



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108707629 A  
(43)申请公布日 2018.10.26

(21)申请号 201810527945.7

(22)申请日 2018.05.28

(71)申请人 上海海洋大学

地址 201306 上海市浦东新区沪城环路999号

(72)发明人 张庆华 郭欣娅 董雪红 岳倩文 李伟明

(74)专利代理机构 上海伯瑞杰知识产权代理有限公司 31227

代理人 曹莉

(51)Int.Cl.

C12N 15/90(2006.01)

C12N 9/22(2006.01)

A01K 67/027(2006.01)

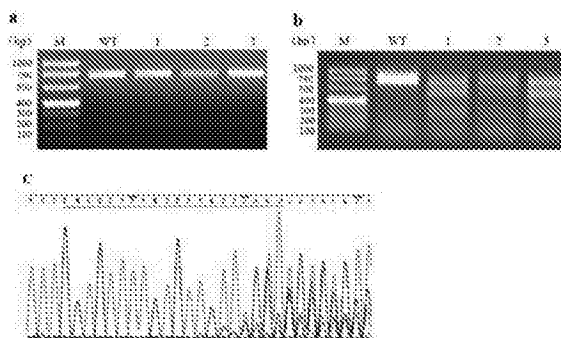
权利要求书1页 说明书7页  
序列表1页 附图2页

(54)发明名称

斑马鱼notch1b基因突变体的制备方法

(57)摘要

本发明公开了一种斑马鱼notch1b基因突变体的制备方法;包括如下步骤:确定notch1b基因敲除的靶点位置;以pUC19-gRNA scaffold质粒为模板,使用引物T7-notch1b-sfd、tracr rev进行PCR扩增;对PCR产物纯化、体外转录获得gRNA;将gRNA与Cas9mRNA导入斑马鱼一细胞期胚胎中,培养获得稳定遗传的notch1b基因突变体。本发明利用CRISPR/Cas9技术,通过选择独特的一段打靶区,使得斑马鱼中的notch1b基因被敲除,又不“误伤”其他基因,形成Notch1b敲除的斑马鱼,对于研究Notch信号通路意义重大。



1. 一种斑马鱼notch1b基因突变体的制备方法,其特征在于,所述方法包括如下步骤:
  - S1、确定notch1b基因敲除的靶点在斑马鱼notch1b基因序列的第四个外显子上;
  - S2、根据步骤S1确定的靶点序列设计扩增引物;
  - S3、以pUC19-gRNA scaffold质粒为模板,使用引物T7-notch1b-sfd、tracr rev进行PCR扩增;
  - S4、对步骤S3的PCR产物进行纯化,体外转录获得gRNA;
  - S5、将gRNA与Cas9 mRNA导入斑马鱼中;
  - S6、培养获得稳定遗传的斑马鱼notch1b基因突变体。
2. 根据权利要求1所述的斑马鱼notch1b基因突变体的制备方法,其特征在于,步骤S2中,所述靶点序列为如SEQ ID NO.2所示的序列。
3. 根据权利要求1所述的斑马鱼notch1b基因突变体的制备方法,其特征在于,步骤S3中,pUC19-gRNA scaffold质粒模板序列为如SEQ ID NO.1所示的序列。
4. 根据权利要求1所述的斑马鱼notch1b基因突变体的制备方法,其特征在于,步骤S3中,所述引物T7-notch1b-sfd的序列为如SEQ ID NO.3所示的序列。
5. 根据权利要求1所述的斑马鱼notch1b基因突变体的制备方法,其特征在于,步骤S3中,所述引物tracr rev的序列为如SEQ ID NO.4所示的序列。
6. 根据权利要求1所述的斑马鱼notch1b基因突变体的制备方法,其特征在于,步骤S4中,所述gRNA的序列为如SEQ ID NO.7所示的序列。
7. 根据权利要求1所述的斑马鱼notch1b基因突变体的制备方法,其特征在于,步骤S5中,将gRNA与Cas9 mRNA导入斑马鱼,具体为:将gRNA与Cas9 mRNA混合,显微注射到斑马鱼一细胞期胚胎中;其中,gRNA终浓度为100ng/ $\mu$ L,Cas9 mRNA终浓度为400ng/ $\mu$ L。
8. 根据权利要求1所述的斑马鱼notch1b基因突变体的制备方法,其特征在于,步骤S6具体包括如下步骤:
  - A1、对导入gRNA与Cas9 mRNA的48hpf斑马鱼进行notch1b基因敲除检测,确定notch1b F<sub>0</sub>靶点突变效率;
  - A2、将notch1b F<sub>0</sub>基因检测敲除成功的成鱼与WT斑马鱼外交,得到F<sub>1</sub>胚胎;经基因型鉴定获得notch1b F<sub>1</sub>突变体斑马鱼;
  - A3、将相同突变的notch1b F<sub>1</sub>突变体斑马鱼内交,获得notch1b F<sub>2</sub>突变体斑马鱼;
  - A4、鉴定为F<sub>2</sub>中notch1b基因敲除的纯合子即所述稳定遗传的斑马鱼notch1b基因突变体。
9. 根据权利要求8所述的斑马鱼notch1b基因突变体的制备方法,其特征在于,步骤A1中,notch1b基因敲除检测采用的引物序列为如SEQ ID NO.5和SEQ ID NO.6所示的序列。

## 斑马鱼notch1b基因突变体的制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种斑马鱼突变体,具体涉及一种斑马鱼notch1b基因突变体的制备方法。

### 背景技术

[0002] Notch信号通路是广泛存在于脊椎动物和无脊椎动物细胞中且高度保守的信号途径,其受体在不同物种之间(从果蝇到人)以及同一物种的不同成员之间都有高度的结构同源性,由相邻细胞膜外配体与受体相互作用进而调控激活下游通路的典型信号通路,并与其它信号通路共同构成复杂而庞大的网络结构。越来越多的研究发现,Notch信号通路可以通过调节多种免疫细胞的发育和功能来调节机体的免疫功能,而且还可以直接调控免疫因子的表达。

[0003] CRISPR/Cas (Clustered Regularly Interspersed Short Palindromic Repeats, CRISPR/CRISPR-associated genes, Cas gene) 系统是一种微生物的后天免疫系统,其主要功能是对抗入侵的病毒及外源DNA,利用向导RNA核酸酶对外源基因进行切割。CRISPR技术是最新出现的第三代基因组编辑工具,它能够完成RNA导向的DNA识别及编辑。CRISPR/Cas有三种类型:I型、II型和III型,其中Type II的运用最多,只需要一个Cas9核酸内切酶切割DNA双链,即CRISPR/Cas9系统,Cas9蛋白主要促进crRNA的成熟,降解侵入的噬菌体DNA或者入侵的外源质粒。相比于锌指核酸酶(Zinc-finger nuclease, ZFN)和转录激活样效应因子核酸酶(transcription activator-like effector nuclease, TALEN),CRISPR/Cas9系统具有容易合成、打靶效率高、靶向精确、易于操作和细胞毒性低等优势,而且其高效性在确保体细胞内对基因进行突变的同时,也能造成生殖细胞的突变,从而将突变基因传递到下一代。

[0004] Notch1b是鱼类Notch信号通路中的一个受体,与小鼠Notch1、斑马鱼Notch1a受体表现出类似的高水平的一致性,分别为73%和72%,而与小鼠的Notch3、Notch4、大鼠的Notch2一致性比较低,分别为51%、37%、和54%。在小鼠中,利用Cre-loxp系统条件性敲除肝窦内皮Notch1重组信号结合蛋白J(RBP-J),导致小鼠肝窦内皮细胞增殖、肝脏充血、肝窦内纤维蛋白样物质沉积等肝静脉闭塞病样改变。最新研究表明,利用Cre-loxp系统特异性敲除小鼠骨髓中的Notch1,结果加剧了由病毒引起的干细胞损伤,增加了巨噬细胞和嗜中性粒细胞的浸润和非应激性的干细胞凋亡。然而,目前关于小鼠中Notch1突变体的研究不足,并且小鼠模型的构建及维护费用昂贵。

[0005] 斑马鱼notch1b基因位于第5号染色体上,有3个转录本,其中最长的一个转录本mRNA全长7824bp,编码2436个氨基酸,含有35个外显子和34个内含子。如何选择有一个功能的靶点,使整个基因失去功能而且易于筛选是十分困难的,成功构建notch1 b的突变体,对于研究Notch信号通路的功能是十分必要的。

### 发明内容

- [0006] 本发明的目的在于提供一种斑马鱼notch1b基因突变体的制备方法。
- [0007] 本发明的目的是通过以下技术方案来实现的：
- [0008] 本发明涉及一种斑马鱼notch1b基因突变体的制备方法，所述方法包括如下步骤：
- [0009] S1、确定notch1b基因敲除的靶点在斑马鱼notch1b的基因序列的第四个外显子上；
- [0010] S2、根据步骤S1确定的靶点序列设计扩增引物；
- [0011] S3、以pUC19-gRNA scaffold质粒为模板，使用引物T7-notch1b-sfd、tracr rev进行PCR扩增；
- [0012] S4、对步骤S3的PCR产物进行纯化，体外转录获得gRNA；
- [0013] S5、以pXT7-hCas9质粒为模板，体外转录合成Cas9 mRNA；
- [0014] S6、将gRNA与Cas9 mRNA导入斑马鱼一细胞期胚胎中；
- [0015] S7、培养获得稳定遗传的斑马鱼notch1b基因突变体。
- [0016] 优选的，步骤S2中，所述靶点序列为GGTGCTCCGTGCCGAAACGG (SEQ ID NO.2)。
- [0017] 优选的，步骤S3中，pUC19-gRNA scaffold质粒模板序列为：GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTTTTT (SEQ ID NO.1)。
- [0018] 优选的，步骤S3中，所述引物T7-notch1b-sfd的序列为TAATACGACTCACTATAGGTGCTCCGTGCCGAAACGGGTTTTAGAGCTAGAAATAGC (SEQ ID NO.3)。
- [0019] 优选的，步骤S3中，所述引物tracr rev的序列为AAAAAAGCACCGACTCGGTGCCAC (SEQ ID NO.4)。
- [0020] 优选的，步骤S4中，所述gRNA的序列为T7启动子+靶位点+pUC19-gRNA固定序列，所述gRNA的序列为TAATACGACTCACTATAGGTGCTCCGTGCCGAAACGGGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTTTTT (SEQ ID NO.7)。是使用T7-notch1b-sfd和tracr rev引物对，以pUC19-gRNA scaffold质粒为模板，使用高保真酶Phusion® High-Fidelity PCR Master Mix with HF Buffer，电泳、切胶回收获得。
- [0021] 优选的，步骤S5中，所述Cas9 mRNA是通过包括如下步骤的方法制备而得：
- [0022] A1、pXT7-hCas9质粒线性化，用XbaI内切酶酶切质粒pXT7-hCas9；
- [0023] A2、酶切产物纯化，用DNA Clean&Contentrator TM-5 kit纯化试剂盒对上述质粒酶切产物进行纯化；
- [0024] A3、体外转录Cas9 mRNA，用mMESSAGE mMACHINE T7ULTRA kit体外转录试剂盒对Cas9 mRNA进行体外转录；
- [0025] A4、对得到的产物进行加尾后用Nanodrop 2000C测浓度并-80℃保存备用。
- [0026] 优选的，步骤S6中，将gRNA与Cas9 mRNA导入斑马鱼具体为：将gRNA与Cas9 mRNA混合，显微注射到斑马鱼一细胞期胚胎中；其中，gRNA终浓度为100ng/μL，Cas9 mRNA终浓度为400ng/μL。
- [0027] 优选的，步骤S7中，具体包括如下步骤：
- [0028] B1、对导入gRNA与Cas9 mRNA的斑马鱼进行notch1b敲除检测，确定notch1b F<sub>0</sub>靶点突变效率；
- [0029] B2、将notch1b F<sub>0</sub>成鱼与WT斑马鱼外交，得到F<sub>1</sub>胚胎；经基因型鉴定获得notch1b

F<sub>1</sub>突变体斑马鱼；

[0030] B3、将相同突变的notch1b F<sub>1</sub>突变体斑马鱼内交,获得notch1b F<sub>2</sub>突变体斑马鱼；

[0031] B4、鉴定F<sub>2</sub>中notch1b敲除的纯合子,F<sub>2</sub>中notch1b基因敲除的纯合子即所述稳定遗传的斑马鱼notch1b突变体。

[0032] 优选的,步骤B1中,notch1b敲除检测采用的引物序列为notch1b F: GATGATGATGTAATTGTGGGAG (SEQ ID NO.5):notch1b R:CACGAGATCATATCCATATCAC (SEQ ID NO.6)。

[0033] 本发明用CRISPR/Cas9技术制备notch1b突变体,未发现明显的表型,并且notch1b纯合突变体能成活长至成鱼,并且可繁殖后代,纯合突变体内交产生的F<sub>3</sub>斑马鱼也未发现明显的表型。同时,本发明用CRISPR/Cas9技术制备notch1b突变体,可实现永久性特异性的基因敲除,并可遗传给后代,且遗传背景清晰干净,能为研究斑马鱼天然免疫和早期发育中Notch信号通路的功能提供可靠的材料保障。

[0034] 与现有技术相比,本发明具有如下有益效果:

[0035] 1、利用CRISPR/Cas9技术及一段特异的打靶位点,首次在斑马鱼中敲除notch1b。

[0036] 2、notch1b突变可稳定遗传,方便深入研究notch1b的基因功能。

[0037] 3、notch1b纯合突变体可长至成鱼,并可繁殖后代。

[0038] 4、利用CRISPR/Cas9技术,设计独特的一段打靶区,使得斑马鱼中的notch1b基因被敲除,又不“误伤”其他基因,形成notch1b敲除的斑马鱼。

## 附图说明

[0039] 图1为notch1b F<sub>0</sub>敲除检测示意图;其中,a为notch1b F<sub>0</sub>斑马鱼胚胎PCR产物,b为T7E1内切酶酶切鉴定结果,c为PCR产物测序结果;

[0040] 图2为notch1b F<sub>1</sub>突变类型统计;

[0041] 图3为notch1b F<sub>2</sub>成年斑马鱼基因型检测结果;其中,a为notch1b杂合突变体内交的F<sub>2</sub>成鱼剪尾PCR结果;b为部分T7E1内切酶酶切鉴定杂合突变体结果;c为第一次酶切未切开的PCR产物与WT PCR产物1:1混合,部分T7E1内切酶酶切鉴定纯合突变体结果;d为WT和notch1b纯合突变体PCR产物测序峰图序列比对结果。

## 具体实施方式

[0042] 下面结合实施例对本发明进行详细说明。以下实施例将有助于本领域的技术人员进一步理解本发明,但不以任何形式限制本发明。应当指出的是,对本领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明构思的前提下,还可以做出若干调整和改进。这些都属于本发明的保护范围。

[0043] 实施例

[0044] 1材料及设备

[0045] 1.1实验用鱼

[0046] 本实验中所用的斑马鱼均为AB品系,购置于中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所斑马鱼平台。

[0047] 1.2质粒

[0048] pXT7-hCas9质粒,pUC19-gRNA scaffold质粒来源于文献:Chang N,Sun C,Gao L,Zhu D,Xu X,Zhu X,Xiong JW,Xi JJ.Genome editing with RNA-guided Cas9nuclease in zebrafish embryos,Cell Res,2013,23(4):465-472。

[0049] 在gRNA产物合成中用到的pUC19-gRNA scaffold质粒模板序列为:

[0050]

GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTTT(SEQ ID NO.1)。

[0051] 1.3主要试剂

[0052] DNA Clean&Contentrator-5 (ZYMO RESEARCH,D4004),普通DNA纯化试剂盒(TIANGEN,DP204-03),**MAXIscript**<sup>®</sup>T7in vitro Transcription Kit(Ambion,AM1314),乙醇(无水乙醇)(国药集团化学试剂有限公司,10009218),GenCrisprNLS-Cas9-NLS(金斯瑞,Z03389-25),Premix Taq<sup>™</sup>(Ex Taq<sup>™</sup> Version 2.0plus dye)(TAKARA,RR902),DNA Marker I(TIANGEN,MD 101-02),T7endonuclease 1(NEW ENGLAND**BioLab**<sup>®</sup>Inc.,M0302L),快速质粒小提试剂盒(TIANGEN,DP105),DH5 $\alpha$ 感受态细胞(TIANGEN,CB101-03),2BEasyTaq PCR SuperMix(+dye)(TAKARA,AS111-12),LB Broth(上海生工,D915KA6602),LB Broth agar(上海生工,D911KA6566),pMD<sup>™</sup>19-T Vector Cloning Kit(TAKARA,6013)。

[0053] 1.4主要仪器

[0054] PCR仪(品牌: BIO-RAD,型号: c1000Touch<sup>™</sup>Thermal Cycler),离心机(品牌: eppendorf,型号: Centrifuge 5424),震荡混匀仪(品牌: VORTEX-GENIE,型号: G560E),紫外分光光度计(品牌: Thermo Scientific,型号: Nanodrop 2000C),电泳仪(品牌: BIO-RAD,型号: PowerPac Basic),照胶仪(品牌: BIO-RAD,型号: Gel Doc EZ Imager),电子天平(品牌: METTLER TOLEDO,型号: AL104),玻璃毛细管(品牌: WPI,型号: TW100F-4),Milli-Q Direct 8超纯水系统(品牌: Millipore,型号: Milli-Q Direct 8),垂直拉针仪(品牌: NARISHIGE,型号: PC-10),恒温摇床(品牌: Innova,型号: 40R),磨针器(品牌: NARISHIGE,型号: EG-400),微量注射泵(品牌: WARNER,型号: PLI-100A),恒温水浴锅(品牌: 精宏,型号: H1401438,DK-8D),4℃冰箱(品牌: Haier,型号: HYC-610),-40℃低温冰箱(品牌: Haier,型号: DW-40L508),-80℃超低温冰箱(品牌: Pana-sonic,型号: MDF-U53V),高压蒸汽灭菌锅(品牌: SANYO,型号: MLS-3780)。

[0055] 2实验方法

[0056] 2.1gRNA合成

[0057] (1)靶点设计

[0058] a、下载序列:在Ensembl数据库查找并下载斑马鱼notch1b的基因序列。

[0059] b、靶点设计:利用<http://zifit.partners.org/ZiFiT/ChoiceMenu.aspx>网站在notch1b基因ATG之后的外显子序列上设计靶点(表1)。靶点设计在notch1b的第四个外显子上。

[0060] c、靶点特异性检测:在NCBI网站将设计的靶点序列通过blast比对,验证靶位点特异性。

[0061] d、亲本检测:将用于基因敲除的WT斑马鱼剪尾并用碱裂解法获得基因组DNA,进行PCR扩增靶点附近的一段序列。

[0062] e、酶切检测：用T7E1内切酶酶切检测WT斑马鱼，看T7E1酶能否将扩增的片段切开，若切不开，则可用于后续敲除检测；若被切开，则需要根据扩增序列信息选择特异性的酶进行酶切检测。

[0063] f、测序鉴定：将PCR产物送测序，峰图及序列比对，确认亲本为纯合子，不存在自然突变，从而保证后续制备的突变体为基因敲除后造成的。

[0064] 表1 notch1b靶位点序列

[0065]

| 基因             | 所在染色体 | 基因全长/bp | mRNA长度/bp | 氨基酸个数/aa | 内含子个数 | 外显子个数 | 靶序列 (5'-3')                           | 靶点所在外显子 |
|----------------|-------|---------|-----------|----------|-------|-------|---------------------------------------|---------|
| <i>notch1b</i> | 5     | 103190  | 7824      | 2436     | 34    | 35    | GGTGCTCCGTGCCGAAACGG<br>(SEQ ID NO.2) | 4       |

[0066] (2) 设计检测引物：设计的引物应保证距离靶点两侧大于100bp，并且上下游引物到靶点的距离与下游引物到靶点的距离应相差大于100bp，至少50bp。引物扩增应具备特异性，扩增片段约500bp。引物在上海生工生物工程股份有限公司合成(表2)。

[0067] 表2实验所用引物信息

[0068]

| 引物名称                    | 引物序列 (5'-3')  | 片段大小/bp | 酶切片段大小/bp |
|-------------------------|---|---------|-----------|
| T7- <i>notch1b</i> -sfd | TAATACGACTCACTATAGGTGCTCCGTGCCGAAACG<br>GGTTTTAGAGCTAGAAATAGC (SEQ ID NO.3) | 120     | —         |
| trac rev                | AAAAAAAGCACCGACTCGGTGCCAC (SEQ ID NO.4)                                     | —       | —         |
| <i>notch1b</i> -F       | GATGATGATGTAATTGTGGGAG (SEQ ID NO.5)  | 539     | 339+196   |
| <i>notch1b</i> -R       | CACGAGATCATATCCATATCAC (SEQ ID NO.6)  |         |           |

[0069] (3) gRNA产物合成：以pUC19-gRNA scaffold质粒为模板，使用引物T7-*notch1b*-sfd、trac rev和2×EasyTaq PCR Super Mix (+dye) 扩增片段并用试剂盒纯化。

[0070] (4) 体外转录：

[0071] 表3反应体系

[0072]

|                         |         |
|-------------------------|---------|
| Nuclease-free Water     | to 20μL |
| DNA template            | 1μg     |
| 10×Transcription Buffer | 2μL     |
| 10mM ATP                | 1μL     |
| 10mM CTP                | 1μL     |

|              |           |
|--------------|-----------|
| 10mM GTP     | 1 $\mu$ L |
| 10mM UTP     | 1 $\mu$ L |
| T7Enzyme Mix | 2 $\mu$ L |

[0073] 注意:最后添加10 $\times$ Transcription Buffer和T7Enzyme mix。

[0074] 混匀并短暂离心后,37 $^{\circ}$ C孵育80min;之后向体系中加入1 $\mu$ L TURBO DNase并混匀,短暂离心后37 $^{\circ}$ C孵育15min。

[0075] (5) 纯化gRNA:

[0076] a、向20 $\mu$ L体外转录体系中加入2.5 $\mu$ L 4M的LiCl和100 $\mu$ L无水乙醇,混匀并短暂离心后放于-80 $^{\circ}$ C冰箱至少1h。

[0077] b、到时间后从冰箱取出,4 $^{\circ}$ C,12000rpm,离心15min。弃上清后用70%乙醇清洗沉淀。4 $^{\circ}$ C,8000rpm,离心5min。弃上清后将离心管放于通风橱中使乙醇挥发干净。

[0078] c、根据沉淀大小加入适量DEPC水溶解gRNA沉淀。

[0079] d、用Nanodrop检测浓度和OD值并用电泳检测。

[0080] 所述gRNA的序列为TAATACGACTCACTATAGGTGCTCCGTGCCGAAACGGGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGTCTTTTTT (SEQ ID NO.7)。

[0081] 2.2 显微注射

[0082] 将gRNA与Cas9 mRNA混合,利用显微注射仪注射到斑马鱼一细胞期胚胎中。混合注射终浓度:gRNA为100ng/ $\mu$ L,Cas9 mRNA为400ng/ $\mu$ L。

[0083] 2.3 T7E1酶切检测敲除效率

[0084] a、提取胚胎基因组

[0085] 每组5枚胚胎,加35 $\mu$ L的50mM NaOH,95 $^{\circ}$ C孵育20min,中间取出振荡。之后加3.5 $\mu$ L 1M TrisHCl (pH $\approx$ 8.0),振荡混匀后离心。

[0086] b、PCR扩增目的片段

[0087] 使用表里中notch1b F (SEQ ID NO.5)与notch1b R (SEQ ID NO.6)引物扩增目的片段。

[0088] 表4 PCR反应体系

[0089]

|                  |               |
|------------------|---------------|
| H <sub>2</sub> O | to 25 $\mu$ L |
| 酶                | 12.5 $\mu$ L  |
| F                | 0.5 $\mu$ L   |
| R                | 0.5 $\mu$ L   |
| Template         | 10ng          |

[0090] PCR反应条件:

[0091] 98 $^{\circ}$ C预变性2sec;98 $^{\circ}$ C变性10sec,60 $^{\circ}$ C退火30sec,72 $^{\circ}$ C延伸1min,共34个循环;72 $^{\circ}$ C再延伸5min;4 $^{\circ}$ C保存。

[0092] 2%琼脂糖凝胶120V电泳25min。

[0093] c、T7E1内切酶酶切检测

[0094] 表5



[0095]

|                  |               |
|------------------|---------------|
| H <sub>2</sub> O | to 10 $\mu$ L |
| PCR产物            | 5 $\mu$ L     |
| Buffer           | 1.1 $\mu$ L   |

[0096] 95℃孵育5min,冷却至室温,加0.25 $\mu$ L T7E1酶,37℃孵育45min。

[0097] d、电泳检测

[0098] 电泳后利用凝胶电泳成像仪对电泳的琼脂糖凝胶成像,观察目的条带,判断敲除是否成功,并计算敲除效率。

[0099] 3实验结果

[0100] 3.1notch1b突变体的构建

[0101] 3.1.1notch1b F<sub>0</sub>基因敲除检测结果

[0102] 结果显示notch1b基因敲除成功,利用Image Lab 5.1软件计算敲除效率达到80%以上。测序峰图显示在16bp靶点处出现套峰,证明敲除成功(图1)。

[0103] 3.1.2notch1b F<sub>1</sub>突变体斑马鱼检测

[0104] 对F<sub>1</sub>斑马鱼进行基因型检测,共得到1种突变类型,在靶点附近缺失5bp。对突变的序列进行氨基酸翻译发现形成翻译的提前终止。notch1b可编码2465个氨基酸,缺失5bp突变体会在110位氨基酸处出现翻译终止(图2)。

[0105] 3.1.3notch1b F<sub>2</sub>突变体斑马鱼检测

[0106] 对F<sub>2</sub>斑马鱼成鱼进行基因型鉴定,从中筛选出纯合突变体,并将PCR产物送测序,峰图及序列比对,确认为纯合子(图3)。将纯合突变体雌鱼和雄鱼进行交配,正常产卵,可繁殖后代。

[0107] 3.1.4notch1b突变体斑马鱼形态学观察

[0108] 将相同突变类型的notch1b杂合突变体斑马鱼内交后,从中筛选纯合突变体,纯合突变体能正常生长和繁殖,并且在成鱼和幼鱼纯合突变体中均没有观察到明显的表型。

[0109] 综上所述,本发明首次在斑马鱼中利用CRISPR/Cas9技术获得notch1b突变体。作为首例利用CRISPR-Cas9方法敲除的Notch1b基因模式动物斑马鱼,可以排除人为因素干预,对于Notch1b基因的功能研究意义重大,同时与传统基因敲除的技术相比,周期短,使得Notch1b基因更快的被敲除。考虑到notch1b基因对机体的重要作用,为深入研究基因的具体功能,我们首次在斑马鱼上利用CRISPR/Cas9技术制备notch1b突变体,为后续基因功能的深入研究提供了实验材料。

## 序列表

<110> 上海海洋大学

<120> 斑马鱼notch1b基因突变体的制备方法

<130> 2018

<160> 8

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 83

<212> DNA

<213> pUC19-gRNA scaffold质粒()

<400> 1

gttttagagc tagaaatagc aagttaaaat aaggetagtc cgttatcaac ttgaaaaagt 60

ggcaccgagt cgggtgctttt ttt 83

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Danio rerio

<400> 2

ggtgctccgt gccgaaacgg 20

<210> 3

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

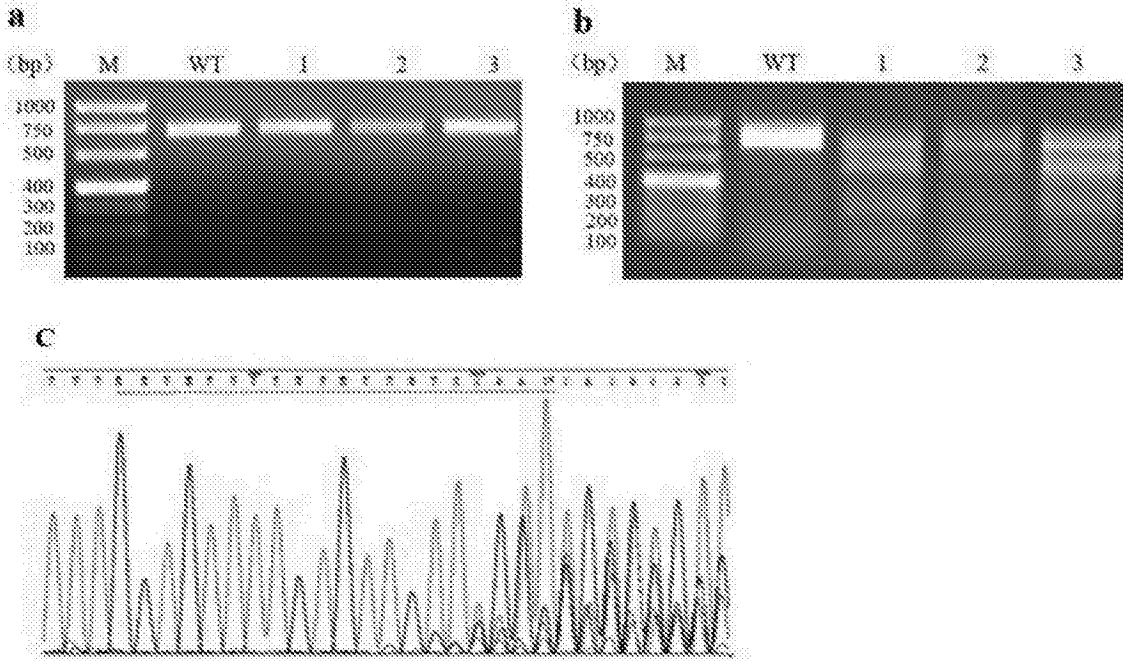


图1

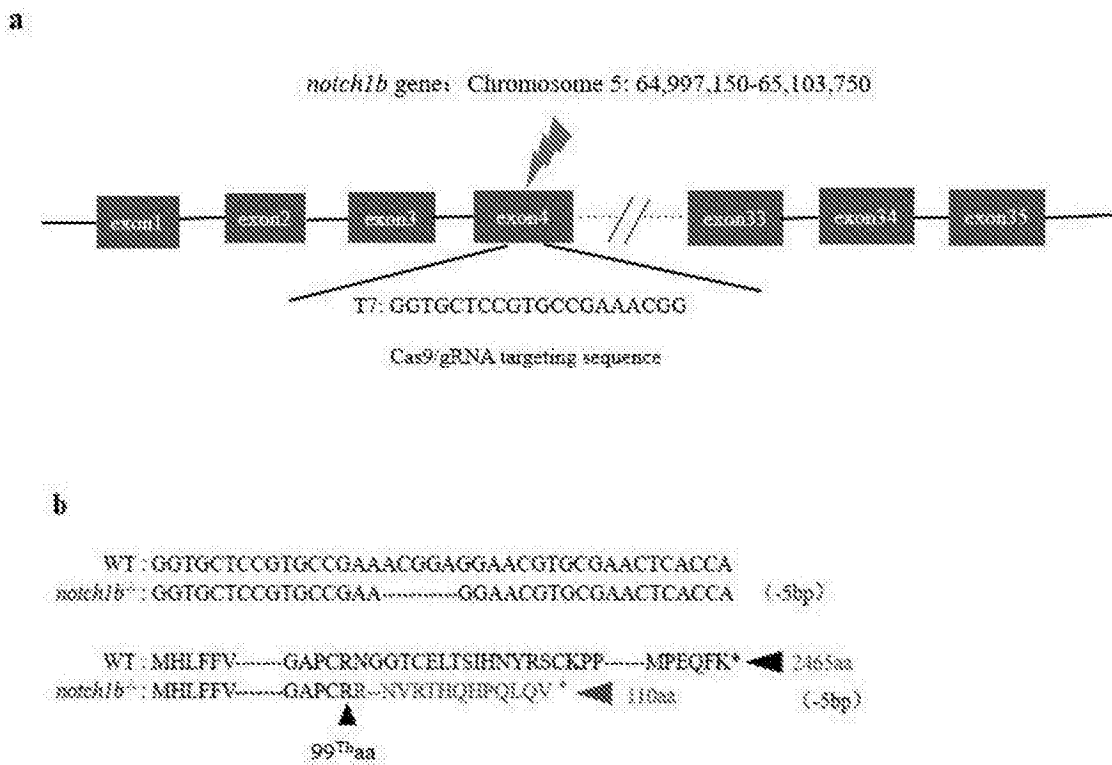


图2

