



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Engineering

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



Research
Genetic Engineering—Article

利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术培育携带扬子鳄抗菌肽基因的生态友好型和抗病力强的斑点叉尾鮰

汪金海, 苏宝锋*, 邢德, Timothy J. Bruce, 李尚佳, Logan Bern, 尚梅, Andrew Johnson, Rhoda Mae C. Simora, Michael Coogan, Darshika U. Hettiarachchi, 王文文, Tasnuba Hasin, Jacob Al-Armanazi, 卢翠玉, Rex A. Dunham

School of Fisheries, Aquaculture, and Aquatic Sciences, Auburn University, Auburn, AL 36849, USA

ARTICLE INFO

Article history:

Received 28 November 2022
Revised 28 September 2023
Accepted 8 December 2023
Available online 1 February 2024

关键词

基因编辑
单链寡核苷酸
双链 DNA
抗菌肽
生殖障碍
水产养殖

摘要

作为一种极为精确且功能较多的基因组操作工具,成簇的规律间隔短回文重复序列(CRISPR)及其相关蛋白9(Cas9)有望被用于鱼类性状的改变。为了减少转基因渗入的风险并有效地控制其繁殖,研究人员对斑点叉尾鮰的抗病能力和生殖调控进行了研究,以降低转基因动物逃逸对生态环境带来的潜在风险。利用 CRISPR/Cas9 介导系统,通过双链 DNA(dsDNA)和单链寡脱氧核苷酸(ssODN)辅助的两个递送系统,我们成功地将扬子鳄(*Alligator sinensis*)的 cathelicidin 基因(*As-Cath*)整合到斑点叉尾鮰(*Ictalurus punctatus*)的黄体生成素(*lh*)基因座中。本研究使用 ssODN 策略,实现了较高的基因敲入(KI)效率(22.38%, 64/286)并显著地降低了脱靶事件的发生率。同时,采用 dsDNA 作为供体模板,实现了理想的靶点敲入(10.80%, 23/213)。As-Cath 的靶向敲入在建立 lh 敲除(LH⁻As-Cath⁺)斑点叉尾鮰品系中发挥了重要作用。与野生型(WT)同胞鱼相比,该品系表现出更强的抗病能力和显著降低的繁殖能力。此外,通过施用人绒毛膜促性腺激素(HCG)联合促黄体生成激素释放激素类似物(LHRHa)可以有效恢复该转基因鱼系的繁殖能力。综上,我们用 cathelicidin 转基因替换了 lh 基因,然后进行激素治疗,实现了对抗病转基因斑点叉尾鮰的繁殖能力的可调节,在环境安全性方面具有明显优势。该策略不仅有效地提升了产品在消费端的市场价值,而且有效阻断了转基因渗入自然环境,在水产养殖遗传改良领域提供了一种具有实用前景的繁育控制新路径。

© 2024 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

随着科学的进步和发展,生物技术的创新让粮食的产量和质量不断提高,也让动物和人类的生存福利得到改善。成簇的规律间隔短回文重复序列(CRISPR)及其相关蛋白9(Cas9)作为基因组工程的原型,为转基因和育

种提供了新的可能性。当它诱导双链断裂时,会触发两种 DNA 修复机制——非同源末端连接(NHEJ)和同源定向修复(HDR)——来发挥作用[1]。这两种机制目前均被应用于水产养殖,在改善遗传育种的过程中用来改良对消费者有利的性状。NHEJ用于敲除(KO)或破坏功能基因,而HDR则用于精确敲入(KI)相关的外源基因,从

* Corresponding author.

E-mail address: bzs0014@auburn.edu (B. Su).

而改善目标性状。

近年来,出现了各种CRISPR/Cas9系统,以通过HDR途径来提高KI的靶向编辑效率。在模式动物中,人们已经观察到使用单链寡脱氧核苷酸(ssODN)作为修复模板的成功案例,它可以插入小的DNA片段[2-4]。Yoshimi等[5]通过将两个80 bp的ssODN与CRISPR/Cas9系统联合使用,成功扩展了ssODN介导策略在更大范围序列基因敲入中的应用,在大鼠受精卵中实现了约10%的整合率[5]。之后,利用CRISPR/Cas9-ssODNs介导的KI系统,在绵羊受精卵上实现了10.96%的KI率[6]。然而,当ssODN被用作斑马鱼(*Danio rerio*)的修复模板时,发生修复错误的概率就变得更高[7]。另外,修饰的供体质粒具有同源臂(HAs),两侧是两个单导向(sgRNA)靶向序列,可提供高位点特异性KI率[8-9],这种HA介导的KI已被证实适用于斑马鱼和青鳉鱼(*Oryzias latipes*) [9-10]。从理论上讲,直接提供由靶向位点的5'-和3'-端衍生的两个HAs组成的线性双链DNA(dsDNA),而忽略环状DNA和dsDNA供体之间稳定性的差异,将提高基因敲入效率。除了供体类型以外,使用适当浓度的CRISPR/Cas9系统组件,可以减少脱靶事件和降低胚胎死亡率,从而对KI产生重要且积极的影响。在这方面,递送系统和成分剂量的正确选择有望在非模式鱼类中实现高效的基因整合。

转基因和CRISPR/Cas9介导的基因组编辑技术改变了水产养殖的育种方式,产生了转基因AquAdvantage鲑鱼[11-12]、基因编辑虎河豚和东海鲷[13]等商业产品。虽然NHEJ主要用于控制那些消费者所关注的性状(如生长、着色和繁殖等),但基于HDR的KI可有效提高omega-3脂肪酸含量和抗病性[14-16]。然而,通过HDR途径整合外源基因引发了人们对低KI效率和基因渗入的担忧,后者直接影响到消费者对转基因鱼的接受和认可度[17]。为解决这一问题,研究人员通过NHEJ介导的基因破坏方式让转基因鱼类失去繁殖能力,以此来减少其对环境的影响[17-19]。例如,黄体生成素(LH或*lh*)基因通过结合受体来调节配子的产生,包括精子发生与卵母细胞的成熟及排放[20-21]。缺乏*lh*基因的雌性斑马鱼是不能繁育的,而突变的雄性斑马鱼则具有生育能力,这表明*lh*基因能促进卵母细胞成熟并触发排卵[22]。此外,斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)的*lh*基因的功能缺失可导致雄性与雌性个体均表现为不育[23]。

暴发大规模疾病的风险无法完全避免,因此需要进一步对疾病控制的方法进行改良。抗菌肽(AMP)是一类可以替代抗生素的多肽,在多类物种抵御微生物入侵的第

一道防线中发挥作用,能够有效减少抗生素的残留[24-25]。几十年来,包括天蚕素、铁调素、毒鱼豆素、肾上腺素-1、溶菌酶和乳铁蛋白在内的抗菌肽基因(AMG)及编码基因都分别被作为转基因和饲料补充剂使用,以此来提高各种水生动物的抗病性[14,26]。Cathelicidins是一个特别重要的AMP家族,它们具有共同的cathelin样结构域[27],表现出广谱抗菌和免疫调节活性[28]。近期研究表明,扬子鳄的cathelicidin基因在体内和体外均能抑制鱼类病原体的入侵[29-31]。因此,将AMG整合到基因组的DNA中,在建立新型抗病鱼类品系中具有广阔的应用前景。

具有AMGs的转基因鱼为有效解决疾病问题提供了更多有价值的选择。然而,需要注意的是,我们还要防止野生种群出现繁殖逃逸。假设像*lh*这样负责配子发生和妊娠的生殖基因可以在DNA水平上被敲除,并用cathelicidin基因进行替代,从而繁育出具有高度抗病性的“不育鱼”。而这些基因编辑不育鱼可以通过帮助人工鱼产卵的激素疗法暂时恢复生育能力,从而繁育出与环境兼容的抗病鱼系。本项研究使用了两种CRISPR/Cas9递送系统(HA和ssODN介导的KI)将扬子鳄的*As-Cath*基因插入到斑点叉尾鲷的*lh*基因座,用于开发可逆转的不育品系和抗病品系。我们比较了不同系统的KI效率、孵化率和鱼苗存活率,通过激素治疗恢复了*As-Cath*整合的初代不育鱼种P₁的生育能力。此外,还对新鱼种P₁及其子代F₁个体的细菌耐药性进行了进一步评估。

2. 材料与方法

2.1. 伦理审批

实验中关于动物的护理和使用遵循了专家培训课程适用指南。实验方案已获得奥本大学动物护理和使用委员会(AU-IACUC; 方案审查编号: 2021-4003)的批准。所有鱼类研究均按照国际实验动物评估和认可委员会(AAALAC)制定的程序和标准进行。

2.2. 基因插入的靶位点

我们选择了*lh*基因作为整合靶位点,该基因普遍存在于卵巢卵泡膜细胞中,在性腺发育过程中辅助卵母细胞成熟和排卵[22]。基于斑点叉尾鲷的基因组[32],sgRNA的目标位点位于外显子2的中间(图1)。插入的基因片段来源于扬子鳄cathelicidin基因的编码序列(CDS)(*As-Cath*, GeneBank号为XM_006037211.3) [29]。

2.3. 供体DNA、sgRNA以及CRISPR/Cas9系统的设计

将dsDNA或ssODN用作供体模板，可以通过HDR对基因靶向KI进行工程设计。在当前的研究中，我们采用两个CRISPR/Cas9介导系统在*lh*基因座上对*As-Cath*片段实施靶向KI。对于第一个系统，将*As-Cath*基因的CDS克隆到pUC57_mini载体的*EcoRV*酶消化位点中，以创建ssODN1_ *As-Cath* ssODN2构建体作为质粒供体。两种sgRNA (sgRNA1和sgRNA2)作为“剪刀”，分别用于切割*lh*基因和使质粒供体线性化。两个短的ssODN用于连接两个切割位点的末端，标记为双命中双寡核苷酸(2H2OP)系统[图1(a)]。ssODN1长度为80 bp，其中上游40 bp来源于*lh*基因外显子2的一部分，其余40 bp与pUC57_mini主链同源。ssODN2的上游40 bp来自于pUC57_mini主链，而下游的40 bp来自于*lh*基因外显子2的一部分。通过构建*As-Cath* CDS序列产生双链DNA供体，该序列的两侧有两个长300 bp的同源臂(HA)，这些HA源自斑点叉尾鲷的*lh*基因，位于插入DNA的两侧；我们将第二个构建体标记为HA1_ *As-Cath* _HA2。具体来说，HA1(左同源臂)的163 bp来自于外显子2的上游，136 bp与内含子1相同，1 bp源自外显子1。HA2(右同源臂)包含了来自外显子2下游的21个bp、来自内含子2的85个bp和来自外显子3上游的194个bp(附录A)。此时，我们使用了一个sgRNA (sgRNA1)来切割斑点叉尾鲷基因组DNA中的*lh*位点，并提供了一个线性dsDNA作为供体模板，该系统被标记为dsDNA[图1(b)]。在这两种构建体中，*As-Cath*基因的表达都是由斑马鱼泛素(UBI)启动子驱动的[33]。线性dsDNA、环状质粒和ssODN则是由Genewiz (Azenta Life Sciences, USA)合成。

通过CRISPR在线设计工具(CRISPR Guide RNA Design Tool, Benchling[†])，筛选出靶向斑点叉尾鲷的*lh*基因和供体质粒的sgRNA。通过基本局部比对搜索工具将候选sgRNA序列与斑点叉尾鲷的全基因组进行比较，以避免脱靶位点的切割。使用在线工具Cas OFFinder[‡]排除了潜在脱靶位点[34]，最终得到*lh*位点的sgRNA1和供体质粒的sgRNA2。根据说明书，使用Maxiscript T7试剂盒(Thermo Fisher Scientific, USA)体外获得sgRNA，并用RNA Clean and Concentrator试剂盒(Zymo Research)纯化sgRNA。同时，分别用Nanodrop 2000分光光度计(Thermo Fisher Scientific, USA)和2%琼脂糖凝胶[1×三硼酸EDTA(TBE)缓冲液]检测sgRNA的浓度和质量。将合成的sgRNA稀释至约300 ng·μL⁻¹的浓度，分装于聚

合酶链反应(PCR)管中(每管2 μL)，于-80 °C条件下保存备用。Cas9蛋白粉购于PNA BIO股份有限公司(美国)，用DNase/RNase-free水稀释至50 ng·μL⁻¹的浓度，于-20 °C条件下保存备用。本研究使用的sgRNA和通用引物列于附录A中表S1。每个KI体系均设置两种不同剂量的供体DNA模板和两个对照组，分别为50 ng·μL⁻¹、100 ng·μL⁻¹、假注射对照组(iCT，只注射10%酚红溶液)和非注射对照组(nCT，不注射)。

2.4. 转基因鱼的繁育和饲养

根据Elaswad等[35]提供的指南，斑点叉尾鲷的雌性和雄性都可以进行人工繁殖。略微不同的是我们选择了体重超过1.5 kg的个体进行产卵。雌性用150~200 ppm(1 ppm = 1 mg·L⁻¹)甲磺酸三卡因(MS222; Hardover, USA)进行麻醉，植入75 μg·kg⁻¹的促黄体生成激素释放激素类似物(LHRHa)以诱导其排卵。然后在直径为20 cm、涂有油脂的产卵盘中轻轻挤取卵子。用300 ppm MS222对成年雄性鱼实施安乐死后收集其精巢，并进行冲洗、称重后压碎；精子用0.9%生理盐水(g:v = 1:10)配制。将2 mL精子溶液加入到约300个鱼卵中并轻轻混合。混合1 min后，在卵中加入足够的池水以激活精子，然后将精子与卵的混合物轻轻旋转30 s。随后继续加入池水，将受精卵保持在盘中保持单层分布，胚胎硬化15 min后进行显微注射。

用于KI显微注射的CRISPR/Cas9系统由Cas9蛋白、sgRNA和供体模板以2:1:1的比例进行组合，并加入酚红成分被用作为指示剂。对于ssODN1_ *As-Cath* _ssODN2构建体(2H2OP系统)，将8 μL Cas9蛋白(50 ng·μL⁻¹)、2 μL sgRNA1/sgRNA2(300 ng·μL⁻¹)、2 μL供体质粒(50 ng·μL⁻¹和100 ng·μL⁻¹)、2 μL ssODN1/ssODN2(50 ng·μL⁻¹和100 ng·μL⁻¹)和2 μL酚红溶液混合进行显微注射。对于HA1_ *As-Cath* _HA2构建体(dsDNA体系)，将4 μL Cas9蛋白(50 ng·μL⁻¹)、2 μL sgRNA1(300 ng·μL⁻¹)、2 μL供体dsDNA(50 ng·μL⁻¹和100 ng·μL⁻¹)、2 μL酚红和10 μL无酶水进行混合，总体积为20 μL。对于每种CRISPR/Cas9系统的混合溶液，首先将Cas9蛋白和sgRNA混合，并在冰上孵育10 min，然后加入供体模板。对于iCT组，我们仅仅只注射用0.9%生理盐水稀释的酚红溶液。如前所述[36]，将每种处理后的混合溶液分别显微注射到单细胞期胚胎中。将每6 μL的混合物注入外径为1.0 mm的硼硅玻璃毛细管中，用垂

[†] <https://zlab.bio/guide-design-resources>.

[‡] <http://www.rgenome.net/cas-offinder/>.

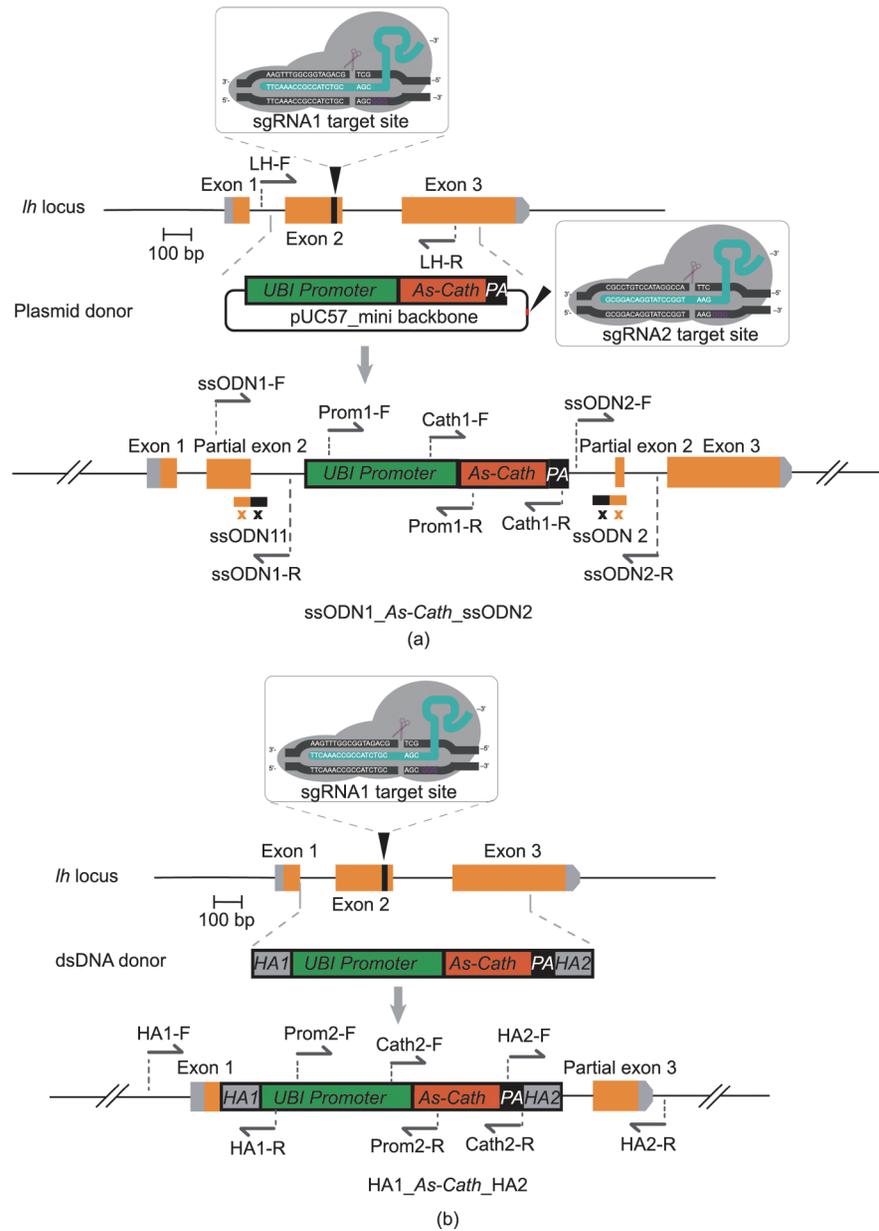


图1. 基于KI斑点叉尾鲷 *lh* 基因座上的扬子鳄抗菌肽 (*As-Cath*) 进行转基因的两个CRISPR/Cas9的介导系统。(a) *As-Cath* KI通过2H2OP系统插入物特异性区域的示意图, 由 *lh* 位点的ssODNs辅助, 记为ssODN1_*As-Cath*_ssODN2构建体。用黄色条带表示 *lh* 基因外显子的结构, 黑色三角形表示sgRNAs靶向位点, 矩形框表示靶序列。原间隔区相邻基序 (PAM) 用绿色进行标注。图示了引物组, 呈现了使用PCR扩增测试 *As-Cath* 转基因的 *lh* 突变、ssODN1/ssODN2连接、UBI启动子区和插入特异性区的策略。(b) *As-Cath* KI通过dsDNA系统的示意图, 表示为HA1_*As-Cath*_HA2供体。引物显示了测试HA连接、UBI启动子区和 *As-Cath* 转基因区的策略。HA: 同源臂; UBI: 泛素; PA: 聚(A)尾。

直拉针器 (David Kopf Instruments, USA) 将其注射到 600 个胚胎中。本实验共注射 1000 个胚胎, 将它们分成五个随机重复的处理组; 每个对照组还设有 200 个胚胎, 包含三个重复。所有胚胎均来自同一对亲本, 并于其受精 90 min 后终止显微注射。

所有注射胚胎和对照胚胎在显微注射后立即转移到用于胚胎孵化的 10 L 容器中, 其中每个容器装有 7 L 的 Holtfreter 溶液 (59 mmol NaCl、2.4 mmol NaHCO₃、1.67 mmol MgSO₄、0.76 mmol CaCl₂ 和 0.67 mmol KCl)

[37] 和 10~12 ppm 多西环素的。将所有孵化容器均置于同一流水孵化槽内, 在孵化槽上游放置加热器, 确保水温保持在 26~28 °C; 通过连续供氧将溶解氧水平维持在大于 5 ppm。每天要更换 2 次 Holtfreter 溶液, 孵化期间每天收集并记录死亡胚胎/鱼苗的情况, 并对其进行分析。将孵化出的鱼苗转移到不含多西环素的 Holtfreter 溶液中, 每天用活的丰年虫投喂 4 次。在孵化容器中培养 1 周后, 将所有鱼苗分别放入一个 60 L 的水族箱中 (每箱 120 条), 在循环系统水中生长。随着鱼体生长, 要根据鱼嘴的大小

调整饲料颗粒的大小。具体做法是每天用 Purina AquaMax 粉状饲料（50%粗蛋白、17%粗脂肪、3%粗纤维和12%灰分）饲喂鱼缸中的鱼苗4次，持续喂食2个月。然后，再用 Aquaxcel WW Fish Starter 4512（45%粗蛋白、12%粗脂肪、3%粗纤维和1%磷）投喂，每天2次，持续喂养2个月。幼鱼每天饲喂一次 WW 4010 过渡饲料（40%粗蛋白、10%粗脂肪、4%粗纤维和1%磷）[15]。所有鱼均饱食投喂。

2.5. 基因整合分析和突变检测

经过4个月的培养，将所有幼鱼（20~40 g）进行标记（Biomark, USA），以区分每个个体。然后将经过不同方式处理的鱼混合，随机分散到两个密度相同（每缸120条鱼）的圆形水箱中（水箱容积为1200 L，装有800 L水），对鱼每月生长的情况比较。同时，从被麻醉的鱼的身上取下腹鳍和触须进行DNA提取和基因型鉴定。在该阶段，每日给所有鱼投喂1次 WW 4010 过渡饲料，以确保其处于饱腹的状态。对于这两个构建体，分别采用不同的基因分型策略。其中 ssODN1_*As-Cath*_ssODN2 构建体，使用引物 Cath1-F/R（正向和反向）来扩增 *As-Cath* 的 CDS 区域，以确保基因能够插入，通过引物 Prom1-F/R 扩增启动子区域。在连接部分，则使用引物 ssODN1-F/R 和 ssODN2-F/R 扩增 ssODN1 和 ssODN2 区域以确定其是否为靶向插入。对于 HA1_*As-Cath*_HA2 构建体，分别使用引物 Cath2-F/R 和 Prom2-F/R 检测 *As-Cath* 和启动子区域。其次，通过引物 HA1-F/R 和 HA2-F/R 扩增左侧 HA 和右侧 HA 连接。可通过在线软件 Primer3Plus[†] 进行查询，详细结果见附录 A 中表 S2。此外，PCR 反应在 10 μ L 体系中进行，PCR 产物通过 1.0% 琼脂糖凝胶电泳（1 \times 三乙酸-EDTA（TAE）缓冲液）进行观察。每个区域对应长度的亮带表示靶阳性（LH⁻_As-Cath⁺）。同时，假使我们可以确定一些个体已经插入了 *As-Cath* 转基因，但无法检测到连接区域（HA-或 ssODN-区域），则可将其鉴定为潜在的脱靶阳性（LH⁺_As-Cath⁺）。

我们选择了 60 个 LH⁺_As-Cath⁺ 鱼类个体进行 *lh* 突变测试。在本文中，根据 Elawad 等[35]使用 Expand High Fidelity^{PLUS} PCR 系统（Roche Diagnostics, USA）在 20 μ L 体积系统中进行的 PCR 实验，两种构建体均使用了 LH-F/R 引物。根据相关说明[38]，通过 surveyor 突变检测试剂盒（IDT, USA）进行了 surveyor 突变检测分析，以 nCT 组的基因组 DNA 作为阴性对照。用 1 \times TBE 缓冲液在 2% 琼脂糖凝胶中电泳 1 h，并与野生型（WT）样品进行比较。

2.6. DNA 测序

对于整合的 *As-Cath*、启动子和连接序列，在 50 μ L 体积体系中对阳性样品进行 PCR 扩增。然后根据制造商的说明，使用 QIAquick PCR 产物纯化试剂盒（QIAGEN, Germany）纯化 PCR 产物。测序前，所有纯化的 DNA 样品均使用 Nanodrop 进行定量和鉴定，并使用 1.0% 琼脂糖凝胶进行电泳。利用引物 Cath1-F/Cath2-F 和 Prom1-F/Prom-2F 分别对 HA1_*As-Cath*_HA2 和 ssODN1_*As-Cath*_ssODN2 构建体的 *As-Cath* 和启动子区域进行测序；分别用引物 HA1-F/HA2-F 和 ssODN1-F/ssODN2-F 对这两个构建体的连接区域进行测序。

对于 *lh* 突变，我们使用 TOPO TA 克隆试剂盒（Invitrogen, USA）对假定突变个体的 PCR 产物进行了克隆，并按照使用说明稍作修改。简而言之，我们使用引物 LH-F/R 对先前通过 surveyor 测定鉴定出的每个突变个体进行 PCR 扩增，为下一个克隆步骤做准备。此外，使用相同的引物和程序对 nCT 组的三个 WT 提取 DNA，将其混合成一个样品并克隆，作为 WT 对照用于测序。如前所述[35]，克隆后，我们将含有 PCR 产物的 pCRTM4-TOPO 载体转化至 One Shot TOP10 ElectrocompTM 大肠杆菌（*E. coli*）（Invitrogen, USA）中。然后随机选取 15 个单菌落进行菌落 PCR，利用 LH-F 引物对 *lh* 突变体样本进行测序。

2.7. 嵌合性和转基因表达的测定

随机选取 5 条 12 个月龄的靶阳性鱼和 5 条假注射对照鱼并进行安乐死处理。取皮肤、肝脏、肾脏、脾脏、血液、肠道、鳃、胃、鳍、须、肌肉、眼睛、大脑、性腺等 14 个组织，置于 1.5 mL 的试管中，并立即转移到液氮中用于后续的 DNA 和 RNA 提取。采用 PCR 和实时定量 PCR（qRT-PCR）检测 *As-Cath* 基因的潜在嵌合性和 mRNA 水平。使用 TRIzol 试剂（Thermo Fisher Scientific, USA）从各种组织中分离总 RNA，按照制造商的说明，使用 iScriptTM 试剂盒（Bio-Rad, USA）反转录为 cDNA。

根据说明书，在 C1000 热循环仪上使用 SsoFastTM EvaGreen Supermix 试剂盒（Bio-Rad, USA）进行 qRT-PCR。将 cDNA 产物的浓度稀释至 250 ng \cdot μ L⁻¹，并在 10 μ L PCR 反应体积中使用 1 μ L 模板。以 18S rRNA 的 mRNA 水平作为内参，参照 Coogan 等[39]制定了详细的 qRT-PCR 程序。用于 qRT-PCR 的引物（Cath_RT-F 和 Cath_RT-R）的详细参数列于附录 A 中表 S2。使用 CFX 软件（1.6 版，Bio-Rad）采集原始交叉点（C_i）值。转基因鱼的靶基因 *18S rRNA* 基因与非转基因鱼的靶基因表达水

[†] <http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>.

平转化为倍数差异。使用公式 $2^{-(\Delta\Delta CT)}$ 对每个样品进行三次重复的分析,将所有非转基因同胞的零表达设置为 $1\times$ 以进行比较。

2.8. 亲本KI鱼的繁殖评价与恢复

将所有 P_1 鱼放入位于奥本大学鱼类遗传学中心里的一个面积为 400 m^2 的土池塘中,以供其加速生长和成熟。当上述鱼群长至两岁时,部分 P_1 鱼有望达到性成熟[40]。为评估2岁鱼龄的KI初代鱼的繁殖水平,通常会选择靶向阳性(LH⁻_As-Cath⁺)、脱靶阳性(LH⁺_As-Cath⁺)和野生型鱼样本分别进行三轮交配实验。首先,将三对野生型鱼样本、六对LH⁻_As-Cath⁺和四对LH⁺_As-Cath⁺成熟亲本随机放置在13个产卵池($60\text{ cm}\times 45\text{ cm}\times 30\text{ cm}$)中进行两周的自然产卵,以此来评估各基因类型的产卵能力,并收集可产卵亲本的受精卵。然后,用 $50\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ LHRHa 植入物和 $1600\text{ IU}\cdot\text{kg}^{-1}$ 人绒毛膜促性腺激素(HCG)对未产卵组的雄性进行预处理,再进行为期一周的观察,以确定LH⁻_As-Cath⁺雌性是否具有生育能力。在此之后,我们又另行选取了六对LH⁻_As-Cath⁺鱼,来评估激素治疗的效果。试验设定三种剂量的HCG和LHRHa联合植入物($1200\text{ IU}\cdot\text{kg}^{-1}$ HCG + $50\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ LHRHa、 $1600\text{ IU}\cdot\text{kg}^{-1}$ HCG + $50\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ LHRHa 和 $2000\text{ IU}\cdot\text{kg}^{-1}$ HCG + $50\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ LHRHa)和注射0.85% NaCl的对照组。此外,每个基因型收集30 g的卵块,重复3次,以此来计算繁殖力[以卵数 $\cdot\text{kg}^{-1}$ 体重(BW)表示]。最后,将卵块转移到容器中,测定孵化率和鱼苗的存活率。在整个实验过程中,鱼可自由摄食。

2.9. F_1 鱼代及基因型分析

将所有鱼苗按照不同的基因类型分别放入60 L培养箱中。养殖4个月,除对照组外,从其余60个基因类型的 F_1 个体中收集鱼鳍条和触须提取DNA。 F_1 代培养和基因分型程序与上述相同。

2.10. 黄杆菌(*F. covae*)和爱德华氏菌(*E. ictaluri*)攻毒实验

将基因编辑后的斑点叉尾鲷放置于奥本大学的鱼类遗传学实验室(经AU-IACUC批准),在温室内的60 L水族箱里进行培养。为了确定其对病原体的抵抗能力, P_1 和 F_1 鱼都要进行*F. covae*和*E. ictaluri*的病原菌感染试验。

2.10.1. *F. covae*实验

将体重为(150.62 ± 4.24) g(平均值 \pm 标准误差)的健康 P_1 鱼种,包括四种基因型(每种基因型选取15尾),即LH⁻_As-Cath⁺、LH⁺_As-Cath⁺、阴性LH⁺_As-Cath⁻(未插

入*As-Cath*和*lh*突变的阴性鱼)和野生型鱼,混合养于一个孵化槽中适应五天,然后将其转移到用作攻毒实验室的1800 L水池中,在细菌感染前再适应24 h。最后,将所有的鱼随机均等分配到两个60 L的桶中(盛有30 L的水)。简言之,在改良的谢氏琼脂(MSA)上复活的*F. covae*分离菌(菌株ALG-00-530)被接种到容量为12 mL的改良版谢氏肉汤(MSB)中,在50 mL的无菌瓶中混合培养,并在 $150\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 、 $28\text{ }^\circ\text{C}$ 的摇床培养箱中生长12 h。然后将这些培养物在500 mL烧瓶中扩增成200 mL的培养物(添加5 mL菌种),再培养12 h。接着,将光密度(OD)调整为 $\text{OD}_{540} = 0.731$;然后,进行涂布板稀释以确定最终接种物的浓度。每种接种物取100 μL 进行稀释,一式两份涂布在MSA琼脂平板上,于 $28\text{ }^\circ\text{C}$ 下孵育48 h,以此来定量接种物的浓度。制备好后,将两个装有325 mL接种物($4.55\times 10^8\text{ CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$)的烧瓶分别立即加入两个容量为60 L装有鱼苗的桶中。在 $28\text{ }^\circ\text{C}$ 的温度下将鱼静态浸泡于水桶中1.5 h(浸入剂量: $2.46\times 10^6\text{ CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$),之后,将所有的鱼轻轻地移回总容量为1800 L,装有1000 L水的水池中,并让恢复水流。同时,使用模拟感染对照组,将另外的40条鱼放入30 L的饲养水中,用无菌MSB(325 mL)代替细菌培养1.5 h。在 F_1 幼鱼[(3.15 ± 0.24) g]攻毒实验中,选取LH⁻_As-Cath⁺、LH⁺_As-Cath⁺、LH⁺_As-Cath⁻和WT 4个家系(每个家系45条),每个家系随机分为3个重复组,每组15条。为 F_1 代以相同的攻毒程序接种菌株,剂量为 $4.75\times 10^8\text{ CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$ (浸液剂量为 $2.57\times 10^6\text{ CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$)。

2.10.2. *E. ictaluri*实验

为了实施*E. ictaluri*攻毒实验,本研究准备了60尾包括上述四种基因型在内的 P_1 鱼[(142.62 ± 3.72) g]。*E. ictaluri*(菌株S97-773)由美国农业部水生动物健康研究所(USDA-ARS, Aquatic Animal Health Research Unit)提供,该菌株的活化及攻毒程序的详细流程则是参考Simora等[30]的方法,并做适当调整。简言之,即将1 mL冷冻甘油保存的*E. ictaluri*原液接种到20 mL的脑-心浸萃液体培养基(BHIB; Hardy Diagnostics)中,在恒温 $26\text{ }^\circ\text{C}$ 和 $180\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 的摇床中,持续培育24 h。然后在相同条件下将细菌再次接种于1 L的BHIB中,在相同的条件下再培养24 h,直到吸光值为 OD_{600} 对应的细胞密度达到约 $1\times 10^8\text{ CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。将所有的 P_1 个体随即转移到一个1800 L的水池中进行实验。在感染开始之前,把水量降至100 L。然后加入1 L含有 $3.20\times 10^8\text{ CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的*E. ictaluri*悬浮液,最终浸泡剂量为 $3.20\times 10^6\text{ CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。将鱼在该条件

下静态浸泡 2 h, 同时保持曝气量大于 5 ppm, 随后恢复进水。此时, 除感染组之外, 一个包含了 30 条鱼的对照组只接受无菌 BHIB 的作为模拟攻毒组。关于 F_1 鱼 (54.27 ± 1.49) g 的攻毒实验, 选择的是包含 60 条鱼在内的四种基因型, 并采用与 P_1 相同的攻毒菌株和方法, 攻毒菌液浓度为 2.80×10^8 CFU \cdot mL $^{-1}$ (浸液剂量为 2.80×10^6 CFU \cdot mL $^{-1}$)。

在实验的前 72 h, 我们每 4 h 检查一次死亡率, 之后每天检查三次。对于接受攻毒测试的鱼均连续监测十天, 以确认细菌的外部感染症状, 并通过从肾脏和肝脏中分离出的细菌生长情况来确定其死亡原因。此外, 还要及时记录和收集不同时间点个体死亡的情况。

2.11. 统计分析

采用单因素方差分析 (ANOVA) /Tukey 多重比较检验分析法对鱼类的产卵率、孵化率、繁殖力、鱼苗存活率和生长数据进行分析, 用来检测和处理不同鱼类之间的平均差异。为了比较不同组的 KI 效率, 实验中采用单因素方差分析/多因素比较和比值比 (OR) (附录 A 中表 S3)。攻毒实验的存活曲线采用 Kaplan-Meier 图和 log-rank (Mantel-Cox) 检验确定。所有统计分析均通过 GraphPad Prism 9.4.1 (GraphPad Software, LLC) 完成。用未配对的 Student 双样本 t 检验, 分析转基因和非转基因鱼之间的基因表达。统计显著性 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义, 所有数据均以平均数 \pm 标准差 (SEM) 表示。

3. 结果

3.1. 将 *As-Cath* 基因的 KI 靶向整合到 *lh* 位点

2H2OP 和 dsDNA 系统均能诱导 *As-Cath* 整合斑点叉尾鮰品系且整合率较高, 但 2H2OP 系统具有明显的脱靶效应 [图 2 (a) 和 (b), 附录 A 中图 S1 至图 S4]。具体来说, 即含有 50 ng \cdot μ L $^{-1}$ 供体 (2H2OP50) 的 2H2OP 体系的 KI 效率最高, 为 27.61% (37/134); 其次是 2H2OP100 组 (17.76%, 27/152)、dsDNA50 组 (12.21%, 26/213) 和 dsDNA100 组 (10.25%, 25/244) (附录 A 中表 S4)。尽管 2H2OP50 组能够引入最高的 KI 效率 ($P < 0.01$) [图 3 (a)], 2H2OP 体系或供体 50 ng \cdot μ L $^{-1}$ 的 KI 效率显著高于 dsDNA 方法 ($P = 0.0001$) 或供体 100 ng \cdot μ L $^{-1}$ ($P = 0.00469$) [图 3 (b) ~ (c)], 但与其他处理方式相比, 50 ng \cdot μ L $^{-1}$ 供体的 dsDNA 显示出最高的 KI 中靶效率 (10.80%, 23/213) ($P < 0.01$) [图 3 (d)]。相比之下, 在 2H2OP 系统中仅观察到 1 例 KI 中靶例子, 明显低于 dsD-

NA ($P < 0.0001$) [图 3 (e)]。尽管不同剂量的供体对总 KI 效率有显著影响, 但结果表明, 这种差异在 KI 中靶上其实并不突出 ($P = 0.3577$) [图 3 (f)]。

根据 OR 可以看出, 2H2OP 系统和低剂量体系往往具有更高的总整合率, 分别是 dsDNA (2H2OP vs dsDNA, OR = 2.30) 和高剂量体系 (50 ng \cdot μ L $^{-1}$ vs 100 ng \cdot μ L $^{-1}$, OR = 1.47) 的数倍。尽管如此, dsDNA 在靶上集成方面显示出显著优势, 其效率是 2H2OP 系统的 20 多倍 (OR = 26.70) (附录 A 中表 S3)。综上所述, 研究表明在本研究条件下, 采用 dsDNA 系统并配合 50 ng \cdot μ L $^{-1}$ 的供体剂量产生了最高的靶向 KI 效率。

此外, 还应关注到那些未整合 *As-Cath* 的鱼, 因为我们在检测中只检测到了发生 *lh* 突变的个体。具体来说, 即在 surveyor 突变实验中, 2H2OP50、2H2OP100、dsDNA50 和 dsDNA100 组分别有 5.56% (3/54)、6.67% (4/60)、3.33% (2/60) 和 3.33% (2/30) 的鱼类缺乏 *lh* (附录 A 中表 S4); 2H2OP100 组的 4 个 *lh* 突变个体中存在 2、2、1 和 3 种类型的突变 (附录 A 中图 S5)。

3.2. 剂量和 CRISPR/Cas9 系统的影响

不同的供体剂量和 CRISPR/Cas9 介导的系统会对鱼类胚胎产生毒性, 从而降低孵化率和鱼苗存活率。尽管与 iCT 组相比, 这四个 CRISPR/Cas9 介导注射组的孵化率没有产生显著性的差异 ($P = 0.1630$), 但孵化率明显低于 nCT 组 ($P < 0.01$) [图 3 (g)]。此外, 不同供体剂量 (50 ng \cdot μ L $^{-1}$ 与 100 ng \cdot μ L $^{-1}$) ($P = 0.1080$) 或 CRISPR/Cas9 介导的系统 (2H2OP 与 dsDNA) ($P = 0.0796$) 发生的胚胎致死率是一致的, 并且是显著高于 nCT 组 [图 3 (h) ~ (i)] 的。在鱼苗的存活率方面, 各组鱼苗成活率均在 90% 以上 [$P = 0.0747$; 图 3 (j)], CRISPR/Cas9 系统 [2H2OP 与 dsDNA, $P = 0.9975$; 图 3 (k)] 和剂量 [50 ng \cdot μ L $^{-1}$ 与 100 ng \cdot μ L $^{-1}$, $P = 0.9995$; 图 3 (l)] 没有产生显著影响。

3.3. 嵌合性与 *As-Cath* 表达

采用 PCR 和 qRT-PCR 检测 *As-Cath* 基因在靶向阳性鱼不同组织中的表达情况。结果显示, 五条 LH $^{-}$ _As-Cath $^{+}$ 鱼中有三条在所有 14 个样本组织 (皮肤、肝脏、肾脏、脾脏、血液、肠道、鳃、胃、鳍、须、肌肉、眼睛、大脑和性腺) 中表达了 *As-Cath* [图 4 (a) 和 (b)], 但其中一条在 11 个组织中表达 (须、肌肉和鳃未表达), 另一条在八个组织 (皮肤、肝脏、血液、肠道、鳃、须、肌肉和性腺) 中表达 (附录 A 中图 S6), 表明在靶向阳性个体中存在嵌

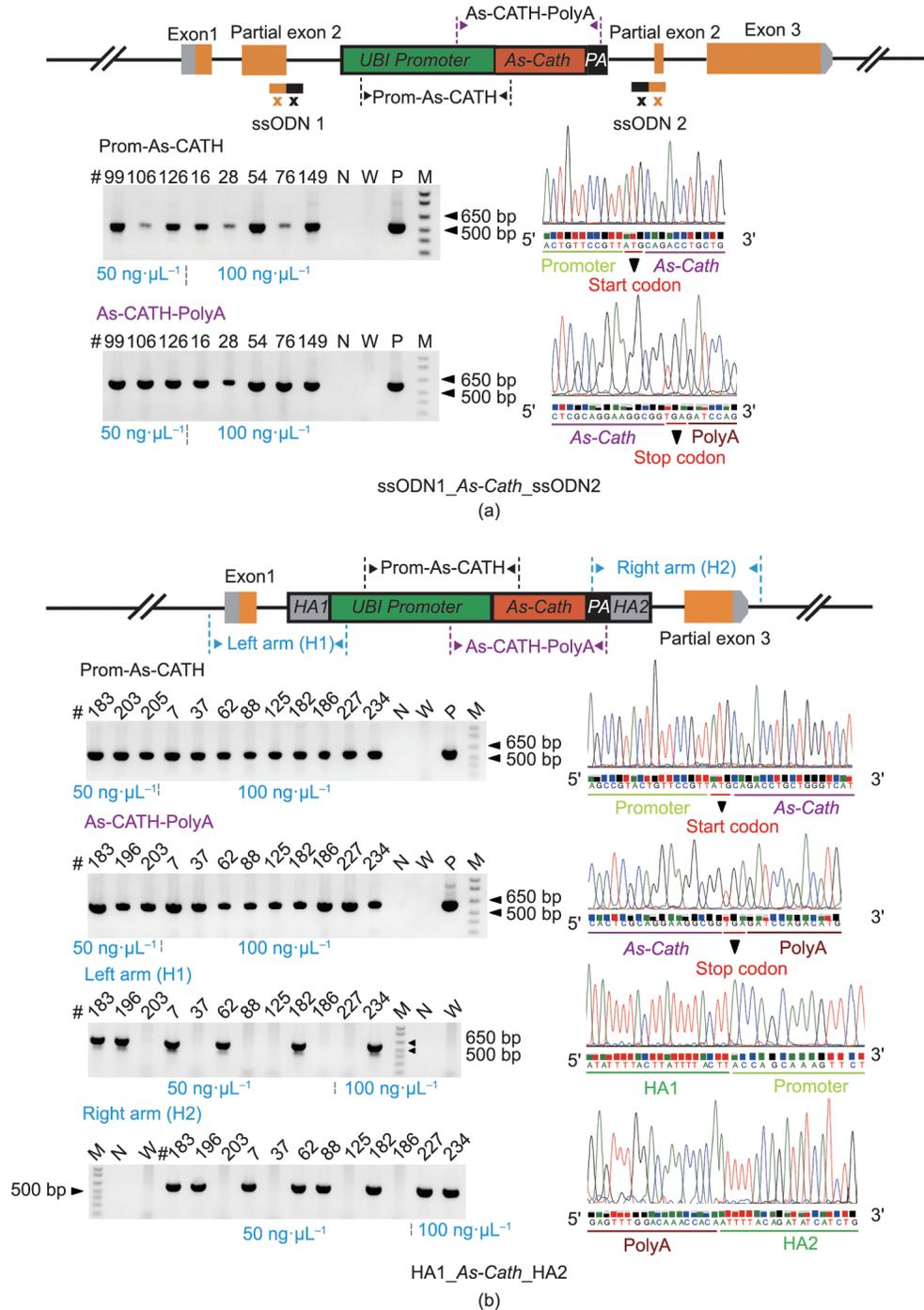


图2. 对携带 *As-Cath* 转基因的转基因阳性斑点叉尾鲷的检测。(a) PCR 扩增物的 TAE 琼脂糖凝胶显示使用 2H2OP 方法脱靶检测 ssODN1_ *As-Cath*_ssODN2 构建物, 测序结果显示了启动子区 (Prom-As-CATH, 519 bp) 和 *As-Cath* 区 (*As-CATH*-PolyA, 591 bp) 的情况; (b) PCR 扩增物的 TAE 琼脂糖凝胶显示, 采用 dsDNA 方法对 HA1_ *As-Cath*_HA2 构建体的靶向阳性检测情况。通过测序结果确定了靶基因区 (Prom-As-CATH, 542 bp 和 *As-CATH*-PolyA, 597 bp) 和连接区 (HA1, 573 bp 和 HA2, 598 bp)。凝胶图像顶部的数字表示的是鱼的样本编号。N 道: 以水为模板的阴性对照; W 道: 野生型对照 (nCT); P 道: 阳性 (质粒或 dsDNA 供体) 对照; M 道: DNA 标记 (1 kb)。500 bp 和 650 bp 的条带用黑色三角形突出显示; 50 ng·μL⁻¹ 和 100 ng·μL⁻¹ 显示了不同剂量的供体, 质粒或 dsDNA。

合性。通过分析发现, 即使没有受到致病性的感染, 3 个靶向阳性个体也能检测到 *As-Cath* 的表达。最高的 3 个部位分别是肾脏 (28.91 倍)、皮肤 (24.30 倍) 和鳃 (8.45 倍), 其次是肌肉 (7.43 倍)、脾脏 (6.05 倍) 和须 (4.81 倍)。然而, 与其他组织相比, 眼睛 (1.33 倍)、肠道 (1.59 倍)

和鳍 (1.61 倍) 的表达最低[图 4 (c)]。

此外, 与野生型个体相比, 1 岁时 LH⁻*As-Cath*⁺ 雌性性腺 *lh* mRNA 水平下调 ($P = 0.0016$), 而雄性性腺 *lh* mRNA 水平并无显著差异 ($P = 0.5817$) [图 4 (d)]。体内的 LH 水平通常由雌激素和睾酮等性激素的反馈机制调

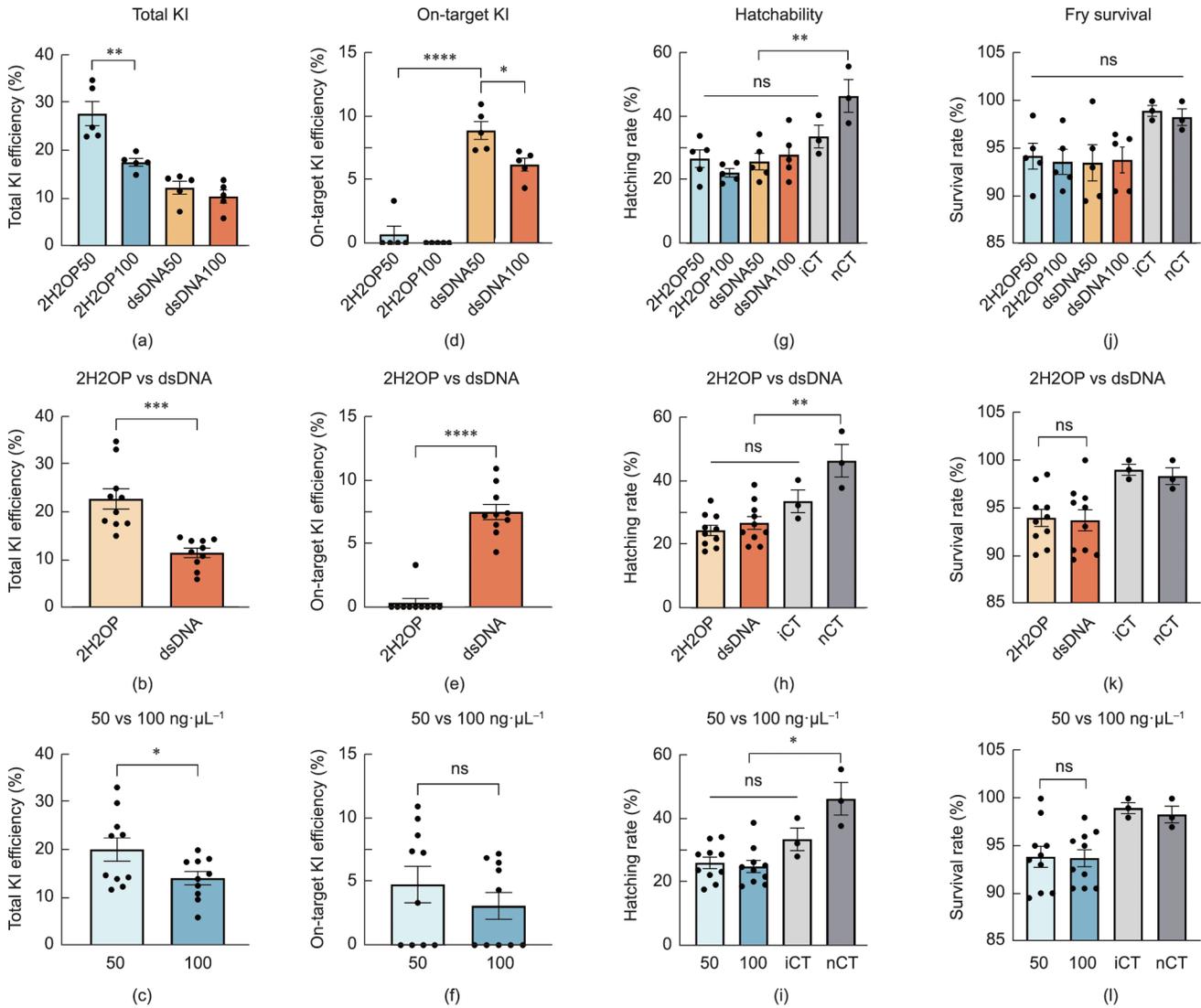


图3. 不同CRISPR/Cas9介导系统对KI效率、孵化率和鱼苗存活率的影响。(a) 不同CRISPR/Cas9介导系统和剂量组合的KI总效率。(b)、(c) 不同系统或供体剂量的KI总效率的比较；(d) 不同CRISPR/Cas9介导系统和剂量组合的靶向KI效率；(e)、(f) 不同系统或剂量的KI靶效率的比较。(g) 不同CRISPR/Cas9介导系统和剂量组合对孵化率的影响；(h)、(i) 不同系统或剂量的孵化率的比较；(j) 不同CRISPR/Cas9介导系统和剂量组合对鱼苗存活的影响；(k)、(l) 不同系统或剂量下鱼苗的成活率比较。2H2OP (50/100)：CRISPR/Cas9介导系统与ssODN1_*As-Cath*_ssODN2构建体偶联 (pUC57_mini质粒和ssODN供体为50/100 ng· μL^{-1})；dsDNA (50/100)：CRISPR/Cas9介导的系统与HA1_*As-Cath*_HA2供体偶联 (dsDNA供体为50/100 ng· μL^{-1})。* $P < 0.05$ ；** $P < 0.01$ ；*** $P < 0.001$ ；**** $P < 0.0001$ ；ns：不显著，通过非配对Student *t*检验或单因素方差分析。

节。雌性通常具有较高的雌激素水平，这会影响到LH的分泌。对于这些激素反馈回路的任何破坏都可能会对雌性的LH mRNA水平产生更为显著的影响。

3.4. 生殖不育与生殖恢复

进行了三轮次的交配实验后，已经能够证明完全控制斑点叉尾鲷的繁殖是具有可行性的[图5 (a)]。研究结果显示，在第一次为期2周的自然交配中，分别有三对野生型 (100%，7927个卵· kg^{-1} BW) 和两对LH⁺*As-Cath*⁺鱼 (50%，8952个卵· kg^{-1} BW) 产卵，但在LH⁻*As-Cath*⁺对中未观察到产卵 (0%) 的情况。与LH⁻*As-Cath*⁺相比，WT和LH⁺*As-Cath*⁺鱼在自然配对条件下具有更高的产卵

能力 ($P = 0.0148$ 和 $P = 0.1743$)。此外，与WT对相比，LH⁺*As-Cath*⁺鱼在繁殖能力方面没有展现出明显的差异 ($P = 0.2143$) [图5 (b)]。

此外，对雄性鱼进行为期一周的激素启动处理 (50 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ LHRHa + 1600 IU· kg^{-1} HCG)，并未诱导LH⁻*As-Cath*⁺雌性进行产卵，这表明缺失*lh*基因的雌性鱼卵母细胞成熟和排卵过程被阻断。然而，研究结果表明，当雄性和雌性都进行激素启动时，LHRHa和HCG的组合能有效地诱导LH⁻*As-Cath*⁺雌性进行产卵。更具体地说，1200 IU· kg^{-1} 、1600 IU· kg^{-1} HCG联合50 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ LHRHa组中分别有2条、2条和1条雌性鱼在注射激素24~48 h后产卵，产卵量分别为6213个卵· kg^{-1} BW、

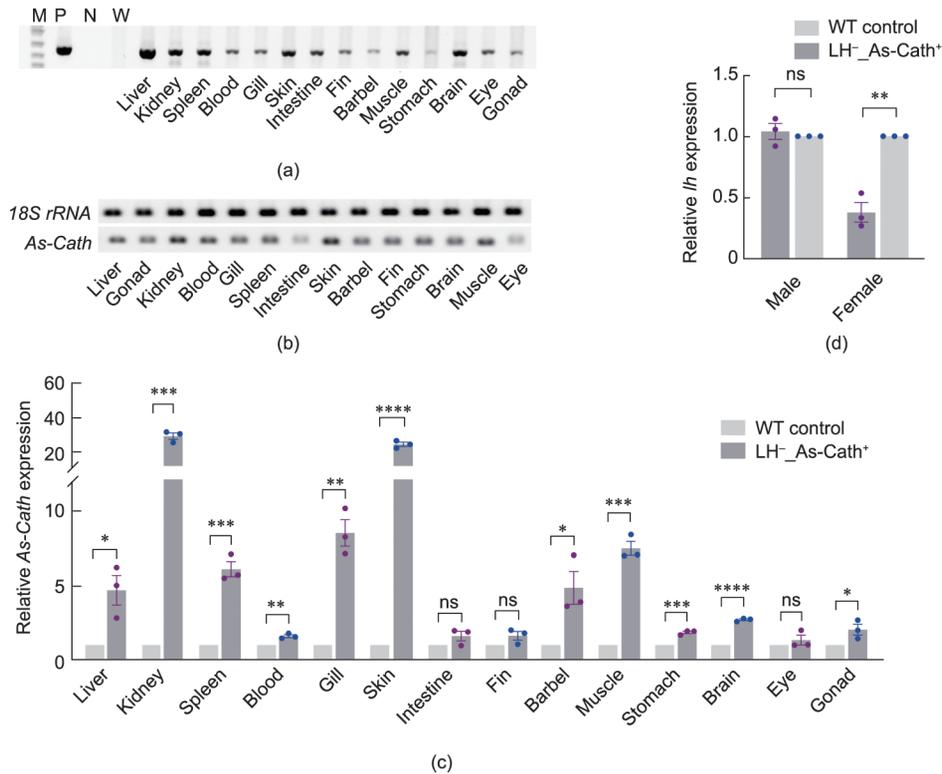


图4. 嵌合体检测和LH₋As-Cath⁺斑点叉尾鲷系中扬子鳄cathelicidin基因(*As-Cath*)的表达。(a) PCR扩增显示了一种代表性LH₋As-Cath⁺鱼的转基因,它在鱼的14个身体组织中都存在;(b)琼脂糖凝胶电泳显示*As-Cath*基因在P₁转基因斑点叉尾鲷不同组织中的表达。(c)通过RT-PCR分析不同组织中*As-Cath*基因的相对表达;(d)LH₋As-Cath⁺雄性和雌性性腺*lh*基因的相对表达量。采用18S rRNA作为内参,对照组基因表达量设为1.0,数据显示为相对于对照组的平均倍数变化(平均值±标准误差, $n=3$)。表达水平根据同胞野生型鱼类的相应组织来进行校准,每个基因型使用三个个体。M道:DNA标记(1 kb);P道:阳性(质粒或dsDNA供体)对照;N道:阴性(水)对照;W道:野生型对照(nCT);* $P<0.05$;** $P<0.01$;*** $P<0.001$;**** $P<0.0001$;ns:不显著,通过非配对 t 检验或单因素方差进行分析)。

5514个卵·kg⁻¹ BW和3778个卵·kg⁻¹ BW。与0.85% NaCl注射液相比,三种处理均显著提高了产卵量($P<0.0001$)。随着激素用量的增加,繁殖力下降,但三者间的差异并不明显($P=0.0731$)。然而,当采用1200 IU·kg⁻¹ ($P=0.2627$)或1600 IU·kg⁻¹ ($P=0.1983$) HCG和50 μg·kg⁻¹ LHRHa时,繁殖力就能恢复到正常水平[图5(c)]。与WT和其他激素治疗组相比,2000 IU·kg⁻¹ HCG组的繁殖力(3778个卵·kg⁻¹ BW, $P=0.0494$)和孵化率(18.01%, $P=0.0476$) [图5(d)]明显降低。尽管不同的激素处理对繁殖力和孵化率会产生不同的影响,但它们对于早期鱼苗的存活并没有影响($P=0.1018$) [图5(e)]。

3.5. F₁基因分型以及P₁和F₁的生长比较

如上所述,三轮交配实验产生了三个野生型、两个LH₋As-Cath⁺和五个LH₋As-Cath⁺家系。然而,经过基因型分析,确定只有一个LH₋As-Cath⁺家系[F₁后代的整合率为33.33% (10/30)]和两个LH₋As-Cath⁺家系[家系1的F₁后代的整合率为40% (12/30),家系2的F₁后代整合率为46.67% (14/30)],在F₁代中可检测到*As-Cath*基因。这些结果进一步证实了P₁初代中存在嵌合现象。

为了进一步确定*lh*破坏和*As-Cath*整合对鱼类生长的多效性影响,我们分别比较了P₁初代和F₁后代随着时间推移所产生的体重变化。生长数据表明,前九个月,P₁代的LH₋As-Cath⁺个体在生长方面没有表现出明显优势。尽管如此,与其他基因型(25 g)相比,P₁LH₋As-Cath⁺鱼依旧表现出最大的增重(36.35 g)。此外,经过3个月的培养,LH₋As-Cath⁺的F₁代生长速度已经显著加快($P=0.0222$) (附录A中表S5)。

3.6. 增强对鱼类病原体的抵抗力

根据临床症状、肝脏和肾脏的细菌培养情况,死掉的鱼被确诊为细菌感染(*F. covae*或*E. ictaluri*)。与在P₁代和F₁代的攻毒实验中发现的野生型/阴性个体相比,整合*As-Cath*的鱼对细菌的抗性增强。根据*F. covae*攻毒观察,大多数感染的野生型鱼表现出明显的临床症状:脊柱前凸、鳍糜烂、身体皮肤变黄。然而,一些*As-Cath*转基因鱼只表现出诸如鳍磨损等轻微的临床症状,在感染后还能幸存下来。两种类型对照(WT和LH₋As-Cath⁻),P₁代(13.33%与20%, $P=0.8682$)和F₁代(26.67%与40%, $P=0.8955$)的存活率并没有出现明显差异。然而,与野生型

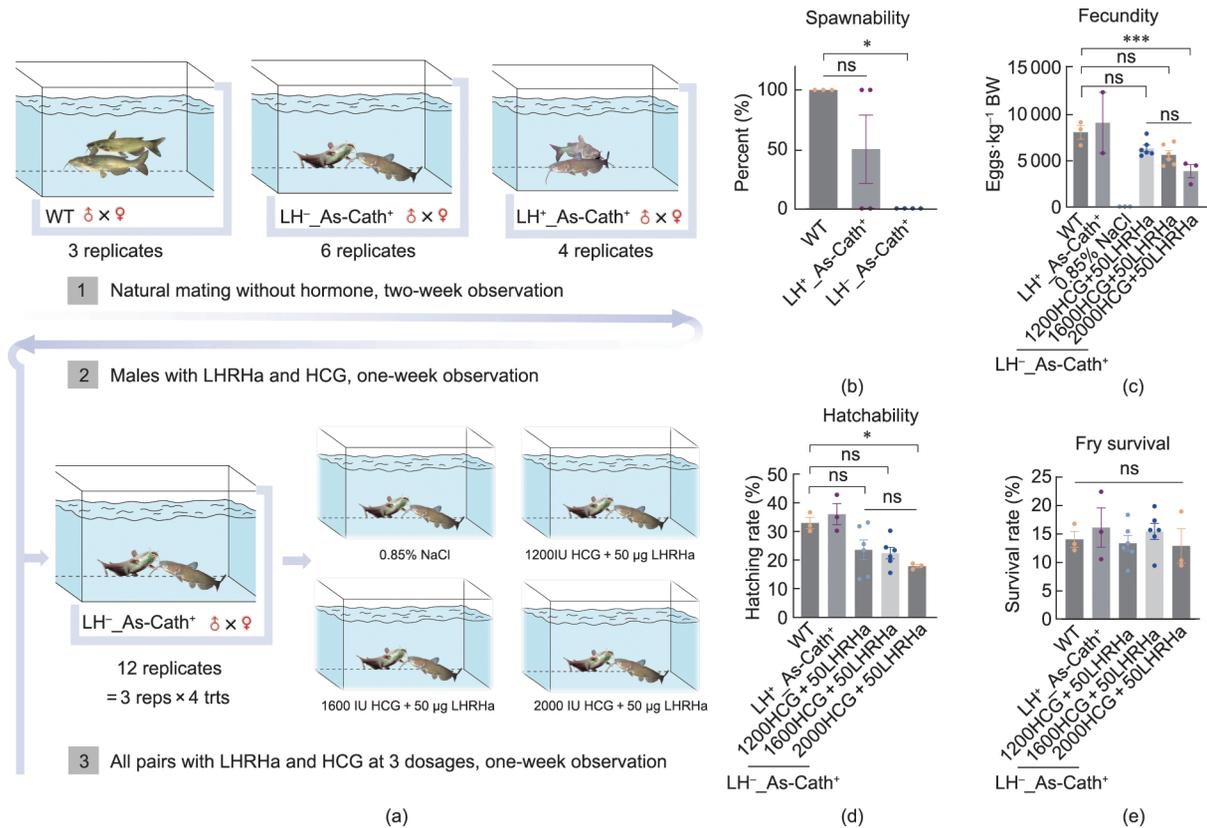


图5. *As-Cath* 斑点叉尾鲷的繁殖测定和恢复。(a) 设计三轮繁殖实验。P₁初代涉及3种基因型: WT、LH⁻_As-Cath⁺和LH⁺_As-Cath⁺。第一轮: 每种基因型随机设置3对、6对和4对, 分别在13个水箱中重复配对, 不进行激素处理, 观察两周。第二轮: 移出繁殖对, 用50 μg · kg⁻¹ LHRHa和1600 IU · kg⁻¹ HCG对未进行交配的雄性进行预处理, 以确定LH⁻_As-Cath⁺雌性的繁殖, 观察一周。第三轮: 12对LH⁻_As-Cath⁺鱼进行补充和重新配对, 并使用三种剂量的LHRHa和HCG治疗一周。共有四个处理程序, 每组重复三次。(b) LH⁻_As-Cath⁺鱼在自然交配过程中的产卵能力检测。(c) ~ (e) 不同激素处理对P₁代的繁殖力和孵化能力以及F₁代的鱼苗存活存在潜在的影响。* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; ns: 不显著, 通过非配对 t 检验或单因素方差进行分析。

组相比, LH⁻_As-Cath⁺和LH⁺_As-Cath⁺鱼在感染 *F. covae* 后的存活率明显提高 (LH⁻_As-Cath⁺与野生型: 73.33%与13.33%, $P = 0.0016$; LH⁺_As-Cath⁺与野生型: 66.67%与13.333%, $P = 0.0014$) 和F₁后代 (LH⁻_As-Cath⁺与WT: 86.67%与26.67%, $P = 0.0010$; LH⁺_As-Cath⁺与WT: 73.33%与26.67%, $P = 0.0127$)。此外, *As-Cath* 基因的靶位插入与非靶位阳性相比, 对 *F. covae* 的抗病性得到提高, 两代中不存在统计学上的差异 (P₁为73.33%对66.67%, $P = 0.7726$, F₁为86.67%与73.33%, $P = 0.3613$)。此外, 我们的研究表明, F₁后代比它的P₁亲本能更抵御 *F. covae* 入侵和影响[第6 (a) 和 (b)]。

在死亡的斑点叉尾鲷中可以观察到典型的“头部穿孔”, 同时伴有腹水积聚, 出血和突出眼等临床体征。然而, 一些转基因 *As-Cath* 鱼虽然也出现皮肤溃疡和腹部肿胀, 但在感染后存活下来。在P₁代 (LH⁻_As-Cath⁺与WT: 73.33%与33.33%, $P = 0.0125$; LH⁺_As-Cath⁺与WT: 60%与33.33%; $P = 0.0427$) 和F₁代 (LH⁻_As-Cath⁺与WT: 66.67%与40%, $P = 0.0558$; LH⁺_As-Cath⁺与

WT: 73.33%与40%; $P = 0.0350$) 中也观察到鱼类对 *E. ictaluri* 的抗病性得到了加强, 与 *F. covae* 的攻毒结果相似。总体来说, 与WT鱼相比, *As-Cath* 的个体存活率显著提高 (P₁为66.67%对33.33%, $P = 0.0381$; F₁为70%对40%, $P = 0.0335$)。然而, LH⁻_As-Cath⁺和LH⁺_As-Cath⁺鱼却没有表现出明显的差异 (P₁为73.33%对60%, $P = 0.4566$; F₁为66.67%对73.33%, $P = 0.6851$) [图6 (c) 和 (d)]。

4. 讨论

与之前专注于改善期望性状的基因编辑方式不同, 本项研究统筹考虑了减少转基因鱼类对生态系统和遗传生物多样性的潜在影响的方法。具体来说, 通过使用CRISPR/Cas9介导的基因编辑技术成功地将AMG整合到生殖相关位点中。本文确定了一种适合斑点叉尾鲷的KI系统, 以增强鱼类的抗病性和繁殖控制, 以此来减少水产养殖过程中对抗生素和抗寄生药物的依赖。HA介导的CRISPR/

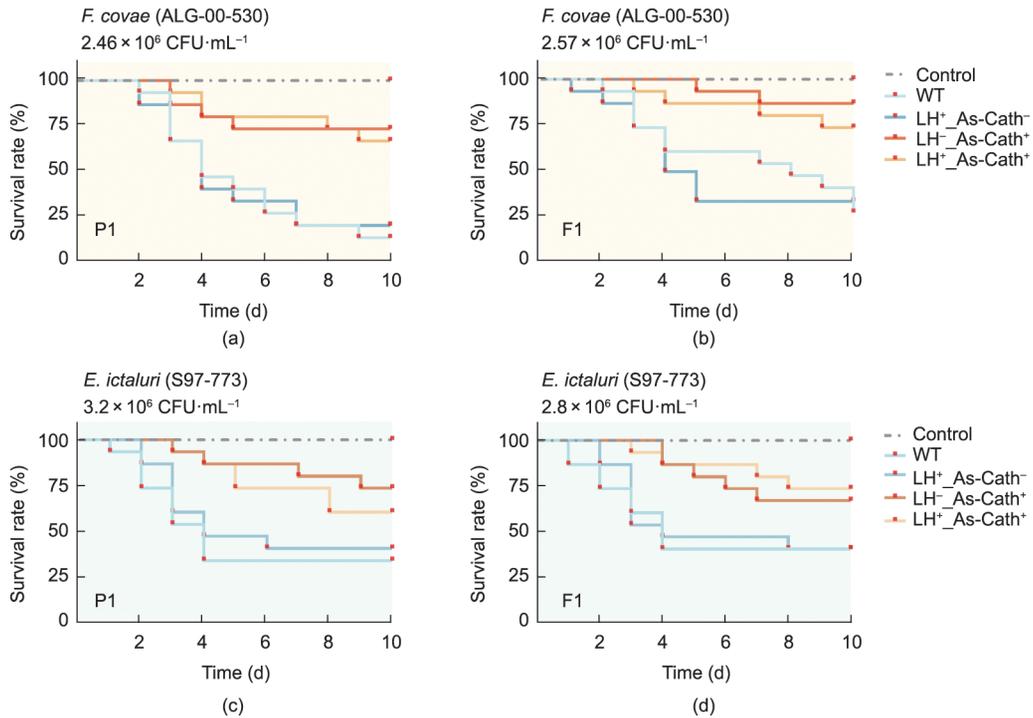


图6. *As-Cath*斑点叉尾鲷对抗两种鱼类细菌病原体的Kaplan-Meier生存曲线图。(a)、(b)受到不同基因型幼虫的感染后, P₁代和F₁代的存活率曲线;(c)、(d) P₁和F₁代分别感染*E. ictaluri*后呈现的存活曲线。通过log-rank (Mantel-Cox)检验生存率比较, 确定非注射鱼; $LH^{-}_As-Cath^{-}$: 阴性鱼线(无*lh*突变和插入*As-Cath*的注射鱼); $LH^{+}_As-Cath^{+}$: 在目标阳性鱼上(在*lh*位点检测到*As-Cath*插入); $LH^{+}_As-Cath^{+}$: 脱靶阳性鱼(检测到*As-Cath*插入, 但在*lh*基因点)的不同情况。

Cas9系统显示出高整合率、低脱靶率和低毒性。此外, 繁殖过程被证实是完全可控的, 通过激素治疗就能在新的鱼系中得到恢复。总体而言, 在*lh*位点插入cathelicidin转基因以增强其对传染病的抵抗力和生殖限制, 从而提高消费者所注重的品质, 促进转基因鱼类的环境友好性, 似乎是有希望的。

当CRISPR/Cas9介导的KI系统被用于非模型动物的胚胎时, 出现了一些障碍。在基因组编辑的历史上, 最初的CRISPR/Cas9系统是基于哺乳动物细胞或模型动物的胚胎提出的。当该系统从模型动物迁移运用到非模型动物时, 则存在一些不确定性, 如胚胎大小、发育期和对Cas9蛋白的敏感性等, 研究人员必须在开始新物种的基因组编辑时优化到一个合适的系统。Yoshimi等[5]证明, 当使用短的ssODN模板时, ssODN介导的末端连接方法在大鼠体内诱导出17.6% (3/17)的高整合率。相反, 最近的研究表明, ssODN介导的KI可以在绵羊中诱导出很高比例(17.8%)的indel突变[41]。在目前的研究中, 我们使用由ssODNs和HA辅助的CRISPR/Cas9系统在*lh*位点上创建出*As-Cath*基因的靶向KI。尽管在ssODN介导的系统中检测到22.38% (64/286)的KI效率, 但它在斑点叉尾鲷中引发了极高的脱靶概率(>90%)。我们的实验的结果与斑马鱼的研究结果一致, 这些研究结果表明, 当

采用不同长度的模板时, 会发生错误的ssODN整合[7]。这些研究表明, 在鱼类模型中, ssODN介导的KI效率在很大程度上依赖于ssODN模板[42]的选择, 在使用ssODN创建KI模型时需要谨慎。

与ssODN介导的KI相比, HA辅助的KI可以在不同同源序列的人细胞中实现20%~30%的HDR介导率[9,43]。此外, Simora等[44]发现, HA介导的CRISPR/Cas9系统提供了线性dsDNA供体, 在斑点叉尾鲷基因组的非编码区显示出29%的总整合率, 远远高于该项研究的平均水平[29%对11.16% (51/457)]。由此可得, 这种整合率的差异源于不同的样本量、靶区的未知功能(非编码与*lh*基因座)、sgRNA和HA的效率以及不可预测的遗传相互作用等因素。研究的样本量越大, 得出的结论就越可靠。这些发现表明, HA介导系统在斑点叉尾鲷品系中比ssODN更有效。HDR诱导的CRISPR/Cas9的KI效率一直处于较低的水平, 在细胞系和模型动物中[5,7,9]均是如此。幸运的是, 新的CRISPR/Cas介导的技术正在不断发展。例如, CRISPR/Cas12i介导系统在人类T细胞中具有高突变率的多重基因组编辑中显示出良好的前景[45]。此外, 使用同源性独立靶向整合(HITI)载体, Kelly等[46]建立了用于插入大型DNA供体的CRISPR/Cas9-HITI系统, 在人类293T细胞中具有36%的高整合效率。最近, 一项新的研

究表明,使用单链DNA退火蛋白(SSAP)和催化失活的dCas9(dCas-SSAP)系统,可以在哺乳动物的细胞中整合长序列基因,具有很高的靶向KI效率(约为20%)[47]。这些新的工具或系统有望从模型动物应用到非模型动物,并有效提高基因组的编辑效率。

尽管我们使用公认的软件预测并避免了可能的脱靶事件,但实际的整合结果显示,实验中依旧存在脱靶的现象。这主要是由于计算机无法准确评估动物体内真正的脱靶位点[48-49]。此外,动物体内实验中脱靶事件的发生频率高于体外细胞实验[50]。大量文献表明,观察到的意外突变/插入是CRISPR/Cas9系统应用中的一个主要问题,可能会混淆对研究结果的解释[49,51-52]。然而,尽管一些报道声称,在小鼠和鱼类中没有发现基因型或表型的可检测不良突变/插入[44,53-54],但还是需要关注以下几个潜在问题:①可能观察到未改变的表型,因为脱靶切割可能发生在非编码区[55];②研究人员倾向于关注有意插入的P₁初代基因,而不是那些可能存在脱靶突变的基因[56-57];③大多数使用动物模型的研究都没有使用全基因组方法来检测脱靶病例,这可能会隐藏一些不常见的脱靶编辑位点[50]。在同样的情况下,除了*lh*突变,我们没有对所有脱靶的个体进行彻底的检测,主要是因为彻底检测既耗时又昂贵。尽管如此,这并不妨碍我们保留那些未分析的脱靶个体,因为最终将以全基因组和无偏差的方式对它们进行基因分型。

从本文中的基因表达研究中可以看出,LH对于斑点叉尾鲴的生殖调节非常重要。LH在雌性卵母细胞的最终成熟和排卵过程中起到了至关重要的作用,与对照组相比,敲除*lh*的雌性斑点叉尾鲴的*lh*表达显著降低。相反,在敲除了*lh*的雄性中没有观察到*lh*表达的实质性变化,这说明*lh*在雄性生殖中的作用相对较小。观察结果与在其他物种(如斑马鱼)中进行的类似研究结果产生了共鸣[22]。在*lhb*突变雌性斑马鱼中,不育现象频繁发生,进一步凸显了LH在雌性繁殖中的关键作用。然而,*lhb*突变雌斑马鱼是可生育的,通过形态学和组织学分析观察到*lhb*突变雄斑马鱼的性腺指数(GSI)降低,与对照雄斑马鱼相比,*lhb*突变雌斑马鱼在精子活力和精巢结构方面没有明显差异[22]。因此,我们的研究结果证实了*lh*基因在雌性斑点叉尾鲴卵母细胞成熟与排卵中的关键作用,而其在雄性生育力中的作用相对较弱,但仍会导致不育。值得注意的是,我们的数据与斑马鱼的研究结果不同,凸显了斑点叉尾鲴中精巢的发育和基因表达并不必然意味着具有生育能力,这与斑马鱼中观察到的模式存在显著差异,反映出不同硬骨鱼类之间在生殖策略与遗传机制方面存在显

著多样性。

基因嵌合是长期存在的障碍。本文中,我们未能有效地获得100%没有嵌合的个体。本质上,CRISPR/Cas9基因组编辑生物体的嵌合现象在基于受精卵的编辑中十分常见,并且在小鼠[58-59]、大鼠[57]和斑马鱼[60-61]中都均已观察到,只是频率不尽相同。CRISPR/Cas9修饰的嵌合现象会带来意想不到的后果,它阻碍了纯合子阳性后代的产生,并且延长了纯合子产生的时间。研究人员评估了五个靶向阳性P₁初代的*As-Cath*转基因表达,发现其中一个个体在性腺中没有表达。研究中,种系里出现了几个嵌合事件,导致无法将*As-Cath*基因转移到后代身上。因此,本文认为嵌合现象在非模型鱼中十分常见并且无法避免。尽管早期的精子/精巢或卵/卵巢基因分型可以有效地避免不良后代的产生,但在不牺牲亲本的情况下获取种系DNA是具有挑战性的。然而,纯合性应该在F₂和F₃子代中实现。Easi CRISPR、C-CRISPR[6]、CRISPR/Cas9 HI-TI[46]和dCas9-SSAP[47]等一系列新的策略可被用于减少嵌合动物的诱导。

无论CRISPR/Cas9介导的基因组编辑类型是何种情况,显微注射都会对胚胎产生不可逆的影响。在目前的研究中,这都是死亡率增加和孵化率下降的原因。本文通过模拟手术和CRISPR/Cas9介导的显微注射,发现了极高的胚胎死亡率,这表明死亡主要发生在卵黄注射阶段,而DNA供体和试剂所带来的影响较小[44]。尽管高剂量会导致较高的胚胎死亡率和较低的孵化率,但与野生型样本组相比,它并没有明显降低鱼苗的存活率,这与Elaswad等[35]的研究结果一致。这可能是因为显微注射只会对胚胎的卵黄产生有害影响。不过,一旦受精卵被成功孵化,这种影响就不再会影响到鱼苗。考虑到胚胎培育中不可避免的物理致死性、脱靶效应和嵌合性,我们建议对非模型鱼类物种进行约3000个受精卵的显微注射,以便为后续的验证实验提供足够的基因编辑鱼。

为了评估基因多效性效应,文中比较了靶向/脱靶的*As-Cath*整合的鱼系与野生型样本种群的生长表现。研究结果表明,在P₁初代的各个家系中,脱靶插入并没有表现出明显的生长抑制或改善。尽管如此,初步数据显示,在水箱中培养3个月,与野生型个体相比,LH⁺*As-Cath*⁺鱼类的体重增加更显著,F₁后代的生长差异也不断得以显现。文中假设,AMP转基因应该更加健康,在某些培养条件或生命阶段可以更快地生长。与野生型鱼相比,在4年的培养过程中,缺乏cfGnRH的斑点叉尾鲴也能正常的生长和存活[19]。然而,当*lh*基因被*As-Cath*取代时,则可能存在潜在的基因多效性效应。因此,携带

As-Cath 转基因的 P_1 嵌合初代可以用来繁育 F_1 、 F_2 和 F_3 纯合子家族；然后，对 $LH^-As-Cath^+$ 鱼系的生长、成活率、敏感性和鱼体性状进行比较，让 $LH^-As-Cath^+$ 鱼的基因强化性能可以在未来对公众和养殖户而言变得更加透明。

由于整合效率极低，HDR 介导的 KI 很少应用于水产养殖，但大多数性状都是通过 NHEJ 介导的 KO 来实现的 [18]。此外，迄今为止，很少有研究证明基因突变体可以通过 KO 诱导抗病鱼种 [14]。相比之下，AMG 的整合作为提高鱼类对病原体抵抗力的手段是令人鼓舞的 [14,17]。消费者通常对转基因的了解相对较少，对转基因生物的态度比基因编辑生物更加消极 [62]，公众对转基因/基因编辑动物的抵制是阻碍它们进入市场的关键因素之一。此项实验让我们看到，*cathelicidin* 转基因的鲷不会对食品安全构成威胁，因为①即使生吃，肠道也会消化大多数蛋白质并使其失活；②由于烹饪使蛋白质变性，蛋白质在胃中被进一步消化，人体吸收的是氨基酸而不是活性蛋白质；③尽管基因序列在不同的生物中产生了变化，但人类经常消耗的编码氨基酸却只有 20 种。本着这一精神，我们向公众公开 *As-Cath* 转基因鱼具有的潜在利益和风险，以此来提高人们的关注度。

尽管如此，科学家和养殖户都需要充分认识到转基因鱼类可能会对环境和生态系统造成损害 [17]。通过基因组编辑实现的生殖不育长久以来受到了专家们的广泛关注，并为减少水产养殖中存在的环境风险问题提供了解决的思路 [62]。此外，一些有代表性的案例表明，通过敲除/破坏繁殖的相关基因，有望在模型鱼和养殖鱼中进行繁殖控制 [23,63–66]。最近，Qin 等 [19] 证明了繁殖阻断斑点叉尾鲷是不育个体，并且这种繁殖限制可以通过 LHRHa 的激素治疗进行治疗修复。此项研究中，与其他激素治疗相比， $1600 \text{ IU} \cdot \text{kg}^{-1}$ HCG 剂量加上 $50 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ LHRHa 能够使生殖力恢复到最高水平；然而，这种改善与 $1200 \text{ IU} \cdot \text{kg}^{-1}$ HCG 剂量的改善并没有显著的差异。值得注意的是，尽管 LHRHa 在同步产卵中的作用机制已被充分证实，但其在我们的 P_1 代转基因鱼中是否同样如野生型鱼那样必不可少，仍有待进一步研究。

本研究构建了靶向和非靶向 *As-Cath* 转基因斑点叉尾鲷。值得注意的是，在鱼类养殖中使用基因编辑/转基因时，生物安全至关重要。关键的安全问题包括通过使用先进测序的全基因组评估对脱靶效应进行全面分析。此外，评估遗传修饰在世代稳定性方面至关重要，需要通过跟踪后代来实现，以确保预期的变化能够持续存在，并且不会因为非靶基因座的变化而导致意外的生理或生化后果。此外，由于 AMG 转基因鱼产生 AMP 是其基因操作的一部

分，因此应充分研究其对宿主鱼健康的影响。这包括评估肽是否会影响鱼类的生长、免疫系统和整体健康。如果这些鱼将来要供人类食用，则需要进行全面的安全评估。这将涉及评估转基因鱼类的 AMP 或任何其他成分是否会对消费者的健康带来风险。同时，也应特别注意致敏性和对人类肠道微生物组产生的影响。

5. 结论

我们建立了一个通过表达 *cathelicidin* 蛋白表达增强对鱼类病原体的抵抗力、同时实现雌雄个体不育的斑点叉尾鲷品系。研究表明，通过 HA 或 ssODN 介导的 CRISPR/Cas9 系统在 *lh* 基因位点插入 *cathelicidin* 基因是一种生产兼具高抗病性和环境生物安全性不育的鱼类品系的有效策略。令人鼓舞的是，在繁殖相关基因位点的进行抗菌肽基因 (AMG) 的 CRISPR/Cas9 介导敲入，结合激素治疗，可以在其他商业鱼类中推广应用，从而增加利润并降低转基因个体逃逸所带来的环境风险。我们认为，基因组编辑工具应该作为现有育种技术的补充，而不是取代它们。因此，需要将基因组编辑和传统选择性育种技术相结合，最大限度地发挥其在水产领域应用中的潜力，并加快育种过程。总之，本研究让人们看到，使用 CRISPR/Cas9 工程在斑点叉尾鲷生殖相关的基因位点插入并过表达抗病肽是具有前景和潜力的，这将为减少水产养殖中长期存在的细菌和疾病问题带来科学的解决方案，同时也为降低环境风险提供了一种可行的策略。虽然繁殖能力可恢复，但与野生型相比数量还是有所减少，因此，如何通过激素治疗进一步恢复生育能力仍是一项重要课题，需深入研究和优选。

Acknowledgements

We thank Dr. Eric Peatman for providing the CFX96™ RealTime System. This project was partially supported by USDA Grant (2018-33522-28769), and Alabama Agricultural Experiment Station grant (AAES-AIR). Jinhai Wang was supported by a scholarship from the China Scholarship Council. Rhoda Mae C. Simora is based at the College of Fisheries and Ocean Sciences, University of the Philippines Visayas Miagao, Philippines.

Compliance with ethics guidelines

Jinhai Wang, Baofeng Su, De Xing, Timothy J.

Bruce, Shangjia Li, Logan Bern, Mei Shang, Andrew Johnson, Rhoda Mae C. Simora, Michael Coogan, Darshika U. Hettiarachchi, Wenwen Wang, Tasnuba Hasin, Jacob Al-Armanazi, Cuiyu Lu, and Rex A. Dunham declare that they have no conflict of interest or financial conflicts to disclose.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.eng.2023.12.005>.

References

- [1] Doudna JA, Charpentier E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science* 2014;346(6213):1258096.
- [2] Storici F, Snipe JR, Chan GK, Gordenin DA, Resnick MA. Conservative repair of a chromosomal double-strand break by single-strand DNA through two steps of annealing. *Mol Cell Biol* 2006;26(20):7645–57.
- [3] Chen F, Pruett-Miller SM, Huang Y, Gjoka M, Duda K, Taunton J, et al. High-frequency genome editing using ssDNA oligonucleotides with zinc-finger nucleases. *Nat Methods* 2011;8(9):753–5.
- [4] Wefers B, Meyer M, Ortiz O, de Angelis MH, Hansen J, Wurst W, et al. Direct production of mouse disease models by embryo microinjection of TALENs and oligodeoxynucleotides. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013;110(10):3782–7.
- [5] Yoshimi K, Kunihiro Y, Kaneko T, Nagahora H, Voigt B, Mashimo T. ssODN-mediated knock-in with CRISPR-Cas for large genomic regions in zygotes. *Nat Commun* 2016;7:10431.
- [6] Mehravar M, Shirazi A, Nazari M, Banan M. Mosaicism in CRISPR/Cas9-mediated genome editing. *Dev Biol* 2019;445(2):156–62.
- [7] Boel A, De Saffel H, Steyaert W, Callewaert B, De Paep A, Coucke PJ, et al. CRISPR/Cas9-mediated homology-directed repair by ssODNs in zebrafish induces complex mutational patterns resulting from genomic integration of repair-template fragments. *Dis Model Mech* 2018;11(10):dmm035352.
- [8] Hisano Y, Sakuma T, Nakade S, Ohga R, Ota S, Okamoto H, et al. Precise inframe integration of exogenous DNA mediated by CRISPR/Cas9 system in zebrafish. *Sci Rep* 2015;5:8841.
- [9] Zhang JP, Li XL, Li GH, Chen W, Arakaki C, Botimer GD, et al. Efficient precise knockin with a double cut HDR donor after CRISPR/Cas9-mediated double-stranded DNA cleavage. *Genome Biol* 2017;18:35.
- [10] Murakami Y, Ansai S, Yonemura A, Kinoshita M. An efficient system for homology-dependent targeted gene integration in medaka (*Oryzias latipes*). *Zoological Lett* 2017;3:10.
- [11] Ledford H. Salmon approval heralds rethink of transgenic animals. *Nature* 2015;527(7579):417–8.
- [12] Waltz E. First genetically engineered salmon sold in Canada. *Nature* 2017; 548(7666):148.
- [13] Japan embraces CRISPR-edited fish. *Nat Biotechnology* 2022;40:10.
- [14] Wang J, Su B, Dunham RA. Genome-wide identification of catfish antimicrobial peptides: a new perspective to enhance fish disease resistance. *Rev Aquacult* 2022;14(4):2002–22.
- [15] Xing D, Su B, Bangs M, Li S, Wang J, Bern L, et al. CRISPR/Cas9-mediated knock-in method can improve the expression and effect of transgene in P1 generation of channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Aquaculture* 2022; 560: 738531.
- [16] Xing D, Su B, Li S, Bangs M, Creamer D, Coogan M, et al. CRISPR/Cas9-mediated transgenesis of the Masu salmon (*Oncorhynchus masou*) *elovl2* gene improves n-3 fatty acid content in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Mar Biotechnol* 2022;24(3):513–23.
- [17] Dunham RA, Su B. Genetically Engineered Fish: Potential Impacts on Aquaculture, Biodiversity, and the Environment. In: Chaurasia A, Hawksworth DL, Pessoa de Miranda M, editors. *GMOs: Implications for Biodiversity Conservation and Ecological Processes*. Berlin: Springer International Publishing; 2020. p. 241–75.
- [18] Yang Z, Yu Y, Tay YX, Yue GH. Genome editing and its applications in genetic improvement in aquaculture. *Rev Aquacult* 2022;14(1):178–91.
- [19] Qin G, Qin Z, Lu C, Ye Z, Elawad A, Bangs M, et al. Gene editing of the catfish gonadotropin-releasing hormone gene and hormone therapy to control the reproduction in channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Biology* 2022; 11(5):649.
- [20] Grier HJ. Cellular organization of the testis and spermatogenesis in fishes. *Am Zool* 1981;21(2):345–57.
- [21] Yamaguchi Y, Nagata J, Nishimiya O, Kawasaki T, Hiramatsu N, Todo T. Molecular characterization of *fshb* and *lhb* subunits and their expression profiles in captive white-edged rockfish, *Sebastes taczanowskii*. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2021;261:111055.
- [22] Chu L, Li J, Liu Y, Hu W, Cheng CHK. Targeted gene disruption in zebrafish reveals noncanonical functions of LH signaling in reproduction. *Mol Endocrinol* 2014;28(11):1785–95.
- [23] Qin Z, Li Y, Su B, Cheng Q, Ye Z, Perera DA, et al. Editing of the luteinizing hormone gene to sterilize channel catfish, *Ictalurus punctatus*, using a modified zinc finger nuclease technology with electroporation. *Mar Biotechnol* 2016; 18(2):255–63.
- [24] Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 2006;124(4):783–801.
- [25] Wang G, Li X, Wang Z. APD3: the antimicrobial peptide database as a tool for research and education. *Nucleic Acids Res* 2016;44(D1):D1087–93.
- [26] Wang J, Wilson AE, Su B, Dunham RA. Functionality of dietary antimicrobial peptides in aquatic animal health: multiple meta-analyses. *Anim Nutr* 2023;12: 200–14.
- [27] Mookherjee N, Anderson MA, Haagsman HP, Davidson DJ. Antimicrobial host defence peptides: functions and clinical potential. *Nat Rev Drug Discov* 2020; 19(5):311–32.
- [28] Hilchie AL, Wuerth K, Hancock REW. Immune modulation by multifaceted cationic host defense (antimicrobial) peptides. *Nat Chem Biol* 2013; 9(12): 761–8.
- [29] Chen Y, Cai S, Qiao X, Wu M, Guo Z, Wang R, et al. As-CATH1-6, novel cathelicidins with potent antimicrobial and immunomodulatory properties from *Alligator sinensis*, play pivotal roles in host antimicrobial immune responses. *Biochem J* 2017;474(16):2861–85.
- [30] Simora RMC, Li SJ, Abass NY, Terhune JS, Dunham RA. Cathelicidins enhance protection of channel catfish, *Ictalurus punctatus*, and channel catfish ♀ × blue catfish, *Ictalurus furcatus* ♂ hybrid catfish against *Edwardsiella ictaluri* infection. *J Fish Dis* 2020;43(12):1553–62.
- [31] Simora RMC, Wang W, Coogan M, El Husseini N, Terhune JS, Dunham RA. Effectiveness of cathelicidin antimicrobial peptide against *Ictalurid* catfish bacterial pathogens. *J Aquat Anim Health* 2021;33(3):178–89.
- [32] Liu Z, Liu S, Yao J, Bao L, Zhang J, Li Y, et al. The channel catfish genome sequence provides insights into the evolution of scale formation in teleosts. *Nat Commun* 2016;7:11757.
- [33] Mosimann C, Kaufman CK, Li P, Pugach EK, Tamplin OJ, Zon LI. Ubiquitous transgene expression and Cre-based recombination driven by the ubiquitin promoter in zebrafish. *Development* 2011;138(1):169–77.
- [34] Bae S, Park J, Kim JS. Cas-OFFinder: a fast and versatile algorithm that searches for potential off-target sites of Cas9 RNA-guided endonucleases. *Bioinformatics* 2014;30(10):1473–5.
- [35] Elawad A, Khalil K, Ye Z, Liu Z, Liu S, Peatman E, et al. Effects of CRISPR/Cas9 dosage on TICAM1 and RBL gene mutation rate, embryonic development, hatchability and fry survival in channel catfish. *Sci Rep* 2018; 8: 16499.
- [36] Khalil K, Elayat M, Khalifa E, Daghash S, Elawad A, Miller M, et al. Generation of myostatin gene-edited channel catfish (*Ictalurus punctatus*) via zygote injection of CRISPR/Cas9 system. *Sci Rep* 2017;7:7301.
- [37] Armstrong JB, Malacinski GM. *Developmental Biology of the Axolotl*. New York City: Oxford University Press; 1989.
- [38] Qiu P, Shandilya H, D' Alessio JM, O' Connor K, Durocher J, Gerard GF. Mutation detection using SurveyorTM nuclease. *Biotechniques* 2004; 36(4): 702–7.
- [39] Coogan M, Alston V, Su B, Khalil K, Elawad A, Khan M, et al. CRISPR/Cas-9 induced knockout of myostatin gene improves growth and disease resistance in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Aquaculture* 2022;557: 738290.
- [40] Davis KB. Age at puberty of channel catfish, *Ictalurus punctatus*, controlled by thermoperiod. *Aquaculture* 2009;292(3–4):244–7.

- [41] Menchaca A, Dos Santos-Neto PC, Souza-Neves M, Cuadro F, Mulet AP, Tesson L, et al. Otoferrin gene editing in sheep via CRISPR-assisted ssODN-mediated homology directed repair. *Sci Rep* 2020;10(1):5995.
- [42] Kan Y, Ruis B, Takasugi T, Hendrickson EA. Mechanisms of precise genome editing using oligonucleotide donors. *Genome Res* 2017;27(7):1099–111.
- [43] Byrne SM, Ortiz L, Mali P, Aach J, Church GM. Multi-kilobase homozygous targeted gene replacement in human induced pluripotent stem cells. *Nucleic Acids Res* 2015;43(3):e21.
- [44] Simora RMC, Xing D, Bangs MR, Wang W, Ma X, Su B, et al. CRISPR/Cas9-mediated knock-in of alligator cathelicidin gene in a non-coding region of channel catfish genome. *Sci Rep* 2020;10(1):22271.
- [45] McGaw C, Garrity AJ, Munoz GZ, Haswell JR, Sengupta S, Keston-Smith E, et al. Engineered Cas12i2 is a versatile high-efficiency platform for therapeutic genome editing. *Nat Commun* 2022;13(1):2833.
- [46] Kelly JJ, Saeed-Marand M, Nyström NN, Evans MM, Chen Y, Martinez FM, et al. Safe harbor-targeted CRISPR-Cas9 homology-independent targeted integration for multimodality reporter gene-based cell tracking. *Sci Adv* 2021;7(4):eabc3791.
- [47] Wang C, Qu Y, Cheng JKW, Hughes NW, Zhang Q, Wang M, et al. dCas9-based gene editing for cleavage-free genomic knock-in of long sequences. *Nat Cell Biol* 2022;24(2):268–78.
- [48] Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc* 2013;8(11):2281–308.
- [49] Heigwer F, Kerr G, Boutros M. E-CRISP: fast CRISPR target site identification. *Nat Methods* 2014;11(2):122–3.
- [50] Zhang X, Tee LY, Wang X, Huang Q, Yang S. Off-target effects in CRISPR/Cas9-mediated genome engineering. *Mol Ther Nucleic Acids* 2015;4:e264.
- [51] Pattanayak V, Lin S, Guilinger JP, Ma E, Doudna JA, Liu DR. High-throughput profiling of off-target DNA cleavage reveals RNA-programmed Cas9 nuclease specificity. *Nat Biotechnol* 2013;31(9):839–43.
- [52] Cho SW, Kim S, Kim Y, Kweon J, Kim HS, Bae S, et al. Analysis of off-target effects of CRISPR/Cas-derived RNA-guided endonucleases and nickases. *Genome Res* 2014;24(1):132–41.
- [53] Shen B, Zhang J, Wu H, Wang J, Ma K, Li Z, et al. Generation of gene-modified mice via Cas9/RNA-mediated gene targeting. *Cell Res* 2013;23(5):720–3.
- [54] Iyer V, Shen B, Zhang W, Hodgkins A, Keane T, Huang X, et al. Off-target mutations are rare in Cas9-modified mice. *Nat Methods* 2015;12(6):479.
- [55] Wang T, Wei JJ, Sabatini DM, Lander ES. Genetic screens in human cells using the CRISPR-Cas9 system. *Science* 2014;343(6166):80–4.
- [56] Li D, Qiu Z, Shao Y, Chen Y, Guan Y, Liu M, et al. Heritable gene targeting in the mouse and rat using a CRISPR-Cas system. *Nat Biotechnol* 2013;31(8):681–3.
- [57] Li W, Teng F, Li T, Zhou Q. Simultaneous generation and germline transmission of multiple gene mutations in rat using CRISPR-Cas systems. *Nat Biotechnol* 2013;31(8):684–6.
- [58] Oliver D, Yuan S, McSwiggin H, Yan W. Pervasive genotypic mosaicism in founder mice derived from genome editing through pronuclear injection. *PLoS One* 2015;10(6):e0129457.
- [59] Raveux A, Vandormael-Pourmin S, Cohen-Tannoudji M. Optimization of the production of knock-in alleles by CRISPR/Cas9 microinjection into the mouse zygote. *Sci Rep* 2017;7:42661.
- [60] Jao LE, Wente SR, Chen W. Efficient multiplex biallelic zebrafish genome editing using a CRISPR nuclease system. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013;110(34):13904–9.
- [61] Auer TO, Duroure K, De Cian A, Concordet JP, Del Bene F. Highly efficient CRISPR/Cas9-mediated knock-in in zebrafish by homology-independent DNA repair. *Genome Res* 2014;24(1):142–53.
- [62] Hallerman EM, Dunham R, Houston RD, Walton M, Wargelius A, Wray-Cahen D. Towards production of genome-edited aquaculture species. *Rev Aquac* 2022;15(2):404–8.
- [63] Wargelius A, Leininger S, Skafnesmo KO, Kleppe L, Andersson E, Taranger GL, et al. *Dnd* knockout ablates germ cells and demonstrates germ cell independent sex differentiation in Atlantic salmon. *Sci Rep* 2016;6:21284.
- [64] Gay S, Bugeon J, Bouchareb A, Henry L, Delahaye C, Legeai F, et al. MiR-202 controls female fecundity by regulating medaka oogenesis. *PLoS Genet* 2018;14(9):e1007593.
- [65] Su B, Peatman E, Shang M, Thresher R, Grewe P, Patil JG, et al. Expression and knockdown of primordial germ cell genes, *vasa*, *nanos* and *dead end* in common carp (*Cyprinus carpio*) embryos for transgenic sterilization and reduced sexual maturity. *Aquaculture* 2014;420:S72–84.
- [66] Su B, Shang M, Grewe PM, Patil JG, Peatman E, Perera DA, et al. Suppression and restoration of primordial germ cell marker gene expression in channel catfish, *Ictalurus punctatus*, using knockdown constructs regulated by copper transport protein gene promoters: Potential for reversible transgenic sterilization. *Theriogenology* 2015;84(9):1499–512.