

Sun Q J, Wang B K, Xiao Z Y, *et al.* Construction of fish without intermuscular bones based on cytosine base editing system [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2025, 49(12): 122504. [孙秋洁, 王博凯, 肖正雨, 等. 基于胞嘧啶碱基编辑系统构建无肌间刺鱼类品系 [J]. 水生生物学报, 2025, 49(12): 122504.]

基于胞嘧啶碱基编辑系统构建无肌间刺鱼类品系

孙秋洁¹ 王博凯¹ 肖正雨¹ 徐天宏² 王文秀¹ 汪 垚¹ 高泽霞^{1,3,4} 聂春红^{1,3}

(1. 华中农业大学水产学院, 农业农村部淡水生物繁育重点实验室/长江经济带大宗水生生物产业绿色发展教育部工程研究中心, 武汉 430070; 2. 上海贝斯昂生物科技有限公司, 上海 200120; 3. 湖北洪山实验室, 武汉 430070; 4. 湖北省名优鱼育种与健康养殖工程技术研究中心, 武汉 430070)

摘要: 为验证一种高度特异性的新型CBE在鱼类中的应用效果, 研究以调控鱼类肌间刺形成的关键基因 *runx2b* 为目的基因, 在斑马鱼上探讨其对构建的单碱基突变品系的编辑效率、表型和相关基因表达等方面的影响。结果表明F₀代的编辑效率达60%, 突变体的肌间刺数量减少约55%, 且其自交繁殖产生的F₁代仅有杂合子和纯合子的存在, 纯合比例达70%以上, 纯合子的肌间刺全部缺失且可稳定遗传。Western Blot蛋白表达结果显示Runx2b蛋白在突变体内不表达, RT-qPCR定量结果也显示成骨分化和矿化相关基因(*entpd5a*、*sp7*和*alpl*)表达在突变体中显著降低。研究表明CBE在鱼类上具有较高的编辑效率, 可有效编辑斑马鱼*runx2b*基因, 获得无肌间刺表型, 缩短获得纯合突变品系的世代时间, 为鱼类高效精准的基因编辑育种提供了新的途径。

关键词: CBE; 肌间刺; *runx2b*; 编辑效率; 基因表达; 斑马鱼

中图分类号: Q784 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2025)12-122504-07

doi: 10.3724/1000-3207.2025.2025.0114 **CSTR:** 32229.14.SSSWXB.2025.0114



在当今全球水产养殖业中, 基因编辑育种技术正成为推动产业升级的关键力量。基因组编辑技术主要包括ZFN (Zinc Finger Nucleases)^[1]、TALEN (Transcription Activator-Like Effector Nucleases)^[2]和CRISPR/Cas (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR-associated protein)^[3]等3种人工核酸内切酶介导的基因修饰技术。这3种编辑系统都是通过DNA双链断裂(Double-Strand Break, DSB)后的修复过程产生的突变来达到基因敲除、替换、插入等修饰, 而DSB引发的修复很难实现高效稳定的单碱基突变。2016年, 碱基编辑系

统应运而生。胞嘧啶碱基编辑系统(Cytosine base editors, CBE)在不依赖DSB的产生、无需供体DNA的参与、产物纯度高前提下, 实现高效且精准的C-T的替换^[4]。

近年来, 基因组编辑技术尤其是CRISPR/Cas9系统的突破性发展, 为鱼类遗传改良提供了高效精准的技术手段。国内外已在半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)^[5]、团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)^[6]、罗非鱼(*Oreochromis mossambicus*)^[7]等20多种养殖鱼类上开展了基因组编辑技术的研究和育种工作^[8]。日本学者通过编辑真鲷(*Pagrus major*)的*mstn* (myo-

收稿日期: 2025-04-02; **修订日期:** 2025-05-16

基金项目: 国家自然科学基金重点项目(32330108); 国家自然科学基金青年科学基金项目(32202917); 国家大宗淡水鱼类产业技术体系建设项目(CARS-45-01); 湖北省自然科学基金(2022CFB819); 湖北省技术创新计划项目(2024BBA001); 湖北农业生物基因育种专项(2024BBB017); 中央高校基本科研业务费专项资金(2662023SCQD002)资助 [Supported by the Key Program of the National Natural Science Foundation of China (32330108); the Young Scientists Fund of the National Natural Science Foundation of China (32202917); the Earmarked Fund for Agriculture Research System of China (CARS-45-01); the Hubei Provincial Natural Science Foundation of China (2022CFB819); Hubei Agricultural Gene Editing Platform Technology and Breeding R and D (2024BBA001); the Hubei Provincial Agricultural Biology Genomic Breeding Program (2024BBB017); the Fundamental Research Funds for the Central Universities (2662023SCQD002)]

作者简介: 孙秋洁(2001—), 女, 学士; 主要研究方向为鱼类遗传育种与繁育。E-mail: QiuJieSun@webmail.hzau.edu.cn

通信作者: 聂春红(1993—), 博士; 主要研究方向为鱼类遗传育种研究。E-mail: chunhongnie@mail.hzau.edu.cn

statin)基因,使其骨骼肌质量增加16%、体长缩短^[9]。华中农业大学团队编辑团头鲂*runx2b* (*RUNX family transcription factor 2b*)基因后,获得了肌间刺完全缺失且生长发育正常的无肌间刺F₁代突变个体^[10]。此外,中国科学院水生生物研究所利用CRISPR/Cas9同时敲除异育银鲫(*Carassius gibelio*)的*foxl2b-A* (*forkhead box L2b-A*)和*foxl2b-B* (*forkhead box L2b-B*),致使F₀生殖细胞消失而产生不育个体^[11]等,相继培育出了一系列生长快、无肌间刺、抗病抗逆等新材料。

当前基于CRISPR/Cas9的基因敲除技术仍存在DSB引发的脱靶风险,且编辑效率在经济鱼类上较低。Liu等^[12]开发了一种高度特异性的新型CBE,能够实现体内外高效且零脱靶的基因编辑,目前已在人的原代T细胞、NK细胞,动物体内等不同场景实现了成功编辑,但仍没有在鱼类上开展应用。为探讨新的基因编辑工具在鱼类中的可行性,本研究以调控鱼类肌间刺形成的关键基因*runx2b*为目的基因^[13],利用CBE技术在斑马鱼上构建突变品系,并分析其应用效果。本研究的开展在保持基因组完整性的同时精准编辑*runx2b*基因,不仅为培育无肌间刺鱼类品系提供了更安全高效的途径,拓宽了碱基编辑系统的适用范围,也为在经济鱼类的重要经济性状的基因编辑育种提供了基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物与材料

实验中所使用的野生型AB品系斑马鱼亲本均由中国科学院水生生物研究所提供,后代在华中农业大学水产学院繁殖并饲养,水温保持在28℃,光暗交替周期为14h光照和10h黑暗。斑马鱼胚胎在28℃下培养,5dpf (day post fertilization)到14dpf饲喂草履虫,14dpf后饲喂丰年虫。

1.2 *runx2b*基因的sgRNA及检测引物的设计与合成

在CRISPR-BETS网站(<https://bioinform.yzu.edu.cn/crisprbets/>)设计6个斑马鱼*runx2b*基因的sgRNA(表1),sgRNA长度为20 bp, PAM (Protospacer Adjacent Motif)序列为NGG,并通过化学合成方式在3'端和5'端的前3个碱基均添加硫代和2'-O-methyl修饰,交由金斯瑞生物科技股份有限公司合成。根据*runx2b*基因序列,利用NCBI在线网站(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)在靶位点附近设计检测引物(表1)。

1.3 突变体的构建

将BS-EP1 (终浓度666.7 ng/μL)和sgRNA (终浓度83.3 ng/μL)配制混合注射样品注射到1—2细胞期的斑马鱼胚胎中,其中本研究中所用的BS-EP1由

贝斯生物公司(<https://www.basetherapeutics.com/index.html>)提供,也可在恺佳生物科技(上海)有限公司(<https://www.kactusbio.cn/product/detail/KD-0001>)购买。注射后的胚胎置于28℃恒温培养箱孵育,48hpf (hour post fertilization)后用快速裂解法随机快速提取16个胚胎基因组的DNA (具体操作步骤参考聂春红^[14]),用引物扩增靶点附近的产物后进行测序,通过EditR 1.0.10分析靶位点的编辑效率。

待F₀代基因编辑的个体生长至2月龄时,将靶位点编辑效率在80%以上的个体F₀挑选出来培养至成鱼。F₀自交繁殖产生F₁代个体,按照上述分析F₁代靶点的编辑效率,筛选出编辑效率90%以上的个体被确认是纯合突变体。

1.4 茜素红骨骼染色

茜素红整体骨骼染色的方法参照聂春红等^[15]方法,随机选取3月龄的F₀、F₁和F₂的突变体和野生型斑马鱼各11尾,4% PFA (Paraformaldehyde)固定48h后进行骨骼染色,最后将标本保存在100%甘油中。骨骼染色标本通过SZX16体视显微镜(OLYMPUS, 日本)对肌间刺表型和数目进行拍照和记录。

1.5 RT-qPCR分析

分别采集48hpf、72hpf、96hpf和120hpf的纯合突变体和野生型的整胚各50尾置于冻存管中,于-80℃保存。采用TRIzol法提取整胚总RNA,使用HiScript[®] II 1st Strand cDNA Synthesis Kit (+gDNA

表1 斑马鱼*runx2b*基因的靶位点和引物序列信息

Tab. 1 The target site and primer sequence information of *runx2b* gene in zebrafish

基因 Gene	靶点序列 Target sequence	检测引物 Primer (5'—3')	产物片段 大小 Product size (bp)
<i>runx2b-1</i>	CAGGGCCAAACG CAGATTAC	CTGGATGACTCTC CGAAGGC ACTGCTTTTATAC CAGCCAAACT	588
<i>runx2b-2</i>	TCAGCAGCAGCAG GACGGCG	CAAACTCATCAG ACTGCAGCG CGCGACCGGTAG GGTTTAT	367
<i>runx2b-3</i>	AGGCTCAATCTTC CCCACCA	TCAGTAGGAATG GCCAGATAA ATCGCTGATGGA GGGCAGAC	312
<i>runx2b-4</i>	CATGTCAGCAGAA CTTCTTC	AAGGGTCACCAG AAACCACG CTTTCAGCTTGCA CACACCC	375
<i>runx2b-5</i>	TATTACCTGTAAT CTGCGTT	CTGGATGACTCTC CGAAGGC ACTGCTTTTATAC CAGCCAAACT	588
<i>runx2b-6</i>	GATCTGAAGGAAC AAACAAG	TCAGTAGGAATG GCAGATAA ATCGCTGATGGA GGGCAGAC	312

wiper)反转录出cDNA。以 β -actin为内参,用Hieff[®] qPCR SYBR Green Master Mix (Low Rox Plus)检测 *alpl*、*entpd5a*和*sp7*的表达水平,扩增引物见表2,均设置3个生物学重复。RT-qPCR于QuantStudio[™] 6 Flex Real-Time PCR系统中进行。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法^[16]分析数据,计算目的基因的相对表达量。

1.6 Western Blot检测

分别采集5dpf和60dpf的纯合突变体和野生型的整胚各50尾、尾部肌肉各9尾置于冻存管中,于 -80°C 保存。提取整胚和尾部肌肉的总蛋白,使用BCA Protein Assay Kit测定蛋白浓度,2×Loading Buffer稀释煮沸变性后进行SDS-PAGE电泳,湿转法转膜后用TBST稍加漂洗,5%脱脂奶粉室温封闭2h,置于TBST中洗净奶粉,加入兔抗Runx2b和Actin抗体 4°C 摇床孵育过夜, TBST漂洗;加入HRP-conjugated Goat anti-Rabbit IgG (H+L)二抗室温避光摇床孵育45min, TBST漂洗,加入ECL显影液,通过Tanon化学发光图像分析系统进行曝光拍照。

1.7 数据分析

本研究中获得实验数据均由GraphPad Prism

表2 骨骼发育相关基因的定量引物序列

Tab. 2 Primer sequences of skeletal development related genes for RT-qPCR

基因 Gene	引物序列 Primer sequence (5'—3')	目的片段大小 Product size (bp)
<i>alpl</i>	GGAATCGTCACAACAACGC GCTCTGCAGTGCTTCATTGG	115
<i>entpd5a</i>	AGCTTGCGGTCTCATGGAAA CGCGAACAGTTCTTTGGGTG	194
<i>sp7</i>	CGGGAGGTCTTCTTGCGATT TTTACCGTACACCTTCCCGC	127
β -actin	GGCATCACACCTTCTACAA GAGTCCATCACAATACCAGTA	208

8.0.2软件进行统计分析,均以平均值±标准差表示,对实验数据进行 t 检验, $P<0.05$ 表示差异显著, $P<0.01$ 为差异极显著。

2 结果

2.1 编辑效率检测和基因型分析

在斑马鱼上对设计的*runx2b*基因的6个靶点进行敲除实验,检测结果显示靶位点3和4的个体突变效率较高,个体平均编辑效率达75%以上,而其他靶点编辑效率在60%以下(图1)。由于第1个外显子上的靶点4不在任一功能域中,所以选择位于*runx2b*基因PHA03247功能域中第6个外显子上的靶点3进行后续分析(图2)。

当F₀代的群体生长至2月龄时,我们对70尾个体进行测序分析,结果显示,19尾个体编辑效率在80%以上,23尾个体在10%—80%(表3)。筛选编辑

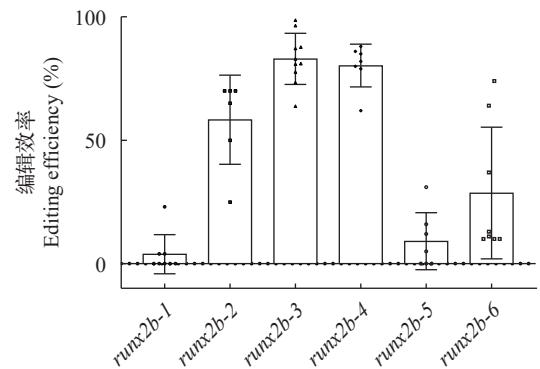


图1 CBE构建斑马鱼*runx2b*基因6个靶点F₀代的编辑效率

Fig. 1 CBE editing efficiency of six targets of *runx2b* gene in zebrafish

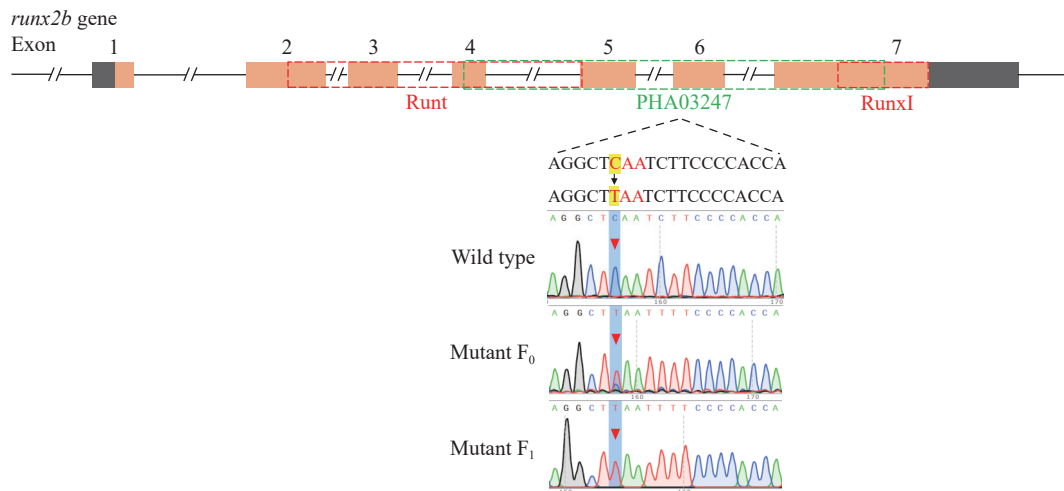


图2 斑马鱼*runx2b*基因sgRNA靶位点示意图

Fig. 2 Schematic diagram of the sgRNA target location in the *runx2b* of zebrafish

灰色突出显示为编辑位点,由CAA突变为TAA

The edited locus (CAA→TAA) is indicated by grey highlighting

效率在80%以上的F₀代突变个体自交繁殖F₁代。结果显示, F₁代仅存在杂合子和纯合子两种突变类型, 且F₁代纯合个体达70%以上。靶位点突变率在90%以上的F₁个体自交产生F₂代, 共检测48尾, 个体

表3 CBE在斑马鱼*runx2b-3*靶点F₀代的编辑效率

Tab. 3 Editing efficiency of *runx2b-3* across the F₀ generation of zebrafish using CBE

个体编辑效率 Editing efficiency	F ₀ 代 F ₀ generation
<10(%)	28
[10—80)	23
[80—100]	19

突变率均在90%以上。与野生型相比, 纯合突变体蛋白结构不完整, 功能域被破坏(图3)。

2.2 突变体表型分析

为了观察利用CBE技术构建的*runx2b*突变体的表型, 对野生型及F₀、F₁和F₂代突变体进行茜素红骨骼染色。结果显示, 与野生型相比, F₀代突变体的肌间刺数量显著减少, 具体表现为左侧肌间刺数11—28根, 右侧10—33根(图4B和表4), 肌间刺总数减少约55%。利用CBE技术构建的*runx2b*突变体, 在F₁代可以获得70%以上的纯合子, 且F₁代纯合子的肌间刺全部缺失(图4C)。同样, 11尾染色的F₂代突变体均不存在肌间刺, 表明CBE技术构建的

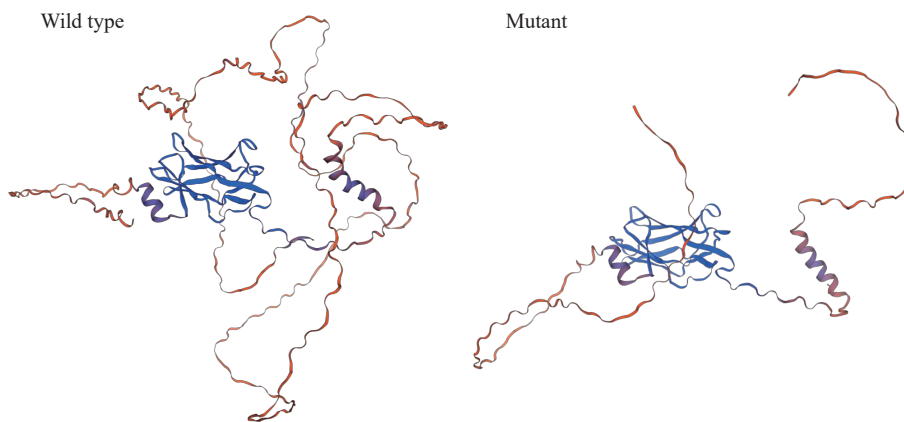


图3 野生型和突变体的Runx2b蛋白结构示意图

Fig. 3 Schematic representation of the Runx2b protein structures of wild-type and mutant

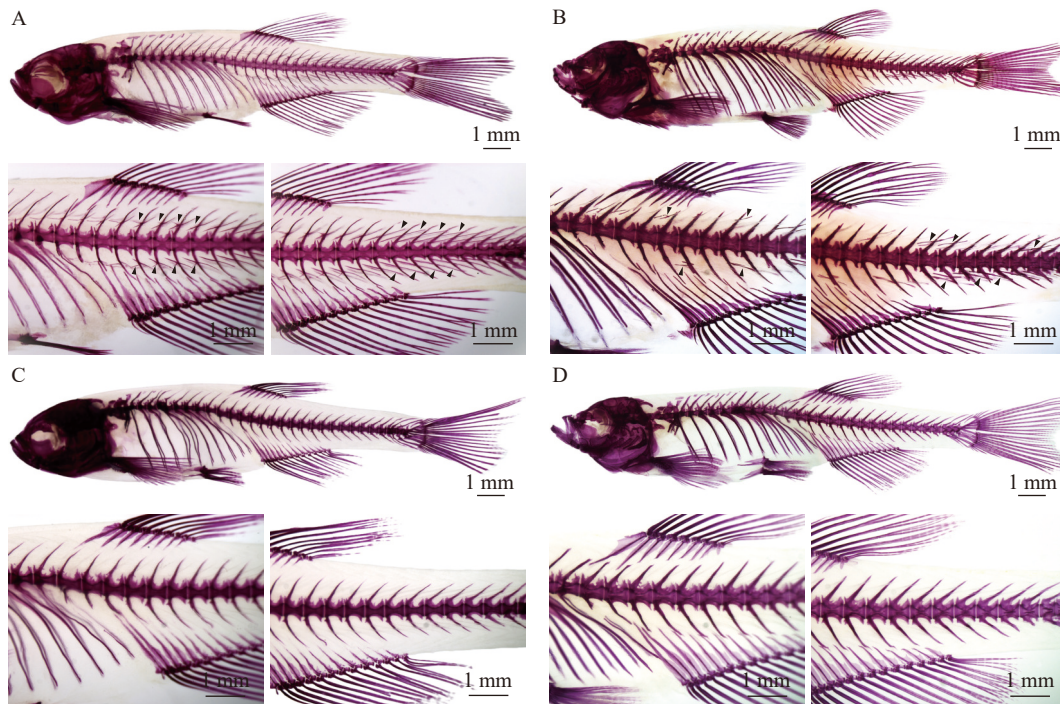


图4 野生型(A)、F₀代突变体(B)、F₁代(C)和F₂代纯合子(D)斑马鱼的茜素红骨骼染色示意图(箭头所示为肌间刺)

Fig. 4 Alizarin red skeleton staining of the wild-type zebrafish (A), F₀ mutants (B), F₁ (C), and F₂ homozygote (D) (The arrows indicate intermuscular bones)

突变体无肌间刺表型可稳定遗传(图 4D)。

2.3 基因和蛋白表达分析

为了进一步探讨CBE编辑*runx2b*对成骨相关基因表达的影响,本研究利用RT-qPCR和Western Blot检测相关基因的表达。Western Blot结果显示Runx2b蛋白在5dpf和60dpf的突变体内不表达(图 5)。RT-qPCR结果显示与野生型相比,突变体成骨相关基因(*alpl*、*entpd5a*、*sp7*)的表达量显著下调。综上

所述,CBE能够有效编辑斑马鱼*runx2b*基因,提前终止蛋白翻译。

3 讨论

3.1 新型碱基编辑系统CBE的应用基础

CRISPR/Cas9系统是目前被广泛使用的第三代基因组编辑系统^[3],但该系统利用修复过程中产生的突变来达到基因编辑的效果,易造成编辑位点碱

表 4 野生型和F₀代突变体斑马鱼的肌间刺数目

Tab. 4 The number of intermuscular bones in the wild-type zebrafish and mutant of F₀ generation

样本编号 Sample ID	左侧髓弓小骨数 Epineurals (LSB)	左侧脉弓小骨数 Epipleurals (LSB)	左侧肌间刺数 Number of IBs (LSB)	右侧髓弓小骨数 Epineurals (RSB)	右侧脉弓小骨数 Epipleurals (RSB)	右侧肌间刺数 Number of IBs (RSB)
WT	27±0	17±1	44±1	27±1	17±1	44±1
F ₀ -1	8	10	18	15	4	19
F ₀ -2	14	10	24	15	10	25
F ₀ -3	13	11	24	5	9	14
F ₀ -4	9	9	18	17	12	29
F ₀ -5	10	13	23	16	17	33
F ₀ -6	8	6	14	6	4	10
F ₀ -7	10	1	11	6	7	13
F ₀ -8	6	5	11	10	9	19
F ₀ -9	18	10	28	12	13	25
F ₀ -10	10	17	27	16	13	29
F ₀ -11	9	2	11	12	1	13
F ₀ 平均值	10±3	9±5	19±7	12±4	9±5	21±8

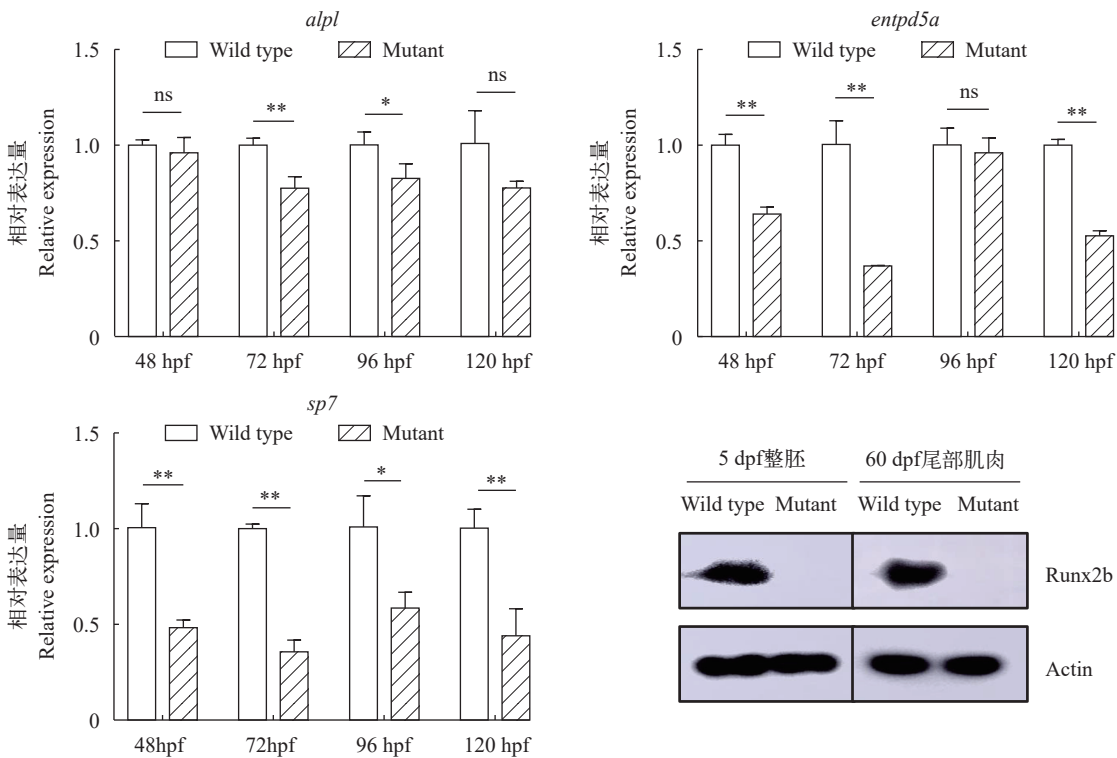


图 5 成骨相关基因和Runx2b蛋白在野生型和突变体内的表达分析

Fig. 5 Relative expression of osteogenic genes and Runx2b protein expression levels

**P<0.05, *P<0.01

基的随机插入和缺失, 发生脱靶, 难以实现高效精准的单碱基突变^[17]。2016年, 美国哈佛大学David R. Liu实验室率先在CRISPR/Cas9系统的基础上开发出了不依赖于DSB, 仅针对单个碱基进行替换的碱基编辑系统BE (Base editor), 提高了基因编辑的准确性和效率^[18]。

目前, 研究人员已开发出了四代碱基编辑系统(BE1-BE4), 并应用于小鼠和家畜的性状改良育种中, 但编辑效率低下、脱靶问题严重^[19], 且在鱼类上开发应用极少。据报道, CRISPR/Cas9技术对斑马鱼胚胎的编辑效率为11%—43%^[20]。利用优化后的第四代胞嘧啶碱基编辑系统zAncBE4max对*twist2*等6个基因进行编辑, 平均编辑效率为42.723%^[21], 且存在一定的脱靶效应。而本研究中应用的CBE是Liu等^[12]开发的一种高度特异性的碱基编辑系统, 与被广泛使用的BE4max相比^[22], 可极大降低脱靶效应, 平均编辑效率达80%, 还可对甲基化或可能富集GC的序列进行稳定编辑^[12]。

3.2 CBE介导斑马鱼*runx2b*高效精准敲除

该系统已在细胞和小鼠上成功应用, 但在斑马鱼等鱼类中尚未开展应用。本研究利用该系统编辑斑马鱼的*runx2b*基因, 结果发现F₀代的编辑效率达60%, 显著高于CRISPR/Cas9和第四代胞嘧啶碱基编辑系统在斑马鱼上的效率。

为验证CBE和CRISPR/Cas9构建的*runx2b*突变体的表型和基因表达情况是否一致, 本研究利用茜素红骨骼染色方法观察F₀、F₁和F₂代的肌间刺表型, 结果显示F₀代突变体的肌间刺数量缺失约55%, F₁和F₂代纯合子均无肌间刺, 与CRISPR/Cas9构建的*runx2b*^{-/-}突变体表型一致^[13], 且无肌间刺表型稳定遗传。此外, 本文发现*runx2b*基因的下游与成骨发育相关基因*alpl*^[23]和*sp7*^[24]及与骨骼矿化相关基因*entpd5a*^[25]的表达在突变体内显著下降, 和已报道的*runx2b*缺失导致的基因表达趋势一致。

3.3 CBE在鱼类中的应用前景

本研究成功应用CBE高效介导斑马鱼*runx2b*基因靶位点C-T的碱基替换, 引入终止密码子, 提前终止蛋白翻译, 达到敲除目的。相比CRISPR/Cas9系统F₂代才筛选到纯合突变体^[26], 本研究使用的CBE系统能更快观察到突变体表型变化及在F₁代即可得到纯合个体, 一定程度上缩短育种周期。此外, 在团头鲂^[10]、银鲫^[27]等经济鱼类中的研究也已证实, 编辑*runx2b*基因能使肌间刺完全缺失, 且不影响正常生长发育。因此, 后期可利用CBE进行无肌间刺经济鱼类的培育, 进而拓展该技术的物种和性状的适用范围。

(作者声明本文符合出版伦理要求)

参考文献:

- [1] Porteus M H, Carroll D. Gene targeting using zinc finger nucleases [J]. *Nature Biotechnology*, 2005, **23**(8): 967-973.
- [2] Boch J, Scholze H, Schornack S, *et al.* Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors [J]. *Science*, 2009, **326**(5959): 1509-1512.
- [3] Mali P, Yang L, Esvelt K M, *et al.* RNA-guided human genome engineering via Cas9 [J]. *Science*, 2013, **339**(6121): 823-826.
- [4] Zong Y, Gao C X. Progress on base editing systems [J]. *Hereditas*, 2019, **41**(9): 777-800. [宗媛, 高彩霞. 碱基编辑系统研究进展 [J]. 遗传, 2019, **41**(9): 777-800.]
- [5] Cui Z K, Liu Y, Wang W W, *et al.* Genome editing reveals *dmrt1* as an essential male sex-determining gene in Chinese tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*) [J]. *Scientific Reports*, 2017(7): 42213.
- [6] Sun Y, Zheng G D, Nissa M, *et al.* Disruption of *mstna* and *mstnb* gene through CRISPR/Cas9 leads to elevated muscle mass in blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) [J]. *Aquaculture*, 2020(528): 735597.
- [7] Li M H, Yang H H, Zhao J E, *et al.* Efficient and heritable gene targeting in Tilapia by CRISPR/Cas9 [J]. *Genetics*, 2014, **197**(2): 591-599.
- [8] Yang Z T, Yu Y P, Tay Y X, *et al.* Genome editing and its applications in genetic improvement in aquaculture [J]. *Reviews in Aquaculture*, 2022, **14**(1): 178-191.
- [9] Kishimoto K, Washio Y, Yoshiura Y, *et al.* Production of a breed of red sea bream *Pagrus major* with an increase of skeletal muscle mass and reduced body length by genome editing with CRISPR/Cas9 [J]. *Aquaculture*, 2018(495): 415-427.
- [10] Dong Q, Nie C H, Wu Y M, *et al.* Generation of blunt snout bream without intermuscular bones by *runx2b* gene mutation [J]. *Aquaculture*, 2023(567): 739263.
- [11] Gan R H, Wang Y, Li Z, *et al.* Functional divergence of multiple duplicated Foxl2 homeologs and alleles in a recurrent polyploid fish [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2021, **38**(5): 1995-2013.
- [12] Liu Y, Zhou C, Huang S, *et al.* A Cas-embedding strategy for minimizing off-target effects of DNA base editors [J]. *Nature Communications*, 2020, **11**(1): 6073.
- [13] Nie C H, Wan S M, Chen Y L, *et al.* Single-cell transcriptomes and *runx2b*^{-/-} mutants reveal the genetic signatures of intermuscular bone formation in zebrafish [J]. *National Science Review*, 2022, **9**(11): nwac152.
- [14] Nie C H. Analysis of ossification pattern and key genes related with intermuscular bones development of *Megalobrama amblycephala* [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2021: 75-76. [聂春红. 团头鲂肌间骨化类型与关键调控基因功能分析 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2021: 75-76.]
- [15] Nie C H, Hilsdorf A W S, Wan S M, *et al.* Understanding

- the development of intermuscular bones in teleost: status and future directions for aquaculture [J]. *Reviews in Aquaculture*, 2020, **12**(2): 759-772.
- [16] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method [J]. *Methods*, 2001, **25**(4): 402-408.
- [17] Hsu P D, Lander E S, Zhang F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering [J]. *Cell*, 2014, **157**(6): 1262-1278.
- [18] Komor A C, Kim Y B, Packer M S, *et al.* Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage [J]. *Nature*, 2016, **533**(7603): 420-424.
- [19] Zhang Y B, Zhang C T, Wu Y, *et al.* Principle and development of single base editing technology and its application in livestock breeding [J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2023, **39**(1): 19-33. [张迎冰, 张成图, 吴英, 等. 单碱基编辑技术的原理、发展及其在家畜育种中的应用 [J]. 生物工程学报, 2023, **39**(1): 19-33.]
- [20] Hruscha A, Krawitz P, Rechenberg A, *et al.* Efficient CRISPR/Cas9 genome editing with low off-target effects in zebrafish [J]. *Development*, 2013, **140**(24): 4982-4987.
- [21] Zhao Y, Shang D, Ying R, *et al.* An optimized base editor with efficient C-to-T base editing in zebrafish [J]. *BMC Biology*, 2020, **18**(1): 190.
- [22] Koblan L W, Doman J L, Wilson C, *et al.* Improving cytidine and adenine base editors by expression optimization and ancestral reconstruction [J]. *Nature Biotechnology*, 2018, **36**(9): 843-846.
- [23] Li B, He X N, Dong Z W, *et al.* Ionomycin ameliorates hypophosphatasia via rescuing alkaline phosphatase deficiency-mediated L-type Ca^{2+} channel internalization in mesenchymal stem cells [J]. *Bone Research*, 2020(8): 19.
- [24] Hojo H, Ohba S. Sp7 action in the skeleton: its mode of action, functions, and relevance to skeletal diseases [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, **23**(10): 5647.
- [25] Huitema L F A, Apschner A, Logister I, *et al.* Entpd5 is essential for skeletal mineralization and regulates phosphate homeostasis in zebrafish [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, **109**(52): 21372-21377.
- [26] Niu M H, Wang H M, Hu R Q, *et al.* Role of *Asb14a* gene in intermuscular bone development in zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Journal of Dalian Ocean University*, 2024, **39**(2): 259-265. [牛明慧, 王化敏, 胡瑞芹, 等. *Asb14a* 基因在斑马鱼肌间骨发育中的作用 [J]. 大连海洋大学学报, 2024, **39**(2): 259-265.]
- [27] Gan R H, Li Z, Wang Z W, *et al.* Creation of intermuscular bone-free mutants in amphitriploid gibel carp by editing two duplicated *runx2b* homeologs [J]. *Aquaculture*, 2023(567): 739300.

CONSTRUCTION OF FISH WITHOUT INTERMUSCULAR BONES BASED ON CYTOSINE BASE EDITING SYSTEM

SUN Qiu-Jie¹, WANG Bo-Kai¹, XIAO Zheng-Yu¹, XU Tian-Hong², WANG Wen-Xiu¹, WANG Yao¹, GAO Ze-Xia^{1,3,4} and NIE Chun-Hong^{1,3}

(1. Key Lab of Freshwater Animal Breeding, Ministry of Agriculture and Rural Affairs/Engineering Research Center of Green Development for Conventional Aquatic Biological Industry in the Yangtze River Economic Belt, Ministry of Education, College of Fisheries, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China; 2. Base Therapeutics, Shanghai 200120, China; 3. Hubei Hongshan Laboratory, Wuhan 430070, China; 4. Hubei Province Famous Fish Breeding and Healthy Aquaculture Engineering Technology Research Center, Wuhan 430070, China)

Abstract: To verify the editing effect of new cytosine base editor (CBE) in fish, this study took the *runx2b* that regulates the formation of intermuscular bones (IBs) in fish as the target gene, and explored its editing efficiency, phenotype and related gene expression on the constructed mutation zebrafish line. The results showed that the mutation efficiency in the F_0 generation was 60%. Skeletal staining demonstrated a 55% reduction in IBs in F_0 generation mutants compared to wild-type controls. In the F_1 generation produced by self-crossing of the F_0 generation, only heterozygotes and homozygotes were observed, with homozygotes exhibiting completely IBs absence and stable inheritance across generations. Western Blot analysis confirmed the absence of *runx2b* protein in mutant, while RT-qPCR showed significantly downregulated expression of osteoblast differentiation and mineralization-related genes (*entpd5a*, *sp7*, and *alpl*) in mutants. The results indicate that CBE not only achieves high editing efficiency in fish, but also enables IBs free phenotypes, shortens homozygotes generation time, and expands the utility of base editing in aquatic species. This study provides a foundation for applying GE in breeding economic fish.

Key words: CBE; Intermuscular bones; *runx2b* gene; Editing efficiency; Gene expression; *Danio rerio*