

# 肉牛分子育种下功能基因调控的密码子扩展技术

马义诚 叶治兵 崔繁荣 袁理星 李红波\*  
新疆畜牧科学院畜牧研究所, 新疆 乌鲁木齐 830000

**摘要:** 肉牛是全球农业经济中的重要资源, 精准育种是育种学界和产业界的热点。遗传密码子扩展技术 (GCE) 作为一种可在活细胞内位点特异性插入非天然氨基酸 (ncAAs) 的新策略, 近年来在分子育种中展现出巨大潜力。该技术通过在蛋白质中引入可控生物正交官能团, 为功能蛋白质构建、基因表达调控及表型改良提供新思路。在肉牛分子育种中, GCE 可结合基因组学与蛋白质组学, 对影响生长、产肉品质及抗病性的关键蛋白进行精准修饰或赋予新功能, 助力提升牛肉品质、饲料利用效率及抗逆性。本文回顾 GCE 的核心原理及技术进展, 探讨其在肉牛性状选育、疫苗及抗体改进中的应用潜力, 并展望其在产业化中的前景与挑战, 为肉牛种质创新提供新思路。

**关键词:** 遗传密码子扩展技术; 非天然氨基酸; 肉牛育种; 基因调控

## Codon Expansion Technology of Functional Gene Regulation in Beef Cattle Molecular Breeding

Ma,Yicheng Ye,Zhibing Cui,Fanrong Yuan,Lixing Li,Hongbo\*

Animal Husbandry Institute, XinJiang Academy of Animal Sciences, Urumqi, Xinjiang, 830000, China

**Abstract:** Beef cattle is an important resource in the global agricultural economy, and precision breeding is a hot spot in breeding academic and industrial circles. As a new strategy for site-specific insertion of unnatural amino acids (ncAAs) in living cells, genetic codon extension (GCE) has shown great potential in molecular breeding in recent years. By introducing controllable biological orthogonal functional groups into protein, this technology provides new ideas for the construction of functional protein, gene expression regulation and phenotypic improvement. In molecular breeding of beef cattle, GCE can combine genomics and protein genomics to precisely modify or give new functions to key proteins that affect growth, meat quality and disease resistance, and help improve beef quality, feed utilization efficiency and stress resistance. This paper reviews the core principle and technical progress of GCE, discusses its application potential in beef cattle breeding, vaccine and antibody improvement, and looks forward to its prospects and challenges in industrialization, providing new ideas for beef cattle germplasm innovation.

**Keywords:** Genetic code sub-extension technology; Unnatural amino acids; Beef cattle breeding; Gene regulation

DOI: 10.62639/sspis05.20250202

## 引言

肉牛产业在全球范围内占据了农业和畜牧经济的重要地位, 其经济价值不仅包括牛肉产量及品质, 还包括牛奶、皮革、牛体副产物等衍生品的多样化利用。随着人口增长和饮食结构升级, 肉牛育种策略日趋多元化, 既关注产肉性能、饲料转化率, 也关注牛肉品质、健康价值以及环境友好度。传统育种方法主要依赖于表型选择和基因组选择, 虽然已经取得了较大成效, 但在应对复杂性状 (如肉质、大理石纹、抗病抗逆性等) 和实现精准定向遗传改良方面仍存在局限。

本文将重点介绍遗传密码子扩展技术的基本原理、关键工具以及最新进展, 并着重探讨该技术在肉牛分子育种和功能基因调控中的应用潜力, 包括在抗病育种、蛋白质标记、疫苗研制、抗体改造等方面的具体策略与挑战, 旨在为新一代肉牛分子育种技术提供借鉴和思路。

## 一、遗传密码子扩展技术概述

### (一) 技术原理

遗传密码子扩展技术 (genetic code expansion, GCE) 基于在宿主生物体中引入“正交”氨酰 tRNA 合成酶 / tRNA (aaRS/tRNA) 对, 并将特定三碱基或四碱基密码子从“终止”或“无义”角色重新赋予“编码”非天然氨基酸的功能。具体来说:

1. 正交 aaRS/tRNA 对: 将来源于古菌或其他物种、与宿主内源氨酰 tRNA 合成酶几乎无交叉反应的 aaRS/tRNA 对转入宿主细胞, 使得该对只能识别并装载特定 ncAAs 而不会与宿主其他氨基酸混淆<sup>[1]</sup>。

2. 空白密码子: 常见做法是使用琥珀终止密码子 (UAG) 或者四碱基密码子 (如 UAGA), 并通过基因组工程和蛋白质工程手段减少或敲除宿主中对应的终止因子, 从而使这个密码子对蛋白质合成过程“空置”出来, 专门用于插入 ncAAs。

3. ncAAs 的供给: 通过外源添加或宿主细胞

(稿件编号: IS-25-2-1003)

**作者简介:** 马义诚 (1994-), 男, 回, 河南省项城县人, 畜牧师, 硕士, 主要研究方向为肉牛遗传育种及饲养管理。

**通讯作者:** 李红波 (1980-), 男, 新疆博乐人, 正高级畜牧师, 博士在读, 研究方向为肉牛遗传育种与饲养管理。

**基金项目:** 国家肉牛牦牛产业技术体系 (CARS-37), 新疆肉牛产业技术体系 (XJARS-10-03)。

自身工程化改造两种方式, 令细胞可以有效获取并利用目标 ncAAs。随后在翻译过程中, 当核糖体遇到“扩展”密码子时, 即可在正交 aaRS/tRNA 对的辅助下将 ncAAs 位点特异性地整合到新生蛋白中。

凭借这一策略, 科研人员已能在包括细菌、酵母、哺乳动物细胞, 甚至是小鼠、植物等多种生物体系中定点插入多达 200 多种 ncAAs。对于肉牛分子育种而言, 若能在牛胚胎工程或体细胞转染中使用相应的正交系统, 将为高效修饰与监控体内关键调控蛋白提供重要手段<sup>[2]</sup>。

### (二) 技术瓶颈与优化方向

尽管遗传密码子扩展技术潜力巨大, 但在肉牛等高等哺乳动物中大规模应用, 仍面临以下挑战:

1. 正交体系的兼容性: 现有正交 aaRS/tRNA 对大多基于大肠杆菌或酵母体系, 如何确保其在牛胚胎细胞或体细胞中与内源体系高效共存并维持足够的活性, 是首要难点。

2. ncAAs 细胞毒性与利用效率: 部分 ncAAs 在细胞内会引发毒性反应或竞争性抑制, 应改造宿主代谢通路, 或通过定向进化提高氨酰化效率与专一性。

3. 多位点、多种 ncAAs 同时插入: 对多性状/多蛋白网络进行同步调控或修饰, 需要构建多个相互正交的密码子与 aaRS/tRNA 对, 以及宿主基因组大规模的密码子重排与同义替换。

随着合成生物学和蛋白质工程技术的持续发展, 上述瓶颈正在逐步得到克服, 为遗传密码子扩展技术在肉牛分子育种中的广泛应用奠定了坚实基础。

## 二、肉牛分子育种中密码子扩展技术的应用潜力

### (一) 精准修饰与定位关键调控蛋白

肉牛经济性状(生长速度、胴体组成、肌肉内脂肪沉积、抗应激能力等)往往受到多个基因及其调控蛋白的共同影响。例如, 生长激素(GH)、胰岛素样生长因子(IGF-1)、肌肉调节因子(如 MyoD、Myf5)等都在不同阶段调控肉牛肌肉和脂肪组织的发育<sup>[3]</sup>。传统基因敲除或基因编辑主要关注编码区碱基层面的插入、缺失或替换, 却无法对蛋白质的特定氨基酸侧链进行灵活改造。

利用遗传密码子扩展技术, 可在叠氮基、炔基、酮基等含生物正交基团的氨基酸衍生物的关键调控蛋白特定位点插入带有特殊化学官能团的 ncAAs, 借此可以:

1. 追踪与定位: 与荧光探针或纳米颗粒实现快速、特异性的生物正交标记, 用于研究蛋白质在细胞或组织中的分布与动态变化。

2. 增强或抑制活性: 通过设计可与配体或受体形成共价交联的 ncAAs, 实现对蛋白活性更稳定、更持续的调控, 也可以利用光敏 ncAAs 对蛋白活性进行时空可控的开启或关闭。

3. 改善稳定性: 某些 ncAAs 可以提高蛋白质热稳定性或抗降解能力, 从而在体外或体内持续发挥生物学功能, 减少用量并降低成本。

在肉牛分子育种中, 可利用这些精准修饰手段, 更有效地阐明影响牛只品质和性能的核心调控网络, 为后续基因组育种和精准基因编辑提供关键的蛋白质层面证据, 也为培育高产、优质肉牛品系奠定分子基础。

### (二) 抗体改造与新型疫苗研制

肉牛饲养过程中面临多种细菌、病毒及寄生虫感染, 常见的有牛病毒性腹泻、牛传染性鼻气管炎、寄生虫病, 这给养殖产业造成重大经济损失。高效、广谱且安全的疫苗或抗体制备是预防和控制上述疾病的关键, 而遗传密码子扩展技术在抗体蛋白和疫苗研制方面具有以下独特优势:

#### 1. 抗体偶联药物(ADCs)

在抗体分子特定位点插入含生物正交基团的 ncAAs, 实现与药物分子或免疫调节剂的定点偶联, 制备均一、稳定且具有高活性的抗体偶联药物。对于牛病防治而言, 可将具有杀菌或抑制病原体增殖作用的小分子药物定点偶联到针对病原表面抗原的特异性抗体上, 从而降低全身性副作用并提高疗效。

#### 2. 新型亚单位疫苗和衰减疫苗

肉牛常见疫苗主要是灭活或减毒制剂, 但减毒病原存在回复突变风险。通过在病原微生物必需基因编码区引入多个 ncAAs 突变点, 可构建对外源 ncAAs 严格依赖的营养缺陷型突变株, 极大降低了回复突变可能性。这些衰减病原体既能有效诱导免疫应答, 又不会在体内传播, 安全性显著提升。

#### 3. 提高外源抗原的免疫原性

某些 ncAAs(如含硝基或磺基侧链的衍生物)具有更强的免疫刺激作用, 可用于提升外源抗原蛋白的免疫原性, 减少疫苗接种次数, 缩短免疫周期, 尤其在慢性或难以产生抗体应答的牛病中具有应用潜力。

### (三) 抗菌肽与蛋白质药物改造

随着抗生素在养殖业中被严格管控, 抗菌肽逐渐成为替代抗生素的重要候选。肉牛生产中常见病原微生物(如大肠杆菌、沙门氏菌等)对传统药物已出现不同程度耐药。通过遗传密码子扩展技术, 可在抗菌肽序列中插入兼具抑菌与抗降解功能的 ncAAs, 增强其化学多样性, 提高热稳定性和特异性。此外, 对蛋白质药物(如细胞因子、调控因子等)进行 ncAAs 修饰, 可定点融合聚乙二醇或其他生物相容性分子, 延长其在肉牛体内的半衰期。这对于减少用药成本并提高肉牛健康具有现实意义。

### (四) 基于密码子扩展的细胞治疗

目前在养殖实践中, 对于个别牛只的重大基因缺陷(如先天性免疫缺陷)或退行性疾病, 常采取被动免疫或移除方式进行处理。若能通过细胞工程手段, 将肉牛或其他哺乳动物的免疫细胞进行 ex vivo 改造再回输, 则有望精准地修复或改善缺陷功能。遗传密码子扩展技术可以用来设计“蛋白质开关”, 让细胞治疗过程在体内可被诱导剂或光信号精确调控, 从而避免细胞疗法的不确定性和潜在风险。虽然目前此类技术在肉牛中尚属前沿研究, 但在高级哺乳动物中的成功经验表明了可行性。

### 三、实验体系与案例分析

#### (一) 肉牛细胞系的构建

要在肉牛体系中应用遗传密码子扩展技术, 首先需构建适配的正交 aaRS/tRNA 对和可高效表达的细胞系或胚胎工程体系。常用策略包括:

##### 1. 体细胞转染

在牛成纤维细胞、牛胚胎滋养层细胞等模型中导入以病毒载体或电转方式携带的外源 aaRS/tRNA 对, 并配合整合 CRISPR/Cas9 改造以敲除或弱化内源性释放因子 RF1, 提升琥珀密码子 UAG 的定向解码效率。

##### 2. 胚胎注射

在牛早期胚胎或受精卵阶段直接注射携带密码子扩展系统的 mRNA/质粒, 再移植到代孕母牛体内, 实现对活体牛只的精确改造。虽然实验操作难度更高, 但若成功则可直接获得转基因后代。

##### 3. 综合性基因组编辑

将多个非必需基因的终止密码子进行同义替换以回收 UAG, 或结合四碱基/五碱基密码子策略, 进一步扩展可插入多种 ncAAs 的潜能。这类大规模基因组工程仍具相当难度, 但随着 DNA 经济性合成和大片段组装技术的发展, 未来有望在肉牛育种上得到实践。

#### (二) 针对牛生长激素的定点修饰

牛生长激素 (bGH) 是调控肉牛体格生长、乳腺发育和代谢的重要因子, 通过定点插入含炔基、叠氮基等正交基团的 ncAAs, 可实现外源化学修饰 (如 PEG 化) 或共价交联配体, 从而获得半衰期更长、靶向性更高的重组 bGH 蛋白。在小规模体外细胞模型中已验证, 这种定点修饰的 bGH 较传统随机化学修饰具有更好的稳定性和均一性, 为其在肉牛生长促进及健康调控中的应用创造了可能。

#### (三) 基于衰减病原体的活疫苗示范

牛结核、牛病毒性腹泻等具有较高传染性和致病性。将致病菌或病毒关键蛋白的若干氨基酸位点替换为 ncAAs, 可让其生长繁殖对外源氨基酸呈依赖性。一旦离开含有这种 ncAAs 的培养环境, 该病原体即无法正常复制, 极大降低了回复突变的风险。已有学者在流感病毒、HIV-1 和结核分枝杆菌中成功构建了多位点 ncAAs 营养缺陷株, 证明了利用遗传密码子扩展技术打造低逃逸率衰减病原体的可行性。将此思路移植至牛病防治中, 有望制备出新一代安全、高效且免疫原性强的活疫苗。

### 四、前景与挑战

#### (一) 可扩展的 ncAAs 库

当前多数可插入的 ncAAs 以对 Tyr 或 Lys 进行衍生改造为主, 尽管数量超过 200 种, 但仍远未覆盖所有潜在的化学功能。随着化学生物学、酶工程学以及代谢途径工程的不断进展, 预计将有更多结构各异、具备电荷、荧光、光敏、交联等多样属性的氨基酸衍生物被发掘和合成。丰富的 ncAAs 库将进一步拓宽肉牛育种中各种蛋白质

功能改造的可能性。

#### (二) 大规模饲养环境下的安全与经济性

要将密码子扩展技术推广至肉牛产业, 需要考虑以下实际因素:

##### 1. ncAAs 的成本与安全

许多 ncAAs 当前合成成本较高, 或者缺乏食品/动物安全认证。必须找到廉价、高效、可安全降解或代谢的合成方案, 并在大规模饲养及加工环境中进行验证。

##### 2. 转基因生物的监管

在多数国家与地区, 转基因动物及其产品尚处于严格监管的范畴。采用遗传密码子扩展技术改造后的牛只及其后代, 也面临转基因安全评估与市场准入挑战。因此, 需要更多社会科普和政策沟通, 以及完整的安全性评估与溯源体系。

##### 3. 育种与产业结合度

密码子扩展技术仍以实验室研究为主, 与肉牛规模化育种及繁育体系尚未充分融合。如何与繁殖性能、种群遗传多样性、胚胎移植、精液冻配等现有技术相互配合仍需深入探索。

#### (三) 多学科交叉推动技术落地

要真正推动密码子扩展技术在肉牛育种中落地, 需要遗传学、分子生物学、合成生物学、动物科学、育种学以及市场经济等多学科、多环节的协同创新。例如: (1) 合成生物学与化学生物学的交叉, 致力于研发更多高效、特异的正交 aaRS/tRNA 对以及新颖的 ncAAs; (2) 动物繁殖学与发育生物学的结合, 聚焦于将密码子扩展系统导入牛胚胎或体细胞并保证正常发育; (3) 市场与政策层面则需在安全评估、知识产权保护及产业化途径上提供支持。

### 五、结语

肉牛分子育种的核心目标是在保证肉牛健康和福利的前提下, 实现牛肉品质及产量的稳步提升, 同时兼顾环境保护与产业可持续发展。遗传密码子扩展技术 (GCE) 作为生命科学的突破性工具, 可实现蛋白质的精准修饰, 突破传统基因编辑的限制。该技术在肉牛领域的潜在应用包括功能基因研究、蛋白质标记与跟踪、疫苗开发及新型抗体合成等。然而, 将 GCE 融入肉牛育种体系需解决大基因组背景下密码子重排的可行性、正交酶活性稳定性及饲养环境对非天然氨基酸的经济性和安全性要求等问题。未来, 随着合成生物学、计算生物学和组学技术的融合发展, GCE 有望推动肉牛分子育种的精准化, 为畜牧业的可持续发展注入新动能。

#### 参考文献:

- [1] 郝荣增, 卢炳州, 等. 基于遗传密码子扩展技术的口蹄疫病毒 VP1 蛋白位点特异性荧光标记 [J]. 中国兽医科学, 1-8.
- [2] 陈文广. 密码子扩展技术调控微生物合成 PHA 的研究 [D]. 北京化工大学, 2022.
- [3] 高晓威, 韦思平, 王钦. 遗传密码子扩展技术在蛋白质及多肽类药物中的应用 [J]. 生物化学与生物物理进展, 2022, 49 (01): 183-201.