

CRISPR/Cas 系统在斑马鱼中的研究进展

王阿利, 刘江东*

武汉大学生命科学学院, 武汉 430072

摘要: 斑马鱼是生物学中十分重要的模式生物, 可作为基因功能分析、人类疾病病理学研究和新药研发的有利工具。它具有易于控制操作、与人类进化关系相近的优势, 目前已经开发了多种斑马鱼模型用于研究人类相关疾病。聚集的有规则间隔的短回文重复序列及其关联蛋白 (the clustered regularly interspaced short palindromic repeats and CRISPR-associated proteins, CRISPR/Cas) 技术的出现, 大大降低了斑马鱼基因编辑的复杂性。主要描述了 CRISPR/Cas 系统的基本原理、技术革新, 总结了 CRISPR/Cas 系统在斑马鱼基因敲除或敲入、活细胞成像、转录调控、多重靶向、建立疾病模型中的重要作用, 以期探究 CRISPR/Cas 系统在斑马鱼基因组学研究中的应用提供一定思路。

关键词: CRISPR/Cas; 斑马鱼; 基因编辑; 基因组学研究; 疾病模型

DOI: 10.19586/j.2095-2341.2023.0033

中图分类号: Q78 文献标志码: A

Research Progress on the CRISPR/Cas System in Zebrafish

WANG Ali, LIU Jiangdong*

College of Life Science, Wuhan University, Wuhan 430072, China

Abstract: The zebrafish is an important model organism in biology and a useful tool for gene function analysis, human disease pathology research, and new drug development. It has advantages of easy operation and close evolutionary relationship with humans. Currently, various zebrafish models have been developed for the study of human-related diseases. The emergence of clustered regularly interspaced short palindromic repeats and CRISPR-associated proteins (CRISPR/Cas) technology with regularly spaced short palindromic repeats and their associated proteins has greatly reduced the complexity of zebrafish gene editing. This article mainly described the basic principles and technical innovations of the CRISPR/Cas system, and summarized the important role of the CRISPR/Cas system in zebrafish gene knockout, knock-in, live-cell imaging, transcriptional regulation, multiple targeting, and disease model establishment, with a view to providing a certain idea for exploring the application of the CRISPR/Cas system in zebrafish genomics research.

Key words: CRISPR/Cas; zebrafish; gene editing; genomics research; disease model

与哺乳动物不同, 斑马鱼通过体外受精繁殖, 可以方便地对其胚胎发育的各个阶段进行研究观察。斑马鱼的光学透明特性, 使其易于结合荧光报告系统进行发育相关研究^[1]。此外, 斑马鱼的快速繁殖能力和胚胎便于基因操作特性, 使其与基因组 DNA 编辑技术的结合成为必然^[2]。CRISPR/Cas 系统相较于其他编辑系统, 在斑马鱼中表现出更高的基因编辑效率和相对较低的细胞

毒性^[3], 还具有可靶向编辑甲基化序列^[4]以及进行多重基因编辑的优势^[5]。因此, 近年来 CRISPR/Cas 系统在斑马鱼基因编辑领域的应用愈加广泛, 并取得了一系列新突破。本文根据已有的相关报道, 总结了 CRISPR/Cas 系统在斑马鱼基因敲除或敲入、活细胞成像、转录调控、多重靶向、疾病模型建立中的研究进展, 以期从 CRISPR/Cas 系统在斑马鱼中应用的角度为人类疾病机制的探索提供新的思路。

收稿日期: 2023-03-15; 接受日期: 2023-03-31

联系方式: 王阿利 E-mail: 2020202040077@whu.edu.cn; * 通信作者 刘江东 E-mail: liujd@whu.edu.cn

1 CRISPR/Cas 系统

1.1 CRISPR/Cas 系统的基本作用原理

CRISPR/Cas 系统是一个在古细菌和细菌中发现的内切酶工具,作用是抵抗入侵的外源遗传物质,例如噬菌体病毒、外源质粒等。同时,类似于哺乳动物的二次免疫,CRISPR/Cas 系统可以为细菌提供获得性免疫,当病毒或者外源质粒入侵细菌时,细菌会形成相应的“记忆”,从而保护细菌免受外源遗传物质的二次入侵^[2,6]。CRISPR/Cas 系统可以识别并切断外源 DNA 或 RNA,使外源遗传物质的表达沉默,此原理与真核生物中 RNA 干扰(RNA interference, RNAi)非常相似。正是因为具有精准靶向功能,CRISPR/Cas 系统被开发为一种高效的基因编辑工具并被广泛应用于工程动物基因组^[6-7]。

表 1 CRISPR/Cas Class2 系统的种类及其特征

Table 1 Types and characteristics of CRISPR/Cas Class 2 systems

种类	CRISPR 酶	向导 RNA	PAM 序列	目标序列	应用	参考文献
II	Cas9	sgRNA	NGG	DNA	基因组编辑、活细胞成像、转录调控	[9-11]
V	Cas12	crRNA/sgRNA	TTN	DNA	基因组编辑	[12-14]
VI	Cas13	crRNA	—	RNA	RNA 编辑和示踪	[15-16]

注:PAM—protospacer adjacent motif,原间隔邻近基序。

1.3 CRISPR/Cas 系统在斑马鱼中的技术革新

虽然 CRISPR/Cas 系统在基因编辑中广泛应用,但是由于细胞内修复结果的不确定性,研究者对 CRISPR/Cas 系统的编辑精度有更高的追求。在提高 CRISPR/Cas 系统编辑精度上的研究有以下几方面进展。

1.3.1 改造 Cas 蛋白 Cas 蛋白是 CRISPR/Cas 系统的核心组件。在斑马鱼中,通过改变核苷酸碱基从而遵循斑马鱼密码子规律,并调节 GC 含量和二级 mRNA 结构,构建了斑马鱼密码子优化的 Cas9(zCas9)cDNA。再经过体外转录,利用显微注射到斑马鱼胚胎中,能够特异性地提高 zCas9 对斑马鱼基因编辑的效率^[17]。

1.3.2 拓展 PAM 序列多样性 Cas9 能够识别的序列范围受到特定 PAM 的限制^[18-21]。SpCas9 是迄今为止使用最广泛的 Cas9,主要识别 NGG PAMs。由于仅限于包含该基序的位点可以被 CRISPR/

1.2 CRISPR/Cas 系统的种类

CRISPR/Cas 系统主要分为 2 类,分别为 Class1 和 Class2,Class1 系统中包含 4~7 种 Cas 蛋白,共同作用干扰靶基因表达,目前在斑马鱼基因编辑中应用较少;Class2 系统中只有 1 种 Cas 蛋白,可单独行使多种功能,这类 Cas 蛋白通常具有多个复杂结构域,例如 Cas9、Cas12 等。而根据其剪切元件序列和功能特征,以及辅助元件的组成,Class1 分为 Type I、III、IV 3 种类型,Class2 分为 Type II、V、VI 3 种类型^[8]。用于斑马鱼基因编辑的主要是 Class2 系统,Type II、V、VI 中的 Cas 蛋白分别为 Cas9、Cas12、Cas13(表 1)。其中 Cas9 和 Cas12 具有基因编辑功能,由 crRNA 和 tracrRNA 人工组合成单一指导 RNA(single guidance RNA, sgRNA),引导 Cas9 和 Cas12 定点切割目标序列。二者具有通过改变 sgRNA 序列即可任意改变切割位点的可控性以及便利性,因此广泛应用于斑马鱼基因组编辑。

Cas9 系统编辑,SpCas9 很难精确靶向各种基因组序列并引发基因编辑所必需的双链断裂(double strand breaks, DSBs)^[22]。拓展 PAM 序列的多样性成为扩大 CRISPR/Cas9 应用范围的研究重点。如今在 NGG PAMs 之外,还发现了多种能够靶向其他 PAM 序列的 Cas9。例如,被修饰过的化脓性链球菌 Cas9(SpCas9)可以在斑马鱼细胞中特异地区分非典型 NAG 和 NGA PAMs^[23];SaCas9 和其 KKH SaCas9 变体,可以高效率靶向编辑斑马鱼基因组中 PAM 为 5'-NNNRRT-3' 的 DNA 序列^[24];ScCas9 作为一种新发现的 Cas 蛋白,可以靶向基因组序列中更多的 NNG PAMs^[25]。PAM 的多样性扩大了可用靶位点的选择范围,增加了 Cas9 的适用性,进一步激发了 CRISPR/Cas9 系统在斑马鱼基因组编辑中的潜力。

1.3.3 优化系统存在形式 引导 RNA 和靶位点的互补配对,使得 Cas9 或 Cas12 能够在指定位点

进行双链切割,引导RNA的不稳定靶向,大大降低了CRISPR/Cas9和CRISPR/Cas12的基因编辑效率。研究表明,sgRNA 5'端多余的鸟嘌呤核苷酸会导致斑马鱼胚胎内CRISPR/Cas9编辑能力降低^[26]。在Cpf1(更名为Cas12a)蛋白缺失的情况下,crRNA(Cpf1的向导RNA)在体内不稳定并发生降解^[14]。以上2种情况都可以通过将CRISPR/Cas系统组装成核糖核蛋白复合物以提高其对基因组编辑的稳定性和有效性^[26-27]。

1.3.4 改变载体组分 不同的CRISPR/Cas系统载体构成具有不同的编辑效果。在质粒载体的CRISPR/Cas系统中,以组织特异性的启动子启动系统表达,就可以获得针对特定组织结构的基因编辑工具,进而对不同的组织进行特异性基因编辑操作^[28]。

1.3.5 选择合适的温度 环境也会影响CRISPR/Cas系统在斑马鱼中的使用效果。有研究表明,降低温度有利于延缓斑马鱼胚胎早期发育,提高CRISPR/Cas9的编辑效率^[29]。

2 CRISPR/Cas系统在斑马鱼基因编辑中的应用

2.1 利用CRISPR/Cas系统对斑马鱼进行基因敲除或敲入

Cas9和Cas12蛋白都可以用作基因敲除或敲入,通过引入双链断裂、非同源端连接(non-homologous end joining, NHEJ)修复或同源定向修复(homologous directed repair, HDR)均可以诱导目的基因的插入或缺失(indels)^[30]。但由于供体和断点之间的连接是不可预测的,修复后突变的结果通常并不理想,特别是HDR介导的基因组编辑敲入方法在斑马鱼中效率更低^[31]。因此,研究者提出了很多办法来提高插入/缺失效率。

针对HDR导致的突变效率低的问题,在斑马鱼胚胎中引入斑马鱼长单链DNA模板(zebrafish long single-stranded DNA template, zLOST),利用HDR和长单链DNA(long single stranded DNA, lssDNA)作为修复模板可以在斑马鱼中产生更有效、更精确的突变^[32]。最近出现的先导编辑(prime editing, PE)系统也是提高修复后插入成功率的有效途径。PE系统包含1个pegRNA和1个

PE2蛋白,PE2蛋白由1个nCas9和1个改造的M-MLV逆转录酶(reverse transcriptase, RT)融合组成。与常规sgRNA不同的是,pegRNA不仅具有靶向作用,自身还带有“逆转录模板”,PE2蛋白会在pegRNA引导下结合到目标序列上,然后启动逆转录酶功能,以pegRNA上的一段序列为逆转录模板,合成一段DNA序列,随后细胞内的修复机制就会将新合成的序列整合到基因组中^[33]。体外纯化的PE核糖核蛋白(ribonucleoprotein, RNP)复合物被证实可以高效地诱导斑马鱼体细胞突变并进行种系传递^[9]。

除了进行系统构成改良之外,优化实验设计也能提高基因插入/缺失效率。例如,在基因组中插入荧光蛋白标记时,利用RNA剪接过程中非编码序列会从转录本中移除的特性,在非编码区域(如内含子和5'非翻译区)整合荧光蛋白,这样即使出现不精确的整合事件也不会影响标记蛋白的表达,从而提高了荧光蛋白精确插入的成功率^[34]。除此之外,利用斑马鱼胚胎基因分型(zebrafish embryo genotyping, ZEG)装置,在受精后72 h的胚胎中提取少量的基因组DNA,选出敲入率最高的斑马鱼胚胎,再和下一代测序相结合,可以使CRISPR/Cas系统获得17倍的体细胞编辑能力,大大提高了斑马鱼CRISPR编辑的选择能力^[35]。

2.2 dCas9作用于斑马鱼活细胞成像与转录调控

CRISPR/dCas9活细胞成像技术的基本原理是将dCas9与荧光基团偶联,在细胞核定位序列(nuclear localization sequence, NLS)的引导下穿过细胞器膜,通过sgRNA的靶向作用特异性地标记染色体基因序列。一般情况下,dCas9在细胞中广泛表达,为了提高信噪比及靶位点的数量,sgRNA一般靶向重复序列^[36]。利用CRISPR/dCas9活细胞成像技术,可以对细胞内的基因实现精确定位,并利用荧光基团使其可视化。例如,属于调节母体mRNA清除的microRNA家族中的miR-430,是一个有54个拷贝的重复基因,将dCas9-3xGFP与定位在内源性miR-430上的gRNAs共注射入单细胞中,可以寻找到miR-430位点在胚胎中最早的转录时间点^[10]。

基因的转录起始和延伸可以被启动子和外显子中的sgRNA复合物干扰,如dCas9(dead Cas9, Cas9的无外切酶活性形式)。如果克虏伯相关盒

(krüppel associated box, KRAB)结构域与dCas9融合,则会抑制靶基因的表达式。同样,转录激活因子如VP16的融合则可以增加靶基因的表达式^[37]。将体外合成dCas9-KRAB的mRNA和靶特异性sgRNAs注射到斑马鱼单细胞期胚胎中,则发现靶位点基因的表达式水平降低^[11]。

2.3 利用CRISPR/Cas系统靶向斑马鱼RNA

自发现C2c2(现被称为Cas13a)是一种单组分可编程RNA引导的靶向RNA CRISPR效应器之后^[38],研究人员开始运用CRISPR/Cas13a进行RNA示踪的研究。2023年1月,陈玲玲团队在斑马鱼合子中注射纯化的CRISPR/dCas13荧光蛋白和修饰后的引导RNA,在没有其他基因工程操作的前提下,从合子基因组激活(zygotic genome activation, ZGA)到早期分节期(early segmentation period),对表达的mRNA进行单色和双色跟踪,揭示了转录和mRNP运动的特征,为多细胞生物内源性RNA的可视化提供了强大工具^[15]。

CRISPR/Cas13系统已被用于沉默酵母、植物和哺乳动物细胞系中的RNA,比起RNAi,该系统有更广泛的适用性和更高的沉默效率^[39-41]。研究证实,CRISPR-RfxCas13d(CasRx)是一个有效且精确的RNA沉默系统,该系统可以有效靶向斑马鱼合子表达和母体提供的转录本,使转录本水平平均下降76%^[16]。

2.4 CRISPR/Cas系统多重靶向斑马鱼基因组

有些性状是由多个基因共同控制的,单位点编辑可能无法改变性状。而单基因控制的性状由于受RNA剪接、RNA无意义的衰减、mRNA失调等因素影响^[42-45],编辑效果并不理想。CRISPR/Cas系统的一个优势就是可操作性灵活,它可以同时对多个基因位点进行高效编辑。

利用Cas蛋白和sgRNA的多样性,可实现斑马鱼的多重靶向基因编辑。研究表明,化脓性链球菌、金黄色链球菌、毛螺科细菌的CRISPR/Cas系统在斑马鱼体内能够同时运行,且编辑效果可叠加^[46]。另外,同时递送一种Cas蛋白和多条sgRNA到斑马鱼胚胎中,也可以达到多位点共同编辑的目的^[47]。在此基础上,使用来自斑马鱼的内源性tRNA基因,可以构建tRNA-多重sgRNA载体。利用tRNA的转录本内源性加工,单个载体的转录本即可在斑马鱼胚胎中加工出多个sgRNA,既能为多重sgRNA的内源性加工工具提供更多

选择,又能降低多重靶向系统对斑马鱼的毒性^[48]。除此之外,向斑马鱼胚胎同时注射4种靶向单个基因的CRISPR/Cas9核糖核蛋白复合物(Cas9 RNP),也能够显著提高对功能基因的破坏效率^[49]。

CRISPR/Cas系统的多重靶向功能增加了靶位点数量,不仅可以同时完成多基因编辑,还可以实现长片段和多片段的突变,对研究相关的基因或者同一通路的基因功能有重要意义。

2.5 CRISPR/Cas系统应用于建立斑马鱼疾病模型

斑马鱼与人类具有很高的遗传相似性,是人类疾病基因研究的理想模型。特别是其胚胎透明等特点,使得斑马鱼在建立疾病模型上具有不可替代的优势,在探索器官发育、神经调控、谱系追踪等方面作出了较大贡献^[50-51]。

除了胚胎透明特性外,斑马鱼还能够心血管系统失去功能的情况下通过氧扩散生存,允许在发育后期研究致命的心脏缺陷,以此阐明心脏疾病相关机制。在斑马鱼的心脏发育研究中,通过CRISPR敲除斑马鱼的WAVE2复合物蛋白基因*brk1*、*nckap1*和*wasf2*以及小GTPase信号中的*cul3a*和*racgap1*调控因子,建立了斑马鱼先天性心脏病模型,发现WAVE2复合物蛋白的缺失会引发冠心病等先天性心脏病,证明其对心脏正常发育具有重要作用^[52]。另一项研究表明,斑马鱼缺乏与人类左心发育不全综合征(hypoplastic left heart syndrome, HLHS)相关的RNA结合蛋白RBFOX2,会显示出与HLHS患者一致的心血管缺陷重叠,且继发于泵功能受损,该研究利用斑马鱼进一步阐明了人类HLHS的发病机制^[53]。

迄今为止,人类神经疾病方面的研究进展缓慢,斑马鱼因其遗传可驯化性、强大的行为特征和易于高通量药物筛选而成为研究神经疾病有价值的模型。在斑马鱼中利用CRISPR/Cas系统进行神经疾病相关基因的敲除或敲低,可以揭示一系列神经疾病的发病机制。例如,在斑马鱼中使用CRISPR/Cas9来靶向CHD7内多个位置,构建了CHARGE综合征相关的听觉和视觉行为缺陷模型,发现CHD7基因内突变位置的改变会影响CHARGE综合征相关表型的外显率^[54]。利用CRISPR/Cas9基因编辑技术,构建编码PRC1复合物成分Ring1b的*mf2*基因突变体系,发现其编

码成年大脑中参与突触结构和功能的基因下调,神经嵴和神经前体细胞异常迁移和分化,说明大脑连接不足可能是 *setd5* 突变斑马鱼模型社会障碍的原因,这为人类自闭症的研究奠定了基础^[55]。另外,通过斑马鱼模型的筛选等方法,发现了除草剂利奴隆会激活 IRE1a-XBP1 信号从而促进中枢神经系统炎症,并可能促进多发性硬化,证实环境会影响星形胶质细胞的致病活动^[56]。

多细胞生物是由单个细胞通过不同的谱系发展而来的。在此期间,有限的胚胎细胞产生人体内的所有细胞。确定这些胚胎细胞在成人组织中的发育命运,需要在单细胞水平同时获取发育途径和细胞身份信息,这一直是谱系追踪的主要挑战。CRISPR/Cas9 靶位点受到 PAM 序列 NGG 的限制,而由于 GG 或 CC 二核苷酸平均每 8 个碱基对出现一次,因此偶然且紧凑的 CRISPR/Cas9 靶点阵列存在于大多数基因组,并能够提供足够多的信息进行谱系追踪^[57]。使用 CRISPR/Cas9 技术,在目标基因组位点诱导双链断裂,并在不同位置(疤痕)上引入突变,可以永久且可遗传地特异性标记斑马鱼胚胎中的细胞,并在多轮细胞分裂过程中,逐步引入和积累 DNA 突变,通过细胞间共享的突变模式来阐明谱系关系,以此将斑马鱼胚胎中的细胞与成体组织中的克隆细胞对应起来^[57-60]。

3 展望

CRISPR/Cas 系统作为基因组操作工具的出现,使斑马鱼的生物学研究发生了革命性变化。各种类型的核酸酶及其变体已被开发用于斑马鱼研究的多个方面,包括基因敲除或敲入、活细胞成像、转录调控、多重靶向、建立疾病模型等。

随着对多种斑马鱼疾病模型的研究,CRISPR/Cas 系统可能会被用于保护健康和预防疾病等领域,例如用来预防心血管疾病。然而 CRISPR/Cas 系统缺少直接靶向成体特定组织的能力,并且脱靶率也一直是需要改进的问题。因此,未来需要进一步提高其成体适用性,建立高精度靶向的 CRISPR/Cas 系统,拓展相关基础研究和临床诊疗手段。同时,由于 CRISPR/Cas 系统体积大且带有负电荷,Cas 蛋白和 sgRNA 的传递仍然具有挑战性。因此,开发出能够将 CRISPR/Cas 系统高效传

递到细胞内的载体,是未来实现该系统理想效果的重要方向。

未来 CRISPR/Cas 系统的研究和应用会进一步扩大,同时需与技术交叉,例如机器学习、活细胞成像和更快捷的 DNA 测序等。毫无疑问,CRISPR/Cas 系统将不断结合新的功能元件,成为基因组工程研究中一个持续扩展的工具箱。

参 考 文 献

- [1] KARI G, RODECK U, DICKER A P. Zebrafish: an emerging model system for human disease and drug discovery[J]. Clin. Pharmacol. Ther., 2007, 82(1): 70-80.
- [2] VAN DER O J, JORE M M, WESTRA E R, *et al.* CRISPR-based adaptive and heritable immunity in prokaryotes[J]. Trends Biochem. Sci., 2009, 34(8): 401-407.
- [3] HSU P D, SCOTT D A, WEINSTEIN J A, *et al.* DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases[J]. Nat. Biotechnol., 2013, 31(9): 827-832.
- [4] CONG L, RAN F A, COX D, *et al.* Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems[J]. Science, 2013, 339(6121): 819-823.
- [5] KETTLEBOROUGH R N, BUSCH-NENTWICH E M, HARVEY S A, *et al.* A systematic genome-wide analysis of zebrafish protein-coding gene function[J]. Nature, 2013, 496(7446): 494-497.
- [6] BARRANGOU R, FREMAUX C, DEVEAU H, *et al.* CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes[J]. Science, 2007, 315(5819): 1709-1712.
- [7] WRIGHT A V, NUÑEZ J K, DOUDNA J A. Biology and applications of CRISPR systems: harnessing nature's toolbox for genome engineering[J]. Cell, 2016, 164(1-2): 29-44.
- [8] MAKAROVA K S, WOLF Y I, IRANZO J, *et al.* Evolutionary classification of CRISPR-Cas systems: a burst of class 2 and derived variants[J]. Nat. Rev. Microbiol., 2020, 18(2): 67-83.
- [9] PETRI K, ZHANG W T, MA J Y, *et al.* CRISPR prime editing with ribonucleoprotein complexes in zebrafish and primary human cells[J]. Nat. Biotechnol., 2022, 40(2): 189-193.
- [10] CHAN S H, TANG Y, MIAO L Y, *et al.* Brd4 and P300 confer transcriptional competency during zygotic genome activation[J]. Dev. Cell, 2019, 49(6): 867-881.
- [11] LONG L J, GUO H, YAO D, *et al.* Regulation of transcriptionally active genes via the catalytically inactive Cas9 in *C. elegans* and *D. rerio*[J]. Cell Res., 2015, 25(5): 638-641.
- [12] HAN B Z, ZHANG Y G, ZHOU Y, *et al.* ErCas12a and T5exo-ErCas12a mediate simple and efficient genome editing in zebrafish[J/OL]. Biology, 2022, 11(3): 411[2022-03-08]. <https://doi.org/10.3390/biology11030411>.
- [13] XIN C C, YIN J H, YUAN S P, *et al.* Comprehensive assessment of miniature CRISPR-Cas12f nucleases for gene disruption[J/OL]. Nat. Commun., 2022, 13(1): 5623[2022-09-24]. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-33346-1>.
- [14] MORENO-MATEOS M A, FERNANDEZ J P, ROUET R, *et al.*

- CRISPR-Cpf1 mediates efficient homology-directed repair and temperature-controlled genome editing[J/OL]. *Nat. Commun.*, 2017, 8(1): 2024[2017-12-08]. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01836-2>.
- [15] HUANG Y K, GAO B Q, MENG Q, *et al.* CRISPR-dCas13-tracing reveals transcriptional memory and limited mRNA export in developing zebrafish embryos[J/OL]. *Genome Biol.*, 2023, 24(1): 15[2023-01-19]. <https://doi.org/10.1186/s13059-023-02848-6>.
- [16] KUSHAWAH G, HERNANDEZ-HUERTAS L, EZ A N, *et al.* CRISPR-Cas13d induces efficient mRNA knockdown in animal embryos[J]. *Dev. Cell*, 2020, 54(6): 805-817.
- [17] LIU D, WANG Z X, XIAO A, *et al.* Efficient gene targeting in zebrafish mediated by a zebrafish-codon-optimized Cas9 and evaluation of off-targeting effect[J]. *J. Genet. Genomics*, 2014, 41(1): 43-46.
- [18] MOJICA F J M, DÍEZ-VILLASEÑOR C, GARCÍA-MARTÍNEZ J, *et al.* Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system[J]. *Microbiology*, 2009, 155(3): 733-740.
- [19] SHAH S A, ERDMANN S, MOJICA F J M, *et al.* Protospacer recognition motifs: mixed identities and functional diversity[J]. *RNA Biol.*, 2013, 10(5): 891-899.
- [20] JINEK M, CHYLINSKI K, FONFARA I, *et al.* A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity[J]. *Science*, 2012, 337(6096): 816-821.
- [21] STERNBERG S H, REDDING S, JINEK M, *et al.* DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9[J]. *Nature*, 2014, 507(7490): 62-67.
- [22] JIANG W Y, BIKARD D, COX D, *et al.* RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems[J]. *Nat. Biotechnol.*, 2013, 31(3): 233-239.
- [23] KLEINSTIVER B P, PREW M S, TSAI S Q, *et al.* Engineered CRISPR-Cas9 nucleases with altered PAM specificities[J]. *Nature*, 2015, 523(7561): 481-485.
- [24] FENG Y, CHEN C, HAN Y X, *et al.* Expanding CRISPR/Cas9 genome editing capacity in zebrafish using SaCas9[J]. *G3-Genes Genom. Genet.*, 2016, 6(8): 2517-2521.
- [25] LIU Y X, LIANG F, DONG Z J, *et al.* Genome editing in zebrafish by ScCas9 recognizing NNG PAM[J/OL]. *Cells*, 2021, 10(8): 2099[2021-08-16]. <https://doi.org/10.3390/cells10082099>.
- [26] HOSHIJIMA K, JURYNEC M J, KLATT S D, *et al.* Highly efficient CRISPR-Cas9-based methods for generating deletion mutations and F0 embryos that lack gene function in zebrafish[J]. *Dev. Cell*, 2019, 51(5): 645-657.
- [27] FERNANDEZ J P, VEJNAR C E, GIRALDEZ A J, *et al.* Optimized CRISPR-Cpf1 system for genome editing in zebrafish[J]. *Methods*, 2018, 150:11-18.
- [28] ABLAIN J, DURAND E M, YANG S, *et al.* A CRISPR/Cas9 vector system for tissue-specific gene disruption in zebrafish[J]. *Dev. Cell*, 2015, 32(6): 756-764.
- [29] TERZIOGLU M, SARALAHTI A, PIIPPO H, *et al.* Improving CRISPR/Cas9 mutagenesis efficiency by delaying the early development of zebrafish embryos[J/OL]. *Sci. Rep.*, 2020, 10(1): 21023[2020-12-03]. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-77677-9>.
- [30] AUER T O, DUROURE K, CIAN A D, *et al.* Highly efficient CRISPR/Cas9-mediated knock-in in zebrafish by homology-independent DNA repair[J]. *Genome Res.*, 2014, 24(1): 142-153.
- [31] ZU Y, TONG X J, WANG Z X, *et al.* TALEN-mediated precise genome modification by homologous recombination in zebrafish[J]. *Nat. Methods*, 2013, 10(4): 329-331.
- [32] BAI H P, LIU L J, AN K, *et al.* CRISPR/Cas9-mediated precise genome modification by a long ssDNA template in zebrafish[J/OL]. *BMC Genomics*, 2020, 21(1): 67[2020-01-21]. <https://doi.org/10.1186/s12864-020-6493-4>.
- [33] ANZALONE A V, KOBLAN L W, LIU D R. Genome editing with CRISPR-Cas nucleases, base editors, transposases and prime editors[J]. *Nat. Biotechnol.*, 2020, 38(7): 824-844.
- [34] LEVIC D S, YAMAGUCHI N, WANG S Y, *et al.* Knock-in tagging in zebrafish facilitated by insertion into non-coding regions[J/OL]. *Development*, 2021, 148(19): dev199994[2021-07-08]. <https://doi.org/10.1242/dev.199994>.
- [35] SIELIWONCZYK E, VANDENDRIESSCHE B, CLAES C, *et al.* Improved selection of zebrafish CRISPR editing by early next-generation sequencing based genotyping[J/OL]. *Sci. Rep.*, 2023, 13(1): 1491[2023-01-27]. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-27503-9>.
- [36] GUO D G, WANG D B, LIU C, *et al.* CRISPR-based genomic loci labeling revealed ordered spatial organization of chromatin in living diploid human cells[J/OL]. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.*, 2019, 1866(12): 118518[2019-07-31]. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2019.07.013>.
- [37] BIKARD D, JIANG W Y, SAMAI P, *et al.* Programmable repression and activation of bacterial gene expression using an engineered CRISPR-Cas system[J]. *Nucl. Acids Res.*, 2013, 41(15): 7429-7437.
- [38] ABUDAYYEH O O, GOOTENBERG J S, KONERMANN S, *et al.* C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector[J/OL]. *Science*, 2016, 353(6299): aaf5573[2016-08-05]. <https://doi.org/10.1126/science.aaf5573>.
- [39] KONERMANN S, LOTFY P, BRIDEAU N J, *et al.* Transcriptome engineering with RNA-targeting type VI-D CRISPR effectors[J]. *Cell*, 2018, 173(3): 665-676.
- [40] JING X, XIE B R, CHEN L X, *et al.* Implementation of the CRISPR-Cas13a system in fission yeast and its repurposing for precise RNA editing[J/OL]. *Nucl. Acids Res.*, 2018, 46(15): e90[2018-05-31]. <https://doi.org/10.1093/nar/gky433>.
- [41] AMAN R, ALI Z, BUTT H, *et al.* RNA virus interference via CRISPR/Cas13a system in plants[J/OL]. *Genome Biol.*, 2018, 19(1): 1[2018-01-04]. <https://doi.org/10.1186/s13059-017-1381-1>.
- [42] ANDERSON J L, MULLIGAN T S, SHEN M C, *et al.* mRNA processing in mutant zebrafish lines generated by chemical and CRISPR-mediated mutagenesis produces unexpected transcripts that escape nonsense-mediated decay[J/OL]. *PLoS Genet.*, 2017, 13(11): e1007105[2017-11-21]. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007105>.
- [43] MOU H W, SMITH J L, PENG L T, *et al.* CRISPR/Cas9-mediated genome editing induces exon skipping by alternative splicing or exon deletion[J/OL]. *Genome Biol.*, 2017, 18(1):

- 108[2017-06-14]. <https://doi.org/10.1186/s13059-017-1237-8>.
- [44] EL-BROLOSY M A, KONTARAKIS Z, ROSSI A, *et al.* Genetic compensation triggered by mutant mRNA degradation[J]. *Nature*, 2019, 568(7751): 193-197.
- [45] MA Z P, ZHU P P, SHI H, *et al.* PTC-bearing mRNA elicits a genetic compensation response via Upf3a and COMPASS components[J]. *Nature*, 2019, 568(7751): 259-263.
- [46] TAKASUGI P R, WANG S Z, TRUONG K T, *et al.* Orthogonal CRISPR-Cas tools for genome editing, inhibition, and CRISPR recording in zebrafish embryos[J/OL]. *Genetics*, 2022, 220(1): iyab196[2022-01-04]. <https://doi.org/10.1093/genetics/iyab196>.
- [47] KIM B H, ZHANG G J. Generating stable knockout zebrafish lines by deleting large chromosomal fragments using multiple gRNAs[J]. *G3-Genes Genom. Genet.*, 2020, 10(3): 1029-1037.
- [48] SHIRAKI T, KAWAKAMI K. A tRNA-based multiplex sgRNA expression system in zebrafish and its application to generation of transgenic albino fish[J/OL]. *Sci. Rep.*, 2018, 8(1): 13366 [2018-09-06]. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-31476-5>.
- [49] WU R S, LAM I I, CLAY H, *et al.* A rapid method for directed gene knockout for screening in G0 zebrafish[J]. *Dev. Cell*, 2018, 46(1): 112-125.
- [50] KAWAHARA G, KARP J A, MYERS J A, *et al.* Drug screening in a zebrafish model of Duchenne muscular dystrophy[J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2011, 108(13): 5331-5336.
- [51] WEBER T, KÖSTER R. Genetic tools for multicolor imaging in zebrafish larvae[J]. *Methods*, 2013, 62(3): 279-291.
- [52] EDWARDS J J, ROUILLARD A D, FERNANDEZ N F, *et al.* Systems analysis implicates WAVE2 complex in the pathogenesis of developmental left-sided obstructive heart defects[J]. *JACC-Basic Transl. Sci.*, 2020, 5(4): 376-386.
- [53] HUANG M M, AKERBERG A A, ZHANG X R, *et al.* Intrinsic myocardial defects underlie an Rbfox-deficient zebrafish model of hypoplastic left heart syndrome[J/OL]. *Nat. Commun.*, 2022, 13(1): 5877[2022-10-05]. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-32982-x>.
- [54] HODOROVICH D R, LINDSLEY P M, BERRY A A, *et al.* Morphological and sensorimotor phenotypes in a zebrafish CHARGE syndrome model are domain-dependent[J/OL]. *Genes Brain Behav.*, 2023: e12839[2023-03-14]. <https://doi.org/10.1111/gbb.12839>.
- [55] GABELLINI C, PUCCI C, DE CESARI C, *et al.* CRISPR/Cas9-induced inactivation of the Autism-risk gene *setd5* leads to social impairments in zebrafish[J/OL]. *Int. J. Mol. Sci.*, 2023, 24(1): 167[2022-12-22]. <https://doi.org/10.3390/ijms24010167>.
- [56] WHEELER M A, JARONEN M, COVACU R, *et al.* Environmental control of astrocyte pathogenic activities in CNS inflammation[J]. *Cell*, 2019, 176(3): 581-596.
- [57] DOUDNA J A, CHARPENTIER E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9[J/OL]. *Science*, 2014, 346(6213): 1258096[2014-11-28]. <https://doi.org/10.1126/science.1258096>.
- [58] COTTERELL J, VILA-CEJUDO M, BATLLE-MORERA L, *et al.* Endogenous CRISPR/Cas9 arrays for scalable whole-organism lineage tracing[J/OL]. *Development*, 2020, 147(9): dev184481 [2023-03-14]. <https://doi.org/10.1242/dev.184481>.
- [59] MCKENNA A, FINDLAY G M, GAGNON J A, *et al.* Whole-organism lineage tracing by combinatorial and cumulative genome editing[J/OL]. *Science*, 2016, 353(6298): aaf7907[2016-07-29]. <https://doi.org/10.1126/science.aaf7907>.
- [60] ALEMANY A, FLORESCU M, BARON C S, *et al.* Whole-organism clone tracing using single-cell sequencing[J]. *Nature*, 2018, 556(7699): 108-112.