

国家水生生物种质资源库 (NABRC)

## 讲座四

# 斑马鱼转基因及显微注射技术

国家斑马鱼资源中心 (CZRC)

熊凤

国家水生生物种质资源库

国家斑马鱼资源中心

[xiongfeng@ihb.ac.cn](mailto:xiongfeng@ihb.ac.cn)



- 国家水生生物种质资源库 (NABRC)
- 1 斑马鱼基因过表达技术 → 瞬时基因功能获得
  - 2 斑马鱼转基因技术 → 稳定基因功能获得
  - 3 斑马鱼基因敲入技术 → 定向编辑序列
  - 4 斑马鱼胚胎显微注射技术 → 胚胎操作基础技能
- 国家斑马鱼资源中心 (CZRC)
- www.zfish.cn



- 国家水生生物种质资源库 (NABRC)
- 1 斑马鱼基因过表达技术 → 瞬时基因功能获得
  - 2 斑马鱼转基因技术 → 稳定基因功能获得
  - 3 斑马鱼基因敲入技术 → 定向编辑序列
  - 4 斑马鱼胚胎显微注射技术 → 胚胎操作基础技能
- 国家斑马鱼资源中心 (CZRC)
- www.zfish.cn





# 1. 斑马鱼基因过表达技术

斑马鱼胚胎早期过表达技术是通过早期胚胎注射DNA或mRNA的方法，使目的基因在人为控制的条件下大量转录和翻译，实现基因产物的过表达，从而瞬时获得基因功能的一种方法。

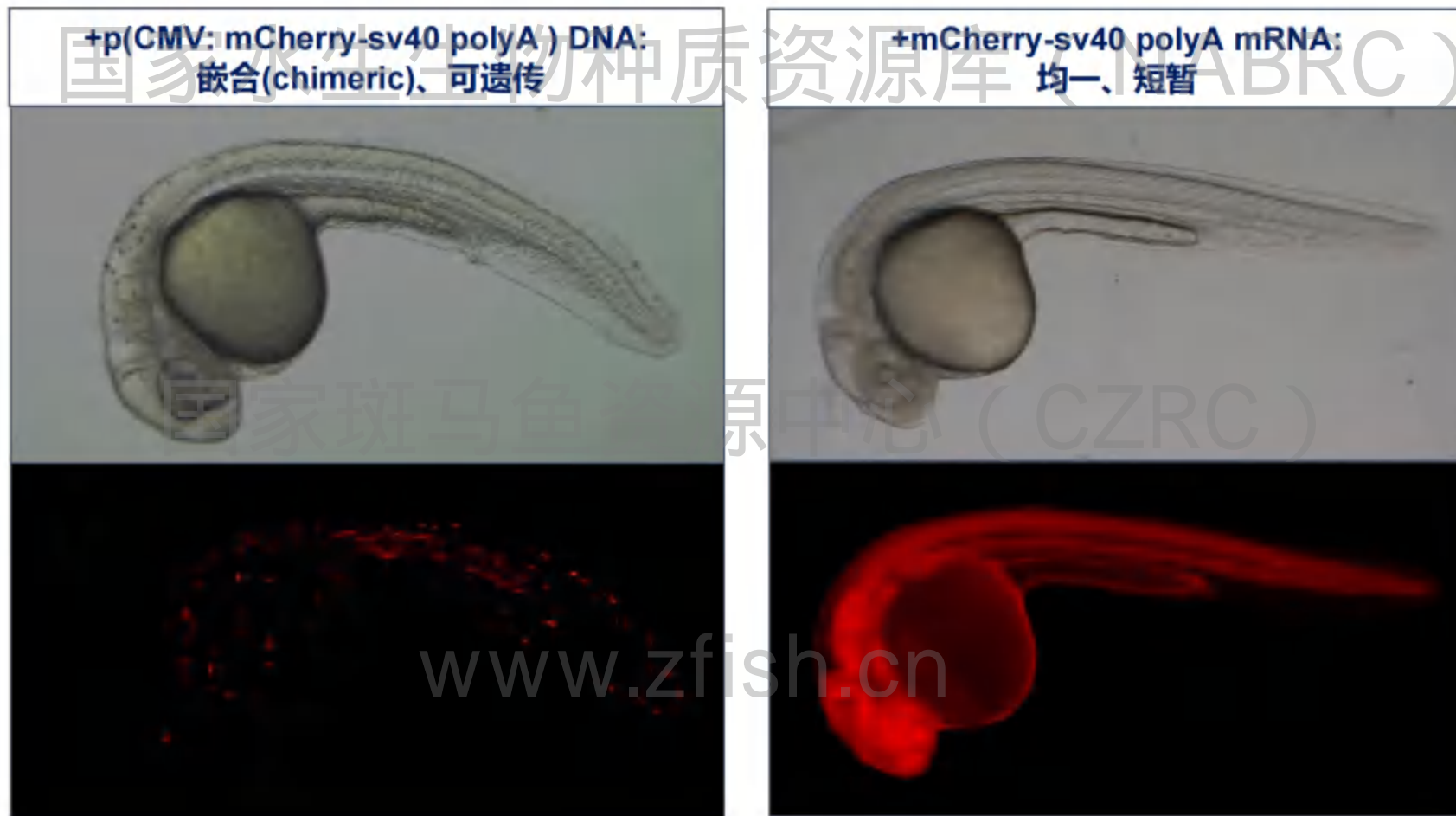
## 1.1 过表达技术样品：

- ① 质粒DNA: 构建真核表达载体 (表达框)
- ② mRNA: 构建原核表达载体; 体外线性化、转录



# 1. 斑马鱼基因过表达技术

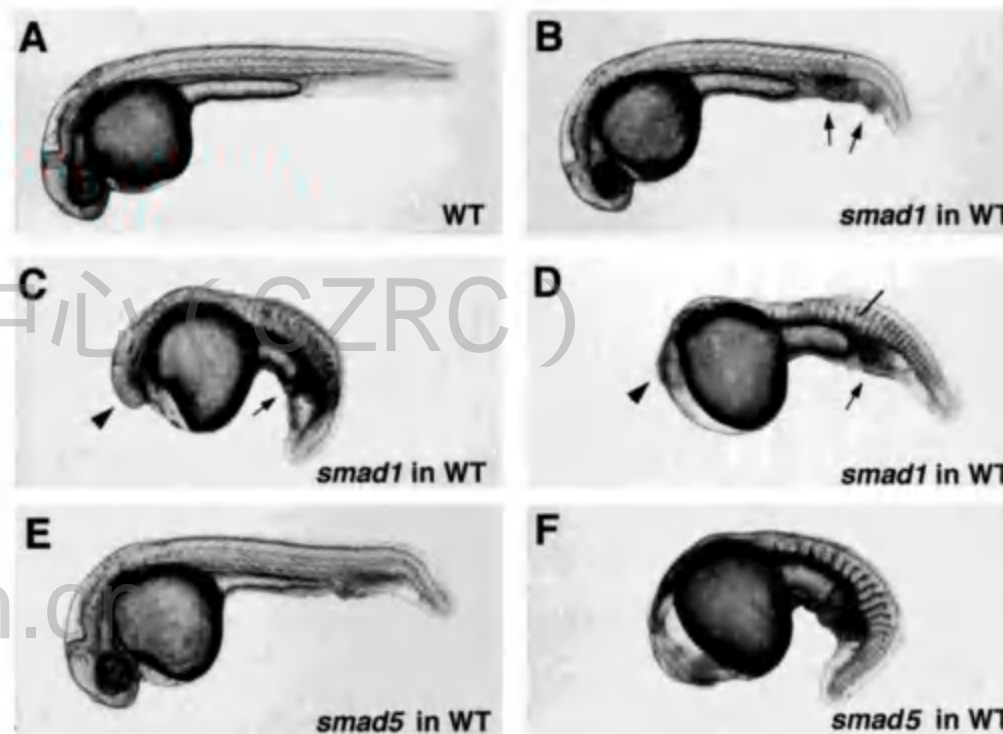
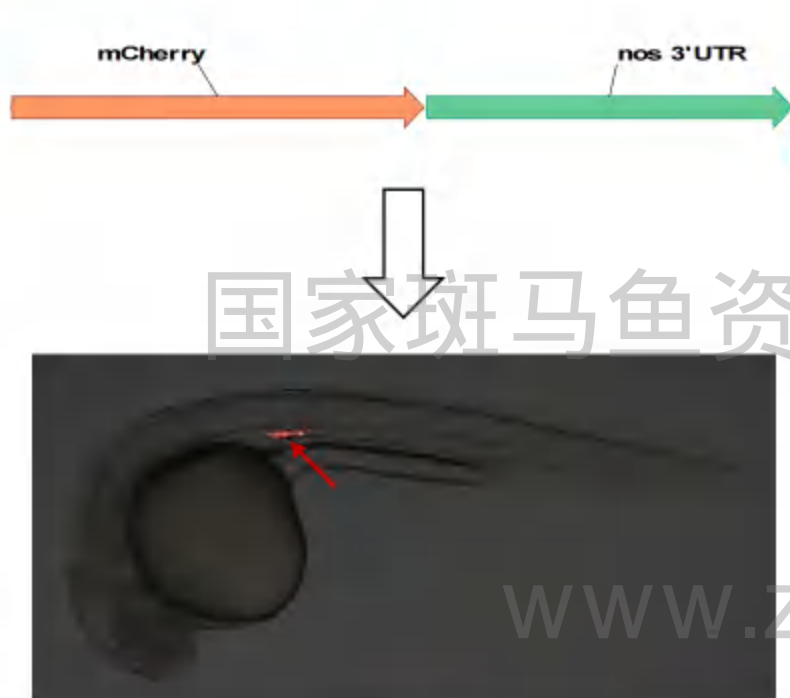
## 1.2 DNA/mRNA样品的区别



# 1.斑马鱼基因过表达技术

## 1.3 过表达技术的应用:

- ① 组织特异性标记
- ② 功能性特异基因过表达



(Dick A et al., *Dev Dyn*, 1999)



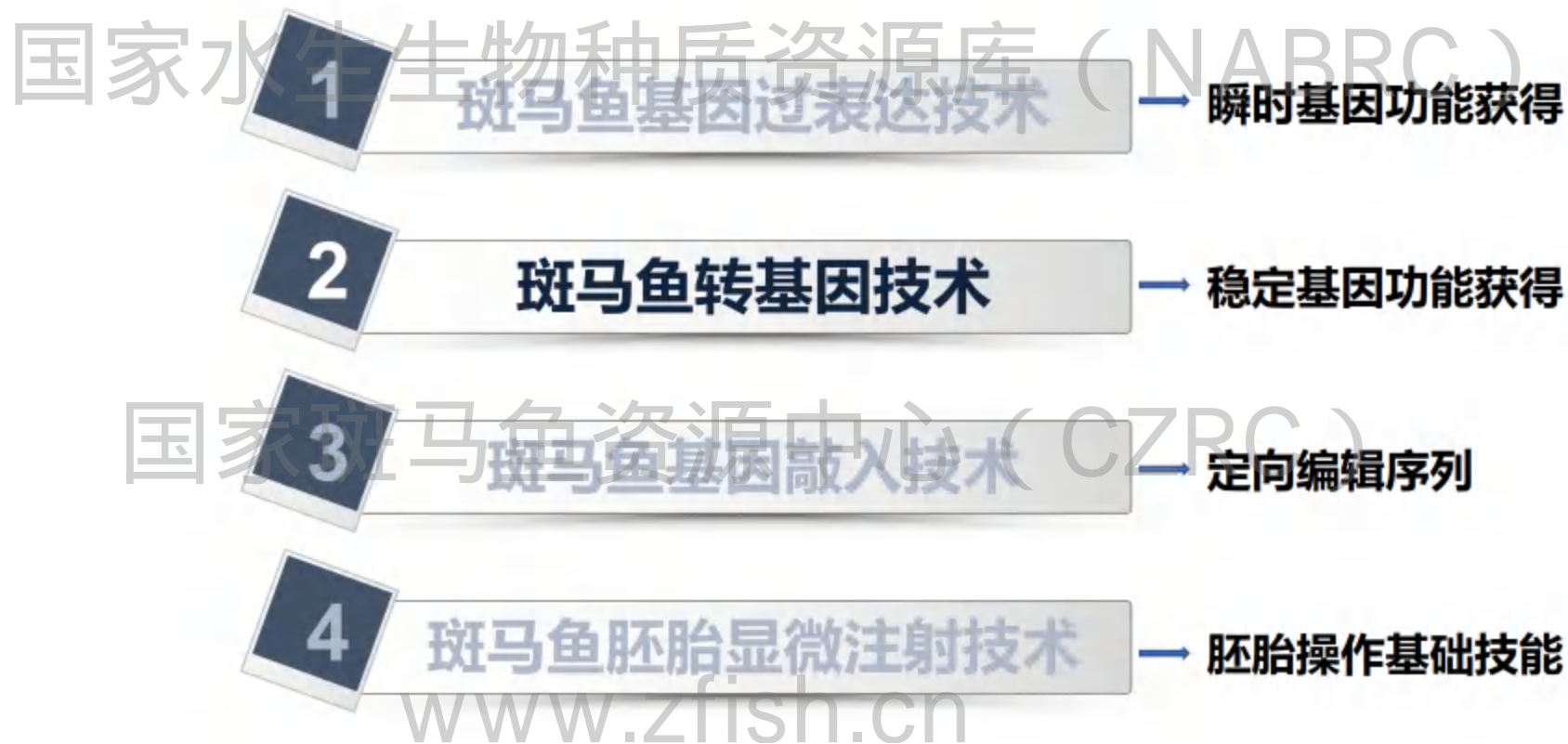


- 斑马鱼胚胎早期过表达技术是通过早期胚胎注射DNA或mRNA的方法，使目的基因在人为控制的条件下大量转录和翻译，实现基因产物的过表达，从而**瞬时获得基因功能**的一种方法。
- 在斑马鱼中，实现基因过表达的一个常见方法是通过注射体外合成的mRNA实现目的基因的过表达，并通过观察表型推测目的基因的功能。

国家斑马鱼资源中心（CZRC）

[www.zfish.cn](http://www.zfish.cn)





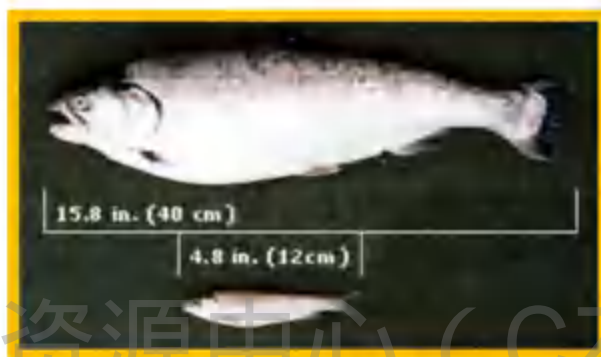


## 2.转基因技术

转基因技术是将人工分离和修饰过的基因导入到生物体基因组中，由于导入基因的表达，引起生物体的性状产生可遗传的修饰。



Zhu et al., 2000



Devlin et al., 2001



Rahman, 2001



Fletcher, et al, 2004



Nam et al., 2002



Glofish



# 2.转基因技术

## 2.1 转基因载体

转基因载体是承载外源基因，携带靶基因进入斑马鱼胚胎细胞，并将目的基因整合到斑马鱼基因组使其稳定维持的DNA分子。

- ① 启动子。启动子是RNA聚合酶识别、结合和开始转录的一段DNA序列，它含有RNA聚合酶特异性结合和转录起始所需的保守序列，多数位于结构基因转录起始点的上游。
- ② 目的基因：荧光蛋白；特异基因
- ③ 终止子。终止子是在转录过程中，提供转录终止信号的序列。
- ④ 其它元件：转座子、增强子等。



When & where

- 决定基因在哪个发育阶段表达
- 决定基因表达的组织特异性(组成型、组织特异型、诱导型)

What

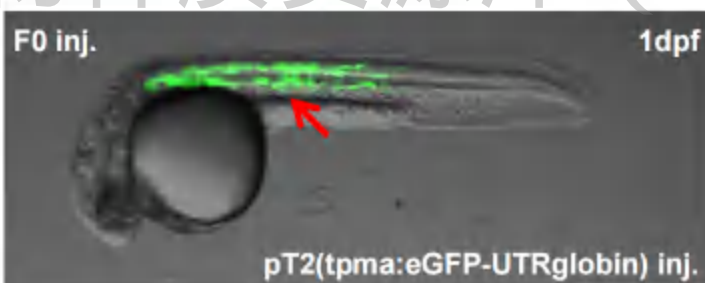
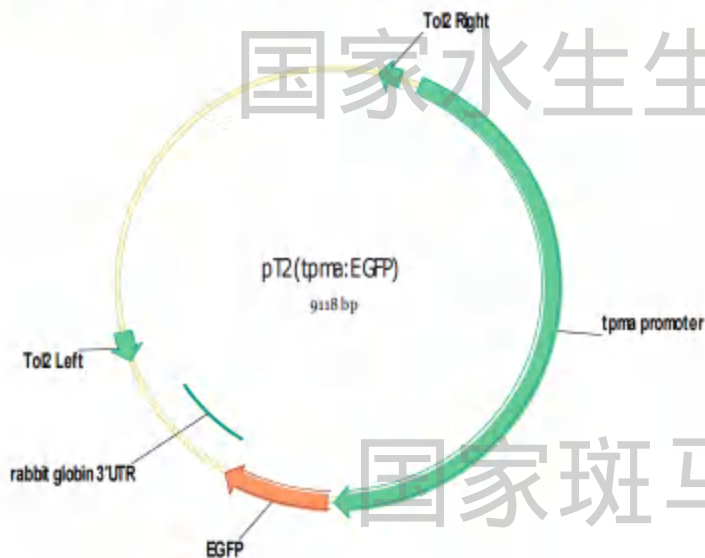
- 决定表达的内容





## 2.转基因技术

以质粒样品pT2(tpma:eGFP-UTRglobin)为例:



转基因载体的元件:

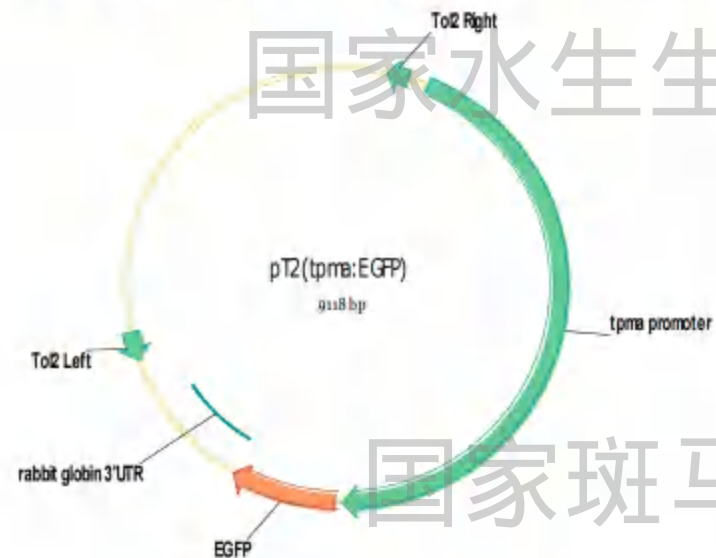
- ① 启动子: *tpma*;
- ② 目的基因: *eGFP*;
- ③ 终止子: *globin 3'UTR*;
- ④ 其它元件: Tol2转座子。

www.zfish.cn



# 2.转基因技术

以质粒样品pT2(tpma:eGFP-UTRglobin)为例:



国家水生生物种质资源库 (NABRC)

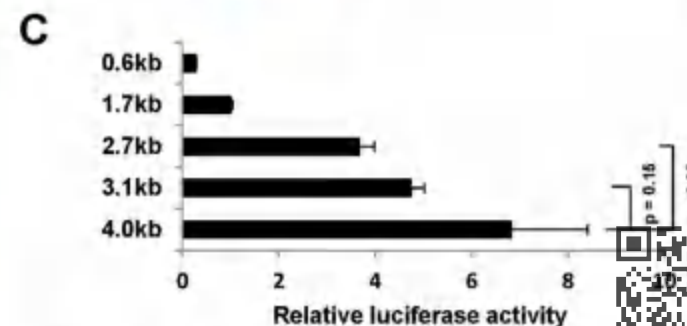
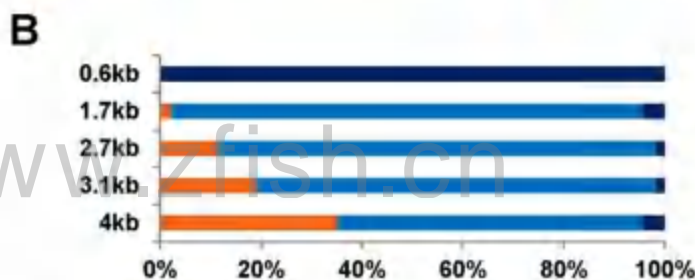


国家斑马鱼资源中心 (CZRC)



转基因载体的元件:

- ① 启动子: *tpma*;
- ② 目的基因: *eGFP*;
- ③ 终止子: *globin 3'UTR*;
- ④ 其它元件: ToI2转座子。



*tpma*启动子分析 (Pang et al., Mar Biotechnol (NY), 2015)



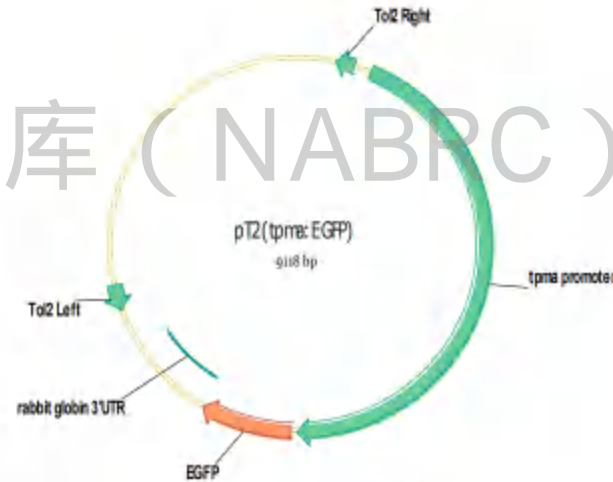
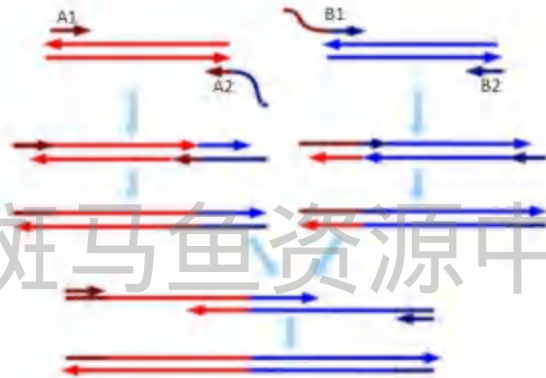


# 2.转基因技术

## 2.2 转基因载体的制备方法:

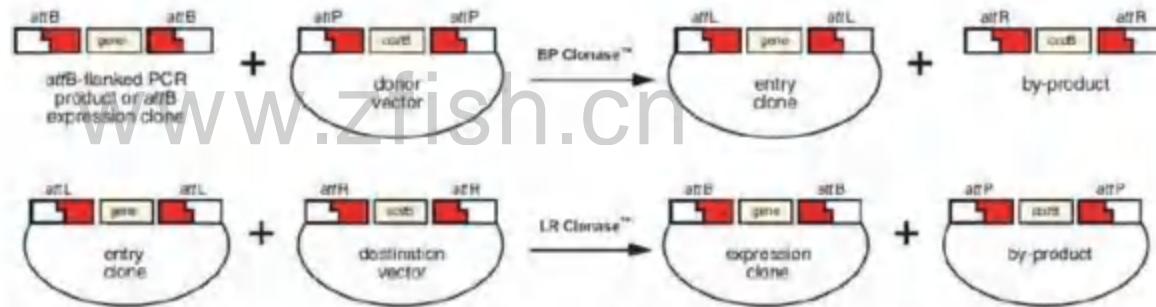
- ① 传统的酶切连接 (可结合搭桥PCR)
- ② Gateway技术。

### 搭桥PCR:



(Heckman et al., *Nat Protoc*, 2007)

### Gateway:

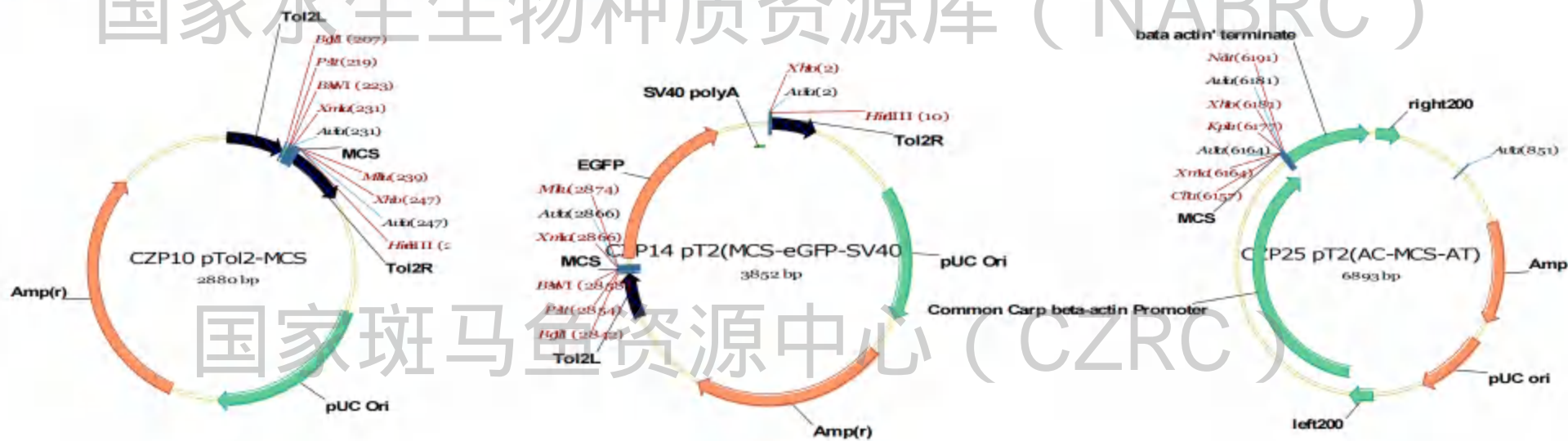


(Walhout et al., *Nat Protoc*, 2000)



# 2.转基因技术

## 斑马鱼中心转基因载体构建的工具质粒:

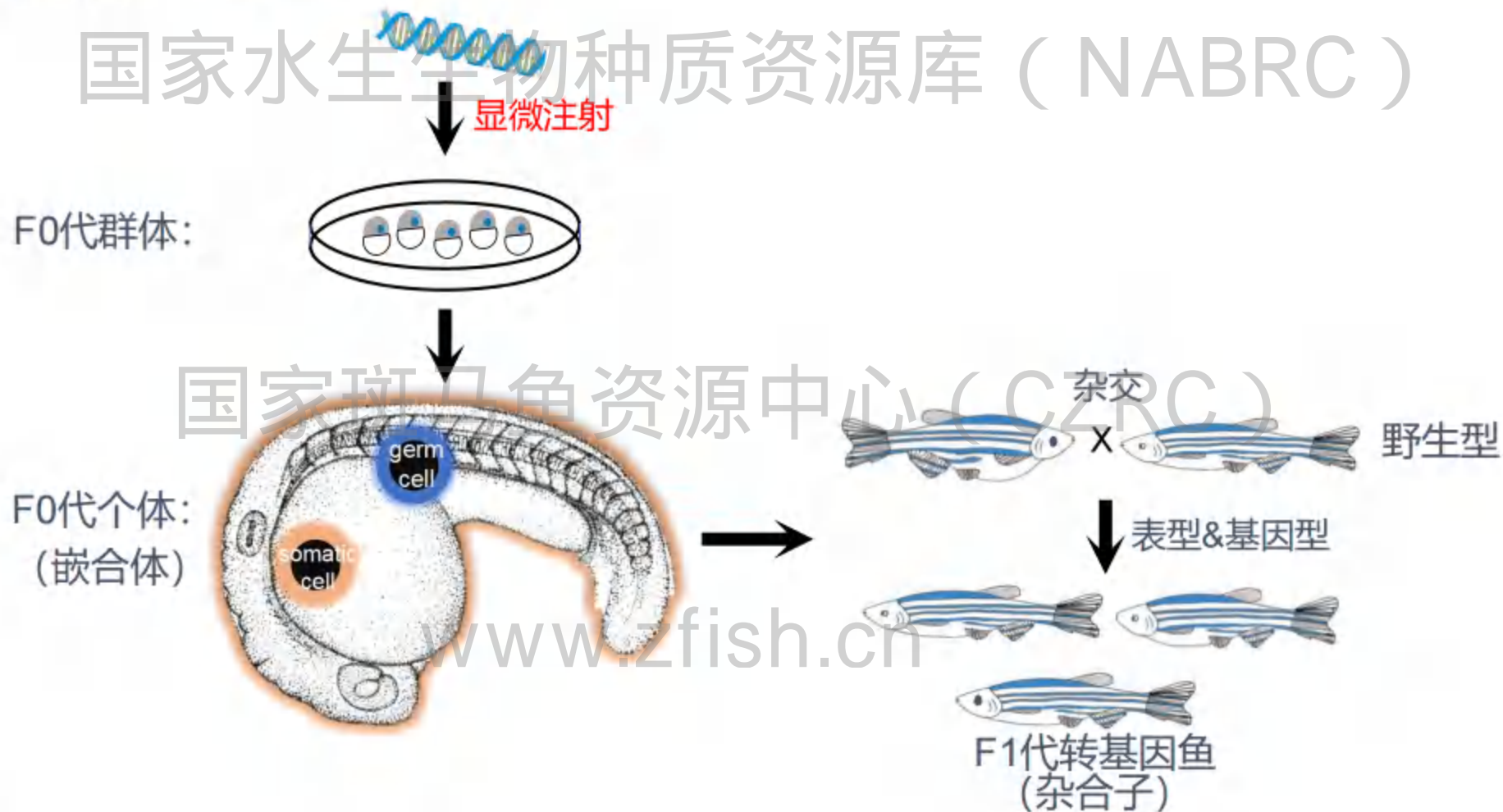


<http://www.zfish.cn/Products/OtherProductList.aspx?cid=001006>



## 2.转基因技术

### 2.3 转基因品系构建流程:





# 2.转基因技术

## 斑马鱼中心保存的转基因品

• <http://www.zfish.cn>

国家水生生物种质资源库 (NABRC)



CZ62



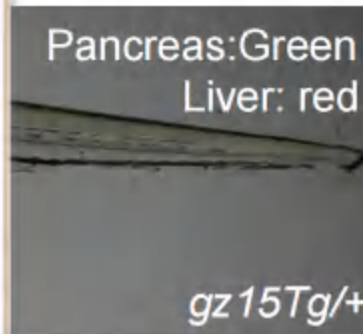
CZ79

**CZRC** 国家斑马鱼资源中心  
地址: 武汉市武昌区洪山街7号中科院水生所 邮编: 430072  
电话: 027-65780570 邮箱: zebrafish@zfish.cn 网址: <http://www.zfish.cn>

*Tg(mpeg1:EGFP) (AB)<sup>Ab207s</sup>* 和 *Tg(mpeg1:mCherry) (AB)<sup>Ab217s</sup>* 转基因斑马鱼研制项目报告

- 2013年12月, F1代转基因鱼 *Tg(mpeg1:mCherry)* 和 *Tg(mpeg1:EGFP)* 长至2月龄, 转基因阳性的F1代斑马鱼在腹鳍处特异地表达荧光, 分别筛选出20尾阳性F1代 *Tg(mpeg1:mCherry)* 转基因鱼, 25尾阳性F1代 *Tg(mpeg1:EGFP)* 转基因鱼。
- Tg(mpeg1:EGFP) (AB)<sup>Ab217s</sup>* 的阳性F1代转基因鱼的特异荧光表达如下所示:

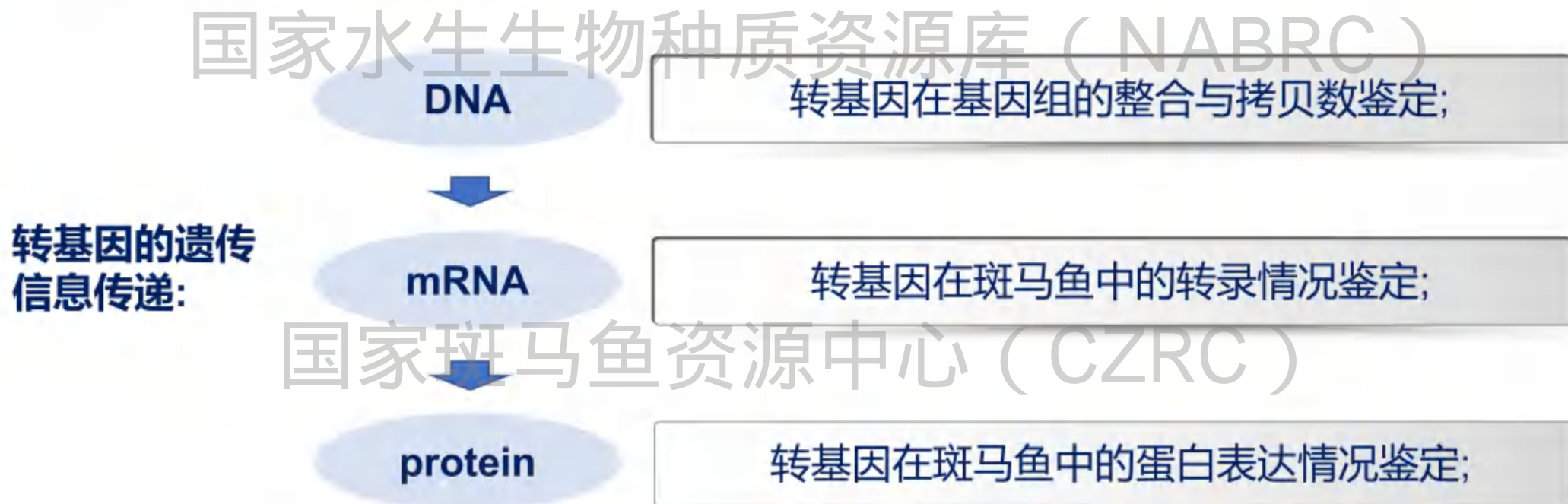
- Tg(mpeg1:mCherry) (AB)<sup>Ab207s</sup>* 的F1代转基因鱼的特异荧光表达如下所示:





## 2.转基因技术

### 2.8 转基因品系的鉴定方法:



[www.zfish.cn](http://www.zfish.cn)

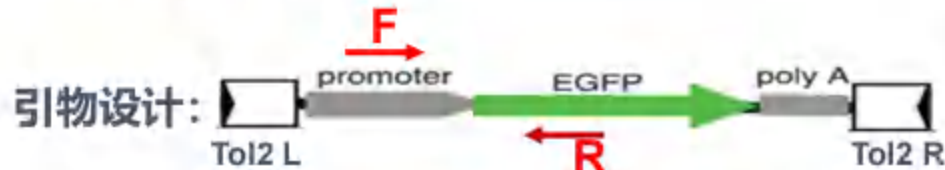


# 2.转基因技术

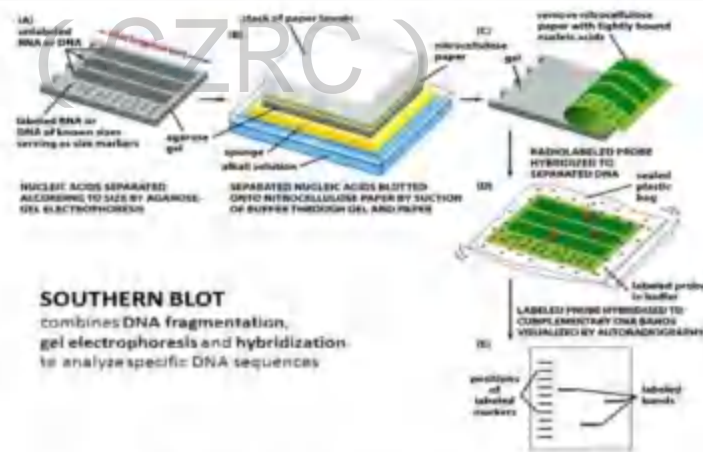
## 2.8 转基因品系的鉴定方法:

### A. 转基因在基因组的整合与拷贝数鉴定

- PCR (聚合酶链式反应): 引物跨多元件、提取基因组注意相互污染;
- Southern杂交



## Southern Blotting Technique



(<https://www.onlinebiologynotes.com/southern-blotting-principle-procedure-application/>)



# 2.转基因技术

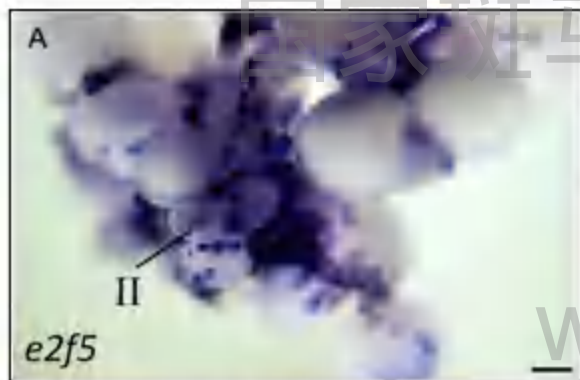
## 2.8 转基因品系的鉴定方法:

### B. 转基因在斑马鱼中的转录情况鉴定

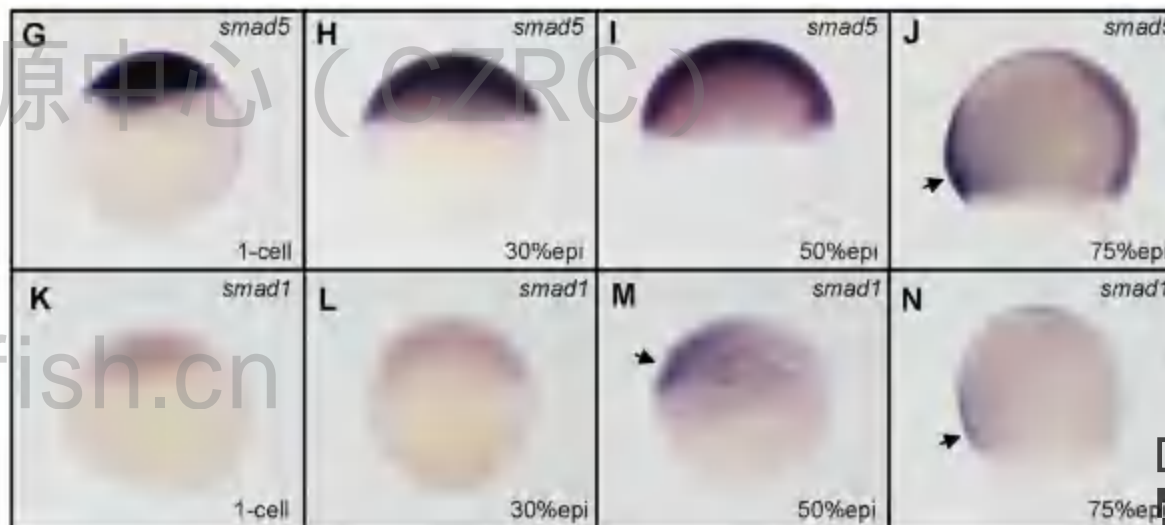
- 原位杂交技术;
- RT-PCR (反转录PCR) ;
- Northern杂交

原位杂交技术是利用带标签的反义RNA探针检测胚胎或者组织内基因转录本的原始分布及相对表达水平。该技术能够反映转录本:

- ✓ 相对表达水平信息
- ✓ 位置信息



(Yang et al., Mol Biol Rep, 2010)



(Wei et al., J Biol Chem 2014)





## 2.转基因技术

### 2.8 转基因品系的鉴定方法:

#### B. 转基因在斑马鱼中的转录情况鉴定

- 原位杂交技术;
  - RT-PCR (反转录PCR) ;
  - Northern杂交
- **RT-PCR** (reverse transcription-PCR) 是聚合酶链式反应 (PCR)的一种广泛应用的变形。在RT-PCR中, 一条RNA链被逆转录成为互补DNA (cDNA), 再以此为模板通过PCR进行DNA扩增。
  - **半定量PCR**是在RT-PCR体系中同时加入内参标基因的引物, 使目的基因和内参基因在同一条件下同时扩增。在扩增反映结束之后, 可以通过凝胶电泳的方法对扩增产物进行半定量分析。
  - **定量PCR**是以一定时间内DNA的增幅量为基础进行DNA的定量分析。



(<https://www.thesciencenotes.com/northern-blotting-principle-procedure-and-applications/>)



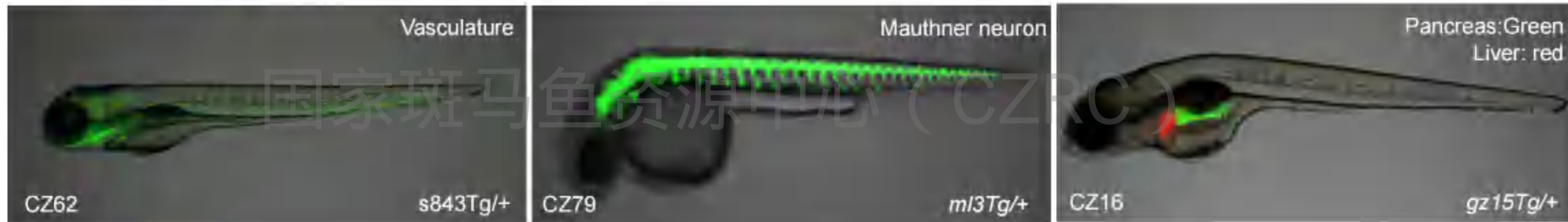


## 2.转基因技术

### 2.8 转基因品系的鉴定方法:

#### C. 转基因在斑马鱼中的蛋白表达情况鉴定

- 表型鉴定 (荧光表达观察)
- ELISA检测
- Western杂交



#### 鉴定方法:

荧光报告基因在不同的发育阶段, 不同组织中的特定表达模式是进行此类转基因品系筛选的首选依据。

第一步, 品系调研, 确定荧光报告基因表达的**发育时期**和标记的**组织器官**。

第二步, 收集该品系胚胎, 待胚胎发育到合适的时期, 使用荧光显微镜进行镜检。



## 2.转基因技术

### 2.8 转基因品系的鉴定方法:

#### C. 转基因在斑马鱼中的蛋白表达情况鉴定

- 表型鉴定 (荧光表达观察)
- ELISA检测
- Western杂交

酶联免疫吸附测定 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 首先利用抗原与**抗体**的特异反应待测物与酶连接, 然后加入酶反应底物后, 底物被催化成有色产物, 最后根据颜色的深浅进行定性或定量分析。**利用ELISA检测转基因表达蛋白具有方便快捷、特异性高等特点, 但也易出现缺乏标准化、本底高等问题。**

Western杂交 (杂交蛋白质印迹法): 与Southern Blot或Northern Blot杂交方法类似, 但Western Blot法被检测物是蛋白质, 采用的是聚丙烯酰胺凝胶电泳, “探针”是**抗体**, “显色”用标记的二抗, 最后通过着色的位置及深度分析特定蛋白在细胞或组织中的表达情况。**Western杂交直接反应了目的基因在蛋白水平的表达, 具有非常重要的意义, 但是该技术步骤繁琐, 费用高, 不适于批量检测。**





- **转基因技术**是将人工分离和修饰过的基因导入到生物体基因组中，由于导入基因的表达，引起生物体的性状产生可遗传的修饰。
- **转基因载体**是承载外源基因，携带靶基因进入斑马鱼胚胎细胞，并将目的基因整合到斑马鱼基因组使其稳定维持的DNA分子。转基因载体的设计决定了转基因品系的效应。
- 转基因品系研制需要通过**多代**筛选，才能获得稳定遗传的转基因品系。
- **荧光表达观察、PCR和原位杂交技术**是常用的转基因品系的鉴定方法。

[www.zfish.cn](http://www.zfish.cn)



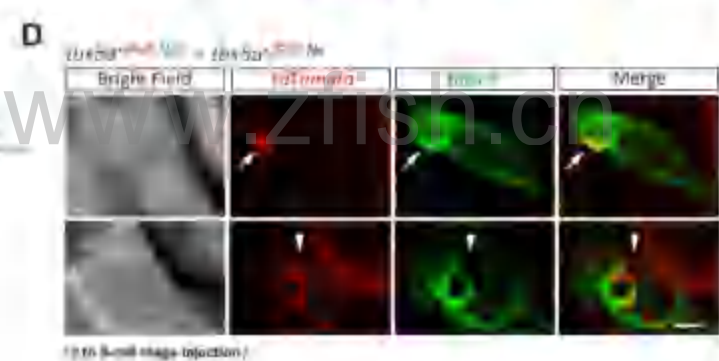
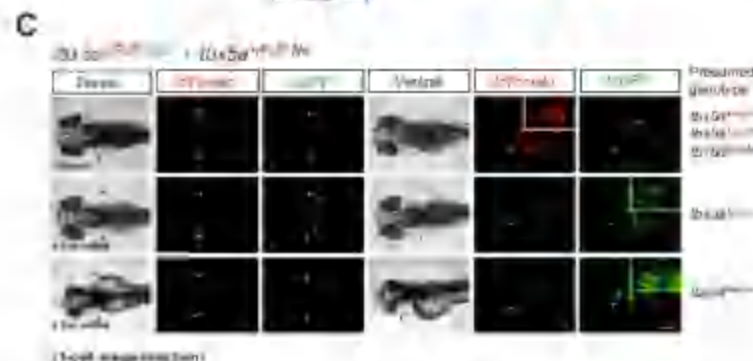
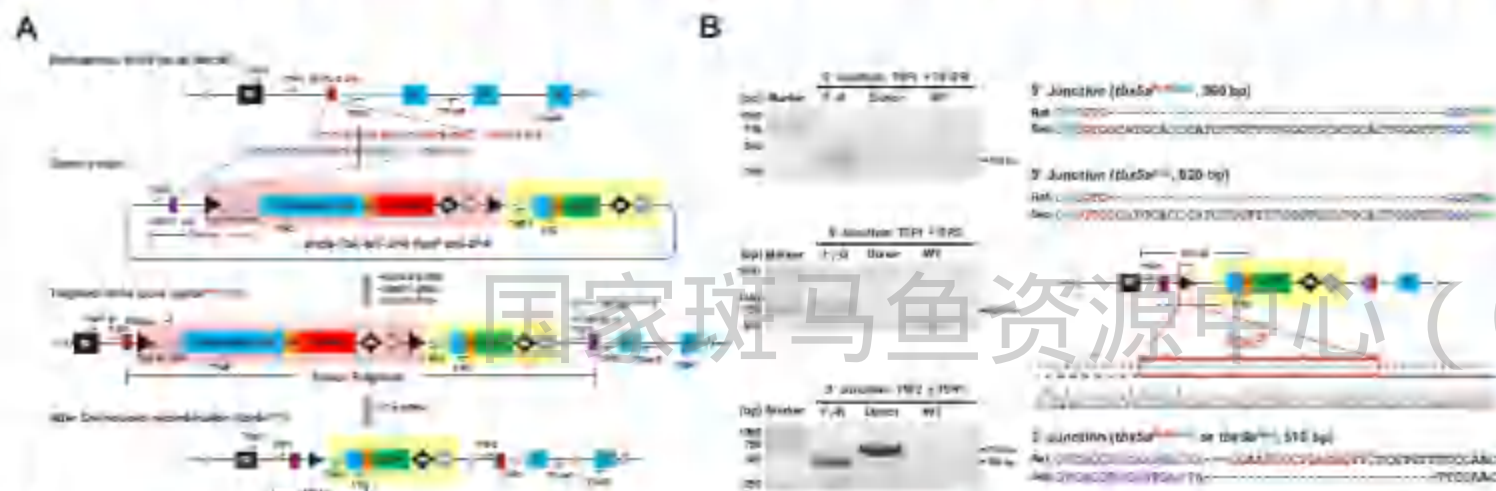
- 国家水生生物种质资源库 (NABRC)
- 1 斑马鱼基因过表达技术 → 瞬时基因功能获得
  - 2 斑马鱼转基因技术 → 稳定基因功能获得
  - 3 斑马鱼基因敲入技术 → 定向编辑序列
  - 4 斑马鱼胚胎显微注射技术 → 胚胎操作基础技能
- 国家斑马鱼资源中心 (CZRC)
- www.zfish.cn





# 3.斑马鱼基因敲入技术

随着基因编辑技术的发展，“基因敲入技术”逐步建立和发展起来，利用该技术可以进行特定的外源核酸序列转入细胞或组织基因组中的特定位点，以实现条件性基因敲除、基因治疗、细胞或组织标记等多种精确和(或)复杂的基因组靶向修饰。



利用基因敲入技术，在*tbx5a*基因序列中通过一次插入同时引入两个loxP序列以及荧光蛋白报告基因，实现了一步法产生双色标记的敲入及条件性基因敲除品系：

- ✓ 可达到基因/等位基因表达的活体标记与细胞示踪效果
- ✓ 可对目的基因实现进行可视化地条件性/组织特异性敲除

(Li et al., *Elife* . 2010)

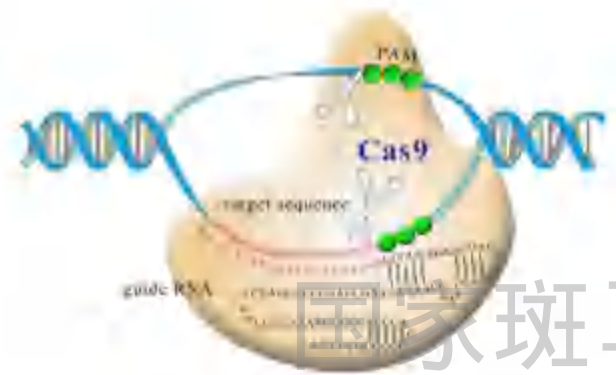




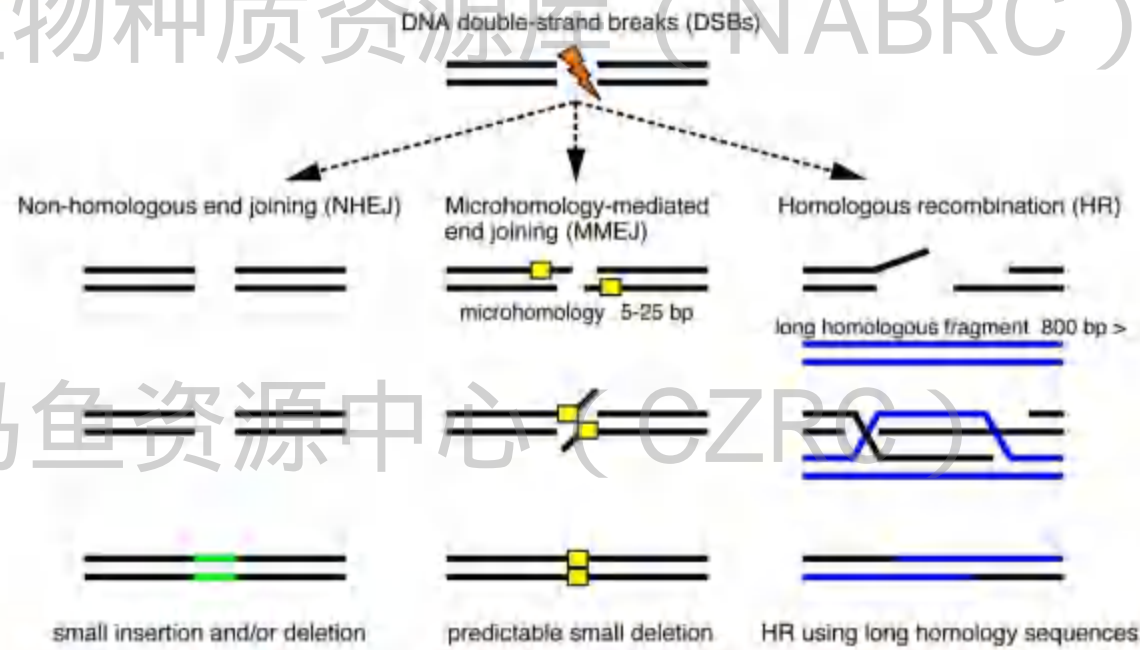
# 3. 斑马鱼基因敲入技术

## 斑马鱼基因敲入技术原理

国家水生生物种质资源库 (NABRC)



(Cong et al., *Science*. 2013)



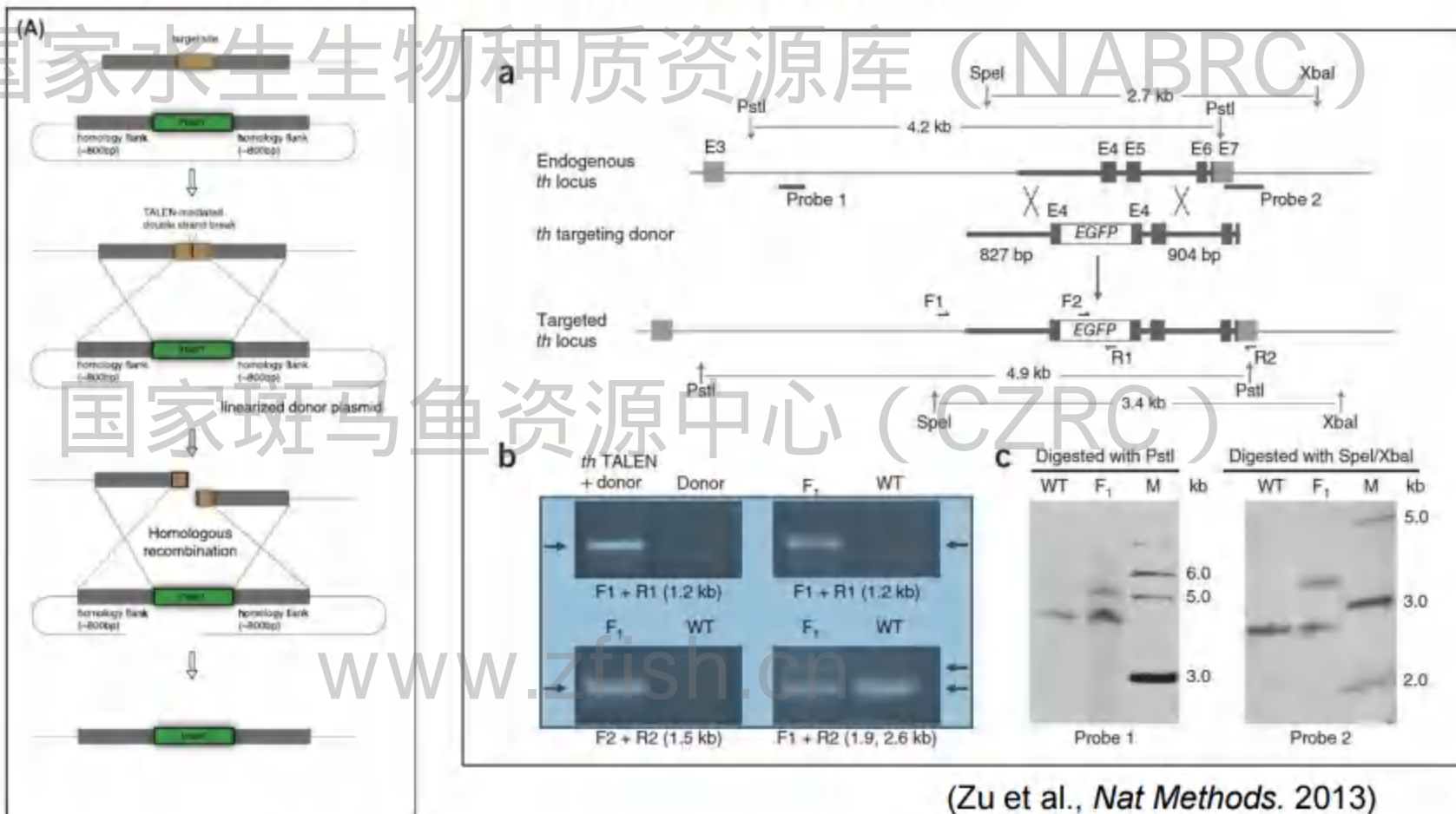
(Kawahara et al., *Int J Mol Sci*. 2016)

- 目前斑马鱼中的基因敲入技术主要是基于**基因敲除技术**在基因组特定的靶点产生双链断裂，激发细胞内的**双链断裂修复机制**来实定点敲入。
- DNA双链断裂修复对基因组完整性具有重要意义，非同源端连接 (Non-homologous End Joining, NHEJ) 微同源介导的末端连接 (Microhomology-mediated end joining, MMEJ) 以及同源重组 (Homologous Recombination, HR)、被认为是斑马鱼中的三种主要修复机制。



# 3. 斑马鱼基因敲入技术

## 3.1 基于同源重组(HR)修复机制的基因组靶向敲入策略



(Auer et al., *Methods*. 2014)

(Zu et al., *Nat Methods*. 2013)

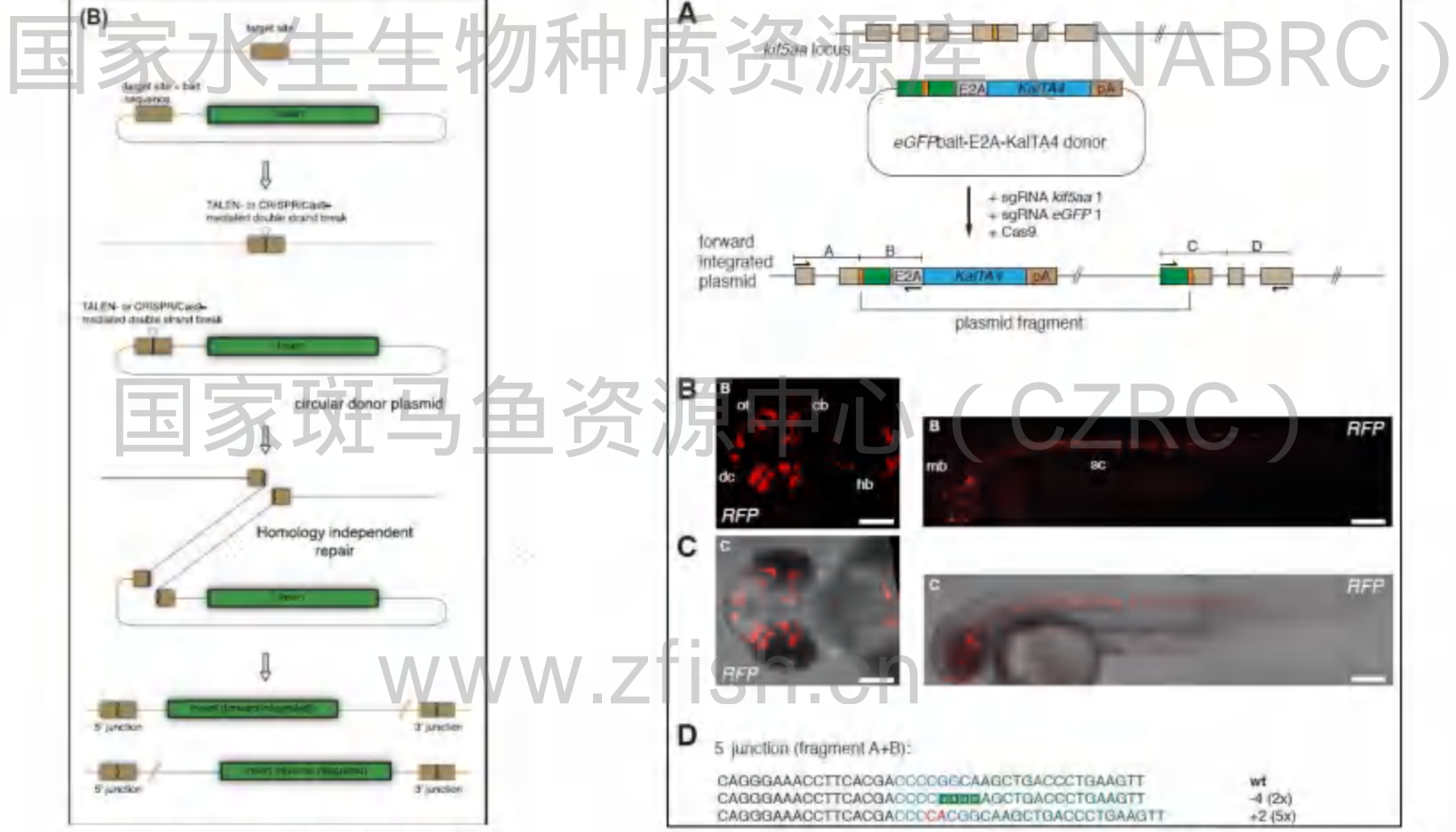
生殖传递率为1.5%





# 3. 斑马鱼基因敲入技术

## 3.2 基于非同源末端连接(NHEJ)修复机制的基因组靶向敲入策略



(Auer et al., *Methods*. 2014)

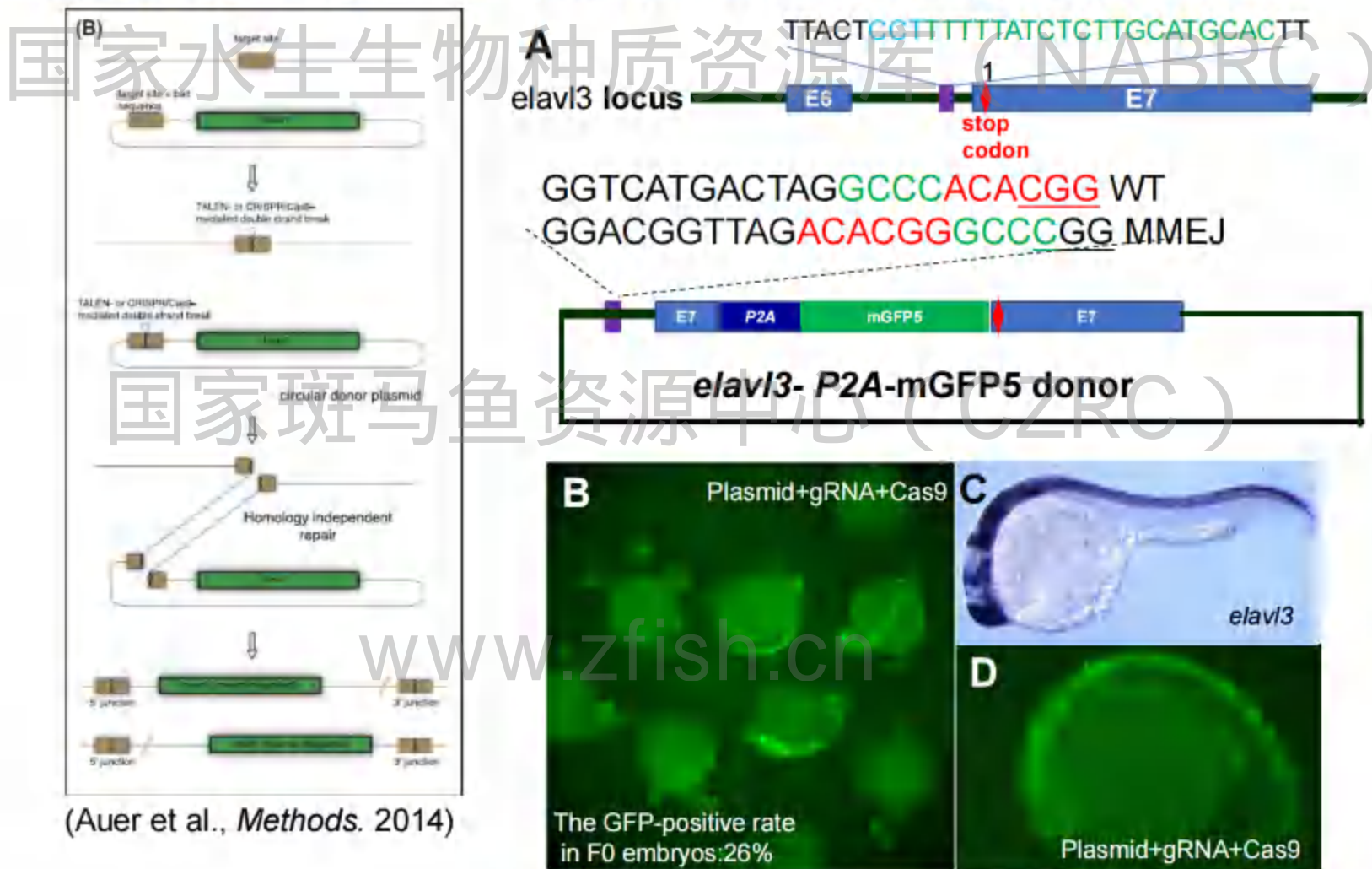
(Auer et al., *Genome Res.* 2014)

生殖传递率为10%



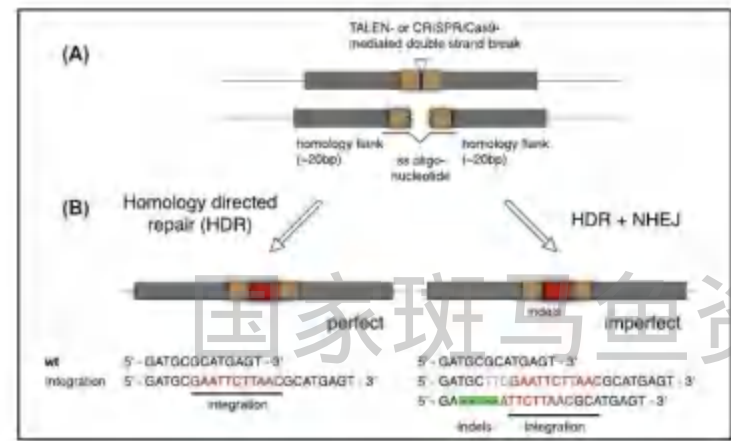
# 3.斑马鱼基因敲入技术

## 3.3 基于微同源末端连接(MMEJ)修复机制的基因组靶向敲入策略

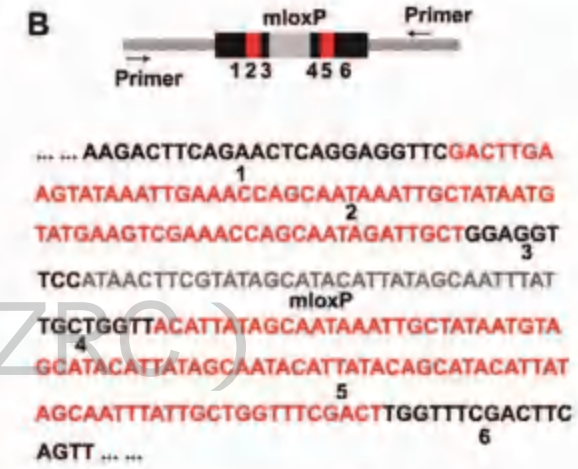
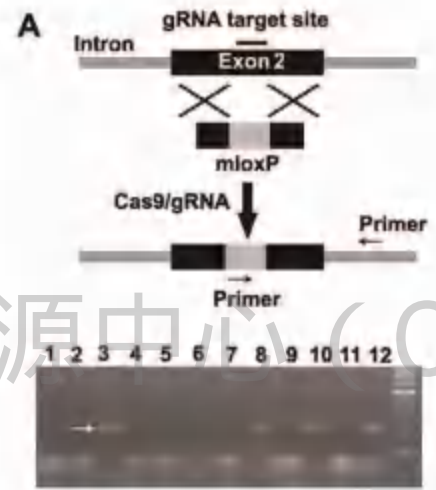


# 3. 斑马鱼基因敲入技术

## 3.4 以单链寡聚核苷酸(single-stranded oligodeoxynucleotides, ssODNs)为模板的实现小片段敲入策略



(Auer et al., *Methods*. 2014)



(Chang et al., *Cell Res* 2013)

www.zfish.cn





### 3.斑马鱼基因敲入技术

- 斑马鱼中的基因敲入技术主要是基于DNA损伤修复机制，利用基因敲除技术产生DSB，介导外源DNA整合到基因组中的特定位点，实现目的基因的靶向遗传修饰。
- 基因敲入技术可以进行特定的外源核酸序列转入细胞或组织基因组中的特定位点，不仅可以特异地破坏目的基因，还可以将外源序列引入内源基因位点。
- 斑马鱼中实现精确的基因敲入或者序列编辑，仍较难成功实现。斑马鱼中基因敲入实验所面临的主要挑战之一就是插入效率偏低，同时还有技术细节较多以及基因敲入过程中DNA修复的精细分子机制尚不完全明确等。

[www.zfish.cn](http://www.zfish.cn)



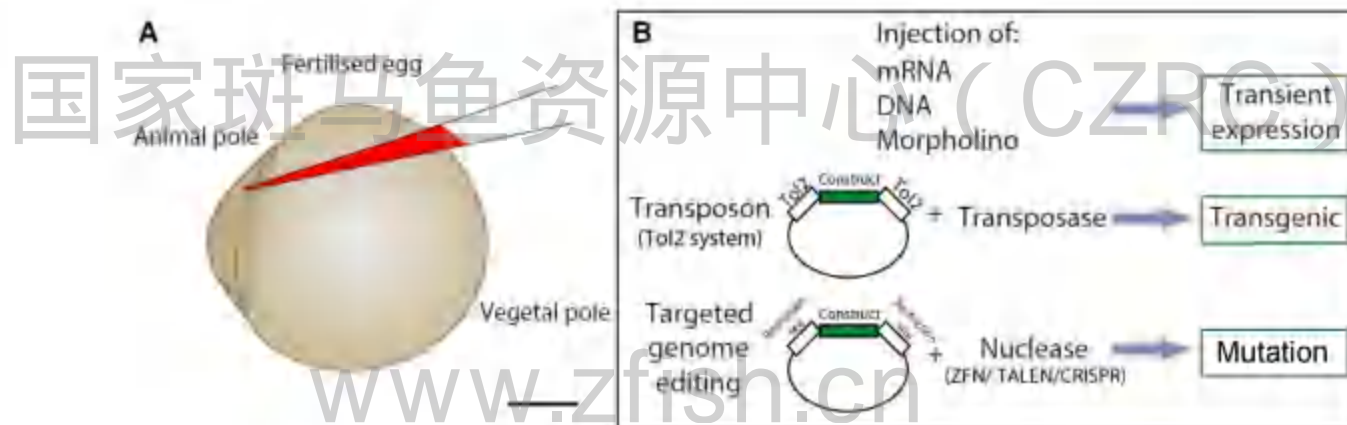
- 国家水生生物种质资源库 (NABRC)
- 1 斑马鱼基因过表达技术 → 瞬时基因功能获得
  - 2 斑马鱼转基因技术 → 稳定基因功能获得
  - 3 斑马鱼基因敲入技术 → 定向编辑序列
  - 4 斑马鱼胚胎显微注射技术 → 胚胎操作基础技能
- 国家斑马鱼资源中心 (CZRC)
- www.zfish.cn





# 4.斑马鱼胚胎显微注射技术

斑马鱼胚胎显微注射技术是在显微镜下，利用显微操作系统，将实验材料直接注射到1至4细胞期的斑马鱼胚胎中。由于胚胎发育早期没有膜分隔动物极和卵黄，注入的溶液将扩散至整个胚胎中。通过注射不同类型的实验样品，可以实现基因的短时间过表达、表达敲降、以及制备转基因或基因突变斑马鱼品系等实验目标。



(Wyatt et al., *Eur J Neurosci*, 2015)





# 4.斑马鱼胚胎显微注射技术

## 4.1 显微注射样品:

国家水生生物种质资源库 (NABRC)

DNA

mRNA

国家斑马鱼资源中心 (CZRC)

Morpholino

[www.zfish.cn](http://www.zfish.cn)  
其它



# 4.斑马鱼胚胎显微注射技术

## 1.注射DNA的实验:

- ① 过表达分析 (over & ectopic expression) ;
- ② 启动子分析;
- ③ 转基因;
- ④ 定点敲入 (knock-in) 。

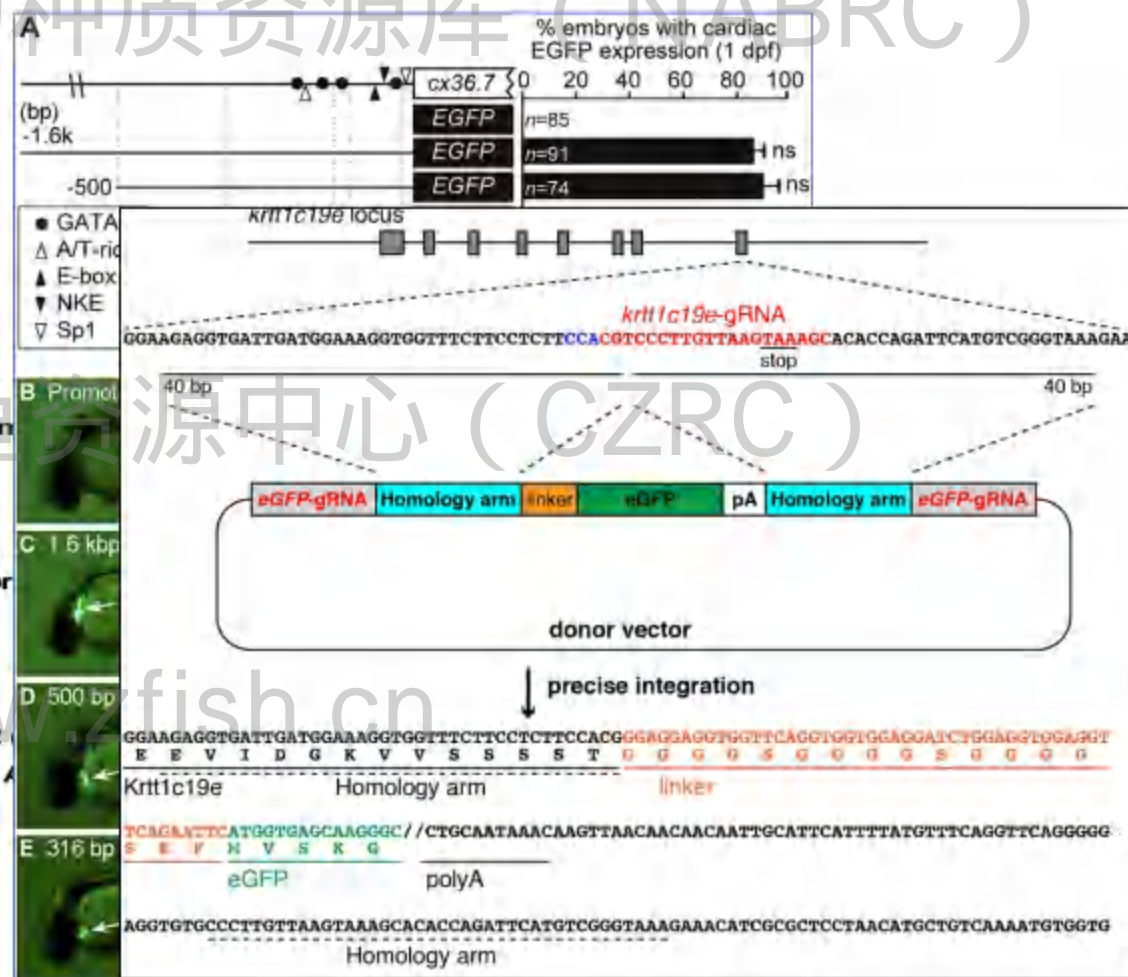
国家水生生物种质资源库 (NABRC)

国家斑马鱼资源中心 (CZRC)

www.zfish.cn

(Miyagi et al., *Gene*, 2016)

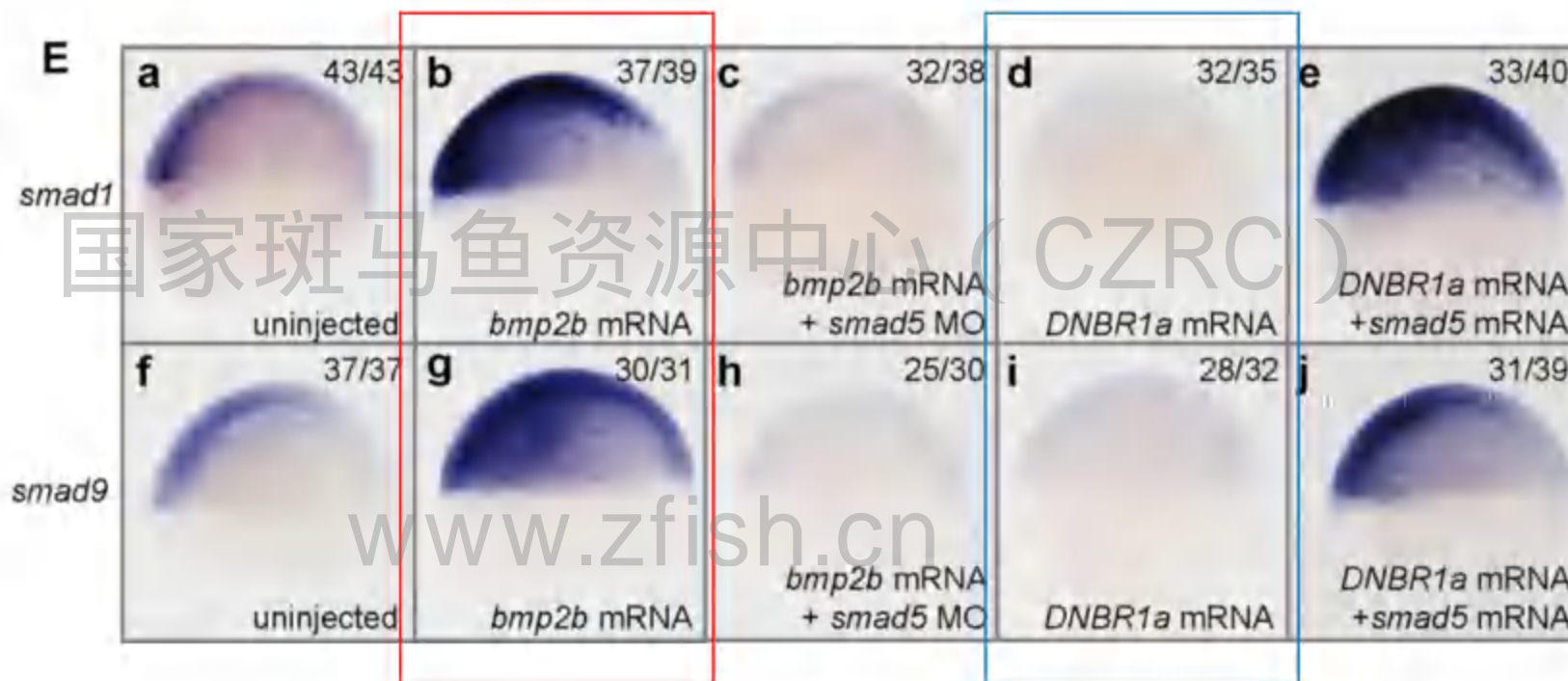
(Hisano et al., *Sci Rep*, 2015)



# 4.斑马鱼胚胎显微注射技术

## 2.注射mRNA的实验：过表达

- ① 野生型编码基因：过表达调控分析 ( over & ectopic expression) ;
- ② 突变型编码基因：显性负调控分析 (Dominant negative expts) ;
- ③ 工具酶：Tol2转座酶、CRISPR/Cas9系统。

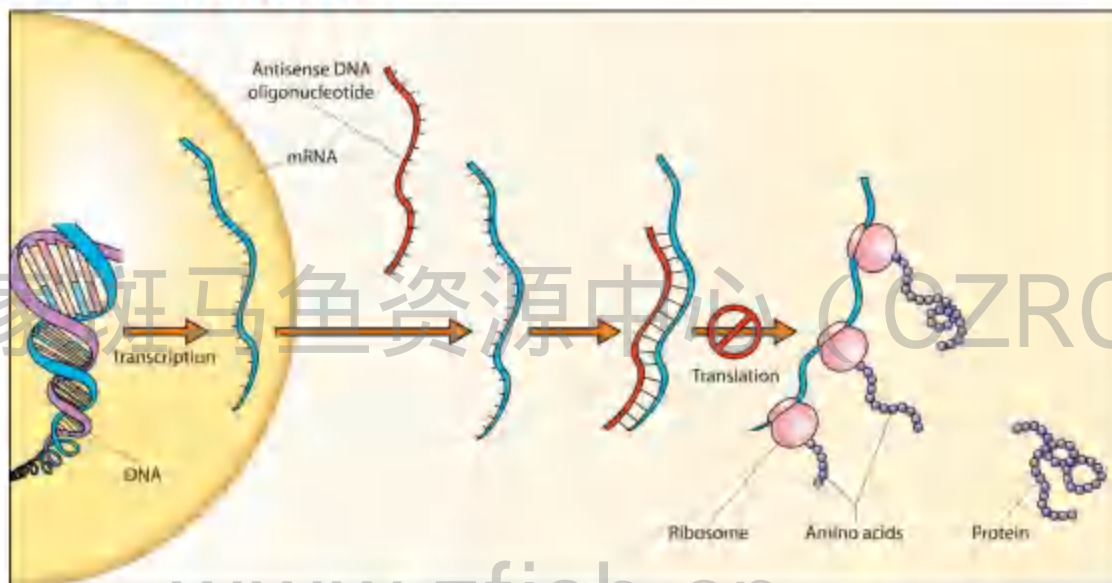




# 4.斑马鱼胚胎显微注射技术

## 3.Morpholino:

- ① 天然核苷酸结构重新设计获得的**合成的寡核苷酸单链**，长度多为25个碱基；
- ② 以标准核苷酸碱基配对的方式与RNA**互补结合**。
- ③ 注射Morpholino的实验：**敲低表达**



Morpholino工作原理示意图(gene-tools公司)

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



前期显微注射实验课样品：

*chordin* MO 国家水生生物种质资源库 (NABRC)



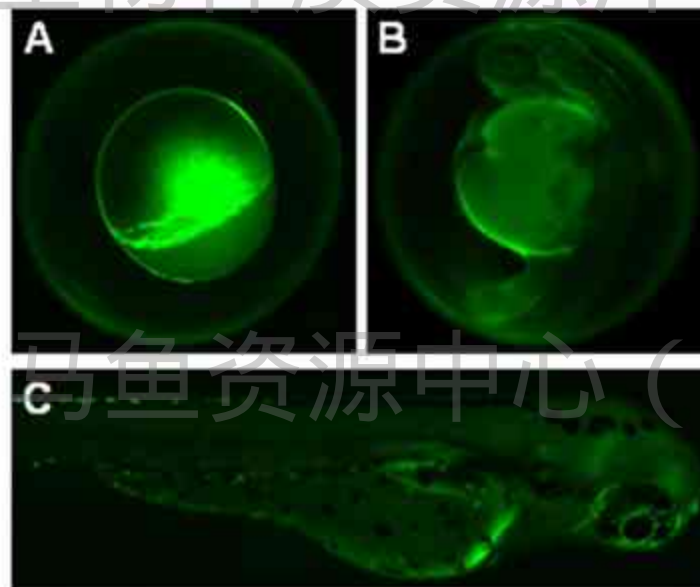
胚胎出现整齐的轻微腹部化：头部变小、血岛增大



# 4.斑马鱼胚胎显微注射技术

胚胎显微注射其它样品：染料、蛋白、药物等。

国家水生生物种质资源库 (NABRC)



国家斑马鱼资源中心 (CZRC)

注射荧光染料

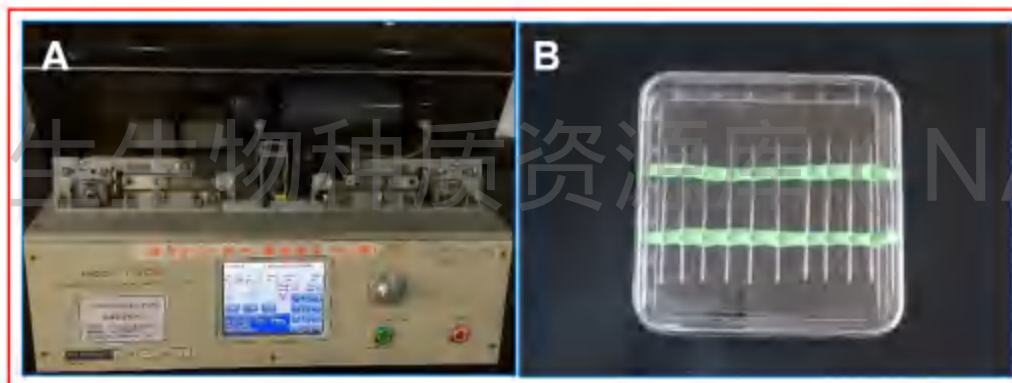
(Wang et al., *PLoS ONE*, 2007)





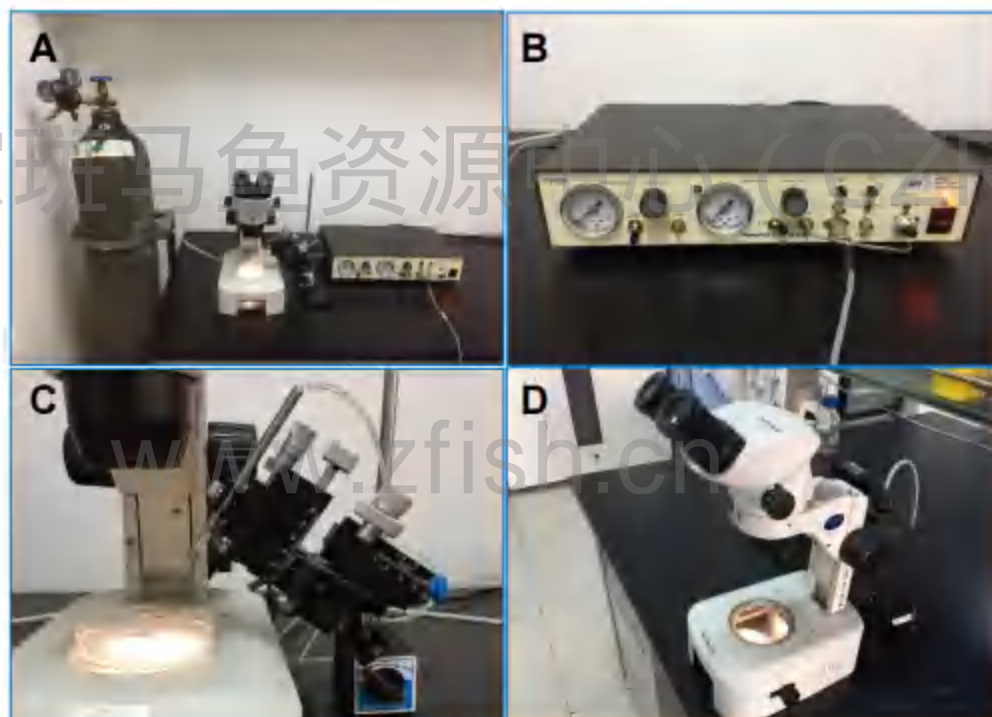
## 4. 斑马鱼胚胎显微注射技术

### 4.2 显微注射设备：



显微注射针准备。

(A) 拉针仪； (B) 拉制好的注射针。



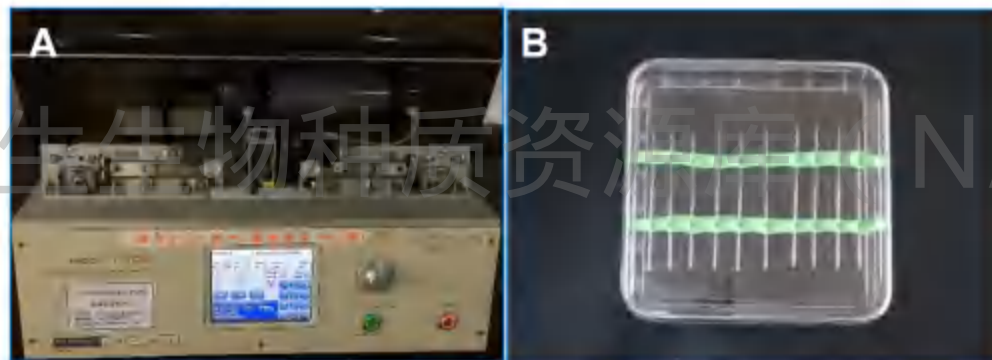
显微注射常用设备。

(A) 全套搭建好的显微注射设备；  
(B) 显微注射仪； (C) 显微操纵器；  
(D) 体视显微镜。



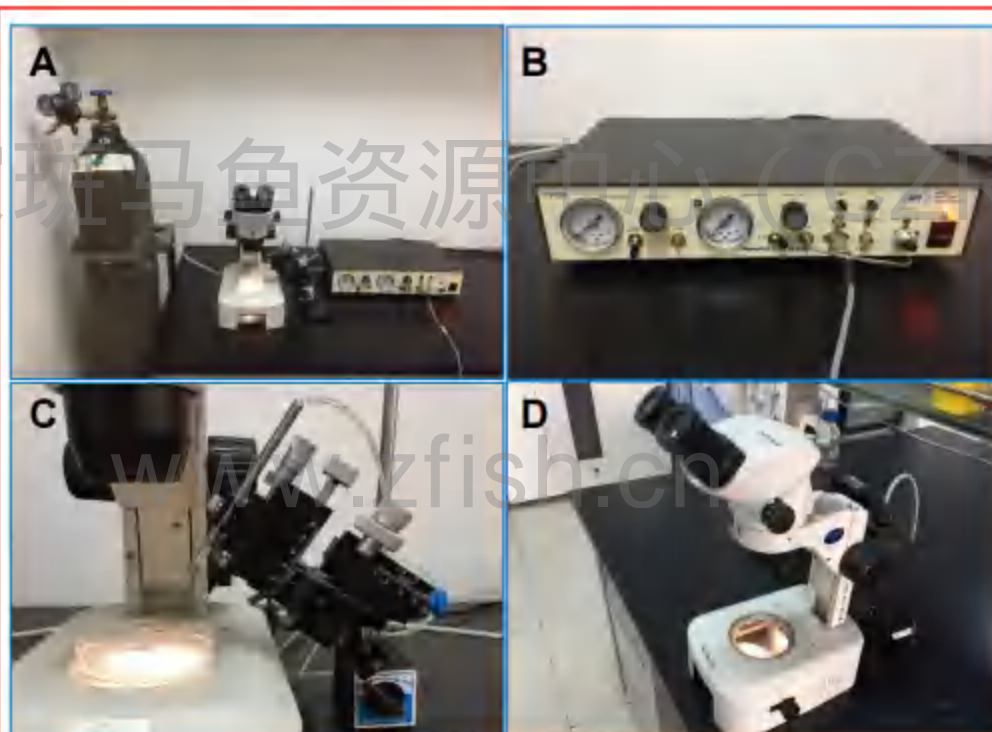
# 4.斑马鱼胚胎显微注射技术

## 4.2 显微注射设备：



显微注射针准备。

(A) 拉针仪； (B) 拉制好的注射针。



显微注射常用设备。

(A) 全套搭建好的显微注射设备；  
(B) 显微注射仪； (C) 显微操纵器；  
(D) 体视显微镜。



# 4.斑马鱼胚胎显微注射技术

## 4.3 显微注射视频





# 4.斑马鱼胚胎显微注射技术

## 4.4 显微注射操作:

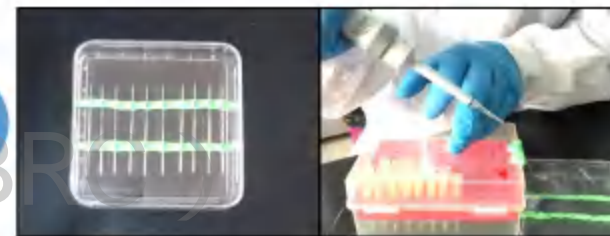


# 4.斑马鱼胚胎显微注射技术



准备胚胎：  
配鱼、收卵

准备注射针：  
拉针、上样



注射实验：  
仪器调节、破针、  
调剂量、注射胚胎

胚胎观察：  
荧光、表型、  
基因型检测



国家斑马鱼资源中心 (CZRC)

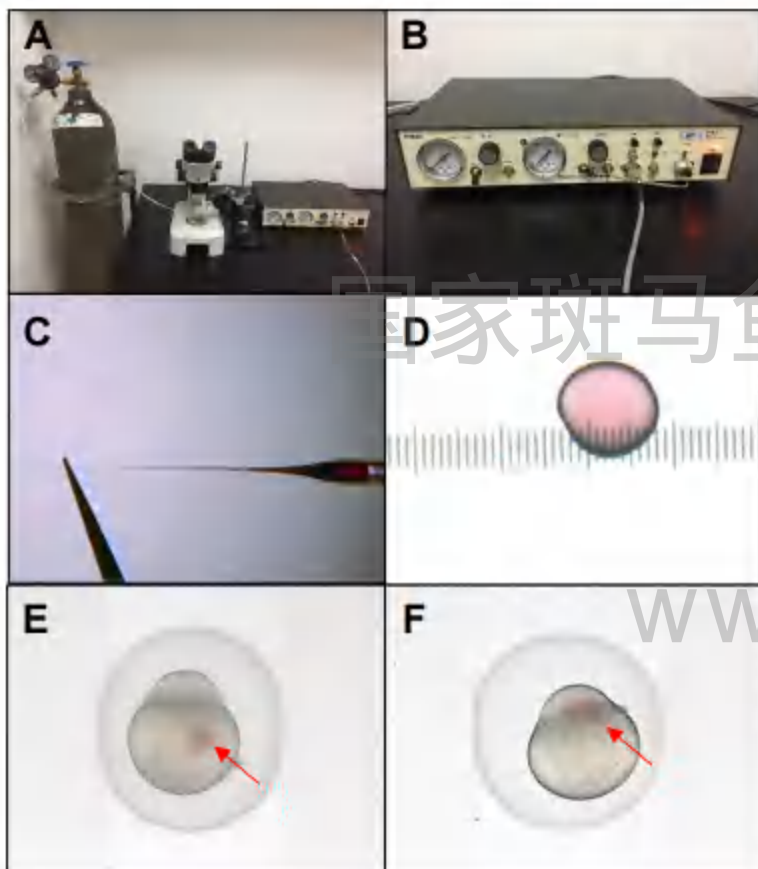
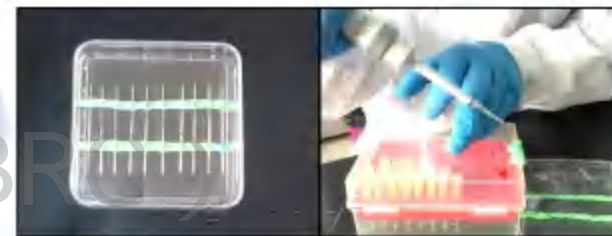
www.zfish.cn

# 4.斑马鱼胚胎显微注射技术



准备胚胎：  
配鱼、收卵

准备注射针：  
拉针、上样



注射实验：  
仪器调节、破针、  
调剂量、注射胚胎

胚胎观察：  
荧光、表型、  
基因型检测



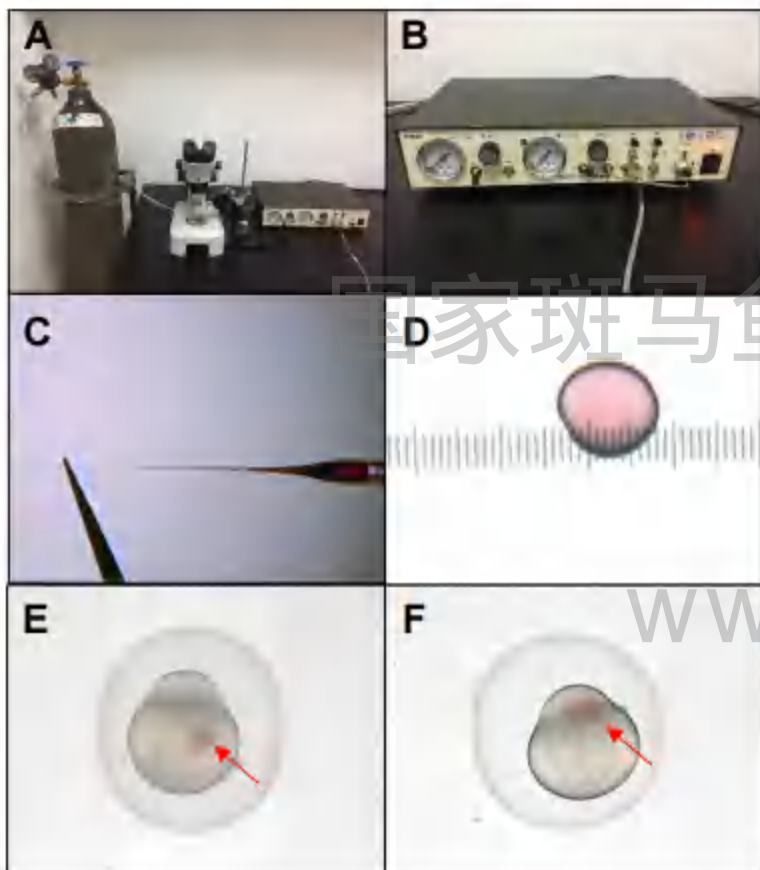


# 4. 斑马鱼胚胎显微注射技术



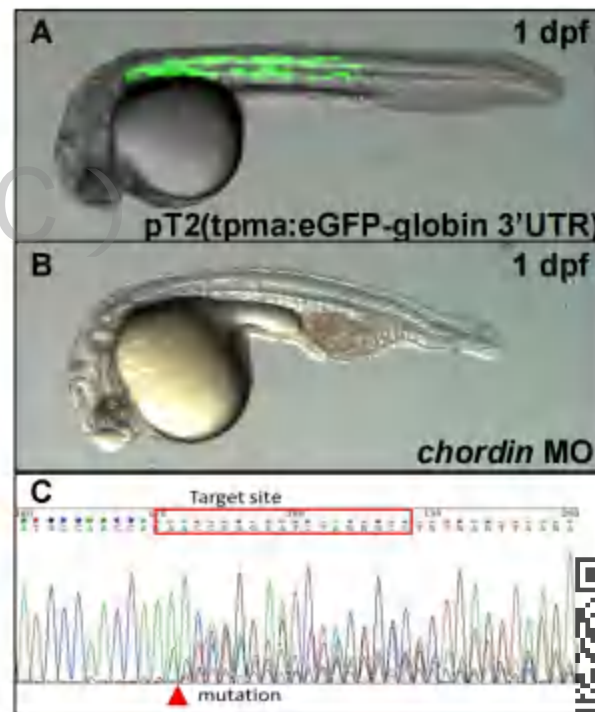
准备胚胎：  
配鱼、收卵

准备注射针：  
拉针、上样



注射实验：  
仪器调节、破针、  
调剂量、注射胚胎

胚胎观察：  
荧光、表型、  
基因型检测



# 4.斑马鱼胚胎显微注射技术

注意事项	原因
样品的纯度	堵针; DNA样品去内毒素
样品的浓度	最佳浓度优化
注射剂量	1nl/embryo
针尖大小	太粗: 注射量多, 受精卵破裂; 太细: 注射量少, 不易扎入胚胎
注射压力	需要与针尖大小相匹配
安全问题	严禁将注射针尖对着人员
胚胎养殖	注射后的胚胎需要细心照顾, 控制温度、水质和养殖密度

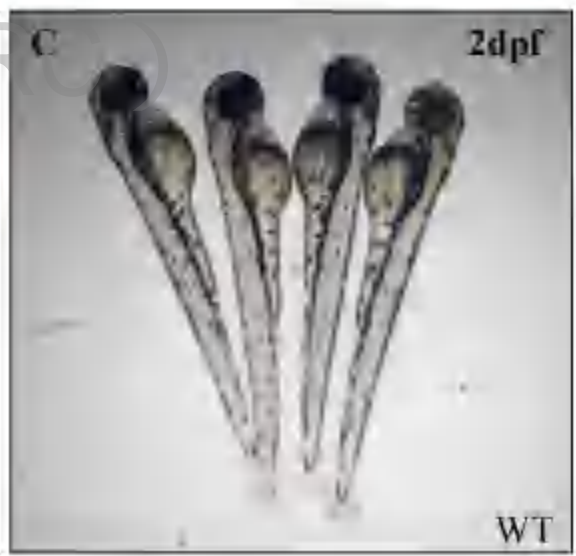




# 总结

- 斑马鱼胚胎显微注射技术是在显微镜下，利用显微注射系统，将实验材料直接注射到斑马鱼胚胎中的一种方法。
- 显微注射术需有相当精密的显微操作设备，以及熟练的操作技术。
- 胚胎显微注射是目前斑马鱼研究常用方法之一：通过注射不同类型的实验样品，可以实现基因的短时间过表达、表达敲降、以及制备基因突变、转基因或基因敲入斑马鱼品系等实验目标。

本次培训实验课注射样品：





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

