Journal of Marine Science and Technology

***In Press* / DOI: 10.22113/JMST.2023.417019.2549**

Available Online: *http://jmst.kmsu.ac.ir*
Original Article

The potential of phytase enzyme production in microalgae using CRISPR method for application in aquaculture

Hassan Zadabbas Shahabadi [1], Arash Akbarzadeh [1*], Hamideh Ofoghi [2*], Sabihe Soleimanian-Zad [3] and Saeid Kadkhodaei [4]

1. Department of Fisheries, Faculty of Marine Science and Technology, University of Hormozgan, Bandar Abbas, Iran.
2. Department of Biotechnology, Medical and Pharmaceutical Biotechnology Iranian Research Organization for Science and Technology (IROST), Tehran, Iran.
3. Department of Food Science and Technology,College of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran.
4. Genetic Engineering- Genomix, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Isfahan branch, Isfahan, Iran.

[*] **Corresponding Author Email:** akbarzadeh@hormozgan.ac.ir

Received: 27 September 2023 **Revise Date:** 23 October 2023 **Accepted:** 6 December 2023

ABSTRACT

In modern aquaculture, energy consumption, raw materials used, and environmental effects should be considered, therefore, during the last decade, phytase has been used by aquatic feed industries as an enzyme supplement to increase the digestibility and absorption of plant compounds and improve growth performance along with reducing phosphorus pollution in the aquatic environment. In this study, by using the Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR) system, the bacterial phytase gene was inserted into the model microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* in the designed position of the NR gene, and the correct editing was checked and confirmed by PCR. Confirmation of the efficiency and expression of the phytase gene placed in the NR site was investigated using SDS Page gel. Also, the translation of the phytase gene was confirmed by SDS PAGE on five colonies containing the correct editing and one control sample colony as confirmation of the expression of the transgene inserted at the protein level, which indicated the successful transcription and translation of the phytase gene inserted in the exon 2 position of the microalgae NR gene. considering the benefits of producing and using phytase enzymes in aquatic diets, reducing production costs and eutrophication of aquatic ecosystems will be achieved and it can be a new perspective to accelerate the commercial production of other recombinant proteins in organisms with nutritional value "*C. reinhardtii*" and provide the development of the fish feed industry and modern aquaculture.
Keywords: Chlamydomonas reinhardtii microalgae; Phytase; CRISPR system; Nitrate Reductase gene

1. INTRODUCTION

The rising cost and scarcity of fish meal have prompted the exploration of affordable alternative protein sources, such as plant derivatives (Morales et al., 2014). However, the utilization of plant by-products as protein sources is hindered by the presence of anti-nutritional factors, particularly phytate (von Danwitz et al., 2016). Phytate inhibits phosphorus absorption and forms complexes with essential minerals like magnesium, manganese, copper, iron, and calcium, thereby reducing their bioavailability (Dawood et al., 2015), ultimately impacting fish growth performance (Council and others, 1993). Numerous studies highlight the effectiveness of incorporating phytase into the diet to counteract the negative effects of phytate. Phytase hydrolyzes phytate, cleaving phosphate groups and making phosphorus and other vital nutrients available for absorption (Lei et al., 2013). As a significant feed additive, phytase plays a crucial role in providing access to essential nutrients involved in the phytate complex.

2. MATERIALS AND METHODS

Cultures of *Chlamydomonasreinhardtii* lacking the cell wall "UVM11" in TAP medium, as outlined by Andersen in 2005, were employed in this study. Phytase proteins from various natural bacterial and fungal sources were investigated and analyzed, leading to the selection of a bacterial phytase gene from *Buttiauxella*sp., engineered by Danisco.

***In Press* / DOI: 10.22113/JMST.2023.417019.2549**

The transfection process involved introducing the RNP complex and a donor plasmid containing the phytase gene (P1Chlamyck-I/O) into C. reinhardtii using the glass bead method described by Zadabbas Shahabadi et al. in 2023. Verification of the edited (knocked-in) microalgae was conducted using the PCR method, wherein genomic DNA was extracted from positive colonies utilizing the CTAB method as outlined by Zadabbas Shahabadi et al. in 2023. The accuracy of the editing was confirmed through molecular methods using a PCR device as detailed in the same study. To analyze the expression of phytase, the protein was extracted and subsequent analysis was carried out through SDS PAGE.

3. RESULTS

In this study, the direct transfer of the RNP complex, in conjunction with the DNA donor plasmid "p1ChlamyCK-I/O," to *C. reinhardtii* cells was successfully executed, leading to the screening of positive colonies. Confirmation of the phytase gene's translation, indicating the expression of the foreign gene on the protein surface, was verified through SDS PAGE. The results unequivocally demonstrate the successful transcription and translation of the phytase gene, showcasing a molecular weight of 47.5 kDa.

Moreover, the study findings indicate the successful localization of the phytase gene in the desired position (exon 2 of the nitrate reductase gene) with a consistent expression level. Conversely, the control sample (gene transfer without using the RNP complex) did not exhibit stable expression of the phytase gene.

4. DISCUSSION AND CONCLUSION

This study achieved successful production of the phytase enzyme by C. reinhardtii using the CRISPR method. The bacterial phytase gene was inserted into the nitrate reductase gene via CRISPR/Cas9 RNP. The efficiency of the gene insertion at the exon 2 position of the nitrate reductase gene was confirmed through SDS PAGE data analysis. Importantly, the study demonstrated the continuity of expression and translation even in the 15th generation of genome-edited clones, confirming the stability of phytase expression at the nitrate reductase (NR) locus. The suitability of the NR gene for inserting foreign target genes was also underscored. Furthermore, cultivation and selection were conducted on all positively edited colonies over 15 generations, spanning 150 days. Results indicated correct and stable editing without the negative effects of gene silencing or insertion sites. Considering the edibility of C. reinhardtii and its FDA approval, these findings have potential implications for the poultry and aquatic industries, where phytase enzyme is a significant dietary component.

REFERENCES

Andersen, R.A., 2005. Algal culturing techniques. Elsevier. doi:10.1111/j.1529-8817.2005.00114.x

Council, N.R., others, 1993. Nutrient requirements of fish. National Academies Press.

Dawood, M.A.O., Koshio, S., Ishikawa, M., Yokoyama, S., others, 2015. Effects of partial substitution of fish meal by soybean meal with or without heat-killed Lactobacillus plantarum (LP20) on growth performance, digestibility, and immune response of amberjack, Seriola dumerili juveniles. Biomed Res. Int. 2015. doi: 10.1155/2015/514196

Lei, X.G., Weaver, J.D., Mullaney, E., Ullah, A.H., Azain, M.J., 2013. Phytase, a new life for an “old” enzyme. Annu. Rev. Anim. Biosci. 1, 283–309. doi: 10.1146/annurev-animal-031412-103717

Morales, G.A., Márquez, L., de Rodrigañez, M., Bermúdez, L., Robles, R., Moyano, F.J., 2014. Effect of phytase supplementation of a plant-based diet on phosphorus and nitrogen bioavailability in sea bream Sparus aurata. Aquac. Nutr. 20, 172–182. doi: 10.1111/anu.12063

von Danwitz, A., van Bussel, C.G.J., Klatt, S.F., Schulz, C., 2016. Dietary phytase supplementation in rapeseed protein based diets influences growth performance, digestibility and nutrient utilisation in turbot (Psetta maxima L.). Aquaculture 450, 405–411. doi: 10.1016/j.aquaculture.2015.07.026

Yildrim, A., 2022. Fine-Tuning of Protein Extraction From Wall-Deficient Chlamydomonas reinhardtii Using Liquid Nitrogen and Sonication-Assisted Cell Disruption. Mar. Sci. Technol. Bull. 11, 32–40.doi: 10.33714/masteb.1057346.

Zadabbas Shahabadi, H., Akbarzadeh, A., Ofoghi, H., Kadkhodaei, S., 2023. Site-specific gene knock-in and bacterial phytase gene expression in Chlamydomonas reinhardtii via Cas9 RNP-mediated HDR. Front. Plant Sci. 14, 1–13. doi: 10.3389/fpls.2023.1150436

Copyrights:
Copyright for this article is retained by the author(s), with publication rights granted Journal of Marine Science and Technology. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons. org/licenses/ by/4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Journal of Marine Science and Technology

***In Press* / DOI: 10.22113/JMST.2023.417019.2549**

مقاله پژوهشی

Available Online: *http://jmst.kmsu.ac.ir*

امکان سنجی تولید آنزیم فیتاز در میکروجلبک با روش CRISPR به منظور کاربرد در آبزی پروری

حسن زادعباس شاه آبادی[۱]، آرش اکبرزاده [*۱]، حمیده افقی[*۲] ، صبیحه سلیمانیان زاد [۳]، سعید کدخدایی [۴]

۱. گروه شیلات، دانشکده علوم وفنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران.
۲. گروه بیوتکنولوژی، زیست فناوری پزشکی و صنایع داروئی، سازمان تحقیقات علمی و صنعتی ایران، تهران، ایران.
۳. گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران.
۴. گروه مهندسی ژنتیک – ژنومیکس، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران (ABRII) واحد اصفهان، اصفهان، ایران.

[*] **نویسنده مسئول، پست الکترونیک:** akbarzadeh@hormozgan.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۷/۰۵ **تاریخ بازنگری:** ۱۴۰۲/۰۸/۰۱ **تاریخ پذیرش:** ۱۴۰۲/۰۹/۱۵

شناسه دیجیتال (DOI): 10.22113/JMST.2023.417019.2549

چکیده

در آبزی پروری مدرن باید مصرف انرژی، مواد خام مورد استفاده و اثرات زیست محیطی در نظر گرفته شوند لذا در طول دهه اخیر، آنزیم فیتاز توسط کارخانه های صنایع خوراک آبزیان به عنوان مکمل آنزیمی برای افزایش قابلیت هضم و جذب منابع پروتئینی گیاهی جیره، بهبود عملکرد رشد و کاهش آلودگی فسفر در محیط های آبی استفاده شده است. در این مطالعه با بهره گیری از سیستم تناوب‌هایِ کوتاهِ پالیندرومِ فاصله‌دارِ منظمِ خوشه‌ای (CRISPR: Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) اقدام به انتقال و درج ژن فیتاز باکتریایی به میکروجلبک مدل *Chlamidomonas reinhardtii* در جایگاه طراحی شده ژن نیترات ردوکتاز (NR) گردید و ویرایش صحیح ژنوم ریزجلبک با روش PCR بررسی و مورد تایید قرار گرفت. همچنین تایید کارآیی و بیان ژن فیتاز جایگذاری شده در جایگاه NR با استفاده از ژل SDS PAGE مورد بررسی قرار گرفت. نتایج کشت جلبک، حضور کلنی‌های مثبت دارای ویرایش صحیح بر روی محیط انتخابی در طول ۱۵ نسل در دوره زمانی ۱۵۰ روزه را نشان داد که خود نشان دهنده پایداری ویرایش صحیح بدون خاموشی ژن بود. همچنین ترجمه ژن فیتاز به عنوان تأیید بیان ژن انتقالی درج شده در سطح پروتئین توسط SDS PAGE بر روی پنج کلنی حاوی ویرایش صحیح و یک کلنی نمونه کنترل مورد تأیید قرار گرفت که نشان دهنده موفقیت رونویسی و ترجمه ژن فیتاز درج شده در جایگاه اگزون ۲ ژن NR ریز جلبک است. با توجه به مزایای تولید و استفاده از آنزیم فیتاز نوترکیب در جیره های غذایی آبزیان از جمله استفاده بیشتر از منابع پروتئینی گیاهی، کاهش هزینه های تولید و کاهش غنی شدن بیش از حد مواد آلی در اکوسیستم های آبی، استفاده از این روش برای توسعه صنعت خوراک آبزیان و آبزی پروری مدرن توصیه می شود.

واژگان کلیدی: ریزجلبک کلامیدوموناس؛ آنزیم فیتاز، سیستم CRISPR، ژن نیترات ردوکتاز.

Copyrights:
Copyright for this article is retained by the author(s), with publication rights granted Journal of Marine Science and Technology. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons. org/licenses/ by/4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

۱. مقدمه

در گذشته، پودر ماهی به دلیل وجود مقادیر زیادی از مواد مغذی ضروری مانند اسیدهای آمینه، لیپیدها، فاکتورهای رشد و ویتامین ها، قابلیت هضم بالا و سطح پایین کربوهیدرات (Morales et al., 2014; Zhou et al., 2004) به عنوان منبع اصلی پروتئین در غذای ماهی استفاده می شد (Shahzad et al., 2017)؛ اما کمبود و هزینه بالای پودر ماهی منجر به نیاز به استفاده از منابع پروتئینی جایگزین کم هزینه شامل مشتقات گیاهی شده است (Morales et al., 2014). اما مشکل عمده در استفاده از منابع پروتئینی مبتنی بر محصولات جانبی گیاهی وجود عوامل ضد تغذیه ای است (von Danwitz et al., 2016). مهمترین عامل ضد تغذیه ای در این میان اسید فیتیک یا فیتات می باشد (Reddy, 2001) فیتات شامل ۶۰ تا ۸۰ درصد کل فسفر (فسفر)، نمک‌های کلات منیزیم، کلسیم و سدیم است که در رژیم‌های غذایی گیاهی یافت می‌شود (Lei et al., 2013). اینوزیتول هگزا کیس فسفات (insp6) که معمولاً به عنوان فیتات شناخته می شود، جزء اصلی ذخیره ای در بذر، ریشه و غده گیاهان می باشد که در اصل به عنوان یک منبع فسفات برای جوانه زنی و رشد به کار می رود (Dahiya, 2016). اسید فیتیک یا فیتات دارای پتانسیل تشکیل باند با پروتئین ها، اسیدهای آمینه، کاتیونهای چند ظرفیتی یا مواد معدنی در مواد غذایی و ایجاد کمپلکس های غیرقابل حل نموده و عمل هضم و جذب آنها را دشوار نموده (Dahiya, 2016; Dahiya et al., 2009) و عملاً مقدار زیادی از مواد موجود در جیره غذایی از دسترس خارج می شود. فیتات به عنوان یک بازدارنده در اطراف فسفر عمل می کند و با سایر مواد معدنی مانند منیزیم، منگنز، مس، آهن و کلسیم تشکیل کمپلکس داده (Denstadli et al., 2006) و جذب آنها را کاهش می دهد (Dawood et al., 2015; Hussain et al., 2015, 2011) که در نهایت منجر به اثرات نامطلوب بر عملکرد رشد ماهیان می گردد (Council and others, 1993).

با توجه به اثرات مضر فیتات، نیاز به تجزیه کمپلکس های فیتات معدنی موجود در جیره های غذایی مبتنی بر محصولات گیاهی است. فیتازها آنزیم های فسفوهیدرولیتیک هستند که در اولین مرحله سبب آزاد شدن فسفر موجود در فیتات می شوند. طبق مطالعات متعدد انجام شده به خوبی مشخص شده است که اضافه کردن فیتاز به جیره غذایی برای هیدرولیز فیتات بسیار مؤثر است و آن را برای جذب در دسترس قرار می دهد (Vikas et al., 2012). آنزیم فیتاز، گروه های فسفات را از فیتات (هگزا کیس فسفات) در یک فرآیند گام به گام (چند مرحله ای) جدا می کند (Lei et al., 2013) و به عنوان یک افزودنی خوراکی قابل توجه برای حیوانات فاقد معده و تک معده برای ایجاد دسترسی به فسفر و سایر مواد مغذی اساسی درگیر در کمپلکس فیتات استفاده می شود (Lei and Stahl, 2000). این آنزیم، مواد معدنی محبوس شده توسط فیتات را آزاد می کند و منجر به افزایش جذب آنها می شود (Rabia et al., 2017). این کار از طریق جلوگیری از ایجاد کمپلکس فیتات با مواد معدنی (مس، روی، آهن، منگنز و...)، اسیدهای آمینه، اسیدهای چرب، نشاسته و سایر اجزای مهم رژیم غذایی انجام می شود و متعاقباً سبب نیاز کمتر به این عوامل ذکر شده در جیره غذایی خواهد شد (Dahiya, 2016) . در روده جانوران تک معده ای همچون انسان، پرندگان، آبزیان و خوک (Dahiya, 2016; Turner et al., 2007) تولید آنزیم فیتاز کم بوده و یا اصلا وجود ندارد لذا مقدار زیادی از فسفر موجود در جیره غذایی به صورت فیتات (فسفر غیر قابل هضم) از دسترس میزبان خارج می شود. اگر چه این نیاز به فسفر به وسیله سویا و سایر خوراکی های غنی شده با فسفر معدنی تامین می شود اما اسید فیتیک دفعی موجود در کود این جانوران توسط خاک و میکرو ارگانیسم های موجود در آب به صورت آنزیمی شکسته می شود و در نتیجه فسفر موجود در کودها آزاد شده و به اکوسیستم های آبی منتقل و سبب بروز غنای بیش از حد فسفر در محیط آبی می گردد و منجر به رشد بی رویه جلبک ها و در نتیجه کمبود اکسیژن در اکوسیستم آبی می شود (Bali and Satyanarayana, 2001). در نتیجه آنزیم فیتاز به عنوان یک مکمل غذایی افزایش دهنده جذب فسفر و کاهش دهنده دفع آن توسط میزبان به عنوان یکی از موثرترین افزودنیهای خوراکی سودآور مطرح شده است (Lei et al., 2013).

به طور کلی فیتاز دسترسی زیستی مواد مغذی را در میزبان به حداکثر می رساند و آزادسازی یا دفع آن در سیستم آبی را به حداقل می رساند (Cao et al., 2007; Kumar et al., 2016). بنابراین افزودن فیتاز به جیره غذایی یک تکنیک مفید برای بهبود ضریب تبدیل خوراک (FCR)، جذب مواد معدنی، هضم کامل و حفظ فسفر در بدن و در نتیجه کاهش آلودگی در اکوسیستمهای آبی می باشد (Hussain et al., 2015; Lei et al., 2013)).

در حال حاضر چندین ابزار ویرایش ژنوم توسعه یافته‌اند، از جمله نوکلئازهای انگشت روی (ZFNs)، نوکلئازهای مؤثر فعال‌کننده رونویسی (TALENs)، و اخیراً تکرارهای کوتاه پالیندرومیک با فاصله منظم (CRISPR) و نوکلئازهای مرتبط با آن (Cas9) که امکان ویرایش ژن ها یا حذف قسمت های ناخواسته آن ها را در مدل های مختلف حیوانی ممکن ساخته است (Seruggia and Montoliu, 2014). سیستم CRISPR-Cas9 به عنوان یک ابزار مهندسی ژنوم جدید توسعه یافته است، حتی برای موجوداتی که ویرایش ژنوم در آنها چالش برانگیز است. با استفاده از این فناوری نویدبخش، می توان بر چالش هایی که صنعت آبزی پروری با آن مواجه است غلبه کرد. ویرایش ژنومی با استفاده از CRISPR می تواند به سرعت تغییرات ژنومی قابل توجهی را ایجاد کند و آن را برای بهبود ژنتیکی، مقاومت به بیماری و کنترل بیماری در آبزی پروری مفید کند (Ansai et al., 2021; Seruggia and Montoliu, 2014). به عنوان مثال،

In Press

یک مکانیسم جدید برای ایمنی هدایت شده توسط RNA در برابر ویروس های RNA در مهره داران توسط CRISPR-CasRx برای تداخل مهندسی در برابر ویروس های RNA در ماهی ها ارائه شده است (Wang et al., 2021). بنابراین، نقش مکانیسم CRISPR-Cas در زمینه آبزی پروری برای تقاضای جهانی غذا در آینده بسیار مهم است.

چندین بررسی در مورد استفاده از ویرایش ژنوم مبتنی بر CRISPR در آبزی پروری وجود دارد (Gratacap et al., 2019; Wargelius, 2019). با این حال مطالعات اندکی در زمینه ویرایش ژنوم و تولیدات نوترکیب در هسته میکروجلبک ها در آبزی پروری با روش CRISPR-Cas انجام شده است. لذا در مطالعه حاضر، از سیستم CRISPR مبتنی بر ویرایش مستقیم هموولوگ (HDR) با واسطه کمپلکس ریبو نوکلئوپروتئین (RNP) برای انتقال و درج دقیق ژن خارجی در مکان مورد نظر برای دستیابی به بیان پایدار آنزیم فیتاز مورد استفاده قرار گرفت.

۲. مواد و روش ها

سویه فاقد دیواره سلولی *C. reinhardtii* "UVM11" در محیط تری استات–فسفات (TAP) (Andersen, 2005; Gorman and Levine, 1965) با روشنایی پیوسته (250 µmol photons m^{-2} s^{-1}) بر روی شیکر (۱۲۰ دور در دقیقه) در دمای ثابت (۲۵°C) کشت داده شد.

با توجه به خاصیت آنزیم فیتاز شامل فعالیت در محیط اسیدی، قلیایی و تحمل دمایی مختلف اقدام به انتخاب ژن میگردد. در این مطالعه، بررسی و آنالیز خصوصیات پروتئین های فیتاز جدا شده از منابع مختلف طبیعی باکتریایی و قارچی و همجنین پروتئین های فیتاز مهندسی شده توسط شرکت های مختلف در قالب ثبت اختراع، منجر به انتخاب پروتئین فیتاز باکتریای (*Buttiauxella sp.*) مهندسی شده توسط شرکت Danisco گردید (https://www.lens.org/lens/patent/067-475-823-386-005/fulltext).

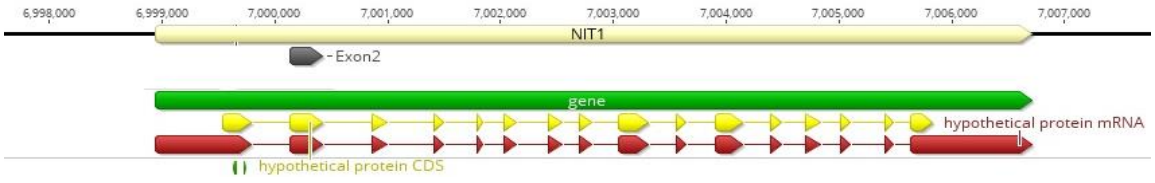
به منظور بررسی کدون ترجیحی و بهینه سازی ژن از پایگاه داده بانک ژن (NCBI) و Kazusa (http://www.kazusa.or.jp/codon/) استفاده گردید (Kadkhodaei et al., 2018).

به منظور بیان و خالص سازی پروتئین Cas9، ژن کد کننده پروتئین SpCas9 متعلق به استرپتوکوک پیوژنز (SpCas9 pET-28b-Cas9-His) به باکتری E. coli سویه Rosetta2 (DE3) منتقل گردید (Zadabbas Shahabadi et al., 2023).

همانطور که در شکل (۱) مشاهده میگردد بعد از تجزیه و تحلیل های بیوانفورماتیک اگزون دوم ژن NR (Nit1) که بخش ابتدایی از ناحیه کد کننده ژن نیترات ردوکتاز است، به عنوان محل هدف برای درج ژن فیتاز انتخاب و gRNA طراحی گردید (Zadabbas Shahabadi et al., 2023).

برای سنتز gRNA و تهیه کمپلکس RNP و تست برش آنزیمی در شرایط آزمایشگاهی، ابتدا الگوی DNA sgRNA به روش MOE PCR ساخته شد (Zadabbas Shahabadi et al., 2023) و سپس ۷۵ نانوگرم از DNA sgRNA الگو برای رونویسی و سنتز gRNA در شرایط آزمایشگاهی ، با استفاده از کیت سنتز RNA (Hi Scribe T7 Quick High Yield RNA Synthesis Kit) و طبق پروتکل شرکت سازنده (NEB #E2050) استفاده گردید.

فعالیت sgRNA و پروتئین Cas9 قبل از استفاده از آنها در شرایط in-vivo باید در شرایط آزمایشگاهی تأیید شود. بدین منظور از تست آزمایشگاهی به روش Hu et al. (2021) با کمی تغییرات به شرح زیراستفاده شد (Zadabbas Shahabadi et al., 2023). ۱۳۰۰ نانوگرم sgRNA و ۱۳۰ نانوگرم پروتئین CAS9 (نسبت ۱۰: ۱) به همراه ۳ میکرولیتر از بافر فعالیت 10X CAS9 و با آب عاری از نوکلئاز به حجم نهایی ۱۵ میکرولیتر رسانده شده و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ دقیقه انکوبه گردیدند تا کمپلکس RNP تشکیل و آماده فعالیت (شناسایی الگوی هدف توسط sgRNA و برش جایگاه هدف توسط Cas9) شود. سپس، برای هر آزمایش ، ۴۰۰ نانوگرم از پلاسمید اهدا کننده P1Chlamyck-I/O (با توجه به وجود دو جایگاه برش قابل شناسایی توسط gRNA) (Zadabbas Shahabadi et al., 2023) به واکنش اضافه شد و در دمای ۳۷°C به مدت ۴ ساعت انکوبه شدند. برای غیرفعال کردن نوکلئاز CAS9 ، واکنش ها در دمای ۶۵°C به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه شدند.



شکل ۱- بخش های کد کننده ژن نیترات ردوکتاز

Fig. 1- Nitrate reductase gene coding parts

In Press

انتقال کمپلکس RNP و پلاسمید اهداکننده ساختار حاوی ژن مورد نظر (P1Chlamyck-I/O) به *C. reinhardtii* (strein UVM11) با استفاده از روش دانه‌های شیشه‌ای (glass bead) توصیف شده در مطالعه قبلی توسط Zadabbas Shahabadi et al. (2023) انجام گردید.

بازیابی سلولی و کشت پیرو مطالعه قبلی توسط Zadabbas Shahabadi et al. (۲۰۲۳) انجام گرفت و در نهایت، کلونی های مثبت (رشد یافته بر روی ۱۰ میکروگرم در میلی لیتر هیگرومایسین) برای نگهداری و تایید ویرایش ژنوم شامل PCR و SDS PAGE انتخاب گردیدند.

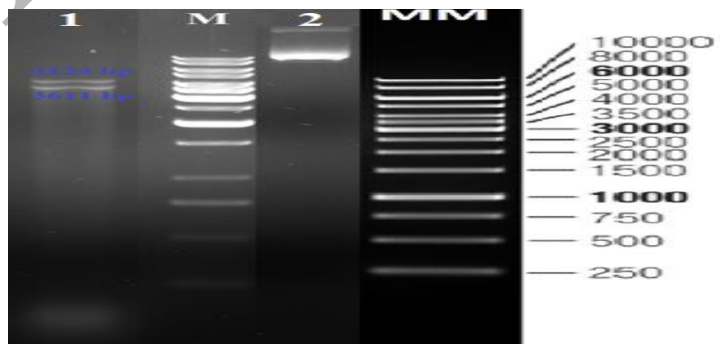
برای راستی آزمایی میکروجلبک های ویرایش شده (knocked-in) به روش PCR، DNA ژنومی از کلنی های مثبت (با قطر ۰.۵ میلی متر) با استفاده از روش CTAB استخراج گردیدند (Zadabbas Shahabadi et al., 2023). سپس بررسی صحت ویرایش به روش مولکولی از طریق دستگاه PCR انجام گرفت (Zadabbas Shahabadi et al., 2023).

به منظور آنالیز بیان فیتاز به روش SDS PAGE ابتدا استخراج پروتئین با روش Yildrim (۲۰۲۲) با کمی تغییرات به شرح زیر انجام گردید: الف) برداشت ۵۰ میلی لیتر نمونه میکروجلبکی در انتهای فاز لگاریتمی رشد (۴۳ میلیون سلول در میلی لیتر) ب) سانتریفیوژ با ۴۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴°C به مدت ۷ دقیقه و برداشت پلت ها و نگهداری در فریزر منفی ۸۰°C ج) اضافه کردن ۵۰ میلی لیتر بافر TBS (50 mM Tris–HCl pH 8, 40 mM NaCl, 0.1 % Tween 20 and 1 mM PMSF) (Campos-Quevedo et al., 2013) جهت حل کردن پلت میکروجلبک. د) سونیکیت کردن محلول میکروجلبک توسط دستگاه هموزنایزر التراسونیک با برنامه ۲۰ ثانیه سونیکیت – ۳۰ ثانیه استراحت به مدت ۷/۵ دقیقه بر روی یخ. سپس جهت بررسی و مشاهده پروتئین فیتاز بیان شده در میکروجلبک کلامیدوموناس ری اینهاردتی با بهره گیری از روش SDS PAGE (Laemmli, 2011) و نکات بیان شده توسط Grabski وBurgess (۲۰۰۱) انجام گرفت.

۳. نتایج

از آنجاییکه پلاسمید اهداکننده DNA (P1Chlamyck-I/O) دارای دو توالی هدف gRNA در طرفین ساختار اهدا شونده می باشد، برای ارزیابی کارایی و فعالیت کمپلکس Cas9/gRNA (RNP) جهت برش در شرایط آزمایشگاهی مورد استفاده قرار گرفت. نتیجه تست برش آنزیمی در شرایط آزمایشگاهی به وضوح اندازه مورد انتظار (۴۱۲۴ و ۳۶۱۱ جفت باز) را در شکل (۲) نشان داد، در حالی که وقتی تنها gRNA به الگوی هدف اضافه شد، هیچگونه برشی مشاهده نگردید.

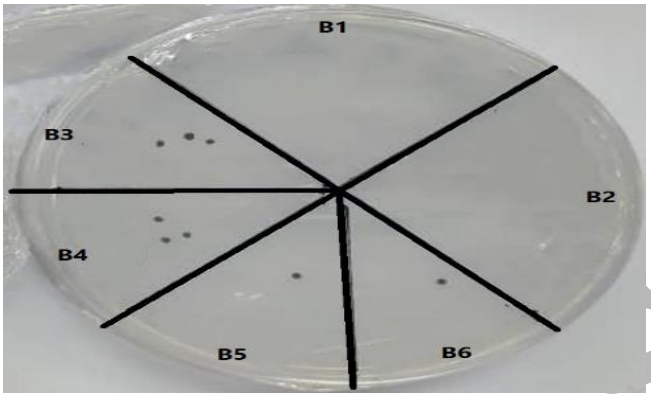
در این تحقیق، انتقال مستقیم کمپلکس RNP به همراه پلاسمید اهداکننده DNA "p1ChlamyCK-I/O" به سلول میکروجلبک *C. reinhardtii* انجام گردید و همانطور که در شکل (۳) مشاهده می کنید، کلنی‌های مثبت (کلنی های رشد یافته) بر روی محیط کشت TAP آگار حاوی ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر هیگرومایسین B غربالگری شدند. در مجموع ۶ عدد کلنی مثبت از نمونه های انتقال ژن یافته اصلی (انتقال کمپلکس RNP به همراه پلاسمید اهداکننده DNA) جهت غربالگری بیشتر به منظور تایید ویرایش و یا درج صحیح ژن خارجی در جایگاه اگزون ۲ ژن نیترات ردوکتاز ریز جلبک *C. reinhardtii* و ۲ عدد کلونی مثبت از نمونه های انتقال ژن یافته کنترل (ترانسفورم شده تنها با استفاده از پلاسمید اهدا کننده DNA) به منظور مقایسه انتقال و بیان مورد مطالعه قرار گرفتند.



شکل ۲- ژل آگارز 1% TAE به منظور بهینه سازی روش برش Cas9 در شرایط آزمایشگاهی بر روی پلاسمید p1ChlamyCK-I/O (شماره دسترسی بانک ژن OP236418) با دو سایت هدف gRNA (gRNA هدف A از نوکلئوتید ۳۵۸۸ تا ۳۶۱۰ و gRNA هدف B از نوکلئوتید ۷۷۱۲ تا ۷۷۳٤ بر روی ساختار ۷۷۳٤ جفت باز ی) را نشان می‌دهد. ۱) gRNA: 1300ng/ Cas9: 130ng/ Donor plasmid: 400ng ؛ M) نشانگر ((GeneRuler 1 kb DNA Ladder, ready-to-use(Catalog Number SM0313 ؛ ۲) پلاسمید اهدا کننده p1ChlamyCK-I/O (400ng) ؛ (MM نقشه نشانگر (Catalog Number SM0313)

In Press

Fig. 2 - TAE 1% agarose gel in order to optimize the Cas9 cleavage method in laboratory conditions on plasmid p1ChlamyCK-I/O (Gene Bank accession number OP236418) with two gRNA target sites (target gRNA A form nucleotides 3588 to 3610 and target gRNA B from Nucleotide 7712 to 7734 represents 7734 bp on the structure. 1) gRNA: 1300ng/ Cas9: 130ng/ Donor plasmid: 400ng; (M Marker ((Catalog Number SM0313) GeneRuler 1 kb DNA Ladder, ready-to-use)); 2) donor plasmid p1ChlamyCK-I/O (400ng); MM) Marker Map (Catalog Number SM0313)



شکل ۳-کلنی های مثبت *C. reinhardtii* به دست آمده با ترانسفورم به روش گلس بید بر روی محیط انتخابی TAP همراه با ۱۰ میکروگرم بر میلی لیتر B1 Hygromycin B) کشت *C. reinhardtii* بدون هیچ گونه ترانسفورم B2) کشت *C. reinhardtii* تیمار شده در شرایط ترانسفورم اما بدون استفاده از پلاسمید اهدا کننده و کمپلکس B3 RNP) کشت *C. reinhardtii* تیمار شده در شرایط ترانسفورم با استفاده از پلاسمید اهداکننده "p1ChlamyCK-I/O" و کمپلکسB4 RNP) تکرار B3 B5) کشت *C. reinhardtii* تیمار شده در شرایط ترانسفورم تنها با استفاده از پلاسمید اهدا کننده "p1ChlamyCK-I/O" B6) تکرار B5.

Fig. 3 - Positive colonies of C. reinhardtii obtained by transformation by glass bead method on TAP selective medium with 10 µg/ml Hygromycin B; B1) C. reinhardtii culture without any transformation; B2) C. reinhardtii culture treated in Transformation conditions but without using donor plasmid and RNP complex; B3) Culture of C. reinhardtii treated in transformation conditions using donor plasmid "p1ChlamyCK-I/O" and RNP complex ; B4) B3 Repeat; B5) Culture of C. reinhardtii treated In transformation conditions using only donor plasmid "p1ChlamyCK-I/O"; B6) B5 replicate.

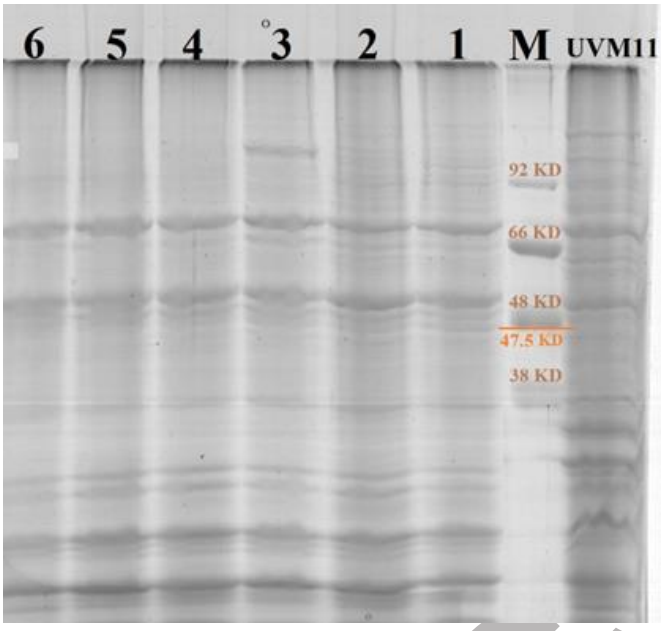
ترجمه ژن فیتاز به عنوان تأیید بیان ژن خارجی درج شده در سطح پروتئین توسط SDS PAGE بر روی ۵ کلنی حاوی ویرایش صحیح و ۱ کلنی نمونه کنترل (انتقال ژن بدون استفاده از کمپلکس RNP و تنها با استفاده از پلاسمید اهدا کننده "p1ChlamyCK-I/O" در مقایسه با پروفیل پروتئین استخراجی از نمونه کنترل ترانس فرم نشده (سویه میکروجلبک UVM11) مورد تأیید قرار گرفت و همانطور که در شکل (۴) نشان داده شده است، ژن خارجی (فیتاز) درج شده در جایگاه اگزون ۲ ژن نیترات ردوکتاز ریز جلبک با موفقیت رونویسی و ترجمه گردیده است. از سوی دیگر نتایج مطالعه حاضر نشان داد که ژن فیتاز می تواند با موفقیت در محل مورد نظر (اگزون ۲ ژن نیترات ردوکتاز) با سطح ثابت در نمونه های دارای ویرایش صحیح با وزن مولکولی ۴۷/۵ کیلو دالتون بیان و ترجمه شود اما در نمونه کنترل (انتقال ژن بدون استفاده از کمپلکس RNP)، بیان به صورت ثابت و پایدار مشاهده نگردید.

٤. بحث و نتیجه گیری

اخیرا سیستم CRISPR، فناوری ویرایش ژن را در تحقیقات و کاربردهای تجاری به آسانی در دسترس قرار داده است. ویرایش ژن با استفاده از CRISPR/Cas درمطالعات صورت گرفته اخیر با موفقیت در گیاهان (Scheben et al., 2017)، ماهی (Khalil et al., 2017) و کاربردهای انسانی (Ma ;Cyranoski, 2016 et al., 2017) انجام شده است. و در مطالعه حاضر برای اولین بار از سیستم نوین CRISPR مبتنی بر RNP برای درج صحیح و دقیق ژن فیتاز باکتریایی در هسته میکروجلبک کلامیدوموناس استفاده گردید.

فن‌آوری ژن، پتانسیل پیشرفت پزشکی، ارائه جایگزین‌های سوخت، بهبود عملکرد محصول و در نتیجه فرصتی برای کمک به امنیت غذایی را دارد.. چنین کاربردهایی در آبزی پروری برای مقابله با چالش های پایداری و افزایش تولید در حال رشد هستند (Osmond and Colombo, 2019).

In Press



شکل ٤- ژل SDS PAGE که نشان دهنده بیان و ترجمه ژن فیتاز با وزن مولکولی ٤٧/٥ کیلو دالتون به شرح زیر می باشد: UVM11) پروتئین استخراجی از نمونه جلبکی ترانسفورم نشده؛ M) لدر؛ ١،٢،٣،٤،٥) پروتئین استخراجی از نمونه های دارای ویرایش صحیح و ترانسفورم شده با کمپلکس RNP و پلاسمید اهدا کننده"p1ChlamyCK-I/O"؛ 6) پروتئین استخراجی از کلنی نمونه کنترل و ترانسفرم شده بدون استفاده از کمپلکس RNP و فقط با استفاده از پلاسمید اهداکننده "p1ChlamyCK.

Fig. 4- SDS PAGE gel showing the expression and translation of the phytase gene with a molecular weight of 47.5 kDa as follows: UVM11) protein extracted from untransformed algal sample; M) ladder; 1, 2, 3, 4, 5) protein extracted from correctly edited and transformed samples with RNP complex and donor plasmid "p1ChlamyCK-I/O"; 6) Protein extracted from the control sample colony and transformed without using the RNP complex and only using the "p1ChlamyCK" donor plasmid.

تا به امروز، بسیاری از تحقیقات انجام شده CRISPR در آبزی پروری نشان دهنده بهبود روش های ژنتیک سنتی در بسیاری از عوامل مانند رشد، مقاومت در برابر بیماری، تولید مثل، عقیمی و الگوهای رنگ آمیزی در ماهی ها شده است (Roy et al., 2022).

تکنیک ویرایش ژنوم CRISPR برای افزایش رشد با هدف قرار دادن ژن میوستاتین (mstn) در چندین ماهی پرورشی استفاده شده است (Hallerman, 2021; Khalil et al., 2017; Kishimoto et al., 2018). تکنیک های CRISPR برای افزایش رشد با غیرفعال کردن ژن میوستاتین (mstn) در بسیاری از ماهی ها مانند کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) (Zhong et al., 2016)، گربه ماهی کانالی (*Ictalurus punctatus*) (Khalil et al., 2017)، ماهی بریم دریایی قرمز (*Pagrus major*) (Kishimoto et al., 2018)، ماهی *Paralichthys olivaceus* (Kim et al., 2019)، صدف *Crassostrea gigas* (Yu et al., 2019)، ماهی *Megalobrama amblycephala* (Yuan Sun et al., 2020) و تیلاپیا نیل (*Oreochromis niloticus*) توسط شرکت AquaBounty توسعه یافته است. بدین صورت که ماهی Red seabream به طور قابل توجهی توده عضلانی خود را افزایش می‌دهد (افزایش ۱۶ درصدی ماهیچه‌های اسکلتی)، طول بدن کوتاه و راندمان تغذیه بهتر و در نتیجه رشد کلی بهتری را به همراه دارد (Kishimoto et al., 2018; Ohama et al., 2020). جدا از ژن mstn، همچنین CRISPR برای صفات مرتبط با رشد در ماهی *Takifugu rubripe* با ایجاد اختلال در ژن گیرنده لپتین که اشتها را کنترل می‌کند و باعث می‌شود ماهی‌ها بیشتر بخورند، استفاده شده است (Kishimoto et al., 2018).

از سیستم CRISPR/Cas به عنوان یک رویکرد موثر برای کنترل بیماری ها در مطالعاتی مانند هموراژیک ناشی از reovirus کپور علفخوار (GCRV) (Ma et al., 2018)، گربه ماهی کانالی (Elaswad et al., 2018)، ناک اوت کردن ژن EcNinaB-X1 در میگوی *Exopalaemon carinicauda* جهت افزایش مقاومت و کاهش مرگ و میر (Yuying Sun et al., 2020) گردید و در مطالعه دیگری، CRISPR/Cas9 HDR برای ادغام

In Press

یک ژن خارجی از تمساح *alligator cathelicidin* (که فعالیت ضدمیکروبی وسیع الطیف را نشان می دهد) در یک منطقه هدفمند غیر کدکننده از ژنوم گربه ماهی کانالی استفاده شد (Simora et al., 2020).

در زمینه عقیم سازی و کنترل جنسیت، CRISPR/Cas9 برای توسعه مدل‌های عقیم جدید در ماهی آزاد اقیانوس اطلس (*Salmo salar*) با حذف ژن (dnd)، ماهی آزاد اقیانوس اطلس بدون سلول های زاینده ، نابالغ باقی ماند و به بلوغ نرسید (Kleppe et al., 2017). در مطالعه صورت گرفته توسط Chen et al. (۲۰۱۸) با ناک اوت ژن dnd1 ماهی خاویاری Sterlet عقیم بدست آمد، از سیستم CRISPR/Cas9 برای حذف ژن های dmrt6، dmrt1، foxl2، nanos2 ، nanos3، فاکتور استروئیدوژنیک ۱، Gsdf، (Wt1) و ژن eEF1A در تیلاپیا نیل (*Oreochromis niloticus*) (Chen et al., 2017; Jiang et al., 2017; Li et al., 2014; Xie et al., 2016) استفاده شده است و همچنین اخیراً از CRISPR/Cas9 برای تولید جمعیت کپور معمولی ماده (*Cyprinus carpio*) از طریق حذف ژن سیتوکروم P450 17A1 استفاده شده است (Zhai et al., 2022).

در مطالعه صورت گرفته توسط Datsomor et al. (2019)، ویرایش ژن elovl2 در ماهی قزل آلا اقیانوس اطلس توسط CRISPR/Cas9 استفاده گردید، که از طویل شدن PUFA جلوگیری می کند که نقش کلیدی elovl2 را در سنتز PUFA نشان می دهد و همچنین نشان می دهد که عنصر تنظیم کننده استرول پروتئین-۱ (Srebp-1) یک عنصر اصلی تنظیم کننده سنتز PUFA درون زا در ماهی قزل آلا اقیانوس اطلس می باشد (Datsomor et al., 2019).

در یک مطالعه، دو ژن ASIP 1 و ASIP 2 از طریق سیستم CRISPR/Cas9 مختل شدند و به وسیله آن، لکه های سیاه در ماهی کپور معمولی ناپدید شدند (Chen et al., 2019) و در مطالعه دیگر با هدف قرار دادن ژن slc45a2 در بیوسنتز ملانین مورد استفاده قرار گرفت و یک گونه آلبینو از ماهی تیلاپیا نیل با پوست و چشم قرمز تولید گردید (Segev-Hadar et al., 2021).

روی هم رفته با توجه به مطالعات صورت گرفته اخیر بر روی آبزیان با بهره گیری از سیستم CRISPR از یک طرف و افزایش استفاده تجاری از *C. reinhardtii* که عموماً توسط FDA به عنوان گونه ایمن (GRAS) شناخته می‌شود از طرف دیگر، نیازمند بهبود و توسعه سویه‌هایی از این گونه میکروجلبکی می باشد که ترکیبات زیستی با ارزش افزوده بالا را تولید کنند. اصلاح ژنوم با استفاده از سیستم CRISPR-Cas با موفقیت در طیف وسیعی از ارگانیسم‌ها از جمله چندین ریزجلبک انجام شده است (Naduthodi et al., 2019; Shin et al., 2016)). سیستم CRISPR-Cas در ریزجلبک ها برای اثبات عملکرد یک ژن خاص و ایجاد سویه هایی با ویژگی های صنعتی مانند بهبود محتوای لیپید و بهره برداری بیشتر زیست توده استفاده شده است و این سیستم (CRISPR-Cas) تغییرات ژنومی را با سرعت، کارایی، دقت و سهولت بیشتری در مقایسه با سایر روش های مهندسی ژنوم ایجاد کرده است (Patel et al., 2019).

نسل دوم پلتفرم ویرایش CRISPR-Cas (غیر مبتنی بر DNA) معروف به کمپلکس RNP بر خلاف نسل اول CRISPR-Cas (مبتنی بر DNA) که از سازه های پلاسمیدی برای بیان Cas9 استفاده می نماید (Shin et al., 2016)، در چند سال اخیر بسیار بیشتر مورد توجه قرار گرفته است. این استراتژی (کمپلکس RNP) فعالیت شناسایی هدف درست را بهبود می بخشد و اثرات سمی پروتئین Cas9 (به تنهایی) را بر روی سلول ها کاهش می دهد. انتقال RNPs (نسل دوم) مزایای زیادی نسبت به پلاسمید بیانگر gRNA و Cas9 (نسل اول) دارد به طوریکه از یک سو بازده ویرایش بسیار بالاتری در اصلاحات مبتنی بر RNP در *C. reinhardtii* در مقایسه با تغییرات مبتنی بر DNA گزارش شده است (Baek et al., 2016; Shin et al., 2016) و از سوی دیگر انجام تست برش در شرایط آزمایشگاهی با حضور gRNA های طراحی‌شده باعث صرفه‌جویی زیادی در زمان، هزینه و نیروی کار می‌شود لذا در پژوهش حاضر، بر روی درج ژن فیتاز و ویرایش ژنوم در *C. reinhardtii*، عملیات کشت، انتخاب و غربالگری بر روی کلنی‌های ویرایش شده مثبت صحیح (۵ کلنی) در طول ۱۵ نسل در یک دوره زمانی ۱۵۰ روزه انجام شد و نتایج نشان‌دهنده درستی و ویرایش پایدار بود، در حالی که نمونه های انتقال ژن شده به روش کلاسیک (انتقال ژن بدون استفاده از کمپلکس RNP یا روش CRISPR) پس از دو نسل ژن فیتاز را از دست دادند.

با توجه به مطالعات صورت گرفته تا کنون همگی انتقال ژن های فیتاز در کلروپلاست میکروجلبک ها بوده است که اکثریت آنها از میزان بیان پایینی برخوردار بوده است (Erpel et al., 2016; Yoon et al., 2011) و در مطالعه صورت گرفته توسط Potvin (۲۰۱۵) عدم وجود بیان مشاهده گردید، اما در مطالعه حاضر برای بار نخست در ایران و همچنین در سطح جهانی تولید آنزیم فیتاز توسط میکرو جلبک *C. reinhardtii* با بهره گیری از روش CRISPR برای درج ژن فیتاز باکتریایی در ژن نیترات ردوکتاز (انتقال به هسته) به واسطه CRISPR/Cas9 RNP با موفقیت انجام گردید.

برای تایید کارایی ژن درج شده در جایگاه اگزون ۲ ژن نیترات ردوکتاز، تجزیه و تحلیل داده های SDS PAGE در شکل (۴)، وجود ژن فیتاز خارجی، رونویسی و ترجمه ژن فیتاز در کلون های ویرایش شده را نشان داد، بدین صورت که تداوم بیان و ترجمه حتی در نسل پانزدهم کلون‌های ویرایش ژنوم شده می‌تواند پایداری بیان فیتاز را در جایگاه نیترات ردوکتاز (NR) و همچنین مناسب بودن ژن NR برای درج ژن های هدف خارجی بدون تحت تاثیر قرار

In Press

گرفتن خاموشی ژن را به اثبات رساند. با توجه به مطالعات صورت گرفته تا این لحظه، این اولین گزارش موفقیت آمیز از درج و بیان ژن فیتاز باکتریایی در ژن نیترات ردوکتاز میکروجلبک *C. reinhardtii* به واسطه CRISPR/Cas9 RNP می باشد که بیان و ترجمه ژن فیتاز با آنالیز SDS PAGE تایید گردید. علاوه بر این، کشت و انتخاب بر روی تمام کلنی های ویرایش شده مثبت در ۱۵ نسل در طول یک دوره زمانی ۱۵۰ روزه انجام گردید و نتایج نشان‌دهنده ویرایش صحیح و پایدار بدون تأثیر خاموشی ژن یا اثر منفی مکان درج ژن بود. به طور کلی، با توجه به خوراکی بودن میکروجلبک *C. reinhardtii* و دارا بودن تاییدیه از سازمان غذا و دارو (FDA) این نتایج می‌تواند از یک سو سبب توسعه صنعت تغذیه طیور و آبزیان به عنوان عمده مصرف کنندگان آنزیم فیتاز در جیره غذایی گردد و از سوی دیگر سبب توسعه حفاظت محیط زیست از طریق کاهش رهاسازی و تجزیه فسفر در طبیعت گردد.

تشکر و قدردانی

این کار با مشارکت سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران (IROST) و دانشگاه هرمزگان (شماره گرنت: ۳۴۱۵۰۰) تامین شده است. نویسندگان همچنین از مساعدت فنی محبوبه سلیمانی چشم، زهره عمیدی، فرزانه عزیزمحسنی، علی شیخی نژاد، حامد ناقوسی و محمد زندی تشکر و قدردانی می نمایند.

References:

Andersen, R.A., 2005. Algal culturing techniques. Elsevier. doi:10.1111/j.1529-8817.2005.00114.x.

Ansai, S., Mochida, K., Fujimoto, S., Mokodongan, D.F., Sumarto, B.K.A., Masengi, K.W.A., Hadiaty, R.K., Nagano, A.J., Toyoda, A., Naruse, K., others, 2021. Genome editing reveals fitness effects of a gene for sexual dichromatism in Sulawesian fishes. Nat. Commun. 12, 1350. doi: 10.1038/s41467-021-21697-0.

Baek, K., Kim, D.H., Jeong, J., Sim, S.J., Melis, A., Kim, J.-S., Jin, E., Bae, S., 2016. DNA-free two-gene knockout in Chlamydomonas reinhardtii via CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins. Sci. Rep. 6, 1–7. doi: 10.1038/srep30620.

Bali, A., Satyanarayana, T., 2001. Microbial phytases in nutrition and combating phosphorus pollution. Everyman's Sci 4, 207–209.

Cao, L., Wang, W., Yang, C., Yang, Y., Diana, J., Yakupitiyage, A., Luo, Z., Li, D., 2007. Application of microbial phytase in fish feed. Enzyme Microb. Technol. 40, 497–507. doi: 10.1016/j.enzmictec.2007.01.007.

Chen, H., Wang, J., Du, J., Si, Z., Yang, H., Xu, X., Wang, C., 2019. ASIP disruption via CRISPR/Cas9 system induces black patches dispersion in Oujiang color common carp. Aquaculture 498, 230–235. doi: 10.1016/j.aquaculture.2018.08.057.

Chen, J., Jiang, D., Tan, D., Fan, Z., Wei, Y., Li, M., Wang, D., 2017. Heterozygous mutation of eEF1A1b resulted in spermatogenesis arrest and infertility in male tilapia, Oreochromis niloticus. Sci. Rep. 7, 43733. doi: 10.1038/srep43733.

Chen, J., Wang, W., Tian, Z., Dong, Y., Dong, T., Zhu, H., Zhu, Z., Hu, H., Hu, W., 2018. Efficient gene transfer and gene editing in sterlet (Acipenser ruthenus). Front. Genet. 9, 117. doi: 10.3389/fgene.2018.00117

Council, N.R., others, 1993. Nutrient requirements of fish. National Academies Press.

Cyranoski, D., 2016. CRISPR gene-editing tested in a person for the first time. Nature 539. doi: 10.1038/nature.2016.20988.

Dahiya, S., 2016. Industrial application of phytases. Int J Appl Res 2, 95–98.

Dahiya, S., Singh, N., Rana, J.S., 2009. Optimization of growth parameters of phytase producing fungus using RSM.

Datsomor, A.K., Zic, N., Li, K., Olsen, R.E., Jin, Y., Vik, J.O., Edvardsen, R.B., Grammes, F., Wargelius, A., Winge, P., 2019. CRISPR/Cas9-mediated ablation of elovl2 in Atlantic salmon (Salmo salar L.) inhibits elongation of polyunsaturated fatty acids and induces Srebp-1 and target genes. Sci. Rep. 9, 7533. doi: 10.1038/s41598-019-43862-8.

Dawood, M.A.O., Koshio, S., Ishikawa, M., Yokoyama, S., others, 2015. Effects of partial substitution of fish meal by soybean meal with or without heat-killed Lactobacillus plantarum (LP20) on growth performance, digestibility, and immune response of amberjack, Seriola dumerili juveniles. Biomed Res. Int. 2015. doi: 10.1155/2015/514196.

Denstadli, V., Skrede, A., Krogdahl, Å., Sahlstrøm, S., Storebakken, T., 2006. Feed

In Press

intake, growth, feed conversion, digestibility, enzyme activities and intestinal structure in Atlantic salmon (Salmo salar L.) fed graded levels of phytic acid. Aquaculture 256, 365–376. doi: 10.1016/j.aquaculture.2006.02.021

Elaswad, A., Khalil, K., Cline, D., Page-McCaw, P., Chen, W., Michel, M., Cone, R., Dunham, R., 2018. Microinjection of CRISPR/Cas9 protein into channel catfish, Ictalurus punctatus, embryos for gene editing. JoVE (Journal Vis. Exp. e56275. doi: 10.3791/56275.

Erpel, F., Restovic, F., Arce-Johnson, P., 2016. Development of phytase-expressing Chlamydomonas reinhardtii for monogastric animal nutrition. BMC Biotechnol. 16, 1–7. doi: 10.1186/s12896-016-0258-9.

Gorman, D.S., Levine, R.P., 1965. Cytochrome f and plastocyanin: their sequence in the photosynthetic electron transport chain of Chlamydomonas reinhardi. Proc. Natl. Acad. Sci. 54, 1665–1669. doi: 10.1073/pnas.54.6.1665.

Grabski, A.C., Burgess, R.R., 2001. Preparation of protein samples for SDS-polyacrylamide gel electrophoresis: procedures and tips. Innovations 13, 1–12.

Gratacap, R.L., Wargelius, A., Edvardsen, R.B., Houston, R.D., 2019. Potential of genome editing to improve aquaculture breeding and production. Trends Genet. 35, 672–684. doi: 10.1016/j.tig.2019.06.006.

Hallerman, E., 2021. Genome editing in cultured fishes. CABI Agric. Biosci. 2, 1–19. doi: 10.1186/s43170-021-00066-3.

Hu, L., Feng, S., Liang, G., Du, J., Li, A., Niu, C., 2021. CRISPR/Cas9-induced β-carotene hydroxylase mutation in Dunaliella salina CCAP19/18. AMB Express. doi: 10.1186/s13568-021-01242-4.

Hussain, S.M., Afzal, M., Javid, A., Hussain, A.I., Ali, Q., Mustafa, I., Chatha, S.A.S., Shah, S.Z.H., Hussain, M., Ullah, M.I., 2015. Efficacy of Phytase Supplementation on Growth Performance and Mineral Digestibility of Labeo rohita Fingerlings Fed on Cottonseed Meal Based Diet. Pak. J. Zool. 47.

Hussain, S.M., Afzal, M., Rana, S.A., Javid, A., Hussain, M., 2011. Impact of phytase supplementation on nutrient digestibility for Labeo rohita fingerlings fed on sunflower meal based diets. Pak. J. Life Soc. Sci 9, 85–90.

Jiang, D., Chen, J., Fan, Z., Tan, D., Zhao, J., Shi, H., Liu, Z., Tao, W., Li, M., Wang, D., 2017. CRISPR/Cas9-induced disruption of wt1a and wt1b reveals their different roles in kidney and gonad development in Nile tilapia. Dev. Biol. 428, 63–73. doi: 10.1016/j.ydbio.2017.05.017

Kadkhodaei, S., Hashemi, F.S.G., Rezaei, M.A., Abbasiliasi, S., Tan, J.S., Memari, H.R., Bande, F., Baradaran, A., Moradpour, M., Arbakariya, B., others, 2018. Cis/Transgene Optimization: Systematic Discovery of Novel Gene Expression Elements Using Bioinformatics and Computational Biology Approaches. Springer. doi: 10.1007/978-3-319-90391-0_4

Khalil, K., Elayat, M., Khalifa, E., Daghash, S., Elaswad, A., Miller, M., Abdelrahman, H., Ye, Z., Odin, R., Drescher, D., others, 2017. Generation of myostatin gene-edited channel catfish (Ictalurus punctatus) via zygote injection of CRISPR/Cas9 system. Sci. Rep. 7, 7301. doi: 10.1038/s41598-017-07223-7

Kim, J., Cho, J.Y., Kim, J.-W., Kim, H.-C., Noh, J.K., Kim, Y.-O., Hwang, H.-K., Kim, W.-J., Yeo, S.-Y., An, C.M., others, 2019. CRISPR/Cas9-mediated myostatin disruption enhances muscle mass in the olive flounder Paralichthys olivaceus. Aquaculture 512, 734336. doi:10.1016/j.aquaculture.2019.734336.

Kishimoto, K., Washio, Y., Yoshiura, Y., Toyoda, A., Ueno, T., Fukuyama, H., Kato, K., Kinoshita, M., 2018. Production of a breed of red sea bream Pagrus major with an increase of skeletal muscle mass and reduced body length by genome editing with CRISPR/Cas9. Aquaculture 495, 415–427. doi: 10.1016/j.aquaculture.2018.05.055.

Kleppe, L., Andersson, E., Skaftnesmo, K.O., Edvardsen, R.B., Fjelldal, P.G., Norberg, B., Bogerd, J., Schulz, R.W., Wargelius, A., 2017. Sex steroid production associated with puberty is absent in germ cell-free salmon. Sci. Rep. 7, 12584. doi: 10.1038/s41598-017-12936-w.

Kumar, N., Sharma, R., Tripathi, G., Kumar, K., Dalvi, R.S., Krishna, G., 2016. Cellular

In Press

metabolic, stress, and histological response on exposure to acute toxicity of endosulfan in Tilapia (O reochromis mossambicus). Environ. Toxicol. 31, 106–115. doi: 10.1002/tox.22026

Laemmli, 2011. Laemmli SDS PAGE Fanglian He Carnegie Institution at Stanford. Bio-Protocol.Org 1, 3–6.

Lei, X.G., Stahl, C.H., 2000. Nutritional benefits of phytase and dietary determinants of its efficacy. J. Appl. Anim. Res. 17, 97–112. doi: 10.1080/09712119.2000.9706294.

Lei, X.G., Weaver, J.D., Mullaney, E., Ullah, A.H., Azain, M.J., 2013. Phytase, a new life for an “old” enzyme. Annu. Rev. Anim. Biosci. 1, 283–309. doi: 10.1146/annurev-animal-031412-103717.

Li, Minghui, Yang, H., Zhao, J., Fang, L., Shi, H., Li, Mengru, Sun, Y., Zhang, X., Jiang, D., Zhou, L., others, 2014. Efficient and heritable gene targeting in tilapia by CRISPR/Cas9. Genetics 197, 591–599. doi: 10.1534/genetics.114.163667.

Ma, H., Marti-Gutierrez, N., Park, S.-W., Wu, J., Lee, Y., Suzuki, K., Koski, A., Ji, D., Hayama, T., Ahmed, R., others, 2017. Correction of a pathogenic gene mutation in human embryos. Nature 548, 413–419. doi: 10.1038/nature23305.

Ma, J., Fan, Y., Zhou, Y., Liu, W., Jiang, N., Zhang, J., Zeng, L., 2018. Efficient resistance to grass carp reovirus infection in JAM-A knockout cells using CRISPR/Cas9. Fish \& Shellfish Immunol. 76, 206–215. doi: 10.1016/j.fsi.2018.02.039.

Morales, G.A., Márquez, L., de Rodrigañez, M., Bermúdez, L., Robles, R., Moyano, F.J., 2014. Effect of phytase supplementation of a plant-based diet on phosphorus and nitrogen bioavailability in sea bream Sparus aurata. Aquac. Nutr. 20, 172–182. doi: 10.1111/anu.12063.

Naduthodi, M.I.S., Mohanraju, P., Südfeld, C., D’Adamo, S., Barbosa, M.J., Van Der Oost, J., 2019. CRISPR--Cas ribonucleoprotein mediated homology-directed repair for efficient targeted genome editing in microalgae Nannochloropsis oceanica IMET1. Biotechnol. Biofuels 12, 1–11. doi: 10.1186/s13068-019-1401-3.

Ohama, M., Washio, Y., Kishimoto, K., Kinoshita, M., Kato, K., 2020. Growth performance of myostatin knockout red sea bream Pagrus major juveniles produced by genome editing with CRISPR/Cas9. Aquaculture 529, 735672. doi: 10.1016/j.aquaculture.2020.735672

Osmond, A.T.Y., Colombo, S.M., 2019. The future of genetic engineering to provide essential dietary nutrients and improve growth performance in aquaculture: advantages and challenges. J. World Aquac. Soc. 50, 490–509. doi: 10.1111/jwas.12595.

Patel, V.K., Soni, N., Prasad, V., Sapre, A., Dasgupta, S., Bhadra, B., 2019. CRISPR–Cas9 System for Genome Engineering of Photosynthetic Microalgae. Mol. Biotechnol. 61, 541–561. doi: 10.1007/s12033-019-00185-3.

Potvin, G., 2015. Development and Optimization of Novel Platforms for the Production of Recombinant Proteins. Université d’Ottawa/University of Ottawa. doi: 10.20381/ruor-4228

Rabia, S., Afzal, M., Shah, S.Z.H., 2017. Nutrient digestibility performance by rohu (Labeo rohita) juveniles fed acidified and phytase pre-treated sunflower meal-based diet. J. Appl. Anim. Res. 45, 331–335. doi: 10.1080/09712119.2016.1190731.

Reddy, N.R., 2001. Occurrence, distribution, content, and dietary intake of phytate. In: Food Phytates. CRC Press, pp. 41–68.

Roy, S., Kumar, V., Behera, B.K., Parhi, J., Mohapatra, S., Chakraborty, T., Das, B.K., 2022. CRISPR/Cas Genome Editing—Can It Become a Game Changer in Future Fisheries Sector? Front. Mar. Sci. 9, 924475. doi: 10.3389/fmars.2022.924475.

Scheben, A., Wolter, F., Batley, J., Puchta, H., Edwards, D., 2017. Towards CRISPR/Cas crops--bringing together genomics and genome editing. New Phytol. 216, 682–698. doi: 10.1111/nph.14702.

Segev-Hadar, A., Slosman, T., Rozen, A., Sherman, A., Cnaani, A., Biran, J., 2021. Genome editing using the CRISPR-Cas9 system to generate a solid-red germline of Nile tilapia (Oreochromis niloticus). Cris. J. 4, 583–594. doi: 10.1089/crispr.2020.0115.

In Press

Seruggia, D., Montoliu, L., 2014. The new CRISPR--Cas system: RNA-guided genome engineering to efficiently produce any desired genetic alteration in animals. Transgenic Res. 23, 707–716. doi: 10.1007/s11248-014-9823-y

Shahzad, M.M., Hussain, S.M., Jabeen, F., Hussain, A.I., Ahmad, S., Ashraf, A., Arsalan, M.Z.-H., 2017. Effect of phytase supplementation on mineral digestibility to Catla catla fingerlings fed Moringa oleifera leaf meal based test diets. Punjab Univ. J. Zool 32, 65–73.

Shin, S.E., Lim, J.M., Koh, H.G., Kim, E.K., Kang, N.K., Jeon, S., Kwon, S., Shin, W.S., Lee, B., Hwangbo, K., Kim, J., Ye, S.H., Yun, J.Y., Seo, H., Oh, H.M., Kim, K.J., Kim, J.S., Jeong, W.J., Chang, Y.K., Jeong, B.R., 2016. CRISPR/Cas9-induced knockout and knock-in mutations in Chlamydomonas reinhardtii. Sci. Rep. doi: 10.1038/srep27810.

Simora, R.M.C., Xing, D., Bangs, M.R., Wang, W., Ma, X., Su, B., Khan, M.G.Q., Qin, Z., Lu, C., Alston, V., others, 2020. CRISPR/Cas9-mediated knock-in of alligator cathelicidin gene in a non-coding region of channel catfish genome. Sci. Rep. 10, 22271. doi: 10.1038/s41598-020-79409-5.

Sun, Y., Yan, C., Liu, M., Liu, Y., Wang, W., Cheng, W., Yang, F., Zhang, J., 2020. CRISPR/Cas9-mediated deletion of one carotenoid isomerooxygenase gene (EcNinaB-X1) from Exopalaemon carinicauda. Fish \& Shellfish Immunol. 97, 421–431. doi: 10.1016/j.fsi.2019.12.037.

Sun, Y., Zheng, G.-D., Nissa, M., Chen, J., Zou, S.-M., 2020. Disruption of mstna and mstnb gene through CRISPR/Cas9 leads to elevated muscle mass in blunt snout bream (Megalobrama amblycephala). Aquaculture 528, 735597.doi:10.1016/j.aquaculture.2020.735597.

Turner, B.L., Richardson, A.E., Mullaney, E.J., 2007. Inositol phosphates: linking agriculture and the environment. CABI. doi: 10.1079/9781845931520.0000

Vikas, K., Debtanu, B., Kundan, K., Vikash, K., Mandal, S.C., Clercq, E. de, others, 2012. Anti-nutritional factors in plant feedstuffs used in aquafeeds. World Aquac. 43, 64–68.

von Danwitz, A., van Bussel, C.G.J., Klatt, S.F., Schulz, C., 2016. Dietary phytase supplementation in rapeseed protein based diets influences growth performance, digestibility and nutrient utilisation in turbot (Psetta maxima L.). Aquaculture 450, 405–411. doi: 10.1016/j.aquaculture.2015.07.026

Wang, Q., Liu, Y., Han, C., Yang, M., Huang, F., Duan, X., Wang, S., Yu, Y., Liu, J., Yang, H., others, 2021. Efficient RNA virus targeting via CRISPR/CasRx in fish. J. Virol. 95, 10–1128. doi: 10.1128/jvi.00461-21.

Wargelius, A., 2019. Application of genome editing in aquatic farm animals: Atlantic salmon. In: Transgenic Research. pp. 101–105. doi: 10.1007/s11248-019-00163-0

Xie, Q.-P., He, X., Sui, Y.-N., Chen, L.-L., Sun, L.-N., Wang, D.-S., 2016. Haploinsufficiency of SF-1 causes female to male sex reversal in Nile tilapia, Oreochromis niloticus. Endocrinology 157, 2500–2514. doi: 10.1210/en.2015-2049.

YILDIRIM, A., 2022. Fine-Tuning of Protein Extraction From Wall-Deficient Chlamydomonas reinhardtii Using Liquid Nitrogen and Sonication-Assisted Cell Disruption. Mar. Sci. Technol. Bull. 11, 32–40.doi: 10.33714/masteb.1057346.

Yoon, S.-M., Kim, S.Y., Li, K.F., Yoon, B.H., Choe, S., Kuo, M.M.-C., 2011. Transgenic microalgae expressing Escherichia coli AppA phytase as feed additive to reduce phytate excretion in the manure of young broiler chicks. Appl. Microbiol. Biotechnol. 91, 553–563. doi; 10.1007/s00253-011-3279-2

Yu, H., Li, H., Li, Q., Xu, R., Yue, C., Du, S., 2019. Targeted gene disruption in Pacific oyster based on CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein complexes. Mar. Biotechnol. 21, 301–309. doi: 10.1007/s10126-019-09885-y

Zadabbas Shahabadi, H., Akbarzadeh, A., Ofoghi, H., Kadkhodaei, S., 2023. Site-specific gene knock-in and bacterial phytase gene expression in Chlamydomonas reinhardtii via Cas9 RNP-mediated HDR. Front. Plant Sci. 14, 1–13. doi: 10.3389/fpls.2023.1150436.

Zhai, G., Shu, T., Chen, K., Lou, Q., Jia, J., Huang, J., Shi, C., Jin, X., He, J., Jiang, D., others,

In Press

2022. Successful production of an all-female common carp (Cyprinus carpio L.) population using cyp17a1-deficient neomale carp. Engineering 8, 181–189. doi: 10.1016 /j.eng.2021.03.026.

Zhong, Z., Niu, P., Wang, M., Huang, G., Xu, S., Sun, Y., Xu, X., Hou, Y., Sun, X., Yan, Y., others, 2016. Targeted disruption of sp7 and myostatin with CRISPR-Cas9 results in severe bone defects and more muscular cells in common carp. Sci. Rep. 6, 22953. doi: 10.1038/srep22953

Zhou, Q.-C., Tan, B.-P., Mai, K.-S., Liu, Y.-J., 2004. Apparent digestibility of selected feed ingredients for juvenile cobia Rachycentron canadum. Aquaculture 241, 441–451. doi: 10.1016/j.aquaculture.2004.08.044.

In Press