DOI:10.16016/j.1000-5404.201503197

论著

鼠*fscb*基因靶向敲除载体的构建及动物模型的建立

周庭友,孙中义,张 勇,张 军,毕 罡,刘旭东,李 珂,周 波,靳风烁,张克勤,李彦锋 (400042 重庆,第三军医大学大坪医院野战外科研究所泌尿外科)

[摘要] **目的** 利用CRISPR/Cas9系统构建鼠*fscb*基因打靶载体,为研究鼠FSCB蛋白在精子鞭毛运动和获能中作用建立*fscb*基因敲除动物模型。**方法** 根据*fscb*基因全长序列,设计CRISPR/Cas9作用靶点,合成3对单链向导RNA(single-guide RNA, sgRNA),并克隆进PU57-T7-GDNA载体,通过PCR测序鉴定,获得sgRNA表达质粒。利用T7 RNA聚合酶体外转录sgRNA和Cas9 RNA。将Cas9 mRNA和sgRNA以适当比例混合后注射入B6J小鼠受精卵中,获得*fscb*基因敲除的初建鼠(F0)。通过PCR对基因突变情况进行鉴定,选取靶基因敲除的小鼠进行传代并进一步测序分析确定突变情况。**结果** 成功构建表达sgRNA的载体并进行体外转录,将有活性的sgRNA和Cas9 RNA直接注射入鼠受精卵,获得39只F0代阳性小鼠,选取3只明确删除目的基因片段并产生移码的雄鼠与野生雌鼠回交繁育得到5只F1代阳性小鼠(2只雄鼠,3只雌鼠),将F1代杂合子雄鼠与雌鼠交配,获得纯合子小鼠。通过鉴定,建立了两种不同基因型的*fscb*基因敲除鼠系,并传代繁育。Western blot分析证实两种鼠系纯合子雄鼠睾丸及精子内的FSCB蛋白表达消失。**结论** 通过CRISPR/Cas9系统靶向敲除*fscb*基因并获得纯合子小鼠,为进一步分析FSCB蛋白的功能提供了基因敲除小鼠模型。

[关键词] 基因敲除;精子蛋白;CRISPR/Cas9;动物模型
[中图法分类号] R-332; R394-33; R698 [文献标志码] A

Construction of targeting vector and preparation of fibrous sheath CABYR-binding protein knockout mice using CRISPR/Cas9 system

Zhou Tingyou, Sun Zhongyi, Zhang Yong, Zhang Jun, Bi Gang, Liu Xudong, Li Ke, Zhou Bo, Jin Fengshuo, Zhang Keqin, Li Yanfeng (Department of Urology, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042, China)

[**Abstract**] **Objective** To build the targeting vectors to delete the gene of mouse fibrous sheath CABYR-binding protein (*fscb*) by using the CRISPR/Cas9 system, and to establish *fscb* gene knockout mice to study its function in the sperm activation and capacitation. **Methods** The targeting sites were designed according to the full-length sequence of *fscb* gene, and 3 pairs of single-guide RNA (sgRNA) were chemically synthesized, and inserted into the linearized plasmid pUC57-T7-GDNA. The Cas9 and sgRNAs were transcribed by T7 RNA polymerase *in vitro*. Cas9 mRNA and sgRNA mixtures were microinjected into fertilized eggs to generate mice with targeted mutation. The genotypes of homozygous were identified by PCR, DNA sequencing and Western blotting. **Results** The vector expressing sgRNA was successfully built, and the sgRNA and Cas9 mRNA were transcribted *in vitro*. The active sgRNA and Cas9 mRNA were then injected into the fertilized eggs of mice, and 39 positive mice as the F0 generation were generated. Three select male mice with clear deletion of the *fscb* gene fragment and with obvious frame shifting were bred with wild-type female mice, and 5 positive F1 mice (2 males and 3 females) were achieved. The heterozygous males mated with females to generate the F2

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81170617)
[通信作者] 李彦锋,E-mail: lyf1000@aliyun.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20150722.0905.010.html(2015-07-22)

homozygous mice. Two different genotypes of homozygous were generated. Western blot analysis confirmed that the expression of FSCB protein in the testis and sperm of the homozygous male mice were disappeared. **Conclusion** The *fscb* gene knockout model is successfully established by using the CRISPR/Cas9 system, which offer a tool for the function of FSCB protein.

[**Key words**] knockout; sperm protein; CRISPR/Cas9; animal model

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81170617). Corresponding author: Li Yanfeng, E-mail: lyf1000@aliyun.com

已有研究发现严重弱精症或精子完全无运动的患者存在精子纤维鞘发育不良[1],精子形成过程中睾丸特异性基因的适时有序表达,并驱动精子各细胞器的有序形成包括精子鞭毛骨架结构和相关蛋白的有序装配整合是保证精子发挥正常功能的根本物质基础[2]。纤维鞘CABYR结合蛋白(fibrous sheath CABYR-binding protein,FSCB)是在精子形成过程中特异性表达并最终定位于精子鞭毛纤维鞘上的一种新蛋白,由李彦锋教授[3]在美国率先发现和鉴定。前期的研究发现FSCB、CABYR等蛋白可能通过直接或间接的相互作用结合装配于纤维鞘的支架蛋白AKAPs上,形成巨分子蛋白复合物,共同发挥纤维鞘的生理功能。根据其基本特性,推断该蛋白可能是一种参与精子鞭毛运动,与精子获能和超活化作用有关的重要蛋白[3]。本研究应用CRISPR/Cas9系统靶向敲除小鼠*fscb*基因并建立动物模型,为深入探讨FSCB蛋白缺失后精子发生,精子形成和精子形态结构的可能改变以及该蛋白在精子中的生物学功能提供了保证。

1 材料与方法

1.1 主要材料

大肠杆菌、LB琼脂平板、B6J小鼠、PUC57-T7-GDNA表达载体、Cas9表达载体(均由南京大学模式动物研究所提供)、T7 Ultra试剂盒/MEGAshortscript试剂盒(Ambion,AM1345)、PCR纯化试剂盒(南京大学模式动物研究所),DH5α感受态(Transgene公司),限制性内切酶*Bsa* Ⅰ、*Dra* Ⅰ、*Age* Ⅰ、T_4 Ligase/T_4 Buffer连接酶、*Taq*酶和dNTP等(NEB公司),质粒小量提试剂盒(天根生化科技有限公司),琼脂糖胶回收试剂盒(康为世纪公司),抗-FSCB抗体(李彦锋教授国外研究制备),山羊抗豚鼠IgG(博奥生物有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 sgRNA设计和寡聚核苷酸链的合成 鼠Fscb基因定位于第12条染色体的12C1区段(Chromosome 12: 65,572,320 - 65,575,885, ENSMUST00000059833),全长3 566 bp,仅有单一的外显子,无内含子,表达蛋白全长1 062 aa。针对该基因,通过在线免费设计sgRNA的软件(http://crispr.mit.edu/),设计3对针对*fscb*基因的向导RNA寡聚核苷酸链:正义链1:TAGGATGAAGAGAAAGCATGTCC,反义链1:5′-AAACGGACATGCTTTCTCTTCATC-3′;正义链2:5′-TAGGTGAGTTAGAAATTATTATC-3′,反义链2:5′-AAACGATAATAATTTCTAACTCAC-3′;正义链3:5′-TAGGGAATACTCTGTGGCAATTC-3′,反义链3:5′-AAACGAATTGCCACAGAGTATTCC-3′。将*fscb* sgRNA寡核苷酸单链以逐步降温的方法退火成双链,程序如下:95 ℃,5 min;94 ℃,1 min, -1 ℃/循环,22个循环;72 ℃,30 min;71 ℃,1 min, -1 ℃/循环,46个循环;4 ℃保持备用。

1.2.2 sgRNA表达载体构建 将3对sgRNA寡核苷酸双链稀释至0.5 μmol/L。用*Bsa* Ⅰ酶切pUC57-T7-GDNA质粒使其线性化,回收后稀释至50 mg/L,然后与3对寡核苷酸双链分别进行连接,连接体系:线性化的pUC57-T7-GDNA质粒2 μL,sgRNA寡核苷酸双链6 μL,T_4连接酶1 μL,T_4缓冲液1 μL,16 ℃连接6 h或过夜。连接后转化感受态大肠杆菌,涂布于含125 μg/mL卡那霉素的LB琼脂平皿上进行培养。次日在LB琼脂平板上挑取具有卡那霉素抗性的单克隆菌落,溶于20 μL LB液中,涡旋后,将部分菌液接种到LB液中,37 ℃,半径=50 mm,250 r/min下振摇培养,另一部分的菌液提取质粒DNA,进行测序鉴定。鉴定正确的阳性克隆保存备用。

1.2.3 sgRNA和Cas9表达载体的体外转录 sgRNA的表达载体pUC57-T7-GDNA-sgRNA经*Dra* Ⅰ酶切线性化,Cas9表达载体经*Age* Ⅰ酶切线性化,两者均经酚氯仿抽提纯化后,溶于无核酸酶的水中作为模板,用于体外转录。sgRNA的体外合成利用MEGA shortscript试剂盒(Ambion,AM1354)在体外通过T7 RNA聚合酶完成。Cas9 mRNA的合成利用T7 Ultra试剂盒(Ambion,AM1345)在体外通过T7 RNA聚合酶完成。上述载体转录合成均在南京大学模式动物研究所完成。

1.2.4 Cas9/sgRNA的原核注射获得F0代初建鼠 转录好的sgRNA和Cas9 mRNA混合并调整浓度至每种sgRNA 10 ng/μL和20 ng/μL,显微注射法将RNA混合物注射到B6J鼠受精卵的雄核和细胞质中,用B6J小鼠作为假孕受体鼠,移植成功后获得基因敲除的初建鼠。实验中小鼠编号为"数字"加"#"上标表示,如"1#",以此逐一编号。实验中涉及动物操作程

序已经得到中国医学科学院医学实验动物研究所动物使用与管理委员会批准。

1.2.5 *fscb* 基因敲除鼠基因鉴定及测序 F0 代初建鼠在出生 7 ~ 14 d 时,剪取鼠尾组织提取基因组 DNA。设计 1 对包含 sgRNA 作用靶点的鉴定引物,正向引物:5′-GCTTCAGTACAACCTCCTGCC-3′,反向引物:5′-CAACCAAAGGATCTTCTTGTGC-3′。PCR 反应体系 50 μL。反应条件:95 ℃ 5 min;(95 ℃ 30 s,58 ℃ 30 s,72 ℃ 40 s) ×40;72 ℃ 5 min;保存于 16 ℃。PCR 产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳分离,通过 PCR 产物大小进行判断可能的阳性鼠。野生型小鼠其扩增片段大小为 520 bp,如果 CRISPR/Cas9 对靶基因相应位点造成了突变,该 520 bp 的 PCR 产物将消失,代之以缩小的片段。表明靶点 DNA 系列可能存在突变,通过 TA 克隆、测序检查确定突变。

1.2.6 Western blot 证实 FSCB 蛋白在睾丸和精子内的表达缺失 取后续繁育 A line 和 D line 雄鼠野生、杂合、纯合各 1 只精液及睾丸组织用 RIPA-NP40 蛋白裂解液提取蛋白作 Western blot。一抗稀释:称抗-FSCB 抗体粉剂 1/10,溶解于 100 μL 预冷的双蒸水中,充分溶解后分装,-20 ℃保存。稀释后的抗体使用前 1∶1 000 稀释于含 5% BSA,0.1% NaN3 的 TBST 中。Marker: Fermentas 26616 (SM-0671);二抗,山羊抗豚鼠 IgG 1∶10 000 稀释。

本实验应用 CRISPR/Cas9 系统实现小鼠 *fscb* 基因靶向敲除并建立动物模型,其过程及步骤(图 1)。

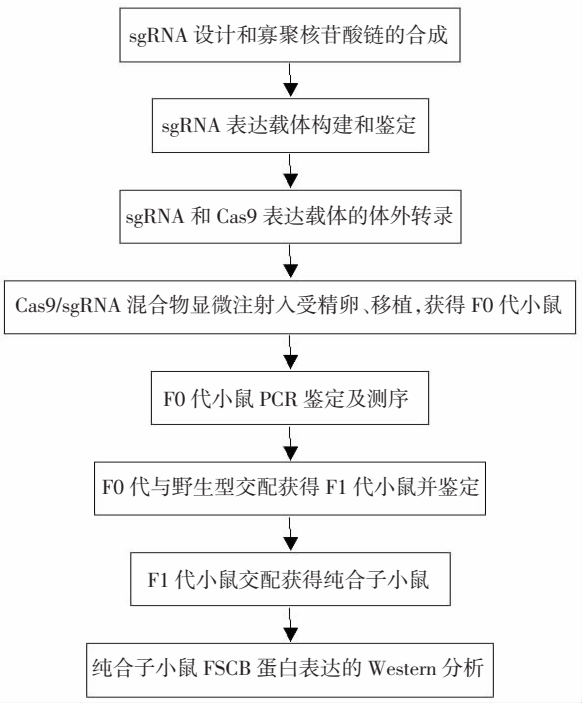


图 1 通过 CRISPR/Cas9 系统构建 *fscb* 基因敲除动物模型实验流程图

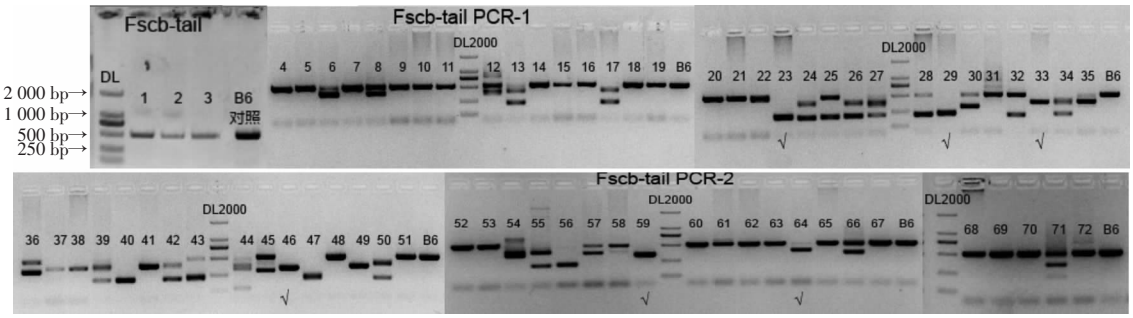
2 结果

2.1 表达载体的构建

pUC57-T7-GDNA 质粒经 *Bsa* Ⅰ酶切使其线性化,经设计的 3 条 sgRNA 寡核苷酸双链形成的黏性末端与 *Bsa* Ⅰ酶切的黏性末端相匹配。3 条 sgRNA 寡核苷酸双链分别与上述载体连接,成功构建 3 种 PU57-T7-GDNA-sgRNA 载体。经测序验证序列正确无误。

2.2 获得 CRISPR/Cas9 介导敲除 *fscb* 基因小鼠

sgRNA 的表达载体 pUC57-T7-GDNA-sgRNA 和 Cas9 表达载体经体外转录后,将转录好的 sgRNA 和 Cas9 mRNA 混合物通过显微注射法注射到 B6J 鼠受精卵内,并将受精卵移植进 B6J 假孕鼠。第 1 次将 124 枚移植进 6 只假孕鼠,妊娠 3 只小鼠并生产 3 只,剪鼠尾提取 DNA 作为 PCR 模板,经过鉴定后未获得阳性小鼠。第 2 次注射,增加注射和移植数量,将 360 枚受精卵移植进 13 只假孕鼠,有 11 只妊娠,并产生 71 只小鼠,有 2 只意外死亡,总共获得了 69 只小鼠,经过 PCR 鉴定后获得 39 只阳性小鼠(图 2),为 F0 代小鼠。根据与野生型小鼠 PCR 结果的比较分析,将 PCR 产物大小发生明显变化,条带单一,无杂带的 23#\29#\33#\46#\59#\64#共 6 只鼠的 PCR 产物进行连 T 载体并测序分析,鉴定改造后基因序列。PCR 产物连 T 测序结果显示:产生 5 中不同的基因型,33#命名为 A Line(图 3A);23#命名为 B Line;29#命名为 C Line;59#和 64#为同一种基因型(图 3B),命名为 D Line;46#存在基因改变,但没有实现移码。其余 5 只小鼠在删除基因片段后都产生移码。最终选择 A line 和 D Line 的 33#、59#和 64#用于回交野生鼠繁育。将 33#、59#和 64#雄鼠与 B6J 雌鼠交配获得小鼠为 F1 代,33#后代中获得 1 雄 2 雌 3 只阳性小鼠;59#后代中获得 1 雄 1 雌 2 只阳性小鼠。再次行 PCR 鉴定(图 4)及测序(图 5)。结果:F0 代 33#和其子代 91#、95#、96#均在 481 ~ 614 bp 的区域发生了 134 bp 的删除,同时在第 2 个靶点有 8 bp 的删除。F0 代 59#和其子代 72#、74#均在第 1 个靶点有 9 个碱基发生了删除,在 605 ~ 783 bp 的区域发生了 179 bp 的删除。表明:F1 代小鼠测序结果与 F0 代基因型相同,显示 Cas9/sgRNA 介导的基因突变可以稳定传代。我们将 F1 代获得的杂合子雄鼠与雌鼠交配,获得纯合子小鼠。为此,我们建立了 2 种不同基因型的 *fscb* 基因敲除鼠系,并传代繁育。



DL2000:DNA 分子质量标准;B6:野生型对照鼠;√:选取做基因测序的阳性鼠;1～72:获得的 F0 代 72 只小鼠

图 2　F0 代小鼠 *fscb* 基因敲除 PCR 鉴定结果



A:33#小鼠基因测序对比图;B:59#和 64#小鼠基因测序对比图;黄色区示第 1 个靶点,蓝色区示第 2 个靶点,紫色区示第 3 个靶点,红色字体示碱基删除部分

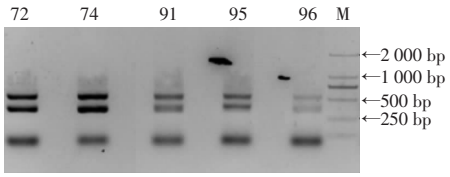
图 3　F0 代小鼠 *fscb* 基因敲除基因型分析结果

```
FSCB-fwd (451)  ACTTCAGAAA ACTTTGATGA AGAGAAAGCA TGTCCAGGAT ATGACTGACA - - - - -
G1312041847-FSCB-91-FSCB  ACTTCAGAAA ACTTTGATGA AGAGAAAGCA - - - - - - - - - - - - - - - - -
G1312041848-FSCB-95-FSCB  ACTTCAGAAA ACTTTGATGA AGAGAAAGCA - - - - - - - - - - - - - - - - -
G1312041849-FSCB-96-FSCB  ACTTCAGAAA ACTTTGATGA AGAGAAAGCA - - - - - - - - - - - - - - - - -
FSCB-fwd (591)  - - - - - AGCTCCTGAA TTGCCACAGA GTATTCCAGA AGTAGAGATT - - - - -
G1312041847-FSCB-91-FSCB  - - - - - - - - - - - - CACAGA GTATTCCAGA AGTAGAGATT - - - - -
G1312041848-FSCB-95-FSCB  - - - - - - - - - - - - CACAGA GTATTCCAGA AGTAGAGATT - - - - -
G1312041849-FSCB-96-FSCB  - - - - - - - - - - - - CACAGA GTATTCCAGA AGTAGAGATT - - - - -
FSCB-fwd(741)  - - - - - ACAGACCTAC TTTAGTGAGT TAGAAATTAT TATCAGGTCT ATTCCAGGTA
G1312041847-FSCB-91-FSCB  - - - - - ACAGACCTAC TTTAGTGAGT TAGAA- - - - -CAGGTCT ATTCCAGGTA
G1312041848-FSCB-95-FSCB  - - - - - ACAGACCTAC TTTAGTGAGT TAGAA- - - - -CAGGTCT ATTCCAGGTA
G1312041849-FSCB-96-FSCB  - - - - - ACAGACCTAC TTTAGTGAGT TAGAA- - - - -CAGGTCT ATTCCAGGTA   Ⓐ

FSCB-fwd (461)  ACTTTGATGA AGAGAAAGCA TGTCCAGGAT ATGACTGACA AATCTCTTCA - - - - -
G1312101379-FSCB-72-FSCB  ACTTTGATGA AGAGAAAGCA T- - - - - ATGACTGACA AATCTCTTCA - - - - -
G1312101381-FSCB-74-FSCB  ACTTTGATGA AGAGAAAGCA T- - - - - ATGACTGACA AATCTCTTCA - - - - -
FSCB-fwd (591)  - - - - - TTGGAGAAAT AGCTCCTGAA TTGCCACAGA GTATTCCAGA - - - - -
G1312101379-FSCB-72-FSCB  - - - - - TTGGAGAAAT AGCT- - -  - - - - - - - - - - - - - - - - -
G1312101381-FSCB-74-FSCB  - - - - - TTGGAGAAAT AGCT- - -  - - - - - - - - - - - - - - - - -
FSCB-fwd (741)  - - - - - ACAGACCTAC TTTAGTGAGT TAGAAATTAT TATCAGGTCT ATTCCAGGTA
G1312101379-FSCB-72-FSCB  - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -CAGGTCT ATTCCAGGTA
G1312101381-FSCB-74-FSCB  - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -CAGGTCT ATTCCAGGTA   Ⓑ
```

A:91#、95#、96#小鼠基因测序对比图;B:72#和 74#小鼠基因测序对比图;红色字体示碱基删除部分,红色“-”示删除的碱基序列,黑色“-”示与原有基因相同的碱基序列

图 5　F1 代小鼠基因测序与野生型比对结果

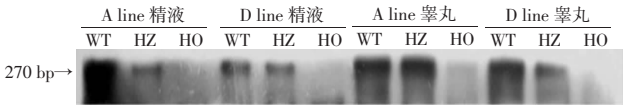


72#、74#均为 F0 代 33#的子代,91#、95#、96#均为 F0 代 59#的子代;M:DNA 分子质量标准

图 4　F1 代小鼠 *fscb* 基因敲除 PCR 鉴定结果

2.3　基因敲除后小鼠精液和睾丸 FSCB 蛋白表达的 Western blot 分析

取 A line 和 D line 野生型、杂合子、纯合子雄鼠各 1 只,获取精液及睾丸组织,应用 RIPA-NP40 蛋白裂解液提取蛋白后,进行 Western blot 分析。结果显示,野生型小鼠精液及睾丸蛋白提取物中 FSCB 蛋白位于约 270 bp 大小平面,而 A Line 和 D Line 的纯合子雄鼠的精液(3、6 泳道)和睾丸(9、12 泳道)中 FSCB 蛋白表达消失,杂合子小鼠 FSCB 蛋白在精液(2、5 泳道)和睾丸(8、11 泳道)中的表达与野生型相比略降低(图 6)。



WT:野生型;HZ:杂合子;HO:纯合子

图 6　FSCB 蛋白在 WT、HZ、HO 小鼠精液和睾丸组织中表达的 Western blot 鉴定结果

3　讨论

基因敲除是研究基因功能最直接有效的方法之一。早期的传统基因敲除主要是应用同源重组原理通过设计的同源片段替代靶基因片段,从而使目的基因的功能丧失[4],但同源重组方法总体而言存在效率

低,技术要求高,时间周期长而且成本高的缺点,严重制约了相关基础研究的发展。本研究前期曾应用传统的同源重组技术试图进行*fscb*基因敲除,经反复尝试未能成功。近年来,新的基因靶向敲除技术不断涌现,为该领域的研究提供了更为高效快捷的平台,如锌指核酸酶(zinc finger nucleases,ZFN)技术[5-6]、转录激活子样效应因子核酸酶[transcription activator-like (TAL) effector nucleases,TALENs]技术[7-9]和最新出现的规律性重复短回文序列簇(clustered regularly interspaced short palindromic repeats,CRISPRs)/(CRISPR-associated,Cas)系统[10-13]。尤其是CRISPR/Cas9技术不再需要传统技术所必需的胚胎干细胞,其操作更加简便快捷,应用范围更广,靶向效率更高,而且可以在同一细胞中同时进行多个靶点的操作[14]。显然比之传统基因敲除技术具有更加显著的优势。

CRISPRs/Cas系统是一种原核生物特有的针对外源性遗传物质免疫防御机制,可通过序列特异的RNA介导,对入侵的外源性遗传物质进行靶向定位并利用Cas酶进行酶切、降解[15]。该系统分为3种类型,其中类型Ⅱ由于组成简单,只需要存在核酸酶Cas9蛋白、CRISPR-derived RNA (crRNA)、Trans-activating crRNA(tracrRNA)、RNase Ⅲ 4种成分即可发挥作用[16],因而被改造成基因组靶向编辑工具。经过改造的Ⅱ型CRISPRs/Cas9系统能够利用RNA介导的DNA靶向功能对多种生物基因组的任意区域进行编辑[17-20]。CRISPR能够转录产生前体crRNA(Pre-CRISPR RNA, Pre-crRNA),Pre-crRNA经过Cas9-tracrRNA复合物加工后生成成熟的crRNA,crRNA的5′端区域能够与靶位点互补配对,而3′端能够与tracrRNA及Cas9形成复合物,从而引导Cas9蛋白结合于靶位点进行特异性切割[16]。这一系统仅仅需要根据目的基因序列,设计一种向导RNA(sgRNA),在其介导下即可实现定向基因打靶[21],因此自从该技术出现后即获得广泛认可和青睐。

由于本研究前期应用同源重组技术未能成功敲除*fscb*基因,故改用CRISPR/Cas9系统,结果顺利构建sgRNA表达载体并成功获得阳性克隆小鼠,从而建立了A Line和D Line两种*fscb*基因敲除鼠系。在本研究中,我们将sgRNA和Cas9 RNA混合物注入124枚受精卵,移植进6只假孕鼠,结果仅有3只小鼠妊娠,最终仅生产3只小鼠,经过鉴定后未获得阳性小鼠。所以第2次注射增加了sgRNA和Cas9 RNA混合物注射量和受精卵的移植数,注射360枚受精卵,移植进13只假孕鼠,共有11只妊娠,并产生69只存活小鼠,通过PCR鉴定后获得39只阳性小鼠,突变率为56.5%。

在建系中,因每1只F0代小鼠的基因删除情况都不一样,故每个F0代小鼠称为一个line。F0代首建鼠可能出现多种删除的情况,故原则上F0代小鼠之间不能相互交配。为了确保产生的移码突变能整合进生殖系并稳定传代,我们将其与同背景的野生型小鼠进行交配;选择其中产生移码突变的后代进行进一步的繁育。本研究获得的F0代和F1代小鼠均首先通过PCR方法对基因片段的删除情况进行鉴定,然后通过将PCR产物连接T载体,再进行测序确认基因删除的具体片段和是否产生移码突变。对确认产生移码突变的来自于同一个line的F1代杂合子再通过其互配获得*fscb*基因敲除的纯合子小鼠。为了验证我们所建鼠系,对纯合子子代亦进行了PCR鉴定和测序,对比基因型与母代相同,得到稳定传代的基因突变小鼠。成年后小鼠的FSCB蛋白表达情况,经反复Western blot证实,其在纯合子雄鼠睾丸和精子内的蛋白表达消失。

本研究前期对鼠FSCB蛋白的基本生物学特性研究发现,该蛋白与精子纤维鞘蛋白AKAP3、AKAP4[22]、CABYR等具有极为相似的定位特征,同时具有钙结合能力,并且其丝氨酸/苏氨酸在体内外均可被蛋白激酶A(PKA)磷酸化。既往基因敲除小鼠的研究证实:Akap4$^{-/-}$纯合子雄鼠产生的精子数量正常,但存在纤维鞘形成缺陷,表现为缩短的柱状体和稀薄的环状肋板,同时精子丧失前向运动而表现为不育,其机理分析认为是由于缺乏AKAP4情况下信号转导的失败所致[22]。基于前期研究对FSCB蛋白相关生物学特性的认识,为了解其在精子的形成和运动过程中的具体作用,本研究应用CRISPR/Cas9基因敲除方法建立了*fscb*基因敲除小鼠动物模型,为探讨FSCB蛋白缺失后精子发生、形成、形态结构改变以及该蛋白在精子中的生物学功能的改变奠定了基础。

由于精子形成过程的特异性基因在鼠和人之间绝大部分具有高度保守性,*fscb*基因在鼠和人之间也具有很强的保守性,因而从基因敲除小鼠所获得的重要生物学信息很可能适合应用于人类不育的病因学诊断和治疗。CRISPR/Cas9系统具有操作简单、靶向精确性高、基因修饰高并可稳定遗传,可实现靶基因多点同时敲除而且无物种限制,实验周期短等特点[23]。为此,本研究应用CRISPR/Cas9系统技术,获得*fscb*基因敲除小鼠,不但为下一步鉴定*fscb*基因敲除小鼠的表型特征尤其是*fscb*基因缺失对生育能力的影响提供了动物模型,而且为进一步进行精子特异性表达基因的多位点敲除研究提供了技术支撑。

参考文献：

[1] Chemes H E, Rawe V Y. The making of abnormal spermatozoa: cellular and molecular mechanisms underlying pathological spermiogenesis[J]. Cell Tissue Res, 2010, 341(3): 349 – 357.

[2] Kolthur-Seetharam U, Martianov I, Davidson I. Specialization of the general transcriptional machinery in male germ cells [J]. Cell Cycle, 2008, 7(22): 3493 – 3498.

[3] Li Y F, He W, Jha K N, *et al*. FSCB, a novel protein kinase A-phosphorylated calcium-binding protein, is a CABYR-binding partner involved in late steps of fibrous sheath biogenesis [J]. J Biol Chem, 2007, 282(47): 34104 – 34119.

[4] Lamotte L, Jackerott M, Bucchini D, *et al*. Knock-in of diphteria toxin A chain gene at Ins2 locus: effects on islet development and localization of Ins2 expression in the brain[J]. Transgenic Res, 2004, 13(5): 463 – 473.

[5] Geurts A M, Cost G J, Freyvert Y, *et al*. Knockout rats *via* embryo microinjection of zinc-finger nucleases[J]. Science, 2009, 325(5939): 433.

[6] Brown A J, Fisher D A, Kouranova E, *et al*. Whole-rat conditional gene knockout via genome editing[J]. Nat Methods, 2013, 10(7): 638 – 640.

[7] Tesson L, Usal C, Menoret S, *et al*. Knockout rats generated by embryo microinjection of TALENs[J]. Nat Biotechnol, 2011, 29(8): 695 – 696.

[8] Miller J C, Tan S, Qiao G, *et al*. A TALE nuclease architecture for efficient genome editing[J]. Nat Biotechnol, 2011, 29(2): 143 – 148.

[9] Bedell V M, Wang Y, Campbell J M, *et al*. *In vivo* genome editing using a high-efficiency TALEN system[J]. Nature, 2012, 491(7422): 114 – 118.

[10] Wiedenheft B, Sternberg S H, Doudna J A. RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea [J]. Nature, 2012, 482(7385): 331 – 338.

[11] Mojica F J M, Diez-Villasenor C, Soria E, *et al*. Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria[J]. Mol Microbiol, 2000, 36(1): 244 – 246.

[12] Terns M P, Terns R M. CRISPR-based adaptive immune systems[J]. Curr Opin Microbiol, 2011, 14(3): 321 – 327.

[13] Bhaya D, Davison M, Barrangou R. CRISPR-Cas systems in bacteria and archaea: versatile small RNAs for adaptive defense and regulation[J]. Annu Rev Genet, 2011, 45: 273 – 297.

[14] Mussolino C, Cathomen T. RNA guides genome engineering [J]. Nat Biotechnol, 2013, 31(3): 208 – 209.

[15] Lillestol R, Redder P, Garrett R A, *et al*. A putative viral defence mechanism in archaeal cells[J]. Archaea, 2006, 2 (1): 59 – 72.

[16] Makarova K S, Grishin N V, Shabalina S A, *et al*. A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action[J]. Biol Direct, 2006, 1: 7.

[17] Jao L E, Wente S R, Chen W. Efficient multiplex biallelic zebrafish genome editing using a CRISPR nuclease system [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013, 110(34): 13904 – 13909.

[18] Cong L, Ran F A, Cox D, *et al*. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems [J]. Science, 2013, 339(6121): 819 – 823.

[19] Jiang W, Bikard D, Cox D, *et al*. RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems[J]. Nat Biotechnol, 2013, 31(3): 233 – 239.

[20] Gilbert L A, Larson M H, Morsut L, *et al*. CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes[J]. Cell, 2013, 154(2): 442 – 451.

[21] 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.

[22] Brown P R, Miki K, Harper D B, *et al*. A-kinase anchoring protein 4 binding proteins in the fibrous sheath of the sperm flagellum[J]. Biol Reprod, 2003, 68(6): 2241 – 2248.

[23] Fu Y, Foden J A, Khayter C, *et al*. High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells[J]. Nat Biotechnol, 2013, 31(9): 822 – 826.

（收稿：2015-03-29；修回：2015-04-27）

（编辑 张 维）