

国家水生生物种质资源库 (NABRC)  
**讲座三**

## 斑马鱼转基因和基因敲入技术

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

斑马鱼基因瞬时过表达技术

2

斑马鱼转基因技术

3

斑马鱼基因敲入技术

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

## 国家水生生物种质资源库 (NABRC)

- 1 斑马鱼基因瞬时过表达技术** → 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

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

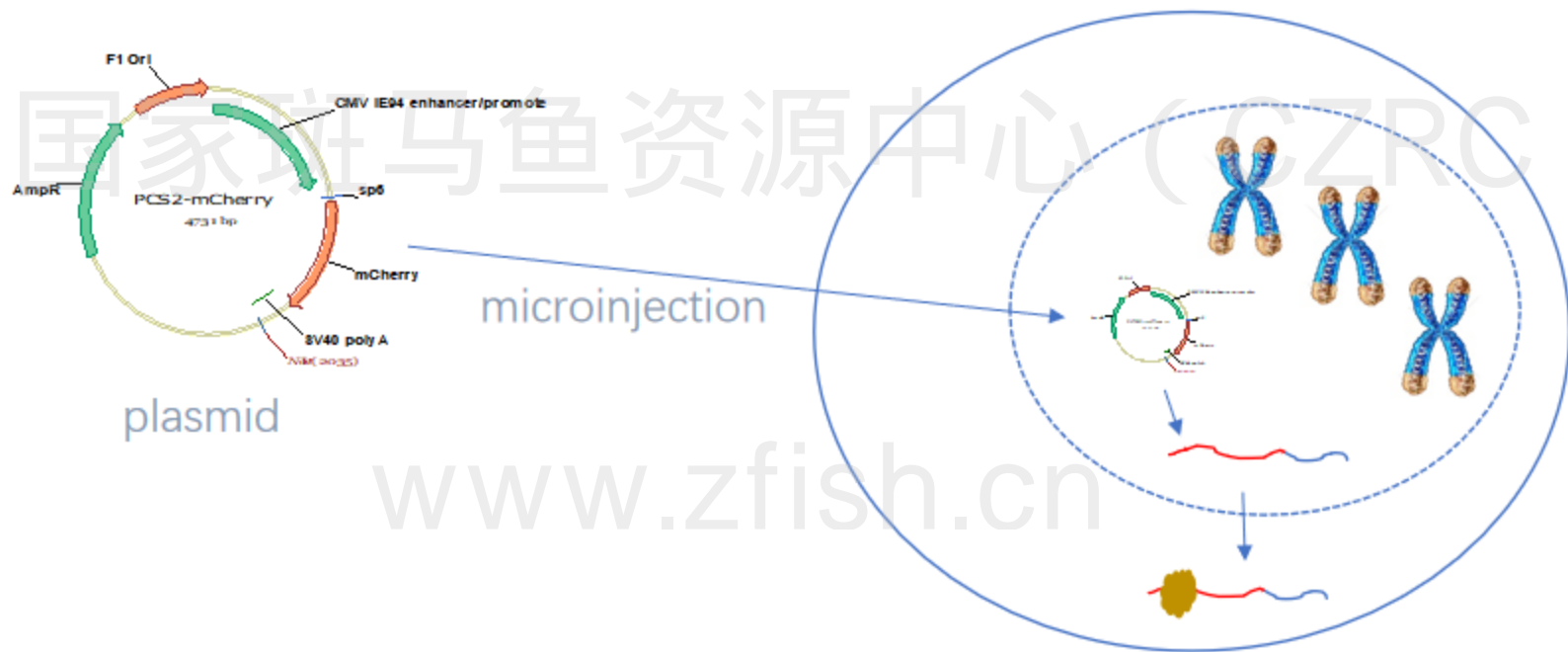
## 国家水生生物种质资源库 (NABRC)

- 1 斑马鱼基因瞬时过表达技术** → 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

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

# 1.斑马鱼基因瞬时过表达技术

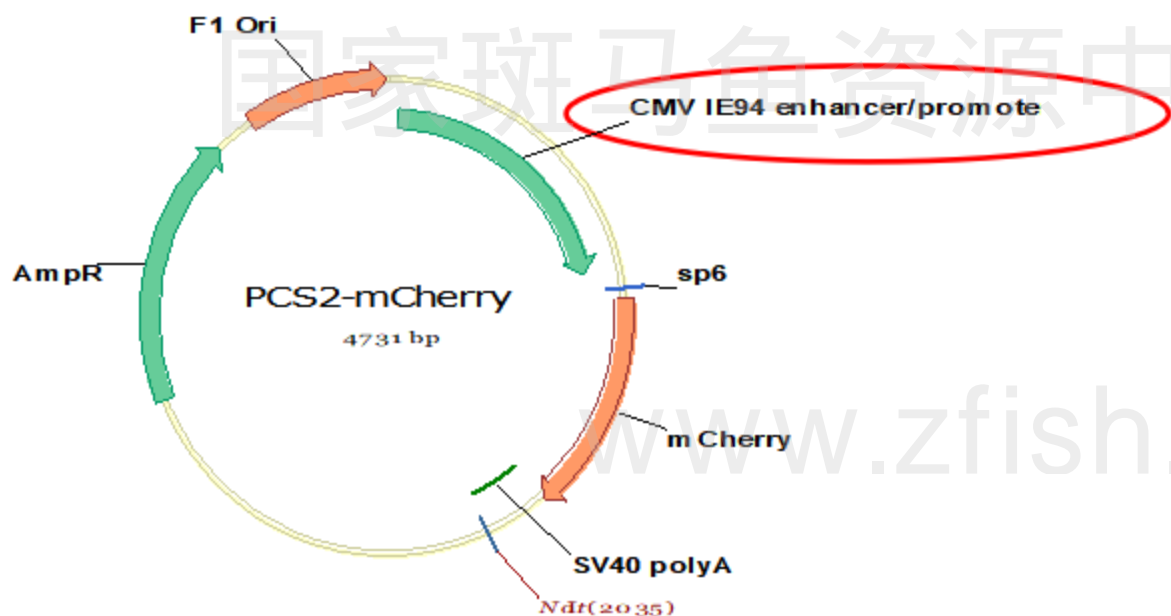
瞬时过表达：外源基因进入受体细胞后，**未整合**进受体细胞基因组而立即转录，出现基因产物。



# 1. 斑马鱼基因瞬时过表达技术

## 1.1 DNA过表达载体设计和构建:

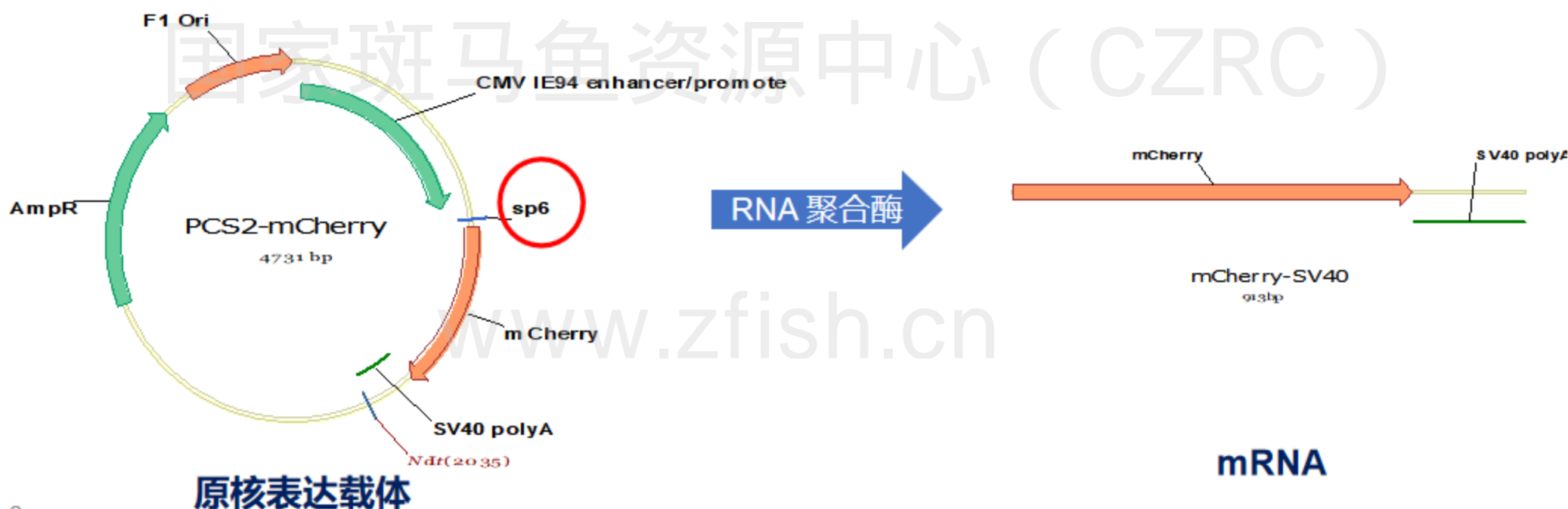
- ① 目的基因cDNA序列克隆
- ② 过表达载体的确定 (表达框, 真核启动子)
- ③ 利用分子生物学技术构建出真核表达载体



# 1. 斑马鱼基因瞬时过表达技术

## 1.2 mRNA过表达载体设计和构建:

- ① 目的基因cDNA序列克隆
- ② 过表达载体的确定 (原核启动子, PCS2载体)
- ③ 利用分子生物学技术构建出原核表达载体
- ④ 载体线性化、体外转录mRNA



# 1.斑马鱼基因瞬时过表达技术

## DNA/mRNA样品的区别

+p(CMV: mCherry-sv40 polyA ) DNA:  
嵌合(chimeric)、可遗传



+mCherry-sv40 polyA mRNA:  
均一、短暂

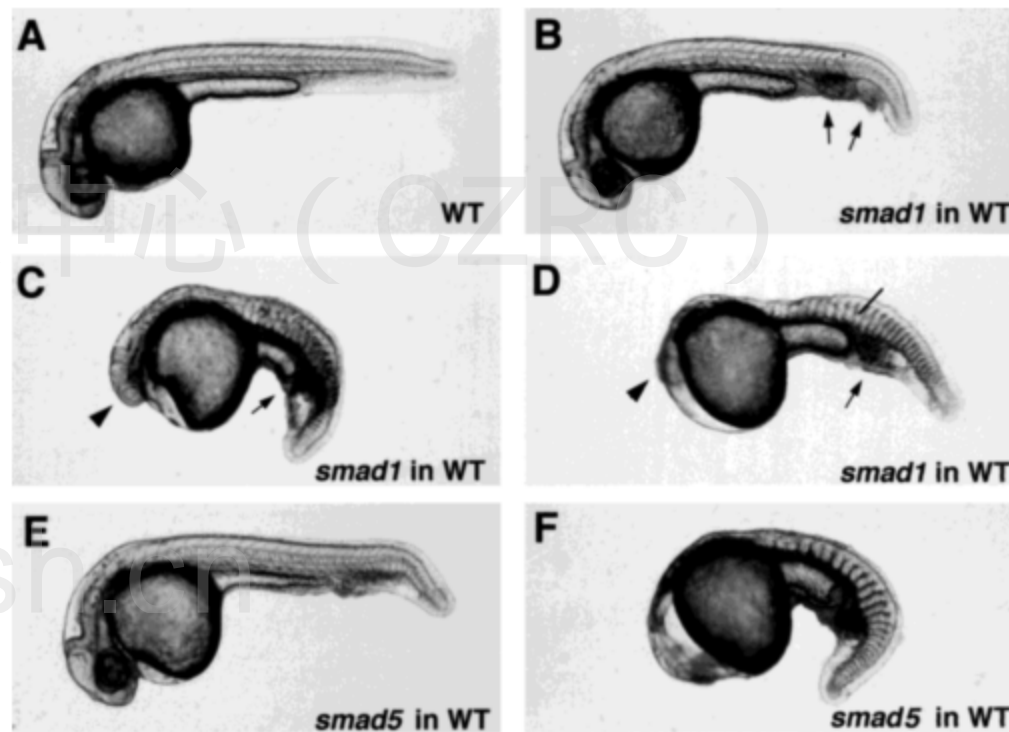
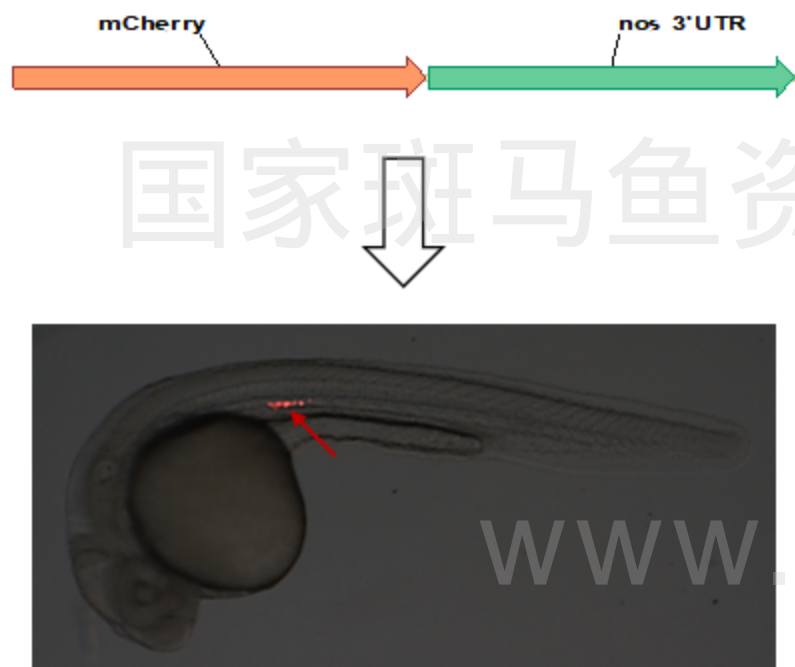




# 1. 斑马鱼基因瞬时过表达技术

## 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。
- 在斑马鱼中常利用**注射mRNA**的方法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。
- 与传统的转基因技术相比：
  - ✓ 瞬时过表达不需要整合到染色体上，因此不受基因组的位置效应和基因沉默的影响，表达效率较稳定
  - ✓ 具有简单、快速、周期短、准确等优点
  - ✓ 仅限于早期胚胎研究

## 国家水生生物种质资源库 (NABRC)

- 1 斑马鱼基因瞬时过表达技术** → 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

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

## 2. 斑马鱼转基因技术

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. 斑马鱼转基因技术

### 2.1 转基因载体的设计

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

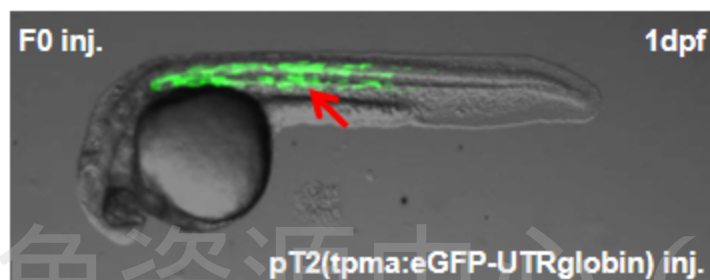
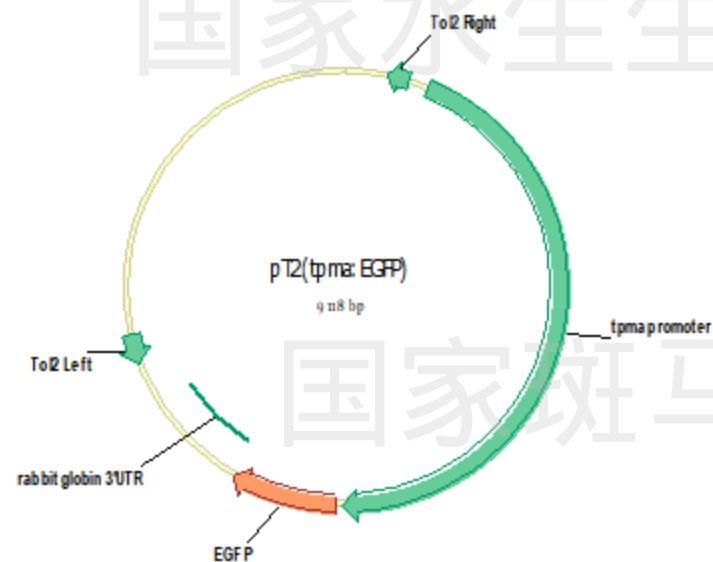
- 决定基因在哪个发育阶段表达
- 决定基因表达的组织特异性(组成型、组织特异型、诱导型)

#### What

- 决定表达的内容

## 2. 斑马鱼转基因技术

以质粒样品pT2(tpma:eGFP-UTRglobin)为例:

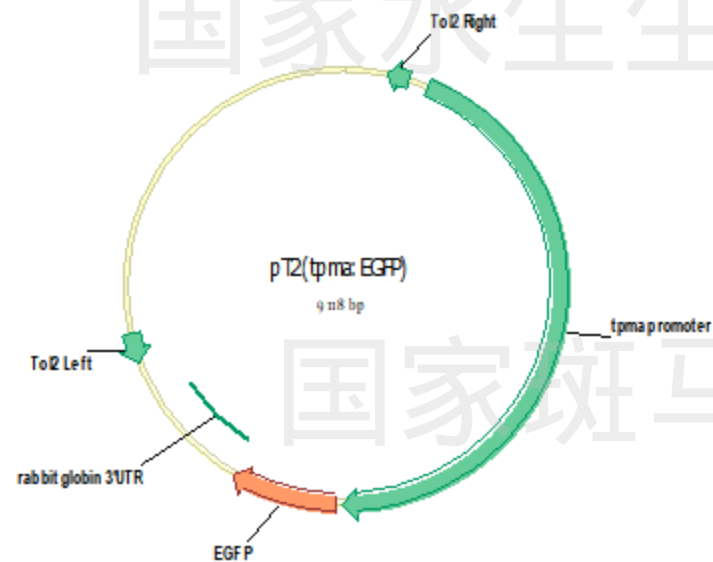


转基因载体的元件:

- 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。

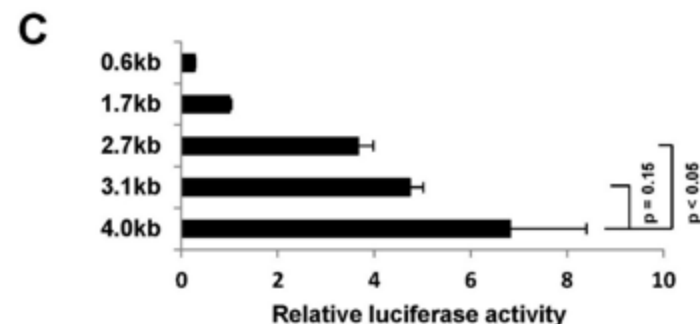
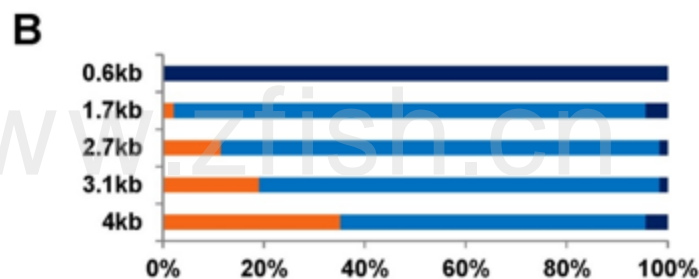
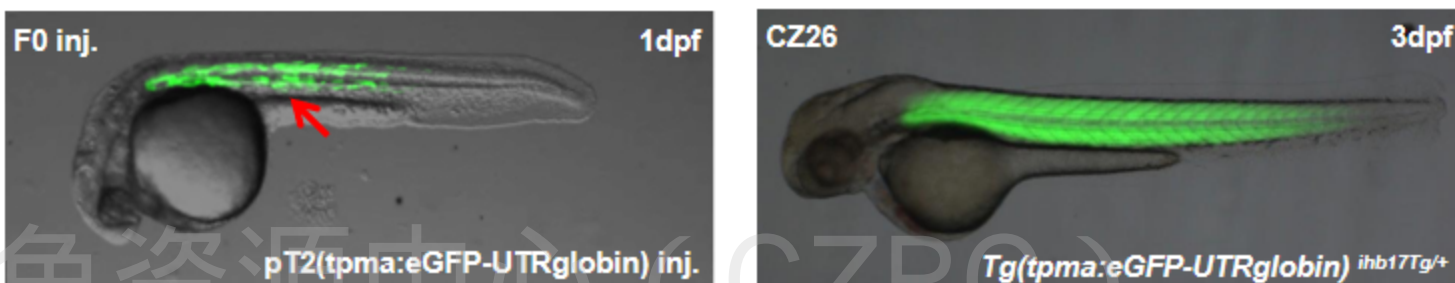
## 2. 斑马鱼转基因技术

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。



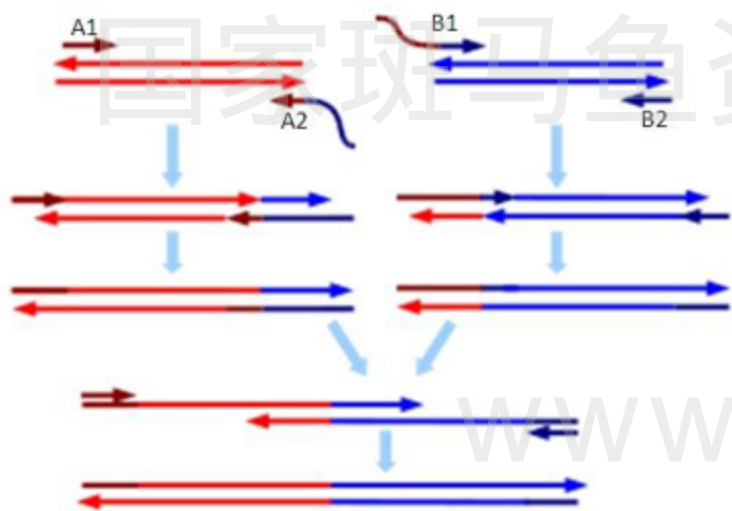
*tpma*启动子分析 (Pang et al., Mar Biotechnol (NY), 2015)

## 2. 斑马鱼转基因技术

### 2.2 转基因载体的构建:

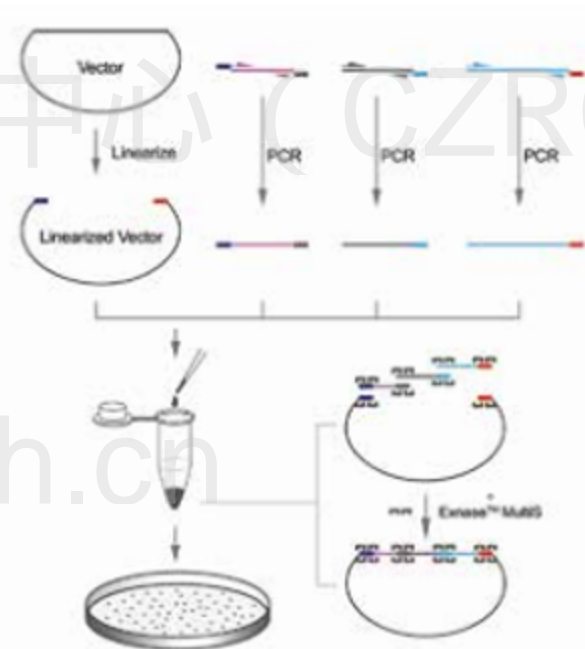
- ① 传统的酶切连接技术 (结合搭桥PCR)
- ② 基于重组酶的无缝克隆技术

#### ➤ 搭桥PCR:



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

#### ➤ 无缝克隆技术:

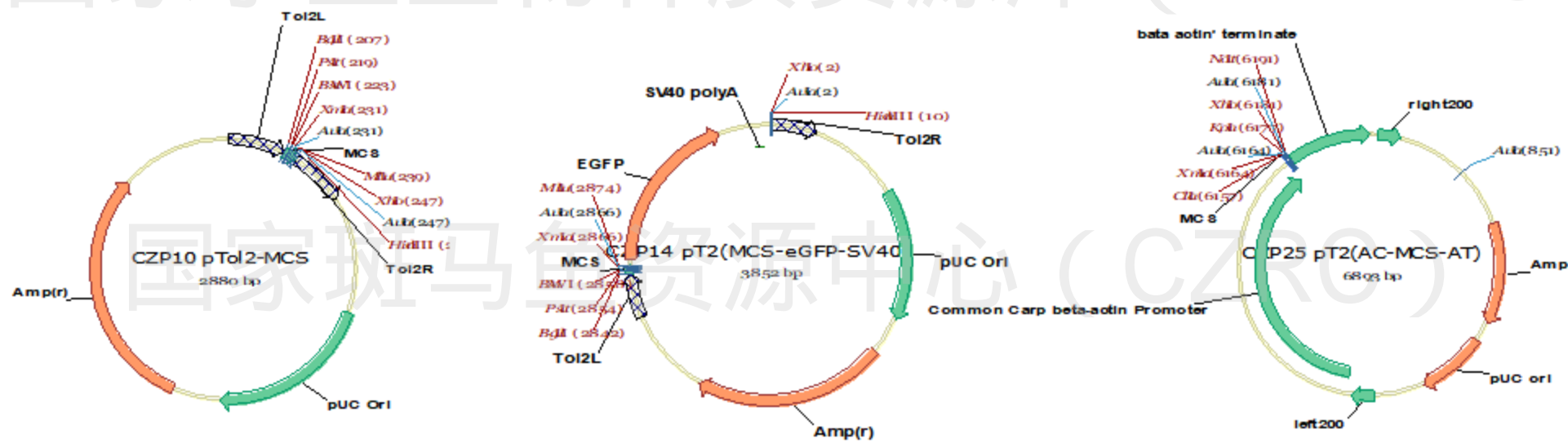


(<https://www.vazyme.com/corpvideo/2/>)



## 2. 斑马鱼转基因技术

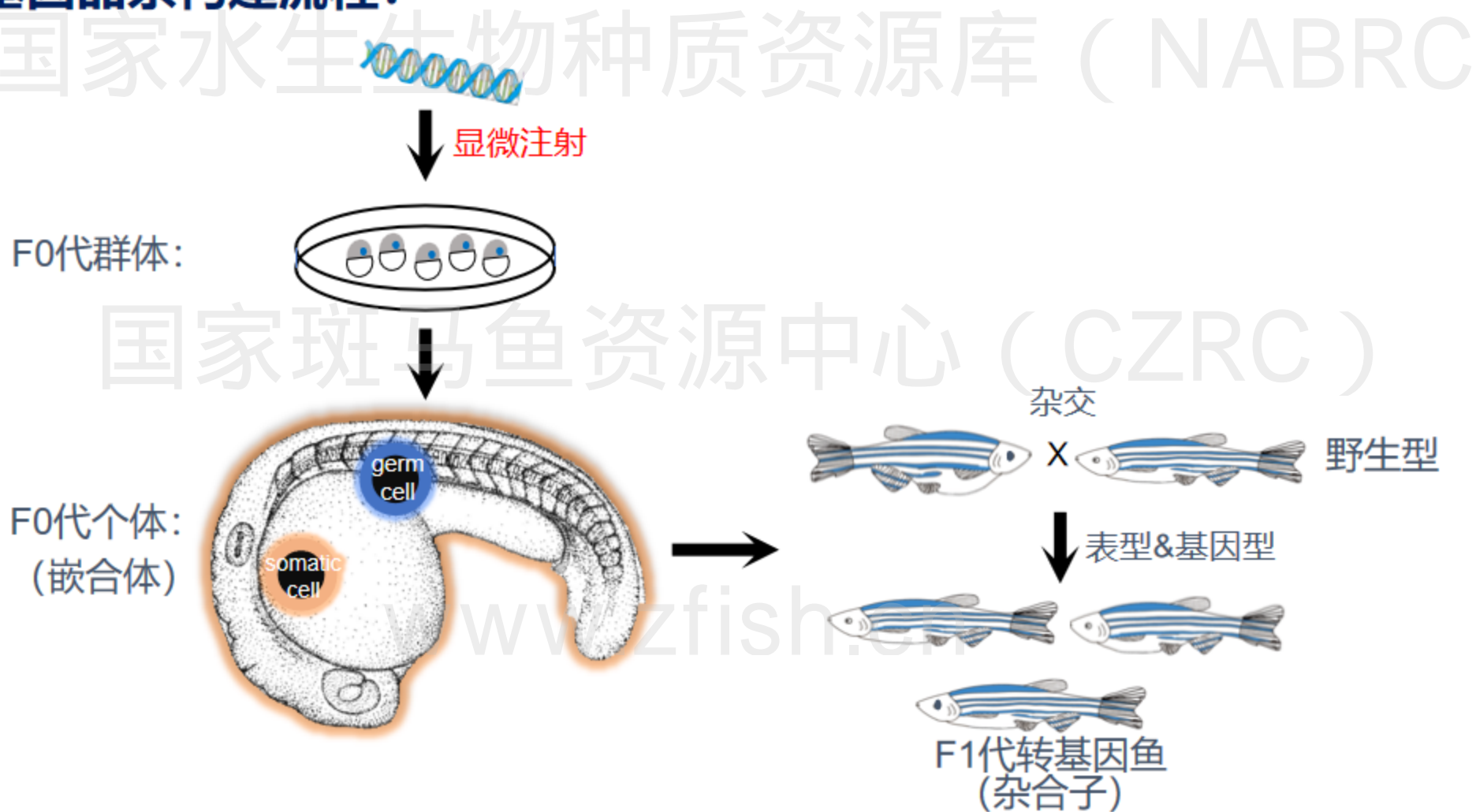
构建转基因载体的工具质粒: 国家水生生物物种质资源库 (NABRC)



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

## 2. 斑马鱼转基因技术

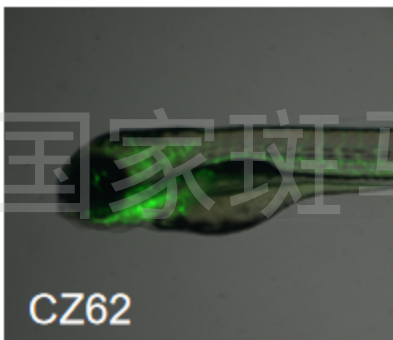
### 2.3 转基因品系构建流程:



## 2. 斑马鱼转基因技术

### 斑马鱼中心保存的转基因品

• <http://www.zfish.cn>



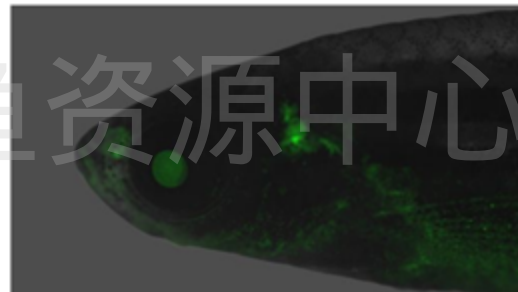
地址: 武汉市武昌区洪山嘴7号中科院水生所 邮编: 430072  
电话: 027-68780570 邮箱: zfish@zfish.ac.cn 网址: <http://www.zfish.cn>

*Tg(mpeg1:EGFP) (AB)<sup>00207z</sup>*和 *Tg(mpeg1:mCherry) (AB)<sup>00207z</sup>*转基因

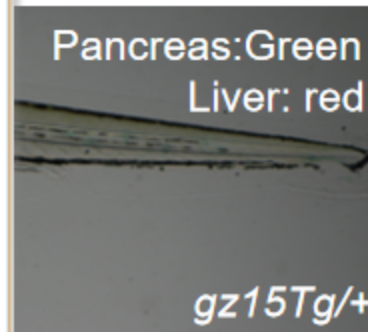
#### 因斑马鱼研制项目报告

1. 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代斑马鱼在脾脏处特异性地表达荧光, 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。

2. *Tg(mpeg1:EGFP) (AB)<sup>00207z</sup>*的阳性F1代转基因鱼的特异荧光表达如下所示:



3. *Tg(mpeg1:mCherry) (AB)<sup>00207z</sup>*的F1代转基因鱼的特异荧光表达如下所示:

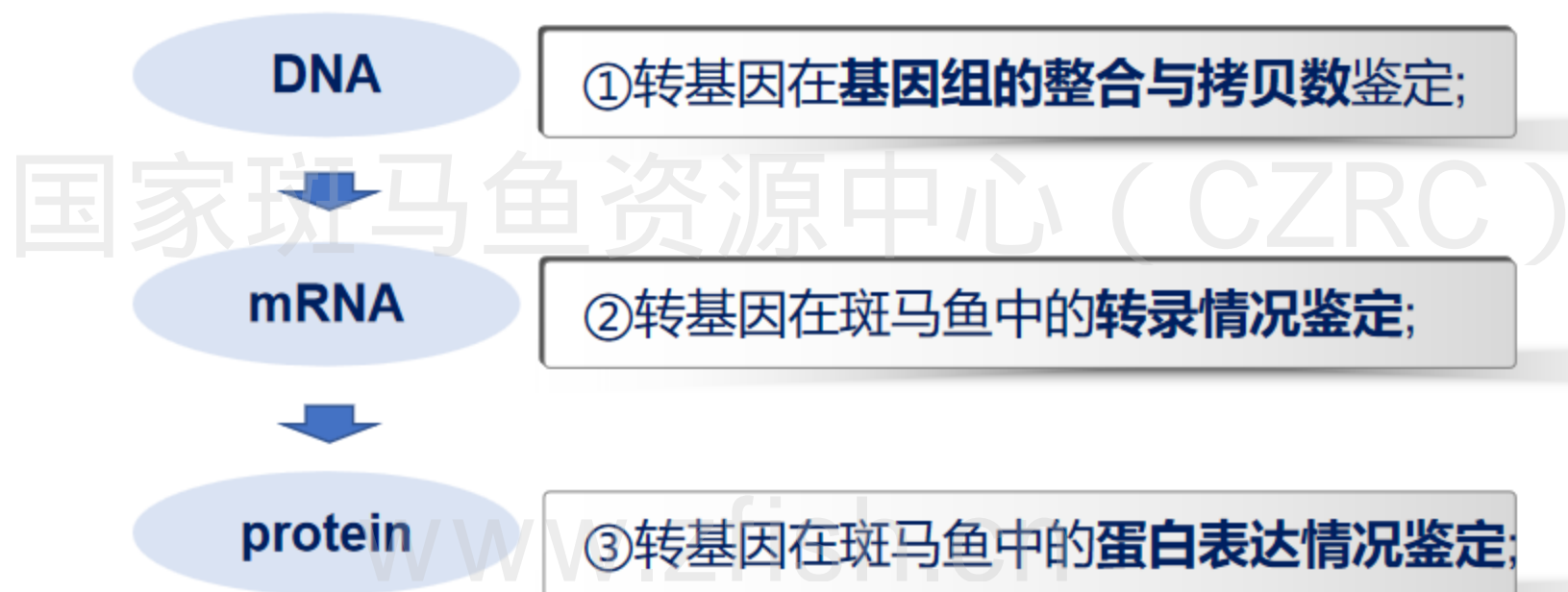


## 2. 斑马鱼转基因技术

### 2.4 转基因品系的鉴定方法

国家水生生物种质资源库 (NABRC)

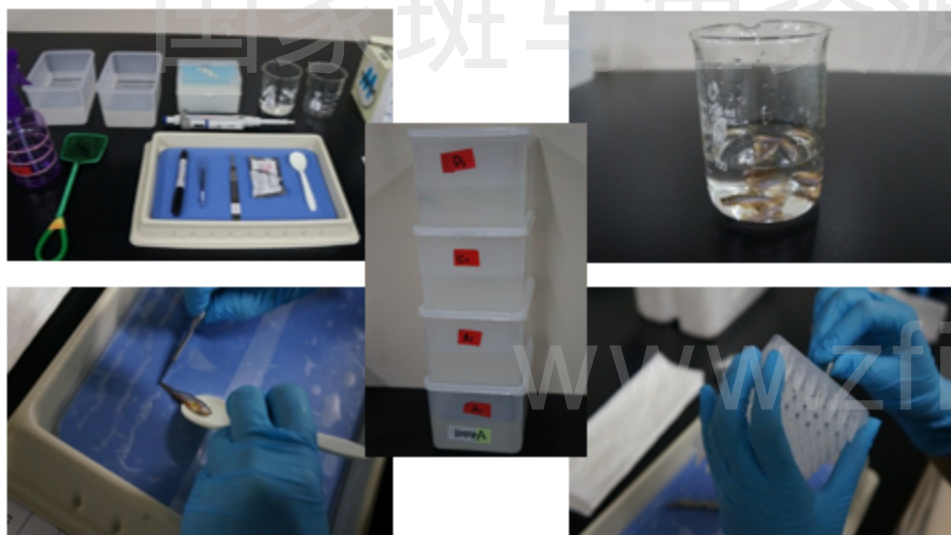
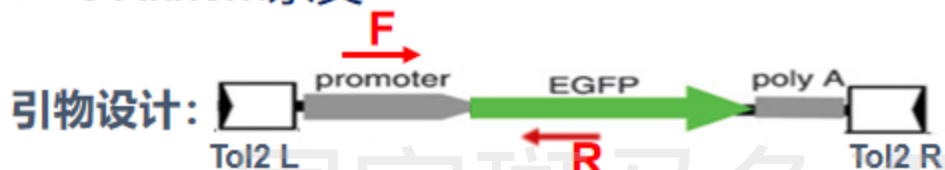
转基因的遗传信息传递:



## 2.4 转基因品系的鉴定方法

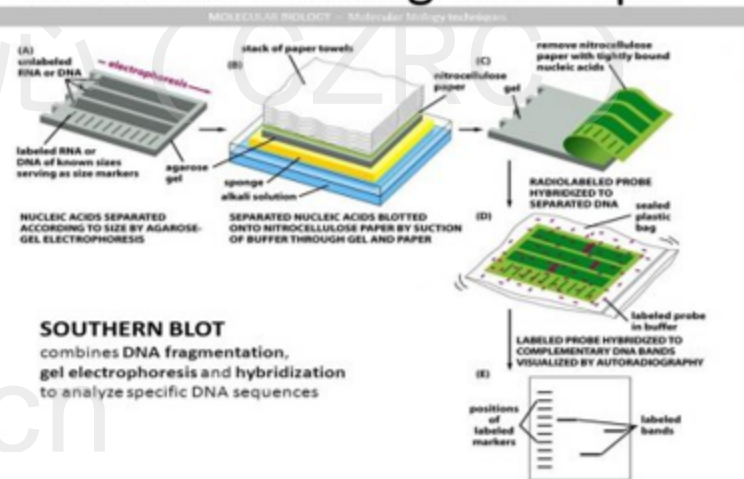
### ① 转基因在基因组的整合与拷贝数鉴定

- 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



麻醉斑马鱼;剪尾鳍;提取DNA样品

### Southern Blotting Technique



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

Southern方法特异性强, 准确度高, 但是实验步骤繁琐, 对实验技术要求要, 且成本高。

## 2.4 转基因品系的鉴定方法

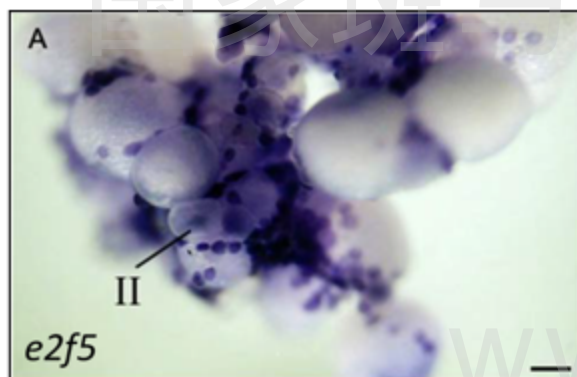
### ② 转基因在斑马鱼中的转录情况鉴定

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

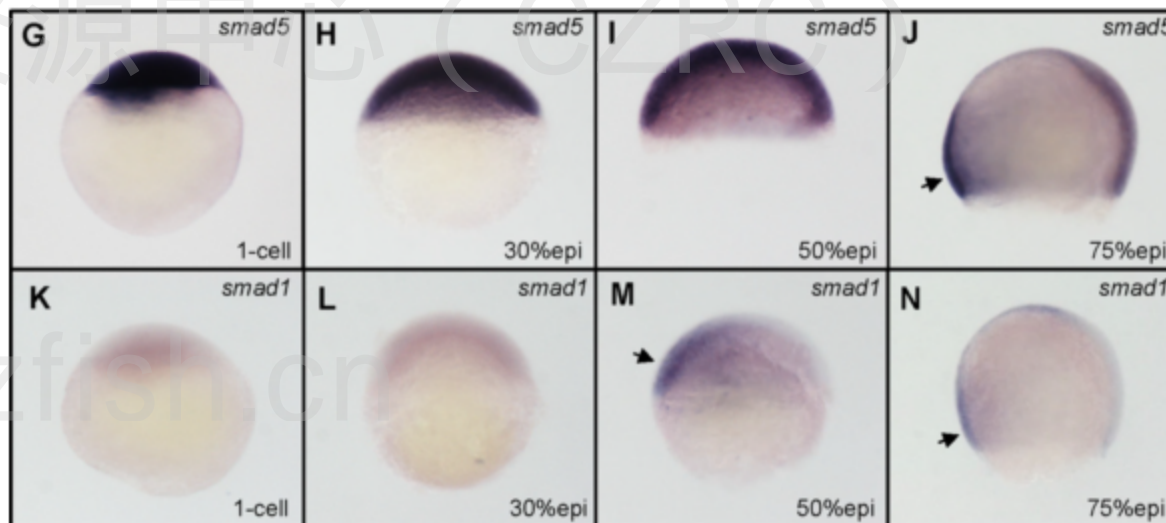
原位杂交技术是利用带标签的反义RNA探针检测胚胎或者组织内基因转录本的原始分布及相对表达水平。该技术能够反映转录本:

✓位置信息

✓相对表达水平信息



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



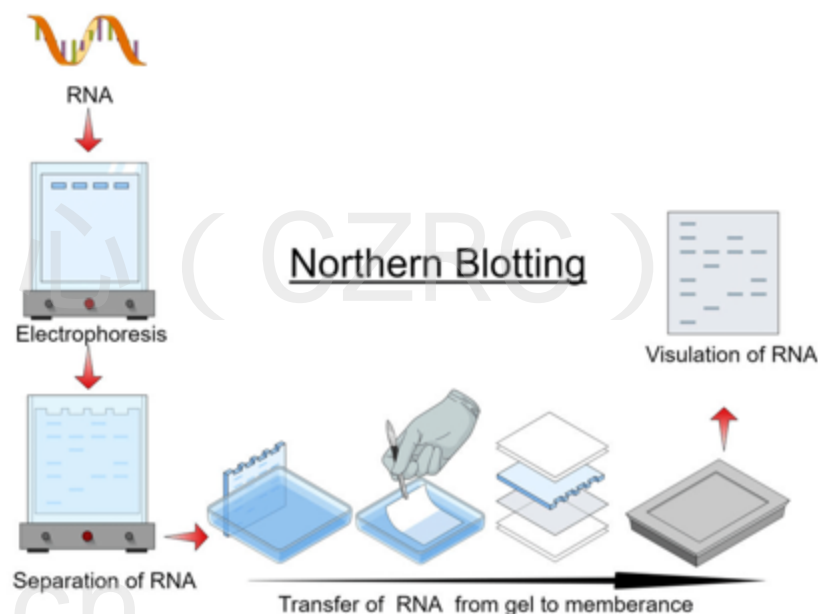
(Wei et al., J Biol Chem 2014)

## 2.4 转基因品系的鉴定方法

### ② 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。

定量PCR技术灵敏度高且用途广泛



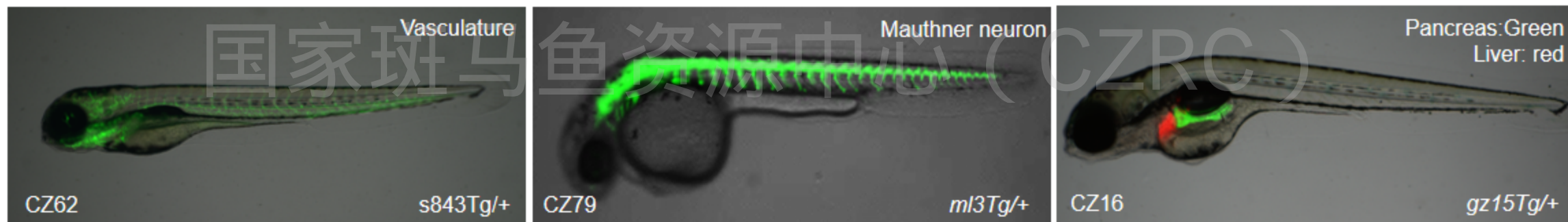
(<https://www.thesciencenotes.com/northern-blotting-principle-procedure-and-applications/>)

Northern杂交灵敏度低

## 2.4 转基因品系的鉴定方法

### ③ 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



#### 荧光表达观察：

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。



## 2.4 转基因品系的鉴定方法

### ③ 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**的特异反应将待测物与酶连接, 然后加入酶反应底物, 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。

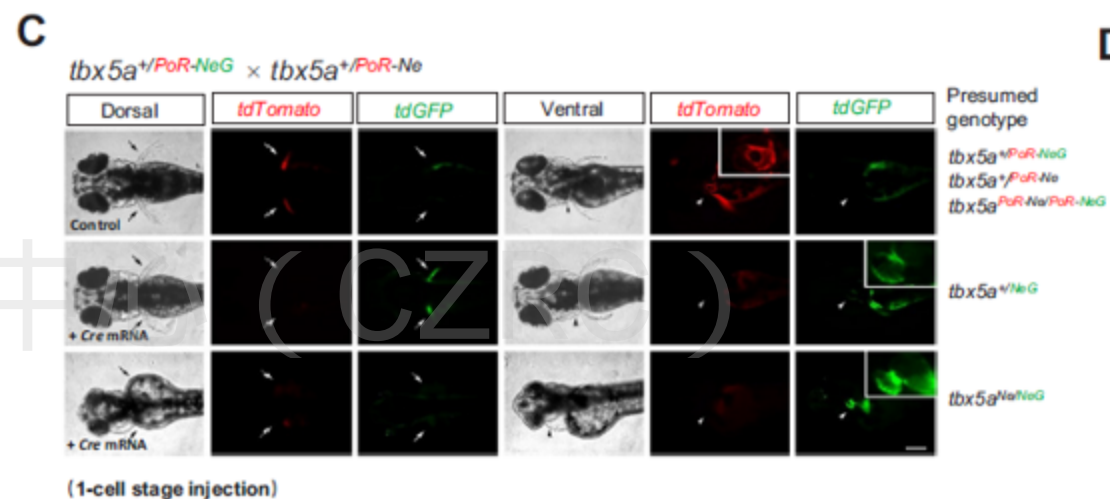
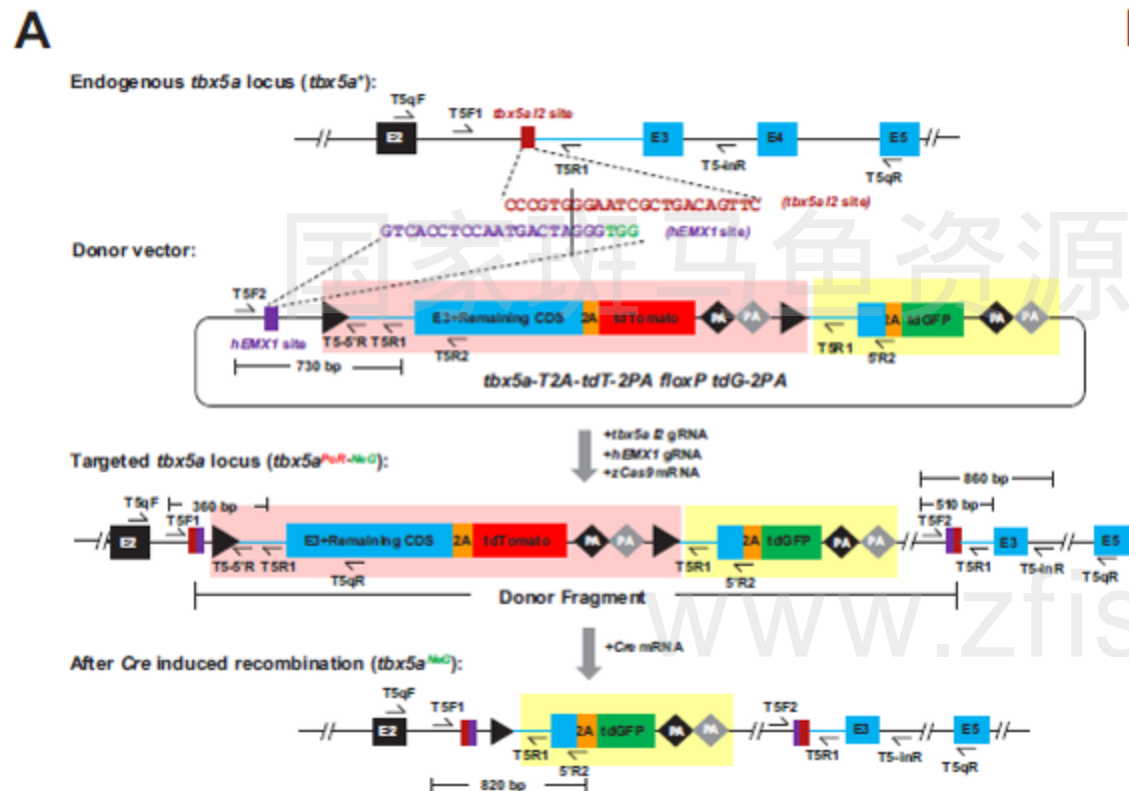
## 国家水生生物种质资源库 (NABRC)

- 1 斑马鱼基因瞬时过表达技术** → 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

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

# 3.斑马鱼基因敲入技术

将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。

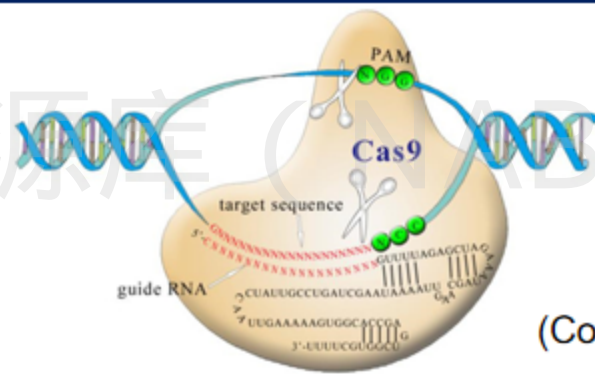


利用基因敲入技术，在*tbx5a*基因序列中插入外源质粒，通过一次插入同时引入两个loxP序列以及荧光蛋白报告基因：  
✓ 可达到基因表达的活体标记与细胞示踪效果  
✓ 可对目的基因实现进行可视化地条件性/组织特异性敲除  
实现了一步法产生双色标记的敲入及条件性基因敲除品系

# 3.斑马鱼基因敲入技术

## 斑马鱼基因敲入技术原理

- 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，斑马鱼中的三种主要修复机制有：
  - 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)
  - 同源重组 (Homologous Recombination, HR)



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

DNA double-strand breaks (DSBs)

Non-homologous end joining (NHEJ)



small insertion and/or deletion

Microhomology-mediated end joining (MMEJ)



predictable small deletion

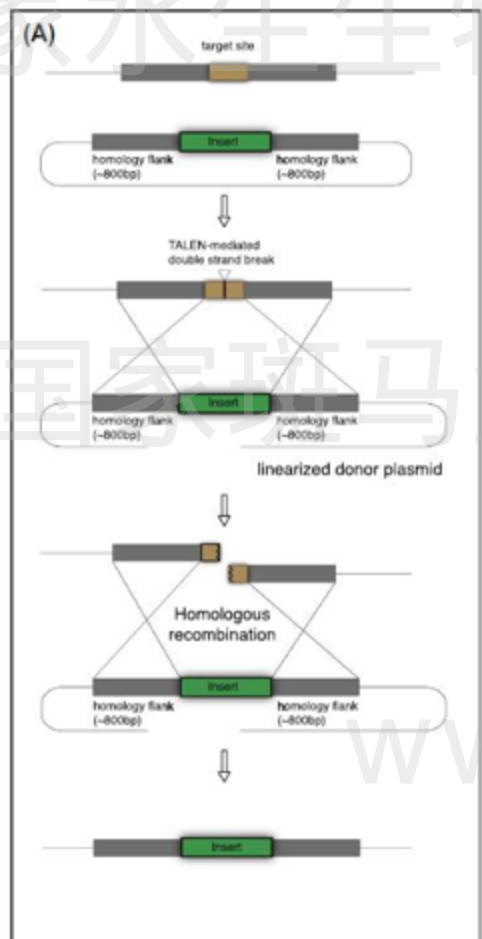
Homologous recombination (HR)



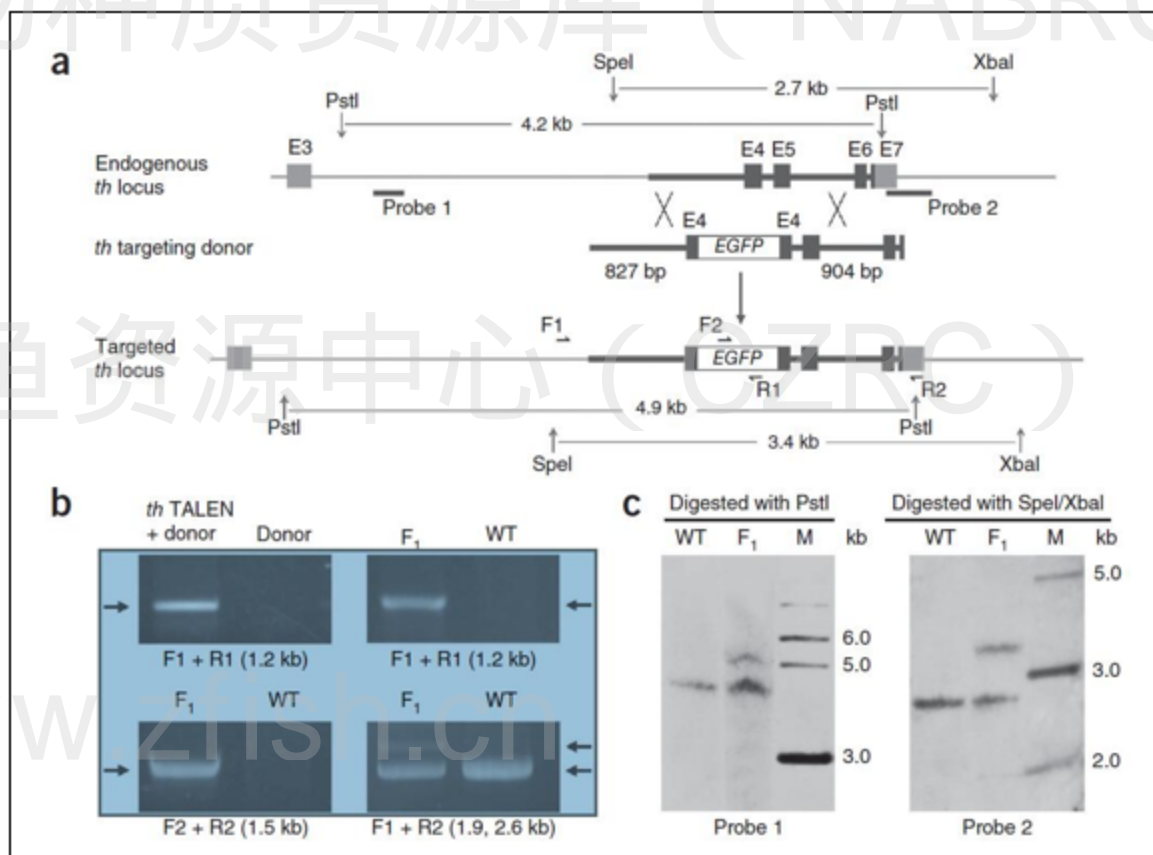
HR using long homology sequences

# 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



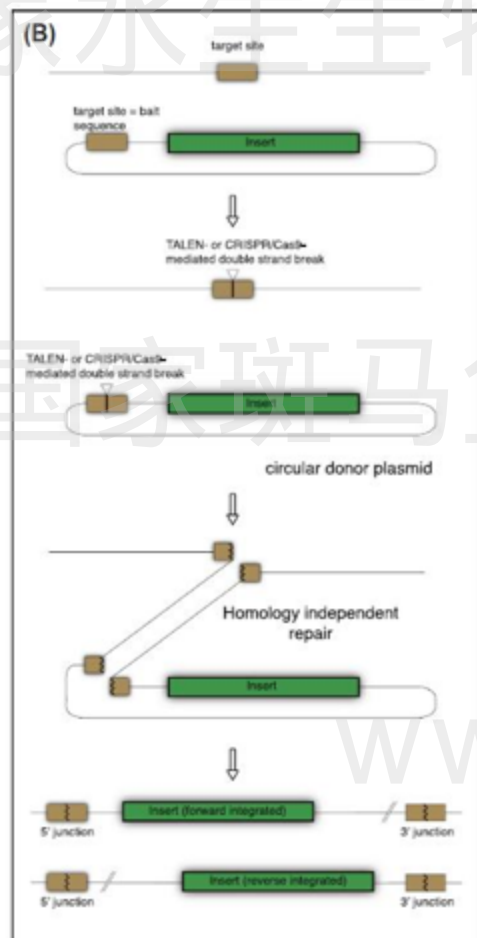
(Auer et al., *Methods*. 2014)



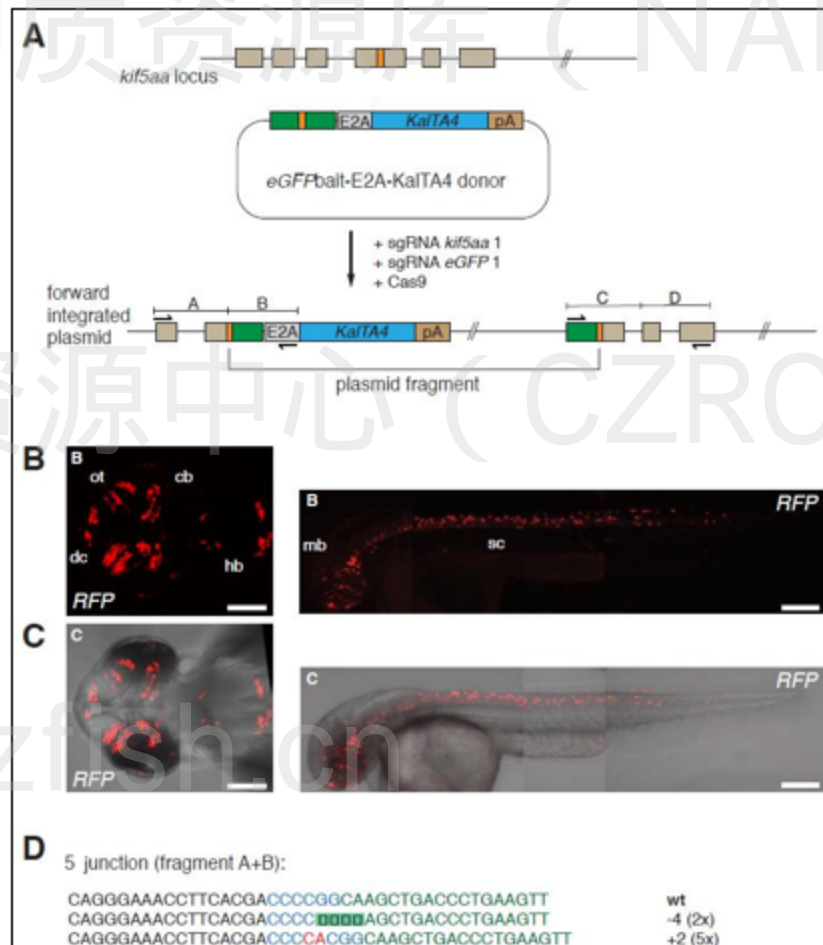
(Zu et al., *Nat Methods*. 2013)

生殖传递率为1.5%

## 3.2 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%-21.1%

# 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

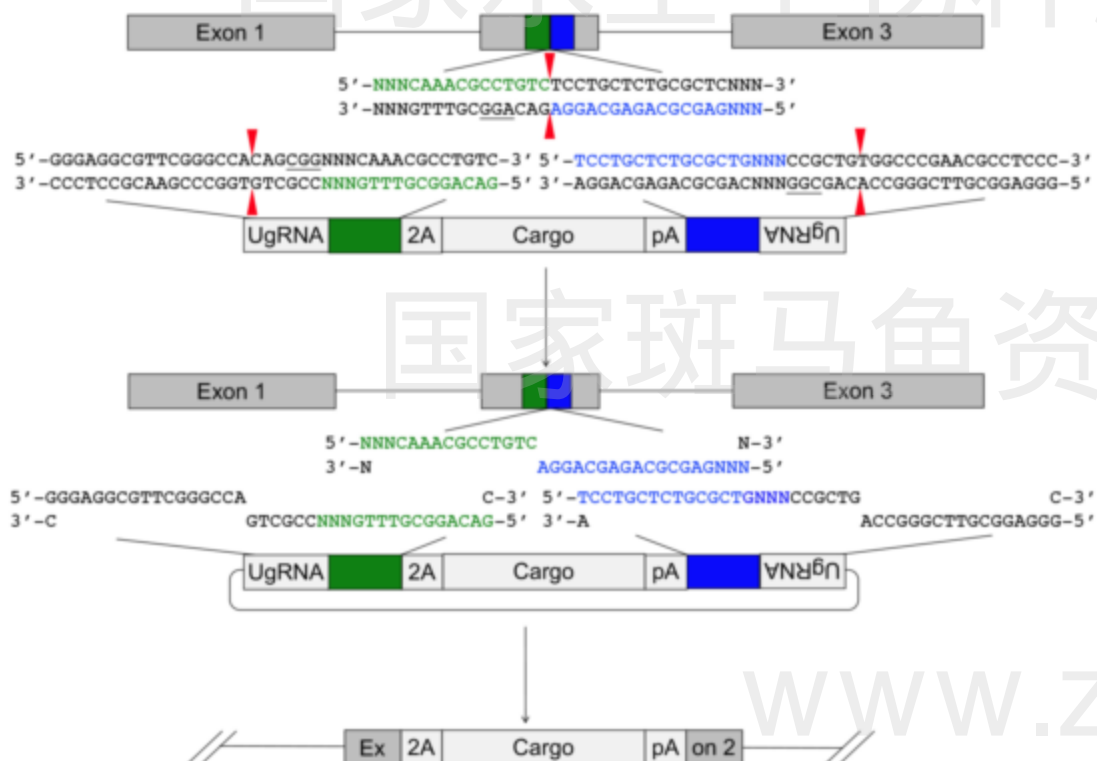


Table 1. Germline transmission of zebrafish GeneWeld GTag integrations.

Genomic target	Exon	5'/3' Homology arm length	Reporter expression	Number of germline transmitting adults	Percentage of germline transmitting adults
<i>noto</i>	E1	24/24	24%	3/5	60%
<i>tyr</i>	E4	24/24	64%	3/8	38%
<i>cx43.4*</i>	E2	24/24	50%	0/1	0%
<i>cx43.4*</i>	E2	48/48	38%	0/4	0%
<i>esama</i>	E4	24/24	21%	12/18	67%
<i>flna</i>	E4	48/42	100%	3/4	75%
<i>msna</i>	E2	48/48	55%	1/4	25%
<i>msna</i>	E6	48/48	26%	1/3	33%
<i>aqp1a1</i>	E1	48/48	4%	2/9	22%
<i>aqp8a1</i>	E1	48/48	14%	1/1	100%
<i>anxa2a</i>	E3	48/48	35%	4/4	100%
			Total	30/61	49%

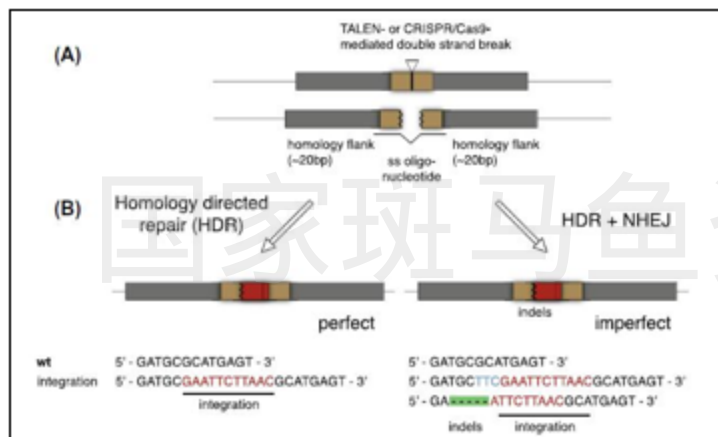
(Wesley et al., *eLife*. 2020)

(生殖传递率为49%)

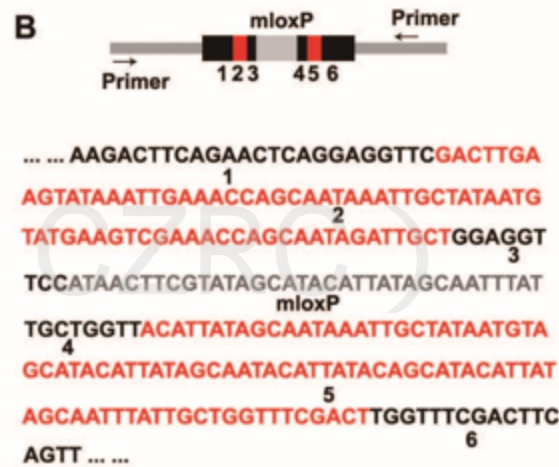


# 3. 斑马鱼基因敲入技术

## 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

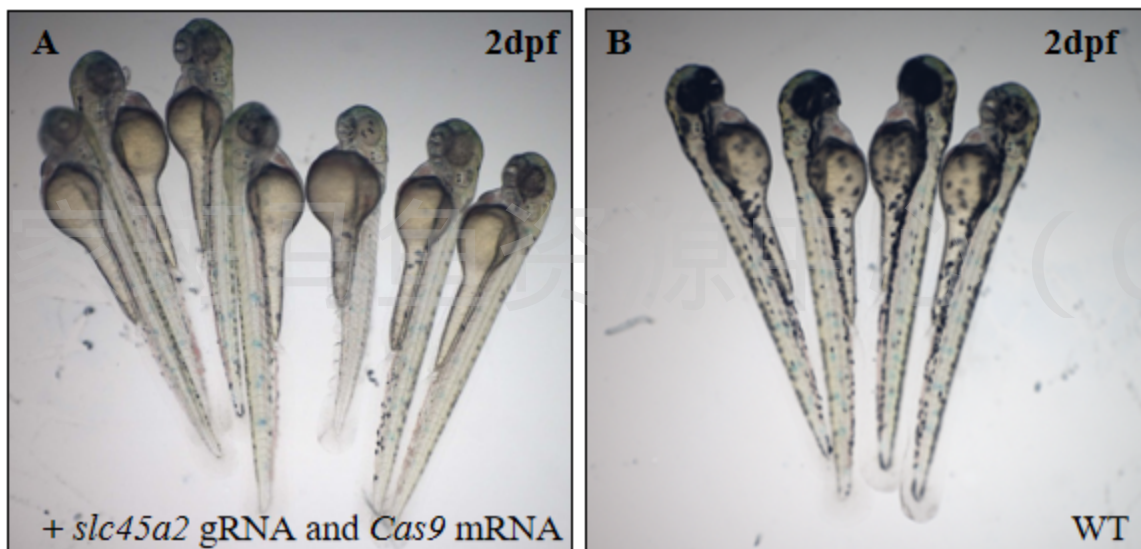
### 3.斑马鱼基因敲入技术

- 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。
- 基因敲入技术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，实现基因序列的精细编辑。
- 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。

# 本次培训实验课显微注射样品

国家水生生物种质资源库 (NABRC)

CRISPR/Cas9样品:



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



中国斑马鱼信息中心