

CRISPR-Cas13a系统在斑马鱼基因表达 下调中的应用研究

许梦婷 肖薇 刘东* 段旭初*

(南通大学生命科学学院, 南通市发育与疾病重点实验室, 神经再生重点实验室, 南通 226001)

摘要 该研究建立了基于CRISPR-Cas13a系统的斑马鱼基因表达下调体系, 并对其效果和特异性进行了检测分析。以斑马鱼报告基因 $egfp$ 和内源性基因 ta 、 $fabp11a$ 为研究对象, 设计并合成靶向靶标基因的crRNA及其突变体, 构建Cas13a及其突变体(dCas13a)的表达质粒, 在体外合成Cas13a-mRNA和dCas13a-mRNA(dCas13a), 分别与各crRNA共注射至野生型AB和 $egfp$ 转基因斑马鱼胚胎中, 通过表型观察及qRT-PCR技术验证靶标基因表达下调的情况。结果表明, Cas13a-mRNA分别与 $egfp$ -crRNA、 ta -crRNA和 $fabp11a$ -crRNA共注射后, 可相应导致斑马鱼体内绿色荧光蛋白减少、尾部发育缺陷以及眼睛发育缺陷等表型; qRT-PCR结果显示, 注射Cas13a-mRNA和各靶基因crRNA后 $egfp$ 、 ta 和 $fabp11a$ 表达均下调; 而用含有序列突变的Cas13a或者crRNA注射后, CRISPR-Cas13a系统无法下调靶基因表达。该研究表明CRISPR-Cas13a系统可有效下调斑马鱼体内基因的表达。

关键词 CRISPR-Cas13a; 斑马鱼; 基因表达下调

Application of CRISPR-Cas13a System in Downregulation of Zebrafish Genes

XU Mengting, XIAO Wei, LIU Dong*, DUAN Xuchu*

(School of Life Science, Nantong Laboratory of Development and Diseases,
Key Laboratory of Neuroregeneration, Nantong University, Nantong 226001, China)

Abstract This study aims to establish and validate a CRISPR-Cas13a-based system for downregulating gene expression in zebrafish. In the study, the transgenic reporter gene $egfp$ and the endogenous zebrafish genes ta and $fabp11a$ were selected as target genes for the CRISPR-Cas13a system. Corresponding specific guiding crRNAs and their mutants were designed and synthesized. Cas13a and dCas13a expression vectors were constructed. After *in vitro* transcription, Cas13a/dCas13a-mRNAs and the guiding crRNAs/crRNA-muts of target genes were co-injected into AB and $Tg(\beta\text{-actin:loxp-egfp-stop-loxp-DTA})$ zebrafish embryos. Phenotypic observation and qRT-PCR analysis were performed to detect the downregulating effects of Cas13a on the target genes. Following co-injection of Cas13a-mRNA and $egfp$ -crRNA, ta -crRNA, or $fabp11a$ -crRNA respectively, phenotypic observations revealed markedly reduced GFP signals and developmental defects on tails or eyes, which varied among target genes. qRT-PCR detection confirmed the reduction of target gene transcripts. CRISPR-Cas13a systems with dCas13a or mutated crRNAs failed to reduce target genes expression. The results indicated that CRISPR-Cas13a system could effectively knock down target gene expression in zebrafish.

收稿日期: 2021-05-10 接受日期: 2021-06-11

江苏省研究生科研与实践创新计划(批准号: KYCX19_2049)资助的课题

*通讯作者。Tel: 18605133927, E-mail: tom@ntu.edu.cn; Tel: 15370641026, E-mail: dxd2002sk@ntu.edu.cn

Received: May 10, 2021 Accepted: June 11, 2021

This work was supported by the Postgraduate Research & Practice Innovation Program of Jiangsu Province (Grant No.KYCX19_2049)

*Corresponding authors. Tel: +86-18605133927, E-mail: tom@ntu.edu.cn; Tel: +86-15370641026, E-mail: dxd2002sk@ntu.edu.cn

Keywords CRISPR-Cas13a; zebrafish; downregulation of gene expression

CRISPR-Cas是细菌抵御病毒入侵的一种免疫系统^[1-2],其中CRISPR是规律间隔成簇短回文重复序列(clustered regularly interspaced short palindromic repeats),可储存入侵病毒特征性DNA片段,转录后产生的RNA序列(crRNA)能够再次识别入侵病毒的遗传物质;Cas(CRISPR-associated proteins)具有核酸酶活性^[3]。2016年,ABUDAYYEH等^[4]描述了一种RNA靶向的CRISPR酶——C2c2(Cas13a),其与广泛使用的CRISPR-Cas9系统切割DNA的活性不同^[5],CRISPR-Cas13a能够用于切割RNA序列,可在哺乳动物细胞中降低靶基因表达水平^[6-9]。然而,关于Cas13a在斑马鱼中是否也起到相同作用,仍没有相关报道。

目前,斑马鱼是研究遗传学、发育生物学、血管生物学和疾病建模方面重要的模式动物,具有遗传操作简便、胚胎透明、易繁殖等优势^[10-12]。在斑马鱼中敲降基因表达主要使用Mo(Morpholino)技术^[13-14],但其合成费用昂贵、周期长,因此亟需寻找一种代替Mo在斑马鱼体内实现基因敲降的方法。CRISPR-Cas13a作为一种新型的基因编辑系统,其Cas13a蛋白主要包含识别瓣叶(recognition lobe, REC)和核酸酶瓣叶(nuclease lobe, NUC)两个功能结构域,其中NUC中HEPN结构域为切割靶标RNA的活性区域^[15]。Cas13a在引导序列(crRNA)的帮助下,可特异性地识别靶标基因RNA,并将靶序列切割降解^[4],抑制其表达。

在斑马鱼中,*ta*(*T-box transcription factors T/Brachyury homolog A*)编码中胚层发育所必需的T-box转录因子,*ta*基因突变产生脊索和尾巴发育缺陷表型^[16-18];脂肪酸结合蛋白11a(*Fabp11a*)是FABP家族成员,在调节葡萄糖和脂质体内稳态以及炎症中发挥重要作用^[19-20],该基因功能缺陷也会导致斑马鱼眼睛发育异常^[18]。我们以转基因斑马鱼中报告基因*egfp*和内源基因*ta*、*fabp11a*为测试对象,检测CRISPR-Cas13a系统在斑马鱼中下调基因表达的功能,为其将来更多更广泛的应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 实验用野生型AB系斑马鱼和转基因斑马鱼*Tg*(β -actin:*loxp*-EGFP-*stop-loxp*-DTA)、

Tg(*hb:egfp*)由南通大学实验动物中心提供。斑马鱼繁育方法根据*The Zebrafish Book*描述进行^[21],受精卵于清晨由雌雄鱼交配所得,将收集的受精卵置于E3培养液(5 mmol/L NaCl、0.17 mmol/L KCl、0.33 mmol/L CaCl₂、0.33 mmol/L MgSO₄)中,并于28.5 °C恒温培养箱中培养。所有斑马鱼实验操作均在南通大学实验动物中心完成[SYXK(苏)2017-0046],动物实验符合江苏省实验动物管理委员会伦理规范,所有动物实验均遵循3R原则,动物实验伦理审批号为20180510-001。

1.1.2 主要试剂与仪器 Cas13a(*Leptotrichia shahii*)与dCas13a表达质粒由上海永联生物技术公司合成。*fabp11a* morpholino(5'-ACC ATT TTC CCG AAT AAT GAT GCT C-3')由Gene Tools公司合成。PCR引物和crRNA的引物由南京金斯瑞生物科技有限公司合成。mMESSAGE mMACHINE® SP6 Kit与MAXIscript™ T7体外转录试剂盒、TRIzol™试剂、低熔点的琼脂糖(UltraPure™ Low Melting Point Agarose)购自ThermoFisher公司(美国);PrimeScript™ RT Master Mix购自TaKaRa公司(日本);Tricaine购自Sigma-Aldrich公司(美国)。体视荧光显微镜MVX10购自Olympus公司(日本);StepOne Plus实时荧光定量PCR仪购自ThermoFisher公司;斑马鱼养殖系统购自北京爱生科技发展有限公司;PV380显微注射仪购自世界精密仪器商贸公司。

1.2 方法

1.2.1 RNA体外转录 将公司合成的Cas13a和dCas13a表达质粒利用限制性内切酶Not I进行酶切线性化,胶回收纯化后采用mMESSAGE mMACHINE® SP6试剂盒进行体外转录从而获得Cas13a-mRNA和dCas13a-mRNA;通过PCR扩增合成crRNA模板DNA,胶回收纯化后利用MAXIscript™ T7体外转录试剂盒合成各crRNA产物,相关引物序列见表1。

1.2.2 显微注射 在注射前1天晚上将需要使用的斑马鱼按照1:1的雌雄比例转移至杂交缸内,用隔板隔开雌雄;显微注射当天早上,将隔板移除,待斑马鱼产胚胎。与此同时准备注射用的针。将试剂用超细显微枪头加到注射用针中,在显微镜下用刀片切成合适的长度。根据KIMMEL等^[22]对斑马鱼胚胎

表1 合成crRNA引物序列
Table 1 Primer sequences of synthetic crRNA

引物名称 Primer name	引物序列(5'→3') Primer sequences (5'→3')
egfp-crRNA-F	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGG TTT TAG TCC CCT TCG ATA TTG GGG TGG GCA CTG CAC GCC GTA GGT CAG GGT GGT C
egfp-crRNA-R	GAC CAC CCT GAC CTA CGG CGT GCA GTG CCC ACC CCA ATA TCG AAG GGG ACT AAA ACC CCT ATA GTG AGT CGT ATT A
egfp-crRNA-mut-F	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGG TTT TAG TCC CCT TCG ATA TTG GGG TGG GCA CTG CAC AAA AAT AAT CAG GGT GGT C
egfp-crRNA-mut-F	GAC CAC CCT GAT TAT TTT TGT GCA GTG CCC ACC CCA ATA TCG AAG GGG ACT AAA ACC CCT ATA GTG AGT CGT ATT A
ta-crRNA-F	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGG TTT TAG TCC CCT TCG ATA TTG GGG TGG TAC GGG TGC TTT CAT CCA GTG CGC GCC G
ta-crRNA-R	CGG CGC GCA CTG GAT GAA AGC ACC CGT ACC ACC CCA ATA TCG AAG GGG ACT AAA ACC CCT ATA GTG AGT CGT ATT A
fabp11a-crRNA-F	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGG TTT TAG TCC CCT TCG ATA TTG GGG TGG TTG TCG CTG GTG GTC ATT TTC CAC GTT C
fabp11a-crRNA-R	GAA CGT GGA AAA TGA CCA CCA GCG ACA ACC ACC CCA ATA TCG AAG GGG ACT AAA ACC CCT ATA GTG AGT CGT ATT A

表2 qRT-PCR引物序列
Table 2 qRT-PCR primer sequences

引物名称 Primer name	引物序列(5'→3') Primer sequences (5'→3')
egfp-qPCR-F	CAC CAT CTT CTT CAA GGA CGA
egfp-qPCR-R	GTT GTG GCT GTT GTA GTT GTA
ta-qPCR-F	GCA TAT CAG AAT GAA GAG ATT ACC
ta-qPCR-R	CGA GTT GTG AAT ATC CAG ATT G
fabp11a-qPCR-F	TTG CTA CTC GTC AGG TTG
fabp11a-qPCR-R	TCG TGG TCT TTC TGT CAT C

发育阶段的描述, 收集受精后的胚胎, 整齐地排列在模具中并在1-2细胞期进行显微注射, 使用5 μ L注射体系(包括1 500 ng Cas13a-mRNA和500 ng crRNA)。注射后将胚胎置于28.5 $^{\circ}$ C条件下进行培养。

1.2.3 活体成像 斑马鱼胚胎经MS-222麻醉剂麻醉后用0.8%的低熔点琼脂糖凝胶包埋于玻璃小皿中, 并用Olympus MVX10体式荧光显微镜对其发育表型进行观察并拍照。成像结束后胚胎的自发运动和血液循环被用作胚胎存活的检测指标。

1.2.4 实时荧光定量PCR(qRT-PCR) 收集48hpf(hours post fertilization, hpf)的对照组以及基因下调处理组的胚胎, 利用TRIzol™试剂(Invitrogen, Cat: 15596026)提取对照组和显微注射组胚胎总RNA, 通过逆转录获得cDNA模板, 再利用qRT-PCR分别检测报告基因*egfp*和内源基因*ta*、*fabp11a*的表达水平。相关基因的qRT-PCR引物序列见表2。

1.3 统计学分析

利用GraphPad Prism 7软件对实验数据进行统计学分析。数据采用平均值 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 使用Dunnett's检验的单因素方差分析(One-Way ANOVA)进行多组比较, $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 CRISPR-Cas13a系统在斑马鱼体内有效下调报告基因*egfp*的表达

为了检测CRISPR-Cas13a在斑马鱼体内是否可以发挥敲降基因表达的功能, 以表达绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, *egfp*)的转基因斑马鱼*Tg(β -actin:loxp-egfp-stop-loxp-DTA)*为研究对象, 在斑马鱼胚胎1细胞期共注射Cas13a-mRNA和*egfp*-crRNA, 观察Cas13a是否能够下调*egfp*基因表达(图1A)。实验结果显示, 在48hpf共注射组斑马鱼体内*egfp*分布

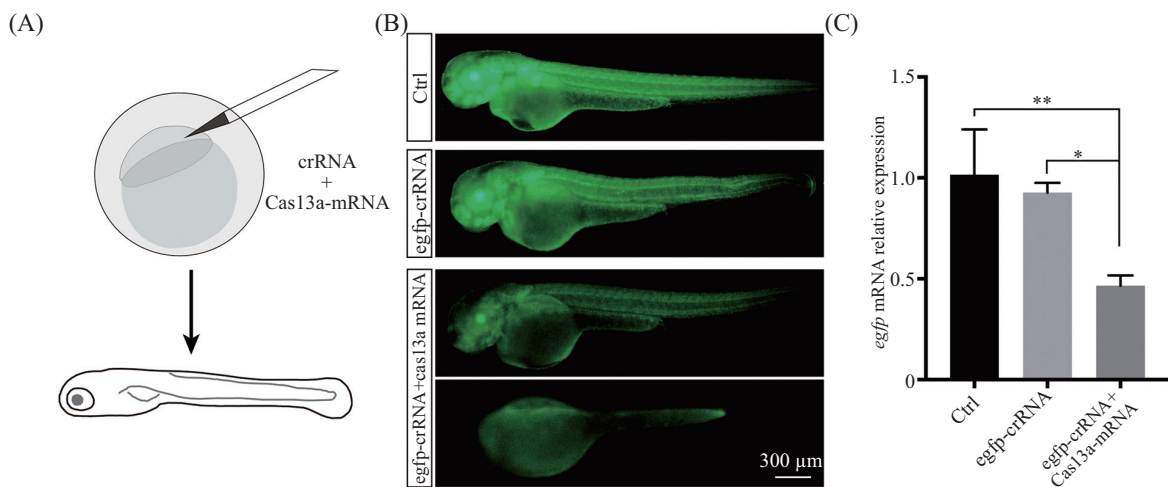
范围显著缩小,亮度降低,而单注射 $egfp$ -crRNA组无显著变化;qRT-PCR结果也证实,共注射组 $egfp$ 表达水平下调约52%,与对照组($P<0.01$)以及单注射 $egfp$ -crRNA组($P<0.05$)相比具有显著差异(图1B和图1C),这提示CRISPR-Cas13a能够下调斑马鱼体内报告基因 $egfp$ 的表达。

2.2 CRISPR-Cas13a系统下调斑马鱼内源性基因 ta 和 $fabp11a$ 表达验证

ta 是斑马鱼中胚层发育过程中重要的转录因子之一,该基因突变将导致脊索、尾巴发育缺陷,为了检测CRISPR-Cas13a系统是否能够有效下调斑马鱼

内源性基因表达,我们体外合成 ta -crRNA和Cas13a-mRNA。在野生型斑马鱼胚胎1细胞期显微共注射Cas13a-mRNA和 ta -crRNA,48hpf后观察胚胎发育表型(图2A)。结果表明,注射组斑马鱼尾巴会出现缺失或畸形的表型,其中共注射组与对照组相比其尾巴发育畸形比例约70%(图2B);qRT-PCR检测证实共注射组 ta mRNA表达丰度被降低至49%($P<0.001$,图2C)。

$fabp11a$ 是斑马鱼眼睛发育相关的重要基因,其功能缺陷会导致斑马鱼眼睛发育异常,为了进一步验证CRISPR-Cas13a系统在斑马鱼中的作用,我们将 $fabp11a$ -crRNA和Cas13a-mRNA共注射到野生型

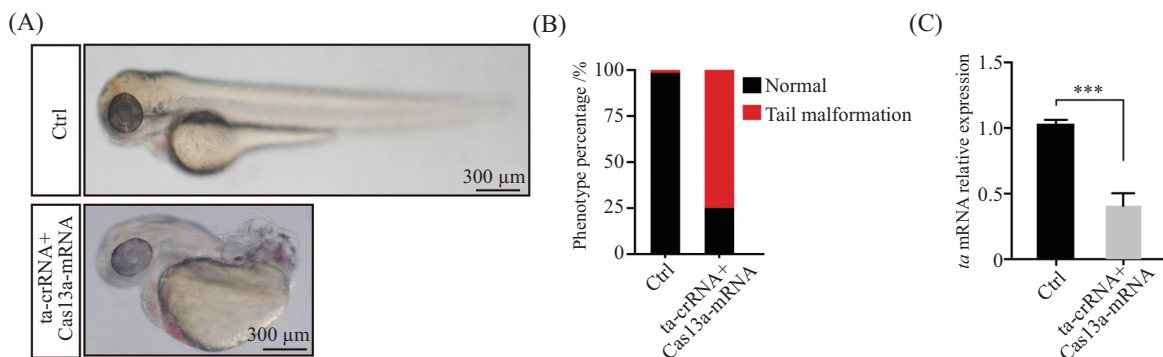


A: 斑马鱼显微注射示意图。B: 显微共注射Cas13a-mRNA和 $egfp$ -crRNA,48hpf,荧光显微镜观察转基因斑马鱼 $Tg(\beta$ -actin:loxp- $egfp$ -stop-loxp-DTA)体内EGFP表达。C: qRT-PCR检测 $egfp$ 表达水平,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

A: schematic representation of zebrafish microinjection. B: following microinjection of embryos with Cas13a-mRNA and $egfp$ -crRNA, EGFP fluorescence was detected in embryos of transgenic zebrafish $Tg(\beta$ -actin:loxp- $egfp$ -stop-loxp-DTA) at 48hpf; C: $egfp$ mRNA was analysed using qRT-PCR, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

图1 CRISPR-Cas13a系统下调斑马鱼报告基因 $egfp$ 的表达

Fig.1 CRISPR-Cas13a system induces report gene $egfp$ knock-down in zebrafish



A: 48hpf,观察 ta -crRNA和Cas13a-mRNA共注射组胚胎表型。B: 斑马鱼尾发育表型统计。C: qRT-PCR检测 ta 表达水平,*** $P<0.001$ 。

A: following microinjection of embryos with ta -crRNA and Cas13a-mRNA, the phenotype of injected embryos was observed at 48hpf. B: the tail phenotypes were analyzed at 48hpf. C: ta mRNA was detected by qRT-PCR, *** $P<0.001$.

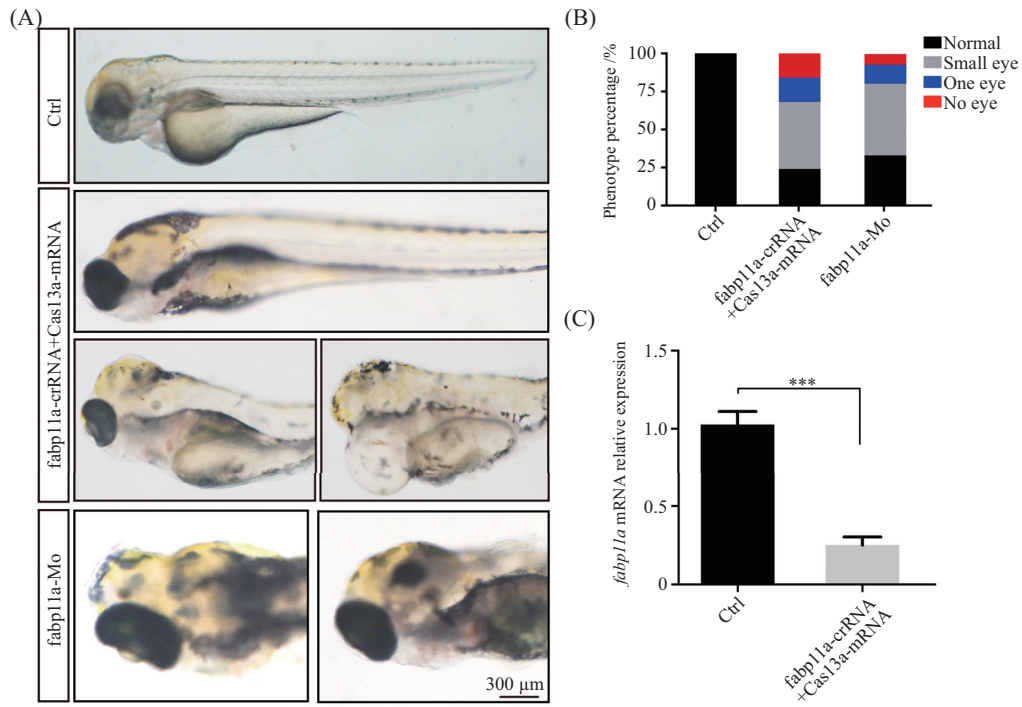
图2 CRISPR-Cas13a系统下调斑马鱼内源基因 ta 表达

Fig.2 CRISPR-Cas13a system induces endogenous genes ta knock-down in zebrafish

斑马鱼1细胞期胚胎,发现斑马鱼眼睛发育异常,出现无眼、眼睛大小不一或单眼等表型(图3A);在注射fabp11a-Mo组,作为阳性对照我们也观察到同样的表型。数据统计表明,共注射组与对照组相比眼睛畸形比例约为60%(图3B);qRT-PCR结果证实,与对照组相比,共注射组fabp11a mRNA表达丰度约

27%,被显著下调($P < 0.001$,图3C)。

当同时注射Cas13a-mRNA、ta-crRNA和fabp11a-crRNA时,我们也可观察到部分斑马鱼同时出现眼睛和尾巴发育异常的现象,表明CRISPR-Cas13a具有同时下调斑马鱼不同内源基因表达量的功能(图4A和图4B)。综上所述,CRISPR-Cas13a系统能够下

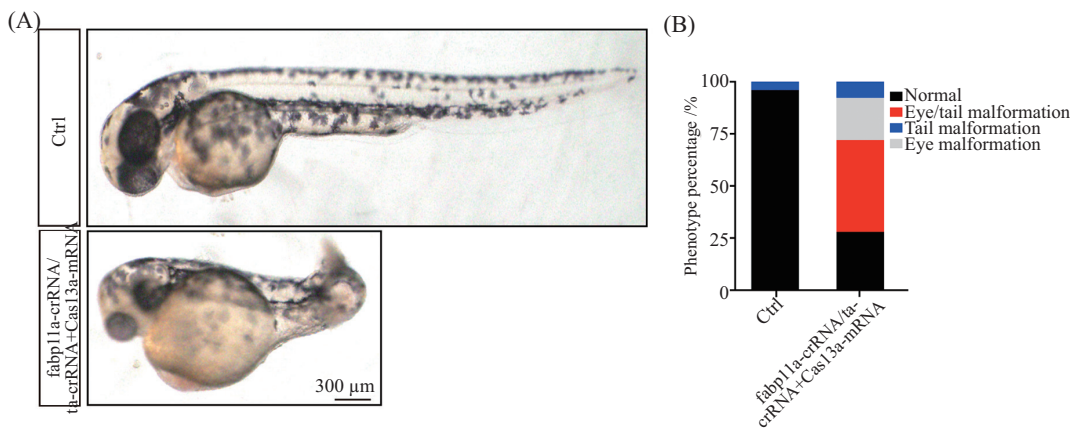


A: 72hpf, 观察fabp11a-crRNA和Cas13a-mRNA共注射后胚胎表型, fabp11a-Mo组作为阳性对照。B: 斑马鱼眼睛表型统计。C: qRT-PCR检测fabp11a mRNA表达水平, *** $P < 0.001$ 。

A: following microinjection of embryos with fabp11a-crRNA and Cas13-mRNA, the phenotype of injected embryos was observed at 72hpf. B: the eye phenotypes were analyzed at 72hpf. C: fabp11a mRNA was detected by qRT-PCR, *** $P < 0.001$.

图3 CRISPR-Cas13a系统下调斑马鱼内源基因fabp11a表达

Fig.3 CRISPR-Cas13a system induces endogenous genes fabp11a knock-down in zebrafish



A: 显微注射fabp11a-crRNA、ta-crRNA和Cas13a-mRNA, 48hpf观察斑马鱼胚胎表型。B: 斑马鱼发育表型统计。

A: following microinjection of embryos with ta-crRNA, fabp11a-crRNA and Cas13-mRNA, the phenotype of injected embryos was observed at 48hpf. B: the eye/tail phenotypes were analyzed at 48hpf.

图4 CRISPR-Cas13a系统下调斑马鱼内源基因ta和fabp11a表达

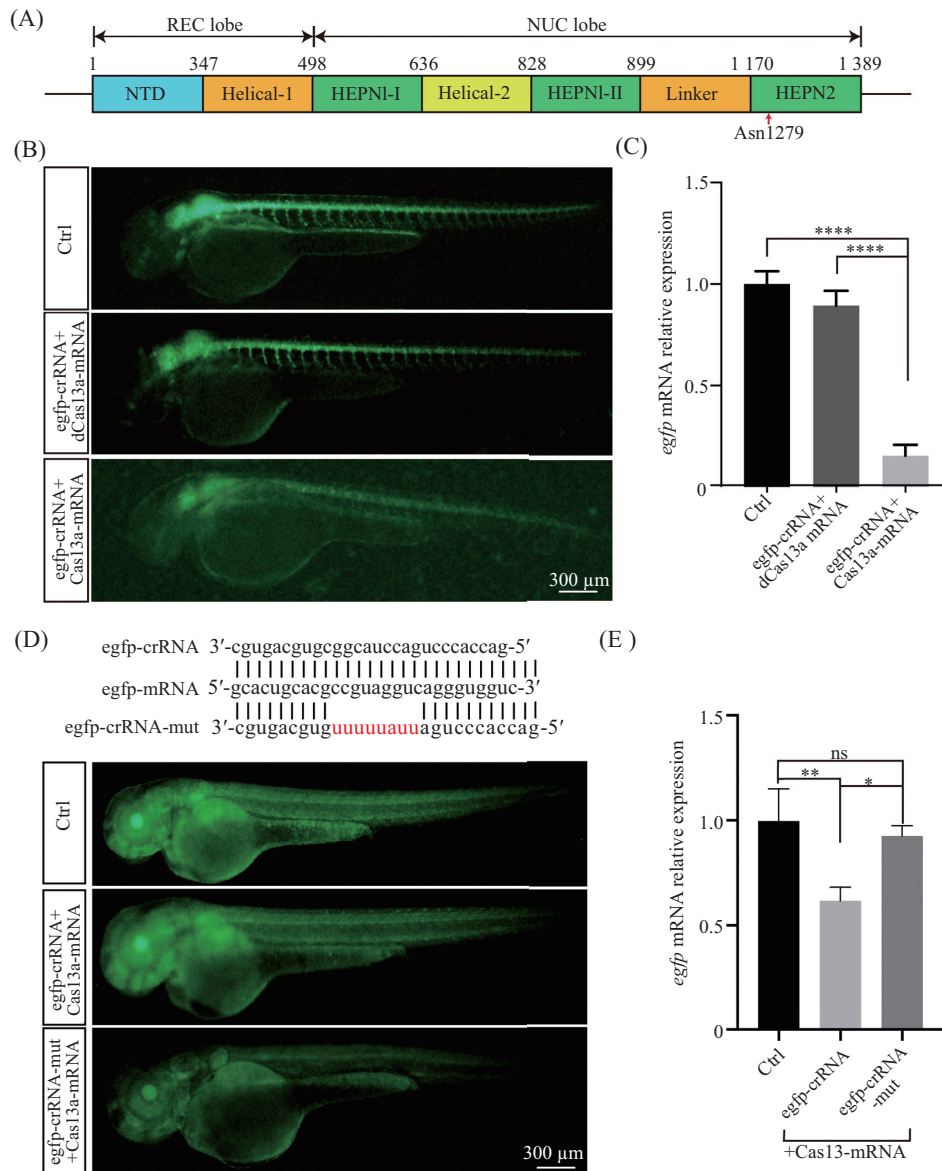
Fig.4 CRISPR-Cas13a system induces endogenous genes ta and fabp11a knock-down in zebrafish

调斑马鱼内源性基因*ta*和*fabp11a*的表达。

2.3 Cas13a突变或crRNA突变后对其活性的影响分析

有研究表明,位于HEPN1结构域内的Asn598和HEPN2结构域内的Asn1279是Cas13核酸酶发挥功能的关键氨基酸位点,当Asn598或Asn1279被丙氨酸取

代时,Cas13a失活。为了进一步证实Cas13a的作用特异性,我们体外合成了含有Asn1279突变的dCas13a mRNA(图5A),在转基因斑马鱼*Tg(hb9:egfp)*胚胎中,与egfp-crRNA共注射后,检测其敲降活性,结果发现,dCas13a不能有效下调转基因鱼中*egfp*的表达(图5B和图5C)。体外合成egfp-crRNA-mut,与Cas13a



A: Cas13a结构域示意图。B: egfp-crRNA分别与Cas13a-mRNA和dCas13a-mRNA共注射,48hpf观察转基因斑马鱼*Tg(hb:egfp)*体内egfp表达。C: qRT-PCR检测*egfp*表达水平,**** $P<0.0001$ 。D: Cas13a/crRNA介导的基因靶向*egfp*示意图,红色标记egfp-crRNA突变体错配碱基。egfp-crRNA-mut与Cas13a mRNA共注射转基因斑马鱼*Tg(β -actin:loxp-EGFP-stop-loxp-DTA)*胚胎,48hpf观察其EGFP表达。E: qRT-PCR检测*egfp*表达水平,* $P<0.05$,** $P<0.01$,ns:差异不显著。

A: schematic diagram of Cas13a domain. B: egfp-crRNA was co-injected with Cas13a-mRNA and dCas13a-mRNA separately, and egfp fluorescence was detected in embryos of transgenic zebrafish *Tg(hb9:egfp)* at 48hpf. C: *egfp* mRNA was detected by qRT-PCR, **** $P<0.0001$. D: schematic diagram of Cas13a/crRNA-mediated gene targeting *egfp*. The mismatched base in egfp-crRNA mutation is highlighted in red. Following microinjection of embryos with egfp-crRNA-mut and Cas13a mRNA in *Tg(β -actin:loxp-EGFP-stop-loxp-DTA)*, the expression was observed at 48hpf. E: *egfp* mRNA was detected by qRT-PCR at 48hpf, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, ns: no significance.

图5 Cas13a和crRNA突变后对Cas13a活性的影响分析

Fig.5 Analysis of the effect of Cas13a and crRNA mutation on the activity of Cas13a

mRNA共注射转基因 *Tg(β -actin:loxp-egfp-stop-loxp-DTA)* 胚胎, *egfp* 表达与对照组没有显著差异(图5D和图5E), 这也提示crRNA突变后, CRISPR-Cas13a系统无法下调靶基因表达。

3 讨论

斑马鱼作为一种重要的模式生物, 在生物学和基础医学研究中具有广泛的应用。目前, 有关斑马鱼基因功能的研究技术主要包括基因敲除和敲降两类, 其中基因敲降技术仅以Morpholino应用为主。CRISPR-Cas13a是一种稳健、精确且通用的RNA靶向系统。CRISPR-Cas13a介导的操作不限于靶向细胞质转录物, 也可以靶向核内非编码转录物和前体mRNA等。研究表明, Cas13a通过直接切除细胞内mRNA而快速地下调靶基因的表达, 因而成为一种新型的基因下调的工具, 并已在小鼠和人的细胞中得到研究验证^[7, 23-24]。然而, CRISPR-Cas13a系统在斑马鱼体内是否可以有效下调靶基因表达仍未见相关报道。

本研究以 *Leptotrichia shahii* 来源的Cas13a蛋白为对象, 验证了其在斑马鱼体内可有效下调报告基因 *egfp* 及内源基因 *fabp11a* 和 *ta* 的表达, 或者同时下调两个不同的基因, 表明Cas13a作为新型的基因下调工具, 可以应用于斑马鱼分子遗传及基因功能研究领域。对各种基因编辑或表达调控工具而言, 其作用特异性和安全性非常重要。在此前的报道中, 张峰等^[7]用转录组学分析等手段证实CRISPR-Cas13a系统在哺乳动物细胞中具有良好的特异性和安全性, 不会导致明显的脱靶效应的产生, 然而, 相关结论在活体动物中是否依然成立仍不确定。在我们的研究中, 没有观察到CRISPR-Cas13a的处理对鱼带来明显的毒性作用, 显微注射组的一些明显发育缺陷或畸形与早期研究报道类似^[16-18, 25]。本实验中我们还发现在注射Cas13a及其crRNA两天后, 靶基因的表达下降到最低水平, 而在注射五天后, 斑马鱼表型没有明显的恢复, 说明该下调效应持续时间较长, 不亚于Morpholino的效果。未来还可以通过构建靶基因crRNA组织特异性表达的转基因斑马鱼品系, 再通过注射导入Cas13a来实现对其特定组织或器官中的靶基因进行特异性下调的作用。但关于CRISPR-Cas13a系统在斑马鱼体内的特异性和是否会出现脱靶效应等相关问题, 还需要今后深入研

究和分析。

参考文献 (References)

- [1] STERNBERG S H, RICHTER H, CHARPENTIER E, et al. Adaptation in CRISPR-Cas systems [J]. *Mol Cell*, 2016, 61(6): 797-808.
- [2] MARRAFFINI L A. CRISPR-Cas immunity in prokaryotes [J]. *Nature*, 2015, 526(7571): 55-61.
- [3] MAKAROVA K S, WOLF Y I, ALKHNABASHI O S, et al. An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2015, 13(11): 722-36.
- [4] ABUDAYYEH O O, GOOTENBERG J S, KONERMANN S, et al. C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector [J]. *Science*, 2016, 353(6299): aaf5573.
- [5] CONG L, ZHANG F. Genome engineering using CRISPR-Cas9 system [J]. *Methods Mol Biol*, 2015, 1239: 197-217.
- [6] CHAUDHARY K. CRISPR/Cas13a targeting of RNA virus in plants [J]. *Plant Cell Rep*, 2018, 37(12): 1707-12.
- [7] ABUDAYYEH O O, GOOTENBERG J S, ESSLETZBICHLER P, et al. RNA targeting with CRISPR-Cas13 [J]. *Nature*, 2017, 550(7675): 280-4.
- [8] JING X, XIE B, CHEN L, et al. Implementation of the CRISPR-Cas13a system in fission yeast and its repurposing for precise RNA editing [J]. *Nucleic Acids Res*, 2018, 46(15): e90.
- [9] LIN P, QIN S, PU Q, et al. CRISPR-Cas13 inhibitors block RNA editing in bacteria and mammalian cells [J]. *Mol Cell*, 2020, 78(5): 850-61.e5.
- [10] WANG X, LING C C, LI L, et al. MicroRNA-10a/10b represses a novel target gene *mib1* to regulate angiogenesis [J]. *Cardiovasc Res*, 2016, 110(1): 140-50.
- [11] GORE A V, PILLAY L M, VENERO GALANTERNIK M, et al. The zebrafish: a fantastic model for hematopoietic development and disease [J]. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*, 2018, 7(3): e312.
- [12] MEYERS J R. Zebrafish: development of a vertebrate model organism [J]. 2018, 16(1): e19.
- [13] PENG J. Gene redundancy and gene compensation: an updated view [J]. *J Genet Genomics*, 2019, 46(7): 329-33.
- [14] STAINIER D Y R, RAZ E, LAWSON N D, et al. Guidelines for morpholino use in zebrafish [J]. *PLoS Genet*, 2017, 13(10): e1007000.
- [15] LIU L, LI X, WANG J, et al. Two distant catalytic sites are responsible for C2c2 RNase activities [J]. *Cell*, 2017, 168(1/2): 121-34.e12.
- [16] HALPERN M E, HO R K, WALKER C, et al. Induction of muscle pioneers and floor plate is distinguished by the zebrafish *no tail* mutation [J]. *Cell*, 1993, 75(1): 99-111.
- [17] LEONG I U, LAI D, LAN C C, et al. Targeted mutagenesis of zebrafish: use of zinc finger nucleases [J]. *Birth Defects Res C Embryo Today*, 2011, 93(3): 249-55.
- [18] QI J, DONG Z, SHI Y, et al. NgAgo-based *fabp11a* gene knockdown causes eye developmental defects in zebrafish [J]. *Cell Res*, 2016, 26(12): 1349-52.
- [19] ZHANG J, QI J, WU S, et al. Fatty acid binding protein 11a is required for brain vessel integrity in Zebrafish [J]. *Front Physiol*, 2017, 8: 214.

- [20] FURUHASHI M, TUNCMAN G, GORGUN C Z, et al. Treatment of diabetes and atherosclerosis by inhibiting fatty-acid-binding protein aP2 [J]. *Nature*, 2007, 447(7147): 959-65.
- [21] WESTERFIELD M. *The Zebrafish book. A guide for the laboratory use of Zebrafish (Danio rerio)* [M]. 4th Edition ed. University of Oregon Press: Eugene, 2000.
- [22] KIMMEL C B, BALLARD W W, KIMMEL S R, et al. Stages of embryonic development of the zebrafish [J]. *Dev Dyn*, 1995, 203(3): 253-310.
- [23] GOOTENBERG J S, ABUDAYYEH O O, LEE J W, et al. Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2e2 [J]. *Science*, 2017, 356(6336): 438-42.
- [24] COX D B T, GOOTENBERG J S, ABUDAYYEH O O, et al. RNA editing with CRISPR-Cas13 [J]. *Science*, 2017, 358(6366): 1019-27.
- [25] AMACK J D, WANG X, YOST H J. Two T-box genes play independent and cooperative roles to regulate morphogenesis of ciliated Kupffer's vesicle in zebrafish [J]. *Dev Biol*, 2007, 310(2): 196-210.