

黄河鲤肌间骨转录组分析及斑马鱼 *bmp1* 基因敲除模型构建

董传举^{a,b}, 贾颖颖^a, 申亚伟^a, 李学军^{a,b}

(河南师范大学 a.水产学院; b.三农法律问题研究中心, 河南 新乡 453007)

摘要:肌间骨(IBs)由肌膈间的肌腱骨化而来,仅存在于低等硬骨鱼类中,研究选取黄河鲤(*Cyprinus carpio haematopterus*)肌间骨发育前后两个关键阶段进行转录组测序,并对差异表达基因进行功能富集分析.结果表明:测序共获得高质量有效序列 120 356 780 条,共筛选出差异表达基因 3 454 个(上调 1 283 个,下调 2 171 个).GO 和 KEGG 分析显示差异基因主要富集于胞外区域、跨膜运输、氧化还原过程、催化活性、蛋白结合等功能,参与次生代谢物的生物合成、PI3K-Akt 信号通路、AMPK 信号通路、糖酵解等.经 qRT-PCR 验证差异基因表达谱与 RNA-seq 结果基本一致后,为进一步了解其生物功能,选取两阶段中显著上调基因 *bmp1*,利用 CRISPR/Cas9 建立 *bmp1* 突变的嵌合体斑马鱼(*Danio rerio*).测序验证 *bmp1* 突变品系已成功构建,表型观察结果发现突变型明显发育迟缓且尾部出现脊椎畸形.

关键词:肌间骨;黄河鲤;转录组;*bmp1*;基因敲除

中图分类号:S917.4

文献标志码:A

文章编号:1000-2367(2024)04-0071-09

肌间骨俗称肌间刺,是大宗淡水鱼类遗传育种的重要性状^[1],但其存在严重影响黄河鲤食用安全及食品加工工业的发展.自 20 世纪 60 年代起,人们开始集中于肌间骨形态、数目、骨化模式等研究^[2-5].陈琳等^[6]对黄河鲤仔稚鱼肌间骨骨化时期的形态进行染色观察,发现伴随鱼体生长,肌间骨由尾向头依次骨化.随着相关研究的深入,人们着力探索肌间骨发育的分子机制,目前已有大量研究表明肌间骨的骨化与游泳模式^[7]、鱼类倍性^[8]以及生长环境等多方面相关,其发育受到 TGF- β 、Wnt 等多种信号通路的复杂调控,也与肌腱发育及骨骼发育的关键基因存在密切联系^[9].研究发现 *scxa* 基因的缺失能够使斑马鱼中肌间骨生长数量显著减少,并且发现斑马鱼同时存在肋骨矿化缺陷、游泳行为异常、肌肉体积减小等不良发育现象^[10-11].LIU 等^[12]明确 Bmp, Wnt, Fgf 等信号通路在肌间刺发生发育过程中的调控作用,发现 *scxa*、*bmp6*、*runx2b* 等基因在不同程度上调控了鱼类肌间刺的发生发育^[13].以上研究表明肌间骨的发育可能受到多种关键基因的调控,存在复杂的分子调控机制.

转录组分析是一种深度测序技术,在鱼类育种中被广泛应用.2015 年, WAN 等^[14]首次对 6 月龄团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)肌间骨和包含肌间骨的结缔组织的 miRNA 分子特征进行比较分析,结果表明 MiR-206 抑制成骨细胞分化, mam-miR-221、mam-miR-222a、mam-miR-92a 和 mam-miR-26a 在肌间骨发育中发挥一定作用. LIU 等^[12]对团头鲂进行全基因组测序及基因表达分析,进一步确认了所观察到的基因表达差异确实与肌间骨的形成和功能有关.何萍萍等^[15]对禾花鲤(*C. carpio var. Quanzhounensis*)和建鲤

收稿日期:2023-01-11; **修回日期:**2023-03-29.

基金项目:国家自然科学基金(31801032);河南省科技攻关项目(182102210081).

作者简介:董传举(1989-),男,山东巨野人,河南师范大学讲师,博士,研究方向为环境资源保护、渔业法规与渔政管理, E-mail: cjd1989@126.com.

通信作者:李学军, E-mail: xjli@htu.cn.

引用本文:董传举,贾颖颖,申亚伟,等.黄河鲤肌间骨转录组分析及斑马鱼 *bmp1* 基因敲除模型构建[J].河南师范大学学报(自然科学版),2024,52(4):71-79.(Dong Chuanju, Jia Yingying, Shen Yawei, et al. Transcriptome analysis of intermuscular bone in Yellow River Carp and construction of *bmp1* gene knockout model in Zebrafish[J]. Journal of Henan Normal University(Natural Science Edition), 2024, 52(4): 71-79. DOI: 10.16366/j.cnki.1000-2367.2023.01.11.0002.)

(*C. carpio* var. *Jian*)肌间骨进行 miRNA 的高通量测序,发现肌间骨的发育可能是通过下调促进及上调抑制成骨 miRNA 的表达量来抑制成骨过程,禾花鲤肌间骨细小柔软的特性可能与之密切相关。

CRISPR/Cas9 技术是由 crRNA 和 tracrRNA 互补配对结合,形成能指导 Cas9 核酸酶特异性识别、剪切靶点的二级结构 RNA^[16]。CRISPR/Cas9 系统的结构简单,操作方便,比之前其他基因编辑技术应用的更加广泛。斑马鱼作为被广泛研究的模式生物,体型小、易饲养、生长速度快、繁殖周期短、体外完成受精和胚胎发育、透明的非黏性卵等特点都让其成为 CRISPR/Cas9 技术的良好材料。HWANG 等^[17]首次将 CRISPR/Cas9 技术应用在斑马鱼上并成功敲除 *etsr* 基因和 *gata5* 基因。庞天抒等^[18]利用该技术发现 *msxC* 基因缺失斑马鱼尾部肌间骨平均缩短了 15% 以上,验证了 *msxC* 基因的缺失影响肌间刺与大侧肌的形成与发育。ZHANG 等^[19]在团头鲂肌间骨发育相关研究中运用 CRISPR/Cas9 技术,构建了两个 *bmp3* 斑马鱼敲除品系,进行表型差异观察及 *bmp3* 上下游调控基因表达变化的探讨,揭示了 *bmp3* 对骨形成的负调控作用,为 BMPs 在团头鲂肌间骨发生发育中发挥的作用提供了理论依据。

基于以上探究,为培育无刺新品种鱼类,促进淡水鱼养殖产业发展,本研究聚焦于黄河鲤这一地方特色物种,通过对黄河鲤肌间骨发育前后两阶段仔鱼进行茜素红染色,对其尾部组织样本进行转录组测序,挖掘其肌间骨发育前后的关键基因及通路,并对其表达水平进行了测定。继而选定差异表达显著上调的基因 *bmp1*,以斑马鱼这一模式生物为载体,采用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术分析,期望通过观察胚胎发育,比较突变型和野生型的肌间骨形态以及其他骨骼形态差异,明确 *bmp1* 是否参与肌间骨的形成和发育以及可能的调控途径。研究为深入揭示黄河鲤肌间骨的发育分子机制,鲤科鱼肌间骨选择性育种提供理论支撑。

1 材料和方法

1.1 鱼类样品制备

黄河鲤选自河南师范大学水产养殖基地。从孵化后第 5 天开始,每 2 d 采集 1 次黄河鲤样品进行茜素红染色观察。直至肌间骨发育完全,共持续 12 d,以确定肌间骨发育前后的准确阶段。收集仔鱼臀鳍末端到尾鳍前部的各时期组织样本提取 RNA,每阶段设置 3 个生物学重复。每个重复 15 个样本。

1.2 RNA 提取、cDNA 文库构建和 RNA 序列分析

利用 RNAiso Plus 试剂盒(TaKaRa,中国)从 2 个阶段共 6 个黄河鲤尾部组织样本中提取 RNA。使用 NanoDrop 2000 分光光度计(Thermo,美国)及质量分数 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 浓度及质量。将合格的样品取 3 μ g RNA 反转录为 cDNA。使用 NEBNext UltraTM RNA Library Prep Kit(Illumina)生成测序文库,继而在 Illumina HiSeq 2000 平台上对文库进行测序,生成 125 bp/150 bp 的双端序列。

1.3 序列拼接和比对

将所得的原始序列通过 FastQC 进行质控,Trim Galore 处理获得 clean reads,通过 Hisat 2(2.0.5)软件与黄河鲤参考基因组(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=txid7962%5Borgn%5D>)比对,通过 HTSeq 包计算 counts 值,并计算归一化的 TPM 值(每百万映射读数每千碱基的转录本)。

1.4 差异表达基因分析

按照 $|\log_2(\text{fold change})| > 2$ 且 $\text{padj} < 0.05$ 的标准,通过 DESeq2 筛选差异表达基因。随后,对差异表达基因进行 GO 功能和 KEGG 通路的富集分析($P < 0.05$)。

1.5 通过定量实时 PCR 进行验证

为了验证测序数据结果的正确性,随机挑选 10 个骨发育相关的差异表达基因在 Primer Premier 5 引物设计软件中设计 2~3 对引物,送公司合成,验证后选取一对引物用于 qRT-PCR 实验。qRT-PCR 使用 NovoStart SYBR qPCR SuperMix plus(SYBR Green)试剂盒,设 3 个平行重复,内参基因采用 β -actin。

1.6 利用 CRISPR/Cas9 建立 *bmp1* 突变品系

在 Chopchop 网站上设计多对 *bmp1* 基因的靶点。为确保破坏基因的功能,靶点一般选择在基因的保守片段或功能区。合成 sgRNA,靶序列信息如下(sgRNA, 5'GAATTAATACGACTCACTATAGGACTGACAGTCCGATGCCCGGTTTAAGAGCTATGCTGG3')。挑选斑马鱼亲本进行培育,人工控制光周期,促进

斑马鱼产卵.将 sgRNA 与购自美国 NEB 公司的 Cas9 蛋白 EnGen Spy Cas9 NLS(M0646T)及酚红按照 1 : 1 : 1 体积比混合,常温静置 10 min.将斑马鱼受精卵置于无菌凹槽模具中,在显微注射系统下进行单细胞期胚胎注射,1 μ L 混合物约可注射 200 颗受精卵.注射后的受精卵置于 28 $^{\circ}$ C 孵化.在体式显微镜下观察并记录其出膜情况.用于突变分析的基因组 DNA 从混合对照和注射胚胎中提取^[20].

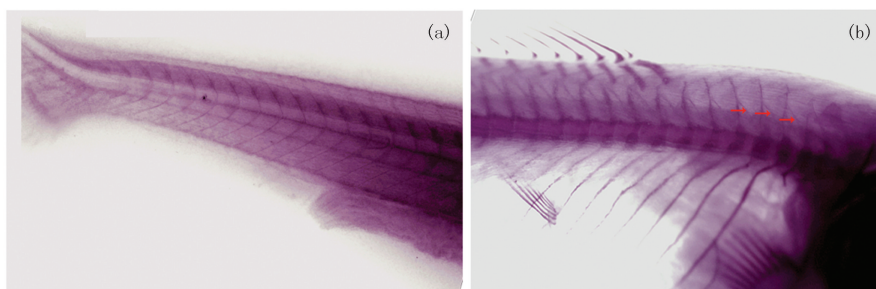
1.7 统计分析

qRT-PCR 实验结果采用 $2^{-\Delta\Delta ct}$ 差异倍数法来计算肌间骨骨化前后两时期各基因的相对表达量,以柱状图的形式呈现各基因表达量水平的平均值 \pm 标准差.

2 结果

2.1 样本确定

根据染色结果最终确定了出膜后第 11 天为肌间骨尚未出现的最后时间,出膜后第 20 天为肌间骨发育完全的初始时间(图 1),故取该 2 个发育阶段的组织样本提取 RNA,分别设为肌间骨未出现阶段 NIB 与肌间骨完全出现阶段 PIB,后进行转录组测序.



(a) dph11, NIB 肌间骨尚未出现; (b) dph20, PIB 肌间骨发育完全. 红色箭头指向即肌间骨所在位置.

图1 黄河鲤肌间骨发育前后关键阶段

Fig.1 The key stages of intermuscular bone development of yellow river carp

2.2 测序数据概述

测序后分别获得 20 571 647、24 497 356、23 575 378、25 811 334、26 259 664 个 raw reads.经数据过滤质控,删除显著离群样本 NIB3 和 PIB3.约有 99% 作为 clean reads 被保留,共获得 120 356 780 条序列进行下游分析,各阶段 clean reads 为 20 521 064~26 172 251 条;GC 含量为 46%~47%;Q20 均在 99.87% 以上, Q30 在 97.00% 左右;两阶段 clean reads 的比率为 91.5%~92.5% (附录表 S1).转录组测序质量较高,数据可满足生物信息学分析相关要求.

2.3 差异表达基因分析

获得所有样本的基因表达量 FPKM 之后,对各组样本进行差异基因表达分析.共获得差异表达基因 3 451 个,上调 1 283 个,下调 2 168 个(图 2).此外,发现在上调基因中,与骨形态发生蛋白相关的基因 *bmp1*、*bmp2* 显著差异表达;在下调基因中,*bmp7* 显著差异表达.热图显示(图 3),肌间骨两发育阶段的差异基因呈现不同的表达聚类模式,两发育阶段主要的高表达基因簇存在明显差异.

2.4 DEGs 的功能注释和路径分配

GO 分析表明,两阶段 DEGs 均能显著富集到生物过程、细胞组分及分子功能,其中涉及细胞组分的条目最多、生物过程的最少(图 4).KEGG 分析发现,两阶段 DEGs 显著富集到细胞过程、环境信息处理、人类疾病、新陈代谢、生物体系统 5 类途径,除人类疾病等部分通路外,主要

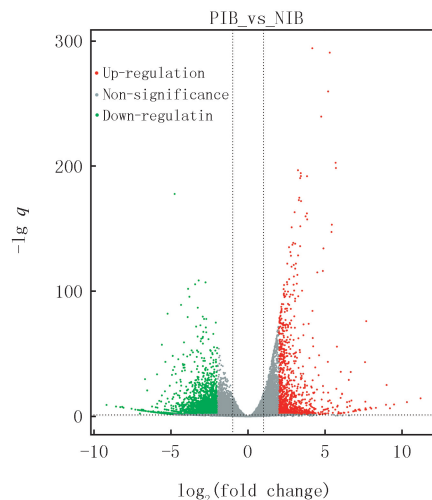


图2 差异表达基因的MA-plot图

Fig.2 MA-plot of differentially expressed genes

涉及次生代谢物的生物合成、PI3K-Akt 信号通路、糖酵解、MAPK 信号通路等(图 5)。

2.5 通过荧光定量 PCR 验证转录组测序

为检验转录组测序数据的准确性和可靠性,随机选择 9 个包含骨发育相关的差异基因进行了荧光定量 PCR 验证,所选的基因分别是 *bmp1*、*bmp2*、*bmp7*、*igf1*、*annexin A2*、*ALP*、*OC*、*troponin I*、*coll*。荧光定量 PCR 的表达趋势和 RNA-seq 的结果类似,这说明转录组测序数据的准确性较高,以上分析结果具有可靠性(图 6)。

2.6 利用 CRISPR/Cas9 产生 *bmp1* 突变品系

通过差异基因的筛选,发现 *bmp1* 差异表达明显,显著上调。而 BMP(骨形态发生蛋白)在脊椎动物骨形成中的作用被广泛认可,且有研究表明 *bmp* 家族多个基因可能在团头鲂肌间骨的形成分化中发挥作用,因此选取 *bmp1* 进行敲除,探索其是否参与肌间骨的形成和发育以及可能的调控途径。利用 CRISPR/Cas9 技术建立了 *bmp1* 敲除模型,其选定的部分基因结构分别由 128、214、251 和 941 bp 的 4 个外显子和 3 个内含子组成。在 *bmp1* 的第 19 外显子中选择了包含与 PAM 相邻的 NlaIII 限制性内切酶位点的靶点(附录图 S1)。根据测序结果可观察到成功敲除后在靶点附近出现的杂峰,嵌合体斑马鱼相较于野生型出现明显的碱基缺失(附录图 S2),*bmp1* 突变的嵌合体斑马鱼构建成功,可进行后续胚胎发育观察。

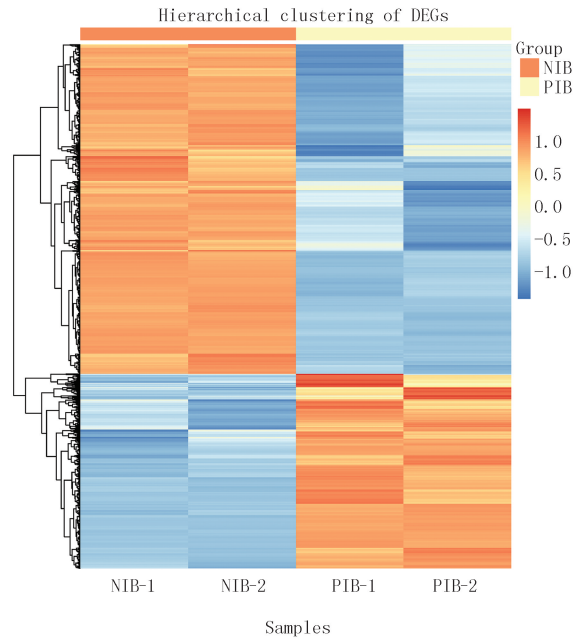


图3 差异基因表达模式聚类图

Fig.3 Cluster diagram of gene expression patterns

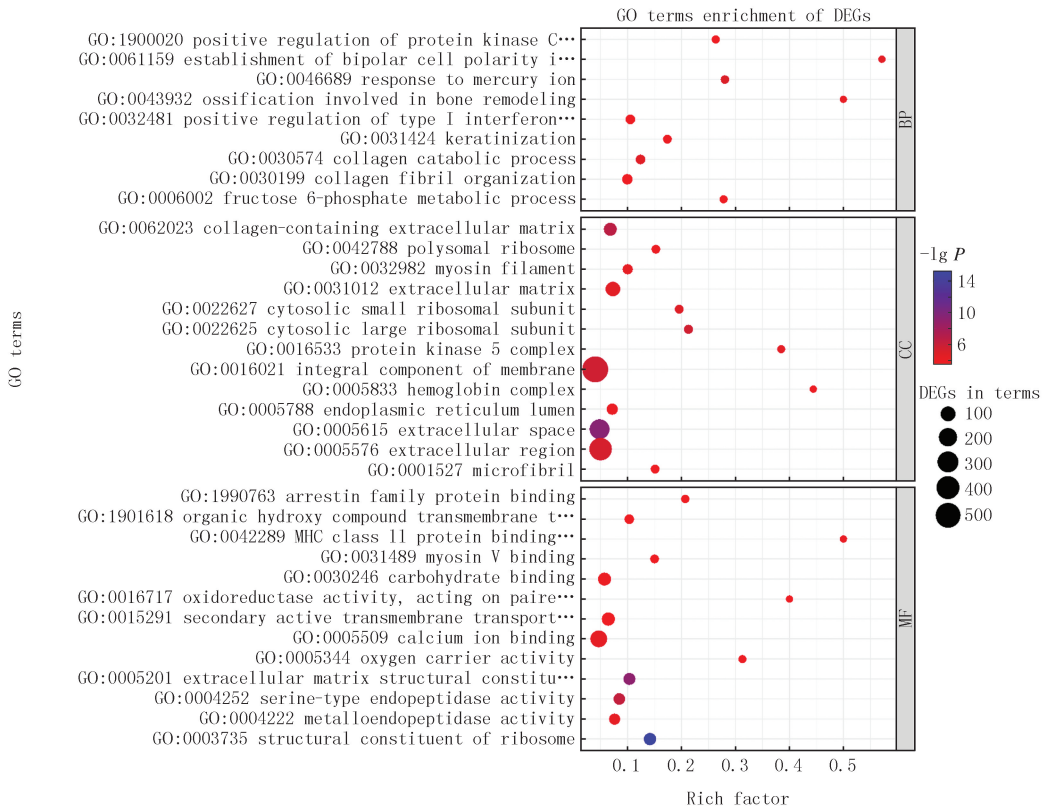


图4 差异基因富集的前35个GO条目

Fig.4 Top35 GO terms enrichment of DEGs

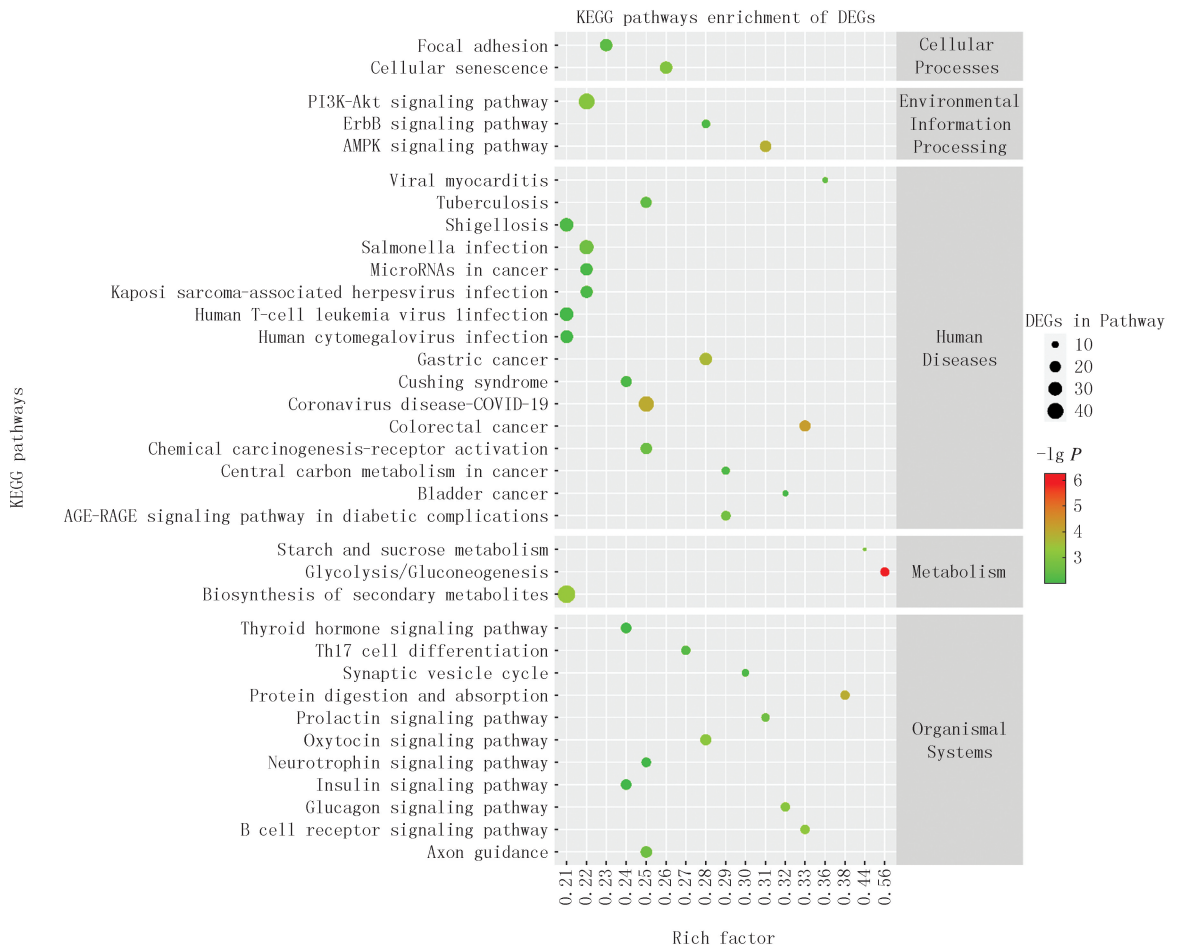


图5 差异基因富集的前35个KEGG通路

Fig.5 Top 35 KEGG pathways enrichment of DEGs

2.7 *bmp1* 缺失影响肌间骨的发育

敲除后斑马鱼受精 4 d 后才开始出膜,受精第 6 天后基本全部出膜,明显晚于野生型斑马鱼的出膜时间.敲除成功个体在仔鱼阶段表现异常,可明显观察到突变体较野生型发育迟缓、个体偏小,且尾部出现脊椎畸形(图 7).初步表明 *bmp1* 的缺失可能对包含肌间骨在内的骨骼发生发育产生影响.

3 讨论

肌间骨因其纤细、密集和难以除去的特点给常见鲤科鱼类的食用和深度加工带来极大的阻碍^[20].鲤科鱼类肌间骨从尾部向头部骨化,尾部分布的数量最多但形态较为简单,靠近头部的数量较少但形态更为复杂^[21].本文以黄河鲤尾部组织为材料,选定肌间骨未出现和完全出现的两个阶段,采用高通量测序技术进行转录组分析.这将有利于捕获肌间骨骨化前后相关调控基因并探究黄河鲤肌间骨发育的分子机制.研究发现黄河鲤肌间骨发育前后两阶段的差异基因数目是 3 454 个.两阶段差异基因表达的筛选结果显示,显著上调的基因中有骨形态发生蛋白相关基因 *bmp1* 和 *bmp2* (XP_

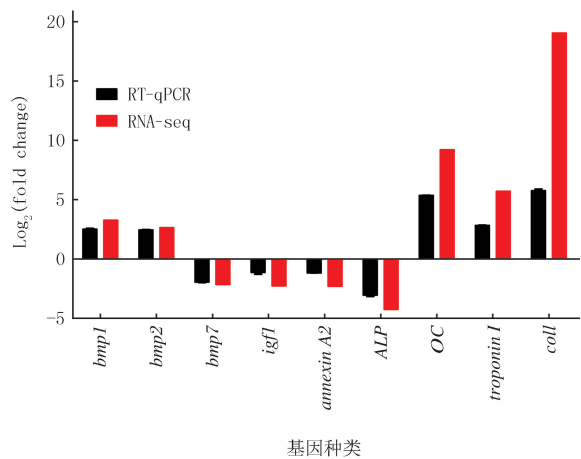
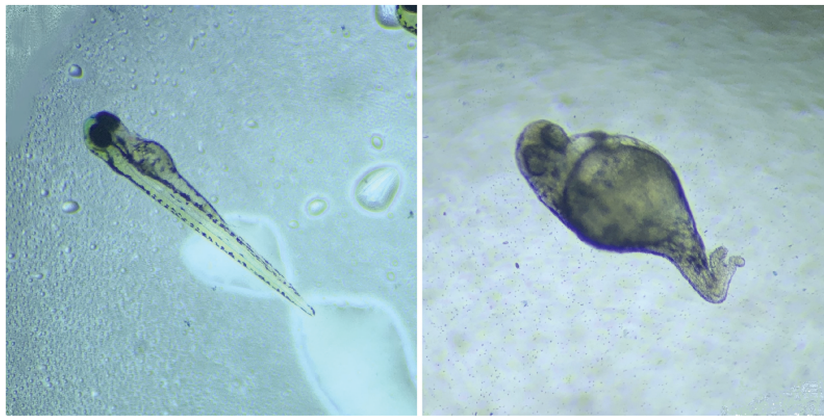


图6 RT-qPCR定量验证结果

Fig.6 Validation of RNA-seq data by RT-qPCR

简单,靠近头部的数量较少但形态更为复杂^[21].本文以黄河鲤尾部组织为材料,选定肌间骨未出现和完全出现的两个阶段,采用高通量测序技术进行转录组分析.这将有利于捕获肌间骨骨化前后相关调控基因并探究黄河鲤肌间骨发育的分子机制.研究发现黄河鲤肌间骨发育前后两阶段的差异基因数目是 3 454 个.两阶段差异基因表达的筛选结果显示,显著上调的基因中有骨形态发生蛋白相关基因 *bmp1* 和 *bmp2* (XP_

042588976.1 和 XP_042591968.1). 而骨形态发生蛋白(BMP)在脊椎动物发育期间的骨形成中具有公认的作用,并且在体内也表现出多种功能^[22]. 目前多种 *bmp* 基因已被报道在骨骼发育中发挥重要作用,*bmp2* 在 Prx1-Cre 小鼠和 Col2-Cre 细胞系中被条件性敲除会导致软骨发育不良、骨膜附着不良、自发性骨折或缺损性骨折修复^[23]; *bmp3* 敲除的小鼠表现出明显的高骨量^[24]; *bmp4* 在 Col2-CreER 细胞系中条件性敲除结果显示微小的软骨细胞的缺陷^[25]; 敲除 *bmp5* 或 *bmp6* 的小鼠,分别表现出骨骼形态异常和轻微的骨化延迟. 这表明 BMP 家族基因对骨骼发育十分重要,也使得本研究构建 *bmp1* 突变的嵌合体斑马鱼有据可依.



(a)野生型斑马鱼对照组

(b)突变型样本

图7 敲除*bmp1*后斑马鱼仔鱼形态Fig. 7 Zebrafish larva morphology after *bmp1* knock out

肌间骨是间充质细胞不经过软骨阶段直接骨化而来. 首先间充质细胞先迁移至肌膈间, 分化为胚型结缔组织膜, 衍生血管, 为细胞增殖分化提供养分和氧. 随后间充质细胞在胚型结缔组织膜内直接骨化为肌间骨^[20]. 因此, 肌间骨出现前期需要细胞大量的增殖分化. 本研究中差异基因的 GO 富集结果显示, 两阶段差异基因在膜组成部分(integral component of membrane GO: 0016021)、胞外区域(extracellular region GO: 0005576)、细胞外隙(extracellular space GO: 0005615)、胞外基质(extracellular matrix GO: 0031012)、胶原细胞外基质(collagen-containing extracellular matrix GO: 0062023)等细胞组部分显著富集, 且富集条目最多. 研究发现胞外基质相关的 GO term 与细胞增殖及调节细胞生长发育有关^[26], 由于这两阶段是肌间骨从无到有的产生过程, 间充质细胞增殖分化等相关的分子机制可能被激活.

在分子功能部分, 核糖体的结构组成(structural constituent of ribosome GO: 0003735)、钙离子结合(calcium ion binding GO: 0005509)、碳水化合物结合(carbohydrate binding GO: 0030246)、细胞外基质的结构组成(extracellular matrix structural constituent GO: 0005201)、肌球蛋白 V 结合(myosin V binding GO: 00314489)等 GO term 显著富集. 在生物过程中富集较少, 主要集中在骨化与骨重塑(ossification involved in bone remodeling GO: 0043932)、胶原原纤维组织(collagen fibril organization GO: 0030199)、胶原蛋白分解代谢过程(collagen catabolic process GO: 0030574)、果糖 6-磷酸代谢过程(fructose 6-phosphate metabolic process GO: 0006002)、蛋白激酶 C 的正调控(positive regulation of protein kinase C GO: 1900020)等 GO 条目中. 其中部分条目与运动组织、代谢、钙离子结合及骨化与骨重塑相关. 因此, 在肌间骨出现后, 肌间骨的骨化可能已从大量间充质细胞的分化向肌节、肌纤维的发育以及能量代谢转变且已经基本完成. 肌间骨在鱼类中主要起支持作用是公认的, 也有研究认为肌间骨和肌纤维一样都可以在运动中传递力^[27]. 结合差异基因显著富集在肌球、骨化、糖代谢等 GO term 上, 本研究认为肌层、肌纤维的发育可能与肌间骨的发育有直接关系.

由 KEGG 通路富集结果可以看出: 差异基因主要富集到次生代谢物的生物合成、糖酵解及 AMPK 信号通路. 腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)可以上调过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 辅激活因子-1 α (PGC-1 α)的转录活性而激发线粒体的生物合成^[19]. 与我们的 GO 富集结果一致, 不仅是细胞增殖分化的时期, 糖酵解等多种生命活动能量相关的通路被显著富集. 这表明分化和增殖已不再是发育的重点. NIE 等^[10]在对团头鲂肌间

骨发育关键阶段的转录组和蛋白组综合分析中,也发现多个骨相关基因在蛋白和 mRNA 水平上表达趋势不一致。骨发育相关通路上的基因是否参与肌间骨骨化中的调控以及具体的机制,还需要进一步的验证。

BMP 由具有诱导骨形成的能力而得名,在进化上高度保守,属于 TGF- β 家族,其能刺激 DNA 合成和细胞复制,从而促进间充质细胞定向分化为成骨细胞。经过统计筛选,将骨发育相关的差异基因作为影响参与肌间骨发育调控的候选基因,即 *bmp1*、*bmp2* 和 *bmp7*。研究结果显示,*bmp1* 和 *bmp2* 均为显著上调基因,*bmp7* 为下调基因。据相关研究表明,在团头鲂肌间骨发育过程中多个 BMP 家族基因差异表达,这些基因可能对肌间骨的骨化和形态维持有重要作用。研究认为 *bmp3*、*bmp4*、*bmp5*、*bmp8a* 参与刺激间充质细胞向肌间骨生长部位迁移、聚集和成骨细胞分化;*bmp7b*、*bmp16* 参与成骨细胞分化;*bmp2a*、*bmp2b* 对肌间骨形态维持起更重要的作用^[28]。近年来对 *bmp7* 基因的研究多集中在软骨形成及组织纤维化等,舒灵等^[29] 在研究拟穴青蟹 (*Scylla paramamosain*) 卵黄发育中发现 *bmp7* 基因表达含量随着卵黄的成熟而逐渐降低。本研究认为 *bmp2* 主要是维持肌间骨形态,*bmp7* 可能参与调控肌间骨发育的形成。

bmp1 虽然能够诱导骨和软骨发育,但最初分离的 *bmp1* 与其他 BMP 家族基因无序列同源性,隶属于细胞外基质金属蛋白酶超家族中的 Tolloid 蛋白酶家族。它作为一种金属蛋白酶,在胶原成熟过程中作为前胶原 C-蛋白酶发挥作用,不属于 TGF- β 超家族^[30]。雷小灿等^[31] 发现 *bmp1* 在体外培养水牛颗粒细胞的表达随着时间显著增加,*bmp1* 能通过调控相关基因的表达促进体外培养水牛颗粒细胞的增殖并抑制其凋亡,在水牛卵泡发生过程中具有重要的调控功能;YANG^[32] 在探究卵形鲳鲷骨骼发育研究中测定其仔鱼孵化 0~18 d 内 *bmp1* 的表达水平,发现孵化后 18 d 明显高于孵化后 0 d。本研究针对黄河鲤的 *bmp1* 表达量测定与其结果一致。张泽成等^[30] 发现 *bmp1* 通过水解其他 BMP 的抑制物,促进其他 BMP 信号传导,通过相互作用在胚胎发育背腹沿线建立稳定的 BMP 信号梯度。JASUJA 等^[33] 将 *bmp2*、*bmp7* 与 *bmp1* 前结构域序列纯化,证明了 *bmp1* 前结构域能够在体内外调节 *bmp2*、*bmp7* 的信号传导。因此,进一步利用基因编辑技术对 *bmp1* 的功能进行深入研究十分必要。

近年来,随着基因编辑技术的成熟,针对鱼类遗传育种发展方向进行基因功能性研究愈发简单。为验证 *bmp1* 是否参与调控肌间骨发育的形成,本研究通过常用的基因编辑技术即 CRISPER/Cas9 系统,对 *bmp1* 基因进行编辑,发现一个有效靶点,成功构建一个 *bmp1* 突变嵌合体斑马鱼品系。研究观察到已敲除的斑马鱼仔鱼表现出个体短小、发育迟缓,且尾部出现明显的畸形弯曲,但是否是因为 *bmp1* 基因突变引起,还需要进一步的验证。本研究为后续探讨 *bmp1* 对肌间骨骨化的影响,提供了良好的实验材料。

附录见电子版 (DOI:10.16366/j.cnki.1000-2367.2023.01.11.0002)。

参 考 文 献

- [1] 王旭东,聂春红,高泽霞.鱼类肌间骨发育分子调控机制及遗传选育研究进展[J].水生生物学报,2021,45(3):680-691.
WANG X D, NIE C H, GAO Z X. Research progress on molecular regulation mechanism and genetic selection of intermuscular bones in teleosts[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2021, 45(3): 680-691.
- [2] 董在杰,黄代中,李丽娟,等.几种常见鲤科养殖鱼类肌间刺的初步研究[J].上海水产大学学报,2006(4):425-429.
DONG Z J, HUANG D Z, LI L J, et al. Preliminary study on intermuscular bones of several cultured cyprinids[J]. Journal of Shanghai Fisheries University, 2006(4): 425-429.
- [3] 柯中和,张炜,蒋燕,等.鲢肌间小骨发育的形态学观察[J].动物学杂志,2008,43(6):88-96.
KE Z H, ZHANG W, JIANG Y, et al. Developmental morphology of the intermuscular bone in *Hypophthalmichthys molitrix*[J]. Chinese Journal of Zoology, 2008, 43(6): 88-96.
- [4] 吕耀平,周晨晨,杨丽美,等.瓯江彩鲤肌间小骨的骨化模式[J].上海海洋大学学报,2014,23(1):58-63.
LYU Y P, ZHOU C C, YANG L M, et al. Ossification pattern of the intermuscular bone in *Cyprinus carpio* var. color[J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2014, 23(1): 58-63.
- [5] 万世明,易少奎,仲嘉,等.团头鲂肌间骨发育的形态学观察[J].水生生物学报,2014,38(6):1143-1151.
WAN S M, YI S K, ZHONG J, et al. Developmental and morphological observation of intermuscular bones in *Megalobrama amblycephala*[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2014, 38(6): 1143-1151.
- [6] 陈琳,田雪,米佳丽,等.黄河鲤肌间骨发育的形态学观察[J].上海海洋大学学报,2017,26(4):481-489.

- CHEN L, TIAN X, MI J L, et al. Developmental and morphological study of intermuscular bones in *Cyprinus carpio haematopterus*[J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2017, 26(4): 481-489.
- [7] 聂春红. 团头鲂肌间骨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.
- NIE C H. Analysis of Ossification Pattern and Key Genes Related with Intermuscular Bones Development of *Megalobrama Amblycephala* [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2021.
- [8] 黎玲, 钟泽州, 曾鸣, 等. 不同倍性鱼肌间骨的比较分析[J]. 中国科学(生命科学), 2013, 43(3): 189-200.
- LI L, ZHONG Z Z, ZENG M, et al. Comparative analysis of intermuscular bone in different ploidy fish[J]. Scientia Sinica (Vita), 2013, 43(3): 189-200.
- [9] 杨笑星, 佟广香, 闫婷, 等. Cilp 基因对斑马鱼肌间骨和脊椎发育的影响[J]. 上海海洋大学学报, 2023, 32(3): 460-471.
- YANG X X, TONG G X, YAN T, et al. Effect of cilp on the development of the intermuscular bones and vertebra in zebrafish[J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2023, 32(3): 460-471.
- [10] NIE C H, WAN S M, TOMLJANOVIĆ T, et al. Comparative proteomics analysis of teleost intermuscular bones and ribs provides insight into their development[J]. BMC Genomics, 2017, 18(1): 147.
- [11] KAGUE ERIKA, HUGHES SIMON M, LAWRENCE ELIZABETH A, et al. Scleraxis Genes are Required for Normal Musculoskeletal Development and for Rib Growth and Mineralization in Zebrafish. [J]. FASEB journal; official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, 2019, 33(8): 9116-9130.
- [12] LIU H, CHEN C H, GAO Z X, et al. The draft genome of blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) reveals the development of intermuscular bone and adaptation to herbivorous diet[J]. GigaScience, 2017, 6(7): 1-13.
- [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): 152.
- [14] WAN S M, YI S K, ZHONG J, et al. Identification of microRNA for intermuscular bone development in blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2015, 16(5): 10686-10703.
- [15] 何莘萍, 王卉, 韦媛媛, 等. 禾花鲤与建鲤肌间骨 miRNAs 测序与分析比较[J]. 水生生物学报, 2019, 43(4): 757-762.
- HE P P, WANG H, WEI P Y, et al. Mirnas sequencing and analysis of intermuscular bone between rice flower carp and Jian carp [J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2019, 43(4): 757-762.
- [16] 陈思行, 陈发, 蔡湾湾, 等. CRISPR/Cas9 系统对斑马鱼 *fh11a* 基因敲除有效性的研究[J]. 湖南师范大学自然科学学报, 2017, 40(3): 21-26.
- CHEN S X, CHEN F, CAI W W, et al. The validation study of zebrafish *Fh11a* gene knockout by CRISPR/Cas9 system [J]. Journal of Natural Science of Hunan Normal University, 2017, 40(3): 21-26.
- [17] HWANG W Y, FU Y F, REYON D, et al. Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system [J]. Nature Biotechnology, 2013, 31(3): 227-229.
- [18] 庞天抒, 车金远, 范纯新, 等. *MsxC* 基因在斑马鱼肌间刺和大侧肌发育中的作用[J]. 上海海洋大学学报, 2022, 31(2): 328-335.
- PANG T S, CHE J Y, FAN C X, et al. Role of *MsxC* gene in the development of intermuscular bones and axial muscle in zebrafish [J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2022, 31(2): 328-335.
- [19] ZHANG W Z, LAN T, NIE C H, et al. Characterization and spatiotemporal expression analysis of nine bone morphogenetic protein family genes during intermuscular bone development in blunt snout bream [J]. Gene, 2018, 642: 116-124.
- [20] 段晓迪. 黄河鲤肌间骨骨化相关基因的挖掘[D]. 新乡: 河南师范大学, 2021.
- DUAN X D. Mining genes related to ossification of intermuscular bone in Yellow River carp [D]. Xinxiang: Henan Normal University, 2021.
- [21] 聂春红, 陈祖萱, 戴彩娇, 等. 不同鱼类肌间骨的骨化模式研究[J]. 水生生物学报, 2018, 42(1): 131-137.
- NIE C H, CHEN Z X, DAI C J, et al. Ossification patterns of intermuscular bones in different fish species [J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2018, 42(1): 131-137.
- [22] LOWERY J W, ROSEN V. The BMP pathway and its inhibitors in the skeleton [J]. Physiological Reviews, 2018, 98(4): 2431-2452.
- [23] MI M, JIN H T, WANG B L, et al. Chondrocyte BMP2 signaling plays an essential role in bone fracture healing [J]. Gene, 2013, 512(2): 211-218.
- [24] BANDYOPADHYAY A, TSUJI K, COX K, et al. Genetic analysis of the roles of BMP2, BMP4, and BMP7 in limb patterning and skeletogenesis [J]. PLoS Genetics, 2006, 2(12): e216.
- [25] SHU B, ZHANG M, XIE R, et al. BMP2, but not BMP4, is crucial for chondrocyte proliferation and maturation during endochondral bone development [J]. Journal of Cell Science, 2011, 124(Pt 20): 3428-3440.
- [26] 袁琳, 宋关斌. 影响骨髓间充质干细胞增殖的调节因素及其信号转导途径[J]. 生物技术通报, 2009(7): 35-38.
- YUAN L, SONG G B. Study of key factors for the proliferation of bone marrow mesenchymal stem cells and their signal transduction [J]. Biotechnology Bulletin, 2009(7): 35-38.

- [27] FIEDLER I A K,ZEVELEVA S,DUARTE A,et al.Microstructure,mineral and mechanical properties of teleost intermuscular bones[J].*Journal of Biomechanics*,2019,94:59-66.
- [28] 张伟卓.团头鲂 BMP 家族基因在肌间骨发生发育中的表达调控作用[D].武汉:华中农业大学,2018.
ZHANG W Z.Expression and regulation of BMP family genes in *Megalobrama amblycephala* in the development of intermuscular bone [D].Wuhan:Huazhong Agricultural University,2018.
- [29] 舒灵.拟穴青蟹骨形态发生蛋白 BMP7 在卵巢发育过程中的旁分泌作用研究[D].厦门:厦门大学,2017.
SHU L,Study on Paracrine Effect of Bone Morphogenetic Proteins(BMP7) during Ovarian Development of the Mud Crab,*Scylla Paramo-*sain.[D]Xiamen:Xiamen Univerisity,2017.
- [30] 张泽成,张媛媛,米立志.BMP-1 及 BMP 家族在背-腹轴图式形成中的作用[J].*中国生物化学与分子生物学报*,2018,34(7):689-696.
ZHANG Z C,ZHANG Y Y,MI L Z.The roles of BMP-1 and BMPs in dorsal-ventral patterning[J].*Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*,2018,34(7):689-696.
- [31] 雷小灿,张海航,崔奎青,等.水牛 BMP1 基因对颗粒细胞增殖与凋亡的功能研究[J].*畜牧兽医学报*,2015,46(10):1766-1774.
LEI X C,ZHANG H H,CUI K Q,et al.Function analysis of buffalo BMP1 gene on proliferation and apoptosis of granulosa cells[J].*Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*,2015,46(10):1766-1774.
- [32] YANG Q B.The Ontogenic Expressions of BMP and IGF Genes in Golden Pompano *Trachinotus Ovatus*(Linnaeus 1758) Larvae[J].*Indian Journal of Animal Research*,2016,50(5):637-645.
- [33] JASUJA R,GE G X,VOSS N G,et al.Bone morphogenetic protein 1 prodomain specifically binds and regulates signaling by bone morphogenetic proteins 2 and 4[J].*The Journal of Biological Chemistry*,2007,282(12):9053-9062.

Transcriptome analysis of intermuscular bone in Yellow River carp and construction of *bmp1* gene knockout model in Zebrafish

Dong Chuanju^{a,b}, Jia Yingying^a, Shen Yawei^a, Li Xuejun^{a,b}

(a. College of Fishery; b. Research Center on Legal Issues Concerning Agriculture, Countryside and Farmers, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China)

Abstract: Intermuscular bones (IBs) arise from the ossification of the tendons between the muscle diaphragm and are found only in lower bony fishes. In this study, transcriptome sequencing was performed in *Cyprinus carpio* haematopterus at two key stages of intermuscular bone development. Transcriptome data were analyzed to identify differentially expressed genes, and functional enrichment analysis was conducted for them. The results showed that a total of 120 356 780 high quality read sequences were obtained, and 3 454 differentially expressed genes (1 283 up-regulated and 2 171 down-regulated) were screened. By GO and KEGG analysis, differential genes were mainly enriched in extracellular regions, transmembrane transport, RED-OX process, catalytic activity, protein binding and other functions, and involved in biosynthesis of secondary metabolites, PI3K-Akt signaling pathway, AMPK signaling pathway, glycolysis and so on. After qRT-PCR verified that the differential gene expression profile was basically consistent with the results of RNA-seq, in order to further understand its biological function, the significantly up-regulated gene *bmp1* was selected in two stages, and CRISPR/Cas9 was used to establish chimeric zebrafish with *bmp1* mutation. Sequencing confirmed that the mutant strain of *bmp1* had been successfully constructed, and phenotypic observation showed that the mutant had obvious developmental retardation and vertebral deformities in the tail.

Keywords: intermuscular bone; Yellow River carp; transcriptome; *bmp1*; gene knockout

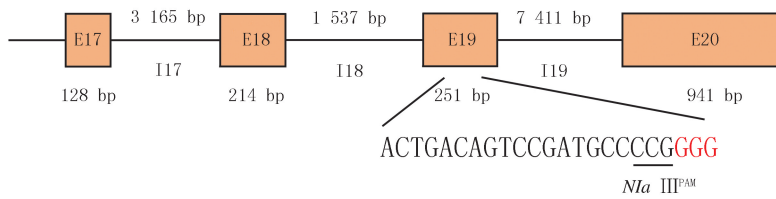
[责任编辑 刘洋 杨浦]

附录

表 S1 样本测序结果汇总

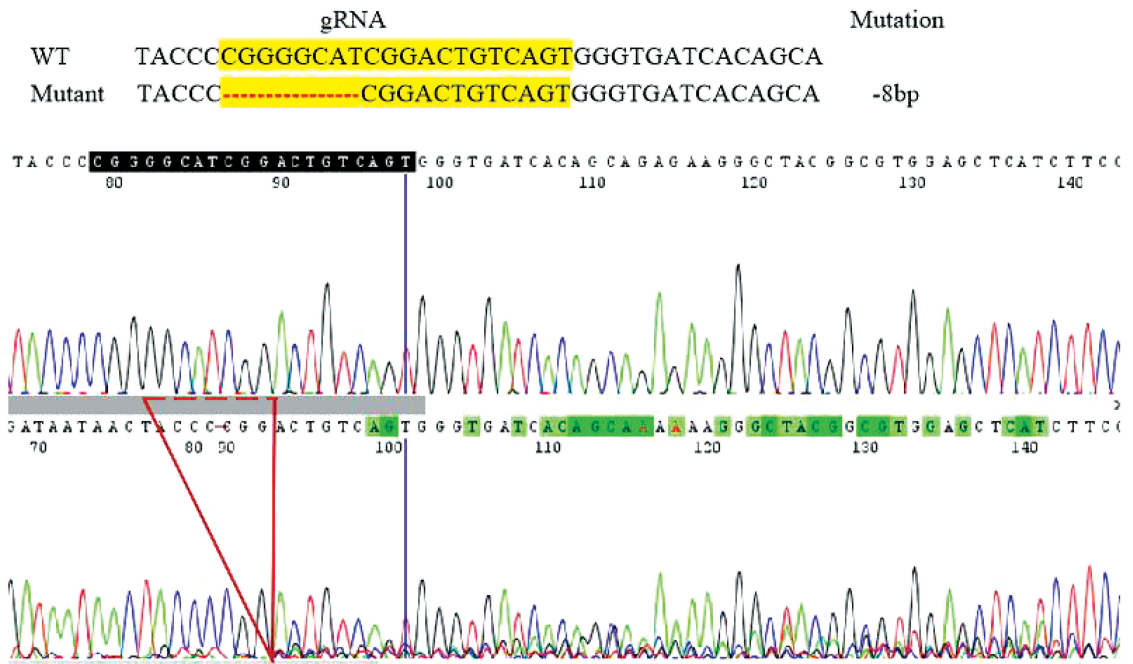
Tab. S1 Summary of the sequencing results from samples

Category	Raw reads	Clean reads	GC rate/%	Q20 rate/%	Q30 rate/%	Overall Alignment rate/%
NIB1	20 571 647	20 521 064	47	99.89	96.99	92.2
NIB2	24 497 356	24 449 574	47	99.90	97.06	91.9
PIB1	23 575 378	23 523 799	46	99.89	96.55	92.5
PIB2	25 811 334	25 690 092	46	99.87	96.62	92.0



图S1 靶向***bmp1***位点的gRNA示意图

Fig.S1 Schematic representation of gRNA targeting the *bmp1* locus



图S2 *bmp1*敲除突变型测序验证结果

Fig.S2 *Bmp1* mutant type sequencing validation results