

## 讲座三

国家水生生物种质资源库 (NABRC)

# 斑马鱼转基因构建及 胚胎显微注射技术

国家斑马鱼资源中心 (CZRC)

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)

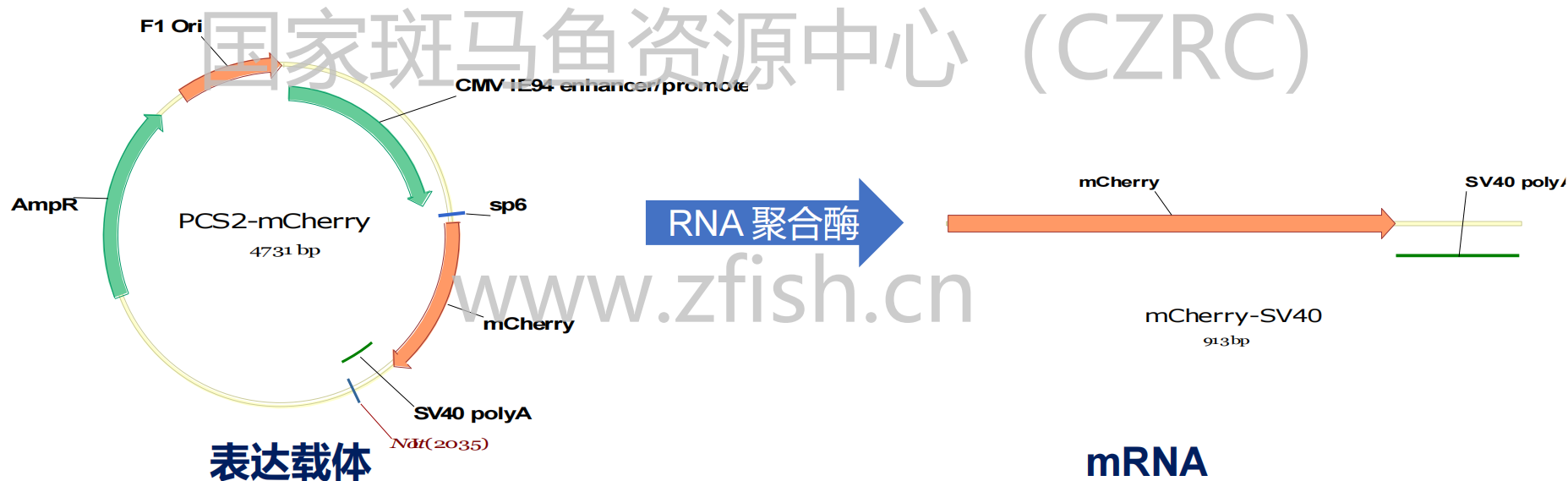
- 1 斑马鱼基因过表达技术 → 瞬时基因功能获得
- 2 斑马鱼转基因技术 → 稳定基因功能获得
- 3 斑马鱼基因敲入技术 → 定向编辑序列
- 4 斑马鱼胚胎显微注射技术 → 胚胎操作的基础技能

# 一、斑马鱼基因过表达技术

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。

## 1.1 过表达技术样品：

- ① 质粒DNA: 构建真核表达载体 (表达框)
- ② mRNA: 构建原核表达载体; 体外转录



# 一、斑马鱼基因过表达技术

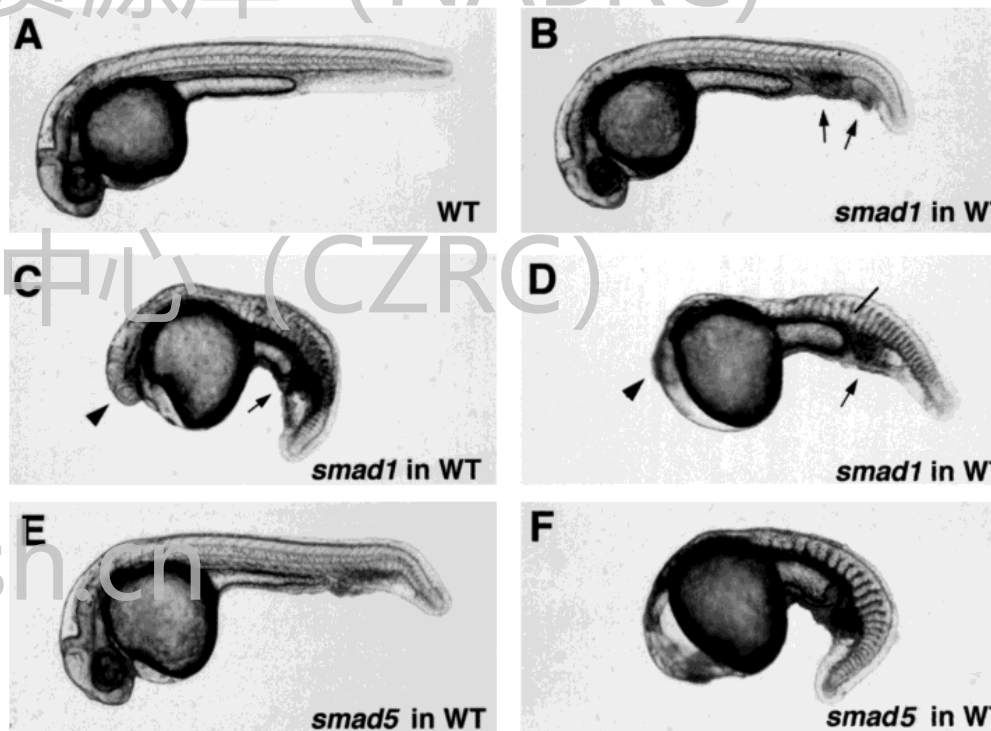
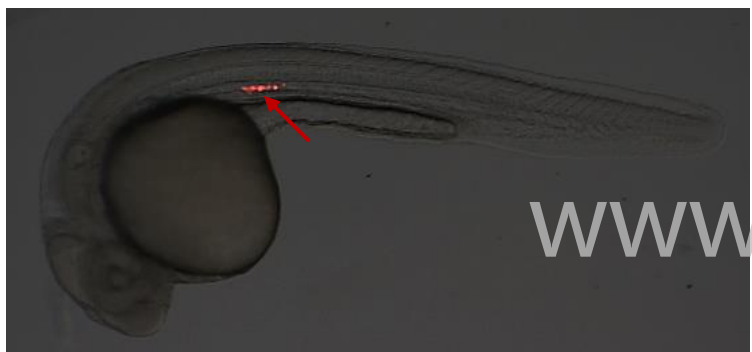
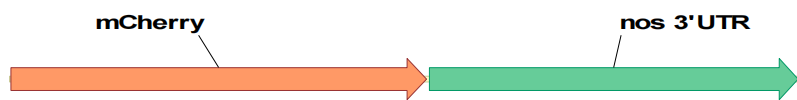
## 1.2 DNA/mRNA样品的区别



# 一、斑马鱼基因过表达技术

## 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



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

(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，实现基因过表达的一个常见方法是通过注射体外合成的**mRNA**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。

国家斑马鱼资源中心 (CZRC)

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

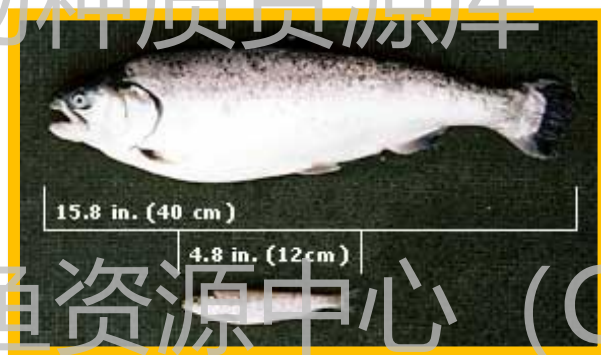
- 1 斑马鱼基因过表达技术 → 瞬时基因功能获得
- 2 斑马鱼转基因技术 → 稳定基因功能获得
- 3 斑马鱼基因敲入技术 → 定向编辑序列
- 4 斑马鱼胚胎显微注射技术 → 胚胎操作的基础技能

## 二、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



# 二、斑马鱼转基因技术

## 2.1 转基因载体

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。



### 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

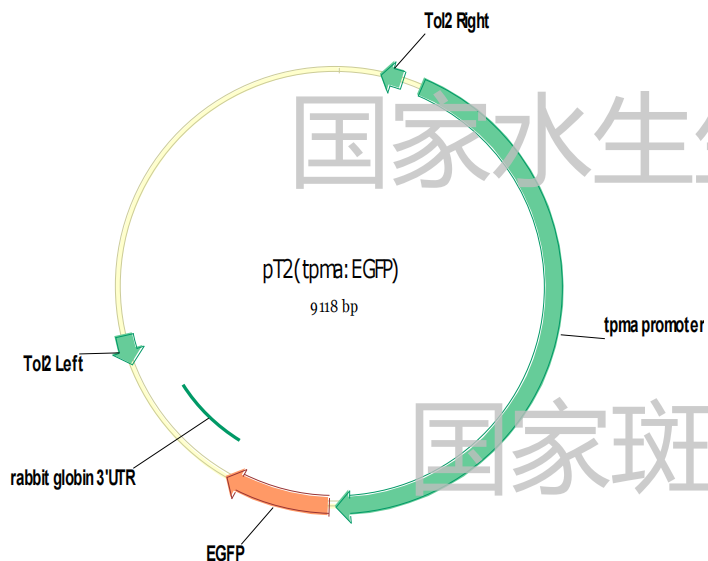
- 决定表达的内容

### 3'UTR

- 提供转录终止信号
- 决定基因表达的组织特异性

## 二、斑马鱼转基因技术

以质粒样品pT2(tpma:eGFP-UTRglobin)为例:



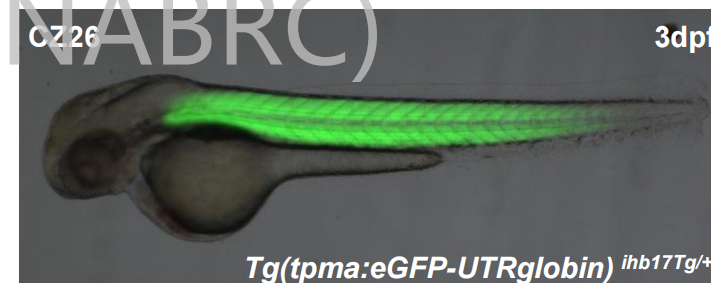
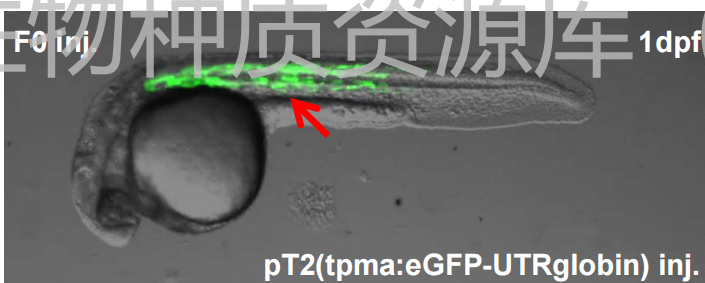
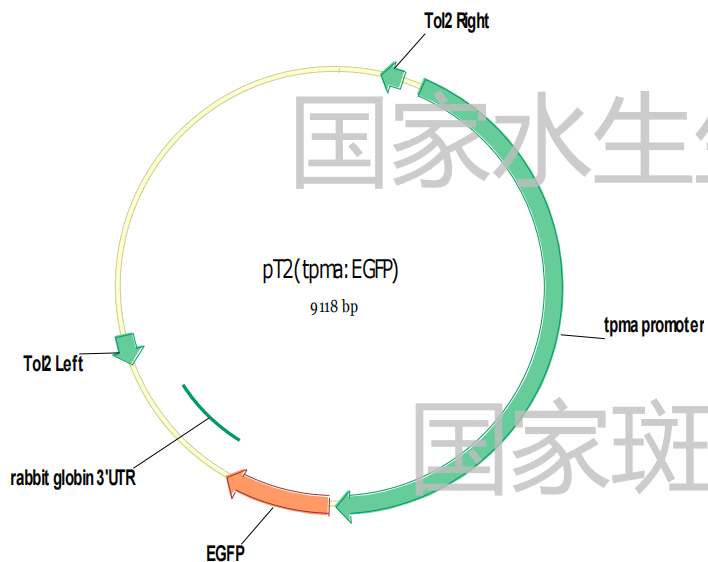
转基因载体的元件:

- 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。

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

## 二、斑马鱼转基因技术

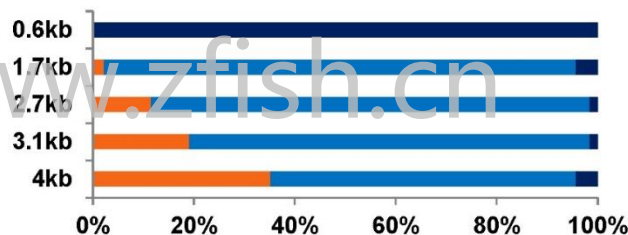
以质粒样品pT2(tpma:eGFP-UTRglobin)为例:



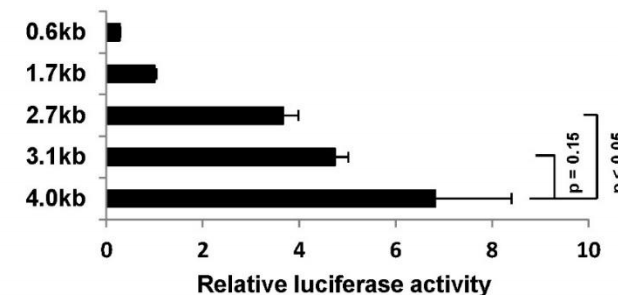
转基因载体的元件:

- 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。

B



C



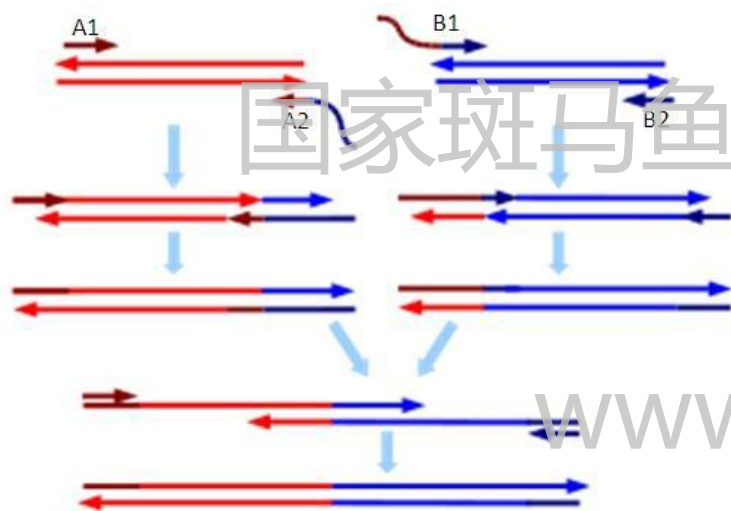
*tpma*启动子分析 (Pang et al., Mar Biotechnol (NY), 2015)

## 二、斑马鱼转基因技术

### 2.2 转基因载体的制备:

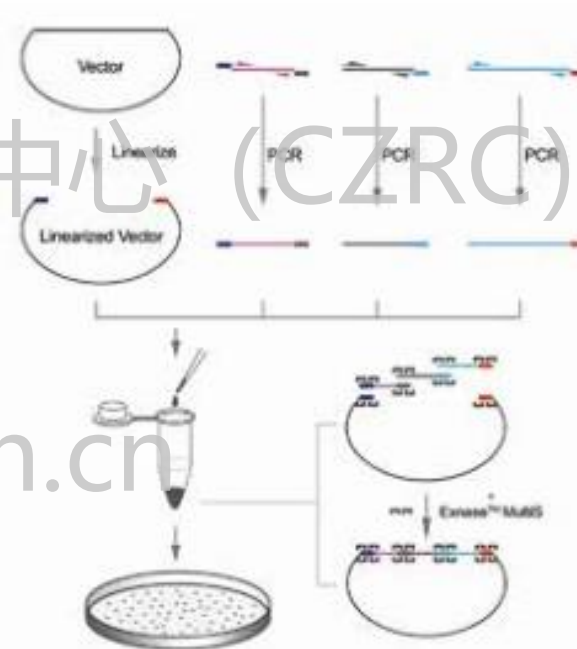
- ① 传统的酶切连接技术 (结合搭桥PCR)
- ② 基于重组酶的无缝克隆技术

#### ➤ 搭桥PCR:



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

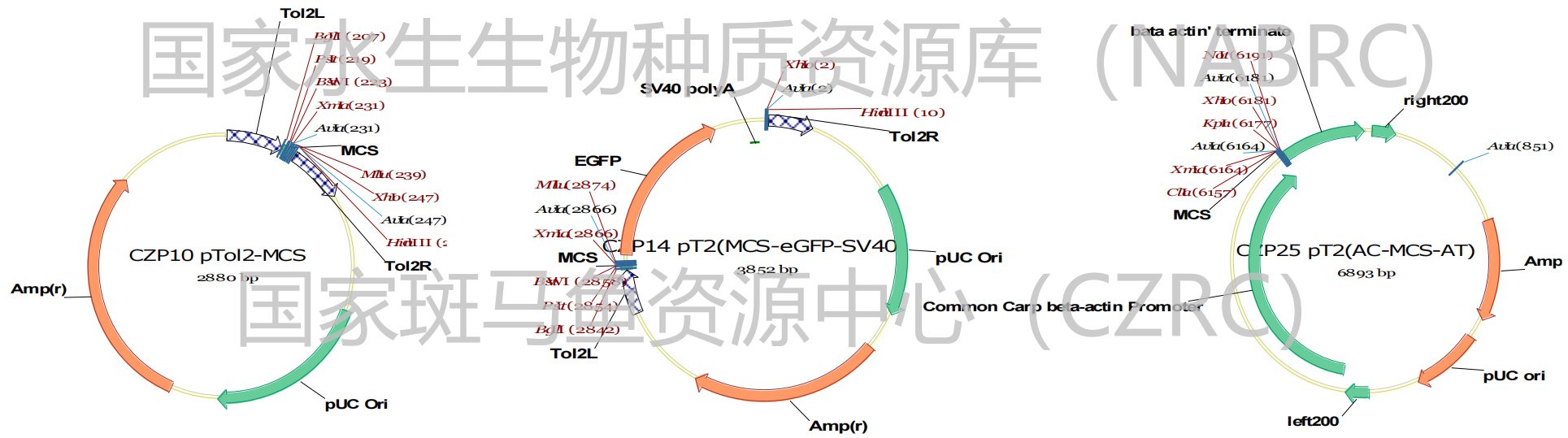
#### ➤ 无缝克隆技术:



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

# 二、斑马鱼转基因技术

## 斑马鱼中心转基因载体构建的工具质粒：



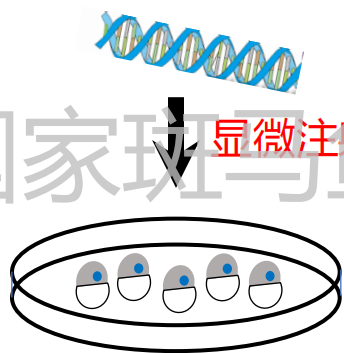
[www.zfish.cn](http://www.zfish.cn)  
<http://www.zfish.cn/Products/OtherProductList.aspx?cid=001006>

### 3. 斑马鱼转基因品系的构建

#### 1. 构建F0代转基因斑马鱼

嵌合体 (Chimera)：遗传学上用以指不同遗传性状嵌合或混杂表现的个体。

F0代群体：



F0代个体 (嵌合体)

### 3. 斑马鱼转基因品系的构建

#### 2. 筛选F0代转基因斑马鱼

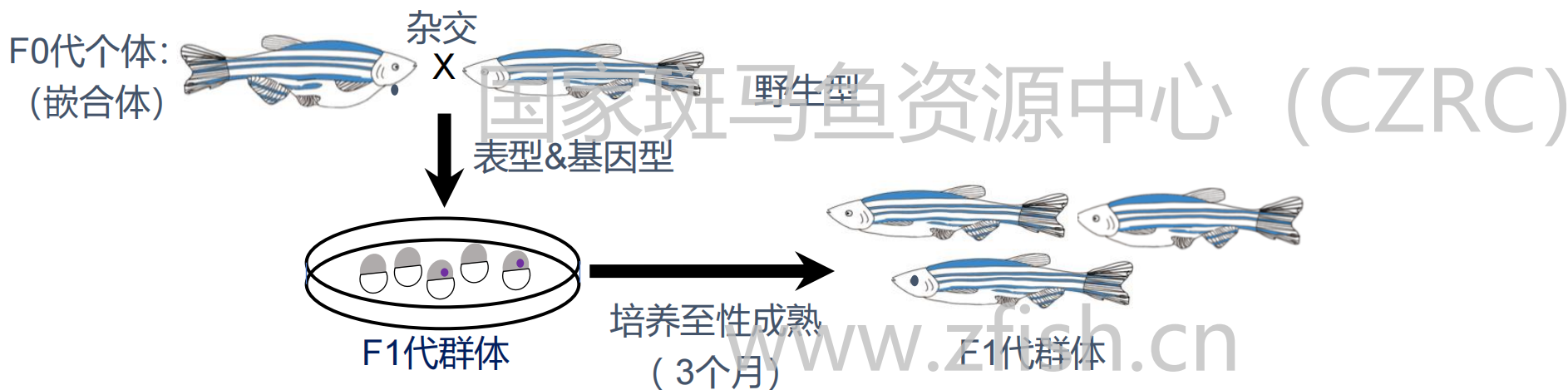
- ① 将F0代转基因群体培养至性成熟 (3个月)
- ② 取转基因斑马鱼逐条与野生型品系侧交, 收集胚胎作遗传检测, 筛选出能够稳定遗传转基因片段的F0个体。



## 2. 斑马鱼转基因品系的构建

### 3. 筛选F1代转基因斑马鱼

- ① 将能够稳定遗传转基因片段的F0个体与野生型品系侧交，繁殖出F1代群体胚胎。
- ② F1代个体的筛选鉴定：基因型和表型鉴定。





## 2. 斑马鱼转基因品系的构建

### 4. 稳定遗传的转基因品系获得

- ① 繁殖F2代胚胎。将转基因阳性的F1代个体与野生型品系侧交，制备转基因F2代胚胎。
- ② 纯合子构建。F2代转基因阳性鱼自交获得F3代，其中1/4中纯合子。



# 二、斑马鱼转基因技术

## 3 斑马鱼转基因品系的构建-小结

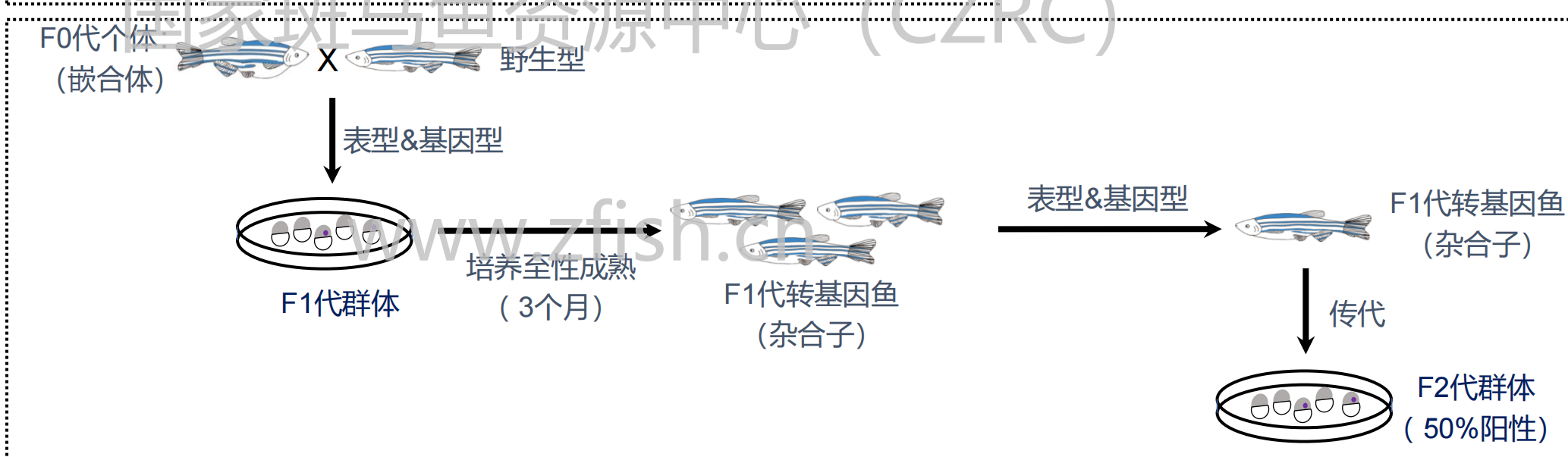
### 1. 载体处理



### 2. F0代构建



### 3. 遗传筛选



# 二、斑马鱼转基因技术

## 2.3 斑马鱼转基因品系

### 转基因斑马鱼技术服务平台

有关技术服务咨询，请联系 熊凤 博士 (xiongfeng@ihb.ac.cn)

#### 平台服务描述

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是制作转基因斑马鱼过程中最常用的方法，它是在显微镜下将外源基因通过显微注射导入受精卵的基因组中，从而建立可稳定遗传转植基因的转基因品系。转基因斑马鱼广泛应用于毒理学、水产育种学等研究领域。

中心是我国唯一的国家级斑马鱼资源平台，拥有规模最大和规格最高的单体斑马鱼养殖，最高质量和最高效率完成相关技术服务。



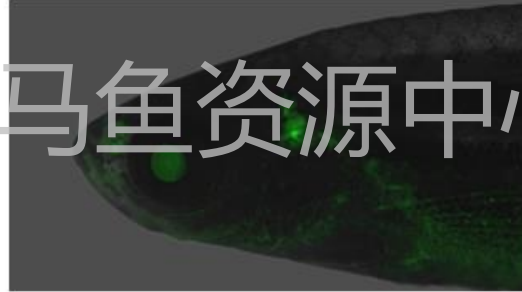
中心养殖系统

**CZRC**  
国家斑马鱼资源中心  
地址：武汉市武昌区东湖南路7号中科院水生所 邮编：430072  
电话：027-68780370 邮箱：zbfish@ihb.ac.cn 网址：http://www.zfish.cn

### *Tg(mpeg1:EGFP) (AB)<sup>h2217g/+</sup>*和 *Tg(mpeg1:mCherry) (AB)<sup>h2217g/+</sup>* 转基因斑马鱼项目报告

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代斑马鱼在胸鳍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。

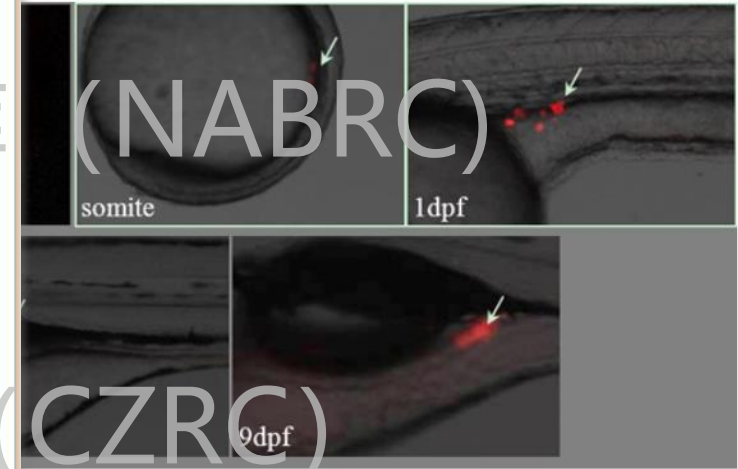
2. *Tg(mpeg1:EGFP) (AB)<sup>h2217g/+</sup>*的阳性F1代转基因鱼的特异荧光表达如下所示：



3. *Tg(mpeg1:mCherry) (AB)<sup>h2217g/+</sup>*的F1代转基因鱼的特异荧光表达如下所示：



效、特异的斑马鱼原始生殖细胞（PGC）操作平台，可在胚胎发育期高效、快速筛选出生殖细胞转植基因在转基因鱼中的表达效率和生殖传递效率。



特异、高效的斑马鱼PGC操作平台

秀，AB是最为普遍使用的标准纯遗传背景之一，直接保证了委托方得到纯净背景的转基因斑马鱼以及其它遗传背景的转基因斑马鱼服务。

讨论，双方签订技术服务合同。

设计到构建的一站式技术服务。

表型，与预期表型进行对照（2-3天）。

选出能将转基因传递给子代的P0代转基因斑马鱼（3个月）。

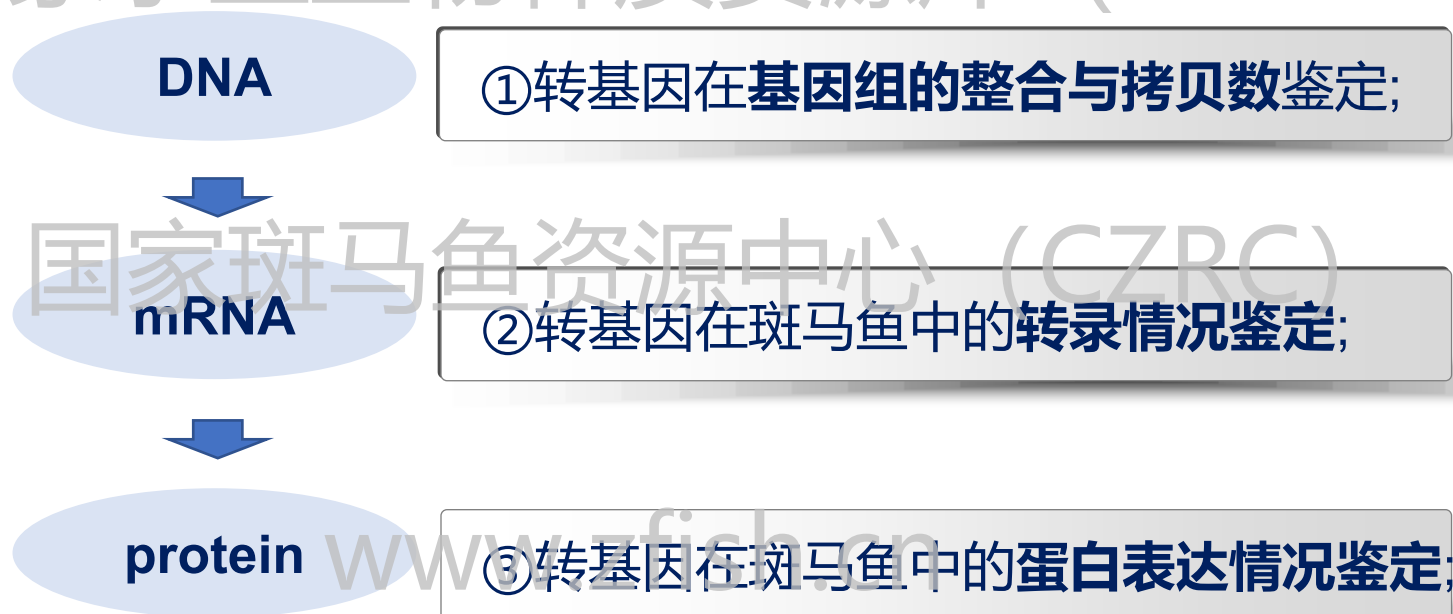
斑马鱼杂交建立F1代，鉴定F1代斑马鱼的基因型，及阳性F1代转基因斑马鱼胚胎的表型特征（2-3

进行逐尾鉴定），鉴定转基因阳性的F1代个体，交付委托方（2个月）。

## 二、斑马鱼转基因技术

### 2.4 转基因品系的鉴定方法

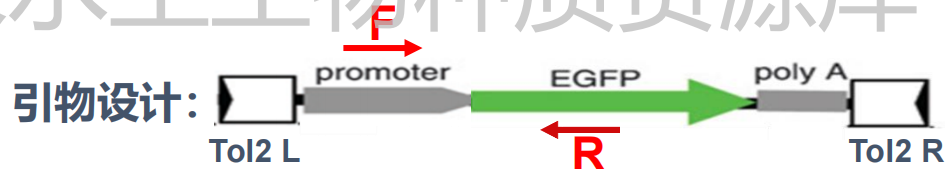
转基因的遗传信息传递:



## 二、斑马鱼转基因技术

### 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；



麻醉斑马鱼;剪尾鳍;提取DNA样品

## 二、斑马鱼转基因技术

### ② 转基因在斑马鱼中的转录情况鉴定

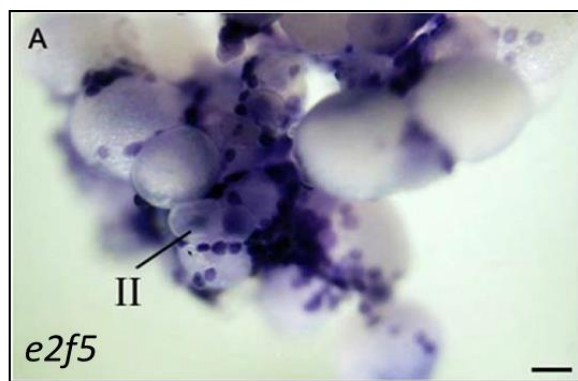
#### ➤ 原位杂交技术;

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。

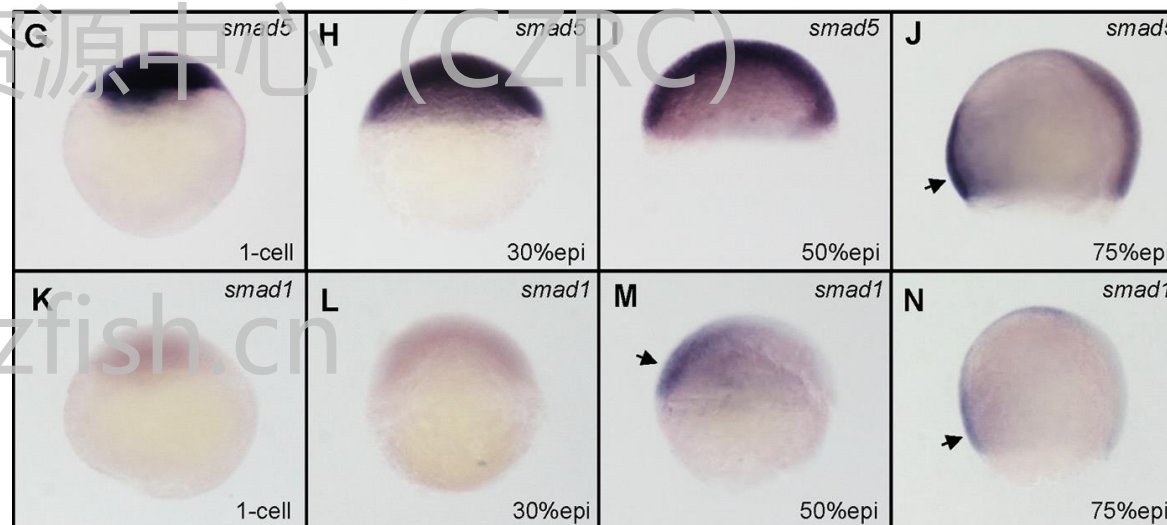
该技术能够反映转录本:

✓ 相对表达水平信息

✓ 位置信息



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

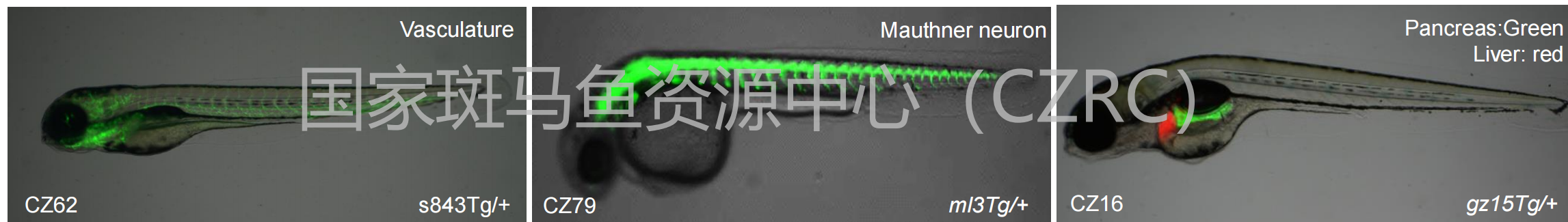


(Wei et al., *J Biol Chem* 2014)

## 二、斑马鱼转基因技术

### 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



#### 鉴定方法:

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。

- **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。

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

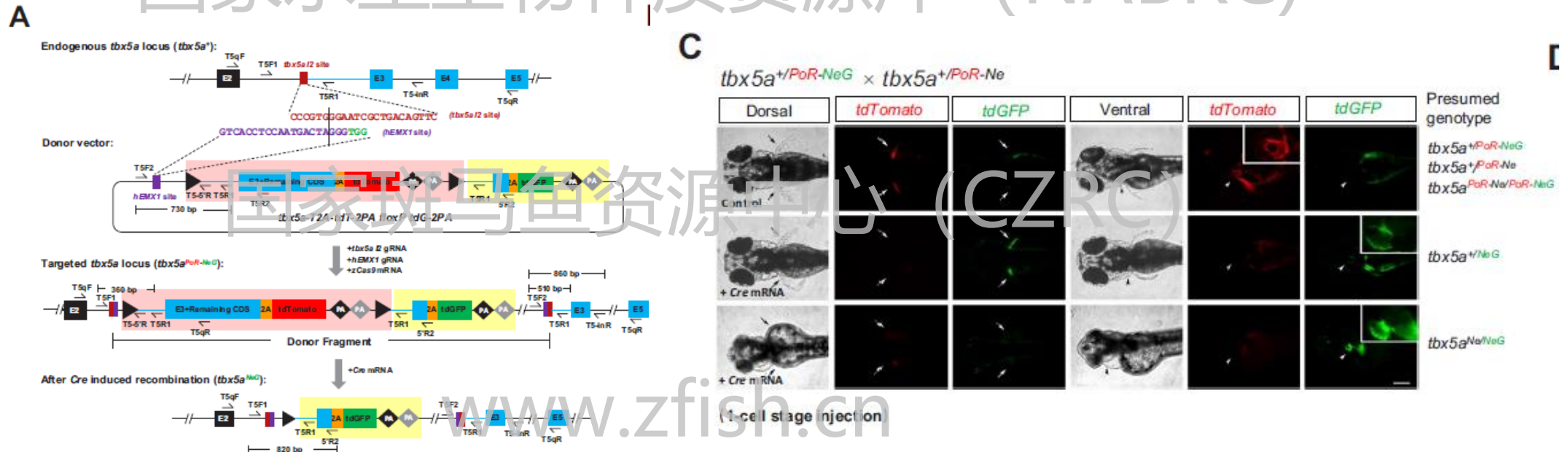


- 1 斑马鱼基因过表达技术 → 瞬时基因功能获得
- 2 斑马鱼转基因技术 → 稳定基因功能获得
- 3 斑马鱼基因敲入技术 → 定向编辑序列
- 4 斑马鱼胚胎显微注射技术 → 胚胎操作的基础技能

# 三、斑马鱼基因敲入技术

基因敲入技术是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。

国家水生生物种质资源库 (NABRC)

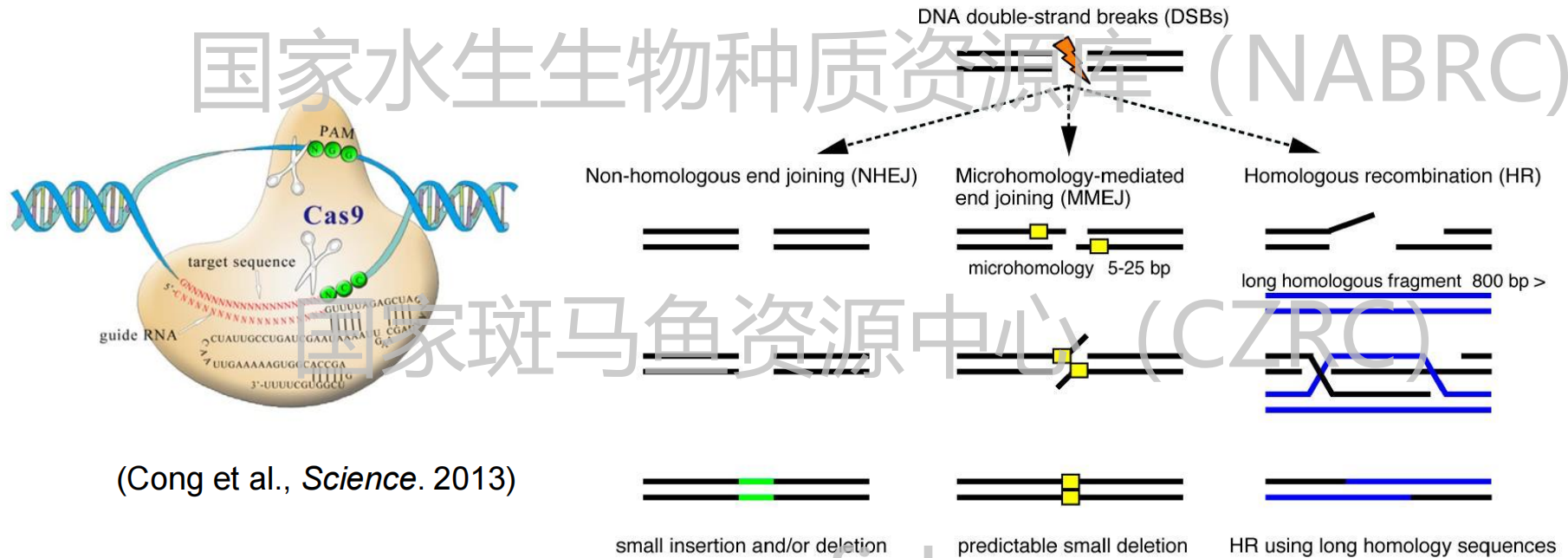


利用基因敲入技术，在**tbx5a**基因序列中通过一次插入同时引入两个loxP序列以及荧光蛋白报告基因，实现了一步法产生**双色标记的敲入及条件性基因敲除品系**：

- ✓ 可达到基因/等位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

# 三、斑马鱼基因敲入技术

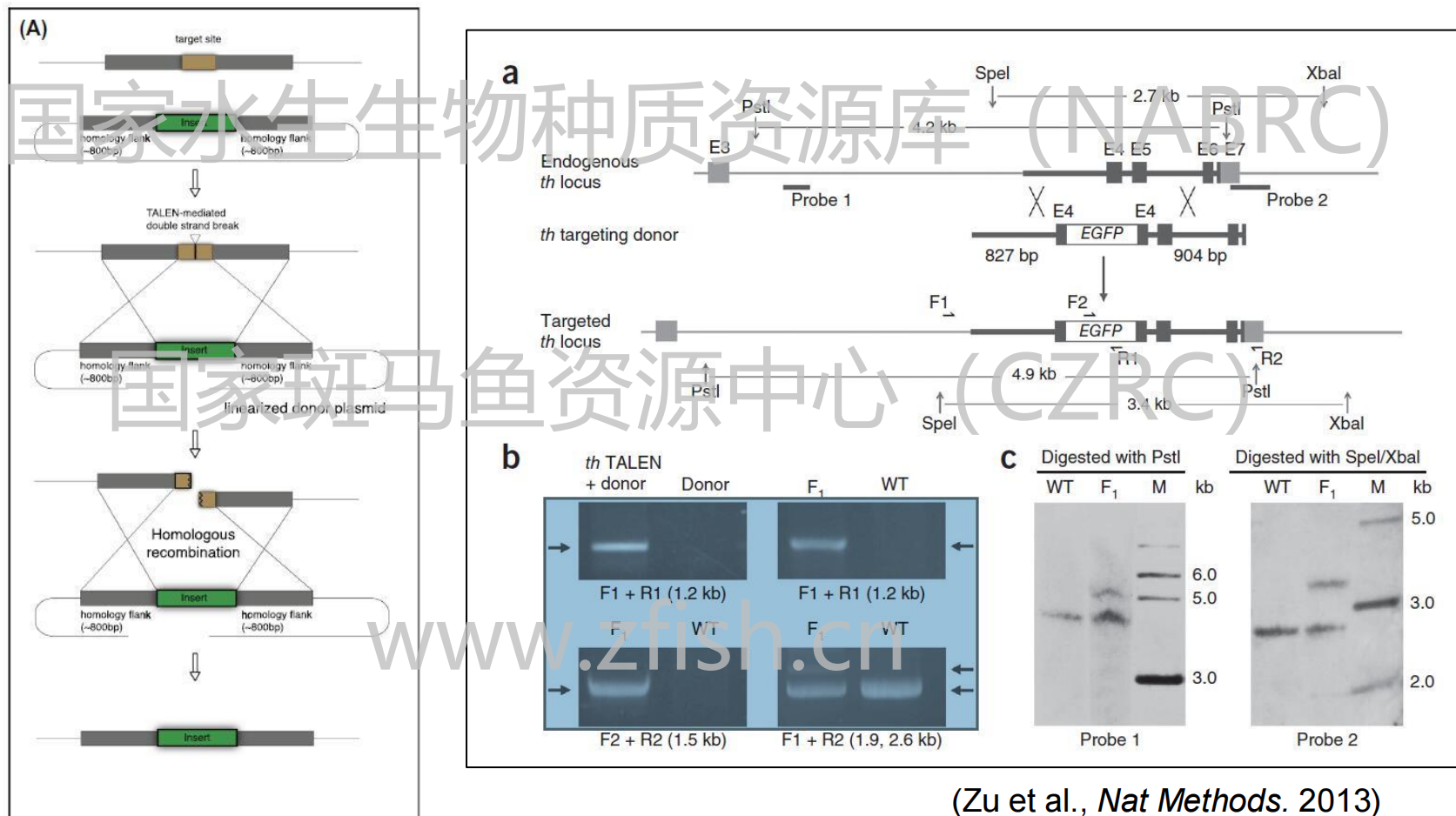
## 斑马鱼基因敲入技术原理



- 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，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）以及同源重组（Homologous Recombination, HR）、被认为是斑马鱼中的三种主要修复机制。

# 三、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

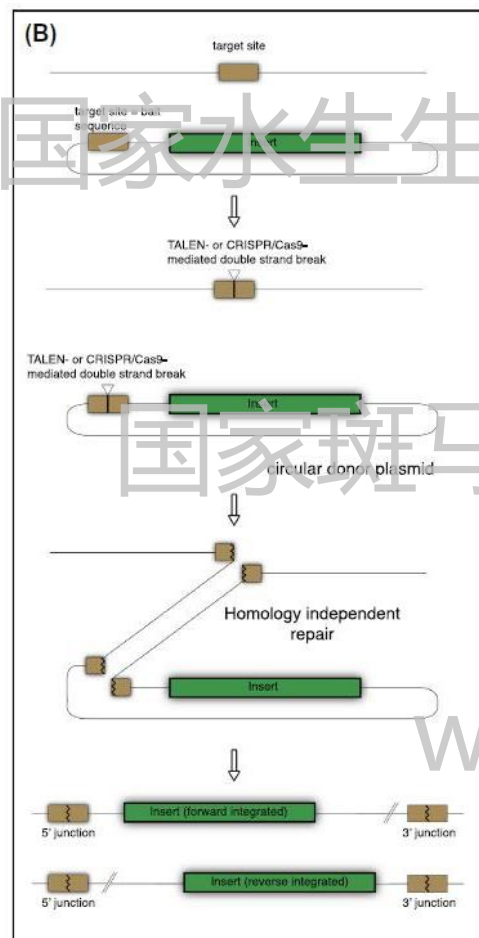


(Auer et al., *Methods*. 2014)

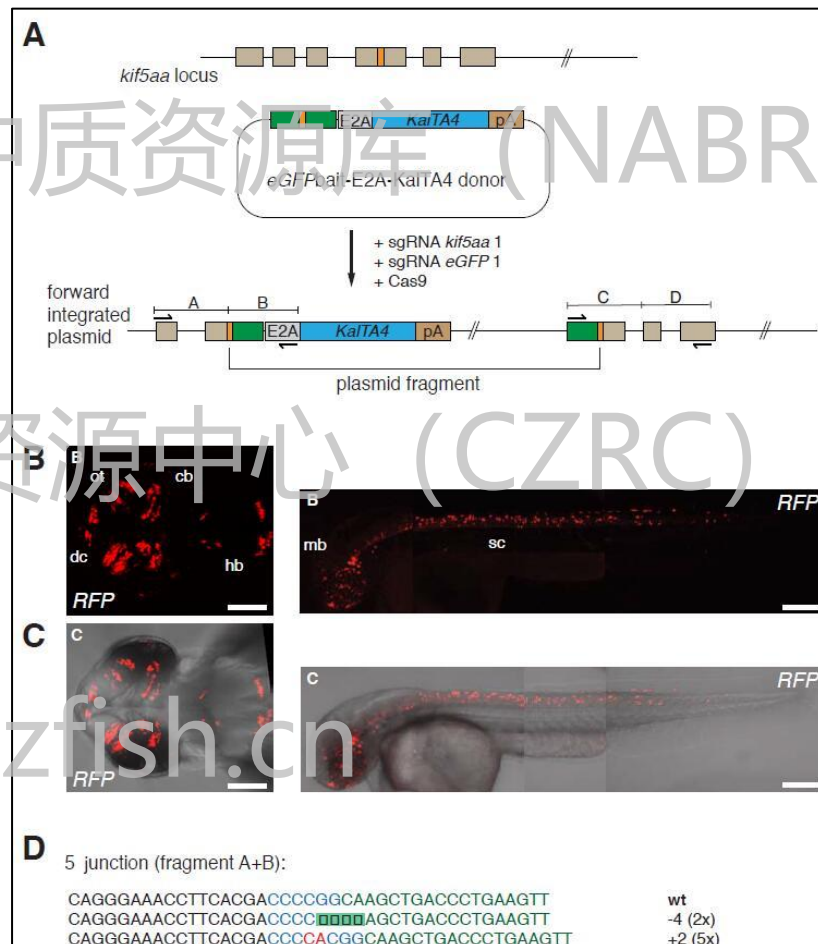
(Zu et al., *Nat Methods*. 2013)

# 三、斑马鱼基因敲入技术

## 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%

# 三、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

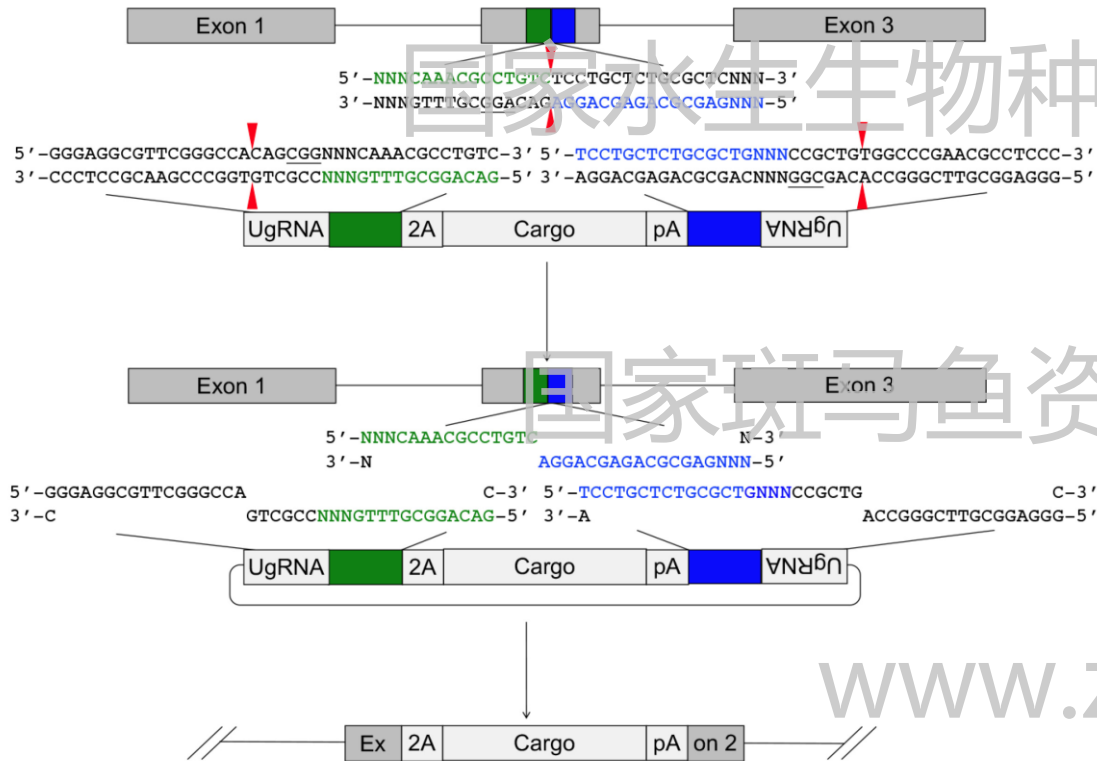


Table 1. Germline transmission of zebrafish GeneWeld GTag integrations.

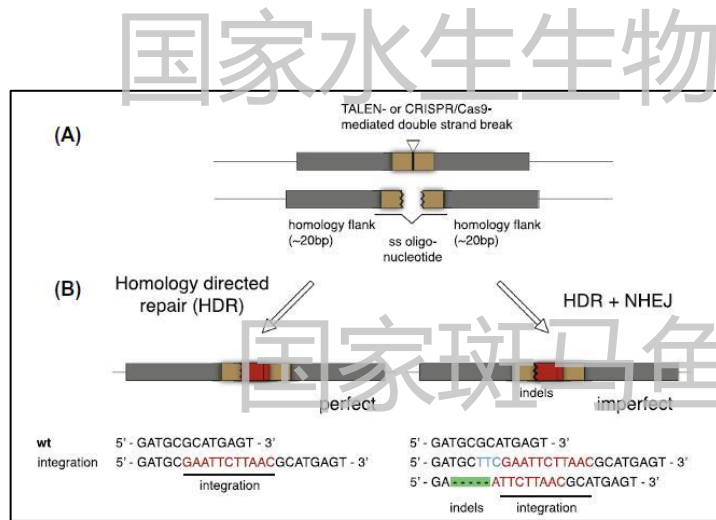
Genomic target	Exon	5'/3' Homology arm length	Reporter expression	Number of germline transmitting adults	Percentage of germline transmitting adults
<i>noto</i>	E1	24/24	24%	3/5	60%
<i>tyr</i>	E4	24/24	64%	3/8	38%
<i>cx43.4*</i>	E2	24/24	50%	0/1	0%
<i>cx43.4</i>	E2	48/48	38%	0/4	0%
<i>esama</i>	E4	24/24	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)

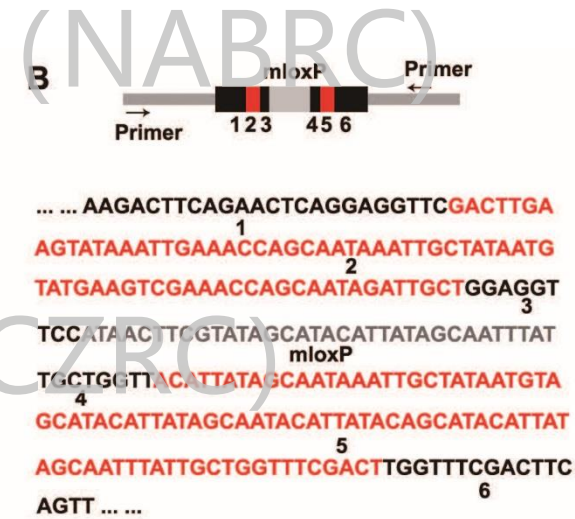
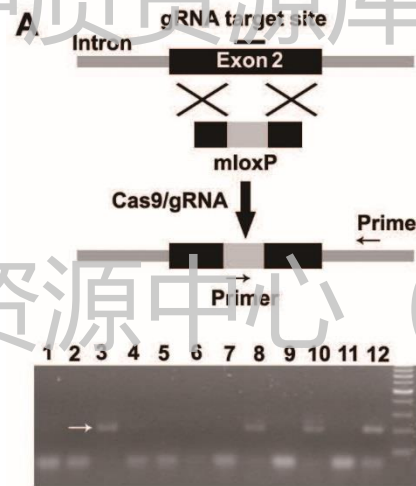
(生殖传递率为49%)

# 三、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

# 三、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**组织性特异敲除**。
- 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。

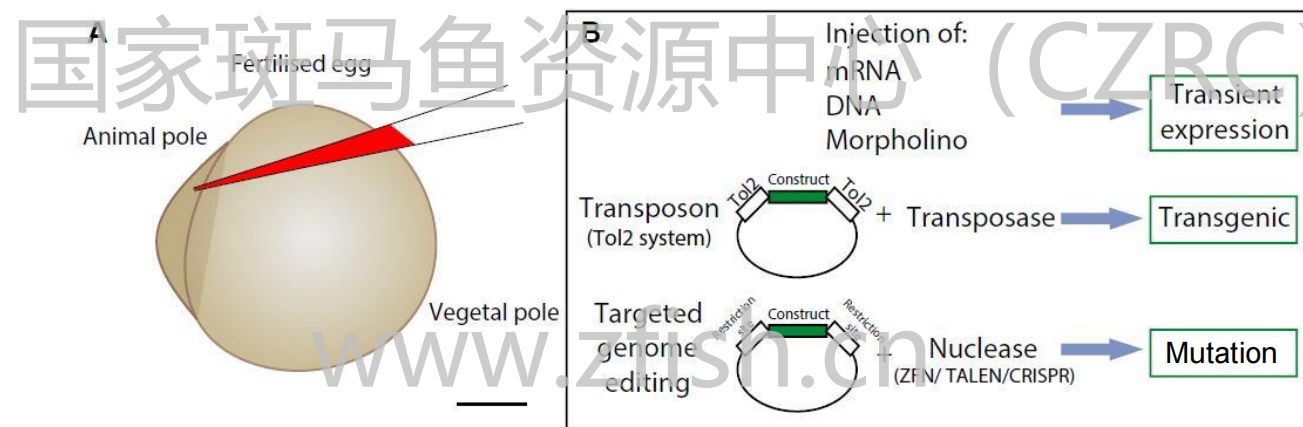
www.zfish.cn



- 1 斑马鱼基因过表达技术 (NABRC)
- 2 斑马鱼转基因技术
- 3 斑马鱼基因敲入技术
- 4 斑马鱼胚胎显微注射技术 → 胚胎操作的基础技能

# 四、斑马鱼胚胎显微注射技术

斑马鱼胚胎显微注射技术是在显微镜下，利用显微操作系统，将实验材料直接注射到1至4细胞期的斑马鱼胚胎中。由于胚胎发育早期没有膜分隔动物极和卵黄，注入的溶液将扩散至整个胚胎中。通过注射不同类型的实验样品，可以实现基因的短时间过表达、表达敲降、以及制备转基因或基因突变斑马鱼品系等实验目标。



(Wyatt et al., *Eur J Neurosci*, 2015)

# 四、斑马鱼胚胎显微注射技术

## 4.1 显微注射样品:

国家水生生物种质资源库 (NABRC)

DNA

mRNA

国家斑马鱼资源中心 (CZRC)

Morpholino

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

其它

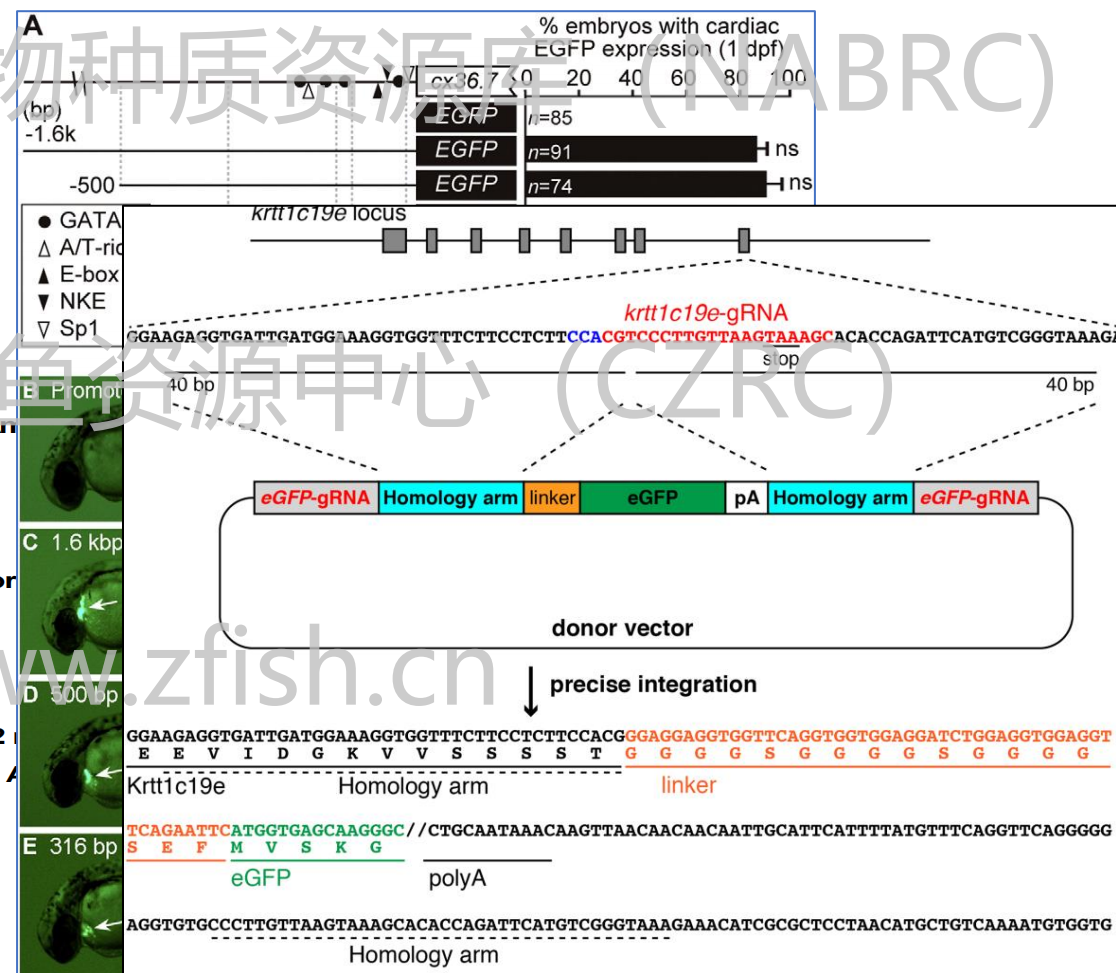
# 四、斑马鱼胚胎显微注射技术

## 4.1.1 注射DNA的实验:

- ① 过表达分析 (over & ectopic expression) ;
- ② 启动子分析;
- ③ 转基因;
- ④ 定点敲入 (knock-in) 。

(Miyagi et al., *Gene*, 2016)

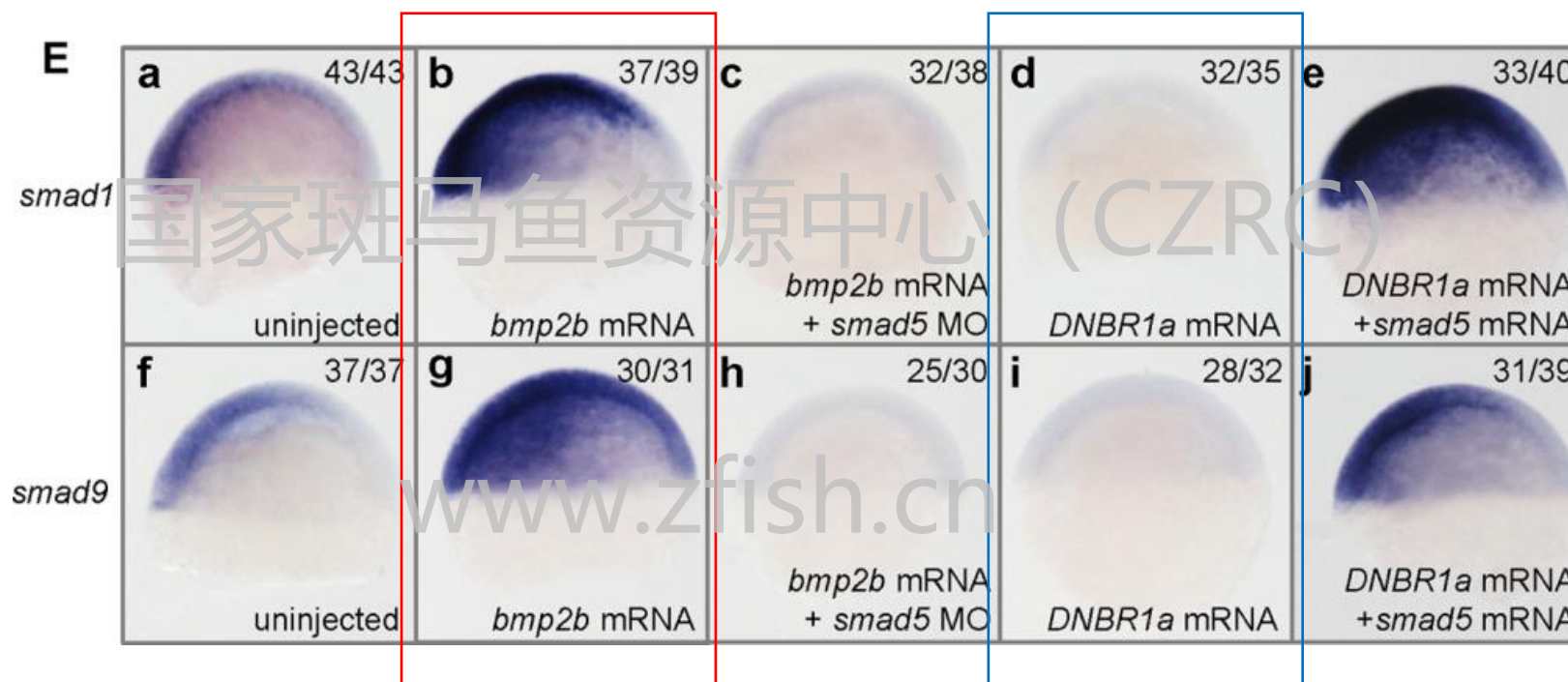
(Hisano et al., *Sci Rep*, 2015)



# 四、斑马鱼胚胎显微注射技术

## 4.1.2 注射mRNA的实验：过表达

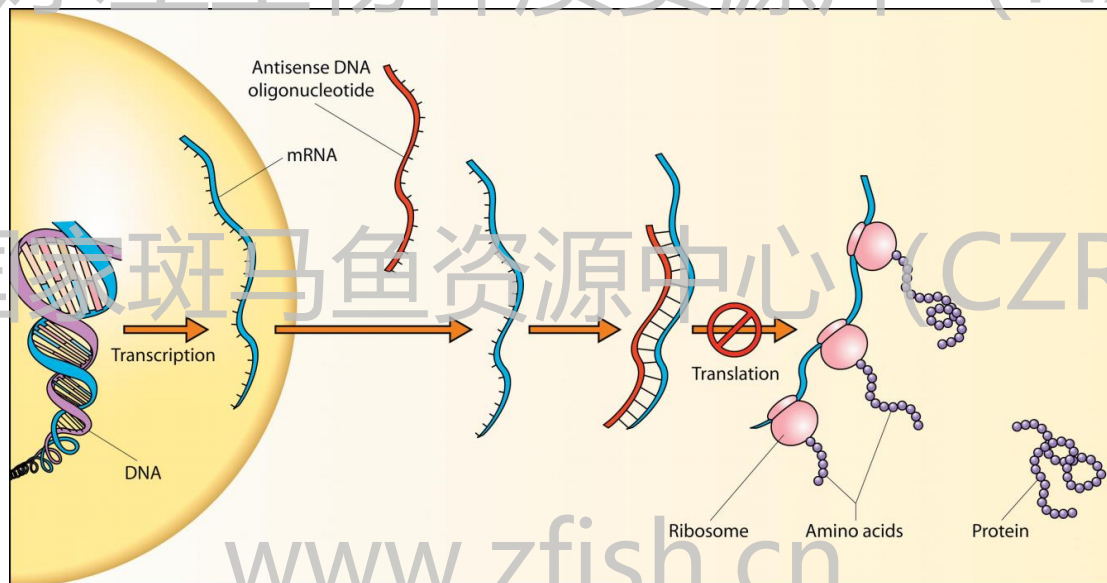
- ① 野生型编码基因：过表达调控分析（over & ectopic expression）；
- ② 突变型编码基因：显性负调控分析（Dominant negative expts）；
- ③ 工具酶：Tol2转座酶、CRISPR/Cas9系统。



## 四、斑马鱼胚胎显微注射技术

### 4.1.3 Morpholino:

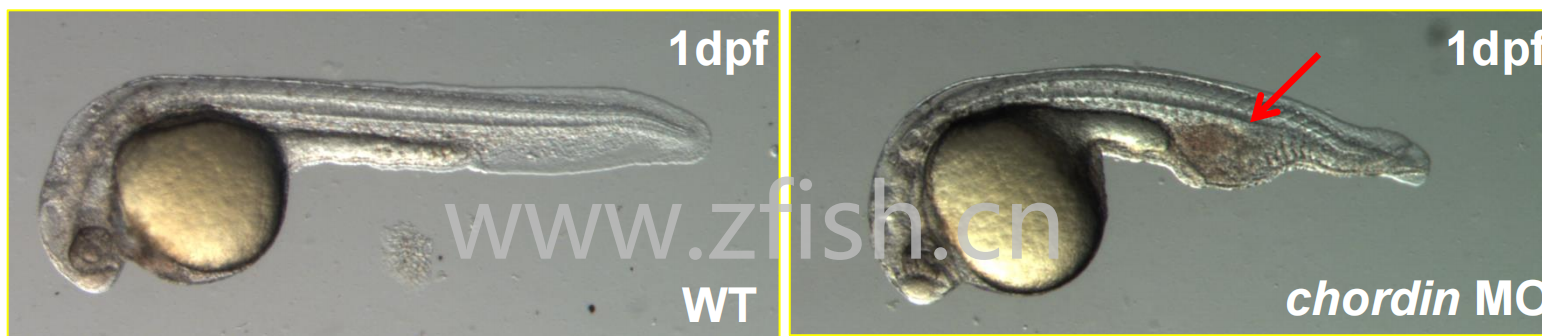
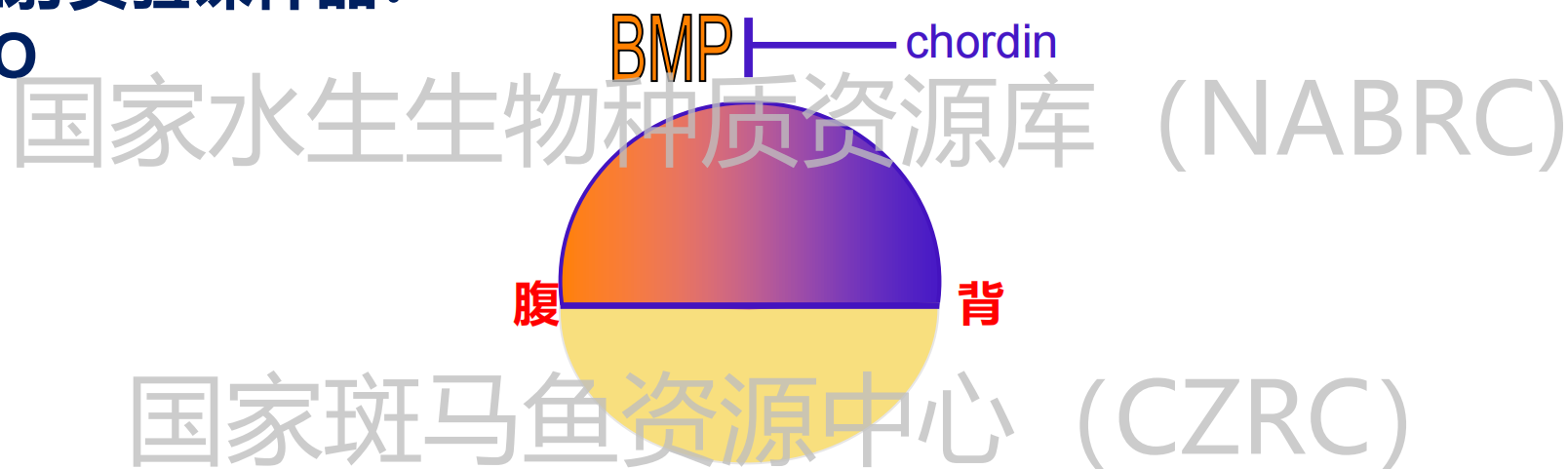
- ① 天然核苷酸结构重新设计获得的**合成的寡核苷酸单链**，长度多为25个碱基；
- ② 以标准核苷酸碱基配对的方式与RNA**互补结合**。
- ③ 注射Morpholino的实验：**敲低表达**



Morpholino工作原理示意图(gene-tools公司)

- 阻止翻译：靶点位于mRNA的5' UTR 或者靠近ATG的编码区；
- 阻止剪切：靶点位于外显子与内含子的交界处，也阻止翻译。

前期显微注射实验课样品：  
*chordin* MO



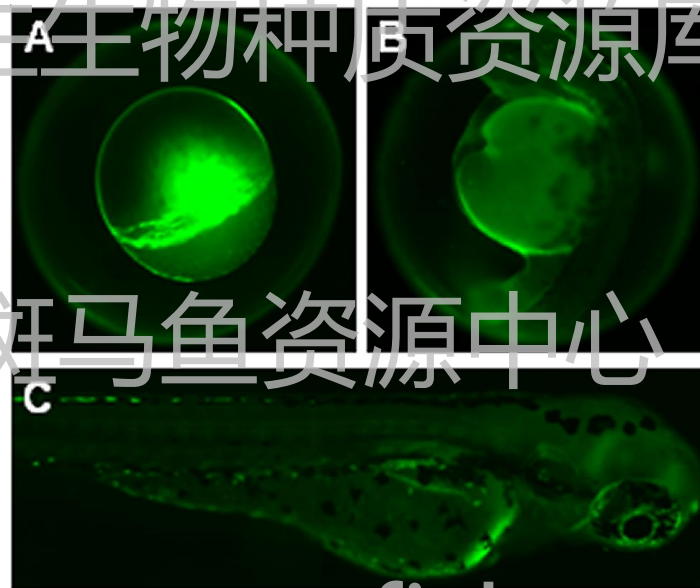
胚胎出现整齐的轻微腹部化：头部变小、血岛增大

# 四、斑马鱼胚胎显微注射技术

胚胎显微注射其它样品：染料、蛋白、药物等。

国家水生生物种质资源库 (NABRC)

国家斑马鱼资源中心 (CZRC)



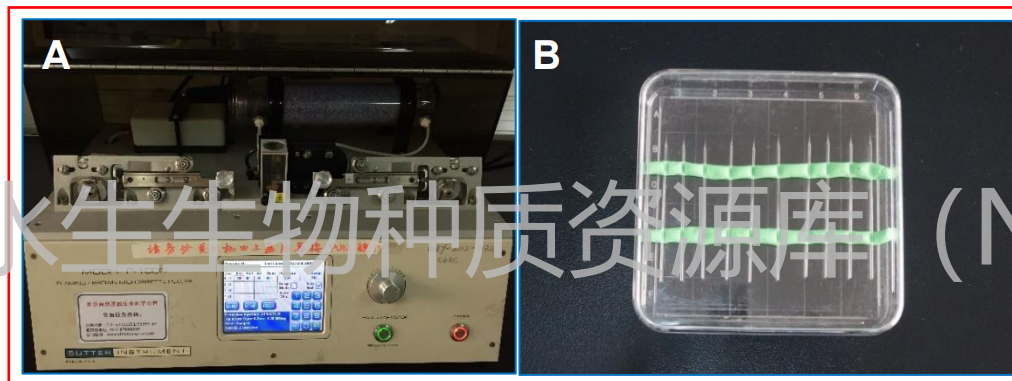
[www.zfish.cn](http://www.zfish.cn) 注射荧光染料

(Wang et al., *PLoS ONE*, 2007)

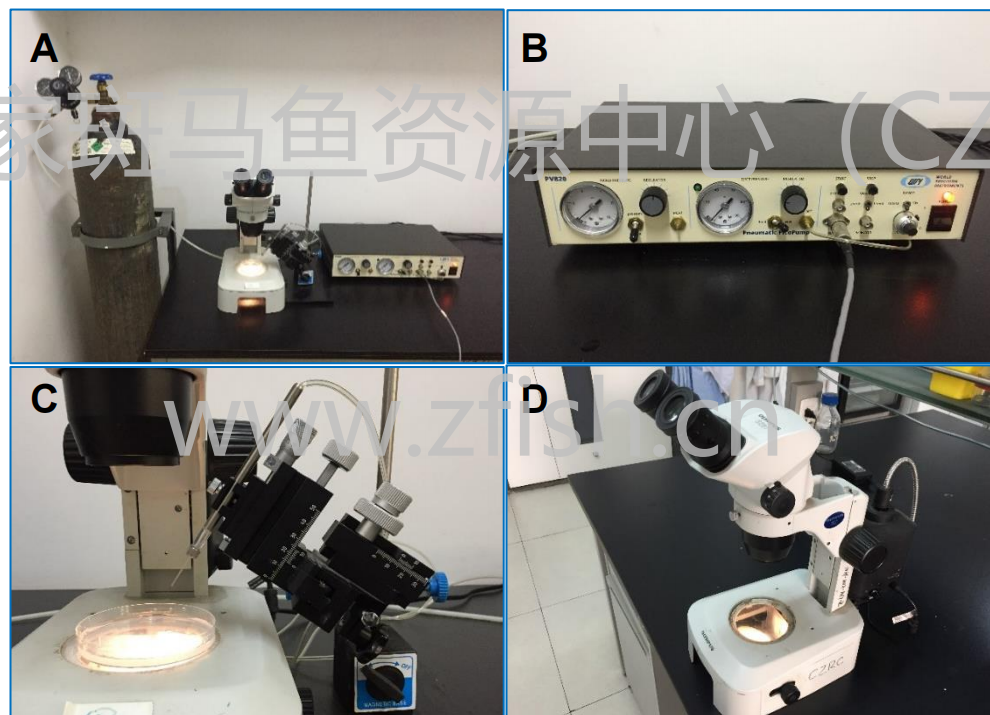


# 四、斑马鱼胚胎显微注射技术

## 4.2 显微注射设备：



显微注射针准备。  
(A) 拉针仪； (B) 拉制好的注射针。

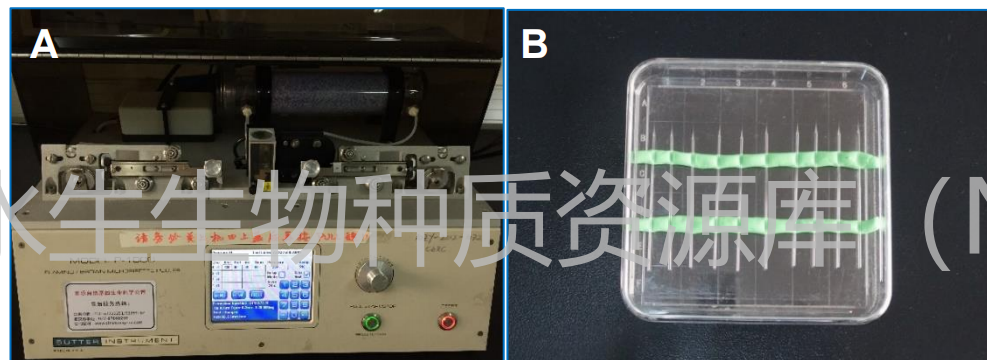


显微注射常用设备。  
(A) 全套搭建好的显微注射设备；  
(B) 显微注射仪； (C) 显微操纵器；  
(D) 体视显微镜。

# 四、斑马鱼胚胎显微注射技术

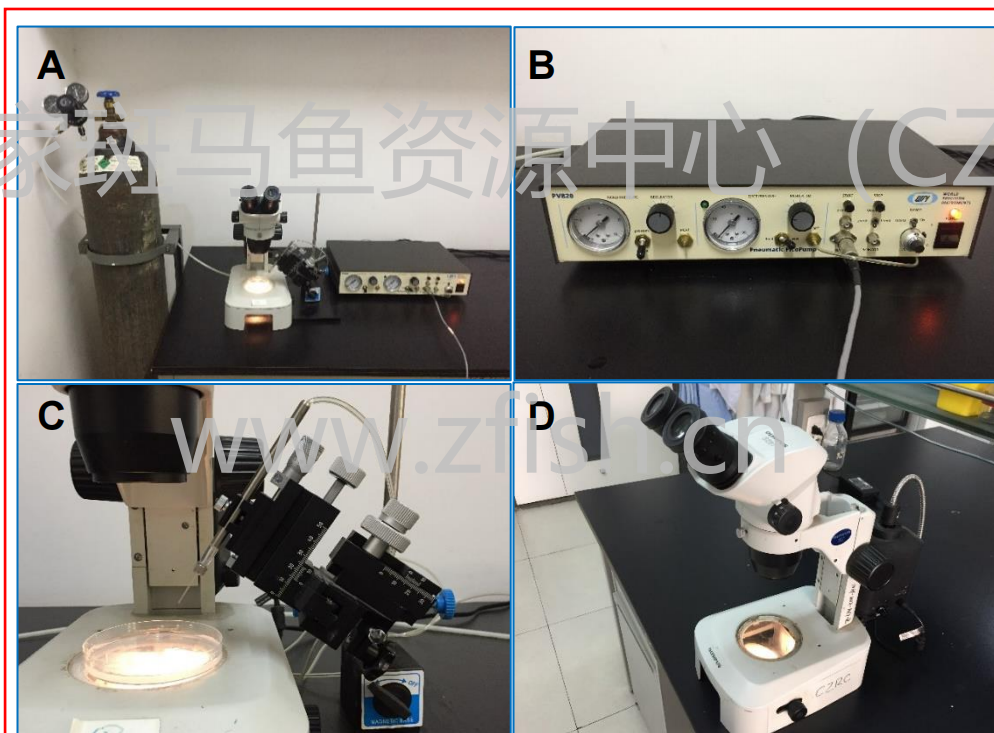
## 4.2 显微注射设备：

国家水生生物种质资源库 (NABRC)



显微注射针准备。  
(A) 拉针仪； (B) 拉制好的注射针。

国家斑马鱼资源中心 (CZRC)



显微注射常用设备。  
(A) 全套搭建好的显微注射设备；  
(B) 显微注射仪； (C) 显微操纵器；  
(D) 体视显微镜。

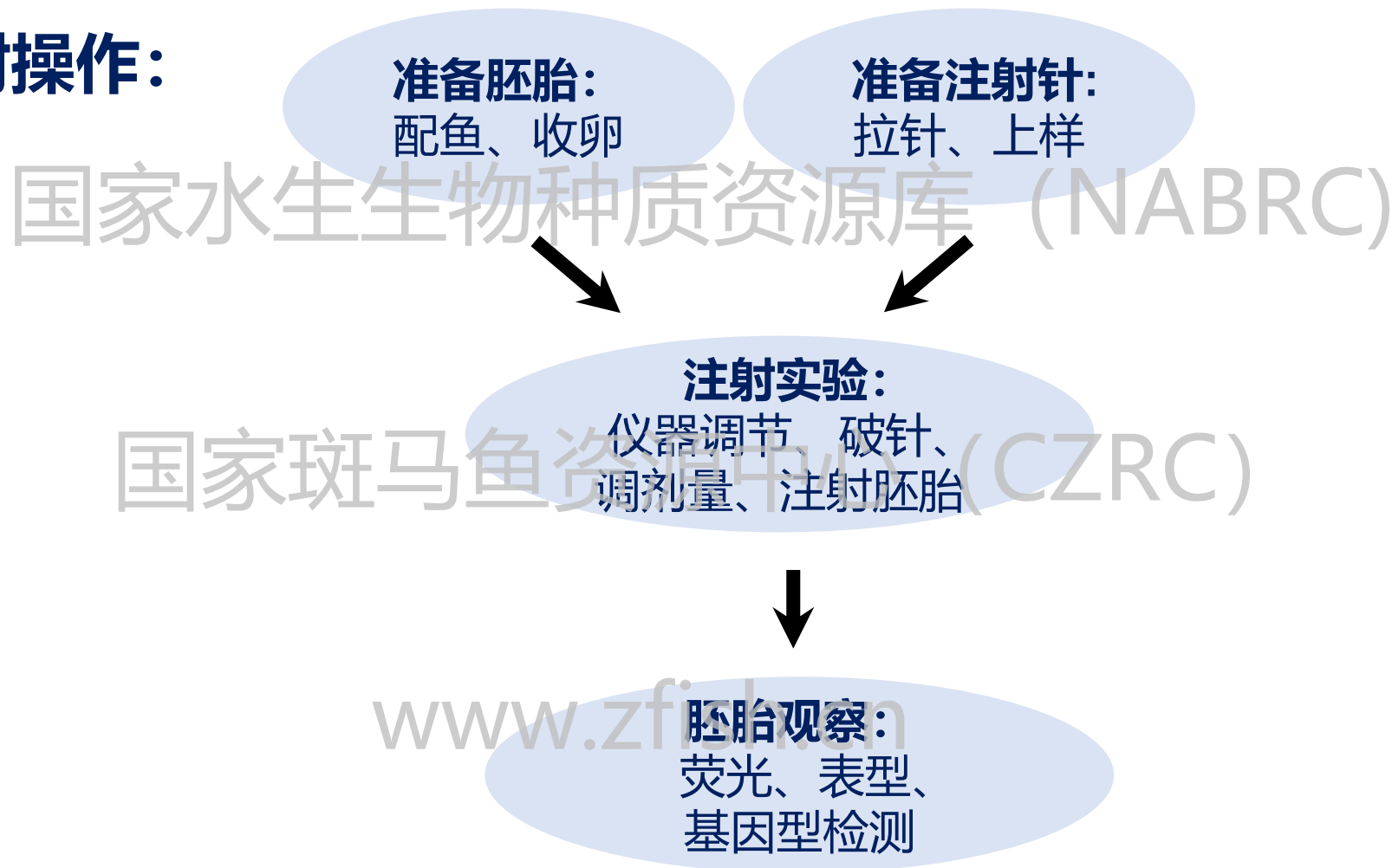
# 四、斑马鱼胚胎显微注射技术

## 4.3 显微注射视频



## 四、斑马鱼胚胎显微注射技术

### 4.4 显微注射操作:



# 四、斑马鱼胚胎显微注射技术

## 1. 准备胚胎：配鱼、收卵

国家水生生物种质资源库 (NABRC)

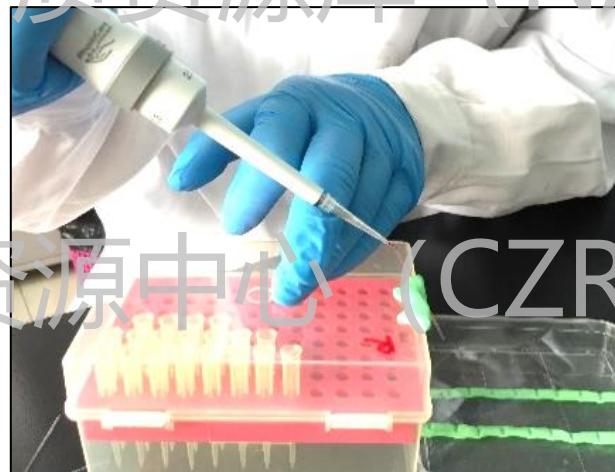
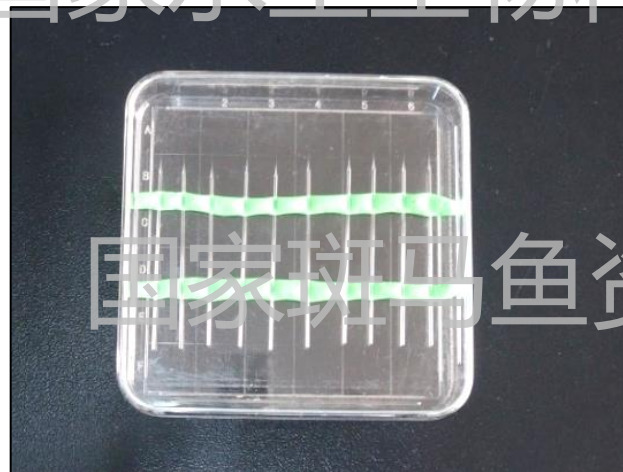


胚胎在受精后1至2分钟内卵膜将膨胀，10分钟后动物极膨起，细胞形态变得较为规整，此时可以开始注射。  
受精后45分钟左右发生第一次卵裂。

# 四、斑马鱼胚胎显微注射技术

## 2. 准备显微注射针：拉针、上样

国家水生生物种质资源库 (NABRC)



国家斑马鱼资源中心 (CZRC)

针尖大小以及针尖角度适合的注射针。  
注射针最好提前一天准备，且不宜一次准备过多。  
样品通过虹吸作用将汇聚于玻璃管针头部分。  
在注射样品中加入酚红便于观察注射过程。

## 四、斑马鱼胚胎显微注射技术

### 3. 胚胎显微注射：**仪器调节**、破针、调剂量、注射

国家水生生物种质资源库 (NABRC)

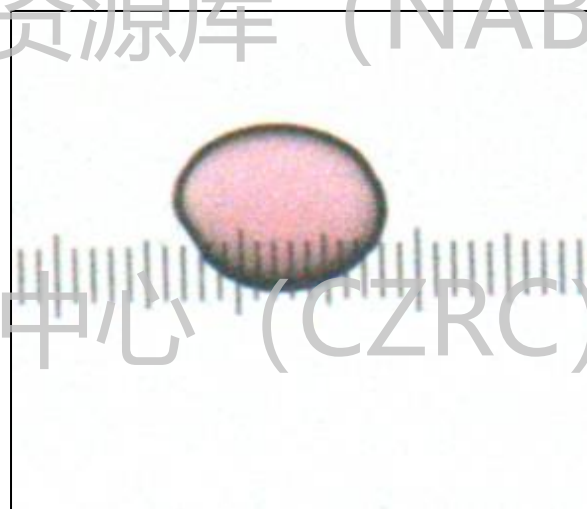
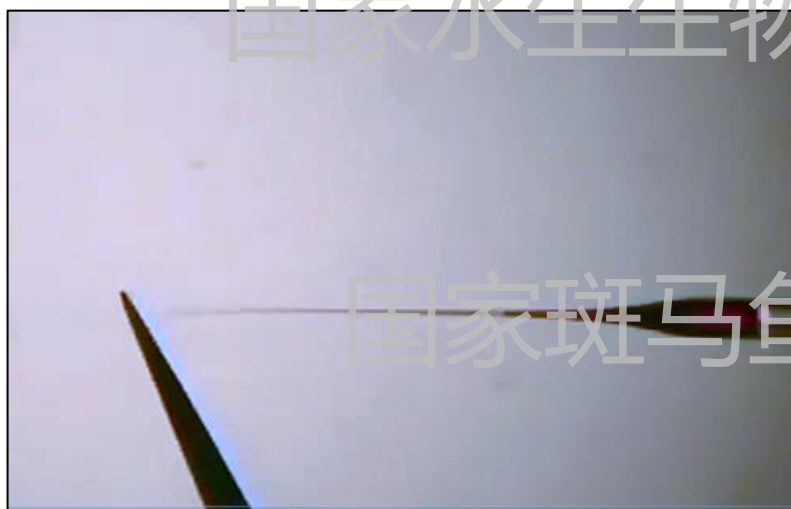


[www.zfish.cn](http://www.zfish.cn)

氮气罐总阀压力至0-0.5 MPa之间；注射压力值到15-20 psi之间；  
调节脉冲时间至40-50毫秒之间；调节保持压力值在0.5 psi左右；

## 四、斑马鱼胚胎显微注射技术

### 3. 胚胎显微注射：仪器调节、破针、调剂量、注射



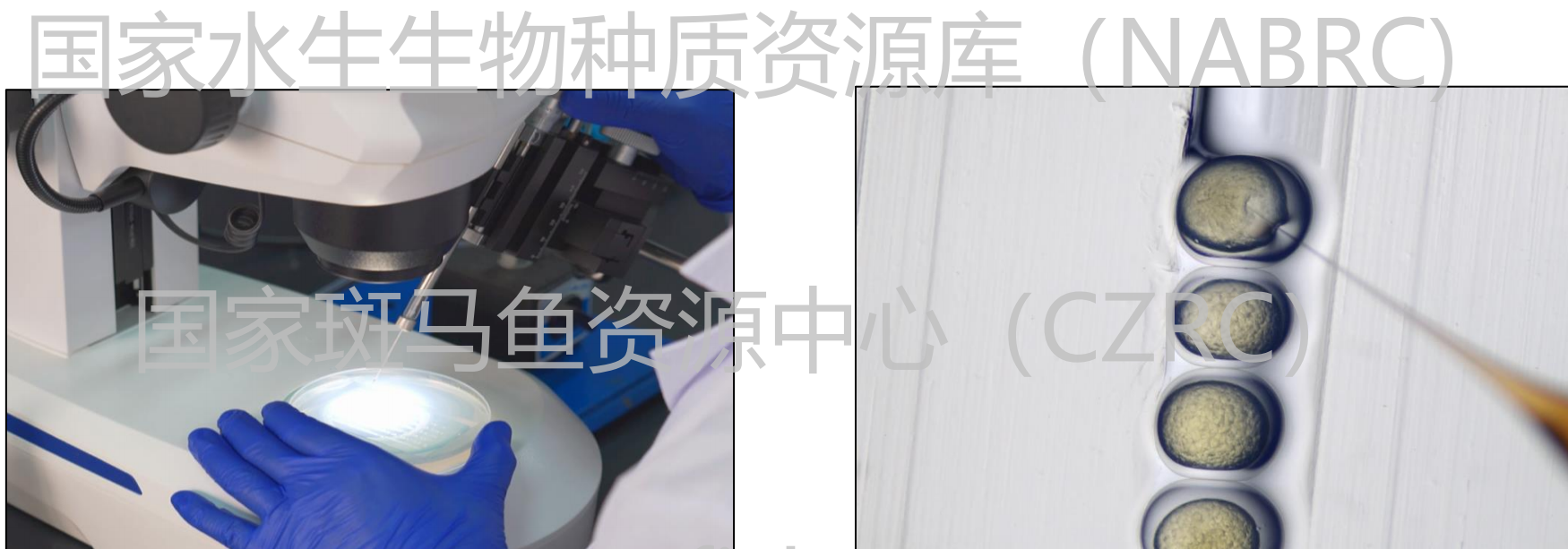
注射针尖太细则很难刺破卵膜，  
注射针尖太粗则会给胚胎造成比较大损伤

理想的注射剂量为胚胎体积的10%，一般为1 nL。  
液滴直径要控制在0.1至0.15 mm之间。



## 四、斑马鱼胚胎显微注射技术

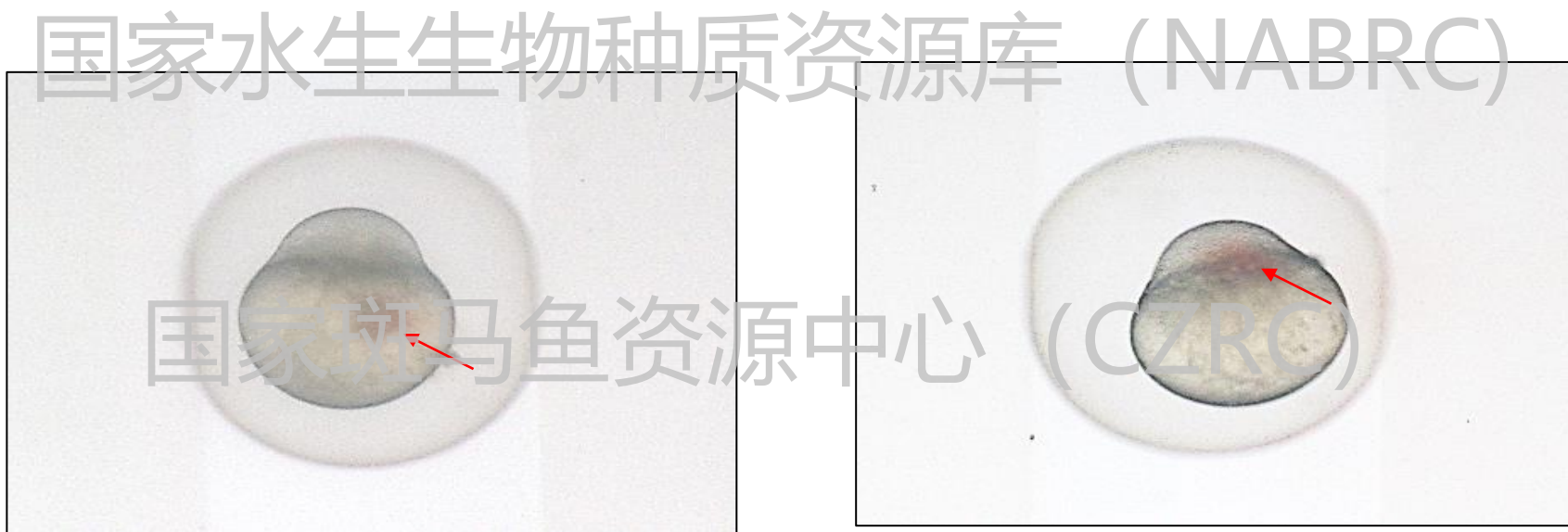
### 3. 胚胎显微注射：仪器调节、破针、调剂量、**注射**



将待注射的胚胎放置到体视显微镜下，用低倍物镜对准胚胎调焦。调节显微操纵器轻轻的落下针尖，将注射针尖推入视野中心，通过显微操纵器的微调调整注射针位置，直到清晰见到针尖为止。进一步调整显微镜焦距、注射针及胚胎的位置，使胚胎和注射针尖均达到最佳清晰程度。

## 四、斑马鱼胚胎显微注射技术

### 3. 胚胎显微注射：仪器调节、破针、调剂量、**注射**



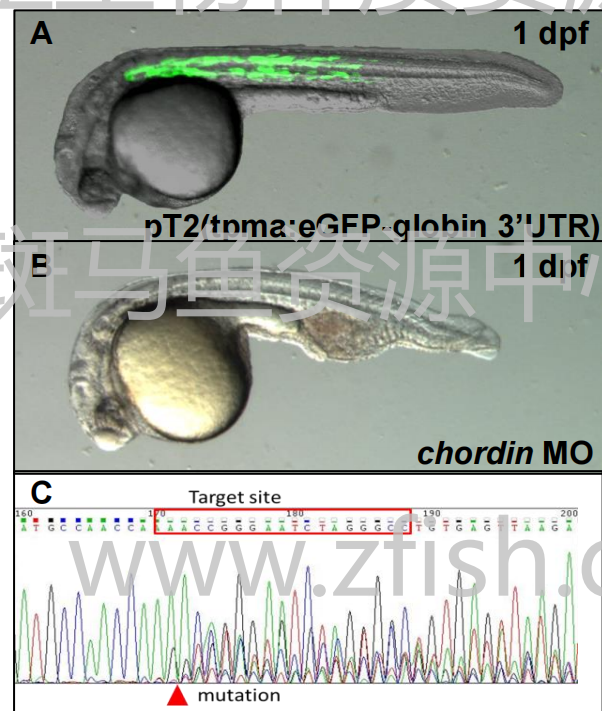
www.zfish.cn

卵黄注射相对比较容易，胚胎存活率高，但是样品需要时间扩散到细胞质中。动物极注射需要正确的胚胎定位和注射技术，相对耗时较长，胚胎死亡率也比注射入卵黄高，但是DNA样品需注射入动物极才能高效率发挥作用。

# 四、斑马鱼胚胎显微注射技术

## 4. 注射胚胎的培养和观察：荧光、表型、基因型检测

国家水生生物种质资源库 (NABRC)



国家斑马鱼资源中心 (CZRC)

# 四、斑马鱼胚胎显微注射技术

注意事项	原因
样品的纯度	堵针；DNA样品去内毒素
样品的浓度	最佳浓度优化
注射剂量	1nl/embryo
针尖大小	太粗：注射量多，受精卵破裂； 太细：注射量少，不易扎入胚胎
注射压力	需要与针尖大小相匹配
安全问题	严禁将注射针尖对着人员
胚胎养殖	注射后的胚胎需要细心照顾，控制温度、水质和养殖密度

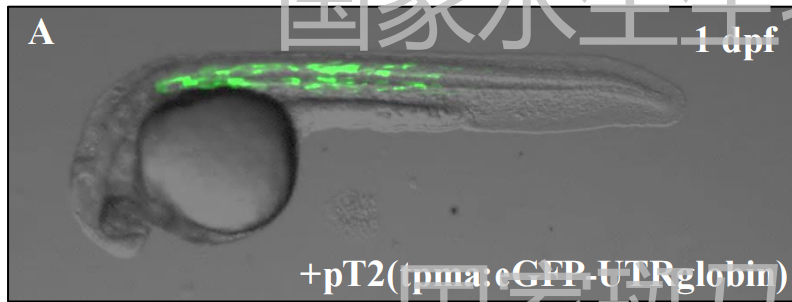
- 斑马鱼胚胎显微注射技术是在显微镜下，利用显微注射系统，将实验材料直接注射到斑马鱼胚胎中的一种方法。
- 显微注射术需有相当精密的显微操作设备，以及熟练的操作技术。
- 胚胎显微注射是目前斑马鱼研究常用方法之一：通过注射不同类型的实验样品，可以实现基因的短时间过表达、表达敲降、以及制备基因突变、转基因或基因敲入斑马鱼品系等实验目标。

国家斑马鱼资源中心 (CZRC)

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

# 本次培训实验课显微注射样品

## 1. DNA样品:



## 2. RNA样品:



国家水生生物讲习所 (NABRC)

**欢迎交流!**

国家斑马鱼资源中心 (CZRC)



中国斑马鱼信息中心