

DOI: 10.13376/j.cblls/2015005

文章编号: 1004-0374(2015)01-0026-04



杜久林, 博士, 中科院神经科学研究所和脑科学卓越创新中心高级研究员, 神经科学国家重点实验室副主任, 国家杰出青年基金、中科院百人计划、上海市优秀学术带头人等获得者, 科技部重大科学研究计划项目首席科学家。创建多项国际领先的斑马鱼在体研究技术, 从突触-神经元-环路-行为的研究策略出发, 以视觉系统为切入点, 在全脑尺度上研究感觉-运动的神经机制以及神经调质系统的功能, 特别侧重于神经环路功能联结图谱的研究; 同时拓展交叉研究方向, 探索脑血管网络的发育规律及其神经调节; 取得系列原创性研究成果, 论文主要发表在 *Neuron*、*Developmental Cell*、*PLoS Biology*、*Circulation Research*、*Nature*、*PNAS* 等期刊上。指导的研究生多人获得多种国际或国内学术奖励, 包括 2 人获吴瑞奖等。

CRISPR/Cas9技术在斑马鱼基因修饰中的应用

李 佳*, 杜久林*

(中国科学院上海生命科学研究院神经科学研究所中国科学院脑科学卓越创新中心神经科学国家重点实验室, 上海 200031)

摘 要: CRISPR/Cas9 系统的应用促进了基因编辑技术的快速发展, 现已成功地在不同模式生物中实现了高效的基因修饰, 包括 DNA 序列的点突变、大片段删除以及外源基因的定向插入等。现就 CRISPR/Cas9 系统在斑马鱼模式动物中建立基因敲除和敲入品系的最新研究进展作一综述。

关键词: CRISPR/Cas9; 斑马鱼; 基因修饰; 基因敲除; 基因敲入

中图分类号: Q789; Q819 **文献标志码:** A

CRISPR/Cas9-mediated genomic editing in zebrafish

LI Jia*, DU Jiu-Lin*

(State Key Laboratory of Neuroscience, Center for Excellence in Brain Science, Institute of Neuroscience, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

Abstracts: The CRISPR/Cas9 system greatly accelerates the development of genomic engineering, and has been widely applied in many model organisms to induce point mutation, DNA fragment deletion, and exogenous sequence insertion. In this review, we briefly summarize the recent progresses of the generation of knockout and knockin zebrafish.

Key words: CRISPR/Cas9; zebrafish; gene editing; knockout; knockin

斑马鱼作为一种相对新颖的模式脊椎动物, 在生命科学诸多研究领域已显示出其独特的优势和广阔的前景^[1]。斑马鱼幼鱼小巧而透明、发育迅速, 使得我们可以借助于先进的成像手段, 直接在活体

动物上观察器官发育、细胞迁移、蛋白质定位、染

收稿日期: 2014-10-16

*通信作者: E-mail: lijia@ion.ac.cn (李佳); forestdu@ion.ac.cn (杜久林)

染色体动态变化等不同时空尺度上的生物学过程。为了进一步揭示这些生命过程背后的分子机制, 则需依赖于多种遗传突变品系和转基因品系的斑马鱼。

建立斑马鱼基因突变品系的经典策略是运用前向遗传学手段 - 化学诱变的方法, 在基因组上随机产生点突变, 然后根据后代的表型进行筛选, 最终通过定位和测序确定受到影响的具体基因^[2]; 但由于该方法在基因组中产生的点突变是随机的, 且基因定位的工作量大, 建立一个特定的突变品系往往需要较长的时间。为了高效而迅速地实现特定基因的敲除, 定向基因操作技术就显得十分关键。

1 定点基因修饰技术

锌指核酸酶 (zinc-finger nuclease, ZFN) 和转录激活因子样效应因子核酸酶 (transcription activator-like effector nuclease, TALEN) 这两种核酸酶技术的出现, 使得定向基因操作得以实现^[3-4]。这两者都是以 DNA 引导的二聚体形式发挥功能。其中每个单体包括特异的 DNA 结合结构域和非特异的 DNA 切割结构域。前者负责确定切割位置, 后者负责对 DNA 双链分子进行切割, 形成 DNA 双链断裂 (double-strand break, DSB), 然后激活内源的非同源末端连接修复机制 (non-homologous end joining, NHEJ), 产生基因序列的随机缺失或插入 (indel), 破坏基因的读码框^[3,5]。然而, 由于以二聚体的形式才能发挥功能, ZFN 和 TALEN 靶点的设计需要同时考虑两个相互靠近的靶点, 并且要借助商业化的试剂盒来完成复杂的模块化组装 (modular assembly) 来构建质粒元件。因此, 靶点设计复杂和合成繁琐的缺点制约了 ZFN 和 TALEN 技术的普及。

新近出现的基于细菌 / 古细菌的一种获得性免疫系统改造而成的 CRISPR/Cas9 技术, 以其设计简单、制备方便、作用高效等优势, 迅速取代了 ZFN/TALEN 技术。CRISPR/Cas9 是一种由单导向 RNA (single guide RNA, sgRNA) 介导的定向基因编辑技术, 以单体形式发挥作用, 只需要一个靶点即可完成对特定序列的切割。它的具体原理是 crRNA (CRISPR-derived RNA) 与 tracrRNA (transactivating RNA) 结合形成 tracrRNA/crRNA 复合物, 引导具有核酸酶活性的 Cas9 蛋白在与 crRNA 配对的序列靶位点处剪切 DNA 双链, 形成 DSB, 借助 NHEJ 修复机制, 产生基因序列的缺失或者增加。通过人工改造, 将上述两种 RNA 构建成嵌合体 RNA, 可以形成具有定向作用的 sgRNA, 引导 Cas9

蛋白对基因组 DNA 进行定点切割^[6]。sgRNA 设计简单, 一般为 20 个碱基, 只要满足 3' 端紧接 NGG (N 为任意碱基) 序列即可。sgRNA 质粒的构建不需要复杂的模块组装, 只需插入靶点序列 DNA 的 20 个碱基即可完成, 然后通过 T7 或者 U6 启动子转录合成 sgRNA 即可。这极大地简化了设计和合成基因编辑元件的过程, 使得 Cas9 系统在小鼠、果蝇、线虫等模式生物上被广泛使用^[7-11]。

2 CRISPR/Cas9介导的斑马鱼基因敲除技术

美国 Joung 教授实验室首次将 Cas9 系统应用于斑马鱼基因组编辑的研究。他们将 Cas9 mRNA 和基因特异的 sgRNA 共同显微注射到一细胞期的斑马鱼受精卵中, 实现了对基因组的靶向操作, 在特定基因位点处产生了碱基缺失和插入的不同形式的突变^[12]。北京大学熊敬维教授实验室几乎在同一时间报道了运用 Cas9 系统在斑马鱼中进行特定基因敲除 (Knockout, KO) 的方法^[13]。他们用 Cas9 系统对参与血管发育的 *etsrp* 基因的第二个外显子进行定向操作, 破坏其蛋白翻译的读码框, 由此产生的突变体的血管发育出现异常, 表型与已有的化学诱变产生的突变体的一致。同时, 他们利用 Cas9 对参与心脏发育的重要基因 *gata5* 的第二个外显子进行定向破坏, 产生了心脏发育异常的突变体。除了利用 Cas9 进行小片段 DNA 突变外, 北京大学张博教授实验室通过在一条染色体上设计一对 Cas9 位点, 实现了大片段 DNA (上百个到百万个碱基) 的剪切或倒置^[14]。这种同时利用两个 sgRNA 进行基因组编辑的方法, 能对多个外显子进行整体敲除, 最大限度地实现了对基因组的破坏, 在制备基因敲除模型上更有优势。Cas9 的高效性不但确保了在体细胞内对基因进行突变, 而且也能同时造成生殖细胞的突变, 从而将突变的基因遗传到下一代。Schmid 实验室的研究表明, 在 Cas9 显微注射的受精卵中, 有 11% ~ 43% 能够发育成为 F0, 产生稳定的突变品系^[15]。因此, 结合斑马鱼幼鱼发育快的特点, Cas9 对基因读码框序列破坏的高效性使得我们可以在短时间内建立稳定可遗传的突变斑马鱼品系, 这将有力推动基因功能的研究。

3 CRISPR/Cas9介导的斑马鱼基因敲入技术

基因敲入 (Knockin, KI) 技术是将一段外源的 DNA 序列插入到基因组的特点序列中, 使其在生物体内表达, 以实现对内源基因的操作或标记。

例如, 通过将两个 *LoxP* 序列定向添加到特定基因的内部, 同时结合细胞特异性的 Cre 蛋白的表达, 即可实现组织特异性的条件性基因敲除 (conditional knockout, cKO), 从而可以研究这些基因在特定类型细胞中的生物学功能^[16]。另一方面, 通过基因敲入方法将报告基因 (如荧光蛋白 GFP、转录激活蛋白 Gal4 等) 定向地插入到基因组中, 使得转基因斑马鱼品系的建立更为便捷。

传统建立转基因斑马鱼的方法, 需要构建包含目的基因启动子的质粒, 用于驱动外源蛋白的特异表达; 但在斑马鱼中, 基因启动子往往很长, 几十到几百 kb。因此, 在构建启动子的质粒上需要用 BAC 同源重组等复杂的技术, 耗时数月, 且成功率低。另外, 体外构建的启动子由于长度限制, 往往只能包含内源性启动子的一部分, 往往会丢失内源性的某些重要的其他顺式元件的特异调控 (如增强子、沉默子等其他调控序列), 因而制备的转基因斑马鱼有非特异表达的情况。通过定向敲入技术, 可以利用基因的内源启动子驱动表达, 既可以省去构建启动子质粒的繁琐过程, 又能确保其表达的高度特异性。因此, 要特异地标记不同的细胞类型和蛋白质, 建立高效的斑马鱼基因敲入技术就十分必要。

与成熟的基因敲除技术相比, 定向基因敲入在斑马鱼中的应用刚刚起步。制约的因素主要是体外培养和操作斑马鱼胚胎干细胞技术还不具备, 现阶段也无法实现斑马鱼的代孕和嵌合体斑马鱼的产生。因此, 目前还无法运用小鼠中常用的同源重组体外打靶的方法建立斑马鱼基因敲入品系。同时, 由于细胞本底水平的同源重组效率非常低, 如果只将包含左右同源臂的打靶载体注射到受精卵中, 很难实现在体水平的基因敲入。然而, 如果利用基因组产生的 DSB, 可以使同源重组的效率提高若干个数量级^[17]。加拿大 Ekker 教授实验室的研究表明, 通过 TALEN 系统在基因组产生 DSB, 同时以单链 DNA 作为模板, 可以将短片段的外源 DNA 序列 (如 *EcoRV* 和 *mLoxP*) 定点插入到基因组中, 并且这种插入能通过生殖细胞遗传到下一代, 效率达 10% 左右。张博教授实验室用同样的方法, 在斑马鱼 *tyrosine hydroxylase* (*th*) 基因中产生 DSB, 成功地将大片的绿色荧光蛋白 EGFP 的 DNA 序列插入到 *th* 的外显子内。EGFP 的插入可成功地遗传到下一代, 但效率较低 (约 1.5%)。这些工作表明, 插入片段越大, 其通过同源重组整合到基因组中的效

率就越低。随后的功能分析发现, 由于 EGFP 插入 *Th* 蛋白的读码框中, EGFP 序列后面缺乏 3' 调控元件, 使得 *Th*-EGFP 的 mRNA 不稳定, 在细胞内被迅速降解, 导致 *Th* 和 EGFP 都无法表达, 间接形成了 *th* 基因敲除的品系。效率低和内源基因功能的破坏, 限制了这类方法在斑马鱼中的推广。

相比于 TALEN, Cas9 系统高效切割 DNA 产生 DSB 的特点为基因敲入提供了更简单的途径。美国 Jaenisch 教授实验室首先在小鼠中应用 Cas9 系统中实现了大片段 DNA 的定点插入^[18]。他们将 Cas9 mRNA、sgRNA 和模板质粒共同注射到一细胞期小鼠受精卵中, 通过同源重组机制, 将大片段的报告基因插入到 *Nanog* 和 *Oct4* 基因的 3' 端, 成功地实现了对胚胎干细胞和被靶向基因表达的蛋白标记^[18]。目前, 运用相似策略在斑马鱼中实现大片段 DNA 敲入的方法还未建立, 其中一个可能的原因是斑马鱼受精卵在一细胞期停留时间很短, 只有十几分钟 (小鼠则有数小时), 如此短的时间窗口难以实现 Cas9 蛋白高效切割 DNA 形成 DSB, 并介导同源重组的发生, 因而整合效率也就很低。另一个可能的原因是, 斑马鱼的基因组背景相对复杂, 近交品系基因组序列的纯合度不够, 克隆序列一致的长片段同源臂比较困难。这两点制约了利用同源重组整合的方法建立斑马鱼定点基因敲入。

在斑马鱼早期发育阶段, NHEJ 效率是同源重组的 10 倍以上^[19]。在细胞系中, 科研人员通过 TALEN 诱导 DSB 介导的 NHEJ 的机制, 高效地将环状质粒定点插入到基因组中^[20]。这种方法不但高效, 而且避开了克隆构建同源臂的步骤, 只需在质粒中引入产生 DSB 的位点即可。法国 Bene 教授实验室通过在斑马鱼一细胞期受精卵中同时注射 Cas9 mRNA、sgRNA 和含有 Cas9 识别位点的 Gal4 质粒, 通过 NHEJ 机制, 成功地将 Gal4 序列插入到转基因斑马鱼的 GFP 基因中。借助 UAS::RFP 转基因品系, 在体直接观察到荧光从绿色转变为红色, 效率高达 75%。同时, 他们也针对内源基因 *kif5aa* 进行了定向敲入, 将 Gal4 插入到其外显子中, 效率达 9.6%^[21]。这种方法虽然简单高效, 但由于外源质粒插入到目标基因的外显子中, 从而破坏了目标基因的读码框, 造成该基因功能的破坏, 影响基因敲入的后续功能分析。日本 Higashijima 教授实验室利用类似的策略, 将含有热激启动子和 Gal4 序列的质粒插入到内源基因起始密码子的 5' 端, 实现了对内源基因的高效标记^[22]。然而, 由于基因整合的位

点发生在内源基因启动子和基因读码框之间, 顺式调控元件的完整性被破坏, 从而降低基因表达的特异性, 最终会影响后续基因功能的相关研究^[22]。因此, 未来的攻克方向应该在保持高效特异的同时, 使得外源 DNA 序列的插入不破坏内源目标基因的完整性。例如, 通过在基因内含子中设计 Cas9 靶点的策略, 可以避免三联子的翻译错码, 既能保证读码框的完整性, 又能使得敲入效率提高3倍。另外, 由于是将整个质粒插入到基因组, 为了将质粒骨架的多余部分去除, 可以在质粒上引入 *LoxP* 或者 *FRT* 序列等。

4 展望

近两年基因编辑技术发展的突飞猛进, 使得对斑马鱼基因组进行操作变得更为简单高效。利用 Cas9 系统进行斑马鱼基因的突变技术, 已很成熟, 成为在体研究斑马鱼基因功能的必备工具。同时, 针对斑马鱼的基因敲入技术也正逐渐发展起来。结合斑马鱼幼鱼透明的特点, 基因编辑技术必将为在体研究发育等动态过程的分子机制揭开新的篇章。

[参 考 文 献]

- [1] Lieschke GJ, Currie PD. Animal models of human disease: zebrafish swim into view. *Nat Rev Genetics*, 2007, 8(5): 353-67
- [2] Patton EE, Zon LI. The art and design of genetic screens: zebrafish. *Nat Rev Genetics*, 2001, 2(12): 956-66
- [3] Doyon Y, McCammon JM, Miller JC, et al. Heritable targeted gene disruption in zebrafish using designed zinc-finger nucleases. *Nat Biotechnol*, 2008, 26(6): 702-8
- [4] Bedell VM, Wang Y, Campbell JM, et al. *In vivo* genome editing using a high-efficiency TALEN system. *Nature*, 2012, 491(7422): 114-8
- [5] Zu Y, Tong X, Wang Z, et al. TALEN-mediated precise genome modification by homologous recombination in zebrafish. *Nat Methods*, 2013, 10(4): 329-31
- [6] Mali P, Esvelt KM, Church GM. Cas9 as a versatile tool for engineering biology. *Nat Methods*, 2013, 10(10): 957-63
- [7] Cong L, Ran FA, Cox D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 2013, 339(6121): 819-23
- [8] Mali P, Yang L, Esvelt KM, et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*, 2013, 339(6121): 823-26
- [9] Wang H, Yang H, Shivalila CS, et al. One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell*, 2013, 153(4): 910-8
- [10] Friedland AE, Tzur YB, Esvelt KM, et al. Heritable genome editing in *C. elegans* via a CRISPR-Cas9 system. *Nat Methods*, 2013, 10(8): 741-3
- [11] Gratz SJ, Cummings AM, Nguyen JN, et al. Genome engineering of *Drosophila* with the CRISPR RNA-guided Cas9 nuclease. *Genetics*, 2013, 194(4): 1029-35
- [12] Hwang WY, Fu Y, Reyon D, et al. Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(3): 227-9
- [13] Chang N, Sun C, Gao L, et al. Genome editing with RNA-guided Cas9 nuclease in zebrafish embryos. *Cell Res*, 2013, 23(4): 465-72
- [14] Xiao A, Wang Z, Hu Y, et al. Chromosomal deletions and inversions mediated by TALENs and CRISPR/Cas in zebrafish. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41(14): e141
- [15] Hruscha A, Krawitz P, Rechenberg A, et al. Efficient CRISPR/Cas9 genome editing with low off-target effects in zebrafish. *Development*, 2013, 140(24): 4982-7
- [16] Capecchi MR. Gene targeting in mice: functional analysis of the mammalian genome for the twenty-first century. *Nat Rev Genet*, 2005, 6(6): 507-12
- [17] Egli D, Hafen E, Schaffner W. An efficient method to generate chromosomal rearrangements by targeted DNA double-strand breaks in *Drosophila melanogaster*. *Genome Res*, 2004, 14(7): 1382-93
- [18] Yang H, Wang H, Shivalila CS, et al. One-step generation of mice carrying reporter and conditional alleles by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell*, 2013, 154(6): 1370-9
- [19] Liu J, Gong L, Chang C, et al. Development of novel visual-plus quantitative analysis systems for studying DNA double-strand break repairs in zebrafish. *J Genet Genomics*, 2012, 39(9): 489-502
- [20] Maresca M, Lin VG, Guo N, et al. Obligate ligation-gated recombination (ObLiGaRe): custom-designed nuclease-mediated targeted integration through nonhomologous end joining. *Genome Res*, 2013, 23(3): 539-46
- [21] Auer TO, Duroure K, De Cian A, et al. Highly efficient CRISPR/Cas9-mediated knock-in in zebrafish by homology-independent DNA repair. *Genome Res*, 2014, 24(1): 142-53
- [22] Kimura Y, Hisano Y, Kawahara A, et al. Efficient generation of knock-in transgenic zebrafish carrying reporter/driver genes by CRISPR/Cas9-mediated genome engineering. *Sci Rep*, 2014, 4: 6545