

国家水生生物种质资源库 (NABRC)  
国家斑马鱼资源中心 (CZRC)

# 讲座七 斑马鱼基因突变技术 及遗传鉴定

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](mailto:zebrafish_sub@ihb.ac.cn)

国家水生生物种质资源库 (NABRC)

➤ 基因敲降技术 (Gene knockdown)

➤ 基因编辑技术 (Gene Editing)

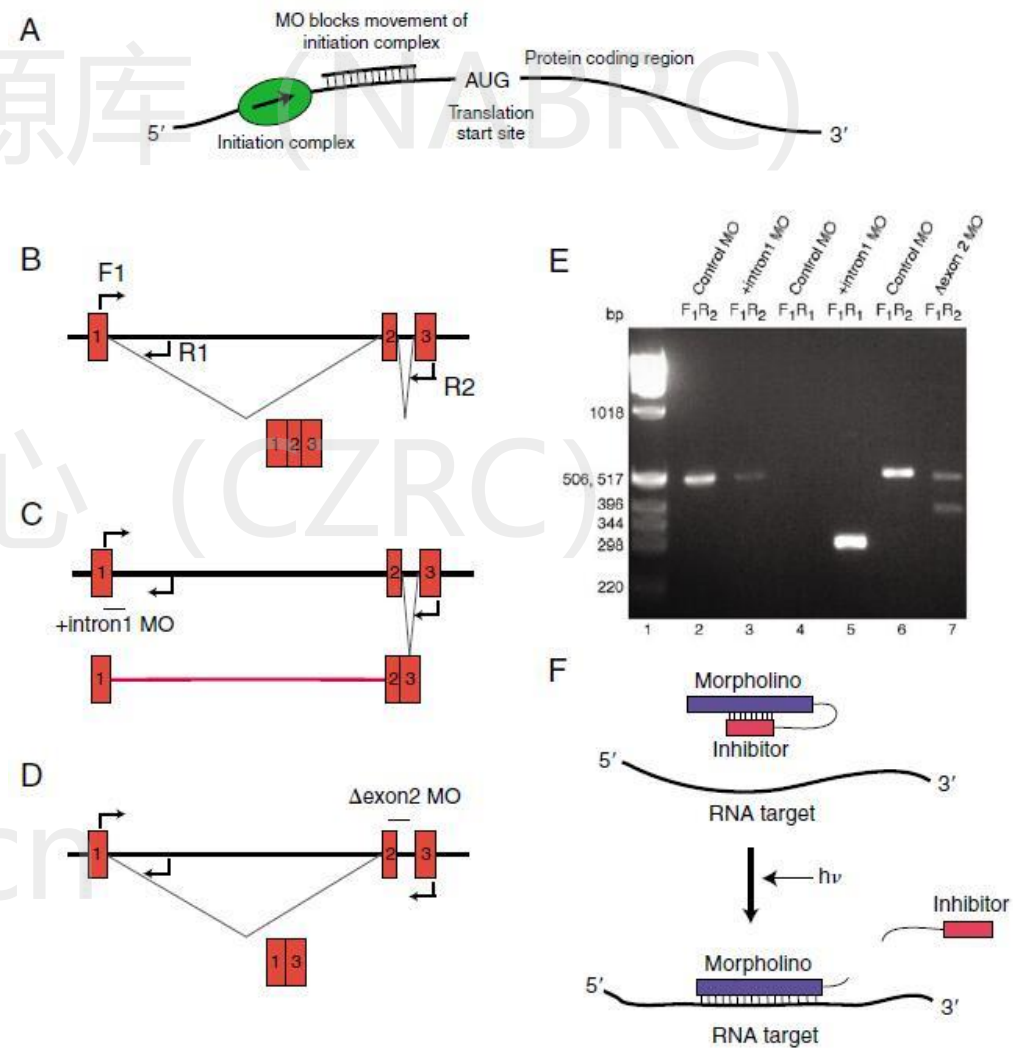
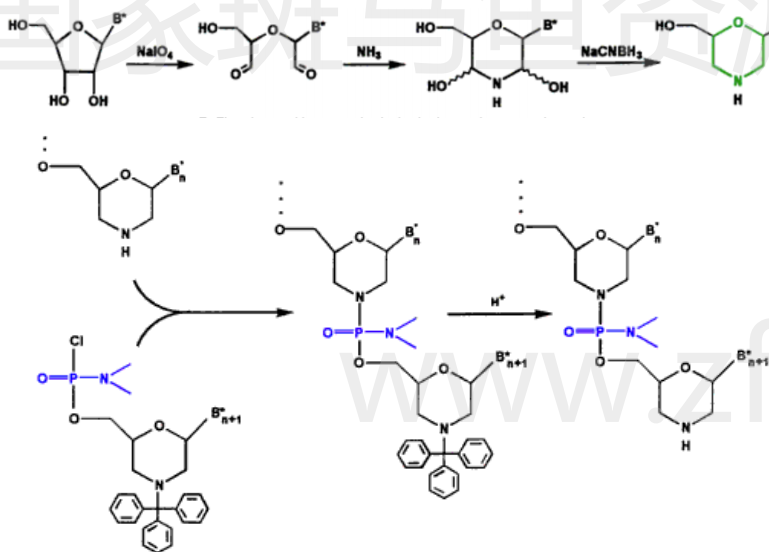
➤ 斑马鱼突变品系常规鉴定方法 (methods of mutation detection)

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

# 1、基因敲降技术

## 1.1 反义Morpholino技术:

- 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**, ~25nt, 以标准碱基互补配对的方式与mRNA结合。
- ④ ATG-MO: 阻止翻译, 靶点位于mRNA的5' UTR 或者靠近ATG的编码区;
- ⑤ Splice-MO: 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。

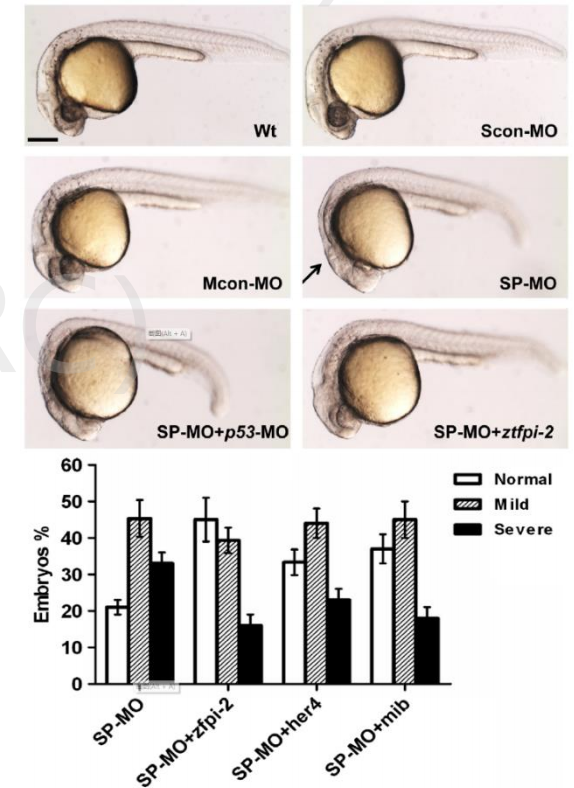
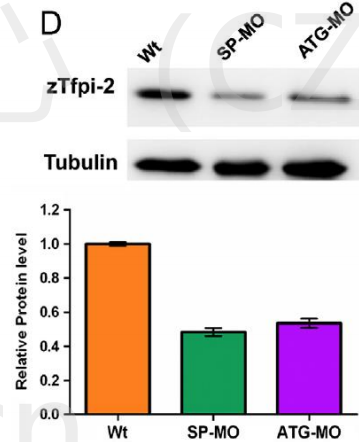
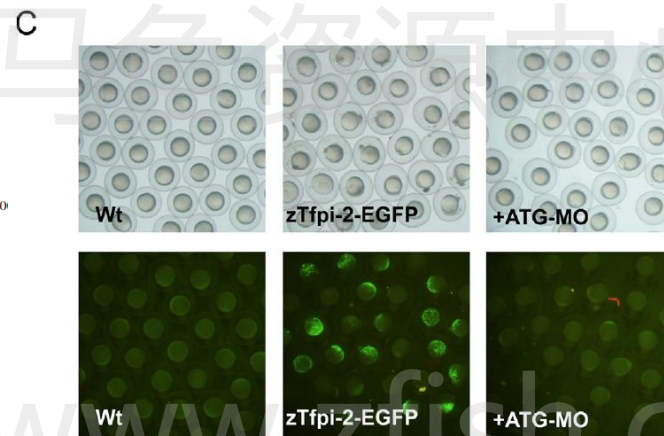
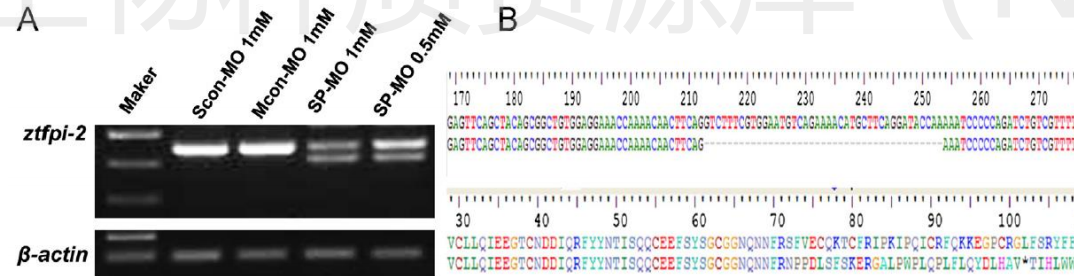


Morpholino转变及组装示意图 (gene-tools公司: <http://www.gene-tools.com/>)

Morpholino工作原理 (Eisen JS, et al. Development. 2008.)

# 1、基因敲降技术

## Morpholino技术在斑马鱼研究中的应用 *ztfpi-2* (Tissue factor pathway inhibitor-2) gene CNS development



© 2001 Wiley-Liss, Inc.

Morpholino-Induced Knockdown of Zebrafish Engrailed Genes *eng2* and *eng3* Reveals Redundant and Unique Functions in Midbrain-Hindbrain Boundary Development

Steffen Scholpp and Michael Brand\*

Tissue factor pathway inhibitor-2: A novel gene involved in zebrafish central nervous system development

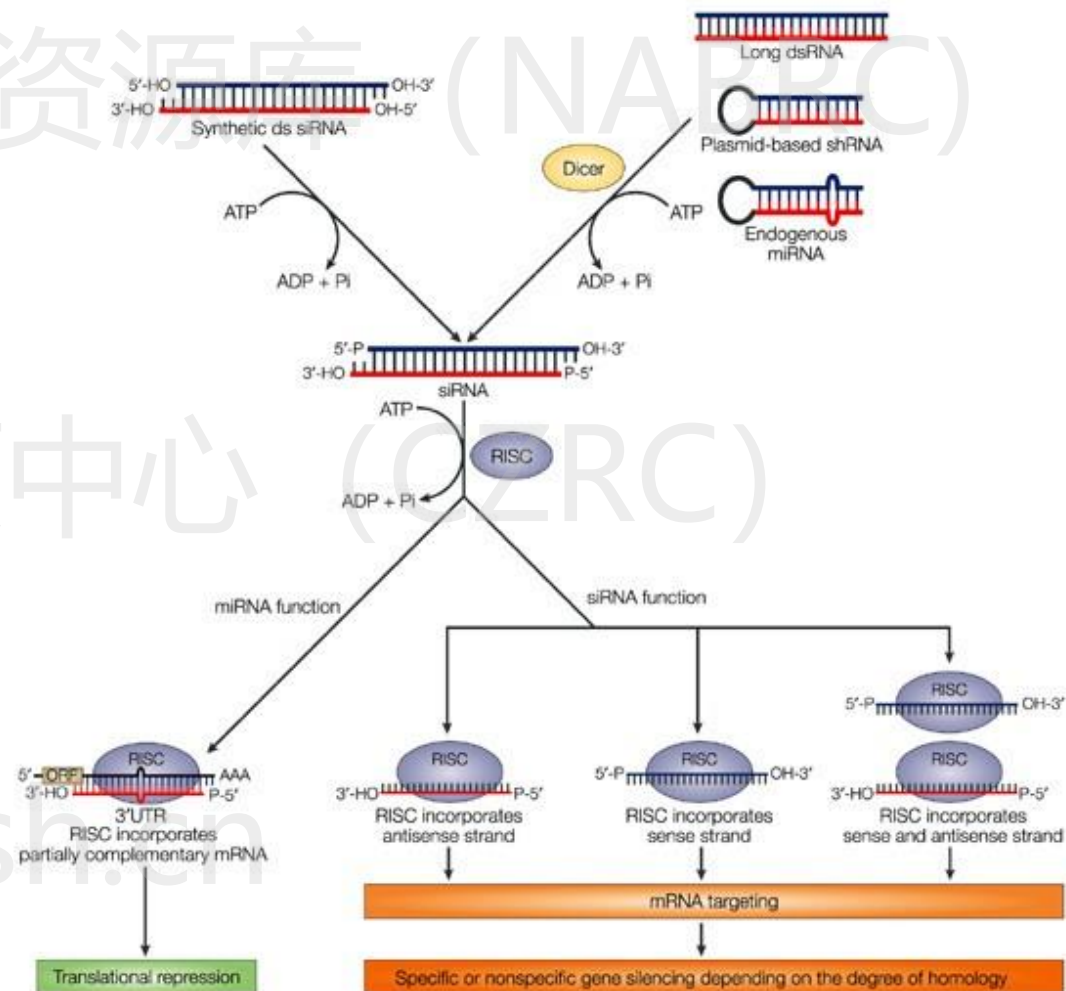
Yanli Zhang<sup>a</sup>, Lina Wang<sup>a</sup>, Wenhao Zhou<sup>b</sup>, Huijun Wang<sup>b</sup>, Jin Zhang<sup>a</sup>, Shanshan Deng<sup>a</sup>, Weihua Li<sup>c</sup>, Huawei Li<sup>a</sup>, Zuohua Mao<sup>a</sup>, Duan Ma<sup>a,b,\*</sup>

- *ztfpi-2* knockdown by MOs

# 1、基因敲降技术

## 1.2 RNAi技术:

- ① 人工合成的双链RNA序列 (dsRNA) 或siRNA 表达质粒体外合成;
- ② dsRNA经Dicer加工成21-25nt的siRNA;
- ③ siRNA中的反义链指导合成沉默复合体RISC;
- ④ RISC切割与siRNA反义链互补的mRNA分子, 引发其特异性降解, 从而阻断靶基因表达。



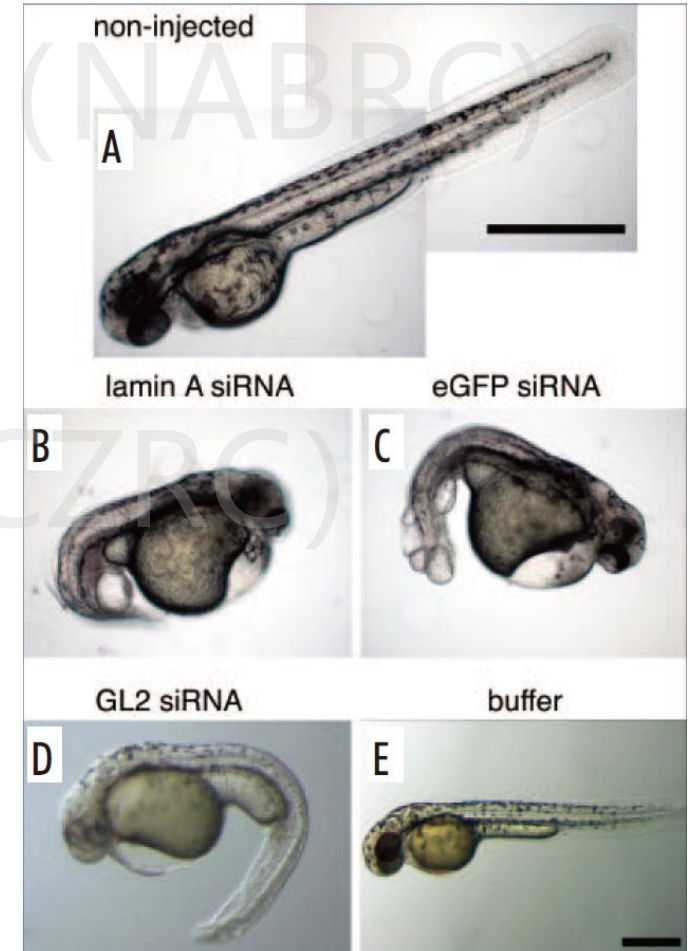
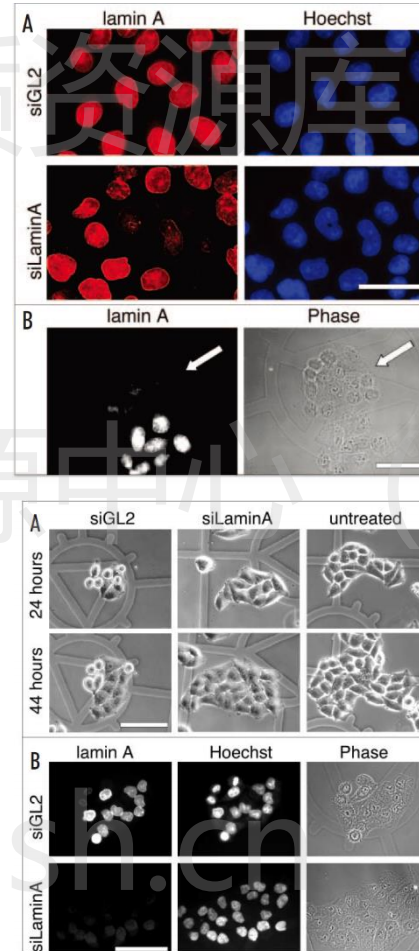
# 1、基因敲降技术

## RNAi技术在斑马鱼研究中的应用

- siRNAs work well in zebrafish cell lines (ZFL, SJD, ZF4)
- siRNA injected zebrafish embryos showed severe unspecific defects.

control firefly luciferase siRNA (siGL2)

ZFL cells



- siRNA injected embryos at 48 hpf showed severe unspecific defects.

RNA Biology

ISSN: 1547-6286 (Print) 1555-8584 (Online) Journal homepage: <https://www.tandfonline.com/loi/krnb20>

## Specific RNAi Mediated Gene Knockdown in Zebrafish Cell Lines

Jens Gruber, Heiko Manninga, Thomas Tuschl, Mary Osborn & Klaus Weber

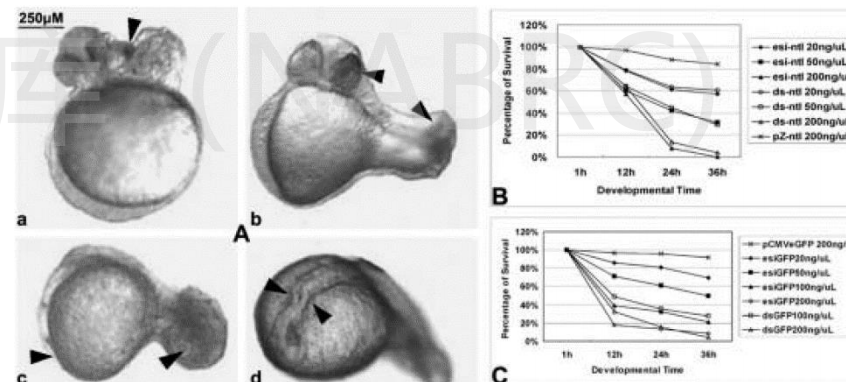
# 1、基因敲降技术

## RNAi技术在斑马鱼研究中的应用

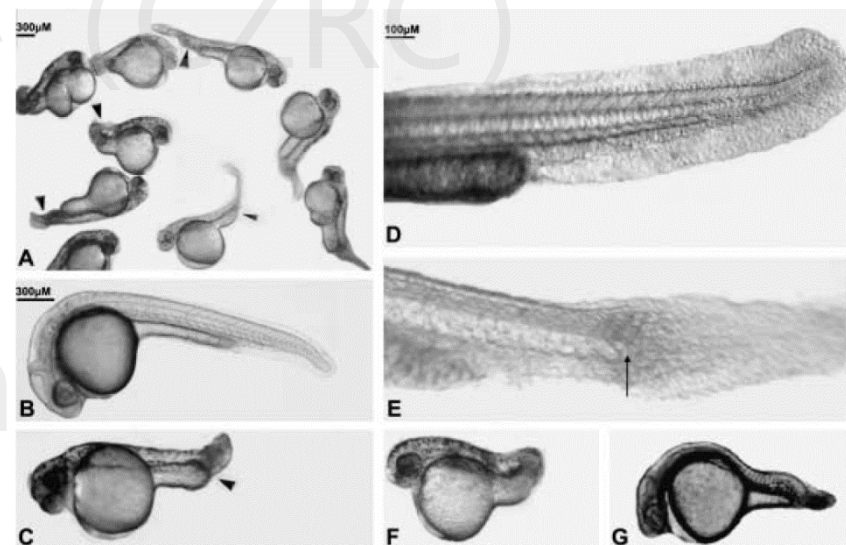
*esi-ntl*: dsRNA of *ntl* digested by RNaseIII, purified

*si-ntl*: produced by SP6 RNA polymerase

*esi-ntl*, 50ng/μl



*si-ntl*, 4 μg/μL



typical *ntl* mutant

Develop. Growth Differ. (2005) 47, 323–331

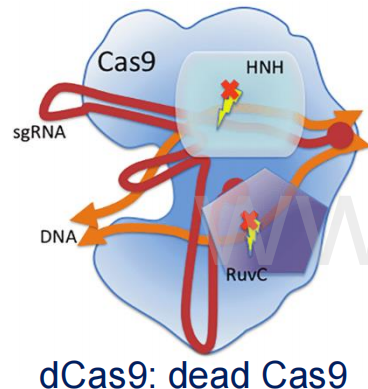
## Efficient RNA interference in zebrafish embryos using siRNA synthesized with SP6 RNA polymerase

Wei-Yi Liu,<sup>1,2</sup> Yan Wang,<sup>1</sup> Yong-Hua Sun,<sup>1,\*</sup> Yun Wang,<sup>1,2</sup> Ya-Ping Wang,<sup>1</sup> Shang-Ping Chen<sup>1</sup> and Zuo-Yan Zhu<sup>1,\*</sup>

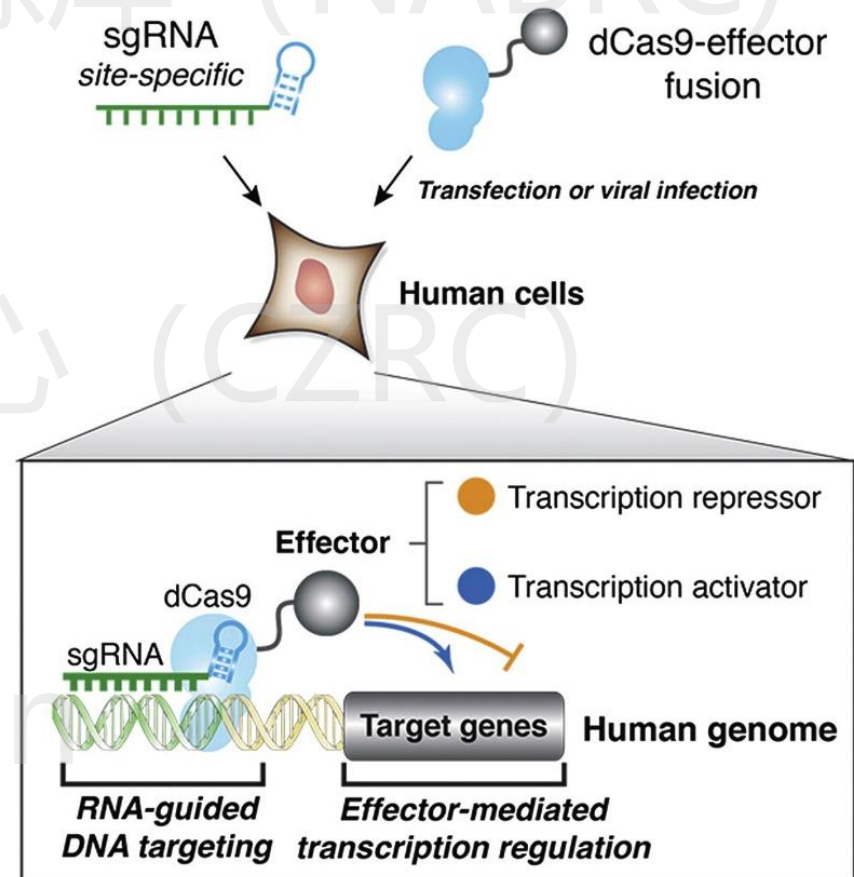
# 1、基因敲降技术

## 1.3 CRISPRi基因抑制技术:

- ① 失去切割DNA的功能的dCas9 (RuvC-D10A/HNH-H840A) 与转录抑制因子 (如Eve、KRAB) 形成融合蛋白;
- ② 根据目标基因的转录起始位点的特征, 设计 sgRNA 识别位点 (不少于 4 个);
- ③ CRISPRi系统可逆地抑制靶向基因转录的作用;
- ④ CRISPRi 敲降的有效性可以通过RT-PCR 法检测。



## CRISPRi: a modular RNA-guided genome regulation platform



(Gilbert LA, et al. Cell. 2013.)



# 1、基因敲降技术

	RNAi	反义Morpholino	CRISPRi
靶标的识别区域	21-23nt的siRNA	25nt的寡核苷酸单链	sgRNAs/dCas9蛋白
靶位点及作用	mRNA, 介导其降解	mRNA, 阻断其翻译或剪接	DNA转录起始位点, 抑制转录
作用对象	mRNA为主	mRNA	适用于多种转录本, 包括mRNA、非编码RNA、microRNA、反义转录本等
有效性评价	RT-PCR 法检测目标基因表达水平	RT-PCR 法检测目标基因表达水平或Western Blot检测目标蛋白表达水平	RT-PCR 法检测目标基因表达水平
优点	靶向精确, 操作方便	靶向精确、操作便捷	靶向精确、脱靶率低、细胞毒性低、价廉方便
缺点	脱靶率高、技术重现性差、具有细胞毒性	有一定的脱靶率, 存在诱发细胞凋亡风险、价格较高	作用受限于PAM序列

国家水生生物种质资源库 (NABRC)

➤ 基因敲降技术 (Gene knockdown)

➤ 基因编辑技术 (Gene Editing)

➤ 斑马鱼突变品系常规鉴定方法 (methods of mutation detection)

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

## 2、基因编辑技术

基因突变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。



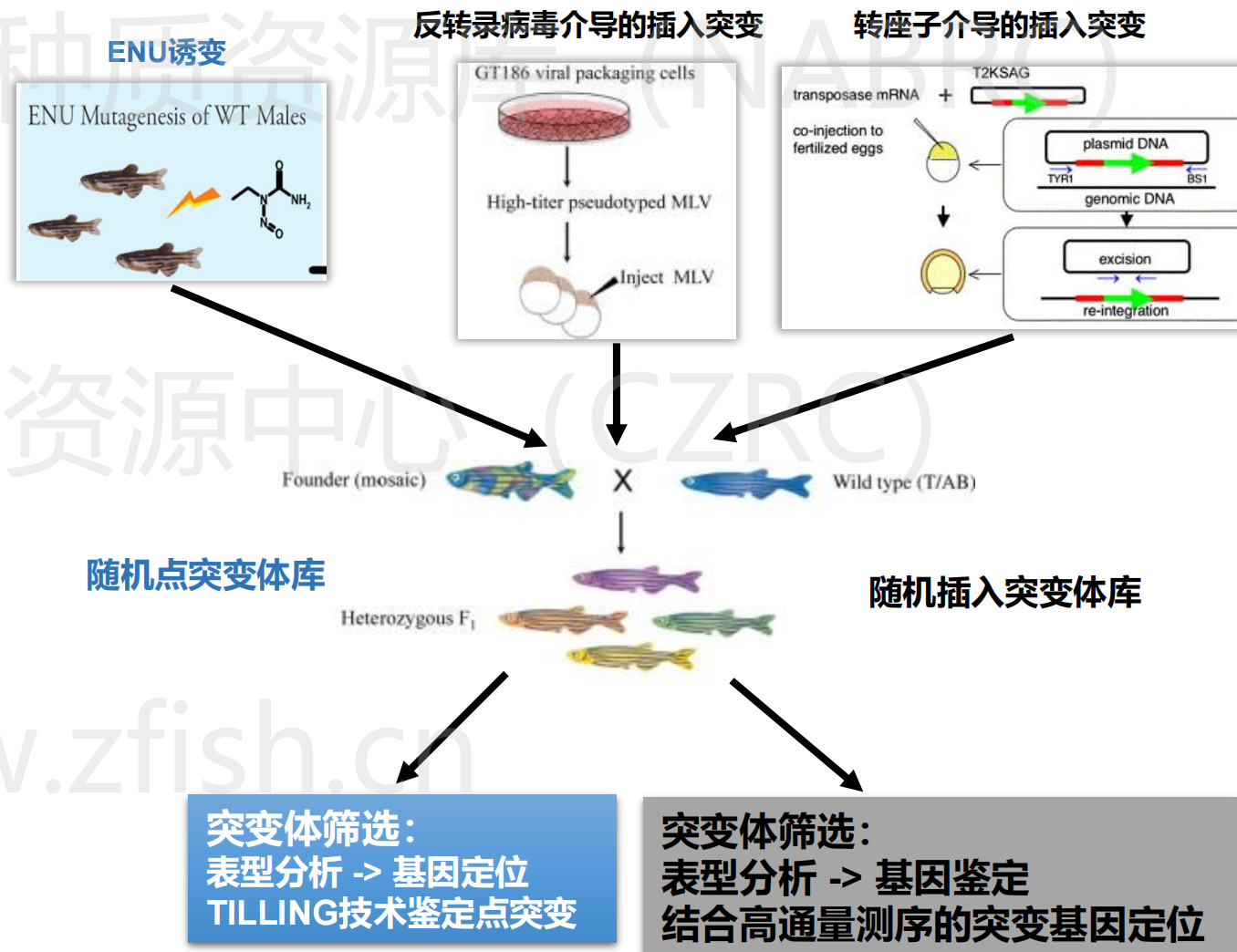
[www.zfish.cn](http://www.zfish.cn)

# 2、基因编辑技术

## 正向遗传学技术:

正向遗传学技术是指通过生物个体的基因组的自发突变或人工诱变, 寻找相关的表型或性状的变化, 然后从这些特定性状变化的个体中找到对应的突变基因并揭示其功能。

- 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。

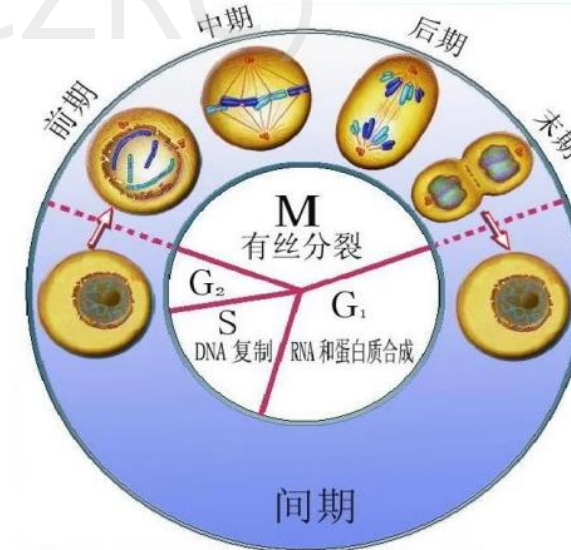
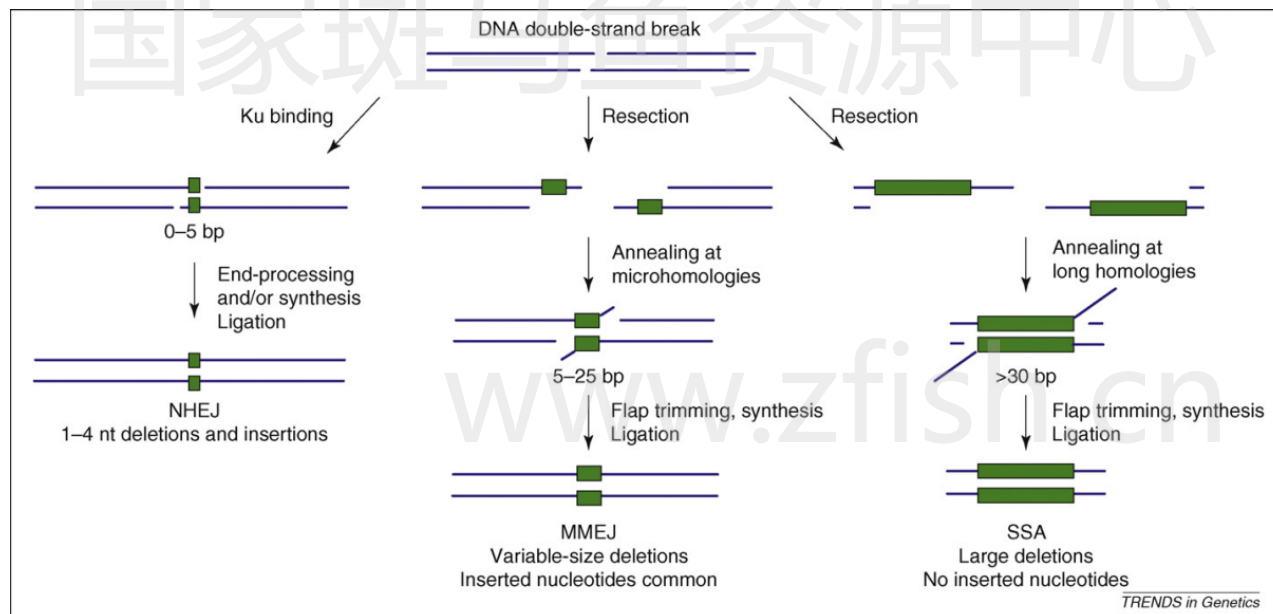


www.zfish.cn

## 2、基因编辑技术

### 双链断裂修复机制

- ① **HR**: 依赖于同源模板或染色体, 准确修复DSB。
- ② **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;
- ③ **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;
- ④ **SSA**: 存在30bp或以上的同源末端, 在连接处引入缺失;

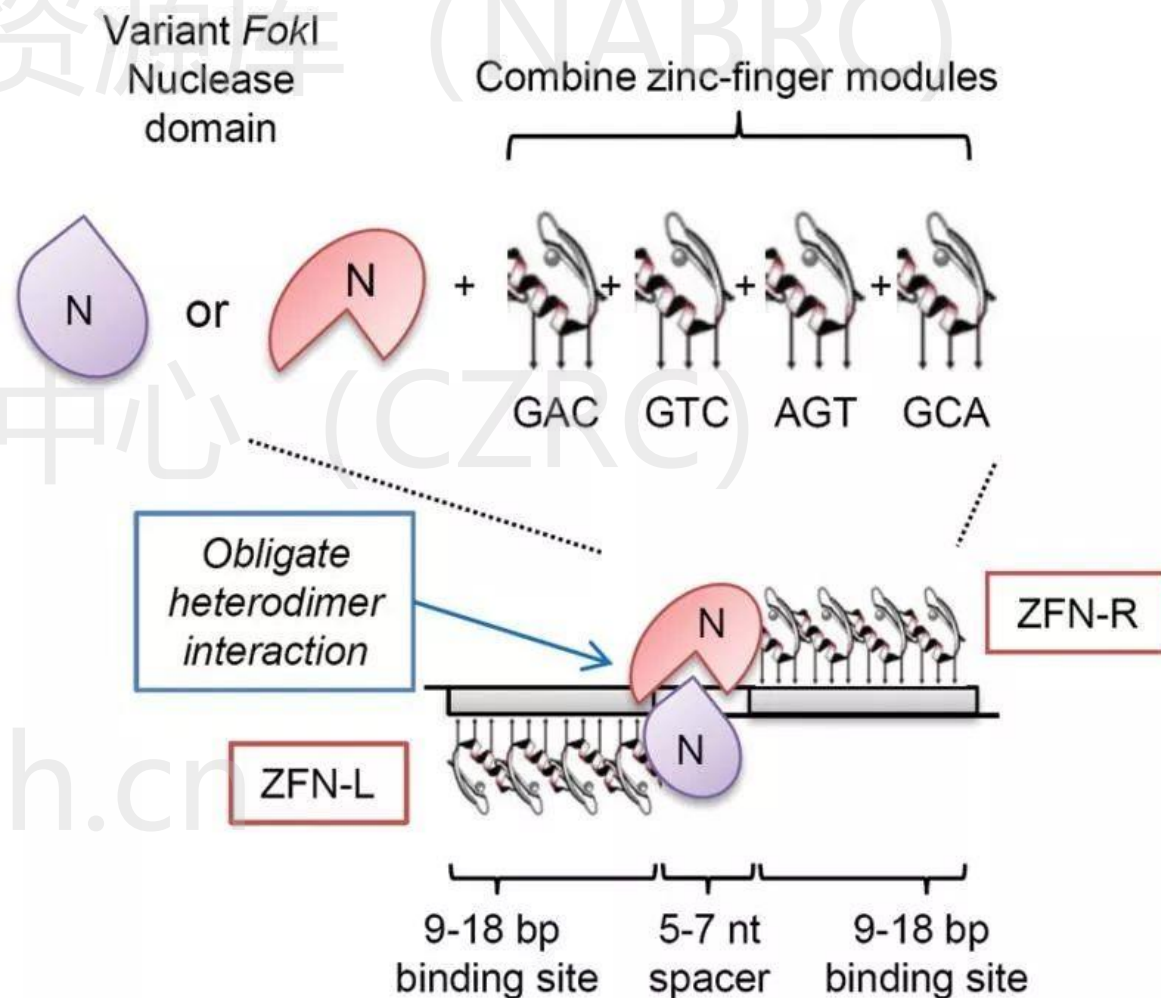


## 2、基因编辑技术

### ZFNs技术

- ① ZFN=锌指DNA结合域 ZF+核酸内切酶 Fok I;
- ② ZF: DNA 识别, 3-4个 Cys2-His2锌指蛋白串联组成, 每个锌指蛋白识别一个特异的三联体碱基;
- ③ Fok I: 形成二聚体对DNA定向剪切。  
间隔区spacer: 以5~7bp为宜

**锌指核酸酶** (Zinc-finger nuclease, **ZFN**) 是一类人工合成的限制性内切酶, 由锌指DNA结合域 (zinc finger DNA-binding domain) 与核酸内切酶的DNA切割域 (DNA cleavage domain) 融合而成。



## 2、基因编辑技术

### ZFN技术在斑马鱼研究中的应用

- 2008年首次成功地使用ZFN基因编辑技术，对斑马鱼基因进行精确的位点特异性编辑。

*Nat Biotechnol.* 2008 June ; 26(6): 702–708. doi:10.1038/nbt1409.

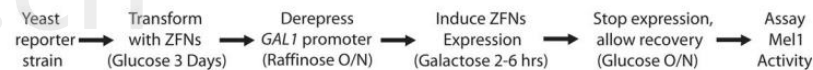
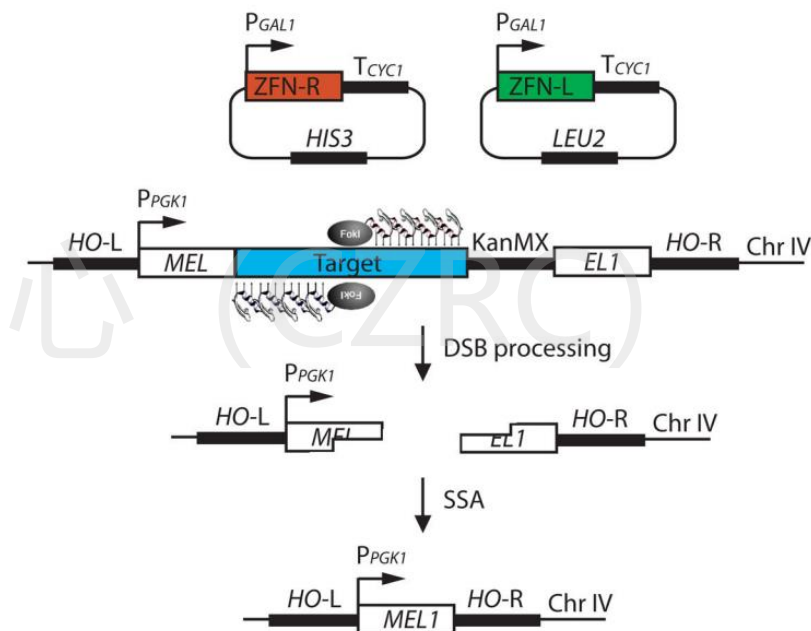
### Heritable Targeted Gene Disruption in Zebrafish Using Designed Zinc Finger Nucleases

Yannick Doyon<sup>2,4</sup>, Jasmine M McCammon<sup>1,4</sup>, Jeffrey C Miller<sup>2</sup>, Farhoud Faraji<sup>2</sup>, Catherine Ngo<sup>2</sup>, George E Katibah<sup>2</sup>, Rainier Amora<sup>2</sup>, Toby D Hocking<sup>2</sup>, Lei Zhang<sup>2</sup>, Edward J Rebar<sup>2</sup>, Philip D Gregory<sup>2</sup>, Fyodor D Urnov<sup>1,2</sup>, and Sharon L Amacher<sup>1,3</sup>

*Nat Biotechnol.* 2008 June ; 26(6): 695–701.

### Targeted gene inactivation in zebrafish using engineered zinc finger nucleases

Xiangdong Meng<sup>1,4</sup>, Marcus B. Noyes<sup>1,2</sup>, Lihua (Julie) Zhu<sup>1</sup>, Nathan D. Lawson<sup>1,3</sup>, and Scot A. Wolfe<sup>1,2</sup>



- Yeast-based system of identification of maximally active ZFNs

# 2、基因编辑技术

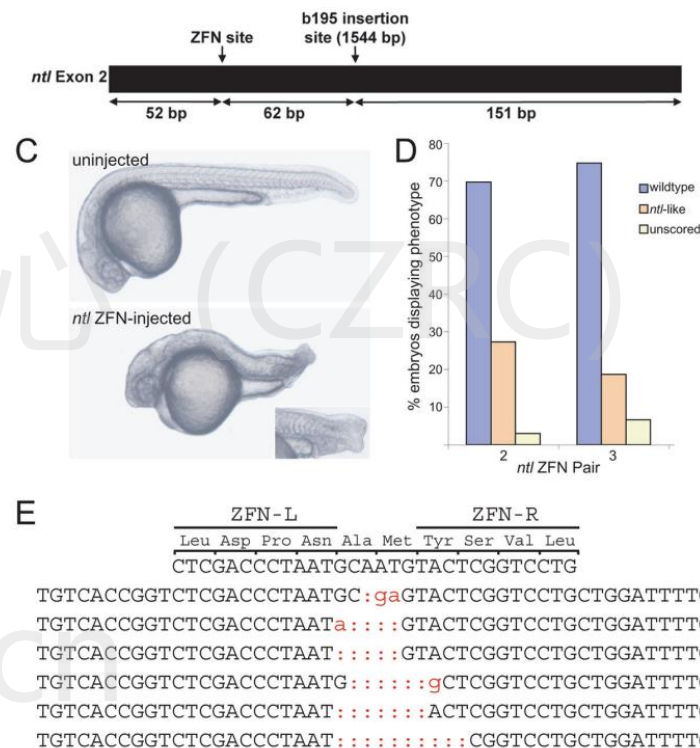
## ZFN技术在斑马鱼研究中的应用

- 2008年首次成功地使用ZFN基因编辑技术，对斑马鱼基因进行精确的位点特异性编辑。

Nat Biotechnol. 2008 June ; 26(6): 702–708. doi:10.1038/nbt1409.

### Heritable Targeted Gene Disruption in Zebrafish Using Designed Zinc Finger Nucleases

Yannick Doyon<sup>2,4</sup>, Jasmine M McCammon<sup>1,4</sup>, Jeffrey C Miller<sup>2</sup>, Farhoud Faraji<sup>2</sup>, Catherine Ngo<sup>2</sup>, George E Katibah<sup>2</sup>, Rainier Amora<sup>2</sup>, Toby D Hocking<sup>2</sup>, Lei Zhang<sup>2</sup>, Edward J Rebar<sup>2</sup>, Philip D Gregory<sup>2</sup>, Fyodor D Urnov<sup>1,2</sup>, and Sharon L Amacher<sup>1,3</sup>



- Injection of no tail ZFN-encoding mRNA into zebrafish embryos induces targeted loss of-function mutations in somatic cells

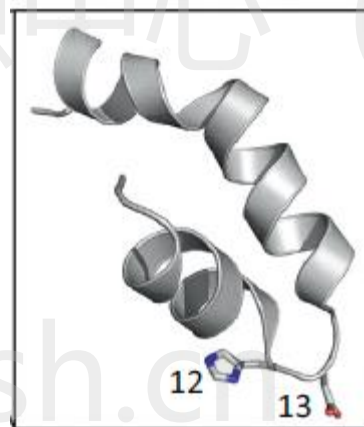


## 2、基因编辑技术

### TALENs技术

- ① TALEN=TALE+核酸内切酶Fok I;
- ② TALE: DNA 识别，一串TALE蛋白组成，TALE蛋白识别特异碱基对;

**TALEN** (transcription activator-like effector nucleases) 由一个包含核定位信号 (NLS) 的N端结构域、一个包含可识别特定 DNA序列的串联TALE重复序列的中央结构域，以及一个具有FokI核酸内切酶功能的C端结构域组成。



TAL蛋白

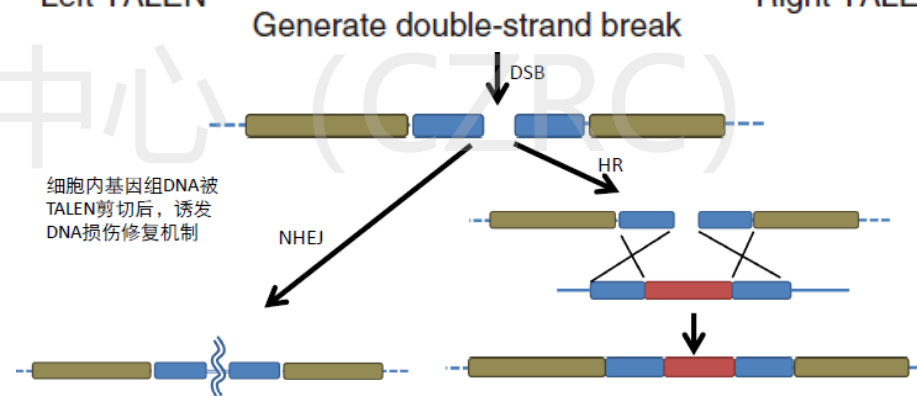
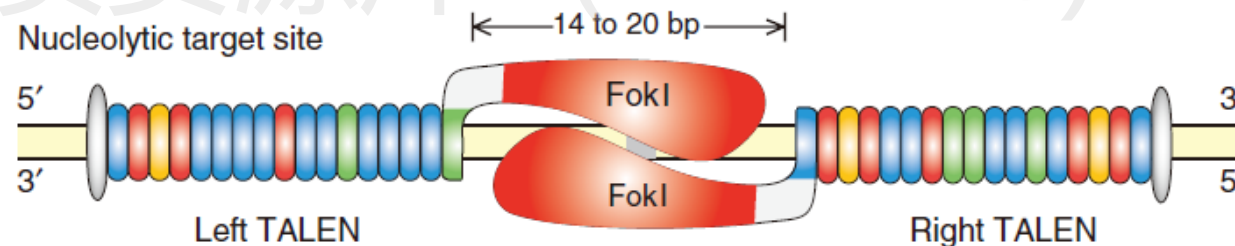
氨基酸残基与碱基的对应关系:

**NG** -> **T**  
**HD** -> **C**  
**NI** -> **A**  
**NN** -> **G**

## 2、基因编辑技术

### TALENs技术

- ① TALEN=TALE+核酸内切酶Fok I;
- ② TALE: DNA 识别, 一串TALE蛋白组成, TALE蛋白识别特异碱基对;
- ③ Fok I: 形成二聚体对DNA定向剪切。



通过NHEJ (Non-homologous End Joining) 修复DNA, 缺乏修复模板, 在此修过程中或多或少地删除或插入了一定数目的碱基, 造成移码, 形成目标基因敲除突变体

如果有同源修复模板, 细胞可通过同源重组HR (Homologous Recombination) 方式修复DNA, 如果在细胞中转入的质粒含有修复模板, 就可以对目标DNA做修饰, 如点突变、碱基替换、碱基磷酸化、加入标记

www.zfish.cn

# 2、基因编辑技术

## TALENs技术在斑马鱼中的应用

- 2011年，首次成功地使用TALEN基因编辑技术，对斑马鱼基因进行精确的基因编辑。

### Heritable gene targeting in zebrafish using customized TALENs

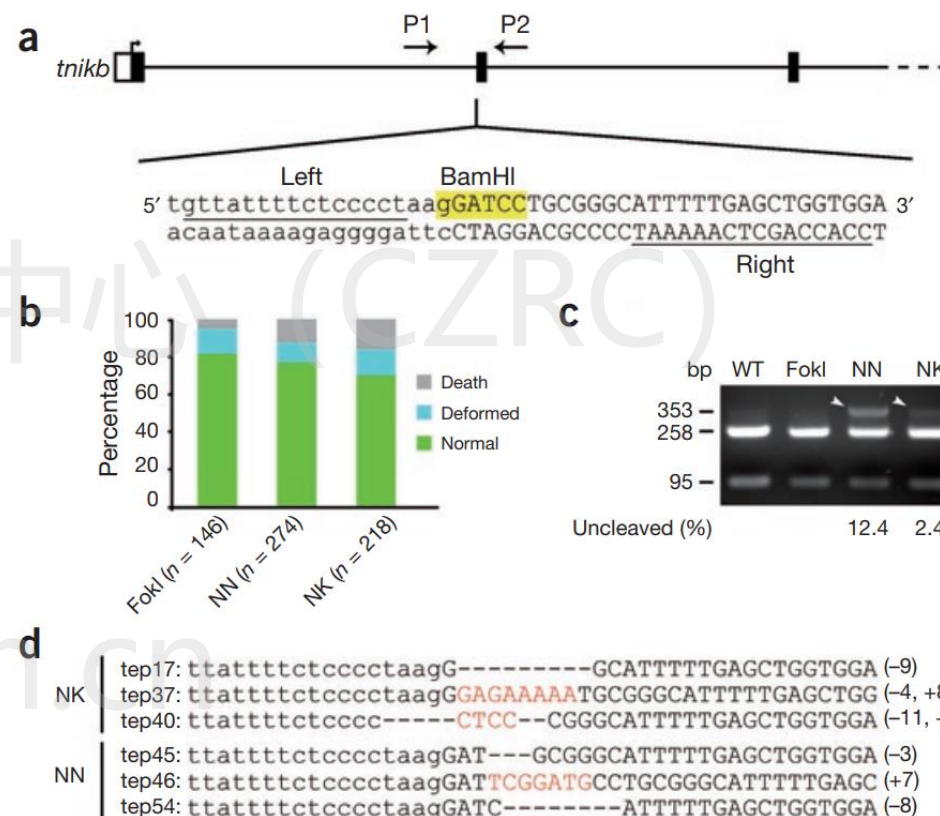
Peng Huang, An Xiao, Mingguo Zhou, Zuoyan Zhu, Shuo Lin & Bo Zhang

*Nature Biotechnology* 29, 699–700 (2011) | [Cite this article](#)

*Nat Biotechnol.* ; 29(8): 697–698. doi:10.1038/nbt.1934.

### Targeted gene disruption in somatic zebrafish cells using engineered TALENs

Jeffrey D. Sander<sup>1,2,\*</sup>, Lindsay Cade<sup>3,\*</sup>, Cyd Khayter<sup>1,2</sup>, Deepak Reyon<sup>4</sup>, Randall T. Peterson<sup>3,5</sup>, J. Keith Joung<sup>1,2,#</sup>, and Jing-Ruey J. Yeh<sup>3,#</sup>

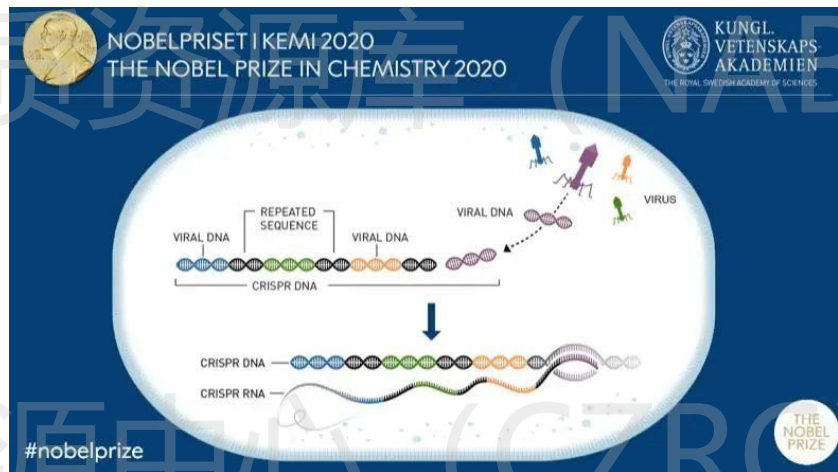


- Targeted and heritable disruption of the *tnika* gene in zebrafish using TALENs. (Huang P et al, *Nat Biotechnol.* 2011)

# 2、基因编辑技术



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

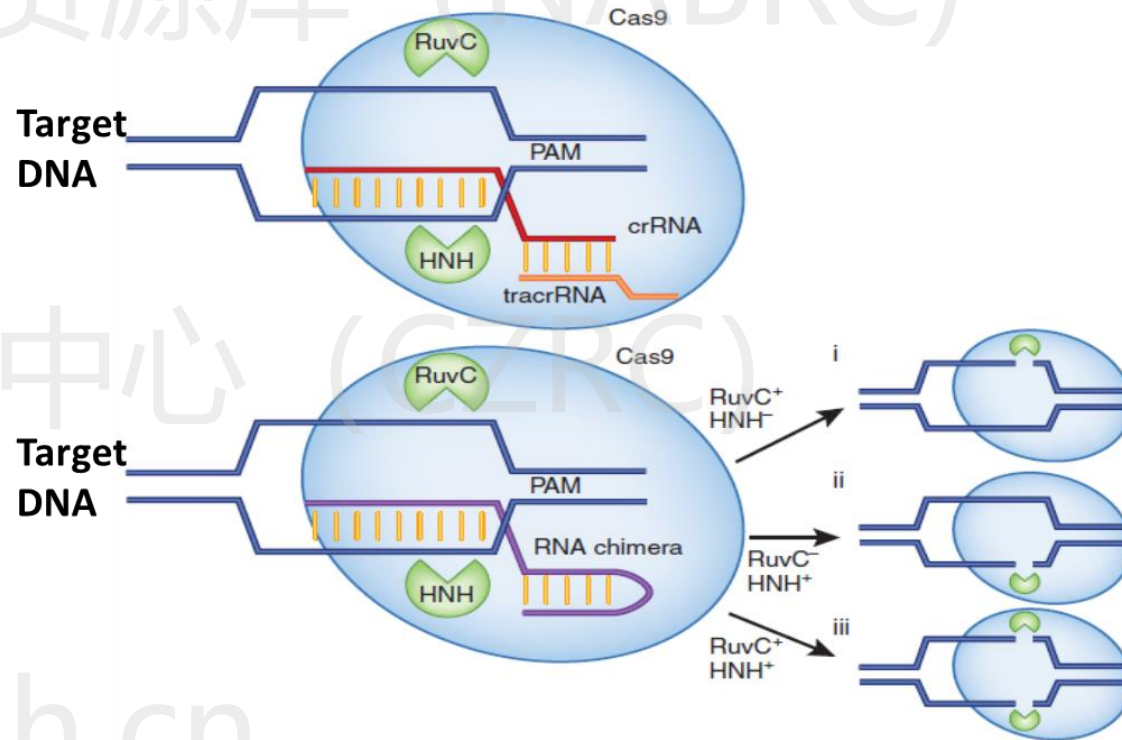
2007年，证明CRISPR-Cas为细菌适应性免疫系统

2011年，发现tracr RNA, cas9是二型CRISPR-Cas所需唯一基因

## 2、基因编辑技术

### CRISPR/Cas9技术

**CRISPR/Cas9** (clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated protein 9) **技术**：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蛋白（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蛋白对与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., Nature Biotechnology. 2012)

## 2、基因编辑技术

	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、基因编辑技术

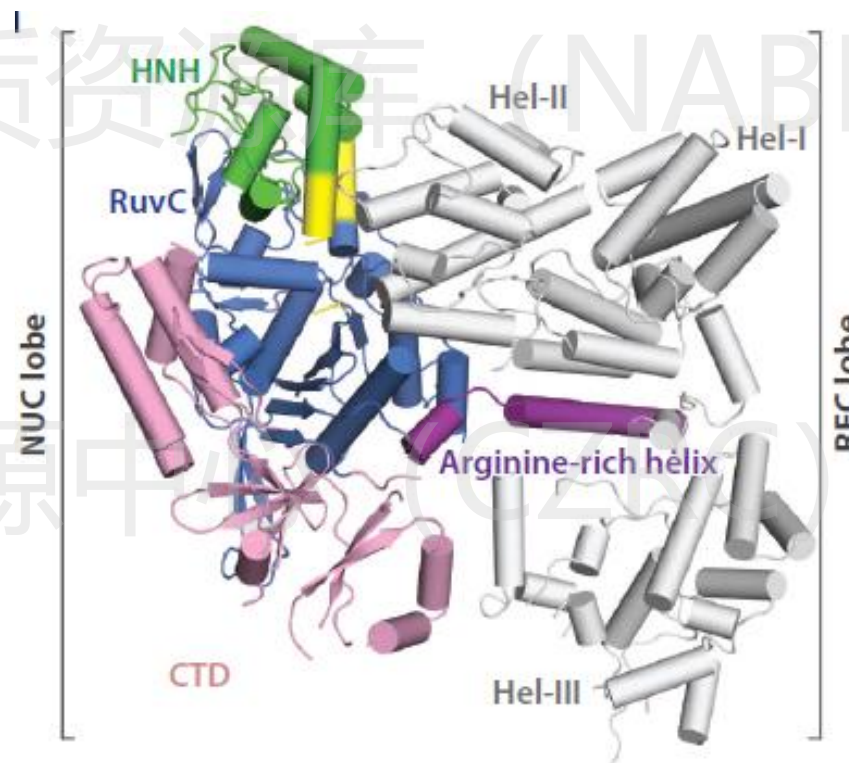
### SpCas9蛋白结构

(*Streptococcus pyogenes*, 酿脓链球菌)

- ① RNA 结合结构域;
- ② a PAM-interacting site.
- ③ an  $\alpha$ -helical recognition lobe;
- ④ a nuclease lobe:

NHN: 负责切割与crRNA互补的链

RuvC: 负责非互补链的切割



Type II-A *Streptococcus pyogenes* Cas9 (SpyCas9, or SpCas9)

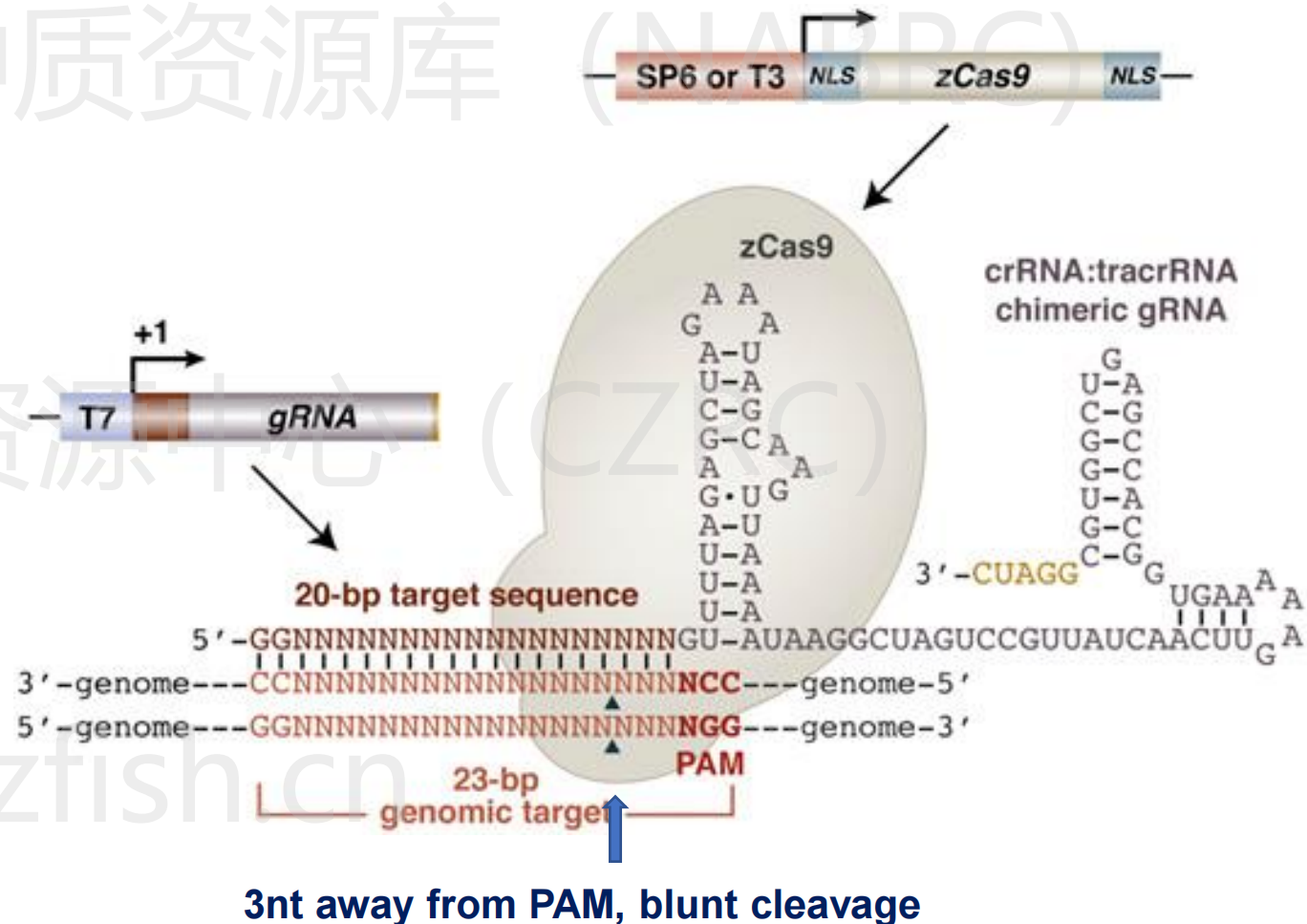


## 2、基因编辑技术

### CRISPR/Cas9技术

#### 2.1 工作原理:

- 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。





# 2、基因编辑技术

## CRISPR/Cas9技术

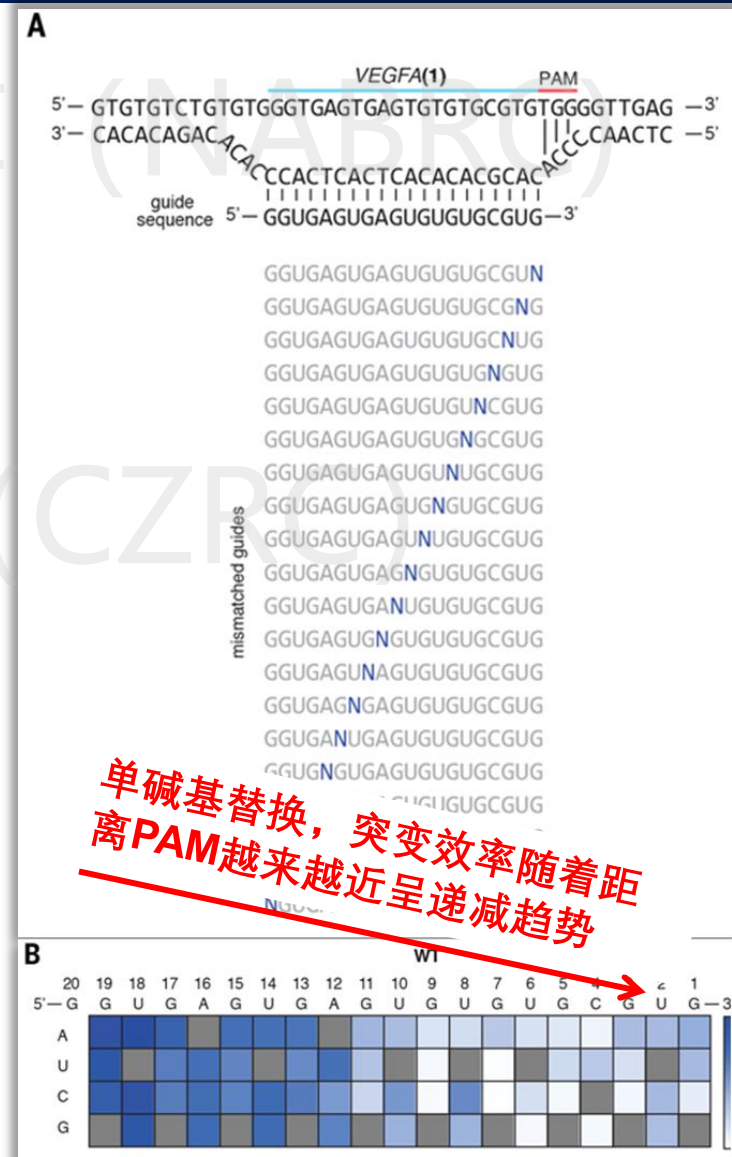
### 2.2 gRNA靶点的选择:

- 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

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



## 2、基因编辑技术

### 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；
    - 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，破坏基因的剪接；
  - 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、基因编辑技术

**阳性F0代：**设计靶点，合成gRNA和Cas9 mRNA，通过显微注射的方式获得阳性P0代

**F0代个体筛选：**一般通过与野生型侧交的方式进行筛选，将阳性胚胎培养为F1代

**F1代个体筛选：**一般采取剪尾鳍测序的方式进行筛选，获取两个具有不同阅读框的移码品系

### 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、基因编辑技术

### 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>

## 2.5 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：

- 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

Gene Name: *solute carrier family 45, member 2*  
Gene Symbol: *slc45a2*  
Sequence Ontology ID: [SO:0000704](#)  
Previous Names: *oca4, aim1 (1), alb (1), albino (1), B gene, im:7138762*  
Location: Chr: 21 [Mapping Details/Browsers](#)

#### GENE EXPRESSION

All Expression Data: 7 figures from 3 publications  
Directly Submitted Expression Data: 5 figures (8 images) from [Thisse 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

Allele	Type	Localization	Consequence	Mutagen	Suppliers
b4	Insertion	Unknown	Unknown	SPONTANEOUS	<a href="#">Zebrafish International Resource Center (ZIRC) (order this)</a>
hu1844	Point Mutation	Unknown	Unknown		
ihb64	Insertion	Unknown	Unknown	CRISPR	<a href="#">China Zebrafish Resource Center (CZRC) (order this)</a>
ihb65	Small Deletion	Unknown	Unknown	CRISPR	<a href="#">China Zebrafish Resource Center (CZRC) (order this)</a>
ihb66	Small Deletion	Unknown	Unknown	CRISPR	<a href="#">China Zebrafish Resource Center (CZRC) (order this)</a>
nk1	Point Mutation	Exon 6	Premature Stop		
s1154	Unknown	Unknown	Unknown	ENU	
s3567	Unknown	Unknown	Unknown	ENU	
sa16467	Point Mutation	Unknown	Premature Stop	ENU	<a href="#">Zebrafish International Resource Center (ZIRC) (order this)</a> <a href="#">European Zebrafish Resource Center (EZRC) (order this)</a>

## 2、基因编辑技术

### 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>

- 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；

Location: 21:19,409,306-19,447,653 Gene: slc45a2 Transcript: slc45a2-201

Transcript: slc45a2-201 ENSDART0000030887.7

Marked-up sequence

Exons slc45a2 exons All exons in this region

Markup loaded

```
>chromosome:GRCz10:21:19408706:19448253:1
CTCATTCACTTGGAGAAATGTGGAAATGAGCATTTTAACTCATGTGGCACCATTGAC
CGGTTCCCTGTGATCCACAGCTTGGAGTCTATAGATTAAGTCTGAGAGAGAGATAGATG
ATGACCACTGCGGAGCTCACATGATTTCTCACAGAGACTCGCCGACGTTCTCATGACAGAT
TTGAGTAAACCCAGCAGTCTTTGTAATGGAGAGCAGGCTTGGTGAAGCAGTGTGCTT
TAAGTCTACTATAAATTTGTGGCATTCTTTTCCAGCCCTTTCAAGCCGCTGCAAA
GCAATCACATGGTACGTCACATGATTTTCCAAATCCAAAGTGTGCAACACCAAGAAATG
TTTGTAGATCTTTACCAATTTCCGCCCCAAACAACTAGCATTTCCAGTATGTGAAC
TGAATTTGTGACGCTTGTGGCTTAACTTTTAACTTATTTCCACTCCAGCAGGAGTGG
GAGAAAAGCATCTTCAAGTATATCTCAGTACATGCTTACAA@CCGAGCTACAAAAC
AGAGGCCAAGGAGACCACCACTGCTTGCCTTCTCAGCTCACAACTTGTGATGCCACTG
CTCAACTATGCACTAGGAATCAAGAGTCTTACCACTCCAGAACCATGACTCTTCTACTGA
GGACCAGCCTTGCAGGTTCTCTGCACCGGAAAGCCCAATTTGCATCCATGGAGCAGTACCA
GGTGGACTCGGAGCTTAAAGAGGACTGTTGGACAACAATGGAAAGCGGCTGTTTTGGAGT
GGTGGAGCCTCCGAGGCGCTCAGGGGAAAGTTGATTATGCACGGTCCGCCATGTTGG
AAGGGAATTTCTGCTACGCTGTTGAGGCTGCGTTTGTGACGCGAGTGTGCTGAGCGTTGG
ACTTCCAGAGCTGTGACAGTCTGGTGTGGCTCATAGCCCAATTTGGGTTTTATCT
ACAGCCGCTCATCGGCTCGGAGGAGCTACTGTAGGTCGTCTAGGGCCGAAAGGAGACC
GTACATACTTACTGGGATTTCTGATGTAGTGGGATGACTTTATTTCTAAATGGAGA
TGCACTCACAACAGTGGTGAAGGTCAAGTAACTTGAATGATTTTACTTCATTTTGA
GACAAAGCACTAAATACAAAGGAAGTATGATGATTTCCAGGTCACACACAGCTATGTT
ATTTCTGGAATATCAAGGTTTTTAAAGGCTTTTCCAAAGTGAAGTCAAGTATTTT
TATTTAAATTTTTCGGTCCAGTCAATGGAATATCAGGATTTCTGTTTTTCACTTACAG
TTGAAGTCAGAAATATAGCCCCAGTTTTATTTTCCCTAATTTCTGTTAAACAGAGC
GAAGATTTACATAAATGTTTTAATAACTATTTCTAACTAAATTTTATTTTATTTATCT
TTTCATGCTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATG
```

## 2、基因编辑技术

### 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  
aaaaaaaaaatgaagcccaactgaagattctgtgagcgtccctcacaggtgtttctctcggtgtgtgttcagGAGCGTCTCGTGGTCCGTATCTTCTTCATGTTGATCGCCGGGATGCCGCTTCTAC

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

>slc45a2  
ttttcaccgcagCCATAATATCAGACAGAAATTTAAAAAGGACATGGGCCATCGTGGTGGTGTGTTGGAGTGTTTTGTTTGACTTTGCC  
GCAGACTTCATTGACGGACCCATTAAAGCCTATTTGTTGATGTGTGTTCTCATCGGGATAAAGAGCGGGGTCTTCATTACCATGCTTT  
ACTCACAGgtaagaactaataa

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、基因编辑技术

### 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
- ✓ 敲除效率检测及突变体筛选

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）

```
caaactggtgagctacaagtagagagaattttcagtcttgatgtttcttaaagttgtataactaaa  
gtatttattaacattgagtgatttactgaactaagcatgacggttggtgtttttcaccgcagCCA  
TAATATCAGACAGAAATTTAAAAAGGACATGGGCCATCGTGGTGGTGATGTTTGGAGTGGTTTTG  
TTTGACTTTGCCGCAGACTTCATTGACGGACCCATTAAAGCCTATTTGTTTGATGTGTGTTCTCA  
TCGGGATAAAGAGCGGGTCTTCATTACCATGCTTTACTCACAGgtaagaactaataacgctcat  
ttagcttggttttcttacagcagaaatgtacattggctgggtcagttggcgtttctgtgtgaagt  
ttgcatgttctcccatgtttgcgtggacttccttgtggtgctccattttccgtttccgctagt  
ataac
```

**Forward primer:** CAAACTGGTGAGCTACAAGTAG

**Reverse primer:** GTTATACATAGCGGAAACGG

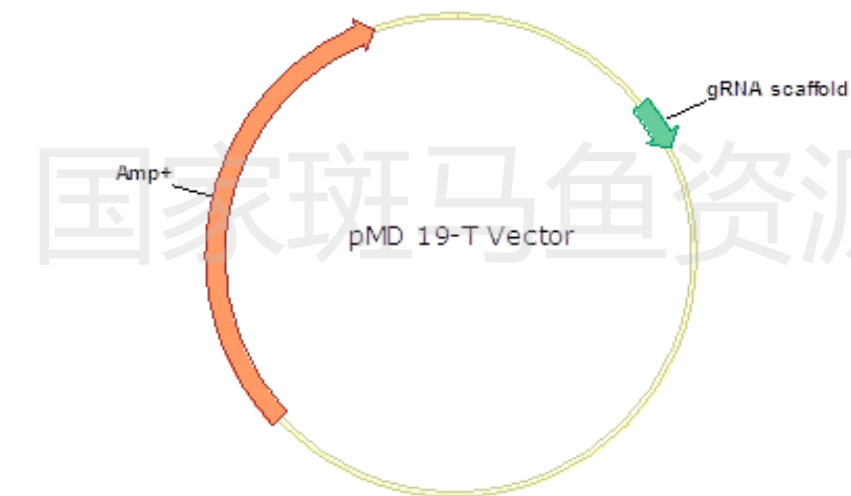


## 2、基因编辑技术

### 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



CZRZ Catalog ID:	CZP3
Product:	gRNA-pMD19-T
Note:	For making in vitro transcribed gRNA (CRISPR/Cas9)
NoteInfo:	Chang N, Sun C, Gao L, Zhu D, Xu X, 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、基因编辑技术

### 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:

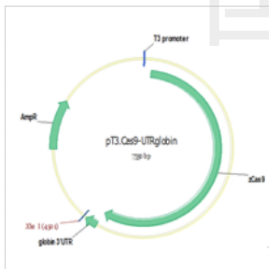
- Cas9 mRNA合成质粒：CZP11

CZRC Catalog ID: CZP11

Product: pT3TS(T3:zCas9-UTRglobin)

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

Phenotype:



NoteInfo:

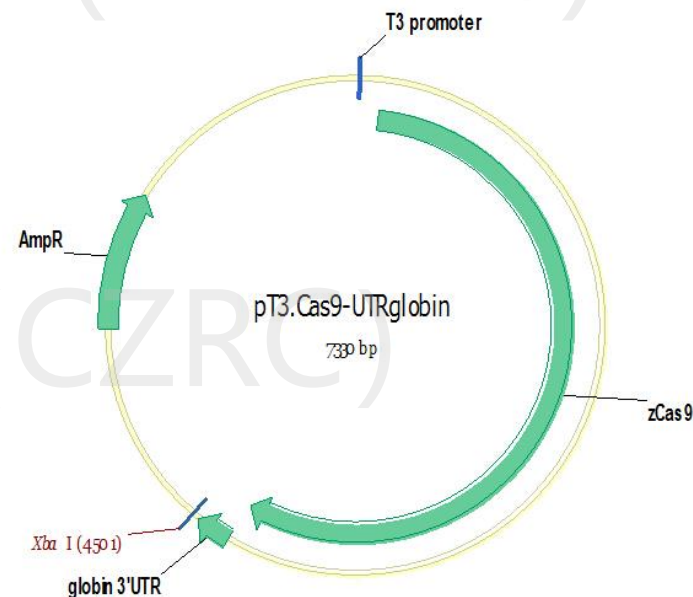
[两种密码子优化的cas9编码基因在斑马鱼胚胎中基因敲除效率的比较\\_1.pdf](#)

[Jao, L. E., S. R. Wentz, 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](#)



增加hei-tag, 加速Cas9蛋白入核

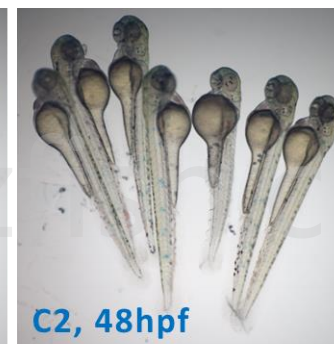
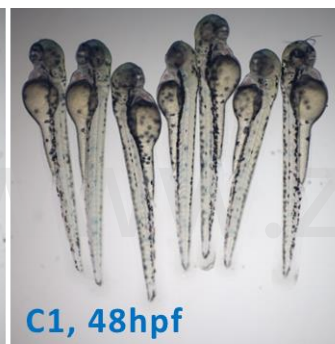
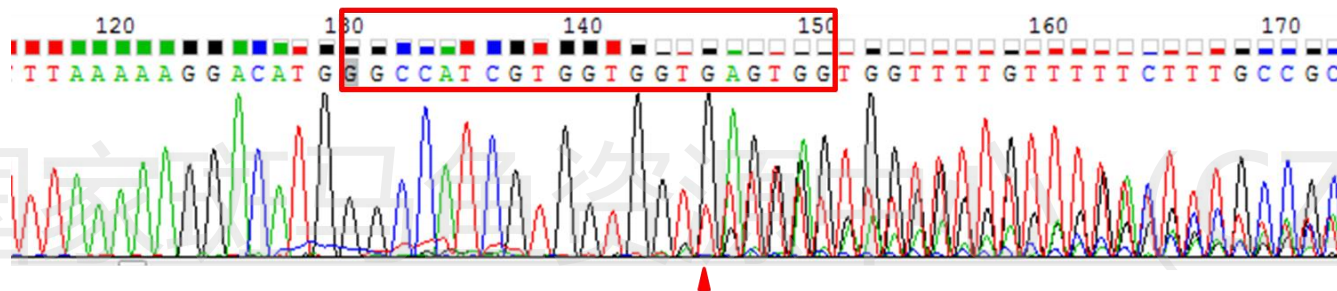
pT3-heiCas9B-UTRglobin

## 2、基因编辑技术

### 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：

Sequencing primer: F1

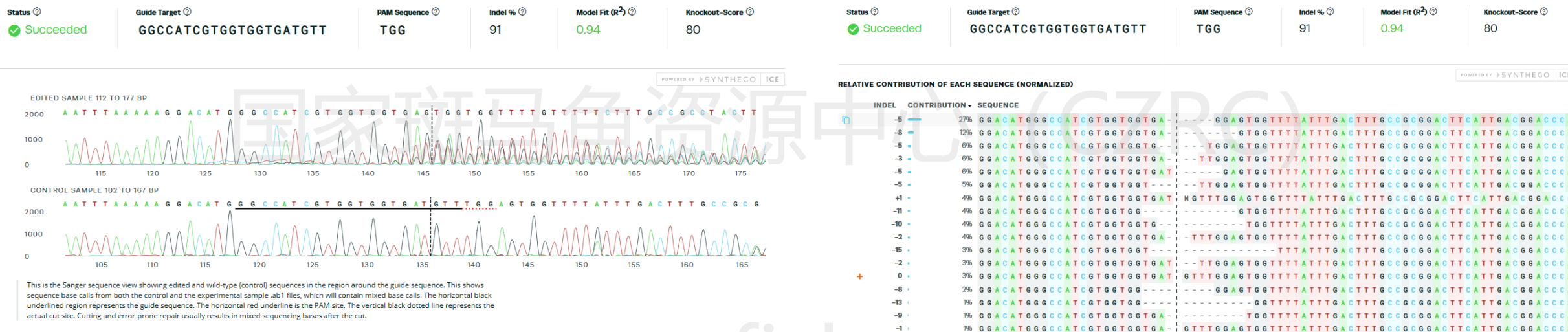


*slc45a2* gRNA/Cas9 mRNA共  
注射胚胎表型统计  
35.8% C1 + 61.8% C2  
P0代表型同预期一致

# 2、基因编辑技术

## 2.5 以显微注射实验课CRISPR/Cas9敲除样品为例：靶向scl45a2基因

### 7. 显微注射与P0代靶点效率检测：



www.zfish.cn  
Synthego - CRISPR Performance Analysis  
<https://ice.synthego.com/#/>

# 2、基因编辑技术

## 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

地址: 武汉市武昌区东湖南路7号中科院水生所 邮编: 430073  
电话: 027-68780570 邮箱: zebrafish@ihb.ac.cn 网址: <http://www.zfish.cn>

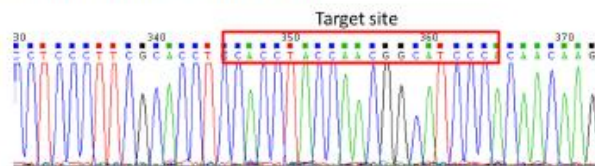
### stat6 基因敲除斑马鱼研制项目一期进展报告

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

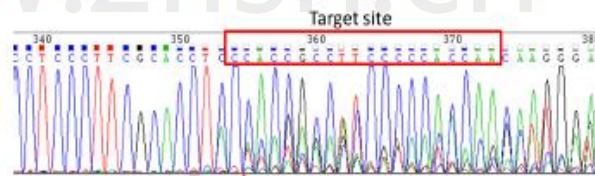
ACTIONS	QUERY	SCORE	START	END	Q:SIZE	IDENTITY	CHRO	STRAND	START	END	SPAN
hide/show details	YourSeq	20	1	20	20	100.0%	23	+	27351035	27351054	20

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。



野生型靶点序列

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:



P0 代胚胎群体中靶点序列

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。)

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

1 页

国家水生生物种质资源库 (NABRC)

➤ 基因敲降技术 (Gene knockdown)

➤ 基因编辑技术 (Gene Editing)

➤ 斑马鱼突变品系的常规鉴定方法 (methods of mutation detection)

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

- 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

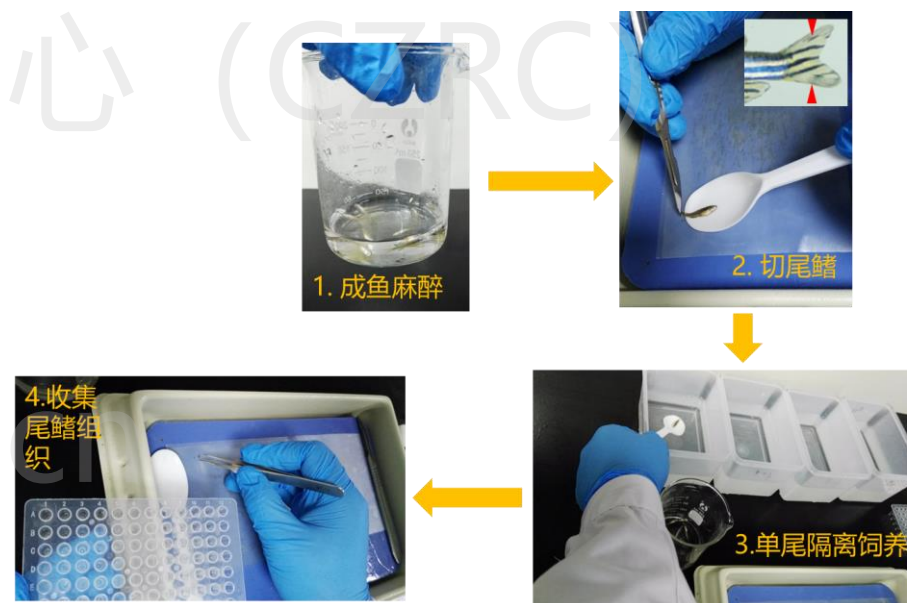
### 第二步，提取基因组DNA

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

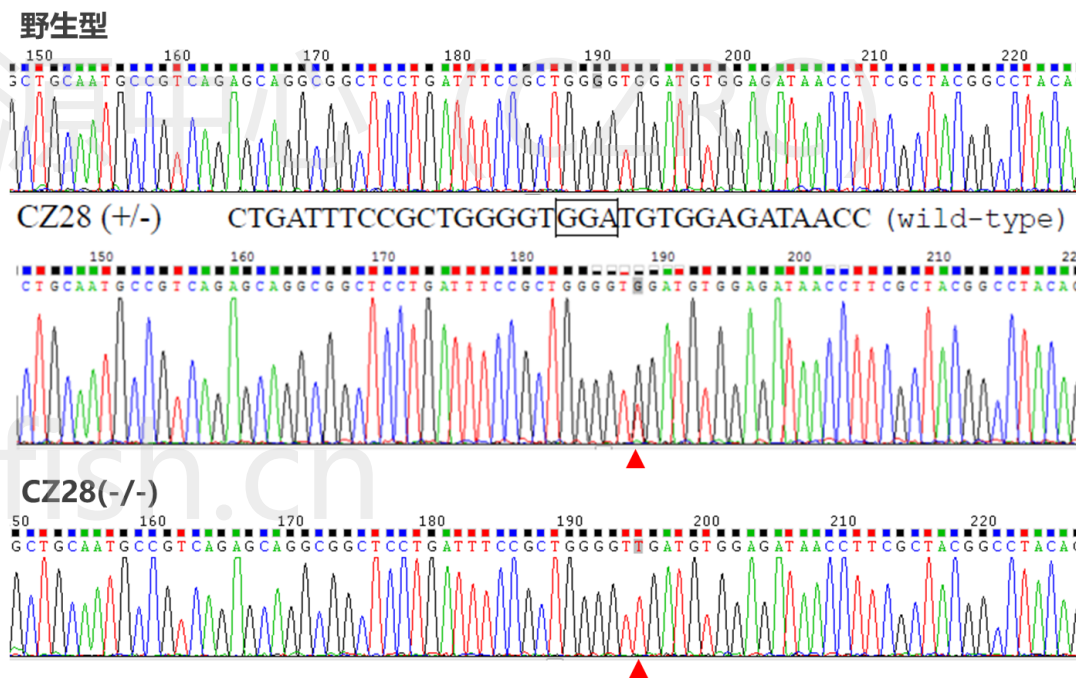
第三步，PCR扩增并测序，测序结果分析；克隆测序验证，以确定其基因型

突变类型：单碱基替换、碱基缺失、碱基插入、indel（同时包含碱基缺失和插入）等，相应的峰图会有所差异。

### ➤ 单碱基替换

单碱基替换的杂合子一般仅在碱基替换位点出现一个双峰，其他的序列峰图不受影响。

*wnt11<sup>tz216/+</sup>* (GGA->TGA, CZ28)



# 3、斑马鱼突变品系的常规鉴定方法

## 3.1 分子鉴定法

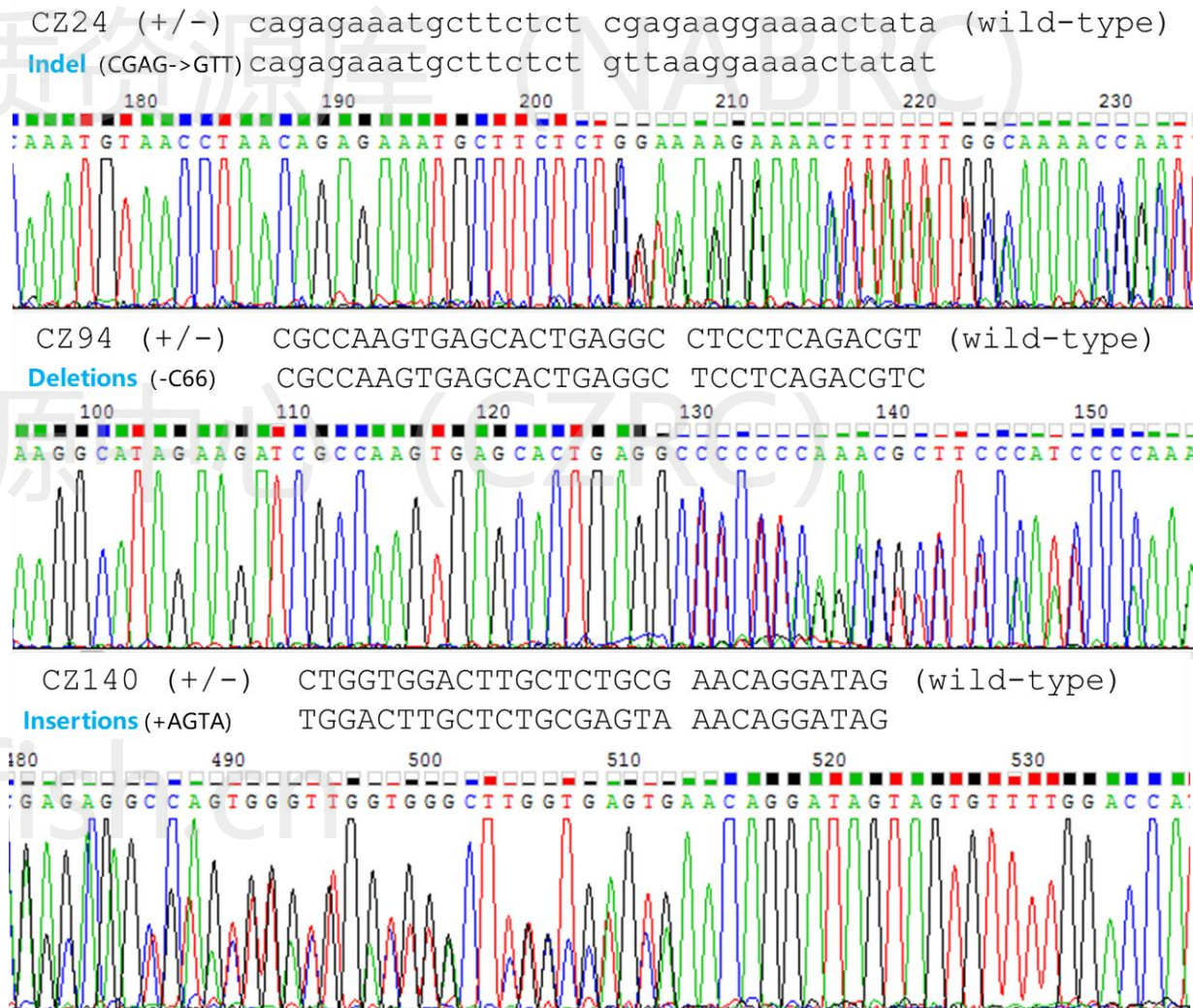
### ➤ 碱基缺失或插入

碱基缺失、碱基插入和indel这3种突变类型的杂合子都是在突变位点开始出现双峰；

**Indel** *lhx1a<sup>ihb25/+</sup>* (CGAG->GTT, CZ24)

**Deletions** *socs1a<sup>ihb33/+</sup>* (C66碱基缺失, CZ94)

**Insertions** *nirc5<sup>ihb51/+</sup>* (AGTA碱基插入, CZ140)



# 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诱变品系和基因捕获品系等  
这些品系一般是有特定表型的，可以根据表型特征进行鉴定。

casper (*mitfa*<sup>w2/w2</sup>; *roy*<sup>a9/a9</sup>, CZ73), *mitfa* (Q113X)

- 由于基因补偿效应等，斑马鱼中只有大约5-10%的基因突变会导致早期发育异常 (Kettleborough, Busch-Nentwich et al. 2013)。



(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)

*kdrl<sup>ihb123/+</sup>* (AGTG碱基缺失, CZ265)



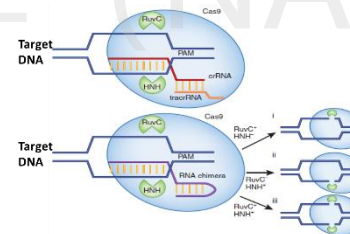
<http://www.zfish.cn/Products/ProductDetail.aspx?CZRCID=CZ265>

## 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)



ENU诱变技术  
插入突变技术  
基因编辑技术



CRISPR/Cas9 技术

国家斑马鱼资源中心 (CZRC)



ENU诱变品系  
TALEN突变品系  
Cas9敲除品系

突变位点已知

分子鉴定

斑马鱼成鱼剪尾鳍  
测序结果分析

自然突变品系  
ENU诱变品系  
基因捕获品系

表型分析

所有品系

分子表型分析

整体原位杂交

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)



国家斑马鱼资源中心  
CHINA ZEBRAFISH RESOURCE CENTER



中国斑马鱼信息中心