

## 大黄鱼 *amy* 和 *slc5a1* 基因耐高糖功能研究

王颖, 方铭\*

### 引言

#### 大黄鱼 (*Larimichthys crocea*)

硬骨鱼纲、鲈形目、石首鱼科、黄鱼属。俗称黄鱼、大黄花鱼、黄瓜鱼等。是我国特有的重要海水经济鱼类，也是我国目前海水养殖量最大的经济鱼类。培育优良的亲鱼有利于大黄鱼增产增收，其中生长性状是评价大黄鱼亲鱼的重要指标。

淀粉是植物中重要的碳水化合物，也是鱼类的主要能源物质之一，饲料中添加适量的淀粉对鱼类具有一定的蛋白质节约作用，但是鱼类利用淀粉的能力十分有限。通过转基因及基因编辑技术来探究大黄鱼生长性状相关基因的功能以及耐高糖的能力，为今后大黄鱼转基因优良品种的选育、功能基因以及对饲料中糖类物质的添加量有重要的作用。本研究利用斑马鱼作为研究载体。



利用Tol2转座系统构建转基因斑马鱼。将Tol2转座酶质粒进行体外转录获得Tol2ase mRNA，进行斑马鱼胚胎注射时，注射液配比为：转基因质粒：Tol2ase mRNA：酚红=1：1：0.1

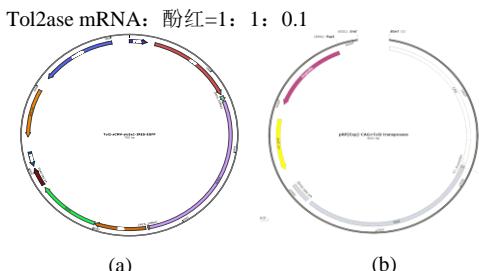


图3 转基因重组载体图谱  
(a) *slc5a1* 转基因载体 (b) Tol2转座酶质粒

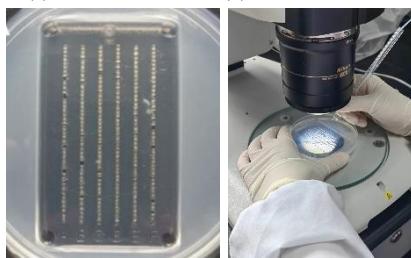


图4 斑马鱼显微注射操作  
(a) 胚胎排列在注射用培养皿凹槽中 (b) 在显微镜下左手扶盘右手持针进行注射

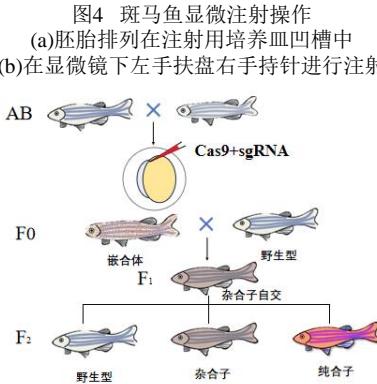


图5 构建基因敲除F2代斑马鱼流程

### 方法

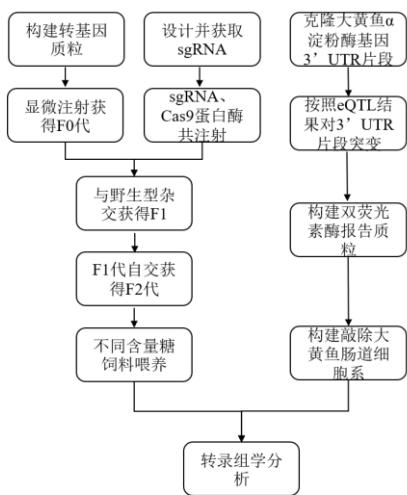


图1 研究过程技术路线图

在CRISPR-Cas9系统中长度约20bp的外源DNA可以作为短的回文重复序列整合在CRISPR基因组中，转录加工成CRISPR RNA(crRNA)。这些crRNA会与trans-activating crRNA(tracrRNA)形成一种双链二级结构。在这两种RNA的引导下，Cas9蛋白的HNH结构域能够特异性识别与crRNA互补配对的模板链并实现切割，切割位点位于原间隔序列毗邻基序(Protospacer adjacent motif PAM)上游3nt处; RuvC-like结构域参与另一条链特定位点的切割。切割位点位于PAM上游3-8nt处。设计不同的sgRNA可以指导Cas9内切酶完成对DNA的定点切割，形成DSB。

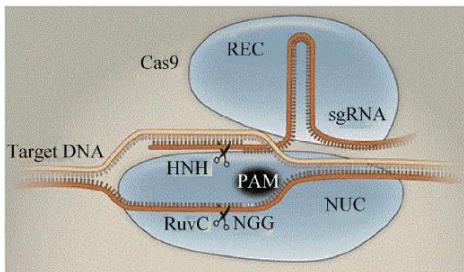


图2 CRISPR-Cas9 定点诱变示意图

### 结果

Genomic coordinates and sequence details for the *amy* gene region.

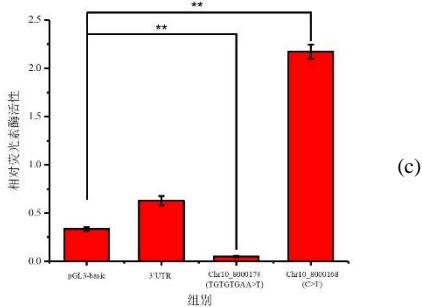


图6 大黄鱼 *amy* 3' UTR 相关结果  
(a) 肝脏eQTL结果 (b) 针对eQTL对 *amy* 3' UTR 点突变 (c) 大黄鱼 *amy* 3' UTR 不同突变片段荧光素酶活性

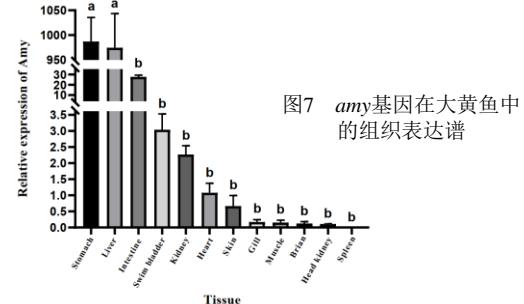


图7 *amy* 基因在大黄鱼中的组织表达谱

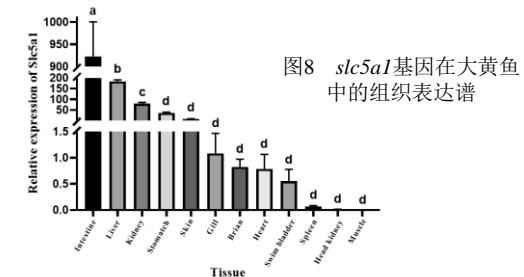


图8 *slc5a1* 基因在大黄鱼中的组织表达谱

以  $\beta$ -actin 为内参基因检测 *amy*、*slc5a1* 基因在成年大黄鱼组织表达情况，发现 *amy* 在胃和肝脏高表达，而 *slc5a1* 在肠道特异表达。



图9 转基因斑马鱼胚胎荧光观察图

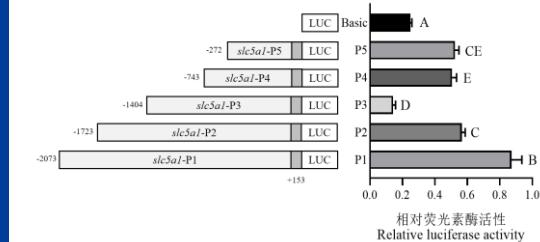


图10 大黄鱼 *slc5a1* 基因启动子不同长度片段活性分析

### 结论及展望

根据 *amy* 基因在大黄鱼的组织表达谱，结合本实验室已有的eQTL结果以及双荧光素酶报告系统可知，缺失突变(8000174号突变)会抑制荧光表达，而单碱基突变(8000168号突变)会增加荧光素酶活性。推测该基因3' UTR区域突变后使miRNA结合减少，导致表达量增加。

后续将在大黄鱼肠道细胞上进行单碱基编辑，进一步验证8000168号突变是否能增加该基因的表达量。

### 致谢

感谢国家自然科学基金(31672399, U1705231, 31872560, 32172964)、福建省自然科学基金重点项目、影响大黄鱼生长差异的主效基因及功能突变鉴定(2021J02045)和福建省种业创新与产业化工程项目大黄鱼新品种选育(2021FJSCZY01)给予本研究的资助。