วารสารวิชาการพระจอมเกล้าพระนครเหนือ ปีที่ 31, ฉบับที่ 2 เม.ย.–มิ.ย. 2564
The Journal of KMUTNB., Vol. 31, No. 2, Apr.–Jun. 2021

บทความวิจัย

แบบแผนการถ่ายทอดทางพันธุกรรมของยีน Salt Inducible Kinase1 (*sik1*$^{(+/-)}$) ในปลาม้าลาย (*Denio rerio*) กลายพันธุ์แบบเฮเทอโรไซกัส

วัลย์ลดา กลางนุรักษ์* และ สุทธิรัตน์ ปัญจขันธ์
สาขาวิทยาศาสตร์การประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
Tokumoto Toshinobu
Department of Biological Science, Faculty of Science, National University Corporation Shizuoka University, Shizuoka, Japan

* ผู้นิพนธ์ประสานงาน โทรศัพท์ 09 5569 3235 อีเมล: wanlada.kl@kmitl.ac.th DOI: 10.14416/j.kmutnb.2020.12.008
รับเมื่อ 1 เมษายน 2563 แก้ไขเมื่อ 13 พฤษภาคม 2563 ตอบรับเมื่อ 19 พฤษภาคม 2563 เผยแพร่ออนไลน์ 14 ธันวาคม 2563
© 2021 King Mongkut's University of Technology North Bangkok. All Rights Reserved.

บทคัดย่อ

ยีน Salt Inducible Kinase1 (*sik1*) มีบทบาทในเรื่องของการควบคุมสมดุลกลูโคสและไขมันใน Metabolic Pathway และมีความเกี่ยวข้องกับการตกไข่ในปลาม้าลาย การสร้างตัวกลายพันธุ์ที่ถูกดัดแปลงพันธุกรรมโดยใช้เทคนิค CRISPR/Cas9 นั้น อาจทำให้แบบแผนการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมของยีนไม่เป็นไปตามกฎของเมนเดล ในการวิจัยครั้งนี้จึงได้ศึกษารูปแบบการถ่ายทอดทางพันธุกรรมในปลาม้าลายรุ่น F2 ซึ่งได้มาจากการผสมพันธุ์ระหว่างปลาม้าลายรุ่นพ่อแม่ (F1) ที่เป็นตัวกลายพันธุ์แบบเฮเทอโรไซกัส (*sik1*$^{(+/-)}$) และไวลด์ไทป์ โดยตรวจสอบรูปแบบการเปลี่ยนแปลงบนสายดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Heteroduplex Mobility Assay (HMA) และ Sequencing ผลการศึกษาพบว่า บริเวณดีเอ็นเอเป้าหมายของปลาม้าลายกลายพันธุ์แบบเฮเทอโรไซกัสในรุ่น F2 (*sik1*$^{(+/-)}$) มีการเพิ่มของลำดับเบส 12 ตำแหน่ง และการหายไปของลำดับเบส 9 ตำแหน่ง ส่งผลให้สามารถแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนได้เพียง 3 ตำแหน่ง เท่านั้น เช่นเดียวกับปลาม้าลายกลายพันธุ์ในรุ่น F1 (*sik1*$^{(+/-)}$) แสดงให้เห็นว่ารหัสพันธุกรรมที่ถูกเปลี่ยนแปลงสามารถถ่ายทอดไปยังรุ่นลูกได้ แต่แบบแผนการถ่ายทอดไม่เป็นไปตามกฎของเมนเดล ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าเมื่อยีน *sik1* ถูกดัดแปลงลักษณะทางพันธุกรรมทำให้เสียสมดุลกลูโคสและไขมัน ส่งผลทำให้ปลาที่กลายพันธุ์ตาย หรืออาจเกิดความผิดปกติในช่วงการตกไข่ จึงทำให้สัดส่วนระหว่างตัวที่เป็นไวลด์ไทป์และตัวกลายพันธุ์แบบเฮเทอโรไซกัส (*sik1*$^{(+/-)}$) ไม่เป็นไปตามกฎของเมนเดล ดังนั้นงานวิจัยครั้งนี้จึงมีประโยชน์ในการวางแผนเพื่อผลิตจำนวนตัวกลายพันธุ์แบบเฮเทอโรไซกัส (*sik1*$^{(+/-)}$) ที่ต้องการสำหรับการศึกษาที่เกี่ยวข้องกับบทบาทของยีน *sik1* ในอนาคตต่อไป

คำสำคัญ: เทคนิค CRISPR/Cas9, Gene Knockout ตัวกลายพันธุ์แบบเฮเทอโรไซกัส กฎของเมนเดล

การอ้างอิงบทความ: วัลย์ลดา กลางนุรักษ์, สุทธิรัตน์ ปัญจขันธ์ และ Tokumoto Toshinobu, "แบบแผนการถ่ายทอดทางพันธุกรรมของยีน salt inducible kinase1 (*sik1*$^{(+/-)}$) ในปลาม้าลาย (*Denio rerio*) กลายพันธุ์แบบเฮเทอโรไซกัส," *วารสารวิชาการพระจอมเกล้าพระนครเหนือ*, ปีที่ 31, ฉบับที่ 2, หน้า 346–355, เม.ย.–มิ.ย. 2564.

Research Article

Gene Transmission Pattern of Salt Inducible Kinase1 (*sik1*$^{(+/-)}$) Heterozygous Mutant in Zebrafish (*Denio rerio*)

Wanlada Klangnurak* and Sutthirat Panchakhan
Fisheries Science, Faculty of Agricultural Technology, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok, Thailand
Tokumoto Toshinobu
Department of Biological Science, Faculty of Science, National University Corporation Shizuoka University, Shizuoka, Japan

* Corresponding Author, Tel. 09 5569 3235, E–mail: wanlada.kl@kmitl.ac.th DOI: 10.14416/j.kmutnb.2020.12.008.
Received 1 April 2020; Revised 13 May 2020; Accepted 19 May 2020; Published online: 14 December 2020
© 2021 King Mongkut's University of Technology North Bangkok. All Rights Reserved.

Abstract

Salt inducible kinase1 gene (*sik1*) plays an important role in controlling glucose and lipid homeostasis of metabolism pathway. This gene is an ovulation-related gene in zebrafish. The mutant zebrafish which their genome were modified by CRISPR/Cas9 may lead to irregular genetic transmission pattern of Mendel's laws. This research aims to investigate gene transmission pattern in F2 zebrafish which was cross-breeding from F1 heterozygous mutants (*sik1*$^{(+/-)}$) and wild type. Genotype of all survived F2 zebrafish were checked by heteroduplex mobility assay (HMA) and sequencing. The results showed that 12 bp insertion and 9 bp deletion at F2 heterozygous mutants (*sik1*$^{(+/-)}$) could cause a stop codon after translation for 3 amino acids. The F1 heterozygous mutants (*sik1*$^{(+/-)}$) could heritage their genotype to F2 heterozygous mutants (*sik1*$^{(+/-)}$) but transmission pattern of *sik1*$^{(+/-)}$ was not in accordance with Mendel's laws. Some of F2 heterozygous mutants (*sik1*$^{(+/-)}$) may not survive due to the non-function of glucose and lipid homeostasis in metabolism pathway or abnormality during ovulation leading to non-Mendelian inheritance of gene transmission pattern. This research is a guide artic

Keywords: CRISPR/Cas9, Gene Knockout, Heterozygous Mutant, Mendelian Inheritance

Please cite this article as: W. Klangnurak, S. Panchakhan, and T. Toshinobu , "Gene transmission pattern of salt inducible kinase1 (*sik1*$^{(+/-)}$) heterozygous mutant in zebrafish (*Denio rerio*)," *The Journal of KMUTNB*, vol. 31, no. 2, pp. 346–355, Apr.–Jun. 2021 (in Thai).

1. บทนำ

ปลาม้าลาย (*Denio rerio*) จัดว่าเป็นสิ่งมีชีวิตต้นแบบ (Model Organism) ที่นิยมใช้ในการศึกษาเกี่ยวกับพฤติกรรมของสัตว์ การกลายพันธุ์ เภสัชวิทยา พิษวิทยา และระบบสืบพันธุ์ ปลาม้าลายจะเข้าวัยเจริญพันธุ์เมื่อมีอายุประมาณ 3 เดือน โดยตัวเมียสามารถปล่อยไข่ได้ทุกสัปดาห์ และมีจำนวนกว่า 100 ฟองต่อการปล่อยไข่ 1 ครั้ง หากต้องการผสมพันธุ์ปลาให้ได้คุณภาพและปริมาณของไข่และตัวอ่อนที่ดีอย่างต่อเนื่อง ควรทิ้งระยะห่างในการผสมพันธุ์ในแต่ละครั้งมากกว่า 5 วัน [1] อีกทั้งไข่ยังมีความโปร่งใสทำให้สามารถเห็นการพัฒนาภายในเซลล์ไข่ได้ชัดเจน เช่น การพัฒนาของตัวอ่อนในระยะแกสตรูลา (Gastrula) การพัฒนาของสมองและการเต้นของหัวใจซึ่งถือว่าเป็นข้อดีสำหรับการใช้ปลาม้าลายในการศึกษาการพัฒนาตัวอ่อนของสิ่งมีชีวิต [2], [3]

ยีน Salt Inducible Kinase (*sik*) อยู่บนโครโมโซมที่ 9 ของปลาม้าลาย ตั้งแต่ลำดับเบสตำแหน่งที่ 9,112,943 ถึง 9,122,055 ของจีโนม (Genome) โดยจัดอยู่ในกลุ่มยีนที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับ AMP-activated Protein Kinase (AMPK) ประกอบด้วย 3 หน่วยย่อย คือ *sik1*, *sik2* และ *sik3* ตามการศึกษาของ Sakamoto และคณะ [4] พบว่ายีน *sik* มีบทบาทเกี่ยวกับเมแทบอลิซึม (Metabolism) โดยควบคุมสมดุลกลูโคส และสมดุลไขมัน (Glucose and Lipid Homeostasis) ซึ่งการควบคุมการแสดงออกของยีนนี้จะถูกควบคุมโดยสัญญาณจากภายนอกเซลล์ (Extracellular Signals) เช่น ฮอร์โมน ทั้งนี้ Okamoto และคณะ [5] ได้รายงานว่า ยีน *sik1* มีการแสดงออกสูงใน Adrenal Cortex, Neural Tissues และ Adipose Tissues โดยจะมีการแสดงออกเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วภายใน 1 ชั่วโมง เมื่อได้รับการกระตุ้นจาก cAMP-PKA Signaling ที่บริเวณเนื้อเยื่อนั้นๆ และเมื่อหยุดกระตุ้นการแสดงออกจะลดลงสู่ปกติหลังจากเวลาผ่านไปหลายชั่วโมง อีกทั้งยังมีการศึกษาของ Klangnurak และคณะ [6] พบว่า ยีน *sik1* มีการแสดงออกสูงบริเวณรังไข่ของปลาม้าลายในช่วงการ Ovulation หรือการตกไข่ จึงมีความเป็นไปได้ว่ายีน *sik1* อาจมีบทบาทในการควบคุมการตกไข่ในปลาอีกด้วย ทั้งนี้ จึงจำเป็นที่จะต้องมีการศึกษาหน้าที่ของยีน *sik1* ที่มีความเกี่ยวข้องกับการตกไข่ในปลาม้าลาย โดยสร้างปลาม้าลายกลายพันธุ์ที่มีการหยุดการทำงานของยีน *sik1* (Gene Knockout) แล้วติดตามลักษณะทางจีโนไทป์ (Genotype) และฟีโนไทป์ (Phenotype) ที่เกิดขึ้นในแต่ละชั่วรุ่น

เทคนิค Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats and CRISPR-associated Protein 9 หรือ CRISPR/Cas9 เป็นเทคโนโลยีการปรับเปลี่ยนลักษณะทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตที่ทันสมัยในปัจจุบัน [6]–[11] ซึ่งสามารถเปลี่ยนแปลงรหัสพันธุกรรมที่ตำแหน่งเป้าหมายได้อย่างแม่นยำ จากนั้นสายดีเอ็นเอจะมีการซ่อมแซมบริเวณตำแหน่งเป้าหมายแบบ Non Homologous End Joining (NHEJ) หรือ Homology Directed Repair (HDR) [8], [12] ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ขึ้นตรงตำแหน่งเป้าหมาย หลังจากสร้างตัวกลายพันธุ์สำเร็จแล้ว จำเป็นต้องมีการตรวจสอบแบบแผนการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรม หรือ Gene Transmission คือการศึกษารูปแบบการถ่ายทอดลักษณะทางจีโนไทป์จากรุ่นพ่อแม่ไปยังรุ่นลูก โดยอาศัยหลักการตามกฎของเมนเดล (Mendelian Role) ยกตัวอย่างในกรณีที่ผสมพันธุ์ปลาในรุ่นพ่อแม่ที่มีลักษณะทางจีโนไทป์แบบโฮโมไซกัส โดมิแนนท์ (Dominant Homozygous; AA) และเฮเทอโรไซกัส (Heterozygous; Aa) ลูกรุ่นถัดไปที่จะมีลักษณะทางจีโนไทป์ที่เป็นไปได้ทั้งแบบโฮโมไซกัส โดมิแนนท์ (AA) และเฮเทอโรไซกัส (Aa) ในสัดส่วน 1 : 1 เมื่อสามารถระบุตัวกลายพันธุ์และทราบรูปแบบการถ่ายทอดลักษณะทางจีโนไทป์แล้ว จึงสามารถศึกษาลักษณะทางฟีโนไทป์ที่เปลี่ยนแปลงไปจากเดิมในตัวกลายพันธุ์ เพื่อศึกษาหน้าที่ของยีนที่สนใจต่อไป

การปรับเปลี่ยนลักษณะทางพันธุกรรมในยีน *sik1* ซึ่งเป็นกลุ่มยีนที่มีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการเมแทบอลิซึมที่สำคัญในการดำรงชีวิตของปลา อาจมีผลกระทบต่อแบบแผนการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมของตัวกลายพันธุ์แบบเฮเทอโรไซกัส (Heterozygous Mutant) ได้ ในการศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษารูปแบบการทอดลักษณะทางพันธุกรรมจากรุ่นพ่อแม่ (F1) ที่เป็นตัวกลายพันธุ์แบบ

เฮเทอโรไซกัส (*sik1*$^{(+/-)}$) ผสมกับไวลด์ไทป์ (Wild Type) สู่รุ่นลูก (F2) เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการสร้างตัวกลายพันธุ์แบบโฮโมไซกัส (*sik1*$^{(-/-)}$) ในการศึกษาหน้าที่ของยีน *sik1* ต่อไป

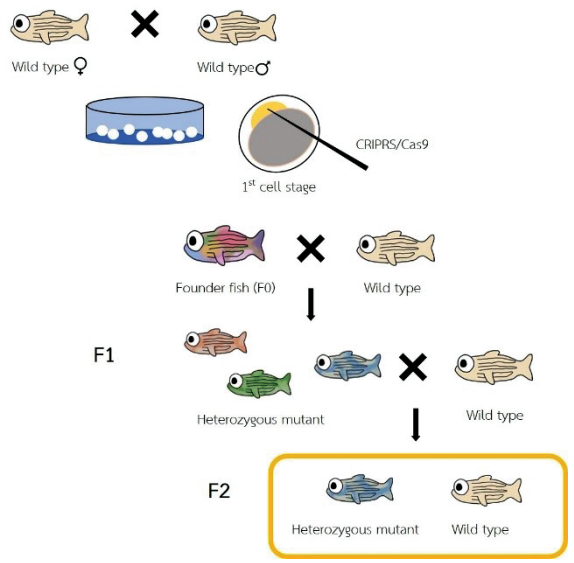
2. วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

2.1 วิธีการเลี้ยงดูปลาม้าลาย

เลี้ยงปลาม้าลายสายพันธุ์ Roy Orbison (Roy) ภายใต้สภาวะห้องปฏิบัติการที่ควบคุมแสงสว่าง 14 ชั่วโมง มืด 10 ชั่วโมง และควบคุมอุณหภูมิที่ 28 องศาเซลเซียส ตามวิธีการมาตรฐานสำหรับเลี้ยงปลาม้าลายของ Westerfield [13] ในตู้ขนาด 6,500 ลูกบาศก์เซนติเมตร ให้อากาศอย่างเพียงพอ และมีการหมุนเวียนน้ำ ให้อาหาร 2 ครั้ง (9.00 และ 16.00 น.) ต่อวัน ในช่วงเดือนแรกของตัวอ่อนจะให้ *Paramecium* spp. หลังจากนั้นจะทำการเปลี่ยนอาหารเป็นอาหารแผ่นสำเร็จรูป (ยี่ห้อ Tetra) ร่วมกับ *Paramecium* spp. และเปลี่ยนอาหารเป็นอาหารแผ่นสำเร็จรูปอย่างเดียว เมื่อปลามีอายุ 2 เดือน จนสิ้นสุดการทดลอง การดำเนินการวิจัยในสัตว์ทดลองครั้งนี้เป็นไปตาม การอนุมัติให้ดำเนินการเลี้ยงและใช้สัตว์ของ Institutional Ethics Committee of Shizuoka University, Japan (approved No. 29F-2)

2.2 การดัดแปลงลำดับพันธุกรรมด้วยวิธี CRISPR/Cas9

การดัดแปลงลำดับพันธุกรรมด้วยวิธี CRISPR/Cas9 ต้องอาศัยการทำงานร่วมกันระหว่าง Single Guide RNA (sgRNA) และเอนไซม์ Cas9 โดยสังเคราะห์ sgRNA ของยีน *sik1* จาก Oligonucleotide ด้วยวิธี *in vitro* ตามวิธีการที่อธิบายใน MEGA shortscript™ Kit (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) และใช้เอนไซม์ Cas9 จาก Clotech Laboratories (Takara Bio, Japan) จากนั้นผสม *sik1* sgRNA ความเข้มข้น 0.54 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร กับเอนไซม์ Cas9 ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร แล้วฉีดเข้าสู่ตัวอ่อนในระยะ 1 เซลล์ (1st Cell Embryo) ด้วยวิธี Microinjection ในปริมาตร 4 นาโนลิตร/เซลล์ จากนั้นนำไข่ที่ได้รับการฉีดสารแล้วใส่ในจานเพาะเชื้อเพื่อเลี้ยงเป็นเวลา



รูปที่ 1 แผนภาพการผสมพันธุ์ปลา โดยมีการตรวจหาตำแหน่งที่มีการเปลี่ยนแปลงบนสายดีเอ็นเอที่ต้องการนำมาผสมพันธุ์ (ตรวจหา Strains) ด้วยวิธี HMA และ Sequencing ตั้งแต่ลูกรุ่น F1

5 วัน ก่อนนำไปปล่อยลงถังเลี้ยงเพื่อให้ปลาที่เป็นตัว Founder เจริญเติบโตเป็นตัวเต็มวัย ซึ่งใช้เวลาประมาณ 3 เดือน จากนั้นสุ่มปลาจำนวน 10% ของตัวที่ยังมีชีวิตอยู่คือ 14 ตัว ไปตรวจสอบความสำเร็จในการดัดแปลงลำดับพันธุกรรม ด้วยวิธี Heteroduplex Mobility Assay (HMA) (รายละเอียดอธิบายในหัวข้อ 2.4)

2.3 แผนการผลิตปลาเพื่อตรวจสอบการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมของตัวกลายพันธุ์แบบเฮเทอโรไซกัส (*sik1*$^{(+/-)}$)

การผลิตลูกในรุ่น F1 จะใช้ปลาตัวที่เป็น Founder ผสมกับตัวที่เป็นไวลด์ไทป์ ซึ่งจะได้ลูกรุ่น F1 ที่มีการกลายพันธุ์แบบเฮเทอโรไซกัสทั้งหมด แต่อาจจะมีการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสบนสายดีเอ็นเอที่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ได้หลายรูปแบบ หรือเรียกได้ว่ามีหลาย Strain ซึ่งต่อมาจะตรวจสอบรูปแบบการกลายพันธุ์บนสายดีเอ็นเอ ด้วยวิธี HMA (รายละเอียดในข้อ 2.4) จากนั้นจึงเลือกตัวเมีย F1 ที่เป็นตัวกลายพันธุ์แบบ

เฮเทอโรไซกัส (*sik1*$^{(+/-)}$) มา 1 Stain ผสมกับไวลด์ไทป์ เพื่อผลิตลูกในรุ่น F2 (รูปที่ 1) เลี้ยงดูปลารุ่น F2 จนอายุมากกว่า 3 เดือน แล้วตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสบนสายดีเอ็นเอ ด้วยวิธี HMA (รายละเอียดอธิบายในหัวข้อ 2.4)

2.4 Heteroduplex Mobility Assays (HMA)

ปลาม้าลายที่ถูกดัดแปลงพันธุกรรมด้วยวิธี CRISPR/Cas9 จะมีการซ่อมแซมของสายดีเอ็นที่แตกต่างกันออกไป ซึ่งอาจมีการหายไปของลำดับเบสบางตำแหน่ง (Deletion) การเพิ่มเข้ามาของลำดับเบส (Insertion) หรือการสลับทิศของลำดับเบสบางตำแหน่ง (Inversion) สิ่งเหล่านี้อาจทำให้การแปลรหัส (Translation) เป็นโปรตีนเกิดความผิดปกติ ซึ่งอาจทำให้ลักษณะทางจีโนไทป์ของปลาม้าลายที่ถูกทำ Gene Knockout บริเวณยีนเป้าหมายเปลี่ยนแปลงไป ดังนั้นจึงต้องมีการใช้วิธี HMA มาใช้ในการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสเบื้องต้น โดยสังเกตจากลักษณะของแถบแบนดีเอ็นเอ เมื่อตรวจสอบด้วยเจลอิเล็กโทรโฟริซิส (Gel Electrophoresis) แบบแนวตั้ง

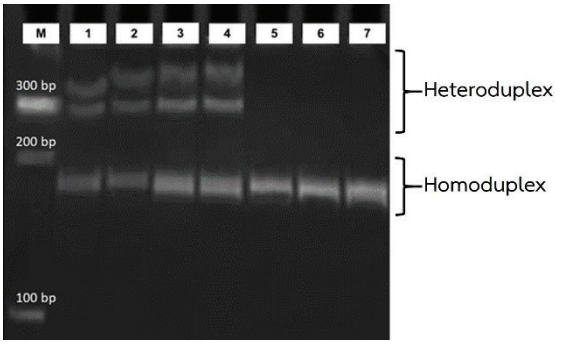
การตรวจสอบสายพันธุ์ด้วยวิธี HMA เริ่มจากการสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี Phenol-chloroform จากครีบหางของปลาม้าลายแล้วทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส หรือเทคนิคพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction; PCR) เพื่อเพิ่มจำนวนของยีนเป้าหมาย ขนาด 185 bp (รูปที่ 2) ออกแบบไพร์เมอร์ (Primers) จาก Genome Sequence (ENSDARG00000058606) ด้วยโปรแกรม primer3plus (https://primer3plus.com/cgibin/dev/primer3plus.cgi) ให้ครอบคลุมตำแหน่งเป้าหมาย นั้นคือ CGGCATCATG-GTGATCATGA ซึ่งเป็นบริเวณของลำดับ นิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอในยีน *sik1* ที่จะถูกแปลรหัสไปเป็นโปรตีน (เอ็กซอน) ตำแหน่งที่ 2 โดยไพร์เมอร์ที่ออกแบบไว้นี้จะสังเคราะห์ชิ้นส่วนดีเอ็นเอในบริเวณที่เป็นเอ็กซอน และบริเวณลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอใกล้เคียงที่จะไม่ถูกแปลรหัสไปเป็นโปรตีน (อินตรอน) ส่วนประกอบของสารละลายสำหรับทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ประกอบด้วยด้วย 2x Mytaq HS Mix (Bioline, USA) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร Forward

รูปที่ 2 ตำแหน่งที่ไพร์เมอร์จับกับสายดีเอ็นเอเพื่อเพิ่มจำนวนให้ได้ขนาด 185 bp (บริเวณสีเทาเข้ม) และขนาด 641 bp (บริเวณสีเทา) บริเวณสีดำ คือ บริเวณเป้าหมายของการดัดแปลงพันธุกรรมด้วยวิธี CRISPR/Cas9

(ZF_CC9_*sik1*_sF: 5'- AGAGAAGACCAAAGTTGATT-3') และ Reverse Primer (ZF_CC9_*sik1*_sR: 5'-ATAG-GATGGCTAGTATTGTG-3') ชนิดละ 1 ไมโครลิตร ดีเอ็นเอปริมาตร 4 ไมโครลิตร ภายใต้สภาวะ (PCR Condition) ที่ Pre-denaturation 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ตามด้วย 30 รอบ ของ Denaturation 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที Annealing ที่อุณหภูมิ 58 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที และ Extension ที่ 72 องศาเซลเซียส 1 นาที จากนั้นตรวจผลผลิตพีซีอาร์ (PCR Product) ด้วยเจลอิเล็กโทรโฟริซิสแบบแนวตั้งด้วย 15% Non-denaturing Polyacrylamide Gel โดยในปริมาตร 100 มิลลิลิตร (Gel Stock) ประกอบด้วย 40% acrylamide/bis ปริมาตร 37.5 มิลลิลิตร 10X TBE ปริมาตร 10 มิลลิลิตร และน้ำปราศจากเชื้อปริมาตร 52.5 มิลลิลิตร เมื่อต้องการเตรียมเจลเพื่อทำเจลอิเล็กโทรโฟริซิสแบบแนวตั้ง จะต้องใช้ 15% Non-denaturing Polyacrylamide Gel ที่เตรียมไว้ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ในการเตรียมเจล 1 เจล แล้วเติม 10% APS ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และ TEMED ปริมาตร

10 ไมโครลิตร จากนั้นตั้งทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัว 1 ชั่วโมง หลังจากเจลแข็งตัวเรียบร้อยแล้วผสมผลผลิตพีซีอาร์ ปริมาตร 5 ไมโครลิตร กับ 1X Loading Dye ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้สายของดีเอ็นเอแยกออกจากกัน ในเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (PCR Machine) แล้วนำไปแช่ต่อในน้ำแข็งก่อนจะนำตัวอย่างใส่ในหลุมเจล เพื่อป้องกันการจับตัวกันของสายดีเอ็นเอ จากนั้นตรวจสอบด้วยการทำเจลอิเล็กโทรโฟริซิส ที่กำลังไฟ 150 วัตต์ ระยะเวลามากกว่า 2 ชั่วโมง แล้วย้อมเจลด้วย Midori Green ก่อนนำไปตรวจสอบด้วยเครื่องอ่านเจล แล้วตรวจสอบตำแหน่งของแถบแบนดีเอ็นเอที่ได้เทียบกับไวลด์ไทป์

นอกจากนี้ตำแหน่งของดีเอ็นเอของปลาที่เป็นตัวกลายพันธุ์แบบเฮเทอโรไซกัส (*sik1*$^{(+/-)}$) จะถูกตรวจสอบอีกครั้งด้วยวิธี Sequencing โดยเพิ่มจำนวนของยีนเป้าหมายขนาด 641 bp ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยมีการออกแบบไพร์เมอร์ดังที่ได้กล่าวข้างต้น และให้ครอบคลุมตำแหน่งเป้าหมาย โดยไพร์เมอร์ที่ออกแบบไว้นี้จะสังเคราะห์ชิ้นส่วนดีเอ็นเอทั้งในบริเวณที่เป็นเอ็กซอนและอินตรอน (รูปที่ 3) ส่วนประกอบของสารละลายเพื่อทำปฏิกิริยา ประกอบด้วยด้วย 2x Mytaq HS mix (Bioline, USA) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ตามด้วย Forward (ZF_CC9_*sik1*_LF: 5'-TCGTGTTTCTGGTC-TATTGCAG ATCA3') และ Reverse Primer (ZF_ CC9_*sik1*_LR: 5'-TCGGCAAGGGGAACTTTGCTG-3') สำหรับการทำ Sequencing ชนิดละ 2 ไมโครลิตร และดีเอ็นเอปริมาตร 4 ไมโครลิตร ภายใต้สภาวะในการทำพีซีอาร์ คือ Pre-denaturation 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ตามด้วย 35 รอบ ของ Denaturation 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที Annealing ที่อุณหภูมิ 58 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที และ Extension ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที แล้วส่งตัวอย่างทำให้บริสุทธิ์ (Purify) และ Sequencing ที่บริษัทธีระเทรดดิ้ง (http://www.theetrad.com) เมื่อได้ข้อมูล Sequencing ตรวจสอบความถูกต้องของลำดับเบสด้วยซอฟต์แวร์ CodonCode และวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสในปลาที่เป็นตัวกลายพันธุ์แบบเฮเทอโรไซกัส เทียบกับลำดับเบสของปลาที่เป็นไวลด์ไทป์ แล้วทำการอ่านผลลำดับเบสให้เป็นกรดอะมิโน (Amino Acid Alignment) ด้วยซอฟต์แวร์ MEGA เวอร์ชัน 6.0.6



รูปที่ 3 15% Non-denaturing Gel จาก Heteroduplex Mobility Assay โดย M คือ HyperLadder™ 100bp, ตัวอย่างที่ 1-4 คือ ปลาที่มีกลายพันธุ์แบบเฮเทอโรไซกัส (*sik1*$^{(+/-)}$) และตัวอย่างที่ 5–7 คือ ปลาที่เป็นไวลด์ไทป์

2.5 วิเคราะห์ข้อมูล

หาความแตกต่างทางสถิติของสัดส่วนของการถ่ายทอดทางพันธุกรรมระหว่างไวลด์ไทป์ และตัวกลายพันธุ์แบบเฮเทอโรไซกัส โดยใช้ไคสแควร์ (Chi-square) เพื่อตรวจสอบว่าการถ่ายทอดทางพันธุกรรมของตัวกลายพันธุ์แบบเฮเทอโรไซกัส (*sik1*$^{(+/-)}$) ที่มีการ Knockout ยีน *sik1* ว่าเป็นไปตามกฎของเมนเดลหรือไม่ โดยกำหนดให้การถ่ายทอดทางพันธุกรรมของกลุ่มควบคุมเป็นไปตามกฎของเมนเดล เมื่อตัวกลายพันธุ์แบบเฮเทอโรไซกัส (*sik1*$^{(+/-)}$) (Aa) ผสมกับไวลด์ไทป์ (AA) ลูกที่ได้จะมีสัดส่วนของจีโนไทป์เป็น 1 : 1 (AA : Aa)

3. ผลการทดลอง

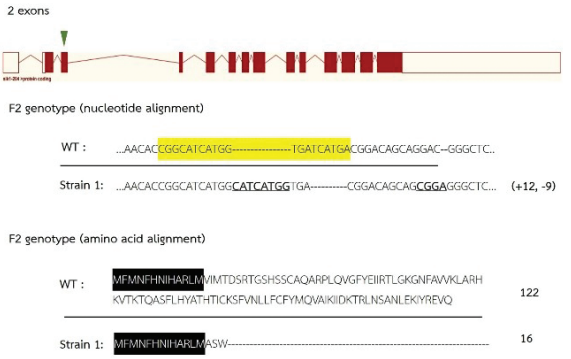
3.1 ความสำเร็จในการเหนี่ยวนำการกลายพันธุ์ของยีน *sik1* ในปลาม้าลายโดยใช้เทคนิค CRISPR/Cas9

หลังจากปลาม้าลายตัวที่เป็น Founder Fish (F0) ซึ่งถูกดัดแปลงพันธุกรรมด้วยเทคนิค CRISPR/Cas9 เพื่อ Knockout ยีน *sik1* ได้เจริญเติบโตเป็นตัวเต็มวัยแล้ว จึงนำ

ปลามาตรวจสอบความสำเร็จในการเหนี่ยวนำการกลายพันธุ์ในปลาม้าลายโดยใช้เทคนิค CRISPR/Cas9 พบว่า มีความสำเร็จในการทำ Gene Knockout ถึง 78.57%

3.2 แบบแผนการถ่ายทอดรหัสทางพันธุกรรม

จากการตรวจสอบลักษณะทางพันธุกรรมของปลาม้าลายในรุ่น F2 จำนวน 20 ตัว ด้วยวิธี HMA จะทำให้สามารถจำแนกปลาที่เป็นตัวกลายพันธุ์แบบเฮเทอโรไซกัส (*sik1*$^{(+/-)}$) และไวลด์ไทป์ได้ โดยปลาม้าลายที่มีลักษณะจีโนไทป์เป็นแบบเฮเทอโรไซกัส (*sik1*$^{(+/-)}$) จะปรากฏลักษณะของแถบแบนแบบ Multiple Heteroduplex ซึ่งเกิดจากการที่ปลามีจีโนไทป์แบบเฮเทอโรไซกัส นั่นคือมีส่วนหนึ่งของลำดับเบสเหมือนกับไวลด์ไทป์ และลำดับเบสอีกส่วนหนึ่งเป็นส่วนที่ถูกดัดแปลงด้วยเทคนิค CRISPR/Cas9 หลังจากแยกสายคู่ของดีเอ็นเอจากผลผลิตพีซีอาร์ ด้วยอุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส แล้วนำไปแช่ในน้ำแข็งทันทีทำให้สายดีเอ็นเอ มีการจับคู่กันอย่างไม่เป็นแบบแผน จึงทำให้เกิดแถบแบนแบบ Heteroduplex 2 แถบแบน และ Homoduplex 2 แถบแบน ซึ่งแถบแบนแบบ Heteroduplex เกิดจากการจับกันของท่อนดีเอ็นเอที่มีทั้งส่วนที่จับกันสนิทและไม่สนิท จึงมักเคลื่อนที่ได้ช้ากว่าแถบแบนแบบ Homoduplex โดยปลาที่มี Strain เดียวกันจะมีลักษณะของแถบแบนแบบเดียวกัน [14]–[16] (รูปที่ 3) ซึ่งต่างกับปลาม้าลายที่มีจีโนไทป์แบบไวลด์ไทป์จะมีแถบแบนปรากฏเพียง 1 แถบแบน [14], [15] จากนั้นสุ่มเลือกตัวแทนของปลาที่เป็นตัวกลายพันธุ์แบบเฮเทอโรไซกัส (*sik1*$^{(+/-)}$) และไวลด์ไทป์ ไปตรวจสอบรหัสพันธุกรรมด้วยวิธี Sequencing พบว่า บริเวณเป้าหมาย (Target Site) บนยีน *sik1* ของตัวกลายพันธุ์แบบเฮเทอโรไซกัส (*sik1*$^{(+/-)}$) Strain นี้เกิดการเพิ่มเข้ามาของลำดับเบส 12 ตำแหน่ง และมีลำดับเบสหายไป 9 ตำแหน่ง ส่งผลทำให้ลำดับเบสเกิดการเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม มีการสร้างกรดอะมิโนได้เพียง 3 ตำแหน่ง แล้วจึงสร้าง Stop Codon ซึ่งทำให้ไม่สามารถแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนตัวอื่นได้อีก (รูปที่ 4) เมื่อพิจารณาสัดส่วนปลาในรุ่น F2 ทั้งหมดที่ยังมีชีวิตอยู่ 20 ตัว พบว่า ปลาที่เป็นตัวกลายพันธุ์แบบเฮเทอโรไซกัส (*sik1*$^{(+/-)}$) และไวลด์ไทป์



รูปที่ 4 ลักษณะทางจีโนไทป์ของปลาม้าลายในรุ่น F2 หลังจากยีน *sik1* ถูก Knockout (บริเวณไฮไลท์แสดงถึงตำแหน่งเป้าหมายที่ Cas9 เข้าไปตัด เพื่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสายดีเอ็นเอ)

มีค่าเป็น 1 : 2 แสดงให้เห็นว่าปลาม้าลายที่ถูก Knockout ที่ยีน *sik1* สามารถถ่ายทอดรหัสทางพันธุกรรมไปยังรุ่นลูกได้ แต่การถ่ายทอดไม่ได้เป็นไปตามกฎของเมนเดล เนื่องจากตัวเต็มวัยในรุ่น F2 ที่เกิดจากตัวเมีย F1 ที่เป็นตัวกลายพันธุ์แบบเฮเทอโรไซกัส (*sik1*$^{(+/-)}$) ผสมกับไวลด์ไทป์ไม่ได้มีสัดส่วนเป็น 1 : 1 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (χ^2=10.769, df=1, $p\leq$0.05)

อีกทั้งจากการสังเกตลักษณะภายนอกของตัวปลาม้าลายในรุ่น F2 โดยเปรียบเทียบระหว่างปลาม้าลายที่เป็นไวลด์ไทป์ และตัวที่มีการกลายพันธุ์แบบเฮเทอโรไซกัส (*sik1*$^{(+/-)}$) พบว่า ไม่มีความแตกต่างกันของลักษณะภายนอก มีพฤติกรรมการหาอาหารและสามารถปล่อยไข่ได้ตามปกติ

4. อภิปรายผลและสรุป

ความสำเร็จในการดัดแปลงพันธุกรรมด้วยเทคนิค CRISPR/Cas9 ในครั้งนี้มีถึง 78.57% ซึ่งถือว่ามีความสำเร็จในการดัดแปลงลำดับพันธุกรรมที่ค่อนข้างสูง ทั้งนี้ตามการศึกษาของ Jao และคณะ [16] พบว่า ความสำเร็จในการเหนี่ยวนำการกลายพันธุ์ในปลาม้าลายโดยใช้เทคนิค CRISPR/Cas9 อยู่ในช่วง 75-99% อีกทั้ง Bassett และคณะ [17] ได้ทำการ Knock in ยีนเรืองแสงเข้าในตัวของแมลงหวี่ (*Drosophila Melanogaster*) ด้วยวิธี CRISPR/Cas9 พบว่ามีความสำเร็จในการ Knock in ถึง 88% จึงถือว่าเทคนิคนี้

สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ได้ในอัตราที่สูงมาก

การเปลี่ยนแปลงลำดับพันธุกรรมด้วยเทคนิค CRIPRS/Cas9 อาศัยหลักการทำให้สายดีเอ็นเอตรงตำแหน่งเป้าหมายถูกตัดออก จากนั้นสายดีเอ็นเอจะซ่อมแซมตัวเองแบบ NHEJ คือการซ่อมแซมสายดีเอ็นเออย่างไม่มีแบบแผน ทำให้เมื่อสายของดีเอ็นเอถูกตัดออกจากกัน บริเวณนั้นจะสามารถซ่อมแซมตัวเองได้หลายรูปแบบ นำไปสู่การกลายพันธุ์ (Mutation) ซึ่งอาจเกิดการเพิ่มเข้าของลำดับเบส การหายไปของลำดับเบสบางตำแหน่ง หรือการเปลี่ยนตำแหน่ง (Translocation) ที่บริเวณโลคัส (Locus) ของตำแหน่งเป้าหมาย หรืออาจมีการซ่อมแซมสายดีเอ็นเอแบบ HDR ซึ่งเป็นลักษณะของการซ่อมแซมในรูปแบบนี้จะทำให้สายของ ดีเอ็นเอเหมือนกับซิสเตอร์โครมาทิด (Sister Chromatid) สายของดีเอ็นเอที่เกิดความเสียหายจากปัจจัยใดๆ จะกลับสู่สภาพปกติ [8], [12] ดังนั้นในการเหนี่ยวนำการกลายพันธุ์ในปลาม้าลายโดยใช้เทคนิค CRISPR/Cas9 ไม่เพียงแต่ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ได้ในอัตราที่สูงเท่านั้น แต่อาจสร้างตัวกลายพันธุ์ได้หลายรูปแบบด้วยเช่นกัน

การเหนี่ยวนำการกลายพันธุ์ในสิ่งมีชีวิตโดยใช้เทคนิค CRISPR/Cas9 มักทำให้เกิดการถ่ายทอดของลักษณะจีโนไทป์ของตัวกลายพันธุ์ที่ต้องการได้มากกว่าสัดส่วนที่ระบุไว้ตามกฎของเมนเดล หรือเรียกอีกอย่างว่า Super-Mendelian Inheritance [18] อีกทั้งมีการศึกษาของ Mishira and Tatum [19] เกี่ยวกับการกลายพันธุ์ของยีน Inositol-independent (*inos*) ในสิ่งมีชีวิตประเภทเห็ดรา Neurospora พบว่า มีการถ่ายทอดยังรุ่นลูกด้วยสัดส่วนที่ไม่เป็นไปตามกฎของเมนเดล เนื่องจากระหว่างการแบ่งตัวของเซลล์แบบไมโอซิส (Meiosis) ของเซลล์สืบพันธุ์นั้นจะทำให้รหัสพันธุกรรมบางส่วนขาดหายไป ส่งผลทำให้เกิดการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมแบบไม่เป็นไปตามกฎของเมนเดลขึ้น แม้ว่าในการทดลองครั้งนี้จะมีการควบคุมการเลี้ยงในห้องปฏิบัติการเป็นไปตามมาตรฐานของ Westerfield [13] แต่ยีน *sik1* นั้น มีความเกี่ยวข้องกับการควบคุมการเมแทบอลิซึม [4] และยังการแสดงออกสูงในช่วงการตกไข่ [6] ซึ่งเป็นไปได้ว่าปลาม้าลายที่ถูก Knockout บริเวณยีน *sik1* จะมีความผิดปกติของการเมแทบอลิซึม และการตกไข่จึงอาจส่งผลให้ลูกปลาที่เป็นตัวกลายพันธุ์แบบเฮเทอโรไซกัส ($sik1^{(+/-)}$) ไม่สามารถเจริญเติบโต หรือทำให้ลูกปลาตาย การตรวจสอบเมแทบอลิซึมของปลาที่ถูก Knockout บริเวณยีน *sik1* รวมถึงหน้าที่ของยีนนี้ในการควบคุมการตกไข่จึงเป็นประเด็นที่น่าศึกษาต่อไป

จากการศึกษาแบบแผนการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมของปลาม้าลายที่ถูก Knockout บริเวณยีน *sik1* พบว่า ปลาม้าลายที่เป็นตัวกลายพันธุ์แบบเฮเทอโรไซกัส ($sik1^{(+/-)}$) สามารถถ่ายทอดรหัสทางพันธุกรรมจากรุ่นพ่อแม่ (F1) ไปยังรุ่นลูก (F2) ได้ ซึ่งปลา Strain ที่ศึกษานี้มีการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบส โดยมีการเพิ่มเข้ามาของลำดับเบส 12 ตำแหน่ง และมีการหายไปของลำดับเบส 9 ตำแหน่ง จึงส่งผลทำให้ไม่สามารถแปลรหัสต่อได้ แต่ปลาม้าลายที่มีการกลายพันธุ์แบบเฮเทอโรไซกัส ($sik1^{(+/-)}$) ยังไม่ปรากฏลักษณะของความผิดปกติทางฟีโนไทป์ ในกรณีที่ต้องการศึกษาหน้าที่ของยีน *sik1* ซึ่งเป็นยีนที่มีความเกี่ยวข้องกับการตกไข่ในปลาเพศเมียรวมถึงมีความเกี่ยวข้องกับการเมแทบอลิซึม ในอนาคตจำเป็นจะต้องสร้างตัวกลายพันธุ์ที่เป็นโฮโมไซกัส ($sik1^{(-/-)}$) จากปลาม้าลายเพศผู้และเพศเมียที่เป็นตัวกลายพันธุ์แบบเฮเทอโรไซกัส ($sik1^{(+/-)}$) ที่มี Strain เดียวกัน เพื่อใช้ศึกษาลักษณะของฟีโนไทป์ที่จะแสดงออกชัดเจน เนื่องจากยีน *sik1* ถูกหยุดการทำงานแล้วอย่างสมบูรณ์ โดยการทดลองครั้งนี้จะใช้เป็นแนวทางในการผลิตปลาเพื่อให้ได้จำนวนที่ต้องการสำหรับการศึกษาหน้าที่ของยีน *sik1* และตระหนักถึงแบบแผนการถ่ายทอดทางพันธุกรรมที่อาจไม่เป็นไปตามกฎของเมนเดลเสมอไป

เอกสารอ้างอิง

[1] S. Panchakhan, M. Chatcharitmongkol, and W. Klangnurak, “Fecundity egg quality and ovarian regression of female zebrafish in the continuous spawning period,” *King Mongkut’s Agricultural Journal*, vol. 38, no. 4, 2020 (in Thai).

[2] J. P. Briggs, "The zebrafish: A new model organism for integrative physiology," *American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, vol. 282, no. 1, pp. 3–9, 2002.

[3] W. Driever, D. Stemple, A. Schier, and L. Solnica-Krezel, "Zebrafish: Genetic tools for studying vertebrate development," *Trend in Genetic*, vol. 10, pp. 152–159, 1994.

[4] K. Sakamoto, L. Bultot, and O. Göransson, "The salt-inducible kinases: Emerging metabolic regulators," *Trends in Endocrinology and Metabolism*, vol. 29, no. 12, pp. 827–840, 2018.

[5] M. Okamoto, H. Takemori, and Y. Katoh, "Salt-inducible kinase in steroidogenesis and adipogenesis," *Trends in Endocrinology and Metabolism*, vol. 15, no. 1, pp. 21–6, 2004.

[6] W. Klangnurak, T. Fukuyo, M. D. Rezanujjaman, M. Seki, S. Sugano, Y. Suzuki, and T. Tokumoto, "Candidate gene identification of ovulation-inducing genes by RNA sequencing with an *in vivo* assay in zebrafish," *Plos One*, vol. 13, no. 5, pp. 1–19, 2018.

[7] W. Klangnurak and T. Tokumoto, "Fine selection of up-regulated genes during ovulation by *in vivo* induction of oocyte maturation and ovulation in zebrafish," *Zoological Letters*, vol. 3, no. 2, pp. 1–10, 2017.

[8] F. A. Ran, P. D. Hsu, J. Wright, V. Agarwala, D. A. Scott, and F. Zhang, "Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system," *Nature America*, vol. 8, pp. 2281–2308, 2013.

[9] K. Salman, T. R. Perrino, and R. A. Wallace, "Experimental conditions for oocyte maturation in the zebrafish, *Brachydanio rerio*," *The Journal of Experimental Zoology*, vol. 269, no. 6, pp. 538–550, 1994.

[10] H. P. Tang, Y. Liu, J. Z. Li, G. F. Li, Y. Chen, Y. K. Yin, Y. Guo, C. H. K. Cheng, X. C. Liu, and H. R. Lin, "LH signaling induced ptgs2a expression is required for ovulation in zebrafish," *Molecular and Cellular Endocrinology*, vol. 447, pp. 125–133, 2017.

[11] H. P. Tang, Y. Liu, J. Z. Li, Y. K. Yin, G. F. Li, Y. Chen, S. S. Li, Y. Zhang, H. R. Lin, X. C. Liu, and C. H. K. Cheng, "Gene knockout of nuclear progesterone receptor provides insights into the regulation of ovulation by LH signaling in zebrafish," *Scientific Reports*, vol. 6, pp. 1–11, 2016.

[12] C. Yu, Y. Zhang, S. Yao, and Y. Wei, "A PCR based protocol for detecting indel mutations induced by TALENs and CRISPR/Cas9 in zebrafish," *PLOS one*, vol. 9, no. 6, pp. 1–9, 2014.

[13] M. Westerfield, The Zebrafish Book: A Guide for the Laboratory Use Of Zebrafish (*Brachydanio rerio*). Eugene: University of Oregon press., 1995.

[14] S. Ansai, K. Inohaya, Y. Yoshiura, M. Schartl, N. Uemura, R. Takahashi, and M. Kinoshita, "Design, evaluation and screening methods for efficient targeted mutagenesis with transcription activator-like effector nucleases in medaka," *Development, Growth Differentiation*, vol. 56, no. 1, pp. 98–107, 2014.

[15] A. Kawahara, T. Yabe, S. Ansai, S. Takada, and M. Kinoshita, "Genome editing in zebrafish and medaka " in *Targeted Genome Editing Using Site-Specific Nucleases: ZFNs*, T. Yamamoto, Ed., ed Japan: Springer, 2015, pp. 119–131.

[16] L. Jao, S. R. Wente, and W. Chen, "Efficient multiplex biallelic zebrafish genome editing using a CRISPR nuclease system," in *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, pp. 13904–13909.

[17] A. R. Bassett, C. Tibbit, C. P. Ponting, and J. Liu, "Highly efficient targeted mutagenesis of drosophila with the CRISPR/Cas9 system," *Cell Reports*, vol. 4, no. 11, pp. 220–228, 2013.

[18] H. A. Grunwald, V. M. Gantz, G. Poplawski, X. S. Xu, E. Bier, and K. L. Cooper, "Super-mendelian inheritance mediated by CRISPR-Cas9 in the female mouse germline," *Nature*, vol. 566, pp. 105–109, 2019.

[19] N. C. Mishira and E. L. Tatum, "Non-mendelian inheritance of DNA-induced inositol independence in *Neurospora*," in *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1973, pp. 3875–3879.