

利用CRISPR/Cas9技术繁育基因修饰猪在医学领域的研究进展



高孟雨¹, 杨光² 综述 包骥¹ 审校

1. 四川大学 华西医院 卫生部移植工程与移植免疫重点实验室 病理研究室(成都 610041)
2. 四川大学 华西医院 实验动物中心(成都 610041)

【摘要】 猪在解剖学、生理病理学、营养代谢和疾病特征等方面都与人类相似度较高,基因修饰猪现已是疾病发生机制、病理毒理研究、治疗药物评估等众多领域所需的重要动物模型。但是大型基因修饰动物模型生产难度大、步骤繁琐、耗时长、成本高昂。随着基因编辑技术的突破,规律性短重复回文序列簇(CRISPR)和CRISPR相关蛋白9(Cas9)构成的CRISPR/Cas9技术大大提高了基因突变效率,降低了基因修饰动物模型的造模成本,同时简化了步骤,推进了基因修饰猪的广泛应用。本文主要综述了基因修饰猪的生产方法以及利用CRISPR/Cas9技术生产人类疾病动物模型猪的研究进展。

【关键词】 规律性短重复回文序列簇及相关蛋白9;大型动物疾病模型;基因修饰猪;基因编辑

Research progress of producing genetically modified pigs by CRISPR/Cas9 in the medical field

GAO Mengyu¹, YANG Guang², BAO Ji¹

1. Laboratory of Pathology, Key Laboratory of Transplant Engineering and Immunology, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, P.R.China

2. Experimental Animal Center, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, P.R.China

Corresponding author: BAO Ji, Email: baoji@scu.edu.cn

【Abstract】 As pigs are similar to humans in anatomy, physiology and pathology, nutrition metabolism and disease characteristics, genetically modified pigs are already used for the studies of disease mechanism, pathology and toxicology and the evaluation of drugs. But the production of large modified animals is difficult, cumbersome, time-consuming and costly. With the breakthrough of gene editing technology, clustered regularly interspersed short palindromic repeat (CRISPR)/CRISPR-associated 9 (Cas9)(CRISPR/Cas9) technology has greatly improved the mutation efficiency, reduced the cost and simplified the steps, and promoted the widespread application of genetically modified pigs. In this paper, the production methods of genetically modified pigs and the research progress of genetically modified pigs by CRISPR/Cas9 in the medical field were reviewed.

【Key words】 clustered regularly interspersed short palindromic repeat/CRISPR-associated 9; large animal disease models; genetically modified pig; gene editing

引言

目前用于人类生殖发育和疾病研究的动物模型主要为啮齿类动物,但啮齿类动物与人亲缘关系远、寿命短、体型小;而非人灵长类动物作为人类的近亲,却又存在成本昂贵、繁育周期长、胎数少

等问题,难以大规模推广应用。相较于以上两者,猪一方面在解剖学、体型大小、生理病理、营养代谢等方面与人类相似,另一方面猪资源丰富、繁殖周期短、繁育力强、价格便宜。因此,猪作为动物模型,目前已被广泛应用于移植免疫、药理毒理、肿瘤、口腔疾病、心血管疾病、遗传性和营养代谢性疾病等医学研究。其中,基因修饰猪在生物医学领域取得的一系列成果尤为突出^[1]。但是早期基因编辑技术,如:锌指核酸内切酶(zinc finger

DOI: 10.7507/1001-5515.201802046

基金项目:国家自然科学基金面上项目(81770618)

通信作者:包骥,Email: baoji@scu.edu.cn

nucleases, ZFNs) 和转录激活子样效应核酸酶 (transcription activator-like effector nucleases, TALENs) 技术, 均存在操作步骤繁琐、载体构建时间长、打靶效率低、成本高昂等缺陷, 限制了基因编辑猪的广泛应用^[2]。而规律性短重复回文序列簇 (clustered regulatory interspaced short palindromic repeat, CRISPR) 和 CRISPR 相关蛋白 9 (CRISPR-associated 9, Cas9) 构成的 CRISPR/Cas9 技术在大大提高基因编辑效率的同时还简化了相应的操作步骤, 因此目前已被广泛应用于基因编辑动物模型的制造领域^[3]。本文主要对基因修饰猪的生产方法以及利用 CRISPR/Cas9 技术构建人类疾病动物模型猪的研究进展进行综述, 旨在为生产基因修饰猪以及利用基因修饰猪研究人类疾病提供方法和思路。

1 CRISPR/Cas9 技术生产基因修饰猪的方法以及优化策略

1.1 CRISPR/Cas9 技术原理简述

CRISPR/Cas9 技术作为以 RNA 为向导的基因编辑技术, 由靶向特异性的 CRISPR RNA (crRNA)、反式激活 CRISPR RNA (transactivating crRNA, tracrRNA) 和核酸内切酶 Cas9 蛋白 3 部分组成^[4]。tracrRNA 和 crRNA 经人工组合为一条单链向导 RNA (single guide RNA, sgRNA), 与 Cas9 蛋白结合后即可对靶基因进行特异性切割^[5]。在构建打靶载体时, 只要将合成的带有约 20 bp 靶序列的 sgRNA 连接到含有 Cas9 序列的表达载体上即可。

该系统作为最新的人工核酸酶技术与 ZFNs 和 TALENs 技术相比, 其优势在于 Cas9 载体构建简单, 只需根据特异性打靶位点一次性设计 20 bp 左右的 sgRNA 即可, 而 ZFNs 和 TALENs 技术针对每个打靶位点都需要重新设计和组装与 DNA 结合的蛋白序列^[6]。其次是 Cas9 可以高效地同时进行多基因打靶, 且同一基因的打靶位点多^[7]。虽然 CRISPR/Cas9 技术的脱靶率要高于 ZFNs 和 TALENs 技术, 但是比较而言, CRISPR/Cas9 技术却使得基因编辑愈加高效、灵活和廉价^[8]。

1.2 利用 CRISPR/Cas9 技术生产基因修饰猪的方法

目前 CRISPR/Cas9 技术已被广泛应用于生产基因修饰猪等大动物模型, 然而猪的妊娠周期较长, 为平均 114 天, 如果实验完成后才通过猪胎或新生猪仔的 DNA 样本来确定猪基因组的插入或缺失突变, 需要花费昂贵的时间、动物以及劳动成本。因此, 如何提高 CRISPR/Cas9 技术的基因编辑

率, 以更简便高效的方式获得基因修饰猪, 是科学家们关注的焦点问题。

体细胞核移植 (somatic cell nuclear transfer, SCNT) 以及胚胎显微注射法是目前利用 CRISPR/Cas9 技术生产基因修饰猪最常用的两种方式, 其技术路线如图 1 所示。通过体外筛选出纯合突变或杂合突变的稳定突变体细胞, 结合 SCNT 技术, 就可以得到预期突变的后代^[9-12]。然而利用 SCNT 技术获得的重构胚胎, 通常伴有成活率低、后代畸形等问题, 体现出 SCNT 技术具有操作技术要求高、难度大、效率低的缺点^[13]。

近年来, 一些研究表明, 通过胚胎注射 sgRNA 与 Cas9 mRNA 的复合物, 或者 sgRNA 与 Cas9 蛋白复合物, 可高效建立基因突变猪^[14-17]。利用该方法获得基因修饰猪的操作周期相对较短、成本较低, 但是存在原核期受精卵采集困难、基因修饰结果只能等到新生胎儿产出后方可鉴定等缺点。

1.3 高效利用 CRISPR/Cas9 技术生产基因修饰猪方法的探索

为了提高 CRISPR/Cas9 技术生产大型基因编辑动物的效率, 不同课题组为此付出了很多努力, 进行了多种尝试。Wang 等^[18]向胚胎注射 Cas9 mRNA/sgRNA 复合物, 然后对发育到囊胚期的胚胎进行靶位点测序, 筛选出打靶效率最高的 sgRNA, 用于后续基因修饰猪的生产。通过该筛选过程, 使得双等位基因敲除猪获得率达到 100%。Wu 等^[19]利用单链退火 (single-strand annealing, SSA) 报告载体筛选出高活性的 sgRNA, 使得利用 CRISPR/Cas9 技术敲除猪胰岛素样生长因子 2 (Insulin-like growth factor 2, IGF2) 基因的打靶效率提高了 5 倍左右。以上两个研究是通过筛选高效的 sgRNA 来提高基因编辑猪的生产效率。还有研究人员, 利用孤雌激活的胚胎来探究 CRISPR/Cas9 系统注射浓度以及注射时间点对获得双等位基因突变猪的影响。结果显示, 卵母细胞经过孤雌激活 8 h 后注射 Cas9 mRNA/sgRNA (浓度为 $125 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1} / 12.5 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) 至胞质可获得 93% 的双等位基因突变率, 为利用孤雌生殖法高效地获得双等位基因编辑猪提供了可行方案^[20]。为了进一步简化 CRISPR/Cas9 技术生产基因编辑猪的方法, 2017 年 Wang 等^[21]成功将 Cas9 蛋白基因插入到猪基因组的反向剪切受体 26 (reverse orientation splice acceptor 26, ROSA26) 位点, 首次构建了依赖于环化重组酶 (cyclization recombination enzyme, Cre) 的条件性表达 Cas9 基因工具猪模型。他们通过直接在动物体水平对该工具猪转染

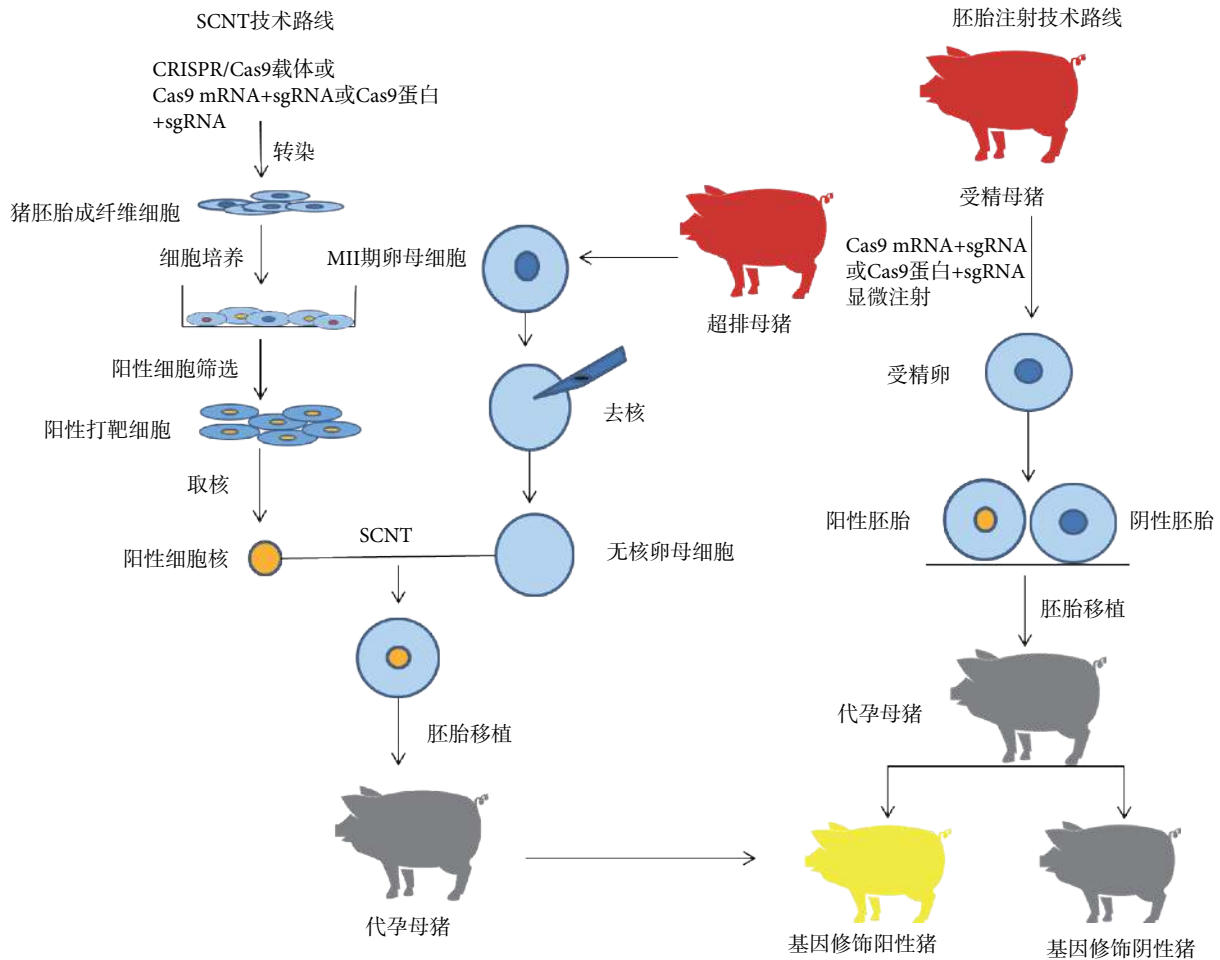


图1 利用 CRISPR/Cas9 技术生产基因修饰猪的技术路线

Fig.1 The flowchart to produce genetically modified pig by CRISPR/Cas9

连有靶基因 sgRNA 的 Cre 重组酶载体,就可快速获得基因编辑猪,大大节省基因修饰猪生产时间。此后,研究人员进一步通过滴鼻慢病毒的方式感染工具猪,在三个月后出现了典型的肺癌症状,成功建立了肺癌模型猪。

2 CRISPR/Cas9 技术在基因修饰猪中的应用实例

2.1 利用 CRISPR/Cas9 技术生产人类疾病动物模型猪

血管性血友病是由血管性血友病因子 (von Willebrand factor, vWF) 基因缺陷所造成的常见遗传性出血性疾病。Hai 等^[22]通过显微注射 Cas9 mRNA 和靶向猪 vWF 基因 5 号外显子的 sgRNA 至猪胚胎,获得的 16 头仔猪,6 只为双等位基因突变,5 只为单等位基因突变,基因突变率达 68.8%;双等位基因突变体的凝血时间显著高于野生型。

小眼畸形相关转录因子 (microphthalmia-associated transcription factor, MITF) 是黑色素细胞

发育的主调节蛋白, MITF 是黑素瘤的重要致病基因。人类 MITF 基因的突变已经出现在低色素沉着和耳聋综合征中。Wang 等^[18]通过胚胎注射 125 ng/μL 的 Cas9 mRNA 和 12.5 ng/μL 的 sgRNA,生产出 MITF 双等位基因敲除猪,效率可达 100%,用以模拟人的 Werner 综合症 (Werner syndrome, WS)。通过基因组测序,预测脱靶位点未发生有害脱靶。

Runt 相关转录因子 3 (Runt-related transcription factor 3, Runx3) 基因被认为是一种新型肿瘤抑制基因,该基因的缺失对胃肠道肿瘤的发展有促进作用^[23]。由于 Runx3 纯合基因突变鼠出现致死情况, Kang 等^[24]通过 SCNT 技术获得 5 只存活的单等位基因修饰猪用于胃癌发生的研究,为研究肿瘤治疗的新方案提供动物模型资源。

肌肉生长抑制素 (myostatin, MSTN) 作为骨骼肌生长负调节因子,对肌肉生长发育起重要调控作用。2015 年 Wang 等^[25]运用 CRISPR/Cas9 结合 SCNT 技术,获得了 8 只“双肌”表型的 MSTN 纯

合基因敲除猪。该基因缺陷猪在研究肌肉生长发育和提高肉质性能上都具有重要意义。

亨廷顿舞蹈症(Huntington's disease, HD)是神经退行性疾病之一,其特点是纹状体中的中型刺状神经元选择性缺失。2018年Yan等^[26]利用CRISPR/Cas9技术和SCNT技术,建立了HD猪模型,该猪模型内源性表达全长突变的亨廷顿蛋白(huntingtin, HTT),并且通过繁育,成功地获得了子一代和子二代HD猪。子一代HD猪表现出与亲本一致的运动、行为异常以及早死症状。更重要的是,HD猪的大脑显示出明显的、有选择性的纹状体神经元退化。因此,这种HD猪可以用于研究大型哺乳动物神经性疾病的发病机制及其治疗方案。

为构建帕金森病大动物模型,Zhou等^[10]通过电转染CRISPR/Cas9载体到胚胎成纤维细胞中然后结合SCNT技术,获得了20只与帕金森疾病相关的帕金森疾病II型(Parkinson disease 2, PARK2)基因、PTEN诱导激酶(PTEN-induced putative kinase 1, PINK1)基因纯合敲除猪。*PARK2*^{-/-}和*PINK1*^{-/-}双基因纯合敲除猪不表达PINK1蛋白。Wang等^[27]将2条靶向*PARK2*,2条靶向帕金森疾病7(Parkinson disease 7, DJ-1),2条靶向*PINK1*基因的总共6条sgRNA以及Cas9 mRNA复合物同时注射到猪原核期胚胎中,快速获得了3基因纯合突变的猪。但是以上两个研究获得的猪都没有出现帕金森症状,可能是由于猪年龄尚小。以上两研究均表明,利用靶向多基因的多条sgRNA获得的基因修饰猪未出现明显脱靶,证明了利用CRISPR/Cas9技术生产多基因修饰猪的高效性。

2.2 利用CRISPR/Cas9技术繁育基因修饰猪用于异种移植研究

解决人供体器官短缺的重要途径是开展异种器官移植和异种细胞移植,而猪则被认为是人体异种器官来源以及异种细胞再生反应器的首选动物。但是免疫排斥反应和猪内源性逆转录病毒(porcine endogenous retroviruses, PERVs)对人体具有潜在风险是实现异种移植首要攻克的两难课题。

2015年,Yang等^[28]利用CRISPR/Cas9技术,在全基因组范围内灭活了猪肾上皮细胞(porcine kidney epithelial, PK15)中所有62个拷贝的PERVs基因,使人感染猪内源性逆转录病毒的风险降低了1000倍以上。2017年该课题组最新研究成果表示,PERVs不仅会感染人类细胞,并且会在感染了PERVs的人类细胞间横向传播。于是该团队通过CRISPR/Cas9技术获得了PERVs灭活的原代猪胚

胎成纤维细胞,结合SCNT技术,生产出了首例PERVs灭活的五指山猪^[29]。该研究为避免PERVs种间传播,解决异种移植转向临床应用的生物安全问题做出了极大贡献。

α -1,3-半乳糖基转移酶(α -1,3-Galactosyltransferase, GGTA1)基因是引起异种器官移植后超急性免疫排斥反应的重要基因。近期多个团队先后利用CRISPR/Cas9技术获得GGTA1以及与免疫相关基因的敲除猪。Estrada等^[30]利用CRISPR/Cas9技术结合SCNT技术,分别获得GGTA1、GGTA1/胞苷单磷酸N-乙酰神经氨酸羟化酶(cytidine monophosphate-N-acetylneuraminic acid hydroxylase, CMAH)和GGTA1/CMAH/ β -1,4-N-乙酰半乳糖胺基转移酶(β -1,4-N-Acetylgalactosaminyl transferase 2, β 4GalNT2)基因敲除猪,通过对比3种基因敲除猪,发现猪 β 4GalNT2基因被敲除后其细胞与人IgM和IgG抗体的结合能力明显下降,表明该模型可降低猪在异种移植中的抗原性。同时该团队2016年一项研究表明,GGTA1/CMAH双基因敲除猪可以有效减少猪肝细胞对人体血小板的吞噬作用,为猪—人肝细胞异种移植造成的小血小板减少症提供了一个有效解决策略^[31]。2017年Gao等^[32]通过手工克隆的方式得到了11只双等位基因突变的GGTA1/CMAH五指山猪,均不表达N-羟基乙酰神经氨酸(N-glycolylneuraminic acid, Neu5Gc)和半乳糖(galactose, Gal)抗原,但该方法操作繁琐,获得活胎率低,仅2.5%。2016年Petersen等^[33],通过受精卵质显微注射靶向GGTA1基因8号外显子的CRISPR/Cas9—px330质粒,获得6只存活的猪仔。其中,3只纯合突变(双等位基因突变率达50%),细胞表面不表达Gal表位抗原,两只嵌合体,仅一只未发生任何基因修饰。

白介素2受体(interleukin 2 receptor, IL2RG)基因突变将致X-连锁重症免疫缺陷病(X-linked severe combined immunodeficiency, X-SCID)。Kang等^[34]先通过直接向胚胎注射靶向IL2RG基因的sgRNA和Cas9 mRNA复合物,获得了纯合突变的雌性猪胎,然后分离该纯合突变猪的胚胎成纤维细胞进行SCNT,获得3只IL2RG^{-/-}猪仔,表现为胸腺缺失,且B细胞、T细胞、自然杀伤(natural killer, NK)细胞显著减少,该模型可用于异种细胞再生的进一步研究。

综上所述,以上研究均为高效生产免疫排斥较低的异种器官供体猪以及在免疫缺陷基因编辑猪体内进行异种细胞再生奠定了应用基础。

3 生产基因修饰猪面临的操作问题

以上内容介绍了目前利用 CRISPR/Cas9 技术生产用于人类疾病研究的动物模型猪的研究进展,表明利用 CRISPR/Cas9 技术培育疾病模型猪已没有技术障碍,并且具有重要的应用前景。然而,当前基因修饰猪的构建依然存在很多问题,一方面来源于基因编辑技术本身的限制,如容易脱靶或存在潜在基因突变等问题;另一方面,相较于啮齿类动物模型,猪本身的繁殖周期较长,且无论利用 SCNT 技术还是胚胎注射的方法获得基因修饰猪,取卵/受精卵的难度和成本都远高于啮齿类动物,因此限制了猪像啮齿类动物一样在基础医学研究中的大规模应用。

除此以外,还有研究者对利用精子载体法获得基因修饰猪的方法进行尝试探索。精子载体法指将外源 DNA 与精子共孵育或通过电转染、病毒转染、脂质体转染等方式将外源基因引入精子,精子作为外源基因载体进入卵细胞受精,得到基因修饰的胚胎^[35-36]。这种方法避免了 SCNT 技术以及胚胎显微注射法的繁琐操作,只需将改造后的精子通过体外受精或人工受精就可产生基因修饰动物,具有成本低廉、操作简便和发展空间大等优点,因而受到广泛关注。Zhang 等^[37]通过精子载体法结合慢病毒转染,获得了经免疫组化和原位杂交验证的增强绿色荧光蛋白 (enhanced green fluorescent protein, EGFP) 阳性猪。为了提高精子吸收外源 DNA 的效率,Oddi 等^[38]利用 β -环糊精寡聚糖修饰猪精子后,与环状 DNA 共孵育,使得外源 DNA 摄入量提高 8 倍。

但是精子载体法受动物个体的差异影响较大,可重复性不高,且精子脆弱,在体外修饰过程中易出现畸形等问题,使得该方法难以广泛应用。本文课题组目前也在优化精子转染条件,试图利用精子作为载体携带 CRISPR/Cas9 系统到受精卵中,进一步获得基因修饰猪。

4 结语

猪是研究人类疾病的重要动物模型,CRISPR/Cas9 系统作为一种新的基因编辑工具,打靶效率高,操作简便,价格低廉,高效促进了基因编辑猪的广泛应用。

利用 CRISPR/Cas9 技术快速获得疾病模型猪,可为靶向药物筛选以及基因治疗提供重要帮助。同时,由于 PERVs 在猪体内被全部敲除,为异种移

植迈出了关键一步,所以如果在此基础上再敲除免疫相关基因,可以预见基因修饰猪在移植免疫研究中的广阔应用前景。但是,利用 CRISPR/Cas9 技术生产基因修饰动物模型,伴随的嵌合体问题和脱靶效应依然是两大难题。另外,虽然该技术用于基因敲除有很大优势,但是基因敲入率相对较低,还需要对该系统进行优化。相信随着 CRISPR/Cas9 技术的快速发展和不断优化,效率更高、脱靶率更低、特异性更强的基因编辑技术将在生产大型动物模型中发挥更重要的作用。

参考文献

- 1 Whyte J J, Prather R S. Genetic modifications of pigs for medicine and agriculture. *Mol Reprod Dev*, 2011, 78(10/11): 879-891.
- 2 Niemann H, Petersen B. The production of multi-transgenic pigs: update and perspectives for xenotransplantation. *Transgenic Res*, 2016, 25(3): 361-374.
- 3 Butler J R, Ladowski J M, Martens G R, *et al*. Recent advances in genome editing and creation of genetically modified pigs. *Int J Surg*, 2015, 23(Pt B): 217-222.
- 4 Song Chanwoo, Lee J, Lee S Y. Genome engineering and gene expression control for bacterial strain development. *Biotechnol J*, 2015, 10(1): 56-68.
- 5 Eid A, Mahfouz M M. Genome editing: the road of CRISPR/Cas9 from bench to clinic. *Exp Mol Med*, 2016, 48(10): e265.
- 6 Ulain Q, Chung J Y, Kim Y H. Current and future delivery systems for engineered nucleases: ZFN, TALEN and RGEN. *J Control Release*, 2015, 205: 120-127.
- 7 Samanta M K, Dey A, Gayen S. CRISPR/Cas9: an advanced tool for editing plant genomes. *Transgenic Res*, 2016, 25(5): 561-573.
- 8 Lafontaine J S, Fathe K, Smyth H D. Delivery and therapeutic applications of gene editing technologies ZFNs, TALENs, and CRISPR/Cas9. *Int J Pharm*, 2015, 494(1): 180-194.
- 9 Chen Fengjiao, Wang Ying, Yuan Yilin, *et al*. Generation of B cell-deficient pigs by highly efficient CRISPR/Cas9-mediated gene targeting. *Journal of Genetics and Genomics*, 2015, 42(8): 437-444.
- 10 Zhou Xiaoqing, Xin Jige, Fan Nana, *et al*. Generation of CRISPR/Cas9-mediated gene-targeted pigs via somatic cell nuclear transfer. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2015, 72(6): 1175-1184.
- 11 Bi Yanzhen, Hua Zaidong, Liu Ximei, *et al*. Isozygous and selectable marker-free MSTN knockout cloned pigs generated by the combined use of CRISPR/Cas9 and Cre/LoxP. *Sci Rep*, 2016, 6: 31729.
- 12 Lai Sisi, Wei Shu, Zhao Bentian, *et al*. Generation of knock-in pigs carrying Oct4-tdTomato reporter through CRISPR/Cas9-mediated genome engineering. *PLoS One*, 2016, 11(1): e0146562.
- 13 Wang Haoyi, Yang Hui, Shivalila C S, *et al*. One-Step Generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-Mediated genome engineering. *Cell*, 2013, 153(4): 910-918.
- 14 Peng Jin, Wang Yong, Jiang Junyi, *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.

- 15 Wu Jun, Vilarino M, Suzuki K, *et al.* CRISPR-Cas9 mediated one-step disabling of pancreatogenesis in pigs. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 10487.
- 16 Lei Shaohua, Ryu J, Wen Ke, *et al.* Increased and prolonged human norovirus infection in RAG2/IL2RG deficient gnotobiotic pigs with severe combined immunodeficiency. *Sci Rep*, 2016, 6: 25222.
- 17 Sato M, Koriyama M, Watanabe S, *et al.* Direct injection of CRISPR/Cas9-Related mRNA into cytoplasm of parthenogenetically activated porcine oocytes causes frequent mosaicism for indel mutations. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(8): 17838-17856.
- 18 Wang Xianlong, Zhou Jinwei, Cao Chunwei, *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.
- 19 Wu Jinqing, Mei Gui, Liu Zhiguo, *et al.* Improving gene targeting efficiency on pig IGF2 mediated by ZFNs and CRISPR/Cas9 by using SSA reporter system. *Yi Chuan*, 2015, 37(1): 55-62.
- 20 Tao Li, Yang Mingyao, Wang Xiaodong, *et al.* Efficient biallelic mutation in porcine parthenotes using a CRISPR-Cas9 system. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 476(4): 225-229.
- 21 Wang Kepin, Jin Qin, Ruan Degong, *et al.* Cre-dependent Cas9-expressing pigs enable efficient *in vivo* genome editing. *Genome Res*, 2017, 27(12): 2061-2071.
- 22 Hai Tang, Teng Fei, Guo Runfa, *et al.* One-step Generation of knockout pigs by zygote injection of CRISPR/Cas system. *Cell Res*, 2014, 24(3): 372-375.
- 23 Lotem J, Levanon D, Negreanu V, *et al.* Runx3 at the interface of immunity, inflammation and cancer. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1855(2): 131-143.
- 24 Kang J T, Ryu J, Cho B, *et al.* Generation of RUNX3 knockout pigs using CRISPR/Cas9-mediated gene targeting. *Reproduction in Domestic Animals*, 2016, 51(6): 970-978.
- 25 Wang Kankan, Ouyang Hongsheng, Xie Zicong, *et al.* Efficient Generation of myostatin mutations in pigs using the CRISPR/Cas9 system. *Sci Rep*, 2015, 5: 16623.
- 26 Yan Sen, Tu Zhuchi, Liu Zhaoming, *et al.* A huntingtin knockin pig model recapitulates features of selective neurodegeneration in huntington's disease. *Cell*, 2018, 173(4): 989-1002.
- 27 Wang Xianlong, Cao Chunwei, Huang Jiaojiao, *et al.* One-step generation of triple gene-targeted pigs using CRISPR/Cas9 system. *Sci Rep*, 2016, 6: 20620.
- 28 Yang Luhan, Gueell M, Niu Dong, *et al.* Genome-wide inactivation of porcine endogenous retroviruses (PERVs). *Science*, 2015, 350(6264): 1101-1104.
- 29 Niu Dong, Wei Hongjiang, Lin Lin, *et al.* Inactivation of porcine endogenous retrovirus in pigs using CRISPR-Cas9. *Science*, 2017, 357(6357): 1303-1307.
- 30 Estrada J L, Martens G, Li Ping, *et al.* Evaluation of human and non-human Primate antibody binding to pig cells lacking GGTA1/CMAH/ β 4GalNT2 genes. *Xenotransplantation*, 2015, 22(3): 194-202.
- 31 Butler J R, Paris L L, Blankenship R L, *et al.* Silencing porcine CMAH and GGTA1 genes significantly reduces xenogeneic consumption of human platelets by porcine livers. *Transplantation*, 2016, 100(3): 571-576.
- 32 Gao Hanchao, Zhao Chengjiang, Xiang Xi, *et al.* Production of α 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(1): 17-26.
- 33 Petersen B, Frenzel A, Lucas-Hahn A, *et al.* Efficient production of biallelic GGTA1 knockout pigs by cytoplasmic microinjection of CRISPR/Cas9 into zygotes. *Xenotransplantation*, 2016, 23(5): 338-346.
- 34 Kang J T, Cho B, Ryu J, *et al.* Biallelic modification of IL2RG leads to severe combined immunodeficiency in pigs. *Reprod Biol Endocrinol*, 2016, 14(1): 74.
- 35 Wu Zhenfang, Li Zicong, Yang Jinzeng. Transient transgene transmission to piglets by intrauterine insemination of spermatozoa incubated with DNA fragments. *Mol Reprod Dev*, 2008, 75(1): 26-32.
- 36 Lavitrano M, Giovannoni R, Cerrito M G. Methods for sperm-mediated gene transfer. *Methods Mol Biol*, 2013, 927: 519-529.
- 37 Zhang Yongliang, Xi Qianyun, Ding Jinghua, *et al.* Production of transgenic pigs mediated by pseudotyped lentivirus and sperm. *PLoS One*, 2012, 7(4): e35335.
- 38 Oddi S, Bernabò N, Di Tommaso M, *et al.* DNA uptake in swine sperm: effect of plasmid topology and methyl-beta-cyclodextrin-mediated cholesterol depletion. *Mol Reprod Dev*, 2012, 79(12): 853-860.

收稿日期: 2018-02-28 修回日期: 2018-04-26

本文编辑: 陈咏竹