

果蝇睾丸基因敲除突变体的构建及表型分析

唐浚博¹, 曹浩伟¹, 许蕊¹, 张丹丹¹, 黄娟^{1,2}

1. 南京医科大学基础医学院, 南京 211166

2. 南京医科大学生殖医学国家重点实验室, 南京 211166

摘要: 生殖系统功能的正常维持是物种繁衍的基础, 需要多基因协同作用, 但其中许多基因的具体功能和作用机制并不清楚。本研究选取了果蝇(*Drosophila melanogaster*)中 8 个在睾丸中表达、功能未知且与人(*Homo sapiens*)和小鼠(*Mus musculus*)高度同源的基因(*CG4161*、*CG11475*、*CG2921*、*CG10541*、*CG7276*、*CG3800*、*CG8117* 和 *CG16779*), 分析了它们在不同组织中的表达水平, 并分别检测了它们在雄性生殖系统中的功能。在这 8 个基因中, 前 5 个为睾丸优势表达基因, 其余 3 个为全身性表达。首先, 利用 CRISPR/Cas9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated protein 9) 技术结合同源定向修复(homology-directed repair, HDR)在果蝇中对 8 个候选基因逐一进行敲除, 建立了纯合的基因敲除突变品系; 然后对这些品系的雄蝇进行了生育力测试及睾丸细胞学观察。结果显示, *CG7276* 和 *CG3800* 基因敲除果蝇出现部分雄蝇不育且可育雄蝇后代数量较野生型显著下降。睾丸解剖观察显示 *CG7276* 和 *CG3800* 的功能缺失可导致雄蝇分别出现不同程度的精囊缩小及精原干细胞减少和细胞分布混乱; 染色结果也提示 *CG7276* 和 *CG3800* 在精子的成熟过程中发挥一定作用。其他 6 个基因突变并未导致雄蝇育性变化或睾丸形态异常。这些突变体的获得及表型的初步分析为进一步研究基因功能及机制提供了良好的动物模型及基础。

关键词: 睾丸; CRISPR/Cas9; 果蝇; 基因敲除

Mutant generation of the testis genes and phenotype analyses in *Drosophila*

Junbo Tang¹, Haowei Cao¹, Rui Xu¹, Dandan Zhang¹, Juan Huang^{1,2}

1. School of Basic Medical Sciences, Nanjing Medical University, Nanjing 211166, China

2. State key laboratory of reproductive medicine, Nanjing Medical University, Nanjing 211166, China

Abstract: Multiple genes work together to maintain the normal functions of the reproductive system. However, for many of these genes, little is known about their specific functions and mechanisms. In the present study, eight *Drosophila* genes, including *CG4161*, *CG11475*, *CG2921*, *CG10541*, *CG7276*, *CG3800*, *CG8117* and *CG16779*, were selected for detailed

收稿日期: 2018-03-02; 修回日期: 2018-04-27

基金项目: 南京医科大学引进人才启动经费(编号: 2012RC04)和生殖医学国家重点实验室开放课题资助[Supported by the Start-up Foundation from Nanjing Medical University (No. 2012RC04) and Funding of State Key Laboratory of Reproductive Medicine]

作者简介: 唐浚博, 硕士研究生, 专业方向: 雄性生殖。E-mail: twg0312@hotmail.com

通讯作者: 黄娟, 博士, 教授, 研究方向: 生殖生物学。E-mail: huangjuan@njmu.edu.cn

DOI: 10.16288/j.ycz.18-055

网络出版时间: 2018/5/14 8:43:24

URI: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20180514.0843.001.html>

studies based on their testis expression, undefined functions, and having highly homologous and conserved genes in humans (*Homo sapiens*) and mouse (*Mus musculus*). We analyzed their expression levels in different tissues, and determined their probably functions in male reproduction. The results showed that the first five genes were mainly expressed in testis, while other three showed ubiquitous expression in all tissues examined. Using the CRISPR/Cas9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated protein 9) and homology-directed repair (HDR) strategies, we have systematically generated the mutants of these genes and studied their functions in male reproduction. Loss of function of *CG7276* and *CG3800* resulted in partial sterility and reduction of the offspring number, while other genes showed no significant impact on fertility. *CG7276*^{-/-} and *CG3800*^{-/-} mutants were partial sterile and showed various types of abnormalities, including seminal vesicle atrophy, spermatogonial stem cell reduction and cellular distribution disorders. Results of DNA and F-actin staining also indicated that *CG7276* and *CG3800* could play important roles in spermiogenesis. The establishments of these mutants have provided means to unravel the functions and mechanisms of these genes in animal models.

Keywords: testis; CRISPR/Cas9; drosophila; gene knockout

雄性动物生殖系统的发育需要许多基因的参与并共同发挥作用。这些基因功能的异常会直接影响睾丸的发育及精子的成熟,最终导致育性的变化^[1-7]。因此,对这些基因的功能研究有助于人们了解精子发生机制并为诊断和治疗不育症提供理论基础。

果蝇与人类的精子发生过程有诸多相似之处,可大致分为精原干细胞有丝分裂、精母细胞减数分裂和精子形成 3 个阶段^[8]。同时,果蝇与人的基因在序列、结构和功能上具有很高的保守性,人类睾丸发育、精细胞分化、减数分裂和精子形成等过程相关的很多基因在果蝇中有同源基因^[9]。例如,*dBoule* 是保守的 *DAZ* 家族在果蝇中的成员,编码 RNA 结合蛋白,并在睾丸中优势表达;其功能缺失会引起精母细胞减数分裂阻滞,进而造成精子的缺乏;在果蝇突变体中过表达它的人类同源基因 *hBoule* 却可以挽救精子减数分裂的缺陷^[10]。果蝇中 *U2A* 参与 mRNA 的剪接,其突变可导致有丝分裂后的精原细胞无法分化为精母细胞及成熟精子,从而造成不育,而在突变体中表达其人类同源基因 *SNRPA1* 可使果蝇恢复育性^[11]。果蝇和人类基因在功能上的相似性使得果蝇成为研究人类基因功能的良好材料。此外,果蝇还具有生殖周期短、生殖系统简单、易于进行遗传学操作等特点,因此,近年来果蝇在生殖生物学的研究中发挥了重要的作用。

尽管已有的研究已经揭示了很多基因在雄性生殖系统中的功能,但仍有大量基因功能未知,有待

进一步研究。目前,CRISPR/Cas9(clustered regularly interspaced short palindromic repeats/ CRISPR-associated protein 9)技术的应用为实现高效基因打靶、研究基因功能奠定了基础^[12-15]。本研究利用这一技术对果蝇中的 8 个功能未知基因(*CG4161*、*CG11475*、*CG2921*、*CG10541*、*CG7276*、*CG3800*、*CG8117* 和 *CG16779*)分别进行了敲除,获得了纯合的基因敲除果蝇品系,为基因功能研究提供了便捷的动物模型。同时,对突变体果蝇进行了雄性生殖功能的表型分析,为进一步研究这些基因的作用机制提供了参考。

1 材料和方法

1.1 材料

果蝇 *w*¹¹¹⁸、FM7a、Bc/CyO 和 TM3/TM6b 均来自于 Bloomington 果蝇库,*Nos-Cas9*^{[w-1]/CyO}(2nd chr)和 *Nos-Cas9*^[w-1](3rd chr)为本实验室果蝇库所有。同源臂及 sgRNA 载体质粒为本实验室构建。

1.2 候选基因的选择

根据基因组数据库(NCBI)及果蝇数据库(FLY-BASE)信息,参考文献报道,在果蝇中选择了 8 个候选基因(*CG4161*、*CG11475*、*CG2921*、*CG10541*、*CG7276*、*CG3800*、*CG8117* 和 *CG16779*)。这些基因均满足以下条件:在睾丸中有表达、雄性生殖方面功能未知、在小鼠和人有高度同源基因。

1.3 sgRNA 质粒和供体 DNA 质粒构建

利用美国威斯康星大学果蝇 CRISPR 网站 (<http://flycrispr.molbio.wisc.edu>) 的 TargetFinder 功能, 依据最少脱靶、切点距离靶基因最近和不破坏上下游相邻基因的原则在靶基因的起始和末尾分别寻找最优 sgRNA。根据 sgRNA 序列设计引物, 退火为双链 DNA 片段, 并连接在 sgRNA 载体质粒上获得表达 sgRNA 的载体。携带有同源臂的供体质粒通过将靶基因前后两个约 2 kb 的同源臂分别插入同源臂载体质粒的两个多克隆位点(MCS)获得。所有引物合成及测序由南京金斯瑞生物科技有限公司负责。

1.4 基因敲除果蝇纯合突变体的获得

分别提取 sgRNA 质粒和供体 DNA 质粒后用酚/氯仿抽提纯化混合, 使两个 sgRNA 质粒终浓度分别为 250 ng/ μ L, 供体 DNA 质粒终浓度为 500 ng/ μ L。收集 *Nos-Cas9^(w-)/CyO(2nd chr)* 和 *Nos-Cas9^(w-)(3rd chr)* 果蝇胚胎分别用于 3 号染色体或 2 号染色体靶基因的显微注射, 孵化出的雌蝇和雄蝇分别与 *w¹¹¹⁸* 的雄蝇和处女蝇杂交, 后代筛选红色荧光标记并与该染色体对应的平衡品系杂交。分别在基因组和插入的标记上设计引物用于跨同源臂 PCR 鉴定, 扩增约 3 kb 大小的片段, 经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测确认正确后使带有平衡染色体品系自交, 获得纯合基因敲除突变体果蝇; 再在敲除区域内设计引物, 扩增约 400 bp 大小的片段用于 Negative PCR 鉴定, 经电泳检测正确后的果蝇用于后续实验研究。

1.5 候选基因组织表达半定量 PCR

取野生型果蝇头、胸、腹(去除生殖腺)、睾丸组织 cDNA, 及小鼠心、肺、脑、肠和睾丸组织 cDNA, 在基因外显子区域设计引物, PCR 后经 2% 琼脂糖凝胶电泳。电泳图像利用 Photoshop 进行条带灰度分析, 定量各基因在各组织中相对表达量。

1.6 雄性果蝇育性及生育力测试

在果蝇生育力测试中, 为保持各基因型雄性果蝇发育时期一致, 所有品系果蝇在同样条件下培养, 收集相同日期出生的雄蝇和 *w¹¹¹⁸* 处女蝇 25 单独培

养 2 天后取单只雄蝇与 3 只处女蝇杂交, 杂交 2 天后取出亲本果蝇置于新瓶中, 重复该操作 5 次。果蝇放入瓶中之日起第 15 天统计瓶中后代成蝇数量。依据 5 次统计结果绘制雄蝇生育力随时间变化曲线。在雄蝇育性实验中, 不清空亲本, 15 天后观察是否有包括幼虫、蛹和成蝇在内的后代产生, 统计没有后代的瓶子数量, 计算不育率。

1.7 果蝇睾丸形态学观察

根据需求选取羽化后 4 天未交配的雄蝇或羽化后交配 2 天再单独培养 2 天的雄蝇, 解剖分离睾丸组织压片, 立即在相差显微镜下观察并拍照。

1.8 果蝇睾丸荧光染色及观察

解剖后的睾丸迅速放入 4% 多聚甲醛溶液(PFA)中固定 20 min; 0.1% PBST 洗 3 次, 每次 10 min。之后放入 1:50 稀释的鬼笔环肽(Phalloidin, Invitrogen, 美国), 常温避光染色 50 min; 0.1% PBST 洗 3 次, 每次 10 min。将睾丸转移至载玻片上, 滴加 5 μ L 按照 1:1000 稀释的 Hoechst 33342 (Invitrogen, 美国), 避光染色 5 min。滴加 80% 甘油并缓慢覆盖盖玻片后指甲油封片, 激光共聚焦显微镜观察并拍照。

2 结果与分析

2.1 候选基因的同源性分析及表达水平验证

在基因组数据库(NCBI)及果蝇数据库(FLYBASE)中, 搜集了 8 个果蝇候选基因及它们在人和小鼠中的同源基因的氨基酸序列, 并对这些序列进行了分析, 比较了它们之间的一致性和同源性(表 1)。结果显示 8 个候选基因中除 *CG16779* 与人和小鼠同源基因一致性(21%和 21%)和相似性(32%和 31%)较差以外, 其他基因与同源基因相似性均可达到或接近 50%, 一致性均在 30% 以上。

果蝇数据库信息显示其中 5 个基因(*CG4161*、*CG11475*、*CG2921*、*CG10541* 和 *CG7276*)在睾丸中优势表达, 1 个基因 *CG3800* 在全身各组织中表达量都较高, 另外 2 个基因 *CG8117* 和 *CG16779* 在各组织中表达量均较低(图 1A)。为验证这些数据, 分别

表 1 候选果蝇基因与人和小鼠基因蛋白质同源性分析

Table 1 Protein homology analysis of candidate genes among the species *Drosophila*, *Homo sapiens* and *Mus musculus*

果蝇基因编号	人类同源基因	一致性(%)	相似性(%)	小鼠同源基因	一致性(%)	相似性(%)
CG4161	ARMT1	32	50	Armt1	33	51
CG11475	ARMT1	31	51	Armt1	34	52
CG2921	ARMT1	35	54	Armt1	35	53
CG10541	TEKT1	32	54	Tekt1	31	53
CG7276	TCTEX1D2	35	55	Tctex1d2	33	49
CG3800	CNBP	38	49	Cnbp	38	49
CG8117	TCEA1	49	72	Tceal	49	72
CG16779	ELMSAN1	21	32	Elmsan1	21	31

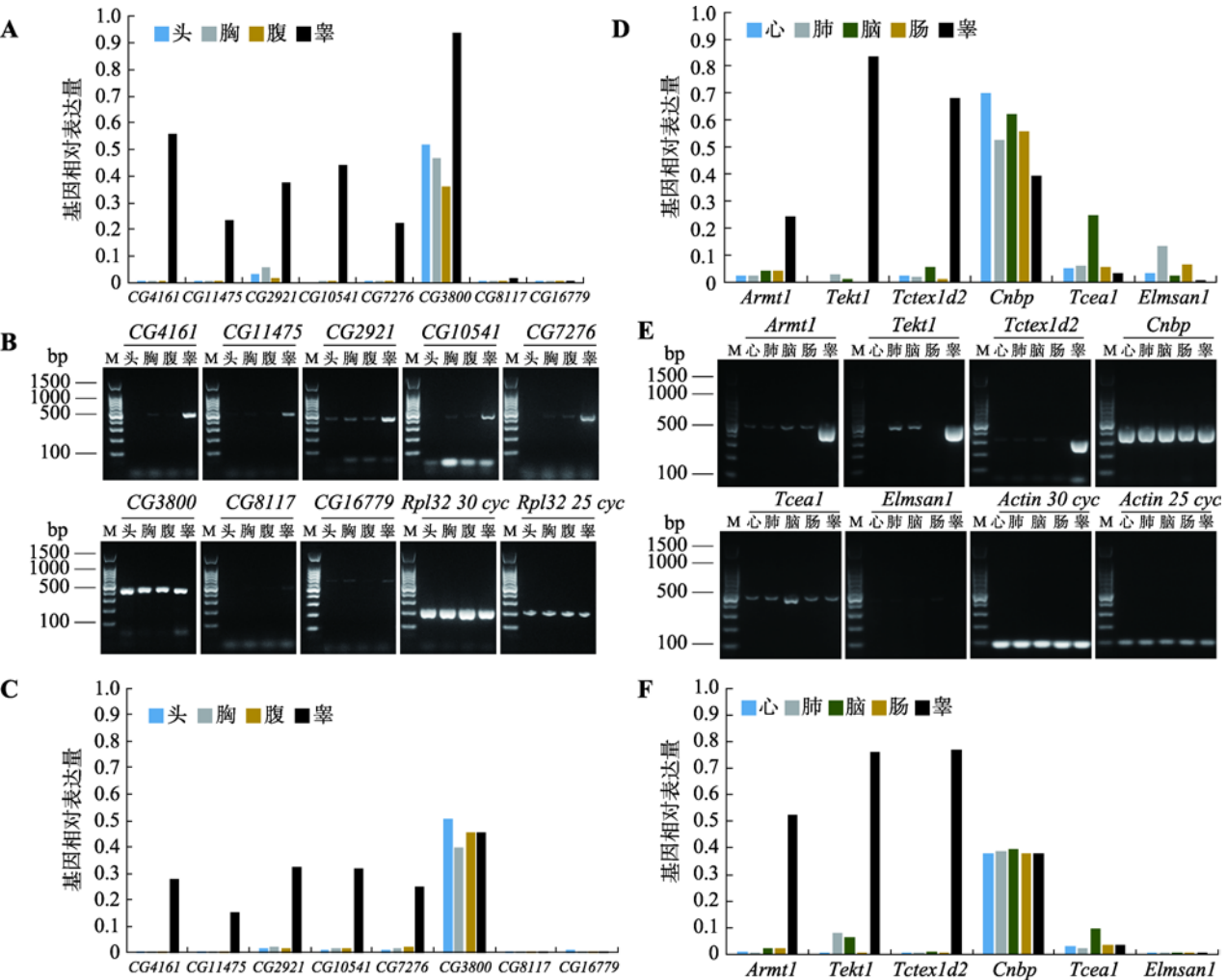


图 1 候选基因各组织表达水平分析

Fig. 1 Expression analysis of candidate genes in different tissues

A : 8 个候选基因在果蝇头、胸、腹、雄性生殖组织中的相对表达水平。头：头部组织；胸：胸腹侧神经节和心脏组织；腹：肠组织；辜：睾丸组织或生殖腺。按照最高表达量取值(数据来源于果蝇数据库网站 <http://flybase.org>)。B : 8 个候选基因在果蝇头、胸、腹、辜丸组织中的半定量 PCR 结果。头：全部头部组织；胸：全部胸部组织；腹：去除生殖器的腹部组织；辜：辜丸组织。M : 100 bp marker；C : 基于灰度计算的 8 个候选基因在果蝇头、胸、腹、辜丸组织中的相对表达水平。D : 6 个同源基因在小鼠心、肺、脑、大肠、辜丸中的相对表达水平(数据来源于 NCBI)。E : 6 个同源基因在小鼠心、肺、脑、大肠、辜丸中的半定量 PCR 结果。F : 基于灰度计算的 6 个同源基因在小鼠心、肺、脑、大肠、辜丸中的相对表达水平。

提取了果蝇头、胸、腹和睾丸组织中的 RNA 进行反转录, 利用半定量 PCR, 以 *Rpl32* 为内参, 对这些基因在果蝇不同组织的表达水平进行了检测。半定量分析电泳显示, 结果与数据库信息一致(图 1: B 和 C)。

同时, 利用 NCBI 查询了小鼠中相应同源基因在各组织中的表达情况。数据库信息显示, 在果蝇睾丸中优势表达的基因, 它们的同源基因 *Armt1*、*Tekt1* 和 *Tctex1d2* 也在小鼠睾丸中优势表达(*CG4161*、*CG11475* 和 *CG2921* 对应同一个同源基因 *Armt1*) ; 在果蝇全身组织中都有高表达的 *CG3800*, 其同源基因 *Cnbp* 在小鼠各组织中表达量也比 *CG8117* 和 *CG16779* 的同源基因 *Tcea1* 和 *Elmsan1* 要高很多(图 1D)。同样, 利用半定量 PCR, 以 *Actin* 为内参, 对这些基因在小鼠心、肺、脑、肠和睾丸组织中的表达水平进行了验证。结果也表明数据库信息真实可靠(图 1: E 和 F)。

2.2 基因敲除突变体的获得及鉴定

为获得基因完全缺失的突变体, 选择利用同源重组将目标基因编码区完全敲除, 同源臂及 sgRNA 的选择见示意图 2A。针对每个候选基因, 设计了两个 sgRNA 位点, 分别位于目的基因上下游, 上游同源臂终止于 5' sgRNA 切割位点, 而下游同源臂起始于 3' sgRNA 切割位点, 2 个 sgRNA 之间为敲除区域。同源重组后目标基因被替换为红色荧光标记基因(图 2A)。获得候选突变体品系后, 通过 PCR 对其进行分子鉴定。首先, 为确认插入片段是否正确替换敲除区域, 分别在同源臂外侧基因组和标记基因上设计 PCR 引物, 保证只有同源重组的发生才能获得相应的条带, 而非特异插入则无法获得(图 2A)。电泳结果显示, 8 个基因敲除品系果蝇均扩增出两侧同源臂, 负对照野生型均无条带(图 2B), 说明同源重组正确发生。其次, 为确认目的区域已被完全敲除以及果蝇品系确为纯合, 对目的基因中的外显子区域设计引物进行 Negative PCR 扩增, 如仍可获得扩增产物, 则说明基因并未敲除成功或突变体并未纯合(图 2A)。结果显示, 8 个基因敲除品系果蝇均未扩增得到条带, 野生型均有条带(图 2C), 说明目标基因敲除纯合突变体果蝇品系成功建立。

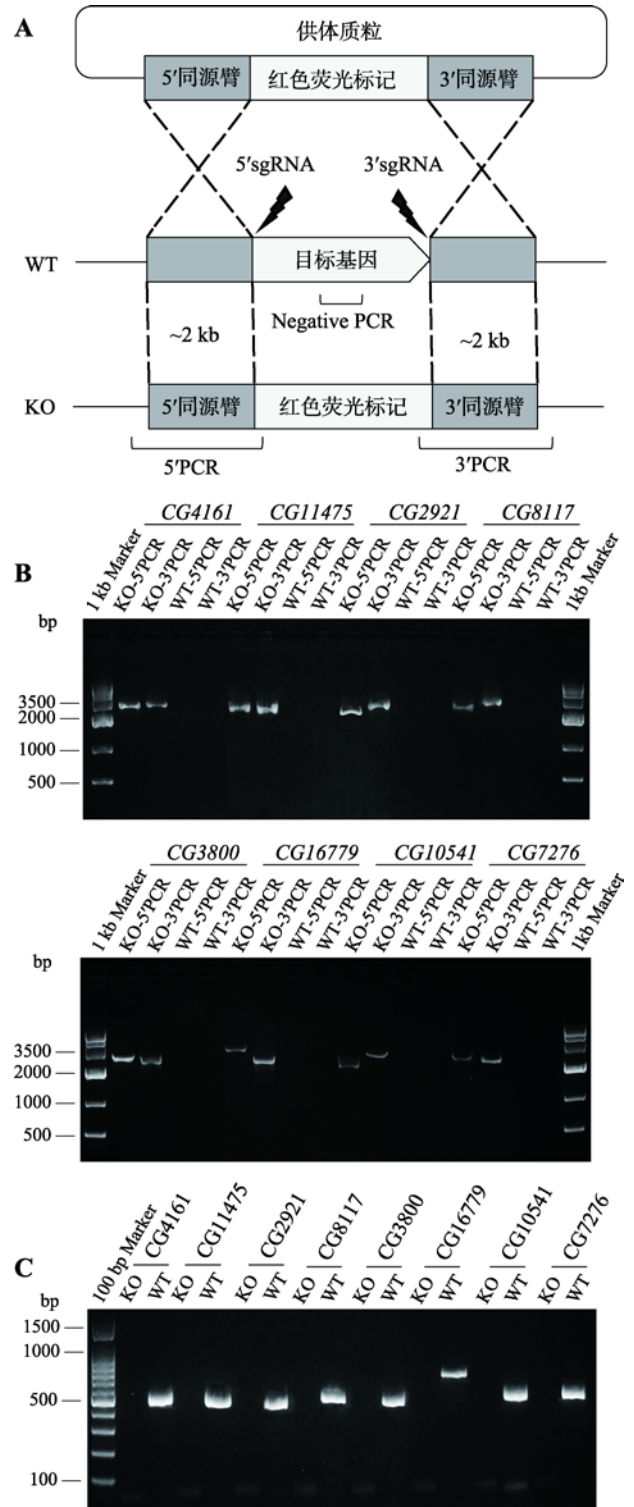


图 2 基因敲除果蝇鉴定

Fig. 2 Molecular verification of knockout flies

A: CRISPR/Cas9 介导同源指导性修复(HDR)敲除目的基因及 PCR 鉴定示意图。WT: 野生型亲本果蝇; KO: 基因敲除果蝇。B: 各基因敲除果蝇跨同源臂 PCR 鉴定结果。C: 各基因敲除果蝇纯合品系 Negative PCR 鉴定结果。

2.3 基因敲除雄蝇的育性测试

为探究这些基因对雄性生殖系统功能的影响,对8个纯合敲除品系雄蝇进行了生育力测试。测试结果显示,CG7276和CG3800的缺失会造成雄蝇部分不育,其中CG7276^{-/-}雄蝇不育比例为48.9%,CG3800^{-/-}雄蝇不育比例为38.4%,其他基因突变体育性正常(图3A)。

为考察基因敲除对雄蝇生育能力的影响,将突变体雄蝇与w¹¹¹⁸处女蝇杂交后,每隔2天取出亲本果蝇置于新瓶中,重复该操作5次,分别统计每瓶中14天后的后代数量,不育雄蝇不计入统计数据(图3B)。结果显示,CG7276^{-/-}雄蝇的后代数量较其他果蝇明显减少,而且这一减少随时间推移更加显著;其余基因突变体与野生型相比没有显著差异,且生育力能维持相当长时间(图3C)。对可育雄蝇后代总数进行统计则发现,CG3800^{-/-}、CG7276^{-/-}和

CG11475^{-/-}后代数量出现不同程度减少,其中CG3800^{-/-}后代数量仅为野生型的58.3%,而CG7276^{-/-}减少更为显著,后代数量仅为野生型的10.0%(图3D)。

以上结果表明,CG7276和CG3800的功能丧失不仅影响了雄蝇的育性,也严重影响了雄蝇的生育能力。

2.4 基因敲除雄蝇睾丸表型分析

为研究基因突变对雄蝇睾丸形态及发育的影响,将出生后雄蝇与野生型处女蝇共置2天以检测是否可育,再单独放置2天以积累精子后解剖睾丸,并在相差显微镜下观察精囊形态、精子发生各阶段细胞形态以及精子数量。结果显示,CG7276^{-/-}和CG3800^{-/-}可育雄蝇同野生型及其他基因敲除突变体雄蝇类似,精子发生过程正常,精原干细胞分化正常,可见成簇长形精细胞,精囊内精子饱满(图4:A~I)。在CG7276^{-/-}不育雄蝇中,部分果蝇精囊与可

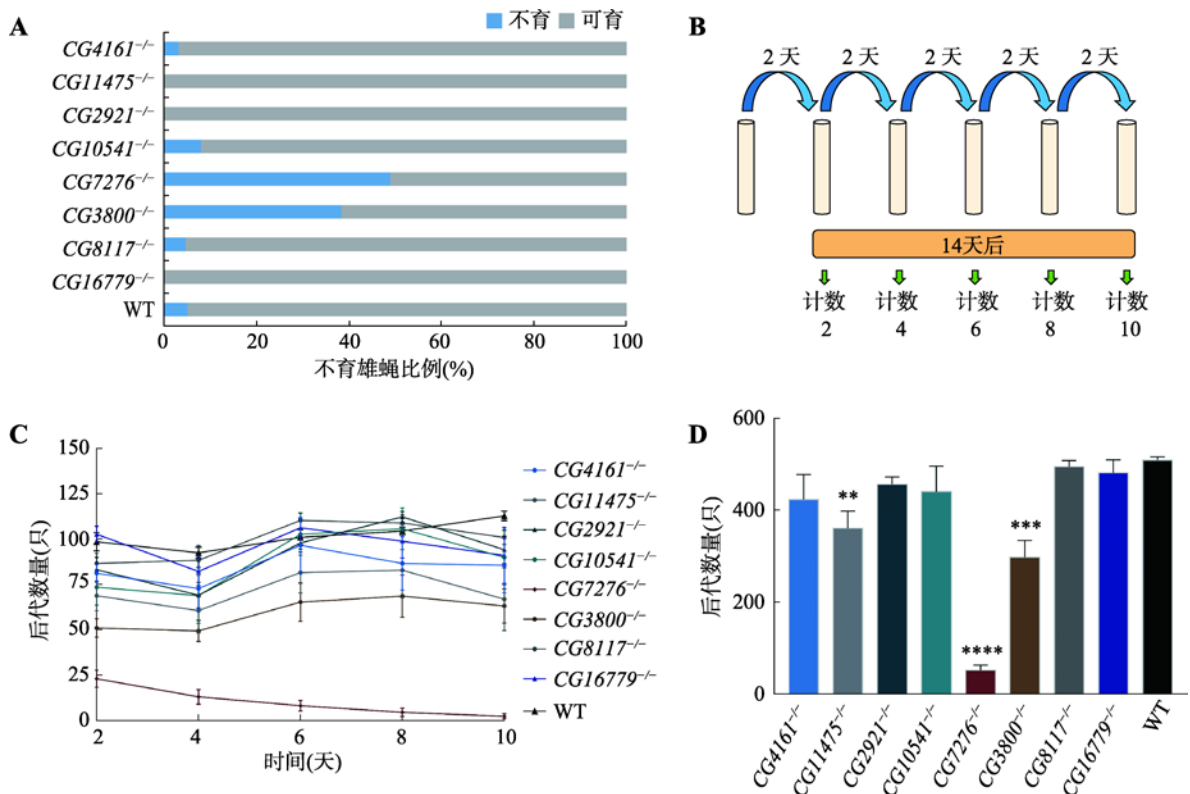


图3 基因敲除雄蝇生育力测试

Fig. 3 Male fertility test of knockout flies

A: 各基因敲除纯合品系雄蝇育性测试结果。各品系果蝇 $n \geq 40$ 。B: 生育能力与时间关系实验示意图。每隔2天倒瓶1次,从放入果蝇当天起14天后统计后代数量。C: 基因敲除果蝇纯合品系生育能力与时间关系。各组数据=平均值±标准差($n=20$)。横坐标: 倒瓶时间与B图对应。D: 各基因敲除纯合品系雄蝇后代总数统计。各组数据=平均值±标准差,方差分析 t 检验, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ 。WT: 野生型 w¹¹¹⁸ 雄蝇。

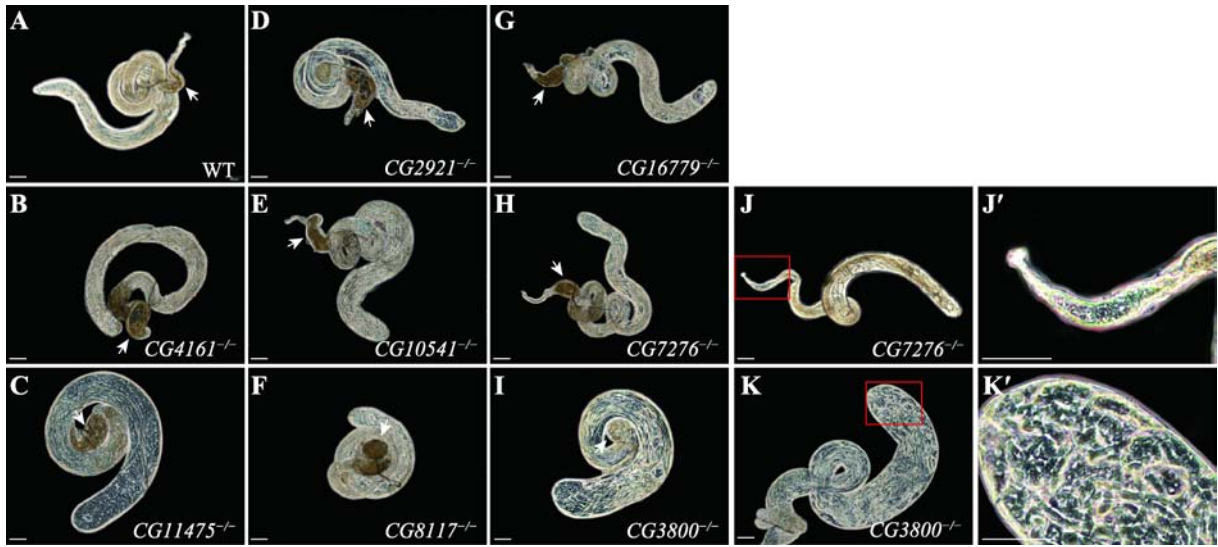


图 4 基因敲除雄蝇睾丸解剖分析

Fig. 4 Testis anatomical analyses of knockout flies

A~I: 野生型(WT)及各基因敲除纯合可育雄蝇睾丸解剖观察。箭头所指为精囊, 其中充满精子。J: $CG7276^{-/-}$ 不育雄蝇睾丸, 红色框区为精囊。J': 红框区域放大; K: $CG3800^{-/-}$ 不育雄蝇睾丸, 红色框区为睾丸头部; K': 红框区域放大。标尺: 100 μm 。

育雄蝇相比明显缩小, 精原干细胞数量相对减少(图 4: J 和 J'); 而 $CG3800^{-/-}$ 不育雄蝇精囊中虽然充满精子, 但睾丸中各类型细胞杂乱分布, 精原干细胞下移, 长形精子上移(图 4: K 和 K')。这一结果从细胞学方面证实了 $CG7276$ 和 $CG3800$ 在雄性生殖系统发育过程中的作用, 并提示了突变体不育的可能原因。

2.5 不育雄蝇睾丸荧光染色分析

睾丸相差观察显示不育的 $CG7276^{-/-}$ 和 $CG3800^{-/-}$ 突变体表现出不同的细胞学表型。为详细观察这一表型, 对突变体雄蝇的睾丸分别用 Phalloidin 和 Hoechst33342 进行了染色。结果显示, $CG7276^{-/-}$ 和 $CG3800^{-/-}$ 可育雄蝇睾丸内各类型细胞分布正常, 每 64 个精子 DNA 头部聚集成簇, 64 个环绕 DNA 的 F-actin 椎体组成个性化复合体(individualization complex, IC), 从 DNA 头部沿着轴丝向尾部运动, 使精子完成脱胞质及成熟过程(图 5: A~A'', C~C'')。 $CG7276^{-/-}$ 不育雄蝇中, 部分个性化复合体移动不同步, 精囊显著缩小, 提示精子未能完成成熟过程进入精囊(图 5: B~B''); 而 $CG3800^{-/-}$ 不育雄蝇则表现出精细胞的散乱分布, 无法聚集成簇(图 5: D~D'')。以上结果提示 $CG7276$ 和 $CG3800$ 在精子头

部的聚集及同步化复合体的形成过程中发挥一定作用, 它们的缺失影响了精子的成熟, 因此造成了部分雄蝇不育, 对可育雄蝇的生育能力也产生了一定影响。

3 讨论

在过去的几年中, 基于 CRISPR/Cas9 的基因编辑技术在细胞株和模式生物研究中都取得了长足的发展, 使得大规模的基因编辑成为可能。这一系统在果蝇中也得到了广泛应用及不断改进。目前, 将带有 sgRNA 的质粒显微注射进内源表达 Cas9 的转基因果蝇是最简单、最迅速、最廉价的方法, 因为高通量的情况下, 体外 RNA 的合成步骤复杂且易降解, 而质粒操作却简单易行^[16, 17]。与其他多细胞模式生物相比, 在果蝇中建立稳定的 Cas9 转基因品系相对比较容易。本研究中使用 sgRNA 和供体 DNA 质粒直接注射生殖细胞表达 Cas9 蛋白的转基因果蝇胚胎, 这种果蝇借由 *nanos* 或 *vasa* 等生殖系统特异性启动子驱动 Cas9 表达^[18], 避免了体细胞表达可能导致的致死^[19], 制造可遗传变异更加可靠。Cas9 是一种可以产生 DNA 双链断裂(DNA double-strand breaks, DSBs)的 DNA 核酶, 在发生 DSBs 后,

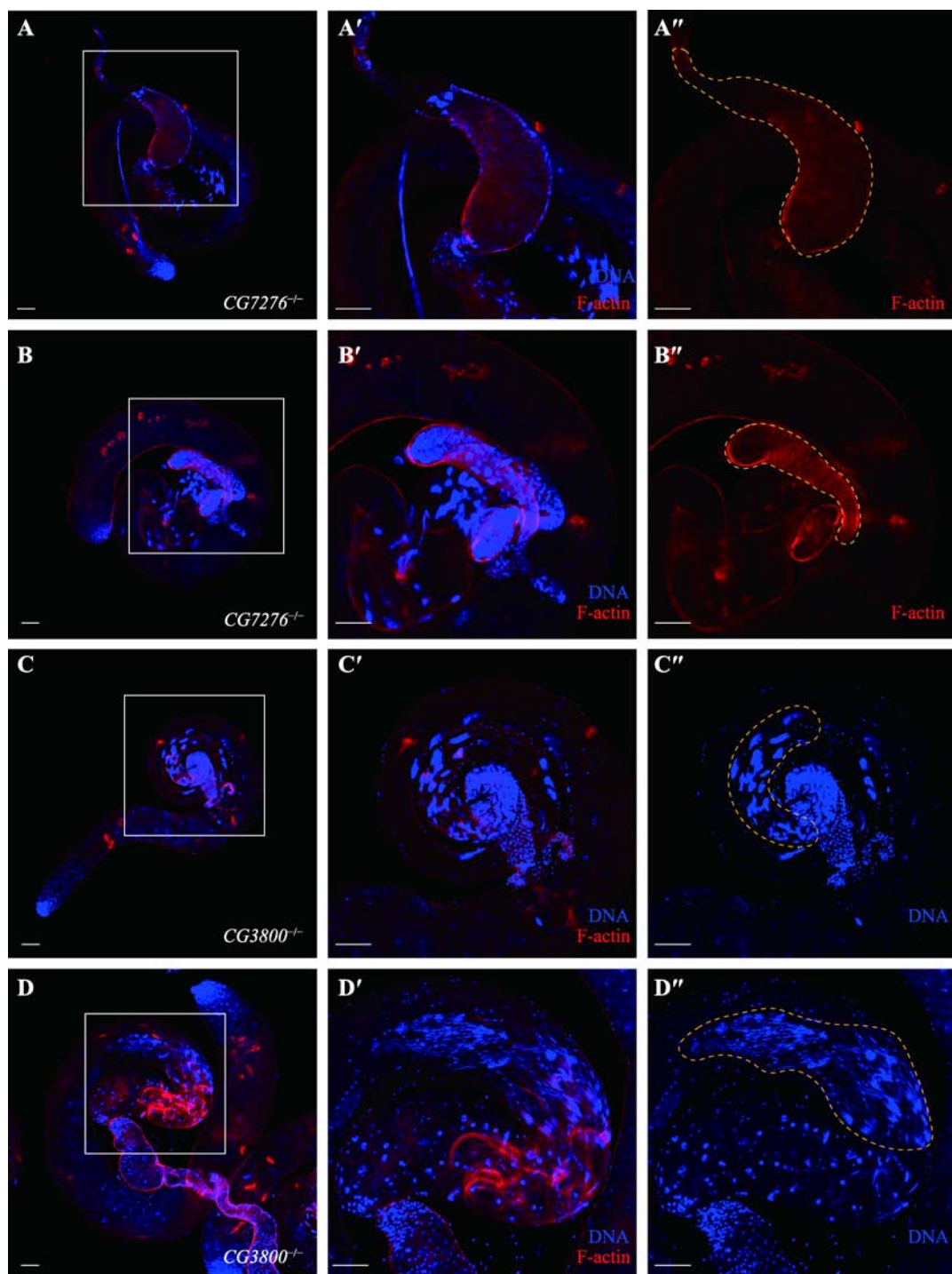


图 5 *CG3800* 和 *CG7276* 基因敲除雄蝇荧光染色分析

Fig. 5 Fluorescence staining of *CG3800* and *CG7276* knockout flies

A~A'' : *CG7276*^{-/-} 可育雄蝇睾丸染色结果。B~B'' : *CG7276*^{-/-} 不育雄蝇睾丸染色结果。黄色框内为果蝇精囊。C~C'' : *CG3800*^{-/-} 可育雄蝇睾丸染色结果。D~D'' : *CG3800*^{-/-} 不育雄蝇睾丸染色结果。黄色框内为睾丸第十区段。A'、B'、C'、D' 分别为 A、B、C、D 白框区域放大。红色为 F-actin(Phalloidin)，蓝色为细胞核 DNA(Hoechst33342)。标尺：50 μ m。

可以通过非同源末端连接(non-homologous end joining, NHEJ)或者同源定向修复 HDR 产生突变。虽

然 NHEJ 通路不需要在 CRISPR 系统中添加额外的成分，效率较高，但产生突变随机性较大^[20]。而本

研究中选用 HDR 策略, 尽管需要额外提供同源重组模板, 但其在基因组编辑中可以进行更有针对性更多样化的设计, 且可用标记基因进行筛选。

一般来说, 基因倾向于在它发挥功能的部位表达, 因此其表达部位可能与它的功能相关。本研究中选择基因在雄性生殖系统睾丸中均有表达, 因此预期这些基因应在生殖系统发育及功能中扮演一定角色。然而, 在选择 8 个基因中, 仅 *CG7276* 和 *CG3800* 的缺失显示出较严重的生殖系统缺陷, 其他基因功能缺失后雄蝇的生育能力并未受到显著影响, 睾丸形态也未有变化。这提示生命体的功能调控是复杂多样的, 不可一概而论。未有明显表型出现有多方面原因: 可能是由于单一基因的缺失通过其他途径获得了功能上的补偿; 可能是这些基因需要协同作用才能发挥功能; 可能是这些基因在精子发生过程中只是起支撑性作用; 也可能是它们在精子发生以外的过程中对果蝇的生殖行为进行着调控。

综上所述, 本研究构建了 8 个功能未知基因的敲除果蝇模型并对这些基因在生殖方面的功能进行了初步解析, 它们的具体功能及作用机制还有待进一步研究。

参考文献(References):

- [1] Ikeda M, Chiba S, Ohashi K, Mizuno K. Furry protein promotes aurora a-mediated polo-like kinase 1 activation. *J Biol Chem*, 2012, 287(33): 27670–27681. [DOI]
- [2] Baker CC, Fuller MT. Translational control of meiotic cell cycle progression and spermatid differentiation in male germ cells by a novel eIF4G homolog. *Development*, 2007, 134(15): 2863–2869. [DOI]
- [3] Koerich LB, Wang XY, Clark AG, Carvalho AB. Low conservation of gene content in the *Drosophila* γ chromosome. *Nature*, 2008, 456(7224): 949–951. [DOI]
- [4] Iyengar B, Luo NG, Farr CL, Kaguni LS, Campos AR. The accessory subunit of DNA polymerase γ is essential for mitochondrial DNA maintenance and development in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(7): 4483–4488. [DOI]
- [5] Goyal G, Fell B, Sarin A, Youle RJ, Sriram V. Role of mitochondrial remodeling in programmed cell death in *Drosophila melanogaster*. *Dev Cell*, 2007, 12(5): 807–816. [DOI]
- [6] Hannigan MM, Zagore LL, Licatalosi DD. Ptpb2 controls an alternative splicing network required for cell communication during spermatogenesis. *Cell Rep*, 2017, 19(12): 2598–2612. [DOI]
- [7] Zagore LL, Grabinski SE, Sweet TJ, Hannigan MM, Sramkoski RM, Li Q, Licatalosi DD. RNA binding protein Ptpb2 is essential for male germ cell development. *Mol Cell Biol*, 2015, 35(23): 4030–4042. [DOI]
- [8] Sharma S, Hanukoglu A, Hanukoglu I. Localization of epithelial sodium channel (ENaC) and CFTR in the germinal epithelium of the testis, Sertoli cells, and spermatozoa. *J Mol Histol*, 2018, 49(2): 195–208. [DOI]
- [9] Bhasin S, Mallidis C, Ma K. The genetic basis of infertility in men. *Baillieres Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 2000, 14(3): 363–388. [DOI]
- [10] Xu EY, Lee DF, Klebes A, Turek PJ, Kornberg TB, Pera RRAR. Human *BOULE* gene rescues meiotic defects in infertile flies. *Hum Mol Genet*, 2003, 12(2): 169–175. [DOI]
- [11] Wu H, Sun LW, Wen Y, Liu YJ, Yu J, Mao FY, Wang Y, Tong C, Guo XJ, Hu ZB, Sha JH, Liu MX, Xia LX. Major spliceosome defects cause male infertility and are associated with nonobstructive azoospermia in humans. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113(15): 4134–4139. [DOI]
- [12] Siddall NA, Hime GR. A *drosophila* toolkit for defining gene function in spermatogenesis. *Reproduction*, 2017, 153(4): R121–R132. [DOI]
- [13] Xu J, Ren XJ, Sun J, Wang X, Qiao HH, Xu BW, Liu LP, Nie JQ. A toolkit of CRISPR-based genome editing systems in *Drosophila*. *J Genet Genomic*, 2015, 42(4): 141–149. [DOI]
- [14] Port F, Chen HM, Lee T, Bullock SL. Optimized CRISPR/Cas tools for efficient germline and somatic genome engineering in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111(29): E2967–E2976. [DOI]
- [15] Gratz SJ, Ukken FP, Rubinstein CD, Thiede G, Donohue LK, Cummings AM, O'Connor-Giles KM. Highly specific and efficient CRISPR/Cas9-catalyzed homology-directed repair in *Drosophila*. *Genetics*, 2014, 196(4): 961–971. [DOI]

- [16] Ren XJ, Yang ZH, Xu J, Sun J, Mao DC, Hu YH, Yang SJ, Qiao HH, Wang X, Hu Q, Deng P, Liu LP, Ji JY, Li JB, Nia JQ. Enhanced specificity and efficiency of the CRISPR/Cas9 system with optimized sgRNA parameters in *Drosophila*. *Cell Rep*, 2014, 9(3): 1151–1162. [DOI]
- [17] Ren XJ, Sun J, Housden BE, Hu YH, Roesel C, Lin SL, Liu LP, Yang ZH, Mao DC, Sun LZ, Wu QJ, Ji JY, Xi JZ, Mohr SE, Xu J, Perrimon N, Ni JQ. Optimized gene editing technology for *Drosophila melanogaster* using germ line-specific Cas9. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(47): 19012–19017. [DOI]
- [18] Kondo S, Ueda R. Highly improved gene targeting by germline-specific Cas9 expression in *Drosophila*. *Genetics*, 2013, 195(3): 715–721. [DOI]
- [19] Yu ZS, Chen HQ, Liu JY, Zhang HT, Yan Y, Zhu NN, Guo YW, Yang B, Chang Y, Dai F, Liang XH, Chen YX, Shen Y, Deng WM, Chen JM, Zhang B, Li CQ, Jiao RJ. Various applications of TALEN- and CRISPR/Cas9-mediated homologous recombination to modify the *Drosophila* genome. *Biol Open*, 2014, 3(4): 271–280. [DOI]
- [20] Liu X, Zhang P, Zhang XF, Li X, Bai Y, Jia KR, Guo XD, Zhang H, Ma XY, Cang M, Liu DJ, Guo XD. Construction of FGF21 knockout mouse models by the CRISPR/Cas9 system. *Hereditas (Beijing)*, 2018, 40(1): 66–74.
刘旭, 张平, 张晓枫, 李兴, 白宇, 贾克荣, 郭晓东, 张豪, 马晓燕, 仓明, 刘东军, 郭旭东. 利用 CRISPR/Cas9 系统构建 *FGF21* 基因敲除小鼠模型. *遗传*, 2018, 40(1): 66–74. [DOI]

(责任编辑: 史庆华)