蝴蝶和甲虫 CRISPR/Cas9 基因编辑技术

CRISPR/Cas9 Gene Editing Technology in Butterflies and Beetles

刘贵春, 何金武, 董志巍, 赵若苹, 王文, 李学燕*

遗传资源与进化国家重点实验室, 中国科学院昆明动物研究所, 昆明 650223

*通讯作者邮箱: lixu@mail.kiz.ac.cn

引用格式: 刘贵春, 何金武, 董志巍, 赵若苹, 王文, 李学燕. (2021). 蝴蝶和甲虫 CRISPR/Cas9 基因编辑技术. *Bio-101* e1010644. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010644.

How to cite: Liu, G. C., He, J. W., Dong, Z. W., Zhao, R. P., Wang, W and Li, X. Y. (2020). CRISPR/Cas9 gene editing technology in butterflies and beetles. *Bio-101* e1010644. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010644. (in Chinese)

摘要: CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) 是一类规律成簇间隔短回文重复序列, 广泛存在于原核生物基因组中, 是细菌和古细菌进化出来用以抵御病毒和质粒入侵的获得性免疫防御机制; Cas9 (CRISPR-associated nuclease) 是 CRISPR 相关核酸酶。CRISPR/Cas9 是由 RNA 指导, 利用 Cas 核酸酶对靶向基因进行编辑的技术。本研究利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术对蝴蝶 (*white*) 和萤火虫 (*Abd-B*) 的两个基因进行功能验证, 为鳞翅目及鞘翅目昆虫提供基因编辑方法体系。本实验的流程为: 选取靶基因进行 sgRNA 靶位点的设计、合成 sgRNA、sgRNA 体外转录成 mRNA、mRNA 与 Cas9 蛋白混合进行显微注射、注射后昆虫的饲养与表型观察及检测。

关键词: CRISPR/Cas9, 蝴蝶, 萤火虫

实验原理: CRISPR/Cas9 基因编辑技术的工作原理是 crRNA (CRISPR-derived RNA) 通过碱基配对与 tracrRNA (trans-activating RNA) 结合形成双链 RNA, 然后 tracrRNA/crRNA 复合体指导 Cas9 蛋白切断与 crRNA 配对的序列靶位点的双链 DNA, 从而实现对靶标基因的编辑功能 (Hsu *et al.*, 2013; Hwang *et al.*, 2013)。通过人工设计这两种 RNA, 融合形成一条具有引导作用的 sgRNA (small guide RNA), 同样可以引导

Cas9靶向剪切 (Bassett *et al.*, 2014)。CRISPR/Cas9系统的高效基因编辑功能已被应用于多种生物如:果蝇(*Drosophila melanogaster*)、家蚕(*Bombyx mori*)、蝴蝶(*Papilio xuthus*, *Papilio machaon*, *Kallima inachus*, *Bicyclus anynana*, *Junonia coenia*)、棉铃虫(*Helicoverpa armigera*)、赤拟谷盗(*Tribolium castaneum*)、萤火虫(*Abscondita terminalis*)、飞蝗(*Locusta migratoria*)、斑马鱼(*Danio rerio*)及各种动物植物中(Wang *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2015 and 2017; Chen *et al.*, 2016; Yang *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2020; Liu *et al.*, 2021)。

实验目的

利用 CRISPR/Cas9 系统对靶基因 (蝴蝶: *white*; 萤火虫: *Abd-B*) 进行编辑, 观察基因编辑后的表型变化, 验证靶基因的功能。

材料与试剂

1. 滤芯枪头 (Axygen)
2. 玻璃片 (帆船牌, 中国)
3. 毛细管 1000 × 1.0 × 0.6 mm (BJ-40 细玻管, 正天易科贸公司, 北京)
4. 胶水 (KRAZY, 美国)
5. 蝴蝶 (柑橘凤蝶, *Papilio xuthus*) 成虫
6. 萤火虫 (边褐端黑萤, *Abscondita terminalis*) 成虫
7. Q5 high-quality DNA polymerase (M0491, NEB)
8. QIAquick PCR Purification kit (28104, Qiagen, Germany)
9. MAXIscript T7 Kit (AM1334, Life technology, USA)
10. Cas9 Protein (CP01, PNA Bio Inc, USA)
11. TransDirect Animal Tissue PCR Kit (AD201, TransGen, China)
12. Trelief™ Animal Genomic DNA Kit (TSP201, TsingKe, China)

仪器设备

1. 0 号软画笔、摆卵模具 (7 × 12)
2. PCR 仪 (ProFlex PCR System, Life SimpliAmp, USA)
3. 冷冻离心机 (5810 R, Eppendorf, Germany)

- 37 °C 培养箱 (ZQZY-75BN, Shanghai Zhichu instrument Co, China)
- 干热仪 (BG-thermoRT, Baygene Biotech Co, China)
- NanoDROP (NANODROP 2000C, Thermofisher, USA)
- 拉针仪 (Sutter Instrument Co, MODEL P-2000, USA)
- 显微注射仪 (TransferMan NK2 and FemtoJet system, Eppendorf, Germany)
- 体式显微镜 (SMZ800, Nikon, Japan)

实验步骤

一、sgRNA 靶点预测和体外转录

1. sgRNA 靶点的预测

sgRNA 特异性识别原间隔序列临近基序 (protospacer adjacent motif, PAM) (5'-NGG)。首先, 在目的基因的基因编码区及其上下游 300 bp 搜索 5'-NNN₁₈NGG-3' 模式。然后, 在全基因组范围内利用种子区 (seed region) 进行脱靶检测。种子区是紧接着 NGG 结构的 12-15 bp 的序列, 原则上种子区在全基因组上出现的次数越少, 目的基因编辑脱靶的可能性就越低。最后, 选取 2-3 个位于 exon 上的靶点进行后续实验 (表 1)。sgRNA 的结构序列由 T7 启动子介导转录, 连接 NNN₁₈ 靶点序列 (sgRNA-F) 和 sgRNA 通用序列 (sgRNA-R)。sgRNA 的通用序列为:

CRISPR-F: GAAATTAATACGACTCACTATANNN₁₈GTTTTAGAGCTAGAAATAGC; (NNN₁₈为设计的靶基因的 20 个靶位点序列)

CRISPR-R: AAAAGCACCGACTCGGTGCCACTTTTTCAAGTTGATAACGGACTAGCCTTATTTAACTTGCTATTTCTAGCTCTAAAC。sgRNA 的 DNA 模板直接通过两段长引物 PCR 合成。

表 1. 柑橘凤蝶 *white* 基因和边褐端黑萤 *Abd-B* 基因靶位点序列。

Species	Gene	Target Name	Strand	Target sequence (NNN ₁₈ NGG)	Location
<i>Papilio xuthus</i>	<i>white</i>	Px_03417_w_8165	-	GACCTTCTCTGTGCCGCCAATGG	exon2
		Px_03417_w_8232	+	GGTCTAGAGACAGAAGATTCTGG	exon2
		Px_03417_w_8700	-	GAGTAGCAGGCTGGCCGTTTCAGG	exon3
<i>Abscondita terminalis</i>	<i>Abd-B</i>	LT07795_T22120	-	GGTGACATGAAGATACAGCGGGG	exon2
		LT07795_T22341	+	GGACCCGAACCGGTTCTACCGG	exon2
		LT07795_T22355	-	GGTGGTGGGTAAGGGCCTGTAGG	exon2

注：T7 的转录起始位点是 G，所以选择靶位点时尽量选择 GG、GA、AG 开始以 GG 结尾。

2. sgRNA 靶点的体外转录

1) sgRNA 模板的制备

合成的 (sgRNA-F) 和 sgRNA 通用序列 (sgRNA-R) 在以下 PCR 条件下合成 DNA 模板，100 μ l 的反应体系如下：

ddH ₂ O	67 μ l
5x Q5 buffer (NEB)	20 μ l
10 mM dNTPs (NEB)	2 μ l
Q5 High-Fidelity DNA Polymerase (NEB)	1 μ l
sgRNA-F Primer (10 μ M)	5 μ l
sgRNA-R Primer (10 μ M)	5 μ l
Total	100 μ l

反应条件为：98 $^{\circ}$ C，30 s；(98 $^{\circ}$ C，10 s；60 $^{\circ}$ C，30 s；72 $^{\circ}$ C；15 s) 35 个循环；72 $^{\circ}$ C，10 min；12 $^{\circ}$ C 保存。

2) PCR 产物用 QIAquick PCR Purification kit 纯化

- 100 μ l PCR 产物转移到 1.5 ml Nuclease-Free 离心管中。
- 加入 500 μ l PB Buffer (结合液)，混匀。
- 把混合的样品加入柱子中，常温 12,000 rpm，离心 2 min，移去废液，柱子放回离心管中。
- 加入 PE Buffer (漂洗液)，常温 12,000 rpm，离心 2 min，移去废液，柱子放回离心管中。
- 常温 12,000 rpm，离心 2 min，把柱子移入新的 1.5 ml Nuclease-Free 离心管中，晾干 2 min。
- 加入 30 μ l Nuclease-Free water。
- 常温 12,000 rpm，离心 2 min，使用 NanoDrop 测量浓度。
- 得到的 sgRNA 模板置入 -20 $^{\circ}$ C 保存待用。

3) 体外转录

根据 MAXIscript T7 Kit (Life technology, USA) 体外转录试剂盒，合成 mRNA，反应步骤如下：

- a) 试剂的解冻：RNA Polymerase和Ribonucleotide solutions放在冰上溶解；10× Transcription Buffer放常温溶解。
- b) 在常温添加反应体系，加样顺序按如下添加：

Nuclease-Free water	xx
sgRNA 模板	300 ng
10x Transcription Buffer	2 µl
10 mM ATP	1 µl
10 mM CTP	1 µl
10 mM GTP	1 µl
10 mM UTP	1 µl
Enzyme mix	2 µl
Total	20 µl

注：不要改变加样顺序，以免10× Transcription Buffer与DNA模板发生沉淀反应，减少反应产物。

- c) 加样后，轻柔混合样品，使其混合均匀，并将液体离心到管底。
- d) PCR仪器盖子温度调到50 °C，37 °C恒温反应5 h。
- e) 之后向反应中加入1 µl的TURBO DNase混合均匀，继续37 °C反应15 min，以去除DNA模板。
- f) 反应完成后，取出样品加入30 µl Nuclease-Free water，5 µl 5 M Ammonium Acetate 震荡混匀，加入165 µl (3倍体积) 无水乙醇，-20 °C沉淀2 h或者过夜。
- g) 4 °C，12,000 rpm离心15 min，移去上清。
- h) 加入1 ml Nuclease-Free water 配置的70%的乙醇，4 °C，12,000 rpm离心5 min，重复一次。
- i) 加10 µl Nuclease-Free water溶解，并用NanoDrop测定浓度。
- j) 置于-80 °C保存备用。

二、显微注射及表型观察 (以柑橘凤蝶为例) (Li *et al.*, 2015 and 2017; Yang *et al.*, 2020; Liu *et al.*, 2021)

1. 消毒

准备注射前，需对所有用到的仪器进行紫外或者 75%酒精消毒：75%的酒精浸泡载玻片 1 h，毛细管 200 °C 干热灭菌 2 h，整个显微注射室紫外消毒 2 h。

2. 拉针及磨针

拉针：拉针仪熔断毛细管 (熔断参数为：Heat: 400、Fil: 5、Vel: 50、Del: 150、Pull: 100)，即可得到细长的可装载试剂的毛细管针。磨针：注射的钨针需要打磨到圆锥形，没有棱角，以便给蝴蝶卵壳打孔，不引起额外机械损伤。

3. 卵的采集及固定

产卵：柑橘凤蝶成虫会把卵产在寄主植物胡椒木 (*Zanthoxylum piperitum*) 的叶子上。在准备注射前，换一盆叶子鲜嫩而少的胡椒木，间隔 20 min 拿出，同时换一盆新的植物进去待下一批产卵。卵的收集：轻取卵统一收集到一个含有少许无菌水的 90 mm 培养皿中，用无菌水清洗两遍去除杂质。摆卵：在体式显微镜下，按模板 7 × 12 的间距，用 0 号毛笔把卵有序排在载玻片上 (粘在叶子的面在下)，之后放入超净工作台晾干水分。固定卵：用玻璃针蘸取少量胶水，置于晾干后卵的一侧，使其固定在载玻片上，之后把玻片置于注射室晾干，即可进行注射。

图 1. 蝴蝶基因编辑操作流程

4. 双针注射

使用 TransferManNK2 和 FemtoJet 双针显微注射系统 (Eppendorf, Germany) 进行双针注射。先用钨针扎出小孔，然后将玻璃针切换到钨针的位置，插入卵中注射 (图 1, 视频 1)。注射的位置在粘胶的另一侧，以最终浓度 1,000 ng/μl Cas9 蛋白和 800–1,000 ng/μl sgRNA 进行微量注射，每个基因注射大约 200 个卵。一板 (7 × 12 个) 需要大约 10 min，最后记录每板注射的卵数量，从产卵到注射完成尽量在 2 h，因为蝴蝶卵的发育在 2 h 左右形成合胞体，超过 2 h 注射，敲除率将会降低或者不能敲除。

视频 1 柑橘凤蝶显微注射演示视频

5. 饲养及表型观察

注射的卵放置在 25 °C、12 h 光照/12 h 黑暗、80%相对湿度的培养箱中，每天观察卵的发育情况，当卵变黑时，往培养皿中放置一片寄主植物胡椒木叶子 (从植物采摘，以湿棉球裹住叶柄切口保湿)，供一龄幼虫初孵出时食用。每天早和晚各检查幼虫孵化情况，记录每天的孵化率，及时将叶子连同初孵幼虫转移到新鲜胡椒木叶片上，并在 27 °C，16 h 光照/25 °C，黑暗 8 h 的培养箱中饲养，并保持 80% 的相对湿度。仔细观察幼虫形态变化。在化蛹之前，将排泄废物的五龄末期游走的幼虫转移到塑料筐中，等待其化蛹及观察表型变化。羽化的成虫，观察表型变化，对有表型的个体进行手工交配，然后将交配的成虫放在带有寄主植物的蚊帐中进行产卵，及观察行为是否有异常 (图 2)。

6. 表型检测

胚胎敲除率检测：选取注射了 4 天已经发育的 20 颗卵直接进行 PCR 克隆检测，检测敲除率，对敲除率高的基因，继续饲养幼虫观察表型，而对敲除率低的基因重新调整注射比例或者重新设计靶点进行注射。表型检测：对获得的具有疑似表型的个体进行 DNA 提取、PCR 扩增、TA 克隆、Sanger 测序分析 (图 3)，RNA 提取、转录组测序分析。

图 2. 柑橘凤蝶 *white* 基因突变体表型。(a) 四龄幼虫；(b) 五龄幼虫；(c) 五龄幼虫精巢；(d) 成虫眼睛。

图 3. *white* 基因突变体检测。蓝色字体为靶点序列 (下划线为 PAM)，红色为插入和缺

失序列。

三、显微注射及表型观察 (以边褐端黑萤为例) (Zhang *et al.*, 2020)

1. 消毒

准备注射前，需对所有用到的仪器进行紫外或者 75%酒精消毒：75%的酒精浸泡载玻片 1 h，毛细管 200 °C 干热灭菌 2 h，注射室紫外消毒 2 h。

2. 拉针

拉针仪熔断毛细管 (熔断参数：Heat:300、Fil:5、Vel:50、Del:150、Pull: 100)，即可得到细长的可装载试剂的毛细管针。

3. 卵的采集及固定

产卵：饲养或者采集的萤火虫成虫，区分雌雄，在饲养盒中放置新鲜的苔藓，之后按性别 1:1 的比例将萤火虫置于饲养盒中，饲养盒放置于黑暗避光处，等待其交配产卵。卵的采集：取出苔藓，在含无菌水的培养皿中轻轻晃动，使卵掉入培养皿中，去除多余苔藓残渣，卵用无菌水清洗两遍。摆卵：用剪去细头的 1 ml 枪头吸取卵有序的排放在载玻片上，用吸水纸吸干水分，等待注射 (图 4)。

图 4. 萤火虫显微注射流程图

4. 单针注射

使用 TransferManNK2 和 FemtoJet 显微注射系统进行单针注射 (图 4)。以最终浓度 1,000 ng/μl Cas9 蛋白和 800–1,000 ng/μl sgRNA 进行微量注射，每个基因注射大约 200 个卵，从产卵到注射完成尽量固定在 5 h 内，因为萤火虫卵的发育在 5 h 左右形成合胞体，超过 5 h 注射，敲除率将会降低或者不能敲除。

5. 饲养及表型观察

注射的卵置于放有湿水纸的保鲜盒中，最后置于 27 °C，12 h 光照/12 h 黑暗，80%相对湿度的培养箱中饲养，每天观察卵的发育情况，当一龄幼虫孵化时，每天早和晚各检查幼虫孵化情况，记录每天的孵化率，及时将幼虫转移到新的饲养盒中。

在饲养盒中放置剪碎的螺蛳肉块，方便幼虫取食，后将饲养盒放在 16 h 光照 (27 °C)/黑暗 8 h (25 °C) 的培养箱中饲养，并保持 80% 的相对湿度。化蛹之前，将未龄游荡、不进食的幼虫转移到含有糊状的泥土的塑料盒中，等待其化蛹及观察表型变化。羽化的成虫，观察表型变化，及观察行为是否有异常 (图 5)。

6. 表型检测

胚胎敲除率检测：选取注射了 14 天已经发育的 20 颗卵进行直接 PCR 克隆检测，检测敲除率，对敲除率高的基因，继续饲养幼虫观察表型，而对敲除率低的基因重新调整注射比例或者重新设计靶点进行注射。表型检测：对获得的具有疑似表型的个体进行 DNA 提取、PCR 扩增、TA 克隆、Sanger 测序分析 (图 6)，RNA 提取、转录组测序分析。

图 5. 边褐端黑萤 *Abd-B* 基因突变体表型。(a) 野生型背面；(b) 野生型腹面；(c-j) 突变体。数字 1-10 代表第 1 到第 10 腹节，红色字体标注有突变的腹节，标尺：1 毫米。

图 6. *Abd-B* 基因突变体检测。蓝色字体为靶位点区域，红色为插入和缺失序列。

四、注意事项

1. 候选基因靶位点的选取：每个基因尽量选取前几个外显子上的靶位点或者选择基因保守区域的靶位点，两个靶位点之间的间隔在 100–200 bp 之间，以便形成大片段的敲除。
2. 体外转录：一个反应的体外转录产物大概约为 6–20 μg ，为了获得高浓度的产物可以进行两个体外转录反应，最后将反应后的产物合并沉淀，已达到获取高浓度和多产物的目的。
3. 注射时期：每种昆虫卵发育的速度不一致，如柑橘凤蝶发育到合胞体大约需要 2 h，萤火虫大约需要 5 h，尽量在发育的早期完成注射实验，以提高实验的成功率。
4. 注射浓度：靶基因的注射可以进行浓度梯度注射预实验，先进行高浓度注射，确定是否对靶基因有敲除，并逐步降低注射产物的浓度以达到敲出率和孵化率的平衡。此外，Cas9 蛋白和 sgRNA 的比例最好控制在 1.2 : 1 左右。
5. 表型观察：对注射饲养的昆虫，与野生型昆虫仔细比对观察表型变化，尽可能每个龄期都进行观察，以免错过突变体表型特征。

6. 注射系统的选择：选择单针还是双针注射系统依据每个物种卵壳的硬度来决定。卵壳比较薄的物种 (如鞘翅目的边褐端黑萤、膜翅目的法老蚁、双翅目的果蝇) 可以用单针系统进行注射，既直接用装载试剂的玻璃针进行注射；而大部分鳞翅目昆虫其卵壳比较硬 (如柑橘凤蝶、金凤蝶、家蚕) 需用双针注射系统进行注射，既先用钨针打出小孔，最后用装载试剂的玻璃针注射。

致谢

感谢国家自然科学基金委员会创新研究群体项目 (31621062)、国家自然科学基金委员会面上项目 (31472035、32070482)、云南省科学技术厅面上项目(2014FB179)、中国科学院西部之光项目 (A 类) 对中国科学院昆明动物研究所遗传资源与进化国家重点实验室的支持。

参考文献

1. Bassett, A. R., Tibbit, C., Ponting, C. P. and Liu, J. L. (2014). [Highly efficient targeted mutagenesis of *Drosophila* with the CRISPR/Cas9 system](#). *Cell Rep* 6(6): 1178-1179.
2. Chen, L., Wang, G., Zhu, Y. N., Xiang, H. and Wang, W. (2016). [Advances and perspectives in the application of CRISPR/Cas9 in insects](#). *Zool Res* 37(4): 220-228.
3. Hsu, P. D., Scott, D. A., Weinstein, J. A., Ran, F. A., Konermann, S., Agarwala, V., Li, Y., Fine, E. J., Wu, X., Shalem, O., Cradick, T. J., Marraffini, L. A., Bao, G. and Zhang, F. (2013). [DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases](#). *Nat biotechnol* 31(9): 827-832.
4. Hwang, W. Y., Fu, Y. F., Reyon, D., Maeder, M. L., Tsai, S. Q., Sander, J. D., Peterson, R. T., Yeh, J. R. and Joung, J. K. (2013). [Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system](#). *Nat biotechnol* 31(3): 227-229.
5. Li, X. Y., Fan, D. D., Zhang, W., Liu, G. C., Zhang, L., Zhao, L., Fang, X. D., Chen, L., Dong, Y., Chen, Y., Ding, Y., Zhao, R., Feng, M., Zhu, Y., Feng, Y., Jiang, X., Zhu, D., Xiang, H., Feng, X., Li, S., Wang, J., Zhang, G., Kronfors, M. R. and Wang, W. (2015). [Outbred genome sequencing and CRISPR/Cas9 gene editing in butterflies](#). *Nat Commun* 6: 8212.
6. Li, X. Y., Liu, G. C., Sheng, W. J., Dong, Z. W., Chen, L., Zhao, R. P. and Wang,

- W.: (2017). [Genome editing in the butterfly type-species *Papilio machaon*](#). *Insect Sci* 24(4): 708-711.
7. Liu, G. C., Liu, W., Zhao, R. P., He, J. W., Dong, Z. W., Chen, L., Wan, W. T., Chang, Z., Wang, W. and Li, X. Y. (2021). [Genome-wide identification and gene-editing of pigment transporter genes in the swallowtail butterfly *Papilio xuthus*](#). *BMC genomics* 22(1): 120.
8. Wang, Y. Q., Li, Z. Q., Xu, J., Zeng, B. S., Ling, L., You, L., Chen, Y. Z., Huang, Y. P. and Tan, A. J. (2013). [The CRISPR/Cas system mediates efficient genome engineering in *Bombyx mori*](#). *Cell Res* 23(12): 1414-1416.
9. Yang, J., Wan, W. T., Xie M., Mao, J. L., Dong, Z. W., Lu, S. H., He, J. W., Xie, F. A., Liu, G. C., Dai, X. L., Chang, Z., Zhao, R. P., Zhang, R., Wang, S. T., Zhang, Y. M., Zhang, W., Wang, W., Li, X. Y. (2020). [Chromosome level reference genome assembly and gene editing of dead leaf butterfly *Kallima inachus*](#). *Mol Ecol Resour.* 20(4): 1080-1092.
10. Zhang, R., He, J. W., Dong, Z. W., Liu, G. C., Yin, Y., Zhang, X. Y., Li, Q., Ren, Y. D., Yang, Y., Liu, W., Chen, X., Xia, W., Duan, K., Hao, F., Lin, Z., Yang, J., Chang, Z., Zhao, R., Wan, W., Lu, S., Peng, Y., Ge, S., Wang, W. and Li, X. (2020). [Genomic and experimental data provide new insights into luciferin biosynthesis and bioluminescence evolution in fireflies](#). *Sci Rep* 10(1): 15882.