

· 综 述 ·

# 碱基编辑技术在猪遗传改良中的应用研究进展

赵无迪<sup>1</sup>, 黄国斌<sup>1</sup>, 朱向星<sup>2</sup>, 毕延震<sup>3\*</sup>, 唐冬生<sup>1,2\*</sup>

1 佛山科学技术学院生命科学与工程学院 广东省动物分子设计与精准育种重点实验室, 广东 佛山 528225

2 佛山科学技术学院医学院 广东省基因编辑工程技术研究中心, 广东 佛山 528225

3 湖北省农业科学院畜牧兽医研究所 动物胚胎工程与分子育种湖北省重点实验室, 湖北 武汉 430072

赵无迪, 黄国斌, 朱向星, 毕延震, 唐冬生. 碱基编辑技术在猪遗传改良中的应用研究进展[J]. 生物工程学报, 2023, 39(10): 3936-3947.

ZHAO Wudi, HUANG Guobin, ZHU Xiangxing, BI Yanzhen, TANG Dongsheng. Application of single base editing technique in pig genetic improvement: a review[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(10): 3936-3947.

**摘 要:** 猪传统育种周期长、耗资大, 亟需利用新技术振兴种业。近年来兴起的 CRISPR/Cas9 基因编辑技术在猪遗传改良上表现出巨大潜力, 成为研究的热点。单碱基编辑是在 CRISPR/Cas9 系统基础上发展起来的新型碱基编辑技术, 可对单个碱基进行靶向突变。CRISPR/Cas9 技术容易操作且设计简单, 但该技术会导致 DNA 双链断裂, 使基因结构不稳定, 造成基因的随机插入和缺失, 故而大大制约了该技术的应用。与 CRISPR/Cas9 技术不同, 单碱基编辑技术不产生双链断裂, 因而具有更高的基因编辑精准性和安全性, 预期在猪遗传育种应用上具有显著优势。本文综述了 CRISPR/Cas9 技术的工作原理与不足、单碱基编辑的开发与优势、不同碱基编辑器的原理、应用特点及其在猪遗传改良上的应用, 以期对后续开展猪的基因编辑遗传育种实践提供理论参考。

**关键词:** CRISPR/Cas9; 基因编辑; 单碱基编辑; 猪; 遗传改良

资助项目: 国家重点研发计划(2021YFA0805900); 广东省重点领域研发计划-重大科技专项(2022B0202110002, 2018B020203003); 国家自然科学基金(82070199); 广东省普通高校重点领域专项(2021ZDZX2050)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2021YFA0805900), the Research and Development Plan for Key Fields of Guangdong Province-Major Science and Technology Project (2022B0202110002, 2018B020203003), the National Natural Science Foundation of China (82070199), and the Special Project in Key Fields of Universities in Guangdong Province (2021ZDZX2050).

\*Corresponding authors. E-mail: TANG Dongsheng, tangdsh@163.com; BI Yanzhen, sukerbyz@126.com

Received: 2023-04-17; Accepted: 2023-07-03; Published online: 2023-07-10

# Application of single base editing technique in pig genetic improvement: a review

ZHAO Wudi<sup>1</sup>, HUANG Guobin<sup>1</sup>, ZHU Xiangxing<sup>2</sup>, BI Yanzhen<sup>3\*</sup>, TANG Dongsheng<sup>1,2\*</sup>

1 Guangdong Key Laboratory of Animal Molecular Design and Precise Breeding, School of Life Science and Engineering, Foshan University, Foshan 528225, Guangdong, China

2 Guangdong Research Center of Gene Editing Engineering Technology, School of Medicine, Foshan University, Foshan 528225, Guangdong, China

3 Hubei Key Laboratory of Animal Embryo Engineering and Molecular Breeding, Institute of Animal Husbandry and Veterinary Science, Hubei Academy of Agricultural Sciences, Wuhan 430072, Hubei, China

**Abstract:** Traditional pig breeding has a long cycle and high cost, and there is an urgent need to use new technologies to revitalize the pig breeding industry. The recently emerged CRISPR/Cas9 genome editing technique shows great potential in pig genetic improvement, and has since become a research hotspot. Base editor is a new base editing technology developed based on the CRISPR/Cas9 system, which can achieve targeted mutation of a single base. CRISPR/Cas9 technology is easy to operate and simple to design, but it can lead to DNA double strand breaks, unstable gene structures, and random insertion and deletion of genes, which greatly restricts the application of this technique. Different from CRISPR/Cas9 technique, the single base editing technique does not produce double strand breaks. Therefore, it has higher accuracy and safety for genome editing, and is expected to advance the pig genetic breeding applications. This review summarized the working principle and shortcomings of CRISPR/Cas9 technique, the development and advantages of single base editing, the principles and application characteristics of different base editors and their applications in pig genetic improvement, with the aim to facilitate genome editing-assisted genetic breeding of pig.

**Keywords:** CRISPR/Cas9; gene editing; single base editing; pig; genetic improvement

中国是世界第一大生猪生产和消费国,猪肉是中国居民最主要的肉类消费品<sup>[1]</sup>。近年来生猪产业的规模、生产能力以及质量安全水平得到显著提升,已经在农业乃至国民经济中占有重要地位。然而在取得突出成绩的同时,也面临着巨大挑战,我国生猪良种基本自给,核心种源还需要进口,严重限制了我国生猪产业高质量发展<sup>[2]</sup>。猪传统遗传改良存在周期长、耗资大、进展缓慢等现实问题,亟需利用新技术振兴猪种业,从而保障我国生猪产业利益和国家食品安全。

与传统遗传改良相比,近年来兴起的以 CRISPR/Cas9 系统为代表的基因编辑技术具有

显著优势,仅需 1 个世代就可改变猪的 1 个或多个可遗传性状,极大地提高了遗传改良效率,是当前国内外生猪育种领域的研究热点<sup>[3]</sup>。利用 CRISPR/Cas9 技术,能够快速提升猪的生长速度、瘦肉率和抗病性等,显著提升经济效益。与此同时,基于 CRISPR/Cas9 衍生出的单碱基编辑(base editor, BE)技术,能够克服 CRISPR/Cas9 因导致基因组双链断裂(double strand breaks, DSB)引发的基因脱靶、染色体不稳等技术局限,实现更安全、更精准的基因组修改,因而在生猪遗传改良上具有更好的应用前景<sup>[4]</sup>。

本文从 CRISPR/Cas9 系统的工作原理和不

足出发,阐述了单碱基基因编辑技术的开发过程和技术优势,着重就单碱基基因编辑技术在猪遗传改良上的最新应用进行综述,以期为后续开展猪的基因编辑改良工作提供参考和借鉴。

## 1 CRISPR/Cas9 系统工作原理及其不足

CRISPR/Cas9 由 Cas9 蛋白和单链向导 RNA (single guide RNA, sgRNA) 组成,当 sgRNA 与能够发生互补配对的基因组靶点识别结合时,激活 Cas9 蛋白的 DNA 内切酶活性,将基因组切割产生 DSB,并激活细胞内的 DNA 修复机制,然后通过非同源末端连接(non-homologous end-joining, NHEJ)或同源重组(homologous recombination, HR)机制分别实现基因突变或基因敲入<sup>[5-6]</sup>。

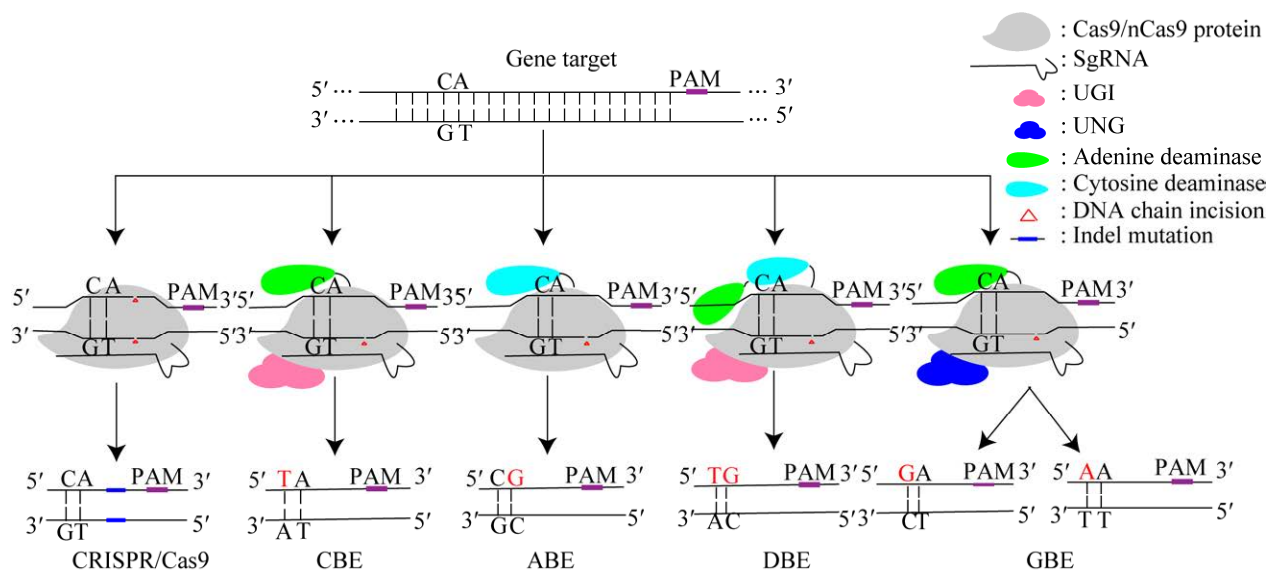
与传统的基因修饰技术相比,CRISPR/Cas9 技术具有组装便捷、剪切高效以及特异性强等优势,因而被迅速用于动植物的基因改造,也被用于猪遗传改良<sup>[7-8]</sup>。但深入研究表明,CRISPR/Cas9 存在诸多局限,原因在于该系统的活性窗口宽,导致编辑时常发生旁观者效应降低编辑准确性<sup>[9]</sup>;Cas9 识别的靶序列受前间隔序列邻近基序(protospacer adjacent motif, PAM)序列的制约,致使基因组中可编辑位点的数量较少<sup>[9]</sup>。与此同时,CRISPR/Cas9 诱发的非同源末端连接(nonhomologous end-joining, NHEJ)修复机制存在不可控性,插入和删除的碱基数无法得到控制,易发生脱靶、基因组大范围删除、基因组重排等,引起安全风险。此外,有时可能无法成功对目的基因产生理想的敲除效果,在筛选有效突变体时筛选效率也很低<sup>[10-12]</sup>。正是由于其存在的基因编辑欠精准性和安全风险,因而在一定程度上限制其在家畜基因改良中的应用。

## 2 单碱基编辑技术工作原理及其优势

单碱基编辑技术是在 CRISPR/Cas9 技术基础上发展起来的新一代基因编辑技术,具有剪性强、高效、安全以及副产物少等优势,有效改善了 CRISPR/Cas9 的弊端。单碱基编辑器主要由碱基脱氨酶、Cas9 变体以及 sgRNA 三部分组成。其中碱基脱氨酶负责对碱基进行脱氨基,Cas9 变体负责结合 DNA 靶位点不切割或仅切割一条 DNA 链,sgRNA 引导 Cas9 蛋白与碱基脱氨酶形成的复合物靶向目标碱基序列<sup>[13-14]</sup>,共同完成改造目标基因的目的。目前较成熟的单碱基编辑器有 4 种,分别是:胞嘧啶碱基编辑器(cytosine base editor, CBE)<sup>[15]</sup>、腺嘌呤碱基编辑器(adenine base editor, ABE)<sup>[16]</sup>、糖基化酶碱基编辑器(glycosylase base editor, GBE)<sup>[17]</sup>和双碱基编辑器(dual base editor, DBE)<sup>[18]</sup>(图 1)。

### 2.1 胞嘧啶碱基编辑技术

胞嘧啶碱基编辑器主要由胞嘧啶脱氨酶、无切割活性的 Cas9 蛋白(dead Cas9, dCas9)以及 sgRNA 组成。其中的 sgRNA 引导 dCas9 与胞嘧啶脱氨酶靶向目标序列,胞嘧啶脱氨酶引起胞嘧啶(C)脱氨形成尿嘧啶(U),尿嘧啶(U)与腺嘌呤(A)相配对,在 DNA 链中腺嘌呤(A)又与胸腺嘧啶(T)配对,最终实现单碱基 C 到 T (G 到 A)的编辑<sup>[19]</sup>。CBE 最早由 Komor 等<sup>[20]</sup>于 2016 年开发,他们使用鼠源脱氨酶 APOBEC1 (rAPOBEC1)经 XTEN 与 dCas9 的 C 端相连接,构成了第 1 代胞嘧啶碱基编辑器 BE1。但尿嘧啶 DNA 糖基化酶(uracil DNA glycosylase, UDG)会识别初始编辑导致 U:G 错配,启动碱基的切除修复机制,切除 U,修复到 C:G 的初始状态,因此碱基编辑效率(仅在 0.8%~7.7%左右)较低<sup>[21]</sup>。为防止突变的 U 碱基变回 C, Komor 等在 BE1 系统的 C 端



**图 1 CRISPR/Cas9 基因编辑与碱基编辑工作原理** 基因靶点在 CRISPR/Cas9 作用下产生双链断裂，并在 NHEJ 机制下发生随机碱基插入或缺失突变，而在碱基编辑作用下，在不引发双链断裂的同时，实现碱基转换突变。因而编辑结果更精准、可预测，也避免了因 DSB 引发的安全隐患

Figure 1 Mechanisms of CRISPR/Cas9 gene editing and base editing. Gene targets undergo double-strand breaks in response to CRISPR/Cas9 and random base indel or deletion mutations in response to NHEJ mechanisms. Under the action of base editing, the mutation of base conversion can be achieved without causing double strand break. Therefore, the editing results are more accurate and predictable, and the security risks caused by DSB are avoided.

连接一段尿嘧啶 DNA-糖基化酶抑制蛋白(uracil DNA glycosylase inhibitor, UGI)，构成 BE2<sup>[20]</sup>。相关细胞实验表明，BE2 的编辑效率得到了显著提升，是 BE1 的 3 倍，编辑效率最高可达到 20%<sup>[22]</sup>。BE1 和 BE2 所用的变体 Cas9 蛋白都为无切割活性的 dCas9 蛋白，不会切割双链。因此，几乎不会引入插入和缺失，产生双链断裂的比例低于 0.1%。为了进一步提高碱基的编辑效率，将尿嘧啶 DNA 糖苷酶抑制因子 UGI 融合到 BE1 的碳端，并用核酸酶失活的 Cas9 蛋白(Cas9 nickase, Cas9n)取代 BE1、BE2 中的 dCas9，形成 BE3，其编辑效率提高到 40%，且广泛应用于生物领域<sup>[23-24]</sup>。

进一步的研究发现，在 DNA 复制和错配修复过程中，尿嘧啶 U 易被 UDG 识别并切除<sup>[18]</sup>。

为进一步抑制 UDG 的活性，2017 年 Komor 等在 BE3 的 Cas9 序列 C 端附加 1 个额外的 UGI 拷贝，并延长了 rAPOBEC1 与 Cas9n 之间的距离以及 Cas9n 和 UGI 之间的接头，这便形成了 BE4<sup>[25]</sup>。在碱基编辑过程中会出现碱基颠换即出现 C 到 G、C 到 A 的副产物。BE4 在不影响编辑活性的情况下，有效降低了碱基颠换的频率，提高目标产物纯度。2018 年 Koblan 等在 BE4 主要蛋白 rAPOBEC1-Cas9 的 N 端、C 端分别添加了定位信号，再将绿色荧光蛋白基因 GFP 和 2A 肽基因 P2A 序列连接在 rAPOBEC1-Cas9 的 C 端，接着优化密码子最后得到 BE4max，较 BE4 提升了 1.3 倍<sup>[26]</sup>。

## 2.2 腺嘌呤碱基编辑技术

基于 CBE 技术原理，将腺嘌呤脱氨酶与

dCas9 相融合从而制备出腺嘌呤碱基编辑器。相较于 CBE, ABE 将胞嘧啶脱氨酶替换为腺嘌呤脱氨酶, 此过程中无需 UGI 作用。ABE 的工作原理是: ABE 靶向链窗口内腺嘌呤(A), 在腺嘌呤脱氨酶水解情况下产生的肌苷(I), 在 DNA 复制或读取过程被识别为鸟嘌呤(G), 指导非靶标链切除原配对的胸腺嘧啶(T)并替换为转化为胞嘧啶(C), 因此编辑过的靶点在经过一轮 DNA 复制后最终实现 A:T 碱基对到 G:C 碱基对的转换。

自然界中存在的腺嘌呤脱氨酶只能在游离腺嘌呤、腺苷以及 RNA 中的腺苷或 RNA-DNA 异源双链中脱氨, 无法作用于 DNA 链上的腺嘌呤<sup>[27]</sup>。开发出能作用于 DNA 链上的腺嘌呤脱氨酶是开发 ABE 碱基编辑技术的重中之重。早期研究表明, 大肠杆菌(*Escherichia coli*) RNA 腺苷脱氨酶 TadA 不需要小分子激活, 且可以作用于多核苷酸, 遂引起关注。2017 年 Gaudelli 等对野生型 TadA 进行人工驯化, 经过 7 轮改造后成功开发出了能够作用于单链 DNA 的 ABE 系统 ABE7.10<sup>[16]</sup>。为了改进 ABE7.10 的效率和准确性, 2018 年 Koblan 等在 TadA7.10 的 N 端增加 bpNLS, 通过优化密码子序列的方式设计出编辑效率更高的 ABEmax<sup>[26]</sup>。2020 年 Richter 等在 ABE7.10 的基础上增加 8 个新突变位点的突变体 TadA8e, 开发出脱氨效率及与 Cas 蛋白的兼容性均大幅提高的 ABE8e, 经超高分辨率冷冻电镜对 ABE8e 结构进行分析, 发现其脱氨速度是 ABE7.10 的 590 倍, 超快的脱氨速度显著提升了 ABE 的编辑活性<sup>[28-29]</sup>。此外, 由于在细胞中暂未发现能够快速切除腺嘌呤脱氨形成的次黄嘌呤碱基(I)的酶, 因此一旦 A 脱氨后生成的 I 后将直接被当成 G 读取, 无法形成无嘌呤无嘧啶状态, 因此该碱基编辑器编辑的副产物极少, 可进行高纯度碱基定向编辑。

### 2.3 糖基化酶碱基编辑技术

由于脱氨酶的功能在于碱基的脱氨基, 因而 ABE 和 CBE 分别仅能实现嘌呤和嘧啶内的转换, 而要实现跨嘌呤和嘧啶间的转换(亦称“颠换”)则需要借助新的工具。新工具 GBE 的发现得益于对 CBE 编辑副产物的深入探究, 其主要原理是将 CBE 系统中的 UGI 替换为尿嘧啶-DNA 糖基化酶(uracil-n-glycosylase, UNG), UNG 能够水解断裂渗入 DNA 中的尿嘧啶糖苷键, 通过生成无碱基中间体介导 C 到 G/A 的颠换<sup>[17]</sup>。2021 年 Zhao 等开发了在大肠杆菌中实现 C-A 颠换的 AID-ncas-Ung (GBE)和在哺乳动物细胞中实现 C-G 颠换的 APOBEC-nCas9-Ung<sup>[17]</sup>。同年, Koblan 等也开发出了与 CBE 作用相接近、可以实现碱基颠换的碱基编辑器 CGBE1 (C-to-G base editors)。为确定 C-G 至 G-C 编辑结果的影响因素, 开发了深度学习模型, 可以有效预测 CGBE 编辑结果, 实现了高效有针对性的碱基颠换预测<sup>[30]</sup>。不久后 Kurt 等开发了两种可实现碱基颠换的碱基编辑器<sup>[31]</sup>。第 1 种在 BE4max 系统上进行改造而得到的, 由 nCas9、rAPOBEC1 (R33A)及大肠杆菌尿嘧啶 DNA N-糖基化酶 eUNG 组成。将 2 个 UGI 删除, 同时增加 eUNG, 解除 UGI 对 UDG 的抑制作用, 以期获得更高的 C 到 A 或 C 到 G 颠换的概率。第 2 种是在 CGBE1 上进行改造, 去除 CGBE1 上的 eUNG 构成 miniCGBE1 也具备相当的编辑效率(与 CGBE1 相比略有下降), 但产生双链断裂的概率明显低于 CGBE1。这 2 种碱基编辑器均可实现目标序列 C-G 碱基颠换, 降低非目标 C 到 A、C、T 以及双链断裂的产生。与此同时, Yuan 等还对密码子进行优化, 改变脱氨酶种类开发了 OPTI-CGBEs<sup>[32]</sup>。目前 GBE 碱基编辑系统也在白杨(*Populus alba*)、水稻(*Oryza sativa* L.) 等植物的碱基编辑中发挥很大作用。GBE 是第

1 个可在哺乳动物上进行 C-G 特异性转换的碱基编辑器,具有较高的特异性和较窄的编辑窗口,为 3 000 多种已知的 C、G 碱基突变引起的人类遗传疾病治疗带来了曙光。

## 2.4 双碱基编辑技术

前述 ABE/CBE 和 GBE 的作用靶标为单种碱基,分别由相应的脱氨酶催化单一类型的核苷酸进行转换,应用覆盖范围低。为了能够同时靶向两种碱基转换,2020 年高彩霞等开发了双重碱基编辑器——饱和靶向内源基因突变碱基编辑器(saturated targeted endogenous mutagenesis editors, STEME),将胞嘧啶脱氨酶和腺嘌呤脱氨酶两种脱氨酶依次与 nCas9 的 N 端相融合,并在 nCas9 的 C 端融合 1 个或 2 个 UGI 拷贝,可在单个 sgRNA 的引导下诱导相关靶点,同时完成 C 到 T、A 到 G 的突变,揭开了双碱基基因编辑器的研究序幕<sup>[33]</sup>。其中 C-T 的编辑效率与 CBE 相似,A-G 编辑效率相对略有降低,但是 DBE 总体效率却大于 ABE+CBE 系统<sup>[34]</sup>。与此同时,Zhang 等将胞嘧啶脱氨酶 rAPOBEC1 用突变活性更高的 hAID 替换,并将 NLS 密码子、UGI 串联优化进行调整,获得了 A&C-BE<sub>max</sub> 双碱基编辑器<sup>[35]</sup>。不久后,Sakata 等将 CBE 系统 Target-AID 和体量更小的 miniABE<sub>max</sub>V82G 的脱氨酶分别融合到 nCas9 的 N 端和 C 端,并增加 2 个 UGI 拷贝,构建了一种新的双碱基编辑器(synchronous programmable adenine and cytosine editor, SPACE)<sup>[18]</sup>。Target-ACE 双碱基编辑与原有的单碱基编辑效率相差不大,但 SPACE 则具有更高的双碱基编辑活性。双碱基编辑系统的成功开发,克服了同时采用 CBE、ABE 系统编辑效率低的问题,在遗传育种、疾病治疗等方面都有很大的应用潜力。

## 3 单碱基编辑技术在猪性状改良上的应用

我国地方猪肉质细嫩、口感好,但瘦肉率低、生长缓慢<sup>[36]</sup>。传统的改良方法所需时间长、改良方向不可控、效率低会耗费大量的人力、财力。基因编辑技术的兴起,将显著加快猪的遗传改良进展。近几年我国科技工作者采用基因编辑技术提高了猪的瘦肉率、加快猪生长速度以及增强抗病性等,为我国地方猪品种改良提供了新途径<sup>[37-39]</sup>。目前基因编辑技术已发展到第 4 代。分别是锌指核酸酶(zincfinger nucleases, ZFNs)技术、转录激活效应因子核酸酶(transcription activator-like effector nucleases, TALENs)技术、CRISPR/Cas 系统以及最新的单碱基编辑技术<sup>[40-42]</sup>。前 3 代均通过人工核酸酶作用于特定基因组位置,使其断裂产生 DSB,诱导 DNA 进行修复,从而实现遗传突变。正因为 DSB 的产生,将引发基因脱靶、染色体不稳,甚至激活癌基因等潜在风险<sup>[43-45]</sup>,引发了学者对生物安全方面的思考。第 4 代单碱基编辑技术由于不产生 DSB,仅针对单个碱基进行转换,提高了基因编辑的准确性和效率,同时降低了生物安全风险,为种猪遗传改良提供了强大工具。

### 3.1 提高瘦肉率

肌肉抑制素(myostatin, MSTN)是对肌肉生长具有负调控的生长抑制素基因,又称生长分化因子 8<sup>[46]</sup>。敲除后可促进肌肉生长,提高瘦肉率,MSTN 基因主要在骨骼肌中表达。比利时蓝牛中双肌肉臀部的发育表型就是 MSTN 中功能缺失所造成的<sup>[47]</sup>。ZFNs、TALENs 和 CRISPR/Cas9 介导的碱基编辑方法在兔子、奶牛、羊等动物中成功复制了双肌臀表型。证明了敲除 MSTN 可以显著提高动物的瘦肉率,从而改良其生长性状。

2020年Li等对两广小花猪MSTN信号肽基因序列进行定点突变(PVD20H和GP19del),使MSTN基因表达显著下降<sup>[37]</sup>。结果表明,基因编辑猪的肌纤维数量有所增加,说明对MSTN相应区域进行精准编辑可有效促进猪肌肉生成。随着单碱基技术的发展。有望使用更准确高效、更加安全的编辑技术对猪的MSTN基因进行修饰。

2021年Pan等使用改良的CBE编辑器Y1-BE4max-NG对巴马香猪进行基因编辑。通过修饰MSTN基因的第20号氨基酸对应的TGG密码子使其变为终止密码子TAG、TGA或TAA,提前终止转录,从而使MSTN丧失活性<sup>[48]</sup>。2022年王晶等使用含有红色荧光的碱基编辑器YE1-BE3-FNLS在宁乡猪MSTN基因的第2个外显子处进行定点突变,成功引入了终止密码子TAA,使翻译提前终止,Western blotting结果显示,该基因蛋白表达量降低了60%<sup>[49]</sup>。

### 3.2 加快生长速度

胰岛素样生长因子2(insulin like growth factor 2, IGF2)可以影响细胞增殖,也可以影响脂肪沉积及骨骼肌生长。若猪IGF2第3个内含子处存在突变,可提高IGF2的基因表达,从而提高瘦肉产量<sup>[50-51]</sup>。2020年王彦芳等用rA1-BE3以及优化后的hA3A-BE3、hA3A-BE3-Y130F和hA3A-eBE-Y130F这4种不同的胞嘧啶碱基编辑器对猪成纤维细胞中IGF2基因第3个内含子进行定点突变<sup>[52]</sup>。最终结果表明,新开发的3种hA3A-BE3碱基编辑器效率远高于rA1-BE3。受脱氨酶活性影响,hA3A-BE3-Y130F、hA3A-eBE-Y130F的编辑效果相较于hA3A-BE3有所下降,但活性窗口相对缩小,降低了旁观者效应,有利于更加精准编辑。进一步说明了单碱基编辑技术在IGF2基因上的可能性。后期有望结合体细胞核移植技术来制备IGF2基因编辑猪,以获得生

长速度更快的猪。2022年Song等利用hA3A-BE3-Y103碱基编辑器获得了CD163、MSTN、IGF2三基因同时突变的基因编辑猪。在靶位点上对C-T进行精准修饰使CD163、MSTN基因不表达,IGF2基因表达增加,使该猪在可以抵抗蓝耳病毒的同时提升瘦肉率<sup>[53]</sup>。为培育出既能改善生长性状又能使传染病抵抗力增加的多基因编辑猪构建良好宏图。

在哺乳动物中,脂肪沉积与三酰基甘油合成速率相关,该合成过程中受二酰甘油酰基转移酶1(diacylglycerol-O-acyltransferase homolog 1, DGAT1)和二酰甘油酰基转移酶2(diacylglycerol-O-acyltransferase homolog 2, DGAT2)基因的影响。2016年Zang等报道发现猪DGAT2基因极有可能比DGAT1发挥更重要的作用,影响猪背膘和瘦肉率<sup>[38]</sup>。黑素皮质素4受体(melanocortin 4 receptor, MC4R)类属于黑素皮质素受体家族。MC4R编码332个氨基酸被作为影响猪生长发育的候选基因,MC4R在动物体内起调节食欲和能量代谢的作用,具有较高的生产应用价值<sup>[54]</sup>。Vaisse等<sup>[55]</sup>、Geller等<sup>[56]</sup>和Young等<sup>[57]</sup>均发现该基因的移码突变和错义突变都可以影响猪背膘厚度、采食量和生长速度,是影响猪生长发育的重要基因之一。DGAT2和M4CR可作为后续单碱基编辑操作基因,进一步高效安全地改善猪的生长状态。

### 3.3 增强抗病性

猪繁殖与呼吸综合征(porcine reproductive and respiratory syndrome, PRRS),又称为猪蓝耳病,源于发病症状为猪双耳充血呈深蓝紫色。该病是由PRRS病毒(porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV)感染引起,该病毒可入侵猪肺泡巨噬细胞或单核细胞,通过患病猪、空气、精液等途径快速传播,引起母猪发热、呼吸困难同时伴随流产的症状,且仔

猪死亡率较高<sup>[58]</sup>。PRRSV 易感范围大、传染性强,是当前我国生猪养殖业危害最大的传染病之一<sup>[59-60]</sup>,对该病的防控十分重要。

PRRSV 入侵机体后与受体 CD163 相结合,敲除 CD163 受体蛋白或功能域可避免 PRRSV 的感染,有效防止该病的发生。2016 年 Whitworth 等利用 CRISPR/Cas9 技术,成功构建出 CD163 第 7 个外显子缺失的基因编辑猪<sup>[39]</sup>。攻毒实验表明,CD163 缺失的基因编辑猪有效抵抗了 PRRSV 感染,充分证明了 CD163 是该病毒入侵宿主的必需受体。2020 年 Wang 等用改良的 hA3A-BE3-NG 成功地制备了 CD163 蛋白缺失猪细胞<sup>[61]</sup>。2022 年赵为民等在胚胎水平上用 YE1-BE3-FNLS 系统将第 7 个外显子中的 1 个密码子 CAA 改变为终止密码子 TAA,使其提前结束翻译<sup>[62]</sup>。相较于传统的 CRISPR/Cas9 技术的编辑方法,该研究的编辑效率可达到 60%,编辑效率有所提高且碱基突变类型单一,改善了不易获得纯合 CD163 的基因敲除猪的弊端。

除了 PRRSV 以外,传染性胃肠炎病毒(transmissible gastro enteritis virus, TGEV)也是一种高度传染性疾病。已有相关报道证明了小肠上皮细胞上的 pAPN 是 TGEV 感染的关键受体<sup>[63]</sup>。2020 年 Xu 等利用基因编辑技术成功制备了 CD163 和 pAPN 双基因敲除猪<sup>[2]</sup>。后续有望采用单碱基编辑技术来开发安全性更高的双基因敲除猪,成功抵抗 PRRSV 和 TGEV 的感染。

## 4 展望

GBE 是对 CBE 的副产物进一步开发所得到的,但 ABE 副产物较少,后续可通过蛋白工程技术对不同蛋白作用进行解析,再筛选出合适的蛋白体,结合到 ABE 碱基编辑器,开发出 A 到 C 或 A 到 T 的碱基编辑器,为性状改良乃至基因治疗提供更强大的技术支撑。

单碱基编辑自问世以来,便以准确、便捷高效和安全等优势,被广泛应用于猪性状改良和遗传育种等相关领域。但由于脱靶效应的产生,这很大程度限制了其应用。大量研究表明,对脱氨酶进行改造,降低脱氨酶活性,可以有效减少随机产生的脱靶效应。因此如何在不降低编辑效率的同时降低脱靶率,提高安全性是未来的一个研究方向。现阶段的单基因编辑往往会受到 PAM 序列的制约。若设计出对 PAM 序列依赖性小或不依赖 PAM 的碱基编辑器,将会大大提升单碱基编辑器适用范围。单碱基编辑,仅在极少数基因的敲除上发展较为成熟,被确定可操作的基因少。可结合人工智能建立庞大的数据库,优化物理预测模型和映射模型降低脱靶率来提高基因编辑的准确性和安全性。随着世界各研究团队的不断探索,更深层的机制逐渐被挖掘,存在的许多问题也在逐步被完善。新型碱基编辑技术的不断开发与优化,进一步巩固了生物技术的底层技术能力,在生物产业中发挥更重要的作用。

## REFERENCES

- [1] 张耀文. 生猪疾病防控及养殖措施[J]. 江西农业, 2022(10): 57-58.  
ZHANG YW. Prevention and control of pig diseases and breeding measures[J]. Jiangxinongye, 2022(10): 57-58 (in Chinese).
- [2] XU K, ZHOU YR, MU YL, LIU ZG, HOU SH, XIONG YJ, FANG LR, GE CL, WEI YH, ZHANG XL, XU CJ, CHE JJ, FAN ZY, XIANG GM, GUO JK, SHANG HT, LI H, XIAO SB, LI JL, LI K. *CD163* and *pAPN* double-knockout pigs are resistant to PRRSV and TGEV and exhibit decreased susceptibility to PDCoV while maintaining normal production performance[J]. eLife, 2020, 9: e57132.
- [3] 刘志国, 王冰源, 牟玉莲, 魏泓, 陈俊海, 李奎. 分子编写育种: 动物育种的发展方向[J]. 中国农业科学, 2018, 51(12): 2398-2409.  
LIU ZG, WANG BY, MU YL, WEI H, CHEN JH, LI K. Breeding by molecular writing (BMW): the future development of animal breeding[J]. Scientia



- Agricultura Sinica, 2018, 51(12): 2398-2409 (in Chinese).
- [4] HSU PD, LANDER ES, ZHANG F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering[J]. *Cell*, 2014, 157(6): 1262-1278.
- [5] DELTCHEVA E, CHYLINSKI K, SHARMA CM, GONZALES K, CHAO YJ, PIRZADA ZA, ECKERT MR, VOGEL J, CHARPENTIER E. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III[J]. *Nature*, 2011, 471(7340): 602-607.
- [6] REES HA, LIU DR. Base editing: precision chemistry on the genome and transcriptome of living cells[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2018, 19(12): 770-788.
- [7] FENG ZY, ZHANG BT, DING WN, LIU XD, YANG DL, WEI PL, CAO FQ, ZHU SH, ZHANG F, MAO YF, ZHU JK. Efficient genome editing in plants using a CRISPR/Cas system[J]. *Cell Research*, 2013, 23(10): 1229-1232.
- [8] 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[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2016, 17(10): 1668.
- [9] 高靖静. 胞嘧啶单碱基编辑器编辑结果的分析与建模预测[D]. 北京: 北京协和医学院硕士学位论文, 2022.
- GAO JJ. Analysis and modeling prediction of editing results of cytosine single base editor[D]. Beijing: Master's Thesis of Peking Union Medical College Hospital, 2022 (in Chinese).
- [10] HAAPANIEMI E, BOTLA S, PERSSON J, SCHMIERER B, TAIPALE J. CRISPR-Cas9 genome editing induces a p53-mediated DNA damage response[J]. *Nature Medicine*, 2018, 24(7): 927-930.
- [11] KOSICKI M, TOMBERG K, BRADLEY A. Repair of double-strand breaks induced by CRISPR-Cas9 leads to large deletions and complex rearrangements[J]. *Nature Biotechnology*, 2018, 36(8): 765-771.
- [12] 徐茜, 杨莎, 郝海生, 杜卫华, 庞云渭, 赵善江, 邹惠影, 朱化彬, 李树静, 余文莉, 赵学明. 单碱基编辑技术的应用研究进展[J]. *中国畜牧兽医*, 2021, 48(12): 4403-4411.
- XU X, YANG S, HAO HS, DU WH, PANG YW, ZHAO SJ, ZOU HY, ZHU HB, LI SJ, YU WL, ZHAO XM. Research progress on application of single base editing technology[J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2021, 48(12): 4403-4411 (in Chinese).
- [13] KARIMIAN A, AZIZIAN K, PARSIAN H, RAFIEIAN S, SHAFIEI-IRANNEJAD V, KHEYROLLAH M, YOUSEFI M, MAJIDINIA M, YOUSEFI B. CRISPR/Cas9 technology as a potent molecular tool for gene therapy[J]. *Journal of Cellular Physiology*, 2019, 234(8): 12267-12277.
- [14] KANTOR A, MCCLEMENTS ME, MACLAREN RE. CRISPR-Cas9 DNA base-editing and prime-editing[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(17): 6240.
- [15] IHRY RJ, WORRINGER KA, SALICK MR, FRIAS E, HO D, THERIAULT K, KOMMINENI S, CHEN JL, SONDEY M, YE CY, RANDHAWA R, KULKARNI T, YANG Z, MCALLISTER G, RUSS C, REECE-HOYES J, FORRESTER W, HOFFMAN GR, DOLMETSCH R, KAYKAS A. p53 inhibits CRISPR-Cas9 engineering in human pluripotent stem cells[J]. *Nature Medicine*, 2018, 24(7): 939-946.
- [16] GAUDELLI NM, KOMOR AC, REES HA, PACKER MS, BADRAN AH, BRYSON DI, LIU DR. Programmable base editing of A•T to G•C in genomic DNA without DNA cleavage[J]. *Nature*, 2017, 551(7681): 464-471.
- [17] ZHAO DD, LI J, LI SW, XIN XQ, HU MZ, PRICE MA, ROSSER SJ, BI CH, ZHANG XL. Glycosylase base editors enable C-to-A and C-to-G base changes[J]. *Nature Biotechnology*, 2021, 39(1): 35-40.
- [18] SAKATA RC, ISHIGURO S, MORI H, TANAKA M, TATSUNO K, UEDA H, YAMAMOTO S, SEKI M, MASUYAMA N, NISHIDA K, NISHIMASU H, ARAKAWA K, KONDO A, NUREKI O, TOMITA M, ABURATANI H, YACHIE N. Base editors for simultaneous introduction of C-to-T and A-to-G mutations[J]. *Nature Biotechnology*, 2020, 38(7): 865-869.
- [19] CONTICELLO SG. The AID/APOBEC family of nucleic acid mutators[J]. *Genome Biology*, 2008, 9(6): 229.
- [20] KOMOR AC, KIM YB, PACKER MS, ZURIS JA, LIU DR. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage[J]. *Nature*, 2016, 533(7603): 420-424.
- [21] NOUSPIKEL T. DNA repair in mammalian cells[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2009, 66(6): 994-1009.
- [22] TARANTINO ME, DOW BJ, DROHAT AC, DELANEY S. Nucleosomes and the three glycosylases: high, medium, and low levels of excision by the uracil

- DNA glycosylase superfamily[J]. *DNA Repair*, 2018, 72: 56-63.
- [23] YASUI M, SUENAGA E, KOYAMA N, MASUTANI C, HANAOKA F, GRUZ P, SHIBUTANI S, NOHMI T, HAYASHI M, HONMA M. Miscoding properties of 2'-deoxyinosine, a nitric oxide-derived DNA adduct, during translesion synthesis catalyzed by human DNA polymerases[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2008, 377(4): 1015-1023.
- [24] 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, et al. Base pair editing in goat: nonsense codon introgression into *FGF5* results in longer hair[J]. *The FEBS Journal*, 2019, 286(23): 4675-4692.
- [25] KOMOR AC, ZHAO KT, PACKER MS, GAUDELLI NM, WATERBURY AL, KOBLAN LW, KIM YB, BADRAN AH, LIU DR. Improved base excision repair inhibition and bacteriophage Mu Gam protein yields C:G-to-T: a base editors with higher efficiency and product purity[J]. *Science Advances*, 2017, 3(8): eaao4774.
- [26] KOBLAN LW, DOMAN JL, WILSON C, LEVY JM, TAY T, NEWBY GA, MAIANTI JP, RAGURAM A, LIU DR. Improving cytidine and adenine base editors by expression optimization and ancestral reconstruction[J]. *Nature Biotechnology*, 2018, 36(9): 843-846.
- [27] 张雅玲, 王铎和, 李构思, 曾栋昌, 祝钦洸, 陈乐天, 刘耀光. 新型 DNA 碱基编辑器的研究进展[J]. *华南农业大学学报*, 2022, 43(6): 1-16, I0004.  
ZHANG YL, WANG XH, LI GS, ZENG DC, ZHU QL, CHEN LT, LIU YG. Research advances in novel DNA base editors[J]. *Journal of South China Agricultural University*, 2022, 43(6): 1-16, I0004 (in Chinese).
- [28] RICHTER MF, ZHAO KT, ETON E, LAPINAITE A, NEWBY GA, THURONYI BW, WILSON C, KOBLAN LW, ZENG J, BAUER DE, DOUDNA JA, LIU DR. Phage-assisted evolution of an adenine base editor with improved Cas domain compatibility and activity[J]. *Nature Biotechnology*, 2020, 38(7): 883-891.
- [29] LAPINAITE A, KNOTT GJ, PALUMBO CM, LIN-SHIAO E, RICHTER MF, ZHAO KT, BEAL PA, LIU DR, DOUDNA JA. DNA capture by a CRISPR-Cas9-guided adenine base editor[J]. *Science*, 2020, 369(6503): 566-571.
- [30] KOBLAN LW, ARBAB M, SHEN MW, HUSSMANN JA, ANZALONE AV, DOMAN JL, NEWBY GA, YANG D, MOK B, REPLOGLE JM, XU A, SISLEY TA, WEISSMAN JS, ADAMSON B, LIU DR. Efficient C•G-to-G•C base editors developed using CRISPRi screens, target-library analysis, and machine learning[J]. *Nature Biotechnology*, 2021, 39(11): 1414-1425.
- [31] KURT IC, ZHOU RH, IYER S, GARCIA SP, MILLER BR, LANGNER LM, GRÜNEWALD J, JOUNG JK. CRISPR C-to-G base editors for inducing targeted DNA transversions in human cells[J]. *Nature Biotechnology*, 2021, 39(1): 41-46.
- [32] YUAN TL, YAN NN, FEI TY, ZHENG JT, MENG J, LI NN, LIU J, ZHANG HH, XIE L, YING WQ, LI D, SHI L, SUN YS, LI YY, LI YX, SUN YD, ZUO EW. Optimization of C-to-G base editors with sequence context preference predictable by machine learning methods[J]. *Nature Communications*, 2021, 12: 4902.
- [33] LI C, ZHANG R, MENG XB, CHEN S, ZONG Y, LU CJ, QIU JL, CHEN YH, LI JY, GAO CX. Targeted, random mutagenesis of plant genes with dual cytosine and adenine base editors[J]. *Nature Biotechnology*, 2020, 38(7): 875-882.
- [34] GRÜNEWALD J, ZHOU RH, LAREAU CA, GARCIA SP, IYER S, MILLER BR, LANGNER LM, HSU JY, ARYEE MJ, JOUNG JK. A dual-deaminase CRISPR base editor enables concurrent adenine and cytosine editing[J]. *Nature Biotechnology*, 2020, 38(7): 861-864.
- [35] ZHANG XH, ZHU BY, CHEN L, XIE L, YU WS, WANG Y, LI LX, YIN SM, YANG L, HU HD, HAN HH, LI YM, WANG LR, CHEN G, MA XY, GENG HQ, HUANG WF, PANG XF, YANG ZZ, WU YX, et al. Dual base editor catalyzes both cytosine and adenine base conversions in human cells[J]. *Nature Biotechnology*, 2020, 38(7): 856-860.
- [36] 杨宇明. 浅谈地方猪种育种工作[J]. *中国畜禽种业*, 2019, 15(6): 60.  
YANG YM. Talking about the breeding of local pig breeds[J]. *The Chinese Livestock and Poultry Breeding*, 2019, 15(6): 60 (in Chinese).
- [37] LI RQ, ZENG W, MA M, WEI ZX, LIU HB, LIU XF, WANG M, SHI X, ZENG JH, YANG LF, MO DL, LIU XH, CHEN YS, HE ZY. Precise editing of myostatin signal peptide by CRISPR/Cas9 increases the muscle mass of Liang Guang small spotted pigs[J]. *Transgenic Research*, 2020, 29(1): 149-163.

- [38] ZANG L, WANG YD, SUN BX, ZHANG X, YANG CH, KANG L, ZHAO ZH, JIANG YL. Identification of a 13 bp indel polymorphism in the 3'-UTR of *DGAT2* gene associated with backfat thickness and lean percentage in pigs[J]. *Gene*, 2016, 576(2): 729-733.
- [39] WHITWORTH KM, ROWLAND RRR, EWEN CL, TRIBLE BR, KERRIGAN MA, CINO-OZUNA AG, SAMUEL MS, LIGHTNER JE, MCLAREN DG, MILEHAM AJ, WELLS KD, PRATHER RS. Gene-edited pigs are protected from porcine reproductive and respiratory syndrome virus[J]. *Nature Biotechnology*, 2016, 34(1): 20-22.
- [40] KIM YG, CHA J, CHANDRASEGARAN S. Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1996, 93(3): 1156-1160.
- [41] CHRISTIAN M, CERMAK T, DOYLE EL, SCHMIDT C, ZHANG F, HUMMEL A, BOGDANOVA AJ, VOYTAS DF. Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases[J]. *Genetics*, 2010, 186(2): 757-761.
- [42] 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[J]. *Science*, 2013, 339(6121): 819-823.
- [43] WANG HF, la RUSSA M, QI LS. CRISPR/Cas9 in genome editing and beyond[J]. *Annual Review of Biochemistry*, 2016, 85: 227-264.
- [44] AGUIRRE AJ, MEYERS RM, WEIR BA, VAZQUEZ F, ZHANG CZ, BEN-DAVID U, COOK A, HA G, HARRINGTON WF, DOSHI MB, KOST-ALIMOVA M, GILL S, XU H, ALI LD, JIANG GZ, PANTEL S, LEE Y, GOODALE A, CHERNIACK AD, OH C, et al. Genomic copy number dictates a gene-independent cell response to CRISPR/Cas9 targeting[J]. *Cancer Discovery*, 2016, 6(8): 914-929.
- [45] ZUO EW, HUO XN, YAO X, HU XD, SUN YD, YIN JH, HE BB, WANG X, SHI LY, PING J, WEI Y, YING WQ, WEI W, LIU WJ, TANG C, LI YX, HU JZ, YANG H. CRISPR/Cas9-mediated targeted chromosome elimination[J]. *Genome Biology*, 2017, 18(1): 224.
- [46] GROBET L, ROYO MARTIN LJ, PONCELET D, PIROTTIN D, BROUWERS B, RIQUET J, SCHOEBERLEIN A, DUNNER S, MÉNISSIER F, MASSABANDA J, FRIES R, HANSET R, GEORGES M. A deletion in the bovine myostatin gene causes the double-muscling phenotype in cattle[J]. *Nature Genetics*, 1997, 17(1): 71-74.
- [47] MCPHERRON AC, LEE SJ. Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1997, 94(23): 12457-12461.
- [48] PAN JS, LIN ZS, WEN JC, GUO JF, WU XH, LIU YY, LAI WJ, LIANG QY, XIE YS, CHEN YR, CHEN YH, YAN AF, FENG J, LIU L, GONG DY, ZHU XX, LU JH, TANG DS. Application of the modified cytosine base-editing in the cultured cells of Bama minipig[J]. *Biotechnology Letters*, 2021, 43(9): 1699-1714.
- [49] 王晶, 朱喆, 张鹏, 毕延震. 利用单碱基编辑器定点突变猪肌肉生长抑制素基因的研究[J]. *中国畜牧兽医*, 2022, 49(8): 2880-2887.
- WANG J, ZHU Z, ZHANG P, BI YZ. Site-directed mutagenesis of porcine myostatin gene using single base editor[J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2022, 49(8): 2880-2887 (in Chinese).
- [50] van LAERE AS, NGUYEN M, BRAUNSCHWEIG M, NEZER C, COLLETTE C, MOREAU L, ARCHIBALD AL, HALEY CS, BUYS N, TALLY M, ANDERSSON G, GEORGES M, ANDERSSON L. A regulatory mutation in *IGF2* causes a major QTL effect on muscle growth in the pig[J]. *Nature*, 2003, 425(6960): 832-836.
- [51] XIANG GH, REN JL, HAI T, FU R, YU DW, WANG J, LI W, WANG HY, ZHOU Q. Editing porcine *IGF2* regulatory element improved meat production in Chinese Bama pigs[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2018, 75(24): 4619-4628.
- [52] 王煜, 宋瑞高, 赵建国, 王彦芳. 碱基编辑器介导的猪 *IGF2* 基因高效定点突变[J]. *中国畜牧兽医*, 2020, 47(11): 3427-3435.
- WANG Y, SONG RG, ZHAO JG, WANG YF. Efficient site-directed mutation of porcine *IGF2* gene via base editors[J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2020, 47(11): 3427-3435 (in Chinese).
- [53] SONG RG, WANG Y, ZHENG QT, YAO J, CAO CW, WANG YF, ZHAO JG. One-step base editing in multiple genes by direct embryo injection for pig trait improvement[J]. *Science China Life Sciences*, 2022, 65(4): 739-752.
- [54] YEO GSH, FAROOQI IS, CHALLIS BG, JACKSON RS, O'RAHILLY S. The role of melanocortin signalling in the control of body weight: evidence from

- human and murine genetic models[J]. QJM: an International Journal of Medicine, 2000, 93(1): 7-14.
- [55] VAISSE C, CLEMENT K, DURAND E, HERCBERG S, GUY-GRAND B, FROGUEL P. Melanocortin-4 receptor mutations are a frequent and heterogeneous cause of morbid obesity[J]. The Journal of Clinical Investigation, 2000, 106(2): 253-262.
- [56] GELLER F, REICHWALD K, DEMPFFLE A, ILLIG T, VOLLMERT C, HERPERTZ S, SIFFERT W, PLATZER M, HESS C, GUDERMANN T, BIEBERMANN H, WICHMANN HE, SCHÄFER H, HINNEY A, HEBEBRAND J. Melanocortin-4 receptor gene variant I103 is negatively associated with obesity[J]. American Journal of Human Genetics, 2004, 74(3): 572-581.
- [57] YOUNG EH, WAREHAM NJ, FAROOQI S, HINNEY A, HEBEBRAND J, SCHERAG A, O'RAHILLY S, BARROSO I, SANDHU MS. The V103I polymorphism of the *MC4R* gene and obesity: population based studies and meta-analysis of 29 563 individuals[J]. International Journal of Obesity, 2007, 31(9): 1437-1441.
- [58] COLLINS JE, BENFIELD DA, CHRISTIANSON WT, HARRIS L, HENNINGS JC, SHAW DP, GOYAL SM, MCCULLOUGH S, MORRISON RB, JOO HS. Isolation of swine infertility and respiratory syndrome virus (isolate ATCC VR-2332) in north America and experimental reproduction of the disease in gnotobiotic pigs[J]. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation: Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc, 1992, 4(2): 117-126.
- [59] WENSVOORT G, TERPSTRA C, POL JM, TER LAAK EA, BLOEMRAAD M, de KLUYVER EP, KRAGTEN C, van BUITEN L, den BESTEN A, WAGENAAR F. Mystery swine disease in The Netherlands: the isolation of Lelystad virus[J]. The Veterinary Quarterly, 1991, 13(3): 121-130.
- [60] NEUMANN EJ, KLIEBENSTEIN JB, JOHNSON CD, MABRY JW, BUSH EJ, SEITZINGER AH, GREEN AL, ZIMMERMAN JJ. Assessment of the economic impact of porcine reproductive and respiratory syndrome on swine production in the United States[J]. Journal of the American Veterinary Medical Association, 2005, 227(3): 385-392.
- [61] WANG Y, BI DF, QIN GS, SONG RG, YAO J, CAO CW, ZHENG QT, HOU NP, WANG YF, ZHAO JG. Cytosine base editor (hA3A-BE3-NG)-mediated multiple gene editing for pyramid breeding in pigs[J]. Frontiers in Genetics, 2020, 11: 592623.
- [62] 赵为民, 王慧利, 曹少先, 郭日红, 王泽平, 陈哲, 徐奎, 付言峰, 李碧侠, 任守文, 程金花. 猪 CD163 基因的单碱基编辑研究[J]. 畜牧兽医学报, 2022, 53(4): 1041-1050.
- ZHAO WM, WANG HL, CAO SX, GUO RH, WANG ZP, CHEN Z, XU K, FU YF, LI BX, REN SW, CHENG JH. The study of base editing of porcine CD163 gene[J]. Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica, 2022, 53(4): 1041-1050 (in Chinese).
- [63] HANSEN GH, DELMAS B, BESNARDEAU L, VOGEL LK, LAUDE H, SJÖSTRÖM H, NORÉN O. The coronavirus transmissible gastroenteritis virus causes infection after receptor-mediated endocytosis and acid-dependent fusion with an intracellular compartment[J]. Journal of Virology, 1998, 72(1): 527-534.

(本文责编 陈宏宇)