

王玉梅,任天应,高坚.不同脂肪源饲料对斑马鱼 *elovl5*、*elovl2* 和 *fads2* 在高度不饱和脂肪酸合成中的作用影响[J].华中农业大学学报, 2021, 40(5): 138-145. DOI:10.13300/j.cnki.hnlkxb.2021.05.017

不同脂肪源饲料对斑马鱼 *elovl5*、*elovl2* 和 *fads2* 在高度不饱和脂肪酸合成中的作用影响

王玉梅¹,任天应¹,高坚^{1,2}

1.华中农业大学水产学院,武汉 430070; 2.农业动物遗传育种与繁育教育部重点实验室,武汉 430070

摘要 为探究延长酶 5(*elovl5*)、延长酶 2(*elovl2*)和去饱和酶 2(*fads2*)基因在淡水鱼高度不饱和脂肪酸(HUFA)合成中的相互作用,利用 CRISPR/Cas9 技术,成功构建出斑马鱼 *elovl5*^{-/-}(以下简称 E5^{-/-}组)、*elovl2*^{-/-}×*elovl5*^{-/-}(以下简称 E2^{-/-}×E5^{-/-}组)、*elovl5*^{-/-}×*fads2*^{-/-}(以下简称 E5^{-/-}×F2^{-/-}组)、*elovl2*^{-/-}×*elovl5*^{-/-}×*fads2*^{-/-}(以下简称 E2^{-/-}×E5^{-/-}×F2^{-/-}组)4 种突变体模型,并对 4 种突变体进行大豆油饲料(SO)和亚麻籽油饲料(CO)的投喂试验,研究斑马鱼 *elovl5*、*elovl2* 和 *fads2* 在 HUFA 合成过程中对饲料不同脂肪源的响应。结果显示,在 E5^{-/-}组和 E2^{-/-}×E5^{-/-}组中,C18PUFA 未出现明显累积,而 E5^{-/-}×F2^{-/-}组和 E2^{-/-}×E5^{-/-}×F2^{-/-}组中的 C18:3n-3(ALA)和 C18:2n-6(LNA)呈现显著的累积。*elovl2*、*elovl5* 和 *fads2* 缺失后,肝脏 *elovl4a* 和 *elovl4b* 表达明显上升。不同脂肪源饲料投喂试验结果显示,SO 饲料投喂后的 E5^{-/-}组 DHA 含量与野生型(WT)无显著差异,E5^{-/-}×F2^{-/-}组较 WT 组 DHA 含量显著降低。然而,CO 饲料投喂后的 E5^{-/-}组 DHA 含量较 WT 组呈现显著升高,E5^{-/-}×F2^{-/-}组与 WT 无显著差异。*fads2* 缺失斑马鱼去饱和作用受到显著影响,表明,*fads2* 是 HUFA 合成过程中的必需酶。而 *elovl2* 和 *elovl5* 缺失的表型可能会被其他 HUFA 合成途径所弥补。以上结果表明,*elovl2* 和 *elovl5* 在 HUFA 合成中存在基因间相互作用,*fads2* 作为去饱和酶在 HUFA 合成中必不可少。

关键词 *elovl5*; *elovl2*; *fads2*; HUFA; 相互作用; 斑马鱼; 不同脂肪源饲料

中图分类号 S 963.73⁺3 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2021)05-0138-08

高度不饱和脂肪酸(highly unsaturated fatty acids, HUFA)是双键数有 2 个或 2 个以上并且碳原子数有 20 个或 20 个以上的一类多烯直链脂肪酸。由于人体内无法自身合成 HUFA,必须从食物中摄取,因此, HUFA 被称为必需脂肪酸^[1]。HUFA 作为必需脂肪酸在维持哺乳动物的正常生命活动中有着不可替代的作用。研究表明, HUFA 在机体抵抗炎症过程中必不可少^[2],同时, HUFA 对抑制心脑血管疾病的产生,以及在抵抗癌细胞增殖扩散等疾病的治疗中发挥重要作用^[3-4]。

目前,水产品是人类获取 DHA 的主要来源。海水鱼类普遍比淡水鱼类具有更多含量的 HUFA,但海水鱼体内的 DHA 主要通过食物链富集而来,而淡水鱼类可以通过自身合成 DHA。因此,如何提高淡水鱼 HUFA 含量具有重要研究价值。斑马鱼作为淡水鱼的经典模式生物,与人类基因组具有

高度同源性,且发育迅速、生长周期短,因而在诸多脂质代谢的研究中都有应用^[5-6]。

研究表明,脂肪酸碳链的延长和去饱和是 HUFA 合成的关键步骤^[7],该过程主要由脂肪酸延长酶 2 (elongase of very long chain fatty acids 2, *elovl2*)、脂肪酸延长酶 5 (elongase of very long chain fatty acids 5, *elovl5*) 和脂肪酸去饱和酶 2 (desaturase of very long chain fatty acids 2, *fads2*) 参与^[8]。*elovl2* 能将 C₂₀ HUFA 延长到 C₂₂ HUFA^[9]。研究表明,在小鼠中, *elovl2* 敲除后血清中 C₂₂ HUFA 含量降低,尤其是 C₂₂:6n-3(DHA)含量会显著减少,使得雄性小鼠精子发育异常导致不育^[10]。Monroig 等^[8]从斑马鱼中克隆出 *elovl5* 基因,并证明 *elovl5* 能将 C₁₈ PUFA 延长至 C₂₀ HUFA,也具有延长 C₂₀ HUFA 至 C₂₂ HUFA 的能力,这与 *elovl2* 的功能具有相似之处。然而,目前对 *elovl5* 的研究主要集中在海水鱼

收稿日期: 2021-05-20

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(31872579)

王玉梅, E-mail: 1183544312@qq.com

通信作者: 高坚, E-mail: gaojian@mail.hzau.edu.cn

中,在淡水鱼 *elovl5* 的研究较少。鱼类 $\Delta 4$ 、 $\Delta 5$ 、 $\Delta 6$ 、 $\Delta 8$ 去饱和作用都属于 *fads2* 基因^[11]。不同鱼类 *fads2* 具有不同的去饱和酶活性^[12]。

笔者所在实验室分别对斑马鱼 *elovl2*、*elovl5* 和 *fads2* 在 HUFA 合成中的作用进行了探究^[13-14]。研究表明,敲除斑马鱼 *elovl5* 出现 C_{18} PUFA 含量降低、 C_{20} HUFA 含量升高^[13]。*elovl5* 和 *fads2* 具有不同的生理功能,在我们前期研究中,*elovl5* 主要将 $C_{18:3n-3}$ (ALA) 和 $C_{18:2n-6}$ (LNA) 分别延长至 $C_{20:3n-3}$ 和 $C_{20:2n-6}$,然而缺失 *elovl5* 的斑马鱼并没有出现 ALA 和 LNA 累积^[13],我们推测 ALA 和 LNA 可能是通过 *fads2* 的 $\Delta 6$ 作用将 ALA 和 LNA 分别转变为 $C_{18:4n-3}$ 和 $C_{18:3n-6}$ 。在作为 *elovl5* 和 *fads2* 的脂肪酸底物 ALA 和 LNA 的合成中,*elovl5* 缺失后,*fads2* 是否会起到替补合成作用,*elovl5* 和 *fads2* 是竞争底物的关系还是互相替补合成的关系都需要进行深入探究。

为此,本研究利用 CRISPR/Cas9 技术成功构建了不同敲除型斑马鱼,即 *elovl5*^{-/-} (以下简称 E5^{-/-} 组)、*elovl2*^{-/-} × *elovl5*^{-/-} (以下简称 E2^{-/-} × E5^{-/-} 组)、*elovl5*^{-/-} × *fads2*^{-/-} (以下简称 E5^{-/-} × F2^{-/-} 组)、*elovl2*^{-/-} × *elovl5*^{-/-} × *fads2*^{-/-} (以下简称 E2^{-/-} × E5^{-/-} × F2^{-/-} 组)。通过对投喂不同饲料的突变体进行脂肪酸组成分析和实时荧光定量,探究斑马鱼敲除 *elovl5* 后缺失 *elovl2* 和 *fads2* 在 HUFA 合成中的影响,旨在为更好地阐释 *elovl2*、*elovl5* 和 *fads2* 在 HUFA 合成中的相互作用机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验用鱼由国家斑马鱼资源中心(中国武汉)提供,成鱼雌雄分别饲养于循环水系统中,系统条件如下:水温为 (28 ± 0.5) °C, pH 值为 7.6 ± 0.1 ,光照周期为 14 h 光照(08:00—22:00)/10 h 黑暗(22:00—08:00)。每天用孵化的丰年虫投喂 3 次。试验中斑马鱼自然受精的卵在 28 °C 恒温过滤水中孵化,受精后 5 d 投喂经纱网过滤的蛋黄,受精后 10 d 开始投喂丰年虫。

1.2 敲除模型的构建

试验中繁殖用到的单基因 *elovl2*、*elovl5* 和 *fads2* 以及 E2^{-/-} × E5^{-/-} 组纯合突变体均来自笔者所在实验室,具体敲除及构建过程参考文献^[13-14]。

E5^{-/-} × F2^{-/-} 组和 E2^{-/-} × E5^{-/-} × F2^{-/-} 组的构建流程如图 1 所示,对基因 *elovl2*、*elovl5* 和 *fads2* 互相杂交后获得杂合子,而杂合子间自交后经筛选获得纯合突变体。各纯合突变体在形态上与野生型(wild type, WT)斑马鱼没有区别,雄雌都可育。

1.3 RNA 提取

用 Primer Premier 6 软件设计斑马鱼荧光定量引物,引物序列见表 1。用 Trizol 法提取各类基因型斑马鱼的 RNA,具体步骤参考笔者所在实验室已发表文章^[13-14]。

1.4 不同脂肪源饲料的制作及试验取样

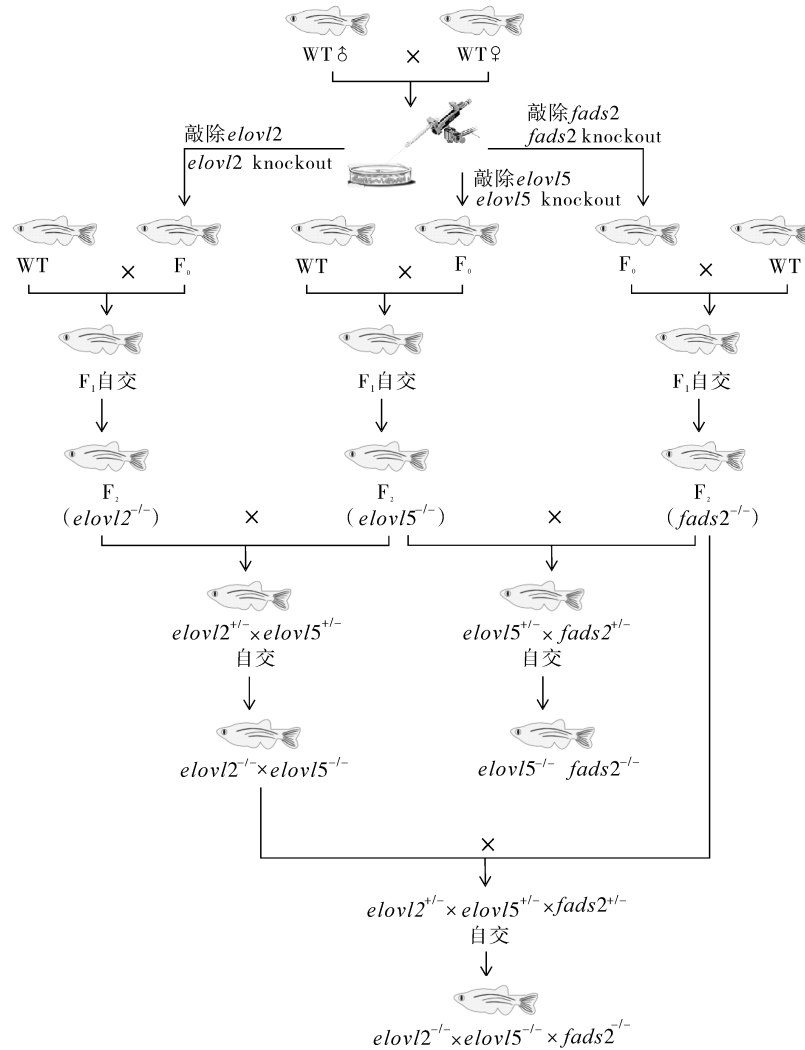
采用商品饲料(粗蛋白 $\geq 35\%$,粗脂肪 $\geq 3\%$,粗灰分 $\leq 12\%$)经破碎、索氏抽提法乙醚脱脂后,分别添加大豆油(SO)和亚麻芥油(CO)制粒并烘干制成的饲料。油脂添加量为 7%,不同饲料脂肪酸组成见表 2。试验饲料置于 -20 °C 冰箱保存。本试验所用各基因型 2 月龄以上雄性斑马鱼共 300 尾,初始试验鱼体质量选择在每尾 (0.25 ± 0.03) g,所用循环水系统缸数为 30 缸。每种饲料每种基因型有 3 个平行缸,每缸放置 10 尾。投喂试验开始前饥饿 1 d 并称体质量。每天定量投喂 3 次,时间分别为 08:00、13:00 和 18:00,每次投喂饲料质量为缸内鱼体总质量的 3%。每天记录斑马鱼的摄食和死亡情况,试验持续 4 周。4 周后饥饿 1 d 再进行取样。取样时,测量每尾斑马鱼的体质量。从每缸随机取 3 尾鱼的肝脏,用于提取 RNA 和分析表达变化;从每缸任意取 9 尾斑马鱼肝脏混合后保存在 -80 °C 冰箱,用于脂肪酸分析。

1.5 斑马鱼肝脏脂肪酸分析

饲料脂肪酸及肝脏组织脂肪酸的测定通过 Li 等^[15]描述的方法进行甲酯化,使用气相色谱仪(GC-2010 Plus)鉴定和定量脂肪酸种类。每种脂肪酸含量计算公式为:脂肪酸含量组成百分比 = 该种脂肪酸出峰面积/总脂肪酸出峰面积 $\times 100\%$ 。

1.6 统计分析

试验数据以平均值 \pm 标准误差(mean \pm SD)表示,采用 SPSS18.0 软件进行单因素方差分析(One way ANOVA),用 LSD 和 Duncan's 多重比较分析确定各试验组间差异的显著性, $P < 0.05$ 则认为是显著的。采用 Prism 8.0.2 软件作图。



WT:野生型 Wild type; 自交:Selfing.

图 1 斑马鱼不同基因的 KO 模型示意图

Fig.1 Zebrafish different knockout (KO) genotypes maps

表 1 PCR 和荧光定量 PCR 引物序列

Table 1 Primers sequence used for PCR and qPCR

基因 Gene	引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence(5'-3')
<i>gapdh</i>	<i>gapdh</i> -F	TCCAGTACGACTCCACCCAT
	<i>gapdh</i> -R	TGACTCTCTTTGCACCACCC
<i>β-actin</i>	<i>β-actin</i> -F	CACCACCACAGCCGAAAGAG
	<i>β-actin</i> -R	ACCGCAAGATTCCATACCCA
<i>elovl2</i>	<i>elovl2</i> -F	GTTTTTCAGCTGTCCCGTA
	<i>elovl2</i> -R	ATTGGAATGACTGTGTTTAGG
<i>fads2</i>	<i>fads2</i> -F	ATCGTCGCTGTTATTCTGGCTA
	<i>fads2</i> -R	GGGTCCTTCTGAAGATGTTGG
<i>elovl4a</i>	<i>elovl4a</i> -F	GTCATTCTTCGGGGCTCACA
	<i>elovl4a</i> -R	CCGATCAGACACCAGTGCAT
<i>elovl4b</i>	<i>elovl4b</i> -F	CTTTGATTGGCTATGCCGTTAC
	<i>elovl4b</i> -R	CGTGCTTTCCTTTTCTTTCTT
<i>fads6</i>	<i>fads6</i> -F	GGCTGGTGTTCAGGCTCAT
	<i>fads6</i> -R	AAGTGCGACAATAGGAGTGATG

表 2 饲料脂肪酸组成(占总脂肪酸的百分比)

Table 2 Fatty acid composition(percentage of total fatty acids)

脂肪酸 Fatty acids	试验组 Experimental diet		%
	SO	CO	
C14:0	0.14	0.17	
C16:0	11.59	7.50	
C18:0	3.08	2.42	
C20:0	0.28	1.92	
C22:0	0.31	0.46	
总 SFA Total SFA	15.40	12.47	
C14:1	0.03	0.04	
C16:1	0.20	0.28	
C18:1	22.07	18.61	
C20:1n-11	0.38	12.87	
C22:1n-11	0.32	3.53	
总 MUFA Total MUFA	23.00	35.34	
C18:2n-6	52.28	26.78	

续表 2 Continued Table 2

脂肪酸 Fatty acids	试验组 Experimental diet	
	SO	CO
C18:3n-6	0.00	0.01
C20:2n-6	0.08	1.17
C20:4n-6	0.00	0.07
Total n-6	52.36	28.02
C18:3n-3	8.90	23.62
C18:4n-3	0.01	0.02
C20:3n-3	0.02	0.02
C20:4n-3	0.00	0.00
C20:5n-3	0.08	0.10
C22:5n-3	0.03	0.02
C22:6n-3	0.20	0.39
总 n-3 Total n-3	9.24	24.18
n-3/n-6	0.18	0.86
总 PUFA Total PUFA	61.60	52.20

注:表中数据为 3 个平行的平均值。Note: Values represent mean of three replicates.

2 结果与分析

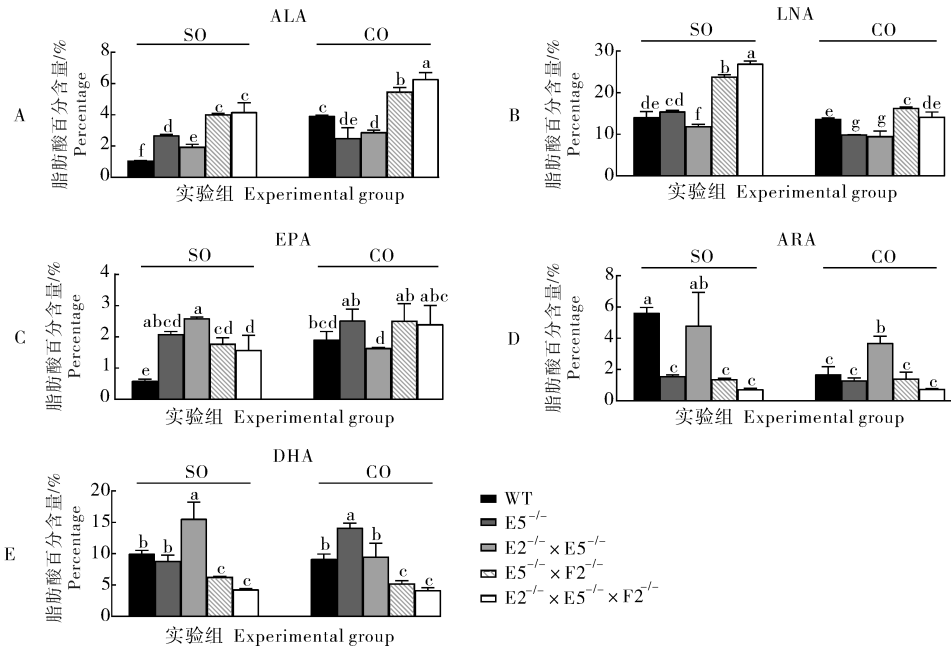
2.1 斑马鱼敲除型的构建

经过 4 周投喂试验,各组鱼体生长性能没有显著差异(未提供数据)。为了研究 *elovl2*、*elovl5* 和 *fads2* 在斑马鱼 HUFA 合成中的功能,使用 SO 饲料和 CO 饲料进行投喂试验,分析不同突变型斑马

鱼的肝脏脂肪酸组成变化,结果见表 3。脂肪酸分析结果显示,SO 饲料中主要脂肪酸为 LNA。在投喂 SO 饲料后,与 WT 组相比,E5^{-/-}组的 C18:2n-6 未显著变化,而 E5^{-/-}×F2^{-/-}组和 E2^{-/-}×E5^{-/-}×F2^{-/-}组 LNA 出现了显著累积。相反,在 E2^{-/-}×E5^{-/-}组 LNA 出现了显著降低。此外,与 WT 组相比,4 组突变类型的 EPA 含量都显著升高。相较于 WT 组,E5^{-/-}×F2^{-/-}组和 E2^{-/-}×E5^{-/-}×F2^{-/-}组的 DHA 显著降低,但 E2^{-/-}×E5^{-/-}组的 DHA 含量却显示显著升高(图 2)。

2.2 不同脂肪源饲料投喂对敲除型斑马鱼脂肪酸组成的影响

在 CO 饲料中,ALA 是主要脂肪酸。脂肪酸分析结果显示,相较于 WT 组,E5^{-/-}×F2^{-/-}组、E2^{-/-}×E5^{-/-}×F2^{-/-}组出现了 ALA 与 LNA 的积累,但在 E5^{-/-}组和 E2^{-/-}×E5^{-/-}组中 ALA 与 LNA 呈现显著降低的结果。与 WT 相比,E5^{-/-}组 DHA 明显增加。同时,E5^{-/-}×F2^{-/-}组和 E2^{-/-}×E5^{-/-}×F2^{-/-}组的 DHA 含量显著降低。在 5 组比较中发现,EPA 的含量并没有明显差异。此外,E2^{-/-}×E5^{-/-}组的花生四烯酸(C20:4n-6,ARA)以及 DHA 含量无明显变化,而 ARA 含量显著高于 WT 组(图 2)。



图内 5 组数据字母不同表示差异显著(P<0.05)。下同。Five groups of data have different letters indicating significant difference in the figure(P<0.05).The same as below.

图 2 斑马鱼肝脏总脂肪酸变化(百分比)

Fig.2 Fatty acids composition (percentage of total fatty acid) in zebrafish liver

2.3 不同脂肪源投喂对敲除型斑马鱼中 HUFA 合成相关基因表达的影响

检测不同突变型斑马鱼肝脏中 HUFA 合成相关基因(如 *elovl4a*、*elovl4b* 和 *fads6*)的表达变化,如图 3 所示。在经过 CO 饲料投喂后,与 WT 组相比,*elovl4a*、*elovl4b* 和 *fads6* 在各敲除类型中都有明显上调,除在 $E5^{-/-}$ 组 *elovl4b* 没有显著性变化。

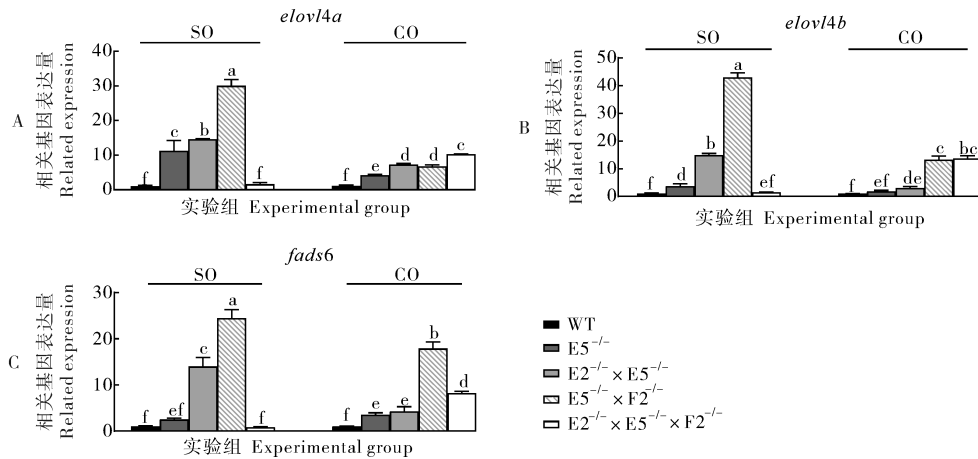


图 3 不同试验组斑马鱼肝脏基因表达量

Fig.3 Gene expression of zebrafish liver in different experimental groups

3 讨论

与海水鱼相比,淡水鱼类具有更高的 HUFA 合成能力^[16]。因此,研究淡水鱼 HUFA 生物合成相关机制有利于提高淡水鱼 HUFA 含量,并为建立高营养价值的淡水生物群提供理论基础。有研究报道,*elovl2*、*elovl5* 和 *fads2* 的缺失或活力低下是造成鱼体 HUFA 生物合成功能较弱、甚至缺失的主要原因^[17],说明 *elovl2*、*elovl5* 和 *fads2* 是合成 HUFA 的关键酶。为深入了解 *elovl2*、*elovl5* 和 *fads2* 在淡水鱼 HUFA 的合成机理,本试验构建了 *elovl5* 和 *fads2* 的双基因敲除斑马鱼模型以及 *elovl2*、*elovl5* 和 *fads2* 三基因敲除斑马鱼模型。用 CO 饲料和 SO 饲料分别投喂 4 周后对 4 种突变体及 WT 组的肝脏进行了脂肪酸组成分析和其他与 DHA 合成相关基因的荧光定量分析。

本研究发现,尽管 CO 饲料和 SO 饲料中不含有 DHA 含量,但在各突变体仍可以检测到 DHA 含量,这表明淡水鱼 *elovl2*、*elovl5* 和 *fads2* 外还存在其他基因作用 HUFA 合成。有研究报道,硬骨鱼类 *elovl4* 可能是通过 Sprecher 途径促进 DHA 的生物合成^[18]。在斑马鱼中已有研究发现 *elovl4a* 可以将 C_{20} HUFA 转化为 C_{22} HUFA,而 *elovl4b* 可以

大豆油饲料投喂后,*elovl4a*、*elovl4b* 在 $E5^{-/-}$ 组、 $E2^{-/-} \times E5^{-/-}$ 组和 $E5^{-/-} \times F2^{-/-}$ 组中呈现梯度递增,而 $E2^{-/-} \times E5^{-/-} \times F2^{-/-}$ 组和 WT 组相比,*elovl4a*、*elovl4b* 的表达水平没有显著变化。与 WT 组相比,*fads6* 的表达水平在 $E5^{-/-}$ 组和 $E2^{-/-} \times E5^{-/-} \times F2^{-/-}$ 组没有显著性变化,在 $E2^{-/-} \times E5^{-/-}$ 组与 $E5^{-/-} \times F2^{-/-}$ 组中呈现显著升高。

使 C_{20} HUFA 转化至 C_{36} 的多烯产物^[19]。在本研究中,相对于 WT 组,除 SO 饲料投喂的 $E2^{-/-} \times E5^{-/-} \times F2^{-/-}$ 组,*elovl4a* 和 *elovl4b* 均在各组高表达,从脂肪酸结果分析,在 *elovl5*、*elovl2* 及 *fads2* 缺失后 *elovl4a* 和 *elovl4b* 可能参与了合成 DHA 的过程,但 *elovl4a* 和 *elovl4b* 的高表达并没有使 DHA 的含量达到正常水平,这也说明 *elovl4a* 和 *elovl4b* 并不能完全替代 *elovl2* 和 *elovl5* 在 C_{20} HUFA 合成 DHA 过程中的功能。

研究表明,淡水鱼 *elovl5* 能将 C_{18} PUFA 延长至 C_{20} HUFA,同时也具有延长 C_{20} HUFA 至 C_{22} HUFA 的能力^[8],但脂肪酸分析结果显示 $E5^{-/-}$ 组中 C_{18} PUFA 并未出现累积,CO 投喂的 $E5^{-/-}$ 组 $C_{18}:2n-6$ 和 $C_{18}:3n-3$ 甚至出现显著下降,这表明在 $E5^{-/-}$ 有替代基因在 C_{18} PUFA 延长至 C_{20} PUFA 起作用。与我们先前的结果一致^[13], $E2^{-/-} \times E5^{-/-}$ 组与 WT 相比 DHA 含量并没有出现显著差异, $E2^{-/-} \times E5^{-/-}$ 组 DHA 并没有降低,说明在 C_{18} PUFA 延长至 C_{22} PUFA 出现了“补偿基因”,即可能激活别的基因对其产生了“遗传补偿效应”。

脂肪酸组成分析结果显示, $E5^{-/-} \times F2^{-/-}$ 组和 $E2^{-/-} \times E5^{-/-} \times F2^{-/-}$ 组在 CO 组和 SO 组的 ALA 和 LNA 都出现显著累积,关键产物 ARA 和 DHA 的

表 3 斑马鱼肝脏脂肪酸组成(占总脂肪酸的百分比)
Table 3 Fatty acid composition (percentage of total fatty acids) of zebrafish liver

脂肪酸 Fatty acids	SO 组/% SO group					CO 组/% CO group					双因素方差分析 Two-way ANOVA		
	WT	E5 ^{-/-}	E2 ^{-/-} × E5 ^{-/-}	E5 ^{-/-} × F2 ^{-/-}	E2 ^{-/-} × E5 ^{-/-} × F2 ^{-/-}	WT	E5 ^{-/-}	E2 ^{-/-} × E5 ^{-/-}	E5 ^{-/-} × F2 ^{-/-}	E2 ^{-/-} × E5 ^{-/-} × F2 ^{-/-}	饲料 Main effect of feed	突变体 Main effect of mutant	交互 effect Interactive effects
C14:0	0.32±0.03d	0.67±0.10bc	0.45±0.18cd	0.62±0.00c	0.45±0.14cd	0.86±0.10ab	0.31±0.00d	0.60±0.12c	1.05±0.25a	0.65±0.14bc	**	**	***
C16:0	29.82±1.07a	21.22±0.99de	19.24±1.47e	22.77±1.37cd	21.12±1.83de	24.30±1.18bc	20.84±2.35de	25.86±1.42b	21.00±1.15de	19.57±0.19e	***	***	***
C18:0	15.18±1.72a	10.88±0.34b	16.12±1.20a	9.37±0.43bc	9.59±2.19bc	9.76±0.54bc	11.16±1.01b	14.23±2.13a	7.90±0.82c	8.31±1.00c	**	***	*
C20:0	0.36±0.05c	0.82±0.06b	0.62±0.14bc	0.67±0.38bc	0.82±0.24b	1.27±0.02a	1.52±0.33a	1.38±0.12a	0.55±0.21bc	0.82±0.43b	***	**	***
C22:0	0.18±0.05de	0.44±0.07b	0.94±0.09a	0.06±0.00f	0.04±0.02f	0.11±0.00ef	0.42±0.04b	0.30±0.12c	0.10±0.06ef	0.23±0.06cd	***	***	***
总 SFA Total SFA	45.87±0.61a	34.02±0.88de	37.37±0.12c	33.49±2.17de	32.02±3.67ef	36.07±1.08cd	34.25±0.97de	42.37±0.82b	30.60±1.56f	29.57±1.04f	**	***	***
C16:1	0.79±0.12c	1.44±0.78c	0.81±0.01e	1.57±0.00bc	1.37±0.46c	1.23±1.09c	1.56±0.19bc	1.67±0.09bc	2.84±0.53a	2.43±0.02ab	***	**	***
C18:1	19.88±0.04g	29.39±1.81bc	19.09±1.21g	23.83±1.03f	25.62±1.53def	27.24±1.77cde	28.34±0.77bcd	24.82±2.82ef	30.22±0.37b	36.15±2.16a	***	***	***
C20:1n-11	0.15±0.04d	0.14±0.01d	0.37±0.08c	0.74±0.30b	0.19±0.02d	0.08±0.01d	0.17±0.05d	0.18±0.02d	1.16±0.06a	0.08±0.00d	***	***	***
C22:1n-11	0.33±0.04cde	0.77±0.15b	1.31±0.54a	0.07±0.00e	0.24±0.07cde	0.25±0.19cde	0.61±0.09bc	0.80±0.17b	0.20±0.00de	0.53±0.14bcd	***	*	*
总 MUFA Total MUFA	21.18±0.16f	31.82±2.41c	21.63±0.74f	26.29±1.30e	27.49±1.98e	28.90±0.44de	30.74±0.92cd	27.55±2.72e	34.58±0.21b	39.28±2.29a	***	***	***
C18:2n-6	14.08±1.40de	15.46±0.31cd	11.90±0.48f	23.82±0.49b	26.94±0.66a	13.68±0.22e	9.92±0.02g	9.54±1.27g	16.32±0.20c	14.15±1.20de	***	***	***
C18:3n-6	0.13±0.05d	0.50±0.03b	0.88±0.13a	0.29±0.19cd	0.16±0.01cd	0.27±0.03cd	0.34±0.10bc	0.27±0.09cd	0.20±0.12cd	0.20±0.01cd	**	***	***
C20:2n-6	0.78±0.16abc	0.39±0.02c	0.59±0.06bc	1.03±0.12a	1.11±0.13a	0.85±0.11ab	0.52±0.17bc	1.03±0.45a	0.92±0.47ab	0.51±0.12bc	**	*	*
C20:4n-6	5.62±0.35a	1.57±0.08c	4.79±2.14ab	1.38±0.07c	0.73±0.07c	1.68±0.50c	1.30±0.17c	3.69±0.44b	1.41±0.42c	0.75±0.02c	**	***	**
总 n-6 Total n-6	20.61±0.94c	17.92±0.41de	18.16±2.55de	26.53±0.11b	28.94±0.71a	16.48±0.58ef	12.07±0.46h	14.52±0.30g	18.86±0.81d	15.60±1.04fg	***	***	***
C18:3n-3	1.06±0.01f	2.68±0.07d	1.95±0.16e	4.02±0.06c	4.16±0.61c	3.93±0.04c	2.51±0.66de	2.88±0.14d	5.47±0.27b	6.28±0.42a	***	***	***
C18:4n-3	0.09±0.01e	1.37±0.17b	0.69±0.21cd	0.63±0.40cd	0.75±0.12cd	0.50±0.06cde	2.63±0.61a	0.31±0.01de	0.86±0.04c	0.49±0.07cde	*	***	***
C20:3n-3	0.18±0.05c	0.46±0.05abc	0.76±0.15a	0.35±0.22bc	0.36±0.04bc	0.56±0.44ab	0.38±0.05bc	0.22±0.09c	0.42±0.00bc	0.25±0.09bc	**	***	**
C20:4n-3	0.19±0.01e	0.31±0.04cd	0.46±0.01ab	0.38±0.05bc	0.26±0.05de	0.49±0.04a	0.24±0.12de	0.36±0.06bc	0.39±0.04bc	0.26±0.03de	***	***	***
C20:5n-3	0.59±0.06e	2.08±0.09abcd	2.59±0.04a	1.78±0.20cd	1.58±0.48d	1.91±0.26bcd	2.52±0.37ab	1.64±0.02d	2.51±0.55ab	2.40±0.61abc	**	***	***
C22:5n-3	0.27±0.03c	0.52±0.09b	0.84±0.09a	0.25±0.01c	0.15±0.03c	0.48±0.20b	0.52±0.12b	0.64±0.05b	0.26±0.03c	0.57±0.06b	*	***	***
C22:6n-3	9.98±0.55b	8.82±0.96b	15.55±2.68a	6.29±0.08c	4.29±0.13c	9.14±0.80b	14.13±0.74a	9.51±2.17b	5.25±0.45c	4.16±0.42c	***	***	***
总 n-3 Total n-3	12.35±0.48de	16.24±1.12bc	22.84±3.16a	13.69±0.76cde	11.55±0.98e	17.01±0.31b	22.93±1.43a	15.56±2.20bc	15.17±0.75bc	14.41±1.33bcd	**	***	***
n-3/n-6	0.60±0.05ef	0.91±0.04cd	1.29±0.36b	0.52±0.03f	0.40±0.02f	1.03±0.02cd	1.90±0.05a	1.07±0.17bc	0.80±0.01de	0.92±0.02cd	***	***	***
总 PUFA Total PUFA	32.96±0.46b	34.16±1.53b	41.00±0.61a	40.22±0.87a	40.49±1.69a	33.49±0.90b	35.00±1.89b	30.08±1.90c	34.03±1.56b	30.02±2.37c	***	**	***

注: SFA; 饱和脂肪酸, MUFA; 单不饱和脂肪酸, PUFA; 多不饱和脂肪酸。表中数据为 3 个平行的平均值。同行数据标不同字母表示差异显著(P<0.05)。Note: SFA; Saturated fatty acid, MUFA; Monounsaturated fatty acid, PUFA; Polyunsaturated fatty acid. Values represent mean±SD of three replicates. Values with different letter in the same line differ significantly(P<0.05).

含量都有显著降低的现象。 $E2^{+} \times E5^{+} \times F2^{+}$ 组与 $E2^{+} \times E5^{+}$ 组相比, $E2^{+} \times E5^{+} \times F2^{+}$ 组 DHA 含量显著降低, 延长底物显著累积。这表明, 淡水鱼 *fads2* 在 DHA 合成中起到非常重要的作用。

斑马鱼 *fads6* 的功能目前未在酵母试验中得到证实, 但有研究报道, *fads6* 在淡水鱼中有微弱的 $\Delta 4$ 去饱和功能^[20]。荧光定量分析结果显示, *fads6* 在 SO 饲料投喂的 $E2^{+} \times E5^{+}$ 组和 $E5^{+} \times F2^{+}$ 组以及 CO 饲料投喂的 4 组突变体中都被诱导表达, 但 *fads6* 的高表达未能弥补 *fads2* 缺失导致的 DHA 含量下降, 说明 *fads2* 在 HUFA 合成中不可或缺, *fads2* 的缺失阻碍了相应 HUFA 的合成。 $E2^{+} \times E5^{+} \times F2^{+}$ 组的碳链延长和去饱和功能受到阻碍, 这提示我们 *fads2* 是在 *elovl2* 和 *elovl5* 合成 HUFA 途径中的必要酶, 去饱和酶的作用是不可被替代的。

在 SO 组中, $E2^{+} \times E5^{+} \times F2^{+}$ 组的 *elovl4a*、*elovl4b* 和 *fads6* 的表达都未发生显著性变化, 这与其在 CO 组的结果有明显差异。脂肪酸分析结果显示, SO 饲料投喂后的 $E5^{+}$ 组 DHA 含量与 WT 无显著差异, $E5^{+} \times F2^{+}$ 组较 WT 组 DHA 含量显著增加, 然而 CO 饲料投喂后的 $E5^{+}$ 组 DHA 含量较 WT 组显著升高, $E5^{+} \times F2^{+}$ 组与 WT 无显著差异 (表 3)。此外, 在 CO 组中, 各突变体的 EPA 含量与 WT 没有明显变化, 这表明在底物 n-3 脂肪酸充足的情况下, EPA 含量并不会因为 *elovl5* 缺失而发生变化。EPA 含量是否是 *elovl5* 缺失后鱼体维持新稳态的重要指标, 其分子机制还有待研究。

综上所述, 本研究首次构建了 *elovl5* 和 *fads2* 的双基因敲除斑马鱼模型以及 *elovl2*、*elovl5* 和 *fads2* 三基因敲除斑马鱼模型。本研究数据表明, 在投喂 SO 饲料和 CO 饲料后, 在 $E5^{+}$ 组和 $E2^{+} \times E5^{+}$ 组中, C18PUFA 到 C20PUFA 的延长仍然存在, 这可能是“遗传补偿效应”的结果。而 $E5^{+} \times F2^{+}$ 组和 $E2^{+} \times E5^{+} \times F2^{+}$ 组摄食到的 ALA 和 LNA 在体内出现累积, 表明 *fads2* 是 *elovl2* 和 *elovl5* 参与 HUFA 合成途径过程中的必需酶。*elovl4* 和 *elovl4b* 会在 *elovl2*、*elovl5* 和 *fads2* 缺失后被诱导表达但不足以使脂肪酸恢复至正常水平。这更加突出了 *elovl2*、*elovl5* 和 *fads2* 在 HUFA 合成中的协同作用, 证明了 *fads2* 对机体 HUFA 的合成至关重要。

参考文献 References

[1] 王雪青, 苗惠, 胡萍. 膳食中多不饱和脂肪酸营养与生理功能的研究进展[J]. 食品科学, 2004, 25(11): 337-339. WANG X Q, MIAO H, HU P. Research progress of nutrition and biological

functions of PUFA[J]. Food science, 2004, 25(11): 337-339 (in Chinese with English abstract).

- [2] 陆永健. 多不饱和脂肪酸的营养及生理功能的研究[J]. 成才之路, 2007(2): 57-58. LU Y J. Research on the nutritional and physiological functions of polyunsaturated fatty acids[J]. Road to growth, 2007(2): 57-58 (in Chinese).
- [3] 杨茜, 王心听, 李媛, 等. ω -3 多不饱和脂肪酸与慢性病关系的研究进展[J]. 昆明医科大学学报, 2012, 33(7): 155-158. YANG Q, WANG X X, LI Y, et al. The research progress in the relationship between *Omega*-3 polyunsaturated fatty acid and chronic diseases[J]. Journal of Kunming Medical University, 2012, 33(7): 155-158 (in Chinese with English abstract).
- [4] BOUDREAU M D, SOHN K H, RHEE S H, et al. Suppression of tumor cell growth both in nude mice and in culture by n-3 polyunsaturated fatty acids: mediation through cyclooxygenase-independent pathways[J]. Cancer research, 2001, 61(4): 1386-1391.
- [5] HO S Y, THORPE J L, DENG Y, et al. Lipid metabolism in zebrafish[J]. Methods in cell biology, 2004, 76: 87-108.
- [6] SCHLEGEL A, STAINIER D Y R. Microsomal triglyceride transfer protein is required for yolk lipid utilization and absorption of dietary lipids in zebrafish larvae[J]. Biochemistry, 2006, 45(51): 15179-15187.
- [7] SPRECHER H. Metabolism of highly unsaturated n-3 and n-6 fatty acids[J]. Biochimica et biophysica acta, 2000, 1486(2/3): 219-231.
- [8] MONROIG Ó, ROTLLANT J, SÁNCHEZ E, et al. Expression of long-chain polyunsaturated fatty acid (LC-PUFA) biosynthesis genes during zebrafish *Danio rerio* early embryogenesis [J]. Biochimica et biophysica acta, 2009, 1791(11): 1093-1101.
- [9] 李信, 高坚. 泥鳅 *elovl2* 和 *elovl5* 基因克隆、表达及其延长活性分析[J]. 华中农业大学学报, 2020, 39(2): 71-81. LI X, GAO J. Cloning, expression analysis and functional study of loach (*Misgurnus anguauddatus*) *elovl2* and *elovl5* genes and their effects on the synthesis of long-chain polyunsaturated fatty acids (LC-PUFA) [J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2020, 39(2): 71-81 (in Chinese with English abstract).
- [10] ZADRAVEC D, TVRDIK P, GUILLOU H, et al. ELOVL2 controls the level of n-6 28:5 and 30:5 fatty acids in testis, a prerequisite for male fertility and sperm maturation in mice[J]. Journal of lipid research, 2011, 52(2): 245-255.
- [11] MONROIG Ó, LI Y Y, TOCHER D R. Delta-8 desaturation activity varies among fatty acyl desaturases of teleost fish: high activity in delta-6 desaturases of marine species[J]. Comparative biochemistry and physiology part B: biochemistry and molecular biology, 2011, 159(4): 206-213.
- [12] XIE D Z, CHEN C Y, DONG Y W, et al. Regulation of long-chain polyunsaturated fatty acid biosynthesis in teleost fish[J/OL]. Progress in lipid research, 2021, 82: 101095 [2021-05-20]. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0163782721000114>. DOI: 10.1016/j.plipres.2021.101095.
- [13] SUN S X, REN T Y, LI X, et al. Polyunsaturated fatty acids synthesized by freshwater fish: a new insight to the roles of *elovl2* and *elovl5* *in vivo* [J]. Biochemical and biophysical research communications, 2020, 532(3): 414-419.
- [14] ZHAO Y, YANG G, WU N Y, et al. Integrated transcriptome

- and phosphoproteome analyses reveal that *fads2* is critical for maintaining body LC-PUFA homeostasis [J/OL]. *Journal of proteomics*, 2020, 229: 103967 [2021-05-20]. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1874391920303353>. DOI: 10.1016/j.jprot.2020.103967.
- [15] LI Y, LIANG X, ZHANG Y, et al. Effects of different dietary soybean oil levels on growth, lipid deposition, tissues fatty acid composition and hepatic lipid metabolism related gene expressions in blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) juvenile [J]. *Aquaculture*, 2016, 451: 16-23.
- [16] STEFFENS W. Effects of variation in essential fatty acids in fish feeds on nutritive value of freshwater fish for humans [J]. *Aquaculture*, 1997, 151(1/2/3/4): 97-119.
- [17] GUILLOU H, ZADRAVEC D, MARTIN P G P, et al. The key roles of elongases and desaturases in mammalian fatty acid metabolism: insights from transgenic mice [J]. *Progress in lipid re-*
- search*, 2010, 49(2): 186-199.
- [18] OBOH A, NAVARRO J C, TOCHER D R, et al. Elongation of very long-chain (>C₂₄) fatty acids in *Clarias gariepinus*: cloning, functional characterization and tissue expression of *elovl4* elongases [J]. *Lipids*, 2017, 52(10): 837-848.
- [19] MONROIG Ó, ROTLLANT J, CERDÁ-REVERTER J M, et al. Expression and role of *elovl4* elongases in biosynthesis of very long-chain fatty acids during zebrafish *Danio rerio* early embryonic development [J]. *Biochimica et biophysica acta (BBA) - molecular and cell biology of lipids*, 2010, 1801(10): 1145-1154.
- [20] ZHU K C, SONG L, GUO H Y, et al. Identification of fatty acid desaturase 6 in golden pompano *Trachinotus ovatus* (Linnaeus 1758) and its regulation by the PPAR α transcription factor [J/OL]. *International journal of molecular sciences*, 2018, 20(1): 23 [2021-05-20]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30577588/>. DOI: 10.3390/ijms20010023.

Effects of dietary different lipid sources on *elovl5*, *elovl2* and *fads2* in highly unsaturated fatty acids biosynthesis in zebrafish

WANG Yumei¹, REN Tianying¹, GAO Jian^{1,2}

1. College of Fisheries, Huazhong Agriculture University, Wuhan 430070, China;

2. Key Laboratory of Agricultural Animal Genetics Breeding and Reproduction, Ministry of Education, Wuhan 430070, China

Abstract In order to further explore the interaction of elongase 5 (*elovl5*), elongase 2 (*elovl2*) and desaturase 2 (*fads2*) in the synthesis of highly unsaturated fatty acids (HUFA) in freshwater fish, we successfully constructed four zebrafish mutations including *elovl5*^{-/-} (E5^{-/-}), *elovl2*^{-/-} × *elovl5*^{-/-} (E2^{-/-} × E5^{-/-}), *elovl5*^{-/-} × *fads2*^{-/-} (E5^{-/-} × F2^{-/-}) and *elovl2*^{-/-} × *elovl5*^{-/-} × *fads2*^{-/-} (E2^{-/-} × E5^{-/-} × F2^{-/-}) using CRISPR/Cas9 technology, and soybean oil (SO) and canola oil (CO) feeding experiments were carried out on four mutants. The responses of zebrafish *elovl5*, *elovl2* and *fads2* to different fat sources in the feed during the HUFA synthesis process were studied. The results showed that in the E5^{-/-} and E2^{-/-} × E5^{-/-} group, the extension of C18PUFA to C20PUFA still existed, while C18:3n-3 (ALA) and C18:2n-6 (LNA) showed significant accumulation in the E5^{-/-} × F2^{-/-} and E2^{-/-} × E5^{-/-} × F2^{-/-} group. The expression of *elovl4a* and *elovl4b* in the liver were induced after mutation of *elovl2*, *elovl5* and *fads2*. The results of fatty acid analysis showed that the DHA content of E5^{-/-} group was not significantly different from that of WT, and the DHA content of E5^{-/-} × F2^{-/-} group was significantly lower than that of WT after fed with SO feed. However, the DHA content of E5^{-/-} group was significantly higher than that of WT, and there was no significant difference between E5^{-/-} × F2^{-/-} and WT after CO feed was fed. Zebrafish desaturation was significantly affected without *fads2*, indicating that *fads2* is an essential enzyme in the process of HUFA synthesis. The missing phenotype of *elovl2* and *elovl5* may be compensated by other HUFA synthesis pathways. This experiment further verified that *elovl2* and *elovl5* had gene interactions in HUFA synthesis, and *fads2* was essential in HUFA synthesis as a desaturase. This study provides a theoretical basis for improving the HUFA synthesis ability of freshwater fish.

Keywords *elovl5*; *elovl2*; *fads2*; HUFA; interaction; zebrafish; dietary different lipid sources

(责任编辑:边书京)