

• 综述 •

斑马鱼遗传操作进展

高煜, 刘家辉, 王新, 刘东

南通大学 教育部江苏省神经再生重点实验室, 江苏 南通 226001

高煜, 刘家辉, 王新, 等. 斑马鱼遗传操作进展. 生物工程学报, 2017, 33(10): 1674–1692.

Gao Y, Liu JH, Wang X, et al. Genetic manipulation in zebrafish. Chin J Biotech, 2017, 33(10): 1674–1692.

摘要: 斑马鱼已经成为在发育生物学与疾病模型研究中应用最广泛的实验动物之一, 其中多种遗传操作方法和高分辨率活体成像技术对斑马鱼的应用起了重要推动作用。斑马鱼在功能基因组学研究上有许多优势, 可以快速便捷地鉴定脊椎动物新基因的功能。本文尝试以示意图来简要总结应用于斑马鱼的遗传操作方法和基本原理, 包括 ENU 化学诱变筛选的基本原理和隐性突变 3 代筛选的流程, 逆转录病毒介导的插入突变的原理及其隐性突变 3 代筛选的流程, 转座子 Sleeping Beauty (SB) 和 Tol2 介导的基因捕获载体系统 (Gene-breaking transposon, GBT) 为基础的基因捕获突变的基本原理, Morpholino 介导的基因下调和 microRNA 下调技术, TILLING (Targeting induced local lesions in genomes) 技术和 CEL1 分析的基本原理和实验流程, 锌指核酸酶 ZFN (Zinc finger nuclease) 与 TALEN (Transcription activator-like effector nuclease)、CRISPR/Cas9 定向基因失活的基本原理, 斑马鱼上广泛采用的转基因技术的几种类型等。

关键词: 斑马鱼, 遗传操作, 突变, 转基因, 转座子, 基因编辑

Genetic manipulation in zebrafish

Yu Gao, Jiahui Liu, Xin Wang, and Dong Liu

MOE Jiangsu Key Laboratory of Neuroregeneration, Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu, China

Abstract: The increasing number of genetic manipulation approaches and high-resolution live imaging technique applied in zebrafish have propelled the rise of this organism as a mainstream model for developmental biology and human diseases studies. Zebrafish has many advantages for functional genomics analysis, allowing for easy, cheap and fast functional characterization of novel genes in the vertebrate genome. Here we provide an overview of the principles of genetic

Received: May 5, 2017; **Accepted:** August 31, 2017

Supported by: Postgraduate Research Notation Project of Jiangsu Province Ordinary University (No. KYLX16-0964).

Corresponding author: Dong Liu. Tel: +86-513-85051593; Fax: +86-513-85511585; E-mail: liudongtom@gmail.com

江苏省普通高校学术学位研究生科研创新计划项目 (No. KYLX16-0964) 资助。

网络出版时间: 2017-09-06

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20170906.1058.003.html>

manipulation in zebrafish, such as Ethylnitrosourea (ENU) mutagenesis, insertional mutagenesis, gene trapping mutagenesis, Morpholino mediated gene knockdown, targeting induced local lesions in genomes (TILLING), genome editing with engineered nucleases ZFN (Zinc finger nuclease), TALEN (Transcription activator-like effector nuclease) and CRISPR/Cas9 system, and transgenic methods used in zebrafish.

Keywords: zebrafish, genetic manipulation, mutation, transgenic, transposon, gene editing

在过去的 20 多年里, 斑马鱼已经成为最广泛应用的实验动物之一, 这主要归功于在这种硬骨鱼上胚胎操作、遗传操作的可行性以及近年来流行的高分辨率成像技术。随着斑马鱼在发育生物学与疾病模型等应用领域的扩展, 针对斑马鱼的遗传操作方法取得了全新的发展; 起源于其他物种的遗传操作方法, 如诱变筛选也被引入到斑马鱼上。本文尝试以示意图的方式简要总结应用于斑马鱼的遗传操作方法, 对于这些方法的具体实验流程并未涉及, 如有需求可查阅相关参考文献。

1 斑马鱼基因组

斑马鱼的基因组为二倍体, 由 25 对染色体组成。这些染色体之间区分困难, 其组成 DNA 大约包含 1.4×10^9 个碱基, 大致为人类基因组的一半大小^[1-2]。据估计, 斑马鱼的基因组包含了大约 25 000 个已知的编码基因以及 6 000 个非编码基因^[2-4]。真哺乳亚纲 (Eutherian) 中不同物种间的基因组非常相似^[5-13]。通过荧光原位杂交和比较减数分裂图揭示, 在人类、猫、牛、猪和绵羊中整个染色体臂包含了几乎完全相同的一套遗传信息。因此在哺乳动物之间, 不仅有同源基因 (Orthologous genes) 还有同源染色体 (Orthologous chromosomes)。在一对同源染色体中, 基因排列的顺序具有可变性, 这也提示在基因组中染色体易位 (Chromosomal translocation) 比染色体倒位 (Chromosomal inversion) 发生的

频率更高^[14]。哺乳动物种间的染色体同源性让我们能够根据一个物种上基因的位置去预测另一个物种同源基因的位置。在进化上, 小鼠和人类的最后一个共同的祖先大约在 1 亿年前, 而斑马鱼和人类最后一个共同祖先大约在 4 亿 2 千万年前。我们能否用哺乳动物的基因位置来预测斑马鱼的基因位置, 或反之? 比较基因组学分析显示, 斑马鱼与哺乳动物基因组之间的共线性 (Synteny) 高度保守, 而且斑马鱼基因组与人类基因组之间的共线性比小鼠与人类基因组之间的共线性更强^[15], 可能是因为相比其他一些哺乳动物, 小鼠的基因组呈现出了大量的重排。斑马鱼和其他硬骨鱼的基因组分析揭示, 在硬骨鱼的物种大发生之前, 在大量基因丢失之后, 斑马鱼基因组经历了一次复制, 导致与其他哺乳动物的同源基因相比, 斑马鱼中大约 30% 的基因有两个拷贝, 许多人类染色体的片段在斑马鱼中也有两个拷贝, 这种现象在基因组的组装和基因功能研究中也得到了印证^[16]。在基因组中一个基因有两个位点, 针对研究的具体问题来说既可以是优点也可以是缺点。对于大多数已经研究的重复基因来说, 其表达调控区域是差异最大的部分。一般观点认为这些重复的基因在功能上是相似的, 但它们的时空表达是特异的。这在正向遗传学研究中可以被认为是优点, 因为单个基因的突变会产生比较特异的表型; 但是, 如果这对重复基因时空表达相同或者很相似, 就会造成功能的冗余和补偿。

当一个基因位点的突变被另一个拷贝所补偿,就会减弱或消除相应的表型,这将增加表型分析的难度。近年来,基于斑马鱼基因组特点,大量遗传学操作策略得以实现,包括正向遗传学、反向遗传学、转基因技术、光遗传学等^[17-22]。

2 正向遗传学

传统的遗传学策略大致可分为两类:正向遗传学 (Forward genetics) 和反向遗传学 (Reverse genetics)。正向遗传学是指通过生物个体或细胞的基因组的自发突变或人工诱变,寻找相关表型或性状的变化,然后从这些特定性状变化的个体或细胞中找到对应的突变基因,并揭示其功能^[18],包括 ENU 诱变^[23]、插入突变^[24]等技术。

2.1 ENU 诱变

突变筛选在早期对推动斑马鱼作为模式生物起了重要的作用,其中主要以乙基亚硝基脲 (Ethylnitrosourea, ENU) 诱发突变,其突变率高,从 20 世纪 90 年代中期一直延续到现在^[25-26]。多数发育异常的表型筛选需要通过几代的交配来得到纯合的隐性突变,显性突变个体在 F1 代就可以获得,其表型不能是胚胎致死,否则不能遗传到下一代。最早期的斑马鱼 ENU 大规模诱变筛选开始于两个实验室,一个是位于 Tübingen 的 Christiane Nüsslein-Volhard 实验室,另一个是位于 Boston/Freiburg 的 Wolfgang Driever 实验室,他们通过显微镜观察,筛选了大量的异常胚胎表型,其中 F3 代出现了纯合的隐性突变体,其研究结果发表于 1996 年 *Development*^[25,27-28]。突变筛选流程简要描述如图 1 所示。ENU 处理的雄性斑马鱼和野生型雌鱼侧交 (Out-cross),

产生大量的 F1 代个体,培养至成鱼,通过剪尾鳍的方法进行基因型鉴定,筛选突变体。筛选出的 F1 代可以通过不同的杂交方式产生 F2 代杂合突变携带者,例如 F1 代可以在品系内异性自交 (In-cross),增加 F2 代中突变基因组的数目;也可以用 F1 代品系与含有遗传多态性标志的完全不同的野生型品系进行侧交, F2 代繁殖的后代进行接下来 F3 代的连锁分析 (Linkage analysis)。F2 代个体之间自交将产生许多可以鉴别的胚胎

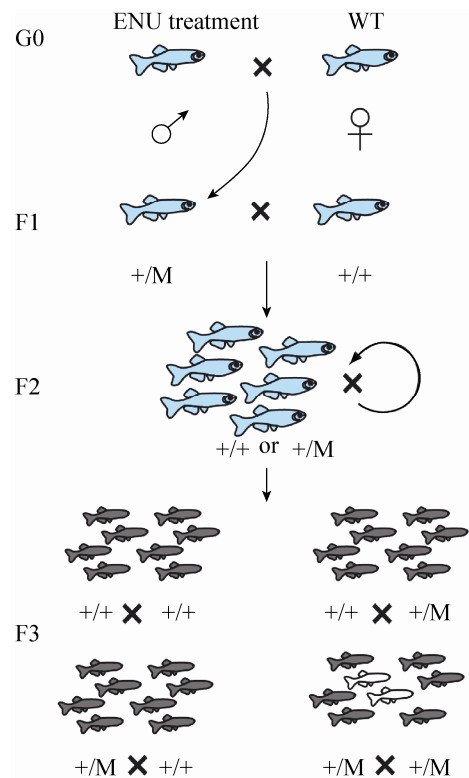


图 1 经典的 ENU 三代隐性突变筛选

Fig. 1 Classical ENU three-generation screen for recessive mutants. In the G0 generation, germline mutations are generated in males, which are out-crossed to generate F1 families. This F1 generation can be screened for nonlethal dominant mutations. F1 fish are out-crossed again to generate F2 families, whose members are in-crossed to generate F3 progeny. F3 embryos will then show recessive phenotypes.

表型, Tübingen 和 Boston 两个研究组得到了超过 6 000 个突变表型, 其中大约 1/3 与细胞分化、器官发生等有关^[27-28], 其余的大部分与发育延迟 (Developmental delay or growth retardation) 和坏死 (Necrosis) 相关^[29], 对一些特异性表型进行分析鉴定, 发现了大约 600 个不连续的位点与原肠胚形成、胚胎图式发生以及器官发生有关^[30-31]。

2.2 插入突变

2.2.1 逆转录病毒介导的插入突变

插入突变可以利用外源 DNA 作为诱变剂, 而插入的 DNA 片段可以作为分子标签来鉴定突变基因。插入突变的方法在突变发生技术中有丰富的历史, 可以使用多种不同的载体和方法^[24]。

插入突变的一个关键问题是突变产生的机制。在大多数脊椎动物基因组中外显子一般占 1%–2% 左右^[32], 插入基因组的片段要求对基因以及基因表达的产物没有任何影响, 或者影响很少。无论选择何种载体, DNA 随机插入基因组破坏外显子的几率都不高。突变插入可能有多种原因, 例如插入序列提前引入了终止密码子, 翻译提前终止, 或者表现在 RNA 水平导致 RNA 降解^[24,33]。在 ENU 大规模诱变筛选过后不久, MIT 的 Nancy H Hopkins 在斑马鱼上启动了逆转录病毒突变筛选, 此方法的基本原理是通过 DNA 片段的随机插入, 破坏基因的正常表达 (图 2)^[34-35]。这种筛选的优点是导致表型产生的

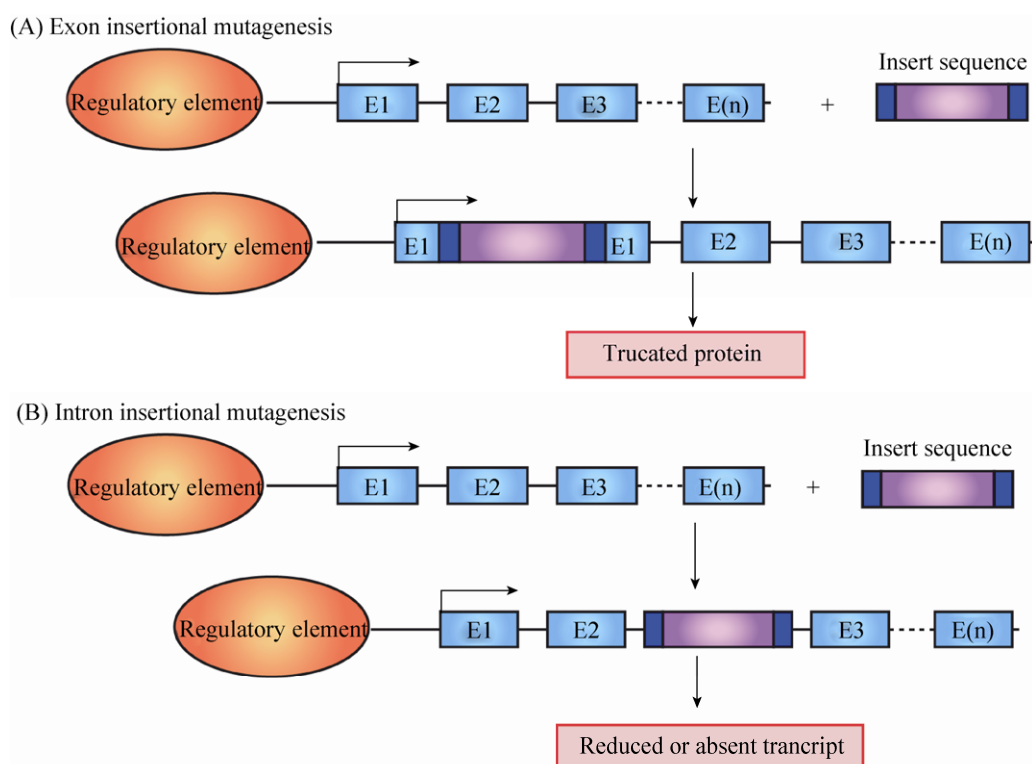


图 2 逆转录病毒插入突变的原理

Fig. 2 Mechanisms of retroviral-based insertional mutagenesis. (A) Integration of DNA into a coding exon can mutate the locus, resulting in a truncated gene product. (B) Retroviral insertional mutagenesis alters the tagged locus using multiple methods, including the loss of the encoding transcript. Transcriptional start sites are shown as an arrow above each diagram.

突变基因可以通过 PCR 来鉴定, 比较容易; 缺点是这种大片段 DNA 插入突变的效率远远低于 ENU 诱导的点突变。插入突变筛选的流程与 ENU 诱变的流程相似, 其筛选流程总结如下 (图 3)。在斑马鱼胚胎 1-2 细胞发育阶段, 显微注射外源 DNA 作为突变剂建立 F₀ 代, 通过 F₀ 代之间的交配, 得到用来筛选的 F₁ 代^[36-37]。从 F₁ 代中预筛选出插入拷贝数比较多的, 来提高下一代突变的频率。接下来的筛选类似于 ENU 诱变, 但这种筛选与 ENU 诱变相比需要更大的工作量。

2.2.2 转座子介导的基因捕获突变

基因捕获突变 (Gene-trap mutagenesis), 即通过随机插入报告基因到基因组中来研究基因的功能和表达。这种方法在应用于斑马鱼之前, 已经成功地在小鼠上实现捕获调控发育的相关基因、增强子和启动子^[38-41]。脊椎动物中 Sleeping Beauty (SB) 和 Tol2 转座子的发现和应用提高了外源 DNA 整合到基因组的效率^[42-43]。在转座酶 (Transposase) 存在的情况下, SB 和 Tol2 载体可以通过“剪切”和“粘贴”机制整合到基因组中 (图 4)^[44]。一般情况下认为, SB 和 Tol2 插

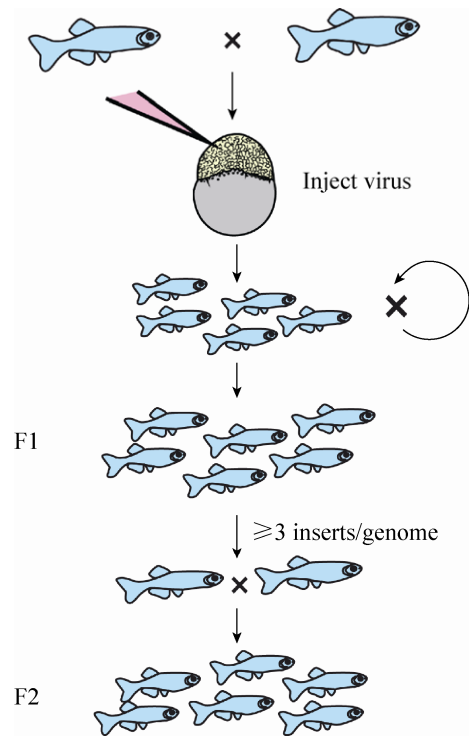


图 3 逆转录病毒介导的插入突变筛选流程

Fig. 3 Overview of screen for retroviral-based insertional mutagenesis. Pseudotyped virus is injected into 1 000-cell stage embryos to create a population of founders for subsequent breeding and mutant analysis. These F₂ families are screened as in ENU-based mutagenesis.

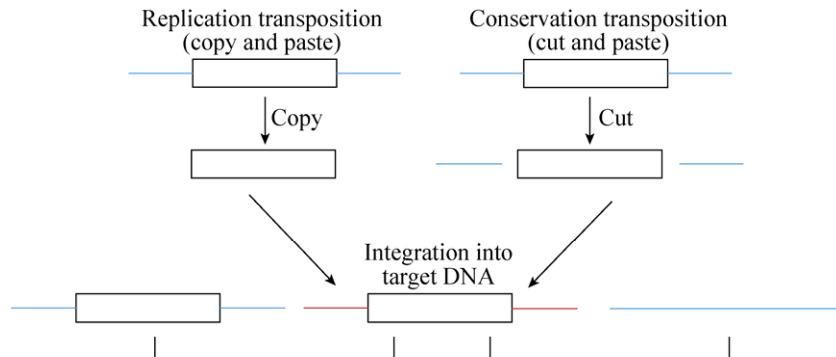


图 4 转座子介导的外源 DNA 片段插入的两种方式

Fig. 4 Mechanisms of transposition and general organization of class I and class II transposable elements. Replicative transposition involves amplification of the element by copying through transcription followed by reverse transcription. The newly synthesized copy is inserted elsewhere in the genome, but the donor element does not move. During conservative transposition, the element is excised from the donor DNA (blue), and integrates into a new target DNA (red).

入基因组是随机的方式,但是据一些报道称 SB 总是插入 TA 位点,而 Tol2 没有固定的偏爱的插入位点^[45]。目前,SB 和 Tol2 转座子介导的基因捕获突变方法在斑马鱼上得到较好的应用和发展^[46-50]。应用于斑马鱼的基因捕获载体(Gene-breaking transposon, GBT)系统至少包含一个 5'端的突变区和 3'端的报告基因区^[50],如图 5 所示。以 GBT 为基础的载体应用在基因捕获突变中,已经成功地产生了一些隐性突变体,如 *Tnnt2* 的突变体,其纯合子斑马鱼胚胎心脏停跳;此外也捕获了一系列基因的表达谱,例如特异表达于大脑、肌肉纤维和心脏等^[51]。

3 反向遗传学

反向遗传学是相对于正向遗传学而言的,在已知 DNA 序列的基础上,通过 DNA 重组、定点突变、插入/缺失等^[52-54]遗传学手段构建突

变体并研究突变造成的表型,从而研究基因的生物学功能,阐释生命现象和规律^[19]。

3.1 Morpholino 介导的基因下调和 microRNA 下调

目前, RNAi 在斑马鱼上的应用有待进一步研究^[55]。2011 年在非洲蟾蜍 (*Xenopus*) 上的研究发现限制 Ago2 蛋白活性,能够抑制 RNAi 和 miRNA 生物合成,暗示 RNAi 在斑马鱼上应用的可能性^[56],尽管还没有其他研究报道佐证。另一种吗啉环修饰的反义寡核苷酸 (Morpholino, MO) 介导的基因下调方法在非洲蟾蜍 (*Xenopus*) 和斑马鱼上得到了很好的应用。MO 的骨架中吗啉环取代了核苷酸中的脱氧核糖^[57-58], MO 下调基因表达通常有两种途径:一种是通过与编码区前 25 个碱基的 5'上游互补配对来抑制翻译,另一种是在细胞核内通过与剪切连接点 (Splice junctions) 或者剪切调控位

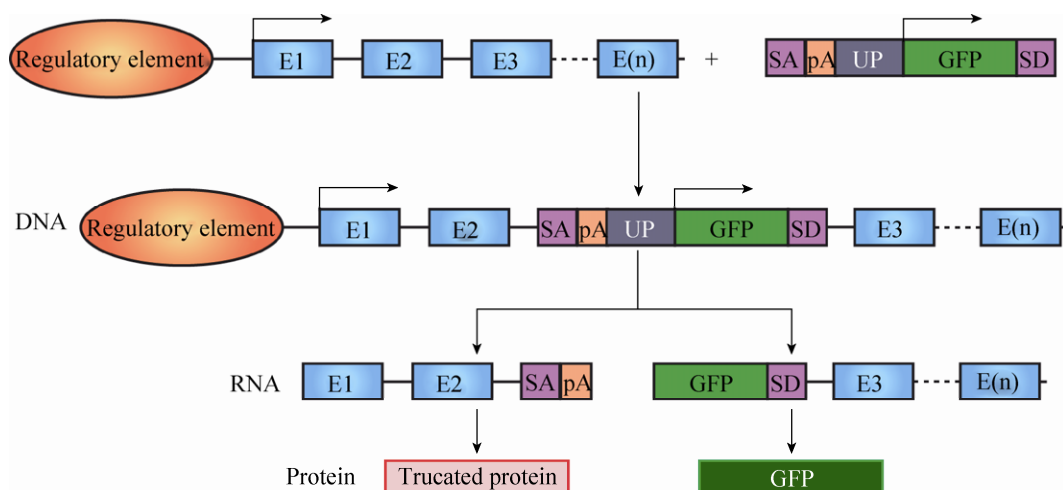


图 5 转座子介导的基因捕获突变

Fig. 5 Gene-trap mutagenesis using transposons. Based on 3' exon or poly(A) trapping methods, this approach uses two components: a transcriptional termination cassette to truncate the integrated locus and a separate 3' exon trap gene finding cassette. The schematized endogenous locus is represented by exons (E) and an endogenous regulatory element. Transcriptional start sites are shown as an arrow above each diagram. pA: polyadenylation signal; SA: splice acceptor; SD: splice donor; UP: ubiquitous promoter.

点 (Splice regulatory site) 互补配对来阻止 mRNA 前体 (Pre-mRNA) 的正确剪切, 可以造成外显子丢失、内含子或内含子的一部分保留在剪切产物中 (图 6)、移码突变或 mRNA 的降解^[59-60]等。MO 下调基因的效率可以通过检测蛋白的表达水平来验证, 对于修饰 mRNA 前体剪切的方式也可以通过 RT-PCR 来验证^[60] (图 6)。除此之外, MO 还可以用来抑制 microRNA (miRNA) 的生物合成及其功能^[61-62]。MO 既可以和 miRNA 的前体通过碱基互补配对在 Dicer 或者 Drosha 的剪切位点形成杂合双链, 阻止 miRNA 前体的剪切 (图 7); 也可以与 miRNA 和 mRNA 作用的靶位点通过碱基互补配对结合, 阻止

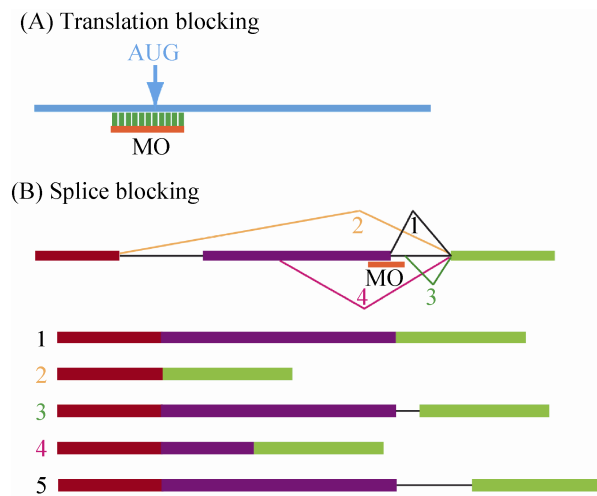


图 6 Morpholino 介导的基因下调通过两种途径

Fig. 6 Morpholino can modify splicing or block translation. (A) Morpholino can interfere with progression of the ribosomal initiation complex from the 5' cap to the start codon, and block translation. (B) Morpholino can interfere with pre-mRNA processing steps, and cause modified splicing, commonly excluding exons from the mature mRNA. Targeting some splice targets results in intron inclusions, while activation of cryptic splice sites can lead to partial inclusions or exclusions.

miRNA 对其靶分子的调控^[63] (图 7)。但是, MO 的应用也有许多的局限性, 下调基因表达的方式不是通过稳定的遗传操作, 所以其效率很不稳定, 而且维持时间也较短。通过显微注射到斑马鱼胚胎中的 MO, 一般认为只能维持 3 d 左右^[64-65]。通过 MO 产生的斑马鱼的表型有许多是由于其脱靶效应造成的, MO 的显微注射也会在很多情况下导致一些组织的细胞凋亡, 实验中可以通过共注射 p53 的 MO 来抑制这种副作用^[66]。

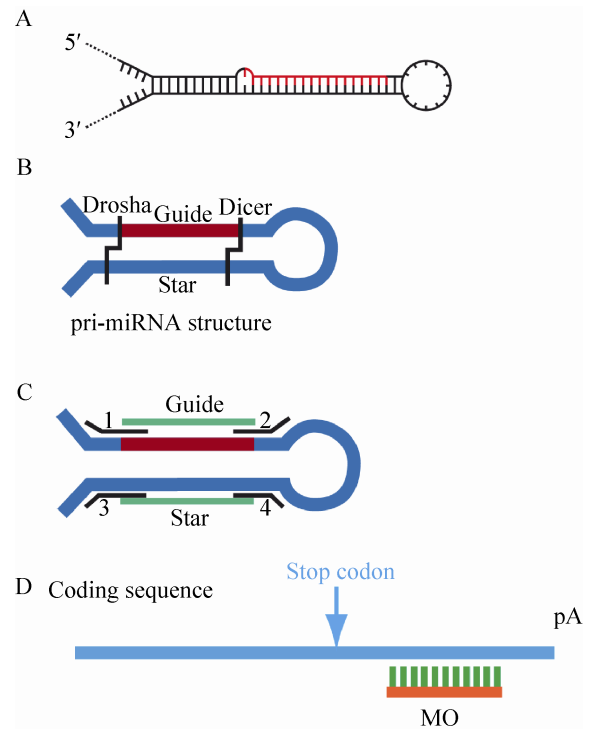


图 7 Morpholino 抑制 microRNA 的生物合成及其功能

Fig. 7 Morpholinos block microRNA biogenesis and function. (A, B) Structure of pri-miRNA. (C) Morpholinos usually target to one of these sites, including guide Drosha (1), guide Dicer (2), star Drosha (3), and star Dicer (4). (D) Morpholinos can target to the site on an mRNA where a miRNA binds, and block the activity of miRNA.

3.2 DNA/RNA 显微注射

研究基因功能的另一个常见方法就是直接显微注射此基因的 mRNA 或 DNA 到单细胞阶段的受精卵中,待发育到一定阶段后分析其表型。所注射的 mRNA 和 DNA 可以编码基因的全长、部分功能结构域或者显性阴性突变体等。用 DNA 作为模板体外转录 mRNA,注射到 1-2 细胞阶段的胚胎中可以高效、均一地表达目的蛋白。在许多情况下为了方便检测表达水平,常常将目的基因与报告基因组成融合蛋白,如与绿色荧光蛋白 (GFP) 组成融合蛋白。注射的 mRNA 一般在受精后 4-5 h 开始表达,2-4 d 后开始降解,因此可以用来研究胚胎发育的早期阶段。DNA 最好在单细胞阶段注射到胚胎细胞中,与 mRNA 注射不同,DNA 注射通常产生嵌合表达。在 Tol2 转座系统存在的情况下可以提高 DNA 整合及表达效率^[45]。

3.3 TILLING

无论是 Morpholino 还是 mRNA 显微注射都无法遗传给下一代,为了产生可遗传的突变,建立了一种 TILLING (Targeting induced local lesions in genomes) 的反向遗传学技术^[67-68]。这种方法利用 CEL1 分析来检测 ENU 诱导突变产生的 F1 个体 DNA 中的杂合随机突变 (图 8A)。CEL1 内切酶能够特异性剪切在野生型和突变型杂交 DNA 双链中单个碱基错配的 3'端^[69]。从突变体中提取基因组 DNA 作为 PCR 的模板来扩增特异的基因,野生型的 DNA 和突变的 DNA 都会从杂合子基因组中复制出来。PCR 产物片段通过变性和缓慢退火形成杂交的双链。通过 CEL1 内切酶的消化,DNA 片段可以在测序胶上分开,从而确定突变的位点 (图 8A),其筛选流程如下 (图 8B)。在 ENU 诱变的 F1 代中得到精子并冻存,通过 CEL1 分析鉴定突变的基

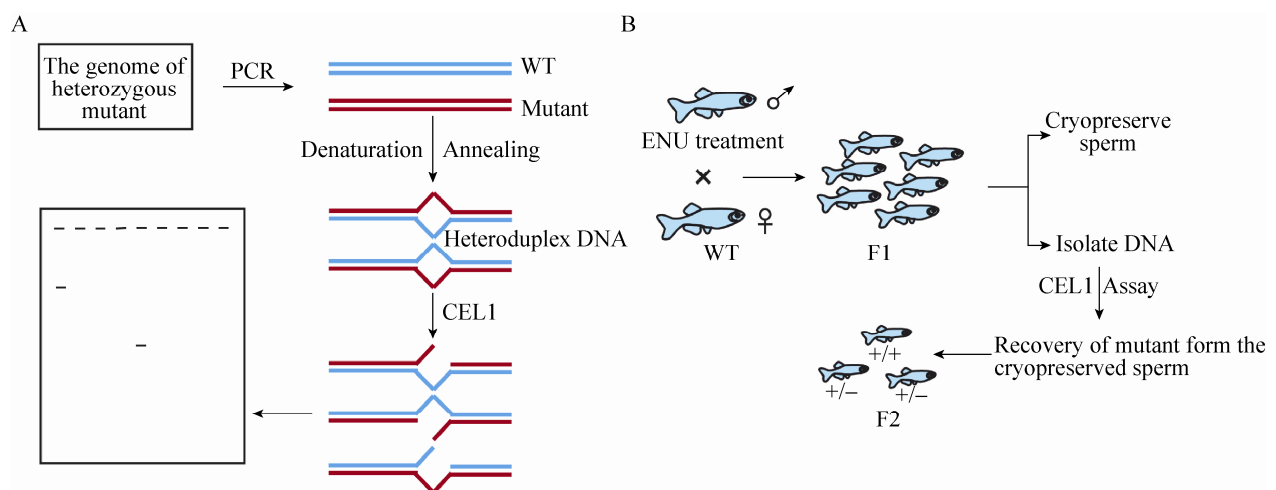


图 8 CEL1 分析和 TILLING 实验流程

Fig. 8 Overview of CEL1 assay and TILLING workflow. (A) In the most common implementation, mutations are detected by denaturation and annealing of pooled PCR products from the genome of heterozygous, followed by digestion with the mismatch-specific endonuclease CEL I, which cleaves heteroduplex DNA. (B) F1 males from the ENU-mutagenesis protocol are sacrificed, where samples of cryopreserved sperm and genomic DNA from each individual are archived. Genomic DNA from these animals is screened in a high-throughput method for individuals bearing lesions in the desired gene. Sperm from each identified carrier is used to generate F2 animals through *in-vitro* fertilization, and heterozygous carriers are then identified by genotyping.

因, 然后可以从精子恢复所需的相应突变体。在 TILLING 技术的发展过程中, 多个实验室起到了重要的推动作用。Hubrecht Institute 建立了 4 608 个 ENU 诱导突变的 F1 代文库, 应用 TILLING 技术已经成功筛选到了 16 个突变基因^[70]; Moens 实验室报道了运用 TILLING 技术大规模筛选斑马鱼 ENU 诱变产生的点突变^[23]; Sanger 研究所也主持了一项基于 TILLING 技术的斑马鱼突变筛选计划 (Zebrafish mutation project, ZMP), 通过大规模 ENU 诱变的方法获得大量突变位点, 构成一个突变位点库, 然后根据需要选择特定的基因, 通过测序的方法寻找该基因的突变并进行表型检测^[71]。在运用 TILLING 技术时, 可能会出现多位点的突变, 后代的表型鉴定比较繁琐。目前, TILLING 技术运用较少。

3.4 ZFN/TALEN 定向基因失活

在小鼠的胚胎干细胞 (Embryonic stem cell, ESC) 上建立的基因打靶策略 (Gene targeting strategy) 是通过 DNA 同源重组实现基因的特异性敲除^[72-73]。在斑马鱼上已经成功建立了 ES 样的细胞, 并且这些细胞可以贡献到生殖细胞系中并传至下一代^[74], 但是这种基因打靶策略并没有成功地应用到斑马鱼上产生基因敲除斑马鱼。现在两种定向基因失活技术 ZFN 和 TALEN 都已经成功地应用到斑马鱼上^[75-79]。锌指核酸酶 (Zinc finger nuclease, ZFN) 是一种人工改造合成的核酸内切酶, 由一个 DNA 识别结构域 (ZF) 和一个非特异性核酸内切酶结构域 (FokI) 组成, 其中 DNA 识别结构域能够识别并结合特异的 DNA 序列, 非特异性核酸内切酶具有 DNA 剪切的功能。通过两个功能结

构域的组合就可以在 DNA 序列的特定靶位点产生双链断裂 (Double strand break, DSB)^[80-81]。双链断裂通过非同源末端连接 (Nonhomologous end-joining, NHEJ) 和同源重组修复 (Homologous recombination repair, HRR), 从而引入小的基因片段, 其中非同源末端连接通过随机的删减或添加碱基可以引起移码突变^[82]。ZFN 的 DNA 识别结构域是由一连串的 Cys2-His2 锌指蛋白单位组成, 每个锌指蛋白单位能够特异地识别和结合 3'到 5'方向 DNA 单链上 3 个连续的碱基组合 (图 9) 和 5'到 3'方向的 1 个碱基^[83]。当识别 DNA 双链的一对 ZFN 的识别位点相距在 6 到 8 个碱基之间时 (图 9), 两个 ZFN 上的核酸内切酶 (FokI) 结构域形成异二聚体^[84]产生核酸酶切功能, 达到 DNA 定向剪切的效果。除了 ZFN 之外, 转录激活因子样核酸酶 (Transcription activator-like effector nuclease, TALEN) 也是一种近来被应用到许多物种的位点特异性的核酸酶^[85]。TALEN 的组成结构也和 ZFN 类似, 包括非特异性核酸内切酶结构域 FokI 和 DNA 识别结构域 TALEN^[86], TALEN 的 DNA 识别结构域 TALEN 来自于植物的致病菌黄单胞菌 *Xanthomonas*^[87], ZFN 的每一模块能够识别 3 个连续碱基, 而 TALEN 每个模块识别 1 个碱基 (图 9)。在斑马鱼上, ZFN 和 TALEN 通过体外转录得到的 mRNA 后注射到单细胞阶段的受精卵中, 筛选并获得靶基因失活的突变体。2011 年, 北京大学张博教授首次利用 TALEN 技术在斑马鱼中成功实现可稳定遗传的基因组定点突变^[77]; 2013 年又在此基础上, 利用 TALEN 造成的 DNA 双链断裂, 大大提高了同源重组效率, 从而在模式生物斑马鱼中实现了真正意义上的同源重

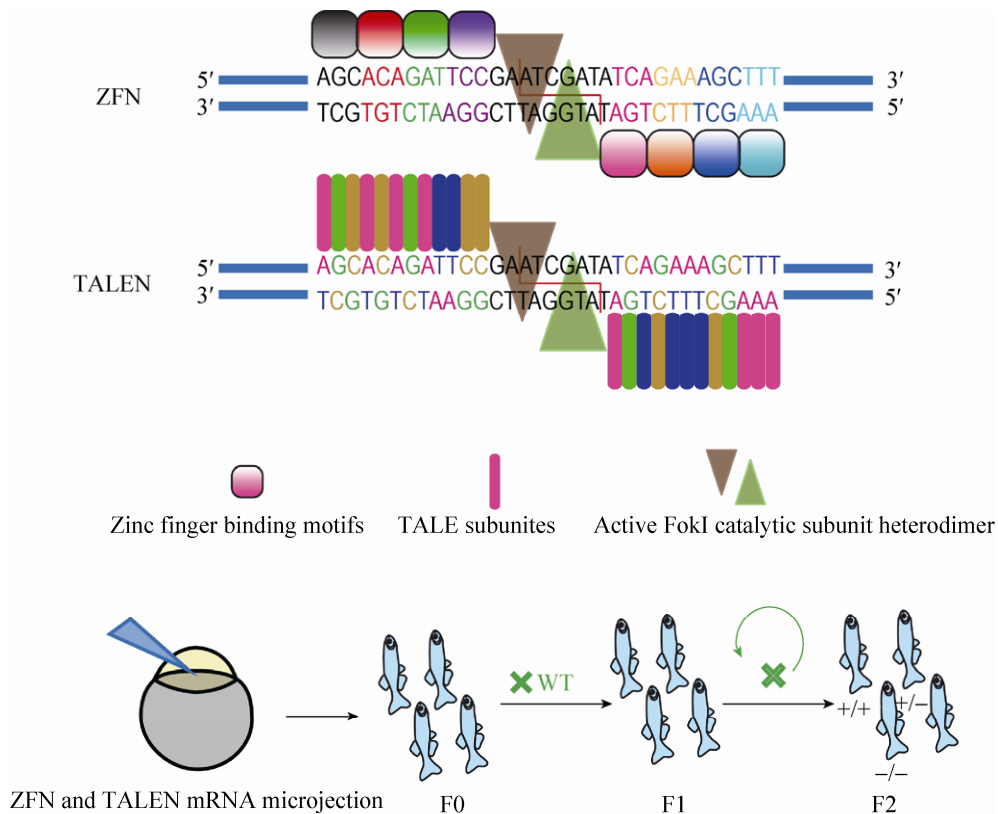


图9 TALEN和ZFN的工作示意图

Fig. 9 The working models of TALEN and ZFN. The ZFN DNA binding domain is composed of subdomain each recognizing three nucleotides. The Fok I endonuclease domain of ZFN activates after dimerization, and introduces the double-strand breaks (DSB). And the TALEN DNA binding domain is composed of subdomains each recognizing a single nucleotide. Similarly to ZFN a pair of TALENs is required to introduce a Fok I-mediated DSB. mRNAs encoding pairs of ZFN and TALEN are prepared and then injected into one-cell embryos. Putative founder F0 from these injections are raised to adulthood and out-crossed to generate an F1 population, and F1 are identified and then in-crossed to provide homozygous mutant embryos.

组基因打靶^[88]。虽然 ZFN 和 TALEN 技术均能用于基因定向失活，应用范围有一定的重合，但是这两种技术有各自不同的缺陷。ZFN 技术脱靶效率高，设计依赖上下游序列；TALEN 技术模块组装过程繁琐、需要大量测序工作、成本高。目前，ZFN 和 TALEN 技术有被 CRISPR/Cas9 系统取代的趋势。

3.5 CRISPR/Cas9

CRISPR/Cas9 是继 ZFN 和 TALEN 之后的

第 3 代 RNA 介导的定向基因编辑技术，来源于细菌和古细菌的获得性免疫系统^[89-91]。具体的原理是：crRNA (CRISPR-derived RNA) 与 tracrRNA (Trans-activating RNA) 结合形成 tracrRNA/crRNA 复合物，引导核酸酶 Cas9 在与 crRNA 配对的序列靶位点处剪切双链 DNA，形成 DSB，通过 NHEJ 修复机制产生基因序列的缺失或者增加 (图 10)。为了简化操作过程，通过人工设计、改造这两种 RNA，形成具有导向

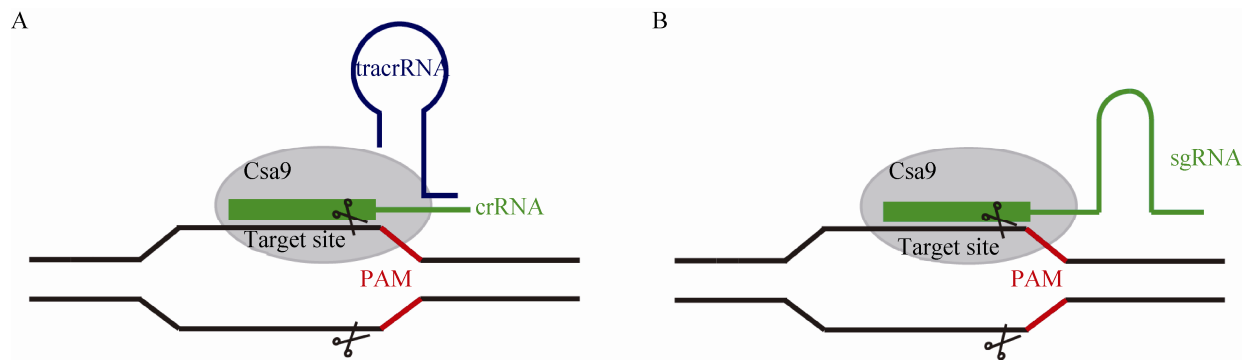


图 10 CRISPR/Cas9 工作示意图

Fig. 10 Working model of CRISPR/Cas9 system. (A) Cas9 is guided by a two-RNA structure formed by trans-activating tracrRNA (blue) and targeting crRNA (green) to cleave site-specifically-targeted DNA. (B) The Cas9 nuclease (in grey) is targeted to genomic DNA by an sgRNA (crRNA and tracrRNA), in which the guide sequence pairs with the DNA target, directly upstream of a PAM motif (red). Cas9 mediates cleavage upstream of the PAM.

作用的 sgRNA (Single guide RNA), 引导 Cas9 对 DNA 的定点切割, 剪切位点位于 sgRNA 互补序列下游 PAM 区 (Protospacer adjacent motif, PAM) 附近, 以 NGG 形式存在 (N 为任意碱基)^[92]。sgRNA 设计简单, 长度为 20 个碱基, 并且在 3'端下游紧邻 NGG 序列。在 2013 年 1 月, 张峰率领的研究小组首次证实 CRISPR/Cas9 系统能够在真核细胞中发挥基因编辑作用^[93]。在斑马鱼中, CRISPR/Cas9 已被证明可产生基因敲除, Joung 实验室首次利用 CRISPR/Cas9 系统在斑马鱼中实现基因组编辑, 他们将特异的 sgRNA 和 Cas9 mRNA 共同注射至斑马鱼 1 细胞期受精卵中, 在特定基因位点处检测到碱基缺失和插入的突变^[94-95]。同时北京大学熊敬维实验室也报道了 CRISPR/Cas9 系统在斑马鱼中进行特定基因敲除 (Knockout, KO) 的方法, 敲除血管发育相关基因 *etsrp*, 发现突变体血管发育异常, 与已有的化学诱变产生的突变体表型一致^[96-97]。如果在 CRISPR/Cas9 系统的基础上引入一个修复的模板质粒, 这样能够按照提供

的模板在修复过程中引入片段插入, 实现基因的敲入。中国科学院上海生命科学研究院神经科学研究所杜久林课题组利用 CRISPR/Cas9 系统开发出了一种以内含子为基础的基因敲入 (Knockin, KI) 方法, 将改造的绿色荧光蛋白 EGFP 的 DNA 序列插入到斑马鱼 *Tyrosine hydroxylase* (*th*) 基因的外显子内, 标记内源性蛋白^[98-99]。CRISPR/Cas9 系统设计简单、成本低廉、制备简便、快捷高效等优点, 使其在基因编辑领域得到广泛应用。

3.6 NgAgo-gDNA

河北科技大学韩春雨实验室报道了一种新的 DNA 介导的基因编辑系统 NgAgo-gDNA (Natronobacterium gregoryi Argonaute, NgAgo), 由核酸内切酶 NgAgo 和具有导向作用的特异性 5'-磷酸化的单链 DNA (Single-stranded guide DNA, gDNA) 组成, NgAgo 结合单链 gDNA, 并导致靶 DNA 发生双链断裂^[100]。目前 NgAgo-gDNA 系统存在一些争议, 机理还有待于进一步研究^[101-102]。我们利用 NgAgo-gDNA 在斑马鱼中实现了基因

敲低 (Knock down, KD), 针对斑马鱼 *fabp11a* 基因, 设计靶向 *fabp11a* 的第 2 和第 3 个外显子 5'-磷酸化单链 DNA, 与 NgAgo mRNA 共同注射至斑马鱼一细胞期受精卵中, 检测到 *fabp11a* mRNA 表达水平下降^[103]。韩国国立首尔大学 Jin-Soo Kim 课题组在 BioRxiv 上发表了他们的研究, 通过体外生化实验, 发现 NgAgo 具有 DNA 依赖的 RNA 酶活性, 并且他们还发现其与 NgAgo 结合的 DNA (Guide oligodeoxyribonucleotides, gODNs) 序列必须与 RNA 反向互补, 而正义 DNA (Sense DNA) 序列则不能引导 NgAgo 切割靶 RNA。

4 转基因

以显微注射为基础的转基因技术是利用斑马鱼为模式生物研究的有力工具。在转基因生物中, 外源基因被整合到宿主基因组中, 在子代稳定遗传。目前有多种方法可以获得转基因斑马鱼, 其中一种方法就是向斑马鱼受精卵中注入外源 DNA, 培养至成鱼, 然后从中筛选出整合了外源基因的转基因品系。这种方法效率不高, 但是因为显微注射和表型筛选容易, 以前常被采用。一般来说, 显微注射外源性 DNA 的斑马鱼中大约 5% 有外源基因整合, 这些嵌合体中又有约 5% 的可以将外源基因传到下一代。这个概率取决于许多因素, 包括外源性表达载体的结构、DNA 注入量以及操作者的技能。转基因斑马鱼遵循孟德尔遗传规律。表型筛选可以利用荧光蛋白 (例如 GFP) 的表达来鉴定, 也可能需要 PCR 来鉴定。通过简单的 DNA 注射方法实现的转基因通常含有多个目的基因的串联拷贝。多拷贝转基因可以提高目的基因表达

效率, 但有时根据目的也需要单拷贝插入。近年来发展出的转座子系统 Tol2^[45] 和 Sleeping Beauty^[46], 可以实现单拷贝插入, 相比简单的显微注射效率提高很多。提高目的基因拷贝插入效率也可以使用核酸酶 I-Sce I^[104] 来实现, 其基本原理如图 11 所示。

利用转基因技术研究基因功能的一个常见问题就是转基因可能引起的显性致死, 无法建立稳定的转基因品系。解决这个问题的方法有多种, 包括基因诱导表达和双组分系统 (Binary systems), 即通过两个转基因品系的交配来实现目的基因的表达 (图 12C、D)。基因诱导表达体系通常含有一个在正常情况下处于沉默状态的

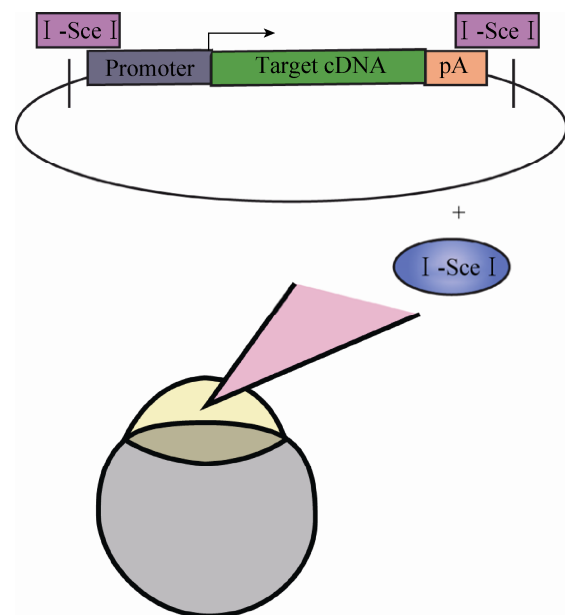


图 11 用 I-Sce I 来产生转基因斑马鱼

Fig. 11 Establishment of transgenic zebrafish by the meganuclease I-Sce I. The transgenic vectors flanked by two I-Sce I recognition sites are co-injected with the I-Sce I meganuclease into one-cell stage embryos. The I-Sce I enzyme cleaves the genomic DNA at specific sites, and exogenous DNA fragment containing the two I-Sce I sites integrates into the genomic DNA.

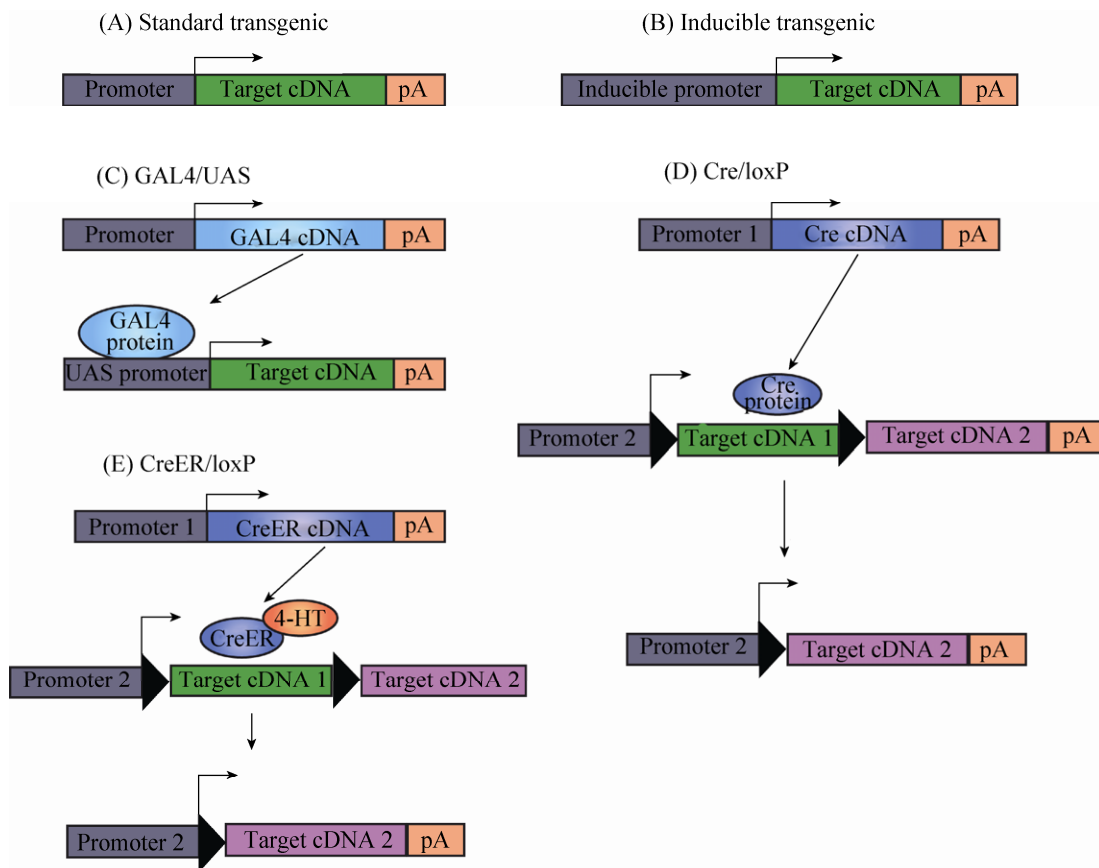


图 12 转基因表达系统

Fig. 12 Transgenic expression systems. (A) A transgene contains an enhancer/promoter (typically tissue-specific) driving expression of a cDNA of interest, including a polyadenylation signal. (B) Inducible transgenics contain a single transgene with a promoter that is activated in response to a stimulus. (C) In the GAL4/UAS system, two different transgenic lines are used. When the two transgenics combined, GAL4 produced by one transgene will activate expression of the target gene. (D) In the Cre/loxP system, more than one transgenic lines are utilized. (E) The CreER/loxP system. Cre recombinase is activated through binding of the 4-OH-Tamoxifen and causes recombination between IoxP sites on a second transgene. In the end, cDNA2 expression is directed by promoter 2.

转基因，当在一些外部因素刺激下这个基因才启动表达。例如，28.5 °C时斑马鱼热休克蛋白 HSP70 的启动子在所有组织中（除了晶状体之外）有很低的活性^[105-106]，Hsp70 的表达可以被高温激活，即 37 °C 热处理胚胎 1 h 可激活 Hsp70 活性。通过使用聚焦激光局部加热的方法也可以诱导 Hsp70 在局部表达^[107]。另外使用糖皮质激素

固醇也可以实现斑马鱼转基因的诱导表达^[108]。双组分系统利用两个独立的转基因品系的交配来调控基因表达。在 GAL4/UAS 系统中，转基因斑马鱼在组织特异性启动子调控下表达酵母转录因子 GAL4，另一个外源基因由含有 UAS 序列的启动子驱动，它在没有外在因素刺激下是沉默的，而当 GAL4 识别 UAS 序列时，启动外

源基因表达。GAL4/UAS 系统的建立可以方便地实现多种遗传操作^[109](图 12C)。另一个双组分系统由位点特异性重组酶 Cre 和其识别序列 loxP 组成。如图 12D 所示, Cre 重组酶作用之前表达一个基因(目标基因 cDNA1), Cre 重组酶作用之后调控表达另一个基因(目标基因 cDNA2), 这种转变通过 Cre 重组酶和 loxP 序列相互作用所调控^[110], 现在基因诱导表达和双组分系统可以组合起来应用图 12E。除此之外基因诱导表达和双组分系统还有一些其他类型, 其原理各不相同, 但是最终可以实现相似的目的, 在此不作一一介绍。

目前常用于生命科学研究的模式生物有酵母、线虫、果蝇、斑马鱼、小鼠等, 相关遗传操作技术发展迅速, 各有优势。例如, 模式生物秀丽隐杆线虫 *Caenorhabditis elegans* 是多细胞无脊椎动物, 在自然状态下具有雄性和雌雄同体这两种性别特征, 在遗传研究上具有无可比拟的优势, 突变体筛选效率高^[20]; 小鼠属于哺乳动物, 生理和发育过程与人类相似, 基因组与人类高度同源, 能够在 ES 细胞上进行遗传操作, 利用同源重组构建基因敲除系^[111-112]。

近年来, 斑马鱼作为一种重要的模式生物, 也被广泛地运用于生命科学研究, 其易于在实验室内繁育, 一般每周可以产卵一次, 每次有 100-300 枚, 遗传学操作和筛选十分方便。这些遗传操作方法在斑马鱼上的单一使用以及组合使用大大增强了斑马鱼作为模式生物的优势。同时, 一些新技术的出现必将进一步推动其在发育生物学与疾病模型上的应用, 例如光遗传学 (Optogenetics)。光遗传学将重组 DNA 技术与光学技术结合起来, 成为细胞生物学的有力工具, 用于活细胞内目标蛋白质的跟踪以及选

择性地控制某类细胞特定的生物学活动^[113]。斑马鱼作为胚胎通体透明的模式动物则更是理想的运用光遗传学开展研究的对象^[114], 2010 年 Didier YR Stainier 实验室成功实现了利用光来控制心脏的功能^[115]。斑马鱼模型上丰富的遗传操作策略将越来越帮助我们认识生命过程、揭示生命的奥秘。

REFERENCES

- [1] Fishman MC. Genomics. Zebrafish--the canonical vertebrate. *Science*, 2001, 294(5545): 1290-1291.
- [2] Postlethwait J, Amores A, Force A, et al. The zebrafish genome. *Methods Cell Biol*, 1999, 60: 149-163.
- [3] Howe K, Clark MD, Torroja CF, et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature*, 2013, 496(7446): 498-503.
- [4] Postlethwait JH, Woods IG, Ngo-Hazelett P, et al. Zebrafish comparative genomics and the origins of vertebrate chromosomes. *Genome Res*, 2000, 10(12): 1890-1902.
- [5] Rettenberger G, Klett C, Zechner U, et al. ZOO-FISH analysis: cat and human karyotypes closely resemble the putative ancestral mammalian karyotype. *Chromosome Res*, 1995, 3(8): 479-486.
- [6] Rettenberger G, Klett C, Zechner U, et al. Visualization of the conservation of synteny between humans and pigs by heterologous chromosomal painting. *Genomics*, 1995, 26(2): 372-378.
- [7] Solinas-Toldo S, Lengauer C, Fries R. Comparative genome map of human and cattle. *Genomics*, 1995, 27(3): 489-496.
- [8] O'Brien SJ, Cevario SJ, Martenson JS, et al. Comparative gene mapping in the domestic cat (*Felis catus*). *J Hered*, 1997, 88(5): 408-414.
- [9] Jiang Y, Xie M, Chen WB, et al. The sheep genome illuminates biology of the rumen and lipid

- metabolism. *Science*, 2014, 344(6188): 1168–1173.
- [10] Keane M, Semeiks J, Webb AE, et al. Insights into the evolution of longevity from the bowhead whale genome. *Cell Rep*, 2015, 10(1): 112–122.
- [11] Ai HS, Fang XD, Yang B, et al. Adaptation and possible ancient interspecies introgression in pigs identified by whole-genome sequencing. *Nat Genet*, 2015, 47(3): 217–225.
- [12] Agaba M, Ishengoma E, Miller WC, et al. Giraffe genome sequence reveals clues to its unique morphology and physiology. *Nat Commun*, 2016, 7: 11519.
- [13] Gordon D, Huddleston J, Chaisson MJ, et al. Long-read sequence assembly of the gorilla genome. *Science*, 2016, 352(6281): aae0344.
- [14] Watkins-Chow DE, Buckwalter MS, Newhouse MM, et al. Genetic mapping of 21 genes on mouse chromosome 11 reveals disruptions in linkage conservation with human chromosome 5. *Genomics*, 1997, 40(1): 114–122.
- [15] Postlethwait JH, Yan YL, Gates MA, et al. Vertebrate genome evolution and the zebrafish gene map. *Nat Genet*, 1998, 18(4): 345–349.
- [16] Postlethwait J, Amores A, Cresko W, et al. Subfunction partitioning, the teleost radiation and the annotation of the human genome. *Trends Genet*, 2004, 20(10): 481–490.
- [17] Deisseroth K. Optogenetics. *Nat Methods*, 2011, 8(1): 26–29.
- [18] Peters JL, Cnudde F, Gerats T. Forward genetics and map-based cloning approaches. *Trends Plant Sci*, 2003, 8(10): 484–491.
- [19] Huang P, Zhu ZY, Lin S, et al. Reverse genetic approaches in zebrafish. *J Genet Genomics*, 2012, 39(9): 421–433.
- [20] Kutscher LM, Shaham S. Forward and reverse mutagenesis in *C. elegans*. *WormBook*, 2014: 1–26.
- [21] Besnard F, Koutsovoulos G, Dieudonné S, et al. Toward universal forward genetics: using a draft genome sequence of the nematode *oscheius tipulae* to identify mutations affecting vulva development. *Genetics*, 2017, 206(4): 1741–1761.
- [22] Besnard F, Koutsovoulos G, Dieudonné S, et al. Construction of a series of pCS2+ backbone-based Gateway vectors for overexpressing various tagged proteins in vertebrates. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2016, 48(12): 1128–1134.
- [23] Draper BW, McCallum CM, Stout JL, et al. A high-throughput method for identifying N-ethyl-N-nitrosourea (ENU)-induced point mutations in zebrafish. *Methods Cell Biol*, 2004, 77: 91–112.
- [24] Sivasubbu S, Balciunas D, Amsterdam A, et al. Insertional mutagenesis strategies in zebrafish. *Genome Biol*, 2007, 8(S1): S9.
- [25] Mullins MC, Hammerschmidt M, Haffter P, et al. Large-scale mutagenesis in the zebrafish: in search of genes controlling development in a vertebrate. *Curr Biol*, 1994, 4(3): 189–202.
- [26] Solnica-Krezel L, Schier AF, Driever W. Efficient recovery of ENU-induced mutations from the zebrafish germline. *Genetics*, 1994, 136(4): 1401–1420.
- [27] Driever W, Solnica-Krezel L, Schier AF, et al. A genetic screen for mutations affecting embryogenesis in zebrafish. *Development*, 1996, 123(1): 37–46.
- [28] Haffter P, Granato M, Brand M, et al. The identification of genes with unique and essential functions in the development of the zebrafish, *Danio rerio*. *Development*, 1996, 123(1): 1–36.
- [29] Kim SH, Wu SY, Baek JI, et al. A post-developmental genetic screen for zebrafish models of inherited liver disease. *PLoS ONE*, 2015, 10(5): e0125980.
- [30] Kur E, Christa A, Veth KN, et al. Loss of Lrp2 in zebrafish disrupts pronephric tubular clearance but not forebrain development. *Dev Dyn*, 2011, 240(6): 1567–1577.
- [31] Jiang F, Chen J, Ma X, et al. Analysis of mutants from a genetic screening reveals the control of intestine and liver development by many common genes in zebrafish. *Biochem Biophys Res*

- Commun, 2015, 8, 460(3): 838–844.
- [32] Venter JC, Adams MD, Myers EW, et al. The sequence of the human genome. *Science*, 2001, 291(5507): 1304–1351.
- [33] Amsterdam A, Becker TS. Transgenes as screening tools to probe and manipulate the zebrafish genome. *Dev Dyn*, 2005, 234(2): 255–268.
- [34] Golling G, Amsterdam A, Sun ZX, et al. Insertional mutagenesis in zebrafish rapidly identifies genes essential for early vertebrate development. *Nat Genet*, 2002, 31(2): 135–140.
- [35] Amsterdam A, Hopkins N. Retroviral-mediated insertional mutagenesis in zebrafish. *Methods Cell Biol*, 2004, 77: 3–20.
- [36] Amsterdam A, Burgess S, Golling G, et al. A large-scale insertional mutagenesis screen in zebrafish. *Genes Dev*, 1999, 13(20): 2713–2724.
- [37] Lin S, Gaiano N, Culp P, et al. Integration and germ-line transmission of a pseudotyped retroviral vector in zebrafish. *Science*, 1994, 265(5172): 666–669.
- [38] Stanford WL, Caruana G, Vallis KA, et al. Expression trapping: identification of novel genes expressed in hematopoietic and endothelial lineages by gene trapping in ES cells. *Blood*, 1998, 92(12): 4622–4631.
- [39] Korn R, Schoor M, Neuhaus H, et al. Enhancer trap integrations in mouse embryonic stem cells give rise to staining patterns in chimaeric embryos with a high frequency and detect endogenous genes. *Mech Dev*, 1992, 39(1/2): 95–109.
- [40] Friedrich G, Soriano P. Promoter traps in embryonic stem cells: a genetic screen to identify and mutate developmental genes in mice. *Genes Dev*, 1991, 5(9): 1513–1523.
- [41] Ni TT, Lu J, Zhu M, et al. Conditional control of gene function by an invertible gene trap in zebrafish. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(38): 15389–15394.
- [42] Ivics Z, Kaufman CD, Zayed H, et al. The Sleeping Beauty transposable element: evolution, regulation and genetic applications. *Curr Issues Mol Biol*, 2004, 6(1): 43–55.
- [43] Kawakami K, Koga A, Hori H, et al. Excision of the Tol2 transposable element of the medaka fish, *Oryzias latipes*, in zebrafish, *Danio rerio*. *Gene*, 1998, 225(1/2): 17–22.
- [44] Ivics Z, Li MA, Mátés L, et al. Transposon-mediated genome manipulation in vertebrates. *Nat Methods*, 2009, 6(6): 415–422.
- [45] Kawakami K. Transposon tools and methods in zebrafish. *Dev Dyn*, 2005, 234(2): 244–254.
- [46] Balciunas D, Davidson AE, Sivasubbu S, et al. Enhancer trapping in zebrafish using the Sleeping Beauty transposon. *BMC Genomics*, 2004, 5(1): 62.
- [47] Kawakami K, Hisashi T, Noriko N, et al. A transposon-mediated gene trap approach identifies developmentally regulated genes in zebrafish. *Dev Cell*, 2004, 7(1): 133–144.
- [48] Parinov S, Kondrichin I, Korzh V, et al. Tol2 transposon-mediated enhancer trap to identify developmentally regulated zebrafish genes *in vivo*. *Dev Dyn*, 2004, 231(2): 449–459.
- [49] Balciunas D, Wangenstein KJ, Wilber A, et al. Harnessing a high cargo-capacity transposon for genetic applications in vertebrates. *PLoS Genet*, 2006, 2(11): e169.
- [50] Sivasubbu S, Balciunas D, Davidson AE, et al. Gene-breaking transposon mutagenesis reveals an essential role for histone H2afza in zebrafish larval development. *Mech Dev*, 2006, 123(7): 513–529.
- [51] Maddison LA1, Li M, Chen W. Conditional gene-trap mutagenesis in zebrafish. *Methods Mol Biol*, 2014, 1101: 393–411.
- [52] Manis JP. Knock out, knock in, knock down—genetically manipulated mice and the Nobel Prize. *N Engl J Med*, 2007, 357(24): 2426–2429.
- [53] Schween G, Egener T, Fritzowsky D, et al. Large-scale analysis of 73 329 *Physcomitrella* plants transformed with different gene disruption libraries: production parameters and mutant phenotypes. *Plant Biol*, 2005, 7(3): 228–237.
- [54] Islam K. Allele-specific chemical genetics: concept, strategies, and applications. *ACS Chem*

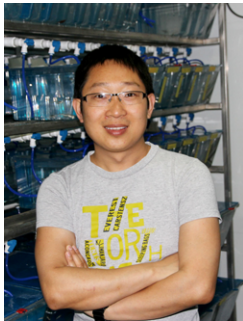
- Biol, 2015, 10(2): 343–363.
- [55] Skromne I, Prince VE. Current perspectives in zebrafish reverse genetics: moving forward. *Dev Dyn*, 2008, 237(4): 861–882.
- [56] Lund E, Sheets MD, Imboden SB, et al. Limiting Ago protein restricts RNAi and microRNA biogenesis during early development in *Xenopus laevis*. *Genes Dev*, 2011, 25(11): 1121–1131.
- [57] Summerton J, Weller D. Morpholino antisense oligomers: design, preparation, and properties. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev*, 1997, 7(3): 187–195.
- [58] Summerton J. Morpholino antisense oligomers: the case for an RNase H-independent structural type. *Biochim Biophys Acta*, 1999, 1489(1): 141–158.
- [59] Nasevicius A, Ekker SC. Effective targeted gene 'knockdown' in zebrafish. *Nat Genet*, 2000, 26(2): 216–220.
- [60] Draper BW, Morcos A, Kimmel CB. Inhibition of zebrafish *fgf8* pre-mRNA splicing with morpholino oligos: a quantifiable method for gene knockdown. *Genesis*, 2001, 30(3): 154–156.
- [61] Flynt AS, Li N, Thatcher EJ, et al. Zebrafish miR-214 modulates Hedgehog signaling to specify muscle cell fate. *Nat Genet*, 2007, 39(2): 259–263.
- [62] Kloosterman WP, Lagendijk AK, Ketting RF, et al. Targeted inhibition of miRNA maturation with morpholinos reveals a role for miR-375 in pancreatic islet development. *PLoS Biol*, 2007, 5(8): e203.
- [63] Choi WY, Giraldez AJ, Schier AF. Target protectors reveal dampening and balancing of Nodal agonist and antagonist by miR-430. *Science*, 2007, 318(5848): 271–274.
- [64] Bill BR, Petzold AM, Clark KJ, et al. A primer for morpholino use in zebrafish. *Zebrafish*, 2009, 6(1): 69–77.
- [65] Smart EJ, De Rose RA, Farber SA. Annexin 2-caveolin 1 complex is a target of ezetimibe and regulates intestinal cholesterol transport. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(10): 3450–3455.
- [66] Robu ME, Larson JD, Nasevicius A, et al. p53 activation by knockdown technologies. *PLoS Genet*, 2007, 3(5): e78.
- [67] McCallum CM, Comai L, Greene EA, et al. Targeted screening for induced mutations. *Nat Biotechnol*, 2000, 18(4): 455–457.
- [68] Wienholds E, Schulte-Merker S, Walderich B, et al. Target-selected inactivation of the zebrafish *rag1* gene. *Science*, 2002, 297(5578): 99–102.
- [69] Oleykowski CA, Bronson Mullins CR, Godwin AK, et al. Mutation detection using a novel plant endonuclease. *Nucleic Acids Res*, 1998, 26(20): 4597–4602.
- [70] Wienholds E, van Eeden F, Kosters M, et al. Efficient target-selected mutagenesis in zebrafish. *Genome Res*, 2003, 13(12): 2700–2707.
- [71] Kettleborough RNW, Busch-Nentwich EM, Harvey SA, et al. A systematic genome-wide analysis of zebrafish protein-coding gene function. *Nature*, 2013, 496(7446): 494–497.
- [72] Capecchi MR. Altering the genome by homologous recombination. *Science*, 1989, 244(4910): 1288–1292.
- [73] Thompson S, Clarke AR, Pow AM, et al. Germ line transmission and expression of a corrected HPRT gene produced by gene targeting in embryonic stem cells. *Cell*, 1989, 56(2): 313–321.
- [74] Ma CG, Fan LC, Ganassin R, et al. Production of zebrafish germ-line chimeras from embryo cell cultures. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(5): 2461–2466.
- [75] Meng XD, Noyes MB, Zhu LJ, et al. Targeted gene inactivation in zebrafish using engineered zinc-finger nucleases. *Nat Biotechnol*, 2008, 26(6): 695–701.
- [76] Doyon Y, McCammon JM, Miller JC, et al. Heritable targeted gene disruption in zebrafish using designed zinc-finger nucleases. *Nat Biotechnol*, 2008, 26(6): 702–708.
- [77] Huang P, Xiao A, Zhou MG, et al. Heritable gene targeting in zebrafish using customized TALENs. *Nat Biotechnol*, 2011, 29(8): 699–700.
- [78] Sander JD, Cade L, Khayter C, et al. Targeted gene disruption in somatic zebrafish cells using

- engineered TALENs. *Nat Biotechnol*, 2011, 29(8): 697–698.
- [79] Wood AJ, Lo TW, Zeitler B, et al. Targeted genome editing across species using ZFNs and TALENs. *Science*, 2011, 333(6040): 307.
- [80] Bibikova M, Carroll D, Segal DJ, et al. Stimulation of homologous recombination through targeted cleavage by chimeric nucleases. *Mol Cell Biol*, 2001, 21(1): 289–297.
- [81] Händel EM, Alwin S, Cathomen T. Expanding or restricting the target site repertoire of zinc-finger nucleases: the inter-domain linker as a major determinant of target site selectivity. *Mol Ther*, 2009, 17(1): 104–111.
- [82] Durai S, Mani M, Kandavelou K, et al. Zinc finger nucleases: custom-designed molecular scissors for genome engineering of plant and mammalian cells. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33(18): 5978–5990.
- [83] Pabo CO, Peisach E, Grant RA. Design and selection of novel Cys₂His₂ zinc finger proteins. *Annu Rev Biochem*, 2001, 70: 313–340.
- [84] Bitinaite J, Wah DA, Aggarwal AK, et al. FokI dimerization is required for DNA cleavage. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(18): 10570–10575.
- [85] Li T, Huang S, Zhao XF, et al. Modularly assembled designer TAL effector nucleases for targeted gene knockout and gene replacement in eukaryotes. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39(14): 6315–6325.
- [86] Baker M. Gene-editing nucleases. *Nat Methods*, 2012, 9(1): 23–26.
- [87] Moscou MJ, Bogdanove AJ. A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors. *Science*, 2009, 326(5959): 1501.
- [88] Zu Y, Tong XJ, Wang ZX, et al. TALEN-mediated precise genome modification by homologous recombination in zebrafish. *Nat Methods*, 2013, 10(4): 329–331.
- [89] Mali P, Esvelt KM, Church GM. Cas9 as a versatile tool for engineering biology. *Nat Methods*, 2013, 10(10): 957–963.
- [90] Carter J, Wiedenheft B. SnapShot: CRISPR-RNA-guided adaptive immune systems. *Cell*, 2015, 163(1): 260–260.e1.
- [91] Ramanan V, Shlomai A, Cox DB, et al. CRISPR/Cas9 cleavage of viral DNA efficiently suppresses hepatitis B virus. *Sci Rep*, 2015, 5: 10833.
- [92] Chari R, Yeo NC, Chavez A, et al. sgRNA Scorer 2.0: A species-independent model to predict CRISPR/Cas9 activity. *ACS Synth Biol*. 2017, 6(5): 902–904.
- [93] Cong L, Ran FA, Cox D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 2013, 339(6121): 819–823.
- [94] Hwang WY, Fu YF, Reyon D, et al. Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(3): 227–229.
- [95] Zhang F, Wen Y, Guo X. CRISPR/Cas9 for genome editing: progress, implications and challenges. *Hum Mol Genet*, 2014, 23(R1): 40–46.
- [96] Chang NN, Sun CH, Gao L, et al. Genome editing with RNA-guided Cas9 nuclease in Zebrafish embryos. *Cell Res*, 2013, 23(4): 465–472.
- [97] Huang X, Zhou G, Wu W, et al. Genome editing abrogates angiogenesis *in vivo*. *Nat Commun*, 2017, 8(1):112.
- [98] Li J, Zhang BB, Ren YG, et al. Intron targeting-mediated and endogenous gene integrity-maintaining knockin in zebrafish using the CRISPR/Cas9 system. *Cell Res*, 2015, 25(5): 634–637.
- [99] Li J, Zhang BB, Bu JW, et al. Intron-based genomic editing: a highly efficient method for generating knockin zebrafish. *Oncotarget*, 2015, 6(20): 17891–17894.
- [100] Gao F, Shen XZ, Jiang F, et al. DNA-guided genome editing using the *Natronobacterium gregoryi* Argonaute. *Nat Biotechnol*, 2016, 34(7): 768–773.
- [101] Cyranoski D. Replications, ridicule and a recluse: the controversy over NgAgo gene-editing intensifies. *Nature*, 2016, 536(7615): 136–137.
- [102] Cyranoski D. Updated: NgAgo gene-editing controversy escalates in peer-reviewed papers.

Nature, 2016, 540(7631): 20–21.

- [103] Qi JL, Dong ZJ, Shi YW, et al. NgAgo-based fabp11a gene knockdown causes eye developmental defects in zebrafish. *Cell Res*, 2016, 26(12): 1349–1352.
- [104] Grabher C, Joly JS, Wittbrodt J. Highly efficient zebrafish transgenesis mediated by the meganuclease I-SceI. *Methods Cell Biol*, 2004, 77: 381–401.
- [105] Blechinger SR, Evans TG, Tang PT, et al. The heat-inducible zebrafish hsp70 gene is expressed during normal lens development under non-stress conditions. *Mech Dev*, 2002, 112(1/2): 213–215.
- [106] Evans TG, Yamamoto Y, Jeffery WR, et al. Zebrafish Hsp70 is required for embryonic lens formation. *Cell Stress Chaperones*, 2005, 10(1): 66–78.
- [107] Halloran MC, Sato-Maeda M, Warren JT, et al. Laser-induced gene expression in specific cells of transgenic zebrafish. *Development*, 2000, 127(9): 1953–1960.
- [108] de Graaf M, Zivkovic D, Joore J. Hormone-inducible expression of secreted factors in zebrafish embryos. *Dev Growth Differ*, 1998, 40(6): 577–582.
- [109] Scheer N, Campos-Ortega JA. Use of the Gal4-UAS technique for targeted gene expression in the zebrafish. *Mech Dev*, 1999, 80(2): 153–158.
- [110] Dong J, Stuart GW. Transgene manipulation in zebrafish by using recombinases. *Methods Cell Biol*, 2004, 77: 363–379.
- [111] Sung YH, Baek IJ, Seong JK, et al. Mouse genetics: catalogue and scissors. *BMB Rep*, 2012, 45(12): 686–692.
- [112] Horii T, Hatada I. Genome editing using mammalian haploid cells. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(10): 23604–23614.
- [113] Wyart C, Del Bene F, Warp E, et al. Optogenetic dissection of a behavioural module in the vertebrate spinal cord. *Nature*, 2009, 461(7262): 407–410.
- [114] Simmich J, Staykov E, Scott E. Zebrafish as an appealing model for optogenetic studies. *Prog Brain Res*, 2012, 196: 145–162.
- [115] Arrenberg AB, Stainier DYS, Baier H, et al. Optogenetic control of cardiac function. *Science*, 2010, 330(6006): 971–974.

(本文责编 郝丽芳)



刘东 博士。于 2011 年获德国马克斯-德尔布吕克分子医学中心 (Max-Delbrück Center for Molecular Medicine)/柏林自由大学 (Free University of Berlin) 自然科学博士学位。从 2012 年 8 月起任南通大学神经再生重点实验室副教授。现为中国解剖学会再生医学专业委员会委员, 江苏省发育与细胞学会理事, 江苏省神经学会理事。主要研究方向为: 1) 鉴定参与血管新生以及神经系统发育过程中的全新的调控分子。2) 组织再生过程中血管化的过程及调控机制。3) 利用多种遗传操作技术建立转基因和基因敲除斑马鱼模型, 以及研发用于斑马鱼模型的遗传操作方法。4) 筛选调控血管内皮细胞和运动神经元行为的天然化合物。