



การปรับแต่งจีโนมเพื่อเพิ่มความต้านทานต่อโรคในปศุสัตว์

ธีรเจต เลหาเสถียร¹ สุภาวดี มานะไตรนนท์¹ และภวัต เสรีตระกูล^{1,*}¹คณะสัตวศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยศิลปากร 1 ม.3 ต.สามพระยา อ.ชะอำ จ.เพชรบุรี 76120

บทคัดย่อ: โรคในปศุสัตว์เป็นปัญหาสำคัญที่ส่งผลให้เกิดการสูญเสียต่อระบบการผลิตสัตว์ และอาจส่งผลเสียไปถึงผู้บริโภคอาหารจากสัตว์ที่เป็นโรคด้วย เทคนิคการปรับแต่งพันธุกรรมเป็นหนึ่งในวิธีที่ช่วยป้องกันและรักษาโรคในสัตว์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ การปรับแต่งจีโนมคือการปรับเปลี่ยนโครงสร้างยีนในลำดับดีเอ็นเอโดยอาจมีการลบ (deletion) หรือแทรก (insertion) ลำดับดีเอ็นเอใหม่ ในปัจจุบันได้มีการพัฒนาเทคนิคการปรับแต่งจีโนมให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้น โดยเทคนิคที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายในปัจจุบันได้แก่ Zinc-finger nucleases (ZFNs), Transcription activator-like effector nucleases (TALENs), and Clustered regulatory interspaced short palindromic repeats (CRISPRs) บทความนี้ได้รวบรวมงานวิจัยที่มีการใช้เทคนิค ZFNs, TALENs หรือ CRISPR ในการตัดแต่งจีโนมในปศุสัตว์ โดยรวมพบว่าสามารถช่วยเพิ่มความต้านทานต่อโรคในปศุสัตว์ได้ ไม่ว่าจะเป็นใช้ในการตัดบริเวณยีนที่เป็นตัวรับของโรคให้สูญเสียหน้าที่ หรือตัดและแทรกยีนอื่น ๆ ที่มีความต้านทานต่อโรคสูง ขึ้นส่งผลให้สัตว์มีความต้านทานต่อโรคที่เพิ่มขึ้นอีกด้วย

คำสำคัญ: การปรับแต่งพันธุกรรม พันธุวิศวกรรม ต้านทานโรค ปศุสัตว์

#ผู้รับผิดชอบบทความ

สัตวแพทยมหาวิทยาลัย. 2565. 17(1): 157-171.

E-mail address: seritrakul_p@silpakorn.edu

Genome Editing to Enhance Disease Resistance in Livestock

Teerajet Laohasatian¹, Supawadee Manatrinon¹, and Pawat Seritrakul^{1,#}

¹Faculty of Animal Sciences and Agricultural Technology, Silpakorn University, 1 Moo 3 Sam phraya,
Cha Am district, Phetchaburi 76120

Abstract: Animal diseases significantly impact livestock production, agriculture, the economy, as well as exposing human to foodborne illnesses that originate from animals. Recently, potential new techniques have emerged that could efficiently prevent and treat animal diseases, one of which is genome editing, which is a technique that can alter genetic information by inserting or removing parts of target genes. Currently, the most widely used genome editing techniques include Zinc-finger nucleases (ZFNs), Transcription activator-like effector nucleases (TALENs), and Clustered regulatory interspaced short palindromic repeats (CRISPRs). This article reviews genome editing techniques (ZFNs, TALENs, and CRISPRs) that have been employed for editing the genomes of livestock. Overall, genome editing has been shown to increase disease resistance, either by removing the causative part of the genes or by replacing them with a resistance cassette, thus enhancing disease resistance in livestock.

Keywords: Genome editing, Genetic engineering, Disease resistance, Livestock

#Corresponding author

J. Mahanakorn Vet. Med. 2022 17(1): 157-171.

E-mail address: seritrakul_p@silpakorn.edu

บทนำ

การเกิดโรคในปศุสัตว์นั้นเป็นปัญหาสำคัญที่ส่งผลกระทบต่อระบบการผลิตสัตว์ เกษตรกร เศรษฐกิจ และในด้านอื่น ๆ นอกจากนี้การเกิดโรคในปศุสัตว์ยังเพิ่มความเสี่ยงต่อการติดเชื้อจากสัตว์สู่มนุษย์ได้ ไม่ว่าจะเป็นเกิดจากการบริโภคสัตว์ที่ติดเชื้อ หรือเกิดจากโรคติดเชื้อจากสัตว์สู่มนุษย์ (zoonosis) ดังนั้นการเกิดโรคติดต่อในสัตว์จึงเป็นปัญหาสำคัญของเกษตรกร ซึ่งควรที่จะมีการป้องกันและแก้ไข โดยในปัจจุบันมีวิธีการที่หลากหลายในการป้องกันและรักษาโรคในปศุสัตว์ เช่น การฉีดวัคซีน การใช้ยาปฏิชีวนะ การจัดการฟาร์ม และการปรับปรุงพันธุ์ ทั้งวิธีดั้งเดิมและวิธีทางพันธุวิศวกรรม เป็นต้น

การปรับแต่งจีโนม (genome editing) เป็นศาสตร์แขนงหนึ่งของพันธุวิศวกรรม มีวัตถุประสงค์ในการปรับเปลี่ยนลำดับดีเอ็นเอในบริเวณที่ต้องการ ในอดีตการปรับแต่งจีโนมนิยมทำในสิ่งมีชีวิตเซลล์เดียว เซลล์ที่เพาะเลี้ยงในหลอด และสัตว์ทดลอง โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาหน้าที่และการทำงานของยีน (Murase et al., 2003; Tsetskhladze et al., 2012; Bi et al., 2019) แต่ในปัจจุบันนี้ได้มีการศึกษาและพัฒนาเทคนิคการปรับแต่งจีโนมให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้น เทคนิคปรับแต่งจีโนมจึงได้เข้ามามีบทบาทอย่างมากในด้านการวิจัย การแพทย์ และปศุสัตว์ โดยเทคนิคที่ได้รับความนิยมในปัจจุบัน ได้แก่ Zinc-finger nucleases (ZFNs),

Transcription activator-like effector nucleases (TALENs) และ Clustered regulatory interspaced short palindromic repeats (CRISPRs) เนื่องจากมีการพัฒนาให้สามารถทำได้ง่ายขึ้น มีราคาที่ถูกลง และมีประสิทธิภาพมากขึ้น (Gupta et al., 2019) จนสามารถนำมาใช้ในงานด้านปศุสัตว์ได้ (Wu et al., 2015; Whitworth et al., 2019)

ในปัจจุบันสภาพแวดล้อมของโลกมีการเปลี่ยนแปลงอยู่ตลอดเวลา ซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อการแพร่กระจายของโรคติดต่อทั้งรุนแรงและไม่รุนแรงในปศุสัตว์ นอกจากนี้ได้มีการนำเทคนิคทางการสืบพันธุ์เข้ามาใช้อย่างแพร่หลาย เช่น การผสมเทียมโดยพ่อพันธุ์ 1 ตัวสามารถผสมกับแม่พันธุ์ได้หลายตัว เป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดเลือดชิดขึ้นในฝูง ส่งผลให้เกิดการแพร่กระจายของยีนที่ก่อให้เกิดโรคทางพันธุกรรมได้ และที่สำคัญในปัจจุบันโรคทางพันธุกรรมยังไม่มียาที่ใช้ในการรักษา (Ikeda et al., 2017) หนึ่งในวิธีการป้องกันที่มีประสิทธิภาพคือการปรับแต่งจีโนม มีหลายงานวิจัยที่ได้แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพและความก้าวหน้าของการปรับแต่งจีโนมเพื่อเพิ่มความต้านทานโรคติดต่อ (Liu et al., 2013; Wu et al., 2015; Burkard et al., 2017) ซึ่งถ้าหากสามารถปรับแต่งจีโนมให้สัตว์ต้านทานโรคหรือป้องกันการเป็นโรคได้ จะทำให้ลดค่าใช้จ่ายต้นทุนในเรื่องของวัคซีน ยา และค่าการรักษาอื่น ๆ จากงานวิจัยที่ได้รวบรวมนั้นแสดงให้เห็นวิวัฒนาการและเทคนิคการปรับแต่งจีโนมที่นิยมในปัจจุบันเพื่อให้สัตว์มีความต้านทานโรคมมากขึ้น โดยมี 3 เทคนิค คือ ZFN, TALENs และ CRISPRs

หลักการปรับแต่งจีโนม

การปรับแต่งจีโนม คือ กระบวนการทำให้เกิดการปรับเปลี่ยนบริเวณที่จำเพาะของลำดับดีเอ็นเอ ซึ่งอาจเกิดการแทรก (insertion) ลบ (deletion) หรือแทรกและลบ (indels) ซึ่งในอดีตมีการใช้การปรับแต่งจีโนม

เพื่อการศึกษาหน้าที่และการทำงานของยีน เช่น การปรับแต่งจีโนมของปลาหมอเพื่อศึกษายีนที่ควบคุมการสร้างเม็ดสี (Tsetschladze et al., 2012) แต่ในปัจจุบันนี้ได้มีการศึกษาและพัฒนาเทคนิคการปรับแต่งจีโนมให้มีความรวดเร็วและแม่นยำมากขึ้น จึงมีการนำเทคนิคการปรับแต่งจีโนมมาใช้เพื่อปรับเปลี่ยนพันธุกรรมให้มีความต้านทานโรคในปศุสัตว์มากขึ้น (Liu et al., 2013; Burkard et al., 2017; Koslová et al., 2020)

เทคนิคการปรับแต่งจีโนมในภาพรวมที่สำคัญประกอบด้วย เอนไซม์สำหรับการตัดลำดับนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) บนสายสายดีเอ็นเอ เช่น เอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) และ เอนไซม์นิวคลีเอส (nuclease enzyme) เป็นต้น โดยมีตัวนำทางเพื่อให้เอนไซม์สามารถไปตัดสายดีเอ็นเอในบริเวณเป้าหมายได้ ซึ่งตัวนำทางนั้นจะแตกต่างกันไปในแต่ละเทคนิค (Petersen, 2017) หลังจากที่ยีสายดีเอ็นเอถูกตัดแล้วจะมีกลไกการซ่อมแซม โดยแบ่งออกเป็น 2 กระบวนการ คือ 1) Non-homologous end joining (NHEJ) เป็นการซ่อมแซมโดยดึงปลายสายดีเอ็นเอที่ขาดทั้งสองสายมาเชื่อมติดกัน แต่อาจทำให้นิวคลีโอไทด์ที่ปลายทั้งสองด้านบางตัวถูกลบออกไปหรือถูกแทรกเข้ามาแทนที่ในบริเวณดีเอ็นเอที่ถูกตัด 2) Homology-directed repair (HDR) เป็นการคัดลอกรหัสพันธุกรรมจาก homologous chromosome ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณรอบ ๆ ใกล้เคียงกับดีเอ็นเอบริเวณที่ถูกตัดเพื่อทดแทนดีเอ็นเอที่ขาดหายไป ซึ่งกลไกนี้สามารถนำมาใช้ในการแก้ไขหรือเติมลำดับเบสที่ต้องการลงไปในพื้นที่เป้าหมายได้โดยการใส่ donor template DNA เข้าไปในเซลล์ที่ต้องการให้เกิด HDR

วิวัฒนาการของการปรับแต่งจีโนม

แนวคิดในการแก้ไขหรือปรับแต่งจีโนมนั้นเริ่มต้นจากการค้นพบโครงสร้างของดีเอ็นเอ ซึ่งก่อให้เกิดการศึกษาทางอณูชีววิทยาและพันธุศาสตร์ หลังจากนั้น

ตารางที่ 1 วิวัฒนาการของการปรับแต่งจีโนม

ปี ค.ศ.	เหตุการณ์	อ้างอิง
1953	James Watson และ Francis Crick ค้นพบโครงสร้างของดีเอ็นเอ	Watson and Devons (1968)
1958	Arthur Kornberg สังเคราะห์ดีเอ็นเอจากแบคทีเรียสำเร็จ	BESSMAN et al. (1958); LEHMAN et al., (1958)
1962	Osamu Shimomura ค้นพบ Green fluorescent protein	SHIMOMURA et al. (1962)
1967	Gellert Lehman ค้นพบ DNA ligase	Gellert (1967)
1968	Werner Arber ค้นพบเอนไซม์ตัดจำเพาะ	Meselson and Yuan (1968)
1970	Hamilton Smith ค้นพบบริเวณที่จำเพาะต่อ Type II restriction enzyme (<i>Hind II</i>)	Smith and Welcox (1970)
1972	ทำพันธุวิศวกรรมครั้งแรกจากการสร้างพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสม recombinant DNA; rDNA) SV40 จากไวรัสสองชนิดเข้าด้วยกัน	Mertz and Davis (1972)
1981	Thomas Wagner สร้างสัตว์ดัดแปลงพันธุกรรมโดยนำยีนของมนุษย์ใส่เข้าไปในจีโนมหนูโดยวิธี DNA microinjection	Wagner et al. (1981)
1983	พัฒนาเทคนิค polymerase chain reaction (PCR)	Debnath et al. (2005)
1985	พัฒนาเทคนิค ZFNs เป็นเทคนิคแรกในการปรับแต่งจีโนม สามารถตัดสายดีเอ็นเอในบริเวณที่จำเพาะได้	Miller et al. (1985)
1999	ทำแผนที่จีโนมของมนุษย์สำเร็จทั้ง 22 โครโมโซม โครงการนี้ได้เริ่มทำมาตั้งแต่ปี 1988 หลังจากนั้นจึงได้ทำแผนที่จีโนมในปศุสัตว์ในปัจจุบัน	Lander et al. (2001; Snelling et al. (2007); Groenen et al. (2012)
2011	พัฒนาเทคนิคการปรับแต่งจีโนม TALENs	Christian et al. (2010; Cermak et al. (2011); Li et al. (2011); Mahfouz et al. (2011); Miller et al. (2011)
2012	พัฒนาเทคนิคการปรับแต่งจีโนม CRISPR/Cas9	Gasiunas et al. (2012); Jinek et al. (2012)

จึงมีการพัฒนาวิธีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ การอ่านลำดับเบส และเทคนิคทางพันธุวิศวกรรมอื่น ๆ รวมไปถึงเทคนิคการปรับแต่งจีโนมอีกด้วย (ตารางที่ 1) จนมาถึงปัจจุบันเทคนิคการปรับแต่งจีโนม ได้เข้ามามีบทบาทอย่างมากในการเพิ่มความต้านทานต่อโรคในปศุสัตว์ โดยเทคนิคที่นิยมในปัจจุบันมี 3 วิธี ได้แก่ ZFNs, TALENs และ CRISPRs

เทคนิคการปรับแต่งจีโนม

Zinc-finger nucleases (ZFNs)

เป็นเทคนิคในการปรับแต่งจีโนม โดยที่มาของชื่อ zinc-finger เกิดจากการรวมตัวกันของ ซิสเตอีน

(Cysteine) หรือฮิสทีดิน (Histidine) อยู่บริเวณรอบ ๆ ซิงค์ไอออน (zinc ion) ทำให้เกิดการจับตัวกันเป็นลูปที่มีรูปร่างคล้ายนิ้วมือจึงเรียกว่า “zinc-finger” (Miller et al., 1985) และหลังจากนั้นจึงค้นพบ *Fok I* endonuclease ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ตัดสายดีเอ็นเอ (Kim et al., 1996; Kim et al., 1997) และพัฒนามาเป็นเทคนิค ZFNs โดยหลักการของ ZFNs คือ การใช้ zinc-finger เข้าไปจับในบริเวณดีเอ็นเอเป้าหมาย (target DNA) และตัดในบริเวณ target site ในจีโนม ซึ่งเป็นการจับกันของโปรตีน zinc-finger กับ ดีเอ็นเอครั้งละ 3 นิวคลีโอไทด์ เรียงต่อกัน 3 ครั้ง เป็นจำนวนทั้งหมด 9 นิวคลีโอไทด์ และตัดสายดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ *Fok I*

endonuclease ทำให้เกิด double-strand breaks (DSBs) เป็นดีเอ็นเอสองเส้นคู่ที่แยกจากกัน ซึ่งการตัดสายดีเอ็นเอนั้นจะเกิดขึ้นระหว่าง zing-finger ด้านซ้ายและด้านขวา (ภาพที่ 1)

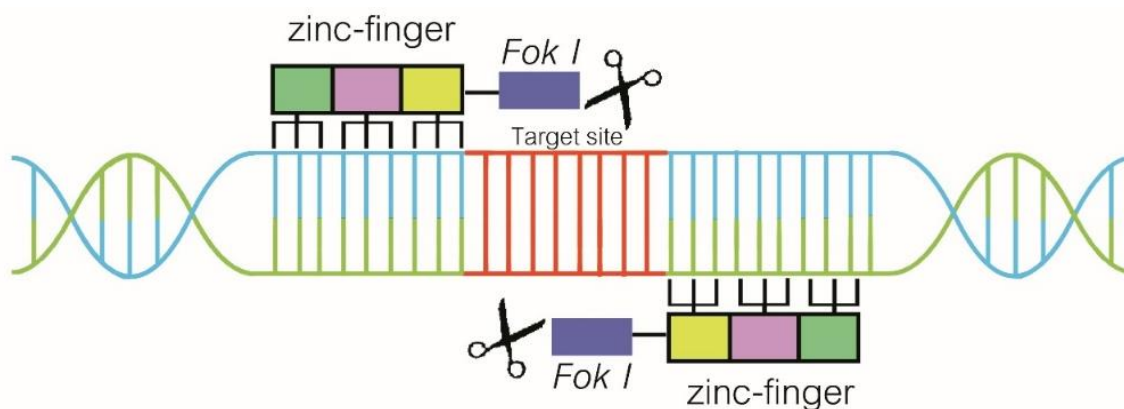
ตัวอย่างการใช้ ZFNs ในปศุสัตว์เพื่อแทรกยีน *lysostaphin* ลงในจีโนมของโคนมที่ตำแหน่งยีน *beta-casein* โดยใช้ ZFNs ที่จำเพาะต่อตำแหน่งยีน *beta-casein* เพื่อให้โคผลิตน้ำนมที่มีโปรตีน *lysostaphin* ซึ่งสามารถยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) ที่เป็นสาเหตุหลักของโรคเต้านมอักเสบได้ จากการทดลองแทรกยีน *lysostaphin* ลงในโคนมนั้นพบว่าโคสามารถผลิตน้ำนมที่มีโปรตีน *lysostaphin* ได้จริงและเมื่อนำมาทดสอบการกำจัดเชื้อ *S. aureus* ก็พบว่าน้ำนมจากโคที่ได้รับการปรับแต่งยีนนั้นสามารถฆ่าเชื้อ *S. aureus* ได้อีกด้วย (Liu et al., 2013) ซึ่งส่งผลให้ลดปัญหาในเรื่องของการเกิดโรคเต้านมอักเสบในโคนมและยังสามารถลดค่าใช้จ่ายในการรักษาโรคเต้านมอักเสบ นอกจากนี้ยังลดการสูญเสียรายได้จากโคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบอีกด้วย

Transcription activator-like effector nucleases (TALENs)

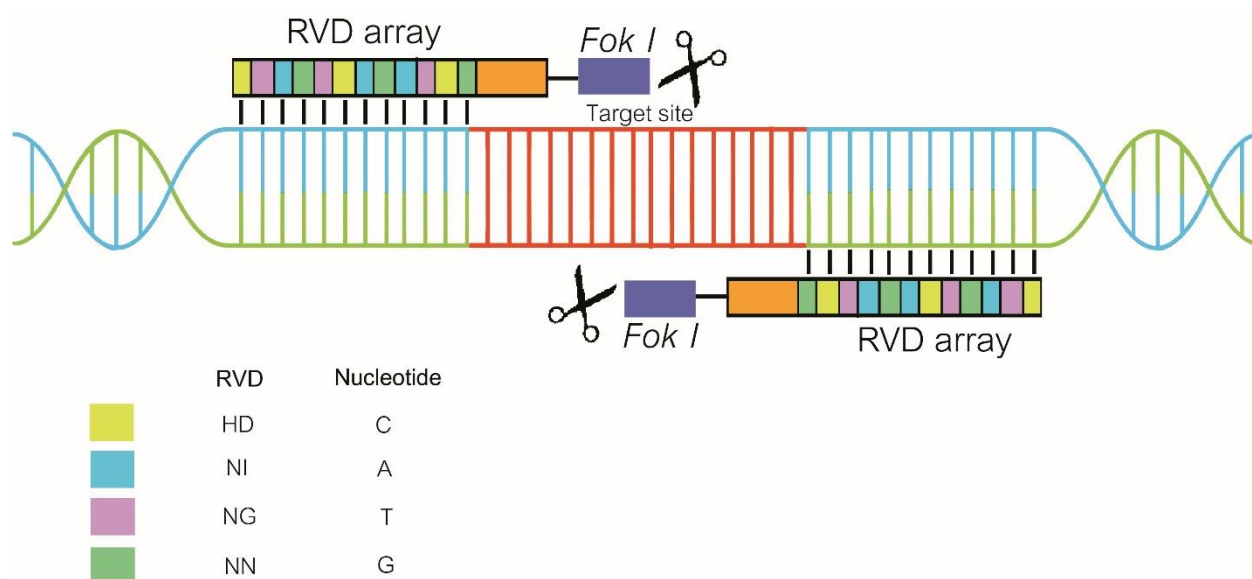
เทคนิคนี้ถูกค้นพบครั้งแรกในแบคทีเรียแกรมลบที่ก่อโรคในพืชที่ชื่อว่า *Xanthomonas* โดยแบคทีเรียจะสร้างโปรตีนที่ชื่อว่า Transcription Activator-Like

effector (TALE) ซึ่งมีคุณสมบัติสามารถเข้าไปจับกับดีเอ็นเอของพืชในตำแหน่งที่เป็นเป้าหมาย และสามารถควบคุมการแสดงออกของยีนในพืชที่เป็นประโยชน์ต่อการอยู่รอดของแบคทีเรีย (Boch et al., 2009; Boch and Bonas, 2010) หลังจากนั้นจึงได้ใช้หลักการนี้ในการออกแบบกรดอะมิโนสายสั้น ๆ ให้คล้ายกับ TALE ที่สามารถจับกับนิวคลีโอไทด์ที่กำหนด เพื่อนำมาใช้ในการจับกับบริเวณดีเอ็นเอเป้าหมายและพัฒนาเป็นเทคนิค TALENs ในปัจจุบัน

เทคนิค TALENs ประกอบไปด้วยกรดอะมิโนสายสั้น ๆ ที่มีโครงสร้างซ้ำ ๆ กันแต่มีความแตกต่างกันในตำแหน่งที่จำเพาะกับนิวคลีโอไทด์แต่ละตัว เรียกว่า repeat-variable di-residue (RVD) ซึ่งจะจำเพาะกับ DNA โดย 1 RVD สามารถจับกับ 1 นิวคลีโอไทด์ และนำมาเรียงต่อกันเป็นแผงจำนวน 12-13 RVD (RVD array) (Moscou and Bogdanove, 2009) เมื่อแผง RVD ที่เชื่อมกับ *Fok I* endonuclease (เรียกรวมกันว่า TALENs) เข้าไปจับกับดีเอ็นเอเป้าหมายที่จำเพาะแล้ว จะตัดสายดีเอ็นเอได้โดยใช้ *Fok I* endonuclease ทำให้ดีเอ็นเอขาดจากกันเกิดเป็น DSB (Christian et al., 2010; Cermak et al., 2011; Li et al., 2011; Mahfouz et al., 2011; Miller et al., 2011) ซึ่งการตัดสายดีเอ็นเอนั้นเกิดขึ้นในตำแหน่งระหว่าง TALENs ด้านซ้ายและด้านขวา คล้ายกับเทคนิค ZFNs (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 1 กลไกการทำงานของ ZFNs



ภาพที่ 2 กลไกการทำงานของ TALENs

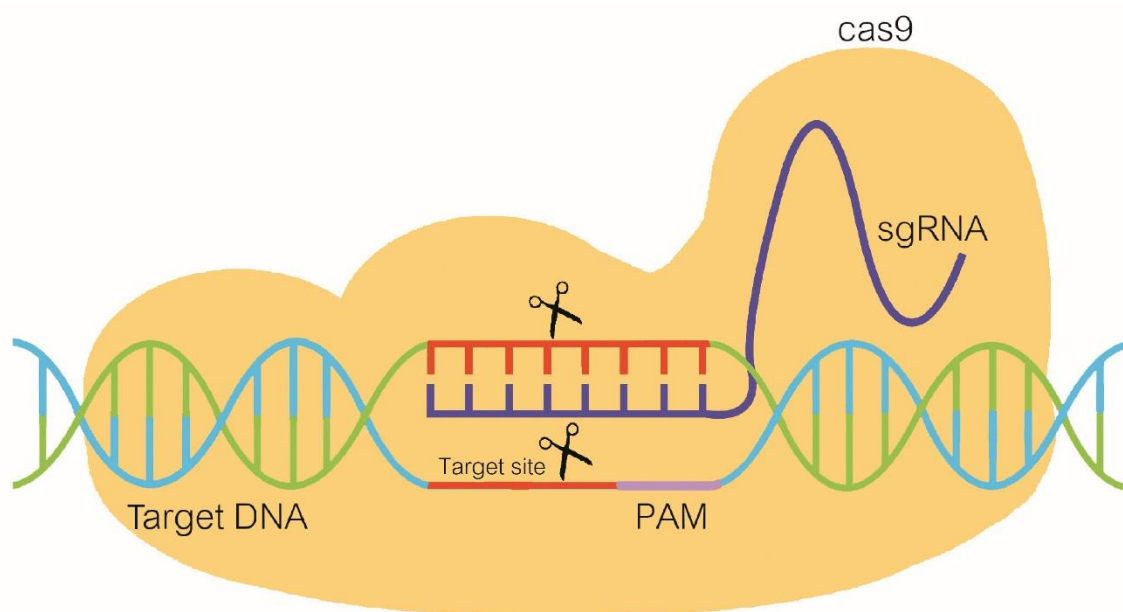
TALEN ได้ถูกนำมาใช้ในการปรับแต่งจีโนมให้มีความต้านทานต่อโรคมมากขึ้น มีการปรับแต่งจีโนมโดยแก้ไขยีน *SP110* ในโค ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการต้านทานต่อเชื้อที่ก่อโรควัวโรโค *Macrobacterium bovis* (*M. bovis*) โดยนำเอายีน *SP110* จากหนูซึ่งมีความต้านทานต่อ *M. bovis* สูง มาแทรกลงในสายดีเอ็นเอของโคในตำแหน่งเดียวกัน ส่งผลให้โคนั้นมีความต้านทานต่อเชื้อสูงขึ้น เมื่อทดลองนำโคที่ปรับแต่งยีนแล้วไปติดเชื้อ *M. bovis* โคที่ได้รับยีน *SP110* จากหนูมีปริมาณเชื้อ *M. bovis* ในปอด ตับ และ ม้ามลดลง เมื่อเทียบกับโคที่ไม่ได้รับการปรับแต่งยีน และมีการเจริญเติบโตของเชื้อลดลงและส่งผลให้เซลล์ตายแบบ apoptosis ซึ่งสามารถลดรอยโรคได้ (Wu et al., 2015) ส่งผลให้โคมีความต้านทานต่อโรควัวโรโคที่มากขึ้นลดการสูญเสียในด้านของเงินทุนการรักษาและลดการสูญเสียรายได้จากการป่วยและตายของโคอีกด้วย

Clustered Regulatory Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR) / Cas9

CRISPR/Cas9 เป็นเทคนิคในการปรับแต่งจีโนมที่ได้รับความนิยมมากที่สุดในปัจจุบัน (Gupta et al.,

2020; Mallikarjunappa et al., 2020; Watters et al., 2020) (ภาพที่ 3) โดยเกิดจากการทำงานร่วมกันของโปรตีน CRISPR associated protein 9 (Cas9) และ single-guided RNA (sgRNA) โดยการทำงานของ CRISPR เริ่มจาก sgRNA จะเข้าไปจับกับดีเอ็นเอเป้าหมายในบริเวณที่จำเพาะ ซึ่งโดยปกติจะอยู่ติดกับบริเวณ Protospacer adjacent motif (PAM) หลังจากนั้นดีเอ็นเอจะถูกตัดให้ขาดจากกันโดยโปรตีน Cas9 ทำให้เกิดเป็น DSB และมีการซ่อมแซมโดย NHEJ หรือ HDR

ต้นแบบของเทคนิคนี้ถูกค้นพบในปี 1987 โดยนักวิทยาศาสตร์ที่ทำการศึกษาลำดับของสารพันธุกรรมในแบคทีเรียที่จับอย่างจำเพาะกับสารพันธุกรรมแปลกปลอมของ bacteriophage ซึ่งเป็นไวรัสของแบคทีเรีย โดยจะเรียกลำดับของสารพันธุกรรมที่จับกันนี้ว่า CRISPR ซึ่ง จะ ทำ หน้า ที่ ใน การ ต่อ ต้าน bacteriophage (Ishino et al., 1987) หลังจากนั้นได้มีการศึกษาเพิ่มเติมและพบว่ามีโปรตีนชนิดหนึ่งที่มีส่วนช่วยในการต่อต้าน bacteriophage ของ CRISPR ในแบคทีเรีย *Streptococcus thermophilus* โดยโปรตีน



ภาพที่ 3 กลไกการทำงานของ CRISPR/cas9

นั้นจะสร้างเอนไซม์ Nuclease, Helicase หรือ RNase มาเพื่อตัดสายดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอ เรียกโปรตีนนั้นว่า Cas protein (Barrangou et al., 2007) จากการค้นพบครั้งนี้ทำให้มีการพัฒนาเทคนิคในการปรับแต่งจีโนมที่เรียกว่า CRISPR-Cas system เพื่อที่จะใช้ในการปรับแต่งหรือแก้ไขลำดับของดีเอ็นเอในบริเวณเป้าหมายที่ต้องการได้อย่างจำเพาะ ซึ่ง CRISPR/Cas จะถูกแบ่งออกตามชนิดของ Cas ซึ่งที่ได้รับความนิยมและใช้กันอย่างแพร่หลายมากที่สุดคือ CRISPR/Cas9 โดยมีการพัฒนา Cas9 ให้สามารถทำงานร่วมกับสายอาร์เอ็นเอสายเดียวที่สามารถจับกับลำดับนิวคลีโอไทด์เป้าหมายที่ต้องการเพื่อที่จะนำพา Cas9 เข้าไปตัดในบริเวณตำแหน่งของสายดีเอ็นเอเป้าหมาย โดยจะเรียกอาร์เอ็นเอนี้ว่า sgRNA (Gasiunas et al., 2012; Jinek et al., 2012)

ในปศุสัตว์ มีการทดลองนำเทคนิค CRISPR/cas9 มาใช้ในการตัดและลบ (deletion) ยีน *cluster of differentiation 163* (*CD163*) ที่เอกซอนที่ 7 ของสุกร ซึ่งเป็นตัวรับของเชื้อไวรัส Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRSV) ที่ก่อโรค Porcine

Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRS) หลังจากตัดเอกซอนที่ 7 ของยีน *CD163* ออกแล้วได้มีการทำให้สุกรติดเชื้อ PRRSV จากผลการทดลองเมื่อลบบริเวณเอกซอนที่ 7 ออกแล้วส่งผลให้สุกรมีอัตราการติดเชื้อ PRRSV ที่ลดลง แสดงให้เห็นว่าบริเวณเอกซอนที่ 7 ของยีน *CD163* เป็นบริเวณตัวรับของเชื้อ PRRSV และเมื่อถูกตัดออกส่งผลให้สุกรมีความต้านต่อเชื้อ PRRSV ที่มากขึ้น (Burkard et al., 2017)

Transmissible gastroenteritis virus (TGEV) เป็นไวรัสที่ก่อโรกระเพาะอาหารและลำไส้อักเสบในสุกร (Liu and Gerdts, 2019) ส่งผลให้มีอัตราการป่วยและตายสูงในสุกรแรกคลอด โดยมี *amino peptidase N* (*ANPEP*) เป็นตัวรับของเชื้อไวรัส TGEV ในงานวิจัยนี้ได้ใช้เทคนิค CRISPR/cas9 มาใช้ในการตัดบริเวณเอกซอนที่ 2 ของยีน *ANPEP* หลังจากนั้นได้มีการทำให้ติดเชื้อไวรัส TGEV และนำไปตรวจผลด้วยเทคนิค PCR และ Immunohistochemistry จากผลการทดลองพบว่าสุกรที่ได้รับการตัดยีน *ANPEP* แสดงความต้านทานต่อเชื้อ TGEV และไม่แสดงปฏิกิริยาของภูมิคุ้มกันต่อเชื้อ TGEV เนื่องจากไม่มีการติดเชื้อ แสดงว่า TGEV นั้นมีตัวรับอยู่ที่

บริเวณเอกซอนที่ 2 ของยีน ANPEP เมื่อถูกตัดออกแล้ว จึงส่งผลให้สุกรไม่มีการติดเชื้อไวรัสชนิดนี้ (Whitworth et al., 2019)

Isoleucyl- tRNA synthetase (IARS) syndrome เป็นโรคทางพันธุกรรมที่พบมากในโคพันธุ์ ญี่ปุ่นขนดำ (Japanese Black) ส่งผลให้มีอัตราการตายของลูกโคสูง ลูกโคที่รอดอ่อนแอและมีอัตราการเจริญเติบโตช้า ซึ่งเกิดจากการกลายพันธุ์ของ single nucleotide substitution ในงานวิจัยนี้ได้ใช้ CRISPR/cas9 ตัดเอกซอนที่ 3 ของยีน *IARS* ในบริเวณที่ใกล้เคียงกับจุดที่เกิดการเปลี่ยนของนิวคลีโอไทด์ นอกจากนี้ยังใส่ *Aequorea coerulescens* Green Fluorescent Protein (AcGFP) ซึ่งเป็นโปรตีนเรืองแสงจากแมงกะพรุน เข้าไปแทรกในบริเวณที่ถูกตัดเพื่อเป็นเครื่องหมายในการคัดเลือกโคที่ได้รับการปรับแต่งแล้ว ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าตัวอ่อนอายุ 6 วันที่ได้รับการปรับแต่งพันธุกรรมมีการเรืองแสง และหลังจากย้ายฝากตัวอ่อนจนตัวอ่อนมีอายุ 34 วัน ผลอัลตราซาวด์พบว่าตัวอ่อนมีการเจริญเติบโตแบบปกติและมีการเรืองแสงเช่นกัน แสดงให้เห็นว่าเทคนิค CRISPR/cas9 มีความแม่นยำสูงในการตัดเอกซอนที่ 3 บริเวณที่ใกล้เคียงกับจุดที่เกิดการเปลี่ยนของนิวคลีโอไทด์หรือจุดที่เกิดการกลายพันธุ์ นอกจากนี้ยังทำให้โคมีความต้านทานต่อ IARS syndrome อีกด้วย (Ikeda et al., 2017)

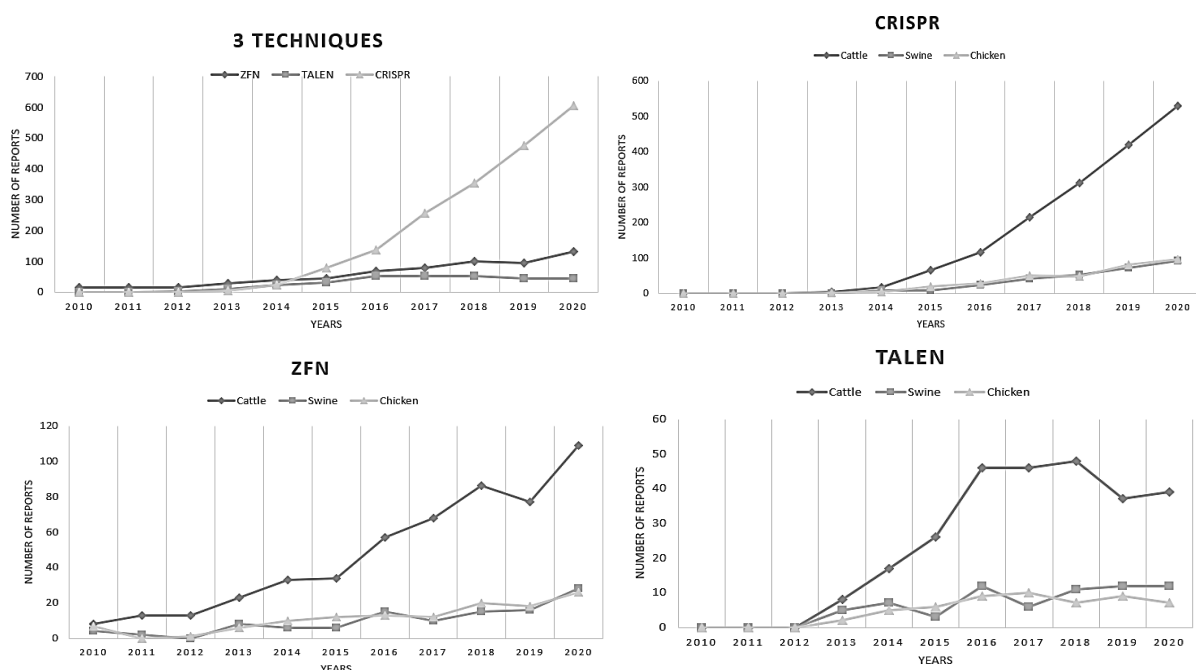
Avian leukosis virus subgroup J (ALV-J) เป็นไวรัสที่ก่อโรคในไก่ โดยมีตำแหน่ง Tryptophan ที่ 38 (W38) ของยีน *Na⁺/H⁺ exchanger type 1 (NHE1)* เป็นตัวรับของเชื้อไวรัส ในงานวิจัยนี้ได้ใช้ CRISPR/cas9 ในการตัดบริเวณ W38 ใน primordial germ cell (PGC) ของไก่ ซึ่งไก่ที่ได้รับการดัดแปลงพันธุกรรมนี้จะมีจีโนไทป์เป็น W38^{-/-} หลังจากนั้นนำไปผสมพันธุ์กับไก่ปกติที่มีจีโนไทป์ W38^{+/+} จะได้ลูก F1 ที่มีจีโนไทป์ W38^{+/-} และนำรุ่น F1 มาผสมกันเองจนได้รุ่น F2 ที่มีจีโนไทป์ W38^{+/+}, W38^{+/-} และ W38^{-/-} หลังจาก

นั้นได้มีการทำให้ติดเชื้อ ALV-J ที่ได้รับการปรับแต่งพันธุกรรมโดยใช้ Green Fluorescent Protein (GFP) เข้าไป ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าไก่ที่ได้รับการตัด W38 ออกมีความต้านทานต่อ ALV-J มากกว่าไก่ปกติ (Koslová et al., 2020) ซึ่งเป็นผลดีต่อเกษตรกรผู้เลี้ยงไก่เป็นอย่างมาก เนื่องจากจะช่วยลดค่ารักษาไก่ที่ป่วยและลดการสูญเสียไก่ที่เป็นโรคอีกด้วย

รายงานผลงานวิจัยที่ใช้เทคนิคการปรับแต่งจีโนม

ในฐานข้อมูล Science direct

ผลงานวิจัยที่ใช้เทคนิคการปรับแต่งจีโนมที่ปรากฏอยู่ในฐานข้อมูล Science Direct ในช่วงปี ค.ศ. 2010-2020 ค้นหาในวันที่ 20 มีนาคม พ.ศ. 2564 พบว่า ในฐานข้อมูลมีจำนวนผลงานวิจัยเกี่ยวกับการปรับแต่งจีโนมด้วยวิธี CRISPRs, ZFNs และ TALENs จำนวน 1,937, 627 และ 310 รายการตามลำดับ (ภาพที่ 4) โดยใช้คำค้น “Genome editing CRISPR (cattle OR cow OR bovine OR pig OR swine OR chicken)” และเปลี่ยนชื่อเทคนิคจาก “CRISPR” เป็น “Zinc-finger” และ “TALEN” ตามลำดับ โดยพบว่าจำนวนผลงานวิจัยเกี่ยวกับการปรับแต่งจีโนมด้วยวิธี CRISPRs โดยแบ่งตามชนิดสัตว์ ได้แก่ โค ไก่ และ สุกร จำนวน 1675, 324 และ 293 รายการตามลำดับ โดยใช้คำค้น “Genome editing CRISPR (cattle OR cow OR bovine)” และเปลี่ยนชื่อชนิดสัตว์จาก “cattle OR cow OR bovine” เป็น “chicken” และ “pig OR swine” ตามลำดับ และจำนวนผลงานวิจัยเกี่ยวกับการปรับแต่งจีโนมด้วยวิธี ZFNs โดยแบ่งตามชนิดสัตว์ ได้แก่ โค ไก่ และ สุกร จำนวน 521, 125 และ 110 รายการตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่ามีจำนวนผลงานวิจัยเกี่ยวกับการปรับแต่งจีโนมด้วยวิธี TALENs โดยแบ่งตามชนิดสัตว์ ได้แก่ โค ไก่ และ สุกร จำนวน 267, 55 และ 68 รายการตามลำดับ โดยใช้คำค้นเช่นเดียวกับเทคนิค CRISPRs และเปลี่ยนชื่อเทคนิคจาก “CRISPR” เป็น “Zinc-finger” และ “TALEN”



ภาพที่ 4 รายงานการใช้เทคนิคการปรับแต่งจีโนมในฐานข้อมูล Science Direct ในช่วงปี ค.ศ. 2010-2020

ตามลำดับ โดยเทคนิคการปรับแต่งจีโนมที่นิยมมากที่สุด ในปัจจุบัน คือ เทคนิค CRISPR ซึ่งนิยมปรับแต่งจีโนมในโค ในด้านการเพิ่มความต้านทานโรคมกที่สุด

วิจารณ์

แม้ว่าเทคนิคการปรับแต่งจีโนมนั้นจะแสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพในการเพิ่มความต้านทานต่อโรคในปศุสัตว์ แต่ก็ยังคงมีประเด็นและข้อควรระวังในด้านต่าง ๆ ที่ควรพิจารณา ซึ่งประเด็นหลักที่จะต้องพิจารณา คือ ด้านจริยธรรม โดยจะต้องคำนึงถึงผลกระทบต่อ มนุษย์ สัตว์ สิ่งแวดล้อม และสังคม โดยเฉพาะในสัตว์ จะต้องได้รับการพิจารณาในเรื่องสวัสดิภาพสัตว์และความปลอดภัยต่อผู้บริโภคและสิ่งแวดล้อม เป็นต้น (Murray, 2013) เนื่องจากยังมีความกังวลในเรื่องของผลเสียจากการบริโภคผลผลิตจากสัตว์ที่ได้รับการปรับแต่งพันธุกรรม แม้ว่าในปัจจุบันนี้ยังไม่มีรายงานผลกระทบจากผลผลิตจากสัตว์ที่ได้รับการปรับแต่งพันธุกรรมต่อร่างกายมนุษย์ก็ตาม แต่ก็ยังคงมีความกังวลถึงผลกระทบต่อสุขภาพในระยะยาว

การปรับแต่งจีโนมนั้นอาจก่อให้เกิดความผิดพลาดในการไปจับและตัดสายดีเอ็นเอในตำแหน่งที่ไม่ใช่บริเวณที่ต้องการ เรียกว่า “off-target effect” อาจก่อให้เกิดการกลายพันธุ์และเกิดความผิดปกติในการทำงานของยีนส่งผลให้เกิดเนื้องอกและมะเร็งได้ (Cho et al., 2014) และในระหว่างการซ่อมแซมตัวเองของสายดีเอ็นเอหลังจากถูกตัดอาจเกิดการแทรกหรือลบของนิวคลีโอไทด์โดยไม่สามารถควบคุมได้ ซึ่งจะทำให้ได้สัตว์ที่มีพันธุกรรมที่ไม่ต้องการ ส่งผลให้ยากต่อการกำจัดสัตว์นั้น ๆ ทั้งด้วยเหตุผลในเรื่องของสวัสดิภาพสัตว์ นอกจากนี้ยังคงมีความกังวลในเรื่องของพันธุกรรมที่ได้รับการปรับแต่งอาจถ่ายทอดไปสู่สิ่งมีชีวิตอื่น ๆ ในธรรมชาติ และส่งผลเสียต่อธรรมชาติและสิ่งแวดล้อมจนไม่สามารถควบคุมได้ (Esvelt et al., 2014)

การปรับแต่งจีโนมในปศุสัตว์นั้นส่วนมากมักจะทำในธุรกิจการผลิตสัตว์ที่มีขนาดใหญ่ โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อที่จะปรับปรุงให้ผลผลิตดีขึ้น จึงอาจส่งผลต่อเกษตรกรรายย่อยที่ไม่สามารถผลิตสัตว์ที่มีพันธุกรรมปกติให้มีผลผลิตที่ดีเทียบเท่ากับธุรกิจใหญ่ๆ ได้ บริษัทที่

ผลิตสัตว์ที่ได้รับการปรับแต่งพันธุกรรมนั้นจึงผูกขาดกับตลาดโดยสิ้นเชิง

หลังจากสัตว์ถูกปรับแต่งจีโนมให้มีพันธุกรรมและผลผลิตตามที่ต้องการแล้ว สัตว์จะถูกนำไปเลี้ยงเพื่อใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์ และนำผลผลิตไปเป็นอาหารของมนุษย์ ซึ่งในประเทศที่มีการยอมรับในปศุสัตว์ที่ดัดแปลงพันธุกรรมนั้นจะมีหน่วยงานที่เข้ามาควบคุมดูแลในส่วนนี้ เช่น Food and Drug Administration (FDA) และ European Medicines Agency (EMA) เป็นต้น ในขณะที่การปรับแต่งจีโนมในปศุสัตว์ยังคงไม่เป็นที่ยอมรับในหลาย ๆ ประเทศและได้มีการใช้กฎหมายเข้ามาควบคุมสัตว์ดัดแปลงพันธุกรรมอีกด้วย (พรบ.สัตว์ทดลอง, กฎหมาย GMO)

บทสรุป

เทคนิคการปรับแต่งจีโนมในปัจจุบันนี้มีหลากหลายวิธี แต่ที่ยังคงมีความนิยมและใช้มากที่สุด คือ CRISPR เนื่องจากได้มีการพัฒนาให้มีประสิทธิภาพและความแม่นยำในการจับดีเอ็นเอเป้าหมายที่สูง ทำได้ง่าย และราคาถูก โดยในปี ค.ศ. 2010 – 2020 มีจำนวนผลงานวิจัยมากที่สุดเมื่อเทียบกับเทคนิค ZFNs และ TALENs และนอกจากนี้ยังพบว่าในผลงานวิจัยด้านปศุสัตว์มีการปรับแต่งจีโนมในโคมากที่สุด ในปัจจุบันการปรับแต่งจีโนมสามารถทำได้ง่าย สะดวก รวดเร็ว มีประสิทธิภาพและความแม่นยำมากกว่าในอดีต ทำให้สัตว์เศรษฐกิจในปัจจุบันมีพันธุกรรมที่ทนต่อโรคมมากขึ้น และมีผลผลิตตามความต้องการได้ แต่การปรับแต่งจีโนมในปศุสัตว์ยังคงไม่เป็นที่ยอมรับในบางประเทศ เนื่องจากมีความกังวลในด้านของผลกระทบต่อสุขภาพและสิ่งแวดล้อม จริยธรรม สวัสดิภาพสัตว์ และเศรษฐกิจ เป็นต้น จึงทำให้มีกฎหมายออกมาควบคุมไม่ให้มีการปรับแต่งพันธุกรรมในสัตว์

เอกสารอ้างอิง

- Barrangou, R., C. Fremaux, H. Deveau, M. Richards, P. Boyaval, S. Moineau, D. A. Romero, and P. Horvath. 2007. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*. 315: 1709–1712.
- BESSMAN, M. J., I. R. LEHMAN, E. S. SIMMS, and A. KORNBERG. 1958. Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid. II. General properties of the reaction. *J. Biol. Chem.* 233: 171–177.
- Bi, H. L., J. Xu, L. He, Y. Zhang, K. Li, and Y. P. Huang. 2019. CRISPR/Cas9-mediated ebony knockout results in puparium melanism in *Spodoptera litura*. *Insect Sci.* 26: 1011–1019.
- Boch, J., and U. Bonas. 2010. Xanthomonas AvrBs3 family-type III effectors: Discovery and function. *Annu. Rev. Phytopathol.* 48: 419–436.
- Boch, J., H. Scholze, S. Schornack, A. Landgraf, S. Hahn, S. Kay, T. Lahaye, A. Nickstadt, and U. Bonas. 2009. Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science*. 326: 1509–1512.
- Burkard, C., S. G. Lillico, E. Reid, B. Jackson, A. J. Mileham, T. Ait-Ali, C. B. A. Whitelaw, and A. L. Archibald. 2017. Precision engineering for PRRSV resistance in pigs: Macrophages from genome edited pigs lacking CD163 SRCR5 domain are fully resistant to both PRRSV genotypes while maintaining biological function. *PLoS Pathog.* 13: 1–28.

- Cermak, T., E. L. Doyle, M. Christian, L. Wang, Y. Zhang, C. Schmidt, J. A. Baller, N. V. Somia, A. J. Bogdanove, and D. F. Voytas. 2011. Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting. *Nucleic Acids Res.* 39: 1–11.
- Cho, S. W., S. Kim, Y. Kim, J. Kweon, H. S. Kim, S. Bae, and J. S. Kim. 2014. Analysis of off-target effects of CRISPR/Cas-derived RNA-guided endonucleases and nickases. *Genome Res.* 24: 132–141.
- Christian, M., T. Cermak, E. L. Doyle, C. Schmidt, F. Zhang, A. Hummel, A. J. Bogdanove, and D. F. Voytas. 2010. Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. *Genetics.* 186: 756–761.
- Crea, R., A. Kraszewski, and T. Hirose. 1978. Chemical synthesis of genes for human insulin (synthetic genes/oligonucleotide synthesis/phosphotriester method/high-performance liquid chromatography). 75: 5765–5769.
- Debnath, M., G. B. K. S. Prasad, and P. S. Bisen. 2005. Molecular diagnostics: Promises and possibilities. *Mol. Diagnostics Promises Possibilities.*
- Esvelt, K. M., A. L. Smidler, F. Catteruccia, and G. M. Church. 2014. Concerning RNA-guided gene drives for the alteration of wild populations. *Elife.* 3: 1–21.
- Gasiunas, G., R. Barrangou, P. Horvath, and V. Siksnys. 2012. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109: 2579–2586.
- Gellert, M. 1967. Formation of covalent circles of lambda DNA by E. coli extracts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 57: 148–155.
- Groenen, M. A. M., A. L. Archibald, H. Uenishi, C. K. Tuggle, Y. Takeuchi, M. F. Rothschild, C. Rogel-Gaillard, C. Park, D. Milan, H. J. Megens, S. Li, D. M. Larkin, H. Kim, L. A. F. Frantz, M. Caccamo, H. Ahn, B. L. Aken, A. Anselmo, C. Anthon, L. Auvil, B. Badaoui, C. W. Beattie, C. Bendixen, D. Berman, F. Blecha, J. Blomberg, L. Bolund, M. Bosse, S. Botti, Z. Bujie, M. Bystrom, B. Capitanu, D. Carvalho-Silva, P. Chardon, C. Chen, R. Cheng, S. H. Choi, W. Chow, R. C. Clark, C. Clee, R. P. M. A. Crooijmans, H. D. Dawson, P. Dehais, F. De Sapio, B. Dibbits, N. Drou, Z. Q. Du, K. Eversole, J. Fadista, S. Fairley, T. Faraut, G. J. Faulkner, K. E. Fowler, M. Fredholm, E. Fritz, J. G. R. Gilbert, E. Giuffra, J. Gorodkin, D. K. Griffin, J. L. Harrow, A. Hayward, K. Howe, Z. L. Hu, S. J. Humphray, T. Hunt, H. Hornshøj, J. T. Jeon, P. Jern, M. Jones, J. Jurka, H. Kanamori, R. Kapetanovic, J. Kim, J. H. Kim, K. W. Kim, T. H. Kim, G. Larson, K. Lee, K. T. Lee, R. Leggett, H. A. Lewin, Y. Li, W. Liu, J. E. Loveland, Y. Lu, J. K. Lunney, J. Ma, O. Madsen, K. Mann, L. Matthews, S. McLaren, T. Morozumi, M. P. Murtaugh, J. Narayan, D. T. Nguyen, P. Ni, S. J. Oh, S. Onteru, et al. 2012. Analyses of pig genomes provide

- insight into porcine demography and evolution. *Nature*. 491: 393–398.
- Gupta, D., O. Bhattacharjee, D. Mandal, M. K. Sen, D. Dey, A. Dasgupta, T. A. Kazi, R. Gupta, S. Sinharoy, K. Acharya, D. Chattopadhyay, V. Ravichandiran, S. Roy, and D. Ghosh. 2019. CRISPR-Cas9 system: A new-fangled dawn in gene editing. *Life Sci*. 232: 116636.
- Gupta, S. K., S. Dixit, S. K. Dangi, G. Kaur, M. Mashooq, K. Karthik, M. Sarkar, S. Mahajan, and V. K. Nagaleekar. 2020. Marker-less deletion of cctA gene of *Clostridium chauvoei*. *Anaerobe*. 61: 102116.
- Ikeda, M., S. Matsuyama, S. Akagi, K. Ohkoshi, S. Nakamura, S. Minabe, K. Kimura, and M. Hosoe. 2017. Correction of a Disease Mutation using CRISPR/Cas9-assisted Genome Editing in Japanese Black Cattle. *Sci. Rep*. 7: 1–9.
- Ishino, Y., H. Shinagawa, K. Makino, M. Amemura, and A. Nakamura. 1987. Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isoenzyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J. Bacteriol*. 169: 5429–5433.
- Jinek, M., K. Chylinski, I. Fonfara, M. Hauer, J. A. Doudna, and E. Charpentier. 2012. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*. 337: 816–821.
- Kim, Y. G., J. Cha, and S. Chandrasegaran. 1996. Hybrid restriction enzymes: Zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. 93: 1156–1160.
- Kim, Y. G., Y. Shi, J. M. Berg, and S. Chandrasegaran. 1997. Site-specific cleavage of DNA-RNA hybrids by zinc finger/FokI cleavage domain fusions. *Gene*. 203: 43–49.
- Koslová, A., P. Trefil, J. Mucksová, M. Reinišová, J. Plachý, J. Kalina, D. Kučerová, J. Geryk, V. Krchliková, B. Lejčková, and J. Hejnar. 2020. Precise CRISPR/Cas9 editing of the NHE1 gene renders chickens resistant to the J subgroup of avian leukosis virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. 117: 2108–2112.
- Lander, E. S., L. M. Linton, B. Birren, C. Nusbaum, M. C. Zody, J. Baldwin, K. Devon, K. Dewar, M. Doyle, W. Fitzhugh, R. Funke, D. Gage, K. Harris, A. Heaford, J. Howland, L. Kann, J. Lehoczký, R. Levine, P. McEwan, K. McKernan, J. Meldrim, J. P. Mesirov, C. Miranda, W. Morris, J. Naylor, C. Raymond, M. Rosetti, R. Santos, A. Sheridan, C. Sougnez, N. Stange-Thomann, N. Stojanovic, A. Subramanian, D. Wyman, J. Rogers, J. Sulston, R. Ainscough, S. Beck, D. Bentley, J. Burton, C. Clee, N. Carter, A. Coulson, R. Deadman, P. Deloukas, A. Dunham, I. Dunham, R. Durbin, L. French, D. Grafham, S. Gregory, T. Hubbard, S. Humphray, A. Hunt, M. Jones, C. Lloyd, A. McMurray, L. Matthews, S. Mercer, S. Milne, J. C. Mullikin, A. Mungall, R. Plumb, M. Ross, R. Shownkeen, S. Sims, R. H. Waterston, R. K. Wilson, L. W. Hillier, J. D.

- McPherson, M. A. Marra, E. R. Mardis, L. A. Fulton, A. T. Chinwalla, K. H. Pepin, W. R. Gish, S. L. Chissoe, M. C. Wendl, K. D. Delehaunty, T. L. Miner, A. Delehaunty, J. B. Kramer, L. L. Cook, R. S. Fulton, D. L. Johnson, P. J. Minx, S. W. Clifton, T. Hawkins, E. Branscomb, P. Predki, P. Richardson, S. Wenning, T. Slezak, N. Doggett, J. F. Cheng, A. Olsen, S. Lucas, C. Elkin, et al. 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*. 409: 860–921.
- LEHMAN, I. R., M. J. BESSMAN, E. S. SIMMS, and A. KORNBERG. 1958. Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid. I. Preparation of substrates and partial purification of an enzyme from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 233: 163–170.
- Li, T., S. Huang, W. Z. Jiang, D. Wright, M. H. Spalding, D. P. Weeks, and B. Yang. 2011. TAL nucleases (TALNs): Hybrid proteins composed of TAL effectors and FokI DNA-cleavage domain. *Nucleic Acids Res.* 39: 359–372.
- Liu, Q., and V. Gerdt. 2019. Transmissible Gastroenteritis Virus of Pigs and Porcine Epidemic Diarrhea Virus. *Ref. Modul. Life Sci.*
- Liu, X., Y. Wang, W. Guo, B. Chang, J. Liu, Z. Guo, F. Quan, and Y. Zhang. 2013. Zinc-finger nickase-mediated insertion of the lysostaphin gene into the beta-casein locus in cloned cows. *Nat. Commun.* 4: 1–11.
- Mahfouz, M. M., L. Li, M. Shamimuzzaman, A. Wibowo, X. Fang, and J. K. Zhu. 2011. De novo-engineered transcription activator-like effector (TALE) hybrid nuclease with novel DNA binding specificity creates double-strand breaks. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108: 2623–2628.
- Mallikarjunappa, S., U. K. Shandilya, A. Sharma, K. Lamers, N. Bissonnette, N. A. Karrow, and K. G. Meade. 2020. Functional analysis of bovine interleukin-10 receptor alpha in response to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* lysate using CRISPR/Cas9. *BMC Genet.* 21: 1–11.
- Mertz, J. E., and R. W. Davis. 1972. Cleavage of DNA by R 1 restriction endonuclease generates cohesive ends. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 69: 3370–3374.
- Meselson, M., and R. Yuan. 1968. DNA restriction enzyme from *E. coli*. *Nature*. 217: 1110–1114.
- Miller, J. C., S. Tan, G. Qiao, K. A. Barlow, J. Wang, D. F. Xia, X. Meng, D. E. Paschon, E. Leung, S. J. Hinkley, G. P. Dulay, K. L. Hua, I. Ankoudinova, G. J. Cost, F. D. Urnov, H. S. Zhang, M. C. Holmes, L. Zhang, P. D. Gregory, and E. J. Rebar. 2011. A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. *Nat. Biotechnol.* 29: 143–150.
- Miller, J., A. D. McLachlan, and A. Klug. 1985. Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from *Xenopus oocytes*. *EMBO J.* 4:1609–1614.

- Moscou, M. J., and A. J. Bogdanove. 2009. Recognition by TAL Effectors. *Science*. 326: 1501.
- Murase, K., K. L. Morrison, P. Y. Tam, R. L. Stafford, F. Jurnak, and G. A. Weiss. 2003. EF-Tu Binding Peptides Identified, Dissected, and Affinity Optimized by Phage Display GDP conformation of EF-Tu. Because EF-Tu is abundant in the cell, other functions have been suggested, particularly during periods of cellular stress when protein syn-g. *Chem. Biol.* 10: 161–168.
- Petersen, B. 2017. Basics of genome editing technology and its application in livestock species. *Reprod. Domest. Anim.* 52:4–13.
- SHIMOMURA, O., F. H. JOHNSON, and Y. SAIGA. 1962. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent. *J. Cell. Comp. Physiol.* 59: 223–239.
- Smith, H. O., and K. W. Welcox. 1970. A Restriction enzyme from Hemophilus influenzae. I. Purification and general properties. *J. Mol. Biol.* 51: 379–391.
- Snelling, W. M., R. Chiu, J. E. Schein, M. Hobbs, C. A. Abbey, D. L. Adelson, J. Aerts, G. L. Bennett, I. E. Bosdet, M. Boussaha, R. Brauning, A. R. Caetano, M. M. Costa, A. M. Crawford, B. P. Dalrymple, A. Eggen, A. Everts-van der Wind, S. Floriot, M. Gautier, C. A. Gill, R. D. Green, R. Holt, O. Jann, S. J. M. Jones, S. M. Kappes, J. W. Keele, P. J. de Jong, D. M. Larkin, H. A. Lewin, J. C. McEwan, S. McKay, M. A. Marra, C. A. Mathewson, L. K. Matukumalli, S. S. Moore, B. Murdoch, F. W. Nicholas, K. Osoegawa, A. Roy, H. Salih, L. Schibler, R. D. Schnabel, L. Silveri, L. C. Skow, T. P. L. Smith, T. S. Sonstegard, J. F. Taylor, R. Tellam, C. P. Van Tassell, J. L. Williams, J. E. Womack, N. H. Wye, G. Yang, and S. Zhao. 2007. A physical map of the bovine genome. *Genome Biol.* 8.
- Tsetsckhladze, Z. R., V. A. Canfield, K. C. Ang, S. M. Wentzel, K. P. Reid, A. S. Berg, S. L. Johnson, K. Kawakami, and K. C. Cheng. 2012. Functional Assessment of Human Coding Mutations Affecting Skin Pigmentation Using Zebrafish. 7.
- Wagner, E. F., T. A. Stewart, and B. Mintz. 1981. The human β -globin gene and a functional viral thymidine kinase gene in developing mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 78: 5016–5020.
- Watson, J. D., and S. Devons. 1968. The Double Helix: A Personal Account of the Discovery of the Structure of DNA. *Phys. Today*. 21: 71–72.
- Watters, K. E., H. Shivram, C. Fellmann, R. J. Lew, B. McMahon, and J. A. Doudna. 2020. Potent CRISPR-Cas9 inhibitors from Staphylococcus genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 117: 6531–6539.
- Whitworth, K. M., R. R. R. Rowland, V. Petrovan, M. Sheahan, A. G. Cino-Ozuna, Y. Fang, R. Hesse, A. Mileham, M. S. Samuel, K. D. Wells, and R. S. Prather. 2019. Resistance to coronavirus infection in amino peptidase N-deficient pigs. *Transgenic Res.* 28: 21–32.

Wu, H., Yong Zhang, Y. Wang, Yan Zhang, M.
Yang, J. Lv, and J. Liu. 2015. TALE nickase-
mediated SP110 knockin endows cattle
with increased resistance to tuberculosis.
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 112: E1530–
E1539.

