



# 大口黑鲈幼鱼响应饲料叶酸的肝脏差异表达基因分析 Liver differentially expressed genes in response to folic acid in the feed of juvenile largemouth bass (*Micropterus salmoides*)

杭莹<sup>1,2,3</sup> 华雪铭<sup>1,2,3\*</sup>  
Ying Hang<sup>1,2,3</sup> Xue Ming Hua<sup>1,2,3\*</sup>

1.上海海洋大学, 农业农村部环境生态与鱼类营养研究中心, 上海 201306; 2.上海海洋大学, 农业农村部淡水水生遗传资源重点实验室, 上海 201306; 3.上海海洋大学, 国家水产科学实验教育示范中心, 上海 201306

<sup>1</sup>Centre for Research on Environmental Ecology and Fish Nutrition (CREEFN) of the Ministry of Agriculture, Shanghai Ocean University, Shanghai, China, 201306, <sup>2</sup>Key Laboratory of Freshwater Aquatic Genetic Resources, Ministry of Agriculture, Shanghai, China, 201306, <sup>3</sup>National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai, China, 201306

第一作者 杭莹 联系邮箱: 1543270149@qq.com  
通讯作者 华雪铭 联系邮箱: xmhua@shou.edu.cn

## 背景介绍

叶酸是水溶性B族维生素的一种, 作为一碳单位的供体和受体, 以其辅酶四氢叶酸(THF)的形式参与氨基酸、核苷酸代谢等许多生理反应, 对于红细胞形成有促进作用, 参与动物体内遗传物质合成和蛋白质代谢, 通过辅酶在动物营养中发挥作用。近年来研究发现, 配合饲料中其他物质的添加, 水生动物养殖水体变化以及抗生素类的使用会影响动物自身的叶酸含量, 因而需额外添加。大口黑鲈(*Micropterus salmoides*)是典型的肉食性鱼类, 随着其养殖业的快速发展, 目前对于大口黑鲈饲料营养需求量日益重视, 对其饲料蛋白, 脂肪, 维生素A、维生素C, 维生素D, 维生素E和维生素K<sub>3</sub>等需求已有报道, 但未见对于叶酸需求量的研究。本实验室前期研究发现, 饲料中添加适量叶酸促进大口黑鲈幼鱼的生长。为探究叶酸促生长的可能分子机制, 对摄食无叶酸饲料和1.5mg/kg叶酸饲料7周的大口黑鲈幼鱼肝脏组织进行了高通量测序及荧光定量(qRT-PCR)验证。

## 材料方法



## 结果

### Unigene的组装

本实验共拼接出 Unigene 48943 条 (>=300 bp, 总长度为74837456 bp, 平均长度为1529 bp. 其中长度 >=500 bp 的 Unigene 31486 条, 长度 >=1000 bp 的 Unigene 19762 条, N50 为3042 bp.

表1: 拼接结果统计

Term	All(>300bp)	>=500bp	>=1000bp	N50	Total Length	Max Length	Min Length	Average Length
Unigene	48943	31486	19762	3042	74837456	25980	301	1529.07

注: 1. All(>300bp): 长度>=300 bp的Unigene数量; 2. >=500bp: 长度>=500 bp的Unigene数量; 3. >=1000bp: 长度>=1000 bp的Unigene数量; 4. N50: 将各个序列按长度大小排序, 从大到小逐一扫描各个序列的长度值, 进行累加, 当该累加值第一次超过所有序列总长的50%时, 此时扫描到的序列的长度即为 N50; 5. Total\_Length: 总的Unigene的碱基数; 6. Max\_Length: 最长Unigene长度; 7.Min Length: 最短Unigene长度; 8.Average Length: 平均长度。

### Unigene的功能注释

Unigene 各数据库注释比例统计维恩图见图1. 其中23491个基因注释到 NR 库 (图2), 18485个基因注释到 Swissprot 库, 13458个基因注释到 KEGG 库 (图3), 13848个基因注释到 KOG 库 (图4), 21171个基因注释到 eggNOG 库 (图5), 16851个基因注释到 GO 库 (图6), 15829个基因注释到 Pfam 库。

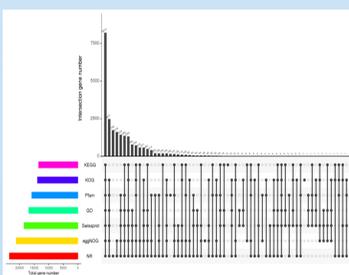


图1: 各数据库注释维恩图

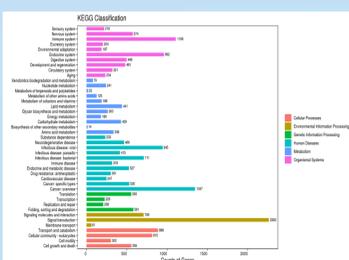


图3 Level2水平下的KEGG注释统计

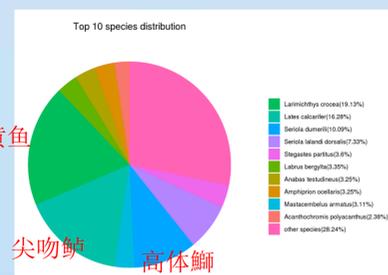


图2 Nr库Top10物种分布图

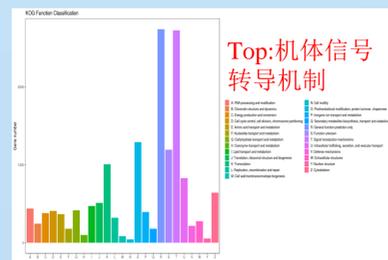


图5. KOG功能分类图

## 结论

1.5mg/kg叶酸添加组和无叶酸组相比, 共检测到638个差异基因, 其中有266个基因上调表达, 372个基因下调表达, 注释到KEGG pathway下的上调差异表达基因有23个, 65个下调差异表达基因。主要参与翻译转录, 氨基酸代谢, 辅酶因子和维生素代谢, 脂质代谢, 糖代谢, 消化和免疫等通路。随机挑选10个差异表达基因进行RT-PCR验证, 验证结果趋势与测序结果吻合度较高, 说明转录组测序结果可信度较高。研究结果为进一步分析叶酸的促生长表观调控机制提供了参考。

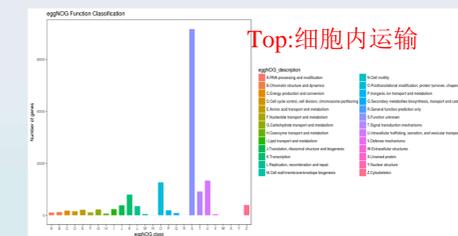


图5 eggNOG功能分类图

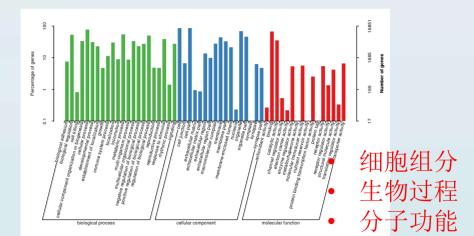


图6 GO功能分类图

### 差异表达基因

筛选 筛选差异条件为p-value<0.05 且差异倍数大于2, 以无叶酸为对照组, 其检测到638个差异基因

### 富集分析

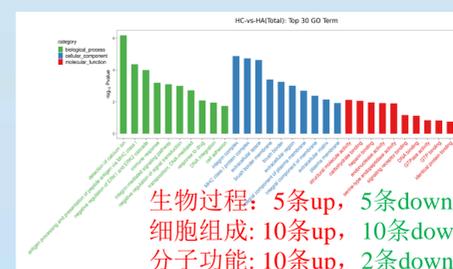


图7 差异Unigene GO富集结果

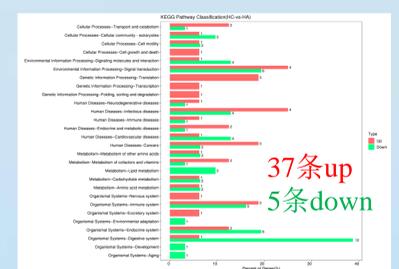


图8 差异表达 Unigene 在 KEGG 二级水平分布图

### 转录组结果验证

表2 Real-time PCR 引物设计

Num	Gene Symbol	Forward primer(5->3)	Reverse primer(5->3)
1	鲈鱼actin	TGTGCAAGCCGGATTCC	CCTCTTGTCTCTGGGCTTCA
2	HMOX	TTGTGGCCAGTTAGGATG	CTGTACGGCACAAATCGGA
3	MTFMT	TGTGCTCCCTTTGTGGCTA	TCTCAACCAGGAGTTCATC
4	DDIT4	GTATTGAGCCTGGGTCTAAC	TAGAGGGACACAGGTCACCTA
5	CEBPB	CACAACATCCGACAGTTGA	TGGAGGGCTGAGATGAGAC
6	MHC1	AAACCACAGGCTGTCATC	ACACTCTGGGTCAGGTA
7	RAC3	GAAACCAGTGAATCTGGGC	ACATCAAGAACACATCCGTC
8	NFKBIZ	TGGCTTCTGAGGAGGCAA	CTGTGTTTCCACTGAAGGT
9	ACE	CAGAAITGCCAGGAATCCG	CTTCCAGCATGGATTGT
10	ITGB4	CTGCTGGAAGTCTGTGC	CTTGAAGCCAACCATCGGA
11	PRKAB	AGTGTCTGGATCATGGATCT	TCAGCGCAACACACCGATA

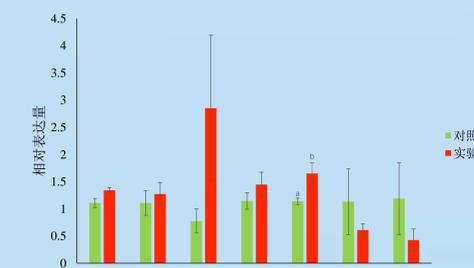


图9 7个与转录组结果趋势一致的差异基因表达量