

大黄鱼肌肉HUFA含量相关候选基因rnf5功能研究

尹存¹, 徐若茜¹, 方铭^{1*}, 王志勇^{1*}

集美大学水产学院农业农村部东海海水健康养殖重点实验室, 福建 厦门 361021

引言

全球水产养殖业迅猛发展, 水产饲料工业对鱼油的需求与日俱增, 而全球渔业资源日渐枯竭, 鱼油产量不断下降, 二者的矛盾日益尖锐, 使得鱼油价格节节攀升, 给饲料企业带来了沉重的成本。从分子角度探究大黄鱼个体间高不饱和脂肪酸的遗传机制, 对于后续培育具有转化HUFA能力强的大黄鱼品系具有重要意义。

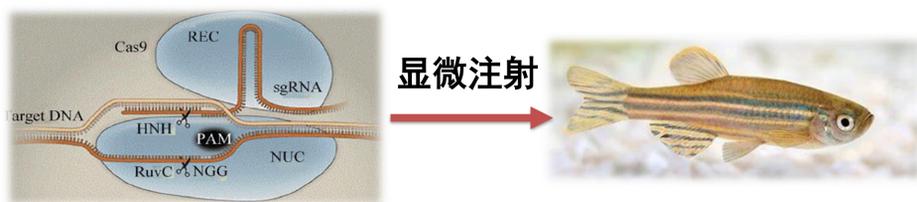
本课题组周锐涛等通过对大黄鱼肌肉粗脂肪中各脂肪酸含量、各脂肪酸相对含量和脂肪酸代谢性状的全基因组关联分析, 最后联合GWAS与eQTL进行共定位分析筛选到与脂肪酸代谢相关的候选基因有rnf5等, 说明这些基因在大黄鱼脂肪酸代谢过程中可能扮演着十分重要的角色。

本研究将以斑马鱼为受体鱼通过转基因及基因敲除技术来探究大黄鱼脂肪酸性状相关候选基因的功能, 为今后大黄鱼转基因优良品种的选育及功能基因开发提供重要的参考资料。

方法

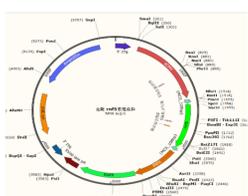
基因敲除品系构建

1. 设计sgRNA, 寻找高敲除效率的靶点。
2. 有效sgRNA与cas9蛋白共注射斑马鱼受精卵, 得F0代。
3. F0代阳性鱼与野生型杂交, 得到F1代。
4. 将F1代相同突变类型的个体自交, 得到F2代。
5. 将F2代纯合子与对照组做HUFA含量差异分析, 表型分析, 转录组测序分析等。



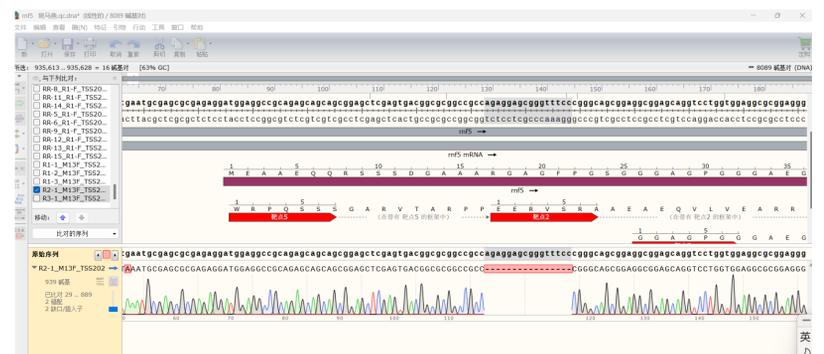
转基因品系构建

1. 构建重组质粒。
2. 将质粒与Tol2转座酶显微注射到斑马鱼受精卵。
3. 筛选到F0代阳性鱼与野生型杂交, 得到F1代。
4. 筛选出转基因F1代与野生型杂交, 获得稳定遗传的F2代。
5. 将F2代转基因鱼与对照组做HUFA含量差异分析, 表型分析, 转录组测序分析等。



结果

1. 基因敲除



Rnf5基因敲除靶点测序图

Rnf5基因F2代缺失16bp氨基酸序列

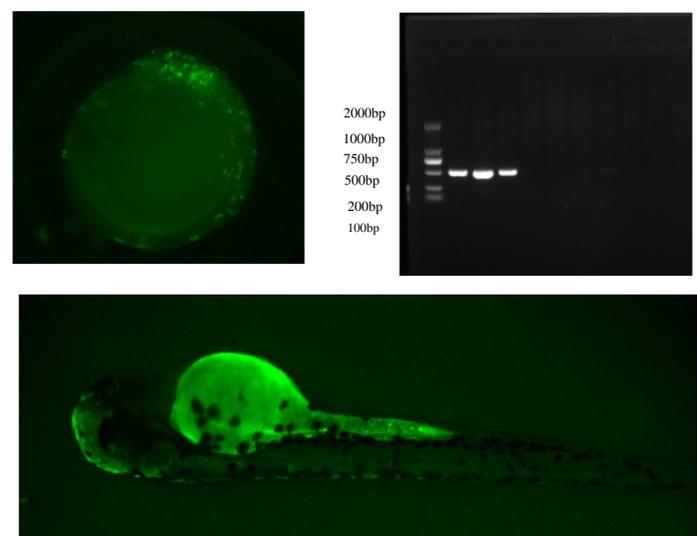
```
MEAAEQQRSSSDGAAARAAEQVLVEARRASGTENGLSSAIS
AWTPPETRSSASVDTCSVGRVFISGWRRVPADSSVPCVKQESAVI
K*****
```

Rnf5基因F2代完整氨基酸序列

```
MEAAEQQRSSSDGAAARGAGFPGSGGGAGPGGAEGERDRER
ATFECNICLDTARDAVISLFCGHLFCWPCLHQWLETRPSRQQCPVC
KAGISRDKVIPLYGRGSSSQEDPRLKTPPRPQQQRSEPESESRGPFQ
GFGDTGFHMSFGIGAFPFQFFTTVFNTNPFHRADAHYGADQQA
NENANNNGNNWQDSLFLFLAIFFFFWILSV
```

2. 转基因

Rnf5转基因荧光图与电泳图



显微注射8h, 60h后用荧光显微镜观察如图, 荧光图初步显示基因在斑马鱼胚胎表达, 在斑马鱼成年后, 剪尾鳍提DNA, 扩pcr, 跑电泳条带, 电泳图进一步确定rnf5基因在斑马鱼中成功表达。

结论

- Rnf5转基因敲除与转基因品系构建完成。
- Rnf5基因敲除F0代、F1代、F2代鉴定筛选完成, rnf5转基因F0代筛选完成。
- 后续将F2代纯合子与对照组做HUFA含量差异分析, 表型分析, 转录组测序分析等。