文章编号:1000-1638(2026)05-0551-10 DOI:10.13484/j.nmgdxxbzk.20260511

牛干细胞在基因编辑中的应用*

海 超,许 颖,刘雪霏,宋丽爽,白春玲,苏广华,李光鹏,杨 磊
(内蒙古大学生命科学学院省部共建草原家畜生殖调控与繁育国家重点实验室,呼和浩特 010070)

摘要:围绕多能干细胞的建立策略以及基因编辑技术工具的发展历程,具体分析了二者联合应用的优点及目前存在的困难和挑战,提出可通过优化基因编辑系统和改善细胞培养条件等方法提高结合效率,旨在挖掘干细胞技术和基因编辑技术在农业和生物医学领域中的应用潜力。

关键词:牛;多能干细胞;基因编辑;CRISPR/Cas9;生物育种
中图分类号:Q813.11 **文献标志码**:A

牛是我国畜牧业发展中的关键物种之一,也是畜牧医学研究中不可替代的模式动物。目前,基因编辑技术在畜牧养殖以及畜牧医学方向的研究中至关重要。通过定点修饰家畜基因组,可精准实现内源基因的修饰和外源基因的整合,为传统畜牧养殖、疾病模型构建和生物制药等领域带来了新的机遇[1]。

作为重要的经济动物,牛在全球食物供应体系中的地位不可替代。据统计,家牛和水牛提供的牛奶和肉类占全球动物蛋白供应的45%。因此,有针对性地开展牛的基因编辑研究不仅有助于提升畜牧生产的效率与质量,同时对保障全球肉类和奶制品的供应也有重要意义[2-4]。已有报道发现,牛的基因组与人基因组有很强的相似性[5],因此牛的基因编辑为模拟人类疾病与探索治疗过程提供了有效工具。以牛为模型的研究,除了可以促进畜牧业的发展,更有助于揭示人类相关疾病的发病机制,并为对应的治疗方法提供借鉴。

CRISPR/Cas9以及其他新型基因编辑工具自问世以来,实现了家畜基因组定点修饰与编辑,加速了家畜育种进程。干细胞具有自我更新能力和多向分化能力,在基因编辑领域展现出独特的优势,通过对干细胞进行精准编辑,可实现多组织、多器官甚至整个个体的遗传改变[6]。一般干细胞根据分化潜能的不同,可分为以下3种类型:全能干细胞(Totipotent stem cells,TSCs)、多能干细胞(Pluripotent stem cells,PSCs)和单能干细胞(Unipotent stem cells,USCs)[7]。PSCs由于其较强的细胞干性,常被用作基因编辑研究的理想材料[8]。它不仅能够在体外长期维持未分化状态,还能进行稳定扩增并保持多向分化潜力,故此成为遗传改造实验中的优良载体。

牛作为一种大型的模式动物,具有繁殖周期长、后代选择效率低等特点,而对牛开展基因编辑,不仅可以提升遗传育种效率,实现牛肉质等遗传性状的精准调控,还能促进优良品种的快速培育,为畜牧业发展提供强有力的促进手段[9-10]。此外,PSCs在分化为体细胞后依然能够保持编辑后的基因特性,使其在整体动物水平上实现稳定的遗传改良[11]。因此,深入系统地探讨牛PSCs在基因编辑中的优势与前景,对于推动牛基因编辑技术的发展和应用具有重要的理论和实践意义。

* **收稿日期**:2025-10-21;**修回日期**:2025-12-09
基金项目:内蒙古自治区自然科学基金项目(2023MS03004);新疆维吾尔自治区揭榜挂帅项目(2023A02011-1-6);内蒙古自治区科技重大专项(2021ZD0009)
作者简介:海 超(1994—),男(蒙古族),内蒙古乌兰察布人,博士。主要从事动物育种研究。E-mail:h15248037201@163.com
通信作者:杨 磊(1987—),男,内蒙古呼和浩特人,教授,博士。主要从事动物生殖生物技术与生物育种研究。E-mail:mrknowall@126.com

1 牛多能干细胞(PSCs)系的建立

干细胞机制在发育研究和谱系探索中具有重要价值,已成为家畜基因组改良和体外育种策略的重要工具。PSCs凭借其独特的生物学特性,在基因编辑技术的应用中发挥了关键作用。PSCs主要包括两类:一类是来源于囊胚内细胞团(Inner cell mass,ICM)的胚胎干细胞(Embryonic stem cells,ESCs),另一类是通过对体细胞进行重编程获得的诱导多能干细胞(Induced pluripotent stem cells,iPSCs)。这两类细胞均具备自我更新能力和多向分化潜能,可分化形成内胚层、中胚层和外胚层3个胚层的全部细胞类型(图1)[12]。

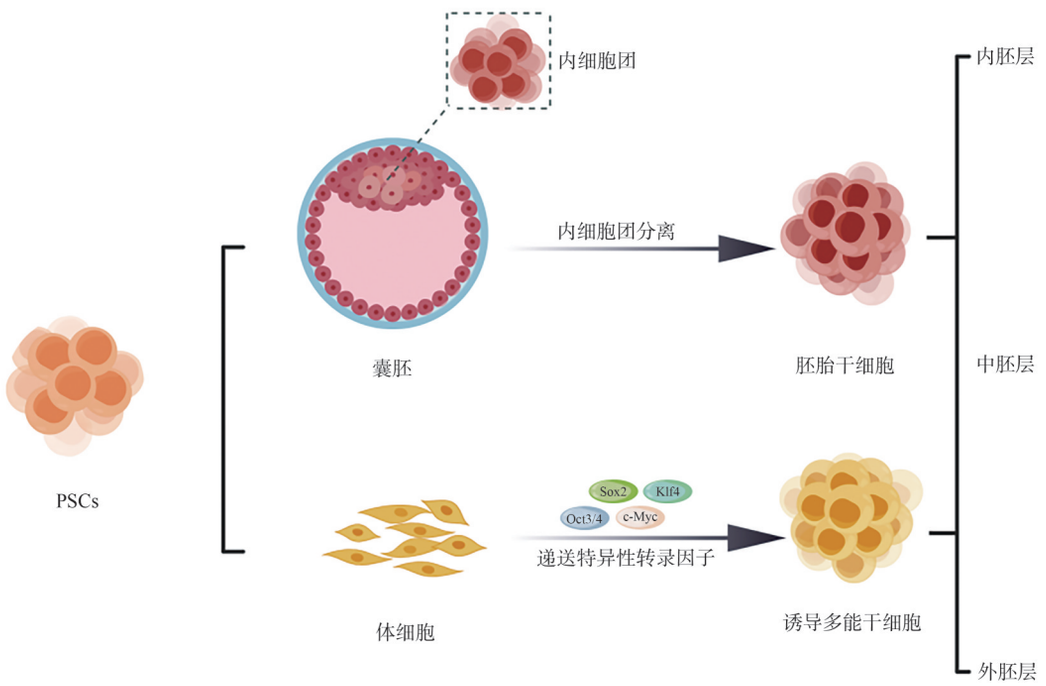


图1 多能干细胞的分类

Fig. 1 Classification of pluripotent stem cells

1.1 胚胎干细胞(ESCs)

ESCs是从早期胚胎或原始性腺组织中分离获得的一类细胞,具有在体外无限增殖、自我更新以及向多种细胞谱系分化的能力。20世纪80年代,研究人员首次从小鼠囊胚的ICM中成功分离出ESCs[13]。此后经过约17年,人类ESCs于1998年被首次报道[14]。ESCs以其强大的自我更新能力和多向分化潜能,被视为经典的PSCs,能够分化为三胚层来源的所有细胞类型。相比之下,从成体组织中获得的干细胞通常仅具有有限的多向分化能力,多为多潜能或单能类型。

牛ESCs作为一种重要经济动物干细胞,其研究对提升畜牧业生产效率与质量、推动医学领域新药和治疗方法开发意义重大。早期研究中,科研人员尝试使用小鼠ESCs培养条件进行培养,虽成功从牛囊胚ICM分离培养出牛ESCs样细胞,但这类细胞仅能增殖至第四代;采用人ESCs培养条件获得的牛ESCs样细胞,也存在无法自我更新且会自发分化的问题,因此使用小鼠或人ESCs培养条件始终未能建立真正的牛ESCs[15-16]。2018年,Bogliotti等[17]取得关键突破,他们使用合成纤维生长因子2和IWR-1的定制化TeSRI基础培养基,并以伽马射线灭活后的小鼠胚胎成纤维细胞(Mouse embryonic fibroblast,MEF)为饲养层,成功得到牛ESCs,这是首个在体外实现稳定始发多能状态的牲畜ESCs[18]。

1.2 诱导多能干细胞(iPSCs)

iPSCs通过重编程技术手段诱导体细胞(如皮肤或血液细胞)转化获得,其生物学特性与ESCs

高度相似。2006年，Takahashi等[19]利用携带多种ESCs特异性转录因子的逆转录病毒，成功将小鼠成纤维细胞重编程为iPSCs，该研究首次完成了体细胞体外重编程。后续研究表明，获得的iPSCs在体外可形成拟胚体（Embryoid bodies，EBs），在体内形成畸胎瘤，并且可以参与胚胎嵌合，其在多能性相关基因表达、信号通路依赖和表观遗传调控模式上均与iPSCs高度一致[20-21]。随后，Takahashi等[22]采用相同策略首次获得了来源于人类成纤维细胞的iPSCs，为人类疾病模型构建奠定了基础。

在牛iPSCs研究中，Han等[23]在2011年首次利用6种不同的转录因子从牛胚胎成纤维细胞中建立了具有多能性特征的牛iPSCs，但得到的细胞重编程不完全且自我更新能力有限。随后出现了多种重编程策略，包括利用逆转录病毒转导*OSKM*基因（包括*Oct3/4*、*Sox2*、*Klf4*和*c-Myc*）以及利用慢病毒介导的重编程体系[24-25]。为克服病毒整合导致突变风险，非病毒转座子系统（如PiggyBac和Sleeping Beauty等）被广泛应用，显著提升了重编程效率与细胞稳定性。利用该系统建立的牛iPSCs系在体外最高可传50代以上，单克隆效率达到40%[26]，实现了重要的突破。2015年，Kawaguchi等[27]通过引入含有*OSKM*基因的piggyBac载体，以羊膜细胞为媒介，获得了不同类型的牛iPSCs，该研究成为肉牛育种中的重要突破。

尽管使用非病毒转座子系统显著提高了牛体细胞重编程效率，但目前所制备的牛iPSCs仍然面临重编程不完全、难以维持初始态多能性、长期体外培养后的核型异常等问题[28]。体细胞重编程本质是通过调控染色质开放状态，使多能性基因重新激活并抑制分化基因表达，因此表观修饰在其中发挥关键作用。近些年，组蛋白的多种修饰（如乙酰化、巴豆酰化等）被证实可调控染色质结构和基因表达，从而影响iPSCs的重编程效率和质量[29]。组蛋白乙酰化作为重要的表观遗传修饰，可以通过改变染色质结构和调节基因表达来影响多种生物过程。组蛋白去乙酰化酶抑制剂（如丙戊酸、曲古抑菌素）可以提高重编程效率，其最适浓度、处理时间和方式已被系统研究[30]。组蛋白巴豆酰化作为一种较新的赖氨酸酰化修饰[31]，具有较强的染色质和靶标基因的激活功能[32]。由于其疏水链更长，所以推测可能比乙酰化更能有效地干扰染色质压缩，从而更强地激活基因表达。研究表明，外源补充巴豆酸钠可以提高细胞内巴豆酰化水平，促进体细胞的重编程和克隆胚胎发育[33]。因此，深入研究组蛋白修饰在体细胞重编程领域中的功能和原理，可以为优化牛iPSCs重编程体系提供关键的分子机制支撑。

2　基因编辑技术概述

2.1　传统基因编辑工具

基因编辑技术的发展大致经历了3个阶段（图2）：锌指核酸酶（Zinc finger nuclease，ZFN）、类转录激活因子效应核酸酶（Transcription activator-like effector nuclease，TALEN）以及当前广泛应用的CRISPR/Cas9系统。基因编辑技术的精确度和准确性都在不断提高，应用效率和适用范围也在不断扩大[34]。其中，CRISPR/Cas9基因编辑系统在家畜遗传改良与基因编辑研究领域具有革命性的意义[35]。其依赖RNA与Cas核酸酶的协同作用，显著提高编辑效率水平，并实现了多位点突变，成为基因工程的主流工具。

2.1.1　锌指核酸酶（ZFN）

ZFN是诞生于1996年的第一代编辑技术，主要通过锌指蛋白的功能特性进行编辑。其核心由多个串联重复的锌指结构域组成，每个锌指结构域约含30个氨基酸，具备Cys_2-His_2型保守结构，可折叠为β-β-α构型，特异性识别DNA中的3个连续碱基。通过连接3～6个锌指结构域，可识别9～18 bp的DNA序列，这一长度几乎覆盖整个基因组，靶向特异性较高[36]。将锌指蛋白与Fok Ⅰ内切酶的切割域融合后即可构建ZFN[37]。非特异性内切酶Fok Ⅰ仅在二聚体形成后具有切割活性。当两个识别位点间距为6～8 bp时，Fok Ⅰ二聚化并切割DNA，触发细胞的修复机制：若无外源模板，主要通过非同源末端连接（NHEJ）引入插入或缺失（Indels），实现基因敲除；若提供同源重组模板，则可通过同

源定向修复(HDR)进行精准编辑或外源序列插入。尽管ZFN为靶向编辑奠定了基础,但其构建过程复杂、成本高,并需依赖大规模锌指文库筛选,且非所有靶序列都能高效设计,因此靶点灵活性有限[38]。此外,脱靶效应也限制了其广泛应用。

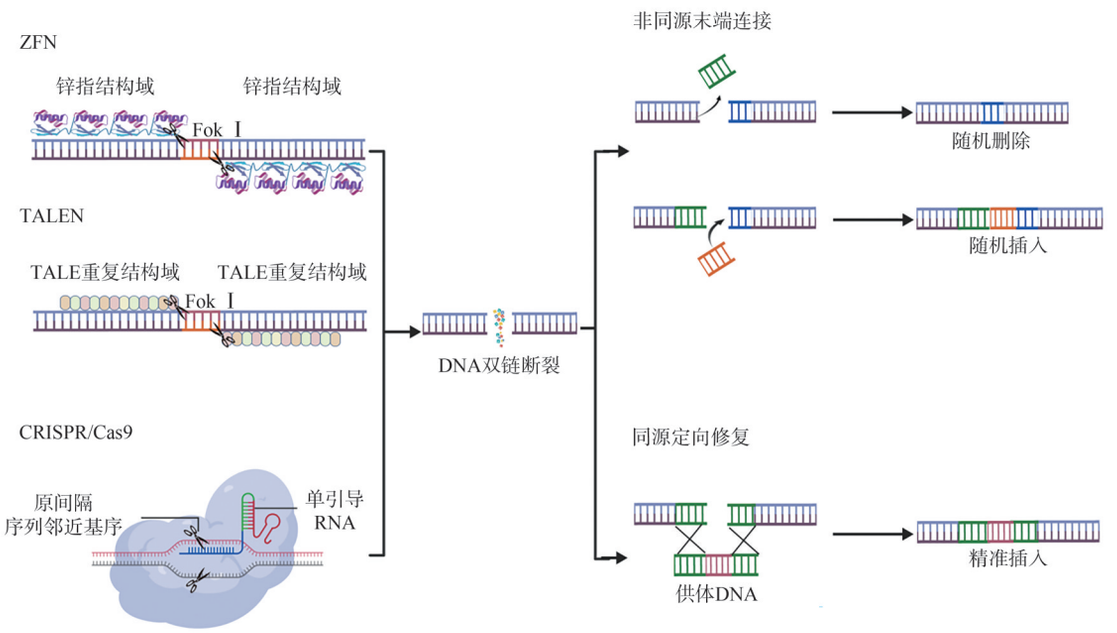


图2 3种基因编辑技术工作原理

Fig. 2 Working principles of the three gene editing technologies

2.1.2 类转录激活因子效应核酸酶(TALEN)

TALE蛋白于1989年被发现,但直到2009年,两组独立研究才揭示了TALE的DNA识别规律,并证明其能够特异性结合DNA[39-40],为TALEN的发展提供了理论基础。2010年,Christian等[41]首次提出将TALE与Fok Ⅰ结合形成融合蛋白TALEN,并验证其具有靶向切割功能。2012年,TALE-DNA复合物的晶体结构被解析,进一步明确了其识别机制[42]。TALE蛋白由N端分泌信号、中央DNA结合域、核定位信号和C端激活域组成。其中,中央DNA结合域包含多个重复单元,每个单元约33~35个氨基酸,第12和13位氨基酸被称为可变双残基(RVD),负责识别特定碱基。目前常用RVD识别规则为:HD识别C、NG识别T、NI识别A、NN识别G。TALEN通过将TALE的DNA结合域与Fok Ⅰ切割域结合,可在目标位点引发DNA双链断裂,并通过NHEJ或HDR实现基因敲除或精准编辑。其常用构建方法为“Golden Gate组装法”,通过模块化组装将不同RVD单元逐一连接到含Fok Ⅰ和核定位信号的载体中。

2.1.3 CRISPR/Cas系统

CRISPR/Cas9系统源自细菌和古细菌的获得性免疫机制,由高度保守的回文重复序列(repeat)与间隔序列(spacer)交替组成。CRISPR/Cas系统最早于1987年被发现,并于2002年被正式命名[43]。2007年至2010年期间外源遗传元件逐渐被明确[44-45]。在CRISPR/Cas9系统中,靶点识别主要包括3个阶段:一是适应阶段,通过筛选潜在整合到染色体的目标DNA;二是产生crRNA(CRISPR RNA);三是靶向干扰阶段。Ⅱ型CRISPR系统的Cas9最为简洁,仅需Cas9核酸酶、crRNA和tracrRNA(crRNA和tracrRNA融合成为单一向导RNA,即sgRNA)即可实现高效双链DNA切割。Cas9通过HNH结构域切割与crRNA互补的DNA链,RuvC结构域切割非互补链,从而完成双链断裂[46]。

然而CRISPR/Cas系统仍然存在一些局限性。第一,其切割活性高度依赖原间隔序列邻近基序(Protospacer adjacent motif,PAM),如Streptococcus pyogenes Cas9需5′-NGG-3′PAM,所以这一特

性也限制了其靶点选择范围；第二，长度为 20 nt 的 crRNA 不能够保证目标靶位的绝对选择，而且 crRNA 在一定程度上存在较大的脱靶性；第三，真核细胞中的表观遗传环境也可能影响 Cas9 的切割效率；第四，在递送方面，由于 Cas9 蛋白尺寸较大，也为其体内治疗应用带来挑战。

2.2　新型基因编辑工具

虽然 CRISPR/Cas9 技术的出现为基因编辑的发展作出了突出贡献，但其仍存在 DNA 双链断裂（DSB）引发的插入/缺失突变、染色体重排、p53 激活和细胞周期阻滞等问题[47]。为克服这些不足，碱基编辑器（Base editor，BE）和先导编辑器（Prime editor，PE）等新型基因编辑工具陆续被开发[48]。

2.2.1　碱基编辑器（BE）

BE 于 2016 年被提出，是无需产生 DSB 即可实现单碱基精准替换的技术[48]。主要包括胞嘧啶碱基编辑器（Cytosine base editor，CBE）和腺嘌呤碱基编辑器（Adenine base editor，ABE），分别实现 C→T（或 G→A）和 A→G（或 T→C）的碱基转换，理论上可纠正大多数由单核苷酸多态性（SNP）引起的人类遗传疾病[49-50]。

CBE 由胞苷脱氨酶与 Cas9 融合产生，可将 C 脱氨为 U，并在 DNA 复制中被识别为 T，从而实现 GC→TA 的碱基替换[51]。ABE 则由 nCas9 与工程化腺嘌呤脱氨酶融合构成，可将 A 转化为 I，使 A→G 替换得以实现[52-53]。相较于 CBE，ABE 脱靶率更低、安全性更高[54]。

总体而言，CBE 与 ABE 构成了第一代高精度碱基编辑系统，为精准基因修复和治疗提供了更高效、安全的手段。

2.2.2　先导编辑器（PE）

碱基编辑仅能实现 4 种过渡突变，限制了其编辑范围。2019 年 PE 被开发[55]，其不需要 DSB 与供体模板即可实现碱基替换、插入和删除[56]。PE 主要由 3 个部分组成，分别是 H840A nCas9、逆转录酶（MMLV-RT）和 pegRNA（prime editor guide RNA）。pegRNA 是一种复杂的分子，既包含识别目标 DNA 位点的间隔序列，也包含编码所需编辑的 RT 模板序列[57]。在由 pegRNA 引导的 PE 过程中，编辑操作在目标 DNA 序列结合后启动。首先，nCas9（H840A）在非靶链上产生单链切口，切口处的游离端与 pegRNA 3′端的引物结合序列配对。随后，MMLV-RT 以该结合位点为起点，利用 pegRNA 中的逆转录模板（RT 模板）合成含有编辑信息的新 DNA 链。最后，细胞自身的 DNA 修复机制将该新合成链整合入基因组，从而完成精准的基因编辑[58]。因此，pegRNA 的结构稳定性与设计优化是决定编辑成功率的关键因素之一[59]。PE 技术的出现使“可编写 DNA 序列”成为现实，为基因治疗带来了更大可能。

3　牛干细胞用于基因编辑的前景

3.1　干细胞用于基因编辑的发展

目前，干细胞的基因编辑研究主要集中于人类和小鼠，牛干细胞相关研究仍处于初步探索阶段。人类 ESCs 和人类 iPSCs 因其多能性和自我更新能力，被广泛用于疾病模型构建、遗传变异鉴定和基因修复[60-62]。如对携带眼部疾病单核苷酸变异的人 iPSCs 进行基因编辑，经诱导分化获得视网膜细胞，可助力眼科疾病的潜在治疗方法的研究[63]。在小鼠体系中，通过敲低 SNCA A53T 突变 iPSCs 中的 α-突触核蛋白，将其分化为神经干细胞（Neural stem cells，NSCs）并移植至帕金森病（Parkinson′s disease，PD）模型小鼠后，不仅提高了小鼠的协调能力、平衡能力和运动活动能力，而且显著延长了它们的寿命[64]。此外，研究人员利用宽 PAM 识别的 SpCas9-NG 在小鼠 iPSCs 中修正 F9 基因，使分化的肝细胞样细胞恢复分泌凝血因子，移植后可以显著提升小鼠凝血指标[65]。总之，CRISPR/Cas9 基因编辑技术和干细胞二者融合将会成为引领当今生物医学发展、实现精准医疗的主要途径之一。

3.2　牛干细胞用于基因编辑的设想

目前，牛基因组编辑研究主要集中在抗病性提升（如牛结核病）[66-67]、生产效率改良[如肌肉生长

抑制素基因(*Myostatin*,*MSTN*)敲除[68]]以及消减牛乳致敏性(敲除β-乳球蛋白基因)[69]等方面。但这些成果多依赖体细胞核移植,基于牛干细胞开展基因编辑的技术仍不成熟。一项研究首次将牛和羊的单倍体孤雄ESCs(Haploid androgenetic embryonic stem cells,haESCs)与无整合游离型引导编辑(ePE)系统结合,在细胞中实现*MSTN*基因100%精准编辑,再利用鱼精蛋白介导的胞质内haESCs细胞注射技术,成功生成可育的*MSTN*基因修饰个体[70],为大型家畜的快速遗传改良提供了可行路径。由于牛的繁殖周期较长,传统育种成本高,干细胞技术结合基因编辑、核移植、胚胎嵌合,可缩短世代间隔,加速优良牲畜的选育进程。牛干细胞的自我更新和分化潜能有利于早期筛选优良遗传背景,加速家畜性状提升。同时,干细胞可作为保存遗传信息的有效工具,通过冷冻保存与细胞核移植技术,用于保护濒临灭绝的品种。

4 总结

4.1 意义

基因编辑技术与干细胞生物学的不断融合发展,为精准医疗与动物育种带来重大机遇[71-72]。有研究显示,牛在早期发育阶段的部分分子标志物表达模式与人类更为接近,提示其在某些再生医学相关研究中可能具有特定优势[73]。

随着基因编辑技术的迅猛发展,牛多能干细胞作为体外疾病模型、遗传操作载体以及基因功能研究平台的潜力不断提升。基于其自我更新和分化潜能,可在特定位点实现敲除、敲入或定点突变,从而构建高效的牛细胞基因组修饰体系。这不仅为优良品种改良提供了新的生物学策略,也为构建与人类疾病相关的大动物模型提供了参考框架。将干细胞技术与精准基因编辑工具结合,有望推动畜牧遗传改良和生物医学模型构建取得更具突破性的进展。

4.2 挑战与展望

尽管近几年基因编辑技术和干细胞技术飞速发展,但将其应用于牛干细胞上仍然存在限制和挑战。首先牛干细胞在长期体外培养下易受培养环境微小变化影响,其多能性维持和基因组稳定性对营养供给、细胞因子组成、培养基成分和酸碱度高度敏感[74]。

其次,在基因编辑层面,CRISPR/Cas9系统仍可能受到gRNA的非特异性结合或Cas蛋白脱靶活性的影响,进而降低编辑效率或引发非预期基因组改变[75]。特别是牛基因组中高GC含量区域(如部分抗病基因启动子区)会增加编辑工具的靶向操作难度。此外,PE等精准编辑技术在牛细胞中的链延伸效率和编辑稳定性仍有待提高,脱靶效应可能导致细胞状态紊乱或早期胚胎发育受阻,进一步限制其实际应用。

在监管层面,各国对基因编辑动物的监管标准差异显著,欧盟将其归为转基因生物严格管控,而美国、巴西等国在部分情境下实施简化审查程序。目前全球尚未形成统一的基因编辑牛食品安全评价标准,特别是社会层面对“基因编辑食品”的接受度存在认知偏差,部分消费者担忧其长期食用的生物安全性。

未来的研究需要进一步优化牛PSCs的培养体系,开发牛种特异性sgRNA,提升HDR模板构建策略,以提高特定位点的精准编辑成功率。此外,应加强基因编辑技术与干细胞技术在大动物模型中的联合应用,为复杂疾病建模、再生医学和畜牧育种提供更加可靠的实验基础。通过推动两项技术的深度融合,有望构建更稳定、可控且安全的编辑体系,为人类健康和畜牧业发展带来新的突破。

参考文献:

[1] Ruan J X,Xu J,Chen-Tsai R Y,et al. Genome editing in livestock:Are we ready for a revolution in animal breeding industry?[J]. Transgenic Research,2017,26(6):715-726.

[2] Liu Y,Liu S,Sheng H,et al. Revolutionizing cattle breeding:Gene editing advancements for enhancing economic

traits[J]. Gene,2024,927:148595.

[3] Eenennaam A L V. Application of genome editing in farm animals:Cattle[J]. Transgenic Research,2019,28(Suppl 2):93-100.

[4] 尉翔栋,吕晨晨,朱肖亭,等. 利用CRISPR-Cas9基因编辑技术制备牛*MSTN*基因编辑胚胎[J]. 河南农业科学,2019,48(2):131-136.

[5] Elsik C G,Tellam R L,Worley K C,et al. The genome sequence of taurine cattle:A window to ruminant biology and evolution[J]. Science,2009,324(5926):522-528.

[6] Eggan K,Akutsu H,Loring J,et al. Hybrid vigor,fetal overgrowth,and viability of mice derived by nuclear cloning and tetraploid embryo complementation[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,2001,98(11):6209-6214.

[7] Amin N,Tan X N,Ren Q N,et al. Recent advances of induced pluripotent stem cells application in neurodegenerative diseases[J]. Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry,2019,95:109674.

[8] Soto D A,Ross P J. Pluripotent stem cells and livestock genetic engineering[J]. Transgenic Research,2016,25(3):289-306.

[9] Xu Y N,Song L S,Wei Z Y,et al. Application of gene editing technology in cattle genetic breeding[J]. Agriculture Communications,2025,3(2):100086.

[10] 卜力格,海超,宋丽爽,等. *MSTN*突变牛与野生牛的肉质性状差异分析[J]. 内蒙古大学学报(自然科学版),2026,57(2):127-133.

[11] Zhao L X,Gao X F,Zheng Y X,et al. Establishment of bovine expanded potential stem cells[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,2021,118(15):e2018505118.

[12] Kumar D,Talluri T R,Selokar N L,et al. Perspectives of pluripotent stem cells in livestock[J]. World Journal of Stem Cells,2021,13(1):1-29.

[13] Martin G R. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,1981,78(12):7634-7638.

[14] Thomson J A,Itskovitz-Eldor J,Shapiro S S,et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts[J]. Science,1998,282(5391):1145-1147.

[15] Wang L,Duan E K,Sung L Y,et al. Generation and characterization of pluripotent stem cells from cloned bovine embryos[J]. Biology of Reproduction,2005,73(1):149-155.

[16] Wu X,Song M,Yang X,et al. Establishment of bovine embryonic stem cells after knockdown of CDX2[J]. Scientific Reports,2016,6:28343.

[17] Bogliotti Y S,Wu J,Vilarino M,et al. Efficient derivation of stable primed pluripotent embryonic stem cells from bovine blastocysts[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,2018,115(9):2090-2095.

[18] Navarro M,Laiz-Quiroga L,Blüguermann C,et al. Livestock embryonic stem cells for reproductive biotechniques and genetic improvement[J]. Animal Reproduction,2024,21(3):e20240029.

[19] Takahashi K,Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors[J]. Cell,2006,126(4):663-676.

[20] Liang G Y,Zhang Y. Embryonic stem cell and induced pluripotent stem cell:An epigenetic perspective[J]. Cell Research,2013,23(1):49-69.

[21] Maherali N,Sridharan R,Xie W,et al. Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution[J]. Cell Stem Cell,2007,1(1):55-70.

[22] Takahashi K,Tanabe K,Ohnuki M,et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors[J]. Cell,2007,131(5):861-872.

[23] Han X P,Han J Y,Ding F R,et al. Generation of induced pluripotent stem cells from bovine embryonic fibroblast

cells[J]. Cell Research,2011,21(10):1509-1512.
[24] Jiang Y,Cai N N,An X L,et al. Naïve-like conversion of bovine induced pluripotent stem cells from sertoli cells[J]. Theriogenology,2023,196:68-78.
[25] Jiang Y,An X L,Yu H,et al. Transcriptome profile of bovine iPSCs derived from sertoli cells[J]. Theriogenology,2020,146:120-132.
[26] Talluri T R,Kumar D,Glage S,et al. Derivation and characterization of bovine induced pluripotent stem cells by transposon-mediated reprogramming[J]. Cellular Reprogramming,2015,17(2):131-140.
[27] Kawaguchi T K M,Tsukiyama T,Kimura K,et al. Generation of naïve bovine induced pluripotent stem cells using piggyBac transposition of doxycycline-inducible transcription factors[J]. PLoS One,2015,10(8):e0135403.
[28] Pillai V V,Kei T G,Reddy S E,et al. Induced pluripotent stem cell generation from bovine somatic cells indicates unmet needs for pluripotency sustenance[J]. Animal Science Journal,2019,90(9):1149-1160.
[29] Gao S Q,Xiao H,Luo H D,et al. Histone acetylation:A key regulator of inflammatory responses[J]. Life Sciences,2025,380:123936.
[30] Mahapatra P S,Singh R,Kumar K,et al. Valproic acid assisted reprogramming of fibroblasts for generation of pluripotent stem cells in buffalo (*Bubalus bubalis*)[J]. The International Journal of Developmental Biology,2017,61(1/2):81-88.
[31] Tan M J,Luo H,Lee S,et al. Identification of 67 histone marks and histone lysine crotonylation as a new type of histone modification[J]. Cell,2011,146(6):1016-1028.
[32] Fang Y,Xu X J,Ding J,et al. Histone crotonylation promotes mesoendodermal commitment of human embryonic stem cells[J]. Cell Stem Cell,2021,28(4):748-763.
[33] Li W N,Yan W,Hao F,et al. Effects of crotonylation on reprogramming of cashmere goat somatic cells with different differentiation degrees[J]. Animals,2022,12(20):2848.
[34] Lee K,Uh K,Farrell K. Current progress of genome editing in livestock[J]. Theriogenology,2020,150:229-235.
[35] Nigam D,Bhoomika K. Targeted genome editing by CRISPR/Cas9 for livestock improvement[M]//Mondal S,Lakhan S R. Emerging issues in climate smart livestock production. Cambridge,Massachusetts:Academic Press,2022:415-447.
[36] Dreier B,Fuller R P,Segal D J,et al. Development of zinc finger domains for recognition of the 5′-CNN-3′ family DNA sequences and their use in the construction of artificial transcription factors[J]. Journal of Biological Chemistry,2005,280(42):35588-35597.
[37] Zhao J,Lai L X,Ji W Z,et al. Genome editing in large animals:Current status and future prospects[J]. National Science Review,2019,6(3):402-420.
[38] Urnov F D,Rebar E J,Holmes M C,et al. Genome editing with engineered zinc finger nucleases[J]. Nature Reviews Genetics,2010,11(9):636-646.
[39] Moscou M J,Bogdanove A J. A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors[J]. Science,2009,326(5959):1501.
[40] Boch J,Scholze H,Schornack S,et al. Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type Ⅲ effectors[J]. Science,2009,326(5959):1509-1512.
[41] Christian M,Cermak T,Doyle E L,et al. Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases[J]. Genetics,2010,186(2):757-761.
[42] Deng D,Yan C Y,Pan X J,et al. Structural basis for sequence-specific recognition of DNA by TAL effectors[J]. Science,2012,335(6069):720-723.
[43] Jansen R,Embden J D A V,Gaastra W,et al. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes[J]. Molecular Microbiology,2002,43(6):1565-1575.
[44] Garneau J E,Dupuis M È,Villion M,et al. The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA[J]. Nature,2010,468(7320):67-71.

[45] Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes[J]. Science, 2007, 315(5819): 1709-1712.

[46] 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.

[47] Haapaniemi E, Botla S, Persson J, et al. CRISPR-Cas9 genome editing induces a p53-mediated DNA damage response[J]. Nature Medicine, 2018, 24(7): 927-930.

[48] 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.

[49] Liang Y H, Chen F B, Wang K P, et al. Base editors: Development and applications in biomedicine[J]. Frontiers of Medicine, 2023, 17(3): 359-387.

[50] Huang T P, Newby G A, Liu D R. Precision genome editing using cytosine and adenine base editors in mammalian cells[J]. Nature Protocols, 2021, 16(2): 1089-1128.

[51] Wang J, Wang K, Deng Z, et al. Engineered cytosine base editor enabling broad-scope and high-fidelity gene editing in *Streptomyces*[J]. Nature Communications, 2024, 15(1): 5687.

[52] Arantes P R, Chen X Y, Sinha S, et al. Dimerization of the deaminase domain and locking interactions with Cas9 boost base editing efficiency in ABE8e[J]. Nucleic Acids Research, 2024, 52(22): 13931-13944.

[53] Xiao Y L, Wu Y, Tang W X. An adenine base editor variant expands context compatibility[J]. Nature Biotechnology, 2024, 42(9): 1442-1453.

[54] Neugebauer M E, Hsu A, Arbab M, et al. Evolution of an adenine base editor into a small, efficient cytosine base editor with low off-target activity[J]. Nature Biotechnology, 2023, 41(5): 673-685.

[55] 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.

[56] Chen P J, Liu D R. Prime editing for precise and highly versatile genome manipulation[J]. Nature Reviews Genetics, 2023, 24(3): 161-177.

[57] Lee J, Kweon J, Kim Y. Emerging trends in prime editing for precision genome editing[J]. Experimental & Molecular Medicine, 2025, 57(7): 1381-1391.

[58] Shuto Y, Nakagawa R, Zhu S Y, et al. Structural basis for pegRNA-guided reverse transcription by a prime editor [J]. Nature, 2024, 631(8019): 224-231.

[59] Li X Y, Wang X, Sun W J, et al. Enhancing prime editing efficiency by modified pegRNA with RNA G-quadruplexes [J]. Journal of Molecular Cell Biology, 2022, 14(4): mjac022.

[60] Jiang Y Q, Zhou Y X, Bao X P, et al. An ultrasensitive calcium reporter system via CRISPR-Cas9-mediated genome editing in human pluripotent stem cells[J]. iScience, 2018, 9: 27-35.

[61] Bruntraeger M, Byrne M, Long K, et al. Editing the genome of human induced pluripotent stem cells using CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein complexes[J]. Methods in Molecular Biology, 2019, 1961: 153-183.

[62] Bassett A R. Editing the genome of hiPSC with CRISPR/Cas9: Disease models[J]. Mammalian Genome, 2017, 28 (7/8): 348-364.

[63] Getachew H, Chinchilla B, Fernandez-Godino R. Genome editing of induced pluripotent stem cells using CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein complexes to model genetic ocular diseases[J]. Methods in Molecular Biology, 2022, 2549: 321-334.

[64] Wang C H, Lin G C, Fu R H, et al. Neural stem cells derived from α-synuclein-knockdown iPS cells alleviate Parkinson's disease[J]. Cell Death Discovery, 2024, 10(1): 407.

[65] Hiramoto T, Kashiwakura Y, Hayakawa M R S, et al. PAM-flexible Cas9-mediated base editing of a hemophilia B mutation in induced pluripotent stem cells[J]. Communications Medicine, 2023, 3(1): 56.

[66] 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 Biology, 2017, 18(1): 13-27.

[67] Wu H B, Wang Y S, Zhang Y, et al. TALE nickase-mediated SP110 knockin endows cattle with increased resistance to tuberculosis[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2015, 112(13): E1530-E1539.

[68] Proudfoot C, Carlson D F, Huddart R, et al. Genome edited sheep and cattle[J]. Transgenic Research, 2015, 24(1): 147-153.

[69] Yu S L, Luo J J, Song Z Y, et al. Highly efficient modification of *beta-lactoglobulin* (BLG) gene via zinc-finger nucleases in cattle[J]. Cell Research, 2011, 21(11): 1638-1640.

[70] Yang L, Di A Q, Song L S, et al. Generation of modified cows and sheep from spermatid-like haploid embryonic stem cells[J]. Nature Biotechnology, 2026, 44(8): 1361-1369.

[71] Mcgonigle P, Ruggeri B. Animal models of human disease: Challenges in enabling translation[J]. Biochemical Pharmacology, 2014, 87(1): 162-171.

[72] Maynard L H, Humbert O, Peterson C W, et al. Genome editing in large animal models[J]. Molecular Therapy, 2021, 29(11): 3140-3152.

[73] Hu H, Zheng N, Gao H N, et al. Immortalized bovine mammary epithelial cells express stem cell markers and differentiate in vitro[J]. Cell Biology International, 2016, 40(8): 861-872.

[74] Jiang Z L, Sun J W, Dong H, et al. Transcriptional profiles of bovine in vivo pre-implantation development[J]. BMC Genomics, 2014, 15(1): 756.

[75] Luo Y, Chen Y W, Xie H Z, et al. Interpretable CRISPR/Cas9 off-target activities with mismatches and indels prediction using BERT[J]. Computers in Biology and Medicine, 2024, 169: 107932.

(责任编委 那顺布和)

Application of Bovine Stem Cells in Gene Editing

HAI Chao, XU Ying, LIU Xuefei, SONG Lishuang, BAI Chunling,
SU Guanghua, LI Guangpeng, YANG Lei
(*State Key Laboratory of Reproductive Regulation and Breeding of Grassland Livestock, School of Life Sciences, Inner Mongolia University, Hohhot* 010070, *China*)

Abstract: The establishment strategies of pluripotent stem cells and the development history of gene editing technology tools are systematically reviewed, with an emphasis on the advantages of their combined application as well as the key challenges currently faced. Furthermore, strategies such as optimizing gene-editing systems and improving cell culture conditions are proposed to enhance their synergistic efficiency, with the aim of further exploring the application potential of stem cell and gene-editing technologies in agriculture and biomedicine.

Key words: bovine; pluripotent stem cells; gene editing; CRISPR/Cas9; biological breeding