

曹愿,杨远松,谷文达,等. 基于 CRISPR/Cas9 系统构建 *Lep* 基因敲除小鼠模型 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(11): 43-49.

Cao Y, Yang YS, Gu WD, et al. Construction of *Lep* gene knockout mouse model based on CRISPR/Cas9 system [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(11): 43-49.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.11.006

# 基于 CRISPR/Cas9 系统构建 *Lep* 基因敲除小鼠模型

曹 愿, 杨远松, 谷文达, 赵皓阳, 翟世杰, 孙晓炜, 范昌发\*

(中国食品药品检定研究院实验动物资源研究所, 国家啮齿类实验动物资源库, 北京 102629)

**【摘要】** 目的 本研究旨在利用 CRISPR/Cas9 系统构建 *Lep* 基因敲除小鼠 (C57BL/6N-*Lep*<sup>em1</sup>/Nifdc, 简称 ob 小鼠), 作为肥胖症、糖尿病等临床疾病体内药物评价的动物模型。方法 根据 CRISPR/Cas9 靶点设计原则, 设计能够靶向小鼠 *Lep* 基因的 sgRNA, 经体外转录, 与 Cas9 mRNA 一并注射入小鼠受精卵。随后提取出生小鼠的鼠尾 DNA, 采用 PCR 检测及测序技术, 得到阳性小鼠。将其与野生型小鼠进行交配传代, 最终获得纯合 ob 小鼠, 并对纯合 ob 小鼠进行血清生化指标检测及肝病理检测。结果 经鉴定, 共得到 8 只阳性小鼠, 经筛选传代, 得到能够稳定遗传的阳性小鼠。纯合 ob 小鼠的血清生化指标甘油三酯 (triglycerides, TG)、总胆固醇 (total cholesterol, TC)、谷丙转氨酶 (alanine aminotransferase, ALT) 含量均显著高于野生型小鼠。肝病理检测结果表明, 纯合 ob 小鼠的肝中存在明显的炎症浸润及脂肪空泡样病变。结论 成功建立 *Lep* 基因敲除小鼠, 丰富了国家啮齿类实验动物资源库, 为药物临床前评价提供了动物模型支持。

**【关键词】** 基因敲除; ob 小鼠; CRISPR/Cas9 技术; *Lep* 基因

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 11-0043-07

## Construction of *Lep* gene knockout mouse model based on CRISPR/Cas9 system

CAO Yuan, YANG Yuansong, GU Wenda, ZHAO Haoyang, ZHAI Shijie, SUN Xiaowei, FAN Changfa\*

(Division of Animal Model Research, National Rodent Laboratory Animal Resources Center, Institute for Laboratory Animal Resources, National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 102629, China)

**【Abstract】 Objective** We generated ob mice (C57BL/6N-*Lep*<sup>em1</sup>/Nifdc) with *Lep* gene knockout (ob/ob) using the CRISPR/Cas9 system, to establish a suitable animal model for preclinical drug evaluation for clinical diseases such as diabetes. **Methods** According to the principle of CRISPR/Cas9 target design, single guide RNA targeting the mouse *Lep* gene was designed for transcription *in vitro*, and microinjected with Cas9 mRNA into mouse zygotes. Mouse tail DNA was extracted and detected by polymerase chain reaction and sequencing, followed by mating of positive and wild-type mice. Blood biochemistry and liver pathology were assessed in homozygous ob mice. **Results** Eight positive mice were identified and a stable mouse strain was selected for further breeding. Serum triglycerides, total cholesterol, and alanine aminotransferase levels were significantly higher in homozygous ob mice than in wild-type mice, and liver pathology showed inflammatory infiltration and lipid vacuolar transformations. **Conclusions** We successfully established a *Lep* gene knockout mouse model, which will provide an important addition to the national rodent experimental animal database and an animal model for preclinical drug evaluation.

**【Keywords】** knockout; ob mouse; CRISPR/Cas9 technology; *Lep* gene

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

**【基金项目】** 药品监管科学全国重点实验室课题 (2023SKLDRS0124)。

**【作者简介】** 曹愿 (1990—), 女, 硕士, 助理研究员, 研究方向: 模型动物构建。E-mail: 18810961171@163.com

**【通信作者】** 范昌发 (1970—), 男, 博士, 研究员, 研究方向: 疾病动物模型研究。E-mail: fanfc@nifdc.org.cn

基因编辑能够精确操控细胞 DNA 序列,并改变生物体特征,成为研究人类疾病的重要手段<sup>[1]</sup>。其中,遗传修饰动物模型是研究人类疾病的重要工具。到目前为止,关于遗传修饰动物模型构建的方法多种多样,包括 ES 细胞打靶、转录激活因子效应物核酸酶 (transcription activator-like effector nucleases, TALEN)、锌指核酸酶 (zinc-finger nucleases, ZFN)、CRISPR/Cas (clustered regulatory interspaced short palindromic repeat/Cas) 等内切酶系统,其中,利用 CRSIPR/Cas9 技术构建的基因编辑动物模型具有高效且快速的特点,已经成为模型构建的常用策略<sup>[2-4]</sup>。

瘦素 (leptin) 是一种由脂肪组织分泌的激素,能够维持机体能量稳态,与哺乳动物体重调节密切相关<sup>[5]</sup>。瘦素基因 (*Lep*, *ob*) 位于 6 号染色体,在 1994 年由 Friedman 教授团队率先克隆<sup>[6]</sup>,这一重大发现让人们认识到肥胖和基因的密切关系。最新的文献表明肥胖与胰岛素抵抗相关,尤其是与 2 型糖尿病这一全球普遍存在、患病率逐年攀升的慢性代谢性疾病密切相关<sup>[7-8]</sup>。因此,肥胖及能量代谢成为研究 2 型糖尿病机制的热点之一。本文利用 CRSIPR/Cas9 技术构建 *Lep* 基因敲除小鼠模型 (简称 *ob* 小鼠),为进一步开发和评价肥胖症相关代谢性疾病临床前药物提供良好的动物模型。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

SPF 级 4~6 周龄雌性 C57BL/6N 小鼠,体重 13~18 g,来自中国食品药品检定研究院 [SCXK (京) 2022-0002],饲养于中国食品药品检定研究院实验动物资源研究所 SPF 级屏障环境中 [SYXK (京) 2021-0019]。饲养期间给予小鼠标准饲料及洁净饮用水 (饲料购自北京科奥公司,饮用水由本单位经高压灭菌制备)。饲养环境:温度控制于 18~26 °C,湿度恒定,自动光控 (昼夜各半交替)。本实验所有操作均符合本单位实验动物伦理学要求 (中检动 (福) 第 2024 (B) 016 号),遵循 3R 原则。

### 1.2 主要试剂与仪器

Cas9 转录试剂盒、MEGA shortscript T7 high yield transcription kit、MEGA clear transcription clean-up kit、mMESSAGE、mMESSAGE T7 transcription kit、Poly (A) tailing kit 均购自美国 Life Technologies 公司;胶回收试剂盒、RNeasy mini kit 购自德国 Qiagen

公司;TRIzol、RT-PCR 试剂盒、TB Green Premix Ex TaqII 荧光定量 PCR 试剂盒、琼脂糖购自日本 TaKaRa 公司;胚胎操作液和透明质酸酶购自美国 Sigma 公司;绒毛膜促性腺激素购自宁波第二激素厂;其他常用化学试剂如苯、乙醇等购自北京化学工业集团有限公司;所有引物均由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成;血液指标测定相关试剂盒 (TC *in vitro* diagnostic kit、TG *in vitro* diagnostic kit、ALT/GPT *in vitro* diagnostic kit) 均购自中生北控 Biosino 公司。

Roche 480II 荧光定量 PCR 仪 (Roche 公司,瑞士);Nano Drop 超微量分光光度计 (Thermo Fisher 公司,美国);电子天平 (Sartorius, 德国);离心机 (Thermo Fisher 公司,美国);显微注射仪 (Eppendorf 公司,德国);PCR 仪 (ABI 公司,美国);全自动生化分析仪 (OLYMPUS 公司,日本);病理切片扫描仪 (HAMAMATSU 公司,日本)。

## 1.3 实验方法

### 1.3.1 sgRNA 的体外合成及转录

根据 Genbank 报道的小鼠 *Lep* 基因序列,确定切割位点位于外显子 3 区域 (图 1A)。根据 <https://portals.broadinstitute.org/gppx/crispick/public> 在线软件进行预测,选择综合评分最高的作为目标 sgRNA 序列,即 sgRNA f 和 sgRNA r (见表 1)。设计好的引物合成之后,进行退火,将其连接至 BbsI 酶切 pT7 质粒上,然后克隆转化,次日挑取 2 个菌落进行质粒提取,并进行测序验证。然后以测序正确的 sgRNA 质粒为模板,引物 T7 f/T7 r (见表 1) 进行 PCR 扩增。PCR 条件:95 °C 5 min;95 °C 30 s,55 °C 30 s,72 °C 15 s,共 30 个循环。然后,加入 2 倍体积无水乙醇,12 000 r/min 离心 10 min,弃去上清,加入 500 μL 70% 乙醇清洗 2 次,然后将沉淀溶解于 30 μL RNase free 水中。使用 MEGA shortscript T7 high yield transcription kit 进行体外转录,37 °C 孵育 4 h,然后加入 TURBO DNase 消化 20 min,最后使用 MEGA clear transcription clean-up kit 对产物进行纯化,纯化后对产物进行浓度测定并分装,于 -80 °C 保存<sup>[4]</sup>。

### 1.3.2 Cas9 mRNA 的体外转录

以 px330 质粒为模板,采用 HindIII 酶进行酶切,跑胶回收后,最终加入 30 μL RNase free 水溶解。以回收产物为模板,利用 mMESSAGE、mMESSAGE T7 transcription kit 进行体外转录,37 °C

孵育 2 h, 然后加入 TURBO DNase 消化 20 min, 再使用 Poly(A) tailing kit 加尾 50 min, 最后使用 RNeasy mini kit 对产物进行纯化, 纯化后对产物进行浓度测定并分装, 于  $-80^{\circ}\text{C}$  保存。

### 1.3.3 显微注射及胚胎移植

6 周龄 C57BL/6N 雌性小鼠超数排卵后与雄鼠合笼, 挑选见栓雌鼠, 剖开腹腔, 在输卵管壶腹部收集受精卵细胞。将构建好的 sgRNA 和 Cas9 mRNA 置于冰上解冻, 混合浓度为 sgRNA  $50\text{ ng}/\mu\text{L}$ , Cas9 mRNA  $100\text{ ng}/\mu\text{L}$ ,  $13\ 000\text{ r}/\text{min}$  离心 40 min, 吸取上清。用口吸管吸取液体从注射针后端注入尖端, 进行显微注射。将操作成功的囊胚放入胚胎培养液中,  $37^{\circ}\text{C}$ ,  $5\% \text{ CO}_2$  培养 30~60 min, 随后尽快移植到假孕母鼠的子宫内, 缝合后将移植鼠饲养于 IVC 环境中。

### 1.3.4 $F_0$ 代新生小鼠和 $F_1$ 代小鼠的基因型鉴定

对所有出生小鼠进行剪尾, 提取 DNA 后, 取  $100\text{ ng}$  DNA 进行 PCR, 扩增引物 F/R 见表 1, 扩增条件:  $95^{\circ}\text{C}$  5 min;  $95^{\circ}\text{C}$  20 s,  $62^{\circ}\text{C}$  30 s,  $72^{\circ}\text{C}$  60 s/kb, 35 个循环;  $72^{\circ}\text{C}$  10 min。将扩增产物送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序, 测序引物为 F/R (见表 1)。得到阳性鼠后, 将其与野生型 C57BL/6N 小鼠进行交配, 得到的  $F_1$  采用同样的方法进行鉴定。

### 1.3.5 荧光定量 PCR 法检测基因表达水平

取  $50\text{ mg}$  左右小鼠组织, TRIzol 法提取纯合 ob 小鼠和野生型 C57BL/6N 小鼠的心脏、肝、脾、肺、肾、脑、白色脂肪组织的总 RNA, 反转录 PCR 获得 cDNA, 以 cDNA 为模版进行检测。扩增引物: 上游序列  $5' - \text{AGCAGTCCGGTATCCGCCAAGC} - 3'$ , 下游序列  $5' - \text{GATAGACTGCCAGAGT} - 3'$ , 小鼠 GAPDH 基因作为内参, 内参引物序列信息为: 上游序列  $5' - \text{CAGCAACTCCCCTCTTCCAC} - 3'$ , 下游序列  $5' - \text{TGGTCCAGGGTTTCTTACTC} - 3'$ 。扩增条件:  $95^{\circ}\text{C}$  30 s;  $95^{\circ}\text{C}$  15 s,  $61^{\circ}\text{C}$  30 s, 40 个循环;  $4^{\circ}\text{C}$   $\infty$ 。每组 3 个样本, 每个样本设置 3 个复孔。数据分析以

表 1 PCR 引物序列

Table 1 Primer sequences for PCR

引物名称 Primers name	引物序列(5'-3') Primer sequences (5'-3')
sgRNA f	TAGGCTCAAGATGGACCAGACTC
sgRNA r	AAACGAGTCTGGTCCATCTTGGAC
T7 f	TGACGGGACGGCGGCTTTGT
T7 r	AAAAGCACCGACTCGGTGCCACTT
F	TCTGATAAGGGCAGGAGGCT
R	ATGGATGTGTGCACATGCTCTCTT

$Lep/\text{GAPDH}$  比值计算: 先将内参基因均一化, 即目的基因平均 Ct 值-内参基因平均 Ct 值 =  $\Delta\text{Ct}$ ; 然后将模型样本和对照样本比较:  $\Delta\text{Ct}$  模型样本 -  $\Delta\text{Ct}$  对照样本 =  $\Delta\Delta\text{Ct}$ , 最后倍数变化  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  即为  $Lep/\text{GAPDH}$  比值。

### 1.3.6 血液指标检测

小鼠麻醉后, 腹主动脉取血于  $1.5\text{ mL}$  抗凝管中, 用全自动生化分析仪检测血浆中的甘油三酯 (triglycerides, TG)、总胆固醇 (total cholesterol, TC)、丙氨酸转氨酶 (alanine aminotransferase, ALT)。

### 1.3.7 肝组织病理学检测

小鼠麻醉后, 取肝组织, 甲醛溶液固定, 进行苏木精-伊红染色 (hematoxylin-eosin staining, HE) 及油红 O 染色。HE 染色: 乙醇梯度脱水, 二甲苯透明, 切片, 行 HE 染色。油红 O 染色: 加  $60\%$  异丙醇浸洗后, 加入改良油红 O 染色液, 密闭染色 10~15 min,  $60\%$  乙醇分化后水洗, 使用 Harris 淡染, 再次水洗后贴敷于载玻片, 甘油明胶封固。最后使用病理切片扫描仪进行图像扫描分析。

## 1.4 统计学方法

采用 Graphpad Prism 7.0 进行统计, 数据表示为平均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ), One-Way ANOVA 方法分析数据, 以  $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

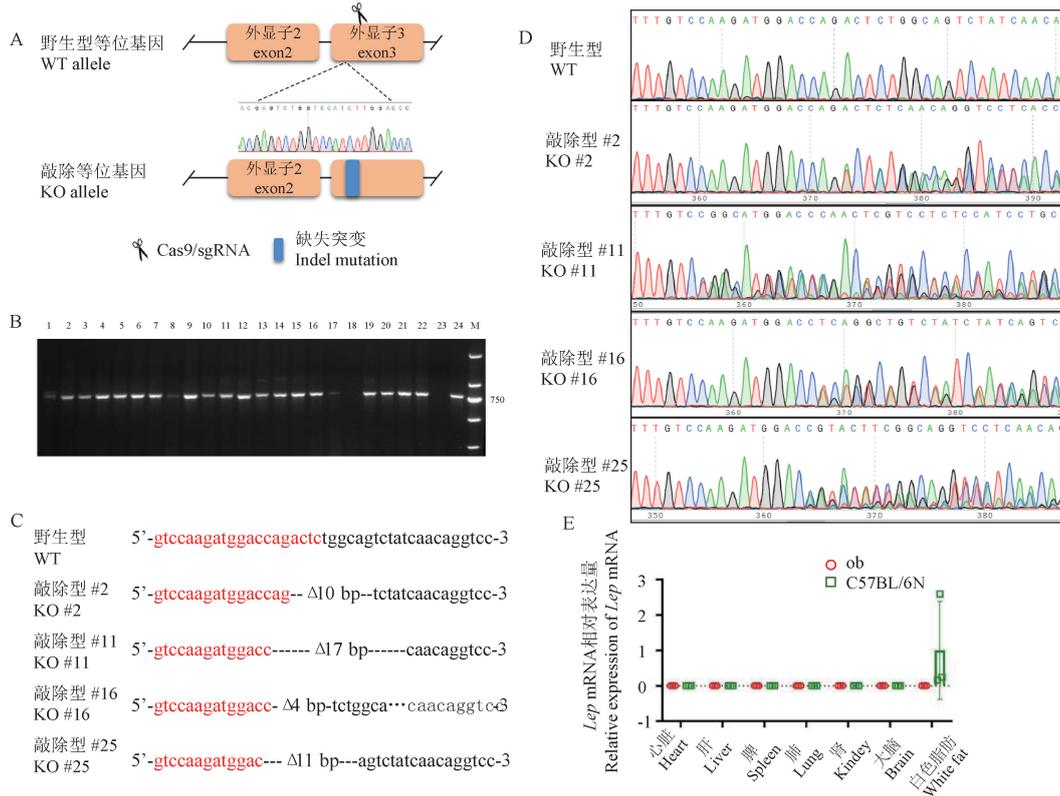
### 2.1 阳性小鼠的获得

$Lep$  基因位于小鼠 6 号染色体, 共 2 个转录本 (Ensembl: ENSMUSG00000059201)。首先在  $Lep$  基因 3 号外显子处选取长度为  $250\text{ bp}$  的序列, 然后利用在线预测软件针对这  $250\text{ bp}$  序列进行 sgRNA 设计。根据评估, 选择综合评分最高的 sgRNA 作为靶序列。 $Lep$  基因敲除小鼠构建策略及 sgRNA 的切割位点如图 1A。

本研究共进行了两批次显微注射, 注射胚胎 205 枚, 出生 83 只小鼠 (表 2)。对出生仔鼠鼠尾进行基因型鉴定, 野生型小鼠的目标片段为  $736\text{ bp}$ , 经测序验证, 共获得 8 只  $F_0$  小鼠, 部分结果如图所示 (图 1B~1D)。在后续繁殖过程中, 排除小鼠发育出现异常情况导致无法正常传代外, 只保留  $F_0\#2$  小鼠传代繁殖, 命名为 C57BL/6N- $Lep^{em1}/Nifdc$  (简称 ob 小鼠)。采用 RT-PCR 技术检测纯合 ob 小鼠和野生型 C57BL/6N 小鼠的心脏、肝、脾、肺、肾、大脑、白色脂肪组织中  $Lep$  基因的表达, 结果显示  $Lep$  基因仅

表 2 显微注射情况  
Table 2 Microinjection results

批次 Batch	品系 Strain	移植胚胎/n Transferred zygotes	出生小鼠/n Pups born	首建鼠/n Founder
1	C57BL/6N	80	43	4
2	C57BL/6N	125	40	4



注: A: *Lep* 基因敲除小鼠策略及 sgRNA 的切割位点示意图; B: 基因型鉴定结果; C、D: 部分测序结果, 红色表示 sgRNA 序列; E: *Lep* mRNA 表达水平。WT: 野生型; KO: 敲除型。

图 1 ob 小鼠的构建策略及鉴定结果

Note. A, Schematic diagram of *Lep* gene knockout mouse of cleavage site of sgRNA. B, Genotype results. C/D, Partial sequencing results, Red indicates sgRNA sequence. E, Relative expression of *Lep* RNA. WT, Wild-type; KO, Knock out.

Figure 1 Construction strategy and identification results of ob mice

在野生型 C57BL/6N 小鼠的白色脂肪组织中存在表达,而在 ob 小鼠中无表达(图 1E),说明 *Lep* 基因敲除成功。

## 2.2 ob 小鼠体重的变化

如图 2 所示,在正常饲料饲养条件下,与野生型 C57BL/6N 小鼠相比,纯合 ob 小鼠形态肥胖,屁股肥大,腿短。4~8 周龄的 ob 小鼠体重远高于同周龄的野生型小鼠,且体重随时间呈现稳步上升趋势,8 周龄 ob 小鼠与同周龄野生型小鼠相比,体重增加 2~3 倍。

## 2.3 ob 小鼠血生化测定结果

TG 和 TC 是动脉粥样硬化疾病检测的基本指

标。TG 主要存在于脂肪组织中,原发性或继发性高脂蛋白血症、动脉粥样硬化、糖尿病及肾病综合征等都可使血液中 TG 含量增高。TC 主要与动脉粥样硬化的形成有关。丙氨酸转氨酶(ALT)主要存在于肝细胞中,当肝细胞受损时,ALT 释放入血,使血液中含量升高。对 8 周龄 ob 小鼠血生化检测结果显示,纯合 ob 小鼠血浆中 TG ( $P < 0.01$ )、TC ( $P < 0.001$ ) 显著高于野生型小鼠,说明 ob 小鼠出现了高脂血症;纯合 ob 小鼠血浆中 ALT ( $P < 0.001$ ) 显著高于野生型小鼠,表明 ob 小鼠出现了肝功能异常;而杂合 ob 小鼠与野生型小鼠相比,TG、TC、ALT 含量等均无明显差异,如图 3。

## 2.4 肝组织切片结果

如图 4 所示,对小鼠肝组织进行 HE 染色和油红 O 染色。HE 染色结果显示,野生型 C57BL/6N 小鼠肝细胞结构完整、排列紧密,肝小叶轮廓清晰;

ob 小鼠肝细胞排列疏松,体积大,炎性细胞增多,肝组织出现大面积的空泡样变,甚至存在许多的大泡样变,说明肝组织出现异常。油红 O 染色结果显示,野生型 C57BL/6N 小鼠肝组织未发生脂质沉积;

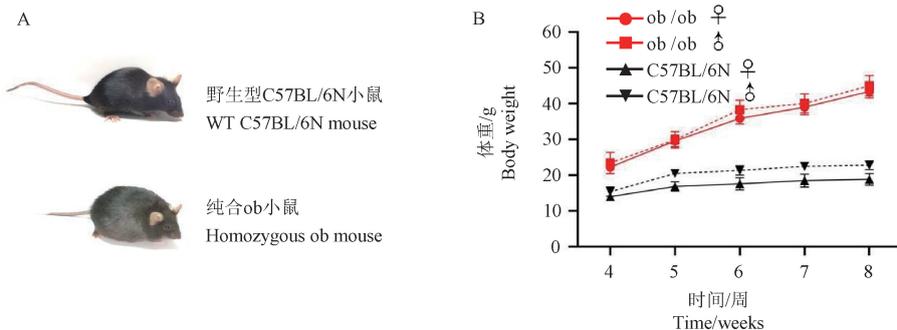
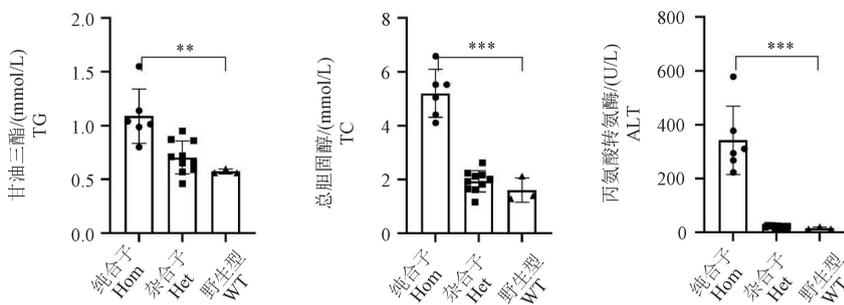


图 2 纯合 ob 小鼠形态(8 周)及体重变化曲线(n=5)

Figure 2 Appearance of 8 weeks homozygous ob mouse and the change curve of ob mice average weight



注:与 WT 相比, \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ 。

图 3 8 周 ob 小鼠的血生化检测结果(n=3~10)

Note. Compared with WT group, \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ .

Figure 3 Biochemical results of 8 weeks ob mice

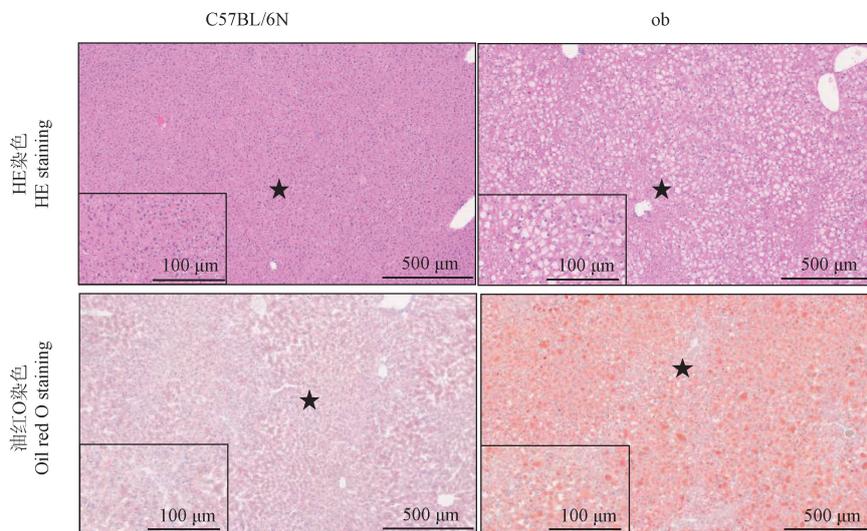


图 4 ob 小鼠的肝病理结果

Figure 4 Representative histopathological result in the liver of ob mice

ob 小鼠肝组织存在大面积脂质沉积,肝细胞中充斥着被染成红色的大颗粒脂滴,肝脂肪变严重,同时表现出弥漫性脂肪泡分布,与 HE 染色结果一致,说明 ob 小鼠肝发生脂质化及脂肪变性。

### 3 讨论

CRISPR 相关基因编辑技术是目前最为热门的基因编辑工具之一,广泛应用于模型动物制作。自 2013 年以来,CRISPR 技术的研究呈爆发式增长,受到越来越多的关注。该技术的发展实现了哺乳动物基因组的改变或修饰<sup>[9-10]</sup>。其主要原理如下:在 sgRNA 的引导下,Cas9 被定位至邻近宿主间隔序列 (protospacer adjacent motif, PAM) 序列的特定位置,导致双链断裂。当存在外源性 DNA 模板时,通过同源定向修复 (homology-directed repair, HDR) 产生新的基因重组;而在没有外源模板的情况下,通过非同源末端连接 (non-homologous end-joining, NHEJ) 在靶位点产生片段的缺失、插入或移码突变<sup>[11]</sup>。使用 CRISPR/Cas9 技术在临床中的应用潜力巨大,特别是在基因治疗方面,即对患者特异性突变进行基因编辑,或者传统疗法无法治疗的人类疾病方面<sup>[12]</sup>。在过去几年里,基因编辑作为一种治疗多种疾病的通用技术已经取得了相当大的进步,并且大大增加了在真核细胞基因组中修复和操纵的能力<sup>[13-14]</sup>。本研究采用 CRISPR/Cas9 技术建立了 *Lep* 基因敲除小鼠模型 (简称 ob 小鼠),经过验证,确定该基因成功敲除,建立了能够稳定遗传的 ob 小鼠种群。

瘦素基因 (*Lep*) 突变会导致瘦素缺失,瘦素受体不能接收信号,导致该小鼠长期处于“零脂肪低能量状态”,表现出极强的食欲;同时由于自身能量代谢和脂肪分解被抑制,结果导致小鼠体内蓄积数倍于正常小鼠的脂肪,最终导致小鼠异常肥胖<sup>[15]</sup>。第一只 ob 小鼠是 1949 年 Jackson 实验室发现的,属于隐性突变,且纯合子不育。这种突变小鼠在生长过程中体重迅速增加,甚至达到未突变小鼠的 4 倍<sup>[16]</sup>。本研究构建的 ob 小鼠模型也具有相同的表现,8 周龄 ob 小鼠与同周龄野生型小鼠相比,体重增加 2~3 倍。据报道,瘦素主要在白色脂肪组织中高表达,在其他组织中不表达或表达极低<sup>[17]</sup>,敲除该基因后,白色脂肪组织不表达瘦素,引发 ob 小鼠的高血脂和肝功能异常,并且在繁育过程中,雌性纯合子小鼠由于下丘脑-垂体水平的激素不足导

致生育异常,与文献报道一致<sup>[16,18-21]</sup>。此外,除了肥胖,ob 小鼠的主要特征还包括高摄食量、高脂、高胰岛素血症、高血糖、胰岛素抵抗和性腺功能不全<sup>[22]</sup>,这些特征使得 ob 小鼠被广泛用于肥胖症、糖尿病等的研究。另有文献报道,ob 小鼠可作为非酒精性脂肪肝动物模型,为药品研发及疾病发病机制提供背景资料和参考<sup>[23]</sup>。

目前,国际上仅有一篇关于 *Lep* 基因敲除小鼠模型的报道<sup>[24]</sup>,而国内虽然有公司研发了此模型,但未见相应的文章报道。本研究是中国食品药品检定研究院自主建立的基于 CRISPR/Cas9 技术的基因敲除小鼠模型,为研究肥胖症、糖尿病及相关并发症的研究提供了动物模型,并且进一步丰富国家啮齿类实验动物资源库,具有广泛的应用前景。

### 参考文献:

- [1] DOUDNA J A. The promise and challenge of therapeutic genome editing [J]. *Nature*, 2020, 578(7794): 229-236.
- [2] GAJ T, GERSBACH C A, BARBAS C F. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering [J]. *Trends Biotechnol*, 2013, 31(7): 397-405.
- [3] 吴曦, 霍桂桃, 刘甦苏, 等. 利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术建立 *FcγR* 基因大片段敲除小鼠模型 [J]. *中国实验动物学报*, 2019, 27(5): 583-591.  
WU X, HUO G T, LIU S S, et al. Establishment of a large fragment *FcγR* gene knockout mouse model using CRISPR/Cas9 genome editing technique [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2019, 27(5): 583-591.
- [4] 吴曦, 周舒雅, 刘甦苏, 等. 高效切割 *Hipp11* 敲入位点的 sgRNA 设计及活性验证 [J]. *实验动物科学*, 2015, 32(5): 26-30.  
WU X, ZHOU S Y, LIU S S, et al. Designation and activity verification of high efficiency sgRNAs for *Hipp11* locus [J]. *Lab Anim Sci*, 2015, 32(5): 26-30.
- [5] FRIEDMAN J M, HALAAS J L. Leptin and the regulation of body weight in mammals [J]. *Nature*, 1998, 395(6704): 763-770.
- [6] ZHANG Y, PROENCA R, MAFFEI M, et al. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue [J]. *Nature*, 1994, 372(6505): 425-432.
- [7] KAHN S E, HULL R L, UTZSCHNEIDER K M. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes [J]. *Nature*, 2006, 444(7121): 840-846.
- [8] FATUMO S. Including diverse populations enhances the discovery of type 2 diabetes loci [J]. *Nat Rev Genet*, 2024, 25(2): 82.
- [9] KOMOR A C, BADRAN A H, LIU D R. CRISPR-based technologies for the manipulation of eukaryotic genomes [J]. *Cell*, 2017, 169(3): 559.

- [10] LI T, YANG Y, QI H, et al. CRISPR/Cas9 therapeutics: progress and prospects [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2023, 8(1): 36.
- [11] MALI P, ESVELT K M, CHURCH G M. Cas9 as a versatile tool for engineering biology [J]. *Nat Methods*, 2013, 10(10): 957-963.
- [12] GARVÍ E S, ÖKTEM M, MASEREEUW R, et al. Gene surgery: a potential CRISPR/cas-based treatment option for nephropathic cystinosis *in vitro* [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2022, 33(11S): 37.
- [13] COX D B, PLATT R J, ZHANG F. Therapeutic genome editing: prospects and challenges [J]. *Nat Med*, 2015, 21(2): 121-131.
- [14] SYDING L A, NICKL P, KASPAREK P, et al. CRISPR/Cas9 epigenome editing potential for rare imprinting diseases: a review [J]. *Cells*, 2020, 9(4): 993.
- [15] PELLEYMOUNTER M A, CULLEN M J, BAKER M B, et al. Effects of the obese gene product on body weight regulation in *ob/ob* mice [J]. *Science*, 1995, 269(5223): 540-543.
- [16] INGALLS A M, DICKIE M M, SNELL G D. Obese, a new mutation in the house mouse [J]. *J Hered*, 1950, 41(12): 317-318.
- [17] BRAY G A, YORK D A. Hypothalamic and genetic obesity in experimental animals: an autonomic and endocrine hypothesis [J]. *Physiol Rev*, 1979, 59(3): 719-809.
- [18] SWERDLOFF R S, BATT R A, BRAY G A. Reproductive hormonal function in the genetically obese (*ob/ob*) mouse [J]. *Endocrinology*, 1976, 98(6): 1359-1364.
- [19] LANE P W. The pituitary-gonad response of genetically obese mice in parabiosis with thin and obese siblings [J]. *Endocrinology*, 1959, 65: 863-868.
- [20] RUNNER M N, ROSCOE B. Inherited hypofunction of the female pituitary in the sterile-obese syndrome in the mouse [J]. *Genetics*, 1954, 39: 990-991.
- [21] DRASHER M L, DICKE M W, LANE P W. Physiological differences in uteri of obese stock mice [J]. *J Hered*, 1955, 46(5): 209-212.
- [22] CHEHAB F F, LIM M E, LU R. Correction of the sterility defect in homozygous obese female mice by treatment with the human recombinant leptin [J]. *Nat Genet*, 1996, 12(3): 318-320.
- [23] 薛欣, 李玉梅, 陈冰, 等. 瘦素缺陷型 *ob/ob* 小鼠和 C57BL/6J 小鼠生物学特性的对比研究 [J]. *中国医科大学学报*, 2015, 44(11): 983-986.
- XUE X, LI Y M, CHEN B, et al. Comparative study of biological characteristics between leptin defect *ob/ob* mice and C57BL/6J wild-type mice [J]. *J Chin Med Univ*, 2015, 44(11): 983-986.
- [24] ROH J I, LEE J, PARK S U, et al. CRISPR-Cas9-mediated generation of obese and diabetic mouse models [J]. *Exp Anim*, 2018, 67(2): 229-237.

〔收稿日期〕2024-06-03