

曹彬彬,蔡瑶,王宝珠,等. 基于 CRISPR/Cas9 技术构建 *Plcz1* 基因敲除小鼠模型 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(7): 101-108.

Cao BB, Cai Y, Wang BZ, et al. Generation of a *Plcz1* gene knockout mouse by using the CRISPR/Cas9 system [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(7): 101-108.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.07.014

基于 CRISPR/Cas9 技术构建 *Plcz1* 基因敲除小鼠模型

曹彬彬^{1,2}, 蔡瑶^{1,2}, 王宝珠^{1,2}, 饶喻^{1,2}, 王超^{1,2}, 苟克勉^{1,2}, 王涛^{1,2*}

(1.扬州大学兽医学院,江苏扬州 225009;2.江苏高校动物重要疫病与人兽共患病防控协同创新中心,江苏扬州 225009)

【摘要】 目的 利用 CRISPR/Cas9 系统构建精子特异性磷脂酶 C zeta-1 (phospholipase C zeta-1, *Plcz1*) 基因敲除 (*Plcz1*^{-/-}) 小鼠模型,探讨 *Plcz1* 基因在雄性小鼠生育过程中的作用。方法 选择小鼠 *Plcz1* 基因第 6、7 外显子作为靶位点,前后两个位点设计 2 对 sgRNA 序列,再将 2 对 sgRNA 以 Golden Gate 方法插入 pX330A 质粒中,构建 pX330-sgRNA 重组质粒。经扩增、纯化后,将重组质粒显微注射进小鼠受精卵原核中,进行胚胎移植至代孕母鼠, F0 代小鼠出生后,提取其尾 DNA 进行 PCR 鉴定和 DNA 测序分析。通过 F0 代与野生型小鼠交配得到 F1 代小鼠, F1 代交配繁殖至 F2 代获得 *Plcz1* 基因缺失的小鼠纯合品系, *Plcz1*^{-/-} 与野生型小鼠交配,分析 *Plcz1*^{-/-} 雄鼠的生育能力。结果 成功构建 pX330-sgRNA 重组质粒,通过繁育和测序筛选获得 3 只 *Plcz1*^{-/-} 雄鼠 (*Plcz1*^{m3}、*Plcz1*^{m4}、*Plcz1*^{m5}),对 3 只小鼠进行目的基因测序发现:(1) *Plcz1*^{m3}: *Plcz1* 基因第 6、7 外显子区域缺失 3078 bp;(2) *Plcz1*^{m4}: 第 7 外显子区域缺失 7 bp,该小鼠在饲养过程中死亡;(3) *Plcz1*^{m5}: *Plcz1* 基因第 6 外显子区域缺失 1 bp。结论 利用 CRISPR/Cas9,成功获得 *Plcz1*^{-/-} 雄性小鼠, *Plcz1*^{-/-} 雄性小鼠可育,但与野生型小鼠相比,其生育能力明显下降。

【关键词】 *Plcz1*; CRISPR/Cas9; 序列测定; 基因敲除; 小鼠

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 07-0101-08

Generation of a *Plcz1* gene knockout mouse by using the CRISPR/Cas9 system

CAO Binbin^{1,2}, CAI Yao^{1,2}, WANG Baozhu^{1,2}, RAO Yu^{1,2}, WANG Chao^{1,2}, GOU Kemian^{1,2}, WANG Tao^{1,2*}

(1. College of Veterinary Medicine, Yangzhou 225009, China. 2. Jiangsu Co-innovation Center for Prevention and Control of Important Animal Infectious Diseases and Zoonoses, Yangzhou 225009)

【Abstract】 Objective A sperm-specific phospholipase C zeta-1 (*Plcz1*^{-/-}) gene knockout mouse was generated by the CRISPR/Cas9 system to explore the role of the *Plcz1* gene in male mouse fertility. **Methods** Exons 6 and 7 of the mouse *Plcz1* gene were selected as target sites to design two pairs of sgRNAs. The two pairs of sgRNAs were inserted into the pX330A plasmid by the Golden Gate method to construct the pX330-sgRNA recombinant plasmid. After amplification and purification, the recombinant plasmid was microinjected into pronuclear of mouse zygote. The embryos were transferred to surrogate mother mice. After the birth of F0 generation mice, tail DNA was analyzed by PCR and sequencing. The F0 generation was mated with wild-type mice to obtain F1 generation mice. The F1 generation was bred to the F2 generation to obtain a homozygous strain of *Plcz1* gene knockout mice. To analyze *Plcz1*^{-/-} male mouse fertility, *Plcz1*^{-/-} mice were mated with wild-type mice. **Results** The recombinant plasmid pX330-sgRNA was constructed successfully, and three *Plcz1*^{-/-}

【基金项目】江苏高校优势学科建设工程资助项目(PAPD);国家自然科学基金青年项目(31802260);江苏省自然科学基金青年项目(BK20180917);江苏省高等学校自然科学研究面上项目(18KJB230009)。

【作者简介】曹彬彬(1996—),女,硕士研究生,研究方向:实验动物学。E-mail:1727295040@qq.com

【通信作者】王涛(1989—),男,硕士生导师,研究方向:实验动物学。E-mail:wtao6550@yzu.edu.cn

male mice ($Plcz1^{m3}$, $Plcz1^{m4}$ and $Plcz1^{m5}$) were obtained by breeding. Target gene sequencing of the three mice showed that $Plcz1^{m3}$ had a 3078 nucleotide deletion between exons 6 and 7 of $Plcz1$, $Plcz1^{m4}$ had a seven nucleotide deletion in exon 7 of $Plcz1$, which died during feeding, and $Plcz1^{m5}$ had a one nucleotide deletion in exon 6 of $Plcz1$. **Conclusions** $Plcz1^{-/-}$ male mice were successfully generated using the CRISPR/Cas9 system. $Plcz1^{-/-}$ male mice were fertile, but their fertility was significantly decreased compared with wild-type mice.

【Keywords】 $Plcz1$; CRISPR/Cas9; sequencing; gene knockout; mice

生殖能力下降是人和动物共同面临的健康问题,不仅对畜牧业造成经济损失,而且对人类健康构成严重威胁。因此,寻找动物生殖过程中关键的调控基因,探讨其生殖发生过程中的调控机制成为该领域内关注的焦点之一。在过去的半个多世纪里,许多在动物生殖过程中发挥重要作用的精子因子相继被发现,在动物发生受精时,精子中的某些因子会通过融合孔进入卵母细胞胞质中,启动卵母细胞内钙离子释放系统,从而激活卵母细胞^[1]。研究发现,哺乳动物受精的特征是在精子-卵子融合后,卵子内持续 2~4 h 不同程度的 Ca^{2+} 振荡^[2],该过程是恢复第一次减数分裂和胚胎发育的前提,同时还阻止多精入卵的发生^[3]。

磷脂酶 C zeta (PLC ζ) 是 Saunders 等^[4] 在研究小鼠睾丸中 PLC 时发现的新亚型,随后证实 PLC ζ 不仅存在于睾丸中,并且拥有其他亚型中的基本结构域。该蛋白结构域由 4 个位于 N 端的 EF 手型结构域、位于中心的特征性 X 和 Y 催化域以及碳基端的 C2 结构域构成^[5]。其中 EF 手型区域对低浓度 Ca^{2+} 敏感,使 PLC ζ 在静息状态的 Ca^{2+} 水平具有活性。通过 C2 结构域与 PI(3)P、PI(5)P 或一种未知的膜蛋白相互作用可能实现 PLC ζ 与特定囊泡膜的结合^[6],带正电的 XY 连接区与第一个 EF 手型结构域相互作用,催化 XY 结构域进行 PIP₂ 的酶促水解,生成三磷酸肌醇(IP₃)^[7],促进内质网中 Ca^{2+} 的释放,进而诱导细胞内 Ca^{2+} 振荡的发生^[8]。Saunders 等^[4] 将 PLC ζ 功能受到抑制的精子注入卵母细胞中,发现 Ca^{2+} 的振荡不明显,而将完整的 PLC ζ cRNA 注入小鼠卵母细胞后产生了与正常体外受精相类似的 Ca^{2+} 振荡现象,表明 PLC ζ 介导的 Ca^{2+} 振荡在体外受精过程中发挥重要作用。研究显示,在牛^[9]、鸡^[10] 和猪^[11] 等家畜中已经发现 PLC ζ 基因。

体外授精实验结果表明, $Plcz1$ 基因缺陷的精子会导致小鼠受精失败,进而导致不育,最近研究发现,在缺失 PLC ζ 蛋白的情况下,自然交配的小鼠也会导致体内受精产生后代,但产仔数明显下降^[12]。

因此,自然受精的情况下 $Plcz1$ 基因缺陷雄鼠是否具有生育能力尚未完全阐明。本研究利用 CRISPR/Cas9 技术构建 $Plcz1^{-/-}$ 小鼠模型,并对 $Plcz1^{-/-}$ 小鼠进行扩繁和基因型鉴定,探讨 $Plcz1$ 基因在雄性小鼠生育过程中的作用,为解决 $Plcz1$ 基因突变带来的生殖能力障碍提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级 C57BL/6 雄鼠 6 只,8~12 周龄,体重 23~28 g;SPF 级 C57BL/6 雌鼠 12 只,4~8 周龄,体重 14~22 g;SPF 级 ICR 雄鼠 3 只,10 周龄,体重 32~37 g;SPF 级 ICR 雌鼠 3 只,10 周龄,体重 30~35 g,均购自扬州大学比较医学中心[SCXK(苏)2017-0007],实验操作在扬州大学兽医学院兽医大楼的实验室进行[SYXK(苏)2017-0044]。实验小鼠均饲养于扬州大学比较医学中心的 SPF 级动物房,光照周期采用 5:00 am~7:00 pm,环境温度控制在 20℃~25℃,自由饮水、进食,每周更换 1 次垫料。

动物实验伦理审核由扬州大学审批(NSFC2020-SYXY-20),并按照实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀。

1.2 主要试剂与仪器

pX330A-1x2、pX330S-2 载体购自 Addgene;限制性内切酶 BpiI (批号:10020723)、T4 DNA 连接酶(批号:10037474)及限制性内切酶 Eco31I(批号:0431712)购自 New England Biolabs 公司;2×Es Taq MasterMix(Dye)(批号:01031/50351)、DH5 α 感受态细胞(批号:50525)及高纯度质粒小提试剂盒(批号:50433)购自康为世纪生物科技股份有限公司;EndoFree Plasmid Maxi Kit(批号:163013537)购自 QIAGEN;普通琼脂糖(批号:EZ6688C178)购自赛国生物科技有限公司;纯化试剂盒(批号:123722)购自 MP Biomedicals;DL2000 marker(批号:AKF0781A)购自 TaKaRa Bio;Spe 抗生素(批号:EB15BA0006)购自生工生物工程(上海)股份有限公司。

T100 Thermal Cycler PCR 仪购自美国 Bio-Rad 公司;ABI PCR 仪 miniAmp 及 ABI 经典型 PCR 仪 2720 购自美国 Thermo Fisher 公司;天能 1600 型凝胶成像+电脑、HE-90 电泳槽购自上海天能生物科技有限公司;恒温水浴锅购自宁波新芝生物科技有限公司;台式冷冻离心机 5424R、台式离心机 5424、微型离心机 MiniSpin 购自德国 Eppendorf 公司;ZHTY-50 N 恒温振荡培养箱购自上海知楚仪器有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 设计 sgRNA 及 sgRNA 双链合成

从 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 上查询到 C57BL/6 小鼠的 *Plcz1* 基因的序列 (NM_054066.4), 由于第一个外显子不存在氨基酸, 因此本试验从第二个外显子开始统计外显子数量并标记的。通过张峰 sgRNA 设计的网站 (<http://crispr.mit.edu/>) 在第 6、7 外显子上选择 sgRNA 靶点序列, 选择出得分较高的 2 条 sgRNA, 并在其两端添加限制性内切酶 Bpi I 酶切位点, 由擎科有限公司合成 (如表 1 所示)。其中, 如图 1 所示的基因敲除示意图, *Plcz1*-sgRNA6 位于 *Plcz1* 基因第 6 外显子, *Plcz1*-sgRNA7 位于 *Plcz1* 基因第 7 外显子。

将合成的上游引物和下游引物各 8 μL、Taq DNA Polymerase Buffer 4 μL 在 PCR 管中混合, 进行 PCR 退火反应: 99°C 10 min, 16°C 10 min。

1.3.2 pX330-sgRNA 重组载体的构建

将退火的寡核苷酸分别插入 pX330A 和 pX330S 载体, 反应体系共 2 μL: 25 ng/μL pX330A/S 载体 0.3 μL, 10 μmol/L 退火的寡核苷酸 0.5 μL, 10×T4 DNA 连接酶缓冲液 0.2 μL, BpiI 0.1 μL, T4 DNA 连接酶 0.1 μL, 无菌蒸馏水 0.8 μL。进行 PCR 扩增反应: 37°C 5 min, 16°C 10 min 进行 3 个循环, 循环反应后, 在 37°C 下进行额外的 BpiI 酶消化 1 h, 即得到连接产物 pX330A-1x2-sgRNA6 与

pX330S-2-sgRNA7, 用于后续步骤。

1.3.3 连接产物转化感受态细胞

取冷冻的感受态细胞置于冰浴中, 待感受态细胞在冰上融化后, 在超净台中向感受态细胞悬液中加入连接产物, 用移液器轻轻吹打混匀, 置于冰上 30 min。42°C 热击 90 s, 迅速将离心管转移到冰浴中, 冰上静置 2 min。在超净台里向每个离心管中加入 700 μL 无菌的 LB 培养基, 不含抗生素, 混匀后置于 37°C 摇床, 220 r/min 振荡培养 1 h 使菌体复苏。在超净台中取 50 μL 已转化的感受态细胞, 加到含 Amp 或者 Spe 抗生素的 LB 固体琼脂培养基上, 用无菌的涂布棒将菌液均匀涂开, 直至干燥, 倒置平板, 37°C 12~16 h 培养。

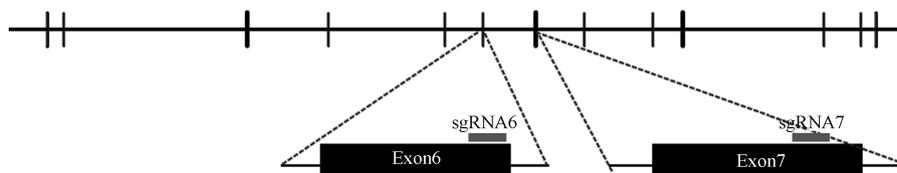
1.3.4 质粒的提取与鉴定

用灭菌过后的枪头挑取上述培养出的单菌落, 接种于 5 mL Amp 或 Spe 抗生素的 LB 液体琼脂培养基置于 37°C 摇床, 220 r/min 振荡培养 10~12 h。在超净台中保菌, 余下菌液用质粒小提试剂盒提取质粒, 取过夜培养的菌液加入离心管 (自备) 中, 13000 r/min 离心 30 s 收集菌体沉淀, 尽量吸弃上清。向留有菌体沉淀的离心管中加入 250 μL 含 RNase A 的 Buffer P1, 使用涡旋振荡器充分混匀, 悬浮菌体沉淀。加入 250 μL Buffer P2, 轻轻地上下颠倒混匀 6 次, 充分混匀使菌体裂解, 此时溶液应变得清亮粘稠。加入 350 μL Buffer N3, 立即轻柔地上下颠倒混匀 10 次, 充分混匀, 此时应出现白色絮状沉淀。13000 r/min 离心 5 min。将所得的上清液转移

表 1 *Plcz1* 基因 sgRNA 寡核苷酸链

Table 1 SgRNA oligonucleotide chain of *Plcz1* gene

目的片段 Target fragment	sgRNA 序列 (5' - 3') sgRNA sequence (5' - 3')
<i>Plcz1</i> -sgRNA6	F: CACCGAGATACACTACCGTCTCCAG
	R: AAACCTGGAGACGGTAGTGTATCTC
<i>Plcz1</i> -sgRNA7	F: CACCGCTTCTATCACGGATCAAGG
	R: AAACCTTGATCCGTGATAGGAAGC



注: *Plcz1* 基因的外显子由竖线表示。

图 1 *Plcz1* 基因的基因结构 (NM_054066.4) 和 CRISPR/CAS9 的靶序列

Note. Exons are represented by vertical bars.

Figure 1 Gene structure of the mouse *Plcz1* gene (NM_054066.4) and target sequences for CRISPR/Cas9

到已装入收集管的吸附柱 (Spin Columns DM) 中, 13000 r/min 离心 30 s, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱重新放回收集管中。向吸附柱中加入 150 μ L Buffer PB, 13000 r/min 离心 30 s。向吸附柱中加入 400 μ L Buffer PW, 13000 r/min 离心 1 min, 倒掉收集管中的废液。将吸附柱置于 1 个新的离心管中, 向吸附膜的中间部位加入 60 μ L Buffer EB, 室温放置 2 min, 13000 r/min 离心 1 min, 将质粒溶液收集到离心管中, -20°C 保存质粒。质粒送至南京擎科生物科技有限公司进行测序, 测序引物为通用引物 U6-F。

1.3.5 Golden Gate assembly

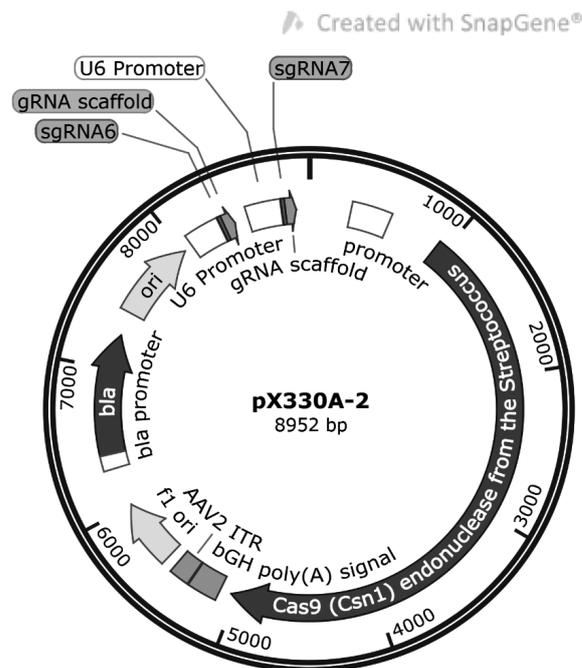
为构建靶向 2 个 *Plcz1* 基因组位点的 CRISPR/Cas9-核酸酶载体, 将测序正确的 pX330A-1x2-sgRNA6 与 pX330S-2-sgRNA7 统一到单个载体中。将 pX330A/S 载体、Eco31I、T4 DNA 连接酶与 $10\times$ T4 DNA 连接酶缓冲液在 PCR 管中混合, 并进行如下热循环反应: 37°C 5 min, 16°C 10 min 进行 25 个循环, 循环反应后, 在 37°C 下进行额外的 Eco31I 消化 1 h, 即得到连接产物 pX330A-2 (如图 2 所示), 用于后续步骤。

1.3.6 显微注射

测序正确的质粒经纯化后, 用注射用水稀释至 3 ng/ μ L, 存于 -20°C 备用。将注射过 PMSG 和 hCG 的 C57BL/6 雌鼠 (供体) 与 C57BL/6 雄鼠合笼, 同时将未注射过激素的 ICR 雌鼠与结扎的雄鼠合笼, 从而获得假孕雌鼠 (受体)。处死超数排卵的供体雌鼠, 取出受精卵, 使用显微注射仪将质粒注射到受精卵原核中。麻醉假孕雌鼠, 将受精卵移植至受体卵巢内。3 周后移植成功的受体雌鼠可生出 F0 代小鼠。

1.3.7 基因敲除小鼠的筛选

提取鼠尾基因组 DNA, 通过 PCR 检测目的片段。由南京擎科生物科技有限公司合成检测 sgRNA 的引物 (如表 2 所示)。PCR 反应体系: $2\times$ Es Taq MasterMix (Dye) 10 μ L, F (10 μ mol/L) 1 μ L, R (10 μ mol/L) 1 μ L, DNA (<0.2 μ g) 1 μ L, ddH₂O 7 μ L。PCR 反应程序: 预变性 94°C 2 min, 变性 94°C 30 s, 退火 60°C 30 s, 延伸 72°C 30 s, 循环 33 次, 终延伸 72°C 2 min。PCR 扩增产物送至南京擎科生物科技有限公司进行测序, 用 SnapGene 软件分析。



注: 图片由 SnapGene 提供。

图 2 pX330A-2 质粒图谱

Note. The picture was support by SnapGene software.

Figure 2 Plasmid map of pX330A-2

表 2 检测目的片段的引物序列

Table 2 Primer sequences for detection of target fragment

引物名称 Primer name	引物序列 (5'-3') Primer sequence (5'-3')
检测 <i>Plcz1</i> -sgRNA6 引物 Detection of <i>Plcz1</i> -sgRNA6 primer	F: TTAGAAAATCACTGCTCCCTG R: GCGTAGCAAACCATCTTCTCT
检测 <i>Plcz1</i> -sgRNA7 引物 Detection of <i>Plcz1</i> -sgRNA7 primer	F: TATCTGAAACCCACGAGAGGAT R: GAAGAGGAAGCTGACCCCTTAT

1.3.8 *Plcz1*^{-/-} 雄性小鼠的饲养和繁育

繁育出 F0 代小鼠后, 与野生型 C57BL/6 小鼠合笼, 得到 F1 代杂合小鼠。然后将纯合和纯合小鼠、纯合和杂合小鼠、纯合和野生型、杂合和杂合小鼠以及野生型和野生型小鼠等不同基因型间进行合笼, 从繁殖情况分析 *Plcz1* 基因敲除雄性小鼠的生育能力。

1.4 统计学方法

应用 IBM SPSS Statistics 22 统计软件进行统计学分析, 组间两两比较采用配对双尾 *t* 检验, 数据以平均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 显示。当 $P < 0.05$ 时表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 pX330A-sgRNA 重组载体构建

目的序列 *Plcz1*-sgRNA6 和 sgRNA7 与载体

pX330A 载体连接,通过序列测定验证目的基因,并用 SnapGene 软件进行序列比对,结果表明正确插入两对 sgRNA 序列(图 3)。

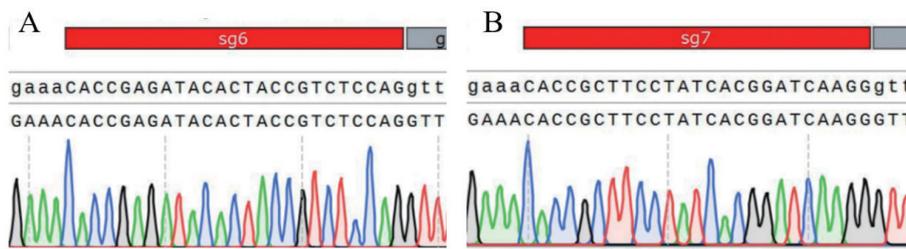
2.2 *Plcz1* 基因敲除小鼠的测序筛选

获得受精卵 82 枚,显微注射活胚 54 枚,胚胎移植两只 ICR 受体(C102、C103),其中 C102 受体产仔 6 只,编号 1~6, C103 受体生的 8 只后代均被吃。PCR 扩增包含 sgRNA 的片段后进行琼脂糖凝胶电泳(如图 4 所示),电泳结果显示:用检测 sgRNA6 或 sgRNA7 引物进行 PCR 扩增,3 号小鼠没有电泳条带,其余小鼠电泳条带大小为 289 bp;而用检测 sgRNA6 上游引物和 sgRNA7 下游引物进行 PCR 扩增,3 号小鼠在 268 bp 处显示电泳条带。经测序 3~4 次鉴定出 3、4、5 号小鼠为 *Plcz1* 基因敲除小鼠,分别为:(1) *Plcz1*^{m3}: *Plcz1* 基因第 6、7 外显子区域缺失 3078 bp,在第 295 个氨基酸处开始突变;(2) *Plcz1*^{m4}: *Plcz1* 基因第 7 外显子区域缺失 7 bp,在第 356 个氨基酸处开始突变,该小鼠在饲养过程中死亡。(3) *Plcz1*^{m5}: *Plcz1* 基因第 6 外显子区域缺失 1 bp,在第 295 个氨基酸处开始突变。同时预测 *Plcz1*^{m3}、*Plcz1*^{m4} 与 *Plcz1*^{m5}

的等位基因表达产生的截短蛋白结构域(如图 5 所示);*Plcz1*^{m3} 和 *Plcz1*^{m5} 小鼠的 PLC ζ 蛋白在 X 结构域处产生缺失;*Plcz1*^{m4} 小鼠的 PLC ζ 蛋白在 X-Y 连接区产生缺失。

2.3 *Plcz1*^{-/-} 雄性小鼠的生育能力分析

表 3 和表 4 显示了小鼠 *Plcz1*^{m3} 和 *Plcz1*^{m5} 后代的生育能力。结果发现,*Plcz1*^{m3} 和 *Plcz1*^{m5} 雄鼠与野生型雌鼠交配虽然可以产生后代,但与野生型雄鼠(8.5 \pm 1.4)相比,后代数量极显著性降低(*Plcz1*^{m3}: 2.5 \pm 0.5; *Plcz1*^{m5}: 2.3 \pm 1.1)。同时与野生型雄鼠相比(受精率 100%; 后代死亡率 4.7%),*Plcz1*^{m3} 雄鼠受精率 13.3%; *Plcz1*^{m5} 雄鼠受精率 50%, 后代死亡率 24%。*Plcz1*^{m3} 雄鼠和 *Plcz1*^{m3} 雌鼠交配,后代数量极显著性降低(3.0 \pm 2.2), *Plcz1*^{m3} 雄鼠受精率 30%, 后代死亡率高达 100%, 而 *Plcz1*^{m5} 雄鼠与 *Plcz1*^{m5} 雌鼠交配不产生后代。由此可见,*Plcz1*^{m3} 和 *Plcz1*^{m5} 雄鼠可以和不同基因型雌鼠进行交配,但其受精率、出生率以及死亡率均显著性下降。结果表明, *Plcz1*^{-/-} 雄鼠自然交配可以产生后代,但是生育能力显著性下降,同时 *Plcz1*^{m5} 雄鼠较 *Plcz1*^{m3} 雄鼠受精率高,但后代死亡率也高。



注:A:sgRNA6 的测序结果与预测构建的载体的序列比对;B:sgRNA7 的测序结果与预测构建的载体的序列比对。

图 3 载体测序对比图

Note. A, Sequencing results of sgRNA6 were compared with the predicted vector. B, Sequencing results of sgRNA7 were compared with the predicted vector.

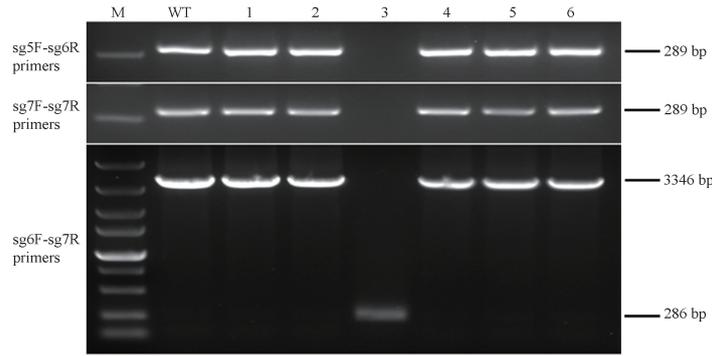
Figure 3 Comparison of vector sequencing

表 3 小鼠 *Plcz1*^{m3} 后代生育能力参数($\bar{x}\pm s$)
Table 3 Fertility parameters of mouse *Plcz1*^{m3} offspring

交配 Crosses 雄性×雌性 Male × Female	受精率(%) Fertilization rate	产仔窝数 Number of litters	每窝产仔数 Litter size	出生小仔死亡率(%) Infant mortality rate
WT(n=6)×WT(n=7)	100.0	10	8.5 \pm 1.4	4.7
Het ^(m3) (n=16)×Het ^(m3) (n=15)	75.0	25	6.3 \pm 1.5***	21.0
Het ^(m3) (n=6)×Mut ^(m3) (n=7)	55.6	9	6.9 \pm 1.5*	16.1
Mut ^(m3) (n=15)×WT(n=15)	13.3	2	2.5 \pm 0.5***	0
Mut ^(m3) (n=17)×Het ^(m3) (n=17)	17.7	3	3.0 \pm 0.8***	0
Mut ^(m3) (n=10)×Mut ^(m3) (n=6)	30.0	3	3.0 \pm 2.2***	100.0

注:与野生型小鼠每窝产仔数相比,* $P<0.05$,*** $P<0.001$ 。

Note. Compared with the litter size of wild-type mouse, * $P<0.05$, *** $P<0.001$.

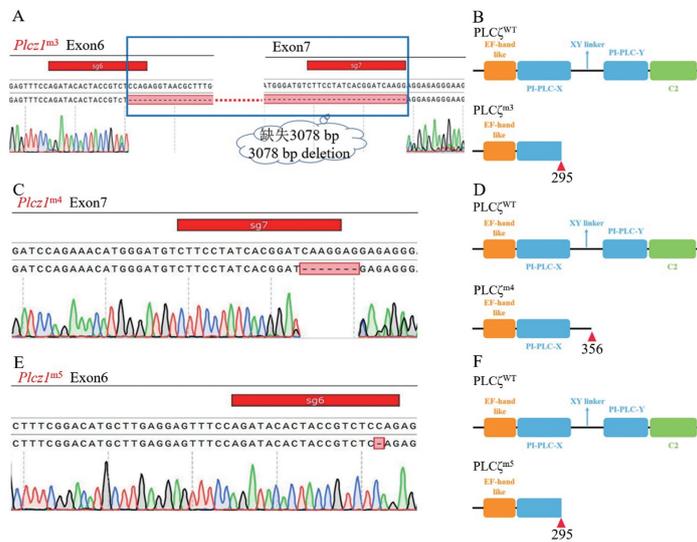


注: M; DL5000 Marker; WT; 野生型; 1~6; 原代小鼠的鼠尾 DNA。

图 4 PCR 法鉴定小鼠 *Plcz1* 基因突变位点

Note. M, DL5000 Marker. WT, Wild type. 1~6, Tail DNA of primary mice.

Figure 4 Identification of mouse *Plcz1* gene mutation site by PCR



注: A、C、E; 野生型 *Plcz1* (*Plcz1*^{WT}) 等位基因和 3 个核苷酸缺失突变 *Plcz1* 等位基因的基因组序列比较, 虚线标红为缺失序列; B、D、F: 预测了野生型小鼠 PLC ζ 蛋白 (PLC ζ ^{WT}) 和突变的 PLC ζ ^{m3} (B)、PLC ζ ^{m4} (D) 以及 PLC ζ ^{m5} (F) 等位基因表达的截短蛋白的结构域。

图 5 小鼠 *Plcz1*^{m3}、*Plcz1*^{m4} 以及 *Plcz1*^{m5} 突变等位基因的表达分析

Note. A, C, E, Comparison of genomic sequences from wild-type *Plcz1* (*Plcz1*^{WT}) allele and three mutant *Plcz1* alleles harbouring nucleotide deletions, the missing sequence is marked red by a dotted line. B, D, F, Predicted protein-domain structures for wild-type mouse PLC ζ protein (PLC ζ ^{WT}) and truncated proteins resulting from expression of mutant PLC ζ ^{m3} (B), PLC ζ ^{m4} (D) and PLC ζ ^{m5} (F) alleles.

Figure 5 Expression analysis of mouse *Plcz1*^{m3}, *Plcz1*^{m4} and *Plcz1*^{m5} mutant alleles

表 4 小鼠 *Plcz1*^{m5} 后代生育能力参数 ($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Fertility parameters of mouse *Plcz1*^{m5} offspring

交配 Crosses 雄性×雌性 Male×Female	受精率 (%) Fertilization rate	产仔窝数 Number of litters	每窝产仔数 Litter size	出生小仔死亡率 (%) Infant mortality rate
WT (n=6) × WT (n=7)	100.0	10	8.5 ± 1.4	4.7
Het ^(m5) (n=10) × Het ^(m5) (n=11)	80.0	13	8.0 ± 2.3	14.4
Het ^(m5) (n=6) × Mut ^(m5) (n=4)	75.0	3	6.7 ± 1.3	10.0
Mut ^(m5) (n=13) × WT (n=22)	50.0	11	2.3 ± 1.1***	24.0
Mut ^(m5) (n=9) × Het ^(m5) (n=10)	18.2	2	2.5 ± 0.5***	0
Mut ^(m5) (n=5) × Mut ^(m5) (n=5)	0	0	0	0

注: 杂合: *Plcz1*^{+/m3} 或 *Plcz1*^{+/m5}; 纯合: 纯合子 *Plcz1*^{m3} 或 *Plcz1*^{m5}; WT; 野生型; 雄性和雌性小鼠之间根据指定的基因型建立交配对。与野生型小鼠每窝产仔数相比, *** $P < 0.001$ 。

Note. Het, *Plcz1*^{+/m3} or *Plcz1*^{+/m5}. Mut, homozygote *Plcz1*^{m3} or *Plcz1*^{m5}. WT, Wild-type. Mating pairs were set up between males and females with genotypes as indicated. Compared with the litter size of wild-type mouse, *** $P < 0.001$.

3 讨论

不孕症是一种影响男性和女性的复杂和多因素的疾病,全球临床数据显示,每 7 对夫妇中就有 1 对经历不孕不育^[13]。即使采用胞浆内单精子注射(ICSI),高达 5%的 ICSI 治疗周期仍然失败,仅在英国每年就有至少 1000 对夫妇受到影响^[14]。目前,卵子激活过程中的缺陷被认为是这一失败的主要来源^[15]。许多临床报告已将人类 PLC ζ 缺陷与卵母细胞激活失败联系在一起,同时某些类型的男性不育与人类精子中 PLC ζ 的异常表达、功能、结构以及定位密切相关^[16]。因此,本研究构建的 *Plcz1* 基因敲除小鼠模型对研究 PLC ζ 在精子和卵母细胞中的表达和功能活性的调控机制,以及找出不孕症的潜在治疗方案具有临床意义。

利用基因组靶向编辑技术制备动物模型是当今研究的热点领域之一。CRISPR/Cas9 系统使用 RNA 引导的核酸酶切割外源基因^[17],相较于其他基因编辑技术,具有易于定制、更高的靶向效率以及促进多重基因组编辑的能力^[18-19],操作更加简单,成本较低^[20]。Sakuma 等^[21]用 CRISPR/Cas9 构建的系统为多重基因组/表观基因组编辑、同时激活/抑制多个基因等提供了有效的靶向策略。Golden Gate 载体构建方法,使构建质粒更加便利^[22]。为保证 CRISPR/Cas9 的切割效率,本研究选择脱靶位点较少、sgRNA 与其互补序列错配率也较少的靶点,且得分较高的靶点,同时也控制 CRISPR/Cas9 的剂量,因为剂量也是影响脱靶突变的另一个因素,最大限度地减少脱靶突变。此外,通过利用 Cas9 与多个 sgRNA 一起使用的优势,可成功地实现 sgRNA 靶点之间的大片段缺失或倒置^[23]。

利用显微注射方法将质粒注射到胚胎原核中^[24],21 d 后,6 只 F0 代小鼠出生,鼠尾 DNA 经过 PCR 后琼脂糖凝胶电泳和测序分析,证明 3 只小鼠有 *Plcz1* 基因缺失,成功构建出 *Plcz1* 基因敲除小鼠模型。野生型或 *Plcz1*^{-/-} 雄性小鼠分别与野生型雌性小鼠交配,结果表明 *Plcz1*^{-/-} 雄性小鼠可以繁育后代,但是与野生型雄性小鼠相比其产仔数量显著性下降,此结果与 Hachem 等^[12]的研究结果相符,为阐明 *Plcz1* 基因突变带来的生殖能力障碍提供理论依据。

目前,研究者越来越重视卵母细胞激活途径的选择与优化,在体外激活卵母细胞的过程中,研究

者往往通过选取不同的激活方式获得动物的胚胎,而卵母细胞的人工激活效率会直接影响胚胎的发育质量。受精时,PLC ζ 作为精子中一种重要的因子在激活卵母细胞第二次减数分裂过程中发挥重要作用。精卵融合后,PLC ζ 通过精子进入卵质,并催化 PIP₂ 水解生成 IP₃。IP₃ 触发的细胞内 Ca²⁺ 释放,产生特有的胞质 Ca²⁺ 振荡,导致卵子激活,从而启动胚胎发育过程。Nomikos 等^[25]证明在表达功能障碍的 PLC ζ 不能激活的卵母细胞中显微注射重组人 PLC ζ ,可以有效地挽救失败的激活,并正常发育至囊胚阶段。在人类生殖过程中,PLC ζ 蛋白缺陷的男性会不育^[26-27]。Hachem 等^[12]首次在哺乳动物上证明,在没有卵母细胞激活的情况下,自然交配和受精可以产生后代,与本文研究结果相符,相较于野生型雄鼠,*Plcz1*^{-/-} 雄鼠在受精率和繁殖率上均有显著性下降,是否存在别的途径激活小鼠体内的卵母细胞还有待商榷,需要对 *Plcz1* 基因敲除小鼠进行深入的机制研究。同时,Dai 等^[28]证明催化结构域变异的精子会受到损害,失去水解 PIP₂ 的功能,导致异常的 Ca²⁺ 振荡,不能激活卵母细胞使受精失败。Unnikrishnan 等^[29]表明 PLC ζ 在精子中的分布在不同物种中存在差异:在人类精子头部的顶体、赤道段和顶体后区域,以及尾部区域;在小鼠精子的顶体和顶体后区域。但是,PLC ζ 的不同结构域调节 PLC ζ 定位的机制,以及对于精子获能的具体作用尚不清楚。

本研究利用 CRISPR/Cas9 系统构建的 *Plcz1* 基因敲除(*Plcz1*^{-/-})小鼠模型,为进一步揭示 *Plcz1* 基因缺失导致的生殖障碍发病机制提供理论依据,同时为治疗生育能力障碍等问题的研究提供了有效的动物模型。但是关于 PLC ζ 的确切作用机制及其在卵母细胞激活过程中的作用程度仍然存在许多问题,所以需要进一步探索。

参考文献:

- [1] Swann K, Saunders CM, Rogers NT, et al. PLC zeta (ζ): a sperm protein that triggers Ca²⁺ oscillations and egg activation in mammals [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2006, 17(2): 264-273.
- [2] Kashir J, Nomikos M, Lai FA, et al. Sperm-induced Ca²⁺ release during egg activation in mammals [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 450(3): 1204-1211.
- [3] Nozawa K, Satouh Y, Fujimoto T, et al. Sperm-borne phospholipase C ζ -1 ensures monospermic fertilization in mice [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 1315.
- [4] Saunders CM, Larman MG, Parrington J, et al. PLC ζ : a sperm-

- specific trigger of Ca^{2+} oscillations in eggs and embryo development [J]. *Development*, 2002, 129(15): 3533.
- [5] Saunders CM, Swann K, Lai FA. PLC ζ , a sperm-specific PLC and its potential role in fertilization [J]. *Biochem Soc Symp*, 2007, 74: 23–36.
- [6] Nomikos M, Stamatiadis P, Sanders JR, et al. Male infertility-linked point mutation reveals a vital binding role for the C2 domain of sperm PLC ζ [J]. *Biochem J*, 2017, 474(6): 1003–1016.
- [7] 纪丽轩, 高玉平. 精源性卵母细胞激活因子的相关机制研究进展 [J]. *中国男科学杂志*, 2021, 35(3): 82–87.
- [8] Nomikos M, Elgmati K, Theodoridou M, et al. Phospholipase C ζ binding to PtdIns(4,5)P2 requires the XY-linker region [J]. *J Cell Sci*, 2011, 124(Pt 15): 2582–2590.
- [9] Ross PJ, Beyhan Z, Iager AE, et al. Parthenogenetic activation of bovine oocytes using bovine and murine phospholipase C ζ [J]. *BMC Dev Biol*, 2008, 8: 16.
- [10] Coward K, Ponting CP, Chang HY, et al. Phospholipase C ζ , the trigger of egg activation in mammals, is present in a non-mammalian species [J]. *Reproduction*, 2005, 130(2): 157–163.
- [11] Yoneda A, Kashima M, Yoshida S, et al. Molecular cloning, testicular postnatal expression, and oocyte-activating potential of porcine phospholipase C ζ [J]. *Reproduction*, 2006, 132(3): 393–401.
- [12] Hachem A, Godwin J, Ruas M, et al. PLCzeta is the physiological trigger of the Ca^{2+} oscillations that induce embryogenesis in mammals but conception can occur in its absence [J]. *Development*, 2017, 144(16): 2914–2924.
- [13] Ramadan WM, Kashir J, Jones C, et al. Oocyte activation and phospholipase C zeta (PLC ζ): diagnostic and therapeutic implications for assisted reproductive technology [J]. *Cell Commun Signal*, 2012, 10(1): 12.
- [14] Kashir J, Heindryckx B, Jones C, et al. Oocyte activation, phospholipase C zeta and human infertility [J]. *Hum Reprod Update*, 2010, 16(6): 690–703.
- [15] Yeste M, Jones C, Amdani SN, et al. Oocyte activation deficiency: a role for an oocyte contribution? [J]. *Hum Reprod Update*, 2016, 22(1): 23–47.
- [16] Amdani SN, Jones C, Coward K. Phospholipase C ζ (PLCzeta): oocyte activation and clinical links to male factor infertility [J]. *Adv Biol Regul*, 2013, 53(3): 292–308.
- [17] 朱佩琪, 蒋伟东, 周诺. CRISPR/Cas9 基因编辑系统的发展及其在医学研究领域的应用 [J]. *中国比较医学杂志*, 2019, 29(2): 116–123.
- [18] Ran FA, Hsu PD, Wright J, et al. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system [J]. *Nat Protoc*, 2013, 8(11): 2281–2308.
- [19] 杨伟莉, 涂著池, 李晓江. CRISPR/Cas9 系统: 构建非人灵长类动物疾病模型的新技术 [J]. *中国比较医学杂志*, 2014, 24(8): 70–74.
- [20] 董健健. 应用 CRISPR/Cas9 技术构建 Wilson 病小鼠模型及其基因治疗研究 [D]. 合肥: 中国科学技术大学, 2021.
- [21] Sakuma T, Nishikawa A, Kume S, et al. Multiplex genome engineering in human cells using all-in-one CRISPR/Cas9 vector system [J]. *Sci Rep*, 2014, 4: 5400.
- [22] 梁龙, 杨华, 杨永林, 等. “Golden Gate” 克隆法构建靶向载体 [J]. *中国生物工程杂志*, 2013, 33(3): 111–116.
- [23] 朱浩然, 张鑫, 祁俊侠, 等. 利用双引导 RNA 的 CRISPR/Cas9 技术构建 Nudt3 基因敲除小鼠 [J]. *南京医科大学学报 (自然科学版)*, 2021, 41(7): 949–955.
- [24] 张茹君, 夏海林, 朱赞, 等. 基于 CRISPR/Cas9 构建小鼠 UOX 基因敲除模型 [J]. *中外医疗*, 2020, 39(7): 32–35.
- [25] Nomikos M, Yu Y, Elgmati K, et al. Phospholipase C ζ rescues failed oocyte activation in a prototype of male factor infertility [J]. *Fertil Steril*, 2013, 99(1): 76–85.
- [26] Yoon SY, Jellerette T, Salicioni AM, et al. Human sperm devoid of PLC, zeta 1 fail to induce Ca^{2+} release and are unable to initiate the first step of embryo development [J]. *J Clin Invest*, 2008, 118(11): 3671–3681.
- [27] Yuan P, Zheng L, Liang H, et al. Novel mutations in the PLCZ1 gene associated with human low or failed fertilization [J]. *Mol Genet Genomic Med*, 2020, 8(10): e1470.
- [28] Dai J, Dai C, Guo J, et al. Novel homozygous variations in PLCZ1 lead to poor or failed fertilization characterized by abnormal localization patterns of PLC ζ in sperm [J]. *Clin Genet*, 2020, 97(2): 347–351.
- [29] Unnikrishnan V, Kastelic JP, Thundathil JC. Ouabain-induced activation of phospholipase C ζ and its contributions to bovine sperm capacitation [J]. *Cell Tissue Res*, 2021, 385(3): 785–801.

[收稿日期] 2021-09-13