

# 利用 CRISPR/Cas9 技术构建斑马鱼 *prkd1* 基因敲除品系

吕丹<sup>1,2</sup>, 陈宇<sup>2</sup>, 谭志霞<sup>1,3</sup>, 李永青<sup>2</sup>, 吴秀山<sup>2</sup>, 江志钢<sup>2</sup>, 叶湘漓<sup>1,2\*</sup>

(1. 湖南师范大学医学院, 中国湖南长沙 410013; 2. 湖南师范大学生命科学学院, 中国湖南长沙 410081; 3. 长沙市第九医院检验科, 中国湖南长沙 410004)

**摘要:** 蛋白激酶 D1 (protein kinase D1, PKD1; 也称作 PRKD1) 是蛋白激酶家族成员之一, 该家族由 3 种结构相关的应激激活酶组成, 可调节机体多种生物学功能, 主要涉及细胞增殖、分化、凋亡、免疫调节、心脏收缩、血管生成和癌症等, 其中 PRKD1 与心脏肥大、收缩和缺血再灌注损伤的底物磷酸化有关。相关研究报道, 先天性心脏病患者存在 *PRKD1* 基因突变, 但其在心脏中的特异性功能和分子机制并未阐明。为了便于后期研究 *PRKD1* 基因在人类早期心脏发育的作用机制, 本文拟利用 CRISPR/Cas9 技术构建斑马鱼 *prkd1* 基因敲除品系。首先, 通过生物信息学网站筛选出两个最佳的基因敲除靶位点, 合成相应靶位点的单链向导 RNA (single guide RNA, sgRNA) 和引物; 然后, 将两个靶位点的 sgRNA 进行体外转录, 并将其与 Cas9 蛋白混合后共同注射到斑马鱼的 1- 细胞期; 最后, 对基因敲除后的 F0、F1、F2 及 F3 代斑马鱼的胚胎和成鱼进行有效性鉴定及表型观察。结果显示, 靶位点附近出现了不同程度的碱基缺失; 成功构建了 F1 代能够稳定遗传的 *prkd1* 基因敲除的 3 个亚系; 与野生型相比, F3 代纯合子胚胎表现出不同程度的心腔膨大、环化异常及心血管线性化等畸形现象。综上所述, 本研究利用 CRISPR/Cas9 技术成功构建了斑马鱼 *prkd1* 基因敲除品系, 为进一步研究该基因在人类心脏发育中的特异性功能提供了有益参考, 并为后期的先天性心脏病筛查和精准医疗提供了重要依据。

**关键词:** *prkd1* 基因; CRISPR/Cas9 技术; 基因敲除; 先天性心脏病(CHD)

中图分类号: Q78

文献标志码: A

文章编号: 1007-7847(2024)01-0018-08

## Construction of the Zebrafish *prkd1* Gene Knockout Model Based on CRISPR/Cas9 Technology

LÜ Dan<sup>1,2</sup>, CHEN Yu<sup>2</sup>, TAN Zhixia<sup>1,3</sup>, LI Yongqing<sup>2</sup>, WU Xiushan<sup>2</sup>,  
JIANG Zhigang<sup>2</sup>, YE Xiangli<sup>1,2\*</sup>

(1. College of Medicine, Hunan Normal University, Changsha 410013, Hunan, China; 2. College of Life Sciences, Hunan Normal University, Changsha 410081, Hunan, China; 3. Department of Clinical Laboratory, the Ninth Hospital of Changsha, Changsha 410004, Hunan, China)

**Abstract:** Protein kinase D1 (PKD1 or PRKD1) is a member of the protein kinase family, which is composed of three structurally related stress-activating enzymes that regulate a variety of biological functions in the body, mainly involving cell proliferation, differentiation, apoptosis, immune regulation, cardiac contraction, angiogenesis, and cancer. In these processes, PRKD1 is associated with substrate phosphorylation of cardiac hypertrophy, systole, and ischemia-reperfusion injury. Relevant studies have reported the presence of *PRKD1* gene mutations in patients with congenital heart disease, but its specific function and molecular mechanism in the heart have not been elucidated. In order to facilitate the study of the mechanism of *PRKD1* gene in

收稿日期: 2023-02-02; 修回日期: 2023-03-10; 网络首发日期: 2024-02-19

基金项目: 湖南省发育生物学与生物育种优势特色学科交叉研究项目(2022XKQ0205); 湖南省教育厅科学研究重点项目(18A028); 湖南省卫生健康委员会重点项目(202201065690); 湖南省普通高等教育教学改革研究项目(HNJG-2020-1286); 湖南师范大学基层教学组织建设项目(202101003015)

作者简介: 吕丹(1994—), 女, 湖南衡阳人, 硕士研究生, 主要从事分子发育遗传学研究; \*通信作者: 叶湘漓(1970—), 男, 湖南长沙人, 教授, 硕士生导师, 主要从事人类心脏发育及其心血管疾病相关基因的筛选及功能研究, E-mail: ye\_xiangli@hunnu.edu.cn

early human heart development, a zebrafish *prkd1* gene knockout line was constructed using CRISPR/Cas9 technology. Firstly, the two optimal gene knockout target sites were screened out through the bioinformatics website, and the single guide RNAs (sgRNAs) and primers of the corresponding target sites were synthesized. Then, the sgRNAs of the two target sites were transcribed *in vitro* and mixed with Cas9 protein and co-injected into the one-cell stage zebrafish embryos. Finally, the zebrafish embryos and adults of the F0, F1, F2 and F3 generations after gene knockout were identified and phenotypically observed. The results showed that there were different base deletions near the target site. Three sublineages of *prkd1* gene knockout that can be stably inherited in the F1 generation were successfully constructed. Compared with the wild type, the F3 homozygous embryos showed different degrees of malformations such as cardiac chamber expansion, abnormal circularization and cardiac tube linearization. In summary, this study demonstrated the successful construction of a zebrafish *prkd1* gene knockout line using CRISPR/Cas9 technology, which lays a groundwork for further studying the specific function of this gene in human heart development and is useful for congenital heart disease screening and precision medicine.

**Key words:** *prkd1* gene; CRISPR/Cas9 technology; gene knockout; congenital heart disease (CHD)

(*Life Science Research*, 2024, 28(1): 018–025)

《中国心血管健康与疾病报告 2021》指出,我国心血管疾病的发病率和致死量占各类疾病的首位,远高于肿瘤和其他疾病<sup>[1]</sup>。造成心血管疾病的原因很多,主要有遗传和环境两大方面,其中遗传占主导因素<sup>[2]</sup>。研究表明,遗传变异是先天性心脏病(congenital heart disease, CHD)发生的主要驱动因素,即先天性心脏病的发病基础可能是调控心血管发育的基因出现突变或表达异常<sup>[3]</sup>。因此我们猜测,上调或下调相关的基因水平是否可以为先天性心脏病的发病机制提供新的见解,并为疾病的诊断与预防开辟新的道路。

蛋白激酶 D1 (protein kinase D1, PKD1; 也称作 PRKD1)是一种丝/苏氨酸蛋白激酶,属于蛋白激酶 D 家族的成员之一,该家族在细胞分化增殖、血管生成及细胞迁移等方面发挥着重要的作用<sup>[4]</sup>。研究发现,PRKD1 基因与心脏肥大、心肌收缩和缺血再灌注损伤的底物磷酸化有关,并且研究人员已在先天性心脏病患者中找到该基因的突变纯合子<sup>[5–6]</sup>。此外,有研究报道,PRKD1 基因介导的信号通路在心血管系统中起着重要作用,尤其是在心肌收缩、心肌肥大和病理性心脏重塑等方面<sup>[7]</sup>,但其具体的调控机制尚不明确。

随着基因组编辑技术的发展,斑马鱼已成为研究心血管疾病合适的脊椎动物模型<sup>[8–10]</sup>。一方面,斑马鱼胚体透明,允许在心脏发育过程中进行无创体内成像,这非常有利于观察斑马鱼心脏发育形成的全过程<sup>[11–12]</sup>。另一方面,斑马鱼的心脏结构比哺乳动物的简单,但负责心脏发育重要步骤的

基因在整个脊椎动物中都是保守的<sup>[13–15]</sup>。因此,斑马鱼作为心脏发育研究的模式生物,有助于解决心血管疾病的发生和转归问题。

成簇规则间隔的短回文重复序列及其相关蛋白 9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeat/CRISPR-associated protein 9, CRISPR/Cas9)是一种在体内外均可进行基因敲除的技术,其简便性引起遗传学研究的广泛关注<sup>[16–17]</sup>。本文基于 CRISPR/Cas9 基因敲除技术拟构建斑马鱼 *prkd1* 基因的敲除模型,为后期探究该基因在心血管疾病中的作用机制及诊疗方法提供参考依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要材料

本实验所用的野生鱼品系为 AB 品系(湖南师范大学心脏发育研究中心养殖)。

主要的试剂耗材: DNA 高保真酶试剂(南京诺唯赞生物科技股份有限公司); DNA 琼脂糖凝胶纯化回收试剂(江苏康为世纪生物科技股份有限公司); T7 体外转录试剂(Promega 公司,美国); True-Cut Cas9 蛋白(ThermoFisher Scientific 公司,美国); *E. coli* DH5 $\alpha$  (北京擎科生物科技股份有限公司); P42250 质粒(又名 pUC57–sgRNA, 由湖南师范大学心脏发育研究中心提供); pMD–18–T 载体(Takara 公司,日本)。

### 1.2 斑马鱼养殖

斑马鱼养殖条件: 水温约 28.5 °C; 光照周期为黑暗 10 h:光照 14 h; pH 6.8~7.5。斑马鱼胚胎

采用标准化养殖模式: 5~7 d 开始喂食草履虫; 7~15 d 采用草履虫和丰年虾混合的方式喂养; 之后转移到循环系统并通过喂食丰年虾的方式养至性成熟, 性成熟后的成鱼用于下一步的繁殖培养工作。

### 1.3 *prkd1* 基因的靶位点设计

通过美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)网站(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)分析斑马鱼 *prkd1* 基因(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/homologene/?term=prkd1>), 该基因位于斑马鱼的 17 号染色体, 共有两个转录本(XM\_021467430.1 和 XM\_005158816.4), 最长有 19 个外显子, 编码 886 个氨基酸。本实验选择该基因的 1 号外显子进行敲除, 遵循了以下规则: 靶位点序列的长度约 20 bp; 前间隔邻近基序(protospacer adjacent motif, PAM)为 NGG 序列(N 为任意碱基); 尽量选择两个靶位点进行敲除, 不要跨越内含子序列<sup>[18]</sup>。

首先, 打开基因敲除网站(<http://crispr.dbcls.jp/>), 按照标准的设计规则, 选取 *prkd1* 基因的一个转录本序列, 将转录本共有的碱基序列复制粘贴到靶位点的分析框内, PAM 序列选择 NGG, 物种选择 zebrafish, 提交后即可得到网站评估结果。然后, 根据网页提供的靶位点以及评分, 选择特异性较高、脱靶可能性较低的靶位点序列作为单链向导 RNA (single guide RNA, sgRNA)。本实验选出的两个靶位点为 *prkd1*-sgRNA-靶位点 1 (CC-TCCGTAATCCGACCGCCGAG)和 *prkd1*-sgRNA-靶位点 2 (AATCCAGATCGGGTTGAGCCGGG)。

### 1.4 引物设计与合成

在设计好的靶位点序列之前加上保护碱基 tg 和 T7 启动子序列, 之后加上 P42250 (pUC57-sgRNA)骨架上游序列作为正向引物, 而骨架的下游序列则为反向引物, 具体序列见表 1。此外, 在

NCBI 网站设计两对鉴定引物(检测到 185 bp 和 212 bp 的对照组条带), 用于后续的有效性检测, 引物的具体信息见表 1。sgRNA 靶位点序列及鉴定引物设计后, 委托北京擎科生物科技股份有限公司合成。

### 1.5 *prkd1* 基因 sgRNA 的体外转录

以 P42250 质粒骨架作为模板, 依照靶位点的引物, 利用 PCR 扩增法合成 Cas9-*prkd1*-sgRNA 的 DNA 产物。DNA 产物纯化回收后, 用 T7 体外转录试剂合成 Cas9-*prkd1*-sgRNA 的 RNA 产物(针对两个靶位点, 后文分别用 *prkd1*-sgRNA1 和 *prkd1*-sgRNA2 表示), 并对其纯化回收。回收的 RNA 需测定浓度后方可用于显微注射工作。

### 1.6 显微注射

将上述纯化回收的 *prkd1*-sgRNA1 和 *prkd1*-sgRNA2 与 Cas9 蛋白按 1 : 1 : 0.7 的比例混合, 共同注射至斑马鱼的 1-细胞期。48 h 后, 检测本次基因敲除的有效性。

### 1.7 *prkd1* 基因敲除后 F0、F1、F2 代的检测

收集 48 h 胚胎并区分野生型对照组(wild type, WT)和敲除实验组(*prkd1* knockout, *prkd1*-KO)。随机挑取 10~12 个胚胎置于 1.5 mL EP 管中, 用碱裂解法提取基因组。将处理后的基因组用作模板, 利用表 1 的鉴定引物进行 PCR 扩增, 其扩增产物利用琼脂糖凝胶电泳(浓度 2.8%)进行检查。将疑似敲除阳性的扩增产物纯化回收, 纯化回收后的片段与 pMD-18-T 载体连接, 之后将连接子加到 *E. coli* DH5 $\alpha$  感受态细胞中进行转化, 再均匀涂布到氨苄培养基上, 于 37 °C 培养箱过夜培养; 次日, 随机挑取单克隆菌落进行扩大培养; 为了保证测序的有效性, 对菌液进行 PCR 扩增和电泳检测, 挑出疑似阳性菌液送至北京擎科生物科技股份有限公司测序。

表 1 *prkd1* 基因敲除靶位点及鉴定引物

Table 1 The *prkd1* knockout target sites and identification primers

Primer	Sequence
<i>prkd1</i> -sgRNA-F1	5'tgTAATACGACTCACTATA <b>CCTCCGGTAATCCGACCGCCGAG</b> GTTTTAGAGCTAGAAATAGC3'
<i>prkd1</i> -sgRNA-F2	5'tgTAATACGACTCACTATA <b>AATCCAGATCGGGTTGAGCCGGG</b> TTTTAGAGCTAGAAATAGC3'
<i>prkd1</i> -sgRNA-R	5'AAGCACCGACTCGGTGCCACT3'
<i>prkd1</i> -identify primer-F1	5'TCCACCAGCGTAATTGTCT3'
<i>prkd1</i> -identify primer-R1	5'GCATGCCATCTCTCGGACTT3'
<i>prkd1</i> -identify primer-F2	5'TGTCCACCAGCGTAATTGT3'
<i>prkd1</i> -identify primer-R2	5'CTGGAACTTCTGGTCCACG3'

注: 加粗序列为基因敲除的靶位点。

Note: The bold sequences are the target sites for gene knockout.

将 *prkd1*-KO 阳性的 F0 代扩大培养 3~4 个月直至性成熟,而后剪取每条鱼的尾鳍单独放到 1.5 mL 的 EP 管中,提取尾鳍的基因组,进行 PCR 扩增和琼脂糖凝胶电泳,筛选 F0 代敲除有效的成鱼。接下来,将 F0 代阳性成鱼与野生型成鱼杂交,产生 F1 代杂合子,继续培育 3~4 个月后进行筛选鉴定。最后,选出有相同碱基缺失的雌雄成鱼进行自交,并检测 F2 代突变纯合子的获得情况。

### 1.8 *prkd1* 基因敲除 F3 代突变纯合子的表型观察

将 F2 代继续自交获得 F3 代纯合子,并对其表型进行观察。区分野生型对照组和敲除纯合子实验组,利用显微镜(Zeiss 公司,德国)对受精后 48 h (48 hours post fertilization, 48 hpf) 的斑马鱼胚胎进行表型观察,将异常的表型(心包水肿及环化异常等)记录并拍照。

## 2 结果

### 2.1 *prkd1* 基因的靶位点确定

*prkd1* 转录本(XM\_021467430.1)共有 19 个外显子,其编码序列全长 2 636 bp,起始密码子 ATG 位于第 1 号外显子上。为了获得最佳的基因敲除效果,采用两个靶位点进行双敲除,其敲除模式见图 1。我们将鉴定引物设计在双靶位点的外围,以检测此次敲除的缺失情况:通过 PCR 克隆 *prkd1* 基因的 sgRNA 产物,琼脂糖凝胶电泳结果显示可见目的条带,这验证了靶位点设计的合理性。

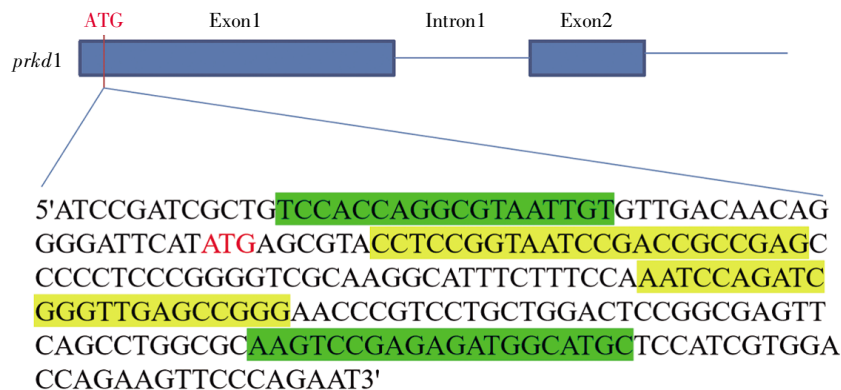


图 1 *prkd1* 基因敲除详细模式图

图示斑马鱼 *prkd1* 基因(XM\_021467430.1)的部分碱基序列。绿色高亮的是 *prkd1* 基因的鉴定引物序列(F1/R1),黄色高亮的是 *prkd1* 基因的两个敲除位点,红色 ATG 是起始密码子。

Fig.1 Detailed pattern map of *prkd1* gene knockout

Partial base sequence diagram of zebrafish *prkd1* gene (XM\_021467430.1) is shown. The detection primer sequences (F1/R1) of the *prkd1* gene are highlighted in green, the two knockout sites of the *prkd1* gene are highlighted in yellow, and the start codon ATG is marked in red.

### 2.2 *prkd1* 基因的 sgRNA 合成

经体外转录和纯化回收后的 sgRNA (*prkd1*-sgRNA1 和 *prkd1*-sgRNA2)的电泳检测结果见图2。由图可知,本实验合成了条带大小约 100 bp 的 *prkd1*-sgRNA,其符合预期所设计的长度大小,可直接用于下一步的显微注射工作。

### 2.3 *prkd1* 基因敲除的有效性鉴定

#### 2.3.1 *prkd1*-KO-F0 代胚胎的有效性检测

对基因敲除的胚胎进行 PCR 扩增,扩增产物的琼脂糖凝胶电泳结果如图 3 所示。已知 WT 条带大小是 185 bp,故 185 bp 附近有新增小条带的样品可能是有效敲除管,不过其确定性需要进一步培养并测序,此处只做初筛(由于后续的脱靶可能性和胚胎鉴定后的不可存活性,此处只粗略判断缺失明显的敲除管,换言之,F0 代的电泳图只判定有无缺失现象,而不做精确的判断)。从图 3 可知,在随机选取的 9 管样品中(每管 10 个胚胎),有 7 管检出有效,其有效率高达 77.8% (7/9),可见实验设计的靶位点较为合理。

为了进一步确定此次的基因敲除是否成功,将上述电泳初步鉴定有效的胚胎进行 DNA 纯化回收,纯化后的 DNA 产物连接到 pMD-18-T 载体(连接子)后,进一步将连接子转化、涂板,随后挑取单克隆菌落扩大培养,并将经 PCR 扩增疑似阳性的菌液进行测序。测序结果如图 4 所示,与原始 WT 的碱基序列相比,所送检菌液的测序结果出现了一定程度的碱基缺失现象且非 3 的倍数,并且缺失位置恰好位于靶位点 1。这说明成功

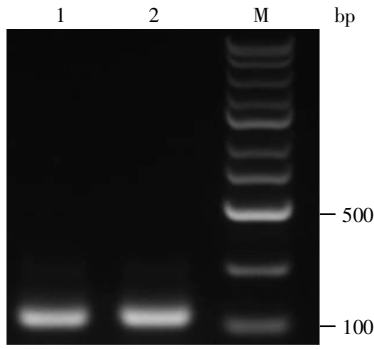


图 2 *prkd1*-sgRNA 体外转录并纯化后的电泳检测图  
泳道 1: 转录并纯化后的 *prkd1*-sgRNA1; 泳道 2: 转录并纯化后的 *prkd1*-sgRNA2; M: DNA 标记。

**Fig.2 Electrophoresis detection of *prkd1*-sgRNA after *in vitro* transcription and purification**

1: Transcribed and purified *prkd1*-sgRNA1; 2: Transcribed and purified *prkd1*-sgRNA2; M: DNA marker.

构建了 F0 代胚胎, 证明此次基因敲除有效。

### 2.3.2 *prkd1*-KO-F1 代敲除阳性个体的获得

将 F0 代有效的成鱼个体与野生型斑马鱼杂交, 获得的 F1 代养殖在不同的鱼缸中, 便于后期的筛选鉴定。由于 F0 代是嵌合体, 并不一定能遗传给后代, 因此得到的 F1 代胚胎需要先进行基

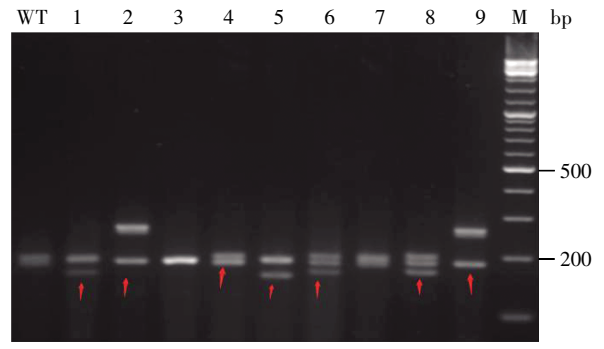


图 3 *prkd1*-KO-F0 代部分斑马鱼胚胎的敲除有效性检查

WT: 野生型对照(条带大小 185 bp); 泳道 1~9: 随机选取的 9 管样品, 每管 10 个胚胎, 红色箭头表示敲除初筛有效; M: DNA 标记。

**Fig.3 Knockout validity check of partial zebrafish embryos of *prkd1*-KO-F0 generation**

WT: Wild-type control (band size 185 bp); 1~9: Randomly selected 9 samples, each containing 10 embryos. The red arrow indicates the effective knockout in the initial screening; M: DNA marker.

因型鉴定; 若敲除有效的 F0 代可以遗传给 F1 代胚胎, F1 代胚胎便可养至性成熟。

待 F1 的斑马鱼胚胎养至性成熟, 我们剪尾

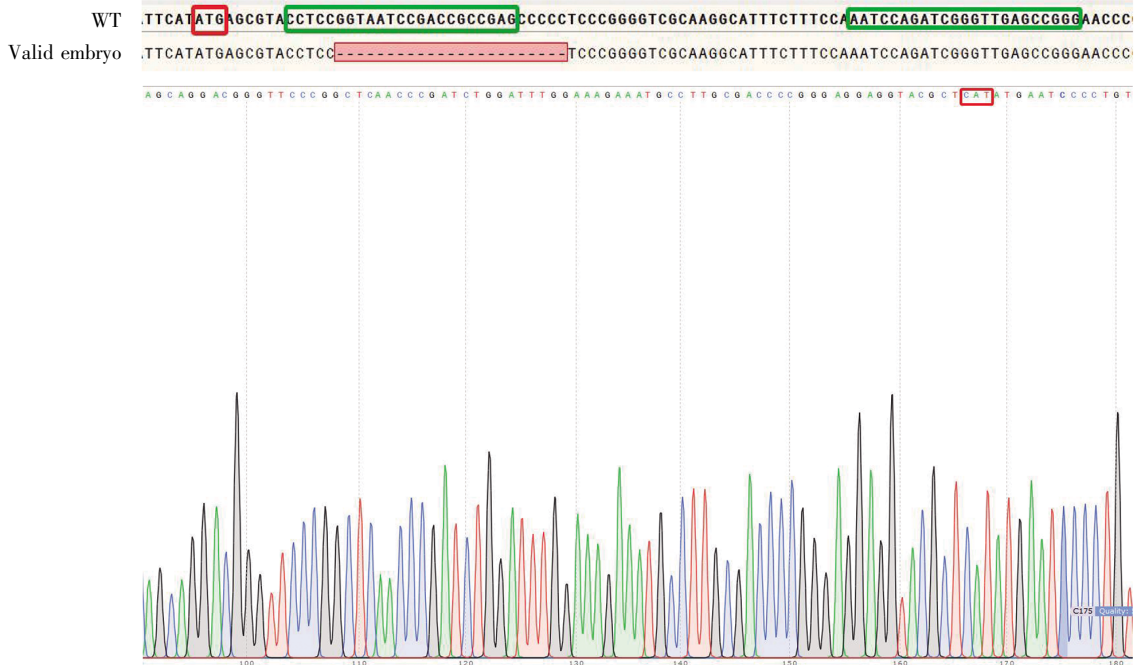


图 4 *prkd1*-KO-F0 代测序结果的比对

WT: 野生型对照; Valid embryo: 有碱基缺失(用红色阴影标示)的胚胎。红色框标示起始密码子; 绿色框标示两个基因敲除位点。测序结果显示, F0 代胚胎在设定的靶位点附近出现了碱基缺失的现象, 证明了此次敲除的有效性。

**Fig.4 Comparison of *prkd1*-KO-F0 generation sequencing results**

WT: Wild-type control; Valid embryo: Embryos with base deletions (marked with red shading). The red box indicates the start codon, and the green boxes indicate the two gene knockout sites. The sequencing results show that the F0 generation embryos have a base deletion near the set target site, proving the effectiveness of the knockout.

鳍进行基因型的鉴定。测序结果(图 5)显示,最终筛选出 3 种敲除突变亚系,即缺失 8 bp ( $prkd1^{\Delta 8}$ )、23 bp ( $prkd1^{\Delta 23}$ )、26 bp ( $prkd1^{\Delta 26}$ )。如图 5 所示, F1 代的 3 个敲除亚系均落在所设计的靶位点附近,且与 F0 代缺失的位置一样,确保了遗传的稳定性。

### 2.3.3 *prkd1*-KO-F2 代突变纯合子的获得

将上文得到的 3 种敲除亚系分别进行扩大培养,并将具有相同碱基缺失的雌雄 F1 代自交。由于生长速度的差异及相同碱基缺失数目雌雄鱼较难获得的特点,本文仅培养了缺失 23 bp 的 F2 雌雄后代。因此,下文的纯合子指的是 *prkd1* 基因缺失 23 bp 的 F2 代突变纯合子。由图 6A 的电泳结果可知,我们成功获得 F2 代纯合子。为了确保 F2 代胚胎的遗传稳定性,我们取斑马鱼的尾鳍进行基因型鉴定,测序结果如图 6B 所示。由

图 6B 可知,所设计的靶位点附近出现了碱基缺失现象,说明本实验成功获得了可稳定遗传的 F2 代纯合子。

### 2.3.4 *prkd1* 基因敲除后的 F3 代纯合子的表型观察

在 48 hpf, 斑马鱼的心室和心房已发育完成,我们可以借助胚体的透明性研究斑马鱼的早期心脏发育。前期研究表明, *prkd1* 基因在 24 hpf 和 48 hpf 高度表达<sup>[9]</sup>; 因此,我们选取缺失 23 bp 的 F3 代纯合子胚胎进行表型观察。

由图 7 可知,与野生型对照相比, F3 代  $prkd1^{-/-}$  突变纯合子的表型存在较为明显的差异,胚胎表现出整体的严重畸形,如围心腔膨大、环化异常、心血管线性化和体轴弯曲等,这提示 *prkd1* 基因的敲除会影响到斑马鱼的早期心脏发育。

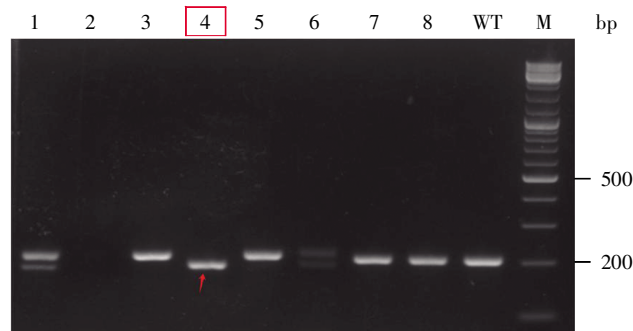


图 5 *prkd1*-KO-F1 代 3 种缺失亚系的测序结果

WT: 野生型对照;  $prkd1^{\Delta 8}$ 、 $prkd1^{\Delta 23}$  和  $prkd1^{\Delta 26}$ : *prkd1* 基因缺失 8 bp、23 bp、26 bp 的 F1 代。

### Fig.5 Sequencing results of three deletion sublines of *prkd1*-KO-F1 generation

WT: Wild-type control;  $prkd1^{\Delta 8}$ ,  $prkd1^{\Delta 23}$  and  $prkd1^{\Delta 26}$ : F1 generation embryos with 8 bp, 23 bp and 26 bp deletions, respectively, in the *prkd1* gene.



(A)



(B)

图 6 *prkd1*-KO-F2 代突变纯合子的电泳检测结果及测序结果

(A) F2 代纯合子的电泳检测图。泳道 1~8 是随机选取的 8 个 F2 代胚胎,其中泳道 1、6 是杂合子,泳道 4 是纯合子; (B) F2 代纯合子的测序结果比对。WT: 野生型对照; M: DNA 标记;  $prkd1^{-/-}$ : *prkd1* 基因缺失 23 bp 的 F2 代突变纯合子。

### Fig.6 Electrophoresis and sequencing results of *prkd1*-KO-F2 mutant homozygotes

(A) Electrophoresis plot of F2 homozygotes. Lanes 1~8 are randomly selected eight F2 embryos, in which lanes 1 and 6 are heterozygous, and lane 4 is homozygous; (B) Comparison of sequencing results of F2 homozygotes. WT: Wild-type control; M: DNA marker;  $prkd1^{-/-}$ : F2 mutant homozygote with a 23 bp deletion in the *prkd1* gene.

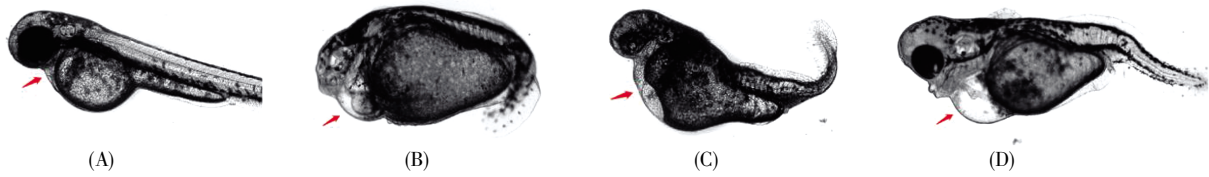


图7 *prkd1* 基因敲除后的 F3 代突变纯合子的表型观察

(A) 野生型对照; (B~D) F3 代 *prkd1*<sup>-/-</sup> 纯合子。红色箭头指向心脏的位置。

Fig.7 Phenotypes of F3 mutant homozygotes after *prkd1* gene knockout

(A) Wild-type control; (B~D) F3 *prkd1*<sup>-/-</sup> homozygotes. The red arrow points to the location of the heart.

### 3 讨论

心脏是胚胎发育过程中第一个形成并发挥功能的器官,其形态发生涉及多个遗传基因和信号通路<sup>[20]</sup>。研究人员借助分子遗传学的方法(全外显子测序及单细胞 RNA 测序)筛选与心脏发育有关联的新基因,再利用反向遗传学的方式在模式生物中敲除和验证新基因,进而推测并研究新基因是如何影响人类早期心脏发育的<sup>[21]</sup>。

PRKD1 是蛋白激酶家族成员之一,该家族由 3 种结构相关的应激激活酶组成,参与心脏收缩、血管生成、细胞增殖和凋亡、癌症发生以及免疫调节等过程<sup>[22-23]</sup>。有研究显示,PRKD1 基因的新型常染色体隐性剪接变异体与先天性心脏病有关,在疾病个体可找到该基因的纯合突变体,提示该基因的丧失突变体可能会干扰正常的心脏形态发生,导致永存动脉干、圆锥形心脏缺陷等疾病<sup>[24-25]</sup>。此外, Sifrim 等<sup>[26]</sup>在先天性外胚层发育不良患者中查到 PRKD1 基因的错义突变体。以上研究结果均基于临床案例并经测序得到,提示 PRKD1 基因与先天性心脏病具有密切的联系,但该基因在人类早期心脏发育的具体机制尚不清楚。

前期的研究发现,小鼠 *Prkd1* 基因的全敲除导致胚胎无法存活,在小鼠中无法追溯该基因纯合子心脏表型的变化<sup>[27]</sup>。而斑马鱼因胚胎透明且具有可体外操作性,成为心脏表型观察的首选生物。最重要的是,斑马鱼胚胎可以在离体的情况下,靠水的被动扩散来获取氧气从而存活数天,这与鼠类等哺乳动物的胚胎有着明显的区别,是研究早期心脏发育的绝佳模式生物。

本文拟利用 CRISPR/Cas9 技术对斑马鱼 *prkd1* 基因进行敲除,构建斑马鱼 *prkd1* 基因敲除品系。首先,在生物信息学网站综合分析 *prkd1* 基因的特征;其次,在 1 号外显子选择两个合适位点进行敲除设计;再次,在显微注射 48 h 后采用电泳

和测序比对的方式验证敲除的有效性;最后,利用显微镜对 F3 代 *prkd1*<sup>-/-</sup> 突变纯合子的表型进行观察。

我们在构建品系的过程中发现, F0 代和野生型杂交后,其后代出现一部分心脏畸形的胚胎。将这些胚胎挑选并分缸养殖,我们发现畸形胚胎大部分是 *prkd1* 基因敲除后的杂合突变体。进一步将 F1 代 *prkd1*<sup>+/-</sup> 杂合子进行自交, F2 代胚胎的检测结果显示,自交后代存在突变纯合子,这与小鼠<sup>[27]</sup>的敲除情况明显不同(小鼠 *Prkd1* 基因敲除纯合会致死),正好弥补了小鼠该基因突变纯合子无法开展表型研究的缺憾;同时,我们推测斑马鱼胚胎在发育的早期可能通过被动扩散来获取氧气,而非完全依赖于心血管系统来实现供氧需求,因为即便是心血管损伤严重的斑马鱼,其胚胎仍能继续存活;此外,这种现象也表明了不同物种对该基因敲除后的反应存在差异性。

需要指出的是,到了 F2 代成鱼阶段, WT: *prkd1*<sup>+/-</sup>:*prkd1*<sup>-/-</sup> 的比例并非是典型的 1:2:1,与孟德尔遗传定律有些许出入。*prkd1*<sup>-/-</sup> 纯合子在生长发育过程中存在部分致死的情况,提示该基因的敲除可能会影响斑马鱼的生存状态。不仅如此,繁殖到 F3 代时,纯合子胚胎的繁殖数目相比于对照组明显减少;另外,在相同条件下,其生长周期明显变长,且成鱼的存活数目较少。基于此,我们推测该基因的敲除可能影响了斑马鱼的繁殖力和生长调控功能,进而可能影响正常心脏的结构和功能。

由于斑马鱼的胚胎具有透明性,便于追溯纯合子的表型变化;而且,斑马鱼胚胎的心脏在 48 hpf 发育完成,此时其早期的心脏结构易于观察。因此,我们利用体式显微镜对 48 hpf *prkd1*<sup>-/-</sup> 纯合子进行了表型观察。结果显示,与野生型对照相比, *prkd1* 基因的 F3 代突变纯合子的表型存在较为明显的差异,表现出心包肿大、环化异常、心血管线

性化且伴有体轴弯曲等,这与前期的研究<sup>[28]</sup>类似,提示 *prkd1* 基因的敲除可能会影响斑马鱼的早期心脏发育,该基因可能参与后期心血管疾病的发生和发展进程。此外,我们也推测在 *prkd1* 基因敲除后,斑马鱼心脏发育相关基因可能出现异常的 RNA 剪接现象,造成某些重要的基因无法正常转录和翻译,继而影响了正常的心脏发育。在后期的研究中,我们可以合成 *prkd1* 基因的 mRNA,用过表达的方式拯救该基因敲除后斑马鱼所出现的表型变化,再通过 qRT-PCR 和 Western-blot 等方式对该基因的表达量进行精准定量。此外,我们还可以从基因的相互作用方面去探索 *prkd1* 的上下游靶基因,以挖掘更多重要基因及信号通路,从而阐明先天性心脏病的发病机制。

总之,本文利用 CRISPR/Cas9 技术从基因水平上成功敲除了斑马鱼 *prkd1* 基因,构建了该基因的稳定遗传敲除品系,并初步分析了该基因 F3 代纯合子的表型变化,验证了 *prkd1* 基因对斑马鱼早期心脏发育的影响,为进一步探讨人类 *PRKD1* 基因在心脏发育中的功能提供了重要依据。

### 参考文献(References):

- [1] 中国心血管健康与疾病报告编写组. 中国心血管健康与疾病报告 2021 概要[J]. 中国循环杂志(The Writing Committee of the Report on Cardiovascular Health and Diseases in China. Report on cardiovascular health and diseases in China 2021: an updated summary[J]. Chinese Circulation Journal), 2022, 37(6): 553-578.
- [2] KAMINSKY L A, GERMAN C, IMBODEN M, *et al.* The importance of healthy lifestyle behaviors in the prevention of cardiovascular disease[J]. Progress in Cardiovascular Diseases, 2022, 70: 8-15.
- [3] GONZALEZ-TERAN B, PITTMAN M, FELIX F, *et al.* Transcription factor protein interactomes reveal genetic determinants in heart disease[J]. Cell, 2022, 185(5): 794-814.e30.
- [4] YOUSSEF I, RICORT J M. Deciphering the role of protein kinase D1 (PKD1) in cellular proliferation[J]. Molecular Cancer Research, 2019, 17(10): 1961-1974.
- [5] ALTER S, ZIMMER A D, PARK M, *et al.* Telangiectasia-ectodermal dysplasia-brachydactyly-cardiac anomaly syndrome is caused by *de novo* mutations in *protein kinase D1*[J]. Journal of Medical Genetics, 2021, 58(6): 415-421.
- [6] MASSADEH S, ALBELADI M, ALBESHER N, *et al.* Novel autosomal recessive splice-altering variant in *PRKD1* is associated with congenital heart disease[J]. Genes, 2021, 12(5): 612.
- [7] ALGHAITH F A, ARTS H H, PLOURDE F J, *et al.* Increased intracranial pressure in a patient with congenital heart defect and ectodermal dysplasia (CHDED): extension of phenotype and review of literature[J]. American Journal of Medical Genetics Part A, 2023, 191(2): 554-558.
- [8] YALCIN H C, AMINDARI A, BUTCHER J T, *et al.* Heart function and hemodynamic analysis for zebrafish embryos[J]. Developmental Dynamics, 2017, 246(11): 868-880.
- [9] GUT P, REISCHAUER S, STAINIER D Y R, *et al.* Little fish, big data: zebrafish as a model for cardiovascular and metabolic disease[J]. Physiological Reviews, 2017, 97(3): 889-938.
- [10] TANG P W H, WU P H, LIN Y T, *et al.* Zebrafish model-based assessment of indoxyl sulfate-induced oxidative stress and its impact on renal and cardiac development[J]. Antioxidants, 2022, 11(2): 400.
- [11] BOWLEY G, KUGLER E, WILKINSON R, *et al.* Zebrafish as a tractable model of human cardiovascular disease[J]. British Journal of Pharmacology, 2022, 179(5): 900-917.
- [12] BOURNELE D, BEIS D. Zebrafish models of cardiovascular disease[J]. Heart Failure Reviews, 2016, 21(6): 803-813.
- [13] GIARDOGLOU P, BEIS D. On zebrafish disease models and matters of the heart[J]. Biomedicine, 2019, 7(1): 15.
- [14] MULLINS M C, NAVAJAS ACEDO J, PRIYA R, *et al.* The zebrafish issue: 25 years on[J]. Development, 2021, 148(24): dev200343.
- [15] LEBEDEVA L, ZHUMABAYEVA B, GEBAUER T, *et al.* Zebrafish (*Danio rerio*) as a model for understanding the process of caudal fin regeneration[J]. Zebrafish, 2020, 17(6): 359-372.
- [16] SHARMA G, SHARMA A R, BHATTACHARYA M, *et al.* CRISPR-Cas9: a preclinical and clinical perspective for the treatment of human diseases[J]. Molecular Therapy, 2021, 29(2): 571-586.
- [17] ZHU Y M. Advances in CRISPR/Cas9[J]. BioMed Research International, 2022, 2022: 9978571.
- [18] MANGHWAR H, LI B, DING X, *et al.* CRISPR/Cas systems in genome editing: methodologies and tools for sgRNA design, off-target evaluation, and strategies to mitigate off-target effects[J]. Advanced Science, 2020, 7(6): 1902312.
- [19] HOLLENBACH M, STOLL S J, JÖRGENS K, *et al.* Different regulation of physiological and tumor angiogenesis in zebrafish by protein kinase D1 (PKD1)[J]. PLoS One, 2013, 8(7): e68033.
- [20] 吴秀山. 心脏发育概论[M]. 北京: 科学出版社(WU Xiushan. Introduction to Cardiac Development[M]. Beijing: Science Press), 2006: 216-230.
- [21] KEMMLER C L, RIEMSLAGH F W, MORAN H R, *et al.* From stripes to a beating heart: early cardiac development in zebrafish[J]. Journal of Cardiovascular Development and Disease, 2021, 8(2): 17.
- [22] FIELTIZ J, KIM M S, SHELTON J M, *et al.* Requirement of protein kinase D1 for pathological cardiac remodeling[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of USA, 2008, 105(8): 3059-3063.
- [23] GUO J F, GERTSBERG Z, OZGEN N, *et al.* Protein kinase D isoforms are activated in an agonist-specific manner in cardiomyocytes[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2011, 286(8): 6500-6509.
- [24] STEINBERG S F. Decoding the cardiac actions of protein kinase D isoforms[J]. Molecular Pharmacology, 2021, 100(6): 558-567.
- [25] GHOSH T K, APARICIO-SÁNCHEZ J J, BUXTON S, *et al.* HDAC4 and 5 repression of *TBX5* is relieved by protein kinase D1[J]. Scientific Reports, 2019, 9: 17992.
- [26] SIFRIM A, HITZ M P, WILSDON A, *et al.* Distinct genetic architectures for syndromic and nonsyndromic congenital heart defects identified by exome sequencing[J]. Nature Genetics, 2016, 48(9): 1060-1065.
- [27] SHAHEEN R, AL HASHEM A, ALGHAMDI M H, *et al.* Positional mapping of *PRKD1*, *NRP1* and *PRDM1* as novel candidate disease genes in truncus arteriosus[J]. Journal of Medical Genetics, 2015, 52(5): 322-329.
- [28] 李韵璇, 陈宇, 吴锦秋, 等. 斑马鱼 *prkd1* 基因在心脏早期发育过程中的作用研究[J]. 生命科学研究(LI Yunxuan, CHEN Yu, WU Jinqiu, *et al.* Role of the *prkd1* gene in early cardiac development in zebrafish[J]. Life Science Research), 2023, 27(2): 95-103, 113.