

文章编号: 1674-5566(2025)06-1193-10

DOI: 10.12024/jsou.20241104689

CRISPR-Cas13d系统下调青鳉*tyr*基因表达的研究

许朝然^{1,2,3}, 夏必琳⁴, 蒋月雯⁴, 邓菊^{1,2,3}, 陈若雪^{1,2,3}, 梁晶婕^{1,2,3}, 陈天圣^{1,2,3}

(1. 集美大学 海水养殖生物育种全国重点实验室,福建 厦门 361021; 2. 集美大学 鳗鲡现代产业技术教育部工程研究中心,福建 厦门 361021; 3. 集美大学 农业农村部东海海水健康养殖重点实验室,福建 厦门 361021; 4. 华中农业大学 水产学院,湖北 武汉 430070)

摘要: CRISPR-Cas13d蛋白通过crRNA介导结合靶向RNA底物,利用其核糖核酸内切酶活性实现精准切割,为RNA水平的基因调控提供非基因组编辑策略。本研究基于青鳉(*Oryzias latipes*)密码子偏好性优化Cas13d基因序列,成功构建原核表达系统并纯化获得分子量为115 ku的重组Cas13d蛋白。进一步通过显微注射将体外转录的Cas13d mRNA与靶向酪氨酸酶基因(*tyr*)的crRNA复合物导入青鳉胚胎,同时利用Cas13d蛋白/crRNA核糖核蛋白(RNP)系统进行平行实验。qRT-PCR及测序分析表明,两种递送方式均能显著降低青鳉胚胎内*tyr*基因的RNA水平($P<0.01$),且基因测序证实靶位点DNA序列未发生突变。本研究在青鳉中验证了Cas13d系统通过RNA编辑实现基因沉默的有效性与特异性,不仅为鱼类基因探索提供新型调控工具,也为构建基于RNA靶向的Cas13d抗病毒转基因鱼类品系奠定了理论基础。

关键词: 青鳉; CRISPR-Cas13d; *tyr*; 蛋白纯化; RNA编辑

中图分类号: S 917.4 文献标志码: A

CRISPR (Clustered regularly interspaced short palindromic repeat)是指细菌DNA中常见的一段重复序列,参与细菌的免疫调节^[1-2]。CRISPR-Cas9系统通过向导RNA(gRNA)识别目标DNA序列,并切割双链DNA,引发DNA修复机制,实现基因敲除^[3-5]、插入或修复,适合基因组的永久性修改^[6-7]。Cas13系统通过向导RNA(crRNA)识别目标RNA序列,切割单链RNA,实现RNA的敲降或编辑,不影响基因组DNA^[8-10]。Cas13系统的优势在于其RNA靶向能力、可逆性调控、附带切割活性、高灵敏度、多重靶向能力和安全性,特别适用于抗病毒治疗与育种^[11-14]、核酸检测等领域^[10,15-16]。

与Cas9相比,Cas13在RNA水平的应用中展现出独特价值。Cas13系统可分为多个亚型,且广泛应用于植物、斑马鱼、小鼠以及人类等^[17-21],但在远缘动物中的应用研究较少^[22-24]。抗病毒植物育种方面^[25-26],研究人员在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中成功抑制了芜菁花叶病毒(Turnip mosaic virus, TuMV)的复制与传播^[27-28],研究人员利用Cas13系统在烟草、水稻、马铃薯分别实现了对烟草花叶病毒(Turnip mosaic virus, TMV)、南方水稻黑条矮缩病毒(Southern rice black-streaked dwarf virus, SRBSDV)、水稻条纹花叶病毒(Rice stripe mosaic virus, RSMV)、马铃薯Y病毒(Potato virus Y, PVY)的抗性^[29-31]。

水产养殖业在满足人类日益增长的蛋白质需求方面发挥着不可替代的作用,但这一行业却面临着病毒等病原微生物的严重威胁^[32]。现有防治策略(如药物防治、微生态制剂和免疫预防等)均存在显著局限:药物残留风险高^[33]、水产专用疫苗匮乏^[34]、微生态制剂应用不成熟^[35]。开发抗病毒新品种是解决方案之一^[36],其中基因编辑技术相比传统育种技术具有周期短、效率高的优势,为鱼类病毒防控提供了新途径。Cas13系统具有靶向下调RNA的特性,因此,通过构建靶向

收稿日期: 2024-11-07 修回日期: 2025-05-19

基金项目: 国家自然科学基金(32273127, 31771648); 集美大学科研基金项目(ZQ2020003)

作者简介: 许朝然(1997—),女,硕士研究生,研究方向为鱼类分子育种。E-mail: 202111710023@jmu.edu.cn

通信作者: 陈天圣, E-mail: tiansheng.chen@jmu.edu.cn

版权所有 ©《上海海洋大学学报》编辑部(CC BY-NC-ND 4.0)

Copyright © Editorial Office of Journal of Shanghai Ocean University (CC BY-NC-ND 4.0)

<http://www.shhydxxb.com>

RNA病毒的CRISPR-Cas13转基因经济鱼,可以实现对RNA病毒的抑制^[37-38],这可以先在模式鱼类比如青鳉中应用。

青鳉(*Oryzias latipes*)繁殖力强,繁殖周期短,最短两个月即可达到性成熟;产卵量大,一般每次产卵量在20~30粒^[39];透明度高,可观察到所有阶段的发育过程^[39-40];胚胎发育迅速,胚胎经过9~10 d可由受精卵出膜孵化成小鱼^[40];对水中有毒物质相当敏感^[41]等特点。它已成为研究脊椎动物生殖细胞增殖、疾病和基因突变以及病毒感染的良好模式生物^[42]。

青鳉*tyr*(Tyrosinase,酪氨酸酶)基因在黑色素合成中起关键作用,其功能缺陷可导致眼部黑色素缺失^[43]。本研究选择*tyr*基因作为靶标,以验证Cas13系统的基因调控效果。通过显微注射Cas13d mRNA/crRNA复合物和Cas13d蛋白/crRNA复合物两种方式,评估Cas13d系统对青鳉内源*tyr*基因表达的调控,为建立基于Cas13系统的RNA基因编辑技术体系提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 青鳉来源

青鳉Hd-rR品系饲养于集美大学实验室水循环系统,温度为28 °C,光周期为每天14 h光照和10 h避光,受精的胚胎在胚胎培养基中培养至孵化^[44],所有程序均符合集美大学动物伦理委员会批准的方案。

1.2 Cas13d mRNA和*tyr* crRNA的合成

根据来自*Ruminococcus* sp菌的Cas13d氨基酸序列(3×HA-Cas13d-NLS,2 889 bp)^[10],按照青鳉密码子偏好进行了优化,并由GenScript Biotech公司合成质粒pcDNA3.1Zeo+_c322d(图1a)。使用*Mfe* I对载体进行线性化,回收纯化后作为模板,并使用mMESSAGE mMACHINE T7试剂盒(Invitrogen,美国)对其进行体外转录得到Cas13d mRNA。使用*tyr*-crRNA-F/*tyr*-crRNA-R引物(表1)PCR扩增合成crRNA模板,并使用TranscriptAid T7高产转录试剂盒(Thermo Fisher Scientific,美国)进行体外转录得到crRNA。根据青鳉*tyr*基因的外显子序列,*tyr*

crRNA目标序列为5'-GGTAGGGGGTCAAGAACCTCCTGGA-3',按照文献[46]的方法纯化Cas13d mRNA和*tyr* crRNA^[45]。

1.3 显微注射Cas13d mRNA系统

将*tyr* crRNA(30 ng/μL)、Cas13d mRNA(300 ng/μL)和0.1%酚红的混合物注射到单受精卵发育胚盘阶段的胚胎中^[45],对照组注射Cas13d mRNA。注射后的胚胎在胚胎培养基(1.00 g NaCl,0.16 g MgSO₄·7H₂O,0.04 g CaCl₂·2H₂O,0.03 g KCl,10 mL 0.1 g/L亚甲基蓝溶液,定容至1 L)中培养,并用LEICA显微镜(Leica,德国)观察。提取有表型胚胎RNA,并使用PrimeScript™ RT reagent Kit(Perfect Real Time)试剂盒(TaKaRa,日本)将RNA反转录为cDNA。加入cDNA作为PCR模板,并使用*tyr*-qPCR-F/*tyr*-qPCR-R(表1)及内参引物β-actin-F/β-actin-R(表1)扩增目标片段,程序设置为95 °C 3 min,95 °C 30 s,60 °C 30 s,72 °C 30 s,72 °C 5 min,共35个循环,对PCR产物进行测序。随后,以各组青鳉胚胎cDNA的10倍稀释液为模板进行实时荧光定量反应(qRT-PCR),检测内源基因*tyr*的表达水平。反应体系为SYBR Green Master Mix 25 μL,正向引物(10 μmol/L)1 μL,反向引物(10 μmol/L)1 μL,cDNA模板2 μL,ddH₂O 21 μL。每组胚胎进行3次生物重复。qRT-PCR反应完成后,对样品进行目的基因和内源基因的熔解曲线分析,根据每个样本的CT值,计算目标基因的相对表达量(RQ值),使用GraphPad Prism 8软件对非配对样本进行T检验,比较两组数据并进行统计分析,最后绘制差异基因表达的柱状图。

1.4 pET28a(+)-Cas13d重组质粒的构建

用引物Cas13dF/Cas13dR2 PCR扩增Cas13d片段(2 889 bp)(表1),使用*Eco*R I和*Xho* I(NEB,美国)酶切pET28a(+)获得5 335 bp的载体骨架,Cas13d片段和pET28a(+)片段经1%琼脂糖凝胶电泳进行凝胶回收,采用同源重组试剂盒(Vazyme,中国)进行连接后转化,挑选单克隆菌落并用Cas13d的内在引物ckF/ckR(表1)进行PCR鉴定,测序阳性质粒。

表1 *Tyr* crRNA的合成,qRT-PCR、pET28a(+) - Cas13d 重组质粒合成与检测的引物序列
Tab. 1 Primer sequences of synthesis of *tyr* crRNA, qRT-PCR and assay of pET28a(+) - Cas13d recombinant plasmid

引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequences(5'-3')
<i>tyr</i> -crRNA-F	CCTCGAGTAATACGACTCACTATAAGGGCTACTACACTGGTGCAGATTGCACTAG
<i>tyr</i> -crRNA-R	GGTACCTCCAGGAGTTCTTGACCCCCCTACCGTTTAGACTAGTCAAATCGCAC
<i>tyr</i> -qPCR-F	CCTCCTGTCCAACAAGGCTC
<i>tyr</i> -qPCR-R	GTGGCTGCCTCTCTCCAAAG
β -actin-F	TATCATTGCCTGAAACCGAT
β -actin-R	CTTGCACATGCCAGATCCG
Cas13dF	AATGGGTCGCGGATCCATGTACCCTTACGATGTGCCAG
Cas13dR	GGTGGTGGTGGTGGTGGCTCGAGCTTTCTTTAGCCTGTCCGGC
<i>ck</i> -F	GAGACTGAGGAAATGCGTGGAG
<i>ck</i> -R	GCTTGTAGCAGCCGGATCTCA

1.5 Cas13d蛋白表达和纯化

将 pET28a(+) - Cas13d 质粒转入表达宿主 BL21(DE3) 细菌, 在 50 μ g/mL 卡那霉素(Kana) 的抗性平板上培养。挑选阳性单克隆菌到 3 mL LB(Kana) 培养基中, 在 37 °C, 200 r/min 持续振荡下培养 12 h。随后, 以 1% 的菌液初始浓度接种到 1 mL 含卡那霉素(50 μ g/mL) 抗性的 LB 培养基中, 在 37 °C 条件下培养至菌液 OD₆₀₀ 值为 0.5~0.8。随后加入 0.5 mmol/L 异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG)诱导 4 h。取菌液离心得到沉淀后, 按照上样缓冲液(5×)与样品体积比 1:4 配比混合, 100 °C 热水浴 10 min 制成电泳样品后, 离心 5 min, 取上清液进行 12.5% 聚丙烯酰胺凝胶 SDS-PAGE(雅伦, 中国)电泳分离细菌蛋白提取物。电泳结果用考马斯亮蓝染色法确定蛋白的表达情况。按照上述方法, 实验进一步检测 Cas13d 蛋白在 37 °C 2 h, 6 h, 18 °C、22 °C、25 °C 各诱导 20 h 的条件下的表达情况。进一步进行蛋白免疫印迹实验, 将蛋白电泳胶与膜放入半干电转移仪(Bio-Rad, 美国), 在 18 V 下电转 25 min。用小鼠抗 His-Tag mAb 抗体(Abclonal, AE003, 1:2 500)作为一抗在 4 °C 下孵育过夜。用 TBST(0.1% Tween 20)漂洗 3 次后, 用辣根过氧化物酶(HRP)结合的山羊抗小鼠抗体(Abclonal, AS003, 1:10 000)作为二抗在室温下孵育膜 1 h。最后用 TBST 漂洗 3 次后, 加入 Clarity Max Western ECL 底物(Bio-Rad, #1705061, 美国), 并在化学发光凝胶成像系统(Epaccoins, EPC-E650, 中国)下显像拍照。

Cas13d 蛋白用 400 mL 菌液进行大量表达, 菌体沉淀用 5 mL 磷酸盐缓冲液(PBS)重悬后, 在冰浴中超声裂解, 在 10 000 r/min 转速下离心 10 min。用结合缓冲液(20 mmol/L NaH₂PO₄·2H₂O, 500 mmol/L NaCl, 10 mmol/L Imidazole, 1 mmol/L DTT, pH 7.4)按 0.5 g/5 mL 的比例重悬沉淀后, 使用超声波细胞破碎仪(HUXI, 中国)在冰浴中对裂解液进行破碎(功率 30%, 开启 3 s; 关闭 3 s), 共持续 30 min。破碎后的裂解液在 4 °C、8 000 r/min 的转速下离心 10 min, 收集上清液和沉淀。将 Cas13d 上清液与 Ni Sepharose 6 Fast Flow(Cytiva, 美国)在 4 °C 下混合过夜, 并用 5 倍体积的洗涤缓冲液(20 mmol/L NaH₂PO₄·2H₂O, 500 mmol/L NaCl, pH 7.4)洗涤, 后用 300 mmol/L 的咪唑的洗脱缓冲液(20 mmol/L NaH₂PO₄·2H₂O, 500 mmol/L NaCl, 300 mmol/L Imidazole, pH 7.4)和 500 mmol/L 的咪唑的洗脱缓冲液(20 mmol/L NaH₂PO₄·2H₂O, 500 mmol/L NaCl, 500 mmol/L Imidazole, pH 7.4)洗脱。洗脱出的蛋白质经真空干燥浓缩后, 储存在-80 °C 保存备用。

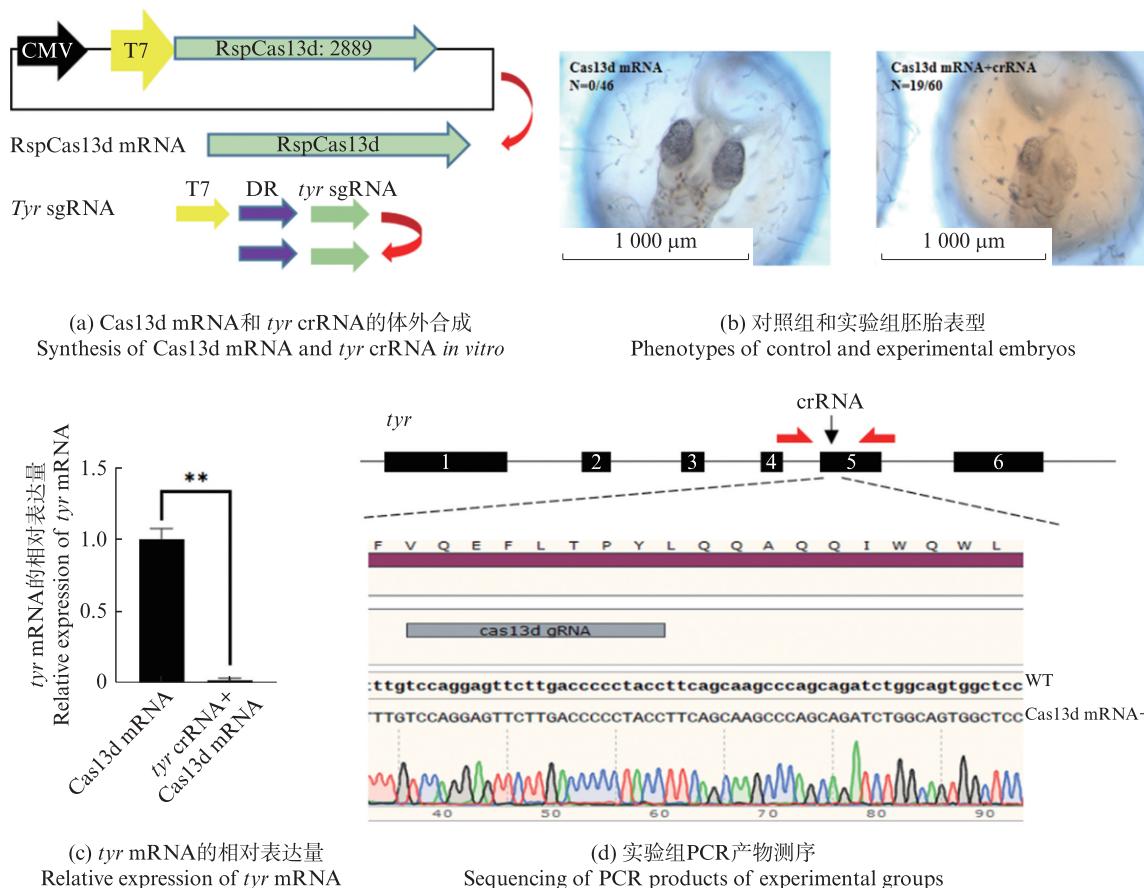
1.6 显微注射 Cas13d 蛋白系统

将纯化后的 Cas13d 蛋白溶解于含 1 mmol/L DTT 的 PBS 中, 并用超微量分光光度计(KAIAO, K5600C, 中国)定量蛋白。实验组注射 Cas13d 蛋白(300 ng/ μ L)、*tyr* crRNA(30 ng/ μ L) 和 0.1% 苯酚红的混合液^[46], 对照组注射 Cas13d 蛋白和苯酚红的混合液。

2 结果

2.1 Cas13d mRNA 系统下调青鳉 *tyr* mRNA

从线性化质粒 pcDNA3.1Zeo+_c322d 中转录 Cas13d mRNA，并用 TranscriptAid T7 高产转录试剂盒在体外转录 *tyr* crRNA(图 1a)。注射的对照组胚胎(mRNA)有 46 个存活而没有色素缺失(n=0/46, 图 1b), 实验组(mRNA/crRNA)的 60 个存活胚胎中有 19 个眼睛黑色素出现明显淡化(n=19/60, 图 1b), 通过 qRT-PCR 方法检测到实验组中 *tyr* mRNA 丰度的降低(图 1c, P<0.01)。同时, 对以实验组和对照组 cDNA 为模板, *tyr*-qPCR-F/*tyr*-qPCR-R 为引物扩增的 PCR 产物进行测序, 测序结果和野生型一致, 未发现突变序列(图 1d), 说明导致眼睛黑色素缺失的是 mRNA 表达水平的降低而非 DNA 突变。因此, Cas13d mRNA/crRNA 可以有效地下调青鳉 *tyr* mRNA。



CMV. 巨细胞病毒启动子; T7. T7 启动子; DR. 直接重复序列, 属于 Cas13 系统中的 crRNA 成分; **. P<0.01。
CMV. Cytomegalovirus promoter; T7. T7 promoter; DR. direct repeat sequence, belongs to crRNA component of Cas13 system; **. P<0.01.

图 1 Cas13d mRNA 系统下调 *tyr* 基因表达的分析

Fig. 1 Analysis of down-regulation of *tyr* gene expression by the Cas13d mRNA system

2.2 pET28a(+)-Cas13d 重组质粒的构建

为了获得原核表达的蛋白, 通过 PCR 从 pcDNA3.1Zeo+_c322d 质粒中扩增出 Cas13d 的目的片段(2 889 bp), 质粒 pET28a(+)经 *Eco*R I 和 *Xba* I 双酶切后(图 2a 和 2b), 将框架质粒和目的片段进行同源重组连接, 构建了 pET28a(+)–Cas13d 质粒。通过 PCR 扩增质粒的内部片段鉴定阳性质粒后(图 2c), 测序再次确认质粒序列没有突变

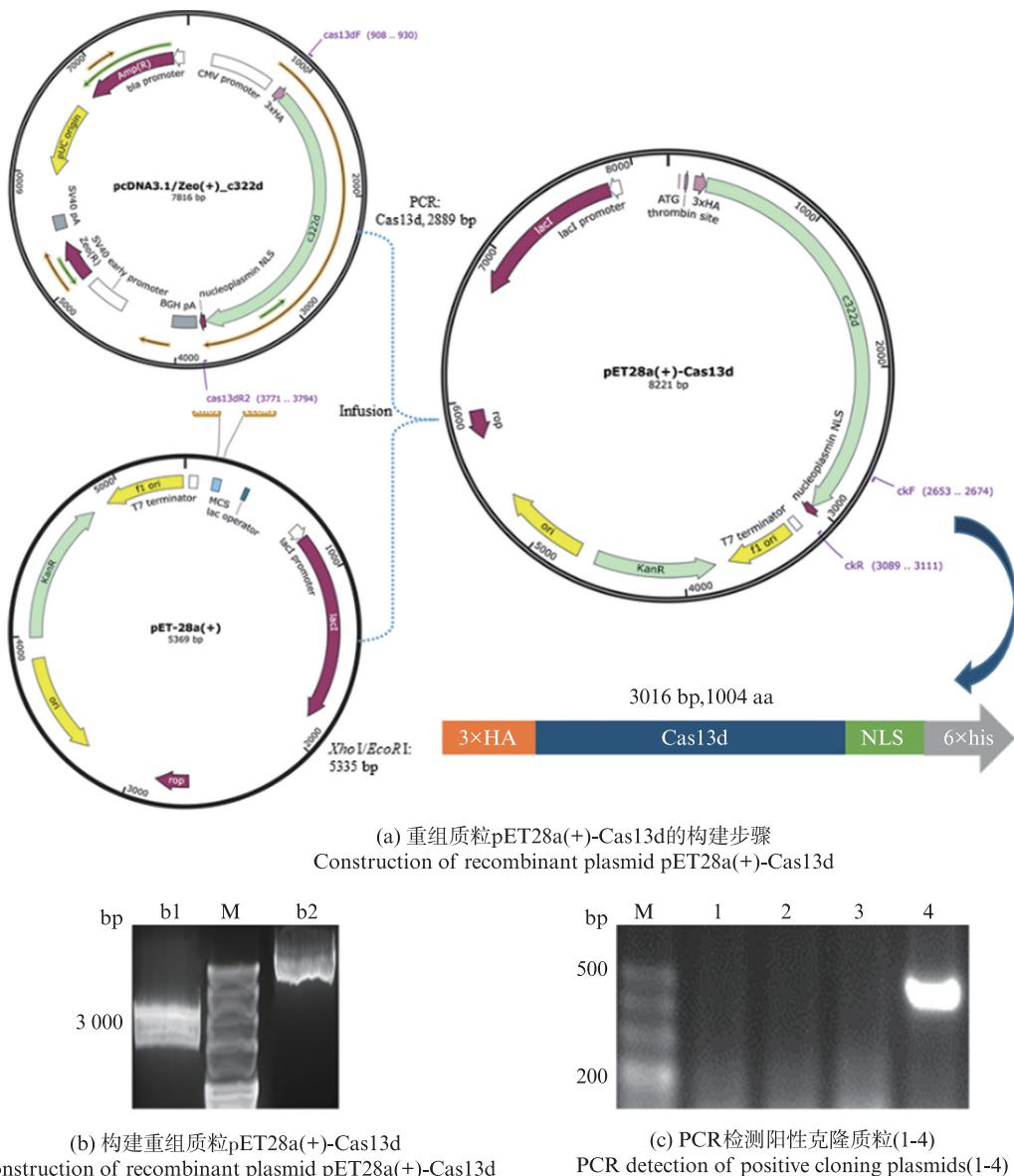
或缺失后可用于下游实验。

2.3 Cas13d 蛋白的表达和纯化

pET28a(+)–Cas13d 菌株经 IPTG 诱导后表达蛋白, 通过考马斯亮蓝染色观察到大概 115 ku 的清晰条带, 符合预期大小(全长 1 004 aa, 115 ku, 图 3a)。用 His-tag 小鼠单克隆抗体进行免疫印迹时也检测到大约 115 ku 特异的目标蛋白条带(图 3b)。因此, 重组 pET28a(+)–Cas13d 原核表达载

体成功表达目的蛋白。在诱导温度和诱导时间方面对重组蛋白的表达条件进行了优化,结果显示, pET28a(+) - Cas13d 菌株在 37 °C 分别诱导 2、4 和 6 h, 18、22、25 °C 各诱导 20 h 后(图 3c), 37 °C, 6 h 条件下的蛋白表达量最高。因此,后期诱导条件为 37 °C 6 h。此外,超声破碎的菌液离心后,通过蛋白电泳显示 Cas13d 蛋白在菌液上清中少量表

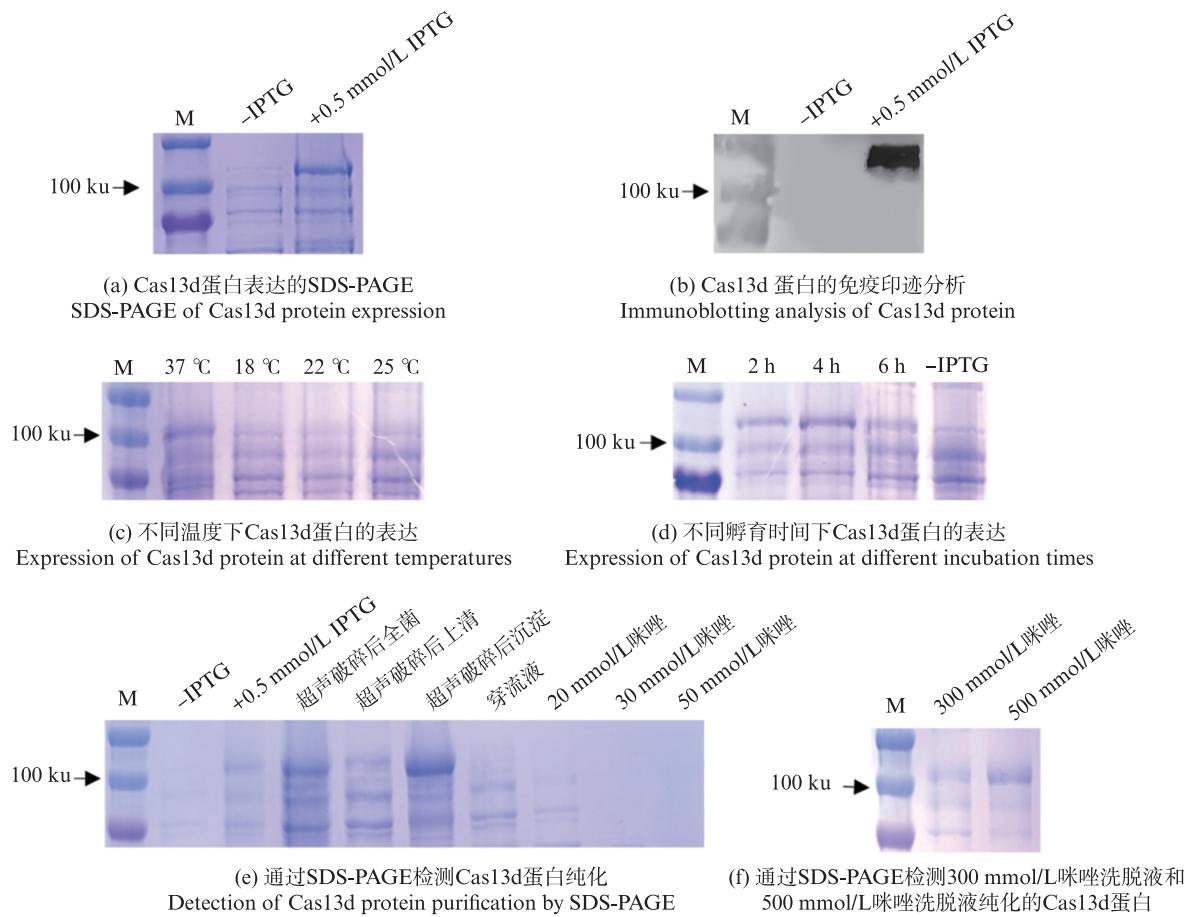
达, 在沉淀中大量表达(图 3e)。鉴于后续实验需要有酶活性的蛋白, 我们收集超声破碎上清菌液进行下游实验。菌液在大量诱导表达后, 经 Ni Sepharose 6 Fast Flow 色谱柱纯化, 在 500 mmol/L 咪唑洗脱后的蛋白在泳道上显示出 1 条明显且较单一的目的条带(图 3f), 按照比例, 1 L LB 培养基可纯化到 2.85 mg Cas13d 蛋白。



M. DNA Marker。b1. Cas13d 重组质粒的 PCR 片段。b2. 通过 *Eco*R I 和 *Xho* I 线性化的 pET28a(+) 质粒。1-3. 阴性质粒。4. 阳性质粒。
M. DNA Marker. b1. The amplified Cas13d by PCR. b2. The linearized plasmid pET28a(+) by *Eco*R I and *Xho* I. 1-3. Negative control plasmids. 4. Positive control plasmid.

图 2 重组质粒 pET28a(+)-Cas13d 的构建

Fig. 2 Construction of recombinant plasmid pET28a(+)-Cas13d



M. 蛋白 marker。IPTG. 异丙基- β -D-硫代半乳糖苷。20 mmol/L 咪唑. 20 mmol/L 咪唑洗涤缓冲液。50 mmol/L 咪唑. 50 mmol/L 咪唑洗涤缓冲液。300 mmol/L 咪唑. 300 mmol/L 咪唑洗涤缓冲液。500 mmol/L 咪唑. 500 mmol/L 咪唑洗涤缓冲液。

M. protein marker. IPTG. Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside. 20mmol/L imidazole. 20 mmol/L imidazole wash buffer. 30mmol/L imidazole. 30 mmol/L imidazole wash buffer. 50mmol/L imidazole. 50 mmol/L imidazole wash buffer. 300 mmol/L imidazole. 300 mmol/L imidazole eluent. 500 mmol/L imidazole. 500 mmol/L imidazole eluent.

图3 Cas13d蛋白的表达和纯化
Fig. 3 Expression and purification of Cas13d protein

2.4 Cas13d蛋白系统下调青鳉tyr mRNA

通过蛋白混合液的注射,对照组胚胎(Cas13d蛋白)中有56个存活而没有发现眼睛黑色素缺少($n=0/56$,图4a),实验组(Cas13d蛋白/crRNA)存活的31个胚胎中有15个眼睛黑色素出现明显缺失($n=15/31$,图4a)。通过qRT-PCR方法检测到实验组中tyr mRNA丰度的降低(图4b, $P<0.01$)。同时,对以实验组cDNA为模板,tyr-qPCR-F/tyr-qPCR-R为引物扩增的PCR产物进行测序,测序结果和野生型一致未发现突变序列(图4c)。因此,Cas13d蛋白/crRNA也可以有效地下调青鳉tyr mRNA。

3 讨论

目前,基因编辑系统已经被广泛应用于不同物种的基因编辑和突变体构建。与CRISPR/Cas9系统相比,CRISPR/Cas13系统具有编辑RNA而不是DNA的功能。本研究以模式鱼类青鳉为研究对象,构建了CRISPR/Cas13d表达系统并体外表达了有活性的Cas13d蛋白。

本研究构建了pET28a(+) - Cas13d重组表达载体,探索pET28a(+) - Cas13d重组表达目的蛋白的最佳时间和温度。研究表明在高温下重组蛋白的合成速率加快,无法折叠成正确的蛋白,也没有达到足够的溶解度,易形成无活性的包涵体^[47],因

此,诱导条件不宜设置为较高温度下太长时间。本研究摸索了37 °C诱导2、4和6 h等3个时间梯度,结果显示在37 °C诱导6 h能表达出最多的目的蛋白。同时,相比低温情况下的长时间诱导,37 °C的表达量更高。大量表达目的蛋白后,通过镍离子亲和层析纯化获得分子量为115 ku的Cas13d蛋白,通过真空冷冻干燥方式浓缩鱼蛋白。基于上述方法获得的活性Cas13蛋白,不仅能用于目的基因的敲降,也为基于Cas13系统的病毒

检测的应用打下基础^[13]。张锋团队将Cas13a与改良的聚合酶扩增技术(RPA)相结合,开发出了一种高实用价值的诊断工具——SHERLOCK^[48],该技术在多种靶标包括寨卡病毒、埃博拉病毒、登革病毒、甲型流感病毒等病原体及其耐药基因^[49-50]得以应用。Cas13系统在病毒检测中具有许多优势,包括高度敏感性、高度特异性、快速检测、操作简单、多重检测、便携式应用等^[51-52]。因此,获得的Cas13d蛋白能开发类似的RNA诊断工具。

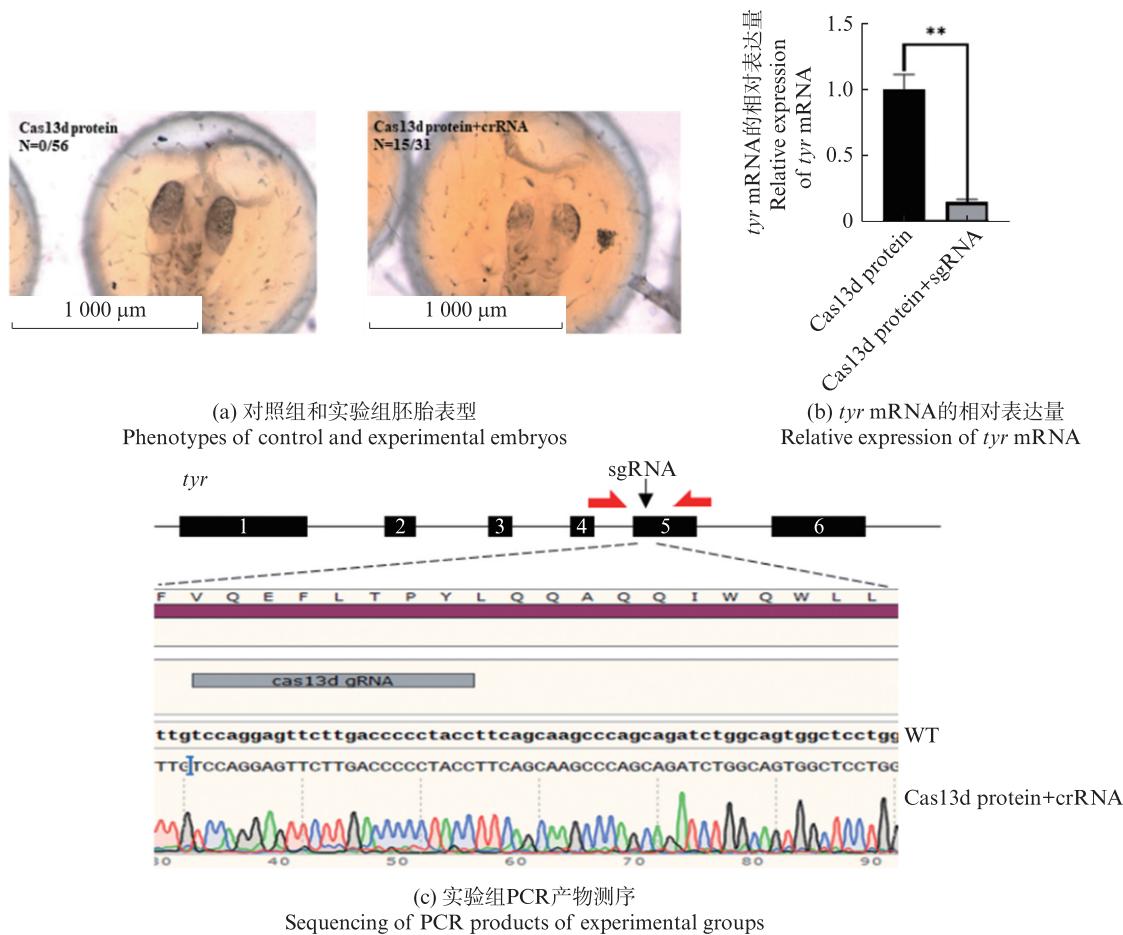


图4 通过Cas13d蛋白和crRNA下调*tyr*基因的表达

Fig. 4 Down-regulation of *tyr* gene expression by Cas13d protein and crRNA

另外,本研究发现,注射Cas13d mRNA/crRNA复合物后青鳉眼部色素减少的表型在注射5 d后仍未恢复,这表明与其他报道类似,下调效果会持续较长时间^[53]。与编辑DNA靶基因的Cas9系统不同,Cas13系统特异敲除目的RNA,并不突变DNA。因此,Cas13系统作为一种革命性的基因编辑工具^[22, 54-56],其精准的RNA靶向敲降能力为鱼类RNA病毒性疾病的防控提供了更

好的解决方案。

本研究制备了经密码子优化的Cas13d重组蛋白,并系统评估了Cas13d mRNA/crRNA复合物和Cas13d蛋白/crRNA复合物对青鳉内源基因*tyr*在RNA水平的调控,为将来构建基于Cas13系统的抗RNA病毒转基因鱼奠定了重要的理论基础。

作者声明本文无利益冲突。

参考文献:

- [1] KOONIN E V, WOLF Y I. Evolution of the CRISPR-Cas adaptive immunity systems in prokaryotes: models and observations on virus-host coevolution [J]. *Molecular Biosystems*, 2015, 11(1): 20-27.
- [2] DEVI V, HARJAI K, CHHIBBER S. CRISPR-Cas systems: role in cellular processes beyond adaptive immunity [J]. *Folia Microbiologica*, 2022, 67(6): 837-850.
- [3] FUJII W, KAWASAKI K, SUGIURA K, et al. Efficient generation of large-scale genome-modified mice using gRNA and CAS9 endonuclease [J]. *Nucleic Acids Research*, 2013, 41(20): e187.
- [4] ZHENG Q P, CAI X H, TAN M H, et al. Precise gene deletion and replacement using the CRISPR/Cas9 system in human cells [J]. *Biotechniques*, 2014, 57(3): 115-124.
- [5] VARSHNEY G K, PEI W H, LAFAVE M C, et al. High-throughput gene targeting and phenotyping in zebrafish using CRISPR/Cas9 [J]. *Genome Research*, 2015, 25(7): 1030-1042.
- [6] 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.
- [7] HISANO Y, SAKUMA T, NAKADE S, et al. Precise in-frame integration of exogenous DNA mediated by CRISPR/Cas9 system in zebrafish [J]. *Scientific Reports*, 2015, 5(1): 8841.
- [8] PERČULIJA V, LIN J Y, ZHANG B, et al. Functional features and current applications of the RNA-targeting type VI CRISPR-Cas systems [J]. *Advanced Science*, 2021, 8(13): 2004685.
- [9] ABUDAYYEH O O, GOOTENBERG J S, KONERMANN S, et al. C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector [J]. *Science*, 2016, 353(6299): aaf5573.
- [10] YAN W X, CHONG S R, ZHANG H B, et al. Cas13d is a compact RNA-targeting type VI CRISPR effector positively modulated by a WYL-domain-containing accessory protein [J]. *Molecular Cell*, 2018, 70(2): 327-329. e5.
- [11] LI Y F, XU J J, GUO X F, et al. Collateral cleavage of 28s rRNA by RfxCas13d causes death of mice [J]. *BioRxiv*, 2022.
- [12] FREIE C A, MYHRVOLD C, BOEHM C K, et al. Programmable inhibition and detection of RNA viruses using Cas13 [J]. *Molecular Cell*, 2019, 76(5): 826-837. e11.
- [13] MAHFOUZ M. Revolutionizing point-of-care diagnostics via CRISPR systems [J]. *ACS Synthetic Biology*, 2024, 13(2): 411-412.
- [14] BHUSHAN K. CRISPR/Cas13a targeting of RNA virus in plants [J]. *Plant Cell Reports*, 2018, 37(12): 1707-1712.
- [15] ALI Z, MAHAS A, MAHFOUZ M. CRISPR/Cas13 as a tool for RNA interference [J]. *Trends in Plant Science*, 2018, 23(5): 374-378.
- [16] HU Y P, CHEN Y C, XU J, et al. Metagenomic discovery of novel CRISPR-Cas13 systems [J]. *Cell Discovery*, 2022, 8(1): 107.
- [17] LIN P, QIN S G, PU Q Q, et al. CRISPR-Cas13 inhibitors block RNA editing in bacteria and mammalian cells [J]. *Molecular Cell*, 2020, 78(5): 850-861. e5.
- [18] KELLEY C P, HAERLE M C, WANG E T. Negative autoregulation mitigates collateral RNase activity of repeat-targeting CRISPR-Cas13d in mammalian cells [J]. *Cell Reports*, 2022, 40(7): 111226.
- [19] LI Y F, XU J J, GUO X F, et al. The collateral activity of RfxCas13d can induce lethality in a RfxCas13d knock-in mouse model [J]. *Genome Biology*, 2023, 24(1): 20.
- [20] 曹瑞萌, 徐逸程, 产久林, 等. 利用CRISPR/Cas9技术研究保守非编码元件对斑马鱼血红蛋白生成的影响 [J]. 上海海洋大学学报, 2025, 34(1): 1-11.
- [21] CAO R M, XU Y C, CHAN J L, et al. Impact of conserved non-coding element on zebrafish hemoglobin production using CRISPR/Cas9 technology [J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2025, 34(1): 1-11.
- [22] AMANR, ALI Z, BUTTH, et al. RNA virus interference via CRISPR/Cas13a system in plants [J]. *Genome Biology*, 2018, 19(1): 1.
- [23] KUSHAWAH G, HERNANDEZ-HUERTAS L, ABUGATTAS-NUÑEZ DEL PRADO J, et al. CRISPR-cas13d induces efficient mRNA knockdown in animal embryos [J]. *Developmental Cell*, 2020, 54(6): 805-817. e7.
- [24] HERNANDEZ-HUERTAS L, KUSHAWAH G, DIAZ-MOSCOSO A, et al. Optimized CRISPR-RfxCas13d system for RNA targeting in zebrafish embryos [J]. *Star Protocols*, 2022, 3(1): 101058.
- [25] SHANGGUAN H K, HUANG X Z, LIN J D, et al. Knockdown of *Kmt2d* leads to growth impairment by activating the *Akt/β-catenin* signaling pathway [J]. *G3 Genes|Genomes|Genetics*, 2024, 14(3): jkad298.
- [26] MAHAS A, AMAN R, MAHFOUZ M. CRISPR-Cas13d mediates robust RNA virus interference in plants [J]. *Genome Biology*, 2019, 20(1): 263.
- [27] ZHAO Y L, YANG X, ZHOU G H, et al. Engineering plant virus resistance: from RNA silencing to genome editing strategies [J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2020, 18(2): 328-336.
- [28] AMAN R, MAHAS A, BUTT H, et al. Engineering

- RNA virus interference via the CRISPR/Cas13 machinery in *Arabidopsis*[J]. *Viruses*, 2018, 10(12): 732.
- [28] 林梦娇,陈亚东,刘洋,等. 半滑舌鳎*vstm2a*基因的响应细菌感染的表达模式和功能[J]. 上海海洋大学学报, 2024, 33(6):1299-1312.
LIN M J, CHEN Y D, LIU Y, et al. The expression pattern and function of *vstm2a* gene in response to bacterial infection in *Cynoglossus semilaevis* [J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2024, 33(6):1299-1312.
- [29] ZHANG T, ZHAO Y L, YE J J, et al. Establishing CRISPR/Cas13a immune system conferring RNA virus resistance in both dicot and monocot plants [J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2019, 17(7): 1185-1187.
- [30] NOUREEN A, ZUHAIB KHAN M, AMIN I, et al. Broad-spectrum resistance against multiple PVY-strains by CRISPR/Cas13 system in *Solanum tuberosum* crop [J]. *GM Crops & Food*, 2022, 13(1): 97-111.
- [31] ZHAN X H, ZHANG F J, ZHONG Z Y, et al. Generation of virus-resistant potato plants by RNA genome targeting [J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2019, 17(9): 1814-1822.
- [32] BACHARACH E, MISHRA N, BRIESE T, et al. Characterization of a novel orthomyxo-like virus causing mass die-offs of tilapia[J]. *mBio*, 2016, 7(2): e00431-e004316.
- [33] 赵玲敏,左妍斐,黄力行. 水产健康养殖中病害防控研究进展[J]. 安徽农业科学, 2018, 46(28): 18-21, 52.
ZHAO L M, ZUO Y F, HUANG L X. Research progress on control of disease in aquaculture[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2018, 46(28): 18-21, 52.
- [34] 陈昌福. 避免水产疾病发生,止损必由之路! 对水产养殖动物疾病进行预防的理由[J]. 当代水产, 2019(12): 82, 86.
CHEN C F. Avoiding avoiding aquatic diseases is a sure way to stop losses! Rationale for prevention of diseases in aquaculture animals[J]. *Current Fisheries*, 2019(12): 82, 86.
- [35] 李锐,蔡小红,张志勇,等. 微生态制剂在水产养殖中的应用进展[J]. 内江科技, 2024, 45(8): 50-51, 119.
LI R, CAI X H, ZHANG Z Y, et al. Progress in the application of microecological agents in aquaculture [J]. *Nei Jiang Science & Technology*, 2024, 45(8): 50-51, 119.
- [36] 宋华丽,孙效迎,孔祥会,等. RNA干扰技术在水产动物抗病毒和抗寄生虫研究中的应用研究进展[J]. 生物技术通报, 2020, 36(2): 193-205.
SONG H L, SUN X Y, KONG X H, et al. Application of RNA interference technology in antiviral and antiparasitic research of aquatic animals [J]. *Biotechnology Bulletin*, 2020, 36(2): 193-205.
- [37] 任婉莹,姜晓娜,葛彦龙,等. *TLR18*基因在鲤感染CyHV-3中的表达模式及信号通路[J]. 上海海洋大学学报, 2023, 32(3):500-509.
REN W Y, JIANG X N, GE Y L, et al. Expression pattern and related signal pathway of *TLR18* in CyHV-3 infection of cyprinid carp [J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2023, 32(3):500-509.
- [38] 吴凤雷,黄瑜,黄郁葱,等. 罗湖病毒实时荧光定量RT-PCR检测方法的建立[J]. 广东海洋大学学报, 2019, 39(5): 31-37.
WU F L, HUANG Y, HUANG Y C, et al. Development of real-time fluorescence quantitative RT-PCR detection method for Tilapia Lake virus[J]. *Journal of Guangdong Ocean University*, 2019, 39(5): 31-37.
- [39] 黄玉瑶. 青鳉的生物学特性与饲养管理技术[J]. 动物学杂志, 1988, 23(6): 28-31.
HUANG Y Y. Biological characteristics and feeding management techniques of *Oryzias latipes* [J]. *Chinese Journal of Zoology*, 1988, 23(6): 28-31.
- [40] IWAMATSU T. Stages of normal development in the medaka *Oryzias latipes*[J]. *Mechanisms of development*, 2004, 121(7-8): 605-618.
- [41] 张丽俏,刘洋,曾阳,等. 氯化镉、灭多威和硝基苯对日本青鳉(*Oryzias latipes*)行为抑制的生物应急监测[J]. 生态毒理学报, 2011, 6(2): 154-159.
ZHANG L Q, LIU Y, ZENG Y, et al. Biological emergency monitoring on the behavior inhibition of Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) exposed to cadmium chloride, methomyl and nitrobenzene [J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2011, 6(2): 154-159.
- [42] TANAKA M, SAITO D, MORINAGA C, et al. Cross talk between germ cells and gonadal somatic cells is critical for sex differentiation of the gonads in the teleost fish, medaka (*Oryzias latipes*) [J]. *Development, Growth & Differentiation*, 2008, 50(4): 273-278.
- [43] FANG J, CHEN T S, PAN Q H, et al. Generation of albino medaka (*Oryzias latipes*) by CRISPR/Cas9 [J]. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, 2018, 330(4): 242-246.
- [44] CHEN T S, CAVARI B, SCHARTL M, et al. Identification and expression of conserved and novel RNA variants of medaka *pax6b* gene [J]. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, 2017, 328(5): 412-422.
- [45] PAN Q H, LUO J Z, JIANG Y W, et al. Medaka (*Oryzias latipes*) *Olpax6.2* acquires maternal inheritance and germ cells expression, but functionally degenerate in the eye[J]. *Gene*, 2023, 872: 147439.
- [46] PAN Q H, LUO J Z, JIANG Y W, et al. Efficient gene editing in a medaka (*Oryzias latipes*) cell line and embryos by SpCas9/tRNA-gRNA [J]. *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B*, 2022, 23(1): 74-83.

- [47] 叶姣,陈长华,夏杰,等. 温度对重组大肠杆菌生长及外源蛋白表达的影响[J]. 华东理工大学学报, 2002, 28(4): 364-367.
- YE J, CHEN C H, XIA J, et al. Effect of temperature on the growth of recombinant E. coli and on the expression of recombinant protein [J]. Journal of East China University of Science and Technology, 2002, 28(4): 364-367.
- [48] KELLNER M J, KOOB J G, GOOTENBERG J S, et al. SHERLOCK: nucleic acid detection with CRISPR nucleases[J]. Nature protocols, 2019, 14(10): 2986-3012.
- [49] MYHRVOLD C, FREIJE C A, GOOTENBERG J S, et al. Field-deployable viral diagnostics using CRISPR-Cas13[J]. Science, 2018, 360(6387): 444-448.
- [50] LEE D, SHIN Y, CHUNG S, et al. Simple and highly sensitive molecular diagnosis of Zika virus by lateral flow assays[J]. Analytical Chemistry, 2016, 88(24): 12272-12278.
- [51] 刘雨风. 基于CRISPR-Cas13a的H7N9检测技术研究[D]. 荆州: 长江大学, 2019.
- LIU Y F. CRISPR-Cas13a based diagnostic technology for avian influenza a (H7N9) virus infection [D]. Jingzhou: Yangtze University, 2019.
- [52] ZHOU J, LI Z, SEUN OLAJIDE J, et al. CRISPR/Cas-based nucleic acid detection strategies: Trends and challenges[J]. Heliyon, 2024, 10(4): e26179.
- [53] XU C L, ZHOU Y S, XIAO Q Q, et al. Programmable RNA editing with compact CRISPR-Cas13 systems from uncultivated microbes [J]. Nature Methods, 2021, 18(5): 499-506.
- [54] LU M X, TOKUYASU T A. CRISPR-Cas13-based RNA-interacting protein detection in living cells [J]. Biochemistry, 2020, 59(19): 1791-1792.
- [55] LIU L, PEI D S. Insights gained from RNA editing targeted by the CRISPR-Cas13 family [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(19): 11400.
- [56] BUCHMAN A B, BROGAN D J, SUN R C, et al. Programmable RNA targeting using CasRx in flies [J]. The CRISPR Journal, 2020, 3(3): 164-176.

Application of Cas13d system in the down-regulation of *tyr* gene expression in medaka (*Oryzias latipes*)

XU Zhaoran^{1,2,3}, XIA Bilin⁴, JIANG Yuwen⁴, DENG Ju^{1,2,3}, CHEN Ruoxue^{1,2,3}, LIANG JingJie^{1,2,3}, CHEN Tiansheng^{1,2,3}

(1.National Key Laboratory of Mariculture Bio-breeding, Jimei University, Xiamen 361021, Fujian, China; 2. Ministry of Education Engineering Research Centre for Eel Modern Industrial Technology, Jimei University, Xiamen 361021, Fujian, China; 3.Key Laboratory of Healthy Seawater Aquaculture in the East China Sea, Jimei University, Xiamen 361021, Fujian, China; 4. College of Fisheries of Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, Hubei, China)

Abstract: The CRISPR-Cas13d protein targets RNA substrates through crRNA-mediated sequence-specific binding and achieves precise cleavage via its ribonuclease activity, offering a non-genome-editing strategy for RNA-level gene regulation. In this study, we optimized the Cas13d gene sequence based on the codon preference of medaka (*Oryzias latipes*), successfully constructed a prokaryotic expression system, and purified recombinant Cas13d protein with a molecular weight of 115 ku. By microinjecting *in vitro*-transcribed Cas13d mRNA complexed with crRNA targeting the tyrosinase gene (*tyr*) into medaka embryos, alongside parallel experiments using Cas13d protein/crRNA ribonucleoprotein (RNP) complexes, we systematically evaluated RNA-editing efficiency. qRT-PCR and sequencing analyses demonstrated that both delivery methods significantly reduced *tyr* RNA levels in embryos ($P < 0.01$), while DNA sequencing confirmed the absence of mutations in the target DNA sequences. This study validates the effectiveness and specificity of Cas13d-mediated gene silencing through RNA editing in medaka, not only providing a novel regulatory tool for fish genetic research but also establishing a theoretical foundation for developing RNA-targeted Cas13d antiviral transgenic fish lines.

Key words: medaka; CRISPR-Cas13d; *tyr*; protein purification; RNA editing