

# 基于 CRISPR/Cas9 系统构建绵羊 VASA 基因敲入载体及验证

杨花, 刘孜斐, 吕文莉, 王锋, 张艳丽\*

南京农业大学动物科技学院 羊业科学研究所, 江苏 南京 210095

杨花, 刘孜斐, 吕文莉, 王锋, 张艳丽. 基于 CRISPR/Cas9 系统构建绵羊 VASA 基因敲入载体及验证[J]. 生物工程学报, 2023, 39(10): 4219-4233.

YANG Hua, LIU Zifei, LÜ Wenli, WANG Feng, ZHANG Yanli. Construction and validation of sheep VASA gene knock-in vector based on CRISPR/Cas9 system[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(10): 4219-4233.

**摘要:** 本研究旨在探索 VASA 基因在绵羊睾丸发育中的表达变化, 并通过构建 VASA 基因敲入载体, 为下一步进行绵羊生殖细胞体外诱导分化研究提供基础。采集性成熟前后即 3 月龄(3-month-old, 3M)和 9 月龄(9-month-old, 9M)绵羊睾丸组织, 利用实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qPCR)和 Western blotting 技术分析 VASA 基因的差异表达, 并利用免疫组织化学技术对 VASA 基因的表达定位进行分析。设计靶向 VASA 基因的向导 RNA (guide RNA, gRNA), 并构建同源重组载体, 进行质粒转染绵羊耳成纤维细胞。结合 CRISPR/dCas9 技术对 VASA 基因进行激活, 进一步验证载体效率。结果表明, VASA 基因随着绵羊睾丸发育, 表达水平极显著增加 ( $P < 0.01$ ), 且主要定位在精母细胞和圆形精子细胞中。利用 CRISPR/Cas9 系统构建了 VASA 基因敲入载体, 联合 pEGFP-PGK puro-VASA 载体转染耳成纤维细胞, CRISPR/dCas9 系统激活后, 耳成纤维细胞成功表达 VASA 基因。结果提示, VASA 基因在绵羊睾丸发育和精子发生中发挥潜在功能, 且通过 CRISPR/Cas9 系统可在体外构建 VASA 基因敲入载体, 为下一步探究 VASA 基因对绵羊雄性生殖细胞的发育和分化提供有效的研究手段。

**关键词:** VASA; CRISPR/Cas9; CRISPR/dCas9; 敲入; 绵羊

资助项目: 国家自然科学基金(31872359)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31872359).

\*Corresponding author. E-mail: zhangyanli@njau.edu.cn

Received: 2022-12-01; Accepted: 2023-07-07; Published online: 2023-07-12

# Construction and validation of sheep *VASA* gene knock-in vector based on CRISPR/Cas9 system

YANG Hua, LIU Zifei, LÜ Wenli, WANG Feng, ZHANG Yanli\*

Institute of Sheep and Goat Science, College of Animal Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, Jiangsu, China

**Abstract:** This study aimed to explore the expression changes of *VASA* gene in sheep testis development and to construct *VASA* gene knock-in vector to prepare for the study on the differentiation of sheep germ cells *in vitro*. The testicular tissues of 3-month-old (3M) and 9-month-old (9M) sheep which represent immature and mature stages, respectively, were collected. The differential expression of *VASA* gene was analyzed by quantitative real-time PCR (qPCR) and Western blotting, and the location of *VASA* gene was detected by immunohistochemistry. The sgRNA targeting the *VASA* gene was designed and homologous recombination vectors were constructed by PCR. Subsequently, plasmids were transferred into sheep ear fibroblasts. The *VASA* gene was activated in combination with CRISPR/dCas9 technology to further verify the efficiency of the vector. The results showed that the expression level of *VASA* gene increased significantly with the development of sheep testis ( $P < 0.01$ ), and was mainly located in spermatocytes and round spermatids. The knock-in vector of *VASA* gene was constructed by CRISPR/Cas9 system, and the Cas9-gRNA vector and pEGFP-PGK puro-*VASA* vector were transfected into ear fibroblasts. After CRISPR/dCas9 system was activated, ear fibroblasts successfully expressed *VASA* gene. The results suggest that *VASA* gene plays a potential function in sheep testicular development and spermatogenesis, and the *VASA* gene knock-in vector can be constructed *in vitro* through the CRISPR/Cas9 system. Our results provided effective research tools for further research of germ cell development and differentiation.

**Keywords:** *VASA*; CRISPR/Cas9; CRISPR/dCas9; knock in; sheep

*VASA* 基因是编码 ATP 依赖性 RNA 解旋酶的基因 DEAD-box 家族中的成员, 又名 *DDX4* 或 *MVH*, 最初在果蝇中鉴定出来, 研究表明 *VASA* 基因在无脊椎动物和脊椎动物中高度保守, 且 *VASA* 蛋白的分子功能包括: 可以与生殖细胞建立相关的靶 mRNA 相结合, 以及控制卵子发生过程中翻译的起始<sup>[1]</sup>。目前, *VASA* 基因已经在果蝇、鱼类、蟹类和哺乳动物等的生殖细胞中有广泛研究。在鱼类原始生殖细胞(primordial germ cells, PGCs)的来源和迁移研究中, *VASA* 基因可作为标记物示踪 PGCs 的整个发育过程<sup>[2]</sup>, 且在精子发生整个过程均有表达<sup>[3]</sup>。*VASA* 基因在青蟹的卵巢和睾丸中均

表达, 在精子发生过程中 *VASA* 表达呈现动态变化, 且主要在精原细胞和初级精母细胞表达<sup>[4]</sup>。*VASA* 在人精子头部和尾部的细胞质膜中表达, 且在少精子症男性中表达显著降低, 因此, *VASA* 可以作为男性不育症的分子标志物<sup>[5]</sup>。*VASA* 同源物(*MVH*)基因纯合突变小鼠以性别依赖的方式呈现生殖缺陷, *MVH* 纯合突变会导致雄性小鼠出现生精缺陷, 造成睾丸中减数分裂损伤和细胞凋亡等, 使胚胎中雄性性腺发育异常, 但不影响雌性生殖细胞的发育<sup>[6]</sup>。*VASA* 基因在人胎儿和成年性腺中均有表达, 主要在精母细胞和成熟卵母细胞表达较高, 是人类生殖细胞高度特异性标记基因<sup>[7]</sup>。此外, 在不同物

种中, VASA 基因在不同性别个体中的表达也不同, 比如在雌性血吸虫中表达水平高于雄性<sup>[8]</sup>; 在亚洲黄塘鳖不同性别胚胎中, 卵巢中表达水平高于睾丸, 但出生后则相反<sup>[9]</sup>。因此, VASA 基因被认为是多种动物生殖细胞谱系鉴定的分子标记, 是研究生殖细胞分化和发育的关键基因。在绵羊精原干细胞动态发育研究中, VASA 基因可作为生殖细胞标记辅助示踪精原干细胞的分化过程, 随着绵羊日龄增加, VASA 基因表达逐渐增强, 证明 VASA 基因在绵羊雄性生殖发育中发挥潜在功能<sup>[10]</sup>。目前, 关于 VASA 基因在家畜尤其是绵羊雄性生殖调控中的系统性研究较少, 探索 VASA 基因在绵羊睾丸发育及精子发生中的潜在功能尤为重要。

CRISPR/Cas9 系统包含 Cas9 蛋白和向导 RNA (guide RNA, gRNA), 由 Cas9 蛋白发挥 DNA 双链切割作用, gRNA 起向导识别作用, DNA 双链断裂(double strand breaks, DSB)后利用同源定向修复(homology directed repair, HDR)、微同源介导的末端连接(microhomology-mediated end joining, MMEJ)、基于同源介导的末端连接(homology-mediated end joining, HMEJ)或非同源末端连接方式(non-homologous end joining, NHEJ)进行自我修复, 进而完成基因的靶向突变、插入、缺失或基因敲除, 实现对基因组的修饰<sup>[11-12]</sup>。CRISPR/Cas9 基因编辑技术具有靶向效率高、脱靶效应低和技术难度低等优点, 被广泛用于疾病防治、家畜育种等研究<sup>[13-14]</sup>。CRISPR/Cas9 敲入系统可以将外源 DNA 有效敲入目标基因组位点, 促进靶向基因的功能发挥, 达到编辑基因组的目的<sup>[15]</sup>。目前, 基于 CRISPR/Cas9 基因敲入技术已经成功构建多个基因的敲入细胞系和小鼠模型<sup>[14,16]</sup>。

VASA 基因作为生殖细胞标记物, 研究其对生殖细胞发育的影响至关重要, 本研究通过对绵羊性成熟前后睾丸组织中 VASA 基因的表达模式进行探索, 确定 VASA 基因对生殖细胞发育具有潜在功能;

并基于 CRISPR/Cas9 系统, 构建 pEGFP-PGK puro-VASA 敲入质粒, 利用 CRISPR/dCas9 技术进一步验证敲入效率, 成功构建绵羊 VASA 基因敲入载体, 为研究 VASA 基因在绵羊生殖细胞体外诱导分化及发育中的作用机制奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

绵羊 3 月龄(3-month-old, 3M)和 9 月龄(9-month-old, 9M)睾丸组织采自江苏省泰州市海伦羊业有限公司, 新鲜采集的睾丸组织, 使用生理盐水洗净后, 剪取少量放至组织冻存管中, 并液氮速冻后转移至 $-80^{\circ}\text{C}$ 冰箱, 用于下一步 RNA 提取和蛋白提取。取  $1\text{ cm}^3$  睾丸组织于 4%多聚甲醛中进行组织固定, 用于组织切片和免疫组织化学试验。本研究所涉及的动物试验方案经南京农业大学动物福利和伦理委员会批准(审批号: SYXK(苏)2022-0031)。

### 1.2 组织 RNA 提取及荧光定量 PCR

取约 100 g 睾丸组织于组织研磨管中, 加入 1 mL Trizol (Invitrogen)进行研磨, 待组织充分分解离后, 根据 Trizol 法提取说明书提取组织 RNA, 并根据南京诺唯赞生物科技股份有限公司(Vazyme)反转录说明书进行 cDNA 合成。利用 NCBI 数据库设计 VASA 基因引物(表 1), 并由南京擎科生物技术有限公司合成。根据诺唯赞 SYBR qPCR 荧光定量预混酶说明进行荧光定量实验, 其中反应体系包含: SYBR qPCR Master Mix  $10\ \mu\text{L}$ 、基因上下游引物( $10\ \mu\text{mol/L}$ )各  $0.6\ \mu\text{L}$ 、cDNA  $1\ \mu\text{g}$  和 Nuclease-free water 补充至  $20\ \mu\text{L}$ 。反应条件如下:  $50^{\circ}\text{C}$ , 2 min;  $95^{\circ}\text{C}$  预变性 10 min; 依次  $95^{\circ}\text{C}$  15 s、 $60^{\circ}\text{C}$  30 s、 $72^{\circ}\text{C}$  30 s, 共 40 个循环; 最后  $72^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min。结果数据通过  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  法, 以 *ACTB* 基因为内参基因对目的基因表达量进行相对定量分析。

### 1.3 Western blotting 分析

取睾丸组织进行组织研磨,加入含 1%苯甲基磺酰氟(phenylmethylsulfonyl fluoride, PMSF)的 RIPA 裂解液进行蛋白提取,依据 BCA 蛋白浓度检测试剂盒(碧云天)进行蛋白浓度测定,在 72 °C 进行蛋白变性 10 min 后,在 200 V 电压条件下进行蛋白电泳 40 min,然后在恒流 290 mA 条件下进行 90 min,使蛋白转印至聚偏氟乙烯(poly vinylidene fluoride, PVDF)膜,转印后的膜放置于 5%脱脂奶粉溶液中进行封闭 2 h,用抗体稀释液将 VASA 基因抗体(Affinity)按 1:500 比例稀释后对目的条带 4 °C 过夜孵育,用 TBST 溶液洗涤条带 3 次,每次 5 min 后,进行二抗孵育 2 h,孵育结束后进行 TBST 洗涤,将条带在化学发光检测系统(Bio-Rad)中进行成像,使用 Image J 软件计算灰度值。

### 1.4 免疫组织化学

将采集的睾丸组织用多聚甲醛固定,依次经

过酒精梯度脱水、二甲苯透明和浸蜡后,将组织进行石蜡包埋,使用石蜡组织切片机将包埋的组织切成 6 μm 厚组织切片,再经过组织脱蜡、柠檬酸盐抗原修复,参照免疫组化试剂盒(Boster)说明进行封闭,将 VASA 基因抗体(affinity)使用封闭液进行 1:100 稀释,4 °C 过夜孵育组织切片,使用试剂盒中的山羊抗兔 IgG (H+L)进行二抗孵育,1 h 后用苏木素染核,中性树脂封片,并在显微镜下观察组织形态和染色情况。

### 1.5 gRNA 设计及合成

根据 NCBI 数据库中绵羊 VASA 基因序列信息,针对 24 号外显子后序列,在 gRNA 在线网站(<http://crispr.mit.edu/>)设计靶向 VASA 基因 gRNA 序列(表 2)。进一步采用实验室保存的 Cas9 和 gRNA 共表达载体 pX330,在 gRNA 序列两端加上 *Bbs* I 黏性末端,交由南京擎科生物技术有限公司合成。

表 1 文中所用基因引物序列

Table 1 Primer sequences used in this study

Primer name	Primer sequence (5'→3')	Product length (bp)	GenBank accession No.
ACTB-F	CGCAAGTACTCCGTGTGGAT	146	NM_001009784.3
ACTB-R	TAACGCAGCTAACAGTCCGC		
VASA-F	AGTGCCCTGTTCTTGTGCT	131	XM_042233781.1
VASA-R	ACGACCAGTACGCCAATTC		

表 2 VASA 基因 gRNA 序列

Table 2 gRNA sequences of VASA gene

Primer name	Sequence (5'→3')
VASA-gRNA1-F	tttcttgctttatatacttctgtggaaggacgaaacaccG AACTGTACCACAACTTGC
VASA-gRNA1-R	tcaacttgctatgctgtttccagcatagctctgaaacGC AAGTTTGTGGTACAGTTC
VASA-gRNA3-F	tttcttgctttatatacttctgtggaaggacGAAAAC AACCTGCAAGTTTG
VASA-gRNA3-R	tcaacttgctatgctgtttccagcatagctctgaaacCA AACTTGCAGGTTGTTTC
VASA-gRNA4-F	tttcttgctttatatacttctgtggaaggacgaaacaccG ACTCATCATCTACTGGATT
VASA-gRNA4-R	tcaacttgctatgctgtttccagcatagctctgaaacAAT CCAGTAGATGATGAGTC

The lower and upper case letters in the table represent the sticky terminal sequences and the gRNA sequences of VASA gene, respectively.

### 1.6 Cas9-gRNA 表达载体构建

依据实验室已有步骤<sup>[17]</sup>,将已合成的 gRNA 引物进行退火,即用 T4 多聚核苷酸激酶(T4 polynucleotide kinase, T4 PNK)处理 gRNA,并进行 PCR 反应(反应体系见表 3),37 °C 30 min、95 °C 5 min,以 5 °C/min 速度从 95 °C 退火至 25 °C,4 °C 保存样品。退火后的样品进行酶切和连接插入 pX330 质粒(反应体系见表 4),即 37 °C 5 min,21 °C 5 min,6 个循环。最后将酶切连接反应产物和大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5α 感受态细胞以 1:10 比例混合进行质粒转化和测序鉴定。

### 1.7 重组质粒 EGFP-PGK puro-VASA 的构建及验证

根据 VASA 基因序列信息, 在 24 号外显子附近确定 2 个前间隔序列邻近基序(protospacer adjacent motif, PAM)位点, 设计 5'和 3'同源臂引物, 参照实验室前期反应进行 PCR 扩增<sup>[17]</sup>, 即 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 30 s, 59 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 共 35 个循环; 最后 72 °C 延伸 7 min。扩增得到含有酶切位点的同源臂片段, 并连接至 pMD19-T 载体, 获得 pMD-5&3HA 中间载体; 以 TV-hPITX3-Reverse (Addgene)为模板, 利用高保真酶参照说明利用 P2A-EGFP-F 和 XhoI-loxp-puro-R 引物扩增 P2A (后)-EGFP-LoxP-PGK-Puro-LoxP, 然后取出扩增的产物稀释 10 倍后用 1  $\mu$ L 作为模板用 NheI-P2A-F 和 XhoI-loxp-puro-R 引物扩增 P2A-EGFP-LoxP-PGK-Puro-LoxP, 进行 PCR 产物回收。使用 *Nhe* I 和 *Xho* I 双酶切 pMD-5&3HA 和 P2A-EGFP-LoxP-PGK-Puro-LoxP PCR 回收产物, 回收酶切产物后通过 T4 DNA 连接酶连接, 得到目的产物 pVASA-EGFP-LoxP-PGK-Puro-LoxP (即重组 EGFP-PGK puro-VASA 质粒)载体图谱见图 1 和图 2。此外, 根据 5'和 3'同源臂序列设计的引物和 EGFP-LoxP-PGK-Puro-LoxP 片段相关引物见表 5, 将同源臂产物进行凝胶电泳检测。

### 1.8 绵羊耳成纤维细胞培养及转染

使用实验室前期分离的绵羊耳成纤维细胞进行转染实验。将细胞培养至六孔板培养皿, 用含 10%胎牛血清和 1%双抗的 DMEM 培养基在 37 °C和 5% CO<sub>2</sub> 培养箱进行培养, 细胞汇合度达 95%左右进行传代, 待细胞密度达 70%–80%左右, 根据 Lipofectamine<sup>®</sup>3000 试剂 (Invitrogen)说明将已构建的 Cas9-gRNA 质粒和 pEGFP-PGK puro-VASA 质粒共同进行转染, 即每个六孔板转染质粒 DNA 量共 2.5  $\mu$ g, 转染

48 h 后, 进行药筛, 即利用含抗生素嘌呤霉素 (puromycin, puro)的培养液进行细胞培养, 每天换液, 去除死细胞, 3–5 d 后待细胞长满进行下一步实验及 DNA 和 RNA 提取。

### 1.9 CRISPR dCas9 激活载体构建及转染

如 1.5 所述, 根据 VASA 基因启动子序列信息, 在 sgRNA 设计网站设计靶向激活 VASA 的 sgRNA (表 6)。用 *Bbs* I 在 37 °C条件下酶切载体质粒 dCas9-p300 (Addgene), 琼脂糖凝胶电泳后, 用 DNA 片段回收试剂盒(Tiangen)进行切胶回收目的载体片段, 在 PCR 仪将引物退火反应后, 进行酶连接及质粒转化, 送公司测序后, 提取目的质粒, 成功构建 CRISPR/dCas9-p300 Activator 表达质粒。并在 1.8 基础上药筛后得到的耳成纤维细胞进行转染, 48 h 后提取 RNA 进行下一步 VASA 基因定量表达鉴定及荧光鉴定。

表 3 gRNA PX330 质粒构建反应体系

Table 3 Construction of gRNA pX330 plasmid reaction system

Components	Volume ( $\mu$ L)
sgRNA top 100 $\mu$ mol/L	1
sgRNA bottom 100 $\mu$ mol/L	1
T4 ligation buffer	1
T4 PNK	1
ddH <sub>2</sub> O	6
Total	10

表 4 酶切连接反应体系

Table 4 Enzyme ligation reaction system

Components	Volume ( $\mu$ L)
Cas9 plasmid 100 ng	164 ng/ $\mu$ L $\times$ 0.61 $\mu$ L
10 $\times$ Tango buffer	2
Oligo duplex	2
ATP 10 mmol/L	1
Fast digest <i>Bbs</i> I	1
T7 DNA ligase	0.5
ddH <sub>2</sub> O	12.9
Total	20

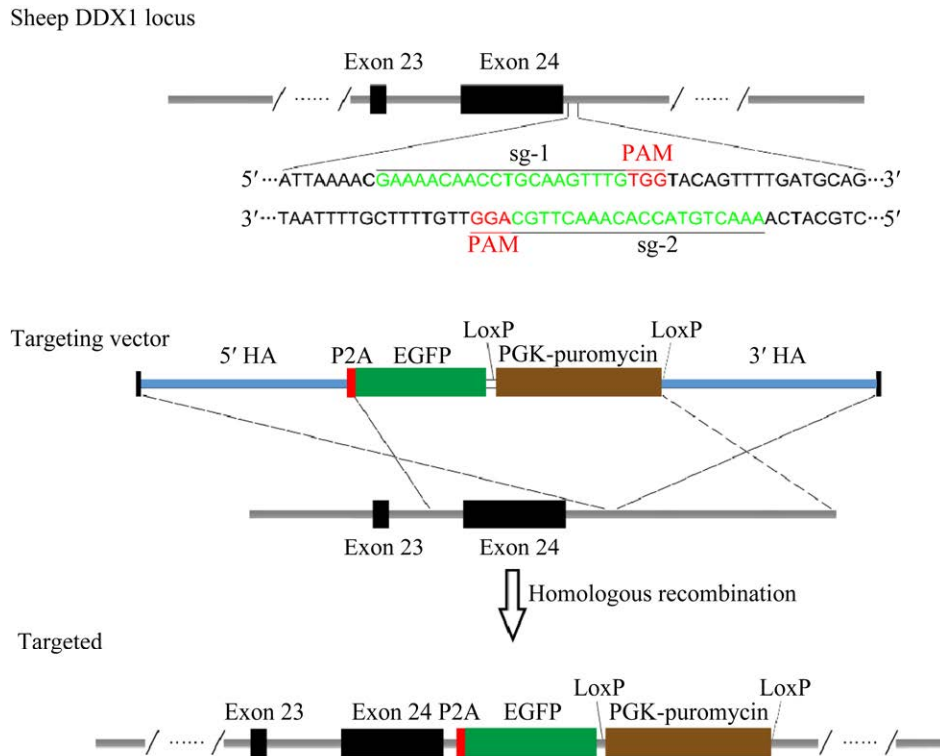


图 1 pEGFP-PGK puro-VASA 载体构建示意图

Figure 1 Schematic diagram of pEGFP-PGK puro-VASA targeting vector construction.

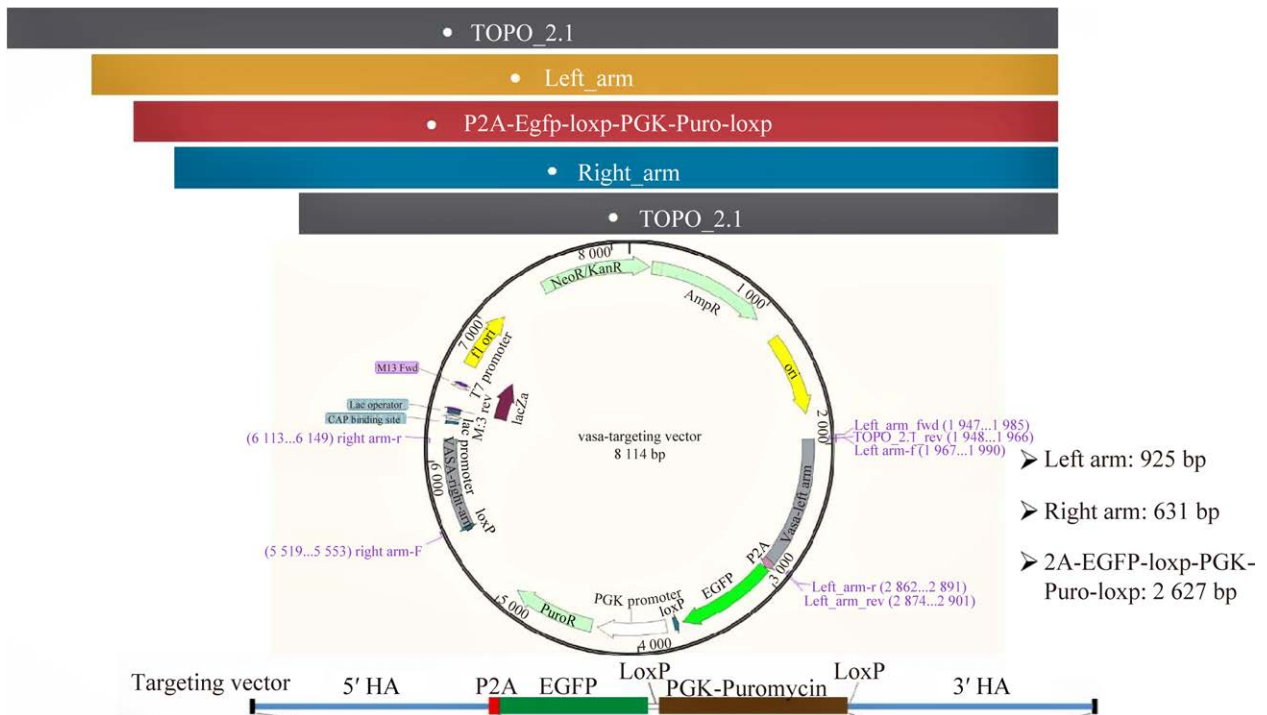


图 2 pEGFP-PGK puro-VASA 载体结构

Figure 2 pEGFP-PGK puro-VASA vector structure.

表 5 VASA 基因同源臂引物序列及 EGFP-LOXP-PGK-PURO-LOXP 片段相关引物

Table 5 Primer sequences of VASA gene homologous arm and EGFP loxP PGK Puro loxP fragment related primers

Primer name	Sequence (5'→3')
5' homologous arm-F	GCTAGCATCCCATGACTCATCATCTA
5' homologous arm-R	TCATCCAGCCCAGCATTTTG
3' homologous arm-F	GGTACCCCCCTGTATTTATGTCTCACTTGTT
3' homologous arm-R	CTCGAGGATGCAGAGAAGAAAGTAG
P2A-EGFP-F	CAGCCTGCTGAAGCAGGCTGGAGACGTGGAGGAGAACCCTGGACCTGTGAGCAAGGGCGA GGAGCT
XhoI-loxp-puro-R	actCTCGAGATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTATGAACCTCTTCGAGGGACCTA
NheI-P2A-F	tcaGCTAGCGGAAGCGGAGCTACTAACTTCAGCCTGCTGAAGCA

### 1.10 细胞 DNA、RNA 提取与荧光定量 PCR

在耳成纤维细胞转染 Cas9-gRNA 及 VASA 重组质粒 48 h 后, 进一步经过 puro 药筛, 待细胞汇合至 95%左右, 吸去培养液, 杜氏磷酸缓冲盐溶液(Dulbecco's phosphate buffered saline, DPBS)洗 3 次, 参照试剂说明(Tiagen)进行细胞基因组 DNA 提取, 纯化后进行下一步 PCR 实验; 在药筛后耳成纤维细胞转染 CRISPR/dCas9-p300 Activator 表达质粒 48 h 后, 加入 Trizol 试剂裂解细胞, 充分裂解后转移至 1.5 mL 离心管, 根据说明书进行 RNA 提取和 cDNA 合成, 并利用荧光定量 PCR 方法检测细胞中 VASA 基因表达变化。

### 1.11 数据处理及分析

本研究所涉及试验均重复至少 3 次, 试验数据以均值±标准误( $\bar{x} \pm s$ )表示。SPSS (24)软件对数据进行差异显著性分析, \*、\*\*和\*\*\*分别代表差异性显著水平为  $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$  和  $P < 0.001$ 。

## 2 结果与分析

### 2.1 VASA 基因在绵羊睾丸发育中的表达及定位

为鉴定 VASA 基因在雄性生殖发育过程中的作用, 利用实时荧光定量 PCR (quantitative

real-time PCR, qPCR)和 Western blotting 技术对性成熟前后即 3 月龄和 9 月龄绵羊睾丸组织进行 VASA 基因表达定量。结果表明, VASA 基因在性成熟后睾丸组织的表达极显著高于性成熟前 ( $P < 0.001$ )。免疫组织化学结果显示, VASA 基因在 3 月龄睾丸的少数精母细胞中呈现阳性着色, 在 9 月龄睾丸的不同生精细胞中均有表达, 主要在大部分精母细胞和圆形精子细胞表达, 而在长形精子细胞和睾丸支持细胞没有表达, 且 9 月龄睾丸中阳性着色程度较 3 月龄高(图 3)。因此, VASA 基因随着睾丸发育, 表达水平显著增高, 证明其在睾丸发育和精子发生中发挥潜在功能。

### 2.2 荧光报告载体 EGFP-PGK puro-VASA 构建

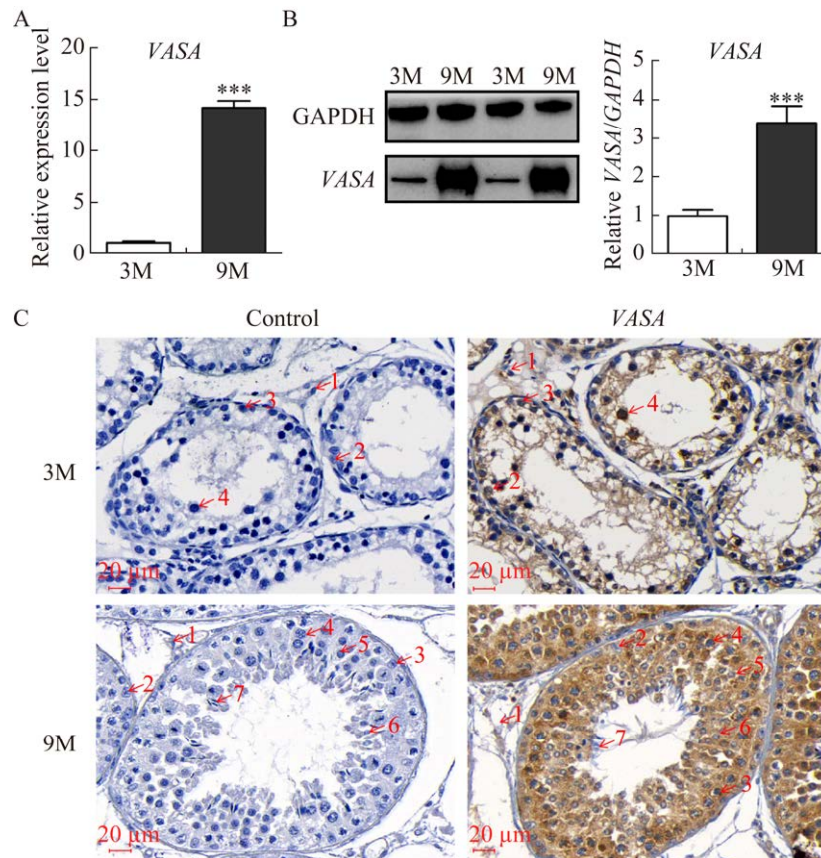
成功构建 EGFP-PGK puro-VASA 表达载体。针对 EGFP-PGK puro-VASA 载体 5'和 3'同源臂进行引物设计, 以绵羊基因组为模板进行

表 6 VASA 基因 sgRNA 序列

Table 6 sgRNA sequences of VASA gene

Primer name	Sequence (5'→3')
sgRNA-a	TTTCTTGGCTTTATATATCTTGTGGAAAGG ACGAAACACCGAACTGTACCACAAACTT GC
sgRNA-b	TCAACTTGCTATGCTGTTTCCAGCATAGCT CTGAAACGCAAGTTTGTGGTACAGTTC





**图 3 VASA 基因在绵羊睾丸中的表达及定位** A: VASA 基因在性成熟前后绵羊睾丸中 mRNA 水平的差异表达. B: VASA 基因在性成熟前后绵羊睾丸中蛋白水平的差异表达. C: VASA 基因在性成熟前后绵羊睾丸组织中的表达定位, 1-7 分别表示间质细胞、支持细胞、精原细胞、初级精母细胞、次级精母细胞、圆形精子细胞和长形精子细胞

**Figure 3** Expression and location of VASA in sheep testis. A: Differential expression of VASA gene at mRNA level in sheep testis before and after sexual maturity. B: Differential expression of VASA gene at protein level in sheep testis before and after sexual maturity. C: Expression localization of VASA gene in sheep testis tissue before and after sexual maturity, 1-7 represents Leydig cells, Sertoli cells, spermatogonia, primary spermatocytes, secondary spermatocytes, round spermatocytes and long spermatocytes, respectively.

PCR 扩增, 如图 4 所示, 凝胶电泳结果表明可成功扩增出两侧同源臂, 且符合目标大小。

### 2.3 VASA 基因 gRNA 设计及 Cas9-gRNA 表达质粒构建

针对 VASA 基因 24 号外显子设计了 3 条 gRNA, 其中 gRNA3 位于正义链, gRNA1 和

gRNA 4 位于负义链, 3 条 gRNA 的打靶位点如图 5 所示, 分别构建 Cas9-gRNA 表达质粒后, 提取 DNA, 进行体外引导切割实验, 电泳结果证明 3 条 gRNA 条带明显, 测序表明 3 个质粒 Cas9-g1、Cas9-g3 和 Cas9-g4 引导序列插入正确(图 6)。



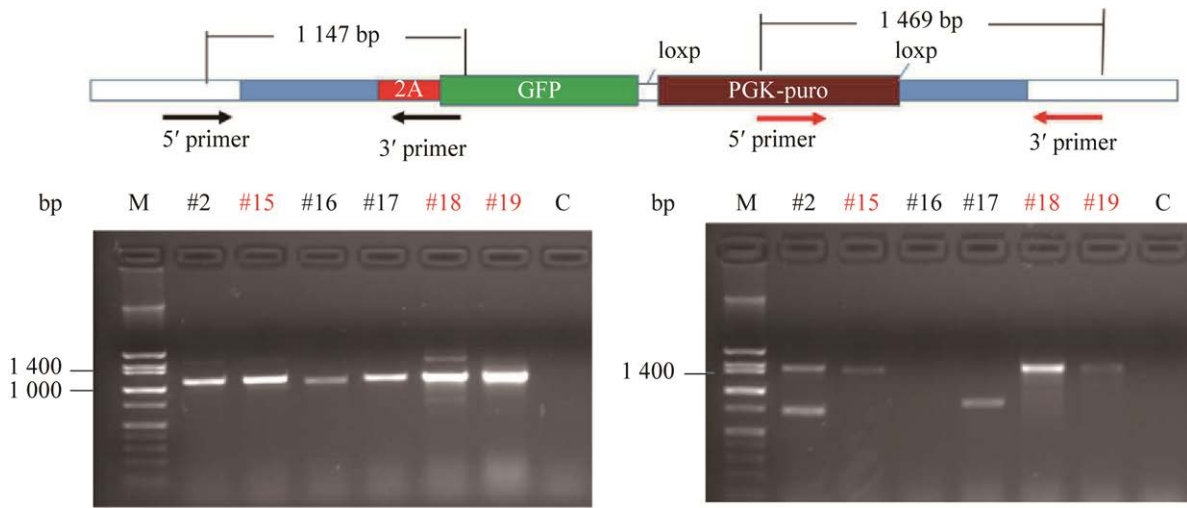


图4 pEGFP-PGK puro-VASA 载体构建 凝胶电泳成像图中 C 和 M 分别表示对照组和 DNA marker, 不同数字代表不同的样品重复

Figure 4 Construction of pEGFP-PGK puro-VASA vector. In the gel electrophoresis image, C and M represent the control group and DNA marker, respectively, and different number represents different sample.

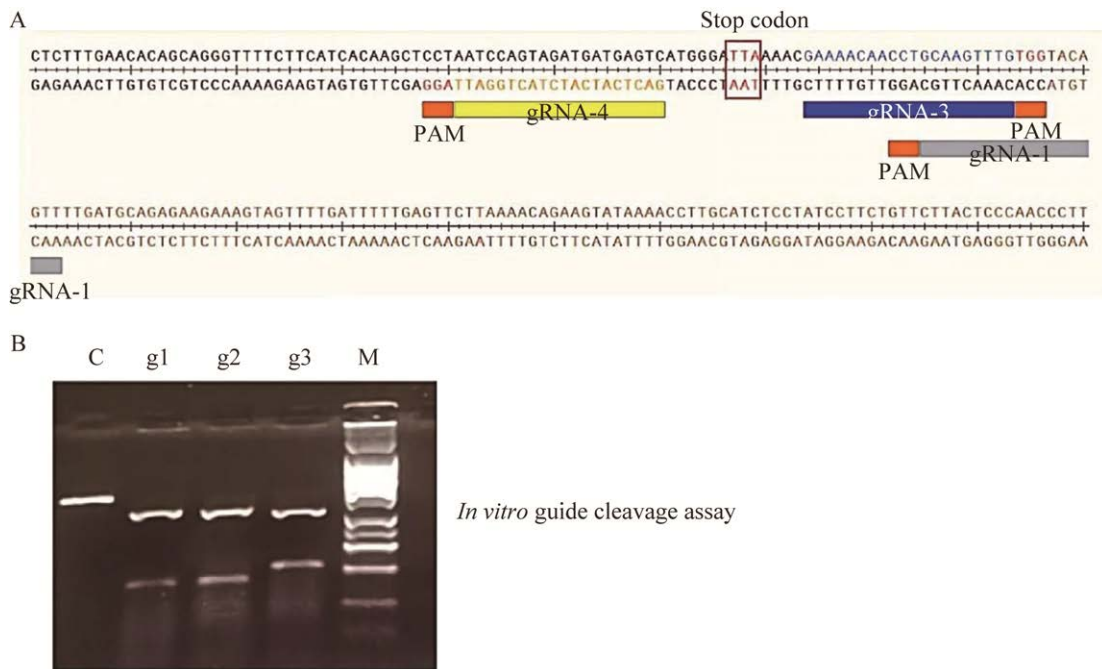


图5 VASA 基因 gRNA 打靶位点及体外引导切割验证 A: 表示 3 条 gRNA 的位点. B: 3 条 gRNA 的体外引导切割实验, 且 c、g1、g3、g4 和 M 分别表示对照组、gRNA1、gRNA3、gRNA4 和 DNA marker  
Figure 5 Targeting site of gRNA at VASA gene and *in vitro* guide cleavage assay. A: The sites of three gRNAs. B: The *in vitro* guided cleavage assay of three gRNAs. c, g1, g3, g4 and M represent the control group, gRNA1, gRNA3, gRNA4 and DNA marker, respectively.

## 2.4 体外转染 VASA 基因 Cas9-gRNA 及 EGFP-PGK puro-VASA 载体并验证其有效性

为验证所构建敲入载体有效性, 在绵羊耳成纤维细胞进行 Cas9-gRNA 和 EGFP-PGK puro-VASA 质粒转染, 48 h 后进行药筛, 持续筛选 3-5 d, 收集细胞基因组 DNA 进行靶向切割

实验检测和扩增目的条带检测; 如图 7 所示, T7E1 检测表明 Cas9-g3 和 Cas9-g4 条带明显, 证明两条 gRNA 可成功进行基因组切割; PCR 扩增结果表明, 转染后可成功扩出 2 627 bp 大小的片段, 证明 VASA 基因被成功敲入细胞中, 后续实验利用 Cas9-gRNA3 载体进行转染。

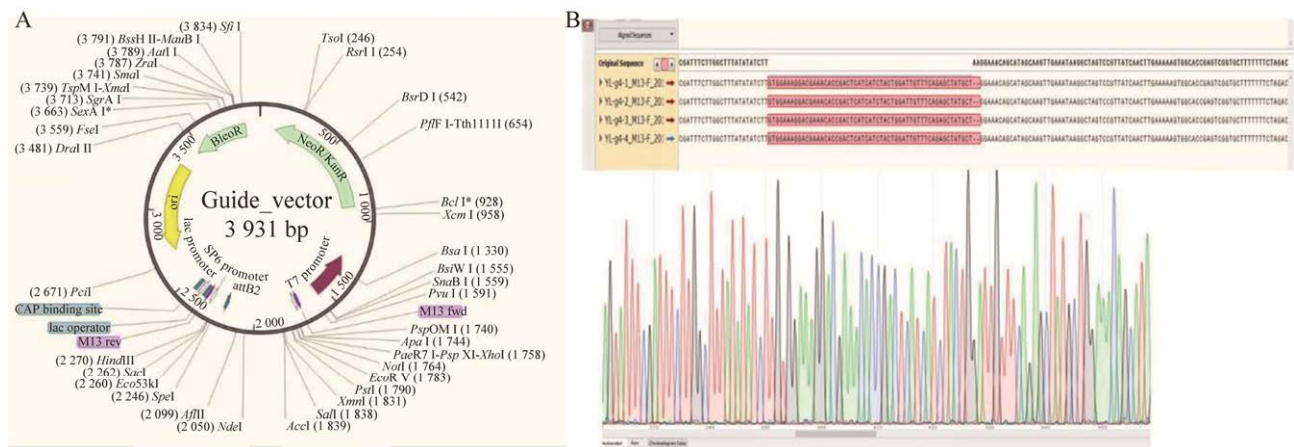


图 6 Cas9-gRNA 载体示意图(A)与 gRNA 序列插入测序鉴定(B)

Figure 6 Schematic diagram of Cas9-gRNA vector (A) and identification of gRNA sequence insertion (B).

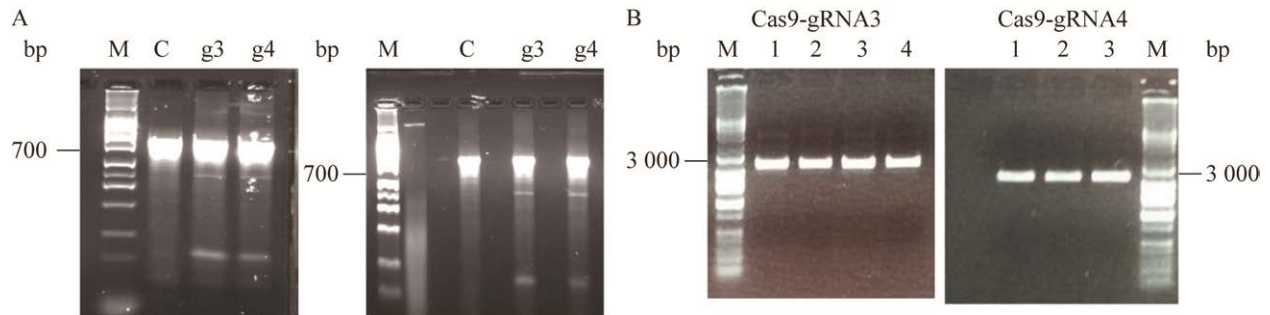


图 7 体外转染 VASA 基因敲入载体验证 A: T7E1 检测 gRNA3 和 4 的基因组切割效果, 泳道 M、C、g3 和 g4 分别表示 DNA marker、对照组、gRNA3 和 gRNA4 组。B: VASA 基因敲入载体扩增电泳分析, Cas9-gRNA3 和 Cas9-gRNA4 表示转染 EGFP-PGK puro-VASA 和 Cas9-gRNA3、4 质粒后扩增片段大小, 泳道 M、1、2、3 和 4 分别表示 DNA marker 和实验重复组

Figure 7 *In vitro* transfection of VASA gene knock-in vector validation. A: The genomic cleavage effect detection of gRNA3 and 4 using T7E1 analysis, and M, C, g3 and g4 represent DNA marker, control group, gRNA3 and gRNA4, respectively. B: VASA gene knock-in vector amplification electrophoresis analysis, Cas9-gRNA3 and Cas9-gRNA4 represent the PCR product of amplified fragments after transfection with EGFP-PGK puro-VASA and Cas9-gRNA3, 4 plasmids, M, 1, 2, 3, 4 represent DNA marker and experiment group repeats, respectively.

### 2.5 CRISPR/dCas9 激活 VASA 基因效率测定

为有效激活 VASA 基因在体外的表达,在 VASA 基因启动子区设计两条 sgRNA (图 8),将已构建的 dCas9 表达质粒和 sgRNA 表达质粒共转染至前期药筛得到的绵羊耳成纤维细胞,48 h 后提取细胞总 RNA 进行 qPCR 鉴定,结果表明,单独转染 sgRNA 时,效果较差,同时转染两条 sgRNA 可有效提高 VASA 基因的表达水平 ( $P<0.05$ ),证明同时转染两条 sgRNA 可有效激活绵羊耳成纤维细胞中 VASA 基因的表达,且绿色荧光结果显示 VASA 基因被成功激活(图 9)。

### 3 讨论

VASA 基因是研究生殖细胞和生殖腺起源和发育的生殖系标记物,但在不同物种之间存在表达差异。已有研究表明 VASA 基因参与雄性生殖细胞的发育,其功能丧失会导致小鼠雄性生殖细胞的增殖和分化受损<sup>[6]</sup>。而目前关于 VASA 基因对绵羊雄性生殖的影响仍未有报道。因此,本研究对 VASA 基因在绵羊睾丸发育中的表达及定位进行探索,利用 CRISPR/Cas9 系统成功构建 VASA 基因敲入载体,并采用 CRISPR/dCas9

技术进行 VASA 基因激活效率鉴定,为未来进一步探索 VASA 基因参与绵羊生殖细胞发育的调控机制提供参考依据。

VASA 基因已被证明在哺乳动物雄性生殖发育过程中发挥重要作用,其在精子发生过程中的表达定位与类染色体密切相关<sup>[1]</sup>。研究表明,VASA 基因在原始生殖细胞中的调控机制在物种间相对保守<sup>[18]</sup>,但在睾丸不同发育阶段呈现差异表达,在新生儿和成人睾丸中,VASA 主要在精母细胞和精子细胞中表达,在体细胞不表达,且成年小鼠睾丸中表达水平较新生小鼠高,VASA 在体内精原干细胞中不表达,但体外分离精原干细胞后,VASA 基因呈现表达,且定位在细胞质<sup>[19]</sup>。在猪睾丸发育研究中,VASA 在青春期前猪睾丸未分化精原细胞中表达,而发育到青春期后,在分化的精母细胞中表达,表明 VASA 基因随着猪睾丸的发育,逐步由精原细胞转移至精母细胞中表达,可作为猪睾丸发育过程中阶段特异性标记基因<sup>[20]</sup>。在青春期前马睾丸中,VASA 主要在精原细胞表达,而在青春期后,表达于精原细胞、精母细胞和圆形精子细胞,且主要在粗线期精母细胞表达,同时在体细胞中没有表达<sup>[21]</sup>。VASA 基因在牛出生后辜

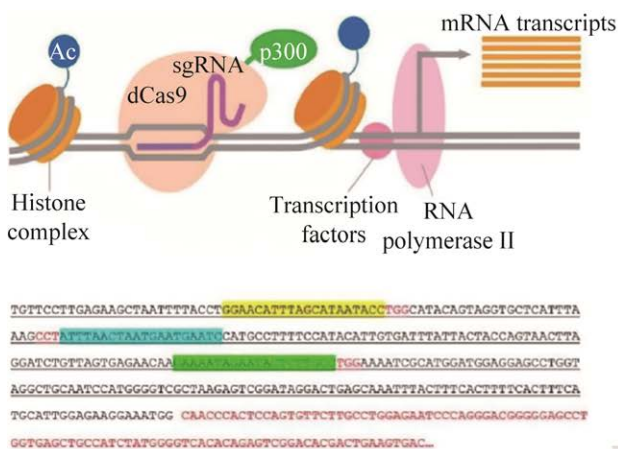
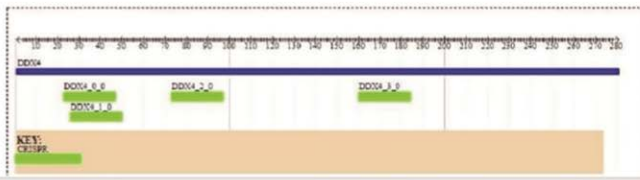
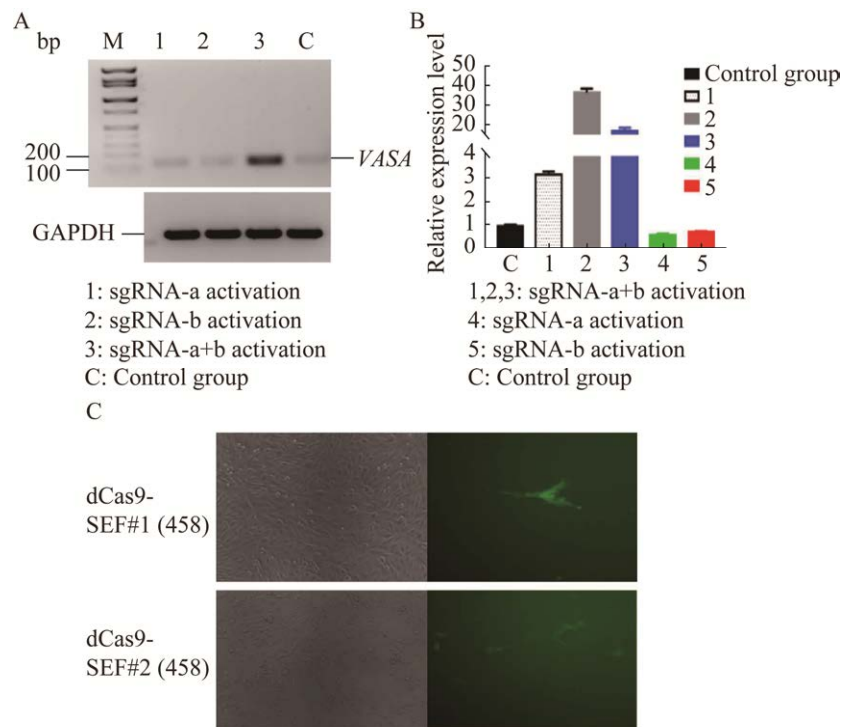


图 8 靶向 VASA 基因的 sgRNA 设计  
Figure 8 Design of sgRNA targeting VASA gene.

Name	Nucleotide sequence	SAE Score	Target	Match string	Number of Hits
DDX4_0_0	GGTATTATGCTAAATG TTC NGG		16	Match string Info	1
DDX4_1_0	GGAGATTATGCATAA TACC NGG		16	Match string Info	2
DDX4_1_0	GGAGCATTATGCATAA TACC NGG		15	Match string Info	2
DDX4_3_0	GAAATAGAACTCT TGCC NGG		16	Match string Info	2
DDX4_3_0	GAAATAGAACTCT TGCC NGG		ENSOAR0000001464 1:RNF17	Match string Info	2
DDX4_2_0	GATTTCATTAGTTA AAT NGG		16	Match string Info	2
DDX4_2_0	GATTTCATTAGTTA AAT NGG		12	Match string Info	2







**图 9** 体外转染 *VASA* 基因 sgRNA 载体激活效率测定 A: 转染载体后, PCR 分析 *VASA* 基因表达情况, 其中泳道 M、1、2、3 和 C 分别表示 DNA marker、sgRNA-a 激活组、sgRNA-b 激活组、sgRNA a 和 b 共同转染组和对照组. B: qPCR 鉴定载体转染后 *VASA* 基因的表达情况, 其中 1、2、3 表示 sgRNA a 和 b 共同转染组, 4 和 5 分别表示 sgRNA-a 和 sgRNA-b 单独激活组. C: 荧光鉴定 *VASA* 基因激活情况, 细胞在 10 倍镜下拍摄

**Figure 9** Detection of the activation efficiency of transfection of *VASA* gene sgRNA *in vitro*. A: After transfection with the vector in cells, PCR was performed to analyze the expression of *VASA* gene, with lanes M, 1, 2, 3, and C representing DNA marker, sgRNA-a activation group, sgRNA-b activation group, sgRNA a and b co-transfection group, and the control group, respectively. B: qPCR analyzed the expression of *VASA* gene after vector transfection, 1, 2, 3 represent sgRNA a and b co-transfection group, 4 and 5 represent sgRNA-a and sgRNA-b activation group, respectively. C: Fluorescence experiment to identify the activation of *VASA* gene, and cells photographed at 10×magnification.

丸发育过程中表达逐步增加, 且主要在分化的精母细胞中表达, 在精原细胞中表达低<sup>[22]</sup>。在本研究中, *VASA* 基因随着绵羊睾丸发育表达逐渐升高, 在 9 月龄睾丸组织中的表达分布较 3 月龄多, 主要在精母细胞和圆形精子细胞表达, 该结果与牛睾丸中研究结果一致。因此, 结果提示 *VASA* 基因主要在精子发生过程中的减数分裂时期发挥功能。

CRISPR/Cas9 技术作为一种高效率、低成本的基因组编辑工具, 在解决家畜育种周期

长、遗传资源有限等问题上被广泛应用<sup>[23]</sup>。在绵羊育种中, 有多项研究利用 CRISPR/Cas9 技术进行 *BLG* 基因和 *MSTN* 基因的敲除, 分别对羊乳“人源化”改造和羊肉品质提升取得显著效果<sup>[24-25]</sup>。在绵羊基因敲入研究中, 已有实验证明利用 CRISPR/Cas9 技术在绵羊胚胎中敲入 *ROSA26* 基因, 并成功得到 8 只在 *ROSA26* 基因座处具有 tGFP 的羊羔<sup>[26]</sup>。通过 CRISPR/Cas9 敲入 *ALPL* 基因中的错义突变, 构建了绵羊低磷酸酯酶症(hypophosphatase, HPP)疾病模型, 用

于研究人类 HPP 疾病机制对牙齿发育的影响<sup>[27]</sup>。为验证 VASA 基因在生殖细胞发育调控中的功能,在前期研究中,已经成功利用分子技术构建山羊报告载体 pVASA-EGFP<sup>[28]</sup>,但目前仍未有利用 CRISPR/Cas9 系统构建绵羊 VASA 基因载体的报道。在最近的研究报道中,利用 CRISPR 介导的精确整合到靶染色体(CRISPR-mediated precise integration into the target chromosome, CRIS-PITCh)的方法将荧光蛋白基因靶向敲入鸡原始生殖细胞的 VASA 同源基因座中,成功对鸡 VASA 同源物 *MVH* 进行表达示踪<sup>[29]</sup>。CRISPR/Cas9 系统在进行 DNA 双链断裂修复时, HDR 利用同源臂结构可以更为精确地进行缺失、碱基替换和插入编码序列,且一些额外的小分子调节剂也可以提升 HDR 效率<sup>[30]</sup>,因此,本研究利用 CRISPR/Cas9 系统,通过连接同源臂结构成功构建了带有荧光蛋白的 VASA 基因敲入载体。

CRISPR/dCas9 系统是由 CRISPR/Cas9 衍生而来,其中 dCas9 系统不具备切割序列的能力,但可以通过融合一个激活元件或抑制元件达到基因激活或抑制的功能<sup>[31]</sup>。实验室前期已利用 CRISPR/dCas9 系统成功构建绵羊 *BMP4*、*DAZL*、*NANOS3* 和 *SYCP2* 过表达载体,并证明其可显著提高绵羊睾丸间质细胞中 4 个基因的表达水平<sup>[32]</sup>。而本研究为证明 VASA 基因敲入载体的有效性,利用 CRISPR/dCas9 技术,激活 VASA 基因的表达,并验证载体构建的效率,但并未在绵羊生殖细胞诱导分化中证明该载体的效率,下一步仍需将该载体在绵羊多能干细胞向雄性生殖细胞诱导分化过程中进行转染,验证其对生殖细胞体外分化的重要性。

总体来说, VASA 在睾丸发育和精子发生中的表达,证明其对精子发生的重要性。并利用 CRISPR/Cas9 技术体外构建 VASA 基因敲入载

体,结合 CRISPR/dCas9 系统证明载体的有效性,为下一步研究 VASA 基因对绵羊雄性生殖细胞发育和分化的研究提供参考。

## 4 结论

综上所述,本研究首先以性成熟前后绵羊睾丸组织为研究对象,检测到生殖细胞标记基因 VASA 在睾丸发育中,表达逐渐增加,主要定位在精母细胞中,在精原细胞中表达较少,且体细胞中几乎没有表达,因此, VASA 基因可能通过调控雄性减数分裂而影响生精细胞的分化。利用 CRISPR/Cas9 和 CRISPR/dCas9 系统,首次构建了绵羊 VASA 基因的体外敲入载体,并验证其敲入效率,为探究 VASA 基因参与绵羊精子发生过程的调控机制提供基础。

## REFERENCES

- [1] NOCE T, OKAMOTO-ITO S, TSUNEKAWA N. Vasa homolog genes in mammalian germ cell development[J]. Cell Structure and Function, 2001, 26(3): 131-136.
- [2] WU XL, TANG ZK, LI W, CHU ZJ, HONG XY, ZHU XP, XU HY. Identifying the germ cells during embryogenesis and gametogenesis by germ-line gene *vasa* in an anadromous fish, American shad *Alosa sapidissima*[J]. Journal of Fish Biology, 2018, 92(5): 1422-1434.
- [3] MILANI L, MAURIZII MG. Vasa expression in spermatogenic cells during the reproductive-cycle phases of *Podarcis sicula* (Reptilia, Lacertidae)[J]. Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution, 2015, 324(5): 424-434.
- [4] WANG YL, CHEN YD, HAN KH, ZOU ZH, ZHANG ZP. A *vasa* gene from green mud crab *Scylla paramamosain* and its expression during gonadal development and gametogenesis[J]. Molecular Biology Reports, 2012, 39(4): 4327-4335.
- [5] GUO X, GUI YT, TANG AF, LU LH, GAO X, CAI ZM. Differential expression of VASA gene in ejaculated spermatozoa from normozoospermic men and patients with oligozoospermia[J]. Asian Journal of Andrology,

- 2007, 9(3): 339-344.
- [6] TANAKA SS, TOYOOKA Y, AKASU R, KATOH-FUKUI Y, NAKAHARA Y, SUZUKI R, YOKOYAMA M, NOCE T. The mouse homolog of *Drosophila* Vasa is required for the development of male germ cells[J]. *Genes & Development*, 2000, 14(7): 841-853.
- [7] CASTRILLON DH, QUADE BJ, WANG TY, QUIGLEY C, CRUM CP. The human VASA gene is specifically expressed in the germ cell lineage[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000, 97(17): 9585-9590.
- [8] DIAO YJ, HUA MQ, SHAO YJ, HUANG W, LIU M, REN CP, JI YS, CHEN JM, SHEN JJ. Preliminary characterization and expression of *Vasa*-like gene in *Schistosoma japonicum*[J]. *Parasitology Research*, 2015, 114(7): 2679-2687.
- [9] LIU XL, ZHU YY, ZHAO YY, WANG YK, LI W, HONG XY, YU LY, CHEN C, XU HY, ZHU XP. *Vasa* expression is associated with sex differentiation in the Asian yellow pond turtle, *Mauremys mutica*[J]. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, 2021, 336(5): 431-442.
- [10] 乌云毕力格. 绵羊精原干细胞的分离富集与体外培养研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古大学博士学位论文, 2011.  
BORJIGIN UYUNBILIG. Enrichment and *in vitro* culture of the ovine spermatogonial stem cell[D]. Hohhot: Doctoral Dissertation of Inner Mongolia University, 2011 (in Chinese).
- [11] 路钦越, 陈志, 杨章平. CRISPR/Cas9 基因编辑技术综述[J]. *河南农业*, 2021(21): 60-62.  
LU QY, CHEN Z, YANG ZP. A review of CRISPR/cas9 gene editing technologies [J]. *Agriculture of Henan*, 2021(21): 60-62 (in Chinese).
- [12] YAO X, WANG X, HU XD, LIU Z, LIU JL, ZHOU HB, SHEN XW, WEI Y, HUANG ZJ, YING WQ, WANG Y, NIE YH, ZHANG CC, LI SL, CHENG LP, WANG QF, WU Y, HUANG PY, SUN Q, SHI LY, et al. Homology-mediated end joining-based targeted integration using CRISPR/Cas9[J]. *Cell Research*, 2017, 27(6): 801-814.
- [13] 徐景, 杨光, 江美祺, 丁向彬, 郭益文, 胡德宝, 李新, 郭宏, 张林林. CRISPR/Cas9 技术在畜禽育种中的研究进展[J]. *中国畜牧兽医*, 2022, 49(4): 1374-1383.
- XU J, YANG G, JIANG MQ, DING XB, GUO YW, HU DB, LI X, GUO H, ZHANG LL. Research advances on CRISPR/Cas9 technology in livestock and poultry breeding[J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2022, 49(4): 1374-1383 (in Chinese).
- [14] PLATT RJ, CHEN SD, ZHOU Y, YIM MJ, SWIECH L, KEMPTON HR, DAHLMAN JE, PARNAS O, EISENHAURE TM, JOVANOVIĆ M, GRAHAM DB, JHUNJHUNWALA S, HEIDENREICH M, XAVIER RJ, LANGER R, ANDERSON DG, HACOEN N, REGEV A, FENG GP, SHARP PA, et al. CRISPR-Cas9 knockin mice for genome editing and cancer modeling[J]. *Cell*, 2014, 159(2): 440-455.
- [15] HE XJ, TAN CL, WANG F, WANG YF, ZHOU R, CUI DX, YOU WX, ZHAO H, REN JW, FENG B. Knock-in of large reporter genes in human cells via CRISPR/Cas9-induced homology-dependent and independent DNA repair[J]. *Nucleic Acids Research*, 2016, 44(9): e85.
- [16] GHETTI S, BURIGOTTO M, MATTIVI A, MAGNANI G, CASINI A, BIANCHI A, CERESETO A, FAVA LL. CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein-mediated knockin generation in hTERT-RPE1 cells[J]. *STAR Protocols*, 2021, 2(2): 100407.
- [17] 周文君, 郭日红, 邓明田, 王锋, 张艳丽. RS-1 提高 CRISPR-Cas9 系统介导的人乳铁蛋白基因敲入效率[J]. *生物工程学报*, 2017, 33(8): 1224-1234.  
ZHOU WJ, GUO RH, DENG MT, WANG F, ZHANG YL. RS-1 enhanced the efficiency of CRISPR-Cas9 mediated knock-in of human lactoferrin[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2017, 33(8): 1224-1234 (in Chinese).
- [18] PERILLO M, SWARTZ SZ, WESSEL GM. A conserved node in the regulation of Vasa between an induced and an inherited program of primordial germ cell specification[J]. *Developmental Biology*, 2022, 482: 28-33.
- [19] AZIZI H, RANJBAR M, RAHAIEE S, GOVAHI M, SKUTELLA T. Investigation of VASA gene and protein expression in neonate and adult testicular germ cells in mice *in vivo* and *in vitro*[J]. *Cell Journal*, 2020, 22(2): 171-177.
- [20] LEE R, LEE WY, PARK HJ, HA WT, WOO JS, CHUNG HJ, LEE JH, HONG K, SONG H. Stage-specific expression of DDX4 and c-kit at different developmental stages of the porcine testis[J]. *Animal Reproduction Science*, 2018, 190: 18-26.

- [21] KIM J, JUNG H, YOON M. VASA (DDX4) is a putative marker for spermatogonia, spermatocytes and round spermatids in stallions[J]. *Reproduction in Domestic Animals*, 2015, 50(6): 1032-1038.
- [22] FUJIHARA M, KIM SM, MINAMI N, YAMADA M, IMAI H. Characterization and *in vitro* culture of male germ cells from developing bovine testis[J]. *Journal of Reproduction and Development*, 2011, 57(3): 355-364.
- [23] RUAN JX, XU J, CHEN-TSAI RY, LI K. Genome editing in livestock: are we ready for a revolution in animal breeding industry?[J]. *Transgenic Research*, 2017, 26(6): 715-726.
- [24] ZHOU WJ, WAN YJ, GUO RH, DENG MT, DENG KP, WANG Z, ZHANG YL, WANG F. Generation of beta-lactoglobulin knock-out goats using CRISPR/Cas9[J]. *PLoS One*, 2017, 12(10): e0186056.
- [25] CRISPO M, MULET AP, TESSON L, BARRERA N, CUADRO F, dos SANTOS-NETO PC, NGUYEN TH, CRÉNÉGUY A, BRUSSELLE L, ANEGÓN I, MENCHACA A. Efficient generation of myostatin knock-out sheep using CRISPR/Cas9 technology and microinjection into zygotes[J]. *PLoS One*, 2015, 10(8): e0136690.
- [26] WU MM, WEI CH, LIAN ZX, LIU RZ, ZHU CY, WANG HH, CAO JX, SHEN YL, ZHAO FP, ZHANG L, MU Z, WANG YY, WANG XG, DU LX, WANG CD. Rosa26-targeted sheep gene knock-in *via* CRISPR-Cas9 system[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 24360
- [27] MOHAMED FF, CHAVEZ MB, HUGGINS S, BERTELS J, FALCK A, SUVA LJ, FOSTER BL, GADDY D. Dentoalveolar defects of hypophosphatasia are recapitulated in a sheep knock-in model[J]. *Journal of Bone and Mineral Research*, 2022, 37(10): 2005-2017.
- [28] 颜光耀, 李佩真, 任才芳, 王锋, 张艳丽. 山羊生殖细胞特异报告载体 pVASA-EGFP 的构建及表达[J]. *生物工程学报*, 2015, 31(9): 1313-1324.
- YAN GY, LI PZ, REN CF, WANG F, ZHANG YL. Construction of goat germ cell specific reporting system pVASA-EGFP[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2015, 31(9): 1313-1324 (in Chinese).
- [29] EZAKI R, ICHIKAWA K, MATSUZAKI M, HORIUCHI H. Targeted knock-in of a fluorescent protein gene into the chicken *Vasa* homolog locus of chicken primordial germ cells using CRIS-PITCH method[J]. *The Journal of Poultry Science*, 2022, 59(2): 182-190.
- [30] ZHANG JP, LI XL, LI GH, CHEN WQ, ARAKAKI C, BOTIMER GD, BAYLINK D, ZHANG L, WEN W, FU YW, XU J, CHUN N, YUAN WP, CHENG T, ZHANG XB. Efficient precise knockin with a double cut HDR donor after CRISPR/Cas9-mediated double-stranded DNA cleavage[J]. *Genome Biology*, 2017, 18(1): 35.
- [31] LEE MH, LIN CC, THOMAS JL, LI JN, LIN HY. Cellular reprogramming with multigene activation by the delivery of CRISPR/dCas9 ribonucleoproteins *via* magnetic peptide-imprinted chitosan nanoparticles[J]. *Materials Today Bio*, 2021, 9: 100091.
- [32] YANG H, DENG MT, LV WL, WEI ZY, CAI Y, CHENG PY, WANG F, ZHANG YL. Overexpression of *bmp4*, *dazl*, *nanos3* and *sycp2* in hu sheep leydig cells using CRISPR/dcas9 system promoted male germ cell related gene expression[J]. *Biology*, 2022, 11(2): 289.

(本文责编 陈宏宇)