

讲座六 斑马鱼基因突变技术 及鉴定方法

国家斑马鱼资源中心 (CZRC)

谢训卫

国家水生生物种质资源库

国家斑马鱼资源中心

zebrafish_sub@ihb.ac.cn

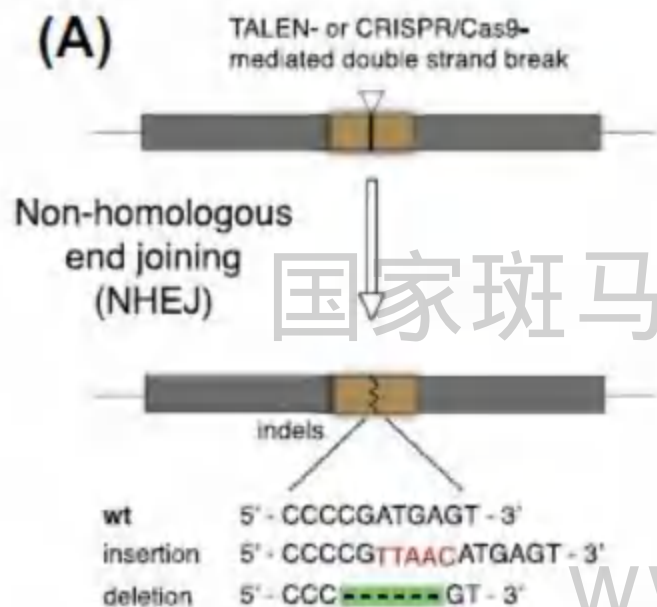
www.zfish.cn



编码基因的遗传信息传递:

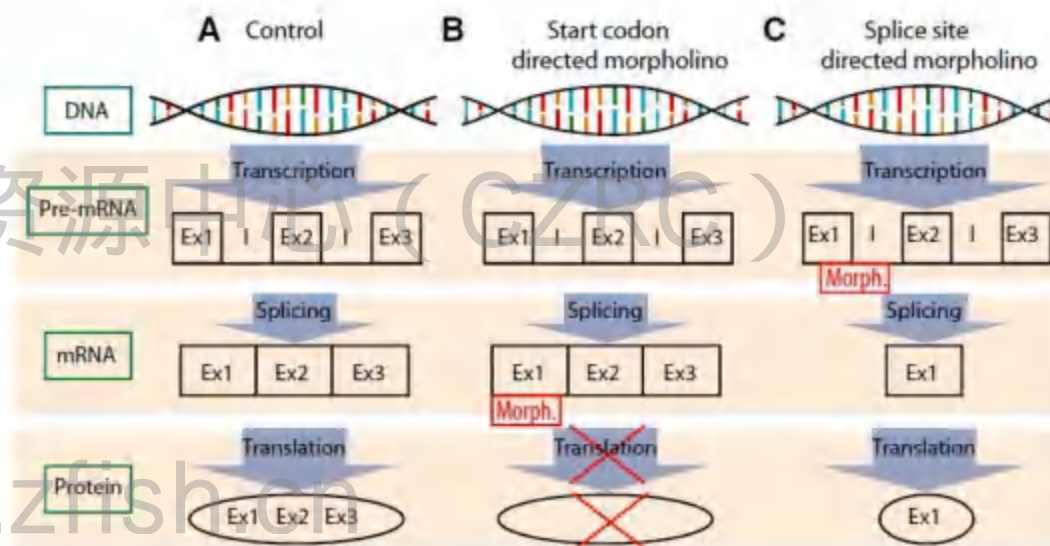
国家水生生物种质资源库 (NABRC)

DNA → **RNA** → **protein**



基因敲除技术 (Auer et al., 2014)

Transient misexpression

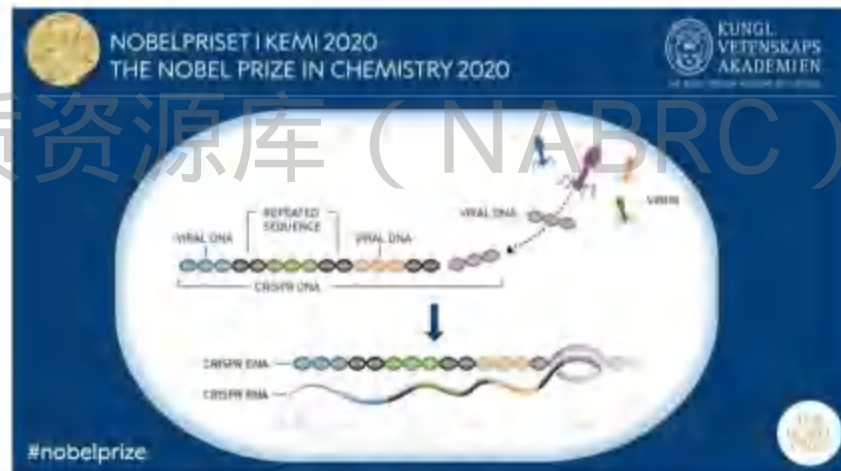


反义Morpholino介导的基因敲降技术 (Wyatt et al., 2015)





2020年诺贝尔化学奖



CRISPR/Cas 系统

1987年，第一次发现CRISPR

2005-2006年，证实 CRISPR中含有病毒序列
2008-2010年，证明二型 CRISPR-Cas切割DNA

2012年，CRISPR/Cas9 编辑技术诞生

2002年，统一命名为CRISPR-Cas

2007年，证明CRISPR-Cas 为细菌适应性免疫系统

2011年，发现tracr RNA, cas9是 二型CRISPR-Cas所需唯一基因



国家水生生物物种质资源库 (NABRC)

1、反义Morpholino技术

2、基因敲除技术

国家斑马鱼资源中心 (CZRC)

3、斑马鱼突变品系的常规鉴定方法

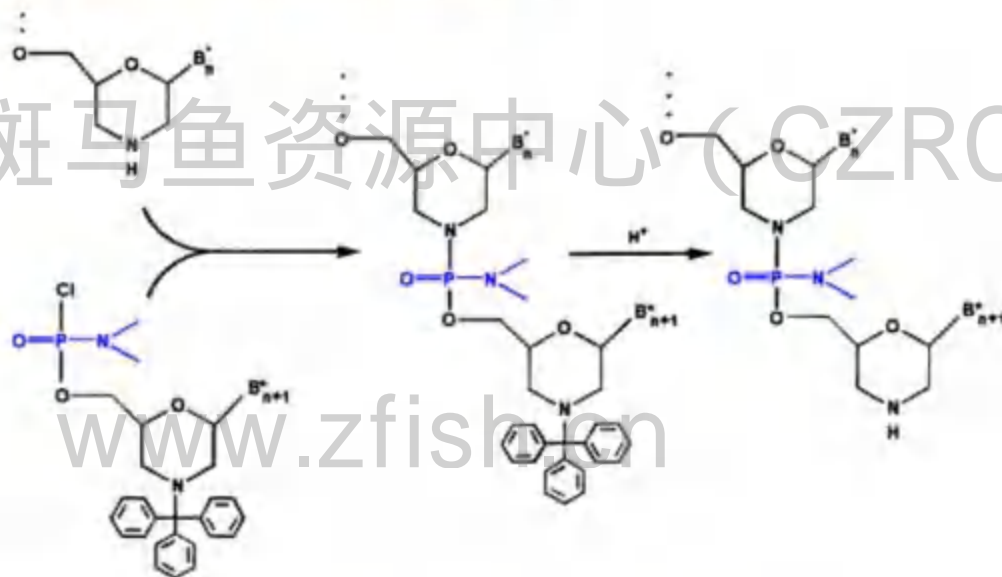
www.zfish.cn



1、反义Morpholino技术

1.1 Morpholino介绍:

- ① 人工合成的稳定的核酸类似物;
- ② 使用吗啉环替代核苷酸上的五碳糖环, 较**稳定**;
- ③ 寡核苷酸**单链**, 长度多为25个碱基;
- ④ 以标准碱基互补配对的方式与RNA**互补**结合。
- ⑤ 订购公司: <http://www.gene-tools.com/>。



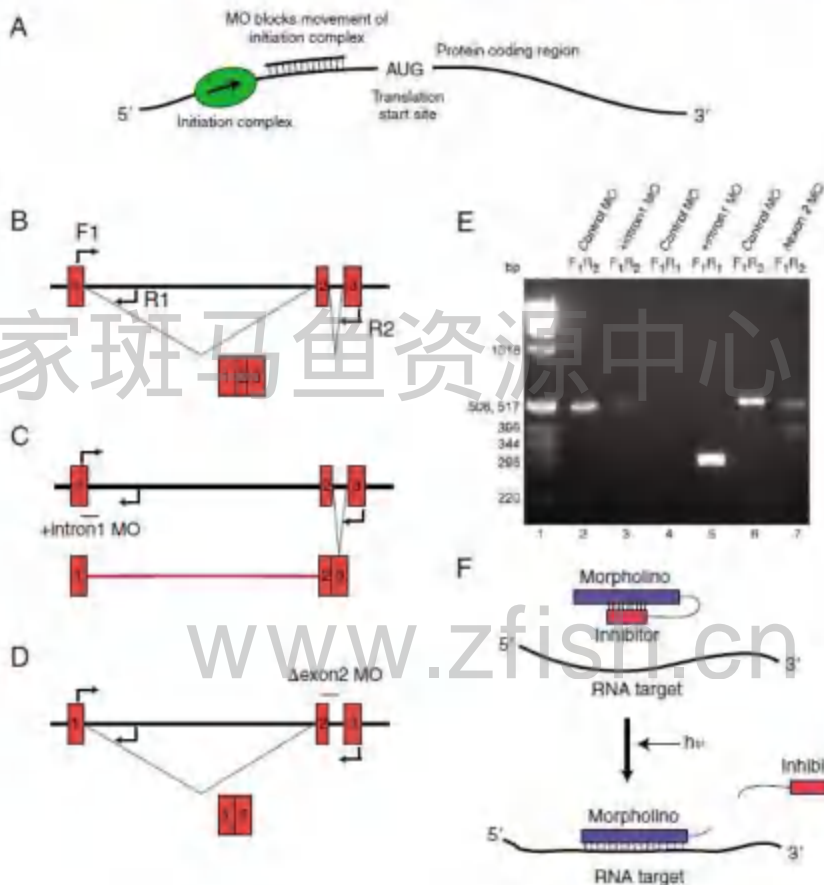
Morpholino组装示意图(gene-tools公司)



1、反义Morpholino技术

1.2 注射Morpholino的实验：敲低表达。

- ① 阻止翻译：靶点位于mRNA的5' UTR 或者靠近ATG的编码区；
- ② 阻止剪切：靶点位于外显子与内含子的交界处，影响正常剪接。



国家斑马鱼资源中心 (CZRC)

www.zfish.cn

Morpholino工作原理示意图
(Eisen et al., 2008)



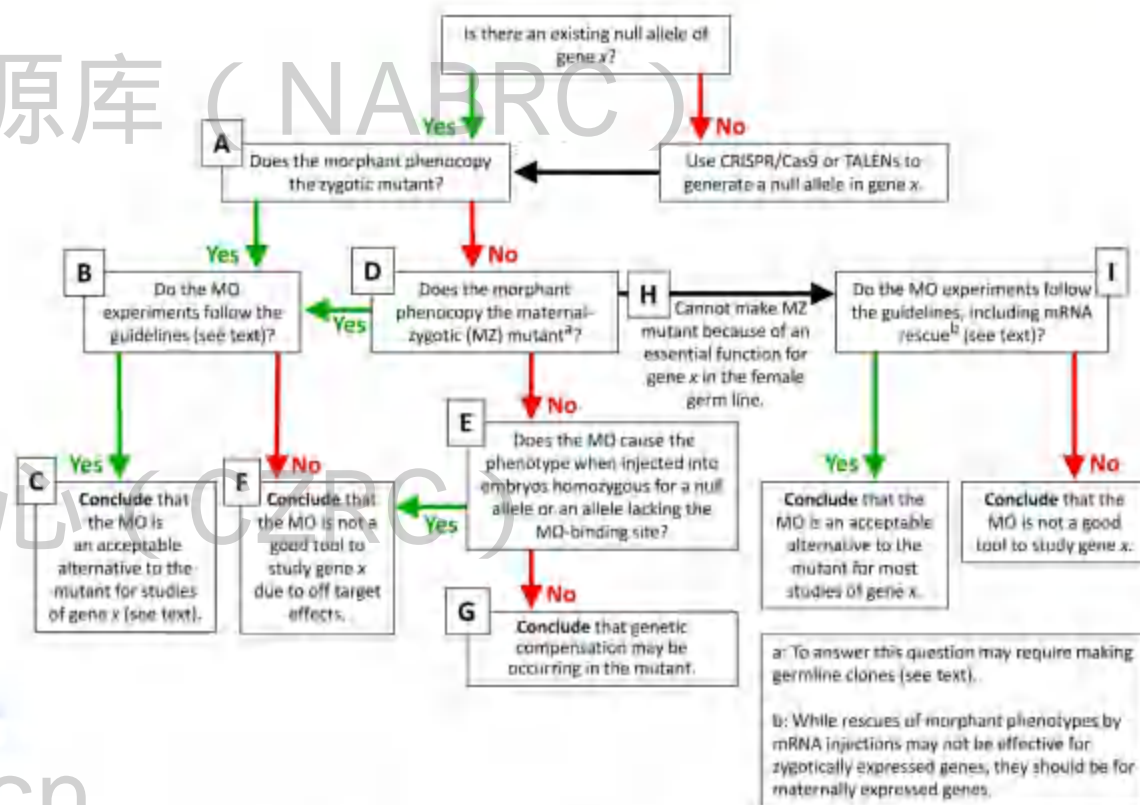
1、反义Morpholino技术

1.3 注射Morpholino的局限:

- ① 脱靶效应;
- ② 维持时间较短;
- ③ 导致细胞凋亡。

1.4 Morpholino实验建议:

- ① 比较现有的突变体的表型;
- ② 搭配RNA 拯救实验;
- ③ 设计2条morpholino产生相同的表型;
- ④ 使用对照morpholino;
- ⑤ 共注射p53 的MO 来抑制细胞凋亡的副作用。



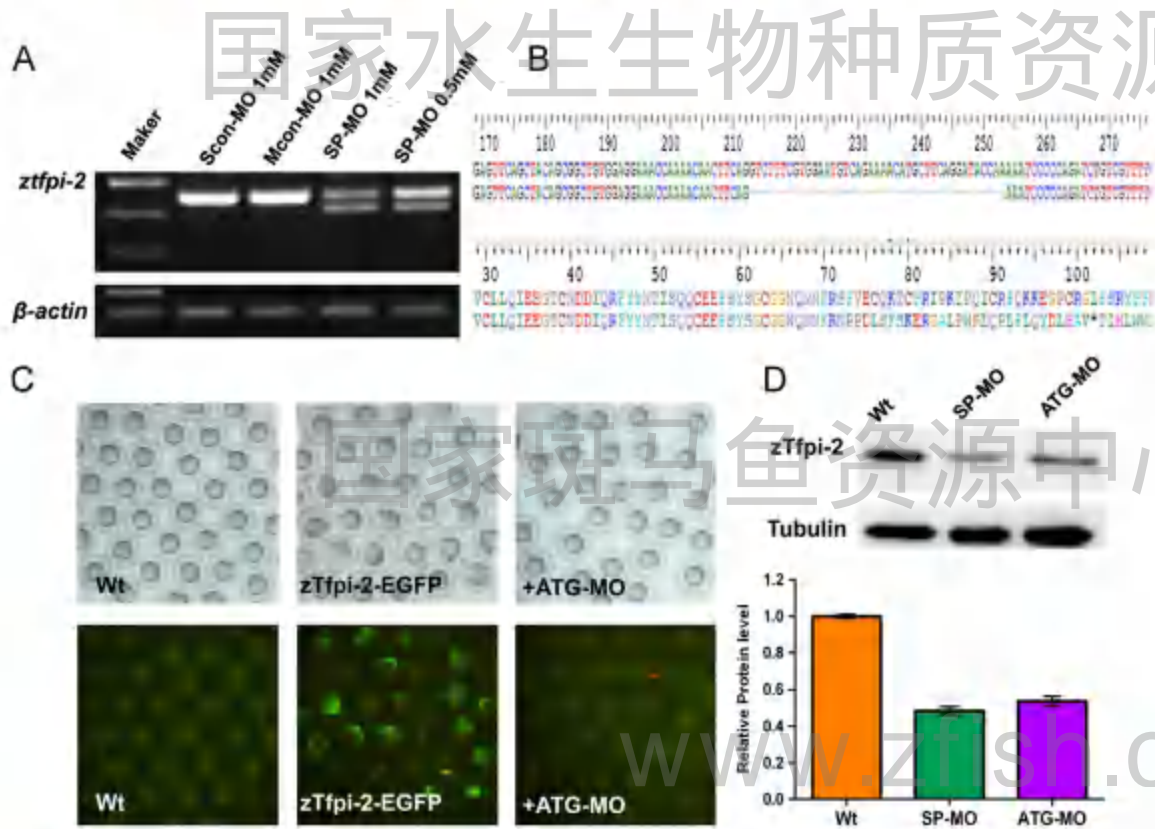
www.zfish.cn

Guidelines for morpholino use in zebrafish
(Stainier et al., 2017)

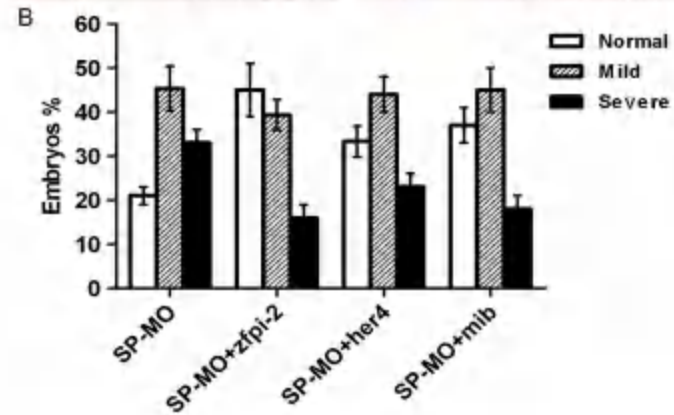


1、反义Morpholino技术

1.5 Morpholino基因敲降示例1



(Zhang et al., 2013)



国家水生生物物种质资源库 (NABRC)

1、反义Morpholino技术

2、基因敲除技术

国家斑马鱼资源中心 (CZRC)

3、斑马鱼突变品系的常规鉴定方法

www.zfish.cn



2、基因敲除技术

基因敲除技术是人为地使靶基因的序列发生碱基对的增加、缺失或替换，引起的靶基因结构的改变，以达到定点修饰改造特定基因的目的。斑马鱼突变品系广泛应用于遗传学、发育生物学、细胞生物学、医学、环境毒理学、水产育种学等研究领域。



正向遗传学技术 基因组编辑技术 (CZRC)

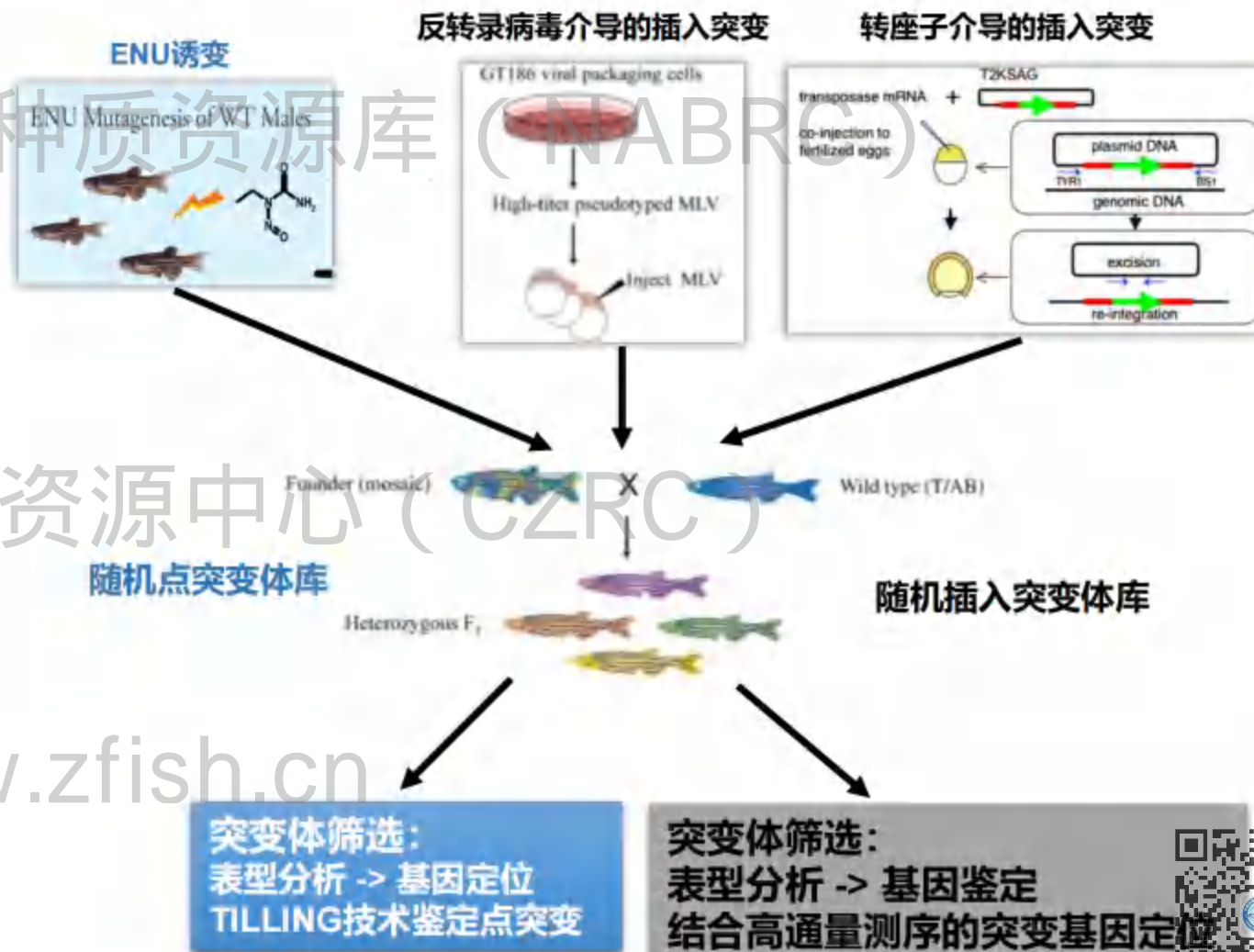
www.zfish.cn



2、基因敲除技术

正向遗传学技术:

- ① 突变位点随机;
- ② 获得大量早期发育突变品系;
- ③ 突变体筛选繁琐耗时。



国家斑马鱼资源中心 (CZRC)

www.zfish.cn



2、基因敲除技术

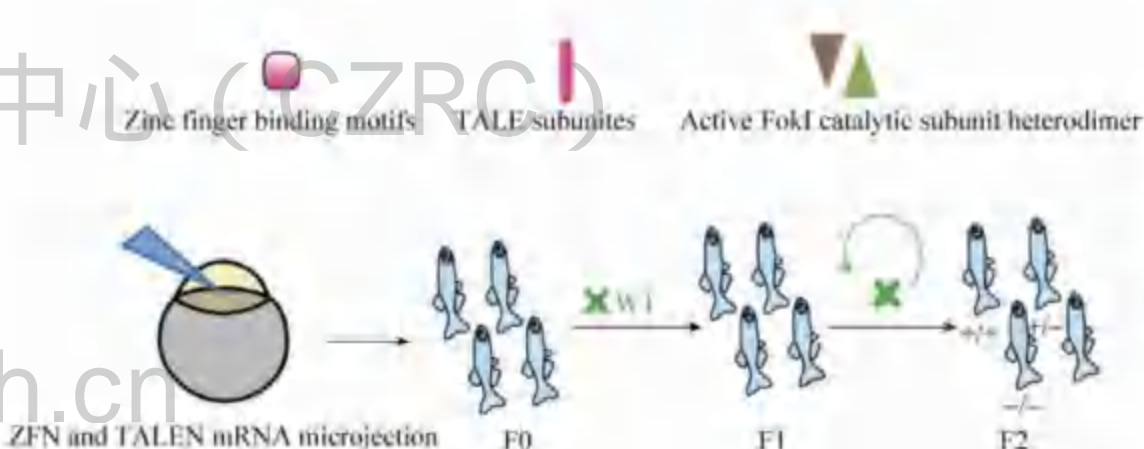
ZFN工作原理

- ZFN=锌指蛋白域 ZF+核酸内切酶 Fok I;
- ZF: DNA 识别, 3-4锌指蛋白组成, 1个锌指蛋白识别一个特异的三联体碱基;
- Fok I: 形成二聚体对DNA定向剪切。



TALEN工作原理

- TALEN=TALE+核酸内切酶Fok I;
- TALE: DNA 识别, 一串TALE蛋白组成, TALE蛋白识别特异碱基对;
- Fok I: 形成二聚体对DNA定向剪切。



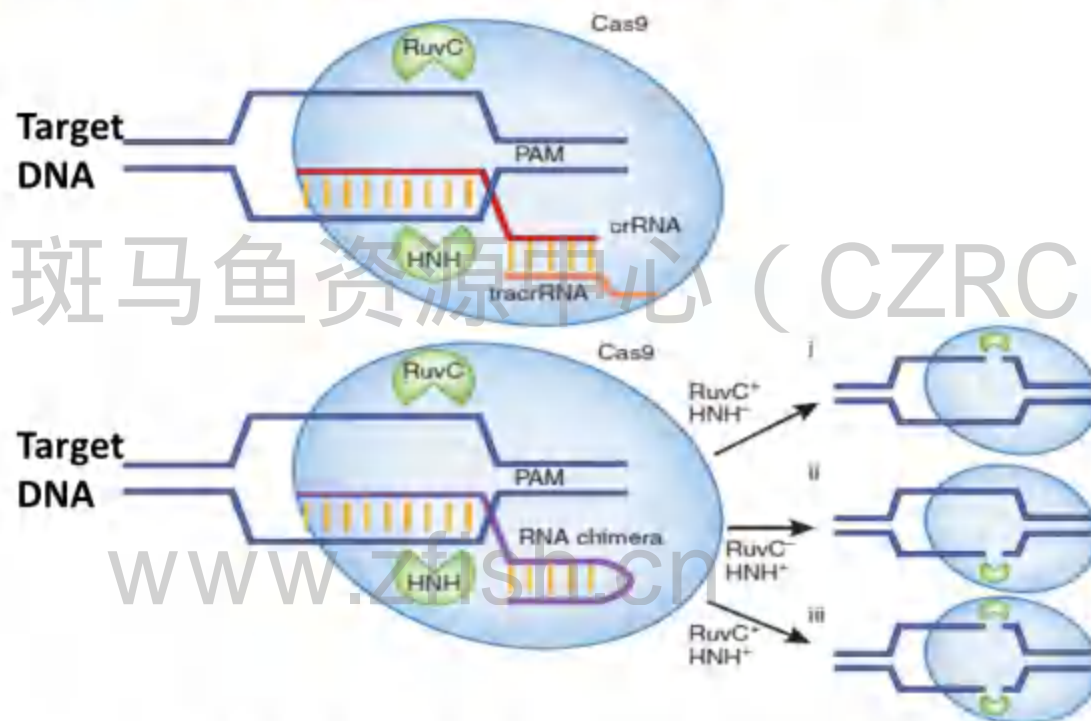
ZFN和TALEN的工作示意图 (Gao Y et al., 2017)



2、基因敲除技术

CRISPR/Cas9工作原理:

利用细菌获得性免疫CRISPR-cas系统进行基因组序列操作，gRNA与cas9（具有HNH和RuvC两个具核酸内切酶活性区域）形成复合体后引导cas9对与gRNA互补的一段基因组序列进行剪切，结合机体修复系统对基因组进行编辑。



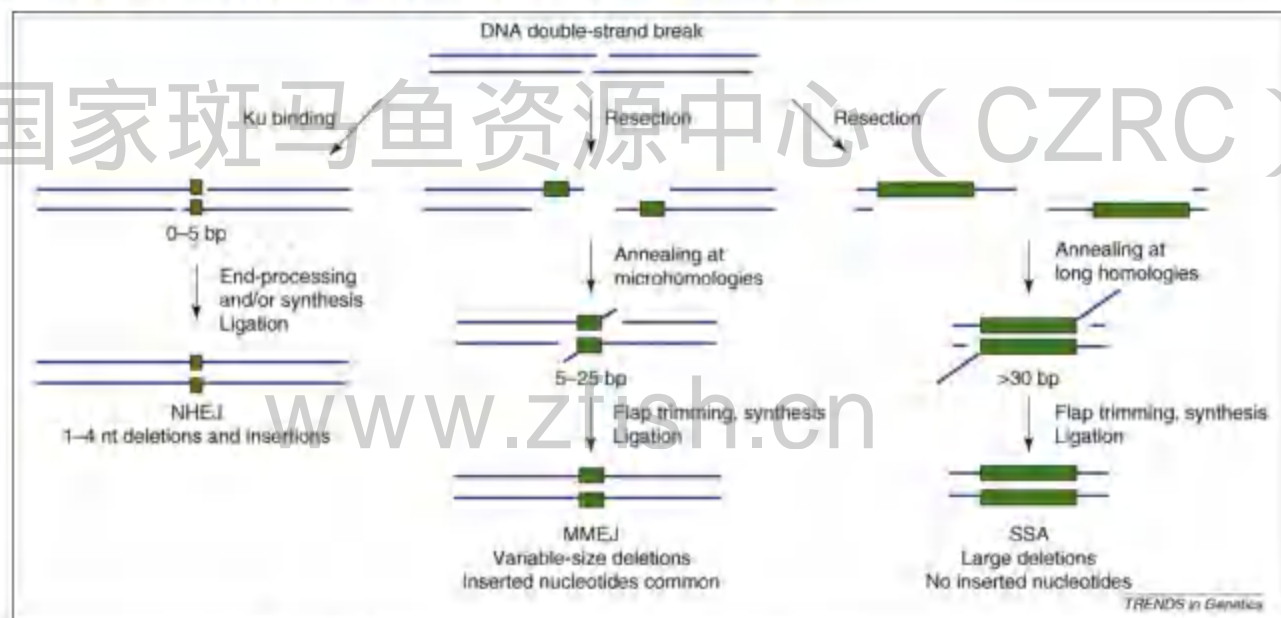
CRISPR/Cas9技术原理示意图 (Rodolphe Barrangou et al., 2012)



2、基因敲除技术

DNA修复机制

- ① **NHEJ**: 依赖于Ku70-Ku80和DNA连接酶 IV-XRCC4异源二聚体来修复DSB, 在连接处随机引入小的突变序列;
- ② **MMEJ**: 不依赖于Ku蛋白, 存在小的微同源末端, 5-25bp, 直接造成一个同源末端和其中间的序列缺失, 在连接处引入缺失, 有时会造成染色体易位;
- ③ **SSA**: 存在30bp或以上的同源末端, 在连接处引入缺失;
- ④ **HR**: 依赖于同源模板或染色体, 准确修复DSB。



DNA修复机制 (Mitch McVey and Sang Eun Lee et al., 2008)



2、基因敲除技术

	ZFNs	TALENs	CRISPR/Cas9
靶标DNA的识别区域	锌指 (ZF) 结构域	重复可变双残基 (RVD) 的重复	CrRNA或gRNA
DNA的剪切	FokI核酸酶结构域	FokI核酸酶结构域	Cas9蛋白
典型核酸酶的构建	通过搜索各类ZF组合数据库, 拼接3-4个ZF结构	8-31个重复可变双残基的拼接, 四联体库	gRNA合成
识别靶位点的大小	(9或12bp) *2	(8-31bp) *2	20bp + "NGG"
最小模块识别碱基数量	3	1	1
优点	平台成熟、效率高于被动同源重组	设计较ZFN简单、特异性高	靶向精确、脱靶率低、细胞毒性低、价廉方便
缺点	设计依赖上下游序列、脱靶率高、具有细胞毒性	细胞毒性, 模块组装过程繁琐、	基因组编辑受限于PAM序列、NHEJ随机毒性

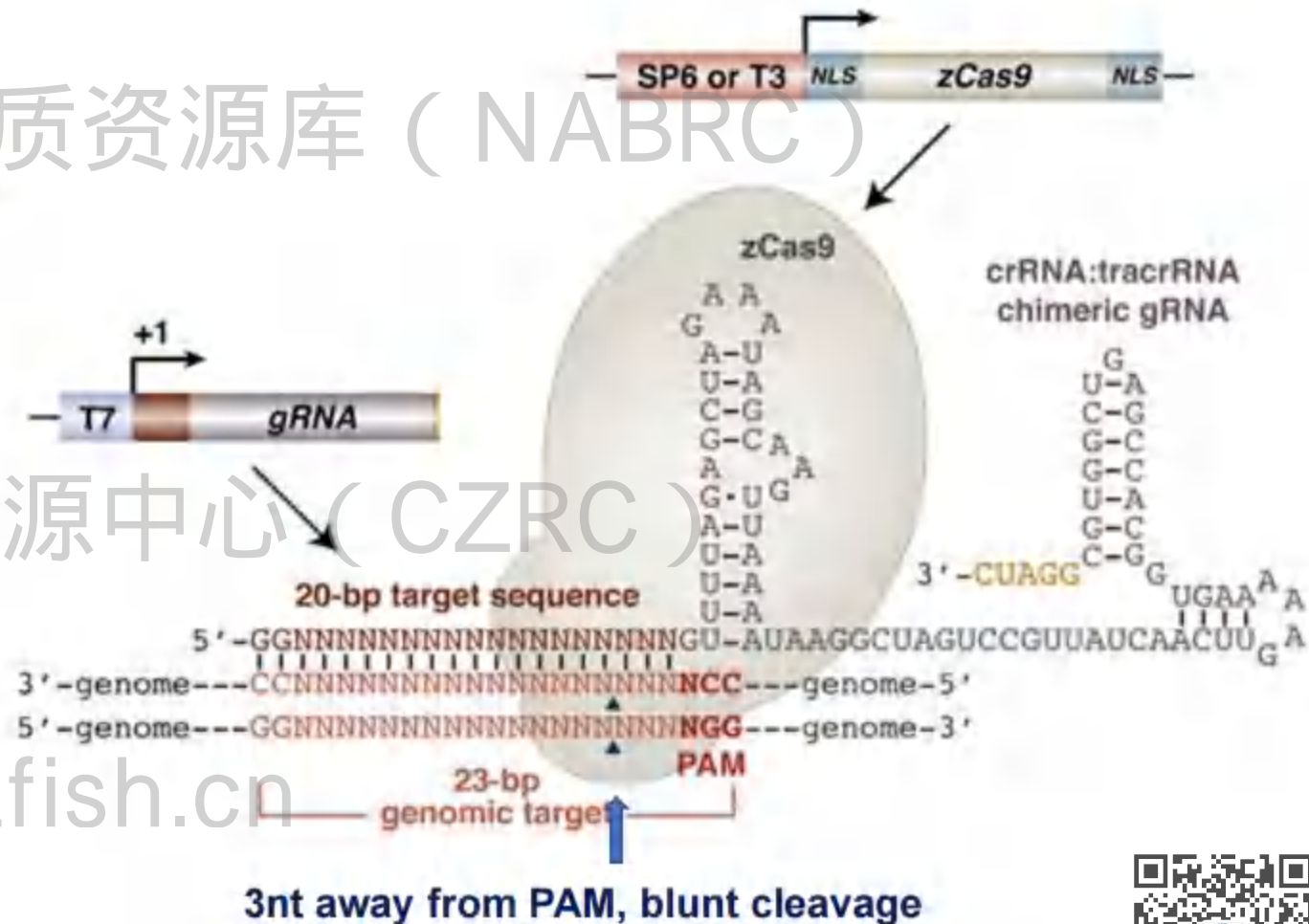


2、基因敲除技术

CRISPR/Cas9技术

2.1 gRNA作用原理:

- ① crRNA + tracrRNA → gRNA, 100bp
- ② gRNA可以和Cas9蛋白相互结合;
- ③ gRNA识别靶标DNA, 并互补配对;
- ④ Cas9蛋白识别靶标DNA的PAM区:
HNH负责切割与gRNA互补的DNA链;
RuvC负责切割另一条DNA链。



www.zfish.cn

3nt away from PAM, blunt cleavage

(Li-En Jao et al., 2013)



2、基因敲除技术

CRISPR/Cas9技术

2.2 gRNA靶点的选择:

- ① PAM (proto-spacer adjacent motif) :
NGGNN (spCas9), 对Cas9识别靶标至关重要, 严格遵守。
- ② 种子序列: 靠近PAM区的12个碱基称为种子序列, 这个区域的碱基突变有可能导致Cas9内切酶的酶切效率的大幅降低。



gRNA靶点的标准格式

www.zfish.cn

gRNA序列特异性评估
(Slaymaker IM et al., 2016)



2、基因敲除技术

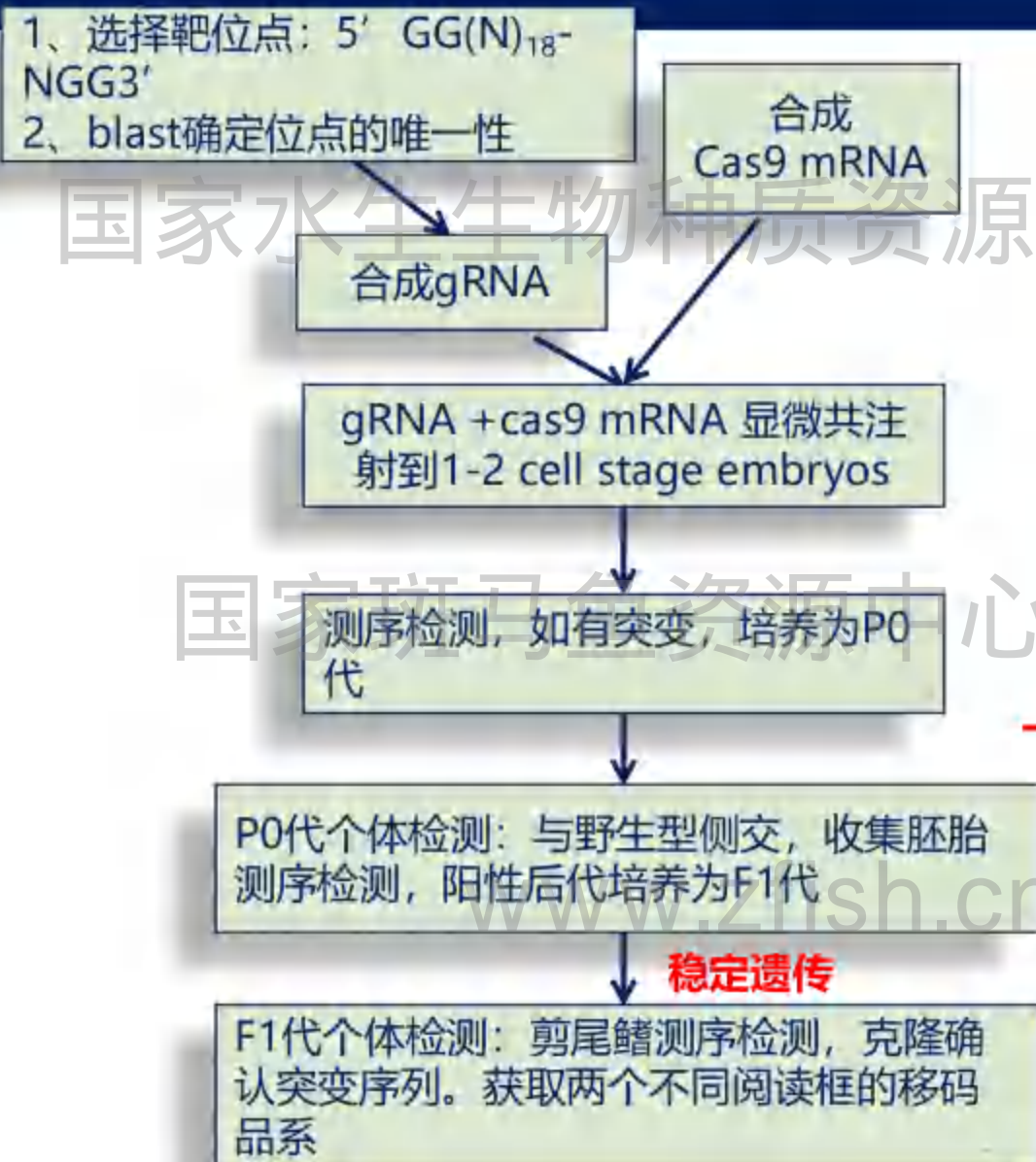
CRISPR/Cas9技术

2.3 gRNA靶点选择的基本原则 (适用于单靶点基因敲除实验):

- ① 在该基因所在的基因组序列上选择靶点;
- ② 靶点应位于基因编码序列中:
 - 靶点最好是位于翻译起始密码子ATG之后和基因编码序列全长2/3之前的区域进行选择, 不要选择5' -UTR和3' -UTR区域;
 - 最好能破坏重要的功能域和/或所有的转录本等:
 - 如果该基因含有多个外显子, 有可能在第一个起始密码子的下游还存在额外的具有相同阅读框的起始密码子, 故最好不要在第一个外显子上选择靶点, 同时也要避免在最后一个外显子上选择靶点;
 - 如果该基因具有多个转录本, 最好在其共有外显子区域选择靶点;
 - 靶点也可以在外显子和内含子的交界处选择, 打靶破坏掉基因的剪接;
 - 可在正义链或反义链上选择靶点;
 - 避免选择含“TTTT”转录终止序列的靶点。



2、基因敲除技术



CRISPR/Cas9技术

2.4 CRISPR/Cas9介导的基因敲除技术操作流程

分子实验相关条件: PCR仪, 相关试剂盒及常规耗材

斑马鱼养殖相关条件: 成熟的活体养殖体系或简易养殖体系均可

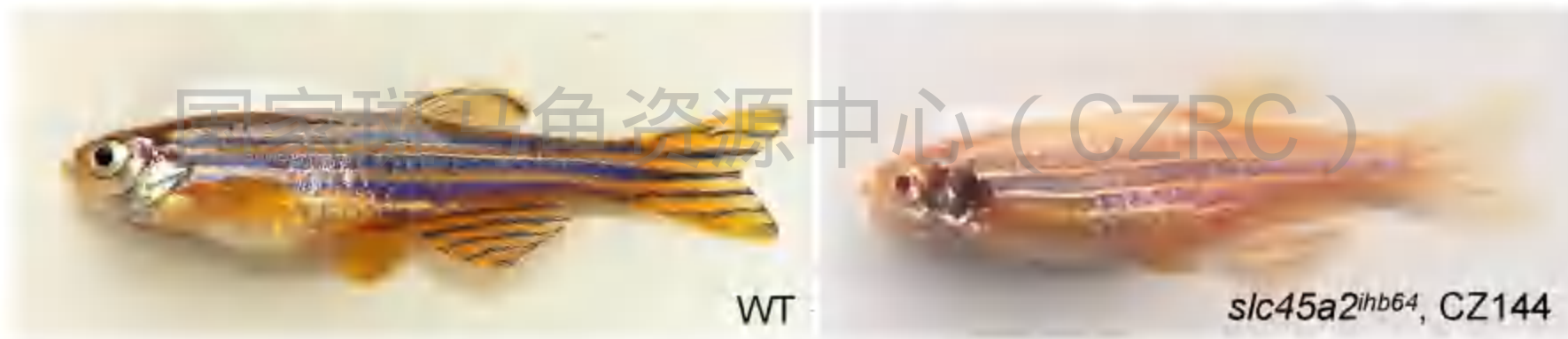
显微注射相关条件: 拉针仪, 显微注射仪及常规耗材



2、基因敲除技术

2.5 以显微注射实验课CRISPR/Cas9敲除样品为例：靶向*slc45a2*基因

- 1. *slc45a2* 基因：***slc45a2*基因参与色素形成过程，被认为是眼皮肤白化病4型（OCA4）的致病基因。OCA4在日本白化病群体中占多数，病人表现为淡金色或白色毛发和不同程度的视网膜色素上皮细胞缺失。*slc45a2*基因不仅影响皮肤黑色素的形成，还对色素瘤的抵抗能力有所影响(Dooley, Schwarz et al. 2013)。



<http://www.zfish.cn/Products/ProductDetail.aspx?CZRCID=CZ144>



2、基因敲除技术

2.5 以显微注射实验课CRISPR/Cas9敲除样品为例：靶向*slc45a2*基因

2. *slc45a2* 基因整体评估：物种质资源库 (NABRC)

- 基因是否致死：5-10%基因突变会导致早期发育异常（建议使用原始生殖细胞特异表达的Cas9工具酶或原始生殖细胞特异表达Cas9蛋白的转基因品系如CZ234/CZ430）
- 是否有重复基因/同源基因（~25% 斑马鱼基因）

Gene Name: *solute carrier family 45, member 2*

Gene Symbol: *slc45a2*

Sequence Ontology ID: [SO:000704](#)

Previous Names: [locat_aim1 \(1\)](#), [atg11](#), [altino \(1\)](#), [B gene](#), [im7138762](#)

Location: [Chr 21 Mapping Detail/Browsers](#)

[Nomenclature History](#)

GENE EXPRESSION

All Expression Data: [7 figures from 3 publications](#)

Directly Submitted Expression Data: [5 figures \(8 images\) from Thosse et al. 2004 \(IMAGE 7138762\)](#)

Wild-type Stages, Structures: [Segmentation 14-19 somites \(16.0h-19.0h\)](#) to [Hatching Long-pec \(48.0h-60.0h\)](#)

[melanoblast](#), [neural crest](#), [optic vesicle](#), [pigment cell](#) (all 7) [+](#)

Curated Microarray Expression: [GEO \(1\)](#)

MUTATIONS AND SEQUENCE TARGETING REAGENTS

Aallele	Type	Localization	Consequence	Mutagen	Suppliers
c4	Insertion	Unknown	Unknown	SPONTANEOUS	Zebrafish International Resource Center (ZIRC) (order this)
N11044	Point Mutation	Unknown	Unknown	CRISPR	China Zebrafish Resource Center (CZRC) (order this)
irb04	Insertion	Unknown	Unknown	CRISPR	China Zebrafish Resource Center (CZRC) (order this)
irb05	Small Deletion	Unknown	Unknown	CRISPR	China Zebrafish Resource Center (CZRC) (order this)
irb06	Small Deletion	Unknown	Unknown	CRISPR	China Zebrafish Resource Center (CZRC) (order this)
nk1	Point Mutation	Exon 8	Premature Stop	ENU	
s1154	Unknown	Unknown	Unknown	ENU	
s3567	Unknown	Unknown	Unknown	ENU	
c10467	Point Mutation	Unknown	Premature Stop	ENU	Zebrafish International Resource Center (ZIRC) (order this) European Zebrafish Resource Project (EZRP) (order this)



2、基因敲除技术

2.5 以显微注射实验课CRISPR/Cas9敲除样品为例：靶向slc45a2基因

3. *slc45a2* 基因序列分析: [Ensembl: http://www.ensembl.org/index.html](http://www.ensembl.org/index.html)

- 基因功能域分析，打靶应尽可能破坏功能域
- 下载基因组序列，并在目标序列上选择靶点；

The screenshot displays the Ensembl genome browser for the transcript *slc45a2-201* in Zebrafish (GRCz10). The main content area shows the 'Marked-up sequence' with a nucleotide sequence. The left sidebar contains various navigation and analysis tools, with 'Gene plots' and 'Secondary structure' highlighted. The right sidebar includes a search bar and a login/register button. A large watermark 'www.zfish.cn' is overlaid on the image.



2、基因敲除技术

2.5 以显微注射实验课CRISPR/Cas9敲除样品为例：靶向*slc45a2*基因

4. *slc45a2* 基因gRNA靶点选择:

ZiFIT: <http://zifit.partners.org/ZiFIT/CSquare9Nuclease.aspx>

CRISPRscan: <http://www.crisprscan.org/>

MEDJED: <http://www.genesculpt.org/medjed/>

BLAT: <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat> (sep. 2014 (GRCz10/danRer10))

Introduction ZiFIT Instructions Examples FAQ References Funding Links

>Sample1
aaaaaaaaaartgaagcccaactgaagatctctgagcgcctccacaggtgtttctctcgggtgtatgtctcagGAGCGTTCCTGGTCCCGTATCTCTTCATGTTTATCGCCGGGATGCCGCTCTCTAC

Please ensure that your query sequence do not contain repeat elements. We suggest that you check the sequence using RepeatMasker

>slc45a2
ttttccctcgagccCATAATATCAGACAGAAATTTAAATAAGGACATGGGCCATCGTGGTGGTGATGTTTGGAGTGGTTTTGTTTGACTTTCGC
GCAGACTTCATTGACGGAGCCATTAAAGCCATTTTGTGTGATGTGTGTTCTCATCGGGATAAAGAGCGGGCTCTTATTACCATGCTTT
ACTCACAGgtaagtactaataa

Length of target site: 20 T7 Promoter: Zebrafish

Query sequence has been repeat masked. Failure to repeat mask will result in no results being returned

Identify potential off-targets Identify target sites Save to CSV

5' NT constraint = GG
Number of query sequences detected = 1

Sequence Name	Targetsite	Oligo 1	Oligo 2
slc45a2 -Reverse Strand	GGGTCCGTCAATGAAGTCTG	TAGGGTCCGTCAATGAAGTCTG	AAACCAGACTTCATT

靶点序列信息



2、基因敲除技术

2.5 以显微注射实验课CRISPR/Cas9敲除样品为例：靶向slc45a2基因

5. 靶点周围序列的扩增：

- ✓ 靶点序列确认
- ✓ 打靶效率检测及后续筛选

引物设计：在靶点周围设计引物，使其距离靶位点两侧都大于100 bp，并且PCR扩增产物最好不要超过1000bp，且为单一条带（primer premier 5）

```
caaaactggtgagctacaagtagagagaattttcagtccttgatgtttcttaaagttgtataactaaa  
gtatttataaacaattgagtggaatttactgaaactaagcatgacgttggttttcaaccgcagCCA  
TAATATCAGACAGAAATTTAAAAAGGACATGCGCCATCGTGGTGGTGA.TGTTTGGAGTGGTTTTG  
TTGACTTTGCCGCAGACTTCATTGACGGACCCATTAAAGCCTATTTGTTTGATGTGTGTTCTCA  
TCGGGATAAAGAGCGGGGTCTTCATTACCATGCTTTACTCACAGgtaagaactaataacgctcat  
ttagccttggttttcttacagcagaaatgtacattggctgggtcagttggcgtttctgtgtgaagt  
ttgcatgttetccccatgtttgcggtggaacttccttggtggtgctccatthttccgttccgctatgt  
ataac
```

Forward primer: CAAACTGGTGAGCTACAAGTAG

Reverse primer: GTTATACATAGCGGAAACGG

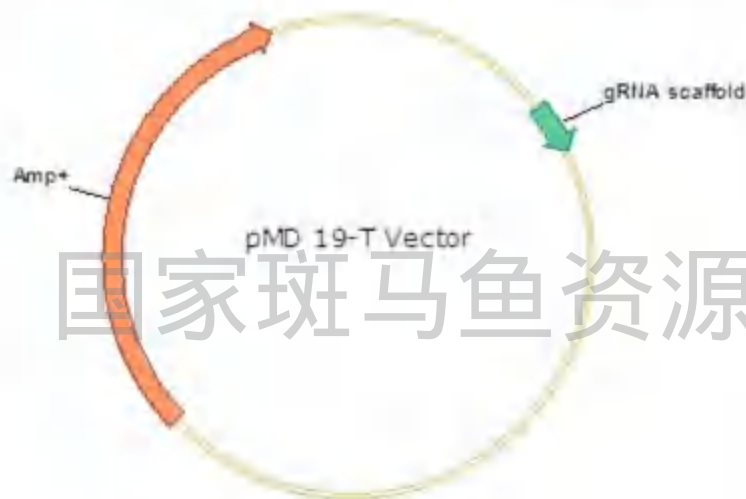


2、基因敲除技术

2.5 以显微注射实验课CRISPR/Cas9敲除样品为例：靶向slc45a2基因

6. 体外转录合成gRNA和Cas9 mRNA:

- gRNA合成：骨架质粒CZP3



gRNA引物对如下:

正向引物:

T7 启动子序列+20bp左右的靶点序列

+20bp gRNA 骨架序列;

反向引物: ~20bp gRNA 骨架序列

PCR



CZRZ Catalog ID:	CZP3
Product:	gRNA-pMD19-T
Note:	For making in vitro transcribed gRNA (CRISPR/Cas9)
Notes:	Chang N, Sun C, Gao L, Zhu D, Xu K, Zhu X, Xiong JW, Xi JJ (2013) Genome editing with RNA-guided Cas9 nuclease in zebrafish embryos. Cell Res 23 (4):465-472. doi:10.1038/cr.2013.45
CRISPR/Cas9 protocol:	
gRNA scaffold sequence: .docx	



2、基因敲除技术

2.5 以显微注射实验课CRISPR/Cas9敲除样品为例：靶向slc45a2基因

6. 体外转录合成gRNA和Cas9 mRNA:

- Cas9 mRNA合成质粒: CZP11

CZRZ Catalog ID: CZP11

Product: pT3TS-nzCas9n

Note: For in vitro transcription of zebrafish codon-optimized version Cas9 mRNA (CRISPR/Cas9)

Phenotype:



seq

NoteInfo:

两种密码子优化的cas9编码基因在斑马鱼胚胎中基因敲除效率的比较(1).pdf

[Jao J, E, S, R, Wente, et al. \(2013\). "Efficient multiplex biallelic zebrafish genome editing using a CRISPR nuclease system." Proc Natl Acad Sci U S A 110\(34\): 13904-13909.](#)

[pT3_Cas9-UTRglobin.doc](#)

[pT3_Cas9-UTRglobin图谱](#)

T3-cas9mRNA合成方法

国家斑马鱼资源中心 (CZRC)

www.zfish.cn

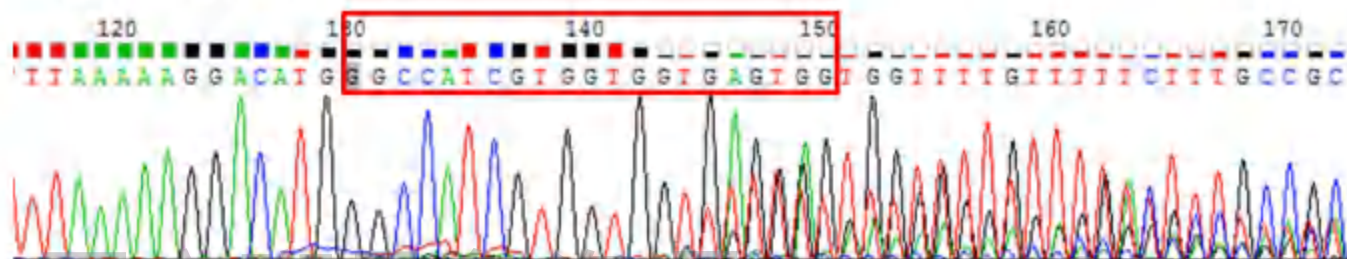


2、基因敲除技术

2.5 以显微注射实验课CRISPR/Cas9敲除样品为例：靶向slc45a2基因

7. 显微注射与P0代靶点效率检测：国家水生生物物种质资源库（NABRC）

Sequencing primer: F1




slc45a2 gRNA/Cas9 mRNA共
注射胚胎表型统计
35.8% C1 + 61.8% C2
P0代表型同预期一致



2、基因敲除技术

2.6 CZRC的突变品系

• <http://www.zfish.cn>



您现在所在的位置: 首页

搜索: ZKO number:

ZKO number	Ensembl
ZKO1	ENSDA
ZKO2	ENSDA
ZKO6	ENSDA
ZKO8	ENSDA
ZKO9	ENSDA
ZKO10	ENSDA
ZKO12	ENSDA
ZKO13	ENSDA
ZKO14	ENSDA
ZKO16	ENSDA

共64页

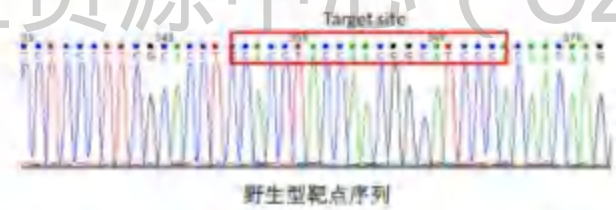
stat6 基因敲除斑马鱼研制项目一期进展报告

1. 靶点设计。根据 ZFIN ID (ZDB-GENE-030131-9359), 从 Ensembl 网站中下载斑马鱼 stat6 基因的基因组序列。该基因共 21 个 exon, 起始密码子 ATG 位于第二号 exon, 在 5 号 exon 设计了 gRNA 靶点, 序列为: 5'GGGATGCCGTTGGTAGGTGG3'。Blast 确认该靶点在斑马鱼基因组中是单一的;

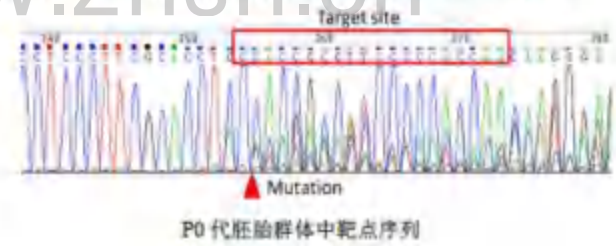
BLAT Search Results

ACTG	QUERY	SCORE	START	END	IDENTITY	ORG	STRAND	START	END	SPAN
AAAAAAAAA	AAAAAAAAA	20	1	20	100.00%	ZZFIN	+	2701410	2701430	21

2. 靶点序列检测和合成 gRNA。从野生型 DNA 中扩增靶点序列, 测序确认靶点序列与 Ensembl 网站中提供的序列是一致的, 如下图所示 (反向序列)。然后, 体外合成出 gRNA 和 hCas9 mRNA。



3. 靶点突变效率检测。斑马鱼胚胎中注射 gRNA-hCas9 mRNA 复合物。PCR 鉴定 P0 代胚胎群体产生了靶向突变 (突变率超过 60%), 结果如下:



Chinese | English

登录 密码找回 注册

信息浏览 联系我们

搜索 CZRC

订购说明

查找

Availability
2013/12/24
2013/12/24
2013/12/24
2013/12/17
2013/12/24
2013/12/24
2013/12/24
2013/12/24
2013/12/18
2013/12/24
2013/12/24

1 / 页



国家水生生物物种质资源库 (NABRC)

1、反义Morpholino技术

2、基因敲除技术

国家斑马鱼资源中心 (CZRC)

3、斑马鱼突变品系的常规鉴定方法

www.zfish.cn



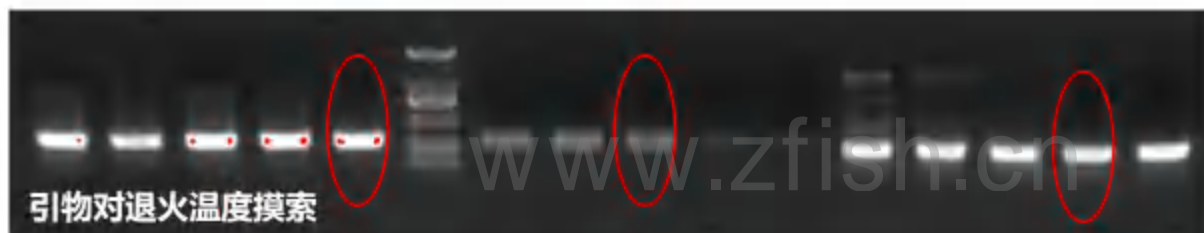
3、斑马鱼突变品系的常规鉴定方法

3.1 分子鉴定法

- 要求：突变位点已知
- 适用：ENU诱变品系、TALEN突变品系和Cas9敲除品系等
- 方法：直接扩增突变位点周围序列，将PCR产物进行测序或进行TA克隆

第一步，确定突变位点信息，设计一对合适的引物

PCR product < 1000bp, 条带单一, 亮度适中



3、斑马鱼突变品系的常规鉴定方法

3.1 分子鉴定法

第二步，提取基因组DNA

材料：少量尾鳍组织 or 15-30枚侧交胚胎

➤ 斑马鱼成鱼剪尾鳍方法

准备工作：

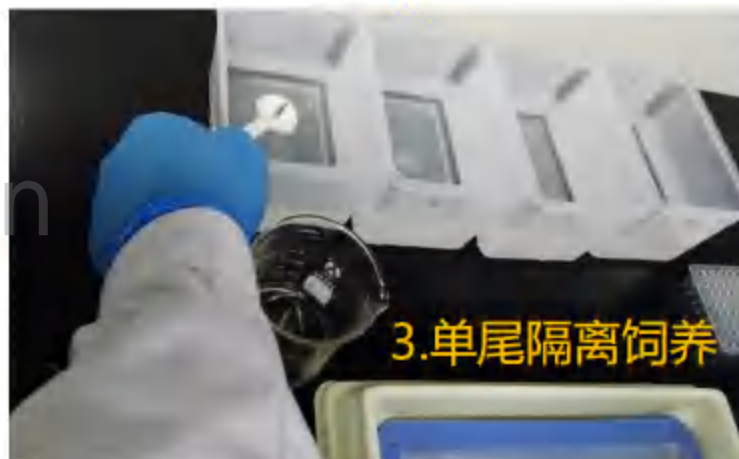
- 托盘（铺上封口膜）
- 手术刀（切尾鳍）
- 尖头镊子（夹取尾鳍）
- 勺子（捞鱼用）
- 小号鱼缸
- 麻醉剂
- 96孔板/EP管
- 酒精棉球、酒精灯等



3、斑马鱼突变品系的常规鉴定方法

3.1 分子鉴定法

- 斑马鱼成鱼剪尾鳍方法

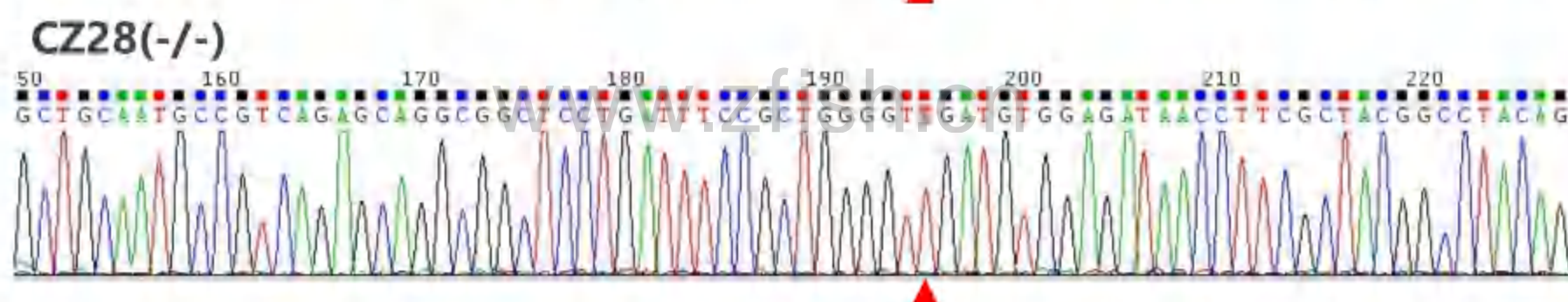
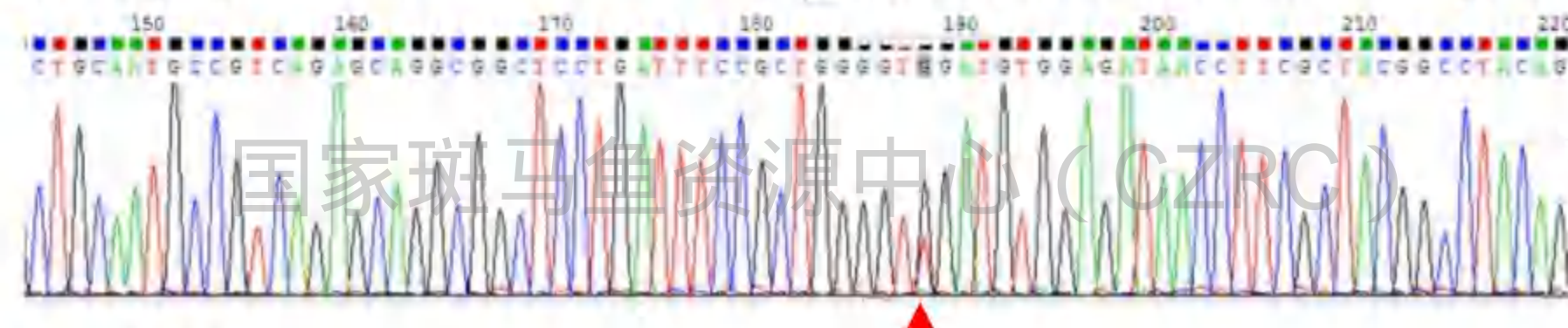
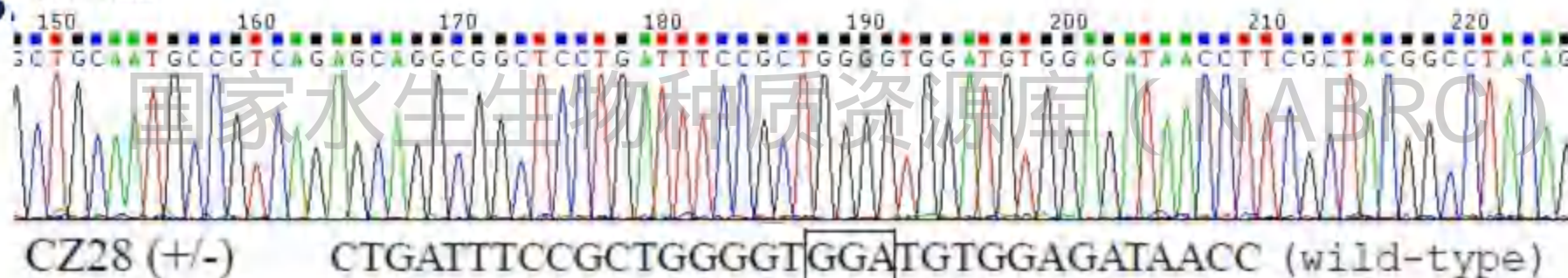


国家斑马鱼资源中心 (CZRC)



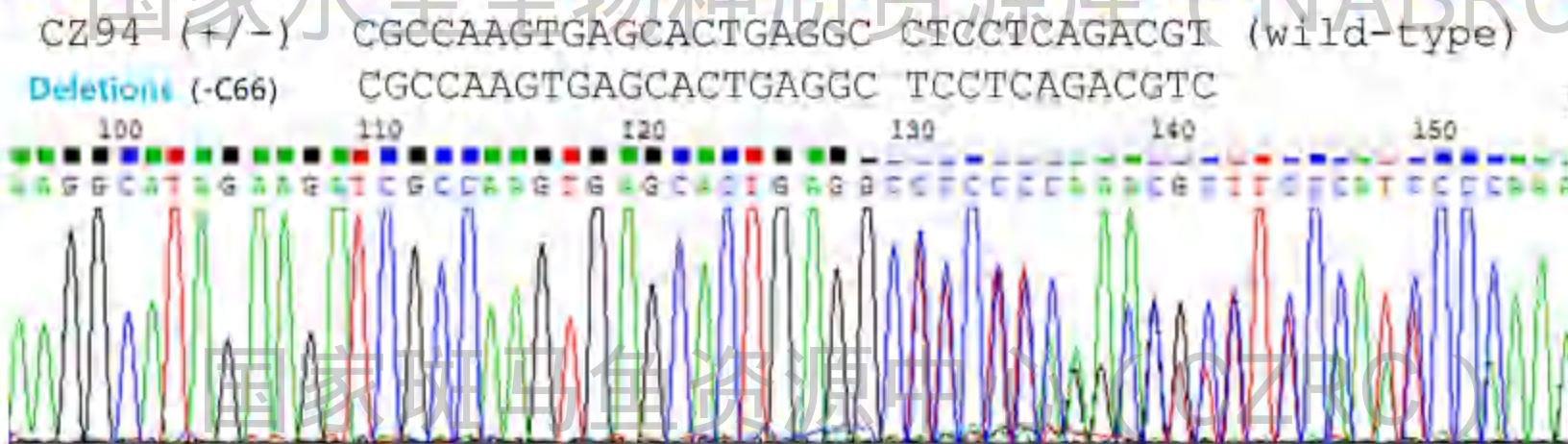
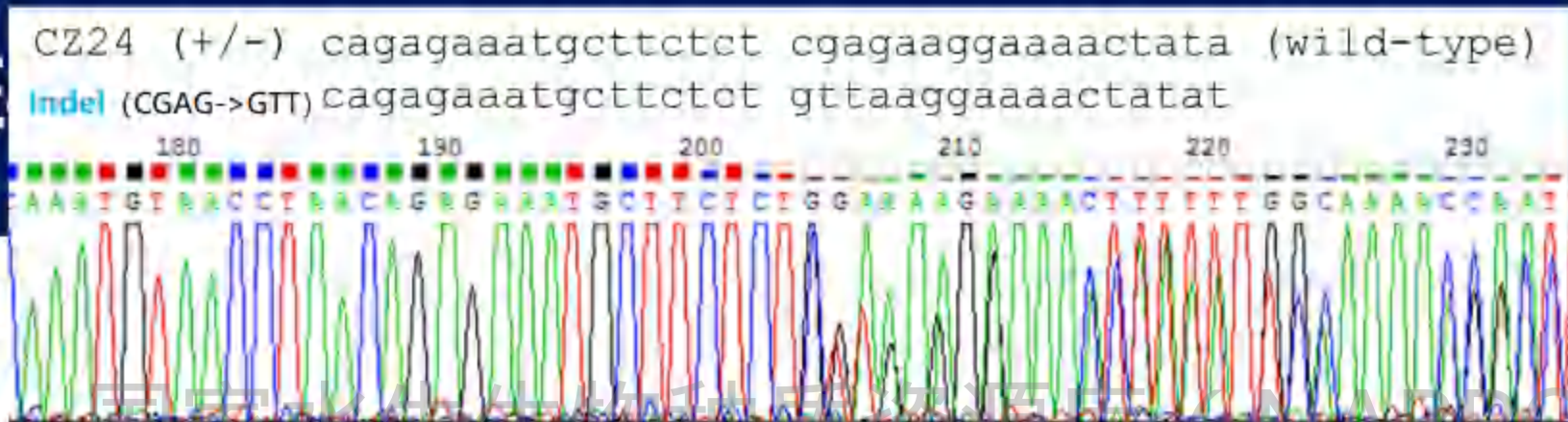
3、斑马鱼突变品系的常规鉴定方法

3. 野生型



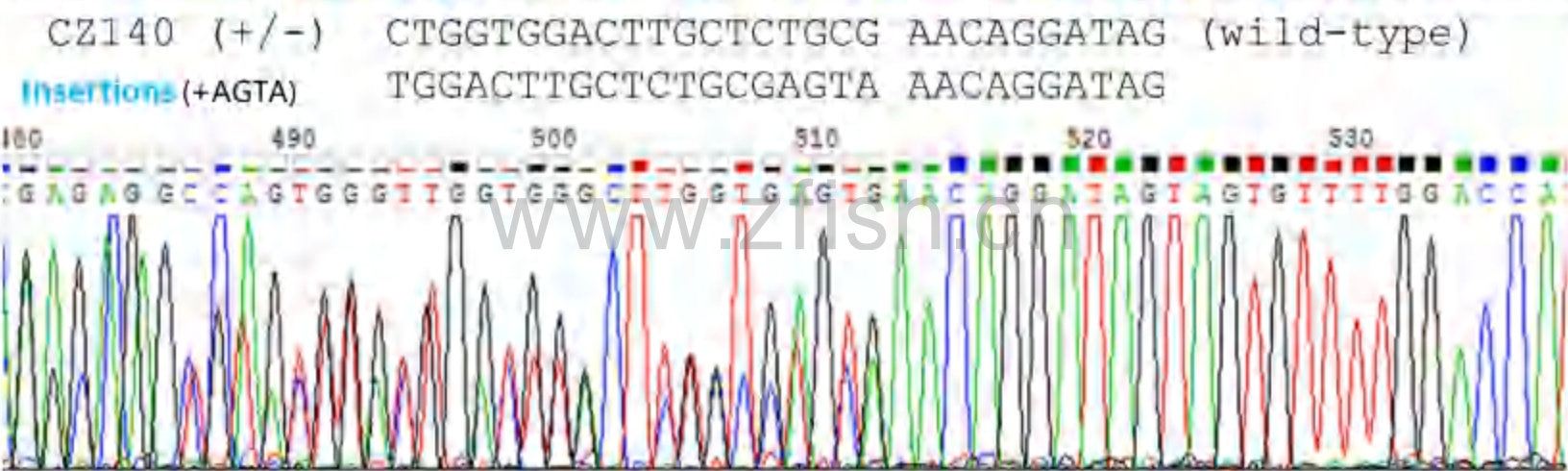
3、斑

3.1



开始出现

成双峰。



3、斑马鱼突变品系的常规鉴定方法

3.2 表型分析法

问题：突变位点未知

适用：自然突变品系、ENU诱变品系
这些品系一般是有特定表型的，可
casper (*mitfa*^{w2/w2}; *roy*^{a9/a9}, CZ73)

- 由于基因补偿效应等，斑马鱼中只发育异常 (Kettleborough, Busch-N)



www.zfish.cn



(White et al., 2008)

3、斑马鱼突变品系的常规鉴定方法

3.3 分子表型分析法

检测基因表达水平的变化

mRNA表达水平：整体原位杂交

蛋白质表达水平：western blot (略)

kdrlihb123/+ (AGTG碱基缺失, CZ265)



<http://www.zfish.cn/Products/ProductDetail.aspx?CZRCID=CZ265>



3、斑马鱼突变品系的常规鉴定方法

3.3 分子表型分析法

➤ 整体原位杂交原理

使用地高辛标记的反义RNA探针与细胞内的mRNA特异性结合，利用免疫组织化学的方法，碱性磷酸酶结合的抗地高辛抗体与杂交的核酸探针特异性结合，然后用碱性磷酸酶的底物进行显色。

• CZRC整体原位杂交技术服务



XXX 基因整体原位杂交技术服务一期报告

- 根据 XXX 蛋白序列比对结果，初步确定在紧随 N 端保守区域（大约 250aa, 750bp）后方 750-1200bp 范围附近设计探针：
XXX probe: 731bp-1159bp 429bp
双方协商一致同意。
- 原位杂交结果
斑马鱼胚胎发育到 48 hpf，固定开腹色处理
阳性对照：心脏特异探针 cm1c

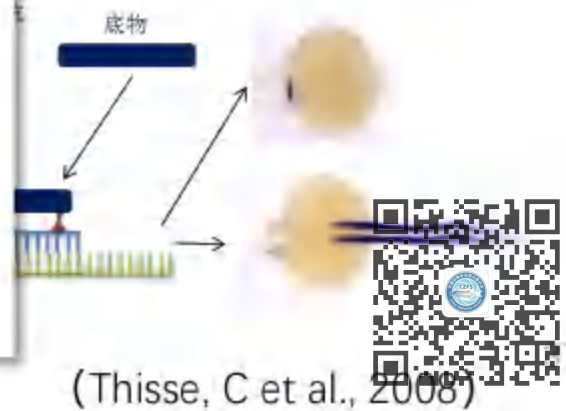


4. 基因序列（方框内为探针序列）
%XXX mRNA 序列

```

ATGAAATGGGGACATGCGACATGTCGCGATTACAACTTGGCTGGGATCGCTGGTCTC
NCTGACTGGTGGACCGGCGCCCTGCGCTCCGCTTTACCGGCGCCACCCTAAG
GGCTTGGCTGACAGTGGGCGGCTACTGAGGAGCTGGGCATCTGTTGGGCTGCAGG
GAGGAAACTGTGGTCTCTGAGCTGGGACCGGCTGAGGCGGCTCTCCAGSSAGCA
CTGSSGCTGAAAGACAGCTGSSGCACTGATGAGCTTGGGGGAGATGTAACAGTCTG
CTGCGGCTTTGADGGCCAGARACCCCTACCTCTTCCGGGATAGGACTGCACCAAC
TCTCACAGTAACGCGCCAGGGGCTATAGCTGCGGCTGATGGCCGGGCTTT

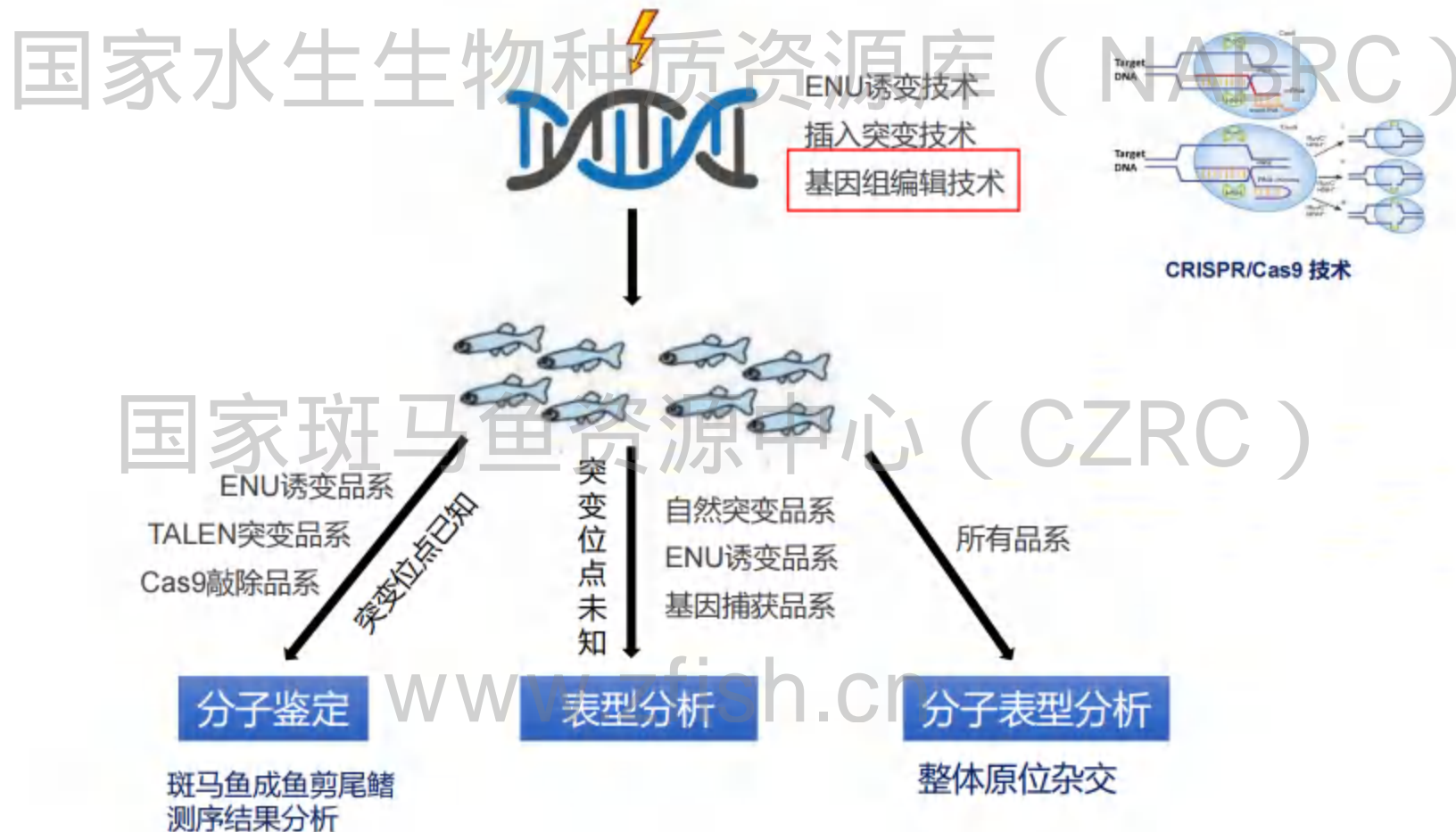
```



www.zfish.cn



斑马鱼基因突变技术及鉴定方法



国家水生生物种质资源库 (NABRC)

本讲内容完毕

欢迎交流!

国家斑马鱼资源中心 (CZRC)



中国斑马鱼信息中心

