



CRISPR 基因编辑技术虚拟仿真教学软件的构建及应用

卢亚萍^{1,2} 成丹^{1,2} 鲁燕舞^{1,2} 包浩然^{1,2} 陈军^{1,2} 崔瑾^{*1,2}

1 南京农业大学农业生物学国家级虚拟仿真实验教学中心 江苏 南京 210095

2 南京农业大学生命科学学院 江苏 南京 210095

摘要: CRISPR 基因编辑技术逐渐成为一个强有力的分子技术, 已越来越广泛地应用于科学研究和临床试验。在高校教学实践中, 为了解决该实验原理复杂、操作难度大、周期长、成本高等问题, 构建了 CRISPR 基因编辑仿真教学软件。该软件包括原理演示和实训操作 2 个模块。原理部分通过 3D 技术呈现出每个分子的结构, 并以动画的形式演绎 CRISPR-Cas9 的分子机制。实训操作部分模拟了整个实验的操作过程, 学生可以通过互动的形式在电脑上反复学习和操作。该交互式虚拟实验能激发学生的学习兴趣, 显著提高实验教学质量。

关键词: CRISPR, 基因编辑, 虚拟仿真, 实验教学

Construction and application of virtual simulation teaching software of CRISPR gene editing technology

LU Yaping^{1,2} CHENG Dan^{1,2} LU Yanwu^{1,2} BAO Haoran^{1,2} CHEN Jun^{1,2} CUI Jin^{*1,2}

1 National Experimental Teaching Centre for Virtual Simulation of Agrobiolgy, Nanjing Agricultural University, Nanjing, Jiangsu 210095, China

2 School of Life Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing, Jiangsu 210095, China

Abstract: CRISPR, a gene editing technology, has become a powerful molecular technology which has been increasingly applied in scientific research and clinical trials. In order to solve the problems of high complexity in principle, difficulties in operation, high time consumption and economic cost, we have constructed a virtual simulation teaching software of CRISPR gene editing technology that can be utilized in the experimental teaching. The system consists of two modules, which are principle demonstration and operation training. In the principle part, the structure of each molecule is presented by 3D technology, and the molecular mechanism of CRISPR-Cas9 is displayed in the form of animation. The practical operation part simulates the operation process of the whole experiment, and students can learn and operate repeatedly on the computer in the form of interaction. This interactive virtual experiment can stimulate students' interest in learning, as well as significantly improving the quality of experimental teaching.

Keywords: CRISPR, gene editing, virtual simulation, experimental teaching

Foundation item: Teaching Reform Project of Nanjing Agricultural University (2017Y001)

***Corresponding author:** Tel: 86-25-84395773; E-mail: cuijin@njau.edu.cn

Received: 14-04-2020; **Accepted:** 15-07-2020; **Published online:** 10-10-2020

基金项目: 南京农业大学教改项目(2017Y001)

***通信作者:** Tel: 025-84395773; E-mail: cuijin@njau.edu.cn

收稿日期: 2020-04-14; **接受日期:** 2020-07-15; **网络首发日期:** 2020-10-10

1 CRISPR 技术虚拟仿真教学软件的构建思路

21 世纪是生命科学的世纪, 分子生物学不断迅猛发展, 新技术、新方法层出不穷^[1]。在 20 世纪末至 21 世纪初, 伴随着分子克隆、动物克隆、转基因、基因敲除、RNAi 干扰、基因组高通量测序等新技术的发明和应用, 基因编辑技术也成为一个新的研究热点。在短短几年之内, 基因编辑技术已经成为了生物科学领域炙手可热的研究工具, 并成功应用于包括猕猴、猪、兔、斑马鱼、水稻、拟南芥和土豆等多个物种^[2-6]。

作为高等农业院校, 在培养学生的分子生物学实验技能的同时, 激发学生的学习兴趣、提高学生的科学思维和自主创新能力尤为重要。我们的教学改革要紧跟科学研究前沿, 不断对实验内容进行调整和补充。除了传统的验证性实验, 还要增加综合性、设计性和创新性实验^[7]。在调整实验内容的同时, 还要考虑到实验教学的可行性和效果。部分分子生物学实验的教学内容难度大、周期长、成本高, 同时对实验时间、场所、实验操作及实验室的管理等方面都有较高的要求。随着信息技术的高速发展, 现代化的教学手段可以拓展实验教学领域、丰富实验教学内容、提高实验教学水平。

1.1 CRISPR 技术简介及教学实践

基因编辑技术指对目标基因进行“编辑”, 实现对特定 DNA 片段的敲除、插入等。CRISPR 是细菌和古细菌为防御病毒攻击而演化来的获得性免疫机制。CRISPR-Cas 基因编辑技术是继锌指核酸内切酶(Zinc-Finger Nuclease, ZFN)、类转录激活因子效应物核酸酶(Transcription Activator-Like Effector Nuclease, TALEN)之后出现的第三代基因组定点编辑技术^[8]。由于其相对操作简单、实验费用低和实验周期短, CRISPR-Cas 这项基因编辑技术自从问世以来已经得到很多关注, 目前已在 HIV 疫

苗、癌症治疗靶点筛选等领域进行应用研究^[9-10]。

基因编辑技术也已成为高校科学研究及实验室越来越常用的技术, 和其他的分子生物学技术一样, 相关专业的研究生甚至本科生需要掌握其实验原理、实验方案和步骤。因此, 基因编辑技术作为分子生物学教学内容, 正逐渐加入到高校理论课和实验课的教学^[11]。目前, 在我校的教学实践中, CRISPR-Cas 实验教学主要在研究生的创新实验课以及本科生的开放实验课中开设。

1.2 CRISPR 虚拟仿真教学的必要性

CRISPR-Cas 基因编辑技术的原理及步骤都较为复杂, 涉及生物化学、分子生物学、细胞生物学和生物信息学等学科, 对于教师的讲述和学生的理解、操作都存在较大难度。因此需要更先进的教学手段、多途径多方位传授和学习相关知识和技术。

虚拟仿真教学综合运用虚拟现实、多媒体、人机交互、数据库、网络通信等多种技术, 通过构建逼真的可视化环境和对象, 使学生在开放、自主、交互的虚拟环境中开展高效、安全、经济、便捷的学习活动, 达到实体实验不具备或难以实现的教学效果^[11]。虚拟仿真教学是对传统教学的拓展、补充、延伸和提升, 其重点更加偏向于学生对概念的理解、对原理的掌握、对实验过程的熟悉以及分析解决问题能力的提升。同时, 虚拟仿真教学内容活泼生动, 可以在电脑和手机等终端呈现, 对新时代的大学生具有很大的吸引力, 可以促进他们在课内外反复学习和巩固。

我校农业生物学虚拟仿真实验教学中心是 2014 年首批国家级虚拟仿真实验教学中心。经过 5 年多的努力, 目前已建成农业生物学虚拟仿真实验教学信息管理平台 and 江苏省级虚拟仿真实验教学共享平台, 建设了生物学相关虚拟仿真教学资源 20 余项^[12-14], 并且开发了虚拟仿真实验查重系统。CRISPR-Cas 基因编辑技术是我们近年来自主开发的又一项专业实验教学软件。

2 CRISPR 教学软件的设计及内容

本虚拟仿真实验软件的开发基于校园网建立 B/S 网络构架, 并通过 Internet/Intranet 模式下应用数据库, 易于把握且成本也比较低。我们利用 Visual Studio、3D Max、Unity 3D 等工具建立模型、制作多媒体资源、构建基于 ASP.NET 的交互式网络平台; 采用 Window Server、Internet Information Service 及 SQL Server 数据库作为网站服务器端软件; 采用 Dell Power Edge R720 服务器作为硬件支持。

CRISPR 教学软件包括 CRISPR-Cas 基因编辑技术的原理演示和实训操作 2 部分(图 1)。原理部分主要是通过 3D 技术呈现出每个分子的结构, 以动画的形式演绎细菌内 CRISPR-Cas9 的分子机制, 同时介绍人工构建的 CRISPR-Cas9 工作原理。实训操作分为实验介绍、实验模拟、实验考核几个部分, 模拟了整个实验的操作过程, 学生可以通过互动的形式在电脑上反复学习、操练和自检。

2.1 CRISPR-Cas9 的工作原理演示模块

在各种细菌和古细菌中陆续发现了很多成簇的并且规律间隔的短回文重复序列(Clustered

Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat Sequences), 称为 CRISPR, 而 Cas 是指 CRISPR 相关的基因^[12]。在课件的最前面首先展示了“基本概念”, 接着介绍了 Cas 基因座的主要组成(图 2A)和 Cas9 蛋白结构组成(图 2B)。Cas9 蛋白由 1 409 个氨基酸残基组成, 含有 2 个核酸酶结构域: 氨基端的 RuvC-Like 结构域和位于蛋白质中间位置的 HNH 核酸酶结构域^[8]。软件采用三维立体的方式呈现分子结构, 标识出主要的结构域, 分子可以 360° 旋转, 形象生动, 使得学习者能更好地理解抽象的微观分子。

CRISPR-Cas 基因编辑技术的发现是基于细菌的一种免疫性, 即通过将入侵噬菌体和质粒 DNA 的片段整合到 CRISPR 位点, 并利用相应的 crRNAs 来指导同源序列的降解, 从而瓦解外源 DNA 的攻击。课件就细菌的这种免疫过程做了详细的介绍, 以便学习者更好地了解这项技术的来源和机制: 当噬菌体等外源的 DNA 侵染细菌时, 细菌体内的 CRISPR 会在前导区调控下转录成 crRNA, crRNA 通过碱基的配对与 tracrRNA 结合, 形成 tracrRNA/crRNA 复合物(gRNA), gRNA 复合物与 Cas 蛋白结合, 对靶序列进行切割(图 3)。

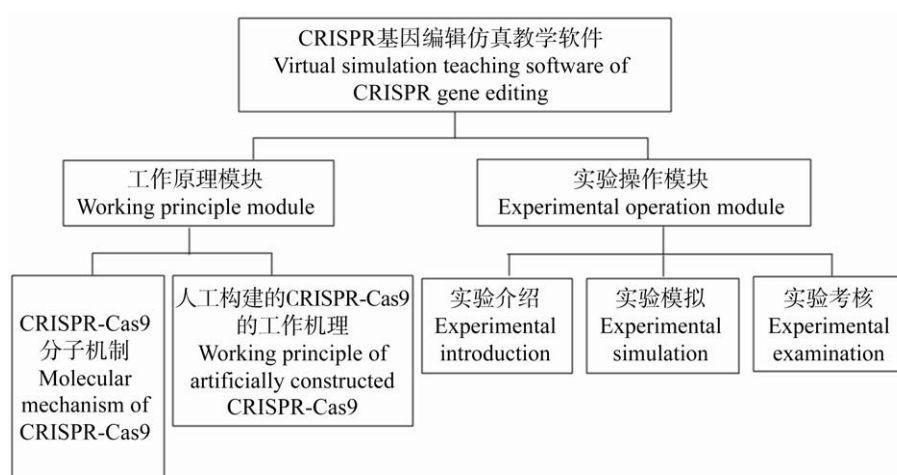


图 1 CRISPR 基因编辑仿真教学软件设计构架

Figure 1 Design framework of the simulation teaching software of CRISPR gene editing

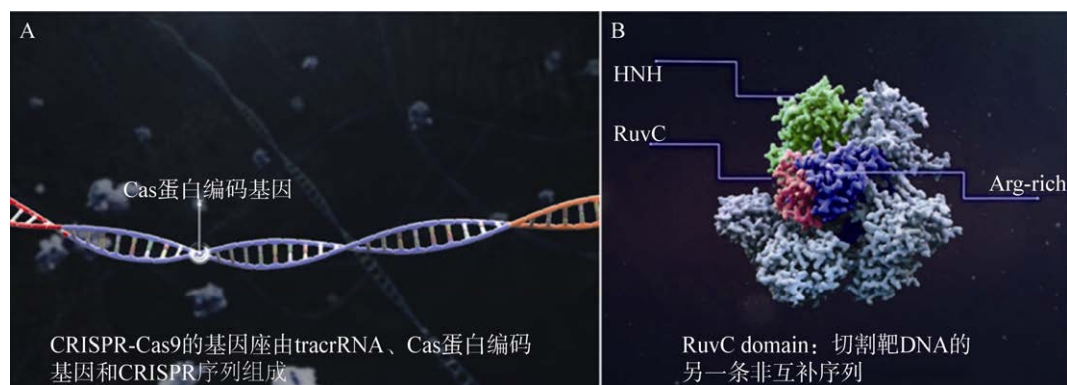


图2 Cas基因座的主要组成(A)及Cas9蛋白结构组成(B)

Figure 2 The main components of Cas locus (A) and the structure of Cas9 protein (B)

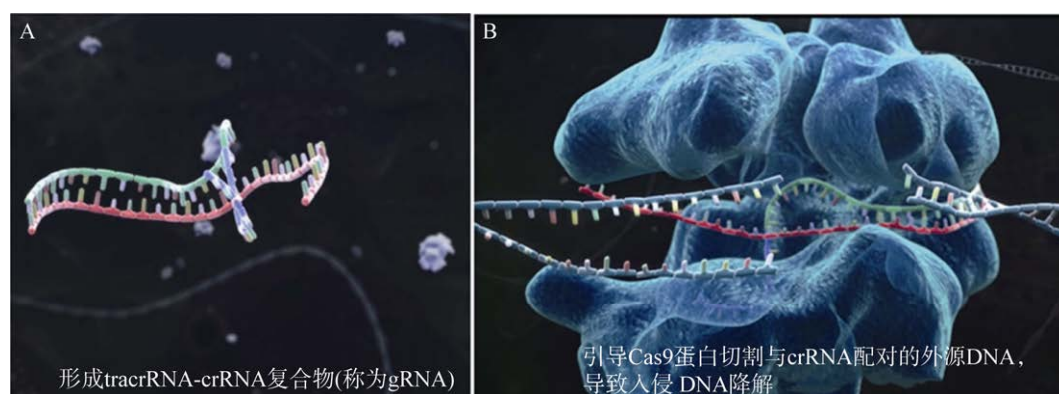


图3 引导RNA (gRNA)结构模型(A)及CRISPR-Cas9剪切DNA的机制(B)

Figure 3 The structure model of guide RNA (A) and the mechanism of DNA cutting by CRISPR-Cas9 (B)

人工构建的CRISPR-Cas9系统是在细菌免疫机制的基础上, 研究者们将crRNA和tracrRNA融合入同一条单链中, 设计出了单链引导RNA。CRISPR-Cas9免疫系统仅需要一个Cas9蛋白来切割双链DNA, 该系统是目前被改造最为成功的人工核酸酶^[8]。Cas9内切酶在sgRNA分子引导下, 对特定位置DNA进行切割, 产生双链断裂, 形成了双链DNA缺口。然后, 细胞会借助同源重组机制或非同源末端连接机制对已经断裂的DNA进行修复, 从而达到基因插入或缺失的目的。

整个课件设计中, 流畅清晰的画面使得这一复杂的原理变得生动明了, 大大地降低了知识的

枯燥性。简明动听的解说配音进一步改善了用户体验, 强化了学习效果。4 min左右的动画课件, 方便在电脑及手机上播放, 让学生可以在课前、课后随时预习和复习。

2.2 CRISPR-Cas9的实验操作模块

实验操作模块包括实验介绍、实验模拟和实验考核3个部分。“实验介绍”部分包括CRISPR技术简介、CRISPR技术应用及CRISPR系统使用方法。“实验模拟”部分是本模块的核心内容, 涵盖了常规的CRISPR-Cas9实验过程的一百多步操作。实验场景、器具和操作过程是在实验专业技术人员和软件编写人员反复研讨和校对后设计制作出来的, 兼顾了科学性、美观性和用户友好性。

CRISPR-Cas9 基因编辑是个综合性大实验, 主要包括 sgRNA 插入到表达载体、共表达载体转化农杆菌、转基因植株的构建与筛选 3 部分。实验涉及很多分子生物学实验技术, 如核酸电泳、PCR、分子克隆、基因转化等。课件完好地呈现了分子生物学实验室的常规工作状态和场景, 并且突出了操作部分的仪器和器具, 同时对操作步骤进行简单而必要的提示。软件首先介绍了实验涉及的 3 种载体(ATU6-26SK-sgRNA、35S-CAS9-NOS-SK 及 PCAMBIA 1300)及其功能, 并根据靶基因序列设计引物, 然后是构建重组载体、重组载体克隆、重组载体转化农杆菌, 最后是“蘸花法”浸染拟南芥, 在下一代的种子中筛选突变植株。操作者可以在“提示”下按顺序逐步完成实验, 也可以调节进度条, 直接跳到需要练习的步骤。

实验考核部分列出了实验原理和操作注意事项相关的习题, 让学生在学习后通过习题进行自我检测和巩固, 系统会针对学生的答题情况进行打分。题型主要是选择、填空和判断, 考核涉及脱靶效应、修复机制、CRISPR-Cas9 发挥作用的场所、PAM 的含义等知识点, 并给出正确答案提示, 借此帮助学生理解和强化实验中的知识和原理。学生可以反复测试, 直至完全掌握相关知识。教师可以得到学生登录次数、练习次数和测试情况等信息, 从而了解学生自主学习的态度和效果。

3 CRISPR 教学软件的特色及应用

虚拟仿真实验教学具有开放性、广域性、交互性和实时性的特点, 是信息化时代教学改革的重要创新^[15]。“CRISPR 基因编辑仿真实验软件”是我校虚拟仿真实验中心自主开发的又一项专业实验教学软件, 已申请了软件著作权, 是国内首个 CRISPR 原理及实验相关的软件。客户可以通过浏览器及 APP, 高效、快捷地访问我中心虚拟仿真教学系统(<http://bio.njau.edu.cn/>), 在互联网上随

时随地访问和学习。

仿真实验与课堂实验功能互补、虚实结合, 给学生在实体实验之前、之后提供了预习和复习的环境, 打破了实体教学时间和空间的限制, 将学习有效延伸到课堂之外; 另外, 虚拟仿真动画演示将抽象的微观分子具体化、形象化, 大大地增强了学习的趣味性, 降低了学习的难度; 同时, 仿真实验作为一个强有力的教学辅助手段, 弥补了实验教学中师生比偏低的局限, 学生可以在仿真课件的帮助下自主、反复学习, 还可以在互动平台上提问和相互交流。总之, 虚拟仿真软件在教学中的应用显著激发了学生的兴趣, 提升了学习效果。

CRISPR 基因编辑仿真实验软件已在我校生命科学学院试点运行, 应用在“生命科学研究方法与技术”为主题的“博士生创新技能培训”和“生物学实验技术概述”两门课程中。研究生的课程有较大的自主性和开放性, 学生根据自己的专业、兴趣和研究方向来选择实验, 然后以小组的形式完成。CRISPR-Cas9 是新开设的实验, 原理复杂、步骤多、耗时长, 学生们在教师的指导下学习应用仿真课件, 然后借助仿真课件自主学习实验相关知识、了解操作过程, 最后进入实验室完成实验。研究生对此款软件给予了高度的评价, 同时也提出了中肯的建议。我们将不断完善此教学软件, 并将其应用到本科生的“分子生物学实验”, 及“生物大分子实验”等开放性实验中, 使更多的学生快速、准确、深入地了解 and 掌握 CRISPR 基因编辑技术, 以便在将来应用到自己的科学研究中。

作为“江苏省生命科学虚拟仿真实验教学共享平台”和“全国生物与食品类虚拟仿真教学资源共享联盟”的牵头单位, 我中心一直秉持“开放、共享”的理念, 在建设优质仿真资源的同时, 深入研究虚拟仿真资源的管理及共享应用机制, 有力促进高校间优质实验资源的整合共享, 先后与浙江大学、南京师范大学、兰州大学、西藏农牧学

院、新疆农业大学等院校签订了共建共享协议。与其他的虚拟仿真资源一样,我们的“CRISPR 基因编辑仿真实验软件”也将和其他院校相关专业进行合作共享。

4 软件制作的关键问题及维护改进

CRISPR-Cas9 技术具有很强的专业性,软件制作的一个关键点就是内容的科学性和严密性,同时还要兼顾易懂性和趣味性。CRISPR-Cas9 技术的原理比较复杂^[16],我们在上课过程中发现,学生对该内容一知半解,或者看懂了以后又会忘记。“CRISPR-Cas9 的工作原理演示模块”目标在于准确、清晰地描述相关内容,让初学者能够看懂,让再学者能加深理解。我们的团队中有专门从事分子生物学教学和科研的教师,专门负责软件的内容设计、资料查询和脚本撰写。比如 Cas9 蛋白的结构模型是根据其氨基酸序列信息,用专门的软件推测出其结构,建模时尽量做到仿真。动画制作由专业的软件工程师完成,由于软件工程师缺乏生物学相关的知识背景,因此制作过程经历了多次沟通和修改。最后定稿前,我们又请了相关的专家对软件内容进行核验,避免存在科学性错误。

“CRISPR-Cas9 的实验操作模块”包含了该综合实验中的所有步骤,过程复杂且耗时长。为了减少同一操作(比如移液、离心等)的简单重复,实验中简化不同环节中相同的操作步骤。学习者可以根据自己的需要,越过熟练的步骤,跳转到其中的某些步骤进行练习。

软件开发的最后环节也是最重要的部分之一,就是在运行中进行修改和更新。我们团队教师进行了多次试验,同时在学生中进行了试运行。我们积极地与学生沟通,听取他们的反馈,并与软件开发人员沟通,及时修改存在的问题。目前通过虚拟仿真中心团队、课程教学老师以及学生对软件的反复使用,我们归纳了软件开发和运行方面存在的一些问题,计划在后续的软件更

新中进行完善。主要包括几个方面:

(1) 软件内容及实验方法可以进一步补充和完善:课件中以常用的模式植物拟南芥为材料,后期可以选用水稻等作物材料,或者一些动物材料;基因转化方法是“蘸花法”浸染,可以有其他的基因转化方法供选用。

(2) 操作步骤可以分为几个子模块,分别运行:该实验是个综合性大实验,实验步骤烦琐,花费的时间较长,因而可以将全部实验步骤分为几个部分,比如载体基础知识学习、重组载体构建、农杆菌转化、拟南芥转化,学生根据自身需要选择其中一部分或几部分进行操练。

(3) 不断提高动画中分子结构的精确性:随着科研技术的发展,对 CRISPR 相关基因及蛋白质结构的研究会更加精确,软件将与时俱进,做出更加精细的模型。

(4) 紧跟科学发展的前沿,在课件里链接一些最新的研究进展和应用实例。

5 结语

以学生为中心的虚实结合的互动教学,有利于培养学生自主学习、探究和解决科学问题的能力,达到提高教学质量和培养学生创新素质的目的,这也是高等院校现代化教育教学建设的必然趋势。在后续的软件使用和维护过程中,我们将紧密结合实体教学和学生培养目标的需要,进一步完善软件的内容和形式,使其成为被越来越多学生喜爱并乐于使用的教学工具,以达到资源最大化的利用,切实体现虚拟仿真教学手段的必要性和优越性。

REFERENCES

- [1] Qin LW, Hu Y, Wan J, Xiong GM, Yang JY, Deng LF, Yang JH, Li B. Construction and application of virtual simulation experimental platform for molecular biology[J]. *Experimental Technology and Management*, 2018, 35(7): 140-143,147 (in Chinese)
秦丽玮, 胡原, 万建, 熊国梅, 杨娇艳, 邓灵福, 杨继红, 李兵. 分子生物学虚拟仿真实验平台的建设与应用[J].

- 实验技术与管理, 2018, 35(7): 140-143,147
- [2] Niu YY, Shen B, Cui YQ, Chen YC, Wang JY, Wang L, Kang Y, Zhao XY, Si W, Li W, et al. Generation of gene-modified cynomolgus monkey via Cas9/RNA-mediated gene targeting in one-cell embryos[J]. Cell, 2014, 156(4): 836-843
- [3] Hai T, Teng F, Guo RF, Li W, Zhou Q. One-step generation of knockout pigs by zygote injection of CRISPR/Cas system[J]. Cell Research, 2014, 24(3): 372-375
- [4] Honda A, Hirose M, Sankai T, Yasmin L, Yuzawa K, Honsho K, Izu H, Iguchi A, Ikawa M, Ogura A. Single-step generation of rabbits carrying a targeted allele of the tyrosinase gene using CRISPR/Cas9[J]. Experimental Animals, 2015, 64(1): 31-37
- [5] Chang NN, Sun CH, Gao L, Zhu D, Xu XF, Zhu XJ, Xiong JW, Xi JJ. Genome editing with RNA-guided Cas9 nuclease in zebrafish embryos[J]. Cell Research, 2013, 23(4): 465-472
- [6] Jiang WZ, Zhou HB, Bi HH, Fromm M, Yang B, Weeks DP. Demonstration of CRISPR/Cas9/sgRNA-mediated targeted gene modification in *Arabidopsis*, tobacco, sorghum and rice[J]. Nucleic Acids Research, 2013, 41(20): e188
- [7] Zhang YS, Li Y, Chen YF. Exploration and practice on scientific research pattern of molecular biology experiment teaching[J]. Research and Exploration in Laboratory, 2010, 29(8): 238-240,270 (in Chinese)
- 张以顺, 黎茵, 陈云凤. 分子生物学实验的科研型教学模式探索与实践[J]. 实验室研究与探索, 2010, 29(8): 238-240,270
- [8] Burgess DJ. Technology: A CRISPR genome-editing tool[J]. Nature Reviews Genetics, 2013, 14(2): 80
- [9] Hartweger H, McGuire AT, Horning M, Taylor JJ, Dosenovic P, Yost D, Gazumyan A, Seaman MS, Stamatatos L, Jankovic M, et al. HIV-specific humoral immune responses by CRISPR/Cas9-edited B cells[J]. Journal of Experimental Medicine, 2019, 216(6): 1301-1310
- [10] Hart T, Chandrashekhar M, Aregger M, Steinhart Z, Brown KR, MacLeod G, Mis M, Zimmermann M, Fradet-Turcotte A, Sun S, et al. High-resolution CRISPR screens reveal fitness genes and genotype-specific cancer liabilities[J]. Cell, 2015, 163(6): 1515-1526
- [11] Xu B, Lei WP, Wang N, Zhang YY, Guo DS, Dong L. Design of virtual simulation practical teaching system for bird identification and field work methods[J]. Experimental Technology and Management, 2018, 35(10): 113-116,139 (in Chinese)
- 徐冰, 雷维蟠, 王宁, 张雁云, 郭冬生, 董路. 鸟类识别与野外工作方法虚拟仿真实习教学系统的设计[J]. 实验技术与管理, 2018, 35(10): 113-116,139
- [12] Cheng D, Cui J, Lu YW, Bao HR, Lu W, Zhang W, Shen ZG. Construction and application of virtual simulation training system in biological field practice[J]. Experimental Technology and Management, 2016, 33(12): 128-131,162 (in Chinese)
- 成丹, 崔瑾, 鲁燕舞, 包浩然, 陆巍, 张伟, 沈振国. 生物学野外实习虚拟仿真实训系统构建与应用[J]. 实验技术与管理, 2016, 33(12): 128-131,162
- [13] Qian M, Cui J, Cheng D, Yang N, He LY, He J, Shen ZG. The exploration on virtual simulation teaching mode of microbiology experiment in Nanjing Agricultural University[J]. Microbiology China, 2016, 43(4): 861-866 (in Chinese)
- 钱猛, 崔瑾, 成丹, 杨娜, 何琳燕, 何健, 沈振国. 南京农业大学微生物学虚拟仿真实验教学模式的探索[J]. 微生物学通报, 2016, 43(4): 861-866
- [14] Cui J, Cheng D, Lu YW, Bao HR, Lu YP. The construction and practice of the experimental teaching system of agricultural biology by virtuality and reality combination[J]. Laboratory Science and Technology in Universities, 2019(1): 1-4 (in Chinese)
- 崔瑾, 成丹, 鲁燕舞, 包浩然, 卢亚萍. “虚实互补”的农业生物学实验教学体系的构建与实践[J]. 高校实验室科学技术, 2019(1): 1-4
- [15] Xu J. Construction summary for the national experiment teaching centers of virtual simulation in 2013 and suggestions for this year's application[J]. Research and Exploration in Laboratory, 2014, 33(8): 1-5,25 (in Chinese)
- 徐进. 2013 年国家级虚拟仿真实验教学中心建设工作小结及 2014 年申报建议[J]. 实验室研究与探索, 2014, 33(8): 1-5,25
- [16] Wiedenheft B, Sternberg SH, Doudna JA. RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea[J]. Nature, 2012, 482(7385): 331-338