国家水生生物种质资源库（NABRC）

# 讲座一 斑马鱼基因突变技术概述

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

# 课程内容

国家斑马鱼资源中心 CHINA ZEBRAFISH RESOURCE CENTER http://zfish.cn

- 基因敲降技术（Gene knockdown ）
- DNA双链断裂修复（DSB Repair）
- 基因编辑技术（Gene Editing）

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

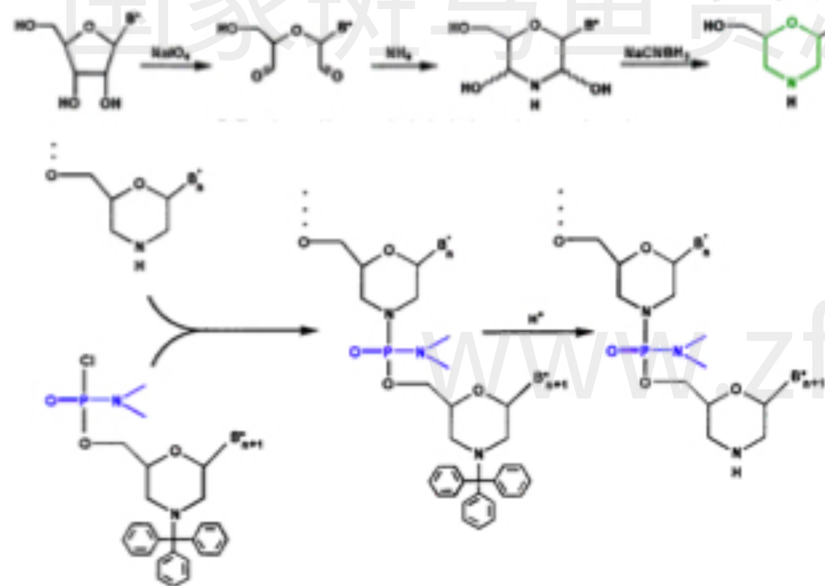
# 1、基因敲降技术

http://zfish.cn
CZRC
国家斑马鱼资源中心
CHINA ZEBRAFISH RESOURCE CENTER

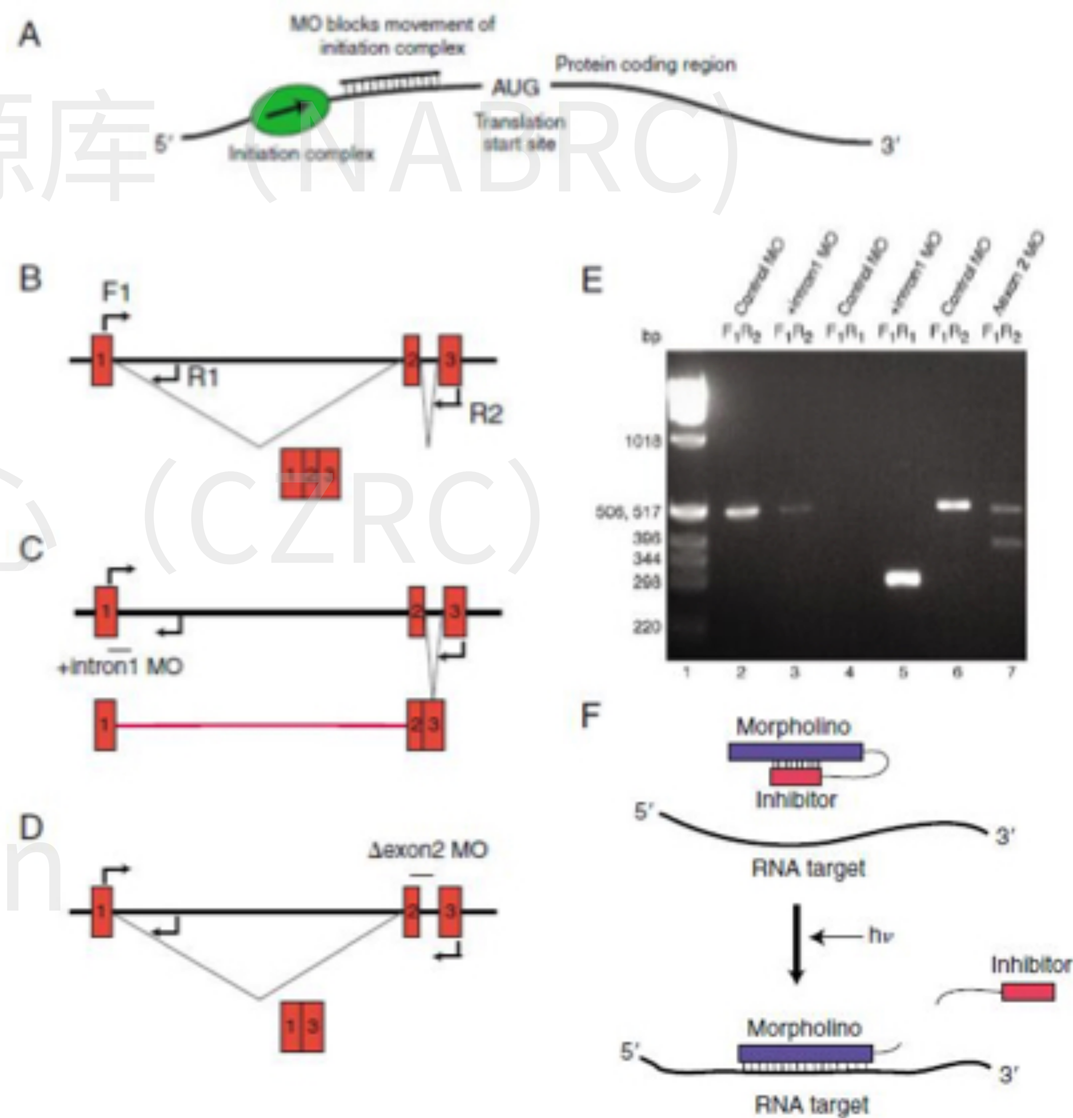
## 1.1 反义Morpholino技术：

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。

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



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.)*

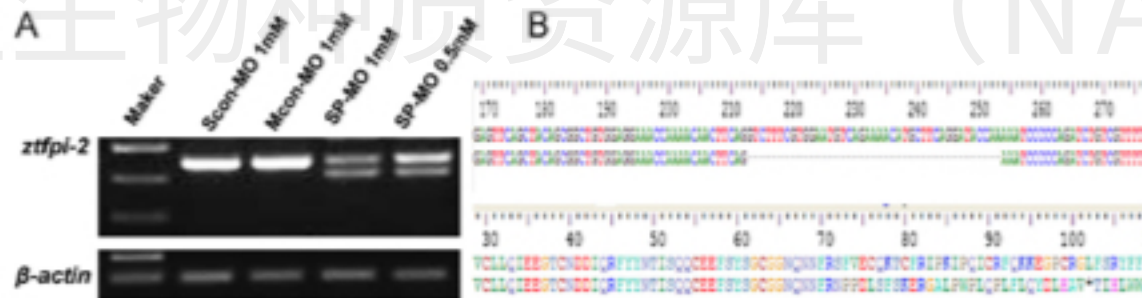
# 1、基因敲降技术

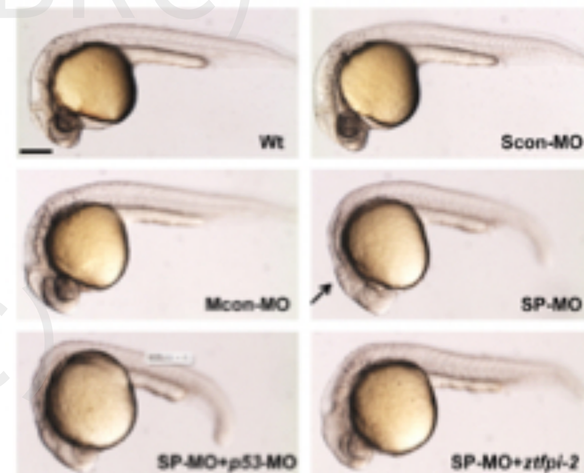
http://zfish.cn
CZRC
国家斑马鱼资源中心
CHINA ZEBRAFISH RESOURCE CENTER

## Morpholino技术在斑马鱼研究中的应用

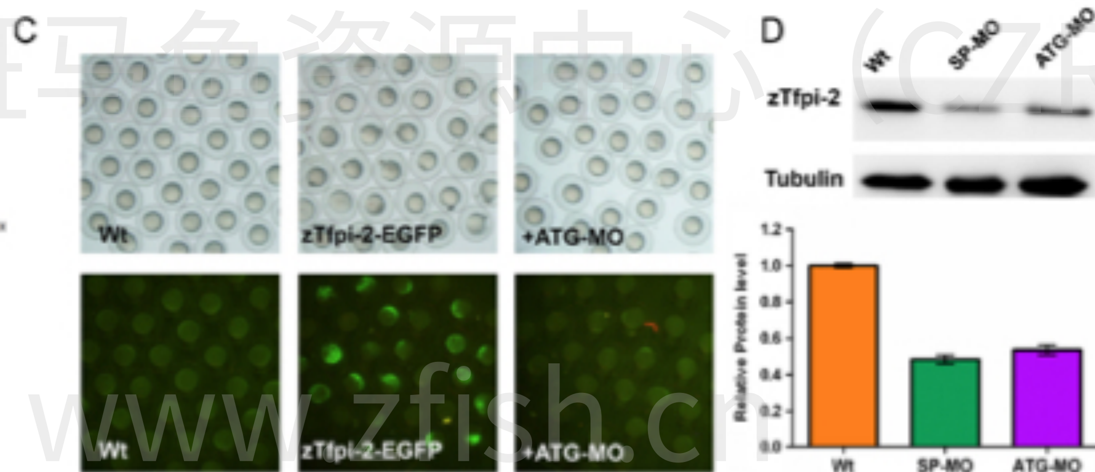
*ztfpi-2* (Tissue factor pathway inhibitor-2) gene
CNS development

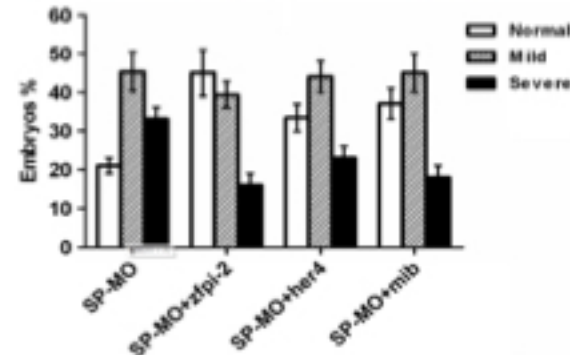
国家水生生物种质资源库（NABRC）




国家斑马鱼资源中心（CZRC）




www.zfish.cn

© 2001 Wiley-Liss, Inc. genesis 30:129–135 (2001)

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[a], Lina Wang[a], Wenhao Zhou[b], Huijun Wang[b], Jin Zhang[a], Shanshan Deng[a], Weihua Li[c], Huawei Li[a], Zuohua Mao[a], Duan Ma[a,b,*]

- ***ztfpi-2*** **knockdown by MOs**

http://zfish.cn
CZRC
国家斑马鱼资源中心
CHINA ZEBRAFISH RESOURCE CENTER

**1.2 RNAi技术：**

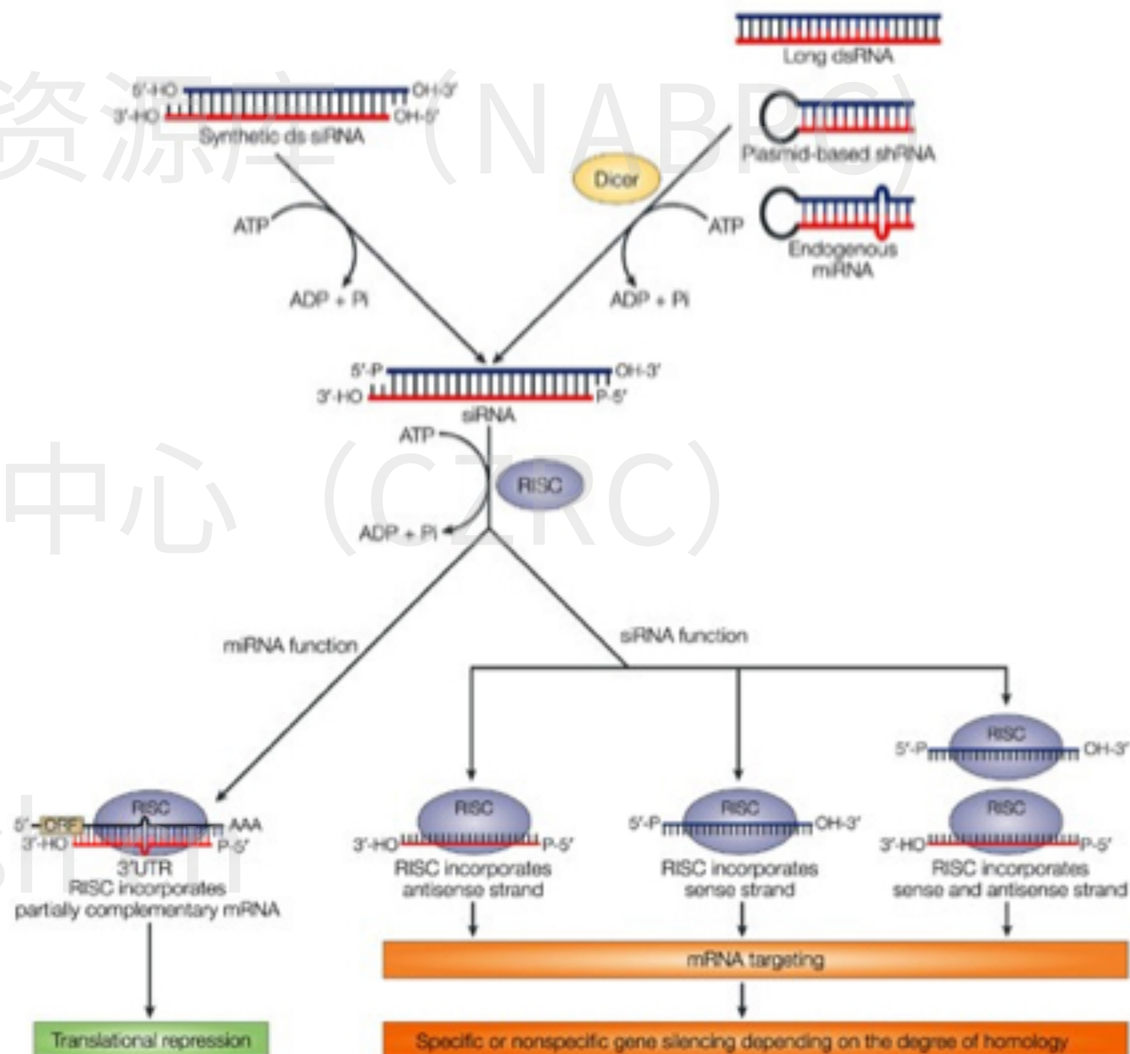
① 人工合成的双链RNA序列（dsRNA）或**siRNA表达质粒体外合成;**

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。

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




(Mittal V. Nat Rev Genet. 2004)

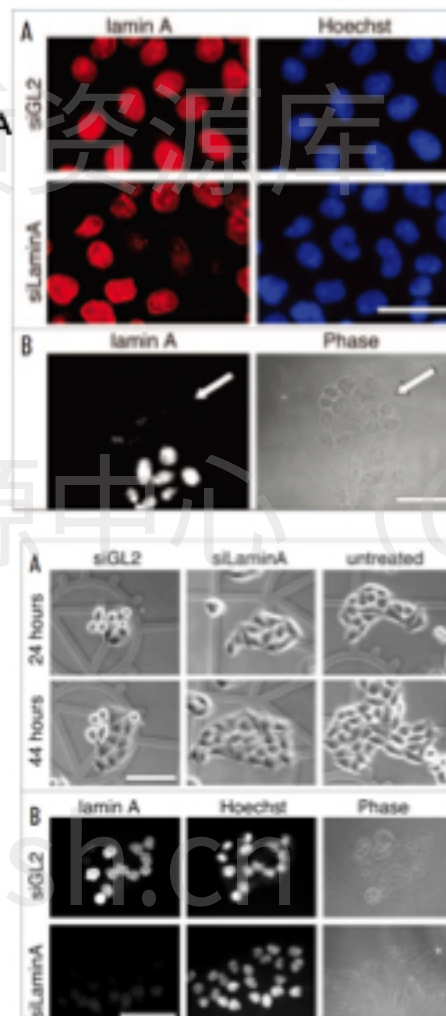
http://zfish.cn
CZRC
国家斑马鱼资源中心
CHINA ZEBRAFISH RESOURCE CENTER

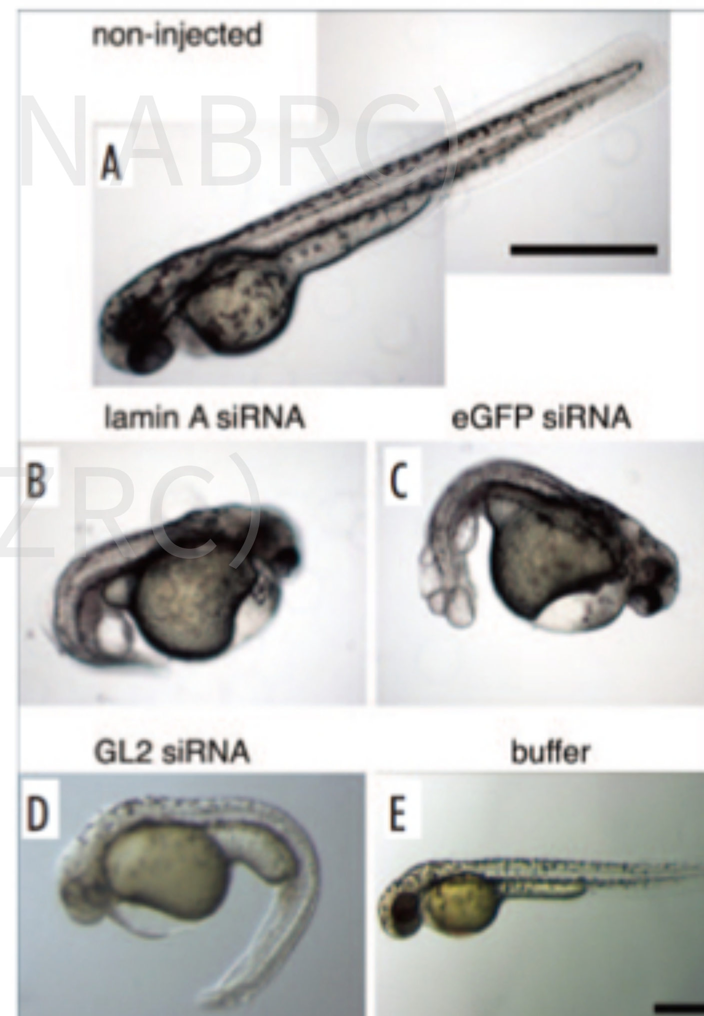
## RNAi技术在斑马鱼研究中的应用

- 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

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

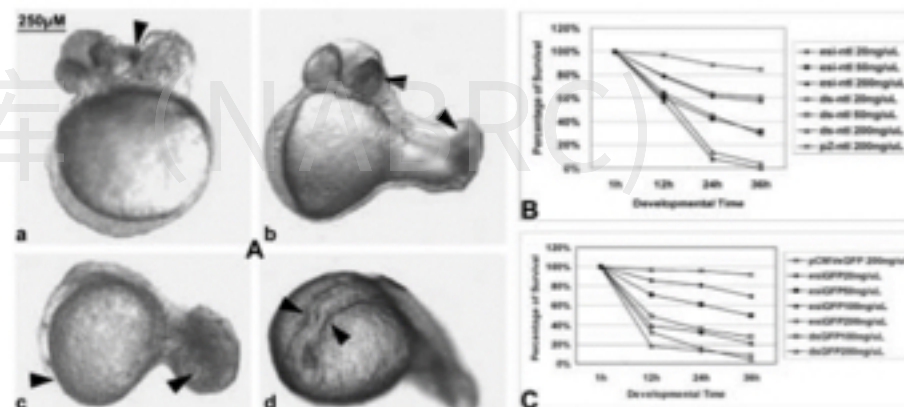
http://zfish.cn
CZRC
国家斑马鱼资源中心
CHINA ZEBRAFISH RESOURCE CENTER

## RNAi技术在斑马鱼研究中的应用

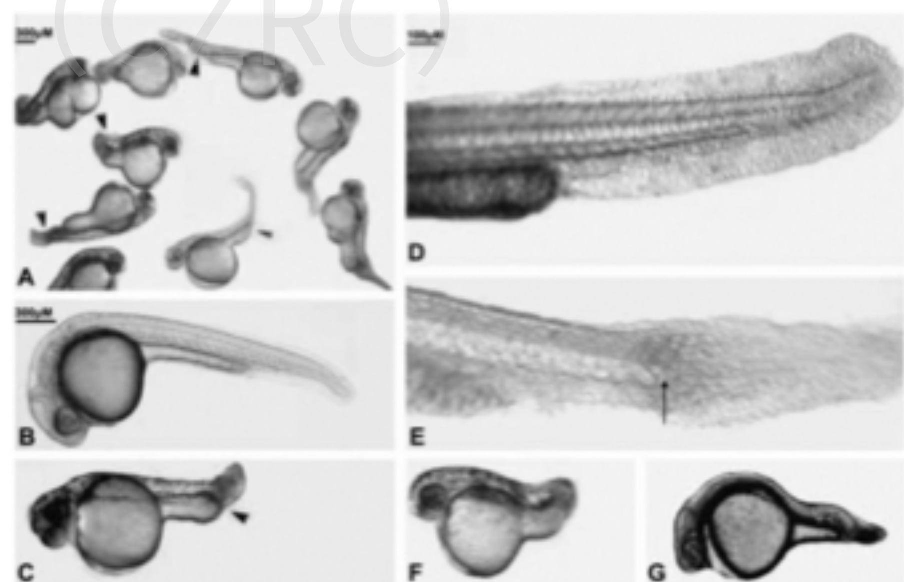
*esi-ntl*：dsDNA of *ntl* digested by RNaseIII, purified

*si-ntl*： produced by SP6 RNA polymerase

***esi-ntl*, 50ng/μl**



***si-ntl*, 4 μg/μL**



typical *ntl* mutant

国家水生生物种质资源库（NAPRC）
国家斑马鱼资源中心（CZRC）
www.zfish.cn

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

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

Wei-Yi Liu,[1,2] Yan Wang,[1] Yong-Hua Sun,[1,*] Yun Wang,[1,2] Ya-Ping Wang,[1] Shang-Ping Chen[1] and Zuo-Yan Zhu[1,*]

# 1、基因敲降技术

http://zfish.cn
CZRC
国家斑马鱼资源中心
CHINA ZEBRAFISH RESOURCE CENTER

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

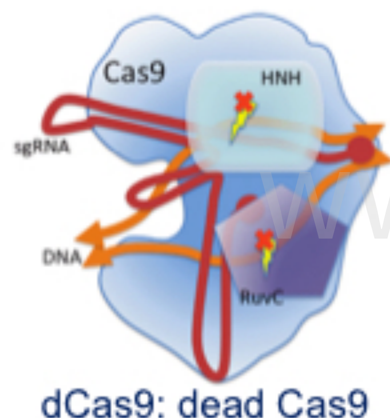
## 1.3 CRISPRi基因抑制技术：

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;

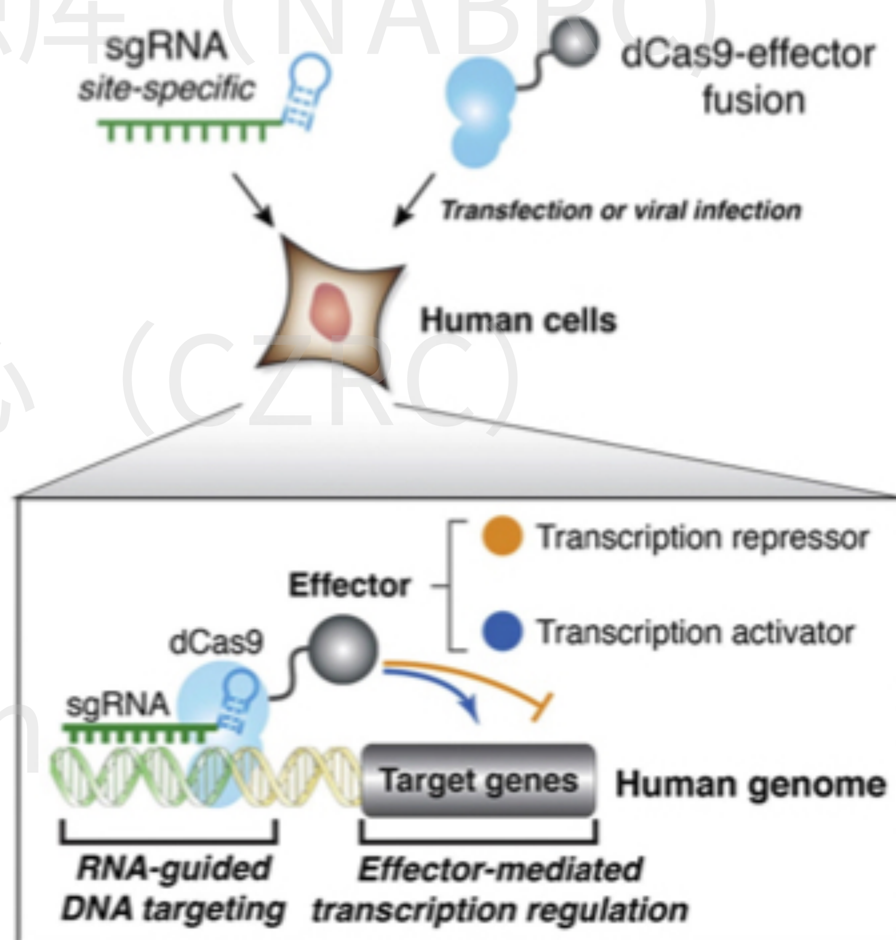
② 根据目标基因的转录起始位点的特征，设计 sgRNA 识别位点（不少于 4 个）；

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。




dCas9: dead Cas9




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

# 1、基因敲降技术

http://zfish.cn
CZRC
国家斑马鱼资源中心
CHINA ZEBRAFISH RESOURCE CENTER

| | 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）
国家斑马鱼资源中心（CZRC）
www.zfish.cn

# 课程内容

http://zfish.cn
CZRC
国家斑马鱼资源中心
CHINA ZEBRAFISH RESOURCE CENTER

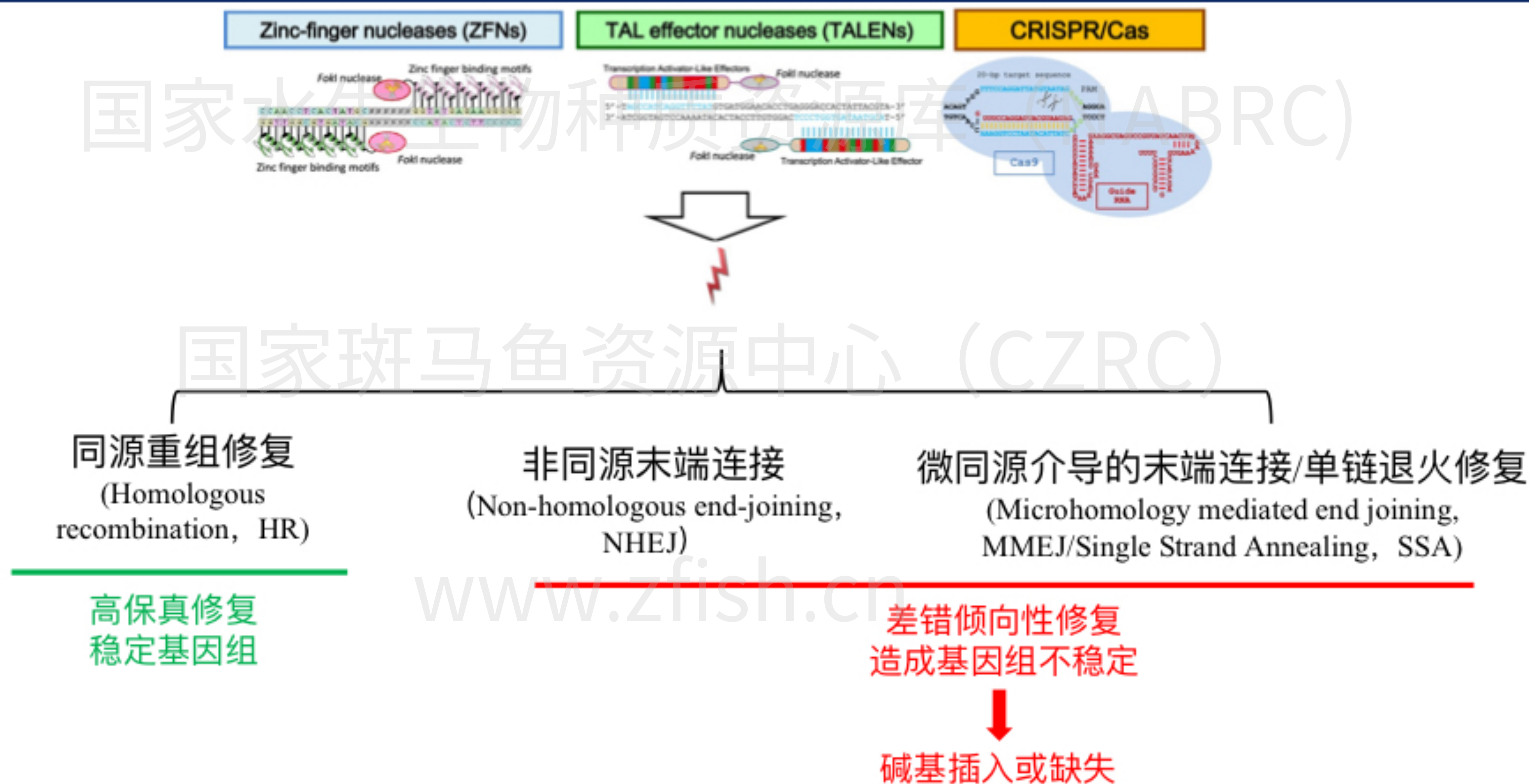
国家水生生物种质资源库（NABRC）

- 基因敲降技术（Gene knockdown）
- DNA双链断裂修复（DSB Repair）
- 基因编辑技术（Gene Editing）

国家斑马鱼资源中心（CZRC）
www.zfish.cn

# 2、DNA双链断裂修复

http://zfish.cn
CZRC
国家斑马鱼资源中心
CHINA ZEBRAFISH RESOURCE CENTER




国家斑马鱼资源中心（CZRC）
www.zfish.cn

# 2、DNA双链断裂修复

http://zfish.cn
CZRC
国家斑马鱼资源中心
CHINA ZEBRAFISH RESOURCE CENTER

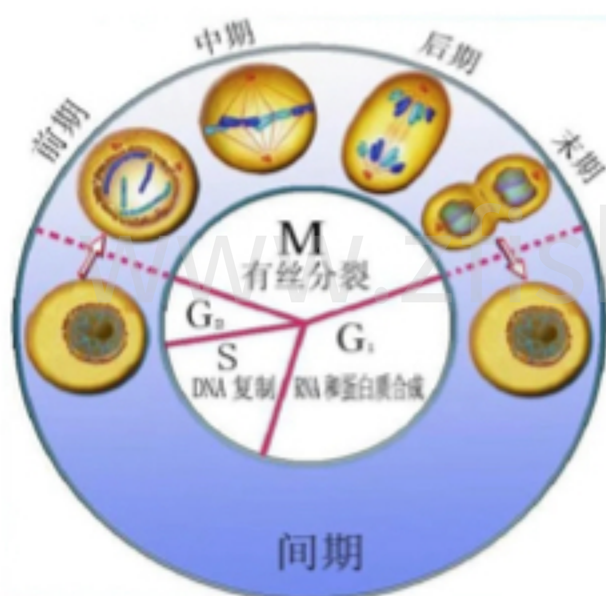
## 2.1 同源重组修复

同源重组修复（Homologous recombination，HR）是保护基因组完整性的重要机制。以姐妹染色单体为DNA 模板，是无错误修复机制。只发生在S 期和G2 期。

① DNA双连断裂处的识别和处理；

② RAD51-ssDNA的侵入；

③ DNA的修复。




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

http://zfish.cn
CZRC
国家斑马鱼资源中心
CHINA ZEBRAFISH RESOURCE CENTER

## 2.2 非同源末端连接

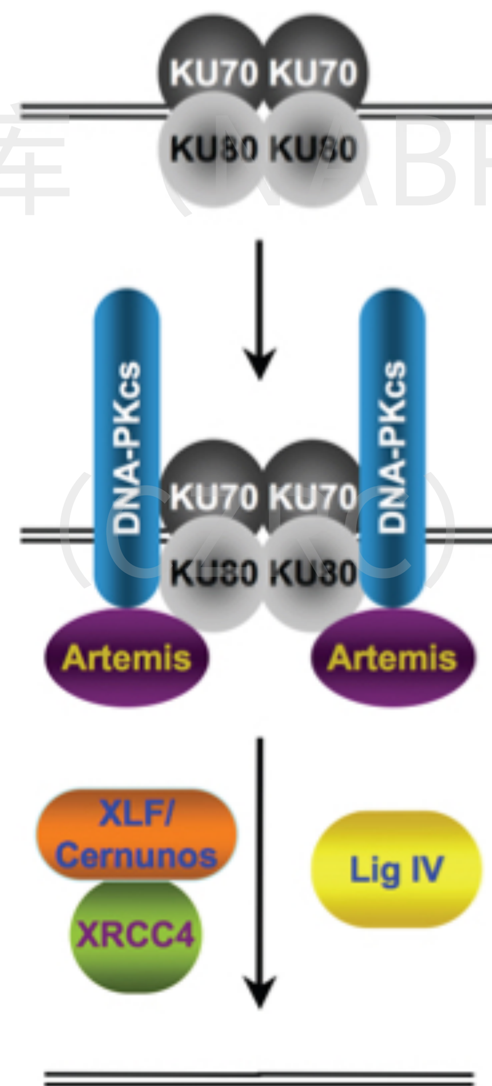
非同源末端连接（Non-homologous end-joining, NHEJ）依赖于Ku70–Ku80和DNA 连接酶 IV–XRCC4异源二聚体来修复DSB，在连接处随机引入小的突变序列。

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

① DNA双链断裂处的识别和结合；

② 断裂末端的加工处理；

③ DNA末端与连接，完成修复过程。




(Anastazja G., et al., *Am J Cancer Res* 2012)

http://zfish.cn
CZRC
国家斑马鱼资源中心
CHINA ZEBRAFISH RESOURCE CENTER

## 2.3 微同源介导的末端连接/单链退火修复

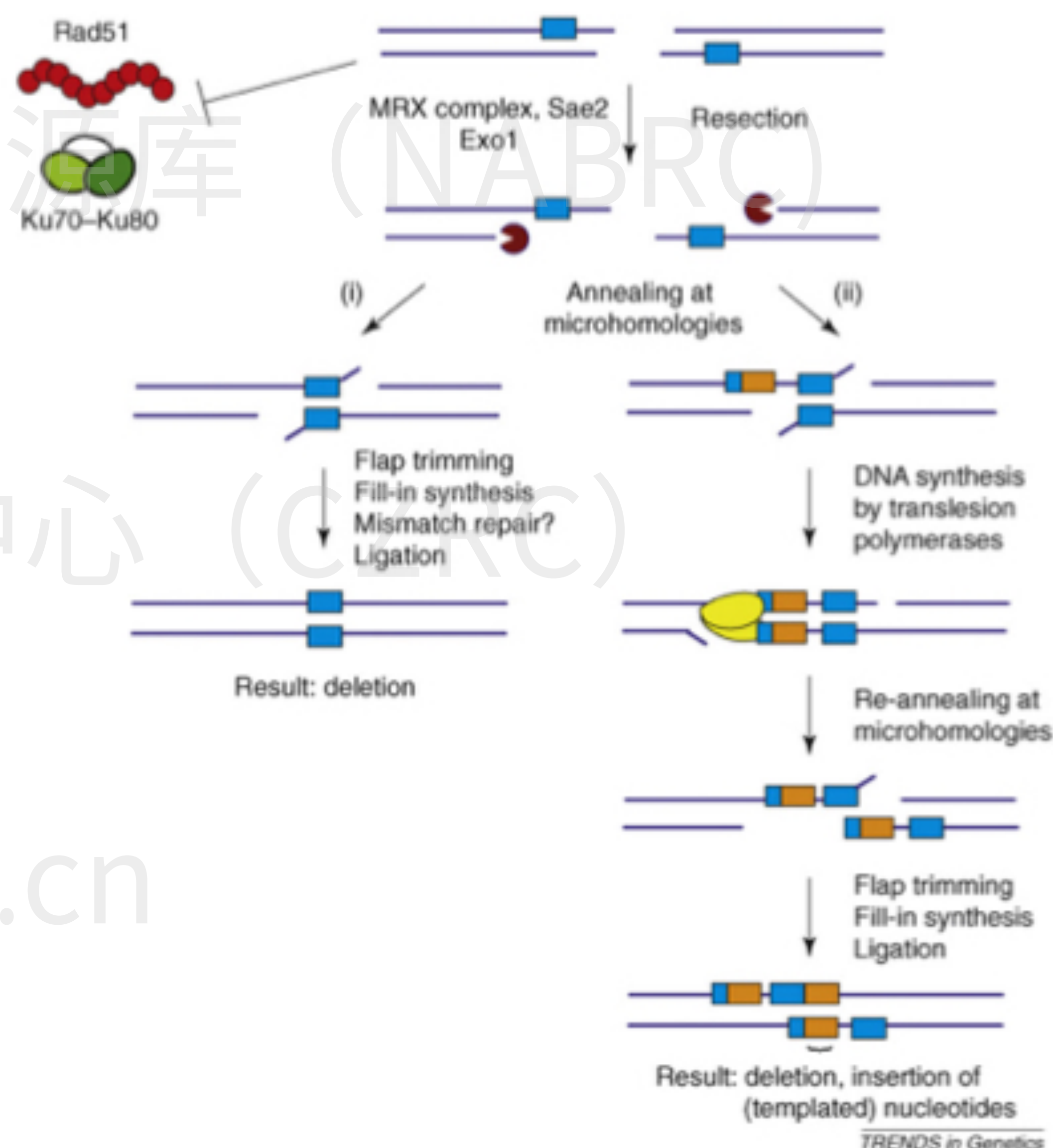
微同源介导的末端连接/单链退火修复

(Microhomology mediated end joining，MMEJ / Single Strand Annealing，SSA) 利用同向的同源序列（5–25 bp/MMEJ; >30bp/SSA）来介导末端连接的修复机制，差错倾向性修复过程。MMEJ修复是在G1 /早S期活跃。

① DNA双链断裂末端识别；

② 5‘末端处理；

③ 微同源序列相互退火，完成修复过程。




(McVey M, et al. Trends Genet. 2008.)

MEDJED (genesculpt.org)

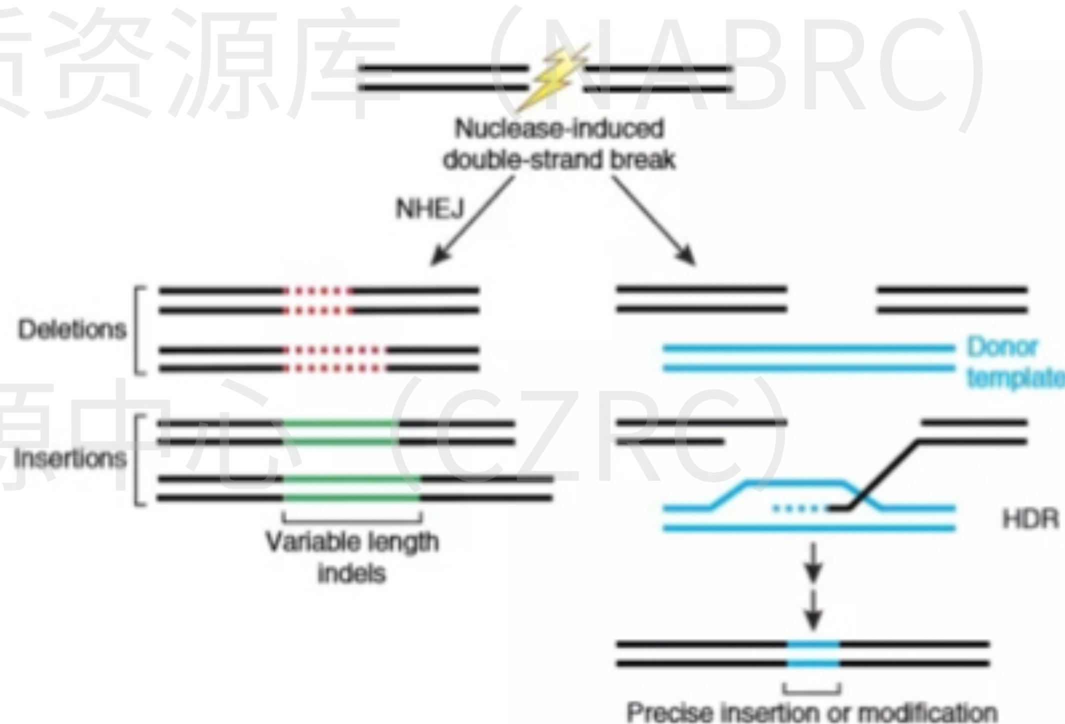
国家水生生物种质资源库（NABRC）
国家斑马鱼资源中心（CZRC）
www.zfish.cn

# 2、DNA双链断裂修复

http://zfish.cn
CZRC
国家斑马鱼资源中心
CHINA ZEBRAFISH RESOURCE CENTER

## 2.4 同源定向修复

同源定向修复（Homology directed repair，HDR）是细胞内一种修复DNA双链损伤的机制，当细胞核内存在与损伤DNA同源的DNA片段时，机体将以该同源DNA片段作为模板对DNA损伤进行修复。




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

# 课程内容

http://zfish.cn
CZRC
国家斑马鱼资源中心
CHINA ZEBRAFISH RESOURCE CENTER

国家水生生物种质资源库（NABRC）

- 基因敲降技术（Gene knockdown ）
- DNA双链断裂修复（DSB Repair）
- 基因编辑技术（Gene Editing）

国家斑马鱼资源中心（CZRC）
www.zfish.cn

# 3、基因编辑技术

http://zfish.cn
CZRC
国家斑马鱼资源中心
CHINA ZEBRAFISH RESOURCE CENTER

**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，以定点修饰改造特定基因，研究基因功能。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。

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

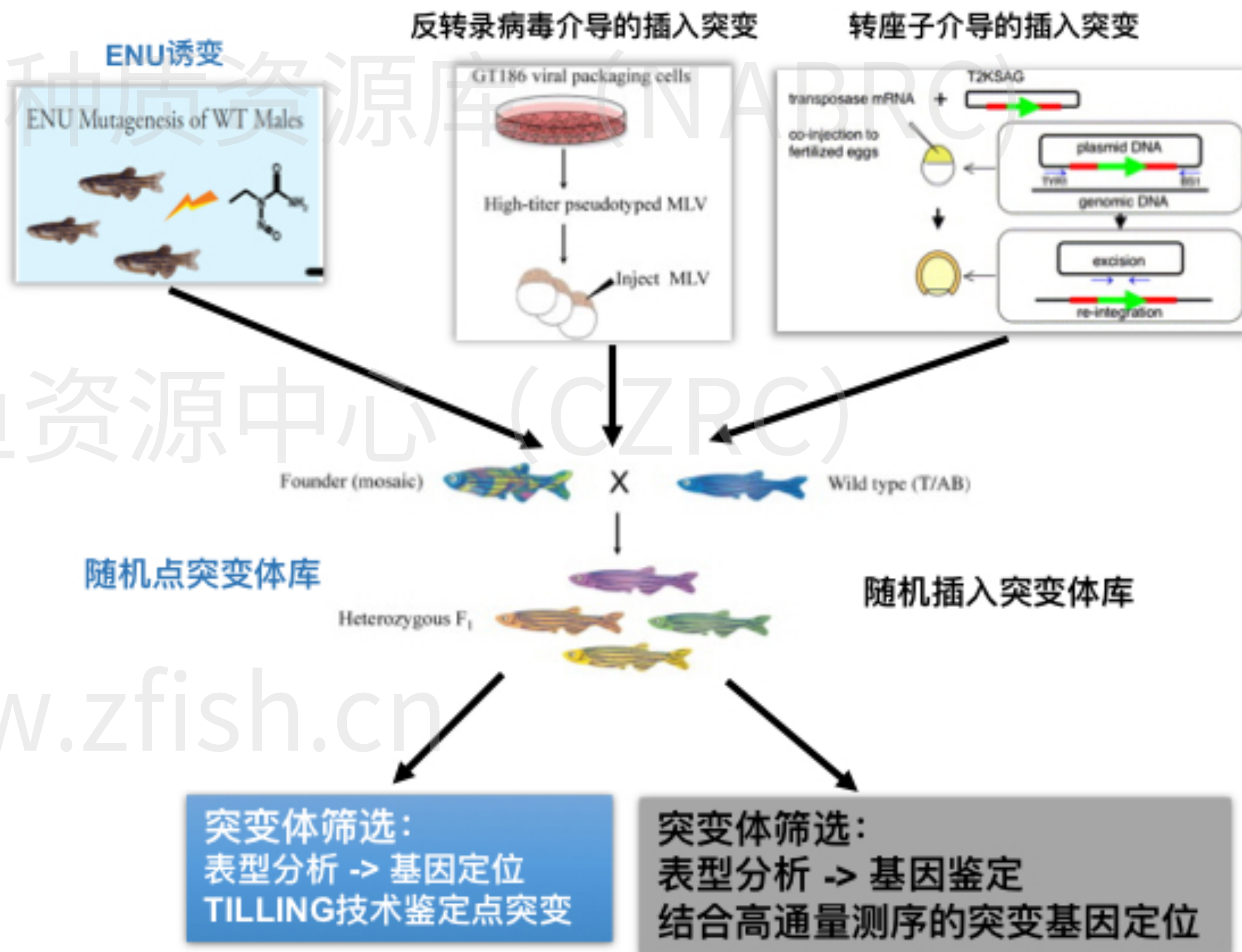
# 3、基因编辑技术

http://zfish.cn
CZRC
国家斑马鱼资源中心
CHINA ZEBRAFISH RESOURCE CENTER

## 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改变，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。




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

# 3、基因编辑技术

http://zfish.cn
CZRC
国家斑马鱼资源中心
CHINA ZEBRAFISH RESOURCE CENTER

## 斑马鱼大规模ENU诱变

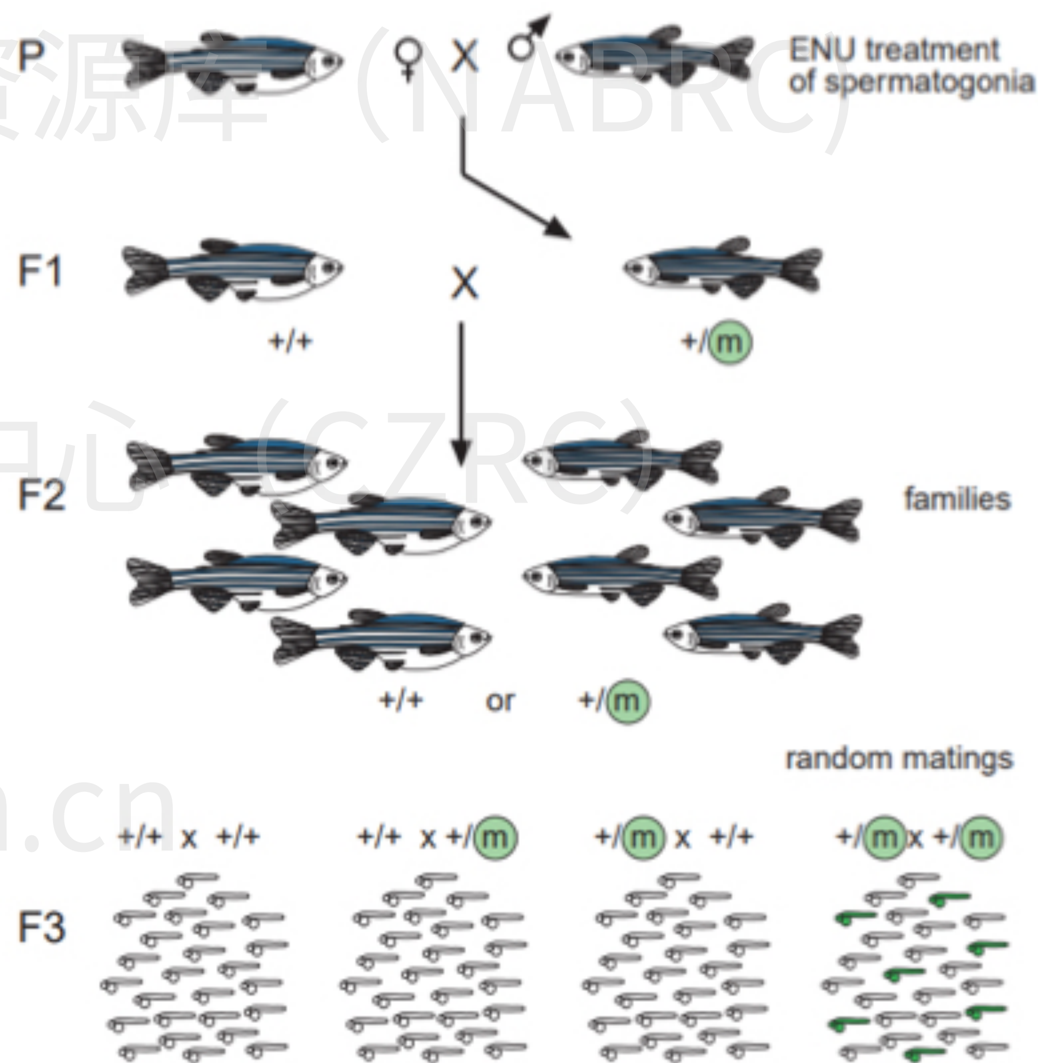
国家水生生物种质资源库（NABRC）

Development 123, 1-36
Printed in Great Britain © The Company of Biologists Limited 1996
DEV3343

**The identification of genes with unique and essential functions in the development of the zebrafish, *Danio rerio***

Pascal Haffter, Michael Granato‡, Michael Brand†, Mary C. Mullins‡, Matthias Hammerschmidt§, Donald A. Kane¶, Jörg Odenthal, Fredericus J. M. van Eeden, Yun-Jin Jiang, Carl-Philipp Heisenberg, Robert N. Kelsh¶, Makoto Furutani-Seiki, Elisabeth Vogelsang**, Dirk Beuchle††, Ursula Schach, Cosima Fabian and Christiane Nüsslein-Volhard*

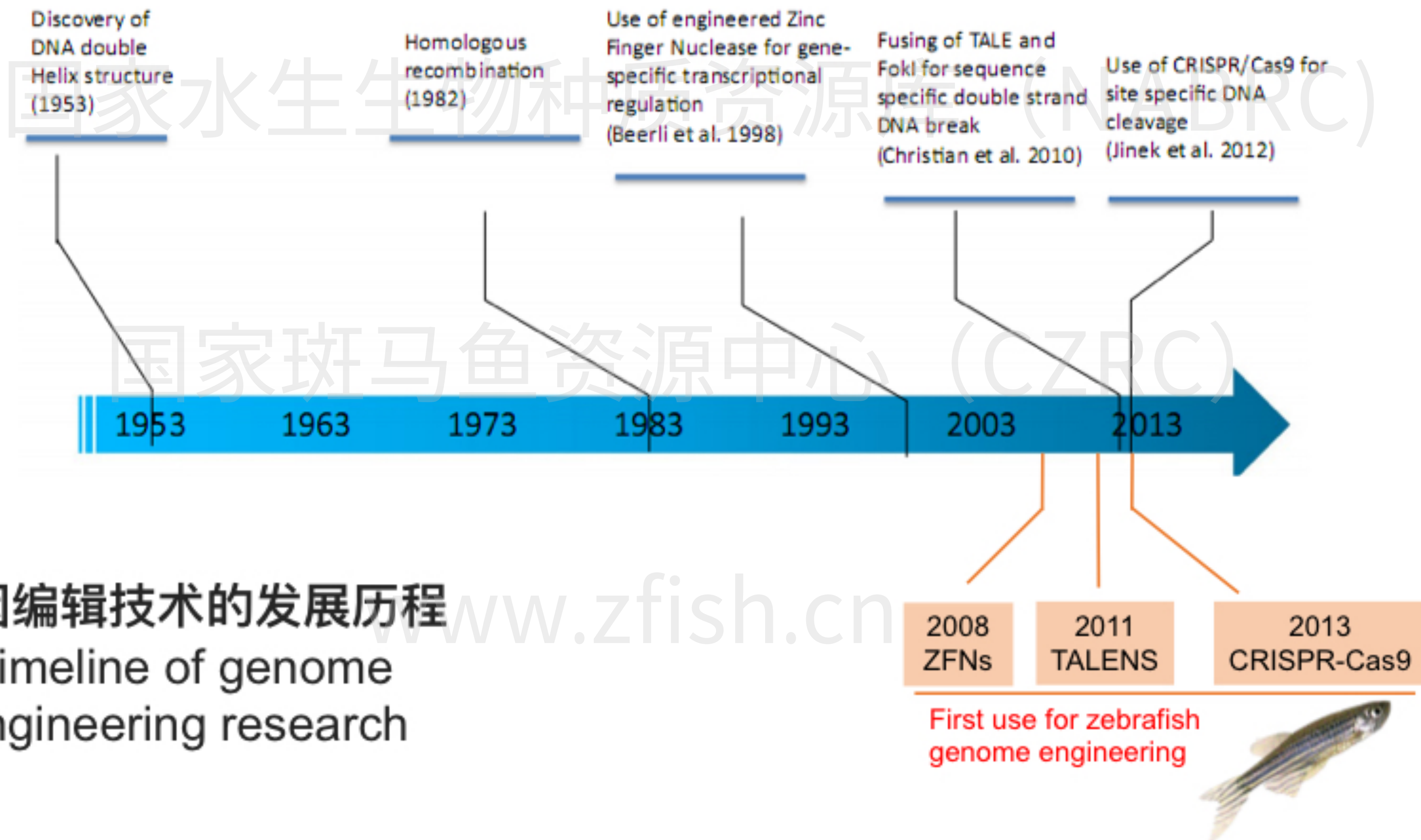
国家斑马鱼资源中心（CZRC）




www.zfish.cn

# 3、基因编辑技术






- 基因编辑技术的发展历程
  Timeline of genome engineering research

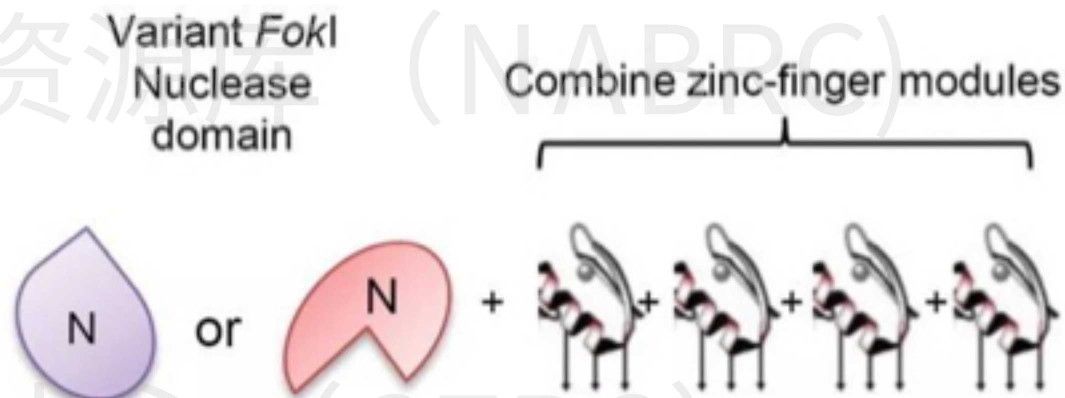
国家水生生物种质资源库（NABRC）
国家斑马鱼资源中心（CZRC）
www.zfish.cn

# 3、基因编辑技术

CZRC http://zfish.cn
国家斑马鱼资源中心
CHINA ZEBRAFISH RESOURCE CENTER

## 3.1 ZFNs技术

① ZFN=锌指DNA结合域 ZF+核酸内切酶 Fok I；




**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。

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

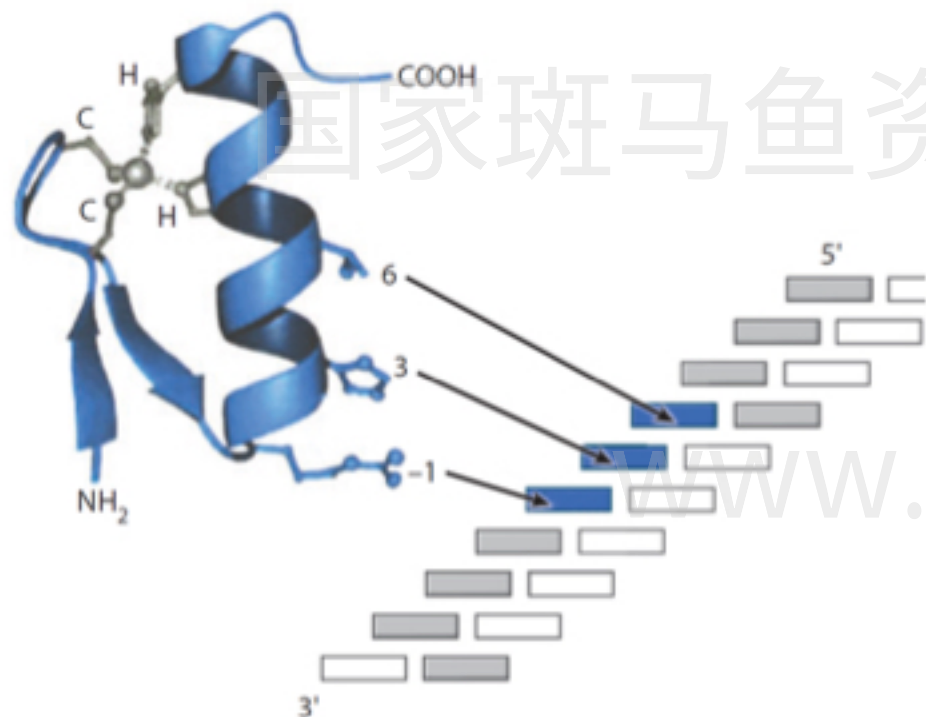
# 3、基因编辑技术

http://zfish.cn
CZRC
国家斑马鱼资源中心
CHINA ZEBRAFISH RESOURCE CENTER

## 3.1 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；




锌指蛋白负责DNA识别

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

# 3、基因编辑技术

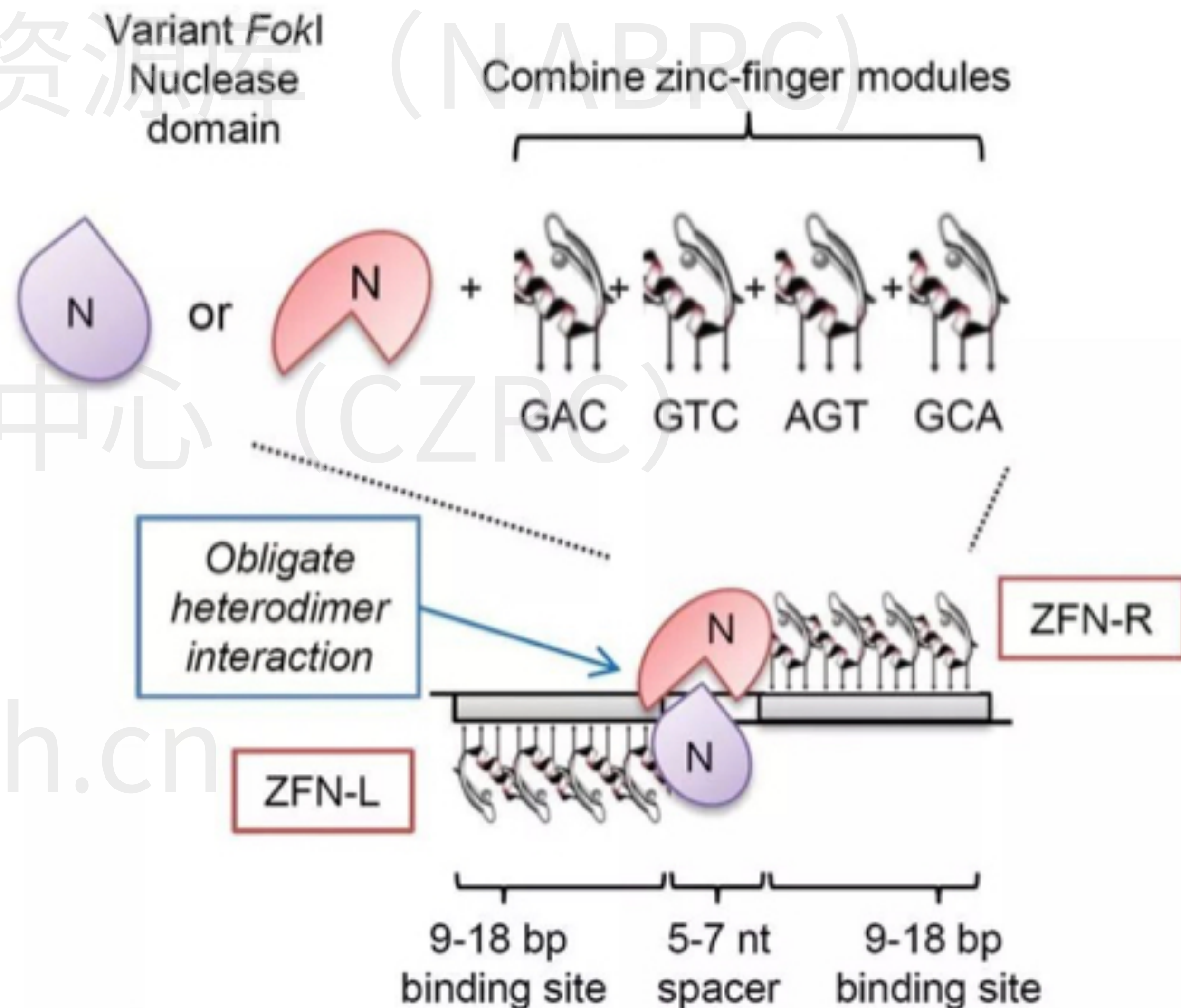
## 3.1 ZFNs技术

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

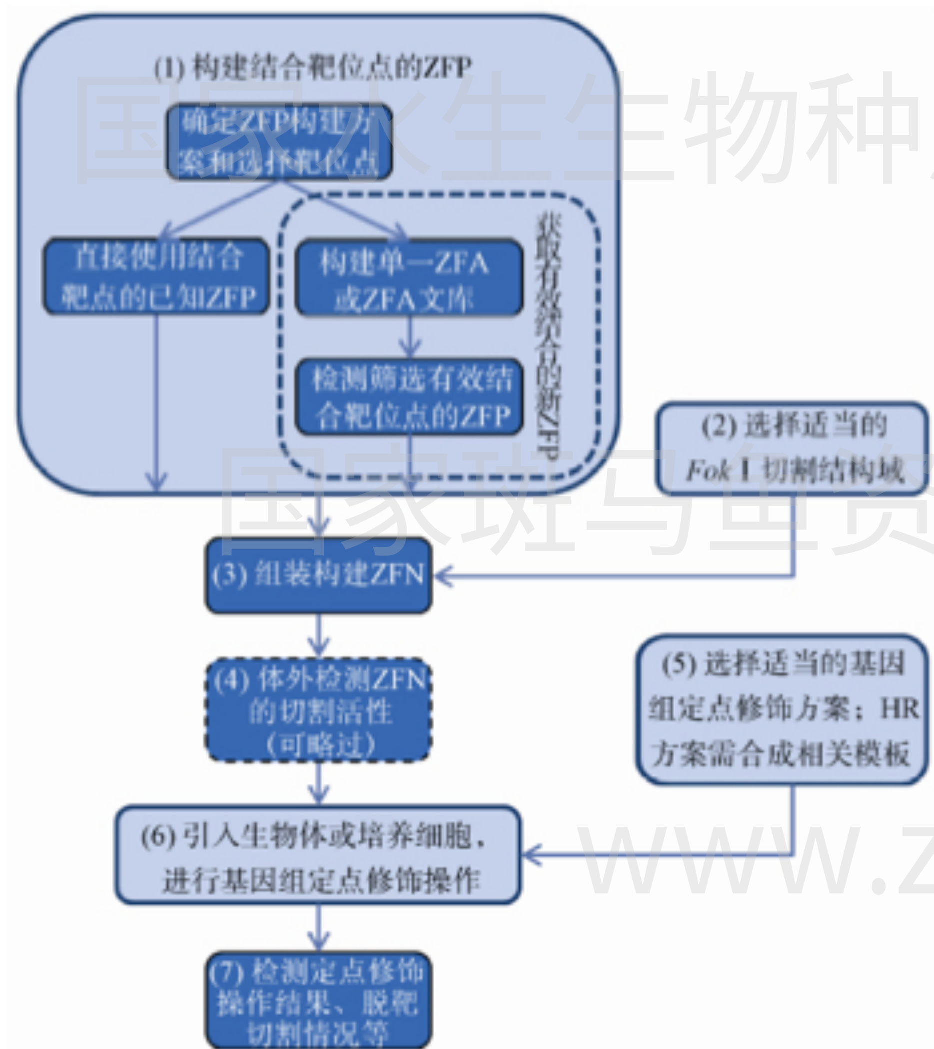



国家水生生物种质资源库（NABRC）
国家斑马鱼资源中心（CZRC）
www.zfish.cn
CZRC 国家斑马鱼资源中心 CHINA ZEBRAFISH RESOURCE CENTER http://zfish.cn

# 3、基因编辑技术

CZRC 国家斑马鱼资源中心 CHINA ZEBRAFISH RESOURCE CENTER http://zfish.cn

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




- ZFNs实验构建流程 *（肖安等，遗传，2011）*

**ZFN设计相关网站**

ZifBase, http://web.iitd.ac.in/~sundar/zifbase

ZiFiT, http://zifit.partners.org/ZiFiT

http://mccb.umassmed.edu/ZFPsearch.html

http://www.addgene.org/zfc

ZiFDB, http://bindr.gdcb.iastate.edu:8080/ZiFDB

# 3、基因编辑技术

http://zfish.cn
CZRC
国家斑马鱼资源中心
CHINA ZEBRAFISH RESOURCE CENTER

## 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，对斑马鱼基因组进行精确的位点特异性编辑。

国家水生生物种质资源库（NABRC）

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

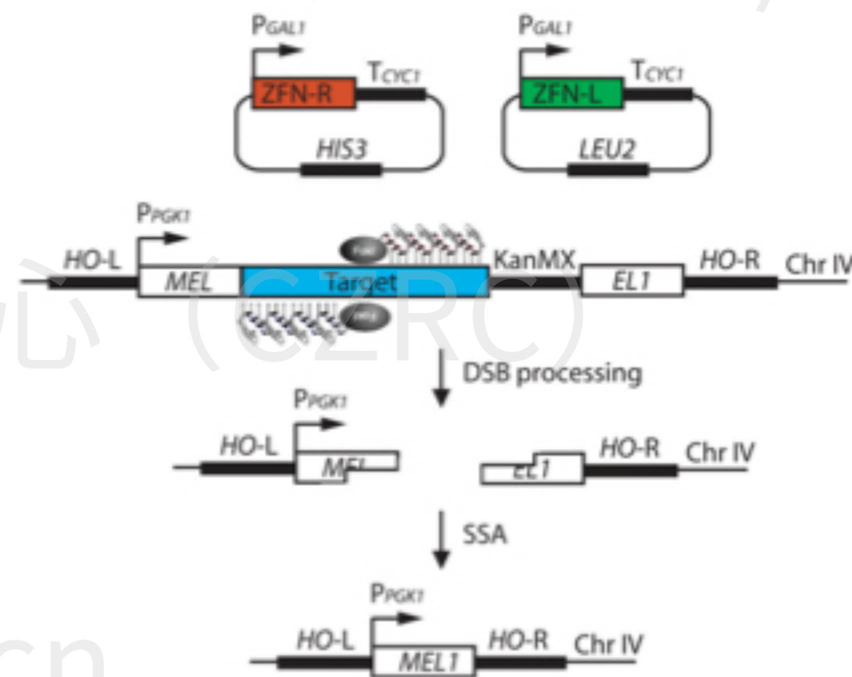
国家斑马鱼资源中心（CZRC）

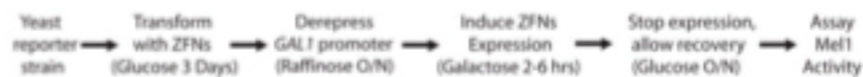
Nat Biotechnol. 2008 June ; 26(6): 695–701.

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

Xiangdong Meng[1,4], Marcus B. Noyes[1,2], Lihua (Julie) Zhu[1], Nathan D. Lawson[1,3], and Scot A. Wolfe[1,2]

www.zfish.cn




- Yeast-based system of identification of maximally active ZFNs

# 3、基因编辑技术

http://zfish.cn
CZRC
国家斑马鱼资源中心
CHINA ZEBRAFISH RESOURCE CENTER

## 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，对斑马鱼基因组进行精确的位点特异性编辑。

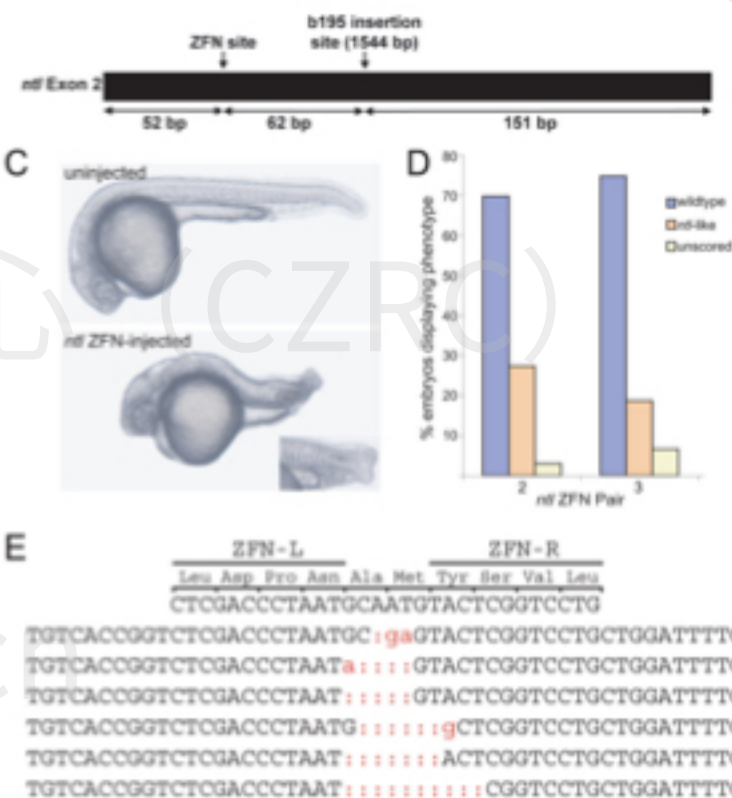
国家水生生物种质资源库（NABRC）

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

国家斑马鱼资源中心（CZRC）
www.zfish.cn



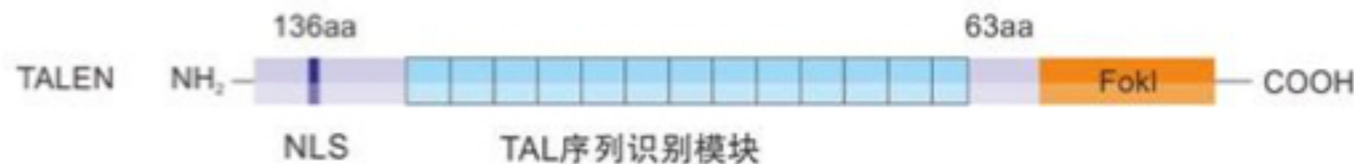

- Injection of no tail ZFN-encoding mRNA into zebrafish embryos induces targeted lossof-function mutations in somatic cells

CZRC http://zfish.cn
国家斑马鱼资源中心
CHINA ZEBRAFISH RESOURCE CENTER

## 3.2 TALENs技术

① TALEN=TALE+核酸内切酶Fok I；

国家水生生物种质资源库（NABRC）




**TALEN**（transcription activator-like effector nuclease）是一类人工合成的限制性内切酶，由可编码的串联TALE蛋白域与核酸内切酶的DNA切割域（DNA cleavage domain）融合而成。

国家斑马鱼资源中心（CZRC）
www.zfish.cn

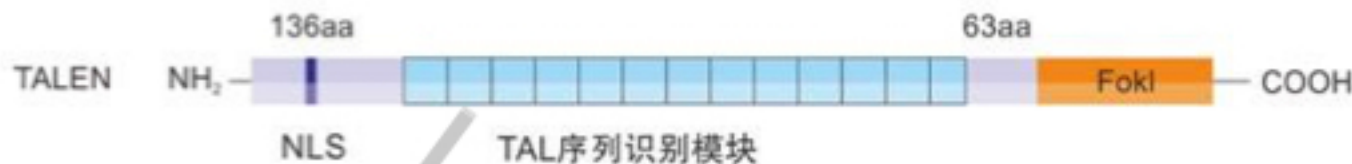
http://zfish.cn
CZRC
国家斑马鱼资源中心
CHINA ZEBRAFISH RESOURCE CENTER

## 3.2 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；

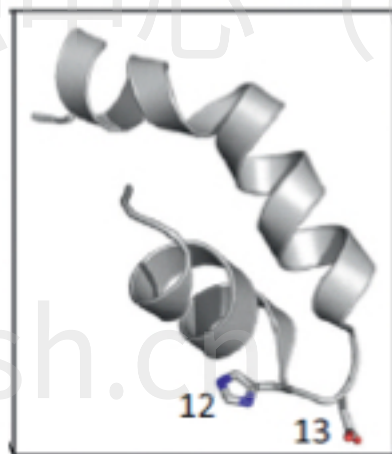
国家水生生物种质资源库（NABRC)




国家斑马鱼资源中心（CZRC)

**TALE**（transcription activator-like effector）

AvrBs3蛋白 (*Xanthomonas*，黄单胞菌），含17.5个由34个氨基酸组成的重复模块




**TAL蛋白**

www.zfish.cn

氨基酸残基与碱基的对应关系：

NG -> T

HD -> C

NI -> A

NN -> G （> (NK->G))

# 3、基因编辑技术

http://zfish.cn
CZRC
国家斑马鱼资源中心
CHINA ZEBRAFISH RESOURCE CENTER

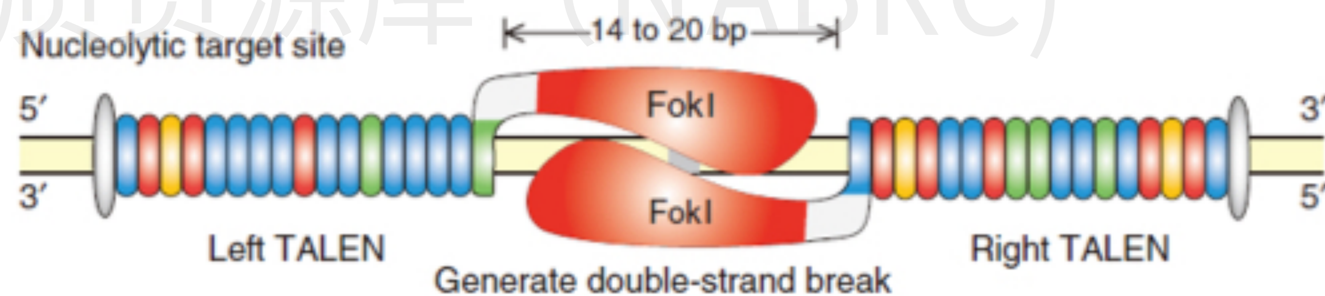
## 3.2 TALENs技术

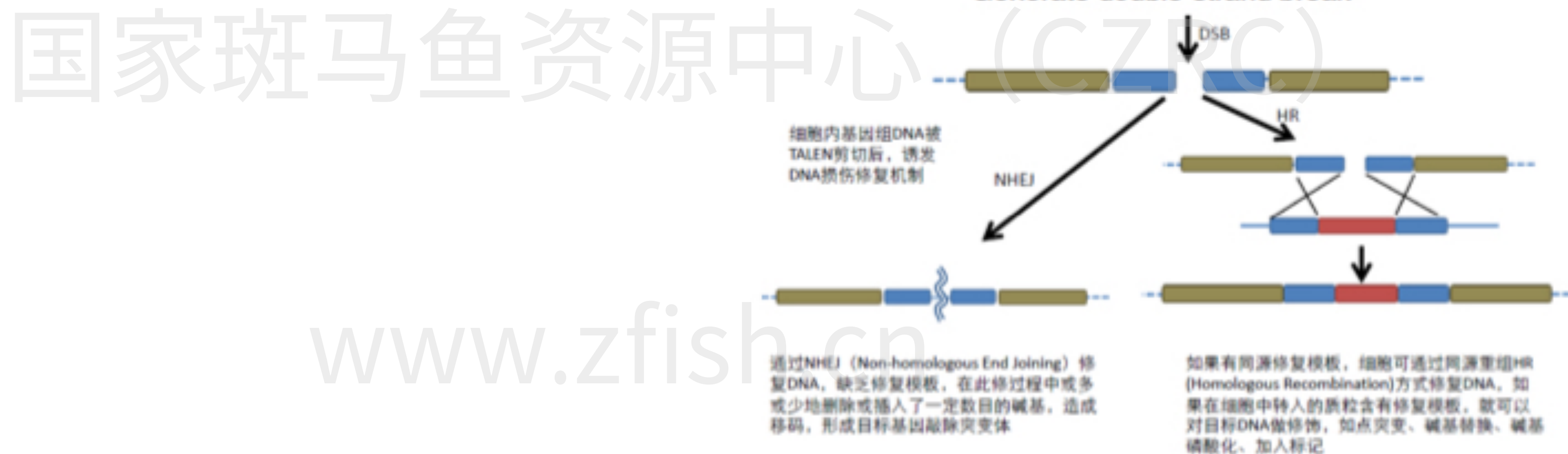
① TALEN=TALE+核酸内切酶Fok I；

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。

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



http://zfish.cn
CZRC
国家斑马鱼资源中心
CHINA ZEBRAFISH RESOURCE CENTER

## 3.2 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。

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

氨基酸残基与碱基的对应关系：

NG -> T

HD -> C

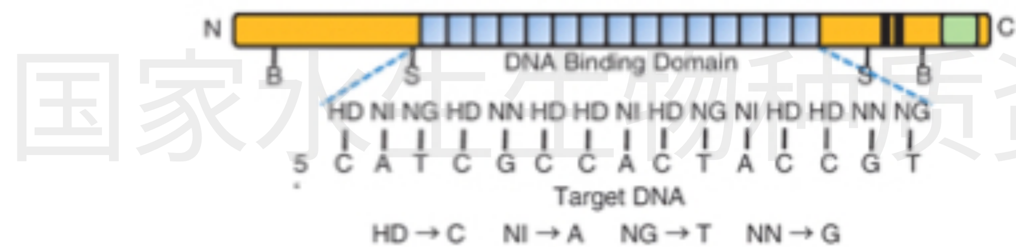
NI -> A

NN (>NK) -> G

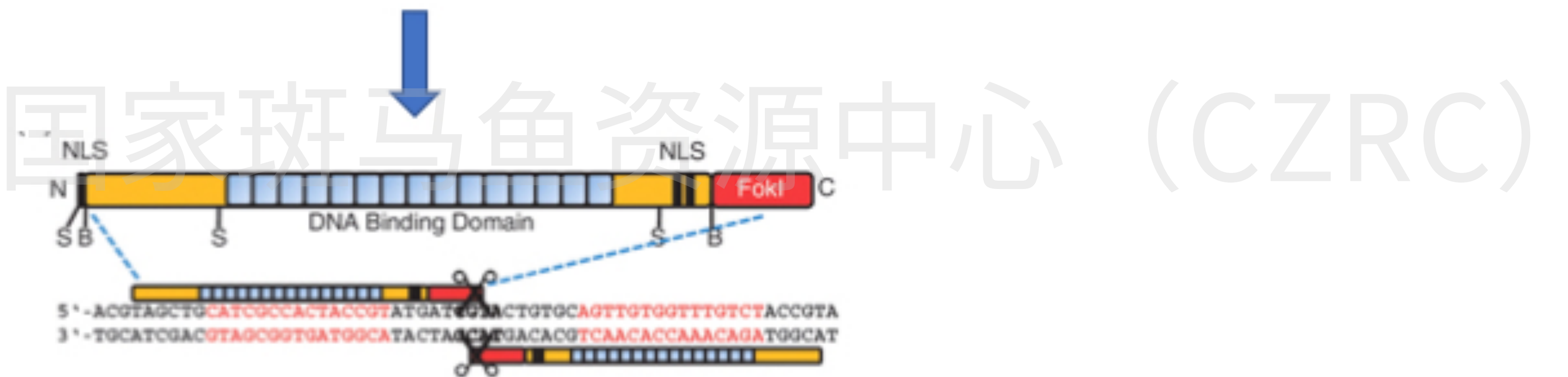
• Construction of TALE repeats *(Huang P et al, Nat Biotechnol. 2011)*

# 3、基因编辑技术

CZRC http://zfish.cn 国家斑马鱼资源中心 CHINA ZEBRAFISH RESOURCE CENTER




- TALENs靶点识别模块构建




- TALENs表达质粒的构建

合成TALEN mRNA，注射到斑马鱼胚胎中，获取阳性F0代

突变体筛选：历经2代，酶切检测法/PCR测序

- 基于TALENs技术的基因敲除品系构建流程

国家水生生物种质资源库（NAPRC）
国家斑马鱼资源中心（CZRC）
www.zfish.cn

# 3、基因编辑技术

CZRC 国家斑马鱼资源中心 CHINA ZEBRAFISH RESOURCE CENTER http://zfish.cn

## 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，对斑马鱼基因组进行精确的基因编辑。

国家水生生物种质资源库（NABRC）

**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

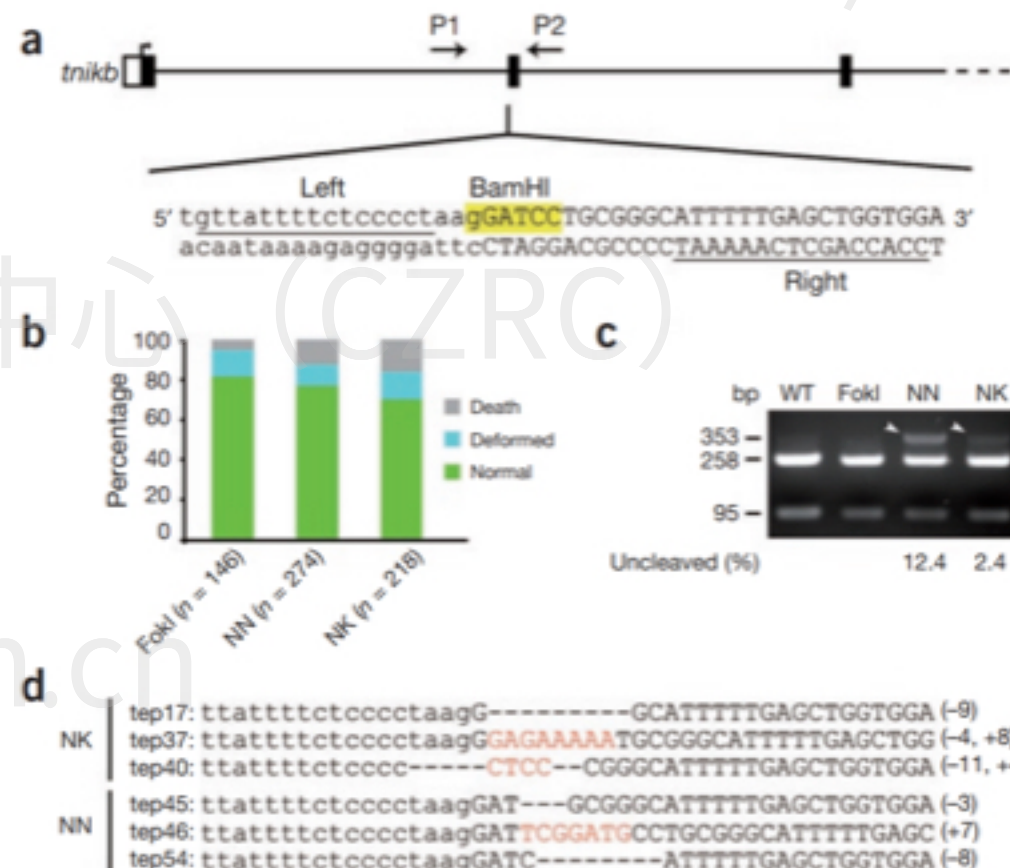
国家斑马鱼资源中心（CZRC）

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

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

Jeffry D. Sander[1,2,*], Lindsay Cade[3,*], Cyd Khayter[1,2], Deepak Reyon[4], Randall T. Peterson[3,5], J. Keith Joung[1,2,#], and Jing-Ruey J. Yeh[3,#]

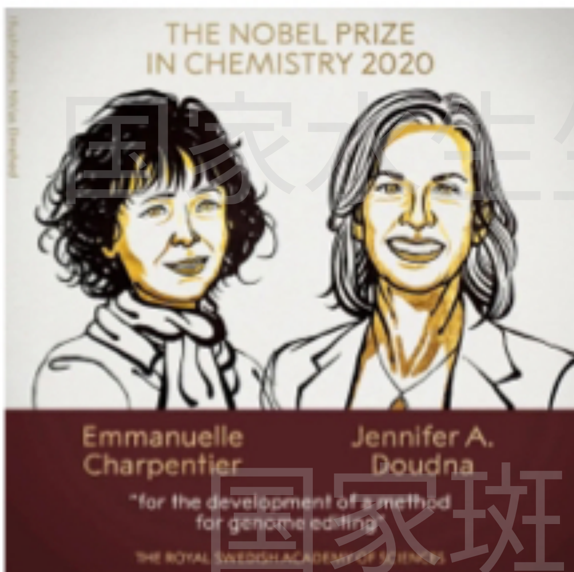
www.zfish.cn



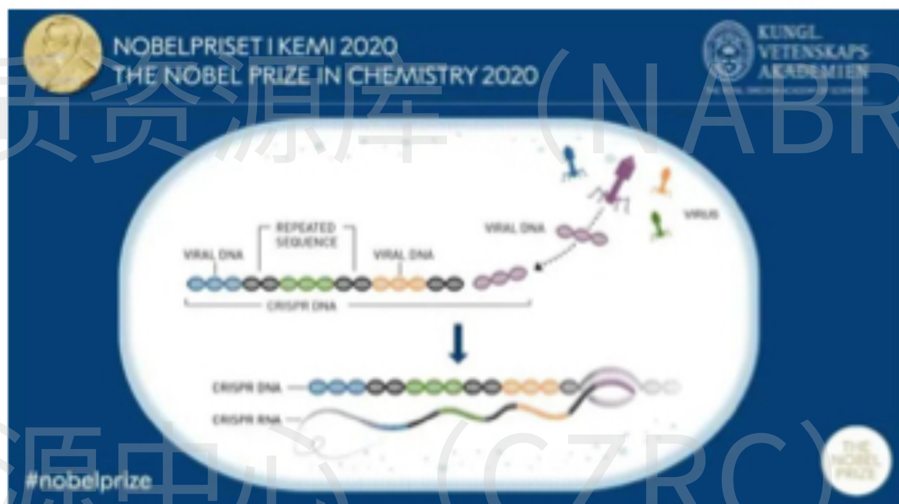

- **Targeted and heritable disruption of the *tnikb* gene in zebrafish using TALENs.** *(Huang P et al, Nat Biotechnol. 2011)*

# 3、基因编辑技术

http://zfish.cn
CZRC
国家斑马鱼资源中心
CHINA ZEBRAFISH RESOURCE CENTER




2020年诺贝尔化学奖




CRISPR/Cas 系统

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

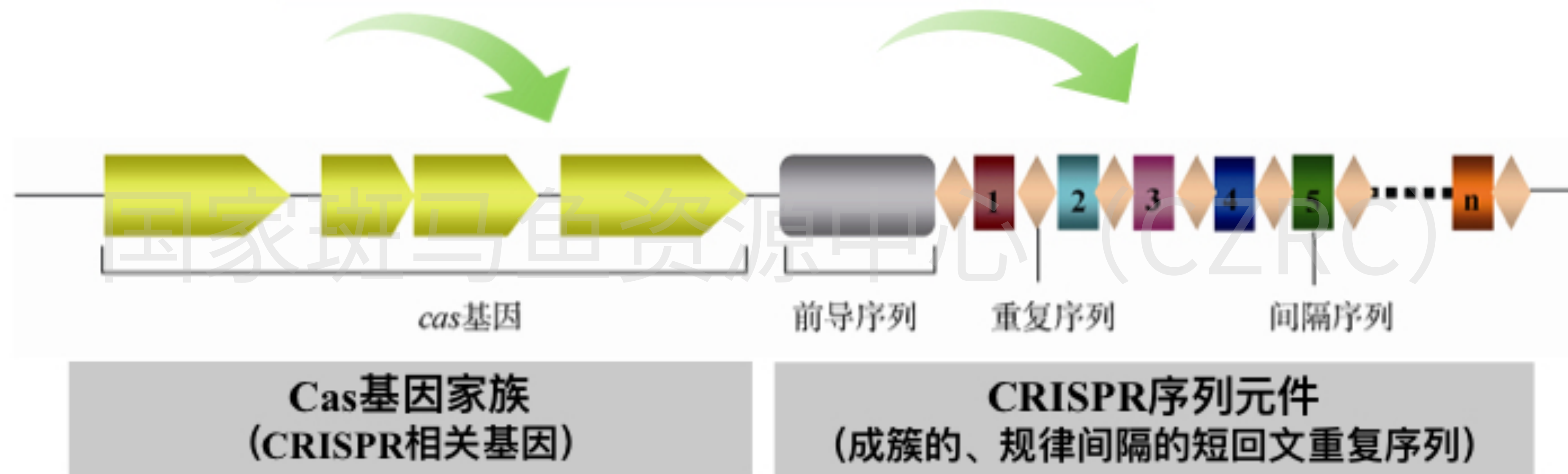
- 1987年，第一次发现CRISPR
- 2002年，统一命名为CRISPR-Cas
- 2005-2006年，证实CRISPR中含有病毒序列
- 2007年，证明CRISPR-Cas为细菌适应性免疫系统
- 2008-2010年，证明二型CRISPR-Cas切割DNA
- 2011年，发现tracr RNA, cas9是二型CRISPR-Cas所需唯一基因
- **2012年，CRISPR/Cas9编辑技术诞生**

# 3、基因编辑技术

CZRC 国家斑马鱼资源中心 CHINA ZEBRAFISH RESOURCE CENTER http://zfish.cn

## 细菌获得性免疫：CRISPR-Cas system

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

**CRISPR** (clustered, regularly interspaced, short palindromic repeats，成簇的规律间隔的短回文重复序列)：

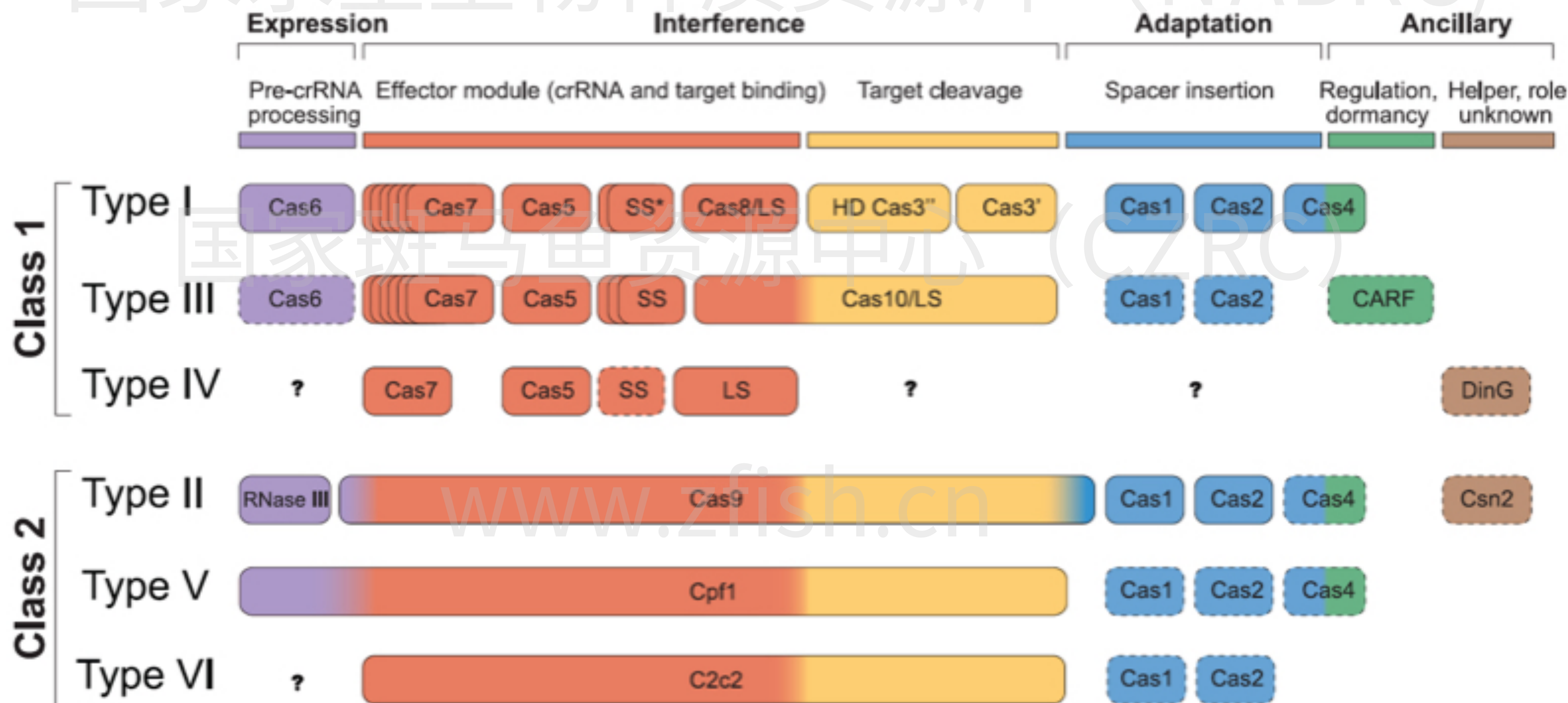
**Cas基因** (CRISPR-associated protein)：位于CRISPR位点附近，是一个较大的多态性家族，编码的蛋白具有核酸酶相关的功能域。

# 3、基因编辑技术

http://zfish.cn
CZRC
国家斑马鱼资源中心
CHINA ZEBRAFISH RESOURCE CENTER

## 细菌获得性免疫：CRISPR-Cas system

国家水生生物种质资源库（NABRC）



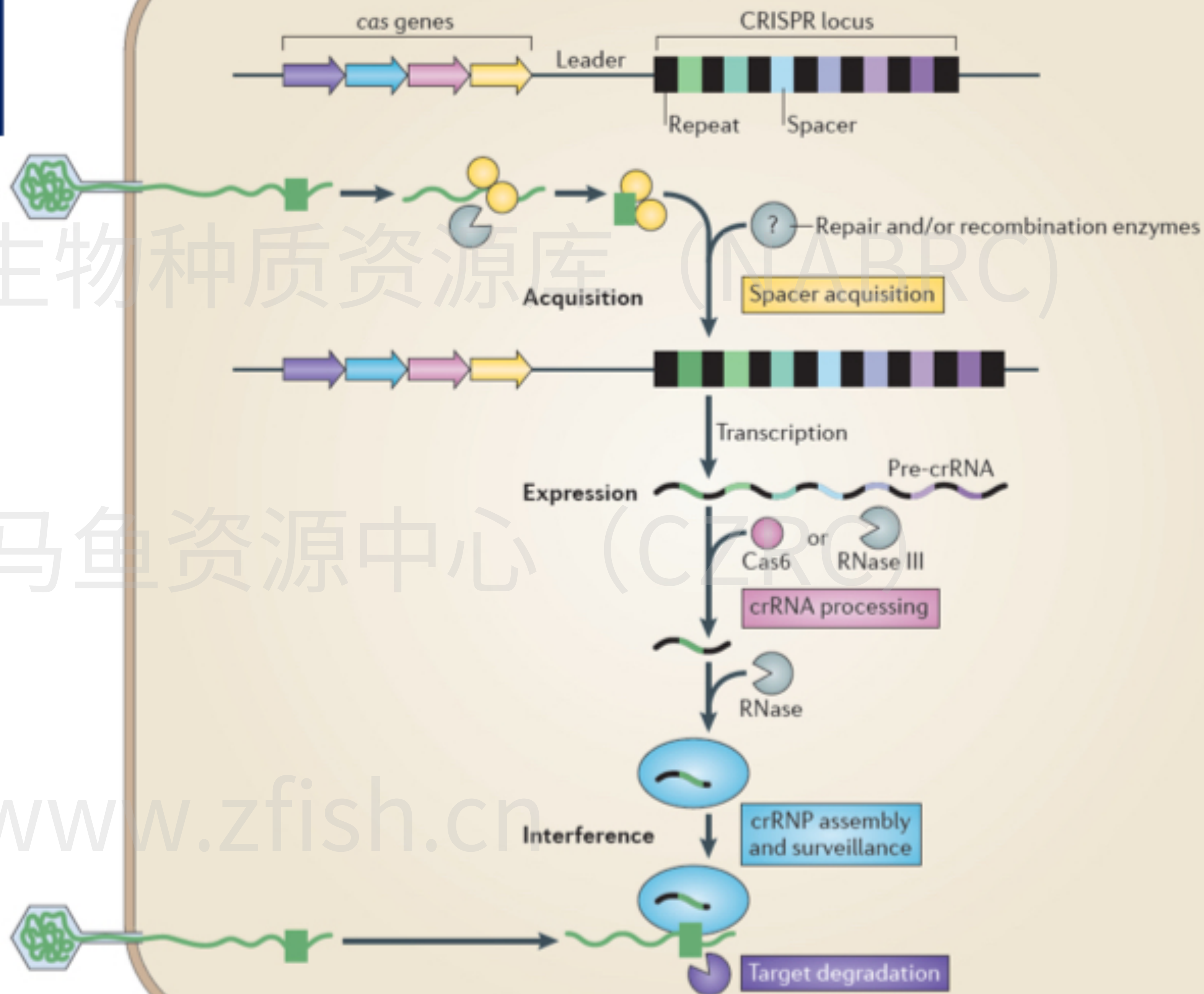

国家斑马鱼资源中心（CZRC）
www.zfish.cn

(Prarthana M. science. 2016)

# 3、基因编辑技术

**CRISPR-Cas system作用机制**

1. **Spacer的获得**
2. **合成CrRNA**
3. **DNA interference**




(John O.. *Curr Opin Struct Biol. 2014*)

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

# 3、基因编辑技术

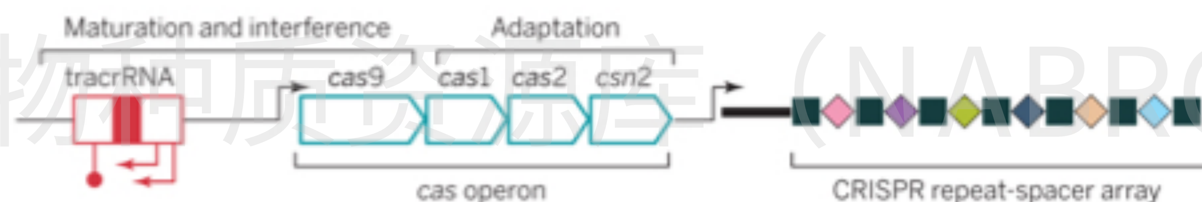


## CRISPR-Cas9 system 工作原理

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

**CRISPR/Cas9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。






(Jennifer A. D. science. 2016)

# 3、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.

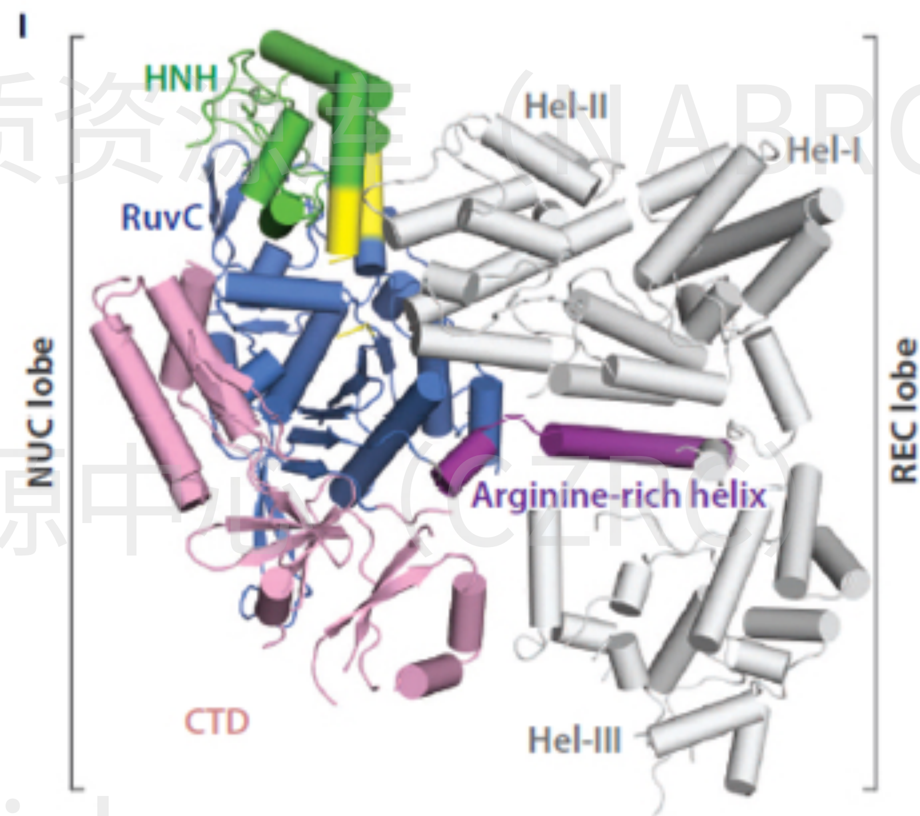
③ an α-helical recognition lobe;

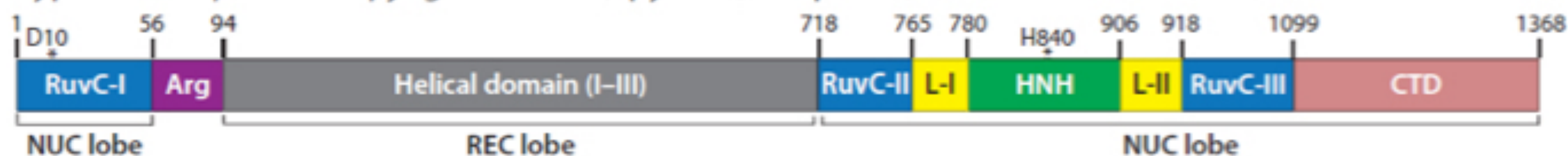
④ a nuclease lobe:

NHN：负责切割与crRNA互补的链

RuvC：负责非互补链的切割

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



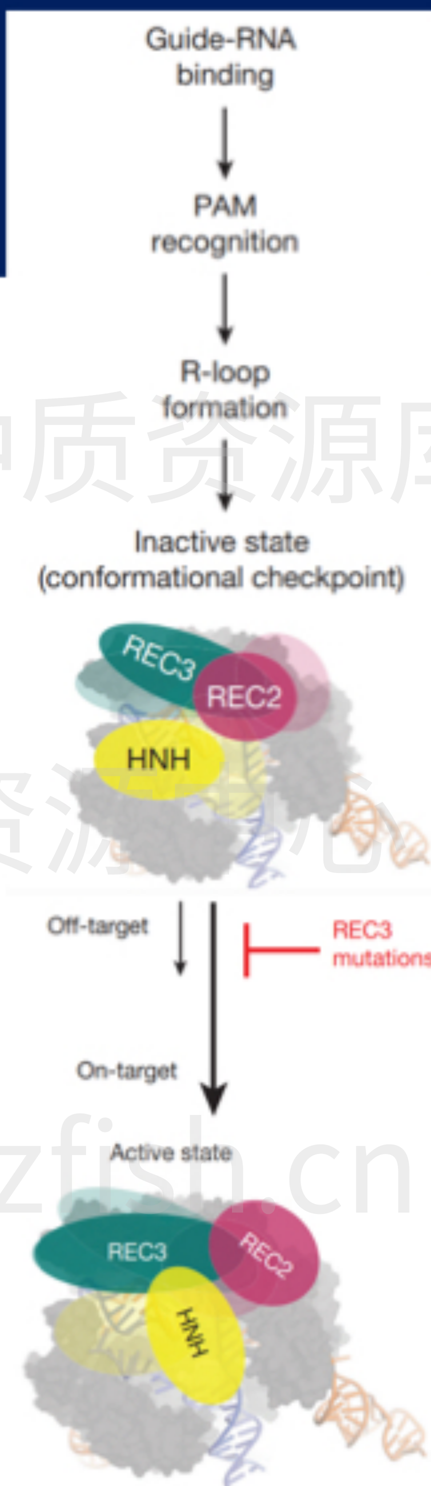

(Fuguo Jiang, et al., Annu. Rev. Biophys. 2017)

# 3、基因编辑技术

http://zfish.cn
CZRC
国家斑马鱼资源中心
CHINA ZEBRAFISH RESOURCE CENTER

**Recognition (REC) lobe**

- REC3结构域
- REC2结构域




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

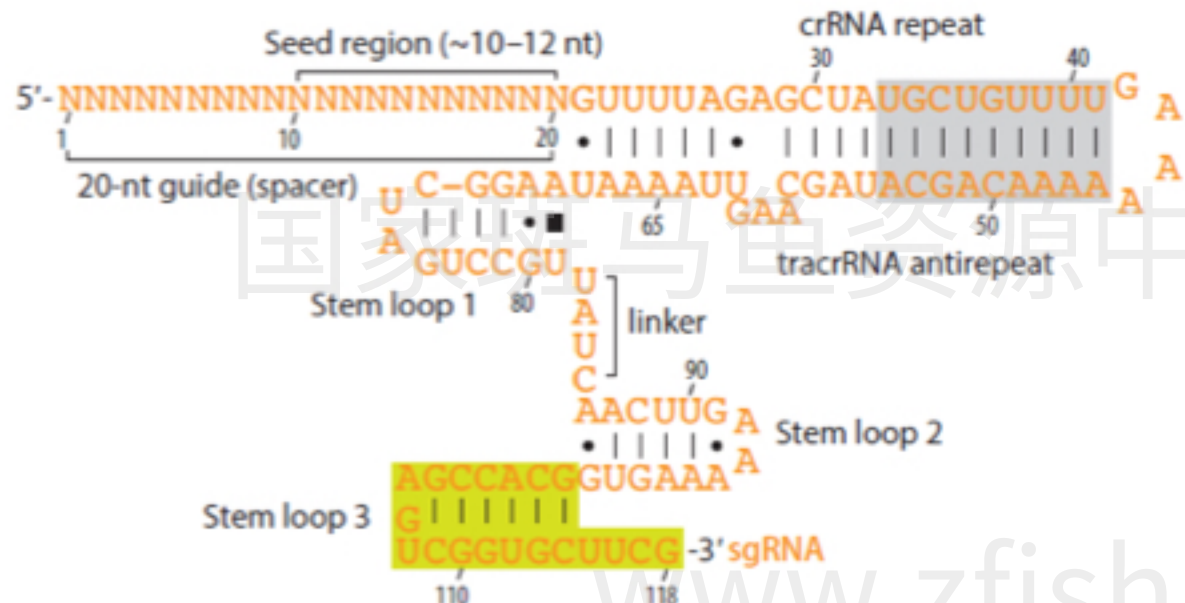
(Janice S. Chen., et al., Nature. 2017)

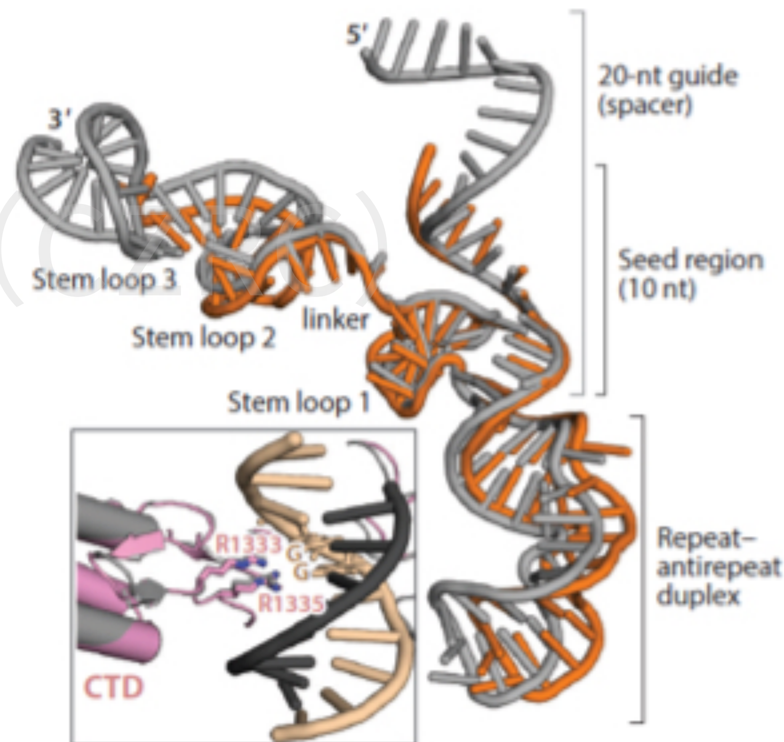
# 3、基因编辑技术

CZRC http://zfish.cn 国家斑马鱼资源中心 CHINA ZEBRAFISH RESOURCE CENTER

- **Seed region**：gRNA 3’端10-12个nt，决定了基因编辑的精确性

国家水生生物种质资源库（NABRC)




- sgRNA序列结构

国家斑马鱼资源中心（CZRC)
www.zfish.cn

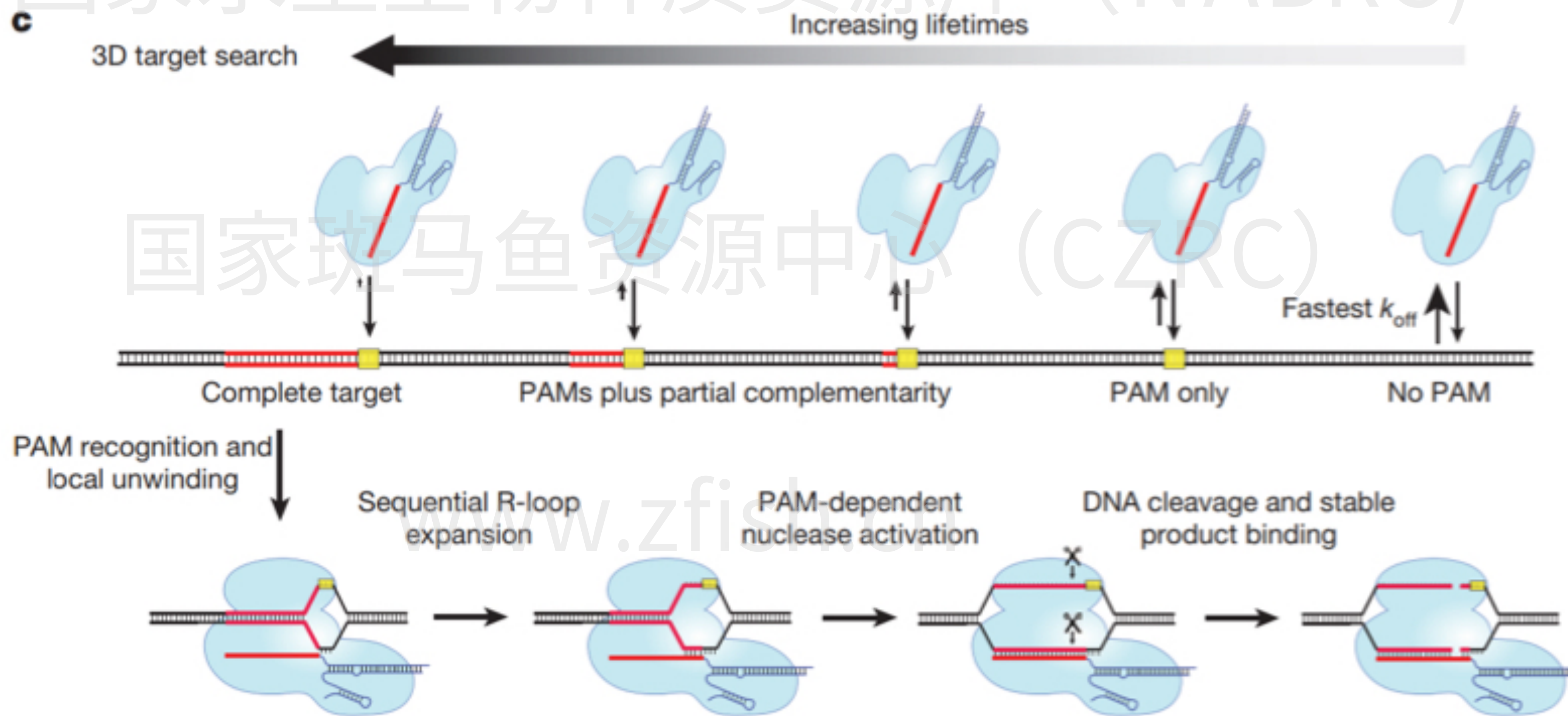
(*Fuguo Jiang, et al., Annu. Rev. Biophys. 2017*)

# 3、基因编辑技术

CZRC http://zfish.cn 国家斑马鱼资源中心 CHINA ZEBRAFISH RESOURCE CENTER

- **PAM区（proto-spacer adjacent motif）& Seed region** 决定了sgRNA/Cas9复合物对靶位点的精确识别和切割

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

(Samuel H. S., et al., Nature. 2014)

# 3、基因编辑技术

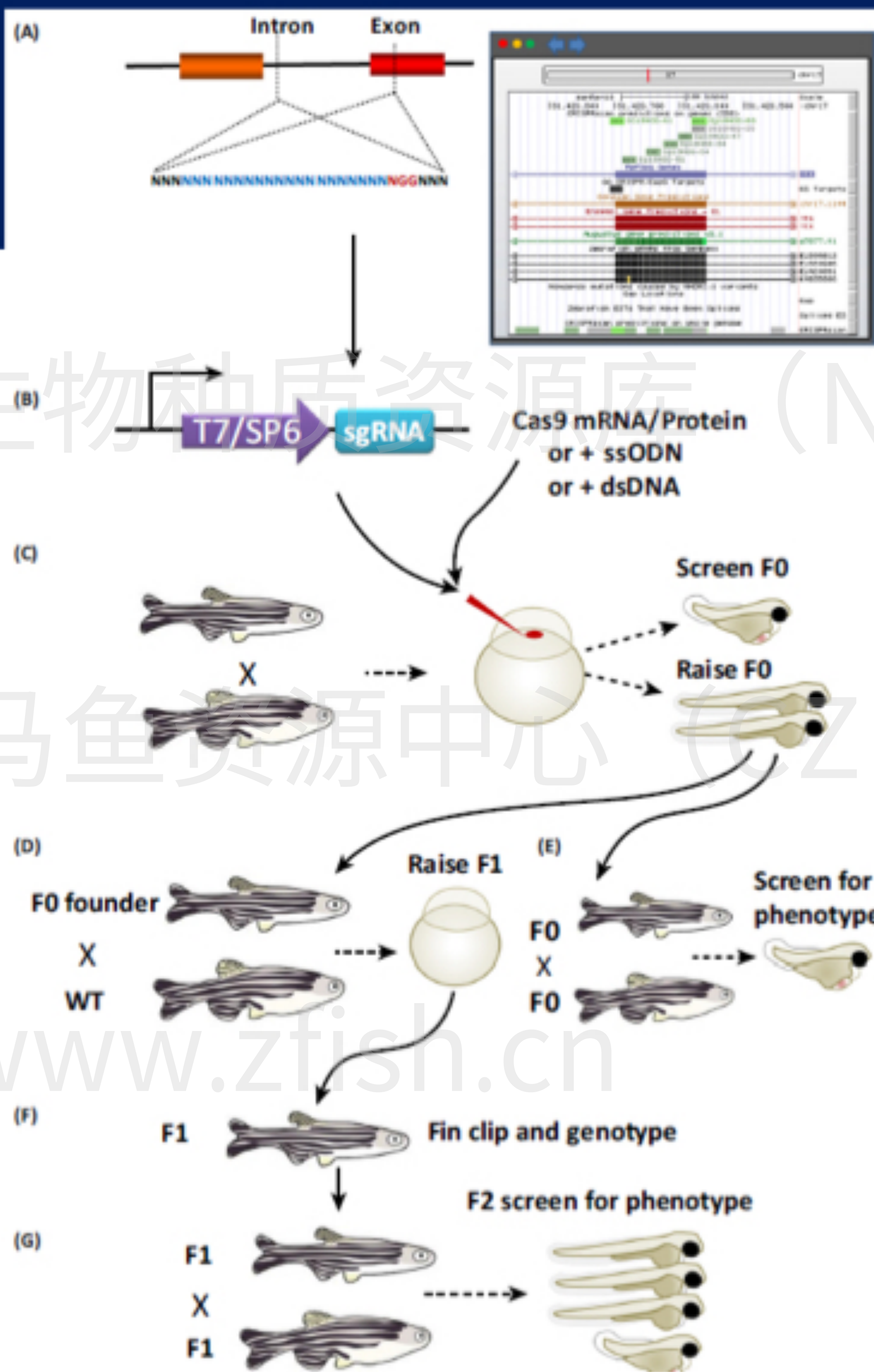
http://zfish.cn
CZRC
国家斑马鱼资源中心
CHINA ZEBRAFISH RESOURCE CENTER

gRNA靶点设计，合成gRNA和Cas9 mRNA

显微注射到斑马鱼胚胎中，获取阳性F0代

F0代个体筛选，通过与野生型侧交的方式进行，将阳性胚胎培养为F1代

F1代个体筛选，通过剪尾鳍测序的方式进行，获取可稳定遗传的F1代个体




- 基于CRISPR/Cas9技术的基因敲除品系构建流程

(Mingyu Li., et al., Trends in Genetics . 2016)

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

CZRC http://zfish.cn 国家斑马鱼资源中心 CHINA ZEBRAFISH RESOURCE CENTER

## CRISPR/Cas9技术在斑马鱼研究中的应用

国家水生生物种质资源库（NABRC）

2013年，多家实验室成功使用CRISPR/Cas9技术对斑马鱼基因组进行精确的基因编辑。

nature biotechnology

Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system

Woong Y Hwang[1,7], Yanfang Fu[2,3,7], Deepak Reyon[2,3], Morgan L Maeder[2,4], Shengdar Q Tsai[2,3], Jeffry D Sander[2,3], Randall T Peterson[1,5,6], J-R Joanna Yeh[1,5] & J Keith Joung[2–4]

国家斑马鱼资源中心（CZRC）

PNAS

**Efficient multiplex biallelic zebrafish genome editing using a CRISPR nuclease system**

Li-En Jao[a], Susan R. Wente[a,1], and Wenbiao Chen[b,1]

[a]Department of Cell and Developmental Biology and [b]Department of Molecular Physiology and Biophysics, Vanderbilt University School of Medicine, Nashville, TN 37232-8240

Edited by Igor B. Dawid, The Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health and Human Development, National Institutes of Health, Bethesda, MD, and approved July 12, 2013 (received for review May 3, 2013)

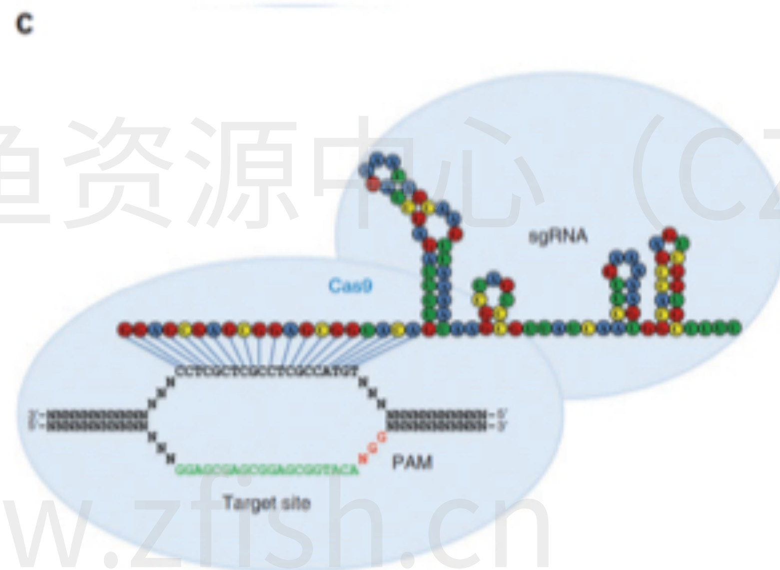
*Open*
ORIGINAL ARTICLE

Cell Research (2013) 23:465-472.
© 2013 IBCB, SIBS, CAS All rights reserved 1001-0602/13
www.nature.com/cr

**Genome editing with RNA-guided Cas9 nuclease in Zebrafish embryos**

Nannan Chang[1,3,*], Changhong Sun[1,2,*], Lu Gao[1,3], Dan Zhu[2], Xiufei Xu[2], Xiaojun Zhu[1,3], Jing-Wei Xiong[1,3], Jianzhong Jeff Xi[1,2]

c




d

*tia1l*
Mutations in 17 out of 44 sequenced alleles

Wild-type
+14 (−1, +15)
+4 (−7, +11)
+3 (−3, +6)
−2
−3 (−4, +1)
−4
−5
−6
−11
−13
−23
[×5]
[×3]

**gsk3b**
Mutations in 8 out of 16 sequenced alleles

Wild-type
+17 (−8, +25)
+2 (−4, +6)
+1 (−2, +3)
+1 (−8, +9)
−7
−10
−11
−13

www.zfish.cn

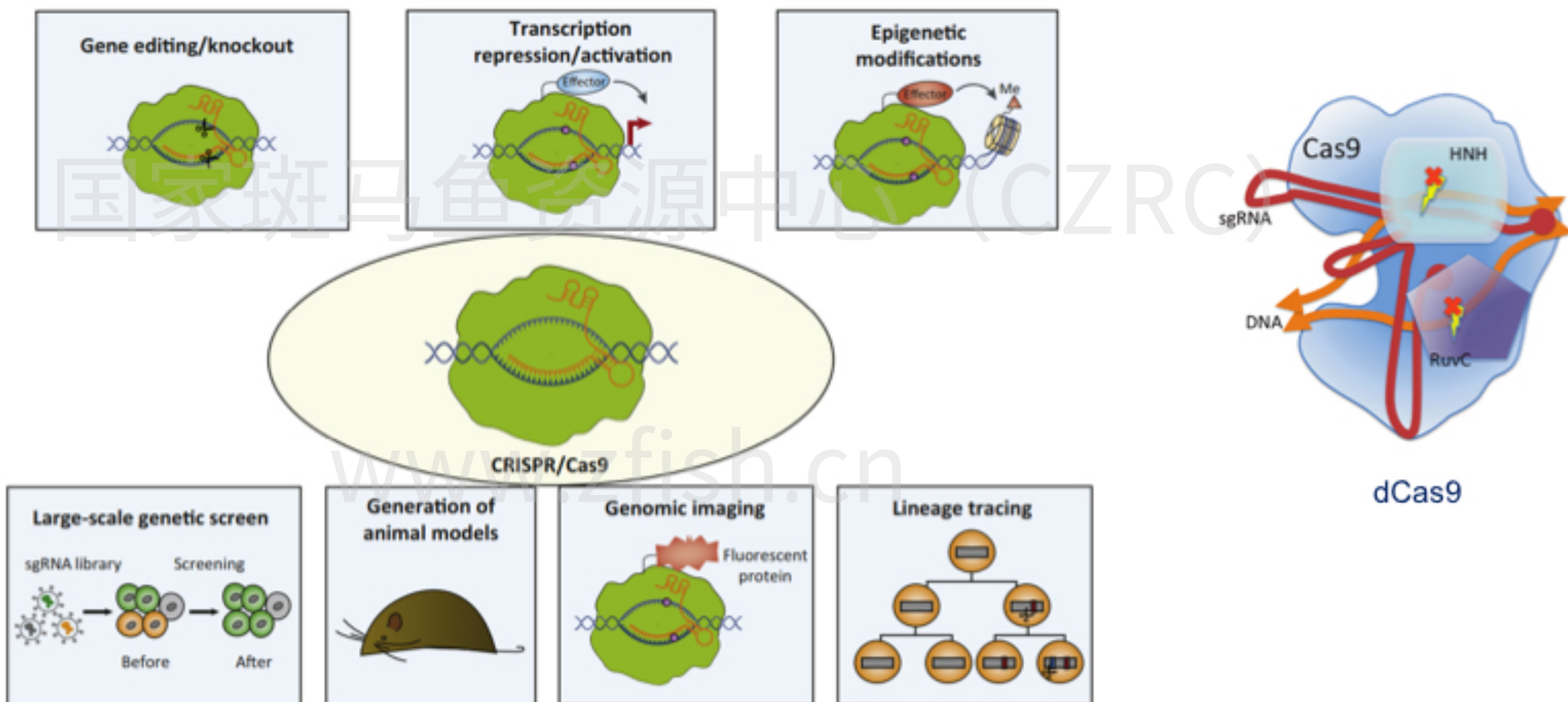
- **Targeted indel mutations induced by engineered sgRNA:Cas9 at the *tia1l* and *gsk3b* genes.**

http://zfish.cn
CZRC
国家斑马鱼资源中心
CHINA ZEBRAFISH RESOURCE CENTER

## CRISPR/Cas技术应用

国家水生生物种质资源库（NABRC）

应用于基因的敲除、敲入以及基因沉默、激活、表观遗传学、基因组成像等…




国家斑马鱼资源中心（CZRC）
www.zfish.cn

http://zfish.cn
CZRC
国家斑马鱼资源中心
CHINA ZEBRAFISH RESOURCE CENTER

## xCAS9：适用范围扩大4倍，特异性提升百倍

可用于转录激活、DNA切割，单碱基编辑

国家水生生物种质资源库（NABRC）

Article

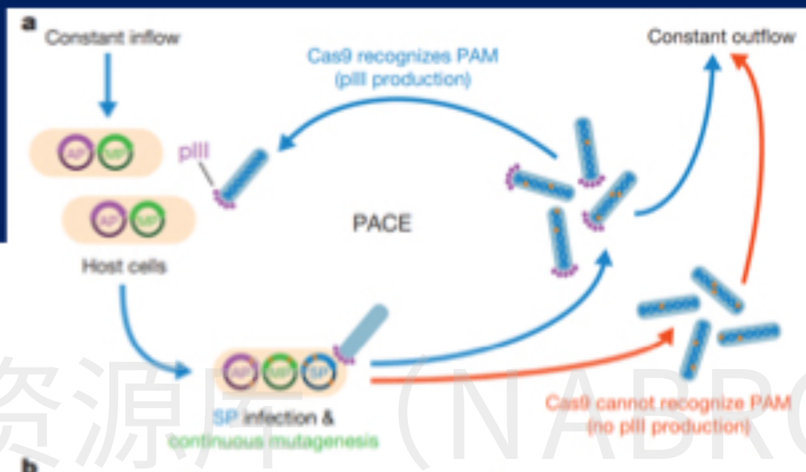
This is an unedited manuscript that has been accepted for publication. Nature Research are providing this early version of the manuscript as a service to our customers. The manuscript will undergo copyediting, typesetting and a proof review before it is published in its final form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers apply.

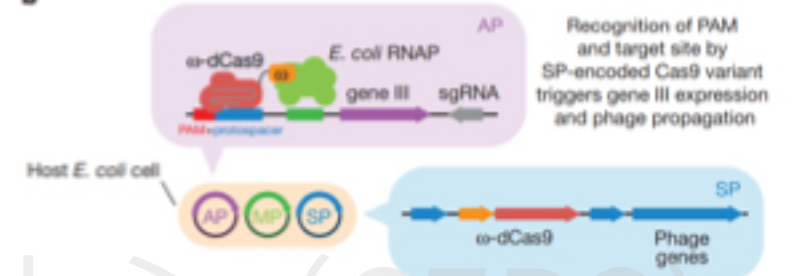
Evolved Cas9 variants with broad PAM compatibility and high DNA specificity

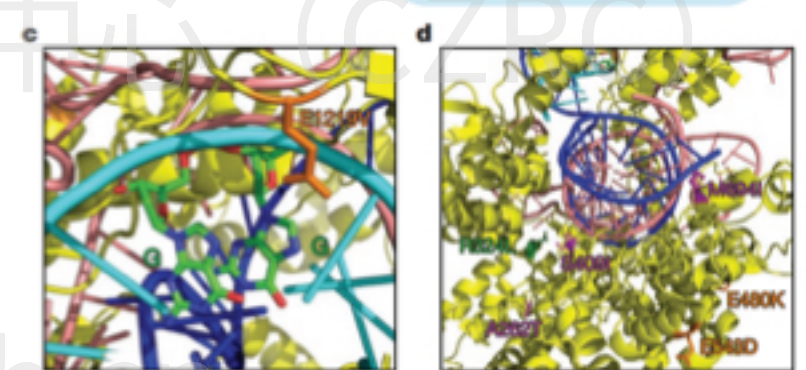
Nature
Received: 17 January 2018
Accepted: 22 February 2018
Published online: 28 February 2018

| | spCAS9 | xCAS9 |
|---|---|---|
| 识别序列 | 1/16（NGG） | 1/4(NGN),<br>GAA,GAT |
| 转录激活 | | 前者的数倍 |
| DNA切割 | | 较前者效率高 |
| 致病突变单碱基编辑（C.G-T.A） | 适用范围26% | 适用范围73% |
| 脱靶效应 | 少 | 前者的~1/100 |

国家斑马鱼资源中心（CZRC）
www.zfish.cn




e

*S. pyogenes* Cas9 amino acid

| | 108 | 217 | 262 | 324 | 409 | 480 | 543 | 694 | 1219 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| SpCas9 | E | S | A | R | S | E | E | M | E |
| xCas9-1.2 | E | S | A | R | S | K | D | M | V |
| xCas9-1.3 | E | S | A | R | S | K | D | M | V |
| xCas9-2.0 | E | S | T | R | I | K | D | M | V |
| xCas9-2.2 | E | S | T | R | I | K | D | I | V |
| xCas9-3.6 | G | A | T | R | I | K | D | I | V |
| xCas9-3.7 | E | S | T | L | I | K | D | I | V |

- **PACE of Cas9 variants with broadened PAM compatibility.**

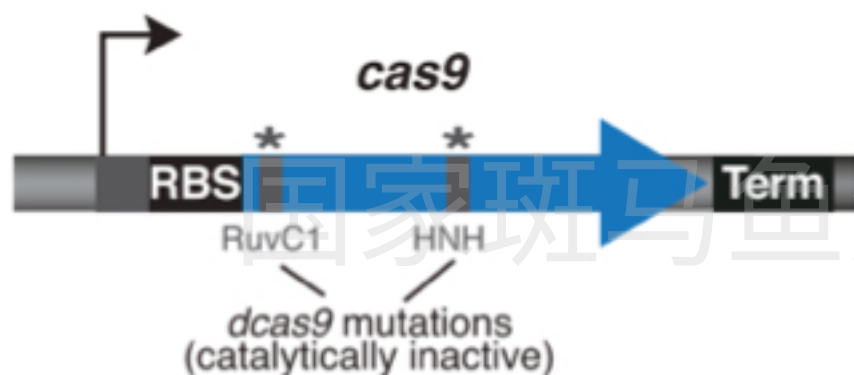
# 3、基因编辑技术

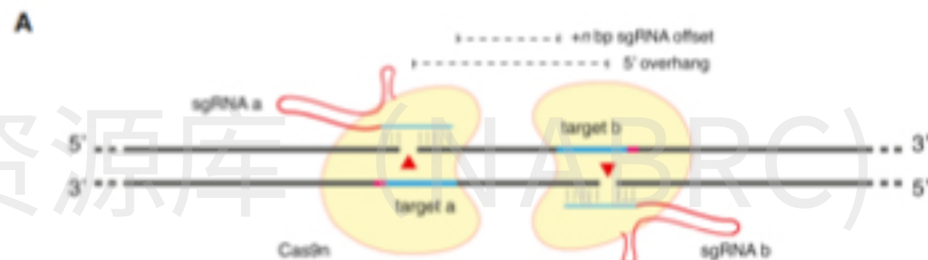


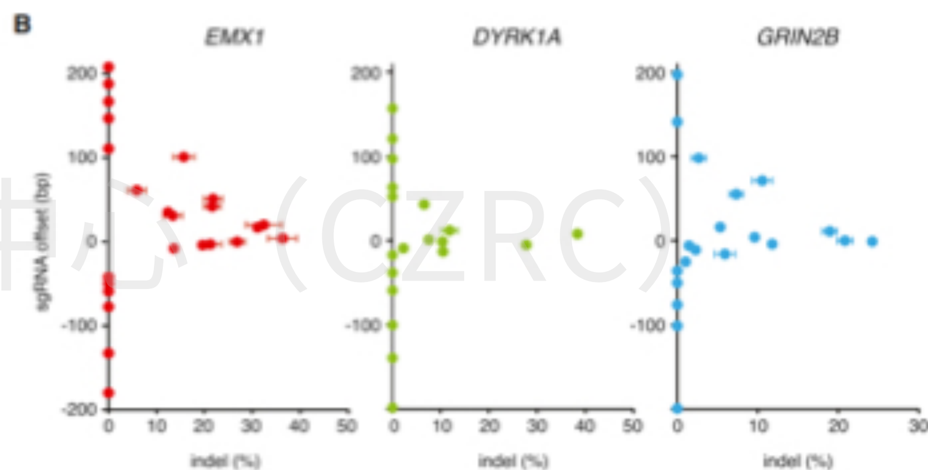
## Cas9 Nickase（with paired gRNAs）

H840A in HNH or D10A in RuvC

特异性提升50-1500倍



Resource

Cell

**Double Nicking by RNA-Guided CRISPR Cas9 for Enhanced Genome Editing Specificity**

F. Ann Ran,[1,2,3,4,5,11] Patrick D. Hsu,[1,2,3,4,5,11] Chie-Yu Lin,[1,2,3,4,6] Jonathan S. Gootenberg,[1,2,3,4] Silvana Konermann,[1,2,3,4] Alexandro E. Trevino,[1] David A. Scott,[1,2,3,4] Azusa Inoue,[7,8,9,10] Shogo Matoba,[7,8,9,10] Yi Zhang,[7,8,9,10] and Feng Zhang[1,2,3,4,*]

- **Double Nicking Facilitates Efficient Genome Editing in Human Cells** *(Ran FA, et al. Cell. 2013. )*

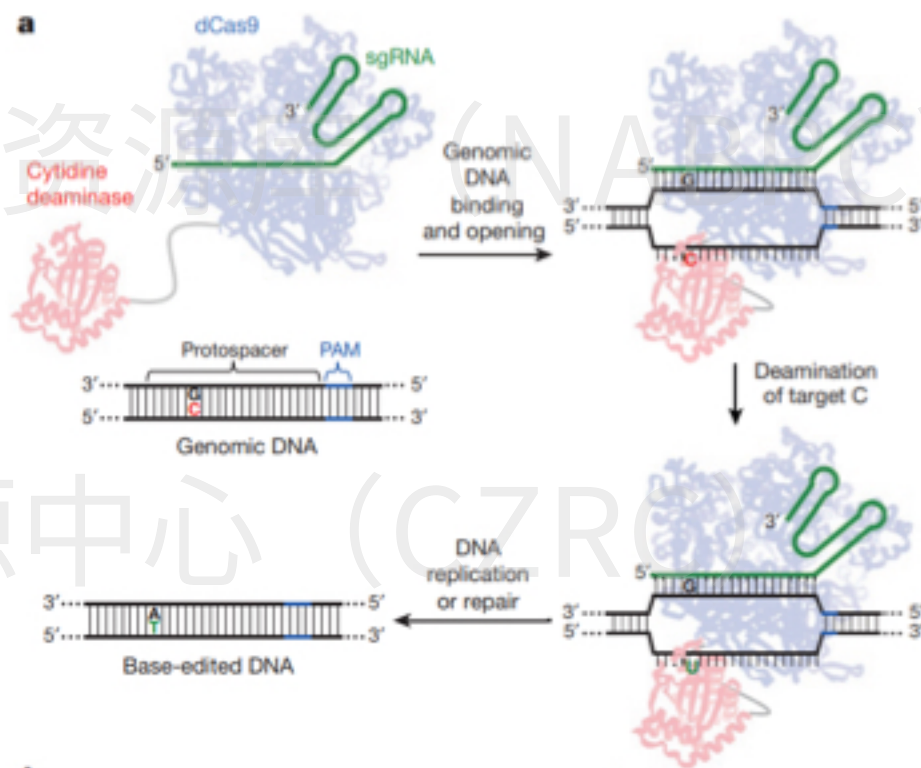
国家水生生物种质资源库（NABRC）
国家斑马鱼资源中心（CZRC）
www.zfish.cn

http://zfish.cn
CZRC
国家斑马鱼资源中心
CHINA ZEBRAFISH RESOURCE CENTER

## Base Editing

2016年，David Liu团队将dCas9与胞苷脱氨酶相连，实现C->T单碱基编辑

BE1: rat APOBEC1–XTEN–dCas9，0.8%-7.7% in cells




LETTER

doi:10.1038/nature17946

Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage

Alexis C. Komor[1,2], Yongjoo B. Kim[1,2], Michael S. Packer[1,2], John A. Zuris[1,2] & David R. Liu[1,2]

- First-generation base editor (BE1) mediates specific, guide RNA-programmed C→U conversion in vitro

国家水生生物种质资源库（NAGRC）
国家斑马鱼资源中心（CZRC）
www.zfish.cn

http://zfish.cn
CZRC
国家斑马鱼资源中心
CHINA ZEBRAFISH RESOURCE CENTER

## Base Editing

BE3 APOBEC–XTEN–dCas9(A840H)–UGI

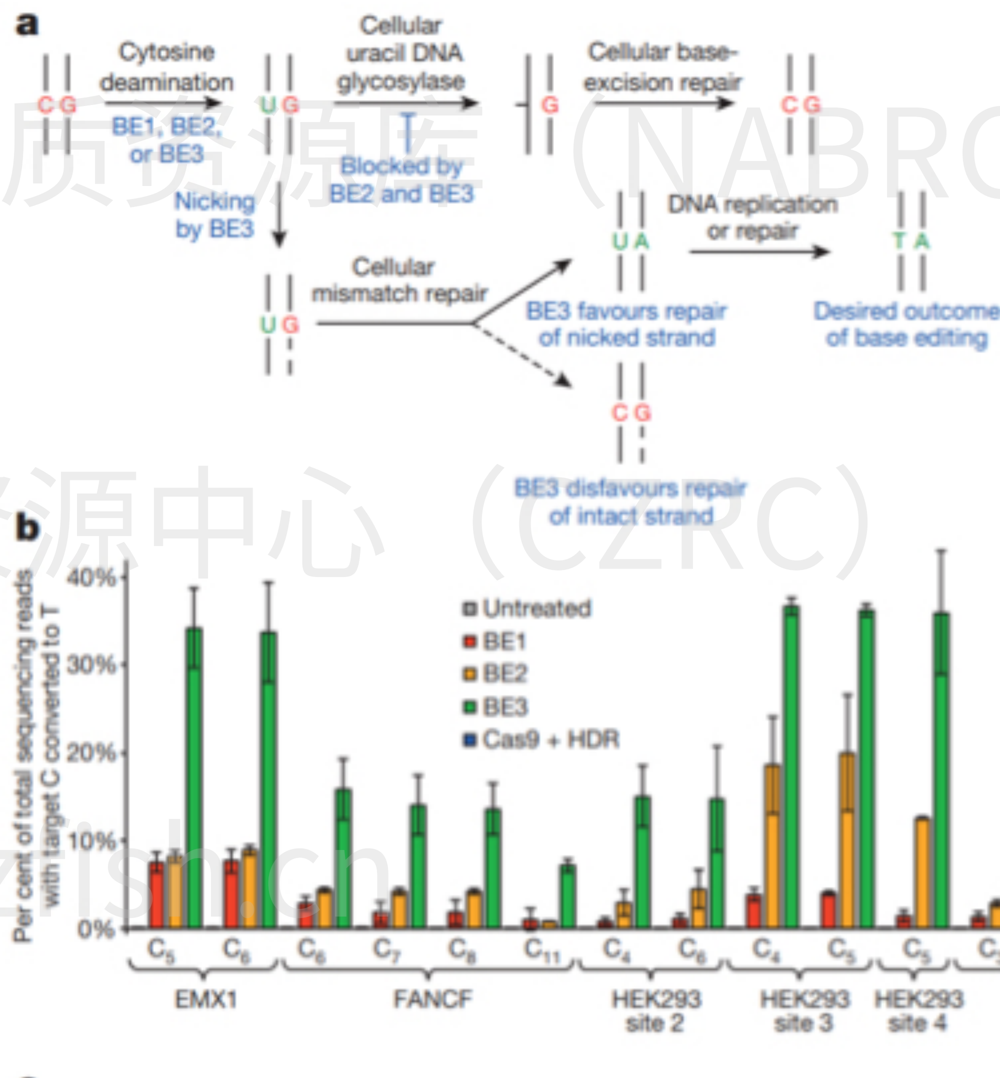
国家水生生物种质资源库（NABRC）
国家斑马鱼资源中心（CZRC）
www.zfish.cn

BE1: rat APOBEC1–XTEN–dCas9，0.8%-7.7% in cells

BE2: APOBEC–XTEN–dCas9–UGI, 效率提高了3倍左右

**BE3: APOBEC–XTEN–dCas9(A840H)–UGI**，效率又提高了2-6倍， 37% in cells

**Cas9 Nickase D10A**



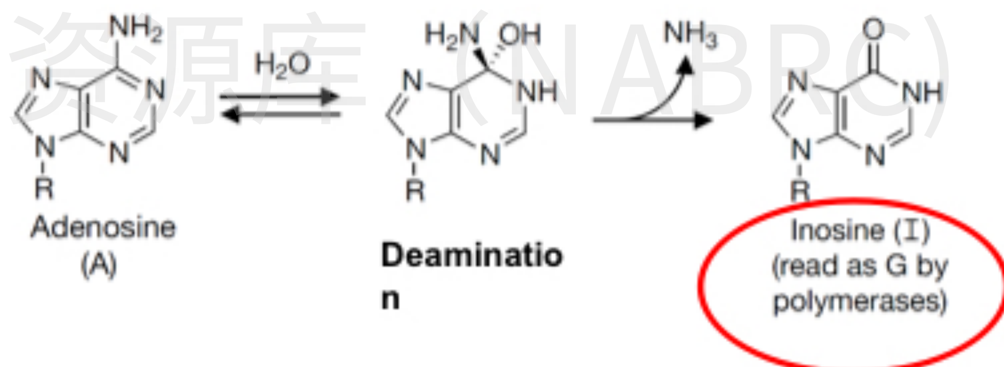

(Komor et. al., Nature, 2016)

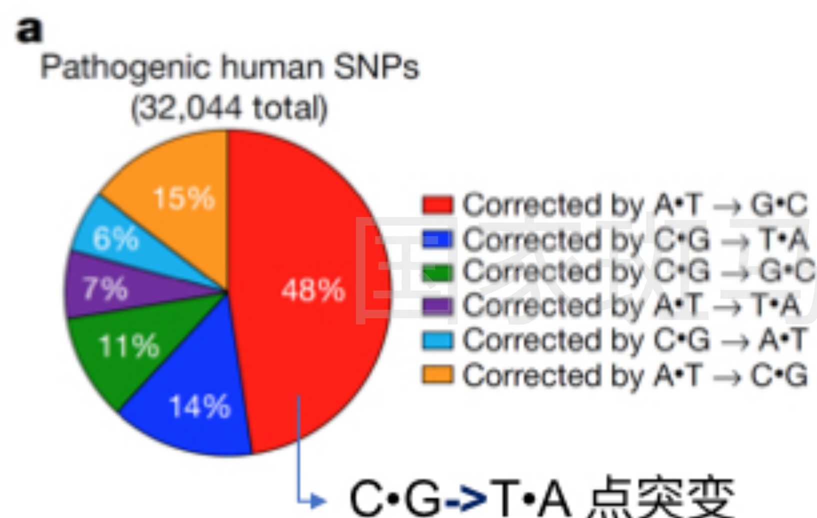
http://zfish.cn
CZRC
国家斑马鱼资源中心
CHINA ZEBRAFISH RESOURCE CENTER

## Adenine Base Editors

2017年，实现 A•T->G•C 碱基编辑

国家水生生物种质资源库（NABRC）



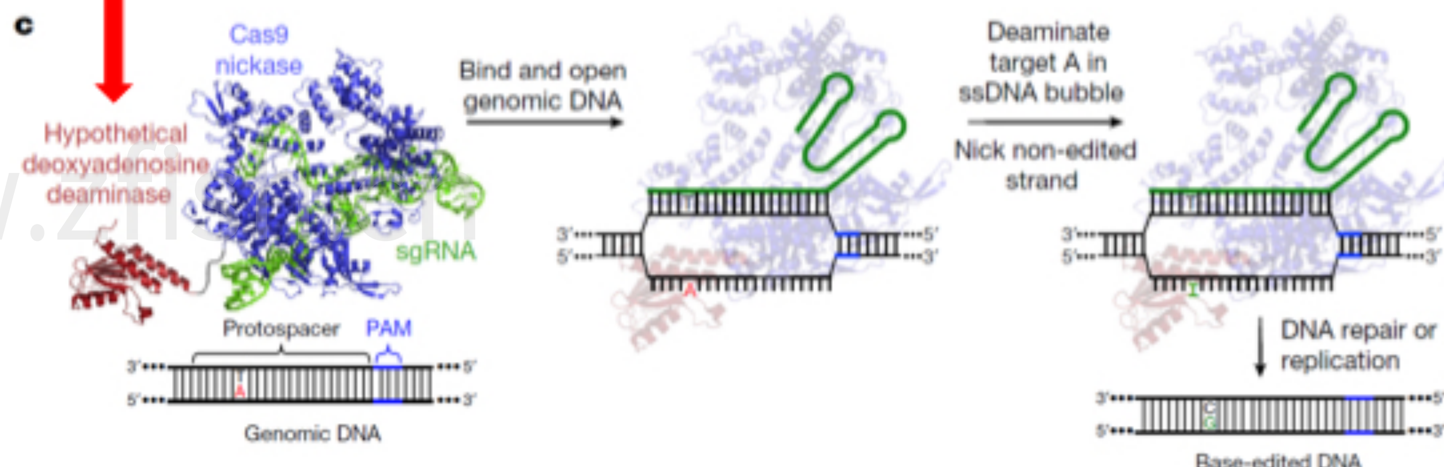




C•G->T•A 点突变

国家斑马鱼资源中心（CZRC）

APOBEC–XTEN–dCas9(A840H)–UGI BE3

**ecTadA** -XTEN–dCas9(A840H) ABE0.1




www.zfish.cn

ARTICLE

doi:10.1038/nature24644

# Programmable base editing of A·T to G·C in genomic DNA without DNA cleavage

Nicole M. Gaudelli[1,2,3], Alexis C. Komor[1,2,3]†, Holly A. Rees[1,2,3], Michael S. Packer[1,2,3]†, Ahmed H. Badran[1,2,3], David I. Bryson[1,2,3]† & David R. Liu[1,2,3]

- ABE-mediated A•T to G•C base editing strategy

# 3、基因编辑技术

http://zfish.cn
CZRC
国家斑马鱼资源中心
CHINA ZEBRAFISH RESOURCE CENTER

**Adenine Base Editors**

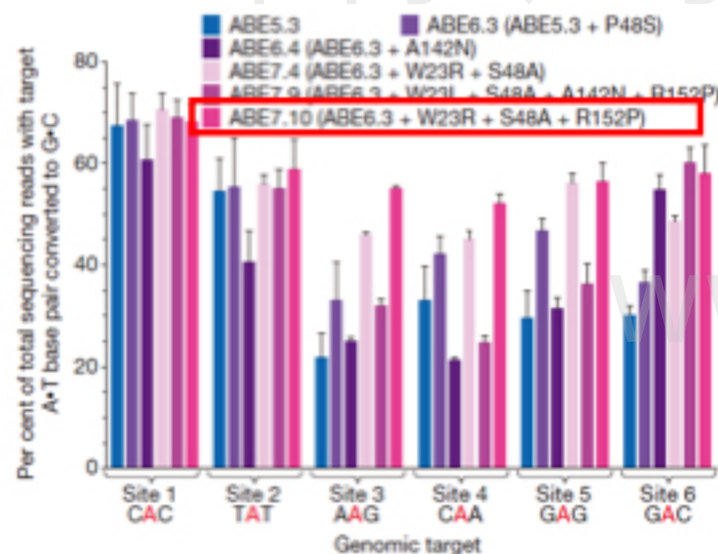
wtTadA–linker1-TadA*–linker2–nCas9–NLS ABE7.10

国家水生生物种质资源库（NABRC）

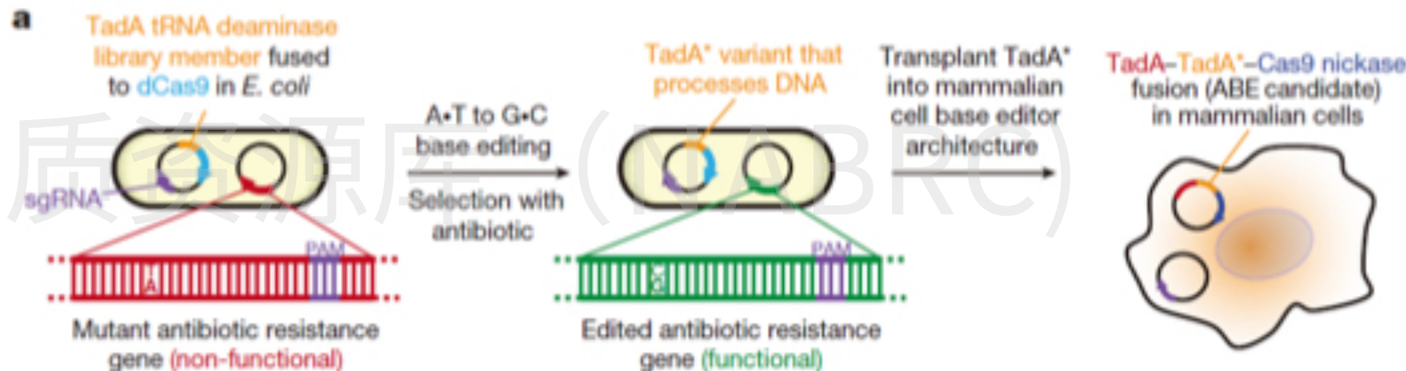
ABE1.2: TadA*–XTEN–nCas9–NLS，3.2 ± 0.88% in cells

**ABE7.10: wtTadA–linker1-TadA*–linker2–nCas9–NLS**，53 ± 3.7% in cells

国家斑马鱼资源中心（CZRC）
www.zfish.cn




a




b

*E. coli* TadA amino acid

| | 23 | 36 | 48 | 51 | 84 | 106 | 108 | 123 | 142 | 146 | 147 | 152 | 155 | 156 | 157 | TadA state | Linker 1 length | Linker 2 length |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| ABE0.1 | W | H | P | R | L | A | D | H | A | S | D | R | E | I | K | Monomer | | 16 |
| ABE1.1 | W | H | P | R | L | A | N | H | A | S | D | R | E | I | K | Monomer | | 16 |
| ABE1.2 | W | H | P | R | L | V | N | H | A | S | D | R | E | I | K | Monomer | | 16 |
| ABE2.1 | W | H | P | R | L | V | N | H | A | S | Y | R | V | I | K | Monomer | | 16 |
| ABE2.9 | W | H | P | R | L | V | N | H | A | S | Y | R | V | I | K | Homodimer | 32 | 16 |
| ABE2.10 | W | H | P | R | L | V | N | H | A | S | Y | R | V | I | K | Heterodimer | 32 | 16 |
| ABE3.1 | W | H | P | R | F | V | N | Y | A | S | Y | R | V | F | K | Homodimer | 32 | 32 |
| ABE4.3 | W | H | P | R | F | V | N | Y | N | S | Y | R | V | F | K | Homodimer | 32 | 32 |
| ABE5.1 | W | L | P | L | F | V | N | Y | A | C | Y | R | V | F | N | Homodimer | 32 | 32 |
| ABE5.3 | W | L | P | L | F | V | N | Y | A | C | Y | R | V | F | N | Heterodimer | 32 | 32 |
| ABE6.3 | W | L | S | L | F | V | N | Y | A | C | Y | R | V | F | N | Heterodimer | 32 | 32 |
| ABE6.4 | W | L | S | L | F | V | N | Y | N | C | Y | R | V | F | N | Heterodimer | 32 | 32 |
| ABE7.4 | R | L | A | L | F | V | N | Y | A | C | Y | R | V | F | N | Heterodimer | 32 | 32 |
| ABE7.8 | L | L | A | L | F | V | N | Y | N | C | Y | R | V | F | N | Heterodimer | 32 | 32 |
| ABE7.9 | L | L | A | L | F | V | N | Y | N | C | Y | P | V | F | N | Heterodimer | 32 | 32 |
| ABE7.10 | R | L | A | L | F | V | N | Y | A | C | Y | P | V | F | N | Heterodimer | 32 | 32 |

- **Protein evolution and engineering of ABEs** (*Gaudelli NM, et al. Nature. 2017*)

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

## Minimization of spCas9

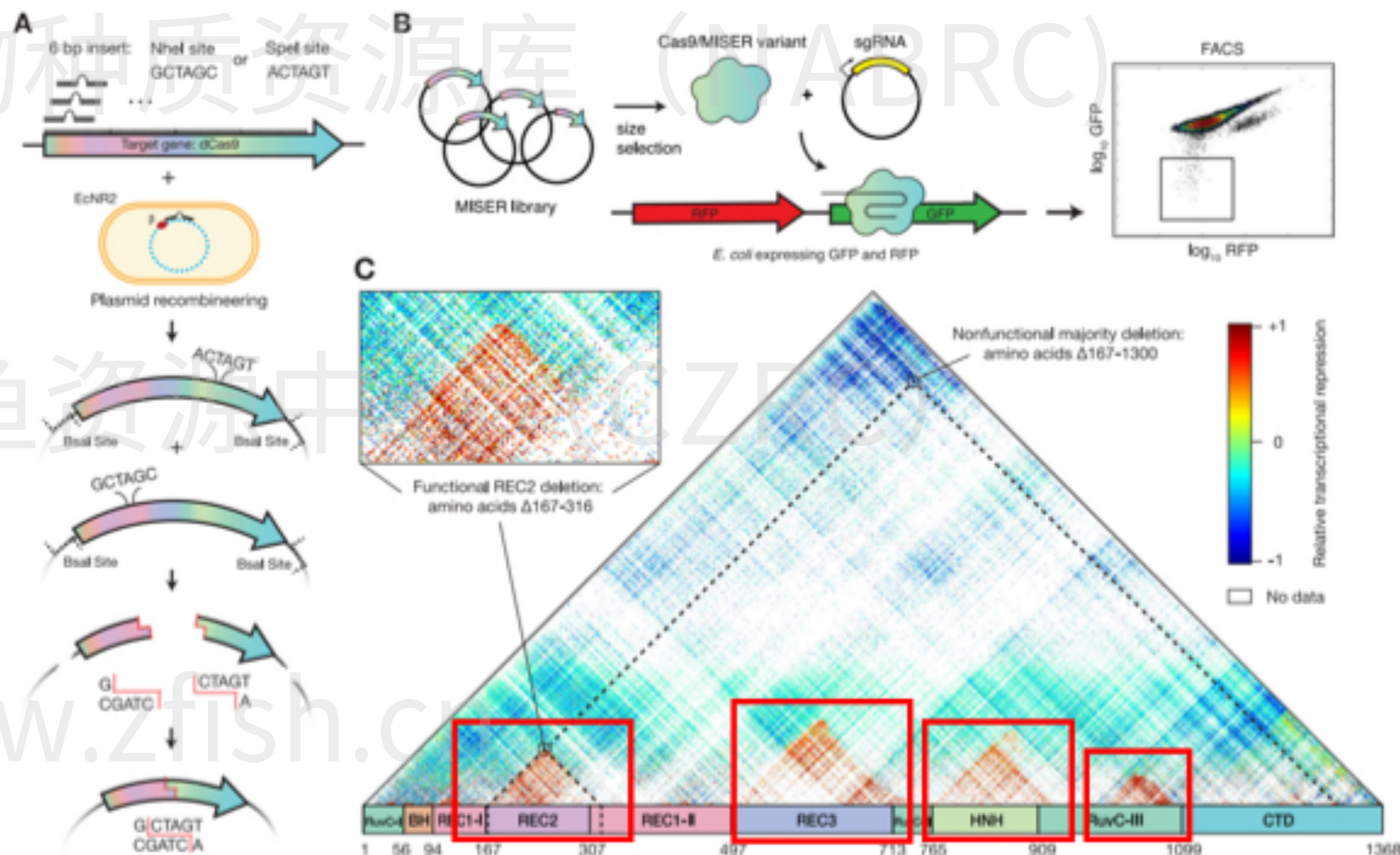
1368aa -> 874aa

ARTICLE

https://doi.org/10.1038/s41467-021-25992-8 OPEN

### Comprehensive deletion landscape of CRISPR-Cas9 identifies minimal RNA-guided DNA-binding modules

Arik Shams[1,12], Sean A. Higgins[1,2,3,12], Christof Fellmann[1,4,5], Thomas G. Laughlin[1,6], Benjamin L. Oakes[1,2,3], Rachel Lew[4], Shin Kim[1,2], Maria Lukarska[1,2], Madeline Arnold[1], Brett T. Staahl[1,2,3], Jennifer A. Doudna[1,2,4,7,8,9,10,11] & David F. Savage[1,2]

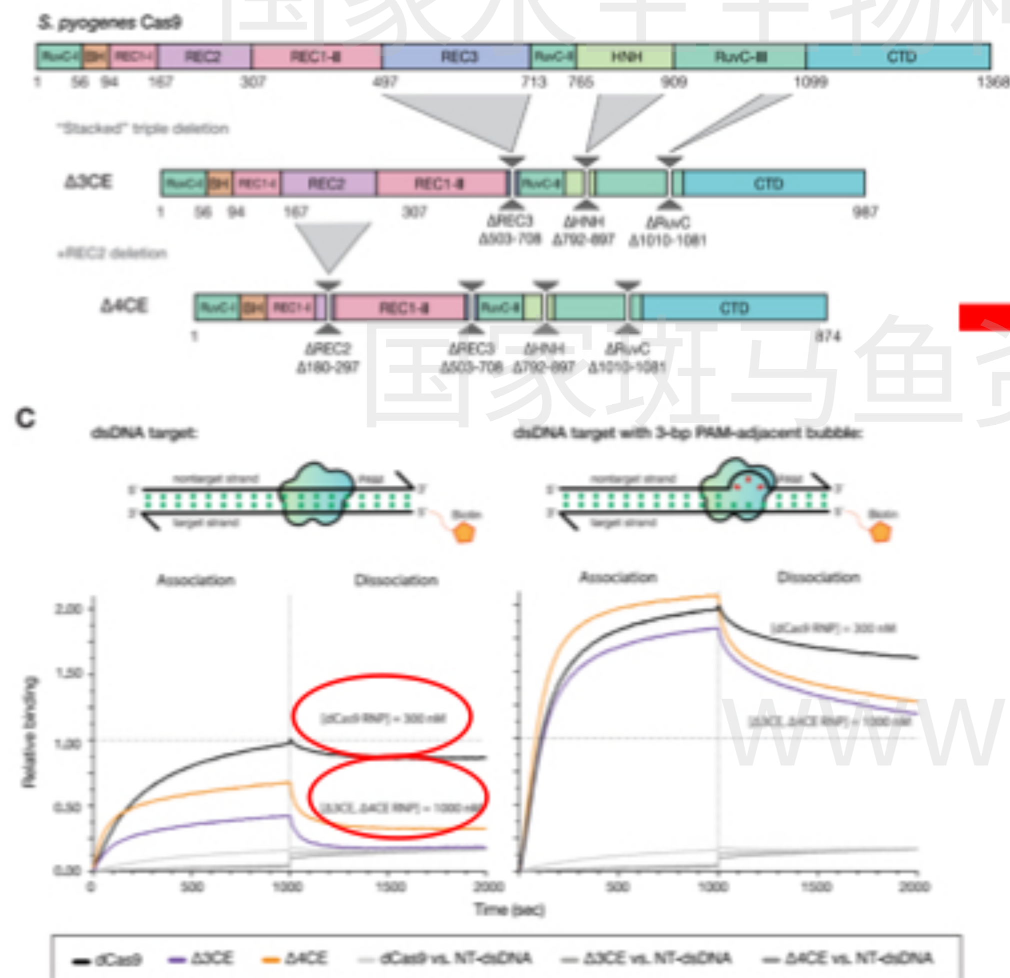



- Minimization by iterative size exclusion and recombination (MISER)

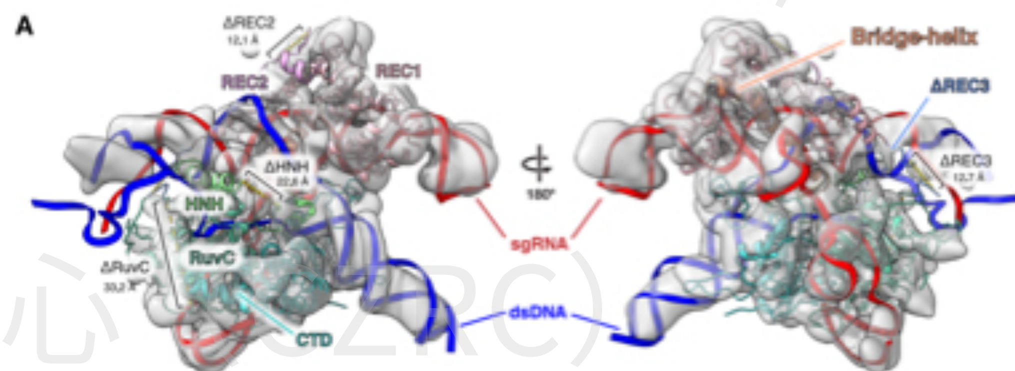
CZFRC http://zfish.cn 国家斑马鱼资源中心 CHINA ZEBRAFISH RESOURCE CENTER

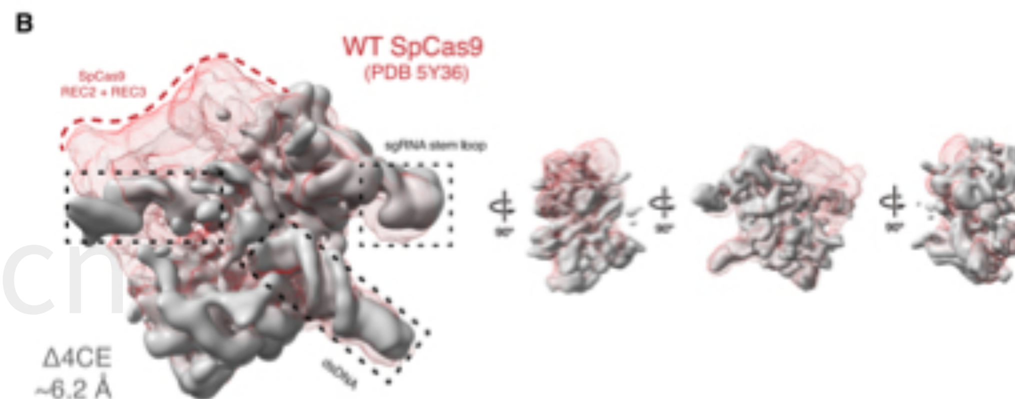
## Minimization of spCas9

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




- Stacking multiple domain deletions on Cas9 results in defective DNA-binding activity




- Density map of Δ4CE compared to WT SpCas9

(Shams A, et al. Nat Commun. 2021)

# 总结

http://zfish.cn
CZRC
国家斑马鱼资源中心
CHINA ZEBRAFISH RESOURCE CENTER

- 基因编辑技术的经历了四个发展阶段：经典同源重组、**ZFNs**、**TALENs和CRISPR/Cas9技术**。
- 三代基因编辑技术能够对基因组进行精确编辑。ZFNs和TALENs技术是通过氨基酸残基来特异性识别DNA碱基，CRISPR/Cas9技术是通过一小段RNA分子以碱基互补配对的方式来特异性识别DNA碱基，实现对基因组的特异性编辑。
- 三代基因编辑技术造成靶向序列DNA双链断裂，通过同源重组修复（HR）、非同源末端连接（NHEJ）以及微同源介导的末端连接/单链退火修复（MMEJ/SSA）机制进行DNA的损伤修复。
- 通过NHEJ、MMEJ/SSA途径进行修复，将造成靶向序列处有碱基插入或缺失，导致基因的敲除；通过HR途径在提供外源DNA模版的条件下，靶向序列处将得到精确的修复或外源基因的敲入。
- 利用CRISPR/Cas9技术可以实现多种多样的基因调控方式，最基本的就是基因敲除和敲入，其次是使用内切酶活性失活的dCas9对基因组的特定位点进行基因调控和递送各种功能因子。

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

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）

www.zfish.cn

中国斑马鱼信息中心