



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Engineering

journal homepage: www.elsevier.com/locate/eng



Research
Genetic Engineering—Article

利用 *cyp17a1* 缺失的伪雄鲤成功构建全雌鲤群体

翟刚^{a,b}, 舒婷婷^{a,b}, 陈颀新^{a,b}, 娄气永^a, 贾景怡^c, 黄建飞^{a,b}, 石闯^{a,b}, 金霞^a, 贺江燕^a, 姜冬火^d, 钱雪桥^d, 胡炜^{a,b,e}, 殷战^{a,b,e,*}

^a State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China

^b College of Advanced Agricultural Sciences, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

^c College of Fisheries, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

^d HAID Research Institute, Guangdong HAID Group Co., Ltd., Guangzhou 511400, China

^e The Innovative Academy for Seed Design, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 January 2021

Revised 14 March 2021

Accepted 15 March 2021

Available online 17 August 2021

关键词

鲤

两性异形

生长

cyp17a1

性类固醇激素

全雌群体

摘要

部分养殖鱼类存在两性生长异形的表型,因此,构建相应单性别养殖群体对水产养殖产量的提升具有产业应用价值。迄今为止,采用激素活性物质诱导产生性反转亲本是水产养殖业构建单性别群体最普遍使用的方法。本研究针对雌鲤生长快于雄鲤的两性生长异形的特性,以 *cyp17a1* 为靶点进行了 CRISPR/Cas9 介导的基因编辑操作,利用 *cyp17a1* 敲除后形成的伪雄鲤,成功构建了全雌鲤群体。首先,我们发现无论遗传性别为 XX 还是 XY,其 *cyp17a1* 缺失鲤个体性腺均发育为精巢,并能正常产精。其次,利用确定的雄性特异 DNA 分子标记,筛选到 *cyp17a1*^{-/-} XX 伪雄个体,其具有正常的精巢发育和精子发生。将其与野生型雌鲤杂交,在 8 月龄时检测后代性别,发现 100% 为雌性。将全雌群体和对照组雌雄混合群体各 500 尾进行同塘生长对比养殖,至 8 月龄或 12 月龄时随机抽样检测,发现 *cyp17a1* 杂合突变雌鲤体重比同塘性别混养对照组分别高 6.60% 或 32.66%。因此,本研究首次成功地利用基因工程技术对单基因位点进行操作,创制了全雌群体,实现了对雌鲤生长快的两性生长异形特性的应用,提升了养殖产量。

© 2021 THE AUTHORS. Published by Elsevier LTD on behalf of Chinese Academy of Engineering and Higher Education Press Limited Company. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

1. 引言

在过去几年中,水产养殖业是食物供应产量增长最快的产业[1]。一些鱼类具有某种性别生长快于另一种性别的生长异形的特性,因此,这使构建生长较快的单性别养殖鱼类群体在养殖生产中具有显著的产业意义。鱼类与大多数哺乳动物相比,其性别决定机制表现出众多的性别决定类型,包括遗传性别决定 (genetic sex determination,

GSD) 和环境性别决定 (environmental sex determination, ESD)。鱼类的性别决定通常也更具可塑性,这种现象也已在多种鱼类中得到了证明,包括可以通过在性别分化过程中使用外源性类固醇激素及其相关活性物质的处理实现性别的转变,从而使个体的生理性别与其遗传性别间出现解偶联 (即伪雄或伪雌鱼)。例如,已有广泛报道的通过给予外源雌激素 (雌二醇)、雄激素 (睾酮)、芳香化酶或雄激素受体抑制剂等处理,实现鱼类性别的转变 [2-6]。采用激素及其相关活性物质诱导导致的性别转变,是渔业

* Corresponding author.

E-mail address: zyin@ihb.ac.cn (Z. Yin).

2095-8099/© 2021 THE AUTHORS. Published by Elsevier LTD on behalf of Chinese Academy of Engineering and Higher Education Press Limited Company. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

英文原文: *Engineering* 2022, 8(1): 181-189

引用本文: Gang Zhai, Tingting Shu, Kuangxin Chen, Qiyong Lou, Jingyi Jia, Jianfei Huang, Chuang Shi, Xia Jin, Jiangyan He, Donghuo Jiang, Xueqiao Qian, Wei Hu, Zhan Yin. Successful Production of an All-Female Common Carp (*Cyprinus carpio* L.) Population Using *cyp17a1*-Deficient Neomale Carp. *Engineering*, <https://doi.org/10.1016/j.eng.2021.03.026>

中获得单性或不育群体的规模化生产使用较为广泛的技术之一。然而，由激素活性物质诱导产生鱼类性别转变的个体的处理时间长，且维持其性别转变和发育不稳定[6]。而且，在养殖水体中使用大量的激素类物质，其排放和处理较为困难，易导致对环境水体的内分泌干扰效应，因此，在养殖水体中使用激素类化学品正不断地引来社会各界的关注[7]。还有一些研究报道，采用温度和光周期控制方式，也可导致养殖鱼类的性别转变。然而，通过这些操作实现的性别转变，往往仅能造成性别出现偏向性，难以获得单性别的养殖鱼类群体[8-9]。因此，开发基因工程方法，以获得稳定的单性或不育的养殖鱼类群体具有较大的理论和产业应用价值。

鲤 (*Cyprinus carpio* L.) 是世界上产量第三大的淡水养殖品种，因生长性状和高经济价值而在世界范围内得到广泛养殖。前人的研究已表明，鲤采用 XX/XY 遗传性别决定型，其生长呈性别二态性，雌性个体的生长速度至少比雄性个体高 10%，特别是在幼鱼期之后[10-11]。Wu 等[12]进行了构建全雌鲤群体的尝试，他们通过对 XX 遗传性别决定型的雌鲤经雌核发育诱导，获得 XX 遗传性别决定型的雌性群体，利用 17 α -甲基睾酮处理后使其转化为伪雄鲤。伪雄鲤的生理表型为雄性，但其遗传性别决定型为 XX，在与野生型雌鲤人工繁殖后可产生全雌后代。除了采用 17 α -甲基睾酮处理外，通过给予芳香酶抑制剂来曲唑和雌激素受体调节剂他莫昔芬进行由雌到雄的性别转变的研究也已有报道[6]。

许多鱼类的性别决定基因已被鉴定，包括 *dmY* [13]、*gsdfY* [14]、*sox3Y* [15]、*amhY* [16-17]、*amhr2* [18]、*gdf6Y* [19]、*dmrt1* [20-21]、*sdY* [22]。这些性别决定基因对性别决定机制的研究至关重要。鲤性别决定研究也是硬骨鱼性别分化研究的较好模型，但其性别决定基因尚未见报道。青鳉是另一种著名的淡水模式鱼，采用 XX/XY 遗传性别决定系统[23]。*Cyp17a1* 是细胞色素 P450 酶家族的成员，也是催化合成睾酮和雌二醇前体的关键酶。利用含有 *P450c17* 基因功能天然缺失突变的 *scl* 青鳉品系进行研究，结果表明该基因的缺失导致 *scl* 突变系雄性 (XY) 和雌性 (XX) 的第二性征的缺失，但 *scl* 突变系雄性 (XY) 的精子发育未见受损。有趣的是，在 6 月龄 XX *scl* 突变体青鳉的性腺中，可见正常的精子发生和双线期卵母细胞同时存在[24]。最近，在斑马鱼中敲除了 *cyp17a1*，发现 *cyp17a1* 敲除斑马鱼具有全部发育为精巢和正常的精子发生的表型。我们也观察到了这些 *cyp17a1* 敲除斑马鱼缺失雄性典型的第二性征和交配行为[2,25-26]。在 *scl* 突变体青鳉中的观察结果可证实，性类固醇激素对于雄性典型的

第二性征和交配行为是必不可少的[2,24,26]。根据前人报道[27]，实验室常用的斑马鱼品系的遗传性别决定系统已丢失。因此，在具有 XX/XY 遗传性别决定型的鲤中敲除 *cyp17a1* 能否实现与 *cyp17a1* 敲除斑马鱼相似且包含伪雄的全雄纯合子表型，是值得关注的。

在本研究中，通过敲除 *cyp17a1* 获得伪雄鲤，将其与对照组雌鲤人工受精，从而获得全雌后代群体。第一，*cyp17a1* 缺失鲤与斑马鱼在性别分化和性征方面表现出相似性，即 *cyp17a1* 缺失鲤也均发育为缺少第二性征的雄鲤。第二，*cyp17a1*^{-/-} XX 基因型的鲤 (伪雄鲤) 发育为精巢结构、精子发生和活力均正常的雄鲤，并可与野生型雌鲤 (*cyp17a1*^{+/+} XX) 进行人工受精，成功发育为个体。第三，对人工受精产生的后代进行雄性特异性标记检查，并进行组织学分析，发现后代均为 *cyp17a1*^{+/-} XX 的基因型，并发育为具有正常卵细胞的雌鲤 (100.00%, *n* = 81)。第四，对全雌组和对照组以 1:1 的比例混合的 1000 尾鱼在同一池塘中开展生长对比，发现早在 8 月龄时就观察到两性生长异形；至 8 月龄或 12 月龄时随机抽样检测，发现 *cyp17a1* 杂合突变雌鲤体重比同塘性别混养对照组分别高 6.60% 或 32.66%。综上所述，我们首次利用基因工程技术，而非依赖于性类固醇激素及其相关活性物质的诱导处理，成功制备了伪雄亲本个体，并借助其创制了全雌鲤群体。

2. 材料和方法

2.1. 动物

本研究中所有实验使用的黄河鲤鱼均购自河南省郑州市鲤原种养殖场。所有鱼类实验均按照《实验动物护理与使用指导准则》进行饲养，并经中国科学院水生生物研究所批准 (见附录 A 中的第 S1 节)。

2.2. *Cyp17a1* 敲除

CRISPR/Cas9 策略被用于 *cyp17a1* 基因敲除。鲤 *cyp17a1* 第一个外显子两个序列的靶向 RNA (gRNA) 分别如下: GGCATGAACAGAAAAGCCA 和 GGGAGTGAT-GGGGGGCTTGG。转录后连同 Cas9 核酸酶重组蛋白和缓冲液注射入鲤胚胎 (见附录 A 中的第 S2 节)。

2.3. 雄性特异标记鉴定

如前文所述，雄性特异标记是基于 DNA 测序、基因组组装、序列拼接、雄性特异片段比对后获得[28] (见附录 A 中的第 S3 节)。

2.4. 基因型鉴定

对于基因型鉴定，本研究使用了基因组DNA作为模板。用于*cyp17a1*基因型鉴定的引物见表1，DNA提取程序详见附录A中的第S4节。

2.5. 精巢中睾酮测定

精巢中睾酮浓度的测定如前文所述[2]（见附录A中的第S5节）。简言之，在样品制备后，制备酶联免疫检测（ELISA）缓冲液、洗涤缓冲液、ELISA标准液、睾酮AChE示踪剂和睾酮ELISA抗血清。根据说明设置样品板。在405~420 nm的波长下读取样品板，并使用Cayman电子计算表格进行数据分析。

2.6. 组织学分析(苏木精和伊红染色)

对*cyp17a1*^{+/+} XY鲤、*cyp17a1*^{-/-} XY鲤、*cyp17a1*^{+/+} XX鲤和*cyp17a1*^{-/-} XX鲤的性腺进行解剖学检查和组织学分析。切片和染色程序如前文所述[29]（见附录A中的第S6节）。每个图像中都显示比例尺。

2.7. RNA提取和编码DNA合成

RNA提取和编码DNA（cDNA）合成如前文所述[2]（见附录A中的第S7节）。cDNA用于*cyp17a1*的基因型鉴定和胰岛素样生长因子3（*igf3*）和胰岛素样3（*insl3*）的实时荧光定量聚合酶链反应（qPCR）。以cDNA为模板进行*cyp17a1*基因型鉴定的引物列于表1中。

2.8. 实时荧光定量聚合酶链反应

根据制造商的说明使用了Bio-Rad实时系统（Bio-

Rad Systems，美国）（见附录A中的第S8节）。用于*igf3*、*insl3*和 β 肌动蛋白（ *β -actin*）的实时荧光定量聚合酶链反应（qPCR）引物列于表1。

2.9. 扫描电镜

使用扫描电子显微镜开展了精子形态的观察和分析，详见附录A中的第S9节。

2.10. 统计分析

使用GraphPad Prism 8软件（GraphPad software，美国）分析数据。所有结果均以均值±标准偏差（SD）表示，差异使用*t*检验进行评估。对于所有统计比较，在*P* < 0.05时被认为具有统计学意义。

3. 结果

3.1. 鲤雄性特异DNA分子标记的鉴定

根据鲤雌性和雄性组装的基因组之间的比较分析，获得了一个包含1209个碱基对的候选雄性特异性序列（众多候选雄性特异性序列之一）。该片段已通过来自同胞和非同胞群体的鲤DNA样本进行了PCR验证（见附录A中的第S10节）。用1%琼脂糖凝胶电泳对扩增的雄性特异标记PCR产物进行评估，发现雄性特异分子标记与鲤的性别完全匹配（见附录A中的图S1）。用于基因型鉴定的雄性特异标记的引物列于表1中。对大于100个来自同胞群体和不同饲养地区的非同胞群体鲤进行解剖学确认，发现与PCR产物的雄性特异性是匹配的。根据Sanger测序结

表1 本研究中使用的引物

Assay and target gene	Primer direction and sequence (5'-3')	Product size (bp)
Genotype identification (genomic DNA used as the template)		
<i>cyp17a1</i> -1	F: CCGATGACACTTAGATAGTTG R: CATGTTGGCTGCAGTGATACTC	717
Male-specific marker	F: GAGCATCCACTGTCAACTT R: ACTCTTCCCAAACACTGATT	1209
<i>cyp17a1</i> validation (cDNA used as the template)		
<i>cyp17a1</i> -2	F: GAAGAGCTGGAGAACAACCTTG R: CCAACATCATGAGTGCTGGTG	924
qPCR		
<i>igf3</i>	F: GGCTTGTGTTTCTGAGGCAA R: TGTGTCAGTGGAAGGATGCTGT	167
<i>insl3</i>	F: CCTGATTACAGACCTTCACTTCGC R: GCTCTGCTGGTGGTGGGCTTATGTG	181
<i>β-actin</i>	F: GCTATGTGGCTCTTGACTTCGA R: CCGTCAGGCAGCTCATAGCT	85

F: forward primer; R: reverse primer; bp: basepair; qPCR: quantitative real-time polymerase chain reaction; cDNA: complementary DNA.

果, 从雄性鲤样本中扩增的特定 PCR 产物是相同且一致的。但这种已证实的雄性特异性标记序列未能与之前在 GenBank 中提交的任何鲤基因组 DNA 序列相匹配。在这个雄性特异标记序列中也没有发现潜在的编码区域。

3.2. *cyp17a1* 缺失鲤的建立

cyp17a1 mRNA 序列长 1533 个碱基对, 编码 510 个氨基酸。利用 CRISPR/Cas9 技术, 通过将 Cas9 核酸酶重组蛋白和 *cyp17a1* gRNA 进行混合显微注射, 生成了两个靶位点突变的 F0 *cyp17a1* 敲除鱼[图 1 (a)], 将 11 条经检测含有有效 *cyp17a1* 突变的雄性鲤在 1 年龄时与野生型雌鲤杂交, 获得了来自 F0 雄鲤 (电子标签号码为 700497) 和野生型雌鲤的后代 (F1 代)。在 *cyp17a1* 的第一个靶位点处发现 3 个碱基对的插入, 在第二个靶位点处观察到 14 个碱基对的缺失[图 1 (b)]。将 F1 *cyp17a1* 杂合子在 1 年龄时自交, 并从 F2 群体中获得了 *cyp17a1* 纯合子。采用 *cyp17a1* 靶点 PCR 的聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 和溴化乙锭染色后的成像技术检查 *cyp17a1* 缺失状态。杂合子的 *cyp17a1* PCR 产物的异源链可以在变性和复性后的第一轮 PAGE 后被鉴定出来。在 *cyp17a1*^{+/+} 鱼和 *cyp17a1*^{-/-} 鱼的 *cyp17a1* PCR 产物中可观察到单一条带, 但在与野生型个体的 *cyp17a1* PCR 产物混合后的第二轮 PAGE 后可观察到异源链[图 1 (c)]。使用来自基因组和 cDNA 作为模板的 PCR 产物进行了突变验证。结果表明, 突变系仅保留了 8

个正确的氨基酸, 并且在表达了 45 个错误的氨基酸后, 发生了提前终止[图 1 (d)]。

3.3. *cyp17a1* 缺失纯合子为全雄且性腺类固醇激素合成和雄性典型第二性征异常

对 1 年龄的 *cyp17a1* 缺失纯合子进行观察, 发现其性腺均发育为精巢[图 2 (b)、(d)]。鲤的生长具有两性异形的特点, 即雌鲤的生长速度明显快于雄鲤[10-11]。F2 代群体的体重分析证实了这点: 在 *cyp17a1*^{+/+} 鱼和 *cyp17a1*^{+/-} 鱼中, 雌鲤的体重显著高于雄鲤[图 2 (e)]。然而, 在 *cyp17a1* 缺失后, 两性生长异形被消除, 因为 *cyp17a1*^{-/-} XX 鱼的体重与 *cyp17a1*^{-/-} XY 鱼的体重相当[图 4 (e)]。值得注意的是, 具有 *cyp17a1*^{+/+} XX 基因型的鱼的体重比对照组高出 32.66% [*cyp17a1*^{+/+} XX 鱼: (750.6 ± 277.2) g; *cyp17a1*^{+/+} 鱼: (565.8 ± 166.6) g]。同时, 对 F2 代群体中 *cyp17a1*^{+/+}、*cyp17a1*^{+/-} 和 *cyp17a1*^{-/-} 鲤的数量和比例进行了统计分析。我们发现来自此统计的比例总体上符合孟德尔遗传定律 (*cyp17a1*^{+/+} 鱼: 20.77%; *cyp17a1*^{+/-} 鱼: 51.38%; *cyp17a1*^{-/-} 鱼: 27.85%) (表 2)。

虽然 *cyp17a1*^{-/-} 鱼精巢的睾酮水平显著降低[图 2 (f)], 但 *cyp17a1*^{-/-} XX 鱼和 *cyp17a1*^{-/-} XY 鱼的精子形态与 *cyp17a1*^{+/+} XY 鱼没有差异[图 2 (g) ~ (i)]。据报道, 鳃盖和胸鳍上的结节是典型的雄性性征[30]。对 1 年龄 F2 代群体的检查结果表明, 在对照雄鱼中可见鳃盖和胸鳍上

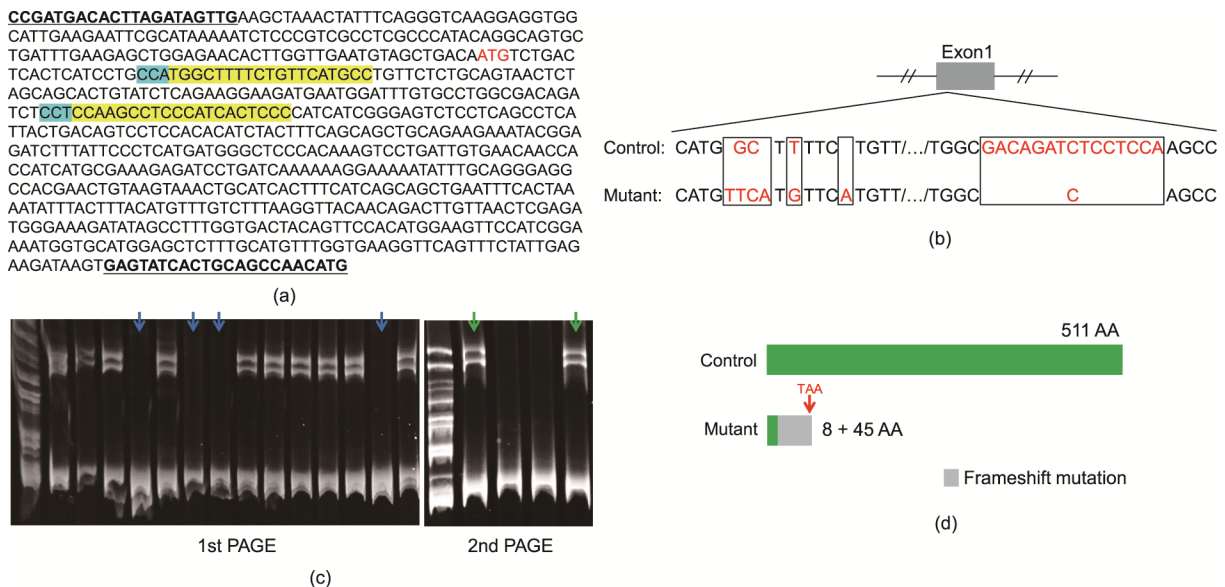


图 1. 鲤 *cyp17a1* 的敲除。(a) 来自鲤基因组 DNA 的 *cyp17a1* 序列。用于筛选的引物已被加粗和用下划线标注。原间隔基序区域的 NGG 序列已用蓝色标记。设计的靶位点已用黄色标记。*cyp17a1* 的起始密码子 ATG 显示为红色字体。(b) 对照 *cyp17a1* 和突变 *cyp17a1* 的示意图。在第一和第二个靶点的突变序列显示为红色字体。(c) 将基因组 DNA 用于 PCR 检测, 使用 PAGE 对 PCR 产物进行基因型鉴定。第一轮 PAGE 可以鉴定出 *cyp17a1*^{+/+} 鱼 (蓝色箭头指示), *cyp17a1*^{+/+} 和 *cyp17a1*^{-/-} 鱼的基因型可以通过与野生型鱼 *cyp17a1* PCR 产物混合后进行的第二轮 PAGE 鉴定出来 (绿色箭头指示)。(d) 对照和突变 *cyp17a1* 表达蛋白的预测示意图。根据测序, 突变的 *cyp17a1* 和对照 *cyp17a1* 表达的蛋白相比, 预计包含了 8 个正确的氨基酸 (绿色标记) 和移码突变的 45 个错误氨基酸 (灰色标记)。提前终止的密码子 TAA 用红色字体显示。AA: 氨基酸。

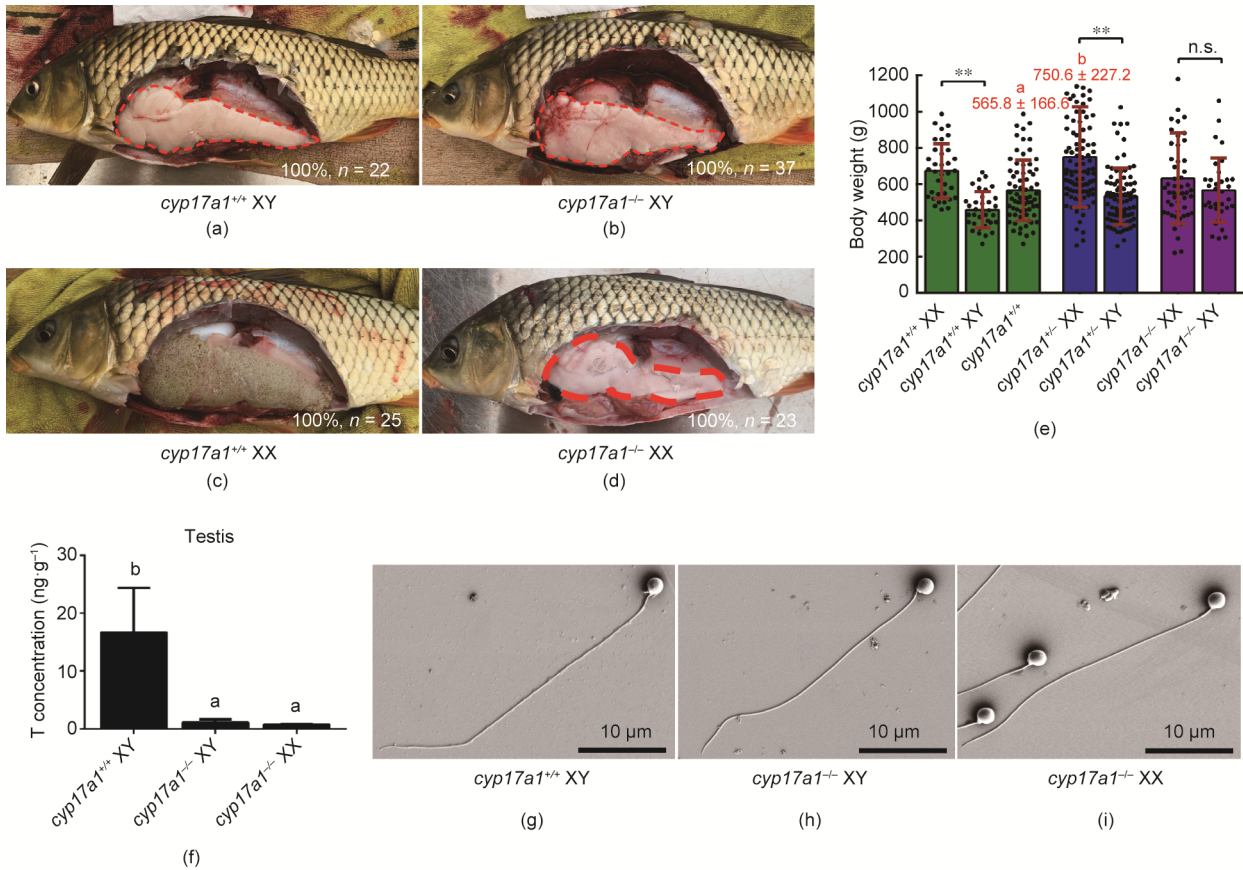


图2. 1年龄的 *cyp17a1* 的敲除纯合子表现为全雄。(a) ~ (d) 不同基因型鱼性腺的解剖学检查；(e) 不同基因型鱼体重的比较；(f) *cyp17a1*^{+/+} XY 鱼、*cyp17a1*^{-/-} XY 鱼和 *cyp17a1*^{-/-} XX 鱼的精巢睾酮水平；(g) ~ (i) 精子的形态学分析。T: 睾酮。(e) 和 (f) 中的柱状图上的字母 a 和 b 代表差异显著。n.s.: 无显著差异。**: $P < 0.01$ 。

表2 2019年和2020年鉴定的每种基因型鱼的数量和比例

Year	<i>cyp17a1</i> ^{+/+}		<i>cyp17a1</i> ^{-/-}		<i>cyp17a1</i> ^{-/-}		In sum
	XX	XY	XX	XY	XX	XY	
2019	47	35	99	84	52	33	350
2020	28	25	78	73	39	57	300
Total	75	60	177	157	91	90	650
Ratio	11.54%	9.23%	27.23%	24.15%	14.00%	13.85%	100.00%

的结节[图3 (a)], 但这些在对照雌鱼[图3 (c)]、*cyp17a1*^{-/-} XX 鱼、*cyp17a1*^{-/-} XY 鱼中均不可见[图3 (b)、(d)]。

3.4. 全雌鲤的创制

鲤的两性生长异形反映了一种生产经济性状, 将 *cyp17a1*^{+/+} XX 鱼和 *cyp17a1*^{-/-} XX 鱼 (伪雄) 杂交, 建立全雌群体将对水产养殖的产量提高做出重大贡献。全雌鲤群体的基因型鉴定和性腺组织切片分析结果在图4中展示。与预期一致, 来自上述亲本的所有后代都被确定为雌性, 因为在5日龄的全雌群体中未检测到雄性特异标记 (100.00%, $n = 84$) [图4 (a), 泳道 13~96]。此外, 我们

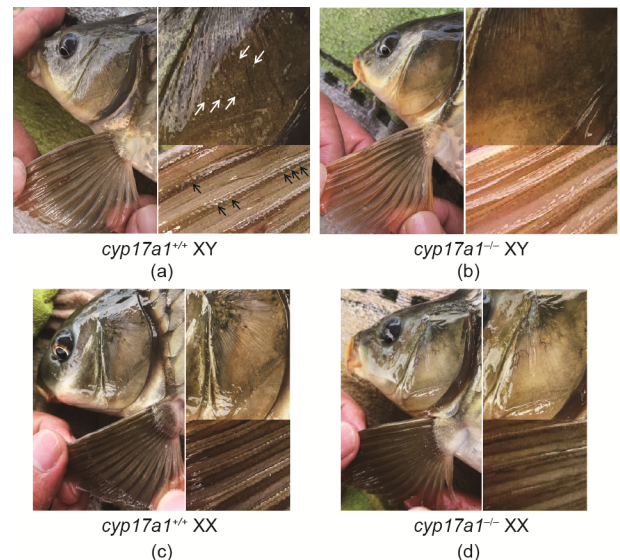


图3. 鳃盖和胸鳍结节的整体外观。(a) *cyp17a1*^{+/+} XY 鱼；(b) *cyp17a1*^{-/-} XY 鱼；(c) *cyp17a1*^{+/+} XX 鱼；(d) *cyp17a1*^{-/-} XX 鱼。鳃盖结节用白色箭头指示；胸鳍结节用黑色箭头指示。

对8月龄 *cyp17a1*^{+/+} XX 鱼和 *cyp17a1*^{-/-} XX 鱼 (伪雄鲤) 杂交群体进行了解剖学观察和性腺组织学分析, 发现其都已分化为卵巢 (100.00%, $n = 81$) [图4 (c)、(d)]。

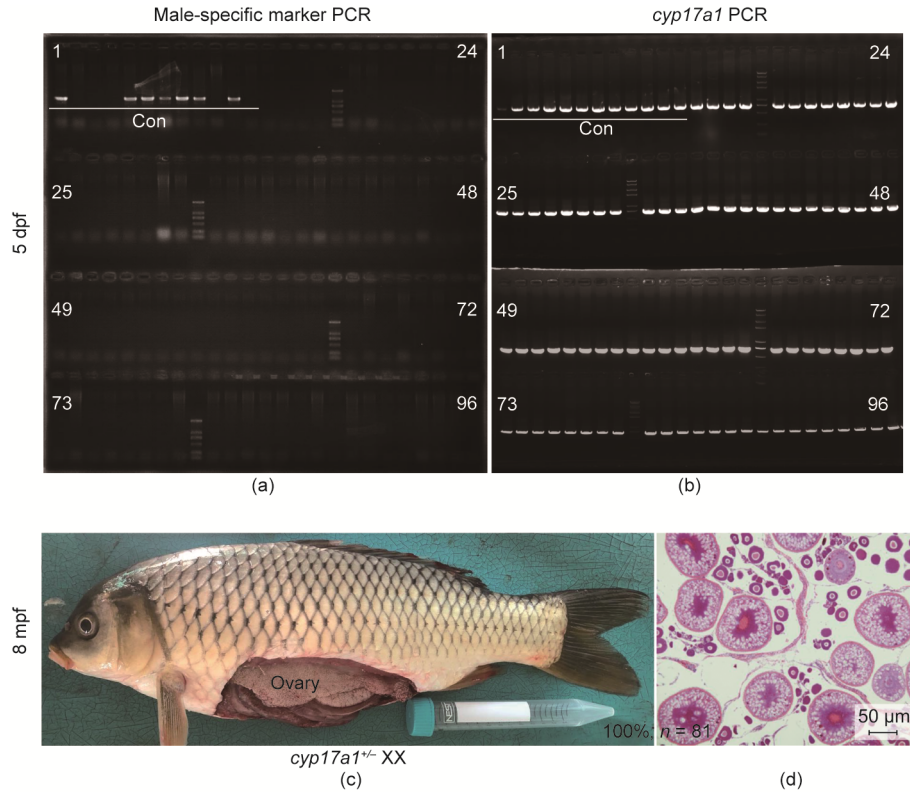


图4. 从全雌鲤群体进行的性腺分化的组织学分析。(a) 使用雄性特异性标记进行遗传性别决定型鉴定。(b) 将 *cyp17a1* 的基因型鉴定作为对照。泳道号码1、24、25、48、49、72、73和96已在琼脂糖凝胶电泳中标注。泳道1~12是以对照组鱼的DNA作为模板获得的雄性特异性标记的PCR产物。泳道13~96是以全雌鲤群体鱼的DNA作为模板获得的雄性特异性标记的PCR产物。(c)、(d) 对8月龄全雌鲤群体 (*cyp17a1*^{+/+} XX) 鱼的性腺进行解剖学和组织学检查的代表性图像。Con: 对照组。

3.5. 对照组和全雌群体的生长比较

我们将全雌群体和对照组雌雄混合群体各500尾个体在孵化后混合, 进行同塘养殖的生长对比。至8月龄时, 随机抽样、取样和统计分析[图5 (a) ~ (c)]。在对照组中, 雌鲤的体重显著高于雄鲤[对照雄鲤: (1.348 ± 0.2428) kg; 对照雌鲤: (1.459 ± 0.2830) kg], 再次证实了鲤两性生长异形的现象。虽然对照组每条鱼的平均体重为 (1.410 ± 0.2705) kg, 但全雌群体的生长显著提高, 即 (1.503 ± 0.2127) kg [图5 (d)]。

4. 讨论

在本研究中, 我们在鲤中敲除了 *cyp17a1*, 并在5月龄、6月龄和1年三个时期分析了 *cyp17a1* 缺失纯合子的性征发育情况; 尝试了前人报道的性别标记, 但未能证实这两个DNA片段在不同来源的鲤群体中存在雄性特异性[31-32]。因此, 我们自行对雌性和雄性组装的鲤基因组进行比较分析, 发现雄性特异性分子标记是从全雄性 *cyp17a1* 缺失纯合子鲤中筛选出具有XX遗传性别决定型的伪雄鲤的重要手段(见表1及附录A中的第S10节和图

S1)。通过自行确定的鲤雄性遗传片段, 筛选出伪雄鲤 (*cyp17a1*^{-/-} XX), 并将其与野生型雌鲤进行人工受精; 雄性遗传标记的发现和运用, 帮助实现了高效地创制全雌鲤群体(图4)。结合之前在斑马鱼中的在体研究结果, 我们证明了在鲤科鱼类中性类固醇激素在调节性腺发育和分化中的作用都是相似的; 无论其是否具有遗传性别决定型, *cyp17a1* 缺失的表型是保守的。我们同样证实, 在8月龄时, 全雌组鱼的平均体重明显高于对照组鱼(图5)。考虑到鲤两性生长异形的表型, 筛选 *cyp17a1* 缺失纯合子伪雄鲤并利用其成功构建全雌群体, 可作为传统的性类固醇激素及其相关物质诱导性转变的有效替代方案。

在20世纪80年代, Wu等[12]报道了将由雌核发育的雌性个体后代用17 α -甲基睾酮进行处理, 可以有效地产生伪雄鲤。随后, 生理为雄性但遗传性别决定型为XX的伪雄鲤在与野生型雌鱼进行人工繁殖后产生了全雌后代。最近的两项研究同样涉及了鲤的雌核发育和17 α -甲基睾酮诱导, 并利用伪雄鲤杂交获得全雌鲤群体[33-34]。此外, 据报道, 通过给予来曲唑和他莫昔芬同样可以诱导性转变[6]。为了建立全雌群体, 甲基睾酮和芳香化酶抑制剂(法偈唑或来曲唑)在几种水产养殖物种中已被广泛用

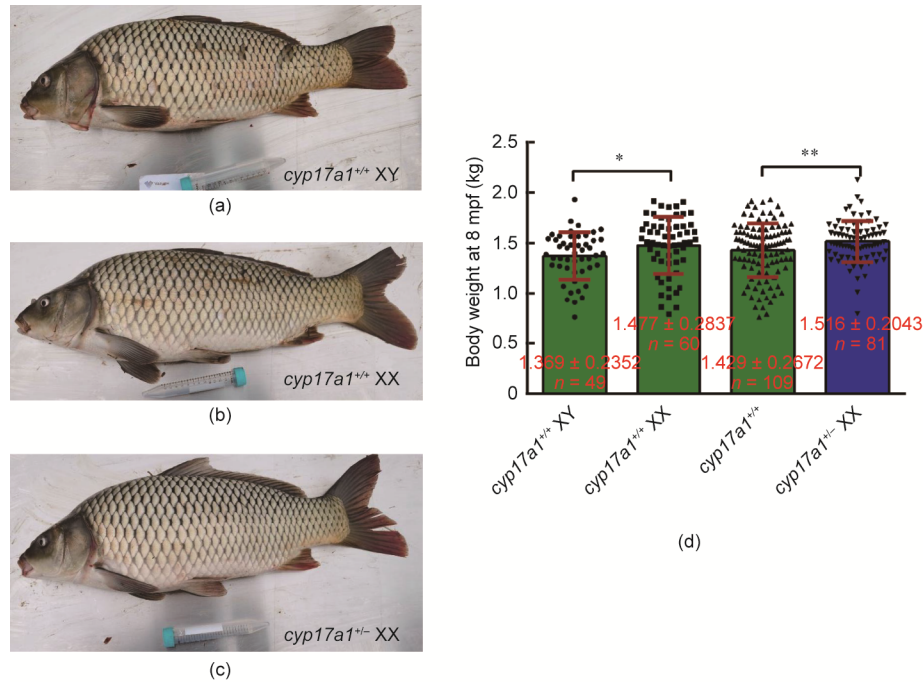


图5. 8月龄全雌鲤组和对照组的生长比较。(a) ~ (c) 鱼整体外观的代表性图像；(d) 109条对照组鱼和81条全雌鲤组鱼的体重比较。*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$ 。

于产生伪雄鲤，包括雌核发育的黄姑鱼[35]、大西洋庸鲽[36]、鳊[37]、美洲红点鲑[38]、黄颡鱼[39]和黑貂鱼[40]。

以在斑马鱼中开展的研究为基础，我们在本研究中利用基因组编辑方法研究了性类固醇激素调节性腺发育和分化的机制，以及其在产生伪雄鲤方面的潜在应用。通过 *cyp17a1* 缺失产生的伪雄鲤，建立了一种用于水产养殖制种全雌鲤群体的新型性别控制技术。在过去的几十年里，中国科学家在几种养殖鱼类中创制了单性群体。然而，生产全雌群体的传统方法由于过程复杂，限制了大量生理稳定的伪雄鱼及单性群体的大规模生产。此外，性类固醇激素及其相关物质的化学残留，以及对环境的内分泌干扰效应是值得关注的问题[7]。与传统的性类固醇激素及其相关物质诱导方法相比，在从杂合个体之间自交产生的后代中大规模生产生理稳定的伪雄鱼更容易，而且无需任何特殊处理。同时，在连续两年的同塘养殖的比较试验中观察到 *cyp17a1*^{+/+} XX 基因型鱼的平均体重显著增高，证明了在两性生长异形的鲤中大规模生产全雌鲤技术方案的有效性和实用性（图2、图5）。有趣的是，在 *cyp17a1*^{-/-} XY 和 *cyp17a1*^{-/-} XX 鱼之间没有看到两性生长异形[图2 (e)]。这些结果表明，两性生长异形是基于性类固醇激素介导的卵巢分化。

前人针对 *ar* [41-43]、*cyp11a2* [44] 和 *cyp11c1* [45] 在斑马鱼中开展了缺失突变的研究，发现雄性激素信号通路的缺乏可以造成精子发生障碍。然而，我们在成年 *cyp17a1*

缺失纯合子斑马鱼和鲤中发现，即使性类固醇激素合成明显降低以及雄性典型的第二性征缺失，但精巢发育和精子发生未见受损。我们认为，尽管雄性激素不足，但正常发育的睾丸与成熟的精子可能是由于存在其他补偿因素；因为许多研究表明，精巢中产生的斑马鱼孕激素信号以及其他雄性性类固醇激素可能是促进和维持精子发生的替代信号。这一假设仍然需要进一步的研究来证实。与6月龄 XX *scl* 突变体青鲮性腺的精子发生观察结果类似，其携带了双线期的卵母细胞。本研究中5月龄的 *cyp17a1*^{-/-} XX 鲤也表现出明显的精卵嵌合性腺（见附录A中的第S11节和图S2）。在5月龄时，在 *cyp17a1*^{-/-} XX 鲤的性腺组织中观察到更高水平的凋亡。随后，6月龄的 *cyp17a1*^{-/-} XX 鲤的性腺组织均全部发育为具有正常精子发生的精巢（见附录A中的第S12节和图S3）。这些结果与在 *cyp17a1* 缺失纯合子斑马鱼中的观察结果一致，斑马鱼在性腺分化的关键时期30 d时显示出睾丸分化和凋亡增加。观察两种 *cyp17a1* 缺失纯合子鲤科鱼类（斑马鱼和鲤鱼），发现卵细胞发育完全停止，这与在 *scl* 突变体青鲮中观察到的表型不同[24]。*cyp17a1* 缺失纯合子鲤科鱼类（斑马鱼和鲤鱼）和 *scl* 突变体青鲮之间性腺分化的差异，包括青鲮中可观察到的较迟时期出现的卵母细胞发育，可能是由于雌激素在不同鱼类中决定卵巢分化的作用差异所导致。在 *cyp17a1* 缺失纯合子斑马鱼和鲤中观察到精巢增生和精子数量显著增加。前期的研究表明，垂体促卵泡素β亚基 (*fshβ*) 的上调可能

是由于 *cyp17a1* 缺失纯合子缺乏性类固醇激素对垂体的负反馈, 因此刺激了精巢发育和精子发生 (因为在 *cyp17a1* 缺失纯合子斑马鱼中再敲除 *fshβ* 可以挽救精巢发育和精子发生) [2]。6 月龄 *cyp17a1*^{-/-} 鲤精巢增生也可能归因于垂体 *fshβ* 潜在的上调, 因为与 *cyp17a1*^{+/+} 鱼的表达相比, *fshβ* 的靶基因 *igf3* 和 *insl3* 在 *cyp17a1* 缺失纯合子的精巢中显著上调 (见附录 A 中的图 S3)。

近年来, 一些物种的基因敲除被证实可以导致由雌到雄的性转变, 如 *cyp19a1a* 和 *cyp17a1* 敲除斑马鱼和罗非鱼, 表明雌激素对于调节性腺分化是不可或缺的[2-3]。即便如此, 哺乳动物中由 *cyp17a1* 突变引起的表型与鱼类中的表型高度分化。例如, 在人类和小鼠中, *cyp17a1* 突变引起性发育障碍和性成熟延迟[46-49]。在 XX/XY 遗传性别决定型系统的鱼类模型青鳉中, 携带 *cyp17a1* 突变的 *scl* 突变鱼也表现出雄性典型的第二性征和交配行为的缺失, 但精子发育未受损, XX 和 XY 遗传性别决定型个体均表现出含有精子的性腺[24]。通过将 *cyp17a1* 缺失纯合子斑马鱼 (没有遗传性别决定系统的实验品系[27]) 与 *cyp17a1* 缺失突变体青鳉和鲤进行比较, 发现这三种 *cyp17a1* 缺失的硬骨鱼在雄性第二性征、精子发生和精巢发育方面的表型非常相似。这些结果表明, 无论是否存在遗传性别决定系统, 在硬骨鱼和哺乳动物之间, 性类固醇激素在性腺发育中的作用都是分化的。此外, 本研究同样证实鲤的 XX/XY 遗传性别决定系统是依赖于性类固醇激素的 (表 2 和图 4)。这些发现驱动我们去建立一种水产养殖鱼类的新型性别控制策略。通过这种遗传方法产生的全雌鲤群体包含一个经过编辑的 *cyp17a1* 位点。我们同样建立了一种简易的可获得高比例伪雄鲤的优化方法 (见附录 A 中的第 S13 节和图 S4)。未来, 我们将参照前人研究 [50], 尝试通过将二倍体 *cyp17a1*^{-/-} 伪雄鲤与四倍体雌鲤杂交, 创制三倍体全雌不育系, 以降低由于自然繁殖而产生的生态风险。这可防止经过人工编辑的 *cyp17a1* 突变位点在自然界发生遗传漂移。

5. 结论

针对 *cyp17a1* 开展基因编辑可有效地使 *cyp17a1*^{-/-} XX 个体具有正常的精巢分化和精子发生。虽然此伪雄鲤表现出雄性第二性征缺失, 但可以便捷地从中获得大量有活力的精子, 并可以成功地使野生型雌鲤的卵子受精。此外, 结合我们鉴定的雄性特异分子标记, 可容易地将成熟的伪雄鲤从 *cyp17a1* 缺失纯合子的全雄性个体中筛选出来, 作为创制全雌群体的父本。因此, 能够通过水产养殖中常规

的方法——体外人工受精——进行 *cyp17a1*^{-/-} XX 全雌群体的创制。采用本遗传方法可生产缺少一些核苷酸和一个功能缺失基因的伪雄鲤。这种新式遗传技术提供了一种基于鲤两性生长异形的特点, 产生大量、稳定的全雌鲤群体的方法, 这对水产养殖业具有重大意义。本方法同样避免了由传统性类固醇激素及其相关物质诱导的性转变方法所释放的内分泌残留物引起的内分泌干扰效应。为防止此全雌鲤群体携带的 *cyp17a1* 突变位点在自然界发生遗传漂移, 后续针对全雌鲤的育性控制技术的研究和发展仍需探索。

致谢

本研究由国家重点研发计划(2018YFD0900205)、国家自然科学基金项目(31972779、31530077)、中国科学院先导 A 项目(XDA24010206)、中国科学院青年创新促进会(20200336)、淡水生态与生物技术国家重点实验室(2016FBZ05)资助。感谢肖媛和邢振飞(中国科学院水生生物研究所分析测试中心)提供的扫描电子显微镜服务。

Compliance with ethics guidelines

Gang Zhai, Tingting Shu, Kuangxin Chen, Qiyong Lou, Jingyi Jia, Jianfei Huang, Chuang Shi, Xia Jin, Jiangyan He, Donghuo Jiang, Xueqiao Qian, Wei Hu, and Zhan Yin declare that they have no conflicts of interest or financial conflicts to disclose.

Authors' contributions

Gang Zhai and Tingting Shu conducted most of the experiments for this work. Gang Zhai prepared all the figures and wrote the draft. Qiyong Lou, Jingyi Jia, Jianfei Huang, Chuang Shi, Xia Jin, and Jiangyan He provided help in genotyping, fish breeding, and rearing. Kuangxin Chen and Wei Hu provided help in the identification of male-specific markers. Donghuo Jiang, Xueqiao Qian, and Zhan Yin provided insights for this work, and initiated and supervised the research team. Zhan Yin and Gang Zhai administrated the project and revised the paper. All authors approved the final manuscript and agreed to be accountable for all aspects of this work.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.eng.2021.03.026>.

References

- [1] Sun Y, Zhu Z. Designing future farmed fishes using genome editing. *Sci China Life Sci* 2019;62(3):420–2.
- [2] Zhai G, Shu T, Xia Y, Lu Y, Shang G, Jin X, et al. Characterization of sexual trait development in *cyp17a1*-deficient zebrafish. *Endocrinology* 2018;159(10):3549–62.
- [3] Tang H, Chen Y, Liu Y, Yin Y, Li G, Guo Y, et al. New insights into the role of estrogens in male fertility based on findings in aromatase-deficient zebrafish. *Endocrinology* 2017;158(9):3042–54.
- [4] Fenske M, Segner H. Aromatase modulation alters gonadal differentiation in developing zebrafish (*Danio rerio*). *Aquat Toxicol* 2004;67(2):105–26.
- [5] Jiang M, Wu X, Chen K, Luo H, Yu W, Jia S, et al. Production of YY supermale and XY physiological female common carp for potential eradication of this invasive species. *J World Aquacult Soc* 2018;49(2):315–27.
- [6] Singh AK. Introduction of modern endocrine techniques for the production of monosex population of fishes. *Gen Comp Endocrinol* 2013;181:146–55.
- [7] Hoga CA, Almeida FL, Reyes FGR. A review on the use of hormones in fish farming: analytical methods to determine their residues. *CYTA J Food* 2018;16(1):679–91.
- [8] Brown EE, Baumann H, Conover DO. Temperature and photoperiod effects on sex determination in a fish. *J Exp Mar Biol Ecol* 2014;461:39–43.
- [9] Devlin RH, Nagahama Y. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture* 2002;208(3–4):191–364.
- [10] Kocour M, Linhart O, Gela D, Rodina M. Growth performance of all-female and mixed-sex common carp *Cyprinus carpio* L. Populations in the central Europe climatic conditions. *J World Aquacult Soc* 2005;36(1):103–13.
- [11] Wu CJ, Gui JF. Fish genetics and breeding engineering. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers; 1999. Chinese.
- [12] Wu C, Chen R, Ye Y, Ke H. Investigation on the carp gynogenesis with reference to establishing a pure line. *Acta Genet Sin* 1981;8(1):50–5.
- [13] Matsuda M, Nagahama Y, Shinomiya A, Sato T, Matsuda C, Kobayashi T, et al. DMY is a Y-specific DM-domain gene required for male development in the medaka fish. *Nature* 2002;417(6888):559–63.
- [14] Myosho T, Otake H, Masuyama H, Matsuda M, Kuroki Y, Fujiyama A, et al. Tracing the emergence of a novel sex-determining gene in medaka, *Oryzias latipes*. *Genetics* 2012;191(1):163–70.
- [15] Takehana Y, Matsuda M, Myosho T, Suster ML, Kawakami K, Shin-I T, et al. Cooption of *Sox3* as the male-determining factor on the Y chromosome in the fish *Oryzias latipes*. *Nat Commun* 2014;5:4157.
- [16] Li M, Sun Y, Zhao J, Shi H, Zeng S, Ye K, et al. A tandem duplicate of anti-Müllerian hormone with a missense SNP on the Y chromosome is essential for male sex determination in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Plos Genet* 2015;11(11):e1005678.
- [17] Hattori RS, Murai Y, Oura M, Masuda S, Majhi SK, Sakamoto T, et al. A Y-linked anti-Müllerian hormone duplication takes over a critical role in sex determination. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012;109(8):2955–9.
- [18] Kamiya T, Kai W, Tasumi S, Oka A, Matsunaga T, Mizuno N, et al. A transspecies missense SNP in *Amhr2* is associated with sex determination in the tiger pufferfish, *Takifugu rubripes* (fugu). *PLoS Genet* 2012;8(7):e1002798.
- [19] Reichwald K, Petzold A, Koch P, Downie B, Hartmann N, Pietsch S, et al. Insights into sex chromosome evolution and aging from the genome of a short-lived fish. *Cell* 2015;163(6):1527–38.
- [20] Chen S, Zhang G, Shao C, Huang Q, Liu G, Zhang P, et al. Whole-genome sequence of a flatfish provides insights into ZW sex chromosome evolution and adaptation to a benthic lifestyle. *Nat Genet* 2014;46(3):253–60.
- [21] Nanda I, Kondo M, Hornung U, Asakawa S, Winkler C, Shimizu A, et al. A duplicated copy of *DMRT1* in the sex-determining region of the Y chromosome of the medaka, *Oryzias latipes*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99(18):11778–83.
- [22] Yano A, Guyomard R, Nicol B, Jouanno E, Quillet E, Klopp C, et al. An immune-related gene evolved into the master sex-determining gene in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Curr Biol* 2012;22(15):1423–8.
- [23] Matsuda M. Sex determination in the teleost medaka, *Oryzias latipes*. *Annu Rev Genet* 2005;39(1):293–307.
- [24] Sato T, Suzuki A, Shibata N, Sakaizumi M, Hamaguchi S. The novel mutant *scf* of the medaka fish, *Oryzias latipes*, shows no secondary sex characters. *Zool Sci* 2008;25(3):299–306.
- [25] Zhai G, Shu T, Xia Y, Jin X, He J, Yin Z. Androgen signaling regulates the transcription of anti-Müllerian hormone via synergy with SRY-related protein SOX9A. *Sci Bull* 2017;62(3):197–203.
- [26] Shu T, Zhai G, Pradhan A, Olsson PE, Yin Z. Zebrafish *cyp17a1* knockout reveals that androgen-mediated signaling is important for male brain sex differentiation. *Gen Comp Endocr* 2020;295:113490.
- [27] Wilson CA, High SK, McCluskey BM, Amores A, Yan YL, Titus TA, et al. Wild sex in zebrafish: loss of the natural sex determinant in domesticated strains. *Genetics* 2014;198(3):1291–308.
- [28] Han C, Zhu Q, Lu H, Wang C, Zhou X, Peng C, et al. Screening and characterization of sex-specific markers developed by a simple NGS method in mandarin fish (*Siniperca chuatsi*). *Aquaculture* 2020;527:735495.
- [29] Lau ESW, Zhang Z, Qin M, Ge W. Knockout of zebrafish ovarian aromatase gene (*cyp19a1a*) by TALEN and CRISPR/Cas9 leads to all-male offspring due to failed ovarian differentiation. *Sci Rep* 2016;6:37357.
- [30] McMillan SC, Géraudie J, Akimenko MA. Pectoral fin breeding tubercle clusters: a method to determine zebrafish sex. *Zebrafish* 2015;12(1):121–3.
- [31] Chen J, Wang Y, Yue Y, Xia X, Du Q, Chang Z. A novel male-specific DNA sequence in the common carp, *Cyprinus carpio*. *Mol Cell Probes* 2009;23(5):235–9.
- [32] Chen J, Du Q, Yue Y, Dang B, Chang Z. Screening and identification of male-specific DNA fragments in common carps *Cyprinus carpio* using suppression subtractive hybridization. *J Fish Biol* 2010;77(2):403–13.
- [33] Xiao J, Zou T, Chen L, Liu S, Xiao J, Zhang H, et al. Microsatellite analysis of different ploidy offspring of artificial gynogenesis in *Cyprinus carpio*. *J Fish Biol* 2011;78(1):150–65.
- [34] Jiang M, Jia S, Chen J, Chen K, Ma W, Wu X, et al. Timing of gonadal development and dimorphic expression of sex-related genes in gonads during early sex differentiation in the Yellow River carp. *Aquaculture* 2020;518:734825.
- [35] Xu D, Yang F, Chen R, Lou B, Zhan W, Hayashida T, et al. Production of neomales from gynogenetic yellow drum through 17 α -methyltestosterone immersion and subsequent application for the establishment of all-female populations. *Aquaculture* 2018;489:154–61.
- [36] Babiak J, Babiak I, van Nes S, Harboe T, Haugen T, Norberg B. Induced sex reversal using an aromatase inhibitor, fadrozole, in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *Aquaculture* 2012;324–325:276–80.
- [37] Liu S, Xu P, Liu X, Guo D, Chen X, Bi S, et al. Production of neomale mandarin fish *Siniperca chuatsi* by masculinization with orally administered 17 α -methyltestosterone. *Aquaculture* 2021;530:735904.
- [38] Haffray P, Petit V, Guiguen Y, Quillet E, Rault P, Fostier A. Successful production of monosex female brook trout *Salvelinus fontinalis* using gynogenetic sex reversed males by a combination of methyltestosterone immersion and oral treatments. *Aquaculture* 2009;290(1–2):47–52.
- [39] Shen ZG, Fan QX, Yang YL, Wang YL, Wang HP. Effects of 17 α -methyltestosterone and aromatase inhibitor letrozole on sex reversal, gonadal structure, and growth in yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco*. *Biol Bull* 2015;228(2):108–17.
- [40] Luckenbach JA, Fairgrieve WT, Hayman ES. Establishment of monosex female production of sablefish (*Anoplopoma fimbria*) through direct and indirect sex control. *Aquaculture* 2017;479:285–96.
- [41] Crowder CM, Lassiter CS, Gorelick DA. Nuclear androgen receptor regulates testes organization and oocyte maturation in zebrafish. *Endocrinology* 2018;159(2):980–93.
- [42] Tang H, Chen Y, Wang L, Yin Y, Li G, Guo Y, et al. Fertility impairment with defective spermatogenesis and steroidogenesis in male zebrafish lacking androgen receptor. *Biol Reprod* 2018;98(2):227–38.
- [43] Yu G, Zhang D, Liu W, Wang J, Liu X, Zhou C, et al. Zebrafish androgen receptor is required for spermatogenesis and maintenance of ovarian function. *Oncotarget* 2018;9(36):24320–34.
- [44] Li N, Oakes JA, Storbeck KH, Cunliffe VT, Krone NP. The P450 side-chain cleavage enzyme *Cyp11a2* facilitates steroidogenesis in zebrafish. *J Endocrinol* 2020;244(2):309–21.
- [45] Oakes JA, Barnard L, Storbeck KH, Cunliffe VT, Krone NP. 11 β -hydroxylase loss disrupts steroidogenesis and reproductive function in zebrafish. *J Endocrinol* 2020;247(2):197–212.

- [46] Liu Y, Yao ZX, Bendavid C, Borgmeyer C, Han Z, Cavalli LR, et al. Haploinsufficiency of cytochrome P450 17 α -hydroxylase/17,20 lyase (CYP17) causes infertility in male mice. *Mol Endocrinol* 2005;19(9):2380–9.
- [47] New MI. Inborn errors of adrenal steroidogenesis. *Mol Cell Endocrinol* 2003; 211(1–2):75–83.
- [48] Yanase T. 17 α -hydroxylase/17, 20-lyase defects. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1995;53(1–6):153–7.
- [49] Kater CE, Biglieri EG. Disorders of steroid 17 α -hydroxylase deficiency. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1994;23(2):341–57.
- [50] Yu F, Xiao J, Liang X, Liu S, Zhou G, Luo K, et al. Rapid growth and sterility of the growth hormone gene transgenic triploid carps. *Sci Bull* 2011;56(16): 1679–84.