



· 综述 ·

## 基因编辑技术在贝类中的应用进展与展望

于红<sup>1,2</sup>, 刘欣<sup>1</sup>, 李琪<sup>1,2\*</sup>

(1. 中国海洋大学, 海水养殖教育部重点实验室, 山东 青岛 266003;

2. 青岛海洋科学与技术国家实验室, 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:** 基因编辑是进行生物体遗传修饰的重要手段, 已广泛应用于功能基因组学研究、动物模型制备、动植物遗传改良、基因治疗等多个研究领域。近年来 CRISPR/Cas9 技术的出现更是为生命科学领域带来一场技术革命, 高效、精准、低成本的 CRISPR 技术已成为目前人们探究基因功能、解析生命现象的重要工具, 在贝类中的应用也日益增多。本文就基因编辑技术的发展、作用原理及其在贝类中的应用进展进行综述, 并对其未来发展进行了分析展望, 以期推动该技术在贝类研究中得到更广泛的应用, 为贝类基因功能解析、经济性状调控、基因挖掘、遗传改良等研究提供参考。

**关键词:** 贝类; 基因编辑; CRISPR; ZFN; TALEN

**中图分类号:** Q 789; S 917.4

**文献标志码:** A

软体动物又称贝类, 在动物界数量仅次于节肢动物门 (Arthropoda), 现存种类超过 7 万种<sup>[1]</sup>, 遍布海洋、湖泊、陆地各种生态系统中, 具有重要的生态、经济以及医用价值。其中海洋贝类更是人类索取海洋动物蛋白的重要来源, 是海水养殖业的重要支柱, 2018 年世界海水贝类养殖产量占海水养殖总产量的 56.3%<sup>[2]</sup>。同时, 海洋贝类也是海洋生态系统中的重要维持者, 在海洋固碳中发挥着重要作用。鉴于贝类重要的经济、生态等价值, 人们对其生物学研究也不断深入。

近十年来, 随着高通量测序技术的迅速发展, 越来越多的贝类基因组信息被揭秘, 目前已有长牡蛎 (*Crassostrea gigas*)、虾夷扇贝 (*Patinopekten yessoensis*)、鹦鹉螺 (*Nautilus pompilius*)、福寿螺 (*Lanistes nyassanus*)、双斑蛸 (*Octopus bimaculoides*) 等几十种贝类的基因组被测定<sup>[3-8]</sup>, 为诠释贝

类生物学现象的遗传基础和分子机制提供了丰富的遗传基因资源。基因编辑是指利用核酸内切酶在基因组的特定位置进行切割, 诱导细胞发生 DNA 损伤修复, 从而实现基因敲除、外源 DNA 插入或特定碱基修饰, 进而调控细胞的命运和生物特性。近年来, 基因编辑技术迅猛发展, 尤其是新一代基因编辑利器 CRISPR 技术的诞生, 为生命科学领域带来一个全新的、爆炸式时代。CRISPR 基因编辑系统的研发者也因此获得 2020 年度诺贝尔化学奖。基因编辑技术已在生命科学的各个领域展现出广阔的应用前景, 包括动植物的病害防治和性状改良、药物研发、基因治疗等<sup>[9-12]</sup>, 极大地促进了生物基因功能的研究, 也为贝类基因功能解析、遗传改良等研究提供了新的方法和研究思路。

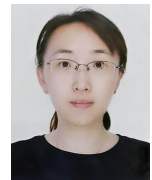
本文就基因编辑技术的原理及其在贝类中的

收稿日期: 2021-08-12 修回日期: 2021-09-15

资助项目: 国家重点研发计划 (2018YFD0900200); 国家自然科学基金 (31672649)

第一作者: 于红 (照片), 从事贝类遗传育种研究, E-mail: hongyu@ouc.edu.cn

通信作者: 李琪, 从事贝类遗传育种研究, E-mail: qili66@ouc.edu.cn



应用现状进行简要综述, 并对贝类基因编辑应用前景进行展望, 以期为贝类的功能基因组研究、重要经济性状基因挖掘、遗传育种等研究提供参考。

### 1 基因编辑技术的发展及作用原理

#### 1.1 锌指核酸酶 (zinc finger nuclease, ZFN) 技术

锌指核酸酶技术是第一代基因编辑技术, 1996 年, Kim 等<sup>[13]</sup> 成功将锌指酶与限制性内切酶 Fok I 改造整合, 获得具有新识别特性的核酸内切酶 ZFN, 开启了精准基因编辑时代。该技术的基本原理是利用锌指蛋白组成的 DNA 识别域与目的基因位点结合, 通过 Fok I 核酸内切酶对 DNA 双链进行切割, 产生双链断裂。利用 ZFN 技术, 已经在多种动植物如小鼠 (*Mus musculus*)、猪 (*Sus scrofa*)、牛 (*Bos taurus*)、斑马鱼 (*Danio rerio*)、果蝇 (*Drosophila melanogaster*)、拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)、玉米 (*Zea mays*) 等物种中实现了基因编辑<sup>[14]</sup>。但是, ZFN 技术也存在一些明显的缺点, 如 ZFN 依靠锌指蛋白识别特定的碱基序列, 每个锌指蛋白识别特异的 3 个碱基, 因此 ZFN 的靶点选择受限于锌指蛋白的种类, 并不适用于任何位点; 再者 ZFN 设计繁琐, 合成成本高<sup>[11,14]</sup>。这些问题很大程度上限制了该技术的推广和应用。

#### 1.2 类转录激活因子效应物核酸酶 (transcription activator-like effector nuclease, TALEN) 技术

类转录激活因子效应物核酸酶技术是基于来自于黄单胞菌的类转录激活因子效应物 (transcription activator-like effector, TALE), TALE 蛋白可

以识别单个碱基, 研究者利用 TALE 替代 ZFN 中的锌指部分, 从而诞生了第二代基因编辑技术 TALEN 技术<sup>[15,16]</sup>。与 ZFN 技术相比, TALEN 技术可以通过 TALE 模块组装识别任意靶序列, 在靶位点的选择上更加灵活, 构建也更简化, 且脱靶效应低。因此 TALEN 技术一出现, 便迅速地被应用于各种生物的基因编辑, 包括酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)、秀丽隐杆线虫 (*Caenorhabditis elegans*)、小鼠、斑马鱼、猪、昆虫等<sup>[17]</sup>。

#### 1.3 成簇规律间隔短回文重复序列 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR) 技术

成簇规律间隔短回文重复序列/相关蛋白 (CRISPR/Cas) 系统最早发现于大肠杆菌的免疫系统<sup>[18]</sup>, 后来在许多细菌和古细菌中都发现这种系统的存在, 它能够将入侵病毒的基因信息整合到 CRISPR 中, 从而在有同样病毒入侵时, 可以通过 RNA 引导的核酸酶切割外来病毒的 DNA 双链, 起到防御入侵的目的。CRISPR/Cas 系统由两部分构成, 即 CRISPR 和 Cas 核酸酶。CRISPR 是指成簇存在的被规律间隔的短回文重复序列, 包含 CRISPR 基因座和 *tracrRNA* 基因, Cas 核酸酶即 CRISPR 相关蛋白。根据系统中 Cas 蛋白的特性和作用效应, CRISPR/Cas 系统目前分为两类 6 型 (I~VI, 图 1)。第一类包括 I、III、IV 型, 这类系统的核酸酶由多个亚基组成; 第二类包括 II、V、VI 型, 这类系统的核酸酶由单一的蛋白组成 (如 Cas9、Cas12、Cas13)<sup>[12,19]</sup>。2012 年, Jinek 等<sup>[20]</sup> 在体外系统中阐明了 Cas9 核酸酶可以在双 RNA (*tracrRNA* 和 *crRNA*) 引导下靶向切割 DNA 双链,

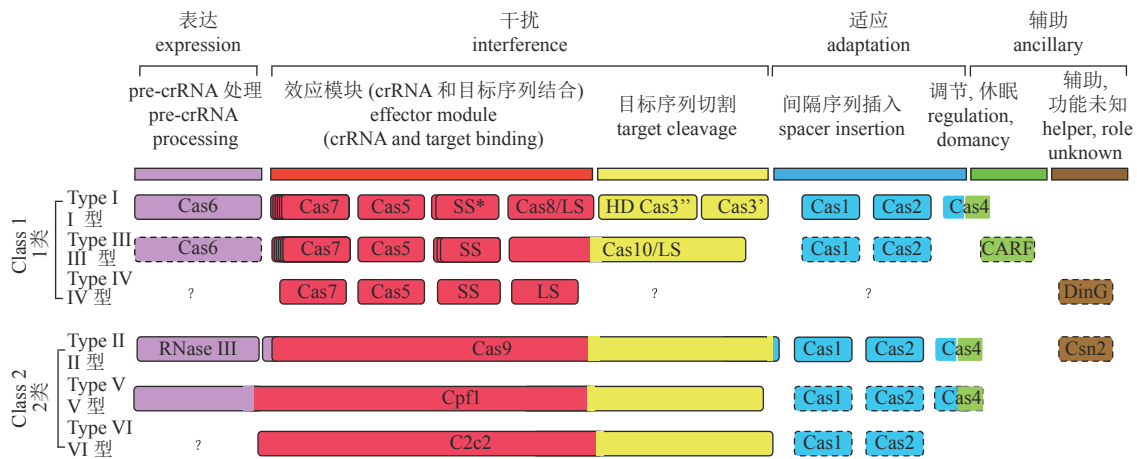


图 1 CRISPR/Cas 系统的分子组成<sup>[19]</sup>

Fig. 1 Modular organization of the CRISPR/Cas systems

首次证明了 CRISPR/Cas9 系统作为基因编辑工具的可能性。2013 年多个课题组相继证实了人工改造后的 CRISPR/Cas9 能够高效地进行人类细胞的基因编辑，自此第三代崭新的基因编辑技术拉开帷幕<sup>[21-24]</sup>。

目前研究最深入、应用范围最广的 CRISPR 系统便是 CRISPR/Cas9 系统。CRISPR/Cas9 基因编辑系统由 sgRNA 和 Cas9 两部分组成，其中 sgRNA 的 5' 20 nt 的引导序列与靶序列互补，靶序列 5' 端须含有 PAM (NGG) 序列；Cas9 蛋白含有 HNH 和 RuvC 两个内切酶结构域，分别切割与 sgRNA 互补配对的靶序列和含有 PAM (NGG) 的序列，从而形成 DNA 双链断裂 (图 2)<sup>[9-10]</sup>。与 ZFN 和 TALEN 技术相比，CRISPR/Cas9 技术的靶点序列只需要含有 PAM 序列即可，可以作用于任何 5'-N20-NGG 的 DNA 序列，而 PAM 序列在基因组中的分布频

率很高，在人类基因组中平均每 12.7 bp 出现一个 PAM 序列<sup>[12]</sup>，因此 CRISPR/Cas9 技术几乎跨越了物种的局限，实现了在任意物种中的基因改造。此外，CRISPR/Cas9 无需合成并组装具有特异性识别能力的蛋白模块，只需设计 sgRNA 即可，且可同时设计多个 sgRNA，识别多个靶位点进行多基因编辑<sup>[9]</sup>。

CRISPR 技术诞生的短短几年时间，其应用范围几乎涵盖了从原核生物到人类在内的整个生物界，人们将 CRISPR 技术推广应用到农业、环境生态学、医学等多个领域中，成为当下炙手可热、最具前景的研究工具<sup>[25-29]</sup>。

## 2 基因编辑技术在贝类中的应用

近年来，随着 CRISPR 技术的不断完善和迅速发展，基因编辑技术在水产动物中的应用也越

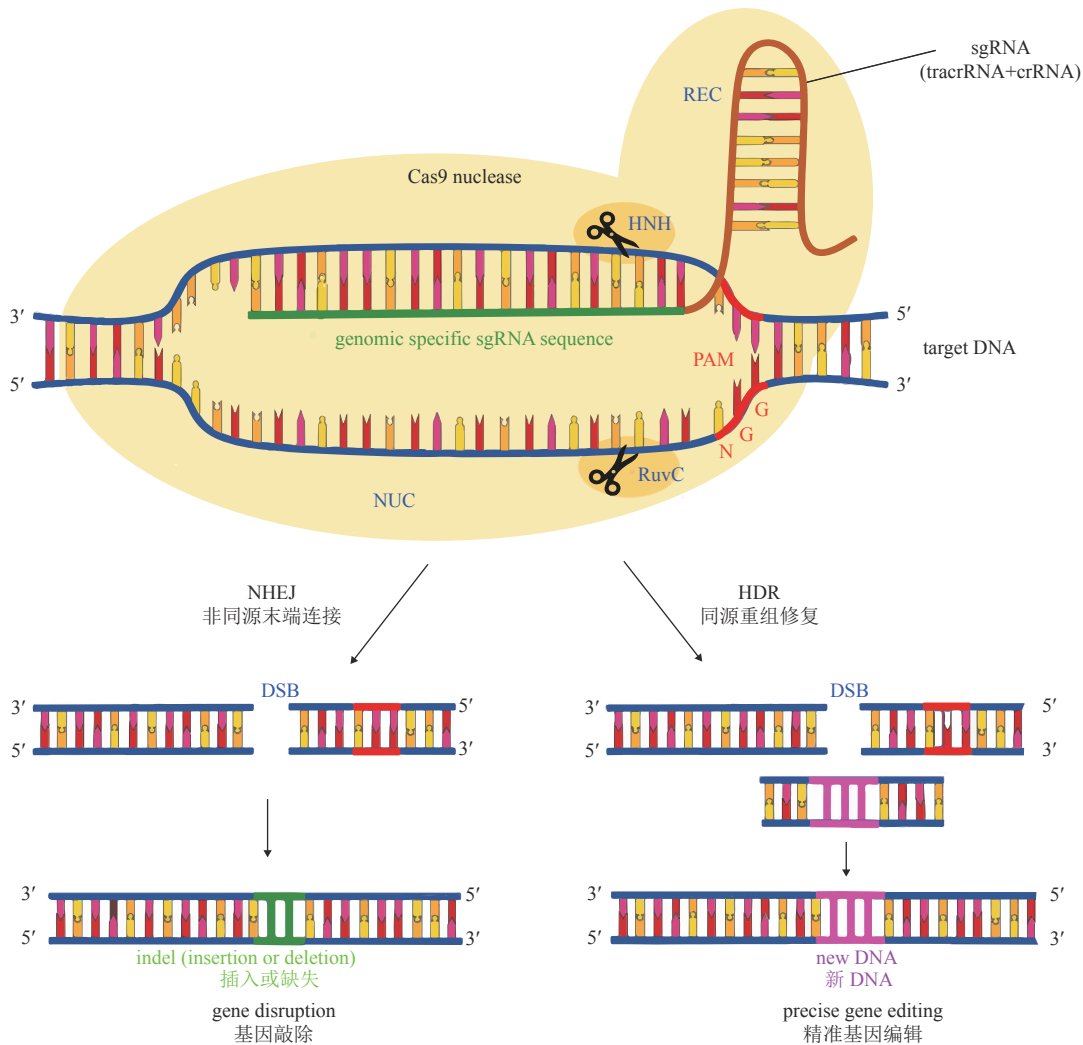


图 2 CRISPR/Cas9 基因编辑原理<sup>[10]</sup>

Fig. 2 Mechanism of CRISPR/Cas9-mediated gene editing



来越广泛。2013年, Hwang等<sup>[30]</sup>首次利用CRISPR/Cas9系统在模式动物斑马鱼中实现基因组编辑, 成功将*fh*基因敲除。目前斑马鱼中应用基因编辑技术已开展了大量基因功能研究, 构建了多个基因敲除模型<sup>[31]</sup>。在其他重要的水产养殖动物中基因编辑技术也得到了广泛应用<sup>[11,31]</sup>, 如Li等<sup>[32]</sup>利用基因编辑技术对尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)的*dmrt1*、*foxl2*等基因进行敲除, 成功获得性逆转后代; Zhang等<sup>[33]</sup>通过敲除黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)的*mstna*基因成功培育出快速生长新品系。迄今, 基因编辑技术已应用于20多种水产养殖动物的精准基因编辑, 其中也在少数贝类中得到成功应用<sup>[11]</sup>。

## 2.1 腹足类

腹足纲(Gastropoda)是软体动物门中种类最多的一个纲, 遍布海洋、湖沼、河流和陆地, 以海产种类最多。腹足类是软体动物中最早开展基因编辑研究的类群。2015年, Perry等<sup>[34]</sup>通过显微注射, 将Cas9 mRNA、sgRNA和外源供体模板共同注射至大西洋舟螺(*Crepidula fornicata*)受精卵中, 成功将外源荧光报告基因*mCherry*整合到大西洋舟螺的 *$\beta$ -catenin*基因靶位点处, 整合效率为11%。编辑后的个体可以通过荧光分析 *$\beta$ -catenin*基因在胚胎发育过程中的表达情况。这是首次在贝类中利用基因编辑技术成功进行外源基因敲入, 也证实了CRISPR/Cas9技术在贝类中的可行性。

Abe等<sup>[35]</sup>利用CRISPR/Cas9技术对静水椎实螺(*Lymnaea stagnalis*)的*Lsdia1*基因进行敲除, 并获得F<sub>1</sub>基因突变纯合体。研究发现*Lsdia1*基因缺失后的静水椎实螺螺壳旋转方向由右旋变为左旋, 这是首次明确证实了*Lsdia1*基因参与决定静水椎实螺螺壳螺旋方向。在笠贝(*Lottia goshimai*)中, Huan等<sup>[36]</sup>利用显微注射将Cas9蛋白和sgRNA混合物递送至笠贝受精卵中, 对纤毛相关基因*Calaxin*进行敲除, 分析了基因敲除后G<sub>0</sub>的表型, 发现30%~80%的幼虫表现出纤毛缩短和运动能力降低, 表明*Calaxin*基因对笠贝幼虫的纤毛长度起调控作用, 同时也表明贝类中进行基因编辑后在G<sub>0</sub>可以出现表型变化。Huang等<sup>[37]</sup>利用TALEN基因编辑技术靶向编辑皱纹盘鲍的*nodal*基因, 该研究通过显微注射方法将基因编辑元件递送至皱纹盘鲍卵中, 然后进行受精、孵化, 通

过对幼虫混样测序, 结果显示*nodal*基因的突变率为50%, 突变类型为1~22 bp的插入/缺失。Coelho等<sup>[38]</sup>采用电穿孔法, 将Cas9蛋白和gRNA导入到光滑双脐螺(*Biomphalaria glabrata*)胚胎细胞系中, 对*BgAIF*基因第4个外显子进行编辑, 成功导致靶基因突变, *BgAIF*基因的转录本表达水平下降73%, 并且发现敲除后的细胞对曼氏血吸虫(*Schistosoma mansoni*)子胞蚴的黏附减弱, 这也是贝类首例利用电穿孔法进行编辑元件递送报道。

## 2.2 头足类

头足类(Cephalopoda)是软体动物门的重要组成部分, 全部海产。相比腹足类, 头足类的基因编辑研究相对较少, 目前仅在乌贼中有所报道。Crawford等<sup>[39]</sup>首次在乌贼(*Doryteuthis pealeii*)中建立了CRISPR/Cas9基因编辑技术。由于乌贼受精卵具有厚且硬的卵壳, 石英注射针无法进行注射, 因此作者设计了微型剪刀先在卵壳上制造切口, 然后使用石英注射针, 通过切口处将Cas9蛋白和sgRNA递送至受精卵中, 从而实现了*TDO*基因的敲除, 敲除效率超过90%; 敲除后乌贼眼睛和皮肤细胞中的色素沉淀几乎消失, 证实了*TDO*基因对乌贼色素的合成至关重要。同时该研究还发现编辑效率与注射时间有关, 注射时间在第二极体出现后30 min内(受精后2 h)编辑效率较高。

## 2.3 双壳类

双壳纲(Bivalvia)全部为水生, 大部分海产, 少数生活在淡水中。与腹足类和头足类相比, 双壳类受精卵通常相对较小, 这也增加了显微注射操作的难度。目前双壳类基因编辑研究仅在长牡蛎中有所报道。Yu等<sup>[40]</sup>首次通过显微注射, 将Cas9蛋白和sgRNA导入至长牡蛎受精卵中, 分别对肌肉相关基因*MSTN*和*Twist*进行敲除, 结果显示18.2%~26.7%担轮幼虫发生基因突变, 突变类型为1~24 bp的插入/缺失。随后Li等<sup>[41]</sup>将Cas9 mRNA和sgRNA混合物注射至长牡蛎受精卵, 对长牡蛎肌球蛋白必需轻链*CgMLCE*基因进行敲除, 并对基因编辑效率影响因素进行分析。结果显示编辑效率与sgRNA/Cas9 mRNA混合物的注射剂量密切相关, 当sgRNA/Cas9 mRNA注射浓度为1 000 ng/ $\mu$ L时, 编辑效率可提升至90%; 同时编

辑效率也与 sgRNA 的设计位置以及使用条数有关, 针对不同外显子设计的 4 条 sgRNA 中, 2 条 sgRNA 编辑效率为 0, 另外 2 条分别为 80% 和 90%; 同时注射 2 条编辑效率较高的 sgRNA 时, 可以使幼虫肌肉表型突变率提升 15%。此外, *CgMLCE* 基因敲除后,  $G_0$  幼虫的肌肉系统表现出严重受损, 面盘收缩肌和闭壳肌肌肉系统均被破坏。Li 等<sup>[42]</sup> 又利用 CRISPR/Cas9 技术对长牡蛎的 *CgSmhc* 基因进行敲除, 发现幼虫的面盘收缩肌横纹结构受到损伤, 但排列模式没有改变, 说明 *CgSmhc* 基因在长牡蛎幼虫肌纤维肌节组装中发挥重要作用。

### 3 结语与展望

基因编辑技术的出现和蓬勃发展使研究者能够对目标 DNA 序列进行精准编辑, 以解析生命现象的本质和机理。CRISPR/Cas9 技术的横空出世为基因编辑技术带来革命性变革, 掀起了国内外基因编辑研究热潮, 人们利用基因编辑技术已经在农业、医学等领域取得了重要性突破。基因编辑技术的迅猛发展也为水产动物的基因功能研究、经济性状解析和遗传改良带来空前的机遇, 在部分经济鱼类的种质创制方面已经取得了重大进展。作为现代生物育种技术之一, 基因编辑技术有望带动水产动物育种进入“精准育种”时代。目前, 该技术在少数贝类中得到了成功应用, 证实了 CRISPR/Cas9 技术在贝类基因编辑中的可行性, 为贝类的基因改造、功能解析提供了新的方法和研究思路。但是目前贝类基因编辑研究尚处于起步阶段, 仍然面临着许多问题和挑战。

如何有效地将基因编辑元件递送至贝类受精卵中, 尤其是高效的递送方法, 可能是目前制约基因编辑技术在贝类中广泛应用的主要原因。众所周知, 显微注射是最有效的编辑元件递送方法, 目前已报道的研究中, 除了在光滑双脐螺胚胎细胞系中采用电穿孔技术进行递送, 其他贝类基因编辑研究均采用显微注射方法将编辑元件递送至受精卵或卵中。但是显微注射法对于产卵量大、存活率低的类群以及具有坚硬卵壳的类群, 就显得力不从心。如头足类的受精卵经常具有坚硬的卵壳, 即使使用石英注射针也很难进行注射, 必须借助其他方法先破壳才能注射; 而双壳类受精卵通常体积较小, 固定难度大, 需要高浓度的编

辑元件注射到受精卵中才能够发挥作用, 且双壳类子代成活率通常较低, 只有注射大量受精卵才可能获得少量后代。目前除了在静水椎实螺中成功获得基因编辑纯合体外, 其他贝类中尚未能获得基因编辑  $F_1$ , 大大限制了基因编辑技术的推广应用。因此安全、高效、便捷的编辑元件 (如 CRISPR/Cas9) 递送方法是目前贝类基因编辑研究和应用中面临的重要挑战。

贝类具有超强的繁殖力, 这从一定程度上可以弥补基因编辑效率低的影响, 但是对大量的配子或受精卵进行基因编辑, 通过显微注射显然无法满足, 必须建立高通量的递送技术体系。目前其他动物中, 高通量的编辑元件递送方法主要有电穿孔法、化学转染法、病毒载体递送法和纳米材料递送。这些方法为未来贝类基因编辑递送方法的研究提供了方向, 但这其中还有一些重要问题需要解决, 例如高通量的递送方法通常是向受精卵中递送含有编辑元件序列的载体, 以降低成本。载体在受精卵内表达 sgRNA 和 Cas9 蛋白, 从而进行基因编辑。这需要筛选开发贝类高效的 mRNA 和 sgRNA 启动子, 从而实现在贝类受精卵内高效表达 sgRNA 和 Cas9 基因。而目前贝类研究中主要使用人类或高等动物的启动子, 其驱动外源基因在贝类中的表达效率极低, 仅在长牡蛎中报道了 *EF-1 $\alpha$*  启动子能够驱动外源基因 *GFP* 在牡蛎胚胎中高效表达<sup>[43]</sup>, 有关贝类小 RNA 启动子的研究还未见报道。因此开发贝类高效的 mRNA 和小 RNA 启动子是开展高通量编辑元件递送技术体系亟待解决的问题之一。

随着基因编辑技术的改进和创新, 一些更高效、精准的基因编辑系统不断涌现, 相信基因编辑技术会在更多贝类中得到应用, 在贝类的功能基因组学、病害防治、遗传改良等领域中也会具有更广阔的应用前景。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

#### 参考文献 (References):

- [1] Rosenberg G. A new critical estimate of named species-level diversity of the recent Mollusca[J]. *American Malacological Bulletin*, 2014, 32(2): 308-322.
- [2] FAO. The state of world fisheries and aquaculture 2020[M]. Rome: FAO, 2020.
- [3] Zhang G F, Fang X D, Guo X M, et al. The oyster gen-

- ome reveals stress adaptation and complexity of shell formation[J]. *Nature*, 2012, 490(7418): 49-54.
- [4] Wang S, Zhang J B, Jiao W Q, *et al.* Scallop genome provides insights into evolution of bilaterian karyotype and development[J]. *Nature Ecology & Evolution*, 2017, 1(5): 120.
- [5] Zhang Y, Mao F, Mu H W, *et al.* The genome of *Nautilus pompilius* illuminates eye evolution and biomineralization[J]. *Nature Ecology & Evolution*, 2021, 5(7): 927-938.
- [6] Sun J, Mu H W, Ip J C H, *et al.* Signatures of divergence, invasiveness, and terrestrialization revealed by four apple snail genomes[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2019, 36(7): 1507-1520.
- [7] Albertin C B, Simakov O, Mitros T, *et al.* The octopus genome and the evolution of cephalopod neural and morphological novelties[J]. *Nature*, 2015, 524(7564): 220-224.
- [8] Yang Z H, Zhang L L, Hu J J, *et al.* The evo - devo of molluscs: insights from a genomic perspective[J]. *Evolution & Development*, 2020, 22(6): 409-424.
- [9] Hsu P D, Lander E S, Zhang F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering[J]. *Cell*, 2014, 157(6): 1262-1278.
- [10] Kozovska Z, Rajcaniova S, Munteanu P, *et al.* CRISPR: history and perspectives to the future[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2021, 141: 111917.
- [11] Yang Z T, Yu Y P, Tay Y X, *et al.* Genome editing and its applications in genetic improvement in aquaculture[J]. *Reviews in Aquaculture*, 2022, 14: 178-191.
- [12] Zhang F. Development of CRISPR-Cas systems for genome editing and beyond[J]. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 2019, 52: e6.
- [13] Kim Y G, Cha J, Chandrasegaran S. Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1996, 93(3): 1156-1160.
- [14] Gaj T, Gersbach C A, Barbas C F. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering[J]. *Trends in Biotechnology*, 2013, 31: 397-405.
- [15] Bogdanove A J, Voytas D F. TAI effectors: customizable proteins for DNA targeting[J]. *Science*, 2011, 333(6051): 1843-1846.
- [16] Muñoz Bodnar A, Bernal A, Szurek B, *et al.* Tell me a tale of TALEs[J]. *Molecular Biotechnology*, 2013, 53(2): 228-235.
- [17] Wright D A, Li T, Yang B, *et al.* TALEN-mediated genome editing: prospects and perspectives[J]. *Biochemical Journal*, 2014, 462(1): 15-24.
- [18] Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, *et al.* Nucleotide sequence of the *Iap* gene, responsible for alkaline phosphatase Isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product[J]. *Journal of Bacteriology*, 1987, 169(12): 5429-5433.
- [19] Mohanraju P, Makarova K S, Zetsche B, *et al.* Diverse evolutionary roots and mechanistic variations of the CRISPR-Cas systems[J]. *Science*, 2016, 353(6299): aad5147.
- [20] Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, *et al.* A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity[J]. *Science*, 2012, 337(6096): 816-821.
- [21] Cong L, Ran F A, Cox D, *et al.* Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems[J]. *Science*, 2013, 339(6121): 819-823.
- [22] Mali P, Yang L H, Esvelt K M, *et al.* RNA-guided human genome engineering via Cas9[J]. *Science*, 2013, 339(6121): 823-826.
- [23] Cho S W, Kim S, Kim J M, *et al.* Targeted genome engineering in human cells with the Cas9 RNA-guided endonuclease[J]. *Nature Biotechnology*, 2013, 31(3): 230-232.
- [24] Hou Z G, Zhang Y, Propson N E, *et al.* Efficient genome engineering in human pluripotent stem cells using Cas9 from *Neisseria meningitidis*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, 110(39): 15644-15649.
- [25] Barrangou R, Horvath P. A decade of discovery: CRISPR functions and applications[J]. *Nature Microbiology*, 2017, 2(7): 17092.
- [26] Pickar-Oliver A, Gersbach C A. The next generation of CRISPR-Cas technologies and applications[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2019, 20(8): 490-507.
- [27] Zhang D Q, Zhang Z Y, Unver T, *et al.* CRISPR/Cas: a powerful tool for gene function study and crop improvement[J]. *Journal of Advanced Research*, 2021, 29: 207-221.

- [28] Moradpour M, Abdulah S N A. CRISPR/dCas9 platforms in plants: strategies and applications beyond genome editing[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2020, 18(1): 32-44.
- [29] Knott G J, Doudna J A. CRISPR-Cas guides the future of genetic engineering[J]. *Science*, 2018, 361(6405): 866-869.
- [30] 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.
- [31] Lu J G, Fang W Y, Huang J R, *et al.* The application of genome editing technology in fish[J]. *Marine Life Science & Technology*, 2021, 3(3): 326-346.
- [32] Li M H, Yang H H, Li M R, *et al.* Antagonistic roles of Dmrt1 and Foxl2 in sex differentiation via estrogen production in tilapia as demonstrated by TALENs[J]. *Endocrinology*, 2013, 154(12): 4814-4825.
- [33] Zhang X C, Wang F, Dong Z J, *et al.* A new strain of yellow catfish carrying genome edited myostatin alleles exhibits double muscling phenotype with hyperplasia[J]. *Aquaculture*, 2020, 523: 735187.
- [34] Perry K J, Henry J Q. CRISPR/Cas9-mediated genome modification in the mollusc, *Crepidula fornicata*[J]. *Genesis*, 2015, 53(2): 237-244.
- [35] Abe M, Kuroda R. The development of CRISPR for a mollusc establishes the formin *Lsdia1* as the long-sought gene for snail dextral/sinistral coiling[J]. *Development*, 2019, 146(9): dev175976.
- [36] Huan P, Cui M L, Wang Q, *et al.* CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis reveals the roles of calaxin in gastropod larval cilia[J]. *Gene*, 2021, 787: 145640.
- [37] Huang J F, You W W, Xu Z W, *et al.* An effective microinjection method and TALEN-mediated genome editing in Pacific abalone[J]. *Marine Biotechnology*, 2019, 21(4): 441-447.
- [38] Coelho F S, Rodpai R, Miller A, *et al.* Diminished adherence of *Biomphalaria glabrata* embryonic cell line to sporocysts of *Schistosoma mansoni* following programmed knockout of the allograft inflammatory factor[J]. *Parasites & Vectors*, 2020, 13(1): 511.
- [39] Crawford K, Quiroz J F D, Koenig K M, *et al.* Highly efficient knockout of a squid pigmentation gene[J]. *Current Biology*, 2020, 30(17): 3484-3490.
- [40] Yu H, Li H J, Li Q, *et al.* Targeted gene disruption in Pacific oyster based on CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein complexes[J]. *Marine Biotechnology*, 2019, 21(3): 301-309.
- [41] Li H J, Yu H, Du S J, *et al.* CRISPR/Cas9 mediated high efficiency knockout of myosin essential light chain gene in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*)[J]. *Marine Biotechnology*, 2021, 23(2): 215-224.
- [42] Li H J, Yu H, Li Q. Striated myosin heavy chain gene is a crucial regulator of larval myogenesis in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2021, 179: 388-397.
- [43] Yue C Y, Yu H, Li H J, *et al.* The endogenous EF-1 $\alpha$  promoter is highly active in driving gene overexpression in developing embryos of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*[J]. *Aquaculture*, 2020, 522: 735134.



## Application advances and prospects of genome editing in molluscs

YU Hong<sup>1,2</sup>, LIU Xin<sup>1</sup>, LI Qi<sup>1,2\*</sup>

(1. Key Laboratory of Mariculture, Ocean University of China, Ministry of Education, Qingdao 266003, China;

2. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes,  
Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266237, China)

**Abstract:** Genome editing is an important means of genetic modification of organisms. It has been widely used in a broad spectrum of fields, such as functional genomics, animal model generation, genetic improvement of animals and plants, and gene therapy. In recent years, the emergence of CRISPR/Cas9 technology has sparked a revolution in biological research. Efficient, accurate and low-cost CRISPR technology has become a useful tool to explore gene functions and elucidate life phenomena, and its application in molluscs is expanding rapidly. In this review, we introduced the developmental course and working mechanisms of gene editing technology, and its application and prospects in molluscs, which might promote further application of genome editing in more molluscan researches, and provide information for identification of gene functions, determining genes related to economic trait, and genetic improvement.

**Key words:** molluscs; genome-editing; CRISPR; ZFN; TALEN

**Corresponding author:** LI Qi. E-mail: qili66@ouc.edu.cn

**Funding projects:** National Key R & D Program of China (2018YFD0900200); National Natural Science Foundation of China (31672649)