

冷冻干燥精子介导基因编辑 在肉牛育种中的潜力与应用前景*

海超,张鑫怡,宋丽爽,刘雪霏,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:基因编辑技术在肉牛育种中展现出巨大的潜力,但目前精子编辑技术仍存在局限,仅能对精原干细胞进行编辑,无法直接高效地编辑精子。冻干精子技术作为保存遗传资源的有效手段,具有保存时间长、运输方便等优势,若能实现利用冷冻干燥精子介导基因编辑,将极大地提升育种效率,缩短育种周期。本文综述了冻干精子、基因编辑技术在肉牛育种中的应用现状,提出了冻干精子介导基因编辑的设想路径,并分析其应用潜力与育种价值,旨在为肉牛育种提供新思路。

关键词:冷冻干燥精子;基因编辑;肉牛育种;精原干细胞;育种效率

中图分类号:S813.3 **文献标志码:**A

生殖细胞的基因编辑作为当下的研究热点,其核心目标是通过精准编辑遗传物质,实现所需性状培育和遗传性疾病的治疗^[1]。截至目前,有关精子编辑的研究多依赖新鲜或液氮冷冻的精子,编辑过程中存在3点局限:一是保存周期短,液氮冷冻精子需持续维持-196℃环境,成本高昂且易受液氮挥发的影响;二是运输受限,利用液氮罐进行运输存在安全风险,实现跨地域资源共享耗费大量财力和人力;三是样本损耗大,反复冻融会导致精子活力与DNA完整性下降,进而影响编辑效率^[2-3]。

冷冻干燥精子技术的出现为解决上述问题提供了支撑^[4-5]。冷冻干燥是一种通过冰的升华来干燥冷冻材料的方法,其过程涉及物质从固态(冰)直接转变为气态(蒸汽)。冷冻干燥的主要优势之一是储存和运输不再需要液氮和干冰,它们可以在室温或4℃条件下储存,从而大幅降低储存和运输成本^[6]。1957年,Leidl等^[7]首次报道了牛精子的冷冻干燥尝试。尽管当时因为甘油浓度达到毒性水平、水的过量清除和形态损坏(中间碎片偶尔断裂)等原因未能实现后代出生,但奠定了冻干精子的技术基础^[8]。1976年,卵胞浆内单精子注射(Intracytoplasmic sperm injection, ICSI)技术的出现使冻干精子研究进入实用阶段。通过使用ICSI技术将人类冷冻干燥精子注射到仓鼠卵母细胞中,观察到生殖核形成,标志着该技术可以进入实用化的研究阶段^[9]。21世纪以来,该技术通过低温脱水使精子含水量降至5%以下,能够实现在不同环境下长期保存:常温可保存不超过1个月,4℃可保存1年以上,-20℃可保存10年,且运输时不需要特殊的保护,运输成本仅为液氮冷冻的1/5。1998年,Wakayama等^[10]首次证实冷冻干燥小鼠精子可支持正常胚胎发育并获得健康后代,自此冷冻干燥精

* 收稿日期:2025-10-21;修回日期:2025-12-09

基金项目:内蒙古自治区科技重大专项(2021ZD0009);新疆维吾尔自治区揭榜挂帅项目(2023A02011-1-6);
内蒙古自治区自然科学基金项目(2023MS03004)

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

子技术在辅助生殖领域正式开始了不断探索前进之路。随着研究的快速发展,已形成了在小鼠中冷冻干燥精子制备的完整研究链条。2004年,Liu等^[11]将230个冷冻干燥精子注射到卵母细胞,随后移植到8只受体,诞生了1只由冻干精子发育而来的家兔后代。同年,Kwon等^[12]研究发现,猪卵母细胞可通过注射冷冻干燥精子完成受精,并发育至囊胚阶段,冻干4 h的精子分离出的头部效果最好,且冻干时间、储存时长及钙离子载体处理均会影响受精与胚胎发育效果。2007年诞生了冷冻干燥精子注射精子发育而来的猪^[13]。这些研究结果说明精子冷冻干燥技术可用于保存大多数物种的精子。

除了在辅助生殖领域的应用,利用冷冻干燥精子进行基因编辑也为研究极端环境下基因组的稳定性及编辑效率调控机制提供了独特的模型,该技术可实现“一次冷冻干燥、多次编辑”,大幅降低了基因编辑的样本成本,更适用于对珍稀物种或临床稀缺样本的研究。目前精子编辑主要集中在对前体精原干细胞(Spermatogonial stem cell, SSC)的编辑。2015年,Chapman等^[14]利用CRISPR/Cas9和SSC在大鼠中实现了靶向生殖系修饰。SSC本身编辑效率较低,因此,本文旨在探讨冷冻干燥精子介导基因编辑在肉牛育种中的潜力与应用前景,通过提出技术设想路径,分析其应用价值与挑战,为未来研究方向提供参考。目前,基因编辑(尤其是CRISPR/Cas系统)已经在家畜育种中显示出巨大的潜力,可用于引入优良等位基因、消除有害等位基因或构建耐病耐热等定向性状。然而,受限于样本的保存与跨地域共享,以及现有SSC编辑/克隆方法的高成本与低通量属性,实现产业化推广仍存在瓶颈。冷冻干燥精子因其常温或4℃条件下长期保存、低运输成本等优势,为“基因编辑按需化、种质全球化备份”提供了新的可能性。该方向的核心假设是:尽管冷冻干燥精子失去运动性,但其染色体核物质在适配的保护剂体系(如EDTA/EGTA、海藻糖、谷氨酸钠)与优化干燥工艺下可长期维持DNA结构稳定性,从而保持CRISPR/Cas9等基因编辑工具识别靶点的完整性,并在ICSI条件下注射后仍具备诱导胚胎发育的能力。Wakayama等^[10]的研究已证明冷冻干燥小鼠精子经ICSI可产生正常后代,并进一步支持其核遗传物质的功能性保留,这为其作为基因编辑载体提供了实验基础^[15]。

1 SSC介导的基因编辑技术在育种中的应用现状

1.1 SSC编辑技术的研究进展

近年来,SSC编辑技术在肉牛育种中占据了重要位置。通过分离后培养肉牛SSC,借助CRISPR/Cas9、转录激活因子样效应物核酸酶(Transcription activator-like effector nucleases, TALENs)等基因编辑工具,成功地在SSC基因组中特定位置引入突变或者插入外源基因,从而实现了对目标性状的改良。2015年,Wu等^[16]首次在小鼠模型中利用CRISPR/Cas9系统对SSC进行体外疾病基因编辑修复,将编辑后SSC移植生成精子,产生后代,成功治愈相关遗传性疾病。2015年,Sato等^[17]用TALENs和CRISPR/Cas9对小鼠SSC进行了基因组编辑,将体外编辑流程标准化:体外长期扩增SSC+基因编辑+睾丸移植+子代表型检测,为后续利用SSC进行基因编辑及精子发生机制研究提供了可真实参考的范式,并且证实了SSC基因组编辑非生殖相关基因并不会干扰生殖干细胞的精子生成能力。但是目前SSC编辑技术仍然面临着一些难题,比如SSC分离与培养难度较大^[18],编辑效率仍然有待提高^[19],以及编辑后干细胞的功能维持和传递能力仍需进一步验证^[20]等。

1.2 SSC编辑技术路径

通过上述方法得到SSC后,利用编辑载体得到编辑后的细胞,可以通过以下两种途径获得基因编辑的后代:克隆技术与自然繁殖。克隆技术是将编辑后的SSC注射到去核卵母细胞中,利用SSC的基因组和卵母细胞的全能性,经体外培养与代孕母体的妊娠获得基因编辑个体,该方法可快速制备大量基因编辑后代,但技术复杂、成本高、成功率低,并且存在伦理争议。自然繁殖则是将编辑后的SSC移植到受体公牛体内,使其发生分化从而产生编辑后的精子,通过自然交配或人工授精方式繁殖,该方法更符合自然规律,但周期较长,且编辑精子产生的效率与稳定性有待提高^[16]。

2 利用冷冻干燥精子进行基因编辑的技术基础

利用冷冻干燥精子开展基因编辑面临两个核心问题:首先是冷冻干燥精子的生物学特性是否适配基因编辑操作;其次是冻干体系的优化需平衡冷冻干燥保存效果与基因编辑效率。

2.1 冷冻干燥精子的生物学特性

冷冻干燥精子在冷冻后会丧失运动能力和自然受精能力,但基因组DNA仍保持稳定,从而为基因编辑提供了基础。冻干处理可在极低含水条件下维持精子既有的高度浓缩核结构,并减少额外损伤。冷冻干燥过程会降低冻干小鼠精子中染色体的完整性,但如果精子在冷冻干燥之前与二价阳离子螯合剂一起孵育,则会减轻染色体损伤的诱导^[21]。

Kawase等^[22]研究发现,在合适的缓冲剂与二价阳离子螯合剂存在的情况下,小鼠冷冻干燥精子的DNA碎片化指数(DNA fragmentation index,DFI)仅为8%~12%,与新鲜精子的5%~10%接近。通过电子显微镜对人类精子冷冻干燥后的外在形态特征进行分析后发现,大部分精子维持原有形态,头尾相连,但也存在干燥过程对精子的膜结构等造成一定损伤的问题,不过由于其DNA完整性并没有受到严重破坏并且可以在较长时间内得以保持,因此通过ICSI注射后仍然可以形成囊胚^[23],证明冻干精子具有基因编辑的基础。

在细胞膜与顶体结构损伤方面,冻干过程通常会导致细胞膜通透性改变与外层膜结构破坏,从而使其无法完成自然受精,但这一短暂的膜通透窗口可为基因编辑工具(如Cas9蛋白或gRNA)进入精子核提供便利条件^[24-25]。这种“通透性增强”可能会促进编辑体系的导入,从而简化编辑操作。

虽然冷冻干燥精子无法实现自然受精,但通过ICSI,其内部的遗传物质可正常激活卵母细胞诱导发育,辅助卵母细胞人工激活,实现对受精功能的恢复,完成胚胎发育^[26]。小鼠冷冻干燥精子经ICSI后的受精率可达40%~60%,与传统冷冻精子相当^[27-28]。肉牛亦可通过相同技术手段进行编辑与繁育(图1)。

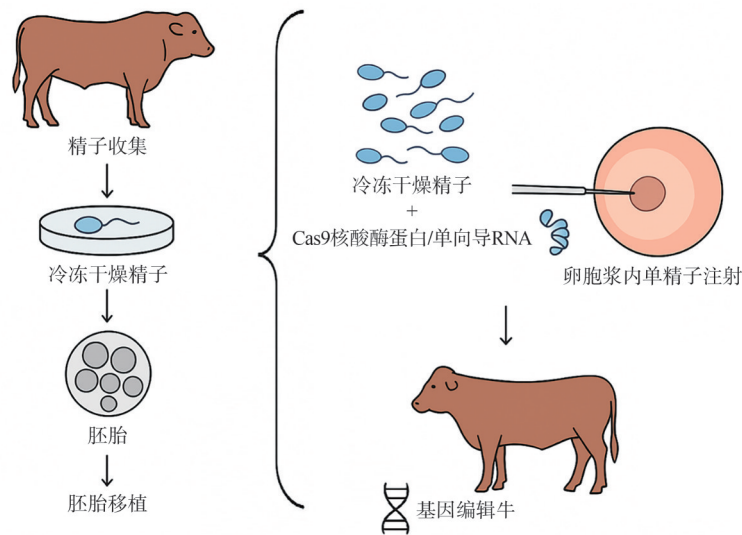


图1 冷冻干燥精子介导肉牛的基因编辑示意图

Fig. 1 Schematic diagram of gene editing in beef cattle mediated by freeze-dried sperm

2.2 基因编辑与冷冻干燥精子的匹配性

基于冷冻干燥精子的结构稳定性与短暂膜通透窗口,可以从以下两个方向对其进行编辑。
一是在冷冻干燥过程中进行精子编辑,因为对新鲜精子进行基因编辑存在一定难度,因此可以通过在冻干过程中加入编辑蛋白实现编辑。该方法的主要思路是在精液制备的冻前缓冲或干燥介质中加入基因编辑RNP(Cas9蛋白+gRNA)或化学/纳米载体,使编辑发生于脱水/冷冻过程中或随

干燥固定于精子核周围。该路径的优势在于:①编辑操作可直接在冻干过程中的精子上进行,编辑效率较高;②该技术可实现一次操作,样本即为“可编辑库存”,无需复苏即可跨地域运输并按需ICSI;③该路径可实现大规模的制备。但难点在于:①如何解决低温/脱水环境下编辑体系(如Cas9/gRNA)活性与稳定性受损问题;②编辑后的精子需通过密度梯度离心法去除残留编辑试剂,否则会增加冷冻干燥过程中的细胞毒性,导致复苏率下降。目前,对冻干过程中的精子进行基因编辑的研究仍处于探索阶段,尚未取得实质性突破。

二是冷冻干燥后进行精子编辑,即先将新鲜精子冷冻干燥保存,使用时复苏后再进行基因编辑。该路径的优势是可按需复苏冷冻干燥精子进行编辑,灵活度高,但需应对复苏后精子活力下降对编辑效率的影响。为提升方法的适配性,需优化两点:①在复苏液中添加100 $\mu\text{mol/L}$ 三磷酸腺苷(Adenosine triphosphate, ATP)以恢复精子代谢活性^[29];②采用电穿孔辅助转染,电压为150 V,脉冲时间为20 ms,增强编辑工具的导入效率^[30]。

2.3 关键工艺优化策略

为提升利用冷冻干燥精子进行基因编辑的效率与稳定性,需从冷冻保护剂、冷冻干燥程序及复苏条件3个方面进行工艺优化。

2.3.1 冷冻保护剂配方改良

传统冷冻保护剂(如甘油)可能会抑制Cas9蛋白活性,需开发适配基因编辑的配方。当精子在含有10 mmol/L Tris-盐酸缓冲液(Tris hydrochloride, Tris-HCl)和1 mmol/L 乙二胺四乙酸(Ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA)的溶液中冷冻干燥时,约73%的受精卵具有正常染色体,57%的胚胎发育到足月。在储存1年的精子胚胎中,注射后获得的囊胚中约25%可以发育成活的后代^[31]。目前主流方案是以10%~15%非还原性糖海藻糖为核心,复合0.5%牛血清白蛋白和小分子渗透调节剂(如5%乙二醇、低浓度甘油等),并测试EDTA/EGTA抑制内源性核酸酶。其基本原理是通过牛血清白蛋白减少细胞膜损伤,使用乙二醇调节渗透压^[32-35]。海藻糖可形成玻璃态结构保护DNA与编辑工具的稳定性^[36],但也有研究发现海藻糖并不能保护冷冻干燥精子的DNA损伤^[37]。研究证实在干燥培养基中添加1%~10%谷氨酸钠后冷冻干燥也可以显著降低DNA损伤^[38]。孟祥黔等^[39]研究发现,0.2 mol/L的海藻糖对猪精子冷冻真空干燥保存的保护效果优于EDTA组及对照组,使用其处理的精子经ICSI后,雄原核形成率(68.52%)、卵裂率(59.17%)、囊胚率(19.16%)均显著提高,可以更好地维持精子顶体与尾部的完整性;该组精子在4℃条件下保存60~180 d,胚胎发育指标稳定,复水化后孵育1 h的效果亦优于2 h。除海藻糖外,研究证实迷迭香酸也可显著降低冻干绵羊精子的DNA损伤,且冻干精子在4℃和常温条件下储存1年后,其受精后胚胎的囊胚发育率与冷冻解冻精子无差异^[40]。此外,为保护精子染色体在较高温度储存时不降解,研究人员比较了Na-ETBS(NaOH/EGTA/Tris-HCl)和K-ETBS(KOH/EGTA/Tris-HCl)两种冷冻干燥溶液,发现pH 5.0条件下精子保存效果极差,无论使用何种溶液、何种储存温度,受精卵染色体畸变率均达97%~100%;Na-ETBS在pH 8.0~8.4时表现最优,4℃时储存染色体损伤率为14%~17%,50℃时储存染色体损伤率为24%~26%;K-ETBS的最佳pH因储存温度略有差异,4℃时pH为7.7~8.4(损伤率为13%~15%),50℃时pH为7.7~8.0(损伤率为16%~23%)^[41]。解决如何在高于4℃条件下储存与运输的问题同样是将基因编辑冷冻干燥精子进行大范围应用的关键^[21]。在ETBS溶液中添加抗氧化剂,如二甲基亚砜(DMSO),可延缓没有抗氧化剂ETBS保存下精子质量在室温下的退化^[42]。这些保护剂的改良可通过稳定DNA与编辑工具的结构,使冷冻干燥精子不仅能“存活”,且能“携带并释放基因编辑复合物”。

2.3.2 冷冻干燥程序动态调整

对于冻干体系的优化,当前最常采用“两步预冻+梯度升华”程序:先以-10℃/min慢速降至-20℃(平衡10 min),再以-50℃/min快速降至-80℃,随后分阶段调控真空度与升华温度,并在

不同阶段采样评估 DNA 完整性与编辑复合物残存性,从而确保水分充分去除且不破坏编辑复合物。该程序可使精子的冷冻干燥时间缩短 20%,DNA 完整性提升 18%^[43-44]。通过加速降解动力学理论证实,冻干小鼠精子需在 -80℃ 条件下储存才能实现长期保存,4℃ 条件下仅能短期维持其活性,但仍然比室温储存效果好^[45-46]。冷冻干燥的压力同样是关键影响因素之一,采用 4、37、103 Pa 3 种不同干燥压力,在不同储存条件下评估其对冻干精子的影响,并测定胚胎发育率。结果发现,37 Pa 的压力在无储存和 4℃ 条件下储存 6 个月,均能使精子受精后胚胎发育至囊胚阶段的比例最高^[47]。此外,储存方式同样影响冷冻干燥精子的损伤。有研究开发出一种利用商用塑料微管收集冻干精子的简便且经济的方法,与传统玻璃安瓿相比,它在精子回收率、损伤控制和成本上更具优势,且能支持精子长期低温储存并产出健康后代,为遗传资源保存与运输提供了低成本的新方案^[48]。冻干程序的优化是“确保精子 DNA 与编辑复合物在干燥和长期储存中不被破坏”,是支撑整个编辑体系可行性的核心技术之一。

2.3.3 复苏与编辑一体化优化

对于 2.3.2 节中第二路径的冻干后编辑,可以使用“复苏-编辑同步”工艺:复苏液中含编辑 RNP 或载体+低浓度还原剂(如二硫苏糖醇)短浴 10~30 s+电穿孔(150 V, 20 ms)或脉冲优化方案作为首选实验方案,并在复苏后 0.5~2 h 内完成 ICSI,以尽量利用膜通透窗口与短暂的核可塑期^[49]。借助体外编辑 DNA 的体系,利用复苏过程中细胞膜的通透性增强期完成编辑工具导入,无需额外转染步骤^[50]。“复苏-编辑同步”方案充分利用复苏期膜通透窗口,与冷冻保护剂和冻干程序共同构成一个连贯的工程体系,最终提高基因编辑效率。

3 冷冻干燥精子在肉牛育种中的应用现状

截至目前,冷冻干燥精子在肉牛育种中主要应用于遗传资源库建设,但仍具有一定的局限性,处于储备与验证阶段,尚未进入大规模商业推广,但其已经表现出明显的优势。首先,研究已证实,冷冻干燥精子可在室温下密封保存至少 1 年,复苏后体外受精率约为常规冷冻精液的 70%,这可以满足遗传资源备份需求^[38]。其次,在储存和运输过程中无需液氮,运输成本大幅降低,因此可以适用于偏远牧场以及灾害应急场景,保证样本的持续稳定供给。2021 年, Ito 等^[51]首次实现小鼠冷冻干燥精子常温邮寄后,多国畜牧研究机构启动牛只等大型家畜验证实验。冷冻干燥过程对 DNA 完整性影响较小,但膜结构受损等结构破坏会导致囊胚率下降,目前仅用于“战略保种”以及基因组的选择参考群体构建,真正投入使用还需要后续继续深入研究^[52]。

1976 年, Pfaller 等^[53]研究发现喷雾冷冻结合冻干的低温制备方法,能减少化学物质对公牛精子超微结构的影响^[43]。2002 年, Keskinetepe 等^[26]首次报道牛冻干精子能形成原核,但囊胚率极低(<20%),并指出 DNA 片段化是主要限制因素。冻干还会削弱公牛精子诱导卵母细胞高频钙振荡的能力,且这种削弱与储存温度(25、4、-196℃)无关,最终导致其使牛卵母细胞恢复减数分裂和形成原核的比例降低^[26],但冷冻干燥过程不会影响牛精子的微管组织中心功能^[54]。以上研究仍然缺乏一个完整的体系能够保证后代的稳定出生率。Zambrano 等^[55]将精液脱水后分装于真空安瓿,在 4℃ 条件下即可存放 5 年以上,降低了液氮罐高昂支出,极宜跨境引种与濒危牛种基因库建设。然而,冻干过程使精子失去活力,须依赖卵胞浆内单精子注射受精,牛 ICSI 产犊率仍低于 30%,且设备与人员成本远高于常规人工授精,故大型牧场仍以常规冻精为主。现有研究主要聚焦抗氧化保护与核稳定性提升:通过添加茶多酚、白藜芦醇或海藻糖,将 DNA 断裂率降至新鲜精液的 1.2 倍以内^[56-57];调整冻干缓冲液的玻璃化转变温度和干燥阶段温度,抑制冻干块状物发生塌陷,减少冻干公牛精子的功能损害^[58];冻干颗粒充氮密封后,常温运输 3 个月再水化,存活率可维持在 85% 以上^[59]。欧美少数种子库已用顶级安格斯、和牛公牛的冻干精子建立备份,以应对口蹄疫等突发事件,同时加速抗病与体型改良。业内认为,未来若能把 ICSI 产犊率提高到 50% 以上,并将冻干制剂成本压缩至常规冻精的两倍以

内,冷冻干燥精子或将在肉牛育种中作为“遗传保险”与“快速引种”双重工具,实现区域性推广,而在此之前,其角色仍限于科研与种质备份,产业仍聚焦常规细管冷冻精液。未来需突破冷冻干燥保护剂配方和复苏后精子功能提升技术,方可在肉牛育种中实现实用化。

4 应用潜力与育种价值

4.1 提高育种效率

传统育种需经过多个世代杂交、筛选,才能固定优良基因型,并且在此之后还需要通过大量样本的基因组数据组装来明确性状与基因之间的联系^[60],周期长并且成本高。通过编辑冷冻干燥精子,可以显著提高传统的SSC编辑肉牛的编辑效率,缩短世代间隔,快速固定优良基因型。冷冻干燥精子编辑技术可直接获得携带目标基因突变的精子,可以通过培养囊胚和胚胎移植快速繁殖出大量基因编辑后代,不仅缩短世代间隔,而且加速优良基因型在种群中的扩散。例如,获得编辑后的冷冻干燥精子后,通过ICSI形成囊胚,可在短时间内对大量母牛进行胚胎移植,快速培育出产肉性能优异、抗病力强的肉牛群体,提升育种进程,满足市场对优质肉牛的需求。

4.2 拓展编辑途径

当前的基因编辑改良育种主要依赖于SSC或克隆技术,存在技术的局限性。冷冻干燥精子介导编辑可以不再依赖SSC或克隆技术,拓展新的编辑窗口。首先,精子易于获取与处理,冷冻干燥保存的方式打破了时间与地域限制,使基因编辑不再受限于SSC的分离培养、克隆技术的复杂流程与高成本等问题;其次,可以灵活安排实验时间,提前制备编辑冷冻干燥精子,按需使用;同时,不同地区实验室也可便捷交换冷冻干燥精子,共享编辑成果,促进全球肉牛育种协作,加速优良品种培育与推广。基于此,开发针对极端干燥环境下仍能保持Cas蛋白与gRNA活性的多组分玻璃化保护体系(海藻糖+氨基酸+抗氧化剂+螯合剂)是制备肉牛基因编辑冷冻干燥精子的重要途径^[34]。

4.3 简便技术操作

相较于SSC编辑与克隆技术,冷冻干燥精子介导基因编辑简化了基因编辑牛的制备流程,降低了技术门槛,无需复杂的干细胞分离培养、核移植等步骤,仅需掌握精子冷冻干燥保存与基因编辑系统导入技术,便可开展实验。这有助于养殖户了解基因编辑领域,推动技术普及与创新。同时,中小企业还可利用冷冻干燥精子编辑技术,针对自身育种需求快速培育具有特定性状的肉牛品种,增强市场竞争力,促进肉牛产业整体发展。

5 结论

冷冻干燥精子介导基因编辑体现了生殖生物技术与分子生物学的交叉创新融合,其核心价值在于将冷冻干燥精子的“保存优势”与基因编辑的“精准优势”结合,解决了传统研究中样本受限、成本高昂、效率低下的问题。虽然冷冻干燥精子介导基因编辑在肉牛育种中尚处于理论设想与初步探索阶段,但其已经展现出巨大潜力与应用前景。目前面临的诸多技术挑战与科学问题,如冷冻干燥过程对CRISPR系统稳定性影响、精子摄取外源基因能力有限、编辑效率与脱靶风险评估困难等,都需要相关技术不断优化与创新,比如开发非病毒递送系统、构建一体化技术流程、优化囊胚培养体系等,从而有望逐步突破瓶颈,实现技术的成熟与应用的推广。未来,冷冻干燥精子介导基因编辑有望成为肉牛育种的关键技术,为全球肉牛产业带来高效、精准的遗传改良方案,推动产业持续健康发展,满足人类对优质肉牛产品不断增长的需求。

参考文献:

- [1] Kolanu N D. CRISPR-Cas9 gene editing: Curing genetic diseases by inherited epigenetic modifications[J]. Global Medical Genetics, 2024, 11(1): 113-122.

- [2] Thomson L K, Fleming S D, Barone K, et al. The effect of repeated freezing and thawing on human sperm DNA fragmentation[J]. *Fertility and Sterility*, 2010, 93(4):1147-1156.
- [3] Kamada Y, Yamaji K O, Ushigome N, et al. Method for long-term room temperature storage of mouse freeze-dried sperm[J]. *Scientific Reports*, 2025, 15(1):303.
- [4] Hochi S, Abdalla H, Hara H, et al. Challenging endeavour for preservation of freeze-dried mammalian spermatozoa [J]. *The Journal of Reproduction and Development*, 2011, 57(5):557-563.
- [5] Olaciregui M, Gil L. Freeze-dried spermatozoa: A future tool? [J]. *Reproduction in Domestic Animals*, 2017, 52(S2):248-254.
- [6] Gil L, Olaciregui M, Luño V, et al. Current status of freeze-drying technology to preserve domestic animals sperm [J]. *Reproduction in Domestic Animals*, 2014, 49(S4):72-81.
- [7] Leidl W. Freezing and freeze-drying of bull spermatozoa[J]. *The American Journal of Physiology*, 1957, 190(2):281-286.
- [8] Saacke R G, Almquist J O. Freeze-drying of bovine spermatozoa[J]. *Nature*, 1961, 192:995-996.
- [9] Uehara T, Yanagimachi R. Microsurgical injection of spermatozoa into hamster eggs with subsequent transformation of sperm nuclei into male pronuclei[J]. *Biology of Reproduction*, 1976, 15(4):467-470.
- [10] Wakayama T, Yanagimachi R. Development of normal mice from oocytes injected with freeze-dried spermatozoa [J]. *Nature Biotechnology*, 1998, 16(7):639-641.
- [11] Liu J L, Kusakabe H, Chang C C, et al. Freeze-dried sperm fertilization leads to full-term development in rabbits [J]. *Biology of Reproduction*, 2004, 70(6):1776-1781.
- [12] Kwon I K, Park K E, Niwa K. Activation, pronuclear formation, and development in vitro of pig oocytes following intracytoplasmic injection of freeze-dried spermatozoa[J]. *Biology of Reproduction*, 2004, 71(5):1430-1436.
- [13] Nakai M, Kashiwazaki N, Takizawa A, et al. Effects of chelating agents during freeze-drying of boar spermatozoa on DNA fragmentation and on developmental ability in vitro and in vivo after intracytoplasmic sperm head injection[J]. *Zygote*, 2007, 15(1):15-24.
- [14] Chapman K M, Medrano G A, Jaichander P, et al. Targeted germline modifications in rats using CRISPR/Cas9 and spermatogonial stem cells[J]. *Cell Reports*, 2015, 10(11):1828-1835.
- [15] Keskintepe L, Eroglu A. Preservation of mammalian sperm by freeze-drying[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2021, 2180:721-730.
- [16] Wu Y X, Zhou H, Fan X Y, et al. Correction of a genetic disease by CRISPR-Cas9-mediated gene editing in mouse spermatogonial stem cells[J]. *Cell Research*, 2015, 25(1):67-79.
- [17] Sato T, Sakuma T, Yokonishi T, et al. Genome editing in mouse spermatogonial stem cell lines using TALEN and double-nicking CRISPR/Cas9[J]. *Stem Cell Reports*, 2015, 5(1):75-82.
- [18] Xi H M, Ren Y J, Ren F, et al. Recent advances in isolation, identification, and culture of mammalian spermatogonial stem cells[J]. *Asian Journal of Andrology*, 2022, 24(1):5-14.
- [19] Yeşilbostan S, Akkurt M Y, Özkavukçu S, et al. Genome editing in mouse spermatogonial stem cell lines targeting the Tex15 gene using CRISPR/Cas9[J]. *Frontiers in Veterinary Science*, 2025, 12:1599598.
- [20] Binsila B, Selvaraju S, Ranjithkumaran R, et al. Current scenario and challenges ahead in application of spermatogonial stem cell technology in livestock[J]. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 2021, 38(12):3155-3173.
- [21] Kusakabe H. Chromosomal integrity and DNA damage in freeze-dried spermatozoa[J]. *Reproductive Medicine and Biology*, 2011, 10(4):199-210.
- [22] Kawase Y, Wada N A, Jishage K. Evaluation of DNA fragmentation of freeze-dried mouse sperm using a modified sperm chromatin structure assay[J]. *Theriogenology*, 2009, 72(8):1047-1053.
- [23] Bossi R D L, Cabral M, Oliveira M, et al. Ultrastructural analysis of lyophilized human spermatozoa[J]. *JBRA Assisted Reproduction*, 2021, 25(3):473-479.
- [24] Keskintepe L, Eroglu A. Freeze-drying of mammalian sperm [J]. *Methods in Molecular Biology*, 2015, 1257:489-497.
- [25] Gianaroli L, Magli M C, Stanghellini I, et al. DNA integrity is maintained after freeze-drying of human spermatozoa [J]. *Fertility and Sterility*, 2012, 97(5):1067-1073.

- [26] Keskinetepe L, Pacholczyk G, Machnicka A, et al. Bovine blastocyst development from oocytes injected with freeze-dried spermatozoa[J]. *Biology of Reproduction*, 2002, 67(2):409-415.
- [27] Wakayama S, Ito D, Ooga M, et al. Production of mouse offspring from zygotes fertilized with freeze-dried spermatids[J]. *Scientific Reports*, 2022, 12(1):18430.
- [28] Ward M A, Kaneko T, Kusakabe H, et al. Long-term preservation of mouse spermatozoa after freeze-drying and freezing without cryoprotection[J]. *Biology of Reproduction*, 2003, 69(6):2100-2108.
- [29] Piomboni P, Focarelli R, Stendardi A, et al. The role of mitochondria in energy production for human sperm motility[J]. *International Journal of Andrology*, 2012, 35(2):109-124.
- [30] Bajwa K K, Punetha M, Kumar D, et al. Electroporation-based CRISPR gene editing in adult Buffalo fibroblast cells[J]. *Animal Biotechnology*, 2023, 34(9):5055-5066.
- [31] Kaneko T, Nakagata N M. Improvement in the long-term stability of freeze-dried mouse spermatozoa by adding of a chelating agent[J]. *Cryobiology*, 2006, 53(2):279-282.
- [32] Kusakabe H, Yanagimachi R, Kamiguchi Y. Mouse and human spermatozoa can be freeze-dried without damaging their chromosomes[J]. *Human Reproduction*, 2008, 23(2):233-239.
- [33] Men N T, Kikuchi K, Nakai M, et al. Effect of trehalose on DNA integrity of freeze-dried boar sperm, fertilization, and embryo development after intracytoplasmic sperm injection[J]. *Theriogenology*, 2013, 80(9):1033-1044.
- [34] Murray A, Kilbride P, Gibson M I. Trehalose in cryopreservation: Applications, mechanisms and intracellular delivery opportunities[J]. *RSC Medicinal Chemistry*, 2024, 15(9):2980-2995.
- [35] Zhu Z D, Fan X T, Pan Y, et al. Trehalose improves rabbit sperm quality during cryopreservation[J]. *Cryobiology*, 2017, 75:45-51.
- [36] Kawase Y S E, Suzuki H. A study on freeze-drying as a method of preserving mouse sperm[J]. *Journal of Reproduction and Development*, 2011, 57(2):176-182.
- [37] Ito D, Wakayama S Y A, Kamada Y, et al. Effect of trehalose on the preservation of freeze-dried mice spermatozoa at room temperature[J]. *The Journal of Reproduction and Development*, 2019, 65(4):353-359.
- [38] Ushigome N, Miyashita M, Ito D, et al. Monosodium glutamate enhances freeze-dried mouse sperm quality during room-temperature storage[J]. *Scientific Reports*, 2025, 15(1):30994.
- [39] 孟祥黔, 顾晓龙, 吴彩凤, 等. 海藻糖对猪精子冷冻真空干燥保存效果的影响[J]. *生物工程学报*, 2010, 26(8):1143-1149.
- [40] Olaciregui M T, Luño V, Domingo P, et al. *In vitro* developmental ability of ovine oocytes following intracytoplasmic injection with freeze-dried spermatozoa[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1):1096.
- [41] Kusakabe H, Tateno H. Prevention of high-temperature-induced chromosome damage in mouse spermatozoa freeze-dried using Ca^{2+} chelator-containing buffer alkalized with NaOH or KOH[J]. *Cryobiology*, 2017, 79:71-77.
- [42] Kusakabe H, Kamiguchi Y. Ability to activate oocytes and chromosome integrity of mouse spermatozoa preserved in EGTA Tris-HCl buffered solution supplemented with antioxidants[J]. *Theriogenology*, 2004, 62(5):897-905.
- [43] Abdalla H, Hirabayashi M, Hochi S. The ability of freeze-dried bull spermatozoa to induce calcium oscillations and resumption of meiosis[J]. *Theriogenology*, 2009, 71(3):543-552.
- [44] Rajska I. Freeze drying as a method of long-term conservation of mammalian semen-a review[J]. *Annals of Animal Science*, 2021, 21:1209-1234.
- [45] Kaneko T, Nakagata N. Relation between storage temperature and fertilizing ability of freeze-dried mouse spermatozoa[J]. *Comparative Medicine*, 2005, 55(2):140-144.
- [46] Kawase Y, Araya H, Kamada N, et al. Possibility of long-term preservation of freeze-dried mouse spermatozoa[J]. *Biology of Reproduction*, 2005, 72(3):568-573.
- [47] Kawase Y, Hani T, Kamada N, et al. Effect of pressure at primary drying of freeze-drying mouse sperm reproduction ability and preservation potential[J]. *Reproduction*, 2007, 133(4):841-846.
- [48] Yang L L, Ito D, Ushigome N, et al. A novel, simplified method to prepare and preserve freeze-dried mouse sperm in plastic microtubes[J]. *The Journal of Reproduction and Development*, 2023, 69(4):198-205.
- [49] Unnikrishnan V, Kastelic J, Thundathil J. Intracytoplasmic sperm injection in cattle[J]. *Genes*, 2021, 12(2):198.
- [50] Liang Z, Chen K L, Li T D, et al. Efficient DNA-free genome editing of bread wheat using CRISPR/Cas9 ribonu-

- cleoprotein complexes[J]. Nature Communications, 2017, 8:14261.
- [51] Ito D, Wakayama S, Emura R, et al. Mailing viable mouse freeze-dried spermatozoa on postcards[J]. iScience, 2021, 24(8):102815.
- [52] Zhang M, Oldenhof H, Sydykov B, et al. Freeze-drying of mammalian cells using trehalose: Preservation of DNA integrity[J]. Scientific Reports, 2017, 7(1):6198.
- [53] Pfaller W, Rován E, Mairbäurl H. A comparison of the ultrastructure of spray-frozen and freeze-etched or freeze-dried bull and boar spermatozoa with that after chemical fixation[J]. Journal of Reproduction and Fertility, 1976, 48(2):285-290.
- [54] Hara H, Abdalla H, Morita H, et al. Procedure for bovine ICSI, not sperm freeze-drying, impairs the function of the microtubule-organizing center[J]. The Journal of Reproduction and Development, 2011, 57(3):428-432.
- [55] Zambrano F, Aguila L, Arias M E, et al. Improved preimplantation development of bovine ICSI embryos generated with spermatozoa pretreated with membrane-destabilizing agents lyssolecithin and Triton X-100[J]. Theriogenology, 2016, 86(6):1489-1497.
- [56] Martins C F, Báo S N, Dode M N, et al. Effects of freeze-drying on cytology, ultrastructure, DNA fragmentation, and fertilizing ability of bovine sperm[J]. Theriogenology, 2007, 67(8):1307-1315.
- [57] Iqbal S, Andrabi S M H, Riaz A, et al. Trehalose improves semen antioxidant enzymes activity, post-thaw quality, and fertility in Nili Ravi buffaloes (*Bubalus bubalis*)[J]. Theriogenology, 2016, 85(5):954-959.
- [58] Hara H, Tagiri M, Hwang I S, et al. Adverse effect of cake collapse on the functional integrity of freeze-dried bull spermatozoa[J]. Cryobiology, 2014, 68(3):354-360.
- [59] Alm-Kristiansen A H, Gaustad E R, Bai G, et al. In vitro studies of norwegian red bovine semen immobilized and cryopreserved in alginate solid gel network[J]. Reproduction in Domestic Animals, 2018, 53(2):365-370.
- [60] 刘原庆, 海超, 宋丽爽, 等. 评估多种组装软件在蒙古牛基因组组装中的应用[J]. 内蒙古大学学报(自然科学版), 2026, 57(2):175-181.

(责任编辑 那顺布和)

The Potential and Prospects of Gene Editing Mediated by Freeze-Dried Sperm in Cattle Breeding

HAI Chao, ZHANG Xinyi, SONG Lishuang, LIU Xuefei, 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: Gene-editing technology has demonstrated great potential in beef cattle breeding; however, sperm-level gene editing remains technically challenging, as current approaches are largely limited to the modification of spermatogonial stem cells and do not allow efficient direct editing of mature sperm. Freeze-dried sperm technology represents an effective strategy for genetic resource preservation, offering advantages such as long-term storage and convenient transportation. If gene editing mediated by freeze-dried sperm could be realized, it would substantially enhance breeding efficiency and shorten breeding cycles. The review systematically summarizes the research progress and applications of freeze-dried sperm and gene-editing technologies in animal breeding, proposes a potential pathway for freeze-dried sperm-mediated gene editing, and evaluates its application prospects and breeding value in beef cattle, aiming to provide new insights and technical references for molecular breeding strategies.

Key words: freeze-dried sperm; gene editing; beef cattle breeding; spermatogonial stem cell; breeding efficiency