

文章编号: 1674-5566(2025)01-0001-11

DOI: 10.12024/jsou.20241204722

## 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

曹瑞萌<sup>1,2,3</sup>, 徐逸程<sup>4</sup>, 产久林<sup>4,5</sup>, 许强华<sup>1,2,3</sup>, 吴智超<sup>4,5</sup>, 胡鹏<sup>4,5</sup>

(1. 上海海洋大学 海洋生物资源与管理学院, 上海 201306; 2. 大洋渔业资源可持续开发教育部重点实验室, 上海 201306; 3. 国家远洋渔业工程技术研究中心, 上海 201306; 4. 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306; 5. 上海海洋大学 水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海 201306)

**摘要:** 血红蛋白是高等生物血液循环系统中的关键组分, 其功能障碍与贫血、心血管疾病等密切相关。南极冰鱼科(Channichthyidae)鱼类血液因缺乏功能性血红蛋白呈现白色, 为研究血红蛋白的生物学功能提供了独特的模型。研究发现位于*foxp1b*基因上游的 intergenic 区域 chr6:43629743-43629779 可能作为关键因子参与鱼类血红蛋白生成, 但其具体的调控功能尚不清楚。本研究通过 CRISPR/Cas9 基因编辑技术, 以斑马鱼为模型构建了 CNE 敲除杂合突变体, 并通过血红蛋白染色比较了野生型对照组与突变体斑马鱼的血红蛋白生成差异。结果表明, chr6:43629743-43629779 的敲除显著降低了斑马鱼血红蛋白的生成。qRT-PCR 分析结果表明, 突变体斑马鱼 *foxp1b* 基因表达量显著低于野生型对照组。揭示了 CNE 通过调控下游基因表达从而调控血红蛋白生成的分子机制, 提示 CNE 在血红蛋白生成中发挥了关键作用。

**关键词:** 南极冰鱼; 斑马鱼; 血红蛋白; CNE; CRISPR/Cas9

**中图分类号:** S 917 **文献标志码:** A

在高等生物的血液循环系统中, 血红蛋白扮演着至关重要的角色, 负责氧气的有效运输和释放, 以维持组织和器官的正常功能<sup>[1]</sup>。血红蛋白水平的异常, 会导致机体出现严重的氧气供应不足, 进而引发包括地中海贫血、心力衰竭在内的一系列严重的临床病症, 对生命构成威胁<sup>[1]</sup>。然而, 生活在南极极端寒冷海域的南极冰鱼科(Channichthyidae)鱼类, 其血液中完全缺失血红蛋白却能够正常生存。这一特性为研究血红蛋白的功能提供了宝贵的模型, 但因其生长环境极端且研究条件受限, 其基因功能验证无法顺利开展<sup>[2-4]</sup>。相比之下, 斑马鱼(*Danio rerio*)作为一种模式生物, 其基因组与高等脊椎动物具有较高的保守性, 成为研究鱼类血红蛋白生成与调控机制的理想替代模型。通过利用斑马鱼开展研究, 不仅有助于我们深入理解生物如何在极端环境中生存和演化, 而且可能为治疗与血红蛋白相关的

疾病提供新的视角和潜在的治疗策略<sup>[5]</sup>。

长期以来, 科研人员主要在基因编码层面对斑马鱼血红蛋白进行研究<sup>[6-7]</sup>, 确定了在斑马鱼胚胎发育的早期阶段, 血红蛋白的合成主要受到 *hbae1*、*hbae3*、*hbbe1*、*hbae4*、*hbbe3*、*hbae5* 和 *hbbe2* 等 7 个编码基因的协同调控<sup>[1]</sup>。这些基因编码的蛋白在斑马鱼胚胎血液形成中发挥着核心作用, 为后续的血液循环和氧气运输奠定基础。然而, 血红蛋白的生成是一个极为复杂的过程, 不仅涉及基因的编码, 还包括基因的转录调控和蛋白质的表达等多个层面。其中, 保守非编码元件(Conserved non-coding element, CNE)作为基因组非编码区上的一段 DNA 序列, 通过与转录因子和其他调控蛋白相互作用, 增强或者减弱特定基因的时空特异表达, 在生物体表型发育和适应性状演化过程中发挥着至关重要的作用<sup>[8-9]</sup>。因此, 探究 CNE 在血红蛋白生成过程中的关键调控

收稿日期: 2024-12-02 修回日期: 2024-12-31

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金(32200414)

作者简介: 曹瑞萌(1999—), 女, 硕士研究生, 研究方向为海洋生物学。E-mail: m220200647@st.shou.edu.cn

通信作者: 胡鹏, E-mail: phu@shou.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.shhydx.com>

作用,对于深入理解血红蛋白在生物体特定发育阶段和组织中精确合成的分子机制,以及红细胞系统的高效准确运作具有重要意义。

CRISPR/Cas9 系统 (Clustered regularly interspaced short palindromic repeats/Cas9) 是一种基于细菌免疫机制的基因编辑技术,广泛应用于基因功能研究、基因治疗等领域<sup>[10]</sup>。本研究以模式动物斑马鱼为模型,利用 CRISPR/Cas9 技术构建 CNE 突变体,从而探究 CNE 对斑马鱼血红蛋白生成的关键作用,为解析鱼类血红蛋白的调控机制提供新视角,以期进一步为人类血液疾病的分子基础研究提供新靶点。

## 1 材料与方法

### 1.1 斑马鱼养殖与维护

研究使用的 AB 品系斑马鱼购于国家斑马鱼资源中心,斑马鱼养殖于上海海洋大学实验室,斑马鱼养殖循环系统购置于上海海圣设备有限公司。斑马鱼养殖过程中温度维持在 26~29 °C, pH 控制在 6.5~7.5,并保持水质的清洁与稳定,维护水质平衡。实验方案经上海海洋大学动物伦理委员会批准,并遵守中国科学技术部制定的《实验动物伦理待遇指南》。

### 1.2 筛选候选 CNE 序列

通过 NCBI 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 得到包含 4 种白血南极冰鱼在内的 16 种鱼类基因组,利用 LASTZ 软件,将包含 4 种白血南极冰鱼在内的 16 种鱼类基因组:青鳉 *Oryzias latipes* (GCF\_002234675.1), 大刺鲃 *Mastacembelus armatus* (GCA\_900324485.2), 绿鳍马面鲀 *Thamnaconus septentrionalis* (GCA\_00982\_3395.1), 黄金鲈 *Perca flavescens* (GCF\_004354835.1), 三刺鱼 *Gasterosteus aculeatus* (BROADS1), 阿留申平鲈 *Sebastes aleutianus* (GCA\_916700875.1), 鞍斑杜父鲈 *Cottoperca gobio* (GCF\_900634415.1), 智利油南极鱼 *Eleginops maclovinus* (GCA\_039105255.1), 鳞头犬牙南极鱼 *Dissostichus mawson* (GCA\_011823955.1), 伯氏肩孔南极鱼 *Trematomus bernacchii* (GCF\_902827165.1), 真裸南极鱼 *Harpagifer antarcticus* (GCA\_90282\_7135.1), 尖

头裸龙鳕 *Gymnodraco acuticeps* (GCF\_902827175.1), 南乔治亚拟冰鱼 *Pseudochaenichthys georgianus* (GCF\_902827115.1), 头带冰鱼 *Chaenocephalus aceratus* (GCA\_023974075.1), 龙嘴雪冰鱼 *Chionodraco myersi* (GCA\_009756435.1), 独角雪冰鱼 *Chionodraco hamatus*<sup>[11]</sup> 与斑马鱼 (GRCz11) 基因组进行两两比对。由于 *foxp1b* 被证明与小鼠等物种的血管、心脏发育密切相关<sup>[12]</sup>, 检索 *foxp1b* 附近在冰鱼中存在特异性丢失或插入碱基的 CNE。获得了在斑马鱼基因组中对应的候选保守非编码元件 chr6:43629743-43629779 区域, 该元件下游基因为 *foxp1b*。

### 1.3 chr6:43629743-43629779 区域敲除靶点设计及 sgRNA 体外转录

在 Ensembl 数据库 (<http://asia.ensembl.org/index.html>) 中检索获得斑马鱼 chr6:43629743-43629779 区域上下游各 500 bp 序列信息,并将序列导入 Crisprscan (<https://www.crisprscan.org/>) 在线网站进行敲除靶点设计。利用 NCBI 网站中的 blast 工具,对获得的 4 个 chr6:43629743-43629779 区域敲除靶点序列进行斑马鱼基因组的比对,以确定靶点特异性。chr6:43629743-43629779 区域敲除靶点序列及突变体检测引物序列信息如表 1 所示,并送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行合成。

表 1 chr6:43629743-43629779 靶点序列、突变体检测及 qRT-PCR 引物序列信息

Tab. 1 Information on chr6:43629743-43629779 target sequence, mutant detection, and qRT-PCR primer sequences

引物名称 Primer name	序列(5'-3') Sequence (5'-3')	用途 Application
chr6-TS1	CCGAGAGATAAAATAGGTA	基因敲除
chr6-TS2	GGCGGTTTTGACTTCGGAAG	基因敲除
chr6-TS3	GGGCGTGTACGCGTCAAAA	基因敲除
chr6-TS4	GGAACGGCAGAATTGACGTCGGG	基因敲除
chr6-F1	GACAACATACGAGAGCATGGCTG	突变体检测
chr6-R1	CATTAGGGGCTGTCATCTGC	突变体检测
<i>foxp1b</i> -F1	TCCAACTACCTAGCAAGCG	qRT-PCR
<i>foxp1b</i> -R1	ATTCCTTTGGTCTCGTTGAGG	qRT-PCR
$\beta$ -actin-F	CGAGCTGTCTCCCATCCA	内参基因
$\beta$ -actin-R	TCACCAACGTAGCTGTCTTTCTG	内参基因

设计的4组sgRNA序列合成后,分别与scaffold序列进行PCR扩增以制备体外转录模板,PCR条件:95℃5min;95℃30s,60℃30s,72℃15s,共34个循环;72℃延伸5min,反应程序结束后于4℃保存。利用QIAquick PCR Purification试剂盒(Qiagen公司,货号:28104)对上述PCR产物进行纯化,并最终溶解于20μL RNase free水中。利用T7 ULTRA体外转录试剂盒(Thermo Fisher Scientific,货号:AM1314)对纯化后的PCR产物进行37℃孵育4h,完成sgRNA的体外转录。转录产物经DNase消化20min后,使用LiCl<sub>2</sub>完成对sgRNA的纯化。对sgRNA浓度进行测定后,分装保存于-80℃冰箱备用。

本研究所用的Cas9质粒由中国科学院水生生物研究所提供。Cas9质粒经限制性内切酶Hind III线性化后,利用mMACHINE™ T3转录试剂盒(Thermo Fisher Scientific,货号:AM1348)进行体外转录获得Cas9 mRNA,纯化测定浓度后,分装保存于-80℃冰箱备用。

#### 1.4 显微注射及靶点有效性验证

sgRNA与Cas9 mRNA按照1:4混合,并通过显微注射仪注入斑马鱼I细胞期的动物极内,每个胚胎的注射剂量为1 ng/μL。针对chr6:43629743-43629779区域的4个靶点sgRNA,分别注射50枚胚胎,注射完成后放入28℃培养箱暂养。收集发育24h后的斑马鱼胚胎,采用氢氧化钠法提取注射胚胎的基因组DNA,并利用突变体检测引物进行PCR扩增,检测成功突变个体。PCR反应体系:注射胚胎DNA模板1μL,PCR Taq Mix(诺唯赞,货号:P112-02)10μL,chr6-F1/R1各1μL,ddH<sub>2</sub>O 7μL。反应条件:95℃3min;95℃30s,65℃30s,72℃1min,共34个循环;72℃延伸5min后,于4℃保存。有效突变体利用上述PCR产物的T7E1酶切图谱进行鉴定,酶切产物以2%琼脂糖凝胶进行电泳,并统计chr6:43629743-43629779每个敲除靶点的基因编辑效率(突变胚胎数/总的胚胎数),选择敲除效率高的靶点进行后续chr6:43629743-43629779敲除实验和血红蛋白染色分析。

#### 1.5 血红蛋白染色及定量

成熟红细胞的血红蛋白可以催化双氧水对二盐酸邻联茴香胺(O-dianisidine, Sigma公司,货号:D3252-5)的氧化反应而显示出铁锈色(偏红

色),因此可综合胚胎的染色面积和平均光密度值来判断成熟红细胞的数量<sup>[13]</sup>。实验步骤如下:分别收集在28℃培养箱中培养52h的注射组和野生型斑马鱼胚胎,使用麻醉剂处理胚胎1min后,利用1565μL O-dianisidine染色液(1.2mg O-dianisidine, 0.8mL无水乙醇, 9.0μL乙酸钠,溶于无酶水中并定容至1565μL)和435μL 3%双氧水的混合液对胚胎进行避光染色,染色时间为20min。染色结束后,加入1mL 4% PFA在水平摇床上固定2h,并利用1mL漂白液(8mg氢氧化钾, 30μL双氧水, 5μL Tween-20,溶于无酶水中并定容至1mL)处理20min。漂白结束后的胚胎储存于50%甘油中,并置于体式显微镜下进行图像采集,利用Image J软件对注射组和野生型胚胎O-dianisidine染色的面积和光密度值进行定量。

#### 1.6 RNA提取及qRT-PCR分析

收集不少于10个发育至52h的斑马鱼胚胎,采用500μL Trizol(Thermo Fisher Scientific,货号:15596018CN)进行匀浆;在室温孵育后,加入200μL氯仿,混合液振荡15s后离心以分离各相;小心将上层水相(含RNA)转移至新试管中,并加入等体积的异丙醇以沉淀RNA;RNA沉淀用75%的乙醇洗涤,随后溶解于20μL无RNase水中,使用NanoDrop分光光度计测量其浓度和质量。

将上述提取的RNA使用ABScript Neo RT Master Mix(Abcclonal公司,货号:RK20433)进行逆转录。并采用SsoFast Eva Green Supermix(Bio-Rad,货号:1725200)在CFX Opus 96实时PCR系统(Bio-Rad)上进行qRT-PCR实验。PCR扩增程序:初始步骤95℃30s,随后40个循环,每个循环95℃10s及58℃30s。引物序列详见表1。qRT-PCR结果采用2<sup>-ΔΔC<sub>t</sub></sup>方法进行分析,以β-actin基因作为内参基因。

#### 1.7 统计学分析

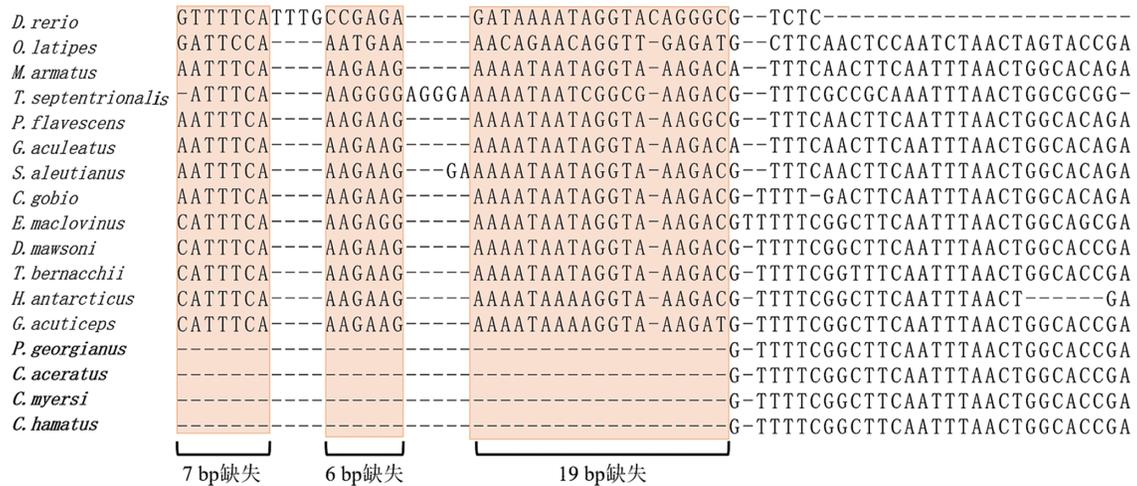
数据分析利用R脚本进行,所有数据均以平均值±标准误(n=3)表示。两组数据的比较采用Student's t分析;3组或3组以上数据采用ANOVA分析,并采用Tukey进行两两多重比较。以P<0.05表示显著性差异(\*, P<0.05; \*\*, P<0.01; \*\*\*, P<0.001; \*\*\*\*, P<0.0001),并使用ggplot2 R软件包作图。

## 2 结果与分析

### 2.1 chr6:43629743-43629779 在鱼类中的保守性分析

比较 17 种鱼类的基因组数据,结果显示 chr6:43629743-43629779 在 4 种白血南极冰鱼中特异性缺失了 32 bp 序列,而这些核心序列在斑马鱼等 13 种红血鱼类中均存在且保守度较高(图

1)。通过 JASPAR 网站对 chr6:43629743-43629779 核心序列进行了转录因子结合基序的预测,发现 chr6:43629743-43629779 核心序列中存在转录因子 GATA6 潜在的结合位点,而 GATA6 被证明能够调控血液发生过程<sup>[14]</sup>。以上结果提示,筛选的 chr6:43629743-43629779 作为潜在的关键 CNE 可能参与调控鱼类血红蛋白的生成。



chr6:43629743-43629779 在 17 种鱼类间进行序列比对,加粗的 4 种鱼类为“白血”南极冰鱼,橘色方框包含了预测转录因子的结合位点;黑框标出的是 chr6:43629743-43629779 具体缺失的 32 bp 核心差异序列。*D. rerio* 斑马鱼;*O. latipes* 青鳉;*M. armatus* 大刺鳅;*T. septentrionalis* 绿鳍马面鲈;*P. flavescens* 黄金鲈;*G. aculeatus* 三刺鱼;*S. aleutianus* 阿留申平鲉;*C. gobio* 鞍斑杜父鱼;*E. maclovinus* 智利油南极鱼;*D. mawsoni* 鳞头犬牙南极鱼;*T. bernacchii* 伯氏肩孔南极鱼;*H. antarcticus* 真裸南极鱼;*G. acuticeps* 尖头裸龙鳞;*P. georgianus* 南乔治亚拟冰鱼;*C. aceratus* 头带冰鱼;*C. myersi* 龙嘴雪冰鱼;*C. hamatus* 独角雪冰鱼。

The sequence chr6:43629743-43629779 was aligned across 17 fish species. The sequences of four species, highlighted in bold, represent "white-blooded" Antarctic icefish. The orange boxes indicate predicted transcription factor binding sites, while the blue box marks the specific 32 bp core deletion of chr6:43629743-43629779. *D. rerio* (zebrafish); *O. latipes* (medaka); *M. armatus* (tire track eel); *T. septentrionalis* (greenfin filefish); *P. flavescens* (yellow perch); *G. aculeatus* (three-spined stickleback); *S. aleutianus* (rougheye rockfish); *C. gobio* (channel bull blenny); *E. maclovinus* (patagonian blennie); *D. mawsoni* (Antarctic toothfish); *T. bernacchii* (emerald rockcod); *H. antarcticus* (Antarctic spiny plunderfish); *G. acuticeps* (ploughfish); *P. georgianus* (South Georgia icefish); *C. aceratus* (blackfin icefish); *C. myersi* (Myers' icefish); and *C. hamatus*.

图1 chr6:43629743-43629779 的多序列比对以及转录因子预测

Fig. 1 Multiple sequence alignment and transcription factor prediction of chr6:43629743-43629779

### 2.2 chr6:43629743-43629779 敲除靶点的效率评估

为了评估不同靶点(chr6-TS1-chr6-TS4)对 chr6:43629743-43629779 的敲除效率,分别收集 4 个靶点的斑马鱼注射胚胎进行 PCR 扩增和 T7E1 酶切,并以野生型斑马鱼胚胎样本作为阴性对照。结果如图 2 所示,chr6-TS1 靶点的敲除效率达到了 100%(10/10),表明该靶点能够有效地诱导 chr6:43629743-43629779 片段的敲除。相比之下,chr6-TS2 靶点未能检测到任何突变体(0/

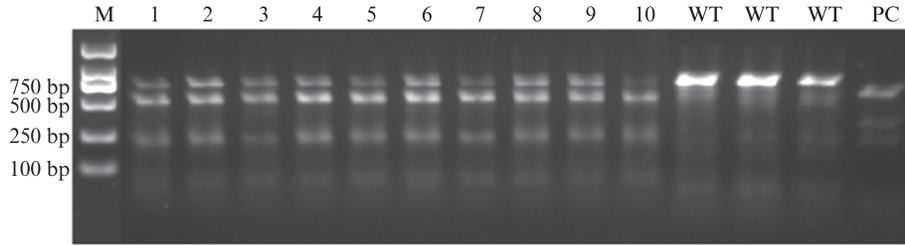
10),而 chr6-TS3 和 chr6-TS4 靶点的敲除效率分别为 10%(1/10)和 40%(4/10)。基于以上结果,本研究选择 chr6-TS1 靶点用于后续对 chr6:43629743-43629779 的功能研究及其调控血红蛋白生成的机制探索。

### 2.3 chr6:43629743-43629779 敲除显著抑制斑马鱼血红蛋白的生成

为了探明保守非编码元件 chr6:43629743-43629779 调控血红蛋白生成的功能,利用 chr6-TS1 完成了对斑马鱼 chr6:43629743-43629779 核

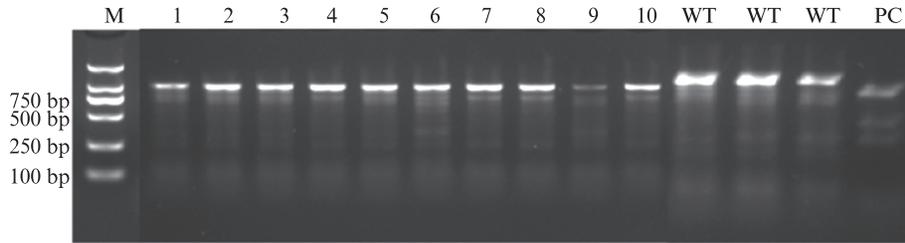
心序列的敲除,并选取与血红蛋白生成无关的酪氨酸酶基因(*tyr*)敲除个体(Ctrl)和野生型胚胎(WT)作为对照。注射后的胚胎存活率如表2所

示,存活的胚胎用于后续血红蛋白染色及斑马鱼 chr6:43629743-43629779 敲除突变体模型的构建。



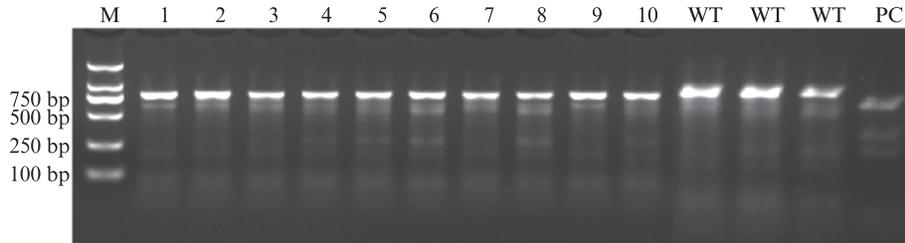
(a) chr6-TS1靶点敲除效率电泳图

Gel electrophoresis image showing knockout efficiency at the chr6-TS1 target site



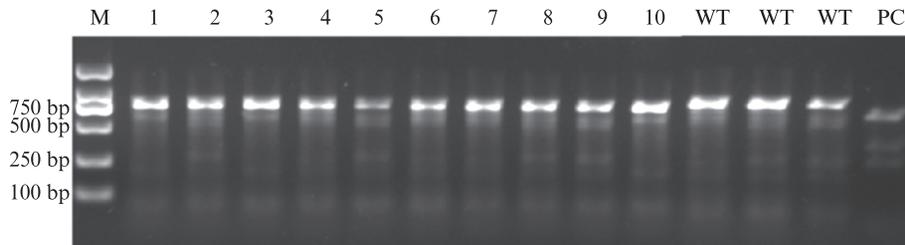
(b) chr6-TS2靶点敲除效率电泳图

Gel electrophoresis image showing knockout efficiency at the chr6-TS2 target site



(c) chr6-TS3靶点敲除效率电泳图

Gel electrophoresis image showing knockout efficiency at the chr6-TS3 target site



(d) chr6-TS4靶点敲除效率电泳图

Gel electrophoresis image showing knockout efficiency at the chr6-TS4 target site

M. 标准品 Marker; WT. 野生型对照; PC. 阳性对照; 其中阳性对照为试剂盒中提供的 Control template, 用于验证 T7E1 酶切反应的有效性。

M. Standard Marker; WT. Wild type; PC. Positive control; The positive control is the control template provided in the kit, which is used to verify the effectiveness of the T7E1 enzyme cleavage reaction.

图2 基于 T7E1 酶切评估不同靶点对 chr6:43629743-43629779 的敲除效率

Fig. 2 Assessment of knockout efficiency of chr6:43629743-43629779 by different target sites using T7E1 digestion

表2 斑马鱼胚胎注射后的存活率统计  
Tab. 2 Survival rate of zebrafish embryo after injection

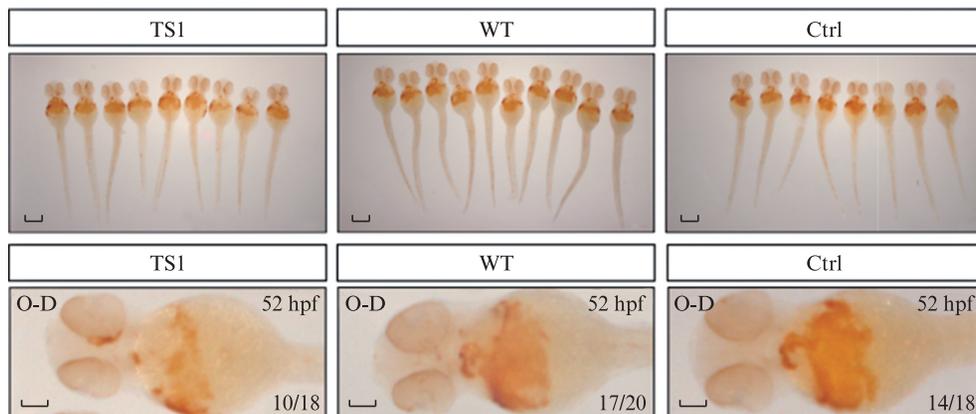
组别 Group	总数 Total number/个	12 h 死亡数 Number of deaths at 12 h/个	12 h 存活数 Number of survivors at 12 h/个	12 h 存活率 Survival rate at 12 h/%	24 h 死亡数 Number of deaths at 24 h/个	24 h 存活数 Number of survivors at 24 h/个	24 h 存活率 Survival rate at 24 h/%
野生型对照 WT	100	1	99	99	3	97	97
敲除个体 Ctrl	50	2	48	96	5	45	90
chr6-TS1	60	3	57	95	3	57	95

胚胎发育 52 h 后,收集 WT、Ctrl、TS1 组胚胎各 20 枚进行血红蛋白染色(图 3),并利用 Image J 软件对血红蛋白染色情况进行定量。结果显示:TS1 组胚胎血红蛋白染色平均光密度值显著低于 WT 组及 Ctrl 组,WT 组与 Ctrl 组之间血红蛋白染色平均光密度值无显著差异,而 TS1 组胚胎血红蛋白染色面积与 WT 组有显著差异,与 Ctrl 组无显著差异(图 3 和 4)。对 TS1 组胚胎进行基因型鉴定,测序峰图如图 5 所示,其中敲除成功个体占 66.67%。对 chr6:43629743-43629779 敲除成功组(TS1-S)及 chr6:43629743-43629779 敲除失败组(TS1-F)胚胎进行血红蛋白染色差异性分析,结果显示:TS1-S 组染色面积、染色平均光密度值及染色积分光密度值 3 个指标均显著低于 TS1-F(图 6

和 7)。以上结果表明,chr6:43629743-43629779 的缺失显著降低斑马鱼血红蛋白的生成,提示保守非编码元件 chr6:43629743-43629779 在血红蛋白生成过程中扮演了关键的调控作用。

#### 2.4 chr6:43629743-43629779 敲除显著降低 *foxp1b* 基因的表达

为探究 chr6:43629743-43629779 区域下游第一个基因 *foxp1b* 在 chr6:43629743-43629779 敲除成功组(TS1-S)与野生型组(WT)中的表达差异,通过 qRT-PCR 对 TS1-S 与 WT 组进行了分析,结果显示,与 WT 组相比,TS1-S 组 *foxp1b* 基因表达量下降了约 20%,且具有显著性差异(图 8)。

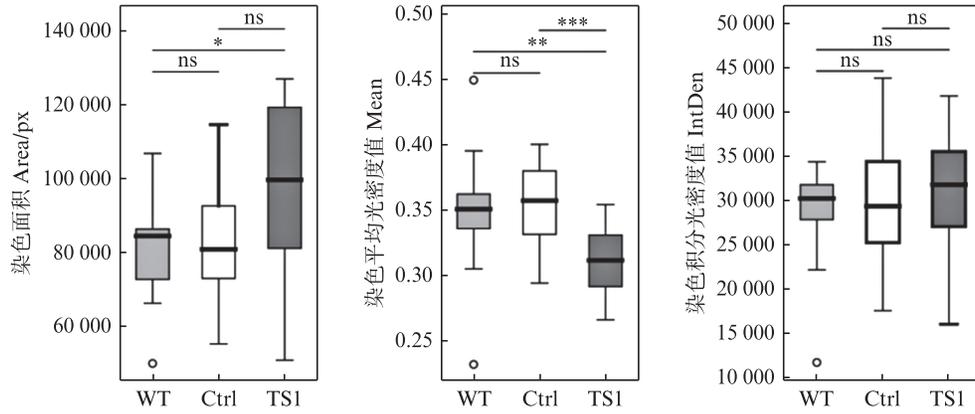


TS1. chr6:43629743-43629779 敲除组;WT. 野生型;Ctrl. 酪氨酸酶基因(*tyr*)敲除组;O-D. O-dianisidine 血红蛋白染色;52 hpf 为进行血红蛋白染色实验时斑马鱼个体的发育时间;右下角的数字为有表型个体与该组总个体数量比;比例尺:100 mm。

TS1. chr6:43629743-43629779 knockout group; WT. wild-type; Ctrl. *tyrosinase* gene (*tyr*) knockout group; O-D. O-dianisidine hemoglobin staining; 52 hpf indicates the developmental stage of zebrafish embryos during the hemoglobin staining experiment; the number in the bottom-right corner represents the ratio of phenotypic individuals to the total number of individuals in the group; scale bar: 100 mm.

图3 WT、Ctrl及 TS1 组斑马鱼胚胎的 O-dianisidine 染色

Fig. 3 O-dianisidine staining of wild-type, control group, and TS1 group zebrafish embryos



ns 表示无显著性差异 ( $P > 0.05$ ); \* 表示有显著性差异 ( $P < 0.05$ ); \*\* 表示有显著性差异 ( $P < 0.01$ ); \*\*\* 表示有显著性差异 ( $P < 0.001$ )。ns indicates that there is no significant difference ( $P > 0.05$ ); \* indicates significant difference ( $P < 0.05$ ); \*\* indicates significant difference ( $P < 0.01$ ); \*\*\* indicates significant difference ( $P < 0.001$ ).

图 4 WT、Ctrl、TS1 组血红蛋白染色情况差异性分析

Fig. 4 Differential analysis of hemoglobin staining in WT, Ctrl, and TS1 groups

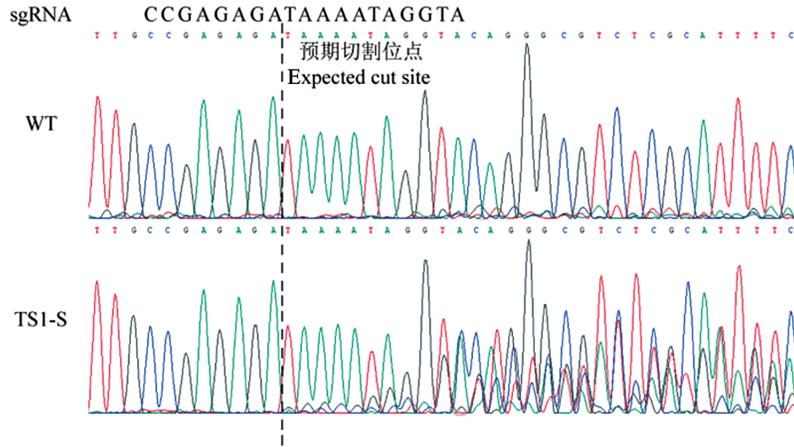
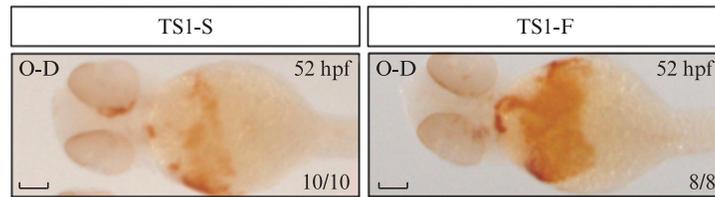


图 5 WT 组与 TS1-S 组测序峰图

Fig. 5 Sequencing Chromatograms of WT Group and TS1-S Group

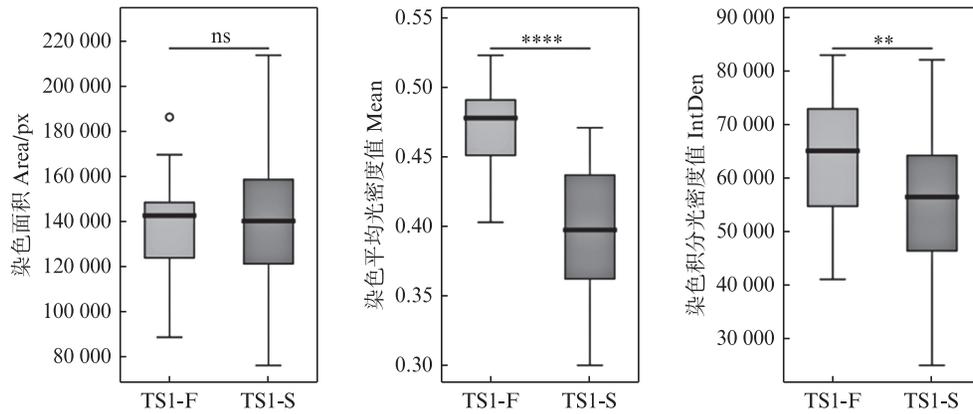


TS1-S. chr6:43629743-43629779 敲除成功组; TS1-F. chr6:43629743-43629779 敲除失败组; O-D. O-dianisidine 血红蛋白染色; 52 hpf 为进行血红蛋白染色实验时斑马鱼个体的发育时间; 右下角的数字为有表型个体与该组总个体数量比; 比例尺: 100  $\mu$ m。

TS1-S. chr6: 43629743-43629779 successful knockout group; TS1-F. chr6: 43629743-43629779 failed knockout group; O-D. O-dianisidine hemoglobin staining; 52 hpf indicates the developmental stage of zebrafish embryos during the hemoglobin staining experiment; the number in the bottom-right corner represents the ratio of phenotypic individuals to the total number of individuals in the group; scale bar: 100  $\mu$ m.

图 6 TS1-S 及 TS1-F 组斑马鱼胚胎的 O-dianisidine 染色

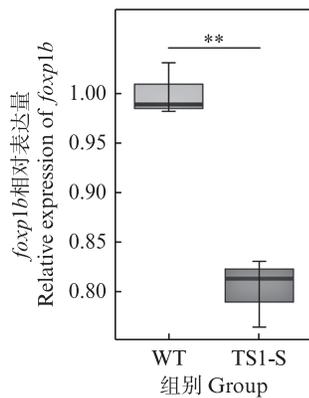
Fig. 6 O-dianisidine staining of TS1-S and TS1-F group zebrafish embryos



ns 表示无显著性差异 ( $P>0.05$ ); \*\*表示有显著性差异 ( $P<0.01$ ); \*\*\*\*表示有显著性差异 ( $P<0.0001$ )。  
ns indicates that there is no significant difference ( $P>0.05$ ); \*\* indicates significant difference ( $P<0.01$ ); \*\*\*\* indicates significant difference ( $P<0.0001$ ).

图7 TS1-F组与TS1-S组血红蛋白染色情况差异性分析

Fig. 7 Differential analysis of hemoglobin staining between TS1-F group and TS1-S group



\*\*表示有显著性差异 ( $P<0.01$ )。

\*\* indicates significant difference ( $P<0.01$ ).

图8 WT组与TS1-S组 *foxp1b* 基因相对表达量

Fig. 8 Relative expression of *foxp1b* gene in WT and TS1-S groups

### 3 讨论

虽然编码基因的功能在基因遗传中非常重要,但是调控其表达的非编码DNA调控元件同样也是破译不同生命活动过程中遗传密码的重要部分。其中,保守非编码元件CNE因其高于蛋白编码序列的保守性,在揭示物种间古老性状的演化机制中具有重要意义<sup>[15-16]</sup>。例如, KVON等<sup>[17]</sup>通过比较基因组学和CRISPR/Cas9实验证实了CNE的缺失如何导致蛇类四肢退化,而LAPOTIN等<sup>[18]</sup>则发现特定CNE的调控功能对南美电鱼的肌肉放电能力至关重要。这些研究表明,CNE不仅在基因表达调控中发挥关键作用,还可能在驱动复杂表型演化方面具有深远影响。

同样,南极冰鱼血红蛋白的缺失作为一种独

特的表型,可能也与特定的CNE相关。这一假设为探索血红蛋白生成的调控机制提供了新的研究方向。在南极冰鱼血红蛋白生成的研究中, DAANE等<sup>[19]</sup>通过对南极鱼亚目类群的分析,发现冰鱼血红细胞的丢失可能与调控血红细胞分化相关基因表达的CNE的快速进化有关。这些CNE通过调控血红细胞的成熟过程,减少了冰鱼体内的红细胞数量,从而帮助它们适应富氧的南极环境。但该研究未指出具体与血红蛋白生成相关的CNE及其内在机理。本研究通过比较包括南极冰鱼在内的17种鱼类的基因组数据,以CNE临近的已知功能基因 *foxp1b* 与血红蛋白之间的关联度并综合与CNE基序所结合的转录因子功能作为依据,筛选得到候选CNE chr6: 43629743-43629779区域。

本研究以斑马鱼上位于 *foxp1b* 基因上游的 intergenic 区域 chr6: 43629743-43629779 为研究对象,待斑马鱼胚胎在 28 °C 正常发育 52 h 后,对实验组、阴性对照组及野生型对照组分别进行血红蛋白染色实验。进行血红蛋白染色的3组胚胎均产自同一对亲本,其中WT为野生型对照,未做任何处理;Ctrl组为注射了 *tyr* 敲除靶点的对照,目的在于排除注射对血红蛋白带来的影响。各组之间的血红蛋白染色情况比较包括染色面积、染色平均光密度值,染色积分光密度值。通过比较野生型(WT)、对照组(Ctrl)以及 chr6: 43629743-43629779 敲除组胚胎的血红蛋白染色情况,结果显示,chr6: 43629743-43629779 敲除组胚胎的血红蛋白染色平均光密度值显著低于WT

组和 Ctrl 组。然而,敲除组的血红蛋白染色面积以及染色积分光密度值与 WT 组和 Ctrl 组均无显著差异。进一步对 chr6:43629743-43629779 敲除组胚胎进行基因型鉴定后,将敲除成功组(TS1-S)与敲除失败组(TS1-F)的血红蛋白染色情况进行比较。结果显示,TS1-S 的染色平均光密度值及染色积分光密度值均显著低于 TS1-F,但两组之间的染色面积差异不显著。这可能是由于斑马鱼的血红蛋白主要分布在血管密集的心脏及胸腹部区域,而 chr6:43629743-43629779 的成功敲除虽然对血红蛋白生成产生了显著影响,但血红蛋白的生成通常依赖于复杂的基因调控网络,单一 CNE 对血红蛋白生成的影响有限,因此 TS1-S 与 TS1-F 在血红蛋白染色面积上未表现出显著差异。此外,通过对实验组与野生型对照组斑马鱼胚胎在发育至 52 h 后进行定量分析,发现实验组中 *foxp1b* 基因的表达水平显著低于对照组。这一结果进一步提示 chr6:43629743-43629779 可能通过调控 *foxp1b* 基因表达,从而在斑马鱼血红蛋白生成过程中发挥作用。

血红蛋白生成的调控网络是多层次的,不仅需要分析单个 CNE 的功能,还需要关注与其他元件的协同作用。随着组学技术的快速发展,快速识别与血红蛋白生成相关的 CNE 成为可能。例如,通过全基因组比对,可以在南极冰鱼、红血南极鱼和模式生物斑马鱼等多物种间识别保守的非编码序列,利用大规模平行报告基因分析(Massively parallel reporter assay, MPRA)对筛选出的 CNE 进行高通量鉴定<sup>[20]</sup>,评价其在转录调控中的活性,通过对 CNE 所在区域的转录本生成能力和调控效果进行分析,筛选出可能参与血红蛋白生成的功能性非编码元件。并利用染色质可及性分析(如 ATAC-seq)<sup>[21]</sup>和染色质构象捕获(Hi-C)<sup>[22]</sup>技术明确这些 CNE 的活性与空间作用关系。同时,单细胞测序技术能够精确揭示 CNE 在不同发育阶段及细胞类型中对血红蛋白生成的调控角色。结合 CRISPR/Cas9 基因编辑技术,对 CNE 进行功能验证,可以进一步阐明其与血红蛋白生成的具体关系。

综上所述,研究 CNE 对斑马鱼血红蛋白生成具有重要意义。未来需整合多种组学技术,结合功能验证手段,从全局和动态视角全面解析 CNE 在血红蛋白生成和基因调控网络中的作用,为揭

示极端环境适应性生物学性状的分子机制提供重要基础,也为血液疾病的研究和治疗提供新思路。

作者声明本文无利益冲突

#### 参考文献:

- [1] SADRZADEH S M, GRAF E, PANTER S S, et al. Hemoglobin. A biologic fenton reagent[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1984, 259(23): 14354-14356.
- [2] DI PRISCO G, MACDONALD J A, BRUNORI M. Antarctic fishes survive exposure to carbon monoxide[J]. Experientia, 1992, 48(5): 473-475.
- [3] HIRSCHLER M M. Effects of carbon monoxide in man: exposure fatality studies [M]/HIRSCHLER M M. Carbon Monoxide and Human Lethality: Fire and Non-Fire Studies. London: CRC Press, 1993: 3-60.
- [4] 许强华,吴智超,陈良标. 南极鱼类多样性和适应性进化研究进展[J]. 生物多样性, 2014, 22(1): 80-87.
- [5] XU Q H, WU Z C, CHEN L B. Biodiversity and adaptive evolution of Antarctic notothenioid fishes [J]. Biodiversity Science, 2014, 22(1): 80-87.
- [6] DAANE J M, DORNBURG A, SMITS P, et al. Historical contingency shapes adaptive radiation in Antarctic fishes [J]. Nature Ecology & Evolution, 2019, 3(7): 1102-1109.
- [7] 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.
- [8] 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 Ocean University, 2015, 30(6): 573-579.
- [9] 黄梓熙,孟琳,陈良标,等. 斑马鱼 3 号染色体血红蛋白基因敲除对心血管发育的影响[J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2023, 43(7): 900-908.
- [10] HUANG Z X, MENG L, CHEN L B, et al. Effect of zebrafish hemoglobin gene knockout in chromosome 3 on cardiovascular development [J]. Journal of Nanjing Medical University (Natural Sciences), 2023, 43(7): 900-908.
- [8] SACKTON T B, GRAYSON P, CLOUTIER A, et al. Convergent regulatory evolution and loss of flight in paleognathous birds[J]. Science, 2019, 364(6435): 74-78.
- [9] WIRTHLIN M E, SCHMID T A, ELIE J E, et al. Vocal learning-associated convergent evolution in mammalian proteins and regulatory elements[J]. Science, 2024, 383(6690): eabn3263.
- [10] 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.
- [11] LU Y, LI W H, LI Y L, et al. Population genomics of an icefish reveals mechanisms of glacier-driven adaptive radiation in Antarctic notothenioids [J]. *BMC Biology*, 2022, 20(1): 231.
- [12] ZHUANG T, LIU J, CHEN X L, et al. Endothelial Foxp1 suppresses atherosclerosis via modulation of Nlrp3 inflammasome activation [J]. *Circulation Research*, 2019, 125(6): 590-605.
- [13] XUE Y Y, GAO S, LIU F. Genome-wide analysis of the zebrafish Klf family identifies two genes important for erythroid maturation [J]. *Developmental Biology*, 2015, 403(2): 115-127.
- [14] MAITRA M, KOENIG S N, SRIVASTAVA D, et al. Identification of *GATA6* sequence variants in patients with congenital heart defects [J]. *Pediatric Research*, 2010, 68(4): 281-285.
- [15] BI X P, ZHOU L, ZHANG J J, et al. Lineage-specific accelerated sequences underlying primate evolution [J]. *Science Advance*, 2023, 9(22): eadc9507.
- [16] ZHUANG X L, ZHANG J J, SHAO Y, et al. Integrative omics reveals rapidly evolving regulatory sequences driving primate brain evolution [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2023, 40(8): msad173.
- [17] KVON E Z, KAMNEVA O K, MELO U S, et al. Progressive loss of function in a limb enhancer during snake evolution [J]. *Cell*, 2016, 167(3): 633-642.
- [18] LAPOTIN S, SWARTZ M E, LUECKE D M, et al. Divergent cis-regulatory evolution underlies the convergent loss of sodium channel expression in electric fish [J]. *Science Advances*, 2022, 8(22): eabm2970.
- [19] DAANE J M, AUVINET J, STOE BENAU A, et al. Developmental constraint shaped genome evolution and erythrocyte loss in Antarctic fishes following paleoclimate change [J]. *PLoS Genetics*, 2020, 16(10): e1009173.
- [20] KLEIN J C, AGARWAL V, INOUE F, et al. A systematic evaluation of the design and context dependencies of massively parallel reporter assays [J]. *Nature Methods*, 2020, 17(11): 1083-1091.
- [21] GRANDI F C, MODI H, KAMPMAN L, et al. Chromatin accessibility profiling by ATAC-seq [J]. *Nature Protocols*, 2022, 17(6): 1518-1552.
- [22] FORCATO M, NICOLETTI C, PAL K, et al. Comparison of computational methods for Hi-C data analysis [J]. *Nature Methods*, 2017, 14(7): 679-685.

## Impact of conserved non-coding element on zebrafish hemoglobin production using CRISPR/Cas9 technology

CAO Ruimeng<sup>1,2,3</sup>, XU Yicheng<sup>4</sup>, CHAN Jiulin<sup>4,5</sup>, XU Qianghua<sup>1,2,3</sup>, WU Zhichao<sup>4,5</sup>, HU Peng<sup>4,5</sup>

(1. College of Marine Living Resource Sciences and Management, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Key Laboratory of Sustainable Exploitation of Oceanic Fisheries Resources, Ministry of Education, Shanghai 201306, China; 3. National Engineering Research Center for Oceanic Fisheries, Shanghai 201306, China; 4. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 5. Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Ministry of Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

**Abstract:** Hemoglobin is a vital component of the circulatory system in higher organisms, and its dysfunction is closely associated with conditions such as anemia and cardiovascular diseases. Antarctic icefish, whose blood appears white due to the absence of functional hemoglobin, serve as a unique model for studying the biological functions of hemoglobin. We identified a conserved non-coding element (CNE) located in the intergenic region chr6:43629743-43629779, upstream of the *foxp1b* gene, which may play a key role in hemoglobin production in fish. However, its specific regulatory function remains unclear. In this study, we utilized CRISPR/Cas9 gene-editing technology to generate zebrafish heterozygous mutants with knockouts of this CNE. Hemoglobin staining was subsequently performed to compare hemoglobin production between the wild-type control group and the mutant zebrafish. The results demonstrated that the knockout of chr6:43629743-43629779 significantly reduced hemoglobin production in zebrafish. Additionally, qRT-PCR (Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction) analysis revealed that *foxp1b* gene expression was significantly lower in the mutant zebrafish compared to the wild-type controls. This study indicates the molecular mechanism by which CNEs regulate hemoglobin production by modulating the expression of downstream genes. It highlights the critical role of conserved non-coding elements in hemoglobin synthesis and offers new insights into the regulation of this essential protein.

**Key words:** Antarctic icefish; zebrafish; hemoglobin; CNE; CRISPR/Cas9