, 仍然存在大量的遗传变异位点未被解析。在未来的研究中, 需要对适合育种的重要经济性状位点进行持续挖掘并结合不断改进的分子设计育种工具, 创制和培育出能够满足人们健康生活质量需求的动物新品种。

参考文献(References):

- [1] Chessa B, Pereira F, Arnaud F, Amorim A, Goyache F, Mainland I, Kao RR, Pemberton JM, Beraldi D, Stear MJ, Alberti A, Pittau M, Iannuzzi L, Banabazi MH, Kazwala RR, Zhang YP, Arranz JJ, Ali BA, Wang ZL, Uzun M, Dione MM, Olsaker I, Holm LE, Saarma U, Ahmad S, Marzanov N, Eythorsdottir E, Holland MJ, Ajmone-Marsan P, Bruford MW, Kantanen J, Spencer TE, Palmarini M. Revealing the history of sheep domestication using retrovirus integrations. *Science*, 2009, 324(5926): 532–536. [DOI]
- [2] Zhao JG, Lai LX, Ji WZ, Zhou Q. Genome editing in large animals: current status and future prospects. *Natl Sci Rev*, 2019, 6(3): 402–420. [DOI]
- [3] Iizumi S, Kurosawa A, So S, Ishii Y, Chikaraishi Y, Ishii A, Koyama H, Adachi N. Impact of non-homologous end-joining deficiency on random and targeted DNA integration: implications for gene targeting. *Nucleic Acids Res*, 2008, 36(19): 6333–6342. [DOI]
- [4] Chouluka A, Perrin A, Dujon B, Nicolas JF. Induction of homologous recombination in mammalian chromosomes by using the I-SceI system of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, 1995, 15(4): 1968–1973. [DOI]
- [5] Gordon JW, Scangos GA, Plotkin DJ, Barbosa JA, Ruddle FH. Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1980, 77(12): 7380–7384. [DOI]
- [6] Hammer RE, Pursel VG, Rexroad CE, Wall RJ, Bolt DJ, Ebert KM, Palmiter RD, Brinster RL. Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection. *Nature*, 1985, 315(6021): 680–683. [DOI]
- [7] 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]
- [8] Lee MS, Gippert GP, Soman KV, Case DA, Wright PE. Three-dimensional solution structure of a single zinc finger DNA-binding domain. *Science*, 1989, 245(4918): 635–637. [DOI]
- [9] Campbell KH, McWhir J, Ritchie WA, Wilmut I. Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature*, 1996, 380(6569): 64–66. [DOI]
- [10] Schnieke AE, Kind AJ, Ritchie WA, Mycock K, Scott AR, Ritchie M, Wilmut I, Colman A, Campbell KH. Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts. *Science*, 1997, 278(5346): 2130–2133. [DOI]
- [11] Moscou MJ, Bogdanove AJ. A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors. *Science*, 2009, 326(5959): 1501. [DOI]
- [12] Rémy S, Tesson L, Ménoret S, Usal C, Scharenberg AM, Anegón I. Zinc-finger nucleases: a powerful tool for genetic engineering of animals. *Transgenic Res*, 2010, 19(3): 363–371. [DOI]
- [13] Sander JD, Cade L, Khayter C, Reyon D, Peterson RT, Joung JK, Yeh JRJ. Targeted gene disruption in somatic zebrafish cells using engineered TALENs. *Nat Biotechnol*, 2011, 29(8): 697–698. [DOI]
- [14] Cong L, Ran FA, Cox D, Lin SL, Barretto R, Habib N, Hsu PD, Wu XB, Jiang WY, Marraffini LA, Zhang F. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 2013, 339(6121): 819–823. [DOI]
- [15] Salabi F, Nazari M, Chen Q, Nimal J, Tong JM, Cao

- WG. Myostatin knockout using zinc-finger nucleases promotes proliferation of ovine primary satellite cells in vitro. *J Biotechnol*, 2014, 192 Pt A: 268–280. [DOI]
- [16] Proudfoot C, Carlson DF, Huddart R, Long CR, Pryor JH, King TJ, Lillico SG, Mileham AJ, McLaren DG, Whitelaw CBA, Fahrenkrug SC. Genome edited sheep and cattle. *Transgenic Res*, 2015, 24(1): 147–153. [DOI]
- [17] Crispo M, Mulet AP, Tesson L, Barrera N, Cuadro F, dos Santos-Neto PC, Nguyen TH, Cr  n  guy A, Brusselle L, Anegón I, Menchaca A. Efficient generation of myostatin knock-out sheep using CRISPR/Cas9 technology and microinjection into zygotes. *PLoS One*, 2015, 10(8): e0136690. [DOI]
- [18] Murray JD, Nancarrow CD, Marshall JT, Hazelton IG, Ward KA. Production of transgenic merino sheep by microinjection of ovine metallothionein-ovine growth hormone fusion genes. *Reprod Fertil Dev*, 1989, 1(2): 147–155. [DOI]
- [19] Adams NR, Briegel JR, Ward KA. The impact of a transgene for ovine growth hormone on the performance of two breeds of sheep. *J Anim Sci*, 2002, 80(9): 2325–2333. [DOI]
- [20] Clements JE, Wall RJ, Narayan O, Hauer D, Schoborg R, Sheffer D, Powell A, Carruth LM, Zink MC, Rexroad CE. Development of transgenic sheep that express the visna virus envelope gene. *Virology*, 1994, 200(2): 370–380. [DOI]
- [21] Rexroad CE, Hammer RE, Bolt DJ, Mayo KE, Frohman LA, Palmiter RD, Brinster RL. Production of transgenic sheep with growth-regulating genes. *Mol Reprod Dev*, 1989, 1(3): 164–169. [DOI]
- [22] Rexroad CE, Mayo K, Bolt DJ, Elsasser TH, Miller KF, Behringer RR, Palmiter RD, Brinster RL. Transferrin- and albumin-directed expression of growth-related peptides in transgenic sheep. *J Anim Sci*, 1991, 69(7): 2995–3004. [DOI]
- [23] Wright G, Carver A, Cottom D, Reeves D, Scott A, Simons P, Wilmut I, Garner I, Colman A. High level expression of active human alpha-1-antitrypsin in the milk of transgenic sheep. *Biotechnology (NY)*, 1991, 9(9): 830–834. [DOI]
- [24] Clark AJ, Bessos H, Bishop JO, Brown P, Harris S, Lathe R, McClenaghan M, Prowse C, Simons JP, Whitelaw CBA, Wilmut I. Expression of human anti-hemophilic factor IX in the milk of transgenic sheep. *Bio Tech*, 1989, 7: 487–492. [DOI]
- [25] Niemann H, Halter R, Carnwath JW, Herrmann D, Lemme E, Paul D. Expression of human blood clotting factor VIII in the mammary gland of transgenic sheep. *Transgenic Res*, 1999, 8(3): 237–247. [DOI]
- [26] Damak S, Jay NP, Barrell GK, Bullock DW. Targeting gene expression to the wool follicle in transgenic sheep. *Biotechnology (NY)*, 1996, 14(2): 181–184. [DOI]
- [27] Jacobsen JC, Bawden CS, Rudiger SR, McLaughlan CJ, Reid SJ, Waldvogel HJ, MacDonald ME, Gusella JF, Walker SK, Kelly JM, Webb GC, Faull RLM, Rees MI, Snell RG. An ovine transgenic Huntington's disease model. *Hum Mol Genet*, 2010, 19(10): 1873–1882. [DOI]
- [28] Bawden CS, Powell BC, Walker SK, Rogers GE. Expression of a wool intermediate filament keratin transgene in sheep fibre alters structure. *Transgenic Res*, 1998, 7(4): 273–287. [DOI]
- [29] Deng SL, Yu K, Wu Q, Li Y, Zhang XS, Zhang BL, Liu GS, Liu YX, Lian ZX. Toll-like receptor 4 reduces oxidative injury via glutathione activity in sheep. *Oxid Med Cell Longev*, 2016, 2016: 9151290. [DOI]
- [30] Denning C, Burl S, Ainslie A, Bracken J, Dinnyes A, Fletcher J, King T, Ritchie M, Ritchie WA, Rollo M, de Sousa P, Travers A, Wilmut I, Clark AJ. Deletion of the alpha(1,3)galactosyl transferase (GGTA1) gene and the prion protein (PrP) gene in sheep. *Nat Biotechnol*, 2001, 19(6): 559–562. [DOI]
- [31] McCreath KJ, Howcroft J, Campbell KH, Colman A, Schnieke AE, Kind AJ. Production of gene-targeted sheep by nuclear transfer from cultured somatic cells. *Nature*, 2000, 405(6790): 1066–1069. [DOI]
- [32] Deng SL, Li GG, Zhang JL, Zhang XS, Cui MS, Guo Y, Liu GS, Li GP, Feng JZ, Lian ZX. Transgenic cloned sheep overexpressing ovine toll-like receptor 4. *Theriogenology*, 2013, 80(1): 50–57. [DOI]
- [33] Duan B, Cheng L, Gao Y, Yin FX, Su GH, Shen QY, Liu K, Hu X, Liu X, Li GP. Silencing of fat-1 transgene expression in sheep may result from hypermethylation of its driven cytomegalovirus (CMV) promoter. *Theriogenology*, 2012, 78(4): 793–802. [DOI]
- [34] He X, Li HT, Zhou ZY, Zhao ZS, Li W. Production of brown/yellow patches in the SLC7A11 transgenic sheep via testicular injection of transgene. *J Genet Genomics*, 2012, 39(6): 281–285. [DOI]
- [35] Qin YR, Chen H, Zhang YN, Zhu CY, Gao B, Yin YH, Li W, Shi QQ, Zheng MM, Xu Q, Song JZ, Li BC. Cloning of the Xuhuai goat PPAR γ gene and the preparation of transgenic sheep. *Biochem Genet*, 2013, 51(7–8): 543–553. [DOI]
- [36] Qin YR, Zhang YN, Yin YH, Xu F, Gao B, Shi QQ, Zhu CY, Li W, Li BC. Cloning of Xuhuai goat lipoprotein

- lipase gene and the preparation of transgenic sheep. *Mol Biol Rep*, 2012, 39(8): 8439–8446. [DOI]
- [37] Ritchie WA, King T, Neil C, Carlisle AJ, Lillico S, McLachlan G, Whitelaw CBA. Transgenic sheep designed for transplantation studies. *Mol Reprod Dev*, 2009, 76(1): 61–64. [DOI]
- [38] Crispo M, Vilarino M, dos Santos-Neto PC, Núñez-Olivera R, Cuadro F, Barrera N, Mulet AP, Nguyen TH, Anegón I, Menchaca A. Embryo development, fetal growth and postnatal phenotype of eGFP lambs generated by lentiviral transgenesis. *Transgenic Res*, 2015, 24(1): 31–41. [DOI]
- [39] Liu CX, Wang LQ, Li WR, Zhang XM, Tian YZ, Zhang N, He SG, Chen T, Huang JC, Liu MJ. Highly efficient generation of transgenic sheep by lentivirus accompanying the alteration of methylation status. *PLoS One*, 2013, 8(1): e54614. [DOI]
- [40] Li WR, He SG, Liu CX, Zhang XM, Wang LQ, Lin JP, Chen L, Han B, Huang JC, Liu MJ. Ectopic expression of FGF5s induces wool growth in Chinese merino sheep. *Gene*, 2017, 627: 477–483. [DOI]
- [41] Ritchie WA, King T, Neil C, Carlisle AJ, Lillico S, McLachlan G, Whitelaw CBA. Transgenic sheep designed for transplantation studies. *Mol Reprod Dev*, 2009, 76(1): 61–64. [DOI]
- [42] Tian YZ, Li WR, Wang LQ, Liu CX, Lin JP, Zhang XM, Zhang N, He SG, Huang JC, Jia B, Liu MJ. Expression of 2A peptide mediated tri-fluorescent protein genes were regulated by epigenetics in transgenic sheep. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 434(3): 681–687. [DOI]
- [43] Platt RJ, Chen SD, Zhou Y, Yim MJ, Swiech L, Kempton HR, Dahlman JE, Parnas O, Eisenhaure TM, Jovanovic M, Graham DB, Jhunjhunwala S, Heidenreich M, Xavier RJ, Langer R, Anderson DG, Hacohen N, Regev A, Feng GP, Sharp PA, Zhang F. CRISPR-Cas9 knockin mice for genome editing and cancer modeling. *Cell*, 2014, 159(2): 440–455. [DOI]
- [44] Bevacqua RJ, Fernandez-Martin R, Canel NG, Gibbons A, Teixeira D, Lange F, Vans Landschoot G, Savy V, Briski O, Hiriart MI, Grueso E, Ivics Z, Taboga O, Kues WA, Ferraris S, Salamone DF. Assessing Tn5 and Sleeping Beauty for transpositional transgenesis by cytoplasmic injection into bovine and ovine zygotes. *PLoS One*, 2017, 12(3): e0174025. [DOI]
- [45] Hu SW, Ni W, Sai WJF, Zhang H, Cao XD, Qiao J, Sheng JL, Guo F, Chen CF. Sleeping Beauty-mediated knockdown of sheep myostatin by RNA interference. *Biotechnol Lett*, 2011, 33(10): 1949–1953. [DOI]
- [46] Rodriguez-Sosa JR, Silvertown JD, Foster RA, Medin JA, Hahnel A. Transduction and transplantation of spermatogonia into the testis of ram lambs through the extra-testicular rete. *Reprod Domest Anim*, 2009, 44(4): 612–620. [DOI]
- [47] Zhang XM, Wang LQ, Wu YS, Li WR, An J, Zhang FC, Liu MJ. Knockout of myostatin by zinc-finger nuclease in sheep fibroblasts and embryos. *Asian-Australas J Anim Sci*, 2016, 29(10): 1500–1507. [DOI]
- [48] Zhao XX, Ni W, Chen CF, Sai WJF, Qiao J, Sheng JL, Zhang H, Li GZ, Wang DW, Hu SW. Targeted editing of myostatin gene in sheep by transcription activator-like effector nucleases. *Asian-Australas J Anim Sci*, 2016, 29(3): 413–418. [DOI]
- [49] Li HH, Wang G, Hao ZQ, Zhang GZ, Qing YB, Liu SH, Qing LL, Pan WR, Chen L, Liu GC, Zhao RP, Jia BY, Zeng LY, Guo JX, Zhao LX, Zhao H, Lv CX, Xu KX, Cheng WM, Li HS, Zhao HY, Wang W, Wei HJ. Generation of biallelic knock-out sheep via gene-editing and somatic cell nuclear transfer. *Sci Rep*, 2016, 6: 33675. [DOI]
- [50] Han HB, Ma YH, Wang T, Lian T, Tian XZ, Hu R, Deng SL, Li KP, Wang F, Li N, Liu GS, Zhao YF, Lian ZX. One-step generation of myostatin gene knockout sheep via the CRISPR/Cas9 system. *Front Agr Sci & Eng*, 2014, 1(1): 2–5. [DOI]
- [51] Wang XL, Niu YY, Zhou JK, Yu HH, Kou QF, Lei AM, Zhao XE, Yan HL, Cai B, Shen QY, Zhou SW, Zhu HJ, Zhou GX, Niu WZ, Hua JL, Jiang Y, Huang XX, Ma BH, Chen YL. Multiplex gene editing via CRISPR/Cas9 exhibits desirable muscle hypertrophy without detectable off-target effects in sheep. *Sci Rep*, 2016, 6: 32271. [DOI]
- [52] Williams DK, Pinzón C, Huggins S, Pryor JH, Falck A, Herman F, Oldeschulte J, Chavez MB, Foster BL, White SH, Westhusin ME, Suva LJ, Long CR, Gaddy D. Genetic engineering a large animal model of human hypophosphatasia in sheep. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 16945. [DOI]
- [53] Vilarino M, Rashid ST, Suchy FP, McNabb BR, van der Meulen T, Fine EJ, Ahsan SD, Mursaliyev N, Sebastiano V, Diab SS, Huising MO, Nakauchi H, Ross PJ. CRISPR/Cas9 microinjection in oocytes disables pancreas development in sheep. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 17472. [DOI]
- [54] Wu MM, Wei CH, Lian ZX, Liu RZ, Zhu CY, Wang HH, Cao JX, Shen YL, Zhao FP, Zhang L, Mu Z, Wang YY,

- Wang XG, Du LX, Wang CD. Rosa26-targeted sheep gene knock-in via CRISPR-Cas9 system. *Sci Rep*, 2016, 6: 24360. [DOI]
- [55] Fan ZQ, Perisse IV, Cotton CU, Regouski M, Meng QG, Domb C, Van Wettere AJ, Wang ZD, Harris A, White KL, Polejaeva IA. A sheep model of cystic fibrosis generated by CRISPR/Cas9 disruption of the CFTR gene. *JCI Insight*, 2018, 3(19): e123529. [DOI]
- [56] Zhang YN, Wang YJ, Bi YL, Tang BB, Wang M, Zhang C, Zhang WH, Jin J, Li TT, Zhao RF, Yu XJ, Zuo QS, Li BC. CRISPR/Cas9-mediated sheep MSTN gene knockout and promote sSMSCs differentiation. *J Cell Biochem*, 2018. [DOI]
- [57] Zhou SW, Cai B, He C, Wang Y, Ding Q, Liu J, Liu Y, Ding YG, Zhao XE, Li GW, Li C, Yu HH, Kou QF, Niu WZ, Petersen B, Sonstegard T, Ma BH, Chen YL, Wang XL. Programmable base editing of the sheep genome revealed no genome-wide off-target mutations. *Front Genet*, 2019, 10: 215. [DOI]
- [58] Zhang XM, Li WR, Liu CX, Peng XR, Lin JP, He SG, Li XJ, Han B, Zhang N, Wu YS, Chen L, Wang LQ, Ma YL, Huang JC, Liu MJ. Alteration of sheep coat color pattern by disruption of ASIP gene via CRISPR Cas9. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 8149. [DOI]
- [59] Zhou SW, Yu HH, Zhao XE, Cai B, Ding Q, Huang Y, Li YX, Li Y, Niu YY, Lei AM, Kou QF, Huang XX, Petersen B, Ma BH, Chen YL, Wang XL. Generation of gene-edited sheep with a defined Booroola fecundity gene (FecBB) mutation in bone morphogenetic protein receptor type 1B (BMPR1B) via clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR)/CRISPR-associated (Cas) 9. *Reprod Fertil Dev*, 2018, 30(12): 1616–1621. [DOI]
- [60] Zhang XM, Li WR, Wu YS, Peng XR, Lou B, Wang LQ, Liu MJ. Disruption of the sheep BMPR-IB gene by CRISPR/Cas9 in *in vitro*-produced embryos. *Theriogenology*, 2017, 91: 163–172.e2. [DOI]
- [61] Menchaca A, Dos Santos-Neto PC, Souza-Neves M, Cuadro F, Mulet AP, Tesson L, Chenouard V, Guiffès A, Heslan JM, Gantier M, Anegón I, Crispo M. Otoferlin gene editing in sheep via CRISPR-assisted ssODN-mediated homology directed repair. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 5995. [DOI]
- [62] Hu R, Fan ZY, Wang BY, Deng SL, Zhang XS, Zhang JL, Han HB, Lian ZX. Rapid communication: generation of FGF5 knockout sheep via the CRISPR/Cas9 system. *J Anim Sci*, 2017, 95(5): 2019–2024. [DOI]
- [63] Li WR, He SG, Liu CX, Zhang XM, Wang LQ, Lin JP, Chen L, Han B, Huang JC, Liu MJ. Ectopic expression of FGF5s induces wool growth in Chinese merino sheep. *Gene*, 2017, 627: 477–483. [DOI]
- [64] Ma T, Tao JL, Yang MH, He CJ, Tian XZ, Zhang XS, Zhang JL, Deng SL, Feng JZ, Zhang ZZ, Wang J, Ji PY, Song YK, He PL, Han HB, Fu JC, Lian ZX, Liu GS. 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 Pineal Res*, 2017, 63(1). [DOI]
- [65] 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]
- [66] Wolfe SA, Neklodova L, Pabo CO. DNA recognition by Cys2His2 zinc finger proteins. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 2000, 29: 183–212. [DOI]
- [67] Smith J, Berg JM, Chandrasegaran S. A detailed study of the substrate specificity of a chimeric restriction enzyme. *Nucleic Acids Res*, 1999, 27(2): 674–681. [DOI]
- [68] Valerie K, Povirk LF. Regulation and mechanisms of mammalian double-strand break repair. *Oncogene*, 2003, 22(37): 5792–5812. [DOI]
- [69] 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]
- [70] Miller J, McLachlan AD, Klug A. Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from *Xenopus oocytes*. *EMBO J*, 1985, 4(6): 1609–1614. [DOI]
- [71] Hwang WY, Fu YF, Reyon D, Maeder ML, Tsai SQ, Sander JD, Peterson RT, Yeh JRJ, Joung JK. Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(3): 227–229. [DOI]
- [72] 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]
- [73] Rees HA, Liu DR. Base editing: precision chemistry on the genome and transcriptome of living cells. *Nat Rev Genet*, 2018, 19(12): 770–788. [DOI]
- [74] Jin S, Zong Y, Gao Q, Zhu ZX, Wang YP, Qin P, Liang CZ, Wang DW, Qiu JL, Zhang F, Gao CX. Cytosine, but not adenine, base editors induce genome-wide off-target mutations in rice. *Science*, 2019, 364(6437): 292–295. [DOI]
- [75] Zuo EW, Sun YD, Wei W, Yuan TL, Ying WQ, Sun H, Yuan LY, Steinmetz LM, Li YX, Yang H. Cytosine base

- editor generates substantial off-target single-nucleotide variants in mouse embryos. *Science*, 2019, 364(6437): 289–292. [DOI]
- [76] Batool A, Malik F, Andrabi KI. Expansion of the CRISPR/Cas genome-sculpting toolbox: innovations, applications and challenges. *Mol Diagn Ther*, 2021, 25(1): 41–57. [DOI]
- [77] Liu JJ, Orlova N, Oakes BL, Ma EB, Spinner HB, Baney KLM, Chuck J, Tan D, Knott GJ, Harrington LB, Al-Shayeb B, Wagner A, Brötzmann J, Staahl BT, Taylor KL, Desmarais J, Nogales E, Doudna JA. CasX enzymes comprise a distinct family of RNA-guided genome editors. *Nature*, 2019, 566(7743): 218–223. [DOI]
- [78] Su HY, Jay NP, Gourley TS, Kay GW, Damak S. Wool production in transgenic sheep: results from first-generation adults and second-generation lambs. *Anim Biotechnol*, 1998, 9(2): 135–147. [DOI]
- [79] Zhang P, Liu P, Dou HW, Chen L, Chen LX, Lin L, Tan PP, Vajta G, Gao JF, Du YT, Ma RZ. Handmade cloned transgenic sheep rich in omega-3 Fatty acids. *PLoS One*, 2013, 8(2): e55941. [DOI]
- [80] Deng SL, Li GD, Yu K, Tian XZ, Wang F, Li WT, Jiang WQ, Ji PY, Han HB, Fu JC, Zhang XS, Zhang JL, Liu YX, Lian ZX, Liu GS. RNAi combining Sleeping Beauty transposon system inhibits ex vivo expression of foot-and-mouth disease virus VP1 in transgenic sheep cells. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 10065. [DOI]
- [81] Hanrahan JP, Gregan SM, Mulsant P, Mullen M, Davis GH, Powell R, Galloway SM. Mutations in the genes for oocyte-derived growth factors GDF9 and BMP15 are associated with both increased ovulation rate and sterility in Cambridge and Belclare sheep (*Ovis aries*). *Biol Reprod*, 2004, 70(4): 900–909. [DOI]
- [82] Zhang ZF, Sun YW, Du W, He SG, Liu MJ, Tian CY. Effects of vertebral number variations on carcass traits and genotyping of Vertnin candidate gene in Kazakh sheep. *Asian-Australas J Anim Sci*, 2017, 30(9): 1234–1238. [DOI]
- [83] Valette M, Poitou C, Le Beyec J, Bouillot JL, Clement K, Czernichow S. Melanocortin-4 receptor mutations and polymorphisms do not affect weight loss after bariatric surgery. *PLoS One*, 2012, 7(11): e48221. [DOI]
- [84] Chmurzyńska A. The multigene family of fatty acid-binding proteins (FABPs): function, structure and polymorphism. *J Appl Genet*, 2006, 47(1): 39–48. [DOI]
- [85] Wang X, Niu Y, Zhou J, Zhu H, Ma B, Yu H, Yan H, Hua J, Huang X, Qu L, Chen Y. CRISPR/Cas9-mediated MSTN disruption and heritable mutagenesis in goats causes increased body mass. *Anim Genet*, 2018, 49(1): 43–51. [DOI]
- [86] Guo RH, Wan YJ, Xu D, Cui LB, Deng MT, Zhang GM, Jia RX, Zhou WJ, Wang Z, Deng KP, Huang MR, Wang F, Zhang YL. Generation and evaluation of Myostatin knock-out rabbits and goats using CRISPR/Cas9 system. *Sci Rep*, 2016, 6: 29855. [DOI]
- [87] Li GW, Zhou SW, Li C, Cai B, Yu HH, Ma BH, Huang Y, Ding YG, Liu Y, Ding Q, He C, Zhou JK, Wang Y, Zhou GX, Li Y, Yan Y, Hua JL, Petersen B, Jiang Y, Sonstegard T, Huang XX, Chen YL, Wang XL. Base pair editing in goat: nonsense codon introgression into FGF5 results in longer hair. *FEBS J*, 2019, 286(23): 4675–4692. [DOI]
- [88] Zhou WJ, Wan YJ, Guo RH, Deng MT, Deng KP, Wang Z, Zhang YL, Wang F. Generation of beta-lactoglobulin knock-out goats using CRISPR/Cas9. *PLoS One*, 2017, 12(10): e0186056. [DOI]
- [89] Niu YY, Zhao XE, Zhou JK, Li Y, Huang Y, Cai B, Liu YT, Ding Q, Zhou SW, Zhao J, Zhou GX, Ma BH, Huang XX, Wang XL, Chen YL. Efficient generation of goats with defined point mutation (I397V) in GDF9 through CRISPR/Cas9. *Reprod Fertil Dev*, 2018, 30(2): 307–312. [DOI]
- [90] Yu BL, Lu R, Yuan YG, Zhang T, Song SZ, Qi ZQ, Shao B, Zhu MM, Mi F, Cheng Y. Efficient TALEN-mediated myostatin gene editing in goats. *BMC Dev Biol*, 2016, 16(1): 26. [DOI]
- [91] Ni W, Qiao J, Hu SW, Zhao XX, Regouski M, Yang M, Polejaeva IA, Chen CF. Efficient gene knockout in goats using CRISPR/Cas9 system. *PLoS One*, 2014, 9(9): e106718. [DOI]
- [92] Hao F, Yan W, Li XC, Wang H, Wang YM, Hu X, Liu X, Liang H, Liu DJ. Generation of cashmere goats carrying an EDAR gene mutant using CRISPR-Cas9-mediated genome editing. *Int J Biol Sci*, 2018, 14(4): 427–436. [DOI]
- [93] Polejaeva IA, Chen SH, Vaught TD, Page RL, Mullins J, Ball S, Dai Y, Boone J, Walker S, Ayares DL, Colman A, Campbell KH. Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature*, 2000, 407(6800): 86–90. [DOI]
- [94] Davis BT, Wang XJ, Rohret JA, Struzynski JT, Merricks EP, Bellinger DA, Rohret FA, Nichols TC, Rogers CS. Targeted disruption of LDLR causes hypercholesterolemia and atherosclerosis in Yucatan miniature pigs. *PLoS One*, 2014, 9(4): e93457. [DOI]
- [95] Yang DS, Yang HQ, Li W, Zhao BT, Ouyang Z, Liu ZM,

- Zhao Y, Fan NN, Song J, Tian JT, Li F, Zhang JF, Chang L, Pei DQ, Chen YE, Lai LX. Generation of PPAR γ mono-allelic knockout pigs via zinc-finger nucleases and nuclear transfer cloning. *Cell Res*, 2011, 21(6): 979–982. [DOI]
- [96] Feng C, Li XR, Cui HT, Long C, Liu X, Tian XH, Pan DK, Luo YZ. Highly efficient generation of GGTA1 knockout pigs using a combination of TALEN mRNA and magnetic beads with somatic cell nuclear transfer. *J Integr Agr*, 2016, 15(7): 1540–1549. [DOI]
- [97] Zou YL, Li ZY, Zou YJ, Hao HY, Li N, Li QY. An FBXO40 knockout generated by CRISPR/Cas9 causes muscle hypertrophy in pigs without detectable pathological effects. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 498(4): 940–945. [DOI]
- [98] Wang HT, Shen LC, Chen JY, Liu XJ, Tan T, Hu YQ, Bai XF, Li YX, Tian KG, Li N, Hu XX. Deletion of CD163 exon 7 confers resistance to highly pathogenic porcine reproductive and respiratory viruses on pigs. *Int J Biol Sci*, 2019, 15(9): 1993–2005. [DOI]
- [99] Yu HH, Zhao H, Qing YB, Pan WR, Jia BY, Zhao HY, Huang XX, Wei HJ. Porcine zygote injection with Cas9/sgRNA results in DMD-modified pig with muscle dystrophy. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(10): 1668. [DOI]
- [100] Whitworth KM, Benne JA, Spate LD, Murphy SL, Samuel MS, Murphy CN, Richt JA, Walters E, Prather RS, Wells KD. Zygote injection of CRISPR/Cas9 RNA successfully modifies the target gene without delaying blastocyst development or altering the sex ratio in pigs. *Transgenic Res*, 2017, 26(1): 97–107. [DOI]
- [101] Zhou XY, Wang LL, Du YN, Xie F, Li L, Liu Y, Liu CH, Wang SQ, Zhang SB, Huang XX, Wang Y, Wei H. Efficient generation of gene-modified pigs harboring precise orthologous human mutation via CRISPR/Cas9-induced homology-directed repair in zygotes. *Hum Mutat*, 2016, 37(1): 110–118. [DOI]
- [102] Park KE, Kaucher AV, Powell A, Waqas MS, Sandmaier SES, Oatley MJ, Park CH, Tibary A, Donovan DM, Blomberg LA, Lillico SG, Whitelaw CBA, Mileham A, Telugu BP, Oatley JM. Generation of germline ablated male pigs by CRISPR/Cas9 editing of the NANOS2 gene. *Sci Rep*, 2017, 7: 40176. [DOI]
- [103] Appel MJ, van Veen HA, Vietsch H, Salaheddine M, Nuijens JH, Ziere B, de Loos F. Sub-chronic (13-week) oral toxicity study in rats with recombinant human lactoferrin produced in the milk of transgenic cows. *Food Chem Toxicol*, 2006, 44(7): 964–973. [DOI]
- [104] Yu DW, Wang J, Zou HY, Feng T, Chen L, Li J, Qi XL, Li ZF, Duan XY, Xu CL, Zhang L, Long X, Lan J, Chen C, Wang C, Xu XY, Ren JL, Zhao YQ, Hu XX, Lian ZX, Men HS, Pan DD, Li N, Capecchi MR, Du XG, Zhao YF, Wu S. Silencing of retrotransposon-derived imprinted gene RTL1 is the main cause for postimplantational failures in mammalian cloning. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2018, 115(47): E11071–11080. [DOI]
- [105] Liu Z, Cai YJ, Wang Y, Nie YH, Zhang CC, Xu YT, Zhang XT, Lu Y, Wang ZY, Poo MM, Sun Q. Cloning of macaque monkeys by somatic cell nuclear transfer. *Cell*, 2018, 172(4): 881–887.e7. [DOI]
- [106] Liang S, Jin YX, Yuan B, Zhang JB, Kim NH. Melatonin enhances the developmental competence of porcine somatic cell nuclear transfer embryos by preventing DNA damage induced by oxidative stress. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 11114. [DOI]
- [107] Hashimoto M, Takemoto T. Electroporation enables the efficient mRNA delivery into the mouse zygotes and facilitates CRISPR/Cas9-based genome editing. *Sci Rep*, 2015, 5: 11315. [DOI]
- [108] Zhang YM, Wang QQ, Liu KL, Gao EE, Guan H, Hou J. Treatment of donor cells with recombinant KDM4D protein improves preimplantation development of cloned ovine embryos. *Cytotechnology*, 2018, 70(5): 1469–1477. [DOI]
- [109] Appel MJ, van Veen HA, Vietsch H, Salaheddine M, Nuijens JH, Ziere B, de Loos F. Sub-chronic (13-week) oral toxicity study in rats with recombinant human lactoferrin produced in the milk of transgenic cows. *Food Chem Toxicol*, 2006, 44(7): 964–973. [DOI]

(责任编辑: 姜雨)