

国家水生生物种质资源库（NABRC）

讲座十

斑马鱼基因敲入技术

国家斑马鱼资源中心（CZRC）

李文渊

国家水生生物种质资源库

国家斑马鱼资源中心

liwenyuan@ihb.ac.cn

- 基因敲入概述
- 斑马鱼基因敲入技术流程
- CZRC基因敲入技术服务平台
- 总结

www.zfish.cn

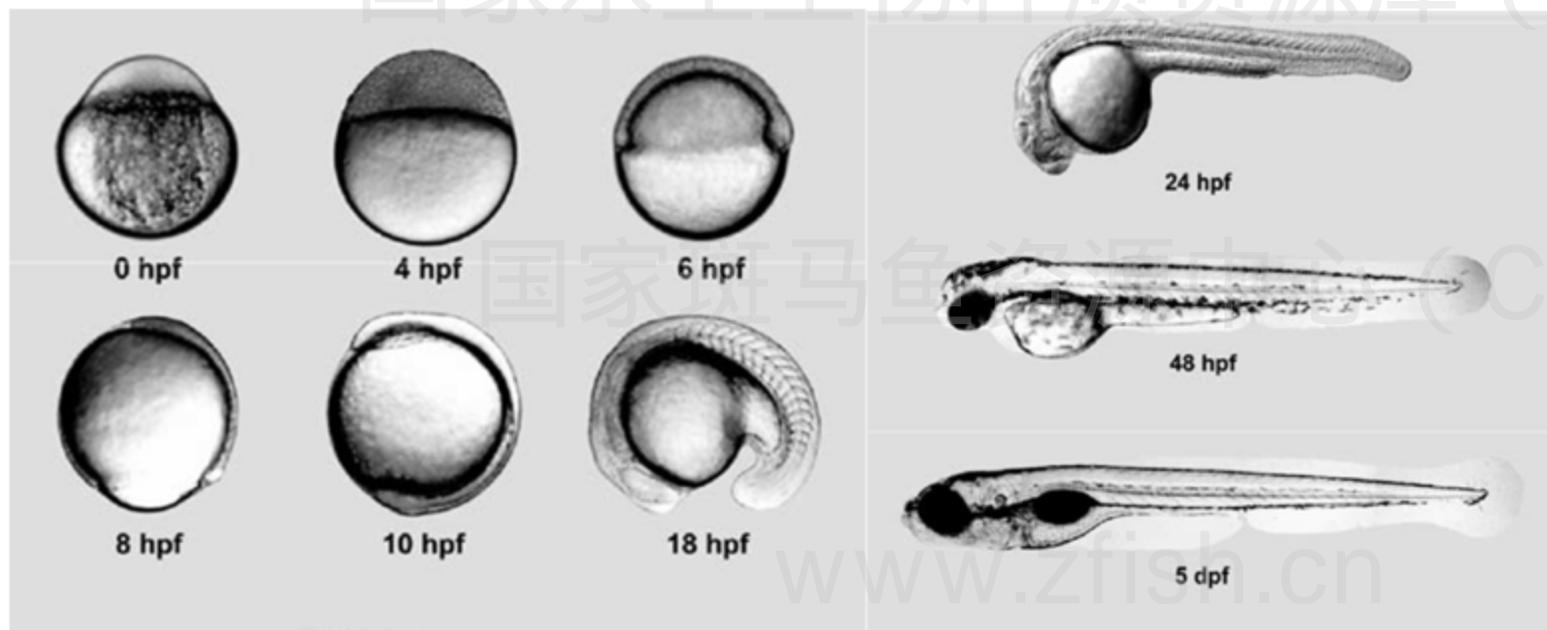
- 基因敲入概述
 - 斑马鱼基因敲入技术流程
 - CZRC基因敲入技术服务平台
 - 总结
- www.zfish.cn

什么是基因敲入?

基因敲入 (knock in, KI) : 是一种将外源功能性DNA序列, 定向的整合或替换到细胞的靶基因中, 以实现靶基因进行荧光标记, 蛋白标签, 条件性基因敲除, 基因替换等遗传操作的技术。

转基因技术	基因敲入技术
利用Tol2等转座子系统介导	需要CRISPR/Cas9或TALEN介导
随机插入	定向整合或替换
需要克隆启动子, 可能存在缺陷	利用内源基因表达调控系统
应用受局限, 实现功能有限	应用范围更广
需构建转基因载体	需构建基因敲入载体
有现成的转基因工具	根据目的设计实验

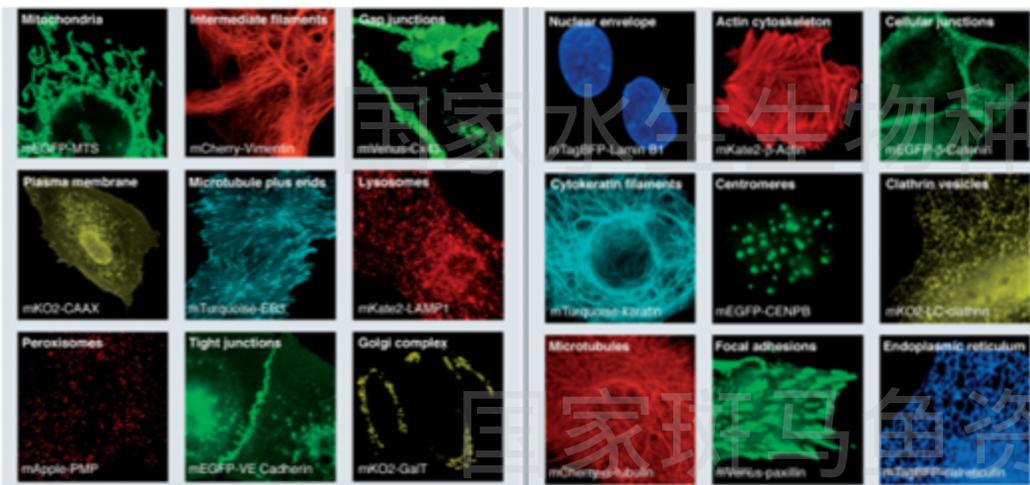
如何充分发挥斑马鱼的优势？



(Dahm and Geisler, 2006)

- 体外受精
- 体外发育
- 胚胎通体透明
- 与人类基因相似度达83%

可用于斑马鱼研究的重要技术

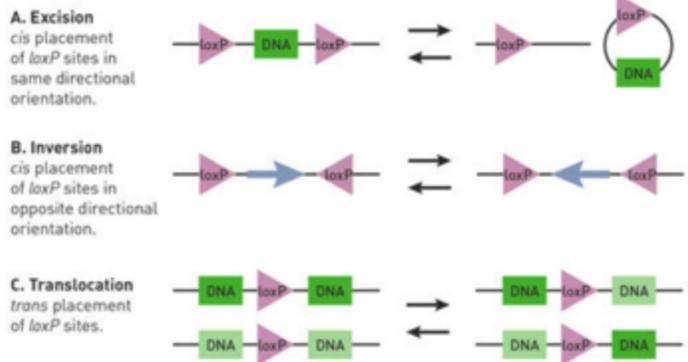


(Kremers *et al.*, 2011)

Microscopic imaging technique

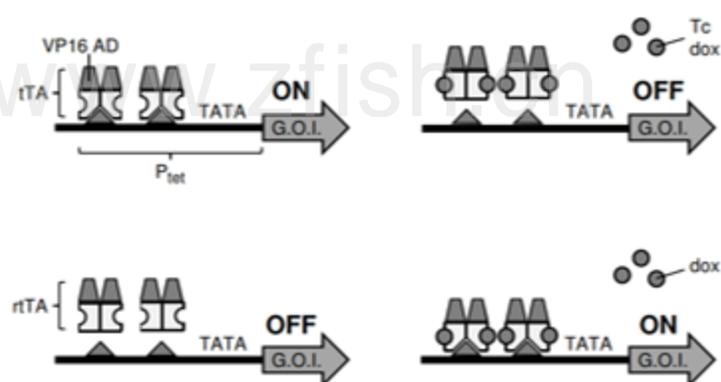


Cre/loxP system

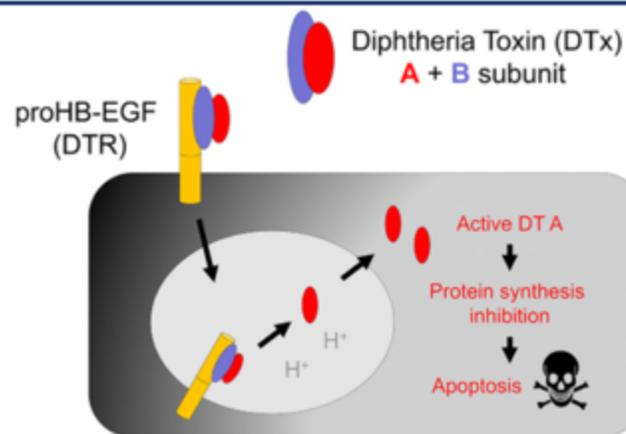


(<https://www.jax.org>)

Tet on and Tet off system



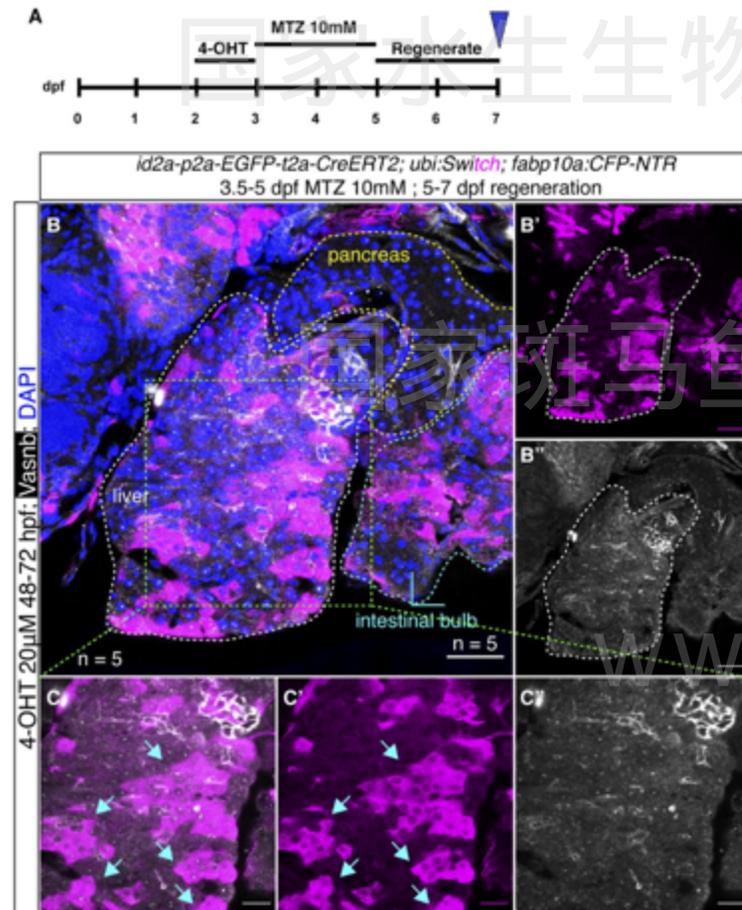
(Das *et al.*, 2016)



(Christiane Ruedl, Steffen Jung, 2018)

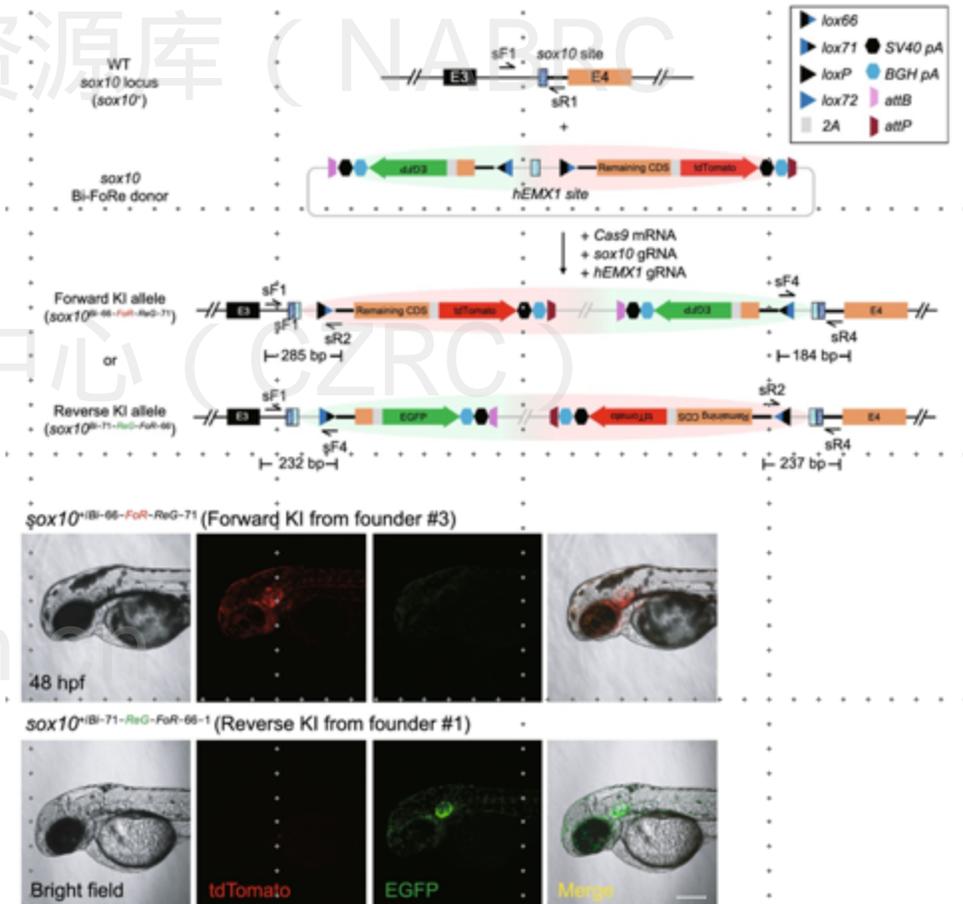
利用基因敲入可以实现哪些遗传操作?

Gene-labeling / Induced cell death



(Jiarui Mi, OlovAndersson, 2023)

Gene-labeling / Conditional knock out



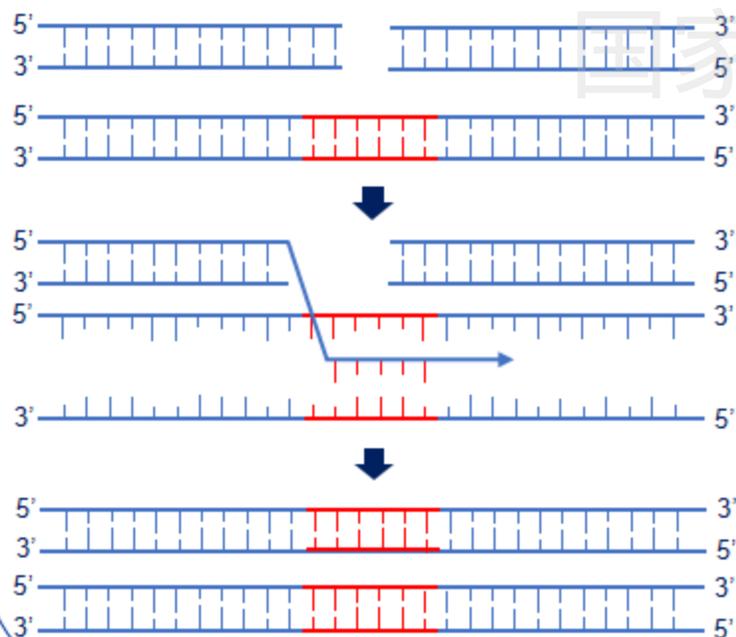
(Han *et al.*, 2020)

DNA双链断裂修复机制

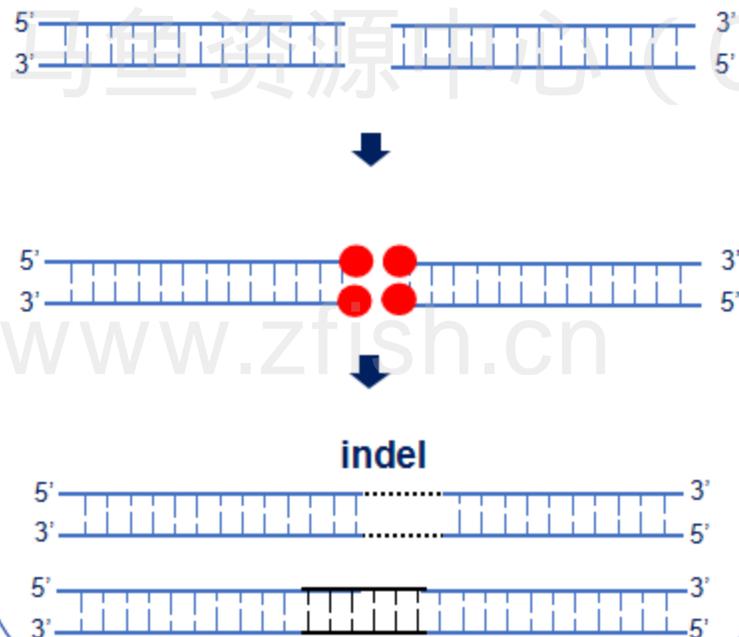
Double-strand breaks (DSBs)



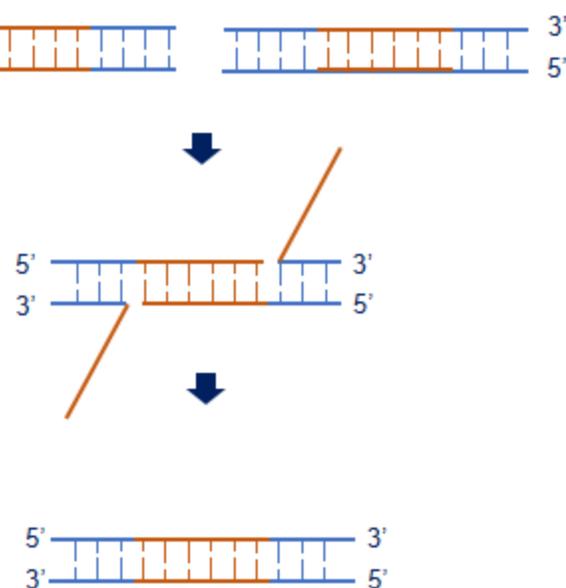
Homologous recombination



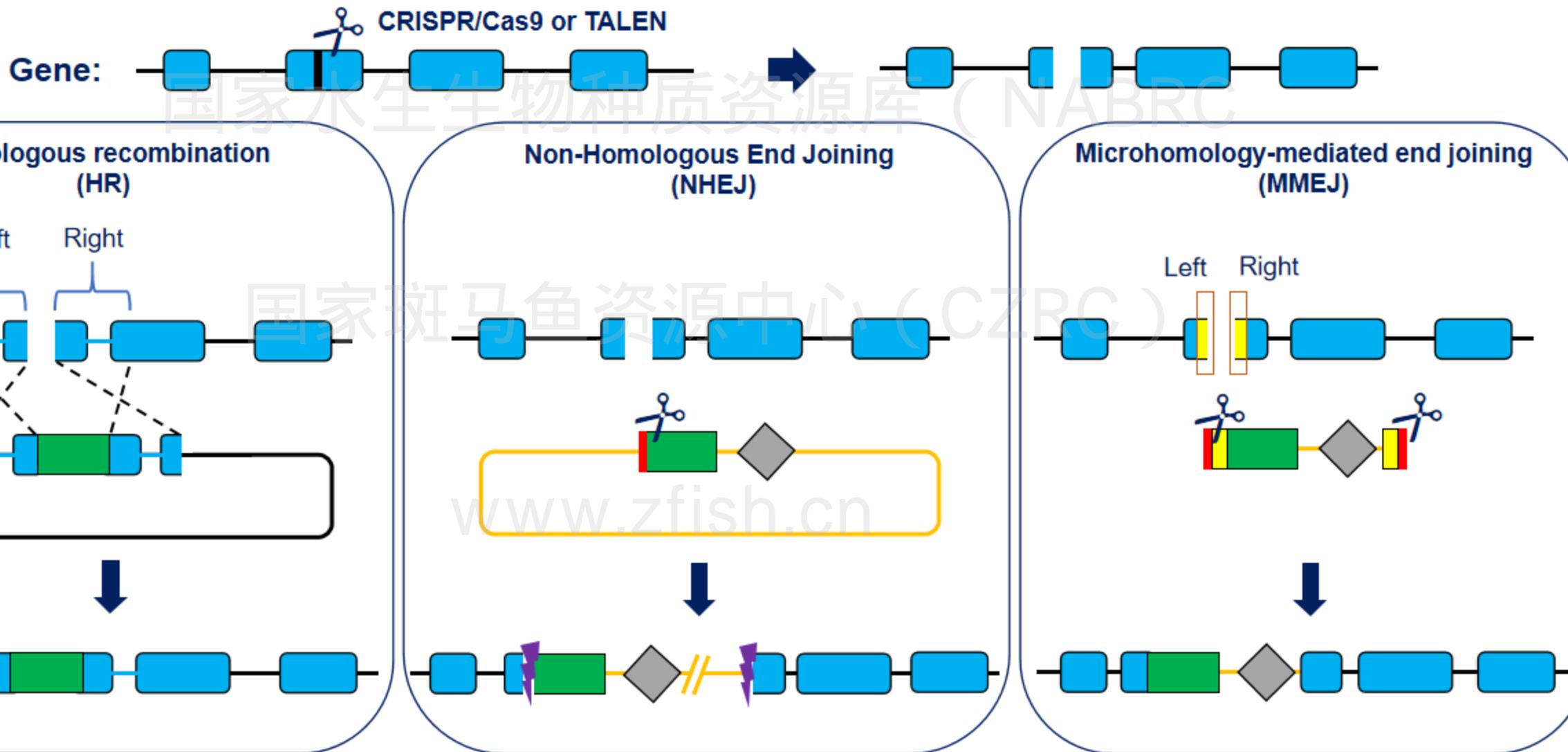
Nonhomologous end joining



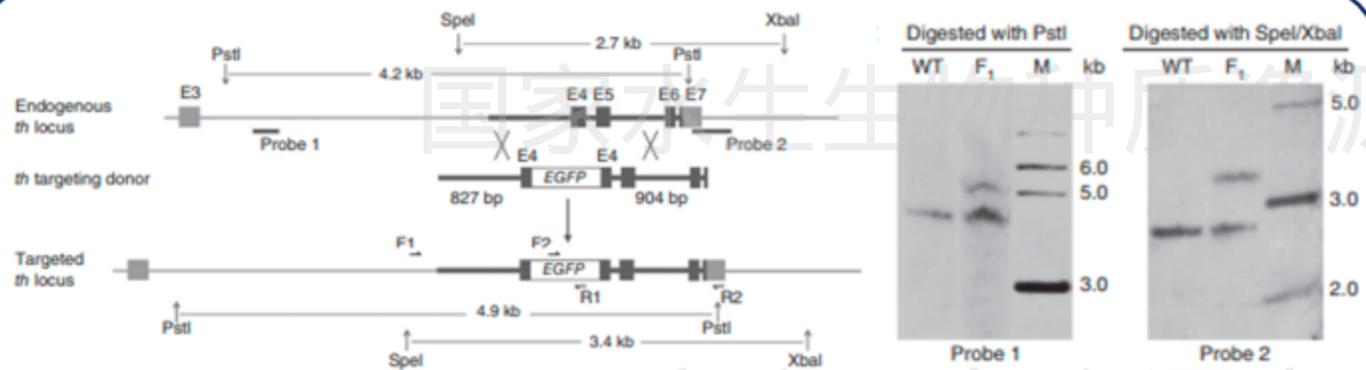
Single-strand annealing



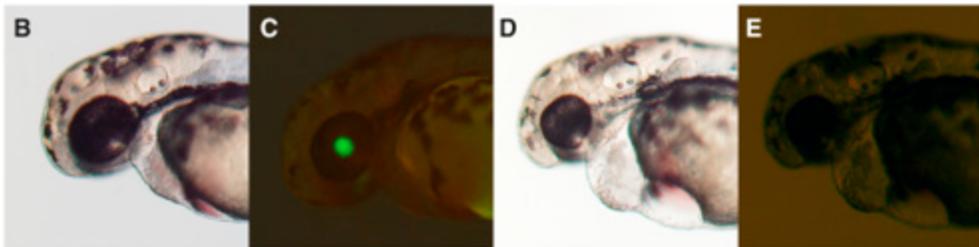
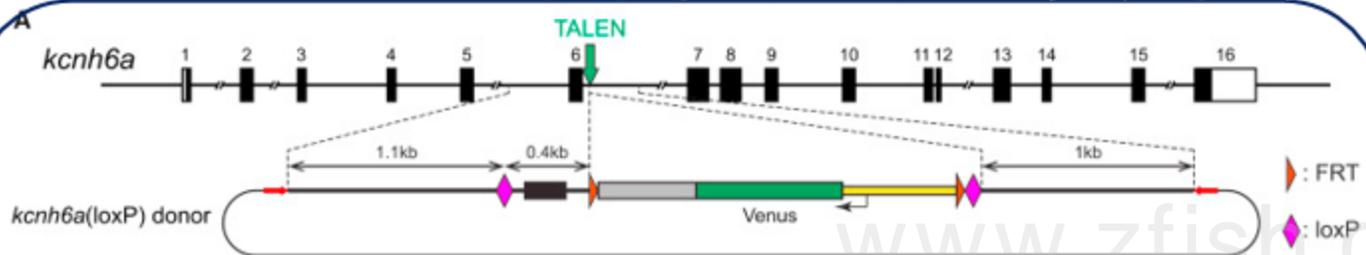
斑马鱼中常用的基因敲入技术



HR 介导的基因敲入



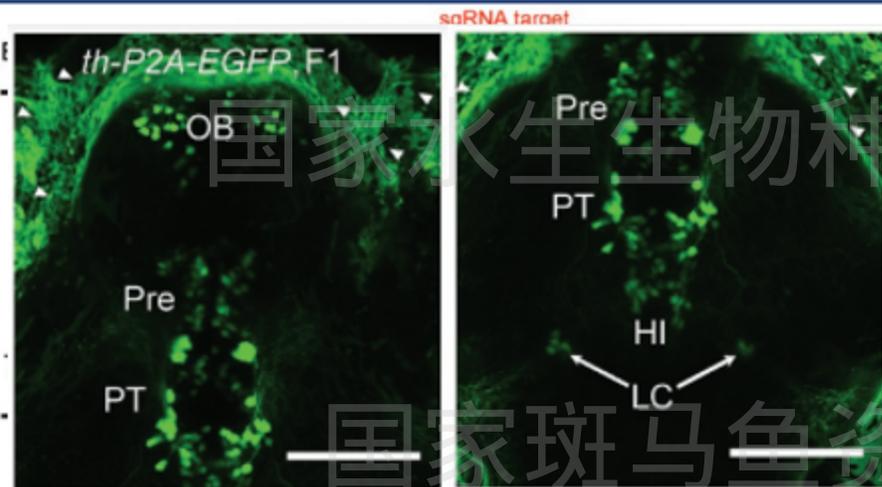
(Zu *et al.*, 2013)



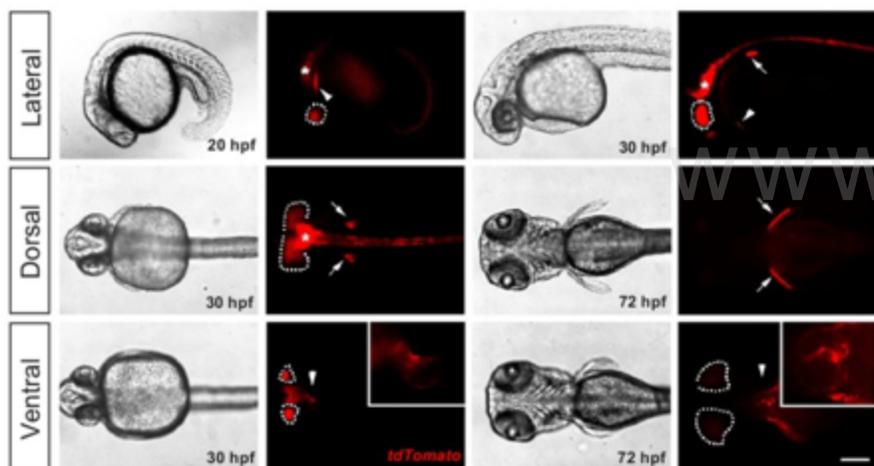
(Hoshijima *et al.*, 2016)

- 完全精确的基因编辑
- 可以实现基因的插入和替换
- 敲入效率低, 约1%, 筛选工作量极大
- 需要1-3 kb的同源臂
- 供体DNA的整合方向确定

NHEJ 介导的基因敲入



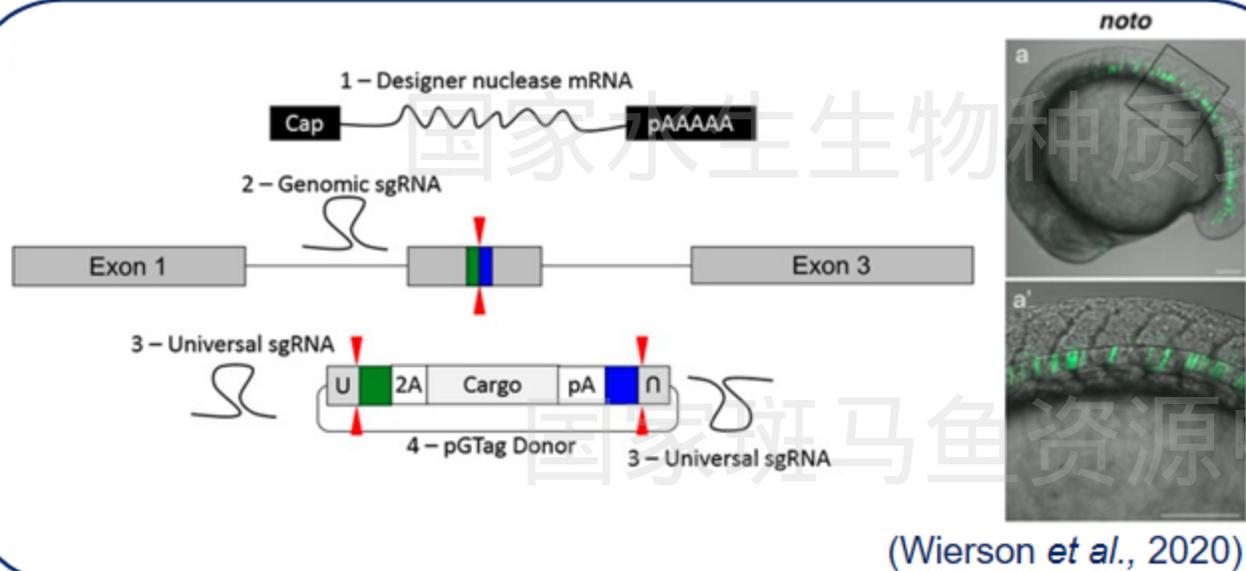
(Li *et al.*, 2013)



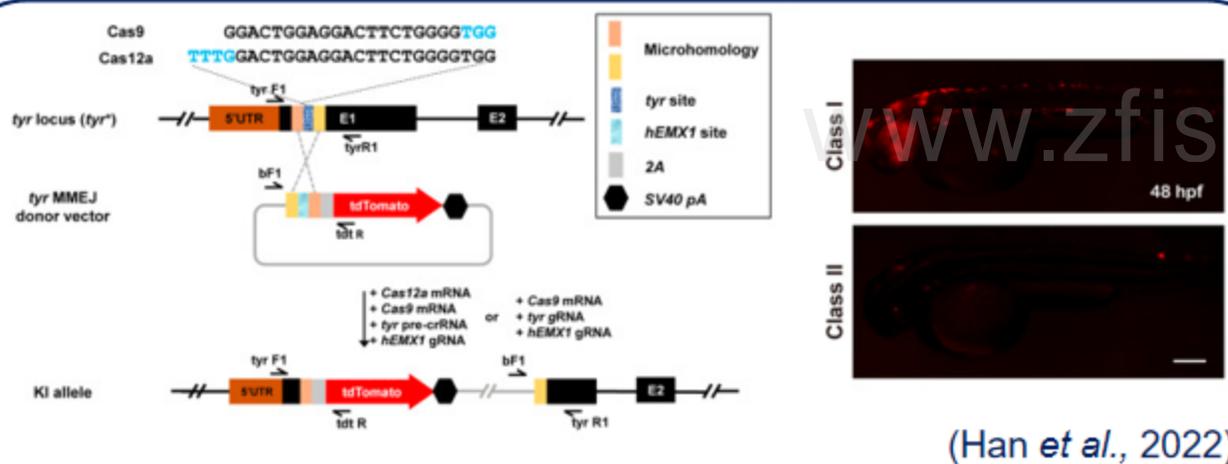
(Li *et al.*, 2019)

- 接口处存在突变
- 需在内含子中插入外源DNA序列
- 可以实现基因的插入和替换
- 基因敲入效率高，高于10%，筛选工作量较小
- 可同时实现基因标记和条件性基因敲除
- 无方向性，载体正向和反向插入概率相同
- 忽略内源基因的剪接过程

MMEJ 介导的基因敲入



- 完全精确的基因编辑
- 可以实现基因的插入和替换
- 可在任意位置插入外源DNA序列
- 基因敲入效率高，高于10%，筛选工作量较小
- 可同时实现基因标记和条件性基因敲除
- 需 10-40 bp 微同源臂，整合有方向性



MMEJ 介导的基因敲入技术
同时具有**精确性**和**高效性**

- 基因敲入概述
 - 斑马鱼基因敲入技术流程
 - CZRC基因敲入技术服务平台
 - 总结
- www.zfish.cn

MMEJ介导基因敲入的操作流程

靶点筛选



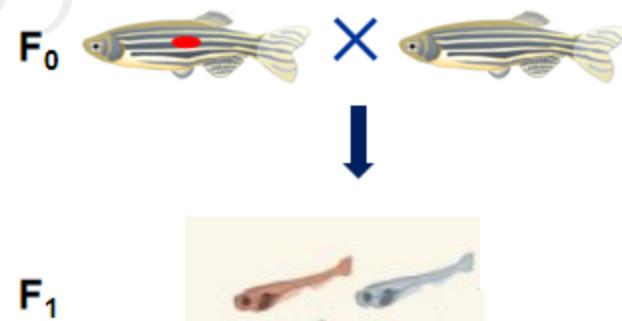
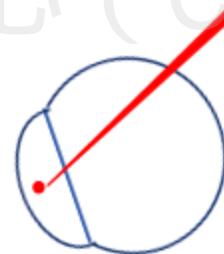
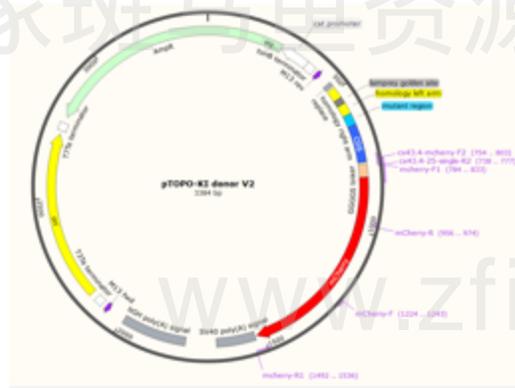
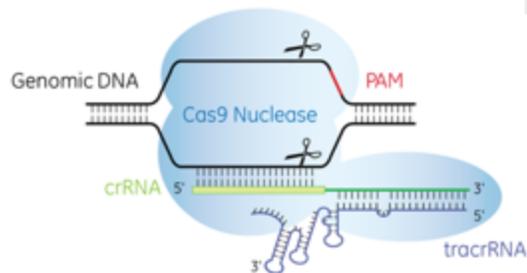
构建供体
DNA模板



显微注射
构建F₀



筛选获得
F₁



www.zfish.cn

MMEJ介导基因敲入的操作流程

- 靶点选择及效率检测
- 供体质粒的构建
- 显微注射构建 F_0
- 种系传递筛选获得 F_1

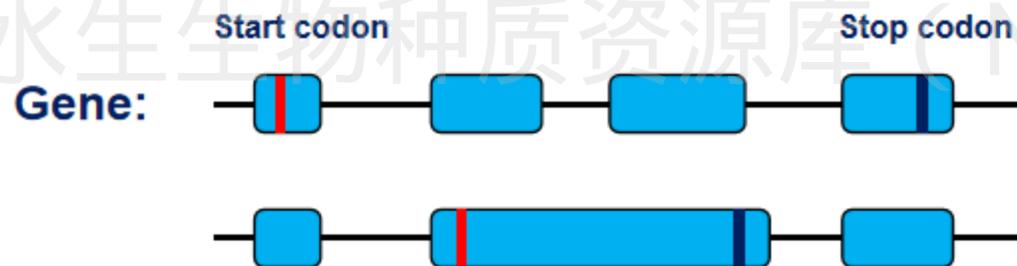
MMEJ介导基因敲入的操作流程

- 靶点选择及效率检测
- 供体质粒的构建
- 显微注射构建 F_0
- 种系传递筛选获得 F_1

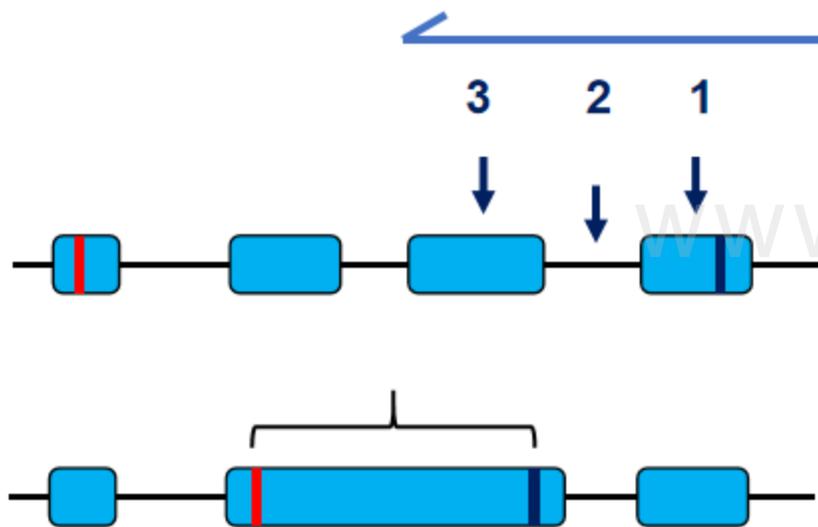
www.zfish.cn

靶点选择及效率评估

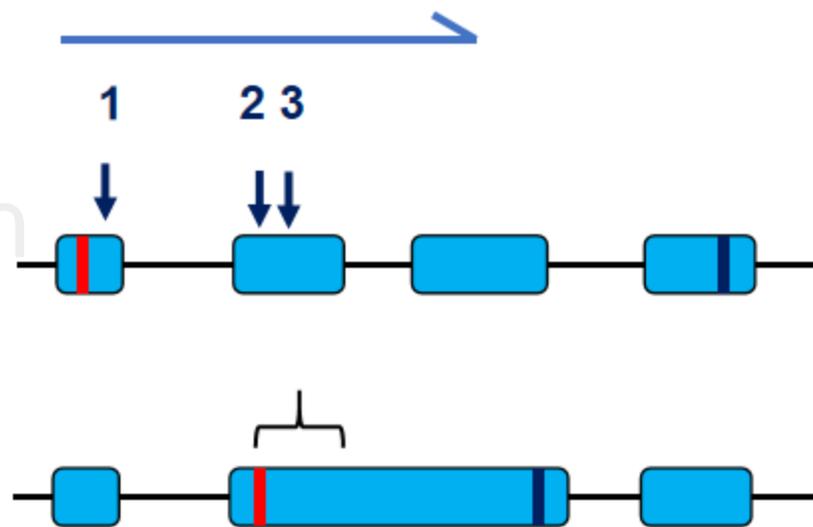
Cas9/sgRNA 靶点的选择



Keep gene function:



KI and KO simultaneously:



靶点选择及效率评估

Cas9/sgRNA 设计 (<http://crispor.tefor.net/>)



国家水生生物种质资源库 (NABRC)

Danio rerio (danRer11), [chr20:52952199-52952285](#), reverse genomic strand

Your input sequence is 87 bp long. It contains 10 possible guide sequences.

Shown below are their PAM sites and the expected cleavage position located -3bp 5' of the PAM site.

Click on a match for the PAM NGG below to show its 20 bp-long guide sequence. (Need help? Look at the [CRISPOR manual](#))

Colors **green**, **yellow** and **red** indicate high, medium and low specificity of the PAM's guide sequence in the genome.

[Suggest a genome variants database to show on this page](#)

Position 0 10 20 30 40 50 60 70 80
Sequence GTATCTGCGTTTCCAGCATATATGGGCTCTCCAAGCGGATCCTCCAGCACCAAGAGTGAAGTGTGGAACAGCCTGATTCTGGCATAA
CCA--- ---GGG CCA--- CCT--- CCA--- ---TGG ---TGG
---TGG ---CGG CCA---

Download for: [SerialCloner \(free\)](#) - [ApE \(free\)](#) - [GenomeCompiler](#) - [Benchling](#) - [SnapGene](#) - [Geneious](#) - [Vector NTI](#) - [LaserGene](#) - [Genbank](#) - [FASTA](#)

Predicted guide sequences for PAMs

Ranked by default from highest to lowest specificity score (Hsu et al., [Nat Biot 2013](#)). Click on a column title to rank by a score.

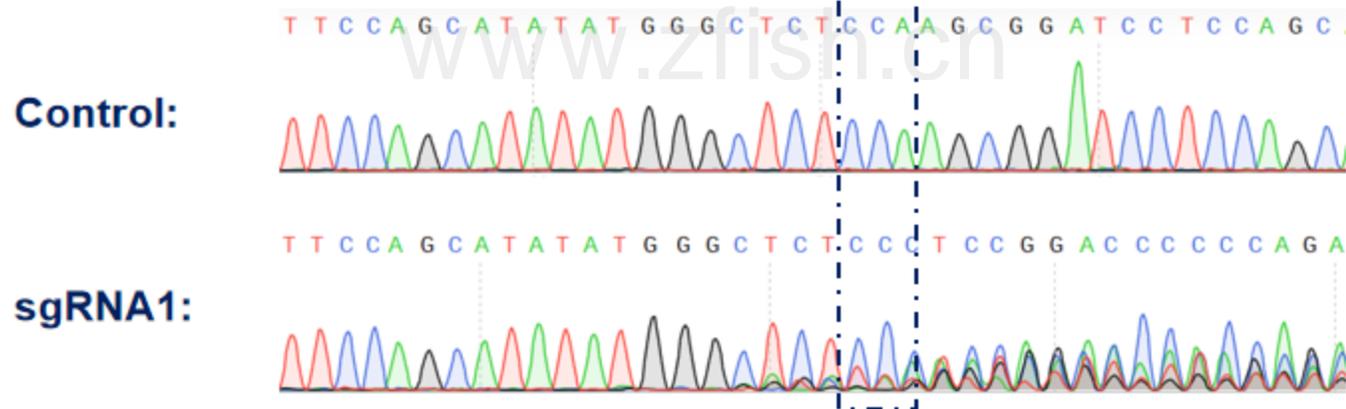
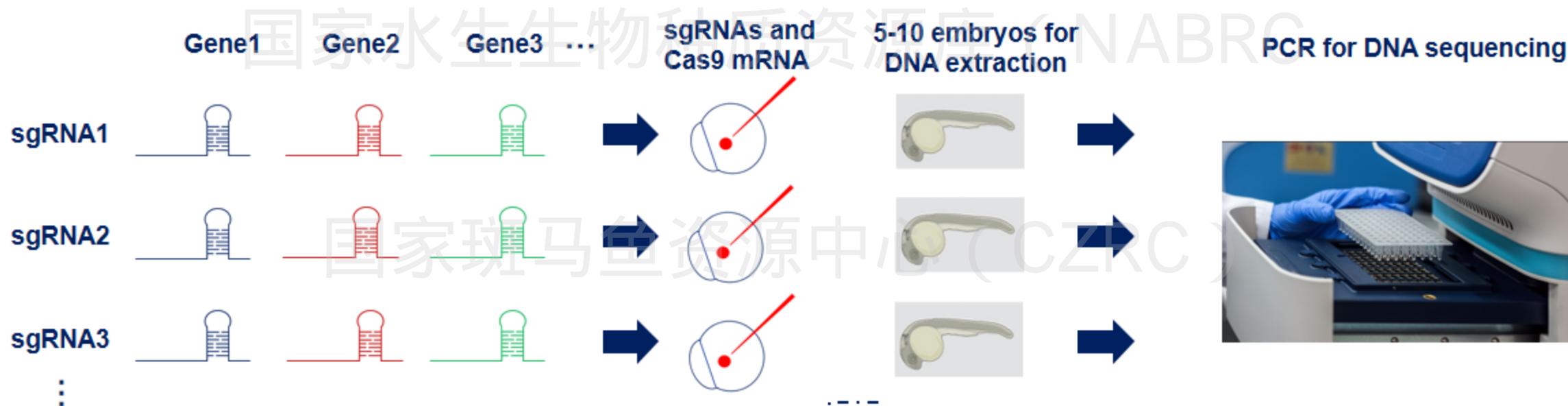
If you use this website, please cite our [paper in NAR 2018](#). Too much information? Look at the [CRISPOR manual](#).

Download as Excel tables: [Guides](#) / [Guides, all scores](#) / [Off-targets](#) / [Saturating mutagenesis assistant](#)

Position/ Strand	Guide Sequence + PAM + Restriction Enzymes <input type="checkbox"/> Only G- <input type="checkbox"/> Only GG- <input type="checkbox"/> Only A-	MIT Specificity Score	CFD Spec. score	Predicted Efficiency Show all scores Doench '16 Mor-Mateos	Outcome Out-of-Frame Lindel	Off-targets for 0-1-2-3-4 mismatches + next to PAM	Genome Browser links to matches sorted by CFD off-target score <input type="checkbox"/> exons only <input type="checkbox"/> chr20 only
---------------------	--	-----------------------------	-----------------------	---	-----------------------------------	---	---

靶点选择及效率评估

Cas9/sgRNA 靶点效率检测



靶点选择及效率评估

Cas9/sgRNA 靶点效率检测

国家水生生物种质资源库 (NABRC) SYNTHEGO

Contributions	Indel Distribution	Traces
Status [?] ✓ Succeeded	Guide Target [?] TTGGTGCTGGAGGATCCGCT	PAM Sequence [?] TGG
	Indel % [?] 95	Model Fit (R ²) [?] 0.97
		Knockout-Score [?] 32

RELATIVE CONTRIBUTION OF EACH SEQUENCE (NORMALIZED)

INDEL	CONTRIBUTION	SEQUENCE
-12	43%	T C C A G C A T A T A T G G G C T C T C C A A G C
-10	6%	T C C A G C A T A T A T G G G C T C T C C A A G -
-3	6%	T C C A G C A T A T A T G G G C T C T C C A A G -
-12	5%	T C C A G C A T A T A T G G G C T C T C C - - - - -
-6	4%	T C C A G C A T A T A T G G G C T C T C C A A G -
+8	3%	T C C A G C A T A T A T G G G C T C T C C A A G C
-13	3%	T C C A G C A T A T A T G G G C T C T C C A A G C
-2	3%	T C C A G C A T A T A T G G G C T C T C C A A G C
+4	2%	T C C A G C A T A T A T G G G C T C T C C A A G C
-8	2%	T C C A G C A T A T A T G G G C T C T C C A A - - -

Add Sample to Analysis

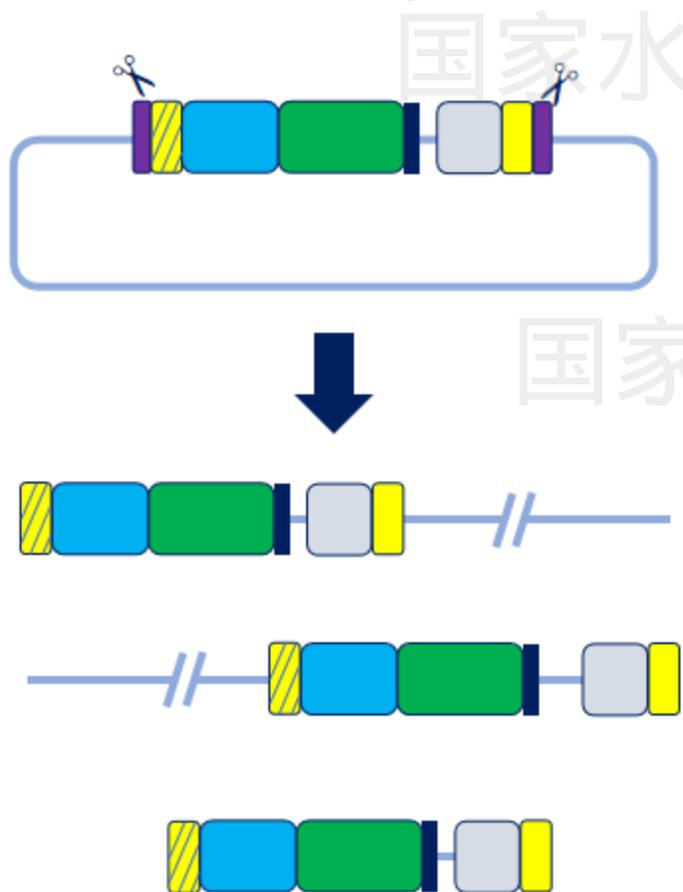
MMEJ介导基因敲入的操作流程

- 靶点选择及效率检测
- 供体DNA模板的构建
- 显微注射构建 F_0
- 种系传递筛选获得 F_1

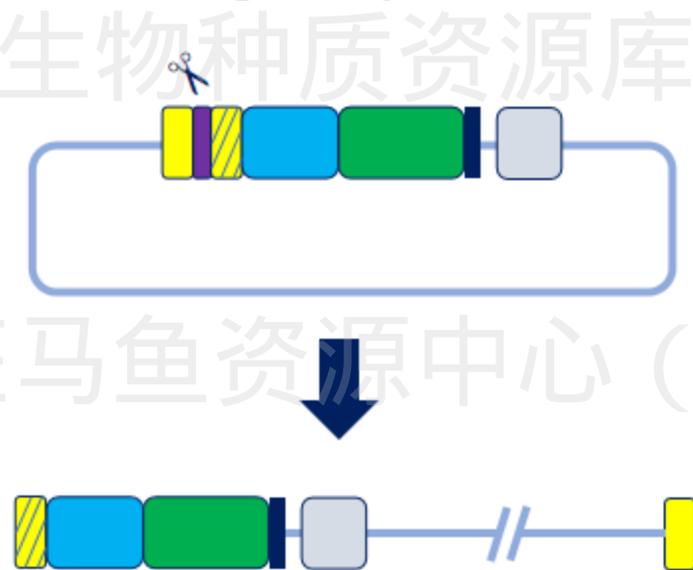
www.zfish.cn

常用的供体DNA模板形式

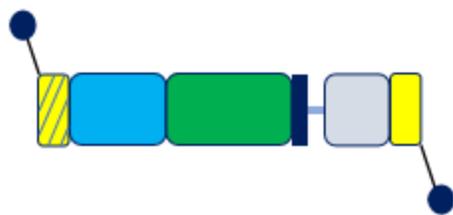
Double-cut plasmid



Single-cut plasmid



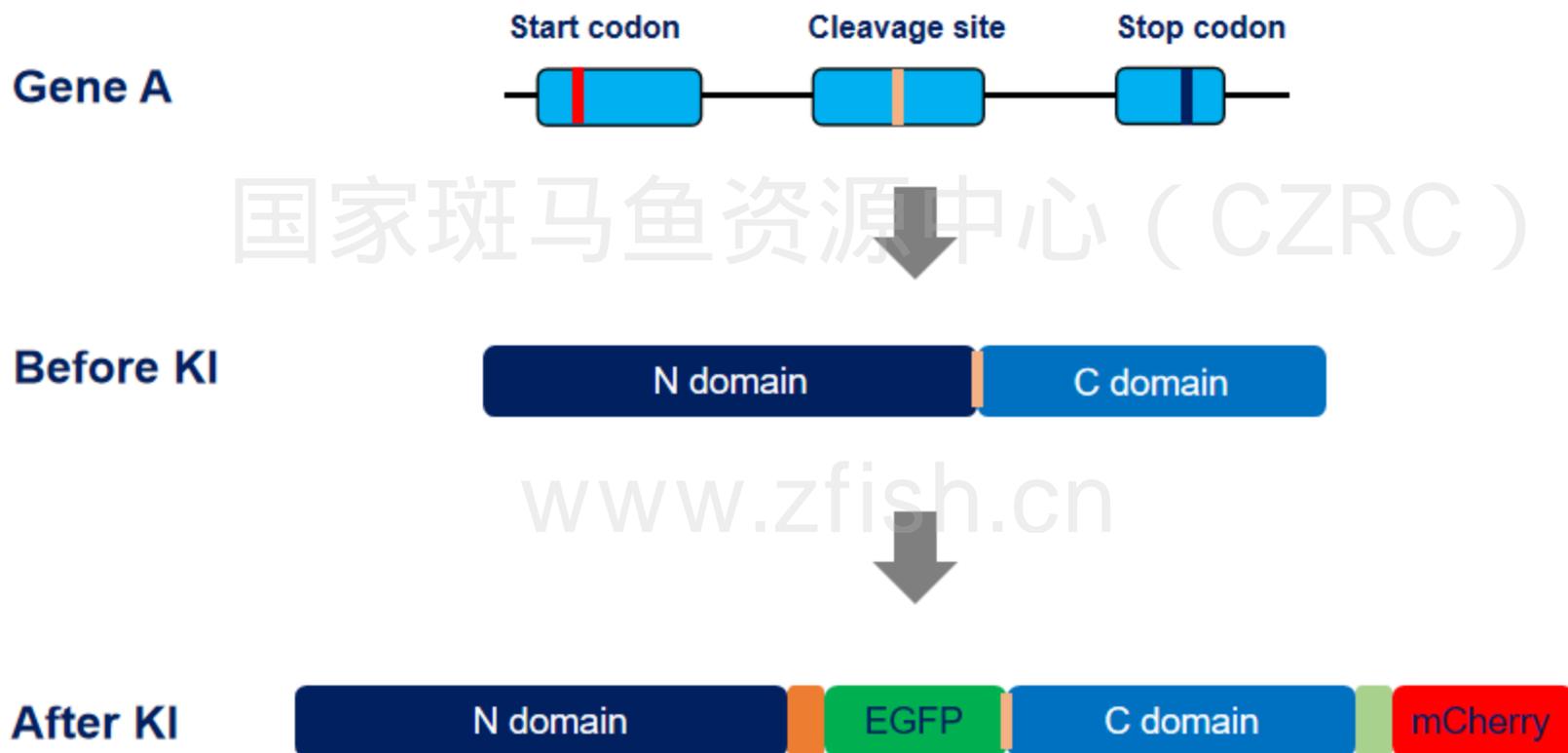
Modified dsDNA fragment



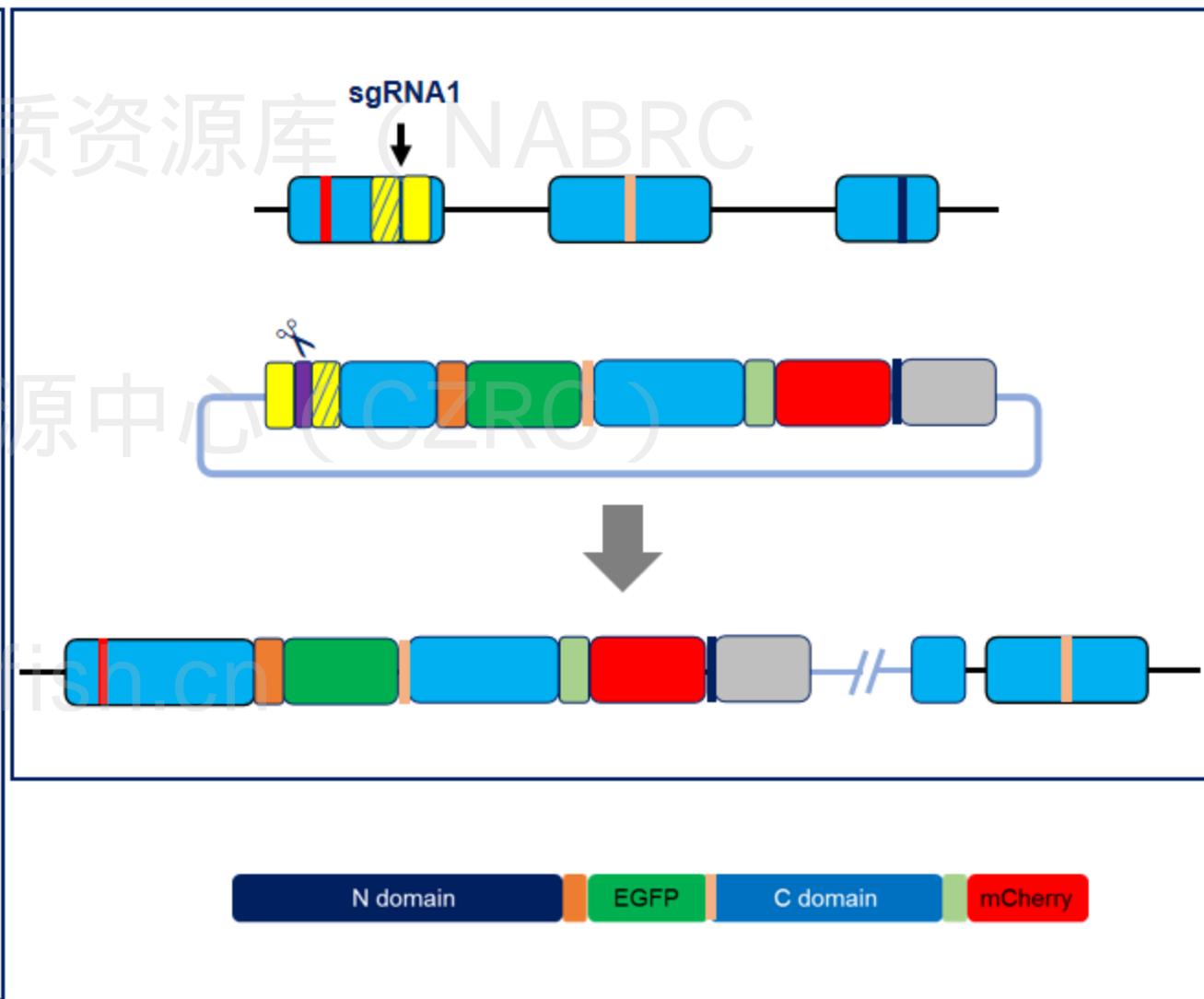
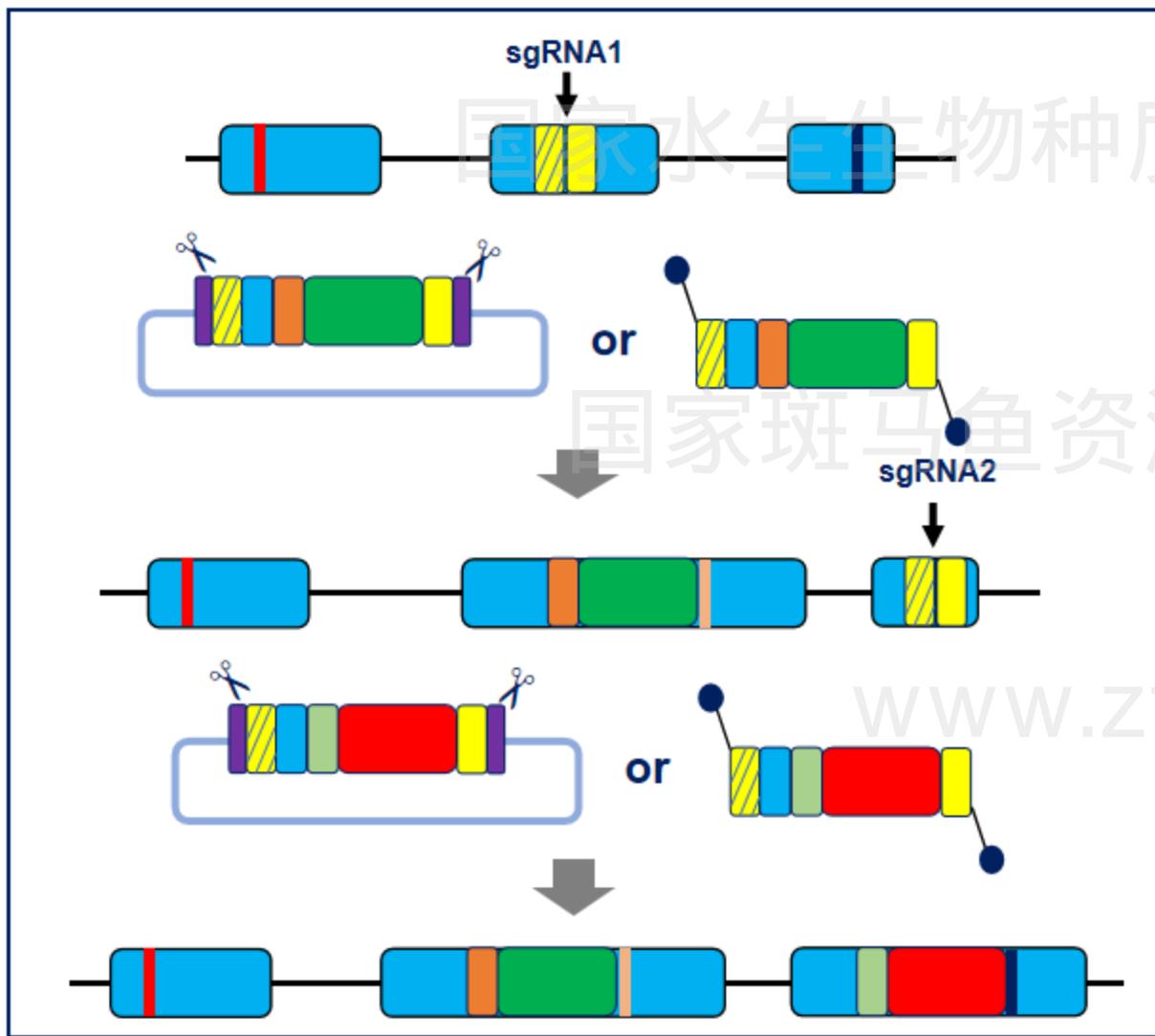
- 双切增加模板复杂度，影响效率
- 单切模板形式单一，效率稳定
- 单切保留质粒骨架，引入额外序列
- 双切和修饰的DNA片段无质粒骨架
- 修饰的DNA片段敲入效率低于质粒
- 双切和修饰的片段便于任意区域的蛋白标签
- 质粒骨架无特殊要求，尽量小

举例一：基因标记和蛋白标签

Gene labeling and Protein tagging



供体DNA模板的构建策略



举例二：条件性基因敲除和精确修饰

Conditional knock out and Precise modification



国家斑马鱼资源中心 (CZRC)

Before KI



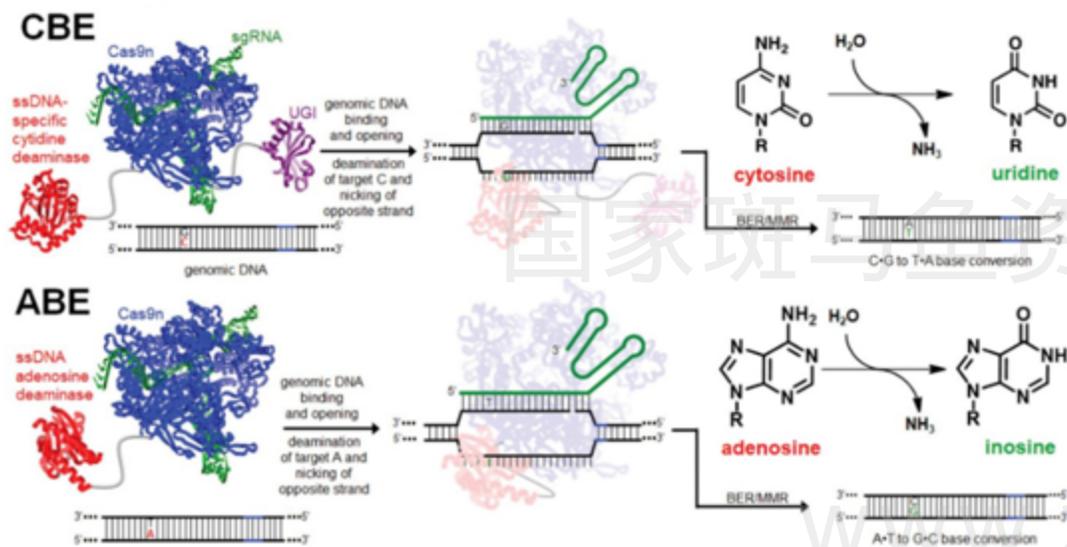
www.zfish.cn

After KI



单碱基编辑和先导编辑

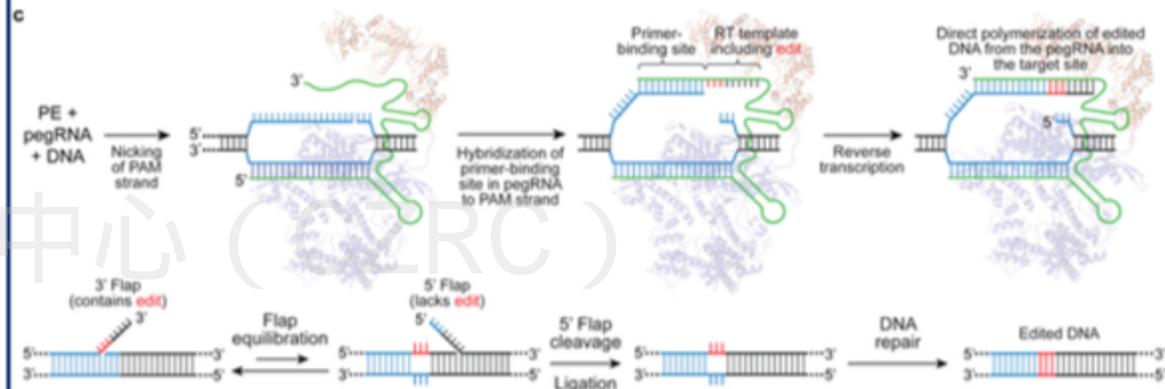
Base editing



(Komor *et al.*, 2016)

(Gaudelli *et al.*, 2017)

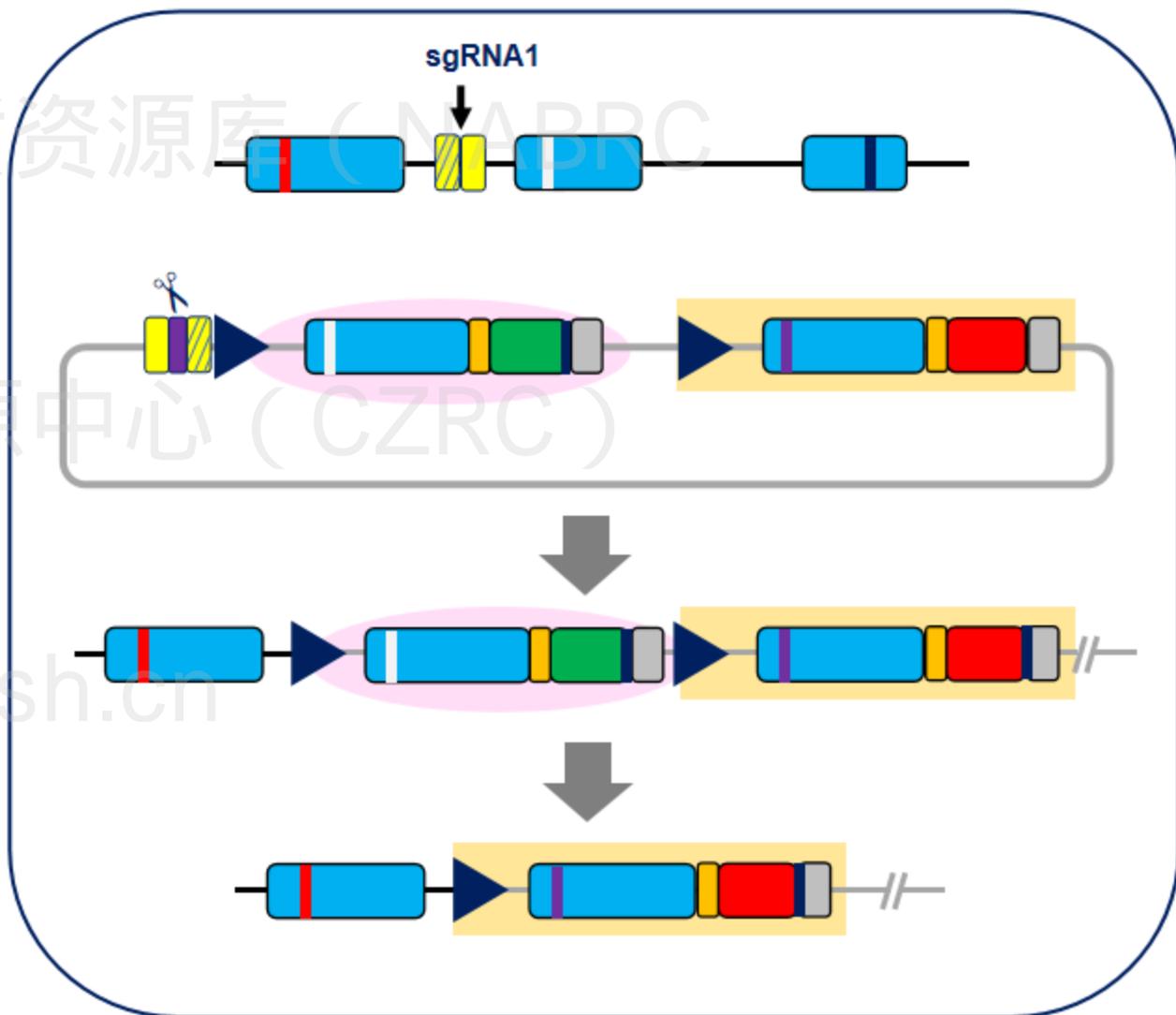
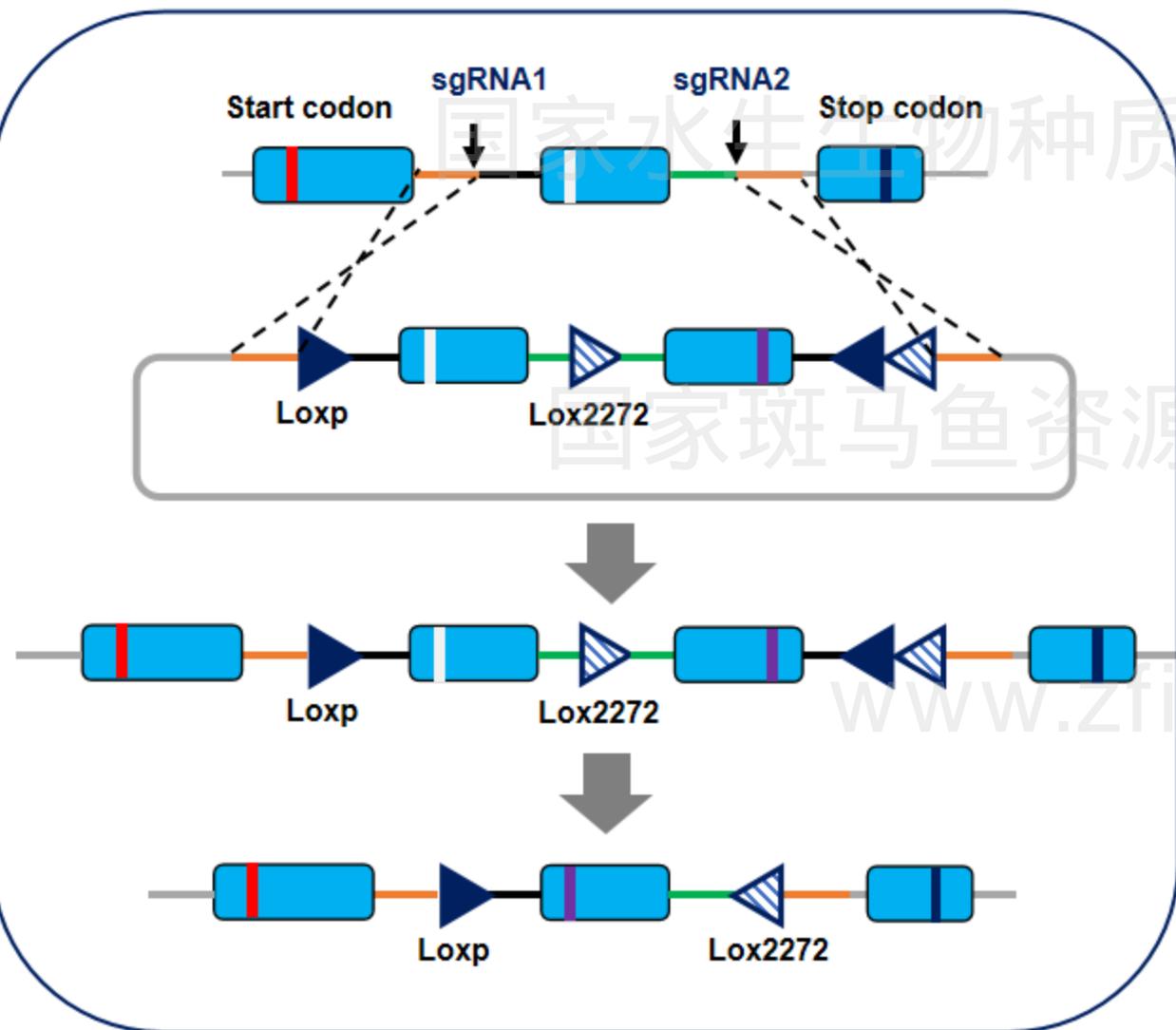
Prime Editing



(Anzalone *et al.*, 2019)

如果想要实现条件性的单碱基突变呢?

条件性单碱基突变的构建策略



供体DNA模板构建中的具体细节

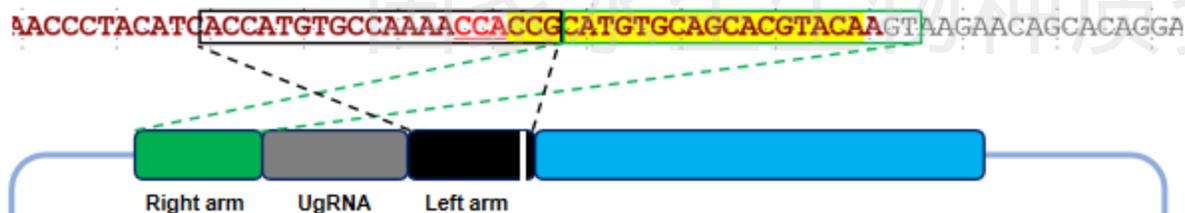
KI and KO

ACCTTGAGAAATATGTTTTCCGAGAAAATGGTGACGTGTTAATACTTAATTTCCCCGCTTTATATGTGTGTGTT
TCAG**GAGGAGAGTGTGTGTTGGTGATGTCTGGAGTCGTCGCGTGTCTTACAGCACAGAGTCTTTTCTTCAGCCTGT**
ACACAAACCCTACATCACCATGTGCCAAAACCA**CCG****CATGTGCAGCACGTACAAGT**AAGAACAGCACAGGAAAACA
CATATCAAACCCTACCATGCACCATCAACTCACTGTATTGCGTGTTTTACAG**GACCATCTACAAGGTTTCTTATA**
GGCAGGTGAGCAGAGCAGCTCCTAATCTACAAATTTACCCAGAATGCTGTCCGGGGTGGAGGGCGCATGCATTCACA
CAACTGCAACCAAGGTAATCAAAGGTCATATCGATTTAAAGGTGCGATAGTTGTCTTCAGATTTTTTTTTTTTGT
ATGCTGCTTGAATGTCTTTTCTTCAT

ATG TAC ACA GCG CTT CTG CTC TCC TCC TCT TTG TTT CTC CTG CAT GTG ACC AGC ACA CCT CAG ACT CAC AGT
CAT CAC GGG AGG AGA GTG TGT GTT GGT GAT GTC TGG AGT CGT CGC GTG TCT TAC AGC ACA GAG TCT TTT CTT
CAG CCT GTA CAC AAA CCC TAC ATC ACC ATG TGC CAA AAC **CAC CGC** GTG AGC AAG GGC GAG GAG CTG TTC ACC
GGG GTG GTG CCC ATC CTG GTC GAG CTG GAC GGC GAC GTA AAC GGC CAC AAG TTC AGC GTG TCC GGC GAG GGC
GAG GGC GAT GCC ACC TAC GGC AAG CTG ACC CTG AAG TTC ATC TGC ACC ACC GGC AAG CTG CCC GTG CCC TGG
CCC ACC CTC GTG ACC ACC CTG ACC TAC GGC GTG CAG TGC TTC AGC CGC TAC CCC GAC CAC ATG AAG CAG CAC
GAC TTC TTC AAG TCC GCC ATG

供体DNA模板构建中的具体细节

Single-cut plasmid



➤ 左侧同源臂与敲入序列融合后读码框完整。

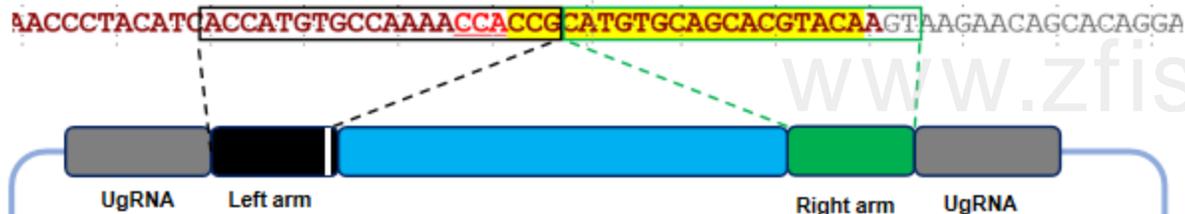
➤ 同义突变以破坏载体或者重组后基因中的 sgRNA 靶位点的序列。

➤ 同源臂的长度为 20-40 bp，如果左侧同源臂中含有同义突变，以第一个突变碱基为起始，向5'端选取20-40 bp作为同源臂。

➤ 同源臂要在基因组DNA序列中选取。

➤ 供体DNA模板一定要RNase free 处理！！！！

Double-cut plasmid



MMEJ介导基因敲入的操作流程

- 靶点选择及效率检测
- 供体DNA模板的构建
- 显微注射构建 F_0
- 种系传递筛选获得 F_1

www.zfish.cn

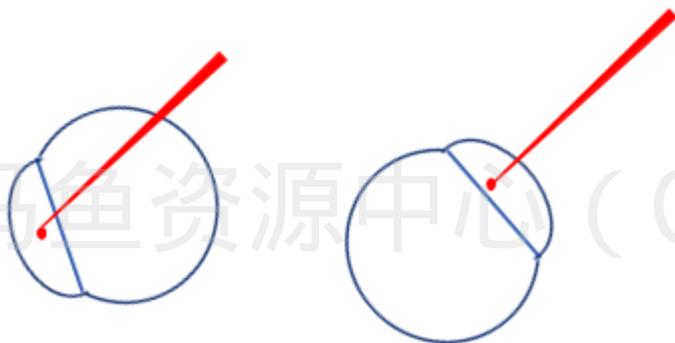
显微注射构建F₀斑马鱼

显微注射体系

- Cas9 mRNA 300-500 ng/μL
- sgRNA 50 ng/μL
- UgRNA 50 ng/μL
- Donor templet 50 ng/μL

Injection volume 1-1.5 nL

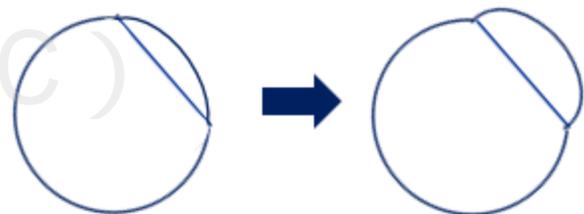
显微注射位置



**Must be injected into the
Animal pole**

显微注射时期

In 30 min postfertilization



**Must be injected during
the one-cell stage**

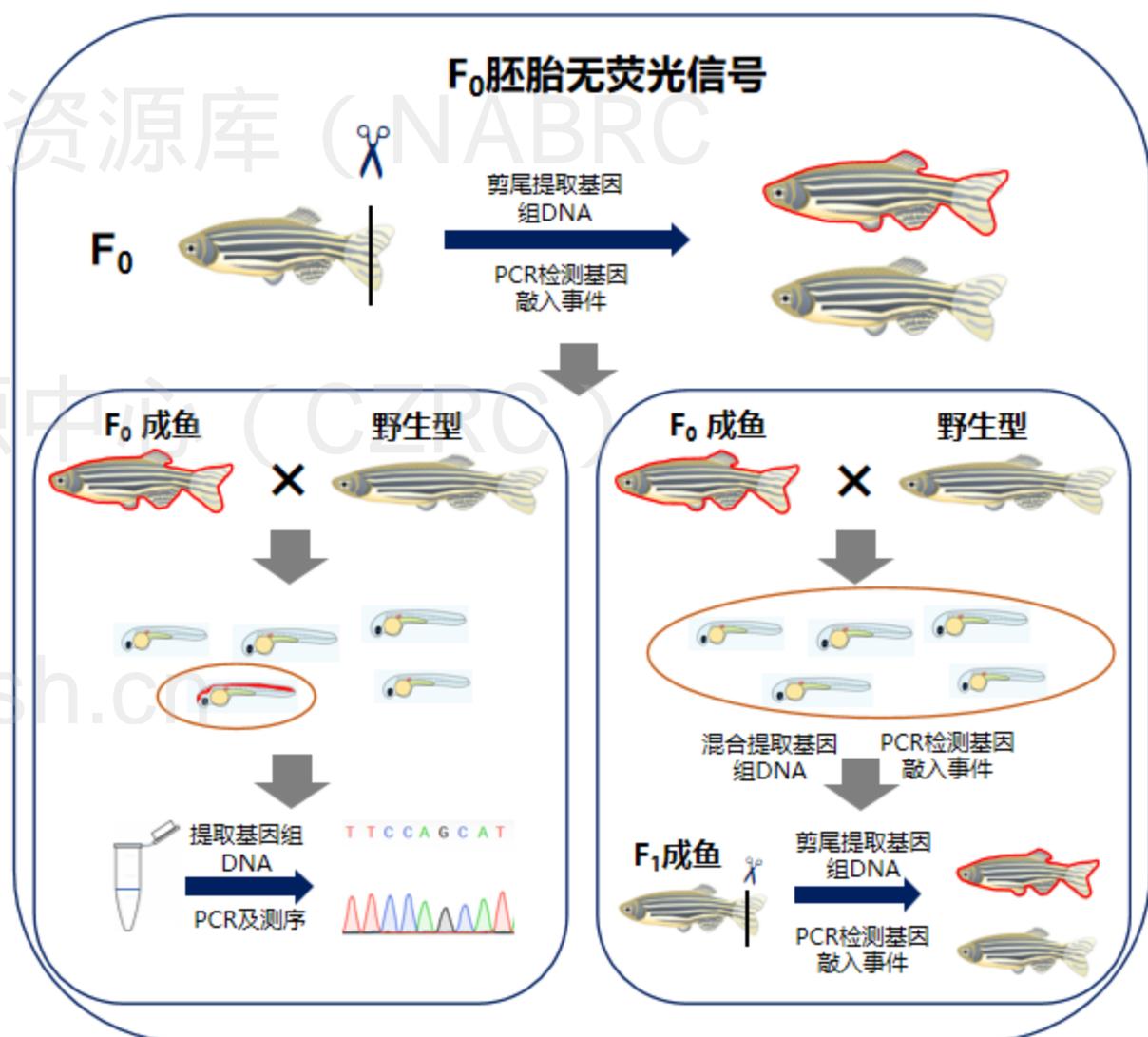
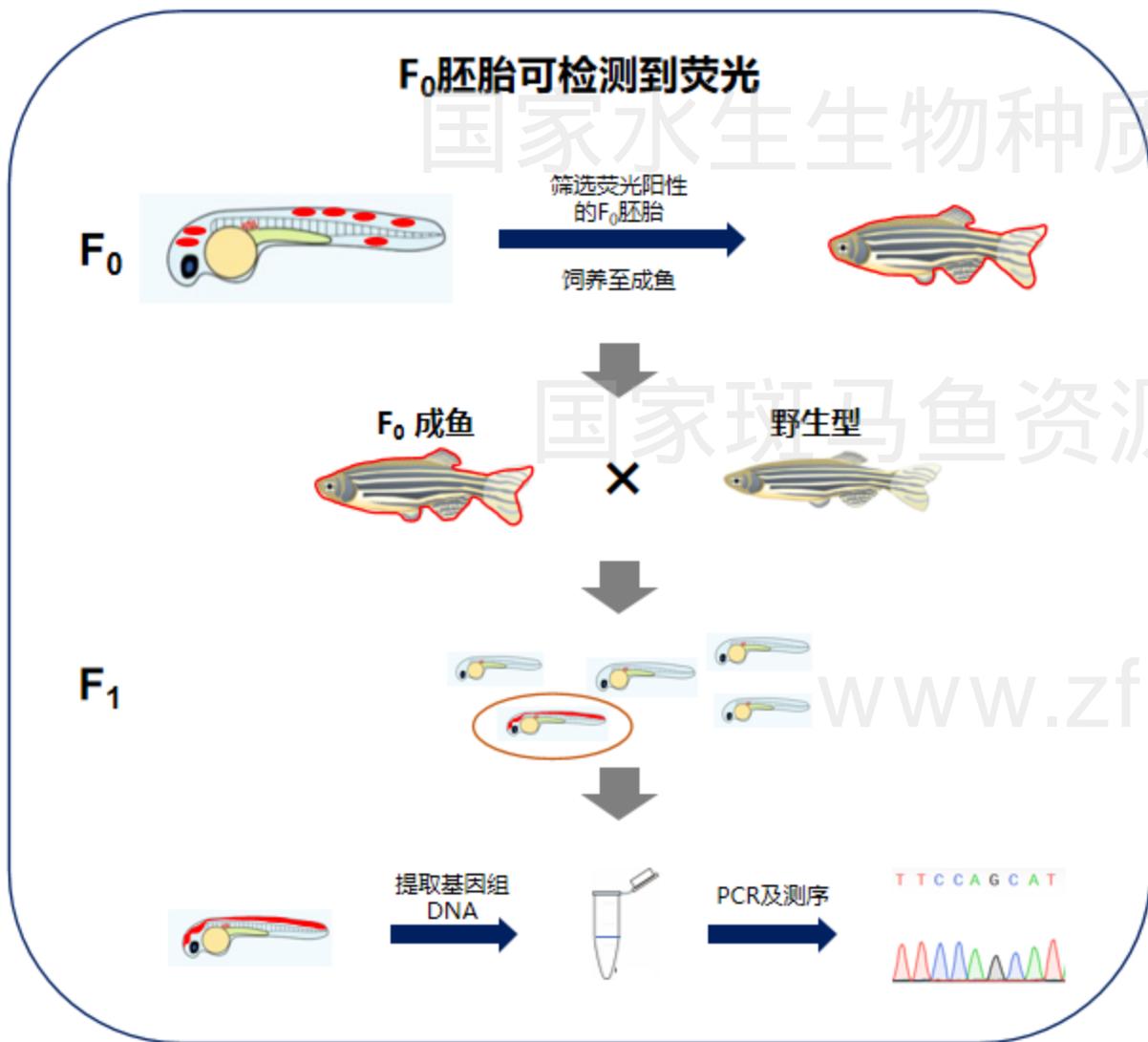
使用优质的斑马鱼胚胎

MMEJ介导基因敲入的操作流程

- 靶点选择及效率检测
- 供体DNA模板的构建
- 显微注射构建 F_0
- 种系传递筛选获得 F_1

www.zfish.cn

种系传递筛选获得基因敲入成功的F₁



- 基因敲入概述
 - 斑马鱼基因敲入技术流程
 - CZRC基因敲入技术服务平台
 - 总结
- www.zfish.cn

专业的斑马鱼饲养系统

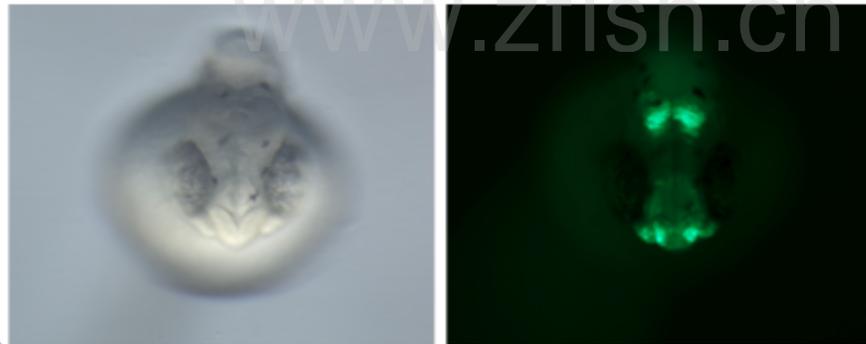


优质的野生型斑马鱼

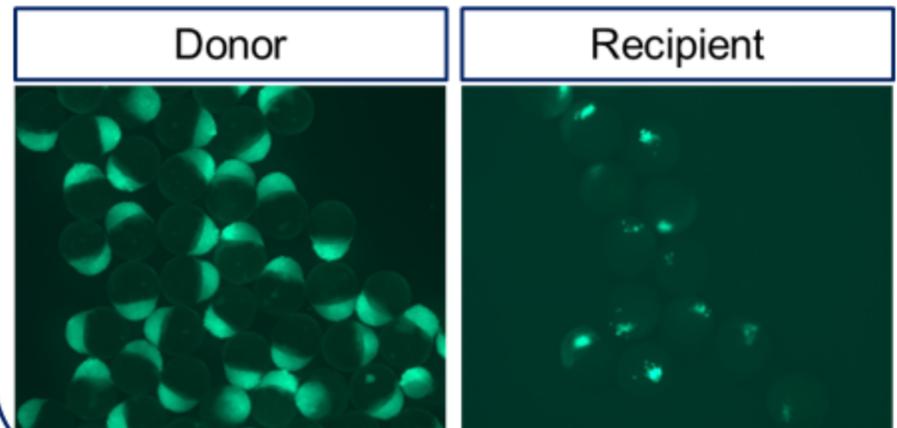


高效的基因敲入技术

Ki(Egfl7-Gal4-VH, uas: EGFP)_egfl7 exon1



诱导生殖细胞移植技术(iPGCT)



荧光标记和蛋白标签

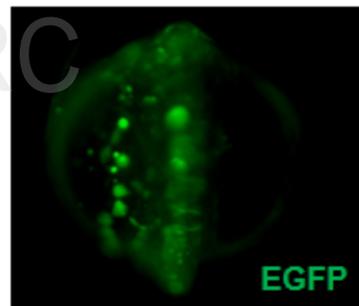
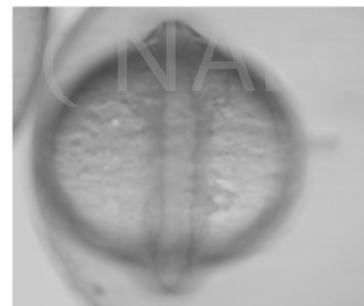
Endogenous locus



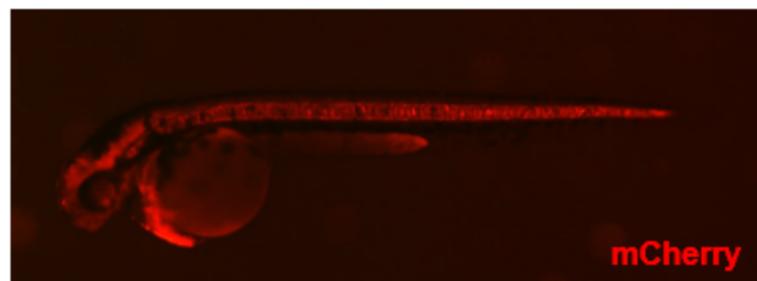
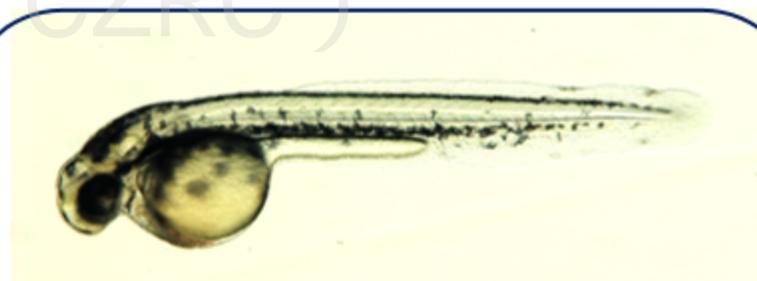
Donor vector



Targeted locus



EGFP



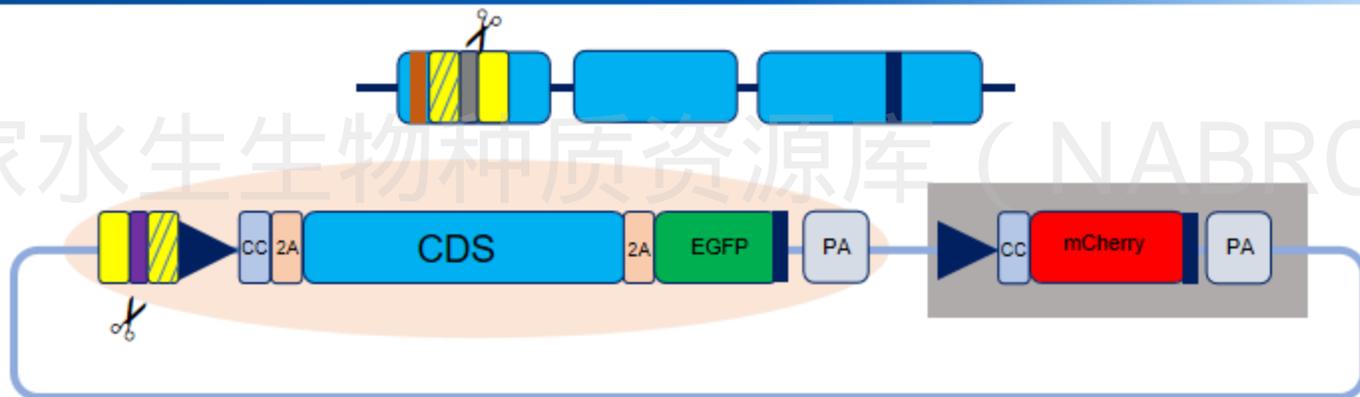
mCherry

PoNe 条件性基因敲除

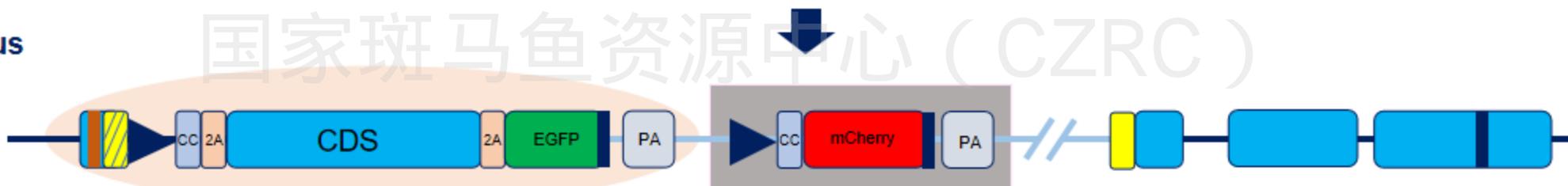
Endogenous locus



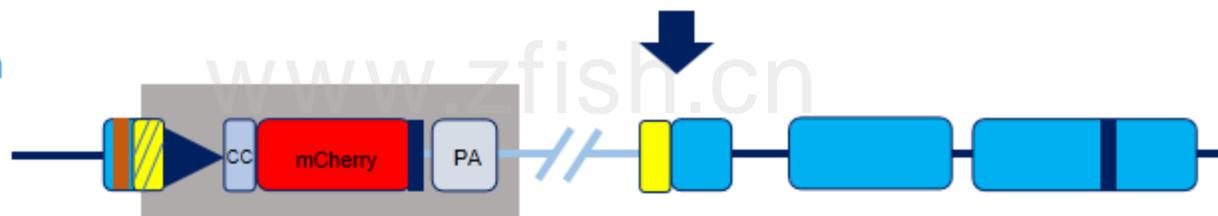
Donor vector



Targeted locus



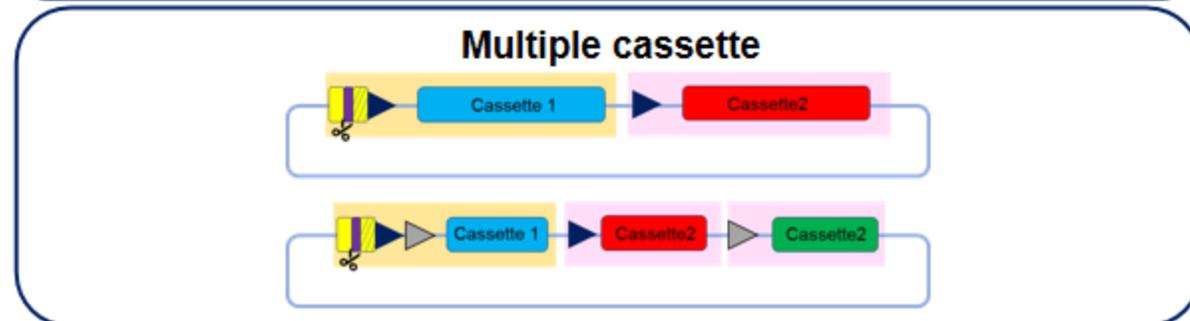
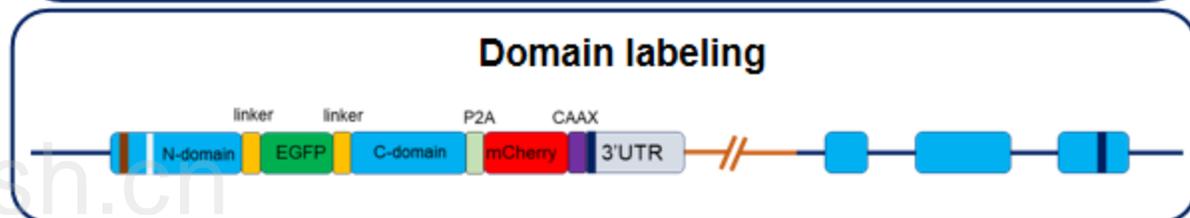
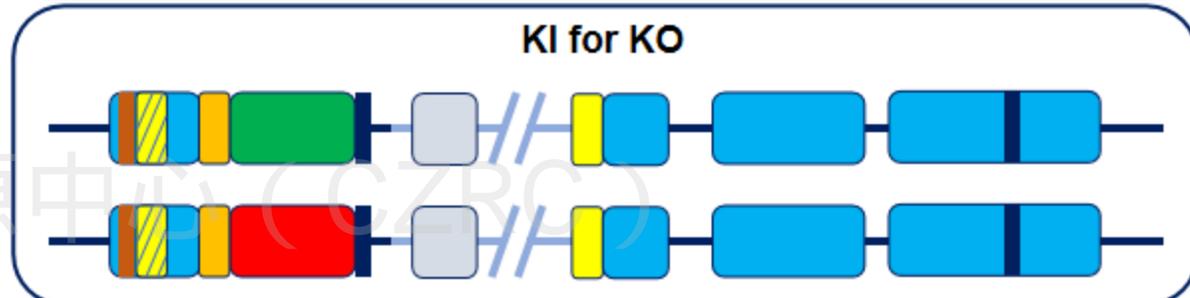
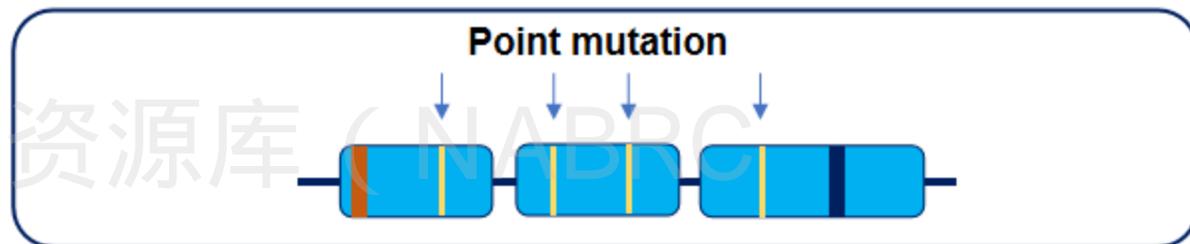
After Cre induced recombination



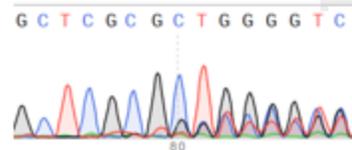
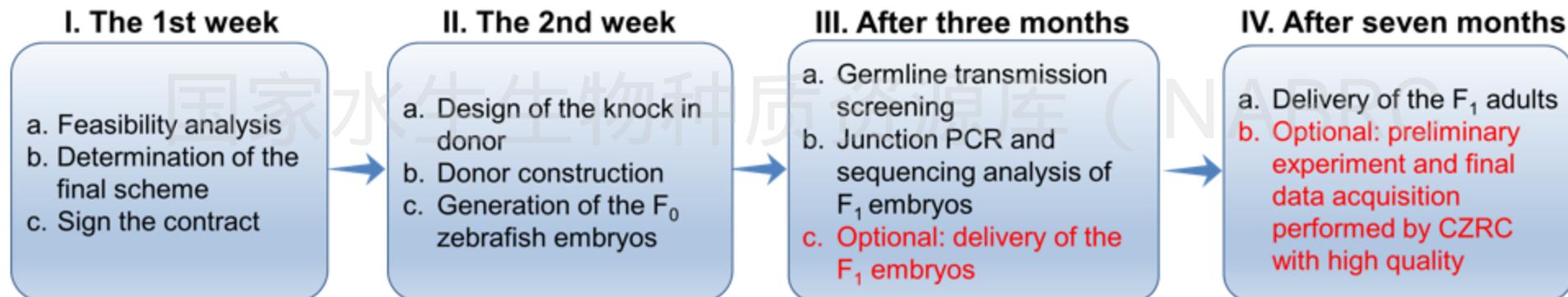
定制化服务

- 指定区域标记, 如: N端、C端
- 基因的精确修饰, 建立疾病模型
- 利用 KI 实现 KO, 荧光标记同时KO
- 基因替换, 实现基因人源化
- 引入DTA, NTR/MTZ实现诱导细胞死亡, 研究再生
- 分别标记同一个基因的不同结构域

•
•
•

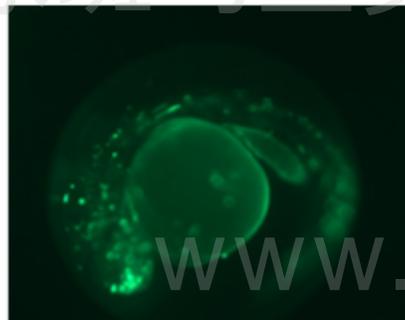


基因敲入时间周期



INDEL	CONTRIBUTION	SEQUENCE
-4	42%	STCCGGCCTGAG
-4	36%	STCCGCTGAG
-7	16%	STCCGCTGAG
0	16%	STCCGGCCTGAG
-4	4%	STCCGGCCTGAG
-4	4%	STCCGGCCTGAG
-7	3%	STCCGGCCTGAG
-4	1%	STCCGGCCTGAG

F₀ embryo



F₁ embryo



F₁ adults



CZRC可以提供优质的高效的基因敲入技术服务

- 基因敲入概述
 - 斑马鱼基因敲入技术流程
 - CZRC基因敲入技术服务平台
 - 总结
- www.zfish.cn

- 主要有 **HR**、**NHEJ**、**MMEJ** 介导的基因敲入技术
- **MMEJ** 介导的基因敲入技术兼具**精确性**和**高效性**
- **MMEJ** 介导基因敲入技术流程
 1. 靶点筛选：适合的区域，高效率
 2. 载体构建：注意蛋白融合区读码框完整，敲入后不存在内源靶点，RNase-free!!!
 3. F₀的制备：使用优质胚胎，一细胞期注射，动物极注射，注射体积小，浓度适中
 4. F₁的筛选：注意敲入基因的表达量和表达范围，根据基因表达情况，使用不同的筛选步骤
- **CZRC**具备优质的高效的基因敲入技术服务平台

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