

DOI: 10.12264/JFSC2024-0371

基因编辑半滑舌鲷的肠道菌群与环境安全性分析

吴茵琪^{1,2}, 陈张帆^{2,3}, 李鹏飞^{1,2}, 崔忠凯², 丁兰清^{1,2}, 成方舟^{1,2}, 闫煦²,
周泽斌², 陈松林^{2,3}

1. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306;
2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 海水养殖生物育种与可持续产出全国重点实验室, 山东 青岛 266071;
3. 青岛海洋科技中心海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室, 山东 青岛 266237

摘要: 针对半滑舌鲷雄鱼生长缓慢、个体小的问题, 本研究室利用 TALEN 基因组编辑技术, 成功获得生长速度较普通雄鱼快 2 倍以上的半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis*) *dmrt1* 纯合突变雄鱼。为评估基因编辑半滑舌鲷的健康状况与环境安全性, 本研究运用高通量测序技术对相同养殖条件下的半滑舌鲷 *dmrt1* 纯合突变雄鱼和普通雌、雄鱼的肠道菌群进行了对比分析。另外, 为评估环境安全风险, 本研究检测了与 *dmrt1* 纯合突变雄鱼共同饲养的普通雌、雄鱼基因型以及饲养环境的水体 eDNA。结果表明, 半滑舌鲷 *dmrt1* 纯合突变雄鱼的肠道菌群 Alpha 多样性与普通雌、雄鱼均无差异, 组成结构及功能预测与普通雄鱼有差异, 而与普通雌鱼之间均并不存在显著性差异。与水环境微生物菌群对比后发现, *dmrt1* 纯合突变雄鱼的肠道微生物指示物种与水环境指示物种高度重合。与 *dmrt1* 纯合突变雄鱼共同饲养的普通鱼中均无法检测到编辑后的基因。对半滑舌鲷 *dmrt1* 纯合突变雄鱼的养殖水环境及其排水路径中的 4 个采样点的水样进行了扩增与测序, 并未发现编辑后的目的基因。研究表明, 基因编辑后半滑舌鲷 *dmrt1* 纯合突变雄鱼的肠道菌群更类似于普通雌鱼, 不会对同一环境下养殖的其他个体或养殖的水体环境产生影响, 不存在环境风险。

关键词: 半滑舌鲷; 基因编辑; 肠道菌群; 环境安全评价; eDNA

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2025)03-0277-09

半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis*)是我国特有的一种海水养殖鱼类, 具有很高的营养价值和商业前景。然而, 半滑舌鲷的雌、雄个体生长速率存在显著差异, 导致雌性成鱼体重可达雄性成鱼体重的 2~4 倍^[1], 这一现象限制了养殖户的生产积极性, 进而制约了半滑舌鲷养殖业的进步与发展。基于这一产业问题, 此前本研究室利用转录激活因子样效应物核酸酶(transcription activator-like effector nucleases, TALEN)基因组编辑技术, 成功敲除了半滑舌鲷雄性决定 *dmrt1* 基因的 8 个

碱基^[2], 并繁殖出 F3 纯合突变雄鱼。纯合突变雄鱼的生长速度较普通雄鱼快 2 倍以上, 体重接近普通雌鱼^[3], 成功破解了半滑舌鲷雄鱼长不大的难题, 也为半滑舌鲷基因编辑育种技术的建立奠定了基础。

肠道微生物对宿主免疫力的提高、营养吸收的改善、生长发育的调控等方面具有重要的影响^[4], 肠道微生物可以在一定程度上反映基因编辑动物的健康状况。此外, 基因编辑动物的肠道微生物可能以粪便的形式进入外界环境, 进而影响外界

收稿日期: 2024-12-06; 修订日期: 2024-12-30.

基金项目: 农业农村部农业生物育种重大项目(2023ZD04062); 国家海水鱼产业技术体系半滑舌鲷种质资源与品种改良岗位专项(CARS-47-G03); 中国水产科学研究院中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(2023TD20)

作者简介: 吴茵琪(2000-), 女, 硕士研究生, 研究方向为水产品安全评价. E-mail: 2752076532@qq.com

通信作者: 陈松林, 研究员, 研究方向为鱼类种质保存、性别控制与抗病分子育种. E-mail: chensl@ysfri.ac.cn

环境中的其他个体以及微生物菌群。此前,有关转基因生物对周遭环境产生影响的报道引起了针对基因修饰生物环境安全性的强烈关注^[5],编辑后的基因是否会通过肠道微生物或者饲养过程中的其他行为对环境产生影响,是目前亟需探究的问题。

环境 DNA (environmental DNA, eDNA)指生物在环境中遗留下来的 DNA,通常来自于生物的脱落组织、黏液、分泌物、血液和尸体等。近年来,eDNA 技术作为一种生态系统检测方法备受关注,尤其在水生生物多样性监测方面显示出广泛的应用潜力。然而,利用 eDNA 技术监测基因编辑动物的环境安全性尚未见相关研究报道。在实际应用中,检测养殖水体中的 eDNA 仍面临诸多挑战。与土壤环境相比,水环境中鱼类的分泌物和脱落组织占比较小,加之养殖水体的浑浊度较高,固体颗粒物容易堵塞滤膜孔径,从而可能影响 eDNA 的有效富集。因此,迫切需要为养殖水环境中的基因编辑动物环境风险监测开发合适的方法。

本研究通过 16S rDNA 高通量测序技术检测了半滑舌鳎 *dmrt1* 纯合突变雄鱼的肠道微生物群落,并检测了相同环境下混合饲养的普通雌、雄鱼体中是否出现编辑后的目的基因,此外,利用 eDNA 技术检测了 *dmrt1* 纯合突变雄鱼的养殖水环境与废水排放路径中是否存在编辑后的目的基因,以评估半滑舌鳎 *dmrt1* 纯合突变雄鱼的环境安全性。

1 材料与方法

1.1 *dmrt1* 纯合突变雄鱼肠道微生物检测

1.1.1 实验材料 本次实验共采集半滑舌鳎 15 尾,其中雌鱼、雄鱼、*dmrt1* 纯合突变雄鱼各 5 尾,均为 18 月龄左右,2024 年 5 月 9 日采集于唐山市维卓水产养殖基地,共同饲养于同一养殖池中 3 个月以上。其中,普通雄鱼的平均体重为(106.9±19.64) g,平均体长为(27.0±1.68) cm;野生型雌鱼的平均体重为(283.7±40.81) g,平均体长为(34.5±1.87) cm;*dmrt1* 纯合突变雄鱼的平均体重为(209.65±27.25) g,平均体长为(35.8±6.21) cm。收集其肠道组织,过液氮后-80 °C 保存。

1.1.2 水环境样本采集 在养殖池中使用采水器采集水样 3 L,经 200 μm 筛绢筛绢过滤除去大型固体颗粒物,使用抽滤气压<250 mmHg 的真空泵,将水环境样本注入抽滤杯后,使用 5 μm 聚碳酸酯膜(直径 47 mm)滤膜过滤 30 min,过滤后置入冷冻离心管中,过液氮后-80 °C 保存。

1.1.3 PCR 扩增与测序 提取各样本细菌总 DNA,使用带有 barcode 的特异性引物扩增 16S rDNA 的 V3~V4 区域^[6](341F: 5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3'; 806R: 5'-GGACTACHVGGGTATCTAAT-3')^[7]。将纯化后的扩增产物连接测序接头,构建测序文库,并进行 Illumina 测序。

1.1.4 数据处理 获取原始数据序列(Raw Reads)之后,使用 Usearch 软件^[8]对低质量的 Reads 进行过滤,然后将双端 Reads 拼接成 Tag,并进一步过滤低质量 Tag,得到高质量 Tags (Clean Tags)。随后,根据 Clean Tags 进行聚类,去除聚类过程中检测到的嵌合体 Tag,最终获得 OUT (Operational Taxonomic Units)的丰度和 OTU 代表序列,进行物种注释,相似度阈值设定为 97%。采用 QIIME (Quantitative Insights Into Microbial Ecology)软件^[9]分析 Alpha 多样性评估肠道微生物多样性,beta 多样性评估样品物种差异;使用 PICRUST2 (Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States 2)软件^[10],结合 IMG (Integrated Microbial Genomes)细菌基因组和古菌基因组数据库,分析获得 KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)群落功能分类信息^[11]。

1.2 *dmrt1* 纯合突变雄鱼环境安全检测

1.2.1 鱼类样品采集 将 20 月龄的半滑舌鳎普通雌、雄鱼和 *dmrt1* 纯合突变雄鱼若干条混养在同一养殖池内 3 个月以上,*dmrt1* 纯合突变雄鱼均打上电子标记。取池中无标记普通鱼 16 条,剪取鳍条,4 °C 酒精保存。

1.2.2 DNA 提取及遗传性别鉴定 使用 TIANGEN TIANamp Marine Animals DNA Kit (天根生化科技有限公司,北京)提取基因组 DNA 样品后,使用性别鉴定引物扩增(F: 5'-CCTAAATGATGGA-TGTAGATTCTGTC-3'; R: 5'-GATCCAGAGAAAA

TAAACCCAGG-3')^[12], PCR 程序设定: 95 °C, 3 min; 95 °C, 30 s, 55 °C, 30 s, 72 °C, 30 s, 循环 29 次, 72 °C, 5 min。用琼脂糖凝胶电泳检测结果。

1.2.3 *dmrt1* 基因编辑样品的靶位点片段扩增及测序 使用崔忠凯^[13]研发的半滑舌鲷 *dmrt1* 引物 (F: 5'-CGGGCAAAGGGAGAAGG-3', R: 5'-AA-AAACATCTCCTGAGGGCTAA-3')对 *dmrt1* 片段进行扩增, PCR 程序设定: 95°C, 3 min; 95 °C, 30 s, 60 °C, 30 s, 72 °C, 40 s, 循环 31 次, 72 °C, 5 min。用琼脂糖凝胶电泳检测结果, 由北京擎科生物科技股份有限公司测序。

1.2.4 水环境样品采集 半滑舌鲷 *dmrt1* 纯合突变雄鱼和普通雌、雄鱼混合饲养的养殖场布局如图 1 所示, 沿排水管道设计了 5 个采样点, 分别是 A: 养殖池内, B: 养殖池侧排水口, C: 养殖池外总排水口, D: 养殖池外排水口 5 m 处, E: 养殖池外排水口 20 m 处。每个采样点分别使用采水器采集底层水样 3 L, 每个采样点采集的水环境样品独立存放。

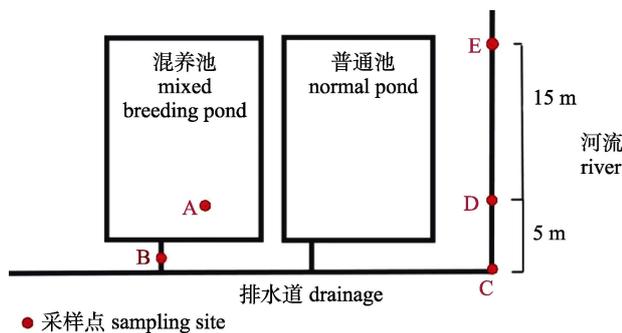


图 1 半滑舌鲷 *dmrt1* 纯合突变雄鱼和普通雌、雄鱼混合饲养水产养殖池排水路径

Fig. 1 Drainage path of mixed rearing aquaculture pond of *dmrt1*^{-/-} ZZ male and normal male *Cynoglossus semilaevis*

1.2.5 水环境样品前处理 采集到的水环境样品, 先经 200 μm 筛绢过滤除去大型固体颗粒物, 使用抽滤气压 < 250 mmHg 的真空泵, 将水环境样本注入抽滤杯后, 使用 5 μm 聚碳酸酯膜 (直径 47 mm) 滤膜过滤 30 min, 过滤后置入冷冻离心管中, 过液氮后 -80 °C 保存。

1.2.6 eDNA 提取和扩增 将上述滤纸剪碎后, 依次加入 0.11 mol/L 乙二胺四乙酸 (EDTA) 溶液 (pH=8.0), 10% 十二烷基硫酸钠 (SDS) 溶液,

10 mg/mL 蛋白酶 K 溶液, 混匀, 简单离心, 56 °C 温浴 24 h 以上。采用 Zymo Research Quick-DNA Kits (Zymo Research, 美国) 按步骤提取滤纸上的 eDNA, 并检验提取的基因组 eDNA 浓度和质量, 用作 PCR 模板。使用 Miya 等^[14]设计的海洋鱼类通用引物 MiFish (F: 5'-GTCGGTAAACTCGTG-CCAGC-3', R: 5'-CATAGTGGGGTATCTAATCC-CAGTTT-3') 作为对照, PCR 程序设定: 94 °C, 5 min; 94 °C, 30 s, 60 °C/55 °C, 30 s, 72 °C 30 s, 循环 35 次; 72 °C, 10 min。使用琼脂糖凝胶电泳检测结果后, 片段交由北京擎科生物科技股份有限公司测序。

2 结果与分析

2.1 半滑舌鲷肠道微生物多样性分析结果

质控后共测序获得有效序列 (effective tags) 1755062 条, 平均每个样本 117004 条, 每个样品的高质量 Tags 数量占据原始 PE Reads 数的百分比均在 90% 左右。将 Tag 序列按相似度 97% 聚类, 共获得 3416 个 OTUs。Alpha 多样性分析结果如图 2a、图 2b 所示, 其中, *dmrt1* 纯合突变雄鱼的 Shannon 指数略高, Simpson 指数则是普通雌鱼略高, 但是 3 组的两种指数之间均不存在显著性差异 ($P > 0.05$)。此外, 基于 OTU 水平的 PLS-DA 分析如图 2c 所示, 3 组样本中 F 组样本点分布紧密, 组内一致性最高。3 组样本分布明显分离, 显示组间存在显著差异, D 组与 M 组分布最远, 其差异显著, F 组则介于两者之间。

2.2 半滑舌鲷肠道微生物组成结构分析结果

肠道微生物群落的组成结构分析结果 (图 3) 表明, 在门水平上共鉴定出 24 个菌门, 3 组中占绝对优势的均为变形菌门 (Proteobacteria), 其次是厚壁菌门 (Firmicutes), 二者相对丰度之和在 3 组的肠道菌群结构中均占比 98% 以上, 变形菌门和厚壁菌门的相对丰度在纯合突变雄鱼和普通雌鱼之间不存在显著性差异 (图 3a)。在属水平上共鉴定出 211 个菌属, 相对丰度较高的菌属主要包括弧菌属 (*Vibrio*)、不动杆菌属 (*Acinetobacter*)、发光菌属 (*Photobacterium*)、阴道球菌属 (*Vagococcus*)、葡萄球菌属 (*Staphylococcus*) 等。其中, 在普通雌

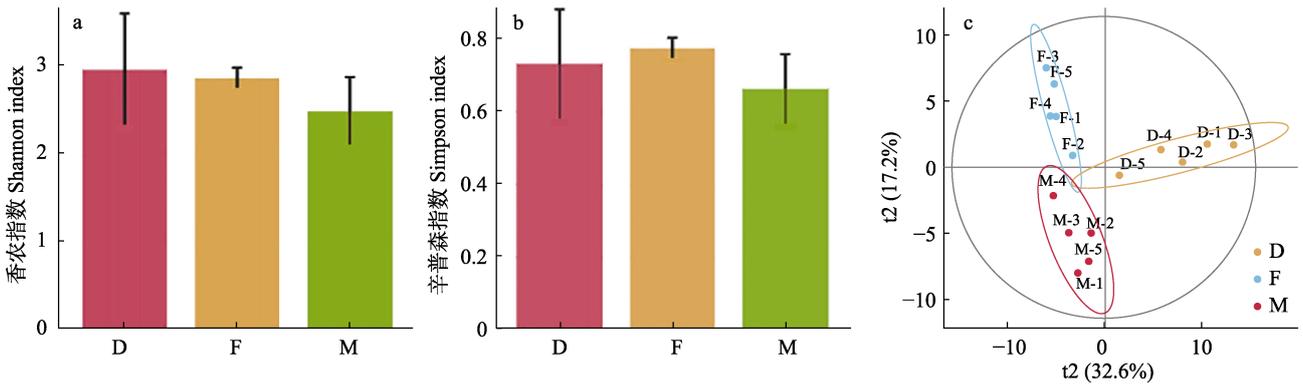


图 2 *dmrt1* 纯合突变雄性半滑舌鲷和普通雌、雄半滑舌鲷肠道菌群多样性指数

a. Shannon 指数; b. Simpson 指数; c. 基于 OTU 水平的 PLS-DA 分析. D 代表 *dmrt1* 纯合突变雄鱼组, F 代表普通雌鱼组, M 代表普通雄鱼组.

Fig. 2 Diversity indices of intestinal microbiota in *dmrt1*^{-/-} ZZ male and normal *Cynoglossus semilaevis* a. Shannon Index; b. Simpson Index; c. PLS-DA analysis based on OTU level. D: *dmrt1*^{-/-} ZZ males; F: normal females; M: normal males.

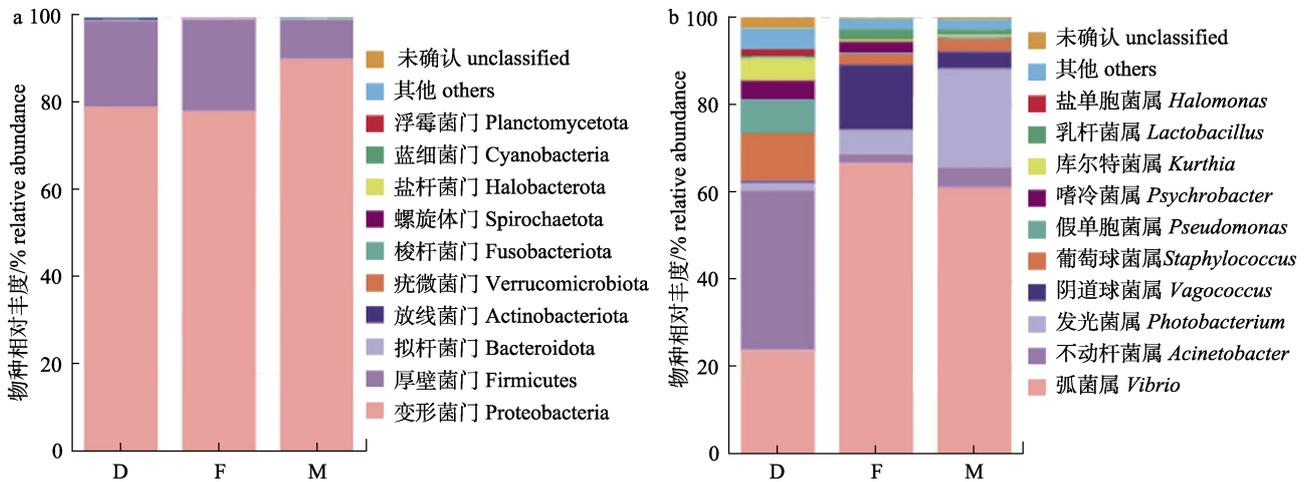


图 3 *dmrt1* 纯合突变雄性半滑舌鲷和普通雌、雄半滑舌鲷肠道菌群组成结构柱状图

a. 门水平; b. 属水平. D 代表 *dmrt1* 纯合突变雄鱼组, F 代表普通雌鱼组, M 代表普通雄鱼组.
Fig. 3 Intestinal microbiota composition in *dmrt1*^{-/-} ZZ male and normal *Cynoglossus semilaevis* a. phylum level; b. genus level. D: *dmrt1*^{-/-} ZZ males; F: normal females; M: normal males.

鱼和雄鱼中占比最高的均是弧菌属, 其次是不动杆菌属; 而纯合突变雄鱼中占比最高的则是不动杆菌属, 其次是弧菌属(图 3b)。

2.3 半滑舌鲷肠道微生物功能预测

使用 PICRUSt 对菌群代谢功能进行预测结果如图 4, 三组注释的 KEGG 一级通路包括代谢、遗传信息处理、细胞过程、环境信息处理和生物体系统, 除细胞过程在纯合突变雄鱼与普通雄鱼之间存在差异外, 其余各项在纯合突变雄鱼和普通雌、雄鱼之间均不存在显著性差异。而二级通

路上的主要信号通路包括碳水化合物代谢、辅因子和维生素代谢、氨基酸代谢等。在丰度前十的功能中, 除纯合突变雄鱼的外来化合物的生物降解与代谢功能与普通雄鱼存在差异外, 其余各项在纯合突变雄鱼和普通雌、雄鱼之间均不存在显著性差异。

2.4 半滑舌鲷肠道微生物与水环境微生物对比

检验了半滑舌鲷养殖水环境中的微生物群落, 与纯合突变雄鱼的肠道指示物种对比后发现(图 5), 在门水平下, 纯合突变雄鱼中总计鉴定了

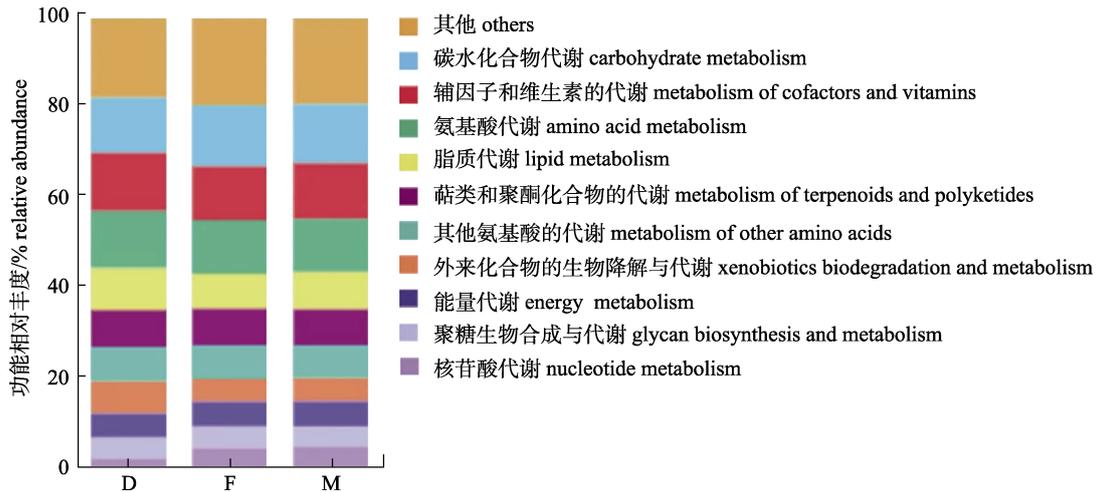


图 4 *dmrt1* 纯合突变雄性半滑舌鲷和普通雌、雄半滑舌鲷肠道菌群代谢功能预测结果堆叠图
D 代表 *dmrt1* 纯合突变雄鱼组, F 代表普通雌鱼组, M 代表普通雄鱼组。

Fig. 4 Predicted metabolic functions of intestinal microbiota in *dmrt1*^{-/-} ZZ male and normal *Cynoglossus semilaevis*
D: *dmrt1*^{-/-} ZZ males; F: normal females; M: normal males.

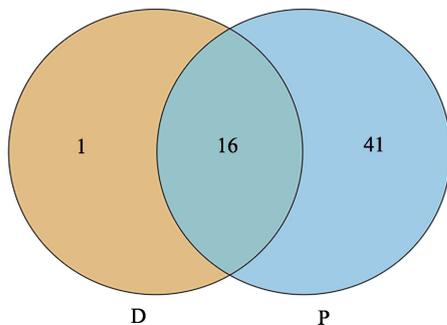


图 5 *dmrt1* 纯合突变雄性半滑舌鲷肠道微生物和水环境微生物指示物种 venn 图(门水平)
D: *dmrt1* 纯合突变雄鱼组, P: 水环境组。

Fig. 5 Venn diagram of intestinal microorganisms and aquatic environmental microbial species in *dmrt1*^{-/-} ZZ male *Cynoglossus semilaevis* (phylum level)
D: *dmrt1*^{-/-} ZZ males; P: water environment.

17 个指示物种, 其中 16 个都与水环境指示物种重合, 仅有协同菌门(Synergistota)未从养殖水环境中检出, 占比 0.8914%。

2.5 同环境养殖普通鱼基因型检测结果

相同环境饲养的 16 条普通半滑舌鲷的基因型测序结果如图 6 所示。*dmrt1* 纯合突变雄鱼的基因序列缺失碱基“TCGTGTCT”, 16 个样品中均未出现碱基缺失现象, 证明与 *dmrt1* 纯合突变雄鱼混合饲养的普通雌、雄鱼 *dmrt1* 基因并未出现碱基缺失现象。

2.6 半滑舌鲷养殖水环境基因漂移检测结果

通过设置的对照组检测了 *dmrt1* 纯合突变雄

鱼和普通雌、雄鱼混合养殖的水环境及排水路径中是否存在编辑后的目的基因, 结果如图 7 所示。5 个水环境样品中均扩增出 MiFish 产物(图 7a), 证明水环境 eDNA 样本提取成功。而使用 *dmrt1* 基因鉴定引物扩增后, 均未出现条带。进一步将扩增得到的 MiFish 产物测序后使用 NCBI (National Center for Biotechnology Information)进行序列比对, 与此前发布的半滑舌鲷全基因组序列^[15]相似度为 100% (图 7b), 证明所扩增的 MiFish 产物属于半滑舌鲷。环境中可以检测到半滑舌鲷的 12S RNA 基因, 但无法检测到半滑舌鲷 *dmrt1* 基因, 表明碱基敲除的 *dmrt1* 基因未漂移到环境水体中。

3 讨论

目前, 伴随着基因修饰技术的进步与发展, 解决了许多传统育种手段无法克服的问题, 如抗病性和产量提升等, 为农业生物技术的发展提供了重要推动力。与此同时, 其潜在的安全性问题也引发了公众的广泛关注, 需要进一步研究和监管。此前有报道表明, *fat-1* 转基因牛的肠道微生物组成产生了显著性变化^[16]。但在 GH 转基因羊^[17]和 *sFat-1* 转基因猪^[18]中的研究表明, 导入外源基因的宿主并未在肠道菌群结构上发生显著变化。相比转基因技术, 基因编辑技术具有不涉及外源基因的优点。在 MSTN 基因编辑猪^[19]、VEGF 基

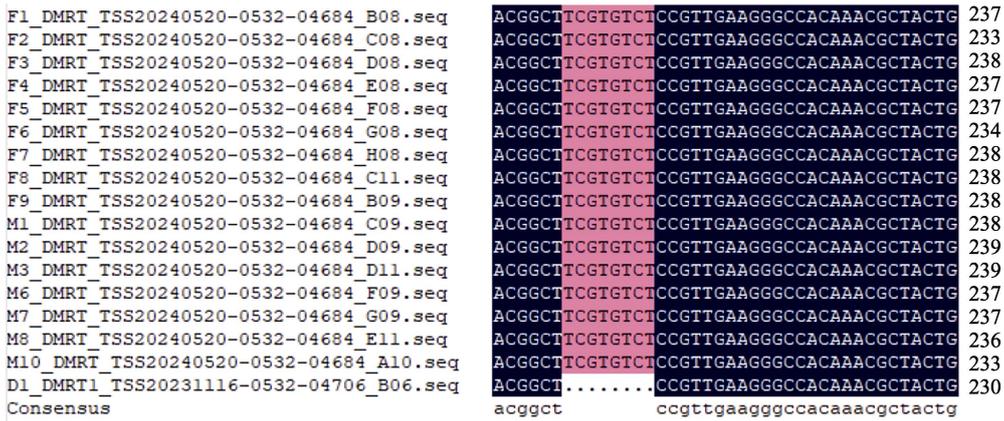


图 6 普通半滑舌鲷基因型测序对比图

D 代表 *dmrt1* 纯合突变雄鱼组, F 代表普通雌鱼组, M 代表普通雄鱼组。

Fig. 6 Genotype sequencing comparison chart of normal *Cynoglossus semilaevis*

D: *dmrt1*^{-/-} ZZ males; F: normal females; M: normal males.

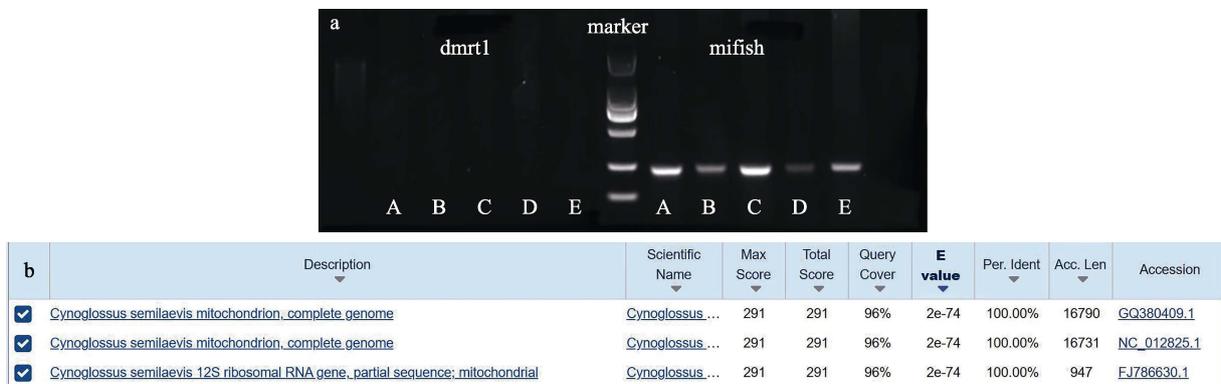


图 7 *dmrt1* 纯合突变雄性半滑舌鲷养殖水环境 eDNA 检测图

a. 5 个水环境样品产物扩增结果; b. 测序结果 NCBI 比对图。A: 养殖池内水样 eDNA, B: 养殖池侧排水口水样 eDNA, C: 养殖池外总排水口水样 eDNA, D: 养殖池外排水口 5 m 处水样 eDNA, E: 养殖池外排水口 20 m 处水样 eDNA, marker: DL2000;.

Fig. 7 eDNA of the breeding environment of *dmrt1*^{-/-} ZZ male *Cynoglossus semilaevis*

a. Amplification results of MiFish in five water environmental samples; b. NCBI sequencing alignment. A: eDNA of inside the breeding pond, B: eDNA of side outlet of the breeding pond, C: eDNA of main outlet outside the breeding pond, D: eDNA of 5 m from the outlet outside the breeding pond, E: eDNA of 20 m from the outlet outside the breeding pond; marker: DL2000.

因编辑羊^[20]等的研究中尚未发现基因编辑对动物肠道菌群产生显著性影响的现象。

本研究的结果显示, 半滑舌鲷 *dmrt1* 纯合突变雄鱼的肠道菌群 Alpha 多样性与普通雌、雄鱼之间均不存在显著性差异, 说明 *dmrt1* 基因突变对其肠道菌群不产生显著影响。另一方面, *dmrt1* 纯合突变雄鱼在三组中 Shannon 指数最高, 反映了其肠道微生物群落可能具有较高的物种丰富度和均匀度。此外还发现, 在门分类水平下, *dmrt1* 纯合突变雄鱼的肠道微生物组成结构与普通雌鱼之间不存在显著性差异, 但与普通雄鱼之间存在

显著性差异。肠道微生物的不同可能影响生长差异, 如在鲟科鱼类的研究中发现鞘氨醇单胞菌属和梭菌科细菌可能影响其生长速率^[21], 在大黄鱼中发现变形菌门对其生长速率存在一定影响^[22]。*dmrt1* 纯合突变雄鱼肠道菌群的组成结构和雌鱼更为相似, 推测其中可能存在某些参与调控生长速率的微生物群体, 对 *dmrt1* 纯合突变雄鱼生长速度的提高起到一定作用。在门水平下, 三组半滑舌鲷的肠道中变形菌门和拟杆菌门均为优势菌群, 这与此前张正等^[23]和张燕玉等^[24]的报道一致。这两类菌种也是鱼类肠道的常见优势菌种,

主要参与宿主的营养吸收与免疫反应等作用^[25]。而在属水平下, 在三组半滑舌鳎中丰度较高的不动杆菌属、弧菌属、发光菌属等也是鱼类肠道中的常见细菌^[26]。一些与生长调控相关的肠道微生物在 *dmrt1* 纯合突变雄鱼中也出现了丰度提高, 如假单胞菌属 (*Pseudomonas*)^[27]、盐单胞菌属 (*Halomonas*)^[28]等, 可能参与作用于 *dmrt1* 纯合突变雄鱼生长速度的提高。此外, 此前有报道表明, 环境或饲料中适应肠道环境的细菌是鱼类肠道微生物的主要来源^[29]。本研究结果中鱼类肠道微生物中的指示物种和养殖水环境高度重合, 唯一不存在于水环境中的是协同菌门, 协同菌门通常为厌氧菌, 而养殖水体中往往溶解氧含量较高, 可能抑制其生长。

基因修饰动物的环境风险也是目前的另一大议题, 可能存在的环境风险包括是否会对同环境中养殖的其他个体产生影响, 是否会对环境中的微生物产生影响等^[30]。此前有关环境监测的研究主要聚焦在陆生动物, 通常采用检测土壤微生物的方式, 对养殖环境周遭一定距离内的环境风险进行监测^[31]。水生动物较陆生动物而言, 具有更难以检测、难以管控的特点, 其环境风险的监测也存在许多不确定性。本研究一方面检测了同一环境中混合养殖的其他个体的基因型, 确认了同一水环境中的其他个体基因型均未发生变化; 另一方面, 基于水环境 eDNA 技术, 提出了一种针对水生基因编辑动物环境风险的可能监测方式, 结果显示在养殖水环境及其排水路径中, 并未检测到编辑后的目的基因, 由此判断半滑舌鳎 *dmrt1* 纯合突变雄鱼并不存在环境安全风险。

此前, 国内外有关鱼类肠道菌群的研究主要聚焦于外源性的影响因素, 如饲料、饲养环境等, 但是对于内源性影响因素的关注较少。本研究在控制外部饲养环境的条件下, 着重探究了基因编辑对半滑舌鳎肠道菌群的影响, 并进一步监测了可能由肠道菌群引发的环境风险, 确认同一环境中混合养殖的其他个体及养殖环境水体均未受到影响。综上所述, 本研究探究了半滑舌鳎 *dmrt1* 纯合突变雄鱼的肠道菌群特征以及环境安全性, 为基因编辑水生动物的安全性评价方法提供了参考。

参考文献:

- [1] Chen S L, Li J, Deng S P, et al. Isolation of female-specific AFLP markers and molecular identification of genetic sex in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*)[J]. Marine Biotechnology, 2007, 9(2): 273-280.
- [2] Cui Z K, Liu Y, Wang W W, et al. Genome editing reveals *dmrt1* as an essential male sex-determining gene in Chinese tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*)[J]. Scientific Reports, 2017, 7(1): Article No.42213.
- [3] Chen S L, Wang D S, Kuang Y Y, et al. Fish genome editing breeding in China: Status, problems and prospects[J]. Journal of Fisheries of China, 2023, 47(1): 13-26. [陈松林, 王德寿, 匡友谊, 等. 中国鱼类基因组编辑育种研究现状及存在问题与展望[J]. 水产学报, 2023, 47(1): 13-26.]
- [4] Xiong J B, Nie L, Chen J. Current understanding on the roles of gut microbiota in fish disease and immunity[J]. Zoological Research, 2019, 40(2): 70-76.
- [5] Pontiroli A, Rizzi A, Simonet P, et al. Visual evidence of horizontal gene transfer between plants and bacteria in the phytosphere of transplastomic tobacco[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(10): 3314-3322.
- [6] Guo H, Xian J A, Wang A L. Analysis of digital gene expression profiling in hemocytes of white shrimp *Litopenaeus vannamei* under nitrite stress[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2016, 56: 1-11.
- [7] Behrendt L, Larkum A W D, Trampe E, et al. Microbial diversity of biofilm communities in microniches associated with the didemnid ascidian *Lissoclinum patella*[J]. The ISME Journal, 2012, 6(6): 1222-1237.
- [8] Zhou Y P, Liu Y X, Li X M. USEARCH 12: Open-source software for sequencing analysis in bioinformatics and microbiome[J]. iMeta, 2024, 3(5): e236.
- [9] Bolyen E, Rideout J R, Dillon M R, et al. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2[J]. Nature Biotechnology, 2019, 37(8): 852-857.
- [10] Douglas G M, Maffei V J, Zaneveld J R, et al. PICRUSt2 for prediction of metagenome functions[J]. Nature Biotechnology, 2020, 38(6): 685-688.
- [11] Loudon A H, Woodhams D C, Parfrey L W, et al. Microbial community dynamics and effect of environmental microbial reservoirs on red-backed salamanders (*Plethodon cinereus*) [J]. The ISME Journal, 2014, 8(4): 830-840.
- [12] Chen Z F, Li X H, Cheng P, et al. Characterization of emopamil binding protein (*Cs-ebp*) reveals its potential role in cholesterol biosynthesis and growth performance of Chinese tongue sole[J]. Aquaculture, 2024, 581: 740382.

- [13] Cui Z K. The establishment of genome editing technique (TALEN) and functional analysis of male sex-determining gene *dmrt1* in Chinese tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*) [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2017. [崔忠凯. 半滑舌鳎基因组编辑 TALEN 技术的建立及雄性决定基因 *dmrt1* 的功能分析[D]. 上海: 上海海洋大学, 2017.]
- [14] Miya M, Sato Y, Fukunaga T, et al. MiFish, a set of universal PCR primers for metabarcoding environmental DNA from fishes: Detection of more than 230 subtropical marine species[J]. Royal Society Open Science, 2015, 2(7): 150088.
- [15] Chen S L, Zhang G J, Shao C W, et al. Whole-genome sequence of a flatfish provides insights into ZW sex chromosome evolution and adaptation to a benthic lifestyle[J]. Nature Genetics, 2014, 46(3): 253-260.
- [16] Liu X F. Self-safety evaluation for FAT-1 transgenic cloned cow[D]. Hohhot: Inner Mongolia University, 2016. [刘新峰. 基于 FAT-1 转基因牛的自身安全评价[D]. 呼和浩特: 内蒙古大学, 2016.]
- [17] Bao Z K, Gao X, Zhang Q, et al. The effects of GH transgenic goats on the microflora of the intestine, feces and surrounding soil[J]. PLoS One, 2015, 10(10): e0139822.
- [18] Tang M X, Zheng X M, Cheng W K, et al. Safety assessment of sFat-1 transgenic pigs by detecting their co-habitant microbe in intestinal tract[J]. Transgenic Research, 2011, 20(4): 749-758.
- [19] Qi C X. Safety evaluation of MSTN gene-edited pigs[D]. Yangzhou: Yangzhou University, 2018. [齐传翔. MSTN 基因编辑猪安全性评价[D]. 扬州: 扬州大学, 2018.]
- [20] Wang H. Biosafety test of VEGF gene editing cashmere goats[D]. Hohhot: Inner Mongolia University, 2019. [王辉. VEGF 基因编辑绒山羊的生物安全检测[D]. 呼和浩特: 内蒙古大学, 2019.]
- [21] Wang R Y, Sun B, Cao D C, et al. Gut microbiota of *Huso dauricus* and *Acipenser schrencki* populations with different growth rates[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2023, 30(9): 1093-1101. [王若愚, 孙博, 曹顶臣, 等. 达氏鳇和施氏鲟生长差异群体肠道菌群特征[J]. 中国水产科学, 2023, 30(9): 1093-1101.]
- [22] Li Y Y, Chen X, Song T Y. Differences in intestinal flora of cultured large yellow croaker *Pseudosciaena crocea* with different growth rates[J]. Journal of Dalian Ocean University, 2017, 32(5): 509-513. [李英英, 陈曦, 宋铁英. 不同生长速度的大黄鱼肠道菌群结构的差异[J]. 大连海洋大学学报, 2017, 32(5): 509-513.]
- [23] Zhang Z, Liao M J, Li B, et al. Study on cultured half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis* Günther) intestinal microflora changes affected by different disease occurrence [J]. Journal of Fisheries of China, 2014, 38(9): 1565-1572. [张正, 廖梅杰, 李彬, 等. 两种疾病发生对养殖半滑舌鳎肠道菌群结构的影响分析[J]. 水产学报, 2014, 38(9): 1565-1572.]
- [24] Zhang Y Y, Han Z R, Sun J F, et al. Effects of infection with *Shewanella algae* on the microbial communities and expression of related functional genes in the intestine of *Cynoglossus semilaevis*[J]. Journal of Southern Agriculture, 2019, 50(10): 2300-2307. [张燕玉, 韩卓然, 孙敬锋, 等. 海藻希瓦氏菌感染对半滑舌鳎肠道菌群结构及相关功能基因表达的影响[J]. 南方农业学报, 2019, 50(10): 2300-2307.]
- [25] Rimoldi S, Terova G, Ascione C, et al. Next generation sequencing for gut microbiome characterization in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed animal by-product meals as an alternative to fishmeal protein sources[J]. PLoS One, 2018, 13(3): e0193652.
- [26] Zhang H, Zhou T, Wang Y. Bacterial composition in the intestine of freshwater pearl mussel and co-cultured fishes in an integrated culture pond[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2013, 37(5): 824-835. [张涵, 周涛, 王岩. 综合养殖池塘中三角帆蚌和鱼类肠道细菌的组成[J]. 水生生物学报, 2013, 37(5): 824-835.]
- [27] Hai N V, Buller N, Fotedar R. Effects of probiotics (*Pseudomonas synxantha* and *Pseudomonas aeruginosa*) on the growth, survival and immune parameters of juvenile western king prawns (*Penaeus latisulcatus* Kishinouye, 1896)[J]. Aquaculture Research, 2009, 40(5): 590-602.
- [28] Agung M U K, Khairunnisa N, Astuty S, et al. Isolation and 16S rRNA characterization of culturable bacteria derived from fire coral *Millepora intricata* in Morela Coastal Waters, Maluku, Indonesia[J]. Indo-Pacific Journal of Ocean Life, 2021, 5(1): 1-7.
- [29] Cahill M M. Bacterial flora of fishes: A review[J]. Microbial Ecology, 1990, 19(1): 21-41.
- [30] Liu S R. Preliminary evaluation of biosafety in ZBED6 gene-edited pigs[D]. Yangling: Northwest A&F University, 2021. [刘世荣. ZBED6 基因编辑猪生物安全的初步评估[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2021.]
- [31] Meng X L, Li W J, Nie G X. Effect of different factors on the fish intestinal microbiota[J]. Journal of Fisheries of China, 2019, 43(1): 143-155. [孟晓林, 李文均, 聂国兴. 鱼类肠道菌群影响因子研究进展[J]. 水产学报, 2019, 43(1): 143-155.]

Analysis of gut microbiota and environmental safety of gene-edited half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*)

WU Yinqi^{1,2}, CHEN Zhangfan^{2,3}, LI Pengfei^{1,2}, CUI Zhongkai², DING Lanqing^{1,2}, CHENG Fangzhou^{1,2}, YAN Xu², CHEN Zebin², CHEN Songlin^{2,3}

1. Shanghai Ocean University, College of Fisheries and Life Sciences, Shanghai 201306, China;
2. Yellow Sea Fisheries Research Institute, National Laboratory of Marine Aquaculture Breeding and Sustainable Production, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;
3. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao Marine Science and Technology Center, Qingdao 266237, China

Abstract: Half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*) is a unique marine aquaculture fish species known for its high nutritional value and commercial potential. However, half-smooth tongue sole exhibits typical sexual dimorphism, characterized by substantially faster growth rates in females than in males, resulting in female adults being two to four times heavier than male adults. Previous studies have successfully obtained *dmrt1*^{-/-} ZZ from male half-smooth tongue sole using TALEN genome editing technology targeting *dmrt1* gene. The growth rate of *dmrt1*^{-/-} ZZ males exceeds twice that of normal male fish, with weights comparable to normal female fish. This successfully addresses the issue of stunted growth in the male half-smooth tongue sole and lays the foundation for the establishment of gene editing breeding techniques for this species. Reports on the impact of transgenic organisms on the surrounding environment have raised marked concerns regarding the environmental safety of genetically-modified organisms. A pressing question is whether the edited genes could affect the environment through gut microbiota or other behavior during the rearing process. Compared to transgenic technology, gene editing has the advantage of not involving exogenous genes. Several studies on the gut microbiota of gene-edited animals have shown that no marked changes in gut microbiota composition were observed in animals after gene editing. To assess the health status and environmental safety of the gene-edited half-smooth tongue sole, this study investigated the changes in gut microbiota of the *dmrt1* homozygous mutant male fish. High-throughput sequencing technology was used to compare the gut microbiota between *dmrt1*^{-/-} ZZ males and normal male and female fish kept under the same aquaculture conditions. Environmental safety risks were assessed by testing the genotypes of normal fish cohabiting with *dmrt1*^{-/-} ZZ males, as well as the eDNA from the water environment where they were raised. There were no marked differences in alpha diversity and composition of the gut microbiota between *dmrt1*^{-/-} ZZ male and normal male and female fish, and no differences were observed in the predicted functions of the gut microbiota. The differences in gut microbiota may influence growth variations. The gut microbiota composition of *dmrt1* homozygous mutant male fish was similar to that of female fish, suggesting that certain microbial populations may be involved in regulating growth rates, which could play a role in enhancing the growth rate of *dmrt1*^{-/-} ZZ males. No edited genes were detected in the normal individuals cohabiting with the *dmrt1*^{-/-} ZZ males. Water samples taken from five sampling points along the drainage path of the aquaculture environment of the *dmrt1*^{-/-} ZZ males were amplified and sequenced indicating no presence of the edited target gene. In conclusion, *dmrt1* gene editing does not lead to marked changes in the gut microbiota of *dmrt1*^{-/-} ZZ male half-smooth tongue sole and does not affect other individuals reared in the same environment, indicating no environmental risks. This study provides a reference for safety assessment methods of gene-edited aquatic animals.

Key words: *Cynoglossus semilaevis*; gene editing; gut microbiota; environmental safety assessment; eDNA

Corresponding author: CHEN Songlin. E-mail: chensl@ysfri.ac.cn