

# *MSTN* 基因突变纯合子兔的繁育和表型分析

尚利青<sup>1#</sup>, 宋绍征<sup>2#</sup>, 张婷<sup>1</sup>, 严坤宁<sup>1</sup>, 蔡何清<sup>1</sup>, 袁玉国<sup>1</sup>, 成勇<sup>1</sup>

1 扬州大学 兽医学院, 江苏 扬州 225009

2 无锡太湖学院 基础医学系, 江苏 无锡 214064

尚利青, 宋绍征, 张婷, 严坤宁, 蔡何清, 袁玉国, 成勇. *MSTN* 基因突变纯合子兔的繁育和表型分析. 生物工程学报, 2022, 38(5): 1847-1858.

SHANG LQ, SONG SZ, ZHANG T, YAN KN, CAI HQ, YUAN YG, CHENG Y. Propagation and phenotypic analysis of mutant rabbits with *MSTN* homozygous mutation. Chin J Biotech, 2022, 38(5): 1847-1858.

**摘要:** 肌肉生长抑制素 (myostatin, *MSTN*) 基因是动物骨骼肌生长的负调控基因。本研究在获得 *MSTN* 基因双等位突变原代兔的基础上, 培育具有“双肌”表型性状和稳定遗传的 *MSTN*<sup>-/-</sup> 纯合突变兔, 建立原代 *MSTN* 双等位突变兔繁育纯合子后代的方法。应用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术制备 *MSTN*<sup>-/-</sup> 突变原代兔, 原代双等位突变兔与野生型兔配种, 产生 F1 代兔。同一突变系的 F1 代兔半同胞交配或回交繁殖 F2 代纯合子兔; 后代兔利用基因组 DNA PCR 扩增产物序列分析和 T 载体克隆测序鉴定用于筛选纯合子兔; 14–19 周龄 *MSTN* 基因突变兔称量体重。*MSTN* 基因突变兔臀大肌组织切片, 统计分析肌纤维横截面积。获得 5 只 *MSTN* 基因突变原代兔, 其中 3 只用于纯合子培育, 共获得 15 只 (5 种突变子) 纯合突变兔 (M2-a: 3 只; M2-b: 2 只; M3-a: 2 只; M7-a: 6 只; M7-b: 2 只)。在 14–19 周龄, *MSTN*<sup>-/-</sup> 纯合突变兔体重极显著高于同龄 *MSTN*<sup>+/+</sup> 野生型兔 (平均 (2 718±120) g 和 (1 969±53) g,  $P<0.01$ , 同龄体重提高 38.0%); 纯合突变兔的臀大肌纤维平均截面积极显著高于野生型兔 ((3 512.2±439.2)  $\mu\text{m}^2$  和 (1 274.8±327.3)  $\mu\text{m}^2$ ,  $P<0.01$ ), 也显著高于 *MSTN*<sup>+/-</sup> 半合子兔 ((3 512.2±439.2)  $\mu\text{m}^2$  和 (2 610.4±604.4)  $\mu\text{m}^2$ ,  $P<0.05$ )。本研究成功培育了 5 种 *MSTN*<sup>-/-</sup> 基因纯合突变兔, 且有明显瘦肉表型。研究表明, 应用 CRISPR/Cas9 基因编辑获得的原代双等位突变兔为非嵌合体突变兔, 突变性状遗传后代; 原代双等位突变兔后代分离为两个不同突变子, 并都呈现“双肌”表型; F1 代单等位突变兔通过近交或回交可获得 *MSTN*<sup>-/-</sup> 纯合突变兔。该研究在利用基因编辑技术培育优良家畜品种方面取得了实验进展。

**关键词:** 肌肉生长抑制素; 繁育; 突变; CRISPR/Cas9; 新西兰兔

**Received:** September 25, 2021; **Accepted:** November 24, 2021; **Published online:** December 13, 2021

**Supported by:** National Key Research and Development Program of China (Inter-governmental Cooperation Project) (2016YFE0126000)

<sup>#</sup>These authors contributed equally to this study

**Corresponding author:** CHENG Yong. Tel: +86-514-87979348; E-mail: chengyong@yzu.edu.cn

**基金项目:** 国家重点研发计划 (政府间合作项目) (2016YFE0126000)

# Propagation and phenotypic analysis of mutant rabbits with *MSTN* homozygous mutation

SHANG Liqing<sup>1#</sup>, SONG Shaozheng<sup>2#</sup>, ZHANG Ting<sup>1</sup>, YAN Kunning<sup>1</sup>, CAI Heqing<sup>1</sup>, YUAN Yuguo<sup>1</sup>, CHENG Yong<sup>1</sup>

1 College of Veterinary Medicine, Yangzhou University, Yangzhou 225009, Jiangsu, China

2 Department of Basic Medicine, Wuxi Taihu University, Wuxi 214064, Jiangsu, China

**Abstract:** Myostatin gene (*MSTN*) encodes a negative regulator for controlling skeletal muscle growth in animals. In this study, *MSTN*<sup>-/-</sup> homozygous mutants with “double muscle” phenotypic traits and stable inheritance were bred on the basis of *MSTN* gene editing rabbits, with the aim to establish a method for breeding homozygous progeny from primary *MSTN* biallelic mutant rabbits. *MSTN*<sup>-/-</sup> primary mutant rabbits were generated by CRISPR/Cas9 gene editing technology. The primary mutant rabbits were mated with wild type rabbits to produce F1 rabbits, whereas the F2 generation homozygous rabbits were bred by half-sibling mating or backcrossing with F1 generation rabbits of the same mutant strain. Sequence analysis of PCR products and its T vector cloning were used to screen homozygous rabbits. The *MSTN* mutant rabbits with 14–19 week-old were weighed and the difference of gluteus maximus tissue sections and muscle fiber cross-sectional area were calculated and analyzed. Five primary rabbits with *MSTN* gene mutation were obtained, among which three were used for homozygous breeding. A total of 15 homozygous rabbits (5 types of mutants) were obtained (M2-a: 3; M2-b: 2; M3-a: 2; M7-a: 6; M7-b: 2). The body weight of *MSTN*<sup>-/-</sup> homozygous mutant rabbits aged 14–19 weeks were significantly higher than that of *MSTN*<sup>+/+</sup> wild-type rabbits of the same age ((2 718±120) g vs. (1 969±53) g,  $P<0.01$ , a 38.0% increase). The mean cross sections of gluteus maximus muscle fiber in homozygous mutant rabbits were not only significantly higher than that of wild type rabbits ((3 512.2±439.2)  $\mu\text{m}^2$  vs. (1 274.8±327.3)  $\mu\text{m}^2$ ,  $P<0.01$ ), but also significantly higher than that of *MSTN*<sup>+/-</sup> hemizygous rabbits ((3 512.2±439.2)  $\mu\text{m}^2$  vs. (2 610.4±604.4)  $\mu\text{m}^2$ ,  $P<0.05$ ). In summary, five homozygous mutants rabbits of *MSTN*<sup>-/-</sup> gene were successfully bred, which showed a clear lean phenotype. The results showed that the primary breeds were non-chimeric mutant rabbits, and the mutant traits could be inherited from the offspring. *MSTN*<sup>-/-</sup> homozygous mutant rabbits of F2 generation could be obtained from F1 hemizygous rabbits by inbreeding or backcrossing. The progenies of the primary biallelic mutant rabbits were separated into two single-allelic mutants, both of which showed a “double-muscle” phenotype. Thus, this study has made progress in breeding high-quality livestock breeds with gene editing technology.

**Keywords:** myostatin; propagation and breeding; mutation; CRISPR/Cas9; New Zealand rabbits

虽然生物进化或基因突变可以自然发生，但依靠天然突变获得新的品系或品种是一个随机和漫长的过程。利用基因编辑技术介导动物

基因组发生定点突变，可以靶向性、高效、快速地修饰动物基因组，从而获得新的、优良的动物种质资源<sup>[1]</sup>。此外，传统育种从群体中甄

别和筛选出自然突变的个体也是一个复杂和耗时的过程。虽然有些优良性状也可以通过杂交优势等手段获得,但同样受到现有遗传资源的限制,很难产生异乎寻常的效果。而且,自然突变一般需要多代的筛选培育,不仅耗时长,而且效率低。基因编辑技术可以在特定位点进行限制性基因改造,从而改变基因结构,获得优良性状的个体,从而拓展了优质性状家畜的创制空间<sup>[2]</sup>。随着科技的进步,基因编辑技术自身的不断改进和发展也创造了更好的应用条件,第三代人工核酸酶介导的 CRISPR/Cas9 基因编辑技术具有定位精准、特异性高、脱靶率低等优点,与早期的锌指核酸酶 (zinc finger nucleases, ZFN) 和类转录激活因子效应物核酸酶 (transcription activatorlike effector nuclease, TALEN) 相比操作更简单、更高效,甚至可以进行单个氨基酸的点突变,生物安全风险低<sup>[3]</sup>。但是,基因编辑技术应用品种改良,需要将单个突变体繁殖扩大,形成群体,因此,获得的原代突变个体进一步培育纯合子动物也是基因编辑技术应用于新品种培育的一个关键环节,对于基因编辑技术在遗传育种的应用具有相当重要的研究意义。由基因编辑产生的突变个体遗传背景及突变位点分子结构清楚,筛选和鉴定简单易行,无需作繁杂的性状分析和检测。而且,应用基因编辑技术可进行反向工程设计<sup>[4]</sup>,有可能获得超乎寻常的表型特征,这是其他育种技术无法做到的,具有独特优势和广阔的应用前景<sup>[5-7]</sup>。

肌肉生长抑制素 (myostatin, *MSTN*) 对动物骨骼肌生长发育具有负调控作用,即在成年期对肌细胞的增殖具有抑制作用<sup>[8]</sup>。解除其负调控作用可以促进肌肉生长发育,呈现“双肌”表型特征,从而获得瘦肉率高、肉质性状优良的动物个体。虽然 *MSTN* 基因通过基因编辑产

生突变动物,并呈现“双肌”性状在牛、羊、猪和小鼠中已有成功的报道<sup>[9-11]</sup>,但到目前为止尚无 *MSTN* 基因编辑个体进一步培育获得纯合子的报道。兔 *MSTN* 基因编辑研究在国内外虽然也有报道,但早期设计的敲除位点大多在启动子部位,即 *MSTN* 第 1 外显子的起始位点,该设计造成 *MSTN* 基因转录起始缺失和编码区整体移位,虽然也能呈现“双肌”表型<sup>[12]</sup>,但这种设计的缺点是生物安全风险较高。根据牛的天然突变体位于 *MSTN* 基因第 3 外显子,因此,本研究以新西兰兔 *MSTN* 第 3 外显子的第 5 532-5 554 和 5 617-5 639 位核苷酸序列为靶位点 (NCBI 序列号为 NC\_013675.1)<sup>[13-14]</sup> 制备 *MSTN* 基因突变兔<sup>[15]</sup>。由于获得的 *MSTN* 原代突变兔绝大部分为双等位突变体,培育纯合子才有可能利用这种突变资源,将基因编辑修饰的动物培育为新品系。单个个体扩群和纯合子培育中常会遇到近亲退化问题,本研究制订适合于源自 *MSTN* 基因编辑原代兔的纯合子培育的研究方案,尝试克服近亲退化的障碍。近年来,随着基因编辑技术的不断进步,这方面的研究对动物新品种的培育也愈发显得重要和紧迫。因此,本研究拟利用 CRISPR/Cas9 系统介导兔 *MSTN* 基因编辑技术,不仅获得具有“双肌”表型的原代突变兔,而且应用突变原代兔进行纯合子培育和后代表型分析,旨在建立由基因编辑产生的 *MSTN* 基因双等位杂合突变兔培育纯合子的方法,获得有“双肌”表型的 *MSTN*<sup>-/-</sup> 纯合子突变兔,为应用基因编辑技术培育优质家畜新品种建立技术平台<sup>[16-19]</sup>。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 试验动物及伦理证明

试验选用新西兰兔,常规笼养,根据不

同性别和年龄要求分别投喂成兔、母兔和仔兔颗粒饲料。试验兔昼夜交替光照 12 h、温度 18–25 °C、湿度 40%–50%、自由饮水、常规防疫。动物实验和相关操作严格按照中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局和中国国家标准化委员会联合颁发《实验动物福利伦理审查指南》<sup>[20]</sup> (GB/T35892-2018) 进行, 并经扬州大学动物伦理和使用委员会批准 (许可证号: SYXK(Su)2017-0044)。

### 1.1.2 主要试剂

超数排卵和同步发情用药品: 卵泡刺激素 (follicle-stimulating hormone, FSH, 宁波市三生药业有限公司, 批号: 180308)、人绒毛膜促性腺激素 (human chorionic gonadotropin, hCG, 丽珠集团丽珠制药厂, 批号: 091217B); 胚胎培养液及试剂: M2、M16、透明质酸酶、蛋白酶 K (Sigma 公司)、FBS (HyClone 公司); 分子生物学试剂: 无 RNase 水、DNA 聚合酶、连接酶、TA 克隆载体、各种限制性内切酶等均购自宝生物工程 (大连) 有限公司; 其他化学试剂: 苯酚、氯仿、氯化钠、盐酸、碳酸氢钠等均为国产分析纯, 均购自国药集团化学试剂有限公司; 动物用药品: 注射用硫酸链霉素、注射用青霉素钠 (哈药集团制药总厂)。

基因编辑用材料: CRISPR/Cas9 质粒试剂盒及 Annealing Buffer 购自南京尧顺禹生物科技有限公司; Phanta Super-Fidelity DNA Polymerase 购自南京诺唯赞生物科技有限公司; Endo-free Plasmid Mini Kit I 来自 OMEGA 公司 (货号: D6948-01); ScriptMAX Thermo T7 Transcription Kit 购自东洋纺生物科技有限公司 (货号: TSK-101); 抗-反向帽类似物 (ARCA, 货号: 01.NEB.S1411S) 和 poly(A) 聚合酶 (货号: 01.NEB.M0276S) 购自 NEB (北京) 有限公司

(New England Biolabs (Beijing) LTD., NEB); 氯化锂 (LiCl) 购自 Sigma 公司 (货号: L7026)。

### 1.1.3 引物设计与合成

试验所用的 PCR 引物借助于 Primer Premier 5.0 软件设计, 并由上海生工生物技术有限公司或华大基因集团公司合成, 引物序列信息如表 1 所示。sgM-F 在 NCBI 序列号为: NC\_013675.1<sup>[21]</sup>, 基因序列位置为 nt 5 242–5 259, sgM-R 在 nt 5 722–5 739。PCR 扩增片段位于野生型兔 *MSTN* 基因组 (NC\_013675.1) 序列的第 5 242–5 739 位。

## 1.2 方法

### 1.2.1 Cas9-sgRNA 二合一共质粒体外转录

兔 *MSTN* 基因组序列来自美国国家生物技术信息中心 (NCBI), 序列号: NC\_013675.1<sup>[21]</sup>。分别在 *MSTN* 基因组序列 5 532–5 554 和 5 617–5 639 位点设计 sgRNA-1 和 sgRNA-2 的引导序列。sgRNA 引导序列由南京尧顺禹生物科技有限公司制作, sgRNA-1 和 sgRNA-2 的完整引导序列分别为: 5'-CCATGGTAGTAGACC GCTGT-3' 及 5'-ATCTTTGTGGAGTACAGCA-3'。引导序列与 CRISPR/Cas9 质粒试剂盒构建 2 个位点的 2 个 Cas9-sgRNA 二合一共质粒, 将它们分别命名为 *mstn*-sgRNA1 和 *mstn*-sgRNA2。

表 1 用于 *MSTN* 基因编辑和突变检测 PCR 扩增的引物序列

Table 1 Primers used for *MSTN* gene editing and mutation detection

Primer name	Primer sequence (5'→3')
sgRNA-1-F	TATAGCCATGGTAGTAGACCGCTGT
sgRNA-1-R	TATAGATCTTTGTGGGA GTACAGCA
sgRNA-2-F	AAACACAGCGGTCTACTACCATGGC
sgRNA-2-R	AAACTGCTGTACTCCCACAAAGATC
sgM-F	CTTATCGTTCCTTTCCTTT
sgM-R	CCTATAGCCTATGGTACA

以 *mstn*-sgRNA1 和 *mstn*-sgRNA2 质粒为模板, 分别 PCR 扩增 sgRNA-1 和 sgRNA-2。以 sgRNA-1、sgRNA-2 和 Cas9 为模板转录 mRNA, 转录步骤如下: 制备 sgRNA 转录模板: 在 PCR 管中按下述配方组成 50  $\mu$ L PCR 反应体系: 5 $\times$ SF 缓冲液 10  $\mu$ L, dNTPs (10 mmol/L each) 1  $\mu$ L, DNA 质粒 (10 ng/ $\mu$ L) 1  $\mu$ L, sgRNA-1 上下游引物或 sgRNA-2 上下游引物 (引物序列见表 1): 分别 (5  $\mu$ mol/L) 4  $\mu$ L, DNA polymerase (1 U/ $\mu$ L) 1  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 29  $\mu$ L。PCR 反应条件: 95  $^{\circ}$ C 预变性 30 s; 95  $^{\circ}$ C 变性 5 s, 52  $^{\circ}$ C 退火 10 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 5 s, 重复 30 个循环; 72  $^{\circ}$ C 再延伸 5 min; 结束反应。制备 Cas9 转录模板: 在 PCR 管中按上述配方 (上下游引物替换为: Cas9-F 和 Cas9-R, 由南京尧顺禹生物科技有限公司提供) 组成 50  $\mu$ L PCR 反应体系, PCR 反应条件: 95  $^{\circ}$ C 预变性 30 s; 95  $^{\circ}$ C 变性 10 s, 56  $^{\circ}$ C 退火 15 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 68 s, 重复 34 个循环; 72  $^{\circ}$ C 再延伸 5 min; 结束反应。sgRNA 和 Cas9 RNA 转录按照 ScriptMAX Thermo T7 Transcription Kit 试剂盒的操作手册进行。转录产物用氯化锂纯化, 操作步骤: 转录产物中加入 30  $\mu$ L 水和 30  $\mu$ L LiCl 溶液 (8 mol/L), 混匀, -20  $^{\circ}$ C 放置 30 min; 16 000 $\times$ g 离心 15 min, 70%乙醇清洗沉淀, 溶解沉淀使用, 所有用水均无 RNase。

### 1.2.2 *MSTN* 基因突变兔的制备

供体兔超数排卵: 每只供体新西兰母兔肌肉注射总量为 60 IU FSH, 每天注射 2 次 (8:00 和 20:00), 连续 3 d, 最后一次注射 FSH 后 12 h 耳缘静脉注射 100 IU hCG, 并与野生型新西兰公兔配种合笼。同期发情寄母兔 hCG 处理。供体母兔与公兔合笼 17 h 后手术收集受精卵。将 sgRNA 与 Cas9 mRNA 显微注射受精卵, 基因终浓度为 5–15 ng/ $\mu$ L, 注射后的受精卵 38  $^{\circ}$ C、

5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度条件下培养 1–2 h。存活的胚胎移植寄母兔输卵管。妊娠寄母兔移植后 30–32 d 左右自然或催产分娩。

### 1.2.3 *MSTN* 基因突变仔兔的检测

仔兔出生 10–20 d 后取样耳尖皮肤组织约 1 mm<sup>3</sup>, 置于 1.5 mL 离心管中, 添加 1 mL 组织裂解液和 0.5 mg 蛋白酶 K, 50–55  $^{\circ}$ C 翻转混旋过夜; 上清液苯酚/氯仿抽提, 乙醇沉淀基因组 DNA, 灭菌蒸馏水溶解 DNA 样品。*MSTN* 基因片段 PCR 扩增: PCR 上下游引物分别为 sgM-F 和 sgM-R, 引物序列见表 1。PCR 反应条件如下: 95  $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 95  $^{\circ}$ C 变性 45 s, 50  $^{\circ}$ C 退火 35 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 50 s, 共 32 个循环; 72  $^{\circ}$ C 再延伸 10 min, 4  $^{\circ}$ C 停止反应并保存。扩增产物琼脂糖电泳分析片段, 出现 500 bp 左右的条带为扩增有效, PCR 产物进行序列测定, 应用 Lasergene-DNASTAR 分子生物学软件进行序列分析比对。

T 克隆和突变分析: 1%琼脂糖凝胶电泳鉴定和回收 PCR 扩增片段, 并插入 T 载体, 转化和细菌增殖培养, 提取扩增的质粒后测序, 应用 Lasergene-DNASTAR 软件与正常野生型兔序列比对和分析 *MSTN* 基因突变序列。

### 1.2.4 *MSTN* 基因突变纯合子兔繁育及筛选

选择 5–6 月龄 *MSTN* 基因双等位突变原代兔与正常新西兰兔交配, 配种后 15–20 d 妊娠检查, 妊娠兔分娩 F1 代仔兔。仔兔基因突变检测方法同 1.2.3。获得的 F1 代 *MSTN* 基因半合子突变兔与相同突变子进行半同胞近交或回交, 出生的 F2 代仔兔进行 *MSTN* 基因突变兔检测。根据孟德尔定律, F2 代将出现纯合子、半合子和野生型 3 种基因型。

### 1.2.5 *MSTN* 基因突变兔体重测定与增长率比较

选择 F2 代 *MSTN* 基因突变纯合子兔与同品种和年龄的正常野生型新西兰兔作为对照,

14–19 周龄期每周称重，计算体重增长率。通过 SPSS 22.0 统计软件分析 *MSTN* 基因突变纯合子兔与野生型兔的体重增长差异性； $P < 0.05$  为差异显著， $P < 0.01$  为差异极显著。

### 1.2.6 兔臀大肌组织切片的制备与观察

肌肉取样：沿肌纤维方向切开皮肤，无菌微创截取 0.5 cm×0.5 cm×0.2 cm 大小的兔臀大肌，浸入 10%福尔马林溶液固定 24 h。按照 70%、80%、90%和 100%不同浓度的乙醇进行梯度脱水，每次 2 h，然后浸入二甲苯溶液中 0.5 h 进行透明处理。再依次进行包埋、切片、展片、烤片等，使用苏木精-伊红染色，清水冲洗干净后，排除气泡，在含有组织的位置滴加 1 滴树脂，进行封片和镜检。运用 Image Pro Plus 6.0 图像分析软件测量肌纤维横截面积：打开 Image Pro Plus 6.0 软件和导入肌肉组织切片图，打开 AOI 工具栏，勾勒出所有完整的肌纤维切面，通过拉动 H/S/I 曲线工具，将肌纤维标记为红色，然后点击“count/size”，计算出肌纤维的总面积，总面积除以肌纤维数目得出平均肌纤维面积。数据应用 SPSS 22.0 软件进行单因素方差分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 *MSTN* 基因突变原代兔的制备和出生

显微注射受精卵共 96 枚，体外培养 1–2 h 后，存活 78 枚胚胎，存活率为 81.3% (78/96)；显微注射胚胎移植寄母兔 4 只，有 3 只寄母兔怀孕，妊娠率 75.0% (3/4)；妊娠期寄母兔产仔 10 只，其中存活 7 只，并健康生长发育至成年兔，7 只突变兔分别编号为 M1–7。

### 2.2 原代仔兔 *MSTN* 基因突变鉴定结果

应用 sgM-F 和 sgM-R 为引物，兔基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增，PCR 产物凝胶电泳结果见图 1：野生型兔或无基因突变兔 PCR

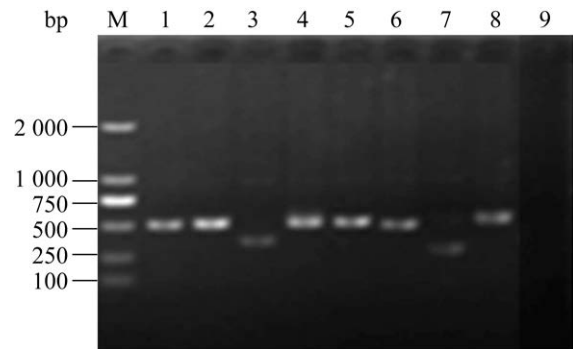


图 1 以出生和存活仔兔基因组 DNA 为模板 PCR 扩增产物凝胶电泳图

Figure 1 Gel electrophoresis of PCR products amplified from genomic DNA of new born and surviving rabbits. Lane M: DL2000 DNA marker; lanes 1–7: rabbit DNA samples (1: M2; 2: M3; 3: M1; 4: M4; 5: M6; 6: M7; 7: M5); lane 8: wild-type rabbit DNA samples; lane 9: blank control (ultrapure water).

产物约 500 bp；其中泳道 3 和 7 (M1、M5) 扩增片段明显变小，可能是缺失了较多的核苷酸；其余泳道 1、2、4、5、6 (M2、M3、M4、M6 和 M7) 扩增片段缩小不明显或没有缩小，PCR 产物测序和比对分析发现凝胶电泳与测序结果吻合。从测序峰图中可以发现，M1–M3 和 M7 出现重叠套峰，而 M4–M6 没有重叠套峰，通过套峰解析和 T 载体克隆测序及序列比对 (图 2)，确认其结果是：M1、M2、M3 和 M7 为双等位杂合突变，M5 为双等位纯合突变，M4 和 M6 未发生突变。总突变率为 71.4% (5/7)，突变类型有碱基缺失、插入和替换，最长的碱基缺失达到 169 bp。7 只原代兔突变类型如下：**M1**: NC\_013675.1: g. [5 493\_5 651 delCATCTT---TGAGAT; 5 492 T>A]; [5 469\_5 637 delTTTTTA---GCTGTG]; p. [H325-S375 delinsDLHLVFNFLKHGRSSPQQF fs\*]; [F317\_S375 delinsGAHEICIWFLTS fs\*]。**M2**: NC\_013675.1: g. [5 594\_5 645 del

AATAAT---TGCTCA]; [5 632\_ 5 633 delinsA]; p. [358\_375 delinsHEICIWFLTS; 0] ; [371\_375 delinsHVGAHEICIW; fs\*]。M3: NC\_013675.1: g. [5 627\_5 636 delAGACCGCTGT]; [5 637\_5 638 insCTCATGT]; p. [V368\_S375 del: HEICIWFLTS] ; [371\_375 insRCGCS; 0] 。M4: 无突变。M5: NC\_013675.1: g. [5 389\_5 524 delTTGAAG---GAGGTTC; 5 629 G>C; 5 530 G>T; 5 533 C>T; 5 537 C>T; 5 538 T>A], p. [290 fs\*]。M6: 无突变。M7: NC\_013675.1: g. [5 539\_5 540 insCT]; [5 539\_5 540 insT]; p. [C340-375 del36; C340\_C375 delinsSVLPQRC LQLICYILMAKNK; fs\*]; [340 del: C; fs\*]。

### 2.3 *MSTN* 基因突变纯合子兔繁育与纯合子筛选结果

野生型 *MSTN* 基因型标记为+/+, *MSTN* 基因半合子突变标记为+/-, *MSTN* 双等位突变或

纯合子突变标记为-/-。选择 3 只 (M2、M3、M7) *MSTN* 基因双等位杂合突变兔进行纯合子繁育。M2、M3、M7 号兔 2 个单等位突变子分别标记为: M2-*a*/*b*、M3-*a*/*b* 和 M7-*a*/*b*。其中 M2-*a*: 缺失 52 bp, M2-*b*: 缺失 1 bp、替换 1 bp; M3-*a*: 缺失 10 bp, M3-*b*: 插入 7 bp、替换 1 bp; M7-*a*: 插入 2 bp, M7-*b*: 插入 1 bp。原代突变兔和野生型兔配种后共获得 39 只 F1 代半合子突仔兔; F1 代兔半同胞近交或回交后出生 69 只 F2 仔兔, 其中有 15 只 (9 只雌兔, 6 只雄兔, ♀: ♂=3: 2) 纯合子突变兔, 纯合子的概率为 21.74% (15/69)。结果共获得了 5 个 *MSTN*<sup>-/-</sup> 基因纯合突变子, 其中 M2-*a* 纯合子突变兔有 3 只, M2-*b*、M3-*a* 和 M7-*b* 各 2 只, M7-*a* 有 6 只, 突变序列与原代兔完全对应 (表 2 和图 3)。

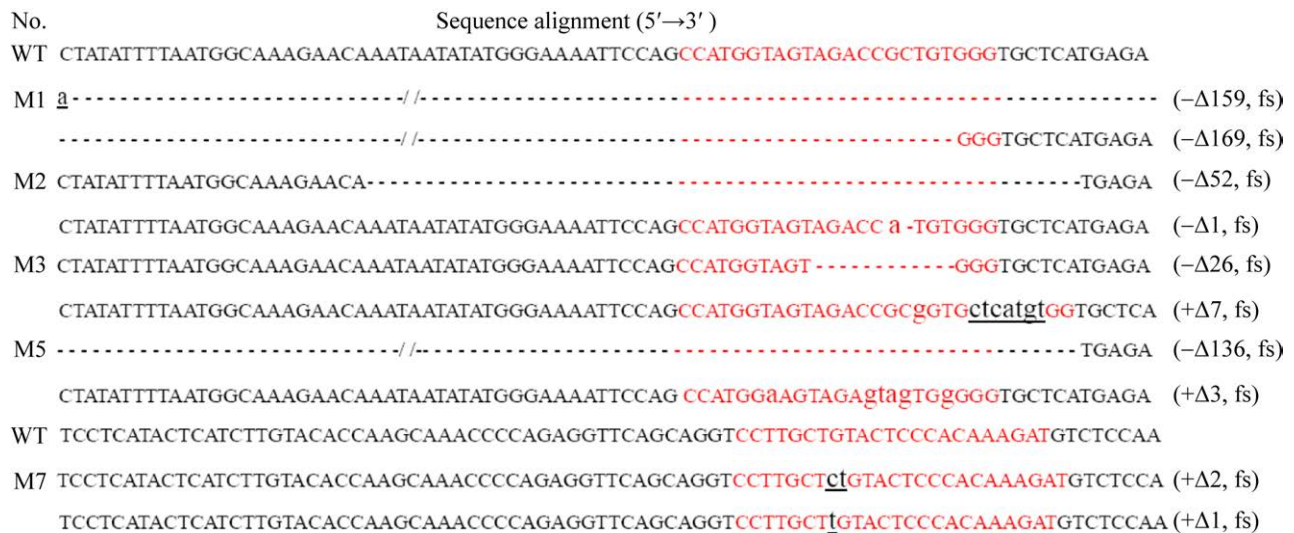


图 2 *MSTN* 突变兔的 PCR 产物和 TA 克隆测序结果

Figure 2 Sequencing results of PCR products from *MSTN* mutant rabbits by vector T cloning. WT is wild-type sequence, “-Δ” indicates nucleotide deletion, “+Δ” and underlined lowercase indicate nucleotide insertion, lowercase indicates nucleotide substitution, “fs” indicates that the reading box shifts. The dash “-” is the missing base, red uppercase letters are bootstrap sequences, red lowercase letters are conversion bases, and black underlined lowercase letters are insertion bases.

表 2 *MSTN* 基因突变纯合子兔的培育结果统计表

Table 2 Statistics of breeding conditions of *MSTN* homozygous mutant rabbits

Numbered F0 rabbits	Numbers of F1 rabbits	Generation F2			
		<i>MSTN</i> <sup>+/+</sup>		<i>MSTN</i> <sup>-/-</sup>	
		<i>MSTN-a</i> gene-type	<i>MSTN-b</i> gene-type	<i>MSTN-a</i> gene-type	<i>MSTN-b</i> gene-type
M2	15	9	8	3	2
M3	14	9	5	2	0
M7	10	13	10	6	2
Total	39	31 (45%)	23 (33%)	11 (16%)	4 (6%)

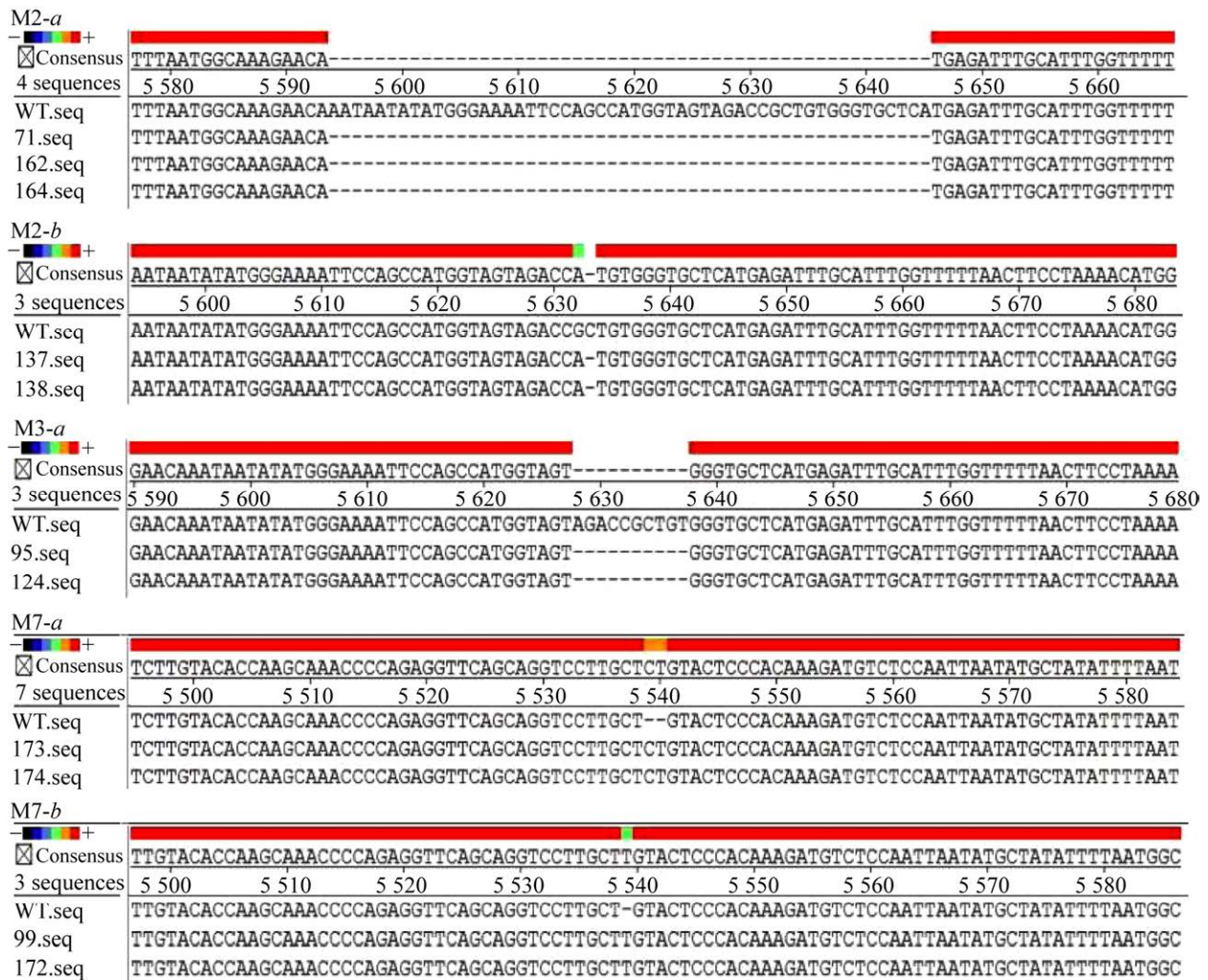


图 3 五种纯合突变兔 *MSTN* 基因纯合突变局部序列

Figure 3 Local sequences of homozygous mutants in five rabbit *MSTN* genes. The numbers before ‘sequences’ represent the number of sequences involved in alignment, ‘WT’ represents the wild-type sequences, and the numbers before ‘.seq’ represent the numbers of selected monoclonal T-vectors. The wide red line indicates that the sequences are completely homologous, and the wide white, green and yellow lines indicate nucleotide deletion, replacement and insertion respectively. M2-*a* genotype: deletion of 52 bp; M2-*b* genotype: deletion of 1 bp, replacement of 1 bp; M3-*a* genotype: deletion of 10 bp, M7-*a* genotype: insertion of 2 bp; M7-*b* genotype: insertion of 1 bp.



### 2.4 *MSTN* 基因突变兔体重增长率显著提高

随机取同周龄期和相同性别的野生型兔，与 *MSTN* 基因突变纯合子兔进行同周龄体重增长比较。在 14–19 周龄的纯合突变兔与野生型兔体重增长率见表 3 和图 4，从中可以看出，14–19 周龄阶段 *MSTN* 基因突变兔平均体重较野生型兔有明显增长率提高，且随着周龄增加体重增长率也从 35.77% 提高到 39.42%

(体重增长率=(同龄期突变兔平均体重-野生型兔体重)/同龄期野生型兔平均体重×100%)。体重增长指数分析可知，14–19 周龄纯合子兔和野生型兔平均周增重分别为 (2 718±120) g 和 (1 969±53) g，纯合突变兔增重率提高 38%，统计学分析各周增重数据差异极显著 ( $P<0.01$ )，这表明 *MSTN* 基因纯合突变与兔体重增长率极显著高于野生型兔 (图 4)。

表 3 *MSTN* 基因突变纯合子兔和野生型兔 14–19 周龄体重增长比较分析

Table 3 Comparative analysis of body weight gain between *MSTN* gene mutant homozygous rabbits and wild-type 14–19-week-old rabbits

No. and genotypes	Weight of 14–19-week-old rabbits						
	14	15	16	17	18	19	
Homozygous mutant rabbits	71# (M2- <i>a</i> )	2 445	2 573	2 653	2 783	2 841	3 090
	138# (M2- <i>b</i> )	2 340	2 495	2 566	2 636	2 708	2 888
	95# (M3- <i>a</i> )	2 314	2 388	2 542	2 652	2 752	2 840
	173# (M7- <i>a</i> )	2 486	2 570	2 696	2 861	2 968	3 057
	179# (M7- <i>a</i> )	2 676	2 774	2 808	2 912	2 981	3 260
Mutant rabbits ( $\bar{x} \pm s$ )		2 452±129	2 560±126	2 653±96	2 768±110	2 850±110	3 027±151
Wild-type rabbits	N21	1 663	1 726	1 827	1 986	2 046	2 102
	N22	1 742	1 826	1 905	1 996	2 078	2 197
	N23	1 829	1 911	1 952	2 029	2 111	2 261
	N24	1 842	1 917	1 964	2 018	2 187	2 273
	N25	1 764	1 801	1 890	1 983	2 074	2 168
Wild-type rabbits ( $\bar{x} \pm s$ )		1 768±65	1 836±72	1 908±49	2 002±18	2 099±49	2 200±63
Rate of increase (%)		38.70	39.42	39.08	38.27	35.77	37.58

### 2.5 *MSTN* 基因突变兔臀大肌肌纤维截面积明显增加

不同 *MSTN* 基因突变半合子、纯合子兔与野生型兔臀大肌肌肉组织切片比较见图 5，*MSTN*<sup>-/-</sup> 纯合突变、*MSTN*<sup>+/-</sup> 半合突变与 *MSTN*<sup>+/+</sup> 野生型兔臀大肌组织切片比较：*MSTN*<sup>-/-</sup> 基因纯合子型兔的肌纤维最粗大，肌纤维间隙最小，单个肌束截面积最大。*MSTN*<sup>-/-</sup> 纯合子兔臀大肌肌纤维平均面积为 (3 512.2±439.2) μm<sup>2</sup>，极显著大于野生型兔 ((1 274.7±327.3) μm<sup>2</sup>， $P<0.01$ )，而且也显著高于 *MSTN*<sup>+/-</sup> 半合子突变兔 ((2 610.3±604.4) μm<sup>2</sup>， $P<0.05$ )；此外，*MSTN*<sup>+/-</sup> 半合子突变兔的臀大肌肌纤维平均截面积 ((2 610.3±604.4) μm<sup>2</sup>) 也显著大于

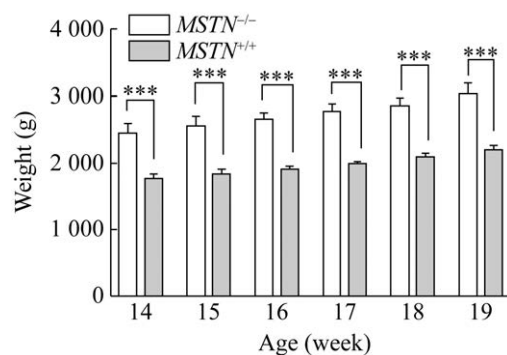


图 4 14–19 周 *MSTN* 基因突变纯合子兔和野生型兔体重增长比较分析

Figure 4 Comparative analysis of body weight gain between *MSTN* mutant homozygous rabbits and wild-type rabbits at week 14–19. \*\*\* means significant difference.

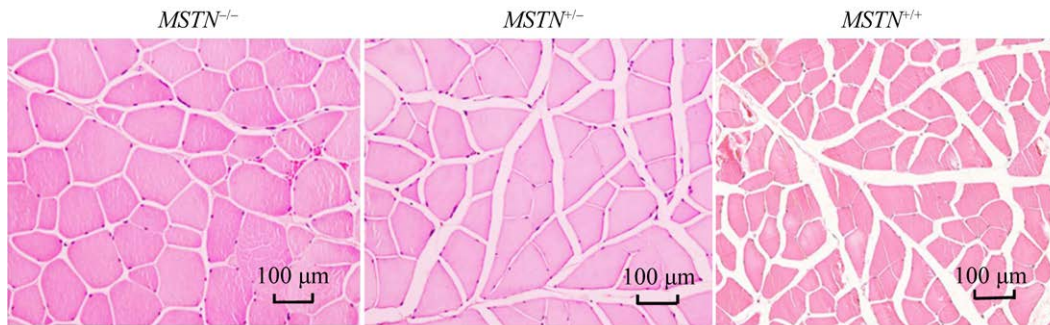


图5 *MSTN* 基因纯合子、半合子突变兔与野生型兔臀大肌组织切片比较

Figure 5 Comparison of gluteus maximus tissue sections between homozygous, hemizygous *MSTN* mutant rabbits and wild-type rabbits. *MSTN*<sup>-/-</sup>: homozygous female rabbit 179#; *MSTN*<sup>+/-</sup>: hemizygous female rabbit in litter with 179#; *MSTN*<sup>+/+</sup>: wild-type rabbit of the same age. The muscle tracts of *MSTN*<sup>-/-</sup> rabbit were significantly thickened and the muscle tracts gap was reduced. The musculature tracts of *MSTN*<sup>+/+</sup> rabbit were smaller, and the musculature tracts were widened significantly. Rabbit *MSTN*<sup>+/-</sup> is somewhere in between.

*MSTN*<sup>+/+</sup>野生型兔 ( $P < 0.05$ )。结果表明：所有突变兔臀大肌均明显较 *MSTN*<sup>+/+</sup>野生型兔肌纤维截面积增大，肌纤维间隙也均小于野生型兔，而且 *MSTN*<sup>-/-</sup>纯合子兔的臀大肌截面积最大，肌纤维间隙最小，说明双等位突变与单突变的肌纤维生长明显前者高于后者。

### 3 讨论

*MSTN* 是一种与 TGF- $\beta$  超家族结构类似的分泌型多肽，广泛存在于哺乳动物的骨骼肌或其他脏器内，同源性高达 100%，对肌肉生长起到负调控作用<sup>[11]</sup>。兔 *MSTN* 基因包括 2 个内含子和 3 个外显子，共编码 375 个氨基酸，其中 C 端有胰蛋白酶水解位点 (RSRR, Arg-Ser-Arg-Arg) 和“半胱氨酸结”二聚体 (6 个半胱氨酸) 结构<sup>[19]</sup>。本研究设计了第 3 外显子的半胱氨酸结 (半胱氨酸结) 位点，目的在于改变 *MSTN* 一级结构 C 端的半胱氨酸结的结构，由此影响其功能，使其失去对肌肉生长的负调控作用。Gim 等<sup>[22]</sup>对盖茨克尼牛 *MSTN* 基因的第 1 和第 3 外显子中的碱基进行替换，导致第 94 位的亮氨酸突变为苯丙氨酸和第 313 位

的半胱氨酸突变为酪氨酸。Yu 等<sup>[23]</sup>设计了波尔山羊 *MSTN* 基因的第 1 和第 3 外显子位点的突变，成功地获得了 2 只双位点突变山羊。这些设计导致 *MSTN* 基因部分序列的多个碱基的缺失和替换，4 个位点的编码半胱氨酸缺失，这种多位点突变很容易导致缺失、移码和转换。本研究在兔 *MSTN* 基因第 3 外显子的半胱氨酸富集区的突变，仅针对第 3 外显子半胱氨酸结的突变同样可以改变 *MSTN* 结构域，起到失活 *MSTN* 的作用，引起肌肉增长加速，形成“双肌”表型<sup>[24]</sup>。

本研究共获得了 5 只 *MSTN* 基因突变原代兔，其突变率为 71.4% (5/7)，高于已有的报道<sup>[23]</sup>，这可能是显微操作的精准及 sgRNA 特异性高等的原因。5 只突变兔中有 2 只 (M1 和 M5) 出现较大片段缺失 (136–169 bp)，这种大片段的缺失不是试验所期望的结果，因为兔基因组的碱基缺失愈多，其生物安全风险愈高。而且，缺失片段的多寡与其“双肌”表型并无正相关性。

本研究从 5 只突变兔中选择 3 只用于纯合子培育，主要在于 M1、M5 号兔缺失碱基过多，增加了生物安全风险度，另一方面，大片

段缺失有可能降低遗传稳定性。原代双等位突变兔与野生型兔交配,产生 F1 代半合子突变兔,其中-a 和-b 突变子各接近 50%,这一结果基本符合孟德尔遗传定律<sup>[25]</sup>。F1 代半合子突变兔未见任何变异,保持与原代兔完全一致的 *MSTN* 基因突变结构;F2 代纯合子发生率 21.74% (15/69),半合子突变为 33.33% (23/69),野生型占 65.22% (45/69),其比例也基本符合孟德尔遗传定律。结果表明,应用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术获得的突变子与天然突变具有相似的遗传比例和传代特性,其双等位杂合突变可分离成 2 个独立的单等位突变子。此外,也表明 3 只 *MSTN* 双等位突变原代兔体细胞与生殖细胞染色体核型完全一致,不存在嵌合体结构。F1 代相同突变兔半同胞交配或回交<sup>[26-28]</sup>,近亲繁殖的 F2 代兔未见明显生理异常或遗传性疾病,公母兔繁殖正常,表明应用 CRISPR/Cas9 基因编辑工具制备的基因突变兔可以象常规育种一样采用近交或回交繁殖、培育 *MSTN* 基因突变纯合子兔。

本研究虽然从纯合子个体的数量上尚不足以建立新的 *MSTN* 突变品系,但从 3 只原代兔均能获得纯合子后代,并且遗传较为稳定,纯合子并未出现突变部位的遗传变异,可以初步判定:利用基因编辑技术制备的突变兔可以得到稳定遗传,而且保持明显的表型,这在遗传育种学上有一定的应用价值<sup>[28-30]</sup>。

纯合突变兔体重增长率极显著高于野生型 (35.77%~39.42%),其中 15 周龄增长率达到高峰 (39.42%),该数据表明:纯合突变子对体内 *MSTN* 合成得到了充分抑制。半合子和纯合子的肌纤维都有增粗,但半合子的肌纤维横截面明显小于纯合子兔。半合子兔的 *MSTN* 基因似乎处于调低状态,可能属于 *MSTN* 基因半显性的特性。

本研究由 3 只原代兔繁衍了 F1 代半合子突变兔和 F2 代纯合子突变兔,表明应用 CRISPR/Cas9 基因编辑制备的双等位突变原代兔可以繁殖 F1 代半合子单突变兔,F1 代兔半同胞近交或回交产生 F2 代兔,并且筛选获得纯合子突变兔。获得的 *MSTN*<sup>-/-</sup>基因纯合突变兔中未发现突变部位的变异;纯合子突变兔体重增长和肌纤维横截面积均显著高于半合子突变兔和野生型兔。这一研究成果为应用基因编辑技术创制和培育优质高产动物新品种建立了实验基础。

## REFERENCES

- [1] Van Eenennaam AL. The contribution of transgenic and genome-edited animals to agricultural and industrial applications. *Revue Sci Et Tech Int Off Epizoot*, 2018, 37(1): 97-112.
- [2] Ruan JX, Xu J, Chen-Tsai RY, et al. Genome editing in livestock: are we ready for a revolution in animal breeding industry? *Transgenic Res*, 2017, 26(6): 715-726.
- [3] Gaj T, Gersbach CA, Barbas CF. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends Biotechnol*, 2013, 31(7): 397-405.
- [4] Zhan TZ, Rindtorff N, Betge J, et al. CRISPR/Cas9 for cancer research and therapy. *Semin Cancer Biol*, 2019, 55: 106-119.
- [5] Bannikov AV, Lavrov AV. CRISPR/Cas9, the king of genome editing tools. *Mol Biol (Mosk)*, 2017, 51(4): 582-594.
- [6] 曹俊霞, 王友亮, 王征旭. 精准调控 CRISPR/Cas9 基因编辑技术研究进展. *遗传*, 2020, 42(12): 1168-1177.  
Cao JX, Wang YL, Wang ZX. Advances in precise regulation of CRISPR/Cas9 gene editing technology. *Hereditas (Beijing)*, 2020, 42(12): 1168-1177 (in Chinese).
- [7] 方锐, 畅飞, 孙照霖, 等. CRISPR/Cas9 介导的基因组定点编辑技术. *生物化学与生物物理进展*, 2013, 40(8): 691-702.  
Fang R, Chang F, Sun ZL, et al. New method of genome editing derived from CRISPR/Cas9. *Prog Biochem Biophys*, 2013, 40(8): 691-702 (in Chinese).
- [8] Whittemore LA, Song K, Li X, et al. Inhibition of myostatin in adult mice increases skeletal muscle mass and strength. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 300(4): 965-971.
- [9] Grobet L, Martin LJ, Poncelet D, et al. A deletion in

- the bovine myostatin gene causes the double-muscling phenotype in cattle. *Nat Genet*, 1997, 17(1): 71-74.
- [10] Boman IA, Klemetsdal G, Blichfeldt T, et al. A frameshift mutation in the coding region of the myostatin gene (*MSTN*) affects carcass conformation and fatness in Norwegian White Sheep (*Ovis aries*). *Anim Genet*, 2009, 40(4): 418-422.
- [11] Aiello D, Patel K, Lasagna E. The myostatin gene: an overview of mechanisms of action and its relevance to livestock animals. *Anim Genet*, 2018, 49(6): 505-519.
- [12] Zhu XX, Zhan QM, Wei YY, et al. CRISPR/Cas9-mediated *MSTN* disruption accelerates the growth of Chinese *Bama* pigs. *Reprod Domest Anim*, 2020, 55(10): 1314-1327.
- [13] Lowe TM, Eddy SR. tRNAscan-SE: a program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence. *Nucleic Acids Res*, 1997, 25(5): 955-964.
- [14] McPherron AC, Lawler AM, Lee SJ. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. *Nature*, 1997, 387(6628): 83-90.
- [15] Guo R, Wan Y, Xu D, et al. Generation and evaluation of myostatin knock-out rabbits and goats using CRISPR/Cas9 system. *Sci Rep*, 2016, 6: 29855.
- [16] He ZY, Zhang T, Jiang L, et al. Use of CRISPR/Cas9 technology efficiently targeted goat myostatin through zygotes microinjection resulting in double-muscling phenotype in goats. *Biosci Rep*, 2018, 38(6): BSR20180742.
- [17] Li WJ, Li RY, Wei YH, et al. Effect of *MSTN* mutation on growth and carcass performance in duroc×Meishan hybrid population. *Animals*, 2020, 10(6): 932.
- [18] Yeh YC, Kinoshita M, Ng TH, et al. Using CRISPR/Cas9-mediated gene editing to further explore growth and trade-off effects in myostatin-mutated F4 medaka (*Oryzias latipes*). *Sci Rep*, 2017, 7: 11435.
- [19] Zhang T, Lu YY, Song SZ, et al. 'Double-muscling' and pelvic tilt phenomena in rabbits with the cystine-knot motif deficiency of myostatin on exon 3. *Biosci Rep*, 2019, 39(5): BSR20190207.
- [20] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 中华人民共和国推荐性国家标准: 实验动物福利伦理审查指南 GB/T 35892—2018. 北京: 中国标准出版社. General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China, Standardization Administration of the People's Republic of China. National Standard (Recommended) of the People's Republic of China: Laboratory animal—Guideline for ethical review of animal welfare. GB/T 35892—2018. Beijing: Standards Press of China (in Chinese).
- [21] GenBank. *Oryctolagus cuniculus* breed Thorbecke inbred chromosome 7, OryCun2.0, whole genome shotgun sequence (NC\_013675.1). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/283562142/>.
- [22] Gim G, Jin Y, Yum S, et al. 94 Efficient generation of myostatin mutation in Korean beef cattle. *Reprod Fertil Dev*, 2020, 32(2): 173.
- [23] Yu B, Lu R, Yuan Y, et al. Efficient TALEN-mediated myostatin gene editing in goats. *BMC Dev Biol*, 2016, 16(1): 26.
- [24] 郭日红. Cas9 技术介导兔和山羊 *MSTN* 与 *CLPG1* 基因编辑的研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2017. Guo RH. Genome editing at *MSTN* and *CLPG1* locus in rabbit and goat using Cas9[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2017 (in Chinese).
- [25] 刘祖洞. 遗传学. 2 版. 北京: 高等教育出版社, 1990. Liu ZD. Genetics. Second Edition. Beijing: Higher Education Press, 1990 (in Chinese).
- [26] Lin X, Jia J, Qin Y, et al. Simple and rapid determination of homozygous transgenic mice via *in vivo* fluorescence imaging. *Oncotarget*, 2015, 6(36): 39073-39087.
- [27] 张飞雪, 吴宁华, 汪佳佳, 等. AMPK $\alpha$ 2 基因敲除鼠饲养繁殖及基因鉴定. 湖北科技学院学报(医学版), 2020, 34(5): 395-397. Zhang FX, Wu NH, Wang JJ, et al. Breeding and gene identification of AMPK $\alpha$ 2 knockout mice. *J Hubei Univ Sci Technol (Med Sci)*, 2020, 34(5): 395-397 (in Chinese).
- [28] Csepregi JZ, Orosz A, Zajta E, et al. Myeloid-specific deletion of *mcl-1* yields severely neutropenic mice that survive and breed in homozygous form. *J Immunol*, 2018, 201(12): 3793-3803.
- [29] Faucherre A, Kissa K, Nargeot J, et al. Comment on: 'Homozygous knockout of the *piezo1* gene in the zebrafish is not associated with *Anemia*'. *Haematologica*, 2016, 101(1): e38.
- [30] Lv Q, Yuan L, Deng J, et al. Efficient generation of myostatin gene mutated rabbit by CRISPR/Cas9. *Sci Rep*, 2016, 6: 25029.

(本文责编 陈宏宇)