



利用CRISPR-Cas9技术敲除蜜蜂减数分裂关键基因的功能研究

汇报人：付鑫冉

2025-04-27







01 课题背景与意义

02 研究方法与技术路线

03 数据分析与结果解读

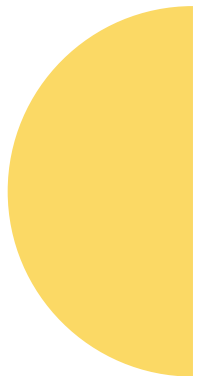
04 研究展望与应用前景





第一节

课题背景与意义



蜜蜂减数分裂的生物学重要性

遗传多样性保障

蜜蜂减数分裂是配子形成的核心过程，通过同源染色体重组和分离产生遗传变异的配子，对维持蜂群遗传多样性和适应性进化至关重要。

农业生态价值

蜜蜂作为重要传粉者，其繁殖健康直接影响作物产量和生态系统稳定性，解析减数分裂基因功能可为蜂群健康管理提供理论依据。

蜂群社会结构基础

蜜蜂中，工蜂（雌性，二倍体）和雄蜂（单倍体）的分化主要受性别决定基因调控，涉及受精状态及特定分子通路（如csd等）。研究与减数分裂调控相关的关键基因，有助于深入揭示蜜蜂生殖发育机制及性别决定与社会性行为的分子基础。

CRISPR-Cas9 技术在基因功能 研究中的应用

高效靶向编辑

CRISPR-Cas9通过sgRNA引导Cas9核酸酶切割特定DNA序列，实现基因敲除、插入或修饰，已成功应用于果蝇、小鼠等模式生物，技术成熟度高。

功能解析工具

该技术可快速构建基因缺陷型模型，结合表型分析（如生殖细胞发育异常、配子活力下降）明确目标基因在减数分裂中的具体作用。

跨物种普适性

尽管蜜蜂基因编辑体系建立较晚，但CRISPR-Cas9在昆虫（如果蝇）中的成功案例为本研究提供了技术借鉴与优化方向。



第二节

研究方法与技术路线



目标基因筛选与 序列分析

01

生物信息学预测

通过蜜蜂基因组数据库 (NCBI) 筛选减数分裂相关基因, 结合RNA-seq数据分析基因表达模式, 优先选择在生殖细胞中高表达且功能保守的关键基因 (如MARF1)。

02

同源比对与保守域分析

使用BLAST工具比对目标基因与其他物种 (如果蝇、红火蚁, 熊蜂) 的同源序列, 通过SMART数据库分析蛋白功能域, 确保靶向区域对基因功能至关重要。

03

脱靶效应评估

利用CRISPR设计软件 (cirspr) 预测gRNA的潜在脱靶位点, 排除与蜜蜂其他基因或调控区域高度相似的候选序列。

Gene

Gene

[Create RSS](#) [Save search](#) [Advanced](#)

[Help](#)

Gene sources

Genomic

Categories

- Alternatively spliced
- Annotated genes
- Protein-coding

Sequence content

- Ensembl
- RefSeq

Status

Current

[Clear all](#)

[Show additional filters](#)

Tabular

Send to:

[Hide sidebar >>](#)

Search results

Items: 1 to 20 of 722

<< First < Prev Page 1 of 37 [Next >](#) [Last >>](#)

[See also 4 discontinued or replaced items.](#)

Name/Gene ID	Description	Location	Aliases
<input type="checkbox"/> LOC100578146 ID: 100578146	meiosis-specific coiled-coil domain-containing protein MEIOC [<i>Apis mellifera</i> (honey bee)]	Chromosome LG1, NC_037638.1 (25273578..25282112)	GB53956
<input type="checkbox"/> Marf1 ID: 409429	meiosis regulator and mRNA stability factor 1-like protein [<i>Apis mellifera</i> (honey bee)]	Chromosome LG14, NC_037651.1 (5027481..5039820, complement)	GB43556
<input type="checkbox"/> hdm ID: 100576947	meiosis specific with OB domains hold'em [<i>Apis mellifera</i> (honey bee)]	Chromosome LG11, NC_037648.1 (15337350..15339808)	GB45294
<input type="checkbox"/> LOC726615 ID: 726615	meiosis-specific nuclear structural protein 1 [<i>Apis mellifera</i> (honey bee)]	Chromosome LG15, NC_037652.1 (6518545..6520150, complement)	GB50079
<input type="checkbox"/> mamo ID: 102654975	zinc finger protein 628-like [<i>Apis mellifera</i> (honey bee)]	Chromosome LG4, NC_037641.1 (8378760..8475988)	GB11420, GB50425

clear

Filters: [Manage Filters](#)

Results by taxon

Top Organisms [\[Tree\]](#)

- Merops nubicus (27)
- Schizosaccharomyces osmophilus (15)
- Linepithema humile (12)
- Bombus impatiens (11)
- Megachile rotundata (11)
- All other taxa (646)

[More...](#)

Find related data

Database:

Search details

(meiosis[All Fields] AND ("Apis mellifera"[Organism] OR bee[All Fields])) AND alive[prop]

align同源序列分析

NP_724394.2		-----													
XP_016771852.2	1	MADQD	TTDYALCANDQDEL	-GLNEKLIENSISQ	SLCDLNSSNNSITVENATS	VSPLL	SHYKYHC	-FSHHDSPVNF 74							
XP_011158463.1	1	MASEKSPDYRASC	MEDNDEIEGLNEKLIQ	LLESEQ [10]	SLCEPEEDCGS	-TVDAKASGSL	SFSHCRHDCsLLCYDSPAKM 85								
XP_024227255.1	1	MADQDNADYALCTNDQNKTEGLNERLIETSISQ			SLCDLN	SRNNSVTVENAASVSPLL	SHYKYHR-FSHHDSPVNF 75								
NP_724394.2		-----													
XP_016771852.2	75	SSLPTYLPPIGVFWDIENCHV	PKGRSAMA	VTQVIREKFFNGYREAEF	I	VVCDV	LRENSRVMKELNNAQVNL	IHVARECKN 154							
XP_011158463.1	86	SSTS	NHLPPIGVFWDIENCQVPKGRSAIAV	TQLIRDKFFSGYREAEF	I	VVCDVQKENSQI	IQELNDAQVNL	IHVAATCKN 165							
XP_024227255.1	76	SSLPTYLPPIGVFWDIENCHV	PKGRSAMA	AATQVIREKFFGGYREAEF	I	VVCDV	LRENNRVMKELNNAQVNL	IHVARECKN 155							
NP_724394.2		-----													
XP_016771852.2	155	AADEK	KLQSI	RRFADIHGSPA	AAVILISGDINFAPD	LSDLR	YRKKIHVILLHMKNT	SEALILCANEHYDFSELMESLPSTT 234							
XP_011158463.1	166	AADEK	KLQTI	RRFADIHGSPA	AAIILISGDINF	AAADLSDLR	RHRKKIHVILLHKKNT	SEALILCANEHYDFMELTEPLPSRP 245							
XP_024227255.1	156	AADEK	KLQSI	RRFADIHGSPA	AAVILISGDINFAPD	LSDLR	YRKKIHVILLHMKNT	SEALILCANEHYDFSELMESLPSTT 235							
NP_724394.2	1	-----													
XP_016771852.2	235	V-QV	TTYD	LLVSNL	PE	DQDIVS	IKCYLKQMFENYGGQVMEIQSNTAI	IHF	TSK	PFAERAQKRL	NGKV	VFGSKISVKF	L-	312	
XP_011158463.1	246	Pp	KG	NESYD	LLIS	NLPDEM	VNVIKRRLKQLSE	NCGGRVIDVQ	SNTAI	VRFT	SHSSADRAQK	RMEGEYV	FVFGSKIFVRY	LG	325
XP_024227255.1	236	I-QV	TAYC	DLLVSNL	PE	DQDIMS	IKCYLKQMFESC	GGQVMEIQSNTAI	VRFT	SKPSADRAQK	RMDGKI	ILGSKISVKF	Q-	313	
NP_724394.2	3	QRHTSV	IDLHRWNY [5]	FDRNGKVENIYVMEHSD	-----	PVPYQQLSTLSPTT	ALYSNFNNSLEAGT	66							
XP_016771852.2	313	KEKG	THFQKIRGIS	INRNGTVSESEIVT	----	SSPRQMYTASASLAGGRALQ	FPHYQSSMPVIGTYS	SGWNAHCTSAS 385							
XP_011158463.1	326	KEKGN	IIAKNLGNI	VTRSRAVSESEIVT	DSKq	NSSKQMYTASASVLGTR	TLOQPHYQSSSSVVGAYPPFNP	HCAPIN 402							
XP_024227255.1	314	KEKTS	NFQQIRANS	INRNGTVSESEIVT	----	SSPRQMYTASASALTGGRALQ	IPHYQSSSPVIGTYS	SGWNAHCASAS 386							
NP_724394.2	67	AERLRL [4]	SQVHSLYVGDGQVQNAS	-EPLSFPSHLNLYQYVRTP	-ANFTIN	-----	SRNRYI	123							
XP_016771852.2	386	TPV-GM	VQPP-VFVRRPYPNN	---NNVAFNR	TYNELARTQSP	-SFWQVS	-GSQQF	SHVWEEQYKVEKTKVLSRRIHI 455							
XP_011158463.1	403	GPPSGL	IQQPIYFGR-YVSS	---GDVAFNR	PYNDLTRVQSP	nLIWPIGp	SPQSYGHIWEEQYKAEKSKTLSKRAHI 475								
XP_024227255.1	387	APV-GM	VQPSVVFVGRSYPNNSn	NNVTFNR	TYNELARAQSP	-LFWQVS	-GPQQF	GHVWEEQYKVEKTKVLSRRIHI 460							
NP_724394.2	124	PYYN	NRSYSA-STTGFP	IASTPLISSHA	---HIQDQQGAA-SYQ	--TIVPLYQ	TASHCAQQHTTLASVAPIVDNSFVEST 196								
XP_016771852.2	456	PQARD	NGVVNDVAPRTSEALRCIRG	THT-YVQPSEWTG	---QHP-SLNVP	INLNGTTHPQ	SNFKRRSPSPMYDLQSRERN 530								
XP_011158463.1	476	PQARD	NVAVA-TTAHTPEGLRRIRG	THGAF	LHAAEWLGGRQSYNn	SLAVPLN	YNVQS---NSFKRRSPSPLYDAPTREKS 551								
XP_024227255.1	461	PQARE	NGVVNNNTSRNSEGLRRIRGTQ	TsfvQPP	EWGTGPRQQYP-PLNVP	PASLNGTA--QSNFKRRSPSPMYDLQSRERN 537									
NP_724394.2	197	TCPMAGI	TSHNIKMKMIPP	NVLLPCSRPTTTAVTIQ	RSTGEDGGDK	KEGHTFAKI	-----	TEMSDAVTLQITNLDY 266							
XP_016771852.2	531	QWNGQ	--QNASV	TRTPSPYENTIQTINQ	QSNRTSPYHPSDTESE	EVEKFFNPVNNRNGI	STNNETCTPIELQVTNLDQ 608								
XP_011158463.1	552	SWHGQ	NQQQVSTRNNKTPSPYEN	NMLQRTGQHNQTSRSHLSDAENE	EVENFLNP	-NNRVGHSTNNGINIP	IELQVTNLDQ 630								
XP_024227255.1	538	QWNGQ	--QNASV	RSTRTPSPYENTVQTVS	QQSNHTSPYHPSDTENE	EVENFFNPINNHN	GISTNNETCTPIELQVTNLDQ 615								
NP_724394.2	267	SLDESH	IRSFLLNQLKPI	TPVVS	LVF----	EGSSYAKV	TVPDLYFAKQVVS	NLHRKKIGHKRMLVSYTRDSSlTEVNTLR 342							
XP_016771852.2	609	SINPK	KMRHMLVSI	FMKHVMVLNVSIFTQ	SDGNFAASVKVPSL	SDAQYAISQLHRRK	LGYKRIFISYAHSGR-ASPQVVR 687								
XP_011158463.1	631	NIDMR	DMKQILLSI	FREHVS	NCHISVFMQSDGNYGASVKVPSL	SDAQYAISQLHRRK	IGYKRILISYAHVGG-PNLQLIR 709								
XP_024227255.1	616	SINPK	KMRHMLVSI	FMHVMVLNVSIFTQ	SDGNFAASVKVPSL	SDAQYAISQLHRRK	VGYKRILISYAHSGR-ASPQVVR 694								

NP 724394.2	343	CQVAGLLKDPFNTPMPYKFRLELFQSRFKTSISVLDLYKMQDICTINSDNNEeKFISLNPPELVNTLD--ISPLMEGLQHS	420
XP 016771852.2	688	AQIVMLLQEVPGHELPLFKFREMYESRFMISISVSELYKMKDVCII TEDPGG-RMVSLNPDHRNTPSPCFNNTTQEEQVE	766
XP 011158463.1	710	AQIVMLLQEVPGHKLPLFKFREMYESRFMISISVSELYKMRDVCII TEDPSG-RMVSLNPDHRNTPSPCFSENTIQDGQVK	788
XP 024227255.1	695	AQIVMLLQEVPGHKLPLFKFREMYESRFMISISVSELYKMKDVCII TEDPGG-RMVSLNPDHRNTPSPCFNNTNQEEQVE	773
NP 724394.2	421	VPYCSIHFKKE-QHKGWAEQEIEPLPNVFMISISEIQKLIYPLLKVHTGDIPVATLLHCVKEELNVSIMANENGVNLEHLI	499
XP 016771852.2	767	LPYCTIHTLKPWSDKGWAEQKVASLPNVKISLKVLEPRIQQLTTHNGSLPLPSLNCYEA EFKEKLQVVENGVPLEHLV	846
XP 011158463.1	789	LPYCTMHTSKPLSDKGWAEQEMASLPNVKISLKLLESRVQQLLASHNGILPLPSLPNCYEA EFKEQLEI IENGVPLEHLV	868
XP 024227255.1	774	LPYCTIHTLKPWSDKGWAEQKVASLPNVKISLKVLDPRIHQQLTTHNGSLPLPSLPNCYEA EFKEKLQVVENGVPLEHLV	853
NP 724394.2	500	CCVQGIQVRANNGFIKILGWLEiNKEMQSG [13] SDRTNCGSyfkNSVADPLFQISREVI ELLKMSPKSTMKFNRFIPAY	588
XP 016771852.2	847	SCLSCVELKQGIGSVKYLIWAE-NKSHENK HEENKCVS---SPLANQLALFSRELVDLLKTAPHCQLPFHRFIPTY	918
XP 011158463.1	869	ACLSCVELRQDIGSVKYI VWIG-KKDHEHN HDETKCVS---PPLANQLALFSRELVDLLKTAPHCQLPFNRFIPTAY	940
XP 024227255.1	854	SCLSCVELKQGIGSVKYLIW TG-NKIHENN QEENKCVT---SPLANQLALFSRELVDLLKTAPHCQLPFNRFIPTAY	925
NP 724394.2	589	HNHFGKQCRVADYGYTKLIELFEALS NVVQIMGDGENRQITLSHRIQIRRF TSDLLRVL RANGNNSVLLS QLPVFTQTQ	668
XP 016771852.2	919	HHHFGRCRQCRVADYGF TKLIDLLEALHTVQVMGEGNNRVITLSHRAQVRRF TSDLLRVLKSKASKQVALSEFP SVYARVI	998
XP 011158463.1	941	HHHFGRCRQCRVADYGF TKLIDLLEALHTVQVMGEGNKRVTLSHRAQVRRF TSDLLRVLKSKASKQVALSEFP NVYNRVI	1020
XP 024227255.1	926	HHHFGRCRQCRVADYGF TKLIDLLEALHTVQVMGEGNNRVVTLSHRAQVRRF TSDLLRVLKSKASKQVALSEFP SVYARVI	1005
NP 724394.2	669	NKTFDITDYGVC DLIDILDGLVSSNIVTlgAAQNGKDILISMPKRKQTNSELEKTCV FAGEMVELFQNALQYTILFQKFV	748
XP 016771852.2	999	AKPWDIVDYGVC DIEDILNEIPKNTIVV--TLINGGDKMIAIPKREQT EEEIKRTRFAIEVIELLRHAPQCRMQFNKFV	1076
XP 011158463.1	1021	AKPWDIVDYGVC DIEDILGEVSENTVVV--TPLEDGD KMIAIPKREQTAE EIERTKLFAKEVIELLQHAPQCRMQFNKFV	1098
XP 024227255.1	1006	AKPWDIVDYGVC EIEDILSEVSENTVVV--TVINGGDKMIAIPKREQTAE EIERTKQFAVEVELLRHAPQCRMQFNKFV	1083
NP 724394.2	749	RSYHYHFAYQCRLSDYGF LKLADLLDAINGLVEMKLTSD EDDKKIVLSPQVA [4] AEQCENLIRNATGNSSHCMKLEQVLV	829
XP 016771852.2	1077	PSYHHHFGHQCRISDYGF TKLIELFEAIPDIVKIEDDGSGERQISL TEKEG LRVLSKQISRLIIRSGGCLSVSNIAQ	1153
XP 011158463.1	1099	PSYHHHFGHQCRVSDYGF TKLIELFEAIPDVVKIEEVNGGERQISL TKKEG LKVLSEQILKLVMRKSGLVNVSIAQ	1175
XP 024227255.1	1084	PSYHHHFGHQCRVSDYGF TKLIELFEAIP EIVKIEDDNSGERQISL TEKEG LLVLSEQISKLITRSKGCLSVSNIAQ	1160
NP 724394.2	830	LHKKKYGYQIQPKTLGVMDMATAVELLPYVELK-KKEQAIWLICHNNDH--EFRFLCYRV-----CK	888
XP 016771852.2	1154	NFLHEFGYAIKPELFGCTSILQLMQKLGDTV KIVYLP SKLVMMIDKSHLQQLTLQCRRL LIDKQP HRMPIKEFQQLYAQ	1233
XP 011158463.1	1176	MFQHQFGYALRPELFGC SMLQLMQKLGDTVQVIDLATGPAIITIDKSHLQQTILQCRRI LMGQPQHRMPTREFVQQYFQ	1255
XP 024227255.1	1161	NFLRQFGYALKPELFGCISVLQLMQKLGDTV KIVYLP SRPVMMVDKSHVQQLILQCRRL LMDKQP HRMSLQEFQHLYAQ	1240
NP 724394.2	889	YVMERDPSASVWTVNRGEVKLT--KSQQFVK--PI-----EKSILVRDFNAKYK-DHLSE SALLAMRQAIEVYDDGGIQC	958
XP 016771852.2	1234	YYLKSCNIDELKQNL CNVVQFITIDDEQFVELTPLHCFACNL CRVMINYG GALKLSQFETAYLSTIGSACKPVDYGFPTT	1313
XP 011158463.1	1256	YYSKQCNLDDLKKNLANVVRFTV VV NNEQVIELTPLHRFACELH LVMNNGT LNL SQFDVSYLNIIGSPCKPAQYGFPTI	1335
XP 024227255.1	1241	YYLKSCNIDELKQNL SNVVRFTTLKDEQFIELTPLHCFACNVYRVMNNG GALKLSQFEAA YLSTIGSVCNPVDYGFPTL	1320
NP 724394.2	959	IRLTRFMKFIIAIVRMLEQRPSMYL [7] NCGLSTTFEFGFP-NLYSVVA AHKDLFSINNGptqERSEVSINMNCEL RQSS	1041
XP 016771852.2	1314	FALLQALPCTVTKLSRRKKNIIYL NKKIA-AVDMVLPsPTCAS ASSYCDTDSSNES---FESDSSSHVNISNN-SN	1385
XP 011158463.1	1336	TALLQALPCTVTKIKETRKKETIIYL NKKLAASVGFVFP-LVHKS ISSHLDTDSSNDS---FESDISCRVNPALST	1408
XP 024227255.1	1321	FALLQALPCTVTKLSRRKKNIIYL NKKITVAVGIALP-PTYAS GSSYCDTDSSNES---FESDSSSRVNVSN-SN	1392

NP_724394.2	1042	LSKDQCVLESQK-----L	TNSKHRA-----	QRSFHS	HIGEHNGLPIS-----	QPPLKR	1084
XP_016771852.2	1386	TLEHAKWTEQTV	DNQNFWKQTEKNNVWSEESNKS	SWKT-SSSEDRS	LNWPLRESGSESFYKSLMQTP	IIPCDFP-APPKPD	1463
XP_011158463.1	1409	MDDHEKWLDQLT	-NVNSWKAKDDKAVWSETCDKH	WKNL	PNSEKRSNNWPALESGGESLLNSLM	RTPIM-RNFPPPPKPD	1486
XP_024227255.1	1393	IPEQTKWVEQVS	ESQDSWKQTDTDNLWLKDSNKS	SWMT-SNSEDRL	VNWSLQENGSESFLKNLIQTP	IMLHGFPPAPPKPD	1471
NP_724394.2	1085	SATINNCSTFQ-----	TYHADTDI	FNVPancLPP	rtnLSLPNSFGSSLES	SFSNSYSNKENSMKS[9]SSG	1157
XP_016771852.2	1464	SPPEKDLNKNQ-CESSVCMTPTKFTYPR---	TPNVQ---	IPP---	LTLHPSWHQITSDG--SNLLSPMK	TLLTA SEN	1528
XP_011158463.1	1487	SPPEDVMCKEEhWKSSLWMSPTKFTYSQDEHS	TNVQ---	VPP---	LTLPSWNQMLSGDGI	SNLLSPTKNLLPA AAN	1556
XP_024227255.1	1472	SPPEEDLDKDQ-WESSVWTTPTKFAYL	RDEHATNVH---	VPP---	FTLPLSWNHITSCD--SNLLSPTKN	LLTA AAN	1539
NP_724394.2	1158	ELNAS[6]TNISLGTGIAVDTSNEPSEL[8]	NRPNSSNFRKSDNGTDG---	TYTIGNYIAPPIGS	IYEPLKYNGQDKEKL		1242
XP_016771852.2	1529	PLNPC TSPFFSSKHNLVVAPHPSEL	PLPSLSLTPKKNMSSE--	AVAENSINKQENTVNNLI	EDMSLKNNESDNS		1600
XP_011158463.1	1557	PLYPP TSPYYPKP---VIAPHPSEL	PLPSLSLTPKKKILVD-----	NQKKIATNARL--	LNLASSENE	EDV	1616
XP_024227255.1	1540	PLNPR TSPFFSSKRNLVVAPHPSEL	PLPSLSLTPKKNVSSENi	IIAESFTNKQEKIVNSS	LEDINLKNNENDSS		1613
NP_724394.2	1243	PFWIDPIWSKGSEQLRHDILN[4]	KARTTKTFSN	ILSP[24]		1305	
XP_016771852.2	1601	NAKTNSNKEKYSTPTKQLFTS	KRRLAAQFNQPIES			1635	
XP_011158463.1	1617	-IDDES	SDSYSTSSKH-FKG	KRRLAAQFNQPIEP		1649	
XP_024227255.1	1614	NMEGNGTKEKHSTPTQQLFTS	KRRLAAQFNRP	IES		1648	

Confidently predicted domains, repeats, motifs and features:

Name	Start ▲	End	E-value
RRM	242	310	0.194
RRM	601	675	0.687
low complexity	869	881	N/A
low complexity	1204	1215	N/A
low complexity	1364	1385	N/A
low complexity	1453	1466	N/A
low complexity	1548	1560	N/A

Click on a row to highlight the feature in the diagram above. Click the feature name for more information.

使用CAS-DESIGNER 进行grna设计

RGEN Target (5' to 3')[?]	Position[?]	Cleavage Position (%)ate[?]	Direction[?]	GC Contents (%, w/o PAM)[?]	Out-of-frame Score[?]	Mismatches[?]		
						0	1	2
GACGCGTTTTGCTAATTTGTGGG	93	33.1	-	40.0	74.5	Available After Job is Done		
AGACGCGTTTTGCTAATTTGTGG	94	33.4	-	40.0	72.5	Available After Job is Done		
ATTGTATTTTCATAAGGCGAAGG	135	47.3	-	30.0	41.8	Available After Job is Done		
GTTTGTATTGTATTTTCATAAGG	141	49.3	-	20.0	58.3	Available After Job is Done		
TCTGTATCACTTGGATGATAAGG	192	66.6	-	35.0	46.8	Available After Job is Done		
TCTTCACTTTCTGTATCACTTGG	201	69.6	-	35.0	62.9	Available After Job is Done		
TACAGAAAGTGAAGAAGTTGAGG	209	76.0	+	35.0	59.8	Available After Job is Done		

使用CRISPOR进行潜在脱靶效应评估

Predicted guide sequences for PAMs

Ranked by default from highest to lowest specificity score (Hsu et al., Nat Biot 2013). Click on a column title to rank by a score.

If you use this website, please cite our paper in NAR 2018. Too much information? Look at the CRISPOR manual.

Download as Excel tables: [Guides](#) / [Guides, all scores](#) / [Off-targets](#) / [Saturating mutagenesis assistant](#)

Position/ Strand ⓘ	Guide Sequence + PAM + Restriction Enzymes ⓘ <input type="checkbox"/> Only G- <input type="checkbox"/> Only GG- <input type="checkbox"/> Only A- ⓘ	MIT Specificity Score ⓘ	CFD Spec. score ⓘ	Predicted Efficiency ⓘ Show all scores			Outcome		Off-targets for 0-1-2-3-4 mismatches + next to PAM ⓘ	Genome Browser links to matches sorted by CFD off- target score ⓘ <input type="checkbox"/> exons only <input type="checkbox"/> chrom 14 only
				Doench '16	Mor.-Mateos	Doench-RuleSet3	Out-of-Frame	Lindel		
21 / fw	GACGCGTTTTGCTAATTTGT GGG ⚠ Not with U6/U3 ⚠ Inefficient Cloning / PCR primers	99	100	41	36	-108	71	87	0-0-0-1-3 0-0-0-0-0 4 off-targets	4:intergenic:GB46677-GB46676 3:intron:AP 4:intergenic:H-GB47775 show all...

可能脱靶位点几乎不会影响基因功能，
经评估此条sgRNA特异性很高，效果很好

基因编辑系统递送方法

显微注射技术

将纯化的sgRNA-Cas9质粒混合物（浓度 ≥ 200 ng/ μ L）注射至蜜蜂卵的生殖质区域，注射时间控制在产卵后2小时内（胚胎发育早期），注射体积为2-5 nL以避免细胞损伤。



第三节

基因编辑验证与分析



基因组DNA提取与PCR验证

高质量DNA提取

采用改良的CTAB法或商业试剂盒提取蜜蜂胚胎基因组DNA，确保DNA完整性（A260/A280比值1.8-2.0），避免降解影响后续PCR扩增效率。

靶位点特异性引物设计

根据CRISPR靶序列上下游设计引物（长度18-22bp，Tm值55-60°C），扩增包含编辑位点的200-500bp片段，通过琼脂糖凝胶电泳验证扩增特异性。

PCR产物纯化

对PCR扩增产物直接进行Sanger测序，利用软件分析突变类型和频率，省略载体克隆步骤。

测序分析与编辑 效率评估



Sanger测序与峰图解析

对PCR产物直接测序，通过Chromas软件分析峰图重叠情况，若出现双峰或噪声信号，提示存在插入/缺失突变 (Indels)。

二代测序深度分析

采用Illumina平台对靶区域进行高通量测序 (覆盖深度 $\geq 1000\times$)，使用CRISPResso2工具统计编辑效率 (突变reads占比)，区分杂合/纯合突变类型。



编辑类型统计

根据测序结果分类突变类型 (如单碱基插入、大片段缺失等)，计算各类型占比，评估CRISPR/Cas9系统的偏好性。



第四节

减数分裂表型分析



染色体行为观察 技术

01

荧光原位杂交 (FISH)

通过标记特定DNA探针与减数分裂染色体结合，可直观观察蜜蜂生殖细胞中染色体的配对、联会和分离行为，揭示基因编辑对染色体动态的影响。

02

免疫荧光染色

利用抗联会复合体蛋白（如SCP3）或组蛋白修饰抗体（如 γ -H2AX），定位减数分裂过程中染色体结构变化，分析CRISPR-Cas9敲除后联会异常或断裂频率的增加。

蜜蜂遗传改良的 潜在应用

抗病性增强

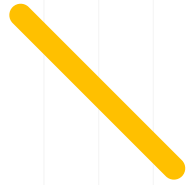
通过靶向编辑蜜蜂免疫相关基因（如抗菌肽基因），可培育对美洲幼虫腐臭病、蜂螨等病虫害具有更高抗性的蜂群，减少养殖中化学药剂的使用。

高产性状优化

针对蜂王产卵量、工蜂采集效率等经济性状相关基因（如卵黄蛋白原基因）进行编辑，提升蜂蜜、蜂王浆等产品的产量和质量。

环境适应性改良

编辑与温度耐受、解毒代谢相关的基因（如热休克蛋白基因），帮助蜂群适应气候变化或农药暴露等环境压力，降低越冬死亡率。



THANKS

