

DOI: 10.12264/JFSC2023-0310

## 白斑狗鱼新基因 *lincRNA-Abcc10* 的克隆、表达及敲除模型构建

王顺哲, 杨倩, 刘璎慧, 刘祎, 汪泳昌, 张俊杰

新疆农业大学生命科学学院, 新疆极端环境生物生态适应与进化重点实验室, 新疆 乌鲁木齐 830052

**摘要:** 长非编码 RNA (lncRNAs) 作为一种新的表观遗传因子, 在研究鱼类性别决定和性别分化过程中具有重要的作用。本研究利用 RACE 技术, 对白斑狗鱼 (*Esox Lucius*) 性别特异性 lncRNAs 基因 *Novel01784* 进行克隆, 获得了全长共 1328 bp 的序列。在线预测工具 CPC2 和 CPAT 的分析结果显示, 该基因不具有编码蛋白质的能力。通过 Blast 比对分析将其定位在 9 号染色体, 且位于 *sp2* 和 *Abcc10* 基因之间, 根据其位置关系将其命名为 *lincRNA-Abcc10*。从共定位分析结果显示, *lincRNA-Abcc10* 可能参与调控离子运输、卵泡细胞发育和线粒体活性, 其表达模式与部分邻近基因相似。其次, 对白斑狗鱼 *lincRNA-Abcc10* 3 个时期在 8 个组织中的 qRT-PCR 结果显示, 该基因在卵巢中特异性表达, 随着时间增长表达量逐渐下降, 说明其可能在卵巢早期分化过程中起着重要的作用。此外, 通过对白斑狗鱼 126 d 卵巢核质 RNA 分离, qRT-PCR 结果显示, *lincRNA-Abcc10* 分布于细胞质内, 可能以顺式或反式方式调控邻近基因的翻译水平。最后, 利用 CRISPR/Cas9 技术建立了 *lincRNA-Abcc10* 突变模型, 为进一步研究其基因功能奠定了基础, 本研究为 lncRNA 在鱼类性别分化的作用提供了新的思路。

**关键词:** 长链非编码 RNA; 表观遗传学; *Esox Lucius*; 性别分化; CRISPR/Cas9

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2024)01-0059-11

长链非编码 RNA (long noncoding RNA, lncRNA) 是指长度 >200 个核苷酸, 且不具有明显编码蛋白质的能力的非编码 RNA<sup>[1-2]</sup>。大量证据表明, lncRNAs 还具有多种作用机制, 包括转录调控、表观遗传修饰、维持 RNA 和蛋白质稳定性、翻译和翻译后修饰, 并且这些都是通过与 DNA、RNA 和蛋白质的相互作用实现的<sup>[3-4]</sup>。此外, lncRNA 被认为在一系列细胞过程中具有重要意义, 如细胞周期、分化、新陈代谢和免疫反应<sup>[5-7]</sup>。有研究表明, lncRNAs 也可以在胚胎发育和卵子发生中发挥作用<sup>[8]</sup>。

近年来, 随着 NGS (Next-Generation Sequencing) 的快速发展, 在硬骨鱼中发现了大量的 lncRNAs, 其中一些 lncRNAs 被报道参与了性别分化过程。如 Feng 等<sup>[9]</sup>从半滑舌鳎 (*Cynoglossus semilaevis*)

性腺克隆得到一个 537 nt 的 lncRNA (DMRT2-AS), 其序列与 *Dmrt2* 部分序列互补, 并在发育期精巢中高度表达, 可增强 *Dmrt2* 的转录。因此, DMRT2-AS 可能是 *Dmrt2* 的转录调节因子, 在精巢分化中起着重要作用。在黄鳝 (*Monopterus albus*) 中, 分析了 5 个不同性腺发育阶段 lncRNA 的表达模式, 发现 2901 个差异表达 lncRNA。其中, *Znf207* 作为 LOC109958454 的靶基因, 在黄鳝的性腺发育各个阶段均有表达, 并且其表达也受到 FSH 和 hCG 的抑制<sup>[10]</sup>。在鲤 (*Cyprinus carpio*) *igf3* 基因敲降后, 对其性腺组织进行全转录组分析, 获得 124 个差异表达的 lncRNAs, 它们可能在鲤的性别分化和性腺发育中发挥重要作用<sup>[11]</sup>。然而, 目前对硬骨鱼中 lncRNAs 的研究仍然局限于从整个转录组分析中获得, 对特定的 lncRNA 的功能

收稿日期: 2023-11-23; 修订日期: 2023-12-19.

基金项目: 国家自然科学基金项目(32260915); 新疆自然科学基金项目(2022D01A66); 新疆农业大学大学生创新项目(S202210758036).

作者简介: 王顺哲(1998-), 男, 硕士研究生, 研究方向为鱼类遗传育种. E-mail: 1458226514@qq.com

通信作者: 张俊杰, 副教授, 研究方向为鱼类遗传育种. E-mail: zhangjuji@sina.cn

的研究仍然很少。

白斑狗鱼(*Esox lucius*)是额尔齐斯河流域的重要水产品之一,它拥有捕食范围广、生长迅速、营养价值高等特点<sup>[12]</sup>。国内外对白斑狗鱼的研究除了基础的生物学特征,还包括行为生态学、环境毒理和分子遗传学等方面<sup>[13-14]</sup>。白斑狗鱼雌鱼生长明显快于雄鱼,通过性别控制实现单性生产对提高养殖效益有着重要意义,但目前白斑狗鱼野生种群中也存在有部分伪雄鱼和伪雌鱼,对于其因受环境影响而发生性逆转的分子网络调控机制还知之甚少,这将直接影响白斑狗鱼的性别控制和实现单性生产。基于本实验室前期对白斑狗鱼 5 个时期性腺转录组数据分析,发现了一个新的雌性特异 lncRNA 基因 *Novel01784*,雌性的 readcount value 为 891.13,雄性的 readcount value 为 0 (数据未发表)。作为一种潜在的表现遗传调控因子,该 lncRNA 在白斑狗鱼性别决定和分化中的作用尚不清楚,本研究克隆并鉴定了白斑狗鱼 *Novel01784* 基因,根据其位置关系,将其命名为 *lincRNA-Abcc10*,此外,研究了该基因在不同组织中的表达丰度,并通过相邻基因的表达模式预测其功能。本研究结果为探索 lncRNA 在白斑狗鱼性别分化中

的作用提供了新的思路,同时对进一步开展白斑狗鱼性别控制和性别发生机制研究提供数据支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验用鱼

用于基因克隆和组织表达分析的白斑狗鱼鱼苗购自中国新疆额尔齐斯河特种鱼类开发有限公司,随后在新疆农业大学水产实验室的具有水循环系统的水池中饲养,水温控制在 18~22 °C。取 126 d、188 d 和 320 d 健康白斑狗鱼的脑、肌肉、肾脏、性腺、头肾、鳃、肠和肾脏,每次取 3 只雌鱼和 3 只雄鱼,灌入液氮中,−80 °C 保存。

用于基因编辑的性成熟白斑狗鱼雌鱼个体购自新疆海富特种鱼养殖有限责任公司,显微注射用受精卵在 10~11 °C 的平槽流水中孵化。

### 1.2 *lincRNA-Abcc10* 的全长克隆

使用 Trizol 法(Invitgen, 美国)提取白斑狗鱼 126 d 卵巢 RNA,并用 Infinite<sup>®</sup>200 PRO 全波长酶标仪和琼脂糖电泳检测 RNA 浓度与质量。以实验室前期转录组数据得到的 *lincRNA-Abcc10* 序列为参考设计引物(784-orf-F1/R1 和 784-orf-F2/R2) (表 1),根据 5'&3'RACE 试剂盒说明制备 cDNA

表 1 本研究所使用的引物  
Tab. 1 Primers used in this study

引物名称 primer name	序列 (5'–3') primer sequence (5'–3')	用途 application
784-orf-F1	ACACTGTTGCTGAATGC	基因克隆
784-orf-R1	TCTCTTGCTTTTCTGGC	gene cloning
784-orf-F2	ACTGAGAGCAGGAGGAAA	
784-orf-R2	ACCTCATAATGACCAAGCA	
784-3'race-F1	CCAAGACACATAGAGCCGTCTGCCC	
784-3'race-F2	CTTCTTGTGGGGAGGCCCTCAGTA	
784-5'race-F1	GTTTGGGCAGACGGCTCTATGTG	
784-5'race-F2	AATGGGGAGTTTCTTGGACTTCACA	
Qpcr-F	TGAAAGTCCAAGAACTCCCC	实时荧光定量 PCR
784-Qpcr-R	GGCAGACGGCTCTATGTGTC	real time quantitative PCR
<i>Actin</i> -F	TGAAATCGCCGCACTGGTT	内参基因
<i>Actin</i> -R	TCCGTGCTCGATGGGGTACT	internal control gene
<i>U6</i> -F	GAACGCAGTCCCCACTAC	
<i>U6</i> -R	TACTTACCTGGCAGGGGAGATAC	
<i>GAPDH</i> -F	AGGGGCGAGGTTTAGAGCA	
<i>GAPDH</i> -R	GGATTGGAAAGAAGCACGAGT	
784-Crispr-F	AAGTCCAAGAACTCCCCAT	突变检测
784-Crispr-R	ACACTGTTGCTGAATGC	mutation detection

并进行 PCR, 用 FasSanPrep 柱 PCR 产物纯化试剂盒[生工生物工程(上海)股份有限公司, 中国]纯化相应条带, 进行 Sanger 测序。

### 1.3 *lincRNA-Abcc10* 的编码能力预测

利用 ORF 软件(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>)预测 *lincRNA-Abcc10* 的开放阅读框, 使用 BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 对其氨基酸序列进行同源比对。通过 CPAT (<http://lilab.research.bcm.edu/>)和 CPC2 (<http://cpc2.gao-lab.org/>)在线预测工具预测其编码潜能, 以已被克隆的白斑狗鱼 *Star* 基因作为参照。

### 1.4 *lincRNA-Abcc10* 在不同组织中的表达分析

将反转录得到的各个组织 cDNA 稀释至同一浓度并以其为模板, 选择  $\beta$ -actin 为内参, 引物序列见表 1, 使用 SYBR Green I (天根, 中国北京)和 CFX 96 实时 PCR 检测系统在每个组织中设置 3 个生物重复和 3 个机器重复, 并且每个反应系统如下: 0.6  $\mu$ L 各引物 (10  $\mu$ mol/L)、10  $\mu$ L 2 $\times$ SuperReal PreMix Plus、1  $\mu$ L 50 ng/ $\mu$ L cDNA 和无 RNA 酶水补足至 20  $\mu$ L。反应程序如下: 95  $^{\circ}$ C, 5 min; 95  $^{\circ}$ C, 30 s, 65  $^{\circ}$ C, 30 s, 39 个循环, 进行熔解曲线分析, 然后以 0.5  $^{\circ}$ C/s 的速率升温至 95  $^{\circ}$ C, 以验证扩增子的特异性。用  $2^{-\Delta C_t}$  法计算相对表达量。用 IBM SPSS Statistics 26.0 软件进行统计学处理,  $P < 0.05$  认为  $t$  检验有统计学意义。

### 1.5 *lincRNA-Abcc10* 的共定位分析

在确定了 *lincRNA-Abcc10* 的基因组位置后, 从白斑狗鱼基因组数据库中提取了其上下游 100 kb 的序列。利用 Ensembl (<https://asia.ensembl.org/index.html>)的可视化功能, 成功预测了 11 个潜在靶基因, 并利用 LncTar (<http://www.cuilab.cn/lncstar>)在线预测了这 11 个基因与 *lincRNA-Abcc10* 的相互作用。

通过实验室前期测序得到的 3 个时期白斑狗鱼性腺转录组数据, 使用 HTSeq (v0.5.4 p3)软件分析每个样本中 11 个潜在靶基因的表达水平, 以 FPKM (fragments per kilobase of exon model per million mapped fragments)值来衡量基因的表达水平, 在后续分析中, 只对 FPKM > 1 的基因进行分析。

### 1.6 *lincRNA-Abcc10* 的亚细胞定位

取 15 mg 126 d 白斑狗鱼卵巢, 按照生产商的说明书使用 Cytoplasmic & Nuclear RNA Purification Kit (Norgen Biotek, 加拿大)分离细胞核和细胞质 RNA, 通过细胞核和细胞质内参、*U6*和 *GAPDH*检测细胞核和细胞质分离效果, 引物序列见表 1, 并通过 qRT-PCR 进行亚细胞定位分析。

### 1.7 *lincRNA-Abcc10* 的靶位点设计

根据上述获得的外显子序列, 利用 CCTOP 软件<sup>[15]</sup>设计了 3 对靶向白斑狗鱼 *lincRNA-Abcc10* 第二外显子的 sgRNA, 并通过 CCTOP 软件验证了特异性, 将所有 sgRNA 提交给金斯瑞(南京, 中国)进行合成。

### 1.8 显微注射

将受精卵转移至培养皿中进行显微注射。将 784-sgRNA 与 Cas9 核酸酶以 1 : 1 的体积比混合, 在室温下孵育 5 min。为了更好地观察, 向混合物中加入少量酚红, 并将优化的 sgRNA/Cas9 RNP 溶液通过显微注射器 zf-ts 2 (上海费曦生物, 中国)以 1000 ng/ $\mu$ L 的终剂量显微注射到 1 细胞期的胚胎中。

### 1.9 突变检测

将 20 dpf 的 F0 鱼苗剪下尾鳍, 显微注射, 用酚-氯仿抽提法提取基因组 DNA, PCR 反应以 784-crispr-F/R 为引物, 引物序列见表 1, 反应体系为: 2 $\times$ Taq PCR MasterMix (TIANGEN KT 201-02) 12.5  $\mu$ L, 上下游引物各 1  $\mu$ L, 模板 cDNA 3  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 补足至 25  $\mu$ L。95  $^{\circ}$ C 30 s, 57  $^{\circ}$ C 30 s, 72  $^{\circ}$ C 30 s, 35 个循环; 72  $^{\circ}$ C 5 min。通过 1.2%琼脂糖凝胶电泳和 Sanger 测序[生工生物工程(上海)股份有限公司]检测反应产物。

## 2 结果与分析

### 2.1 *lincRNA-Abcc10* 的克隆和表达特征

利用 RACE 技术获得的 *Novel01784* 全长为 1328 bp, 位于白斑狗鱼 9 号染色体 18322407~18323807 之间, 介于 *sp2* 和 *Abcc10* 基因之间, 并与其方向一致。根据 LncRNA 命名法, 将其命名为 *lincRNA-Abcc10* (图 1a、b)。

a

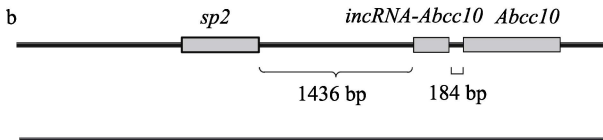
```

1 GACAGCACTG ATGAAGGTAT GAAGCTGAAA TGGTATTATT GTATATTATT TTGTGCACCT
61 TATAGTTTTC CGCCTGTGTT GCTTTATGCC TTCTTGTGGG GAGGGGCCCT AGTAATATAG
121 TACTTAATTG CTTTCAATGT TGAGCCAATC AACCATCTTC CTATAAAGGG TGTGTGAGTC
181 AGCTTGATGT ACAGCACTGA TGAAGCCTGA GTGCAAAATCC TCTCTCAGTA CTAGAAGCTAA
241 AACCAAGCTG TGAAGTCCAA GAAACTCCCC ATTAACCTTC AGGACAGAAAT TTGGTCGAGG
301 CATAGATCAT GGAACCTTGG TAAAGCATTG AAAGTTCTCA AGAGCACAGT GGGCTCCATC
361 ATTATGAAAT GGAATAGGTT TTGAATGACC AAGACACATA GAGCCGCTCG CCCAAACTAA
421 ATAACCGGGC AAGAAGGGCC TTGGTTAGGC AGGTGACCAA ATACCCAATG CAGAGAGAT
481 AGAACCTACA AGAAGGACAA CCATCTTTGC AGCACTCCCA TCATTTCAGGC CTTTTAGTA
541 GAAGGACTAG ATGGAAACCA GTCCTGAGTA AAAGGCATAC GACTTGCTGC CTGAAGGACT
601 CTGAGAGCAG GAGGAAAAAT ATTATCTGGT CCGATGATAC CAAACTATAT GCCAGAAAAG
661 CAAGAGATAT ATCTGTGAA ACCAAAGTGC TGCTCATTAT CTGTCAAATA CCATCCATAC
721 AGTGAAGCAT TGTGGTAGGA GCATCATGCT ATTGGGATGC TTCTAAGCAG CTGAGACTGG
781 TAGATTGGTC AGGATAGAGG GAAGGATGAA CAGAGCAAAA TAAAGAGTTC CTAGGAGAGA
841 ATCAGATCCA GGGTGTACAG GACCTCAGAC TGGGGCAACA CGCACAGTCA CAAAGCACAC
901 AGCAAGATA ACACCTGAGT GGTCTCAGGA TAGGTAAGG TCAGCAGTCA CCGATGCTCT
961 CCACAGAATC AGAGCTTGG AGGATGTACA AGGAAGATG GGAGAACTG CCCACCTCCA
1021 GGTGTGCCAA GCTGGTATAG ACTCAAGCT CTAACCAATTG CCACAGATGC TTCAACAAAA
1081 TAAATGATAA AGGGTCTGAA TGCCTATGTA CATGAGATAT TTCTGTTTCT TATAATTCCA
1141 TAAATTGTCA TATGTCTACA AATTGTGTTT TGCTTGCTCT TTAATGAGGT ATTTATTTAA
1201 TTTGATTGAG TATAAATGT TATGTGCTGG ATGTGAAGAG TCCTAATTTG TTTTATATGG
1261 GATGACTATT GCGGAAAGGA CATATTCTTC GGAATAATTA TTTGTTCTAC AAAAAAAA
1328 AAAAAAAA

```

LG09: 18322703-18323809

5' → 3'



3' → 5'

图 1 白斑狗鱼 *lincRNA-Abcc10* 序列及结构示意图

a. 全长 *lincRNA-Abcc10* 全长 1328bp; b. *lincRNA-Abcc10* 及其邻近基因在基因组中的位置。

Fig. 1 Schematic diagram of sequence and structure of *lincRNA-Abcc10* in *Esox lucius*

a. The full-length of *lincRNA-Abcc10* is 1328 bp. b. The genomic location of *lincRNA-Abcc10* and its neighboring genes in the genome.

## 2.2 *LincRNA-Abcc10* 的编码能力预测

将预测得到的氨基酸结果进行 BLASTP 比对, 结果显示无法比对到任何蛋白, 并且 *lincRNA-Abcc10* 的长度超过 200 nt, 初步判断其为 lncRNA。此外, 利用在线预测工具 CPAT 和 CPC2 对 *lincRNA-Abcc10* 的编码能力进行分析, 以白斑狗鱼具有编码能力的 *Star* 基因(XM\_010876119.5)为对照。结果显示 *lincRNA-Abcc10* 的注释结果均为非编码, 进一步说明 *lincRNA-Abcc10* 为 lncRNA (表 2, 表 3)。

表 2 CPAT 网站编码能力预测结果

Tab. 2 Coding capability prediction results of CPAT

基因名称 gene name	编码标签 coding label	编码潜能 coding probability
<i>lincRNA-Abcc10</i>	非编码 non-coding	9.503438524333e-5
<i>Star</i>	编码 coding	0.99999999741106

表 3 CPC2 网站编码能力预测结果

Tab. 3 Coding capability prediction results of CPC2

基因名称 gene name	编码标签 coding label	编码潜能 coding probability
<i>lincRNA-Abcc10</i>	非编码 non-coding	0.00781535
<i>Star</i>	编码 coding	0.946954

## 2.3 *lincRNA-Abcc10* 的组织表达分析

以  $\beta$ -actin 为内参基因, 通过 qRT-PCR 分别检测 *lincRNA-Abcc10* 在白斑狗鱼 126 d、188 d 和 320 d 的脑、肌肉、肾、性腺、头肾、鳃、肠和肝脏的相对表达量。

126 d 的结果显示, *lincRNA-Abcc10* 在雌鱼卵巢中表达量及显著高于精巢 ( $P < 0.01$ ), 而在其他组织中, 仅在雄鱼的肌肉中有微量表达 (图 2a)。

188 d 的结果显示, *lincRNA-Abcc10* 在卵巢中的表达量极显著高于精巢 ( $P < 0.01$ ), 而在其他组织中, 在雌鱼的肝脏、肾和肌肉中呈现微量表达, 在雄鱼的头肾和肌肉中呈现微量表达 (图 2b)。320 d 的结果显示, *lincRNA-Abcc10* 在卵巢中的表达量仍极显著高于精巢 ( $P < 0.01$ ), 在其他组织中, 在雄鱼的脑、肠、肌肉和肾中微量表达 (图 2c)。针对不同发育时期性腺中的相对表达量进行比较分析, 结果显示随着白斑狗鱼的不断发育, 每个时期 *lincRNA-Abcc10* 的表达量相较于上一个时期都发生极显著地下降 ( $P < 0.01$ ) (图 2d)。

qRT-PCR 的结果说明 *lincRNA-Abcc10* 在白斑狗鱼的卵巢中表达量最高, 在肠、肌肉、肝脏、肾和头肾中表达量极低, 而在鳃和精巢中始终不表达。

## 2.4 *lincRNA-Abcc10* 的靶基因预测

在确定了 *lincRNA-Abcc10* 的基因组位置后, 在该基因组位置的 100 kb 范围内发现了与 *lincRNA-Abcc10* 相邻的基因。共获得 11 个基因, 包括位于 *lincRNA-Abcc10* 上游的腺苷三磷酸结合盒转运蛋白 10 (*Abcc10*)、线粒体核糖体蛋白 L45 (*Mrpl45*)、线粒体核糖体蛋白 L4 (*Mrpl4*)、WAS/WASL 相互作用蛋白家族成员 2a (*wipf2a*)、蛋白酪氨酸磷酸酶 IVA1 型 (*ptp4a1*)、芳基酚类储藏蛋白 2 (sp2)、IX 型胶原蛋白  $\alpha 1$  链 1a (*col9a1a*)、肌球蛋白 M2a (*myom2a*)、含谷氨酰胺合成酶结构域

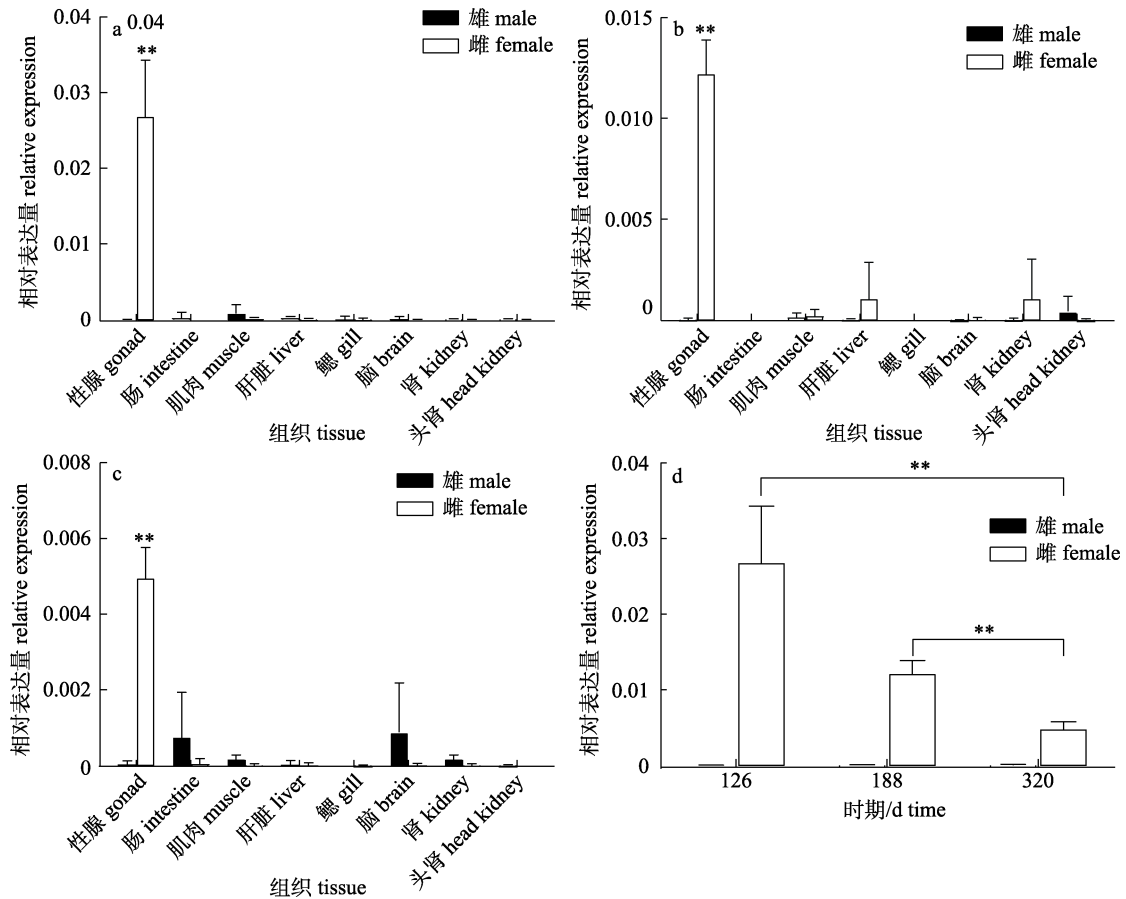


图 2 用 qRT-PCR 检测 *lincRNA-Abcc10* 在白斑狗鱼各组织中的表达特征

a. 126 d 白斑狗鱼组织中 *lincRNA-Abcc10* 的表达; b. 188 d 白斑狗鱼组织中 *lincRNA-Abcc10* 的表达; c. 320 d 白斑狗鱼组织中 *lincRNA-Abcc10* 的表达; d. *LincRNA-Abcc10* 在白斑狗鱼不同发育阶段性腺中的相对表达。

Fig. 2 Expression of *lincRNA-Abcc10* in *Esox lucius* tissues by qRT-PCR

a. Expression of *lincRNA-Abcc10* at 126 d. b. Expression of *lincRNA-Abcc10* at 188 d. c. Expression of *lincRNA-Abcc10* at 320 d. d. Relative expression of *lincRNA-Abcc10* in gonads at different stages.

的晶状体蛋白(*lgsn*)、嘌呤霉素敏感性氨肽酶蛋白(*npepps*)和细胞因子信号转导抑制因子(*socs7*)。

通过在线预测网站 LncTar 对 *lincRNA-Abcc10* 与筛选得到的候选基因进行逐个比对, 归一化结合自由能(normalized binding free energy, ndG)反映了 lncRNA-RNA 中内部碱基对的相对稳定性, ndG 值越小越稳定。结果显示 *lincRNA-Abcc10* 与 *Abcc10* 基因的 ndG 值是候选基因中最小的, 为 -0.0701。进一步说明 *Abcc10* 可能为 *lincRNA-Abcc10* 的靶基因(表 4)。

利用转录组研究了 *lincRNA-Abcc10* 及其邻近的 11 个基因在白斑狗鱼卵巢 126 d、188 d 和 320 d 中的表达谱。结果显示, *lincRNA-Abcc10* 随着时间的增长不断下调, 并且 *Mrpl4* 和 *Mrpl45* 在所有时

表 4 *lincRNA-Abcc10* 靶基因预测结果

Tab. 4 *lincRNA-Abcc10* target gene predict

候选基因 candidate genes	近似结合自由能 approximate binding free energy	归一化结合自由能 normalized binding free energy
<i>Abcc10</i>	-57.18	-0.0701
<i>Mrpl45</i>	-50.33	-0.0665
<i>wipf2a</i>	-52.81	-0.0498
<i>ptp4a1</i>	-30.69	-0.0492
<i>sp2</i>	-51.47	-0.0483
<i>col9a1a</i>	-62.26	-0.0476
<i>myom2a</i>	-49.29	-0.0464
<i>lgsn</i>	-46.53	-0.0426
<i>Mrpl4</i>	-36.50	-0.0403
<i>npepps</i>	-42.40	-0.0390
<i>socs7</i>	-41.47	-0.0344

间点也都下调,与 *lincRNA-Abcc10* 表达模式相似。而 *Abcc10*、*npepps*、*Sp2* 和 *myom2a* 在所有时间点均上调,与 *lincRNA-Abcc10* 表达模式相反,其他基因在卵巢中的表达量过低并没有明显趋势(图 3)。

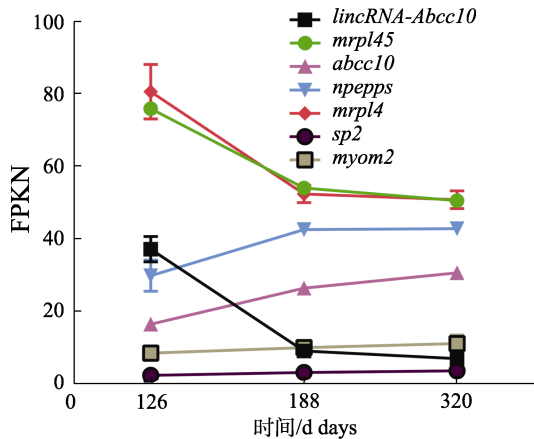


图 3 基于 RNA-seq 分析方法的 *lincRNA-Abcc10* 与其邻近基因在白斑狗鱼卵巢中的基因表达谱  
Fig. 3 The gene expression patterns of *lincRNA-Abcc10* and its neighboring genes in ovary of *Esox lucius* at 3 timepoints by RNA-seq analysis

### 2.5 *lincRNA-Abcc10* 的亚细胞定位

利用 IncLocator 预测 *lincRNA-Abcc10* 亚细胞定位在细胞质中。从白斑狗鱼卵巢组织中提取其核质 RNA, 分析 *U6*、*GAPDH* 和 *lincRNA-Abcc10* 的基因表达情况。结果显示, *lincRNA-Abcc10* 和细胞质内参 *GAPDH* 主要在细胞质中表达, 在细胞核中表达水平极低。同时, 细胞核内参 *U6* 在细胞核中高表达。因此, *lincRNA-Abcc10* 主要分布在细胞质中(图 4)。

### 2.6 *lincRNA-Abcc10* 敲除模型建立

利用 CRISPR/Cas9 技术构建 *lincRNA-Abcc10* 突变嵌合体(*lincRNA-Abcc10*<sup>+/-</sup>)。设计了 3 个靶点来靶向 *lincRNA-Abcc10* 的第二外显子的编码序列, 发现只有一个 sgRNA (sgRNA2) 是有效的(图 5a)。*lincRNA-Abcc10*<sup>+/-</sup> 的测序峰图显示, 从 sgRNA 的第一个碱基 C 开始出现套峰, 并且后面的碱基都出现套峰的结果, 且野生型峰图正常(图 5b, 5c)。

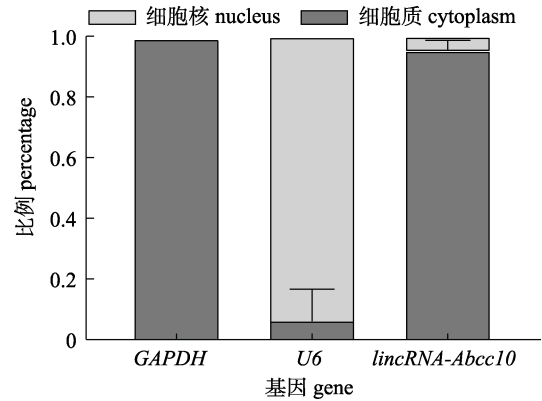


图 4 利用 qRT-PCR 分析 *lincRNA-Abcc10* 在白斑狗鱼中的亚细胞定位

核质分离后, *U6* 作为细胞核内参, *GAPDH* 作为细胞质内参。

Fig. 4 The subcellular localization of *lincRNA-Abcc10* analysis in *Esox lucius* cell by qRT-PCR

Following nuclear cytoplasmic separation, the *U6* was used as internal reference of nucleus, while *GAPDH* was used as internal reference of cytoplasm.

## 3 讨论

尽管非编码 RNA (ncRNAs) 作为基因表达和染色质修饰的关键调节因子在各种生物过程中的重要作用已经被认识到, 但大多数 ncRNAs 的研究都集中在硬骨鱼中的 micro RNA (miRNA) 上。在硬骨鱼中, 已发现大量 miRNAs 参与基因调控, 并广泛研究了 miRNAs 与其靶基因相互作用的分子机制<sup>[16]</sup>。然而, 与 miRNAs 不同的是, lncRNAs 的保守性较低, 对其在硬骨鱼中的表达谱研究还很有限。除了在性别分化中发挥作用外, lncRNAs 还对鱼类放养密度、缺氧反应、脂质代谢和免疫应答等方面中的关键基因表达起到重要的调控作用<sup>[17-19]</sup>。然而, 这些研究都是在整个转录组水平上对特定生物过程中差异表达的 lncRNA 进行全面的鉴定, 还缺乏对特定 lncRNA 的特异性描述。本研究首次在白斑狗鱼中鉴定出一个新的 lncRNA (*lincRNA-Abcc10*), 为进一步了解 lncRNA 在硬骨鱼中的功能作用提供了初步的见解。

根据 lncRNAs 的特点, 将其分为基因间 lncRNAs、内含子 lncRNAs、正义和反义 lncRNA。在本研究中, 所鉴定的 lncRNA 位于 *sp2* 与 *Abcc10* 基因之间且距离 *Abcc10* 基因仅有 176 bp, 根据长链非编码 RNA 基因命名法将其命名为

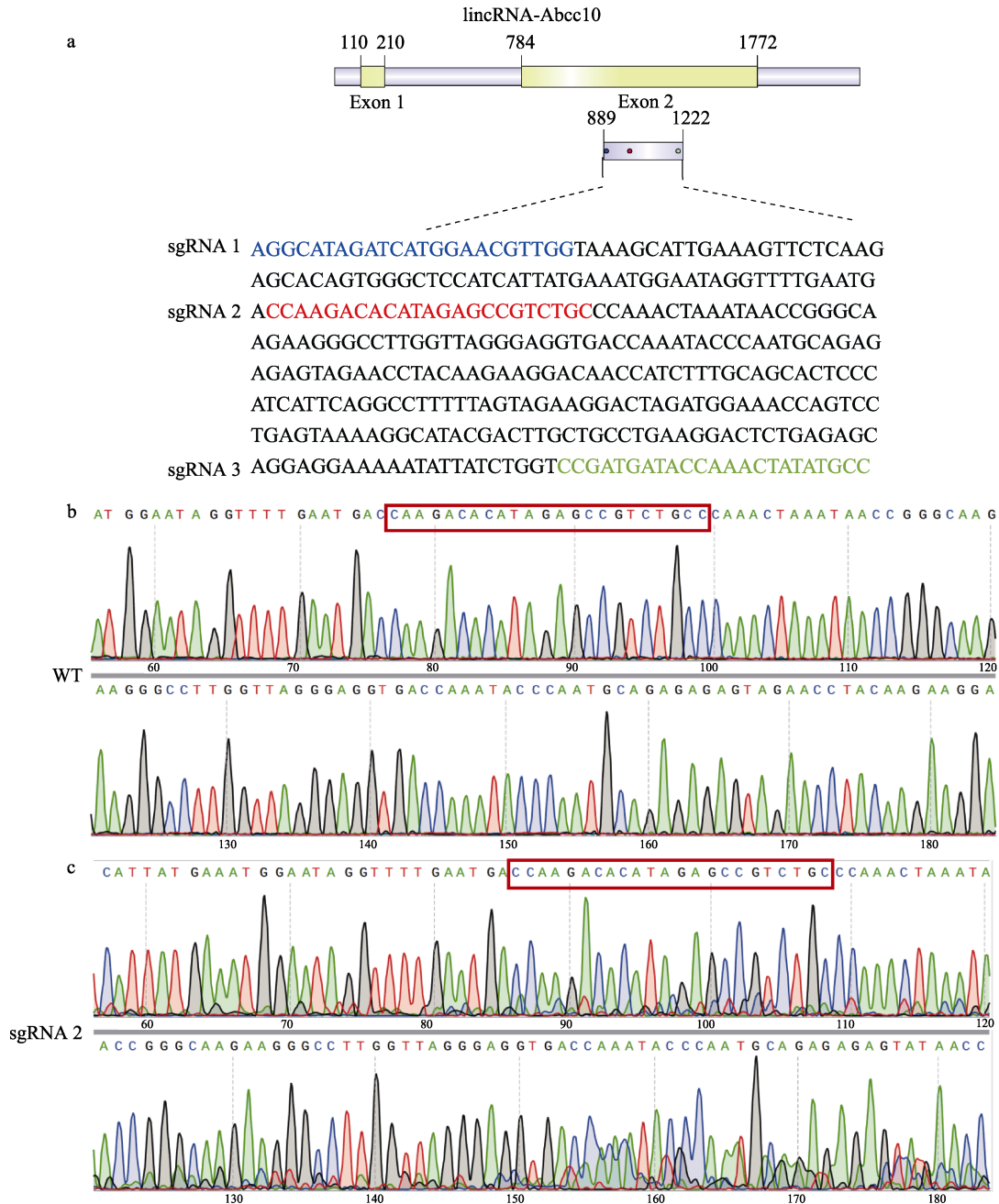


图 5 CRISPR/Cas9 系统介导的白斑狗鱼 *lincRNA-Abcc10* 的修饰

a. 靶向 *lincRNA-Abcc10* 位点的 sgRNA 示意图. *lincRNA-Abcc10* 的外显子以黄色方块显示, *lincRNA-Abcc10* 的 sgRNA 1 为蓝色字体显示, sgRNA2 为红色字体显示, sgRNA 3 为绿色字体显示. b. 野生型靶点测序峰图. c. 基因编辑靶位点测序峰图. b、c 中红色区域为 sgRNA 序列.

Fig. 5 CRISPR/Cas9 system-mediated modifications of *lincRNA-Abcc10* in *Esox lucius*  
 a. Schematic of sgRNAs targeting the *lincRNA-Abcc10* site. The exons of *lincRNA-Abcc10* are shown in yellow squares, sgRNA1 of *lincRNA-Abcc10* is shown in blue font, sgRNA2 is shown in red font, and sgRNA3 is shown in green font.  
 b. Sequencing peak map of wild-type target sites. c. Sequencing peak map of gene editing target sites.  
 Red area is sgRNA sequence in figure b and figure c.

*lincRNA-Abcc10*<sup>[20]</sup>。在虹鳟的性腺全转录组中, 发现许多差异表达的 lncRNAs 与差异表达的 mRNAs 相邻或重叠<sup>[21]</sup>。lncRNAs 作为基因表达的

重要调节因子,与邻近的基因有物理上的联系, 且被证实能够顺式调控它们基因组中邻近的蛋白编码基因。例如, 在大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)

中, 一个名为 SETD3-OT 的 lncRNA 位于 *SETD3* 基因附近, 它被预测可能参与免疫细胞发育和抗感染免疫<sup>[22]</sup>。在邻近的 11 个基因中, 有 2 个基因在雌性发育的不同时期中表现出相似的表达模式, 其中一个在 *lincRNA-Abcc10* 的下游, 另一个在其上游。此外, 有 4 个基因与 *lincRNA-Abcc10* 表现出完全相反的表达模式, 表明 *lincRNA-Abcc10* 也可以调节邻近基因在顺式调控中的表达, 但具体的分子机制有待进一步探讨。

lncRNA 的生物学功能可以通过其附近基因的功能来预测。值得注意的是, *lincRNA-Abcc10* 距离 *Abcc10* 基因最近, *Abcc10* 是 ABC 转运蛋白超家族的一员, 也是多药耐药性蛋白中的一种。在卵巢癌多药耐药的体外模型中, *Abcc10* 的过表达是该模型产生耐药机制的主要原因<sup>[23]</sup>。此外, *Abcc10* 还能够与其他多药耐药性蛋白一样具有阴离子两亲性的特点, 被证明能够依赖镁离子转运 17 $\beta$ -雌二醇<sup>[24]</sup>。与 *lincRNA-Abcc10* 具有相同表达模式的 *Mrpl4* 与 *Mrpl45* 都属于线粒体核糖体蛋白 L 中的一种, 它们在细胞质中合成, 再转运到线粒体, 与线粒体 DNA 编码的两种 rRNA 结合, 对线粒体的生物能量和代谢过程起到至关重要的作用。在果蝇中, *Mrpl4* 的突变提高了果蝇卵巢卵母干细胞系中活性氧的水平 and c-Jun 氨基末端激酶的活性<sup>[25]</sup>。同时在果蝇卵母细胞中的研究首次证实线粒体裂变激活了 Notch 信号, 细胞接收 Notch 信号需要 *Mrpl4* 来允许靶基因转录, 证明 *Mrpl4* 在 Notch 信号通路中具有一定的保守作用。而在 *Mrpl45* 中, 仅发现其与 IMM 交互蛋白 TIM44 和 Mba1 的结构相似, 并在维持核糖体大亚基(mt-LSU)的稳定性和线粒体蛋白翻译过程中起到重要的作用<sup>[26]</sup>。*Mrpl45* 与 *lincRNA-Abcc10* 具有相同的表达模式, 提示其可能在卵巢发育过程中发挥一定的作用。综上所述, *lincRNA-Abcc10* 可能参与调控离子运输、卵泡细胞发育和线粒体活性。

虽然 lncRNA 的表达水平通常低于 mRNA, 但它们显示出更强的组织特异性表达模式, 表明在细胞类型特异性过程中起着不可或缺的作用<sup>[27]</sup>。在本研究中, *lincRNA-Abcc10* 在白斑狗鱼的卵巢

中特异性表达, 而在被检测的其他组织中仅有微量表达, 在鳃和精巢中不表达。白斑狗鱼卵巢中 *lincRNA-Abcc10* 的表达量随着发育逐渐降低, 188 d 卵巢表达量相对 126 d 下降了 55.6%, 320 d 卵巢表达量相对 188 d 下降了 66.7%。*lincRNA-Abcc10* 在卵巢组织早期表达量最高, 揭示其在白斑狗鱼性别分化过程中可能起着重要的作用。

与 mRNA 相比, lncRNAs 更多地富集于细胞核而不是细胞质中, 但最近的研究表明, 细胞质 lncRNAs 的数量比之前认为的要多, 扩大了 lncRNAs 参与调控细胞内不同功能的机会<sup>[28]</sup>。由于 lncRNA 的相互作用影响它们的功能, 因此 lncRNA 在细胞质中的作用可能不同于在细胞核中的作用。在细胞质中, lncRNAs 可以隔离 miRNAs 和蛋白质以调节其活性和水平, 影响蛋白质翻译后修饰, 或调节 mRNA 的翻译和稳定性<sup>[29]</sup>。例如, *PYCARD-ASI* 是促凋亡基因 *PYCARD* 的反义 lncRNA。在细胞核中, *PYCARD-ASI* 与 *PYCARD* mRNA 相互作用, 抑制核糖体组装和 *PYCARD* 翻译<sup>[30]</sup>。本研究发现 *lincRNA-Abcc10* 主要分布在细胞质中, 其表达可以调节邻近基因的翻译水平, 可以通过推断邻近基因的作用来进一步研究其功能。

经过长期的培育和实验, 白斑狗鱼的人工繁殖被攻克<sup>[31]</sup>。然而, 随着消费和产品需求的增加, 在疾病频发的威胁下, 种质资源改良的任务迫在眉睫<sup>[32]</sup>。基因组编辑技术已应用于猪、羊、罗非鱼、半滑舌鳎等多种动物, 获得了良好的遗传特性。虽然 CRISPR/Cas9 在水产养殖中的应用还处于早期发展阶段, 但在白斑狗鱼品种优化中已显示出良好的应用前景<sup>[33]</sup>。

不容忽视的是, 无论是靶点的设计和选择, 还是显微注射的难度, 都给基因编辑带来了很大的障碍。在本研究中, 3 种 sgRNA 中只有 1 种是有效的, 而且注射后损伤导致孵化率很低。即使显微注射可以成功地将 RNPs 转移到胚胎中, 但大多数卵子在注射后由于难以修复尖端的小孔而死亡, 存活率不到 5%。最近, 研究人员利用电穿孔技术将质粒转入斑点叉尾鱼和斑马鱼受精前的生殖细胞, 可以在几分钟内转移数千个细胞, 这可能为 sgRNAs 转移到白斑狗鱼精子细胞或单细



胞胚胎提供新的方向<sup>[34]</sup>。

综上所述, 本研究在白斑狗鱼中鉴定出一个新的 lncRNA (*lincRNA-Abcc10*)。首先, 从邻近基因的注释来看, *lincRNA-Abcc10* 可能参与调控离子运输、卵泡细胞发育和线粒体活性, 其表达模式与部分邻近基因相似。其次, *lincRNA-Abcc10* 在卵巢中特异性表达, 随着时间增长表达量逐渐下降, 说明其可能在卵巢早期分化过程中可能起着重要的作用。此外, *lincRNA-Abcc10* 分布于细胞质内, 可能以顺式或反式方式调控邻近基因的翻译水平。最后, 利用 CRISPR/Cas9 技术建立了 *lincRNA-Abcc10* 突变模型。虽然由于白斑狗鱼繁育周期较长, 本研究没有获得纯合后代, 但 *lincRNA-Abcc10*+/-为进一步研究其基因功能奠定了基础。总之, 研究结果为 lncRNA 在鱼类性别分化中的作用提供了新的思路。然而, 对 *lincRNA-Abcc10* 及其邻近基因基因调控的详细分子机制还需要进一步的研究。

#### 参考文献:

- [1] Ulitsky I, Bartel D P. lincRNAs: Genomics, evolution, and mechanisms[J]. *Cell*, 2013, 154(1): 26-46.
- [2] Jarroux J, Morillon A, Pinskaya M. History, discovery, and classification of lncRNAs[J]. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2017, 1008: 1-46.
- [3] Schmidt K, Weidmann C A, Hilimire T A, et al. Targeting the oncogenic long non-coding RNA SLNCR1 by blocking its sequence-specific binding to the androgen receptor[J]. *Cell Reports*, 2020, 30(2): 541-554.e5.
- [4] Yamazaki T, Souquere S, Chujo T, et al. Functional domains of NEAT1 architectural lncRNA induce paraspeckle assembly through phase separation[J]. *Molecular Cell*, 2018, 70(6): 1038-1053.
- [5] Iyer M K, Niknafs Y S, Malik R, et al. The landscape of long noncoding RNAs in the human transcriptome[J]. *Nature Genetics*, 2015, 47(3): 199-208.
- [6] Kitagawa M, Kitagawa K, Kotake Y, et al. Cell cycle regulation by long non-coding RNAs[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2013, 70(24): 4785-4794.
- [7] Sun X H, Wong D. Long non-coding RNA-mediated regulation of glucose homeostasis and diabetes[J]. *American Journal of Cardiovascular Disease*, 2016, 6(2): 17-25.
- [8] Zhao X N, Feng B, Wang Q, et al. Cloning of the maternal effector gene *org* and its regulation by lncRNA *ORG-AS* in Chinese tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*)[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(15): Article No.8605.
- [9] Feng B, Li S, Wang Q, et al. lncRNA *DMRT2-AS* acts as a transcriptional regulator of *dmrt2* involving in sex differentiation in the Chinese tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*)[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2021, 253: Article No. 110542.
- [10] He Z, Ye L J, Yang D Y, et al. Identification, characterization and functional analysis of gonadal long noncoding RNAs in a protogynous hermaphroditic teleost fish, the ricefield eel (*Monopterus albus*)[J]. *BMC Genomics*, 2022, 23(1): Article No. 450.
- [11] Song F B, Wang L M, Zhu W B, et al. Long noncoding RNA and mRNA expression profiles following *igf3* knockdown in common carp, *Cyprinus carpio*[J]. *Scientific Data*, 2019, 6(1): Article No.190024.
- [12] Guo Y. Fish History of Xinjiang[M]. Urumqi: Xinjiang Science and Technology Press, 2012: 56-58. [郭焱. 新疆鱼类志[M]. 乌鲁木齐: 新疆科学技术出版社, 2012: 56-58.]
- [13] Rask M, Metsälä T R. Mercury concentrations in northern pike, *Esox lucius* L., in small lakes of Evo area, southern Finland[J]. *Water Air & Soil Pollution*, 1991, 56(1): 369-378.
- [14] Lucentini L, Palomba A, Lancioni H, et al. Microsatellite polymorphism in Italian populations of northern pike (*Esox lucius* L.)(J). *Fisheries Research*, 2006, 80(2-3): 251-262.
- [15] Stemmer M, Thumberger T, Del Sol Keyer M, et al. CCTop: An intuitive, flexible and reliable CRISPR/Cas9 target prediction tool[J]. *PLoS ONE*, 2015, 10(4): e0124633.
- [16] Wang M, Jiang S, Wu W, et al. Non-coding RNAs function as immune regulators in teleost fish[J]. *Frontiers in Immunology*, 2018, 9: Article No.2801.
- [17] Gonçalves A T, Núñez-Acuña G, Détrée C, et al. Coding/non-coding cross-talk in intestinal epithelium transcriptome gives insights on how fish respond to stocking density[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*, 2019, 29: 14-23.
- [18] Liu W, Liu X X, Wu C W, et al. Transcriptome analysis demonstrates that long noncoding RNA is involved in the hypoxic response in *Larimichthys crocea*[J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2018, 44(5): 1333-1347.
- [19] Núñez-Acuña G, Détrée C, Gallardo-Escárate C, et al. Func-

- tional diets modulate lncRNA-coding RNAs and gene interactions in the intestine of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*[J]. *Marine Biotechnology*, 2017, 19(3): 287-300.
- [20] Wright M W. A short guide to long non-coding RNA gene nomenclature[J]. *Human Genomics*, 2014, 8(1): Article No. 7.
- [21] Paneru B, Ali A, Al-Tobasei R, et al. Crosstalk among lncRNAs, microRNAs and mRNAs in the muscle 'degradome' of rainbow trout[J]. *Scientific Reports*, 2018, 8(1): Article No.8416.
- [22] Yang N, Wang B B, Yu Z X, et al. Characterization of a novel lncRNA (SETD3-OT) in turbot (*Scophthalmus maximus L.*)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2020, 102: 145-151.
- [23] Wang J Q, Wu Z X, Yang Y Q, et al. Establishment and characterization of a novel multidrug resistant human ovarian cancer cell line with heterogenous MRP7 overexpression[J]. *Frontiers in Oncology*, 2021, 11: Article No. 731260.
- [24] Chen Z S, Hopper-Borge E, Belinsky M G, et al. Characterization of the transport properties of human multidrug resistance protein 7 (MRP7, ABCC10)[J]. *Molecular Pharmacology*, 2003, 63(2): 351-358.
- [25] Wang Z A, Huang J H, Kalderon D. *Drosophila* follicle stem cells are regulated by proliferation and niche adhesion as well as mitochondria and ROS[J]. *Nature Communications*, 2012, 3(1): Article No.769.
- [26] Mai N. The role of MRPL45 and OXA1L in human mitochondrial protein synthesis[D]. Newcastle: Newcastle University, 2017: 1-10.
- [27] Mukherjee N, Calviello L, Hirsekorn A, et al. Integrative classification of human coding and noncoding genes through RNA metabolism profiles[J]. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2017, 24(1): 86-96.
- [28] Bouvrette L P B, Cody N A L, Bergalet J, et al. CeFra-seq reveals broad asymmetric mRNA and noncoding RNA distribution profiles in *Drosophila* and human cells[J]. *RNA*, 2018, 24(1): 98-113.
- [29] Bridges M C, Daulagala A C, Kourtidis A. LNCcation: lncRNA localization and function[J]. *Journal of Cell Biology*, 2021, 220(2): e202009045.
- [30] Miao H, Wang L L, Zhan H M, et al. A long noncoding RNA distributed in both nucleus and cytoplasm operates in the PYCARD-regulated apoptosis by coordinating the epigenetic and translational regulation[J]. *PLoS Genetics*, 2019, 15(5): e1008144.
- [31] Kucska B, Müller T, Sári J, et al. Successful growth of pike fingerlings (*Esox lucius L.*) on pellet at artificial condition[J]. *Aquaculture*, 2005, 246(1-4): 227-230.
- [32] Yan M Z, Li B J, Wang J Y, et al. Disruption of *mstm* gene by CRISPR/Cas9 in large yellow croaker (*Larimichthys crocea*)[J]. *Marine Biotechnology*, 2022, 24(4): 681-689.
- [33] Pan Q W, Herpin A, Guiguen Y. Inactivation of the anti-müllerian hormone receptor type 2 (*amhrII*) gene in northern pike (*Esox lucius*) results in male-to-female sex reversal[J]. *Sexual Development*, 2022, 16(4): 289-294.
- [34] Dunham R A, Elasad A, Qin Z K. Gene editing in channel catfish via double electroporation of zinc-finger nucleases[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2018, 1867: 201-214.

## Cloning, expression and knockout model construction of a novel *lincRNA-Abcc10* gene in northern pike (*Esox lucius*)

WANG Shunzhe, YANG Qian, LIU Yinghui, LIU Yi, WANG Yongchang, ZHANG Junjie

College of Life Science, Xinjiang Agricultural University; Xinjiang Key Laboratory of Biological Ecological Adaptation and Evolution in Extreme Environments, Urumqi 830052, China

**Abstract:** Long non-coding RNA (lncRNAs) are involved in various biological processes, including sex differentiation. However, most studies on lncRNAs are limited to mammals, and a few studies are available on their functions in teleost fish. In this study, the sex-specific gene *Novel01784* was identified using 126-day-old gonadal transcriptome data from northern pike (*Esox lucius*), and the full-length 1328 bp sequence was cloned using RACE. The results of CPC2 and CPAT analyses showed that the gene did not encode proteins. BLAST alignment analysis revealed that it was located on chromosome 9, between the *sp2* and *Abcc10* genes. Based on its location, it was named *lincRNA-Abcc10*. Transcriptome analysis was used to analyze the expression profiles of *lincRNA-Abcc10* and its adjacent 11 genes in the ovaries of northern pikes at 126, 188, and 320 d. The results showed that *lincRNA-Abcc10* was downregulated over time, and *Mrpl4* and *Mrpl45* were downregulated at all time points, similar to the expression pattern of *lincRNA-Abcc10*. According to the gene annotations for *Mrpl4* and *Mrpl45*, *lincRNA-Abcc10* may be involved in the regulation of ion transport, follicular cell development, and mitochondrial activity. Second, the qRT-PCR results of *lincRNA-Abcc10* in eight northern pike tissues at three stages of showed that on day 126, the expression of *lincRNA-Abcc10* in the female ovary was significantly higher than that in the testis, whereas in other tissues, it was only slightly expressed in the male muscle. On day 188, the expression of *lincRNA-Abcc10* in the ovaries was significantly higher than that in the testes. In other tissues, it was slightly expressed in the liver, kidney, and muscle of female fish and in the head kidney and muscle of male fish. At 320 d, the expression of *Abcc10* in the ovaries was significantly higher than that in the testes. Other tissues included the brain, intestines, muscles, and kidneys of male fish. According to the comparative analysis of the relative expression in gonads at different developmental stages, the results showed that with the continuous development of the northern pike, the expression of *lincRNA-Abcc10* at each stage decreased significantly compared to the previous period. It has also been suggested that it plays an important role in early ovarian differentiation. Additionally, through the isolation of nuclear RNA from 126-day-old northern pike ovaries, qRT-PCR results showed that *lincRNA-Abcc10* was distributed in the cytoplasm and might regulate the translation level of adjacent genes in a cis or trans manner. Finally, a *lincRNA-Abcc10* mutation model was established using the CRISPR/Cas9 technology, which laid the foundation for further studies on its gene function. This study provides new insights into the roles of lncRNAs in fish sex differentiation.

**Key words:** long non-coding RNA; epigenetics; *Esox lucius*; sexual development; CRISPR/Cas9

**Corresponding author:** ZHANG Junjie. E-mail: zhangjuji@sina.cn