A Brief Protocol for Gene Targeting by Cas9 in Zebrafish

（2013-02-16 v1.1）

一、Cas9 靶位点的选择

1. Cas9 靶位点（靶点）包含 20 个碱基，其中 5’端应为 GG▲；紧邻靶点 3’端的 3 个碱基构成 PAM 区，要求序列为 NGG（N 为任意碱基）（图 1）。可在正义链或反义链上选择靶位点。可参考如下的 Cas9 靶位点预测网站：

   http://zifit.partners.org/ZiFiT/CSquare9Nuclease.aspx

   ▲注意：5’端选择 GG 并非 Cas9 靶点本身的要求，而是由于本实验所用的 gRNA（guide RNA）体外转录载体采用了 T7 启动子。T7 启动子要求转录起始位点的前两位为 GG，并且第三位最好为 G 或 A；如果采用其他的启动子，可以随之更改。

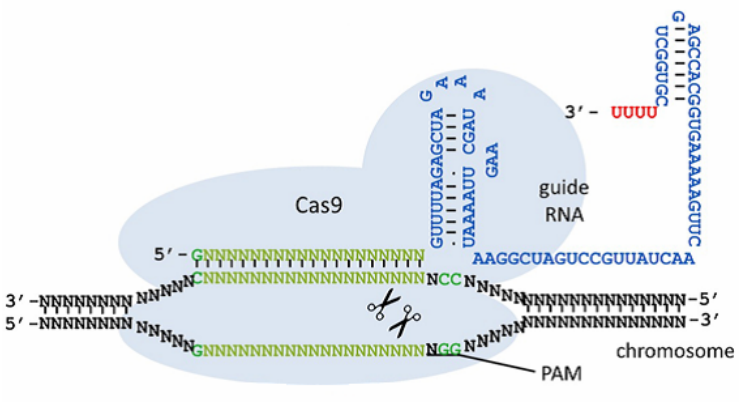


图1. Cas9的作用原理（引自Mali *et al.*, 2013）

2. 如果采用限制性内切酶酶切法检测靶点的突变效率，则需要在靶点序列内、PAM 的 5’端附近选择一个单一的限制性内切酶位点。

例：斑马鱼 *th* 基因的某个 Cas9 靶点（此例的靶点位于反义链上）:

BxtYI

5′-TCTTGTCACCAAATATGATCCGGATCTGGATCAGGATCACCCAgtaagtgctggattat-3′

3′-AGAACAGTGGTTTATACTAGGCCTAGACCTAGTCCTAGTGGGTcattcacgacctaata-5′

PAM Target site

3. 对于 coding gene，靶位点尽量选择在基因 CDS 的前 2/3 区域并且在 ATG 之后，但是不要在最后一个 exon 上；最好能破坏重要的 domain 和/或所有的 isoform/variant。同时还要考虑避免在第一个起始密码子的下游还存在额外的具有相同阅读框（in-frame）的起始密码子。靶点也可选择在 intron 和 exon 交界处，以破坏基因的剪接。原则上不要选择 5’-UTR 和 3’-UTR。

二、Cas9 靶位点的确认

1. 确认靶点在基因组中的唯一性：靶位点序列在 Ensembl 网站进行 blast，确认是斑马鱼基因组中的单一位点。

2. PCR 扩增靶点序列：从准备用于打靶的成鱼中 PCR 扩增靶点及附近的序列。在靶位点周围设计引物，使其距离靶位点两侧都大于 100 bp，并且 PCR 扩增产物最好不要超过 500 bp，且为单一条带。

3. 检测酶切效率：如果计划采用酶切法检测靶点的突变情况，则需要对上述 PCR 产物进行酶切验证。要求尽量酶切完全，并且电泳后能明显与原条带区分开。

4. 测序确认靶点序列：将 PCR 产物直接送去测序（不需要 TA 克隆）。如果实测序列跟靶点的预测序列有出入，原则上应根据实测结果设计 gRNA 序列；但是，如果实测序列不再符合靶点选择的原则（例如，PAM 区不是 NGG，或 5'端不是 GG），则应重新选择靶点；如果测序结果显示靶点序列为杂合子，则最好重新选择实验材料。

5. 遴选实验材料：采用上述的 PCR 与测序策略筛选出足够量的靶点正确且为纯合的成鱼，后续针对该靶点的实验最好都用这一批成鱼进行。

三、构建 gRNA 体外转录载体

1. p-T7-gRNA 为 gRNA 的克隆与体外转录载体，载体骨架来自 pMD18-T simple（Amp 抗性），gRNA 序列的连入方向为 RV-M->T7->M13-47。主要区域的序列如下：

T7 promoter +1 BbsI BbsI

5′-…GAATTC**TAATACGACTCACTATA**G**ca**GTCTTCTAGAAGACgttttagagctagaaata
gcaagttaaaataaggctagtccgttatcaacttgaaaaagtggcaccgagtcggtgcttttt
ttAAAGCTT…-3′

2. 用 BbsI 酶切 pT7-gRNA、切胶回收，得到 gRNA 克隆骨架 pT7-gRNA_BbsI，所得粘性末端如下所示（骨架上 5'各留下一个 4 bp 的 overhang，中间的小片段丢弃）：

5′-…**TAATACGACTCACT** **ATA**G**ca**GTCTTCTAGAAGACgt tttagagctag…-3′
3′-…ATTATGCTGAGTGATATC GTCAGAAGATCTTCTGcaaaat ctcgatc…-5′

酶切体系：

pT7-gRNA plasmid	1~2 μg	37℃，4 h; 切胶回收， 20 μL ddH_2O 溶解。
Buffer G	2.0 μL	
BbsI (Fermentas)	0.5 μL	
ddH_2O	To 20 μL	

3. 根据靶位点订购两条 oligo（均为 25 nt，s 序列与靶序列同向，As 反向）。以 *th* 为例：

th target oligo s：5′-ataGGTGATCCTGATCCAGATCgt-3′
th target oligo As：5′-taaaacGATCTGGATCAGGATCACC-3′

方框内为靶点序列。红色碱基为形成粘性末端所必需的固定序列，不能更改；蓝色碱基则需要根据靶点序列更改（注意 target oligo As 中蓝色的碱基为靶点的互补序列，只需要其中的 19 个碱基，最后一个 G 不需要合成）。

4．用 ddH_2O 分别将 oligo 溶解为 10 μM 的溶液，退火，得到粘性末端如下的小片段：

th target_an：5′-ataGGGTGATCCTGATCCAGATCgt -3′
3′- CCACTAGGACTAGGTCTAGcaaaat-5′

退火程序：

oligo s (10 μM)	5 μL	95℃ 5min, -1℃/30sec/cycle, to 4℃
oligo As (10 μM)	5 μL	

5．将退火后的片段与回收的上述 gRNA 克隆骨架 pT7-gRNA_BbsI 连接、转化，挑取克隆，用 *RV-M* 与 target oligo As 作为引物进行菌液 PCR 鉴定（58℃退火，延伸 30 sec，30 cycle）。目的条带约为 130 bp。挑取阳性克隆送测序，选取序列正确的克隆甘油保菌、提质粒。

RV-M 序列：5’-AGCGGATAACAATTTCACACAGGA-3’

连接体系：

pT7-gRNA _BbsI	0.5 μL	16℃，2 h
target_an	2.0 μL	
2*solutionI (Takara)	2.5 μL	

以 *th* 靶位点为例，正确的克隆序列如下（相应的载体称为 pT7-*th*gRNA）:

5′-…GAATTC**TAATACGACTCACTATA**GGGTGATCCTGATCCAGATCgtttagagctagaa
atagcaagttaaaataaggctagtccgttatcaacttgaaaaagtggcaccgagtcggtgctt
ttttttAAAGCTT…-3′

四、制备 Cas9 mRNA 和 gRNA

1．制备 Cas9 mRNA：

（1）制备 Cas9 mRNA 的体外转录模板：通过 XbaI 单酶切线性化 pSP6-2sNLS-spCas9 载体（Amp 抗性）（37℃，4 h 以上）；取少量电泳确认线性化完全后，直接回收线性化产物。

（2）体外转录 Cas9 mRNA。

mRNA 体外转录体系（SP6 mMESSAGE mMACHINE® Kit，Ambion）：

2× NTP/CAP	10 μL	37℃，2h； 加入 1 μL TURBO DNase，37℃、15 min 以去除 DNA 模板；
10× Reaction Buffer	2 μL	
Linearized template DNA	1 μg (<6 μL)	

SP6 Enzyme Mix	2 μL	取 0.3 μL，电泳查看转录效果（1% agarose，产物约 2 Kbp）；回收 mRNA。
DEPC H_2O	To 20 μL	

（3）添加 polyA 序列、回收得到可用于显微注射的 Cas9 mRNA（添加 polyA 序列可增强 mRNA 的稳定性和翻译效率）。

mRNA 加 polyA 的反应体系：
（这里选用的是 NEB 的加 A 体系；也可以使用 Ambion 的加 A 试剂盒）

ATP (10 mM)	5 μL	37℃，1h； 取 0.3 μL，电泳查看加 A 效果；（1% agarose，产物约 2 Kbp，比加 A 前略大）； 回收 mRNA。
10× Reaction Buffer	5 μL	
体外转录、回收的 mRNA		
E. coli Poly(A) 聚合酶	1 μL	
DEPC H_2O	To 50 μL	

2． 制备 gRNA：

（1）制备 gRNA 的 PCR 体外转录模板：用 *T7-cr fwd* 和 *tracr rev* 引物对，以构建好的 gRNA 体外转录载体（例如 pT7-*th*gRNA 质粒）为模板，使用高保真酶 PCR，得到 gRNA 体外转录模板（58℃退火，延伸 30 sec，40 cycle，40 μL 体系）。取 1 μL PCR 产物电泳，确认为单一条带（125 bp）后直接回收 PCR 产物，用于后续的步骤。

T7-cr fwd 序列：5’-GAAATTAATACGACTCACTATA-3’
tracr rev 序列：5’-AAAAAAAGCACCGACTCGGTGCCAC-3’

（2）体外转录 gRNA。

gRNA 体外转录体系：
（这里选用的是 Ambion 的 MAXIscript® T7 Kit；也可以使用其它的体外转录体系，例如 Promega 的产品，但是不要用体外转录 mRNA 的体系。）

2.5 mmol/L NTP	4 μL	37℃，1h； 加入 1 μL TURBO DNase，37℃、15 min 以去除 DNA 模板； 取 0.3 μL，电泳查看转录效果（3% agarose，产物 100 bp 左右）； 回收 gRNA。
10× Reaction Buffer	2 μL	
Template DNA	1 μg (<6 μL)	
T7 Enzyme Mix	2 μL	
DEPC H_2O	To 20 μL	

（3）回收 gRNA：建议使用 Ambion 的 mirVana™ miRNA Isolation Kit 进行回收。也可采用 LiCl 沉淀法，但效率较低。

用 mirVana™ miRNA Isolation Kit 回收小片段 RNA:

1）用 RNase-free water 将 gRNA 转录体系稀释到 300 μL，加入 330 μL 无水乙醇;

2）将溶液加到回收柱中，10000 g 离心 15 s（转速太高会损伤滤膜）;

3）加入 700 μL 的 miRNA Wash Solution I，离心 5~10 s;

4）加入 500 μL 的 Wash Solution II，离心 5~10 s；重复一次;

5）弃去收集管中的液体，离心 1 min，去除残余的液体；

6）加入适量 95℃预热的 RNase-free water 或 Elution Solution，最大转速离心 20~30 s，收集得到 gRNA 溶液。

五、制备 F_0 斑马鱼与靶点突变效率检测

1. 将 Cas9 mRNA 和 gRNA 混和，注射到单细胞期斑马鱼胚胎中（每个靶点建议至少注射 200 枚胚胎）。同时留一些未注射的同批胚胎作为对照。可尝试不同的注射量，推荐剂量为 Cas9 mRNA 300~500 pg，gRNA 25~200 pg。

2. 取 2~4 dpf 注射后表型正常的胚胎（30 枚，5 枚/管），提取基因组 DNA，PCR、酶切检测靶位点突变效率。未切开的 PCR 条带占所有条带的荧光亮度的百分比可大致反映该靶点的突变效率。也可以选用直接克隆测序等其他方法代替酶切检测突变效率。

例：BstYI 酶切检测 *th* 位点的突变效率（图 2）:

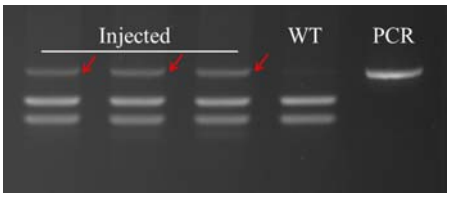


图 2. *th* Cas9 靶点酶切鉴定结果
箭头所指为酶切位点被破坏的潜在突变条带。此例的靶点突变效率约为 20％。

一种提取基因组 DNA 的简易方法（**仅适用**于基因组 DNA 的短片段 PCR）:

1）将 1~5 个胚胎去膜后转移到 PCR 管中；

2）根据胚胎数加入适量的 50 mmol/L NaOH（每个胚胎 10 μL 左右）；

3）PCR 仪加热裂解胚胎，程序：95℃ 10min，4℃ forever；取出后 Vortex 振荡均匀；加入 1/10 体积 1 mol/L Tris（pH8.0）中和 NaOH，混匀。

3. 将未切开的条带回收、TA 克隆测序，检测突变类型。

4. 选取突变效率较高（最好能>10%，这样更便于筛选）、存活率较高的同批次注射的 F_0 胚胎养大（每个靶点建议至少饲养 60 条 F_0 成鱼），用于检测/筛选可遗传的突变。

六、检测 F_0 的 germline transmission

1. 将 F_0 胚胎饲养至性成熟。

2. 与野生型（WT）成鱼外交，将 3~5 个 1 dpf 的 F_1 胚胎混和为一组提取基因组 DNA。每条 F_0 建议检测 20 个以上的 F_1 胚胎；建议优先筛选雄性 F_0。

3. 通过 PCR 和酶切检测靶位点突变情况。

4. 回收未切开的条带、TA 克隆测序，确定突变类型。可以将同一个 F_0 的所有未切开条带混和回收、TA 克隆测序；每个 F_0 送 3~4 个阳性克隆测序即可，以确定该 F_0 主要产生的突变类型。

5. 选取可产生有效突变的 F_0 鱼外交，大量饲养 F_1（每个 F_0 建议至少饲养 60 条 F_1 成鱼），用于筛选带有突变的 F_1 成鱼（杂合子）。

七、筛选携带靶位点突变的 F_1 成鱼

1. 将 F_1 饲养至足够大，直至适合剪尾鳍（1~2 个月即可）。
2. F_1 成鱼剪尾鳍、提基因组，通过 PCR 和酶切逐条进行基因型检测，筛选出 F_1 杂合子。建议每一轮检测两个 F_0 的 F_1 成鱼各 20 条；如果没有筛选到足够量的 F_1 杂合子，可以再做第二轮，甚至第三轮。
3. 回收未切开的条带、TA 克隆，测序确定突变类型。带有同一突变 allele 的鱼可以混养；最好能筛选到分别带有两种不同的移码突变的 allele（allele-1，allele-2），并且雌雄均有。由于每条 F_0 主要产生一种突变类型（一种 allele），建议分批测序，每次先测少量的鱼系和克隆（例如两雌两雄）。

附件 1：所需载体示意图

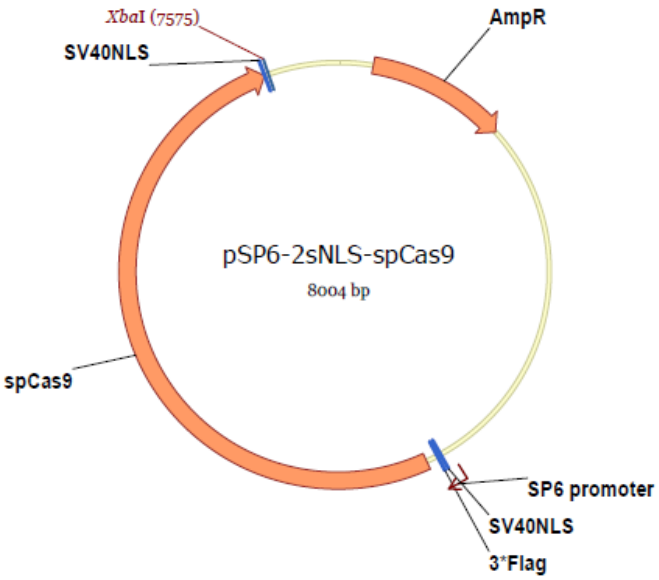


图 3. Cas9 mRNA 体外转录载体

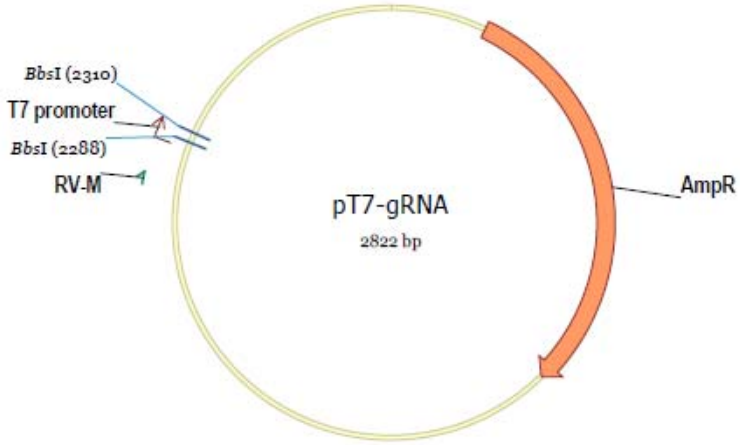


图 4. gRNA 克隆与体外转录载体

附件 2：所需实验材料与试剂

野生型斑马鱼（建议选用实验室常用的近交系品种）。

限制性内切酶：BbsI（Fermentas，ER1011）；XbaI（NEB，R0145L）；鉴定靶点突变效率所需的内切酶（因靶点而异）。

试剂盒：微量琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒（康为世纪，CW0524）；质粒小提试剂盒（康为世纪，CW0511）；快速DNA产物纯化试剂盒（康为世纪，CW2301）；DNA连接试剂盒（TaKaRa，D6020）；pMD®18-T simple（TaKaRa，D103A，用于突变条带的TA克隆和测序）；SP6 mMESSAGE mMACHINE Kit（Ambion，AM1340，用于体外转录Cas9 mRNA）；Poly(A) Tailing Kit（Ambion，AM1350，用于为Cas9 mRNA加polyA）；MAXIscript® T7 Kit（Ambion，AM1312，用于gRNA的体外转录）；mirVana™ miRNA Isolation Kit（Ambion，AM1561，用于gRNA的纯化）。

其他试剂：2×Taq PCR StarMix（含染料）（GenStar，A115-01）；Pyrobest® DNA Polymerase（Takara，DR005A，用于gRNA模板的高保真PCR）；琼脂糖；DNA marker；1×TAE；氨苄青霉素；LB琼脂培养基；LB液体培养基；1 mol/L Tris（pH 8.0）；50 mmol/L NaOH；无水乙醇；超纯水（ddH_2O，18MΩ）；RNase-free water。

仪器设备（养鱼设施除外）：超净工作台（细菌操作用），细菌培养摇床，台式离心机，凝胶电泳仪，凝胶电泳槽，凝胶成像仪，水浴锅，恒温培养箱，漩涡振荡器（Vortex），紫外分光光度计，PCR仪，显微注射装置，体视显微镜，恒温培养箱，配鱼缸（50个左右），台式冷冻离心机

耗材：细菌培养皿，移液器，移液器吸头，Eppendorf离心管，PCR管，显微注射针。

引物列表：

RV-M：5’-AGCGGATAACAATTTCACACAGGA-3’

T7-cr fwd：5’-GAAATTAATACGACTCACTATA-3’

tracr rev：5’-AAAAAAAGCACCGACTCGGTGCCAC-3’

所需养鱼缸估算：

每个靶点的 F_0 建议至少养 60 条，需要 1 个大缸或 2 个中缸，至少占用两个月。筛选出有 germline transmission 的 F_0 用小缸单独养，每个靶点至少养两条这样的 F_0，所以要占用 2 个小缸，至少占用两个月（建议筛选到 F_1 杂合子成鱼后再弃去这两条 F_0）。

筛选 F_0 时要有足够多的小缸来分缸养鱼，具体数量取决于筛选量。建议至少准备 40 个小缸（循环使用）。

F_1 的饲养量取决于 germline transmission 的效率，每个 line（F_0）建议至少养 60 条 F_1。每个靶点按 2 个 line 计算，需占用 2 个大缸或 4 个中缸 1~2 个月，筛选到的 F_1 杂合子要永久占用 2 个中缸（两种突变类型）（得到足够量的 F_1 后可停止筛选，用中缸饲养至性成熟）。

因此，每个靶点至少需要 **2 个大缸**（或 4 个中缸；饲养 F_0 和 F_1，占用 5 个月）、**2 个中缸**（饲养 F_1 杂合子，永久占用）、**2 个小缸**（饲养 F_0，占用 2 个月）；还需要 **40 个小缸**，供所有靶点共用（筛选 F_0，永久占用）。此外，要准备足够的野生型斑马鱼用于外交（按筛选雄鱼计算，一雄配两雌，每天 30 个 cross，需要 60 条雌鱼，一周需要 420 条；加上损耗，约需 500 条雌鱼供每周循环使用）。

附件 3：主要试剂及费用估算
（不包括养鱼的成本，以及常规 PCR、分子克隆的费用）

1、Cas9 mRNA 的合成：<10 元/靶点。

（1）mRNA 合成试剂盒：248.4 元/rxn

mMESSAGE mMACHINE® SP6 Kit（Ambion AM1340）：￥6210，25 rxns。

注：每个反应可以合成约 20 μg 的 mRNA，可多次使用（每次注射仅需数百 ng 的 Cas9 mRNA）。

（2）加 A 反应：109.3 元/rxn，或 36.5 元/rxn

推荐试剂：Poly(A) Tailing Kit（Ambion AM1350）：￥2734，25 rxns。

可选试剂：*E.coli* Poly(A) polymerase（NEB #M0276S）：￥729，20 rxns（需要两次纯化，有损失）

小结：若用推荐试剂合成 mRNA，每次反应约需￥350，得到 20 μg mRNA；这些 mRNA 可至少用于 40 次注射，约￥9/次，几乎可忽略不计。

2、gRNA 的合成：263.2 元/靶点，或 122.2 元/靶点。

（1）oligo 订购及其它：100 元/靶点

两个 oligo 共 50 个碱基，￥50；

模板制备及克隆、测序、提质粒：约￥50。

（2）gRNA 合成试剂盒：77.3/rxn，或 22.2/rxn

推荐试剂：MAXIscript® T7 Kit（Ambion，AM1312）：￥2320，30 rxns。

可选试剂：T7 RNA polymerase（Promega，P2075）：￥554，25 rxns；

+ NTP mix（花费较少）。

（3）gRNA 纯化/回收试剂盒：85.9/rxn，或忽略不计

推荐试剂：mirVana™ miRNA Isolation Kit（Ambion，AM1561）：￥3437，40 rxns。

可选试剂：LiCl、乙醇或者异丙醇沉淀，花费很少，但产率较低。

小结：若用推荐试剂合成 gRNA，每个 gRNA 花费￥263.2；
若用 Promega 体外转录体系+沉淀回收，每个 gRNA 花费￥122.2。

可见，本实验的主要花费在于 gRNA 的合成。每个靶点的成本在 150~300 元。

附件 4：工作量及时间成本估算

工作量主要集中在三个阶段：

1、 RNA 合成和注射及效率检测：限速步骤在显微注射这一步。

（1）每人每天可构建 10 个 gRNA 载体：从完成靶位点 oligo 退火的步骤开始，只需要一轮分子克隆（酶切—连接—转化）的操作即可构建出 gRNA 体外转录载体。每人每天可以做一次克隆，每次可以做 10 个以上的载体（相当于 10 个以上的靶点）。

（2）Cas9 mRNA 体外转录载体的模板线性化和纯化回收约需要 5 h，加 A 再纯化需要约 2h；gRNA 模板 PCR 和纯化回收约需要 3 h；Cas9 mRNA 和 gRNA 体外转录需要反应 2 h，纯化回收需要 1~1.5 h（建议模板在 RNA 合成前一天准备好；可同时操作多个 gRNA 合成，根据个人能力而定，但建议每次在 10 个以下，以免相互混淆）。

（3）每人每天可以注射约 5 个靶点。

（4）每人一天内可完成 5 个靶点的检测：每个靶点约检测 30 枚 3 dpf 左右的胚胎，分为 6 管进行 PCR 和酶切鉴定。

2、 F_0 筛选（显微注射 2~3 个月之后）：限速步骤在于 germline transmission 的效率。建议选取效率在 10%以上的靶位点进行筛选。

每人每天可以外交 30 条 F_0（相当于检测一个靶点）。假设都得到了足够的胚胎，每个 F_0 的后代胚胎取 20 枚，分 4 管进行 PCR、酶切检测，共需要 120 个 PCR 和酶切反应。对于效率在 10%以上的位点，30 条 F_0 中至少会有一条有 germline transmission。

按照上述步骤，相当于每人每天可检测一个靶位点，得到杂合的 F_1 胚胎。

3、 F_1 成鱼剪尾鳍鉴定（F_0 外交 1~2 个月之后）：限速步骤依然为 germline transmission 的效率。

每人每天可以完成约 40 条 F_1 成鱼的剪尾鳍、提取基因组 DNA、PCR 和酶切鉴定（相当于检测一个 F_0 的后代）。如果靶点的突变效率有保证，至少应该可以筛选到一条杂合的 F_1 成鱼。

一般来说，在一天之内能够完成酶切和切胶回收的步骤，可以鉴定出 F_1 中是否有杂合子。但是，考虑到紧接着要为测序而做 TA 克隆，这样一天的时间就会比较紧张。因此，建议根据所选内切酶的特性灵活掌握酶切时间（1 h~overnight），在 1~2 天内完成克隆。