



基于 CRISPR/Cas9 系统构建青鳉突变体

潘启华^{1,2}, 陆可², 罗君志², 蒋月雯², 夏必琳²,
陈磊¹, 王梦洋¹, 戴荣贵¹, 陈天圣^{1,2*}

(1. 集美大学水产学院, 农业农村部东海海水健康养殖重点实验室,
鳗鲡现代产业技术教育部工程研究中心, 福建 厦门 361021;
2. 华中农业大学水产学院, 湖北 武汉 430070)

摘要: 青鳉是研究基因功能、器官发生和发育机制的模式生物之一, 基因编辑技术已在青鳉中得到广泛应用, 但利用 CRISPR/Cas9 技术构建青鳉突变体的详细过程还未见报道。为了完整详细地阐明青鳉突变体的构建过程, 实验以青鳉 *Olpax6.1* 基因的敲除为例, 首先利用 ChopChop 网站设计获得 *Olpax6.1* 基因 gRNA 的靶点; 其次通过 PCR 扩增和质粒酶切分别获得 gRNA 和 Cas9 mRNA 体外转录的模板, 并通过体外转录合成 gRNA 和 Cas9 mRNA; 再将 Cas9 mRNA 和 gRNA 混合进行青鳉胚胎显微注射获得突变 F₀; 最后利用 PCR、T7 Endonuclease I 酶切和 Sanger 测序筛选 F₀ 与野生型杂交的子代获得相同突变类型的 F₁, 进而将相同突变的 F₁ 进行杂交并筛选其子代, 获得青鳉 *Olpax6.1* 敲除的纯合突变体, 纯合突变体表现出眼部发育畸形的经典表型。本研究为青鳉突变体的构建提供详细完整的实验方案, 同时也为其他鱼类突变体的构建提供技术参考。

关键词: 青鳉; Cas9; 突变体; 基因编辑技术

中图分类号: Q 789; S 917.4

文献标志码: A

基因编辑技术是研究基因功能的重要手段之一, 其利用嵌合的核酸酶诱导靶向 DNA 双链断裂来刺激细胞启动 DNA 修复机制, 这一机制包括容易出错的非同源末端连接和同源定向修复, 从而实现有效且精确的遗传修饰^[1]。作为第三代基因编辑系统, CRISPR/Cas9 是由具有核酸内切酶活性的 Cas9 蛋白和特异的单链导向 RNA (single guide RNA, sgRNA) 组成的复合体^[2-3]。由于其易于设计、使用简单以及高效的突变等优点, 已经迅速在包括斑马鱼 (*Danio rerio*) 和青鳉 (*Oryzias latipes*) 在内的多种生物体中广泛运用^[4-9], 并且成为目前分子育种的重要手段之一。

青鳉隶属于鲱形目 (Cyprinodontiformes) 青鳉科 (Oryzlatidae) 青鳉属, 具有饲养简单、耐受力强、性成熟时间短、繁殖能力强、基因组和转录组信息较为完善等优点^[10-12]。此外, 细胞移植技术、显微注射技术、多种分子生物学技术在青鳉中的应用及其多种干细胞的建立, 使其成为研究基因功能、器官发生和发育机制的良好模型^[13-17]。

尽管目前已经有很多研究报道了利用 CRISPR/Cas9 系统在青鳉中成功构建了突变体^[18-20], 如 Fang 等^[4] 运用 CRISPR/Cas9 系统成功敲除青鳉 *tyr* 基因, 导致其眼部黑色素的缺失, 快速获得了白化的突变品系。Sawamura 等^[21] 采取双 sgRNA

收稿日期: 2021-09-06 修回日期: 2021-11-25

资助项目: 国家自然科学基金 (31771648, 31672653); 集美大学科学研究基金 (ZQ2020003); 国家重点基础研究项目 (2013CB967700)

第一作者: 潘启华 (照片), 从事鱼类分子育种研究, E-mail: Pan.Qihua@jmu.edu.cn

通信作者: 陈天圣, 从事鱼类分子育种研究, E-mail: tiansheng.chen@jmu.edu.cn



的方法成功获得了青鳞 *dnd* 突变的 F_0 , 以及非编码 RNA 突变体的构建^[22]。但是这些文献中并没有构建青鳞突变体的完整详细方案和步骤, 因此本研究结合已发表的文献以及本实验室敲除青鳞 *Olpax6.1* 的经验, 总结了从 gRNA 的设计到获得纯合突变体的整个实验技术流程, 为青鳞突变体的构建提供技术指导, 同时为其他鱼类突变体的构建提供技术参考, 以期对养殖品种的分子育种有所帮助。

1 材料与方法

1.1 青鳞的饲养及胚胎

青鳞 HdrR 品系饲养在光照 14 h、黑暗 10 h 的循环水系统中, 每日投喂丰年虫 3 次。收集胚胎时, 先将性成熟雌雄鱼提前 1 天用透明隔板分开, 次日取出隔板使雌雄鱼自然交配产卵。待雌鱼产卵后, 小心地将胚胎从雌鱼的生殖孔轻轻取下并用镊子将卵丝和胚胎分离, 随后在 28 °C 的恒温箱中用胚胎培养液 (1.00 g NaCl、0.03 g KCl、0.04 g CaCl₂·2H₂O、0.16 g MgSO₄·7H₂O, 加入 10 mL 0.01% 亚甲基蓝溶液充分混匀后定容到 1 L) 进行培养^[23]。实验过程中操作人员严格遵守实验动物伦理规范, 并按照集美大学伦理委员会制定的规章制度执行。

1.2 gRNA 的设计

本研究以青鳞 *Olpax6.1* 基因 (Gene ID: 100049356) 的敲除为例, 首先在 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 上找到所需要的基因组序列, 用 Snapgene 软件 (<https://www.snapgene.com/>) 标记好外显子和内含子的位置, 确定需要敲除的位置, 通常 gRNA 的位置应设计在靠近翻译起始位点 ATG 的下游。打开 ChopChop (<http://chopchop.cbu.uib.no/>) 网站, 将 gene ID 放入 Target 框中, 也可以点击“Paste target”将 Target 框中的 gene ID 模式切换到基因序列模式, 将基因的序列复制到 Target 框中; 点击 In 框中选择序列相应的物种; 在 Using 框中选择敲除的系统, 本研究主要基于 CRISPR/Cas9 系统, 因此在 Using 框中选择 CRISPR/Cas9; 全部填写完成后点击“Find Target Sites!”, 网页设计完成后会显示出结果。一般该设计网站会根据 Efficiency 和 Off-targets 给出相应的 Ranking, 此时应选择在基因翻译起始密码子下游 Ranking 排名较前、Efficiency 高以及 Off-targets 少的靶位点作为候选靶点, 一般至少选择 3 个靶点以提高编辑的有效性。gRNA 设计完成后, 再设计特异扩增该靶点的 PCR 检测引物 (图 1)。

将组成 gRNA 的 scaffold 序列 (5' GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACT-TGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCT 3') 进行人工合成 (武汉擎科生物科技有限公司) 并连入 pMD19-T 载体 (TaKaRa, D102A) 中形成 pMD19-gRNA scaffold 质粒备用。用 gRNA 的上游引物 (T7 启动子+靶位点 5'-3' 去掉 NGG 的 N20 个碱基+scaffold 5'端部分序列, 如靶位点为 5' tgcctggtggaatccggcag-CGG 3', 则 gRNA 上游引物为 gRNA-F: 5' TGTAATACGACTCACTATAGGtgctggtggaatccggcagGTTTTAGAGCTAGAAAT 3') (下划线为 T7 启动子序列) 和下游通用引物 (gRNA-R: 5' AAAAGCACCGACTCGGTGCC 3') 以 pMD19-gRNA scaffold 质粒为模板进行扩增。反应体系: 25 μL 2× Phanta Max Master Mix (Vazyme, P515-01), 2.5 μL gRNA-F + gRNA-R (10 μmol/L), 2.5 μL pMD19-gRNA scaffold 质粒 (1 ng/μL), 补充双蒸水至 50 μL,

1.3 体外合成 gRNA 和 Cas9 mRNA

gRNA 模板的扩增 将组成 gRNA 的 scaffold 序列 (5' GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACT-TGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCT 3') 进行人工合成 (武汉擎科生物科技有限公司) 并连入 pMD19-T 载体 (TaKaRa, D102A) 中形成 pMD19-gRNA scaffold 质粒备用。用 gRNA 的上游引物 (T7 启动子+靶位点 5'-3' 去掉 NGG 的 N20 个碱基+scaffold 5'端部分序列, 如靶位点为 5' tgcctggtggaatccggcag-CGG 3', 则 gRNA 上游引物为 gRNA-F: 5' TGTAATACGACTCACTATAGGtgctggtggaatccggcagGTTTTAGAGCTAGAAAT 3') (下划线为 T7 启动子序列) 和下游通用引物 (gRNA-R: 5' AAAAGCACCGACTCGGTGCC 3') 以 pMD19-gRNA scaffold 质粒为模板进行扩增。反应体系: 25 μL 2× Phanta Max Master Mix (Vazyme, P515-01), 2.5 μL gRNA-F + gRNA-R (10 μmol/L), 2.5 μL pMD19-gRNA scaffold 质粒 (1 ng/μL), 补充双蒸水至 50 μL,

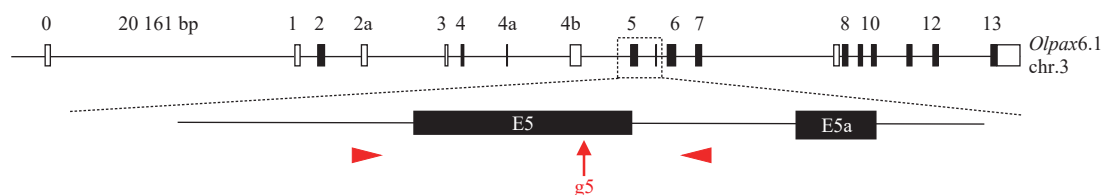


图 1 *Olpax6.1* gRNA 及检测引物的设计

黑色方框代表编码的外显子, 白色方框代表非编码的外显子, 红色箭头代表 gRNA 的位置, 红色三角形代表检测引物。

Fig. 1 Design of *Olpax6.1* gRNA and detection primers

Black boxes represent coding exons, white boxes represent non-coding exons, the red arrow represents the position of gRNA, the red triangles represent detection primer.

总共扩增 8 管。扩增条件：95 °C 3 min；95 °C 30 s，58 °C 30 s，72 °C 10 s，28 个循环；72 °C 5 min，4 °C ∞。PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳后用 E.Z.N.A. Gel Extraction Kit (OMEGA, D2500-02) 回收，最后加入 15 μL RNase-free 水溶解，用 NanoDrop 2000 (ThermoFisher) 测定浓度待用。

Cas9 mRNA 模板的制备 先将 CMV-T7 的序列结构插入 pT3TS-nCas9n 质粒^[24]中 Cas9 的上游构建 pCMV-zCas9 质粒^[4]，利用 *Xba* I (NEB, #R0145V) 将 10 μg 的 pCMV-zCas9 质粒进行线性化，反应体系为 pCMV-zCas9 10 μg，Cutsmart 缓冲液 10 μL，*Xba* I 4 μL，补充双蒸水至 100 μL。37 °C 孵育 5 h，酶切产物琼脂糖凝胶电泳后用 E.Z.N.A. Gel Extraction Kit (OMEGA, D2500-02) 回收，再加入 15 μL RNase-free 水溶解，用 NanoDrop 2000 (ThermoFisher) 测定浓度待用。

体外转录与纯化 RNA 用 TranscripAid T7 High Yield Kit (ThermoFisher, #K0441) 对 gRNA 模板进行体外转录获得 gRNA。反应体系：gRNA 模板 1 μg，ATP/CTP/GTP/UTP 各 1 μL，5×TranscriptAid Reaction Buffer 2 μL，TranscriptAid Enzyme Mix 1 μL，补充 RNase-free 水至 10 μL，混合均匀。

用 mMESSAGE mMACHINE T7 Transcription Kit (Invitrogen, AM1344) 对 Cas9 mRNA 模板进行转录获得 Cas9 mRNA。反应体系：2×NTP/CAP 10

μL，10×Reaction buffer 2 μL，Cas9 mRNA 模板 1 μg，T7 Enzyme Mix 2 μL，补充 RNase-free 水到 20 μL，混合均匀。

上述两种体系配制完成后，放入 37 °C 水浴锅中孵育 4 h。孵育完成后，取 1 μL 转录后产物进行琼脂糖凝胶电泳检测转录效果。随后加入 1 μL DNase I 至转录体系中，混合均匀，37 °C 孵育 15 min。之后，向反应体系中加入 30 μL 7.5 mol/L 的 LiCl 溶液和 30 μL RNase-free 水，混合均匀，-20 °C 沉淀过夜。混合液于 4 °C，12 000 r/min 离心 20 min，弃上清液。然后加入 1 mL 75% 乙醇 (DEPC 水配制) 悬浮沉淀，于 4 °C，12 000 r/min 离心 10 min 后弃上清液；重复 1 次。吸干水分并自然干燥，加入 20 μL RNase-free 水溶解，取 1 μL 转录后产物进行琼脂糖凝胶电泳检测后进行分装。gRNA 分装浓度为 250 ng/μL；Cas9 mRNA 分装时每管的量为 1 500~2 500 ng，体积小于 4 μL，-80 °C 长期保存。

1.4 显微注射

显微注射之前需提前制作注射针和注射槽。利用拉针仪 (Narishige, PC-100, 图 2) 对外径 1.00 mm、内径 0.58 mm 的玻璃细管 (Sutter, BF100-58-10) 进行拉制获得注射针。拉针仪的程序为 Lv1: 86.0, Lv2: 52.6, 重力模块调至 5。注射针拉制完成后，在体视显微镜 (江南, JSZ8) 4×物镜下，

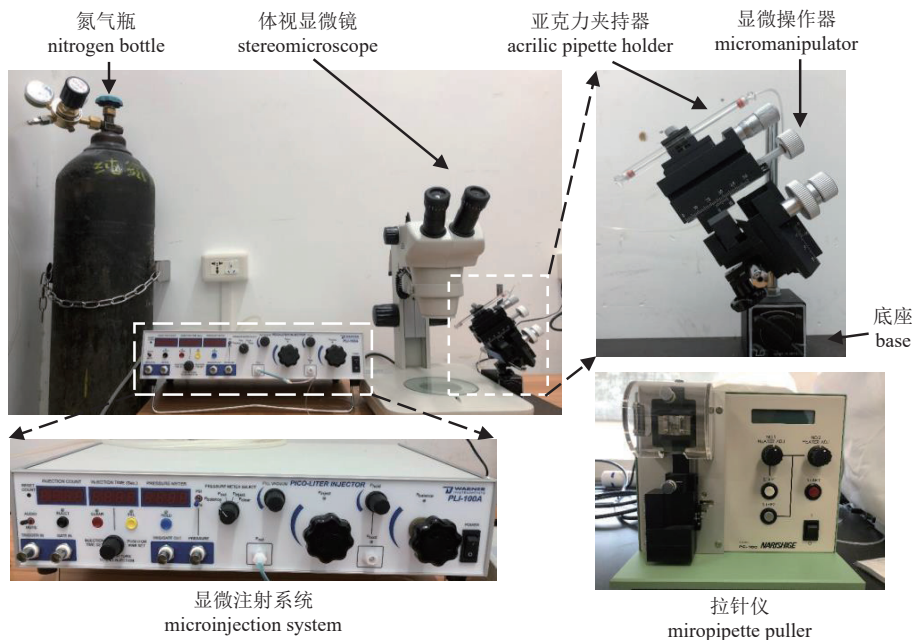


图 2 显微注射操作系统

Fig. 2 Microinjection operating system

用镊子轻轻触碰针尖进行断针处理 (图 3-a)。显微注射凹槽的制作: 用无菌水配制 1.5% 的琼脂糖, 微波炉融化后冷却至 50~60 °C, 倒入 90 mm 培养皿中并放置显微注射凹槽模具 (图 3-b, c), 待琼脂糖凝固后, 用镊子拔出凹槽模具即可 (图 3-d)。凹槽模具为有机玻璃自制。利用微量上样枪头 (Eppendorf, E270452J) 将终浓度为 300~500 ng/ μ L 的 Cas9 mRNA、终浓度为 30~50 ng/ μ L 的 gRNA 以及终浓度为 0.1% 的酚红注射混合液加入针管中, 随后将针管插入固定在显微操作器的亚克力夹持器 (图 2) 上。将前一晚隔离雌雄鱼的隔板抽出, 使雌雄鱼进行交配和自然产卵, 15~30 min 后将悬挂在雌鱼泄殖孔的胚胎轻轻取下, 放入盛有胚胎培养液的培养皿中。在体视显微镜下用镊子将黏

附在胚胎上的丝状物剥离, 用巴氏吸管将分离的胚胎转移到注射凹槽中, 在体视显微镜 2.5 \times 视野下将细胞团翻转朝上, 调节显微注射系统 (Warner, PL-100A, 图 2) 压力, 将注射时间调节为 0.2~0.3 s, 注射压调节为 70 kPa, 平衡压调节为 20 kPa, 用手指调节显微操作器 (图 2) 以控制针的方向, 用脚踩在脚踏板上控制注射开关, 将混合液注射到青鳞胚胎的 1 细胞中。注射完成后用胚胎培养液培养胚胎, 并置于 28 °C 恒温光照培养箱中培养。

1.5 突变位点的体内检测

将注射后的胚胎培养至第 4 天, 随机选取 8 个胚胎, 用碱裂解法分别提取单个胚胎的基因组 DNA, 实验方法: 取单个胚胎, 加入 50 μ L 50 mmol/L 的 NaOH 溶液, 95 °C 孵育处理 30 min,

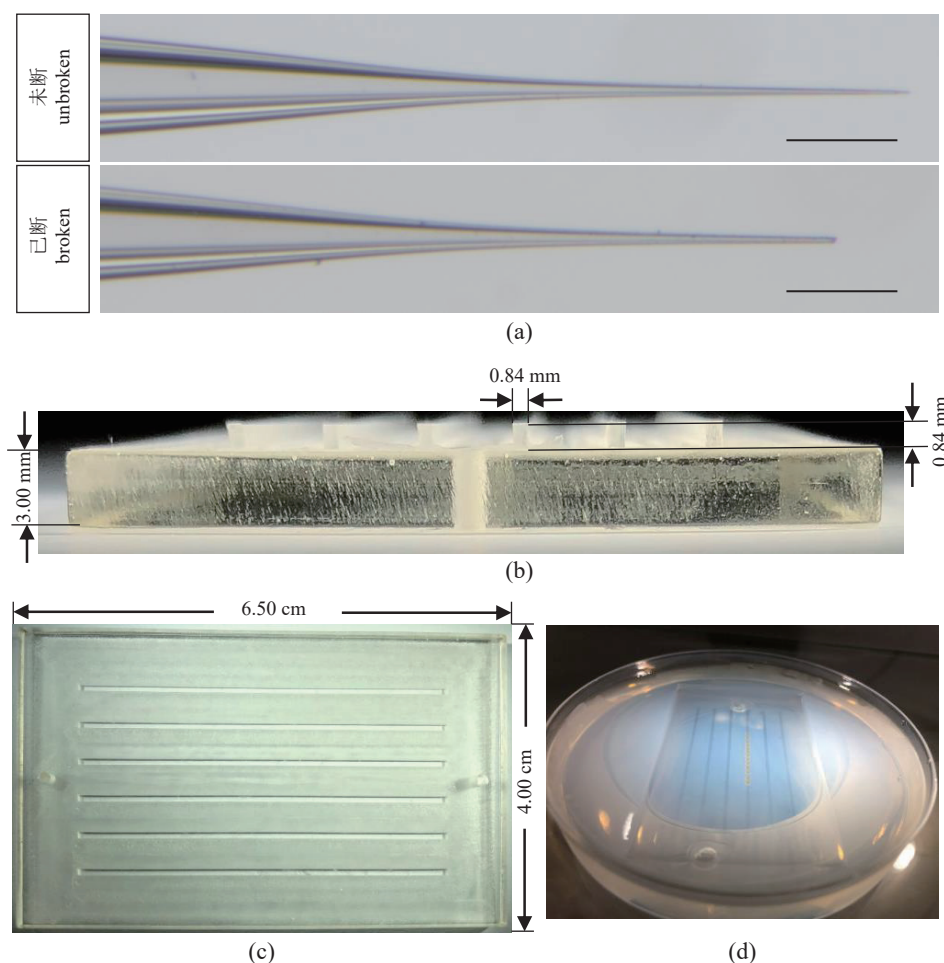


图 3 青鳞显微注射的针与模具的制备

(a) 注射针断与未断的对比, 比例尺: 100 μ m; (b) 显微注射凹槽模具的侧视图; (c) 显微注射凹槽模具的俯视图; (d) 琼脂糖凝胶制备的显微注射凹槽。

Fig. 3 Preparation of needle and mold for microinjection of *O. latipes*

(a) comparison of broken and unbroken injection needles, scale bar: 100 μ m; (b) side view of microinjection groove mold; (c) top view of microinjection groove mold; (d) preparation of microinjection groove using agarose gel.

取出冷却后, 加入 10 μL 0.5 mol/L 的 Tris-HCl 溶液混匀。以基因组 DNA 为模板, 用检测引物对 gRNA 靶点进行 PCR 扩增。引物为 DF: 5' TTT GCTCATTGATACTGTTGTGGGT 3', DR: 5' ATG TCATGCCTTTGTTGCC 3'。扩增体系为 2 μL 粗提基因组 DNA, 5 μL 2 \times NG PCR MasterMix (HLingene, NG001S), 0.5 μL DF+DR (10 $\mu\text{mol/L}$), 2.5 μL 双蒸水。扩增条件为 95 $^{\circ}\text{C}$ 3 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ ∞ 。扩增后利用 T7 Endonuclease I (T7E1, Vazyme, EN3030-01) 对 PCR 产物进行酶切检测突变情况, 实验过程: 取 5 μL PCR 产物在 95 $^{\circ}\text{C}$ PCR 仪变性 5 min 后快速取出, 在室温条件下放置 10 min, 使其从 95 $^{\circ}\text{C}$ 缓慢降至室温。向变性后的 PCR 产物加入 4 μL 双蒸水, 1 μL 10 \times T7 Endonuclease I Reaction Buffer 以及 0.1 μL T7 Endonuclease I, 混匀后 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min。孵育完成后, 酶切产物进行琼脂糖凝胶电泳检测, 若其显示出多条带, 则 PCR 片段有突变, 反之则没有突变。进一步将阳性的 PCR 产物进行测序(生工生物工程上海股份有限公司), 在靶位点附近出现双峰为突变。检测完成后将有突变的同批次胚胎培养至 F₀ 成鱼。

1.6 纯合子突变体的筛选

将 F₀ 成鱼与野生型成鱼进行交配, 随机挑选杂交后的 8 个胚胎进行突变检测, 检测步骤同上所述。若有突变则大量收集该组胚胎养至成鱼, 即为 F₁。剪 F₁ 尾鳍, 经碱裂解法粗提基因组 DNA, 利用 PCR 和 T7E1 酶切对靶位点进行突变的鉴定, 若有突变, 则将其 PCR 产物连接 pMD18-T 载体 (TaKaRa, D102A) 进行单克隆测序。根据测序结果, 将突变类型相同的 F₁ 成鱼进行杂交并大量收集该组胚胎养至成鱼, 即为 F₂。纯合子突变体的筛选过程如图 4 所示, 剪 F₂ 成鱼尾鳍碱裂解法粗提基因组 DNA, 利用 PCR 和 T7E1 酶切对靶位点进行突变的鉴定, 此时 PCR 酶切产物中出现多条带的个体为杂合突变体, 若为单一条带则是未突变个体和纯合突变体。为了进一步区分未发生突变个体和纯合突变体, 按照 1:1 的比例向单一条带的 PCR 产物中加入野生型的 PCR 产物, 再用 T7E1 酶切鉴定, 琼脂糖凝胶电泳产生多条带的酶切产物则为纯合突变体, 其余的为未突变个体。最后将 T7E1 酶切初筛为纯合突变体的 PCR 产物进行测序以确定缺失的序列, 从而确定纯合突变品系。

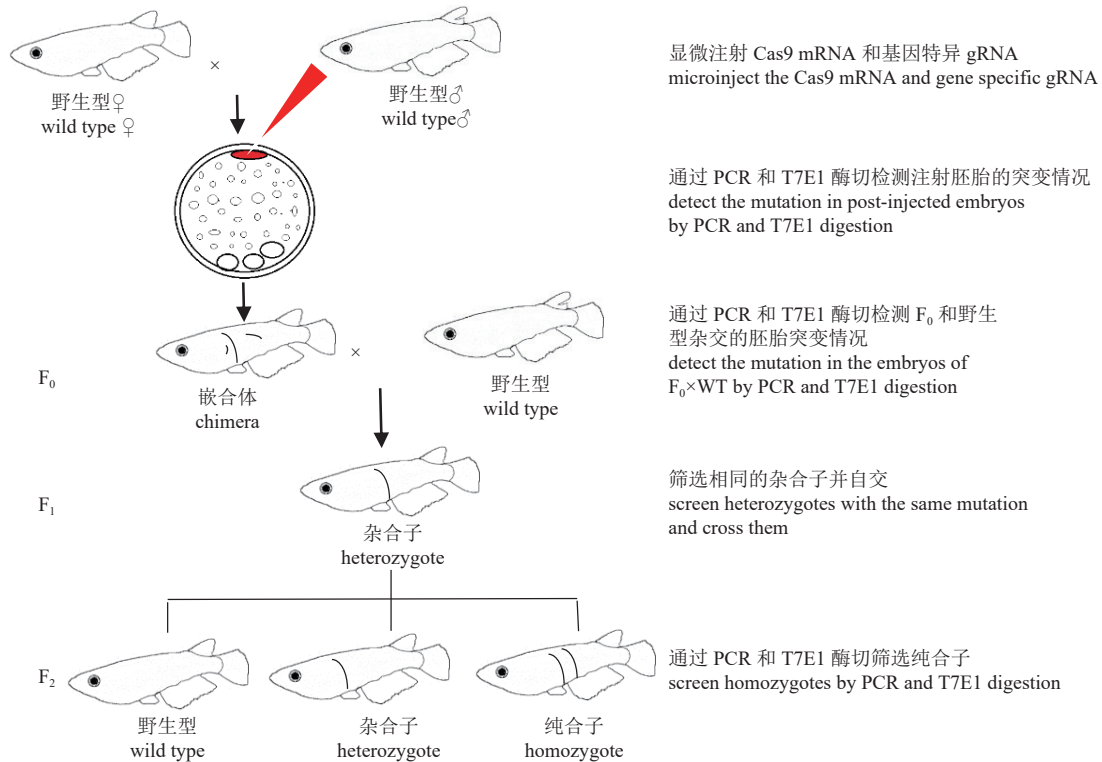


图 4 青鳞纯合子突变体的筛选过程

Fig. 4 Screening process of *O. latipes* homozygotes

2 结果

2.1 gRNA 与 Cas9 mRNA 体外合成的结果

通过 PCR 从 pMD19-gRNA scaffold 质粒中扩增获得了 gRNA 的模板 (图 5-a), 模板纯化后进行体外转录获得 gRNA 模板与 gRNA 的混合物 (图 5-b), 利用 DNase I 对混合物处理并纯化后, 获得了条带单一且无明显降解的 gRNA (图 5-c)。将 pCMV-zCas9 质粒酶切后, 从电泳图可以看出质粒被完全切开, 大小为 8 029 bp (图 5-d), 进一步将其作为模板进行体外转录。对比质粒酶切后的电泳图 (图 5-d), 转录后的电泳图显示出 2 条带 (图 5-e), 其中较大的条带为质粒模板, 较小的条带为 Cas9 mRNA。同样的, 利用 DNase I 对其进行处理并纯化获得了 Cas9 mRNA, 电泳后的目的条带与预期的条带大小基本一致 (图 5-f)。

2.2 酚红标记胚胎显微注射的位置

青鳞卵子受精后, 胚胎中的油球开始由动物极向植物极移动, 胚盘向下凹陷被油球环绕 (图 6-a), 此时将胚盘朝右上方倾斜并将针扎入胚胎的胚盘中进行注射 (图 6-b)。注射完后, 酚红在向下

凹陷的胚盘中而没有散开, 说明注射成功 (图 6-c)。

2.3 突变位点的检测

收集注射 4 d 后的胚胎提取基因组 DNA, 并对 gRNA 靶位点片段进行扩增, 将扩增得到的 PCR 产物利用 T7E1 进行酶切, 结果显示 PCR 产物能够被 T7E1 切割形成两种大小不同的片段 (图 7)。进一步的 PCR 产物测序结果显示, 在靶位点附近出现双峰 (图 7), 这说明了 gRNA 和 Cas9 mRNA 的注射导致了靶位点基因序列的突变。

2.4 F₂ 纯合子的获得

按照前述方法筛选 F₂ 成鱼, 在 21 尾中有 12 尾的 PCR 产物能够被 T7E1 切割, 说明这些是杂合子 (1、4、5、6、8、9、10、11、14、16、18 和 21)。将其他未被切开的 PCR 产物加入野生型的 PCR 产物后进行 T7E1 酶切, 结果显示有 3 尾鱼的 PCR 产物能够被 T7E1 切割, 表明这些个体为纯合子 (7、17 和 20), 其余未被切开的为野生个体 (2、3、12、13、15 和 19) (图 8-a)。进一步的 PCR 产物测序证实了 7、17 和 20 为纯合子, 从而得到了纯合突变品系。该纯合子的表型为典型的 *pax6* 突变表型, 其眼部发育不完整 (图 8-b)。

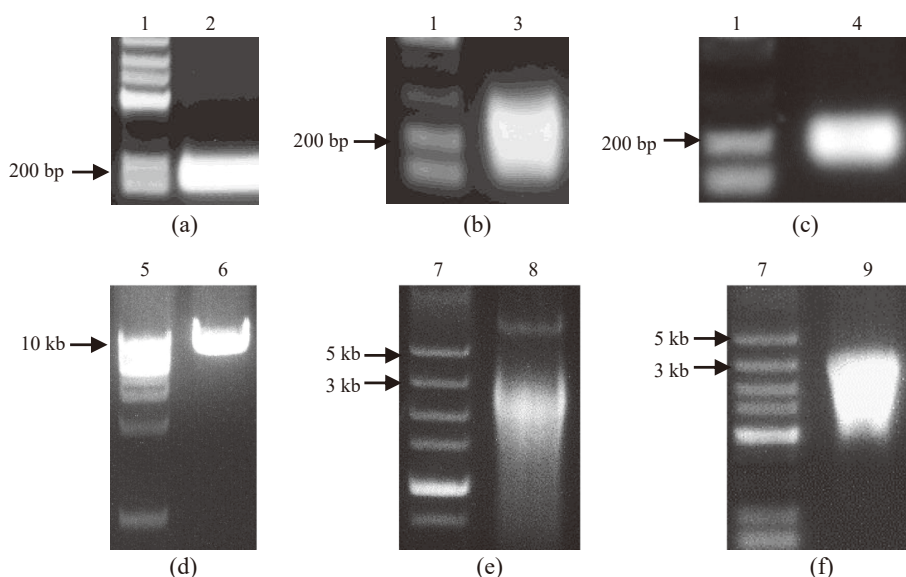


图 5 RNA 的模板及体外转录

(a) PCR 扩增的 gRNA; (b) 体外转录后的 gRNA; (c) 纯化后的 gRNA; (d) 线性化的 pCMV-zCas9; (e) Cas9 体外转录后的 mRNA; (f) Cas9 mRNA 纯化后的检测。1. DL100 marker, 2. 扩增的 gRNA, 3. 转录后的 gRNA, 4. 纯化后的 gRNA, 5. 1 kb marker, 6. 线性化的 pCMV-zCas9, 7. DL500 marker, 8. Cas9 体外转录后的 mRNA, 9. 纯化的 Cas9 mRNA。

Fig. 5 Template and *in vitro* transcription of gRNA

(a) amplified gRNA template; (b) *in vitro* transcribed gRNA; (c) purified gRNA; (d) linearized pCMV-zCas9 mRNA/DNA mixture; (e) *in vitro* transcribed Cas9 mRNA; (f) purified Cas9 mRNA. 1. DL100 marker, 2. amplified gRNA, 3. transcribed gRNA, 4. purified gRNA, 5. 1 kb marker, 6. linearized pCMV-zCas9, 7. DL500 marker, 8. transcribed Cas9 mRNA, 9. purified Cas9 mRNA.

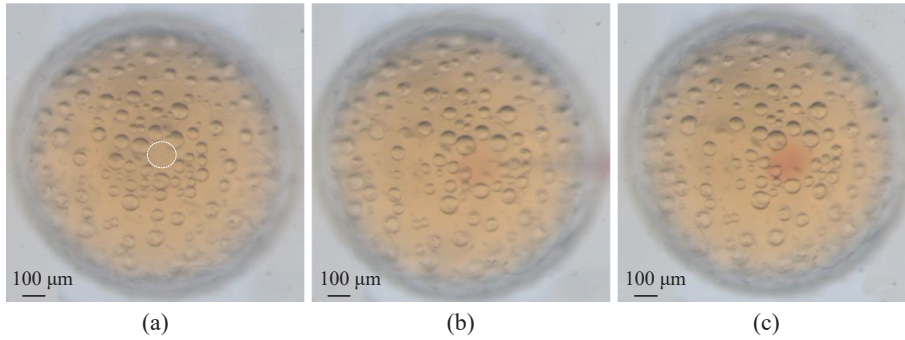


图 6 青鲮胚胎的显微注射

(a) 注射前; (b) 注射中; (c) 注射后。

Fig. 6 Microinjection of medaka embryo

(a) before injection; (b) during injection; (c) after injection.

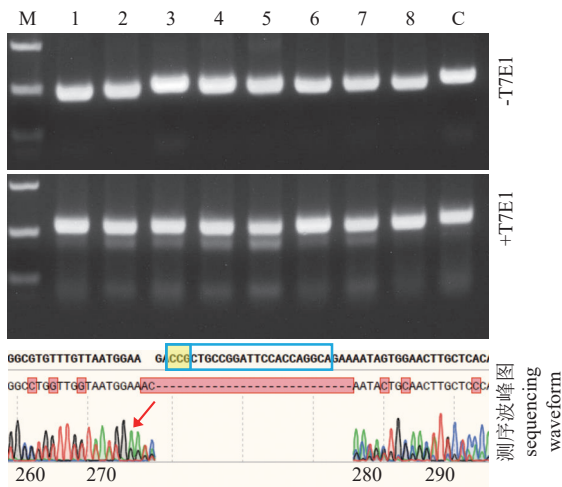


图 7 突变位点的检测

M. marker; 1~8.注射的胚胎; C.野生型胚胎。在测序波形图中, 蓝色方框标记 gRNA 的序列, 黄色高亮标记 PAM 序列, 红色方框表示突变的序列, 红色箭头指向重叠峰的位置。

Fig. 7 Detection of mutation sites

M. marker; 1-8. injected embryos; C. wild-type embryos. In the sequencing waveform, the gRNA sequence is marked by the blue box, the PAM sequence is highlighted by yellow color, red boxes represents mutated sequences, and the red arrow points to overlapping peaks.

3 讨论

生物特异基因突变体的构建是研究基因功能的重要手段之一, 本研究详细描述了青鲮突变体的构建过程。本研究中, gRNA 的设计主要在 ChopChop 网站中进行, 此外还有 CCTop (<https://cctop.cos.uni-heidelberg.de:8043/>)、CRISPOR (<http://crispor.tefor.net/>) 以及 Cas-OFFinder (<http://www.rgenome.net/cas-offfinder/>) 等一系列 gRNA 设计网站可供选择^[25]。CCTop 网站根据主页中指定的参数扫描输入序列以识别 gRNA 目标位点, 根据候选的

目标位点确定潜在的脱靶位点, 并根据潜在脱靶位点匹配到的最接近的外显子给出相应的分数从而进行排序^[26]。CRISPOR 网站也可以计算脱靶分数、所有效率分数、CG 含量警告, 其改进的脱靶和靶位点预测算法可减少筛选脱靶和有效位点序列所花费的时间^[27]。Cas-OFFinder 可自行设定所需的 PAM 序列或错配碱基的数量, 对已测序基因组中的潜在脱靶位点进行快速搜索^[28]。研究者可根据研究目的选择合适的方法进行 gRNA 的设计。

设计完成 gRNA, 实验以含有 gRNA scaffold 的质粒为模板, 通过合成含 T7 启动子的上游引物和通用的下游引物对该质粒进行扩增, 获得 gRNA 体外转录的模板, 利用 T7 体外转录试剂盒转录获得了 gRNA。在其他研究中报道了可通过合成含 T7 启动子、靶位点以及 scaffold 的上游引物和下游引物直接退火形成 gRNA 体外转录的模板, 再利用体外转录试剂盒转录获得 gRNA^[29]。

在显微注射时, 本研究采用了 300~500 ng/μL 的 Cas9 mRNA、30~50 ng/μL 的 gRNA 注射浓度。在其他研究中, 如 Kato-Unoki 等^[30] 在青鲮中的注射浓度为 100 ng/μL 的 Cas9 mRNA 和 25 ng/μL 的 gRNA。Gay 等^[18] 在青鲮中的注射浓度为 100 ng/μL 的 Cas9 mRNA 和 25 ng/μL 的 sgRNA。Meneghetti 等^[31] 在斑马鱼中的注射浓度为 400 ng/μL 的 Cas9 mRNA 和 50 ng/μL 的 gRNA, 同样能引起生物体基因的突变。而对于注射 Cas9 mRNA 也可用 Cas9 蛋白代替, 在斑马鱼中注射 Cas9 蛋白和 gRNA 比注射 Cas9 mRNA 和 gRNA 所引起的突变率更高^[32-33], 这种差异可能是 gRNA/Cas9 蛋白复合物可立即诱导胚胎突变所导致。当注射 gRNA/Cas9 mRNA 时, Cas9 mRNA 必须先翻译成

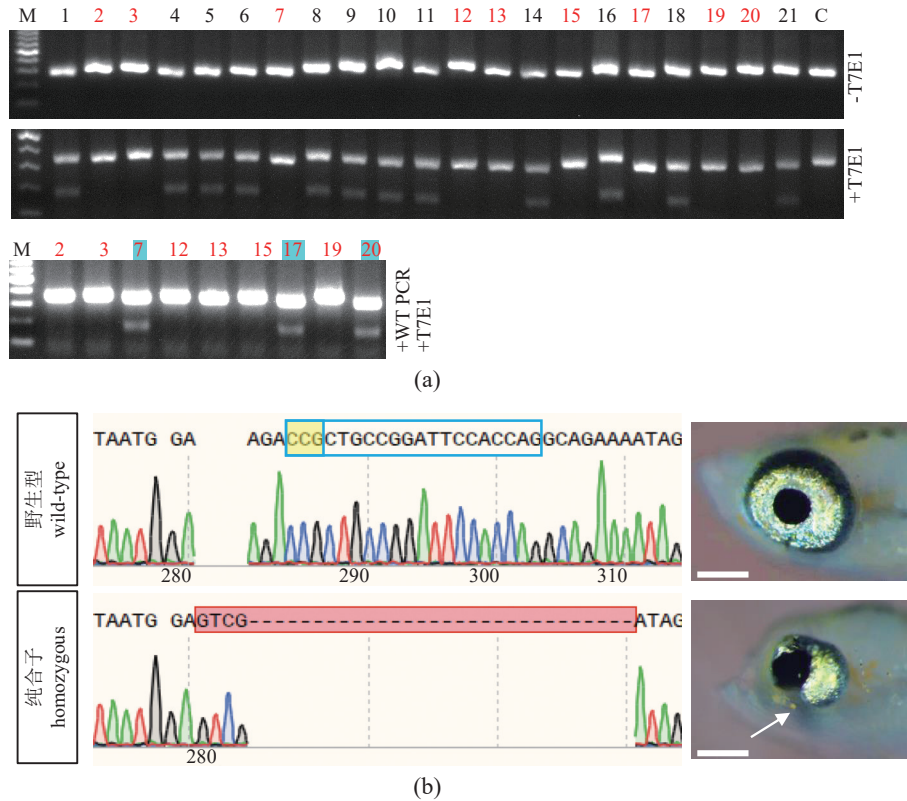


图 8 纯合 F₂ 的筛选及表型分析

(a) 纯合 F₂ 的筛选过程。M. marker; 1~21: 不同个体; C 代表野生型。黑色数字代表杂合子, 红色数字代表非杂合子, 蓝色高亮的红色数字代表纯合子; (b) 野生型和纯合子测序波形图以及表型对比, 蓝色方框标记 gRNA 的序列, 黄色高亮标记 PAM 序列, 红色方框表示突变的序列, 白色箭头指向眼部畸形发育的位置, 比例尺为 200 μm。

Fig. 8 Screening and phenotypic analysis of F₂ homozygous

(a) screening process of homozygous F₂. M. marker; 1-21. different individuals; C. wild type. Black numbers represent heterozygotes, red numbers represent non-heterozygotes, red numbers highlighted in blue represent homozygotes; (b) comparing the sequencing waveform and phenotype between wild-type and homozygotes, where the gRNA sequence is marked by blue box, the PAM sequence is highlighted by yellow color, the red box represents the mutated sequence, and the white arrow points to the location of the eye malformation development. Scale bar: 200 μm.

蛋白质才能与 gRNA 结合, 从而诱导 DNA 双链断裂。Cas9 蛋白的诱导表达以及纯化过程相较于 Cas9 mRNA 的体外合成更为复杂, 因此建议合成 Cas9 mRNA 或购买商品化的 Cas9 蛋白。本研究所用注射针的针尖长度是综合不同研究后所确定, 其与 Porazinski 等^[17]所制的针尖长度较为一致, 而在方健^[34]的研究中, 其注射针尖更短, 这使得断针时需要十分小心, 否则针口过大, 更容易对胚胎造成机械损伤, 从而导致胚胎畸形率的上升, 当然针尖越短其进入卵壳硬的胚胎中更容易。关于注射部位, 由于青鳉卵属于单一卵黄块类型的卵, 其原生质只能从卵黄表面移向动物极形成胚盘, 而核酸分子无法通过卵黄质边界, 因此只能将 Cas9 mRNA 和 gRNA 的混合液注射到胚盘中。类似的鱼类还有条斑星鲽 (*Verasper moseri*) 等^[35]。而如斑马鱼、金鱼 (*Carassius auratus*) 等鱼类的卵

属于含多个卵黄颗粒的卵, 分子能够随着胚胎的发育与原生质一起转移到胚盘中, 因此可将 Cas9 mRNA 和 gRNA 的混合液注射到胚盘或者卵黄区域^[35]。尽管青鳉的 1 细胞期持续时间为 30~45 min, 但随着时间的延长, 其卵壳也会变得越来越硬而不利于注射, 因此推荐在受精后 15~30 min 进行注射, 此时卵壳较软, 胚盘较为明显, 相关的操作视频可参考 JOVE 网站^[17]。

为了验证靶位点的有效性, 本研究主要通过显微注射活体后对靶位点测序验证。然而在一些显微注射存在难度的鱼类中, 需要先在体外验证 gRNA 的有效性, 再进行注射, 以提高突变效率^[5]。检测到胚胎的突变后, 将这些胚胎养至成鱼形成 F₀。由于 F₀ 中同一尾鱼存在不同组织的突变类型可能不一样, 甚至同一组织中仍可能出现多种突变类型, 为了获得纯化的可遗传的突变类型, 需

要将突变体同野生鱼进行杂交获得 F_1 。若从 F_1 中能够检测到突变, 则认为该 F_0 的突变是可遗传的。由于从同一亲本产生的 F_1 中, 仍可以筛选到 2 种以上的突变类型, 因此在 F_1 筛选过程中, 需要经过单克隆测序确定发生无义突变的相同类型, 然后将同种无义突变类型的 F_1 成鱼进行自交从而获得 F_2 。突变体筛选可通过 T7E1 酶切进行, 也可通过 PCR 的方法进行验证。如 Iyer 等^[5] 针对突变位点序列的扩增可一步鉴定出纯合子、杂合子以及野生型个体, 此方法对突变的序列、引物的设计及 PCR 退火温度有一定的要求。

本研究以青鳉 *Olpax6.1* 基因的敲除为例, 阐述了利用 CRISPR/Cas9 系统在青鳉中构建突变体的详细过程, 涵盖了基因特异 gRNA 的设计、gRNA 及 Cas9 mRNA 的体外合成、显微注射、突变检测以及纯合子的筛选过程, 为青鳉突变体的构建提供了详细的实验操作流程, 同时也为其他鱼类乃至其他类型动物的突变体构建提供技术参考。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] Harrison P T, Hart S. A beginner's guide to gene editing[J]. *Experimental Physiology*, 2018, 103(4): 439-448.
- [2] Mali P, Esvelt K M, Church G M. Cas9 as a versatile tool for engineering biology[J]. *Nature Methods*, 2013, 10(10): 957-963.
- [3] Ran F A, Hsu P D, Wright J, et al. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system[J]. *Nature Protocols*, 2013, 8(11): 2281-2308.
- [4] Fang J, Chen T S, Pan Q H, et al. Generation of albino medaka (*Oryzias latipes*) by CRISPR/Cas9[J]. *Journal of Experimental Zoology-Part B: Molecular and Developmental Evolution*, 2018, 330(4): 242-246.
- [5] Iyer N, Tcheuyap V T, Schneider S, et al. Knockout of von Willebrand factor in zebrafish by CRISPR/Cas9 mutagenesis[J]. *British Journal of Haematology*, 2019, 186(4): e76-e80.
- [6] Jiang W Y, Bikard D, Cox D, et al. RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems[J]. *Nature Biotechnology*, 2013, 31(3): 233-239.
- [7] Platt R J, Chen S D, Zhou Y, et al. CRISPR-Cas9 knockin mice for genome editing and cancer modeling[J]. *Cell*, 2014, 159(2): 440-455.
- [8] Xie K B, Minkenberg B, Yang Y N. Boosting CRISPR/Cas9 multiplex editing capability with the endogenous tRNA-processing system[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2015, 112(11): 3570-3575.
- [9] Xu A T, Qin C, Lang Y, et al. A simple and rapid approach to manipulate pseudorabies virus genome by CRISPR/Cas9 system[J]. *Biotechnology Letters*, 2015, 37(6): 1265-1272.
- [10] Kasahara M, Naruse K, Sasaki S, et al. The medaka draft genome and insights into vertebrate genome evolution[J]. *Nature*, 2007, 447(7145): 714-719.
- [11] Wittbrodt J, Shima A, Scharl M. Medaka-a model organism from the far East[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2002, 3(1): 53-64.
- [12] 于艳艳. 全氟十三酸 (PFTriDA) 对青鳉鱼的慢性毒性效应 [D]. 济南: 山东师范大学, 2011.
- Yu Y Y. The chronic toxic effects of perfluorotridecanoate acid (PFTriDA) on medaka[D]. Jinan: Shandong Normal University, 2011 (in Chinese).
- [13] Hong Y H, Liu T M, Zhao H B, et al. Establishment of a normal medakafish spermatogonial cell line capable of sperm production *in vitro*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, 101(21): 8011-8016.
- [14] Hong Y H, Scharl M. Isolation and differentiation of medaka embryonic stem cells[M]//Turksen K. Embryonic stem cell protocols: Volume 1: isolation and characterization. Totowa: Humana Press, 2006: 3-16,doi: 10.1385/1-59745-037-5.
- [15] Hong Y H, Winkler C, Scharl M. Pluripotency and differentiation of embryonic stem cell lines from the medakafish (*Oryzias latipes*)[J]. *Mechanisms of Development*, 1996, 60(1): 33-44.
- [16] Lin C Y, Chiang C Y, Tsai H J. Zebrafish and medaka: new model organisms for modern biomedical research[J]. *Journal of Biomedical Science*, 2016, 23(1): 19.
- [17] Porazinski S R, Wang H J, Furutani-Seiki M. Microinjection of medaka embryos for use as a model genetic organism[J]. *Journal of Visualized Experiments*, 2010(46): e1937.
- [18] Gay S, Bugeon J, Bouchareb A, et al. MiR-202 controls

- female fecundity by regulating medaka oogenesis[J]. *PLoS Genetics*, 2018, 14(9): e1007593.
- [19] Okamura Y, Morimoto N, Ikeda D, *et al.* Interleukin-17A/F1 deficiency reduces antimicrobial gene expression and contributes to microbiome alterations in intestines of Japanese medaka (*Oryzias latipes*)[J]. *Frontiers in Immunology*, 2020, 11: 425.
- [20] Yeh Y C, Kinoshita M, Ng T H, *et al.* Using CRISPR/Cas9-mediated gene editing to further explore growth and trade-off effects in myostatin-mutated F₄ medaka (*Oryzias latipes*)[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 11435.
- [21] Sawamura R, Osafune N, Murakami T, *et al.* Generation of biallelic F₀ mutants in medaka using the CRISPR/Cas9 system[J]. *Genes to Cells*, 2017, 22(8): 756-763.
- [22] 潘启华. *pax6* 基因和母源因子 *Ollnc768* 在青鳞卵巢及胚胎发育中的功能研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2020.
- Pan Q H. Functional studies of *pax6* and maternal factor *Ollnc768* in ovary and embryo development of *Oryzias latipes*[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2020 (in Chinese).
- [23] Chen T S, Cavari B, Scharl M, *et al.* Identification and expression of conserved and novel RNA variants of Medaka *pax6b* gene[J]. *Journal of Experimental Zoology-Part B: Molecular and Developmental Evolution*, 2017, 328(5): 412-422.
- [24] Jao L E, Wente S R, Chen W B. Efficient multiplex biallelic zebrafish genome editing using a CRISPR nuclease system[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, 110(34): 13904-13909.
- [25] Cui Y B, Xu J M, Cheng M X, *et al.* Review of CRISPR/Cas9 sgRNA design tools[J]. *Interdisciplinary Sciences:Computational Life Sciences*, 2018, 10(2): 455-465.
- [26] Stemmer M, Thumberger T, Del Sol Keyer M, *et al.* CCTop: an intuitive, flexible and reliable CRISPR/Cas9 target prediction tool[J]. *PLoS One*, 2015, 10(4): e0124633.
- [27] Haeussler M, Schönig K, Eckert H, *et al.* Evaluation of off-target and on-target scoring algorithms and integration into the guide RNA selection tool CRISPOR[J]. *Genome Biology*, 2016, 17(1): 148.
- [28] Bae S, Park J, Kim J S. Cas-OFFinder: a fast and versatile algorithm that searches for potential off-target sites of Cas9 RNA-guided endonucleases[J]. *Bioinformatics*, 2014, 30(10): 1473-1475.
- [29] 蔡英桂. 利用 CRISPR/Cas9 技术构建斑马鱼 *asb5a* 基因敲除品系 [D]. 长沙: 湖南师范大学, 2018.
- Cai Y G. CRISPR/Cas9-mediated knock-out line of the *asb5a* gene in zebrafish[D]. Changsha: Hunan Normal University, 2018 (in Chinese).
- [30] Kato-Unoki Y, Takai Y, Nagano Y, *et al.* Production of a tributyltin-binding protein 2 knockout mutant strain of Japanese medaka, *Oryzias latipes*[J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2020, 160: 111601.
- [31] Meneghetti G, Skobo T, Chrisam M, *et al.* The *epg5* knockout zebrafish line: a model to study Vici syndrome[J]. *Autophagy*, 2019, 15(8): 1438-1454.
- [32] Gagnon J A, Valen E, Thyme S B, *et al.* Efficient mutagenesis by Cas9 protein-mediated oligonucleotide insertion and large-scale assessment of single-guide RNAs[J]. *PLoS One*, 2014, 9(5): e98186.
- [33] Burger A, Lindsay H, Felker A, *et al.* Maximizing mutagenesis with solubilized CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein complexes[J]. *Development*, 2016, 143(11): 2025-2037.
- [34] 方健. 利用 CRISPR/Cas9 技术编辑青鳞 *tyr* 和 *nanog* 基因 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2018.
- Fang J. CRISPR/Cas9-mediated editing of *tyr* and *nanog* genes in medaka (*Oryzias latipes*)[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2018 (in Chinese).
- [35] Goto R, Saito T, Matsubara T, *et al.* Microinjection of marine fish eggs[M]//Liu C Y, Du Y B. Microinjection: methods and protocols. New York: Humana Press, 2019, 1874: 475-487.

Establishment of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) mutants based on CRISPR/Cas9 system

PAN Qihua^{1,2}, LU Ke², LUO Junzhi², JIANG Yuewen², XIA Bilin²,
CHEN Lei¹, WANG Mengyang¹, DAI Ronggui¹, CHEN Tiansheng^{1,2*}

(1. Key Laboratory of Healthy Mariculture for the East China Sea,
Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Engineering Research Center of the Modern Technology for Eel Industry,
Fisheries College of Jimei University, Xiamen 361021, China;
2. College of Fisheries, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: Medaka (*Oryzias latipes*) is one of the model organisms for studying gene function, organogenesis, and development mechanism. Although editing technology has been widely used in medaka, there was no detailed report on the use of CRISPR/Cas9 to establish *O. latipes* mutant. To thoroughly describe the establishment process of *O. latipes* mutant, this study takes the knockout of *Olpax6.1* as an example. Firstly, the gRNA target of *Olpax6.1* gene was designed using the ChopChop website; secondly, the template for in vitro transcription of gRNA and Cas9 mRNA were obtained by PCR and plasmid digestion respectively, and gRNA and Cas9 mRNA were synthesized by in vitro transcription; thirdly, the mixture of Cas9 mRNA and gRNA was microinjected into medaka embryos to obtain the mutated F₀; finally, we used PCR, T7 Endonuclease I digestion and Sanger sequencing to screen the offspring of the cross between F₀ and wild type to obtain F₁ with the same mutation type, and then crossed the same mutated F₁ and screened their offspring to obtain *Olpax6.1* knockout homozygous mutant, which displays the classic phenotype of ocular developmental malformations. Taken together, this study provides technical guidance for the generation of mutants in *O. latipes* and other fish.

Key words: *Oryzias latipes*; Cas9; mutant; gene editing technology

Corresponding author: CHEN Tiansheng. E-mail: tiansheng.chen@jmu.edu.cn

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (31771648, 31672653); Scientific Research Foundation of Jimei University (ZQ2020003); National Key Basic Research Program of China (2013CB967700)