

# 利用CRISPR/Cas9技术敲除*dync1h1*基因显著影响斑马鱼神经系统发育

钱 亭<sup>1,2</sup> 陈向军<sup>1,2\*</sup> 邓 波<sup>1,2</sup> 张 祥<sup>1,2</sup> 王 旭<sup>3</sup>

(<sup>1</sup>复旦大学附属华山医院神经科, 上海 200040; <sup>2</sup>复旦大学神经病学研究所, 上海 200040;

<sup>3</sup>复旦大学基础医学院生化与分子生物学系及代谢与分子医学教育部重点实验室, 上海 200032)

**摘要** 细胞质动力蛋白(cytoplasmic dynein)是神经系统内重要的马达蛋白复合体, 负责轴浆内重要物质从轴索末端到神经细胞胞体的逆行性运输。重链蛋白二聚体1(dynein 1 heavy chain 1, DYNC1H1)是dynein复合体的核心结构, 其是否正常表达与神经系统发育及神经退行性疾病的发生存在密切联系。该研究运用CRISPR/Cas9基因编辑技术在斑马鱼中对*dync1h1*基因进行敲除, 并将*dync1h1*突变体与转基因鱼*Tg(HuC:mCherry;FLK1:eGFP)*外交, 获得带有荧光标记且突变稳定遗传的斑马鱼种系。表型鉴定提示, *dync1h1*杂合突变斑马鱼发育较野生型斑马鱼无明显异常; 而*dync1h1*纯合突变斑马鱼胚胎正常形态发育受到严重抑制, *dync1h1*基因表达量及Dync1h1蛋白质含量均有明显下降, 脊髓肿胀, 脊髓神经细胞数目显著减少, 背部血管存在发育畸形, 并于受精后5~6 d(days post fertilization, dpf)死亡。该研究利用CRISPR/Cas9技术成功建立了*dync1h1*基因敲除的斑马鱼模型, 为*dync1h1*突变致病机制相关的信号通路或者分子网络间相互作用的探索打下了基础。

**关键词** *dync1h1*; 斑马鱼; CRISPR/Cas9; 神经系统发育异常

## Significant Influence on Nervous System Development in *dync1h1*-knockout Zebrafish Via CRISPR/Cas9 Technology

Qian Ting<sup>1,2</sup>, Chen Xiangjun<sup>1,2\*</sup>, Deng Bo<sup>1,2</sup>, Zhang Xiang<sup>1,2</sup>, Wang Xu<sup>3</sup>

(<sup>1</sup>Department of Neurology Huashan Hospital, Fudan University, Shanghai 200040, China; <sup>2</sup>Neuroscience Research Center of Huashan Hospital, Fudan University, Shanghai 200040, China; <sup>3</sup>Key Laboratory of Metabolism and Molecular Medicine, Ministry of Education Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Basic Medical Sciences, Fudan University, Shanghai 200032, China)

**Abstract** In nervous system, cytoplasmic dynein is an important motor protein complex, which is responsible for the axonal retrograde transportation. Dynein complex drives the movement of cargos from the synapse along the axon and back to the cell body. As the core component of dynein complex, the dimer of heavy chain (DYNC1H1) is highly conserved and has housekeeping functions. Mutants in *dync1h1* may result in many kinds of neurodegeneration diseases. This study generated and verified a heterozygous *dync1h1*-knockout zebrafish model by using CRISPR/Cas9 genome-editing technology, then outcrossed the heterozygous *dync1h1*-knockout zebrafish

收稿日期: 2015-12-25 接受日期: 2016-04-07

国家自然科学基金(批准号: 30870873、81171187)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 021-52888159, E-mail: xiangjchen@fudan.edu.cn

Received: December 25, 2015 Accepted: April 7, 2016

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.30870873, 81171187)

\*Corresponding author. Tel: +86-21-52888159, E-mail: xiangjchen@fudan.edu.cn

网络出版时间: 2016-05-26 16:23:53

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20160526.1623.008.html>

with wild-type and transgenic zebrafish (*Tg*[*HuC:mCherry*;*FLK1:eGFP*]) in order to obtain a stable heterozygous *dync1hl*-knockout line. The results showed that there was no detectable difference in development between the heterozygous *dync1hl*-knockout and wild-type zebrafish, but the morphogenesis in homozygous *dync1hl*-knockout zebrafish was greatly affected, and the expression of gene and protein was decreased significantly. Homozygous *dync1hl*-knockout zebrafish had less neurons in spinal cord and abnormal blood vessels on the dorsal side. Finally, the homozygous *dync1hl*-knockout larvae died at 5-6 dpf (days post fertilization).

**Keywords** *dync1hl*; zebrafish; CRISPR/Cas9; abnormal nervous system development

细胞质动力蛋白(cytoplasmic dynein)复合体参与了细胞有丝分裂中纺锤体定位、细胞核迁移<sup>[1]</sup>、高尔基小体驱动<sup>[2]</sup>等诸多生理活动,在细胞中有非常重要的作用<sup>[3]</sup>。在神经系统中,dynein复合体是重要的逆行性运输马达蛋白,负责将神经细胞生长发育及维持正常生理功能所必需的信号分子、细胞器、有膜小体等从轴索末端运输到神经细胞胞体<sup>[4-5]</sup>,这些重要的物质能够影响基因表达、蛋白质折叠及神经细胞迁移、轴突生长和发育等<sup>[6-7]</sup>。重链蛋白二聚体1(dynein 1 heavy chain 1, DYNC1H1)为dynein复合体的核心结构,是目前发现的轴索中唯一能驱动逆行性运输的蛋白质<sup>[8]</sup>。DYNC1H1包含两个功能域,分别为尾部功能域(tail domain)和运动功能域(motor domain),不同功能域中分布着与不同蛋白作用的结合位点<sup>[9]</sup>。DYNC1H1不同突变可能会导致多种神经退行性疾病<sup>[10-12]</sup>,如肌萎缩侧索硬化症(amyotrophic lateral sclerosis, ALS)<sup>[13]</sup>、脊肌萎缩症(spinal muscular atrophy, SMA)<sup>[14]</sup>、皮质发育异常<sup>[15]</sup>、遗传性运动感觉病<sup>[12]</sup>等,目前具体的致病机制尚不清楚。

模式生物斑马鱼基因组与人类有较高的同源性,且早期神经系统和肌肉组织发育与人类相似,近年来在神经系统发育的研究方面得到了广泛的运用<sup>[16]</sup>。同时,斑马鱼体外受精、体外发育及胚胎透明等优势非常适合开展基因编辑操作,方便构建突变体和转基因种系<sup>[17]</sup>。斑马鱼*dync1hl*基因无论是DNA序列还是氨基酸序列,同源性与人类DYNC1H1基因达到90%左右。

CRISPR/Cas9基因编辑技术是目前比较简易高效的模式生物基因编辑技术<sup>[18]</sup>,其可以在目的基因片段上选择gRNA(guide RNA)靶位点,Cas9 mRNA在gRNA的引导下,可实现对基因组特定位点的剪

切,利用DNA自我修复时可能发生序列错配,引入插入缺失(in-del)突变,导致基因阅读框改变,实现基因敲除的作用<sup>[19,20]</sup>。

本研究使用CRISPR/Cas9基因编辑技术,针对斑马鱼*dync1hl*基因组的尾部功能域设计gRNA作用靶位点,建立了*dync1hl*基因敲除斑马鱼模型。比较*dync1hl*基因突变斑马鱼与野生型斑马鱼形态及神经细胞发育的不同,研究*dync1hl*基因对斑马鱼生长发育的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 实验动物 注射和传代用AB品系斑马鱼(野生型);神经细胞标记有红色荧光及血管内皮标记有绿色荧光的转基因斑马鱼*Tg*(*HuC:mCherry*;*FLK1:eGFP*),在标准温度及光照的循环系统中饲养。胚胎饲养于标准的E3培养液中,每培养皿不超过30颗。胚胎根据具体形态特征区分发育阶段。

1.1.2 质粒 Cas9 mRNA表达质粒pGH-T7-zCas9,用来构建gRNA表达质粒的骨架载体pMD18-T。

### 1.2 方法

1.2.1 gRNA靶位点及鉴定引物设计 在CRISPR/Cas9的靶位点设计网站ZiFiT(<http://zifit.partners.org/ZiFiT/ChoiceMenu.aspx>)寻找符合以下设计要求的gRNA靶位点(targetsite): (1)以*dync1hl*基因组的尾部功能域为模板,寻找5'端为GG、紧邻3'端3个碱基为NGG(PAM区)的20个碱基作为gRNA的靶位点候选序列; (2)将候选序列与*dync1hl*基因组序列比较,选择在外显子或者外显子与内含子交界的序列,能起到破坏基因阅读框或影响mRNA正确剪切的作用,提高基因敲除的效率; (3)将符合以上要求的gRNA靶位点候选序列放入Ensembl(<http://asia.ensembl>).

org/Multi/blastview)网站进行检索, 保证gRNA靶位点作用的唯一性; 注意3'端为NGG, 并与候选序列有较高同源性的片段, 为gRNA潜在脱靶位点(off-targetsite), 需验证以排除; (4)在靶序列5'端添加ata, 3'端添加gt(oligo s), 反向互补链5'端添加taaac, 3'端去掉一个C(oligo As), 作为合成寡核苷酸的最终序列; (5)选择gRNA靶位点上下游约300~400 bp的序列作为模板, 设计基因突变鉴定引物; 如果设计的gRNA靶位点含有同源性较高的脱靶序列(off-target site), 需设计脱靶鉴定引物, 方法同突变鉴定引物。

**1.2.2 gRNA表达质粒构建** 将合成的寡核苷酸粉末稀释后经95 °C退火, 自然降至室温, 两条单链互补成具有黏性末端(ata、gt和taaac)的小片段DNA, 连接进入限制性内切酶*Bbs* I线性化的质粒pMD18-T骨架载体切口中, 经转化, 挑取克隆测序, 得到插入正确序列的克隆, 作为gRNA表达质粒pT7-gRNA。

**1.2.3 体外转录合成gRNA和Cas9 mRNA** (1)制备gRNA。用引物T7-F: 5'-GAA ATT AAT ACG ACT CAC TAT A-3'和tracr-R: 5'-GAA ATT AAT ACG ACT CAC TAT A-3', 以构建好的gRNA表达质粒为模板进行PCR, 直接回收PCR产物, 使用MAXIscript T7试剂盒(Thermofisher公司)进行体外转录, 3%琼脂糖凝胶电泳确定目的条带后, 使用mirVana miRNA Isolation试剂盒(Thermofisher公司)进行回收, 得到可进行显微注射的gRNA原液。(2)制备Cas9 mRNA。使用限制性内切酶*Xba* I线性化pGH-T7-zCas9质粒, 电泳确认线性化完全后, 直接回收线性化产物, 使用mMESSAGE mMACHINE T7试剂盒(Thermofisher公司)进行体外转录, 电泳确定有目的条带后使用RNA回收试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司]回收, 得到可进行显微注射的Cas9 mRNA原液。

**1.2.4 显微注射制备F0斑马鱼** 将gRNA与Cas9 mRNA混匀注射到单细胞期的野生型斑马鱼受精卵中。注射量: gRNA浓度为25~30 ng/ $\mu$ L, Cas9 mRNA浓度为250~350 ng/ $\mu$ L, 每颗受精卵注射1~2 nL。留一些同批未注射的胚胎作为对照组。

**1.2.5 检测gRNA效果** 取受精后24 h(hours post fertilization, hpf)的经显微注射F0胚胎和对照组胚胎各10枚, 分别提取基因组DNA, 并用设计好的突变鉴定引物PCR扩增、胶回收获得PCR产物。PCR产

物测序确认突变, 即如果对照组在gRNA靶位点附近的测序峰图为干净的单一峰, 而显微胚胎注射组在靶位点附近出现双峰或套峰, 则能确定该gRNA有效, 可以造成斑马鱼*dync1hl*基因突变, 且根据杂峰的高度可粗略算出gRNA造成突变的效率。此外, 还可以使用T7核酸内切酶1(T7 endonuclease 1, T7E1)酶切实验初步检测gRNA是否有敲除作用, 具体步骤如下: 取PCR产物5  $\mu$ L, 加入T7E1 Buffer 1.1  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 4.4  $\mu$ L, 95 °C反应5 min。待自然降至室温后, 加入0.5  $\mu$ L T7E1酶, 37 °C反应30 min, 立刻加入DNA Loading Buffer混匀, 65 °C煮10 min破坏T7E1酶, 2%琼脂糖凝胶电泳分析酶切结果。T7核酸内切酶可识别并切割不完全配对的DNA序列, 造成双链DNA断裂, 电泳时可发现除PCR目的产物(expected product)条带外的杂带。因此, 如果显微胚胎注射组PCR产物电泳时出现多条带, 则可能为gRNA靶位点附近出现了突变。T7E1酶切实验不是确认基因组突变的精标准, 但可起到初筛的作用, PCR产物电泳有多条带的亲代再测序确认有突变的可能性更大。特别是当筛选大量样本时, 利用T7E1酶切实验初筛后再送测序更方便。

**1.2.6 筛选有可遗传*dync1hl*突变的F0斑马鱼** F0斑马鱼饲养至性成熟时, 单条鱼与野生型成鱼(*dync1hl*<sup>+/+</sup>)杂交, 得到F1胚胎。24 hpf后, 随机挑选10枚胚胎, 混合提取基因组DNA, PCR扩增、产物回收。可先通过T7E1酶切实验初筛出PCR产物有多条带的斑马鱼, 再送测序确认存在可遗传突变。选取有可遗传突变的F0成鱼与野生型及转基因斑马鱼外交, 大量饲养F1, 用于筛选带有可遗传突变的F1斑马鱼。

**1.2.7 获得稳定遗传的*dync1hl*杂合突变斑马鱼种系** 将F1斑马鱼饲养1~2个月, 单条鱼剪尾鳍, 提基因组DNA, 利用鉴定引物PCR扩增后行凝胶电泳, 回收PCR产物T7E1酶切实验检测有突变后, PCR产物经连接转化、挑克隆, 送测序确定单条鱼的具体突变类型。

选取可造成*dync1hl*基因阅读框移码的F1杂合突变(*dync1hl*<sup>+/-</sup>)成鱼, 与野生型及转基因斑马鱼逐代外交并筛选, 直到获得带有荧光标记的突变可稳定遗传的F3代*dync1hl*<sup>+/-</sup>斑马鱼。将F3代*dync1hl*<sup>+/-</sup>雌鱼与雄鱼内交, 获得*dync1hl*纯合突变斑马鱼

(*dync1h1*<sup>-/-</sup>); 如果为带荧光标记的*dync1h1*<sup>+/-</sup>成鱼内交, 则可获得有荧光标记的*dync1h1*<sup>-/-</sup>斑马鱼。

1.2.8 qRT-PCR检测基因表达情况 分别收集3 dpf(days post fertilization)、4 dpf、5 dpf和6 dpf的*dync1h1*<sup>-/-</sup>斑马鱼和*dync1h1*<sup>+/-</sup>斑马鱼各5条, 分别提取总RNA, 逆转录试剂盒逆转录成cDNA。针对斑马鱼*dync1h1*基因、神经细胞标记基因*huc*及运动神经细胞标记基因*isl*、内参基因β-actin序列的后1/3处设计了qRT-PCR引物(表1)。比较不同时期*dync1h1*在*dync1h1*<sup>-/-</sup>斑马鱼表达量变化情况及与其有相关作用的基因表达情况, 每个样品均设有3个复孔, 重复实验2次。

1.2.9 Western blot实验检测蛋白质相对量 分别收集3 dpf、4 dpf、5 dpf和6 dpf的*dync1h1*<sup>-/-</sup>和*dync1h1*<sup>+/-</sup>斑马鱼各25条, 提取总蛋白, BCA蛋白质定量法测定浓度。由于Dync1h1蛋白质分子量较大, 约530 kDa, 实验选择Dync1h1全长抗体(AP-1-12345), β-Actin抗体为内参(66009-1-Ig), 选择3%~8% TA胶预制胶(Thermofisher公司), Hi-mark预染蛋白质分子量标准(LC5699, Thermofisher公司)。蛋白质电泳采用150 V、70 min; 转膜采用16 V、16 h, 一抗、二抗根据抗体要求稀释。分析蛋白质条带的灰度值, 以Dync1h1的灰度值/β-Actin灰度值的比值反映Dync1h1相对表达水平。

1.2.10 抗体染色 收集5 dpf的*dync1h1*<sup>-/-</sup>和*dync1h1*<sup>+/-</sup>斑马鱼, PBST漂洗, 4%多聚甲醛4 °C过夜固定。使用ACTA2抗体(Genetex)进行肌肉染色, 二抗选择显示红色荧光的Cy3, 按抗体要求稀释, DAPI染核。镜下观察肌肉组织变化。

1.2.11 显微成像 记录不同发育阶段的*dync1h1*<sup>+/-</sup>、*dync1h1*<sup>+/-</sup>和*dync1h1*<sup>-/-</sup>斑马鱼胚胎形态变化, 用E3/Tricaine(0.168 g/L)麻醉除去卵膜的胚胎, 包埋于2%低熔点琼脂糖, Olympus解剖显微镜拍照。神经细胞及血管记录用Olympus FV1200激光共聚焦20×镜头成像。图像处理用Image J软件。

### 1.3 数据处理及统计学分析

实验数据用GraphPad Prism 6.0软件分析, 各组数据的统计学差异采用方差分析(Two-Way ANOVA)或t检验,  $P < 0.01$ 为有显著统计学差异。

## 2 结果

### 2.1 gRNA靶位点选择及表达质粒构建

根据gRNA设计要求, 从候选序列中选择了在*dync1h1*基因组第4个外显子上的两个序列作为gRNA靶位点(表2)。因两个gRNA靶位点相距位置较近, 设计了一对gRNA突变鉴定引物, gR-F: 5'-GAG CAG AAA CAG CAC CAA CA-3', gR-R: 5'-ACT GCA GCT GGT TCA GGA AT-3', 产物长度为587 bp, 可通过PCR产物检测斑马鱼突变情况。在检测gRNA靶位点特异性时, 发现一个与1#gRNA靶位点有15 bp重复的序列: 5'-GGA TAA AAT GGC TCC-3'。同样方法设计脱靶鉴定引物, JD-F: 5'-CAT GCC AGT ACC GTA TCA TCA C-3', JD-R: 5'-TGA TGC ACT GAG GGC TTA TG-3', 用于排除潜在脱靶可能。

经测序验证, 成功构建含gRNA靶位点序列的表达质粒(图1)。

### 2.2 gRNA效果检测

收集经显微注射的F0斑马鱼胚胎和对照组胚

表1 各基因qRT-PCR引物  
Table 1 qRT-PCR primers of genes

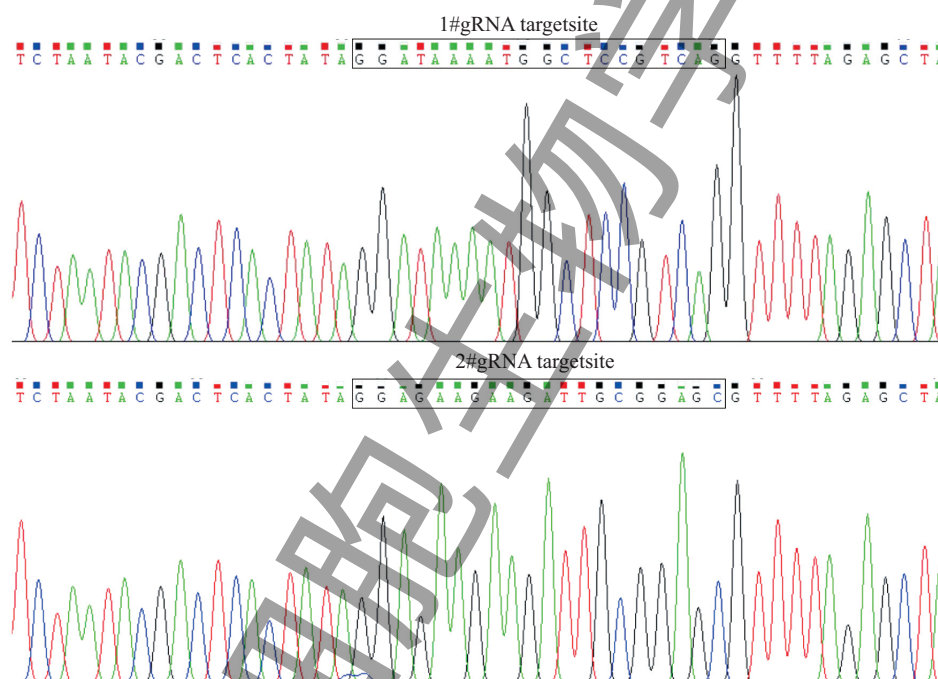
引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence
dync1h1-F	5'-TCA CAC TAG GGG ACC AGG AC-3'
dync1h1-R	5'-GAG ACG GAG CTG GAA CTC AC-3'
huc-F	5'-CGG TCA GAA GCC ACT AGG AG-3'
huc-R	5'-AGA GCT GCC ACA GGA CAC TT-3'
isl-F	5'-GCG AAT TTG CCT TAC AGA GC-3'
isl-R	5'-TGC GAT GAC AGA GAG GTC AC-3'
actin-F	5'-ACT CAG GAT GCG GAA ACT GG-3'
actin-R	5'-AGG GCA AAG TGG TAA ACG CT-3'

表2 *dync1h1* gRNA靶位点寡核苷酸序列  
Table 2 Sequences of the *dync1h1* gRNA targetsites oligo

寡核苷酸名称 Oligo name	序列* Oligo sequence
1# oligo s	5'-ata GGA TAA AAT GGC TCC GTC AGg t-3'
1# oligo As	5'-taa aac CTG ACG GAG CCA TTT TAT C-3'
2# oligo s	5'-ata GGA GAA GAA GAT TGC GGA GCg t-3'
2# oligo As	5'-taa aac GCT CCG CAA TCT TCT TCT C-3'

\*: ata、gt和taaac为黏性末端。修饰过的DNA小片段与pMD18-T骨架载体混合时, 两条DNA片段的黏性末端结合, 形成重组质粒。

\*: ata, gt and taaac are sticky ends. Modified DNA strands mixed with pMD18-T vector, and join at their sticky ends to form a recombinant plasmid.



方框内分别标记的为gRNA表达质粒中的靶位点序列。

Frames mark the targetsites in the gRNA expression plasmids respectively.

图1 gRNA表达质粒测序

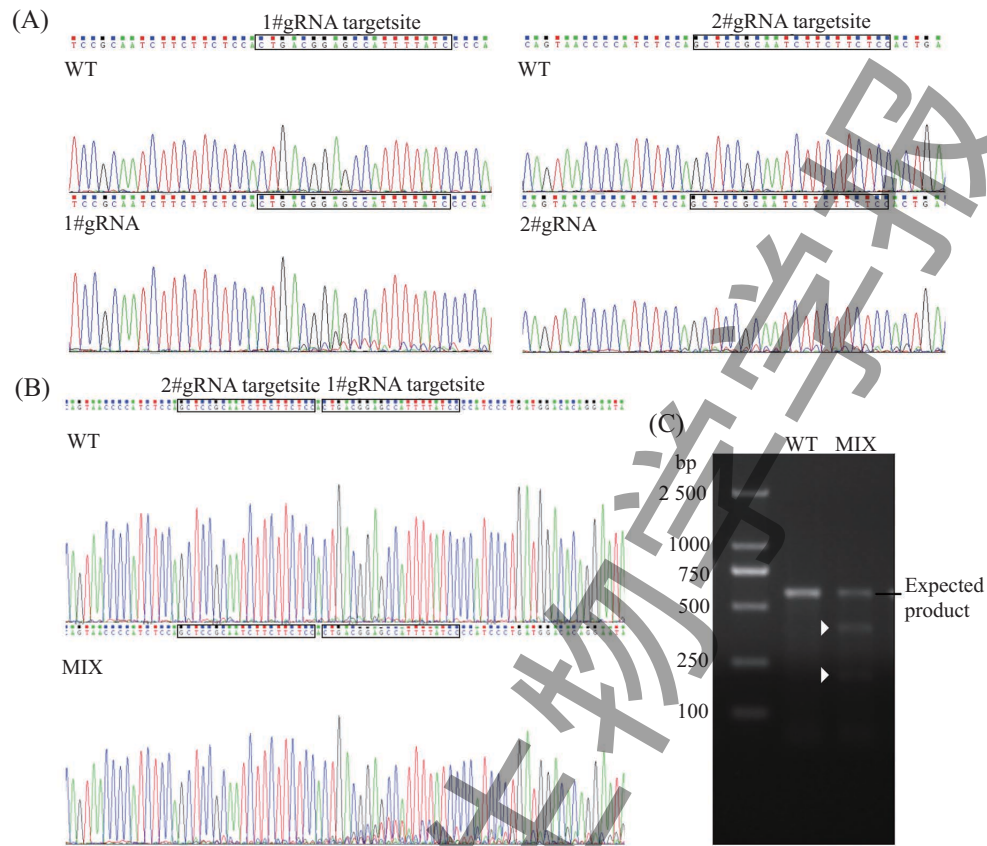
Fig.1 Sequencing graph of gRNA expression plasmids

胎, 提取基因组DNA, PCR产物测序发现, 1#gRNA和2#gRNA均有效, 但套峰较低说明其效率不高, 分别约为13%和18%(图2A)。将1#gRNA和2#gRNA按1:1混合后, 与Cas9 mRNA混匀进行胚胎注射, 测序证实gRNA靶位点附近仍有突变产生(图2B), 且gRNA效率提高, 约为34%, T7E1酶切实验检测亦证明gRNA有效(图2C)。排除脱靶(图3)可能后, 多次注射收集足够数量的胚胎, 能够饲养存活用于筛选有可遗传突变的F0斑马鱼成鱼不少于60条。

### 2.3 获得稳定遗传的*dync1h1*<sup>+/-</sup>斑马鱼

F1斑马鱼经筛选发现两种可遗传的*dync1h1*基因突变, 分别为基因组缺失21个碱基( $\Delta 21$ )和基因组缺失4个碱基( $\Delta 4$ )的*dync1h1*突变(图4A)。

$\Delta 21$ 缺失21个碱基, 不造成基因阅读框的移码, 可能对*dync1h1*整体表达影响较小;  $\Delta 4$ 缺失4个碱基, 导致后面的阅读框移码, 并使得第4外显子上编码第241号亮氨酸(leucine, L)的密码子突变成终止密码子, 造成整个蛋白质翻译终止, 功能丧失, 从而实现

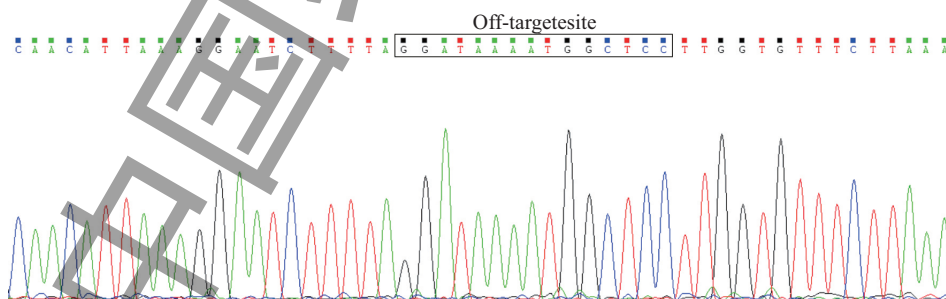


A、B: 基因组DNA的PCR产物测序图。WT为野生型gRNA靶位点附近单峰; 1#gRNA、2#gRNA: 分别注射后, gRNA靶位点处有很低的杂峰; MIX为1#gRNA和2#gRNA混合后显微注射, 出现套峰。C: T7E1酶切实验。WT为野生型斑马鱼胚胎基因组DNA的PCR产物经T7E1酶切实验结果; MIX为经1#gRNA和2#gRNA混合后显微注射的胚胎基因组DNA的PCR产物经T7E1酶切实验结果; 箭头所示为突变位点被T7E1剪切产生的条带。

A,B: sequencing graphs of PCR product. WT: sequencing of wild-type zebrafish embryos, sole peak; 1#gRNA, 2#gRNA: micro-injected zebrafish embryos existing low overlapping peaks respectively; MIX: micro-injected embryos by mixing 1#gRNA and 2#gRNA, existing overlapping peaks. C: T7E1 cleavage assay. WT: PCR product of wild-type zebrafish embryos' genomic DNA; MIX: PCR product of micro-injected zebrafish by mixing 1#gRNA and 2#gRNA embryos' genomic DNA. Arrowheads indicate extra electrophoretic lanes from mismatching DNA base pairs cleaved by T7E1.

图2 测序及T7E1酶切实验检测gRNA作用效率

Fig.2 Sequencing and T7E1 cleavage assay to detect the modification in the PCR product



gRNA潜在脱靶位点PCR产物测序, 单峰提示排除脱靶。

Sequencing PCR product of the potential gRNA off-targetsite, and the sole peak indicates the possibility of off-target is excluded.

图3 gRNA脱靶排除

Fig.3 Excluding the gRNA off-target

基因敲除的目的(图4B)。所以本研究中选择了4个碱基缺失的*dync1h1*突变斑马鱼继续外交, 直到获得稳定遗传的F3代*dync1h1*<sup>-/-</sup>斑马鱼。

将稳定遗传的F3代*dync1h1*<sup>-/-</sup>斑马鱼内交, 产下的胚胎中即有*dync1h1*<sup>-/-</sup>斑马鱼, 通过畸形表型及测序筛选出*dync1h1*<sup>-/-</sup>斑马鱼(图4C)。

## 2.4 纯合突变斑马鱼*dync1h1*、*huc*及*isl*基因表达水平检测

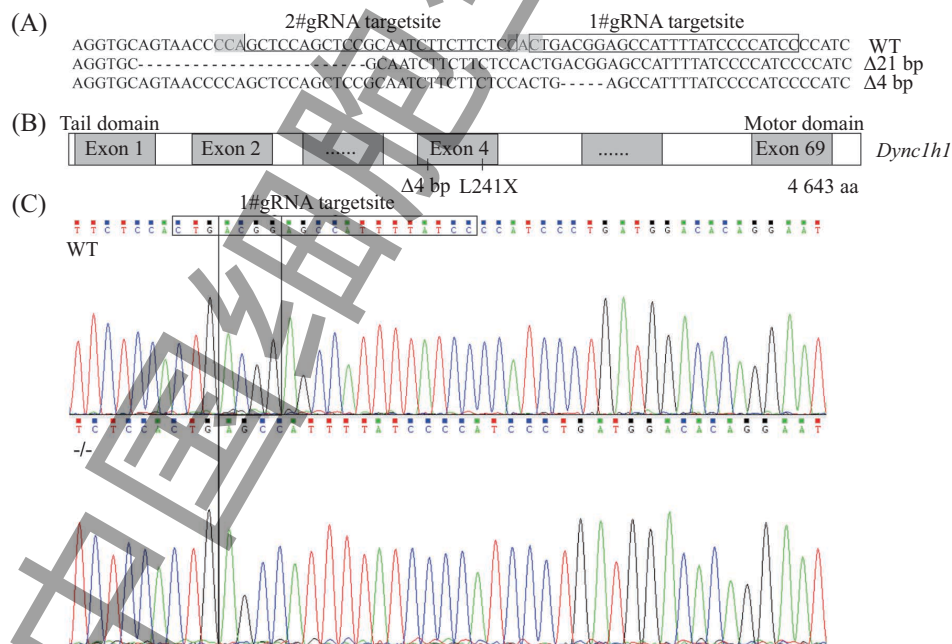
比较3 dpf、4 dpf、5 dpf、6 dpf的*dync1h1*<sup>-/-</sup>和*dync1h1*<sup>+/+</sup>斑马鱼*dync1h1*、*huc*及*isl*基因表达发现, 除了4 dpf, 纯合突变斑马鱼的*dync1h1*基因、神经细胞标记基因*huc*、运动神经细胞标记基因*isl*表达水平都较同期*dync1h1*<sup>+/+</sup>斑马鱼有显著降低( $P < 0.01$ )。 *dync1h1*<sup>-/-</sup>斑马鱼的不同时期之间目的基因表达量变化无统计学意义( $P > 0.05$ )。4 dpf时*dync1h1*表达量升高, 考虑是3 dpf时基因表达量骤降引起*dync1h1*、*huc*、*isl*基因在转录水平的代偿性升高, 而后又因为表达这些基因的细胞数量减少导致基因表达量的再次下降(图5), 比如实验中观察到的脊髓神经细胞数目减少以及肌肉细胞坏死等。

## 2.5 纯合突变斑马鱼Dync1h1蛋白质水平检测

各提取25条3 dpf、4 dpf、5 dpf和6 dpf的*dync1h1*<sup>-/-</sup>和*dync1h1*<sup>+/+</sup>斑马鱼总蛋白, Western blot实验发现, 在3 dpf时, 纯合突变斑马鱼Dync1h1水平有所降低, 但与野生型比较无明显差异; 在4 dpf和5 dpf时, Dync1h1水平进一步下降, 较野生型斑马鱼有显著性降低(图6A和图6B); 到6 dpf时, Dync1h1基本已无表达(图6C和图6D)。此变化是由斑马鱼特殊的发育过程和突变共同造成的, 因为斑马鱼胚胎早期发育较快, 来自其母体的mRNA(maternal mRNA)对其发育有重要的作用。在早期*dync1h1*<sup>-/-</sup>斑马鱼中检测到的Dync1h1为maternal mRNA表达, 由于*dync1h1*<sup>-/-</sup>纯合突变斑马鱼本身不能产生Dync1h1进行后续补充, 随着时间的推移, Dync1h1不断被利用或分解, 6 dpf时基本已经消耗殆尽了<sup>[21]</sup>, 此时*dync1h1*<sup>-/-</sup>斑马鱼也将死亡。结合qRT-PCR实验结果, 说明碱基缺失确实造成了基因阅读框移码, *dync1h1*<sup>-/-</sup>斑马鱼中并没有正常的Dync1h1被翻译出来, *dync1h1*敲除成功。

## 2.6 *dync1h1*突变斑马鱼形态发育

连续观察*dync1h1*突变斑马鱼和野生型斑马

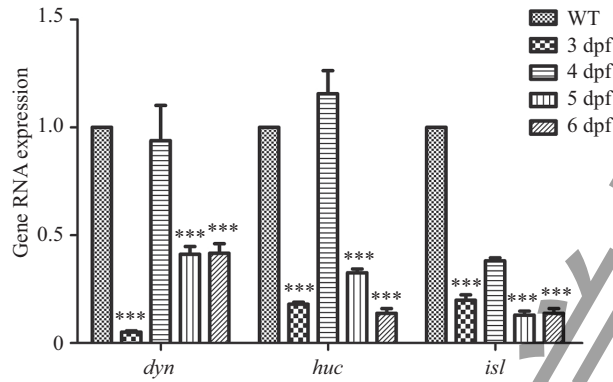


A: 两种可遗传*dync1h1*突变类型, 方框标记gRNA靶位点, 阴影标记PAM区位置; B:  $\Delta 4$ 突变位置示意图; C:  $\Delta 4$  *dync1h1*<sup>-/-</sup>斑马鱼基因组测序图。

A: two hereditary mutants of *dync1h1*. Frames mark the gRNA targetsites, and shades indicate the PAM. B: the diagram of  $\Delta 4$  location. C: sequencing graph of  $\Delta 4$  *dync1h1*<sup>-/-</sup> zebrafish.

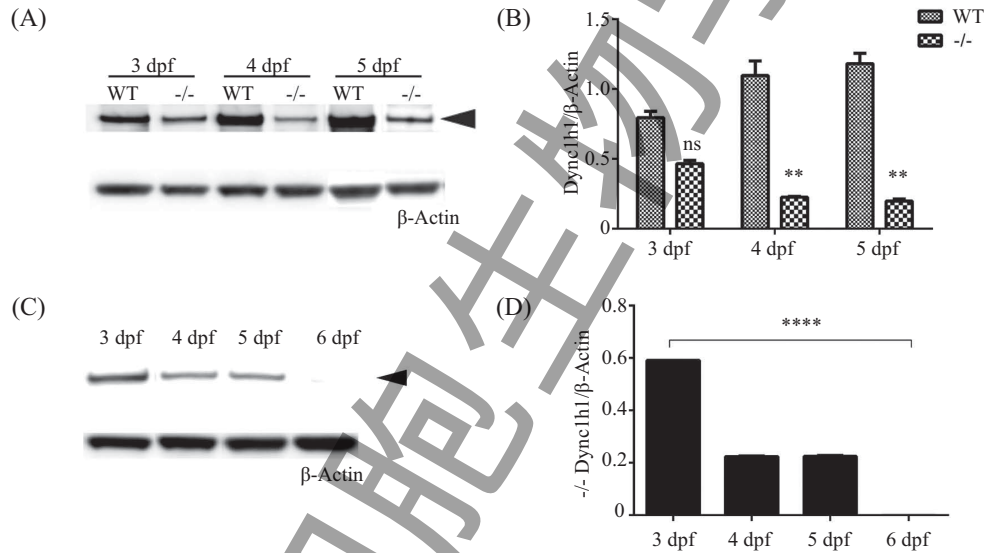
图4 获得可遗传*dync1h1*突变斑马鱼

Fig.4 Generating hereditary *dync1h1* mutant zebrafish model



$\beta$ -Actin表达量为标准; 目的基因表达量数据记为 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ;  $n=5$ ,  $***P<0.001$ , 与野生型斑马鱼比较。  
The expression of  $\beta$ -Actin as the reference; expression of target-gene presented as  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ;  $n=5$ ,  $***P<0.001$  compared with wild-type zebrafish.

图5 野生型和 $dync1h1^{-/-}$ 斑马鱼 $dync1h1$ 、 $huc$ 及 $isl$ 基因表达水平  
Fig.5 Expression of  $dync1h1$ ,  $huc$  and  $isl$  in  $dync1h1^{-/-}$  and wild-type zebrafish



A: Western blot比较不同时期野生型(WT)和 $dync1h1^{-/-}$ 斑马鱼蛋白质相对量, 箭头指示Dync1h1; B: Dync1h1相对量,  $n=25$ ; ns: 无意义;  $**P<0.01$ , 与野生型斑马鱼比较; C: Western blot比较不同时期 $dync1h1^{-/-}$ 斑马鱼蛋白质相对量, 三角形箭头指示Dync1h1; D: Dync1h1相对量,  $****P<0.0001$ 。

A: Western blot analyzing Dync1h1 protein levels of wild-type (WT) and  $dync1h1^{-/-}$  zebrafish in different stages, arrowhead indicates the Dync1h1; B: the bar chart of Dync1h1/ $\beta$ -Actin;  $n=25$ ; ns: no significant;  $**P<0.01$  compared with wild-type zebrafish; C: Western blot analyzing Dync1h1 protein levels of  $dync1h1^{-/-}$  zebrafish in different stages, arrowhead indicates the Dync1h1; D: the bar chart of Dync1h1/ $\beta$ -Actin.  $****P<0.0001$ .

图6 野生型和 $dync1h1^{-/-}$ 斑马鱼Dync1h1蛋白质水平比较  
Fig.6 Dync1h1 protein levels in wild-type and  $dync1h1^{-/-}$  zebrafish

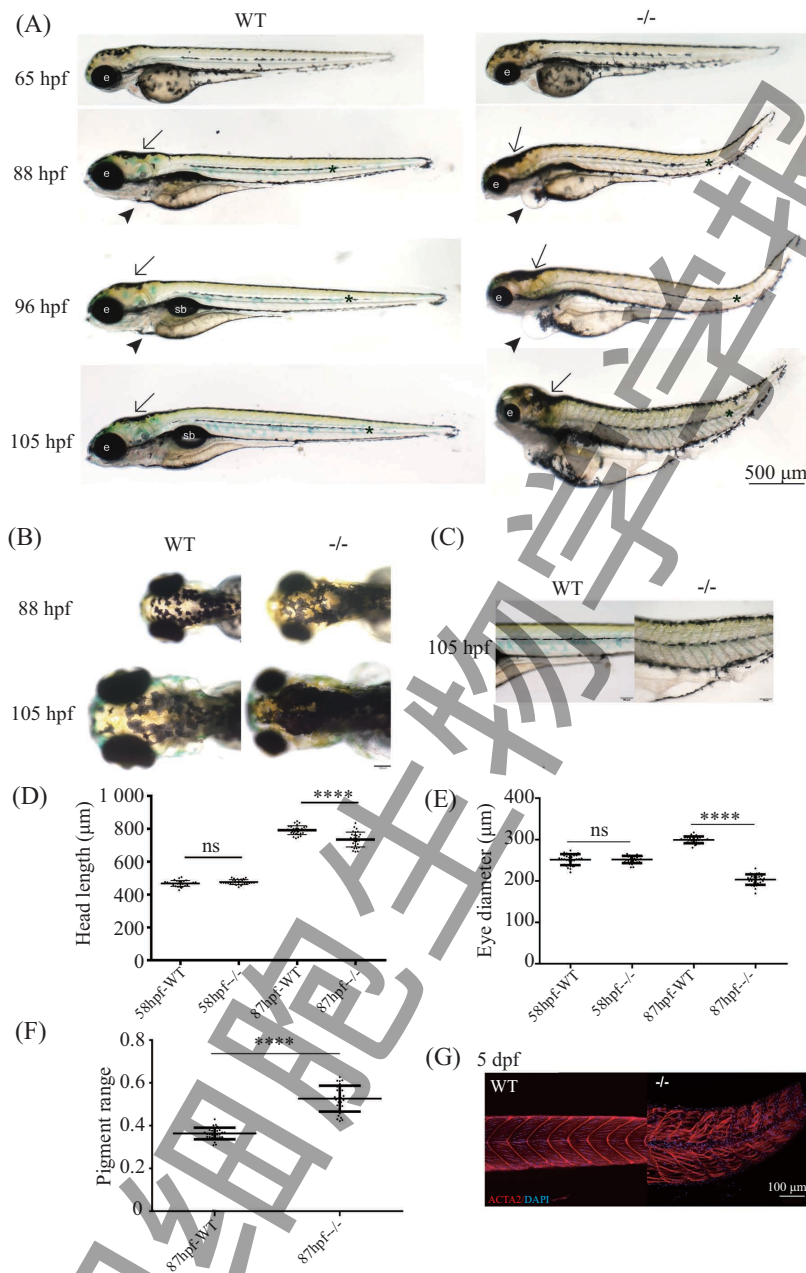
鱼, 比较发现,  $dync1h1^{-/-}$  斑马鱼表型无明显异常。 $dync1h1^{-/-}$  斑马鱼前65 hpf发育较慢, 达到相同发育时期较野生型斑马鱼晚5~7 h; 65 hpf后, 渐渐出现头顶部色素分布范围增大、头小、眼小、尾部弯曲、尾短、心包水肿等; 约87 hpf后,  $dync1h1^{-/-}$  斑马鱼出现肌肉组织松散, 腹腔发育异常, 全身水肿, 且性状随时间不断加重; 4 dpf时, 未见鱼鳔发育; 5~6 dpf,

$dync1h1^{-/-}$  斑马鱼死亡(图7)。

### 2.7 $dync1h1^{-/-}$ 斑马鱼神经细胞及血管异常

使用激光共聚焦显微镜观察脊髓神经细胞及血管发现, 65 hpf  $dync1h1^{-/-}$  斑马鱼开始出现形态发育异常前, 脊髓神经细胞数量和分布较正常斑马鱼无明显变化; 约78 hpf后,  $dync1h1^{-/-}$  斑马鱼脊髓肿胀, 神经细胞数量减少并且分布混乱(图8A), 背部血





A: 斑马鱼整体形态发育; e: 眼睛; sb: 鱼鳔; 实心箭头: 心包腔; 箭头: 头部; \*: 尾部。B: 头顶部色素面积比较。C: 尾部肌肉发育。D、E、F: 比较58 hpf和87 hpf的野生型(WT)与*dync1h1*<sup>-/-</sup>斑马鱼头部长度、眼球直径和87 hpf的头顶部色素面积所占比例, \*\*\*\**P*<0.000 1; G: 免疫荧光组化检测5 dpf的野生型和*dync1h1*<sup>-/-</sup>斑马鱼肌肉; ACTA: 标记肌肉(红色); DAPI: 标记细胞核(蓝色)。

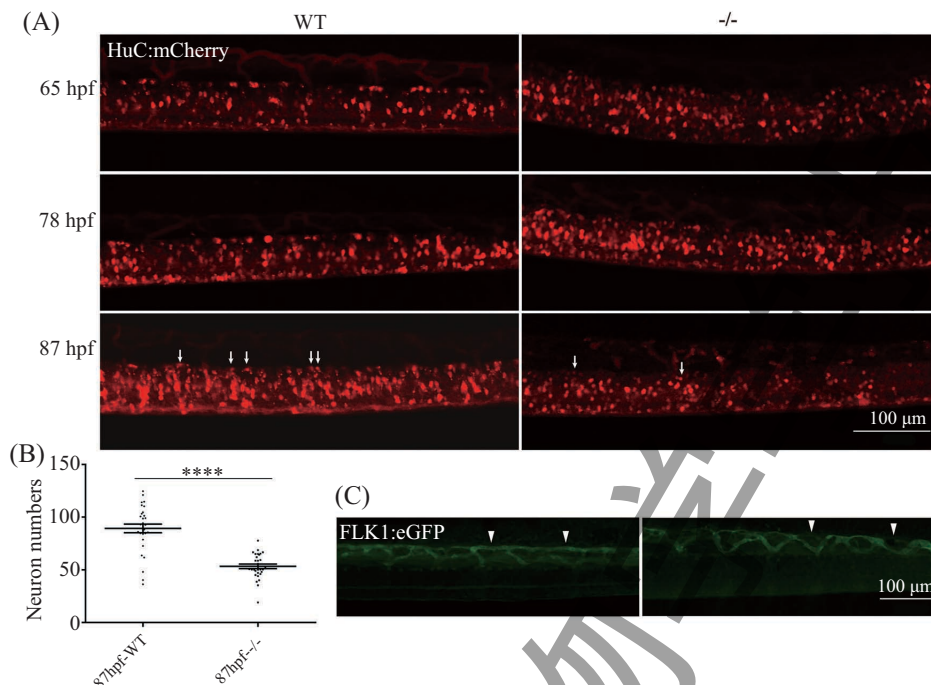
A: general observation of zebrafish; e: eye; sb: swimming bladder; arrowhead: pericardial cavity; arrow: head; \*: tail. B: pigment range. C: muscle development of tail. D,E,F: \*\*\*\**P*<0.000 1 compared the head length and eye diameter of wild-type (WT) with *dync1h1*<sup>-/-</sup> zebrafish in 58 hpf and 87 hpf, and pigment range of head in 87 hpf; G: immunofluorescence staining, shows spinal muscle of wild-type and *dync1h1*<sup>-/-</sup> zebrafish in 5 dpf; ACTA: mark muscle (red); DAPI: mark cell nucleus (blue).

图7 *dync1h1*<sup>-/-</sup>斑马鱼和野生型斑马鱼形态发育比较

Fig.7 Comparing the differences between the *dync1h1*<sup>-/-</sup> and wild-type zebrafish

管发育畸形。统计87 hpf的*dync1h1*<sup>-/-</sup>和*dync1h1*<sup>+/+</sup>斑马鱼第11~12体节间100 μm宽度的脊髓神经细胞数量,发现*dync1h1*<sup>-/-</sup>斑马鱼神经细胞数量减少,具有显

著性差异(图8B)。*dync1h1*<sup>-/-</sup>斑马鱼体节间血管未见明显畸形,但统计发现,背部血管存在畸形的在*dync1h1*<sup>-/-</sup>斑马鱼中占到90%以上(图8C)。



A: 不同时期脊髓神经细胞发育情况; WT: 野生型斑马鱼; -/-: *dync1h1*<sup>-/-</sup>斑马鱼; 箭头指示原始神经细胞。B: 统计单位区域内脊髓神经细胞数量,  $n=30$ , 同一样本重复计数3次,  $t$ 检验, \*\*\*\* $P<0.0001$ , 与野生型斑马鱼比较。C: 87 hpf时观察背部血管发育情况, 实心箭头指示背部血管。

A: development of blood vessel endothelium on dorsal, arrows indicate the primary neurons. B: counting the neuron numbers in unit area of spinal cord,  $n=30$ , repeating 3 times for the same sample,  $t$  test, \*\*\*\* $P<0.0001$  compared with wild-type zebrafish. C: development of blood vessel endothelium on dorsal in 87 hpf, arrowheads indicate the blood vessels.

图8 斑马鱼脊髓神经细胞及血管内皮发育比较

Fig.8 Development of neurons in spinal cord and blood vessel endothelium in zebrafish

### 3 讨论

本研究利用CRISPR/Cas9基因编辑技术, 选择了基因与人类有较高同源性的斑马鱼作为研究的模式生物, 在*dync1h1*尾部功能域第4个外显子上设计了gRNA靶点, 成功构建gRNA表达载体。体外转录合成gRNA, 引导Cas9 mRNA对特异位点的剪切, 经测序及T7E1酶切实验验证gRNA有效, 并排除了gRNA脱靶, 筛选获得*dync1h1*移码突变斑马鱼。通过逐代外交、与转基因鱼杂交并筛选, 得到稳定遗传的带有荧光标记的*dync1h1*杂合突变斑马鱼品系, 内交获得*dync1h1*纯合突变斑马鱼。

本研究中观察*dync1h1*<sup>-/-</sup>斑马鱼形态发现, 其前65 hpf发育较野生型斑马鱼缓慢, 后渐渐出现头小、眼睛小、头顶部色素分布面积增大等, qRT-PCR及Western blot实验证实, 突变斑马鱼*dync1h1*基因及蛋白质不能正常表达, 与文献中报道的*dync1h1*运动功能域突变斑马鱼的表型相符<sup>[21-23]</sup>。同时, *dync1h1*<sup>-/-</sup>斑马鱼的脊髓直径增大, 脊髓神经细胞分布混乱, 原

始神经细胞缺失, 神经细胞总量明显减少, qRT-PCR实验也证实标记神经细胞的基因表达量下降。本研究中建立的突变斑马鱼模型*dync1h1*基因不能正常表达, *Dync1h1*功能破坏后会影响轴索的逆行性运输, 斑马鱼形态及神经细胞的正常发育受到抑制, 说明*dync1h1*基因对于斑马鱼的生长发育是非常重要的。

此外, 本研究中所构建的尾部功能域突变的*dync1h1*<sup>-/-</sup>斑马鱼还有尾部、鱼鳔、腹腔、肌肉以及背部血管等的发育畸形, 并于5~6 dpf死亡, 这些严重表型在文献报道的*dync1h1*运动功能域突变斑马鱼中并未见到。通过对临床报道的DYNC1H1突变及相应临床表现进行总结分析发现, DYNC1H1不同功能域的不同突变造成的损害表现也是不完全相同的, 其中尾部功能域的突变造成损害以运动轴索及运动神经细胞病变为主, 如腓骨肌萎缩症<sup>[24]</sup>和脊肌萎缩症<sup>[14]</sup>等, 运动功能域的突变造成脑皮质和智力损害等为主, 如小头畸形<sup>[25]</sup>、痴呆<sup>[12]</sup>等。现

有的*Dync1h1*突变小鼠主要为*Dync1h1<sup>Loa</sup>*、*Dync1h1<sup>Cra</sup>*和*Dync1h1<sup>Swl</sup>*三种, 突变位点均是位于尾部功能域的等位基因, 但它们的表型也不完全相同, 其中*Dync1h1<sup>+/Loa</sup>*和*Dync1h1<sup>+/Cra</sup>*小鼠<sup>[26]</sup>以运动神经细胞损害为主, 而*Dync1h1<sup>+/Swl</sup>*小鼠<sup>[27]</sup>则以感觉神经细胞损害为主。据此, 我们可以发现, *Dync1h1*不同功能域或者相同尾部功能域不同位置的突变造成的表型都不一定是相同的。*Dynein*在行使轴索逆行性运输功能时*Dync1h1*的作用非常重要, 其尾部功能域参与组成*dynein*的运输物结合端, 而运动功能域含有ATP水解酶和微管蛋白结合位点等, 主要负责*dynein*及所结合物质的驱动运输<sup>[27]</sup>。我们推测, 一方面由于*Dync1h1*尾部功能域和运动功能域的作用不同, 所以突变后对*dynein*逆行性运输产生的影响也不完全一致; 另一方面, 尾部功能域作为运输物的结合区域, 不同位置、不同类型的突变可能对所结合物质的种类和运输能力造成的影响不同, 而这些运输物或其参与的相关信号通路可能为不同类型神经细胞正常生长或功能所必需, 从而表现出选择性神经元损害, 并引起下游所支配的器官和组织产生病变。有体外研究发现, *dynein*依赖的激活神经生长因子/神经营养性酪氨酸激酶I型受体(neurotrophic tyrosine kinase receptor type I, TrkA)复合体在感觉神经细胞中远距离转运出现障碍后, 会阻碍靶因子的促神经生长作用, 最终导致感觉神经细胞病变<sup>[28-29]</sup>, 这可部分证明*dync1h1*突变能够通过所结合的运输物对神经细胞产生影响。在细胞生命活动中, *Dync1h1*的作用不可或缺, 但目前其具体的调控过程以及突变后造成神经细胞损伤的机制仍不清楚, 需要我们进一步地研究探索以明确。本研究所构建的*dync1h1*突变斑马鱼为后续研究提供了良好的动物模型, 为*dync1h1*突变致病机制相关的信号通路或者分子网络间的相互作用的探索打下了基础。

## 致谢——

非常感谢上海市中医老年医学研究所刘特博士在本实验及文章修改中的悉心指导和提出的宝贵意见。

## 参考文献 (References)

1 Heald R, Tournebise R, Habermann A, Karsenti E, Hyman A.

Spindle assembly in *Xenopus* egg extracts: Respective roles of centrosomes and microtubule self-organization. *J Cell Biol* 1997; 138(3): 615-28.

2 Harada A, Takei Y, Kanai Y, Tanaka Y, Nonaka S, Hirokawa N. Golgi vesiculation and lysosome dispersion in cells lacking cytoplasmic dynein. *J Cell Biol* 1998; 141(1): 51-9.

3 Banks GT, Fisher EM. Cytoplasmic dynein could be key to understanding neurodegeneration. *Genome Biol* 2008; 9(3): 214.

4 Serohijos AW, Chen Y, Ding F, Elston TC, Dokholyan NV. A structural model reveals energy transduction in dynein. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103(49): 18540-5.

5 Pfister KK. Dynein cargo gets its groove back. *Structure* 2005; 13(2): 172-3.

6 Yang ML, Shin J, Kearns CA, Langworthy MM, Snell H, Walker MB, et al. CNS myelination requires cytoplasmic dynein function. *Dev Dyn* 2015; 244(2): 134-45.

7 Pfister KK, Shah PR, Hummerich H, Russ A, Cotton J, Annuar AA, et al. Genetic analysis of the cytoplasmic dynein subunit families. *PLoS Genet* 2006; 2(1): e1.

8 Vallee RB, McKenney RJ, Ori-McKenney KM. Multiple modes of cytoplasmic dynein regulation. *Nat Cell Biol* 2012; 14(3): 224-30.

9 Nishikawa Y, Oyama T, Kamiya N, Kon T, Toyoshima YY, Nakamura H, et al. Structure of the entire stalk region of the Dynein motor domain. *J Mol Biol* 2014; 426(19): 3232-45.

10 Schiavo G, Greensmith L, Hafezparast M, Fisher EM. Cytoplasmic dynein heavy chain: the servant of many masters. *Trends Neurosci* 2013; 36(11): 641-51.

11 Eschbach J, Dupuis L. Cytoplasmic dynein in neurodegeneration. *Pharmacol Ther* 2011; 130(3): 348-63.

12 Peeters K, Bervoets S, Chamova T, Litvinenko I, de Vriendt E, Bichev S, et al. Novel mutations in the DYNC1H1 tail domain refine the genetic and clinical spectrum of dyneinopathies. *Hum Mutat* 2015; 36(3): 287-91.

13 Strm A, Gal J, Shi P, Kasarskis EJ, Hayward LJ, Zhu H. Retrograde axonal transport and motor neuron disease. *J Neurochem* 2008; 106(2): 495-505.

14 Scoto M, Rossor AM, Harms MB, Cirak S, Calissano M, Robb S, et al. Novel mutations expand the clinical spectrum of DYNC1H1-associated spinal muscular atrophy. *Neurology* 2015; 84(7): 668-79.

15 Fiorillo C, Moro F, Yi J, Weil S, Brisca G, Astrea G, et al. Novel dynein DYNC1H1 neck and motor domain mutations link distal spinal muscular atrophy and abnormal cortical development. *Hum Mutat* 2014; 35(3): 298-302.

16 Kabashi E, Brustein E, Champagne N, Drapeau P. Zebrafish models for the functional genomics of neurogenetic disorders. *Biochim Biophys Acta* 2011; 1812(3): 335-45.

17 Roberts JA, Miguel-Escalada I, Slovik KJ, Walsh KT, Hadzhiev Y, Sanges R, et al. Targeted transgene integration overcomes variability of position effects in zebrafish. *Development* 2014; 141(3): 715-24.

18 Jao L, Wentz SR, Chen W. Efficient multiplex biallelic zebrafish genome editing using a CRISPR nuclease system. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013; 110(34): 13904-9.

- 19 Kleinstiver BP, Prew MS, Tsai SQ, Topkar VV, Nguyen NT, Zheng Z, *et al.* Engineered CRISPR-Cas9 nucleases with altered PAM specificities. *Nature* 2015; 523(7561): 481-5.
- 20 Auer TO, Duroure K, de Cian A, Concordet JP, del Bene F. Highly efficient CRISPR/Cas9-mediated knock-in in zebrafish by homology-independent DNA repair. *Genome Res* 2014; 24(1): 142-53.
- 21 Langworthy MM, Appel B. Schwann cell myelination requires dynein function. *Neural Dev* 2012; 7: 37.
- 22 Insinna C, Baye LM, Amsterdam A, Besharse JC, Link BA. Analysis of a zebrafish *dync1h1* mutant reveals multiple functions for cytoplasmic dynein 1 during retinal photoreceptor development. *Neural Dev* 2010; 5: 12.
- 23 Yang ML, Shin J, Kearns CA, Langworthy MM, Snell H, Walker MB, *et al.* CNS myelination requires cytoplasmic dynein function. *Dev Dyn* 2015; 244(2): 134-45.
- 24 Weedon MN, Hastings R, Caswell R, Xie W, Paszkiewicz K, Antoniadis T, *et al.* Exome sequencing identifies a *DYNC1H1* mutation in a large pedigree with dominant axonal Charcot-Marie-Tooth disease. *Am J Hum Genet* 2011; 89(2): 308-12.
- 25 Poirier K, Lebrun N, Broix L, Tian G, Saillour Y, Boscheron C, *et al.* Mutations in *TUBG1*, *DYNC1H1*, *KIF5C* and *KIF2A* cause malformations of cortical development and microcephaly. *Nat Genet* 2013; 45(6): 639-47.
- 26 Wiggins LM, Kuta A, Stevens JC, Fisher EM, von Bartheld CS. A novel phenotype for the dynein heavy chain mutation *Loa*: Altered dendritic morphology, organelle density, and reduced numbers of trigeminal motoneurons. *J Comp Neurol* 2012; 520(12): 2757-73.
- 27 Chen XJ, Levedakou EN, Millen KJ, Wollmann RL, Soliven B, Popko B. Proprioceptive sensory neuropathy in mice with a mutation in the cytoplasmic dynein heavy chain 1 gene. *J Neurosci* 2007; 27(52): 14515-24.
- 28 Ha J, Lo KW, Myers KR, Carr TM, Humsi MK, Rasoul BA, *et al.* A neuron-specific cytoplasmic dynein isoform preferentially transports TrkB signaling endosomes. *J Cell Biol* 2008; 181(6): 1027-39.
- 29 Heerssen HM, Pazyra MF, Segal RA. Dynein motors transport activated Trks to promote survival of target-dependent neurons. *Nat Neurosci* 2004; 7(6): 596-604.