

抑制素基因敲除小鼠模型的构建及表型初步分析

洪胜辉, 张旭亮, 王芊芊, 刘平, 刘迪文
(浙江大学实验动物中心, 杭州 310058)

[摘要] 目的 利用成簇的规律间隔短回文重复序列及其相关蛋白9[clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR)/CRISPR-associated protein 9 (Cas9)]基因编辑技术构建抑制素基因敲除小鼠模型, 并对其表型进行初步分析。方法 根据抑制素 α 亚基的第一外显子碱基序列, 设计单链向导RNA (single guide RNA, sgRNA) 识别序列, 构建sgRNA表达质粒。利用T7 RNA聚合酶体外转录sgRNA和Cas9 mRNA后, 将sgRNA/Cas9 mRNA显微注射入C57BL/6J小鼠的受精卵, 通过PCR和基因测序法检测新生小鼠抑制素 α 亚基的基因碱基突变情况。选取F2代基因敲除纯合子的雄鼠和雌鼠, 分别取雄鼠睾丸和雌鼠卵巢进行观察, 并进行石蜡切片和HE染色分析。结果 共获得了12只F0代抑制素基因敲除小鼠, 选取8号雄鼠与C57BL/6J雌鼠回交, 得到F1代小鼠, 再相互交配得到F2代小鼠。F2代小鼠各基因型比例符合孟德尔定律, 基因敲除小鼠不存在胚胎致死现象。F2代纯合子小鼠睾丸和卵巢发生癌变且无法生育。结论 成功构建了抑制素基因敲除小鼠模型, F2代纯合子小鼠的癌变表型显示抑制素在小鼠生殖系统中发挥重要功能。

[关键词] 基因敲除; CRISPR/Cas9 基因编辑技术; 抑制素; 癌变; C57BL/6J 小鼠

[中图分类号] Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2020)04-0306-08

抑制素 (inhibin) 是一种糖蛋白激素, 属于转化生长因子超家族。抑制素由两种亚基 (α 亚基和 β 亚基) 通过二硫键连接而成。其中 β 亚基有两种形式 βA 和 βB , 因此根据不同连接方式, 抑制素分为抑制素 A ($\alpha\beta A$) 和抑制素 B ($\alpha\beta B$)。另外, α 亚基的相对分子量为 2×10^4 , β 亚基的相对分子量为 1.3×10^4 , 单独的 α 亚基和 β 亚基均无生物活性, 只有当 α 亚基和 β 亚基互相结合时, 才能形成相对分子量为 3.2×10^4 且具有生

物活性的抑制素^[1-2]。 α 亚基具有糖基化位点, 可以抑制卵泡刺激素 (follicle stimulating hormone, FSH) 与其受体结合。 β 亚基通过二硫键组成不同形式的激活素, 分别为激活素 A ($\beta A\beta A$)、激活素 AB ($\beta A\beta B$) 和激活素 B ($\beta B\beta B$) 3 种, 激活素可刺激 FSH 的产生和分泌^[3-4]。

抑制素能够特异性作用于垂体, 抑制 FSH 的合成与分泌。抑制素还能够通过调控激活素的释放来调节机体的激素水平^[5]。2015 年, 日本科学家 Takeo 等^[6]报道, 使用抑制素抗血清联合马绒毛膜促性腺激素诱导 C57BL/6J 雌鼠超数排卵, 结果发现平均每只雌鼠排卵数量提高了 2 倍以上, 提示抑制素抗血清中和了小鼠分泌的内源性抑制素后可大大提高雌鼠的排卵数量。那么完全敲除小鼠的抑制素基因是否也影响小鼠的排卵及生殖器官表型, 值得进一步研究探讨。

[收稿日期] 2019-11-11

[基金项目] 浙江省公益技术应用研究实验动物项目 (2017C37170)

[作者简介] 洪胜辉(1986—), 男, 实验师, 研究方向: 实验动物学。E-mail: 0015278@zju.edu.cn

[通信作者] 刘迪文(1958—), 男, 研究员, 研究方向: 实验动物学。E-mail: liudiwen2004@163.com

基因编辑技术是精准研究基因功能的一个重要手段,包括传统的同源重组打靶方法、锌指核酸内切酶技术、类转录激活因子效应物核酸酶技术和成簇的规律间隔短回文重复序列及其相关蛋白9[clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR)/CRISPR-associated protein 9 (Cas9)]基因编辑技术。CRISPR/Cas9 技术具有制作简单、周期短、突变效率高以及成本低等特点,已经被广泛用于小鼠、大鼠、斑马鱼和水稻等物种的基因编辑^[7]。通过 CRISPR/Cas9 基因编辑技术, crRNA (CRISPR-derived RNA) 通过碱基配对与 tracrRNA (trans-activating RNA) 结合,形成双链 RNA; 这一 tracrRNA-crRNA 二元复合体指导 Cas9 蛋白在 crRNA 引导序列靶标的特定位点剪切双链 DNA, 而且在与 crRNA 引导序列互补的位点上, Cas9 蛋白的 HNH 核酸酶结构域剪切互补链, 而 Cas9 蛋白的 RuvC 结构域剪切非互补链, 从而实现目的基因的敲除功能^[8]。

本研究运用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术, 设计了针对抑制素 α 亚基的单链向导 RNA (single guide RNA, sgRNA), 成功诱导了抑制素 α 亚基的基因移码突变, 导致抑制素生物活性的缺失, 从而成功制备了抑制素基因敲除小鼠模型, 为进一步研究抑制素的生殖调控功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 动物 SPF 级 4~8 周龄 C57BL/6J 小鼠和 8~12 周龄 ICR 小鼠均购自上海斯莱克实验动物有限公司[SCXK (沪) 2017-0005], 饲养在本实验动物中心 SPF 级屏障设施的独立通风笼具 (individually ventilated cages, IVC) 环境中[SYXK (浙) 2018-0016], 恒温恒湿, 12 h 光照, 12 h 黑暗, 自由采食。研究中涉及的动物实验方案已通过浙江大学实验动物伦理委员会审批 (编号为 17127)。

1.1.2 试剂 Tag 聚合酶及 PCR 产物纯化试剂盒均购自北京全式金生物科技有限公司。DNA 提取试剂盒购自浙江易思德生物科技有限公司。限制性内切酶购自 NEB (北京) 公司。Cas9 表达载

体和 pUC57-GDNA-T7 载体均由本中心张旭亮博士提供。RNA 体外转录试剂盒及纯化试剂盒均购自美国 Ambion 公司。小鼠胚胎体外操作液购自美国 Sigma 公司。小鼠胚胎培养液 KSOM 购自美国 CQISSON 公司。PCR 引物合成及测序均由苏州金维智生物科技有限公司完成。二甲苯、氨水和中性树胶均购自国药集团化学试剂有限公司。苏木精染液和伊红染液均由武汉谷歌生物公司提供。

1.2 方法

1.2.1 sgRNA 的设计及重组质粒构建 根据 GenBank 公布的小鼠抑制素 α 亚基的基因序列, 将待敲除的基因序列利用 CRISPR 设计工具 (<http://crispr.mit.edu/>) 进行分析。依据靶 Score 的高低及脱靶 Score 的高低, 设计一对长度为 20 bp 的 sgRNA 靶向序列, 并在该靶区域设计引物用于后续阳性小鼠的基因鉴定。抑制素基因鉴定的上游 (F) 引物序列为 5'-GGGTGAGAA-GGGTAGAAGAAGG-3', 下游 (R) 引物序列为 5'-CCGCTTGAGAAGTAGAGGCTA-3'。sgRNA 质粒载体的构建步骤: 将靶序列上下游引物稀释, 再进行引物退火及加磷酸, 用 Bsa I 酶切 pUC57-GDNA-T7 质粒线性化过夜, 将加磷酸产物与线性化载体 pUC57-GDNA-T7 进行连接, 该连接反应在干式恒温器中进行。连接后的重组质粒采用基因测序方法筛选阳性克隆 (命名为 pUC-57 sgRNA), 并用甘油菌 -80 °C 保存备用。

1.2.2 sgRNA 和 Cas9 体外转录及纯化 以上述构建的 pUC-57 sgRNA 和 Cas9 表达载体为模板, 用 T7 体外转录试剂盒转录 sgRNA 和 Cas9 的 mRNA 并纯化。将得到的 sgRNA 测定浓度, 进行电泳鉴定后, 分装保存以备用。

1.2.3 Cas9/sgRNA 的显微注射及胚胎移植 将转录得到的 sgRNA 和 Cas9 mRNA 分别稀释至质量浓度为 50 ng/ μ L, 然后以体积比为 1:1 混合待用。用显微操作仪将混合物注射到受精卵的细胞质中。注射后的受精卵在 CO₂ 培养箱中 37 °C 培养 30 min, 然后移植到假孕的 ICR 母鼠的输卵管里。常规饲养母鼠, 等待 F0 代小鼠的出生。

1.2.4 F0 代小鼠的鉴定及回交 在 F0 代小鼠出生 7 d 后, 采用剪脚趾法标记小鼠, 剪取鼠尾组织并用设计的靶区域引物 (抑制素 α F/ 抑制素 α R)

进行 PCR 鉴定, 选 PCR 阳性样品进行克隆测序。将测序正确的阳性 F0 代小鼠与野生型 C57BL/6J 小鼠进行交配, 产生 F1 代小鼠。

1.2.5 F2 代小鼠存活数统计、体质量比较以及生殖器官大体观察 采用 PCR 方法鉴定 F1 代小鼠, 选 F1 代杂合子小鼠自交产生 F2 代小鼠。统计 F2 代小鼠中野生型、杂合子和基因敲除 (纯合子) 3 种基因型的存活个体数量, 并计算各基因型小鼠所占比例, 判断其是否符合孟德尔分离定律。选 90 日龄的 F2 代小鼠, 分别测量并记录体质量, 比较 3 种基因型小鼠的体质量差异。观察抑制素基因敲除纯合子小鼠的睾丸及卵巢变化, 比较纯合子、杂合子、野生型雄鼠睾丸和雌鼠卵巢的大小。

1.2.6 抑制素基因敲除纯合子小鼠生殖器官的 HE 染色 选 F2 代抑制素基因敲除纯合子雄鼠睾丸和雌鼠卵巢组织, 制作石蜡切片并进行 HE 染色, 观察生殖器官的组织病理学变化。HE 染色方法: 取新鲜组织, 固定于 4% 多聚甲醛溶液中 24 h 以上, 依次脱水、包埋、切片; 用苏木精染液染色细胞核, 用伊红染液染色细胞质, 脱水后用中性树胶封固, 观察染色结果并拍照。

1.2.7 数据处理 运用 SPSS 20.0 软件分析数据, 并用 GraphPad Prism5 软件制图。计量数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 *t* 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 sgRNA 靶向序列的设计

利用 CRISPR 设计工具在抑制素基因外显子

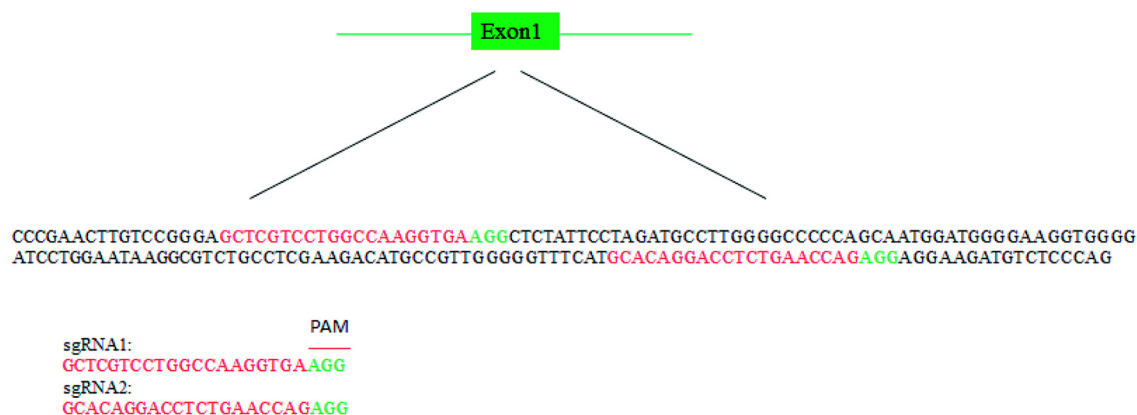


图 1 抑制素基因敲除靶向 sgRNA 的设计

Figure 1 Design of target single guide RNA (sgRNA) for mouse inhibin gene knockout

(Exon) 1 上设计了一对长度为 20 bp 的 sgRNA 靶向序列 (图 1), 图 1 中红色字体为 sgRNA 靶向序列, 绿色字体为 PAM (protospacer adjacent motif) 序列。

2.2 F0 代小鼠的获得、鉴定及回交结果

将 sgRNA 和 Cas9 mRNA 显微注射入受精卵后, 一共存活 75 枚胚胎, 全部存活胚胎移植了 3 只假孕的 ICR 受体母鼠。胚胎移植 20 d 后, 一共出生了 12 只 F0 代小鼠, 其中有 8 雄 4 雌 (雄鼠编号为 1~8, 雌鼠编号为 9~12)。提取小鼠基因组 DNA, PCR 后进行琼脂糖凝胶电泳 (图 2)。由图 2 可见, 编号为 1、3、6、7、8、9、10、12 的小鼠电泳条带有 2 条或者 3 条, 说明这些小鼠的基因组可能发生了序列删除或碱基插入; 而编号为 2、4、5、11 的小鼠疑似发生碱基突变。将这 12 只小鼠的抑制素基因的 PCR 扩增产物进行 TA 克隆测序, 结果显示, 编号为 1、7、8、9、10 的 5 只小鼠发生了序列缺失或碱基插入, 编号为 3 和 6 的小鼠 PCR 扩增产物 TA 克隆测序结果不理想, 其余编号小鼠未发生突变; 其中, 发生移码突变的小鼠有 7 号 (缺失 128 bp)、8 号 (缺失 143 bp, 同时插入 3 bp) 和 10 号 (缺失 122 bp) (表 1)。将编号为 7、8、10 的 3 只小鼠与 C57BL/6J 小鼠回交, 结果发现: 7 号小鼠交配后未正常生育; 8 号小鼠交配后其后代缺失片段较大; 10 号小鼠是雌鼠, 产仔繁殖速度较慢。因此, 后续选择了 8 号小鼠交配繁殖继续繁育。

2.3 F2 代小鼠中各基因型比例统计及体质量差异

8 号 F0 代雄鼠与 C57BL/6 雌鼠回交, 得到 F1

代杂合子小鼠，然后 F1 代杂合子小鼠自交后产生 F2 代小鼠，抑制素基因鉴定结果见图 3A。统计 173 只 F2 代野生型、杂合子和基因敲除纯合子 3 种基因型小鼠的存活个体数量，分别为 45、93 和 35 只，占全部 F2 代小鼠的 26.0%、53.7% 和 20.2%，约为 1：2：1，符合孟德尔分离定律，说明抑制素基因敲除小鼠不存在胚胎致死表型。F2 代野生型、杂合子和基因敲除纯合子 3 种基因型小鼠于 90 日龄的平均体质量比较见图 3B，与野生型小鼠相比，杂合子小鼠体质量无明显差异 ($P > 0.05$)，而抑制素基因敲除纯合子小鼠的体质量明显减轻 ($P < 0.05$)。

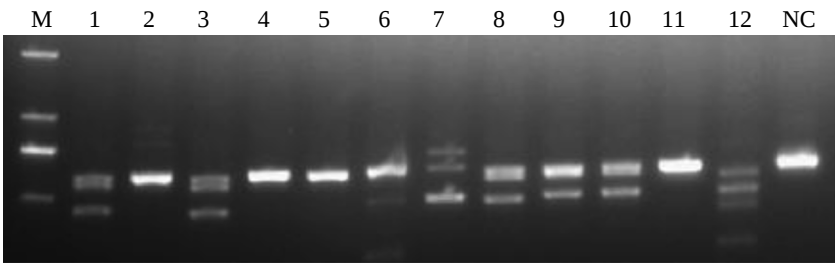
2.4 抑制素基因敲除小鼠的生殖器官大体观察

将 F2 代抑制素基因敲除雄鼠与雌鼠交配，结果不育。将抑制素 α 基因敲除雌鼠与 C57BL/6J 雄鼠交配，仍然不育。观察发现，F2 代及后续子代中抑制素 α 基因敲除雄鼠分笼饲养后，肉眼可见睾丸会逐渐增大。将抑制素基因敲除雄鼠和雌鼠解剖后观察其生殖系统，发现雄鼠的生殖系统发育异常，睾丸变大，颜色发黑，内有血液，附睾萎缩或被吸收入睾丸组织 (图 4A)；雌鼠的生殖系统同样发育异常，卵巢变大，颜色发黑，输卵管已萎缩或被吸收入卵巢组织，子宫粗大，内部充满液体 (图 4B)。

2.5 抑制素基因敲除小鼠生殖器官组织病理学观察

野生型雄鼠的睾丸组织结构正常，有很多形状规则的曲细精管，排列紧密，而且管内生精细胞排列紧密，数量丰富，形态正常，并可见长梭形精子 (图 5A)。而抑制素基因敲除雄鼠的睾丸大面积曲细精管形状不规则或被肿瘤组织取代，肿瘤组织呈弥漫性或结节状分布，没有边界；肿瘤细胞为多形细胞，有丰富的嗜酸性或空泡状细胞质 (黑色箭头)，少见核分裂现象 (红色箭头)；肿瘤结节内可见大量囊腔，伴出血，内充满红细胞 (黄色箭头)；睾丸组织中局部曲细精管结构尚未完全消失，但管内正常生精细胞消失，小管边缘为肿瘤细胞 (绿色箭头) (图 5B 和 5C)。

观察卵巢组织 HE 染色切片可见，野生型雌鼠卵巢组织结构正常，有较多卵泡及黄体结构，卵泡内的卵母细胞形态正常，颗粒细胞排列紧密且形态正常，组织未见异常 (图 5D)。而抑制素基因敲除雌鼠卵巢内正常结构消失，卵泡异常或消失，被肿瘤组织取代；肿瘤由混合性囊性和实性的小叶状或结节性区域组成，肿瘤细胞为多形细胞，细胞嗜酸性 (黑色箭头)；部分滤泡内还伴有出血，可见红细胞 (红色箭头)；少量肿瘤细胞凋亡，细胞核碎裂，细胞质嗜酸性增强 (黄色箭头) (图 5E 和 5F)。



M 是 DNA Marker，1~12 是 12 只抑制素基因敲除后的 F0 代小鼠。NC 是野生型小鼠 C57BL/6J，作为对照。

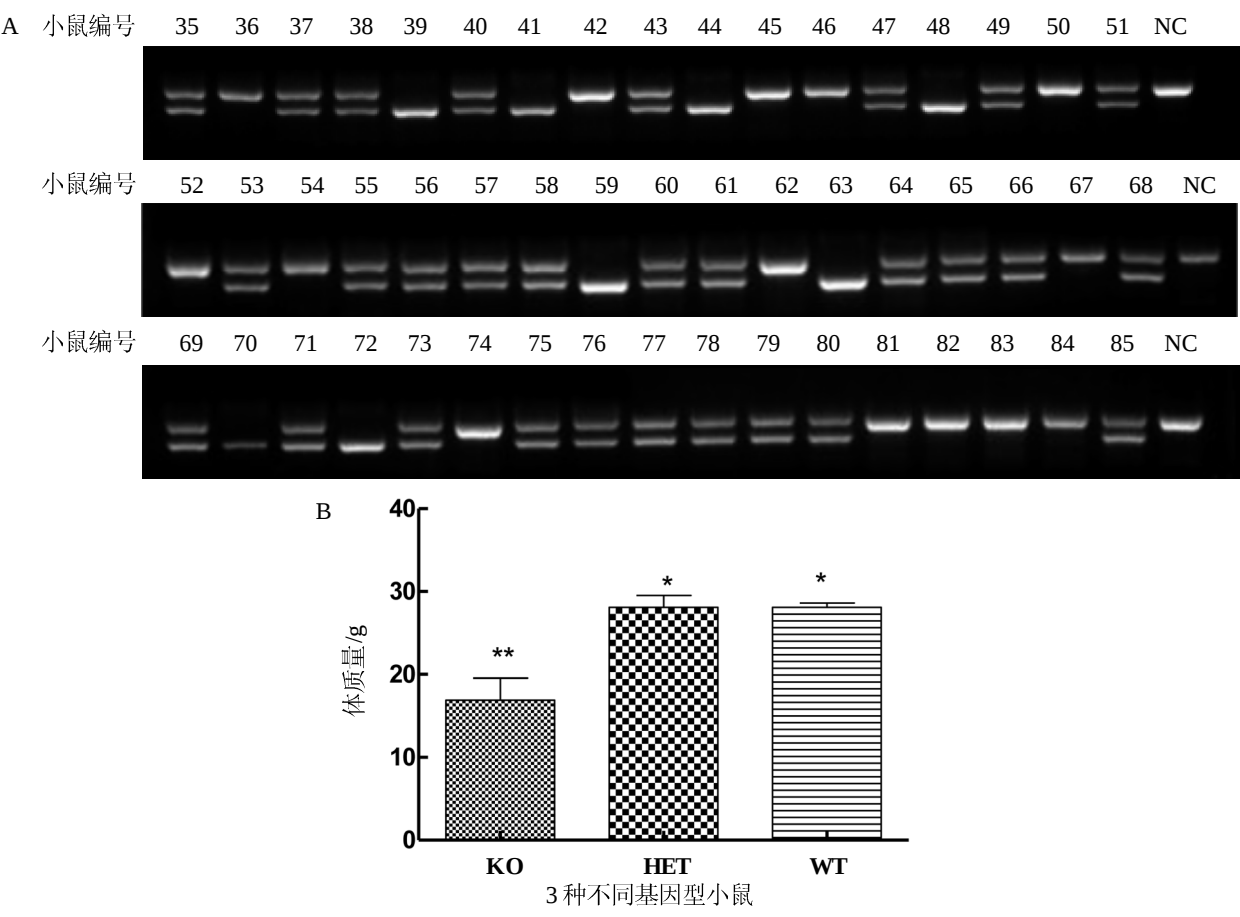
图 2 12 只 F0 代小鼠抑制素基因的 PCR 后电泳结果

Figure 2 Electrophoretic results of inhibin gene in F0 mice after PCR

表 1 F0 代小鼠抑制素基因的 TA 克隆测序结果

Table 1 TA cloning and gene sequencing results of inhibin gene in F0 mice

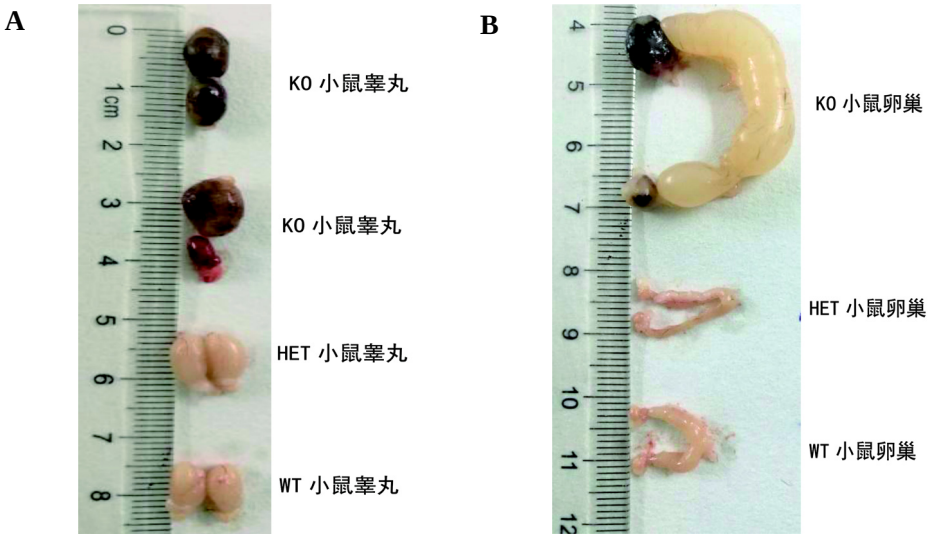
小鼠编号	抑制素基因敲除区域	长度 /bp	判定
1	CCCGAACTTGTCGGGAG-GGACCTCTGAACCAGAGGAGGAAGATGTCTCCCAG	-144	不能移码
7	CCCGAACTTGTCGGGAGCTCGTCCTGGCCA-AGAGGAGGAAGATGTCTCCCAG	-128	可移码
8	CCCGAACTTGTCGGGAGCTC-CCG-CCTCTGAACCAGAGGAGGAAGATGTCTCCCAG	-143+3	可移码
9	CCCGAACTTGTCGGGAGCTCGTCCTGGCCAAGG-GATAT-GAGGAAGATGTCTCCCAG	-128+5	不能移码
10	CCCGAACTTGTCGGGAGCTCGTCCTGGCCAAGG-CCAGAGGAGGAAGATGTCTCCCAG	-122	可移码



NC 为 C57BL/6J 小鼠对照。KO、HET 和 WT 分别代表 F2 代小鼠的基因敲除纯合子、杂合子和野生型 3 种基因型。**与野生型小鼠相比， $P < 0.05$ 。

图 3 F2 代小鼠的抑制素 α 基因 PCR 鉴定 (A) 和体质量比较 (B)

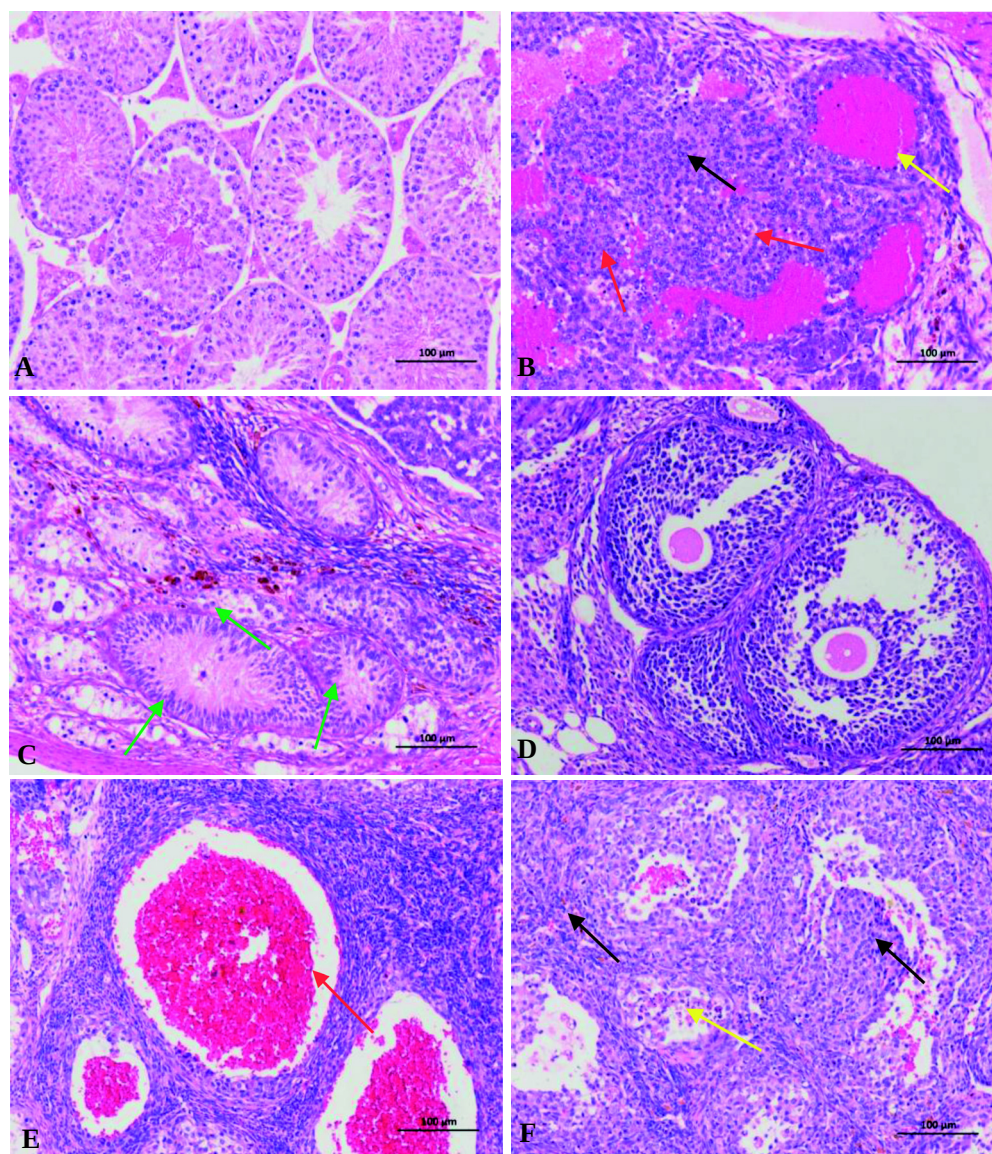
Figure 3 Electrophoretic results of PCR products of inhibin α gene (A) and body weight of F2 mice (B)



A 为雄鼠睾丸组织，B 为雌鼠卵巢；KO、HET 和 WT 分别代表 F2 代小鼠的基因敲除纯合子、杂合子和野生型 3 种基因型。

图 4 抑制素基因敲除小鼠的生殖器官观察

Figure 4 Reproductive organs of inhibin gene knockout mice (A, male mouse testis; B, female mouse ovary)



A 为野生型雄鼠睾丸组织切片；B 和 C 分别为抑制素基因敲除纯合子小鼠睾丸组织的不同切面；D 为野生型雌鼠卵巢组织切片；E 和 F 分别为抑制素基因敲除纯合子小鼠卵巢组织的不同切面。比例尺大小均为 100 μm 。

图 5 抑制素基因敲除小鼠生殖器官的组织切片病理学观察 (HE 染色, $\times 200$)

Figure 5 Pathological observation on the tissue sections of reproductive organs in inhibin gene knockout mice (HE staining, $\times 200$)

3 讨论

与传统基因同源重组靶技术相比, CRISPR/Cas9 基因编辑技术简单, 成本低, 速度快, 制作全身基因敲除的小鼠只需要设计 1 对目的基因的靶向 sgRNA 序列, 然后通过合成、体外转录、受精卵注射和胚胎移植就可以得到 F0 代小鼠, 顺

利的情况下 1 个月即可获得 F0 代小鼠^[9]。本课题将 sgRNA 和 Cas9 mRNA 混合物注入后存活的 75 枚受精卵移植到 3 只受体母鼠中, 结果 3 只受体小鼠均妊娠, 出生 12 只 F0 代小鼠。PCR 显示其中 8 只小鼠发生了抑制素 α 基因碱基突变。通过 TA 克隆测序分析发现, 有 5 只小鼠的抑制素 α 基因发生了片段缺失或碱基插入, 其中 8 号雄鼠交

配的雌鼠最先正常产仔且基因缺失片段较大。因此,选择8号雄鼠继续繁育,得到F1代杂合子小鼠并建系成功。因为 α 亚基是抑制素A和抑制素B的共有核心部分,所以当 α 亚基基因缺失后,抑制素A和抑制素B均会失去生物活性,从而提示本研究成功获得抑制素基因敲除小鼠模型。

抑制素主要由雌性动物的卵巢和雄性动物的睾丸分泌。国内外大量研究主要集中在抑制素对雌性动物生殖调控的作用机制和应用方面^[10-11]。由卵巢分泌的抑制素又称为卵泡抑制素。抑制素能够特异性作用于垂体,通过负反馈机制阻止促性腺激素释放激素对垂体的作用,从而抑制FSH的合成与分泌。抑制素还可以通过抑制激活素来调节FSH的分泌。激活素是通过结合跨膜的丝氨酸-苏氨酸激酶受体完成信号转导过程^[12]。张德坤等^[13]研究抑制素基因免疫调控家畜内源性抑制素的分泌,提高雌性家畜动物体内FSH的合成与分泌,从而提高雌性动物窝产仔数。Cho等^[14]研究抑制素 α 亚基转基因大鼠时发现,雌性大鼠卵巢中抑制素 β A和 β B水平下降时,FSH水平下降,LH水平升高,52%的雌性大鼠窝产仔数减少,雄性大鼠窝产仔数没有明显变化,但是精子数量减少50%。Matzuk等^[15]研究抑制素缺失小鼠时发现,雄鼠和雌鼠生殖器官由于发生癌变导致不育,生殖腺的恶性肿瘤会导致小鼠肝脏和胃等器官组织发生恶性病变以及贫血,癌变的原因是小鼠抑制素缺失导致激活素A和B水平升高。Rukmali等^[16]研究抑制素 α 亚基缺失小鼠模型时同样发现雄鼠睾丸增大且形成肿瘤组织,检测发现激活素水平显著升高。

笔者受上述研究结果的启发,制作了抑制素基因敲除小鼠模型,然后观察发现获得的抑制素基因敲除雌鼠发生了卵巢癌变、输卵管萎缩和子宫腔积液等病变,而抑制素基因敲除雄鼠发生了睾丸癌变,这些症状与前人研究结果基本一致。Takeo等^[6]使用抑制素抗血清中和雌鼠分泌的内源性抑制素后,超数排卵数量翻倍;而笔者制作的抑制素缺失小鼠模型的生殖系统癌变后无法排卵。究其原因,可能是:短时地抑制或中和抑制素可促进FSH的合成和分泌,提高激活素A和B的分泌水平,不会使小鼠发生病变,同时能够

提高小鼠的排卵;而彻底的抑制素基因敲除会使小鼠完全缺乏抑制素的调控,小鼠体内FSH和激活素的合成和分泌都会失去控制,从而导致生殖内分泌系统发生紊乱,进而使生殖系统发生病变。抑制素和激活素处在什么水平或者达到怎样的平衡状态可以使动物的生殖力达到最佳,这还需要进一步的研究。

本研究尚有不足之处,即未能在蛋白质水平进一步验证小鼠目的基因的敲除,这是因为抑制素是一种内分泌激素蛋白,其表达受小鼠内分泌系统调控,处在一个动态变化当中,蛋白质免疫印迹法难以捕捉到正常小鼠(对照组)体内抑制素的表达。激素蛋白的检测可能需要灵敏度更高的技术手段,本课题组将在后续的研究中进一步探索。

参考文献:

- [1] Ling N, Ying SY, Ueno N, et al. Isolation and partial characterization of a Mr 32,000 protein with inhibin activity from porcine follicular fluid[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1985, 82:7217-7221.
- [2] Robertson DM, Foulds LM, Leversha L, et al. Isolation of inhibin from bovine follicular fluid[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1985, 126:220-226.
- [3] Mathews LS, Vale WW. Expression cloning of an activating receptor, a predicted transmembrane serine kinase[J]. *Cell*, 1991, 65:973-982.
- [4] Re E, Sidis Y, Fabrizio DA, et al. Reconstitution and analysis of soluble inhibin and activating receptor complexes in a cell-free system[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279:53126-53135.
- [5] de Kretser DM, Hedger MP, Loveland KL, et al. Inhibins, activins and follistatin in reproduction[J]. *Hum Reprod Update*, 2002, 8:529-541.
- [6] Takeo T, Nakagata N. Superovulation using the combined administration of inhibin antiserum and equine chorionic gonadotropin increases the number of ovulated oocytes in C57BL/6 female mice[J]. *PLoS One*, 2015, 10:1371-1381.
- [7] Hsu PD, Lander ES, Zhang F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering[J]. *Cell*, 2014, 157(6):1262-1278.
- [8] Burgess DJ. Technology: a CRISPR genome-editing tool[J]. *Nat Rev Genet*, 2013, 14(2):80.
- [9] Wang HY, Yang H, Jaenisch R, et al. One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/

- Cas-mediated engineering[J]. Cell, 2013, 153(4):910-918.
- [10] Miyamoto K, Hasegawa Y, Fukuda M, et al. Demonstration of high molecular weight forms of inhibin in bovine follicular fluid (bFF) by using monoclonal antibodies to bFF 32K inhibin[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1986, 136: 1103-1109.
- [11] Hillier SG, Yong EL, Illingworth PJ, et al. Effect of recombinant inhibin on androgen synthesis in cultured human thecal cells[J]. Mol Cell Endocrinol, 1991, 75(2):R1-R6.
- [12] Massague J, Seoane J, Wotton D. Smad transcription factors [J]. Genes Dev, 2005, 19(23):2783-2810.
- [13] 张德坤, 杨利国, 张红琳, 等. 抑制素基因免疫诱导单胎绵羊孪生的研究[J]. 中国农业大学学报, 2004, 9(4):40-45.
- [14] Cho BN, McMullen ML, Pei L, et al. Reproductive deficiencies in transgenic mice expressing the rat inhibin α subunit gene[J]. Endocrinology, 2001, 142:4994-5004.
- [15] Matzuk MM, Finegold MJ, Su JG, et al. α -Inhibin is a tumour-suppressor gene with gonadal specificity in mice [J]. Nature, 1992, 360:313-319.
- [16] Rukmali W, David MK, Andreas M, et al. Activin over-expression in the testis of mice lacking the inhibin α -subunit gene is associated with androgen deficiency and regression of the male reproductive tract[J]. Mol Cell Endocrinol, 2018, 470:188-198.

Construction of Inhibin Gene Knockout Mice and Preliminary Analysis of the Phenotype

HONG Shenghui, ZHANG Xuliang, WANG Qianqian, LIU Ping, LIU Diwen
(Laboratory Animal Center of Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

[Abstract] Objective To construct an inhibin gene knockout mouse model by using the clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR)/CRISPR-associated protein 9 (Cas9) gene editing technology, and to preliminarily study the phenotypes. **Methods** Single guide RNA (sgRNA) plasmids against the exon 1 of inhibin α -subunit were designed and constructed. The sgRNA and Cas9 mRNA were transcribed by T7 RNA polymerase *in vitro*, then mixed and microinjected into the fertilized eggs of C57BL/6J mice. PCR and gene sequencing were used to detect the mutations of inhibin α -subunit in newborn mice. Male and female mice of F2 generation with inhibin gene knockout were selected, and their testis and ovaries were taken to observe and analyze by HE staining after paraffin sections. **Results** Twelve F0 generation mice with inhibin gene knockout by CRISPR/Cas9 were obtained. The No.8 male mouse was selected to mate with female C57BL/6J mice, then F1 generation mice were achieved. F1 generation mice were mated with each other to produced F2 generation, and the ratio of genotypes conforms to Mendel's law in F2 generation. The testis and ovary of F2 generation homozygous mice were cancerous and infertile. **Conclusion** The inhibin gene knockout mouse model was successfully constructed, and the cancerous phenotype of homozygous mice shows that inhibin gene plays an important role in the mouse reproductive system. **[Key words]** Gene knockout; CRISPR/Cas9 gene editing technology; Inhibin; Cancerization; C57BL/6J mice