

讲座二 基于CRISPR/cas9技术的基因敲除操作流程

(仅适用于 *S. pyogenes* 来源Cas9蛋白)

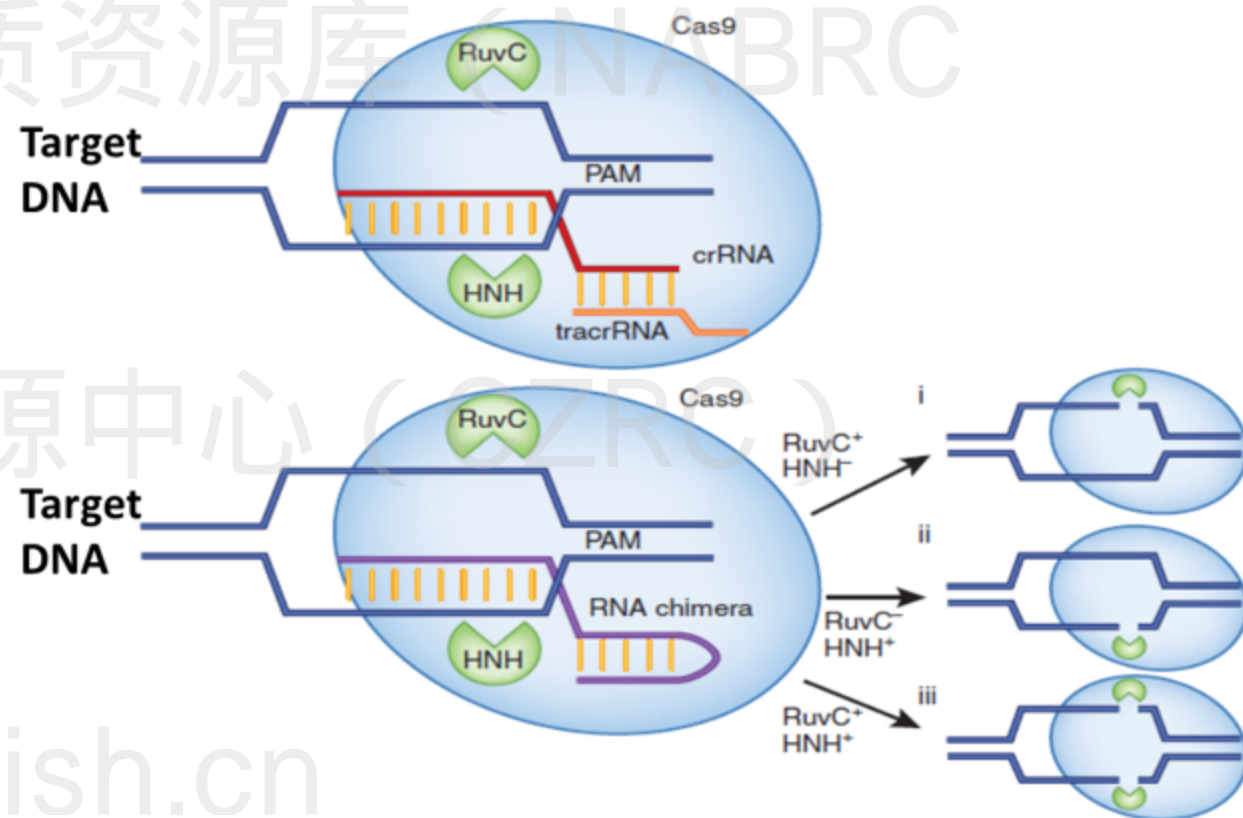
谢训卫

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

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。



CRISPR/Cas9技术原理示意图 (Rodolphe Barrangou et al., Nature Biotechnology. 2012)

CRISPR/cas9介导的基因敲除操作流程

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

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

国家水生生物种质资源库 (NABRC)

➤ 靶点选择方法及原则

➤ RNA合成

➤ 样品准备和显微注射

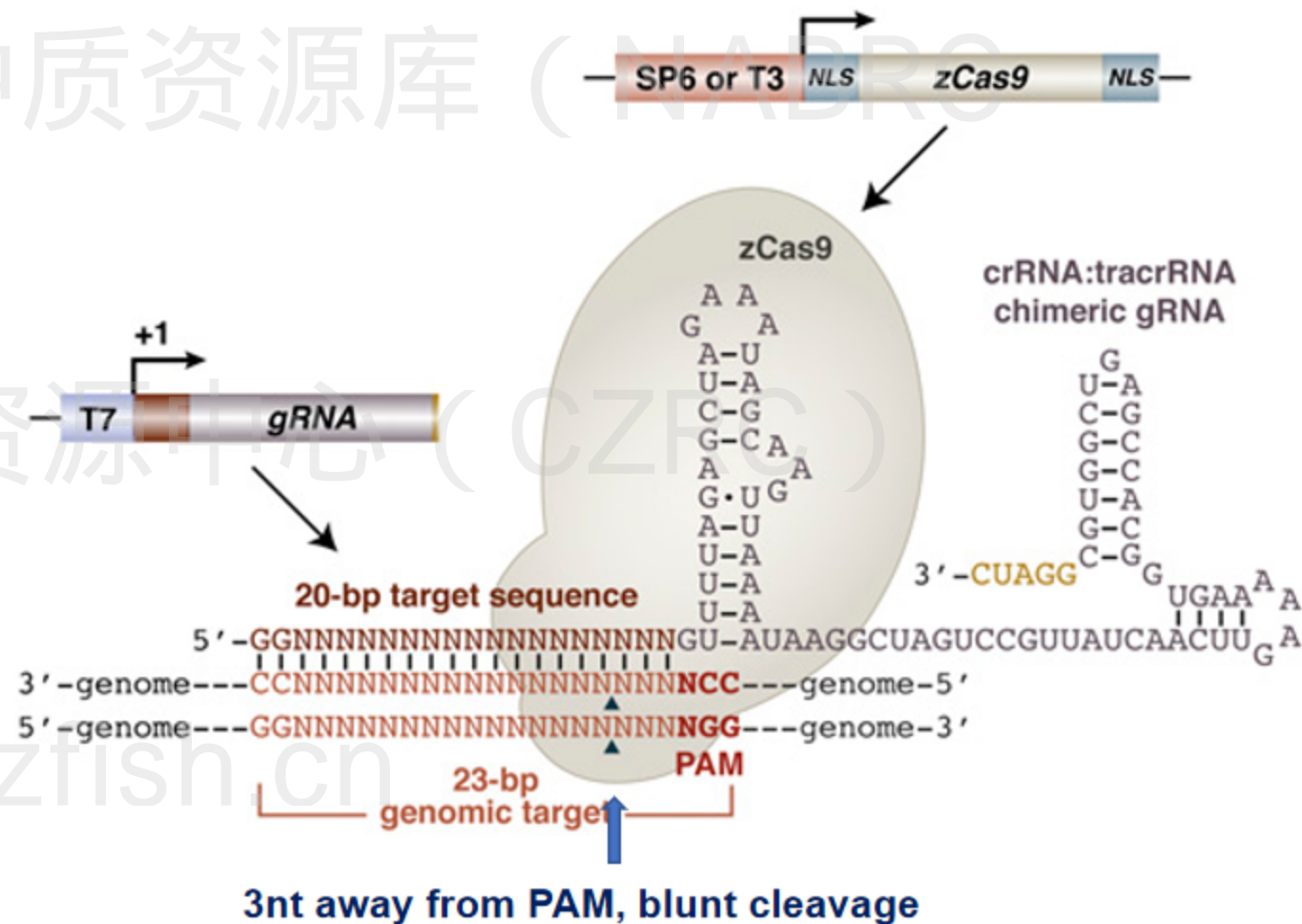
➤ 敲除效率评估

➤ 后续筛选工作

www.zfish.cn

gRNA作用原理

- 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。





- **PAM** (proto-spacer adjacent motif) : NGGNN (*sp*Cas9) , 对Cas9识别靶标至关重要, 严格遵守。
- **种子序列** (seed sequence): 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。
 - ① 种子序列DPSS区, PAM远端区 (12-7) , DPSS区可耐受大部分的单碱基突变, 往往只有某一特定的单碱基替换才会导致打靶失败;
 - ② 种子序列PPSS区, PAM近端区 (6-1, 3号位点除外) , PPSS区的任何单碱基突变都有可能打靶效率的下降, 不同的碱基替换对打靶效率的影响有所差异。



- gRNA序列特异性评估

GGUGAGUGAGUGUGUGCGUN
GGUGAGUGAGUGUGUGCGNG
GGUGAGUGAGUGUGUGCNUJ
GGUGAGUGAGUGUGUNGUG
GGUGAGUGAGUGUNCGUG
GGUGAGUGAGUGUNGCGUG
GGUGAGUGAGUNJGCGUG
GGUGAGUGAGUNGUGCGUG
GGUGAGUGAGUNUGCGUG
GGUGAGUGAGNUGUGCGUG
GGUGAGUGANUGUGCGUG
GGUGAGUNUGUGUGCGUG
GGUGAGUNAGUGUGCGUG
GGUGAGNAGUGUGCGUG
GGUGANUGAGUGUGCGUG
GGUGNUGAGUGUGUGCGUG
GGUNAGUGAGUGUGUGCGUG
GGNAGUGAGUGUGUGCGUG
GGUGAGUGUGUGUGCGUG

mismatched guides



国家水生生物物种资源库 (NABRC)
国家斑马鱼资源中心 (CZRC)



- 5' 端GG- T7 启动子
- 5' 端GN- (非GG, GA, GT, GC) T7 启动子(效率相对要低一些)
- 5' 端GA-, AC- SP6启动子

www.zfish.cn

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 在基因编码序列中选择靶点:
 - 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, 破坏掉基因的剪接;
 - 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。

gRNA靶点的选择原则

1. 在该基因所在的基因组
序列上选择靶点;

Marked-up sequence

Download sequence BLAST this sequence

Exons **slc45a2 exons** All exons in this region

Markup loaded

```
>chromosome:GRCz11:21:19445342:19486289:1
CTCACTTCACTTGGAGAAATGTGTGGAATGTAGCATTTTAAATCCATGTGGCACCATCTGAC
CGGTTCCCTGTGATCCACAGCTTGGAGTCTATAGATTAAAGTCTGAGAGAGAGTAGATG
ATGACCACTGGGAGCTCACATGATTCTCACAGAGACTCGCCGGAGCTCTCATGACAGAT
TTGAGTAAACCCAGCAGTCTTGTGAATGGAGAGGCGAGTTCGGTGGAGGAGTGTGCTT
TAACTCTACTATAAATTTGTTGCCATCTTTTTTCCAGCCOCCCTTCAAGCCGCTCGCAA
GCAATCACATGGTACGTCAGTTGATTTTCCAAATCCAAAGTGTGCAACACCACAAAGGAATG
TTTGTAGATCTTTACCATTTCCCCCCCCAACAACTACCATTTCCAGTATGTGAAGTAA
TGAATGTGTGAGGCTTGGGCTTAACTTTTAAAGCTATTGTCCACTCCGAGCAGGAGTGG
GAGAAAGCATGTTGAGATCATAATCTCAGTCACATGCTTACAAGCCAGCTACAAAAAC
AGGGCCAAAGGAGCCACCACCTCCCTTCCCTTCTCAGCTCACAAGTCTTGGATCCACTG
CTCAACTATGCCTAAGAAATCAAGAGTCTTACCATCCAGAACCATGACTCTTCTTACTGA
GGACCAAGCTTGCAGGTTCTCTGCACCCGAAAGCCCAATTCATCCATGGAGCAGTACCA
GTTGGACTCGGAGCTTAAAGAGGACTGTTTGGACAACATGGAAGCCGCTGTTTTTGGAGT
GTTGGAGCTCCGAGGCTCTAGGGGAAGGTTGATTATGCACGGGTCCGCCATGTTTTGG
AAGGAAATCTGCTACGCTGTTGAGGCTGCGTTTGTCAAGCCAGTGTGCTGAGCCTTTG
ACTTCCAGAGCTCTGTACAGTCTGGTGTGCTCATAAGCCOCCATTTTGGGTTTTATCCT
ACAGCCGCTCATCGGCTCGGCGAGGACTACTGTAGGTCGTATGCGGCCGAGGAGGACC
GTACATACTTTACTGGGATTCTGATGTTAGTGGGCATGACTTTTATTTAAATGGAGA
TGCAGTCACAACAGTGGGTGAAGTCAAGTAACTTGTATAGATTTTACTTCATTTTGAA
GACAAAGCACTAAATACACAAAGGAAAGTAGATGAGTTTCAAGGTCACACAGCTCATGTT
ATTTCTGGAATATCAAGGGTTTTAAAGCTCTTTTCCAAACAGTGAAGTCAAGATTTTT
TATTTAATTAATTTCCGTCCAAGTCATGGAATACAGGGATTTCTGTTTTTCACTTACAG
TTGAAGTCAGAAATTTAGCCOCCAGTTTATTTTTCCCTAAATTTCTGTTAAACAGAGC
GAAGATTTACATAATAGTTTTAAATCACTTTTCTAACTAAATTTATTTTATTTATCT
TTTCCATGATGACAGTAAATTAATTTCACTAGATAATTTTAAACACTTCTATACAGC
TTAACTGACATTTAATGGCTTAAACAGSTTAATTCGGTTTACTAGCCAGSTTAACTTAA
TTAGGTTAAGTTATTGTATACACATTCATATGATGATGTTTGTCTGTAACTATTGAAAG
ACAAAATAAGCTTAAAGGGCTAATAATTTTGTCTTATAATGATGTTTTAAATAAATAA
AAAAACGCTTTTATCTAGCCGAAATAAACAATAAGACTTTTCCAGAAAGAAAAATA
TTATCAGACATACTGTGAAAATTTCTTGCCTGTTTAAACATAATTTGGGAAATATTTAA
AAAAGAAAAAATTTGAAAGAACGGCTAATAATTTCTGACTTTAACTGGATATATATTTACA
ATACAGTATTTGTTAATAAAGCACATTTAAACACAACCAACATTTGCTGTACATTTGGAGT
ACTAAAGGCAGAGAAAGCAGAAATAAAGAAACATTTAAACAAATAAAGCAATAAAA
GCAGTGATTGAGGAGCATTGAAAAGAGAGAAATAGATAGGTTTTAAATGGACTTAA
ACACAGAAATGGAGGAGAAAGTCTAATGTGAATTTGGTAGAGTGTCCAGAGATTTAGGA
GCAGAACTGCAAAATGCTTGATCACATCATATAAATAATATAATTTTTAAAGCGTGTGT
TGTAATGCTTAGACTATTTCTCTGCTCAATTTTATTCTTTTCTGCTCATCAATTTGGCAA
```

cDNA sequence

Download sequence BLAST this sequence

Codons Alternating codons Alternating codons

Exons An exon Another exon

Variants 3 prime UTR 5 prime UTR Missense Synonymous

Other UTR

Markup loaded

• Variants are filtered by consequence type

```
1 CTCAACTATGCCTAAGAAATCAAGAGTCTTACCATCCAGAACCATGACTCTTCTTACTGA 60
.....ATGACTCTTCTTACTGA 17
.....-T--L--L--T--E 6
61 GGACCAAGCTTGCAGGTTCTCTGCACCCGAAAGCCCAATTGCATCCATGGAGCAGTACCA 120
18 GGACCAAGCTTGCAGGTTCTCTGCACCCGAAAGCCCAATTGCATCCATGGAGCAGTACCA 77
6 --D--Q--P--C--R--F--S--A--P--E--S--P--I--A--S--M--E--Q--Y--Q 26
121 GGTGGACTCGGAGCTTAAAGAGGACTGTTTGGACAACATGGAAGCGGCTGTTTTGGAGT 180
78 GGTGGACTCGGAGCTTAAAGAGGACTGTTTGGACAACATGGAAGCGGCTGTTTTGGAGT 137
26 --V--D--S--E--L--K--E--D--C--L--D--N--M--E--A--A--V--F--G--V 46
181 GGTGGAGCTCCAGGCGCTTAGGGGAAGGTTGATTATGCACCGGCTCCGATGTTTTGG 240
138 GGTGGAGCTCCAGGCGCTTAGGGGAAGGTTGATTATGCACCGGCTCCGATGTTTTGG 197
46 --V--E--P--P--R--R--S--R--G--R--L--I--M--H--G--S--A--M--F--G 66
241 AAGGAAATCTGCTAGCTGTTGAGGCTGCGTTTGTACAGCCAGTGTGCTGAGCGTTGG 300
198 AAGGAAATCTGCTAGCTGTTGAGGCTGCGTTTGTACAGCCAGTGTGCTGAGCGTTGG 257
66 --R--E--F--C--Y--A--V--E--A--A--F--V--I--P--V--L--L--S--V--G 86
301 ACTTCCAGAGCTGTGATAGTCTTGTGGTCTCATAAGCCOCCATTTTGGGTTTTATCCT 360
258 ACTTCCAGAGCTGTGATAGTCTTGTGGTCTCATAAGCCOCCATTTTGGGTTTTATCCT 317
86 --L--P--R--R--L--Y--S--L--V--W--L--I--S--P--I--L--G--F--I--L 106
```

gRNA靶点的选择原则

2. 在基因编码序列中选择靶点:

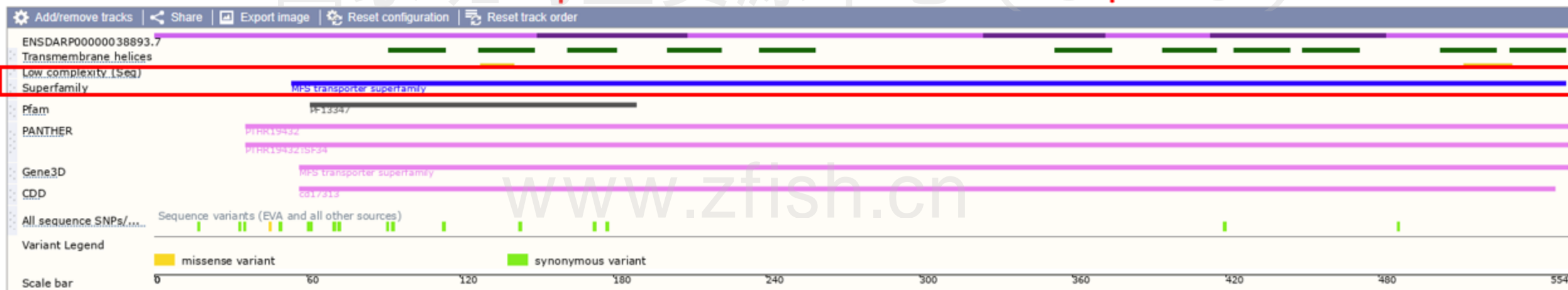
- 靶点最好是位于翻译起始密码子ATG之后和基因编码序列全长2/3之前的区域进行选择, 不要选择5' -UTR和3' -UTR区域;
- 最好能破坏重要的功能域;

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。

适合靶点选择的外显子exon2-4

Protein summary

Protein domains for ENSDARP00000038893.7



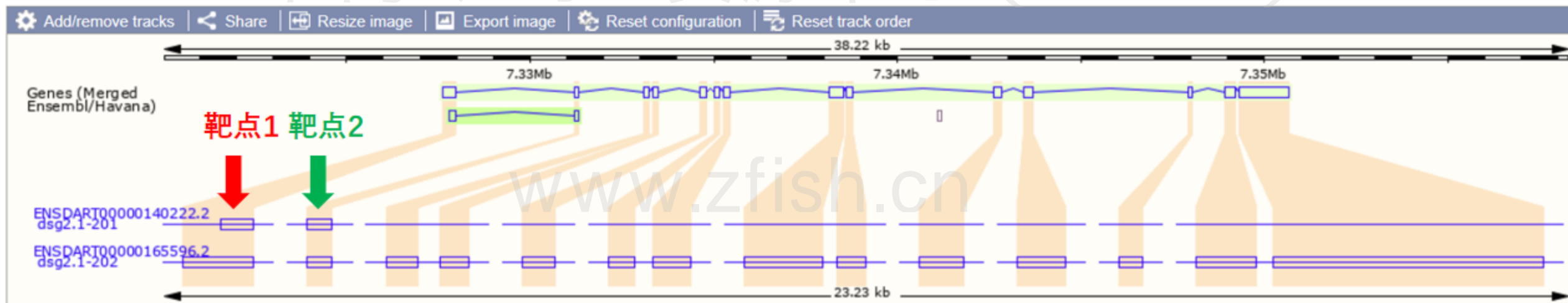
gRNA靶点的选择原则

2. 在基因编码序列中选择靶点:

- 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;
- 打靶最好能破坏重要的domain和/或所有的转录本等;

Transcript ID	Name	bp	Protein	Biotype	Flags
ENSDART00000140222.2	dsg2.1-201	291	No protein	Processed transcript	-
ENSDART00000165596.2	dsg2.1-202	4038	No protein	Processed transcript	Ensembl Canonical

Splice variants ?



2. 在基因编码序列中选择靶点:

- 靶点也可以在外显子和内含子的交界处选择, 破坏掉基因的剪接;

Exon5

```
tcaatttattgtgtccgtgctaatttaaagattctacttatttattattttgttgtcatcct  
tgagattactaaacaaaacaaaataatagattttgggtaacaggttttcttaaaaaaaaa  
acgctagtagtttgtagtggtttgcattgtttcctacggttctactataactgacagttta  
ttctgctactgtatattattctgtctgtaaccacagAGCCACCATAACATCTCTGGAGGAC  
TTTGAGCAGAGGCTGAACCAGGCCATCGAGAGGAACGCTTTTCTGGAGAGTGAACCTGGATG  
AGAAAGAATCTCTCCTTGTGTCTGTGCAGAGACTAAAAGATGAAGCCAGAGgtatttactg  
actctgctctcagtaatctgggtcatgtgtaattacagacagttcctcattccaag
```

gRNA靶点的选择原则

2. 在基因编码序列中选择靶点:

- 可在正义链或反义链上选择靶点;

```
caaactggtgagctacaagtagagagaattttcagtccttgatgtttcttaaagttgtataactaaagt  
at ttattaacattgagtggtgatttactgaactaagcatgacgttgtgtttttcaccgcagCCATAAT  
ATCAGACAGAAATTTAAAAAGGACATGGCCATCGTGGTGGTGTGTTTGGAGTGGTTTTGTTTGAC  
TTTGCCGCAGACTTCATTGACGGACCCATTAAAGCCTATTTGTTTGATGTGTGTTCTCATCGGGATA  
AAGAGCGGGTCTTCATTACCATGCTTTACTCACAGgtaagaactaataacgctcatttagcttggc  
tttcttacagcagaaatgtacattggctgggtcagttggcgtttctgtgtgaagtttgcattgttctc  
cccatgtttgcgtggacttccttgtggtgctccattttccgtttccgctatgtataac
```

靶点1 21bp **GGCCATCGTGGTGGTGTGTT** (tgg)

靶点2 20bp **GGGTCCGTCAATGAAGTCTG** (cgg)

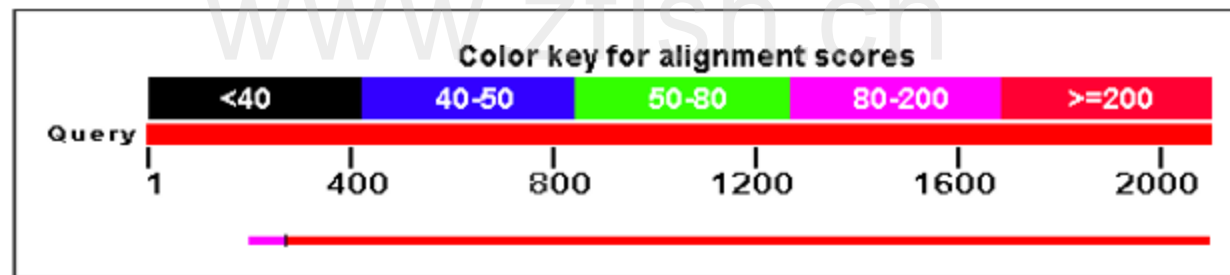
*对于有1个或多个重复基因的基因:

Zko239: >chromosome:Zv9:1:10786533:10788626:-1

Zko240: >chromosome:Zv9:1:10795796:10797865:-1

Zko239和zko240基因组序列比对结果基本一致, 97%的相似性, 编码序列比对为95%的相似性。

Q: 这两个基因是重复基因, 基因序列的高度一致导致单基因敲除靶点很难选择。
在两个基因共有的序列上选择靶点, 同时破坏这两个基因



**对于有1个或多个overlapping gene 的基因:

- overlapping gene为非编码基因: 少数碱基的改变不会造成太大的影响, 照常选择靶点
- overlapping gene为编码基因: 满足目标基因打靶要求的情况下, 尽量减少对overlapping gene的影响

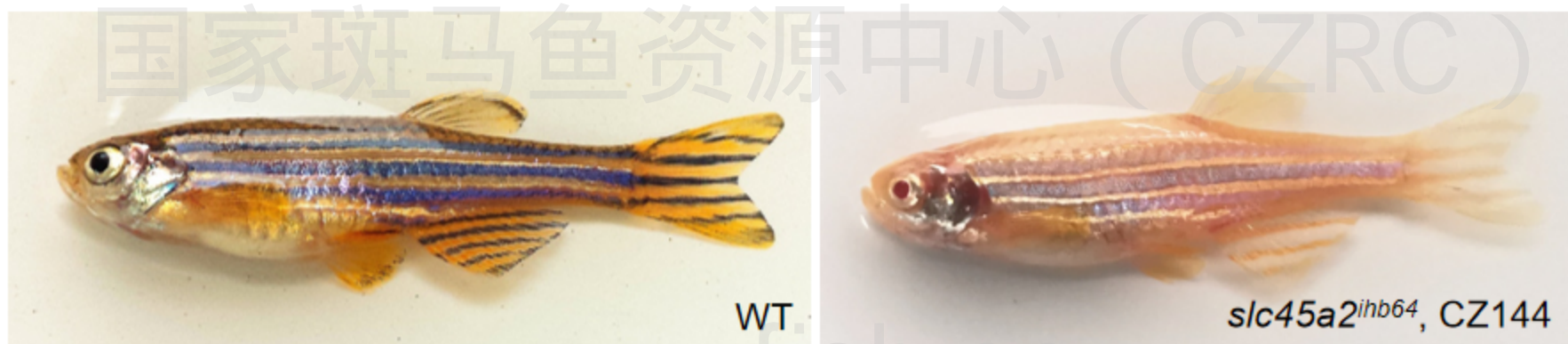
▶对于含“TTTT”转录终止序列的靶点，应避免选择

✓ 基因1靶点 20bp **GTTTTTGACTCGACAGCTTA**
合成失败，同一外显子上找到有效靶点

✓ 基因2靶点 21bp **GAGCGGCCATCATGTTTTTAG**
合成成功，基因敲除失败，同一外显子上找到有效靶点

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>

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	Zebrafish International Resource Center (ZIRC) (order this)
hu1844	Point Mutation	Unknown	Unknown		
ihb64	Insertion	Unknown	Unknown	CRISPR	China Zebrafish Resource Center (CZRC) (order this)
ihb65	Small Deletion	Unknown	Unknown	CRISPR	China Zebrafish Resource Center (CZRC) (order this)
ihb66	Small Deletion	Unknown	Unknown	CRISPR	China Zebrafish Resource Center (CZRC) (order this)
nk1	Point Mutation	Exon 6	Premature Stop		
s1154	Unknown	Unknown	Unknown	ENU	
s3567	Unknown	Unknown	Unknown	ENU	
sa16467	Point Mutation	Unknown	Premature Stop	ENU	Zebrafish International Resource Center (ZIRC) (order this) Finnish Zebrafish Resource Center (FZRC) (order this)

slc45a2基因敲除

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；

The screenshot displays the Ensembl genome browser for the *slc45a2* gene in Zebrafish (GRCz10). The interface is divided into several sections:

- Left Sidebar:** Contains navigation options such as 'Summary', 'Sequence', 'Exons', 'cDNA', 'Protein', 'Genetic Variation', 'External References', and 'Supporting evidence'. The 'Protein Information' section is expanded to show 'Protein summary' and 'Domains & features'.
- Main Content Area:**
 - Transcript-based displays:** Shows the transcript *slc45a2-201* (ENSDART0000033887.7) with a length of 1745 bp.
 - Gene-based displays:** Provides a summary of the gene *slc45a2* (ENSDARG0000002593.8), including its description as a 'solute carrier family 45, member' and its location on chromosome 21.
 - Protein summary:** Displays protein domains for ENSDARP0000003889.3, including 'Transmembrane helix' and 'Low complexity (Seq)'. It also shows superfamily domains like 'Hfam domain'.
- Right Panel:** Features a 'Marked-up sequence' section with a 'Download sequence' button and a 'BLAST this sequence' option. Below this, the genomic context is shown with exons highlighted in yellow.

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/>

Introduction ZiFiT Instructions Examples FAQ References Funding Links

>Sample1
aaaaaaaaatgaagcccaactgaagattctgtgagcgtccctcacaggtgtttctctcgtgtgtgtgtgtcagGAGCGTTCCTGGTGCCGTATCTTCTTCATG(T)TGATCGCCGGGATGCCGCTTCTAC

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

>slc45a2
ttttcaccgcagCCATAATATCAGACAGAAATTTAAAAAGGACATGGGCCATCGTGGTGGTGATGTTTGGAGTGGTTTTGTTGACTTTGCC
GCAGACTTCATTGACGGACCCATTAAGCCTATTTGTTGATGTGTCTCATCGGGATAAAGAGCGGGGTCTTCATTACCATGCTTT
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	Targetsites	Oligo 1	Oligo 2
slc45a2 -Reverse Strand	GGGTCCGTCATGAAGTCTG	TAGGGTCCGTCATGAAGTCTG	AAACCAGACTTCATT

靶点序列信息

以显微注射实验课CRISPR/Cas9敲除样品为例：靶向slc45a2基因

5. gRNA靶点唯一性确认：

BLAT: <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat> (May. 2017 (GRCz11/danRer11))

Blast:

https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=MegaBlast&PROGRAM=blastn&BLAST_PROGRAMS=megaBlast&PAGE_TYPE=BlastSearch&DBSEARCH=true&QUERY=&SUBJECTS=

Zebrafish BLAT Search

BLAT Search Genome

Genome: Search all genomes
Zebrafish

Assembly: May 2017 (GRCz11/danRer11)

Query type: BLAT's guess

Sort output: query.score

Output type: hyperlink

GGCCATGCTGGTGGTGGTGGTGGT

All Results (no minimum matches)

Submit I'm feeling lucky Clear

Paste in a query sequence to find its location in the the genome. Multiple sequences may be searched if separated by lines starting with '>' followed by the sequence name.



Zebrafish BLAT Results

BLAT Search Results

Go back to [chr10:33840892-34129251](#) on the Genome Browser.

Custom track name: blat YourSeq Custom track description: blat on YourSeq

Build a custom track with these results

ACTIONS	QUERY	SCORE	START	END	QSIZE	IDENTITY	CHRO	STRAND	START	END	SPAN
browser details	YourSeq	21	1	21	21	100.0%	21	+	19412620	19412640	21

www.zfish.cn

以显微注射实验课CRISPR/Cas9敲除样品为例：靶向slc45a2基因

6. 靶点周围序列的扩增：

- ✓ 靶点序列确认
- ✓ 打靶效率检测及后续筛选

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）

```
caaactggtgagctacaagtagagagaattttcagtccttgatgtttcttaaagttgtataactaaa  
gtatttattaacattgagtggatttactgaactaagcatgacgttgtggtttttcaccgcagCCA  
TAATATCAGACAGAAATTTAAAAAGGACATGGGCCATCGTGGTGGTGATGTTTGGAGTGGTTTTG  
TTTGACTTTGCCGCAGACTTCATTGACGGACCCATTAAAGCCTATTTGTTTGATGTGTGTTCTCA  
TCGGGATAAAGAGCGGGGTCTTCATTACCATGCTTTACTCACAGgtaagaactaataacgctcat  
ttagcttggctttcttacagcagaaatgtacattggctgggtcagttggcgtttctgtgtgaagt  
ttgcatgttctccccatgtttgcggtgacttcettgtggtgctccattttccgtttccgctatgt  
ataac
```

Forward primer: CAAACTGGTGAGCTACAAGTAG

Reverse primer: GTTATACATAGCGGAAACGG

国家水生生物种质资源库 (NABRC)

- 靶点选择方法及原则

- RNA合成

国家斑马鱼资源中心 (CZRC)

- 样品准备和显微注射

- 敲除效率评估

www.zfish.cn

- 后续筛选工作



pMD19T-gRNA 工具质粒

- ① 靶点序列以PCR方式连入gRNA骨架序列，以PCR产物作为模板合成gRNA
- ② 适用于大规模打靶，简单方便 (Chang N, et al. Cell Res. 2013.)

pT7-sgRNA工具质粒

- ① 靶点序列克隆，以线性化质粒作为模板合成gRNA
- ② 适用于需要反复使用的gRNA，如用于敲入实验等可采用，该质粒的gRNA骨架序列以GGAUC结尾 (Jao LE, et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013.)

pXT7-hCas9



1. pXT7-hCas9工具质粒

Humanized spCAS9 蛋白 (XbaI/T7) (4176bp/1391aa) (*Chang N, et al. Cell Res. 2013.*)

2. pGH-T7-zCas9工具质粒 (Top10感受态)

N端有一个核定位信号nls基序 (两种Cas9编码基因在斑马鱼胚胎中基因敲除效率的比较, 《遗传》, 2016, 38 (2):144-154)

3. pT3TS-nls-zCas9-nls; pCS2-nls-zCas9-nls工具质粒

斑马鱼密码子优化T3-spCAS9蛋白 (XbaI/T3) (4176bp/1391aa) (*Jao LE, et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013.*)

4. pT3-heiCas9B-UTRglobin



Chinese | English

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

用户名 密码 验证码

[首页](#) [关于CZRC](#) [资源与订购](#) [技术服务](#) [资源提交](#) [ZKO品系](#) [信息浏览](#) [联系我们](#)

Others

Resources > Plasmids

 加入购物车

Select	Product	Note	CZRC Catalog
<input type="checkbox"/>	pCS2+	pCS2+ for preparation of in vitro transcribed mRNA, or overexpression constructs for DNA injection and/or transfection.	CZP1
<input type="checkbox"/>	pXT7-hCas9	For in vitro transcription of humanized Cas9 mRNA (CRISPR/Cas9)	CZP2
<input type="checkbox"/>	gRNA-pMD19-T	For making in vitro transcribed gRNA (CRISPR/Cas9)	CZP3
<input type="checkbox"/>	pGH-T7-zCas9	For in vitro transcription of zebrafish codon optimized Cas9 mRNA (CRISPR/Cas9)	CZP4
<input type="checkbox"/>	pT2(kop:Cre-UTRnos3, CMV:EGFP)	PGC-specific Cre expression; whole embryo EGFP.	CZP5
<input type="checkbox"/>	pT2(kop:KalTA4-UTRnos3,CMV:eGFP)	PGC-specific KalTA4 expression; whole embryo EGFP.	CZP6
<input type="checkbox"/>	pT2(kop:lsI-mRFP-UTRnos3,CMV:eGFP)	a loxP flanked SV40 poly(A) signal between the kop promoter and the mRFP gene to regulate PGC-specific mRFP expression; whole embryo EGFP	CZP7
<input type="checkbox"/>	pT2(UAS:mRFP-UTRnos3,CMV:eGFP)	mRFP regulated by UAS and nanos3 UTR ; whole embryo EGFP	CZP8
<input type="checkbox"/>	pTol2-MCS	Tol2 Transposable Element and multi-clone sites	CZP10
<input type="checkbox"/>	pT3TS-nzCas9n	For in vitro transcription of zebrafish codon-optimized version Cas9 mRNA (CRISPR/Cas9)	CZP11

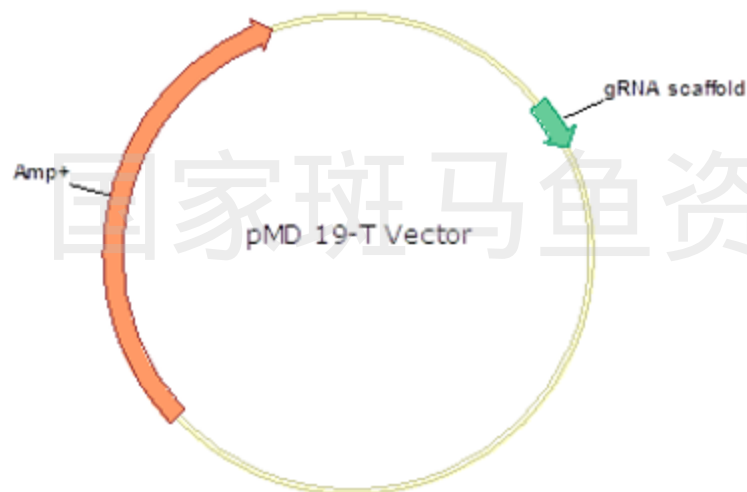
[首页](#) [上一页](#) [1](#) [2](#) [下一页](#) [尾页](#) 转到 页

<http://www.zfish.cn/products/otherproductlist.aspx?cid=001006>

以显微注射实验课CRISPR/Cas9敲除样品为例：靶向slc45a2基因

7. 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

8. 体外转录合成gRNA和Cas9 mRNA:

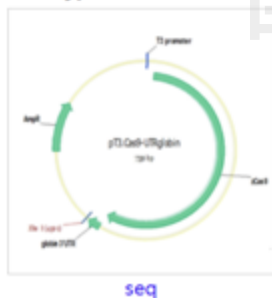
- Cas9 mRNA合成质粒: CZP11

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:

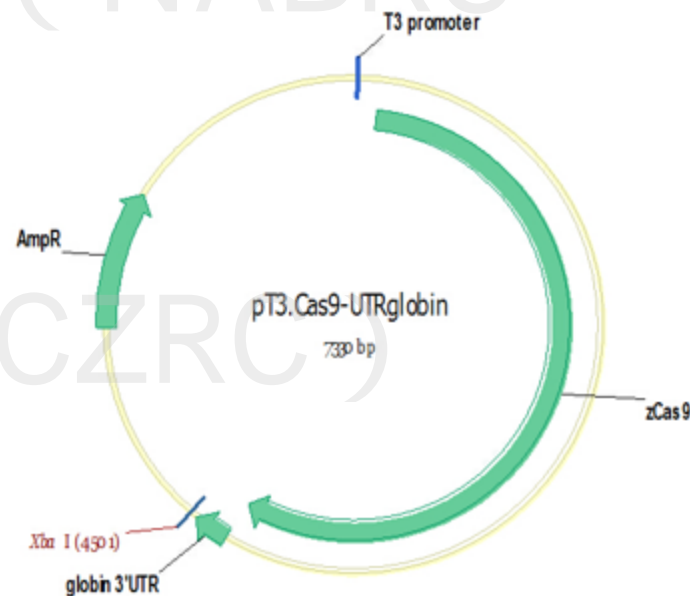
[两种密码子优化的cas9编码基因在斑马鱼胚胎中基因敲除效率的比较_1.pdf](#)

[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

国家水生生物种质资源库 (NABRC)

- 靶点选择方法及原则

- RNA合成

国家斑马鱼资源中心 (CZRC)

- 样品准备和显微注射

- 敲除效率评估

www.zfish.cn

- 后续筛选工作

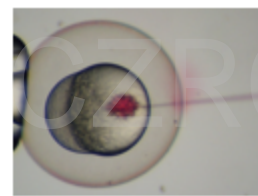
样品准备和显微注射

国家水生生物种质资源库 (NABRC)

样品准备：
合适浓度配比，加入适量指示剂
gRNA (20-100 ng/ul)
cas9 mRNA (200-500 ng/ul)

提前一天配鱼

收集胚胎，显微注射到1-2
cell stage embryos



胚胎发育到24hpf进行检测，
如有突变，培养为F0代

www.zfish.cn

国家水生生物种质资源库 (NABRC)

- 靶点选择方法及原则

- RNA合成

国家斑马鱼资源中心 (CZRC)

- 样品准备和显微注射

- 敲除效率评估

www.zfish.cn

- 后续筛选工作

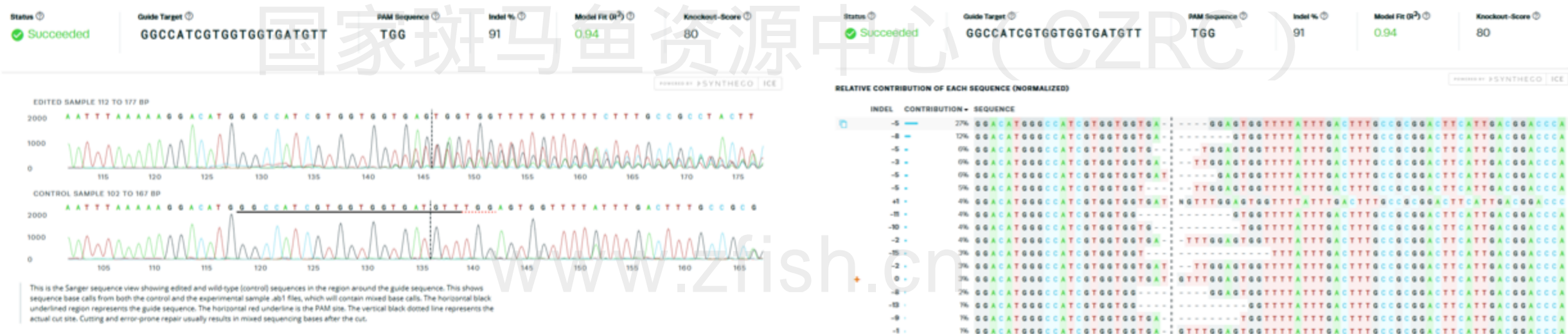
F0代检测常见方法

1. 直接测序法
2. 限制性内切酶酶切法
3. 错配DNA切割检测法
4. 中性聚丙烯酰胺凝胶电泳法

www.zfish.cn

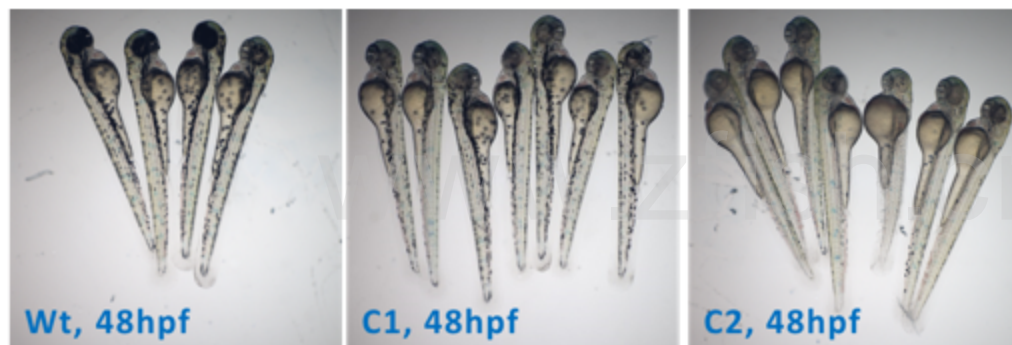
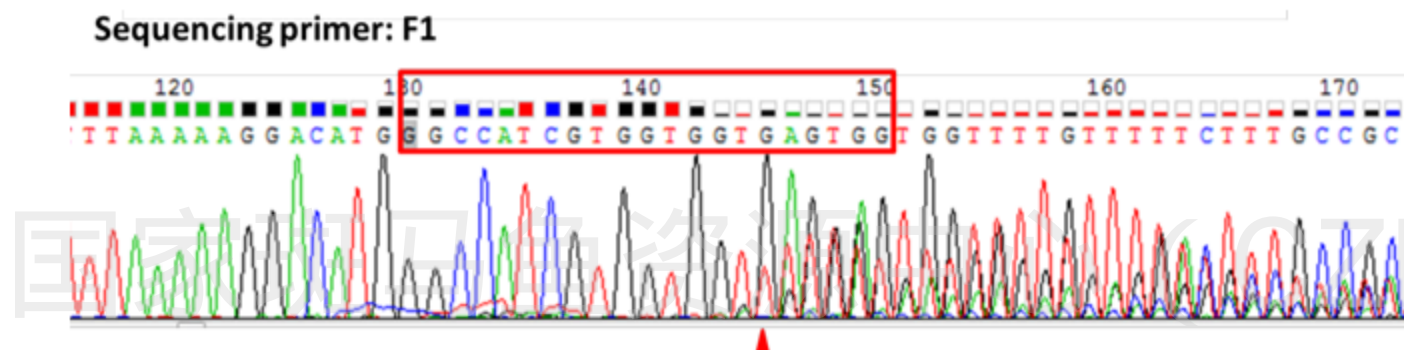
P0代检测方法

1. 直接测序法：直接将PCR产物进行测序或连接到TA克隆载体中，再挑选单克隆菌落测序，该方法不仅可用于评估突变效率，还可以确定突变类型，灵敏度略低。



以显微注射实验课CRISPR/Cas9敲除样品为例：靶向slc45a2基因

9. 显微注射与F0代靶点效率检测：



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

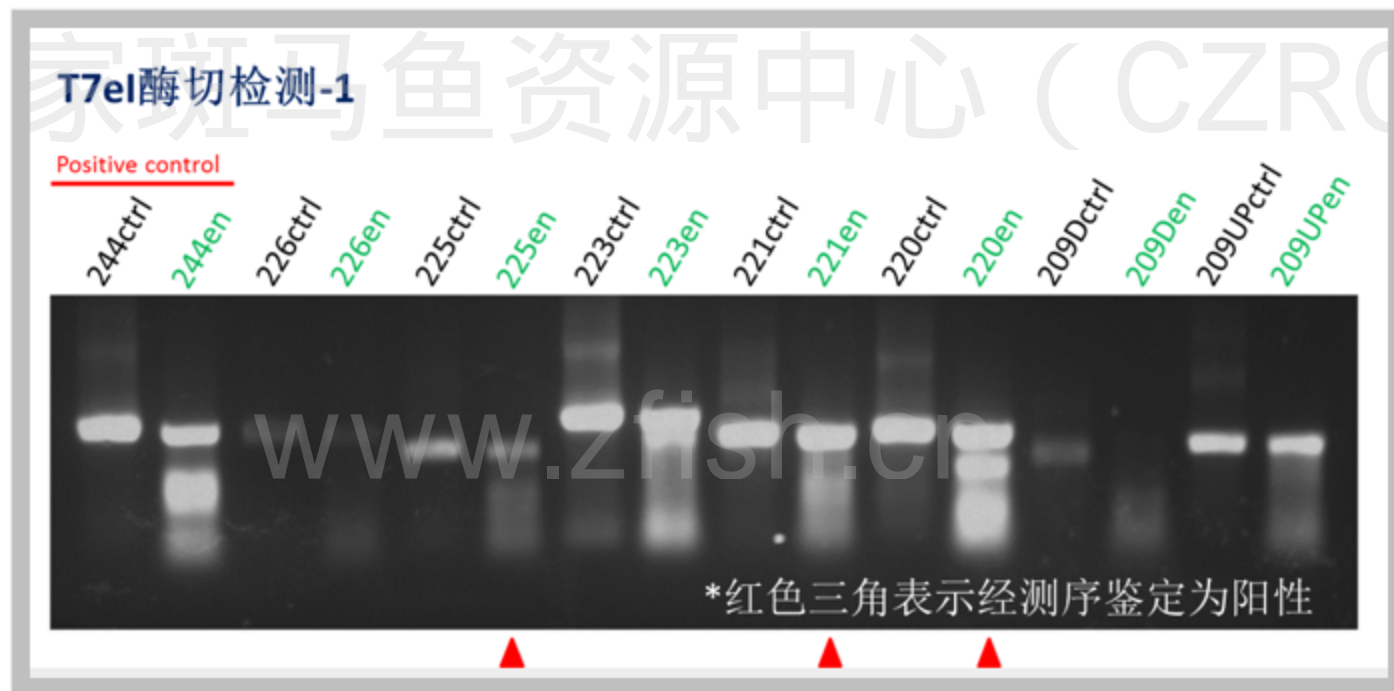
P0代检测方法

2、限制性内切酶酶切法: 要求靶点序列内、PAM 的5' 端附近有一个单一限制性内切酶位点, 扩增靶点周围序列, 酶切后电泳检测。



P0代检测方法

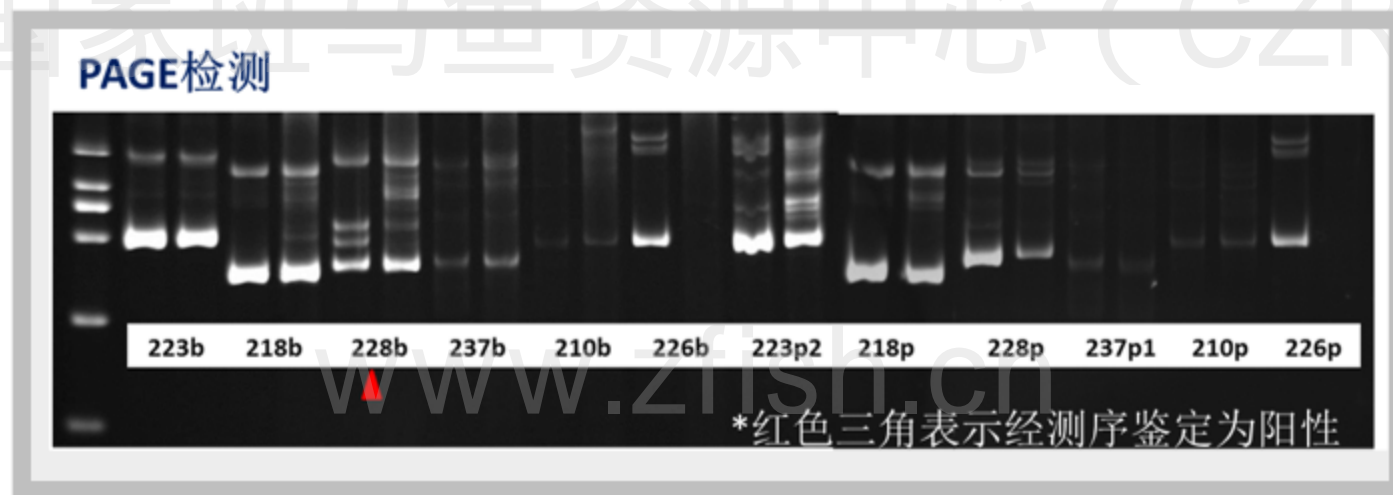
3. 错配DNA切割检测法：比较常用的有Surveyor核酸内切酶和T7核酸内切酶I，两者都能高效识别并切割异源双链中错配的碱基，酶切产物通过电泳分离，根据条带大小判断是否有基因组切割。可用于检测ZFN 技术，TALEN 技术和CRISPR/Cas9 技术介导的基因组编辑，检测靶标结合位点是否有碱基替换或“Indels”。



中性聚丙烯酰胺凝胶电泳法

P0代检测方法

4. 中性聚丙烯酰胺凝胶电泳法：在中性聚丙烯酰胺凝胶中，不同构象等长的DNA 单链电泳迁移率会发生变化，由此来判断基因是否发生突变。



国家水生生物种质资源库 (NABRC)

- 靶点选择方法及原则

- RNA合成

国家斑马鱼资源中心 (CZRC)

- 样品准备和显微注射

- 敲除效率评估

www.zfish.cn

- 后续筛选工作

后续筛选工作

P0代个体筛选：与WT侧交，收集胚胎测序检测，阳性后代培养为F1代

F1代个体筛选：剪尾鳍测序检测，克隆确认突变序列。

获取两个不同阅读框的移码品系($3n \pm 1/3n \pm 2$)

侧交传代或自交传代 (同一基因型)

F2代个体筛选：剪尾鳍测序检测。

自交传代 (同一基因型)

筛选5-10尾同一基因型雄鱼

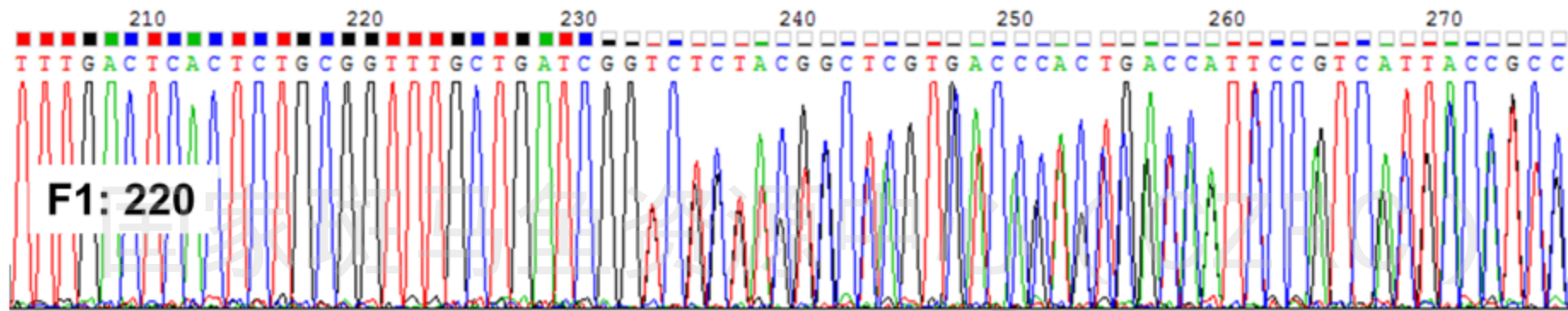
F3代纯合品系构建：用于后续研究

品系的保藏：精子冻存，防止品系丢失，避免品系退化，节省资源

双峰图读取

Wt-sequence

TTTGACTCACTCTGCGGTTTGCTGATCGGTCGGTAGGGCTCGTCTCCAGTGACAGTCCCGTCATTCCATCG



TTTGACTCACTCTGCGGTTTGCTGATCGGTCGGTAGGGCTCGTCTCCAGTGACAGTCCCGTCATTCCATCG

TTTGACTCACTCTGCGGTTTGCTGATCGGGCTCGTCTCCAGTGACAGTCCCGTCATTCCATCGGGACCGTC

将突变序列与野生序列进行对比就可得知突变明细 (TCGGTAGG 缺失, $3n+1/3n-2$)

www.zfish.cn

克隆测序确认突变信息

突变类型

➤ Frameshift ($3n \pm 1 / 3n \pm 2$)

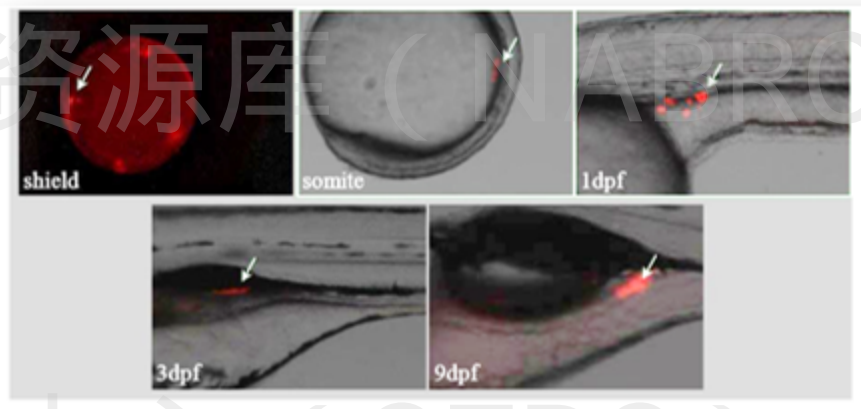
1. 缺失
2. 插入
3. Indel

➤ In-frame ($3n$)



4个PGC

1k-cell
3 h



➤ ZFNs, TALENs和 CRISPR/Cas9技术导致的突变：以缺失居多，缺失突变多在20 bp以内，而插入突变多在10 bp以内 (Hwang WY, et al. Nat Biotechnol. 2013.)

➤ CRISPR/Cas9技术介导的突变多数(>75%)在12 bp以内 (Varshney GK, et al. Genome Res. 2015.)

➤ F0代个体中发生突变的细胞有体细胞和生殖细胞，只有生殖细胞中的突变可遗传给后代。大部分可生殖传递的突变发生较早，很可能在注射后3小时内发生。考虑到生殖传递效率和突变类型，建议养殖2-5个阳性P0代的后代用作后续的筛选。

eg: P0代个体中检测到的突变类型有2642种，其中在F1代个体中检测到99种突变类型 (3.7%)，大部分的突变发生在体细胞中 (96.3%) (Varshney GK, et al. Genome Res. 2015.)

国家水生生物种质资源库 (NABRC)

➤ **关注点一：如何提高基因编辑效率**

国家斑马鱼资源中心 (CZRC)

➤ **关注点二：如何提高基因编辑特异性，降低脱靶效应**

www.zfish.cn

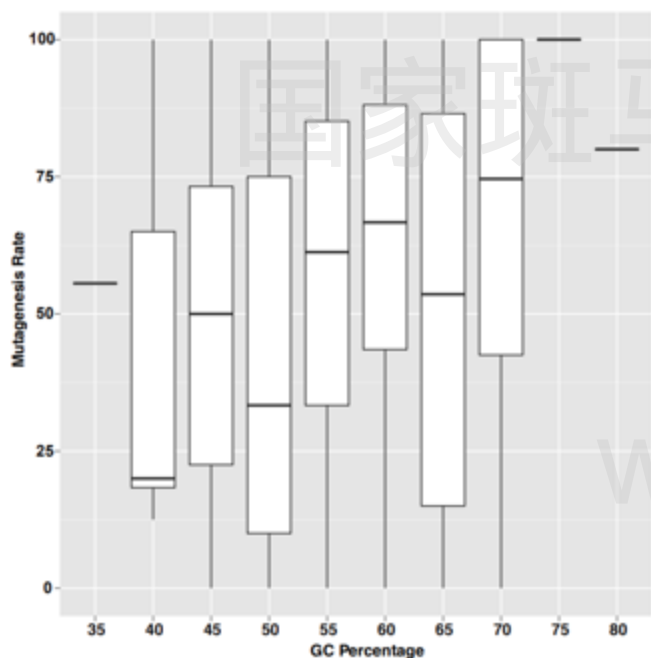
➤ **关注点一：如何提高基因编辑效率？？？**

影响基因编辑效率的因素

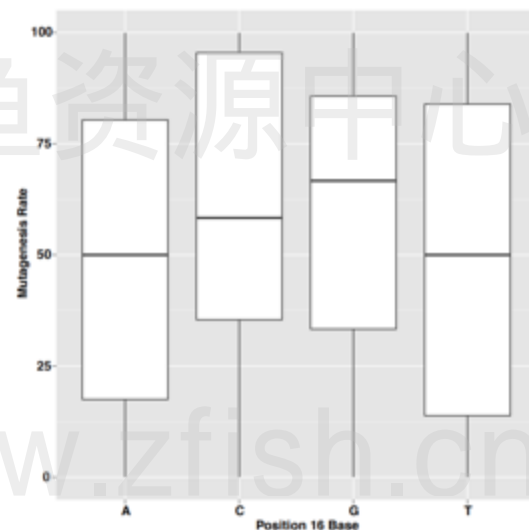
- 靶点序列特征：GC含量，碱基类型，PAM序列等
- DNA靶标的可达性：染色体折叠程度，基因修饰等
- Cas9工具酶切割效率

影响基因编辑效率的因素

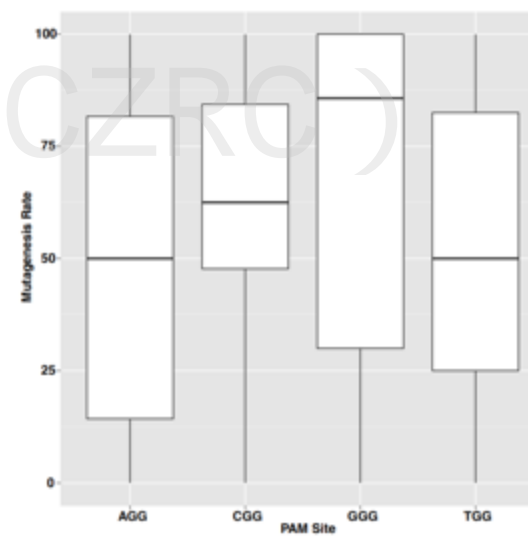
►靶点序列特征：GC含量，碱基类型，PAM序列等。GC含量（35%-80%）、16#和20#碱基类型（A/T/G/C）和PAM（NGG）碱基类型对基因敲除效率没有太大的影响（~160 targets, 20-mer GG-N18）



- GC percentage



- 16th base



- PAM site

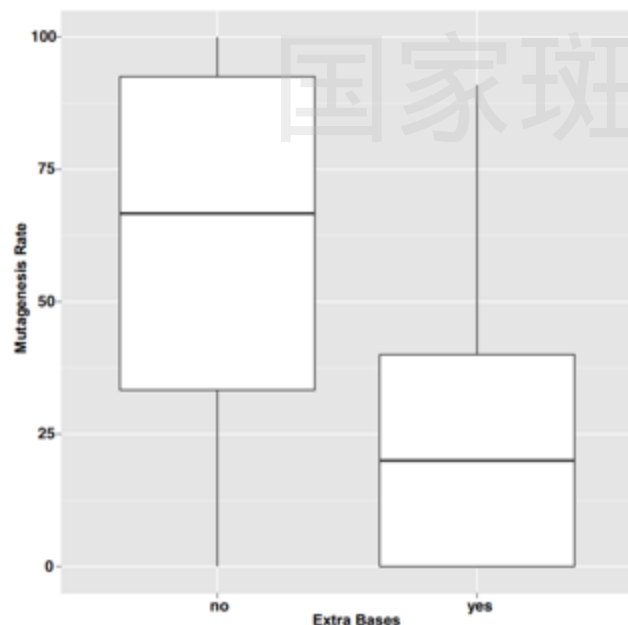
(Varshney GK, et al. Genome Res. 2015.)

影响基因编辑效率的因素

影响基因编辑效率的因素

➤ 靶点序列特征:

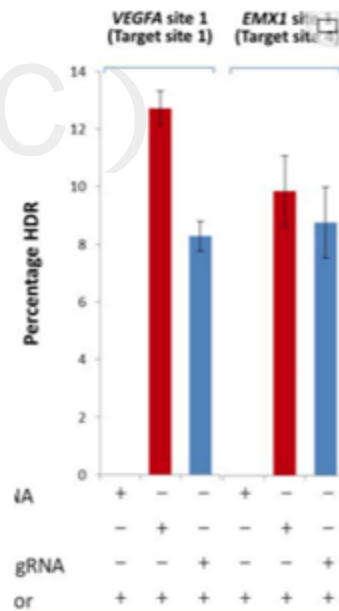
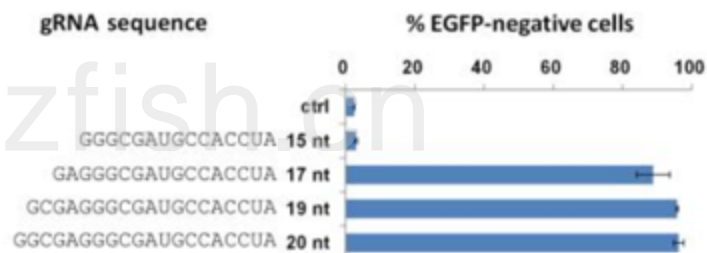
- ① gRNA 的5'端加1个或2个G, 会让基因敲除效率大打折扣; 3'端部分碱基缺失会降低基因敲除效率;
- ② 靶点序列为17-18 bp 的 gRNA 的特异性更好, 可能是短版 gRNA 相对来说对mismatches更敏感。



- additional guanines on the 5' end of TS

a 5'-GGCGAGGGCGATGCCACCTAcGG-3'

b

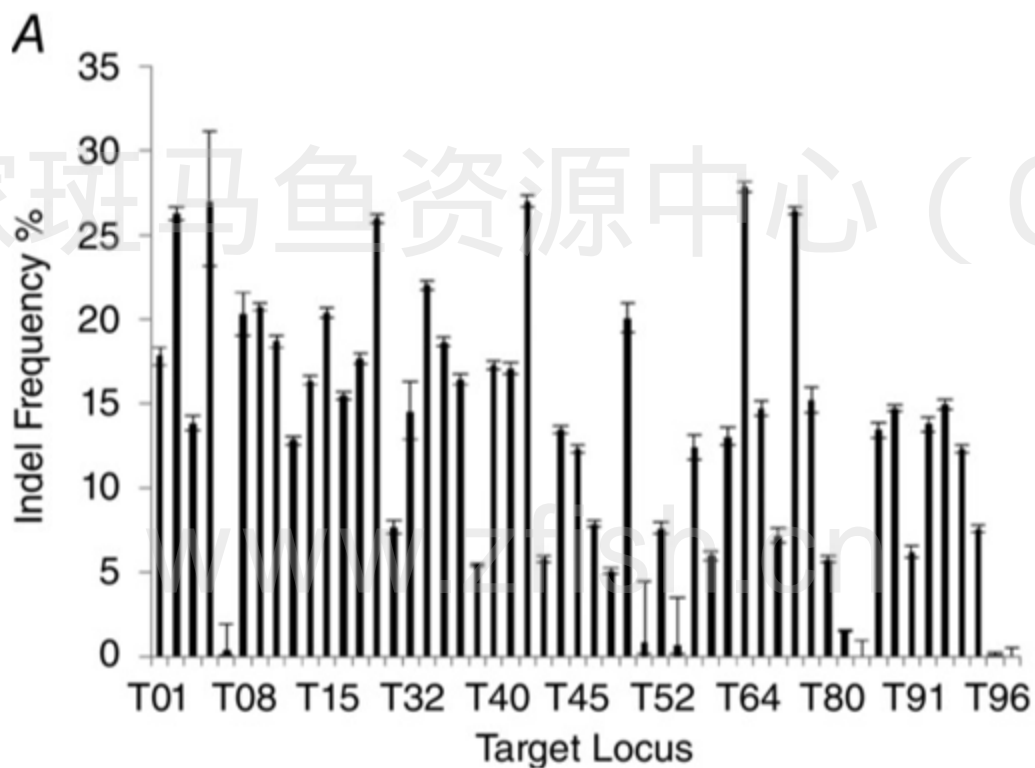


- truncated gRNAs work well in human cells

(Fu Y, et al. Nat Biotechnol. 2014.)

影响基因编辑效率的因素

- DNA靶标的可达性：染色体折叠程度，基因修饰等，对打靶效率的影响较大

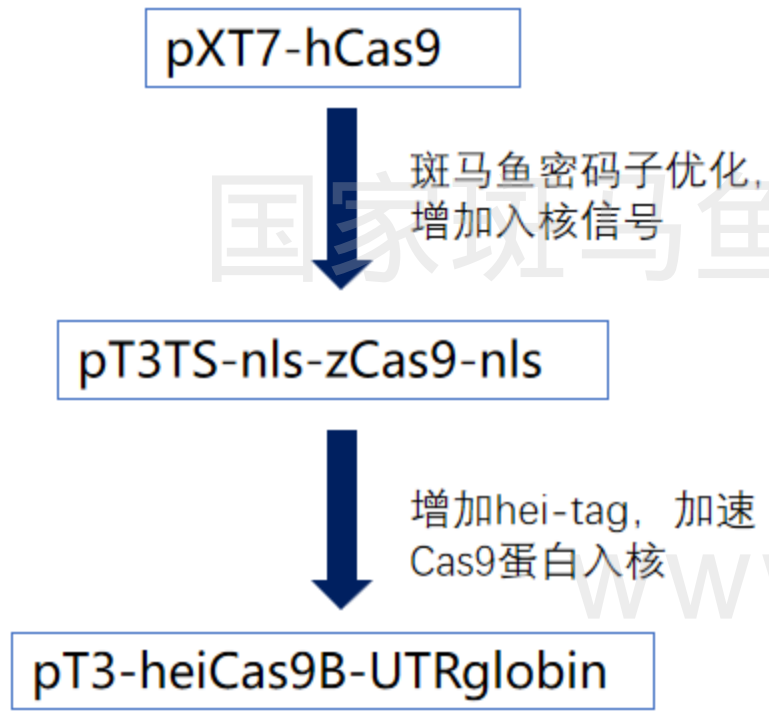


(Lee CM, et al. Exp Physiol. 2018.)

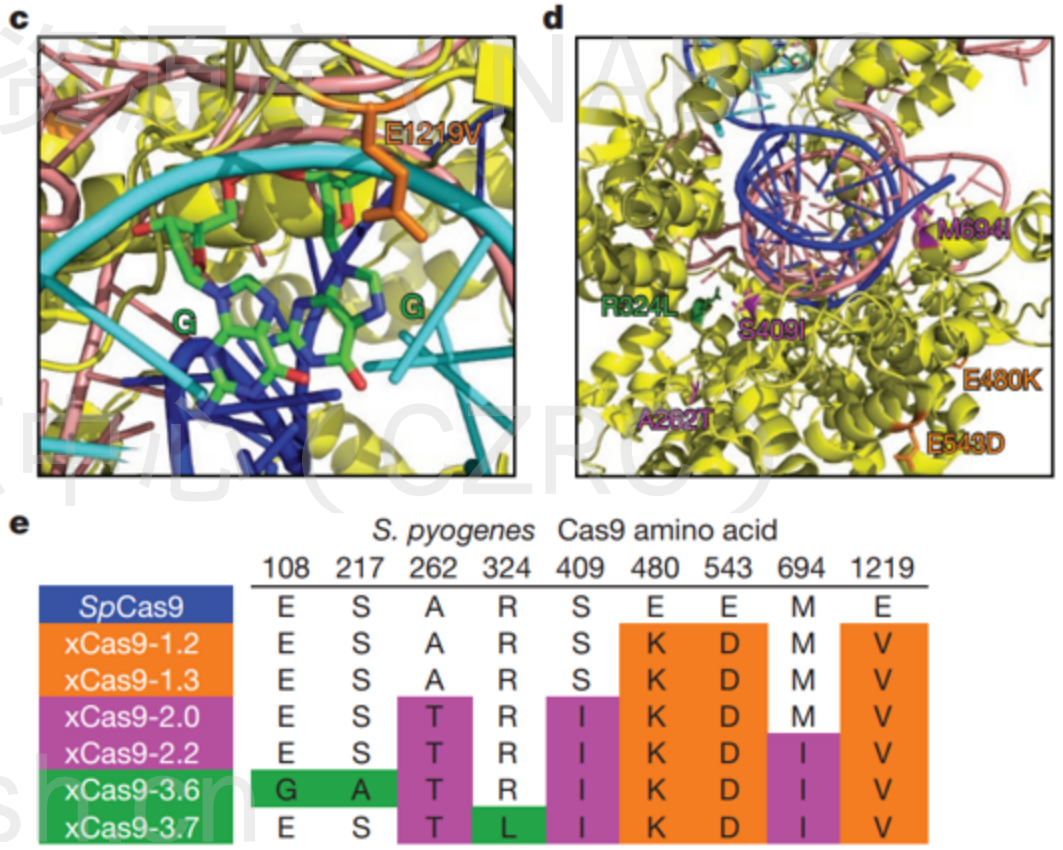
影响基因编辑效率的因素

影响基因编辑效率的因素

➤ Cas9工具酶切割效率



国家斑马鱼资源中心
 www.zfish.cn



• XCas9 variants with broadened PAM compatibility.

(Thumberger T, et al. Elife. 2022.)

(Hu JH, et al. Nature. 2018.)

➤ 关注点二：如何提高基因编辑特异性，降低脱靶效应???

脱靶效应

由于在基因组中存在着与靶标位点相似度较高的序列，导致的非靶标位点的异常打靶现象。

www.zfish.cn



脱靶位点一般形式

Off-target sequence form:

5'-GN-(N)₃₋₈-SeedSequence-NGG-3'

5'-GN-(N)₃₋₈-SeedSequence-NGA-3'

5'-GN-(N)₃₋₈-SeedSequence-NAG-3'

5'-GN-(N)₃₋₈-SeedSequence-NNGG-3'

- ✓ 不同PAM模式介导的基因组编辑能力：NGG>NGA>NAG
- ✓ Seed sequence耐受性较差，碱基替换一般以不超过2个为准，整个序列的碱基替换不超过5个

脱靶位点预测

By Gene Submit sequence Browser tracks Protocol Citing Help CRISPRscan

```
TCACCCGCAGCCATAATATCAGACAGAAATTTAAAAAGGACATGGGCCATCGTGGTGG
TGATGTTTGGAGTGGTTTTGTTGACTTTGCCGCAGACTTCATTGACGGACCCATTAAA
GCCTATTTGTTTGTATGTGTCTCATCGGGATAAAGAGCGGGGTCTTCATTACCATGC
TTTACTCACAGGTAAGAACTA
```

Zebrafish - Danio rerio

Cas9 - NGG

In vitro T7 promoter

Get sgRNAs

Example

CRISPRscan score

Locus

Oligo

Off-targets

CFD All Seed

74	yourseq:21:19412625-19412648 (+)	taatacgactcactataGGTGGTGGTATGTTTGGAGgttttagagctagaa	33.91	4	1
69	yourseq:21:19412663-19412686 (-)	taatacgactcactataGGGTCCGTCATGAAGTCTGgttttagagctagaa	4.08	0	0
58	yourseq:21:19412663-19412685 (-)	taatacgactcactataGGTCCGTCAATGAAGTCTGgttttagagctagaa	4.08	0	0
56	yourseq:21:19412620-19412643 (+)	taatacgactcactataGGCATCGTGGTGGTATGTTTgttttagagctagaa	6.08	0	0
53	yourseq:21:19412700-19412723 (+)	taatacgactcactataGGTTGATGTGTGTTCTCATCgtttttagagctagaa	8.08	0	0
49	yourseq:21:19412699-19412722 (+)	taatacgactcactataGGTTTGTATGTGTGTTCTCATgtttttagagctagaa	16.08	1	0
47	yourseq:21:19412711-19412734 (+)	taatacgactcactataGGTCTCATCGGGATAAAGAGgtttttagagctagaa	3.83	0	0
23	yourseq:21:19412693-19412716 (-)	taatacgactcactataGGAACACACATCAAACAAATgtttttagagctagaa	38.36	0	0

选择一个靶点查看脱靶预测信息

Site type

Gg18NGG

Genome GCCATCGTGGTGGTATGTTTGG

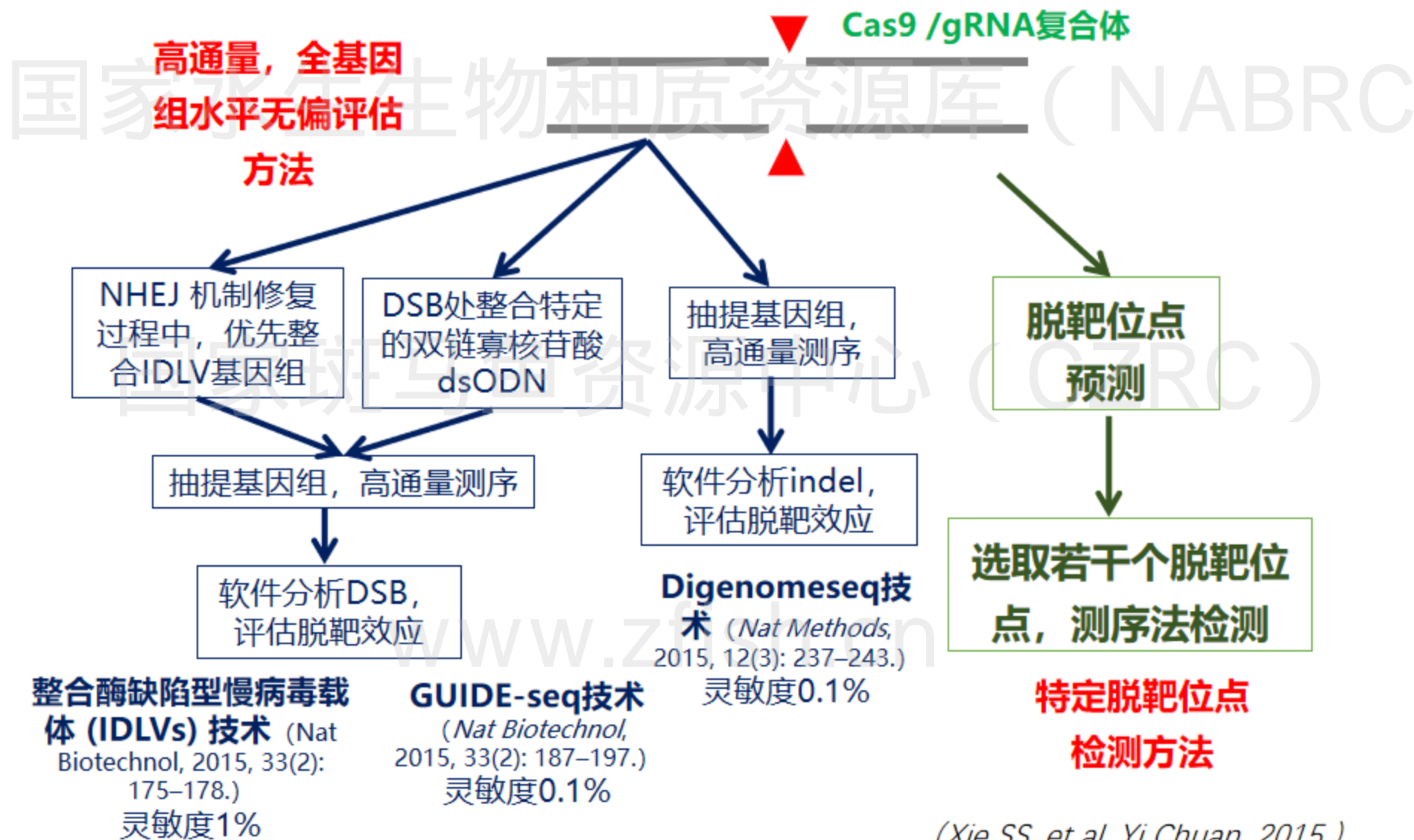
[X|XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX]

sgRNA GGCATCGTGGTGGTATGTT

Off-targets (max 30)

	All	Seed	CFD	Gene
KN149883.1:2436[...X...X...X...]-	-	-	0.47	ENSDARG00
8:1957339[X.X.X.X.....]+	-	-	0.30	
8:1957726[X.X.X.X.....]+	-	-	0.30	
22:37717848[.....XXX.....X]+	-	-	0.28	ENSDARG00
13:28351868[...X.X...XX.....]-	-	-	0.21	
24:24790466[...X.XXX.....]-	-	-	0.18	ENSDARG00
24:4053227[X.XX.X.....]+	-	-	0.17	
13:6572807[X...XXX.....]+	-	-	0.17	
6:14843166[X.X.X.....X.....]+	-	-	0.15	
8:36184727[X...XX.....X.....]-	-	-	0.15	
23:38798232[X X X 1+	-	-	0.14	

脱靶效应检测方法



脱靶位点检测

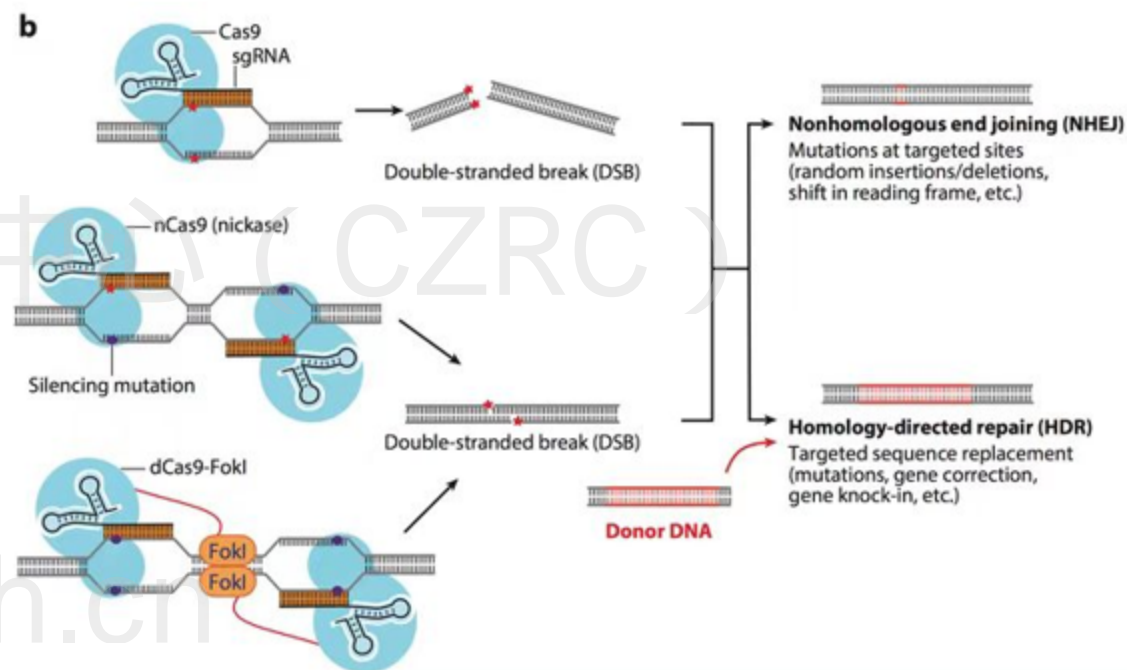
- ✓ CRISPR-cas system应用于人类K562细胞, 中没有检测到off-target effects (Cho SW, et al. Nat Biotechnol. 2013.)
- ✓ 预测的脱靶位点在活体基因敲除实验中普遍无活性或活性很低, 脱靶效应在CRISPR-cas9技术的实际应用中不足为虑 (25个脱靶点/5个基因, 3-9个mismatches, 仅一个脱靶点检测到了突变) (Varshney GK, et al. Genome Res. 2015.)

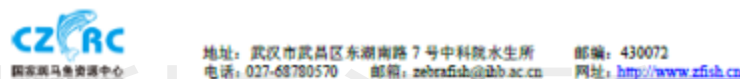
Supplementary Table 4: Off-target analysis of CRISPR/Cas9-induced mutations

Gene Target	Sequence (5'-3'), PAM:green, mismatch:red	Number of matches	Off target detected
DFNA5	GGAGGTGTTGGCGGTAGTGAAGG	20/20	No
DFNA5-OT1	GGGGGTGGTGGTGGTAGTGAGGG	17/20	Yes
DFNA5-OT2	GCTCGTGGTGGTGGTAGTGAGGG	15/20	No
DFNA5-OT3	CTTCGTGCTGGCGGTGGTGTATGG	14/20	No
DFNA5-OT4	TATCCTCTTTGCGGTAGTGAAG	13/20	No
DFNA5-OT5	AGCTTCCATGGCGATAGTGACGG	20-Dec	No
EYA4	GGCTGTCTGTCCGGGCTGAGGGG	20/20	No
EYA4-OT1	GGCGGACTGTCCGGGCTGATGAG	17/20	No
EYA4-OT2	CACTGACAGTCCGGGCGGAGGAG	15/20	No
EYA4-OT3	TGCCTCTGTCCGGGCTGAGGGG	14/20	No
EYA4-OT4	CTCTACAGGTACGGGCTGAGGAG	13/20	No
EYA4-OT5	TGAATGTGGTCCGGACTGAGTGG	20-Dec	No
FNDC7	GGTGGGGAGTAAAGGGGCAGTGG	20/20	No
FNDC7-OT1	GGAGGATGAAAAGGGGCAGAGG	15/20	No
FNDC7-OT2	GAGGGTCTGTAAAGTGGCAGCGG	14/20	No
FNDC7-OT3	ATCCAAGAGTAAAGGGGTAGGGG	14/20	No
FNDC7-OT4	ACACAAAAGTAAAGGGGCGGGAG	13/20	No
FNDC7-OT5	CAAAACTTGTAAAGGTGCAGAGG	20-Dec	No
Marvel2b	GGCCCAATGCAGGATTTTGTCCG	20/20	No
Marvel2b-OT1	TGCCTAGTGCAGGATTATGTGAG	16/20	No
Marvel2b-OT2	AGATCTCTGCAGGTTTTTGTGAG	15/20	No
Marvel2b-OT3	ATGTCAGGGCTGGATTTTGTAAAG	14/20	No
Marvel2b-OT4	TTGTTCCGGAGGATTTTGTGG	20-Dec	No
Marvel2b-OT5	TTGTGCTGGCAGTATTTTGTGG	20-Dec	No
PTPRN2	GGTCAGTGTCTGAGGTATCCAGG	20/20	No
PTPRN2-OT1	CTTCGGTCTCTGAAGTATCCAG	15/20	No
PTPRN2-OT2	GATCCAGATCAGAGGTATCCAGG	14/20	No
PTPRN2-OT3	TTGCTGGATCTGACGTATCCAG	13/20	No
PTPRN2-OT4	TTGTGGAATCTGACGTATCCAG	20-Dec	No
PTPRN2-OT5	ATCTGAAATCTGAGGTGTCCGGG	20-Nov	No

如何降低脱靶效应

- 确认靶点序列在基因组中是唯一的，综合考虑靶点序列特征；
- 使用特异性更高的靶点为17-19 bp的gRNA；
- Cas工具酶使用浓度：就低不就高；
- 应用Cas9单切口酶的双切口技术；
- 应用dCas9-FokI酶；
- 应用特异性更高的新型Cas工具酶。





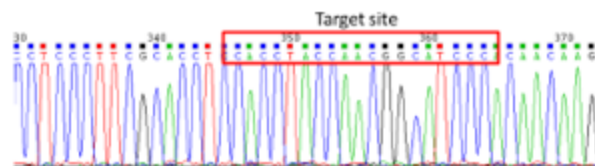
stat6 基因敲除斑马鱼研制项目一期进展报告

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

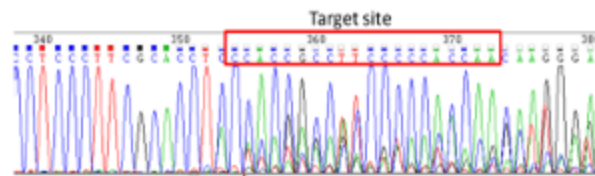
ACTIONS	QUERY	SCORE	START	END	SIZE	IDENTIFY	CHR	STRAND	START	END	SPAN
home details YouGen	20	1	20	26	306106	23	+	27361035	27361064	29	

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



• <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