

基因编辑技术在家畜抗病育种中的应用

邢雯慧^{1,2}, 周梦晗^{1,2}, 钱诗雨^{1,2}, 伍家辉^{1,2}, 李媛媛^{1,2}, 赵春江^{1,2*}

(1. 中国农业大学动物科学技术学院, 北京 100193; 2. 中国农业大学马研究中心, 北京 100193)

摘要: 随着现代畜牧业的发展, 集约化养殖模式在提高生产效益的同时, 也加剧了畜禽传染病的传播风险, 对动物养殖和人类健康产生了严重影响。传统药物治疗和育种方法在应对畜禽疾病方面存在局限性, 难以从根源上解决问题。基因编辑技术的发展和应用于畜禽抗病育种提供了全新的策略和方法。本文综述了基因编辑技术的发展及其应用于猪、牛、羊等主要家畜抗病育种的最新进展, 重点探讨了基因编辑技术在防控猪繁殖与呼吸综合征 (Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome, PRRS)、猪瘟 (Classical Swine Fever, CSF)、非洲猪瘟 (African Swine Fever, ASF)、牛乳腺炎和结核病 (Bovine Tuberculosis, bTB) 等重要传染病中的应用, 以期为本领域进一步的研究和抗病育种提供参考。

关键词: 基因编辑; 抗病育种; 传染病; 病毒; 免疫力

中图分类号: S813

文献标识码: A

DOI 编号: 10.19556/j.0258-7033.20250225-07

肉、蛋、奶等畜产品是人类重要的食品, 其营养丰富, 在健康饮食、提高生活质量方面起着重要作用。随着社会供给需求的转变以及现代化畜牧业的发展, 集约化和规模化养殖模式成为畜牧业的主流趋势。然而, 集约化养殖模式在追求更高的经济价值和收益的同时, 也增加了爆发病疫的风险。受全球流行病和其他动物疾病的影响, 畜禽传染性疾病的暴发对畜禽生产、人类健康和动物福利等都有严重的损害^[1]。传统的药物和抗生素方法仅能够达到治疗和改善畜禽患病状态的效果, 无法从根源上解决传染性对规模化畜禽养殖的影响。此外, 长期使用抗生素还会对生态环境产生破坏, 导致畜禽产生耐药性, 加剧疾病传播风险, 对畜产品质量和人类健康产生负面影响^[2-3]。

传统育种技术对于提高畜禽的抗病能力收效甚微。一方面, 抗病力是复杂性状, 由多位点调控, 受环境影响大, 遗传力低, 选种的准确性无法保障, 导致育种效

果不理想。另外, 传统育种方案存在育种周期长、效率不高、遗传进展缓慢等缺点^[4]。为弥补传统育种技术的不足, 从 20 世纪开始, 科学家们试图寻找一种更高效、更精准的技术从基因层面提高畜禽的抗病力。2007 年, Mario R Capecchi、Martin J Evans 和 Oliver Smithies 3 位科学家发明的基因靶向技术获得诺贝尔奖生理学或医学奖, 该技术发展和应用为从基因层面实现畜禽抗病这一设想带来了新的契机, 为畜禽的抗病育种提供新的思路。

1 基因编辑技术

基因编辑技术是指通过人工插入、删除或更改特定基因座的特定脱氧核糖核酸 (DNA) 序列来改变遗传物质的技术。基因编辑技术的发展经历了多个阶段, 最早可从 James D Watson 和 Francis Crick 发现 DNA 双螺旋结构开始追溯, 这也是分子生物学的开端。20 世纪 70 年代末, Scherer 等^[5]建立了一种能够将体外构建的外源序列或缺失稳定地导入酿酒酵母染色体的方法, 由此证明任何独立的基因都可以通过删除或改变用于替代野生型染色体拷贝。上世纪 80 年代, Thomas 等^[6]通过基因打靶技术在小鼠胚胎干细胞 (Embryonic Stem Cell, ES) 中成功突变了内源性次黄嘌呤磷酸核糖转移酶 (Hypoxanthine Phosphoribosyl Transferase,

收稿日期: 2025-02-25; 修回日期: 2025-04-11

资助项目: 科技部科技创新 2030—重大项目 抗病基因编辑奶牛育种新材料创制课题 (2023ZD0405003)

作者简介: 邢雯慧 (2002-), 女, 河北石家庄人, 硕士研究生, 主要从事动物遗传育种研究, E-mail: wenhuixing@cau.edu.cn

* 通信作者: 赵春江 (1970-), 男, 新疆乌鲁木齐人, 博士, 副研究员, 主要从事动物遗传育种学研究, E-mail: cjzhao@cau.edu.cn

HPRT) 基因, 实现了基因的定点突变。这种基因打靶技术依赖于 DNA 自发产生双链断裂 (Double Strand Break, DSB) 所启动的同源重组修复系统, 导致这种技术受限于细胞状态和突变性质, 打靶结果的准确性和成功率极低, 制约了该技术的普及和应用^[7]。在 20 世纪 90 年代初, 科学家们发现使用例如 I-SceI 等归巢内切酶在哺乳动物细胞中诱导靶向 DSB 可以引发靶位点的同源重组, 这一发现推动了利用具有诱导 DSB 功能的核酸酶进行基因编辑这一理念的形成, 核酸酶の利用也为科学家编辑和改造基因组提供了一种新的思路和途径^[8]。

1.1 锌指核酸酶 (Zinc Finger Nuclease, ZFN) 基因编辑核酸酶也被称为可编程核酸酶, 是基因编辑技术的关键工具, 具有识别和切割基因组中特定序列的作用。ZFN 是一种人工核酸内切酶, 包含特异性识别靶点序列的锌指蛋白 (Zinc Finger Protein, ZFPs) DNA 结构域和非特异性核酸内切酶 Fok I^[9]。1985 年, Miller 等^[10-11] 首次在非洲爪蟾卵母细胞上发现了重复的锌结合结构域, 每个结构域都以锌离子为中心, 被称为锌指 (Zinc Finger, ZF) 结构, 每个锌指由大约 30 个氨基酸残基组成 (包括 2 对不变的半胱氨酸和组氨酸), 并折叠形成 α - β - β 型的二级结构, 可直接特异性识别 DNA 双链中某一条单链上 3 个连续的核苷酸。利用 ZFN 特异识别能力, 串联多个锌指就可以达到识别更长序列的作用, 实现特定靶点的识别。1996 年, Kim 等^[12] 将 2 种不同的锌指蛋白与 Fok I 核酸内切酶的切割结构域结合, 创造出新的位点特异性核酸内切酶, 为 ZFN 技术发展和模块化 DNA 识别蛋白的应用开辟了道路。ZFN 基因编辑技术在小鼠、绵羊和猪等动物中都得到了广泛应用, 在此过程中 ZFN 的优势得以充分展示, 但同时也暴露了该技术的局限性^[13]。尽管这项技术具有编辑精确度高和安全性好的优点, 但由于 ZFN 的识别能力主要依赖于锌指蛋白的功能, 导致靶点的设计和筛选具有局限性, 无法实现全基因组的广泛运用。

1.2 转录激活因子样效应物核酸酶 (Transcription Activator-like Effector Nucleases, TALEN) 2007 年, Romer 等^[14-15] 首次发现植物病原菌黄单胞杆菌所分泌的一组转录激活样效应因子 (Transcription Activator-like Effector, TALE) 可以通过串联重复中央 DNA 结合域 (DNA Binding Domain, DBD) 与 DNA 结合,

利用 III 型分泌系统注射到宿主的植物细胞中与 DNA 结合, 进而改变宿主细胞中的转录, 实现病原菌定植。对 TALE 加以修饰, 添加上核酸内切酶 (Nucleases), 就形成了 TALEN。TALEN 与 ZFN 组成类似, 也是一种人工核酸内切酶, 具有特异性识别的 DNA 结合结构域和核酸内切酶。TALEN 的 DNA 结合结构域由不同数目的氨基酸重复序列组成, 每个重复包括 33~35 个氨基酸单元并可识别单 DNA 碱基对。这是通过重复序列的第 12 和 13 位的高度可变氨基酸残基实现的, 也被称为重复可变双残基 (Repeat-variable Di-residues, RVD)。重复序列能够以模块的形式进行组装, 通过改变 RVD 而生成识别特定目标 DNA 序列的转录激活因子样 (Transcription Activator-like, TAL) 效应蛋白, 因此 RVD 也决定了 TALEN 能够识别和结合的 DNA 碱基序列类型^[16]。由于 TALEN 具有快速创建 Fok I 偶联的能力, 能够识别不同的碱基并且不同单元间相互独立, 所以 TALEN 可以靶向基因组内任何需要的序列, 比 ZFN 适用性强且更快捷, 靶向范围也更大。当前, TALEN 技术已经在小鼠、山羊和猪等动物上有效运用^[17-19]。但是 TALEN 技术依旧存在着局限性, 由于 TALE 识别碱基序列是通过单个单元一一对应的方式进行, 导致在实际过程中 TALE 的需要量庞大, 使得 TALEN 的设计、组装和运用也更加困难^[20]。

1.3 CRISPR/Cas 在 2012 年以前, 科学家们对于成簇规律间隔短回文重复序列 (Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats, CRISPR) 的研究主要集中于微生物学相关领域, 与基因编辑技术处于 2 个平行的研究领域, 并没有交叉研究。早在 1987 年, 日本大阪大学的 Nakata 研究团队^[21] 就对 CRISPR 结构进行了首次的研究报道, 研究人员发现在 IAP 下游 3' 端有 29 个碱基的高度同源重复序列, 而在这些重复序列中间存在一段含 32 个碱基的非重复序列, 这一结构便是 CRISPR 结构。随后, 关于 CRISPR 的研究发现类似的重复序列结构存在于多种细菌和古生菌中, 并预测该结构可能与嗜热菌的 DNA 修复和基因调控有关^[22-23]。2000 年, Mojica 等^[24] 发现这种重复序列存在于 20 多种细菌及古生菌中, 根据序列特点将其命名为短规律性间隔重复序列 (Short Regularly Spaced Repeats, SRSRs), 并列出具具有 SRSR 结构的生物, 推测其结构的高度保守性与进化相关, 并可能具有共同的生物学功

能。2002 年，荷兰科学家 Jansen 等^[25]将这种结构定义为 CRISPR，在其附近发现同源性的特征基因将其命名为 Cas，共发现 4 个 Cas 基因（Cas1、Cas2、Cas3 和 Cas4），并验证了部分 Cas 蛋白的功能。2005 年科学家们观察到 CRISPR 中的许多间隔序列来自质粒和病毒^[20,26]。随着 CRISPR 基因座转录的研究以及对 Cas 基因的各种推测，科学家们提出 CRISPR/Cas 是一种适应性防御系统的设想^[27-28]。经过深入探索，3 种 CRISPR/Cas 类型（I、II 和 III）的分子机制相继被发现和报道^[29]。2011 年 Sapranaukas 等^[30]第一次证实了从嗜热链球菌中可将 CRISPR 系统转移到大肠杆菌。随后 Charpentier 等^[31]首次证实了 Cas9 能够实现 DNA 的体外切割。次年，张锋等^[32]利用 CRISPR/Cas9 在哺乳动物细胞中完成了特定的基因编辑。至此，CRISPR/Cas9 基因编辑技术受到广泛关注，并在多种动植物的基因编辑中得到运用。随后张锋团队^[33-34]相继发现新的 CRISPR/Cas 系统（Cas12a 和 Cas13a），在一定程度上补充了 Cas9 的不足，为 CRISPR 的开发与运用提供了更多的可能。有关基因编辑技术的发展历程如表 1 所示。

1.4 单碱基编辑 传统的 CRISPR/Cas9 编辑技术原理是通过 DSB 诱发细胞内的同源重组（Homologous Recombination，HR）和非同源末端连接（Non-homologous End Joining，NHEJ）修复途径，从而实现 DNA 的定点敲除、替换、插入等修饰，这种 DSB 引发的 DNA 修复机制使得在剪切位点随机引入插入或缺失，很难实现稳定的单碱基突变，导致编辑结果不稳定，因此开发一种能够精准且高效实现单碱基替换的技术就成为一项重要的工作^[31]。2016 年，刘如谦团队^[35]首次提出胞嘧啶碱基编辑器（Cytosine Base Editor，CBE），

这是基于 CRISPR 所开发的一种单碱基编辑技术，旨在治疗单碱基突变引发的相关疾病。单碱基编辑技术实现既保留向导 RNA（Single Guide RNA，sgRNA）的编辑作用又避免了 DNA 双链的断裂，不再需要对双链进行切割或是提供供体模板来完成编辑，能够介导胞嘧啶直接转化为尿嘧啶，从而实现 C→T（或 G→A）的转换。2017 年，刘如谦等^[36]进一步补充单碱基替换技术，提出腺嘌呤碱基编辑器（Adenine Base Editor，ABE），该技术将一种转移 RNA 的腺苷脱氨酶与 CRISPR/Cas9 突变体结合，实现基因组 DNA 中 A→G（或 T→C）转换的功能。2019 年，刘如谦团队^[37]开发出引导编辑器（Prime Editor，PE），利用由 Cas9 H840A 切口酶和工程化的逆转录酶组成的融合蛋白，以及一种引导 RNA（Prime Editing Guide RNA，pegRNA）进行编程，直接在特定 DNA 位点实现 4 种碱基的任意转换，并且该技术在人类细胞中成功纠正了镰状细胞贫血和泰-萨克斯病（Tay-Sachs Disease）的致病遗传位点，为罕见遗传病的基因治疗提供了新的可能性，也推动了更精准基因编辑技术的进步。3 种基因编辑工具特点详见表 2。至此，基因编辑技术的研究精度和技术手段得到显著提升，这也为家畜相关性状遗传改良以及家畜传染病防治提供了新的技术和方向。

2 基因编辑技术在家畜抗病育种中的应用

2.1 猪繁殖与呼吸综合征 猪繁殖与呼吸综合征（Porcine Reproductive And Respiratory Syndrome，PRRS），又称为蓝耳病，是由猪繁殖与呼吸综合征病毒（Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus，PRRSV）引起的一种严重影响猪呼吸和母猪繁殖功能的疾病，可

表 1 基因编辑技术的发展历程

时间	基因编辑技术	CRISPR
19 世纪 70 年代	1979 年在酵母中实现基因替换	-
19 世纪 80 年代	在小鼠 ES 细胞中实现基因定点突变；1985 年发现锌指结构	1987 年，CRISPR 首次被描述
19 世纪 90 年代	利用 NHEJ、HDR 进行基因组断裂修复；锌指核酸酶用于基因组工程	-
20 世纪初	TAL 效应子和 TALE 核酸酶被发现	2002 年，验证部分 Cas 蛋白功能；提出 CRISPR/Cas 是一种适应性防御系统的设想；3 种 CRISPR/Cas 类型分子机制相继被发现
2010 年	-	II 型 CRISPR/Cas 可切割靶标 DNA
2011 年	-	Cas9 能体外切割 DNA，是 II 型 CRISPR/Cas 发挥防御功能所需的唯一 Cas 基因
2012 年	-	证实 CRISPR/Cas9 是 RNA 引导的 DNA 核酸内切酶，并在哺乳动物细胞完成基因编辑
2015 年	-	发现 Cas12a 和 Cas13a，补充 Cas9 不足

表 2 3 种基因编辑工具的比较

	CRISPR/Cas9	BE	PE
组成	Cas9 蛋白 sgRNA 供体 DNA	Cas9 (H840A) 与脱氨酶的融合蛋白 sgRNA	Cas9 (H840A) 与逆转录酶的融合蛋白 pegRNA 非靶标链导向 RNA(nsgRNA)
断链方式	DSB	SSB	SSB
编辑效率	适中	高	高
脱靶效率	高	低	低
应用于	基因敲除和敲入	单核苷酸转换	基因插入、缺失以及单核苷酸替换

通过空气传播导致母猪流产和各阶段猪只患急性肺炎等呼吸系统传染病，对全球养猪业造成严重经济损失^[38]。该病毒自 20 世纪 80 年代首次在美国发现后，如今已遍及世界各地，成为全球养猪行业所关注和重点防治的重要传染性疾病之一。尽管早在 1994 年就已经研究出疫苗接种预防技术，但由于存在无法区分患病猪只、预防不彻底、效果不均一等问题，还需要进一步研究新的抗病技术^[39]。Jay 等^[40]在 2007 年证实，PRRSV 侵入宿主细胞依赖巨噬细胞表面蛋白 CD163，其作为病毒细胞融合受体，可介导 PRRSV 通过内吞方式进入猪肺泡巨噬细胞。随后 Whitworth 等^[41-42]利用 CRISPR/Cas9 技术培育出 CD163 基因敲除猪。该研究表明，敲除 CD163 基因能够有效防止 PRRSV 感染，从而验证了 CD163 在 PRRSV 感染中发挥着重要作用。该研究同时还实现了 CD163 与 CD1D 双基因敲除，为利用基因编辑技术提高畜禽抗病能力和性状改良提供了示范。

尽管研究证明了敲除 CD163 具有防止 PRRSV 感染的能力，但仍需要对更多的基因型以及不同的毒株进行研究和佐证。Prather 等^[43]的研究进一步证实了其他细胞表面受体对病毒感染只起到辅助作用，CD163 是决定 PRRSV 感染的关键因素。2018 年，Burkard 等^[44]通过敲除受精卵 CD163 基因的第 7 个外显子，移除 SRCR5 结构域，培育出对 PRRSV 1 型具有完全抗性的 ΔSRCR5 猪。Yang 等^[45]利用 CRISPR/Cas9 和体细胞核移植 (Somatic Cell Nuclear Transfer, SCNT) 技术培育的 CD163 基因敲除猪对 HP-PRRSV TP 株具有完全抗性且不影响正常生物学功能。同年，Wells 等^[46]对 CD163 基因进行 3 种不同编辑处理，证实 CD163 是 PRRSV 1 型和 2 型病毒感染的关键受体，且部分敲除 CD163 即可表现抗感染能力，填补了 CD163 在不同类型 PRRSV 感染机制的研究空白。2020 年，Xu 等^[47]同时敲除 CD163 第 7 个外显子和 pAPN 第 2 个外显子

培育出能够抵抗 HP-PRRSV 2 型和传染性胃肠炎病毒 (Transmissible Gastroenteritis Virus, TGEV) 的双基因敲除 (Double Knockout, DKO) 猪，为培育多基因编辑品种提供了参考。2024 年，任吉龙^[48]利用 Cas12iMax 对编辑 ANPEP、CD163、MSTN 和 IGF2 等 4 个基因，培育出的基因编辑猪不仅改善了生长速率和肌肉品质，并对 PRRSV 和 TGEV 表现出抗性。当前利用基因编辑技术提高猪抵抗 PRRS 的相关研究已积累了大量成果，有望培育出具有抗蓝耳病的商品化猪品种。

2.2 猪瘟病毒 典型猪瘟 (Classical Swine Fever, CSF) 又称猪霍乱，是由猪瘟病毒 (Classical Swine Fever Virus, CSFV) 引起的一种可多向传播的具有高传染性的疾病。CSFV 是一种囊膜单链正义 RNA 病毒，共分为高毒力、中毒力和无毒毒株 3 种基因型，极易引起家猪和野猪的感染，导致免疫功能下降，继发肠道或呼吸道感染^[49-50]。针对 CSF 对全球猪养殖产业的严重影响，当前的防控策略主要包括系统性接种疫苗和扑灭。我国采用强制性接种疫苗的方式，实现疫苗覆盖率达到 90% 以上^[51]。2018 年 Xie 等^[49]使用 RNAi 和 CRISPR 技术将 shRNA 插入 Rosa26 位点培育的抗 CSFV 转基因猪在体内外攻毒中能够有效限制 CSFV 的复制，且抗病特性可遗传至 F₁ 代。RSAD2 基因的表达产物能够抑制 CSFV 的复制，基于这一研究培育出的 RSAD2 基因敲入 (RSAD2-KI) 猪表现出更强的抗 CSFV 感染能力^[52]。2022 年，Qi 等^[53]首次利用基因编辑技术建立 PCBP1 基因敲除细胞系，并利用 SCNT 得到 PCBP1 基因敲除 (PCBP1-KO) 猪，研究证明 PCBP1 基因能够影响 CSFV 感染的结合过程，该基因缺失会抑制 CSFV 的复制，PCBP1-KO 猪表现出抗 CSFV 能力。这些研究成果为通过基因编辑技术建立抗猪瘟猪新品系打下了良好基础。

2.3 非洲猪瘟 非洲猪瘟 (African Swine Fever, ASF)，

是由非洲猪瘟病毒 (African Swine Fever Virus, ASFV) 产生的一种高传染性疾病。ASFV 是一种复杂的双链 DNA 病毒, 具有 150 多个开放阅读框 (Open Reading Frame, ORF), 通常患病猪只的致死率将近 100%, 严重损害生猪行业的稳定发展^[54]。由于目前没有有效的预防治疗手段, 对 ASF 的防治仍主要采取扑杀策略。在抗性基因的研究中, *CD163* 的表达水平曾被认为与 ASFV 的感染能力密切相关, 但在后续研究中均表明 *CD163* 在 ASFV 感染过程中并不是必要条件, 推测 ASFV 的感染机制可能较为复杂, 需要深入探索^[55]。2022 年 Gao 等^[56] 研究证明了 *CD163* 和唾液酸结合免疫球蛋白样凝集素 1 (Sialic Acid-binding Immunoglobulin-like Lectin 1, *Siglec1*) 的表达与对 ASFV 的抗性密切相关, 并证明二者在 ASFV 感染中具有协同作用, 为研究 ASFV 的感染机制和疫苗打下了良好基础。2016 年研究人员^[57] 推测疣猪与家猪 *RELA* 基因的 3 个氨基酸差异与 ASFV 抵抗力相关, 并利用 ZFN 对猪 PK15 细胞进行编辑替换, 成功培育出了携带疣猪 *RELA* 单倍型的家猪, 研究显示基因编辑猪与野生型个体相比在临床、病理和病毒学相关参数上无显著差异, 仅表现延迟的临床症状和较低的病毒载量。

在疫苗研发方面, Vivian 等^[58] 删除分离株的 *MGF* 基因构建出 ASFV-G- Δ MGF 重组病毒, 接种 ASFV-G- Δ MGF 后猪只不表现疾病, 证明 *MGF* 基因能够作为 ASFV 毒力独立决定因素, 为研发 ASFV 疫苗提供了重要参考依据。2018 年 Borca 等^[59] 利用 CRISPR/Cas9 技术删除了 ASFV 基因组中与 *CD2* 结构部分相似的非必需基因 *8-DR*, 为疫苗的研究提供新思路。同年 Hübner 等^[60] 靶向 ASFV *p30* 基因的 CP204L 序列编辑野生猪肺细胞系 (Wild Boar Cell Line, WSL), 得到的 WSL-gRp30 细胞系能够抑制 ASFV 的复制, 降低了病毒量, 这对培养抗 ASFV 感染的猪只提供了新的方法。此外, 基于 CRISPR/Cas 技术还研发了快速检测 ASFV 工具, 例如基于 *Cas12a* 的现场快速检测系统 (*Cas12a*-based On-site and Rapid Detection System, CORDS) 技术, 能够实现在 1 h 内检测 ASFV 及其他病毒, 且无需仪器设备^[61]。当前 ASFV 感染机制仍未完全明确, 对主要受体及宿主因子的鉴定仍倍受关注。而 ASFV 感染机制的复杂性已成为基因编辑培育抗病猪的主要障碍。

2.4 伪狂犬病 伪狂犬病 (Pseudo Rabies, PR) 是由伪

狂犬病毒 (Pseud Rabies Virus, PRV) 感染导致的传染性疾病, PRV 是典型的具有包膜的疱疹病毒, 基因组线性 DNA 双链长度约为 140 kb, 包含多个可编码氨基酸链的 ORF^[62]。该病于 1902 年首次报道, 能够通过直接接触和间接接触感染绝大多数哺乳动物。当前的防治措施主要依赖于多种疫苗免疫, 例如 Bartha-K61 疫苗、TK 基因缺失疫苗和 *gE* 基因缺失疫苗等^[63]。2016 年 Liang 等^[64] 利用 CRISPR/Cas9 和 Cre/Lox 系统替换 PRV 的 TK 和 *gE* 毒力基因研发出一种新疫苗, 感染试验证明其具有抗 PRV 能力, 这也是首例利用基因编辑技术研发出 PR 疫苗。PRV 中的 *EP0* 和 *UL50* 基因对转录调控、病毒复制和毒力表达等方面具有重要作用。Xu 等^[65] 靶向 PRV *EP0* 和 *UL50* 基因在 PK15 细胞中实现对病毒基因的高效敲除, 为研发新的 PR 疫苗和了解病毒的增殖机制提供了思路。彭志园^[66] 对 PRV 高度保守的 *UL30* 基因进行编辑, 从而抑制了 PRV 的增殖。2017 年 Tang 等^[67] 设计了 75 个 sgRNA 来靶向 PRV 的不同位置, 研究表明大多数的 sgRNA 具有抑制 PRV 复制能力, 但单一 sgRNA 容易引发病毒逃逸, 多个 sgRNA 联合可以达到完全抑制复制的作用, 该研究采用的多 sgRNA 靶向策略也为抗 PRV 感染提供了新思路。Xie 等^[68] 利用 CRISPR/Cas9 技术在 ROSA26 位点插入 *RSAD2* 基因培育出 *RSAD2* 基因敲入 (*pRSAD2-KI*) 猪, 抗病试验表明其对 CSFV 和 PRV 具有显著的抑制效果。

2.5 猪流行性腹泻 猪流行性腹泻 (Porcine Epidemic Diarrhea, PED) 是以猪流行性腹泻病毒 (Porcine Epidemic Diarrhea Virus, PEDV) 为主要病原体所引起的高死亡率疾病。PEDV 属于正义单链 RNA 冠状病毒, 可引发猪只急性肠道疾病, 表现为呕吐、水样腹泻和脱水等症状, 其中新生仔猪致死率极高, 作为高致死率的传染性疾病严重损害全球养猪业。1971 年, PED 首次在英国育肥猪中被发现, 并被认定为急性传染性肠胃炎, 随后确认病原体为 PEDV, 陆续在各个国家和地区被发现并报道^[69]。核转运蛋白 Karyopherin α 2 (KPNA2) 参与增殖、分化、凋亡和宿主免疫等多种细胞活动^[70]。Gao 等^[71] 通过试验发现 KPNA2 在感染细胞中显著富集, 证明其与 PEDV 的复制过程有关, 且 KPNA2 可以通过与 PEDV 的 E 蛋白结合并降解病毒来达到抑制 PEDV 复制的作用。进一步研究表明, 过表达 KPNA2 基因可以抑制 PEDV 的复制, 而敲除 KPNA2

则相反。氨肽酶 N (Aminopeptidase-N, APN) 在哺乳动物的肠上皮组织细胞中广泛分布并参与多种生物调控过程, 很多研究将其作为治疗相关疾病的靶点^[72]。2019年, 罗磊^[73]利用 CRISPR/Cas9n 系统编辑猪胎儿成纤维细胞 APN 基因得到 APN 基因编辑仔猪, 发现 APN 对 PEDV 感染是非必需的, 但为 TGEV 的主要受体。Liu 等^[74]继续对 APN 进行研究, 进一步证明其对 TGEV 感染具有重要调控作用, 对 PEDV 无显著影响。同年, 梅彦等^[75]利用 CRISPR/Cas13b 系统对 PEDV 的 *polII* 基因和 S 基因设计 CRISPR RNA (crRNA) 位点, 构建打靶质粒 U6-crRNA (1-4), 研究发现打靶质粒转染的细胞病毒增殖水平显著降低, 为防控 PED 和制备动物模型提供了新的思路。

2.6 乳腺炎 哺乳动物的乳腺炎 (Mastitis) 是在实际生产中最常见的疾病之一, 通常分为临床乳腺炎和亚临床乳腺炎 (又称为隐性乳腺炎), 主要由病原菌感染导致, 常见病原菌包括金黄色葡萄球菌、乳房链球菌和大肠杆菌等^[76]。患乳腺炎会导致泌乳量和奶品质降低, 影响畜禽健康的同时, 还会危害人类食品安全健康。研究发现奶牛的 *TLR4* 基因外显子 1760 C>T 突变位点具有一定生物学效应, 可作为研究抗乳腺炎的位点^[77]。Shandilya 等^[78]利用 CRISPR/Cas9 敲除牛乳腺上皮细胞的 *TLR4* 基因, 证明该基因对大肠杆菌和分枝杆菌感染的细胞具有不同作用, 能够降低大肠杆菌的炎症反应。溶葡萄球菌素 (Lysostaphin)、人类 β -防御素 3 (Human Beta-Defensin-3, HBD3)、人溶菌酶 (Human Lysozyme, hLZ) 和干扰素- γ (IFN- γ) 是具有显著抗菌活性的分子, 它们在对抗乳腺炎方面展现出巨大的潜力。2006 年研究发现表达 hLZ 的转基因山羊乳汁体细胞数显著低于非转基因山羊, 产量与成分无显著差异, 表明 hLZ 可以作为乳腺炎的防治途径^[79]。随后 Liu 等^[80]将 hLZ 基因整合到牛胎儿成纤维细胞的 β -酪蛋白 (Beta-casein, CSN2) 基因座培养出转基因克隆牛, 其牛奶对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌和无乳链球菌表现抗菌活性, 证实 hLZ 提高了奶牛对乳腺炎的抵抗力。Liu 等^[81-82]相继利用 ZFN 技术将 lysostaphin 基因插入到 CSN2 基因座中, 获得抗金葡菌感染的转基因牛, 并检测到具有生物活性的溶葡萄球菌素蛋白, 通过将 HBD3 基因与 CSN2 基因启动子连接导入山羊基因组中, 结果证明 HBD3 在乳中表达并抑制大肠杆菌和金葡

菌。2016 年中国农业大学研究团队^[83]培育出牛奶中高效表达重组人溶菌酶 rhLZ 的转基因克隆牛, 为乳腺炎防控以及规避抗生素抗性基因风险提供了可靠的动物模型。Liu 等^[84]将 IFN- γ 基因导入山羊的乳腺上皮细胞中, 证实 IFN- γ 可以直接或间接杀伤细菌达到抗菌效果, 尤其能够抑制金葡菌和大肠杆菌的增殖。2024 年任吉龙^[48]利用 Cas12iMax 编辑牛的 *MSTN*、*PRNP* 和 *CD18* 基因, 培育出 3 基因编辑牛胚胎, 并证明了其具有发育潜力。同年, Feng 等^[85]利用 ISDra2-TnpB 系统将炎症调节序列 IRS 靶向整合到溶菌酶 *LYZ* 基因上, 获得具有显著抗乳腺炎能力的基因编辑奶山羊。

2.7 牛结核病 牛结核病 (Bovine Tuberculosis, bTB) 主要由牛分枝杆菌引起, 是一种常见的牛慢性传染病和人畜共患病, 对全球的养牛产业和人类健康都具有严重的威胁^[86]。研究发现在小鼠中 SP110 可抑制结核分枝杆菌, 基于此研究人员利用 TALEN 将 *SP110* 敲入牛基因组获得转基因牛, 试验表明转基因牛对牛分枝杆菌具有较强的抵抗力且抗病能力可遗传, 为基因编辑治疗结核病打下了基础^[87]。过表达自然抗性相关巨噬细胞蛋白-1 (Natural Resistance-associated Macrophage Protein, *NRAMP1*) 可以增强牛对结核病的抵抗力, Gao 等^[88]利用 Cas9n 技术将 *NRAMP1* 基因整合到牛胎儿成纤维细胞基因组, 通过核移植获得的转基因牛在感染分枝杆菌后表现出较强的抗菌能力。Yuan 等^[89]采用同源臂介导的末端接合 (Homology-Mediated End Joining, HMEJ) 技术, 克服传统基因编辑技术插入效率较低的问题, 构建含有 *NRAMP1* 基因及其启动子的靶向载体, 培育出过表达 *NRAMP1* 基因的基因编辑牛, 表现出更强的抗结核病能力, 既证实了 HMEJ 的功效, 也进一步证明了 *NRAMP1* 是抗结核病的功能基因。

2.8 口蹄疫 口蹄疫 (Foot-and-mouth Disease, FMD) 是由口蹄疫病毒 (Foot-and-mouth Disease Virus, FMDV) 引起的急性高传染性疾病, 偶蹄动物易感, 发病率和死亡率高, 给全球的畜牧业造成了严重的经济损失。FMDV 属于单股正链 RNA 病毒, 能够在自然环境下长期存活并不受季节影响, 根据血清型主要分为 O、A、C、Asia1、SAT1、SAT2 和 SAT3 等 7 种类型, 其中 O 型是全球分布范围最广泛的一类^[90]。在疫苗研究方面, Carr 等^[91]通过注射 CD4 单克隆抗体和商业灭活 FMDV 疫苗接种, 揭示了 CD4⁺ T 细胞对机体抵抗

FMDV 感染、提高免疫能力的重要性,对研发和改进商业疫苗具有重要作用。此外,Michael 等^[92]比较接种重组 FMDV A 型疫苗与未接种的荷斯坦公牛血液指标,证明疫苗可预防临床疾病和刺激免疫反应,但不能完全预防 FMDV 感染。近年以来,CRISPR/Cas 技术在 FMD 防治的研究中应用增多,中国农科院兰州兽医研究所发现, *TPL2* 基因能够参与多种信号蛋白的调控与免疫反应^[93]。对敲除 *TPL2* 基因的 PK-15 细胞系进行攻毒,其表现出更高的病毒复制水平和病毒滴度增加,证明敲除 *TPL2* 基因会抑制干扰素信号通路的表达,促进病毒的复制,为利用基因编辑技术作为动物疾病治疗和疫苗研发工具以促进家畜抗病的研究提供支撑。后续该团队相继研究了 *KLHL34* 编码蛋白、*RAB20* 蛋白、*CDGSH* 含铁硫结构域蛋白 2 (*CDGSH Iron-sulfur Domain 2*, *CISD2*)、*TRIM3* 蛋白、管腔结构域样膜相关蛋白 1 (*LULL1*) 和白三烯 A4 水解酶 (*Leukotriene A4 Hydrolase*, *LTA4H*),发现 *KLHL34*、*RAB20*、*TRIM3* 和 *LULL1* 基因均参与细胞增殖活动和细胞内多重调控过程, *CISD2* 参与并调控线粒体的表达,而 *KLHL34* 和 *LTA4H* 可能与 FMDV 的病毒蛋白存在互作关系进而调控其复制^[94-99]。基于上述研究,研究团队分别构建 *KLHL34*、*RAB20*、*CISD2* 和 *LTA4H* 基因敲除 PK-15 细胞系以及 *TRIM3* 和 *LULL1* 基因敲除和过表达细胞系,通过试验证实了 *KLHL34*、*RAB20* 和 *CISD2* 基因的表达具有抑制 FMDV 复制的作用, *LTA4H*、*TRIM3* 和 *LULL1* 基因缺失同样能够抑制 FMDV 的复制,且进一步证实了 *TRIM3* 和 *LULL1* 基因过表达会促进 FMDV 复制,为深入研究 FMDV 复制机制的调控和利用基因敲除技术研发 FMDV 疫苗提供参考。

3 小结与展望

随着基因编辑技术的快速发展,其在家畜抗病育种领域的应用已取得了诸多突破性进展,为解决传统育种方法难以攻克的难题提供了全新思路。从早期的 ZFN 到 TALEN,再到如今广泛应用的 CRISPR/Cas 系统和单碱基编辑技术,新兴基因编辑技术不断迭代升级,其精准性和效率得到大幅提升,为畜禽抗病育种带来了前所未有的机遇。

尽管基因编辑技术在畜禽抗病育种中展现出巨大潜力,但仍面临诸多挑战。当前困扰基因编辑技术发展和

应用的最大阻碍就是基因的脱靶问题,任何一个微小的改变都可能影响基因功能的改变甚至引发疾病,对于基因编辑的安全性和脱靶效应仍需进一步评估,以确保基因编辑后的动物在长期生产中不会产生不可预测的负面影响。其次,虽然基因编辑技术拓展了人类改造生物遗传结构的能力,实现对任何位点的基因都可以进行敲除、插入和转换操作,但单碱基编辑技术的编辑效率依旧很低,而 CRISPR/Cas9 编辑则存在一定细胞毒性且需要产生 DSB 继续编辑,存在脱靶风险。应充分认识到当前基因编辑技术存在的不足,并在此基础上对现有技术继续进行完善和改进,探索和研发更为安全、高效的基因编辑工具。另外,基因编辑技术在不同物种和不同疾病中的应用效果存在较大差异,在家畜抗病育种方面研究较少,尚需要更多研究加以完善和优化。与此同时,基因编辑技术的应用还伴随着生物安全与监管的完善优化。由于全球各国的监管模式差异显著,不仅阻碍了产品流通,也埋下了生物安全与监管的隐患。此外,基因编辑技术本身存在的潜在风险以及打破自然进化规律所引发的伦理争议和生态影响,都需要谨慎应对。

针对上述问题,未来的研究可以通过继续优化编辑技术、优化试验流程和改造编辑工具并结合人工智能和大数据算法来进一步降低脱靶效率、拓宽技术应用范围以及提高编辑精度和稳定性。与此同时,必须加快推进监管体系建设与法律法规修订,在积极推动基因编辑技术的研究与应用的同时,强化公众认识,理清伦理边界,切实保障生物安全。

总体而言,基因编辑技术在畜禽抗病育种中的应用前景广阔。随着技术的不断进步,基因编辑的精准性和效率将进一步提高,有望实现复杂性状的改良。通过基因组学、转录组学、蛋白质组学、代谢组学等多组学技术,还可以更全面地揭示基因编辑对动物机体的影响,从而开发出更安全、更有效的基因编辑策略。

参考文献:

- [1] Morgan A L K, Woolhouse M E J, Wagenaar J A, et al. Modelling the effects of antibiotic usage in livestock on human salmonellosis[J]. One Health, 2023, 17: 100639.
- [2] 王丹萍,李尚民,赵华轩,等. 畜禽养殖环境抗生素抗性基因污染研究进展[J]. 家畜生态学报, 2023, 44(8): 1-7.
- [3] Tian M, He X M, Feng Y Z, et al. Pollution by antibiotics and antimicrobial resistance in livestock and poultry manure in China, and countermeasures[J]. Antibiotics (Basel), 2021, 10(5): 539.

- [4] Gonen S, Jenko J, Gorjanc G, *et al.* Potential of gene drives with genome editing to increase genetic gain in livestock breeding programs[J]. *Genet Sel Evol*, 2017, 49(1): 3.
- [5] Scherer S, Davis R W. Replacement of chromosome segments with altered DNA sequences constructed in vitro[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1979, 76(10): 4951-4955.
- [6] Thomas K R, Capecchi M R. Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells[J]. *Cell*, 1987, 51(3): 503-512.
- [7] Capecchi M R. Altering the genome by homologous recombination[J]. *Science*, 1989, 244(4910): 1288-1292.
- [8] Jasin M. Genetic manipulation of genomes with rare-cutting endonucleases[J]. *Trends Genet*, 1996, 12(6): 224-228.
- [9] Urnov F D, Rebar E J, Holmes M C, *et al.* Genome editing with engineered zinc finger nucleases[J]. *Nat Rev Genet*, 2010, 11(9): 636-646.
- [10] Miller J, McLachlan A D, Klug A. Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from *Xenopus* oocytes[J]. *EMBO J*, 1985, 4(6): 1609-1614.
- [11] 肖安, 胡莹莹, 王唯晔, 等. 人工锌指核酸酶介导的基因组定点修饰技术 [J]. *遗传*, 2011, 33(7): 3-21.
- [12] Kim Y G, Cha J, Chandrasegaran S. Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996, 93(3): 1156-1160.
- [13] Cui X X, Ji D, Fisher D A, *et al.* Targeted integration in rat and mouse embryos with zinc-finger nucleases[J]. *Nat Biotechnol*, 2011, 29(1): 64-67.
- [14] Römer P, Hahn S, Jordan T, *et al.* Plant pathogen recognition mediated by promoter activation of the pepper Bs3 resistance gene[J]. *Science*, 2007, 318(5850): 645-648.
- [15] Boch J, Bonas U. Xanthomonas AvrBs3 family-type III effectors: discovery and function[J]. *Annu Rev Phytopathol*, 2010, 48: 419-436.
- [16] Joung J K, Sander J D. TALENs: a widely applicable technology for targeted genome editing[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2013, 14(1): 49-55.
- [17] Lee J M, Kim U, Yang H, *et al.* TALEN-mediated generation of Nkx3.1 knockout rat model[J]. *Prostate*, 2021 81(3): 182-193.
- [18] Ge H T, Cui C C, Liu J, *et al.* The growth and reproduction performance of TALEN-mediated β -lactoglobulin-knockout bucks[J]. *Transgenic Res*, 2016, 25(5): 721-729.
- [19] Yang H Q, Wu Z F. Genome editing of pigs for agriculture and biomedicine[J]. *Front Genet*, 2018, 9: 360.
- [20] Doudna J A, Charpentier E. Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9[J]. *Science*, 2014, 346(6213): 1258096.
- [21] Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, *et al.* Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product[J]. *J Bacteriol*, 1987, 169(12): 5429-5433.
- [22] Makarova K S, Aravind L, Grishin N V, *et al.* A DNA repair system specific for thermophilic Archaea and bacteria predicted by genomic context analysis[J]. *Nucleic Acids Res*, 2002, 30(2): 482-496.
- [23] Guy C P, Majerník A I, Chong J P, *et al.* A novel nuclease-ATPase (Nar71) from archaea is part of a proposed thermophilic DNA repair system[J]. *Nucleic Acids Res*, 2004, 32(21): 6176-6186.
- [24] Mojica F J, Díez-Villaseñor C, Soria E, *et al.* Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria[J]. *Mol Microbiol*, 2000, 36(1): 244-246.
- [25] Jansen R, Embden J D, Gaastra W, *et al.* Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes[J]. *Mol Microbiol*, 2002, 43(6): 1565-1575.
- [26] Bolotin A, Quinquis B, Sorokin A, *et al.* Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin[J]. *Microbiology (Reading)*, 2005, 151(Pt 8): 2551-2561.
- [27] Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, *et al.* CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes[J]. *Science*, 2007, 315(5819): 1709-1712.
- [28] Makarova K S, Grishin N V, Shabalina S A, *et al.* A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action[J]. *Biol Direct*, 2006, 1: 7.
- [29] Makarova K S, Haft D H, Barrangou R, *et al.* Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2011, 9(6): 467-477.
- [30] Sapranaukas R, Gasiunas G, Fremaux C, *et al.* The *Streptococcus thermophilus* CRISPR/Cas system provides immunity in *Escherichia coli*[J]. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39(21): 9275-9282.
- [31] Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, *et al.* A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity[J]. *Science*, 2012, 337(6096): 816-821.
- [32] Cong L, Ran F A, Cox D, *et al.* Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems[J]. *Science*, 2013, 339: 819-823.
- [33] Zetsche B, Gootenberg J S, Abudayyeh O O, *et al.* Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system[J]. *Cell*, 2015, 163(3): 759-771.
- [34] Abudayyeh O O, Gootenberg J S, Konermann S, *et al.* C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector[J]. *Science*, 2016, 353(6299): aaf5573.
- [35] Komor A C, Kim Y B, Packer M S, *et al.* Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage[J]. *Nature*, 2016, 533(7603): 420-424.
- [36] Gaudelli N M, Komor A C, Rees H A, *et al.* Programmable base editing of A·T to G·C in genomic DNA without DNA cleavage[J]. *Nature*, 2017, 551(7681): 464-471.
- [37] Anzalone A V, Randolph P B, Davis J R, *et al.* Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA[J]. *Nature*, 2019, 576(7785): 149-157.
- [38] Meulenberg J J. PRRSV, the virus[J]. *Vet Res*, 2000, 31(1): 11-21.

- [39] Rowland R R R, Lunney J K. Alternative strategies for the control and elimination of PRRS[J]. *Vet Microbiol*, 2017, 209: 1-4.
- [40] Jay G C, David E S, Shelly L S, *et al*. CD163 expression confers susceptibility to porcine reproductive and respiratory syndrome viruses[J]. *J Virol*, 2007, 81(14): 7371-7379.
- [41] Whitworth K M, Rowland R R, Ewen C L, *et al*. Gene-edited pigs are protected from porcine reproductive and respiratory syndrome virus[J]. *Nat Biotechnol*, 2016, 34(1): 20-22.
- [42] Whitworth K M, Lee K, Benne J A, *et al*. Use of the CRISPR/Cas9 system to produce genetically engineered pigs from in vitro-derived oocytes and embryos[J]. *Biol Reprod*, 2014, 91(3): 78.
- [43] Prather R S, Whitworth K M, Schommer S K, *et al*. Genetic engineering alveolar macrophages for host resistance to PRRSV[J]. *Vet Microbiol*, 2017, 209: 124-129.
- [44] Burkard C, Opriessnig T, Mileham A J, *et al*. Pigs lacking the scavenger receptor cysteine-rich domain 5 of CD163 are resistant to porcine reproductive and respiratory syndrome virus 1 infection[J]. *J Virol*, 2018, 92(16): e00415-418.
- [45] Yang H Q, Zhang J, Zhang X W, *et al*. CD163 knockout pigs are fully resistant to highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus[J]. *Antiviral Res*, 2018, 151: 63-70.
- [46] Wells K D, Bardot R, Whitworth K M, *et al*. Replacement of porcine CD163 scavenger receptor cysteine-rich domain 5 with a CD163-Like homolog confers resistance of pigs to genotype 1 but not genotype 2 porcine reproductive and respiratory syndrome virus[J]. *J Virol*, 2017, 91(2): e01521-16.
- [47] Xu K, Zhou Y R, Mu Y L, *et al*. 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.
- [48] 任吉龙. 应用 Cas12iMax 进行多基因编辑提高家畜肌肉产量及抗病能力的研究 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2023.
- [49] Xie Z C, Pang D X, Yuan H M, *et al*. Genetically modified pigs are protected from classical swine fever virus[J]. *PLoS Pathog*, 2018, 14(12): e1007193.
- [50] Leifer I, Hoepfer D, Blome S, *et al*. Clustering of classical swine fever virus isolates by codon pair bias[J]. *BMC Res Notes*, 2011, 4: 521.
- [51] Ji W, Guo Z, Ding N Z, *et al*. Studying classical swine fever virus: making the best of a bad virus[J]. *Virus Res*, 2015, 197: 35-47.
- [52] Xie Z C, Jiao H P, Xiao H N, *et al*. Generation of pRSAD2 gene knock-in pig via CRISPR/Cas9 technology[J]. *Antiviral Res*, 2020, 174: 104696.
- [53] Qi C Y, Pang D X, Yang K, *et al*. Generation of PCBP1-deficient pigs using CRISPR/Cas9-mediated gene editing[J]. *iScience*, 2022, 25(10): 105268.
- [54] Li Z Y, Chen W X, Qiu Z, *et al*. African swine fever virus: a review[J]. *Life (Basel)*, 2022, 12(8): 1255.
- [55] Popescu L, Gaudreault N N, Whitworth K M, *et al*. Genetically edited pigs lacking CD163 show no resistance following infection with the African swine fever virus isolate, Georgia 2007/1[J]. *Virology*, 2017, 501: 102-106.
- [56] Gao Q, Yang Y L, Luo Y Z, *et al*. Adaptation of African swine fever virus to porcine kidney cells stably expressing CD163 and Siglec1[J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 1015224.
- [57] McCleary S, Strong R, McCarthy R R, *et al*. Substitution of warthog NF- κ B motifs into RELA of domestic pigs is not sufficient to confer resilience to African swine fever virus[J]. *Sci Rep*, 2020, 10: 8951.
- [58] O'Donnell V, Holinka L G, Gladue D P, *et al*. African swine fever virus georgia isolate harboring deletions of MGF360 and MGF505 genes is attenuated in swine and confers protection against challenge with virulent parental virus[J]. *J Virol*, 2015, 89(11): 6048-6056.
- [59] Borca M V, Holinka L G, Berggren K A, *et al*. CRISPR-Cas9, a tool to efficiently increase the development of recombinant African swine fever viruses[J]. *Sci Rep*, 2018, 8: 3154.
- [60] Hübner A, Petersen B, Keil G M, *et al*. Efficient inhibition of African swine fever virus replication by CRISPR/Cas9 targeting of the viral p30 gene (CP204L)[J]. *Sci Rep*, 2018, 8: 1449.
- [61] Bai J, Lin H S, Li H J, *et al*. Cas12a-based on-site and rapid nucleic acid detection of African swine fever[J]. *Front Microbiol*, 2019, 10: 2830.
- [62] 孙秀秀. 猪伪狂犬病脑炎中小胶质细胞的作用机制及净化区猪场病毒的检测研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2024.
- [63] 廖筱萍, 姜高明. 伪狂犬病新型疫苗研究进展 [J]. *微生物学通报*, 2002(6): 76-81.
- [64] Liang X, Sun L Q, Yu T, *et al*. A CRISPR/Cas9 and Cre/Lox system-based express vaccine development strategy against re-emerging Pseudorabies virus[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 19176.
- [65] Xu A T, Qin C, Lang Y, *et al*. A simple and rapid approach to manipulate pseudorabies virus genome by CRISPR/Cas9 system[J]. *Biotechnol Lett*, 2015, 37: 1265-1272.
- [66] 彭志国. CRISPR/Cas9 系统抑制猪伪狂犬病毒增殖的体外研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2017.
- [67] Tang Y D, Liu J T, Wang T Y, *et al*. CRISPR/Cas9-mediated multiple single guide RNAs potentially abrogate pseudorabies virus replication[J]. *Arch Virol*, 2017, 162: 3881-3886.
- [68] Zhou X Q, Xin J G, Fan N N, *et al*. Generation of CRISPR/Cas9-mediated gene-targeted pigs via somatic cell nuclear transfer[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2015, 72(6): 1175-1184.
- [69] Pensaert M B, de Bouck P. A new coronavirus-like particle associated with diarrhea in swine[J]. *Arch Virol*, 1978, 58(3): 243-247.
- [70] Park S H, Ham S, Lee A, *et al*. NLRP3 negatively regulates Treg differentiation through Kpna2-mediated nuclear translocation[J]. *J Biol Chem*, 2019, 294(47): 17951-17961.
- [71] Gao Q, Weng Z J, Feng Y Z, *et al*. KPNA2 suppresses porcine epidemic diarrhea virus replication by targeting and degrading virus envelope protein through selective autophagy[J]. *J Virol*, 2023, 97(12): e0011523.
- [72] Carl-McGrath S, Lendeckel U, Ebert M, *et al*. Ecto-peptidases in

- tumour biology: a review[J]. *Histol Histopathol*, 2006, 21(12): 1339-1353.
- [73] 罗磊. APN 基因编辑猪生产及其对 TGEV 和 PEDV 抗性的研究 [D]. 合肥: 安徽农业大学, 2019.
- [74] Liu Z Y, Zhang M J, Huang P X, *et al.* Generation of APN-chimeric gene-edited pigs by CRISPR/Cas9-mediated knock-in strategy[J]. *Gene*, 2023, 851: 147007.
- [75] 梅彦, 杨化强, 吴珍芳. CRISPR/Cas13b 系统对猪流行性腹泻病毒增殖的抑制作用 [J]. *华南农业大学学报*, 2019, 40(6): 1-7.
- [76] Sharun K, Dhama K, Tiwari R, *et al.* Advances in therapeutic and management approaches of bovine mastitis: a comprehensive review[J]. *Vet Q*, 2021, 41(1): 107-136.
- [77] 陈仁金, 王珍珍, 杨章平, 等. 中国荷斯坦牛 Toll 样受体 4 基因的遗传多态性与体细胞评分的关联分析 [J]. *中国畜牧兽医*, 2013, 40(11): 134-138.
- [78] Shandilya U K, Sharma A, Mallikarjunappa S, *et al.* CRISPR-Cas9-mediated knockout of TLR4 modulates *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* cell lysate-induced inflammation in bovine mammary epithelial cells[J]. *J Dairy Sci*, 2021, 104(10): 11135-11146.
- [79] Maga E A, Shoemaker C F, Rowe J D, *et al.* Production and processing of milk from transgenic goats expressing human lysozyme in the mammary gland[J]. *J Dairy Sci*, 2006, 89(2): 518-524.
- [80] Liu X, Wang Y S, Tian Y C, *et al.* Generation of mastitis resistance in cows by targeting human lysozyme gene to β -casein locus using zinc-finger nucleases[J]. *Proc Biol Sci*, 2014, 281(1780): 20133368.
- [81] Liu X, Wang Y S, Guo W J, *et al.* Zinc-finger nickase-mediated insertion of the lysostaphin gene into the beta-casein locus in cloned cows[J]. *Nat Commun*, 2013, 4: 2565.
- [82] Liu J, Luo Y, Ge H T, *et al.* Anti-bacterial activity of recombinant human β -defensin-3 secreted in the milk of transgenic goats produced by somatic cell nuclear transfer[J]. *PLoS One*, 2013, 8(6): e65379.
- [83] Lu D, Liu S, Ding F R, *et al.* Large-scale production of functional human lysozyme from marker-free transgenic cloned cows[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 22947.
- [84] Liu Y, Zhang H Y, Dong S S, *et al.* Secretion of IFN- γ by transgenic mammary epithelial cells in vitro reduced mastitis infection risk in goats[J]. *Front Vet Sci*, 2022, 9: 898635.
- [85] Feng R, Zhao J L, Zhang Q, *et al.* Generation of anti-mastitis gene-edited dairy goats with enhancing lysozyme expression by inflammatory regulatory sequence using ISDra2-TnpB system[J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2024, 11(38): e2404408.
- [86] Borham M, Oreiby A, El-Gedawy A, *et al.* Review on bovine tuberculosis: an emerging disease associated with multidrug-resistant mycobacterium species[J]. *Pathogens*, 2022, 11(7): 715.
- [87] Wu H B, Wang Y S, Zhang Y, *et al.* TALE nickase-mediated SP110 knockin endows cattle with increased resistance to tuberculosis[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015, 112(13): E1530-E1539.
- [88] Gao Y P, Wu H B, Wang Y S, *et al.* Single Cas9 nickase induced generation of NRAMP1 knockin cattle with reduced off-target effects[J]. *Genome Biol*, 2017, 18(1): 13.
- [89] Yuan M K, Zhang J C, Gao Y P, *et al.* HMEJ-based safe-harbor genome editing enables efficient generation of cattle with increased resistance to tuberculosis[J]. *J Biol Chem*, 2021, 296: 100497.
- [90] Knowles N J, Samuel A R. Molecular epidemiology of foot-and-mouth disease virus[J]. *Virus Res*, 2003, 91(1): 65-80.
- [91] Carr B V, Lefevre E A, Windsor M A, *et al.* CD4⁺ T-cell responses to foot-and-mouth disease virus in vaccinated cattle [J]. *J Gen Virol*, 2013, 94(Pt 1): 97-107.
- [92] Eschbaumer M, Stenfeldt C, Rekant S I, *et al.* Systemic immune response and virus persistence after foot-and-mouth disease virus infection of naïve cattle and cattle vaccinated with a homologous adenovirus-vectored vaccine[J]. *BMC Vet Res*, 2016, 12: 205.
- [93] 闫鸣昊, 郝军红, 张大俊, 等. PK-15 细胞的 *TPL2* 基因敲除有利于口蹄疫病毒和塞内卡病毒复制 [J]. *畜牧兽医学报*, 2020, 51(5): 1060-1073.
- [94] 冉乾东, 杨帆, 张伟, 等. CRISPR/Cas9 介导的 *KLHL34* 基因敲除细胞系的建立及其应用 [J]. *中国兽医科学*, 2023, 53(7): 851-857.
- [95] 蔡建涛, 张伟, 陈治彤, 等. *RAB20* 基因敲除 PK-15 细胞系的构建及其对口蹄疫病毒复制的影响 [J]. *中国兽医科学*, 2025, 55(7): 853-861.
- [96] 陈治彤, 张伟, 蔡建涛, 等. *CISD2* 敲除细胞系的构建及其对口蹄疫病毒复制的影响 [J]. *中国兽医科学*, 2025, 55(7): 862-869.
- [97] 裴丹诗, 范许许, 朱兆宇, 等. CRISPR-Cas9 介导的 *TRIM3* 基因敲除细胞系的建立及其应用 [J]. *中国兽医科学*, 2025, 55(6): 725-731.
- [98] 王一卓, 范许许, 朱兆宇, 等. *LULL1* 基因敲除或过表达 PK-15 细胞系的构建及其对口蹄疫病毒复制的影响 [J]. *中国兽医科学*, 2025, 55(6): 711-718.
- [99] 王家丽, 蒲秀瑛, 杨帆, 等. 敲除 *LTA4H* 基因的 PK-15 细胞系构建及其对口蹄疫病毒复制的影响 [J]. *微生物学报*, 2024, 64(3): 733-744.

Application of Gene Editing Technologies in Disease Resistance Breeding of Livestock

XING Wenhui^{1,2}, ZHOU Menghan^{1,2}, QIAN Shiyu^{1,2}, WU Jiahui^{1,2}, LI Yuanyuan^{1,2}, ZHAO Chunjian^{1,2*}

(1. College of Animal Science and Technology, China Agricultural University, Beijing 100193, China;

2. Equine Center of China Agricultural University, Beijing 100193, China)

犬猫肠道菌群特点及益生菌对肠道菌群的调控研究进展

张美婷¹, 牛玉¹, 王国明², 康佳¹, 王润羽¹, 陈广勇², 杨彩梅^{1*}

(1. 浙江农林大学动物科技学院·动物医学院, 浙江杭州 311300;

2. 浙江惠嘉生物科技股份有限公司, 浙江湖州 311300)

摘要: 肠道菌群在调节动物免疫功能、营养物质代谢和消化吸收中发挥着重要作用, 影响着肠道稳态和宿主健康。近年来, 益生菌作为一种安全且有效的微生态制剂广泛应用于调节犬猫肠道平衡, 维护犬猫健康。然而, 益生菌的作用效果受菌株特异性、宿主差异性等因素影响, 其具体机制仍需进一步研究。目前, 犬猫的肠道菌群研究处于起步阶段, 本文就犬猫肠道菌群的特点、肠道菌群对营养物质代谢与宿主健康的影响、及益生菌对犬猫肠道菌群的调控作用进行了综述, 旨在为改善犬猫肠道健康及促进功能性宠物食品开发提供理论依据。

关键词: 犬猫; 肠道菌群; 益生菌

中图分类号: S829

文献标识码: A

DOI 编号: 10.19556/j.0258-7033.20250221-07

随着社会进步和生活水平的提高, 犬和猫作为家庭成员之一, 其健康尤其是肠道健康越来越受到关注。有研究表明, 肠道菌群失调与犬猫多种疾病相关^[1]。犬猫的肠道菌群与其他哺乳动物相似, 具有调节免疫、改善营养物质代谢、影响神经信号等功能, 在犬猫健康中发挥重要作用^[2]。研究表明, 犬猫肠道菌群主要由厚壁菌门、拟杆菌门、变形菌门和放线菌门等组成, 各菌群的

相对丰度存在差异^[3]。与人类肠道菌群研究相比, 犬猫的肠道菌群和营养调控方法研究还处于起步阶段。

益生菌作为对宿主健康有益处的活性微生物, 主要通过调节肠道菌群平衡、增强肠道屏障、调节免疫反应等途径, 在改善犬猫肠道健康中发挥重要作用。然而, 犬猫本源益生菌的特性, 益生菌在犬猫应用上的适宜剂量及作用机制研究较少。本文综述了犬猫肠道菌群的特点及其与健康的关系, 并探讨益生菌对犬猫肠道菌群的调控机制, 为益生菌在犬猫中的合理应用提供理论依据。

1 犬猫肠道菌群的特点

相比于牛羊等草食动物, 犬猫的肠道较短但肠壁较

收稿日期: 2025-02-21; 修回日期: 2025-03-15

资助项目: 国家重点研发计划 (2023YFD1302800)

作者简介: 张美婷 (2000-), 女, 浙江宁波人, 硕士, 主要从事宠物肠道健康调控方面的研究, E-mail: Mittyours@163.com

* 通信作者: 杨彩梅 (1973-), 女, 湖北天门人, 博士, 教授, 主要从事动物营养与饲料科学方面的研究, E-mail: yangcaimei2012@163.com

Abstract: With the development of modern animal husbandry, the intensive livestock farming improves the efficiency of rearing, but at the meantime increases the risk of transmission of infectious diseases, which has a serious impact on animal husbandry and human health. Traditional drug treatment and breeding methods have limitations in dealing with the diseases, and it is difficult to solve the problem at the root. The development and application of gene editing technologies provides a new strategy for disease resistance breeding of livestock and poultry. This article reviews the development of gene editing technologies and their application in disease resistance breeding of major livestock such as pigs, cattle and sheep, focusing on the application of gene editing technologies in the prevention and control of important infectious diseases such as porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS), swine fever (CSF), African swine fever (ASF), bovine mastitis and tuberculosis (bTB). It is expected to provide a reference for the further research and disease resistance breeding in this field.

Keywords: Gene editing; Breeding for disease resistance; Infectious diseases; Viruses; Immunity

(责任编辑: 石丽丹)