



# 貴州大學

## 本科毕业论文

论文题目：

在果蝇中利用CRISPR-Cas9技术得到*Gar1*功能缺失突变体

学 院：生命科学学院

专 业：生物科学

班 级：生物科学141班

学 号：1400110106

学生姓名：刘畅

指导教师：田嫻

2018年 6 月 1 日

## 贵州大学本科毕业论文（设计） 诚信责任书

本人郑重声明：本人所呈交的毕业论文（设计），是在导师的指导下独立进行研究所完成。毕业论文（设计）中凡引用他人已经发表或未发表的成果、数据、观点等，均已明确注明出处。特此声明。

论文（设计）作者签名：\_\_\_\_\_

日期：\_\_\_\_\_



## 目录

摘要 .....	I
关键词: CRISPR/CAS9, 果蝇, GAR1 .....	II
ABSTRACT .....	II
KEY WORDS: CRISPR/CAS9, DROSOPHILA, GAR1 .....	III
1.引言 .....	I
1.1目的基因的选取 .....	I
1.2CRISPR/Cas9系统的发现和发展: .....	I
1.3 CRISPR/Cas9系统的结构和原理 .....	II
1.4 CRISPR/Cas9系统在果蝇中的研究 .....	III
2.实验材料和方法 .....	VI
2.1实验材料 .....	VI
2.1.1构建载体所需引物 .....	VI
2.1.2所用载体 .....	VI
2.1.3实验所用果蝇株系 .....	VI
2.2实验方法 .....	VII
2.2.1果蝇饲养方法 .....	VII
2.2.2 使用DRSC查找规律性重复短回文序列簇并设计gRNA .....	VII
2.2.3第一步克隆, 将gRNA连入载体PMD18T-U63-BsmBI .....	VIII
2.2.4 PCR给gRNA加Adaptor序列及Golden-gate组装 .....	X
2.2.5通过LR反应将所需片段构建至质粒 (pUAST-attB) 中 .....	XII
2.2.6 转基因果蝇的检验 .....	XIII
3. 实验结果与分析 .....	XV
3.1 gRNA引物的设计 .....	XV
3.2 第一步克隆的检验 .....	XV
3.3 第二步克隆结果检验 .....	XVIII
3.4 最终克隆的GATEWAY载体检验测序 .....	XX
3.5 转基因果蝇鉴定 .....	XXI
4. 结论和讨论 .....	XXII
4.1 结论 .....	XXII
4.2 讨论 .....	XXII
4.2.1 利用Cas9技术敲除果蝇的杂交策略 .....	XXII
4.2.2多次聚合酶链式反应后产物检测不理想 .....	XXIII
4.2.3展望 .....	XXIV
5.参考文献 .....	XXV
6.致谢 .....	XXVI
7.附录 .....	XXVII
附录一 转基因质粒含GRNA部分序列 .....	XXVII
附录二 转基因质粒序列与参考序列比对 .....	XXVII

# 在果蝇中利用CRISPR-Cas9技术得到*Gar1*功能缺失突变体

## 摘要

自2009年CRISPR/Cas9诞生以来, 其因高效性与简单性等优点而被作为新一代基因编辑工具广泛应用于酵母、斑马鱼、小鼠、果蝇等模式生物。在前人的实验中发现, 果蝇*dGar1*的RNAi突变体表现出明显的异位脂肪累积特征, 而同属*Gar1*家族的



*CG10341*在核心区域与*Gar1*高度同源。果蝇基因*CG10341*编码H/ACA核糖核蛋白复合物的非核心亚基，因此得到基因*CG10341*片段缺失的果蝇将有助于研究*Gar1*在果蝇脂肪代谢的作用，甚至为异位脂肪累积的形成提供依据。为此我们应用CRISPR/Csa9技术，设计了两段gRNA来同时敲除目的基因*CG10341*的两个外显子，以达到目的基因大段缺失这一目的。通过三步克隆构建转基因质粒，并将其注射进果蝇体内以便能够得到表达两段gRNA的转基因果蝇。拟用该转基因果蝇与表达Cas9蛋白的果蝇株系杂交得到*Gar1*功能缺失突变体。

**关键词：** CRISPR/Cas9, 果蝇, *Gar1*

## Use the CRISPR-Cas9 technology to obtain *Gar1* loss-of-function mutants in *Drosophila*

### Abstract

Because of its high efficiency and simplicity, since 2009, CRISPR/Cas9 as a new tool for gene editing was widely used in yeast, zebrafish, mice, fruit flies, and other organisms. In previous experiments, it was found that the *dGar1 RNAi* mutant showed significant ectopic fat accumulation in *Drosophila*. The *Drosophila* gene *CG10341* encodes the non-core subunit of the H/ACA ribonucleoprotein complex. *CG10341* and *Gar1* are highly homologous in the core region and belong to the *Gar1* family. The fruit flies that lack the gene *CG10341* fragment will help to study the effect of *Gar1* on lipid metabolism in *Drosophila*, and even provide evidence for the formation of ectopic fat accumulation. To this end, we designed two gRNAs which targeted the two exons of *CG10341*, in order to induce large fragment deletion.



The transgenic plasmid was successfully constructed by three-step cloning and then was injected into the fruit fly to obtain transgenic flies which expressing two gRNAs. It is proposed to cross the transgenic gRNA *flies* to the Cas9 flies to obtain *Gar1* loss-of-function mutants.

**Key words:** CRISPR/Cas9, *Drosophila*, *Gar1*





## 1.引言

### 1.1目的基因的选取

H/ACA小核仁核糖核蛋白颗粒（snoRNP）是通过指导RNA指定修饰位点的RNA假尿苷合酶家族。这些H/ACA snoRNP的功能对于核糖体的生物合成，前体mRNA（pre-mRNAs）的剪接，端粒的维持以及可能用于另外的细胞过程<sup>[1]</sup>。所有H/ACA RNP都含有特定的RNA组分（snoRNA或scaRNA），并且至少有四种蛋白质与所有这些颗粒共有：*Cbf5*，*Gar1*，*Nhp2*和*Nop10*。这些蛋白质在酵母到哺乳动物中都高度保守，同时同源物也存在于古菌中<sup>[2]</sup>。H/ACA蛋白复合物含有由*Cbf5*和*Nop10*组成的稳定核心，*Gar1*和*Nhp2*随后与之结合<sup>[3]</sup>。*Naf1*是盒式H/ACA snoRNPs复合物和核糖体生物合成成熟所需的RNA结合蛋白。在组装H/ACA snoRNPs复合物时，它与复合物结合，在复合物成熟过程中消失并被*Gar1*取代产生成熟的H/ACA snoRNPs复合物<sup>[4]</sup>。

在本实验室之前的研究试验中发现果蝇中的*CG10341*基因负责编码的*Gar1*在其RNAi的突变体中也出现了异位脂肪体积累。推测该基因与果蝇内脂代谢调控有关。通过敲除该基因，得到*Gar1*功能缺失的突变体，便于进一步研究该基因在脂肪代谢调控中的作用。

### 1.2CRISPR/Cas9系统的发现和发展：

CRISPR存在于古细菌和细菌中，是避免外来基因片段（如病毒，质粒）入侵的防御机制。日本学者Ishino等人首次在大肠杆菌中发现负责碱性磷酸酶同工酶转换的*iap*基因附近发现存在一段重复序列。这段序列包括五段高度同源的序列和一段回文结构。当时并不清楚该序列的作用，仅推测有稳定mRNA的功能<sup>[5]</sup>。在2002年，该段序列被正式命名为规律性重复短回文序列簇（Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/CRISPR-associated (Cas) systems）<sup>[6]</sup>。Martin Jinek等人首次将CRISPR/Cas技术用于基因编辑，通过crRNA与tracrRNA结合形成双链RNA引导CRISPR结合蛋白Cas9在目标DNA处产生双链断裂（double-strand breaks）<sup>[7]</sup>。尔后CRISPR/Cas系统作为新兴的基因定点编辑技术的各类应用逐渐成熟并在多种动植物中成功应用。



基于基因序列和免疫机制，CRISPR/Cas系统开始被分为三类，I型存在于古细菌和细菌中，II型仅存在于细菌中，III型主要存在于古细菌中<sup>[8]</sup>。在这三类CRISPR/Cas系统中，II型仅需要Cas9蛋白作用切割DNA双链，因此，II型CRISPR/Cas系统以其相对简洁的操作被更为广泛的运用。Cho, Dicarlo等多个实验室在培养的哺乳动物细胞和人类干细胞中用二元II型CRISPR/Cas系统成功产生双链断裂，其中斑马鱼和小鼠所产生的嵌合体表明CRISPR/Cas9系统在真核生物中用于操纵基因组的普遍性。2013年，Scott J. Gratz等人首次将CRISPR/Cas9系统运用于果蝇当中，成功实现了目标位点的双链断裂，目标基因的敲除和Cas9蛋白介导的同源重组（HR）<sup>[9]</sup>，开启了果蝇基因编辑的新纪元。

### 1.3 CRISPR/Cas9系统的结构和原理

II型CRISPR/Cas系统主要包含一个与CRISPR结合的核酸内切酶即Cas9和两个小分子RNA形成的复合物。该复合物由CRISPR RNA(crRNA)和转录激活CRISPR RNA(tracrRNA)组成（图1.1）。S. pyogenes系统通过形成包含crRNA和tracrRNA的嵌合RNA(gRNA)将该系统简化为二元系统<sup>[7]</sup>。

电子显微镜和X射线晶体学确定的Cas9的分子结构表明，Cas9蛋白在与guide RNA结合后发生的构象重排，与靶双链DNA结合时进一步变化。这种改变产生了一个通道，在蛋白质的两个结构域之间运行，联通RNA-DNA杂交体和同向堆叠的双链RNA结构即crRNArepeat-tracrRNAantirepeat互作结构<sup>[10;11]</sup>。Cas9的构象变化可能是靶向dsDNA解旋和引导RNA链侵入的机制的一部分，尽管这个想法仍有待测试。机制研究还表明，PAM对初始DNA结合至关重要，在没有PAM的情况下，甚至与指导RNA序列完全互补的靶序列也不能被Cas9识别<sup>[12]</sup>。Cas9的C-末端结构域中的精氨酸基序与大沟内非互补链上的PAM相互作用。目标DNA链中+1位的磷酸二酯基团与双链PAM的小沟相互作用，可能导致局部链分离，即所谓的R环，位于PAM上游<sup>[13]</sup>。



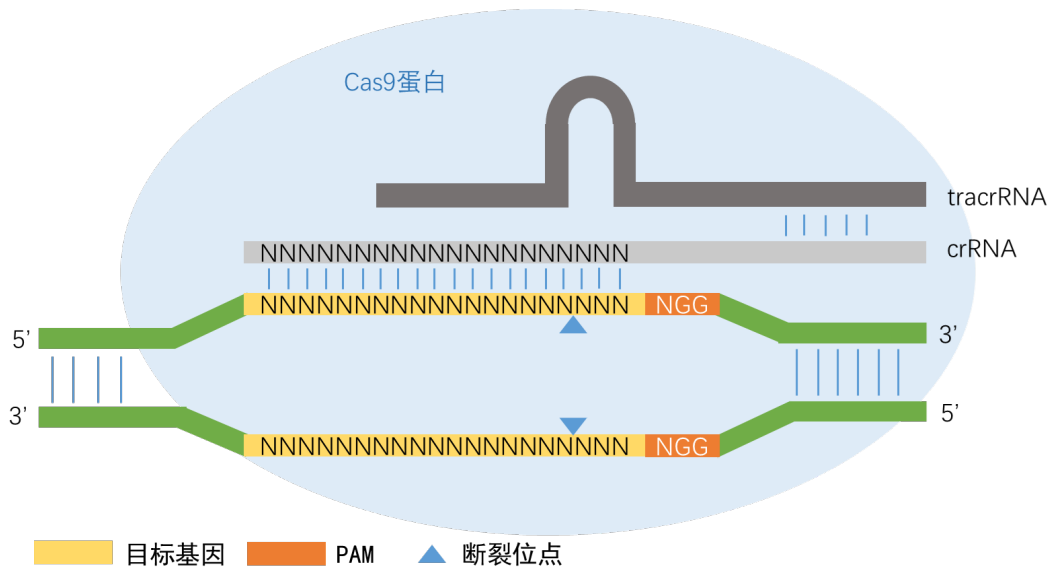


图1.1 CRISPR-CAS9的作用机理。深灰色链为tracrRNA，浅灰色链为crRNA，黄色部分为gRNA识别的目标RNA序列，橙色部分为PAM序列，蓝色三角形为断裂位点，浅蓝色椭圆为Cas9蛋白，图片改编自<sup>[14]</sup>。

尽管CRISPR/Cas9系统的基础机制尚未完全阐明，但大致分为三个阶段：适应，表达和干扰。在适应过程中，外源DNA中的间隔基因被整合到宿主基因组CRISPR基因座5'末端的两个重复序列之间<sup>[15]</sup>。CRISPR基因位点中的间隔序列记录了从5'到3'的顺序的外源基因物质。表达包括两个步骤：在第一步中，CRISPR转录并产生前体非编码RNA（前体crRNA，precrRNA），并且在第二步中，长链前体crRNA被加工成短链crRNA，其中每个都含有转录间隔区和部分重复序列。当crRNA与Cas蛋白结合时，会形成核糖核蛋白（RNP）复合物。gRNA的5'端识别前间区序列临近基序（PAM）前20nt长度的目标序列，与目标序列通过碱基互补配对，3'端结合Cas9核酸酶。在最后阶段干涉中，与Cas蛋白结合的crRNA和tracrRNA的二元复合物识别特定基因座并切割双链DNA，产生DNA双链断裂<sup>[16]</sup>。

#### 1.4 CRISPR/Cas9系统在果蝇中的研究

果蝇以其易培养、增代时间短、繁殖能力强、染色体数量较少等优势作为真核生物中的模式生物，广泛的用于遗传学和发育生物学的研究。美国人类基因组研究所于2000年3月对果蝇和人类基因组进行了比较研究，估计约有60%的基因在这两个物种间保守。约75%的已知人类疾病基因在果蝇基因组中具备可识别的匹配，并且50%的蝇

类蛋白质序列具备哺乳动物同源物。研究果蝇体内的基因有助于理解包括人类在内的其他真核生物基因的表达调控<sup>[17]</sup>。CRISPR/Cas9系统在果蝇中的应用不断成熟，与各类基因编辑技术相融合，使其适用范围更加宽泛。CRISPR/Cas9的效率也因为方法不同基因不同而产生较大的差距。

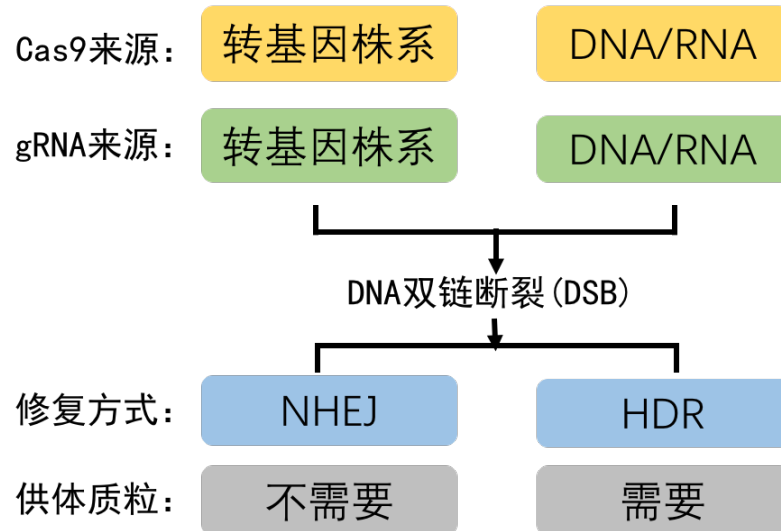


图1.2 CRISPR/Cas9 技术流程图

果蝇中常见CRISPR/Cas9技术流程如图1.2所示。使用转基因果蝇提供gRNA和Cas9用于基因编辑非常高效，Shu Kondo 等人用表达Cas9蛋白的转基因果蝇株系和转录目的gRNA的转基因果蝇株系杂交，敲除*white* locus中的外显子，子代中产生突变的个体高达60%<sup>[18]</sup>。虽然此方法效率较高，稳定的转基因株系的获得往往需要两代以上，较为耗时。直接注射DNA和RNA较为方便快捷，DNA易制得，稳定性高，RNA效率高但相对不稳定。在产生DNA双链断裂后，可通过NHEJ和HDR两种方式进行修复，NHEJ通常产生不准确的小片段基因的插入和缺失，HDR用于相对准确的目标位点的插入、删除和替换（图1.3）<sup>[19]</sup>。在HDR中，用dsDNA作为供体质粒可产生大片段的插入。在实验中发现，Cas9核酸酶对于HDR和NHEJ两种修复方式的效率都有促进作用<sup>[20; 21]</sup>。

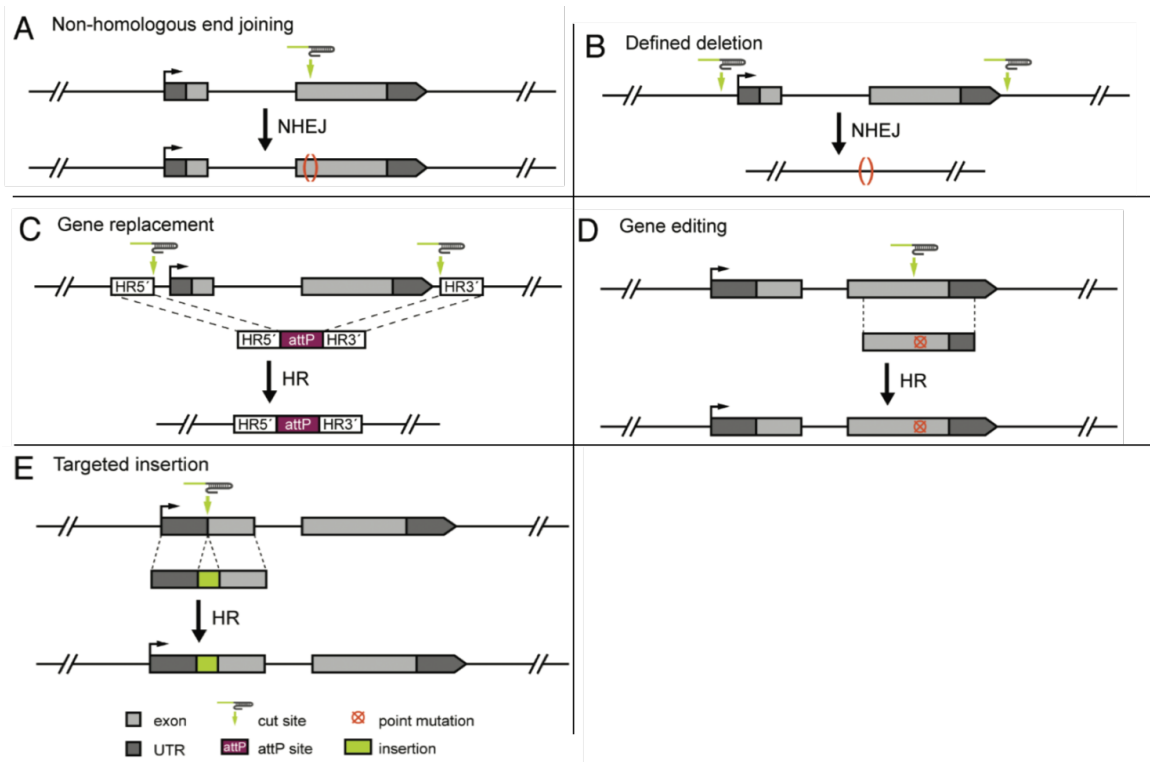


图1.3 CRISPR/Cas技术的应用。(A) 非同源性末端接合：通过单个gRNA产生DSB，NHEJ的修复方式，使目标位点产生小片段缺失或插入；(B) 定位删除：通过两个gRNA产生DSB，用NHEJ的修复方式，敲除两个位点间大段基因片段；(C) 基因替换：通过两个gRNA产生DSB，使用外源供体质粒，供体两端为与目标DNA互补的序列，通过HR的修复方式，将目的基因进行替换；(D) 基因编辑：Cas9介导的HR可用于在目标位点产生点突变，在该实例中，在待突变的序列附近选择靶位点，并通过供体模板引入新的序列，所述供体模板包含侧翼为与靶区域同源的序列的修饰；(E) 在目标位点插入序列：包括荧光分子和表位标签的外源序列的插入可以通过HR掺入到靶基因座中。引用自<sup>[19]</sup>

基于CRISPR的基因组工程的快速发展产生了更具体的应用，包括CRISPRi

(CRISPR干涉)和CRISPRa (CRISPR激活)<sup>[22]</sup>。结合TALENs，另一种用于基因编辑的人工核酸酶，其应用范围正在扩大。II型CRISPR/Cas系统是由于其成分简单，操作简单，突变效率高而成为发展最快的定向基因编辑技术，正在研究和应用于各种生物体中。尽管由于需要原型间隔区相邻基序 (PAM) 而存在限制，使得该系统无法编辑所有目标基因座，但越来越多的证据表明，PAM所需的特定序列在不同的细菌中是不同的<sup>[23]</sup>。这意味着有可能适应不同的目标基因座，给系统提供更广泛的应用范围。

更多关于CRISPR/Cas9作用机制的基础研究已经展开，对于其机制的理解有助于解决CRISPR在不同物种间差距巨大的效率问题，便于寻找更为方便的筛查突变的方法。使其更方便的运用于果蝇基因组编辑。



综上，CRISPR/Cas9作为一项较新的技术，有着高效率，操作简便等优势，也有目标位点限定等诸多劣势待改进。作为模式生物的果蝇为该技术的应用奠定了基础，该技术的发展也为果蝇的研究注入新的动力。

## 2.实验材料和方法

### 2.1实验材料

#### 2.1.1构建载体所需引物

构建载体所用引物如表2.1所示：

表2.1引物序列

引物名称	引物序列（5' to 3'）
BsaI-U63-F1	ATGCggtctcCTGACGCTCACCTGTGATTGCTC
BsaI-gRNA-R1	ATGCggtctcGTAATAAAAAAAGCACCGACTCGGTGC
BsaI-U63-F2	ATGCggtctcAATTAAGTCTGTCTTTCCCCTTTCCGCTCACCT GTGATTGCTC
BsaI-gRNA-R4	ATGCggtctcGGAGTAAAAAAAGCACCGACTCGGTGC
18T通用R	TGAGTTAGCTCACTCATTAGGCA
TOPO 通用 R	CGAAGTCGAGGCATTTCTGT
Gatewaych-R	CGTCTACGGAGCGACAATTC

#### 2.1.2所用载体

构建转基因质粒所用载体如表2.2所示：

表2.2载体列表

载体名称	抗性	作用
pMD18T-U63-BsmBI	AMP	第一步克隆
PCR/TOPO/GW-BsaI-Bb	壮观霉素	第二步克隆
pUAST-attB	AMP	第三部克隆

#### 2.1.3实验所用果蝇株系

本实验中所用果蝇株系如表2.3所示：



表2.3实验中用到的果蝇株系

果蝇株系	作用
attP40	用于显微注射，得到定点插入的表达gRNA的转基因果蝇
54590 (act>cas9)	用于与表达gRNA的转基因果蝇杂交
yw	与显微注射的果蝇杂交得到转基因果蝇
CS	野生果蝇对照

## 2.2实验方法

### 2.2.1果蝇饲养方法

实验室中果蝇生长环境温度为20-25°C，光照周期为每日12h，果蝇食物配方如表2.4所示：

表2.4每升果蝇食物配方

原料	用量
蔗糖	31.62g
葡萄糖	63.2g
酵母	30g
生玉米粉	77.7g
琼脂粉	8g
丙酸尼泊基丁酯	5ml

### 2.2.2 使用DRSC查找规律性重复短回文序列簇并设计gRNA

- 1) 登陆网页<http://www.flyrnai.org/crispr2>;
- 2) 输入所需的FlyBaseCG编号，基因ID，基因符号或染色体位置；
- 3) 选择OT要求和目标序列特征（如CDS，非转录区，内含子，外显子）；
- 4) 选择PAM序列以便于与来源于化脓链球菌的Cas9一起使用；
- 5) 选择OT容错性，可选3至5个错配，5个错配最为严格，3个错配最不严格；



6) 点击“提交”查看基因组浏览器环境下的所有gRNA目标位点，确定感兴趣的区域；

7) 点击每个gRNA位点查看OT注释和效率评分等详细信息。

### 2.2.3 第一步克隆，将gRNA连入载体PMD18T-U63-BsmBI

通过退火来构建gRNA：

- 1) 将上一步设计的每个基因的引物（正向和反向）做好标记，成对摆放；
- 2) 用12000rpm 的转速离心 2分钟；
- 3) 将离心管盖打开，加入适量灭菌双蒸水，后将引物稀释至100 $\mu$ M；
- 4) 加入引物Sense gRNA oligo、Antisense gRNA oligo各1 $\mu$ l，水8 $\mu$ l，混合后成为中浓度10 $\mu$ M的引物；
- 5) 高温处理，使引物复性结合，程序如表2.5所示。

表2.5 引物复性程序

94°C	70°C	67°C	64°C	61°C	58°C	55°C	50°C	37°C
3min	1min	1min	1min	1min	1min	1min	1min	1min

酶切载体PMD18T-U63-BsmBI：

用BbsI内切酶使得载体PMD18T-U63-BsmBI线性化，使用如下体系（表2.6），37°C反应2-4h。

表2.6 BbsI内切酶反应体系

试剂	剂量
pMD18T-U63-BsmBI	1 $\mu$ g
BbsI限制内切酶	1 $\mu$ L
Cutsmart	1 $\mu$ L
H <sub>2</sub> O	22 $\mu$ L

载体PMD18T-U63-BsmBI片段回收及溶解：

酶切产物用DNA凝胶电泳检测，用Takara片段回收试剂盒回收，溶于灭菌双蒸水，最终调整终浓度为50ng/ $\mu$ L，置于冰箱-20°C存储。



将gRNA与与载体1片段连接：

16°C反应2h，反应体系如表2.7所示：

表2.7连接体系

试剂	剂量
退火后的gRNA	50ng/1ul
T4连接酶	1μL
载体1片段	1μL
10X T4 DNA ligation Buffer	1μL
H2O	6μL

转化并涂板：

- 1) 取10μL上一步得到的连接片段加入到50μL DH5a感受态细胞，轻摇混匀，转化的感受态细胞体积可为20-50μL。感受态细胞需用预冷的灭菌EP管分装好；
- 2) 冰上静置30min，42°C水浴90s，冰上静置5min；
- 3) 加入500μL LB培养基，摇菌培养45min，根据分子克隆，适当降低摇床速度至约100rpm；
- 4) 低速离心(相对离心力RCF小于700g)1min, 弃掉多余上清，用灭菌枪头轻吹混匀，涂板（AMP抗性），37°C培养过夜。

通过菌落PCR鉴定阳性克隆并提取质粒：

待平板上长出明显克隆后，挑取3个单克隆，同时用于菌落PCR和接种、摇菌，具体操作如下：

- 1) 取一个干净的Amp<sup>r</sup>的LB平板，根据单克隆的个数分别编号1, 2, 3.....，每个克隆取3-6个左右；
- 2) 用灭菌白枪头挑取单克隆，首先将带菌的该枪头尖端划线到干净的平板中，再把枪头打入4ml LB培养基中，不要碰到其他地方，一一对应；
- 3) 接种好平板置于培养箱，37°C培养16h左右，同时将摇菌管放于37°C震荡培养16h左右。

提取质粒并PCR检测阳性克隆：



- 1) 提质粒（碱裂解法），溶于灭菌50 $\mu$ L双蒸水；
- 2) 质粒PCR，反应体系如表2.8所示：

表2.8质粒PCR反应体系

试剂	剂量
质粒（1:50稀释）	1 $\mu$ l
MIX	22 $\mu$ l
gRNA正向引物	1 $\mu$ l
18T通用R	1 $\mu$ l

- 3) PCR反应如下表2.9所示：

表2.9 质粒PCR反应程序

步骤	温度	时间	循环数
Step 1	95 $^{\circ}$ C	5min	1cycle
Step 2	95 $^{\circ}$ C	30s	
Step 3	58 $^{\circ}$ C	30s	30cycles
Step 4	72 $^{\circ}$ C	30s	
Step 5	72 $^{\circ}$ C	10min	1cycle

- 4) 电泳检测PCR产物。400bp出现明显的产物带的单克隆为阳性克隆；
- 5) 将阳性质粒利用M13-F测序进一步确认，多数情况下PCR鉴定得到的阳性克隆均为正确的连接。

#### 2.2.4 PCR给gRNA加Adaptor序列及Golden-gate组装

- 1) 使用高保真DNA聚合酶（KODplus, phusion），通过PCR给构建好的单体加adaptor序列，质粒为 pMD18T-CG10341-gRNA1, pMD18T-CG10341-gRNA2。其反应体系如表2.10、表2.11所示





表2.10 PCR反应体系1

试剂	剂量
DW	32.5ul
10X KOD plus Buffer	5ul
dNTPs	5ul
25mM MgSO <sub>4</sub>	3ul
引物1: BsaI-U63-F1	1.5ul
引物2: BsaI-gRNA-R1	1.5ul
模板DNA: pMD18T-gRNA1	0.5ul
KOD-plus	1ul

表2.11 PCR反应体系2

试剂	剂量
DW	32.5ul
10X KOD plus Buffer	5ul
dNTPs	5ul
25mM MgSO <sub>4</sub>	3ul
引物1: BsaI-U63-F2	1.5ul
引物2: BsaI-gRNA-R4	1.5ul
模板DNA: pMD18T-gRNA1	0.5ul
KOD-plus	1ul

2) 回收PCR产物，先点3ul PCR产物跑胶，用Takara片段回收试剂盒回收产物，跑胶，并用灭菌水稀释定量至约30ng/uL；

3) Golden-gate组装，将上一步回收的PCR产物通过Golden-gate的方式连接至PCR8中间载体上，反应体系如表2.12、表2.13所示。



表2.12 Golden-gate组装反应体系

试剂	剂量
H <sub>2</sub> O	补足至20ul
100XB SA	1ul
ATP10mM	1ul
T7连接酶	0.5ul
Cutsmart Buffer	2ul
BsaI	1ul
PCR8	1ul
PCR产物1	1ul
PCR产物2	1ul

表2.13 Golden-gate组装反应程序

步骤	温度	时间	循环数
Step 1:	37°C	5min	15cycles
Step 2:	20°C	5min	

4) 转化并涂板，将上一步的反应产物取10ul加入100ul解冻的DH5 $\alpha$ 感受态细胞，混匀；

5) 通过菌落PCR鉴定阳性克隆并提取质粒，PCR检测的引物为第一步合成的gRNA正向引物和TOPO通用R引物进行PCR检测，能够扩增出360bp左右产物的为阳性克隆。

#### 2.2.5通过LR反应将所需片段构建至质粒（pUAST-attB）中

- 1) 将质粒pUAST-attB转化扩增，应使用感受态细胞DB3.1，不能使用DH5 $\alpha$ ；
- 2) 将组装好的片段克隆至Gateway载体，即入门载体为上一步提取的质粒，目标载体为质粒pUAST-attB，25°C过夜，反应反应体系如表2.14所示：



表2.14 LR反应体系

试剂	剂量
入门载体	50-150ng
目标质粒（150ng/ul）	1 $\mu$ L
ddH <sub>2</sub> O	补足至10ul
LR clone II enzyme mix	2 $\mu$ L

- 3) 加入1ul Proteinase K solution, 37°C水浴10min;
- 4) 转化涂板, 取上述反应产物10ul转化至20-50ul DH5 $\alpha$ 感受态细胞;
- 5) 通过菌落PCR鉴定阳性克隆并提取质粒, 后菌落PCR, 反应体系如表2.15:

表2.15菌落PCR反应体系

试剂	剂量
质粒	1ul
MIX	22ul
gRNA正向引物	1ul
Gateway-R	1ul

6) 挑取阳性克隆, 使用天根无内毒素质粒小提中量试剂盒提取质粒, 使用ddH<sub>2</sub>O洗脱, 最终浓度应大于540 ng/ul。

#### 2.2.6 转基因果蝇的检验

- 1) 挑取单只果蝇在1.5ml 离心管中, -20°C放置10min;
- 2) 向每只果蝇中加入50ul 裂解缓冲液（蛋白酶K浓度0.2 mg/ml）, 用枪头碾碎果蝇;
- 3) 37°C 放置30min,裂解释放DNA;
- 4) 95°C 10min, 失活蛋白酶K;
- 5) -20°C保存DNA;
- 6) 将上一步得到的DNA通过PCR进行鉴定, 反应体系如表2.16所示:



表2.16 转基因果蝇DNA鉴定PCR反应体系

试剂	剂量
DNA	1ul
MIX	22ul
gRNA1正向引物	1ul
gRNA2反向引物	1ul

### 3. 实验结果与分析

#### 3.1 gRNA引物的设计

目的基因CG10341有两个外显子，考虑到基因敲除的效率选取在两段CDS区域，分别在两个外显子上进行基因敲除，以达到敲除两个位点间大段基因片段缺失的目的。两段gRNA序列见表3.1，两段gRNA在基因中的位置见图3.1。两段引物设计有BbsI的酶切位点，可以与载体酶切后的片段相连。

表3.1 gRNA序列

gRNA	序列
CG10341-gRNA1-F	GTCGGCTGAAGCCTTTACAGCCGC
CG10341-gRNA1-R	AAACGCGGCTGTAAAGGCTTCAGC
CG10341-gRNA2-F	GTCGTGATCTACGTAGCGGGCTGG
CG10341-gRNA2-R	AAACCCAGCCCGCTACGTAGATCA

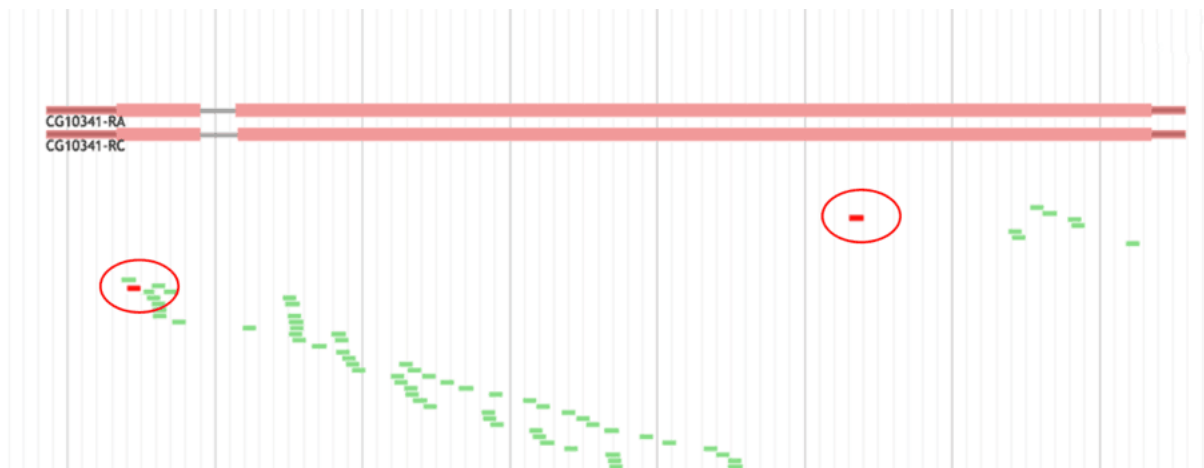


图3.1gRNA在果蝇基因组中的识别位点。图中粉色的代表CG10341的外显子序列，灰色的代表内含子，深红色代表5'和3'的非编码区。两段红圈勾勒的位点为两段gRNA的靶标位点，左边的为gRNA1靶位点，右边的为gRNA2。其中gRNA1有三个错配，其CG含量为60%；gRNA2有五个错配，其CG含量为62%。两段gRNA在果蝇基因组中的两段识别序列相距约1.2kb。

#### 3.2 第一步克隆的检验

将载体pMD18T-Bbs1-U63测序后可看到，该载体有两段Bbs1酶切位点（图3.2），Bbs1限制性内切酶在两个位点酶切后得到大小约为2kb的线性片段，通过PCR凝胶成像，回收成功酶切的片段，即在2kb左右有清晰条带的酶切产物，见图3.3。

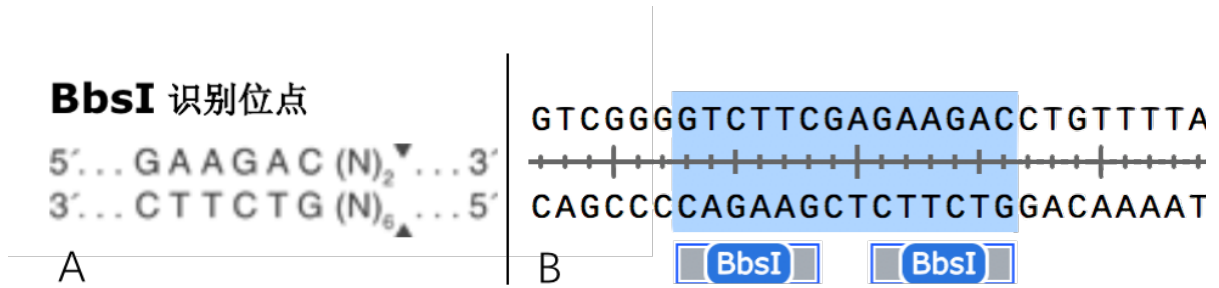


图3.2 A: Bbs1限制内切酶识别位点; B: 载体pMD18T-Bbs1-U63中两段Bbs1识别序列。

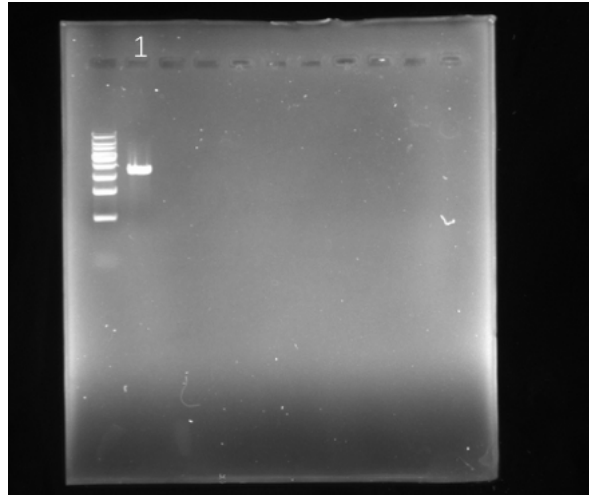


图3.3 pMD18T酶切片凝胶成像图。将线性的酶切产物跑胶，存在2kb左右的片段。

将得到的酶切产物分别与两段gRNA进行T4连接，合成的gRNA1和gRNA2除了20bp的识别序列外，其正向引物前添加有GTCG，反向引物末端为CAGC，能与载体pMD18T-BbsI-U63（后面简称为pMD18T）酶切产物末端配对，通过T4连接酶连接，将gRNA连接到pMD18T载体的U6启动子与终止信号之间。

然后，转化DH5a，涂板，在37度培养16-20小时，取出。挑取单克隆，通过菌落PCR筛选得到了阳性克隆，即跑胶图片上有大小为400bp左右的片段，见图3.4。然后提取质粒，送往公司测序，以确定目标gRNA连接到pMD18T载体中。测序的gRNA的峰图如下（图3.5）。

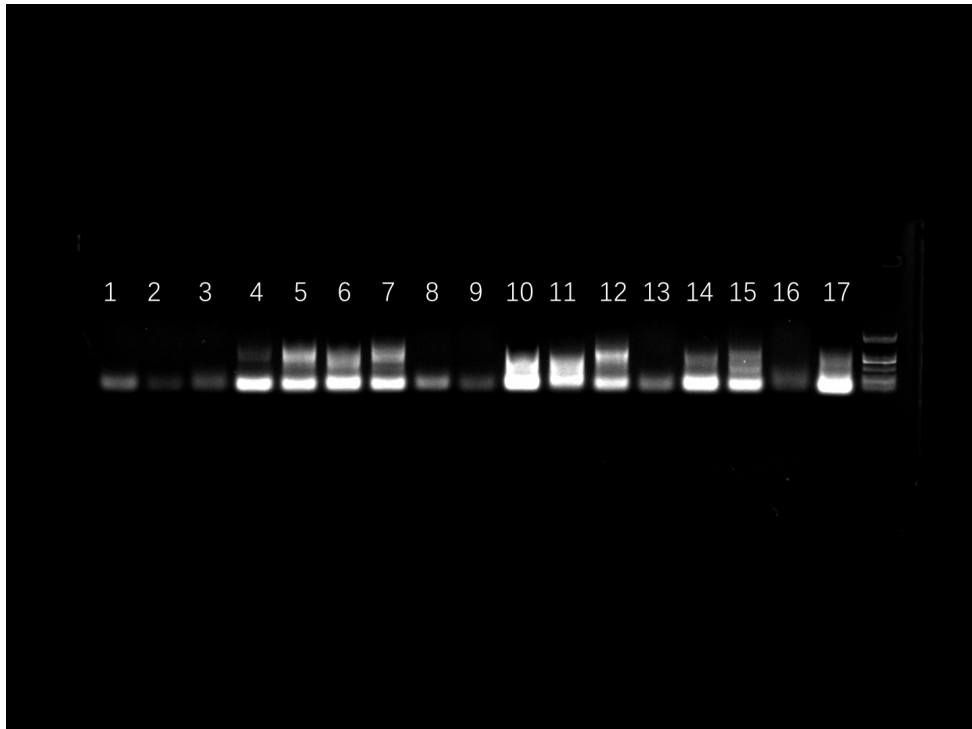


图3.4连接gRNA后菌液PCR产物凝胶成像图。使用T4连接后的产物作模版，使用gRNA-F和18T通用引物作引物进行PCR。编号1-8为pMd18T添加gRNA1的产物，编号9-17为pMD18T添加gRNA2的产物。其中5、6、7、10、11、12存在大小约为400bp的片段，为阳性克隆。

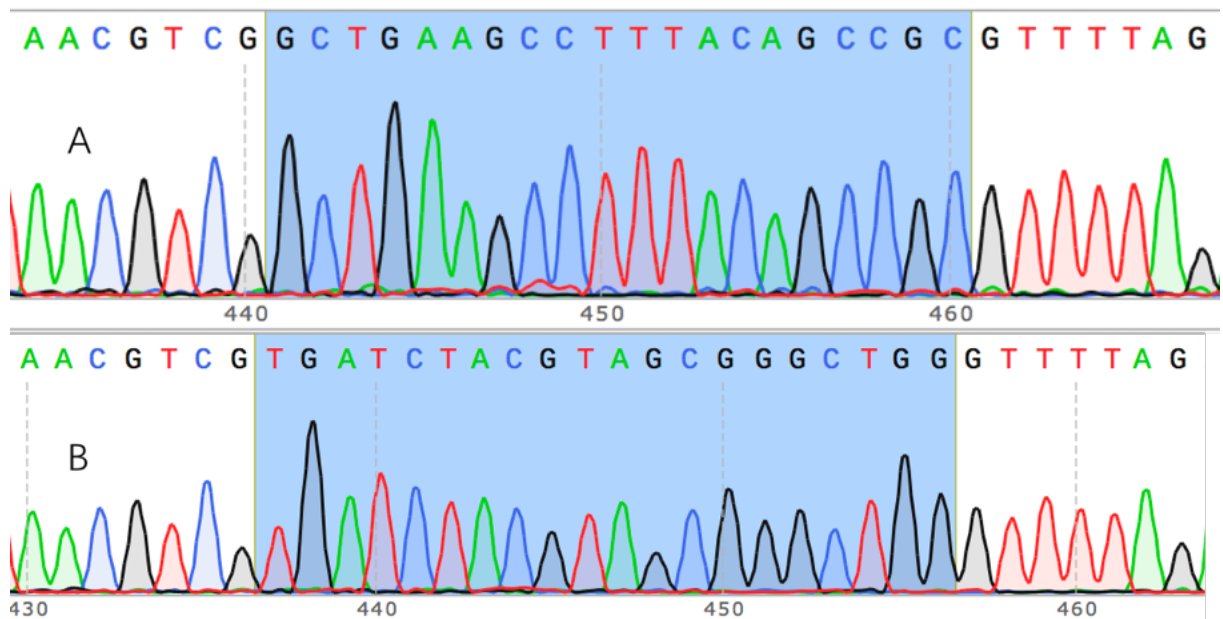


图3.5 pMD18T-gRNA1及pMD18T-gRNA2测序峰图。（A）pMD18T-gRNA1测序峰图，蓝色背景为gRNA1序列；（B）pMD18T-gRNA2测序峰图，蓝色背景为gRNA2序列。

### 3.3 第二步克隆结果检验

通过高保真PCR给分别给gRNA1和gRNA2添加adaptor序列，通过引物Bsal-U63-F1，Bsal-gRNA-R1，Bsal-U63-F2和Bsal-gRNA-R4扩增，使得gRNA前后添加Bsal酶切位点（图3.6）。将PCR添加adaptor的产物跑胶得到凝胶成像图（图3.7）。

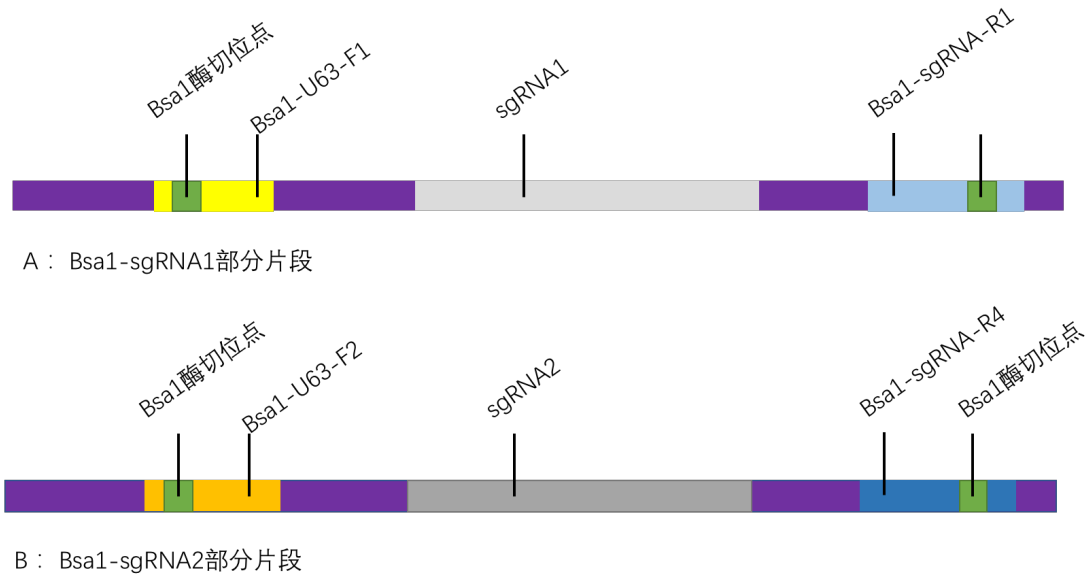


图3.6 BsaI-gRNA片段模式图。(A) BsaI-gRNA1部分片段；(B) BsaI-gRNA2部分片段；其中绿色为BsaI酶切位点，黄色代表Bsal-U63-F1，橙色代表Bsal-U63-F2，浅灰色代表gRNA1，深灰色代表gRNA2，浅蓝色代表Bsal-gRNA-R1，深蓝色代表Bsal-gRNA-R4。

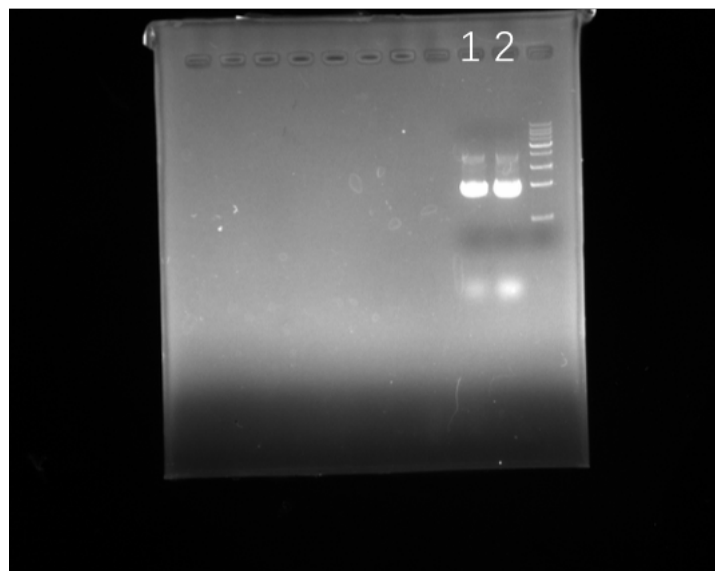


图3.7 PCR添加adaptor序列的产物凝胶成像图。1为gRNA1添加Bsal-U63-F1和Bsal-gRNA-R1序列，2为gRNA2添加Bsal-U63-F2和Bsal-gRNA-R4序列，1、2均在400bp处存在条带，证明添加adaptor序列成功。



将产物使用Takara片段回收试剂盒回收，并用灭菌水稀释定量至约30ng/ug，进一步进行Goldengate组装成功连接至载体PCR/TOPO/GW-BsaI-Bb上。在BsaI内切酶的作用下，载体PCR/TOPO/GW-BsaI-Bb的两处BsaI酶切位点断裂，一端与BsaI-U63-F1相连，另一端与BsaI-gRNA-R4相连，同时BsaI-gRNA-R1与BsaI-U63-F2部分配对连接，成功将两段gRNA整合进入载体PCR/TOPO/GW-BsaI-Bb中（图3.8）。

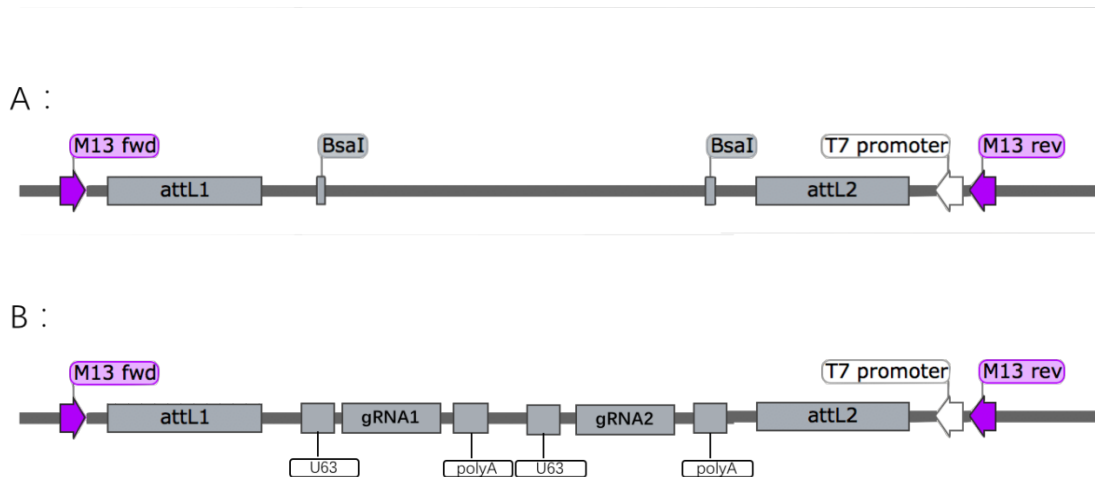


图3.8 Golden-gate组装前后载体PCR8的部分结构模式图。（A）Golden-gate组装前，载体PCR/TOPO/GW-BsaI-Bb的部分序列（B）Golden-gate组装后载体部分序列，在两段attL序列间替换为gRNA1、gRNA2和U63启动子和终止子。

将得到的产物加入DH5a转化涂板，挑取单克隆克隆，使用gRNA正向引物和TOPO通用R引物进行了PCR,并得到凝胶成像（图3.9），其中1、4、5、6、7、8、9、10、11、12、15号克隆均有大小在400bp左右的条带，所以为阳性克隆，最终选取条带较亮的2、12进行下一步操作。

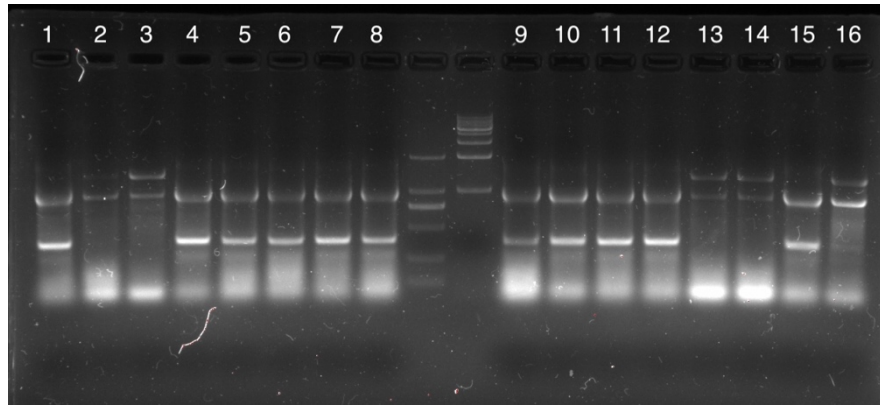


图3.9 PCR-gRNA凝胶成像。挑取了16个单克隆，使用gRNA正向引物和TOPO通用引物R进行PCR，中间的两条ladder分别为DL2000和1kb marker，除2、3、13、14、16号的单克隆为阴性外，其他克隆均为阳性克隆。

### 3.4 最终克隆的Gateway载体检验测序

LR反应是带有attL位点的入门载体和带有attR位点的目的载体的重组反应。通过LR反应成功将组装好的片段克隆至Gateway载体即pUAST-attB质粒。采用LR反应使得所需序列即gRNA的相关基因实现载体间的平行转移的同时保持正确的ORF。在LR克隆酶的作用下实现了两个载体的断裂、位点重新分配和融合。最终我们所需的基因取代目的载体中的ccdB基因，得到带有attB位点和gRNA序列的载体即可用于显微注射的转基因质粒。

将该质粒加入DH5a感受态细胞中，转化涂板，并提取质粒。使用gRNA1-F和Gateway-R做引物将质粒PCR，并将PCR产物跑胶后得到凝胶成像（图3.10）。得到大小约为800bp的阳性克隆，最终选取2号质粒测序并和质粒pUAST-attB比对（见附录一）并将其用于转基因果蝇的注射。

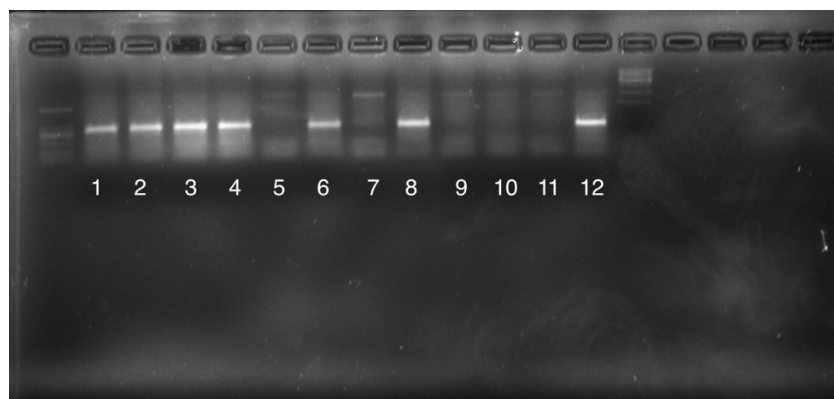


图3.10转基因质粒PCR产物凝胶成像。用最终得到的转基因质粒作模版，gRNA-F和Gateway-R作引物进行PCR，其中1、2、3、4、6、8、12均存在目标条带（800bp左右），为阳性克隆。

### 3.5 转基因果蝇鉴定

通过将重组质粒显微注射进入attP果蝇的胚胎中，得到G0代果蝇，用单只雄蝇与yw处女蝇杂交和单只雌蝇与yw雄蝇杂交，得到带1/2 balancers的转基因果蝇（G1代）。成功转基因的果蝇均为红眼。我们提取了两只红眼果蝇提取DNA通过PCR进行鉴定。通过引物gRNA1-F和gRNA2-R扩增后，两组转基因果蝇PCR产物均得到大小约为500bp的片段（图3.11），而对照组及野生型红眼果蝇（CS）PCR产物中无大小约为500bp的片段，证明成功将gRNA1和gRNA2转入果蝇基因组中。

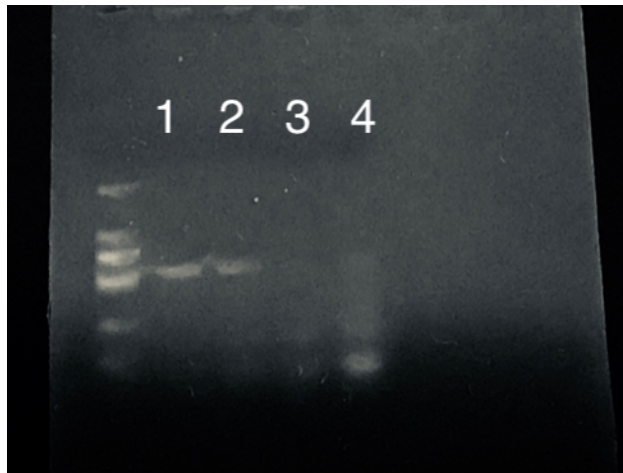


图3.11转基因果蝇DNA PCR产物凝胶成像。用提取的果蝇DNA作模版，gRNA1-F和gRNA2-R作引物进行PCR，其中1、2为转基因果蝇，3、4为野生型果蝇。转基因果蝇有大小约为500bp的条带，而野生型果蝇中没有，证明目的基因成功转入该果蝇株系。



## 4. 结论和讨论

### 4.1 结论

1.该实验在引物设计后，利用三个载体质粒通过三步克隆成功构建用于转基因果蝇显微注射的质粒即pUAST-attB-gRNA。

2.该转基因质粒有attB位点，将该质粒用于显微注射，该质粒中的gRNA的相关基因整合入果蝇三号染色体，成功得到表达gRNA1和gRNA2的转基因果蝇。

3.在转基因果蝇中通过PCR检测，确定了转基因片段的存在。

### 4.2 讨论

#### 4.2.1 利用Cas9技术敲除果蝇的杂交策略

由于时间关系在得到转基因果蝇后无法进行下一步的杂交。为得到*Gar1*功能缺失的突变体应进一步将得到的转基因果蝇与能表达Cas9蛋白的转基因果蝇株系杂交。使得在后代中得到同时表达Cas9蛋白和gRNA的果蝇，在这一代果蝇中将可以出现目的基因缺失的突变体。同时为了得到*Gar1*功能缺失的稳定的stock用于进一步脂肪代谢的研究，应通过杂交去掉一号染色体上Cas9蛋白的基因和三号染色体上gRNA相关基因。杂交步骤如图4.1所示。

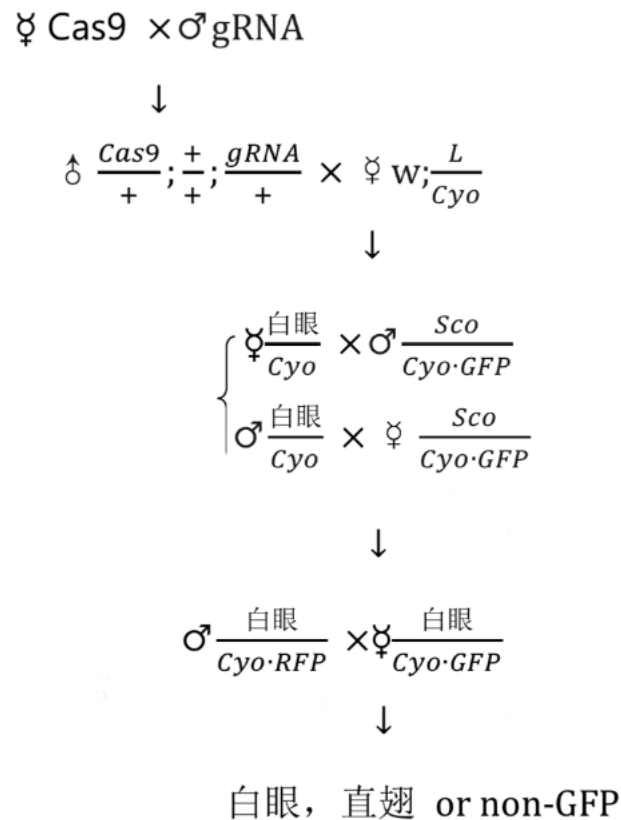


图4.1利用Cas9技术敲除果蝇的杂交策略。

#### 4.2.2 多次聚合酶链式反应后产物检测不理想

该实验在构建转基因质粒的三步克隆过程中，大量用到PCR检验阳性克隆。也多次遇到跑胶效果不理想，实验过程中多次出现目标条带不对、初见较多引物二聚体、出现拖带等情况。一部分原因是因为每次PCR的目标片段大小差异较大，反应体系较大，每次实验中反应体系和反应程序也不尽相同。二是两个反向引物和正向引物的部分序列一致，导致PCR错配。

在用提取质粒进行PCR检测时，几次出现假阴性。经总结后发现，主要是因为DNA模版中存在杂蛋白，PCR程序变性温度低，变性时间短，酶没有完全放冰上，导致酶失活或者活性降低。出现拖带现象明显时，主要是因为电泳电压过高和上样量较大。PCR扩增后同时出现特异性扩增条带和非特异性扩增条带，可能原因是产生引物二聚体和PCR程序循环次数较多。



#### 4.2.3展望

基因编辑技术发展迅速，虽然在实验过程中发现CRISPR/Cas9系统中转基因质粒的构建较为复杂，但相对于P因子，RNAi等技术，CRISPR/Cas9技术敲除的基因位点更为准确，得到突变体的效率在多数实验中也远高于P因子等技术。在构建质粒的过程中，Gateway克隆技术也极大简化了酶切位点的设计，快速高效地实现了目标DNA序列在个体间的转移，以及目的片段在果蝇基因组中的插入。这些技术的出现使得相对快速的得到目的基因缺失或过表达的突变体得以实现，加快对于某一基因的研究，简化前期工作。

得到*Gar1*功能缺失突变体后可进一步探究果蝇基因*CG10341*在分子水平如何影响H/ACA snoRNPs的合成，该大分子复合物又如何影响异位脂肪累积。最终甚至为一位脂肪累积相关的脂肪代谢类疾病治疗提供理论依据。



## 5.参考文献

- [1] Meier U T. How a single protein complex accommodates many different H/ACA RNAs[J]. Trends in biochemical sciences, 2006, 31(6): 311-315.
- [2] Watanabe Y-I, Gray M W. Evolutionary appearance of genes encoding proteins associated with box H/ACA snoRNAs: cbf5p in *Euglena gracilis*, an early diverging eukaryote, and candidate Gar1p and Nop10p homologs in archaeobacteria[J]. Nucleic acids research, 2000, 28(12): 2342-2352.
- [3] Hamma T, Ferré-D'amaré A R. The box H/ACA ribonucleoprotein complex: interplay of RNA and protein structures in post-transcriptional RNA modification[J]. Journal of Biological Chemistry, 2010, 285(2): 805-809.
- [4] Leulliot N, Godin K S, Hoareau-Aveilla C, et al. The box H/ACA RNP assembly factor Naf1p contains a domain homologous to Gar1p mediating its interaction with Cbf5p[J]. Journal of molecular biology, 2007, 371(5): 1338-1353.
- [5] Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, et al. Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product[J]. Journal of bacteriology, 1987, 169(12): 5429-33.
- [6] Coffey A, Ross R P. Bacteriophage-resistance systems in dairy starter strains: molecular analysis to application[J]. Antonie van Leeuwenhoek, 2002, 82(1-4): 303-21.
- [7] 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.
- [8] Forsman B. The Evolution and Mechanisms of Type 1 CRISPR Systems[C], 2017: 1-1.
- [9] Gratz S J, Cummings A M, Nguyen J N, et al. Genome engineering of *Drosophila* with the CRISPR RNA-guided Cas9 nuclease[J]. Genetics, 2013, 194(4): 1029-35.
- [10] Jinek M, Jiang F, Taylor D W, et al. Structures of Cas9 endonucleases reveal RNA-mediated conformational activation[J]. Science, 2014, 343(6176): 1247997.
- [11] Nishimasu H, Ran F A, Hsu P D, et al. Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA[J]. Cell, 2014, 156(5): 935-949.
- [12] Sternberg S H, Redding S, Jinek M, et al. DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9[J]. Nature, 2014, 507(7490): 62.
- [13] Anders C, Niewoehner O, Duerst A, et al. Structural basis of PAM-dependent target DNA recognition by the Cas9 endonuclease[J]. Nature, 2014, 513(7519): 569.
- [14] Kloepper J W, Leong J, Teintze M, et al. Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria[J]. Nature, 1980, 286(5776): 885.
- [15] Godde J S, Bickerton A. The repetitive DNA elements called CRISPRs and their associated genes: evidence of horizontal transfer among prokaryotes[J]. Journal of Molecular evolution, 2006, 62(6): 718-729.
- [16] Garneau J E, Dupuis M-È, Villion M, et al. The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA[J]. Nature, 2010, 468(7320): 67.
- [17] Reiter L T, Potocki L, Chien S, et al. A systematic analysis of human disease-associated gene sequences in *Drosophila melanogaster*[J]. Genome research, 2001, 11(6): 1114-1125.
- [18] Kondo S, Ueda R. Highly improved gene targeting by germline-specific Cas9 expression in *Drosophila*[J]. Genetics, 2013, 195(3): 715-21.
- [19] Gratz S J, Wildonger J, Harrison M M, et al. CRISPR/Cas9-mediated genome engineering and the promise of designer flies on demand[J]. Fly (Austin), 2013, 7(4): 249-55.
- [20] Port F, Chen H M, Lee T, et al. Optimized CRISPR/Cas tools for efficient germline and somatic genome engineering in *Drosophila*[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014, 111(29): E2967-76.
- [21] Ren X, Sun J, Housden B E, 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): 19012-7.
- [22] Gilbert L A, Larson M H, Morsut L, et al. CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes[J]. Cell, 2013, 154(2): 442-451.
- [23] Hsu P D, Scott D A, Weinstein J A, et al. DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases[J]. Nature biotechnology, 2013, 31(9): 827.



## 6.致谢

毕业设计的完成意味着本科生涯的结束。在做毕业实验的过程中，学习了各种分子生物和遗传学方面的知识，但是更多的是在实验室生活中从导师，师兄师姐、同学身上学到了非常多的科研技巧，得到了非常多的帮助。正是因为他们的存在，这篇毕业设计才得以顺利完成。

非常感谢恩师田媛副教授，从开始定期的文献讨论，到实验方案的设计以及每一步克隆乃至每一次PCR都由老师悉心指导。毕业实验的过程中并不是一帆风顺的，多次遇到状况。也是田媛老师让我学会在科研试验中面对失败要从容乐观，能冷静地分析可能出现的问题在哪里，让我学会调节心态。

同时也非常感谢实验室的赵柳师姐以及申洛男、杨光武和罗超同学，在实验室中相互帮助，相互学习。他们也时常帮助我完成工作量较大的实验步骤，让我更好的完成实验设计。还要感谢的是其他导师的实验室给我们提供了诸如PCR仪、超微量DNA浓度测试仪等实验仪器，使得实验方案可行，实验顺利进行。

即便毕业设计已经完成，但在其中学到的科研能力或是为人态度都将使我受用终生，我将怀着感恩之心继续前行，继续保持在实验中习得的毅力。也由衷的希望在这篇毕业设计中给予过我帮助的老师同学们一切顺利！





### 7.附录

#### 附录一 转基因质粒含gRNA部分序列

CGCTAATCGCTTGAGCTGGCCTGACGCTCACCTGTGATTGCTCCTACTCAAATACA  
 AAAACATCAAATTTTCTGTCAATAAAGCATATTTATTTATATTTATTTTACAGGAAAG  
 AATTCCTTTTAAAGTGTATTTTAAACCTATAATGAAAAACGATTAATAAAAAAATACATA  
 AAATAATTCGAAAATTTTGAATAGCCCAGGTTGATAAAAATTCATTTTCATACGTTTT  
 ATAACCTATGCCCCCTAAGTATTTTTTGACCATAGTGTTCATTTCTACATTAATTTTAC  
 AGAGTAGAATGAAACGCCACCTACTCAGCCAAGAGGCGAAAAGGTTAGCTCGCC  
 AAGCAGAGAGGGCGCCAGTGCTCACTACTTTTTATAATTCTCAACTTCTTTTTCCA  
 GACTCAGTTCGTATATATAGACCTATTTTCAATTTAACGTCGGTGAAGCCTTTACA  
 GCCGCGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACT  
 TGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTTTTATTAAGTCTGTCTTTCCCTTTCCG  
 CTCACCTGTGATTGCTCCTACTCAAATACAAAAACATCAAATTTTCTGTCAATAAAG  
 CATATTTATTTATATTTATTTTACAGGAAAGAATTCCTTTTAAAGTGTATTTTAAACCTA  
 TAATGAAAAACGATTAATAAAAAAATACATAAAATAATTCGAAAATTTTGAATAGCC  
 CAGGTTGATAAAAATTCATTTTCATACGTTTTATAACTTATGCCCCCTAAGTATTTTTG  
 ACCATAGTGTTCATTTCTACATTAATTTTACAGAGTAGAATGAAACGCCACCTACT  
 CAGCCAAGAGGCGAAAAGGTTAGCTCGCCAAGCAGAGAGGGCGCCAGTGCTCAC  
 TACTTTTTATAATTCTCAACTTCTTTTTCCAGACTCAGTTCGTATATATAGACCTATTT  
 TCAATTTAACGTCGTGATCTACGTAGCGGGCTGGGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAA  
 GTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTT  
 TTTACTCAATGCGTGAA

注：红色部分为为两段gRNA序列

#### 附录二 转基因质粒序列与参考序列比对

参考序列	1	ATTTATTTTACTGATAGTGACCTGTTTCGTTGCAACAAATTGATGAGCAATGCTTTTTTA
CG10341	1	-----
参考序列	61	TAATGCCAACTTTGTACAAAAAGCAGGCTCCGAATTCGCCCTTGAAGACATGGCCTGAC
CG10341	1	-----
参考序列	121	GCTCACCTGTGATTGCTCCTACTCAAATACAAAAACATCAAATTTTCTGTCAATAAAGCA
CG10341	1	-----
参考序列	181	TATTTATTTATATTTATTTTACAGGAAAGAATTCCTTTTAAAGTGTATTTTAACTATAA
CG10341	1	-----
参考序列	241	TGAAAAACGATTAATAAAAAAATACATAAAATAATTCGAAAATTTTGAATAGCCCAGGTTG
CG10341	1	---AAAAACGATTAATAAAAAAATACATAAAATAATTCGAAAATTTTGAATAGCCCAGGTTG
参考序列	301	ATAAAAATTCATTTTCATACGTTTTATAACTTATGCCCCCTAAGTATTTTTTGACCATAGTG
CG10341	59	ATAAAAATTCATTTTCATACGTTTTATAACTTATGCCCCCTAAGTATTTTTTGACCATAGTG
参考序列	361	TTTCAATTCTACATTAATTTTACAGAGTAGAATGAAACGCCACCTACTCAGCCAAGAGGC
CG10341	119	TTTCAATTCTACATTAATTTTACAGAGTAGAATGAAACGCCACCTACTCAGCCAAGAGGC
参考序列	421	GAAAAGGTTAGCTCGCCAAGCAGAGAGGGCGCCAGTGCTCACTACTTTTTATAATTCTCA
CG10341	179	GAAAAGGTTAGCTCGCCAAGCAGAGAGGGCGCCAGTGCTCACTACTTTTTATAATTCTCA
参考序列	481	ACTTCTTTTTCCAGACTCAGTTCGTATATATAGACCTATTTTCAATTTAACGTCGGCCTT
CG10341	239	ACTTCTTTTTCCAGACTCAGTTCGTATATATAGACCTATTTTCAATTTAACGTCGGCTTGA



参考序列 541 CA~~AA~~ATAACCGAGG~~GG~~TTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTAAAAAAGGCTAGTCCGTTA  
CG10341 299 AG~~CT~~TACAGCCG~~CC~~TTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTAAAAAAGGCTAGTCCGTTA

参考序列 601 TCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTTTTATTAAGTCTGTCTTTCCCCTTT  
CG10341 359 TCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTTTTATTAAGTCTGTCTTTCCCCTTT

参考序列 661 CCGCTCACCTGTGATTGCTCCTACTCAAATACAAAAACATCAAATTTTCTGTCAATAAAG  
CG10341 419 CCGCTCACCTGTGATTGCTCCTACTCAAATACAAAAACATCAAATTTTCTGTCAATAAAG

参考序列 721 CATATTTATTTATATTTATTTTACAGGAAAGAATTCCTTTTAAAGTGTATTTTAAACCTAT  
CG10341 479 CATATTTATTTATATTTATTTTACAGGAAAGAATTCCTTTTAAAGTGTATTTTAAACCTAT

参考序列 781 AATGAAAAACGATTAAAAAAATACATAAAATAATTCGAAAATTTTGAATAGCCCAGGT  
CG10341 539 AATGAAAAACGATTAAAAAAATACATAAAATAATTCGAAAATTTTGAATAGCCCAGGT

参考序列 841 TGATAAAAATTCATTTTCATACGTTTTATAACTTATGCCCTAAGTATTTTTGACCATAG  
CG10341 599 TGATAAAAATTCATTTTCATACGTTTTATAACTTATGCCCTAAGTATTTTTGACCATAG

参考序列 901 TGTTC AATTCTACATTAATTTTACAGAGTAGAATGAAACGCCACCTACTCAGCCAAGAG  
CG10341 659 TGTTC AATTCTACATTAATTTTACAGAGTAGAATGAAACGCCACCTACTCAGCCAAGAG

参考序列 961 GCGAAAAGGTTAGCTCGCCAAGCAGAGAGGGCGCCAGTGCTCACTACTTTTTATAATTCT  
CG10341 719 GCGAAAAGGTTAGCTCGCCAAGCAGAGAGGGCGCCAGTGCTCACTACTTTTTATAATTCT

参考序列1021 CAACTTCTTTTTCCAGACTCAGTTCGTATATATAGACCTATTTTCAATTTAACGTCCGCC  
CG10341 779 CAACTTCTTTTTCCAGACTCAGTTCGTATATATAGACCTATTTTCAATTTAACGTCCGTTA

参考序列1081 TTCAC~~AA~~ATAACCGA~~GG~~TTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTAAAAAAGGCTAGTCCGT  
CG10341 839 T~~CT~~AC~~GT~~AGC~~GG~~GCT~~GG~~TTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTAAAAAAGGCTAGTCCGT

注：参考序列是之前连接成功的两段gRNA序列。