

文章编号: 1674-5566(2019)01-0001-09

DOI:10.12024/jsou.20180502308

利用 CRISPR/Cas9 构建斑马鱼 *tbx20* 基因突变体及其功能分析

朱 哲^{1,2,3}, 胡沛男^{1,2,3}, 李伟明¹, 祖 尧^{1,2,3}

(1. 上海海洋大学 科技部海洋生物科学国际联合研究中心, 上海 201306; 2. 上海海洋大学 水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海 201306; 3. 上海海洋大学 水产科学国家级实验教学示范中心, 上海 201306)

摘 要: 转录因子 TBX20 在脊椎动物心脏的腔室发育和维护中起至关重要的作用。利用 CRISPR/Cas9 系统成功制备了斑马鱼 *tbx20* 突变鱼系, T7E1 检测结果显示 F₀ 敲除效率平均为 42.1%, 测序分析 F₁ 中突变种质遗传效率为 36.7%。F₂ 突变体中观察到心脏突变表型: 48 hpf, 心包腔肿大, 静脉窦瘀血, 环化异常, 心脏结构变形; 3 dpf, 心脏畸形拉伸成线状结构。原位杂交和 qRT-PCR 结果显示, 突变体中 *vmhc* 表达上调, *amhc* 和 *myl7* 表达下调。成功制备了斑马鱼 *tbx20* 突变体, 结果表明 *tbx20* 纯合突变体心脏畸形, 环化受到影响, 为深入探究 *tbx20* 在早期心脏腔室分化过程中的作用奠定了基础。

关键词: *tbx20*; 斑马鱼; 心脏发育; 腔室分化; CRISPR/Cas9

中图分类号: S 917 **文献标志码:** A

脊椎动物的胚胎发育中, 心脏是最早形成并且行使功能的器官之一。心脏祖细胞最早起源于侧板中胚层的两侧对称区域, 之后它们由两边向中间迁移, 汇聚形成心管。心管由心肌层和心内膜层构成, 随后经过复杂的形态发生, 包括不对称发育、环化、多腔室结构以及瓣膜的形成, 最终形成成熟的心脏^[1]。房室间隔 (atrioventricular canal, AVC) 的出现, 是保证腔室结构正常形成的关键^[2]。在心脏生长发育这一系列复杂进程中, 环化 (looping) 阶段最为重要的步骤之一。心脏环化的发育过程是由心管不同区域的复杂运动所共同完成, 而且这些不同的心管运动区域与心脏腔室分化后的区域有关联性, 例如: 不同心脏区域具有特异表达的分子标记以及细胞特征^[3]。

T-box 编码的转录因子在器官形成中具有重要作用^[4], TBX20 属于 T-box 转录因子家族的成员之一, 在果蝇到人类的早期心脏发育调控过程中具有高度的保守性^[5]。*Tbx20* 对整个心脏发育过程和维持成体心脏功能都发挥了重要的作用, 心脏发育过程中 *Tbx20* 持续表达, 小鼠胚胎 E7.5 中 *Tbx20* 在生心中胚层处表达, E8.0~8.5 在新

月形生心区和环化的心管处表达^[6]。小鼠中 *Tbx20* 促进腔室的分化、增殖^[7,9]和调控早期 AVC 的形成^[10]。

Tbx20 缺失的小鼠, 妊娠中期胚胎致死, 心脏发育畸形。突变表型为心脏发育异常, 最初的心室减小, 环化受到阻碍, 胚胎发育 E8.0~9.5, 流出道处突变表型更加明显, 至 E9.5 心管趋于线性^[8], 表明 *Tbx20* 在第一生心区 (first heart field, FHF) 的心脏腔室发育中起到重要作用^[11]。在斑马鱼中敲降 (morpholino, MO) *tbx20*, 胚胎发育 48 hpf, 仍维持心管结构且没有出现明显的腔室分化^[12]。而在斑马鱼 ENU 造成的 *tbx20* 突变体中, 其心脏大小在 48 hpf 明显小于野生型斑马鱼心脏, 且拉伸成线, 出现心脏水肿导致胚胎死亡^[11]。斑马鱼胚胎在发育至 48 hpf, 心脏的腔室结构基本分化形成, 心室和心房在结构上呈现出完全不同的形态^[13]。此时心室特异表达基因 ventricular myosin heavy chain (*vmhc*) 和心房特异表达基因 atrial myosin heavy chain (*amhc*) 的表达分布情况可作为心室心房表达的标志性基因, cardiac myosin light chain 2 (*cmlc2*) 在整个心脏的心肌细

收稿日期: 2018-05-08 修回日期: 2018-11-20

基金项目: 国家自然科学基金(31501166); 上海市教育委员会晨光计划项目(14CG49)

作者简介: 朱 哲(1992—), 女, 硕士研究生, 研究方向为遗传与发育生物学。E-mail: ml40110237@st.shou.edu.cn

通信作者: 祖 尧, E-mail: yzu@shou.edu.cn

胞中表达^[14]。因此, *vmhc*、*amhc* 和 *cmlc2* 可以作为检验 *tbx20* 是否影响心脏腔室分化的重要标志性基因。

本研究利用 CRISPR/Cas9 系统^[15], 通过显微注射技术获得斑马鱼 *tbx20* 突变鱼系, 内交后代可以产生 1/4 纯合突变体, 光镜观察突变体心脏形态变化, 结果显示突变体胚胎发育至 48 hpf, 心包腔肿大, 静脉窦瘀血, 环化异常, 心脏结构变形; 胚胎发育至 3 dpf, 心脏拉伸成线状结构。通过 *tbx20* 突变体的构建, 进一步发现 *tbx20* 的突变影响一些心脏早期腔室发育基因的表达, 为探究 *tbx20* 基因在早期心脏腔室分化和先天性心脏病致病机理过程中发挥的作用提供模型。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

zCas9 质粒来源于北京大学生命科学学院张博教授实验室。gRNA 质粒来源于北京大学分子医学研究所熊敬维教授实验室。感受态细菌 DH5 α 购买于 TIANGEN 公司。

1.2 斑马鱼的来源与养殖条件

本实验所用野生斑马鱼均为 AB 品系, 养殖水温为 28.5 $^{\circ}\text{C}$ 。对斑马鱼的所有处理均以科研为目的进行养殖和使用, 且按照上海海洋大学动物伦理相关规定进行 (IACUC 20171009)。

1.3 gRNA 靶点设计

利用 Ensembl (<http://asia.ensembl.org/index.html>) 网站获得斑马鱼 *tbx20* 基因序列, 然后在 Zifit (<http://zifit.partners.org/Zifit/>) 网站上输入序列查找 *tbx20* 基因 gRNA 位点, 并根据靶点设计上下游引物。靶点序列及上下游引物如表 1 所示。

表 1 斑马鱼 *tbx20* 敲除靶点及引物
Tab.1 Target site and primers of *tbx20*

<i>tbx20</i> 靶点 (5'-3')	引物
<i>tbx20</i> target site (5' to 3')	Primers
CAAAACCTCAGCTCTCTCC	F: GGAGGGTGTGAAGACCAA R: TGCCATTGTGCAAAGCACA

1.4 Cas9 mRNA 及 gRNA 制备

Cas9 质粒菌液扩播 16 h。TIAN prep Rapid Mini plamid Kit (TIANGEN) 快速质粒小提试剂盒抽提质粒 (紫外分光光度计检测质粒的浓度及 260/280 值), 15 000 marker (TaKaRa) 琼脂糖凝胶

电泳检测质粒质量。XbaI (NEB) 线性化 Cas9 质粒, 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 20 min, 1% 琼脂糖凝胶电泳, 110 V, 30 min。线性化质粒用 DNA Clean & ConcentratorTM-5 (Zymo Research) 纯化试剂盒进行纯化, 最后按照 mMESSAGE mMACHINE T7 Ultra (Ambion) 试剂盒进行体外转录。LiCl 乙醇沉淀法纯化 Cas9 mRNA, Nanodrop 测浓度, 取 1 μL 产物进行电泳检验。

gRNA 质粒菌液扩播 14 h, TIAN prep Rapid Mini plamid Kit (TIANGEN) 快速质粒小提试剂盒抽提质粒 (紫外分光光度计检测质粒的浓度及 260/280 值)。以 gRNA 质粒为模板使用高保真酶 PCR 扩增目的片段, 2% 琼脂糖凝胶电泳 120 V, 30 min。用 DNA Clean&ConcentratorTM-5 (Zymo Research) 纯化 *tbx20* gRNA PCR 产物, 纯化产物使用 MAXIscript T7 (Ambion) 试剂盒进行体外转录。LiCl 乙醇沉淀法纯化 *tbx20* gRNA, 测浓度, 2% 琼脂糖凝胶电泳, 150 V, 10 min, 检验目的条带正确性。

1.5 显微注射

显微注射前一天晚上, 挑选若干对雌雄亲本进行配对并暗处理约 12 h, 次日进行产卵交配, 收集鱼卵, 一部分作为野生型对照, 另一部分用于显微注射。gRNA 浓度为 80 ~ 100 ng/ μL , Cas9 mRNA 浓度为 400 ng/ μL , 注射剂量为 1 nL/枚, 最佳注射时间为 1 细胞期胚胎。

1.6 T7E1 酶切检测

胚胎发育至 48 hpf 开始收集, 5 枚一组。碱裂法提取基因组即加 50 μL 50 mmol/L NaOH, 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 min, 振荡; 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 min, 最后加 1 mmol/L Tris HCl, 15 000 r/min 离心 5 min, 可于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。以提取的基因组为模板, 加入 *tbx20* 引物进行 PCR 扩增。体系如下: 反应总体积为 25 μL , 内含 Enzyme mix 12.5 μL 、正反引物各 1 μL 、模板 2 μL 、dd H₂O 8.5 μL 。

2% 琼脂糖凝胶电泳, 120 V, 30 min。随后将单一条带的 PCR 产物进行 T7E1 (NEB) 酶切检测。酶切体系如下: 反应总体积为 9.5 μL , 内含 PCR 产物 5 μL 、Buffer 2.1 μL 、dd H₂O 3.5 μL 。

反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min, 梯度降温至室温。

将 T7E1 酶和 H₂O 按 1:1 混合, 然后取 0.5 μL 混合液加到上述体系, 37 $^{\circ}\text{C}$, 40 min。2% 凝胶电泳, 120 V, 30 min。T7E1 酶切检测阳性的

PCR 产物,选取 2~3 组送生物公司(上海生工)用 Sanger 法测序进一步确定基因是否敲除成功。将敲除成功的 *tbx20* F₀ 斑马鱼养至成鱼,随后对 F₀ 成鱼和同批次养至成鱼的野生型交配,产生的胚胎在受精后 48 h 用 T7E1 酶切法检测嵌合体。在 *tbx20* F₀ 成鱼中,共检测了 30 尾鱼,其中有 11 尾鱼的后代酶切显示为嵌合体。将这些后代养至成鱼,剪尾提取基因组,TA 克隆测序分析基因型。计算种质遗传效率,方法为检测 F₀ 成鱼中阳性嵌合体占总检测鱼尾数的比例,本实验中为 11/30 = 36.7%,为种质遗传效率。

1.7 qRT-PCR 检测 *tbx20* 突变体中下游基因的表达

将 F₁ 内交获得 F₂,胚胎发育 3 dpf 提取纯合突变体的总 RNA,野生型作为对照。按照逆转录试剂盒(TaKaRa PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser)说明书将 RNA 逆转录为 cDNA,以 cDNA 为目的模板对目的基因进行扩增,基因引物见表 2。

表 2 *vmhc*、*amhc* 和 *myl7* qRT-PCR 引物
Tab. 2 qRT-PCR primers of *vmhc*, *amhc* and *myl7* genes

基因 Gene	引物(5'-3') Primers (5' to 3')
<i>vmhc</i>	F: TGTGCCTGATCCAGATGAAGAG R: TGGGGTGAATGTCAGCTTCC
<i>amhc</i>	F: TCTGGGCTGTTTGTGTC R: CGCTTCTGTCCTTCTTAC
<i>myl7</i>	F: GATCAGAACCGGATGGA R: AAGAGGCTGAGGAAGACA

反应体系如下:反应总体积为 14 μL,内含 LightCycler® 480 SYBR Green I Master 10 μL、cDNA 2 μL、F/R 引物各 1 μL、RNase-free water 6 μL。

反应条件:95 °C, 10 s; 60 °C, 30 s; 40 个循环。β-actin 作为内参,确定靶基因在突变体和野生型斑马鱼中的表达。其中实验样本重复 6 次,每次技术重复 3 次,后用 2^{-ΔΔC_T} 分析法进行数据分析,使用 SPSS 软件进行单因素方差的计算与分析,最终的柱形图用 GraphPad Prism. 5.0 软件进行绘制。

1.8 地高辛标记 RNA 探针进行斑马鱼整体原位杂交

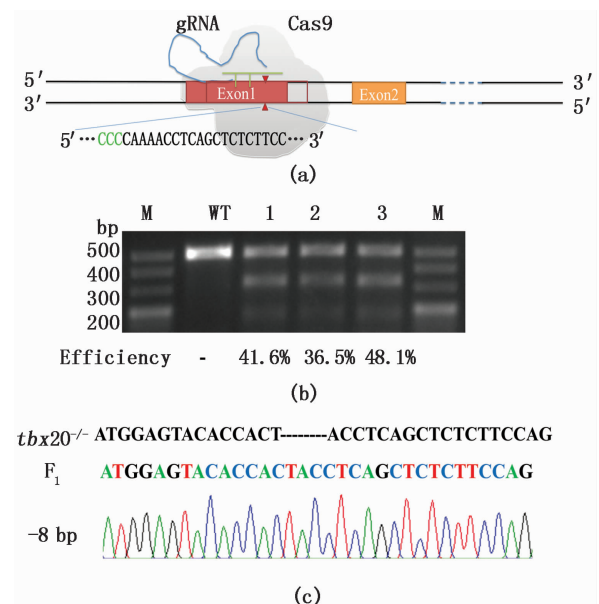
将 F₁ 内交获得 F₂,收集并固定 48 hpf 胚胎,野生型作为对照。按照 AmbionMAXIscript® Kit

试剂盒的步骤合成地高辛(Digoxigenin)标记探针并执行原位杂交,主要过程如下:胚胎用 4% 多聚甲醛在 4 °C 固定过夜后用 30%、50%、70% 和 100% 的乙醇溶液(PBST 配制)进行梯度脱水,每级处理 5 min。蛋白酶 K(10 μg/mL, Roche)处理 10 min 后,将胚胎置于预杂交液 65 °C 孵育 3 h,加入探针,65 °C 孵育过夜。第二天,样品经洗涤之后,加入地高辛抗体,4 °C 过夜。第三天,样品用 NBT-BCIP(Roche)染色后,移至 3% 甲基纤维素(Sigma),在显微镜(Zeiss)下观察拍照。

2 结果与分析

2.1 利用 CRISPR/Cas9 成功构建斑马鱼 *tbx20* 基因突变体

tbx20 基因属于 T-box 家族成员之一,位于 16 号染色体上,拥有一个转录本。*tbx20* 共有 8 个外显子,本实验中 gRNA 设计在第一个外显子上(图 1a)。在靶点上下游设计一对检测引物,扩增片段长度为 499 bp。



(a) *tbx20* 基因敲除靶点示意图,靶点位于第一个外显子上;
(b) *tbx20* F₀ T7E1 酶切结果; M. Marker; WT. 野生型; 1、2、3 为 3 组平行实验;
(c) *tbx20* F₁ 剪尾测序结果及峰图
(a) *tbx20* knockout schematic diagram, the target site is located on the first exon;
(b) T7E1 assay in *tbx20* F₀; M. Marker; WT. wild type; 1, 2 and 3 mean three groups of parallel experiments;
(c) Sequence analysis in *tbx20* F₁

图 1 CRISPR/Cas9 介导的斑马鱼 *tbx20* 基因敲除
Fig. 1 CRISPR/Cas9-mediated *tbx20* knockout in zebrafish

用 28.5 °C 的曝气灭菌水清洗受精卵,均匀分布在模具中,对一细胞期受精卵进行注射,每枚胚胎注射 Cas9 mRNA 和 gRNA,终浓度分别为 400 ng/ μ L 和 80 ~ 100 ng/ μ L,注射剂量为 1 nL/枚。显微注射 48 hpf 后,随机收集 3 组胚胎,5 枚胚胎一组,分别标号为 1、2、3。T7E1 酶切检测结果显示 3 组敲除效率分别为 41.6%、36.5% 和 48.1%,平均突变效率约为 42.1% (图 1 b)。将敲除成功胚胎养至成鱼剪尾测序筛选 F_1 ,共剪 30 尾鱼,其中阳性结果为 11 尾,测序分析 F_1 中突变的种质遗传效率为 36.7%。图 1c 为 F_1 剪尾筛选得到 *tbx20* 敲除成功鱼系靶位点的测序序列及峰图,序列比对结果显示, *tbx20* 敲除鱼系的突变类型为靶点位置缺失 8 bp。

2.2 斑马鱼 *tbx20* 突变导致心脏发育异常

将 F_1 剪尾筛出的 *tbx20* -8 bp 突变携带者进行内交,观察 F_2 中 *tbx20* 突变体表型。结果显示:受精后 48 h 的胚胎中,心包腔肿大,静脉窦瘀血,环化异常,心脏结构变形;3 dpf 胚胎中,突变表型逐渐加深,心脏拉伸成线状结构(图版 I-8)。统计突变个体数,突变体比例约占总胚胎数量的

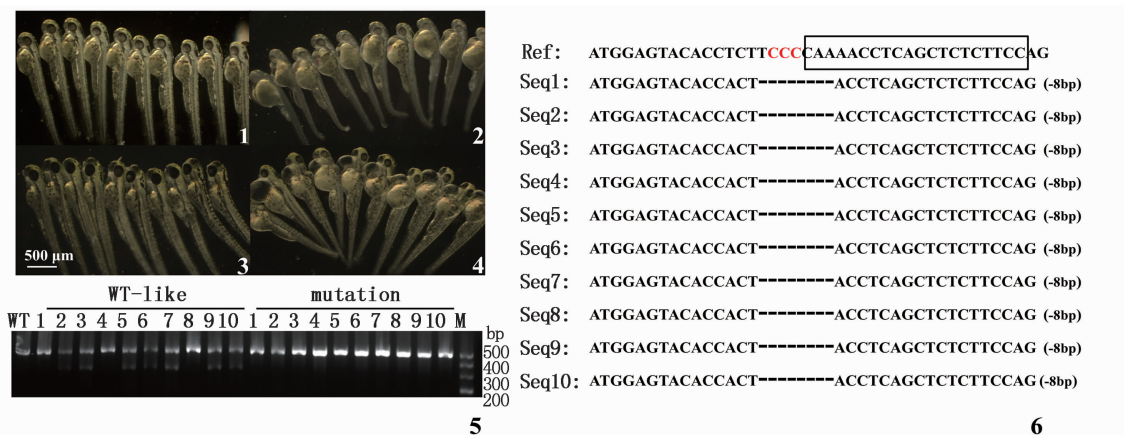
25% (表 3),符合孟德尔遗传定律。

表 3 F_2 表型数量统计
Tab. 3 Count of the F_2 's phenotype

编号 Number	胚胎总数 The total number of embryos	正常表型 Normal phenotype embryos	突变表型 Mutant phenotype embryos	突变比例 Mutant percentage
1	132	100	32	24.2%
2	165	123	42	25.5%
3	85	64	21	24.7%

进一步通过使用 myosin, light chain 7, regulatory (*myl7*) EGFP 标记心肌细胞对突变鱼系心脏表型进行荧光成像,结果显示突变体心脏拉伸成线状结构,环化异常(图版 II)。

对 10 尾突变鱼系心脏表型进行成像,观察到突变体心脏发育异常,胚胎在发育 5 dpf 开始死亡。随后将这 10 尾鱼进行 T7E1 酶切检测,其中 WT-like 表型的有 7 组(2、3、5、6、7、9、10)酶切呈现 3 条带,将 WT、WT-like、mutant 三组 PCR 产物送测序,结果显示 WT-like 组中均为杂合或野生型,mutant 组均缺失 8 bp (图 2)。



F_2 突变体胚胎发育至 48 hpf、3 dpf 10 尾鱼光镜表型(1、2、3、4 侧面观);1、3 为野生型;2、4 为突变体;5 为单胚胎 T7E1 酶切胶图;6 为对应的单胚胎测序图

The phenotype of 10 mutants at 48 hpf and 3 dpf (1,2,3,4 lateral view); 1, 3. wild type; 2, 4. mutant; 5. The T7E1 efficiency of single embryo; 6. single embryo sequence analysis

图 2 *tbx20* 突变表型与基因型对应验证

Fig. 2 Validation of phenotype and genotype from wild-type and *tbx20* mutant zebrafish

2.3 *tbx20* 影响心脏腔室结构的分化

tbx20 杂合子内交获得 F_2 , 胚胎发育 48 hpf, 分别固定收集野生型和突变体表型的胚胎。此时的斑马鱼胚胎心房心室分化基本完成,此时

vmhc 集中在心室高表达, *amhc* 在心房表达, *myl7* 作为心脏的标记基因在整个心脏的心肌细胞中均有表达。原位杂交结果分析显示,与野生型相比,突变体中未检测到 *tbx20* 表达(图版 III-2),突

突变体中 *vmhc* 泛表达在整个心脏中(图版 III-4),且表达量增多。突变体中 *amhc* 的表达减少(图版 III-6),在线性化的心脏中,在心房的表达区域也明显缩小;而 *myl7* 的表达范围在野生型和突变体中无明显差异(图版 III-8),都在整个心脏中表达,但突变体中 *myl7* 表达量有所降低。

2.4 *tbx20* 调控 *vmhc*、*amhc* 和 *myl7* 的表达

tbx20 基因杂合子内交获得 F_2 , 胚胎发育 3 dpf 提取纯合突变体的总 RNA,野生型作为对照,荧光定量 PCR 结果分析显示,与野生型(1.00)相比, F_2 纯合突变体中 3 个基因表达水平均有变化。在突变体中:*vmhc* 基因表达上调了 191.7% ($P < 0.01$),有统计学差异;*amhc* 表达下调了 0.06% ($P > 0.05$),无统计学差异;*myl7* 基因表达下调了 71.9% ($P < 0.001$),有统计学差异。见图 3。

3 讨论

心脏环化是脊椎动物早期心脏发育的重要特征之一^[1]。TBX20 作为 T-box 转录因子家族中一员,其在维持心肌细胞结构和功能中起到中心调控作用^[16]。*Tbx20* 在心脏的 FHF 和第二生心区(second heart field, SHF)处均有表达,且作为转录因子促进腔室的分化和增殖^[7-9]。

在小鼠中,*Tbx20* 在心脏祖细胞、早期心管的心肌细胞和形成心内膜垫的内皮细胞等处高表达,其在心脏瓣膜的前体结构和正在形成的房室隔膜处皆有表达^[17]。小鼠 *Tbx20* 基因敲除导致胚胎死亡同时伴随严重的心管发育不全即环化失败。*Tbx20* 敲降的小鼠表现出流出道间隔不能正常形成和右心心室的发育不正常,其表型跟人类的先天性心脏缺损症状类似^[9],表明其在瓣膜的发育和促进腔室细胞的增殖和分化中扮演关键角色。此外,非洲爪蟾 *tbx20* 的敲降表现出心脏环化失败,腔室结构不能正常形成^[18]。这些模式动物中 *tbx20* 基因的敲除或者敲降,均产生心脏环化失败、房室间隔异常的相关表型,但 *tbx20* 在影响早期心脏腔室分化方面的作用并未有深入研究的报道。

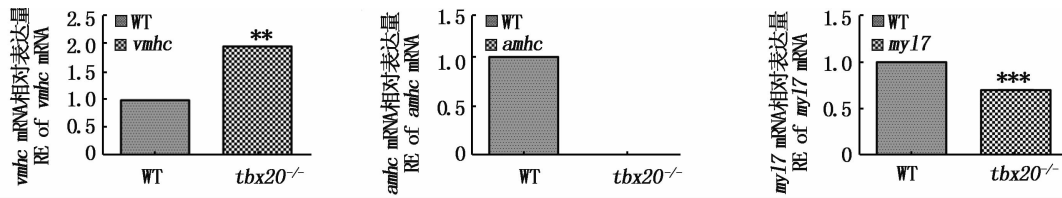
本实验首次用 CRISPR/Cas9 对斑马鱼 *tbx20* 进行基因敲除,并成功获得纯合突变体。通过光学分析突变体心脏形态变化,观察胚胎发育至 48 hpf,心包腔肿大,静脉窦瘀血,环化异常,心脏结

构变形;3 dpf,突变表型逐渐加深,心脏拉伸成线状结构;该表型与小鼠 *Tbx20* 缺失和斑马鱼 MO 敲降 *tbx20* 的表型吻合。目前对 *tbx20* 的研究多数定位在促进心脏祖细胞形成和心肌细胞增殖方面,而对早期心脏腔室分化影响的研究较少。已有的斑马鱼 MO 敲降实验只是在 F_0 水平上对 *tbx20* 的表型进行研究,并且 MO 脱靶率相对较高^[19]。综合以上原因,本研究采用 CRISPR/Cas9 技术敲除 *tbx20* 并获得突变鱼系,将有助于深入挖掘其 *tbx20* 纯合子表型和探究其在腔室分化过程中的作用机制。

斑马鱼心脏中,*vmhc* 基因被严格地限制在心室中表达^[14],小鸡心房肌球蛋白重链基因(AMHC1)的表达局限于形成心管的前心房部分^[18]。地高辛原位杂交结果分析显示,*tbx20* 敲除的 F_2 纯合突变斑马鱼胚胎(48 hpf)中,心房特异表达的 *amhc* 基因和心脏中胚层标记基因 *myl7* 的表达范围缩小,心室特异的 *vmhc* 基因表达与野生型个体的表达差异明显,在整个突变体心脏中都表达。LU 等^[11]关于斑马鱼 *tbx20* 突变体的研究结果显示:正常心脏在发育至 26 hpf 可逐渐形成能够推动血液循环的原始心脏管,而在斑马鱼 *tbx20* 突变体心脏祖细胞数量明显减少,且大小明显小于野生型,其功能仅支持循环,通过对突变体中 *tbx20* 的过表达实验,发现了心肌细胞的增加进而使得突变体心脏腔室形成异常的表型得到缓解补救。结合本实验中荧光定量实验^[20-21]与原位杂交实验,我们发现在 *tbx20* 突变体中,腔室形成的重要标记基因表达异常。在斑马鱼已有的 *tbx20* 突变体报道中,强调了其可以通过调控心肌细胞的数量进而影响到腔室的发育,但是没有探究在突变体中心脏形成的关键区域作用机制。本实验通过原位杂交和荧光定量的方法,确定了在心脏腔室形成过程中,*tbx20* 的缺失,导致了腔室的异常,为我们进一步探究早期心脏腔室形成及分化提供了帮助。

本研究在模式动物斑马鱼中利用 CRISPR/Cas9 系统,通过显微注射技术成功获得 *tbx20* 基因突变鱼系,并在突变体中观察到心脏突变表型:胚胎发育至 48 hpf,心包腔肿大,静脉窦瘀血,环化异常,心脏结构变形;3 dpf,突变表型逐渐加深,心脏拉伸成线状结构。*tbx20* 的突变影响了基因 *vmhc*、*amhc* 和 *myl7* 的表达。*tbx20* 突变鱼系的

成功制备,为进一步深入探究 *tbx20* 基因对早期心脏发育腔室分化过程的影响奠定基础。



** 为有显著统计学差异 $P < 0.01$, *** 为有极其显著的统计学差异 $P < 0.001$

** represents statistical significance, $P < 0.01$. *** represents highly statistical significance, $P < 0.001$

图3 qRT-PCR 检测 *vmhc*、*amhc* 和 *myl7* 在 *tbx20* F₂ 突变斑马鱼 (3 dpf) 中的表达

Fig.3 Relative level of *vmhc*, *amhc* and *myl7* RNA in *tbx20* mutant zebrafish (F₂, 3 dpf) detected by qRT-PCR

参考文献:

- [1] STAINIER D Y R. Zebrafish genetics and vertebrate heart formation[J]. Nature Reviews Genetics, 2001, 2(1): 39-48.
- [2] YAMADA M, REVELLI J P, EICHELE G, et al. Expression of chick *Tbx-2*, *Tbx-3*, and *Tbx-5* genes during early heart development: evidence for BMP2 induction of *Tbx2* [J]. Developmental Biology, 2000, 228(1): 95-105.
- [3] RIBEIRO I, KAWAKAMI Y, BÜSCHER D, et al. *Tbx2* and *Tbx3* regulate the dynamics of cell proliferation during heart remodeling[J]. PLoS One, 2007, 2(4): e398.
- [4] NAICHE L A, HARRELSON Z, KELLY R G, et al. T-box genes in vertebrate development [J]. Annual Review of Genetics, 2005, 39: 219-239.
- [5] PLAGEMAN JR T F, YUTZEY K E. T-box genes and heart development: putting the "T" in heart [J]. Developmental Dynamics, 2005, 232(1): 11-20.
- [6] KRAUS F, HAENIG B, KISPERT A. Cloning and expression analysis of the mouse T-box gene *Tbx20* [J]. Mechanisms of Development, 2001, 100(1): 87-91.
- [7] CAI C L, ZHOU W L, YANG L, et al. T-box genes coordinate regional rates of proliferation and regional specification during cardiogenesis [J]. Development, 2005, 132(10): 2475-2487.
- [8] STENNARD F A, COSTA M W, LAI D, et al. Murine T-box transcription factor *Tbx20* acts as a repressor during heart development, and is essential for adult heart integrity, function and adaptation [J]. Development, 2005, 132(10): 2451-2462.
- [9] TAKEUCHI J K, MILEIKOVSKAIA M, KOSHIBA-TAKEUCHI K, et al. *Tbx20* dose-dependently regulates transcription factor networks required for mouse heart and motoneuron development [J]. Development, 2005, 132(10): 2463-2474.
- [10] CAI X Q, NOMURA-KITABAYASHI A, CAI W B, et al. Myocardial *Tbx20* regulates early atrioventricular canal formation and endocardial epithelial-mesenchymal transition via *Bmp2* [J]. Developmental Biology, 2011, 360(2): 381-390.
- [11] LU F, LANGENBACHER A, CHEN J N. *Tbx20* drives cardiac progenitor formation and cardiomyocyte proliferation in zebrafish [J]. Developmental Biology, 2017, 421(2): 139-148.
- [12] SZETO D P, GRIFFIN K J P, KIMELMAN D. *HrT* is required for cardiovascular development in zebrafish [J]. Development, 2002, 129(21): 5093-5101.
- [13] SATIN J, FUJII S, DEHAAN R L. Development of cardiac beat rate in early chick embryos is regulated by regional cues [J]. Developmental Biology, 1988, 129(1): 103-113.
- [14] YELON D, HORNE S A, STAINIER D Y R. Restricted expression of cardiac myosin genes reveals regulated aspects of heart tube assembly in zebrafish [J]. Developmental Biology, 1999, 214(1): 23-37.
- [15] XIAO A, WANG Z X, HU Y Y, et al. Chromosomal deletions and inversions mediated by TALENs and CRISPR/Cas in zebrafish [J]. Nucleic Acids Research, 2013, 41(14): e141.
- [16] QIAN L, MOHAPATRA B, AKASAKA T, et al. Transcription factor *neuromancer/TBX20* is required for cardiac function in *Drosophila* with implications for human heart disease [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2008, 105(50): 19833-19838.
- [17] STENNARD F A, COSTA M W, ELLIOTT D A, et al. Cardiac T-box factor *Tbx20* directly interacts with *Nkx2-5*, *GATA4*, and *GATA5* in regulation of gene expression in the developing heart [J]. Developmental Biology, 2003, 262(2): 206-224.
- [18] BROWN D D, MARTZ S N, BINDER O, et al. *Tbx5* and *Tbx20* act synergistically to control vertebrate heart morphogenesis [J]. Development, 2005, 132(3): 553-563.
- [19] YUTZEY K E, RHEE J T, BADER D. Expression of the atrial-specific myosin heavy chain *AMHC1* and the establishment of anteroposterior polarity in the developing

- chicken heart[J]. *Development*, 1994, 120(4): 871-883.
- [20] 宋美泽,黎明,李健,等. 急性氨氮暴露对大弹涂鱼炎症反应相关基因表达的影响[J]. *水产学报*, 2018, 42(11): 1704-1710.
- SONG M Z, LI M, LI J, et al. Effects of acute ammonia exposure on gene involved in inflammation of mudskipper [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2018, 42(11): 1704-1710.
- [21] 朱嘉诚,贺婵娟,贾晓会,等. 转基因及相关亚品系鱼腥藻的纯化[J]. *上海海洋大学学报*, 2018, 27(5): 645-655.
- ZHU J C, HE C J, JIA X H, et al. Separation and purification for transgenic *Anabaena* sp. PCC 7120 and its subspecies[J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2018, 27(5): 645-655.

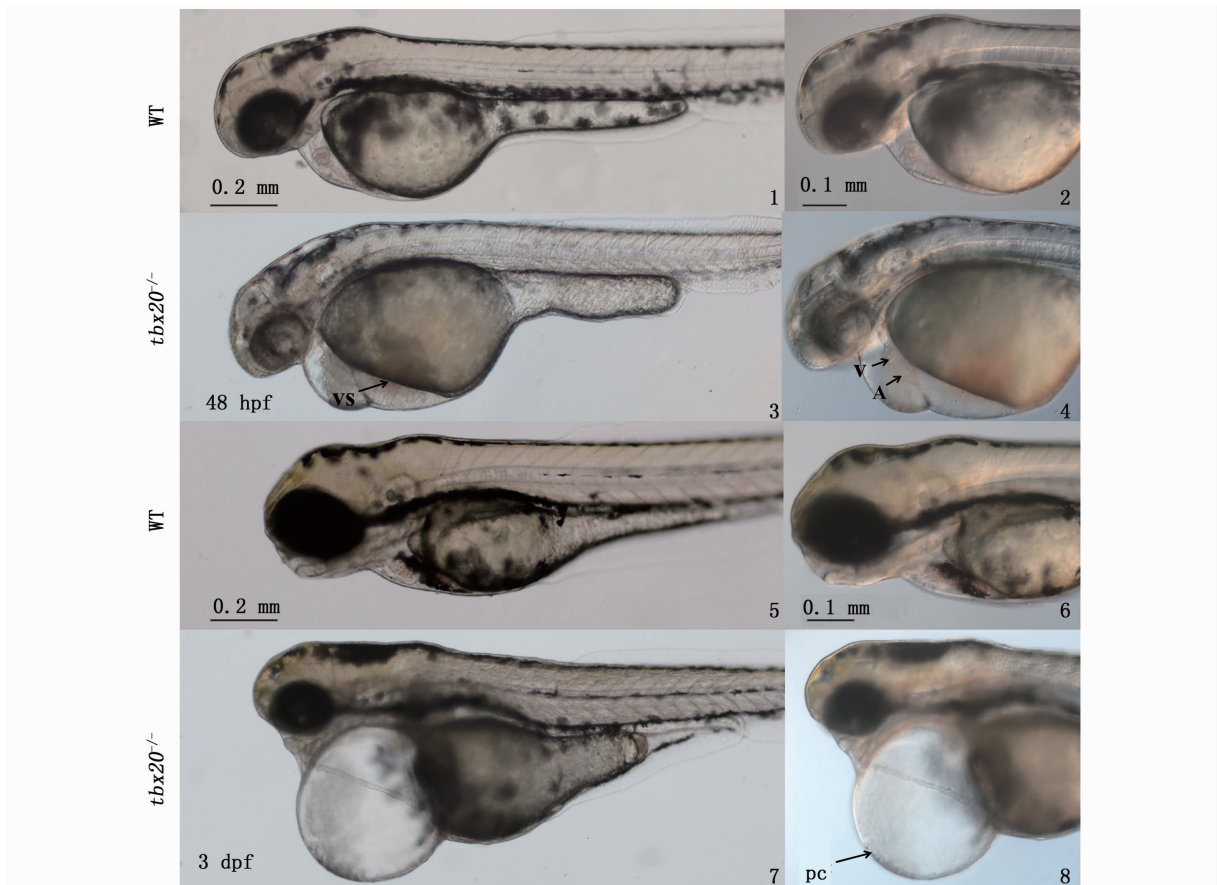
Zebrafish *tbx20* gene knockout using CRISPR/Cas9 system and its related functions analysis

ZHU Zhe^{1,2,3}, HU Peinan^{1,2,3}, LI Weiming¹, ZU Yao^{1,2,3}

(1. *International Research Center for Marine Biosciences, Ministry of Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China*; 2. *Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Ministry of Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China*; 3. *National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China*)

Abstract: The *tbx20* mutated zebrafish line is successfully established by using CRISPR/Cas9 system. The *tbx20* mutagenesis efficiency is about 42.1% which was evaluated by T7E1 assay in F₀. Sequencing analysis estimated the germline transmission efficiency of *tbx20* mutagenesis is 36.7% in F₁. The *tbx20* homozygote mutant showed obvious cardiac phenotypes; the *tbx20* mutant displayed pericardial oedema, sinus congestion, looping abnormal and the cardiac morphology deformation at 48 hpf; all the phenotypes became severer at 3 dpf and *tbx20* mutant showed linear heart. In situ hybridization and realtime fluorescence quantitative PCR results revealed that the expression of *vmhc* was upregulated, *amhc* and *myl7* in the *tbx20* mutants were downregulated. The *tbx20* mutated zebrafish line was successfully produced and was confirmed *tbx20* affected heart looping, which established a foundation for future studies on the function of *tbx20* gene in early cardiac chamber differentiation.

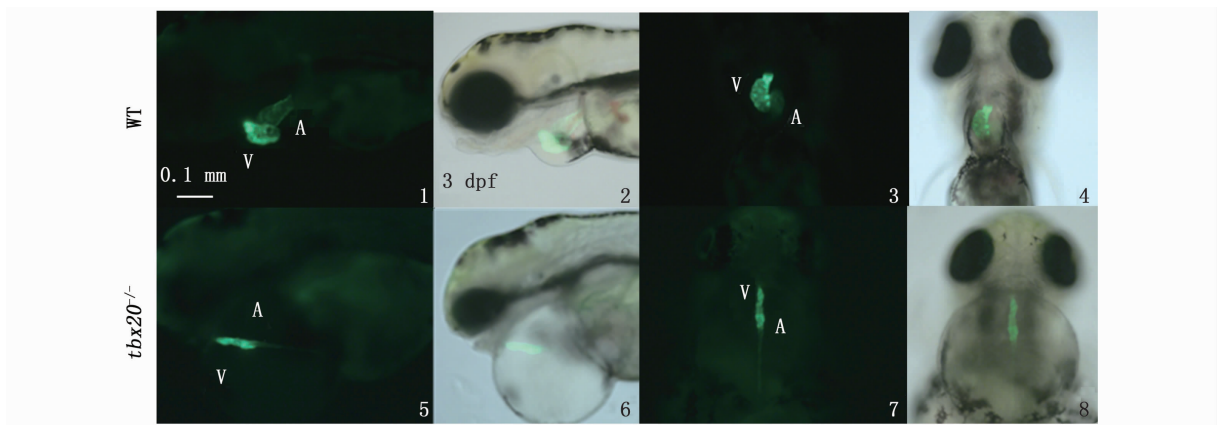
Key words: *tbx20*; zebrafish; cardiac development; chamber differentiation; CRISPR/Cas9



光镜观察 F_2 突变体表型(侧面观,头向左)。胚胎发育 48 hpf WT 可见正常形成的心脏,而 $tbx20$ 突变体中心包腔肿大,静脉窦瘀血,环化异常,心脏结构变形;3 dpf,突变表型逐渐加深,心脏拉伸成线状结构。右图(2,4,6,8)为左图(1,3,5,7)的局部放大图;WT. 野生型;V. 心室;A. 心房;VS. 静脉窦;PC. 心包腔

The phenotype of F_2 (lateral view, head left). Normal heart could be observed at 48 hpf during embryos development in WT, while the mutant of $tbx20$ displayed pericardial cavity oedema, an accumulation of blood cells in the venous sinus and then occurred malformation heart with looping defects. All the phenotypes became severer at 3 dpf and $tbx20$ mutant showed linear heart. 2, 4, 6, 8 were the partial enlarged view of 1, 3, 5, 7; WT. wild type; V. ventricle; A. atrium; VS. venous sinus; PC. pericardial cavity

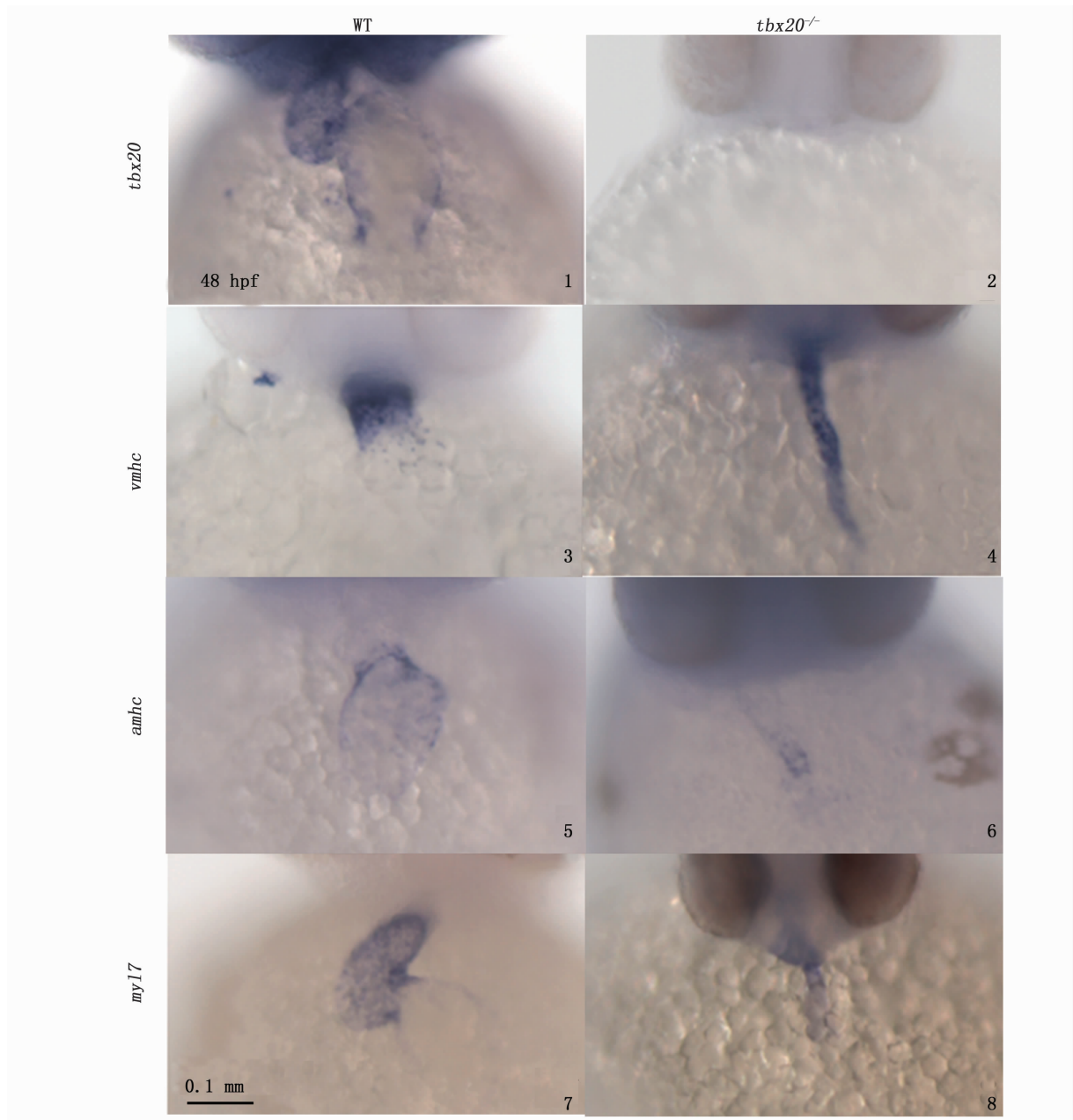
图版 I $tbx20$ 突变体表型
Plate I Phenotype of $tbx20$



F_2 突变体胚胎发育至 3 dpf 荧光表型图(1,2,5,6 侧面观;3,4,7,8 腹面观)。V. 心室;A. 心房

The phenotype of WT and mutant zebrafish imaged with *myl7*: EGFP at 3 dpf (1,2,5,6 lateral view;3,4,7,8 ventral view). V. ventricle; A. atrium

图版 II *myl7*: EGFP 荧光观察 $tbx20$ 突变表型
Plate II Fluorescence and bright micrographs of WT and $tbx20$ mutant morphology



F₂ 突变体胚胎发育至 48 hpf 原位杂交各基因表达图(腹面观,头在上)。WT. 野生型; *tbx20*^{-/-}. 纯合突变体

In situ hybridization of target genes in the WT and mutants at 48 hpf (ventral view with head on the top;). WT. wild type; *tbx20*^{-/-}. mutant

图版 III *tbx20* 突变体中靶基因的表达位点检测

Plate III Expression of *tbx20*, *vmhc*, *amhc* and *myl7* in WT and *tbx20* mutant embryos at 48 hpf was shown by in situ hybridization