

果蝇研究技术与资源的开发

徐荣刚,王霞,王芳,孙锦,毛德才,乔欢欢,贾豫,朱芮葆,彭娉,刘鲁萍,
倪建泉*

(清华大学医学院,北京 100084)

【摘要】 黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*)是进行生物医学研究的理想模型,但研究过程往往受到遗传工具和品系资源的限制,无法有效地调控目的基因表达,阻碍实验的深入开展。为了方便果蝇领域的实验室开展研究,我们首先开发并优化了基于 CRISPR/Cas9 的基因组编辑技术,随后研发了转录激活系统和新一代转基因干扰技术,最终可以简单高效、准确特异地调控目的基因表达。同时,利用这些遗传学新技术,我们构建了相应的基因敲除、转基因转录激活、转基因干扰的果蝇品系资源库,使清华大学果蝇中心成为世界上最重要的果蝇技术和资源中心之一。这些新技术以及相应的果蝇资源,正在被国内外果蝇研究领域的实验室所应用,对发育和疾病等相关研究发挥着广泛的促进作用。

【关键词】 黑腹果蝇;遗传工具;果蝇资源

【中图分类号】 Q95-33

【文献标识码】 A

【文章编号】 1005-4847(2018) 04-0489-04

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2018.04.013

Research techniques and resource development of *Drosophila melanogaster*

XU Ronggang, WANG Xia, WANG Fang, SUN Jin, MAO Decai, QIAO Huanhuan, JIA Yu, ZHU Ruibao,
PENG Ping, LIU Luping, NI Jianquan*

(School of Medicine, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Corresponding author: Ni Jianquan. E-mail: nijq@mail.tsinghua.edu.cn

【Abstract】 *Drosophila melanogaster* is an ideal model organism for diverse topics in biomedical research with various advantages. However, the limitation of genetic tools and fly strains always hampers further studies of related topics. To promote our research, we developed and optimized the CRISPR/Cas9 genome editing system, developed CRISPR/dCas9 based transcriptional activation system and the next generation of transgenic RNAi technique in *Drosophila*. Equipped with these techniques, we can simply, efficiently and specifically regulate the genes of interest. Meanwhile, taking advantage of these novel genetic techniques, we built the library of mutant flies, transgenic transcriptional activation flies and transgenic RNAi flies. These genetic tools together with corresponding fly resources make Tsinghua Fly Center (THFC) to be one of the most important centers of *Drosophila* techniques and resources around the world. Importantly, both these techniques and the fly strains are widely used in the entire *Drosophila* research field, and have broad impact on the research efforts in understanding development and diseases.

【Key words】 *Drosophila melanogaster*; genetic tools; fly resources

Conflict of interest statement: We declare that we have no conflict of interest statement.

【基金项目】 国家科技支撑计划(No. 2015BAI09B03)。

Funded by the National Key Technology Research and Development Program of the Ministry of Science and Technology of China (No. 2015BAI09B03).

【作者简介】 徐荣刚(1992—),男,博士生,主要从事基因表达调控研究。Email:justxuronggang@foxmail.com

【通信作者】 倪建泉(1973—),男,研究员,主要从事基因表达调控与表观遗传学研究。Email:nijq@mail.tsinghua.edu.cn

果蝇具有易于饲养、生命周期短、繁殖能力强、染色体简单、突变表型多且易于观察等诸多优点,并且可以进行品系资源库的开发、保存和大批量的功能筛选,是科研领域最为经典、最为重要的模式生物之一。此外,果蝇中的基因与人类高度同源,因此以果蝇为模型进行干细胞调控和人类疾病等相关研究不仅成本低,而且不受伦理上的限制。利用果蝇作为模式生物,人们取得了一系列重大的科研成果,并多次获得诺贝尔奖,帮助人们更好地理解动物的遗传发育、新陈代谢等过程,揭示人类疾病的致病机理并提供治疗方法。然而,在研究过程中经常受到遗传工具和果蝇品系的限制,无法实现目的基因的有效调控,进而阻碍实验的深入开展。为了解决这一问题,我们在果蝇中先后开发并优化了 CRISPR/Cas9 基因组编辑技术、CRISPR/dCas9 介导的转录激活系统和下一代转基因 RNAi 技术。同时,利用这些新颖的遗传学技术,我们构建了相应的果蝇品系资源库,覆盖了果蝇中的大部分基因,使清华大学果蝇中心成为世界上最大的果蝇品系资源库之一。这些遗传工具和果蝇品系资源被国内外果蝇研究领域的实验室广泛使用,推动了相关研究的快速开展。

1 果蝇中 CRISPR/Cas9 基因编辑技术

基因编辑技术是进行生物医学研究最为重要的一种技术手段,能够有效调控靶基因的表达,促进更多的研究成果。最开始的基因编辑技术是通过 X 射线等高能粒子、甲基磺酸乙酯 (ethylmethylsulfone, EMS) 等化学诱变剂以及转座子等进行基因突变,但这些方法只是随机突变,且可能出现多个突变位点,后续的鉴定工作异常繁琐^[1]。随后的锌指核酸酶 (zinc-finger nucleases, ZFN) 和转录激活因子样效应物核酸酶 (transcription activator-like (TAL) effector nucleases, TALEN) 基因编辑技术虽然具有了靶向性,但需要体外构建针对靶基因的模块化识别蛋白,步骤繁琐,成本较高^[1]。近些年,CRISPR/Cas9 基因编辑技术快速发展并逐渐成为基因组突变的理想方法。CRISPR/Cas9 系统主要由 Cas9 和 sgRNA 两部分组成,其中 Cas9 蛋白具有核酸酶的活性,能够切割 DNA 双链,而 sgRNA 可以引导 Cas9 蛋白到达靶标区域^[2]。该系统的特异性由位于 sgRNA 5' 端的 20 个核苷酸的靶标序列决定,所以在该系统中只需要改变 sgRNA 上 20 个

核苷酸的序列就可以实现靶向不同基因的目标,实现了简便、特异、高效、经济的基因编辑。

为了将 CRISPR/Cas9 技术应用到果蝇中,我们构建了在果蝇生殖细胞稳定表达 Cas9 蛋白的转基因品系,只需要在该转基因果蝇中注射表达 sgRNA 的质粒就能实现高效的靶基因突变,由此形成了特异性靶向果蝇生殖细胞的可遗传突变系统。此外,我们评估了使用不同的启动子和载体骨架表达 sgRNA 对于突变效率的影响,结果发现使用 U6B 人工合成启动子载体取得了接近 100% 的突变效率^[3]。这一系统只在生殖细胞系中发挥作用,因此克服了体细胞突变引起的毒性,并且使获得可遗传突变体的成本降低、时间缩短、效率更高。在该系统的基础上,通过突变 Cas9 核酸酶的结构域,我们构建了表达 Cas9 nickase 的转基因果蝇。Cas9 nickase 只切割 DNA 单链,因此在单个 sgRNA 引导下不会产生突变,而利用 2 个反向的 sgRNA 则可以最大程度地避免脱靶效应,高特异性地构建基因定点突变^[4]。在利用 CRISPR/Cas9 系统进行基因组编辑的过程中,sgRNA 的靶效率是编辑成败的关键。因此,我们在 CG 含量、脱靶条件、注射浓度等方面对 sgRNA 的参数进行了系统的优化。这些改进使我们能够通过一次胚胎注射,首次实现多个基因的同时诱导突变,并显著提高了同源重组修复的效率^[5]。多次实践结果表明,我们开发并优化的 CRISPR/Cas9 基因编辑技术是果蝇基因编辑领域最先进、最高效的系统,具有特异性高、成本低、并且可以半高通量构建突变体等优势^[6-7]。该系统自开发以来就受到广泛使用,这种强大的遗传学方法已经在果蝇各个研究领域发挥重要的作用。

2 果蝇中 CRISPR/dCas9 介导的转录激活系统

增强基因表达是进行基因功能研究最常用的技术手段之一,传统方式主要通过表达由外源载体携带的目的基因的 cDNA^[8],但是其克隆步骤繁琐,成本高,不能同时表达多个基因,并且只过表达 cDNA 的方式不能反映基因自身的表达模式,容易产生假阳性的结果。将 CRISPR/Cas9 系统中 Cas9 蛋白的核酸酶活性突变之后,CRISPR/Cas9 系统会失去切割 DNA 的能力,但是其识别和结合 DNA 的能力不受影响。如果在核酸酶活性缺失的 Cas9 蛋白 (dCas9) C 端融合转录激活结构域,在 sgRNA 的引导下,就可以在基因座的原位增加目标基因的转

录。而且,针对不同的基因只需要改变 sgRNA 序列即可,可以实现简单、高效的转录激活,适合大规模、高通量的激活操作。

为了开发果蝇中 CRISPR/dCas9 介导的转录激活系统,我们与哈佛大学的研究组合作在果蝇体内首次开发了 dCas9-VPR 转录激活系统,并证明该系统可以激活目的基因的表达并产生特定的表型^[9-10],为果蝇体内 gain-of-function 研究提供了重要的技术支持。尽管这一系统可以激活目的基因转录而产生表型,但是其激活效果仍然较低,往往需要两个 sgRNA 才能实现高效的转录激活,增加了系统的成本和复杂性。另外,这个系统需要三个独立的元件, Gal4、UAS:dCas9-VPR 和 sgRNA,使用时需要复杂的遗传整合。为了解决上述问题,我们研发了下一代 CRISPR/dCas9 转录激活系统, flySAM, 利用自剪切肽 T2A 同时表达两个融合的激活蛋白 dCas9-VP64 和 MCP-p65-HSF1, 并将 UAS:dCas9-activator 和 sgRNA 整合到一个载体。结果表明 flySAM 显著提升了系统的激活效率,在一个 sgRNA 的驱动下就可以实现高效的激活,产生比 dCas9-VPR 系统更严重的表型。flySAM 系统只需要一次遗传杂交就可以完成转录激活,并且可以同时激活多个基因的表达^[11]。更重要的是,以 flySAM 转录激活系统为基础的基因组范围的转基因过表达资源库正在构建中,这将是世界上第一个果蝇转基因过表达资源库,这一品系资源库将为整个果蝇研究领域提供重要的技术资源,推动相关研究的快速开展。

3 新一代转基因 RNAi 技术

Andy Fire 和 Craig Mello 因为发现双链 RNA (double-stranded RNA, dsRNA) 可以结合与其互补的 mRNA,并引发目的 mRNA 的降解,而获得了 2006 年诺贝尔生理学或医学奖,这一发现是 RNAi 技术不断发展和完善的奠基性工作^[12]。进一步的研究发现,当 dsRNA 被注射到线虫或果蝇等模式动物体内后,会被蛋白酶 Dicer 切割成大小为 21 bp 的 siRNAs, siRNA 促使 RNA 沉默复合体与目的 mRNA 结合,催化 mRNA 的剪切降解或干扰翻译过程,进而敲低目的基因的表达^[12]。RNAi 技术自从出现开始就得到了广泛的关注并快速发展,能够简单、高效地敲低目的基因,是较为理想的基因调控技术,适合大规模的基因筛选操作。如果将 RNAi 技术与

Gal4/UAS 系统结合到一起,就可以实现在特定的组织器官、特定的发育阶段敲低目的基因,使条件性调控基因表达成为可能。在果蝇中为了实现条件性的基因敲低,最开始的转基因 RNAi 技术是通过 *P-element* 整合并构建 UAS-dsRNA 的转基因果蝇,但这种随机插入的方式会产生较高的假阴性和假阳性结果^[13-14]。随后通过开发 phiC31 介导的定点整合以及利用 UAS-shRNA 取代 dsRNA 的方式,在一定程度上降低了 RNAi 技术的假阴性和假阳性,并可以在果蝇体细胞和生殖细胞中实现高效的 RNAi^[15-17]。

然而,随着使用的深入,现存的转基因 RNAi 技术的一些不足逐渐暴露出来,例如对于高表达基因的低效敲低造成的假阴性结果;即使没有 Gal4 的驱动,基础启动子本底表达的 shRNA 水平也比较高,会产生假阳性的结果;不能同时敲低多个目的基因的表达,阻碍对蛋白质复合体以及功能冗余基因的研究等。为了解决这些问题,提高转基因 RNAi 技术的效率、特异性和多靶点特性,我们独立探索并成功开发了新一代的转基因 RNAi 技术。新一代的转基因 RNAi 技术,与之前的转基因 RNAi 技术相比,其干扰效率高、毒副作用小、特异性高、应用面广、能够高效地敲低高表达基因,并且首次突破性地实现了多个基因的同时调控,该项技术已经获得了国家发明专利。利用新一代转基因 RNAi 技术,我们构建了与人类疾病相关基因的转基因 RNAi 品系资源库,包含各细胞信号通路基因、RNA 结合蛋白基因以及蛋白激酶基因等。这一技术及其相应的果蝇品系资源库将会受到果蝇研究领域的广泛使用,有助于相关研究的快速发展。

4 清华大学果蝇资源中心

清华大学果蝇中心自 2011 年建立以来,一直面向国内外科研机构提供转基因果蝇品系和技术支持,并在维护现有品系的同时,不断研发新颖的果蝇遗传学技术,不断扩大果蝇品系资源库,使清华果蝇中心成为世界上最重要的果蝇技术与资源中心之一^[18]。首先,为了方便果蝇研究领域的实验室开展研究,我们利用自主研发的生殖细胞特异的 CRISPR/Cas9 基因定点编辑技术构建了 100 余株与人类疾病基因同源的突变体品系,这些突变体是在果蝇研究过程中最常用的品系,将大大加快相关研究的开展速度。其次,利用最新研发的新一代转基

因 RNAi 技术,我们又构建了 3500 余株与人类高度同源且与疾病相关基因的转基因 RNAi 品系,包含了各细胞信号通路基因、RNA 结合蛋白基因以及重要蛋白复合体的基因。现如今清华大学果蝇中心共存有一万多株转基因 RNAi 的果蝇品系,覆盖了果蝇中的大部分基因,能够满足国内外果蝇研究领域的大部分使用需求。另外,利用实验室最新研发的果蝇中 CRISPR/dCas9 介导的转录激活系统,我们也已经构建了一千余株转基因转录激活果蝇品系。我们将利用新开发的 CRISPR/dCas9 介导的转录激活系统和新一代转基因 RNAi 技术继续扩大清华果蝇中心的品系资源库,努力将清华果蝇中心建成世界上最大、资源最丰富的果蝇资源库,并争取成为国家级模式动物果蝇中心。

参 考 文 献(References)

[1] St Johnston D. Using mutants, knockdowns, and transgenesis to investigate gene function in *Drosophila*. [J]. Wiley Interdiscip Rev Dev Biol, 2013, 2(5): 587 – 613.

[2] Andrew, Bassett AR, Liu JL. CRISPR/Cas9 and genome editing in *Drosophila* [J]. J Genet Genomics, 2014, 41(1): 7 – 19.

[3] Ren X, Sun J, Housden BE, et al. Optimized gene editing technology for *Drosophila melanogaster* using germ line-specific Cas9 [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013, 110(47): 19012 – 19017.

[4] Ren X, Yang Z, Mao D, et al. Performance of the Cas9 nickase system in *Drosophila melanogaster* [J]. G3 (Bethesda, Md.), 2014, 4(10): 1955 – 1962.

[5] Ren X, Yang Z, Xu J, et al. Enhanced specificity and efficiency of the CRISPR/Cas9 system with optimized sgRNA parameters in *Drosophila* [J]. Cell Rep, 2014, 9(3): 1151 – 1162.

[6] Xu J, Ren X, Sun J, et al. A Toolkit of CRISPR-based genome editing systems in *Drosophila* [J]. J Genet Genomics, 2015, 42(4): 141 – 149.

[7] Ren X, Holsteens K, Li H, et al. Genome editing in *Drosophila melanogaster*: from basic genome engineering to the multipurpose CRISPR-Cas9 system. [J]. Sci China Life Sci, 2017, 60(5):

476 – 489.

[8] Brand AH, Perrimon N. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. [J]. Development, 1993, 118(2): 401 – 415.

[9] Lin S, Ewen-Campen B, Ni X, et al. In vivo transcriptional activation using CRISPR/Cas9 in *Drosophila* [J]. Genetics, 2015, 201(2): 433 – 442.

[10] Ewen-Campen B, Yang-Zhou D, Fernandes VR, et al. Optimized strategy for in vivo Cas9-activation in *Drosophila* [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2017, 114(35): 9409 – 9414.

[11] Jia Y, Xu RG, Ren X, et al. Next-generation CRISPR/Cas9 transcriptional activation in *Drosophila* using flySAM [J]. Proc Natl Acad Sci U S A. 2018 (Under review)

[12] Fire A, Xu SQ, Montgomery MK, et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans* [J]. Nature, 1998, 391(6669): 806.

[13] Kennerdell JR, Carthew RW. Heritable gene silencing in *Drosophila* using double-stranded RNA [J]. Nature Biotechnol, 2000, 18(8): 896.

[14] Lam G, Thummel CS. Inducible expression of double-stranded RNA directs specific genetic interference in *Drosophila*. [J]. Curr Biol, 2000, 10(16): 957 – 963.

[15] Ni JQ, Liu LP, Binari R, et al. A *Drosophila* resource of transgenic RNAi lines for neurogenetics [J]. Genetics, 2009, 182(4): 1089.

[16] Ni JQ, Markstein M, Binari R, et al. Vector and parameters for targeted transgenic RNA interference in *Drosophila melanogaster* [J]. Nature Methods, 2008, 5(1): 49 – 51.

[17] Ni JQ, Zhou R, Czech B, et al. A genome-scale shRNA resource for transgenic RNAi in *Drosophila* [J]. Nature Methods, 2011, 8(5): 405 – 407.

[18] 王霞, 乔欢欢, 潘丽霞, 等. 果蝇新品系开发与种质资源保存 [J]. 实验动物科学, 2016, 33(3): 4 – 12.

Wang X, Qiao HH, Pan LX, et al. The standard of *drosophila* strain development and preservation [J]. Lab Animal Sci, 2016, 33(3): 4 – 12.

[收稿日期] 2018 – 06 – 04