# 酪氨酸酶基因敲除白化西藏小型猪研发报告

## 一、动物模型的命名

中文命名：酪氨酸酶基因敲除白化西藏小型猪

英文命名：Tyrosinase gene knockout albino Tibet minipig

## 二、研究背景综述资料

西藏小型猪原产于我国青藏高原，是少有的高原型猪种[1]，能适应恶劣的高寒气候和以放牧为主的低劣饲养条件[2]，也是我国目前已知小型猪品种中体重最轻的品种之一。2004年顾为望教授等人从中国西藏林芝地区将藏猪引种到亚热带地区中国广州，进行了风土驯化和实验动物化研究，并正式命名为实验用西藏小型猪[3]。

西藏小型猪四肢结实紧凑，蹄质坚硬，被毛多为黑色硬毛，颈部有一直延伸到肩部的鬃毛（图1）。中国猪品种志记载，成年雌性藏猪体重30.96 kg，体长80.31 cm，体高48.81 cm，胸围71.74 cm；成年雄性藏猪体重38.30 kg，体长82.58 cm，体高49.83 cm，胸围77.00 cm[4]。研究发现藏猪中有18个与胎盘发育相关的基因和39个与子宫血液循环相关的基因得到了快速进化，使藏猪能在条件恶劣的高海拔环境下成功繁殖后代[5]。与普通家猪相比，藏猪通过减少每胎的产仔数量（藏猪：4-8头每胎，家猪：8-10头每胎），优化子宫血液循环，有效增加氧的利用效率，来产出更强壮的仔猪以适应恶劣环境（仔猪与母猪的体重比例，藏猪：2.83%，家猪：0.57%）[5]。藏猪有较强的耐寒能力，与胞内线粒体产能有着密切的关系。西藏小型猪线粒体DNA序列具有一定的独特性，其线粒体控制区的串联重复区具有A型和B型。约有54.9％的西藏小型猪的串联重复区序列全部为“gtacacgtgc”，称为A型；约有45.1％的西藏小型猪的串联重复区序列在靠近3’端为“gtacacgtgc”，而靠近5’端有较多的G→A转换，形成“gtacacatge”和“gtacacgtac”排列或交错排列，称为B型。而国内其他小型猪和在基因库查询到的其他猪种的串联重复区均只有A型，很少发生变异，B型未见报道[6]。



图1 实验用西藏小型猪

Figure 1 Laboratory Tibet minipigs

西藏小型猪生长速度慢，耐粗饲，体型匀称，抗病性和抗逆性好，手术耐受性强，是较为理想的实验用小型猪种。但由于西藏小型猪全身被毛和皮肤均为黑色，有时会影响了某些实验操作和观察，如皮肤颜色太深使得耳缘静脉不清晰，难以顺利进针，不易于进行耳缘静脉给药。此外，也不利于对皮肤充血、淤血、出血、炎症、红肿、过敏等症状的观察。白化品系实验动物，如BALB/c小鼠、SD大鼠、新西兰大白兔、白化豚鼠等，便于实验操作和观察，所以更容易受到研究者的喜爱，白化品系实验动物更受研究者喜爱。但目前自然界中尚未发现天然白化的西藏小型猪品种。

动物的肤色、毛色和瞳色是由黑色素的合成和分布决定的。皮肤的黑色素细胞起源于神经嵴，而眼睛的视网膜色素上皮 （RPE） 起源于视杯[7]。黑色素有两种，包括真黑素和褐黑素，可按一定比例混合（图2）。混合黑色素中，真黑素比例越高，就越呈黑色；而褐黑素比例越高，就越呈红色。酪氨酸酶基因（tyrosinase gene，*TYR*）所表达的酪氨酸酶是黑色素合成的关键酶（图2），是一种触发黑色素生物合成的第一步和限速步骤的酶[8,9]。皮肤中的黑色素细胞主要分布于表皮基底层和毛囊。皮肤黑色素可吸收紫外辐射，防止皮肤细胞受到紫外照射损伤。眼皮肤白化病（oculocutaneous albinism，OCA）是一组遗传性黑色素合成障碍疾病，其特征是皮肤/头发中部分或完全没有色素，也与常见的发育性眼缺陷有关[10]。全世界各种形式的白化病的患病率差异很大，据估计约为1/17000[11]。OCA临床上有不同分类，OCA1是最严重最常见的类型，由TYR基因的双等位基因突变引起，全球患病率估计为1：40000[12]。根据突变的严重程度，OCA1 进一步分为两种亚型，OCA1A 和 OCA1B。OCA1A 是最严重的 OCA1 类型，由于酪氨酸酶 （Tyr） 活性的丧失，导致黑色素生成完全缺乏。OCA1A患者终生无色素沉着，表现为白发和睫毛、皮肤苍白和半透明虹膜[13]。与OCA1A不同，与未受影响的人相比，OCA1B的特点是Tyr活性和黑色素产生减少。OCA1B患者的皮肤和头发色素减退，具有晒黑的能力，随着年龄的增长积累黑色素。然而，OCA1的两种亚型都有共同的特征，包括眼球震颤、中央凹发育不全伴视力下降以及视交叉处神经节细胞轴突异常脱落。其中，中央凹发育不全和视网膜到视皮层的光感神经纤维走行异常[14]，可导致斜视和降低立体视觉。佩戴深色眼镜能减轻眼畏光症状。但OCA患者有正常的寿命、发育、智力和生育能力。

黑色素生物合成和黑色素抑制剂-01

图2 黑色素的合成

此图引自刘圆圆等人的文章[15]。PAH，苯丙氨酸羟化酶；TYR，酪氨酸酶；TRP，酪氨酸酶相关蛋白。黑色素有两种，包括真黑素和褐黑素。

Figure 2 Synthesis of melanins

This figure is quoted from the article of Yuanyuan Liu et al[15]. PAH, phenylalanine hydroxylase; TYR, tyrosinase; TRP, tyrosinase related protein. There are two kinds of melanin, including eumelanin and pheomelanin.

本模型目的为了更好提高西藏小型猪品种在科研实验和医疗行业中的利用率，我们采用CRISPR/Cas9基因编辑技术受精卵胞质内注射法定向培育了酪氨酸酶基因敲除白化西藏小型猪，使其在更易于实验观察和实验操作，能得到更广泛的应用。白化西藏小型猪全身皮肤和被毛均呈白色，眼睛因缺乏黑色素而呈红色，呈典型的白化表型，对于研究OCA疾病的发病机制和治疗具有重要意义，有效促进今后探索基因治疗和干细胞移植治疗在改善OCA疾病视力水平的研究。同时白化西藏小型猪的皮肤更加清晰，有利于对皮肤红肿、出血、淤血、过敏、炎症、损伤等的观察，还便于在皮肤或被毛上作清晰的标记。经统计白化西藏小型猪的体尺指标、繁殖性能、血液生理和生化指标等与普通西藏小型猪对应指标相比，基本上无统计学显著性差异（*P* >0.05），适合进一步培育成实验小型猪新品系推广应用。

## **三、**动物模型的制备方法

**3.1 实验材料**

3.1.1 实验动物

动物品系：西藏小型猪；

等级：普通级；

动物规格：230-250日龄，雌性，45头；340-360日龄，雌性，9头；340-360日龄，雄性，2头；

出售单位：南方医科大学；

实验单位：南方医科大学；

伦理审查号：L2016088；

合格证编号：44002100009463；44002100009464；44002100009465；

实验单位使用许可证编号：SYXK（粤）2011-0074；

许可证号：SCXK（粤）2011-0015。

本研究所用的西藏小型猪均在南方医科大学实验动物中心饲养。所有动物实验都经南方医科大学实验动物福利与伦理委员会（IACUC）批准。所有手术均在麻醉下进行，并尽可能减少动物的痛苦**。**

3.1.2 试剂耗材

麦管（0.25 mL，法国，IMV）；

载玻片（7101，国产，帆船牌）；

PZM-3培养液（需配制，表1）；

TCM-199操作液（需配制，表2）；

胚胎水 (W1503，美国，Sigma)；

矿物油（M8410，美国，Sigma）；

Premix Taq（R004A，日本，Takara）；

pMD19-T Vector Cloning Kit（6013，日本，Takara）；

TaKaRa MiniBEST Agarose Gel DNA Extraction Kit（9762，日本，Takara）；Age I限制性内切酶（R3552，美国，New England Biolabs）；

Bsa I限制性内切酶（R3535，美国，New England Biolabs）；

Phusion 超保真 DNA 聚合酶（M0530，美国，New England Biolabs）；MEGAshortscript T7 kit（AM1354，美国，Life Technologies）；

mMESSAGE mMACHINE T7 ultra kit（AM1345，美国，Life Technologies）；

Cas9表达载体pST1374-NLS-flag-linker-Cas9 （44758，美国，Addgene）；

sgRNA克隆载体pGL3-U6-gRNA-PGK-puromycin（51133，美国，Addgene）；

RNA抽提试剂（酚:氯仿:异戊醇=25:24:1，pH<5.0）（P1011，中国，北京索莱宝科技有限公司）；

DNA抽提试剂（酚:氯仿:异戊醇=25:24:1，pH>7.8）（P1012，国产，北京索莱宝科技有限公司）

质粒小提试剂盒（DP103，中国，天根生化科技有限公司）；

血液/组织/细胞基因组提取试剂盒（DP304，中国，天根生化科技有限公司）；

四烯雌酮（CAS 850-52-2，国产，北京市科益丰生物技术发展有限公司）

1%结晶紫水溶液（G1059，国产，北京索莱宝科技有限公司）

甲醇（分析纯，国产，天津市大茂化学试剂厂）

Dubecco's磷酸缓冲液（P1002，国产，北京索莱宝科技有限公司）

青霉素钾（国产，成都中牧生物药业有限公司）

硫酸链霉素（国产，华北制药集团动物保健品有限责任公司）

手术切口无菌膜（海壳生，国产，上海海纯生物有限公司）

可吸收线（金环，国产，上海浦东金环医疗用品股份有限公司）

常用手术器械（金钟，国产，上海医疗器械有限公司手术器械厂）

宠物用留置针（海迪科，国产，山东海迪科医用制品有限公司）

毛细玻璃管（规格1.0×0.6×100 mm，国产，北京正天易科贸有限公司）

保温瓶（SSAM-B1500，国产，上海万盛保温容器有限公司）

常用手术耗材（国产，纱布、棉签、棉球、碘酊、刀片等）

不同规格的培养皿、离心管、EP管、吸头等（美国，Corning）

血液生理分析试剂（日本，Sysmex厂家配套试剂）

血生化检测试剂（见表19，国产，北京九强生物技术有限公司）

3.1.3 仪器设备

高速冷冻离心机（3K18，美国，Sigma）

PCR扩增仪（PTC 200，美国，Bio-Rad）

凝胶成像系统（GelDoc EQ，美国，Bio-Rad）

超低温冰箱（-80℃）（702，美国，Thermo）

紫外分光光度计（NanoDrop 2000，美国，Thermo）

高速离心机（Centrifuge 5418，德国，Eppendorf）

核酸蛋白测定仪（Biophotometer 6131，德国，Eppendorf）

电泳仪（DYY-2C，国产，北京市六一仪器厂）

紫外透射仪（GL-312，国产，江苏海门市麒麟医用仪器厂）

电子分析天平（BT224S，国产，赛利多斯科学仪器有限公司）

生化培养箱（SPX-250B，国产，上海福玛实验设备有限公司）

电热恒温水浴锅（HWS12，国产，上海一恒科学仪器有限公司）

细菌恒温摇床（SPH-210A，国产，上海双旭电子有限公司）

洁净工作台（SW-OJ-2FD，国产，苏净集团苏州安泰空气技术有限公司）

生物安全台（HFsafe-1800，国产，上海力申科学仪器有限公司）

高压蒸汽消毒器（HVE-50，日本，HIRAYAMA Manufacturing Corporation）

金属浴（TOMCS BG25，国产，杭州朗基科学仪器有限公司）

恒温热台（TP-CK05，日本，TOKAT HIT）

拉针仪（P-97，美国，SUTTER INSTRUMENT Company）

煅针仪（MF-900，日本，NARISHIGE Company）

体视显微镜（SZX10，日本，OLYMPUS）

显微注射显微镜（CKX41SF，日本，OLYMPUS）

显微操作仪（TransferMan NK2，德国，Eppendorf）

移液枪（各量程，德国，Eppendorf）

血液分析仪（XT-1800i，日本，Sysmex Corporation）

荧光显微镜（BX43，日本，OLYMPUS）

包埋机（EG1160，德国，Leica）

切片机（RM2245，德国，Leica）

烘片机（HI1220，德国，Leica）

摊片机（HI1210，德国，Leica）

3.1.4 软件系统

SPSS统计分析软件（IBM SPSS 20.0）

Toup View软件系统（国产，北京拓普视野科技有限公司）

3.1.5 试剂配制

（1）PZM-3培养液配制：

表1 PZM-3胚胎培养液

Table 1 PZM-3 Culture medium

|  |  |
| --- | --- |
| Chemical | g/100 mL |
| NaCl | 0.6312 |
| KCl | 0.0746 |
| KH2PO4 | 0.0048 |
| MgSO4.7H2O | 0.0099 |
| NaHCO3 | 0.2106 |
| Na-Pyruvate | 0.0022 |
| Ca-(Lactate)2.5H2O | 0.0617 |
| L-Glutaurine | 0.0146 |
| Hypotaurine | 0.0546 |
| BME | 2 mL |
| MEM | 1 mL |
| Gentamicin (mg/mL) | 0.0050 |
| Fatty acid free BSA (mg/mL) | 0.3 |
| Osmolarity (mOsm) | 288±2 |
| pH | 7.3±0.2 |

（2）TCM-199操作液配制：

表2 TCM-199操作液

Table 2 TCM-199 Manipulation medium

|  |  |
| --- | --- |
| Chemical | g/100 mL |
| TCM-199 | 9.500 |
| NaHCO3 | 0.050 |
| Hepes | 0.750 |
| NaCl | 1.855 |
| Penicillin G | 0.050 |
| Streptomycin | 0.060 |
| BSA | 3.0 |
| Osmolarity (mOsm) | 280 |
| pH | 7.2-7.4 |

**3.2 实验方法**

### 3.2.1 设计和构建CRISPR/Cas9系统

（1）首先通过Ensembl genome browser数据库了解猪的*TYR*基因的基因序列（尤其是外显子序列及编码区）及蛋白结构功能，选择合适的敲除基因位点。注意：不同猪种间的基因序列可能突变差异，应以本实验西藏小型猪的测序结果为准，不应完全按照网上数据库。

（2）通过在线网站（http://crispor.tefor.net/）针对西藏小型猪的*TYR*基因序列设计sgRNA。

（3）根据设计的sgRNA序列，设计出反向互补的双链，并在双链上分别添加与sgRNA空载连接的接头，则需成在上链的5’端前面添加CCGG，需在下链的5’端前面添加AAAC，合成带接头的oligos（表3）。

表3 oligos序列

Table 3 Oligos sequence

|  |  |
| --- | --- |
| Oligos | 序列 （ 5’→ 3’） |
| tyr-sg1-top | CCGGCAGTGCTTTGGCAACTTCAT |
| tyr-sg1-bottom | AAACATGAAGTTGCCAAAGCACTG |
| tyr-sg2-top | CCGGCCGTTCATCCACCCCGGTGA |
| tyr-sg2-bottom | AAACTCACCGGGGTGGATGAACGG |

（4）将oligos磷酸化，然后退火形成带粘性末端的短片段双链DNA。反应体系见表4，反应条件为：先在37℃中反应30 min，然后置于装有1 L开水的烧杯中煮沸5 min，最后待烧杯中的水自然冷却至常温后取出反应物。

表4 PNK退火反应体系

Table 4-2 PNK annealing reaction system

|  |  |
| --- | --- |
| 组分 | 体积 |
| 上链oligo（100 μM） | 1 μL |
| 下链oligo（100 μM） | 1 μL |
| 10×T4连接酶缓冲液 | 1 μL |
| T4 PNK酶 | 0.5 μL |
| 水 | 6.5 μL |

（5）酶切sgRNA克隆载体pGL3-U6-gRNA-PGK-puromycin，酶切反应体系按表5，反应条件为37℃孵育过夜。

表5 酶切反应体系

Table 5 Enzymatic reaction system

|  |  |
| --- | --- |
| 组分 | 体积 |
| pGL3-U6-gRNA-PGK-puromycin质粒 | 5 μg |
| BsaI限制性内切酶 | 5 μL |
| 10×缓冲液 | 5 μL |
| 水 | 定容至50 μL |

（6）将步骤5中得到的酶切产物，进行1%琼脂糖凝胶电泳，然后采用琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒切胶回收长片段DNA。

（7）连接构建sgRNA表达载体，反应体系按表6，反应条件为16℃孵育30-60 min。

表6 连接反应体系

Table 6 Connection reaction system

|  |  |
| --- | --- |
| 组分 | 体积 |
| 插入片段（步骤4的退火后oligos） | 2 μL |
| 骨架载体（步骤6的产物，浓度为20 ng/μL-50 ng/μL） | 0.5 μL |
| 10×T4连接酶缓冲液 | 1 μL |
| T4连接酶 | 1 μL |
| 水 | 5.5 μL |

（8）将步骤7的产物直接用于质粒转化。然后挑取单克隆，送菌液或质粒测序（测序引物为U6通用引物，正向测序），根据测序结果选取构建正确的sgRNA质粒。

### 3.2.2 sgRNA的制备

3.2.2.1 sgRNA的体外转录模板制备

用高保真DNA聚合酶对sgRNA质粒进行PCR扩增。PCR引物按表8，反应体系按照表9，反应条件如表10。得到带T7启动子的sgRNA体外转录模板后，进行2%琼脂糖胶TBE电泳，判断条带大小是否符合预期：sgRNA体外转录模板大小为约120 bp。获得后的体外转录模板采用苯酚/氯仿/异戊醇进行抽提，乙醇和乙酸钠沉淀纯化。

表8 引物序列

Table 8 Primer sequence

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 引物名称 | 引物方向 | 序列（ 5’→ 3’） |
| T7-tyr-sg1-F | 正向引物 | TTAATACGACTCACTATAGCAGTGCTTTGGCAACTTCAT |
| T7-tyr-sg2-F | 正向引物 | TTAATACGACTCACTATAGCCGTTCATCCACCCCGGTGA |
| sgRNA-R | 反向引物 | AAAAGCACCGACTCGGTGCC |

表9 PCR反应体系

Table 9 PCR reaction system

|  |  |
| --- | --- |
| 组分 | 加样量（μL） |
| 10× PCR 缓冲液 | 5 |
| 25 mM MgSO4 | 5 |
| 2 mM dNTPs | 5 |
| 正向引物（10 μM） | 1 |
| 反向引物（10 μM） | 1 |
| sgRNA 质粒（30 ng/μL） | 1 |
| 高保真DNA聚合酶（聚合美，MF003） | 1 |
| 水 | 31 |

注：需要制备6管PCR产物，因为PCR产物达300 μL以上便于进行DNA纯化。

Note: Six tubes of PCR products need to be prepared, because the PCR products are more than 300 μL, which is convenient for DNA purification.

表10 PCR反应条件

Table 10 PCR reaction conditions

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 循环数 | 变性 | 退火 | 延伸 |
| 1 | 95℃，5 min |  |  |
| 2-36 | 94℃，25 s | 60℃，30 s | 68℃，30 s |
| 37 |  |  | 68℃，5 min |

3.2.2.2 sgRNA的体外转录和纯化

将已纯化的sgRNA体外转录模板用T7体外转录试剂盒（MEGAshortscript T7 kit）进行体外转录。合成的sgRNA经核酸纯化后才能用于显微注射。

1. 首先进行体外转录反应合成sgRNA，反应体系按表11，反应条件为37℃，4 h。

表11 体外转录反应

Table 11 In vitro transcription response system

|  |  |
| --- | --- |
| 组分 | 体积 |
| ATP（75 μM） | 2 μL |
| GTP（75 μM） | 2 μL |
| CTP（75 μM） | 2 μL |
| UTP（75 μM） | 2 μL |
| 10×T7 Reaction Buffer | 2 μL |
| sgRNA体外转录DNA模板 | 2-4 μg |
| T7 Enzyme Mix | 2 μL |
| 无酶水 | 加水将总体积定容至20 μL |

注：T7 Reaction Buffer需恢复至常温才可加入到体系中，否则低温条件下其成分可引起DNA模板产生沉淀。

Note: T7 reaction buffer can be added to the system only after it is restored to normal temperature, otherwise, its components can cause DNA template to precipitate under low temperature.

1. 然后去除DNA模板：加入1 μL TURBO DNase，反应条件为37℃，15 min。
2. 最终获得的sgRNA用苯酚/氯仿/异戊醇进行抽提，乙醇和乙酸钠沉淀纯化。

3.2.3 Cas9 mRNA的制备

3.2.3.1 线性化质粒pST1374-NLS-flag-linker-Cas9

酶切酶切反应体系见表12，反应条件：37℃温浴，酶切消化过夜。

表12 酶切反应体系

Table 12 Enzymatic reaction system

|  |  |
| --- | --- |
| 组分 | 体积 |
| pST1374-NLS-flag-linker-Cas9 | 4 μL（1000 ng/μL） |
| 10×NEB buffer | 5 μL |
| *Age* I限制性内切酶 | 1 μL |
| dd H2O | 40 μL |

注：要消化至少30 μg的质粒才利于下一步做体外转录模板的纯化。酶切产物需取少量进行琼脂糖电泳鉴定，确保酶切完全，所有质粒被线性化。

Note: It is necessary to digest at least 30 μg of plasmids for further purification of in vitro transcription template. A small amount of enzyme products need to be identified by agarose electrophoresis to ensure complete enzyme digestion and all plasmids are linearized.

3.2.3.2 Cas9体外转录模板的纯化

质粒pST1374-NLS-flag-linker-Cas9被完全线性化后，为了去除RNA酶和其他杂质，采用苯酚/氯仿/异戊醇进行抽提，乙醇和乙酸钠沉淀，纯化后作为体外转录模板。

3.2.3.3 体外转录Cas9 mRNA

将纯化后的Cas9体外转录模板用T7启动子体外转录试剂盒（mMESSAGE mMACHINE T7 ultra kit）进行体外转录。合成显微注射用的Cas9 mRNA需要分3步：

1. 首先进行体外转录反应，形成初步的mRNA，反应体系参照表13，反应条件为37℃，2 h。

表13 体外转录反应

Table 13 In vitro transcription response system

|  |  |
| --- | --- |
| 组分 | 体积 |
| 2×NTP/ARCA | 10 μL |
| 10×T7 Reaction Buffer | 2 μL |
| Cas9体外转录的DNA模板 | 约1 μg |
| T7 Enzyme Mix | 2 μL |
| 无酶水 | 加水将总体积定容至20 μL |

注意：T7 Reaction Buffer需恢复至常温才可加入到体系中，否则低温条件下其成分可引起DNA模板产生沉淀。

Note: T7 reaction buffer can be added to the system only after it is restored to normal temperature, otherwise, its components can cause DNA template to precipitate under low temperature.

1. 去除DNA模板：加入1 μL的TURBO DNase，反应条件为37℃，15 min。
2. 对mRNA加入polyA序列，使mRNA更稳定性，反应体系参照表14，反应条件为37℃，30-45 min。

表14 加polyA反应体系

Table 14 Add polyA reaction system

|  |  |
| --- | --- |
| 组分 | 体积 |
| 上一步的反应产物 | 21 μL |
| 无酶水 | 35 μL |
| 5×E-PAP Buffer | 20 μL |
| 25 mM MnCl2 | 10 μL |
| ATP Solution | 10 μL |

注意：反应完成后应立刻进行Cas9 mRNA纯化，防止RNA降解。

Note: Cas9 mRNA should be purified immediately after the reaction to prevent RNA degradation.

3.2.3.4 Cas9 mRNA的纯化

为了去除RNA酶和其他杂质，先用苯酚/氯仿/异戊醇抽提RNA，再用乙酸钠和乙醇沉淀RNA。全程要注意采用无RNA酶的枪头和手套。最后要加入适量的胚胎水溶解Cas9 mRNA，并分装于无RNA酶的PCR管中（4 μL/管），-80℃冰箱保存。Cas9 mRNA要保证浓度大于500 ng/μL。

3.2.4 同步发情

选择4-7头健康的性成熟雌性西藏小型猪（7月龄以上）作为供卵母猪，进行同步发情处理。每头母猪每日早上8点喂服20 mg四烯雌酮口服乳浊液，一日一次，持续服用18天。停药后第4天始，每天早晚各观察发情一次，大部分母猪会在停药后5-8天内出现发情。

3.2.5 发情配种

母猪在停止喂服四烯雌酮后第5天左右开始有发情迹象，阴道变红变肿。这时每天用公猪试情1-2次，诱导母猪发情更加同步。在上午清洁栏舍前或下午四点左右观察发情。西藏小型猪在发情早期会爬跨其他母猪，圈舍地面较平时脏乱。当西藏小型猪处于发情中期时遇公猪会静立不动，此时人用手按压其背部，母猪也静立不动。当母猪进入发情后期，阴道红肿会消退，拒绝公猪交配。西藏小型猪单笼饲养时不易观察发情，但母猪发情时会表现进食减少、烦躁不安。

通过阴道细胞涂片结晶紫染色法来判断母猪是否已达到最佳发情状态。首先将棉签轻轻地插入母猪阴道并旋转数圈。抽出棉签，将阴道物均匀涂布在载玻片上，并自然晾干（棉签在玻片上应朝一个方向滚动涂布，不可重复涂布，避免细胞重叠影响观察）。然后载玻片用甲醇脱水30 s，并自然晾干。接着结晶紫溶液染色1 min。最后用清水冲洗3次，并再次晾干，显微镜下观察。在普通光学显微镜下观察涂片上的表皮细胞的大小、形态及比例等来判断西藏小型猪的发情阶段。当镜下观察到大部分细胞为边缘皱褶、体积较大且无细胞核的完全角质化鳞状上皮细胞时，母猪处于最佳发情状态。当母猪表现为静立发情，且阴道细胞涂片提示处于最佳发情阶段时，进行配种。采用自然交配方式或人工授精方式进行配种。

3.2.6 体内冲卵

供卵母猪在配种后16-18 h要进行取卵手术，收集单细胞期受精卵。具体步骤如下：（1）术前母猪禁食12 h；（2）静脉注射戊巴比妥钠溶液（用量为30-45 mg/kg）进行麻醉；（3）下腹部剃毛备皮、清洗、手术消毒；（4）在下腹鼠蹊部肌间隙处开出4-6 cm手术切口；（5）将食指和中指从术口探入腹腔内，凭手指触觉分辨出子宫角（相对于肠而言，子宫角壁较厚一些），用双指轻轻将其夹出，将卵巢和输卵管暴露在手术视野中；（6）将无菌塑料导管的一端从输卵管伞部天然开口处插入，另一端置至塑料平皿上；（7）在输卵管子宫角交接处靠近输卵端轻轻插入一根留置针。同时用手捏紧靠近子宫角的输卵管，防止冲卵时液体进入子宫；（8）用注射器将含0.1%牛血清白蛋白的杜氏磷酸盐缓冲溶液从留置针处推入，液体和胚胎经输卵管从伞部开口沿塑料导管被冲入塑料平皿中；（9）在视显微镜下用口吸管捡卵，将卵移至操作液滴中。注意：显微镜应带恒温热台，保持38.5℃。

3.2.7 胚胎运输

猪胚胎应在38.5℃保持活力，当猪卵暴露在低温环境中时极易死亡，采集到的胚胎必须严格恒温运输。采用简易装置进行短途运输[16]，步骤如下：（1）先用无菌麦管依次吸入：约1 cm的TCM-199操作液液段，约1 cm的空气段，约1.5 cm含有胚胎的TCM-199操作液液段，约1 cm的空气段，约1 cm的TCM-199操作液液段；（2）将麦管两端用烧热的钳子封管；（3）将麦管一端固定在泡沫浮标中；（4）再将麦管和浮标装入有38.5℃温水的真空保温瓶中，并尽快送回实验室。

3.2.8 胚胎培养

显微注射前应将胚胎放入PZM-3培养基液滴中，在含5% CO2的38.5℃培养箱培养半小时以上。注意：PZM-3液滴需要在取卵前一天晚上做好，放入CO2培养箱中平衡12 h才能使用。显微注射操作时，将胚胎移至于含TCM-199的操作液中。

3.2.9 显微注射

配制显微注射的RNA溶液中，Cas9 mRNA的终浓度是100 ng/µL，每种sgRNA的终浓度均为50 ng/µL。在受精卵处于单细胞期或二细胞期时进行胞质内注射。二细胞期注射时，对卵中的每个细胞分别进行注射。本研究采用的是TransferMan NK2显微注射操作系统。完成显微注射后，将胚胎移至平衡好的PZM-3培育基中，于含5% CO2的38.5℃培养箱中培养1 h，再进行胚胎移植。

3.2.10 胚胎移植

西藏小型猪胚胎移植通过手术进行。一般每头代孕母猪移植10～15枚受精卵。对处于发情期的代孕母猪进行麻醉后，剃毛、备皮、消毒、铺巾。在下腹鼠蹊部开一小口，露出卵巢和输卵管。将胚胎吸至胚胎移植管，吸入的液体和空气尽可能少。将胚胎移植管轻轻从输卵管伞部开口插入，进至输卵管第一个大弯曲之后。将移植管内含胚胎的液体注入输卵管，并把移植管退出，然后将卵巢和输卵管放回腹腔，逐层缝合伤口。胚胎移植一般只需移植一侧的输卵管即可。术后连续3天肌肉注射青霉素和链霉素预防感染。移植后第19～21天及第40天，用猪验孕卡或B超仪检测是否妊娠，妊娠过程中留意代孕母猪有无返情。

## 四、动物模型的评价与验证

4.1 模型指标评价体系

依据我国国家卫生健康委员会颁布的《罕见病诊疗指南（2019年版）》中白化病的诊断标准[17]，我们将模型制备成功的评价指标总结如下：

1. 基因诊断：具有*TYR*（tyrosinase 酪氨酸酶）基因突变；
2. 临床表现为泛发性皮肤及毛发色素脱失，眼部色素脱失眼震颤。

表15 模型评价指标

|  |  |
| --- | --- |
| 模型评价指标 | 检测方法 |
| 基因诊断 | DNA桑格测序（DNA sanger sequence） |
| 外观表型分析 | 肉眼观察有无全身皮肤及毛发色素减退 |
| 泛发性皮肤及毛发色素脱失 | 皮肤组织银氨核固红染色 |
| 眼部色素脱失 | 虹膜银氨核固红染色 |

4.2 模型评价方法

1. 基因诊断

取猪耳朵皮肤组织或性成熟的公猪的精液提取DNA。使用*TYR*的PCR引物对基因组DNA进行扩增后进行DNA测序，对测序结果进行基因型分析及鉴定。

表16 PCR引物

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 目的基因位点 | 引物名称 | 序列（ 5’→ 3’） |
| TYR-exon1 | TYR-TA-clone-Forward | GTACTGCCTGCTCTGGACTTT |
| TYR-TA-clone-Reverse | GGATGCTGGGCTGAGTAGATT |

表17 PCR反应体系

|  |  |
| --- | --- |
| 组分 | 体积 |
| 2×Mix taq酶 | 15 μL |
| 正向引物（10 μM） | 0.5 μL |
| 反向引物（10 μM） | 0.5 μL |
| DNA模板 | 1 μL |
| 水 | 13 μL |

表18 PCR反应条件

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 循环数 | 变性 | 退火 | 延伸 |
| 1 | 94℃，5 min |  |  |
| 2-36 | 94℃，30 s | 62℃，30 s | 72℃，40 s |
| 37 |  |  | 72℃，5 min |

1. 银氨核固红染色

银氨核固红染色目的是检测和观察组织中黑色素有无表达和分布。主要步骤有：

1. 脱蜡：将烤好的切片依次在第一缸二甲苯溶液中浸泡5 min，第二缸二甲苯溶液中浸泡5 min，95%乙醇中浸泡3 min，80%乙醇中浸泡3 min，然后蒸馏水中冲洗3 min，浸泡于蒸馏水中备用。
2. 将切片置于氢氧化物银氨溶液中，在常温的暗室中放置18 h。
3. 随后取出并在蒸馏水中快速清洗切片。
4. 置于0.2%氯化金溶液染料中浸泡2 min。
5. 取出在蒸馏水中快速冲洗。
6. 将切片浸泡在5%硫代硫酸钠溶液中3 min。
7. 取出切片，用自来水冲洗10 min。
8. 置入核固红染液中5 min。
9. 自来水冲洗30 s。
10. 脱水、透明、封片：将染色好的切片依次放入第一缸95%乙醇中2 min，第二缸95%乙醇中2 min，第一缸无水乙醇中2 min，第二缸无水乙醇中2 min，第一缸二甲苯中2 min，第二缸二甲苯中2 min。最后用中性树脂封片。

4.3 模型验证

1. F0代*TYR-/-*猪基因型分析

对F0代仔猪进行基因型检测，结果表明大多数目的基因位点都存在有不同长度的碱基删除、插入或碱基替换（表20）。

表20 F0代仔猪的*TYR*基因型

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 仔猪编号 | 性别 | 基因型 | 突变 |
|  |  | GTTCCCCTTCACCGGGGTGGATGAACGGGAG//TGCCAGTGCTTTGGCAACTTCATGGG | WT |
| a1 | 公 | GTTCCCCTTCACCGGGGTGGATGAACGGGAG//TGCCAGTGCTTTGGCAACTTCATGGG | allele 1: WT |
| a2 | 公 | GTTCCCCTTCACCGGGGTGGATGAACGGGAG//TGCCAGTGCTTTGGCA------TCGACTC  GTTCCCCTTCACCGGGGTGGATGAACGGGAG//TGCCGGTGCTTTGGCA------CCTTGGC | allele 1: △352  allele 2: A→G,△352 |
| a3 | 母 | GTTCCCCTTCAACCGGGGTGGATGAACGGGAG//TGCCAGTGCTT--------------------TGGG  --TCCCC-----------------GGGGTGGATGAACGGGAG//TGCCAGTGCTTTGGCAA--------GGG  GTTCCCCTTCA------------------------------------------------------------------------------------CATGGG | allele 1: +1, △11  allele 2: △14  allele 3: △70 |
| a4 | 母 | GTTCCCCTTC--CGGGGTGGATGAACGGGAG//TGCCAGTGCTTTGGCAA---------A--GGG  GTTCCCCTTCA------------------------------------------------------------------------------------CATGGG | allele 1: △7  allele 2: △70 |
| b5 | 母 | GTTCCCCTTCACCGGGGTGGATGAACGGGAG//TGCTTTGGC-----------------GACTTTTGG  AGGCACCCC-------------------------------------------------------------------------------------------TGGG | allele 1: △67  allele 2: △93 |
| b6 | 公 | GTTCCCCTTCAGTTCATCTCCCCGGGGTGGAT//CAGTGCTTTGGCAACTTCTCCATGGG  GTTCCC----------------------------------------------------------------------------------------CTTCATGGG | allele 1: +10, +3  allele 2: △72 |
| b7 | 母 | GTTCATCCC--------CCGGGGTGGATGAACGGG//TGCCAGTGCTTTGGCAAC------ATGGG  GTTCCC-------------GGGGTGGATGAACGGGAG//TGCCAGTGCTTTGGCAACT-------TGGG | allele 1: +2, △7  allele 2: △10 |
| b8 | 母 | GTTCCCCT---------GGGGTGGATGAACGGGAG//TGCCAGTGCTTTGGCAA-------CATGGG  GTTCCCCT---------GGGGTGGATGAACGGGAG//TGCCAGTGCTTTGGCAACTT-------GGG  GTTCCCCTTCACCGGGGTGGATG-----------------------------------------------------------CATGGG  AGGGGTTCCT-------------------------------------------------------------------------------------CATGGG | allele 1: △8  allele 2: △8  allele 3: △58  allele 4: △115 |
| c9 | 公 | GTTCCCCTTCACCGGGGTGGATGAACGGGAG//TGCCAGTGCTTTGGCAAC------ATGGG | allele 1: △3 |
| c10 | 公 | GTTCCCCTTCACCGGGGTGGATGAACGGGAG//TGCCAGTGCTTTGGCAACTTCATGGG  GTTCCCCTTCACCGGGGTGGATGAACGGGAG//TGCCAGTGCTTTGGCAACT------TGGG  GTTCCCCTTCACCGGGGCGGATGAACGGGAG//TGCCAGTGCTTTGGCAACT------TGGG | allele 1: WT  allele 2: △3  allele 3: T→C, △3 |
| c11 | 公 | GTTCCCCTTCACCGGGGTGGATGAACGGGAG//TGCCAGTGCTTTGGCAACTTCATGGG  GTTCCCCTTCACCGGGGTGGATGAACGGGAG//TGCCAGTGCTTTGGCAACTTTCATGG  GTTCCCCTTCACCGGGGTGGATGAACGGGAG//TGCCAGTGCTTTGGCAAC------ATGGG  GTTCCCCCTCACCGGGGTGGATGAACGGGAG//TGCCAGTGCTTTGGCAAC------ATGGG  GTTCCC----------------------------------------------------------------------------------------CTTCATGGG | allele 1: WT  allele 2: +1  allele 3: △3  allele 4: T→C, △3  allele 5: △72 |
| c12 | 母 | GTTCCCCTTCACCGGGGTGGATGAACGGGAG//TGCCAGTGCTTTGGCAACT------TGGG | allele 1: △3 |
| d13 | 公 | GTTCCCCTTCACCGGGGTGGATGAACGGGAG//TGCCAGTGCTTTGGCAACTTCATGGG  GTTCCCCTTCACCGGGGTGGATGAACGGGAG//TGCCAGTGCTTTGGCAACT----ATGGG | allele 1: WT  allele 2: △2 |
| d14 | 公 | GTTCCCCTTCACCGGGGTGGATGAACGGGAG//TGCCAGTGCTT----------------------TGGG  CCCTGGGGAG-----------------------------------------------------------------------------TTGTAAGTTT | allele 1: △11  allele 2: △184 |
| d15 | 公 | GTTCCCCTTCACCGGGGTGGATGAACGGGAG//TGCCAGTGCTT-----------------------TGGG | allele 1: △11 |
| d16 | 母 | GTTCCCCTTCACCGGGGTGGATGAACGGGAG//TGCCAGTGCTT-----------------------TGGG | allele 1: △11 |

注：下划线标记靶向位点。红色文本表示碱基插入；黄色突出显示表示碱基突变；（WT）野生型序列；（-）表示碱基删除；（+）表示插入碱基的数目；（△）表示删除碱基的数目；（→）表示突变碱基。

1. *TYR-/-*猪外观表型分析

肉眼观察可见（图6），F0代仔猪全身皮肤色素缺乏，皮肤毛细血管显露，呈红色及白色，并伴有不同程度的血管扩张。毛发呈纯白色。眼睫毛及眉毛呈白色或淡黄色。虹膜颜色减退，瞳孔颜色减退。

3-5-6-7白化表型-01

图6 *TYR-/-*猪外观、眼睛和耳朵比较。

1. 泛发性皮肤色素检测

取*TYR-/-*猪皮肤组织进行银氨核固红染色，结果可见皮肤表皮黑素减少，但黑素细胞数目正常。

3-8白化皮肤病理-01-01

图8 *TYR-/-*猪皮肤病理

切片采用了银氨核固红染色。低倍图像和高倍图像的标尺分别为200 μm和100 μm。

1. 眼部色素检测

*TYR-/-*猪眼部组织银染结果显示黑素缺乏。

3-7白化眼睛病理-01

图7 *TYR-/-*猪眼球病理

4.4 阳性药物对其指标的证实效应

依据中华医学会医学遗传学分会编写的《白化病的临床实践指南》，白化病是一组与色素合成相关的基因发生变异、导致黑色素缺乏的单基因遗传病，除OA-1表现为X连锁隐性遗传外，其余白化病均呈常染色体隐性遗传[18]。白化病的危害主要是眼部损害和易患皮肤癌，目前缺乏有效的治疗手段，主要通过产前诊断预防白化病患儿出生。除对症治疗外，以减少紫外线对眼睛和皮肤的损害为预防措施。

4.5说明重复验证的批数

从2021年至2022年期间，我们重复构建了4批酪氨酸酶基因敲除白化西藏小型猪，共计获得16头F0代仔猪（见表20，abcd分别代表不同批次构建），依据表15中指标进行验证。

第一批a1及第三批c10呈呈野生型黑色表型，提示至少携带了一个未被敲除的野生型TYR 等位基因；第三批c11及第四批d13呈部分色素缺失，被毛黑白相间，提示 TYR 基因不完全敲除，为嵌合体；第一批a2、a3、a4、第二批b5、b6、b7、b8、第三批c9、c12及第四批d14、d15、d16完全白化表型，提示 TYR 基因被完全敲除。

## **五、**动物模型的生物安全性评价

酪氨酸酶基因敲除白化西藏小型猪是通过CRISPR/Cas9基因编辑技术敲除*TYR*基因而获得的，没有插入任何外源基因，为非转基因动物。获得的白化西藏小型猪由于是通过受精卵胞质注射法而制备的，不携带异种品系猪的线粒体DNA——母系遗传物质，能保持品系的纯正。所用的受精卵均通过手术体内冲卵获得，没有到屠宰场采集卵巢和卵母细胞，生物安全可控。*TYR*突变引起的白化为隐性性状，可通过白化藏猪之间交配繁殖保种，得到的后代均为白化，能稳定遗传。白化藏猪在普通实验饲养环境能正常繁殖存活，但在野外环境会受到长时间太阳紫外线照射而引起皮肤损伤，且没有原有保护色容易被天敌发现和捕杀，野生条件下不易存活，生物安全性高。

饲养环境的生物安全评价，饲养室应具备良好的通风、温度控制、湿度调节和光照条件，以提供适宜的生活环境。此外，饲养室内定期清洁和消毒，保持环境的卫生。同时，应避免饲养密度过高，以减少疾病传播的风险。上述饲养条件均符合GB14925-2010标准中实验猪实验动物生产设施普通环境技术指标要求。（见附件1：普通级环境检测报告。）

饲料和水源生物安全控制，实验动物的饲料和水源也是生物安全控制的重要环节。本动物模型中的饲料来源于可靠渠道，经过严格检查，确保不含有害物质和病原体。饮水为市政自来水过滤，确保水质的安全。根据管理SOP，定期进行饲料和饮水的检测，结果均符合标准。见附件2：饲料和饮水检测报告；

病原体监测与预防，为了及时发现和控制病原体，应定期对实验动物进行健康检查，监测其生理状态和行为变化。同时，若发现病原体感染时，应立即采取隔离、治疗或淘汰等措施，防止疾病的扩散。目前，本模型动物尚未发生重大传染性疾病，定期检测报告见附件3：小型猪质量检测报告。

人员培训与生物安全操作规范，实验动物生物安全控制需要依靠专业的实验人员来执行。因此，我们所有的实验人员都定期进行系统的培训，使其了解生物安全知识、掌握操作规范至关重要。实验人员遵守严格的个人卫生习惯，穿戴合适的防护服和手套，避免与实验动物直接接触。在进行实验操作时，应遵循标准化的操作流程，减少误操作和交叉污染的风险。实验动物产生的废弃物如粪便、尸体等可能携带病原体，因此需妥善处理。废弃物应分类收集，按照相关规定进行无害化处理或焚烧。同时，饲养室和实验设备的清洁和消毒也是关键措施。消毒剂定期更换，定期对饲养室、笼具、饮水器等进行消毒，以杀灭可能存在的病原体。废弃物处理合同及记录见附件4。

## 六、讨论和结论

常用的实验动物一般都有对应的白变种品系，如BALB/c小鼠、SD大鼠、白化豚鼠、新西兰大白兔等，能满足特定实验需求。为了更好地使西藏小型猪满足科研实验需求，本单位通利用CRISPR/Cas9受精卵注射法高效获得了*TYR*基因敲除白化西藏小型猪。该方法可有效避免了体细胞核移植法所引起的胚胎发育延迟、出生后存活率低、同一细胞克隆株所获得的性别单一等问题。此外，受精卵由胞质内注射法所获得的F0代并不携带外源猪种的线粒体DNA，很好地保留了西藏小型猪的其他特性。外观上看，白化西藏小型猪和普通西藏小型猪，除了眼睛和皮毛发颜色不一样外，其他无太大差别。*TYR*基因敲除西藏小型猪，因黑色素合成障碍，导致全身皮肤和毛发呈白色，眼睛呈红色，呈典型的白化症状。与野生型西藏小型猪相比，白化西藏小型猪的耳缘静脉更加清晰，利于实验时静脉注射给药。白化西藏小型猪的皮肤在进行炎症和损伤观察时更加清晰，且还可很方便地在其皮肤或毛发上做标记。

由于白化病为隐性遗传病，白化个体并不携带野生型*TYR*等位基因，白化个体间交配繁殖只能生出白化个体，育种相对方便。白化突变动物通常在野生自然环境下会因长期受到太阳紫外线照射引起损伤或癌变，而容易被自然选择淘汰。为了验证*TYR*基因敲除白化西藏小型猪是否适合培育成实验用小型猪新品系，我们对其一些常用指标进行了检测。目前已通过*TYR*敲除的F0代间交配繁殖目前已获得了F1代、F2代、F3代*TYR*基因敲除白化西藏小型猪。

白化西藏小型猪与普通西藏小型猪的各体尺指标之间无明显差异，表明了白化西藏小型猪与同龄的普通西藏小型猪的体型相近，二者的生长发育速度保持一致。同时也表明了白化西藏小型猪在普通饲养环境能正常生长发育。通过分析和比较白化西藏小型猪与普通西藏小型猪的繁殖性能指标，发现它们的繁殖性能相似，说明白化小型猪在普通饲养环境下能正常繁殖，不受*TYR*基因失活的影响。

初步统计，发现白化西藏小型猪的血液生理指标与普通西藏小型猪的血液生理指标绝大部分无统计学差异。不过白化西藏小型猪的MCHC略高于普通西藏小型猪的MCHC。但由于动物的血液生理学指标也会因年龄、性别、营养状况、生理状态等而有所差异的。总体来说，白化西藏小型猪的血液生理指标与普通西藏小型猪的血液生理指标基本一致。

实验结果表明，*TYR*基因功能失活的白化西藏小型猪，除了皮毛和眼睛颜色与普通正常西藏小型猪不一样外，各项体尺指标、繁殖性能指标、血液生理和生化指标等与普通西藏小型猪的对应指标基本保持一致。*TYR*基因敲除白化西藏小型猪能在普通级动物饲养环境下很好地存活和繁殖。白化西藏小型猪由于皮肤和毛发白色，更利于耳缘静脉给药和皮肤实验的观察。此外也可作为白化病大动物模型进一步研究。我们认为*TYR*基因敲除白化西藏小型猪适合用作实验小型猪新品系，满足科研实验需求。

参考文献

[1] Chen A, Hao L L, Fang X B, et al. Polymorphism analysis of IGFBP-5 gene exon 1 in Tibet Mini-pig and Junmu No. 1 White pig[J]. Genet Mol Res. 2014, 13(1): 1643-1649.

[2] Lin J, Cao C, Tao C, et al. Cold adaptation in pigs depends on UCP3 in beige adipocytes[J]. J Mol Cell Biol. 2017, 9(5): 364-375.

[3] Li H T, Wu Q H, Yuan J, et al. [Mitochondrial DNA D-loop variation types in Tibet mini-pigs in association with the blood parameters][J]. Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao. 2009, 29(8): 1626-1628.

[4] 编委会等中国家蓄家禽品种志. 中国猪品种志[M]. 上海科学技术出版社，1986.

[5] Li M, Tian S, Jin L, et al. Genomic analyses identify distinct patterns of selection in domesticated pigs and Tibetan wild boars[J]. Nat Genet. 2013, 45(12): 1431-1438.

[6] 李洪涛，吴清洪，肖东，等. 西藏小型猪的线粒体DNA控制区分析[J]. 中国实验动物学报. 2009(03):227-231.

[7]Murisier F, Beermann F. Genetics of pigment cells: lessons from the tyrosinase gene family. Histol Histopathol. 2006;21(5):567-578.

[8]Seruggia D, Josa S, Fernández A, Montoliu L. The structure and function of the mouse tyrosinase locus. Pigment Cell Melanoma Res. 2021;34(2):212-221.

[9] Oetting W S, King R A. Molecular basis of albinism: mutations and polymorphisms of pigmentation genes associated with albinism[J]. Hum Mutat. 1999, 13(2): 99-115.

[10]Li C, Chen Q, Wu J, et al. Identification and characterization of two novel noncoding tyrosinase (TYR) gene variants leading to oculocutaneous albinism type 1. J Biol Chem. 2022;298(5):101922. [11] Witkop C J. Albinism: hematologic-storage disease, susceptibility to skin cancer, and optic neuronal defects shared in all types of oculocutaneous and ocular albinism[J]. Ala J Med Sci. 1979, 16(4): 327-330.

[12] Wachamo SA, Patel MH, Varghese PK, Dolinska MB, Sergeev YV. Characterization of Temperature-Dependent Kinetics of Oculocutaneous Albinism-Causing Mutants of Tyrosinase. Int J Mol Sci. 2021;22(15):7771. Published 2021 Jul 21.[13]Dolinska M.B., Kovaleva E., Backlund P., Wingfield P.T., Brooks B.P., Sergeev Y.V. Albinism-causing mutations in recombinant human tyrosinase alter intrinsic enzymatic activity. PLoS ONE. 2014;9:e84494.

[14] Oetting W S, Summers C G, King R A. Albinism and the associated ocular defects[J]. Metab Pediatr Syst Ophthalmol (1985). 1994, 17(1-4): 5-9.

[15] 刘圆圆，刘振辉，张士璀. 黑色素生物合成和黑色素抑制剂[J]. 鲁东大学学报(自然科学版). 2016，32(03):236-242.

[16] 随刘才. 利用体细胞核移植技术生产转基因克隆梅山猪[D]. 安徽农业大学，2011.

[17] 2019版《罕见病诊疗指南(2019年版)》发布[J].健康大视野, 2019, 000(005):P.8-8.

[18]李巍,魏爱华,白大勇,等.白化病的临床实践指南[J].中华医学遗传学杂志, 2020(3):252-257.