

DOI: 10.12264/JFSC2022-0246

## 吉富罗非鱼硬脂酰辅酶 A 去饱和酶基因克隆、表达及其在斑马鱼中的转植研究

冯田田<sup>1</sup>, 陶易凡<sup>3</sup>, 马昕羽<sup>2</sup>, 路思琪<sup>3</sup>, 张幸<sup>1</sup>, 刘文婷<sup>2,3</sup>, 潘奕凡<sup>2</sup>, 强俊<sup>1,2,3</sup>

1. 南京师范大学食品与制药工程学院, 江苏 南京 210023;

2. 南京农业大学无锡渔业学院, 江苏 无锡 214081;

3. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心, 农业农村部淡水渔业与种质资源利用重点实验室, 江苏 无锡 214081

**摘要:** 硬脂酰辅酶 A 去饱和酶(stearoyl-CoA desaturates, SCD)是单不饱和脂肪酸合成的关键限速酶, 它在调节肝脏脂肪生成、脂肪酸代谢和脂质氧化方面发挥着重要作用。在本研究中, 利用 RACE 技术克隆了吉富罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)的完整 *scd* cDNA 序列, qRT-PCR 分析了组织表达特点。为了验证 *scd* 基因的功能, 利用 CRISPR/Cas9 技术构建 *scd* 基因敲除斑马鱼模型, 研究了 F<sub>3</sub> 突变体的表型和基因表达变化, 并结合高脂饲料实验验证了 *scd* 基因缺失后斑马鱼脂代谢的调控机制。结果显示, 吉富罗非鱼 *scd* cDNA 序列全长 1333 bp, 其中包括 173 bp、1008 bp、152 bp 的 5'非编码区、开放阅读框和 3'非编码区, 编码 335 个氨基酸。*scd* 基因在雄性和雌性罗非鱼的组织中都有表达, 在肝脏内表达量最高, 脾脏内表达量最低。利用 CRISPR/Cas9 构建了 *scd* 基因敲除的斑马鱼(*Danio rerio*)模型进行功能验证, 与野生型[SCD<sup>(+/+)</sup>]斑马鱼相比, 纯合型[SCD<sup>(-/-)</sup>]斑马鱼腹部明显膨大。Western blot 和 qRT-PCR 结果显示, 与 SCD<sup>(+/+)</sup>组斑马鱼相比, *scd* 基因在 SCD<sup>(-/-)</sup>组斑马鱼中表达显著降低( $P < 0.05$ ), 且 SCD 蛋白在 SCD<sup>(-/-)</sup>组斑马鱼表达丰度也显著降低( $P < 0.05$ )。在高脂饲料(high fat dietary, HFD, 脂肪含量 16%)投喂下, 与 HFD+SCD<sup>(+/+)</sup>组斑马鱼相比, HFD+SCD<sup>(-/-)</sup>组斑马鱼肝组织细胞中红色脂滴明显减少。qRT-PCR 结果显示, *scd* 基因敲除后, 与 SCD<sup>(+/+)</sup>组斑马鱼相比, SCD<sup>(-/-)</sup>组斑马鱼中 *scd* mRNA 表达量显著降低( $P < 0.05$ ), 而 SCD<sup>(-/-)</sup>组斑马鱼肝脏中 *lpl*、*fas*、*hsl* mRNA 表达量均显著升高( $P < 0.05$ )。与投喂对照组饲料的斑马鱼相比, 高脂饲料投喂能显著升高其肝脏 *scd* mRNA 表达量与抑制 *fas* mRNA 表达量( $P < 0.05$ )。研究结果表明 *scd* 基因敲除可以缓解高脂饲料投喂下斑马鱼肝脏的脂肪沉积, *scd* 基因在鱼类脂肪酸代谢和脂质合成中可能发挥了重要作用。

**关键词:** 吉富罗非鱼; 硬脂酰辅酶 A 去饱和酶; 基因克隆; 斑马鱼; CRISPR/Cas9; 脂质代谢

中图分类号: S961

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2023)01-0011-14

吉富罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)由于其优异的生长性能和抗病性, 具有很高的适销性和潜在的广阔市场<sup>[1]</sup>。近年来, 随着集成化养殖罗非鱼的快速发展<sup>[2]</sup>, 各种代谢疾病如营养性脂肪肝病<sup>[3]</sup>也日趋严重, 严重的脂肪肝会引起肝功能衰竭造成罗非鱼死亡, 因此, 为了治疗或缓解罗非鱼营养性脂肪肝病, 了解脂质代谢机制尤为重要。

硬脂酰辅酶 A 去饱和酶(stearoyl-CoA desaturase, SCD)是一种调节脂质代谢的关键酶<sup>[4]</sup>, 在脂肪代谢中扮演着重要角色, 在催化棕榈酸(C16:0)和硬脂酸(C18:0)形成油酸(C18:1)和棕榈油酸(C16:1)的过程中起重要作用<sup>[5]</sup>, 其中油酸和棕榈酸是甘油三酯、胆固醇酯和膜磷脂合成的两种必需单不饱和脂肪酸(monounsaturated fatty acid,

收稿日期: 2022-07-12; 修订日期: 2022-08-05.

基金项目: 国家自然科学基金项目(31502143; 32002363); 中国水产科学研究院基本科研业务费专项(2020TD37; 2021XT08).

作者简介: 冯田田(1996-), 女, 硕士研究生, 研究方向为水产生物技术. E-mail: ftt17865815919@163.com

通信作者: 强俊, 研究员, 研究方向为水产生物技术. E-mail: qiangj@ffrc.cn

MUFA), 这些由 SCD 参与合成的 MUFA 影响着细胞膜信号传导、抗氧化以及脂代谢调控等重要生理过程<sup>[6]</sup>。虎皮鱼(*Puntius tetrazona*) *scd-1* 基因在肝脏组织的高表达<sup>[7]</sup>表明, *scd* 可能参与了肝脏调控脂肪酸的合成和代谢。在高脂饮食诱导的小鼠模型中, *scd* 基因敲除减少了动物体内脂肪组织的比例, 降低了胰岛素抵抗, 并显著改善了肥胖相关的症状<sup>[8]</sup>。在日粮中添加椰子油可以显著增加杂交罗非鱼(*Oreochromis aureus* ♂ × *O. niloticus* ♀)<sup>[9]</sup>和吉富罗非鱼<sup>[10]</sup>的 *scd* 转录水平以及脂质积累。且有报道指出, *scd* 基因表达的增加可以促进尼罗罗非鱼肌肉中 MUFAs 的生物合成<sup>[11]</sup>, 而 MUFAs 能够降低体重、体脂肪和改善肝脂肪变性, 对于预防和缓解脂肪肝具有重要作用<sup>[12]</sup>。这些研究表明 *scd* 基因可能与脂肪肝病理变化密切相关, 但其在鱼类脂质代谢中的调控机制仍然缺乏深入理解。

斑马鱼(*Danio rerio*)作为发育生物学的模式动物, 繁殖能力强, 发育快速<sup>[13]</sup>, 可以缩短实验周期, 是研究营养代谢的优秀动物模型, 也是肝脏疾病模型的研究热点<sup>[14]</sup>。近年来, 斑马鱼已广泛应用于肝脏代谢相关的疾病研究中, 如高脂血症、酒精性脂肪肝、非酒精脂肪肝、肝纤维化、肝硬化、肝炎和肝癌等, 且大多数斑马鱼都不存在近亲繁殖, 故不会对期望表型产生重大影响<sup>[15]</sup>。因此, 本研究以吉富罗非鱼为研究对象, 采用 RACE 技术对吉富罗非鱼的 *scd* 基因进行克隆, 分析 *scd* 基因组织表达模式及构建物种进化树, 并在斑马鱼中进行相关功能的验证。通过 CRISPR/Cas9 技术对斑马鱼 *scd* 基因进行编辑, 探究 *scd* 在斑马鱼脂肪代谢中的调控作用, 以期作为 *scd* 基因在鱼类分子育种中的合理应用提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

实验用鱼选自中国水产科学研究院淡水渔业研究中心宜兴基地, 实验开始前将鱼放入室内 450 L 循环水饲养桶(水温 28 °C±0.5 °C, pH 7.5±

0.2, 溶解氧 ≥ 6.0 mg/L)中暂养 2 周。每天投喂体重 5% 的商品饲料(购自安徽天邦饲料科技有限公司: 粗蛋白 ≥ 35%, 粗脂肪 ≥ 3%, 粗纤维 ≤ 8%, 粗灰分 ≤ 18%, 水分 ≤ 12%)两次(8:00 和 16:00)。同时, 野生型 TU 品系斑马鱼购自国家斑马鱼资源中心, 每日两次(8:00 和 16:00)投喂商品饲料(购自山东升索渔用饲料研究中心: 蛋白质 50%、脂肪 8%、纤维 3%、灰分 16%、水分 12%), 在循环水系统(水温 28 °C±0.5 °C, pH 7.5±0.5, 溶解氧 7.0~7.5 mg/L)中驯化 2 周。

### 1.2 吉富罗非鱼总 RNA 的提取与 *scd* 基因克隆

随机选取雌雄罗非鱼(体重约 500 g)各 9 尾, 深度麻醉(MS-222, 200 mg/L)后, 解剖取其血、肝、心、脾、肌肉、肾、脑、鳃、皮、前肠、后肠和性腺(精巢/卵巢)组织, 液氮速冻后, -80 °C 保存用于 *scd* 不同组织表达分析。

按照 Trizol Reagent 的使用方法从吉富罗非鱼肝脏组织样本中提取总 RNA<sup>[16]</sup>。RNA 的完整性和浓度采用凝胶成像系统和 NanDrop 分光光度计检测。以肝组织中的总 RNA 为模板, 利用 PrimeScript™ II 1st Stand cDNA Synthesis Kit 试剂盒进行反转录, 并将转录产物置于 -20 °C 冰箱中保存使用。根据 NCBI 上查得的尼罗罗非鱼 *scd* 基因的 mRNA 序列(XM\_005471382.2), 利用 primer5.0 软件进行引物设计(表 1)。使用吉富罗非鱼的 cDNA 为模板, 对 *scd* 基因的中间片段进行克隆。PCR 反应条件为: 95 °C 3 min; 95 °C 1 min, 59 °C 40 s, 72 °C 40 s, 30 个循环; 72 °C 7 min。将 PCR 产物分离纯化, 选择阳性菌落进行测序。*scd* 基因 5'和 3'端序列按同样方法进行克隆<sup>[17]</sup>。

### 1.3 斑马鱼 *scd* 基因 CRISPR/Cas9 敲除系统构建

**1.3.1 *scd* 基因序列分析** 利用 NCBI ORF Finder 对 *scd* 基因开放阅读框(open reading frame, ORF)进行研究。NCBI BLASTn 与 BLASTp 结合分析其核苷酸、序列同源性。在 GenBank 上进行同源检索, 采用 Jalview、Clustal 软件对多物种的 *scd* 基因和氨基酸序列比对, 通过 MEGA7.0 (neighbor-joining 法)构建进化树并分析比较各个不同物种间亲缘关系的远近。

表 1 本研究中所使用的引物序列  
Tab. 1 Primers used in gene cloning

引物 primer	引物序列(5'-3') primer sequence (5'-3')	扩增目标 amplification target
<i>scd</i> F <sub>1</sub>	GATCACACGTACAAAGAGAAAGAGG	<i>scd</i> partial sequence PCR
<i>scd</i> R <sub>1</sub>	TGAGCAAAGAAAAAGCCGC	
<i>scd</i> F <sub>2</sub>	TTCGTCCCAACTCTGCTTAGG	<i>scd</i> 5' PCR
<i>scd</i> R <sub>2</sub>	TGGAGATTCTTCTATCGGTCGT	
5' GSP1	5'AGCAAGGTCAAACGAG3'	<i>scd</i> 3' PCR
5' GSP2	5'GCTGAAGGGACGACGAAC3'	
5' GSP3	5'CGTAAAAGGCTCCTATGTGC3'	
3' 788-1	5'CTTGGTGCTGAACGCTACCTGGCTG3'	<i>scd</i> 3' PCR
3' 788-2	5'TGGGAAAACAGGCCCTATGACAAGA3'	
<i>scd</i> -F	GCCCCAAGCCTCCTATGAAA	<i>scd</i> qRT-PCR
<i>scd</i> -R	CCACCATACACGAAACACGC	
<i>fas</i> -F	AACCACCCAAAAGACGCGAG	<i>fas</i> qRT-PCR
<i>fas</i> -R	TGCTGTTGCTTTTTCCCGA	
<i>hsl</i> -F	CGGCAAGGACAGGACAGT	<i>hsl</i> qRT-PCR
<i>hsl</i> -R	GCATGGAGAAAAGAGGAGCT	
<i>lpl</i> -F	CAGTCTTGGCGCTCATGTTG	<i>lpl</i> qRT-PCR
<i>lpl</i> -R	ACGGGTGTTGGTGTGAAGAA	
$\beta$ -actin-F	ACTCAGGATGCGGAAACTGG	$\beta$ -actin qRT-PCR
$\beta$ -actin-R	AGGGCAAAGTGGTAAACGCT	

**1.3.2 sgRNA 模板的合成** 收集野生型胚胎并自然交配, 选择 24 hpf 的斑马鱼来制备目标基因组 DNA 模板。在 NCBI 中查询斑马鱼 *scd* 基因基本信息, 使用 CRISPR 在线设计工具 (<http://crispr.mit.edu/>), 在斑马鱼 *scd* 基因的第三外显子序列设计 sgRNA, 筛选出 4 条 sgRNA (表 2)。PCR 反应的条件为: 95 °C 3 min, 35×(95 °C 30 s, 56 °C 30 s, 72 °C 30 s), 72 °C 10 min, 4 °C。以上 PCR 产物采用 PCR clean up(Axygen)试剂盒进行采集。回收溶剂是不含核酸的超纯水, 每一次的回收量为均 14  $\mu$ L。为检测回收质量, 采用 1  $\mu$ L 的琼脂糖凝胶(1%)进行电泳, 以测定其质量。

**1.3.3 sgRNA 的体外转录** 利用 T7 RNA 聚合酶在体外转录纯化的模板。按 RNA 体外转录试剂盒

表 2 sgRNA 序列  
Tab. 2 sgRNA sequence

名称 name	序列(5'-3') sequence (5'-3')
<i>scd</i> -sgRNA1-F	GAAGGCCATGGAGTTTCCGA
<i>scd</i> -sgRNA2-F	GGAAAGATGCGCAGAGGTAAAG
<i>scd</i> -sgRNA3-F	GGCTGCAGGCGTTCACAGATTG
<i>scd</i> -sgRNA4-F	GGTGGTCTGGGCATCACTGC

的说明书规定, 依次加入 10×Transcription Buffer 2  $\mu$ L、10 mmol/L ATP 1  $\mu$ L、10 mmol/L CTP 1  $\mu$ L、10 mmol/L GTP 1  $\mu$ L、10 mmol/L UTP 1  $\mu$ L、T7 RNA polymerase mix 2  $\mu$ L、模板 DNA 12  $\mu$ L, 离心混匀后, 37 °C 水浴 1 h。加入 DNase I (Ambion, USA) 1  $\mu$ L, 37 °C 水浴 15 min。随后加入 80  $\mu$ L DEPC 水, 同时加入 pH5.2 的无核酸酶 3 mol/L 醋酸钠 10  $\mu$ L 以及 3 倍体积的无水乙醇, 置于 -80 °C 冰箱中沉淀 24 h。4 °C 12000 g 离心 20 min, 倒去上清液, 加入 75% 的无核酸酶的乙醇, 4 °C 12000 g 离心 20 min, 去除上清后, 沉淀于通风橱晾干, 再以 20  $\mu$ L 无核酸酶超纯水重悬后储存于 -80 °C 冰箱备用。采用 1  $\mu$ L 的琼脂糖凝胶(1%)进行电泳, 以测定其质量。

**1.3.4 斑马鱼 *scd* 基因敲除突变体的筛选** 采用塑料筛网架空鱼缸底部的方法收取斑马鱼受精卵。将 4 条最终浓度为 100 ng/ $\mu$ L 的 sgRNA 和 200 ng/ $\mu$ L 的 Cas9 蛋白充分混合, 在显微镜下注入斑马鱼受精卵, 注射量为每胚胎 1 nL。

将上述 P<sub>0</sub> 代胚胎饲养至性成熟, 然后分组进行雌雄 1 比 1 交配, 获得 F<sub>1</sub> 胚胎。通过对 F<sub>1</sub> 胚胎进行基因型鉴定, 确定携带可种系遗传突变等位基因的阳性 P<sub>0</sub>。选取筛选出的阳性 P<sub>0</sub> 进行自交, 将 F<sub>1</sub> 胚胎饲养至 2 月龄, 鉴定基因型后, 再进行 *scd* 基因编辑的突变体的筛选。

将 F<sub>1</sub> 的 SCD<sup>(+/-)</sup>(-74 bp, 雌)突变体与 SCD<sup>(+/+)</sup>斑马鱼进行交配, 收取 F<sub>2</sub> 胚胎并置于鱼房(28 °C 室温环境下)按常规方法饲养; 待胚胎生长至约 2 月龄时进行基因型鉴定。将性成熟的携带 *scd* 突变(-74 bp)F<sub>2</sub> SCD<sup>(+/-)</sup>斑马鱼进行 1 对 1 自交, 获得 F<sub>3</sub>。同一批次的正常鱼苗在孵化期间每天喂食两次, 作为对照组。

#### 1.4 斑马鱼高脂饲料投喂

选取生长发育良好的 F<sub>3</sub> SCD<sup>(+/+)</sup>斑马鱼, 随机分为 2 组(每组 3 个 20 L 鱼缸, 每个鱼缸 15 尾), 正常溶解氧(DO=7.0~7.5 mg/L)条件下培养, SCD<sup>(-/-)</sup>斑马鱼同上。对照组和实验组分别饲喂对照饲料(normal fat dietary, NFD, 脂肪 7%)和高脂饲料(high fat dietary, HFD, 脂肪 16%)。颗粒饲料的制作步骤如下: 将原料磨成粉末, 用 60 目滤网筛分。

称量混合后,依次加入油和蒸馏水。混合料由直径为 2.0 mm 的模具螺旋压片机制粒,将干燥后的颗粒粉碎至粒度在 20~40 目,饲料储存在 -20 °C。饲料配方详见表 3,每天投喂两次(8:00 和 16:00),实验期 8 周。

表 3 饲料配方及营养成分  
Tab. 3 Feed formulation and nutrients levels

原料 ingredient	%	
	NFD	HFD
大豆浓缩蛋白 soybean protein concentrate	30	30
玉米淀粉 corn starch	36	36
大豆油 sunflower oil	7	16
复合维生素 vitamin mix	0.3	0.3
复合矿物盐 mineral mix	0.1	0.1
氯化胆碱 choline chloride	0.3	0.3
赖氨酸 lysine	0.15	0.15
甲硫氨酸 methionine	0.15	0.15
羧甲基纤维素 carboxymethyl cellulose	4	4
纤维素 cellulose	22	13
营养成分 nutrients compositions		
脂肪 lipid	7.3	17.4
蛋白质 protein	36.8	36.8
碳水化合物 carbohydrate	34.6	34.1
水 moisture	8.5	7.9
矿物质 ssh	2.5	2.6

### 1.5 样本采集

高脂投喂试验结束后,随机选取 NFD 和 HFD 组 SCD<sup>(+/+)</sup>和 SCD<sup>(-/-)</sup>斑马鱼各 27 尾(每个养殖缸各 9 尾),深度麻醉(MS-222, 200 mg/L)后,剖取其肝脏,每尾鱼的肝脏分为 3 份,其中 1 份置于装有 4%多聚甲醛的 EP 管中;剩余 2 份在液氮速冻后, -80 °C 保存用于后续 qRT-PCR 和 Western-blot 实验。

### 1.6 肝脏油红 O 染色切片的制备

肝脏组织在 4%多聚甲醛中固定 24 h 后, 70%乙醇脱水, 经过 20%蔗糖脱水 24 h, OCT 包埋, 在 -20 °C 条件下切成厚度为 15 μm 的薄片贴附在玻片上, 经过蒸馏水和 60%异丙醇浸泡后, 用油红染色 15 min, 蒸馏水冲洗 30 s, 用苏木精复染 3 min, 在光学显微镜下观察。

### 1.7 实时荧光定量 PCR 检测

以提取的斑马鱼总 RNA 为模板, 使用 HiScript III RT SuperMix for qPCR (+gDNA wiper)

试剂盒(Vazyme)反转录获得 cDNA, 反转录反应条件为 42 °C 2 min, 37 °C 15 min, 85 °C 5 s。根据获得的斑马鱼 *scd* 基因以及 *lpl*、*fas* 和 *hsl* 4 种基因序列设计 PCR 特异引物(表 1), 以  $\beta$ -actin 基因作为内参。通过 qRT-PCR 技术检测 *scd* 基因敲除斑马鱼肝脏中 *scd*、*fas*、*hsl* 和 *lpl* 四种基因 mRNA 的表达变化。qRT-PCR 根据 ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix 试剂盒(Vazyme)进行操作, PCR 反应条件为 95 °C 30 s, 95 °C 3 s, 60 °C 30 s, 40 个循环; 95 °C 15 s; 60 °C 60 s; 95 °C 15 s。每个样品重复实验 3 次, 根据荧光定量 PCR 测得的  $C_t$  值, 利用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法<sup>[18]</sup>计算各基因 mRNA 的相对表达量。

### 1.8 Western-blot 检测

Western Blot 检测参考 Qiang 等<sup>[19]</sup>的研究, 取 0.1 g 斑马鱼肝脏组织块剪碎, 液氮研磨后加入 1 mL 蛋白质裂解液(RIPA), 冰上裂解 30 min, 4 °C, 12000 转离心 15 min, 收集上清液转移至新 EP 管中, 并用蛋白试剂盒(南京建成, 江苏)检测样本蛋白浓度; 将 20 μg 总蛋白(与 6×十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)蛋白上样缓冲液混合)在 100 °C 加热变性 10 min, 制备 SDS-PAGE 凝胶。80 V, 15 min; 100 V, 60 min 电泳后; 120 min, 220 mA 恒流转膜。将膜密封在 10%脱脂牛奶的溶液 1 h, PBST 冲洗 4 次, 每次 8 min, 加入 5%的脱脂奶粉封闭后一抗(稀释比例为 1:1000)孵育, 4 °C 冰箱过夜。室温二抗(稀释比例为 1:5000, 体积比)摇床反应 1 h, 用 PBST 冲洗同上; 采用 Immobilon Western HRP 发光试剂(Millipore, 美国)进行显色, Odyssey 双色红外荧光成像系统拍照, GAPDH 是内参蛋白。

### 1.9 统计分析方法

实验数据采用平均值±标准误( $\bar{x}\pm SE$ )表示。利用 SPSS 26.0 统计软件对实时荧光定量数据进行处理, 先使用 Shapiro-Wilk 和 Levene 检验分析数据的正态性和方差同质性, 然后使用双因素方差分析检测脂代谢相关基因在 4 个不同组别间的差异显著性, 其中  $P<0.05$  具有显著差异; *scd* 基因在不同组织的差异性分析采用单因素方差分析法(one-way ANOVA), 差异显著时, 采用 Duncan's

进行多重比较,  $P < 0.05$  表示差异显著。

## 2 结果与分析

### 2.1 吉富罗非鱼 *scd* 基因的克隆与同源性分析

利用 DNA Star 软件对中间片段、3' RACE 和

5' RACE 序列进行拼接, 吉富罗非鱼 *scd* cDNA 全长 1333 bp, 其中包括 173 bp、1008 bp、152 bp 的 5'非编码区、开放阅读框和 3'非编码区, 编码 335 个氨基酸。起始密码子为 ATG, 终止密码子为 TAA(图 1)。

```

1 CTC TTC ATC CTC CGA CGG CGC CAG CAA GCA AGC AGC TAG CCT GCC GGG GCT AGT CAG CAC 60
61 ACA AAT TAA TTA ACA TAT TAA CAA AAC AGC CTC CAT TAC ACA CAA AAA AGC GCC GAG GCG 120
121 ACT GAC TTC TCT CCT CTG TTT GCC GCT CTC AGC ATC ACA GCA CCG CTG CCA CA ATG ACG 179
1 M T 2
180 GAG GCG GAG GCG TTA GAG AAC AAG CAG CAG CAA CGC AAG TCC AGC AAC GGG GAT GTT 236
3 E A E A L E N K Q Q Q R K S S N G D V 21
237 CTT CCA GAG AGC GCC GGA GAA GAC GCG TTT GAT CAC ACG TAC AAA GAG AAA GAG GGC 293
22 L P E S A G E D A F D H T Y K E K E G 40
294 CCA AAA CCT CCC CGG ATC ATC GTA TGG AAA AAT GTC ATA CTG ATG ACT CTG TTG CAC ATA 353
41 P K P P R I I V W K N V I L M T L L H I 60
354 GGA GCC TTT TAC GGC GTG TTC GTC GTC CCT TCA GCA TCT CGT TTG ACC TTG CTT TGG TCT 413
61 G A F Y G V F V V P S A S R L T L L W S 80
414 GTA CTT TGT TTT TTG ATA AGT GCG TTA GGA GTC ACT GCA GGA GCG CAT CGC CTG TGG AGT 473
81 V L C F L I S A L G V T A G A H R L W S 100
474 CAC AGA TCC TAC AAG GCT ACA TTA CCT TTA AAG ATT TTC CTC GGT GTA GCT AAC TCC ATG 533
101 H R S Y K A T L P L K I F L G V A N S M 120
534 GCA TTT CAG AAT GAT ATC TTT GAA TGG GCT CGA GAC CAC AGG GTT CAC CAC AAA TAC TCG 593
121 A F Q N D I F E W A R D H R V H H K Y S 140
594 GAA ACA GAC GCC GAC CCT CAC AAC GCC GTC CGC GGC TTT TTC TTT GCT CAC ATC GGC TGG 653
141 E T D A D P H N A V R G F F F A H I G W 160
654 CTG TTG GTG CGC AAA CAC CCT GAC GTG ATT GAG AAA GGA CGC AAG CTG GAG CTC ACT GAC 713
161 L L V R K H P D V I E K G R K L E L T D 180
714 CTG CTA GCA GAC AAA GTT GTC ATG TTT CAG AGG AAG CAT TAC AAG CTG TCC GTG CTG GTC 773
181 L L A D K V V M F Q R K H Y K L S V L V 200
774 ATG TGC TTT TTT ATC CCA ACA ATC GTG CCT TGG TAC CTG TGG GGG GAG TCT CTG TGG GTG 833
201 M C F F I P T I V P W Y L W G E S L W V 220
834 GCC TAC TTC GTC CCA ACT CTG CTT AGG TAC ACC TTG GTG CTG AAC GCT ACC TGG CTG GTC 893
221 A Y F V P T L L R Y T L V L N A T W L V 240
894 AAC AGC GCT GCC CAC ATG TGG GGA AAC AGG CCC TAT GAC AAG AAC ATC AAC CCC AGA GAG 953
241 N S A A H M W G N R P Y D K N I N P R E 260
954 AAC AAG TTT GTC ACT TTC AGT GCT ATA GGT GAG GGA TTT CAC AAC TAT CAC CAC ACG TTC 1013
261 N K F V T F S A I G E G F H N Y H H T F 280
1014 CCA TAT GAC TAT GCA ACC AGC GAG TTT GGC TGC AAG TTG AAC CTT ACC ACT TGT TTC ATC 1073
281 P Y D Y A T S E F G C K L N L T T C F I 300
1074 GAC TTC ATG TGT TTC TTG GGC CTG GCC AAA GAC CGC AAG AAG GTG TCC CGT GAC CTA GTC 1133
301 D F M C F L G L A K D R K K V S R D L V 320
1134 CTG GCC CGG ATA CAG CGC ACC GGA GAC GGA AGC TAC CGC AGT GGC TAA GAT CGC TAA ACT 1193
321 L A R I Q R T G D G S Y R S G * 335
1194 GTG GTC AGC TTC AAG GCA AAA CAA CCG ATA AGA AGA ATC TCC ACA GTC CTT TGA CAG CTA 1253
1254 TAC ATT TCT CAT TCT CTG AGG ATT AAA GTC AGC TTT ATA AGG GCC TTG ACC ACT AAA AAA 1313
1313 AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 1333

```

图 1 吉富罗非鱼 *scd* 基因 cDNA 全长及其氨基酸序列

Fig. 1 Nucleotide and deduced amino acid sequences of *scd* gene of GIFT

利用 MEGA-X 软件采用 Neighbor-joining 方法选取不同物种 *scd* 的核苷酸序列构建系统发育树(图 2)。进化分析显示, 吉富罗非鱼 *scd* 基因和斑马鱼 *scd* 基因聚为一支。将斑马鱼、吉富罗非鱼、智人(*Homo sapiens*)、大鼠(*Rattus norvegicus*)、原鳍鱼(*Protopterus annectens*)以及遮目鱼(*Chanos chanos*)的 *scd* 基因氨基酸序列进行比对(图 3)。结果显示, 吉富罗非鱼与斑马鱼的氨基酸序列相似性非常高, 因此斑马鱼可以作为罗非鱼 *scd* 基因相关功能验证的良好材料。

### 2.2 *scd* 基因在罗非鱼不同组织中的表达

图 4 表示吉富罗非鱼 12 个组织中 *scd* 基因的相对表达量。结果显示, 吉富罗非鱼雄鱼和雌鱼各组织中 *scd* 表达水平都存在差异, 在肝脏中表达水平均为最高, 其次为雄鱼的精巢和雌鱼的肌肉。雌鱼和雄鱼脾脏中表达水平极低。

### 2.3 sgRNA 表达载体鉴定及体外转录

如图 5A 所示, 对转录产物进行纯化回收, 大小在 100~250 bp, 与预期结果一致, 浓度均大于

500 ng/μL,  $A_{260}/A_{280}$  比值为 1.84~1.91。如图 5B 所示, sgRNA 质量电泳鉴定结果, 大小在 100~250 bp, 完整性良好。如图 5C 所示, PCR 扩增产物大小在 500 bp 左右, 选送 8 个阳性扩增产物, 测序结果如图 5-D 所示, 共反馈 8 个测序结果, 其中 5 个出现 Indel 突变, 表明体外转录 sgRNA 成功。

### 2.4 纯合型 *scd* 基因敲除斑马鱼的获得

共获得 F<sub>1</sub> 斑马鱼 48 尾, PCR 电泳结果如图 6-A 所示, 测序后发现 1、2、7 和 38 号为(-74 bp) F<sub>1</sub> 移码突变(图 7A), 共筛选到突变体斑马鱼 22 尾, 选取移码突变缺失较多的-74 bp 突变体斑马鱼; 选择 F<sub>1</sub>(-74 bp, 雌)杂合突变体与 TU 野生型斑马鱼进行交配, 获得 F<sub>2</sub> 斑马鱼 16 尾, PCR 电泳结果如图 6B 所示, 筛选到杂合突变体共 9 尾(-74 bp), 选取条带确认杂合突变体的 7 和 16 号两个 PCR 产物进行测序, 测序结果如图 7B 所示; 将性成熟的携带突变(-74 bp)F<sub>2</sub> 杂合斑马鱼进行 1 对 1 自交, 获得 F<sub>3</sub> 斑马鱼。

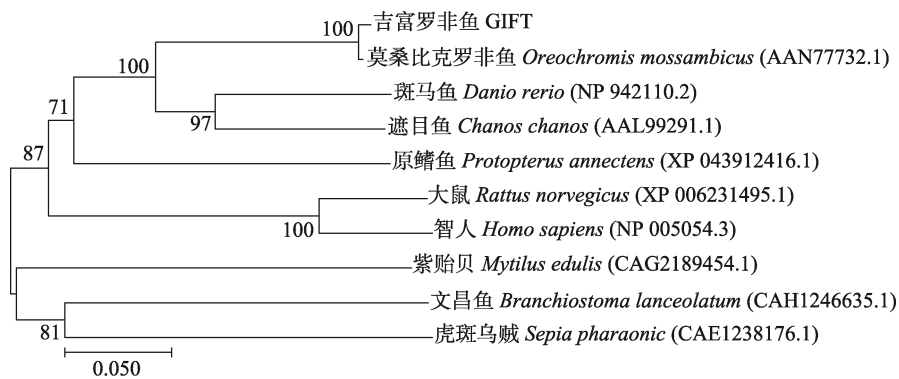


图 2 吉富罗非鱼 *scd* 基因系统发育树

Fig. 2 Phylogeny tree derived from *scd* of GIFT and other vertebrates

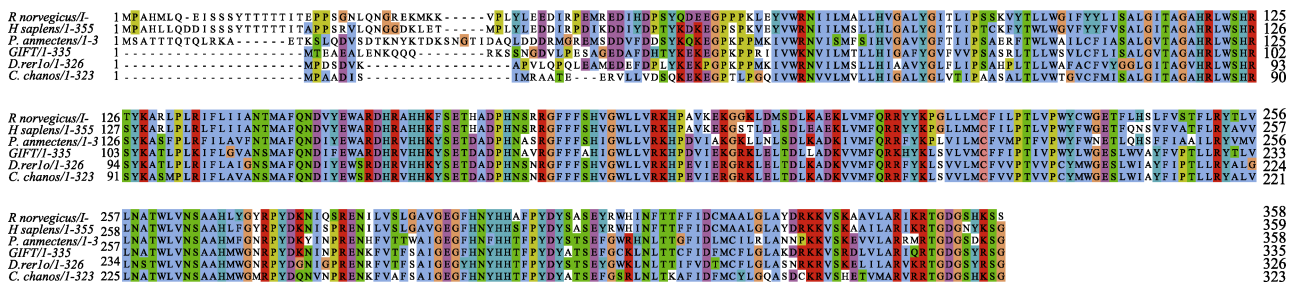


图 3 吉富罗非鱼 *scd* 氨基酸序列与其他物种氨基酸序列对比

Fig. 3 Comparison of *scd* amino acid sequence of GIFT with other species amino acid sequences



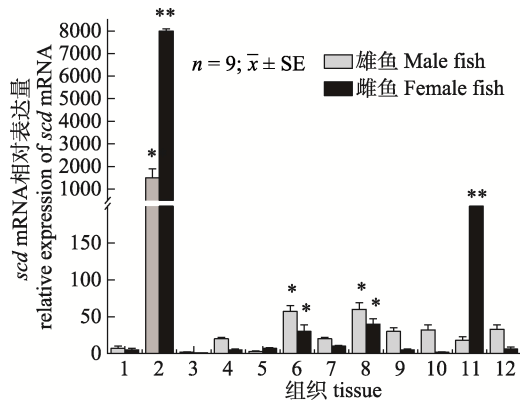


图 4 吉富罗非鱼 *scd* 基因组织分布相对表达量

1: 血, 2: 肝脏, 3: 脾脏, 4: 肾脏, 5: 心脏, 6: 前肠, 7: 后肠, 8: 性腺, 9: 脑, 10: 皮肤, 11: 肌肉, 12: 鳃. \*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ .

Fig. 4 Expression level of *scd* in tissues of GIFT

1: blood, 2: liver, 3: spleen, 4: kidney, 5: heart, 6: foregut, 7: hindgut, 8: gonad, 9: brain, 10: skin, 11: muscle, 12: gill. \*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ .

### 2.5 *scd* 基因敲除斑马鱼体型变化

常规饲料喂养 2 月龄后,  $SCD^{-/-}$  斑马鱼腹部明显比  $SCD^{+/+}$  斑马鱼膨大, 内脏突出, 鱼体腹部颜色变深, 出现不规则红色圆块(图 8)。

### 2.6 高脂饲料投喂对 *scd* 敲除后斑马鱼肝脏油红染色及脂代谢相关基因表达的影响

qRT-PCR 结果(图 9A)显示, *scd* 基因敲除后,  $SCD^{-/-}$  斑马鱼 *scd* mRNA 表达量显著低于  $SCD^{+/+}$  斑马鱼( $P < 0.05$ ), 并且 HFD 投喂后, *scd* mRNA 表达量显著升高( $P < 0.05$ )。

通过 Western-blot 检测 SCD 的蛋白表达水平, 结果(图 9B)显示, SCD 蛋白在 HFD+ $SCD^{+/+}$  斑马鱼组中表达丰度最高, 在 NFD+ $SCD^{-/-}$  斑马鱼组中表达丰度最低。

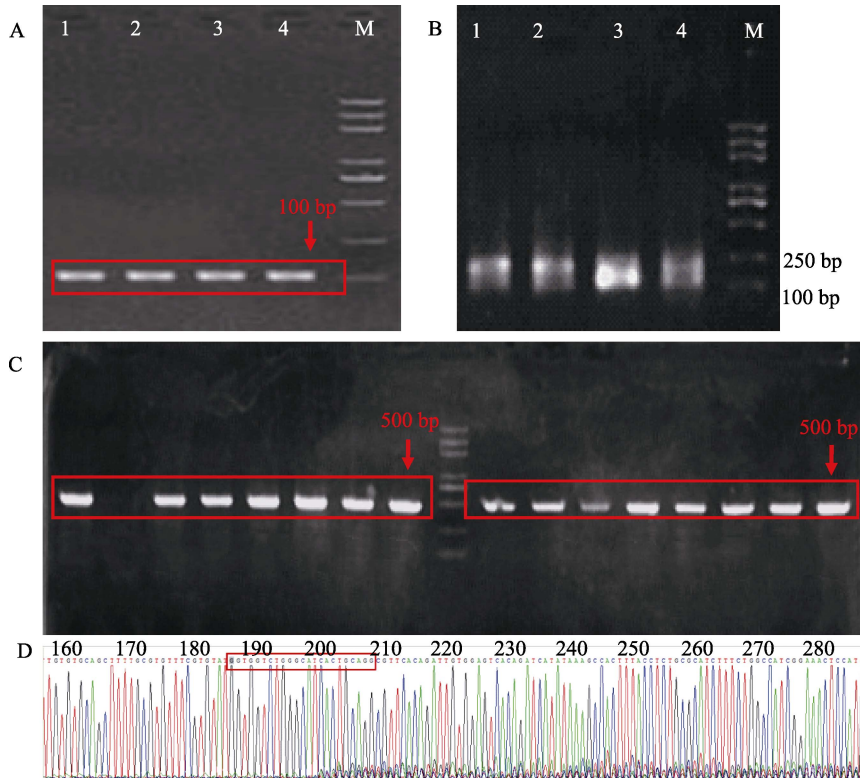


图 5 sgRNA 表达载体鉴定及体外转录

A: 纯化后 sgRNA 体外转录模板的电泳结果; 1~4 泳道为 *scd*-sgRNA1~4 纯化后的 sgRNA 体外转录模板; M: 标准物质; B: 体外合成制备的 sgRNA 质量电泳鉴定结果; 1~4 泳道依次为 *scd*-sgRNA1~4; M: 标准物质; C: sgRNA 活性鉴定的 PCR 扩增产物电泳结果; 1~8, 10~17 泳道为 *scd* sgRNA 活性鉴定的 PCR 扩增产物; M: 标准物质; D: sgRNA 测序结果。

Fig. 5 Identification and in vitro transcription of sgRNA expression vector

A: Electrophoresis results of purified sgRNA in vitro transcription template; lanes 1-4 are the in vitro transcription templates of sgRNA purified by *scd*-sgRNA 1-4; M: marker; B: The results of electrophoresis identification of sgRNA synthesized in vitro; lanes 1-4 are *scd*-sgRNA1-4; M: marker; C: Electrophoresis results of PCR amplification products for sgRNA activity identification; electrophoresis results of PCR amplification products for sgRNA activity identification; M: marker; D: sgRNA sequencing results.

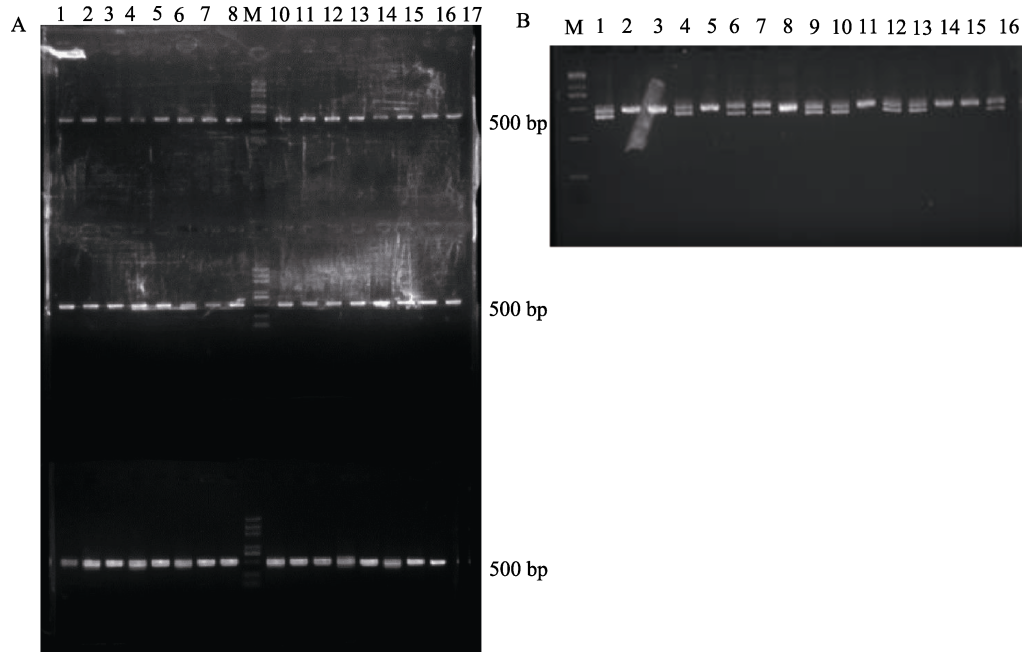


图 6 斑马鱼 F<sub>1</sub> 和 F<sub>2</sub> 基因组 DNA 片段 PCR 扩增产物电泳结果

M: 标准物质; 从下向上依次为 100 bp、250 bp、500 bp、750 bp、1000 bp、2000 bp、3000 bp、5000 bp;  
A: 1~8, 10~17 泳道(编号为 1~48)为 F<sub>1</sub> 基因组 PCR 扩增条带; B: 1~16 泳道(编号为 1~16)为 F<sub>2</sub> 基因组 PCR 扩增条带.

Fig. 6 Electrophoresis results of PCR amplification products of *Danio rerio* F<sub>1</sub> and F<sub>2</sub> genomic DNA fragments

M: marker; 100 bp, 250 bp, 500 bp, 750 bp, 1000 bp, 2000 bp, 3000 bp, 5000 bp from bottom to top;

A: Lanes 1~8 and 10~17(numbered 1~48) are the PCR amplification bands of the F<sub>1</sub> genome;

lanes 1~16 (numbered 1~16) are PCR amplification bands of the F<sub>2</sub> genome.

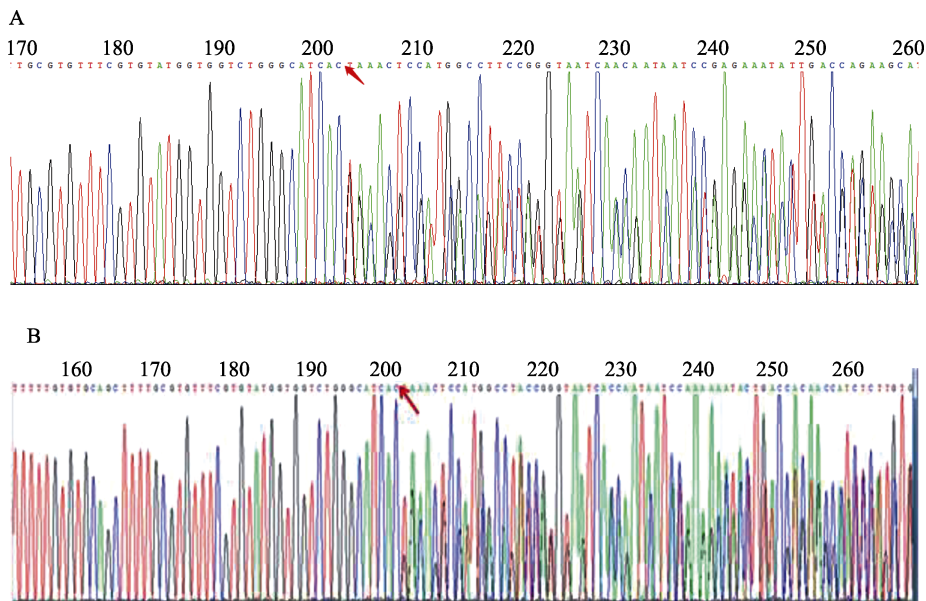


图 7 F<sub>1</sub> 和 F<sub>2</sub> 部分斑马鱼基因测序结果

A: 携带(-74 bp)缺失(移码)突变 F<sub>1</sub> 斑马鱼测序峰图, 红色箭头指示自 202 bp 开始出现(-74 bp)缺失;

B: 携带(-74 bp)缺失(移码)突变 F<sub>2</sub> 斑马鱼测序峰图, 红色箭头指示自 201 bp 开始出现(-74 bp)缺失.

Fig. 7 Gene sequencing results of some *Danio rerio* in F<sub>1</sub> and F<sub>2</sub> generations

A: Sequencing peak map of F<sub>1</sub> zebrafish carrying a (-74 bp) deletion (frameshift) mutation, red arrows indicate (-74 bp) deletions starting at 202 bp; B: Sequencing peak map of F<sub>2</sub> zebrafish carrying a (-74 bp) deletion (frameshift) mutation, red arrows indicate (-74 bp) deletions starting at 201 bp.



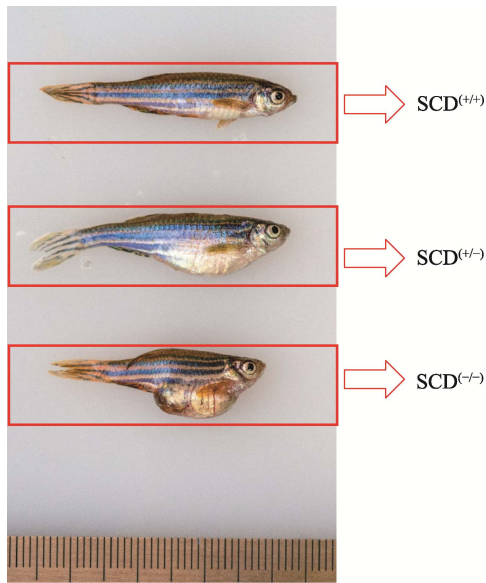


图 8 斑马鱼 *scd* 敲除后体型变化

Fig. 8 Body shape changes after *scd* knockout in *Danio rerio*

取 F<sub>3</sub>NFD+SCD<sup>(-/-)</sup>斑马鱼、NFD+SCD<sup>(+/+)</sup>斑马鱼、HFD+SCD<sup>(-/-)</sup>斑马鱼和 HFD+SCD<sup>(+/+)</sup>斑马鱼各 9 尾, 利用 qRT-PCR 技术检测斑马鱼肝脏组织中 4 个脂代谢相关基因表达变化(图 10), 结果表明, SCD<sup>(-/-)</sup>斑马鱼 *lpl*、*fas*、*hsl* mRNA 表达量显著高于 SCD<sup>(+/+)</sup>斑马鱼( $P<0.05$ ); 与 NFD 喂养斑马鱼相比, HFD 喂养斑马鱼肝脏中 *fas* mRNA 表达量显著下降( $P<0.05$ )。

油红 O 染色结果显示, HFD+SCD<sup>(+/+)</sup>组斑马鱼(图 11C)肝脏切片中, 红色脂滴几乎占据了整个区域; NFD+SCD<sup>(+/+)</sup>组斑马鱼(图 11A)和

HFD+SCD<sup>(-/-)</sup>组斑马鱼(图 11D)肝脏切片中, 仅有少量脂滴; 而 NFD+SCD<sup>(-/-)</sup>组斑马鱼(图 11B)肝脏切片上则几乎没有。

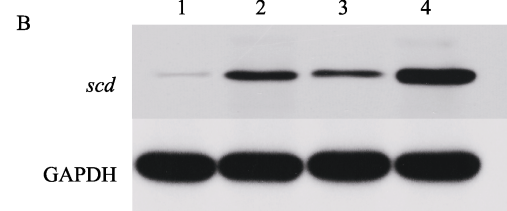
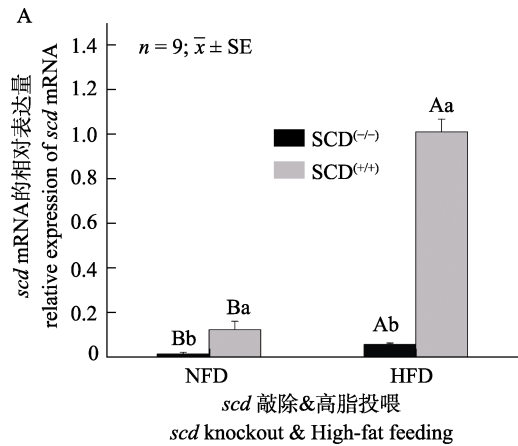


图 9 斑马鱼肝脏中 *scd* mRNA 和蛋白表达水平  
A: 斑马鱼肝脏中 *scd* mRNA 表达水平; B: 斑马鱼肝脏组织中 SCD 的蛋白表达水平, 1: 对照组+ SCD<sup>(-/-)</sup>斑马鱼; 2: 对照组+ SCD<sup>(+/+)</sup>斑马鱼; 3: 高脂组+ SCD<sup>(-/-)</sup>斑马鱼; 4: 高脂组+ SCD<sup>(+/+)</sup>斑马鱼。

Fig. 9 *scd* mRNA protein expression level in *Danio rerio* liver  
A: *scd* mRNA expression level in zebrafish liver; B: Protein expressions of SCD in the liver tissues of zebrafish, 1: SCD<sup>(-/-)</sup> zebrafish fed NFD; 2: SCD<sup>(+/+)</sup> zebrafish fed NFD; 3: SCD<sup>(-/-)</sup> zebrafish fed HFD; 4: SCD<sup>(+/+)</sup> zebrafish fed HFD

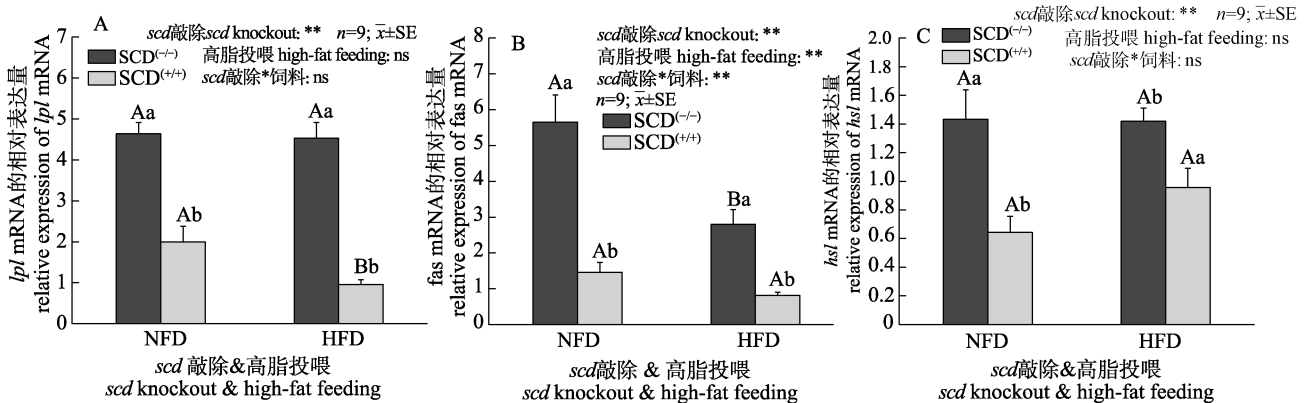


图 10 高脂饲料投喂对 *scd* 敲除后斑马鱼脂代谢相关基因表达的影响

(A) *lpl*; (B) *fas*; (C) *hsl*.

Fig. 10 Effects of high-fat diet feeding on the expression of lipid metabolism-related genes in *Danio rerio* after *scd* knockout

(A) *lpl*; (B) *fas*; (C) *hsl*.

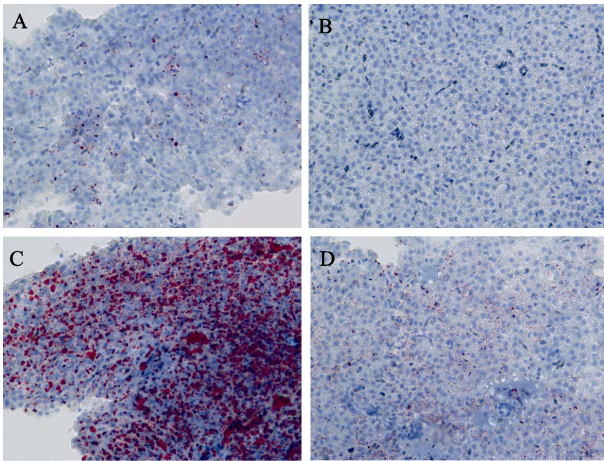


图 11 斑马鱼饲喂高脂饲料投喂下肝脏油红 O 染色显微结构观察( $\times 400$ )

A: 对照组+  $SCD^{+/+}$  斑马鱼; B: 对照组+  $SCD^{-/-}$  斑马鱼;  
C: 高脂组+  $SCD^{+/+}$  斑马鱼; D: 高脂组+  $SCD^{-/-}$  斑马鱼.

Fig. 11 Liver tissues of *Danio rerio* fed different diets ( $\times 400$ )  
A:  $SCD^{+/+}$  zebrafish fed NFD; B:  $SCD^{-/-}$  zebrafish fed NFD;  
C:  $SCD^{+/+}$  zebrafish fed HFD; D:  $SCD^{-/-}$  zebrafish fed HFD.

### 3 讨论

在进化过程中, *scd* 基因在斑马鱼、吉富罗非鱼、智人、大鼠、原鳍鱼以及遮目鱼中是非常保守的, 这也预示着其功能也具有很强的保守性。迄今为止, 哺乳动物 *scd* 基因亚型共计 5 种, 在草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)中发现 *scd* 基因的两种亚型, Polley 等在鲤鱼(*Cyprinus carpio*)中克隆出了 *scd* 的两种同源物, 都在肝脏中高表达<sup>[20-22]</sup>。对遮目鱼<sup>[23]</sup>和斑马鱼<sup>[24]</sup>的研究结果表明, *scd* 在各组织中都有表达, 而在莫桑比克罗非鱼(*Oreochromis mossambicus*)<sup>[25]</sup>中发现仅在肝脏组织中表达。这与本研究结果有所不同。本文通过实时荧光定量检测出雌雄吉富罗非鱼 12 个组织不同程度的 *scd* 的表达量, 结果显示, 雌雄鱼均在肝脏中高表达( $P < 0.01$ )。由于 SCD 在促进饱和脂肪酸(saturated fatty acid, SFA)生成 MUFA 的过程中起着关键的作用, 而肝脏是脂肪代谢的主要场所, 所以 *scd* 在肝脏中表达量较高。这些结果都表明 *scd* 在吉富罗非鱼肝脏脂肪代谢中发挥着重要作用。

CRISPR/Cas9 是一种简单、快速、高效的基因编辑技术<sup>[26]</sup>, 分子遗传操作技术在斑马鱼体内的可行性大大提高了斑马鱼的流行性, 斑马鱼作

为医学研究中的重要模式生物, 被世界各地数以千计的研究者和机构用来建立各种疾病模型<sup>[15]</sup>。本实验中, 斑马鱼和罗非鱼<sup>[3]</sup>脂肪肝病具有许多相似的特征, 包括肝脏脂肪沉积、脂代谢基因的变化等。王志强<sup>[27]</sup>指出团头鲂鳞片发育基因可以在斑马鱼中成功进行功能验证。本研究采用 CRISPR/Cas9 在斑马鱼中进行 *scd* 基因功能验证, 实现了 *scd* 基因的靶向敲除, 并获得了敲除突变体  $F_3$ 。在本研究中, CRISPR 序列设计位置为 Exon 3 区域, 引起 Exon 3 部分碱基发生移码突变, 与野生型相比,  $SCD^{-/-}$  斑马鱼肝脏中 *scd* mRNA 和蛋白水平均显著下调, 然而敲除启动子区域 *scd* mRNA 可能出现完全没有表达, 但可能引起鱼体死亡。有研究<sup>[28]</sup>表明, *scd-1* 敲除小鼠减少了脂肪积累, 并能抵抗高脂饮食所引起的体重增加, 此外, 这些小鼠表现出脂质氧化增加和甘油三酯合成减少。Mauvoisin<sup>[29]</sup>等研究表明, 敲除 *scd-1* 后, 小鼠肝细胞中的瘦素通过抑制 *scd-1* 的转录水平来调控 *scd-1* 基因的表达, 可以抵抗高脂饮食诱导的肥胖和肝脏脂肪变性。本实验中,  $SCD^{-/-}$  组斑马鱼中出现了明显的表型差异, 与  $SCD^{+/+}$  组斑马鱼相比,  $SCD^{-/-}$  组斑马鱼腹部膨大, 但其肝脏切片中却几乎没有红色脂滴, 这可能是因为敲除 *scd* 后对其他器官产生了影响, 具体影响机制有待进一步研究。SCD 在促进 SFA 生成 MUFA 的过程中起着重要作用。相较于 SFA, MUFA 在脂肪合成过程中更有可能成为酰基辅酶 A 胆固醇酰基转移酶和二酰基甘油酰基转移酶的底物, 这增加了胆固醇和甘油三酯的合成<sup>[3]</sup>。肝脏中 *scd* 表达水平可能会改变细胞中 MUFA 的含量, 进而影响了胆固醇和甘油三酯前体的合成<sup>[19]</sup>。相较于 HFD+ $SCD^{+/+}$  组斑马鱼, HFD+ $SCD^{-/-}$  组斑马鱼肝脏切片中红色脂滴相对减少, 这可能是由于斑马鱼肝脏 *scd* 表达水平的下降减缓了 MUFA 的合成, 进而降低了脂质沉积。张春暖等<sup>[30]</sup>研究表明, 饲喂高脂肪饲料(16.9%)的梭鱼(*Liza haematocheila*), 其脂解酶活性以及血清中胆固醇和甘油三酯水平均明显提高。HFD+ $SCD^{+/+}$  组斑马鱼肝脏中 *scd* mRNA 水平明显升高, 并表现出严重的脂肪肝现象, 这可能是因为高脂饲料喂养后, 过多的脂质被送到

肝脏, 导致超负荷状态下的肝脏能量过剩, 而肝脏中其他脂质代谢基因表达量有所下降, 降低了肝脏脂肪氧化代谢, 增加了脂肪沉积。

肝组织 *scd* 表达水平对某些与脂肪代谢有关的基因表达有一定的影响。齐口裂腹鱼(*Schizothorax prenanti*)<sup>[31]</sup>和黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)<sup>[32]</sup>的研究结果表明, *lpl* 在调节脂肪代谢方面发挥着重要作用。王丹等<sup>[33]</sup>研究表明, 高脂模型组大鼠肝脏中的 *LPL* 活性降低, 大鼠体内的甘油三酯分解也减少, 可以初步推断高脂饮食可能改变了影响参与肝脏脂肪代谢相关酶的作用, 从导致体内脂肪代谢的紊乱。FAS 是一种复杂的多功能酶, 在脂肪酸合成中发挥重要作用, 与体内的脂肪代谢密切相关<sup>[34]</sup>。HSL 是催化甘油三酯分解的重要酶, 可作用于甘油三酯水解反应的第二步, 随后催化二甘油酯水解为单酰甘油, 其表达可能间接影响脂肪的沉积<sup>[35]</sup>。有研究<sup>[36]</sup>表明 *HSL* 过表达对高脂饮食小鼠有减少肝脏甘油三酯水平的作用, 提示肝脏 *HSL* 可能通过促进游离脂肪酸氧化及释放, 改善肝脏脂肪变性。在本实验中, 敲除 *scd* 后促进了肝脏中 *lpl*、*fas*、*hsl* 的表达, 斑马鱼在进行脂肪代谢过程中, 可能受到多种基因的调控, 而这些脂质代谢基因之间可能也存在一定的补偿作用。因此, 抑制 *scd* 的表达在某种程度上可能会促进其他脂质代谢基因的表达来增加脂肪利用。

#### 4 结论

研究发现 *scd* 基因在吉富罗非鱼肝脏中高表达, 且具有很高的保守性。通过 CRISPR/Cas9 技术在斑马鱼中进行 *scd* 基因的靶向敲除后, F<sub>3</sub> SCD<sup>(-/-)</sup>组斑马鱼肝脏中 *scd* 表达显著降低, 增加了脂肪合成相关基因(*lpl*、*fas* 和 *hsl*)的表达, 有助于缓解高脂应激下 SCD<sup>(-/-)</sup>组斑马鱼肝脏脂肪沉积。鱼类的脂肪代谢可能由多个基因共同调节, 本研究结果可以为鱼类脂肪代谢研究提供了新的研究线索, 有助于进一步解析分子机制; 也可为选育具有耐高脂饲料的优良罗非鱼新品系提供理论依据和支持。

#### 参考文献:

[1] Li G B, Li Y, Wang Q M, et al. Effects of digestible crude

protein and lipid levels on growth performance, metabolism of energy substances and antioxidant capacity of juvenile GIF1 tilapia, *Oreochromis niloticus*[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2021, 37(20): 126-135. [李光彬, 李英, 王秋梅, 等. 饲料可消化蛋白和脂肪水平对吉富罗非鱼幼鱼生长性能、能量物质代谢和抗氧化功能的影响[J]. 中国农学通报, 2021, 37(20): 126-135.]

- [2] Malik A, Abbas G, Ghaffar A, et al. Effect of different salinity level on breeding, fertilization, hatching and survival of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) in captivity[J]. Pakistan Journal of Zoology, 2018, 50(2): 539-547.
- [3] Tao Y F, Qiang J, Bao J W, et al. Changes in physiological parameters, lipid metabolism, and expression of microRNAs in genetically improved farmed tilapia (*Oreochromis niloticus*) with fatty liver induced by a high-fat diet[J]. Frontiers in Physiology, 2018, 9: 1521.
- [4] Mendoza-Pacheco O, Parra-Bracamonte G M, de la Rosa-Reyna X F, et al. Novel polymorphisms in stearoyl-CoA desaturase (SCD) and fatty acid desaturase 2 (FADS2) in channel catfish (*Ictalurus punctatus*, Rafinesque, 1818)[J]. Journal of Applied Ichthyology, 2021, 37(1): 120-124.
- [5] Yuan X, Hu S Q, Li L, et al. Metabolomic analysis of SCD during goose follicular development: Implications for lipid metabolism[J]. Genes, 2020, 11(9): 1001.
- [6] Ma X Y, Qiang J, Xu P, et al. Research progress of stearyl-CoA desaturase gene structure, function, regulatory factors and its application in fish[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2015, 43(12): 9-13. [马昕羽, 强俊, 徐跑, 等. 硬脂酰辅酶 A 去饱和酶基因结构功能、调控因子及在鱼类上的研究进展[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(12): 9-13.]
- [7] Liu L L, Zhang R, Wang X W, et al. Analysis of sequence, function and expression of PtScd1 gene in tropical stenothermal fish tiger skin barb *Puntius tetrazona*[J]. Fisheries Science, 2020, 39(6): 820-828. [刘丽丽, 张蓉, 王晓雯, 等. 虎皮鱼 PtScd1 基因序列、功能与表达分析[J]. 水产科学, 2020, 39(6): 820-828.]
- [8] Miyazaki M, Flowers M T, Sampath H, et al. Hepatic stearoyl-CoA desaturase-1 deficiency protects mice from carbohydrate-induced adiposity and hepatic steatosis[J]. Cell Metabolism, 2007, 6(6): 484-496.
- [9] Hsieh S L, Hu C Y, Hsu Y T, et al. Influence of dietary lipids on the fatty desaturase expression in hybrid tilapia acid composition and stearoyl-CoA (*Oreochromis niloticus*×*O. aureus*) under cold shock[J]. Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology, 2007, 147(3): 438-444.

- [10] Qiang J, Tao Y F, He J, et al. miR-29a modulates SCD expression and is regulated in response to a saturated fatty acid diet in juvenile genetically improved farmed tilapia (*Oreochromis niloticus*)[J]. The Journal of Experimental Biology, 2017, 220(Pt 8): 1481-1489.
- [11] Ma X Y, Qiang J, He J, et al. Changes in the physiological parameters, fatty acid metabolism, and SCD activity and expression in juvenile GIFT tilapia (*Oreochromis niloticus*) reared at three different temperatures[J]. Fish Physiology and Biochemistry, 2015, 41(4): 937-950.
- [12] Chen Q, Li L, Li S Y. Research progress of nutritional therapy for fatty liver[J]. China Medical Herald, 2021, 18(12): 49-52. [陈巧, 李玲, 李素云. 脂肪肝营养治疗的研究进展[J]. 中国医药导报, 2021, 18(12): 49-52.]
- [13] Lv J, Gao Y, Li C, et al. Effect of American ginseng saponins on enhancing immunity based on zebrafish model organisms[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2020, 51(14): 3728-3733. [吕婧, 高燕, 李晨, 等. 基于斑马鱼模式生物的西洋参皂苷类成分增强免疫作用研究[J]. 中草药, 2020, 51(14): 3728-3733.]
- [14] Chen C B. Establishment of an alcohol-induced fatty liver model in zebrafish and hepatoprotective effect of *Gynura formosana*[D]. Zhangzhou: Minnan Normal University, 2016. [陈灿滨. 酒精性脂肪肝斑马鱼模型的建立及白凤菜保肝护肝作用研究[D]. 漳州: 闽南师范大学, 2016.]
- [15] Li Z Q, Xu Y, Zhao X, et al. Study on liver diseases with zebrafish as an important tool[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2021, 46(2): 320-332. [李芝奇, 徐玥, 赵霞, 等. 斑马鱼作为一种重要的工具进行肝脏疾病研究[J]. 中国中药杂志, 2021, 46(2): 320-332.]
- [16] Li L G, Cao Z M, Tao Y F, et al. Cloning and expression of the calcium-sensing receptor gene in genetically improved farmed tilapia and its mechanism of regulating apoptosis[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2021, 28(9): 1129-1140. [李连歌, 曹哲明, 陶易凡, 等. 吉富罗非鱼钙敏感受体基因的克隆、表达与其参与调控细胞凋亡的机制[J]. 中国水产科学, 2021, 28(9): 1129-1140.]
- [17] Ma X Y. Cloning and expression analysis of stearoyl-coa desaturates (SCD) in juvenile gift tilapia in response to different temperature and lipid[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2016. [马昕羽. 吉富罗非鱼硬脂酰辅酶 A 去饱和酶(SCD)基因的克隆及温度与饲料脂肪源对其表达的研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2016.]
- [18] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method[J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.
- [19] Qiang J, Tao Y F, Bao J W, et al. High fat diet-induced miR-122 regulates lipid metabolism and fat deposition in genetically improved farmed Tilapia (GIFT, *Oreochromis niloticus*) liver[J]. Frontiers in Physiology, 2018, 9: 1422.
- [20] Chang B E, Hsieh S L, Kuo C M. Molecular cloning of full-length cDNA encoding delta-9 desaturase through PCR strategies and its genomic organization and expression in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)[J]. Molecular Reproduction and Development, 2001, 58(3): 245-254.
- [21] Polley S D, Tiku P E, Trueman R T, et al. Differential expression of cold- and diet-specific genes encoding two carp liver delta 9-acyl-CoA desaturase isoforms[J]. American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, 2003, 284(1): R41-R50.
- [22] Evans H, De Tomaso T, Quail M, et al. Ancient and modern duplication events and the evolution of stearoyl-CoA desaturases in teleost fishes[J]. Physiological Genomics, 2008, 35(1): 18-29.
- [23] Hsieh S L, Liao W L, Kuo C M. Molecular cloning and sequence analysis of stearoyl-CoA desaturase in milkfish, *Chanos chanos*[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2001, 130(4): 467-477.
- [24] Hsieh S L, Liu R W, Wu C H, et al. cDNA nucleotide sequence coding for stearoyl-CoA desaturase and its expression in the zebrafish (*Danio rerio*) embryo[J]. Molecular Reproduction and Development, 2003, 66(4): 325-333.
- [25] Hsieh S L, Chang H T, Wu C H, et al. Cloning, tissue distribution and hormonal regulation of stearoyl-CoA desaturase in tilapia, *Oreochromis mossambicus*[J]. Aquaculture, 2004, 230(1-4): 527-546.
- [26] Marino N D, Pinilla-Redondo R, Csörgő B, et al. Anti-CRISPR protein applications: Natural brakes for CRISPR-Cas technologies[J]. Nature Methods, 2020, 17(5): 471-479.
- [27] Wang Z Q. Studies on the scale development and expression of key regulatory genes in blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*)[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2020. [王志强. 团头鲂鳞片发育及关键调控基因表达模式研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2020.]
- [28] Cai Y, Li M, Yu Q W, et al. Research progress on the role of stearoyl-CoA desaturase 1 and its inhibitor in hepatic steatosis[J]. Chinese Journal of Clinical Rational Drug Use, 2020, 13(25): 173-175. [蔡雨, 李苗, 俞沁玮, 等. 硬脂酰辅酶 A 去饱和酶 1 及其抑制剂在肝脂肪变性中的作用研究进展[J]. 临床合理用药杂志, 2020, 13(25): 173-175.]
- [29] Mauvoisin D, Prévost M, Ducheix S, et al. Key role of the ERK1/2 MAPK pathway in the transcriptional regulation of the Stearoyl-CoA Desaturase (SCD1) gene expression in

- response to leptin[J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2010, 319(1-2): 116-128.
- [30] Zhang C N, Wang A M, Liu W B, et al. Effects of dietary lipid levels on fat deposition, lipid metabolize enzyme and antioxidant activities of *Chelon haematocheilus*[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2013, 20(1): 108-115. [张春暖, 王爱民, 刘文斌, 等. 饲料脂肪水平对梭鱼脂肪沉积、脂肪代谢酶及抗氧化酶活性的影响[J]. *中国水产科学*, 2013, 20(1): 108-115.]
- [31] Xiang X, Zeng B H, Wang R, et al. Effects of dietary bile acid on lipid deposition, lipid metabolism enzyme activities and related gene expression to juvenile *Schizothorax prenanti*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2022, 46(6): 1045-1052. [向泉, 曾本和, 王睿, 等. 胆汁酸对齐口裂腹鱼幼鱼脂肪沉积、脂肪代谢酶活性及相关基因表达的影响[J]. *水产学报*, 2022, 46(6): 1045-1052.]
- [32] Qiang J, Tao Y F, He J, et al. Influences of dietary lipid and temperature on growth, fat deposition and lipoprotein lipase expression in darkbarbel catfish (*Pelteobagrus vachellii*)[J]. *Journal of Thermal Biology*, 2017, 69: 191-198.
- [33] Wang D, Zhang L, Feng X Y, et al. Effects of buckwheat on lipid metabolism enzymes of liver and protein of serum in high-fat diet rat[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2016, 37(10): 351-355. [王丹, 张岚, 冯小雨, 等. 荞麦对高脂膳食大鼠肝脏中脂代谢相关酶及血清中蛋白的影响[J]. *食品工业科技*, 2016, 37(10): 351-355.]
- [34] Torres J L, Novo-Veleiro I, Manzanedo L, et al. Role of microRNAs in alcohol-induced liver disorders and non-alcoholic fatty liver disease[J]. *World Journal of Gastroenterology*, 2018, 24(36): 4104-4118.
- [35] Han S L, Liu Y, Limbu S M, et al. The reduction of lipid-sourced energy production caused by ATGL inhibition cannot be compensated by activation of HSL, autophagy, and utilization of other nutrients in fish[J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2021, 47(1): 173-188.
- [36] Yang J, Fan J G. The role of metabolic lipase in the pathogenesis and treatment of liver diseases[J]. *Chinese Hepatology*, 2020, 25(12): 1251-1254. [杨菁, 范建高. 代谢性脂肪酶在肝病发病和治疗中的作用[J]. *肝脏*, 2020, 25(12): 1251-1254.]

## Cloning and expression analysis of the stearoyl-CoA desaturase gene in the genetic improvement of farmed tilapia (*Oreochromis niloticus*) and transference analysis in zebrafish

FENG Tiantian<sup>1</sup>, TAO Yifan<sup>3</sup>, MA Xinyu<sup>2</sup>, LU Siqu<sup>3</sup>, ZHANG Xing<sup>1</sup>, LIU Wenting<sup>2,3</sup>, PAN Yifan<sup>2</sup>, QIANG Jun<sup>1,2,3</sup>

1. School of Food Science and Pharmaceutical Engineering, Nanjing Normal University, Nanjing 210023, China;

2. Wuxi Fisheries College, Nanjing Agricultural University, Wuxi 214081, China;

3. Key Laboratory of Freshwater Fisheries and Germplasm Resources Utilization, Ministry of Agriculture, Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China

**Abstract:** With the rapid development of integrated farming of tilapia, various metabolic diseases such as nutritional fatty liver disease are becoming increasingly serious. Severe fatty liver can cause liver failure and cause death in tilapia. It is particularly important to understand the mechanism of lipid metabolism in patients with fatty liver disease. Zebrafish, as a model animal for developmental biology research, is also a research hotspot for liver disease models. Stearoyl-CoA desaturase (SCD) is a key rate-limiting enzyme for MUFA, which plays an important role in regulating hepatic lipogenesis, fatty acid metabolism, and lipid oxidation. Therefore, it is important to study the regulatory mechanism of the *scd* gene in lipid metabolism in fish. In this study, the complete *scd* cDNA sequence of GIFT was cloned by RACE and qRT-PCR was used to analyze tissue expression characteristics. To verify the function of *scd*, an *scd* knockout zebrafish model was constructed using CRISPR/Cas9 technology, and the phenotypic and gene expression changes of F<sub>3</sub> mutants were studied, and the response mechanism of zebrafish lipid metabolism after *scd* deletion was verified in combination with high-fat diet experiments. The results showed that the cDNA full-length sequence of the *scd* gene of GIFT was 1,333 bp in length, including 173 bp at the 5'-UTR, 152 bp at the 3'-UTR, and a 1,008 bp open reading frame (ORF) encoding 335 amino acids. The *scd* gene was expressed in all tissues of male and female GIFT, with the highest expression in the liver and the lowest expression in the spleen. An *scd* knockout zebrafish model was constructed using CRISPR/Cas9 for functional validation, and the SCD<sup>(-/-)</sup> zebrafish had a significantly enlarged abdomen compared to the SCD<sup>(+/+)</sup> zebrafish. Western blot and qRT-PCR results showed that *scd* gene expression was significantly lower ( $P<0.05$ ) in zebrafish from the SCD<sup>(-/-)</sup> group compared with zebrafish from the SCD<sup>(+/+)</sup> group, and SCD protein expression abundance was also significantly lower ( $P<0.05$ ) in zebrafish from the SCD<sup>(-/-)</sup> group. Under high fat dietary feeding, the red lipid droplets in the liver tissue cells of zebrafish in the HFD+SCD<sup>(-/-)</sup> group were significantly reduced compared to those in the HFD+SCD<sup>(+/+)</sup> group. The qRT-PCR results showed that *scd* mRNA expression was significantly lower in zebrafish in the SCD<sup>(-/-)</sup> group compared with zebrafish in the SCD<sup>(+/+)</sup> group after *scd* knockdown ( $P<0.05$ ), while *lpl*, *fas*, and *hsl* mRNA expression were significantly higher in the liver of zebrafish in the SCD<sup>(-/-)</sup> group ( $P<0.05$ ). Compared with the zebrafish fed the control diet, zebrafish fed with the high-fat diet had significantly increased expression of *scd* mRNA in liver and inhibited the expression of *fas* mRNA ( $P<0.05$ ). The results also suggest that *scd* gene knockdown can alleviate liver fat deposition in zebrafish caused by high fat diets, and that the *scd* gene may play an important role in fatty acid metabolism and lipid synthesis in fish.

**Key words:** GIFT; SCD; gene cloning; zebrafish; CRISPR/Cas9; fat metabolism

**Corresponding author:** QIANG Jun. E-mail: qiangj@ffrc.cn