



华中农业大学

HUZHONG AGRICULTURAL UNIVERSITY

动物科学技术学院 | 动物医学院

“纪念中国改革开放养猪40年庆典暨学术研讨会”

猪遗传育种技术进展—— 40年来分子生物学技术的重要成果

赵书红

shzhao@mail.hzau.edu.cn

华中农业大学



提 纲

- 40年来分子生物学技术的发展
- 基于标记的猪分子育种技术
- 转基因与基因编辑的应用
- 展望

一、40年来分子生物学技术的发展

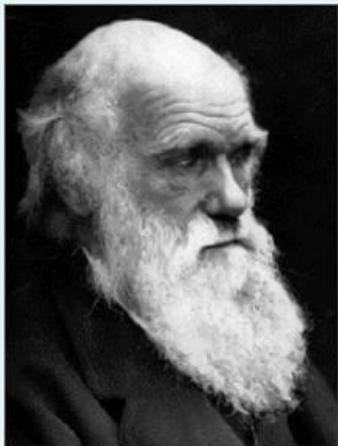


——人类对生命现象的认识

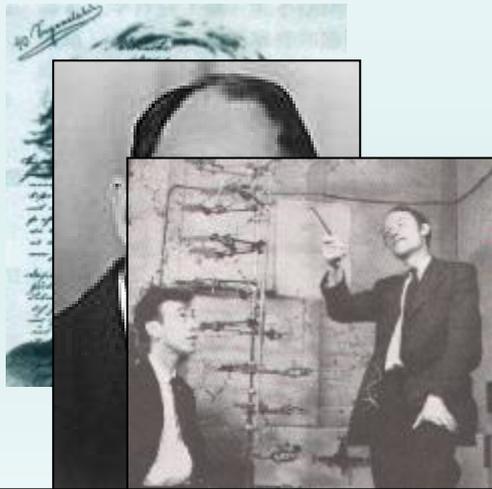
创造论
Creationism



进化论
Evolutionism



还原论
Reductionism



整体论
Holism

Genomics

Systems
Biology

一、40年来分子生物学技术的发展

限制性核酸内切酶的发现与应用 (1967-1970)

The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1978



诞生基因工程的1973年，中国还在“文革”期间，当时国内知道分子生物学和基因工程的人少而又少。改革开放后，第一批国家派到美国学习自然科学的两位生物学者，一位来自教学最优单位北京大学、一位来自研究最优单位中国科学院上海生物化学研究所，对分子生物学和基因工程的基本词汇都不理解，在1979年还在琢磨“限制性内切酶”是什么

饶毅：中国的人类基因研究为什么弱？——核心技术追问

"for the discovery of restriction enzymes and their application to problems of molecular genetics"

DNA体外重组 (1972)和DNA测序(1975)

The Nobel Prize in Chemistry 1980



Paul Berg
(1926-) 1/2

Stanford University

"for his fundamental studies of the biochemistry of nucleic acids, with particular regard to **recombinant-DNA**"



Walter Gilbert
(1932-) 1/4
Harvard University

"for their contributions concerning the determination of **base sequences in nucleic acids**"

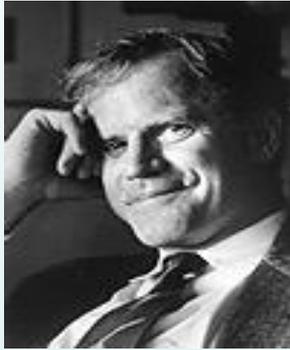


Frederick Sanger
(1918- 2013) 1/4
Cambridge University

PCR技术、核酸定点突变技术

The Nobel Prize in Chemistry 1993

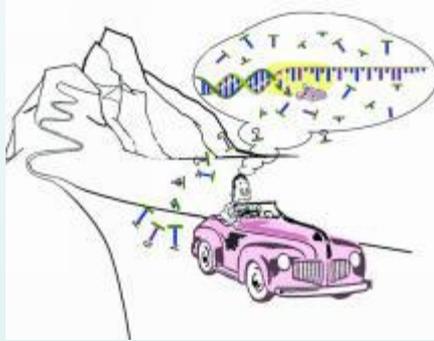
"for contributions to the developments of methods within DNA-based chemistry"



Kary B. Mullis

Perkin-Elmer Cetus Corporation, CA

"for his invention of the polymerase chain reaction (PCR) method, 1985"



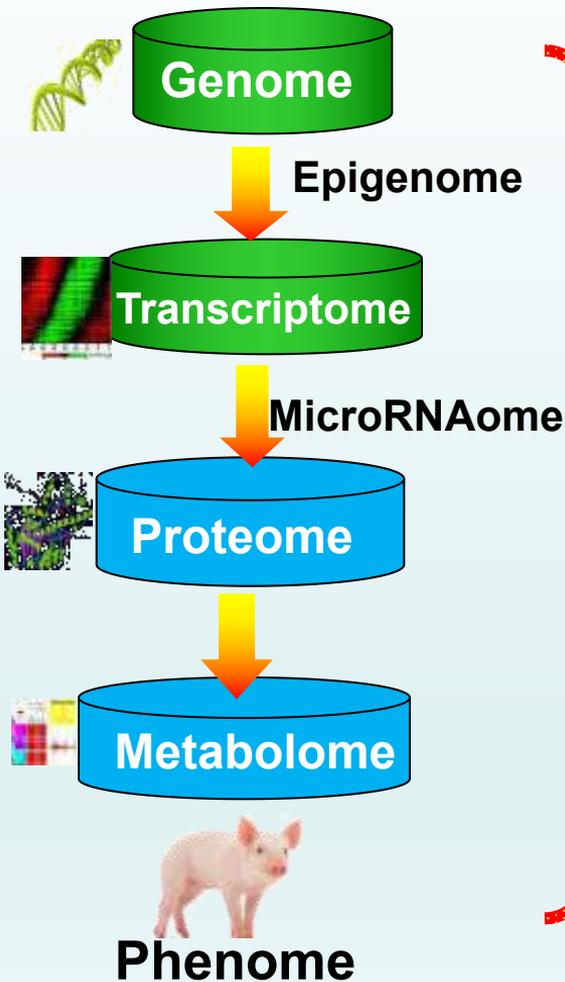
Michael Smith

University of British Columbia, Canada

"for his fundamental contributions to the establishment of oligonucleotide-based, site-directed mutagenesis and its development for protein studies, 1982"

分子生物学理论技术进步

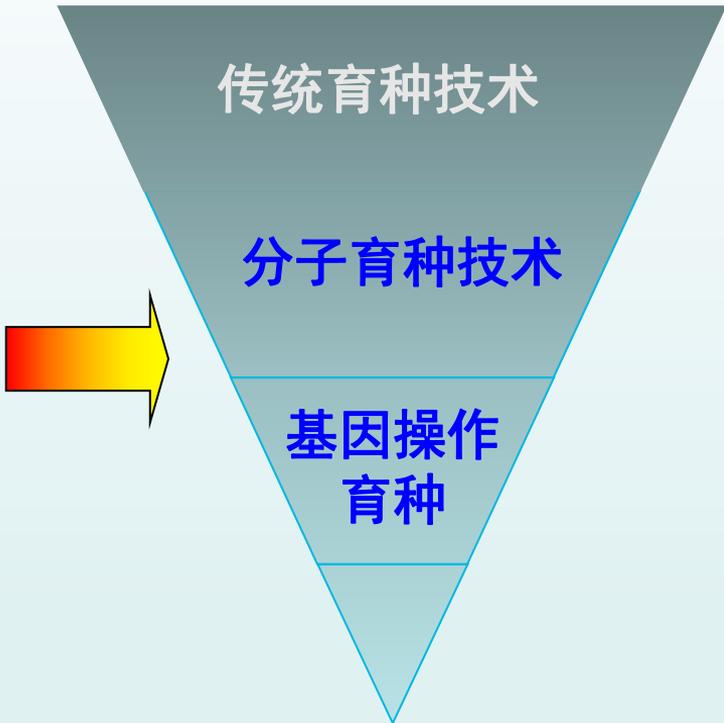
多组学



测序
SNP芯片
3D基因组
基因表达

基因及标记
定位、挖掘

基因功能、
性状机制



猪生产性能改良

猪育种是一个系统工程

$$P = G + E$$

表现型 = 基因型 + 环境因素

生产性能 = 基因型值 + 环境影响

育种 (40--60%)

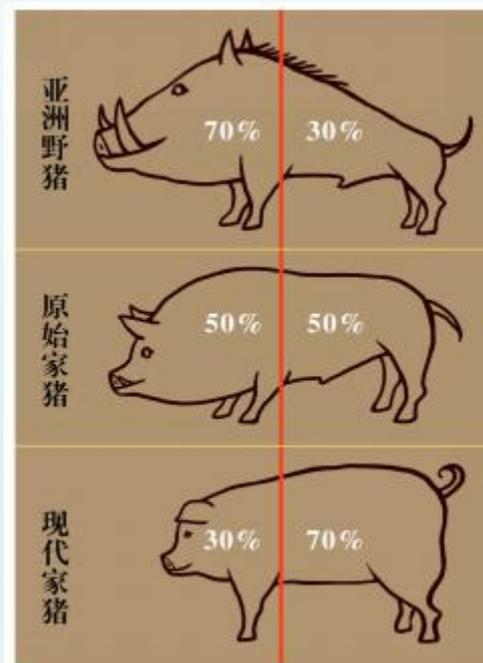
管理、营养、防疫等

分子生物学技术

群体

数据分析

功能基因
分子标记



野猪到家猪身体比例变化图

基于分子生物学技术的家猪分子育种研究进程

单标记时代

氟烷基因致因突变 （ Fujii 等， 1991）

基因组测序技术

中国-丹麦家猪基因组测序计划 （ 2000/07 ）
Swine Genome Sequencing Project
(Swine Genome Sequencing Consortium, 2003-2012)

基因组选择技术

Genomic Estimated Breeding Value, GEBV, 基因组育种值
Direct Genomic Values （ DGV ） ， Meuwissen等， 2001

基因编辑技术

Bibikova et al., 2002 CRISPR/Cas系统， 张峰， 2013
Whitworth, K.M., et al., [2015](#)



基于DNA标记的 分子育种技术

RFLP

PCR-RFLP 单基因或标记

多标记

基因标记聚合育种

主效基因鉴定

SNP芯片—全基因组选择

基因组测序育种

测序技术
发展

基于基因操作的 育种技术

转基因

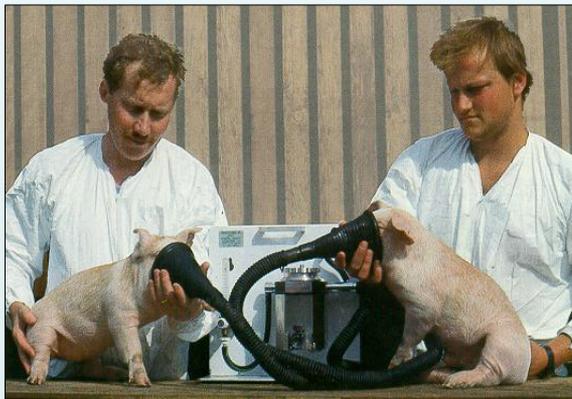
基因编辑

合成生物学—分子设计

重组
DNA
技术

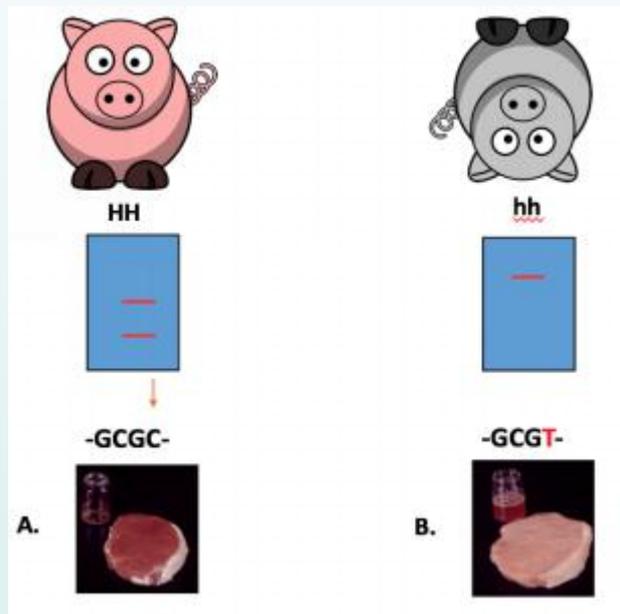
基于DNA标记的分子育种 —— 单标记时代

- 氟烷敏感猪：PSS, PSE meat, etc.
- 1990 以前用氟烷测验检测敏感猪
- 致病突变1991 (Fujii et al. 1991)
- **第一个猪的主效基因 *RYR1***



(From Dr David Casey)

氟烷敏感基因检测



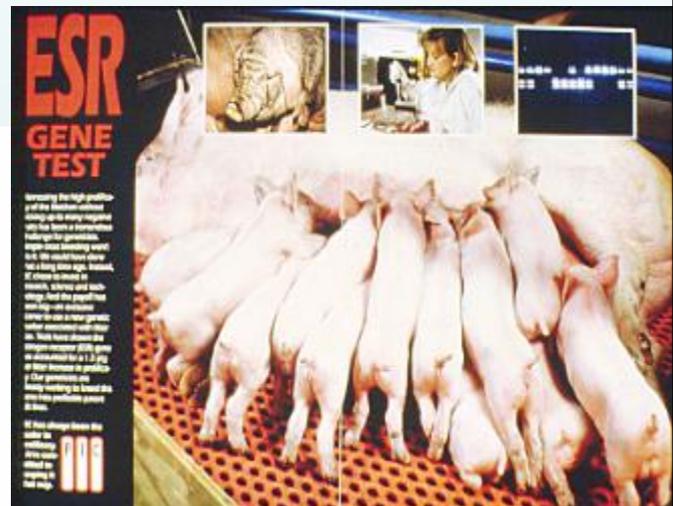
通过氟烷基因的选择淘汰产生PSE（苍白、松软、多汁）劣质猪肉的种猪

基于DNA标记的分子育种 -----单标记时代

- ESR 基因 PvuII RFLP 不同基因型产仔数显著差异

<u>Parity</u>	<u>No. Litters</u>	<u>Litter Size</u>	<u>Sow ESR Genotype</u>	
			<u>AB</u>	<u>BB</u>
1	4,262	10.14	+0.45	+0.83
>2	4,753	11.36	+0.5	+0.68

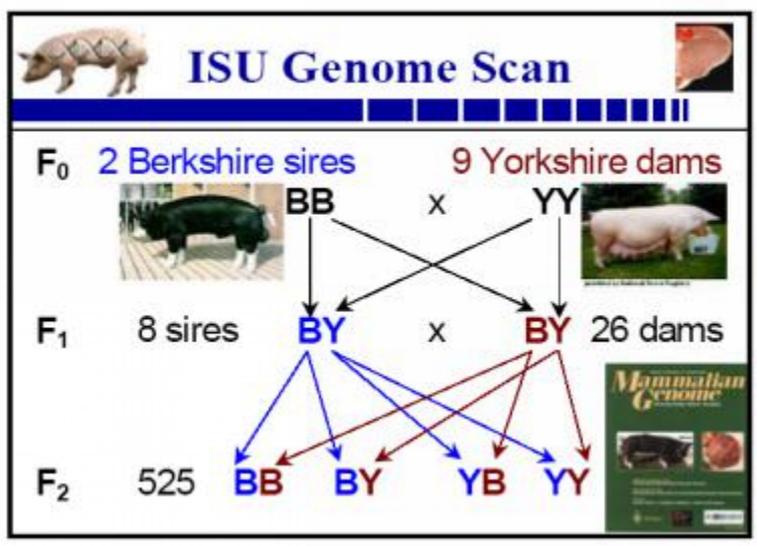
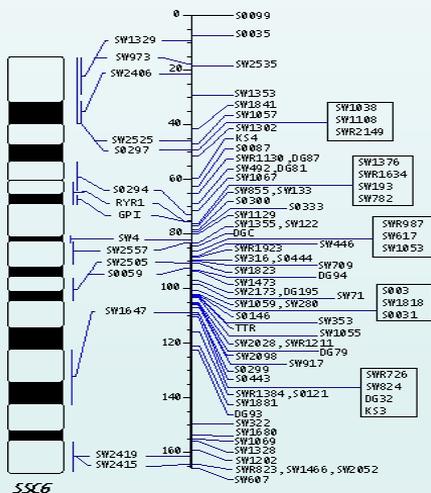
(From Dr David Casey)



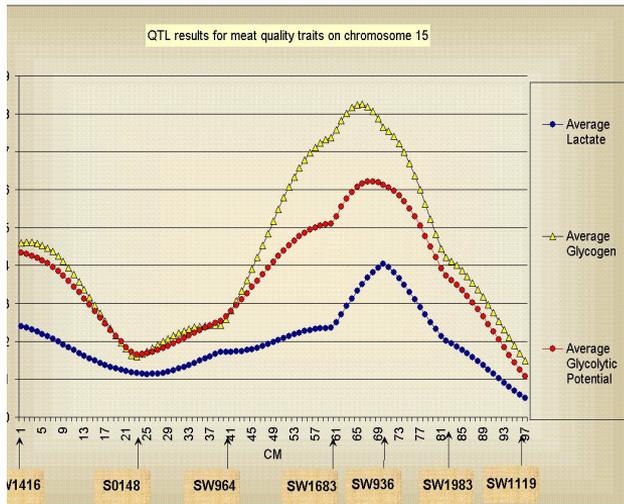
(Rothschild et al 1996,
PNAS 93: 201-205)

基于DNA标记的分子育种 — QTL定位与MAS

通过连锁分析确定QTL（数量性状位点）在图谱上的位置与特定连锁标记之间的遗传距离，确定QTL的表型效应。

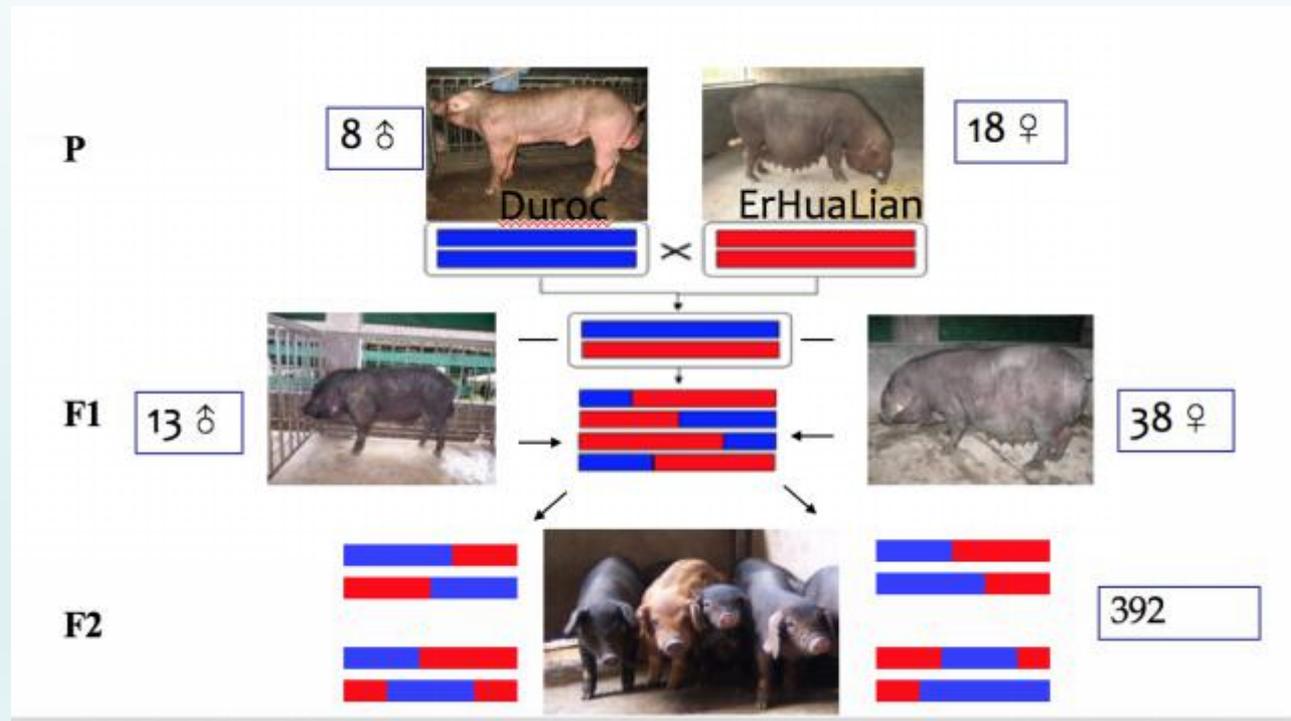


ISU QTL定位群体
From Dr. M.F. Rothschild



影响猪肉质性状的QTL定位结果

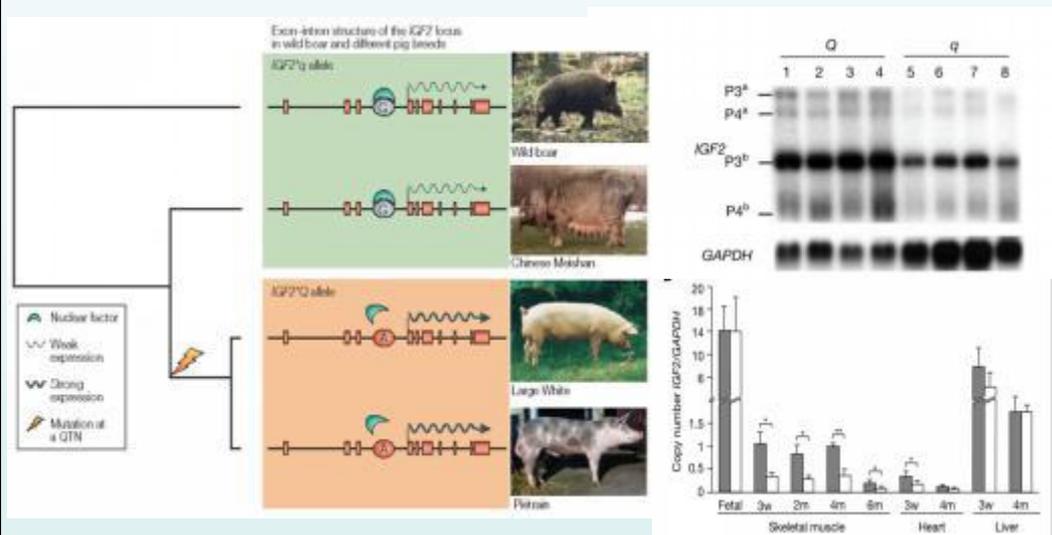
国内：华中农大、江西农大等构建了F2群体进行基因定位



生长性状
肉质性状
免疫性状

致因突变鉴定示例

IGF2:肌肉生长、背膘



Van Laere et al., . A regulatory mutation in IGF2 causes a major QTL effect on muscle growth in the pig. *Nature*. 2003, 23: 832-6.

KPL2: 猪精子短尾不育



■ KPL2基因（在精子鞭毛轴纤丝的形成中发挥重要功能）第一内含子反座子的插入导致剪接异常，造成精子短尾无法运动（Sironen et al., 2006）

Sironen et al., An intronic insertion in KPL2 results in aberrant splicing and causes the immotile short-tail sperm defect in the pig. *PNAS*. 2006, 28:5006-11.

基于DNA标记的分子育种 —— 基因组时代

➤ 猪基因组测序

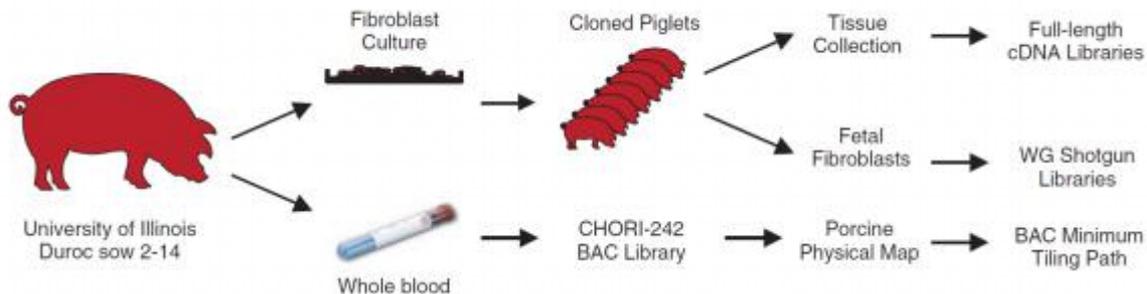
Comparative and Functional Genomics

Comp Funct Genom 2005, 8: 251–255.

Published online in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI: 10.1002/cfg.479

Conference Review

Swine Genome Sequencing Consortium (SGSC): a strategic roadmap for sequencing the pig genome



Lawrence B. Schook et al., 2005

Swine Genome Sequencing Consortium (SGSC),
09/2003, USA



A high-quality draft genome sequence for the pig. *Nature* 2012

基因组时代 - GWAS 鉴定重要基因/突变

用GWAS 鉴定基因： PHKG1 基因突变引起糖元含量增高，肉质变差

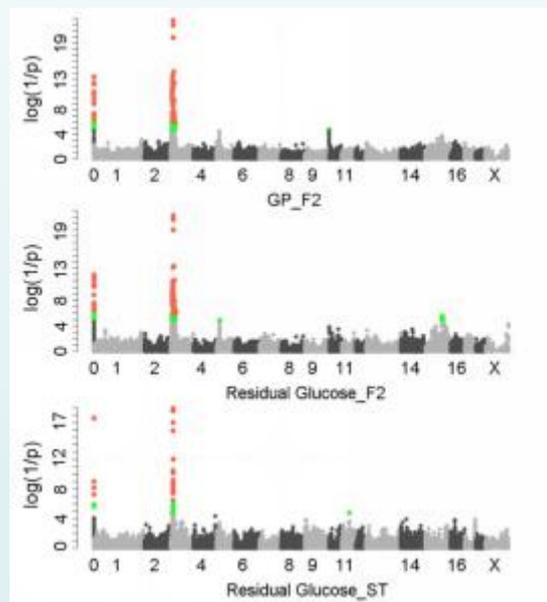


Table 2. Effect of *PHKG1* g.8283C>A on meat quality traits of longissimus muscle in Chinese synthetic Sutaï pigs and Western commercial Duroc × (Landrace × Yorkshire) hybrid pigs.

Traits ^a	Mean ± standard error ^b			P value
	AA (n)	AC (n)	CC (n)	
Sutaï pigs				
Residual G of LM, µmol/g	44.60 ± 19.35 ^a (110)	15.91 ± 13.34 ^b (204)	11.74 ± 10.39 ^c (105)	9.03E-54
pH 24h of LM	5.55 ± 0.13 ^a (96)	5.59 ± 0.19 ^a (153)	5.67 ± 0.23 ^b (91)	2.42E-07
24-h drip loss of LM, %	2.89 ± 1.63 ^a (122)	2.56 ± 2.12 ^a (203)	1.99 ± 1.76 ^b (104)	4.42E-07
IMF of LM, %	1.21 ± 0.56 ^a (119)	1.61 ± 0.72 ^b (204)	1.77 ± 0.67 ^b (105)	4.96E-04
Subjective marbling score of LM, 1-10	1.97 ± 0.53 ^a (122)	2.27 ± 0.53 ^b (203)	2.40 ± 0.53 ^b (104)	2.30E-04
DLY pigs				
Residual G of LM, µmol/g	20.84 ± 11.50 (9)	16.54 ± 12.44 (46)	11.04 ± 8.36 (85)	0.006
pH 36h of LM	5.49 ± 0.31 (7)	5.41 ± 0.17 (42)	5.43 ± 0.23 (61)	0.011
24-h drip loss of LM, %	4.34 ± 2.23 (7)	4.05 ± 2.06 (42)	3.42 ± 2.00 (63)	0.002
IMF of LM, %	1.60 ± 0.30 (9)	1.90 ± 0.70 (46)	1.60 ± 0.50 (85)	0.827
Subjective marbling score of LM, 1-10	2.33 ± 0.56 (9)	2.71 ± 0.61 (46)	2.82 ± 0.71 (85)	0.088

^aLM, longissimus muscle; Residual G, glycogen + glucose; pH 24h and pH 36h, pH value measured at postmortem 24h and 36h respectively; IMF, Intramuscular fat content; DLY, Duroc × (Landrace × Yorkshire).

^bValues with different superscripts in a row are significantly different from each other ($P < 0.05$).

doi:10.1371/journal.pgen.1004710.t002

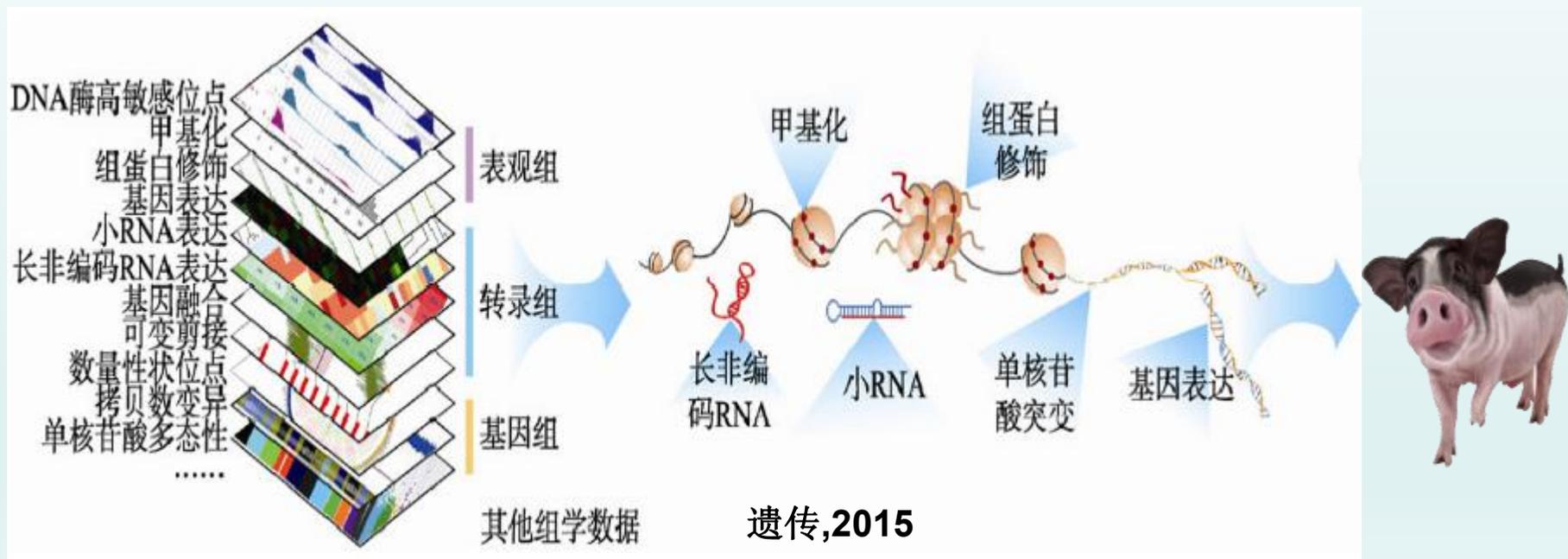
Ma et al., 2014 A Splice Mutation in the *PHKG1* Gene Causes High Glycogen Content and Low Meat Quality in Pig Skeletal Muscle. Plos Genet., 2014

表1 已鉴定的猪不同性状部分重要基因/突变

基因	中文名	关联性状	参考文献
Hal	氟烷基因	PSE肉	Sather AP et al 1991
RN	酸肉基因	PH值、系水力	Le Roy et al 1990
PRKAG3	一磷酸腺苷激活蛋白激酶 γ 3亚基基因	PH值、系水力	Milan et al 2000
PHKG1	磷酸化酶激酶 γ 1	PH值、肌肉脂肪	Ma et al 2014
CAST	巧蛋白酶抑制蛋白基因	嫩度	Wu et al 2007
PROX2	Prospero同源框基因2 Δ 俾	胴体长	DR Ren et al 2012
VRTN	椎体发育同源物	胴体长	Yin Fan et al 2013
H-FABP	脂肪酸结合蛋白	肌肉脂肪	Gerbens et al 1997
A-FABP	脂肪酸结合蛋白	肌肉脂肪	Gerbens et al 1998
IGF2	胰岛素类生长因子2	生长速率	Van Laere et al 2003
MYOG	肌细胞生成素 Δ 俾	生长速率	Anton et al 2006
FTO	肥胖相关基因 Δ 俾	背膘厚	Fontanesi et al 2009
PLAG1	多形性腺瘤基因1	背膘厚	Ruimin Qiao et al 2015
MC4R	黑色皮质激素受体4 Δ 俾	背膘厚	Kim et al 2000
PRLR	催乳素受体 Δ 俾	产仔数	Drogemuller et al 2001
ESR	雌激素受体 Δ 俾	产仔数	Rothschild et al 1997
FSH- β	促卵泡 β 亚基基因 Δ 俾	产仔数	Ellegren et al 1993, Zhao et al, 1999
RBP4	视黄醇结合蛋白4 Δ 俾	产仔数	Messer et al 1996
GNB2L1	G蛋白 β 2亚基类化物1 Δ 俾	产仔数	Kumchoo et al 2015
CD163	分化抗原簇163	繁殖与呼吸综合征	JG Calvert et al 2007
FUT1	岩藻糖转移酶1基因	仔猪腹泻和水肿	Vogili et al 1996
KIT		毛色	Moller et al 1996
TYRP1	酪氨酸酶相关蛋白1	毛色	Jun Ren et al 2011
MC1R	黑色皮质激素受体1	毛色	Kijas et al 1998
PPARD	过氧化物酶体增殖物激活受体 δ	耳朵面积	Ren et al 2011
KPL2	有丝分裂驱动蛋白样2	精子短尾	Sironen, 2006
CD4	CD4基因	T细胞亚型	Ni et al.

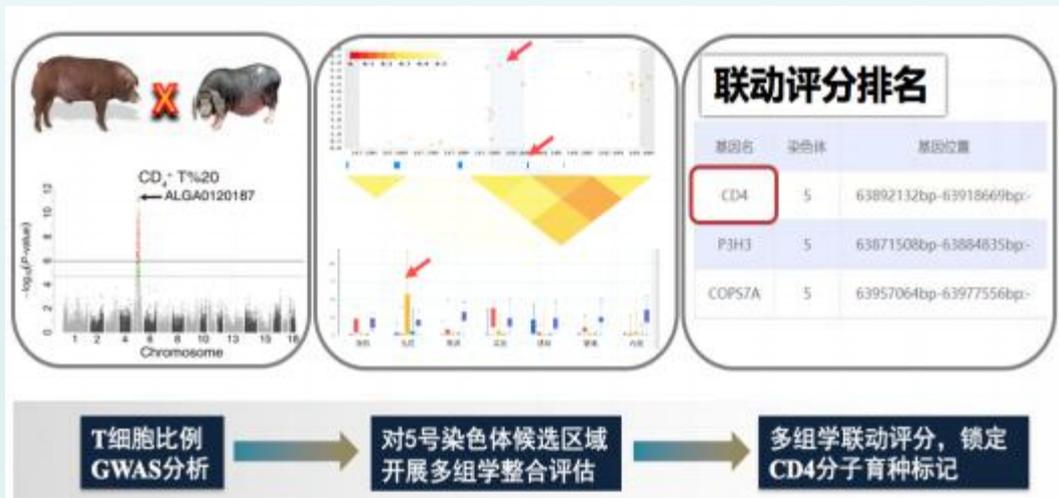
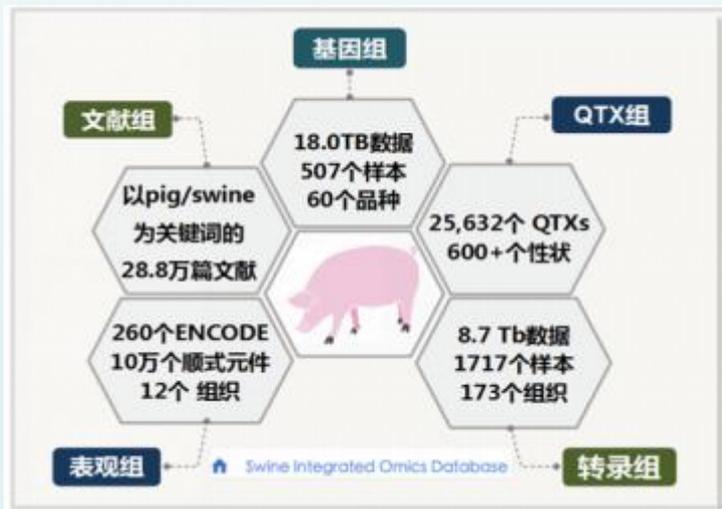
基因组时代 - 整合组学

整合各种层次组学信息鉴定重要基因和突变



基因组时代 - 整合组学

- 构建了猪整合组学数据库
- 鉴定了 CD4 等基因的关键突变位点

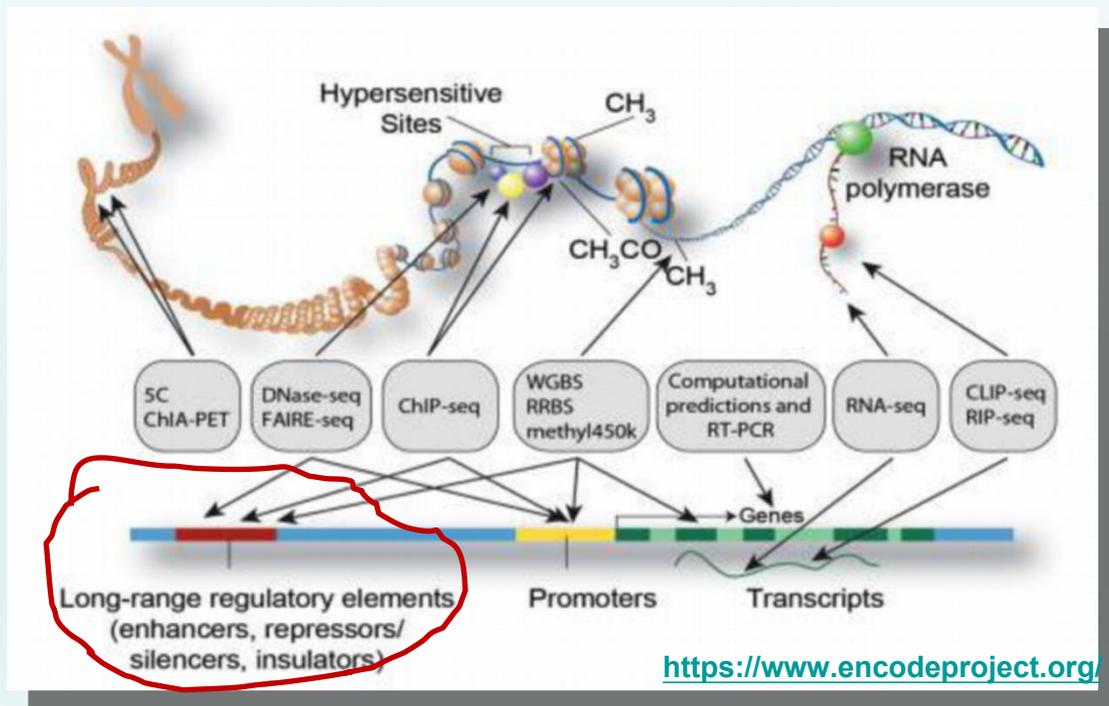


- 唯一数据库
- 数据量大
- 智能化决策

倪娟, 李新云, 赵书红等, Under review

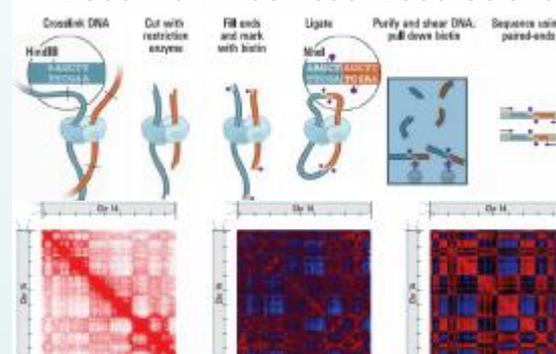
基因组时代 - 3D基因组鉴定调控区及突变

➤ 重要突变可能位于基因组“沙漠”区域

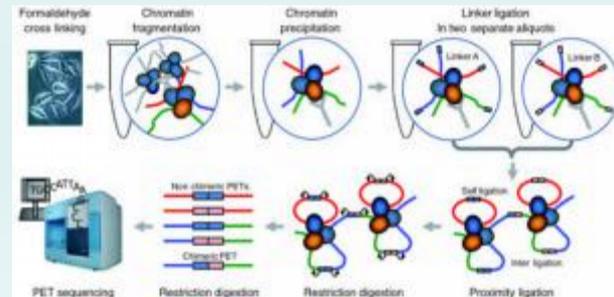


HiC

Lieberman-Aiden et al 2009 Science

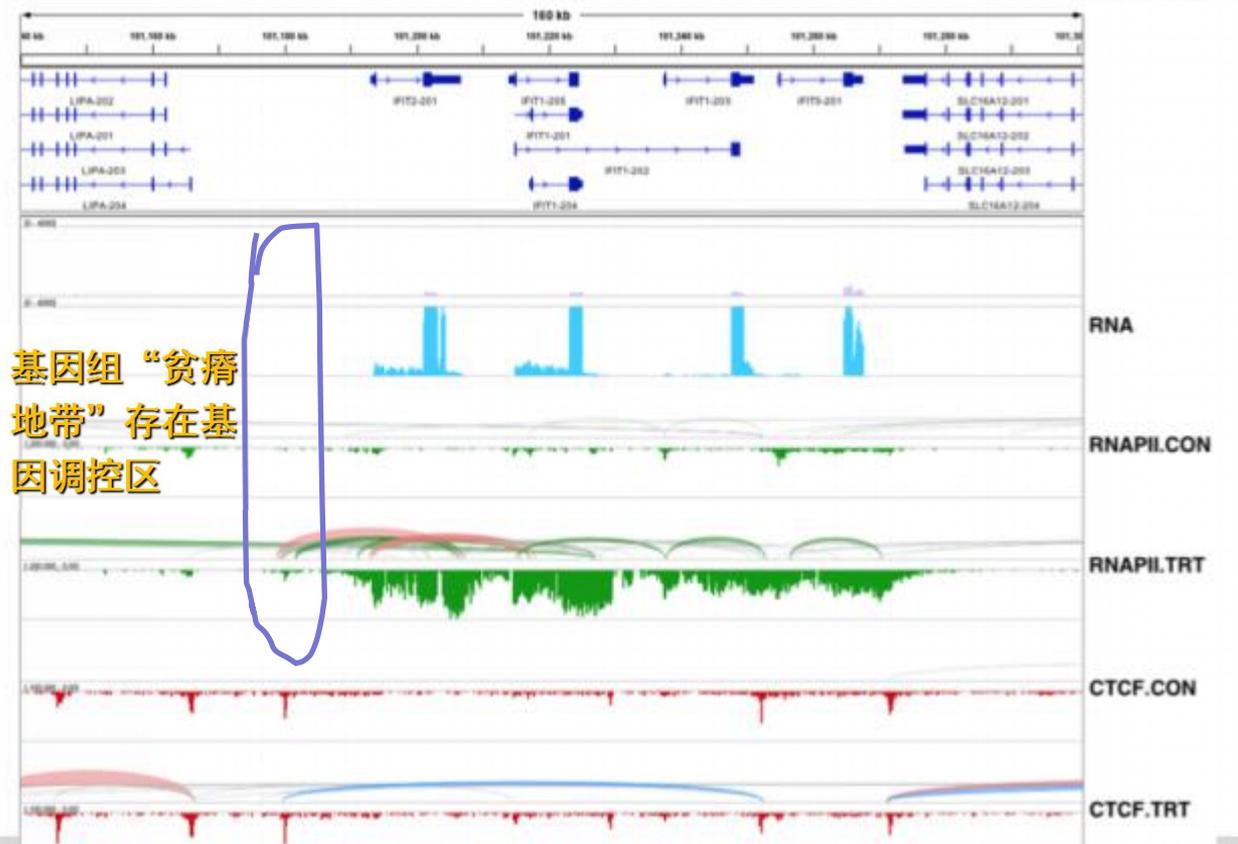


ChIA-PET



Fullwood et al 2009 Nature

基因组时代 - 3D基因组鉴定调控区及突变



基因组“贫瘠地带”存在基因调控区

发现IFIT家族四个基因表达受一个增强子调控

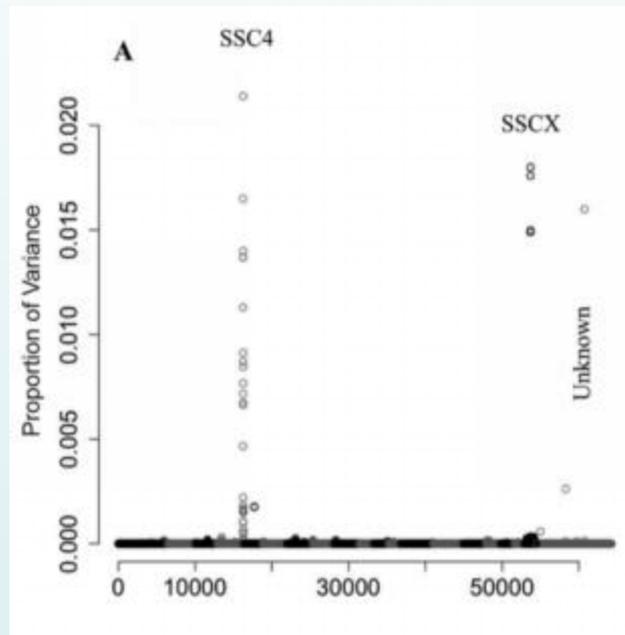
曹建华, 赵书红等, 未发表

3D基因组技术提供了寻找关键分子育种标记的新途径

➤ 猪蓝耳病GWAS例子：

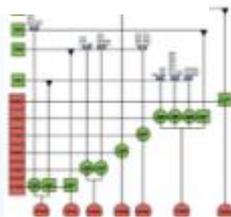
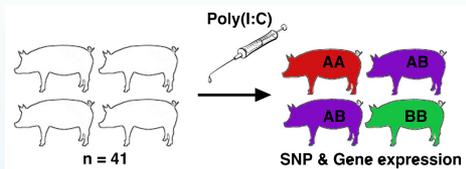
GWAS: 4号染色体上1-Mb 区域发现与体重增长 (WG) 和血液病毒载量 (VL) 相关的显著区域，可以解释 15.7% (VL) 和11.2% (WG42) 的遗传变异。

33 SNP 功能未知

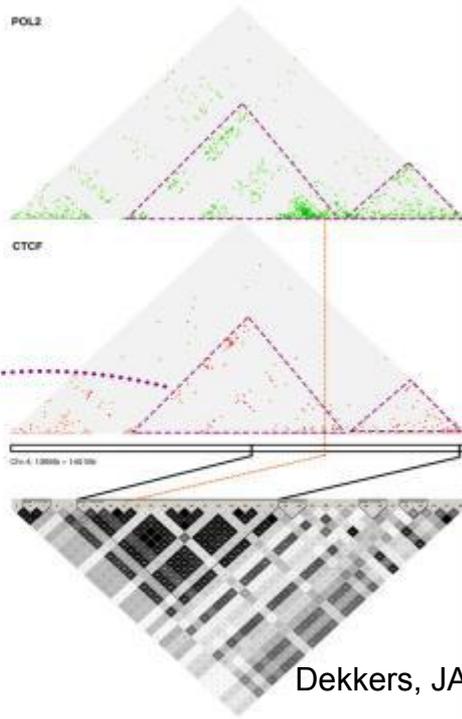
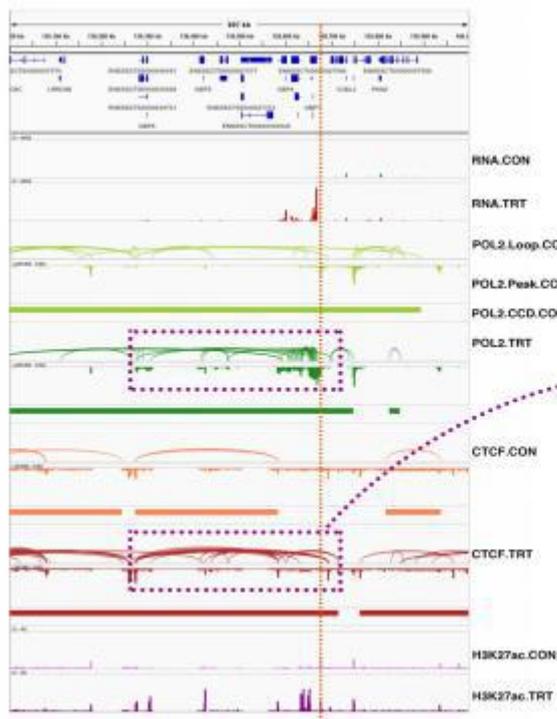


Boddicker et. al., J. Anim. Sci. 2012
Anim. Genet. 2014
GSE, 2014

3D基因组TAD解析GWAS LD区域机制



CTCF 结合区域 SNP 变异导致TAD 拓扑结构域和转录工厂破坏，影响GBP表达，从而影响病毒载量？



CTCF CCD boundary involved SNP variation determined the LD block in GBP family

基于DNA标记的分子育种 —— 基因组选择时代

猪育种发展阶段	遗传进展速度
1) 表型选择 殷商时期 韦豕 相猪专家 《齐民要术》等记载选猪经验	 步行
2) 选择指数 / BLUP 传统育种，利用系谱信息	 汽车
3) 分子育种/全基因组选择 利用全基因组信息	 高铁



分子育种

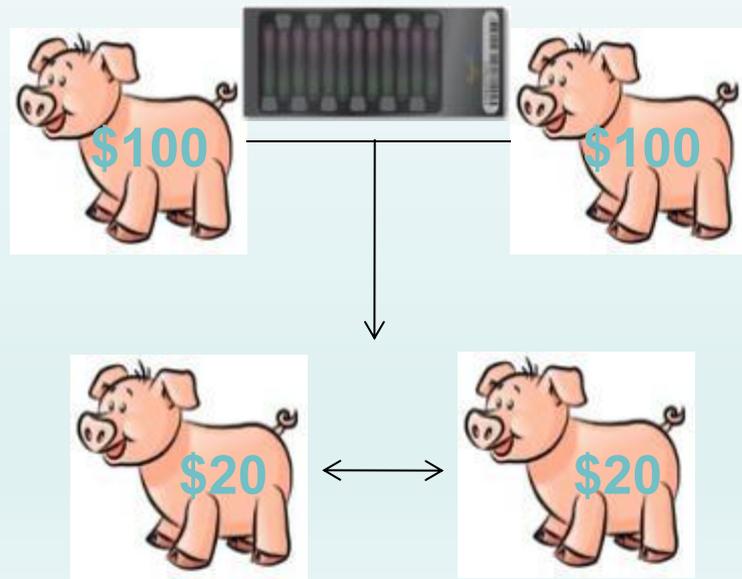
基于DNA标记的分子育种 —— 基因组选择时代

高密度标记 2003--

- 大量标记被发现
- 高通量检测技术
- 标记检测成本大大降低

标记辅助选择所用的标记只捕获了构成表型的一部分变异，但无法检测到构成性状的所有变异

基因组选择



基于DNA标记的分子育种 —— 基因组选择时代

➤ 猪SNP芯片

2008: Kaminski et al., SNiPORK - a microarray of SNPs in candidate genes potentially associated with pork yield and quality - development and validation in commercial breeds. *Anim Biotechnol.* 19:43-69

2009: Kamiński et al., Microarray of SNPs for diverse applications in commercial pig breeding. *Pol J Vet Sci.* 12(1):69-74.

2011: Illumina PorcineSNP60 BeadChip, *Genet Sel Evol.* 43:42

2013: Burgos-Paz et al., Porcine colonization of the Americas: a 60k SNP story. *Heredity*, 110:321-30

.....50K, 80K, 55K

2017: 中芯一号

基于DNA标记的分子育种 —— 基因组选择时代

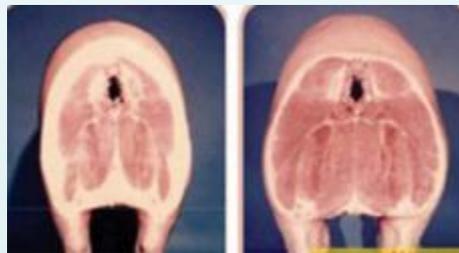


新的表型测定技术

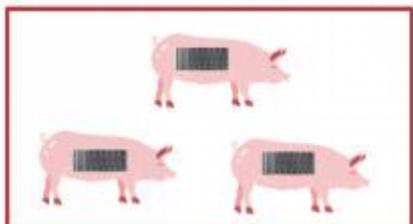
基因组选择技术



育种效率更高



Fix et al. 2010
Livestock Sci.
128:108-114



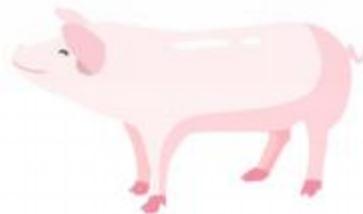
基因组选择

利用覆盖基因组的SNP标记计算个体的基因组估计育种值(genomic estimated breeding value, GEBV)

SSBLUP，一步法
早期选择，间接选择

1. 选择准确性高于BLUP
同时利用系谱和基因组信息
2. 能够高效选择无法直接度量的性状
肉质、抗病性状？
3. 能早期选择—小猪科学“算命”
小猪一出生即可选择，窝内选择

GS育种效率大大高于传统的BLUP



科学“算命”（GS）的优势



耳号	GEBV	EBV
D4293	3.00	2.74
D4292	2.61	2.74
D4295	2.76	2.74
D4294	2.58	2.74
D4350	3.18	2.91
D4351	2.89	2.91
D4348	2.73	2.91
D4349	2.69	2.91

一母生九子，九子各不同

DanBred——猪基因组选择的先锋

1. 丹麦是第一个运用猪基因组信息开展育种的国家
2. 17 October 2011, DanBred宣布旗下所有品种、所有性状启用 Genomic selection (GS, 基因组选择) 开展选育



- 主要通过提高选择的准确性(提高55%), 加快遗传进展获益
- 每头猪每年通过育种可提高~10元的经济效益

丹麦母猪年生产力的不断提高,
基因组信息的利用卓有成效

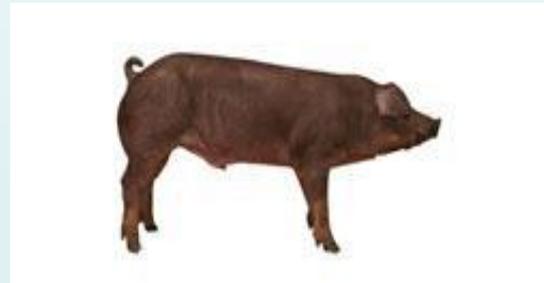
DanBred 针对公猪肉骚味的基因组选择

2018年起，欧盟将全面禁止公猪阉割

2012年，Danish Pig Research Centre与Copenhagen大学合作，在Danish National Advanced Technology Foundation资助下启动了去除公猪肉骚味的GS项目

内容包括：

- (1) 检测影响公猪骚味的基因组信息
- (2) DanBred计划通过GS，培育出不经阉割而没有或轻微骚味的猪群



我们的工作——产业体系全基因组选择岗位科学家团队

生猪产业体系全基因组选择（GS）岗位专家团队



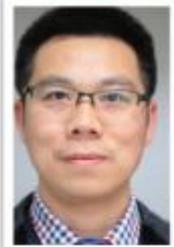
赵书红 教授

GS团队、平台、群体建立、技术开发与推广



刘小磊 副研究员

美国康奈尔大学联合培养博士，GS信息平台建立、GS模型优化



李新云 教授

英国诺丁汉大学访问学者，性能测定、参考群构建、基因组选择实施



马云龙 博士

德国哥廷根大学联合培养博士，基因型填充



朱猛进 教授

美国华盛顿州立大学访问学者，GS育种统计模型建立，育种值评估模型分析



项涛 副研究员

丹麦奥胡思大学博士，SSBLUP改良，G×E

猪全基因组选择育种手册

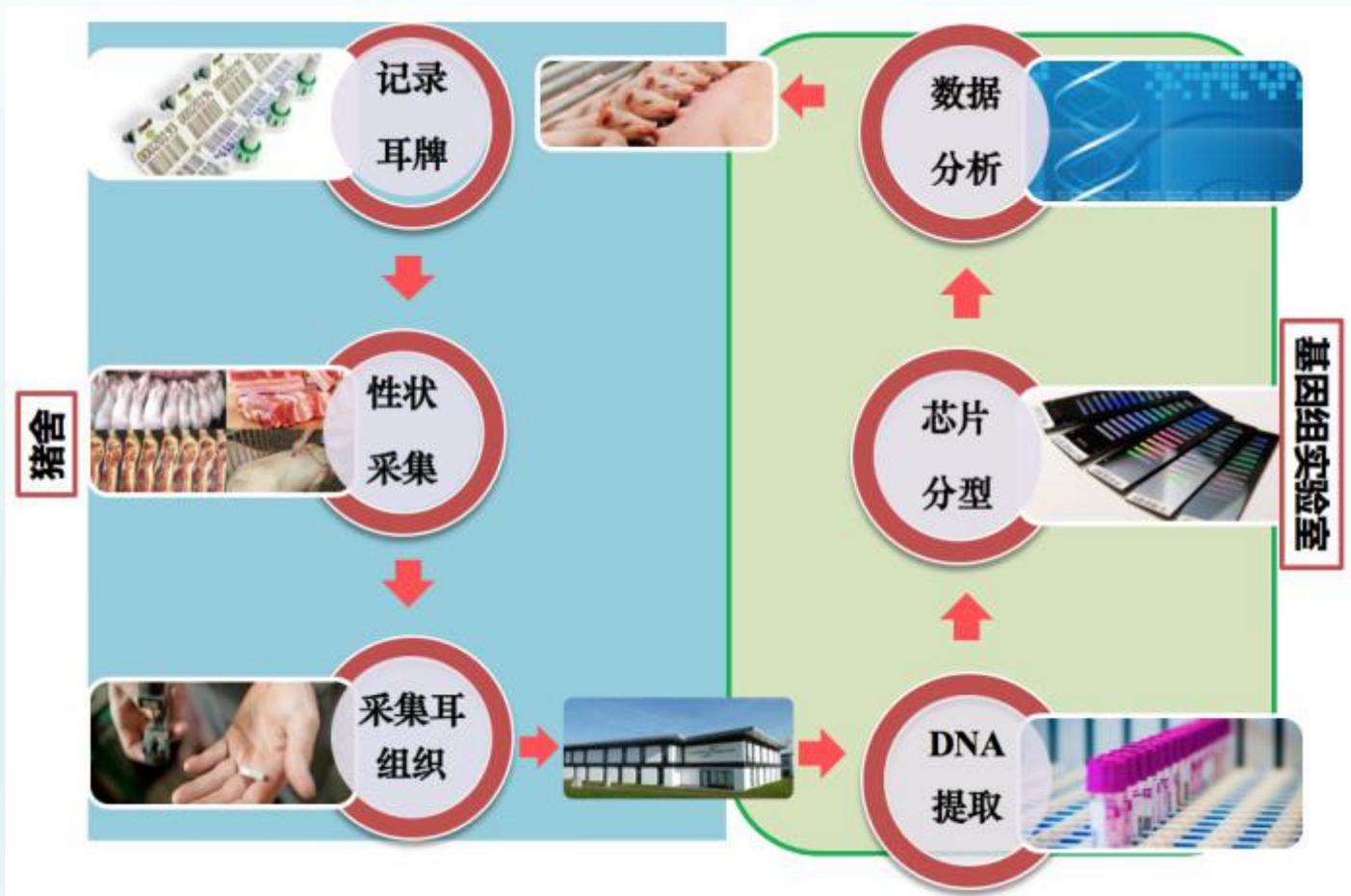
(v 1.0)



赵书红
李新云
朱猛进
刘小磊
马云龙
项 韬
尹立林

农业部猪全基因组选择岗位科学家团队

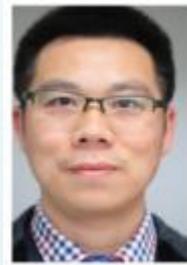
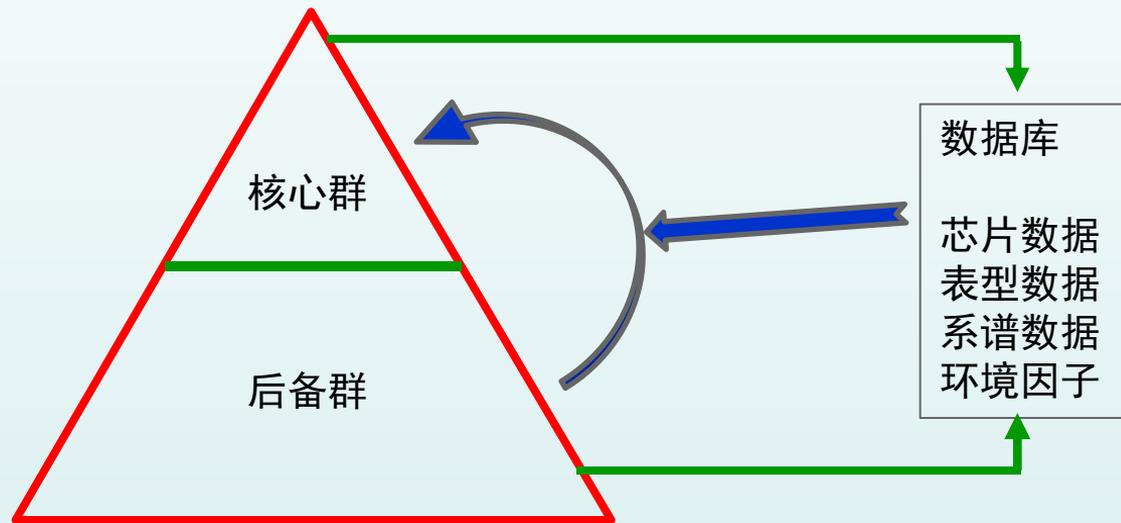
建立技术流程



李新云 教授

基因组育种值估计、选择指数计算流程

基于一步法（SSBLUP）单性状基因组估计育种值标准流程



李新云
教授



项韬
副研究员

一步法：就是同时利用基因芯片和系谱信息，构建亲缘关系矩阵进行育种值估计；因为应用了基因芯片信息，个体间的亲缘系数评估更准，所以育种值评估比传统的BLUP更准

新算法：本团队“猪基因组育种平台” Vs. 国际上DMU



刘小磊 副研究员

```
Number of individuals with phenotype: 52000  
Number of genotyped individuals: 40000  
Number of genotyped individuals with phenotype: 20000  
Number of genotyped individuals without phenotype: 20000  
Number of total individuals: 102000
```

```
Number of individuals with phenotype: 8710  
Number of genotyped individuals: 4999  
Number of genotyped individuals with phenotype: 4031  
Number of genotyped individuals without phenotype: 968  
Number of total individual: 10710  
Deriving A matrix from pedigree...Done within 3s
```

1万个体，本团队（32秒） -- DMU（25分钟）
10万个体，本团队（55分钟） -- DMU（>24小时）
与DMU结果的皮尔森相关系数>99%

注：该计算时间包括从芯片数据、表型数据、系谱数据读取到返回GEBV的所有时间

```
> print(time)  
user system elapsed  
128463.466 68179.616 3255.758
```

```
SSBLUP ACCOMPLISHED SUCCESSFULLY  
> print(time)  
user system elapsed  
448.384 204.375 32.826  
> []
```

❖ 我们团队重新设计了SSBLUP的计算思路，降低了计算复杂度，计算效率远超DMU（DMU只有用于科研目的免费）

自主知识产权
的算法、软件

GS信息系统简介

功能：

❖ 获得综合选择指数，指导育种

输入数据：

❖ 系谱数据（三联表或十五联表）

❖ 表型数据

❖ 芯片公司返回的原始基因型文件



刘小磊 副研究员

特点：

1. 智能化程度高，操作、维护简单
2. 兼容市面上主流育种软件
3. 算法、程序全部自主开发，具有自主知识产权

综合选择指数制订：打通育种工作的“最后一公里”

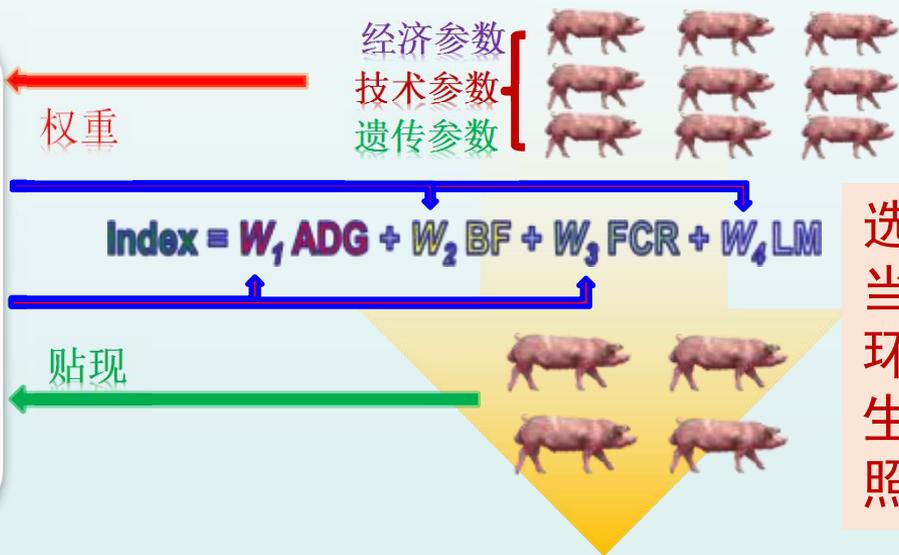
最优综合选择指数的制订策略



朱猛进 教授



马云龙 博士



选择指数的制订都是根据当地的市场、技术、经济环境、猪群生物学特性、生产繁育体系来制订的，照搬指数失真，效率不高

基因组选择效果评估 (SSBLUP Vs. BLUP)

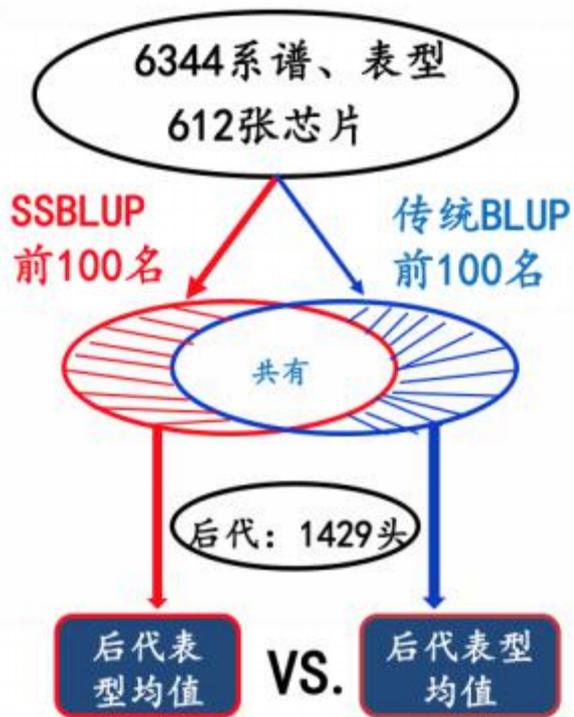
怎么评估？

我们的策略：“后裔测定”

应用SSBLUP 及 BLUP育种值从高到低对种猪排序，选取Top100个体

找出SSBLUP 及 BLUP排序前100名种猪中不同的个体，根据系谱找到其后代，对比后代表型均值

基因组选择效果评估 (SSBLUP Vs. BLUP)



性状	SSBLUP 差异母猪数 (后代数)	BLUP 差异母猪 (后代数)	SSBLUP-BLUP
达上市日龄(d)	25 (75)	31 (86)	-4
日增重(g)	6 (20)	7 (19)	34
背膘厚(mm)	34 (116)	35 (139)	-0.06
眼肌面积(cm ²)	7 (19)	13 (37)	0.7
瘦肉率(%)	8 (29)	9 (32)	0.8

基因组选择（SSBLUP） 测试初步效果

- 从实验结果来看，SSBLUP基因组选择的个体，其后代表型在达到上市日龄性状上提前4天！
- 在日增重、背膘厚、眼肌面积、瘦肉率等性状上全面优于常规BLUP选择个体
- 实验只用了612张芯片，增加芯片理论上SSBLUP的效果会更好
- 基因组选择更准确！遗传进展更快！

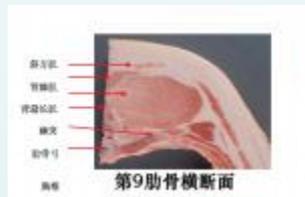
基因组选择—问题

表型测定问题

所有选种技术都要依靠性能测定！



测定数据信息是否真实可靠，既关乎种猪的选留与质量，更关乎企业的育种水平、社会责任和社会诚信



没有测定，就没有真正意义上的育种！

新设备！新方法！表型组大数据！

自主研发能力不足！限制了育种！

企业测定投入不足，数据质量不高，限制了育种技术应用！



基因组选择

成本控制问题

- ❖ 提高选种的准确度，通过提供优秀种猪或商品猪收益降低成本，SSBLUP只要做了基因组检测就可以开始GEBV评估！
- ❖ 通过小公猪早期阉割降低成本！**但需要大参考群体预测！**

- 每窝选2头以上小公猪收集样品，检测芯片，挑选指数前50%进入测定站；对指数后50%的小公猪进行阉割，直接卖小肥猪或者入站测定结束后，当商品猪出售
- 早期阉割猪每头可多卖400元，一部分补贴芯片，相当于没有增加测定成本提高了选择强度！
- 在选择强度一致的情况下，如果少测定1200~1500头公猪，大约可以节约60~70万元成本

基于标记的种猪 分子育种技术

RFLP

PCR-RFLP 单基因或标记

多标记

基因标记聚合育种

主效基因

SNP芯片—全基因组选择

测
序
技
术
发
展

基于基因操作的 育种技术

转基因

基因编辑

单碱基编辑

合成生物学—分子设计

重
组
DNA
技
术

DNA体外重组
(Berg, 1972)

DNA测序(1975)

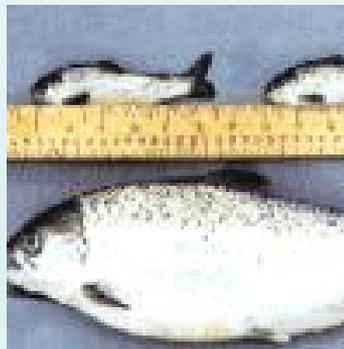
限制性核酸内切
酶 (1967-1970)

显微注射

转基因小鼠



Palmiter RD *et al.*, *Nature*, 1982



Zhu ZY (朱作言) *et al.* 1985.

转基因猪

Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection

Robert E. Hammer*, Vernon G. Pursel†, Caird E. Rexroad Jr†, Robert J. Wall†, Douglas J. Bolt†, Karl M. Ebert*, Richard D. Palmiter‡ & Ralph L. Brinster*

* Laboratory of Reproductive Physiology, School of Veterinary Medicine University of Pennsylvania, Philadelphia, Pennsylvania 19104, USA

† Reproduction Laboratory, Agricultural Research Service, USDA, Beltsville, Maryland 20705, USA

‡ Howard Hughes Medical Institute, Department of Biochemistry, University of Washington, Seattle, Washington 98195, USA

Hammer *et al.* 1985. *Nature* 20:241–245..

基于基因操作的育种技术 -- 转基因技术

我国
转基因动物
新品种
培育
重大
专项

10年



2008-

- 38个转基因动物新材料
- 21个达到中间实验阶段
- 6个获环境释放证书
- 4个获生产性实验生物安全证书

- 转fat1、PGC1a等基因优质猪
- 转人溶菌酶基因抗腹泻猪
- 转木聚糖酶-葡聚糖酶-植酸酶基因节粮环保猪
- 转FSH α / β 基因高繁殖力猪



Muscle fiber-type conversion in the transgenic pigs with overexpression of PGC1 α gene in muscle

Fei Ying^a, Liang Zhang^a, Guowei Bu^a, Yuanzhu Xiong^a, Bo Zuo^{a,b,*}



Novel transgenic pigs with enhanced growth and reduced environmental impact

Xianwei Zhang^{1,2*}, Zicong Li^{1*}, Huaqiang Yang^{1,2}, Dewei Guoling Li¹, Jiansin Mo¹, Dehua Wang¹, Culi Zhong¹, Junsong Shi², Enqin Zheng¹, Fanning Meng¹, Mao Zha Rong Zhou¹, Jian Zhang¹, Miaorong Huang¹, Ran Zhang¹, Ning Li¹, Mingzhe Fan¹, Jinzeng Yang¹, Zhenfang Wu^{1,2*}

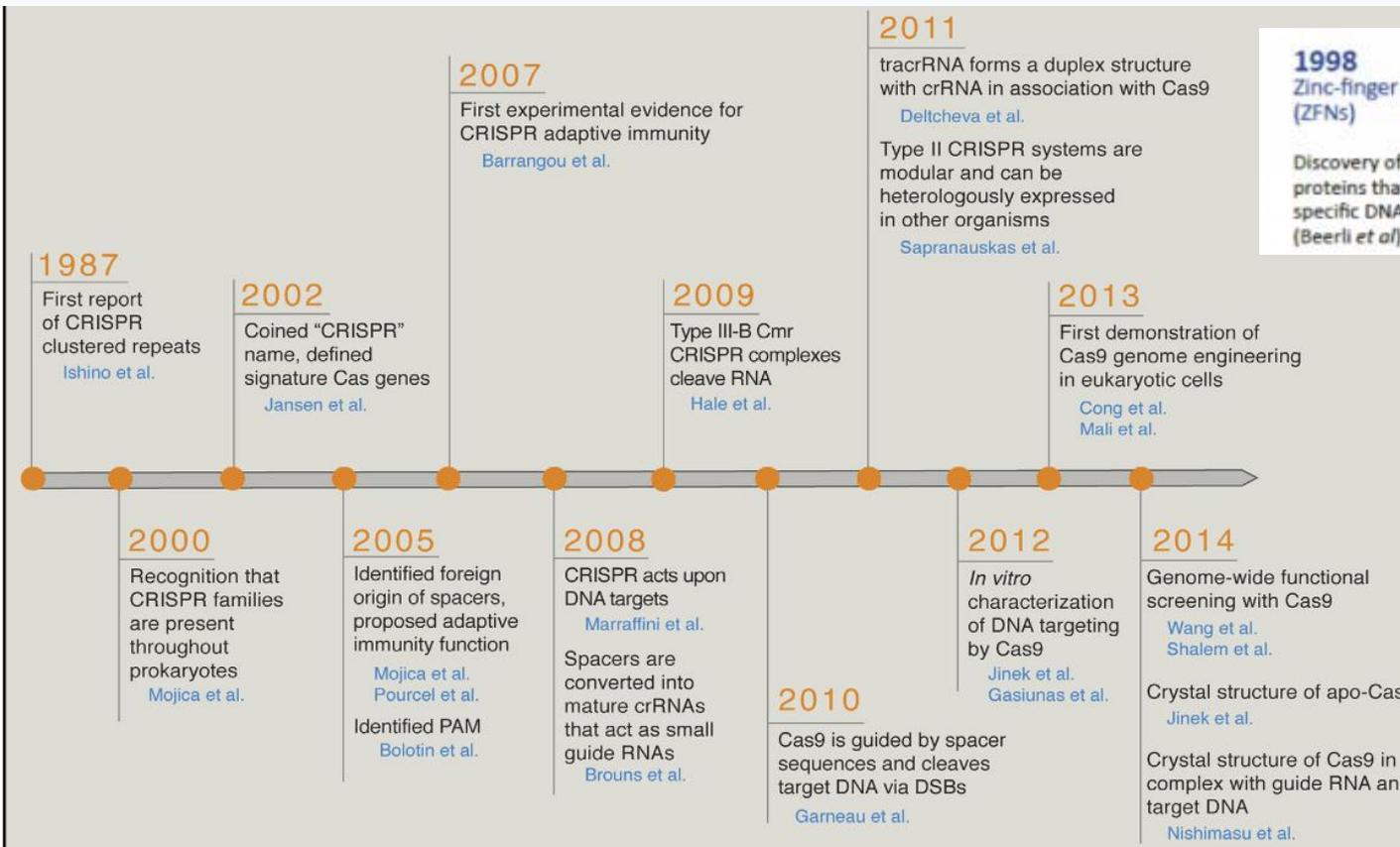


eLIFE

elifesciences.org

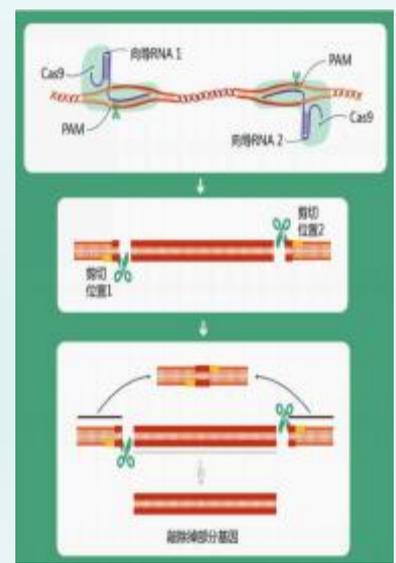
基于基因操作的育种技术

基因组编辑技术



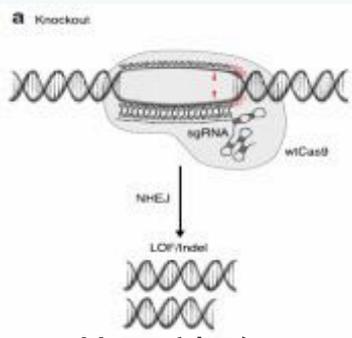
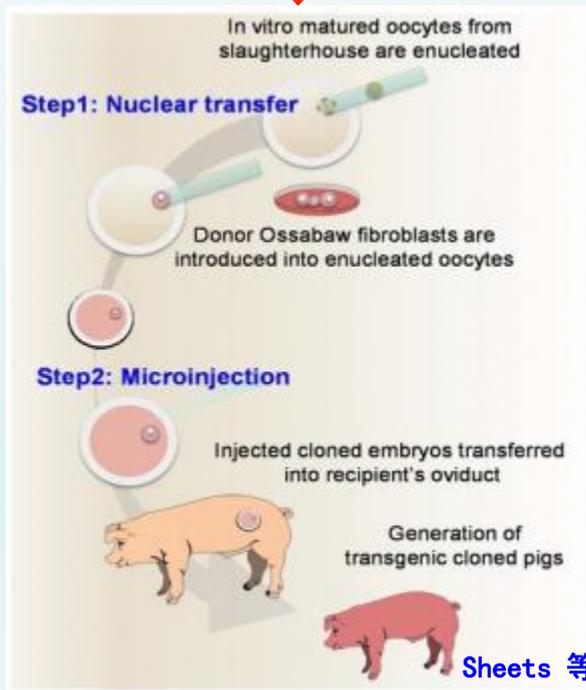
1998
Zinc-finger nucleases (ZFNs)
Discovery of zinc-finger proteins that can target specific DNA sequences (Beerli et al).

2009
Transcription-like effector nucleases (TALENs)
DNA binding proteins discovered in *Xanthomonas* bacteria (Boch et al).

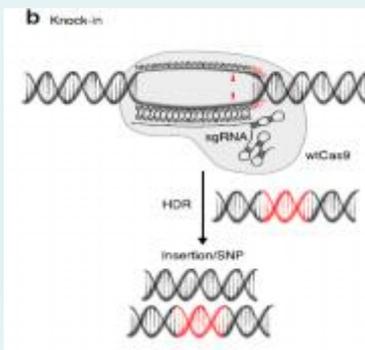


基于基因操作的育种技术 -- 基因组编辑技术

基因编辑细胞



基因敲除



基因敲入

胚胎注射



基于基因操作的育种技术 — 基因组编辑技术

- 培育肌肉发达的超级猪、羊
- 培育抗病猪、牛、羊
- 培育没有过敏原的鸡蛋、牛奶
- 使鱼生殖激素基因失活，不育
- 基因组编辑与全基因组选择技术结合，实现高效精准育种

基于基因操作的育种技术 —— 基因组编辑技术



杨亦农教授

基因编辑：第一个走入市场的产品

蘑菇在采摘后，极易发生褐变，酶加速蘑菇腐烂

蘑菇含有6个多酚氧化酶的基因，用CRISPR技术敲除了一个，就使酶的活性降低了30%：抵抗褐变的能力，更长的保质期。



美国农业部 一种基因编辑
一种基因编辑玉米的监管

白蘑菇褐变是由多酚氧化酶（PPO）引起的。于是，宾夕法尼亚大学的研究人员利用CRISPR技术，敲除了6个PPO编码基因中的1个，将酶活性降低了30%，从而延缓白蘑菇褐变。这项研究本是稀松平常的事，但是，4月份，美国农业部表示，它不会对CRISPR改造的蘑菇进行监管。

基因编辑在猪育种中的应用(1):

MSTN基因编辑高瘦肉率猪

肌肉MSTN敲除猪



Targeted mutations in *myostatin* by zinc-finger nucleases result in double-muscling phenotype in Meishan pigs Qian等, 2015 梅山猪

Lili Qian^{1,2}, Maoxue Tang¹, Jinzeng Yang¹, Qingqing Wang¹, Chunbo Cai^{1,2}, Shengwang Jiang¹, Hagan Li^{1,2}, Ka Jiang¹, Pengfei Gao¹, Dezun Ma¹, Yaoxing Chen¹, Xiaorong An¹, Kui Li¹ & Wentao Cui¹

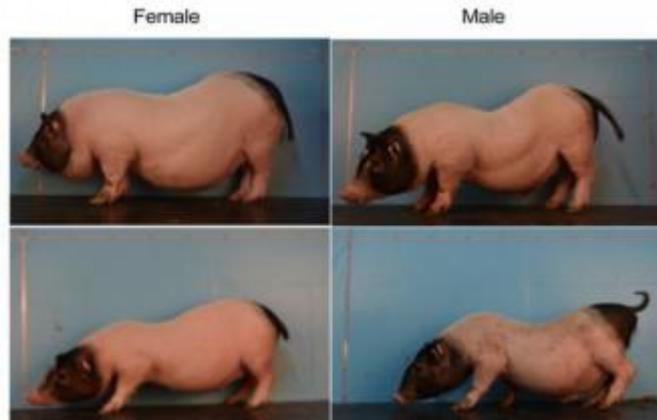


Super-muscly pigs c by small genetic twe

Researchers hope the genetically engineered animals will speed up

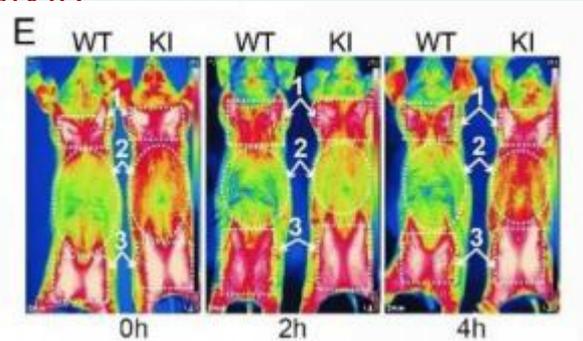


Gene-edited pigs to be sold as pets



IGF2 单位点编辑猪

编辑猪



寒

基因编辑在猪育种中的应用 (2)：抗蓝耳病猪 (CD163)

(1) 将猪的序列替换成人的结构域, 抗性猪含有外源基因

(2) 将猪的第七外显子去掉, 抗性猪不含有外源基因

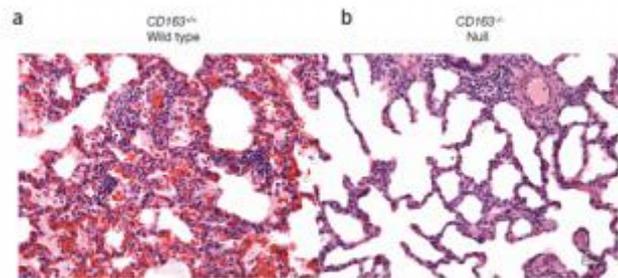


Figure 2 Lung histopathology during acute PRRSV infection. Each photo is from a single representative rat. The pathologist evaluated tissue from every rat. (a, b) Representative chromomicrographs of

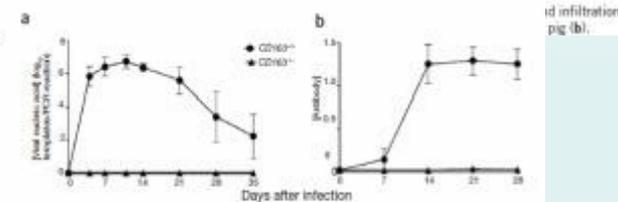


Figure 3 PRRSV-specific nucleic acid and antibody. (a,b) Mean and s.d. of PRRSV nucleic acid concentrations (a) and antibody (b) in serum from CD163^{+/+} (n = 7) and CD163^{-/-} (n = 30) pigs (one replication) are shown. Sample to positive ratio = the median fluorescent intensity (MFI) of the sample divided by the MFI of the positive control.

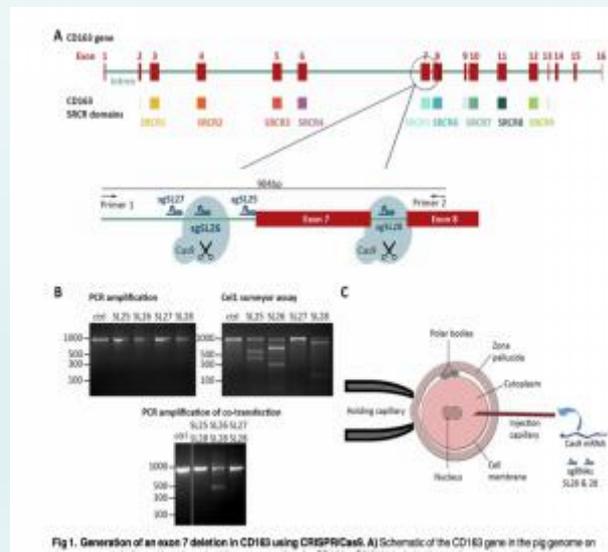


Fig 1. Generation of an exon 7 deletion in CD163 using CRISPR/Cas9. A) Schematic of the CD163 gene in the pig genome and

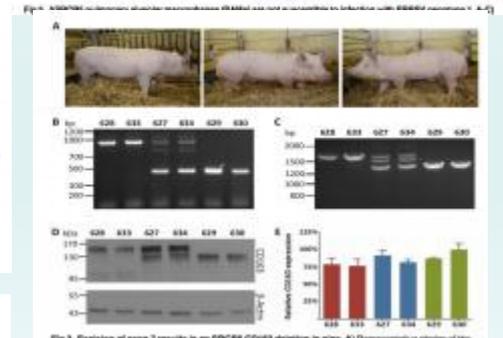
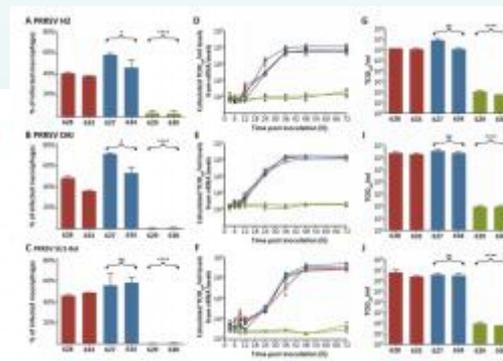


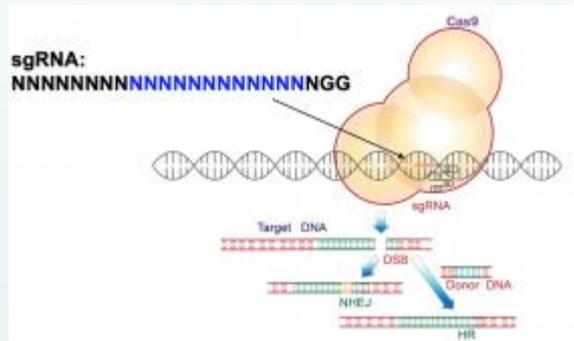
Fig 5. Exclusion of exon 7 results in an 6KPCR-CD163 deletion in pigs. A) Representative photos of the

华中农大基因组编辑

sgRNA 设计

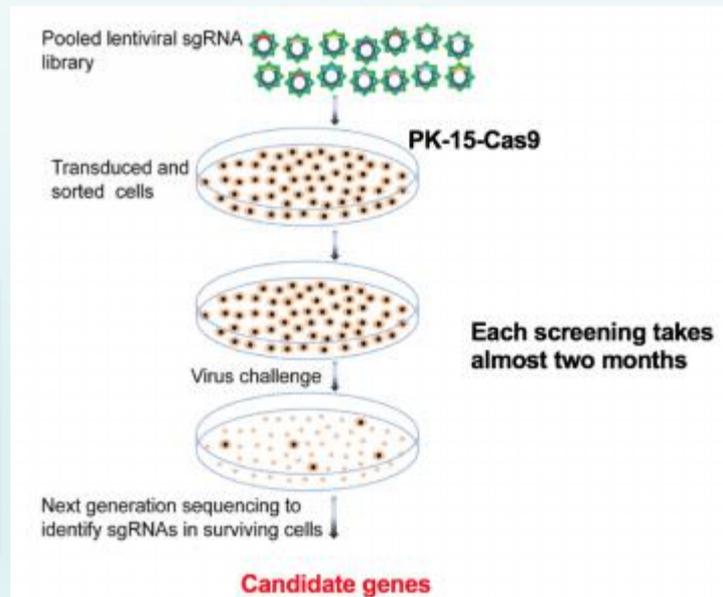
脱靶效应评估软件

- 改善猪乳成分的编辑
- 改善猪肉品质
- 改善抗病力



猪CRISPA文库

筛选抗病毒感染基因



基因组编辑在育种中应用的局限、问题

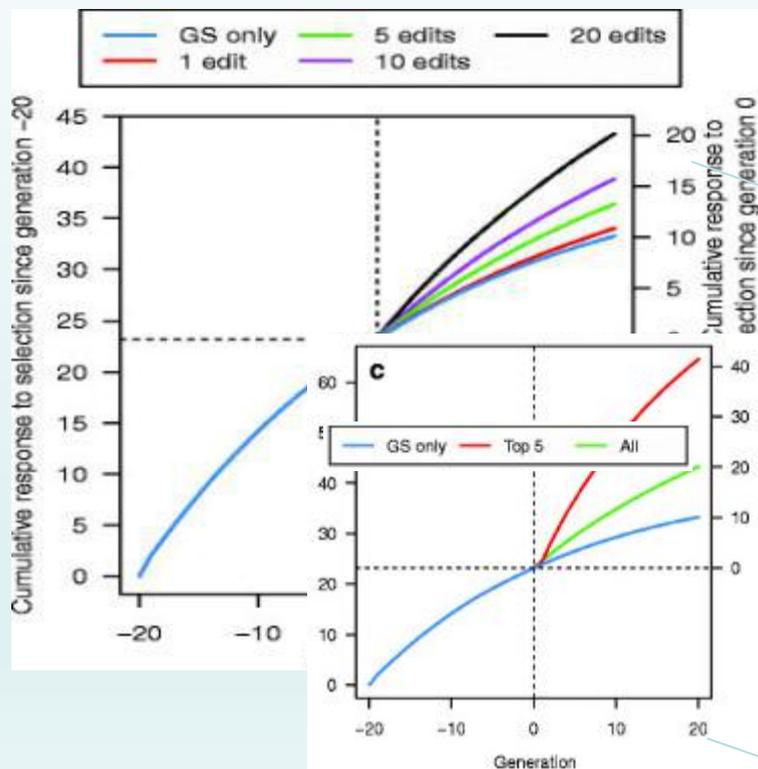
1. 可以用于编辑的基因太少 MSTN, CD163 ...
2. 有些性状没有或还没有找到主基因

人类身高研究: 253 000 人, 697 GWAS,

Only cumulatively explained about 20 % of the heritability for this highly polygenic quantitative trait (most strongly associated ~2,000, ~3,700 and ~9,500 SNPs explained ~21%, ~24% and ~29% of phenotypic variance)

3. 哪些动物需要编辑? 顶级公畜?
4. 基因组编辑与全基因组选择结合提高育种效率?

基因组编辑与全基因组选择结合提高育种效率： 编辑多少个体？ 哪些个体？



Cumulative response to selection across 21 generations of recent historical breeding based on genomic selection only (GS only) and 20 generations of future breeding based on GS only or genomic selection plus the promotion of alleles by genome editing (GS + PAGE) when different numbers of QTN (1, 5, 10, or 20) were edited for all 25 sires

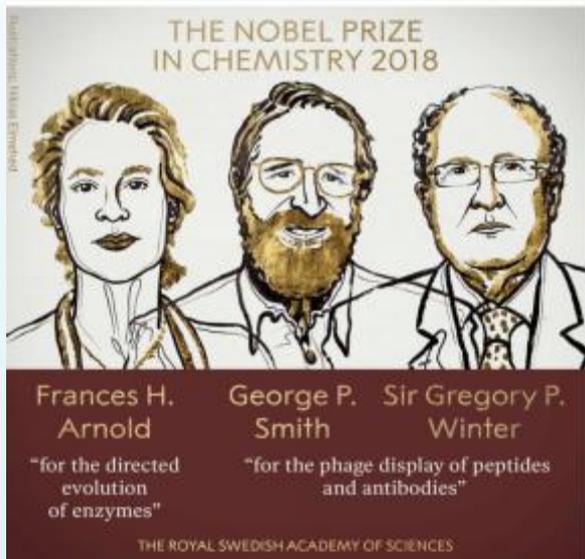
500 edits per generation were distributed across all of the 25 or the top 5 selected sires
GSE 2015

基因组编辑：其他问题

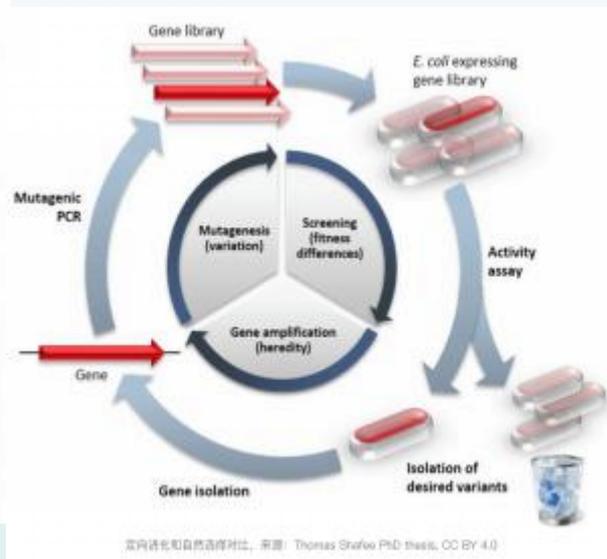
基因编辑技术是颠覆性技术，不仅用于基因功能、药物靶标筛选等基础研究，还可推动我国在育种工程、医学等领域的跨越式发展。

安全评价？ 在不引入外源基因的情况下，如果敲除基因，是否可不受转基因的监管范畴？基因编辑技术的产学研体系构建？与企业合作，创造育种新材料？

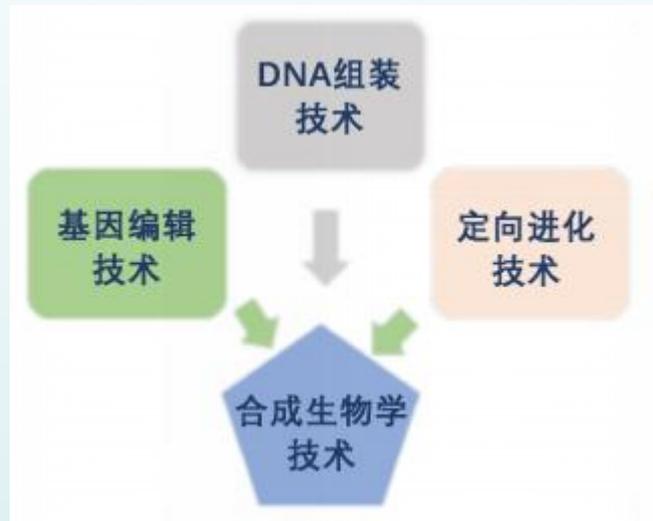
合成生物学与动物育种



美国女科学家 加利福尼亚理工
学院教授 因在定向进化领域
出的开创性工作 独一半的奖项



定向进化

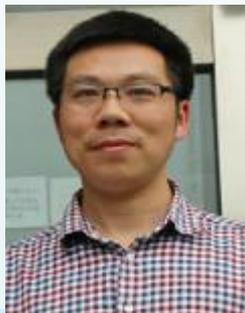


分子设计育种
合成生物学育种

小 结

- 40年来，分子生物学理论和技术发展迅速，越来越多的控制性状的关键基因被鉴定和应用
- 基因组选择技术应用越来越普遍，选择准确性大大提高
- 种猪克隆、基因组编辑技术应用更加广泛
- 分子设计育种（未来）：猪基因组人工设计育种，根据客户/市场个性化需求，精准设计

致 谢



李新云 教授



朱猛进 教授



曹建华
副教授



刘小磊
副研究员



马云龙
博士



项韬
副研究员



谢胜松
副教授



科技创新!
产业升级!

国家基金CG国际合作项目、国家生猪产业技术体系、湖北省等项目资助