

DOI: 10.13376/j.cblls/2018115

文章编号: 1004-0374(2018)09-0955-12



赖良学, 中国科学院广州生物医药与健康研究院研究员, 博士生导师, 华南干细胞与再生医学研究所副所长。长期开展动物干细胞、基因修饰大动物、动物克隆的研究。获得多种在生物医药领域具有重要应用价值的基因修饰猪、兔和狗。

## 利用人工核酸酶构建基因编辑猪的研究进展

金 琴, 王可品, 赖良学\*

(中国科学院广州生物医药与健康研究院, 中国科学院再生生物学重点实验室, 广州 510530)

**摘 要:** 猪不仅具有重要的农业生产价值, 由于猪繁殖周期比灵长类动物短, 产仔量多, 以及猪器官大小、生理代谢过程和解剖结构, 尤其是心血管系统及神经系统较啮齿类动物而言与人类更为接近, 猪在生物医药领域也具有重要的作用。对猪基因组加以编辑, 在农业上可以加速高生产性能猪新品种的培育; 在生命科学领域可用于基因功能、胚胎发育及代谢过程等基础研究; 在医学上, 可提供与人体更为匹配的异种移植器官, 可作为更能准确模拟人类疾病的大动物模型, 用于新的药物和治疗手段的开发。人工核酸酶的出现, 使基因编辑效率得到大大提高, 克服了原有的基因编辑猪制备困难、成功率极低的问题。人工核酸酶技术不仅在猪上实现了高效而又精确的基因编辑, 并且使各种基因突变模式, 如基因敲除、基因敲入、基因组无痕点突变、多基因编辑、体内直接基因编辑以及条件性基因编辑等都成为可能。现将对利用不同人工核酸酶技术结合不同的基因编辑策略建立基因编辑猪的研究新进展进行综述。

**关键词:** 基因编辑猪; 大动物模型; 人工核酸酶; 条件性基因编辑

中图分类号: Q78; S828.99

文献标志码: A

## Progress in generation of gene-editing pigs by engineered endonucleases

JIN Qin, WANG Ke-Pin, LAI Liang-Xue\*

(Key Laboratory of Regenerative Biology of the Chinese Academy of Sciences,  
Guangzhou Institutes of Biomedicine and Health, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510530, China)

**Abstract:** Pigs not only have important agricultural value, but also play an important role in the field of biomedicine because of their shorter reproduction cycle and larger litter size comparing with that of the primate, as well as more similarity of organ size, physiology, metabolism and anatomy, to human comparing with the rodent, especially in cardiovascular system and nervous system. The genome editing of pigs can be used to breed new strain of pigs with higher productivity in agriculture, to study gene function, development of embryos and metabolism in basic life

收稿日期: 2018-08-03

基金项目: 国家重点研发计划干细胞与转化研究专项(2017YFA0105103)

\*通信作者: E-mail: lai\_liangxue@gibh.ac.cn

science field and to provide organs for xenotransplantation, human disease models for developing new drug and new therapeutic strategies in medical field. With the newly emerged engineered endonuclease with high gene editing efficiency, the difficulty of the genome editing has been overcome. The engineered endonucleases not only make pig gene editing with high efficiency and accuracy, but also can be used to generate a variety of gene mutation patterns including knock out, knock in, seamless point mutation, multiple gene editing, direct gene editing *in vivo*, as well as conditional gene-editing in pigs. Here, we will provide an overview of the advances in generation of gene-editing pigs with different gene editing strategies.

**Key words:** gene-editing pig; large animal model; engineered endonuclease; conditional gene editing

基因编辑猪是指人为地对猪基因组特定位点的DNA序列进行定点突变获得的基因修饰猪，并且这种基因突变可以稳定地遗传给后代，从而建立起有特殊表型的基因修饰猪种群。

在农业上，通过对猪进行基因编辑，可以获得具有重要生产价值的新品系，包括提高产量和繁殖性能、改善肉质、增强抗病和抗逆能力以及减少环境污染。例如，将猪肌肉生长抑制素 *MSTN* 基因敲除，基因敲除猪的肌纤维变粗、数量增多，表现出明显的双肌性状，从而使每头猪能够提供数量更多、肌肉质量更好的猪肉<sup>[1-3]</sup>；对猪的 *CD163* 基因进行敲除，猪就能完全避免繁殖与呼吸综合征病毒的感染<sup>[4]</sup>。

由于猪繁殖周期比灵长类动物短，产仔量多，器官大小、生理、代谢过程以及解剖结构与人类更为接近，基因编辑猪在生物医药领域也具有广泛的应用价值。基因编辑猪能模拟复杂的人类疾病，如心血管疾病、神经退行性疾病、囊性纤维化病、代谢类疾病等<sup>[5]</sup>。免疫排斥反应减弱以及大大降低内源性逆转录病毒感染人的风险的基因编辑猪是理想的异种器官移植的供体。另外，基因编辑猪还能作为生物反应器生产药用蛋白，如人血清白蛋白、凝血因子等<sup>[6]</sup>。

由于具有生殖系嵌合能力的猪胚胎干细胞建系一直未成功，早期制备特定的基因编辑猪的方法主要是依赖体细胞同源重组与体细胞核移植技术，如2002年，Lai等<sup>[7]</sup>利用同源重组结合体细胞核移植技术，成功获得了世界首例 $\alpha$ -1,3半乳糖苷转移酶基因敲除猪，解决了异种移植中的超急性免疫排斥反应问题。然而，体细胞基因组中双链断裂缺口出现的概率很低<sup>[8]</sup>，并且猪的体细胞在体外传代次数非常有限，这使得基因编辑猪的制备效率极低、成本极高，且耗时耗力，基因编辑猪的研究进展缓慢。

近年来，新型高效基因编辑技术人工核酸酶的出现，使基因编辑猪的培育发生了革命性的变化。

人工核酸酶是指可识别基因组内特定位点并对其切割的人为改造的核酸内切酶。在基因组内特定位点引入双链断裂缺口，可以高效产生基于非同源重组的基因敲除，并能大大提高基于同源重组修复方式的基因敲入动物的制备效率。人工核酸酶技术不仅使新的基因编辑猪数量不断增加，而且突变的类型也由过去只能产生基因敲除和敲入，发展到可对猪基因组同时进行多基因编辑、无痕点突变、条件性基因编辑，甚至可在猪成体水平直接进行基因编辑。另外，利用人工核酸酶技术不仅可通过体细胞基因编辑结合体细胞核移植技术来制备基因编辑猪，而且可通过受精卵注射的途径直接获得基因编辑个体，从而省去了猪体细胞基因编辑中费时、费力的细胞筛选过程以及复杂低效的体细胞核移植的环节。人工核酸酶技术主要包括锌指核酸酶 ZFN<sup>[9-10]</sup>、转录激活样效应核酸酶 TALEN<sup>[11]</sup>以及成簇规律间隔短回文重复序列 CRISPR 家族的 Cas9<sup>[12]</sup>和 Cpf1 核酸酶<sup>[13]</sup>。不同的人工核酸酶 ZFN、TALEN、CRISPR/Cas9 和 CRISPR/Cpf1 之间，由于其自身结构、识别及切割 DNA 序列方式等的不同，导致它们各有其优缺点。

表1列举了不同人工核酸酶之间几种不同特性的比较。本文将对近几年利用不同的人工核酸酶在基因编辑猪培育中取得的进展进行归纳和总结。

## 1 利用ZFN建立基因编辑猪的研究进展

锌指核酸酶 (ZFN) 是第一代人工核酸酶，ZFN 是由非特异性切割 DNA 的 FokI 内切酶与特异性识别三联 DNA 碱基序列的锌指蛋白模块组成的融合蛋白，可对锌指蛋白特异识别的 DNA 序列进行切割，引入双链断裂缺口，进一步通过非同源末端连接或同源重组的修复方式产生特定的基因编辑<sup>[21]</sup>。早在2001年，ZFN 已经被证实可在非洲爪蟾受精卵中产生基因突变，并有研究人员成功利用 ZFN 筛选出果蝇的突变体<sup>[22-23]</sup>。这些低等动物的研究证

表1 不同人工核酸酶之间几种不同特性的比较

基因编辑工具	ZFN <sup>[9-10]</sup>	TALEN <sup>[11,14-17]</sup>	CRISPR/Cas9 <sup>[12,18-20]</sup>
序列识别方式	蛋白质/DNA	蛋白质/DNA	RNA/DNA
组成单元	锌指蛋白+FokI	TALE+FokI	gRNA+Cas9蛋白
靶序列特征	偏好性识别与锌指模块结合的序列; 一个锌指模块识别三个碱基	以T开头, 靶序列之间间隔15~20 bp	gRNA长为20 bp, U6启动子以G开头, T7启动子以GG开头; PAM区为NGG
组装复杂程度	难	难	简单
基因编辑特点	识别位点有限, 脱靶率较低	基因编辑效率较高, 脱靶率较高	可同时对多个基因进行编辑, 基因编辑效率高, 脱靶率高
成本	高	较高	便宜

明, 锌指核酸酶技术可极大地提高基因敲除效率, 曾被美国 *Science* 杂志评为 2009 年生命科学领域十大创新技术之一。直到 2010 年, Watanabe 等<sup>[24]</sup> 才首次将 ZFN 系统成功应用于猪体细胞中, 它们将靶向体细胞内外源 EGFP 基因的 ZFN mRNA 序列电转入猪体细胞内, 检测到 EGFP 基因的敲除。随后, Whyte 等<sup>[25]</sup> 将 ZFN 敲除外源 EGFP 基因的猪体细胞作为供体细胞, 利用体细胞核移植技术成功制备了首例利用 ZFN 技术敲除外源基因的基因编辑猪。2011 年, Yang 等<sup>[26]</sup> 利用 ZFN 技术制备了首例内源基因 PPAR- $\gamma$  单敲猪模型, 他们将锌指核酸酶技术应用于猪体细胞的基因敲除, 使体细胞基因敲除的效率由传统的同源重组的  $10^{-6}$  提高到 4%。ZFN 技术在猪上进行基因编辑的应用, 打破了研究人员只能通过极低概率的自然发生的同源重组事件与体细胞核移植方法制备对特定基因进行修饰的基因编辑猪的限制。ZFN 是第一种能够人为在特定位点引入双链断裂缺口, 进行基于非同源末端连接途径的基因敲除或基于同源重组途径的基因敲入的技术, 该技术使得之前效率极低, 甚至无法获得的对特定基因进行修饰的基因编辑猪的制备成为可能。更为难能可贵的是, 利用 ZFN 进行体细胞基因打靶, 经筛选可以获得纯合子基因打靶细胞, 这样经过体细胞克隆, 在 F<sub>0</sub> 代就可获得纯合子基因打靶猪, 这使培育能够观察到基因突变表型的猪的时间至少缩短 2~3 年。然而, ZFN 模块组装复杂、费时, 关键技术被公司垄断, 价格昂贵, 并且对一些特定序列无法识别<sup>[27]</sup>。由于效率更高的 TALEN 技术的出现, ZFN 在猪的基因编辑研究中未得到广泛使用, 仅见有以下零星报道 (见表 2), 如 Hauschild 等<sup>[28]</sup> 利用 ZFN 制备 GGTA1 双等位基因敲除的基因编辑猪; 2013 年, Kwon 等<sup>[29]</sup> 利用 ZFN 还建立了单敲和双敲 CMP-Neu5Ac 羟化酶基因的健康基因编辑猪

仔, 这个建立在 GGTA1 敲除背景之上的 CMP-Neu5Ac 羟化酶基因敲除猪模型为异种器官移植研究提供了一个更好的基因编辑猪模型。

## 2 利用TALEN技术建立基因编辑猪的研究进展

TALEN 是第二代人工核酸酶基因编辑技术, 它是由可识别特定 DNA 序列, 来源于植物病原菌的转录激活因子与 FokI 核酸酶组成的融合蛋白<sup>[30]</sup>。与 ZFN 相比, TALEN 有两大优势: 一是其组装方式更为灵活, 大大增加了 TALEN 能够识别的靶序列的范围; 二是其基因编辑效率显著高于 ZFN<sup>[31]</sup>。因此, TALEN 技术在猪的基因编辑中比 ZFN 得到更广泛的应用。2012 年, Carlson 等<sup>[32]</sup> 将 TALEN mRNA 注入多种家畜受精卵中, 获得了效率高达 75% 的基因敲除胚胎, 并且利用 TALEN 技术进行基因编辑的猪胎儿成纤维细胞作为供核细胞进行体细胞核移植, 获得了 LDL 受体基因单敲和双敲猪, 这是家族性高胆固醇血症的理想研究模型。2014 年, 本实验室 Huang 等<sup>[33]</sup> 利用 TALEN 技术敲除猪胎儿成纤维细胞的 RAG1/2 基因, 并且通过体细胞核移植成功制备了重症免疫缺陷猪, 这一基因编辑猪模型可用于感染免疫、炎症、肿瘤和干细胞等相关研究。此外, 本实验室 Xin 等<sup>[34]</sup> 利用 TALEN 技术也高效制备了 GGTA1 基因双敲的近交系小型猪。2014 年, 本实验室 Li 等<sup>[35]</sup> 鉴定出猪基因组中的 Rosa26 位点, 并利用 TALEN 结合 Cre/Loxp 系统成功对此位点进行了高效的基因敲入, 培育了能够用于追踪猪细胞谱系及进行重组酶介导的基因置换的工具猪。Yao 等<sup>[36]</sup> 利用 TALEN 对猪基因组也进行了高效的双等位基因敲除, 并且首次将单链寡核苷酸作为打靶供体与 TALEN 结合成功地在 DJ-1 这一位点敲入了一小段序列。然而, 与 ZFN 相似, TALEN

表2 利用ZFN和TALEN技术建立的基因编辑猪

基因编辑工具	基因编辑类型	靶位点	制备方法	文献
ZFN	KO	<i>eGFP</i>	SCNT	[21]
ZFN	KO	<i>PPAR-γ</i>	SCNT	[26]
ZFN	KO	<i>GGTA1</i>	SCNT	[28]
ZFN	KO/KI	<i>CMAH</i>	SCNT	[29]
ZFN	KO	<i>GGTA1</i>	SCNT	[38,50]
ZFN	KO	<i>IL2RG</i>	SCNT	[24]
ZFN	KO	<i>FBN1</i>	SCNT	[39]
ZFN	KO	<i>GGTA1/CMAH</i>	SCNT	[40]
ZFN	KO	<i>PKD1</i>	SCNT	[41]
TALEN	KO	<i>LDLR</i>	SCNT	[32]
TALEN	KO	<i>GGTA1</i>	SCNT	[34]
TALEN、CRISPR/Cas9	KO	<i>DAZL</i> 、 <i>APC</i>	SCNT	[42]
TALEN	KO	<i>Rosa26</i>	SCNT	[35]
TALEN	KO	<i>MSTN</i>	SCNT	[2]
TALEN	KO	<i>GHR</i>	HMC	[43]
TALEN	KO	<i>RAG1/2</i>	SCNT	[33]
TALEN	KO	<i>RAG2</i>	SCNT	[44]
TALEN	KO	<i>DJ-1</i>	SCNT	[36]
TALEN	KO	<i>GGTA1/hDAF</i>	SCNT	[45]
TALEN	KO	<i>HMGA2</i>	SCNT	[46]
TALEN	KO	<i>P53</i>	SCNT	[47]
TALEN	KI	<i>MYH7</i>	SCNT	[48]
ZFN和CRISPR/Cas9	KO	<i>CMAH/GGTA1</i>	SCNT	[49]
TALEN和CRISPR/Cas9	点突变	<i>insulin</i>	SCNT	[50]
ZFN和TALEN	KO	<i>RELA</i>	受精卵注射	[51]
ZFN和TALEN	KO	<i>GalT/CMAH</i>	SCNT	[52]

注：KO：基因敲除；KI：基因敲入；SCNT：体细胞核移植

也是通过蛋白来对 DNA 进行识别和定位，TALEN 模块构建虽比 ZFN 更容易，但也需要较大的工作量；另外，模块中存在的重复序列以及通过蛋白质模块对 DNA 序列进行识别的特点，使其对一些特定序列无法识别，在构建基因编辑猪上应用仍存在一定的限制<sup>[37]</sup>。表 2 列举了近年来利用 TALEN 技术成功建立的基因编辑猪模型。

### 3 利用CRISPR/Cas9以及CRISPR/Cpf1系统建立基因编辑猪的研究进展

CRISPR/Cas9 是第三代人工核酸酶基因编辑技术，不同于 ZFN 和 TALEN 通过蛋白质对特定 DNA 序列进行识别与结合，CRISPR/Cas9 是通过向导 RNA 对特定 DNA 序列进行识别与结合。新近还陆续发现了与之相似的 CRISPR/Cpf1<sup>[13]</sup> 等其他基因编辑系统。CRISPR/Cas9 系统由识别特异 DNA 序列的向导 RNA 以及对 DNA 序列进行切割的 Cas9 核酸酶组成，Cas9 对基因组特定位点的识别除了对

gRNA-DNA 杂交复合物进行识别之外，还要求被识别的 DNA 序列上与 gRNA 配对的 DNA 序列的 3' 端 PAM 区存在 NGG。与 ZFN 和 TALEN 相比，CRISPR/Cas9 系统的构建方法更为简便快速，价格便宜，效率极高，可对不同细胞类型和不同物种进行基因编辑，并可同时对多个基因进行高效编辑。CRISPR/Cas9 的出现迅速革新了分子生物学的研究手段，成为最强有力的基因编辑工具<sup>[53]</sup>。2013 年，Wang 等<sup>[19]</sup> 利用 CRISPR/Cas9 系统一步制备了携带多基因突变的小鼠。同时，Li 等<sup>[54]</sup> 利用 CRISPR/Cas9 系统在小鼠和大鼠中进行了基因打靶。2014 年，Hai 等<sup>[55]</sup> 将 Cas9 mRNA 和 gRNA 注入猪受精卵，获得了 *vWF* 基因敲除猪，制备了血管性血友病基因编辑猪模型。随后，结合体细胞基因编辑和体细胞核移植，甚至是通过受精卵直接注射的方式，利用 CRISPR/Cas9 系统，通过非同源末端连接的修复途径或者通过基于单链寡核苷酸修复模板或双链 DNA 模板进行的同源定向重组途径，已成功实现在猪基因组内的高

效基因敲除、基因定点敲入、基因组无痕点突变、多基因编辑以及在猪成体内的基因编辑。表 3 列举了近年来利用 CRISPR/Cas9 成功建立的基因编辑猪模型。CRISPR/Cpf1 系统与 CRISPR/Cas9 系统相似, 由识别特异 DNA 序列的向导 RNA 以及 Cpf1 核酸酶组成, 但 CRISPR/Cpf1 要求被识别的 DNA 序列上与 gRNA 配对的 DNA 序列的 5' 端 PAM 区为 TTTN<sup>[13]</sup>。相较而言, CRISPR/Cas9 系统可能适用于对 CG 碱基含量较高的 DNA 序列进行基因编辑, 而 CRISPR/Cpf1 则可以对 CRISPR/Cas9 无法识别的 AT 碱基含量较高的 DNA 序列进行基因编辑。本实验室近期利用哺乳动物转运 RNA (tRNA) 内源剪切机制, 对 Cpf1 引导 RNA (gRNA) 进行了改造, 极大地提高了 Cpf1 在细胞系和动物胚胎中的基因编辑效率, 并成功获得了首例 Cpf1 基因修饰猪模型, 包括 DMD 敲除、PLN 点突变的基因编辑猪<sup>[56]</sup>。

#### 4 人工核酸酶带来的脱靶效应

因为人工核酸酶是通过识别很短的 DNA 序列来实现其靶向功能的, 靶序列以外的基因组内可能存在相似的 DNA 短片段, 所以, 人工核酸酶进行基因编辑时可能在靶序列以外的基因组内的其他 DNA 序列上进行切割, 带来脱靶的风险。为此, 科学家们采取了多种策略来降低脱靶风险。

有学者对减低 ZFN 基因编辑技术脱靶效率进行了探索。2012 年, Ramirez 等<sup>[99]</sup>通过将 ZFN 二聚体中的一个单体的 FokI 进行 D450A 突变, 成功制备了只对 DNA 序列中的一条链进行切割的 ZFN 切口酶, 相关实验结果表明这种 ZFN 切口酶在体外能高效产生 DNA 序列中的单链切口, 在细胞内能够提高对靶序列进行的基于同源重组修复途径的基因编辑, 降低了基于非同源末端连接修复途径在潜在的脱靶位点发生突变的概率。但是, 整体而言, 与正常的 ZFN 相比, 利用这种 ZFN 切口酶牺牲了对靶序列进行基因编辑的效率。

CRISPR/Cas9 系统的打靶效率高, 但其脱靶率也相应变高, 围绕降低 CRISPR/Cas9 系统的脱靶风险的研究结果陆陆续续地有不少报道。CRISPR/Cas9 系统是通过向导 RNA 序列与基因组上的 DNA 序列互补配对来特异性识别靶序列。此外, 向导 RNA 的设计和合成步骤简单, 因此, 最初有人尝试通过增加向导 RNA 序列的长度, 使其特异识别的靶序列长度增加, 提高靶序列识别特异性, 从而降低 CRISPR/Cas9 系统的脱靶概率。然而, Ran

等<sup>[100]</sup>发现, 将向导 RNA 远离 PAM 区的那一端往外延伸 10 nt, 增加向导 RNA 与靶 DNA 序列互补识别区的长度后, 靶向识别的特异性并未发生改变, 因为长度增加的向导 RNA 大多数仍被加工成与靶 DNA 序列互补识别的长度为 20 nt 的序列, 部分基因的编辑效率还有所下降。随后, 他们根据 Cas9 活性切割域组成和功能特点, 设计了新的策略, 成功地降低了 CRISPR/Cas9 系统的脱靶率<sup>[100]</sup>。Cas9 由 HNH 和 RuvC 两个活性切割域组成, 分别对向导 RNA 互补链以及非互补链进行切割, 如对 HNH 结构域进行 H840A 突变或者对 RuvC 结构域进行 D10A 突变, 使其变为 Cas9 切口酶, 后者仅能对 DNA 序列中的一条链进行切割。通过设计配对的向导 RNA 分别识别 DNA 序列的两条链, 导致 Cas9 切口酶会增加靶向识别的序列的长度, 从而有可能提高靶向特异性; 另一方面, 一条向导 RNA 导致 DNA 单链切口会引发高保真的碱基剪切修复, 从而避免因插入缺失突变导致脱靶。Ran 等<sup>[100]</sup>的研究表明, 在小鼠受精卵注射多对配对的向导 RNA 与 Cas9 切口酶, 利用配对的向导 RNA 与 Cas9 切口酶或可将脱靶效率降低 99.5%~99.93%。这种配对的向导 RNA 与 Cas9 切口酶策略在降低脱靶率的同时, 不会影响基因编辑效率, 仍然保留了高效的基因敲除和敲入功能。有研究者在人胚胎干细胞系利用该策略进行基于同源重组途径的基因编辑, 获得了比单独利用单一的向导 RNA 以及 Cas9 切口酶更高的基因敲入的效率。Ran 等<sup>[100]</sup>的同一研究结果显示, 配对的向导 RNA 与 Cas9 切口酶策略制备多基因敲除小鼠的效率, 与利用野生型 Cas9 也无显著差异。但是, 这种策略没有被广泛应用, 因为向导 RNA 与 Cas9 切口酶这种方法有其局限性: 首先是找到靶序列对应的合适的配对的向导 RNA 难度高; 其次是最佳基因修饰效率对应的配对的向导 RNA 之间的间隔尚不明确, 导致编辑效率在不同基因具有不确定性; 第三是应用此策略需要增加额外的一条向导 RNA, 使应用 CRISPR/Cas9 系统进行基因编辑的工作量增加。

与通过增加向导 RNA 序列的长度来增加特异识别的靶序列长度, 从而提高靶序列识别特异性的想法相反, 有研究人员提出利用更短的向导 RNA 来降低 Cas9 的脱靶风险。Fu 等<sup>[101]</sup>在 2014 年通过设计靶向报告基因 EGFP 的不同长度的向导 RNA, 发现 17 或 18 nt 的向导 RNA 与经典的 20 nt 向导 RNA 产生的基因编辑效率基本相同, 但是与靶序

表3 利用CRISPR/Cas9建立的基因编辑猪

基因编辑工具	基因编辑类型	靶位点	制备方法	文献
CRISPR/Cas9	KO	<i>vWF</i>	受精卵注射	[55]
CRISPR/Cas9	KO	<i>Npc111</i>	受精卵注射	[57]
CRISPR/Cas9	KO	<i>DMD</i>	受精卵注射	[58]
CRISPR/Cas9	KO	<i>parkin/DJ-1/PINK1</i>	受精卵注射	[59]
CRISPR/Cas9	KO	<i>CD163</i>	受精卵注射	[4]
CRISPR/Cas9	KO	<i>RAG2/IL2RG</i>	受精卵注射	[60]
CRISPR/Cas9	KO	<i>MITF</i>	受精卵注射	[61]
CRISPR/Cas9	KO	<i>GGTA1</i>	受精卵注射	[62-63]
CRISPR/Cas9-D10A	KO	<i>ULBP1</i>	受精卵注射	[64]
CRISPR/Cas9	KI	<i>Sox10</i>	受精卵注射	[56,65]
CRISPR/Cas9	KI	<i>NANOS2</i>	受精卵注射	[66]
CRISPR/Cas9	KI	<i>Human Albumin</i>	受精卵注射	[6]
CRISPR/Cas9	KI	<i>COLA1</i>	受精卵注射	[67]
CRISPR/Cas9	KO	<i>GRB10</i>	受精卵注射、SCNT	[68]
CRISPR/Cas9	KO	<i>IL2RG</i>	受精卵注射、SCNT	[69]
CRISPR/Cas9	KO	<i>NGN3</i>	受精卵注射、SCNT	[70]
CRISPR/Cas9	KO	<i>CD163、CD1D</i>	受精卵注射、SCNT	[71]
CRISPR/Cas9	KO	<i>PARK2/PINK1、TYR</i>	SCNT	[72]
CRISPR/Cas9	KO	<i>SLA</i>	SCNT	[73]
CRISPR/Cas9	KO	<i>Hoxc13</i>	SCNT	[74]
CRISPR/Cas9	KO	<i>RUNX3</i>	SCNT	[75]
CRISPR/Cas9	KO	<i>MSTN</i>	SCNT	[76]
CRISPR/Cas9	KO	<i>IgM</i>	SCNT	[77]
CRISPR/Cas9	KO	<i>UCP1</i>	SCNT	[78]
CRISPR/Cas9	KO	<i>INS</i>	SCNT	[79]
CRISPR/Cas9	KO	<i>GGTA1/CMAH/iGb3S</i>	SCNT	[80]
CRISPR/Cas9	KO	<i>POL</i>	SCNT	[81]
CRISPR/Cas9	KO	<i>C3</i>	SCNT	[82]
CRISPR/Cas9	KO	<i>IL1B2</i>	SCNT	[83]
CRISPR/Cas9	KO	<i>GGTA1/CMAH/<math>\beta</math>4GalNT2</i>	SCNT	[84]
CRISPR/Cas9	KO	<i>GHR</i>	SCNT	[85-86]
CRISPR/Cas9	KO	<i>GGTA1/CMAH</i>	HMC	[87]
CRISPR/Cas9	KO	<i>ApoE/LDLR</i>	SCNT	[88]
CRISPR/Cas9	KO	<i>FBXO40</i>	SCNT	[89]
CRISPR/Cas9	KO	<i>TPH2</i>	SCNT	[90]
CRISPR/Cas9	KO	<i>XIST</i>	SCNT	[91]
CRISPR/Cas9	KI	<i>Oct4</i>	SCNT	[92]
CRISPR/Cas9	KI	<i>MSTN</i>	SCNT	[66]
CRISPR/Cas9	KI	<i>HTT</i>	SCNT	[93]
CRISPR/Cas9	KI	<i>SURF1</i>	SCNT	[94]
CRISPR/Cas9	KI	<i>ACTB</i>	SCNT	[95]
CRISPR/Cas9	KI	<i>Pif501</i>	SCNT	[96]
CRISPR/Cas9	KI	<i>Hipp11</i>	SCNT	[67]
CRISPR/Cas9	KI	<i>Rosa26</i>	SCNT	[97]
FokI-dCas9	KI	<i>GGTA1-antiCD2</i>	SCNT	[98]

注：KO：基因敲除；KI：基因敲入；SCNT：体细胞核移植；HMC：手工克隆

列互补的长度为 17 或 18 nt 的向导 RNA 产生的脱靶效率比与靶序列互补长度为 20 nt 的向导 RNA 产

生的脱靶效率低很多，在某些脱靶位点脱靶概率可降低 99.99% 以上。利用与靶序列互补长度为 17 或

18 nt 的向导 RNA 虽可大幅度降低脱靶率, 但仍能检测到脱靶现象的存在, 因而可以设想, 如其结合上述的配对向导 RNA 与 Cas9 切口酶策略, 有可能会进一步降低, 甚至避免脱靶的风险。目前尚不清楚更短的向导 RNA 降低 Cas9 带来的脱靶的机制, 可能是由于较长的向导 RNA 需求的与靶序列精确互补配对的亲和力较低, 进行基因编辑可通过稍微减短向导 RNA 与靶序列互补配对序列的长度来降低亲和力, 同时不影响基因编辑能力, 因而降低了向导 RNA 序列对碱基错配的容忍限度, 即降低了与潜在脱靶位点识别结合的亲和力, 从而降低脱靶风险。若希望通过使用更短的向导 RNA 降低脱靶风险进行基因编辑, 研究人员需谨慎评估是否会影响靶向的基因编辑效率。

无论哪一种人工核酸酶技术, 在细胞水平上, 虽经过一系列改进, 脱靶现象似乎仍不可完全避免。但对制备基因编辑动物而言, 基因脱靶似乎不是一个严重关切问题。在已报道的人工核酸酶技术构建的基因编辑猪中, 大多没有检测到脱靶现象, 或者检测到的脱靶常常出现在基因之间的非编码序列中, 对动物的生长发育和健康状况不会带来负面的影响。这是因为, 无论是通过受精卵注射途径或通过体细胞核移植途径来制备基因编辑猪, 基因编辑胚胎都要经历在母体内的发育过程, 如果脱靶造成了致死突变, 胚胎就不能出生, 就会自然淘汰掉, 在出生的基因编辑猪中, 并没有观察到畸形胎儿比例增高的现象, 说明脱靶发生率在胚胎中应该不会太高。在实际生产中, 如果发生有害脱靶, 可以利用表型鉴定或通过繁育基因编辑猪过程淘汰, 由此获得符合预期表型的基因编辑猪。

## 5 条件性基因编辑策略建立基因编辑猪的研究进展

基因的突变会带来不同表型, 有些基因在动物发育过程中过表达或缺失是致死的, 还有些基因只在特定发育阶段、特定的组织或器官中表达, 传统的基因编辑动物模型无法满足这些特定要求, 因此需要建立条件性基因编辑动物模型, 对基因的表达进行时空调控。多种小鼠的条件性基因编辑模型已建立成功<sup>[102]</sup>, 而由于昂贵的成本、较长的时间周期以及较高技术难度等方面的限制, 条件性基因编辑猪模型报道相对较少。下面简要概述基于位点特异性重组酶 Cre/loxP 和 PhiC31 以及 tet-on/off 系统成功建立的条件性基因编辑猪模型。

### 5.1 Cre/LoxP系统

LoxP 是长为 34 bp 的 DNA 序列, 由两边倒置的 13 bp 重复序列以及 8 bp 不对称核心序列组成, Cre 重组酶可特异性识别 LoxP, 从而使 DNA 序列产生剪切、倒置、异位等效应<sup>[103]</sup>。2009 年, Li 等<sup>[104]</sup>在利用广谱启动子启动的 EGFP 前加入了两侧有 Loxp 位点的终止, 从而子构建了第一只可诱导转基因猪模型, 该模型可用来监测猪体内 Cre 的表达活性。2014 年, Luo 等<sup>[105]</sup>制备了 AQP2-Cre 转基因中国小型猪, 这种转基因猪只在肾集合管细胞中特异表达 Cre。Moon 等<sup>[106]</sup>构建了终止子序列两旁加入同向 Loxp 位点来调控 DsRED 表达的载体, 将该载体转入猪成纤维细胞后, 瞬时转染表达 Cre 重组酶, 得到了发红色荧光的猪成纤维细胞, 将这些细胞作为供核细胞进行核移植也获得了带有红光的重构胚胎, 表明 Cre/LoxP 系统可应用于猪体内。2014 年, 本实验室 Li 等<sup>[35]</sup>利用 TALEN 技术将 Cre/LoxP 系统敲入猪的 Rosa26 位点, 成功建立了可以通过 Cre 介导红色荧光蛋白基因过表达的条件性基因编辑工具猪。Rosa26 控制 Cre 基因表达猪模型可用于追踪体内细胞谱系的发育与变迁。另外, 他们在 Rosa26 控制 Cre 基因表达猪体细胞基础上, 利用重组酶介导的基因交换, 成功将 EGFP 基因替换为红色荧光蛋白 tdTomato 基因, 由此获得了世界上第一个重组酶介导的基因交换大动物模型。

最近, 本实验室还利用 TALEN 技术, 构建了 Cas9 基因两侧加入 Loxp 位点的打靶载体, 并将其敲入猪 Rosa26 位点的下游, 建立了依赖 Cre 表达的 Cas9 条件性基因编辑猪模型, 相当于在猪体内加入了一把基因剪刀, 并且在 Cas9 基因附近加上了能与 Cre 重组酶结合的 Loxp 位点, 后者相当于一个开关, 能对其剪切功能的开启加以控制。利用此工具模型, 不需要依赖受精卵注射或体细胞核移植技术, 研究人员在动物体内转入能识别特定基因的 gRNA 和重组酶, 就可直接对猪的基因组进行编辑, 从而快速获得相应基因编辑猪模型。利用条件性表达 Cas9 基因猪模型, 已实现猪体细胞单基因、多基因、超大片段基因的编辑。将慢病毒包装的 Cre 重组酶和靶向六种肿瘤相关基因的 gRNA, 通过滴鼻方式感染工具猪的肺脏, 在猪肺细胞的基因组诱发癌化突变, 三个月后, 猪出现了典型的肺癌症状和病理变化, 从而成功地建立了原发性肺肿瘤大动物模型<sup>[97]</sup>。

### 5.2 PhiC31重组酶

Cre/LoxP 系统需在目的 DNA 片段插入两个顺

式识别位点，通过这两个位点介导底物删除和DNA片段插入。为了减少可逆作用的删除，需要找出并使用一些无法再继续被识别切割的功能突变识别位点序列，并且该重组酶系统需要加入特定的筛选标记来选出进行了盒式交换或DNA嵌入的细胞。而从链霉菌属噬菌体中发现的PhiC31-att系统可以克服Cre/LoxP系统这方面的不足。这种整合酶特异性识别并切割两个异形的位点attB（存在于细菌）和attP（存在于噬菌体），并使attB和attP发生融合连接，重组产生的两个位点attL和attR不能再被整合酶特异性识别和切割。如果目的是将特定的DNA片段直接插入或通过盒式交换嵌入宿主基因组中，由于PhiC31重组酶催化切割重组是不可逆的，因此更稳定；相较于Cre/LoxP重组酶系统，PhiC31整合酶是在基因组内实施位点特异性的插入更为理想的工具。PhiC31系统在基因编辑猪模型上的报道仅见于2013年Bi等<sup>[1]</sup>在体外培养的猪细胞水平的研究，他们验证了PhiC31重组酶可促进基于attP和attB重组的转基因的嵌入与表达。随后，利用PhiC31重组酶系统，他们成功构建出转基因猪，并鉴定出猪基因组中的几个可用于外源基因插入的安全位点<sup>[103]</sup>。

### 5.3 Tet-on/off系统

Tet-on/off系统可通过四环素或其类似物(Dox)调控特定基因是否表达，利用此系统已成功制备了多种条件性基因编辑小鼠。四环素诱导特定基因表达的转基因猪也只有少量报道。2012年，Klymiuk等<sup>[107]</sup>报道了四环素诱导表达RANKL和CTLA-4lg基因的基因编辑猪。他们是通过两轮连续的体细胞核移植技术来实现的，第一轮克隆出了反式四环素激活子表达的转基因猪，第二轮是在此转基因猪基础之上，将四环素应答元件调控的RANKL和CTLA-4lg基因转入此转基因猪的基因组内。这种猪模型为异种器官移植的研究提供了工具。2014年，Jin等<sup>[108]</sup>利用一个包含Tet-on系统所有元件的慢病毒载体感染猪胎儿成纤维细胞，将基因编辑细胞用于体细胞核移植，成功获得了四环素诱导EGFP基因表达的转基因猪。然而，这两种方法制备的Dox诱导外源基因表达的基因编辑猪均存在Dox诱导外源基因表达情况不稳定，甚至外源基因表达完全沉默的缺陷。为了克服这一缺陷，本实验室已经利用CRISPR/Cpf1制备出了将Tet-on系统的两个元件rtTA和TRE同时分别定点敲入猪基因组内的ROSA26和HIPPI1两个不同位点的可诱导外源基因tdTomato

表达的基因编辑猪模型，这种模型猪在经四环素诱导后，tdTomato在各个器官和组织中均实现了稳定高表达，并成功地利用这套体系培育出了条件性表达多种目的基因的基因编辑猪，相关研究结果还未发表。

## 6 结语与展望

人工核酸酶的出现使得在体细胞水平进行基因编辑的效率已不再是制约基因编辑猪制备的主要因素，但基因编辑猪的规模化制备与广泛应用仍存在若干问题。

首先，无法准确预测基因突变结构与基因编辑猪表型之间的关系。由于目前对于物种差异性的理解非常有限，并且这种差异性有时会导致相同的基因在不同物种间的功能不同，如在小鼠中经基因突变获得的表型在猪中不能出现。当利用基因编辑猪制备人类疾病模型时，可能某些基因突变无法获得预期的人类疾病表型。因此，为了获得预期表型的基因编辑猪模型，一方面，或许可以进行多种不同的基因编辑方式或其组合方式的探索；另一方面，结合物种间的生物信息差异性以及体外细胞模型的前期验证结果，可以帮助人们选择最佳的基因编辑策略来获得预期表型的基因编辑猪。

其次，体细胞核移植技术效率仍然很低，制约了下游克隆猪的制备。人工核酸酶在胚胎中的编辑效率很高，通过受精卵直接注射的方法可以绕过低效率的体细胞核移植环节来制备基因编辑猪，不过这种方法获得的F<sub>0</sub>代基因编辑猪，不同突变类型存在于同一个体中，即嵌合体基因编辑猪，不得不花较长的时间进一步繁育来获得表型稳定的纯合子。直接用病毒载体传递人工核酸酶系统到猪成体内，也可绕过体细胞核移植环节直接进行基因编辑，但这种策略只能对局部组织细胞进行基因编辑。因此，提高猪体细胞核移植效率以及建立具有生殖系嵌合能力的猪多能干细胞对实现规模化高效基因编辑猪仍至关重要。另外，通过建立更多的工具猪模型，如重组酶介导的基因交换工具猪模型、可诱导表达Cas9蛋白的工具猪，也有助于加速基因编辑猪的培育。

### [参 考 文 献]

- [1] Bi YZ, Liu XM, Zhang L, et al. Pseudo attP sites in favor of transgene integration and expression in cultured porcine cells identified by streptomyces phage phiC31 integrase. BMC Mol Biol, 2013, 14: 20
- [2] Rao S, Fujimura T, Matsunari H, et al. Efficient



- modification of the myostatin gene in porcine somatic cells and generation of knockout piglets. *Mol Reprod Dev*, 2016, 83: 61-70
- [3] Wang KK, Ouyang HS, Xie ZC, et al. Efficient generation of myostatin mutations in pigs using the CRISPR/Cas9 system. *Sci Rep*, 2015, 5: 16623
- [4] Burkard C, Lillico SG, Reid E, et al. Precision engineering for PRRSV resistance in pigs: macrophages from genome edited pigs lacking CD163 SRCR5 domain are fully resistant to both PRRSV genotypes while maintaining biological function. *PLoS Pathog*, 2017, 13: e1006206
- [5] Yao J, Huang J, Zhao J. Genome editing revolutionize the creation of genetically modified pigs for modeling human diseases. *Hum Genet*, 2016, 135: 1093-105
- [6] Peng J, Wang Y, Jiang JY, et al. Production of human albumin in pigs through CRISPR/Cas9-mediated knockin of human cDNA into swine albumin locus in the zygotes. *Sci Rep*, 2015, 5: 16705
- [7] Lai L, Kolber-Simonds D, Park KW, et al. Production of  $\alpha$ -1,3-galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning. *Science*, 2002, 295: 1089-92
- [8] Vasquez KM, Marburger K, Intody Z, et al. Manipulating the mammalian genome by homologous recombination. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98: 8403-10
- [9] Kim YG, Cha J, Chandrasegaran S. Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93: 1156-60
- [10] Bibikova M, Beumer K, Trautman JK, et al. Enhancing gene targeting with designed zinc finger nucleases. *Science*, 2003, 300: 764
- [11] Boch J, Scholze H, Schornack S, et al. Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science*, 2009, 326: 1509-12
- [12] Mali P, Yang LH, Esvelt KM, et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*, 2013, 339: 823-26
- [13] Zetsche B, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, et al. Cpf1 is a single-RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system. *Cell*, 2015, 163: 759-71
- [14] Zhang F, Cong L, Lodato S, et al. Efficient construction of sequence-specific TAL effectors for modulating mammalian transcription. *Nat Biotechnol*, 2011, 29: 149-53
- [15] Cermak T, Doyle EL, Christian M, et al. Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39: e82
- [16] Miller JC, Tan S, Qiao G, et al. A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. *Nat Biotechnol*, 2011, 29: 143-8
- [17] Moscou MJ, Bogdanove AJ. A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors. *Science*, 2009, 326: 1501
- [18] Doudna JA, Charpentier E. Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, 2014, 346: 1258096
- [19] Wang H, Yang H, Shivalila CS, et al. One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell*, 2013, 153: 910-8
- [20] Cong L, Ran FA, Cox D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 2013, 339: 819-23
- [21] Whyte JJ, Prather RS. Cell biology symposium: zinc finger nucleases to create custom-designed modifications in the swine (*Sus scrofa*) genome. *J Anim Sci*, 2012, 90: 1111-7
- [22] Bibikova M, Carroll D, Segal DJ, et al. Stimulation of homologous recombination through targeted cleavage by chimeric nucleases. *Mol Cell Biol*, 2001, 21: 289-97
- [23] Bibikova M, Golic M, Golic KG, et al. Targeted chromosomal cleavage and mutagenesis in *Drosophila* using zinc-finger nucleases. *Genetics*, 2002, 161: 1169-75
- [24] Watanabe M, Umeyama K, Matsunari H, et al. Knockout of exogenous EGFP gene in porcine somatic cells using zinc-finger nucleases. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 402: 14-8
- [25] Whyte JJ, Zhao JG, Wells KD, et al. Gene targeting with zinc finger nucleases to produce cloned eGFP knockout pigs. *Mol Reprod Dev*, 2011, 78: 2
- [26] Yang DS, Yang HQ, Li W, et al. Generation of PPAR  $\gamma$  mono-allelic knockout pigs via zinc-finger nucleases and nuclear transfer cloning. *Cell Res*, 2011, 21: 979-82
- [27] Move over ZFNs. *Nat Biotechnol*, 2011, 29: 681-4
- [28] Hauschild J, Petersen B, Santiago Y, et al. Efficient generation of a biallelic knockout in pigs using zinc-finger nucleases. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108: 12013-7
- [29] Kwon DN, Lee KH, Kang MJ, et al. Production of biallelic CMP-Neu5Ac hydroxylase knock-out pigs. *Sci Rep*, 2013, 3: 1981
- [30] Christian M, Cermak T, Doyle EL, et al. Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. *Genetics*, 2010, 186: 757-61
- [31] Dupret B, Angrand PO. Targeted genome modifications using TALEN. *Med Sci: Paris*, 2014, 30: 186-93
- [32] Carlson DF, Tan WF, Lillico SG, et al. Efficient TALEN-mediated gene knockout in livestock. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109: 17382-7
- [33] Huang J, Guo X, Fan N, et al. RAG1/2 knockout pigs with severe combined immunodeficiency. *J Immunol*, 2014, 193: 1496-503
- [34] Xin J, Yang H, Fan N, et al. Highly efficient generation of GGTA1 biallelic knockout inbred mini-pigs with TALENs. *PLoS One*, 2013, 8: e84250
- [35] Li XP, Yang Y, Bu L, et al. Rosa26-targeted swine models for stable gene over-expression and Cre-mediated lineage tracing. *Cell Res*, 2014, 24: 501-4
- [36] Yao J, Huang JJ, Hai T, et al. Efficient bi-allelic gene knockout and site-specific knock-in mediated by TALENs in pigs. *Sci Rep*, 2014, 4: 6926
- [37] Wright DA, Li T, Yang B, et al. TALEN-mediated genome editing: prospects and perspectives. *Biochem J*, 2014, 462: 15-24
- [38] Bao L, Chen HD, Jong UM, et al. Generation of GGTA1 biallelic knockout pigs via zinc-finger nucleases and somatic cell nuclear transfer. *Sci China Life Sci*, 2014, 57: 263-8

- [39] Umeyama K, Watanabe K, Watanabe M, et al. Generation of heterozygous fibrillin-1 mutant cloned pigs from genome-edited foetal fibroblasts. *Sci Rep*, 2016, 6: 24413
- [40] Lutz AJ, Li P, Estrada JL, et al. Double knockout pigs deficient in N-glycolylneuraminic acid and galactose  $\alpha$ -1,3-galactose reduce the humoral barrier to xenotransplantation. *Xenotransplantation*, 2013, 20: 27-35
- [41] He J, Li QY, Fang SY, et al. PKD1 mono-allelic knockout is sufficient to trigger renal cystogenesis in a mini-pig model. *Int J Biol Sci*, 2015, 11: 361-9
- [42] Tan WF, Carlson DF, Lancto CA, et al. Efficient nonmeiotic allele introgression in livestock using custom endonucleases. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110: 16526-31
- [43] Li F, Li Y, Liu H, et al. Production of GHR double-allelic knockout Bama pig by TALENs and handmade cloning. *Yi Chuan*, 2014, 36: 903-11
- [44] Lee K, Kwon DN, Ezashi T, et al. 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: 7260-5
- [45] Kang JT, Kwon DK, Park AR, et al. Production of  $\alpha$  1,3-galactosyltransferase targeted pigs using transcription activator-like effector nuclease-mediated genome editing technology. *J Vet Sci*, 2016, 17: 89-96
- [46] Chung J, Zhang X, Collins B, et al. High mobility group A2 (HMGA2) deficiency in pigs leads to dwarfism, abnormal fetal resource allocation, and cryptorchidism. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2018, 115: 5420-5
- [47] Shen YF, Xu KX, Yuan ZM, et al. Efficient generation of P53 biallelic knockout Diannan miniature pigs via TALENs and somatic cell nuclear transfer. *J Transl Med*, 2017, 15: 224
- [48] Montag J, Petersen B, Flogel AK, et al. Successful knock-in of hypertrophic cardiomyopathy-mutation R723G into the MYH7 gene mimics HCM pathology in pigs. *Sci Rep*, 2018, 8: 4786
- [49] Fischer K, Kraner-Scheiber S, Petersen B, et al. Efficient production of multi-modified pigs for xenotransplantation by 'combineering', gene stacking and gene editing. *Sci Rep*, 2016, 6: 29081
- [50] Yang Y, Wang KP, Wu H, et al. Genetically humanized pigs exclusively expressing human insulin are generated through custom endonuclease-mediated seamless engineering. *J Mol Cell Biol*, 2016, 8: 174-7
- [51] Lillico SG, Proudfoot C, Carlson DF, et al. Live pigs produced from genome edited zygotes. *Sci Rep*, 2013, 3: 2847
- [52] Miyagawa S, Matsunari H, Watanabe M, et al. Generation of  $\alpha$ 1,3-galactosyltransferase and cytidine monophospho-N-acetylneuraminic acid hydroxylase gene double-knockout pigs. *J Reprod Dev*, 2015, 61: 449-57
- [53] Mali P, Esvelt KM, Church GM. Cas9 as a versatile tool for engineering biology. *Nat Methods*, 2013, 10: 957-63
- [54] Li DL, Qiu ZW, Shao YJ, et al. Heritable gene targeting in the mouse and rat using a CRISPR-Cas system. *Nat Biotechnol*, 2013, 31: 681-3
- [55] Hai T, Teng F, Guo RF, et al. One-step generation of knockout pigs by zygote injection of CRISPR/Cas system. *Cell Res*, 2014, 24: 372-75
- [56] Wu H, Liu Q, Shi H, et al. Engineering CRISPR/Cpf1 with tRNA promotes genome editing capability in mammalian systems. *Cell Mol Life Sci*, 2018 [Epub ahead of print]
- [57] Wang Y, Du Y, Shen B, et al. Efficient generation of gene-modified pigs via injection of zygote with Cas9/sgRNA. *Sci Rep*, 2015, 5: 8256
- [58] Yu HH, Zhao H, Qing YB, et al. Porcine zygote injection with Cas9/sgRNA results in DMD-modified pig with muscle dystrophy. *Int J Mol Sci*, 2016, 17: 1668
- [59] Wang XL, Cao CW, Huang JJ, et al. One-step generation of triple gene-targeted pigs using CRISPR/Cas9 system. *Sci Rep*, 2016, 6: 20620
- [60] Lei S, Ryu J, Wen K, et al. Increased and prolonged human norovirus infection in RAG2/IL2RG deficient gnotobiotic pigs with severe combined immunodeficiency. *Sci Rep*, 2016, 6: 25222
- [61] Wang XL, Zhou JW, Cao CW, et al. Efficient CRISPR/Cas9-mediated biallelic gene disruption and site-specific knockin after rapid selection of highly active sgRNAs in pigs. *Sci Rep*, 2015, 5: 13348
- [62] Butler JR, Wang ZY, Martens GR, et al. Modified glycan models of pig-to-human xenotransplantation do not enhance the human-anti-pig T cell response. *Transpl Immunol*, 2016, 35: 47-51
- [63] Chuang CK, Chen CH, Huang CL, et al. Generation of GGTA1 mutant pigs by direct pronuclear microinjection of CRISPR/Cas9 plasmid vectors. *Anim Biotechnol*, 2016, 28: 174-81
- [64] Zeyland J, Hryhorowicz M, Nowak-Terpilowska A, et al. The production of UL16-binding protein 1 targeted pigs using CRISPR technology. *3 Biotech*, 2018, 8: 70
- [65] Zhou XY, Wang LL, Du YN, et al. Efficient generation of gene-modified pigs harboring precise orthologous human mutation via CRISPR/Cas9-induced homology-directed repair in zygotes. *Hum Mutat*, 2016, 37: 110-8
- [66] Park KE, Kaucher AV, Powell A, et al. Generation of germline ablated male pigs by CRISPR/Cas9 editing of the *NANOS2* gene. *Sci Rep*, 2017, 7: 40176
- [67] Park KE, Powell A, Sandmaier SE, et al. Targeted gene knock-in by CRISPR/Cas ribonucleoproteins in porcine zygotes. *Sci Rep*, 2017, 7: 42458
- [68] Sheets TP, Park CH, Park KE, et al. Somatic cell nuclear transfer followed by CRISPR/Cas9 microinjection results in highly efficient genome editing in cloned pigs. *Int J Mol Sci*, 2016, 17: 2031
- [69] Kang JT, Cho B, Ryu J, et al. Biallelic modification of IL2RG leads to severe combined immunodeficiency in pigs. *Reprod Biol Endocrinol*, 2016, 14: 74
- [70] Sheets TP, Park KE, Park CH, et al. Targeted mutation of *NGN3* gene disrupts pancreatic endocrine cell development in pigs. *Sci Rep*, 2018, 8: 3582
- [71] Whitworth KM, Rowland RR, Ewen CL, et al. Gene-

- edited pigs are protected from porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Nat Biotechnol*, 2016, 34: 20-2
- [72] Zhou XQ, Xin JG, Fan NN, et al. Generation of CRISPR/Cas9-mediated gene-targeted pigs via somatic cell nuclear transfer. *Cell Mol Life Sci*, 2015, 72: 1175-84
- [73] Reyes LM, Estrada JL, Wang ZY, et al. Creating class I MHC-null pigs using guide RNA and the Cas9 endonuclease. *J Immunol*, 2014, 193: 5751-7
- [74] Han K, Liang L, Li L, et al. Generation of *Hoxc13* knockout pigs recapitulates human ectodermal dysplasia-9. *Hum Mol Genet*, 2017, 26: 184-91
- [75] Kang JT, Ryu J, Cho B, et al. Generation of *RUNX3* knockout pigs using CRISPR/Cas9-mediated gene targeting. *Reprod Domest Anim*, 2016, 51: 970-8
- [76] Wang KK, Tang XC, Xie ZC, et al. CRISPR/Cas9-mediated knockout of myostatin in Chinese indigenous Erhualian pigs. *Transgenic Res*, 2017, 26: 799-805
- [77] Chen F, Wang Y, Yuan Y, et al. Generation of B cell-deficient pigs by highly efficient CRISPR/Cas9-mediated gene targeting. *J Genet Genomics*, 2015, 42: 437-44
- [78] Zheng Q, Lin J, Huang J, et al. Reconstitution of *UCP1* using CRISPR/Cas9 in the white adipose tissue of pigs decreases fat deposition and improves thermogenic capacity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, 114: E9474-E82
- [79] Cho B, Kim SJ, Lee EJ, et al. Generation of insulin-deficient piglets by disrupting *INS* gene using CRISPR/Cas9 system. *Transgenic Res*, 2018, 27: 289-300
- [80] Li P, Estrada JL, Burlak C, et al. Efficient generation of genetically distinct pigs in a single pregnancy using multiplexed single-guide RNA and carbohydrate selection. *Xenotransplantation*, 2015, 22: 20-31
- [81] Niu D, Wei HJ, Lin L, et al. Inactivation of porcine endogenous retrovirus in pigs using CRISPR-Cas9. *Science*, 2017, 357: 1303-7
- [82] Zhang W, Wang G, Wang Y, et al. Generation of complement protein C3 deficient pigs by CRISPR/Cas9-mediated gene targeting. *Sci Rep*, 2017, 7: 5009
- [83] Whyte JJ, Meyer AE, Spate LD, et al. Inactivation of porcine interleukin-1 $\beta$  results in failure of rapid conceptus elongation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2018, 115: 307-12
- [84] Zhang R, Wang Y, Chen L, et al. Reducing immunoreactivity of porcine bioprosthetic heart valves by genetically-deleting three major glycan antigens, GGTA1/ $\beta$ 4GalNT2/CMAH. *Acta Biomater*, 2018, 72: 196-205
- [85] Yu HH, Long WH, Zhang XZ, et al. Generation of GHR-modified pigs as Laron syndrome models via a dual-sgRNAs/Cas9 system and somatic cell nuclear transfer. *J Transl Med*, 2018, 16: 41
- [86] Hinrichs A, Kessler B, Kurome M, et al. Growth hormone receptor-deficient pigs resemble the pathophysiology of human Laron syndrome and reveal altered activation of signaling cascades in the liver. *Mol Metab*, 2018, 11: 113-28
- [87] Gao H, Zhao C, Xiang X, et al. Production of  $\alpha$ 1,3-galactosyltransferase and cytidine monophosphate-N-acetylneuraminic acid hydroxylase gene double-deficient pigs by CRISPR/Cas9 and handmade cloning. *J Reprod Dev*, 2017, 63: 17-26
- [88] Huang L, Hua ZD, Xiao HW, et al. CRISPR/Cas9-mediated *ApoE*<sup>-/-</sup> and *LDLR*<sup>-/-</sup> double gene knockout in pigs elevates serum LDL-C and TC levels. *Oncotarget*, 2017, 8: 37751-60
- [89] Zou Y, Li Z, Zou Y, et al. An FBXO40 knockout generated by CRISPR/Cas9 causes muscle hypertrophy in pigs without detectable pathological effects. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 498: 940-5
- [90] Li Z, Yang HY, Wang Y, et al. Generation of tryptophan hydroxylase 2 gene knockout pigs by CRISPR/Cas9-mediated gene targeting. *J Biomed Res*, 2017, 31: 445-52
- [91] Ruan D, Peng J, Wang X, et al. *XIST* derepression in active X chromosome hinders pig somatic cell nuclear transfer. *Stem Cell Rep*, 2018, 10: 494-508
- [92] Lai S, Wei S, Zhao B, et al. Generation of knock-in pigs carrying Oct4-tdTomato reporter through CRISPR/Cas9-mediated genome engineering. *PLoS One*, 2016, 11: e0146562
- [93] Yan S, Tu Z, Liu Z, et al. A Huntingtin knockin pig model recapitulates features of selective neurodegeneration in Huntington's disease. *Cell*, 2018, 173: 989-1002.e13
- [94] Quadalti C, Brunetti D, Lagutina I, et al. SURF1 knockout cloned pigs: early onset of a severe lethal phenotype. *Biochim Biophys Acta*, 2018, 1864: 2131-42
- [95] Sper RB, Koh S, Zhang X, et al. Generation of a stable transgenic swine model expressing a porcine histone 2B-eGFP fusion protein for cell tracking and chromosome dynamics studies. *PLoS One*, 2017, 12: e0169242
- [96] Ma L, Wang Y, Wang H, et al. Screen and verification for transgene integration sites in pigs. *Sci Rep*, 2018, 8: 7433
- [97] Wang K, Jin Q, Ruan D, et al. Cre-dependent Cas9-expressing pigs enable efficient in vivo genome editing. *Genome Res*, 2017, 27: 2061-71
- [98] Nottle MB, Salvaris EJ, Fiscaro N, et al. Targeted insertion of an anti-CD2 monoclonal antibody transgene into the GGTA1 locus in pigs using FokI-dCas9. *Sci Rep*, 2017, 7: 8383
- [99] Ramirez CL, Certo MT, Mussolino C, et al. Engineered zinc finger nickases induce homology-directed repair with reduced mutagenic effects. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40: 5560-8
- [100] Ran FA, Hsu PD, Lin CY, et al. Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell*, 2013, 154: 1380-9
- [101] Fu YF, Sander JD, Reyon D, et al. Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs. *Nature Biotechnol*, 2014, 32: 279-84
- [102] Branda CS, Dymecki SM. Talking about a revolution: the impact of site-specific recombinases on genetic analyses in mice. *Dev Cell*, 2004, 6: 7-28
- [103] Nagy A. Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring. *Genesis*, 2000, 26: 99-109
- [104] Li L, Pang D, Wang T, et al. Production of a reporter transgenic pig for monitoring Cre recombinase activity. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 382: 232-5

- [105] Luo WW, Li ZJ, Li P, et al. Expression of Cre recombinase in alveolar epithelial cells of the AQP2-Cre transgenic mini-pigs. *Cell Physiol Biochem*, 2014, 34: 1597-13
- [106] Moon J, Kim S, Park H, et al. Production of porcine cloned embryos derived from cells conditionally expressing an exogenous gene using Cre-loxP. *Zygote*, 2012, 20: 423-5
- [107] Klymiuk N, Bocker W, Schonitzer V, et al. First inducible transgene expression in porcine large animal models. *FASEB J*, 2012, 26: 1086-99
- [108] Jin YX, Jeon Y, Lee SH, et al. Production of pigs expressing a transgene under the control of a tetracycline-inducible system. *PLoS One*, 2014, 9: e86146