



## 利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术探究团头鲂 *mdh* 基因功能

郭丹丹, 郑国栋, 陈杰, 邹曙明\*

(上海海洋大学, 农业农村部团头鲂遗传育种中心, 农业农村部淡水水产种质资源重点实验室, 水产科学国家级实验教学示范中心, 上海 201306)

**摘要:** 苹果酸脱氢酶基因 (*mdh*) 与肌肉的生长密切相关, 可以通过影响骨骼肌的能量代谢来调节肌纤维的生长及类型转化, 为探索 *mdh* 基因在团头鲂中的功能及作用, 实验利用 CRISPR/Cas9 技术对团头鲂 *mdh* 进行敲除, 并对敲除突变体的表型及基因表达变化进行了研究。结果显示, CRISPR/Cas9 可成功应用于团头鲂 *mdh* 基因的敲除, 与对照组相比, 敲除突变体个体大小明显小于对照组, 生长性状数据显示, 其体重、体长均发生显著变化。qPCR 结果显示, 敲除突变体中 *mdh* 的表达水平显著低于对照组, 同时, 在敲除突变体中, 生肌决定因子及肌纤维类型因子基因 *MyoG*、*MyHC II a* 的表达水平随着 *mdh* 表达水平的下降显著降低, 而 *MyHC II b* 的表达未发生显著变化。研究表明, CRISPR/Cas9 可用于团头鲂基因的高效、快速编辑, 也证明 *mdh* 基因敲除后可能会抑制团头鲂的生长, 在团头鲂的生长过程中起着促进作用。这一研究结果为团头鲂的生长性状研究提供了一定的理论基础, 有利于 *mdh* 基因在团头鲂分子育种中的合理应用。

**关键词:** 团头鲂; 基因敲除; CRISPR/Cas9; *mdh*; 肌肉生长

**中图分类号:** S 965.119

**文献标志码:** A

反向遗传学是通过核酸序列的突变、插入、缺失等方式改变已知基因序列, 从而创造突变体并对其造成的表型进行研究。基因敲除 (gene knock-out) 是一种重要的反向遗传学研究方法, 又称同源重组技术, 目前主要包括锌指核酸酶技术 (zinc finger nuclease, ZFNs)、转录激活子样效应子核酸酶技术 (transcription activator-like effector nuclease, TALEN) 和 CRISPR/Cas9 3 大类。CRISPR 是一个特殊的 DNA 重复序列家族, 其酶切位点通常由高度保守的重复序列组成, 重复序列之间被间隔序列隔开, 这些间隔序列是 CRISPR 与靶基因进行识别的标记。Cas9 存在于 CRISPR 序列附近, 是一种双链 DNA 核酸酶, 能在 sgRNA (small

guide RNA) 引导下对靶位点邻近的 PAM (protospacer adjacent motif) 序列进行识别并在其附近切割<sup>[1]</sup>。相较于其他两种敲除技术, CRISPR/Cas9 操作简单且敲除率高, 仅需要 gRNA 的介导和 Cas9 蛋白的切割就可以实现对目标基因的编辑, 因此广受科研工作者的青睐。目前该技术已成功应用于斑马鱼 (*Danio rerio*)、尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) 等基因组修饰。蔡畅等<sup>[2]</sup>利用 CRISPR/Cas9 技术对斑马鱼 *hae3* 基因进行敲除, 获得了 *hae3* 基因缺失的杂合突变体, 对缺失 *hae3* 基因的斑马鱼和对照组斑马鱼同时进行固蓝染色, 发现与对照组相比, 实验组斑马鱼血红蛋白含量明显下降。李明辉<sup>[3]</sup>利用 CRISPR/Cas9 基因敲除技术

收稿日期: 2019-12-09 修回日期: 2020-02-12

资助项目: 国家自然科学基金 (31272633, 31201760, 31572220); 上海高校知识服务平台 (ZF1206); 上海地方高校能力建设规划 (18050501900)

第一作者: 郭丹丹 (照片), 从事鱼类遗传育种研究, E-mail: [hmgudandan@163.com](mailto:hmgudandan@163.com)

通信作者: 邹曙明, 从事鱼类遗传育种研究, E-mail: [smzou@shou.edu.cn](mailto:smzou@shou.edu.cn)





和最后一个外显子上。

目的基因靶点敲除后, 需对实验鱼进行靶点序列扩增及酶切检测。在靶点两端设计扩增引物时应满足的条件: 上下游引物与靶点的距离 (a, b) 都大于 100 bp 且  $|a - b| > 100$  bp; PCR 扩增产物最好不要超过 500 bp; 电泳条带单一且明亮<sup>[13]</sup>。

#### 1.4 gRNA 的合成与制备

根据目的基因靶点序列设计 gRNA 合成的上下游引物, 其中上游引物为 T7-target-sfd, 由 T7 启动子、目标靶点及 scaffold 特异序列组成, 下游引物为 tracr rev。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。gRNA 制备时以 pMD19-gRNA scaffold 质粒(本实验室保存)为模板, 由引物对 T7-target-sfd、tracr rev 经高保真酶(HIF enzyme Mix, NEB)PCR 扩增、纯化、体外转录获得。PCR 反应体系: HIF enzyme Mix 25  $\mu$ L, 上下游引物各 1  $\mu$ L, pMD19-gRNA scaffold 质粒 100 ng (0.3  $\mu$ L), DEPC 水 22.7  $\mu$ L。反应条件: 98  $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 98  $^{\circ}$ C 变性 30 s, 66.4  $^{\circ}$ C 退火 15 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 30 个循环; 最后 72  $^{\circ}$ C 延伸 5 min。PCR 产物经纯化试剂盒 (DNA-Clean up Kit, Epi- gentek Group Inc. 美国) 回收后得到高纯度的 DNA, 经 T7 体外转录试剂盒 (mMESSAGE mMACHINE T7 Ultra Kit, Thermo Fisher, 美国) 转录成线性 gRNA。用琼脂糖凝胶电泳和 NanoDrop 分光光度计 (ALLSHENG, 中国) 测定 gRNA 的浓度及质量。

#### 1.5 团头鲂 *mdh* 基因靶点敲除及 F<sub>0</sub> 敲除突变体的筛选

选择发育良好的亲本进行人工授精, 获得团头鲂胚胎。室温下, 待胚胎发育至 1~2 细胞期, 按照一定比例混合并注射 gRNA (100 ng/ $\mu$ L) 和 Cas9 蛋白 (900 ng/ $\mu$ L) (NLS-Cas9-NLS Nuclease, GenCrispr, 美国)。注射 48 h 后, 随机选取 25 个发育正常的胚胎, 除去卵膜, 用碱裂法提取基因组 DNA, PCR 扩增获得靶点及附近 DNA 序列。经 T7 核酸内切酶 I (T7 endonuclease I, T7EI, GenCrispr) 酶切后, 琼脂糖凝胶电泳检测敲除效率。选择敲除效率最高的靶点进行后续的敲除实验。胚胎出膜、平游后放入体积为 24 t 的孵化池孵育并记录放出苗数量。同批次正常鱼苗作为对照组, 孵育期间每天喂食 2 次。

孵化 90 d 后对 F<sub>0</sub> 进行敲除突变体的筛选。首先, 剪取敲除 F<sub>0</sub> 团头鲂幼鱼的鳍, 放于无水乙

醇中保存。采用碱裂法提取基因组 DNA, 检测引物扩增靶点及附近序列后, 利用 T7EI 进行酶切, 经琼脂糖凝胶电泳检测出突变条带后进行潜在突变体 DNA 的测序。同时与对照组序列进行比对, 筛选出突变体。

#### 1.6 实时荧光定量 PCR (qPCR) 分析

在敲除突变体及对照组中各随机选取 3 个个 体分别提取肌肉组织 RNA 进行 qPCR 分析。首先, 用 TRIzol 试剂盒 (Invitrogen, 美国) 提取各样本的肌肉组织总 RNA, DNase 处理后, 用反转录试剂盒 (RNA PCR Kit, TaKaRa, 日本) 反转录出 cDNA。利用 SYBR Green Premix Ex Taq (TaKaRa, 日本) 在 CFX96 Touch™ real-time PCR 荧光定量仪 (BioRad, 美国) 进行 qPCR 扩增。引物分别为 *mdh*-qRT-F/-R、*MyoG*-qRT-F/-R、*MyHC II a*-qRT-F/-R、*MyHC II b*-qRT-F/-R 和 18S-qRT-F/-R(表 1)。以 18S *rRNA* 为参照基因, 采用 C<sub>t</sub> 法进行相对定量分析, 公式为  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ , 其中  $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t(\text{treated gene}) - \Delta C_t(\text{control})$ ,  $\Delta C_t = C_t(\text{target gene}) - C_t(\text{reference gene})$ <sup>[14-15]</sup>。qPCR 所得数据用平均值  $\pm$  标准差表示。组织表达差异显著性采用 *t* 检验的方法进行分析, \*代表  $P < 0.05$ , \*\*代表  $P < 0.01$ 。

## 2 结果

### 2.1 团头鲂 *mdh* 基因序列同源性分析

团头鲂 *mdh* 基因总长 14 189 bp, 共有 9 个外显子, 编码 333 个氨基酸。将团头鲂、斑马鱼、草鱼以及人的 *mdh* 编码的氨基酸序列进行比对, 结果显示, 团头鲂与其他 3 个物种的序列相似性非常高, 均有一个 MDH 结构域, 结构域几乎包含整个开放阅读框 (open reading frame, ORF), 且结构域上分布着 NAD、Malate 等功能结合位点(图 2)。Pymol 预测的蛋白模型显示, 团头鲂、斑马鱼、草鱼以及人的 MDH 蛋白二级结构也非常相似, 主要由  $\alpha$  螺旋和无规则卷曲组成(图 3)。

### 2.2 团头鲂 *mdh* 基因 Cas9 靶点选择及靶点序列扩增

相较于 SP6 启动子, T7 启动子只要求转录起始位点的前 2 位, 这类靶点的选择范围更广, 所以本研究选择设计 T7 方向的靶点。经网站设计 (I 类靶点) 及人工选择 (II 类靶点) 的靶点共有 10 个, 既有正义链上的也有反义链上的。NCBI

表 1 本研究中所使用的引物序列  
Tab. 1 Primer sequences used in this study

Table with 3 columns: 引物名称/primer name, 序列/primer sequence (5'-3'), 用途/application. Lists various primers for mdh, MyoG, and MyHC II genes in different species.

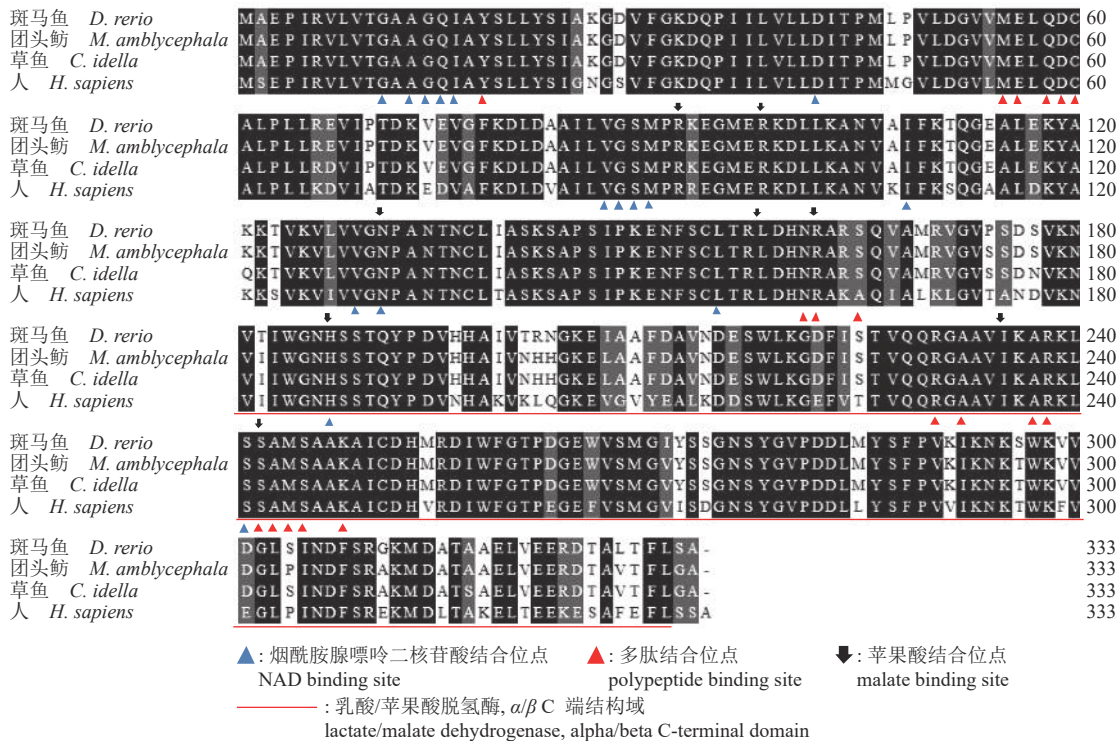


图 2 团头鲂、斑马鱼、草鱼及人 mdh 基因编码氨基酸序列比对

Fig. 2 Alignment of M. amblycephala mdh amino acid sequences with D. rerio, C. idella and H. sapiens

(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/) Blast 比对靶点序列, 确定靶点是否具有唯一性. 经筛选及突变率检测, 最终选择出 1 个目标靶点, 位于第四外显子上 (图 4), 靶点序列为 mdh: GGACCTTGATGCTGC

CATCT. 以正常团头鲂基因组 DNA 为模板, 引物对 mdh-F/-R(表 1) 扩增目标靶点及附近 DNA 序列, 筛选出引物最适退火温度, 琼脂糖凝胶电泳结果表现出单一且明亮的条带, 可用于后期敲除

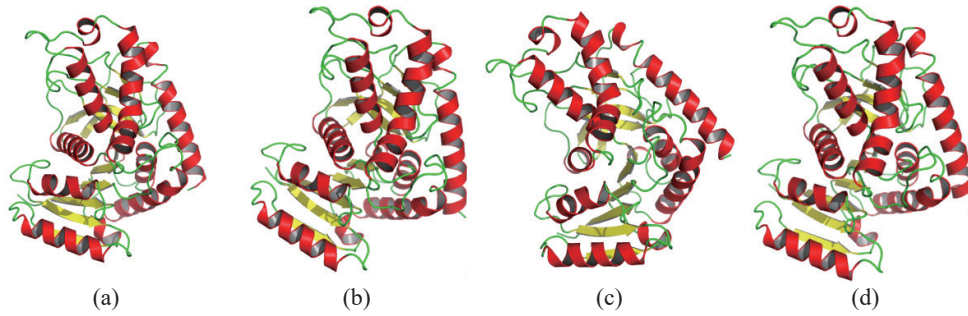


图3 团头鲂、斑马鱼、草鱼及人 MDH 蛋白二级结构预测

(a) 团头鲂, (b) 斑马鱼, (c) 草鱼, (d) 人。

Fig. 3 Predicted secondary structure of MDH in *M. amblycephala*, *D. rerio*, *C. idella* and *H. sapiens*

(a) *M. amblycephala*, (b) *D. rerio*, (c) *C. idella*, (d) *H. sapiens*.

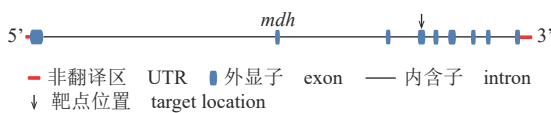


图4 团头鲂 *mdh* 基因敲除靶点位置

Fig. 4 Target location of the *mdh* gene knock-out system in *M. amblycephala*

突变体的鉴定。

### 2.3 团头鲂 *mdh* 基因靶点敲除及 F<sub>0</sub> 敲除突变体的筛选

鱼苗孵化 90 d 后, 对敲除 F<sub>0</sub> 进行潜在突变体的检测。首先, 提取基因组 DNA, 检测引物扩增靶点及附近 DNA 序列后, 用 T7EI 酶切, 经琼脂糖凝胶电泳检测到突变条带 (图 5)。随后进行潜在突变体 DNA 的测序, 潜在突变体部分靶序列变化见表 2。在注射的 385 尾鱼中, 共有 112 尾在靶位点发生了不同类型的突变, 突变效率为 29%。

### 2.4 敲除突变体表型及 *mdh*、*MyoG*、*MyHC II a*、*MyHC II b* 的基因表达分析

孵化 90 d 后, 随机选取敲除突变体及对照组团头鲂个体进行生长相关性状 (体长、体高、体宽和体重) 的测量。根据测量数据显示, 敲除突变体各性状指标明显小于对照组个体, 其中体重和体长变化显著, 表明敲除 *mdh* 基因可能会抑制团头鲂的生长, 其在团头鲂的生长过程中起着促进作用 (图 6)。

为探究团头鲂 *mdh* 基因在肌肉生长发育中的作用, 实验通过 qPCR 测定了其在正常团头鲂及敲除突变体肌肉组织中的表达水平。同时, 还测定了生肌决定因子及肌纤维类型因子 *MyoG*、*MyHC II a*、*MyHC II b* 的表达变化。经分析发现,

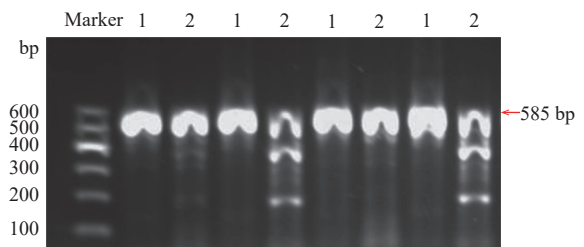


图5 PCR 产物酶切检测

1. PCR 产物条带; 2. PCR 产物酶切后条带。

Fig. 5 Enzyme digestion analysis of PCR products

1. electrophoresis bands of PCR products; 2. electrophoresis bands of PCR products by enzyme digestion.

表 2 团头鲂 *mdh* 基因敲除突变体靶序列变化  
Tab. 2 Changes in target sequence of *mdh* gene knock-out mutants of *M. amblycephala*

序列名称 sequence name	靶点序列 sequence (5'-3')
靶点序列 target sequence	GGACCTTGATGCTGCCATCT
反向互补序列 reverse complement	AGATGGCAGCATCAAGGTCC
对照组 control group	AGATGGCAGCATCAAGGTCC
突变体1 mutant # 1	AGATGGCCTCGTCA <sup>C</sup> CGTCC
突变体2 mutant # 2	AGATGGCAGCATC <sup>CC</sup> GG <sup>CCC</sup>
突变体3 mutant # 3	AGATGGCAGCATC <sup>CC</sup> GGTCC
突变体4 mutant # 4	AGA <sup>G</sup> GGCAGCATCAGGGTCC
突变体5 mutant # 5	AGA <sup>G</sup> GGCAGCATCA <sup>G</sup> GGTCC

注: 红色字母表示突变位点。

Notes: The red letters indicates the mutation site.

在突变体中, *mdh* 的表达水平显著低于对照组 ( $P < 0.05$ ), 且在突变体中随着 *mdh* 基因表达水平的下降, *MyoG*、*MyHC II a* 也显著降低 ( $P < 0.01$ ), 而

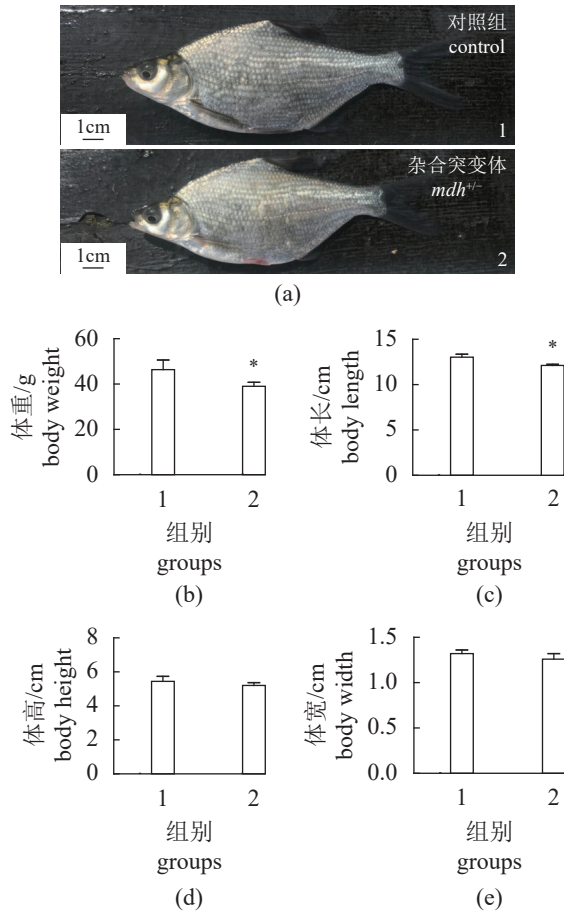


图6 团头鲂 *mdh* 基因敲除突变体及对照组个体表型比较

(a) 对照组与突变体 *mdh*<sup>+/+</sup> 体型比较, (b)~(e) 突变体 *mdh*<sup>+/+</sup> 与对照组生长相关性状比较; 1. 对照组, 2. 突变体 *mdh*<sup>+/+</sup>; \*  $P < 0.05$ 。

Fig. 6 Phenotype comparison between *mdh*<sup>+/+</sup> and control group in *M. amblycephala*

(a) size comparison of *mdh*<sup>+/+</sup> and control group, (b)~(e) comparison of growth-related traits between *mdh*<sup>+/+</sup> and control group; 1. control group, 2. *mdh*<sup>+/+</sup>;  $P < 0.05$ 。

*MyHC II b* 的表达并没有发生显著变化 (图7)。

### 3 讨论

CRISPR/Cas9 是一种简单、快速、高效的基因编辑技术, 本研究首次采用 CRISPR/Cas9 在团头鲂中实现了 *mdh* 基因的靶向敲除, 并获得了突变体 F<sub>0</sub>。本研究结果显示, 在 F<sub>0</sub> 中, *mdh* 敲除突变体产生了明显的表型差异, 与对照组相比, 敲除突变体的个体明显变小, 生长性状数据测量显示, 其体重和体长变化显著, 但其遗传稳定性尚不确定, 待 F<sub>0</sub> 性成熟后还需对其自交获得的 F<sub>1</sub> 及 F<sub>2</sub> 进行表型、基因及遗传稳定性等方面的研究。这种体型的变化表明 *mdh* 在团头鲂的生长过程中

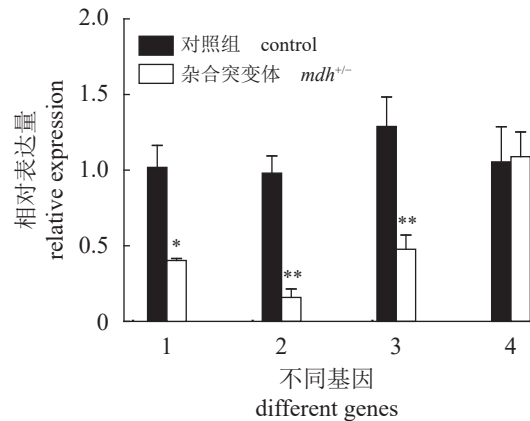


图7 团头鲂 *mdh*、*MyoG*、*MyHC II a*、*MyHC II b* 在肌肉组织中的表达分析

Fig. 7 qPCR analysis of *mdh*, *MyoG*, *MyHC II a* and *MyHC II b* in the muscle of *M. amblycephala*

1. *mdh*, 2. *MyoG*, 3. *MyHC II a*, 4. *MyHC II b*; \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ 。

起着促进作用。序列分析结果显示, *mdh* 在团头鲂、斑马鱼、草鱼及人中非常保守, 这也预示着其功能也具有很强的保守性。已知有多种转录因子调节肌肉生长发育基因表达。在这些因素中, 生肌调控因子家族 MRFs (*myogenin*、*MyoD*、*Myf5* 和 *MRF4*) 尤为重要, 在肌肉发育中起正调控作用<sup>[16-18]</sup>。*MyoG* 是一种肌肉特异性、碱性的螺旋-环-螺旋转录因子, 作为 *MyoD*、*Myf5* 的下游表达基因, 在肌细胞分化过程中起着中心调节作用, 调控成肌细胞融合为肌纤维, 直接影响着肌肉的形成<sup>[19-25]</sup>。已有研究表明, *MyoG* 会促进 *mdh* 基因的表达, 同时, *mdh* 又可促进 *MyoG* 基因的表达, 进而调控肌肉的生长<sup>[26]</sup>。因此, 推测 *mdh* 是作为 *MyoG* 的正调控因子发挥作用的, 在肌肉的生长调控中参与氧化能量代谢, 敲除后 *mdh* 基因表达不足, 导致 *MyoG* 的表达下降, 肌纤维合成受阻, 从而抑制了肌肉的生长。

在肌肉的生长过程中, 肌纤维的类型会不断转变。根据肌纤维代谢类型及所含酶系等的不同, 肌纤维可分为 4 类: I 型 (慢速氧化型肌纤维)、II a 型 (快速氧化型)、II x 型 (中间型)、II b 型 (快速酵解型)。II a 型肌纤维中氧化代谢酶的活性较高, 糖酵解酶活性较低, 而 II b 型肌纤维中的酶系却相反。MDH 是参与氧化能量的酶, 在氧化型肌纤维 (MyHC II a) 中含量最高, 在糖酵解型肌纤维 (MyHC II b) 中最低, 参与肌肉发生中肌纤维类型的调节, 促进向氧化型肌纤维的转变<sup>[7-8]</sup>。有研究在正常成年小鼠 (*Mus musculus*) 的糖酵解纤维中过表达 *MyoG* 后, 导致肌肉代谢向氧化作用更

强, 糖酵解代谢更少的类型转变<sup>[27]</sup>。在肌纤维类型调节方面, *mdh* 与 *MyoG* 的作用是一致的, 这也反映了二者的正调控作用。为探究团头鲂 *mdh* 与肌肉调节因子及肌纤维类型的关系, 实验通过 qPCR 测定了 *MyoG*、*MyHC II a*、*MyHC II b* 的表达变化。结果显示, 在敲除突变体中, 随着 *mdh* 表达水平的下降, *MyoG*、*MyHC II a* 显著降低, 而 *MyHC II b* 的表达无显著变化。进一步证明了团头鲂 *mdh* 在肌肉调节因子表达及肌纤维类型转化方面的影响。

当前, 脊椎动物中大量的肌肉生长相关基因已经在团头鲂中进行了研究, 但大多数报道仅仅从他们的表达水平进行了功能的初步推测。本实验通过 CRISPR/Cas9 技术在团头鲂中进行了 *mdh* 基因的靶向敲除, 获得了 *mdh* 基因功能缺失杂合突变体, 从缺失功能方面对肌肉生长的分子机制进行了研究。鱼类的生长极其复杂, 由多个基因共同调节, 关于生长相关研究遍及整个基因组的数百个基因, 一方面, 本研究为硬骨鱼类肌肉生长发育研究增添了一定的研究线索, 有助于其分子机制的研究; 另一方面, 可为选育具有生长优势的团头鲂优良品系提供理论依据和支持, 有利于 *mdh* 基因在生长优势群体选育方面的合理应用。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

### 参考文献 (References):

- [1] Bassett A R, Liu J L. CRISPR/Cas9 and genome editing in *Drosophila*[J]. *Journal of Genetics and Genomics*, 2014, 41(1): 7-19.
- [2] 蔡畅, 王丛丛, 吴智超, 等. Cas9-CRISPR敲除*hae3*基因对斑马鱼血红蛋白生成的影响[J]. 大连海洋大学学报, 2015, 30(6): 573-579.
- Cai C, Wang C C, Wu Z C, et al. Effect of knocking out *hae3* gene using Cas9-CRISPR on hemoglobin of zebrafish *Danio rerio*[J]. *Journal of Dalian Fisheries University*, 2015, 30(6): 573-579 (in Chinese).
- [3] 李明辉. 罗非鱼基因敲除技术的建立及其在性别决定与分化研究中的应用 [D]. 重庆: 西南大学, 2014.
- Li M H. Establishment of TALENs and CRISPR/Cas9 in tilapia and their applications on sex determination and differentiation[D]. Chongqing: Southwest University, 2014 (in Chinese).
- [4] Guan H Y, Tang Z Q, Li H. Correlation analysis between single-nucleotide polymorphism of malate dehydrogenase gene 5'-flanking region and growth and body composition traits in chicken[J]. *Acta Genetica Sinica*, 2006, 33(6): 501-506.
- [5] Gibala M J, Young M E, Taegtmeier H. Anaplerosis of the citric acid cycle: role in energy metabolism of heart and skeletal muscle[J]. *Acta Physiologica Scandinavica*, 2000, 168(4): 657-665.
- [6] Lin C S, Hsu C W. Differentially transcribed genes in skeletal muscle of Duroc and Taoyuan pigs[J]. *Journal of Animal Science*, 2005, 83(9): 2075-2086.
- [7] 路畅. *Dmrt2a* 和 *igf2bp1* 在斑马鱼胚胎发育中的功能研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2017.
- Lu C. Functional analysis of *dmrt2a* and *igf2bp1* during zebrafish embryo development[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2017 (in Chinese).
- [8] 徐娥. *CNR1* 基因的表达对肌纤维类型的影响及其机制研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2012.
- Xu E. Effect and mechanism of the *CNR1* gene expression on muscle fiber types[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2012 (in Chinese).
- [9] Li S F, Zou S M, Cai W Q, et al. Production of inter-ploid triploids by  $4n \times 2n$  blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*. Yih) and their first performance data[J]. *Aquaculture Research*, 2006, 37(4): 374-379.
- [10] Zou S M, Li S F, Cai W Q, et al. Establishment of fertile tetraploid population of blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*)[J]. *Aquaculture*, 2004, 238(1-4): 155-164.
- [11] 农业部渔业渔政管理局, 全国水产技术推广总站, 中国水产学会. 中国渔业统计年鉴 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2009.
- Bureau of Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, National Fisheries Technology Extension Center, China Society of Fisheries. China fishery statistical year book[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2019 (in Chinese).
- [12] Jeon Y S, Lee K, Park S C, et al. EzEditor: a versatile sequence alignment editor for both rRNA- and protein-coding genes[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2014, 64(2): 689-691.
- [13] Ran F A, Hsu P D, Wright J, et al. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system[J]. *Nature Protocols*, 2013, 8(11): 2281-2308.

- [14] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [15] Guo D D, Guan W Z, Sun Y W, *et al.* Comparative expression and regulation of duplicated fibroblast growth factor 1 genes in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2017, 240: 61-68.
- [16] Lassar A B, Davis R L, Wright W E, *et al.* Functional activity of myogenic HLH proteins requires hetero-oligomerization with E12/E47-like proteins in vivo[J]. *Cell*, 1991, 66(2): 305-315.
- [17] Ludolph D C, Konieczny S F. Transcription factor families: muscling in on the myogenic program[J]. *The FASEB Journal*, 1995, 9(15): 1595-1640.
- [18] Moresi V, Williams A H, Meadows E, *et al.* *Myogenin* and class II HDACs control neurogenic muscle atrophy by inducing E3 ubiquitin ligases[J]. *Cell*, 2010, 143(1): 35-45.
- [19] Molkenin J D, Olson E N. Defining the regulatory networks for muscle development[J]. *Current Opinion in Genetics & Development*, 1996, 6(4): 445-453.
- [20] Weintraub H. The *MyoD* family and myogenesis: redundancy, networks, and thresholds[J]. *Cell*, 1993, 75(7): 1241-1244.
- [21] Rescan P Y. Muscle growth patterns and regulation during fish ontogeny[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2005, 142(1-2): 111-116.
- [22] 刘永斌, 邓凤, 王峰, 等. 肌细胞生成素基因的研究进展 [C]//全国养羊生产与学术研讨会论文集, 2006: 87-88.
- Liu Y B, Deng F, Wang F. Research Progress of *Myogenin* gene[C]//National sheep production and Academic Seminar, 2006: 87-88 (in Chinese).
- [23] Wright W E, Sassoon D A, Lin V K. *Myogenin*, a factor regulating myogenesis, has a domain homologous to *MyoD*[J]. *Cell*, 1989, 56(4): 607-617.
- [24] Hasty P, Bradley A, Morris J H, *et al.* Muscle deficiency and neonatal death in mice with a targeted mutation in the *myogenin* gene[J]. *Nature*, 1993, 364(6437): 501-506.
- [25] 郑江, 邓忠良. *Pax7*对肌肉形成作用的研究进展[J]. *重庆医科大学学报*, 2007, 32(6): 667-669.
- Zheng J, Deng Z L. Advances in the study of the effects of *pax7* on muscle formation[J]. *Journal of Chongqing Medical University*, 2007, 32(6): 667-669 (in Chinese).
- [26] 徐瑶. 黄牛 *Myf5*、*Pax7* 基因的克隆、多态性检测及其遗传效应分析 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2011.
- Xu Y. Cloning, polymorphisms detection of *Myf5* and *Pax7* genes and the analysis of genetic effects on cattle[D]. Yangling: Northwest A & F University, 2011 (in Chinese).
- [27] Ekmark M, Gronevik E, Schjerling P, *et al.* *Myogenin* induces higher oxidative capacity in pre-existing mouse muscle fibres after somatic DNA transfer[J]. *The Journal of Physiology*, 2003, 548(1): 259-269.



## Functional analysis of *mdh* by CRISPR/Cas9 in blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*)

GUO Dandan, ZHENG Guodong, CHEN Jie, ZOU Shuming\*

(Genetics and Breeding Center for Blunt Snout Bream, Key Laboratory of Freshwater Aquatic Genetic Resources,  
Ministry of Agriculture and Rural Affairs, National Demonstration center for Experimental Fisheries Science Education,  
Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

**Abstract:** Malate dehydrogenase gene (*mdh*) is closely associated with muscle growth, regulating muscle fiber growth and type transformation by influencing skeletal muscle energy metabolism. This study aimed to investigate the function and role of *mdh* in *Megalobrama amblycephala* by using CRISPR/Cas9 to knock-out the *mdh* and examining the phenotype and gene expression in the resulting mutants. The findings demonstrated that CRISPR/Cas9 can effectively knock-out *mdh* in *M. amblycephala*, with mutants exhibiting significant phenotypic differences from the control group. Mutants were notably smaller, with reduced body weight, length, height and width compared to controls. qPCR results showed that the expression level of *mdh* in the mutant individuals was significantly lower than that in the control group. In addition, the expression of *MyoG*, *MyHC II a* decreased significantly in mutants with reduced *mdh*, while *MyHC II b* showed no significant change. All the results suggest that CRISPR/Cas9 can be used for efficient and rapid gene editing. It also proved that the *mdh* gene may play a promoting role in the growth of muscle in *M. amblycephala*, and the knock-out of *mdh* will inhibit the growth. The results of this study provide a certain theoretical value for the study of growth traits, which is conducive to the rational application of *mdh* in molecular breeding of *M. amblycephala*.

**Key words:** *Megalobrama amblycephala*; gene knock-out; CRISPR/Cas9; *mdh*; muscle growth

**Corresponding author:** ZOU Shuming. E-mail: [smzou@shou.edu.cn](mailto:smzou@shou.edu.cn)

**Funding projects:** National Natural Science Foundation of China (31272633, 31201760, 31572220); Shanghai University Knowledge Service Platform (ZF1206); Capacity Building Plan of Shanghai Local Colleges and Universities (18050501900)