

復旦大學

本科毕业论文



论文题目：_____ 基于 TetON-Cas9 系统

_____ 在斑马鱼中实现条件性基因敲除

姓 名：_____ 俞皓鸣 _____ 学 号：_____ 15307110127

院 系：_____ 生命科学学院

专 业：_____ 生物科学

指导教师：_____ 张瑞霖 _____ 职 称：_____ 研究员

单 位：_____ 复旦大学生命科学学院

完成日期：_____ 2019 年 5 月 20 日

基于 TetON-Cas9 系统
在斑马鱼中实现条件性基因敲除

完成人

俞皓鸣

指导小组成员

张瑞霖 研究员

目 录

摘 要	I
Abstract	II
一、前言	1
1.1 斑马鱼模型在生物研究中的应用.....	1
1.2 斑马鱼传统基因敲低/敲除技术	1
1.2.1 吗啉寡聚核苷酸.....	1
1.2.2 Cre-loxP 技术	1
1.2.3 CRISPR/Cas9 系统.....	2
1.3 条件性基因敲除与 Tet-ON 系统	3
二、材料与方法	5
2.1 实验材料.....	5
2.1.1 斑马鱼的喂养.....	5
2.1.2 实验试剂.....	5
2.1.3 实验器材.....	6
2.1.4 引物序列.....	7
2.2 实验方法.....	8
2.2.1 斑马鱼基因型鉴定.....	8
2.2.2 整胚原位杂交.....	9
2.2.3 RNA 探针制备	10
2.2.4 显微注射.....	10
2.2.5 心脏冷冻受损, 切片制备及 PCNA-mef2c 染色.....	11

2.2.6 Cas9 mRNA 及 Tol2 mRNA 合成	11
2.2.7 gRNA 合成	12
三、研究结果	13
3.1 TetON-Cas9 系统构建	13
3.1.1 TRE3G-zCas9 质粒的构建	13
3.1.2 gRNA 的验证与插入	14
3.2 TetON-Cas9 系统可以在嵌合体斑马鱼中实现基因敲除	15
3.3 TetON-Cas9 系统在 F1 代中可实现更高效率的基因敲除	17
3.4 TetON-Cas9 系统可在幼鱼和成鱼的心肌实现条件性基因敲除	18
四、讨论	20
参考文献	22
致谢	23

摘要

作为模式生物中的一员，斑马鱼在器官形成、组织再生、固有免疫等各类生物领域的研究中都发挥了十分重要的作用。而生物体内的某些基因在不同组织、不同发育阶段发挥着不同的作用，因此在研究这类基因时，我们往往需要获得该基因的条件性突变体。然而目前在斑马鱼模型中，可以做到时空特异性的条件基因敲除系统还是鲜有报道。

Tet-ON 是一种已被应用多年的可诱导表达外源目的基因的系统，其在斑马鱼模型中已被验证有效。此课题中，我们希望将 Tet-ON 系统和 CRISPR/Cas9 蛋白联用，利用 TetON 蛋白表达的组织特异性和加入 DOX 诱导的时间特异性在斑马鱼模型中实现条件性基因敲除。

以 *Hrt*、*Wnt8a* 为目标基因，我们成功构建了 TetON-Cas9 系统，并且通过 T7E1 assay、T 克隆测序等方法在嵌合体斑马鱼中证明了该系统的可行性。进一步我们构建了可稳定遗传的 *Tg(TRE:zCas9/zU6:Hrt-gRNA)*F0 代斑马鱼，将其与 *Tg(Ubb:TetON)* 和 *Tg(cmlc2:TetON)* 品系杂交，分别获得了 F1 和 F1'。利用 PCR 测序、ISH 和 PCNA staining 等方法，我们分别在 F1 幼鱼，F1' 幼鱼和成鱼中都验证了目的基因敲除的高效性和组织特异性，表明 TetON-Cas9 系统可以在斑马鱼模型中实现有效的条件性基因敲除。

这一系统的构建可为以斑马鱼为模型的生物学研究提供新的平台，在更高的时空精度上调控基因，进一步细化基因功能的研究。值得注意的是，该系统还可联用其他新型的 CRISPR 蛋白，再次拓宽基因调控的范围。

关键词：Tet-ON, CRISPR/Cas9, 斑马鱼, 条件性基因敲除

Abstract

As a vertebrate model organism, zebrafish plays an important role in many fields of biological research including organogenesis, regeneration and innate immunity. Since many genes are expressed and function in several different tissues at different development stages. So conditional mutants are needed to analyze these pleiotropic genes. However, conditional gene knockout technology is limited in zebrafish model.

Tet-ON is a powerful, tightly regulated, tetracycline-inducible mammalian expression system that is proved efficient in zebrafish as well. Here, we want to combine Tet-ON with CRISPR/Cas9 to generate conditional gene knockout in zebrafish.

Targeting *Hrt* and *Wnt8a* genes, we have successfully constructed TetON-Cas9 system and proved its feasibility by T7E1 assay and T clone sequencing in mosaic zebrafish. Then we identified *Tg(TRE:zCas9/zU6:Hrt-gRNA)* F0 founder and crossed it with *Tg(Ubb:TetON)* and *Tg(cmlc2:TetON)* to get F1 and F1'. Using PCR sequencing, in situ hybridization and PCNA immunostaining, we demonstrated the efficient mutagenesis of *Hrt* gene in F1 larvae, F1' larvae and F1' adult fish in specific tissue. All these results showed that TetON-Cas9 system can generate conditional gene knockout in zebrafish effectively.

The establishment of TetON-Cas9 system can provide new platform for biological research based on zebrafish model. Notably, this system can combine other new CRISPR proteins to control gene expression in various ways.

Key words: Tet-ON, CRISPR/Cas9, zebrafish, conditional knockout

一、前言

1.1 斑马鱼模型在生物研究中的应用

作为新晋的模式生物，斑马鱼模型在某些方面的独特性能为生物研究带来很多的便利。首先，斑马鱼体型小、产卵量巨大且可以在体外进行发育，这一点十分有利于大规模遗传筛选工作的进行。其次，斑马鱼发育速度快，并且在早期其身体处于透明的状态，为早期器官发育的观察记录提供了条件。此外，斑马鱼有超过百分之七十的编码蛋白和人类同源，因而使用斑马鱼模型进行基因功能的研究具有相当重要的意义。

最初，由于其在正向遗传筛选中的独特优势，斑马鱼模型在胚胎早期发育和器官形成领域受到了广泛应用^[1]。随着基因组学和蛋白组学工具的发展和高效精准的基因编辑技术的成熟，我们能够更加快速地筛选出差异基因并且以更低的成本获得突变体。因此，基于模式生物的遗传分析方式已经逐渐从正向遗传朝着反向遗传转变。得益于此，斑马鱼模型也在许多个体发育后期的生物过程的研究中大放异彩，例如固有免疫^[2]、器官再生^[3]、睡眠周期^[4]和肿瘤发生^[5]等。

1.2 斑马鱼传统基因敲低/敲除技术

斑马鱼作为模式生物的发展离不开相应的技术手段的支持。由于其自身生物系统的独特性，我们针对斑马鱼模型也有独特的遗传分析手段，下面就简单汇总部分在斑马鱼中的基因敲低/敲除手段

1.2.1 吗啉寡聚核苷酸

吗啉寡聚核苷酸简称为 MO，是一种传统的基因敲低技术，常用于斑马鱼研究。MO 敲低的原理是利用其与特定基因的 mRNA 相互结合，从而阻止 RNA 剪切酶发挥作用，使得靶基因 mRNA 无法进行翻译或是翻译产生错误的蛋白，起到失活靶基因的效果。此外，同时注射多个不同靶点的 MO 还可以起到多基因沉默的效果，因此一定程度上可以避免基因冗余的情况，可以更好地研究基因功能。

其不足之处在于 MO 依赖于胚胎早期注射，因此在研究发育后期基因时，无法发挥作用。并且 MO 在使用过程中会产生脱靶等现象，需要一系列辅助实验来确定其敲低的效率。

1.2.2 Cre-loxP 技术

Cre-loxP 重组酶系统是一种十分高效率的基因敲除系统,可以在特定时间点、特定组织器官进行目的基因打靶,其原理是通过 Cre 重组酶识别 loxP 位点,进而引起两 loxP 位点间 DNA 序列的切除或翻转。近年来,有不少文献报道了利用 Cre-loxP 系统在斑马鱼体内实现了条件性基因敲除^[6,7],而该方法实现的技术核心依赖于 loxP 位点在目的基因部位的精准敲入。从文献中报道以及实验室中以往经验来看,利用同源重组的方式在斑马鱼体内进行 loxP 位点敲入的效率极低;在借助 TALENs 等基因组核酸酶产生特定定位点双链断裂后敲入 loxP 位点的效率会有所提高,但成本和实验复杂程度也会相应上升,并且针对不同的基因我们需要构建完全不同的 loxP 品系斑马鱼,因此相对而言,使用 Cre-loxP 技术进行基因敲除需要花费大量的时间精力与研究成本,不适合大规模基因操纵。

1.2.3 CRISPR/Cas9 系统

CRISPR/Cas9 是一种由单链导向 RNA (sgRNA) 介导的基因编辑技术,其原理是通过含有特定序列的 sgRNA 诱导 Cas9 蛋白识别基因组上的特定基因靶点进行切割产生 DNA 双链断裂 (DSB) ^[8]。由于生物体自身对于 DSB 会产生非同源末端连接的修复方式,而非同源末端连接的过程中会引入基因片段的随机插入或缺失,破坏阅读框,从而达到基因敲除的目的 (图 1.1)。

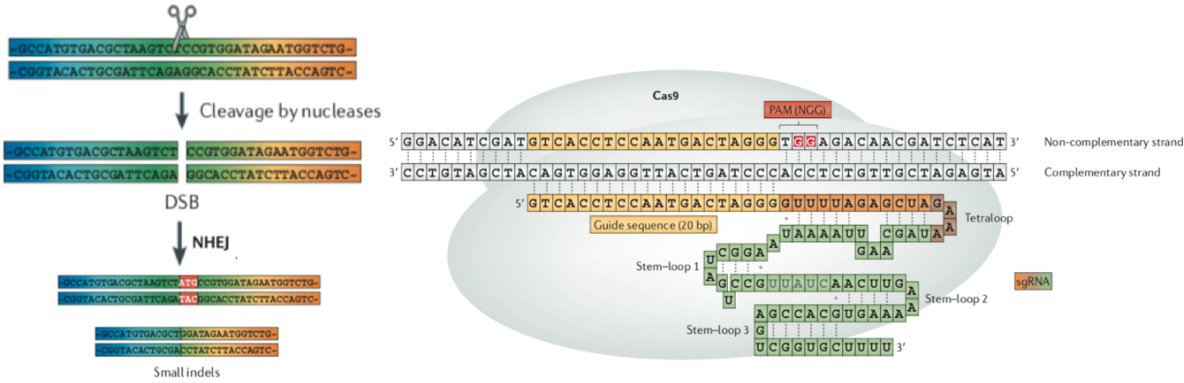


图 1.1 CRISPR/Cas9 蛋白剪辑示意图

CRISPR/Cas9 系统在 2013 年第一次被应用在斑马鱼模型上^[9],之后 Giraldez 实验室对于斑马鱼模型中 Cas9 的使用进行了优化与总结^[10],最终成为了我们目前进行整体基因敲除的标准方法。CRISPR/Cas9 系统发挥作用的核心在于 sgRNA 序列的靶向特异性和高效性,其长度约为 20 个碱基,在 3'端需紧接着一段 PAM 区,其序列设计由 CRISPRcan 网站完成。使用 Cas9 mRNA 和目的基因 sgRNA 在胚胎一细胞期共注射可以在斑马鱼发育过程中进行整体性的目的基因敲除,但

是无法确定组织特异性，以及可能会有目的基因胚胎致死的情况发生，在研究这一类基因功能时会有较大的局限性。

1.3 条件性基因敲除与 Tet-ON 系统

某一类基因在斑马鱼发育早期和后期都发挥了十分重要的作用，而常规的基因敲除技术往往在发育早期就实现了基因敲除，这导致斑马鱼胚胎在发育过程中会产生许多不可逆转的畸形甚至是死亡，这也就导致了我们对该基因发育后期功能的研究受到限制。因此，构建一个可以在斑马鱼发育后期特定时间点诱导、在特定组织器官实现基因敲除的系统具有相当重要的意义。

Tet-ON 是一种成熟的真核生物外源基因诱导表达系统，其原理是通过 Tet-ON 蛋白与四环素 DOX 相互作用改变蛋白构象，从而与特定启动子 TRE 相互作用，激活 TRE 下游基因的表达。一般而言，Tet-ON 系统由两部分组成，一个是在特定组织表达 TetON 的激活子品系，另一个是携带有特定启动子 TRE 和目的基因的响应子品系。通过两品系的杂交，后代即可诱导表达目的基因进行实验（图 1.2）。Tet-ON 系统在小鼠模型中有着十分广泛的应用，且该系统在斑马鱼模型中也被证明可实现高效特异地诱导基因表达^[11]。在这里我们将 Tet-ON 和 CRISPR/Cas9 联用构建出了 TetON-Cas9 系统，利用 TetON 蛋白表达的组织特异性和受 DOX 诱导激活的时间特异性在特定的时间点和组织器官表达出 Cas9 蛋白，同时结合全身表达的 gRNA 片段，实现斑马鱼模型中的条件性基因敲除。

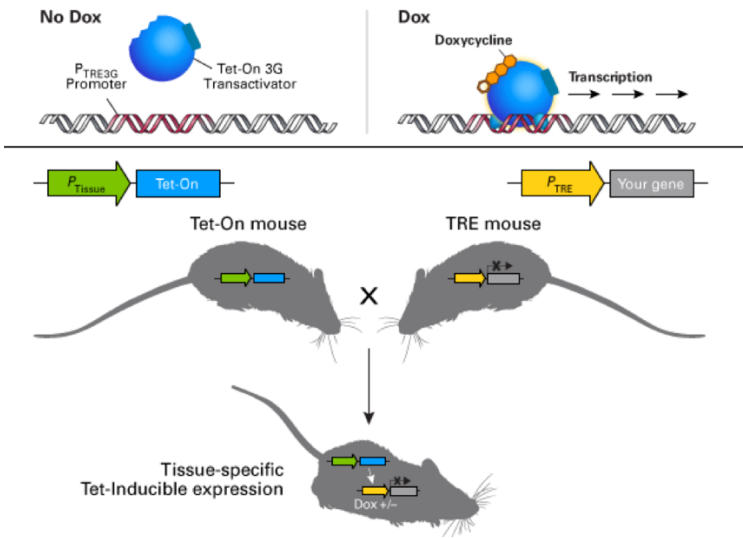


图 1.2 Tet-ON 系统技术示意图

为了检测 TetON-Cas9 系统的敲除效率，我们选择了两个在斑马鱼心脏发育和再生过程中有着关键性作用的基因：*Hrt* 和 *Wnt8a*。*Hrt* 基因对于老鼠和斑马

鱼心脏的早期发育是必需的，同时对于心脏稳态的维持也有着不可或缺的作用^[12]。*Hrt* 基因在斑马鱼心脏再生的过程中会高表达，并且过表达 *Hrt* 蛋白可以提高小鼠心脏再生的能力。*Wnt8a* 基因对于原肠胚形成过程中的后中胚叶形成有着关键性作用，也直接影响到斑马鱼心脏的早期发育^[13]。实验结果表明，TetON-Cas9 系统可有效突变这些基因，其中 *Hrt* 基因在斑马鱼早期发育和成体心脏再生过程中的敲除分别可以导致心脏发育异常和再生能力的下降，再一次证明该系统可在斑马鱼模型中实现简便高效地条件性基因敲除。

二、材料与amp;方法

2.1 实验材料

2.1.1 斑马鱼的喂养

斑马鱼幼鱼及成鱼的培育喂养均在复旦大学生命科学学院斑马鱼鱼房中完成。鱼房保持恒温 28.5℃，昼夜周期为 14 h-10 h，设有循环水系统。斑马鱼胚胎刚出生后先在 28.5℃的培养箱中孵育，发育至 6 dpf 后再放入鱼房的在非循环水中单独培养，用草履虫进行喂养。发育至满一个月后，再放入循环水系统，用丰年虾进行喂养。针对需要进行 ISH 的斑马鱼胚胎，则需要在 24 hpf 时期加入 0.003%PTU 阻止色素形成，以保证斑马鱼身体的透明。

本课题中使用到了野生型 AB、*Tg(Ubb:TetON/zCryaa-mCherry)* 和 *Tg(cmlc2:TetON/zCryaa-mCherry)* 这三个斑马鱼品系。

2.1.2 实验试剂

试剂	公司
限制性内切酶及其 buffer	NEB
T4 连接酶	Promega
pGEM-T easy vector	Promega
Gibson Assemble Kit	NEB
MightyAmp Genotyping Kit	Takara
MinElute Gel Extraction Kit	QIAGEN
MinElute Reaction Cleanup Kit	QIAGEN
TRizol Reagent	Invitrogen
Phasemaker Tubes	Thermofisher
MAXIscript T7 kit	Ambion
mMESSAGE mMACHINE T7 Transcription Kit	Ambion
DNA Marker and loading buffer	Transgene
DEPC water	Sigma
PTU	Sigma
PFA	Sigma

E.coli 菌株 DH5 α	Tiagen
T7 RNA polymerase	NEB
Dig-rUTP	Roche
Citric acid trisodium salt	Sigma
Blocking reagent	Roche
Maleic acid	Sigma
Anti-digoxigenin-AP	Roche
BM purple	Roche
Proteinase K	Tiagen
Tween-20	生工
10 $\times$ PBS	生工
去离子甲酰胺	生工
BSA	Sigma
NCS	Sigma
Horse serum	Sigma
DMSO	生工
常规分子生物学试剂	生工

2.1.3 实验器材

器材	公司
超纯水系统	Milli-Q
琼脂糖凝胶电泳仪	Bio-rad
冰箱	海尔
Nanodrop 2000	Thermo Scientific
移液枪	Eppendorf
PCR 仪器	Thermo Scientific
水浴锅	BluePard
解剖镜	Motic
照胶仪	复日科技
冷冻切片机	LEICA CM1900

杂交箱	uVP HB-1000Hybridizer
倒置荧光显微镜	ZEISS Stemis 2000
体视镜	LEICA DFC 310 FX
恒温培养箱	Memmert
剪刀、镊子	WPI
磁力搅拌器	上海司乐
恒温培养摇床	上海一恒
电热恒温培养箱	上海一恒

2.1.4 引物序列

(1) TRE3G-zCas9 质粒合成引物

zCas9-F:	agtcgacatggcccctaagaaaaagagaaaggtcgg
zCas9-R	cctgccctctccgatccttctcttttggcctgacctg
Tol2-TRE-F	aggccaaaaagaagaaaggatccggagagggcagg
Tol2-TRE-R	ttctcttttcttaggggccatgtcgactttacgagggtg

(2) gRNA 合成引物

Hrt primer F	tgtaatacgactcactataggcggcgggcggcaccggcagggttttagagctagaaatagc
Wnt8a-1 primer F	tgtaatacgactcactataggtagcagctggggctcagagggttttagagctagaaatagc
Wnt8a-2 primer F	tgtaatacgactcactataggtagcgggtggggcacagagggttttagagctagaaatagc
gRNA primer R	agtggcaccgagtcggtgct

(3) gRNA 序列连接入 musa 质粒时所需引物

Hrt-musa-F	cttcggcgggcgggcggcaccggcag
Hrt-musa-R	aaacctgccggygccgccgcgct
Wnt8a-1-musa-F	cttcggtacaagctggggctcagag
Wnt8a-1-musa-R	aaacctctgagccccagcttgtag
Wnt8a-2-musa-F	cttcggtgcgggtggggcacagag
Wnt8a-2-musa-R	aaacctctgtgccccaacccgcac

(4) 测序及目的基因 PCR 引物

U6 测序引物	aagcaatcctgcagtgtga
TetON-zCas9 测序	gtcagatcgctggagcaat

Hrt-det-F	gtttaattcatatatttaa
Hrt-det-R	atttaatttttaggcctaact
Wnt8a-1-det-F	tcacgcagcaatgaaccctt
Wnt8a-1-det-R	ctggtttgaccgctaggag
Wnt8a-2-det-F	tggttacttctccgttggg
Wnt8a-2-det-R	cttaccaagtctgccgttctt

(5) RNA 探针引物

Hrt-probe-F	actcacggatattgagaggga
Hrt-probe-R	tctcaaagtgccgttagccat

2.2 实验方法

2.2.1 斑马鱼基因型鉴定

- (1) 使用 MightyAmp Genotyping Kit (Takara) 试剂盒进行处理, 首先将尾鳍/胚胎放入已加入 30 μL 提取液;
- (2) 加入 0.3 μL 蛋白酶 K (20 mg/mL);
- (3) 放入 65°C 铁浴锅加热 45 min, 再升温至 98°C 失活 15 min, 然后冷却至室温;
- (4) 离心, 获得上清液, 即可得到 template;
- (5) 按以下体系进行配置

2×MightyAmp Buffer	25 μL
Forward Primer	1.5 μL
Reverse Primer	1.5 μL
Template	2 μL
MightyAmp DNA Polymerase	1 μL
ddH ₂ O	19 μL

- (6) PCR 程序如下: 98°C 2 min → 98°C 10 sec, 60°C 15 sec, 68°C 1 min/kb, 循环 35 次 → 4°C
- (7) 跑胶确定条带大小;
- (8) 若需要检测目的基因是否产生突变, 则需要进行 T7E1 assay: 首先按以下程序退火以构建异元二聚体, 95°C 5 min → (-2°C/s) 85°C → (-0.1°C/s)

25°C→(-6°C/s) 4°C;

- (9) 对该样本进行酶切处理，体系如下

退火产物	10 μ L
NEB BufferII	2 μ L
T7 Endonuclease	0.25 μ L
Nuclease-free Water	7.75 μ L

- (10) 37°C, 20 min, 跑胶确定是否有特定大小的切割条带出现。

2.2.2 整胚原位杂交

2.2.2.1 准备工作

- (1) 将斑马鱼胚胎吸入 PCR 管中，每管约 20 枚，加入含 4%PFA 的 PBS, 4°C 过夜固定；
- (2) 加入甲醇，放置于-20°C脱水过夜。

2.2.2.2 原位杂交第一天

- (1) 复水：用梯度浓度的甲醇和 PBS 进行漂洗使胚胎在 PBS 中复水；
- (2) 消化：用蛋白酶 K (10 μ g/mL) 消化胚胎，PBST 终止；
- (3) 预杂交：加入预热的 Hyb- 200 μ L, 放到 65°C杂交箱中 2 h；
- (4) 杂交：将 RNA 探针在杂交液中稀释至 75 ng/100 μ L, 加入 200 μ L 杂交液 Hybe+, 置于 65°C杂交箱过夜。

2.2.2.3 原位杂交第二天

- (1) 高温漂洗：用梯度浓度的 Hyb-和 SSC 进行漂洗使胚胎在 0.2×SSC 中平衡；
- (2) 室温慢速水平摇床漂洗：用梯度浓度的 SSC 和 MABT 进行漂洗，使胚胎在 MABT 中平衡；
- (3) 用 0.9 mL MAB Block 封闭非特异抗体位点，室温下放置 2 h；
- (4) 用 1:4000 的浓度将 Anti-digoxigenin-AP 稀释在 MAB Block 中,4°C过夜。

2.2.2.4 原位杂交第三天

- (1) 漂洗：用 MABT 在室温下冲洗 8 次，每次 15 min。
- (2) 抑制内源性 AP：用 Tris Buffer 在室温下漂洗胚胎 3 次，每次 5 min。
- (3) 显色：在每管中加入 BM Purple 500 μ L, 室温下避光孵育，至充分显色后吸出液体，加入显色停止液漂洗 3 次，每次 5 min。

(4) 观察：将胚胎置于 100%甘油中进行保存，待观察时可取出。

2.2.3 RNA 探针制备

(1) 使用 MAXIscript T7 kit (Ambion) 试剂盒进行体外转录，首先对试剂进行解冻；

(2) 在常温按以下体系配制并充分混合

DNA template	1 μ g
10 $\times$ Transcription Buffer	2 μ L
10mM ATP	1 μ L
10mM CTP	1 μ L
10mM GTP	1 μ L
Dig-rUTP	2 μ L
T7	2 μ L
Nuclease-free Water	To 20 μ L

(3) 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h；

(4) 加入 1 μ L TURBO DNase 消除 DNA 模版，放置于 37 $^{\circ}$ C 水浴锅 15 min；

(5) 跑胶确定；

(6) 使用 RNeasy Mini kit (QIAGEN) 纯化 RNA，首先用 DEPC 水将样本体系调整至 100 μ L；

(7) 加入 350 μ L Buffer RLT 并将其与反应体系充分混合；

(8) 加入 250 μ L 酒精，混合将样品转移至 RNeasy Mini spin column，8000 x g 离心 15 sec，弃去滤过液；

(9) 加入 40 μ L DEPC 水，8000 x g 离心 1 min，洗脱得到目的 RNA。

2.2.4 显微注射

以 1.5% 的琼脂糖凝胶作为基质，使用玻璃模具构建注射槽，用于注射时固定斑马鱼卵。注射时平均每个斑马鱼卵注射 2 nL 溶液，若注射目的是进行整体基因敲除，则 cas9 mRNA 浓度为 300 ng/ μ L，gRNA 浓度为 20 ng/ μ L；若注射目的是构建转基因斑马鱼，则将质粒稀释到 30 ng/ μ L，Tol2 mRNA 稀释到 200 ng/ μ L。注意注射时要将溶液注射到斑马鱼细胞的动物极中，若注射至卵黄部位则无法正常发挥作用。

2.2.5 心脏冷冻受损，切片制备及 PCNA-mef2c 染色

- (1) 将斑马鱼在 0.02% Tricaine 中麻醉，用剪刀暴露其心脏，利用在液氮中冷却完全的铜丝接触冻伤其心室尖部位，再放回鱼水中复苏；
- (2) 取损伤修复八天后的斑马鱼再次麻醉，在显微镜下将斑马鱼心脏（包含流出道、心房和心室）取出；
- (3) 用 PBS 冲洗三次，浸泡于含 4%PFA 的 PBS 中，4℃过夜固定；
- (4) 第二天用 PBS 冲洗三次，换成 10% sucrose 溶液脱水，4℃过夜；
- (5) 将脱水后的心脏用 PBS 冲洗三次，使用
- (6) 利用冰冻切片仪制备 10 μm 厚度的心脏切片，贴附在经电荷处理后的玻片上，常温风干，-80℃保存。
- (7) 将切片在 Citrate Buffer 中煮沸 20 min；
- (8) 自然冷却至室温 20 min；
- (9) 用 PBST 漂洗 4 次，每次 5 min；
- (10) 使用 Blocking Buffer 封闭切片，37℃孵育 1 h；
- (11) 将溶有 mef2c 和 PCNA 一抗的 Blocking Buffer 滴加在切片上，4℃孵育过夜；
- (12) 用 PBST 漂洗 4 次，每次 5 min；
- (13) 将溶有二抗的 Blocking Buffer 滴加到切片上，37℃孵育 1 h；
- (14) 用 PBST 漂洗 5 次，每次 5 min；
- (15) 封片，在显微镜下观察，其中染有 mef2c 的细胞是心肌细胞，染有 PCNA 的细胞是正在经历细胞周期的细胞。对包含受损部位边界线 150μm 外的心脏区域进行画圈，分别计数其中表达 mef2c 和共表达 mef2c+PCNA 的细胞数目，相除可获得相对的心脏再生指数，可指标该斑马鱼心脏再生的水平高低。

2.2.6 Cas9 mRNA 及 Tol2 mRNA 合成

- (1) 用 XbaI 酶切 pGH-T7-zCas9 质粒/用 NotI 酶切 PCS-TP 质粒使其线性化；
- (2) 使用 mMESSAGE mMACHINE T7 Transcription Kit (Ambion) 进行体外转录，首先按以下体系配置反应

2×NTP/CAP	10 μL
-----------	-------

10×Reaction Buffer	2 μ L
Linear template DNA	1 μ g
Enzyme Mix	2 μ L
Nuclease-free Water	To 20 μ L

- (3) 37°C 孵育 1 h;
- (4) 加入 1 μ L TURBO DNase, 37°C 孵育 15 min;
- (5) 使用 RNeasy Mini kit (QIAGEN) 纯化获得 Cas9 mRNA/Tol2 mRNA。

2.2.7 gRNA 合成

- (1) gRNA 骨架被克隆在质粒 pMD 19-T 载体中, 首先利用包含 gRNA 序列信息的特异性引物进行 PCR 扩增;
- (2) 跑胶确定;
- (3) 胶回收目的片段;
- (4) 使用 T7 RNA Polymerase (NEB) 进行体外转录, 按一下体系配置

2×NTP	10 μ L
10×Reaction Buffer	2 μ L
Template DNA	1 μ g
T7 RNA Pol	2 μ L
Nuclease-free Water	To 20 μ L

- (5) 37°C 孵育 1 h;
- (6) 使用 TRIZOL 进行纯化。

三、研究结果

3.1 TetON-Cas9 系统构建

3.1.1 TRE3G-zCas9 质粒的构建

TRE3G-zCas9 质粒以 Tol2 作为骨架，可利用 Tol2 转座子系统随机多拷贝整合在斑马鱼基因组中。其主体部分共包括三部分元件：TRE-Cas9-ZsGreen、U6-gRNA、zCryaa-EGFP。TRE-Cas9-ZsGreen 部分可与 TetON 蛋白作用，在 DOX 的诱导下可表达出融合了绿色荧光的 Cas9 蛋白；U6-gRNA scaffold 部分在插入特定 gRNA 序列后，可以在全身各组织表达具有活性的 gRNA，当 gRNA 与 Cas9 蛋白结合后，可造成特异基因位点的切割，从而介导非同源末端联接产生基因敲除；zCryaa-EGFP 部分可以在斑马鱼晶状体中特异表达绿色荧光蛋白，以此作为筛选标记（图 3.1）。

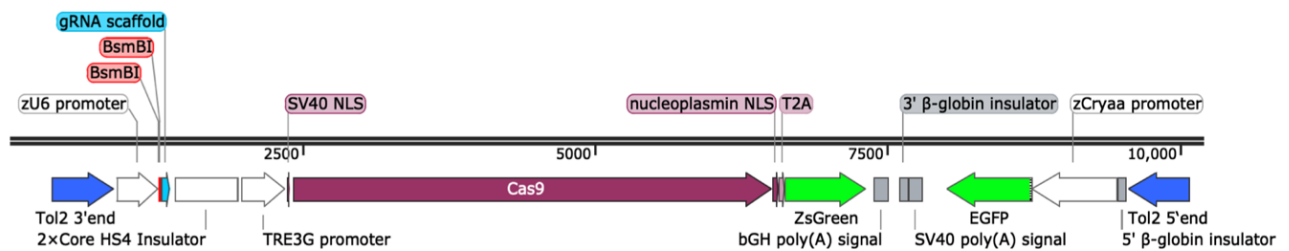


图 3.1 TRE3G-zCas9 线性化质粒示意图

该质粒由两部分连接而成，其中 SV40-zCas9-nucleoplasmin NLS 部分片段从质粒 pGH-T7-zCas9 中获得，T2A-TRE3G promoter 部分片段从实验室已有质粒中获得，片段电泳图和接口处测序结果显示该质粒被正确构建（图 3.2）。

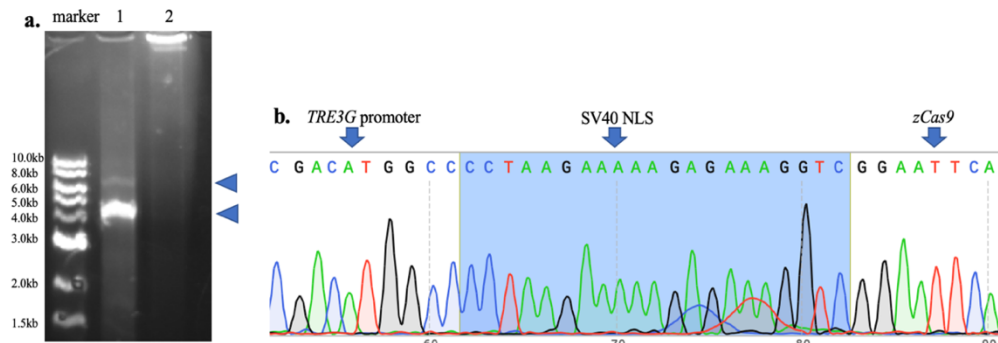


图 3.2 质粒片段电泳图及接口测序结果

- 泳道 1，质粒两部分片段电泳，未加入连接酶；泳道 2，加入酶体系后，质粒电泳结果；箭头标注为两质粒片段
- 质粒连接接头处测序结果，未产生突变

3.1.2 gRNA 的验证与插入

这里我们选择了 *Hrt* 和 *Wnt8a* 这两个基因进行实验, 首先根据已发表的 gRNA 序列, 我们在体外合成了 gRNA-*Hrt*、gRNA-*Wnt8a-1*、gRNA-*Wnt8a-2* 和 zCas9 mRNA, 其中针对 *Wnt8a* 基因我们使用了两个不同的 gRNA 序列分别靶向两个外显子区域。将这三种 gRNA 分别和 zCas9 mRNA 混合后注射到 AB 品系斑马鱼的一细胞期胚胎中, 4dpf 提取基因组 DNA, PCR 扩增目的基因片段进行 T7E1 Assay, 电泳结果显示目的片段在 gRNA 靶点处发生了切割, 说明该 gRNA 序列可以引导 Cas9 蛋白高效特异性地切割目的基因 (图 3.3)。

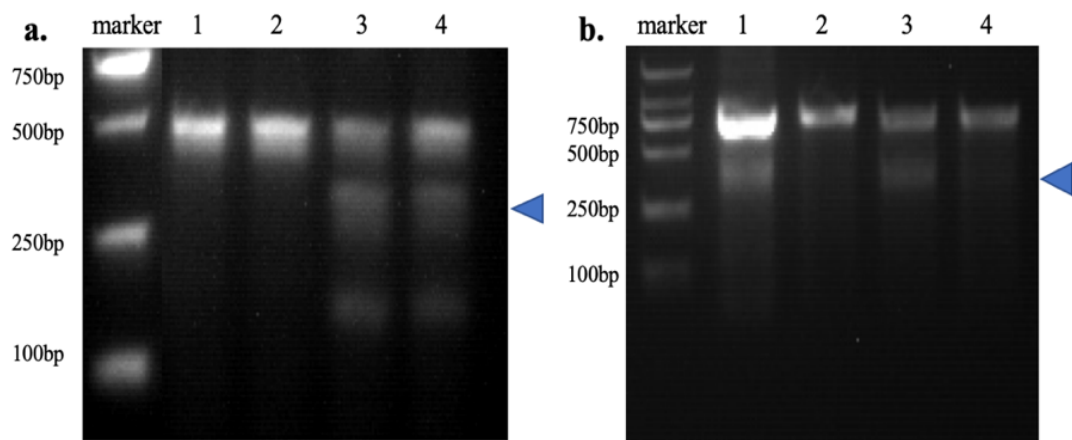


图 3.3 *Cas9* mRNA+gRNA 基因敲除结果

- a. 泳道 1、2, 对照组 *Hrt* 基因片段 PCR 产物的 T7E1 结果; 泳道 3、4, 注射 *Cas9* mRNA+gRNA-*Hrt* 实验组 *Hrt* 基因片段 PCR 产物的 T7E1 结果; 箭头为预期的切割条带
- b. 泳道 1, 对照组 *Wnt8a-1* 基因片段 PCR 产物的 T7E1 结果; 泳道 2, 注射 *Cas9* mRNA+gRNA-*Wnt8a-1* 实验组 *Wnt8a* 基因片段 PCR 产物的 T7E1 结果; 泳道 3, 对照组 *Wnt8a-2* 基因片段 PCR 产物的 T7E1 结果; 泳道 4, 注射 *Cas9* mRNA+gRNA-*Wnt8a-2* 实验组 *Wnt8a-2* 基因片段 PCR 产物的 T7E1 结果; 箭头为预期的切割条带

验证 gRNA 效率后, 我们利用特定引物形成特定的双链寡聚 DNA 作为插入片段; 同时使用 NEB BsmBI 内切酶切割 TRE3G-zCas9 质粒作为载体, 用 T4 连接酶连接两者, 获得含有特定 gRNA 序列的质粒, 这里我们将其命名为 *muramasa* (*Specific gene*) 质粒。利用 zU6 promoter 上游特定的测序引物进行测序, 峰图结果证明 gRNA 序列被正确插入, 得到了 *musa-Hrt*、*musa-Wnt8a-1*、*musa-Wnt8a-2* 这三个质粒 (图 3.4)。

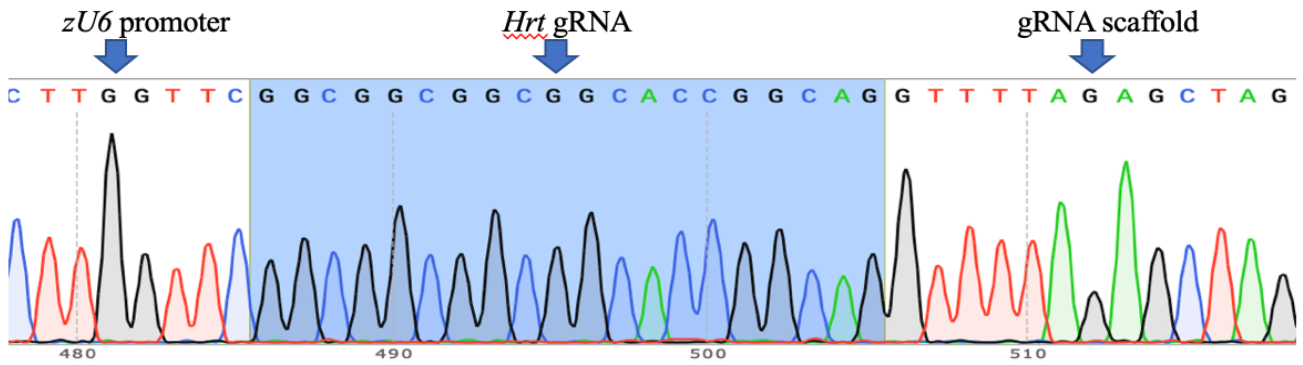


图 3.4 gRNA 插入载体后测序结果（以 Hrt 为例）

3.2 TetON-Cas9 系统可以在嵌合体斑马鱼中实现基因敲除

获得这三个 *musa* 质粒后，我们首先在斑马鱼体内证实其可产生基因敲除。实验室中我们已有 *Tg(Ubb:TetON/zCryaa-mCherry)* 品系的转基因斑马鱼，该品系斑马鱼可在全身各组织表达 TetON 蛋白，经 DOX 诱导后可以激活 TRE 启动子下游的 Cas9 蛋白从而介导基因编辑，并且该品系斑马鱼在晶状体中特异表达红色荧光蛋白，可作为筛选的标记。我们利用该品系转基因斑马鱼内交获得鱼卵，在一细胞期注射 *musa* 质粒和 Tol2 mRNA，在 6hpf 加入 DOX 持续诱导 Cas9 表达，在 4dpf 整胚提取基因组，利用 T7E1 assay 检测目的基因突变效率。电泳结果显示实验组目的基因条带出现了和之前 gRNA+Cas9 mRNA 阳性对照组一样的切割，说明 TetON-Cas9 系统可以在嵌合体斑马鱼中实现基因敲除。进一步，我们对实验组扩增后的目的基因进行了 T 载体连接测序，测序结果表明嵌合体斑马鱼的部分基因产生了缺失或插入的突变，再一次验证了上述结论（图 3.5）。

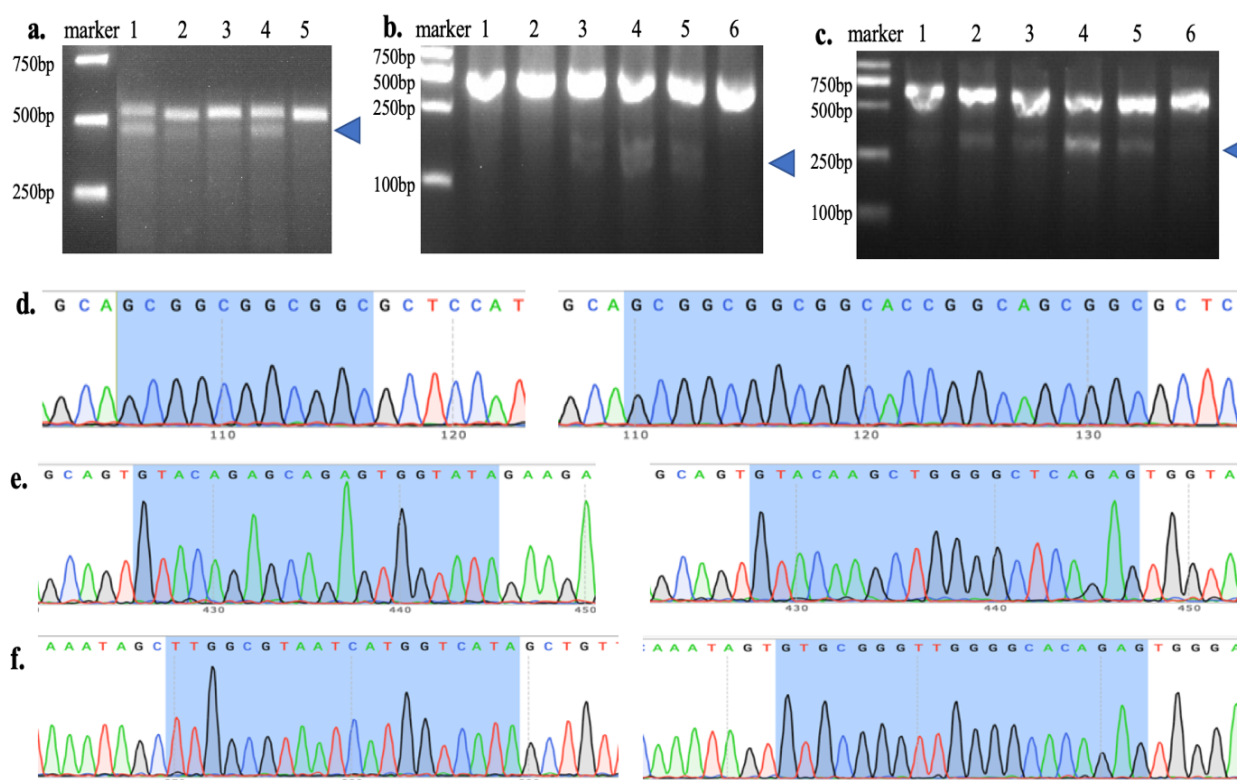


图 3.5 TetON-Cas9 系统在嵌合体斑马鱼基因敲除结果

- 泳道 1-5, 注射 *musa-Hrt* 质粒的嵌合体斑马鱼 *Hrt* 基因片段 PCR 的 T7E1 结果, 其中 1、4 号胚胎突变效率较高; 箭头为预期的切割条带
- 泳道 1-6, 注射 *musa-Wnt8a-1* 质粒的嵌合体斑马鱼 *Wnt8a-1* 基因片段 PCR 的 T7E1 结果, 其中 4、5 号胚胎突变效率较高; 箭头为预期的切割条带
- 泳道 1-6, 注射 *musa-Wnt8a-2* 质粒的嵌合体斑马鱼 *Wnt8a-2* 基因片段 PCR 的 T7E1 结果, 其中 2、4、5 号胚胎突变效率较高; 箭头为预期的切割条带
- 左为 *musa-Hrt* 嵌合体斑马鱼 *Hrt* 基因片段的 T 克隆测序结果, 右为 AB 品系斑马鱼 *Hrt* 基因片段的 T 克隆测序结果, 其中实验组基因片段相对于野生型缺失 12bp
- 左为 *musa-Wnt8a-1* 嵌合体斑马鱼 *Wnt8a-1* 基因片段的 T 克隆测序结果, 右为 AB 品系斑马鱼 *Wnt8a-1* 基因片段的 T 克隆测序结果, 其中实验组基因片段相对于野生型缺失 8bp
- 左为 *musa-Wnt8a-2* 嵌合体斑马鱼 *Wnt8a-2* 基因片段的 T 克隆测序结果, 右为 AB 品系斑马鱼 *Wnt8a-2* 基因片段的 T 克隆测序结果, 其中实验组基因片段相对于野生型增加 10bp

3.3 TetON-Cas9 系统在 F1 代中可实现更高效率的基因敲除

在嵌合体中验证系统可行性后，我们将 *musa* 质粒和 *Tol2* mRNA 共同注射到 AB 品系中，用以制备 *Tg(Musa-specific gene)* 转基因斑马鱼的 F0 代。经筛选后，我们得到了可稳定遗传的 *Tg(Musa-Hrt)* 转基因斑马鱼品系。将 *Tg(Musa-Hrt)* 与 *Tg(Ubb:TetON/zCryaa-mCherry)* 品系杂交后，便可得到 F1，在 6hpf 加入 DOX 诱导 Cas9 蛋白表达，48hpf 即可观察到全身表达绿色荧光，在 6dpf 整胚提取基因组，再次利用 T7E1 assay 检测 *Hrt* 基因突变效率。胶图显示目的条带发生了特异性切割且切割后的条带亮度较高，进一步对 *Hrt* 基因进行 PCR 后直接测序，结果显示 *Hrt* 基因在 gRNA 位点附近出现套峰，说明 F1 代中 *Hrt* 基因产生了敲除，并且敲除效率较高（图 3.6）。

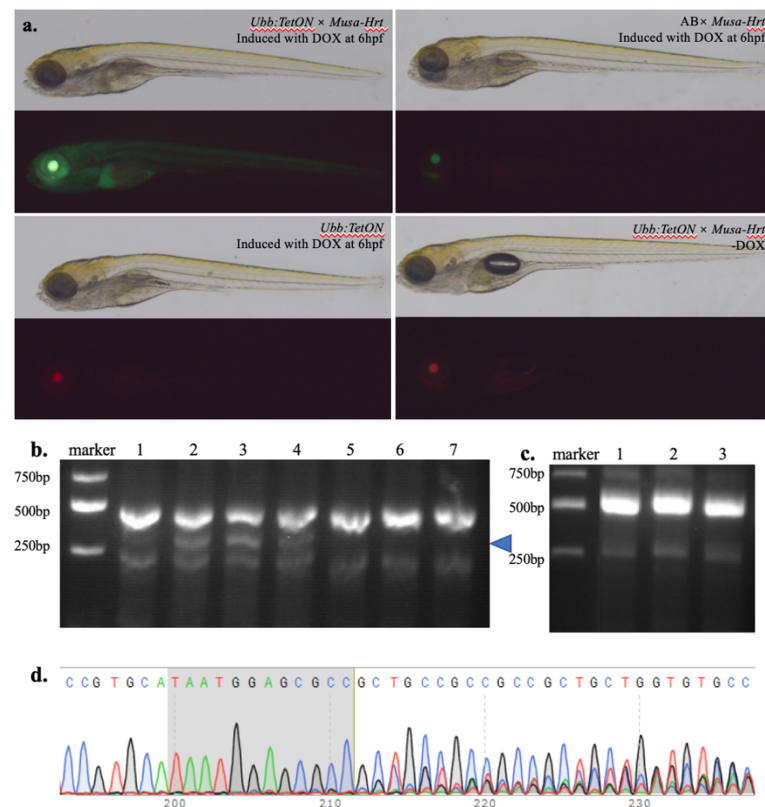


图 3.6 TetON-Cas9 系统在 F1 代斑马鱼中基因敲除结果

- 左上为加 DOX 诱导后的 F1，其全身各组织表达绿色荧光，晶状体表达红色和绿色荧光；右上为加 DOX 诱导的 F0，仅在晶状体表达绿色荧光；左下为加 DOX 诱导的 *Tg(ubb:TetON)*，仅在晶状体表达红色荧光；右下角为未加 DOX 诱导的 F1，仅在晶状体表达红色和绿色荧光
- 泳道 1-4，加 DOX 诱导的 F1 代斑马鱼 *Hrt* 基因片段 PCR 的 T7E1 结果；泳道 5-7，野生型斑马鱼 *Hrt* 基因片段 PCR 的 T7E1 结果；箭头标注为预期产生的切割片段
- 泳道 1-3，未加 DOX 诱导的 F1 代斑马鱼 *Hrt* 基因片段 PCR 的 T7E1 结果
- DOX 诱导的 F1 斑马鱼 *Hrt* 基因片段的 PCR 测序结果，在 gRNA 靶点处出现套峰

3.4 TetON-Cas9 系统可在幼鱼和成鱼的心肌实现条件性基因敲除

利用筛选所得的 *Tg(Musa-Hrt)* 品系, 将其与 *Tg(cmlc2:TetON/zCryaa-mCherry)* 品系杂交获得的子代, 命名为 F1'。F1' 在 6hpf 加入 DOX, 由于 *cmlc2* 是斑马鱼心肌细胞的组织特异性启动子, 因此仅在心肌细胞诱导表达 Cas9 蛋白, 48hpf 即可观察到心脏特异表达绿色荧光。取 72hpf 的 F1' 进行整胚原位杂交, 检测 *Hrt* 基因的 RNA 表达水平, 同时取不加 DOX 诱导的 F1' 和 *Hrt* 纯合突变体分别作为阴性和阳性对照。染色结果显示: 加入 DOX 诱导的 F1' 在心脏部位 *Hrt* 表达水平降低 (图 3.7)。该结果说明在斑马鱼发育早期, TetON-Cas9 系统可在心肌特异性地诱导基因敲除。

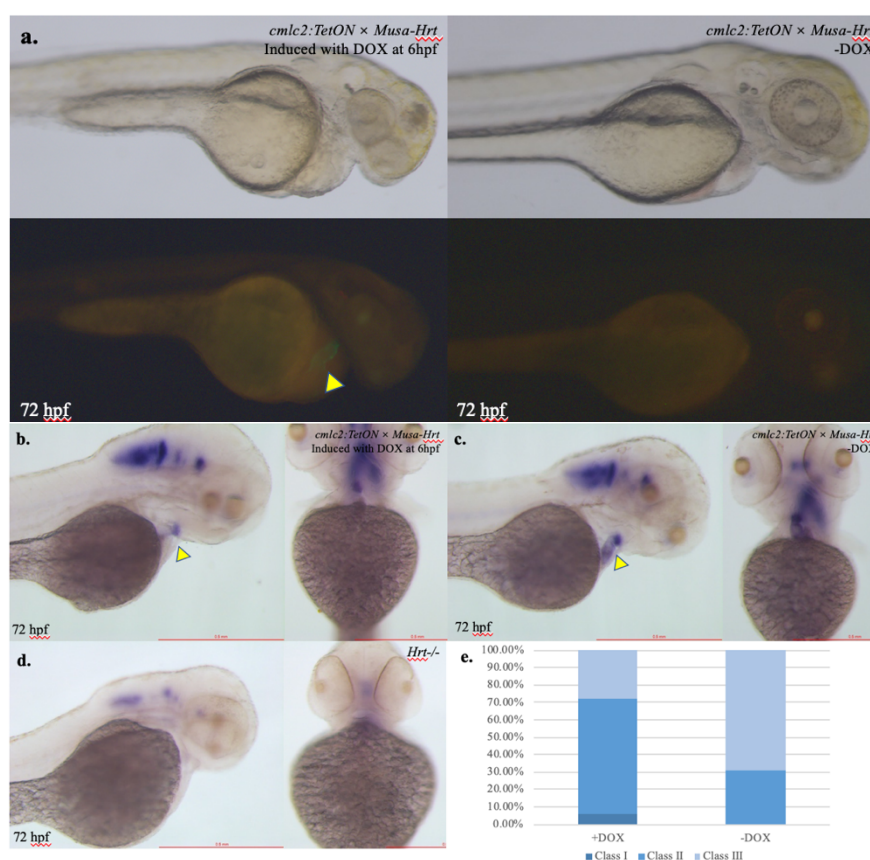


图 3.7 TetON-Cas9 系统在幼鱼中实现心肌特异性基因敲除

- 左为加 DOX 诱导的 F1', 在心肌表达绿色荧光, 在晶状体表达绿色和红色荧光; 右为不加 DOX 诱导的 F1', 仅在晶状体表达绿色和红色荧光
- 加 DOX 诱导的 F1' 在 72hpf 对 *Hrt* 基因的原位杂交结果, 仅在心脏部位染色较浅; 箭头所指为心脏区域
- 未加 DOX 诱导的 F1' 在 72hpf 对 *Hrt* 基因的原位杂交结果, 表达部位染色结果都较深; 箭头所指为心脏区域
- Hrt* 纯合缺失的突变体斑马鱼在 72hpf 对 *Hrt* 基因的原位杂交结果, 其各组织的染色结果均较浅
- 针对实验组和对照组斑马鱼心脏部位染色深浅程度的统计结果: 其中 Class I 代表染色最浅, Class II 代表中等, Class III 代表染色最深

此外，我们还将一部分未加药诱导的 F1' 养至成鱼，年龄大约为 3 个月。将 DOX 用腹腔注射的方式在成体斑马鱼中诱导 Cas9 的表达，每次注射 50mg，连续注射七天后取出心脏，可观察到加药后成鱼 F1' 的心脏呈现绿色荧光。将心脏消化后提取基因组 DNA，同时收集其肌肉和尾鳍部位组织进行基因组提取作为对照，利用 T7E1 assay 检测 Hrt 基因突变的效率，电泳结果显示受诱导的 F1' 其心脏组织的 Hrt 基因产生了突变，而肌肉和尾鳍部位的 Hrt 基因并没有发生突变。此外，取成体加药诱导的 F1' 和等量未加药诱导的 F1' 进行心脏冷冻受损手术，术后第八天取出心脏制作心脏冷冻切片，利用 PCNA-mef2c 切片免疫荧光染色的方法测定斑马鱼心脏再生能力。经数点统计后，我们发现加药后 F1' 的心脏再生水平较对照组明显降低，和文献中所报道的抑制 Hrt 基因可导致心脏再生减弱的现象一致(图 3.8)。这两个实验结果都说明在斑马鱼成体时期，TetON-Cs9 系统依然可以在心肌特异性地诱导基因敲除。

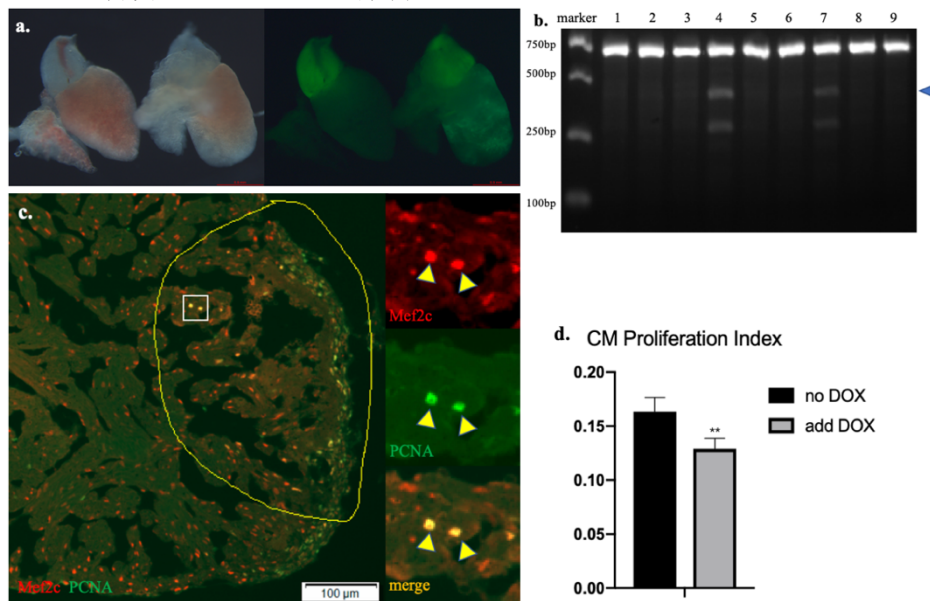


图 3.8 TetON-Cas9 系统在成鱼中实现心肌特异性基因敲除

- 左为不加 DOX 诱导的 F1' 心脏，不表达绿色荧光；右为加 DOX 诱导的 F1' 心脏，在心室高表达绿色荧光蛋白
- 泳道 1、2、3，分别为野生型成鱼心脏、肌肉、尾鳍的 *Hrt* 基因片段 PCR 的 T7E1 结果；泳道 4、5、6，分别为 DOX 诱导的 F1' 成鱼心脏、肌肉、尾鳍的 *Hrt* 基因片段 PCR 的 T7E1 结果；泳道 7、8、9 为重复；箭头为预期的切割条带
- 心脏受损后八天，冷冻切片的 PCNA-mef2c 荧光照片，其中红点代表 mef2c，绿点代表 PCNA，橙色点代表 PCNA-mef2c 共定位
- 在距离受损区域的 150μm 范围进行画圈，数圈内红点数目代表心肌细胞总数，数红绿共染点数目代表再生中的心肌细胞，将再生心肌细胞数除以总心肌细胞数，可得到心肌细胞增殖系数，对加药和非加药组的心脏进行增殖系数的统计，绘制柱状图，其中 $p < 0.01$

四、讨论

本文中我们成功构建了基于 TetON-CRISPR/Cas9 系统的斑马鱼时空特异性基因敲除方法，并且以 *wnt8a*、*hrt* 基因为目标基因，在嵌合体、杂合体幼鱼及成鱼中都验证了该敲除方法的可行性和特异性，也为今后在斑马鱼模型中研究发育后期生物活动相关基因提供了新的思路和手段。值得注意的是，理论上该系统可连接多个 gRNA 靶点，若连接若干个不同基因的 gRNA，则可以一次性实现多基因敲除，进一步提高调控的广度；若连接同一基因的多个靶点的 gRNA，则可以在一定程度上造成单一基因的大片段缺失，同时减少非同源连接时 3bp 修复的可能性，进而提高基因敲除的效率。

此外，TetON-CRISPR 系统可以结合目前最新报道的一系列新型的 CRISPR 蛋白，在功能上实现更高精度更细微的调节。受限于 CRISPR/Cas9 蛋白的切割效率以及切割后修复的不确定性，很容易出现 3bp 的倍数修复等现象，在敲除效率上较低，表型观察较为困难。为了改善这一现象，我认为可以在该系统中尝试以下几种改良后的 CRISPR 蛋白：dCas9-BE3、KRAB-dCas9 和 CRISPR-Cas13a。dCas9-BE3 的原理是利用改造后的腺嘌呤脱氨酶和剪切活性失活的 cas9 蛋白联用^[14]，在特定的基因位点处实现单碱基的替换，从而可以更高精度地控制敲除后的基因序列而非依赖于双链断裂后的非同源修复。在 TetON-CRISPR 系统中使用 dCas9-BE3 可以在一定程度上保证敲除后的序列一致性，能有效提高成功敲除的概率，同时也能减少个体间敲除水平的差异。KRAB-dCas9 则是利用组蛋白转甲基化酶和 dCas9 联用，通过表观遗传的方法抑制目的基因的转录活性^[15]，避免了基因组的损伤，也可以保证加药诱导后的表型一致性。CRISPR-Cas13a 作为一种由 RNA 引导、靶向 RNA 的 VI 型 CRISPR 蛋白，可以在 RNA 水平上实现基因的敲低^[16]，结合 TetON-CRISPR 系统使用可以更加精确地控制 RNA 剪切的时间点和组织器官部位，也能对 lncRNA 等非编码 RNA 的研究提供新的平台。

在本文的设计中，基因敲除的时空特异性分别依赖于 DOX 的加入时间和组织特异性启动子的使用。由于荧光蛋白具有一定的成熟时间，大概需要在 72hpf 才可以观察到绿色荧光的表达，因此较难把握从 DOX 诱导后到 Cas9 蛋白发挥功能的时间间隔，所以该方法针对发育早期特定基因功能的研究会有一定的缺陷。

除此之外，由于 TetON 蛋白的表达依赖于组织特异性启动子，而不同启动子受激活的时间也存在较大的差异，以上述所使用的 **cmlc2** 启动子为例，其激活的时间点较 **ubb** 启动子较晚，而 **hrt** 基因仅在心脏发育早期发挥重要的作用，其表达量在发育中后期明显下降。因此，利用 **cmlc2** 启动子表达 TetON 蛋白进而诱导表达 Cas9 蛋白敲除 **hrt** 基因的时间点，可能相对于 **hrt** 基因发挥作用的时间节点偏后，所以无法在发育早期抑制 **hrt** 蛋白发挥作用，这也能在一定程度上解释为什么 **hrt** 基因表达量下调明显但对于心脏发育的影响并不显著。

参考文献

1. Mary C. Mullins and Christiane Nusslein-Volhard. Mutational approaches to studying embryonic pattern formation in the zebrafish. *Curr Opin Genet Dev.* (1993)3, 648-654.
2. Alan Y. Hsu. et al. Overexpression of microRNA-722 fine-tunes neutrophilic inflammation by inhibiting Rac2 in zebrafish. *Disease Models & Mechanisms.* (2017)10, 1323-1332.
3. Matthew Gemberling, Travis J. Bailey, David R. Hyde, Kenneth D. Poss. The zebrafish as a model for complex tissue regeneration. *Trends in Genetics.* (2013)29, 611-620.
4. Cindy N. Chiu. et al. A Zebrafish Genetic Screen Identifies Neuromedin U as a Regulator of Sleep/Wake States. *Neuron.* (2016)89, 842-856
5. Charles K. Kaufman. et al. A zebrafish melanoma model reveals emergence of neural crest identity during melanoma initiation. *Science.* (2016)351, 464.
6. Kotaro Sugimoto, Subhra P Hui, Delicia Z Sheng, Kazu Kikuchi. Dissection of zebrafish shha function using site-specific targeting with a Cre- dependent genetic switch. *eLife.* (2017)6, e24635.
7. Leonard Burg. Conditional mutagenesis by oligonucleotide-mediated integration of loxP sites in zebrafish. *PLOS Genetics.* (2018)14, e1007754.
8. Hyongbum Kim and Jin-Soo Kim. A guide to genome engineering with programmable nucleases. *Nat Rev Genet.* (2014)15, 321-334.
9. Alexander Hruscha. et al. Efficient CRISPR/Cas9 genome editing with low off-target effects in zebrafish. *Development.* (2013)140, 4982-4987.
10. Charles E. Vejnar. et al. Optimized CRISPR–Cas9 System for Genome Editing in Zebrafish. *Cold Spring Harb Protoc.* (2016)98, 856-870.
11. Daniel Wehner, Christopher Jahn, Gilbert Weidinger. Use of the TetON System to Study Molecular Mechanisms of Zebrafish Regeneration. *Journal of Visualized Experiments.* (2015)100, e52756.
12. Fei Lu, Adam Langenbacher, Jau-Nian Chen. Tbx20 drives cardiac progenitor formation and cardiomyocyte proliferation in zebrafish. *Developmental Biology.* (2017)421, 139-148.
13. Richard W. Naylor. et al. Wnt8a expands the pool of embryonic kidney progenitors in zebrafish. *Developmental Biology.* (2017)425, 130-141.
14. Wei Qin. et al. Precise A•T to G•C base editing in the zebrafish genome. *BMC Biology.* (2018)16, 139.
15. Henriette O’Geen. et al. Ezh2-dCas9 and KRAB-dCas9 enable engineering of epigenetic memory in a context-dependent manner. *Epigenetics & Chromatin.* (2019)12, 26.
16. Omar O. Abudayyeh. et al. RNA targeting with CRISPR–Cas13. *Nature.* (2017)550, 280-284.

致谢

光阴荏苒，转眼间在复旦已度过了四个年头，而我也从刚入校园懵懂无知的少年成长为一名具有独立思考能力的毕业生，更是获得了赴美攻读博士学位的机会，在这里我想要感谢很多人。

首先要感谢的是我的导师张瑞霖教授和邓卿教授，是你们给予了我科研道路上的引导和指点，悉心指导我课题的选择、设计和开展，也为我博士项目的申请做出了强有力的推荐。

再者，我还要感谢我的师兄黎家成和师姐房娅博，是你们手把手教会我实验的各种操作，斑马鱼活体上的实验十分考验技巧，我也常常会把样品搞砸，而你们从来没有埋怨反而是耐心给予我帮助，真的让我特别感动。

我还要感谢孙建建师兄、李国保师兄和理文琰师姐对我实验上的帮助，感谢室友蔡毅鸣同学和杨杰同学对我生活上的帮助，感谢辅导员周薪吉、各位任课老师、各位同学对我成长的帮助。没有你们，也就没有我这么丰富多彩的四年大学生活。感谢我的父母和亲人，你们永远是我坚实的后盾。

最后我要特别感谢我的恋人张弛，是你的陪伴帮助我度过了一个又一个的难关，也是你的鼓励支持我在学业上取得了一个又一个的成就。希望我们可以早日修成正果，在未来一起坚定地走下去。