DOI:10.16016/j.1000-5404.202005029

鼠 Fscb/Cabyr 双基因靶向敲除动物模型的建立和鉴定

李中泰[1,3],李彦锋[1],刘晋祎[2],张 勇[1],张 军[1],毕 罡[1] 400042 重庆,陆军军医大学(第三军医大学)大坪医院泌尿外科[1];400038 重庆,陆军军医大学(第三军医大学)军事预防医学系毒理学研究所[2];463000 河南 驻马店,中国人民解放军第 990 医院泌尿外科[3]

[**摘要**] **目的** 利用 CRISPR/Cas9 系统构建鼠 Fscb/Cabyr 双基因靶向敲除小鼠模型,为研究鼠 FSCB 和 CABYR 蛋白复合物在精子鞭毛运动和获能中作用奠定基础。**方法** 根据 Cabyr 基因全长序列,设计 CRISPR/Cas9 作用靶点,合成 4 条单链向导 RNA(single-guide RNA,sgRNA),克隆入 pUC57-T7-gRNA 表达载体,获得 sgRNA 表达质粒。sgRNA 和 Cas9 mRNA 体外转录后,将 Cas9 mRNA 和 sgRNA 以适当比例混合并注入 C57BL/6J 小鼠受精卵中,获得 Cabyr 基因敲除的初建鼠(F0)。PCR 鉴定后,选取两只嵌合体雌鼠与背景鼠回交繁育,获得靶基因敲除 F1 杂合鼠,将其与前期已经建立的 Fscb 杂合鼠交叉繁育,获得 Fscb/Cabyr(--/--)双基因敲除纯合子小鼠。通过 Western blot 和免疫荧光检测双基因敲除后小鼠精子中 FSCB/CABYR 蛋白的表达情况。**结果** 首先获得 7 只(3 只雄鼠,4 只雌鼠)删除 Cabyr 基因片段并产生移码的 F1 代杂合鼠,将 F1 代杂合雄鼠与雌鼠交配,获得 Cabyr 基因敲除纯合子小鼠。同时,以 Fscb 杂合小鼠与 Cabyr 杂合小鼠通过反复交叉繁育,最终获得 Fscb/Cabyr(--/--)双基因敲除纯合子小鼠。Western blot 检测证实双基因敲除纯合子雄鼠睾丸及精子内 FSCB 和 CABYR 蛋白表达均消失,免疫荧光检测显示精子主段内无 FSCB、CABYR 蛋白荧光表达。**结论** 应用 CRISPR/Cas9 系统和杂合子交叉繁育成功获得 Fscb/Cabyr(--/--)双基因敲除纯合子小鼠,为进一步研究 FSCB 和 CABYR 蛋白复合物的功能奠定了动物模型基础。

[**关键词**] 基因敲除;精子鞭毛;CRISPR/Cas9 系统;动物模型
[**中图法分类号**] R-322;R321.1;R394-33 [**文献标志码**] A

Establishment and identification of a mouse model of Fscb/Cabyr double gene knockout

LI Zhongtai[1,3], LI Yanfeng[1], LIU Jinyi[2], ZHANG Yong[1], ZHANG Jun[1], BI Gang[1] [1]Department of Urology, Daping Hospital, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400042; [2]Institute of Toxicology, Faculty of Military Preventive Medicine, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400038; [3]Department of Urology, No. 990 Hospital of PLA, Zhumadian, Henan Province, 463000, China

[**Abstract**] **Objective** To construct a mouse model of targeted knockout of Fscb/Cabyr dual genes by using the CRISPR/Cas9 system, in order to found a basis for the study of the role of FSCB and CABYR protein complexe in sperm flagellum movement and capacitation. **Methods** The targeting sites for CRISPR/Cas9 system were designed according to the full-length sequence of Cabyr gene. Two pairs of single-guide RNA (sgRNA) were chemically synthesized, and then inserted into the linearized plasmid pUC57-T7-gRNA to express sgRNA. The Cas9 RNA and sgRNA were transcribed *in vitro* by T7 RNA polymerase, and the obtained products were mixed in proper proportion and microinjected into the fertilized eggs of C57BL/6J mice to obtain the primary mouse (F0) with Cabyr gene knockout. After the identification of gene mutation by PCR, 2 chimeric females mice and background mice were selected for backcross breeding, and the Cabyr gene knockout F1 heterozygous mice were obtained. Then they were cross bred with the previously established Fscb heterozygous mice, and finally the Fscb/Cabyr (--/--) double gene knockout homozygous mice were

[**基金项目**] 国家自然科学基金面上项目(81571491)
[**通信作者**] 李彦锋,E-mail:1738401063@qq.com

obtained. The deletions of Fscb/Cabyr proteins in double gene knockout homozygous mice were detected by Western blotting and immunofluorescence assay. **Results** Seven positive F1 mice (3 males and 4 females) with deletion of the Cabyr gene fragment and frame shifting were obtained. The homozygous Cabyr knockout mice were obtained by mating the heterozygous male mice with the female mice. Fscb/Cabyr (--/--) double gene knockout homozygous mice were obtained by repeated cross breeding of Fscb and Cabyr heterozygous mice. Western blot analysis indicated that the expression of FSCB and CABYR protein disappeared in the testis and spermatozoa of the male mice. Immunofluorescence assay showed that there was no fluorescence expression of FSCB and CABYR protein in the principle piece of the sperm flagella. **Conclusion** Fscb/Cabyr (--/--) double gene knockout homozygous mice are obtained by using the CRISPR/Cas9 system and cross breeding, which laid the foundation of animal model for further study on the function of FSCB and CABYR protein complex.

[**Key words**] gene knockout; sperm flagella; CRISPR / cas9 system; animal model

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81571491). Corresponding author: LI Yanfeng, E-mail: 1738401063@qq.com

精子尾部鞭毛是其运动所必需的一种特定细胞器。鞭毛的完整性对正常精子功能的维持至关重要。鞭毛结构缺陷常导致精子的运动能力减弱或缺失,从而引起男性不育。精子鞭毛由4部分组成:连接头部的颈段,包含轴丝及周围螺旋状线粒体鞘的中段、被纤维鞘包裹的主段以及末段[1]。其中主段约占尾部的3/4。主段中包裹于轴丝和外部致密纤维外的纤维鞘是一种独特的细胞骨架结构,由纵向柱状体和环状肋板组成[2]。纤维鞘为鞭毛运动发挥重要支撑作用并在提供能量方面发挥重要作用。精子形成过程中,特异性基因在睾丸内适时有序表达引导各细胞结构的有序形成,包括精子鞭毛的骨架结构形成并与对应蛋白的精确有序装配等,保证精子结构及功能的形成[3]。钙结合酪氨酸磷酸化调节蛋白(calcium-binding tyrosine phosphorylation-regulated protein,CABYR)以及纤维鞘CABYR结合蛋白(fibrous sheath CABYR-binding protein,FSCB)均在精子形成过程中特异性表达并定位于精子鞭毛纤维鞘上,而且该两种蛋白均具有钙结合能力,在精子获能过程中均可发生磷酸化作用,提示该两种蛋白极有可能参与了精子运动功能的调节[4-5]。同时,本课题组前期研究发现FSCB、CABYR蛋白可形成巨分子蛋白复合物,装配于纤维鞘的骨架蛋白AKAPs上,共同参与发挥纤维鞘的生理功能[5];但Fscb单基因敲除小鼠并没有显示明显的精子表型改变[6]。因此,为探讨FSCB/CABYR蛋白复合物在纤维鞘中的生理作用及参与精子运动调节的机制,本研究应用CRISPR/Cas9系统靶向敲除小鼠Cabyr基因,并与前期建立的Fscb基因敲除小鼠模型[7]进行交叉繁育,建立Fscb/Cabyr双基因敲除动物模型,为深入探讨FSCB和CABYR蛋白缺失后精子形态结构、活力、授精能力等的可能改变奠定研究基础。

1 材料与方法

1.1 主要材料

大肠杆菌、LB琼脂平板、C57BL/6J小鼠、pUC57-T7-gRNA表达载体、Cas9表达载体、PCR纯化试剂盒均由南京大学模式动物研究所提供;T7Ultra试剂盒、MEGAshortscript试剂盒(AM1345)购自Ambion公司,DH5α感受态购自Transgene公司,限制性内切酶BsaⅠ、DraⅠ、AgeⅠ、T4Ligase/T4Bufer连接酶、*Taq*酶和dNTP等均购自NEB公司,质粒小量提取试剂盒购自中国天根生化科技有限公司,琼脂糖胶回收试剂盒购自中国康为世纪公司,豚鼠抗-FSCB抗体由李彦锋教授研究制备,兔抗-CABYR抗体、山羊抗兔IgG购自武汉三鹰Proteintech公司,山羊抗豚鼠IgG购自中国博奥生物有限公司。

1.2 方法

1.2.1 sgRNA设计和寡聚核苷酸链的合成 鼠Cabyr基因定位于第18条染色体(Chromosome 18:12 741 324~12 755 146,ENSMUSG00000024430),含有7种转录本,本研究选择Cabyr-001转录本,该转录本包含5个外显子,其中3个属于编码外显子,转录本长度1 557 bp,翻译453个氨基酸。针对该基因,通过在线免费设计sgRNA的软件(http://crispr.mit.edu/),设计4条(2对)针对Cabyr基因的sgRNA核苷酸链(表1,图1)。将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。

表1 Cabyr基因sgRNA核苷酸链

sgRNA名称	sgRNA序列(5′→3′)	PAM
S1	CGATCTAGCACTTATTAAGA	AGG
S2	CCCACTGCTTACTAATGCAC	AGG
S3	ATGGACTTTGGCCAGTTGGC	AGG
S4	GTACTCTCACATACTGTTTC	TGG

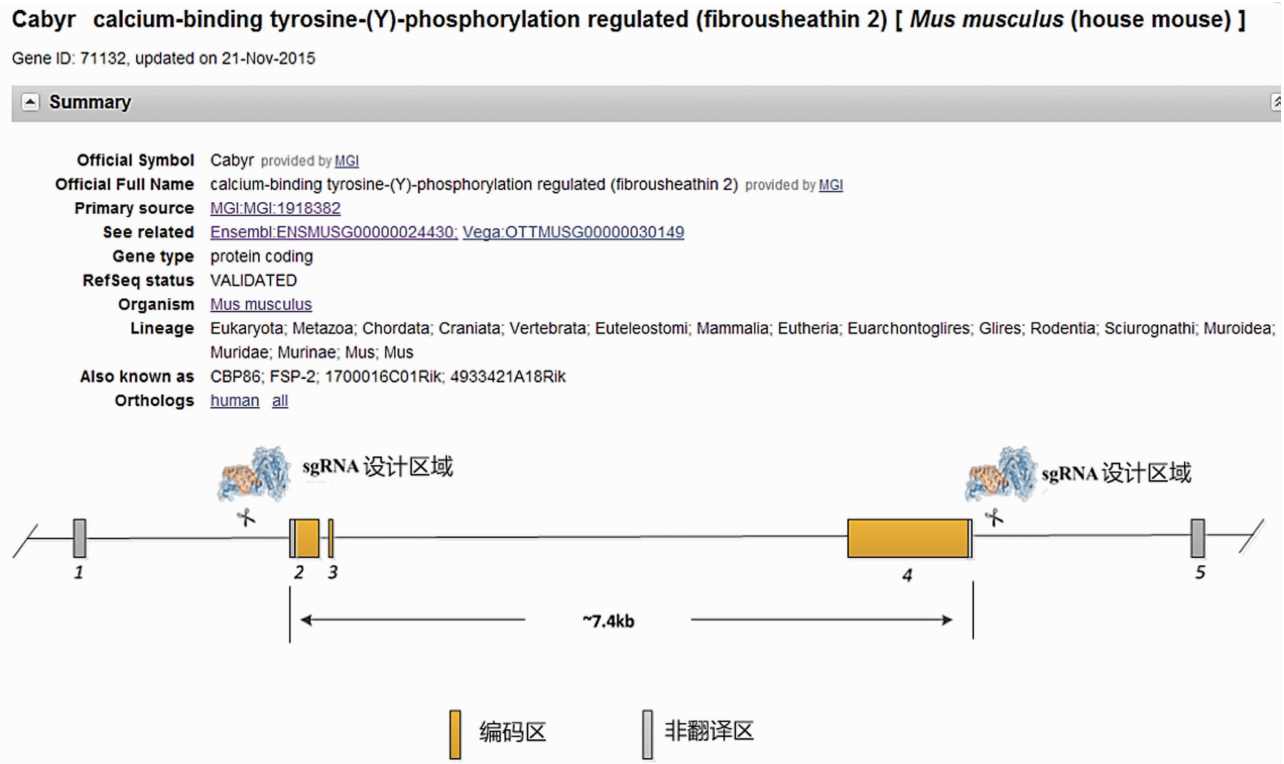


图 1 Cabyr 基因及 sgRNA 设计示意图

1.2.2 sgRNA 表达载体构建 将 4 条 sgRNA 寡核苷酸双链稀释至 0.5 μmol/L。用 Bsa Ⅰ酶切 pUC57-T7-gRNA 质粒使其线性化,回收后稀释至 50 mg/L,然后与 4 条寡核苷酸双链分别进行连接。连接体系:线性化的 pUC57-T7-gRNA 质粒 2 μL,sgRNA 寡核苷酸双链 6 μL,T4 连接酶 1 μL,T4 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-gRNA-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 T7RNA 聚合酶完成。Cas9mRNA 的合成利用 Ultra 试剂盒(Ambion,AM1345)在体外通过 T7RNA 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 C57BL/6J 鼠受精卵的雄核和细胞质中,用 C57BL/6J 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。

1.2.5 Cabyr 基因敲除小鼠基因鉴定及测序 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 2 对包含 sgRNA 作用靶点的鉴定引物,引物 F1:5-TAGTGCCTGTATGGACGTTATTTGG-3,R1:5-AATGCCACAGCCCAAATAAACG-3;引物 F2:5-TAGTGCCTGTATGGACGTTATTTGG-3,R2:5- GTCTTGAGGCCATAGGGTACAACA-3。PCR 反应体系 25 μL。反应条件:95 ℃ 5 min;[98 ℃ 30 s,65 ℃ 30 s(每循环降 0.5 ℃),72 ℃ 45 s]×20 循环;(98 ℃ 30 s,55 ℃ 30 s,72 ℃ 45 s)×20 循环;72 ℃ 5 min;保存于 10 ℃。PCR 产物用 1.5%的琼脂糖凝胶电泳分离,通过 PCR 产物进行判断可能的阳性鼠及鉴定纯合性。引物 1 用以检测靶基因相应位点产生了突变的阳性鼠,扩增片段大小为 600 bp,野生型无该 600 bp 条带;引物 2 用以检测纯合性,非纯合小鼠扩增产物大小为 630 bp,纯合突变小鼠此 PCR 产物消失。通过 PCR 鉴定表明靶点 DNA 系列可能存在突变,进一步通过 TA 克隆、测序检查确定突变。

1.2.6　Fscb/Cabyr 双基因敲除鼠模型的建立及鉴定　以 Fscb 杂合小鼠与 Cabyr 杂合小鼠交叉繁育获得双杂合雄鼠,进而以双杂合雄鼠与背景鼠通过体外受精获得大量同代 Fscb/Cabyr(++/+−)、Fscb/Cabyr(+−/++)、Fscb/Cabyr(+−/+−)、Fscb/Cabyr(++/++)型小鼠以用于扩增繁育。以上各种基因型小鼠互配,产仔后行 PCR 鉴定基因型,最终获得 Fscb/Cabyr(−−/−−)双基因敲除纯合子,同时可获得一定数量的杂合子。

1.2.7　Western blot 检测 FSCB、CABYR 蛋白在睾丸精子内的表达　取 Fscb/Cabyr(++/+−)、Fscb/Cabyr(−−/+−)、Fscb/Cabyr(++/++)、Fscb/Cabyr(−−/−−)、Fscb/Cabyr(++/−−)5 种基因型雄鼠,将附睾及睾丸组织用 RIPA 蛋白裂解液提取蛋白作 Western blot 检测。电泳电压为 80 V 恒压约 30 min,待溴酚蓝进入分离胶层,将电压调节至 120 V 恒压至电泳结束。常规在预冷转移缓冲液中进行转膜,FSCB 组电压 80 V 恒压 240 min,CABYR 组电压 80 V 恒压 120 min。PVDF 膜以 3%BSA 封闭 1 h 后,一抗 4 ℃孵育过夜(抗-FSCB 抗体 1∶1 000 稀释,抗-CABYR 抗体 1∶500 稀释)。TBST 洗膜 15 min×3 次,常温孵育二抗 1 h(山羊抗豚鼠 IgG 1∶2 000 稀释,山羊抗兔 IgG 1∶1 000 稀释)。TBST 洗膜 15 min×3 次,曝光。

1.2.8　免疫荧光观察 FSCB、CABYR 蛋白在基因敲除小鼠精子上的表达　按前述方法取小鼠附睾精子,置于 HTF 中 37 ℃获能 1 h 后,取 10 μL 涂于载玻片上,充分干燥后,4%多聚甲醛固定 30 min,再于室温干燥后,使用或储存于−20℃冰箱备用;取精子涂片室温下复温 20 min,PBS 清洗 3 次×5 min;加快速抗原修复液孵育 15 min,PBS 清洗 3 次×5 min;取含 5‰ Triton X-100 的 PBS 孵育 15 min,再用 PBS 清洗 3 次×5 min;加免疫染色封闭液 37 ℃孵育 60 min,弃封闭液,勿洗;加稀释后一抗(抗-FSCB 1∶400,抗-CABYR 1∶200),4 ℃孵育过夜,用含 3‰ Tween-20 的 PBS 清洗 3 次×5 min;加 1∶400 稀释后相应二抗,37 ℃孵育 60 min,弃二抗,用含 3‰ Tween-20 的 PBS 清洗 3 次×5 min;取 DAPI 室温避光染核,孵育 15 min,用含 3‰ Tween 20 的 PBS 清洗 3 次×5 min;抗荧光猝灭封片剂封片后立即置于荧光显微镜下观察,拍照。

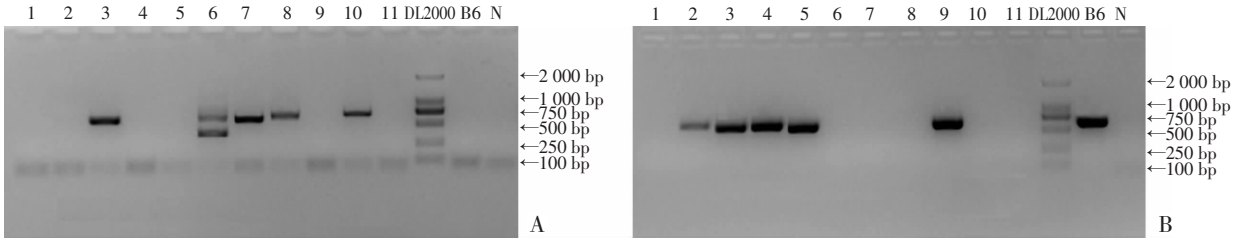
2　结果

2.1　表达载体的构建

以 Bsa Ⅰ 酶切处理 pUC57-T7-GDNA 质粒使其线性化,进而与 4 条设计的 sgRNA 寡核苷酸双链黏性末端分别匹配连接,经测序验证证实成功构建 4 种 pUC57-T7-GDNA-sgRNA 表达载体。

2.2　Cabyr 基因敲除小鼠获得

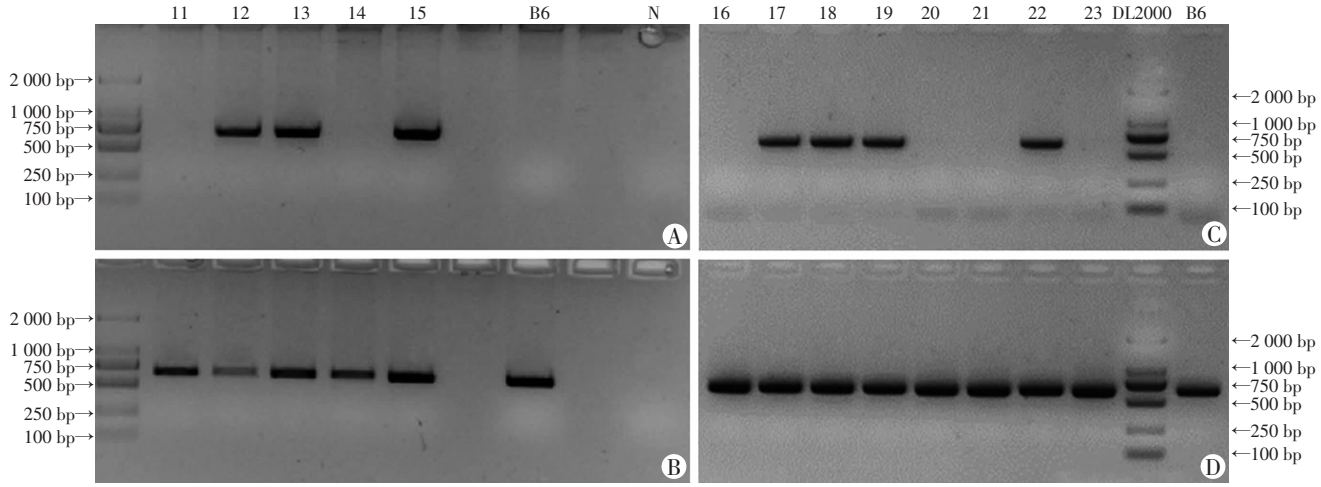
将 pUC57-T7-GDNA-sgRNA 和 Cas9 表达载体进行体外转录,通过显微注射法将转录好的 sgRNA 和 Cas9 mRNA 混合物注射入 144 枚 C57BL/6J 小鼠受精卵内,存活 128 枚,将 128 枚受精卵移植进 7 只假孕小鼠体内,妊娠 6 只,出生 14 只,存活 11 只。PCR 鉴定提示 5 只阳性小鼠可能(图 2),进而行基因测序结果显示:产生 3#、6#、7#和 10#四种不同敲除基因型,并均产生移码。8#测序为双峰,提示可能 PCR 产物是双克隆而不是单纯目标敲除序列的基因型。最终选择 3#、10#两只嵌合体雌鼠与背景鼠回交繁育,分别命名为 A 株和 B 株。将两株获得的后代进一步行 PCR 鉴定(图 3)及基因测序(图 4),结果显示:3#后代 17#、18#、19#、22#均在 16 976~24 600 bp 区域发生 7 625 bp 的删除,获得 3 雄 1 雌共 4 只阳性小鼠;10#后代 12#、13#、15#均在 16 990~24 549 bp 区域发生 7 560 bp 的删除和 24 603 位点的 1bp 的插入,获得 3 只雌性阳性小鼠,并显示 Cas9/sgRNA 引导的基因突变可稳定遗传。将 F1 代杂合子雄鼠与雌鼠交配以获得纯合子 Cabyr 基因敲除小鼠,获得两株 Cabyr 基因敲除小鼠品系并进一步将同一个品系小鼠互配繁殖,同时获得的 A 株杂合子小鼠用于进一步与 Fscb 基因敲除小鼠交配以获得双基因敲除纯合子小鼠模型。



1~11:F0 代小鼠;DL2000:DNA 分子质量标准;B6:野生型对照鼠;N:阴性对照

A:应用鉴定引物 1 进行 PCR 扩增后电泳结果　阳性鼠扩增片段大小为 600 bp;野生型无 600 bp 条带;B:应用鉴定引物 2 进行 PCR 扩增后电泳结果　非纯合小鼠扩增产物大小为 630 bp;纯合突变小鼠此 PCR 产物消失;提示 3#、6#、7#、8#和 10#可能为阳性小鼠

图 2　Cabyr 基因敲除后 F0 代小鼠 PCR 鉴定结果



11~23:F1 代小鼠;DL2000:DNA 分子质量标准;B6:野生型对照鼠;N:阴性对照

A、C:应用鉴定引物 1 进行 PCR 扩增后电泳结果　阳性鼠扩增片段大小为 600 bp;野生型无 600 bp 条带;B、D:应用鉴定引物 2 进行 PCR 扩增后电泳结果　非纯合小鼠扩增产物大小为 630 bp;纯合突变小鼠此 PCR 产物消失;提示 12#、13#、15#、17#、18#、19#和 22#为阳性小鼠

图 3　Cabyr 基因敲除后 F1 代小鼠 PCR 基因型鉴定

2.3　Fscb/Cabyr 双基因敲除小鼠的获得

以 Fscb 杂合小鼠与 Cabyr 杂合小鼠交叉繁育获得 Fscb/Cabyr(+-/+-)双杂合雄鼠,以双杂合雄鼠与背景鼠经体外受精获得同一代 Fscb/Cabyr(++/+-)、Fscb/Cabyr(+-/++)、Fscb/Cabyr(+-/+-)、Fscb/Cabyr(++/++)型小鼠后,以 Fscb/Cabyr(++/+-)雌雄互配,以 Fscb/Cabyr(--/+-)雄鼠配 Fscb/Cabyr(+-/+-)雌鼠,以 Fscb/Cabyr(+-/+-)雄鼠配 Fscb/Cabyr(--/+-)雌鼠,Fscb/Cabyr(--/+-)雌雄互配,从而最终获得 Fscb/Cabyr(--/--)双基因敲除纯合子小鼠,并 PCR 进行基因型鉴定,同时获得 Fscb/Cabyr(++/--)型小鼠及各种杂合子小鼠,以用于进一步生殖能力验证实验。

2.4　各型敲除小鼠睾丸中 FSCB、CABYR 蛋白表达验证

对各基因型雄鼠睾丸蛋白进行 FSCB、CABYR 相关蛋白 Western blot 分析,蛋白表达情况如图 5 所示:FSCB 蛋白在 Fscb/Cabyr(--/--)、Fscb/Cabyr(--/+-)的基因型中未表达,在 Fscb/Cabyr(++/--)、Fscb/Cabyr(++/++)、Fscb/Cabyr(++/+-)三种基因型中正常表达;CABYR 蛋白在 Fscb/Cabyr(--/--)、Fscb/Cabyr(++/--)的基因型中未表达,在 Fscb/Cabyr(++/+-)、Fscb/Cabyr(--/+-)两种基因型中表达明显降低,而在 Fscb/Cabyr(++/++)基因型中正常表达。

2.5　免疫荧光检测 FSCB、CABYR 蛋白在 Fscb/Cabyr 双基因敲除小鼠精子上的表达

取 Fscb/Cabyr(++/++)、Fscb/Cabyr(--/--)、Fscb/Cabyr(++/--)三种基因型雄鼠精子样本,经相应抗体免疫荧光染色后,置于荧光显微镜下选取视野拍照,结果显示:Fscb/Cabyr(++/++)除头部着色外,尾部主段同时有绿色和红色荧光(呈黄色),表明其主段同时有 FSCB、CABYR 蛋白表达。Fscb/Cabyr(++/--)尾部主段出现 FSCB 的绿色荧光,无 CABYR 的红色荧光;Fscb/Cabyr(--/--)小鼠精子仅头部着蓝色荧光,尾部未出现 FSCB、CABYR 蛋白荧光(图 6)。

12#,13#,15# 测序结果:基因型删除 7 560 bp,插入 1 bp(Cabyr2~4 外显子完全删除)/wt,黄色区域为 2~4 外显子,红色为插入序列,绿色区域为删除序列:

gtctgtggcccacctaccaccttct---tttcaggtggcatctatatctagtgtctgtccacccagctccacactcctgccCaactggccaaagtccatgttcag

```
16801  GTGTCCATGA TGGTGTGGGT ATGTGTGCTT GTATGTGCAC GTGCATGTAT GCCACATGTG TGGTTAAAGG AACTCCAACC TCTGGAGTTA GTTCTGTTCT
       CACAGGTACT ACCACACCCA TACACACGAA CATACACGTG CACGTACATA CGGTGTACAC ACCAATTTCC TTGAGGTTGG AGACCTCAAT CAAGACAAGA
16901  GCTACCTTGT GGGATCCAGC CATTAAATTC AGGTCCTCAG TTCTGTAGGA AACACTTGAG TCATGTCTGT GGCCCACCTA CCACCTTCTT AATAAGTGCT
       CGATGGAACA CCCTAGGTCG GTAATTTAAG TCCAGGAGTC AAGACATCCT TTGTGAACTC AGTACAGACA CCGGGTGGAT GGTGGAAGAA TTATTCACGA
17001  AGATCGCTTA CCTGTGCATT AGTAAGCAGT GGGTTTTATT TTATATGTTA CTAGAATAAA TAGAGATTAG AAGTAAAGCT AATAATGGTA ATAGATTTGG
       TCTAGCGAAT GGACACGTAA TCATTCGTCA CCCAAAATAA AATATACAAT GATCTTATTT ATCTCTAATC TTCATTTCGA TTATTACCAT TATCTAAACC
17101  TTTTAGAAAC CCCAATTAAA TAAGAATGCT CAGTAAATCT AATGTACAGT ATAAGACTTT GTTTCTCTTC ATTACAGTTG AAATTACAGA CATCTTGCCA
       AAAATCTTTG GGGTTAATTT ATTCTTACGA GTCATTTAGA TTACATGTCA TATTCTGAAA CAAAGAGAAG TAATGTCAAC TTTAATGTCT GTAGAACGGT
17201  AAATGATTTC TTCAAAGCCC AGACTTGTTG TACCCTATGG CCTCAAGACT CTGCTTGAGG GAGTTAGCAG AGCCATTCTC AAAACCAATC CAACAAACAT
       TTTACTAAAG AAGTTTCGGG TCTGAACAAC ATGGGATACC GGAGTTCTGA GACGAACTCC CTCAATCGTC TCGGTAAGAG TTTTGGTTAG GTTGTTTGTA
17301  CACCCAGTTT GCAGCCGTTT ATTTTAAAGA ACTCATTGTG TTTAGAGAAG GTTTGTACTG CTTTAGATCT GTATTTCCTG CTTTACAGTC ATCTTAAATG
       GTGGGTCAAA CGTCGGCAAA TAAAATTTCT TGAGTAACAC AAATCTCTTC CAAACATGAC GAAATCTAGA CATAAAGGAC GAAATGTCAG TAGAATTTAC
17401  GAAATCCATC TCTATTTGAC TTCCTATGCT TATTCCTCCA GGGAATTCGT CTCTAGATAT AAAAGATCTG ATTAAACAGT TTCACCAGAT GAAAGGTAAG
       CTTTAGGTAG AGATAAACTG AAGGATACGA ATAAGGAGGT CCCTTAAGCA GAGATCTATA TTTTCTAGAC TAATTTGTCA AAGTGGTCTA CTTTCCATTC
```

……

```
24301  AGAGGGCTTT TTCAAAGTAG CCTCTGAAAA TTCTCTGCAC CTTGAAACGG AGATCGTTAT CATAAACCCT GATGATCCTG GCCAGGAGGA GTCAGGGGGG
       TCTCCCGAAA AAGTTTCATC GGAGACTTTT AAGAGACGTG GAACTTTGCC TCTAGCAATA GTATTTGGGA CTACTAGGAC CGGTCCTCCT CAGTCCCCCC
24401  AACGCTGCAC CCCATTCATC TGGTGACCCC TTCCCTCCTG CGCCAGGAGG CCTTACTGAA CCAGAAATGC AACCAGATGG GGAAGCTGCT CCTGAACAGG
       TTGCGACGTG GGGTAAGTAG ACCACTGGGG AAGGGAGGAC GCGGTCCTCC GGAATGACTT GGTCTTTACG TTGGTCTACC CCTTCGACGA GGACTTGTCC
24501  TTTGATGAAG CCAGGTAAGA AAATTAGCTA CTTGTACTCT CACATACTGT TTCAGGTGGC ATCTATATCT AGTGTCTGTC CACCCAGCTC CACACTCCTG
       AAACTACTTC GGTCCATTCT TTTAATCGAT GAACATGAGA GTGTATGACA AAGTCCACCG TAGATATAGA TCACAGACAG GTGGGTCGAG GTGTGAGGAC
24601  CCCAACTGGC CAAAGTCCAT GTTCAGGGTT TTTTAAATGC CAAACCTTCT TAAAGGCTTT GTTGTACTTA AATTTGTACC ATTATGGAAA CCATATGGTG
       GGGTTGACCG GTTTCAGGTA CAAGTCCCAA AAAATTTACG GTTTGGAAGA ATTTCCGAAA CAACATGAAT TTAAACATGG TAATACCTTT GGTATACCAC
24701  TTGTCAAAGT TTGATTCGTT TTGCACATTT GTAAACATGA GAATCGGCTA GGCTTTTAAT GCCTGTTTAC AAAATGGCTA CAGGATGTCA CCTTGAGGTT
       AACAGTTTCA AACTAAGCAA AACGTGTAAA CATTTGTACT CTTAGCCGAT CCGAAAATTA CGGACAAATG TTTTACCGAT GTCCTACAGT GGAACTCCAA
```

17#,18#,19#,22# 测序结果:基因型删除 7 625 bp(2~4 外显子完全删除)/wt,黄色区域为 2~4 外显子,红色为起始密码子和终止密码子,绿色区域为删除序列:

gtcatgtctgtggcccacctaccac---caaagtccatgttcagggttttta

```
16901  TGGGATCCAG CCATTAAATT CAGGTCCTCA GTTCTGTAGG AAACACTTGA GTCATGTCTG TGGCCCACCT ACCACCTTCT TAATAAGTGC TAGATCGCTT
       ACCCTAGGTC GGTAATTTAA GTCCAGGAGT CAAGACATCC TTTGTGAACT CAGTACAGAC ACCGGGTGGA TGGTGGAAGA ATTATTCACG ATCTAGCGAA
17001  ACCTGTGCAT TAGTAAGCAG TGGGTTTTAT TTTATATGTT ACTAGAATAA ATAGAGATTA GAAGTAAAGC TAATAATGGT AATAGATTTG GTTTTAGAAA
       TGGACACGTA ATCATTCGTC ACCCAAAATA AAATATACAA TGATCTTATT TATCTCTAAT CTTCATTTCG ATTATTACCA TTATCTAAAC CAAAATCTTT
17101  CCCCAATTAA ATAAGAATGC TCAGTAAATC TAATGTACAG TATAAGACTT TGTTTCTCTT CATTACAGTT GAAATTACAG ACATCTTGCC AAAATCATTT
       GGGGTTAATT TATTCTTACG AGTCATTTAG ATTACATGTC ATATTCTGAA ACAAAGAGAA GTAATGTCAA CTTTAATGTC TGTAGAACGG TTTTAGTAAA
17201  CTTCAAAGCC CAGACTTGTT GTACCCTATG GCCTCAAGAC TCTGCTTGAG GGAGTTAGCA GAGCCATTCT CAAAACCAAT CCAACAAACA TCACCCAGTT
       GAAGTTTCGG GTCTGAACAA CATGGGATAC CGGAGTTCTG AGACGAACTC CCTCAATCGT CTCGGTAAGA GTTTTGGTTA GGTTGTTTGT AGTGGGTCAA
17301  TGCAGCCGTT TATTTTAAAG AACTCATTGT GTTTAGAGAA GGTTTGTACT GCTTTAGATC TGTATTTCCT GCTTTACAGT CATCTTAAAT GGAAATCCAT
       ACGTCGGCAA ATAAAATTTC TTGAGTAACA CAAATCTCTT CCAAACATGA CGAAATCTAG ACATAAAGGA CGAAATGTCA GTAGAATTTA CCTTTAGGTA
17401  CTCTATTTGA CTTCCTATGC TTATTCCTCC AGGGAATTCG TCTCTAGATA TAAAAGATCT GATTAAACAG TTTCACCAGA TGAAAGGTAA GTGCGACGGA
       GAGATAAACT GAAGGATACG AATAAGGAGG TCCCTTAAGC AGAGATCTAT ATTTTCTAGA CTAATTTGTC AAAGTGGTCT ACTTTCCATT CACGCTGCCT
17501  GACGCCCACT TCAGCAGGGT CGTCACACCC TTGGTAACAC ATGTAACTGT TACCACTGCA TCCCTGGTTA CCACATCAGT GTCTCATGTG AAATGACCGT
       CTGCGGGTGA AGTCGTCCCA GCAGTGTGGG AACCATTGTG TACATTGACA ATGGTGACGT AGGGACCAAT GGTGTAGTCA CAGAGTACAC TTTACTGGCA
```

……

```
23901  CCTCAGCCCC CTTGCAGGGT GAACAAGAAC CTCCTGCTCA TGAAGCTCCT GATACCCAGG TTACATCAGC CAGTCGTATA TCATCCATAT ATAACGATGT
       GGAGTCGGGG GAACGTCCCA CTTGTTCTTG GAGGACGAGT ACTTCGAGGA CTATGGGTCC AATGTAGTCG GTCAGCATAT AGTAGGTATA TATTGCTACA
24001  GCCTGTCAAT GAAGGAGTTG TCTATGTTGA GGAGATACCA GGATACATAG TTATCCCTTT TACTGATCAT GATCAAGTTG CTTGTGTTAA AGAAATTGAG
       CGGACAGTTA CTTCCTCAAC AGATACAACT CCTCTATGGT CCTATGTATC AATAGGGAAA ATGACTAGTA CTAGTTCAAC GAACACAATT TCTTTAACTC
24101  CAGTCACCAC CAGGTAGTCC CAAAGCTGTA GAACCCAAGA CTAAAATATC TATAGAGTCT CTGAAAACTG TCCAGGTGGA GGAGAATTCC CAACACAAGT
       GTCAGTGGTG GTCCATCAGG GTTTCGACAT CTTGGGTTCT GATTTTATAG ATATCTCAGA GACTTTTGAC AGGTCCACCT CCTCTTAAGG GTTGTGTTCA
24201  CCTCAGTACA CGTGGAGGCA GAAGCTACAG TTCTGCTCTC TAACACTGCT TTAGATGGTC AGCCCGAGGT ACCTGCAGAA CCCCTGGATG CAGAGGGCTT
       GGAGTCATGT GCACCTCCGT CTTCGATGTC AAGACGAGAG ATTGTGACGA AATCTACCAG TCGGGCTCCA TGGACGTCTT GGGGACCTAC GTCTCCCGAA
24301  TTTCAAAGTA GCCTCTGAAA ATTCTCTGCA CCTTGAAACG GAGATCGTTA TCATAAACCC TGATGATCCT GGCCAGGAGG AGTCAGGGGG GAACGCTGCA
       AAAGTTTCAT CGGAGACTTT TAAGAGACGT GGAACTTTGC CTCTAGCAAT AGTATTTGGG ACTACTAGGA CCGGTCCTCC TCAGTCCCCC CTTGCGACGT
24401  CCCCATTCAT CTGGTGACCC CTTCCCTCCT GCGCCAGGAG GCCTTACTGA ACCAGAAATG CAACCAGATG GGGAAGCTGC TCCTGAACAG GTTTGATGAA
       GGGGTAAGTA GACCACTGGG GAAGGGAGGA CGCGGTCCTC CGGAATGACT TGGTCTTTAC GTTGGTCTAC CCCTTCGACG AGGACTTGTC CAAACTACTT
24501  GCCAGGTAAG AAAATTAGCT ACTTGTACTC TCACATACTG TTTCAGGTGG CATCTATATC TAGTGTCTGT CCACCCAGCT CCACACTCCT GCCAACTGGC
       CGGTCCATTC TTTTAATCGA TGAACATGAG AGTGTATGAC AAAGTCCACC GTAGATATAG ATCACAGACA GGTGGGTCGA GGTGTGAGGA CGGTTGACCG
24601  CAAAGTCCAT GTTCAGGGTT TTTTAAATGC CAAACCTTCT TAAAGGCTTT GTTGTACTTA AATTTGTACC ATTATGGAAA CCATATGGTG TTGTCAAAGT
       GTTTCAGGTA CAAGTCCCAA AAAATTTACG GTTTGGAAGA ATTTCCGAAA CAACATGAAT TTAAACATGG TAATACCTTT GGTATACCAC AACAGTTTCA
```

图 4 F1 代小鼠基因测序结果

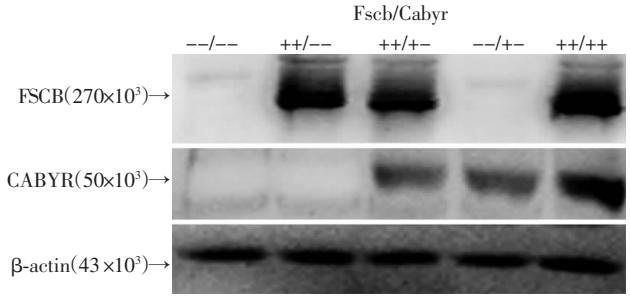
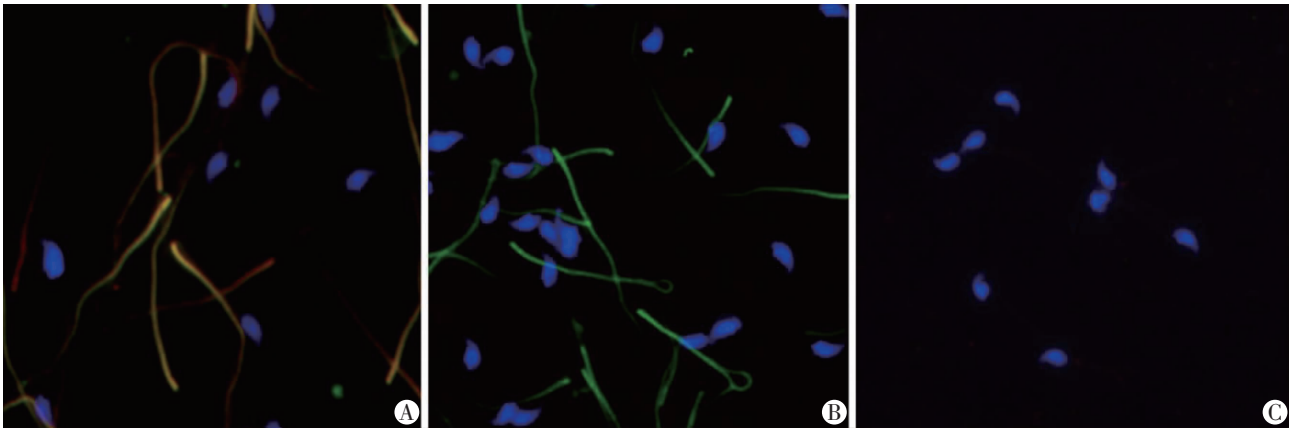


图 5 FSCB、CABYR 蛋白在双基因敲除纯合子小鼠及杂合子中表达的 Western blot 分析

3 讨论

精子纤维鞘是精子鞭毛主段所独有的,环绕于外致密纤维(ODF)和轴丝之外的细胞骨架结构。基于现有研究,纤维鞘至少存在 3 方面作用:第一,发挥重要的结构性支撑作用,在精子运动中调节其柔韧度、鞭毛摆动方向及幅度[2]。第二,在为精子鞭毛运动提供能量方面具有重要作用。糖酵解是精子活力的主要能量来源。而大多数糖酵解酶定位于纤维鞘上,因而精子运动所需的糖酵解产生的能量被整合于纤维鞘中。第三,纤维鞘是多种重要信号传导通路和代谢通路的支架[8-10]。迄今为止,研究发现的纤维鞘相关蛋白有 20 多种,其主要结构成分是 A 激酶锚定蛋白家族(AKAPs)的 AKAP3 和 AKAP4[11]。在对纤维鞘的相关功能研究中,已经发现纤维鞘的正常功能对精子运动至关重要,相关基因缺陷可能导致纤维鞘发育异常(DFS),影响轴丝和 ODF 结构[12],并可能影响能量产生,导致精子运动障碍。如 Akap4 突变小鼠表现为纤维鞘形态发育异常,AKAP3 和甘油醛 3-磷酸脱氢酶-S(GAPDS)表达水平降低,糖酵解和能量产生减少,从而导致精子运动能力极差[13]。同时,某些基因缺陷可影响相关信号通路,导致精子运动能力下降和授精能力显著降低或丧失,如 Rho 信号通路通过定位于纤维鞘的 rhophilin 相关蛋白 1(ROPN1)和 rhophilin 发挥作用,ROPN1 和 ropporin 样基因(ROPN1L)双突变小鼠既表现出纤维鞘结构和形态的异常(主段变薄和碎裂),伴随着 AKAP3 水平的降低,同时也出现精子活力和 PKA 依赖性信号传导过程的缺陷,从而导致男性不育[11]。

本研究组长期致力于纤维鞘相关蛋白 CABYR 和 FSCB 的功能研究并已经获得多方面认识。CABYR 是一种纤维鞘上既具有钙结合能力,又在获能过程中进行磷酸化调节的多态性精子运动和获能相关蛋白。该蛋白在精子形成后期表达并逐渐迁移至精子纤维鞘上,在获能过程中不但发生由 PKA 介导的丝氨酸/苏氨酸磷酸化,而且发生由酪氨酸激酶(TKs)介导的酪氨酸磷酸化,尤其是其磷酸化的同时还表现出钙结合能力的显著提高,显示该蛋白依赖于获能过程的磷酸化作用在钙信号传导中具有重要调节作用[4]。本研究组前期对 CABYR 蛋白的研究证实其不同异构体可形成二聚体和寡聚体参与纤维鞘的装配,通过免疫共沉淀和酵母双杂交技术还证实,CABYR 蛋白和纤维鞘骨架蛋白 AKAP3、AKAP4 及 Rho 信号通路蛋白 ROPN1均具有明确的紧密相互作用,可能形成巨分子



FSCB 为绿色标记;CABYR 为红色标记;合成后为黄色标记;精子头部 DAPI 染色为蓝色
A:Fscb/Cabyr(++/++);B:Fscb/Cabyr(++/−−);C:Fscb/Cabyr(−−/−−)

图 6 免疫荧光检测 FSCB、CABYR 蛋白在野生型、Cabyr 单基因敲除和 Fscb/Cabyr 双基因敲除小鼠精子上的表达 (×100)

复合物,参与精子鞭毛运动[8,10]。同时,本研究组在从事 CABYR 及其巨分子复合物研究中率先发现和鉴定了一种与 CABYR 结合的新蛋白 FSCB[5]。鼠 FSCB 具有睾丸/精子特异性,仅在精子形成后期表达并最终迁移至精子纤维鞘上。同时该蛋白与 CABYR 相似,既具有钙结合能力,又可在获能后被 PKA 磷酸化[14]。而且,值得注意的是,有研究显示 ROPN1 基因缺陷小鼠精子内 FSCB 蛋白表达消失,而主要纤维鞘结构蛋白 AKAP 3 和 AKAP4 的表达并没有改变,这表明 ROPN1 可能直接与 FSCB 结合或通过与 CABYR 形成异二聚体,从而将其锚定于纤维鞘内[11]。上述研究表明在纤维鞘中,结构蛋白、信号通路蛋白、钙结合蛋白等多类蛋白之间具有复杂而紧密的相互作用关系,共同发挥纤维鞘的生理功能。而 CABYR 和 FSCB 蛋白可能在鞭毛纤维鞘上作为蛋白复合体的一部分发挥作用。为了明确 FSCB 和 CABYR 蛋白复合物在精子纤维鞘中的生理功能,本研究组前期首先尝试构建了 FSCB 基因敲除小鼠,并进行了相关表型观察,结果显示 Fscb(--)、Fscb(+-)雄鼠精子密度、活率和各项运动参数与野生型均无明显差异。与野生型相比,杂合子和纯合子雄鼠精子与透明带完整卵细胞及无透明带卵细胞的结合和融合的能力均无差异。体内实验显示野生型、杂合子和纯合子雄鼠使雌鼠的受孕率和每胎雌鼠产仔数均无差异,表明敲除 Fscb 基因对雄性小鼠精子的运动功能及体内外受精能力均无明显影响,提示 FSCB 蛋白的独立缺失并不影响精子的功能,对于精子的运动和授精能力的维持,该蛋白并非不可或缺[6]。而近来针对 CABYR 的研究显示,Cabyr 基因敲除后雄性小鼠表现出严重的生育能力低下,精子运动能力缺陷,双联微管的结构异常,纤维鞘明显紊乱,这表明纤维鞘对于轴丝的正确组装具有重要作用。而且,在纤维鞘的形成过程中,CABYR 是雄性生殖所必需的蛋白[15]。基于本研究的前期发现,为进一步深入探讨 FSCB 和 CABYR 蛋白复合物在精子纤维鞘中的生理作用,以及该两种蛋白缺失可能对精子相关结构和功能造成的影响及其发生机制,本研究在构建 Fscb 单基因敲除小鼠的基础上,进一步进行了 Cabyr 基因的敲除,并构建了 Fscb/Cabyr(--/--)双基因敲除小鼠。

基因敲除技术是体外研究基因功能的关键技术基础,是鉴定在男性生殖过程中某个基因是否必要的重要方法。为进一步探讨该两种蛋白的生理作用,前期本研究组已经建立了 Fscb 基因敲除小鼠模型,并对基因敲除后小鼠精子鞭毛的形态学及其授精功能的可能改变进行了研究,结果发现精子鞭毛形态学,精子的运动参数及授精能力均无明显改变。这一结果提示 FSCB 在精子中的功能可能并非不可取代。事实上,在生殖医学研究的起始阶段,很多基因在体内表达分析中被认为是生殖功能所必需的,但经基因敲除后相关研究后证实并非如此[16]。如蛋白酶、精子顶体酶曾被认为是在精子穿过透明带过程所必需的,后通过基因敲除小鼠研究证实缺乏这些蛋白的精子同样可以穿过透明带[17]。可见在精子发生和形成过程中,可能许多生理功能的完善存在某些代偿机制。为深入探讨 FSCB 与 CABYR 结合的复合物在精子中的生物学功能,本研究在前期已经获得 Fscb 单基因敲除小鼠模型的基础上,进一步采用 CRISPR/Cas9 系统及受精卵注射的方式成功建立两个能稳定遗传的 Cabyr 基因敲除小鼠模型品系,进而与前期建立的 Fscb 敲除小鼠模型[7]进行交叉繁育,最终获得 Fscb/Cabyr(--/--)双基因敲除小鼠,为探讨 FSCB 蛋白及 CABYR 蛋白缺失后对小鼠精子的形态结构及功能的影响奠定了基础。

基于前期对 CABYR 蛋白、FSCB 蛋白相关功能的研究,预期其复合物作为精子尾部纤维鞘的必要组成部分,在调节精子尾部韧性及活动能力等方面发挥重要作用,并且可能通过对精子 Ca^{2+} 信号通路中通道蛋白 CatSper 的调控而发挥功能化调控作用。本研究后期将利用 Fscb/Cabyr(--/--)双基因敲除小鼠,通过观察其精子形态学、运动参数、体内外授精功能的改变以及精子中钙离子浓度的改变,探讨 FSCB 及 CABYR 蛋白复合物在精子的功能及其作用中的可能机制。

参考文献:

[1] LEHTI M S, SIRONEN A. Formation and function of the manchette and flagellum during spermatogenesis[J]. Reprod Camb Engl, 2016, 151(4): R43-R54. DOI:10.1530/REP-15-0310.

[2] EDDY E M, TOSHIMORI K, O'BRIEN D A. Fibrous sheath of mammalian spermatozoa[J]. Microsc Res Tech, 2003, 61(1): 103-115. DOI:10.1002/jemt.10320.

[3] KOLTHUR-SEETHARAM U, MARTIANOV I, DAVIDSON I. Specialization of the general transcriptional machinery in male germ cells[J]. Cell Cycle Georget Tex, 2008, 7(22): 3493-3498. DOI:10.4161/cc.7.22.6976.

[4] NAABY-HANSEN S, MANDAL A, WOLKOWICZ M J, *et al*. CABYR, a novel calcium-binding tyrosine phosphorylation-regulated fibrous sheath protein involved in capacitation[J]. Dev Biol, 2002, 242(2): 236-254. DOI:10.1006/dbio.

2001.0527.

[5] 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. DOI:10.1074/jbc.M702238200.

[6] 周庭友, 张勇, 张军, 等. FSCB 基因敲除对雄性小鼠生殖功能的影响[J]. 第三军医大学学报, 2016, 38(15): 1729-1734. DOI:10.16016/j.1000-5404.201511059.
ZHOU T Y, ZHANG Y, ZHANG J, *et al*. Knockout of fibrous sheath CABYR-binding on reproductive function in male mice[J]. J Third Mil Med Univ, 2016, 38(15): 1729-1734. DOI:10.16016/j.1000-5404.201511059.

[7] 周庭友, 孙中义, 张勇, 等. 鼠 fscb 基因靶向敲除载体的构建及动物模型的建立[J]. 第三军医大学学报, 2015, 37(15): 1527-1533. DOI: 10.16016/j.1000-5404.201503197.
ZHOU T Y, SUN Z Y, ZHANG Y, *et al*. Construction of targeting vector and preparation of fibrous sheath CABYR-binding protein knockout mice using CRISPR/Cas9 system[J]. J Third Mil Med Univ, 2015, 37(15): 1527-1533. DOI:10.16016/j.1000-5404.201503197.

[8] LI Y F, HE W, MANDAL A, *et al*. CABYR binds to AKAP3 and Ropporin in the human sperm fibrous sheath[J]. Asian J Androl, 2011, 13(2): 266-274. DOI:10.1038/aja.2010.149.

[9] NAKAMURA N, DAI Q S, WILLIAMS J, *et al*. Disruption of a spermatogenic cell-specific mouse enolase 4 (Eno4) gene causes sperm structural defects and male infertility[J]. Biol Reprod, 2013, 88(4): 90, 1-12. DOI: 10.1095/biolreprod.112.107128.

[10] LI Y F, HE W, KIM Y H, *et al*. CABYR isoforms expressed in late steps of spermiogenesis bind with AKAPs and ropporin in mouse sperm fibrous sheath [J]. Reproductive Biol Endocrinol, 2010, 8(1): 1-19. DOI: 10.1186/1477-7827-8-101.

[11] FIEDLER S E, DUDIKI T, VIJAYARAGHAVAN S, *et al*. Loss of R2D2 proteins ROPN1 and ROPN1L causes defects in murine sperm motility, phosphorylation, and fibrous sheath integrity[J]. Biol Reprod, 2013, 88(2): 41, 1-10. DOI:10.1095/biolreprod.112.105262.

[12] BACCETTI B, COLLODEL G, ESTENOZ M, *et al*. Gene deletions in an infertile man with sperm fibrous sheath dysplasia[J]. Hum Reprod, 2005, 20(10): 2790-2794. DOI:10.1093/humrep/dei126.

[13] MIKI K, WILLIS W D, BROWN P R, *et al*. Targeted disruption of the Akap4 gene causes defects in sperm flagellum and motility[J]. Dev Biol, 2002, 248(2): 331-342. doi: 10.1006/dbio.2002.0728.

[14] LIU S L, NI B, WANG X W, *et al*. FSCB phosphorylation in mouse spermatozoa capacitation[J]. BMB Rep, 2011, 44(8): 541-546. DOI:10.5483/bmbrep.2011.44.8.541.

[15] YOUNG S A M, MIYATA H, SATOUH Y, *et al*. CABYR is essential for fibrous sheath integrity and progressive motility in mouse spermatozoa[J]. J Cell Sci, 2016, 129(23): 4379-4387. DOI:10.1242/jcs.193151.

[16] OKABE M. Mechanism of fertilization: a modern view[J]. Exp Animals, 2014, 63(4): 357-365. doi: 10.1538/expanim.63.357.

[17] BABA T, AZUMA S, KASHIWABARA S, *et al*. Sperm from mice carrying a targeted mutation of the acrosin gene can penetrate the oocyte zona Pellucida and effect fertilization[J]. J Biol Chem, 1994, 269(50): 31845-31849.

(收稿:2020-05-06;修回:2020-06-05)

(编辑 汪勤俭)