

· 动物及兽医生物技术 ·

基于 *Cre/loxP* 系统的睾丸组织特异性敲除 *Elovl4* 基因小鼠模型的构建及敲除效率检测

杨仕赛^{1,2}, 赵瑄², 王雨虹², 郑红梅², 甘婷², 朱贵明²

1 贵州医科大学 基础医学院, 贵州 贵阳 550025

2 贵州医科大学 生物与工程学院 生物与医学工程重点实验室, 贵州 贵阳 550025

杨仕赛, 赵瑄, 王雨虹, 郑红梅, 甘婷, 朱贵明. 基于 *Cre/loxP* 系统的睾丸组织特异性敲除 *Elovl4* 基因小鼠模型的构建及敲除效率检测. 生物工程学报, 2022, 38(8): 2912-2927.

YANG SS, ZHAO X, WANG YH, ZHENG HM, GAN T, ZHU GM. Construction of a testis *Elovl4* gene knockout mouse model based on *Cre/loxP* system. Chin J Biotech, 2022, 38(8): 2912-2927.

摘要: 极长链多不饱和脂肪酸 (very long chain polyunsaturated fatty acids, VLC-PUFAs) 是哺乳动物视网膜、睾丸等极少数组织中特有的脂肪酸, 其生物合成的关键酶为极长链脂肪酸延长酶 4 (very long chain fatty acid elongase 4, *Elovl4*)。建立组织特异性敲除 *Elovl4* 基因的动物模型有利于深入研究 VLC-PUFAs 的生物学功能, 因此, 本研究基于 *Cre/loxP* 系统, 先分别构建了 *Stra8-Cre* 小鼠和 *Elovl4 floxed* 小鼠, 通过杂交获得 (*Elovl4[flox/+]*, *Stra8-Cre*) 杂合子基因敲除小鼠, 再选择雌鼠与 *Elovl4 floxed* 纯合子雄鼠即 *Elovl4 [flox/flox]* 雄鼠杂交, 通过基因型鉴定筛选获得 (*Elovl4[flox/flox]*, *Stra8-Cre*) 纯合子小鼠。利用 RT-PCR、qRT-PCR、Western blotting、免疫组化和免疫荧光检测 *Elovl4* 在睾丸组织中的敲除效率, 结果表明, 无论是杂合子还是纯合子基因敲除小鼠, 其睾丸组织中 *Elovl4* 的表达在 mRNA 及蛋白水平显著下调, 但其他组织未受影响。本研究成功构建了睾丸组织特异性敲除 *Elovl4* 基因小鼠, 为后续研究 VLC-PUFAs 对雄性小鼠生殖功能的影响及相关分子机制提供可靠的动物模型。

关键词: *Cre/loxP*; 睾丸; *Elovl4*; *Stra8-Cre*; 特异性敲除

Received: March 23, 2022; **Accepted:** May 18, 2022; **Published online:** May 20, 2022

Supported by: National Natural Science Foundation of China (31960205); Guizhou Provincial Department of Education Major Research Group for Innovation Groups of China (Qian Jiao He KY[2016]031)

Corresponding author: ZHU Guiming. E-mail: zgm926@sina.com

基金项目: 国家自然科学基金 (31960205); 贵州省教育厅创新群体重大项目 (黔教合 KY 字 [2016]031)

Construction of a testis *Elovl4* gene knockout mouse model based on *Cre/loxP* system

YANG Shisai^{1,2}, ZHAO Xuan², WANG Yuhong², ZHENG Hongmei², GAN Ting², ZHU Guiming²

1 School of Basic Medicine, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, Guizhou, China

2 Key Laboratory of Biological and Medical Engineering, School of Biology and Engineering, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, Guizhou, China

Abstract: Very long chain polyunsaturated fatty acids (VLC-PUFAs) are unique fatty acids in tissues of mammals such as retina and testis, and the key enzyme of its biosynthesis is very long chain fatty acid elongase 4 (*Elovl4*). Development of an animal model of tissue-specific knockout of *Elovl4* gene is conducive to the in-depth study of the biological function of VLC-PUFAs. Therefore, we constructed *Stra8-Cre* mice and *Elovl4* floxed mice based on *Cre/loxP* system, and obtained the (*Elovl4*[*flox*/+], *Stra8-Cre*) heterozygous knockout mice by hybridization. Subsequently, female mice were selected to cross with male mice with homozygous *Elovl4*[*flox/flox*] to gain homozygous mice (*Elovl4*[*flox/flox*], *Stra8-Cre*) through genotype identification and screening. RT-PCR, qRT-PCR, Western blotting, immunohistochemistry and immunofluorescence techniques were used to detect the knock-out efficiency of *Elovl4* in testis. The expression of *Elovl4* in testis of both heterozygous and homozygous knockout mice were significantly down-regulated at mRNA and protein levels, but were not affected in other tissues. In summary, we constructed a mouse model with specific knockout of *Elovl4* gene in testis, which provides a reliable animal model for studying the effect of VLC-PUFAs on the reproductive function of male mice and the underpinning molecular mechanisms.

Keywords: *Cre/loxP*; testis; *Elovl4*; *Stra8-Cre*; specific knockout

在视网膜中, 由于一种常染色体显性遗传病——stargardt 黄斑营养不良视网膜病变 (Stargardt type 3, STGD3) 的研究引起研究者对极长链多不饱和脂肪酸 (very long chain polyunsaturated fatty acids, VLC-PUFAs) 的关注和兴趣, 随后通过定位克隆发现了 STGD3 的致病基因, 即极长链脂肪酸延长酶 4 基因 (Very long chain fatty acid elongase 4, *Elovl4*)。研究表明, 正是由于该基因突变后使 VLC-PUFA 不能合成而导致 STGD3^[1]。此后, 大量相关研究围绕 STGD3 展开, 迄今已发现

了至少 9 个 *Elovl4* 基因突变型, 有力推动了 VLC-PUFAs 在视网膜中的生理功能等相关研究。此外, 还建立了多个 STGD3 动物模型, 包括转基因或基因敲除/敲入的大鼠、小鼠以及猪, 部分阐释 VLC-PUFAs 与 STGD3 的关系及机制^[2-6]。相对而言, VLC-PUFAs 在视网膜中的作用及功能研究比较深入, 但在睾丸及精子等组织器官的研究甚少。在睾丸及精子中, 现有的研究主要围绕 VLC-PUFAs 的种类、参与形成各种复合脂质 (鞘磷脂、神经酰胺等) 以及在精子发生过程中的变化等有限几个方面

开展, 而对 VLC-PUFAs 的生物合成调控仍然知之甚少, 至于其具体生理功能目前还没有令人信服的研究报道^[3,7-8]。

Elovl4 属于极长链脂肪酸延长酶家族 (Elovl5), 该家族还有其他 6 个成员。其中, Elovl1、Elovl3、Elovl6 和 Elovl7 主要参与 18C–26C 的饱和脂肪酸和单不饱和脂肪酸碳链的延长, 而 Elovl2 和 Elovl5 主要参与 18C–24C 多不饱和脂肪酸 (polyunsaturated fatty acids, PUFAs) 碳链的延长^[9-11]。研究证实, 只有 Elovl4 参与碳链长度大于 26C 的极长链脂肪酸碳链的延长, 其中即包括 VLC-PUFAs, 也包括极长链饱和脂肪酸 (very long chain saturated fatty acids, VLC-SFAs)^[9,12]。哺乳动物中, Elovl4 仅在少数几种组织 (视网膜、大脑、皮肤、睾丸、睑板腺) 中表达^[12-14]。在皮肤中, Elovl4 参与合成的 VLC-SFAs 作为鞘脂类的成分形成皮肤防水层而保护动物不会脱水; 视网膜中, Elovl4 参与合成了 VLC-SFAs 和 VLC-PUFAs, VLC-PUFAs 仅发现存在于磷脂酰胆碱中并富集于光感受器外节膜盘; 大脑中, 最新研究表明 Elovl4 并不合成 VLC-PUFAs, 而是仅仅参与合成 VLC-SFAs 并作为磷脂酰胆碱成分发挥功能^[15]。此外, Davis 等研究者发现哺乳动物睾丸中存在 VLC-PUFAs^[16-17]。另有研究表明, 哺乳动物中只有视网膜和睾丸及其产生的精子中含有 VLC-PUFAs, 而大脑、皮肤和睑板腺不含 VLC-PUFAs, 但含有 VLC-SFAs。这些组织中, 无论是 VLC-PUFAs 还是 VLC-SFAs, 都是由 Elovl4 延长酶活性催化合成的, VLC-PUFAs 功能的阐释, 很大程度上依赖人类 *Elovl4* 基因突变型的相关研究。

如上所述, 除了利用人类各种 *Elovl4* 基因突变型进行研究以外, 不同的研究者还利用培养的细胞模型、转基因动物模型、基因敲除或

敲入动物模型等进行 *Elovl4* 相关功能研究。在细胞模型中, 体外表达突变的 *Elovl4*/STGD3 蛋白的不正确折叠, 导致内质网应激并引起突变蛋白和正常蛋白胞内聚集体的形成, 进而造成 *Elovl4* 功能丧失和 VLC-PUFAs 耗尽^[4,18]。早期动物模型将人类的 *Elovl4* 基因突变型敲入或将动物自身 *Elovl4* 基因敲除, 纯合子动物个体因皮肤中不能合成 VLC-SFAs 而失去了皮肤阻渗层导致严重脱水致死, 而杂合子动物个体虽能成活, 但却因单倍剂量不足、*Elovl4* 功能仅部分下降而检测不到相应的疾病 (如 STGD3) 表型^[19-21], 从而使相关研究无法有效进行。

可见, 要深入研究 VLC-PUFAs 的生物学功能, 建立组织特异性敲除 *Elovl4* 基因的动物模型将起到关键作用。在有关雄性动物睾丸组织 VLC-PUFAs 的研究中, 目前尚未见睾丸组织特异性敲除 *Elovl4* 基因动物模型的文献报道。因此本研究利用 *Cre/loxP* 重组系统构建了睾丸组织特异性敲除 *Elovl4* 基因的小鼠模型, 利用这种睾丸中不能表达 *Elovl4* 基因、从而不能合成 26C–38C 的 VLC-PUFAs 的模型小鼠, 可为后续研究 VLC-PUFAs 对雄性小鼠生殖功能产生的影响及相关分子机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

本研究所有小鼠品系为 C57BL/6N。实验室小鼠的饲养条件为: 日平均温度 22 °C–26 °C, 湿度 60%–80%, 光照周期为 12 h 光照, 12 h 黑暗。所用实验小鼠均在 SPF 级动物房持续饲养至性成熟 (8 周) 后进行后续研究, 鼠尾鉴定时间为 21 d 断奶后。所有动物实验均经过贵州医科大学动物管理中心和使用委员会许可后进行 (贵州医科大学实验动物伦理委员会, No. 2000060)。所有手术均在麻醉情

况下进行，尽量减少动物的痛苦，实验后的动物尸体均交回动物管理中心统一处理，符合动物实验伦理道德。

1.2 方法

1.2.1 Elov14 floxed 小鼠制备

将小鼠 *Elov14* 基因的 gRNA (表 1)、含有 loxP 位点的供体载体和 Cas9 mRNA 共同注射到小鼠受精卵中，以产生目标特异性敲除后代 (F0 代嵌合体小鼠)。将其与野生型小鼠交配以测试种系传递并产生 F1 小鼠，F1 代小鼠互相交配产生 F2 代小鼠 (或用组织特异性 Cre 工具鼠交配 F1 代目标小鼠以生成 F2)。通过 F1 代杂合子小鼠 *Elov14*[*flox*/+] 的配种繁育，可鉴定获得纯合子小鼠 *Elov14*[*flox*/*flox*]。纯合突变小鼠用

来和 Cre 小鼠杂交，杂合突变小鼠用于保种。

1.2.2 Stra8-Cre 小鼠制备

将包含 *Stra8-Hipp11 (H11)* 位点的小鼠 gRNA 及含有“mouse *Stra8* promoter- Kozak-Cre rBG pA”盒的供体载体和 Cas9 mRNA 共同注射到小鼠受精卵中，以产生靶向的条件敲入 F0 子代小鼠。通过 PCR 进行分析鉴定 F0 代小鼠，将其饲养至性成熟后与野生型小鼠杂交以测试种系传递并检测 F1 代小鼠的基因型。然后利用 PCR、基因测序及 Southern blotting 对 F1 代小鼠进行基因型验证以确定 F0 代是否为阳性小鼠。其中，gRNA 目标序列为：5'-GAACACTAGTGCACCTATCCTGG-3'；PCR 验证引物见表 2。

表 1 gRNA 引物序列

Table 1 Primer sequences of gRNA

Name	Sequences (5'→3')
gRNA1 (matching reverse strand of gene)	GGCACAATGTTAATCCAGCCTGACTC
gRNA2 (matching forward strand of gene)	GTGACCAGTTTGTCTCCTCCAGTAGA
gRNA3 (matching reverse strand of gene)	GATGTGAACAAAGCACCTATGGCTC
gRNA4 (matching forward strand of gene)	GTGTCGATCATCCATTAGCCTAGCC

表 2 Stra8-Cre 小鼠验证引物序列

Table 2 Primers used for *Stra8-Cre* mice validation

Name	Primer sequences (5'→3')	Size (bp)
5' arm forward primer (F1)	GTACATCCACAGCATCTTCCAAG	3 100
3' KI reverse primer (R1)	TTCTAAAGTATGCAACAGGGTAC	
5' KI forward primer (F2)	GCATCTGACTTCTGGCTAATAAAG	2 800
3' arm reverse primer (R2)	GCCTTGACCTAAGAGATGATGCGAC	
5' sequence primer (F3)	CTCTACTGGAGGAGGACAAACTG	
3' sequence primer (R3)	GTCTTCCACCTTTCTTCAGTTAGC	
Forward primer (F3-1)	CATATTGGCAGAACGAAAACGC	413
Reverse primer (R3-1)	CCTGTTTCACTATCCAGGTTACGG	
5' probe forward primer	GGCACAATGTTAATCCAGCCTGACTC	4 840
5' probe reverse primer	GTGACCAGTTTGTCTCCTCCAGTAGA	
3' probe forward primer	GATGTGAACAAAGCACCTATGGCTC	11 380
3' probe reverse primer	GTGTCGATCATCCATTAGCCTAGCC	

1.2.3 *Elovl4* floxed 小鼠与 *Stra8-Cre* 小鼠杂交产生睾丸组织特异性 *Elovl4* 敲除小鼠

将上述得到的 *Elovl4*[*flox/flox*] 小鼠和 *Stra8-Cre* 小鼠杂交, 可获得睾丸特异性敲除 *Elovl4* 基因的 F1 代杂合子小鼠 (*Elovl4*[*flox/+*], *Stra8-Cre*)。F1 代杂合子雌性小鼠再次与 *Elovl4*[*flox/flox*] 雄性小鼠互相交配繁殖可产生敲除纯合子小鼠 (*Elovl4*[*flox/flox*], *Stra8-Cre*), 21d 断奶后剪其鼠尾提取 DNA 进行基因型鉴定 (引物见表 3), 可获得睾丸组织特异性敲除 *Elovl4* 纯合子小鼠。

1.2.4 mRNA 水平检测 *Elovl4* 敲除效率

按照天根生化科技 (北京) 有限公司 RNA

提取试剂盒说明书, 取睾丸组织提取总 RNA。将 RNA 定量后反转录为 cDNA, 进行 RT-PCR 扩增以及 qRT-PCR 实验。RT-PCR 扩增程序为: 98 °C 30 s; 98 °C 10 s, 60 °C 30 s, 72 °C 5 min, 32 个循环; 最后 72 °C 5 min, 4 °C 保存。内参基因引物为 *Bactin-s*/*Bactin-a*, 扩增程序同上。qRT-PCR 采用三步法进行, 反应体系为: TB Green 5 μL (TaKaRa), 上下游引物各 0.5 μL, cDNA 1 μL, ddH₂O 补齐至 10 μL。反应条件为: 95 °C 预变性 30 s; 95 °C 5 s, 60 °C 30 s, 72 °C 30 s, 40 个循环; 内参基因为 *β-actin*, 反应条件同上。敲除效率检测所用引物见表 4。

表 3 *Elovl4* 敲除小鼠鉴定引物序列

Table 3 Primers used for *Elovl4* knockout mice identification

Name	Primer sequences (5'→3')	Size (bp)
F4	ATACACTTCAGTTGAGCACTGGTT	Homozygotes: one band with 217 bp; Heterozygotes: two bands with 217 bp and 161 bp; Wildtype allele: one band with 161 bp
R4	TAAGGGATTAAGGACCCAGGAAGA	
Kozak-MF	CATATTGGCAGAACGAAAACGC	Homozygotes: two bands with 410 bp and 335 bp; Heterozygotes: three bands with 410 bp, 335 bp and 519 bp; Wildtype allele: two bands with 335 bp and 519 bp
Kozak-MR	CCTGTTTCACTATCCAGGTTACGG	
Kozak-WF	CTCTACTGGAGGAGGACAAACTG	Heterozygotes: three bands with 410 bp, 335 bp and 519 bp; Wildtype allele: two bands with 335 bp and 519 bp
Kozak-WR	GTCTTCCACCTTTCTTCAGTTAGC	
ICP-F	CATGCCAATGGTTCCTACTAAGGT	
ICP-R	TCTCTATGTCCCAAAGTGCAGACAC	

表 4 敲除效率检测引物序列

Table 4 Primers used for knockout efficiency detection

Name	Sequences (5'→3')	Aim	Size (bp)	Annealing temperature (°C)
<i>Bactin-s</i>	ATGGATGACGATATCGCTG	RT-PCR	569	58
<i>Bactin-a</i>	ATGAGGTAGTCTGTCAGG			
<i>β-actin-s</i>	AAGGCCAACCGTGAAAAGAT	RT-qPCR	102	60
<i>β-actin-a</i>	ACCAGAGGCATACAGGGACA			
<i>Elovl4-s</i>	GTCCTGAACGCGATGTCCAC	RT-PCR	350	58
<i>Elovl4-a</i>	GCGCCAGCTATCCTGACTT			
<i>Elovl4-F</i>	GGTGGATTGGAATCAAGTGG	RT-qPCR	145	60
<i>Elovl4-R</i>	TACCGCTTCCACCAAAGGTA			

1.2.5 Western blotting 检测 *Elovl4* 敲除效率

提取睾丸组织总蛋白：加入 10 倍组织体积的裂解液，混匀后放 4 °C 冰箱 30 min，12 000 r/min 低温高速离心机离心 10 min，收集上清，即为总蛋白溶液。蛋白浓度测定：使用 BCA 试剂盒进行蛋白定量。蛋白变性：100 °C 水浴 5–10 min，–20 °C 冰箱备用。SDS-PAGE 电泳：配制 12% 的分离胶和 5% 的浓缩胶进行 SDS-PAGE 电泳；上样量：15 μ L；电泳条件为：恒压 80 V，30 min，恒压 120 V，90 min。转膜：0.45 μ m 的 PVDF 膜；转膜条件（湿转）：250 mA 恒流转膜 90 min（冰浴）。封闭：转好的膜在 TBST 中快速洗脱两次，5 min/次；加 5% 的脱脂奶粉室温封闭 2 h，洗脱 3 次，10 min/次。一抗孵育：1% 的脱脂奶粉按照 1 : 2 000 配制一抗 *Elovl4*，4 °C 孵育过夜（商家：Proteintech，Cat：55023-1-LP，Lot：0900166）；回收一抗，用 TBST 快速洗膜 3 次，10 min/次。二抗孵育：按照 1 : 5 000 的比例配制 HRP 标记的二抗，室温下孵育 40 min；用 TBST 快速洗膜 3 次，10 min/次。曝光：按照 1 : 1 的比例配制 ECL 发光液进行曝光。

1.2.6 免疫组化及免疫荧光检测 *Elovl4* 敲除效率

石蜡切片经脱蜡至水，抗原修复后浸入 3% 双氧水溶液，室温避光孵育温育 25 min，将玻片置于 PBS (pH 7.4) 中在脱色摇床上洗涤 3 次，5 min/次，加入山羊血清（稀释 20 倍），室温封闭 30 min。甩掉封闭液，加入一抗 *Elovl4* (IHC=1 : 20, 1 : 200, IF=1 : 10, 1 : 100, 商家：Proteintech，Cat：55023-1-LP，Lot：0900166)，4 °C 过夜。次日，PBS (pH 7.4) 洗涤 3 次，5 min/次，结束后加入二抗(IHC：HRP 标记山羊抗小鼠 IgG，稀释比例 1 : 200，货号：GB23301；IF：FITC 标记山羊抗小鼠 IgG，稀释比例 1 : 200，货号：GB22301，商

家：Servicebio)，室温孵育 50 min。PBS (pH 7.4) 洗涤 3 次，5 min/次，加二氨基联苯胺 (3,3'-diaminobenzidine, DAB) 显色液，显微镜下控制显色时间，变为棕黄色后流水冲洗终止显色。苏木精复染 30 min，自来水洗，苏木素分化液分化数秒，自来水洗，苏木素返蓝液返蓝，流水冲洗。将切片依次放入 75% 酒精 5 min-85% 酒精 5 min-无水乙醇 I 5 min-无水乙醇 II 5 min-二甲苯 5 min 中脱水透明，晾干，中性树胶封片，切片置于扫描仪下采集图像。FITC 的激发波长 465–495 nm，绿光，发射波长为 515–555 nm。

1.3 统计学分析

所有数据均用 SPSS 软件进行统计分析，qRT-PCR 数据采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算后作图表示，各组间均数比较采用非配对 *t* 检验，以 *P* 定量资料，以均数 \pm 标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示，其中 $P\leq 0.05$ 表示具有显著性差异。

2 结果与分析

2.1 *Elovl4 floxed* 小鼠基因型鉴定

将小鼠 *Elovl4* 基因的 gRNA (表 1)、含有 *loxP* 位点的供体载体和 Cas9 mRNA 共同注射到小鼠受精卵中，以产生目标特异性敲除后代 (F0 代嵌合体小鼠) (图 1)。按 *Elovl4 floxed* 制备方法进行数代杂交并进行基因型鉴定，其中的一批鉴定结果如图 2 所示，2 号和 13 号为 *Elovl4[flox/flox]* 纯合子小鼠，可见 217 bp 单条条带 (图 2B)；3、5、6、7、10、11、12、15 号为 *Elovl4[flox/+]* 杂合子小鼠，可见 161 bp 和 217 bp 双条带 (图 2B)；1、4、8、9、14 号为 *Elovl4[+/+]* 野生型小鼠，可见 161 bp 单条条带 (图 2B)。以上结果说明，我们成功获得 *Elovl4[flox/flox]* 阳性小鼠。

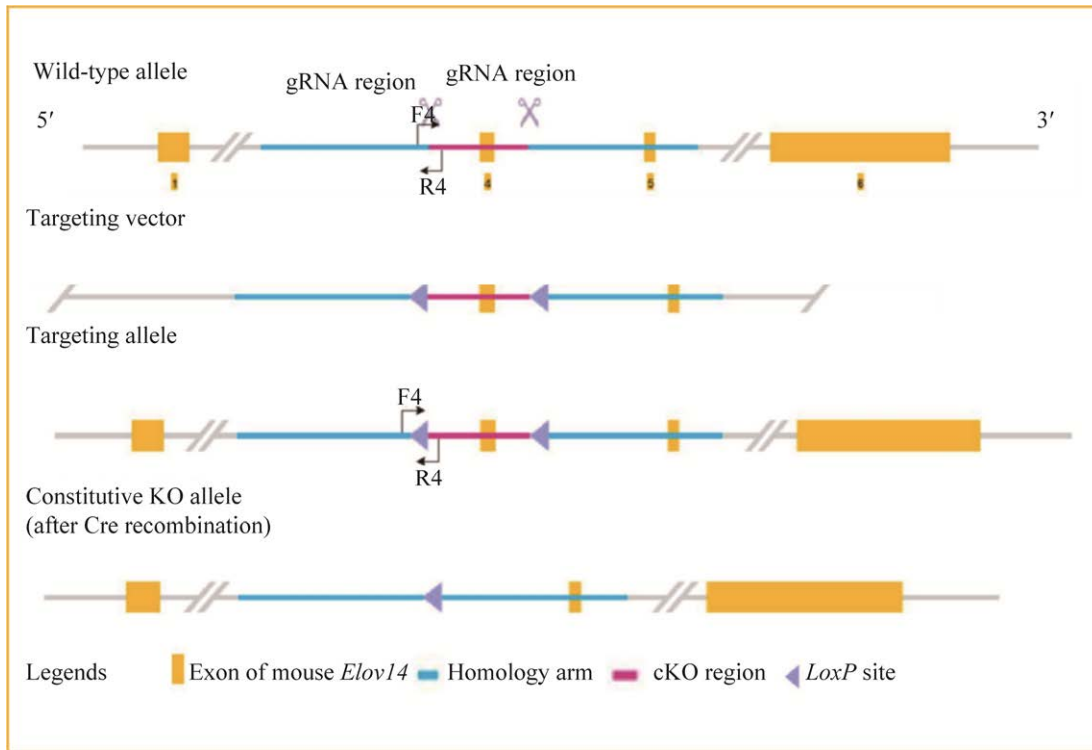


图1 目的基因 *Elov14* 敲除策略示意图

Figure 1 Schematic diagram of knockout strategy of gene *Elov14*.

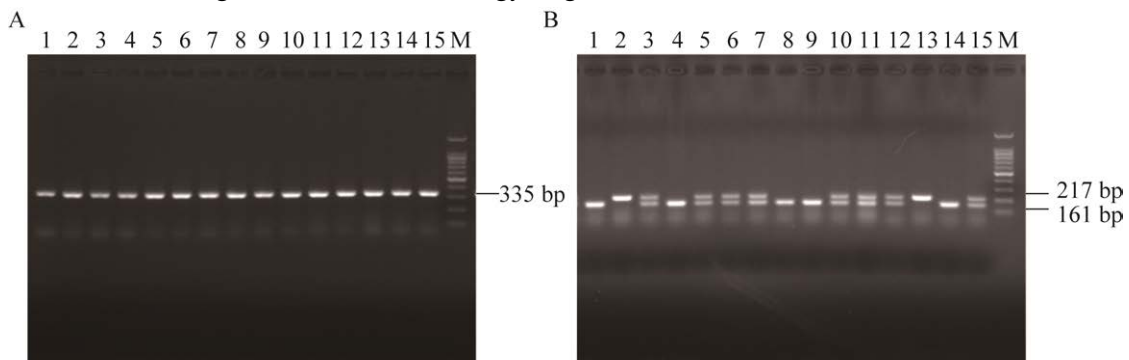


图2 *Elov14 floxed* 小鼠基因型鉴定

Figure 2 Genotype identification of *Elov14 floxed* mice. (A) Beta-actin, one band with 335 bp. (B) F4/R4 (gene sequence details shown in Table 3); *Elov14[flox/flox]*: one band with 217 bp; *Elov14[flox/+]*: two bands with 161 bp and 217 bp; *Elov14[+/+]*: one band with 161 bp; 1–15: the serial numbers of the mice; M: marker.

2.2 *Stra8-Cre* 小鼠获得

通过 *Stra8-Cre* 小鼠制备方法获得两只 F0 代小鼠，将其分别与野生型小鼠杂交后获得编号为 2、5、6、21 的 4 只 F1 代小鼠 (包括 1 只雄鼠、3 只雌鼠)。为鉴定其基因型，实验分别通过 PCR 技术、基因测序以及 Southern

blotting 对 F1 代小鼠进行验证，由此推断 F0 代小鼠是否为 *Stra8-Cre* 阳性小鼠。

引物 1 验证 5'端同源臂 *Stra8-Cre* 的插入位点，目的片段大小为 3.1 kb，引物 2 验证 3'端同源臂 *Stra8-Cre* 的插入位点，目的片段大小为 2.7 kb。PCR 结果显示，其目标片段大小分别为

3.1 kb 和 2.8 kb, 分别为与筛选引物大小相符 (图 3), 可确定 F1 代编号为 2、5、6 和 21 的小鼠为阳性杂合子小鼠, 由此可初步推断 F0 代小鼠为阳性纯合子小鼠。

以 F1 代阳性小鼠中一只鼠为例 (小鼠编号 2) 进行测序比较, 在标准条件下, 以 50 μL 体系进行 33 个循环的 PCR 反应, 反应中加入上下游引物 F3/R3 (表 2)。得到的测序结果与预期相

符, 可判断 F1 代的另外 3 只小鼠均为阳性小鼠, 可推出其父母 F0 代 (非野生型一方) 为阳性纯合子小鼠 (图 4A)。若 DNA 样品纯度低或没有足够的 PCR 延伸时间, 长片段 PCR 产物可能无法扩增, 可用引物 F3-1/R3-1 进行扩增验证 (表 2)。得到目的片段为 413 bp 的单一一条带 (图 4B), 扩增结果与测序结果一致, 进一步确定 F1 代小鼠的第 2、5、6 和 21 号为阳性小鼠。

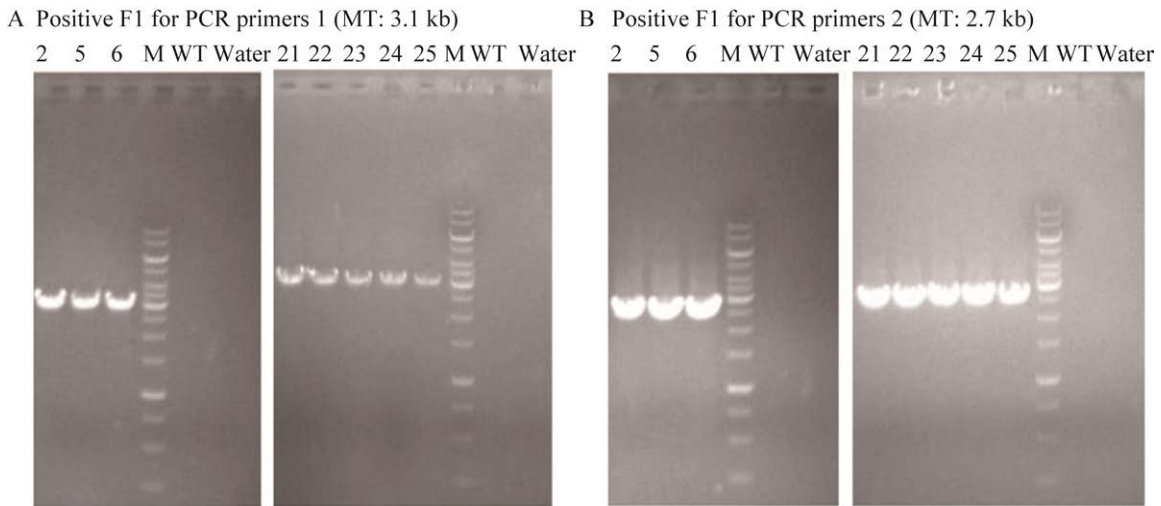


图 3 F1 代小鼠的 PCR 鉴定图

Figure 3 PCR identification diagram of F1 generation mice. (A) Verification of the insertion site of the homologous arm *Stra8-Cre* at the 5' end, the target fragment 3.1 kb in size. (B) Verification of the insertion site of the homologous arm *Stra8-Cre* at the 3' end, the target fragment 2.8 kb in size. M: marker; WT: wild-type mice; Water: blank control; 2, 5, 6 and 21–25 (positive control): the serial numbers of the mice, two bands with 3.1 kb and 2.7 kb.



图 4 F1 代小鼠基因测序 (No. 2)

Figure 4 Gene sequencing of F1 generation mice (No. 2). (A) Gene sequencing results (F3/R3), the upper and lower red marks indicate sequencing results of *Stra8-Cre* at the 5' end and 3' end, respectively; (B) PCR results (F3-1/R3-1); 2, 5, 6 and 21: the serial numbers of the mice, one band with 413 bp; M: marker; W: water; P: positive control.

通过对 4 只 F1 代小鼠 (2、5、6 和 21) 的鼠尾 DNA 样本进行 Southern blotting 分析, 结果显示, 其目的片段大小正确。以野生型小鼠为对照 (5' probe 片段大小为 5.62 kb, 3' probe 片段大小为 8.36 kb), 4 只 F1 代小鼠均出现了双条带, 其中一条与阴性对照 (野生型) 条带大小一致, 另外一条则与目标条带大小一致 (图 5), 可判断 F1 代的 4 只小鼠均为阳性小鼠, 由此可推出其父母 F0 代 (非野生型一方) 为成功的靶向纯合子敲除小鼠。

2.3 睾丸特异性敲除 *Elovl4* 纯合子小鼠鉴定

将基因型确定为 *Elovl4*[*flox/flox*] 小鼠和

Stra8-Cre 小鼠进行杂交, 获得睾丸特异性敲除 *Elovl4* 基因的 F1 代杂合子小鼠 (*Elovl4*[*flox/+*], *Stra8-Cre*)。考虑到 *Elovl4* 基因的敲除会影响雄性小鼠的生殖, 用 F1 代杂合子雌性小鼠与 *Elovl4*[*flox/flox*] 雄性小鼠进行交配繁殖 (最佳繁殖方案) 获得仔鼠, 断奶后剪尾进行基因型鉴定 (引物序列见表 3), 由实验结果可初步判定, 3 号和 5 号小鼠为 (*Elovl4*[*flox/flox*], *Stra8-Cre*) 纯合子小鼠, 1 号为 (*Elovl4*[*flox/+*], *Stra8-Cre*) 杂合子小鼠 (图 6)。以上结果说明, 我们初步构建了睾丸特异性敲除 *Elovl4* 小鼠模型。

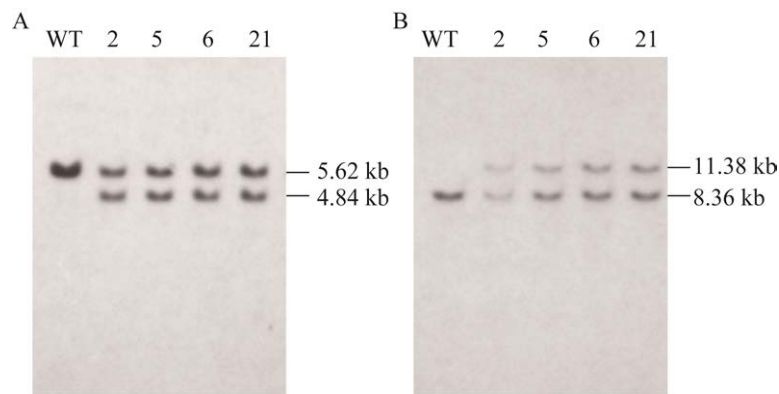


图 5 Southern blotting 验证 F1 代小鼠

Figure 5 Southern blotting verification of F1 generation mice. (A) *Stra8-Cre* mice (5' probe): two bands with 4.84 kb and 5.62 kb. (B) *Stra8-Cre* mice (3' probe): two bands with 8.36 kb and 11.38 kb; WT: wild-type mice; 2, 5, 6 and 21: the serial numbers of the mice.

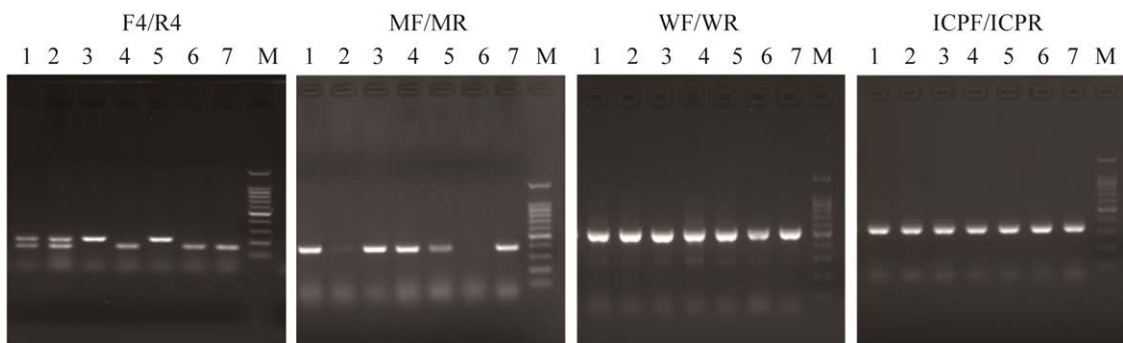


图 6 PCR 鉴定 *Elovl4* 敲除小鼠

Figure 6 PCR identification of *Elovl4* knockout mice. Homozygotes, (*Elovl4*[*flox/flox*], *Stra8-Cre*): four bands with 217 bp, 410 bp, 519 and 335 bp; Heterozygotes, (*Elovl4*[*flox/+*], *Stra8-Cre*): five bands with 161 bp, 217 bp, 410 bp, 335 bp and 519 bp; Wild-type allele: three bands with 161 bp, 335 bp and 519 bp.

2.4 睾丸组织中 *Elovl4* 敲除效率的检测

通过配种繁殖试验及 PCR 鉴定, 可初步判定特异性敲除 *Elovl4* 小鼠模型已建立, 为了确定 *Elovl4* 在敲除小鼠睾丸中被成功敲除, 本研究从 mRNA 及蛋白水平分别进行敲除效率的验证。研究利用 RT-PCR、Western blotting、免疫荧光等方法分别检测 *Elovl4* 在睾丸组织中的表达水平, 以确定 *Elovl4* 在睾丸组织中是否被成功敲除。

2.4.1 mRNA 水平检测睾丸组织中 *Elovl4* 敲除效率

RT-PCR 和 qRT-PCR 检测到特异性敲除 *Elovl4* 纯合子小鼠睾丸中, *Elovl4* 基因的 mRNA 被损坏, *Elovl4* 基因表达显著下调 (图 7), 说明检测的引物位于被删除的区域, 而杂合子小鼠和野生型小鼠的睾丸中均有 *Elovl4* 基因的表达。此外, 以野生型为对照, 我们检测了敲除鼠相关组织中 *Elovl4* 在 mRNA 水平的表达情况, 发现 *Elovl4* 在其他组织的表达未受影响 (皮肤及视网膜) (图 8)。

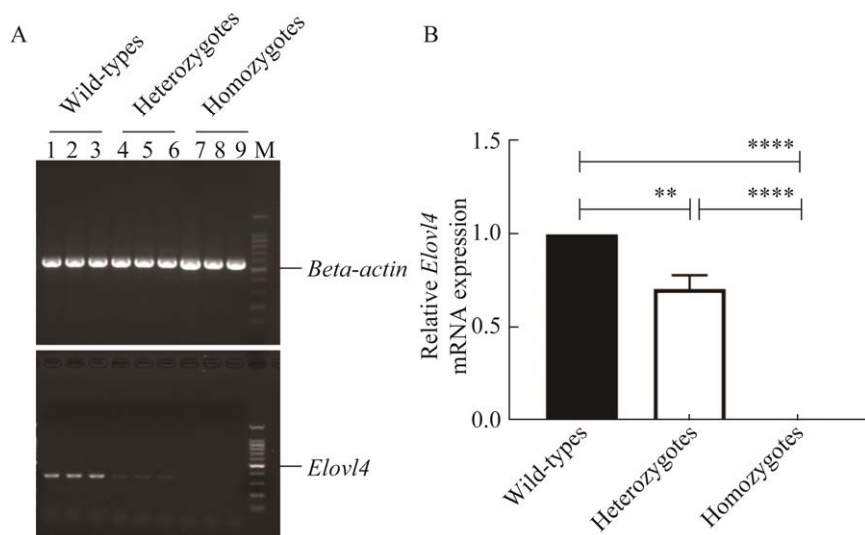


图 7 mRNA 水平检测 *Elovl4* 敲除效率

Figure 7 The efficiency of *Elovl4* knockout detected at mRNA level. (A) RT-PCR results of mice testis. (B) qRT-PCR results of mice testis. ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$.

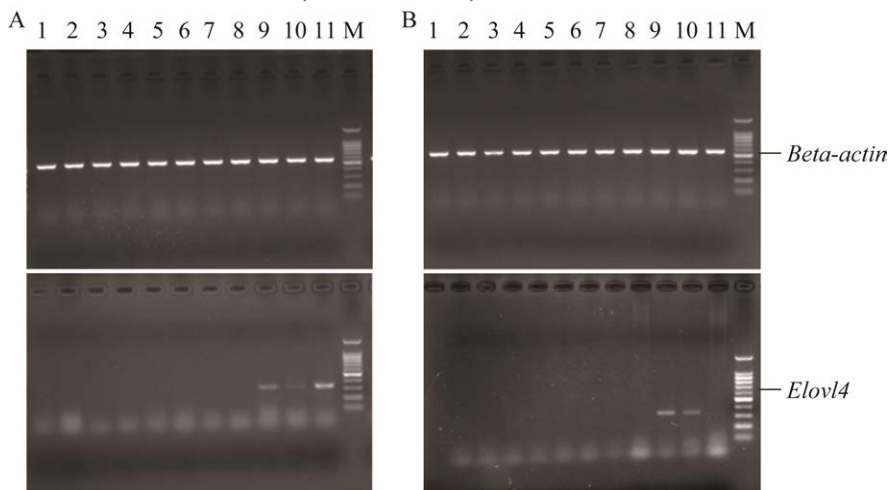


图 8 *Elovl4* 在小鼠各个组织中的表达

Figure 8 The expression of *Elovl4* in various tissues of mice. (A) Tissues of wild-type mice. (B) Tissues of homozygous mice; lane 1–11: heart, liver, spleen, lung, kidney, intestine, stomach, muscle, retina, skin, testis; *Beta-actin*: one band with 569 bp; *Elovl4*: one band with 350 bp.

2.4.2 Western blotting 检测睾丸组织中 *Elov14* 敲除效率

Western blotting 用于检测蛋白水平的敲除效率, 结果显示, *Elov14* 特异性敲除小鼠的睾丸中 *Elov14* 显著下调, 而杂合子与野生型个体中, 仍有 *Elov14* 蛋白的表达 (图 9), 与 RT-PCR 和 qRT-PCR 检测结果一致。该结果进一步验证特异性敲除雄鼠睾丸中的 *Elov14* 已被成功敲除。

2.4.3 免疫组化检测睾丸组织中 *Elov14* 的敲除效率

对 3 种基因型的小鼠睾丸组织进行 *Elov14* 免疫组化分析, 结果显示, 不管是在睾丸还是附睾中, 野生型小鼠组的 *Elov14* 在管壁内的成熟精子中及管腔外间质细胞中大量分布, 圆形精子中也存在少量 *Elov14* 蛋白 (图 10A、10D), 且睾丸生精细胞活跃, 精子数量密集 (图 10A)。*Elov14* 敲除组与野生组相较, *Elov14* 蛋白分布

减少, 圆形精子数量减少 (图 10B、10C、10E、10F), 尤其在敲除纯合子组小鼠睾丸中基本没有 *Elov14* 蛋白分布 (图 10C、10F), 且圆形精子数量减少尤为明显 (图 10C)。

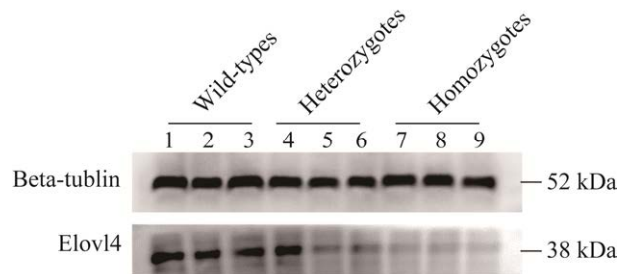


图 9 Western blotting 检测 *Elov14* 敲除效率

Figure 9 The efficiency of *Elov14* knockout detected by Western blotting. Wild-types (1–3, control groups): the genotype with (*Elov14*[+/+]); heterozygotes (4–6): the genotype with (*Elov14*[*flox*/+], *Stra8*-*Cre*); homozygotes (7–9): the genotype with (*Elov14*[*flox*/*flox*], *Stra8*-*Cre*), one band with 38 kDa.

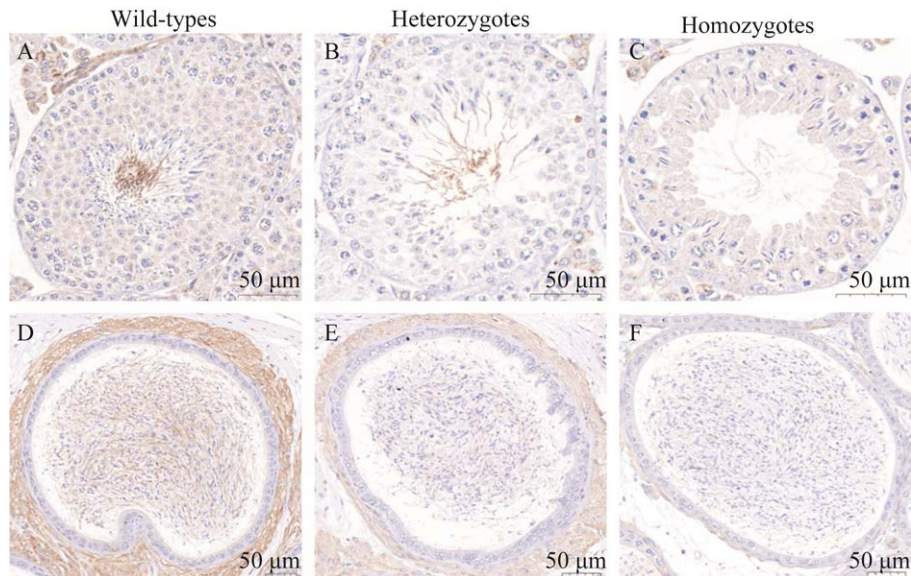


图 10 免疫组化检测小鼠睾丸中 *Elov14* 表达

Figure 10 The expression of *Elov14* in mice testis by immunohistochemistry. The immunohistochemical results of testis tissue in wild-type mice (control groups) (A, D), in heterozygous mice (B, E), and in homozygous mice (C, F).

2.4.4 免疫荧光检测睾丸组织中 *Elov14* 的敲除效率

为观察 *Elov14* 在 3 种基因型小鼠睾丸组织中表达及定位, 本研究取 3 种基因型雄鼠睾丸固定包埋后制作切片并进行免疫荧光分析。免疫荧光结果显示, 在野生型小鼠睾丸中可以很明显地观察到 *Elov14* 主要分布在生精小管管腔内的长形精子中, 生精小管管壁的精原细胞和精母细胞中也有少量表达。与野生型小鼠相比较, 敲除杂合子小鼠睾丸中发绿色

荧光的 *Elov14* 蛋白表达显著下调, 敲除纯合子小鼠睾丸中则几乎观察不到发绿色荧光的阳性蛋白(图 11)。此外, 我们还对小鼠附睾中 *Elov14* 蛋白的荧光发光情况进行分析, 结果与上述一致, 同野生型小鼠相比较, 敲除雄鼠附睾中 *Elov14* 的表达均明显下调, 纯合子下调尤为明显, 几乎观察不到阳性信号(图 12)。该结果进一步验证 *Elov14* 基因已被删除, 我们成功构建了睾丸组织特异性敲除 *Elov14* 小鼠模型。

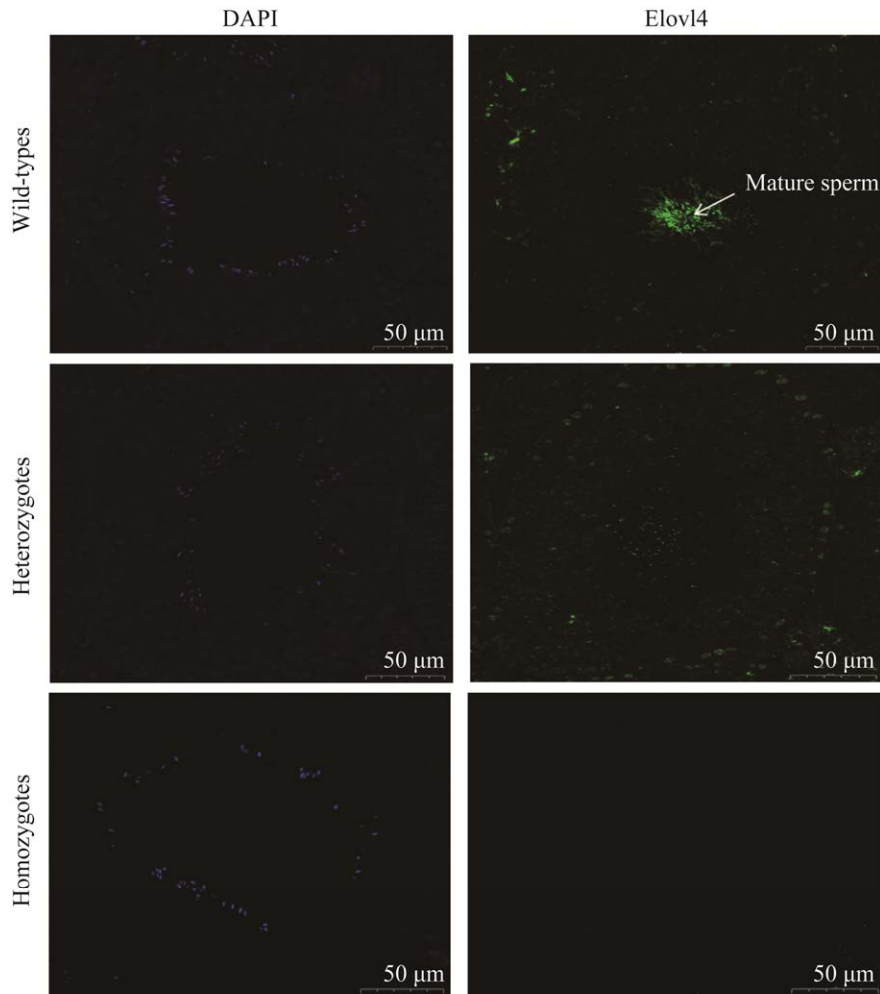


图 11 免疫荧光检测小鼠睾丸中 *Elov14* 表达

Figure 11 The expression of *Elov14* in mice testis by immunofluorescence. Wild-types (control groups): the genotype with (*Elov14*[+/+]); heterozygotes: the genotype with (*Elov14*[*flox*/+], *Stras8-Cre*); homozygotes: the genotype with (*Elov14*[*flox*/*flox*], *Stras8-Cre*); DAPI: blue fluorescence; *Elov14*: green fluorescence. Similar here in after Figure 12.

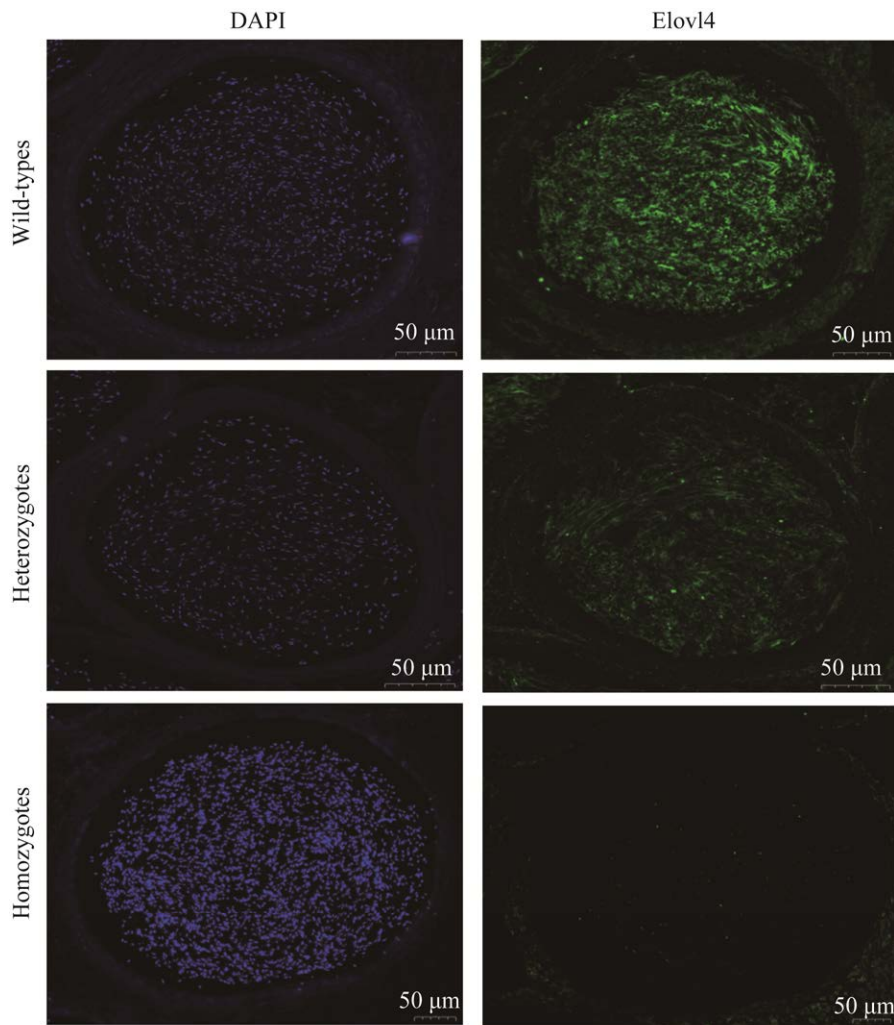


图 12 免疫荧光检测纯合子小鼠附睾中 Elov14 表达

Figure 12 The expression of Elov14 in homozygous mice epididymis by immunofluorescence.

3 讨论

现已明确，睾丸及其所产生的精子均含有比较丰富的 VLC-PUFAs，且这些 VLC-PUFAs 大多与鞘磷脂或磷脂结合（视网膜中 VLC-PUFAs 则与磷脂酰胆碱结合），此外三酰甘油酯和胆固醇酯中也含有 VLC-PUFAs^[22]。曲精细管、精母细胞、精子细胞等均能合成一定的 VLC-PUFAs^[23]。在大鼠睾丸中，甘油磷脂和鞘脂类富含 PUFAs 和 VLC-PUFAs，其中 28:4n-6 和 30:5n-6 的 VLC-PUFAs 最为丰富。在

成年大鼠生精细胞中，甘油磷脂中主要结合的 PUFAs 为二十二碳六烯酸 (docosahexenoic acid, DHA) 和花生四烯酸 (arachidonic acid, ARA)，而鞘脂类 (主要为鞘磷脂和神经酰胺) 主要结合的 LC-PUFAs 为 28:4n-6、30:5n-6 和 32:5n-6^[24]。其中 VLC-PUFAs 在神经酰胺中的比例远高于鞘磷脂^[25]。VLC-PUFAs 的含量随着精子发生的起始就一直增加，最终可达到鞘磷脂中脂肪酸总和的 15% 和磷脂中脂肪酸总和的 40%^[26]。这意味着 VLC-PUFAs 与精子发生及成熟过程密切相关。相关研究还表明，

VLC-PUFAs 正是由稍短的 LC-PUFAs 作为前体在 Elov14 等延长酶的作用下催化合成的。现已明确 Elov14 是负责视网膜中 VLC-PUFAs 合成的酶^[27], 该酶被认为在动物睾丸中执行相同作用。

Cre/loxP 重组系统是一种特异性、诱导性的基因打靶技术, 目前已被广泛应用于各项基础研究中^[28-29]。Cre/loxP 系统来源于 F1 噬菌体, 可以介导特异位点的 DNA 序列重组, 重组后可使 DNA 序列发生颠倒、易位、替换、缺失等^[30]。Cre 重组酶是一种由 343 个氨基酸组成的能使特异性位点重组的单体蛋白^[31], 可以介导两个 34 bp 的 loxP 之间的位点特异性重组, 使 loxP 位点间的序列位点或基因被删除, 从而达到在特定细胞、器官、组织中删除某种特定基因的目的^[32]。小鼠 *Stra8* 基因最初在胚胎干细胞和胚胎癌细胞中被鉴定, 在雌性和雄性生殖细胞减数分裂前期高表达^[33-34]。此外, 在雌性和雄性原始生殖细胞中, *Stra8* 的表达对于有丝分裂/减数分裂的转换是不可或缺的^[35], *Stra8* 还促进精原细胞的分化^[36]。而 *Stra8-Cre* 作为 Cre 酶的一种, 被认为是减数分裂起始的标记蛋白, 在雄性睾丸发育中发挥重要作用^[34,37]。

由于全身敲除 *Elov14* 会导致动物不能合成 VLC-PUFAs 而脱水死亡或合成的 VLC-PUFAs 剂量不足而无法进行相关研究^[19-21]。因此, 为探索由 Elov14 催化延长的 VLC-PUFAs 与雄性生殖功能之间的分子机制, 本研究基于 Cre/loxP 系统构建了睾丸组织特异性敲除 *Elov14* 小鼠模型, 通过 PCR 鉴定获得基因型为 (*Elov14*[flox/flox], *Stra8-Cre*) 的敲除小鼠。在 mRNA 水平及蛋白水平检测了敲除鼠睾丸中 *Elov14* 的敲除效率, 所有结果均表明睾丸组织中的 *Elov14* 基因已被删除, 我们成功构建了睾丸组织特异性 *Elov14* 基因敲除小鼠模型。

此外, 我们的研究初步发现, 在动物配种

繁殖实验过程中, 睾丸组织特异性 *Elov14* 基因敲除小鼠纯合子雄鼠与野生型雌鼠杂交后, 雌鼠怀孕的数量极少, 产生的子代数量也显著减少, 且存活率大大降低, 甚至同窝幼仔在出生后 1 d 内全部死亡, 此现象表明 Elov14 在睾丸组织中的缺失可导致雄性生殖能力大大下降甚至不育 (数据尚未报道)。综上所述, 本研究构建的睾丸组织特异性敲除 *Elov14* 小鼠为探索 VLC-PUFAs 与雄性生殖之间的分子机制提供了良好的实验动物模型。

REFERENCES

- [1] Zhang K, Kniazeva M, Han M, et al. A 5-bp deletion in *ELOVL4* is associated with two related forms of autosomal dominant macular dystrophy. *Nat Genet*, 2001, 27(1): 89-93.
- [2] Hopiavuori BR, Anderson RE, Agbaga MP. ELOVL4: very long-chain fatty acids serve an eclectic role in mammalian health and function. *Prog Retin Eye Res*, 2019, 69: 137-158.
- [3] McMahon A, Butovich IA, Mata NL, et al. Retinal pathology and skin barrier defect in mice carrying a Stargardt disease-3 mutation in elongase of very long chain fatty acids-4. *Mol Vis*, 2007, 13: 258-272.
- [4] Gorusupudi A, Rallabandi R, Li BX, et al. Retinal bioavailability and functional effects of a synthetic very-long-chain polyunsaturated fatty acid in mice. *PNAS*, 2021, 118(6): e2017739118.
- [5] Schori C, Agbaga MP, Brush RS, et al. *Elov14* 5-bp deletion does not accelerate cone photoreceptor degeneration in an all-cone mouse. *PLoS One*, 2018, 13(1): e0190514.
- [6] Sommer JR, Estrada JL, Collins EB, et al. Production of ELOVL4 transgenic pigs: a large animal model for stargardt-like macular degeneration. *Br J Ophthalmol*, 2011, 95(12): 1749-1754.
- [7] Luo JX, Monroig Ó, Liao K, et al. Biosynthesis of LC-PUFAs and VLC-PUFAs in *Pampus argenteus*: characterization of Elov14 elongases and regulation under acute salinity. *J Agric Food Chem*, 2021, 69(3): 932-944.

- [8] Barabas P, Liu AH, Xing W, et al. Role of ELOVL4 and very long-chain polyunsaturated fatty acids in mouse models of stargardt type 3 retinal degeneration. *PNAS*, 2013, 110(13): 5181-5186.
- [9] Wilkerson A, Bhat N, Quoc Hai Pham H, et al. Physiological effects of inactivation and the roles of Elov13/ELOVL3 in maintaining ocular homeostasis. *FASEB J*, 2021, 35(2): e21327.
- [10] Oh CS, Toke DA, Mandala S, et al. ELO2 and ELO3, homologues of the *Saccharomyces cerevisiae* *ELO1* gene, function in fatty acid elongation and are required for sphingolipid formation. *J Biol Chem*, 1997, 272(28): 17376-17384.
- [11] Hayashi S, Satoh Y, Ogasawara Y, et al. Recent advances in functional analysis of polyunsaturated fatty acid synthases. *Curr Opin Chem Biol*, 2020, 59: 30-36.
- [12] Agbaga MP, Brush RS, Mandal MNA, et al. Role of stargardt-3 macular dystrophy protein (ELOVL4) in the biosynthesis of very long chain fatty acids. *PNAS*, 2008, 105(35): 12843-12848.
- [13] Morais S, Torres M, Hontoria F, et al. Molecular and functional characterization of *Elov14* genes in *Sparus aurata* and *Solea senegalensis* pointing to a critical role in very long-chain (>C 24) fatty acid synthesis during early neural development of fish. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(10): 3514.
- [14] McMahon A, Lu H, Butovich IA. A role for ELOVL4 in the mouse meibomian gland and sebocyte cell biology. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2014, 55(5): 2832-2840.
- [15] Sherry DM, Hopiavuori BR, Stiles MA, et al. Distribution of ELOVL4 in the developing and adult mouse brain. *Front Neuroanat*, 2017, 11: 38.
- [16] Mykhailenko O, Kovalyov V, Kovalyov S, et al. Fatty acid composition of lipids of *Iris sibirica*. *Ceska Slov Farm*, 2018, 66(5): 220-226.
- [17] Davis JT, Bridges RB, Coniglio JG. Changes in lipid composition of the maturing rat testis. *Biochem J*, 1966, 98(1): 342-346.
- [18] Zhai Y, Benson MD, MacDonald IM. Corneal involvement in a case of autosomal dominant stargardt-like macular dystrophy (STGD3) with ELOVL4 mutation. *Ophthalmic Genet*, 2022, 43(1): 134-136.
- [19] Vasireddy V, Uchida Y, Salem N, et al. Loss of functional *ELOVL4* depletes very long-chain fatty acids (\geq C28) and the unique ω -O-acylceramides in skin leading to neonatal death. *Hum Mol Genet*, 2007, 16(5): 471-482.
- [20] Agbaga MP, Stiles MA, Brush RS, et al. The Elov14 spinocerebellar ataxia-34 mutation 736T>G (p.W246G) impairs retinal function in the absence of photoreceptor degeneration. *Mol Neurobiol*, 2020, 57(11): 4735-4753.
- [21] Raz-Prag D, Ayyagari R, Fariss RN, et al. Haploinsufficiency is not the key mechanism of pathogenesis in a heterozygous *Elov14* knockout mouse model of STGD3 disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2006, 47(8): 3603-3611.
- [22] Stoffel W, Schmidt-Soltau I, Binczek E, et al. Dietary ω 3- and ω 6-polyunsaturated fatty acids reconstitute fertility of juvenile and adult *Fads2*-deficient mice. *Mol Metab*, 2020, 36: 100974.
- [23] Grogan WM. Metabolism of arachidonate in rat testis: characterization of 26–30 carbon polyenoic acids. *Lipids*, 1984, 19(5): 341-346.
- [24] Craig LB, Brush RS, Sullivan MT, et al. Decreased very long chain polyunsaturated fatty acids in sperm correlates with sperm quantity and quality. *J Assist Reprod Genet*, 2019, 36(7): 1379-1385.
- [25] Zanetti SR, De Los Angeles Monclus M, Rensetti DE, et al. Ceramides with 2-hydroxylated, very long-chain polyenoic fatty acids in rodents: from testis to fertilization-competent spermatozoa. *Biochimie*, 2010, 92(12): 1778-1786.
- [26] Santiago Valtierra FX, Peñalva DA, Luquez JM, et al. *Elov14* and *Fa2h* expression during rat spermatogenesis: a link to the very-long-chain PUFAs typical of germ cell sphingolipids. *J Lipid Res*, 2018, 59(7): 1175-1189.
- [27] Mandal MNA, Ambasadhan R, Wong PW, et al. Characterization of mouse orthologue of ELOVL4: genomic organization and spatial and temporal expression. *Genomics*, 2004, 83(4): 626-635.
- [28] Yang FY, Liu CB, Chen D, et al. CRISPR/Cas9-loxP-mediated gene editing as a novel site-specific genetic manipulation tool. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2017, 7: 378-386.
- [29] Gupta D, Bhattacharjee O, Mandal D, et al. CRISPR-Cas9 system: a new-fangled dawn in gene editing. *Life Sci*, 2019, 232: 116636.

- [30] Ma YW, Yu L, Pan S, et al. CRISPR/Cas9-mediated targeting of the Rosa26 locus produces Cre reporter rat strains for monitoring Cre-loxP-mediated lineage tracing. *FEBS J*, 2017, 284(19): 3262-3277.
- [31] Luo GJ, Zhao NN, Jiang SB, et al. Application of RecET-Cre/loxP system in *Corynebacterium glutamicum* ATCC 14067 for L-leucine production. *Biotechnol Lett*, 2021, 43(1): 297-306.
- [32] Aguirre AJ, Meyers RM, Weir BA, et al. Genomic copy number dictates a gene-independent cell response to CRISPR/Cas9 targeting. *Cancer Discov*, 2016, 6(8): 914-929.
- [33] Oulad-Abdelghani M, Bouillet P, Décimo D, et al. Characterization of a premeiotic germ cell-specific cytoplasmic protein encoded by *Stra8*, a novel retinoic acid-responsive gene. *J Cell Biol*, 1996, 135(2): 469-477.
- [34] Anderson EL, Baltus AE, Roepers-Gajadien HL, et al. *Stra8* and its inducer, retinoic acid, regulate meiotic initiation in both spermatogenesis and oogenesis in mice. *PNAS*, 2008, 105(39): 14976-14980.
- [35] Nagaoka SI, Nakaki F, Miyauchi H, et al. ZGLP1 is a determinant for the oogenic fate in mice. *Science*, 2020, 367(6482): eaaw4115.
- [36] Desimio MG, Cesari E, Sorrenti M, et al. Stimulated by retinoic acid gene 8 (*STRA8*) interacts with the germ cell specific bHLH factor SOHLH1 and represses *c-KIT* expression *in vitro*. *J Cell Mol Med*, 2021, 25(1): 383-396.
- [37] Hwang G, Verver DE, Handel MA, et al. Depletion of *SMC5/6* sensitizes male germ cells to DNA damage. *Mol Biol Cell*, 2018, 29(25): 3003-3016.

(本文责编 郝丽芳)