

Doi: 10.11840/j.issn.1001-6392.2023.01.008

一种电转染华贵栉孔扇贝基因编辑的应用方法

陈颖^{1,2,3}, 张洪宽^{1,2,3}, 何成^{1,2,3}, Tan Karsoon^{1,2,3}, 郑怀平^{1,2,3}

(1. 汕头大学 海洋科学研究院, 广东 汕头 515063; 2. 广东省海洋生物技术重点实验室, 广东 汕头 515063;
3. 广东省亚热带海水养殖工程技术研究中心, 广东 汕头 515063)

摘 要: 目前, CRISPR/Cas9 基因编辑技术已成为动植物遗传育种领域研究的热点。为解决 CRISPR 技术在贝类生产实践中应用难的问题, 本文探究了一种电转染的双壳贝类基因编辑方法。利用本方法分别对华贵栉孔扇贝受精卵的 *SRB-like-3* 和 *MSTN* 进行编辑, 并成功地将编辑后的幼虫培养到稚贝。在编辑后 5 d 和 10 d 的 D-型幼虫及 40 d 的稚贝中都检测到了荧光, 并且编辑 *MSTN* 后的 10 d 幼虫, 其壳长显著大于编辑 *SRB-like-3* 组和对照组。本研究表明: 电转染基因编辑技术在贝类中具有可行性。本方法具有成本低、操作简单、易推广等优点, 可以广泛应用于贝类的遗传育种领域。

关键词: 华贵栉孔扇贝; CRISPR/Cas9; 电转染; 基因编辑

中图分类号: P736.22

文献标识码: A

文章编号: 1001-6932(2023)01-0066-08

An application method for gene editing mediated by electroporation in the noble scallop *Chlamys nobilis*

CHEN Ying^{1,2,3}, ZHANG Hongkuan^{1,2,3}, HE Cheng^{1,2,3}, TAN Karsoon^{1,2,3}, ZHENG Huaiping^{1,2,3}

(1. Marine Sciences Institute, Shantou University, Shantou 515063, China; 2. Key Laboratory of Marine Biotechnology of Guangdong Province, Shantou 515063, China; 3. Research Center for Subtropical Mariculture of Guangdong Province, Shantou 515063, China)

Abstract: At present, the application of CRISPR/Cas9 gene editing technique has become a research hotspot in the field of genetics and breeding in animals and plants. In order to solve the problem in mollusks, an application method for CRISPR gene editing technique mediated by electroporation in bivalves was developed in the present study. Two genes of *SRB-like-3* (a key gene related to carotenoids accumulation) and *MSTN* (*myostatin gene*) were both successfully edited in the fertilized eggs of the noble scallop *Chlamys nobilis* using the method. And, the fluorescence was detected in D-larvae at 5 and 10 days, as well as juveniles at 40 days after the two genes edited, respectively. Moreover, shell length of D-larvae at 10 days from editing *MSTN* group was both significantly larger ($P < 0.05$) than that from editing *SRB-like-3* group and control group. This study shows that the application method for CRISPR/Cas9 gene editing mediated by electroporation in bivalves is feasible. More importantly, the method has some advantages of low cost, simple operation and easy to popularize, etc., so it will be widely applied to the filed of genetics and breeding in mollusks.

Keywords: noble scallop *Chlamys nobilis*; CRISPR/Cas9; electroporation; gene editing

随着全基因组测序成本的降低, 越来越多的海洋生物基因组信息公布, 这在提供丰富遗传信息资源的同时, 也对反向遗传学研究手段提出更高需

求。自 2013 年 CRISPR 技术首次在生物基因编辑领域的实现以来^[1], 其已成为应用最广泛的基因编辑技术之一。在海洋生物的研究应用中, CRISPR

收稿日期: 2022-05-04; 修订日期: 2022-07-05

基金项目: 国家重点研发计划 (2018YFD0901400); 广东省重点领域研发计划 (2021B0202020003)

作者简介: 陈颖 (1996—), 硕士研究生, 主要从事海洋贝类养殖与育种研究, 电子邮箱: 993896374@qq.com

通信作者: 郑怀平, 博士, 教授, 电子邮箱: hpzheng@stu.edu.cn

技术也从玻璃海鞘等模式动物逐渐向诸多非模式生物中发展^[2],然而该技术在双壳贝类中的应用报道较少,尚处于初级阶段的研究仍面临诸多问题。

在 CRISPR/Cas 系统基因编辑导入方法中,主要分为三大类,即生物转染(慢病毒、腺病毒等)^[3-4]、化学转染(脂质体、阳离子聚合物)^[5-6]、物理转染(电转染、显微注射、基因枪)^[7]。对比上述导入方法,生物转染的方法相对操作难度较低,然而存在细胞毒素残留可能;化学转染方法最突出的优点是操作简便,无须复杂技术要求,也不存在细胞毒素问题,然而其最大弊端是成本相对较高,同时还有转染时间较长、稳定性难以保证、转染效率相对较低等因素制约;物理转染很大程度上降低此类毒素风险,在实际研究中具有较高的优先级。

贝类的主要价值为食用,因而选择一种效率高且毒性小的导入方法至关重要。显微注射方法每次对单个个体进行精确操作,具有转化率高、整合率高的特点,目前在贝类中对长牡蛎(*Crassostrea gigas*)^[8-10]和侏儒蛤(*Mulinia lateralis*)^[11]的基因编辑均是借助显微注射技术开展,但这些报道中的编辑后受精卵均没有培养到稚贝阶段。同斑马鱼显微注射类似,由于在胚胎发育早期至4细胞前没有膜完全分隔细胞和卵黄^[12],故将实验材料直接注射到1-4细胞期的胚胎中,注入1个细胞或卵黄的溶液将扩散到整个胚胎中。然而,分析双壳贝类自身特点,其受精卵个体比较小,直径一般仅在60 μm左右,并且注射后存活率低,即使是操作熟练的技术人员也难以在发育至4细胞前完成保证存活的受精卵量,由此可见,利用显微注射开展双壳贝类的基因编辑技术难度比较大,尤其不适宜受精卵较小生物的研究应用,前景不够理想。

电转染(Electroporation)方法^[13]是利用可控的脉冲电场使精子细胞质膜产生暂时的孔洞,从而促进外源DNA进入精子的转基因方法。该方法已广泛应用于一些非渗透的外源大分子进入细胞,例如DNA、蛋白质和药物等。目前,电转染介导的体内基因转移在疫苗生产、转基因表达、酶的替代和癌症控制等方面也十分有效,其还应用到包括电场促细胞融合、细菌转化、呈递化学药物等方面。电转染方法利用电脉冲产生暂时性孔洞使外源物质进入细胞,一次可以对多个对象进行操作,难度相对较低,可以在短时间内向多细胞同时进行导入操作,

尤其适合在每次排卵量大的生物中进行相关研究。国内已有研究人员尝试利用电转染技术对福建牡蛎(*Crassostrea angulata* 或 *C. gigas angulata*)开展基因编辑工作^[14-15],但编辑后受精卵都没有培养到稚贝阶段。然而,由于电转染方法具有操作简单、成本低、无细胞毒性、一次性可以处理大量受精卵等优点,在双壳类基因编辑上将有广阔的应用前景。

清道夫受体(Scavenger Receptor, SR)是一种可以识别、结合多聚阴离子并将它们转运至细胞内降解的细胞表面跨膜糖蛋白,是受体基因超家族的一员^[16]。B型清道夫受体(Class B Scavenger Receptor, SR-B)参与动物体动脉粥样硬化、免疫防御、凋亡细胞清除和类胡萝卜素代谢和转运等生理过程。Liu等经实验证明SRB/CD36家族成员SRB-like-3基因是华贵栉孔扇贝(*Chlamys nobilis*)富集类胡萝卜素的关键基因,此基因只在金色个体中表达,在普通个体中不表达^[17]。肌肉生长抑制素(myostatin, MSTN)属于转化生长因子-β(transforming growth factor-beta)超家族一员,在动物肌肉生长和发育过程中起负调控作用^[18]。由于其重要的功能,到目前为止,MSTN已被在很多脊椎动物中广泛研究,包括鸟类,哺乳动物和水生物种^[19]。闭壳肌大小是贝类关键经济性状,故MSTN的研究具有重要价值。目前在海湾扇贝(*Argopecten irradians*)^[20-21]、栉孔扇贝(*Ch. farreri*)^[22]、华贵栉孔扇贝(*Ch. nobilis*)^[23]、贻贝(*Mytilus chilensis*)^[24]、小狮爪海扇蛤(*Nodipecten subnodosus*)^[25]和竹蛏(*Sinonovacula constricta*)^[26]等物种中皆有MSTN基因的报道。

本文以华贵栉孔扇贝为研究对象,利用电转染介导的CRISPR/Cas9方式对其受精卵进行了基因编辑,首次在贝类中将基因编辑后的幼虫培育至稚贝阶段。本文详细描述了电转染的基因编辑方法应用于华贵栉孔扇贝的过程,目的是提供一种双壳类基因编辑方法,旨在解决贝类基因编辑应用难的问题。

1 材料方法

1.1 实验材料

本实验所用亲贝为性腺成熟的华贵栉孔扇贝“南澳金贝”1龄贝,养殖于国家贝类产业技术体系汕头综合试验站核心示范区的汕头大学南澳临海

实验站专用海域。

取华贵栉孔扇贝“南澳金贝”的性腺及闭壳肌组织备用,同时挑选性腺饱满的雌、雄个体,清除体表附着物,留作亲贝备用。

1.2 sgRNA 设计合成及检验

在 NCBI 中下载华贵栉孔扇贝“南澳金贝”的 *SRB-like-3* 和 *MSTN* 的序列信息,依据基因组和转录组数据分析基因 CDS 在基因序列上的位置,利用 Gene Structure Display Server 工具绘制基因结构图,区分外显子和内含子位置。按照基因本身的性质,选择候选的待敲除位点,确定待敲除位点。利用靶位点设计网站 <http://crispr.mit.edu/> 的 Benchling 设计工具,在文本框中输入基因 CDS 序列。根据 sgRNA 设计原则,设计长 20 nt 的核心序列,获得 GG20 nt+NGG 序列。

设计 T7-sgRNA-F (6nt 保护碱基 +20 nt 核心序列 +12 nt pDR274 5' 序列) 和 sgRNA-R 引物对,以 pDR274 为模板进行 PCR 扩增,产物约 120 bp。对上述纯化后的 PCR 产物使用 MEGA script™ T7 Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific) 进行 sgRNA 体外转录实验,并对转录产物进行纯化备用。

1.3 sgRNA 体外切割检验

提取性腺及闭壳肌组织总 RNA,反转录实验获得 cDNA,进行基因克隆实验获取 *SRB-like-3* 和 *MSTN* 作为目的片段备用。使用 Guide-it sgRNA Screening Kit (TAKARA) 进行体外切割检验实验,再用电泳检验。

1.4 sgRNA 和 Cas9 共表达质粒的构建

参考 Ran 等共表达质粒的构建方法^[2],使用 T4 连接酶退火使设计的 sgRNA 形成双链,利用 T7 连接酶将 sgRNA 质粒连入经 BbsI 酶切的质粒 pSpCas9(BB)~2A-GFP(PX458)中,16 °C 连接过夜,随后取 1~2 μL 质粒转化至 50 μL Stbl3 感受态中,离心混匀后吸悬液至含有 50 μg/mL 氨苄抗生素的 LB 平板上,37 °C 倒置培养 12~16 h,挑取单菌落,接种于含氨苄的 LB 液体培养基中,37 °C 于摇床培养 12~16 h,提质粒,测序鉴定。将鉴定成功后的质粒对应菌种扩大培养,提取质粒并浓缩至工作浓度,剩余质粒 -20 °C 保存备用。

1.5 电转染基因编辑技术流程

步骤一:人工催产获得精子和卵子,人工授精

获得受精卵。

步骤二:进行电转染步骤,转染形式为 sgRNA:Cas9 酶 =2:1 体积比混合成核糖核蛋白复合物(Ribonucleoprotein, RNP),其中 sgRNA 工作浓度保持 ≥ 50 ng/μL, Cas9 工作浓度保持 ≥ 250 ng/μL;或者转染上述重组质粒确保质粒浓度 ≥ 2 μg/μL,取 4~7 μL 线性质粒(用不破坏质粒结构的酶切割)。将 RNP 或重组质粒与 800 μL 高密度受精卵混匀,以电击参数 250 V,400 μs,保证在 4 细胞前完成转染操作。然后利用电转仪将上述质粒转染到受精卵中。将 *SRB-like-3* 和 *MSTN* 编辑后的受精卵分别放入 500 L 的孵化桶中孵化,同时将未转染的受精卵作为对照组放入另外一个 500 L 的孵化桶中孵化,共形成了 2 个编辑组(*SRB-like-3* 和 *MSTN*) 和 1 个对照组。

1.6 受精卵孵化,幼虫培育、稚贝保苗和养成

参照 Zheng 等的方法进行受精卵孵化、幼虫培育、稚贝保苗和养成^[27],但幼虫培养的方法略有差异,期间充气、不换水。

1.7 编辑效果检测

从下面三个方面检测编辑效果:

① 荧光检测:对 5 d 和 10 d D-型幼虫及 40 d 稚贝,在倒置荧光显微镜下观察绿色荧光情况。

② 分子检测:使用 QIAamp DNA Micro Kit 试剂盒(微量提取)提取 RNP 编辑组 5 d D-型幼虫的总 DNA,对有目的片段进行克隆,将阳性克隆菌液送往华大基因进行 Sanger 测序,然后进行序列比对,利用 qPCR 方法比较编辑组和实验组 5 d D-型幼虫(多幼虫混样)靶基因表达量差异。

③ 生长检测:比较质粒编辑组(*SRB-like-3* 和 *MSTN*) 和对照组 10 d 的 D-型幼虫,壳长(μm),检测编辑效果。将幼虫用碘液固定后,用带有目微尺的光学显微镜(OLYMPUS,日本)进行测量,每组随机测量 30 个个体。

1.8 数据分析

实验数据用 SPSS 19.0、SAS 统计软件进行单因素方差分析(One-way ANOVA)或 T 检验(T-test)以及成组数据进行比较,最终数据以同一处理六个平行样品的平均值 ± 标准误(Mean ± SE)表示;用 GraphPad Prism 5.0 软件作图;设置显著性水平为 $P < 0.05$, $P < 0.01$ 或 $P < 0.001$ 。

2 结果

2.1 靶基因结构分析

SRB-like-3 共具有 10 个内含子区和 11 个外

显子区 (如图 1(a)所示); *MSTN* 共有 2 个内含子区, 3 个外显子区分布 (如图 1(b)所示)。

2.2 靶点 sgRNA 设计

根据基因序列分析及 sgRNA 设计原则, 针对每个基因设计非跨外显子的 sgRNA 序列 (表 1)。

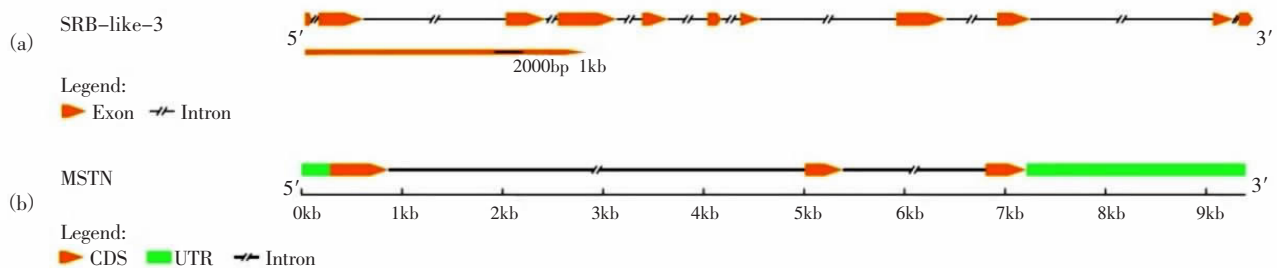


图 1 靶基因结构分析

表 1 设计相关 sgRNA 信息

名称	位置	序列 (5'-3')	PAM	切割评分	靶向评分
SRB3-sgRNA-F1	8 号外显子 +	GGAGTTTGGACTATAGAATC	TGG	50.7	70.3
SRB3-sgRNA-F2	9 号外显子 +	GGAGCTTTGTAGGTCAATGA	CGG	56.7	67.2
MSTN-sgRNA-F1	2 号外显子 -	GGAACCTTTACTAAATTTACC	GGG	57.0	65.7
MSTN-sgRNA-F2	3 号外显子 -	GGCTGACTCAAGGTAGGGGA	AGG	56.9	61.9

2.3 体外切割电泳检验

图 2(a)所示, 获取 *SRB-like-3* 片段约 1.7K bp, *MSTN* 片段约为 1K bp。

引物序列:

MSTN-F1 CTTCCGACAACCACATC

MSTN-R1 AAGAGCAGTATGGCCAAC;

SRB-like-3-F1 GAAGATCTATGGGAAAGAAA
ACCTGGAGATGTA

SRB-like-3-R1 ATGATTTCCGTATCTTTAACA
TCCT

SRB-like-3-R2 TCCCCCGGGCCTGTTTGTCTG
TCTTCAGTTTATCA

图 2(b)所示为 SRB3-sgRNA-1 及 MSTN-sgRNA-1 切割检验结果, 其中 1 号、5 号孔位均为 DL2000plus Marker, 2 号为经过 SRB3-sgRNA-1 切割的 *MSTN* 片段, 3 号为经过 MSTN-sgRNA-1 切割的 *MSTN* 片段, 4 号为未经任何切割实验的 *MSTN* 片段, 6 号为经过 MSTN-sgRNA-1 切割的 *SRB-like-3* 片段, 7 号为经过 SRB3-sgRNA-1 切割的 *SRB-like-3* 片段, 8 号为未经任何切割实验的 *SRB-like-3* 片段。结果显示, 2 号、3 号、6 号、7 号均显示两条条带, 无论 *MSTN* 还是 *SRB-like-3*

基因片段均被 MSTN-sgRNA-1 和 SRB3-sgRNA-1 切割为约 750 bp 和 150 bp 两条条带。

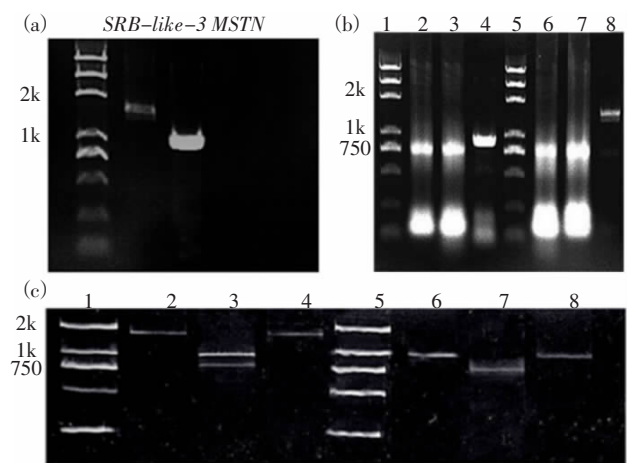


图 2 (a)目的片段获取; (b)、(c)体外切割效率检验电泳图

图 2(c)所示为 SRB3-sgRNA-2 及 MSTN-sgRNA-2 切割检验结果, 其中 1 号、5 号孔位均为 DL2000 Marker, 2 号为经过 MSTN-sgRNA-2 切割的 *SRB-like-3* 片段, 3 号为经过 SRB3-sgRNA-2 切割的 *SRB-like-3* 片段, 4 号为未经任何切割实验的 *SRB-like-3* 片段, 6 号为 SRB3-sgRNA-2 切割后的 *MSTN* 片段, 7 号为经过 MSTN-sgRNA-2

切割的 *MSTN* 片段, 8 号为未经任何切割实验的 *MSTN* 片段。结果显示, 只有 3 号、7 号显示出与对照不同的切割序列, 其中 3 号显示约 1K bp 及约 750 bp 两条条带, 而 7 号显示一条约为 750 bp 条带。2 号与 4 号显示的一致均为约 1.7K bp 单条条带, 而 6 号、8 号显示一致均为约 1K bp 单条条带。

2.4 荧光检测

无论是经 *SRB-like-3* (图 3(a)) 还是 *MSTN* (图 3(b)) 的重组质粒转染后发育到 5 d D-型幼虫中部分有绿色荧光, 在 *SRB-like-3* (图 4(a)) 和 *MSTN* (图 4(c)) 编辑的 10 d D-型幼虫中也检测

到荧光信号, 而对照组 (图 4(b)) 则不显示。此外, 在编辑后的 40 d 稚贝中也检测到了荧光信号 (图 5)。

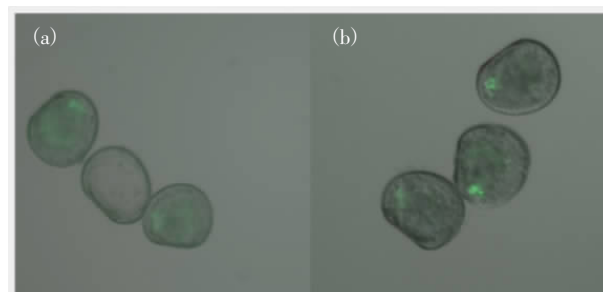


图 3 5 d D-型幼虫荧光检测

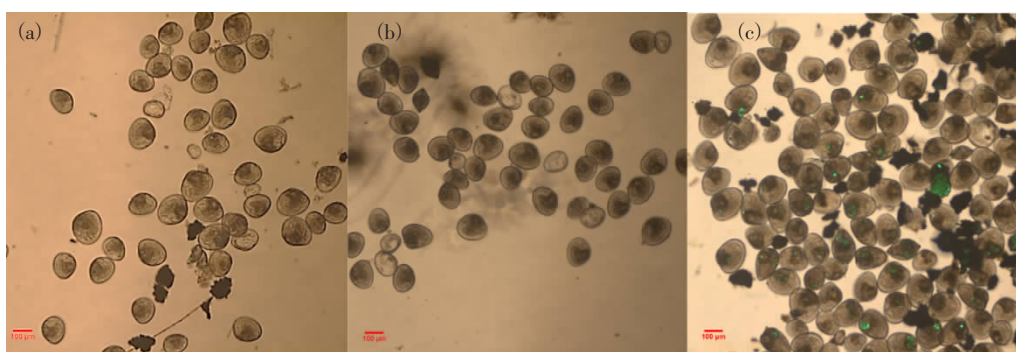


图 4 10 d D-型幼虫及其荧光检测

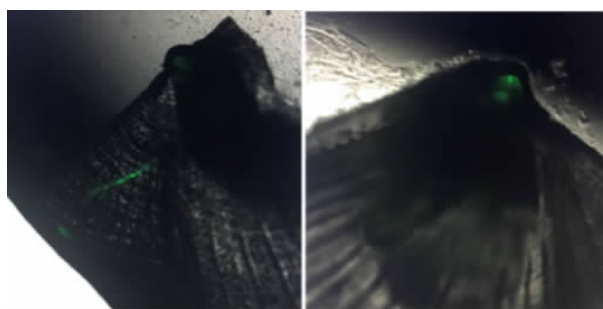


图 5 40 d 稚贝的荧光检测

2.5 测序检测

在电转染 RNP 的 *SRB-like-3* 和 *MSTN* 实验组中, 每组各随机取 5 d D 型幼虫 50 个, 进行 DNA 提取, 并送测序检验, 在 *SRB-like-3* 实验组中共有 4 个突变 (图 6), 编辑率为 8%; 在 *MSTN* 实验组中共检测 5 个突变 (图 6), 编辑率为 10%。

2.6 基因表达量分析

图 7 清楚地显示, *SRB-like-3* 和 *MSTN* 两个基因被编辑后, 其相对表达量均显著降低, 导入质粒编辑 *SRB-like-3* 基因和导入 RNP 编辑 *MSTN* 后, 其相应基因表达量均显著降低 ($P < 0.01$), 而

导入质粒编辑 *MSTN* 基因和导入核酸蛋白复合物 RNP 编辑 *SRB-like-3* 后, 其相应基因表达量均显著降低 ($P < 0.001$), 而两种编辑方案间无显著差异。

2.7 生长比较

图 8 是两个基因编辑组和对照组 10 d D-型幼虫的壳长。 *MSTN* 基因被编辑后, 幼虫生长变快, 其壳长显著地大于 *SRB-like-3* 组和对照组 ($P < 0.05$), 而 *SRB-like-3* 组与对照组之间无显著差异 ($P > 0.05$)。

3 讨论

在 CRISPR/Cas9 技术广泛应用的当下, 该技术的安全性一直是广大科研人员研究的重心所在, 也是社会关注的重点, 更是能否应用于人体临床医学及优良经济物种选育的关键^[28]。谈及安全性, 首当其冲的则是脱靶效应, 其次才应当考虑切割效率、递送方法安全性等因素^[29]。而解决脱靶问题, 在提高基因靶向切割特异性的环节中, sgRNA 的设计及筛选至关重要。所筛选出的 sgRNA 在系统

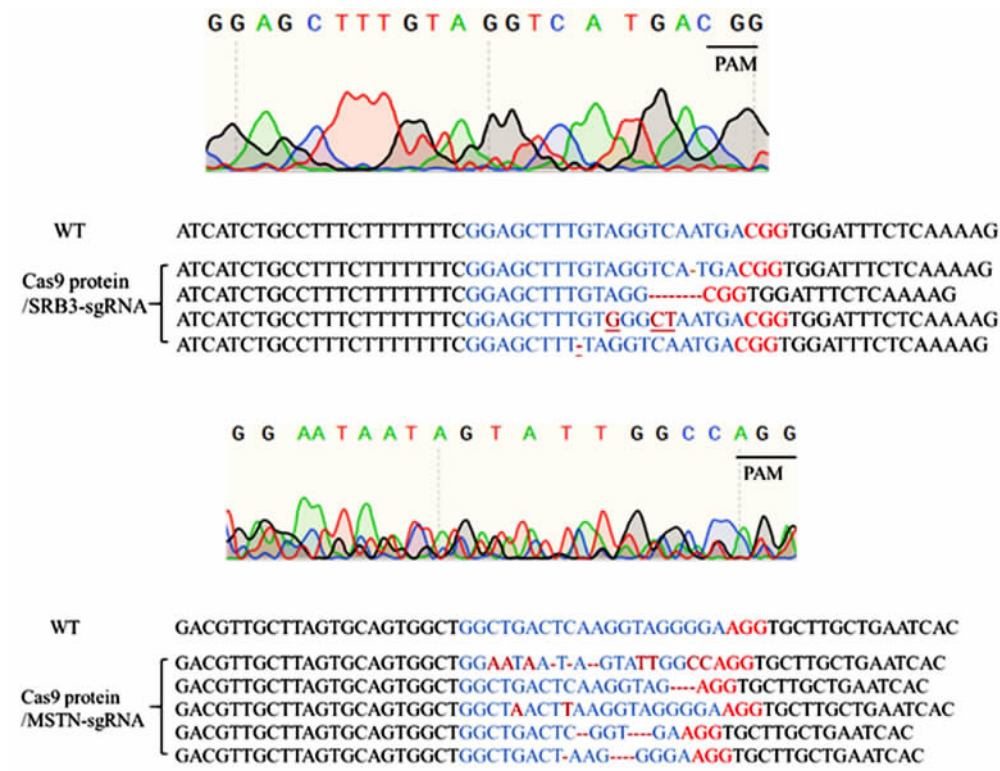


图6 Sanger 测序结果

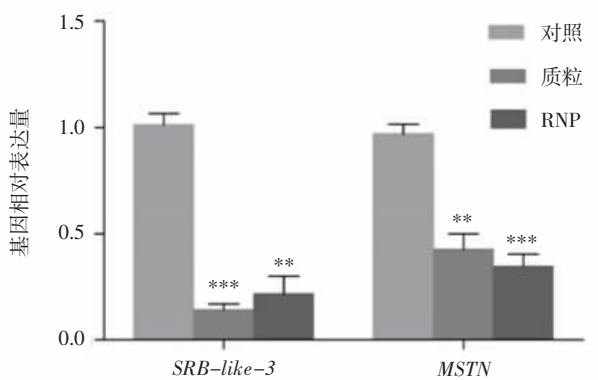


图7 两个靶基因的相对表达量比较

注: ** 表示 $P < 0.01$; *** 表示 $P < 0.001$ 。

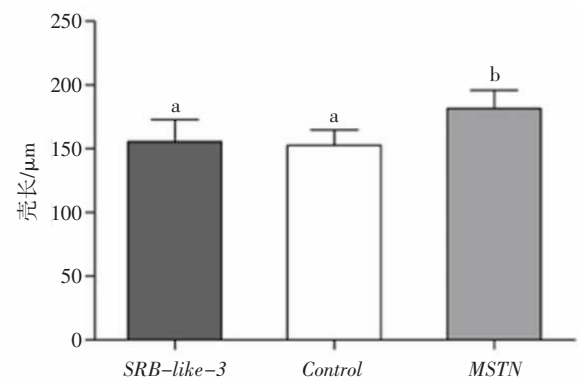


图8 10 d D-型幼虫大小的比较

注: 误差棒上具有不同字母者表示平均值间具有显著差异。

中评分相应较高,故系统内靶向评分有一定参考性。

由于 PAM 位点普遍存在,故造成脱靶的可能性很高。同时,许多科学家为提高编辑特异性进行了一系列的改造,包括针对 scaffold 的改造等^[30],因此,本文虽初步筛选出可应用于体内实验的相应 sgRNA,但并不保证其唯一性,可随着技术的发展对其进行优化。

2013 年,张峰等应用 CRISPR/Cas9 技术在哺乳动物中实现基因编辑,引发突变。自此,CRISPR/Cas 技术的热潮席卷全球^[31],并陆续在海

洋动物中开展应用研究,特别是在脊尾白虾中,宋凤阁成功孵化出发育时间缩短的突变的幼虾个体^[32]。然而,迄今为止,该技术在软体动物中尤其是双壳类中的应用还处于探索阶段。2019 年 Yu 等利用长牡蛎为材料,首次在贝类中采用 CRISPR/Cas9 技术开展了基因编辑研究^[8]。他们通过显微注射 sgRNA/Cas9 核酸蛋白复合物的方式对 MSTN 基因以及持家基因 Twist 进行了编辑,成功地引发了 Indel 突变,为 CRISPR/Cas9 技术在贝类中的研究提供了参考。利用同样的技术,该课题组

在长牡蛎中对肌肉生长发育的进程进行了基因编辑研究^[9-10]。他们在编辑后第 13 h 的多细胞胚胎以及第 24 h 到第 120 h 的 D-型幼虫中都成功地检测到报告质粒的表达。此外,利用显微注射技术,在侏儒蛤中也成功地对 *Cfap206* 基因进行了编辑^[11]。然而,无论是在长牡蛎中还是在侏儒蛤中都没有将编辑后的受精卵培养到稚贝阶段。由于双壳贝类受精卵个体比较小,直径一般仅在 60 μm 左右,并且注射后存活率低,即使是操作熟练的技术人员也难以在发育至 4 细胞前完成保证存活的受精卵量,因此应用显微注射开展双壳贝类的基因编辑技术难度比较大,且应用前景不理想。

然而,由于双壳贝类受精卵较小且产卵量大,电转染的导入方式显得更适合其基因编辑的研究。国内已有研究人员尝试利用电转染技术对福建牡蛎开展基因编辑工作^[14-15],但编辑后的幼虫也都没有培养到稚贝阶段。本研究以华贵栉孔扇贝为研究对象,采用电转染介导的基因编辑方法,首次在贝类中成功地将基因编辑后的幼虫培育到稚贝,说明电转染介导的 CRISPR/Cas9 基因编辑技术在贝类中的应用是可行性的。首先,编辑后的受精卵能够正常发育到 D-型幼虫,并且仍有较高的孵化率;其次,电转后 5 d D-型幼虫的编辑效率 8%~10%,并且仍有大量的幼虫存活,5 d 和 10 d 幼虫(图 3 和图 4)及 40 d 的稚贝(图 5)中均能够检测到荧光标记;第三,*MSTN* 被编辑后,第 10 天幼虫的壳长显著地大于编辑 *SRB-like-3* 的实验组和对照组(图 8),因为 *MSTN* 能够抑制生长,该基因被编辑后,幼虫的生长加快,在幼虫阶段以壳长为指标辅助说明编辑效果。由于应用电转染技术每次可以对多个受精卵同时作用,每次电转所经历的时间大约 1 s,应用该技术可以快速地对大量的受精卵进行编辑,因此该技术具有效率高的优点。此外,电转染 CRISPR/Cas9 基因编辑技术只需要电转仪即可短时间对受精卵完成转染,设备要求简单、技术难度低,并且电转染器皿可重复利用,因而该技术具有操作简单、成本低的优点。

本研究充分体现了电转染 CRISPR/Cas9 基因编辑技术在贝类基因编辑中的优势,尽管还存在编辑效率偏低,电转染条件需要优化等问题,但该技术在贝类开展基因编辑研究中仍具有广阔的应用前景。

参 考 文 献

- [1] RAN F, HSU P, WRIGHT J, et al. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system[J]. *Nature Protocols*, 2013, 8(11): 2281-2308.
- [2] 于笛,迟小妹,滕炜鸣,等.基因编辑 CRISPR 技术在海洋生物遗传育种的应用进展[J]. *大连海洋大学学报*, 2021, 36: 169-176.
- [3] SENTIS E, FATOUROS C, GROBE S, et al. CRISPR/Cas9-mediated genome engineering: An adeno-associated viral (AAV) vector toolbox[J]. *Biotechnology Journal*, 2014, 9: 1402-1412.
- [4] STADTMAUER E, FRAIETTA J, DAVIS M, et al. CRISPR-engineered T cells in patients with refractory cancer[J]. *Science*, 2020, 367: 6481.
- [5] BURKE B, CARROLL M. BCR-ABL: a multi-faceted promoter of DNA mutation in chronic myelogenous leukemia[J]. *Leukemia*, 2010, 24: 1105-1112.
- [6] WANG P, ZHANG L, ZHENG W, et al. Thermo-triggered release of CRISPR-Cas9 system by lipid-encapsulated gold nanoparticles for tumor therapy[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2017, 130: 1507-1512.
- [7] HWANG W, FU Y, REYON D, et al. Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system [J]. *Nature Biotechnology*, 2013, 31: 227-229.
- [8] YU H, LI H, LI Q, et al. Targeted gene disruption in Pacific oyster based on CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein complexes[J]. *Marine Biotechnology*, 2019, 21: 301-309.
- [9] LI H, YU H. Striated myosin heavy chain gene is a crucial regulator of larval myogenesis in the pacific oyster *Crassostrea gigas*[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2021, 179: 388-397.
- [10] LI H, YU H, DU S. CRISPR/Cas9 mediated high efficiency knockout of myosin essential light chain gene in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) [J]. *Marine Biotechnology*, 2021, 23: 215-224.
- [11] WANG Y, ZHU X, LIAN S, et al. Functional characterization of *Cfap206* for bivalve ciliogenesis by RNAi and CRISPR/Cas9 technologies[J]. *Frontiers in Marine Science*, 2022, 9: 864037.
- [12] TOLEDO-JACOBO L, HENSON J, SHUSTER C. Cytoskeletal polarization and cytokinetic signaling drives polar lobe formation in spiralian embryos[J]. *Developmental Biology*, 2019, 456: 201-211.
- [13] HASHIMOTO M, YAMASHITA Y, TAKEMOTO T. Electroporation of Cas9 protein/sgRNA into early pronuclear zygotes generates non-mosaic mutants in the mouse[J]. *Developmental Biology*, 2016, 418: 1-9.
- [14] JIN K, ZHANG B, JIN Q, et al. CRISPR/Cas9 system-mediated gene editing in the Fujian oysters (*Crassostrea angulata*) by electroporation[J]. *Frontiers in Marine Science*, 2021, 8: 763470.
- [15] CHAN J, ZHANG W, XU Y, et al. Electroporation-based CRISPR/Cas9 mosaic mutagenesis of β -Tubulin in the cultured oysters[J]. *Frontiers in Marine Science*, 2022, 9: 912409.
- [16] CANTON, NECULAI D, GRINSTEIN S. Scavenger receptors in homeostasis and immunity[J]. *Nature Reviews in Immunology*, 2013, 13: 621-634.
- [17] LIU H, ZHENG H, ZHANG H, et al. A de novo transcriptome of the noble scallop, *Chlamys nobilis*, focusing on mining transcripts for

- carotenoid-based coloration[J]. BMC Genomics, 2015, 16: 44.
- [18] MCPHERRON A, LEE S. Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of USA, 1997, 94: 12457–12461.
- [19] RODGERS B, GARIKIPATI D. Clinical, agricultural, and evolutionary biology of myostatin: a comparative review[J]. Endocrine Reviews, 2008, 29: 513–534.
- [20] KIM H, MYKLES D, GOETZ F, et al. Characterization of a myostatin-like gene from the bay scallop, *Argopecten irradians*[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2004, 1679: 174–179.
- [21] GUO L, LI L, ZHANG S, et al. Molecular cloning and characterization of the myostatin gene in a cultivated variety of bay scallop, *Argopecten irradians*[J]. Aquaculture, 2012, 350–353: 192–199.
- [22] HU X, GUO H, HE Y, et al. Molecular characterization of Myostatin gene from Zhikong scallop *Chlamys farreri* (Jones et Preston 1904)[J]. Genes & Genetic Systems, 2010, 85: 207–218.
- [23] FAN S, XU Y, LIU B, et al. Molecular characterization and expression analysis of the myostatin gene and its association with growth traits in Noble scallop (*Chlamys nobilis*)[J]. Comparative biochemistry and physiology. Biochemistry & Molecular Biology Part B, 2017, 212: 24–31.
- [24] NÚÑEZ-ACUÑA G, GALLARDO-ESCÁRATE C. The myostatin gene of *Mytilus chilensis* evidences a high level of polymorphism and ubiquitous transcript expression[J]. Gene, 2014, 536: 207–212.
- [25] MORELOS R, RAMÍREZ J, GARCÍA-GASCA A, et al. Expression of the myostatin gene in the adductor muscle of the Pacific lion-paw scallop *Nodipecten subnodosus* in association with growth and environmental conditions. Journal of Experimental Zoology[J]. Ecological Genetics and Physiology Part A, 2015, 323, 239–255.
- [26] NIU D, WANG L, BAI Z, et al. Identification and expression characterization of the myostatin (*MSTN*) gene and association analysis with growth traits in the razor clam *Sinonovacula constricta*[J]. Gene, 2015, 555: 297–304.
- [27] ZHENG H, ZHANG T, SUN Z, et al. Inheritance of shell colours in the noble scallop *Chlamys nobilis* (Bivalve: Pectinidae). Aquaculture Research, 2013, 44: 1229–1235.
- [28] WOLPE P, ROMMELFANGER K. Ethical principles for the use of human cellular biotechnologies[J]. Nature Biotechnology, 2017, 35: 1050–1058.
- [29] KLEISTIVER B, PATTANAYAK V, PREW M, et al. High-fidelity CRISPR-Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects[J]. Nature, 2016, 529: 490–495.
- [30] SONG Q, NI K, LIU M, et al. Direct-seq: programmed gRNA scaffold for streamlined scRNA-seq in CRISPR screen[J]. Genome Biology, 2020, 21: 136.
- [31] CONG L, RAN F, COX D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems[J]. Science, 2013, 339: 819–823.
- [32] 宋凤阁. CRISPR/Cas9 技术对脊尾白虾蜕皮抑制激素基因的靶向敲除研究[D]. 青岛: 中国科学院大学(中国科学院海洋研究所), 2017.

(本文编辑: 袁泽轶)