

文章编号: 1674-5566(2020)06-0811-09

DOI:10.12024/jsou.20191202872

基因编辑酪氨酸酶(*TYR*)基因不同功能区对鱼类体色的影响

许细丹^{1,2,3}, 陈红林^{1,2,3}, MANDAL Biplab Kumar^{1,2,3}, 司周旋^{1,2,3}, 王军^{1,2,3},
王成辉^{1,2,3}

(1. 上海海洋大学 农业农村部淡水水产种质资源重点实验室, 上海 201306; 2. 上海海洋大学 水产科学国家级实验教学示范中心, 上海 201306; 3. 上海海洋大学 上海水产养殖工程技术研究中心, 上海 201306)

摘要: 以 AB 系斑马鱼(*Danio rerio*)为研究对象,应用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术,对纯合亲鱼受精卵进行显微注射,通过编辑损坏 *Tyr* 基因的 CDS 区第二外显子和 3'-UTR 非 poly-A 加尾信号区,使基因发生突变,检测基因不同功能区经编辑后对鱼类体色的影响。结果显示:*Tyr* 基因在野生型斑马鱼胚胎的各个发育时期均能正常表达,眼睛出现黑色素时的表达量最高;编辑损坏 *Tyr* 基因的 CDS 区后,突变型斑马鱼的胚胎和仔鱼均未出现黑色素细胞,表现为体表白化,而成鱼会再度出现黑色素细胞,表现为体表黑色条纹断裂。编辑损坏 *Tyr* 基因的 3'-UTR 非 poly-A 加尾信号区后,突变型胚胎、仔鱼和成鱼均未出现黑色素减退,黑色素合成未受影响。研究表明,编辑损坏基因的 CDS 区会对生物表型产生显著影响,而编辑损坏 3'-UTR 非 poly-A 加尾信号区对生物表型的影响有限。

关键词: *Tyr*; 基因编辑; CDS; 3'-UTR; 黑色素; CRISPR/Cas9

中图分类号: S 917 **文献标志码:** A

酪氨酸酶(Tyrosinase, *Tyr*)基因是黑色素合成通路中的关键基因,通过参与 L-多巴(Levodopa, L-DOPA)的羟化和氧化形成多巴醌(Dopaquinone, DOPA-quinone)来调控黑色素的形成,其表达量和活性水平决定了黑色素生成的速度和种类^[14]。已有研究表明,*Tyr* 基因突变会导致人的眼皮白化病(Oculocutaneous albinism, OCA2)^[1]。此外,*Tyr* 基因的突变与动物的白化现象密切相关,如丹麦奶牛会出现毛发、皮肤、眼睛白化现象^[5],兔出现毛发和眼睛虹膜的完全白化^[6]。*Tyr* 基因突变导致青鳉(*Oryzias latipes*)的黑色素细胞异常,表现出橘色皮肤^[7];虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)*Tyr* 基因突变体表现出嵌合白化和完全白化现象^[8];黄颡鱼(*Tochysurus fulvidraco*)*Tyr* 基因突变体出现黑色素缺乏,表现为金黄色^[9]。由此可见,*Tyr* 基因突变会对动物的体色带来重要影响。

动物的基因由编码区(CDS)、5'非翻译区

(5'-untranslated region, 5'-UTR)、3'非翻译区(3'-untranslated region, 3'-UTR)、调控区等结构组成。其中,3'非翻译区作为非编码 DNA 调控区域,可参与调控基因 mRNA 的衰变和翻译,具有重要的转录调节功能^[10-13]。目前,基因的突变研究大多关注基因的 CDS 区突变对该基因功能的影响,而较少关注 3'-UTR 突变对基因功能的影响。已有研究^[14]表明,3'-UTR 是秀丽隐杆线虫生殖系基因表达的主要调节因子。人类气道上皮细胞趋化因子配体(Chemokine ligand, *CXCL*)基因的 3'-UTR 突变可导致该基因表达水平下降^[15]。敲除 Ras 相关的 C3 肉毒素底物 1(Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1, *Rac1*)基因的 3'-UTR 会损害小鼠初级皮层神经元树突的生长发育^[16]。此外,相关体色基因研究^[17]发现,酪氨酸酶相关蛋白 1(Tyrosinase-related protein 1, *Tyrp1*)基因的 3'-UTR 碱基插入或缺失会导致欧洲家兔的毛色呈褐色。应用基因敲除技术损坏莲山兔 *Tyr* 基因

收稿日期: 2019-12-04 修回日期: 2020-03-17

基金项目: 国家自然科学基金(31372521); 广西科技重大专项(桂科 AA17204095-7)

作者简介: 许细丹(1993—),女,硕士研究生,研究方向为水产动物种质资源与种苗工程。E-mail: m170100185@st.shou.edu.cn

通信作者: 王成辉, E-mail: wangch@shou.edu.cn

的 3'-UTR 区域,也得到了褐色毛色的突变体^[18]。这些研究结果表明,基因的 3'-UTR 突变会对动物带来重要影响。

CRISPR/Cas9 基因编辑技术作为一种高效的基因编辑技术,已广泛应用于动物^[19-20]、植物^[21-22]、微生物^[23]的基因功能编辑,并可实现大片外源基因敲入^[24]和定点突变^[25]。在鱼类,CRISPR/Cas9 靶向编辑 *Slc45a2* 基因得到白化斑马鱼^[26],靶向编辑 *Tyr* 基因得到白化大型泥鳅^[27]。本实验室应用 CRISPR/Cas9 技术编辑瓯江彩鲤 *Asip* 基因,发现突变体表现出体表黑色素细胞缩小,黑色斑块弥散的现象^[28]。以斑马鱼为对象,利用 CRISPR/Cas9 技术分别对 *Tyr* 基因的 CDS 和 3'-UTR 非 poly-A 加尾信号区域进行编辑,旨在探索 *Tyr* 基因不同功能区对体色的影响,以便为瓯江彩鲤以及其他鱼类的体色遗传机制研究积累资料。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验材料为 AB 系斑马鱼,饲养于 28 °C 恒温循环水系统(上海海圣循环水养殖系统)。

Tyr 基因表达时序分析材料:取 3~4 月龄斑马鱼亲鱼繁育授精,在受精后第 6、12、24、30、36、48 和 60 小时取胚胎,以及 1、2、3、4、5、10、15 dph (孵化出膜后的天数)取稚幼鱼,使用体式显微镜观察和拍照黑色素细胞出现时间、数量及大小等情况后,置于液氮中速冻并保存于 -80 °C 冰箱备用。

Tyr 基因编辑材料:剪取 3~4 月龄斑马鱼亲鱼鳍条,使用酚氯仿抽提法提取基因组 DNA 并检测纯度。在 Ensembl 网站 (<https://asia.ensembl.org/index.html>) 下载斑马鱼的 *Tyr* 基因 CDS 区、3'-UTR 区序列,使用 SnapGene 软件分别设计引物对它们进行 PCR 扩增(表 1),扩增产物送公司测序(生工生物工程股份有限公司)。分别筛选出 *Tyr* 基因不同功能区纯合且无突变的候选亲鱼作为基因编辑实验亲鱼。

Tyr 下游基因 (*Tyrp1*, *Dct*) 表达分析材料:根据 *Tyr* 基因 CDS 成鱼突变体皮肤黑色素细胞密度以及分布情况,取突变体体侧无黑色素区域、

少量黑色素区域、大量黑色素区域等不同皮肤区域,置于液氮中速冻并保存于 -80 °C 冰箱备用。

1.2 *Tyr* 基因和下游基因 (*Tyrp1*, *Dct*) 表达分析

使用 Trizol (TaKaRa, 日本) 法提取上述样品的总 RNA,经 2% 凝胶电泳和 Nanodrop 2000 检测其纯度和浓度。使用 PrimeSript™ RT reagent Kit (TaKaRa, 日本) 试剂盒反转录得到 cDNA,并保存于 -40 °C 冰箱。通过在线网址 (<https://www.genscript.com/tools/real-time-pcr-taqman-primer-design-tool>) 设计 *Tyr* 基因 CDS 区和下游基因 (*Tyrp1*, *Dct*) CDS 区的定量表达检测引物(表 1),选用 β -actin 基因作为内参基因。使用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ ^[29] 法分析 *Tyr* 基因和下游基因的定量表达结果。

1.3 sgRNA 的靶点设计与体外转录

斑马鱼 *Tyr* 基因 CDS 区第二外显子和 3'-UTR 非 poly-A 加尾信号区的编辑靶点通过在线网址 (<http://zifit.partners.org/ZiFiT/CSquare9Nuclease.aspx>) 设计。合成含有靶点的正向 Target 序列与反向 Scaffold,并进行 sgRNA 体外转录,PCR 扩增程序:94 °C 预变性 3 min;94 °C 变性 30 s,65 °C 复性 30 s,72 °C 延伸 1 min,共 34 个循环;72 °C 延伸 5 min。取 5 μ L PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳,确认明亮且清晰单一的条带,大小为 100 bp 左右。根据 AxyPrep PCR Cleanup Kit (AXYGEN, 美国) 试剂盒回收 PCR 产物,应用 Promega P1300 体外转录试剂盒 (Promega, 美国) 进行体外转录合成 sgRNA。最后使用乙醇沉淀法纯化回收,DEPC 水溶解,经琼脂糖凝胶电泳和 NanoDrop2000 检测纯度和含量,保存于 -80 °C 冰箱^[30]。

1.4 显微注射与编辑效率检测

将 gRNAs (150 ng/ μ L) 和 Cas9 蛋白 (127 ng/ μ L, NEB, 美国) 混合后,显微注射到斑马鱼受精卵的 1 期细胞中。注射 2 d 后随机采集 20 粒眼睛色素缺陷的 CDS 编辑胚胎,以及 20 粒 3'-UTR 编辑胚胎,提取 DNA,进行 *Tyr* 基因 CDS 和 3'-UTR 靶点区域 PCR 扩增,产物测序以分析编辑效率。显微镜下观察野生型和突变型胚胎 (48 h)、仔鱼 (出膜后 3 d)、成鱼 (性成熟) 的整体和局部特征,并进行基因型和表型分析比较。

表1 *Tyr* 基因 CDS 和 3'-UTR 区的 PCR 扩增、定量表达检测引物以及基因编辑靶点序列Tab.1 PCR amplification, qRT-PCR primers and gene editing target sequence of CDS and 3'-UTR regions in *Tyr* gene

引物 Primer 或靶点 Target	序列 Sequence (5' - 3')	位置 Site	用途 Usage
正向 F1	ACAGCAATGTTACAGCAAGAGTTTCAG	<i>Tyr</i> -CDS	扩增
反向 R1	ATTACACTAGCGTCGCCTCTTG	<i>Tyr</i> -CDS	扩增
正向 F1	AGCTTCATATCAAACCACACTGTG	<i>Tyr</i> -3'-UTR	扩增
反向 R1	AGTCACCTACATCTCGGGTGA	<i>Tyr</i> -3'-UTR	扩增
β -actin-F	ATGGATGAGGAAATCGCTGCC	CDS	定量内参引物
β -actin-R	CTCCCTGATGCTCGGGTCGTC	CDS	定量内参引物
<i>Tyr</i> -Q-F	GCGTTTCTGCCTFPGGCATCG	CDS	定量引物
<i>Tyr</i> -Q-R	TCAGTTCATCCGTGCACACC	CDS	定量引物
<i>Tyrla</i> -Q-F	CGCTTCGACTCCACTGCCAT	CDS	定量引物
<i>Tyrla</i> -Q-R	GTGCCACAGCGTGTCTAGTTC	CDS	定量引物
<i>Tyrlb</i> -Q-F	GCCGGGACGACAGAGAGAGA	CDS	定量引物
<i>Tyrlb</i> -Q-R	CGGCCACAGTTGAACCCAGT	CDS	定量引物
<i>Dct</i> -Q-F	GCGAGTGAAGTTCGGCTGGA	CDS	定量引物
<i>Dct</i> -Q-R	TCCTGCAGCTCTCCGGACT	CDS	定量引物
靶点 1 Target1	CAGCAAGAGAAGGATCCAAG	<i>Tyr</i> -CDS	编辑第 2 外显子
靶点 1 Target1	GATCTCATCCGTAACCCAA	<i>Tyr</i> -3'-UTR	编辑 3'-UTR
靶点 2 Target2	AAGGGTGTGTTCATCA	<i>Tyr</i> -3'-UTR	编辑 3'-UTR
靶点 3 Target3	CAGCAAGAGAAGGATCCAAG	<i>Tyr</i> -3'-UTR	编辑 3'-UTR

2 结果

2.1 *Tyr* 基因在斑马鱼胚胎中的表达

斑马鱼胚胎发育形态与定量表达结果(图 1)显示,*Tyr* 基因在 14 个检测时期都有表达,其中以受精后 36 h 表达量最高,此时胚胎眼部出现色素沉着,形成可见黑色素细胞。受精后 48 h 表达量下降,此时黑色素细胞延伸至胚胎全身,形成早期背侧和腹部条纹。至出膜第 3 天后,随着胚胎背侧和腹部条纹逐渐明确与密集,稚鱼 *Tyr* 基因表达量逐渐稳定。至出膜后 15 天,形成了细小的早期两侧条纹,胸鳍、臀鳍和尾鳍均分布圆形细小的黑色素细胞。

2.2 *Tyr* 基因 CDS 区的编辑

通过检测显微注射组的胚胎,发现 20 个胚胎中有 18 个胚胎出现不同程度的突变。将突变体饲养至成体时,选取体表黑色素条带褪断明显的突变个体的鳍条 DNA 进行 PCR 检测,单克隆测序结果显示,存在 15 个突变型序列和 5 个野生型序列,编辑效率达 75%,其中 73.3% 为核苷酸移码突变,导致 *Tyr* 基因编码氨基酸的改变(图 2)。

与野生型相比,突变型胚胎和仔鱼均未出现黑色素细胞,整体表现为白化状态。性成熟成鱼体表出现由色素细胞组成的体表条纹图案,皮肤

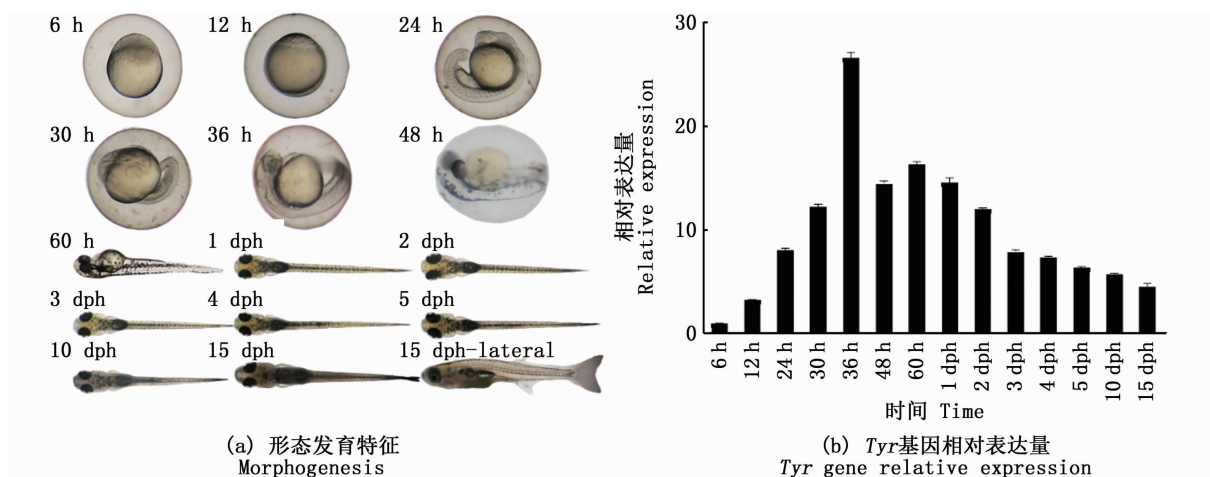
暗条纹沿背腹轴呈断裂现象,断裂处缺失黑色素细胞,非断裂处黑色素细胞排列整齐,未出现黑色素细胞的缩小。眼睛和鳍条黑色素细胞排列紧密,树突结构明显(图 2)。

下游基因(*Tyrl1*, *Dct*) 定量表达结果(图 3)显示,下游基因在 *Tyr* 基因 CDS 成鱼突变体体表侧面无黑色素区域、少量黑色素区域以及大量黑色素区域等不同皮肤区域均表达,其中下游基因在无黑色素区域表达量较其他区域小。

2.3 *Tyr* 基因 3'-UTR 区的编辑

显微注射组胚胎 PCR 测序检测结果显示,20 个胚胎中只有 6 个受到了不同程度的编辑影响。选取性成熟突变个体,经单克隆测序检测,发现 20 个克隆中突变型序列占 90%,即编辑效率为 90%,包括 1/3 的核苷酸插入突变和 2/3 的核苷酸删除突变,插入片段长达 18 bp,删除片段长达 78 bp(图 4)。

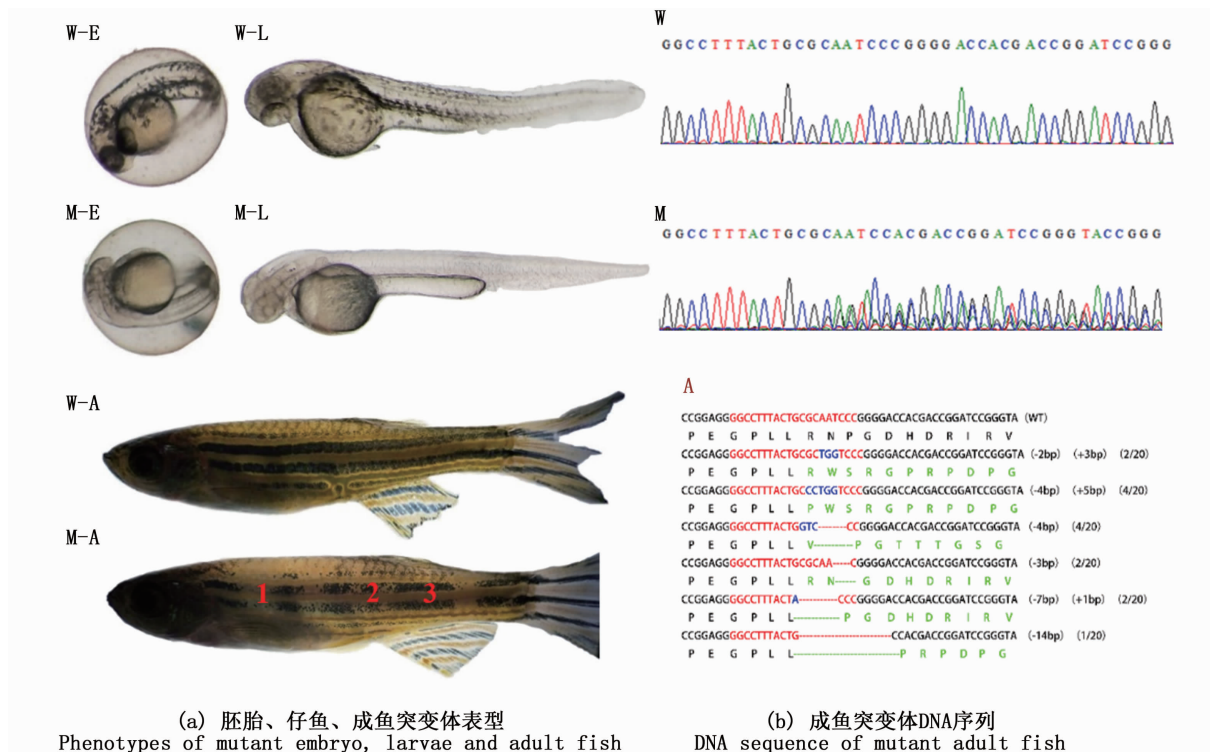
观察发现突变型胚胎期、仔鱼期的卵黄囊和胚体上均分布黑色素细胞,并形成正常的早期背侧和腹部条纹,视网膜黑色素沉着形成可见黑色素。性成熟突变成鱼体表图案明显,黑色素细胞色素颗粒聚集,暗条纹黑色素细胞排列紧密,背侧、腹侧和两侧色素条纹加深,未出现黑色素细胞减少以及树突结构的缩小(图 4)。



dph. 孵化出膜后的天数
dph. days post hatch

图 1 Tyr 基因在斑马鱼胚胎和稚鱼发育时期的相对表达量变化

Fig. 1 Relative expression profiles of Tyr gene at different embryonic and larva stages in zebrafish

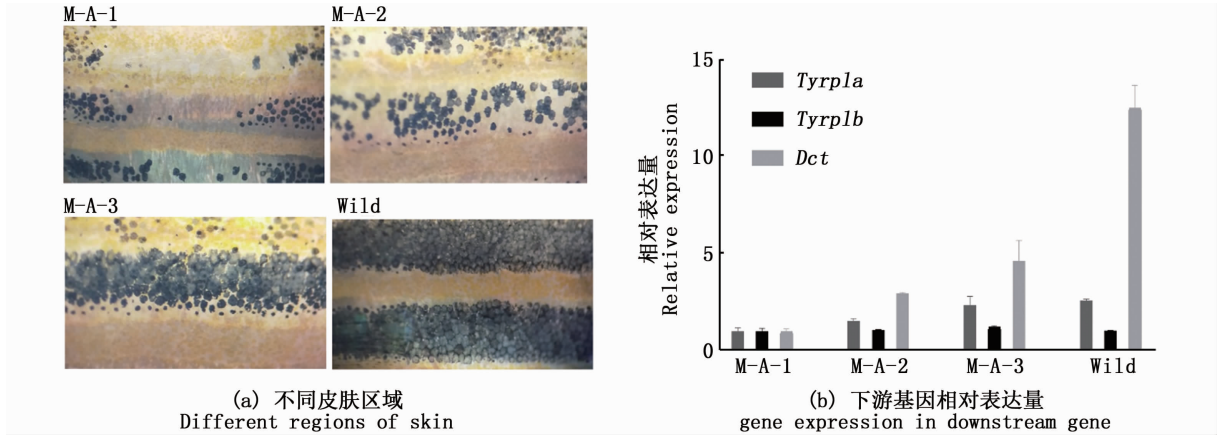


W-E. 野生型胚胎; W-L. 野生型仔鱼; W-A. 野生型成鱼; M-E. 突变型胚胎; M-L. 突变型仔鱼; M-A. 突变型成鱼; 红色表示靶点序列; 蓝色表示替换序列; 绿色表示突变氨基酸序列; “-” 缺失; “+” 插入

W-E. wild-type embryo; W-L. wild-type larvae fish; W-A. wild-type adult fish; M-E. mutant embryo; M-L. mutant larvae fish; M-A. mutant adult fish; Targets are marked in red; Substitution sequences are presented in blue; Mutant amino acid sequences are located in green; deletions“-”; insertions“+”

图 2 Tyr 基因 CDS 区经编辑后的突变体表型及其 DNA 序列

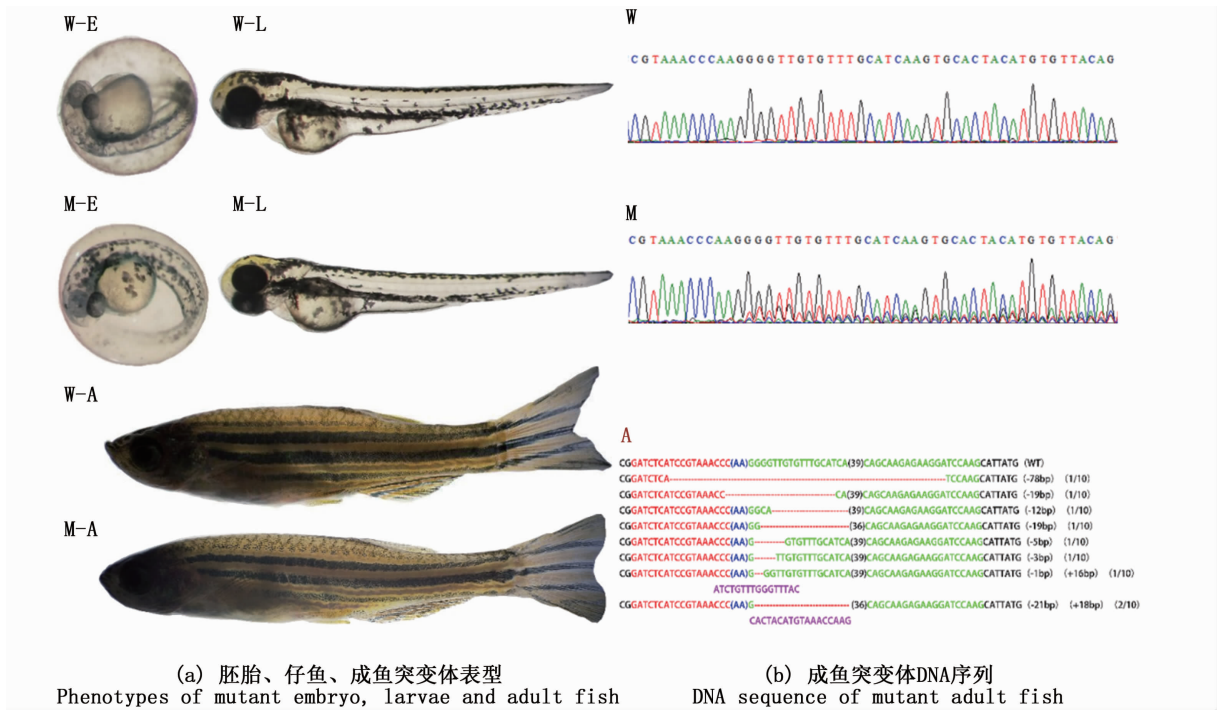
Fig. 2 Phenotypes and DNA sequence of mutant fish by targeting CDS region of Tyr gene in zebrafish



M-A-1. 突变型成鱼无黑色素区域; M-A-2. 突变型成鱼少量黑色素区域; M-A-3. 突变型成鱼大量黑色素区域

M-A-1. region with no melanophore in mutant adult fish; M-A-2. region with less melanophore in mutant adult fish; M-A-3. region with large amount of melanophore in mutant adult fish

图3 下游基因在 *Tyr* 基因 CDS 成鱼突变体不同皮肤区域的相对表达量变化
Fig. 3 Relative expression profiles of the downstream gene at different regions of skins in adult zebrafish of editing CDS region of *Tyr* gene



W-E. 野生型胚胎; W-L. 野生型仔鱼; W-A. 野生型成鱼; M-E. 突变型胚胎; M-L. 突变型仔鱼; M-A. 突变型成鱼; 红色. 正向靶点序列; 绿色. 反向靶点序列; 紫色. 插入序列; (AA). 正向和反向靶点共有序列; “-” 缺失; “+” 插入

W-E. wild-type embryo; W-L. wild-type larvae fish; W-A. wild-type adult fish; M-E. mutant embryo; M-L. mutant larvae fish; M-A. mutant adult fish; Forward targets are marked in red; Reverse targets are marked in green; Insertion sequences are presented in purple; Common sequences between forward and reverse target are shown with AA; deletions“-”; insertions “+”

图4 *Tyr* 基因 3'-UTR 区经编辑后的突变体表型及其 DNA 序列

Fig. 4 Phenotypes and DNA sequence of mutant fish by targeting 3'-UTR region of *Tyr* gene in zebrafish

3 讨论

在脊椎动物中,酪氨酸酶基因家族中 *Tyr* 基因是黑色素合成信号通路中的关键限速酶,黑色素生成的速度和种类取决于 *Tyr* 基因的表达量和活性水平,因此 *Tyr* 基因在组织中广泛表达。*Tyr* 基因在黄颡鱼胚胎中的表达结果显示在胚胎发育阶段存在差异表达,呈现由低逐渐升至最高后降低的趋势,在皮肤和鳍条开始形成大量黑色素时表达量最高^[9]。在橘色双冠丽鱼中,*Tyr* 基因在胚胎发育各个时期均表达,黑色素细胞开始形成时期表达量急速增至最高^[30]。本研究发现,斑马鱼 *Tyr* 基因在各胚胎发育阶段表达,眼睛黑色素细胞开始形成阶段表达量最高,这一结果与上述结果符合。有研究^[31-32]表明斑马鱼胚胎黑色素细胞大部分形成后的 12 d 中只会有微量的黑色素细胞数量上的调节。与本实验胚胎发育后期阶段表达无明显差异结果相符合。

生物体中基因的表达主要通过翻译蛋白表示,而翻译起始在很大程度上依赖于起始密码子以及相对于 CDS 的上下游区域^[33-34]。基因的 CDS 通过编码氨基酸来表达基因,基因的 UTR 调控区主要通过与相关结合蛋白或 miRNA 作用介导基因转录的调控^[35-36]。应用 CRISPR/Cas9 技术编辑连山黑兔 *Tyr* 基因 CDS 区的结果显示,删除 CDS 区 105 kb 的大长度片段可导致连山黑兔的完全白化^[37]。应用 CRISPR/Cas9 技术编辑连山黑兔 *Tyr* 基因的 3'-UTR 调控区发现,删除其两个有效 poly-A 加尾信号,突变体虹膜和毛色中的黑色素减少,产生褐色连山兔^[18]。在欧洲兔中,*Tyrp1* 基因第二外显子的突变引起终止密码子的提前,突变体毛色呈褐色。同样 *Tyrp1* 基因的 3'-UTR 核苷酸插入或缺失会导致欧洲兔毛呈褐色^[17]。本研究通过 CRISPR/Cas9 技术编辑 *Tyr* 基因 CDS 区和 3'-UTR 非 poly-A 加尾信号区,发现 *Tyr* 基因的 CDS 区突变型胚胎、仔鱼和性成熟成鱼的黑色素发育存在缺陷,表明 *Tyr* 基因 CDS 区对斑马鱼各个发育时期黑色素的形成都发挥着重要作用。然而 *Tyr* 基因的 3'-UTR 突变型胚胎、仔鱼和性成熟成鱼黑色素细胞发育正常,与野生型相比,体表未出现明显差异。在哺乳动物,加尾信号(AAUAUU)六碱基的缺失或突变会阻碍多腺苷酸化 3'端的产生,3'-UTR 序列保守程

度高于其他真核生物,且某特定保守序列(UAAC/GUUAU)仅在 3'-UTR 有活性^[38-40]。此外,有研究^[41-45]表明 3'-UTR 包含多种顺式调控元件,通过 RNA 结合蛋白和 miRNA 识别并结合对基因进行调控,且许多元件已被实验证实为活性元件。结合本实验,实验结果引起了 3'-UTR 碱基的插入与缺失,但可能未对 poly-A 加尾信号区造成影响,推测斑马鱼 *Tyr* 基因 3'-UTR 非 poly-A 加尾信号区可能不存在活性保守区域,并未参与 *Tyr* 基因的调控。此外,也有可能本实验靶点作用区域并未影响 3'-UTR 活性元件以及与其他调控因子的作用。在生物体的黑色素合成过程中, α -促黑色素细胞激素(α -Melanocyte-stimulating hormone, α -MSH)可通过与黑色素细胞膜上的黑色素皮质激素受体 1(Melanocortin-1 receptor, *Mclr*)结合促使 *Tyr* 上调合成多巴;同样 α -MSH 还可通过激活小眼畸形相关转录因子(Microphthalmia-associated transcription factor, *Mitf*)提高酪氨酸酶基因家族活性,合成黑色素^[46]。同样,研究表明 *Mclr*^[47], *Mitf*^[48], *Tyrp1*^[9], *Dct*^[49], *Slc24a5*^[26]等单基因的突变会导致生物存在不同程度的黑色素发育缺陷。本研究 *Tyr* 基因的 CDS 区突变型仔鱼和性成熟成鱼的黑色素发育模式不同,表现为完全白化的仔鱼和体表黑色素分布不均的性成熟成鱼,在 *Tyr* 基因突变导致其功能缺失时,其下游基因(*Tyrp1*, *Dct*)在成鱼突变体不同皮肤区域表达存在差异,推测突变体断裂条纹的形成可能受晚期黑色素合成相关通路中其他基因的影响,形成旁路补偿现象。

参考文献:

- [1] SIMEONOV D R, WANG X J, WANG C, et al. DNA variations in oculocutaneous albinism: an updated mutation list and current outstanding issues in molecular diagnostics [J]. *Human Mutation*, 2013, 34(6): 827-835.
- [2] HEARING V J, TSUKAMOTO K. Enzymatic control of pigmentation in mammals[J]. *The FASEB Journal*, 1991, 5(14): 2902-2909.
- [3] DEL MARMOL V, BEERMANN F. Tyrosinase and related proteins in mammalian pigmentation [J]. *FEBS Letters*, 1996, 381(3): 165-168.
- [4] COOKSEY C J, GARRATT P J, LAND E J, et al. Evidence of the indirect formation of the catecholic intermediate substrate responsible for the autoactivation kinetics of

- tyrosinase[J]. Journal of Biological Chemistry, 1997, 272(42): 26226-26235.
- [5] SCHMUTZ S M, BERRYERET G, CIOBANU D C, et al. A form of albinism in cattle is caused by a tyrosinase frameshift mutation[J]. Mammalian Genome, 2004, 15(1): 62-67.
- [6] AIGNER B, BESENFELDER U, MÜLLER M, et al. Tyrosinase gene variants in different rabbit strains [J]. Mammalian Genome, 2000, 11(8): 700-702.
- [7] KOGA A, INAGAKI H, BESSHO Y, et al. Insertion of a novel transposable element in the tyrosinase gene is responsible for an albino mutation in the medaka fish, *Oryzias latipes* [J]. Molecular and General Genetics MGG, 1995, 249(4): 400-405.
- [8] BOONANUNTANASARN S, YOSHIZAKI G, IWAI K, et al. Molecular cloning, gene expression in albino mutants and gene knockdown studies of tyrosinase mRNA in rainbow trout [J]. Pigment Cell Research, 2004, 17(4): 413-421.
- [9] ZHANG X T, WEI K J, CHEN Y Y, et al. Molecular cloning and expression analysis of *Tyr* and *Tyrl* genes in normal and albino yellow catfish *Tachysurus fulvidraco* [J]. Journal of Fish Biology, 2018, 92(4): 979-998.
- [10] GEISSLER R, GRIMSON A. A position-specific 3' UTR sequence that accelerates mRNA decay [J]. RNA Biology, 2016, 13(11): 1075-1077.
- [11] MAYR C. Regulation by 3'-untranslated regions [J]. Annual Review of Genetics, 2017, 51: 171-194.
- [12] ATWATER J A, WISDOM R, VERMA I M. Regulated mRNA stability [J]. Annual Review of Genetics, 1990, 24(1): 519-541.
- [13] SANJANA N E, SHALEM O, ZHANG F. Improved vectors and genome-wide libraries for CRISPR screening [J]. Nature Methods, 2014, 11(8): 783-784.
- [14] MERRITT C, RASOLOSON D, KO D, et al. 3' UTRs are the primary regulators of gene expression in the *C. elegans* germline [J]. Current Biology, 2008, 18(19): 1476-1482.
- [15] ZHAO W X, SIEGEL D, BITON A, et al. CRISPR - Cas9-mediated functional dissection of 3'-UTRs [J]. Nucleic Acids Research, 2017, 45(18): 10800-10810.
- [16] BRAZ SO, CRUZ A, LOBO A, et al. Expression of Rael alternative 3' UTRs is a cell specific mechanism with a function in dendrite outgrowth in cortical neurons [J]. Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms, 2017, 1860(6): 685-694.
- [17] UTZERI V J, RIBANI A, FONTANESI L. A premature stop codon in the *TYRPI* gene is associated with brown coat colour in the European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) [J]. Animal Genetics, 2014, 45(4): 600-603.
- [18] SONG Y N, XU Y X, DENG J C, et al. CRISPR/Cas9-mediated mutation of tyrosinase (Tyr) 3' UTR induce graying in rabbit [J]. Scientific Reports, 2017, 7(1): 1569.
- [19] WANG H Y, YANG H, SHIVALILA C S, et al. One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering [J]. Cell, 2013, 153(4): 910-918.
- [20] YAN Q M, ZHANG Q J, YANG H Q, et al. Generation of multi-gene knockout rabbits using the Cas9/gRNA system [J]. Cell Regeneration, 2014, 3(1): 12.
- [21] WANG Y, GENG L Z, YUAN M L, et al. Deletion of a target gene in Indica rice via CRISPR/Cas9 [J]. Plant Cell Reports, 2017, 36(8): 1333-1343.
- [22] ZONG Y, WANG Y P, LI C, et al. Precise base editing in rice, wheat and maize with a Cas9-cytidine deaminase fusion [J]. Nature Biotechnology, 2017, 35(5): 438-440.
- [23] JAKOČIŪNAS T, BONDE I, HERRGÅRD M, et al. Multiplex metabolic pathway engineering using CRISPR/Cas9 in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Metabolic Engineering, 2015, 28: 213-222.
- [24] YANG H, WANG H Y, SHIVALILA C S, et al. One-step generation of mice carrying reporter and conditional alleles by CRISPR/Cas-mediated genome engineering [J]. Cell, 2013, 154(6): 1370-1379.
- [25] JIANG W H, LIU L L, CHANG Q R, et al. Production of Wilson disease model rabbits with homology-directed precision point mutations in the ATP7B gene using the CRISPR/Cas9 system [J]. Scientific Reports, 2018, 8(1): 1332.
- [26] IRION U, KRAUSS J, NÜSSELEIN-VOLHARD C. Precise and efficient genome editing in zebrafish using the CRISPR/Cas9 system [J]. Development, 2014, 141(24): 4827-4830.
- [27] XU X W, CAO X J, GAO J. Production of a mutant of large-scale loach *Paramisgurnus dabryanus* with skin pigmentation loss by genome editing with CRISPR/Cas9 system [J]. Transgenic Research, 2019, 28(3): 341-356.
- [28] CHEN H L, WANG J, DU J X, et al. ASIP disruption via CRISPR/Cas9 system induces black patches dispersion in Oujiang color common carp [J]. Aquaculture, 2019, 498: 230-235.
- [29] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the method [J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.
- [30] 蒋燕玲. 橘色双冠丽鱼体色发育变化及体色相关基因 *TYR* 的克隆与表达研究 [D]. 上海: 上海海洋大学, 2016.
- [31] JIANG Y L. Body color variation and cloning, expression analysis of *TYR* Gene in *Amphilophus citrinellus* [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2016.
- [32] MILOS N, DINGLE A D. Dynamics of pigment pattern formation in the zebrafish, *Brachydanio rerio*. I. Establishment and regulation of the lateral line melanophore stripe during the first eight days of development [J]. Journal of Experimental Zoology, 1978, 205(2): 205-216.

- formation in the zebrafish, *Brachydanio rerio*. II. Lability of lateral line stripe formation and regulation of pattern defects [J]. *Journal of Experimental Zoology*, 1978, 205(2): 217-224.
- [33] CUPERUS J T, GROVES B, KUCHINA A, et al. Deep learning of the regulatory grammar of yeast 5' untranslated regions from 500, 000 random sequences [J]. *Genome Research*, 2017, 27(12): 2015-2024.
- [34] HINNEBUSCH A G, IVANOV I P, SONENBERG N. Translational control by 5'-untranslated regions of eukaryotic mRNAs[J]. *Science*, 2016, 352(6292): 1413-1416.
- [35] JACKSON R J, HELLEN C U T, PESTOVA T V. The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2010, 11(2): 113-127.
- [36] ARAUJO P R, YOON K, KO D, et al. Before it gets started: regulating translation at the 5' UTR [J]. *Comparative and Functional Genomics*, 2012, 2012: 475731.
- [37] SONG Y N, YUAN L, WANG Y, et al. Efficient dual sgRNA-directed large gene deletion in rabbit with CRISPR/Cas9 system [J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2016, 73(15): 2959-2968.
- [38] SIEPEL A, BEJERANO G, PEDERSEN J S, et al. Evolutionarily conserved elements in vertebrate, insect, worm, and yeast genomes[J]. *Genome Research*, 2005, 15(8): 1034-1050.
- [39] XIE X H, LU J, KULBOKAS E J, et al. Systematic discovery of regulatory motifs in human promoters and 3' UTRs by comparison of several mammals[J]. *Nature*, 2005, 434(7031): 338-345.
- [40] 王俊丽, 卢荣华, 秦超彬, 等. 草鱼 SREBP-1-3'-UTR 双荧光素酶报告载体构建及 miR-33 对其表达的影响[J]. *上海海洋大学学报*, 2017, 26(1):17-22.
- WANG J L, LU R H, QIN C B, et al. Construction of dual luciferase recombinant vector containing SREBP-1-3'-UTR of *Ctenopharyngodon idella* and effect of miR-33 on its expression[J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2017, 26(1):17-22.
- [41] BALTZ A G, MUNSCHAUER M, SCHWANHÄUSSER B, et al. The mRNA-bound proteome and its global occupancy profile on protein-coding transcripts [J]. *Molecular Cell*, 2012, 46(5): 674-690.
- [42] CASTELLO A, FISCHER B, EICHELBAUM K, et al. Insights into RNA biology from an atlas of mammalian mRNA-binding proteins [J]. *Cell*, 2012, 149(6): 1393-1406.
- [43] LEPPEK K, SCHOTT J, REITTER S, et al. Roquin promotes constitutive mRNA decay via a conserved class of stem-loop recognition motifs[J]. *Cell*, 2013, 153(4): 869-881.
- [44] RAY D, KAZAN H, COOK K B, et al. A compendium of RNA-binding motifs for decoding gene regulation [J]. *Nature*, 2013, 499(7457): 172-177.
- [45] ZHAO W X, POLLACK J L, BLAGEV D P, et al. Massively parallel functional annotation of 3' untranslated regions [J]. *Nature Biotechnology*, 2014, 32(4): 387-391.
- [46] HOEKSTRA H E. Genetics, development and evolution of adaptive pigmentation in vertebrates [J]. *Heredity*, 2006, 97(3): 222-234.
- [47] RIEDER S, TAOURIT S, MARIAT D, et al. Mutations in the agouti (*ASIP*), the extension (*MC1R*), and the brown (*TYRP1*) loci and their association to coat color phenotypes in horses (*Equus caballus*) [J]. *Mammalian Genome*, 2001, 12(6): 450-455.
- [48] LIU J H, WEN S, LUO C, et al. Involvement of the *mitfa* gene in the development of pigment cell in Japanese ornamental (Koi) carp (*Cyprinus carpio* L.) [J]. *Genetics and Molecular Research*, 2015, 14(1): 2775-2784.
- [49] GUYONNEAU L, MURISIER F, ROSSIER A, et al. Melanocytes and pigmentation are affected in dopachrome tautomerase knockout mice [J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2004, 24(8): 3396-3403.

Fish coloration change from disrupting different functional regions in tyrosinase (*TYR*) gene by gene editing technology

XU Xidan^{1,2,3}, CHEN Honglin^{1,2,3}, MANDAL Biplab Kumar^{1,2,3}, SI Zhouxuan^{1,2,3}, WANG Jun^{1,2,3}, WANG Chenghui^{1,2,3}

(1. Key Laboratory of Freshwater Aquatic Genetic Resources, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 3. Shanghai Engineering Research Center of Aquaculture, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: In order to detect the effect of editing different functional regions of genes on fish coloration, fertilized eggs of AB strain of homozygous zebrafish (*Danio rerio*) were microinjected by CRISPR/Cas9 technology, *Tyr* gene were disrupted in the exon 2 and non-poly (A) addition signal of 3'-UTR, and mutants with disruption of different functional regions were obtained. The results showed that: the relative expression level of *Tyr* gene was detected in the examined stages of fertilized egg to 15 dph larvae in wild-type zebrafish, and the relative expression level increased to the highest level at melanin formation of eyes; the melanocytes were not observed in mutant embryo and larvae with disrupting the CDS region of *Tyr* gene, displaying complete albino, then, the melanocytes were observed in adult fishes with broken melanocyte stripes. The mutants with disrupting non-poly (A) addition signal of 3'-UTR region of *Tyr* gene showed the same melanocyte stripes with wild-type zebrafish, indicating normal melanin synthesis in them. It was indicated that significantly phenotypic change would occur by disrupting CDS region of gene, while no obvious phenotypic change was detected by disrupting non-poly (A) addition signal of 3'-UTR region of gene.

Key words: *Tyr*; gene editing; CDS; 3'-UTR; melanin; CRISPR/Cas9